

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7072386号

(P7072386)

(45)発行日 令和4年5月20日(2022.5.20)

(24)登録日 令和4年5月12日(2022.5.12)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 C 211/22 (2006.01)

C 0 7 C 211/22

C S P

C 0 7 C 233/36 (2006.01)

C 0 7 C 233/36

C 0 7 C 233/47 (2006.01)

C 0 7 C 233/47

A 6 1 K 47/24 (2006.01)

A 6 1 K 47/24

A 6 1 K 47/28 (2006.01)

A 6 1 K 47/28

請求項の数 51 (全77頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2017-567367(P2017-567367)

(86)(22)出願日 平成28年6月29日(2016.6.29)

(65)公表番号 特表2018-521052(P2018-521052
A)

(43)公表日 平成30年8月2日(2018.8.2)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/039999

(87)国際公開番号 WO2017/004143

(87)国際公開日 平成29年1月5日(2017.1.5)

審査請求日 令和1年6月18日(2019.6.18)

(31)優先権主張番号 62/186,210

(32)優先日 平成27年6月29日(2015.6.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 516386834

アクイタス セラピューティクス インコ
ーポレイテッドカナダ国 ブイ6ティー 1ダブリュー5
ブリティッシュ コロンビア, バンクー
バー, アグロノミー ロード 6190
, スイート 402, ユニバーシティ
オブ ブリティッシュ コロンビア - ケー
イーティーアール

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100150500

弁理士 森本 靖

(72)発明者 ドゥ, シンヤオ

カナダ国 ブイ7エー 2エム1 プリテ
最終頁に続く

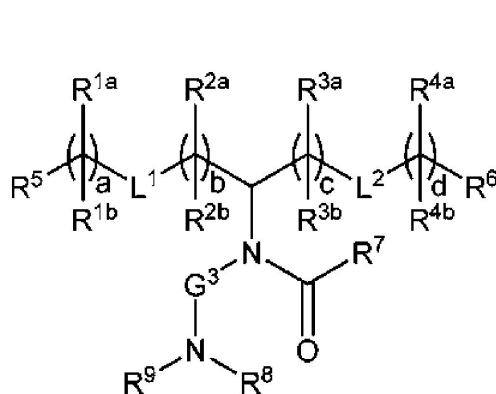
(54)【発明の名称】 核酸の送達のための脂質および脂質ナノ粒子製剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

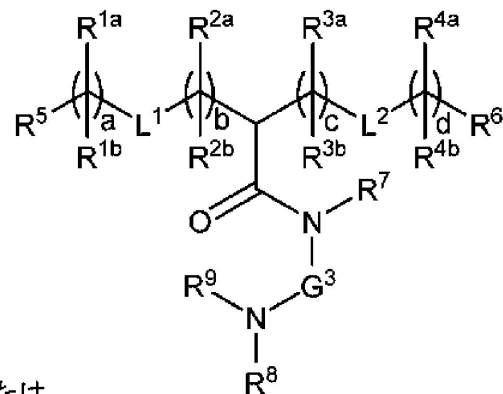
式(IA)または(IB)：

【化1】



(IA)

または



(IB)

(式中、

L¹ および L² は、それぞれ独立して - O (C = O) - 、または - (C = O) O - であり、
G³ は C₁ ~ C₆ アルキレンであり、

R^a は H または C₁ ~ C₁₂ アルキルであり、

R^{1a} および R^{1b} は、出現ごとに、独立して、(a) H もしくは C₁ ~ C₁₂ アルキルであるか、または (b) R^{1a} は H もしくは C₁ ~ C₁₂ アルキルであり、R^{1b} とそれが結合している炭素原子は、隣接する R^{1b} とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素 - 炭素二重結合を形成し、

R^{2a} および R^{2b} は、出現ごとに、独立して、(a) H もしくは C₁ ~ C₁₂ アルキルであるか、または (b) R^{2a} は H もしくは C₁ ~ C₁₂ アルキルであり、R^{2b} とそれが結合している炭素原子は、隣接する R^{2b} とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素 - 炭素二重結合を形成し、

10

R^{3a} および R^{3b} は、出現ごとに、独立して、(a) H もしくは C₁ ~ C₁₂ アルキルであるか、または (b) R^{3a} は H もしくは C₁ ~ C₁₂ アルキルであり、R^{3b} とそれが結合している炭素原子は、隣接する R^{3b} とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素 - 炭素二重結合を形成し、

R^{4a} および R^{4b} は、出現ごとに、独立して、(a) H もしくは C₁ ~ C₁₂ アルキルであるか、または (b) R^{4a} は H もしくは C₁ ~ C₁₂ アルキルであり、R^{4b} とそれが結合している炭素原子は、隣接する R^{4b} とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素 - 炭素二重結合を形成し、

R⁵ および R⁶ は、それぞれ独立して、H またはメチルであり、

20

R⁷ は、任意選択で - (C = O) O R^b または - O (C = O) R^b で置換されている C₆ ~ C₁₆ アルキルであり、

R^b は、C₁ ~ C₁₅ アルキルであり、

R⁸ および R⁹ は、それぞれ独立して、C₁ ~ C₁₂ アルキルであるか、または R⁸ および R⁹ は、それらが結合している窒素原子と一緒にあって、5、6 または 7 員の複素環を形成し、

a、b、c および d は、それぞれ独立して、1 ~ 24 の整数である)

の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体。

【請求項 2】

前記化合物が式 (I A) を有する、請求項 1 に記載の化合物。

30

【請求項 3】

前記化合物が式 (I B) を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

L¹ または L² の 1 つが - O (C = O) - である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 5】

L¹ および L² のそれぞれが - O (C = O) - である、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 6】

L¹ または L² の 1 つが - (C = O) O - である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の化合物。

40

【請求項 7】

L¹ および L² のそれぞれが - (C = O) O - である、請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 8】

R^{1a} および R^{1b} の少なくとも 1 つの出現に対して、R^{1a} が H または C₁ ~ C₁₂ アルキルであり、R^{1b} とそれが結合している炭素原子が、隣接する R^{1b} とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素 - 炭素二重結合を形成する、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 9】

R^{4a} および R^{4b} の少なくとも 1 つの出現に対して、R^{4a} が H または C₁ ~ C₁₂ アルキルであり、R^{4b} とそれが結合している炭素原子が、隣接する R^{4b} とそれが結合し

50

ている炭素原子と一緒にあって、炭素 - 炭素二重結合を形成する、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 10】

R²a および R²b の少なくとも 1 つの出現に対して、R²a が H または C₁ ~ C₁₂ アルキルであり、R²b とそれが結合している炭素原子が、隣接する R²b とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素 - 炭素二重結合を形成する、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 11】

R³a および R³b の少なくとも 1 つの出現に対して、R³a が H または C₁ ~ C₁₂ アルキルであり、R³b とそれが結合している炭素原子が、隣接する R³b とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素 - 炭素二重結合を形成する、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の化合物。

10

【請求項 12】

a、b、c および d が、それぞれ独立して、2 ~ 12 の整数である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 13】

a、b、c および d が、それぞれ独立して、5 ~ 9 の整数である、請求項 12 に記載の化合物。

【請求項 14】

R¹a、R²a、R³a および R⁴a の少なくとも 1 つが H である、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項 15】

R¹a、R²a、R³a および R⁴a が出現ごとに H である、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 16】

R¹a、R²a、R³a および R⁴a の少なくとも 1 つが C₁ ~ C₈ アルキルである、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 17】

C₁ ~ C₈ アルキルが、メチル、エチル、n - プロピル、イソ - プロピル、n - ブチル、イソ - ブチル、tert - ブチル、n - ヘキシルまたは n - オクチルである、請求項 16 に記載の化合物。

30

【請求項 18】

R¹b、R²b、R³b および R⁴b の少なくとも 1 つが H である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 19】

R¹b、R²b、R³b および R⁴b が出現ごとに H である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 20】

R⁵ または R⁶ の 1 つがメチルである、請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 21】

R⁵ および R⁶ のそれぞれがメチルである、請求項 1 から 20 のいずれか一項に記載の化合物。

40

【請求項 22】

R⁷ が C₆ ~ C₉ アルキルである、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 23】

R⁷ が - (C = O)OR^b または - O(C = O)R^b で置換されている、請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 24】

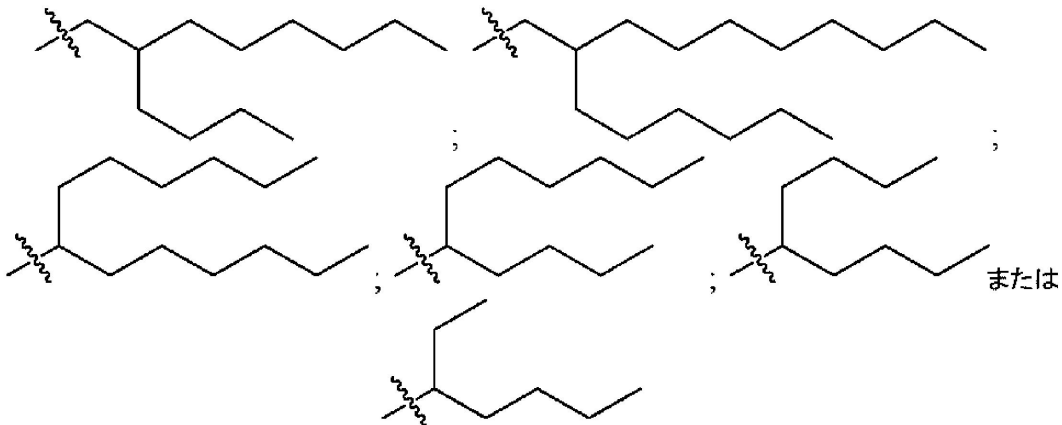
R^b が分枝状 C₁ ~ C₁₅ アルキルである、請求項 23 に記載の化合物。

【請求項 25】

50

R^b が、以下の構造：

【化 3】



10

の 1 つを有する、請求項 2.4 に記載の化合物。

【請求項 2.6】

R⁸ または R⁹ の少なくとも 1 つがメチルである、請求項 1 から 2.5 のいずれか一項に

20

30

記載の化合物。

【請求項 2.7】

R⁸ および R⁹ のそれぞれがメチルである、請求項 2.6 に記載の化合物。

40

【請求項 2.8】

R⁸ および R⁹ が、これらが結合している窒素原子と一緒にあって、5、6 または 7 員の複素環を形成する、請求項 1 から 2.5 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 2.9】

前記複素環がピロリジニルである、請求項 2.8 に記載の化合物。

【請求項 3.0】

前記複素環がピペラジニルである、請求項 2.8 に記載の化合物。

【請求項 3.1】

G³ が C₂ ~ C₄ アルキレンである、請求項 1 から 3.0 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 3.2】

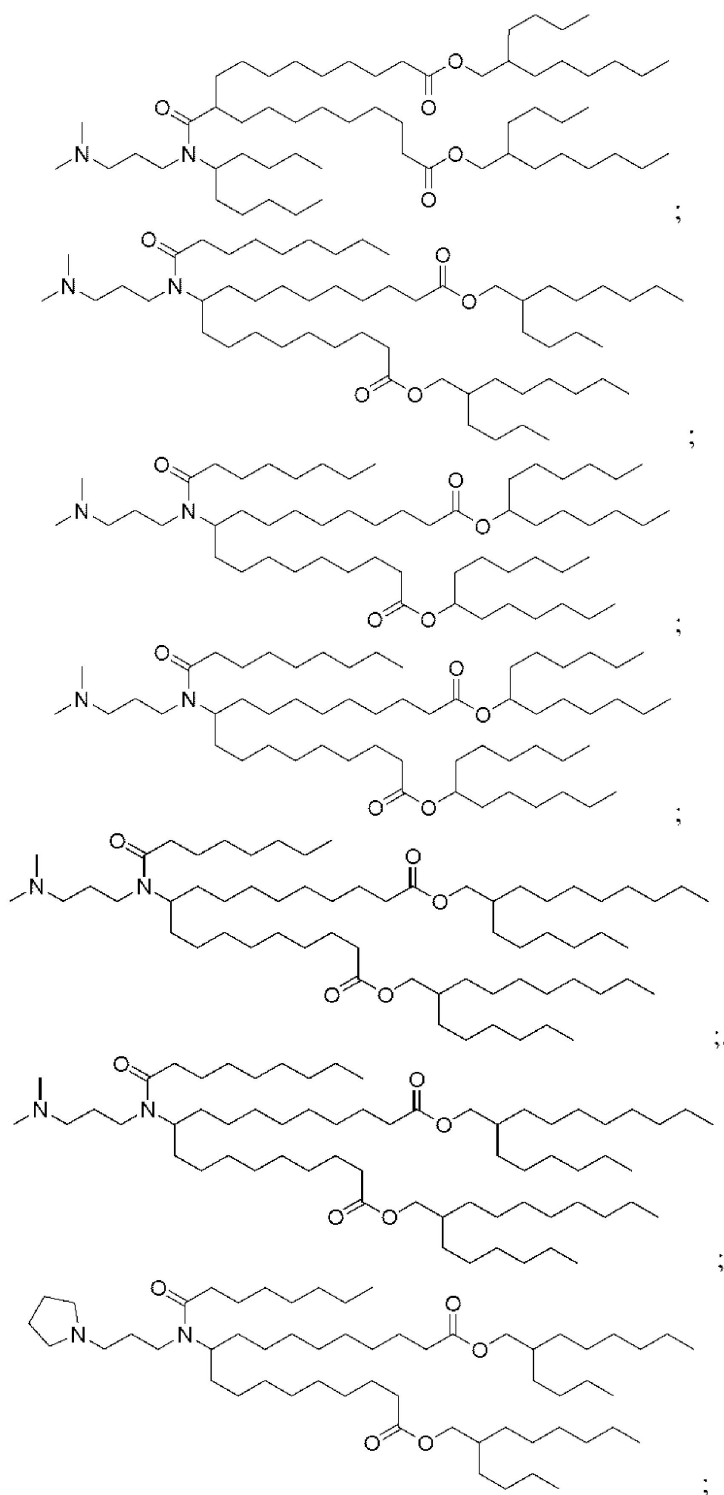
50

G³がC₃アルキレンである、請求項1から3.1のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項33】

