

(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2013-527856

(P2013-527856A)

(43) 公表日 平成25年7月4日(2013.7.4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07C 217/08 (2006.01)	C07C 217/08	4B024
C07D 233/60 (2006.01)	C07D 233/60 103	4C076
C07D 249/04 (2006.01)	C07D 249/04 503	4C086
A61K 9/16 (2006.01)	A61K 9/16	4H006
A61K 47/18 (2006.01)	A61K 47/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 117 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-509608 (P2013-509608)	(71) 出願人	510179098 プロチバ バイオセラピューティクス インコーポレイティッド カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 バーナビー グレンライオン パークウ エイ 100-8900
(86) (22) 出願日	平成23年5月12日 (2011.5.12)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成24年12月26日 (2012.12.26)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号	PCT/GB2011/000723	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02011/141705	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成23年11月17日 (2011.11.17)		
(31) 優先権主張番号	61/384,050		
(32) 優先日	平成22年9月17日 (2010.9.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/334,104		
(32) 優先日	平成22年5月12日 (2010.5.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 陽イオン性脂質およびその使用方法

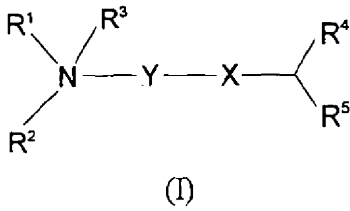
(57) 【要約】

本発明は、細胞への治療剤の送達のための組成物および方法を提供する。特にこれらは、核酸の効率的な封入、および、封入された核酸の細胞への効率的なインピボ送達を提供する、新規の陽イオン性脂質および核酸-脂質粒子を含む。本発明の組成物は非常に効力が高く、よってこれにより比較的 low 用量における特定の標的タンパク質の効果的なノックダウンが可能になる。加えて、本発明の組成物および方法は、当技術分野で既知の組成物および方法に比べて毒性が低く、より高い治療指数を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の構造を有する式Iの陽イオン性脂質またはその塩：



10

式中：

R¹およびR²は同じであるかまたは異なっており、かつ独立に、水素(H)または置換されていてもよいC₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、もしくはC₂-C₆アルキニルであるか、あるいは、R¹およびR²は一緒になって、置換されていてもよい複素環を形成してもよく；

R³は、存在しないか、または、水素(H)もしくはC₁-C₆アルキルであって4級アミンを提供し；

R⁴およびR⁵は同じであるかまたは異なっており、かつ独立に、置換されていてもよいC₁₀-C₂₄アルキル、C₁₀-C₂₄アルケニル、C₁₀-C₂₄アルキニル、またはC₁₀-C₂₄アシルであり；

Xは、O、S、N(R⁶)、C(O)、C(O)O、OC(O)、C(O)N(R⁶)、N(R⁶)C(O)、OC(O)N(R⁶)、N(R⁶)C(O)O、C(O)S、C(S)O、S(O)、S(O)(O)、C(S)、または置換されていてもよい複素環であり、ここで、R⁶は、水素(H)または置換されていてもよいC₁-C₁₀アルキル、C₂-C₁₀アルケニル、もしくはC₂-C₁₀アルキニルであり；かつ

Yは、存在しないか、または置換されていてもよいC₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、もしくはC₂-C₆アルキニルである。

【請求項2】

R¹およびR²が、メチル基およびエチル基からなる群より独立に選択される、請求項1記載の陽イオン性脂質。

【請求項3】

R¹およびR²の両方がメチル基である、請求項1または2記載の陽イオン性脂質。

【請求項4】

R¹およびR²が一緒になって、2~5個の炭素原子、ならびに窒素(N)、酸素(O)、硫黄(S)、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される1~3個のヘテロ原子を有する、置換されていてもよい複素環を形成する、請求項1~3のいずれか一項記載の陽イオン性脂質。

【請求項5】

Xが、O、C(O)O、C(O)N(R⁶)、N(R⁶)C(O)O、またはC(O)Sである、請求項1~4のいずれか一項記載の陽イオン性脂質。

【請求項6】

R⁶が、水素(H)および、置換されていてもよいメチル基、エチル基、またはC₃-C₁₀アルキル基、アルケニル基、もしくはアルキニル基からなる群より選択される、請求項1~5のいずれか一項記載の陽イオン性脂質。

【請求項7】

Xが、2~5個の炭素原子、ならびに窒素(N)、酸素(O)、硫黄(S)、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される1~3個のヘテロ原子を有する、置換されていてもよい複素環である、請求項1~4のいずれか一項記載の陽イオン性脂質。

【請求項8】

Yが、(CH₂)_nであり、nが、0、1、2、3、4、5、または6である、請求項1~7のいずれか一項記載の陽イオン性脂質。

【請求項9】

nが、2、3、または4である、請求項8記載の陽イオン性脂質。

50

【請求項 10】

R⁴およびR⁵の少なくとも一方が、少なくとも1個の不飽和部位を含む、請求項1～9のいずれか一項記載の陽イオン性脂質。

【請求項 11】

R⁴およびR⁵が、ドデセニル成分、テトラデセニル成分、ヘキサデセニル成分、オクタデセニル成分、およびイコセニル成分からなる群より独立に選択される、請求項10記載の陽イオン性脂質。

【請求項 12】

前記オクタデセニル成分がオレイル成分である、請求項11記載の陽イオン性脂質。

【請求項 13】

R⁴およびR⁵の両方がオレイル成分である、請求項12記載の陽イオン性脂質。

10

【請求項 14】

R⁴およびR⁵の少なくとも一方が、少なくとも2個の不飽和部位を含む、請求項1～9のいずれか一項記載の陽イオン性脂質。

【請求項 15】

R⁴およびR⁵が、ドデカジエニル成分、テトラデカジエニル成分、ヘキサデカジエニル成分、オクタデカジエニル成分、およびイコサジエニル成分からなる群より独立に選択される、請求項14記載の陽イオン性脂質。

【請求項 16】

前記オクタデカジエニル成分がリノレイル成分である、請求項15記載の陽イオン性脂質

20

【請求項 17】

R⁴およびR⁵の両方がリノレイル成分である、請求項16記載の陽イオン性脂質。

【請求項 18】

XがC(O)Oであり、Yが(CH₂)₂または(CH₂)₃であり、かつR⁴およびR⁵の両方がリノレイル成分である場合、R¹およびR²の両方がメチル基であることはない、請求項1記載の陽イオン性脂質。

【請求項 19】

R⁴およびR⁵の少なくとも一方が、少なくとも3個の不飽和部位を含む、請求項1～9のいずれか一項記載の陽イオン性脂質。

30

【請求項 20】

R⁴およびR⁵が、ドデカトリエニル成分、テトラデカトリエニル成分、ヘキサデカトリエニル成分、オクタデカトリエニル成分、およびイコサトリエニル成分からなる群より独立に選択される、請求項19記載の陽イオン性脂質。

【請求項 21】

前記オクタデカトリエニル成分が、リノレニル成分または -リノレニル成分である、請求項20記載の陽イオン性脂質。

【請求項 22】

R⁴およびR⁵の両方がリノレニル成分または -リノレニル成分である、請求項21記載の陽イオン性脂質。

40

【請求項 23】

前記少なくとも1、2、または3個の不飽和部位のそれぞれが、R⁴およびR⁵の少なくとも一方における特定の位置でのシス二重結合、トランス二重結合、またはこれらの組み合わせに相当する、請求項10～22のいずれか一項記載の陽イオン性脂質。

【請求項 24】

R⁴およびR⁵の少なくとも一方が、置換されたC₁₂-C₂₄アルキルを含む、請求項1～9のいずれか一項記載の陽イオン性脂質。

【請求項 25】

前記置換されたC₁₂-C₂₄アルキルが、少なくとも1～6個のC₁-C₆アルキル置換基を有するC₁₂-C₂₄アルキルを含む、請求項24記載の陽イオン性脂質。

50

【請求項 26】

R⁴およびR⁵の両方がフィタニル成分である、請求項25記載の陽イオン性脂質。

【請求項 27】

R⁴またはR⁵の一方が、少なくとも1個の置換されていてもよい環状アルキル基を含む、請求項1~9のいずれか一項記載の陽イオン性脂質。

【請求項 28】

前記置換されていてもよい環状アルキル基が、置換されていてもよい飽和環状アルキル基、置換されていてもよい不飽和環状アルキル基、またはこれらの組み合わせを含む、請求項27記載の陽イオン性脂質。

【請求項 29】

前記置換されていてもよい飽和環状アルキル基が、置換されていてもよいC₃₋₈シクロアルキル基を含む、請求項28記載の陽イオン性脂質。

10

【請求項 30】

前記置換されていてもよい飽和環状アルキル基が、シクロプロピル基を含む、請求項28または29記載の陽イオン性脂質。

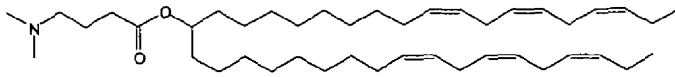
【請求項 31】

前記置換されていてもよい不飽和環状アルキル基が、置換されていてもよいC₃₋₈シクロアルケニル基を含む、請求項28記載の陽イオン性脂質。

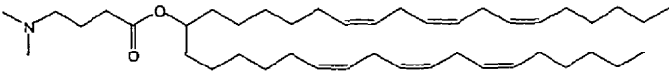
【請求項 32】

下記：

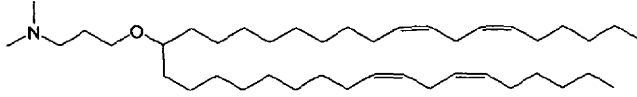
20



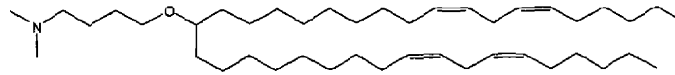
LenMC3 (化合物 4)



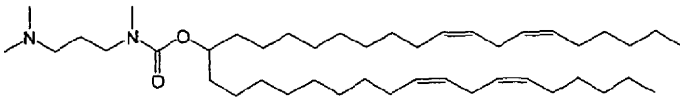
γ -LenMC3 (化合物 8)



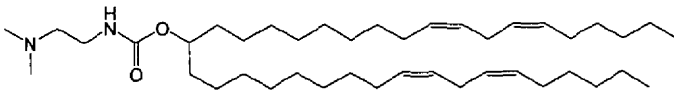
MC3 エーテル (化合物 13)



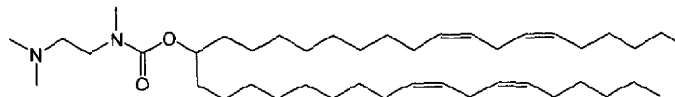
MC4 エーテル (化合物 15)



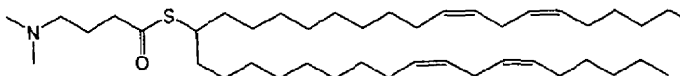
MC3MC (化合物 10)



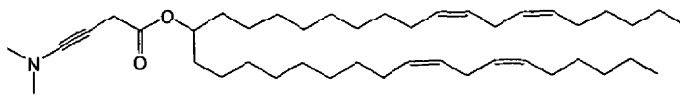
MC2C (化合物 12)



MC2MC (化合物 11)



MC3 チオエステル (化合物 20)

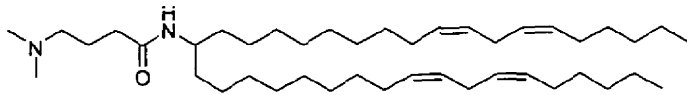


MC3 アルキン (化合物 45)

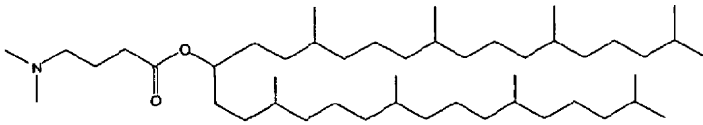
10

20

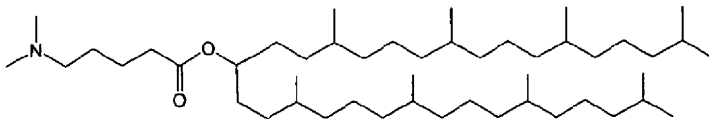
30



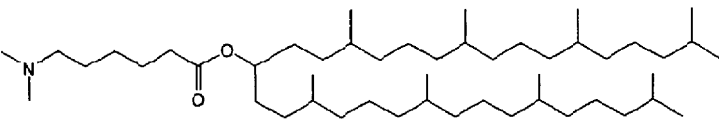
MC3 アミド (化合物16)



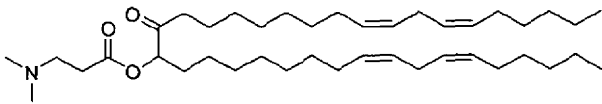
Pan-MC3 (化合物17)



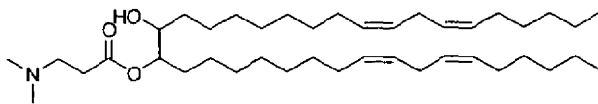
Pan-MC4 (化合物18)



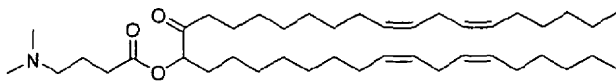
Pan-MC5 (化合物19)



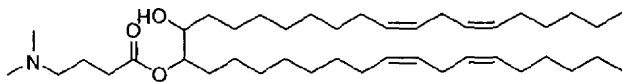
化合物 21



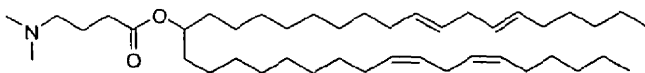
化合物 22



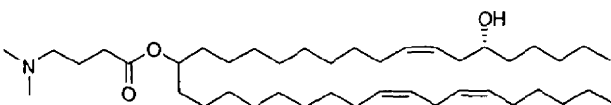
化合物 23



化合物 24



化合物 25



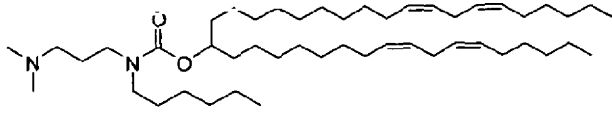
化合物 26

10

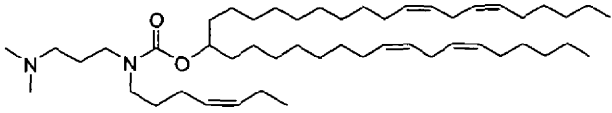
20

30

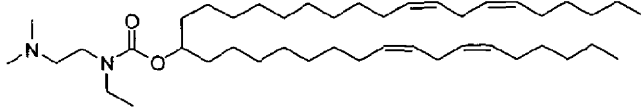
40



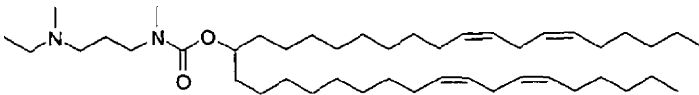
化合物 27



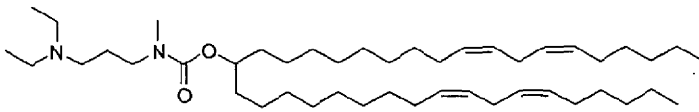
化合物 28



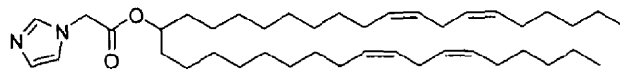
化合物 29



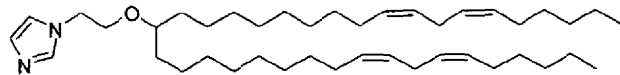
化合物 30



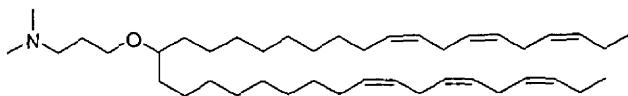
化合物 31



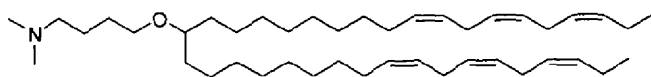
化合物 32



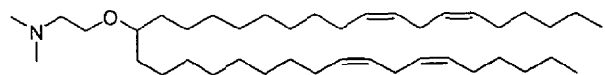
化合物 33



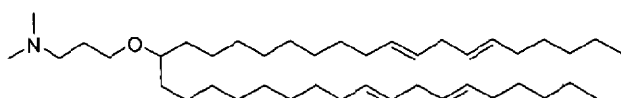
化合物 34



化合物 35



化合物 36



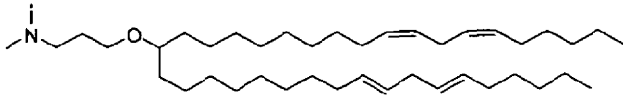
化合物 37

10

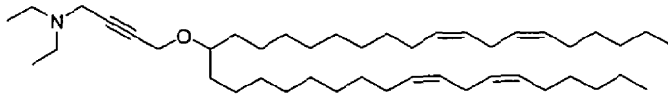
20

30

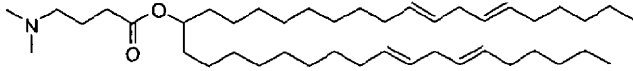
40



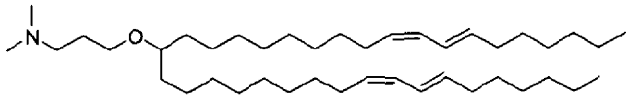
化合物 38



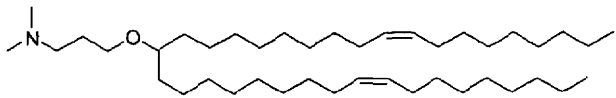
化合物 39



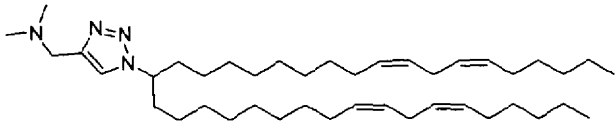
化合物 40



化合物 41

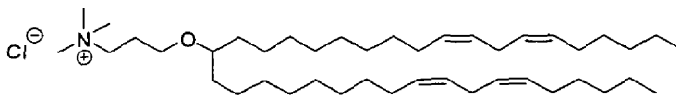


化合物 42



化合物 43

, および



化合物 44

10

20

30

40

50

からなる群より選択される構造を有する、請求項1記載の陽イオン性脂質。

【請求項 3 3】

請求項1～32のいずれか一項記載の陽イオン性脂質を含む、脂質粒子。

【請求項 3 4】

非陽イオン性脂質をさらに含む、請求項33記載の脂質粒子。

【請求項 3 5】

前記非陽イオン性脂質が、リン脂質、コレステロール、またはリン脂質とコレステロールとの混合物からなる群より選択される、請求項34記載の脂質粒子。

【請求項 3 6】

前記リン脂質が、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、またはその混合物を含む、請求項35記載の脂質粒子。

【請求項 3 7】

前記コレステロールがコレステロール誘導體である、請求項35記載の脂質粒子。

【請求項 3 8】

粒子の凝集を阻害する結合脂質をさらに含む、請求項33～37のいずれか一項記載の脂質粒子。

【請求項 3 9】

粒子の凝集を阻害する前記結合脂質が、ポリエチレングリコール(PEG)-脂質コンジュゲートを含む、請求項38記載の脂質粒子。

【請求項 4 0】

前記PEG-脂質コンジュゲートが、PEG-ジアシルグリセロール(PEG-DAG)コンジュゲート、PEG-ジアルキルオキシプロピル(PEG-DAA)コンジュゲート、またはその混合物を含む、請求項39記載の脂質粒子。

【請求項41】

治療剤をさらに含む、請求項33～40のいずれか一項記載の脂質粒子。

【請求項42】

前記治療剤が核酸である、請求項41記載の脂質粒子。

【請求項43】

前記核酸が干渉RNAである、請求項42記載の脂質粒子。

【請求項44】

前記干渉RNAが、低分子干渉RNA (siRNA)、非対称干渉RNA (aiRNA)、マイクロRNA (miRNA)、Dicer-基質dsRNA、低分子ヘアピンRNA (shRNA)、およびこれらの混合物からなる群より選択される、請求項43記載の脂質粒子。

10

【請求項45】

前記干渉RNAがsiRNAである、請求項43または44記載の脂質粒子。

【請求項46】

前記治療剤が、血清中での粒子の37 で30分間のインキュベーション後に実質的に分解されない、請求項41～45のいずれか一項記載の脂質粒子。

【請求項47】

前記治療剤が、前記粒子中に完全に封入されている、請求項41～46のいずれか一項記載の脂質粒子。

20

【請求項48】

約5:1～約15:1の脂質:治療剤の質量比を有する、請求項41～47のいずれか一項記載の脂質粒子。

【請求項49】

約30nm～約150nmの直径中央値を有する、請求項33～48のいずれか一項記載の脂質粒子。

【請求項50】

請求項33～49のいずれか一項記載の脂質粒子および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

30

【請求項51】

細胞内に治療剤を導入するための方法であって、該細胞を請求項41～48のいずれか一項記載の脂質粒子と接触させる工程を含む、方法。

【請求項52】

前記細胞が哺乳動物中にある、請求項51記載の方法。

【請求項53】

治療剤のインピボ送達のための方法であって、哺乳動物に請求項41～48のいずれか一項記載の脂質粒子を投与する工程を含む、方法。

【請求項54】

前記投与が、経口、鼻腔内、静脈内、腹腔内、筋肉内、関節内、病巣内、気管内、皮下、および皮内からなる群より選択される、請求項53記載の方法。

40

【請求項55】

前記哺乳動物がヒトである、請求項53または54記載の方法。

【請求項56】

それを必要とする哺乳動物における疾患または障害を処置するための方法であって、請求項41～48のいずれか一項記載の脂質粒子の治療有効量を該哺乳動物に投与する工程を含む、方法。

【請求項57】

前記疾患または障害が、ウイルス感染、肝臓の疾患または障害、および癌からなる群より選択される、請求項56記載の方法。

50

【請求項58】

前記哺乳動物がヒトである、請求項56または57記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2010年5月12日に出願された米国仮特許出願第61/334,104号および2010年9月17日に出願された米国仮特許出願第61/384,050号の優先権を主張し、それらの仮特許出願の開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【背景技術】

10

【0002】

発明の背景

治療用核酸には、例えば低分子干渉RNA (siRNA)、マイクロRNA (miRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、プラスミド、および免疫刺激性核酸が含まれる。これらの核酸は、多様なメカニズムによって作用する。siRNAおよびmiRNAなどの干渉RNA分子の場合、これらの核酸は、RNA干渉 (RNAi) と称される過程を経て特異的タンパク質の細胞内レベルを下方調節することができる。細胞質内に干渉RNAを導入した後に、これらの二本鎖RNA構築物は、RISCと称されるタンパク質に結合することができる。干渉RNAのセンス鎖は、RISC複合体から外れ、結合している干渉RNAの配列に相補的な配列を有するmRNAを認識してそれと結合できるRISC内テンプレートを提供する。相補的mRNAに結合すると、RISC複合体はmRNAを切断し、切断された鎖を放出する。RNAiは、タンパク質合成をコードする対応するmRNAの特異的破壊を標的とすることによって特異的タンパク質の下方調節を提供することができる。

20

【0003】

干渉RNA構築物が、標的タンパク質に対する任意のヌクレオチド配列を有するように合成できるので、RNAiの治療応用は極めて広い。現在まで、siRNA構築物は、インビトロモデルおよびインビボモデルの両方で標的タンパク質を特異的に下方調節する能力を示している。加えて、siRNA構築物は、現在臨床試験で評価されている。

【0004】

しかし、干渉RNA構築物が現在直面する二つの問題は、第一に、血漿中のヌクレアーゼ消化に対してそれらが感受性であること、および第二に、遊離の干渉RNA分子として全身投与されたときにそれらがRISCと結合できる細胞内区画にアクセスする能力に限られることである。これらの二本鎖構築物は、分子内での化学的に修飾されたヌクレオチドリンカー、例えばホスホチオエート基の組込みによって安定化することができる。しかし、そのような化学的に修飾されたリンカーは、ヌクレアーゼ消化からの限定的な保護のみを提供し、構築物の活性を低下させる場合がある。干渉RNAの細胞内送達には、ポリマー、陽イオン性リポソームなどの担体系の使用により、または分子へのコレステロール成分の共有結合により促進することができる。しかし、siRNAおよびmiRNAなどの干渉RNA分子の効力を増大させるために、ならびに化学的に修飾されたヌクレオチドリンカーの要件を緩和または排除するために、改善された送達系が必要である。

30

40

【0005】

加えて、干渉RNAなどの治療用核酸が細胞膜を通過する能力が限定されているという問題 (Vlassov et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1197:95-1082 (1994) (非特許文献1) 参照)、ならびに補体媒介アナフィラキシー、凝固特性の変化、および血球減少などの全身毒性に関連する問題 (Galbraith et al., *Antisense Nucl. Acid Drug Des.*, 4:201-206 (1994) (非特許文献2)) が残っている。

【0006】

効力を高めようと、研究者らは、化学的に修飾された治療用核酸または未修飾の治療用核酸を送達するために、脂質に基づく担体系も用いている。Zelphati et al. (*J. Contr. Rel.*, 41:99-119 (1996) (非特許文献3)) は、陰イオン性 (従来型) リポソーム、pH感

50

Yは、存在しないか、または置換されていてもよいC₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、もしくはC₂-C₆アルキニルである。

【0011】

一態様において、R¹およびR²は、メチル基およびエチル基からなる群より独立に選択され、すなわちR¹およびR²の両方がメチル基であるか、R¹およびR²の両方がエチル基であるか、またはR¹およびR²は、1個のメチル基と1個のエチル基との組み合わせである。別の態様において、R¹およびR²は一緒になって、2~5個の炭素原子（例えば2、3、4、もしくは5個の炭素原子、または2~5、2~4、2~3、3~5、3~4、もしくは4~5個の炭素原子）ならびに窒素（N）、酸素（O）、硫黄（S）、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される1~3個のヘテロ原子（例えば1、2、もしくは3個のヘテロ原子、または1~3、1~2、もしくは2~3個のヘテロ原子）を有する、置換されていてもよい複素環を形成する。ある場合において、R¹およびR²は一緒になって、置換されていてもよいジアゾール（例えば、置換されていてもよいイミダゾール）または置換されていてもよいトリアゾールを形成する。

10

【0012】

なお別の態様において、Xは、O、C(O)O、C(O)N(R⁶)、N(R⁶)C(O)O、またはC(O)Sである。ある場合において、R⁶は、水素（H）、置換されていてもよいメチル基、置換されていてもよいエチル基、または置換されていてもよいC₃-C₁₀アルキル基、アルケニル基、もしくはアルキニル基（例えば、置換されていてもよいC₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、もしくはC₁₀のアルキル基、アルケニル基、もしくはアルキニル基）である。さらなる一態様において、Xは、2~5個の炭素原子（例えば2、3、4、もしくは5個の炭素原子、または2~5、2~4、2~3、3~5、3~4、もしくは4~5個の炭素原子）、ならびに窒素（N）、酸素（O）、硫黄（S）、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される1~3個のヘテロ原子（例えば1、2、もしくは3個のヘテロ原子、または1~3、1~2、もしくは2~3個のヘテロ原子）を有する、置換されていてもよい複素環である。ある場合において、Xは、置換されていてもよいジアゾール（例えば、置換されていてもよいイミダゾール）または置換されていてもよいトリアゾールである。他の態様において、Yは(CH₂)_nであり、nは0、1、2、3、4、5、または6である。特定の態様において、nは、2、3、または4である（例えばnは、2~4、2~3、または3~4である）。

20

【0013】

一態様において、独立に置換されていてもよいR⁴およびR⁵の少なくとも一方（例えば、R⁴およびR⁵の両方）は、少なくとも1個の不飽和部位を含む。特定の態様において、R⁴およびR⁵は、ドデセニル成分、テトラドセニル（例えばミリストレイル）成分、ヘキサデセニル（例えばパルミトレイル）成分、オクタデセニル（例えばオレイル）成分、およびイコセニル成分からなる群より独立に選択される。好ましい態様において、R⁴もしくはR⁵の一方は、オレイル成分であるか、またはR⁴およびR⁵の両方がオレイル成分である。いくつかの態様において、R⁴またはR⁵の一方は、本明細書記載の1個の不飽和部位を含み、他方の側鎖は、少なくとも2または3個の不飽和部位を含む。

30

【0014】

別の態様において、独立に置換されていてもよいR⁴およびR⁵の少なくとも一方（例えば、R⁴およびR⁵の両方）は、少なくとも2個の不飽和部位を含む。特定の態様において、R⁴およびR⁵は、ドデカジエニル成分、テトラドカジエニル成分、ヘキサドカジエニル成分、オクタドカジエニル成分、およびイコサジエニル成分からなる群より独立に選択される。ある場合において、オクタドカジエニル成分は、リノレイル成分である。好ましい態様において、R⁴もしくはR⁵の一方は、リノレイル成分であるか、またはR⁴およびR⁵の両方がリノレイル成分である。いくつかの態様において、R⁴またはR⁵の一方は、本明細書記載の2個の不飽和部位を含み、他方の側鎖は、少なくとも3個の不飽和部位を含む。他の態様において、XがC(O)Oであり、Yが(CH₂)₂または(CH₂)₃であり、かつR⁴およびR⁵の両方がリノレイル成分である場合に、R¹およびR²の両方がメチル基であることはない。

40

【0015】

50

なお別の態様において、独立に置換されていてもよい R^4 および R^5 の少なくとも一方（例えば、 R^4 および R^5 の両方）は、少なくとも3個の不飽和部位を含む。特定の態様において、 R^4 および R^5 は、ドデカトリエニル成分、テトラデカトリエニル成分、ヘキサデカトリエニル成分、オクタデカトリエニル成分、およびイコサトリエニル成分からなる群より独立に選択される。ある場合において、オクタデカトリエニル成分は、リノレニル成分または -リノレニル成分である。好ましい態様において、 R^4 もしくは R^5 の一方は、リノレニルもしくは -リノレニル成分であるか、または R^4 および R^5 の両方がリノレニルもしくは -リノレニル成分である。いくつかの態様において、 R^4 または R^5 の一方は、本明細書記載の3個の不飽和部位を含み、他方の側鎖は、少なくとも4個の不飽和部位を含む。

【0016】

さらなる一態様において、 R^4 および R^5 の少なくとも一方（例えば、 R^4 および R^5 の両方）は、置換された C_{12} - C_{24} アルキルを含む。特定の態様において、置換された C_{12} - C_{24} アルキルは、少なくとも1~6個の C_1 - C_6 アルキル置換基を有する C_{12} - C_{24} アルキルを含む。ある場合において、 R^4 もしくは R^5 の一方は、フィタニル成分であるか、または R^4 および R^5 の両方がフィタニル成分である。いくつかの態様において、 R^4 または R^5 の一方は、置換された C_{12} - C_{24} アルキルを含み、他方の側鎖は、本明細書記載の少なくとも1、2、または3個の不飽和部位を含む。

【0017】

なおさらに別の態様において、 R^4 または R^5 の一方は、少なくとも1個の置換されていてもよい環状アルキル基を含む。特定の態様において、置換されていてもよい環状アルキル基は、置換されていてもよい飽和環状アルキル基、置換されていてもよい不飽和環状アルキル基、またはこれらの組み合わせを含む。ある場合において、置換されていてもよい飽和環状アルキル基は、例えばシクロプロピル基などの置換されていてもよい C_{3-8} シクロアルキル基を含む。ある他の場合において、置換されていてもよい不飽和環状アルキル基は、置換されていてもよい C_{3-8} シクロアルケニル基を含む。いくつかの態様において、 R^4 または R^5 の一方は、少なくとも1個の置換されていてもよい環状アルキル基を含み、他方の側鎖は、本明細書記載の置換されていてもよい C_{10} - C_{24} アルキル、 C_{10} - C_{24} アルケニル、 C_{10} - C_{24} アルキニル、または C_{10} - C_{24} アシル基（例えば、少なくとも1、2、または3個の不飽和部位を含む側鎖）の任意の一つを含む。

【0018】

いくつかの態様において、 R^4 および R^5 の一方または両方に存在する少なくとも1、2、または3個の不飽和部位のそれぞれは、 R^4 および R^5 の一方または両方における特定の位置でのシス二重結合、トランス二重結合、またはこれらの組み合わせに相当する。ある場合において、 R^4 および R^5 の一方または両方は、側鎖の一つまたは複数の位置にシスおよび/またはトランス配置の二重結合の任意の組み合わせ（例えば、 C_{18} アルキル基の9位に、6および9位に、3、6、および9位に、6、9、および12位に、または7および9位にシスおよび/またはトランス二重結合）を含有する C_{18} アルキル基である。当業者は、 R^4 および R^5 の一方または両方に存在する少なくとも1、2、または3個の不飽和部位を、化学記号「E」および/または化学記号「Z」のいずれかによっても特徴づけることができることを理解しているであろう。

【0019】

特定の態様において、式Iの陽イオン性脂質は、本明細書記載の化合物4、8、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、および45からなる群より選択される。

【0020】

さらなる一局面において、本発明は、式Iの上記陽イオン性脂質またはその塩の一つまたは複数を含む脂質粒子を提供する。ある態様において、脂質粒子は、中性脂質などの一つまたは複数の非陽イオン性脂質をさらに含む。ある他の態様において、脂質粒子は、粒子の凝集を減少させるかまたは阻害することができる一つまたは複数の結合脂質(conjuga

10

20

30

40

50

ted lipid)をさらに含む。さらなる態様において、脂質粒子は、一つまたは複数の有効成分または治療剤をさらに含む。

【0021】

ある態様において、脂質粒子の非陽イオン性脂質構成要素は、リン脂質、コレステロール（もしくはコレステロール誘導体）、またはその混合物を含み得る。特定の一態様において、リン脂質は、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、またはその混合物を含む。いくつかの態様において、脂質粒子の結合脂質構成要素は、ポリエチレングリコール（PEG）-脂質コンジュゲートを含む。ある場合において、PEG-脂質コンジュゲートは、PEG-ジアシルグリセロール（PEG-DAG）コンジュゲート、PEG-ジアルキルオキシプロピル（PEG-DAA）コンジュゲート、またはその混合物を含む。他の態様において、脂質コンジュゲートは、POZ-DAAコンジュゲートなどのポリオキサゾリン（POZ）-脂質コンジュゲートを含む。

10

【0022】

いくつかの態様において、有効成分または治療剤は、核酸を含む。ある場合において、核酸は干渉RNA分子を含み、該干渉RNA分子には、RNAiを仲介可能な、例えばsiRNA、Dicer-基質dsRNA、shRNA、aiRNA、プレ-miRNA、またはその混合物などの任意の二本鎖RNAが含まれる。ある他の場合において、核酸は、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、プラスミド、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、またはその混合物などの一本鎖または二本鎖のDNA、RNA、またはDNA/RNAハイブリッドを含む。

20

【0023】

他の態様において、脂質粒子中の有効成分または治療剤が、例えばヌクレアーゼまたはプロテアーゼによる酵素分解に対して水溶液中で耐性になるように、該有効成分または治療剤は、該脂質粒子の脂質部分内に完全に封入されている。さらなる態様において、脂質粒子は、ヒトなどの哺乳動物に実質的に無毒である。

【0024】

好ましい態様において、本発明は：（a）干渉RNA分子などの一つまたは複数の核酸；（b）一つまたは複数の式Iの陽イオン性脂質またはその塩；（c）一つまたは複数の非陽イオン性脂質；および（d）粒子の凝集を阻害する一つまたは複数の結合脂質を含む、血清安定性の核酸-脂質粒子（SNALP）を提供する。

30

【0025】

いくつかの態様において、本発明は：（a）一つまたは複数の核酸；（b）粒子中に存在する全脂質の約50mol%～約85mol%を構成する、一つまたは複数の式Iの陽イオン性脂質またはその塩；（c）粒子中に存在する全脂質の約13mol%～約49.5mol%を構成する一つまたは複数の非陽イオン性脂質；および（d）粒子中に存在する全脂質の約0.5mol%～約2mol%を構成する、粒子の凝集を阻害する一つまたは複数の結合脂質を含む、核酸-脂質粒子（例えばSNALP）を提供する。

【0026】

この態様の一局面において、核酸-脂質粒子は：（a）一つまたは複数の核酸；（b）粒子中に存在する全脂質の約50mol%～約65mol%を構成する、一つまたは複数の式Iの陽イオン性脂質またはその塩；（c）一つまたは複数のリン脂質と、コレステロールまたはその誘導体との混合物を含む一つまたは複数の非陽イオン性脂質（ここで、一つまたは複数のリン脂質は、粒子中に存在する全脂質の約4mol%～約10mol%を構成し、コレステロールまたはその誘導体は、粒子中に存在する全脂質の約30mol%～約40mol%を構成する）；および（d）粒子中に存在する全脂質の約0.5mol%～約2mol%を構成する一つまたは複数のPEG-脂質コンジュゲートを含む。この態様の核酸-脂質粒子は、本明細書において通常「1:57」製剤と称される。

40

【0027】

ある場合において、1:57製剤は：（a）一つまたは複数の核酸；（b）粒子中に存在する全脂質の約52mol%～約62mol%を構成する、一つまたは複数の式Iの陽イオン性脂質またはその塩；（c）粒子中に存在する全脂質の約36mol%～約47mol%を構成する、一つまたは

50

複数のリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物；および（d）粒子中に存在する全脂質の約1mol%～約2mol%を構成する一つまたは複数のPEG-脂質コンジュゲートを含む。特定の一態様において、1：57製剤は、約1.4mol%のPEG-脂質コンジュゲート（例えばPEG2000-C-DMA）、約57.1mol%の式Iの陽イオン性脂質またはその塩、約7.1mol%のDPPC（またはDSPC）、および約34.3mol%のコレステロール（またはその誘導体）を含む4成分系である。

【0028】

この態様の別の局面において、核酸-脂質粒子は：（a）一つまたは複数の核酸；（b）粒子中に存在する全脂質の約56.5mol%～約66.5mol%を構成する、一つまたは複数の式Iの陽イオン性脂質またはその塩；（c）粒子中に存在する全脂質の約31.5mol%～約42.5mol%を構成するコレステロールおよび/またはその一つもしくは複数の誘導体；ならびに（d）粒子中に存在する全脂質の約1mol%～約2mol%を構成する一つまたは複数のPEG-脂質コンジュゲートを含む。この態様の核酸-脂質粒子は、本明細書において通常「1：62」製剤と称される。特定の一態様において、1：62製剤は、リン脂質を含まず、約1.5mol%のPEG-脂質コンジュゲート（例えばPEG2000-C-DMA）、約61.5mol%の式Iの陽イオン性脂質またはその塩、および約36.9mol%のコレステロール（またはその誘導体）を含む3成分系である。

10

【0029】

1：57および1：62製剤に関するさらなる態様は、国際公開公報第09/127060号および米国特許出願公開第20110071208号に記載されており、それらの開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

20

【0030】

他の態様において、本発明は：（a）一つまたは複数の核酸；（b）粒子中に存在する全脂質の約2mol%～約50mol%を構成する、一つまたは複数の式Iの陽イオン性脂質またはその塩；（c）粒子中に存在する全脂質の約5mol%～約90mol%を構成する一つまたは複数の非陽イオン性脂質；および（d）粒子中に存在する全脂質の約0.5mol%～約20mol%を構成する、粒子の凝集を阻害する一つまたは複数の結合脂質を含む、核酸-脂質粒子（例えばSNALP）を提供する。

【0031】

この態様の一局面において、核酸-脂質粒子は：（a）一つまたは複数の核酸；（b）粒子中に存在する全脂質の約30mol%～約50mol%を構成する、一つまたは複数の式Iの陽イオン性脂質またはその塩；（c）粒子中に存在する全脂質の約47mol%～約69mol%を構成する、一つまたは複数のリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物；および（d）粒子中に存在する全脂質の約1mol%～約3mol%を構成する一つまたは複数のPEG-脂質コンジュゲートを含む。この態様の核酸-脂質粒子は、本明細書において通常「2：40」製剤と称される。特定の一態様において、2：40製剤は、約2mol%のPEG-脂質コンジュゲート（例えばPEG2000-C-DMA）、約40mol%の式Iの陽イオン性脂質またはその塩、約10mol%のDPPC（またはDSPC）、および約48mol%のコレステロール（またはその誘導体）を含む4成分系である。

30

【0032】

さらなる態様において、本発明は：（a）一つまたは複数の核酸；（b）粒子中に存在する全脂質の約50mol%～約65mol%を構成する、一つまたは複数の式Iの陽イオン性脂質またはその塩；（c）粒子中に存在する全脂質の約25mol%～約45mol%を構成する一つまたは複数の非陽イオン性脂質；および（d）粒子中に存在する全脂質の約5mol%～約10mol%を構成する、粒子の凝集を阻害する一つまたは複数の結合脂質を含む、核酸-脂質粒子（例えばSNALP）を提供する。

40

【0033】

この態様の一局面において、核酸-脂質粒子は：（a）一つまたは複数の核酸；（b）粒子中に存在する全脂質の約50mol%～約60mol%を構成する、一つまたは複数の式Iの陽イオン性脂質またはその塩；（c）粒子中に存在する全脂質の約35mol%～約45mol%を構成

50

する、一つまたは複数のリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物；および（d）粒子中に存在する全脂質の約5mol%～約10mol%を構成する一つまたは複数のPEG-脂質コンジュゲートを含む。この態様の核酸-脂質粒子は、本明細書において通常「7：54」製剤と称される。ある場合において、7：54製剤中の非陽イオン性脂質混合物は：（i）粒子中に存在する全脂質の約5mol%～約10mol%のリン脂質；および（ii）粒子中に存在する全脂質の約25mol%～約35mol%のコレステロールまたはその誘導体を含む。特定の一態様において、7：54製剤は、約7mol%のPEG-脂質コンジュゲート（例えばPEG750-C-DMA）、約54mol%の式Iの陽イオン性脂質またはその塩、約7mol%のDPPC（またはDSPC）、および約32mol%のコレステロール（またはその誘導体）を含む4成分系である。

【0034】

10

この態様の別の局面において、核酸-脂質粒子は：（a）一つまたは複数の核酸；（b）粒子中に存在する全脂質の約55mol%～約65mol%を構成する、一つまたは複数の式Iの陽イオン性脂質またはその塩；（c）粒子中に存在する全脂質の約30mol%～約40mol%を構成する、コレステロールおよび/またはその一つもしくは複数の誘導体；ならびに（d）粒子中に存在する全脂質の約5mol%～約10mol%を構成する一つまたは複数のPEG-脂質コンジュゲートを含む。この態様の核酸-脂質粒子は、本明細書において通常「7：58」製剤と称される。特定の一態様において、7：58製剤は、リン脂質を含まず、約7mol%のPEG-脂質コンジュゲート（例えばPEG750-C-DMA）、約58mol%の式Iの陽イオン性脂質またはその塩、および約35mol%のコレステロール（またはその誘導体）を含む3成分系である。

【0035】

20

7：54および7：58製剤に関するさらなる態様は、米国特許出願公開第20110076335号に記載されており、その開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0036】

本発明は、また、核酸-脂質粒子（例えばSNALP）などの脂質粒子および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を提供する。

【0037】

別の局面において、本発明は、核酸などの一つまたは複数の治療剤を細胞内に導入するための方法であって、該細胞を本明細書記載の脂質粒子（例えばSNALP）と接触させる工程を含む方法を提供する。一態様において、細胞は哺乳動物中にあり、哺乳動物はヒトである。

30

【0038】

なお別の局面において、本発明は、核酸などの一つまたは複数の治療剤のインビボ送達のための方法であって、哺乳動物に本明細書記載の脂質粒子（例えばSNALP）を投与する工程を含む方法を提供する。ある態様において、脂質粒子（例えばSNALP）は、以下の投与経路の一つにより投与される：経口、鼻腔内、静脈内、腹腔内、筋肉内、関節内、病巣内、気管内、皮下、および皮内。特定の態様において、脂質粒子（例えばSNALP）は、経腸または非経口投与経路で全身投与される。好ましい態様において、哺乳動物はヒトである。

【0039】

40

さらなる一局面において、本発明は、それを必要とする哺乳動物における疾患または障害を処置するための方法であって、核酸などの一つまたは複数の治療剤を含む脂質粒子（例えばSNALP）の治療有効量を該哺乳動物に投与する工程を含む方法を提供する。疾患または障害の非限定的な例には、ウイルス感染、肝臓の疾患または障害、および癌が含まれる。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0040】

ある態様において、本発明は、干渉RNA（例えばsiRNA）などの核酸を核酸-脂質粒子（例えばSNALP）の中に入れて、単独で、または高脂血症治療薬と組み合わせて投与することによって、肝臓の疾患または障害を処置するための方法を提供する。脂質の疾患および障害の例には、非限定的に、脂質異常症（例えば、トリグリセリドレベル上昇（高トリグリ

50

セリド血症)および/またはコレステロールレベル上昇(高コレステロール血症)などの高脂血症)、アテローム性動脈硬化症、冠動脈心疾患、冠動脈疾患、アテローム性心血管疾患(CVD)、脂肪肝疾患(脂肪肝症)、異常脂質代謝、異常コレステロール代謝、糖尿病(2型糖尿病を含む)、肥満、心血管疾患、および異常代謝に関係する他の障害が含まれる。高脂血症治療薬の非限定的な例には、スタチン、フィブラート、エゼチミブ、チアゾリジンジオン、ナイアシン、遮断薬、ニトログリセリン、カルシウム拮抗薬、および魚油が含まれる。

【0041】

特定の一態様において、本発明は、コレステロールレベルの低下または減少を必要とする哺乳動物(例えばヒト)(例えば血中コレステロールレベルが上昇している哺乳動物)におけるコレステロールを低下または減少させるための方法であって、代謝疾患および障害に関連する一つまたは複数の遺伝子を標的とする一つまたは複数の干渉RNA(例えばsiRNA)を含む、本明細書記載の核酸-脂質粒子(例えばSNALP製剤)の治療有効量を哺乳動物に投与する工程を含む方法を提供する。別の特定の一態様において、本発明は、トリグリセリドレベルの低下または減少を必要とする哺乳動物(例えばヒト)(例えば血中トリグリセリドレベルが上昇している哺乳動物)においてトリグリセリドレベルを低下または減少させるための方法であって、代謝疾患および障害に関連する一つまたは複数の遺伝子を標的とする一つまたは複数の干渉RNA(例えばsiRNA)を含む、本明細書記載の核酸-脂質粒子(例えばSNALP製剤)の治療有効量を哺乳動物に投与する工程を含む方法を提供する。これらの方法は、標準的な組織培養技法を使用してインビトロで、または当技術分野で公知の任意の手段を用いて干渉RNA(例えばsiRNA)を投与することによってインビボで実施することができる。好ましい態様において、干渉RNA(例えばsiRNA)は、ヒトなどの哺乳動物において肝細胞(例えば、肝実質細胞)に送達される。

【0042】

脂質粒子を用いて肝臓の疾患または障害を処置することに関するさらなる態様は、例えば、国際公開公報第2010/083615号、および米国特許出願公開第20060134189号に記載されており、それらの開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0043】

他の態様において、本発明は、干渉RNA(例えばsiRNA)などの核酸を核酸-脂質粒子(例えばSNALP)中に入れて、単独で、または化学療法薬と組み合わせて投与することによって、癌などの細胞増殖障害を処置するための方法を提供する。該方法は、標準的な組織培養技法を用いてインビトロで、または当技術分野で公知の任意の手段を用いて干渉RNA(例えばsiRNA)を投与することによってインビボで実施することができる。好ましい態様において、干渉RNA(例えばsiRNA)は、単独で、または化学療法薬と組み合わせてヒトなどの哺乳動物における癌細胞に送達される。核酸-脂質粒子および/または化学療法薬は、また、従来のホルモン剤、免疫療法剤、および/または放射線療法剤と同時投与し得る。

【0044】

脂質粒子を用いて細胞増殖障害を処置することに関するさらなる態様は、例えば、国際公開公報第09/082817号、米国特許出願公開第20090149403号、国際公開公報第09/129319号、および同第2011/038160号に記載されており、それらの開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0045】