以下の構造：

【化4】



10

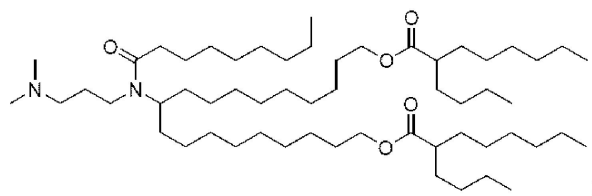
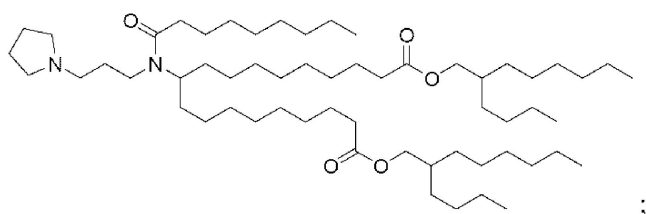
20

30

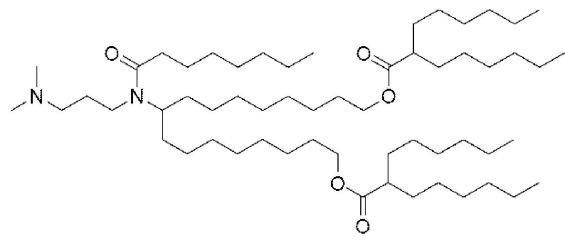
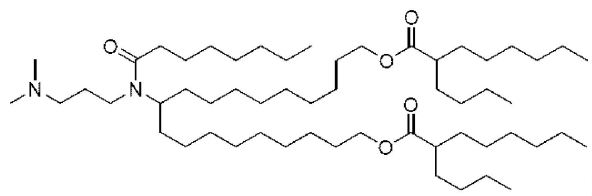
40

50

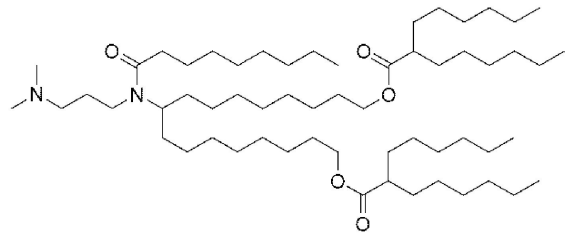
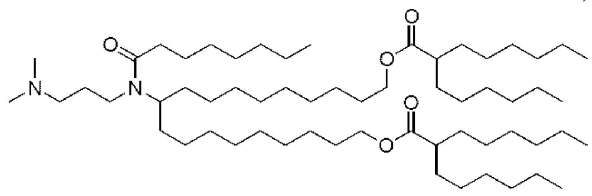
【化 5】



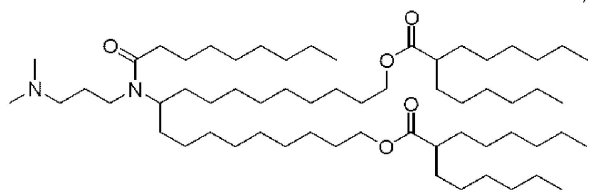
10



20



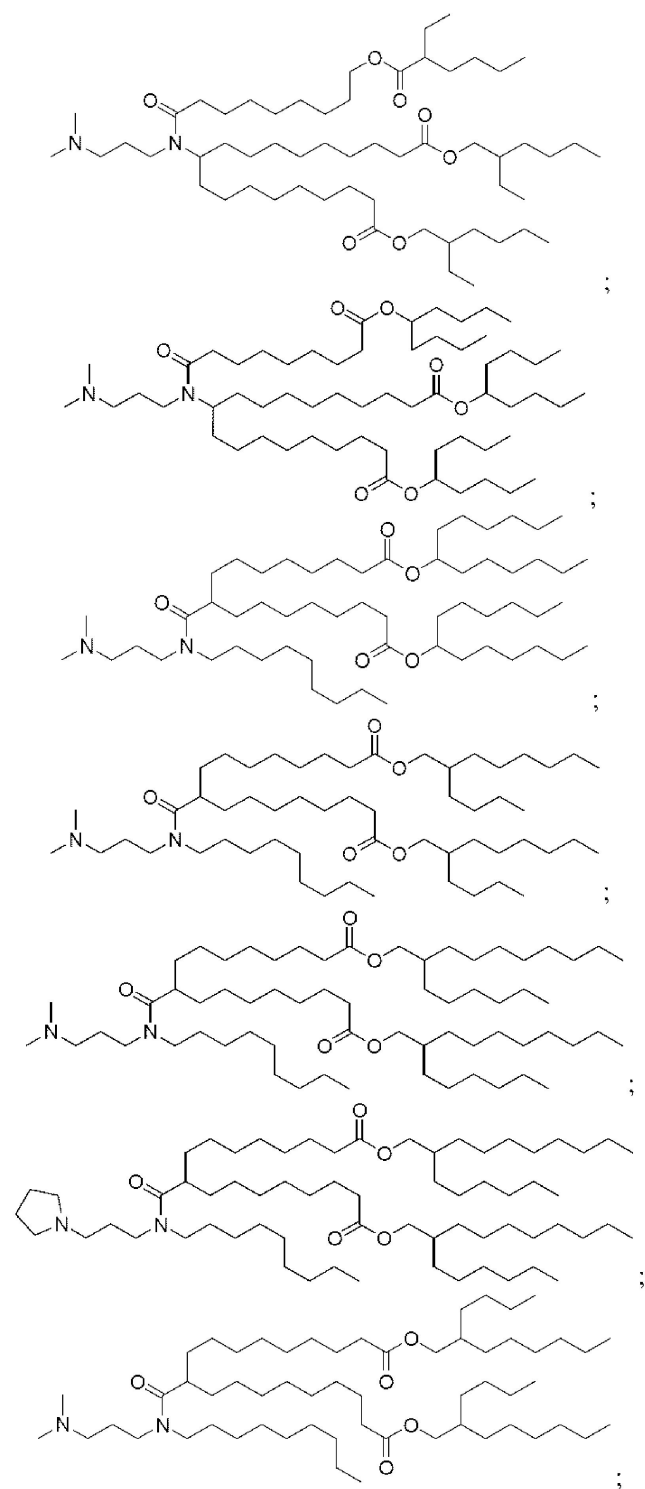
30



40

50

【化 6】



10

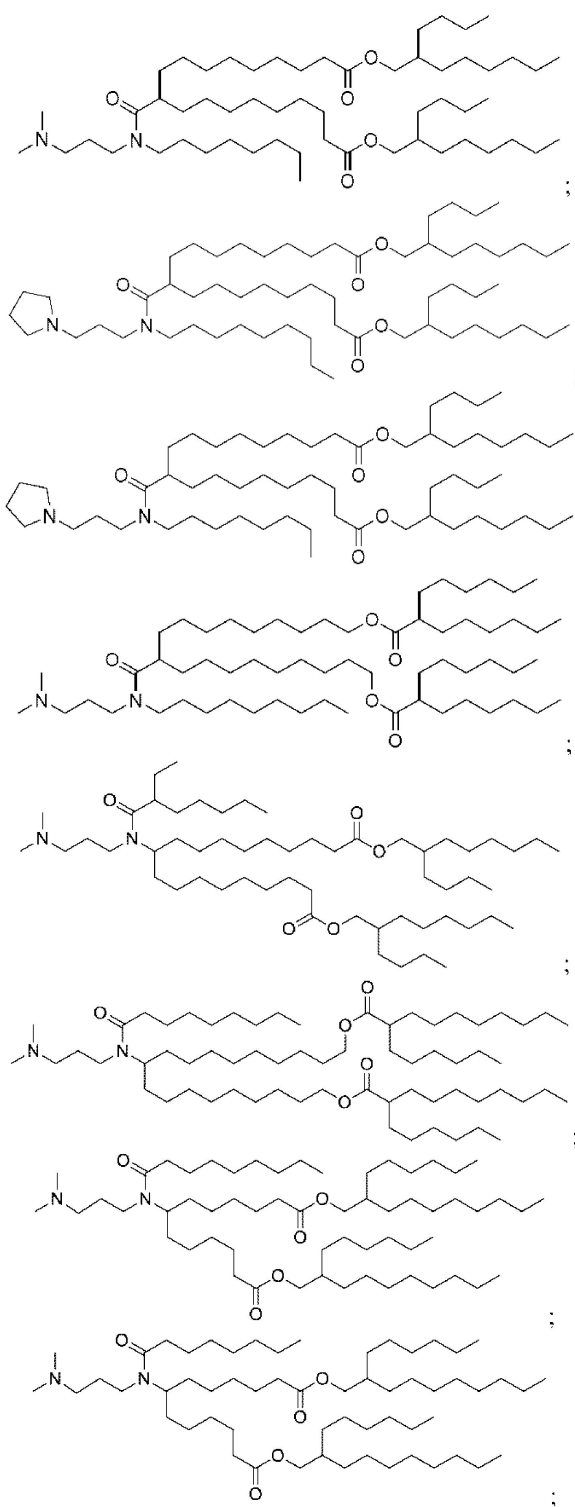
20

30

40

50

【化 7】



10

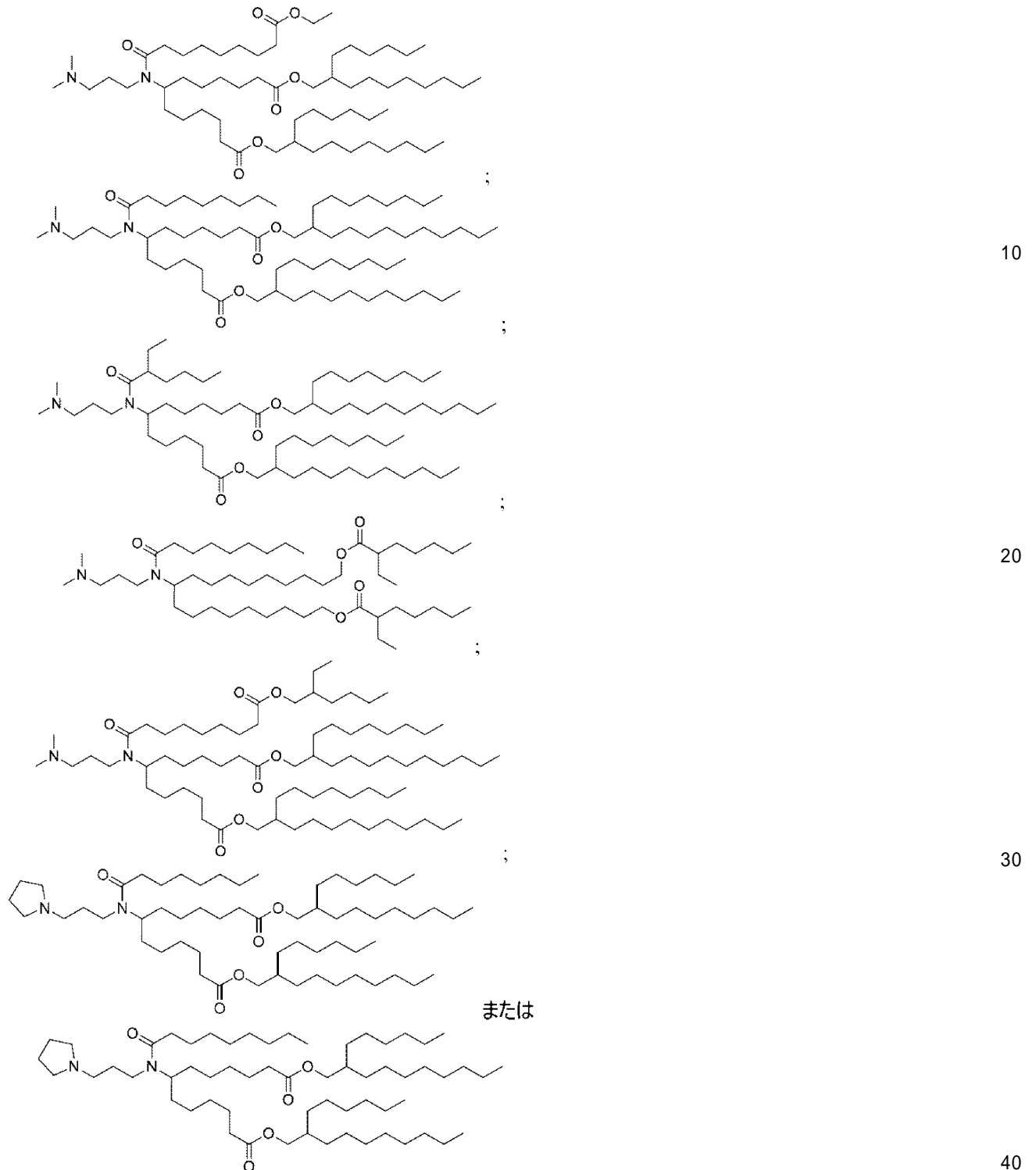
20

30

40

50

【化 8】



のうちの 1 つを有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3 4】

請求項 1 から 3.3 のいずれか一項に記載の化合物と、治療剤とを含む組成物。

【請求項 3 5】

中性脂質、ステロイドおよびポリマーコンジュゲート脂質から選択される 1 種または複数の賦形剤をさらに含む、請求項 3.4 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

DSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPE および SM から選択される 1 種または複数の中性脂質を含む、請求項 3.5 に記載の組成物。

【請求項 37】

前記中性脂質が D S P C である、請求項 36 に記載の組成物。

【請求項 38】

前記化合物と前記中性脂質とのモル比が、約 2 : 1 ~ 約 8 : 1 の範囲である、請求項 34 から 37 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 39】

前記ステロイドがコレステロールである、請求項 35 から 38 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 40】

前記化合物とコレステロールとのモル比が、約 2 : 1 ~ 1 : 1 の範囲である、請求項 39 に記載の組成物。

10

【請求項 41】

前記ポリマーコンジュゲート脂質がペグ化脂質である、請求項 35 から 40 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 42】

前記化合物と前記ペグ化脂質とのモル比が、約 100 : 1 ~ 約 25 : 1 の範囲である、請求項 41 に記載の組成物。

【請求項 43】

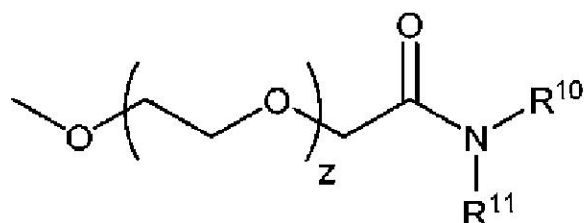
前記ペグ化脂質が、PEG-DAG、PEG-PE、PEG-S-DAG、PEG-cer または PEG ジアルコキシプロピルカルバメート (dialkoxypropyl carbamate) である、請求項 41 または 42 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 44】

前記ペグ化脂質が以下の構造 (II) :

【化 9】



30

(II)

(式中、

R¹⁰ および R¹¹ は、それぞれ独立して、10 ~ 30 個の炭素原子を含有する、直鎖状または分枝状の、飽和または不飽和のアルキル鎖であり、前記アルキル鎖は、1 つまたは複数のエステル結合により、任意選択で分断されており、

z は、30 ~ 60 の範囲の平均値を有する)

40

またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体を有する、請求項 41 または 42 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 45】

R¹⁰ および R¹¹ が、それぞれ独立して、12 ~ 16 個の炭素原子を含有する直鎖状の、飽和したアルキル鎖である、請求項 44 に記載の組成物。

【請求項 46】

前記 z の平均が約 44 である、請求項 44 または 45 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 47】

前記治療剤が核酸を含む、請求項 34 から 46 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 48】

50

前記核酸が、アンチセンスおよびメッセンジャーRNAから選択される、請求項47に記載の組成物。

【請求項49】

治療剤の投与を必要とする患者に治療剤を投与するための方法において使用するための、請求項34から48のいずれか一項に記載の組成物であって、前記方法は、前記組成物を調製または提供するステップと、前記組成物を前記患者に投与するステップとを含む、組成物。

【請求項50】

請求項1から33のいずれか一項に記載の化合物を含む脂質ナノ粒子。

【請求項51】

前記組成物が脂質ナノ粒子を含む、請求項34から48のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、中性脂質、コレステロールおよびポリマーコンジュゲート脂質などの他の脂質成分と組み合わせて使用され得る新規のカチオン性脂質であって、*in vitro*と*in vivo*の両方で、オリゴヌクレオチドを有する脂質ナノ粒子を形成し、治療用核酸（例えば、オリゴヌクレオチド、メッセンジャーRNA）の細胞内送達を促進することができる新規のカチオン性脂質に一般的に関する。

【背景技術】

【0002】

生体系内で所望の応答を生じさせる核酸の送達に関連して、多くの難題が存在する。核酸をベースとする治療薬は、莫大な可能性を有するが、この可能性を実現するためには、細胞または生物内の適当な部位への核酸のより有効な送達の必要性が依然としてある。治療用核酸として、例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、DNAザイム、プラスミド、免疫刺激核酸、アンタゴmir（antagomir）、抗mir（antimir）、模倣体、スーパーmir（supermir）、およびアプタマーが挙げられる。mRNAまたはプラスミドなどの一部の核酸は、例えば、タンパク質または酵素の欠乏に関係した疾患の処置に有用となるような、特定の細胞産物の発現を生じさせるために使用することができる。その系に常在性であるかどうかに関わらず、任意の選択されたタンパク質配列を生成するためにコンストラクトは合成され得るので、翻訳可能なヌクレオチド送達の治療的用途は極めて幅広い。核酸の発現産物は、細胞または生物内で、タンパク質の既存レベルを増大させるか、欠損したもしくは非機能的バージョンのタンパク質を置き換えるか、または新規タンパク質および関連する機能性を導入することができる。

【0003】

miRNA阻害剤などの一部の核酸は、例えば、タンパク質または酵素の欠乏に関係した疾患の処置に有用となるような、miRNAにより調節される特定の細胞産物の発現を生じさせるために使用することができる。1つまたは複数のmiRNAを阻害するためにコンストラクトは合成され得るので、これがひいてはmRNA産物の発現を調節することになるので、miRNA阻害の治療的用途は極めて幅広い。内因性miRNAの阻害は、特定のmiRNAまたはmiRNAの群に関連する疾患を処置するための手段として、細胞または生物内で、その下流の標的タンパク質の発現を増大させ、適切な機能を回復することができる。

【0004】

他の核酸は、特定のmRNAの細胞内レベルを下方制御することができ、その結果、RNA干渉（RNAi）またはアンチセンスRNAの相補結合などのプロセスを介して対応するタンパク質の合成を下方制御することができる。オリゴヌクレオチドコンストラクトは、標的mRNAに向けられた任意のヌクレオチド配列を用いて合成することができるので、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびRNAiの治療的用途もまた極めて幅広い。標

10

20

30

40

50

的として、正常細胞由来の mRNA、がんなどの疾患状態に関連する mRNA、およびウイルスなどの感染物質の mRNA を挙げることができる。今日までに、アンチセンスオリゴヌクレオチドコンストラクトは、*in vitro* と *in vivo* の両モデルにおいて、同族 mRNA の分解を介して標的タンパク質を特異的に下方制御する能力を示している。加えて、アンチセンスオリゴヌクレオチドコンストラクトは、臨床研究において現在評価されている。

【 0 0 0 5 】

しかし、治療的状況におけるオリゴヌクレオチドの使用は、現在 2 つの問題に直面している。第 1 に、遊離 RNA は、血漿中のヌクレアーゼ消化の影響を受けやすい。第 2 に、遊離 RNA は、関連する翻訳機構が存在する細胞内区画へのアクセス取得能力が限られている。中性脂質、コレステロール、PEG、ペグ化脂質などの他の脂質成分を有するカチオン性脂質およびオリゴヌクレオチドから形成された脂質ナノ粒子は、血漿中での RNA の分解を遮断し、オリゴヌクレオチドの細胞取り込みを促進するために使用されてきた。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

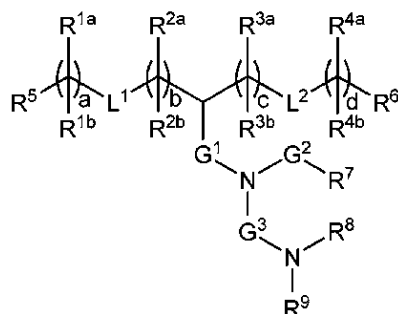
本発明は、例えば、以下を提供する：

(項目 1)

式 I :

【化 1 8 】

20



I

30

(式中、

L_1 および L_2 は、それぞれ独立して $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)_x-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-NR_aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR_a-$ 、 $-NR_aC(=O)NR_a-$ 、 $-OC(=O)NR_a-$ 、 $-NR_aC(=O)O-$ または直接結合であり、

G_1 は、 $C_1 \sim C_2$ アルキレン、 $-(C=O)-$ 、 $-O(C=O)-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-NR_aC(=O)-$ または直接結合であり、

G_2 は、 $-C(=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-C(=O)NR_a-$ または直接結合であり、

40

G_3 は $C_1 \sim C_6$ アルキレンであり、

R_a は H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、

R_{1a} および R_{1b} は、出現ごとに、独立して、(a) H もしくは $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであるか、または (b) R_{1a} は H もしくは $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、 R_{1b} とそれが結合している炭素原子は、隣接する R_{1b} とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素-炭素二重結合を形成し、

R_{2a} および R_{2b} は、出現ごとに、独立して、(a) H もしくは $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであるか、または (b) R_{2a} は H もしくは $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、 R_{2b} とそれが結合している炭素原子は、隣接する R_{2b} とそれが結合している炭素原子と一緒になっ

50

て、炭素 - 炭素二重結合を形成し、

R^{3a} および R^{3b} は、出現ごとに、独立して、(a) H もしくは $C_{1 \sim 12}$ アルキルであるか、または (b) R^{3a} は H もしくは $C_{1 \sim 12}$ アルキルであり、 R^{3b} とそれが結合している炭素原子は、隣接する R^{3b} とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素 - 炭素二重結合を形成し、

R^{4a} および R^{4b} は、出現ごとに、独立して、(a) H もしくは $C_{1 \sim 12}$ アルキルであるか、または (b) R^{4a} は H もしくは $C_{1 \sim 12}$ アルキルであり、 R^{4b} とそれが結合している炭素原子は、隣接する R^{4b} とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素 - 炭素二重結合を形成し、

R^5 および R^6 は、それぞれ独立して、H またはメチルであり、

R^7 は $C_{4 \sim 20}$ アルキルであり、

R^8 および R^9 は、それぞれ独立して、 $C_{1 \sim 12}$ アルキルであるか、または R^8 および R^9 は、それらが結合している窒素原子と一緒にあって、5、6 または 7 員の複素環を形成し、

a、b、c および d は、それぞれ独立して、1 ~ 24 の整数であり、

x は 0、1 または 2 である。

の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体。

(項目 2)

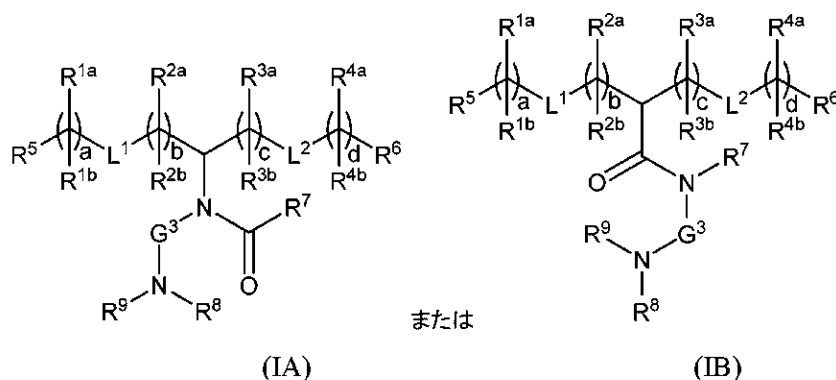
L^1 および L^2 が、それぞれ独立して $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ または直接結合であり、

G^1 および G^2 が、それぞれ独立して $-(C=O)-$ または直接結合である、項目 1 に記載の化合物。

(項目 3)

以下の構造 (IA) または (IB) :

【化 19】



の 1 つを有する、項目 1 に記載の化合物。

(項目 4)

L^1 または L^2 の 1 つが $-O(C=O)-$ である、項目 1 から 3 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 5)

L^1 および L^2 のそれぞれが $-O(C=O)-$ である、項目 4 に記載の化合物。

(項目 6)

L^1 または L^2 の 1 つが $-(C=O)O-$ である、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 7)

L^1 および L^2 のそれぞれが $-(C=O)O-$ である、項目 6 に記載の化合物。

(項目 8)

L¹またはL²の1つが直接結合である、項目1から3のいずれか一項に記載の化合物。
(項目9)

L¹およびL²のそれぞれが直接結合である、項目8に記載の化合物。
(項目10)

R^{1a}およびR^{1b}の少なくとも1つの出現に対して、R^{1a}がHまたはC₁~C₁₂アルキルであり、R^{1b}とそれが結合している炭素原子が、隣接するR^{1b}とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素-炭素二重結合を形成する、項目1から9のいずれか一項に記載の化合物。