さらなる態様において、本発明は、出血熱を引き起こすアレナ(arena)ウイルス(例えばラッサ(Lassa)ウイルス)感染もしくはフィロ(filo)ウイルス(例えばエボラ(Ebola)ウイルス、マールブルグ(Marburg)ウイルス等)感染、または急性もしくは慢性肝炎を引き起こす肝炎ウイルス(例えばC型肝炎ウイルス)感染などのウイルス感染を予防または治療するための方法であって、干渉RNA(例えばsiRNA)などの核酸を核酸-脂質粒子(例えばSNALP)中に入れて、単独で、またはウイルスの状態またはそれに関連する任意の症状を処置または改善するために用いられる従来の剤の投与と組み合わせて投与すること

による方法を提供する。該方法は、標準的な組織培養技法を用いてインビトロで、または当技術分野で公知の任意の手段を用いて干渉RNAを投与することによってインビボで実施することができる。ある好ましい態様において、干渉RNA（例えばsiRNA）は、出血熱ウイルスに感染した、および/または感染感受性のヒトなどの哺乳動物の細胞、組織、または器官、例えば網内系細胞（例えば、単球、マクロファージなど）、内皮細胞、肝細胞（例えば、肝実質細胞）、線維芽細胞、および/または血小板細胞などに送達される。ある他の好ましい態様において、干渉RNA（例えばsiRNA）は、肝炎ウイルスに感染した、および/または感染感受性のヒトなどの哺乳動物の細胞、組織、または器官、例えば肝細胞（例えば肝実質細胞）などに送達される。

【0046】

脂質粒子を用いてウイルス感染を予防または治療することに関するさらなる態様は、例えば、米国特許出願公開第20070218122号、米国特許出願公開第20070135370号、国際公開公報第2011/011447号、同第2010/105372号、および2011年3月31日に出願された米国特許出願第13/077,856号に記載されており、それらの開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0047】

一つまたは複数の式Iの陽イオン性脂質またはその塩を含む本発明の脂質粒子（例えばS NALP）は、対象（例えばヒトなどの哺乳動物）への干渉RNAなどの核酸の投与に使用するために特に有利および適している。なぜなら、脂質粒子は、循環中で安定であり、血管外部位へのアクセスをもたらす薬力学的挙動に必要なサイズであり、かつ標的細胞集団に到達可能だからである。

【0048】

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から当業者に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0049】

なし

【発明を実施するための形態】

【0050】

発明の詳細な説明

I. 緒言

本発明は部分的に、核酸などの有効成分または治療剤の哺乳動物細胞へのインビボ送達のために脂質粒子中に入れて使用した場合に利益を提供する、新規な陽イオン性（アミノ）脂質の発見に基づく。特に本発明は、核酸（例えば干渉RNA）の活性増加および組成物のインビボ耐容性改善を提供することにより、先に記載された核酸-脂質粒子組成物と比べて治療指数の有意な増加を導く、本明細書記載の一つまたは複数の新規な陽イオン性脂質を含む核酸-脂質粒子組成物を提供する。

【0051】

特定の態様において、本発明は、siRNAなどの干渉RNAのインビトロおよびインビボ送達のための改良された組成物の製剤化を可能にする新規な陽イオン性脂質を提供する。これらの改良された脂質粒子組成物が、標的遺伝子のタンパク質レベルおよび/またはmRNAレベルの下方調節（例えばサイレンシング）に有効であることが本明細書において示される。さらに、これらの改良された脂質粒子組成物の活性が本発明の新規な陽イオン性脂質の存在に依存することが本明細書において示される。

【0052】

本発明の脂質粒子および組成物は、様々な目的のために、例えば、封入されているかまたは結合している（例えば複合体を形成した）治療剤、例えば核酸を、インビトロおよびインビボの両方で細胞に送達するために、使用され得る。したがって、本発明はさらに、疾患または障害の処置を必要とする対象において、適切な治療剤を封入しているかまたは該治療剤に結合している脂質粒子と該対象とを接触させることによって疾患または障害を

10

20

30

40

50

処置する方法であって、該脂質粒子が本明細書記載の一つまたは複数の新規な陽イオン性脂質を含む方法を提供する。

【0053】

本明細書に記載される本発明の脂質粒子は、例えばsiRNAなどの干渉RNA分子を含めた核酸の送達に特に有用である。したがって、本発明の脂質粒子および組成物は、細胞を本明細書記載の一つまたは複数の新規な陽イオン性脂質を含む脂質粒子と接触させることによって、インビトロおよびインビボの両方で標的遺伝子およびタンパク質の発現を低下させるために使用し得、ここで、該脂質粒子は、標的遺伝子の発現を低下させる核酸（例えばsiRNA）を封入しているかまたは核酸と結合している。あるいは、本発明の脂質粒子および組成物は、細胞を本明細書記載の一つまたは複数の新規な陽イオン性脂質を含む脂質粒子と接触させることによって、インビトロおよびインビボの両方で所望のタンパク質の発現を増加させるために使用し得、ここで、該脂質粒子は、所望のタンパク質の発現を高める核酸（例えば所望のタンパク質をコードするプラスミド）を封入しているかまたは核酸と結合している。

10

【0054】

本発明の陽イオン性脂質、それを含む脂質粒子および組成物、ならびに核酸などの有効成分または治療剤を送達して遺伝子およびタンパク質の発現を調節するためのそれらの使用の様々な例示的な態様を、下記にさらに詳細に説明する。

【0055】

II. 定義

本明細書で使用される以下の用語は特に規定しない限りそれらに属するとされる意味を有する。

20

【0056】

本明細書で使用される「干渉RNA」または「RNAi」または「干渉RNA配列」という用語には、干渉RNAが標的遺伝子または配列と同じ細胞の中にある場合に、（例えば干渉RNA配列に相補的なmRNAの分解を仲介することによりまたは翻訳を阻害することにより）標的遺伝子または配列の発現を低減または阻害することができる、一本鎖RNA（例えば成熟miRNA、ssRNAiオリゴヌクレオチド、ssDNAiオリゴヌクレオチド）、二本鎖RNA（すなわち、siRNA、ダイサー基質dsRNA、shRNA、aiRNA、またはプレmiRNAなどの二重鎖RNA）、DNA-RNAハイブリッド（例えば国際公開公報第2004/078941号を参照）、またはDNA-DNAハイブリッド（例えば国際公開公報第2004/104199号を参照）が含まれる。したがって、干渉RNAは、標的mRNA配列に相補的な一本鎖RNA、または2本の相補鎖によりもしくは1本の自己相補鎖により形成した二本鎖RNAを指す。干渉RNAは、標的遺伝子もしくは配列に実質的もしくは完全な同一性を有してもよく、またはミスマッチ領域（すなわちミスマッチモチーフ）を含んでもよい。干渉RNAの配列は、完全長標的遺伝子またはその部分配列に対応しうる。好ましくは、干渉RNA分子は化学合成される。上記特許文書のそれぞれの開示は、全てのためのために全体として参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0057】

干渉RNAには、「低分子干渉RNA」または「siRNA」、例えば約15~60、15~50、または15~40（二重鎖）ヌクレオチド長、さらに典型的には約15~30、15~25、または19~25（二重鎖）ヌクレオチド長の干渉RNAが含まれ、干渉RNAは、好ましくは約20~24、21~22、または21~23（二重鎖）ヌクレオチド長である（例えば、二本鎖siRNAの各相補配列は、15~60、15~50、15~40、15~30、15~25、または19~25ヌクレオチド長、好ましくは約20~24、21~22、または21~23ヌクレオチド長であり、二本鎖siRNAは、約15~60、15~50、15~40、15~30、15~25、または19~25塩基対長、好ましくは約18~22、19~20、または19~21塩基対長である）。siRNA二重鎖は、約1~約4個のヌクレオチドまたは約2~約3個のヌクレオチドの3'オーバーハングおよび5'リン酸末端を含みうる。siRNAの例には、非限定的に、二つの別々の鎖分子から集合した二本鎖ポリヌクレオチド分子（ここで、一方の鎖はセンス鎖であって、他方は相補的アンチセンス鎖である）；一本鎖分子から集合した二本鎖ポリヌクレオチド分子（ここで、該センスおよびアンチセンス領域は、核酸ベ

40

50

ースまたは非核酸ベースのリンカーにより連結している) ; 自己相補的センスおよびアンチセンス領域を有するヘアピン型二次構造を有する、二本鎖ポリヌクレオチド分子 ; ならびに二つまたはそれ以上のループ構造ならびに自己相補的センスおよびアンチセンス領域を有するステムを有する環状一本鎖ポリヌクレオチド分子 (ここで、該環状ポリヌクレオチドは、インビボまたはインビトロでプロセシングされて活性二本鎖siRNA分子を産生することができる) が含まれる。本明細書で使用される「siRNA」という用語には、RNA-RNA二重鎖およびDNA-RNAハイブリッド (例えば国際公開公報第2004/078941号を参照) が含まれる。

【0058】

好ましくは、siRNAは化学合成される。siRNAはまた、より長いdsRNA (例えば、約25ヌクレオチド長を超えるdsRNA) を大腸菌 (*E. coli*) 由来のRNase IIIまたはダイサーにより切断することによって産生させることができる。これらの酵素は、dsRNAをプロセシングして生物学的に活性なsiRNAにする (例えば、Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:9942-9947 (2002); Calegari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:14236 (2002); Byrom et al., Ambion TechNotes, 10(1):4-6 (2003); Kawasaki et al., Nucleic Acids Res., 31:981-987 (2003); Knight et al., Science, 293:2269-2271 (2001); およびRobertson et al., J. Biol. Chem., 243:82 (1968)を参照)。好ましくは、dsRNAは、少なくとも50ヌクレオチド長~約100、200、300、400、または500ヌクレオチド長である。dsRNAは、1000、1500、2000、5000ヌクレオチド長またはそれ以上でありうる。dsRNAは、遺伝子転写物全体または遺伝子転写物の一部をコードしうる。場合によっては、siRNAは、プラスミドによってコードされてもよい (例えば、ヘアピンループを有する二重鎖に自動的に折り畳まれる配列として転写される)。

【0059】

本明細書で使用される「ミスマッチモチーフ」または「ミスマッチ領域」という用語は、干渉RNA (例えばsiRNA) 配列の、その標的配列に対して100%の相補性を有さない部分を指す。干渉RNAは、少なくとも1、2、3、4、5、6個またはそれ以上のミスマッチ領域を有しうる。ミスマッチ領域は、連続的であっても、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個もしくはそれ以上のヌクレオチドで分離されていてもよい。ミスマッチモチーフまたはミスマッチ領域は、1個のヌクレオチドを含んでもよく、2、3、4、5個もしくはそれ以上のヌクレオチドを含んでもよい。

【0060】

「標的遺伝子の発現を阻害する」という語句は、干渉RNA (例えばsiRNA) などの核酸が標的遺伝子の発現をサイレンシングする、低減する、または阻害する能力を指す。遺伝子サイレンシングの程度を検査するために、試験試料 (例えば標的遺伝子を発現している培養細胞の試料) または試験哺乳動物 (例えばヒトなどの哺乳動物またはげっ歯類 (例えばマウス) もしくは非ヒト霊長類 (例えばサル) モデルなどの動物モデル) を、標的遺伝子の発現をサイレンシングする、低減する、または阻害する干渉RNA (例えばsiRNA) などの核酸と接触させる。試験試料または試験動物における標的遺伝子の発現を、核酸 (例えば干渉RNA) との接触にも投与にも供されていない対照試料 (例えば標的遺伝子を発現している培養細胞試料) または対照哺乳動物 (例えばヒトなどの哺乳動物またはげっ歯類 (例えばマウス) もしくは非ヒト霊長類 (例えばサル) モデルなどの動物モデル) における標的遺伝子の発現と比較する。対照試料または対照哺乳動物における標的遺伝子の発現に100%の値を割り当てることができる。特定の態様では、試験試料または試験哺乳動物における標的遺伝子の発現レベルが、対照試料または対照哺乳動物における標的遺伝子の発現レベルの約95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、または0%である場合に、標的遺伝子の発現のサイレンシング、阻害、または低減が達成される。言い換えると、核酸 (例えば干渉RNA) は、核酸 (例えば干渉RNA) と接触も投与もされていない対照試料または対照哺乳動物における標的遺伝子の発現レベルに比べて、試験試料または試験哺乳動物において標的遺伝子の発現を、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%

、80%、85%、90%、95%、または100%サイレンシングする、低減する、または阻害することができる。標的遺伝子の発現レベルを測定するのに適したアッセイには、非限定的に、例えば当業者に公知の技法、例えば、ドットプロット、ノーザンプロット、インサイチュールハイブリダイゼーション、ELISA、免疫沈降、酵素機能、および当業者に公知の表現型アッセイなどを使用する、タンパク質またはmRNAレベルの検査が含まれる。

【0061】

治療用核酸（例えば、siRNAなどの干渉RNA）などの活性剤または治療剤の「有効量」または「治療有効量」とは、所望の効果、例えば、核酸（例えば干渉RNA）の非存在下で検出された正常発現レベルと比較した標的配列の発現の阻害を生じるために十分な量である。標的遺伝子または標的配列の発現阻害は、干渉RNA（例えばsiRNA）などの核酸を用いて得られた値が対照の約95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、または0%となる場合に達成される。標的遺伝子または標的配列の発現を測定するのに適したアッセイには、例えば、当業者に公知の技法、例えば、ドットプロット、ノーザンプロット、インサイチュールハイブリダイゼーション、ELISA、免疫沈降、酵素機能、および当業者に公知の表現型アッセイなどを使用する、タンパク質またはRNAレベルの検査が含まれる。

10

【0062】

干渉RNA（例えばsiRNA）などの核酸によって免疫反応を「低下させる」、「低下させること」、「低減する」、または「低減させること」とは、所与の核酸（例えば修飾された干渉RNA）に対する免疫反応の検出可能な低下を意味することが意図される。一部の例において、修飾された干渉RNAなどの核酸による免疫反応の低下量は、未修飾の干渉RNA存在下での免疫反応のレベルと比べて測定することができる。非限定的な例として、検出可能な低下は、未修飾の干渉RNAの存在下で検出された免疫反応よりも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、またはそれ以上に低くてもよい。核酸（例えば干渉RNA）に対する免疫反応の低下は、典型的にはレスポンダー細胞によるサイトカイン（例えば、IFN γ 、IFN α 、TNF α 、IL-6、IL-8、またはIL-12）のインビトロ生成の低下、または核酸（例えば干渉RNA）投与後の哺乳動物対象の血清中サイトカインの生成の低下により測定される。

20

【0063】

本明細書で使用される「レスポンダー細胞」という用語は、未修飾の干渉RNA（例えば未修飾のsiRNA）などの免疫刺激性核酸と接触した場合に、検出可能な免疫反応を生成する細胞、好ましくは哺乳動物細胞を指す。レスポンダー細胞の例には、非限定的に、樹状細胞、マクロファージ、末梢血単核細胞（PBMC）、脾臓細胞などが含まれる。検出可能な免疫反応には、例えば、TNF α 、IFN γ 、IFN α 、IFN β 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、TGF β 、およびそれらの組み合わせなどの、サイトカインまたは成長因子の生成が含まれる。検出可能な免疫反応にはまた、例えばテトラトリコペプチドリピートを有するインターフェロン誘導タンパク質1（IFIT1）mRNAの誘導が含まれる。

30

【0064】

本明細書で使用される「核酸」という用語は、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態の、少なくとも2個のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含有するポリマーを指し、DNA、RNA、およびそれらのハイブリッドを含む。DNAは、例えば、アンチセンス分子、プラスミドDNA、DNA-DNA二重鎖、凝縮前のDNA、PCR産物、ベクター（P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体）、発現カセット、キメラ配列、染色体DNA、またはこれらの群の誘導體および組み合わせの形態でありうる。RNAは、低分子干渉RNA（siRNA）、ダイサー基質dsRNA、低分子ヘアピンRNA（shRNA）、非対称干渉RNA（airRNA）、マイクロRNA（miRNA）、mRNA、tRNA、rRNA、ウイルスRNA（vRNA）、およびそれらの組み合わせの形態でありうる。核酸には、合成、天然、および非天然でありかつ参照核酸と類似した結合特性を有する、公知のヌクレオチドアナログまたは修飾された主鎖残基または連結を含有する、核酸が含まれる。そのようなアナログの例には、非限定的に、ホスホロチオエート、

40

50

ホスホロアミデート、ホスホン酸メチル、キラル-ホスホン酸メチル、2'-O-メチルリボヌクレオチド、およびペプチド-核酸（PNA）が含まれる。具体的に限定されない限り、この用語は、参照核酸と類似の結合特性を有する、天然ヌクレオチドの公知のアナログを含有する核酸を包含する。特に示さない限り、特定の核酸配列はまた、明示された配列だけでなく、保存的に改変されたその変異体（例えば縮重コドン置換）、アレル、オーソログ、SNP、および相補的配列を暗黙的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、一つまたは複数の選択された（または全ての）コドンの第三の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を産生させることによって達成することができる（Batzler et al., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)）。「ヌクレオチド」は、糖デオキシリボース（DNA）またはリボース（RNA）、塩基、およびリン酸基を含有する。ヌクレオチドは、リン酸基を介して一緒に連結している。「塩基」には、プリンおよびピリミジンが含まれ、それにはさらに、天然化合物であるアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン、および天然アナログ、ならびにプリンおよびピリミジンの合成誘導体が含まれ、合成誘導体には、これらに限定されるわけではないがアミン、アルコール、チオール、カルボン酸エステル、およびハロゲン化アルキルなどの新しい反応性基を配置する修飾が非限定的に含まれる。

10

【0065】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチドまたは前駆ポリペプチドの生成に必要な、部分長または完全長のコード配列を含む核酸（例えばDNAまたはRNA）配列を指す。

20

【0066】

本明細書で使用される「遺伝子産物」とは、RNA転写物またはポリペプチドなどの遺伝子産物を指す。

【0067】

「脂質」という用語は、非限定的に脂肪酸エステルを含み、水に不溶であるがしかし多数の有機溶媒に可溶であることを特徴とする有機化合物の群を指す。それらは、普通は以下の少なくとも三つのクラスに分類される：（1）脂肪、油およびロウが含まれる「単純脂質」；（2）リン脂質および糖脂質が含まれる「複合脂質」；ならびに（3）ステロイドなどの「誘導脂質」。

【0068】

「脂質粒子」という用語には、関心対象の標的部位（例えば細胞、組織、器官、腫瘍等）に核酸（例えば干渉RNA）などの活性剤または治療剤を送達するために使用できる脂質製剤が含まれる。好ましい態様では、本発明の脂質粒子は、典型的には陽イオン性脂質と、非陽イオン性脂質と、粒子の凝集を阻害する任意の結合脂質とから形成される核酸-脂質粒子である。他の好ましい態様では、核酸（例えば干渉RNA）などの活性剤または治療剤を粒子の脂質部分に封入することにより、それを酵素的分解から保護することができる。

30

【0069】

本明細書で使用される「SNALP」という用語は、安定な核酸-脂質粒子を指す。SNALPは、脂質（例えば陽イオン性脂質、非陽イオン性脂質、および粒子の凝集を阻害する任意の結合脂質）から製造される粒子であり、核酸（例えば干渉RNA）は脂質内に完全に封入されている。場合によっては、SNALPは、静脈内（i.v.）注射後に循環寿命の延長を示すことができ、遠位部位（例えば、投与部位から物理的に隔離された部位）に蓄積することができ、これらの遠位部位での標的遺伝子の発現のサイレンシングを仲介できることから、全身適用に極めて有用である。国際公開公報第00/03683号に示されるように、核酸は、凝縮剤と複合体を形成し、SNALP内に封入することができ、その開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる。

40

【0070】

本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、典型的には約30nm～約150nm、約40nm～約150nm、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、約70nm～約100nm、約80nm～約

50

100nm、約90nm～約100nm、約70～約90nm、約80nm～約90nm、約70nm～約80nm、または約30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm、もしくは150nmの平均直径を有し、実質的に無毒である。加えて核酸は、本発明の脂質粒子中に存在する場合、水溶液中でヌクレアーゼによる分解に耐性である。核酸-脂質粒子およびそれらの調製方法は、例えば、米国特許出願公開第20040142025号および同第20070042031号に開示されており、それらの開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる。

【0071】

本明細書で使用される「封入された脂質」とは、完全に封入された、部分封入された、またはその両方の、核酸（例えば、siRNAなどの干渉RNA）などの活性剤または治療剤を提供する脂質粒子を指すことができる。好ましい態様では、核酸（例えば干渉RNA）は、（例えば、SNALPまたは他の核酸-脂質粒子を形成するために）脂質粒子に完全に封入される。

10

【0072】

「脂質コンジュゲート」という用語は、脂質粒子の凝集を阻害する結合脂質を指す。そのような脂質コンジュゲートには、非限定的に、例えばジアルキルオキシプロピルとカップリングしたPEG（例えばPEG-DAAコンジュゲート）、ジアシルグリセロールとカップリングしたPEG（例えばPEG-DAGコンジュゲート）、コレステロールとカップリングしたPEG、ホスファチジルエタノールアミンとカップリングしたPEG、およびセラミドと結合したPEG（例えば米国特許第5,885,613号を参照）などのPEG-脂質コンジュゲート、陽イオン性PEG脂質、ポリオキサゾリン（POZ）-脂質コンジュゲート（例えばPOZ-DAAコンジュゲート；例えば2011年1月13日に出版された米国特許出願第13/006,277号を参照）、ポリアミドオリゴマー（例えばATTA-脂質コンジュゲート）、およびそれらの混合物が含まれる。POZ-脂質コンジュゲートの追加的な例は、国際公開公報第2010/006282号に記載されている。PEGまたはPOZは、脂質に直接結合させても、またはリンカー成分を介して脂質に連結させてもよい。例えば非エステル含有リンカー成分およびエステル含有リンカー成分を含めた、PEGまたはPOZを脂質にカップリングさせるのに適した任意のリンカー成分を使用することができる。ある好ましい態様では、アミドまたはカルバメートなどの非エステル含有リンカー成分が使用される。上記特許文書のそれぞれの開示は、全ての目的のために全体として参照により本明細書に組み入れられる。

20

30

【0073】

「両親媒性脂質」という用語は、部分的に、脂質物質の疎水性部分が疎水性相に配向し、一方で親水性部分が水相に配向する、任意の適切な物質を指す。親水性の特徴は、炭水化物、リン酸、カルボキシル、スルファート、アミノ、スルフヒドリル、ニトロ、ヒドロキシルおよび他の同等の基などの極性基または荷電基の存在に由来する。疎水性は、長鎖の飽和および不飽和脂肪族炭化水素基、ならびに一つまたは複数の芳香族基、脂環式基、または複素環式基により置換されたそのような基を非限定的に含む、無極性基の包含により付与することができる。両親媒性化合物の例には、非限定的に、リン脂質、アミノ脂質、およびスフィンゴ脂質が含まれる。

40

【0074】

リン脂質の代表例には、非限定的に、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、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンシトール、ホスファチド酸、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、およびジリノレオイルホスファチジルコリンが含まれる。スフィンゴ脂質、スフィンゴ糖脂質ファミリー、ジアシルグリセロール、および -アシルオキシ酸などのリンを欠如する他の化合物もまた、両親媒性脂質として指定された群の中に含まれる。追加的に、上記両親媒性脂質は、トリグリセリドおよびステロールを含めた他の脂質と混合することができる。

50

【0075】

「中性脂質」という用語は、選択されたpHで非荷電形態または中性双性イオン形態のいずれかで存在する、いくつかの脂質種のいずれかを指す。生理的pHで、そのような脂質には、例えば、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、コレステロール、セラプロシド、およびジアシルグリセロールが含まれる。

【0076】

「非陽イオン性脂質」という用語は、任意の両親媒性脂質および任意の他の中性脂質または陰イオン性脂質を指す。

【0077】

「陰イオン性脂質」という用語は、生理的pHで負電荷を有する任意の脂質を指す。これらの脂質には、非限定的に、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、N-ドデカノイルホスファチジルエタノールアミン、N-スクシニルホスファチジルエタノールアミン、N-グルタリルホスファチジルエタノールアミン、リシルホスファチジルグリセロール、パルミトイルオレオイル (palmitoyloleoyl) ホスファチジルグリセロール (POPG)、および他の陰イオン性修飾基が中性脂質と結合したものが含まれる。

【0078】

「疎水性脂質」という用語は非限定的に、飽和および不飽和の長鎖脂肪族炭化水素基が含まれる無極性基を有する化合物を指し、そのような基は、一つまたは複数の芳香族基、脂環式基、または複素環式基により置換されていてもよい。適切な例には、非限定的に、ジアシルグリセロール、ジアルキルグリセロール、N-N-ジアルキルアミノ、1,2-ジアシルオキシ-3-アミノプロパン、および1,2-ジアルキル-3-アミノプロパンが含まれる。

【0079】

「膜融合性」という用語は、SNALPなどの脂質粒子が細胞の膜と融合する能力を指す。膜は、原形質膜またはオルガネラ、例えばエンドソーム、核等を囲む膜のいずれかでありうる。

【0080】

本明細書で使用される「水溶液」という用語は、水を全体的または部分的に含む組成物を指す。

【0081】

本明細書で使用される「有機脂質溶液」という用語は、脂質を有する有機溶媒を全体的または部分的に含む組成物を指す。

【0082】

本明細書で使用される「遠位の部位」とは、隣接する毛細血管床に限らない、生体全体に広く分布する部位を含む、物理的に隔離された部位を指す。

【0083】

SNALPなどの核酸-脂質粒子に関係する「血清安定性」とは、遊離DNAまたはRNAを著しく分解しうる血清またはヌクレアーゼアッセイへの曝露後に、粒子が有意に分解されないことを意味する。適切なアッセイには、例えば、標準的な血清アッセイ、DNAseアッセイ、またはRNAseアッセイが含まれる。

【0084】

本明細書で使用される「全身送達」とは、生体内での干渉RNA (例えばsiRNA) などの活性剤の広範な生体内分布をもたらす、脂質粒子の送達を指す。ある剤の全身送達につながる投与技法もあれば、つながらない投与技法もある。全身送達は、有用な量、好ましくは治療量の剤が身体の大部分に曝露されることを意味する。広い生体内分布を得るために、剤は、一般に、投与部位から遠位の疾患部位に到達する前に (初回通過器官 (肝臓、肺等) または迅速な非特異的細胞結合などにより) 迅速な分解およびクリアランスを受けないような血中寿命を必要とする。脂質粒子の全身送達は、例えば静脈内、皮下、および腹腔内を含めた、当技術分野で公知の任意の手段により行われ得る。好ましい態様では、

10

20

30

40

50

脂質粒子の全身送達は、静脈内送達による。

【0085】

本明細書で使用される「局所送達」とは、生体内の標的部位に干渉RNA（例えばsiRNA）などの活性剤を直接的に送達することを指す。例えば、剤は、腫瘍などの疾患部位、炎症部位などの他の標的部位、または肝臓、心臓、膵臓、腎臓等などの標的器官に、直接注射により局所送達することができる。

【0086】

「哺乳動物」という用語は、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ハムスター、モルモット、ウサギ、家畜等などの任意の哺乳動物種を指す。

【0087】

「癌」という用語は、異常細胞の制御不能な増殖を特徴とする疾患クラスの任意のメンバーを指す。この用語には、悪性、良性、軟組織または固形のいずれに特徴決定されるかに関わらず、全ての公知の癌および腫瘍状態、ならびに転移前の癌および転移後の癌を含めた全ての病期および悪性度の癌が含まれる。異なる種類の癌の例には、非限定的に、肝臓癌、肺癌、大腸癌、直腸癌、肛門癌、胆管癌、小腸癌、胃癌、食道癌、胆嚢癌、膵臓癌、虫垂癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、前立腺癌、腎臓癌（例えば腎細胞癌）、中枢神経系の癌、神経膠芽腫、皮膚癌、リンパ腫、絨毛癌、頭頸部癌、骨原性肉腫、および血液癌が含まれる。特定種類の肝臓癌の非限定的な例には、肝細胞癌（HCC）、二次肝臓癌（例えば、いくつかの他の種類の非肝臓性癌細胞の転移により起こるもの）、および肝芽腫が含まれる。本明細書で使用される「腫瘍」は、一つまたは複数の癌細胞を含む。

10

20

【0088】

III. 新規な陽イオン性脂質

本発明は、とりわけ、細胞への核酸などの治療剤のインビトロおよび/またはインビボ送達のための本明細書記載の脂質粒子に有利に使用することができる、新規な陽イオン性（アミノ）脂質を提供する。本発明の新規な陽イオン性脂質は、本明細書の式Iに示される構造を有し、該脂質には、その（R）および/または（S）鏡像異性体が含まれる。

【0089】

いくつかの態様において、本発明の脂質は、ラセミ混合物を含む。他の態様において、本発明の脂質は、一つまたは複数のジアステレオマーの混合物を含む。ある態様において、本発明の脂質が、少なくとも約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%の鏡像体過剰率を含むように、該脂質は、一つの鏡像異性体に富んでいる。ある他の態様において、本発明の脂質が、少なくとも約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%のジアステレオマー過剰率を含むように、該脂質は、一つのジアステレオマーに富んでいる。あるさらなる態様において、本発明の脂質は、キラル純粋である（例えば単一の光学異性体を含む）。さらなる態様において、本発明の脂質が、少なくとも約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%の異性体過剰率を含むように、該脂質は、一つの光学異性体に富んでいる（例えば光学活性異性体）。本発明は、ラセミ混合物としての、または光学的に純粋な形態での、式Iの陽イオン性脂質の合成を提供する。

30

【0090】

「陽イオン性脂質」および「アミノ脂質」という用語は、1、2、3本、またはそれ以上の脂肪酸鎖または脂肪族アルキル鎖およびpH滴定可能なアミノ頭基（例えばアルキルアミノまたはジアルキルアミノ頭基）を有する脂質およびその塩を含み、本明細書において互換的に使用される。陽イオン性脂質は、典型的には陽イオン性脂質の pK_a 未満のpHでプロトン化され（すなわち陽性荷電し）、 pK_a よりも高いpHで実質的に中性である。本発明の陽イオン性脂質は、また、滴定可能な陽イオン性脂質と称される場合もある。

40

【0091】

「塩」という用語には、本明細書において開示された陽イオン性脂質と一つまたは複数の陰イオンとの間で形成した複合体などの、任意の陰陽イオン性複合体が含まれる。陰イオンの非限定的な例には、無機および有機の陰イオン、例えば、ヒドリドイオン、フッ化

50

物イオン、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン、シュウ酸（例えば、ヘミシュウ酸（hemioxalate））イオン、リン酸イオン、ホスホン酸イオン、リン酸水素イオン、リン酸二水素イオン、酸化物イオン、炭酸イオン、重炭酸イオン、硝酸イオン、亜硝酸イオン、窒化物イオン、亜硫酸水素イオン、硫化物イオン、亜硫酸イオン、重硫酸イオン、硫酸イオン、チオ硫酸イオン、硫酸水素イオン、ホウ酸イオン、ギ酸イオン、酢酸イオン、安息香酸イオン、クエン酸イオン、酒石酸イオン、乳酸イオン、アクリル酸イオン、ポリアクリル酸イオン、フマル酸イオン、マレイン酸イオン、イタコン酸イオン、グリコール酸イオン、グルコン酸イオン、リンゴ酸イオン、マンデル酸イオン、チグリン酸イオン、アスコルビン酸イオン、サリチル酸イオン、ポリメタクリル酸イオン、過塩素酸イオン、塩素酸イオン、亜塩素酸イオン、次亜塩素酸イオン、臭素酸イオン、次亜臭素酸イオン、ヨウ素酸イオン、アルキルスルホン酸イオン、アリールスルホン酸イオン、ヒ酸イオン、亜ヒ酸イオン、クロム酸イオン、ニクロム酸イオン、シアン化物イオン、シアン酸イオン、チオシアン酸イオン、水酸化物イオン、過酸化物イオン、過マンガン酸イオン、およびそれらの混合物が含まれる。特定の態様において、本明細書において開示された陽イオン性脂質の塩は、結晶塩である。

10

20

30

40

50

【0092】

「アルキル」という用語には、1~24個の炭素原子を含有する直鎖または分岐の非環状または環状の飽和脂肪族炭化水素が含まれる。代表的な飽和直鎖アルキルには、非限定的にメチル、エチル、*n*-プロピル、*n*-ブチル、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシル等が含まれ、一方で飽和分岐アルキルには、非限定的にイソプロピル、*sec*-ブチル、イソブチル、*tert*-ブチル、イソペンチル等が含まれる。代表的な飽和環状アルキルには、非限定的に本明細書記載のC₃₋₈シクロアルキルが含まれ、一方で不飽和環状アルキルには、非限定的に本明細書記載のC₃₋₈シクロアルケニルが含まれる。

【0093】

「ヘテロアルキル」という用語には、例えばO、N、Si、および/またはSなどの約1~約5個のヘテロ原子（すなわち1、2、3、4、または5個のヘテロ原子）を有する、上記と同義の、直鎖または分岐の非環状または環状の飽和脂肪族炭化水素が含まれ、ここで、窒素原子および硫黄原子は、酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は、4級化されていてもよい。ヘテロアルキル基は、炭素原子またはヘテロ原子を經由して分子の残りに結合することができる。

【0094】

「環状アルキル」という用語には、下記の任意の置換または非置換のシクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、シクロアルケニル基、およびヘテロシクロアルケニル基が含まれる。

【0095】

「シクロアルキル」という用語には、環の頂点として約3~約8個の炭素原子（すなわち3、4、5、6、7、または8個の炭素原子）を有する置換または非置換の環状アルキル基が含まれる。好ましいシクロアルキル基には、環の頂点として約3~約6個の炭素原子を有するシクロアルキル基が含まれる。C₃₋₈シクロアルキル基の例には、非限定的に、シクロプロピル、メチル-シクロプロピル、ジメチル-シクロプロピル、シクロブチル、メチル-シクロブチル、シクロペンチル、メチル-シクロペンチル、シクロヘキシル、メチル-シクロヘキシル、ジメチル-シクロヘキシル、シクロヘプチル、およびシクロオクチル、ならびに他の置換C₃₋₈シクロアルキル基が含まれる。

【0096】

「ヘテロシクロアルキル」という用語には、O、N、SiおよびSからなる群より選択される約1~約3個のヘテロ原子を環員として有する、上記と同義の置換または非置換の環状アルキル基が含まれ、ここで、窒素原子および硫黄原子は、酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は、4級化されていてもよい。ヘテロシクロアルキル基は、炭素原子またはヘテロ原子を經由して分子の残りに結合することができる。

【0097】

「シクロアルケニル」という用語には、環の頂点として約3～約8個の炭素原子（すなわち3、4、5、6、7、または8個の炭素原子）を有する置換または非置換の環状アルケニル基が含まれる。好ましいシクロアルケニル基は、環の頂点として約3～約6個の炭素原子を有するシクロアルケニル基である。C₃₋₈シクロアルケニル基の例には、非限定的に、シクロプロベニル、メチル-シクロプロベニル、ジメチル-シクロプロベニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、およびシクロオクテニル、ならびに他の置換C₃₋₈シクロアルケニル基が含まれる。

【0098】

「ヘテロシクロアルケニル」という用語には、O、N、SiおよびSからなる群より選択される約1～約3個のヘテロ原子を環員として有する、上記と同義の置換または非置換の環状アルケニル基が含まれ、ここで、窒素原子および硫黄原子は、酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は、4級化されていてもよい。ヘテロシクロアルケニル基は、炭素原子またはヘテロ原子を経由して分子の残りに結合することができる。

10

【0099】

「アルコキシ」という用語には、式:アルキル-O-[式中、「アルキル」は前記定義を有する]の基が含まれる。アルコキシ基の非限定的な例には、メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、イソプロポキシ、n-ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシおよびtert-ブトキシが含まれる。

【0100】

「アルケニル」という用語には、隣り合う炭素原子の間の二重結合を少なくとも1個含有する上記と同義のアルキルが含まれる。アルケニルには、シスおよびトランス異性体の両方が含まれる。代表的な直鎖および分岐アルケニルには、非限定的に、エチレニル、プロピレニル、1-ブテニル、2-ブテニル、イソブチレニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-メチル-1-ブテニル、2-メチル-2-ブテニル、2,3-ジメチル-2-ブテニル等が含まれる。代表的な環状アルケニルは、上に記載されている。

20

【0101】

「アルキニル」という用語には、隣り合う炭素原子の間の三重結合を少なくとも1個追加的に含有する上記と同義の任意のアルキルまたはアルケニルが含まれる。代表的な直鎖および分岐アルキニルには、非限定的に、アセチレニル、プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、3-メチル-1ブチニル等が含まれる。

30

【0102】

「アリール」という用語には、単環であり得るかまたは、一緒に縮合されたか共有結合された多環（最大で三環）であり得る、多価不飽和（典型的には芳香族）炭化水素基が含まれ、かつ該基は、例えば、ハロゲン、トリフルオロメチル、アミノ、アルキル、アルコキシ、アルキルカルボニル、シアノ、カルバモイル、アルコキシカルバモイル、メチレンジオキシ、カルボキシ、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、ヒドロキシ、ニトロ等などの一つまたは複数の置換基を担持してもよい。非置換アリール基の非限定的な例には、フェニル、ナフチル、およびビフェニルが含まれる。置換アリール基の例には、非限定的に、フェニル、クロロフェニル、トリフルオロメチルフェニル、クロロフルオロフェニル、およびアミノフェニルが含まれる。

40

【0103】

「アルキルチオ」、「アルキルスルホニル」、「アルキルスルフィニル」、および「アリールスルホニル」という用語には、それぞれ式:-S-Rⁱ、-S(O)₂-Rⁱ、-S(O)-Rⁱおよび-S(O)₂Rⁱ[式中、Rⁱは、前記と同義のアルキル基であり、かつRⁱは、前記と同義のアリール基である]を有する基が含まれる。

【0104】

「アルケニルオキシ」および「アルキニルオキシ」という用語には、式:-O-Rⁱ[式中、Rⁱは、それぞれアルケニル基またはアルキニル基である]を有する基が含まれる。

【0105】

50

「アルケニルチオ」および「アルキニルチオ」という用語には、式： $-S-R^k$ [式中、 R^k は、それぞれ、アルケニル基またはアルキニル基である] を有する基が含まれる。

【 0 1 0 6 】

「アルコキシカルボニル」という用語には、式： $-C(O)O-R^i$ [式中、 R^i は、上記と同義のアルキル基である] を有する基が含まれ、ここで、炭素原子の合計数は、アルキル成分およびカルボニル成分の組み合わせを指す。

【 0 1 0 7 】

「アシル」という用語には、結合点の炭素が下記と同義のオキシ基で置換された任意のアルキル、アルケニル、またはアルキニルが含まれる。以下はアシル基の非限定的な例である： $-C(=O)$ アルキル、 $-C(=O)$ アルケニル、および $-C(=O)$ アルキニル。

【 0 1 0 8 】

「複素環」という用語には、飽和型、不飽和型、または芳香族のいずれかであり、かつ窒素 (N)、酸素 (O)、および硫黄 (S) より独立に選択される1、2、3個、またはそれ以上のヘテロ原子を含有する、五～七員単環式複素環または七～十員二環式複素環が含まれ、ここで、窒素および硫黄ヘテロ原子は、酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は、4級化されていてもよく、複素環には、任意の上記複素環がベンゼン環に縮合した二環式環が含まれる。複素環は、任意のヘテロ原子または炭素原子を介して結合することができる。複素環には、非限定的に、下記と同義のヘテロアリール、およびモルホリニル、ピロリジノニル、ピロリジニル、ペペリジニル (piperidiny l)、ペペリジニル (piperizynyl)、ヒダントイニル、パレロラクタミル、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフランニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピリジニル、テトラヒドロピリミジニル (tetrahydroprimidiny l)、テトラヒドロチオフエニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロチオフエニル、テトラヒドロチオピラニル等が含まれる。

【 0 1 0 9 】

「ヘテロアリール」という用語には、窒素 (N)、酸素 (O)、および硫黄 (S) より選択される1、2、3個、またはそれ以上のヘテロ原子を含有する、芳香族五～十員複素環が含まれる。ヘテロアリールは、例えばハロゲン、アルキル、アルコキシ、シアノ、ハロアルキル (例えばトリフルオロメチル)、ヘテロシクリル (例えばモルホリニルまたはピロリジニル) 等の置換基により一つまたは複数の炭素原子が置換されていてもよい。ヘテロアリールの非限定的な例には、ピリジニルおよびフラニルが含まれる。

【 0 1 1 0 】

「ハロゲン」という用語には、フルオロ、クロロ、プロモ、およびヨードが含まれる。

【 0 1 1 1 】

「置換されていてもよいアルキル」、「置換されていてもよい環状アルキル」、「置換されていてもよいアルケニル」、「置換されていてもよいアルキニル」、「置換されていてもよいアシル」、および「置換されていてもよい複素環」という用語は、置換されると少なくとも1個の水素原子が置換基で置き換えられることを意味する。「オキシ」置換基 ($=O$) の場合、2個の水素原子が置き換えられる。置換基の非限定的な例には、オキシ、ハロゲン、複素環、 $-CN$ 、 $-OR^x$ 、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^xC(=O)R^y$ 、 $-NR^xSO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ 、および $-SO_nNR^xR^y$ が含まれる [式中、 n は、0、1、または2であり、 R^x および R^y は、同じであるかまたは異なっており、かつ独立に水素、アルキル、または複素環であり、かつ、アルキル置換基および複素環置換基のそれぞれは、さらに、一つまたは複数のオキシ、ハロゲン、 $-OH$ 、 $-CN$ 、アルキル、 $-OR^x$ 、複素環、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^xC(=O)R^y$ 、 $-NR^xSO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ 、および $-SO_nNR^xR^y$ で置換されていてもよい]。置換基の列挙の前に使用される「置換されていてもよい」という用語は、列挙内の各置換基が本明細書記載のように置換されていてもよいことを意味する。

【 0 1 1 2 】

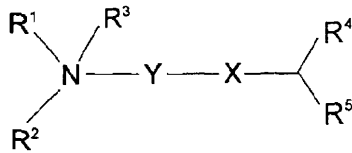
一局面において、本発明は、以下の構造を有する式 I の陽イオン性脂質またはその塩

10

20

30

40



(I)

を提供し、式中：

R¹およびR²は同じであるかまたは異なっており、かつ独立に、水素(H)または置換されていてもよいC₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、もしくはC₂-C₆アルキニルであるか、あるいは、R¹およびR²は一緒になって、置換されていてもよい複素環を形成してもよく；

10

R³は、存在しないか、または、水素(H)もしくはC₁-C₆アルキルであって4級アミンを提供し；

R⁴およびR⁵は同じであるかまたは異なっており、かつ独立に、置換されていてもよいC₁-C₂₄アルキル、C₁₀-C₂₄アルケニル、C₁₀-C₂₄アルキニル、またはC₁₀-C₂₄アシルであり；

Xは、O、S、N(R⁶)、C(O)、C(O)O、OC(O)、C(O)N(R⁶)、N(R⁶)C(O)、OC(O)N(R⁶)、N(R⁶)C(O)O、C(O)S、C(S)O、S(O)、S(O)(O)、C(S)、または置換されていてもよい複素環であり、ここで、R⁶は、水素(H)または置換されていてもよいC₁-C₁₀アルキル、C₂-C₁₀アルケニル、もしくはC₂-C₁₀アルキニルであり；かつ

Yは、存在しないか、または置換されていてもよいC₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、もしくはC₂-C₆アルキニルである。

20

【0113】

いくつかの態様において、R¹およびR²はそれぞれ独立に、水素(H)または置換されていてもよいC₁-C₂アルキル、C₁-C₃アルキル、C₁-C₄アルキル、C₁-C₅アルキル、C₂-C₃アルキル、C₂-C₄アルキル、C₂-C₅アルキル、C₂-C₆アルキル、C₃-C₄アルキル、C₃-C₅アルキル、C₃-C₆アルキル、C₄-C₅アルキル、C₄-C₆アルキル、C₅-C₆アルキル、C₂-C₃アルケニル、C₂-C₄アルケニル、C₂-C₅アルケニル、C₂-C₆アルケニル、C₃-C₄アルケニル、C₃-C₅アルケニル、C₃-C₆アルケニル、C₄-C₅アルケニル、C₄-C₆アルケニル、C₅-C₆アルケニル、C₂-C₃アルキニル、C₂-C₄アルキニル、C₂-C₅アルキニル、C₂-C₆アルキニル、C₃-C₄アルキニル、C₃-C₅アルキニル、C₃-C₆アルキニル、C₄-C₅アルキニル、C₄-C₆アルキニル、もしくはC₅-C₆アルキニルである。特定の態様において、R¹およびR²は、両方ともメチル基であるか、両方ともエチル基であるか、または1個のメチル基と1個のエチル基との組み合わせである。ある場合において、アミノ頭基がプロトン化されるように、pHが陽イオン性脂質のpK_aよりも高いとき、R³は存在せず、かつpHが陽イオン性脂質のpK_a未満のとき、R³は水素(H)である。ある他の場合において、R³は、置換されていてもよいC₁-C₂アルキル、C₁-C₃アルキル、C₁-C₄アルキル、C₁-C₅アルキル、C₂-C₃アルキル、C₂-C₄アルキル、C₂-C₅アルキル、C₂-C₆アルキル、C₃-C₄アルキル、C₃-C₅アルキル、C₃-C₆アルキル、C₄-C₅アルキル、C₄-C₆アルキル、またはC₅-C₆アルキルであって4級アミンを提供する。

30

【0114】

ある態様において、R¹およびR²は一緒になって、1、2、3、4、5、6個、またはそれ以上の炭素原子、ならびに窒素(N)、酸素(O)、硫黄(S)、およびその組み合わせなどの1、2、3、4個、またはそれ以上のヘテロ原子を含む、置換されていてもよい複素環を形成する。いくつかの態様において、置換されていてもよい複素環は、2~5個の炭素原子、ならびに窒素(N)、酸素(O)、および/または硫黄(S)などの1~3個のヘテロ原子を含む。ある態様において、複素環は、置換されていてもよいイミダゾール、トリアゾール(例えば、1,2,3-トリアゾール、1,2,4-トリアゾール)、ピラゾール、チアゾール、ピロール、フラン、オキサゾール、イソキサゾール、オキサゾリン、オキサゾリジン、オキサジアゾール、テトラゾール等を含む。ある場合において、置換されていてもよい複素環は、5個の炭素原子および1個の窒素原子を含み、ここで、該複素環は、オルト(ortho)、メタ(meta)、および/またはパラ(para)位でヒドロキシル(-OH)基などの置換基で置換されていてもよい。ある場合において、複素環は、置換されていてもよいイミダゾール基を含む

40

50

。

【0115】

他の態様において、 R^6 は、水素(H)または置換されていてもよい C_1 - C_2 アルキル、 C_1 - C_3 アルキル、 C_1 - C_4 アルキル、 C_1 - C_5 アルキル、 C_1 - C_6 アルキル、 C_1 - C_7 アルキル、 C_1 - C_8 アルキル、 C_1 - C_9 アルキル、 C_2 - C_3 アルキル、 C_2 - C_4 アルキル、 C_2 - C_5 アルキル、 C_2 - C_6 アルキル、 C_2 - C_7 アルキル、 C_2 - C_8 アルキル、 C_2 - C_9 アルキル、 C_2 - C_{10} アルキル、 C_3 - C_4 アルキル、 C_3 - C_5 アルキル、 C_3 - C_6 アルキル、 C_3 - C_7 アルキル、 C_3 - C_8 アルキル、 C_3 - C_9 アルキル、 C_3 - C_{10} アルキル、 C_4 - C_5 アルキル、 C_4 - C_6 アルキル、 C_4 - C_7 アルキル、 C_4 - C_8 アルキル、 C_4 - C_9 アルキル、 C_4 - C_{10} アルキル、 C_5 - C_6 アルキル、 C_5 - C_7 アルキル、 C_5 - C_8 アルキル、 C_5 - C_9 アルキル、 C_5 - C_{10} アルキル、 C_6 - C_7 アルキル、 C_6 - C_8 アルキル、 C_6 - C_9 アルキル、 C_6 - C_{10} アルキル、 C_7 - C_8 アルキル、 C_7 - C_9 アルキル、 C_7 - C_{10} アルキル、 C_8 - C_9 アルキル、 C_8 - C_{10} アルキル、 C_9 - C_{10} アルキル、 C_2 - C_3 アルケニル、 C_2 - C_4 アルケニル、 C_2 - C_5 アルケニル、 C_2 - C_6 アルケニル、 C_2 - C_7 アルケニル、 C_2 - C_8 アルケニル、 C_2 - C_9 アルケニル、 C_3 - C_4 アルケニル、 C_3 - C_5 アルケニル、 C_3 - C_6 アルケニル、 C_3 - C_7 アルケニル、 C_3 - C_8 アルケニル、 C_3 - C_9 アルケニル、 C_3 - C_{10} アルケニル、 C_4 - C_5 アルケニル、 C_4 - C_6 アルケニル、 C_4 - C_7 アルケニル、 C_4 - C_8 アルケニル、 C_4 - C_9 アルケニル、 C_4 - C_{10} アルケニル、 C_5 - C_6 アルケニル、 C_5 - C_7 アルケニル、 C_5 - C_8 アルケニル、 C_5 - C_9 アルケニル、 C_5 - C_{10} アルケニル、 C_6 - C_7 アルケニル、 C_6 - C_8 アルケニル、 C_6 - C_9 アルケニル、 C_6 - C_{10} アルケニル、 C_7 - C_8 アルケニル、 C_7 - C_9 アルケニル、 C_7 - C_{10} アルケニル、 C_8 - C_9 アルケニル、 C_8 - C_{10} アルケニル、 C_9 - C_{10} アルケニル、 C_2 - C_3 アルキニル、 C_2 - C_4 アルキニル、 C_2 - C_5 アルキニル、 C_2 - C_6 アルキニル、 C_2 - C_7 アルキニル、 C_2 - C_8 アルキニル、 C_2 - C_9 アルキニル、 C_3 - C_4 アルキニル、 C_3 - C_5 アルキニル、 C_3 - C_6 アルキニル、 C_3 - C_7 アルキニル、 C_3 - C_8 アルキニル、 C_3 - C_9 アルキニル、 C_3 - C_{10} アルキニル、 C_4 - C_5 アルキニル、 C_4 - C_6 アルキニル、 C_4 - C_7 アルキニル、 C_4 - C_8 アルキニル、 C_4 - C_9 アルキニル、 C_4 - C_{10} アルキニル、 C_5 - C_6 アルキニル、 C_5 - C_7 アルキニル、 C_5 - C_8 アルキニル、 C_5 - C_9 アルキニル、 C_5 - C_{10} アルキニル、 C_6 - C_7 アルキニル、 C_6 - C_8 アルキニル、 C_6 - C_9 アルキニル、 C_6 - C_{10} アルキニル、 C_7 - C_8 アルキニル、 C_7 - C_9 アルキニル、 C_7 - C_{10} アルキニル、 C_8 - C_9 アルキニル、 C_8 - C_{10} アルキニル、もしくは C_9 - C_{10} アルキニルである。特定の一態様において、 R^6 は、水素(H)、 C_1 アルキル(メチル)基、ならびに C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、および C_{10} のアルキル、アルケニル、およびアルキニル基からなる群より選択される。

10

20

30

【0116】

特定の一態様において、 X は $C(O)O$ である。別の特定の一態様において、 X は O である。ある態様において、 X は $C(O)N(R^6)$ 、 $N(R^6)C(O)O$ 、または $C(O)S$ である。特定の一態様において、 X は、 $N(R^6)C(O)O$ であり、 R^6 は、水素(H)、メチル基、または C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、もしくは C_{10} のアルキル基、アルケニル基、もしくはアルキニル基である。ある他の態様において、 X は、置換されていてもよい複素環である。特定の一態様において、複素環は、1、2、3、4、5、6個、またはそれ以上の炭素原子、ならびに窒素(N)、酸素(O)、硫黄(S)、およびその組み合わせなどの1、2、3、4個、またはそれ以上のヘテロ原子を含む。いくつかの態様において、置換されていてもよい複素環は、2~5個の炭素原子、ならびに窒素(N)、酸素(O)、および/または硫黄(S)などの1~3個のヘテロ原子を含む。ある態様において、複素環は、置換されていてもよいイミダゾール、トリアゾール(例えば、1,2,3-トリアゾール、1,2,4-トリアゾール)、ピラゾール、チアゾール、ピロール、フラン、オキサゾール、イソキサゾール、オキサゾリン、オキサゾリジン、オキサジアゾール、テトラゾール等を含む。ある場合において、 X が $C(O)O$ であり、 Y が $(CH_2)_2$ または $(CH_2)_3$ であり、かつ R^4 および R^5 の両方がリノレイル成分である場合、 R^1 および R^2 の両方がメチル基であることはない。

40

【0117】

ある態様において、 R^4 および R^5 の少なくとも一方または両方は、置換されていてもよい C_{12} - C_{24} 、 C_{12} - C_{22} 、 C_{12} - C_{20} 、 C_{14} - C_{24} 、 C_{14} - C_{22} 、 C_{14} - C_{20} 、 C_{16} - C_{24} 、 C_{16} - C_{22} 、または C_{16} - C_{20} のアルキル、アルケニル、アルキニル、またはアシル基(すなわち C_{12} 、 C_{13} 、 C_{14} 、 C_{15} 、 C_{16} 、 C_{17} 、 C_{18} 、 C_{19} 、 C_{20} 、 C_{21} 、 C_{22} 、 C_{23} 、または C_{24} のアルキル、アルケニル、ア

50

ルキニル、またはアシル基)を独立に含む。他の態様において、 R^4 および R^5 の少なくとも一方または両方は、独立に、少なくとも1、2、3、4、5、もしくは6個の不飽和部位(例えば、1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、2~3、2~4、2~5、または2~6個の不飽和部位)、または置換されたアルキルもしくはアシル基を含む。ある場合において、不飽和側鎖は、ドデセニル成分、テトラドセニル(例えばミリストレイル)成分、ヘキサドセニル(例えばパルミトレイル)成分、オクタドセニル(例えばオレイル)成分、イコセニル成分、ドデカジエニル成分、テトラデカジエニル成分、ヘキサデカジエニル成分、オクタデカジエニル成分、イコサジエニル成分、ドデカトリエニル成分、テトラデカトリエニル成分、ヘキサデカトリエニル成分、オクタデカトリエニル成分、イコサトリエニル成分、またはそのアシル誘導体(例えば、オレオイル、リノレオイル、リノレノイル、 γ -リノレノイル等)を含む。ある場合において、オクタデカジエニル成分はリノレイル成分である。特定の態様において、 R^4 および R^5 の両方がリノレイル成分である。他の場合において、オクタデカトリエニル成分は、リノレニル成分または γ -リノレニル成分である。特定の態様において、 R^4 および R^5 の両方がリノレニル成分または γ -リノレニル成分である。 R^4 および R^5 の一方または両方が分岐のアルキルまたはアシル基(例えば、置換されたアルキルまたはアシル基)を独立に含む態様において、分岐のアルキルまたはアシル基は、少なくとも1~6個の(例えば、1、2、3、4、5、6個の、またはそれ以上の) C_1 - C_6 アルキル置換基を有する C_{12} - C_{24} のアルキルまたはアシルを含み得る。特定の態様において、分岐のアルキルまたはアシル基は、1~6個(例えば、1、2、3、4、5、6個)の C_1 - C_4 アルキル(例えば、メチル、エチル、プロピル、またはブチル)置換基を有する C_{12} - C_{20} または C_{14} - C_{22} のアルキルまたはアシルを含む。いくつかの態様において、分岐アルキル基は、フィタニル(3,7,11,15-テトラメチル-ヘキサデカニル)成分を含み、分岐アシル基は、フィタノイル(3,7,11,15-テトラメチル-ヘキサデカノイル)成分を含む。特定の態様において、 R^4 および R^5 の両方がフィタニル成分である。さらなる態様において、 R^4 および R^5 の少なくとも一方または両方は、オキソ(=O)置換基、 $-OR^x$ 置換基、およびこれらの組み合わせなどの1、2、3、4個、またはそれ以上の置換基で、独立に置換されており、ここで、各 R^x は独立に、水素またはアルキル基である。ある場合において、オキソ(=O)または $-OR^x$ (例えば-OH)置換基は、 R^4 および R^5 の一方または両方における、 R^4 または R^5 を化合物の残り部分に結合させる炭素に存在する。

10

20

【0118】

30

いくつかの態様において、 R^4 および R^5 の一方または両方に存在する1、2、3、4、5、6個、またはそれ以上の不飽和部位は、それぞれの場合に、不飽和側鎖の一方または両方における特定位置でのシス二重結合、トランス二重結合、またはこれらの組み合わせに対応する。二重結合が水素原子とアルキルまたはアルキレン鎖との間に位置する不飽和側鎖について、化学記号「E」は、トランス二重結合配置を指し、化学記号「Z」は、シス二重結合配置を指す。非限定的な例として、 R^4 および R^5 の一方または両方は、側鎖中の一つまたは複数の位置でシスおよび/またはトランス配置の二重結合の任意の組み合わせ(例えば、 C_{18} アルキル基の9位での、6および9位での、3、6、および9位での、6、9、および12位での、または7および9位でのシスおよび/またはトランス二重結合)を含有する C_{18} アルキル基である。同様に、非限定的な例として、 R^4 および R^5 の一方または両方は、側鎖中の一つまたは複数の位置で化学記号「E」および/または化学記号「Z」のいずれかによって特徴づけることのできる任意の組み合わせの二重結合(例えば、 C_{18} アルキル基の9位での、6および9位での、3、6、および9位での、6、9、および12位での、または7および9位での二重結合「Z」および/または「E」)を有する C_{18} アルキル基である。

40

【0119】

他の態様において、 R^4 または R^5 の一方は独立に、少なくとも1、2、3、4、5、6個、またはそれ以上の、置換されていてもよい環状アルキル基(例えば、1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、2~3、2~4、2~5、または2~6個の置換されていてもよい環状アルキル基)を含む。ある場合において、 R^4 または R^5 の一方は独立に、置換されていてもよい C_{12} - C_{24} 、 C_{12} - C_{22} 、 C_{12} - C_{20} 、 C_{14} - C_{24} 、 C_{14} - C_{22} 、 C_{14} - C_{20} 、 C_{16} - C_{24} 、 C_{16} - C_{22} 、または C_{16} - C_{20} のアル

50

キル、アルケニル、アルキニル、またはアシル基（すなわち C_{12} 、 C_{13} 、 C_{14} 、 C_{15} 、 C_{16} 、 C_{17} 、 C_{18} 、 C_{19} 、 C_{20} 、 C_{21} 、 C_{22} 、 C_{23} 、または C_{24} のアルキル、アルケニル、アルキニル、またはアシル基）を含み、かつ R^4 または R^5 の他方は、少なくとも1、2、3、4、5、または6個の置換されていてもよい環状アルキル基（例えば1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、2~3、2~4、2~5、または2~6個の置換されていてもよい環状アルキル基）を含む。

【0120】

特定の態様において、 R^4 および R^5 の一方に存在する一つまたは複数の置換されていてもよい環状アルキル基は、置換されていてもよい飽和環状アルキル基、置換されていてもよい不飽和環状アルキル基、およびこれらの組み合わせからなる群より独立に選択される。ある場合において、置換されていてもよい飽和環状アルキル基は、置換されていてもよい C_{3-8} シクロアルキル基（例えばシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル等）を含む。好ましい態様において、置換されていてもよい飽和環状アルキル基は、一つまたは複数の置換基および/またはヘテロ原子を含有していてもよいシクロプロピル基を含む。他の場合において、置換されていてもよい不飽和環状アルキル基は、置換されていてもよい C_{3-8} シクロアルケニル基（例えばシクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、シクロオクテニル等）を含む。

10

【0121】

いくつかの態様において、 R^4 または R^5 の一方は、少なくとも1、2、3、4、5、もしくは6個の不飽和部位（例えば1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、2~3、2~4、2~5、もしくは2~6個の不飽和部位）、または置換されたアルキルもしくはアシル基を含み、他方の側鎖は、少なくとも1、2、3、4、5、または6個の置換されていてもよい環状アルキル基（例えば1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、2~3、2~4、2~5、または2~6個の置換されていてもよい環状アルキル基）を含む。 R^4 または R^5 の一方が少なくとも1、2、3、4、5、または6個の不飽和部位を含む態様において、不飽和側鎖は、ミリストレイル成分、パルミトレイル成分、オレイル成分、ドデカジエニル成分、テトラデカジエニル成分、ヘキサデカジエニル成分、オクタデカジエニル成分、イコサジエニル成分、ドデカトリエニル成分、テトラデカトリエニル成分、ヘキサデカトリエニル成分、オクタデカトリエニル成分、イコサトリエニル成分、またはそのアシル誘導体（例えばリノレオイル、リノレノイル、 γ -リノレノイル等）を含み得る。ある場合において、オクタデカジエニル成分はリノレイル成分である。他の場合において、オクタデカトリエニル成分は、リノレニル成分または γ -リノレニル成分である。 R^4 または R^5 の一方が分岐のアルキルまたはアシル基（例えば、置換されたアルキルまたはアシル基）を含む態様において、分岐のアルキルまたはアシル基は、少なくとも1~6個の（例えば1、2、3、4、5、6個の、またはそれ以上） C_1 - C_6 アルキル置換基を有する C_{12} - C_{24} のアルキルまたはアシルを含み得る。特定の態様において、分岐のアルキルまたはアシル基は、1~6個（例えば、1、2、3、4、5、6個）の C_1 - C_4 アルキル（例えば、メチル、エチル、プロピル、またはブチル）置換基を有する C_{12} - C_{20} または C_{14} - C_{22} のアルキルまたはアシルを含む。いくつかの態様において、分岐アルキル基はフィタニル成分を含み、分岐アシル基はフィタノイル成分を含む。

20

30

【0122】

好ましい態様において、 R^4 または R^5 の一方に存在する、置換されていてもよい環状アルキル基は、対応する不飽和側鎖中の不飽和部位に位置する。非限定的な例として、 R^4 または R^5 の一方は、1、2、または3個の置換されていてもよい環状アルキル基を含有する C_{18} アルキル基であり、ここで、置換されていてもよい環状アルキル基（例えば、独立に選択されたシクロプロピル基）は、対応するリノレイル成分、リノレニル成分、または γ -リノレニル成分に存在する一つまたは複数の（例えば全ての）不飽和部位に位置する。

40

【0123】

式Iの陽イオン性脂質の代替態様において、 R^4 および R^5 は異なっており、かつ独立に、置換されていてもよい C_1 - C_{24} アルキル、 C_2 - C_{24} アルケニル、 C_2 - C_{24} アルキニル、または C_1 - C_{24} アシルである。特定の態様において、 R^4 または R^5 の一方は、少なくとも1、2、3、4、

50

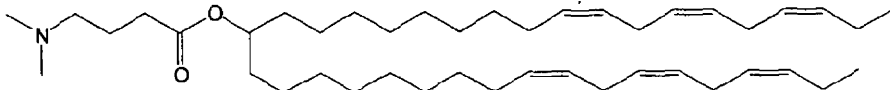
5、または6個の置換されていてもよい環状アルキル基（例えば1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、2~3、2~4、2~5、または2~6個の置換されていてもよい環状アルキル基）を含む。ある態様において、 R^4 および R^5 は異なっており、かつ独立に、置換されていてもよい C_4 - C_{20} アルキル、 C_4 - C_{20} アルケニル、 C_4 - C_{20} アルキニル、または C_4 - C_{20} アシルである。ある場合において、 R^4 は、置換されていてもよい C_{12} - C_{24} アルキル、 C_{12} - C_{24} アルケニル、 C_{12} - C_{24} アルキニル、または C_{12} - C_{24} アシルであり、かつ R^5 は、置換されていてもよい C_4 - C_{10} アルキル、 C_4 - C_{10} アルケニル、 C_4 - C_{10} アルキニル、または C_4 - C_{10} アシルである。他の場合において、 R^4 は、置換されていてもよい C_{12} - C_{20} もしくは C_{14} - C_{22} アルキル、 C_{12} - C_{20} もしくは C_{14} - C_{22} アルケニル、 C_{12} - C_{20} もしくは C_{14} - C_{22} アルキニル、または C_{12} - C_{20} もしくは C_{14} - C_{22} アシルであり、かつ R^5 は、置換されていてもよい C_4 - C_8 もしくは C_6 アルキル、 C_4 - C_8 もしくは C_6 アルケニル、 C_4 - C_8 もしくは C_6 アルキニル、または C_4 - C_8 もしくは C_6 アシルである。ある場合において、 R^4 は、置換されていてもよい C_4 - C_{10} アルキル、 C_4 - C_{10} アルケニル、 C_4 - C_{10} アルキニル、または C_4 - C_{10} アシルであり、かつ R^5 は、置換されていてもよい C_{12} - C_{24} アルキル、 C_{12} - C_{24} アルケニル、 C_{12} - C_{24} アルキニル、または C_{12} - C_{24} アシルである。ある他の場合において、 R^4 は、置換されていてもよい C_4 - C_8 もしくは C_6 アルキル、 C_4 - C_8 もしくは C_6 アルケニル、 C_4 - C_8 もしくは C_6 アルキニル、または C_4 - C_8 または C_6 アシルであり、かつ R^5 は、置換されていてもよい C_{12} - C_{20} もしくは C_{14} - C_{22} アルキル、 C_{12} - C_{20} もしくは C_{14} - C_{22} アルケニル、 C_{12} - C_{20} もしくは C_{14} - C_{22} アルキニル、または C_{12} - C_{20} もしくは C_{14} - C_{22} アシルである。特定の態様において、一つまたは複数の置換されていてもよい環状アルキル基は、 R^4 または R^5 の一方に存在する場合、上記の通りである。

10

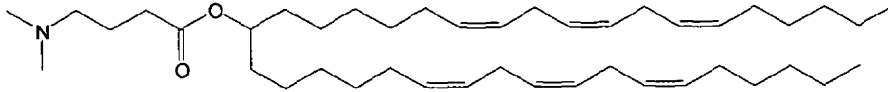
20

【 0 1 2 4 】

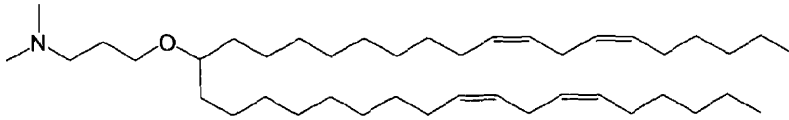
式Iの陽イオン性脂質の態様のいくつかの群において、 R^4 および R^5 は同じであるかまたは異なっており、かつ下記からなる群より独立に選択される：



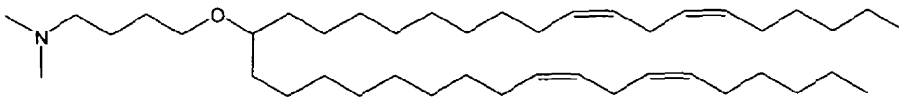
LenMC3 (化合物4)



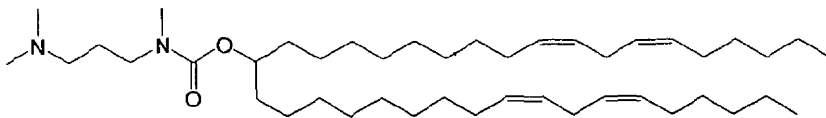
γ-LenMC3 (化合物8)



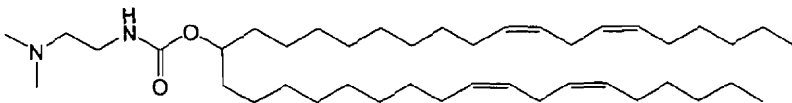
MC3 エーテル (化合物13)



MC4 エーテル (化合物15)



MC3MC (化合物10)

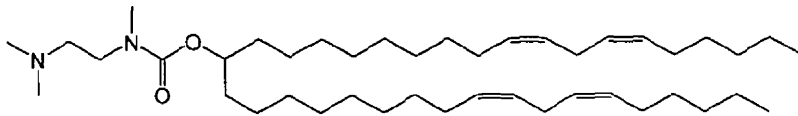


MC2C (化合物12)

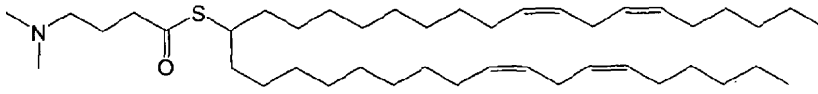
10

20

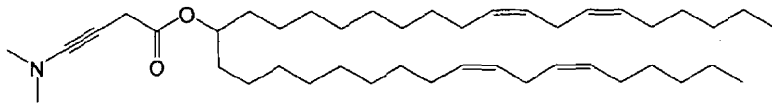
30



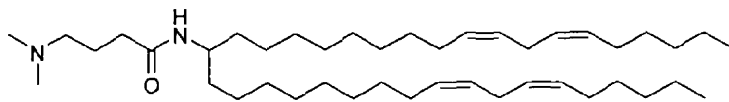
MC2MC (化合物11)



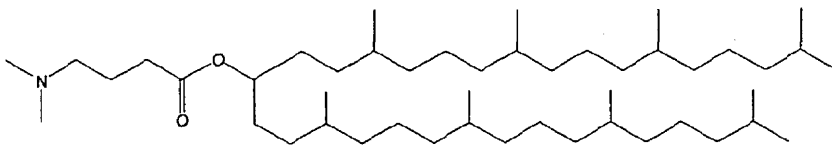
MC3 チオエステル(化合物20)



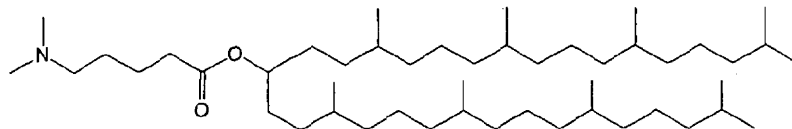
MC3 アルキン(化合物45)



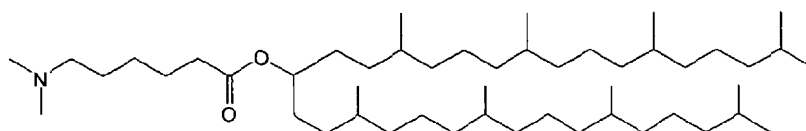
MC3 アミド(化合物16)



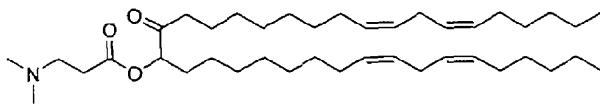
Pan-MC3 (化合物17)



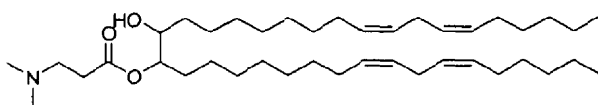
Pan-MC4 (化合物18)



Pan-MC5 (化合物19)



化合物 21



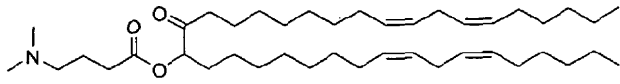
化合物 22

10

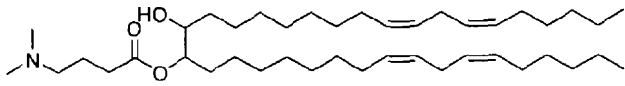
20

30

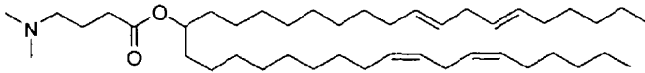
40



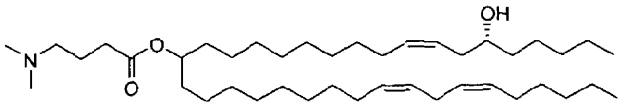
化合物 23



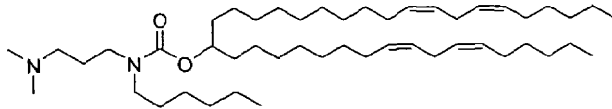
化合物 24



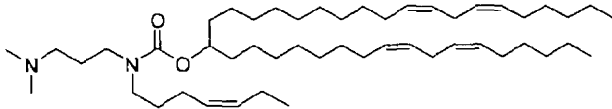
化合物 25



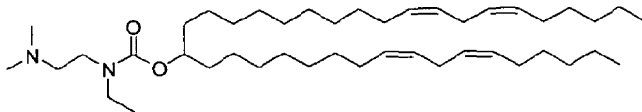
化合物 26



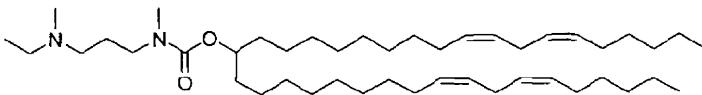
化合物 27



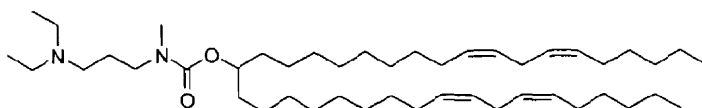
化合物 28



化合物 29



化合物 30



化合物 31

10

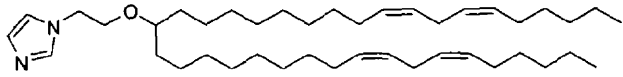
20

30

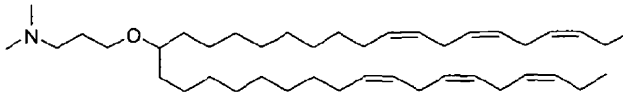
40



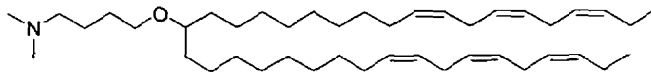
化合物 32



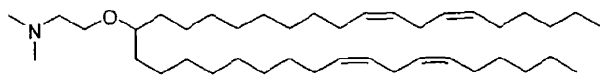
化合物 33



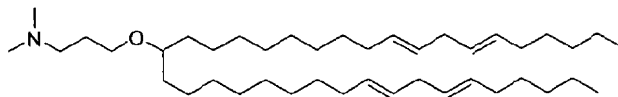
化合物 34



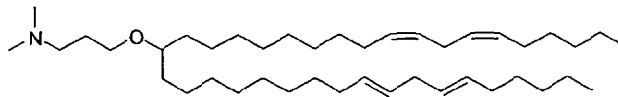
化合物 35



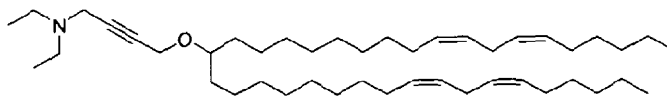
化合物 36



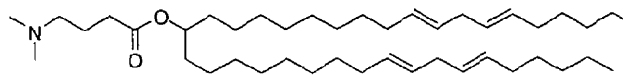
化合物 37



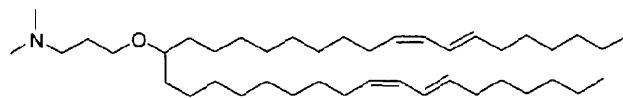
化合物 38



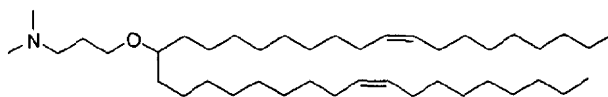
化合物 39



化合物 40



化合物 41



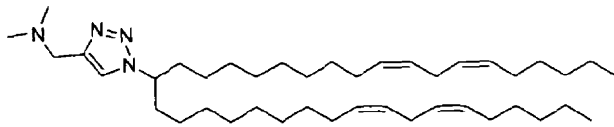
化合物 42

10

20

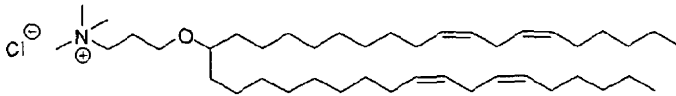
30

40



化合物 43

,または



化合物 44

10

【0129】

本発明の化合物は、実施例に記載された方法を含めた公知の有機合成技法によって調製し得る。いくつかの態様において、本発明の陽イオン性脂質の合成は、保護基の使用を必要とする場合がある。保護基の方法論は、当業者に周知である（例えば、PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, Green, T.W. et. al., Wiley-Interscience, New York City, 1999参照）。簡潔には、本発明の文脈内の保護基は、官能基の望ましくない反応性を低下させるか消失させる任意の基である。保護基は、ある反応中にその反応性をマスクするために官能基に付加され、次に本来の官能基を露出させるために除去することができる。ある場合において、「アルコール保護基」が使用される。「アルコール保護基」は、アルコール官能基の望ましくない反応性を低下させるか消失させる任意の基である。保護基は、当技術分野で周知の技法を使用して付加および除去することができる。

20

【0130】

ある態様において、本発明の陽イオン性脂質は、脂質が、生理学的pHでまたはそれ未満のpH（例えばpH7.4）で正荷電し、かつ第二のpH、好ましくは生理学的pHでまたはそれ以上で中性であるように、少なくとも1個のプロトン化可能基または脱プロトン化可能基を有する。pHの関数としてのプロトンの付加または除去は平衡プロセスであること、および荷電脂質または中性脂質への言及は最も多い種の性質を指すものでありかつ全ての脂質が荷電形態または中性形態で存在する必要はないことが、当業者によって理解されよう。2つ以上のプロトン化可能基または脱プロトン化可能基を有する脂質または両性イオン性（zwitterionic）脂質は、本発明における使用から除外されない。

30

【0131】

ある他の態様において、本発明によるプロトン化可能な脂質は、約4～約11の範囲の pK_a のプロトン化可能基を有する。最も好ましいのは、約4～約7の pK_a であり、なぜならこれらの脂質がより低いpHの製剤化段階で陽イオン性である一方、およそpH7.4の生理学的pHで粒子の表面が（完全にではなくとも）大部分中性化されているからである。この pK_a の利点の一つは、粒子の外表面に結合している少なくとも一部の核酸が生理学的pHでその静電相互作用を喪失し、かつ簡単な透析によって除去され、従って、該粒子のクリアランスに対する感受性が大きく低下することである。

【0132】

IV. 有効成分

有効成分（例えば治療剤）には、細胞、組織、腫瘍、器官、または対象に所望の効果を発揮することのできる任意の分子または化合物が含まれる。そのような効果は、例えば、生物学的、生理学的、および/または化粧料的であり得る。有効成分は、非限定的に、核酸、ペプチド、ポリペプチド、低分子、およびこれらの混合物を含めた任意の種類の分子または化合物であり得る。核酸の非限定的な例には、干渉RNA分子（例えば、siRNA、Dicer基質dsRNA、shRNA、aiRNA、および/またはmiRNAなどのdsRNA）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、プラスミド、リボザイム、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、およびこれらの混合物が含まれる。ペプチドまたはポリペプチドの例には、非限定的に、抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体フラグメント；ヒト化抗体、組み換え抗体、組み換えヒト抗体、および/またはPrimatized（商標）抗体）、サイトカイン、成長因

40

50

子、アポトーシス因子、分化誘導因子、細胞表面レセプターおよびそのリガンド、ホルモン、ならびにその混合物が含まれる。低分子の例には、非限定的に、任意の従来剤または当業者に公知の薬物などの、有機低分子または低分子化合物が含まれる。

【0133】

いくつかの態様において、有効成分は、治療剤、またはその塩もしくは誘導体である。治療剤誘導体は、それ自体治療活性であってもよく、または、さらに修飾されると活性になるプロドラッグであってもよい。したがって一態様において、治療剤誘導体は、未修飾の剤と比べて一部または全ての治療活性を保持し、一方、別の態様において、治療剤誘導体は、治療活性を欠くが、さらに修飾されると活性になるプロドラッグである。

【0134】

好ましい態様において、本明細書記載の脂質粒子は、核酸に結合し、核酸-脂質粒子（例えばSNALP）を生じる。siRNA、Dicer-基質dsRNA、shRNA、aiRNA、miRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、および免疫刺激性オリゴヌクレオチドなどの核酸を選択、合成、および修飾することに関する非限定的な例示的態様は、例えば、米国特許出願公開第20070135372号；米国特許出願公開第20110076335号；および国際公開公報第2010/105372号に記載されており、それらの開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0135】

ある態様において、核酸-脂質粒子（例えばSNALP）の核酸（例えば干渉RNA）構成要素は、少なくとも一つの修飾ヌクレオチド（例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個、またはそれ以上の修飾ヌクレオチド）を含む。ある場合において、核酸（例えば、siRNAなどの干渉RNA）は、非限定的に、2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'F)ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)ヌクレオチド、ロックド核酸(LNA)ヌクレオチド、5-C-メチルヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、2'-アミノヌクレオチド、2'-C-アリルヌクレオチド、およびこれらの混合物を含めた修飾ヌクレオチドを含む。特定の態様において、修飾された干渉RNA（例えば修飾siRNA）は、一般に、対応する未修飾の干渉RNA（例えば未修飾siRNA）配列よりも免疫刺激性が低く、かつ関心対象の標的遺伝子に対するRNAi活性を保持する。いくつかの態様において、修飾された干渉RNA（例えば修飾siRNA）は、2'OMe-グアノシン、2'OMe-ウリジン、2'OMe-アデノシン、および/または2'OMe-シトシンヌクレオチドなどの少なくとも一つの2'OMeプリンヌクレオチドまたは2'OMeピリミジンヌクレオチドを有する。修飾ヌクレオチドは、干渉RNA（例えばsiRNA）の一方の鎖（すなわち、センスまたはアンチセンス）または両方の鎖に存在することができる。いくつかの好ましい態様において、ウリジンおよび/またはグアノシンヌクレオチドの一つまたは複数は、干渉RNA（例えばsiRNA）の一方の鎖（すなわち、センスまたはアンチセンス）または両方の鎖で修飾（例えば2'OMe-修飾）されている。これらの態様において、修飾された干渉RNA（例えば、修飾siRNA）は、さらに、一つまたは複数の修飾（例えば2'OMe-修飾）アデノシンヌクレオチドおよび/または修飾（例えば2'OMe-修飾）シトシンヌクレオチドを含むことができる。他の好ましい態様において、ウリジンおよび/またはグアノシンヌクレオチドだけが、干渉RNA（例えばsiRNA）の一方の鎖（すなわち、センスまたはアンチセンス）または両方の鎖で修飾（例えば2'OMe-修飾）されている。干渉RNA（例えばsiRNA）配列は、オーバーハング（例えば、Elbashir et al., Genes Dev., 15:188 (2001)またはNykaenen et al., Cell, 107:309 (2001)に記載されているような3'または5'オーバーハング）を有してもよく、またはオーバーハングを欠如してもよい（すなわち平滑末端を有する）。干渉RNA（例えばsiRNA）配列は、二本鎖（二重鎖）領域中に、および/または、存在する場合にはオーバーハング（例えば、3'オーバーハング）の一方もしくは両方に、一つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含み得る。

【0136】

核酸-脂質粒子（例えばSNALP）の核酸（例えば干渉RNA）構成要素は、関心対象の遺伝子の翻訳（すなわち発現）を下方調節またはサイレンシングするために使用することがで

10

20

30

40

50

きる。関心対象の遺伝子の非限定的な例には、代謝疾患および代謝障害（例えば、肝臓の疾患または障害）に関連する遺伝子、細胞増殖、腫瘍形成、および/または細胞形質転換（例えば、癌などの細胞増殖障害）に関連する遺伝子、血管新生遺伝子、レセプターリガンド遺伝子、免疫調節因子遺伝子（例えば、炎症応答および自己免疫応答に関連する遺伝子）、ウイルス感染および生存に関連する遺伝子、ならびに神経変性障害に関連する遺伝子が含まれる。例えば、核酸-脂質粒子（例えばSNALP）の核酸（例えば干渉RNA）によって下方調節またはサイレンシングされ得る例示的な標的遺伝子（そのGenbankアクセッション番号を含む）の記載については、米国特許出願公開第20110076335号を参照されたい。

【0137】

腫瘍形成または細胞形質転換に関連する遺伝子配列の非限定的な例には、ポロ様キナーゼ1 (PLK-1)、サイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4)、COP1、リング-ボックス1 (RBX1)、WEE1、Eg5 (KSP、KIF11)、フォークヘッドボックスM1 (FOXM1)、RAM2 (R1、CDCA7L)、XIAP、CSN5 (JAB1)、およびHDAC2が含まれる。代謝疾患および代謝障害に関連する遺伝子配列の非限定的な例には、アポリポタンパク質B (APOB)、アポリポタンパク質CIII (APOC3)、アポリポタンパク質E (APOE)、プロタンパク質転換酵素スプチリシン/ケキシン (kexin) 9型 (PCSK9)、ジアシルグリセロール0-アシルトランスフェラーゼ1型 (DGAT1)、およびジアシルグリセロール0-アシルトランスフェラーゼ2型 (DGAT2) が含まれる。ウイルス感染および生存に関連する遺伝子配列の非限定的な例には、組織因子 (TF) などの宿主因子またはエボラウイルスおよびマールブルグウイルスなどのフィロウイルス由来核酸配列（例えば、VP30、VP35、核タンパク質 (NP)、ポリメラーゼタンパク質 (L-pol)、VP40、糖タンパク質 (GP)、およびVP24)；ラッサウイルス（例えば、NP、GP、L、および/またはZ遺伝子）、フニン (Junin) ウイルス、マチュポ (Machupo) ウイルス、グアナリト (Guanarito) ウイルス、およびサビア (Sabia) ウイルスなどのアレナウイルス；A、B、C、D、およびE型肝炎ウイルスなどの肝炎ウイルス；A、B、およびC型インフルエンザ (Influenza) ウイルスなどのインフルエンザウイルス；ヒト免疫不全ウイルス (HIV)；ヘルペス (Herpes) ウイルス；ならびにヒトパピローマ (Human Papilloma) ウイルス (HPV) 由来の核酸配列が含まれる。

【0138】

他の態様において、本発明の脂質粒子に結合する有効成分は、一つまたは複数の治療用タンパク質、ポリペプチド、または有機低分子もしくは低分子化合物を含み得る。そのような治療上有効な剤または薬物の非限定的な例には、腫瘍薬（例えば、化学療法薬、ホルモン療法剤、免疫療法剤、放射線療法剤等）、高脂血症治療薬、抗ウイルス薬、抗炎症性化合物、抗うつ薬、刺激薬、鎮痛薬、抗生物質、避妊薬、解熱薬、血管拡張薬、血管新生阻害薬、細胞血管剤、シグナル伝達阻害薬、抗不整脈剤などの心臓血管薬、ホルモン、血管収縮薬、およびステロイドが含まれる。これらの有効成分は、本発明の脂質粒子に入れて単独で、または干渉RNAなどの核酸を含む本発明の脂質粒子と組み合わせて（例えば同時投与）投与し得る。これらの種類の有効成分の非限定的な例は、例えば、米国特許出願公開第20110076335号に記載されており、その開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0139】

V. 脂質粒子

ある局面において、本発明は、本明細書記載の一つまたは複数の陽イオン性（アミノ）脂質またはその塩を含む脂質粒子を提供する。いくつかの態様において、本発明の脂質粒子は、さらに、一つまたは複数の非陽イオン性脂質を含む。他の態様において、脂質粒子は、さらに、粒子の凝集を減少することまたは阻害することが可能な一つまたは複数の結合脂質を含む。さらなる態様において、脂質粒子は、さらに、治療用核酸（例えば、siRNAなどの干渉RNA）などの一つまたは複数の有効成分または治療剤を含む。

【0140】

脂質粒子には、非限定的に、リポソームなどの脂質小胞が含まれる。本明細書で使用される脂質小胞には、水性の内部を密閉する脂質含有膜を有する構造が含まれる。特定の態

10

20

30

40

50

様では、本明細書記載の一つまたは複数の陽イオン性脂質を含む脂質小胞は、脂質小胞内に核酸を封入するために使用される。他の態様では、本明細書記載の一つまたは複数の陽イオン性脂質を含む脂質小胞は、核酸と複合体を形成してリボプレックスを形成する。

【0141】

本発明の脂質粒子は、典型的には、活性剤または治療剤、陽イオン性脂質、非陽イオン性脂質、および粒子の凝集を阻害する結合脂質を含む。いくつかの態様では、活性剤または治療剤は、脂質粒子中の活性剤または治療剤が水溶液中で例えばヌクレアーゼまたはプロテアーゼによる酵素的分解に耐性であるように、脂質粒子の脂質部分内に完全に封入される。他の態様では、本明細書記載の脂質粒子は、ヒトなどの哺乳動物に対して実質的に無毒である。本発明の脂質粒子は、典型的には、約30nm～約150nm、約40nm～約150nm、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、または約70～約90nmの平均直径を有する。本発明の脂質粒子は、また典型的には、約1：1～約100：1、約1：1～約50：1、約2：1～約25：1、約3：1～約20：1、約5：1～約15：1、または約5：1～約10：1の脂質：治療剤（例えば脂質：核酸）比（質量/質量比）を有する。

10

【0142】

好ましい態様では、本発明の脂質粒子は、干渉RNA（例えば、siRNAなどのdsRNA、ダイサー基質dsRNA、shRNA、aiRNA、および/またはmiRNA）、陽イオン性脂質（例えば、一つまたは複数の本明細書に示される式Iの陽イオン性脂質またはその塩）、非陽イオン性脂質（例えば一つまたは複数のリン脂質とコレステロールとの混合物）、および粒子の凝集を阻害する結合脂質（例えば一つまたは複数のPEG-脂質コンジュゲート）を含む、血清安定性の核酸-脂質粒子（SNALP）である。SNALPは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の未修飾および/または修飾干渉RNA分子（例えばsiRNA）を含みうる。核酸-脂質粒子およびその調製方法は、例えば米国特許第5,753,613号；同第5,785,992号；同第5,705,385号；同第5,976,567号；同第5,981,501号；同第6,110,745号；および同第6,320,017号；ならびに国際公開公報第96/40964号に記載されており、それらの開示は、それぞれ全ての目的のために全体として参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0143】

本発明の核酸-脂質粒子において、核酸は粒子の脂質部分内に完全に封入されており、このことによって、核酸をヌクレアーゼ分解から保護することができる。好ましい態様では、干渉RNAなどの核酸を含むSNALPは粒子の脂質部分内に完全に封入されており、このことによって、核酸をヌクレアーゼ分解から保護する。場合によっては、SNALP中の核酸は、37℃で少なくとも約20、30、45、または60分間粒子をヌクレアーゼに曝露した後に、実質的に分解されない。ある他の場合には、SNALP中の核酸は、血清中で粒子を37℃で少なくとも約30、45、もしくは60分間または少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、もしくは36時間インキュベーションした後に実質的に分解されない。他の態様では、核酸は、粒子の脂質部分と複合体を形成している。本発明の製剤の利点の一つは、核酸-脂質粒子組成物が、ヒトなどの哺乳動物に対して実質的に無毒なことである。

30

【0144】

「完全に封入された」という用語は、核酸-脂質粒子中の核酸が、遊離のDNAまたはRNAを著しく分解しうる血清またはヌクレアーゼアッセイへの曝露の後に有意には分解されないことを示す。完全に封入された系では、通常は、遊離核酸の100%が分解されうる処理において、粒子中の核酸の好ましくは約25%未満が分解され、さらに好ましくは粒子中の核酸の約10%未満、最も好ましくは約5%未満が分解される。「完全に封入された」とはまた、核酸-脂質粒子が血清安定性であること、すなわち、インビボ投与直後に迅速に分解されてその構成成分になることがないことも示す。

40

【0145】

核酸の文脈において、完全な封入は、核酸と結合した場合に増幅された蛍光を発する色素を使用する膜不透過性蛍光色素排除アッセイを行うことによって判定することができる。OliGreen（登録商標）およびRiboGreen（登録商標）（Invitrogen Corp.；Carlsbad, CA）

50

A) のような特異的色素が、プラスミドDNA、一本鎖デオキシリボヌクレオチド、および/または一本鎖もしくは二本鎖のリボヌクレオチドの定量のために利用可能である。封入は、リポソーム製剤に色素を添加する工程、得られた蛍光を測定する工程、およびそれを、少量の非イオン性界面活性剤を添加したときに観察される蛍光と比較する工程によって判定される。リポソーム二重層の界面活性剤介在性破壊によって、封入された核酸が放出され、それにより、膜不透過性色素との相互作用が可能になる。核酸封入は、 $E=(I_0-I)/I_0$ として計算することができ、式中、 I および I_0 は、界面活性剤添加前後の蛍光強度を表す (Wheeler et al., Gene Ther., 6:271-281 (1999) を参照されたい)。

【0146】

他の態様では、本発明は、複数の核酸-脂質粒子を含む核酸-脂質粒子 (例えばSNALP) 組成物を提供する。

10

【0147】

いくつかの場合には、SNALP組成物は、粒子の約30%~約100%、約40%~約100%、約50%~約100%、約60%~約100%、約70%~約100%、約80%~約100%、約90%~約100%、約30%~約95%、約40%~約95%、約50%~約95%、約60%~約95%、約70%~約95%、約80%~約95%、約85%~約95%、約90%~約95%、約30%~約90%、約40%~約90%、約50%~約90%、約60%~約90%、約70%~約90%、約80%~約90%、または少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99% (またはその任意の割合もしくはその中の範囲) の内部に核酸が封入されるように、粒子の脂質部分内に完全に封入された核酸を含む。

20

【0148】

他の場合では、SNALP組成物は、投入核酸の約30%~約100%、約40%~約100%、約50%~約100%、約60%~約100%、約70%~約100%、約80%~約100%、約90%~約100%、約30%~約95%、約40%~約95%、約50%~約95%、約60%~約95%、約70%~約95%、約80%~約95%、約85%~約95%、約90%~約95%、約30%~約90%、約40%~約90%、約50%~約90%、約60%~約90%、約70%~約90%、約80%~約90%、または少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99% (またはその任意の割合もしくはその中の範囲) が粒子中に封入されるように、粒子の脂質部分内に完全に封入された核酸を含む。

30

【0149】

本発明の脂質粒子の意図される使用に応じて、構成要素の比率を変動させることができ、特定の製剤の送達効率は、例えば、エンドソーム放出パラメーター (ERP) アッセイを用いて測定することができる。

【0150】

特定の態様において、本発明は、本明細書記載の複数の脂質粒子および抗酸化剤を含む脂質粒子 (例えばSNALP) 組成物を提供する。ある場合において、脂質粒子組成物中の抗酸化剤は、脂質粒子中に存在する陽イオン性脂質 (例えば、多価不飽和陽イオン性脂質) の分解を減少、抑制、および/または阻害する。有効成分が干渉RNA (例えばsiRNA) などの治療用核酸である場合、脂質粒子組成物中の抗酸化剤は、例えば、陽イオン性脂質の酸化を減少、抑制、および/もしくは阻害することによって、核酸ペイロードの分解を減少、抑制、および/もしくは阻害することによって、ホスホロチオエート (PS) 修飾核酸ペイロードの脱硫を減少、抑制、および/もしくは阻害することによって、ならびに/または脂質および核酸構成要素の両方を安定化することによって、核酸ペイロードの分解を減少、抑制、および/または阻害する。

40

【0151】

抗酸化剤の例には、非限定的に、金属キレート剤 (例えば、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、クエン酸塩等)、一次抗酸化剤 (例えば、 α -トコフェロールまたはその塩などのビタミンE異性体、ブチルヒドロキシアニソール (BHA)、ブチルヒドロキシトルエン (BHT)、tert-ブチルヒドロキノン (TBHQ) 等)、二次抗酸化剤 (例えば、アスコルビン酸、パルミチン酸アスコルビル、システイン、グルタチオン、 α -リポ酸等)、その塩、お

50

よびこれらの混合物が含まれる。必要であれば、抗酸化剤は、典型的には脂質粒子中に存在する陽イオン性脂質および/または有効成分の分解を抑制、阻害、および/または減少させるために十分な量で存在する。特定の態様において、抗酸化剤は、EDTAあるいはその塩（例えば、約20mM～約100mM）を、単独で、あるいは -トコフェロールもしくはその塩（例えば、約0.02mol%～約0.5mol%）などの一次抗酸化剤および/またはパルミチン酸アスコルビルもしくはその塩（例えば、約0.02mol%～約5.0mol%）などの二次抗酸化剤と組み合わせる。EDTAなどの抗酸化剤は、第VI節に記載された脂質粒子形成プロセスにおける任意の工程または複数の工程（例えば、脂質粒子の形成の前、途中、および/または後）で含ませることができる。

【0152】

脂質粒子中に存在する陽イオン性脂質および/または有効成分（例えば治療用核酸）の分解を抑制する方法、これらの方法によって安定化された脂質粒子を含む組成物、これらの脂質粒子の製造方法、ならびにこれらの脂質粒子を送達および/または投与する方法に関するさらなる態様は、2010年12月1日出願されたPCT出願番号第PCT/CA2010/001919号に記載されており、その開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0153】