(項目11)

R^{4a}およびR^{4b}の少なくとも1つの出現に対して、R^{4a}がHまたはC₁~C₁₂アルキルであり、R^{4b}とそれが結合している炭素原子が、隣接するR^{4b}とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素-炭素二重結合を形成する、項目1から10のいずれか一項に記載の化合物。

10

(項目12)

R^{2a}およびR^{2b}の少なくとも1つの出現に対して、R^{2a}がHまたはC₁~C₁₂アルキルであり、R^{2b}とそれが結合している炭素原子が、隣接するR^{2b}とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素-炭素二重結合を形成する、項目1から11のいずれか一項に記載の化合物。

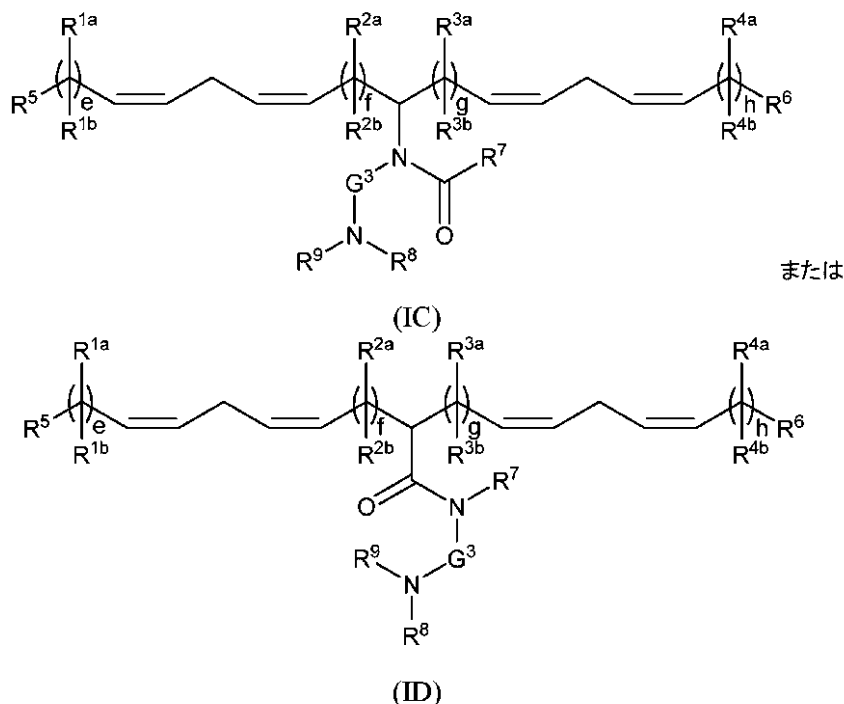
(項目13)

R^{3a}およびR^{3b}の少なくとも1つの出現に対して、R^{3a}がHまたはC₁~C₁₂アルキルであり、R^{3b}とそれが結合している炭素原子が、隣接するR^{3b}とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素-炭素二重結合を形成する、項目1から12のいずれか一項に記載の化合物。

20

(項目14)

以下の構造(IC)または(ID)：
【化20】



30

40

(式中、e、f、gおよびhは、それぞれ独立して、1~12の整数である)の1つを有する、項目1に記載の化合物。

50

(項目 15)

e、f、g および h が、それぞれ独立して、4 ~ 10 の整数である、項目 14 に記載の化合物。

(項目 16)

a、b、c および d が、それぞれ独立して、2 ~ 12 の整数である、項目 1 から 15 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 17)

a、b、c および d が、それぞれ独立して、5 ~ 9 の整数である、項目 16 に記載の化合物。

(項目 18)

R_{1a}、R_{2a}、R_{3a} および R_{4a} の少なくとも 1 つが H である、項目 1 から 17 のいずれか一項に記載の化合物。

10

(項目 19)

R_{1a}、R_{2a}、R_{3a} および R_{4a} が出現ごとに H である、項目 1 から 18 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 20)

R_{1a}、R_{2a}、R_{3a} および R_{4a} の少なくとも 1 つが C₁ ~ C₈ アルキルである、項目 1 から 18 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 21)

C₁ ~ C₈ アルキルが、メチル、エチル、n - プロピル、イソ - プロピル、n - ブチル、イソ - ブチル、tert - ブチル、n - ヘキシルまたは n - オクチルである、項目 20 に記載の化合物。

20

(項目 22)

R_{1b}、R_{2b}、R_{3b} および R_{4b} の少なくとも 1 つが H である、項目 1 から 21 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 23)

R_{1b}、R_{2b}、R_{3b} および R_{4b} が出現ごとに H である、項目 1 から 9 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 24)

R₅ または R₆ の 1 つがメチルである、項目 1 から 23 のいずれか一項に記載の化合物。

30

(項目 25)

R₅ および R₆ のそれぞれがメチルである、項目 1 から 24 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 26)

R₇ が C₆ ~ C₁₆ アルキルである、項目 1 から 25 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 27)

R₇ が C₆ ~ C₉ アルキルである、項目 1 から 26 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 28)

R₇ が - (C=O)OR_b、- O(C=O)R_b、- C(=O)R_b、- OR_b、- S(O)_xR_b、- S-SR_b、- C(=O)SR_b、- SC(=O)R_b、- NR_aR_b、- NR_aC(=O)R_b、- C(=O)NR_aR_b、- NR_aC(=O)NR_aR_b、- OC(=O)NR_aR_b、- NR_aC(=O)OR_b、- NR_aS(O)_xNR_aR_b、- NR_aS(O)_xR_b または - S(O)_xNR_aR_b で置換されており、ここで、R_a が H または C₁ ~ C₁₂ アルキルであり、R_b が C₁ ~ C₁₅ アルキルであり、x が 0、1 または 2 である、項目 1 から 27 のいずれか一項に記載の化合物。

40

(項目 29)

R₇ が - (C=O)OR_b または - O(C=O)R_b で置換されている、項目 28 に記載の化合物。

(項目 30)

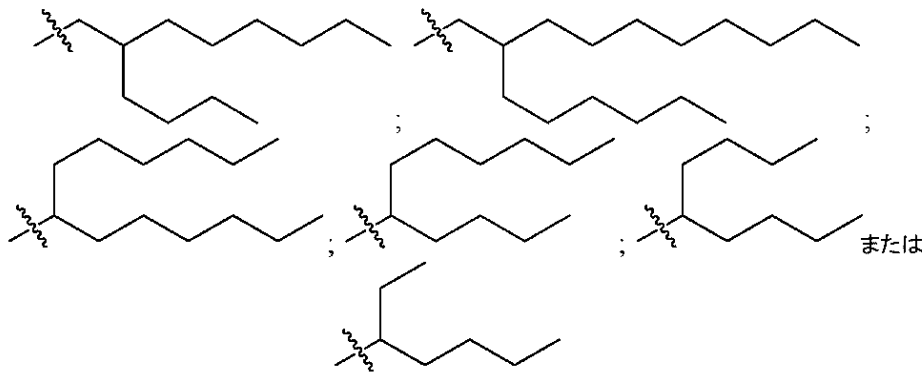
R_b が分枝状 C₁ ~ C₁₅ アルキルである、項目 28 または 29 に記載の化合物。

50

(項目 3 1)

R^bが、以下の構造：

【化 2 1】



10

の 1 つを有する、項目 3 0 に記載の化合物。

(項目 3 2)

R⁸またはR⁹の少なくとも 1 つがメチルである、項目 1 から 3 1 のいずれか一項に記載の化合物。

20

(項目 3 3)

R⁸およびR⁹のそれぞれがメチルである、項目 3 2 に記載の化合物。

(項目 3 4)

R⁸およびR⁹が、これらが結合している窒素原子と一緒に、5、6 または 7 員の複素環を形成する、項目 1 から 3 1 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 3 5)

前記複素環がピロリジニルである、項目 3 4 に記載の化合物。

(項目 3 6)

前記複素環がピペラジニルである、項目 3 4 に記載の化合物。

(項目 3 7)

G³がC₂~C₄アルキレンである、項目 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の化合物。

30

(項目 3 8)

G³がC₃アルキレンである、項目 1 から 3 7 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 3 9)

表 1 の中の化合物から選択される化合物。

(項目 4 0)

項目 1 から 3 9 のいずれか一項に記載の化合物と、治療剤とを含む組成物。

(項目 4 1)

中性脂質、ステロイドおよびポリマーコンジュゲート脂質から選択される 1 種または複数の賦形剤をさらに含む、項目 4 0 に記載の組成物。

40

(項目 4 2)

DSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPE および SM から選択される 1 種または複数の中性脂質を含む、項目 4 1 に記載の組成物。

(項目 4 3)

前記中性脂質が DSPC である、項目 4 2 に記載の組成物。

(項目 4 4)

前記化合物と前記中性脂質とのモル比が、約 2 : 1 ~ 約 8 : 1 の範囲である、項目 4 0 から 4 3 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 4 5)

前記ステロイドがコレステロールである、項目 4 1 から 4 4 のいずれか一項に記載の組

50

成物。

(項目46)

前記化合物とコレステロールとのモル比が、約2:1~1:1の範囲である、項目45に記載の組成物。

(項目47)

前記ポリマーコンジュゲート脂質がペグ化脂質である、項目41から46のいずれか一項に記載の組成物。

(項目48)

前記化合物と前記ペグ化脂質とのモル比が、約100:1~約25:1の範囲である、項目47に記載の組成物。

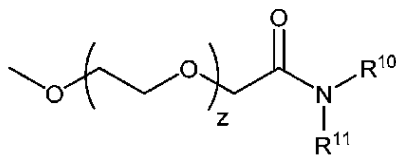
(項目49)

前記ペグ化脂質が、PEG-DAG、PEG-PE、PEG-S-DAG、PEG-cerまたはPEGジアルコキシプロピルカルバメート(dialkoxypropyl carbamate)である、項目47または48のいずれか一項に記載の組成物。

(項目50)

前記ペグ化脂質が以下の構造(II)：

【化22】



(II)

(式中、

R¹⁰およびR¹¹は、それぞれ独立して、10~30個の炭素原子を含有する、直鎖状または分枝状の、飽和または不飽和のアルキル鎖であり、前記アルキル鎖は、1つまたは複数のエステル結合により、任意選択で分断されており、

zは、30~60の範囲の平均値を有する)

またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体を有する、項目47または48のいずれか一項に記載の組成物。

(項目51)

R¹⁰およびR¹¹が、それぞれ独立して、12~16個の炭素原子を含有する直鎖状の、飽和したアルキル鎖である、項目50に記載の組成物。

(項目52)

前記zの平均が約45である、項目50または51のいずれか一項に記載の組成物。

(項目53)

前記治療剤が核酸を含む、項目40から52のいずれか一項に記載の組成物。

(項目54)

前記核酸が、アンチセンスおよびメッセンジャーRNAから選択される、項目53に記載の組成物。

(項目55)

治療剤の投与を必要とする患者に治療剤を投与するための方法であって、項目40から54のいずれか一項に記載の組成物を調製または提供するステップと、前記組成物を前記患者に投与するステップとを含む方法。

オリゴヌクレオチド送達のための改善されたカチオン性脂質および脂質ナノ粒子に対する必要性が依然として存在する。好ましくは、これらの脂質ナノ粒子は、薬物：脂質の最適比を提供し、血清中の分解およびクリアランスから核酸を保護し、全身送達に対して適切であり、核酸の細胞内送達を提供する。加えて、これらの脂質-核酸粒子は、核酸の有効

10

20

30

40

50

用量での患者の処置が、患者に対する許容不可能な毒性および／または危険性を伴わないよう、かなり容認され、十分な治療指数を提供するべきである。本発明は、これらの、および関係する利点を提供する。

【 0 0 0 7 】

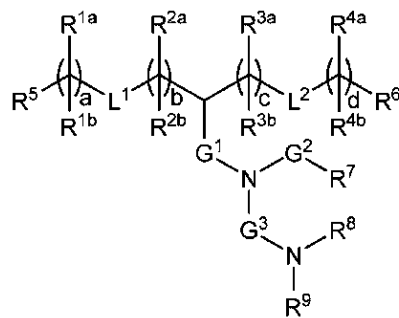
手短に言えば、本発明の実施形態は、単独で、あるいは他の脂質成分、例えば、中性脂質、荷電脂質、ステロイド（例えば、すべてのステロールを含む）および／もしくはこれらのアナログ、ならびに／またはポリマーコンjugate脂質などと組み合わせて使用することによって、治療剤の送達のための脂質ナノ粒子を形成することができる、脂質化合物の立体異性体、薬学的に許容される塩または互変異性体を含めた、脂質化合物を提供する。ある場合には、脂質ナノ粒子を使用して、アンチセンスおよび／またはメッセンジャー RNA などの核酸を送達する。様々な疾患または状態、例えば、感染性の実体および／またはタンパク質の不全により引き起こされるものなどの処置のためにこのような脂質ナノ粒子を使用する方法もまた提供される。

10

【 0 0 0 8 】

一実施形態では、以下の式（ I ）：

【 化 1 】



(I)