一局面において、本発明の脂質粒子は、ターゲティング脂質を含み得る。いくつかの態様において、ターゲティング脂質は、GalNAc成分（すなわちN-ガラクトサミン成分）を含む。非限定的な例として、GalNAc成分を含むターゲティング脂質は、2008年12月4日出願された米国特許出願第12/328,669号に記載された脂質を含むことができ、その開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。ターゲティング脂質は、また、例えば、米国特許出願第12/328,669号または国際公開公報第2008/042973号（それらの各々の内容は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる）に記載されたような当技術分野で公知の任意の他の脂質（例えばターゲティング脂質）を含むことができる。いくつかの態様において、ターゲティング脂質は、複数のGalNAc成分、例えば、2または3個のGalNAc成分を含む。いくつかの態様において、ターゲティング脂質は、複数の、例えば、2または3個のN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）成分を含有する。いくつかの態様において、ターゲティング脂質中の脂質は、1,2-ジ-O-ヘキサデシル-sn-グリセリド（すなわちDSG）である。いくつかの態様において、ターゲティング脂質は、PEG成分（例えば、約1000Da、1500Da、2000Daまたはそれ以上などの、少なくとも約500Daの分子量を有するPEG成分）を含み、例えば、ターゲティング成分は、PEG成分を介して脂質に結合している。GalNAcターゲティング脂質の例には、非限定的に、(GalNAc)₃-PEG-DSG、(GalNAc)₃-PEG-LCO、およびこれらの混合物が含まれる。

【0154】

いくつかの態様において、ターゲティング脂質は葉酸成分を含む。例えば、葉酸成分を含むターゲティング脂質は、米国特許出願第12/328,669号に記載された脂質を含むことができ、その開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。葉酸ターゲティング脂質の例には、非限定的に、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[葉酸(ポリエチレングリコール)-2000]（アンモニウム塩）（葉酸-PEG-DSPE）、葉酸-PEG2000-DSG、葉酸-PEG3400-DSG、およびこれらの混合物が含まれる。

【0155】

別の局面において、本発明の脂質粒子は、さらに、一つまたは複数のアポリポタンパク質を含み得る。本明細書に使用するときの「アポリポタンパク質」または「リポタンパク質」という用語は、当業者に公知のアポリポタンパク質ならびにその変異体および断片を、および例えば国際公開公報第2010/0088537号に記載されたアポリポタンパク質アゴニスト、そのアナログまたは断片を指し、その開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。適切なアポリポタンパク質には、非限定的に、ApoA-I、ApoA-II、ApoA-IV、ApoA-V、およびApoE（例えば、ApoE2、ApoE3等）、および活性多形、

10

20

30

40

50

アイソフォーム、変異体、および突然変異体、ならびにその断片または切断型が含まれる。単離されたApoEならびに/またはその組換え産生された形態を含むその活性断片およびポリペプチドアナログは、米国特許第5,672,685号；第5,525,472号；第5,473,039号；第5,182,364号；第5,177,189号；第5,168,045号；および第5,116,739号に記載されており、それらの開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0156】

A. 陽イオン性脂質

本明細書に示される式Iの新規な陽イオン性脂質またはその塩のいずれも、単独または一つもしくは複数の他の陽イオン性脂質種もしくは非陽イオン性脂質種との組み合わせのいずれかで、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）において使用可能である。

10

【0157】

本発明の脂質粒子中に同様に含まれ得る他の陽イオン性脂質またはその塩には、非限定的に、2011年3月31日に出願された米国特許出願第13/077,856号に記載された式I~XXIIの陽イオン性脂質もしくはその塩の一つもしくは複数、2010年12月1日に出願されたPCT出願番号第PCT/CA2010/001919号に記載された式I~XIXの陽イオン性脂質もしくはその塩の一つもしくは複数、および/または2011年5月12日に出願された「新規な環状陽イオン性脂質およびその使用方法 ("Novel Cyclic Cationic Lipids and Methods of Use Thereof")」と題する、代理人整理番号86399-010110PC(805953)および/または参照番号N.114015 PJ C/JRNを有するPCT出願番号第PCT/GB2011/_____に記載された式I~IIIの陽イオン性脂質またはその塩の一つまたは複数が含まれ、それらの開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。さらなる適切な陽イオン性脂質の非限定的な例には、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLinDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLenDMA)、2,2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1,3]-ジオキサラン (DLin-K-C2-DMA；「XTC2」または「C2K」)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキサラン (DLin-K-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-(3-ジメチルアミノプロピル)-[1,3]-ジオキサラン (DLin-K-C3-DMA；「C3K」)、2,2-ジリノレイル-4-(4-ジメチルアミノブチル)-[1,3]-ジオキサラン (DLin-K-C4-DMA；「C4K」)、2,2-ジリノレイル-5-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキサラン (DLin-K6-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-N-メチルペピアジノ (methylpepiazzino)-[1,3]-ジオキサラン (DLin-K-MPZ)、2,2-ジオレオイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキサラン (DO-K-DMA)、2,2-ジステアロイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキサラン (DS-K-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-N-モルホリノ-[1,3]-ジオキサラン (DLin-K-MA)、2,2-ジリノレイル-4-トリメチルアミノ-[1,3]-ジオキサランクロリド (DLin-K-TMA.Cl)、2,2-ジリノレイル-4,5-ビス(ジメチルアミノメチル)-[1,3]-ジオキサラン (DLin-K²-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-メチルピペラジン (methylpiperzine)-[1,3]-ジオキサラン (D-Lin-K-N-メチルピペラジン)、DLen-C2K-DMA、-DLen-C2K-DMA、DPan-C2K-DMA、DPan-C3K-DMA、DLen-C2K-DMA、-DLen-C2K-DMA、DPan-C2K-DMA、TLinDMA、C2-TLinDMA、C3-TLinDMA、1,2-ジ- -リノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(-DLenDMA)、1,2-ジリノレイルオキシ-(N,N-ジメチル)-ブチル-4-アミン(C2-DLinDMA)、1,2-ジリノレオイルオキシ-(N,N-ジメチル)-ブチル-4-アミン(C2-DLinDAP)、ジリノレイルメチル-3-ジメチルアミノプロピオネート (DLin-M-C2-DMA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート (DLin-M-C3-DMAまたは「MC3」；ジリノレイルメチル4-(ジメチルアミノ)ブタノエートとも呼ばれる)、CP-LenMC3、CP- -LenMC3、CP-MC3、CP-DLen-C2K-DMA、CP- DLen-C2K-DMA、CP-C2K-DMA、CP-DODMA、CP-DPetroDMA、CP-DLinDMA、CP-DLenDMA、CP- DLenDMA、そのアナログ、その塩、およびこれらの混合物が含まれる。

20

30

40

【0158】

なおさらなる陽イオン性脂質の例には、非限定的に、1,2-ジオエイルカルバモイルオキシ (dioeylcarbamoxyloxy)-3-ジメチルアミノプロパン (DO-C-DAP)、1,2-ジミリストレオイル-3-ジメチルアミノプロパン (DMDAP)、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアミノプロ

50

パンクロリド (DOTAP.Cl)、1,2-ジリノレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-C-DAP)、1,2-ジリノレイオキシ(dilinoleyoxy)-3-(ジメチルアミノ)アセトキシプロパン (DLin-DAC)、1,2-ジリノレイオキシ-3-モルホリノプロパン (DLin-MA)、1,2-ジリノレオイル-3-ジメチルアミノプロパン (DLinDAP)、1,2-ジリノレイルチオ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-S-DMA)、1-リノレオイル-2-リノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-2-DMAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパン塩化物塩 (DLin-TMA.Cl)、1,2-ジリノレオイル-3-トリメチルアミノプロパン塩化物塩 (DLin-TAP.Cl)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(N-メチルピペラジノ)プロパン (DLin-MPZ)、3-(N,N-ジリノレイルアミノ)-1,2-プロパンジオール (DLinAP)、3-(N,N-ジオレイルアミノ)-1,2-プロパンジオ (propanedio) (DOAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(2-N,N-ジメチルアミノ)エトキシプロパン (DLin-EG-DMA)、3-ジメチルアミノ-2-(コレスタ-5-エン-3- -オキシブタン-4-オキシ)-1-(cis,cis-9,12-オクタデカジエノキシ)プロパン (CLinDMA)、2-[5'-(コレスタ-5-エン-3- -オキシ)-3'-オキサペントキシ]-3-ジメチ(dim ethy)-1-(cis,cis-9',1-2'-オクタデカジエノキシ)プロパン (CpLinDMA)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン (DMOBA)、1,2-N,N'-ジレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DOcarbDAP)、1,2-N,N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLincarbDAP)、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド (DO DAC)、1,2-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DODMA)、1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DSDMA)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムプロミド (DDAB)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP)、3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール (DC-Chol)、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド (DMRIE)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スペルミン-カルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA)、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン (DOGS)、そのアナログ、その塩およびこれらの混合物が含まれる。

10

20

30

40

50

【0159】

いくつかの態様において、さらなる陽イオン性脂質は、一つまたは複数の陰イオンと共に塩(好ましくは結晶塩)を形成する。特定の一態様において、さらなる陽イオン性脂質は、そのシュウ酸(例えばヘミシュウ酸)塩であり、これは好ましくは結晶塩である。

【0160】

DLinDMAおよびDLenDMAなどの陽イオン性脂質、ならびにさらなる陽イオン性脂質の合成は、米国特許出願公開第20060083780号に記載されており、その開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0161】

DLin-K-C2-DMA、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLin-K6-DMA、DLin-K-MPZ、DO-K-DMA、DS-K-DMA、DLin-K-MA、DLin-K-TMA.Cl、DLin-K²-DMA、D-Lin-K-N-メチルピペラジン、DLin-M-C2-DMA、DO-C-DAP、DMDAP、およびDOTAP.Clなどの陽イオン性脂質、ならびにさらなる陽イオン性脂質の合成は、国際公開公報第2010/042877号に記載されており、その開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0162】

DLin-K-DMA、DLin-C-DAP、DLinDAC、DLinMA、DLinDAP、DLin-S-DMA、DLin-2-DMAP、DLinTMA.Cl、DLinTAP.Cl、DLinMPZ、DLinAP、DOAP、およびDLin-EG-DMAなどの陽イオン性脂質、ならびにさらなる陽イオン性脂質の合成は、国際公開公報第09/086558号に記載されており、その開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0163】

-DLenDMA、DLen-C2K-DMA、 -DLen-C2K-DMA、DPan-C2K-DMA、DPan-C3K-DMA、DLen-C2K-DMA、 -DLen-C2K-DMA、DPan-C2K-DMA、TLinDMA、C2-TLinDMA、C3-TLinDMA、C2-DLinDM

A、およびC2-DLinDAPなどの陽イオン性脂質、ならびにさらなる陽イオン性脂質の合成は、国際公開公報第2011/000106号に記載されており、その開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0164】

CP-LenMC3、CP- -LenMC3、CP-MC3、CP-DLen-C2K-DMA、CP- DLen-C2K-DMA、CP-C2K-DMA、CP-DODMA、CP-DPetroDMA、CP-DLinDMA、CP-DLenDMA、およびCP- DLenDMAなどの陽イオン性脂質の合成は、2011年5月12日に出願された「新規な環状陽イオン性脂質およびその使用方法 ("Novel Cyclic Cationic Lipids and Methods of Use Thereof") 」と題する、代理人整理番号86399-010110PC (805953) および/または参照番号N.114015 PJC/JRNを有するPCT出願番号第PCT/GB2011/_____に記載されており、その開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

10

【0165】

CLinDMAなどの陽イオン性脂質、およびさらなる陽イオン性脂質の合成は、米国特許出願公開第20060240554号に記載されており、その開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0166】

いくつかの他の陽イオン性脂質および関係するアナログの合成は、米国特許第5,208,036号；第5,264,618号；第5,279,833号；第5,283,185号；第5,753,613号；および第5,785,992号；および国際公開公報第96/10390号に記載されており、それらの開示は、それぞれ、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。追加的に、例えば、LIPOFECTIN (登録商標) (DOTMAおよびDOPEを含む、GIBCO/BRLから入手可能)；LIPOFECTAMINE (登録商標) (DOSPAおよびDOPEを含む、GIBCO/BRLから入手可能)；およびTRANSFECTAM (登録商標) (DOGSを含む、Promega Corp.から入手可能)などのいくつかの陽イオン性脂質の市販調製物を使用することができる。

20

【0167】

本発明の脂質粒子での使用に適したさらなる陽イオン性脂質の合成は、国際公開公報第2010/054401号、同第2010/054405号、同第2010/054406号、同第2010/054384号、および同第2010/144740号；米国特許出願公開第20090023673号；ならびに2009年12月18日に出願された「核酸の送達のための方法および組成物 ("Methods and Compositions for Delivery of Nucleic Acids") 」と題する、米国仮特許出願第61/287,995号に記載されており、それらの開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

30

【0168】

いくつかの態様において、陽イオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約45mol% ~ 約90mol%、約45mol% ~ 約85mol%、約45mol% ~ 約80mol%、約45mol% ~ 約75mol%、約45mol% ~ 約70mol%、約45mol% ~ 約65mol%、約45mol% ~ 約60mol%、約45mol% ~ 約55mol%、約50mol% ~ 約90mol%、約50mol% ~ 約85mol%、約50mol% ~ 約80mol%、約50mol% ~ 約75mol%、約50mol% ~ 約70mol%、約50mol% ~ 約65mol%、約50mol% ~ 約60mol%、約55mol% ~ 約65mol%または約55mol% ~ 約70mol% (またはその任意の割合もしくはその中の範囲)を構成する。

【0169】

ある好ましい態様において、陽イオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約50mol% ~ 約58mol%、約51mol% ~ 約59mol%、約51mol% ~ 約58mol%、約51mol% ~ 約57mol%、約52mol% ~ 約58mol%、約52mol% ~ 約57mol%、約52mol% ~ 約56mol%、または約53mol% ~ 約55mol% (またはその任意の割合もしくはその中の範囲)を構成する。特定の態様において、陽イオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約50mol%、51mol%、52mol%、53mol%、54mol%、55mol%、56mol%、57mol%、58mol%、59mol%、60mol%、61mol%、62mol%、63mol%、64mol%、または65mol% (またはその任意の割合もしくはその中の範囲)を構成する。他の態様において、陽イオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の(少なくとも)約66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、または90mol% (またはその任意の割合もしくはその中

40

50

の範囲)を構成する。

【0170】

さらなる態様において、陽イオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約2mol%～約60mol%、約5mol%～約50mol%、約10mol%～約50mol%、約20mol%～約50mol%、約20mol%～約40mol%、約30mol%～約40mol%、または約40mol%(またはその任意の割合もしくはその中の範囲)を構成する。

【0171】

本発明の脂質粒子での使用に適した陽イオン性脂質のさらなるパーセンテージおよび範囲は、国際公開公報第09/127060号、米国特許出願公開第20110071208号、および米国特許出願公開第20110076335号に記載されており、それらの開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

10

【0172】

本発明の脂質粒子中に存在する陽イオン性脂質のパーセンテージが目標量であること、および製剤中に存在する陽イオン性脂質の実際量が例えば $\pm 5\text{mol}\%$ 変動する場合があることを理解すべきである。例えば、1:57脂質粒子(例えばSNALP)製剤において、陽イオン性脂質の目標量は57.1mol%であるが、陽イオン性脂質の実際量は、その目標量の $\pm 5\text{mol}\%$ 、 $\pm 4\text{mol}\%$ 、 $\pm 3\text{mol}\%$ 、 $\pm 2\text{mol}\%$ 、 $\pm 1\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.75\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.5\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.25\text{mol}\%$ 、または $\pm 0.1\text{mol}\%$ であり得、製剤の残りは、他の脂質構成要素で構成されている(合計すると粒子中に存在する全脂質の100mol%になる)。同様に、7:54脂質粒子(例えばSNALP)製剤において、陽イオン性脂質の目標量は54.06mol%であるが、陽イオン性脂質の実際量は、目標量の $\pm 5\text{mol}\%$ 、 $\pm 4\text{mol}\%$ 、 $\pm 3\text{mol}\%$ 、 $\pm 2\text{mol}\%$ 、 $\pm 1\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.75\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.5\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.25\text{mol}\%$ 、または $\pm 0.1\text{mol}\%$ であり得、製剤の残りは、他の脂質構成要素で構成されている(合計すると粒子中に存在する全脂質の100mol%になる)。

20

【0173】

B. 非陽イオン性脂質

本発明の脂質粒子(例えばSNALP)に使用される非陽イオン性脂質は、安定な複合体を生成することができる任意の様々な中性非荷電性、双性イオン性、または陰イオン性脂質でありうる。

【0174】

非陽イオン性脂質の非限定的な例には、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン(ESM)、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、リン酸ジセチル、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルコリン(POPC)、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(POPE)、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルグリセロール(POPG)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート(DOPE-mal)、ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン(DMPE)、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、モノメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジェラドイル-ホスファチジルエタノールアミン(DEPE)、ステアロイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(SOPE)、リゾホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルコリン、およびそれらの混合物などのリン脂質が含まれる。他のリン脂質であるジアシルホスファチジルコリンおよびジアシルホスファチジルエタノールアミンもまた使用することができる。これらの脂質のアシル基は、好ましくは、 C_{10} - C_{24} 炭素鎖を有する脂肪酸由来のアシル基、例えば、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、またはオレオイルである。

30

40

50

【0175】

非陽イオン性脂質の追加的な例には、コレステロールなどのステロールおよびその誘導体が含まれる。コレステロール誘導体の非限定的な例には、5 β -コlestanoール、5 α -コprostanoール、コレステリル-(2'-ヒドロキシ)-エチルエーテル、コレステリル-(4'-ヒドロキシ)-ブチルエーテル、および6-ケトコlestanoールなどの極性アナログ；5 β -コlestanoール、コレステノン、5 α -コlestanoール、5 β -コlestanoール、およびコレステリルデカノエートなどの非極性アナログ；ならびにそれらの混合物が含まれる。好ましい態様では、コレステロール誘導体は、コレステリル-(4'-ヒドロキシ)-ブチルエーテルなどの極性アナログである。コレステリル-(2'-ヒドロキシ)-エチルエーテルの合成は、国際公開公報第09/127060号に記載されており、その開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる。

10

【0176】

いくつかの態様では、脂質粒子（例えばSNALP）中に存在する非陽イオン性脂質は、一つまたは複数のリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含むか、またはそれから成る。他の態様では、脂質粒子（例えばSNALP）中、例えばコレステロール不含の脂質粒子製剤中に存在する非陽イオン性脂質は、一つまたは複数のリン脂質を含むか、またはそれから成る。さらに他の態様では、脂質粒子（例えばSNALP）中、例えばリン脂質不含の脂質粒子製剤中に存在する非陽イオン性脂質は、コレステロールまたはその誘導体を含むか、またはそれから成る。

【0177】

本発明における使用に適する非陽イオン性脂質の他の例には、例えば、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、アセチルパルミテート、グリセロールリシンオレエート、ヘキサデシルステアレート、イソプロピルミリステート、両性アクリルポリマー、トリエタノールアミン-ラウリルスルフェート、アルキル-アリールスルフェートポリエチルオキシ化脂肪酸アミド、ジオクタデシルジメチルアンモニウムブロミド、セラミド、スフィンゴミエリンなどのリン不含の脂質が含まれる。

20

【0178】

いくつかの態様では、非陽イオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約10mol%～約60mol%、約20mol%～約55mol%、約20mol%～約45mol%、約20mol%～約40mol%、約25mol%～約50mol%、約25mol%～約45mol%、約30mol%～約50mol%、約30mol%～約45mol%、約30mol%～約40mol%、約35mol%～約45mol%、約37mol%～約42mol%、または約35mol%、36mol%、37mol%、38mol%、39mol%、40mol%、41mol%、42mol%、43mol%、44mol%、もしくは45mol%（またはその任意の割合もしくはその中の範囲）を構成する。

30

【0179】

脂質粒子がリン脂質とコレステロールまたはコレステロール誘導体との混合物を含有する態様では、混合物は、粒子中に存在する全脂質の最大約40mol%、45mol%、50mol%、55mol%、または60mol%を構成しうる。

【0180】

いくつかの態様において、混合物中のリン脂質構成要素は、粒子中に存在する全脂質の約2mol%～約20mol%、約2mol%～約15mol%、約2mol%～約12mol%、約4mol%～約15mol%、または約4mol%～約10mol%（またはその任意の割合もしくはその中の範囲）を構成し得る。ある好ましい態様において、混合物中のリン脂質構成要素は、粒子中に存在する全脂質の約5mol%～約10mol%、約5mol%～約9mol%、約5mol%～約8mol%、約6mol%～約9mol%、約6mol%～約8mol%、または約5mol%、6mol%、7mol%、8mol%、9mol%、もしくは10mol%（またはその任意の割合もしくはその中の範囲）を構成する。非限定的な例として、リン脂質とコレステロールとの混合物を含む1:57脂質粒子製剤は、粒子中に存在する全脂質の約7mol%（またはその任意の割合）のDPPCまたはDSPCなどのリン脂質を、例えば約34mol%（またはその任意の割合）のコレステロールまたはコレステロール誘導体と混合して含み得る。別の非限定的な例として、リン脂質とコレステロールとの混合物を含む7:54脂質粒子製剤は、約7mol%（またはその任意の割合）のDPPCまたはDSPCなど

40

50

のリン脂質を、例えば粒子中に存在する全脂質の約32mol%（またはその任意の割合）のコレステロールまたはコレステロール誘導体と混合して含み得る。

【0181】

他の態様において、混合物中のコレステロール構成要素は、粒子中に存在する全脂質の約25mol%～約45mol%、約25mol%～約40mol%、約30mol%～約45mol%、約30mol%～約40mol%、約27mol%～約37mol%、約25mol%～約30mol%、または約35mol%～約40mol%（またはその任意の割合もしくはその中の範囲）を構成し得る。ある好ましい態様において、混合物中のコレステロール構成要素は、粒子中に存在する全脂質の約25mol%～約35mol%、約27mol%～約35mol%、約29mol%～約35mol%、約30mol%～約35mol%、約30mol%～約34mol%、約31mol%～約33mol%、または約30mol%、31mol%、32mol%、33mol%、34mol%、もしくは35mol%（またはその任意の割合もしくはその中の範囲）を構成する。他の態様において、混合物中のコレステロール構成要素は、粒子中に存在する全脂質の約36、37、38、39、40、41、42、43、44、または45mol%（またはその任意の割合もしくはその中の範囲）を構成する。典型的には、リン脂質とコレステロールとの混合物を含む1：57脂質粒子製剤は、粒子中に存在する全脂質の約34mol%（またはその任意の割合）のコレステロールまたはコレステロール誘導体を、例えば、約7mol%（またはその任意の割合）のDPPCまたはDSPCなどのリン脂質と混合して含み得る。典型的には、リン脂質とコレステロールとの混合物を含む7：54脂質粒子製剤は、粒子中に存在する全脂質の約32mol%（またはその任意の割合）のコレステロールまたはコレステロール誘導体を、例えば、約7mol%（またはその任意の割合）のDPPCまたはDSPCなどのリン脂質と混合して含み得る。

【0182】

脂質粒子がリン脂質を含まない態様において、コレステロールまたはその誘導体は、粒子中に存在する全脂質の最大約25mol%、30mol%、35mol%、40mol%、45mol%、50mol%、55mol%、または60mol%を構成し得る。

【0183】

いくつかの態様において、リン脂質不含脂質粒子製剤中のコレステロールまたはその誘導体は、粒子中に存在する全脂質の約25mol%～約45mol%、約25mol%～約40mol%、約30mol%～約45mol%、約30mol%～約40mol%、約31mol%～約39mol%、約32mol%～約38mol%、約33mol%～約37mol%、約35mol%～約45mol%、約30mol%～約35mol%、約35mol%～約40mol%、または約30mol%、31mol%、32mol%、33mol%、34mol%、35mol%、36mol%、37mol%、38mol%、39mol%、40mol%、41mol%、42mol%、43mol%、44mol%、もしくは45mol%（またはその任意の割合もしくはその中の範囲）を構成し得る。非限定的な例として、1：62脂質粒子製剤は、粒子中に存在する全脂質の約37mol%（またはその任意の割合）のコレステロールを含み得る。別の非限定的な例として、7：58脂質粒子製剤は、粒子中に存在する全脂質の約35mol%（またはその任意の割合）のコレステロールを含み得る。

【0184】

他の態様において、非陽イオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約5mol%～約90mol%、約10mol%～約85mol%、約20mol%～約80mol%、約10mol%（例えばリン脂質のみ）、または約60mol%（例えば、リン脂質およびコレステロールまたはその誘導体）（またはその任意の割合もしくはその中の範囲）を構成する。

【0185】

本発明の脂質粒子での使用に適した非陽イオン性脂質のさらなるパーセンテージおよび範囲は、国際公開公報第09/127060号、米国特許出願公開第20110071208号、および米国特許出願公開第20110076335号に記載されており、それらの開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0186】

本発明の脂質粒子中に存在する非陽イオン性脂質のパーセンテージが目標量であること、および製剤中に存在する非陽イオン性脂質の実際量が例えば±5mol%変動する場合があることを理解すべきである。例えば、1：57脂質粒子（例えばSNALP）製剤において、リン

10

20

30

40

50

脂質の目標量は7.1mol%であり、およびコレステロールの目標量は34.3mol%であるが、リン脂質の実際量は、その目標量の $\pm 2\text{mol}\%$ 、 $\pm 1.5\text{mol}\%$ 、 $\pm 1\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.75\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.5\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.25\text{mol}\%$ 、または $\pm 0.1\text{mol}\%$ であり得、およびコレステロールの実際量は、その目標量の $\pm 3\text{mol}\%$ 、 $\pm 2\text{mol}\%$ 、 $\pm 1\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.75\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.5\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.25\text{mol}\%$ 、または $\pm 0.1\text{mol}\%$ であり得、製剤の残りは、他の脂質構成要素で構成されている（合計すると粒子中に存在する全脂質の100mol%になる）。同様に、7:54脂質粒子（例えばSNALP）製剤において、リン脂質の目標量は6.75mol%であり、およびコレステロールの目標量は32.43mol%であるが、リン脂質の実際量は、その目標量の $\pm 2\text{mol}\%$ 、 $\pm 1.5\text{mol}\%$ 、 $\pm 1\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.75\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.5\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.25\text{mol}\%$ 、または $\pm 0.1\text{mol}\%$ であり得、およびコレステロールの実際量は、その目標量の $\pm 3\text{mol}\%$ 、 $\pm 2\text{mol}\%$ 、 $\pm 1\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.75\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.5\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.25\text{mol}\%$ 、または $\pm 0.1\text{mol}\%$ であり得、製剤の残りは、他の脂質構成要素で構成されている（合計すると粒子中に存在する全脂質の100mol%になる）。

10

【0187】

C. 脂質コンジュゲート

陽イオン性および非陽イオン性脂質に加えて、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、さらに脂質コンジュゲートを含みうる。結合脂質は、粒子の凝集を阻害する点で有用である。適切な結合脂質には、非限定的に、PEG-脂質コンジュゲート、POZ-脂質コンジュゲート、ATTA-脂質コンジュゲート、陽イオン性ポリマー-脂質コンジュゲート（CPL）、およびそれらの混合物が含まれる。ある態様では、脂質粒子は、CPLと一緒にPEG-脂質コンジュゲートまたはATTA-脂質コンジュゲートを含む。「ATTA」または「ポリアミド」という用語には非限定的に、その開示が全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる、米国特許第6,320,017号および同第6,586,559号に記載された化合物が含まれる。

20

【0188】

好ましい態様では、脂質コンジュゲートはPEG-脂質である。PEG-脂質の例には、非限定的に、例えば国際公開公報第05/026372号に記載されたようなジアルキルオキシプロピルにカップリングしたPEG(PEG-DAA)、例えば米国特許出願公開第20030077829号および同第2005008689号に記載されたようなジアシルグリセロールにカップリングしたPEG(PEG-DAG)、ホスファチジルエタノールアミンなどのリン脂質にカップリングしたPEG(PEG-PE)、例えば米国特許第5,885,613号に記載されたようなセラミドに結合したPEG、コレステロールまたはその誘導体に結合したPEG、およびそれらの混合物が含まれる。これらの特許文書の開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる。

30

【0189】

本発明における使用に適する追加的なPEG-脂質には、非限定的に、mPEG2000-1,2-ジ-O-アルキル-sn3-カルボモイル(carbomoyl)グリセリド(PEG-C-DMG)が含まれる。PEG-C-DMGの合成は、国際公開公報第09/086558号に記載されており、その開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる。さらに追加的な、適切なPEG-脂質コンジュゲートには、非限定的に、1-[8'-(1,2-ジミリストイル-3-プロパンオキシ)-カルボキサミド-3',6'-ジオキサオクタニル]カルバモイル-メチル-ポリ(エチレングリコール)(2KPEG-DMG)が含まれる。2KPEG-DMGの合成は、米国特許第7,404,969号に記載されており、その開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる。

40

【0190】

PEGは、2個の末端ヒドロキシル基を有するエチレンPEG繰り返しユニットの直鎖水溶性ポリマーである。PEGは、その分子量によって分類され；例えば、PEG2000は約2,000ダルトンの平均分子量を有し、PEG5000は約5,000ダルトンの平均分子量を有する。PEGは、Sigma Chemical Co.および他の会社から市販されており、それには、非限定的に以下のものが含まれる：モノメトキシポリエチレングリコール(MePEG-OH)、モノメトキシポリエチレングリコール-スクシネート(MePEG-S)、モノメトキシポリエチレングリコール-スクシンイミジルスクシネート(MePEG-S-NHS)、モノメトキシポリエチレングリコール-アミ

50

ン (MePEG-NH₂)、モノメトキシポリエチレングリコール-トレシレート (tresylate) (MePEG-TRES)、モノメトキシポリエチレングリコール-イミダゾリル-カルボニル (MePEG-IM)、ならびに末端メトキシ基の代わりに末端ヒドロキシル基を含有するそのような化合物 (例えば、HO-PEG-S、HO-PEG-S-NHS、HO-PEG-NH₂等)。米国特許第6,774,180号および同第7,053,150号に記載されたPEGのような他のPEG (例えばmPEG (20KDa) アミン) もまた、本発明のPEG-脂質コンジュゲートを調製するために有用である。これらの特許の開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる。加えて、モノメトキシポリエチレングリコール-酢酸 (MePEG-CH₂COOH) は、例えばPEG-DAAコンジュゲートを含めたPEG-脂質コンジュゲートを調製するために特に有用である。

【0191】

本明細書に記載されたPEG-脂質コンジュゲートのPEG成分は、約550ダルトン～約10,000ダルトンの範囲の平均分子量を含みうる。場合によっては、PEG成分は、約750ダルトン～約5,000ダルトン (例えば、約1,000ダルトン～約5,000ダルトン、約1,500ダルトン～約3,000ダルトン、約750ダルトン～約3,000ダルトン、約750ダルトン～約2,000ダルトン等) の平均分子量を有する。他の場合には、PEG成分は、約550ダルトン～約1000ダルトン、約250ダルトン～約1000ダルトン、約400ダルトン～約1000ダルトン、約600ダルトン～約900ダルトン、約700ダルトン～約800ダルトン、または約200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、もしくは1000ダルトンの平均分子量を有する。好ましい態様では、PEG成分は、約2,000ダルトンまたは約750ダルトンの平均分子量を有する。

【0192】

場合によっては、PEGは、アルキル、アルコキシ、アシル、またはアリアル基により置換されていてもよい。PEGは、脂質に直接結合されても、または、リンカー成分を介して脂質に連結していてもよい。例えば、エステル不含のリンカー成分およびエステル含有リンカー成分を含めた、脂質にPEGをカップリングするのに適した任意のリンカー成分を使用することができる。好ましい態様では、リンカー成分は、エステル不含のリンカー成分である。本明細書で使用される「エステル不含のリンカー成分」という用語は、カルボン酸エステル結合 (-OC(O)-) を含有しないリンカー成分を指す。適切なエステル不含のリンカー成分には、非限定的に、アミド (-C(O)NH-)、アミノ (-NR-)、カルボニル (-C(O)-)、カルバメート (-NHC(O)O-)、尿素 (-NHC(O)NH-)、ジスルフィド (-S-S-)、エーテル (-O-)、スクシニル (- (O)CCH₂CH₂C(O)-)、スクシニアミジル (-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-)、エーテル、ジスルフィド、およびそれらの組み合わせ (カルバメートリンカー成分とアミドリリンカー成分の両方を含有するリンカー等) が含まれる。好ましい態様では、カルバメートリンカーは、脂質にPEGをカップリングするために使用される。

【0193】

他の態様では、エステル含有リンカー成分は、脂質にPEGをカップリングするために使用される。適切なエステル含有リンカー成分には、例えば、カーボネート (-OC(O)O-)、スクシノイル、リン酸エステル (-O-(O)POH-O-)、スルホン酸エステル、およびそれらの組み合わせが含まれる。

【0194】

様々な鎖長および飽和度をもつ様々なアシル鎖基を有するホスファチジルエタノールアミンを、PEGに結合させて、脂質コンジュゲートを形成させることができる。そのようなホスファチジルエタノールアミンは、市販されているか、または、当業者に公知の従来技法を用いて単離もしくは合成することができる。C₁₀～C₂₀の範囲の炭素鎖長を有する飽和または不飽和脂肪酸を含有するホスファチジルエタノールアミンが好ましい。モノまたはジ不飽和脂肪酸、および飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸との混合物を有するホスファチジルエタノールアミンもまた、使用することができる。適切なホスファチジルエタノールアミンには、非限定的に、ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン (DMPE)、ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、およびジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン (DSPE

10

20

30

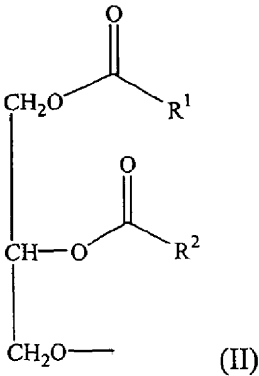
40

50

)が含まれる。

【0195】

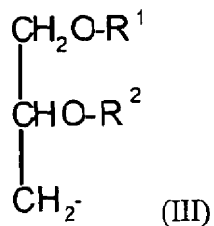
「ジアシルグリセロール」または「DAG」という用語には、2本の脂肪族アシル鎖 R^1 および R^2 を有する化合物が含まれ、その両方が独立に、エステル結合によりグリセロールの1位および2位に結合している、2~30個の炭素を有する。アシル基は、飽和していてもよく、様々な不飽和度を有してもよい。適切なアシル基には、非限定的に、ラウロイル(C_{12})、ミリストイル(C_{14})、パルミトイル(C_{16})、ステアロイル(C_{18})、およびイコソイル(C_{20})が含まれる。好ましい態様では、 R^1 および R^2 は同一であり、すなわち R^1 および R^2 はどちらもミリストイル(すなわちジミリストイル)であり、 R^1 および R^2 の両方がステアロイル(すなわちジステアロイル)等である。ジアシルグリセロールは、一般式



を有する。

【0196】

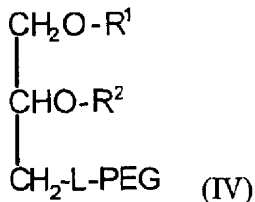
「ジアルキルオキシプロピル」または「DAA」という用語には、どちらも独立に2~30個の炭素を有する2本のアルキル鎖 R^1 および R^2 を有する化合物が含まれる。アルキル基は、飽和であるか、または様々な不飽和度を有しうる。ジアルキルオキシプロピルは、一般式



を有する。

【0197】

好ましい態様では、PEG-脂質は、式



を有するPEG-DAAコンジュゲートである：

式中、 R^1 および R^2 は独立に選択され、約10~約22個の炭素原子を有する長鎖アルキル基であり；PEGは、ポリエチレングリコールであり；Lは、上記のエステル不含のリンカー成分またはエステル含有リンカー成分である。長鎖アルキル基は、飽和または不飽和でありうる。適切なアルキル基には、非限定的に、デシル(C_{10})、ラウリル(C_{12})、ミリスチル(C_{14})、パルミチル(C_{16})、ステアリル(C_{18})、およびイコシル(C_{20})が含まれる。好ましい態様では、 R^1 および R^2 は同じであり、すなわち R^1 および R^2 はどちらもミリスチル(すなわちジミリスチル)であり、 R^1 および R^2 はどちらもステアリル(すなわちジステアリル)等である。

10

20

30

40

50

【0198】

上記式IVにおいて、PEGは、約550ダルトン～約10,000ダルトンの範囲の平均分子量を有する。場合によっては、PEGは、約750ダルトン～約5,000ダルトン（例えば、約1,000ダルトン～約5,000ダルトン、約1,500ダルトン～約3,000ダルトン、約750ダルトン～約3,000ダルトン、約750ダルトン～約2,000ダルトン等）の平均分子量を有する。他の場合には、PEG成分は、約550ダルトン～約1000ダルトン、約250ダルトン～約1000ダルトン、約400ダルトン～約1000ダルトン、約600ダルトン～約900ダルトン、約700ダルトン～約800ダルトン、または約200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、もしくは1000ダルトンの平均分子量を有する。好ましい態様では、PEGは、約2,000ダルトンまたは約750ダルトンの平均分子量を有する。PEGは、アルキル、アルコキシ、アシル、またはアリール基で置換されていてもよい。ある態様では、末端ヒドロキシル基は、メトキシまたはメチル基で置換されている。

10

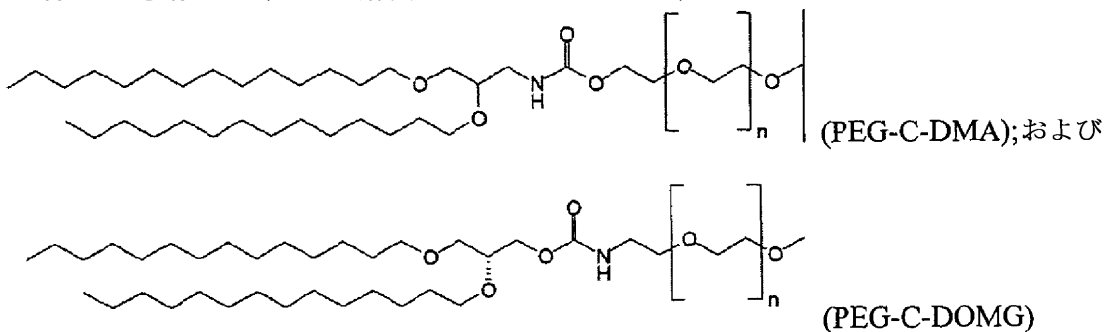
【0199】

好ましい態様では、「L」は、エステル不含のリンカー成分である。適切なエステル不含のリンカーには、非限定的に、アミドリリンカー成分、アミノリンカー成分、カルボニルリンカー成分、カルバメートリンカー成分、尿素リンカー成分、エーテルリンカー成分、ジスルフィドリリンカー成分、スクシニアミジルリンカー成分、およびそれらの組み合わせが含まれる。好ましい態様では、エステル不含のリンカー成分は、カルバメートリンカー成分である（すなわち、PEG-C-DAAコンジュゲート）。別の好ましい態様では、エステル不含のリンカー成分は、アミドリリンカー成分である（すなわち、PEG-A-DAAコンジュゲート）。さらに別の好ましい態様では、エステル不含のリンカー成分は、スクシニアミジルリンカー成分である（すなわちPEG-S-DAAコンジュゲート）。

20

【0200】

特定の態様では、PEG-脂質コンジュゲートは、



30

から選択される。

【0201】

PEG-DAAコンジュゲートは、当業者に公知の標準技法および試薬を用いて合成される。PEG-DAAコンジュゲートは、様々なアミド結合、アミン結合、エーテル結合、硫黄結合、カルバメート結合、および尿素結合を含有することが認識されているであろう。当業者は、これらの結合を形成するための方法および試薬が周知であり、容易に入手可能であることを認識しているであろう。例えば、March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992); Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989); およびFurniss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 5th ed. (Longman 1989)を参照されたい。存在する任意の官能基はPEG-DAAコンジュゲートの合成の異なる時点で保護および脱保護を必要としうることも、認められているであろう。当業者は、そのような技法が周知であることを認識しているであろう。例えば、Green and Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991)を参照されたい。

40

【0202】

好ましくは、PEG-DAAコンジュゲートは、PEG-ジデシルオキシプロピル(C₁₀)コンジュゲート、PEG-ジラウリルオキシプロピル(C₁₂)コンジュゲート、PEG-ジミリスチルオキシプロピル(C₁₄)コンジュゲート、PEG-ジパルミチルオキシプロピル(C₁₆)コンジュゲート、ま

50

たはPEG-ジステアリルオキシプロピル(C₁₈)コンジュゲートである。これらの態様において、PEGは、好ましくは約750または約2,000ダルトンの平均分子量を有する。特に好ましい態様において、PEG-脂質コンジュゲートはPEG2000-C-DMAを含み、ここで、「2000」は、PEGの平均分子量を表し、「C」は、カルバメートリンカー成分を表し、「DMA」は、ジミリスチルオキシプロピルを表す。別の特に好ましい態様において、PEG-脂質コンジュゲートはPEG750-C-DMAを含み、ここで、「750」は、PEGの平均分子量を表し、「C」は、カルバメートリンカー成分を表し、「DMA」は、ジミリスチルオキシプロピルを表す。特定の態様において、PEGの末端ヒドロキシル基は、メチル基で置換されている。当業者は、他のジアルキルオキシプロピルを本発明のPEG-DAAコンジュゲートに使用できることを容易に認識するであろう。

10

【0203】

前記に加えて、PEGの代わりに他の親水性ポリマーを使用できることが、当業者に容易に明らかになるであろう。PEGの代わりに使用することのできる適切なポリマーの例には、非限定的に、ポリビニルピロリドン、ポリメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミドおよびポリジメチルアクリルアミド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、およびヒドロキシメチルセルロースまたはヒドロキシエチルセルロースなどの誘導体化セルロースが含まれる。

【0204】

前記構成要素に加えて、本発明の脂質粒子(例えばSNALP)は、さらに、陽イオン性ポリ(エチレングリコール)(PEG)脂質またはCPLを含むことができる(例えば、Chen et al., *Bioconj. Chem.*, 11:433-437 (2000); 米国特許第6,852,334号; 国際公開公報第00/62813号参照、それらの開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる)。

20

【0205】

いくつかの態様において、脂質コンジュゲート(例えばPEG-脂質)は、粒子中に存在する全脂質の約0.1mol%~約2mol%、約0.5mol%~約2mol%、約1mol%~約2mol%、約0.6mol%~約1.9mol%、約0.7mol%~約1.8mol%、約0.8mol%~約1.7mol%、約0.9mol%~約1.6mol%、約0.9mol%~約1.8mol%、約1mol%~約1.8mol%、約1mol%~約1.7mol%、約1.2mol%~約1.8mol%、約1.2mol%~約1.7mol%、約1.3mol%~約1.6mol%、約1.4mol%~約1.5mol%、または約1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、もしくは2mol%(またはその任意の割合もしくはその中の範囲)を構成する。

30

【0206】

他の態様において、脂質コンジュゲート(例えばPEG-脂質)は、粒子中に存在する全脂質の約0mol%~約20mol%、約0.5mol%~約20mol%、約2mol%~約20mol%、約1.5mol%~約18mol%、約2mol%~約15mol%、約4mol%~約15mol%、約2mol%~約12mol%、約5mol%~約12mol%、または約2mol%(またはその任意の割合もしくはその中の範囲)を構成する。

【0207】

さらなる態様において、脂質コンジュゲート(例えばPEG-脂質)は、粒子中に存在する全脂質の約4mol%~約10mol%、約5mol%~約10mol%、約5mol%~約9mol%、約5mol%~約8mol%、約6mol%~約9mol%、約6mol%~約8mol%、または約5mol%、6mol%、7mol%、8mol%、9mol%、もしくは10mol%(またはその任意の割合もしくはその中の範囲)を構成する。

40

【0208】

本発明の脂質粒子での使用に適した脂質コンジュゲートのさらなる例、パーセンテージ、および/または範囲は、国際公開公報第09/127060号、米国特許出願公開第20110071208号、米国特許出願公開第20110076335号、2011年1月13日に出版された米国特許出願第13/006,277号、および国際公開公報第2010/006282号に記載されており、それらの開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0209】

50

本発明の脂質粒子中に存在する脂質コンジュゲート（例えばPEG-脂質）のパーセンテージが目標量であること、および製剤中に存在する脂質コンジュゲートの実際量が例えば $\pm 2\text{mol}\%$ 変動する可能性があることを理解すべきである。例えば、1:57脂質粒子（例えばSNALP）製剤において、脂質コンジュゲートの目標量は $1.4\text{mol}\%$ であるが、脂質コンジュゲートの実際量は、その目標量の $\pm 0.5\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.4\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.3\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.2\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.1\text{mol}\%$ 、または $\pm 0.05\text{mol}\%$ であり得、製剤の残りは、他の脂質構成要素で構成されている（合計すると粒子中に存在する全脂質の $100\text{mol}\%$ になる）。同様に、7:54脂質粒子（例えばSNALP）製剤において、脂質コンジュゲートの目標量は $6.76\text{mol}\%$ であるが、脂質コンジュゲートの実際量は、その目標量の $\pm 2\text{mol}\%$ 、 $\pm 1.5\text{mol}\%$ 、 $\pm 1\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.75\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.5\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.25\text{mol}\%$ 、または $\pm 0.1\text{mol}\%$ であり得、製剤の残りは、他の脂質構成要素で構成されている（合計すると粒子中に存在する全脂質の $100\text{mol}\%$ になる）。

10

【0210】

当業者は、用いられる脂質コンジュゲートに応じて、かつ脂質粒子が膜融合性になる割合に応じて、脂質コンジュゲートの濃度を変動させることができることを認識しているであろう。

【0211】

脂質コンジュゲートの組成および濃度を制御することによって、脂質粒子からの脂質コンジュゲートの交換割合、および今度は脂質粒子が膜融合性になる割合を制御することができる。例えば、PEG-DAAコンジュゲートを脂質コンジュゲートとして使用する場合、例えば、脂質コンジュゲートの濃度を変動させることにより、PEGの分子量を変動させることにより、またはPEG-DAAコンジュゲート上のアルキル基の鎖長および飽和度を変動させることにより、脂質粒子が膜融合性になる割合を変動させることができる。加えて、例えば、pH、温度、イオン強度等を含めた他の変数を用いて、脂質粒子が膜融合性になる割合を変動および/または制御することができる。脂質粒子が膜融合性になる割合を制御するために用いることができる他の方法は、本開示を読めば当業者に明らかになるであろう。また、脂質コンジュゲートの組成および濃度を制御することによって、脂質粒子（例えばSNALP）の粒子径を制御することができる。

20

【0212】

VI. 脂質粒子の調製

本発明の脂質粒子（核酸（例えば、siRNAなどの干渉RNA）などの有効成分が該粒子の脂質部分中に捕捉されかつ分解から保護される）、例えばSNALPは、非限定的に、連続混合法、直接希釈プロセス、およびインライン希釈プロセスを含めた当技術分野で公知の任意の方法により形成することができる。ある態様において、金属キレート剤（例えばEDTA）、一次抗酸化剤、および/または二次抗酸化剤などの一つまたは複数の抗酸化剤を、PCT出願番号第PCT/CA2010/001919号（その開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる）に記載されたプロセスにおける任意の工程または複数の工程で（例えば、脂質粒子の形成の前、途中、および/または後）含ませてもよい。

30

【0213】

特定の態様では、陽イオン性脂質は、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上の、式Iに示したものなどの陽イオン性脂質またはその塩を、単独でまたは他の陽イオン性脂質種と組み合わせて含む。他の態様では、非陽イオン性脂質は、1つ、2つ、またはそれ以上の脂質、例えば卵スフィンゴミエリン（ESM）、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルコリン（POPC）、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン（DPPC）、モノメチル-ホスファチジリエタノールアミン、ジメチル-ホスファチジリエタノールアミン、14:0 PE（1,2-ジミリストイル-ホスファチジリエタノールアミン（DMPE））、16:0 PE（1,2-ジパルミトイル-ホスファチジリエタノールアミン（DPPE））、18:0 PE（1,2-ジステアロイル-ホスファチジリエタノールアミン（DSPE））、18:1 PE（1,2-ジオレオイル-ホスファチジリエタノールアミン（DOPE））、18:1 トランスPE（1,2-ジエラドイル-ホスファチジリエタノールアミン（DEPE））、18:0~18:1 PE（1-ステ

40

50

アロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(SOPE)、16:0~18:1 PE(1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(POPE))、ポリエチレングリコールベースのポリマー(例えば、PEG2000、PEG5000、PEG修飾ジアシルグリセロール、またはPEG修飾ジアルキルオキシプロピル)、コレステロール、それらの誘導体、またはそれらの組み合わせを含みうる。

【0214】

ある態様では、本発明は、連続混合法により、例えば核酸(例えば干渉RNA)を含む水溶液を第1リザーバー中に供給する工程、有機脂質溶液を第2リザーバー中に供給する工程(ここで、有機脂質溶液中に存在する脂質は、有機溶媒中、例えばエタノールなどの低級アルカノール中に可溶化される)、および、有機脂質溶液が水溶液と混合されて核酸を内部に封入している脂質小胞(例えばリポソーム)を実質的に瞬時に生成するように、有機脂質溶液と水溶液を混合する工程を含むプロセスにより生成された、核酸-脂質粒子(例えばSNALP)を提供する。このプロセスおよびこのプロセスを実施するための装置は、米国特許出願公開第20040142025号に詳細に記載されており、その開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる。

10

【0215】

脂質および緩衝溶液を混合チャンバー内のような混合環境に連続的に導入する操作により、緩衝溶液による脂質溶液の連続希釈が行われ、これによって、混合の際実質的に瞬時に脂質小胞が生成される。本明細書で使用される「脂質溶液を緩衝溶液で連続的に希釈する」という語句(および変形)は、一般に、脂質溶液が水和プロセスにおいて小胞産生を達成するために十分な力で十分に迅速に希釈されることを意味する。核酸を含む水溶液を有機脂質溶液と混合することにより、有機脂質溶液は、緩衝溶液(すなわち水溶液)の存在下で連続的な段階希釈を受けて、核酸-脂質粒子を生成する。

20

【0216】

連続混合法を用いて形成された核酸-脂質粒子は、典型的には、約30nm~約150nm、約40nm~約150nm、約50nm~約150nm、約60nm~約130nm、約70nm~約110nm、約70nm~約100nm、約80nm~約100nm、約90nm~約100nm、約70~約90nm、約80nm~約90nm、約70nm~約80nm、約120nm未満、110nm未満、100nm未満、90nm未満、もしくは80nm未満、または約30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm、もしくは150nm(またはその任意の割合もしくはその中の範囲)の大きさを有する。そのように形成した粒子は凝集せず、所望により均一な粒子径に到達するように整粒される。

30

【0217】

別の態様では、本発明は、脂質小胞(例えばリポソーム)溶液を形成させる工程、ならびに制御された量の希釈緩衝液を含む収集容器に該脂質小胞溶液を直ちに直接導入する工程を含む、直接希釈プロセスを介して生成した核酸-脂質粒子(例えばSNALP)を提供する。好ましい局面では、収集容器は、希釈を容易にするように収集容器の内容物を攪拌するように設計された一つまたは複数の要素を含む。一局面では、収集容器中に存在する希釈緩衝液の量は、それに導入された脂質小胞溶液の体積に実質的に等しい。非限定的な例として、脂質小胞の45%エタノール溶液は、等体積の希釈緩衝液が入った収集容器中に導入された場合に、有利なことに、より小さな粒子をもたらさう。

40

【0218】

さらに別の態様では、本発明は、希釈緩衝液が入った第3のリザーバーを第2の混合領域と流体連通するインライン希釈プロセスを介して生成した核酸-脂質粒子(例えばSNALP)を提供する。この態様では、第1混合領域中で形成した脂質小胞(例えばリポソーム)溶液が、第2混合領域中で希釈緩衝液と直ちに直接混合される。好ましい局面では、第2混合領域は、脂質小胞溶液および希釈緩衝液の流れが、180°対向する流れとして合流するように配置されたT-連結基を含むが、例えば約27°~約180°(例えば約90°)のより浅い角度を提供する連結器を使用することもできる。ポンプ機構は、第2混合領域に制御可能な緩衝液流を送達する。一局面では、第2混合領域に提供される希釈緩衝液の流速は、第1

50

混合領域からそこに導入される脂質小胞溶液の流速と実質的に等しいように制御される。この態様は、有利なことに、第2混合領域中で脂質小胞溶液と混合している希釈緩衝液の流れをと、したがって、第2混合プロセス全体にわたる緩衝液中の脂質小胞溶液の濃度のさらなる制御を可能にする。そのような希釈緩衝液の流速の制御により、有利なことに、低濃度でより小さな粒子径の形成が可能になる。

【0219】

これらの直接希釈プロセスおよびインライン希釈プロセスを実施するためのこれらのプロセスおよび装置は、米国特許出願公開第20070042031号に詳細に記載されており、その開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる。

【0220】

直接希釈プロセスおよびインライン希釈プロセスを用いて形成した核酸-脂質粒子は、典型的には約30nm～約150nm、約40nm～約150nm、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、約70nm～約100nm、約80nm～約100nm、約90nm～約100nm、約70～約90nm、約80nm～約90nm、約70nm～約80nm、約120nm未満、110nm未満、100nm未満、90nm未満、もしくは80nm未満、または約30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm、もしくは150nm（またはその任意の割合もしくはその中の範囲）の大きさを有する。このように形成した粒子は凝集せず、均一な粒子径を達成するために整粒してもよい。

【0221】

必要であれば、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、リボソームを整粒するために利用可能な任意の方法により整粒することができる。整粒は、所望の大きさの範囲および比較的狭い粒子径分布を達成するために行うことができる。

【0222】

所望の大きさに粒子を整粒するためにいくつかの技法を利用することができる。リボソームのために使用され、本発明の粒子に等しく適用可能な一つの製粒方法は、米国特許第4,737,323号に記載されており、その開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる。槽内超音波処理またはプローブ超音波処理により粒子懸濁物を超音波処理することで、約50nm未満まで粒子径を漸減させる。ホモジナイゼーションは、より大きな粒子をより小さな粒子に断片化するための剪断エネルギーに依存する別の方法である。典型的なホモジナイゼーション手順では、典型的には約60から約80nmの間の選択された粒子径が観察されるまで標準的な乳剤ホモジナイゼーションにより粒子が再循環される。両方の方法において、従来のレーザー光粒子径判別またはQELSにより、粒子径分布をモニターすることができる。

【0223】

細孔性ポリカーボネート膜または非対称なセラミック膜を通した粒子の押出もまた、粒子径を低減させ相対的に明確な径分布とするために有効な方法である。典型的には、所望の粒子径分布が達成されるまで、膜を1回または複数回通過させて懸濁液を循環させる。逐次より小さな孔の膜を通過させて粒子を押し出し、径を徐々に縮小することができる。

【0224】

いくつかの態様では、粒子中に存在する核酸は例えば、その開示が全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる、米国特許出願第09/744,103号に記載されているように予め濃縮される。

【0225】

他の態様では、方法は、さらに、本発明の組成物を使用して細胞のリポフェクションを行うために有用な非脂質性ポリ陽イオンを添加する工程を含む。適切な非脂質性ポリ陽イオンの例には、臭化ヘキサジメトリン（POLYBRENE（登録商標）の商品名でAldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wisconsin, USA) から販売）または他のヘキサジメトリン塩が含まれる。他の適切なポリ陽イオンには、例えば、ポリ-L-オルニチン、ポリ-L-アルギニン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ポリアリルアミン、およびポリエチレンイミンの塩が含ま

10

20

30

40

50

れる。これらの塩が添加されるのは、好ましくは粒子が形成した後である。

【0226】

いくつかの態様では、形成した核酸-脂質粒子（例えばSNALP）中の核酸/脂質比（質量/質量比）は、約0.01～約0.2、約0.05～約0.2、約0.02～約0.1、約0.03～約0.1、または約0.01～約0.08の範囲であり得る。出発物質（投入量）の比もまた、この範囲内に入る。他の態様では、粒子調製物は、全脂質10mgあたり約400 μ gの核酸を使用するか、または約0.01～約0.08の、さらに好ましくは核酸50 μ gあたり1.25mgの全脂質に対応する約0.04の核酸対脂質量比を用いる。他の好ましい態様では、粒子は、約0.08の核酸：脂質量比を有する。

【0227】

他の態様では、形成した核酸-脂質粒子（例えばSNALP）中の脂質対核酸比（質量/質量比）は、約1（1：1）～約100（100：1）、約5（5：1）～約100（100：1）、約1（1：1）～約50（50：1）、約2（2：1）～約50（50：1）、約3（3：1）～約50（50：1）、約4（4：1）～約50（50：1）、約5（5：1）～約50（50：1）、約1（1：1）～約25（25：1）、約2（2：1）～約25（25：1）、約3（3：1）～約25（25：1）、約4（4：1）～約25（25：1）、約5（5：1）～約25（25：1）、約5（5：1）～約20（20：1）、約5（5：1）～約15（15：1）、約5（5：1）～約10（10：1）の範囲、または約5（5：1）、6（6：1）、7（7：1）、8（8：1）、9（9：1）、10（10：1）、11（11：1）、12（12：1）、13（13：1）、14（14：1）、15（15：1）、16（16：1）、17（17：1）、18（18：1）、19（19：1）、20（20：1）、21（21：1）、22（22：1）、23（23：1）、24（24：1）、もしくは25（25：1）、またはその任意の割合もしくはその中の範囲である。出発物質（投入量）の比もまた、この範囲内に入る。

【0228】

前述のように、結合脂質には、さらにCPLが含まれてもよい。SNALP-CPL（CPL含有SNALP）を製造するための様々な一般法を本明細書に述べる。二つの一般的な技法には、「挿入後」技法、すなわち例えば予め形成したSNALPへのCPLの挿入、および例えばSNALP形成段階の間に、CPLを脂質混合物中に含ませる「標準」技法が含まれる。挿入後技法は、主にSNALP二重層膜の外面にCPLを有するSNALPを生じ、一方で、標準技法は、内面および外面の両方にCPLを有するSNALPを提供する。この方法は、特に、リン脂質（コレステロールを含有しうる）から作られた小胞およびPEG-脂質（PEG-DAAおよびPEG-DAGなど）を含有する小胞にも有用である。SNALP-CPLの製造方法は、例えば、米国特許第5,705,385号；同第6,586,410号；同第5,981,501号；同第6,534,484号；および同第6,852,334号；米国特許出願公開第20020072121号；ならびに国際公開公報第00/62813号に教示されており、それらの開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる。

【0229】

VII. キット

本発明は、また、キット形態の脂質粒子（例えばSNALP）を提供する。いくつかの態様において、キットは、脂質粒子の様々な要素（例えば、核酸などの有効成分または治療剤、および粒子の個別の脂質構成要素）を保持するように区画化されている容器を含む。好ましくは、キットは、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）を保持する容器（例えばバイアルまたはアンプル）を含み、ここで、粒子は、本明細書に示されるプロセスの一つによって製造される。いくつかの態様において、キットは、さらに、金属キレート剤（例えばEDTA）、一次抗酸化剤、および/または二次抗酸化剤などの一つまたは複数の抗酸化剤を含み得る。他の態様において、キットは、さらに、エンドソーム膜不安定化剤（例えばカルシウムイオン）を含み得る。典型的にはキットには、本発明の粒子組成物が、薬学的に許容される担体中の懸濁物としてまたは脱水された形態でのいずれかで、その再水和（凍結乾燥の場合）および投与のための説明書と共に入っている。

【0230】

本発明の脂質粒子は、関心対象の特定の組織、器官、または腫瘍を優先的に標的とするように誘導することができる。ある場合において、SNALPなどの脂質粒子の優先的なターゲ

10

20

30

40

50

ティングは、粒子自体の組成を制御することにより実施し得る。ある場合において、肝臓（例えば、正常な肝組織）を優先的に標的とするために1:57脂質粒子（例えばSNALP）製剤を使用することができる。他の場合において、肝腫瘍および肝臓外部の腫瘍などの固形腫瘍を優先的に標的とするために7:54脂質粒子（例えばSNALP）製剤を使用することができる。好ましい態様において、本発明のキットは、これらの肝臓指向性および/または腫瘍指向性脂質粒子を含み、ここで、該粒子は、懸濁物としてまたは脱水された形態で容器中に存在する。

【0231】

ある場合において、粒子のターゲティングをさらに増強するために、脂質粒子の表面にターゲティング成分を結合させることが望ましい場合がある。ターゲティング成分（例えば、抗体、タンパク質など）を脂質（本発明の粒子に用いられるものなど）に結合させる方法は、当業者に公知である。

10

【0232】

VIII. 脂質粒子の投与

一旦形成すれば、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、細胞への有効成分または治療剤（例えば、干渉RNAなどの核酸）の導入に有用である。したがって本発明は、細胞内に核酸（例えば干渉RNA）などの有効成分または治療剤を導入するための方法も提供する。ある場合において、細胞は、肝細胞、例えば肝組織内に存在する肝実質細胞などである。他の場合において、細胞は、腫瘍細胞、例えば固形腫瘍内に存在する腫瘍細胞などである。この方法は、最初に上記の粒子を形成し、次に、細胞への有効成分または治療剤の送達が起こるために十分な時間、細胞とその粒子を接触させることにより、インビトロまたはインビボで実施される。

20

【0233】

本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、それらが混合または接触するほぼ全ての細胞型に吸着することができる。それらの粒子は、一旦吸着すると細胞の一部によりエンドサイトーシスされるか、脂質を細胞膜と交換するか、または細胞と融合するかのいずれかでありうる。粒子の活性剤または治療剤（例えば核酸）成分の送達または組込みは、これらの経路のいずれか一つにより実施することができる。特に、融合が起こると、粒子の膜は細胞膜に組込まれ、粒子の内容物は細胞内液と混和する。

30

【0234】

本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、単独で、または投与経路および標準的な薬学的診療により選択される薬学的に許容されうる担体（例えば、生理食塩水またはリン酸緩衝液）と混合して、投与することができる。一般に、生理緩衝食塩水（例えば135~150mM NaCl）が薬学的に許容されうる担体として用いられよう。他の適切な担体には、アルブミン、リポタンパク質、グロブリン等の糖タンパク質を安定性増強のために含む、例えば、水、緩衝水、0.4%食塩水、0.3%グリシン等が含まれる。さらなる適切な担体は、例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)に記載されている。本明細書で使用される「担体」には、任意および全ての溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗細菌および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、緩衝液、担体溶液、懸濁物、コロイド等が含まれる。「薬学的に許容されうる」という語句は、ヒトに投与したときにアレルギー性または類似の有害反応を生じない分子実体および組成物を指す。

40

【0235】

薬学的に許容されうる担体は、一般に、脂質粒子の形成の後に添加される。したがって、脂質粒子（例えばSNALP）が形成した後に、生理緩衝食塩水などの薬学的に許容されうる担体中で粒子を希釈することができる。

【0236】

薬学的製剤中の粒子の濃度は広く変動してよく、すなわち、約0.05重量%未満から、通常は約2~5重量%であるかまたは少なくとも約2~5重量%で、約10~90重量%程度まで変動してもよく、選択された特定の投与様式に従って、主として流体体積、粘度等により選択

50

されよう。例えば、治療に付随する流体負荷量を低下させるために、濃度を増大させることができる。これは、アテローム性動脈硬化症に関連するうっ血性心不全または重症高血圧症を有する患者に特に望ましいことがある。または、投与部位の炎症を和らげるために、刺激性脂質から構成される粒子を低濃度に希釈することもできる。

【0237】

本発明の薬学的組成物は、従来の周知の滅菌技法により滅菌することができる。水溶液は、使用のために包装してもよく、無菌条件下で濾過して凍結乾燥し、その凍結乾燥調製物を投与前に無菌水溶液と混合してもよい。組成物は、適切な生理的条件下に必要とされるような、薬学的に許容されうる補助物質、例えばpH調整緩衝剤、浸透圧調整剤等、例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、および塩化カルシウムを含有してもよい。追加的に、粒子懸濁液は、保存時のフリーラジカル障害および脂質過酸化障害から脂質を保護する脂質保護剤を含んでもよい。トコフェロールなどの親油性フリーラジカルクエンチャーおよびフェリオキサミンなどの水溶性鉄特異的キレート剤が適切である。

10

【0238】

いくつかの態様では、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、特に、干渉RNA配列（例えばsiRNA）を含む一つまたは複数の核酸の治療的送達のための方法に有用である。特に、一つまたは複数の標的核酸配列または関心対象の遺伝子の転写および/または翻訳を下方制御またはサイレンシングすることによって、哺乳動物（例えばマウスなどのげっ歯類またはヒト、チンパンジー、もしくはサルなどの霊長類）における疾患または障害を治療するためのインビトロおよびインビボ方法を提供することが、本発明の目的である。非限定的な例として、本発明の方法は、哺乳動物対象の肝臓および/または腫瘍に干渉RNA（例えばsiRNA）をインビボ送達するために有用である。ある態様では、疾患または障害は、遺伝子の発現および/または過剰発現と関連し、遺伝子の発現または過剰発現は、干渉RNA（例えばsiRNA）によって低減される。ある他の態様では、治療有効量の脂質粒子は、哺乳動物に投与することができる。いくつかの場合には、干渉RNA（例えばsiRNA）を製剤化してSNALPとし、該粒子を、そのような治療を必要とする患者に投与する。他の場合には、細胞が患者から取り出され、干渉RNAがインビトロ送達され（例えば、本明細書記載のSNALPを使用して）、その細胞が患者に再注入される。

20

【0239】

A. インビボ投与

インビボ療法のための全身送達、例えば、循環などの身体系を介した遠位標的細胞への治療用核酸の送達は、その開示が全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる、国際公開公報第05/007196号、同第05/121348、同第05/120152号、および同第04/002453号に記載されたものなどの核酸-脂質粒子を使用して達成される。本発明はまた、血清中でヌクレアーゼ分解から核酸を保護し、非免疫原性で、サイズが小さく、反復投薬に適した、完全に封入された脂質粒子を提供する。

30

【0240】

インビボ投与に関して、投与は、当技術分野で公知の任意の方法、例えば、注射、経口投与、吸入（例えば、鼻腔内または気管内）、経皮塗布、または直腸投与によって行われる。投与は、単回または分割投与により達成することができる。薬学的組成物は、非経口的、すなわち、関節内、静脈内、腹腔内、皮下、または筋肉内に投与することができる。いくつかの態様では、薬学的組成物は、ボーラス注射により静脈内または腹腔内投与される（例えば、米国特許第5,286,634号を参照）。細胞内核酸送達はまた、Straubinger et al., *Methods Enzymol.*, 101:512 (1983); Mannino et al., *Biotechniques*, 6:682 (1988); Nicolau et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6:239 (1989); および Behr, *Acc. Chem. Res.*, 26:274 (1993) に述べられている。脂質ベースの治療薬を投与するなお他の方法は、例えば、米国特許第3,993,754号；同第4,145,410号；同第4,235,871号；同第4,224,179号；同第4,522,803号；および同第4,588,578号に記載されている。脂質粒子は、疾患部位での直接注射により、または疾患部位から遠位の部位での注射により

40

50

投与することができる（例えば、Culver, HUMAN GENE THERAPY, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York. pp.70-71(1994)を参照）。上記参照の開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる。

【0241】

本発明の脂質粒子（例えばSNALP）が静脈内投与される態様では、粒子の総注射用量の少なくとも約5%、10%、15%、20%、または25%が、注射の約8、12、24、36、または48時間後の血漿中に存在する。他の態様では、脂質粒子の総注射用量の約20%、30%、40%より多く、および約60%、70%または80%程度が、注射の約8、12、24、36、または48時間後に血漿中に存在する。場合によっては、複数の粒子の約10%より多くが、投与の約1時間後に哺乳動物の血漿中に存在する。ある他の場合には、脂質粒子の存在は、粒子の投与の少なくとも約1時間後に検出可能である。ある態様では、核酸などの治療剤の存在は、投与の約8、12、24、36、48、60、72または96時間後に、肺、肝臓、腫瘍の細胞で、または炎症部位の細胞で、検出可能である。他の態様では、干渉RNA（例えばsiRNA）による標的配列の発現の下方制御は、投与の約8、12、24、36、48、60、72または96時間後に検出可能である。さらに他の態様では、干渉RNA（例えばsiRNA）による標的配列の発現の下方制御は、肝細胞（例えば肝実質細胞）において、腫瘍細胞において、または炎症部位の細胞において優先的に起こる。さらなる態様では、投与部位から近位もしくは遠位の細胞中または肺、肝臓、もしくは腫瘍の細胞中の干渉RNA（例えばsiRNA）の存在または作用は、投与の約12、24、48、72、もしくは96時間後、または約6、8、10、12、14、16、18、19、20、22、24、26、もしくは28日後に検出可能である。追加的な態様では、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、非経口または腹腔内投与される。

10

20

【0242】

本発明の組成物は、吸入（例えば鼻腔内または気管内）により投与するために、単独で、または他の適切な構成要素と組み合わせ、エアロゾル製剤へと作製することができる（すなわち、その製剤は「噴霧する」ことができる）（Brigham et al., Am. J. Sci., 29:278 (1989)を参照）。エアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素等の加圧された許容されうる噴射剤内に配置することができる。

【0243】

ある態様では、薬学的組成物は、鼻腔内スプレー、吸入、および/または他のエアロゾル送達用ビヒクルにより送達することができる。核酸組成物を鼻エアロゾルスプレーにより肺に直接送達するための方法は、例えば米国特許第5,756,353号および同第5,804,212号に記載されている。同様に、鼻腔内微粒子樹脂およびリゾホスファチジル-グリセロール化合物を用いた薬物の送達（米国特許第5,725,871号）もまた、薬学的分野で周知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン（polytetrafluoroethylene）支持マトリックスの形態における経粘膜薬物送達は、米国特許第5,780,045号に記載されている。上記特許の開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる。

30

【0244】

例えば、関節内（関節の中）、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、および皮下経路などによる非経口投与に適した製剤には、酸化防止剤、緩衝剤、静菌薬、および意図されたレシipientの血液と製剤を等張にする溶質を含有しうる水性および非水性の等張無菌注射剤、ならびに懸濁化剤、溶解補助剤、粘稠化剤、安定化剤、および保存料を含みうる水性および非水性無菌懸濁剤が含まれる。本発明の実施において、組成物は、好ましくは例えば静脈内注入により、経口的、局所的、腹腔内、膀胱内、または髄腔内に投与される。

40

【0245】

一般に脂質粒子製剤は、静脈内投与する場合に、適切な薬学的担体を用いて製剤化される。本発明の組成物および方法に、多数の薬学的に許容されうる担体を用いることができる。本発明に使用するのに適した製剤は、例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed.(1985)に見出される。様々な水性担体、例えば、水、緩衝水、0.4%食塩水、0.3%グリシンなどを使用することができ、それらの担体は、安定性を高めるためにアルブミン、リボタンパク質、グロブリン等の糖

50

タンパク質を含んでもよい。一般に、薬学的に許容されうる担体として、生理緩衝食塩水（135～150mM NaCl）が用いられるが、他の適切な担体でも十分であり得る。これらの組成物は、濾過などの従来のリポソーム滅菌技法により滅菌することができる。これらの組成物は、生理的条件に近づけるために必要とされるような、pH調整緩衝剤、浸透圧調整剤、湿潤剤等の薬学的に許容されうる補助物質、例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレエート等を含んでもよい。これらの組成物は、上記した技法を使用して滅菌してもよく、その代わりに、滅菌条件下で製造してもよい。結果として得られた水溶液は、使用のために包装してもよく、無菌条件下での濾過および凍結乾燥を行い、投与前に凍結乾燥した調製物を無菌水溶液と混合してもよい。

10

【0246】

ある用途では、本明細書に開示された脂質粒子は、個体に経口投与することにより送達することができる。粒子に賦形剤を混ぜ込んで、摂取可能な錠剤、パッカ錠、トローチ剤、カプセル剤、丸剤、ロゼンジ、エリキシル剤、洗口剤、懸濁剤、口腔スプレー剤、シロップ剤、ウエハース等の形態で使用することができる（例えば、米国特許第5,641,515号、同第5,580,579号、および同第5,792,451を参照されたく、それらの開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる）。これらの経口剤形はまた、以下を含有しうる：結合剤、ゼラチン；賦形剤、滑沢剤、および/または着香料。単位剤形がカプセルの場合、それは、上記物質に加えて液体担体を含有してもよい。様々な他の物質を、コーティング剤として、またはその他の方法で投薬単位の物理的形態を修飾するために、存在させてもよい。当然ながら、任意の単位剤形を調製する際に使用される任意の物質は、薬学的に純粋で、用いられる量で実質的に無毒であるべきである。

20

【0247】

典型的には、これらの経口製剤は、少なくとも約0.1%またはそれ以上の脂質粒子を含有しうるが、粒子のパーセンテージは、当然ながら変動してもよく、好都合には製剤の合計重量または体積の約1%または2%から、約60%または70%またはそれ以上の間でありうる。当然、治療的に有用な各組成物中の粒子の量は、適切な投薬量が得られるような様式で任意の所定単位用量の化合物中に調製することができる。溶解度、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与経路、製品有効期間、および他の薬理学的考察などの要因が、そのような薬学的製剤を調製する当業者によって考慮され、そのように、様々な投薬量および治療方式が望ましいことがある。

30

【0248】

経口投与に適した製剤は以下からなってもよい：(a)液剤、例えば水、食塩水、またはPEG400などの希釈剤中に懸濁した、核酸（例えば干渉RNA）などのパッケージされた治療剤の有効量、(b)それぞれ核酸（例えば干渉RNA）などの治療剤の所定量を液体、固体、顆粒、またはゼラチンとして含有するカプセル剤、サシェ（sachet）、または錠剤；(c)適切な液体中の懸濁剤；および(d)適切な乳剤。錠剤の剤形は、一つまたは複数の乳糖、ショ糖、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、トウモロコシデンブ、バレシヨデンブ、微結晶セルロース、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、および他の賦形剤、着色料、増量剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、保存料、矯味剤、色素、崩壊剤、および薬学的に適合されうる担体を含みうる。ロゼンジの剤形は、矯味剤、例えばスクロース中に核酸（例えば干渉RNA）などの治療剤を含み得、同様に、パステル剤は、ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアラビアゴムなどの不活性基剤中に治療剤を含み、乳剤、ゲル剤等は、治療剤に加えて、当技術分野で公知の担体を含有し得る。

40

【0249】

それらの別の使用例では、脂質粒子は、幅広い局所剤形に混ぜ込むことができる。例えば、SNALPなどの核酸-脂質粒子を含有する懸濁物は、ゲル剤、油剤、乳剤、局所クリーム剤、パスタ剤、軟膏、ローション剤、フォーム、ムース等として製剤化および投与することができる。

50

【0250】

本発明の脂質粒子の医薬製剤を調製する場合、空の粒子または核酸などの治療剤が外面に結合した粒子を低減または除去するために精製された大量の粒子を用いることが好ましい。

【0251】

本発明の方法は、様々な宿主で実施することができる。好ましい宿主には、霊長類（例えばヒトおよびチンパンジーならびに他の非ヒト霊長類）、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、げっ歯類（例えばラットおよびマウス）、ウサギ、およびブタなどの哺乳動物種が含まれる。

【0252】

投与される粒子の量は、治療剤（例えば核酸）と脂質の比、使用される特定の治療剤（例えば核酸）、治療される疾患または障害、患者の年齢、体重、および状態、ならびに実施者の判断に左右されうるが、一般に約0.01から約50mg/kg体重の間、好ましくは約0.1から約5mg/kg体重の間、または投与（例えば注射）1回あたり粒子約 $10^8 \sim 10^{10}$ 個であり得る。

【0253】

B. インビトロ投与

インビトロ用途に関して、核酸（例えば干渉RNA）などの治療剤の送達は、植物起源であっても動物起源であっても、脊椎動物であっても無脊椎動物であっても、いずれの組織または種類であっても、培養されている任意の細胞に対して行われうる。好ましい態様では、細胞は、動物細胞、さらに好ましくは哺乳動物細胞、最も好ましくはヒト細胞（例えば腫瘍細胞または肝実質細胞）である。

【0254】

インビトロで実施される場合に、細胞と脂質粒子との間の接触は、生物学的に適合されうる培地中で行われる。粒子の濃度は、特定の用途に応じて広く変動するが、一般に約 $1 \mu\text{mol}$ から約 10mmol の間である。脂質粒子を用いた細胞の治療は、一般に、生理的溫度（約 37°C ）で、約1～48時間、好ましくは約2～4時間の期間だけ実施される。

【0255】

好ましい態様の一群では、脂質粒子懸濁物は、約 $10^3 \sim 10^5$ 個/ml、さらに好ましくは約 2×10^4 個/mlの細胞密度を有する、60～80%集密の平板培養された細胞に添加される。細胞に添加される懸濁物の濃度は、好ましくは約 $0.01 \sim 0.2 \mu\text{g/ml}$ 、さらに好ましくは約 $0.1 \mu\text{g/ml}$ である。

【0256】

必要とされうる範囲において、細胞の組織培養は当技術分野において周知である。例えば、Freshney, Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 3rd Ed., Wiley-Liss, New York (1994), Kuchler et al., Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. (1977)、およびそこに引用された参考文献は、細胞培養への一般的な手引きを提供する。培養される細胞系は、多くの場合に単層細胞の形態であるが、細胞懸濁物も使用される。

【0257】

エンドソーム放出パラメーター（ERP）アッセイを用いて、SNALPまたは本発明の他の脂質粒子の送達効率を最適化することができる。ERPアッセイは、米国特許出願公開第20030077829号に詳細に記載されており、その開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる。さらに詳細には、ERPアッセイの目的は、SNALPまたは他の脂質粒子の様々な陽イオン性脂質およびヘルパー脂質構成要素の作用を、結合/取込みまたはエンドソーム膜との融合/その不安定化にそれらが及ぼす相対作用に基づき判別することである。このアッセイにより、SNALPまたは他の脂質粒子の各構成要素が送達効率にどのように影響するかを定量的に決定するが可能になり、それによって、SNALPまたは他の脂質粒子が最適化される。通常は、ERPアッセイは、レポータータンパク質（例えば、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）等）の発現を測定す

10

20

30

40

50

ることから、場合によっては、発現プラスミドについて最適化されたSNALP製剤はまた、干渉RNAを封入するためにも適している。他の場合には、ERPアッセイは、干渉RNA（例えばsiRNA）の存在下または非存在下で標的配列の転写または翻訳の下方制御を測定するために適合させることができる。様々なSNALPまたは他の脂質粒子のそれぞれについてのERPを比較することにより、最適化された系を、例えば、細胞中に最も多く取込まれるSNALPまたは他の脂質粒子を容易に決定することができる。

【0258】

C. 脂質粒子を送達するための細胞

本発明の組成物および方法は、多種多様な種類の細胞をインビボおよびインビトロで治療するために使用される。適切な細胞には、肝実質細胞、網内系細胞（例えば、単球、マクロファージなど）、線維芽細胞、内皮細胞、血小板細胞、ウイルスに感染したおよび/またはウイルス感染感受性の他の細胞型造血前駆（幹）細胞、ケラチノサイト、骨格筋および平滑筋細胞、骨芽細胞、神経細胞、静止状態リンパ球、終末分化細胞、周期が遅いまたは停止した一次細胞、実質細胞、リンパ細胞、上皮細胞、骨細胞等が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0259】

特定の態様では、核酸（例えば干渉RNA）などの活性剤または治療剤は、肝臓癌細胞、肺癌細胞、結腸癌細胞、直腸癌細胞、肛門癌細胞、胆管癌細胞、小腸癌細胞、胃癌細胞、食道癌細胞、胆嚢癌細胞、膵臓癌細胞、虫垂癌細胞、乳癌細胞、卵巣癌細胞、子宮頸癌細胞、前立腺癌細胞、腎癌細胞、中枢神経系の癌細胞、神経膠芽腫細胞、皮膚癌細胞、リンパ腫細胞、絨毛癌腫瘍細胞、頭頸部癌細胞、骨原性肉腫細胞、および血液癌細胞を非限定的に含む癌細胞（例えば固形腫瘍の細胞）に送達される。

【0260】

核酸（例えば干渉RNA）を封入しているSNALPなどの脂質粒子のインビボ送達は、任意の細胞型の細胞を標的とするのに適している。方法および組成物は、例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、げっ歯類（例えばマウス、ラット、およびモルモット）、ウサギ、ブタ、および霊長類（例えばサル、チンパンジー、およびヒト）などの哺乳動物を含めた、多種多様な脊椎動物の細胞に関して用いることができる。

【0261】

D. 脂質粒子の検出

いくつかの態様では、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、約1、2、3、4、5、6、7、8時間時点で、またはそれ以上の時点で、対象から検出可能である。他の態様では、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、粒子の投与から約8、12、24、48、60、72、もしくは96時間後、または約6、8、10、12、14、16、18、19、22、24、25、もしくは28日後に対象から検出可能である。粒子の存在は、対象由来の細胞、組織、または他の生物学的試料から検出することができる。粒子は、例えば、粒子の直接検出により、干渉RNA（例えばsiRNA）配列などの治療用核酸の検出により、関心対象の標的配列の検出により（すなわち関心対象の配列の発現または発現低下を検出することにより）、またはその組み合わせにより、検出することができる。

【0262】

1. 粒子の検出

SNALPなどの本発明の脂質粒子は、当技術分野で公知の任意の方法を用いて検出することができる。例えば、当技術分野で周知の方法を用いて、脂質粒子の構成要素に標識を直接または間接的にカップリングさせることができる。必要な感度、脂質粒子構成要素との結合の容易さ、安定性の要件、ならびに利用可能な計測および廃棄の規定に応じて標識を選択して、多種多様な標識を使用することができる。適切な標識には、非限定的に、蛍光色素（例えば、フルオレセインならびにフルオレセインイソチオシアネート（FITC）およびOregon Green（商標）などの誘導體；ロダミンおよびテキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート（TRITC）等の誘導體、ジゴキシゲニン、ピオチン、フィコエリトリン、AMCA、CyDye（商標）等のような分光標識；³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、³²P、³³P等の放

10

20

30

40

50

射標識；西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素；コロイド状金または色ガラスまたはポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス等のプラスチックビーズなどの分光比色測定用標識が含まれる。標識は、当技術分野で公知の任意の手段を用いて検出することができる。

【0263】

2. 核酸の検出

核酸（例えば干渉RNA）は、本明細書において当業者に周知の任意のいくつかの手段により検出および定量される。核酸の検出は、サザン分析、ノーザン分析、ゲル電気泳動、PCR、放射標識、シンチレーション計数、およびアフィニティークロマトグラフィーなどの周知の方法により行うことができる。分光測定、ラジオグラフィー、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、および高拡散（hyperdiffusion）クロマトグラフィーなどの追加的な生化学分析法もまた、用いることができる。

10

【0264】

核酸ハイブリダイゼーション形式の選択は、重要ではない。様々な核酸ハイブリダイゼーション形式が、当業者に公知である。例えば、よく見られる形式には、サンドイッチアッセイおよび競合または置換アッセイが含まれる。ハイブリダイゼーション技法は、一般に、例えば、"Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach," Eds. Hames and Higgins, IRL Press (1985)に記載されている。

20

【0265】

ハイブリダイゼーションアッセイの感度は、検出途中の標的核酸を増大させる核酸増幅システムの使用により高めることができる。分子プローブとして使用するための配列の増幅に適した、またはその後のサブクロニングのための核酸断片の産生に適したインビトロ増幅技法は、公知である。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、Q-レプリカーゼ増幅、および他のRNAポリメラーゼ介在技法（例えばNASBA（商標））を含めた、そのようなインビトロ増幅法を介して当事者を十分に案内する技法の例は、Sambrook et al., In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000)；およびAusubel et al., SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (2002)；ならびに米国特許第4,683,202号；PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds.) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990)；Arnheim & Levinson (October 1, 1990), C&EN 36；The Journal Of NIH Research, 3:81 (1991)；Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173 (1989)；Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874 (1990)；Lomell et al., J. Clin. Chem., 35:1826 (1989)；Landegren et al., Science, 241:1077 (1988)；Van Brunt, Biotechnology, 8:291 (1990)；Wu and Wallace, Gene, 4:560 (1989)；Barringer et al., Gene, 89:117 (1990)；およびSooknanan and Malek, Biotechnology, 13:563 (1995)に見出される。インビトロ増幅した核酸をクロニングする改良法は、米国特許第5,426,039号に記載されている。当技術分野で記載されている他の方法は、核酸配列に基づく増幅（NASBA（商標）、Cangene, Mississauga, Ontario）およびQ-レプリカーゼシステムである。選択された配列が存在する場合にのみ伸長または連結するようにPCRまたはLCRプライマーが設計されているこれらのシステムは、突然変異体を直接同定するために使用することができる。または、選択された配列は、一般に例えば非特異的PCRプライマーを用いて増幅することができる。その後、突然変異を示す特異的配列を求めて、増幅された標的領域を探索することができる。上記参照の開示は、全ての目的のために全体として本明細書に参照により組み入れられる。

30

40

【0266】

例えばインビトロ増幅法におけるプローブとしての使用のための、遺伝子プローブとしての使用のための、または阻害剤構成要素としての核酸は、典型的には、Beaucage et al., Tetrahedron Letts., 22:1859-1862 (1981)により記載された固相ホスホルアミダイト

50

トリエステル法により、例えば、Needham VanDevanter et al., *Nucleic Acids Res.*, 12:6159 (1984)に記載されたような自動合成装置を使用して化学合成される。必要ならば、ポリヌクレオチドの精製は典型的に、未変性アクリルアミドゲル電気泳動により、または Pearson et al., *J. Chrom.*, 255:137-149 (1983)に記載されたような陰イオン交換HPLCにより、行われる。合成ポリヌクレオチドの配列は、Maxam and Gilbert (1980) in Grossman and Moldave (eds.) Academic Press, New York, *Methods in Enzymology*, 65:499の化学分解法を用いて検証することができる。

【0267】

転写レベルを測定するための代替手段は、インサイチューハイブリダイゼーションである。インサイチューハイブリダイゼーションアッセイは周知であり、一般に、Angerer et al., *Methods Enzymol.*, 152:649 (1987)に記載されている。インサイチューハイブリダイゼーションアッセイにおいて、細胞を固体支持体、典型的にはガラススライドに固定する。DNAを探索する場合、細胞を、熱またはアルカリで変性させ、次に、細胞を中程度の温度でハイブリダイゼーション溶液と接触させ、標識された特異的プローブのアニールリングを行う。プローブは、好ましくは放射性同位体または蛍光レポーターで標識される。

10

【実施例】

【0268】

IX. 実施例

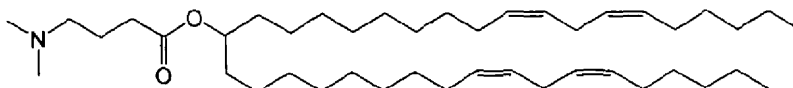
本発明を具体例によりさらに詳細に説明する。以下の実施例を例示目的で提供するが、本発明は該実施例によりいかなる様式にも限定されるものではない。当業者は、本質的に同じ結果をもたらすように変更または修飾することができる、様々な重大でないパラメータを容易に認識するであろう。

20

【0269】

実施例1. MC3の合成

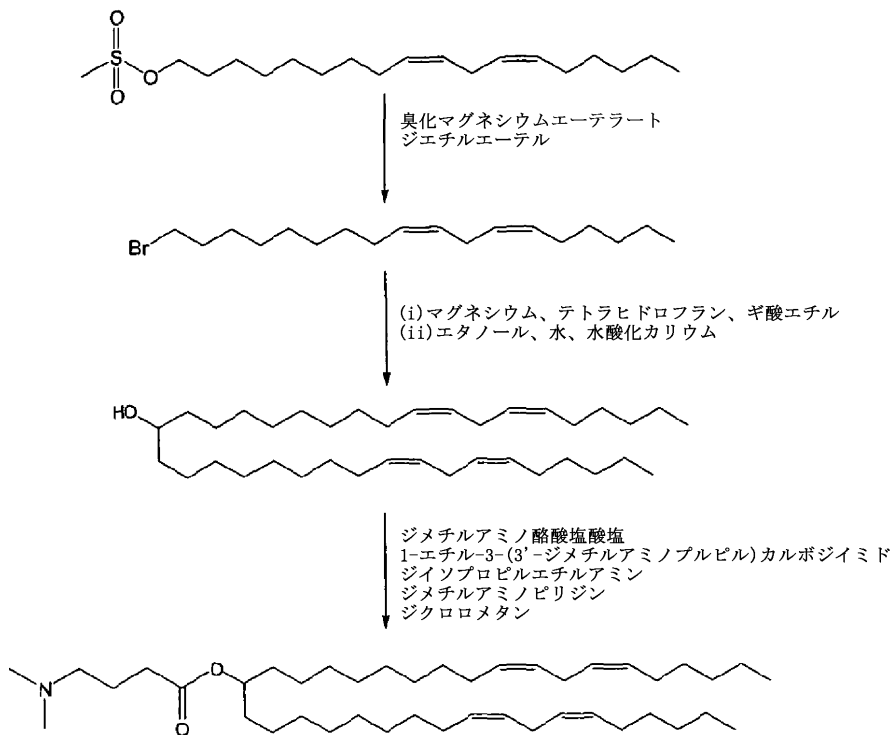
下に示す構造を有するMC3 (化合物1)を、下のスキーム1に記載するように合成した。



MC3

30

スキーム1



10

20

30

40

50

【0270】

工程1：臭化マグネシウムエーテラート（34g、110mmol）および攪拌子を2000mL丸底フラスコに加えた。フラスコを密封し、窒素を流した。無水ジエチルエーテル（400mL）を、カニユーレを介して加えた。次に、リノレニルメシレート（20g、58mmol）の無水エーテル（300mL）溶液を加え、懸濁液を一晩攪拌した。懸濁液を冷水500mLに注ぎ、2000-mL分液漏斗に移した。振盪後、有機相を分離した。次に、水相をエーテルで抽出（2×250mL）し、全てのエーテル相を混合した。エーテル相を水（2×250mL）、ブライン（250mL）で洗浄し、無水Mg₂SO₄で乾燥させた。溶液を濾過し、濃縮し、フラッシュクロマトグラフィーによって精製した。最終収量18.9g、99%。

【0271】

工程2：1リットルRBFに削り屑状マグネシウム（11.1g、463mmol）、無水THF（65mL）および攪拌子を入れ、窒素を流した。別のフラスコで、リノレイルプロミド（140g、425mmol）の無水THF（150mL）溶液を調製し、この溶液20mLをマグネシウムに加えた。大部分の熱が放散したときに、残りのプロミドを15分間かけて加えた。次に、温度を45℃で4時間維持した。次に、反応物を冷却（0℃）した。滴下漏斗を用いて、ギ酸エチル（32.4g、438mmol）の無水THF（150mL）溶液を40分間かけて加えた。反応物を室温で一晩攪拌した。反応物を-15℃に冷却し、5N HCl（185mL）をゆっくりと加えた。混合物を2L分液漏斗に移し、分離した。水（150mL）およびヘキサン（150mL）を加え、混合物を洗浄し、水相を再度除去した。有機相を最後に水（150mL）で洗浄し、次に黄色の油状物になるまで濃縮した。その黄色の油状物をEtOH（210mL）、水（30mL）およびKOH（15.8g）の混合物と共に室温で1.5時間攪拌した。EtOHを蒸発させ、残渣をヘキサン（50mL）で処理した。5N HCl（200mL）を滴下漏斗により加えた。有機相を水（2×50mL）で洗浄し、蒸発させ、乾燥させ、クロマトグラフィーによって精製した（ヘキサン中に0～5%のEtOAc、91g、81%）。

【0272】

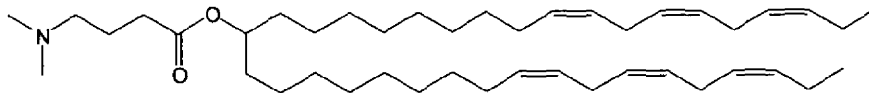
工程3：ジリノレイルメタノール（7.8g、14.9mmol）、ジメチルアミノ酪酸塩酸塩（2.99g、17.8mmol）および攪拌子を500mL RBFに加えた。フラスコに窒素を流し、無水DCM（120mL）を加え、続いてEDCI（3.6g、18.8mmol）、DIPEA（6.3mL、36.3mmol）およびDMAP（450mg、3.69mmol）を加えた。反応物を一晩攪拌した。反応物をDCM（300mL）で希釈し、飽和NaHCO₃（200mL）、水（300mL）および飽和NaCl（200mL）で洗浄した。それぞれの水性洗

浄液をDCM (50mL) で1回抽出した。有機相を混合し、乾燥させ (MgSO₄)、濃縮して、幾分結晶状物質を有する黄色の油状物を回収した。これをクロマトグラフィー (CHCl₃中に0~2%のMeOH) によって精製して、Lin-MC3を淡黄色の油状物として回収した (9.0g、14.1 mmol、95%)。

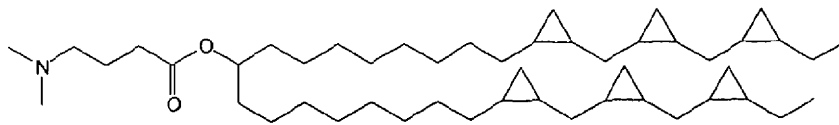
【0273】

実施例2. LenMC3およびCP-LenMC3の合成

下に示す構造を有するLenMC3 (化合物4) およびCP-LenMC3 (化合物5) を、下のスキーム2に記載するように合成した。LenMC3は、また、リノレニル-MC3およびDLen-MC3として知られている。CP-LenMC3はまた、CP-リノレニル-MC3およびCP-DLen-MC3としても知られている。

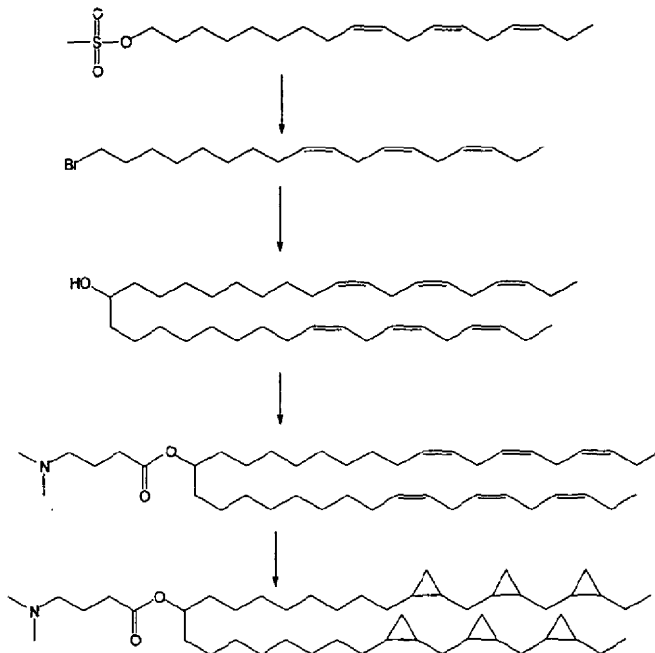


LenMC3



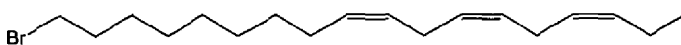
CP-LenMC3

スキーム2



【0274】

リノレニルブロミド (化合物2) の合成



C₁₈H₃₃Br
 計算精密質量: 328.18
 分子量: 329.36
 C, 65.64; H, 10.10; Br, 24.26

臭化マグネシウムエーテラート (34g、110mmol) および攪拌子を2000mL丸底フラスコに

10

20

30

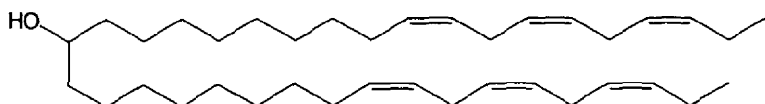
40

50

加えた。フラスコを密封し、窒素を流した。無水ジエチルエーテル（400mL）を、カニユーレを介して加えた。次に、リノレニルメシレート（20g、58mmol）の無水エーテル（300mL）溶液を加え、懸濁液を一晩攪拌した。懸濁液を冷水500mLに注ぎ、2000mL分液漏斗に移した。振盪後に、有機相を分離した。次に、水相をエーテル（2×250mL）で抽出し、全てのエーテル相を混合した。エーテル相を水（2×250mL）、ブライン（250mL）で洗浄し、無水Mg₂SO₄で乾燥させた。溶液を濾過し、濃縮し、フラッシュクロマトグラフィーによって精製した。最終収量19.1g、100%。