20

（式中、 R^{1a} 、 R^{1b} 、 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{3a} 、 R^{3b} 、 R^{4a} 、 R^{4b} 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 L^1 、 L^2 、 G^1 、 G^2 、 G^3 、 a 、 b 、 c および d は本明細書で定義された通りである）

30

を有する化合物またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体が提供される。

【 0 0 0 9 】

前述の式（ I ）の化合物の 1 つまたは複数と、治療剤とを含む医薬組成物もまた提供される。一部の実施形態では、医薬組成物は、中性脂質、荷電脂質、ステロイドおよびポリマーコンjugate脂質から選択される 1 つまたは複数の構成成分をさらに含む。このような組成物は、治療剤の送達のための脂質ナノ粒子の形成に有用である。

【 0 0 1 0 】

他の実施形態では、本発明は、治療剤の投与を必要とする患者に治療剤を投与するための方法であって、式（ I ）の化合物および治療剤を含む脂質ナノ粒子の組成物を調製することと、患者に組成物を送達することを含む方法を提供する。

40

【 0 0 1 1 】

本発明のこれらおよび他の態様は、以下の詳述された説明を参照して明らかとなる。

【 0 0 1 2 】

図の中で、同一の参照番号は同様の要素を特定している。図の中の要素の大きさおよび相対的位置は、必ずしも一定の縮尺で描かれているわけではなく、図の読みやすさを改善するためにこれらの要素のいくつかは、随意に拡大および配置されている。さらに、描かれている要素の特定の形状は、特定の要素の実際の形状に関して任意の情報を伝えることを意図しておらず、図を認識しやすくするために選択されたものにすぎない。

50

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図 1】図 1 は、マウスの肝臓におけるルシフェラーゼ発現の時間経過を示している。

【 0 0 1 4 】

【図 2】図 2 は、開示された脂質に関連する代表的な例として、M C 3 に対する $p K a$ の計算を図示している。

【 0 0 1 5 】

【図 3】図 3 は、異なる脂質に対するルシフェラーゼ活性比較データを提供している。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6 】

以下の説明では、本発明の様々な実施形態の十分な理解が得られるよう、ある特定の詳細が記載されている。しかし、当業者であれば、これらの詳細なしに本発明は実施され得ることを理解するであろう。

【 0 0 1 7 】

本発明は、哺乳動物の細胞への、核酸などの活性薬剤または治療剤の *in vivo* 送達のために脂質ナノ粒子において使用した場合に利点をもたらす新規のカチオン性（アミノ）脂質の発見に部分的に基づく。特に、本発明の実施形態は、*in vivo* において、核酸の活性の増加および組成物の耐性の改善を提供し、以前記載された核酸 - 脂質ナノ粒子組成物と比較した場合、治療指数の顕著な増加をもたらす、本明細書に記載の新規カチオン性脂質の 1 つまたは複数を含む核酸 - 脂質ナノ粒子組成物を提供する。

【 0 0 1 8 】

特定の実施形態では、本発明は、mRNA および / または他のオリゴヌクレオチドの *in vitro* および *in vivo* 送達のための改善された組成物の製剤化を可能にする新規カチオン性脂質を提供する。一部の実施形態では、これらの改善された脂質ナノ粒子組成物は、mRNA によってコードされているタンパク質の発現に有用である。他の実施形態では、これらの改善された脂質ナノ粒子組成物は、1 つの標的 mRNA またはいくつかの mRNA を調節する 1 つの特定の miRNA または miRNA の群を標的とする miRNA 阻害剤を送達することによって、内因性タンパク質の発現を上方制御するのに有用である。他の実施形態では、これらの改善された脂質ナノ粒子組成物は、標的遺伝子のタンパク質レベルおよび / または mRNA レベルを下方制御（例えば、サイレンシング）するのに有用である。いくつかの他の実施形態では、脂質ナノ粒子はまた、導入遺伝子の発現のための mRNA およびプラスミドの送達にも有用である。さらなる他の実施形態では、脂質ナノ粒子組成物は、タンパク質の発現に起因する薬理効果、例えば、適切なエリスロポエチン mRNA の送達を介した赤血球産生の増加、または適切な抗体をコードしている mRNA の送達を介した感染からの保護などを誘導するのに有用である。

【 0 0 1 9 】

本発明の実施形態の脂質ナノ粒子および組成物は、*in vitro* と *in vivo* の両方で、封入されたまたは付随する（例えば、複合体形成された）治療剤、例えば、核酸を細胞に送達することを含めて、様々な目的に使用することができる。したがって、本発明の実施形態は、対象を適切な治療剤を封入または付随している脂質ナノ粒子と接触させることによって、疾患または障害の処置または予防を必要とする対象において、疾患または障害を処置または予防する方法であって、脂質ナノ粒子が、本明細書に記載の新規カチオン性脂質の 1 つまたは複数を含む方法を提供する。

【 0 0 2 0 】

本明細書に記載されているように、本発明の脂質ナノ粒子の実施形態は、例えば、mRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、プラスミド DNA、マイクロ RNA (miRNA)、miRNA 阻害剤（アンタゴミル / 抗ミル）、メッセンジャー - RNA - 干渉性相補性 RNA (micRNA)、DNA、多価 RNA、ダイサー基質 RNA、相補 DNA (cDNA) などを含めた、核酸の送達に特に有用である。したがって、本発明のある特定の実施形態の脂質ナノ粒子および組成物は、細胞を、本明細書に記載の 1 つまたは複数

10

20

30

40

50

の新規のカチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子と接触させることによって、*in vitro*と*in vivo*の両方で所望のタンパク質の発現を誘導させるために使用することができ、脂質ナノ粒子は、所望のタンパク質を生成するために発現される核酸（例えば、所望のタンパク質をコードしているメッセンジャーRNAまたはプラスミド）を封入または付随している。代わりに、本発明の一部の実施形態の脂質ナノ粒子および組成物は、細胞を、本明細書に記載の1つまたは複数の新規カチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子と接触させることによって、*in vitro*と*in vivo*の両方で標的遺伝子およびタンパク質の発現を低減するために使用することができ、脂質ナノ粒子は、標的遺伝子の発現を減少させる核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは小分子干渉RNA（*siRNA*））を封入または付随している。本発明の実施形態の脂質ナノ粒子および組成物はまた、異なる核酸（例えば、適切な遺伝子修飾酵素をコードするmRNAおよび宿主ゲノムへの組込みのためのDNAセグメント（複数可））の共局在化を必要とする作用を提供するために有用であり得るなど、異なる核酸（例えば、mRNAおよびプラスミドDNA）を別々にまたは組み合わせて共同送達するために使用することができる。

10

【0021】

本発明の実施形態での使用のための核酸は、任意の利用可能な技術に従い調製することができる。mRNAに関して、調製の主要な方法は、これに限定されないが、長い配列に特異的なmRNAを生成する最も効率的な方法を現在代表する酵素合成（*in vitro*転写とも呼ばれる）である。*in vitro*転写は、目的の遺伝子をコードしている下流の配列に連結している上流バクテリオファージプロモーター配列（例えば、T7、T3およびSP6コリファージからのものを含むが、これらに限定されない）で構成される操作されたDNAテンプレートからのRNA分子のテンプレート指示合成のプロセスを記載する。テンプレートDNAは、これらに限定されないが、プラスミドDNAおよびポリメラーゼ連鎖反応増幅を含めた当技術分野で周知である適当な技術を用いて、いくつかの供給源から*in vitro*転写のために調製することができる（Linpinsel, J. L.およびConn, G. L., General protocols for preparation of plasmid DNA template、ならびにBowman, J. C., Azizi, B., Lenz, T. K., Ray, P.およびWilliams, L. D., RNA *in vitro* transcription and RNA purification by denaturing PAGE in Recombinant and *in vitro* RNA syntheses Methods、941巻、Conn G. L.（編）、New York、N.Y. Humana Press、2012年を参照されたい）。

20

30

【0022】

RNAの転写は、生成したmRNA転写物の起こり得る分解を最小限に抑えながら、ポリメラーゼ活性を支持する条件下で、対応するRNAポリメラーゼならびにアデノシン、グアノシン、ウリジンおよびシチジンのリボヌクレオシド三リン酸（rNTP）の存在下で線状化DNAテンプレートを使用して、*in vitro*で起こる。*in vitro*転写は、これらに限定されないが、Ribomax Large Scale RNA Production System（Promega）、MegaScript Transcriptionキット（Life Technologies）を含めた様々な市販のキットを使用して、ならびにRNAポリメラーゼおよびrNTPを含めた市販の試薬を用いて実施することができる。mRNAの*in vitro*転写のための方法は当技術分野で周知である。（例えば、これらのすべてが参照により本明細書に組み込まれている、Losick, R., 1972年、*In vitro* transcription, Ann Rev Biochem、41巻、409~46頁；Kamakaka, R. T.およびKraus, W. L., 2001年、*In Vitro Transcription. Current Protocols in Cell Biology*. 2: 11.6:11.6.1~11.6.17；Beckert, B.およびMasquida, B., (2010年) Synthesis of RNA by *In Vitro*

40

50

Transcription in RNA in Methods in Molecular Biology、703巻(Neilson, H. 編)、New York、N. Y. Humana Press、2010年; Brunelle, J. L. および Green, R.、2013年、第5章 In vitro transcription from plasmid or PCR-amplified DNA, Methods in Enzymology、530巻、101~114頁を参照されたい)。

【0023】

次いで、所望の、in vitro 転写された mRNA は、転写または関連する反応の所望しない構成成分(取り込まれなかった rNTP、タンパク質酵素、塩、短い RNA オリゴなどを含む)から精製される。mRNA 転写物の単離のための技術は当技術分野で周知である。周知の手順として、一価カチオンまたは塩化リチウムの存在下での、フェノール/クロロホルム抽出またはいずれかのアルコール(エタノール、イソプロパノール)による沈殿が挙げられる。使用することができる精製手順の追加の、非限定的例として、サイズ排除クロマトグラフィー(Lukavsky, P. J. および Puglisi, J. D.、2004年、Large-scale preparation and purification of polyacrylamide-free RNA oligonucleotides、RNA、10巻、889~893頁)、シリカベースのアフィニティクロマトグラフィーおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動(Bowman, J. C.、Azizi, B.、Lenz, T. K.、Ray, P. および Williams, L. D.、RNA in vitro transcription and RNA purification by denaturing PAGE in Recombinant and in vitro RNA syntheses Methods、941巻、Conn G. L. (編)、New York、N. Y. Humana Press、2012年)が挙げられる。精製は、これらに限定されないが、SV Total Isolation System(Promega)および in Vitro Transcription Cleanup and Concentration Kit(Norgen Biotek)を含めた、様々な市販のキットを使用して実施することができる。

【0024】

さらに、逆転写は多量の mRNA を産生することができるが、その産物は、全長 mRNA の調製物から除去する必要がある所望しないポリメラーゼ活性に伴ういくつかの異常な RNA 不純物を含有する可能性がある。これらは、不完全な転写開始ならびに RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性、RNA テンプレートからの、RNA をプライマーとした転写、および自己相補性 3' 伸長により生成される二本鎖 RNA(dsRNA)から生じる短い RNA を含む。dsRNA 構造を有するこれらの混入物は、特定の核酸構造を認識し、強力な免疫応答を誘導するように機能する真核細胞内の様々な生得的免疫センサーとの相互作用を介して所望しない免疫刺激活性をもたらす可能性があることが実証されている。ひいてはこれによって、細胞の生得的免疫応答の間、タンパク質合成は減少するため、mRNA 翻訳が劇的に減少する可能性がある。したがって、これに限定されないが、拡張可能な HPLC 精製を含めた、これらの dsRNA 混入物を除去するための追加的技術が開発され、当技術分野で公知である(例えば Kariko, K.、Muramatsu, H.、Ludwig, J. および Weissman, D.、2011年、Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA、Nucl Acid Res、39巻、e142; Weissman, D.、Pardi, N.、Muramatsu, H. および Kariko, K.、HPLC Purification of in vitro transcribed long RNA in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulat

10

20

30

40

50

ion in Methods in Molecular Biology、969巻(Rabinovich, P. H. 編)、2013年を参照されたい)。HPLC精製されたmRNAは、特に一次細胞および*in vivo*でずっとより大きなレベルで翻訳されることが報告されている。

【0025】

*in vitro*で転写されたmRNAの特定の特性を変化させ、その有用性を改善するために使用されるかなり様々な修飾が当技術分野で記載されている。これらは、mRNAの5'および3'末端に対する修飾を含むが、これらに限定されない。内因性真核生物のmRNAは通常、mRNAキャップ結合タンパク質(CBP)の結合の媒介に重要な役割を果たす(これが、ひいては、細胞内のRNA安定性およびmRNA翻訳の効率の増強に關与する)成熟分子の5'-末端上にキャップ構造を含有する。したがって、最高レベルのタンパク質発現が、キャッピングされたmRNA転写物を用いて達成される。5'-キャップは、最も5'側のヌクレオチドとグアニンヌクレオチドとの間の5'-5'-トリホスフェート結合を含有する。コンジュゲートグアニンヌクレオチドはN7位でメチル化されている。追加的修飾は、2'-ヒドロキシル基上の最も5'側のヌクレオチドおよび最も5'側から2番目のヌクレオチドのメチル化を含む。