【0275】

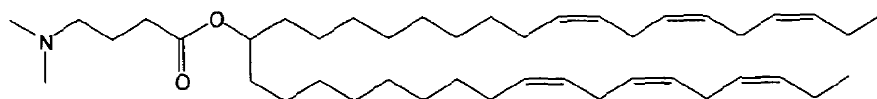
ジリノレニルメタノール（化合物3）の合成



削り屑状マグネシウム（2.1g、87mmol）、ヨウ素結晶5個および攪拌子を1000mL丸底フラスコに加えた。フラスコに窒素を流し、リノレニルプロミド（化合物2）（19.1g、58mmol）の無水ジエチルエーテル（500mL）溶液を、カニユーレを介して加えた。混合物は濁り、それを一晩還流した。混合物を室温に冷却し、ギ酸エチル（4.66mL、58mmol）を、シリンジを介して加えた。添加は、反応混合物への直接滴下により行い、濁った懸濁液を再度一晩攪拌した。この間に、反応物は鮮黄色に変化した。R.M.をエーテル（50mL）と共に2000mL分液漏斗に移し、10% H₂SO₄（200mL）、水（2×200mL）およびブライン（200mL）で洗浄した。有機相を無水MgSO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗収量は14.5gであった。TLCは、大部分の生成物がギ酸メチルであることを示し、それをカラムクロマトグラフィーによって精製した。精製されたギ酸エステル（9.3g、16.7mmol）を1000mL丸底フラスコに移し、EtOH（600mL）および攪拌子を加えた。攪拌しながら、水（25mL - 約5%の水溶液を形成させる）をゆっくりと加え、続いてKOH（2.0g、35.7mmol）を加えた。1時間後に、溶液は淡黄色に変化した。TLCは、反応が完了したことを示した。溶液をロータリーエバポレーターでその体積の50%に濃縮し、次に5% HCl 200mLに注いだ。水相をエーテル（3×200mL）で抽出した。エーテル画分を混合し、水（3×200mL）で洗浄し、乾燥させ（MgSO₄）、濃縮してジリノレニルメタノール8.9g（16.8mmol、58%）を回収した。

【0276】

Len-MC3（化合物4）の合成



ジリノレニルメタノール（化合物3）（2.5g、4.76mmol）、ジメチルアミノ酪酸塩酸塩（970mg、5.77mmol）および攪拌子を100mL RBFに加えた。フラスコに窒素を流し、無水DCM（40mL）を加え、続いてEDCI（FW 191.7、1.2g、6.26mmol）、DIPEA（2.1mL、12.1mmol）およびDMAP（150mg、1.23mmol）を加えた。反応物を一晩攪拌し、その結果、TLCは>80%の転換率を示した。反応物をDCM（100mL）で希釈し、飽和NaHCO₃（100mL）、水（200mL）および飽和NaCl（100mL）で洗浄した。水性洗浄液を混合し、DCM（2×50mL）で抽出した。次に、有機相を混合し、乾燥させ（MgSO₄）、濃縮して幾分結晶状物質を有する黄色の油状物を回収した。これをクロマトグラフィーによって精製してLen-MC3を淡黄色の油状物として回収した（2.3g、3.6mmol、76%）。

【0277】

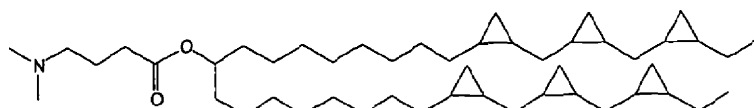
CP-LenMC3（化合物5）の合成

10

20

30

40



化学式: $C_{40}H_{67}NO_2$
 計算精密質量: 721.7
 分子量: 722.2
 元素分析: C, 81.49; H, 12.14; N, 1.94; O, 4.43

250mL RBFにLen-MC3 (化合物4) (1.1g, 1.72mmol)、攪拌子および無水DCM (40mL) を加えた。フラスコに N_2 を流し、0℃に冷却し、次に、ジエチル亜鉛の1Mヘキサン溶液 (30mL, 30mmol) を加えた。溶液を0℃で1時間攪拌し、次に、ジヨードメタン (2.4mL 30mmol) を加え、反応物を室温で一晩攪拌した。反応混合物を濃縮し、次にEtOAc (50mL) に再溶解した。EtOAcを5% HCl (2×50mL)、水 (50mL)、 $NaHCO_3$ (50mL)、水 (50mL)、およびブライン (50mL) で連続的に洗浄した。水性洗浄液を混合し、DCM (2×50mL) で抽出した。全ての有機相を混合し、乾燥させ、濃縮して粗CP-Len-MC3を得た。 1H -NMRは、オレフィンがまだ幾分存在することを示したことから、上に概略を述べたものと同じ手順および量を用いて化合物を再度処理した。今回は、クロマトグラフィー後に、 1H -NMRがオレフィンの全転換を示した。最終収量1.0g、1.39mmol、81%。

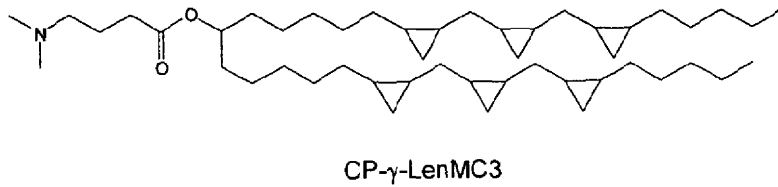
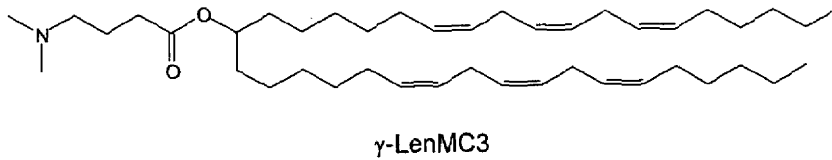
10

【0278】

実施例3. -LenMC3およびCP- -LenMC3の合成

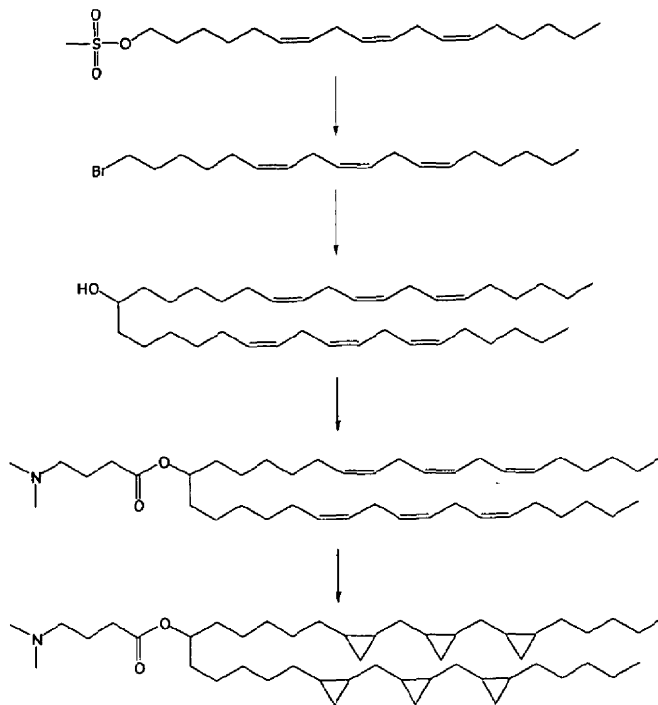
下に示した構造を有する -LenMC3 (化合物8) およびCP- -LenMC3 (化合物9) を下のスキーム3に記載したように合成した。 -LenMC3は、リノレニル-MC3、DLen-MC3、およびD- -Len-MC3としても知られている。CP- -LenMC3は、CP- リノレニル-MC3、CP- DL en-MC3、およびCP-D- -Len-MC3としても知られている。

20



10

スキーム3



20

30

【 0 2 7 9 】

-リノレニルプロミド (化合物6) の合成

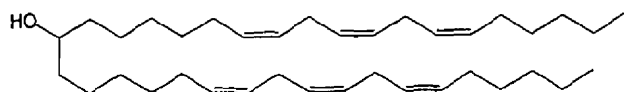


臭化マグネシウムエーテラート (34g、110mmol) および攪拌子を2000mL丸底フラスコに加えた。フラスコを密封し、窒素を流した。無水ジエチルエーテル (400mL) を、カニユーレを介して加えた。次に、-リノレニルメシレート (20g、58mmol) の無水エーテル (300mL) 溶液を加え、懸濁液を一晚攪拌した。懸濁液を冷水500mLに注ぎ、2000mL分液漏斗に移した。振盪後に、有機相を分離した。次に、水相をエーテル (2×250mL) で抽出し、全てのエーテル相を混合した。エーテル相を水 (2×250mL)、ブライン (250mL) で洗浄し、無水Mg₂SO₄で乾燥させた。溶液を濾過し、濃縮し、フラッシュクロマトグラフィーによって精製した。最終収量18.9g、99%。

40

【 0 2 8 0 】

ジ- -リノレニルメタノール (化合物7) の合成



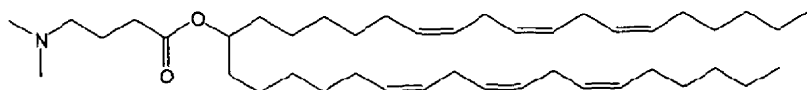
削り屑状マグネシウム (2.1g、87mmol)、ヨウ素結晶5個および攪拌子を1000mL丸底フラスコに加えた。フラスコに窒素を流し、ジ-リノレニルプロミド (化合物6) (18.9g、57mmol) の無水ジエチルエーテル (500mL) 溶液を、カニューレを介して加えた。混合物は濁り、それを一晚還流した。混合物を室温に冷却し、ギ酸エチル (4.66mL、58mmol) を滴下した。懸濁液を一晚攪拌し、それは鮮黄色に変化した。R.M. をエーテル (50mL) と共に2000mL分液漏斗に移し、10% 硫酸 (200mL)、水 (2×200mL) およびブライン (200mL) で洗浄した。有機相を無水MgSO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗収量は14.5gであった。TLCは、大部分の生成物がギ酸メチルであることを示し、それをカラムクロマトグラフィーによって精製した。精製されたギ酸エステルを1000mL丸底フラスコに移し、EtOH (600mL) および攪拌子を加えた。攪拌しながら、水 (25mL - 約5%の水溶液を形成させる) をゆっくりと加え、続いてKOH (2.0g、35.7mmol) を加えた。1時間後に、溶液は淡黄色に変化した。TLCは、反応が完了したことを示した。溶液をロータリーエバポレーターでその体積の50%に濃縮し、次に5% HCl 200mLに注いだ。水相をエーテル (3×200mL) で抽出した。エーテル画分を混合し、水 (3×200mL) で洗浄し、乾燥させ (MgSO₄)、濃縮して8.8gのジ-リノレニルメタノール (16.8mmol、58%) を回収した。

10

【0281】

-LenMC3 (化合物8) の合成

20



ジ-リノレニルメタノール (化合物7) (2.5g、4.76mmol)、ジメチルアミノ酪酸塩酸塩 (970mg、5.77mmol) および攪拌子を100mL RBFに加えた。フラスコに窒素を流し、無水DCM (40mL) を加え、続いてEDCI (1.2g、6.26mmol)、DIPEA (2.1mL、12.1mmol) およびDMAP (150mg、1.23mmol) を加えた。反応物を一晚攪拌した。反応物をDCM (100mL) で希釈し、飽和NaHCO₃ (100mL)、水 (200mL) および飽和NaCl (100mL) で洗浄した。水性洗浄液を混合し、DCM (2×50mL) で抽出した。次に、有機相を混合し、乾燥させ (MgSO₄)、濃縮して黄色の油状物を回収した。これをクロマトグラフィーによって精製して -Len-MC3を淡黄色の油状物として回収した (2.6g、4.1mmol、86%)。

30

【0282】

CP- -LenMC3 (化合物9) の合成



250mL RBFに -LenMC3 (化合物8) (1.28g、2.0mmol)、攪拌子および無水DCM (40mL) を加えた。フラスコにN₂を流し、0℃に冷却し、次に、ジエチル亜鉛の1Mヘキサン溶液 (30mL、30mmol、オレフィンに対して約5当量) を加えた。溶液を0℃で1時間攪拌し、次に、ジヨードメタン (2.4mL 50mmol) を加え、反応物を室温で一晚攪拌した。反応混合物を濃縮し、次にEtOAc (50mL) に再溶解した。EtOAcを5% HCl (2×50mL)、水 (50mL)、NaHCO₃ (50mL)、水 (50mL)、およびブライン (50mL) で連続的に洗浄した。水性洗浄液を混合し、DCM (2×50mL) で抽出した。全ての有機相を混合し、乾燥させ、濃縮して粗CP- -LenMC3を回収した。¹H-NMRは、オレフィンがまだ幾分存在することを示したことから、上に概略を述べたものと同じ手順および量を用いて化合物を再度処理した。今回、¹H-NMRはオレフィンの全転換を示した。クロマトグラフィー後の最終収量は、1.3g、1.8mmol、90%であった。

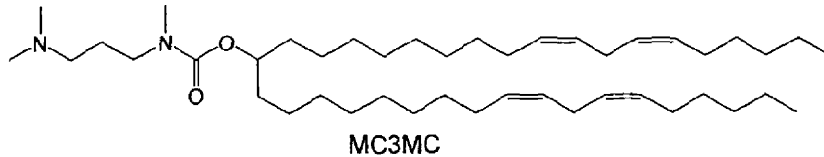
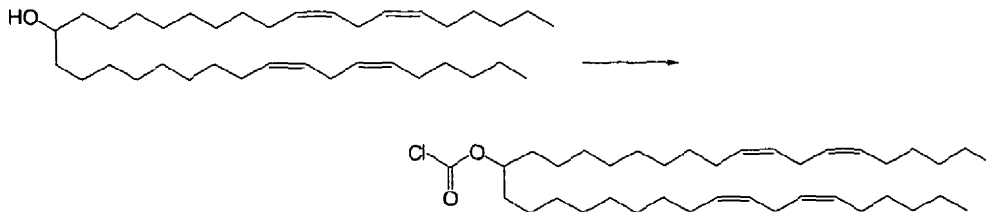
40

【0283】

50

実施例4. MC3MCの合成

下に示す構造を有するMC3MC（化合物10）を、下のスキーム4および5に記載するように合成した。

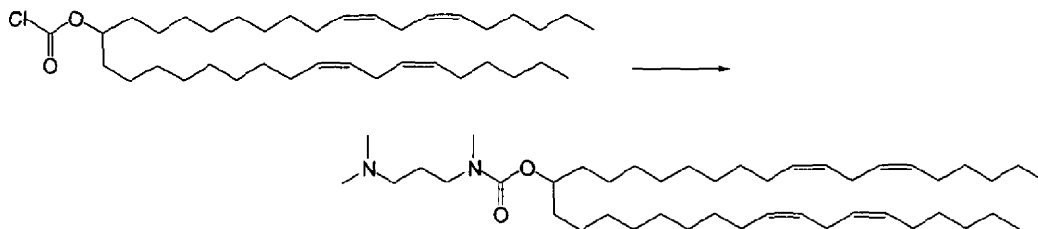
スキーム4

10

【0284】

50mL丸底フラスコにジリノレイルメタノール（3.06g、5.78mmol）および撹拌子を入れ、窒素を流した。無水DCM（30mL）を加え、続いてジホスゲン（1.75mL、14.46mmol、2.5当量）を加えた。反応物を一晩撹拌し、次にロータリーエバポレーターで濃縮し、クロマトグラフィーによって精製した。これにより、生成物を無色の油状物として回収した（2.6g、4.4mmol、76%）。

20

スキーム5

30

【0285】

クロロギ酸（350mg、0.59mmol）および撹拌子が入った50mL r.b.f.に窒素を流し、密封した。無水DCM（10mL）およびN,N,N'-トリメチル-1,3-プロパンジアミン（580mg、5mmol）を加え、反応物を4時間撹拌した。TLCは、反応が完了したことを示した。混合物をDCMで体積40mLまで希釈し、飽和NaHCO₃（30mL）、水（30mL）およびブライン（30mL）で洗浄した。水相を混合し、DCM（20mL）で1回抽出した。次に有機相を混合し、MgSO₄で乾燥させ、ロータリーエバポレーターによって濃縮した。精製により、生成物、350mg、0.52mmol、89%を淡色の油状物として回収した。

【0286】

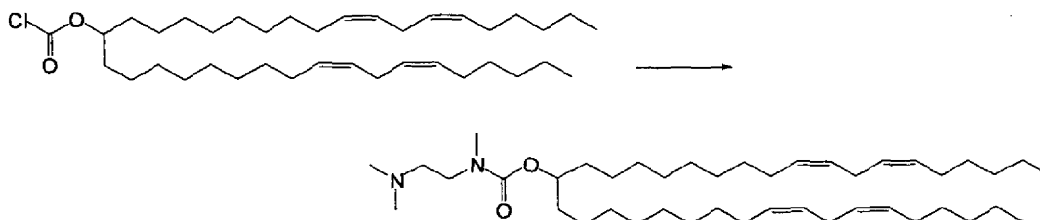
実施例5 MC2MCの合成

下に示す構造を有するMC2MC（化合物11）を、下のスキーム6に記載するように合成した。

40



スキーム6



10

【0287】

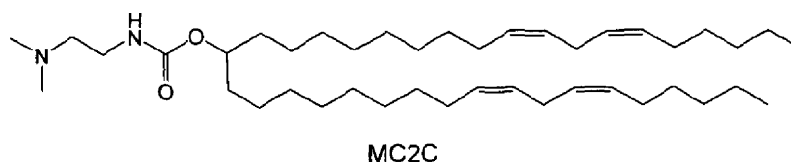
クロロギ酸 (400mg、0.68mmol) および攪拌子が入った50mL丸底フラスコに窒素を流し、密封した。無水DCM (10mL) およびN,N,N'-トリメチル-1,2-エタンジアミン (510mg、5mmol) を加え、反応物を一晩攪拌した。TLCは、反応が完了したことを示した。混合物をロータリーエバポレーターによって濃縮し、カラムクロマトグラフィーによって精製して生成物を淡色の油状物として回収した (350mg、0.53mmol、78%)。

20

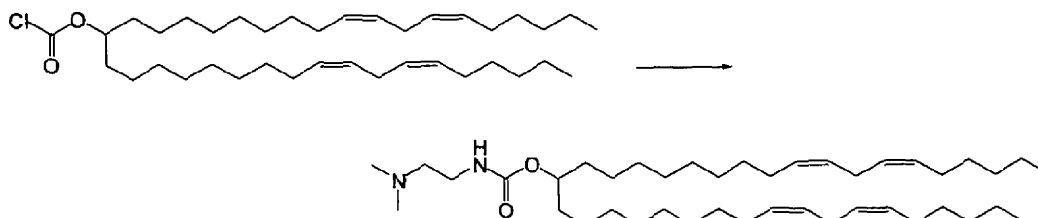
【0288】

実施例6. MC2Cの合成

下に示す構造を有するMC2C (化合物12) を、下のスキーム7に記載するように合成した。



スキーム7



30

【0289】

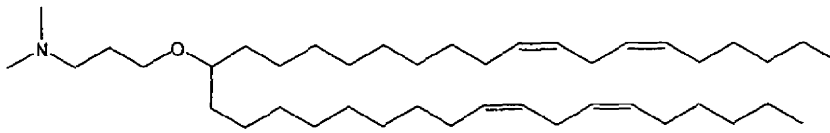
クロロギ酸 (400mg、0.68mmol) および攪拌子が入った50mL丸底フラスコに窒素を流し、密封した。無水DCM (10mL) およびN,N'-ジメチルエチレンジアミン (440mg、5mmol) を加え、反応物を一晩攪拌した。TLCは、反応が完了したことを示した。混合物をロータリーエバポレーターによって濃縮し、カラムクロマトグラフィーによって精製して生成物を淡黄色の油状物として回収した (350mg、0.54mmol、80%)。

40

【0290】

実施例7. MC3エーテルの合成

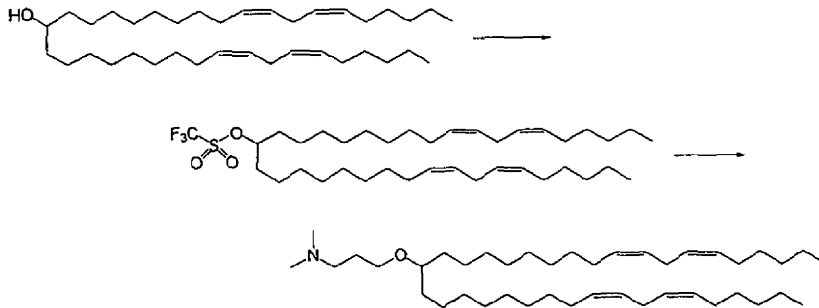
下に示す構造を有するMC3エーテル (化合物13) を、下のスキーム8に記載するように合成した。



化学式: $C_{37}H_{77}NO$
 計算精密質量: 613.6
 分子量: 614.1
 元素分析: C, 82.15; H, 12.97; N, 2.28; O, 2.61

MC3エーテル

スキーム8



10

【0291】

20

撹拌子を有する50mL RBFに窒素および無水DCM (4mL) を流した。無水トリフル酸 (0.7g、420 μ L、2.5mmol) を加え、フラスコを-15 に冷却した。無水ピリジン (198mg、202 μ L、2.5mmol) をゆっくりと加え、発煙および白色沈殿を発生させた。ジリノレイル(dilino leyl)メタノール (1.06g、2mmol) の無水DCM (2mL) 溶液を2分間かけてゆっくりと加えた。約-15 で2時間撹拌後に、反応物の色は、オフホワイトであった。TLCは、トリフレーションの形成を示したので、反応を止めるために水 (2mL) を加えた。DCM (10mL) を加え、混合物を水 (2 \times 20mL) で洗浄し、乾燥させ ($MgSO_4$)、濾過し、25mL丸底フラスコに移した。プロトンスポンジ (1.07g、5mmol、最小で2.5当量)、ジメチルアミノプロパノール (515mg、5mmol、最小で2.5当量) および撹拌子を加え、容器に窒素を流し、冷却器を装着し、48時間還流した。水 (10mL) を加え、数分間激しく撹拌した後に30mL分液漏斗中で分離させた。有機相を水 (10mL) で再度洗浄し、 $MgSO_4$ で乾燥させ、濃縮し、クロマトグラフィー (MeOH/ $CHCl_3$) によって精製して生成物を淡黄色の油状物として回収した (400mg、33%)。

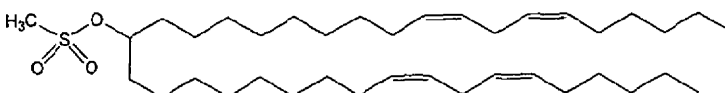
30

【0292】

または、MC3エーテル (化合物13) を、ジリノレイルメタノール (DLinMeOH) から出発して以下のように合成した。

【0293】

化合物14の合成



化学式: $C_{37}H_{70}O_2S$
 計算精密質量: 606.5
 分子量: 607.0
 元素分析: C, 75.19; H, 11.62; O, 7.91; S, 5.28

40

【0294】

撹拌子を有する50mL RBFに窒素を流し、DLinMeOH (1060mg、2mmol)、TEA (6mmol、834 μ L) および無水DCM (20mL) を加えた。フラスコを0 に冷却し、いずれかのMsCl (6mmol) を加えた。反応物を一晩撹拌した。反応物をDCMで70mLに希釈し、飽和 $NaHCO_3$ (2 \times 50mL) および飽和 $NaCl$ (50mL) で洗浄し、乾燥させ ($MgSO_4$)、濾過し、濃縮し、カラムクロマトグラフィー (ヘキサン中の1~4% EtOAc) によって精製した。収量900mg、75%。

50

【0295】

MC3エーテルの合成

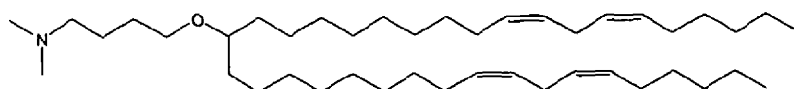
撈拌子を有する50mL RBFに窒素を流し、NaH (220mg、9mmol)、ジメチルアミノプロパノール (927mg、1.06mL、9mmol) および無水ベンゼン (10mL) を加えた。発泡が小さくなってから、化合物14 (440mg、0.75mmol) を加え、RMを90 で一晩還流した。TLCは、30~50%の生成物形成を示した。RMを次の夜も還流したが、TLCはさらなる反応を示したようには見えなかった。反応物をベンゼンで40mLに希釈し、エタノール (25mL) で反応を止めた。次に、それを水 (40mL) で洗浄し、乾燥させ、濃縮した。粗生成物を精製して、生成物を淡黄色の油状物 (157mg、33%) として回収した。

【0296】

10

実施例8. MC4エーテルの合成

下に示す構造を有するMC4エーテル (化合物15) を、下に記載するように合成した。



化学式: $C_{40}H_{76}NO$
 計算精算精密質量: 627.6
 分子量: 628.1
 元素分析: C, 82.22; H, 13.00; N, 2.23; O, 2.55

MC4エーテル

【0297】

20

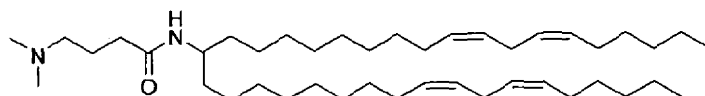
撈拌子を有する50mL RBFに窒素を流し、NaH (220mg、9mmol)、ジメチルアミノプロパノール (1.05g、9mmol) および無水ベンゼン (10mL) を加えた。発泡が小さくなってから、化合物14 (440mg、0.75mmol) を加え、RMを90 で一晩還流した。TLCは、幾分の生成物の形成を示した。反応物をベンゼンで40mLに希釈し、エタノール (25mL) で反応を止めた。次に、それを水 (40mL) で洗浄し、乾燥させ、濃縮した。粗生成物を精製して、生成物を淡黄色の油状物 (145mg、31%) として回収した。

【0298】

実施例9. MC3アミドの合成

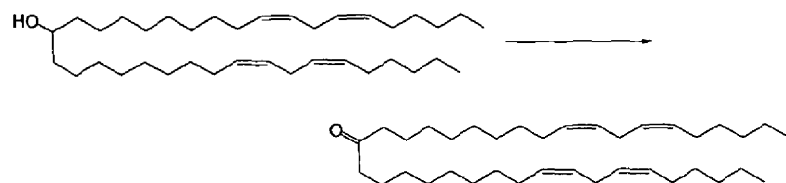
下に示す構造を有するMC3アミド (化合物16) を、下のスキーム9~11に記載するように合成した。

30



MC3アミド

スキーム9



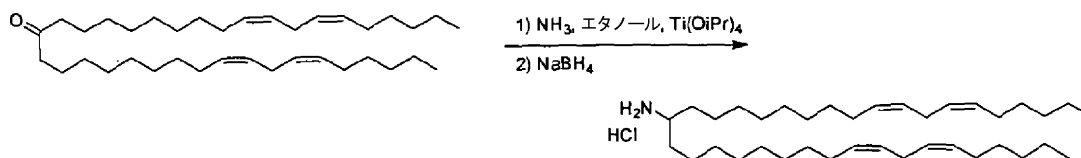
40

【0299】

ジリノレイルメタノール (10g、18.9mmol) のDCM (200mL) 溶液が入った500mL RBFにクロロクロム酸ピリジニウム (12.24g、56.7mmol)、無水炭酸ナトリウム (1.0g、9.5mmol) および撈拌子を加えた。結果として生じた懸濁液を窒素下にて室温で3時間撈拌し、その後TLCは、全てのSMが消費されたことを示した。次に、エーテル (300mL) を混合物に加え、結果として生じた褐色の懸濁液はシリカのパッド (300mL) を通して濾過し、パッドをエーテル (3x100mL) で洗浄した。エーテル相を混合し、濃縮し、精製して9.0g (17.1mmol、90%) のケトンを得た。

50

スキーム10

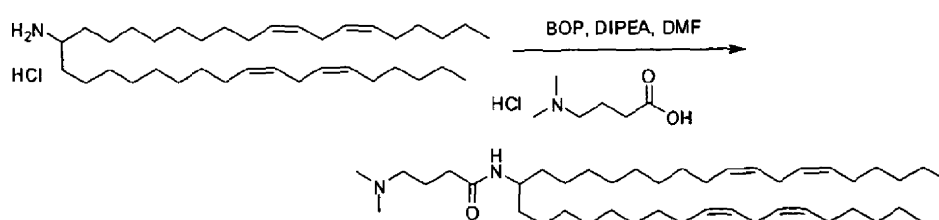


【0300】

2Mアンモニア中のジリノレイルケトン（1.0g、1.9mmol）のエタノール（5mL）溶液に、チタン(IV)イソプロポキシド（1.15mL、3.8mmol）を加えた。溶液を窒素下にて室温で6時間攪拌し、次に水素化ホウ素ナトリウム（110mg、3.8mmol）を加えた。溶液は、約5分間発泡し、次に無色の沈殿が形成し始めた。溶液を室温で16時間攪拌し、10% NH_4OH （25mL）で反応を止め、酢酸エチル（50mL）で希釈した。無機固体を濾過し、水相を酢酸エチル（2×75mL）で洗浄した。混合した酢酸エチル抽出物を2M HCl （2×50mL）で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、乾燥するまで濃縮して生成物を淡黄色の HCl 塩として得た（1.1g、定量的）。

10

スキーム11



20

【0301】

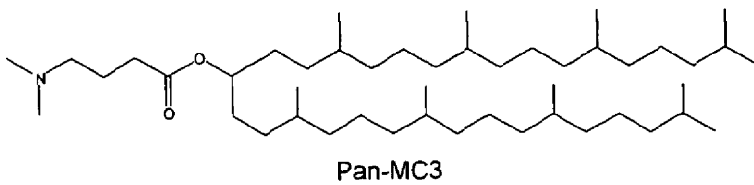
ジリノレイルメチルアミン塩酸塩（1.1g、1.95mmol）、BOP（1.1g、2.4mmol）および4-(ジメチルアミノ)ブタン酸塩酸塩（402mg、2.4mmol）の無水DMF（20mL）溶液に、ジイソプロピルエチルアミン（1.4mL、7.8mmol）を加えた。溶液を室温で16時間攪拌した。溶液を真空中で乾燥するまで濃縮し、酢酸エチル（100mL）に溶解した。酢酸エチルをブライン（3×50mL）で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー（ CHCl_3 中に1%～2.5%の MeOH ）によって精製して橙色の油状物として生成物を得た。シリカゲルのパッドを通す脱色（50%ヘキサン-酢酸エチル～100%酢酸エチルで溶出した）によって、生成物を淡黄色の油状物として得た（151mg、12%）。

30

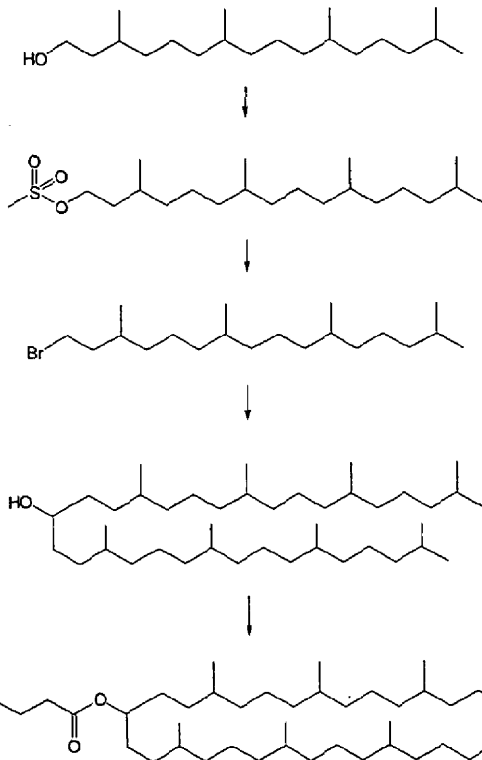
【0302】

実施例10. Pan-MC3の合成

下に示す構造を有するフィタニル-MC3（「Pan-MC3」）（化合物17）を、下のスキーム12に記載するように合成した。



スキーム12

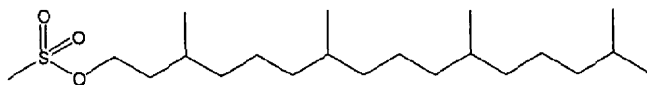


10

20

【0303】

フィタニルメシレートの合成



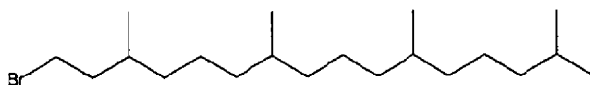
30

フィタノール (14.98g、50.2mmol) の無水ジクロロメタン (150mL) 溶液に、窒素下でトリエチルアミン (7.7mL、55.2mmol) を加えた。溶液を -10 に冷却し、次にメタンスルホニルクロリド (11.51g、100.5mmol) の無水ジクロロメタン (100mL) 溶液を30分間かけて滴下した。完了と同時に、溶液を、ジクロロメタンを用いて500mLに希釈した。溶液を飽和NaHCO₃で2回洗浄し、MgSO₄で乾燥させ、濾過し、乾燥するまで濃縮して生成物を無色の油状物として得た (18.9g、100%)。

40

【0304】

フィタニルブロミドの合成



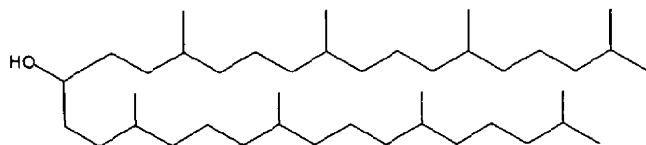
臭化マグネシウムジエチルエーテラート (25.9g、100.3mmol) の無水ジエチルエーテル (250mL) 懸濁液に窒素下にて室温でフィタニルメシレート (18.9g、50.2mmol) の無水ジエチルエーテル (200mL) 溶液を15分間かけて滴下した。結果として生じたスラリーを室温で72時間攪拌した。完了と同時に反応混合物を0 に冷却し、全ての固体が溶解し発泡が停止するまで氷冷水を滴下した。ジエチルエーテル (300mL) を加え、有機層と水層を

50

分離した。水層をジエチルエーテル（200mL）で逆抽出した。混合したジエチルエーテル抽出物をMgSO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。結果として生じた油状物をカラムクロマトグラフィー（カラム10"L×2"W；100%ヘキサンで溶出した）によって精製して、生成物を淡黄色の油状物として得た（16.3g、90%）。

【0305】

ジフィタニルメタノールの合成



10

削り屑状マグネシウム(1.18g、48.5mmol)をオープンに入れて250 で1時間加熱し、次に窒素下にて室温で2時間撹拌した。無水ジエチルエーテル(300mL)およびヨウ素結晶1個を加え、続いてフィタニルプロミド(15.2g、42.1mmol)の無水ジエチルエーテル(30mL)溶液を加えた。結果として生じた濁った混合物を一晩加熱還流した。溶液を冷却(0)し、ギ酸エチル(3.9mL、48.5mmol)の無水ジエチルエーテル(15mL)溶液を25分間かけて滴下した。結果として生じた黄色の溶液を再度一晩撹拌した。黄色溶液を冷却(0)し、5M HCl(15mL)を用いて反応を止め、次にヘキサン(100mL)および水(150mL)を加えた。水層と有機層とを分離させ、水層をヘキサンで2回逆抽出した。混合した有機層を水で洗浄し、MgSO₄で乾燥させ、濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮した。

20

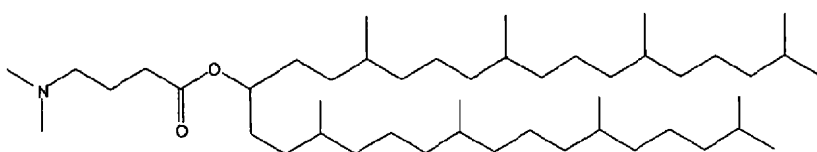
【0306】

結果として生じた淡黄色の油状物をエタノール(25mL)に溶解し、水酸化カリウム(2.2g、39.2mmol)の水溶液(5mL)が入ったフラスコに移した。結果として生じた二相溶液を10 で2.5時間撹拌した。エタノールを真空中で除去し、ヘキサン(25mL)および5M HCl(35mL)を加えた。有機層と水層とを分離させ、有機層を水で2回洗浄した。混合した有機層をMgSO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。結果として生じた淡黄色の油状物をカラムクロマトグラフィー（カラム12"L×2"W；100%ヘキサン ヘキサン中に2% 4%のエチルエーテルの勾配で溶出した）によって精製して生成物を淡黄色の油状物として得た（6.4g、49%）。

30

【0307】

フィタニル-MC3の合成



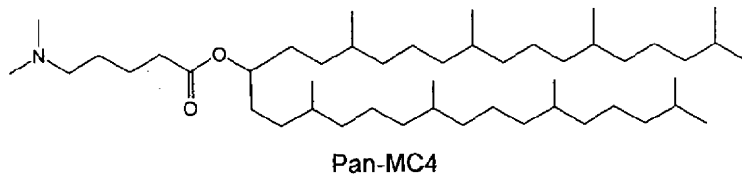
ジフィタニルメタノール(6.4g、10.3mmol)および4-(ジメチルアミノ)酪酸塩酸塩(2.25g、13.4mmol)の無水ジクロロメタン(60mL)溶液に、窒素下にて室温でEDC(2.77g、18.0mmol)、ジイソプロピルエチルアミン(5.4mL、31.0mmol)、および4-ジメチルアミノピリジン(45mg、0.37mmol)を加えた。16時間後に反応混合物をジクロロメタン(75mL)で希釈した。有機層を飽和NaHCO₃、水、およびブラインで洗浄し、次にMgSO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。結果として生じた黄色の油状物をカラムクロマトグラフィー（カラム10"L×2"W；100%ヘキサン ヘキサン中に10% 50%酢酸エチルの勾配で溶出した）によって精製して、幾分のフィタニルメタノール(2.81g、44%)を回収すると共に生成物を淡黄色の油状物として得た（3.53g、49%）。

40

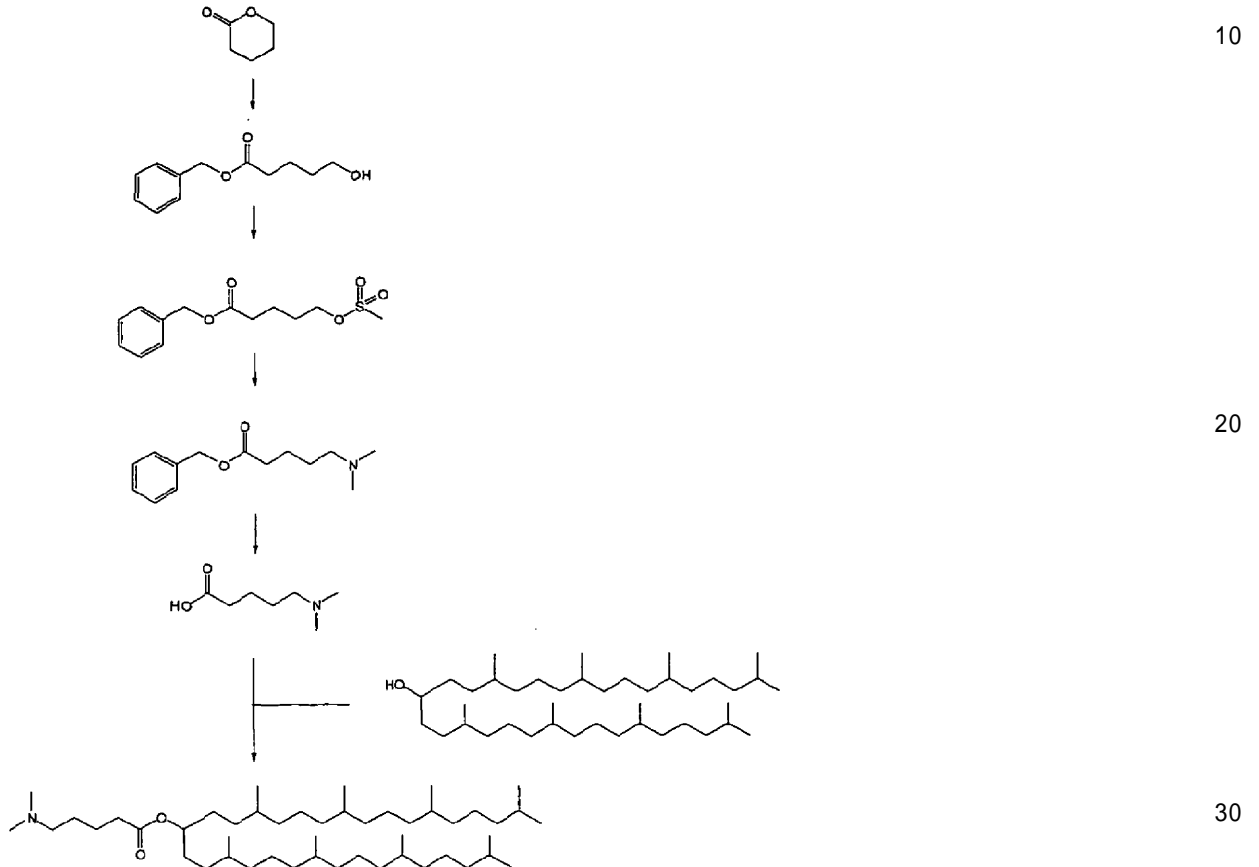
【0308】

実施例11. Pan-MC4の合成

下に示す構造を有するフィタニル-MC4（「Pan-MC4」）（化合物18）を下のスキーム13に記載するように合成した。

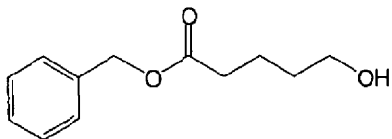


スキーム13



【0309】

ベンジル5-ヒドロキシペンタノエートの合成

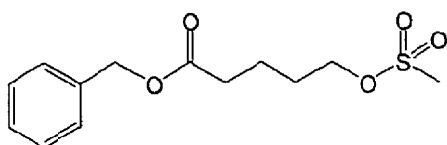


-バレロラクトン (10g、100mmol) を1M水酸化ナトリウム水溶液 (100mL) に溶かした溶液を65 で攪拌しながら一晩加熱した。溶液を乾燥するまで真空中で濃縮し、残留水があれば高真空下にて-190 で除去した。結果として生じた白色粉末を壊し、アセトン (40mL) 中に懸濁した。攪拌しながら、ベンジルブロミド (17g、101.4mmol) およびテトラブチルアンモニウムブロミド (0.82g、2.539mmol) を加えた。混合物を攪拌しながら45 で72時間加熱し、冷却し、濃縮した。結果として生じた白色の油状粉末を酢酸エチル (300mL) に溶解し、飽和NaHCO₃ およびブラインでそれぞれ2回洗浄した。有機部分を無水MgSO₄ で乾燥させ、濾過し、次に濃縮した。結果として生じたものは黄色の油状物であり、それをカラムクロマトグラフィー (カラム10"L x 2"W ; 100%ヘキサン ヘキサン中に30% 50%酢酸エチルの勾配で溶出した) によって精製して生成物を淡黄色の油状物として得た (3.11g、15%) 。

40

50

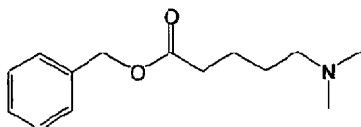
【0310】

ベンジル5-(メタンスルホニル)ペンタノエートの合成

ベンジル5-ヒドロキシペンタノエート (2.01g、9.65mmol) の無水ジクロロメタン (30mL) 溶液に、窒素下にて-15 でトリエチルアミン (2.7mL、19.3mmol) を加え、続いてメタンスルホニルクロリド溶液 (1.5mL、19.3mmol) を20分間かけて滴下した。反応物を室温で一晩攪拌し、次にジクロロメタンを用いて75mLに希釈した。有機層を飽和NaHCO₃で3回洗浄し、混合した水層をジクロロメタンで逆抽出した。混合した有機相をMgSO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。結果として生じた暗橙色の油状物をカラムクロマトグラフィー (カラム5"L×1"W; 100%ヘキサンヘキサン中に10% 20% 25%のジエチルエーテルの勾配で溶出した) によって精製して生成物を淡黄色の油状物として得た (1.39g、50%) 。

10

【0311】

ベンジル5-(ジメチルアミノ)ペンタノエートの合成

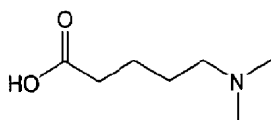
20

ベンジル5-(メタンスルホニル)ペンタノエート (1.39g、4.85mmol) をジメチルアミンの5.6Mエタノール (100mL) 溶液中で20時間反応させた。次に溶液を乾燥するまで真空中で濃縮した。結果として生じた褐色の油状物をカラムクロマトグラフィー (カラム10"L×1"W; 100%ジクロロメタンジクロロメタン中に2%/0.5% 4%/0.5% MeOH/NH₄OHの勾配で溶出した) によって精製して生成物を黄色の油状物として得た (0.79g、69%) 。

【0312】

5-(ジメチルアミノ)ペンタン酸の合成

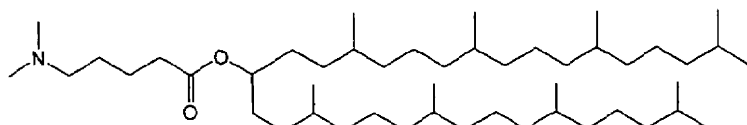
30



5-(ジメチルアミノ)ベンジルペンタノエート (0.79g、33.6mmol) の無水酢酸エチル (20mL) 溶液に窒素下にて室温で10%パラジウム担持炭 (250mg) を加えた。溶液を水素雰囲気下にて激しく攪拌した。16時間後にさらなるパラジウム担持炭 (100mg) を加えて反応を促進し、24時間目に水素ガスを溶液に泡立て入れた。40時間目に溶液はセライトを通して濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮して生成物を黄色の油状物として得た (295mg、60.4%) 。

40

【0313】

フィタニル-MC4の合成

ジフィタニルメタノール (0.8g、1.3mmol) および4-(ジメチルアミノ)ペンタン酸 (0.24g、1.7mmol) の無水ジクロロメタン (10mL) 溶液に、窒素下にて室温でEDC (0.347g、1.8mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (0.67mL、3.9mmol)、および4-ジメチルアミノピリジン (45mg、0.37mmol) を加えた。20時間後にさらなる5-(ジメチルアミノ)ペンタン酸

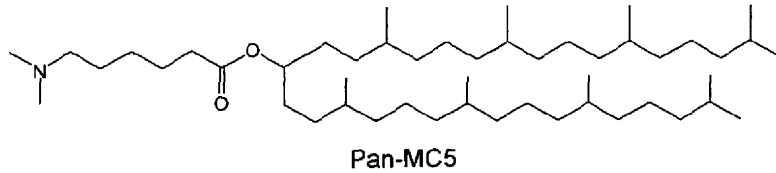
50

(0.05g, 0.34mmol)を加えて反応を促進した。反応物をさらなる52時間攪拌し、次にジクロロメタンを用いて50mLに希釈した。有機相を飽和NaHCO₃、水、およびブラインで洗浄し、混合した水層をジクロロメタンで逆抽出した。混合した有機層をMgSO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。結果として生じた黄色の油状物をカラムクロマトグラフィー(カラム10"L×1¹/₄"W; 100%ヘキサンヘキサン中に10%50%酢酸エチルの勾配で溶出した)によって精製して、幾分のジフィタニルメタノール(348mg、43.5%)を回収すると共に淡黄色の油状物として生成物を得た(474mg、51%)。

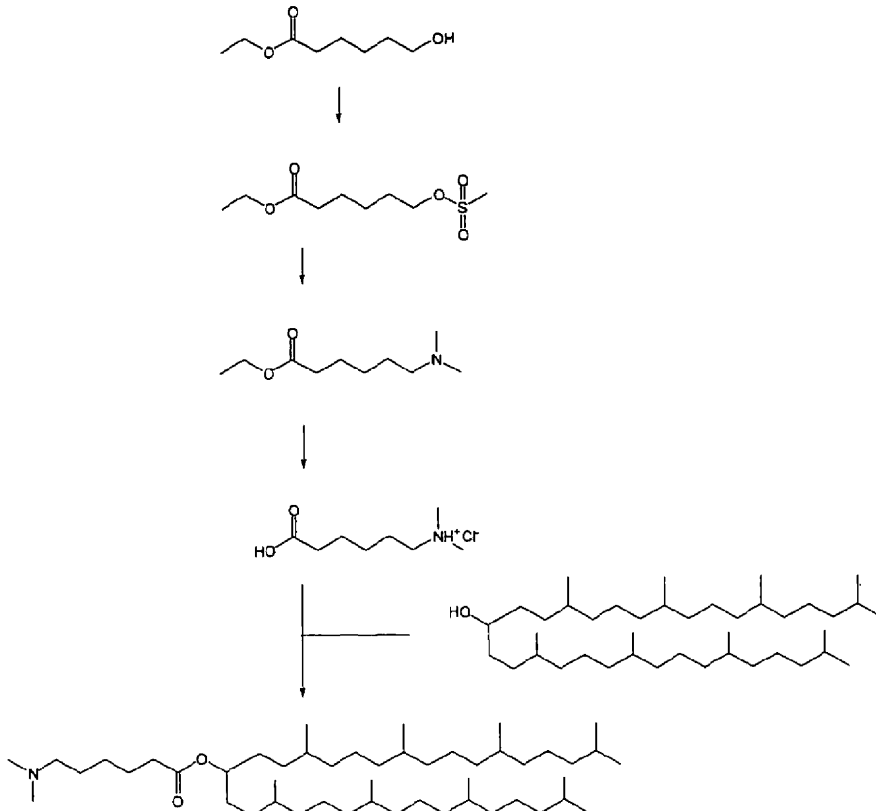
【0314】

実施例12. Pan-MC5の合成

下に示す構造を有するフィタニル-MC5(「Pan-MC5」)(化合物19)を、下のスキーム14に記載するように合成した。

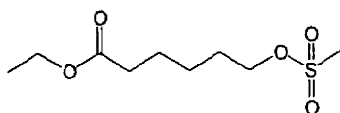


スキーム14



【0315】

エチル6-(メタンシルホニル)ヘキサノエートの合成

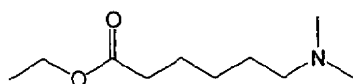


エチル6-ヒドロキシヘキサノエート (5g、31.2mmol) の無水ジクロロメタン (115mL) 溶液に窒素下にて-10 でトリエチルアミン (8.7mL、62.5mmol) を加え、続いてメタンスルホニルクロリド (4.8mL、62.5mmol) を1時間かけて滴下した。結果として生じた溶液を室温で6時間攪拌し、次にジクロロメタンを用いて300mLに希釈した。溶液を飽和NaHCO₃で2回洗浄し、水層をジクロロメタンで逆抽出した。混合した有機層をMgSO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。結果として生じた暗橙色の油状物をカラムクロマトグラフィー (カラム 5"L×2"W; 100%ヘキサン ヘキサン中に10% 20%酢酸エチルの勾配で溶出した) によって精製して生成物を淡黄色の油状物として得た。

10

【0316】

エチル6-(ジメチルアミノ)ヘキサノエートの合成

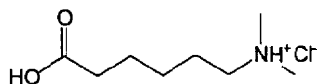


エチル6-(メタンスルホニル)ヘキサノエートを5.6Mジメチルアミン-エタノール溶液 (100mL) 中で17時間反応させた。次に、溶液を乾燥するまで真空中で濃縮した。結果として生じた鮮橙色のペーストをカラムクロマトグラフィー (カラム5"L×2"W; 100%ジクロロメタン ジクロロメタン中に1%/0.25% 2%/0.5% MeOH/NH₄OHの勾配で溶出した) によって精製して生成物を黄色の油状物として得た。

20

【0317】

6-(ジメチルアミノ)ヘキサン酸塩酸塩の合成

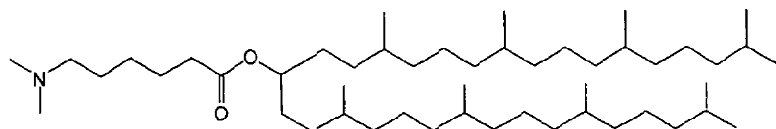


エチル6-(ジメチルアミノ)ヘキサノエート (5.85g、31.2mmol) のジオキサン (200mL) 溶液に、1M NaOH (200mL) を加えた。溶液を室温で2時間激しく攪拌し、次にジオキサンを真空中で除去した。結果として生じた水溶液を、濃HCl (15mL) を用いてわずかに酸性にした。この時点で、ジクロロメタンおよびエーテルを使用して溶液から生成物を抽出しようと試みた。しかし、全ての試みは失敗した。代わりに、高真空下で水を除去して、NaCl中に約35重量%の6-(ジメチルアミノ)ヘキサン酸塩酸塩という混合物であるオフホワイト色の固体として生成物を得た。

30

【0318】

フィタニル-MC5の合成



40

ジフィタニルメタノール (1.5g、2.4mmol) および35% 6-(ジメチルアミノ)ヘキサン酸塩酸塩 (1.79g、3.2mmol) の無水ジクロロメタン (15mL) 溶液に、窒素下にて室温でEDC (0.65g、3.4mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (1.26mL、7.2mmol) および4-ジメチルアミノピリジン (10mg) を加えた。48時間後にさらなる35% 6-(ジメチルアミノ)ヘキサン酸 (1g、1.8mmol)、EDC (0.32g、1.7mmol) および4-ジメチルアミノピリジン (15mg) を加えた。さらなる72時間の後に反応混合物を、ジクロロメタンを用いて75mLに希釈し、次に水、飽和NaHCO₃、およびブラインで洗浄した。混合した水層をジクロロメタンで2回逆抽出し、混合した有機層をMgSO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。結果として生じた黄色の油状物をカラムクロマトグラフィー (カラム1¹/₄"W×10"L; 100%ヘキサン ヘキ

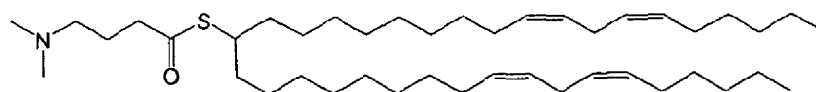
50

サン中に10% 50%酢酸エチルの勾配で溶出した)によって精製して、幾分のジフィタニルメタノールを回収すると共に黄色の油状物として生成物を得た(175mg、10%)。

【0319】

実施例13. MC3チオエステルの合成

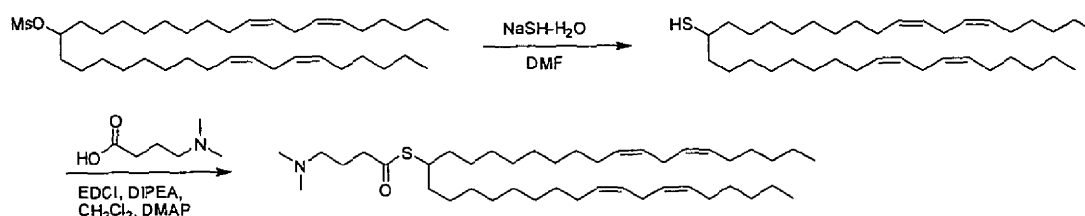
下に示す構造を有するMC3チオエステル(化合物20)を下のスキーム15に記載するように合成した。



MC3チオエステル

10

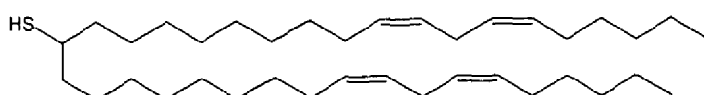
スキーム15



【0320】

(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-チオールの合成

20

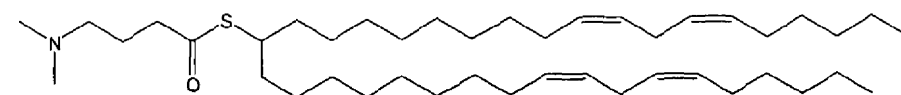


(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルメタンスルホネート(2.0g、3.3mmol)の無水DMF(15mL)溶液を、NaSH·H₂O(925mg、16.5mmol)で処理し、加熱した(70℃、2時間)。混合物を冷まし(室温)、H₂Oで希釈し、Et₂Oで抽出した(3×)。有機抽出液をブラインで洗浄し、次に乾燥させ(Na₂SO₄)、濾過し、濃縮した。粗物質をクロマトグラフィー(ヘキサン 2% EtOAc-ヘキサン)に供して、(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-チオール(1.31g、73%)を淡黄色の油状物として回収した。R_f 0.9(10% EtOAc-ヘキサン)、FW 544.50、C₃₇H₆₈S。

30

【0321】

S-(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4(ジメチルアミノ)ブタンチオエート(MC3チオエステル)の合成



(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-チオール(500mg、0.92mmol)およびN,N-ジメチルアミノ-酪酸塩酸塩(200mg、1.2mmol)の無水CH₂Cl₂(3mL)溶液を、EDC(229mg、1.2mmol)、ヒューニツヒ塩基(481μL、2.8mmol)およびDMAP(18mg)で処理した。攪拌後(2h)、溶液をCH₂Cl₂で希釈し、NaHCO₃(飽和水溶液)およびブラインで洗浄し、次に乾燥させ(Na₂SO₄)、濾過し、濃縮した。粗物質をクロマトグラフィー(CH₂Cl₂ 3% CH₃OH-CH₂Cl₂)に供して、S-(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4(ジメチルアミノ)ブタンチオエート(197mg、33%)を無色の油状物として回収した。

40

Rf 0.4 (8% CH₃OH-CHCl₃), ¹H NMR

(400MHz, CDCl₃, δ_H) 5.41-5.28 (m, 8 H, HC=CH x 8), 3.53-3.45 (m, 1 H, CHSCO), 2.77 (app. t, 4 H, C=CHCH₂HC=C x 2), 2.56 (t, 2 H, CH₂COS), 2.27 (t, 2 H, CH₂N(CH₃)₂), 2.21 (s, 6 H, N(CH₃)₂), 2.10-1.97 (m, 8 H, CH₂HC=C x 4), 1.85-1.76 (m, 2 H, CH₂), 1.63-1.43 (m, 4 H, CH₂ x 2), 1.42-1.20 (m, 36 H, CH₂ x 18), 0.89 (t, 6 H, CH₃ x 2). FW 659.14,

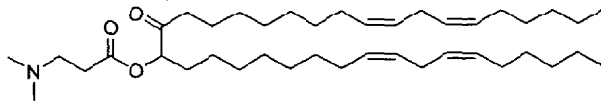
C₄₃H₇₉NOS

【 0 3 2 2 】

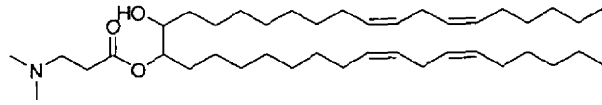
10

実施例14. 化合物21~24の合成

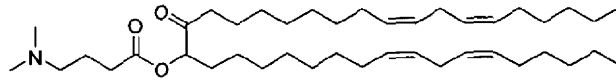
下に示す構造を有する(6Z,9Z,27Z,30Z)-19-オキソヘキサトリアコンタ-6,9,27,30-テトラエン-18-イル3-(ジメチルアミノ)プロパノエート(化合物21)、(6Z,9Z,27Z,30Z)-19-ヒドロキシヘキサトリアコンタ-6,9,27,30-テトラエン-18-イル3-(ジメチルアミノ)プロパノエート(化合物22)、(6Z,9Z,27Z,30Z)-19-オキソヘキサトリアコンタ-6,9,27,30-テトラエン-18-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(化合物23)、および(6Z,9Z,27Z,30Z)-19-ヒドロキシヘキサトリアコンタ-6,9,27,30-テトラエン-18-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(化合物24)を、下のスキーム16の記載するように合成した。



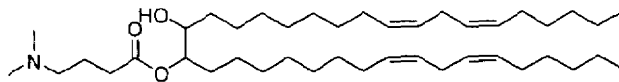
化合物 21



化合物 22



化合物 23

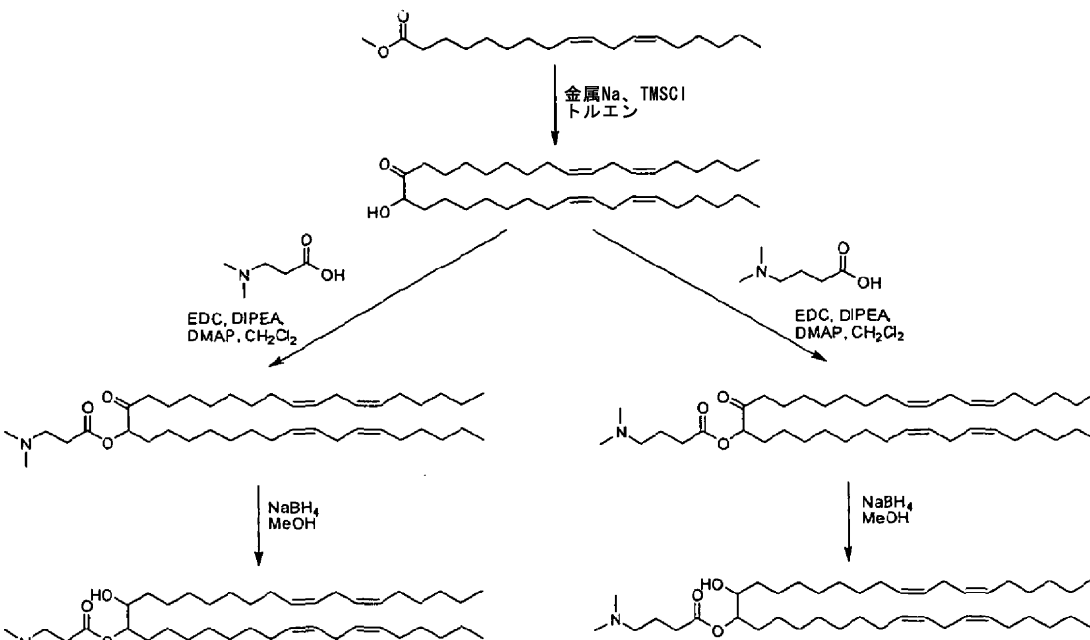


化合物 24

10

20

スキーム16

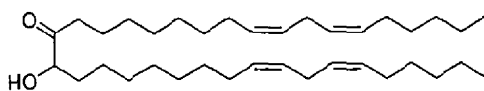


30

40

【 0 3 2 3 】

(6Z,9Z,27Z,30Z)-19-ヒドロキシヘキサトリアコンタ-6,9,27,30-テトラエン-18-オンの合成



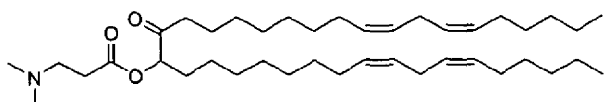
窒素パージした500mL丸底フラスコに、無水トルエン(70mL)を加え、続いて金属ナトリウムの薄切片(4.25g、185mmol)を加えた。クロロトリメチルシラン(17mL、136.1mmo

50

1) をゆっくりと加え、反応物を40 に加熱した。この溶液にリノール酸メチル (10g、32.4mmol) を45分間かけて滴下した。溶液を2時間還流し、その時点でナトリウムは大きな塊から1~2mmの小さなビーズ状に変化した (約1.5時間後に反応液は紫色に変わった)。反応物を室温に冷まし、メタノール (25mL) を用いて0 で30分間かけて反応をゆっくりと止めた。未反応の金属ナトリウムがいったん溶解してから、反応混合物はセライトを通して濾過し、エーテル (400mL) ですすいだ。濾液 (約400~500mL) を飽和塩化アンモニウム (300mL) と共に16時間激しく攪拌した。完了時に、エーテル/トルエン層を分離し、ブライン (1×100mL) で洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮した。その黄色の油状物をカラムクロマトグラフィー (勾配: 100%ヘキサン~ヘキサン中に5% EtOAc) によって精製して標記化合物を淡黄色の油状物として得た (4.8g、56%)。

【 0 3 2 4 】

(6Z,9Z,27Z,30Z)-19-オキソヘキサトリアコンタ-6,9,27,30-テトラエン-18-イル3-(ジメチルアミノ)プロパノエート (化合物21) の合成



(6Z,9Z,27Z,30Z)-19-ヒドロキシヘキサトリアコンタ-6,9,27,30-テトラエン-18-オン (1.0g、1.9mmol)、3-(ジメチルアミノ)プロパン酸塩酸塩 (876mg、5.7mmol) およびEDCI (1.2g、6.3mmol) のジクロロメタン (20mL) 溶液に、DIPEA (1.0mL、5.7mmol) およびDMAP (20mg) を加えた。溶液を窒素下にて室温で16時間攪拌した。完了時に、反応物をジクロロメタン (50mL) で希釈し、重炭酸ナトリウム溶液 (50mL) で洗浄した。ジクロロメタン層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (100%酢酸エチル) によって精製して標記化合物を無色の油状物として得た (675mg、57%)。

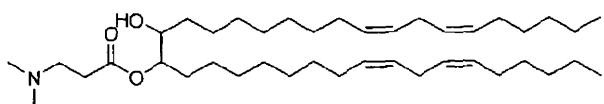
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.43-5.28 (m, 8H), 5.03-4.98

(m, 1H), 2.80-2.75 (m, 4H), 2.74-2.56 (m, 4H), 2.54-2.36 (m, 2H), 2.28 (s, 6H), 2.09-2.01

(m, 8H), 1.82-1.64 (m, 2H), 1.63-1.52 (m, 2H), 1.42-1.23 (m, 30H), 0.93-0.86 (m, 6H)

【 0 3 2 5 】

(6Z,9Z,27Z,30Z)-19-ヒドロキシヘキサトリアコンタ-6,9,27,30-テトラエン-18-イル3-(ジメチルアミノ)プロパノエート (化合物22) の合成



(6Z,9Z,27Z,30Z)-19-オキソヘキサトリアコンタ-6,9,27,30-テトラエン-18-イル3-(ジメチルアミノ)プロパノエート (450mg、0.72mmol) の無水メタノール (20mL) 溶液に、水素化ホウ素ナトリウム (222mg、5.9mmol) をゆっくりと加えた。溶液を室温で16時間攪拌し、次に水 (20mL) で反応を止めた。溶液をジクロロメタン (3×50mL) で洗浄し、混合した抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (100%酢酸エチル) によって精製して標記化合物を無色の油状物として得た (416mg、91%)。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.45-5.28 (m, 8H), 5.02-4.82 (m, 1H), 3.69-3.43 (m,

1H), 2.84-2.45 (m, 8H), 2.30 (s, 6H), 2.09-2.02 (m, 8H), 1.67-1.20 (m, 36H), 0.93-0.86 (m,

6H)

10

20

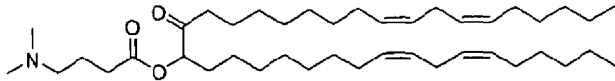
30

40

50

【 0 3 2 6 】

(6Z,9Z,27Z,30Z)-19-オキソヘキサトリアコンタ-6,9,27,30-テトラエン-18-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(化合物23)の合成

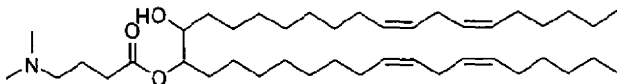


(6Z,9Z,27Z,30Z)-19-オキソヘキサトリアコンタ-6,9,27,30-テトラエン-18-イル3-(ジメチルアミノ)プロパノエートの合成について記載された手順に類似の手順を用いて、(6Z,9Z,27Z,30Z)-19-オキソヘキサトリアコンタ-6,9,27,30-テトラエン-18-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエートを無色の油状物として得た(980mg、80%)。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.43-5.29 (m, 8H), 5.02-4.97 (m, 1H), 2.81-2.75 (m, 4H), 2.54-2.33 (m, 6H), 2.39 (s, 6H), 2.09-2.01 (m, 8H), 1.92-1.82 (m, 2H), 1.80-1.64 (m, 2H), 1.62-1.53 (m, 2H), 1.42-1.24 (m, 30H), 0.93-0.86 (m, 6H)

【 0 3 2 7 】

(6Z,9Z,27Z,30Z)-19-ヒドロキシヘキサトリアコンタ-6,9,27,30-テトラエン-18-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(化合物24)の合成



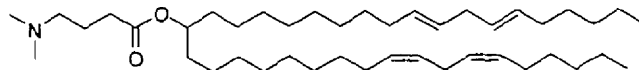
(6Z,9Z,27Z,30Z)-19-ヒドロキシヘキサトリアコンタ-6,9,27,30-テトラエン-18-イル3-(ジメチルアミノ)プロパノエートの合成について記載された手順に類似の手順を用いて、(6Z,9Z,27Z,30Z)-19-ヒドロキシヘキサトリアコンタ-6,9,27,30-テトラエン-18-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエートを無色の油状物(218mg、31%)として得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.44-5.29 (m, 8H), 4.92-4.81 (m, 1H), 3.71-3.54 (m, 1H), 2.81-2.75 (m, 4H), 2.46-2.34 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.09-2.02 (m, 8H), 1.94-1.78 (m, 2H), 1.69-1.20 (m, 36H), 0.93-0.86 (m, 6H)

【 0 3 2 8 】

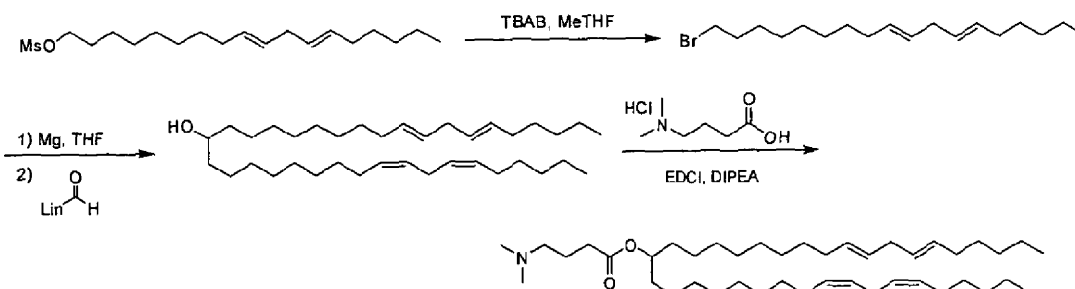
実施例15. 化合物25の合成

下に示す構造を有する(6Z,9Z,28E,31E)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(化合物25)を、下のスキーム17に記載するように合成した。



化合物 25

スキーム17



10

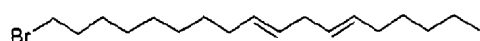
20

30

40

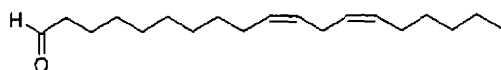
50

【0329】

(6E,9E)-18-ブロモオクタデカ-6,9-ジエンの合成

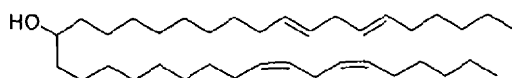
リノレイルプロミドの合成について記載された手順に類似の手順を用いて、(6E,9E)-18-ブロモオクタデカ-6,9-ジエンを無色の油状物として得た(9.1g、87%)。

【0330】

(10Z,13Z)-ノナデカ-10,13-ジエンールの合成

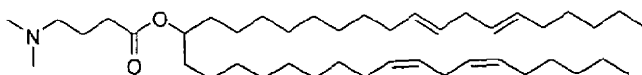
削り屑状マグネシウム(462mg、19.0mmol)および撹拌子が入った100mL丸底フラスコを高温ヒートガンで5分間乾燥させた。フラスコを窒素下にて室温に冷却し、次にTHF(25mL)を入れた。リノレイルプロミド(1.9g、5.76mmol)を滴下し、溶液を窒素下にて45℃で3時間加熱した。完了直後に、DMF(1.3mL、16.7mmol)をゆっくりと加え、溶液を室温で1時間撹拌した。溶液をエーテル(75mL)で希釈し、5% HCl(3×50mL)で洗浄した。エーテル溶液を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濃縮し、乾燥するまで真空中で濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー(カラム:2"×10";2%エーテル/ヘキサンで溶出した)によって精製して標記化合物を無色の油状物として得た(3.5g、83%)。

【0331】

(6Z,9Z,28E,31E)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-オールの合成

削り屑状マグネシウム(355mg、14.6mmol)および撹拌子が入った100mL丸底フラスコを高温ヒートガンで5分間乾燥させた。窒素下で冷却直後に、THF(6mL)を加え、続いてリノライジル(linolaidyl)プロミド(6.02g、18.3mmol)を加えた。混合物を45℃に加熱し、一粒のヨウ素を加えた。反応物を2.5時間還流し、次に室温に冷まし、その時点で(10Z,13Z)-ノナデカ-10,13-ジエンール(3.4g、12.4mmol)のTHF(10mL)溶液を加えた。溶液を室温で1.5時間撹拌し、次に水(150mL)に注ぎ、5% HCl(50mL)を加えた。マグネシウムの溶解直後に、溶液をエーテル(2×150mL)で抽出した。混合したエーテル抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー(100%ヘキサン)によって精製して標記化合物を無色の油状物として得た(4.57g、71%)。

【0332】

(6Z,9Z,28E,31E)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(化合物25)の合成

(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエートの合成について記載された手順に類似の手順を用いて、(6Z,9Z,28E,31E)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエートを淡黄色の油状物として得た(1.12g、93%)。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.47-5.29 (m,

8H), 4.91-4.83 (m, 1H), 2.81-2.75 (m, 2H), 2.70-2.65 (m, 2H), 2.58-2.30 (m, 10H), 2.10-1.85

(m, 10H), 1.57-1.45 (m, 4H), 1.41-1.20 (m, 36H), 0.93-0.86 (m, 6H)

【0333】

10

20

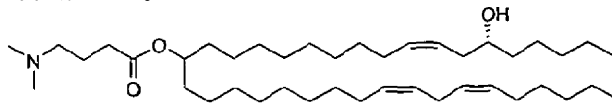
30

40

50

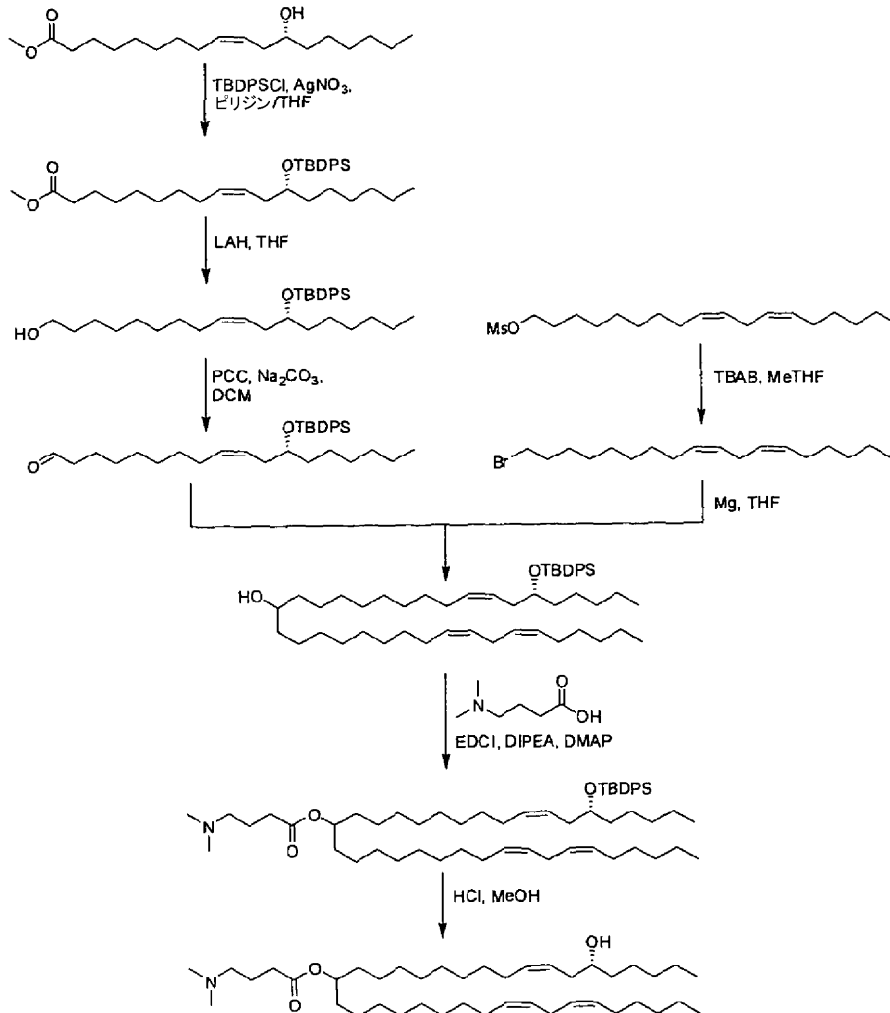
実施例16. 化合物26の合成

下に示す構造を有する(6R,8Z,27Z,30Z)-6-ヒドロキシヘキサトリアコンタ-8,27,30-トリエン-18-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(化合物26)を、下のスキーム18に記載するように合成した。



化合物 26

スキーム18



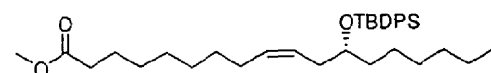
10

20

30

【 0 3 3 4 】

(R,Z)-メチル12-(tert-ブチルジフェニルシリルオキシ)オクタデカ-9-エノエートの合成



40

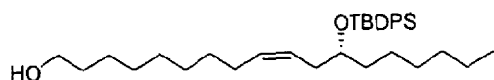
無水ピリジン (90mL) および無水THF (45mL) 中のメチルリシノレエート (8.0g、32mmol) の溶液に、t-ブチルククロジメチルシラン (8.5mL、33.3mmol) および硝酸銀 (5.65g、33.3mmol) を加えた。溶液を窒素下にて室温で90分間攪拌した。溶液はセライトを通して濾過し、濾過ケーキをTHF (400mL) ですすいだ。濾液を真空中で濃縮し、残渣をジクロロメタン (300mL) に溶解し、5% HCl (150mL) で洗浄した。水層を分離し、ジクロロメタン (2×200mL) で洗浄した。混合したジクロロメタン抽出物をブライン (350mL) で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (勾配: 100%ヘキサン~ヘキサン中の10%酢酸エチル) によって

50

精製して標記化合物を無色の油状物として得た (13.1g、93%)。

【0335】

(R,Z)-12-(tert-ブチルジフェニルシリルオキシ)オクタデカ-9-エン-1-オールの合成

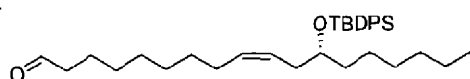


水素化アルミニウムリチウム (1.8g、47.5mmol) の無水THF (30mL) 懸濁液に、(R,Z)-メチル12-(tert-ブチルジフェニルシリルオキシ)オクタデカ-9-エノエート (13.1g、23.7mmol) のTHF (30mL) 溶液を30分間かけて滴下した。反応物を窒素下にて室温で1時間撹拌した。完了直後に、5M NaOH (4mL) を0 で滴下した。混合物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮して標記化合物を淡黄色の油状物として得た。生成物 (11.1g、89%) をそれ以上精製せずに次の工程で使用した。

10

【0336】

(R,Z)-12-(tert-ブチルジフェニルシリルオキシ)オクタデカ-9-エンールの合成

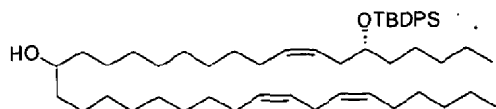


(R,Z)-12-(tert-ブチルジフェニルシリルオキシ)オクタデカ-9-エン-1-オール (11.1g、21.2mmol) の無水ジクロロメタン (160mL) 溶液に、クロロクロム酸ピリジニウム (215.6g、110.3mmol) および炭酸ナトリウム (1.1g、18.4mmol) を加えた。混合物を室温で3時間撹拌し、次にシリカのパッドを通して濾過した (100%酢酸エチルで溶出した)。濾液を乾燥するまで真空中で濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィー (勾配: 100%ヘキサン~ヘキサン中の10%酢酸エチル) によって精製して標記化合物を黄色の油状物として得た (8.9g、81%)。

20

【0337】

(6R,8Z,27Z,30Z)-6-(tert-ブチルジフェニルシリルオキシ)ヘキサトリアコンタ-8,27,30-トリエン-18-オールの合成



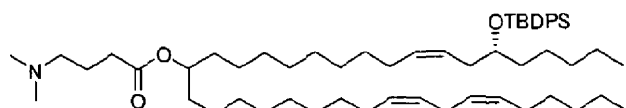
30

削り屑状マグネシウム (0.16g、6.53mmol) および撹拌子が入った100mL丸底フラスコを高温ヒートガンで5分間乾燥させた。フラスコを窒素下にて室温に冷却し、次にTHF (1.1mL) を入れた。リノレイルプロミド (1.9g、5.76mmol) のTHF (1.9mL) 溶液を滴下し、溶液を窒素下にて55 に2時間加熱した。完了直後に、反応混合物を室温に冷まし、(R,Z)-12-(tert-ブチルジフェニルシリルオキシ)オクタデカ-9-エンール (2.0g、3.84mmol) のTHF (20mL) 溶液を10分間かけてゆっくりと加えた。溶液を室温で1時間撹拌し、次に5M HCl (20mL) および水 (100mL) で反応を止めた。残りの溶液をジエチルエーテル (3 x 150mL) で抽出し、混合したジエチルエーテル抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (勾配: 100%ヘキサン~5%酢酸エチル-ヘキサン) によって精製して標記化合物を黄色の油状物として得た (1.8g、60%)。

40

【0338】

(6Z,9Z,28Z,31Z)-6-(tert-ブチルジフェニルシリルオキシ)ヘキサトリアコンタ-8,27,30-トリエン-18-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエートの合成



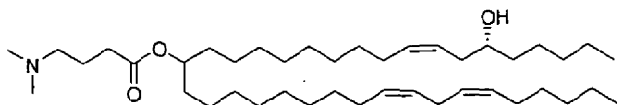
(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミ

50

ノ)ブタノエートの合成について記載された手順に類似の手順を用いて、(6R,8Z,27Z,30Z)-6-(tert-ブチルジフェニルシリルオキシ)ヘキサトリアコンタ-8,27,30-トリエン-18-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエートを無色の油状物として得た(800mg、78%)。

【0339】

(6R,8Z,27Z,30Z)-6-ヒドロキシヘキサトリアコンタ-8,27,30-トリエン-18-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(化合物26)の合成



(6R,8Z,27Z,30Z)-6-(tert-ブチルジフェニルシリルオキシ)ヘキサトリアコンタ-8,27,30-トリエン-18-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(800mg、0.95mmol)の飽和HCl_(g)/MeOH(50mL)溶液を10分間撹拌した。出発物質は溶解しなかったので、無水DCM(12mL)を加え、混合物を30分間撹拌した。完了直後に、溶液を真空中で濃縮し、飽和重炭酸ナトリウム(75mL)を加え、溶液を酢酸エチル(3×100mL)で抽出した。混合した酢酸エチル抽出物をブライン(100mL)で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー(100%酢酸エチル)によって精製して標記化合物を無色の油状物として得た(0.228g、39%)。

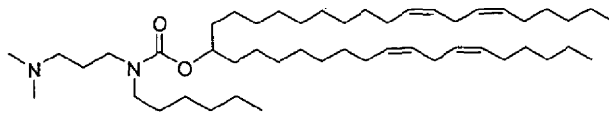
¹H NMR

(400 MHz, CDCl₃): δ 5.61-5.52 (m, 1H), 5.45-5.29 (m, 4H), 4.91-4.83 (m, 1H), 3.66-3.58 (m, 1H), 2.81-2.75 (m, 2H), 2.75-2.44 (m, 7H), 2.42-2.36 (m, 2H), 2.24-2.18 (m, 2H), 2.10-1.93 (m, 7H), 1.56-1.41 (m, 6H), 1.40-1.20 (m, 36H), 0.93-0.85 (m, 6H)

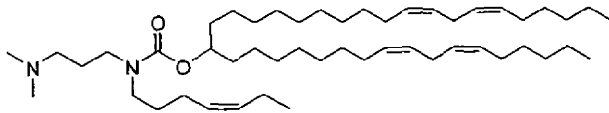
【0340】

実施例17. 化合物27および28の合成

下に示す構造を有する(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-18-イル3-(ジメチルアミノ)プロピル(ヘキシル)カルバメート(化合物27)および(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-18-イル3-(ジメチルアミノ)プロピル((Z)-ヘプタ-4-エニル)カルバメート(化合物28)を、下のスキーム19に記載するように合成した。

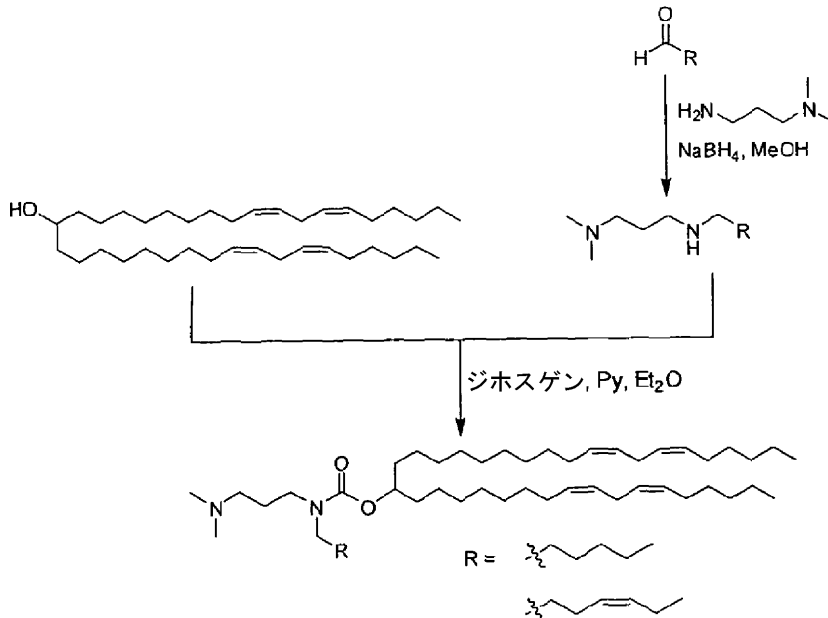


化合物 27



化合物 28

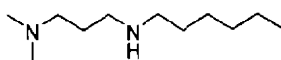
スキーム19



10

20

【 0 3 4 1 】

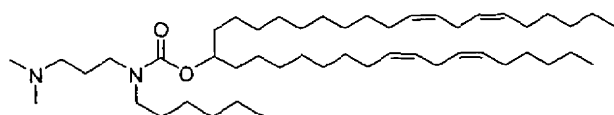
N-ヘキシル-N',N'-ジメチルプロパン-1,3-ジアミンの合成

30

n-カブロンアルデヒド (3.79g、37.8mmol) およびN,N-ジメチルプロパン-1,3-ジアミン (5mL、39.7mmol) の無水メタノール (140mL) 溶液を室温で3時間攪拌した。この溶液に水素化ホウ素ナトリウム (2.15g、56.8mmol) を5分間かけてゆっくりと加えた。溶液を30分間攪拌し、次に1M NaOH (75mL) で反応を止め、水 (125mL) で希釈し、酢酸エチル (3 × 150mL) で抽出した。混合した酢酸エチル抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (勾配: 100% DCM ~ 1% NH₄OHを加えたDCM中の10% MeOH) によって精製して標記化合物を淡黄色の油状物として得た (3.79g、54%)。

40

【 0 3 4 2 】

(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-18-イル3-(ジメチルアミノ)プロピル(ヘキシル)カルバメート (化合物27) の合成

窒素下で-15℃に冷却したジリノレイルメタノール (1.0g、1.9mmol) およびピリジン (230 μL、4.7mmol) の無水エーテル (10mL) 溶液に、ジホスゲン (380 μL、3.1mmol) をゆっくりと加えた。反応物を-15℃で20分間攪拌し、次にN-ヘキシル-N',N'-ジメチルプロパ

50

ン-1,3-ジアミン (3.8g, 20.3mmol) を4:1エーテル/ジクロロメタン (10mL) 中の溶液として加えた。溶液を室温に加温し、攪拌を20分間続けた。完了直後に、溶液をジエチルエーテル (100mL) で希釈し、飽和重炭酸ナトリウム (2×50mL) で洗浄した。エーテル抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (100% 酢酸エチル) によって精製して標記化合物を無色の油状物として得た (1.1g, 76%)。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.43-5.26 (m, 8H), 4.80-4.68 (m, 1H), 3.35-3.15 (m, 4H), 2.81-2.75 (m, 4H), 2.66-2.25 (m, 8H), 2.10-1.70 (m, 14H), 1.64-1.46 (m, 6H), 1.40-1.20 (m, 38H), 1.00-0.93 (m, 3H), 0.92-0.86 (m, 6H)

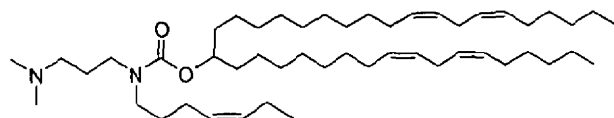
10

【 0 3 4 3 】

(Z)-N-(ヘプタ-4-エニル)-N',N'-ジメチルプロパン-1,3-ジアミンの合成

N-ヘキシル-N',N'-ジメチルプロパン-1,3-ジアミンの合成について記載された手順に類似の手順を用いて、(Z)-N-(ヘプタ-4-エニル)-N',N'-ジメチルプロパン-1,3-ジアミンを淡黄色の油状物として得た (5.11g, 68%)。

【 0 3 4 4 】

(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-18-イル3-(ジメチルアミノ)プロピル((Z)-ヘプタ-4-エニル)カルバメート (化合物28) の合成

(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-18-イル3-(ジメチルアミノ)プロピル(ヘキシル)カルバメートの合成について記載された手順に類似の手順を用いて、(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-18-イル3-(ジメチルアミノ)プロピル((Z)-ヘプタ-4-エニル)カルバメートを無色の油状物として得た (1.31g, 92%)。

30

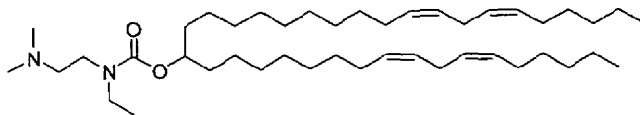
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.44-5.27 (m, 10H), 4.80-4.67 (m, 1H), 3.35-3.15 (m, 4H), 2.81-2.74 (m, 4H), 2.69-2.26 (m, 8H), 2.10-1.98 (m, 12H), 1.98-1.72 (m, 2H), 1.64-1.46 (m, 6H), 1.41-1.22 (m, 36H), 0.96 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H), 0.92-0.86 (m, 6H)

【 0 3 4 5 】

実施例18. 化合物29の合成

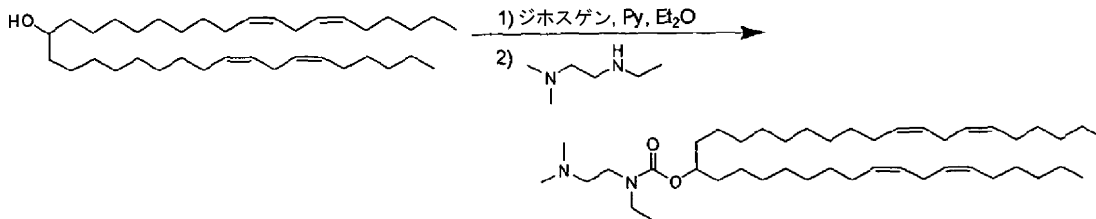
下に示す構造を有する(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-18-イル2-(ジメチルアミノ)エチル(エチル)カルバメート (化合物29) を、下のスキーム20に記載するように合成した。

40



化合物 29

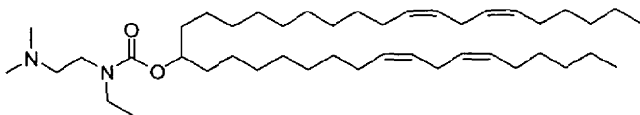
スキーム 20



10

【 0 3 4 6 】

(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-18-イル2-(ジメチルアミノ)エチル(エチル)カルバメート(化合物29)の合成



窒素下にて-15℃に冷却したジリノレイルメタノール(1.0g、1.9mmol)およびピリジン(230μL、4.7mmol)の無水エーテル(10mL)溶液に、ジホスゲン(0.38mL、3.14mmol)をゆっくりと加えた。反応液を-15℃で1時間攪拌し、次にN,N-ジメチル-N'-エチル-エチレンジアミン(2.2mL、14.2mmol)を加えた。溶液を室温に加熱し、30分間攪拌した。溶液をジエチルエーテル(50mL)で希釈し、濾過して尿素およびアンモニウム塩を除去した。エーテル濾液を乾燥するまで真空中で濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィー(100%酢酸エチル)によって精製して標記化合物を無色の油状物として得た(990mg、78%)。

20

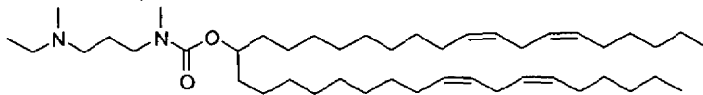
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.41-5.27 (m, 8H), 4.77-4.69 (m, 1H), 3.55-3.20 (m, 4H), 2.79-2.72 (m, 4H), 2.72-2.56 (m, 1H), 2.55-2.21 (m, 7H), 2.08-1.96 (m, 8H), 1.58-1.44 (m, 4H), 1.39-1.15 (m, 36H), 1.10 (t, $J=7.0$ Hz, 3H), 0.90-0.82 (m, 6H)

30

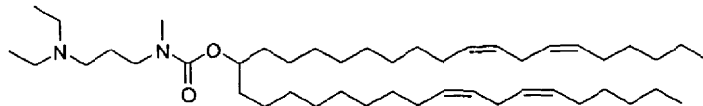
【 0 3 4 7 】

実施例19. 化合物30および31の合成

下に示す構造を有する(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル(3-(エチル(メチル)アミノ)プロピル)(メチル)カルバメート(化合物30)および(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル(3-(ジエチルアミノ)プロピル)(メチル)カルバメート(化合物31)を、下のスキーム21に記載するように合成した。

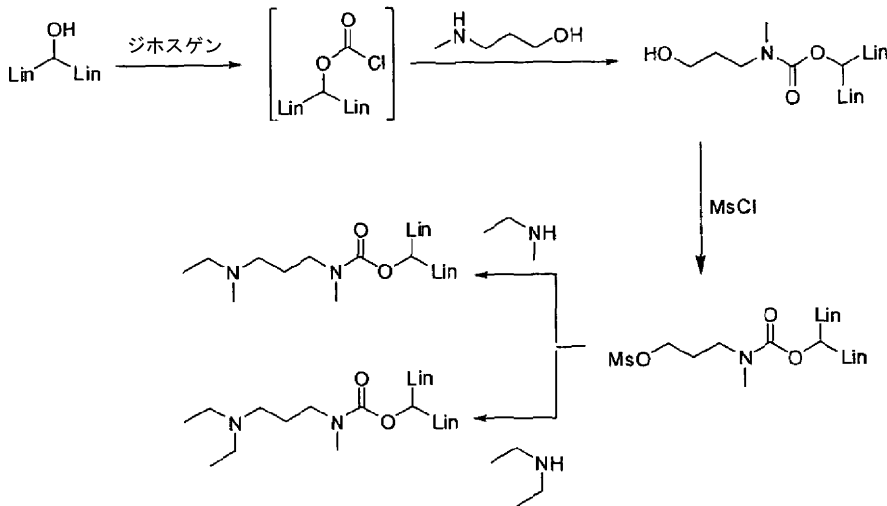


化合物 30



化合物 31

スキーム 21

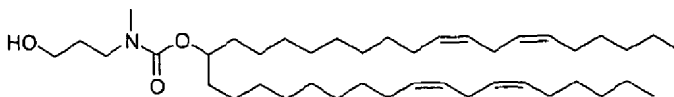


10

20

【 0 3 4 8 】

(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル(3-ヒドロキシプロピル)(メチル)カルバメートの合成