【0026】

*in vitro*で転写された合成mRNAの5'-キャップを生成するために、複数の異なるキャップ構造を使用することができる。合成mRNAの5'-キャッピングは、ケミカルキャップアナログとの共転写により実施することができる(すなわち、*in vitro*転写中のキャッピング)。例えば、アンチリバースキャップアナログ(ARCA)キャップは、1つのグアニンがN7メチル基ならびに3'-O-メチル基を含有する5'-5'-トリホスフェートグアニン-グアニン結合を含有する。しかし、転写物の20%までが、この共転写プロセス中にキャッピングされないまま残り、合成キャップアナログは本物の細胞mRNAの5'-キャップ構造と同一ではなくなり、翻訳可能性および細胞安定性を潜在的に減少させる。代わりに、合成mRNA分子はまた、転写後に酵素によりキャッピングされてもよい。これらは、キャップ結合タンパク質の結合が増強し、半減期が増加し、5'エンドヌクレアーゼに対する感受性が減少し、および/または5'デキャッピングが減少した内因性5'-キャップを構造的または機能的にさらに厳密に模倣するより本物の5'-キャップ構造を生成することができる。mRNA安定性および翻訳可能性を増強するために、多くの合成5'-キャップアナログが開発され、当技術分野で公知である(例えば、Grudzien-Nogalska, E., Kowalska, J., Su, W., Kuhn, A. N., Slepencov, S. V., Darynkiewicz, E., Sahin, U., Jemielity, J. および Rhoads, R. E., Synthetic mRNAs with superior translation and stability properties in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in Methods in Molecular Biology、969巻(Rabinovich, P. H. 編)、2013年を参照されたい)。

【0027】

3'-末端において、アデニンヌクレオチドの長鎖(ポリAテール)は通常、RNAプロセシング中にmRNA分子に付加される。転写直後に、転写物の3'末端は切断されて、ポリアデニル化と呼ばれるプロセスにおいて、ポリAポリメラーゼはアデニンヌクレオチド鎖をRNAに付加する3'ヒドロキシルを遊離させる。ポリAテールは、mRNAの翻訳効率と安定性の両方を増強することが広く示されている(Bernstein, P. および Ross, J., 1989年、Poly(A)、poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability、Trends Bio Sci、14巻、373~377頁; Guhaniyogi, J. および Brewer, G., 2001年、Regulation of mRNA stability in mammalian cells、Gene、265巻、

10

20

30

40

50

11～23頁; Dreyfus, M. および Regnier, P., 2002年、The poly (A) tail of mRNAs: Bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria、Cell、111巻、611～613頁を参照されたい)。

【0028】

in vitroで転写されたmRNAのポリ(A)テーリングは、これらに限定されないが、ポリ(T)領域のDNAテンプレートへのクローニングまたはポリ(A)ポリメラーゼを使用した転写後の付加を含めた様々な手法を使用して達成することができる。最初のケースは、ポリ(T)領域の大きさに応じて、定義された長さのポリ(A)テールを有するmRNAのin vitro転写を可能にするが、テンプレートの追加操作を必要とする。後者のケースは、アデニン残基の、RNAの3'末端への組込みを触媒するポリ(A)ポリメラーゼを使用して、ポリ(A)テールをin vitroで転写したmRNAに酵素的に付加することを含み、DNAテンプレートの追加操作は必要ないが、不均一な長さのポリ(A)テールを有するmRNAが結果として生じる。5'-キャッピングおよび3'-ポリ(A)テーリングは、これらに限定されないが、ポリ(A)ポリメラーゼテーリングキット(EpiCenter)、mMESSAGE mMACHINE T7 Ultraキットおよびポリ(A)テーリングキット(Life Technologies)を含めた様々な市販のキットを使用して、ならびに市販の試薬、様々なARCAキャップ、ポリ(A)ポリメラーゼなどを用いて実施することができる。

【0029】

5'キャップおよび3'ポリアデニル化に加えて、in vitro転写物の他の修飾が、翻訳の効率および安定性に関係するような利益を提供することが報告されている。病原体DNAおよびRNAは、真核細胞内の様々なセンサーにより認識され、強力な生得的免疫応答を引き起こすことができることが当技術分野で周知されている。自然の供給源由来の大部分の核酸は修飾ヌクレオシドを含有するので、病原体DNAおよびRNAと、自己DNAおよびRNAとを判別する能力は、少なくとも部分的に構造およびヌクレオシド修飾に基づくことが示されている。対照的に、in vitroで合成したRNAは、これらの修飾を欠き、したがって免疫刺激性になり、これが、ひいては、上記に概説されているように有効なmRNA翻訳を阻害する可能性がある。in vitroで転写されたmRNAへの修飾ヌクレオシドの導入を使用して、RNAセンサーの認識および活性化を防止し、したがってこの所望しない免疫刺激活性を軽減し、翻訳能力を増強することができる(例えば、Kariko, K. および Weissman, D., 2007年、Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development、Curr Opin Drug Discov Devel、10巻、523～532頁; Pardi, N., Muramatsu, H., Weissman, D., Kariko, K., In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in Methods in Molecular Biology、969巻(Rabinovich, P.H. 編)、2013年; Kariko, K., Muramatsu, H., Welsh, F.A., Ludwig, J., Kato, H., Akira, S., Weissman, D., 2008年、Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability、Mol Ther、16巻、1833～1840頁を参照されたい)。修飾RNAの合成に使用される修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、当技術分野で公知の一般的方法および手順を使用して、調製、モニターおよび利用すること

ができる。単独でまたは他の修飾ヌクレオシドと組み合わせて、ある程度 *in vitro* で転写された mRNA に取り込むことができる多種多様のヌクレオシド修飾が利用可能である（例えば、US 2012/0251618 を参照されたい）。ヌクレオシド修飾された mRNA の *in vitro* 合成は、同時に翻訳能力を増強しながら、免疫センサーを活性化する能力を減少させることが報告されている。

【0030】

翻訳可能性および安定性に関する利益を提供するために修飾することができる mRNA の他の構成成分として、5' および 3' の非翻訳領域 (UTR) が挙げられる。両方ともまたは独立して、UTR (好ましい 5' および 3' UTR は細胞またはウイルス RNA から得ることができる) を最適化することは、*in vitro* で転写された mRNA の mRNA 安定性および翻訳効率を増加させることが示されている（例えば、Pardi, N., Muramatsu, H., Weissman, D., Kariko, K., *In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in Methods in Molecular Biology*, 969 巻 (Rabinovich, P. H. 編), 2013 年を参照されたい)。

【0031】

mRNA に加えて、他の核酸ペイロードを本発明の実施形態に使用することができる。オリゴヌクレオチドに対して、調製の方法として、これらに限定されないが、長い前駆体の化学合成および酵素的、化学的切断、上記のような *in vitro* 転写などが挙げられる。DNA および RNA ヌクレオチドを合成する方法は、当技術分野で広く使用され、周知である（例えば、両方とも参照により本明細書に組み込まれている、Gait, M. J. (編) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, D.C.: IRL Press, 1984 年; および Herdewijn, P. (編) *Oligonucleotide synthesis: methods and applications*, *Methods in Molecular Biology*, 288 巻 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Human a Press, 2005 年を参照されたい)。

【0032】

プラスミド DNA に関して、本発明の実施形態での使用のための調製は、これらに限定されないが、目的のプラスミドを含有する細菌の液体培養物中の *in vitro* でのプラスミド DNA の増大および単離を一般的に利用する。特定の抗生剤 (ペニシリン、カナマイシンなど。) に対する耐性をコードする目的のプラスミドに遺伝子が存在することにより、目的のプラスミドを含有する細菌を、抗生剤を含有する培養物中で選択的に増殖させることが可能となる。プラスミド DNA を単離する方法は当技術分野で広く使用され、周知である（例えば、Heilig, J., Elbing, K. L. および Brent, R (2001 年) *Large-Scale Preparation of Plasmid DNA. Current Protocols in Molecular Biology*, 41 巻: II 号: 1.7: 1.7.1 ~ 1.7.16 頁; Rozkov, A., Larsson, B., Gillstrom, S., Bjornestedt, R., および Schmidt, S. R. (2008 年), *Large-scale production of endotoxin-free plasmids for transient expression in mammalian cell culture. Biotechnol. Bioeng.*, 99 巻: 557 ~ 566 頁; および US 6197553 B1 を参照されたい)。プラスミド単離は、これらに限定されないが、Plasmid Plus (Qiagen), GenJET プラスミド MaxiPrep (Thermo) および Pure Yield MaxiPrep (Promega) キットを含めた様々な市販のキットを使用して、ならびに市販の試薬を用いて実施する

ことができる。

【0033】

本発明のカチオン性脂質、これを含む脂質ナノ粒子および組成物、ならびに遺伝子およびタンパク質発現をモジュレートする核酸などの活性（例えば、治療剤）を送達するためのこれらの使用の様々な例示的な実施形態が、以下にさらに詳細に記載されている。

【0034】

本明細書で使用される場合、他に特定されていない限り、以下の用語は、これらに属する意味を有する。

【0035】

特に文脈上異なって理解されることを要しない限り、本明細書および特許請求の範囲を通して、単語「含む」およびその変形形態、例えば、「含む（comprises）」および「含むこと」などは、開かれた、包括的な意味、すなわち、「～を含むが、これらに限定されない」と解釈されるものとする。

【0036】

本明細書全体にわたり「一実施形態」または「ある実施形態」への言及は、この実施形態に関連して記載されている特定の特色、構造または特徴が本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれていることを意味する。したがって、本明細書全体にわたり様々な箇所における「一実施形態では」または「ある実施形態では」という句の出現は、必ずしもすべてが同じ実施形態について言及しているわけではない。さらに、特定の特色、構造、または特徴は、1つまたは複数の実施形態において任意の適切な方式で組み合わせてもよい。

【0037】

他に定義されていない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者により共通して理解されているものと同じ意味を有する。明細書および特許請求の範囲において使用される場合、単数形「1つの（a）」、「1つの（an）」および「その（the）」は、特に文脈上そうではないことが明確に指示されていない限り、複数の言及を含む。

【0038】

「所望のタンパク質の発現を誘導する」という句は、所望のタンパク質の発現を増加させる核酸の能力を指す。タンパク質発現の程度を調査するため、試験試料（例えば、所望のタンパク質を発現する培養中の細胞試料）または試験哺乳動物（例えば、哺乳動物、例えば、ヒトなどまたは動物モデル、例えば、げっ歯類（例えば、マウス）などまたはヒト以外の霊長類（例えば、サル）モデル）を核酸（例えば、本発明の脂質と組み合わせた核酸）と接触させる。試験試料または試験動物における所望のタンパク質の発現を、核酸と接触させていない、または核酸が投与されていない対照試料（例えば、所望のタンパク質を発現する培養中の細胞試料）または対照哺乳動物（例えば、哺乳動物、例えば、ヒトなどまたは動物モデル、例えば、げっ歯類（例えば、マウス）などまたはヒト以外の霊長類（例えば、サル）モデル）中の所望のタンパク質の発現と比較する。所望のタンパク質が対照試料または対照哺乳動物中存在する場合、対照試料または対照哺乳動物中の所望のタンパク質の発現に1.0の値を割り当てることができる。特定の実施形態では、所望のタンパク質の発現の誘導は、試験試料または試験哺乳動物中の所望のタンパク質発現の、対照試料または対照哺乳動物中の所望のタンパク質発現のレベルに対する比が1を超えた場合、例えば、約1.1、1.5、2.0、5.0または10.0である場合達成される。所望のタンパク質が対照試料または対照哺乳動物中に存在しない場合、所望のタンパク質の発現の誘導は、試験試料または試験哺乳動物中で、任意の測定可能なレベルの所望のタンパク質が検出された場合達成される。当業者であれば、試料中のタンパク質発現レベルを判定するのに適当なアッセイ、例えばドットプロット、ノーザンプロット、インサイチュハイブリダイゼーション、ELISA、免疫沈降、酵素機能、および表現型アッセイ、または適当な条件下で蛍光もしくは発光を生成できるリポータータンパク質に基づくアッセイを理解している。

【0039】

10

20

30

40

50

「標的遺伝子の発現を阻害する」という句は、標的遺伝子の発現をサイレンシングさせる、減少させる、または阻害する核酸の能力を指す。遺伝子サイレンシングの程度を調査するために、試験試料（例えば、標的遺伝子を発現する培養中の細胞試料）または試験哺乳動物（例えば、哺乳動物、例えば、ヒトなどまたは動物モデル、例えば、げっ歯類（例えば、マウス）などまたはヒト以外の霊長類（例えば、サル）モデル）を、標的遺伝子の発現をサイレンシングさせる、減少させる、または阻害する核酸と接触させる。試験試料または試験動物中の標的遺伝子の発現を、核酸と接触させていない、または核酸が投与されていない対照試料（例えば、標的遺伝子を発現する培養中の細胞試料）または対照哺乳動物（例えば、哺乳動物、例えば、ヒトなどまたは動物モデル、例えば、げっ歯類（例えば、マウス）などまたはヒト以外の霊長類（例えば、サル）モデル）中の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中の標的遺伝子の発現に、100%の値を割り当てることができる。特定の実施形態では、標的遺伝子の発現のサイレンシング、阻害、または減少は、対照試料または対照哺乳動物中の標的遺伝子発現のレベルに対する、試験試料または試験哺乳動物中の標的遺伝子の発現レベルが約95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、または0%である場合達成される。言い換えると、核酸は、核酸と接触させていない、または核酸が投与されていない対照試料または対照哺乳動物中の標的遺伝子の発現レベルに対して、試験試料または試験哺乳動物中で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、減少させる、または阻害することが可能である。標的遺伝子の発現レベルを判定するのに適切なアッセイとして、限定されないが、当業者に公知の技術、例えば、ドットプロット、ノーザンプロット、インサイチュハイブリダイゼーション、ELISA、免疫沈降、酵素機能、ならびに当業者に公知の表現型アッセイなどを使用したタンパク質またはmRNAレベルの調査が挙げられる。

【0040】

活性薬剤または治療剤、例えば、治療用核酸などの「有効量」または「治療有効量」とは、所望の効果、例えば、核酸の不在下で検出された通常の発現レベルと比較して、標的配列の発現の増加または阻害を生じるのに十分な量である。標的配列の発現の増加は、核酸の不在下では存在しない発現産物のケースでは、任意の測定可能なレベルが検出された場合達成される。核酸との接触以前に発現産物があるレベルで存在するケースでは、発現の増加は、mRNAなどの核酸を用いて得た値の倍増が、対照に対して、約1.05、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.75、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100、250、500、750、1000、5000、10000倍またはそれ超である場合達成される。標的遺伝子または標的配列の発現の阻害は、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどの核酸を用いて得た値が、対照に対して、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切なアッセイとして、例えば、当業者に公知の技術、例えば、ドットプロット、ノーザンプロット、インサイチュハイブリダイゼーション、ELISA、免疫沈降、酵素機能、適切なりポータータンパク質の蛍光または発光、ならびに当業者に公知の表現型アッセイなどを使用したタンパク質またはRNAレベルの調査が挙げられる。

【0041】

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で少なくとも2つ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、およびそのハイブリッドを含む。DNAは、アンチセンス分子、プラスミドDNA、cDNA、PCR産物、またはベクターの形態であってよい。RNAは、小さなヘアピンRNA（shRNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、アンチセンスRNA、miRNA、micRNA、多価RNA、ダイサー基質RNAまたはウイ

10

20

30

40

50

ルスRNA (vRNA)、およびこれらの組合せの形態であってよい。核酸は、合成、天然、および非天然のものであり、基準核酸と同様の結合特性を有する、公知のヌクレオチドアナログまたは修飾された骨格残基または結合を含有する核酸を含む。このようなアナログの例として、限定されないが、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2'-O-メチルリボヌクレオチド、およびペプチド-核酸(PNA)が挙げられる。具体的に限定されない限り、「核酸」という用語は、基準核酸と同様の結合特性を有する自然の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。他に指示されていない限り、特定の核酸配列はまた、伝統的方式で修飾されたその変形(例えば、縮退コドン置換)、対立遺伝子、オルソログ、単一ヌクレオチド多型、および相補性配列ならびに明示的に示された配列も暗示的に包含する。具体的には、縮退コドン置換は、1つまたは複数の選択された(またはすべての)コドンの3位が混合塩基および/またはデオキシノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成され得る(Batzera、Nucleic Acid Res.、19巻:5081頁(1991年); Ohtsukaら、J. Biol. Chem.、260巻:2605~2608頁(1985年); Rossoliniら、Mol. Cell. Probes、8巻:91~98頁(1994年))。「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」は、プリンおよびピリミジンを含み、このプリンおよびピリミジンは、自然化合物のアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン、および自然のアナログ、ならびにプリンおよびピリミジンの合成誘導体をさらに含み、このプリンおよびピリミジンの合成誘導体は、例えば、これらに限定されないが、アミン、アルコール、チオール、カルボキシレート、およびアルキルハロゲン化物などの新規反応性基を配置する修飾を含むが、これに限定されない。

【0042】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチドまたは前駆体ポリペプチドの産生に必要な部分的長さまたは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。

【0043】

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

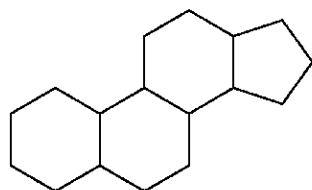
【0044】

「脂質」という用語は、これらに限定されないが、脂肪酸のエステルを含み、水中では難溶解性であるが、多くの有機溶媒中では溶解性であることを一般的に特徴とする有機化合物の群を指す。脂質は、少なくとも3つのクラスに通常分割される:(1)「単純な脂質」、これは脂肪および油ならびに蠟を含む、(2)「複合脂質」、これは、リン脂質および糖脂質を含む、ならびに(3)「誘導脂質」、例えば、ステロイドなど。

【0045】

「ステロイド」は、以下の炭素骨格:

【化2】



を含む化合物である。

【0046】

ステロイドの非限定的例として、コレステロールなどが挙げられる。

【0047】

「カチオン性脂質」とは、正に帯電することが可能な脂質を指す。例示的なカチオン性脂質は、正電荷を保持する１つまたは複数のアミン基を含む。例示的なカチオン性脂質は、これらが、pHに応じて、正に帯電しているか、または中性の形態で存在できるようにイオン化できる。カチオン性脂質のイオン化は、異なるpH条件下での脂質ナノ粒子の表面電荷に影響を及ぼす。この電荷状態は、血漿タンパク質吸収、血液クリアランスおよび組織分布（S e m p l e , S . C . ら、A d v . D r u g D e l i v R e v、32巻：3～17頁（1998年））ならびに核酸の細胞内送達に重要な意味を持つエンドソーム溶解性の非二重層構造を形成する能力（H a f e z , I . M . ら、G e n e T h e r 8巻：1188～1196頁（2001年））に影響を及ぼし得る。

【0048】

「脂質ナノ粒子」という用語は、式（I）の化合物または他の特定されたカチオン性脂質の１つまたは複数を含む、少なくとも１つのナノメートル程度の（例えば、1～1,000nm）寸法を有する粒子を指す。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、目的の標的部（例えば、細胞、組織、器官、腫瘍など）に活性薬剤または治療剤、例えば、核酸（例えば、mRNA）などを送達するために使用することができる製剤に含まれている。一部の実施形態では、本発明の脂質ナノ粒子は核酸を含む。このような脂質ナノ粒子は通常、式（I）の化合物と、中性脂質、荷電脂質、ステロイドおよびポリマーコンジュゲート脂質から選択される１つまたは複数の賦形剤とを含む。一部の実施形態では、活性薬剤または治療剤、例えば、核酸などは、脂質ナノ粒子の脂質部分または脂質ナノ粒子の脂質部分の一部もしくはすべてにより包まれた水性空間に封入され、これによって、宿主生物または細胞の機構、例えば、有害な免疫応答により誘導される酵素的分解または他の有害作用からこれを保護することができる。

【0049】

様々な実施形態では、脂質ナノ粒子は、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、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、または150nmの平均径を有し、実質的に無毒性である。ある特定の実施形態では、核酸は、脂質ナノ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対して耐性がある。核酸を含む脂質ナノ粒子およびこれらの調製方法は、例えば、すべての目的のために、これら全体においてその完全な開示が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許公開第2004/0142025号、第2007/0042031号およびPCT公開WO2013/016058およびWO2013/086373に開示されている。

【0050】

本明細書で使用される場合、「～が封入された脂質」とは、完全な封入、部分的な封入、または両方を用いて、活性薬剤または治療剤、例えば、核酸（例えば、mRNA）などを提供する脂質ナノ粒子を指す。ある実施形態では、核酸（例えば、mRNA）は脂質ナノ粒子内に完全に封入されている。

【0051】

「ポリマーコンジュゲート脂質」という用語は、脂質部分とポリマー部分の両方を含む分子を指す。ポリマーコンジュゲート脂質の例はペグ化脂質である。「ペグ化脂質」という用語は、脂質部分とポリエチレングリコール部分の両方を含む分子を指す。ペグ化脂質は当技術分野で公知であり、1-（モノメトキシ-ポリエチレングリコール）-2,3-ジミリストイルグリセロール（PEG-DMG）などを含む。

【0052】

「中性脂質」という用語は、選択されたpHにおいて、帯電していないか、または中性の

10

20

30

40

50

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。生理学的 pH でのこのような脂質として、これらに限定されないが、ホスホチジルコリン、例えば、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、1, 2 - ジミリスチル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC)、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (POPC)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、ホスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamines) 例えば、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DOPE)、スフィンゴミエリン (SM)、セラミドなど、ステロイド、例えば、ステロールなどおよびこれらの誘導体が挙げられる。中性脂質は、合成でも、または自然由来でもよい。

10

【0053】

「荷電脂質」という用語は、有用な生理学的な範囲内の pH、例えば pH 約 3 ~ pH 約 9 であるかに関係なく、正に帯電または負に帯電した形態で存在するいくつかの脂質種のいずれかを指す。荷電脂質は合成でもまたは自然由来でもよい。荷電脂質の例として、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジイノシトール、ステロールヘミスクシネート、ジアルキルトリメチルアンモニウム - プロパン、(例えば DOTAP、DOTMA)、ジアルキルジメチルアミノプロパン、エチルホスホコリン、ジメチルアミノエタンカルバモイルステロール (例えば DC-Chol) が挙げられる。

20

【0054】

本明細書で使用される場合、「水溶液」という用語は、水を含む組成物を指す。

【0055】

核酸脂質ナノ粒子に関連して「血清安定している」とは、遊離 DNA または RNA を有意に分解する、血清またはヌクレアーゼアッセイへの曝露後、ヌクレオチドが有意に分解しないことを意味する。適切なアッセイとして、例えば、標準血清アッセイ、DNA se アッセイ、または RNA se アッセイが挙げられる。

【0056】

「全身送達」は、本明細書で使用される場合、生物内で活性薬剤の広範囲な曝露をもたらすことができる治療用製品の送達を指す。一部の投与技術は、ある特定の薬剤の全身送達をもたらすことができるが、他の薬剤はできない。全身送達とは、薬剤の有用な、好ましくは治療用の量が身体の大部分に曝露されることを意味する。脂質ナノ粒子の全身送達は、例えば、静脈内、動脈内、皮下、および腹腔内送達を含めた当技術分野で公知の任意の手段によることができる。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子の全身送達は静脈内送達による。

30

【0057】

「局所送達」とは、本明細書で使用される場合、生物内の標的部位に直接活性薬剤を送達することを指す。例えば、薬剤は、疾患部位、例えば、腫瘍など、他の標的部位、例えば、炎症部位など、または標的器官、例えば、肝臓、心臓、脾臓、腎臓などに直接注射することにより局所的に送達できる。局所送達はまた、局所的適用または局所的注射の技術、例えば、筋肉内、皮下または皮内注射などを含むことができる。局所送達は、全身性薬理効果を妨げない。

40

【0058】

「アルキル」とは、飽和または不飽和 (すなわち、1 つまたは複数の二重および / または三重結合を含有する) であり、例えば、1 ~ 24 個の炭素原子 (C₁ ~ C₂₄ アルキル)、4 ~ 20 個の炭素原子 (C₄ ~ C₂₀ アルキル)、6 ~ 16 個の炭素原子 (C₆ ~ C₁₆ アルキル)、6 ~ 9 個の炭素原子 (C₆ ~ C₉ アルキル)、1 ~ 15 個の炭素原子 (C₁ ~ C₁₅ アルキル)、1 ~ 12 個の炭素原子 (C₁ ~ C₁₂ アルキル)、1 ~ 8 個の炭素原子 (C₁ ~ C₈ アルキル) または 1 ~ 6 個の炭素原子 (C₁ ~ C₆ アルキル) を有し、単結合により残りの分子に結合している炭素および水素原子のみからなる直鎖状または

50

分枝状の炭化水素鎖基、例えば、メチル、エチル、*n*プロピル、1メチルエチル（イソプロピル）、*n*ブチル、*n*ペンチル、1, 1ジメチルエチル（*t*ブチル）、3メチルヘキシル、2メチルヘキシル、エテニル、プロパ1エニル、ブタ1エニル、ペンタ1エニル、ペンタ1, 4ジエニル、エチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニルなどを指す。明細書中でそうではないことが具体的に述べられていない限り、アルキル基は任意選択で置換されている。