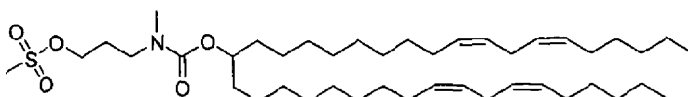
30

トリクロロメチルクロロギ酸 (340 μ L、2.8mmol) の無水Et₂O (5mL) 溶液を冷却 (-15) し、ジリノレイルメタノール (1.0g、1.9mmol) およびピリジン (230 μ L、2.8mmol) のEt₂O (5mL) 溶液で処理した。攪拌後 (1時間)、反応混合物はフリットを通して濾過し、濾液を3-メチルアミノ-プロパン-1-オール (1.1mL、11.3mmol) の冷Et₂O (5mL) 溶液 (0) に滴下した。攪拌後 (5min)、反応混合物を濾過し、濃縮した。粗物質をクロマトグラフィー (12% 20%EtOAc-ヘキサン) に供して、(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル(3-ヒドロキシプロピル)(メチル)カルバメート (960mg、79%) を無色の油状物として回収した。R_f 0.17 (10% EtOAc-ヘキサン)、FW 644.07、C₄₂H₇₇NO₃。

40

【 0 3 4 9 】

3-(((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)プロピルメタンスルホネートの合成



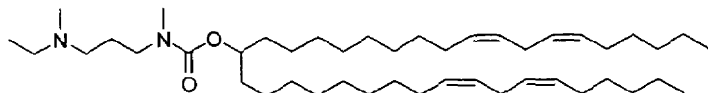
アルコール(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル(3-ヒドロキシプロピル)(メチル)カルバメート (960mg、1.5mmol) およびトリエチルアミン(0.7mL) の無水CH₂Cl₂(7mL) 溶液を冷却 (-15) し、メタンスルホニルクロリド (230 μ L) のCH₂Cl₂ (5mL) 溶液で5分間処理した。攪拌後 (45分間)、溶液をCH₂Cl₂で希釈し、NaHC

50

O₃ (飽和水溶液) およびブラインで洗浄し、乾燥させ (Na₂SO₄)、濾過し、濃縮した。粗物質をクロマトグラフィー (20% EtOAc-ヘキサン) に供して、3-((((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)プロピルメタンスルホネート (1.0g、95%) を無色の油状物として回収した。R_f 0.5 (CH₂Cl₂)、FW 722.16、C₄₃H₇₉NO₅S。

【 0 3 5 0 】

(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル(3-(エチル(メチル)アミノ)プロピル)(メチル)カルバメート (化合物30) の合成



10

エチルメチルアミン (2mL) のEtOH (10mL) 溶液を、CH₂Cl₂ (2.5mL) 中の3-((((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)プロピルメタンスルホネート (500mg、0.7mmol) で処理した。溶液を攪拌し (50時間)、濃縮し、クロマトグラフィー (EtOAc) に供して、(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル(3-(エチル(メチル)アミノ)プロピル)(メチル)カルバメート (305mg、64%) を淡黄色の油状物として回収した。

R_f0.41

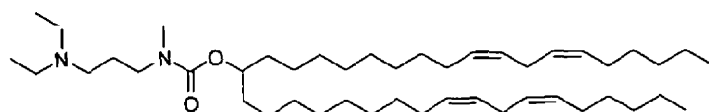
(10% CH₃OH-CH₂Cl₂), ¹H NMR (400MHz, CDCl₃, δ_H) 5.47-5.34 (m, 8 H, C=CH x 8), 4.81-4.75 (m, 1 H, CHO₂CNR₂), 3.33 (br. s, 2 H, CH₂NCH₃), 2.94 (br. s, 3 H, CO₂NCH₃), 2.83 (app. t, 4 H), 2.45 (q, 2 H, N(CH₃)CH₂CH₃), 2.37 (t, 2 H, CH₂N(CH₃)CH₂CH₃), 2.25 (s, 3 H, N(CH₃)CH₂CH₃), 2.14-2.07 (m, 8 H, CH₂HC=C x 4), 1.81-1.70 (m, 4 H, CH₂ x 2), 1.62-1.50 (m, 4 H, CH₂ x 2), 1.46-1.25 (m, 34 H, CH₂ x 17), 1.09 (t, 3 H, CH₃NCH₂CH₃), 0.93 (t, 6 H, CH₃ x 2), FW 685.16, C₄₅H₈₄N₂O₂

20

【 0 3 5 1 】

(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル(3-(ジエチルアミノ)プロピル)(メチル)カルバメート (化合物31) の合成

30



ジエチルアミン (2mL) のEtOH (10mL) 溶液を、CH₂Cl₂ (2.5mL) 中の3-((((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)プロピルメタンスルホネート (500mg、0.7mmol) で処理した。溶液を攪拌し (50時間)、濃縮し、クロマトグラフィー (EtOAc) に供して、(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル(3-(ジエチルアミノ)プロピル)(メチル)カルバメート (207mg、42%) を淡黄色の油状物として回収した。

40

R_f0.43 (10%)

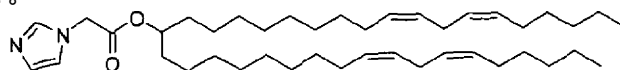
CH₃OH-CH₂Cl₂), ¹H NMR (400MHz, CDCl₃, δ_H) 5.41-5.28 (m, 8 H, C=CH x 8), 4.79-4.70 (m, 1 H, CHO₂CNR₂), 3.28 (br. s, 2 H, CH₂NCH₃), 2.94-2.83 (br. s, 3 H, CO₂NCH₃), 2.79 (app. t, 4 H, bis-allylic CH₂ x 2), 2.52 (q, 4 H, N(CH₂CH₃)₂), 2.09-2.01 (m, 8 H, CH₂HC=C x 4), 1.75-1.65 (m 4 H, CH₂ x 2), 1.59-1.45 (m, 4 H, CH₂ x 2), 1.42-1.22 (m, 36 H, CH₂ x 18), 1.15 (t, 6 H, N(CH₂CH₃)₂), 0.90 (t, 6 H, CH₃ x 2). FW 699.19, C₄₆H₈₆N₂O₂

【 0 3 5 2 】

50

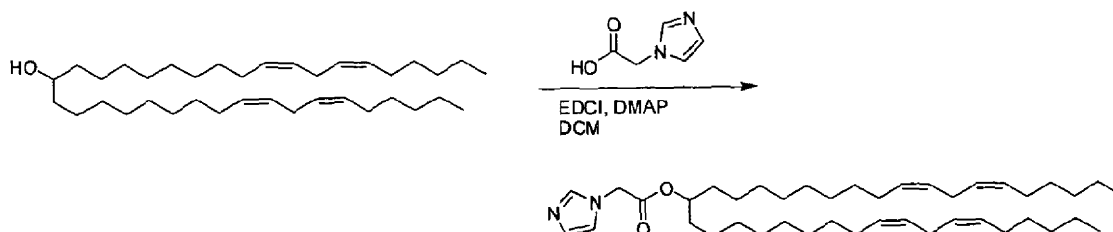
実施例20. 化合物32の合成

下に示す構造を有する(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル2-(1H-イミダゾール-1-イル)アセテート(化合物32)を、下のスキーム22に記載するように合成した。



化合物 32

スキーム 22



10

【 0 3 5 3 】

ジリノレイルメタノール(1.5g、2.8mmol)、2-(1H-イミダゾール-1-イル)酢酸(1.07g、8.5mmol)、EDCI塩酸塩(1.8g、9.4mmol)の無水ジクロロメタン(25mL)溶液に、DMAP(10mg)を加えた。溶液を窒素下にて16時間還流した。完了直後に、溶液をジクロロメタン(100mL)で希釈し、飽和重炭酸ナトリウム(100mL)で洗浄した。その重炭酸ナトリウム溶液をジクロロメタン(2×100mL)で逆抽出した。混合したジクロロメタン抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮した。シリカゲル60を用いたカラムクロマトグラフィー(カラム:2"×6"L;1:1ヘキサン/酢酸エチルで溶出した)によって残渣を精製して標記化合物を無色の油状物として得た(700mg、39%)。

20

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz,

CDCl_3): δ 7.91 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 5.44-5.28 (m, 8H), 4.99-4.90 (m, 1H), 4.77

(s, 2H), 2.81-2.75 (m, 4H), 2.09-2.02 (m, 8H), 1.58-1.49 (m, 4H), 1.41-1.20 (m, 36H), -.93-

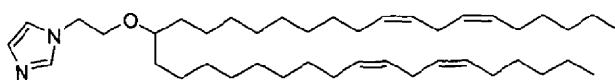
0.86 (m, 6H)

30

【 0 3 5 4 】

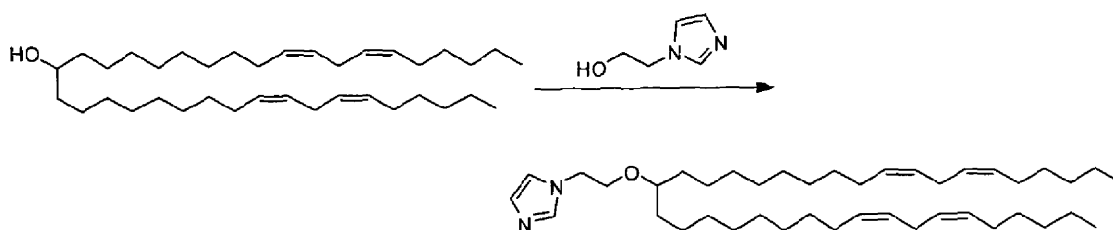
実施例21. 化合物33の合成

下に示す構造を有する1-(2-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)エチル)-1H-イミダゾール(化合物33)を、下のスキーム23に記載するように合成した。



化合物 33

スキーム 23



40

【 0 3 5 5 】

3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン(MC3エーテル)の合成について記載された手順に類似の手順

50

を用いて、1-(2-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)エチル)-1H-イミダゾールを淡黄色の油状物として得た(600mg、24%)。

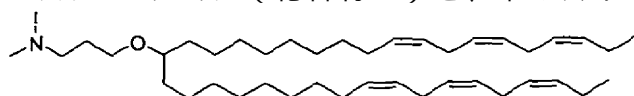
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ

8.12 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 5.43-5.30 (m, 8H), 4.20 (t, $J=4.9$ Hz, 2H), 3.70 (t, $J=5$ Hz, 2H), 3.26-3.18 (m, 1H), 2.82-2.75 (m, 4H), 2.10-2.04 (m, 8H), 1.46-1.12 (m, 40H), 0.93-0.86 (m, 6H)

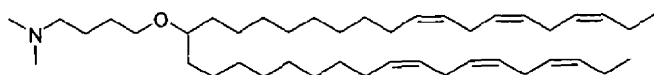
【0356】

実施例22. 化合物34~37の合成

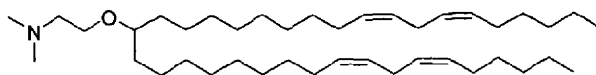
下に示す構造を有する3-((3Z,6Z,9Z,28Z,31Z,34Z)-ヘプタトリアコンタ-3,6,9,28,31,34-ヘキサエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン(化合物34)、4-((3Z,6Z,9Z,28Z,31Z,34Z)-ヘプタトリアコンタ-3,6,9,28,31,34-ヘキサエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルブタン-1-アミン(化合物35)、2-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルエタンアミン(化合物36)、および3-((6E,9E,28E,31E)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン(化合物37)を、下のスキーム24に記載するように合成した。



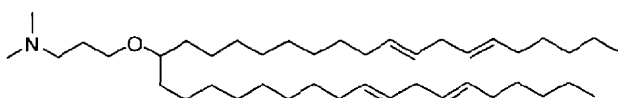
化合物34



化合物35

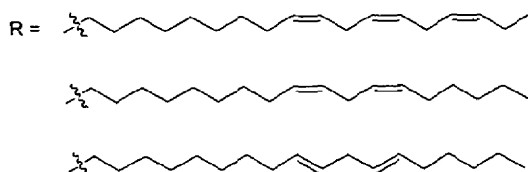
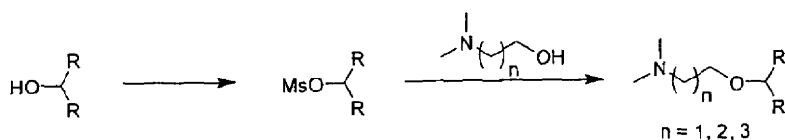


化合物36



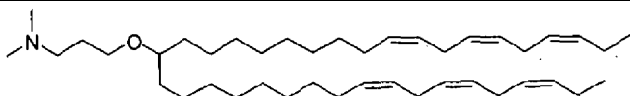
化合物37

スキーム24



【0357】

3-((3Z,6Z,9Z,28Z,31Z,34Z)-ヘプタトリアコンタ-3,6,9,28,31,34-ヘキサエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン(化合物34)の合成



10

20

30

40

50

3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン (MC3エーテル) と同様に、3-((3Z,6Z,9Z,28Z,31Z,34Z)-ヘプタトリアコンタ-3,6,9,28,31,34-ヘキサエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン (2.26g、54%) を淡黄色の油状物として調製した。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ_{H}) 5.43-5.27 (m, 12 H), 3.46

(t, 2 H), 3.18 (app. p, 1 H), 3.07-2.91 (m, 3 H), 2.84-2.77 (m, 8 H), 2.61-2.45 (m, 2 H), 2.44-

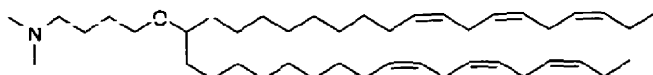
2.30 (br. s, 6 H), 2.11-2.04 (m, 8 H), 1.89-1.78 (br. s, 2 H), 1.45-1.20 (m, 28 H), 0.95 (t, 6 H).

UPLC 95.6%. FW 610.05, $\text{C}_{42}\text{H}_{75}\text{NO}$

10

【 0 3 5 8 】

4-((3Z,6Z,9Z,28Z,31Z,34Z)-ヘプタトリアコンタ-3,6,9,28,31,34-ヘキサエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルブタン-1-アミン (化合物35) の合成



3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン (MC3エーテル) と同様に、4-((3Z,6Z,9Z,28Z,31Z,34Z)-ヘプタトリアコンタ-3,6,9,28,31,34-ヘキサエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルブタン-1-アミン (1.33g、74%) を淡黄色の油状物として調製した。

20

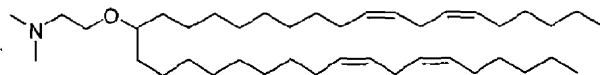
$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ_{H}) 5.48-5.27 (m, 12 H), 3.41

(t, 2 H), 3.21-3.17 (m, 1 H), 2.86-2.79 (m, 8 H), 2.50-2.40 (m, 2 H), 2.35 (s, 6 H), 2.12-2.02

(m, 8 H), 1.70-1.56 (m, 4 H), 1.50-1.20 (m, 28 H), 0.98 (t, 6 H). FW 624.08, $\text{C}_{43}\text{H}_{77}\text{NO}$

【 0 3 5 9 】

2-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルエタンアミン (化合物36) の合成



30

3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン (MC3エーテル) と同様に、2-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルエタンアミン (1.30g、52%) を淡黄色の油状物として調製した。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ_{H}) 5.42-5.26 (m, 8 H), 3.58 (t, 2 H), 3.23-3.18 (m, 1

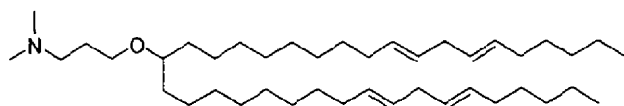
H), 2.77 (app. t, 4 H), 2.63-2.58 (m, 2 H), 2.37 (s, 6 H), 2.10-2.00 (m, 8 H), 1.56-1.21 (m, 40

H), 0.90 (t, 6 H). FW 600.06, $\text{C}_{41}\text{H}_{77}\text{NO}$

40

【 0 3 6 0 】

3-((6E,9E,28E,31E)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン (化合物37) の合成



3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン (MC3エーテル) と同様に、3-((6E,9E,28E,31E)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン (

50

0.22g、56%) を無色の油状物として調製した。

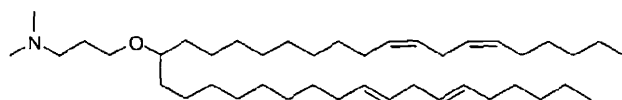
$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ_{H}) 5.50-5.35 (m, 8 H), 3.43 (t, 2 H), 3.21-3.18 (m, 1 H), 2.74-2.60 (m, 4 H), 2.48-2.40 (m, 2 H), 2.30 (s, 6 H), 2.16-1.91 (m, 8 H), 1.82-1.73 (m, 2 H), 1.51-1.20 (m, 40 H), 0.92 (t, 6 H). FW 614.08, $\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{NO}$

【0361】

実施例23. 化合物38の合成

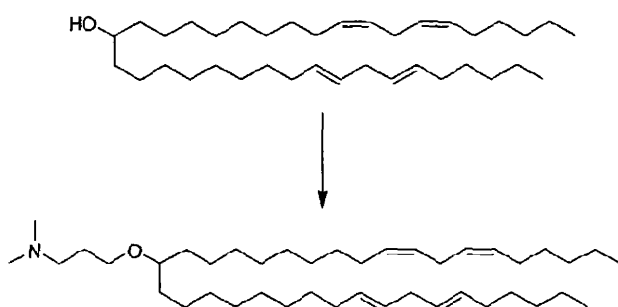
下に示す構造を有する3-((6Z,9Z,28E,31E)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン(化合物38)を、下のスキーム25に記載するように合成した。

10



化合物38

スキーム25



20

【0362】

3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン(MC3エーテル)と同様にして、3-((6Z,9Z,28E,31E)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン(1.23g、50%)を(6Z,9Z,28E,31E)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-オールから無色の油状物として調製した。

30

$^1\text{H NMR}$

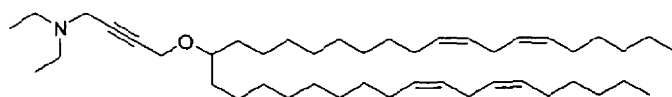
(400MHz, CDCl_3 , δ_{H}) 5.50-5.32 (m, 8 H), 3.49 (t, 2 H), 3.22-3.18 (m, 1 H), 2.79 (app, t, 2 H), 2.76-2.62 (m, 4 H), 2.45 (br. s, 6 H), 2.30-2.15 (m, 4 H), 2.15-1.96 (m, 4 H), 1.94-1.83 (m, 2 H), 1.51-1.20 (m, 40 H), 0.95-0.88 (m, 6 H). FW 614.08, $\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{NO}$

【0363】

実施例24. 化合物39の合成

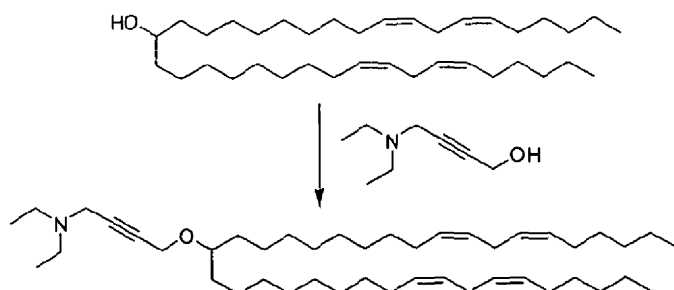
下に示す構造を有するN,N-ジエチル-4-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)ブタ-2-イン-1-アミン(化合物39)を、下のスキーム26に記載するように合成した。

40



化合物 39

スキーム 26



10

【 0 3 6 4 】

3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン (MC3エーテル)と同様にして、N,N-ジエチル-4-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)ブタ-2-イン-1-アミン (511mg、48%)をジ-リノレイルメシレート (1.0g、1.6mmol)および4-ジエチルアミノブチン-1-オール (1.2mL、8.2mmol)から調製した。

20

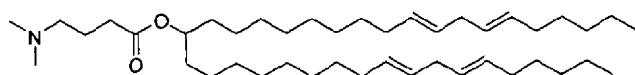
$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ_{H}) 5.46-5.35 (m, 8 H), 4.20 (s, 2 H), 3.50-3.39 (m, 3 H), 2.80 (app. t, 4 H), 2.59 (q, 4 H), 2.15-2.00 (m, 8 H), 1.65-1.58 (br. s, 2 H), 1.52-1.25 (m, 42 H), 1.10 (t, 6 H), 0.88 (t, 6 H). FW 652.13, $\text{C}_{45}\text{H}_{81}\text{NO}$

【 0 3 6 5 】

実施例 25. 化合物 40 の合成

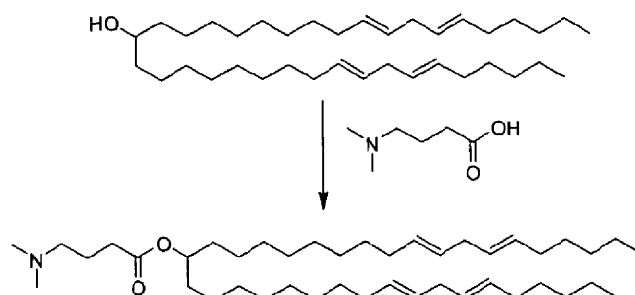
下に示す構造を有する (6E,9E,28E,31E)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート (化合物 40)を、下のスキーム 27 に記載するように合成した。

30



化合物 40

スキーム 27



40

【 0 3 6 6 】

(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート (MC3)と同様にして、(6E,9E,28E,31E)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート (2.9g、59%)を無色の油状物とし

50

て調製した。

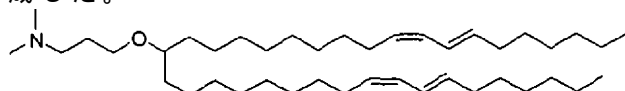
$^1\text{H NMR}$ (400MHz,

CDCl_3 , δ_{H}) 5.49-5.35 (m, 8 H), 4.87 (app. p, 1 H), 2.75-2.61 (m, 4 H), 2.36-2.24 (m, 4 H), 2.22 (s, 6 H), 2.04-1.91 (m, 8 H), 1.83-1.72 (m, 3 H), 1.56-1.44 (m, 4 H), 1.40-1.19 (m, 38 H), 0.89 (t, 6 H). FW 642.09, $\text{C}_{43}\text{H}_{79}\text{NO}_2$

【 0 3 6 7 】

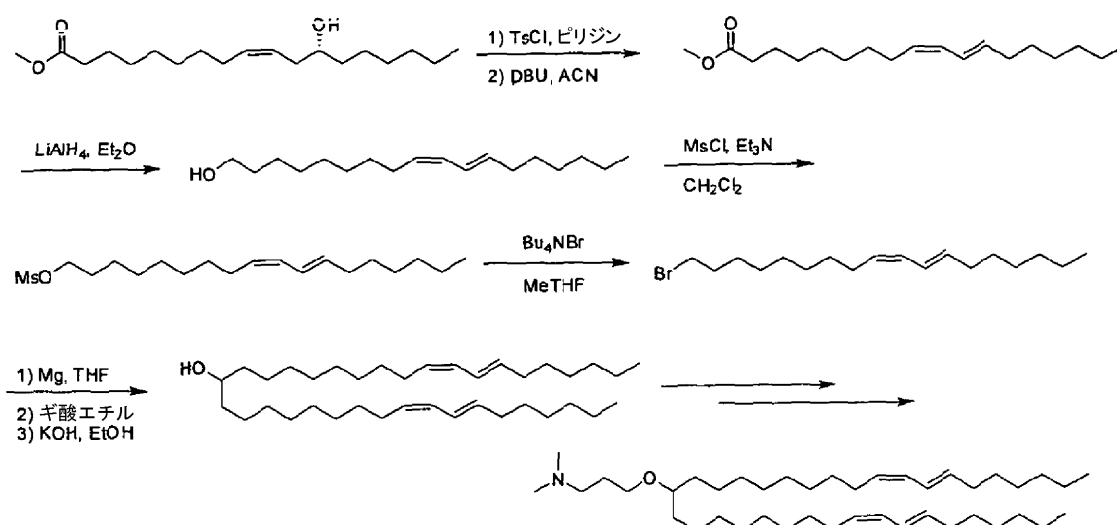
実施例26. 化合物41の合成

下に示す構造を有する3-((7E,9Z,28Z,30E)-ヘプタトリアコンタ-7,9,28,30-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン(化合物41)を、下のスキーム28に記載するように合成した。



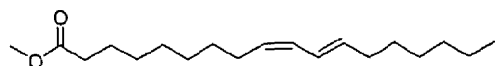
化合物 41

スキーム28



【 0 3 6 8 】

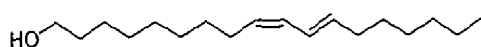
(9Z,11E)-メチルオクタデカ-9,11-ジエノエートの合成



(9Z,11E)-メチルオクタデカ-9,11-ジエノエートを、米国特許第5,892,074号(その特許の開示は、全ての目的についてその全体が本明細書に参照により組み入れられる)に記載された手順にしたがって合成した。

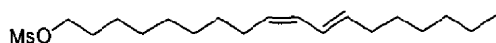
【 0 3 6 9 】

(9Z,11E)-オクタデカ-9,11-ジエン-1-オールの合成



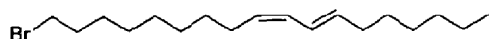
窒素下にて0 に冷却した水素化アルミニウムリチウム(1.5g、38.7mmol)の無水エーテル(50mL)懸濁液に、(9Z,11E)-メチルオクタデカ-9,11-ジエノエート(11.6g、38.7mmol)の無水ジエチルエーテル(50mL+25mLすぎ)溶液を、カニューレ送液を介してゆっくりと加えた。溶液を0 で2時間攪拌し、次に1M NaOH(3.5mL)で反応をゆっくりと止めた。溶液を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮して生成物を無色の油状物として得た(9.5g、92%)。

【 0 3 7 0 】

(9Z,11E)-オクタデカ-9,11-ジエニルメタンスルホネートの合成

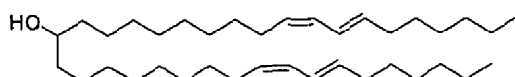
ジリノレイルメシレートの合成について記載された手順に類似の手順を用いて、(9Z,11E)-オクタデカ-9,11-ジエニルメタンスルホネートを淡黄色の油状物として得た(11.8g、96%)。

【 0 3 7 1 】

(7E,9Z)-18-ブロモオクタデカ-7,9-ジエンの合成

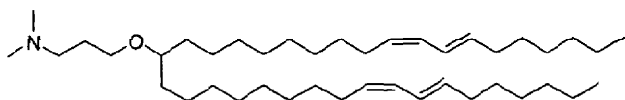
リノレイルプロミドの合成について記載された手順に類似の手順を用いて、(7E,9Z)-18-ブロモオクタデカ-7,9-ジエンを淡黄色の油状物(11.0g、97%)として得た。

【 0 3 7 2 】

(7E,9Z,28Z,30E)-ヘプタトリアコンタ-7,9,28,30-テトラエン-19-オールの合成

ジリノレイルメタノールの合成について記載された手順に類似の手順を用いて、(7E,9Z,28Z,30E)-ヘプタトリアコンタ-7,9,28,30-テトラエン-19-オールを淡黄色の油状物として得た(4.7g、53%)。

【 0 3 7 3 】

3-((7E,9Z,28Z,30E)-ヘプタトリアコンタ-7,9,28,30-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン(化合物41)の合成

3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミンの合成について記載された手順に類似の手順を用いて、3-((7E,9Z,28Z,30E)-ヘプタトリアコンタ-7,9,28,30-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミンを淡黄色の油状物として得た(1.3g)。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6.35-5.26 (m, 8H),

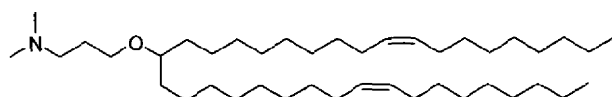
3.49-3.44 (m, 2H), 3.23-3.15 (m, 1H), 2.60-2.50 (m, 2H), 2.38 (s, 6H), 2.21-1.95 (m, 8H),

1.88-1.77 (m, 2H), 1.50-1.21 (m, 44H), 0.92-0.86 (m, 6H)

【 0 3 7 4 】

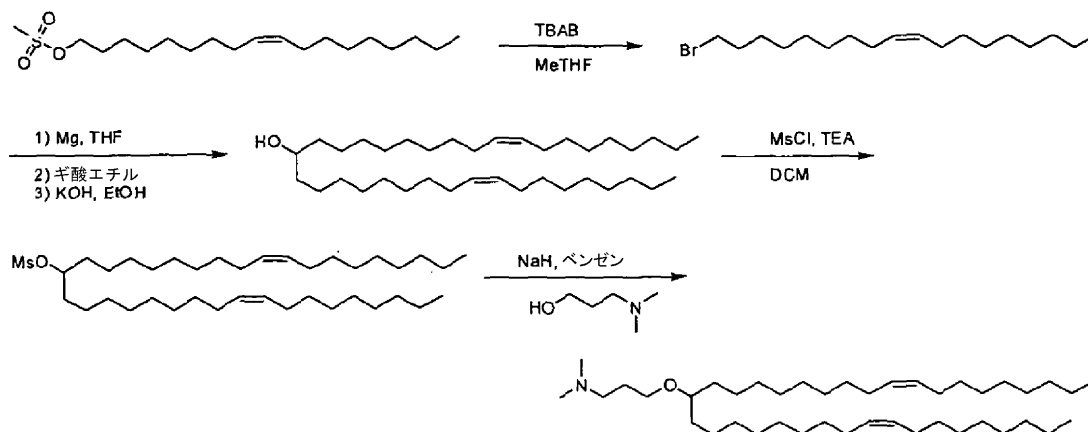
実施例27. 化合物42の合成

下に示す構造を有する3-((9Z,28Z)-ヘプタトリアコンタ-9,28-ジエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン(化合物42)を、下のスキーム29に記載するように合成した。



化合物 42

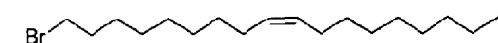
スキーム 29



10

【 0 3 7 5 】

オレイルブロミドの合成

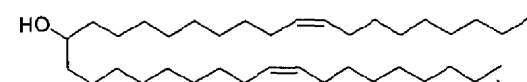


20

リノレイルブロミドの合成について記載された手順に類似の手順を用いて、オレイルブロミドを無色の油状物として得た (70.2g、定量的)。

【 0 3 7 6 】

ジオレイルメタノールの合成

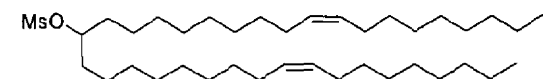


30

ジリノレイルメタノールの合成について記載された手順に類似の手順を用いて、ジオレイルメタノールを無色の油状物として得た (46.6g、82%)。

【 0 3 7 7 】

ジオレイルメシレートの合成

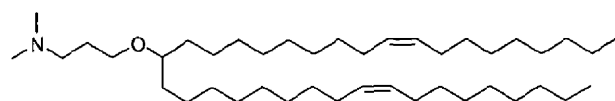


ジリノレイルメシレートの合成について記載された手順に類似の手順を用いて、ジオレイルメシレートを淡黄色の油状物として得た (51.7g、97%)。

【 0 3 7 8 】

3-((9Z,28Z)-ヘプタトリアコンタ-9,28-ジエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミン (化合物42) の合成

40



3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミンの合成について記載された手順に類似の手順を用いて、3-((9Z,28Z)-ヘプタトリアコンタ-9,28-ジエン-19-イルオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミンを無色の油状物として得た (14.7g、28%)。

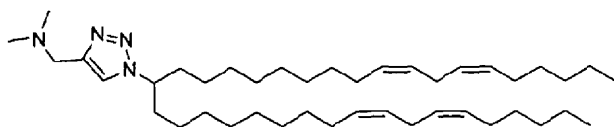
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.41-5.30 (m, 4H), 3.46 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.23-3.16 (m, 1H), 2.46-2.38 (m, 2H), 2.29 (s, 6H), 2.08-1.96 (m, 8H), 1.81-1.72 (m, 2H), 1.52-1.20 (m, 52H), 0.93-0.86 (m, 6H)

【0379】

実施例28. 化合物43の合成

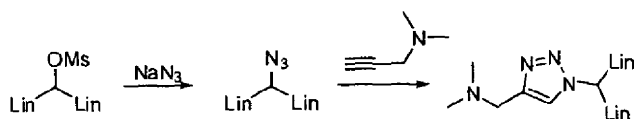
下に示す構造を有する1-(1-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル)-1H-1,2,3-トリアゾール-4-イル)-N,N-ジメチルメタンアミン(化合物43)を、下のスキーム30に記載するように合成した。

10



化合物 43

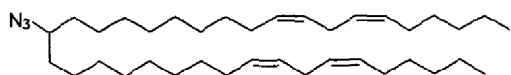
スキーム 30



20

【0380】

ジリノレイルメチルアジドの合成

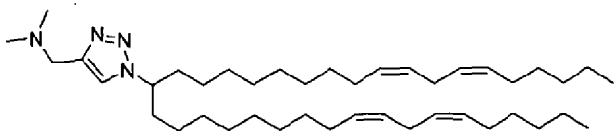


ジリノレイルメシレート (6.27g、10.3mmol) の無水DMF(110mL) 溶液を、 NaN_3 (3.35g、51.6mmol) で処理し、続いて加熱した (80、18時間)。次にDMFを減圧下で除去した。残渣を CH_2Cl_2 に溶かし、飽和 NaHCO_3 水溶液 (2x) およびブラインで洗浄し、乾燥させ (Na_2SO_4)、濾過し、濃縮し、カラムクロマトグラフィー (0.5% 1% 酢酸エチル/ヘキサン) によって精製してジリノレイルメチルアジド (4.89g、86%) を無色の油状物として回収した。FW 553.95、 $\text{C}_{37}\text{H}_{67}\text{N}_3$ 。

30

【0381】

1-(1-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル)-1H-1,2,3-トリアゾール-4-イル)-N,N-ジメチルメタンアミン(化合物43)の合成



ジリノレイルメチルアジド (500mg、0.90mmol) および3-ジメチルアミノ-1-プロピン (75mg、0.90mmol) の $\text{H}_2\text{O}/\text{tert}$ -ブチルアルコール (1:1、12mL) 溶液を、アスコルビン酸ナトリウム (0.090mmol、1M水溶液から17.9 μL を採取) で処理し、続いて $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.3mg、水30 μL に溶解) で処理し、攪拌した (96時間)。次に溶液を H_2O (50mL) で希釈し、 CH_2Cl_2 (3x) で抽出し、乾燥させ (Na_2SO_4)、濾過し、濃縮し、カラムクロマトグラフィー (2% 4% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) によって精製して無色の油状物として標記化合物を回収した (524mg、91%)。

40

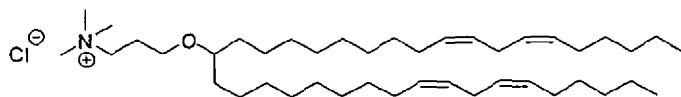
$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ_{H}) 7.76

(br. s, 1 H), 5.47-5.25 (m, 8 H), 4.48 (p, 1 H), 3.80 (br. s, 2 H), 2.75 (app. t, 4 H), 2.49 (s, 6 H), 2.15-2.00 (m, 8 H), 1.91-1.75 (m, 4 H), 1.40-1.12 (m, 34 H), 1.11-0.98 (m, 2 H), 0.85 (t, 6 H). FW 637.08, $\text{C}_{42}\text{H}_{76}\text{N}_4$

【 0 3 8 2 】

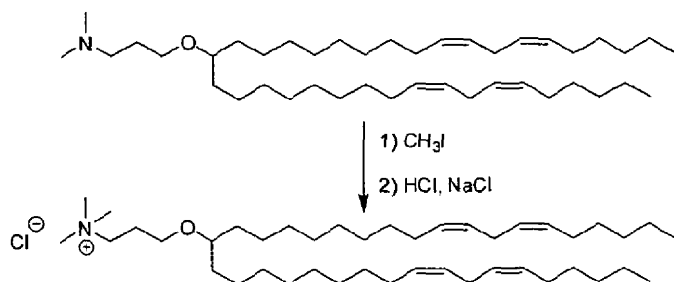
実施例29. 化合物44の合成

下に示す構造を有する3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イルオキシ)-N,N,N-トリメチルプロパン-1-アミニウムクロリド(化合物44)を、下のスキーム31に記載するように合成した。



化合物 44

スキーム31



【 0 3 8 3 】

化合物13(3.0g、4.9mmol)のジクロロメタン(10mL)溶液にヨードメタン(4.5mL、73.5mmol)を加えた。溶液を室温で16時間、窒素下にて室温で撹拌した。完了直後に、溶液を乾燥するまで真空中で濃縮し、ジクロロメタン(150mL)に溶解した。溶液を分液漏斗に移し、1M HClのメタノール溶液(40mL)で洗浄した。この溶液にブライン(50mL)を加え、混合物を十分に振盪した。水相を除去し、以前の洗浄手順をさらに4回繰り返してイオン交換プロセスを完了した。ジクロロメタン溶液を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、乾燥するまで真空中で濃縮した。黄色の残渣をシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィー(100%酢酸エチル~酢酸エチル中の15%MeOH)によって精製して標記化合物を無色の油状物として得た(2.3g、71%)。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ

5.43-5.28 9m, 8H), 3.63-3.56 (m, 2H), 3.54-3.45 (m, 11H), 3.23-3.16 (m, 1H), 2.81-2.76 (m, 4H), 2.09-2.01 (m, 10H), 1.45-1.20 (m, 40H), 0.92-0.86 (m, 6H)

【 0 3 8 4 】

実施例30. siRNAの脂質封入

これらの研究に使用された全てのsiRNA分子は、化学合成され、標準手順を用いてアニリングされたものである。

【 0 3 8 5 】

いくつかの態様において、以下の脂質から構成される血清安定性の核酸-脂質粒子(SNALP)中にsiRNA分子を封入した:それぞれ1.4:57.1:7.1:34.3のモル比の(1)脂質コンジュゲートPEG2000-C-DMA(3-N-[(メトキシポリ(エチレングリコール)2000)カルバモイル]-1,2-ジミリスチルオキシプロピルアミン);(2)一つまたは複数の陽イオン性脂質またはその塩(例えば、本発明の式Iの陽イオン性脂質および/または本明細書記載の他の陽

イオン性脂質) ; (3) リン脂質DPPC (1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン) (Avanti Polar Lipids; Alabaster, AL) ; および (4) 合成コレステロール (Sigma-Aldrich Corp.; St. Louis, MO)。言い換えると、以下の「1:57」製剤のSNALP中にsiRNA分子を封入した: 1.4% PEG2000-C-DMA ; 57.1% 陽イオン性脂質 ; 7.1% DPPC ; および34.3% コレステロール。1:57製剤は標的製剤あること、ならびに製剤中に存在する脂質 (陽イオン性および非陽イオン性の両方) の量および存在する脂質コンジュゲートの量の変動し得ることを理解すべきである。典型的には1:57製剤において、陽イオン性脂質の量は57.1mol% ± 5mol% であり、脂質コンジュゲートの量は1.4mol% ± 0.5mol% であり、1:57製剤の残りは、非陽イオン性脂質 (例えば、リン脂質、コレステロール、またはそれら二つの混合物) で構成されるであろう。

10

【0386】

他の態様において、以下の脂質から構成されるSNALP中にsiRNAを封入した: それぞれ6.76:54.06:6.75:32.43のモル比の(1) 脂質コンジュゲートPEG750-C-DMA (3-N-[(メトキシポリ(エチレングリコール)750)カルバモイル]-1,2-ジミリスチルオキシプロピルアミン) ; (2) 一つまたは複数の陽イオン性脂質またはその塩 (例えば、本発明の式Iの陽イオン性脂質および/または本明細書記載の他の陽イオン性脂質) ; (3) リン脂質DPPC ; および (4) 合成コレステロール。言い換えると、以下の「7:54」製剤のSNALP中にsiRNAを封入した: 6.76mol% PEG750-C-DMA ; 54.06mol% 陽イオン性脂質 ; 6.75mol% DPPC ; および32.43mol% コレステロール。典型的には7:54製剤において、陽イオン性脂質の量は54.06mol% ± 5mol% であり、脂質コンジュゲートの量は6.76mol% ± 1mol% であり、7:54製剤の残りは、非陽イオン性脂質 (例えば、リン脂質、コレステロール、またはそれら二つの混合物) で構成されるであろう。

20

【0387】

ビヒクル対照のために、同一の脂質組成を有する空の粒子をsiRNAの非存在下で形成され得る。

【0388】

実施例31. 新規な陽イオン性脂質を含有するSNALP製剤の特徴づけ

この実施例は、ApoBを標的とするsiRNAと共に本明細書記載の式Iの様々な新規の陽イオン性脂質を含有する1:57 SNALP製剤の効力を、マウス肝臓モデルにおいて実証している。本研究に使用したApoB siRNA配列を表1に提供する。

30

【0389】

(表1)

siRNA	ApoB siRNA配列	2' OMe-修飾 (%)	DS領域における修飾 (%)
ApoB-10164	5'-AGUGUCAUCACACUGAAUACC-3' (SEQ ID NO:1) 3'-GUUCACAGUAGUGGACUUUAU-5' (SEQ ID NO:2)	7/42 = 16.7%	7/38 = 18.4%

1列目: 「ApoB」の後の数字は、ヒトApoB mRNA配列 NM_000384に比したセンス鎖の5'塩基のヌクレオチド位置を指す。2列目: 2'OMeヌクレオチドを太字の下線付きで示す。siRNA分子の一方の鎖または両方の鎖上の3'-オーバーハングは、1~4個のデオキシチミジン (dT) ヌクレオチド、1~4個の修飾されたおよび/もしくは未修飾のウリジン (U) リボヌクレオチド、または標的配列もしくはその相補鎖への相補性を有する1~2個のさらなるリボヌクレオチドを選択的に含み得る。3列目: siRNA分子中の2'OMe-修飾ヌクレオチドの数およびパーセンテージを提供する。4列目: siRNA分子の二本鎖 (DS) 領域中の修飾ヌクレオチドの数およびパーセンテージを提供する。

40

【0390】

封入されたApoB siRNAを含有する1:57 SNALP製剤は、上の第VI節に記載されたように、DLin-C2K-DMA (「C2K」) または化合物1 (DLin-M-C3-DMA (「MC3」))、4、5、8、9、10、11、13、15、17、18、20、22、23、25、27、28、29、30、31、34、35、40、または41を用いて調製した。

【0391】

50

SNALP製剤は、0.033mg/kgまたは0.05mg/kgでIV注射によりBalb/cマウスに投与した（1群あたりn=3）。ハウスキーピング遺伝子GAPDHに比べてApoB mRNAを検討評価するために、SNALP投与の48時間後に肝臓ApoB mRNAレベルを分岐DNAアッセイ（QuantiGeneアッセイ）によって評価した。

【0392】

表2に、これらの各SNALP製剤の肝臓ApoB mRNAノックダウン活性の比較を示す。非限定的な例として、表2は、同用量で投与された場合、化合物1、4、8、13、15、27、28、または35を含有するSNALP製剤が、C2Kベンチマーク陽イオン性脂質を含有するSNALP製剤と比べて予想外に改善されたApoBサイレンシング活性を示したことを説明している。

【0393】

（表2）Balb/cマウス（48時間、n=3）に0.05または0.033mg/kgで投与された、新規な陽イオン性脂質を含有する1:57 SNALPのApoB:GAPDに対する作用

化合物	用量 (mg/kg)	PBS対照に対する ApoBのノックダウン (%)
C2K	0.033	-51
	0.05	-66
1 (MC3)	0.033	-71
	0.05	-81
4	0.033	-78
5	0.033	-56
8	0.033	-71
9	0.033	-54
10	0.033	-50
11	0.05	-54
13	0.033	-69
15	0.05	-77
17	0.05	-14
18	0.05	-46
20	0.05	-50
22	0.033	-30
23	0.033	-33
25	0.05	-66
27	0.033	-66
28	0.033	-68
29	0.05	-59
30	0.05	-65
31	0.05	-62
34	0.033	-41
35	0.033	-78
40	0.05	-58
41	0.033	-52

【0394】

上記明細書は例示を目的としており、限定を意図するものではないことを理解されたい。上記明細書を閲覧した当業者には多数の態様が明らかであろう。したがって本発明の範囲は、上記明細書を参照して決定すべきではなく、その代わりに、当該特許請求の範囲が権利を有する同等物の全範囲と共に添付の特許請求の範囲を参照して決定すべきである。特許出願、特許、PCT公報、およびGenbankアクセッション番号を含めた全ての論文および参考文献の開示は、全ての目的について本明細書に参照により組み入れられる。

【手続補正書】

【提出日】平成25年1月17日(2013.1.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2013527856000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2011/000723

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
INV.	C07C217/08	A61K48/00	C12N15/11	C07C217/46	C07C229/12
	C07C229/30	C07C237/06	C07C271/20	C07C327/06	C07D233/60
	C07D249/04	A61K47/48	C12N15/88		
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)					
C07C C07D A61K C12N					
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)					
EPO-Internal, WPI Data, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim No.	
E	WO 2011/075656 A1 (UNIV BRITISH COLUMBIA [CA]; ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; HOPE MIC) 23 June 2011 (2011-06-23) page 32 - page 55; claims; examples -----			1-58	
X,P	WO 2011/017548 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; BUMCROT DAVID [US]; AKINC AKIN [US];) 10 February 2011 (2011-02-10) claims; figure 20; examples -----			1-58	
X,P	WO 2010/054401 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; MANOHARAN MUTHIAH [US]; JAYARAMAN MU) 14 May 2010 (2010-05-14) claims; examples ----- -/--			1-31, 33-58	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.					
* Special categories of cited documents :					
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report		
30 August 2011			06/09/2011		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer Zervas, Brigitte		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2011/000723

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2010/144740 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; CHEN JIANXIN; ANSELL STEVEN; AKINC A) 16 December 2010 (2010-12-16) claims; examples -----	1-58
X	WO 2010/042877 A1 (TEKMIRA PHARMACEUTICALS CORP [CA]; UNIV BRITISH COLUMBIA [CA]; HOPE MI) 15 April 2010 (2010-04-15) claims; examples -----	1-58
X	WO 2009/132131 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; MANOHARAN MUTHIAH [US]; RAJEEV KALLA) 29 October 2009 (2009-10-29) claims; examples -----	1-3, 7-23, 33-58

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2011/000723

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011075656	A1	23-06-2011	NONE
WO 2011017548	A1	10-02-2011	NONE
WO 2010054401	A1	14-05-2010	AU 2009313201 A1 14-05-2010 AU 2009313205 A1 14-05-2010 AU 2009313206 A1 14-05-2010 CA 2743135 A1 14-05-2010 CA 2743136 A1 14-05-2010 CA 2743139 A1 14-05-2010 EP 2355851 A1 17-08-2011 EP 2355658 A1 17-08-2011 WO 2010054405 A1 14-05-2010 WO 2010054406 A1 14-05-2010
WO 2010144740	A1	16-12-2010	US 2010324120 A1 23-12-2010
WO 2010042877	A1	15-04-2010	AU 2009303345 A1 15-04-2010 CA 2740000 A1 15-04-2010 EP 2350043 A1 03-08-2011
WO 2009132131	A1	29-10-2009	NONE

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/22	(2006.01)	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 31/713	(2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 31/7105	(2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 C 229/12	(2006.01)	C 0 7 C 229/12	C S P
C 0 7 C 271/20	(2006.01)	C 0 7 C 271/20	
C 0 7 C 327/22	(2006.01)	C 0 7 C 327/22	
C 0 7 C 229/30	(2006.01)	C 0 7 C 229/30	
C 0 7 C 237/06	(2006.01)	C 0 7 C 237/06	
C 0 7 C 217/46	(2006.01)	C 0 7 C 217/46	
C 1 2 N 15/113	(2010.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A G

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

(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ヘイズ ジェームズ
カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ウェスト 第7 アベニュー 47 -
870

(72) 発明者 ウッド マーク
カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 ポート ムーディー クラハニー ドライブ 205
- 801

(72) 発明者 マーティン アラン
カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー アボット ストリート 708 - 68
8

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA11 CA20 EA10
4C076 AA31 BB01 BB03 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 BB25 CC16
CC27 CC35 DD49A DD60A
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 NA13 ZA75 ZB26 ZB33
4H006 AA01 AA03 AB20 AB27 AB28 AB29 BN10 BP10 BR10 BT12
BU32 BV22 RA06 TN50