【0059】

「アルキレン」または「アルキレン鎖」とは、飽和または不飽和（すなわち、1つまたは複数の二重および/または三重結合を含有する）であり、例えば、1～24個の炭素原子（ $C_1 \sim C_{24}$ アルキレン）、1～15個の炭素原子（ $C_1 \sim C_{15}$ アルキレン）、1～12個の炭素原子（ $C_1 \sim C_{12}$ アルキレン）、1～8個の炭素原子（ $C_1 \sim C_8$ アルキレン）、1～6個の炭素原子（ $C_1 \sim C_6$ アルキレン）、2～4個の炭素原子（ $C_2 \sim C_4$ アルキレン）、1～2個の炭素原子（ $C_1 \sim C_2$ アルキレン）を有し、残りの分子をラジカル基に連結している、炭素および水素のみからなる直鎖状または分枝状の二価の炭化水素鎖、例えば、メチレン、エチレン、プロピレン、*n*-ブチレン、エテニレン、プロペニレン、*n*-ブテニレン、プロピニレン、*n*-ブチニレンなどを指す。アルキレン鎖は、単結合または二重結合を介して残りの分子に結合し、単結合または二重結合を介してラジカル基に結合している。アルキレン鎖の残りの分子およびラジカル基への結合点は、鎖内の1個の炭素または任意の2個の炭素を介することができる。明細書中でそうではないことが具体的に述べられていない限り、アルキレン鎖は任意選択で置換されていてもよい。

【0060】

「ヘテロシクリル」または「複素環」は、1～12個の環炭素原子（例えば、2～12個）、ならびに窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される1～6個の環ヘテロ原子を有する安定した3～18員の（例えば、5、6または7員の）非芳香族環の基を指す。本明細書中でそうではないことが具体的に述べられていない限り、ヘテロシクリル基は、縮合または架橋した環系を含んでもよい、単環式、二環式、三環式または四環式環系であってよく、ヘテロシクリル基の窒素、炭素または硫黄原子は、任意選択で酸化されていてもよく、窒素原子は任意選択で四級化されていてもよく、ヘテロシクリル基は部分的または完全に飽和していてもよい。このようなヘテロシクリル基の例として、これらに限定されないが、ジオキサニル、チエニル[1, 3]ジチアニル、デカヒドロイソキノリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、イソチアゾリジニル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、オクタヒドロインドリル、オクタヒドロイソインドリル、2-オキソピペラジニル、2-オキソピペリジニル、2-オキソピロリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、ピラゾリジニル、キヌクリジニル、チアゾリジニル、テトラヒドロフリル、トリチアニル、テトラヒドロピラニル、チオモルホリニル、チアモルホリニル、1-オキソ-チオモルホリニル、および1, 1-ジオキソ-チオモルホリニルが挙げられる。本明細書中でそうではないことが具体的に述べられていない限り、ヘテロシクリル基は任意選択で置換されていてもよい。

【0061】

本明細書で使用される「置換されている」という用語は、少なくとも1個の水素原子（例えば、1、2、3個またはすべての水素原子）が、非水素原子、例えば、これに限定されないが、ハロゲン原子、例えば、F、Cl、Br、またはIなど；オキソ基（=O）；ヒドロキシル基（-OH）； $C_1 \sim C_{12}$ アルキル基；シクロアルキル基； $-(C=O)OR'$ ； $-O(C=O)R'$ ； $-C(=O)R'$ ； $-OR'$ ； $-S(O)_xR'$ ； $-S-SR'$ ； $-C(=O)SR'$ ； $-SC(=O)R'$ ； $-NR'R'$ ； $-NR'C(=O)R'$ ； $-C(=O)NR'R'$ ； $-NR'C(=O)NR'R'$ ； $-OC(=O)NR'R'$ ； $-NR'C(=O)OR'$ ； $-NR'S(O)_xNR'R'$ ； $-NR'S(O)_xR'$ ；および $-S(O)_xNR'R'$ （式中、 R' は、出現ごとに、独立して、H、 $C_1 \sim C_{15}$ アルキルまたはシクロアルキルであり、 x は0、1または2である）との結合により置き換えられている、上記の基のいずれか（例えば、アルキル、アルキレンまたはヘテロシクリル）を意味する。一部の実施形態で

は、置換基はC₁～C₁₂アルキル基である。他の実施形態では、置換基はシクロアルキル基である。他の実施形態では、置換基は、ハロ基、例えば、フルオロなどである。他の実施形態では、置換基はオキソ基である。他の実施形態では、置換基はヒドロキシル基である。他の実施形態では、置換基はアルコキシ基である。他の実施形態では、置換基はカルボキシル基である。他の実施形態では、置換基はアミン基である。

【0062】

「任意選択の」または「任意選択で」（例えば、任意選択で置換されている）は、続いて記載されている状況の事象が起こっても、または起こらなくてもよいことを意味し、記載は、前記事象または状況が起こった場合と、それが起こらない場合とを意味する。例えば、「任意選択で置換されているアルキル」とは、アルキル基は、置換されていても、または置換されていなくてもよいことを意味し、記載は置換アルキル基と置換を有さないアルキル基の両方を含むことを意味する。

10

【0063】

「プロドラッグ」とは、生理的条件下で、または本発明の生物活性のある化合物への加溶媒分解により、変換することができる化合物を示すことを意図する。したがって、「プロドラッグ」という用語は、薬学的に許容される本発明の化合物の代謝性前駆体を指す。プロドラッグは、それを必要とする対象に投与された時点で不活性であってよいが、*in vivo*で本発明の活性化合物に変換される。プロドラッグは通常、例えば、血中の加水分解により、*in vivo*で急速に変換されて、本発明の親化合物を産生する。プロドラッグ化合物は、哺乳動物の生物において、溶解性、組織適合性または遅延放出という利点をしばしばもたらす(Bundgard, H., Design of Prodrugs (1985年)、7～9頁、21～24頁(Elsevier, Amsterdam)を参照されたい)。プロドラッグの議論は、Higuchi, Tら、A.C.S. Symposium Series、14巻およびBioreversible Carriers in Drug Design、Edward B. Roche編、American Pharmaceutical Association and Pergamon Press、1987年において提供されている。

20

【0064】

「プロドラッグ」という用語はまた、このようなプロドラッグが哺乳動物の対象に投与された場合に本発明の活性化合物を*in vivo*で放出する任意の共有結合した担体を含むことを意図する。本発明の化合物のプロドラッグ（例えば、式(I)の化合物）は、修飾が、規定通りの操作または*in vivo*のいずれかで切断されて本発明の親化合物になるように、本発明の化合物中に存在する官能基を修飾することによって調製することができる。プロドラッグは、ヒドロキシ、アミノまたはメルカプト基が任意の基に結合し、本発明の化合物のプロドラッグが、哺乳動物の対象に投与された場合、この任意の基が切断されて、遊離ヒドロキシ、遊離アミノまたは遊離メルカプト基をそれぞれ形成する本発明の化合物を含む。プロドラッグの例として、これらに限定されないが、本発明の化合物中のアルコールのアセテート、ホルメートおよびベンゾエート誘導体またはアミン官能基のアミド誘導体などが挙げられる。

30

【0065】

本明細書で開示されている本発明の実施形態はまた、1個または複数の原子が、異なる原子量または質量数を有する原子で置き換えられることにより同位体標識されている、式(I)の化合物のすべての薬学的に許容される化合物を包含することを意図する。開示化合物に取り込むことができる同位体の例として、水素、炭素、窒素、酸素、リン、フッ素、塩素、およびヨウ素の同位体、例えば、それぞれ²H、³H、¹¹C、¹³C、¹⁴C、¹³N、¹⁵N、¹⁵O、¹⁷O、¹⁸O、³¹P、³²P、³⁵S、¹⁸F、³⁶Cl、¹²³I、および¹²⁵Iなどが挙げられる。これらの放射標識した化合物は、例えば、作用部位もしくは作用機序、または薬理学的に重要な作用部位への結合親和性を特徴付けることにより、化合物の有効性を判定または測定するのに助けるのに有用であり得る。式(I)または(II)の構造を有するある特定の同位体で標識された化合物、例えば、

40

50

放射性同位体を取り込んでいるものなどは、薬物および／または基質組織分布研究において有用である。放射性同位元素トリチウム、すなわち、 ^3H 、および炭素 14 、すなわち、 ^{14}C は、これらの組込みの容易さおよび素早い検出手段を考慮すると、この目的に特に有用である。

【0066】

より重い同位体、例えば、重水素、すなわち、 ^2H などによる置換は、より大きな代謝安定性、例えば、*in vivo*半減期の増加または必要用量の減少に起因するある特定の治療上の利点をもたらすことができるので、一部の状況では好ましいこともある。

【0067】

ポジトロン発光同位体、例えば、 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O および ^{13}N などによる置換は、基質受容体占有率を調査するためのポジトロン放出トポグラフィー（PET）研究において有用であり得る。（II）の式（I）の同位体標識された化合物は、当業者に公知の従来の技術によって、または以前に利用した非標識試薬の代わりに、適当な同位体標識した試薬を使用して、以下に提示されているように、調製および実施例に記載されているものと類似のプロセスにより一般的に調製することができる。

10

【0068】

本明細書で開示されている本発明の実施形態はまた、開示化合物の*in vivo*代謝産物を包含することを意図する。このような産物は、主に酵素的プロセスによる、例えば、投与された化合物の酸化、還元、加水分解、アミド化、エステル化などから生じ得る。したがって、本発明の実施形態は、その代謝産物を産生するのに十分な期間、本発明の化合物を哺乳動物に投与することを含むプロセスにより生成される化合物を含む。このような産物は、本発明の放射標識した化合物を検出可能な用量で、ラット、マウス、モルモット、サル、またはヒトなどの動物に投与し、代謝が起きるだけの十分な時間を割り当て、尿、血液または他の生物試料からその変換産物を単離することによって通常同定される。

20

【0069】

「安定した化合物」および「安定した構造」とは、反応混合物から有用な程度の純度への単離および効果的治療剤への製剤化に耐え抜くのに十分に強固な化合物を示すことを意図する。

【0070】

「哺乳動物」は、ヒトならびに家畜、例えば、実験動物および家庭のペット（例えば、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ウサギ）と、非家畜動物、例えば、野生生物などの両方を含む。

30

【0071】

「薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤」として、限定されないが、任意のアジュバント、担体、賦形剤、流動促進剤、甘味剤、希釈剤、防腐剤、色素／着色剤、香味向上剤、界面活性剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、安定剤、等張剤、溶媒、または乳化剤が挙げられ、これらは、ヒトまたは家畜における使用が許容されるとして米国食品医薬品局により認可されたものである。

【0072】

「薬学的に許容される塩」は、酸付加塩と塩基付加塩の両方を含む。

40

【0073】

「薬学的に許容される酸付加塩」とは、遊離塩基の生物学的有効性および特性を保持し、生物学的にまたは他の点で有害ではなく、無機酸、例えば、これらに限定されないが、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸など、および有機酸、例えば、これらに限定されないが、酢酸、2,2-ジクロロ酢酸、アジピン酸、アルギン酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、4-アセトアミド安息香酸、樟脳酸、樟脳-10-スルホン酸、カプリン酸、カプロン酸、カプリル酸、炭酸、ケイヒ酸、クエン酸、シクラミン酸、ドデシル硫酸、エタン-1,2-ジスルホン酸、エタンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、ギ酸、フマル酸、ガラクトール酸、ゲンチシン酸、グルコヘプトン酸、グルコン酸、グルクロン酸、グルタミン酸、グルタル酸、2-オキソ-グルタ

50

ル酸、グリセロリン酸、グリコール酸、馬尿酸、イソ酪酸、乳酸、ラクトビオン酸、ラウリン酸、マレイン酸、リンゴ酸、マロン酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、粘液酸、ナフタレン - 1, 5 - ジスルホン酸、ナフタレン - 2 - スルホン酸、1 - ヒドロキシ - 2 - ナフトエ酸、ニコチン酸、オレイン酸、オロチン酸、シュウ酸、パルミチン酸、パモ酸、プロピオン酸、ピログルタミン酸、ピルビン酸、サリチル酸、4 - アミノサリチル酸、セバシン酸、ステアリン酸、コハク酸、酒石酸、チオシアン酸、p - トルエンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、ウンデシレン酸などと一緒に形成される塩を指す。

【0074】

「薬学的に許容される塩基付加塩」とは、遊離酸の生物学的有効性および特性を保持し、生物学的にまたはその他の点で有害ではない塩を指す。これらの塩は、無機塩基または有機塩基の遊離酸への付加から調製される。無機塩基に由来する塩として、これらに限定されないが、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウム塩などが挙げられる。好ましい無機塩は、アンモニウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、およびマグネシウム塩である。有機塩基に由来する塩として、これらに限定されないが、第一級、第二級、および第三級アミン、天然置換アミンを含めた置換アミン、環状アミンおよび塩基性イオン交換樹脂の塩、例えば、アンモニア、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、ジエタノールアミン、エタノールアミン、デアノール、2 - ジメチルアミノエタノール、2 - ジエチルアミノエタノール、ジシクロヘキシルアミン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、プロカイン、ヒドラバミン、コリン、ペタイン、ベネタミン、ベンザチン、エチレンジアミン、グルコサミン、メチルグルカミン、テオブロミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、プリン、ピペラジン、ピペリジン、N - エチルピペリジン、ポリアミン樹脂などが挙げられる。特に好ましい有機塩基は、イソプロピルアミン、ジエチルアミン、エタノールアミン、トリメチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、コリンおよびカフェインである。

【0075】

結晶化は多くの場合、本発明の化合物の溶媒和物を生成する。本明細書で使用される場合、「溶媒和物」という用語は、本発明の化合物の1個または複数の分子と、溶媒の1個または複数の分子とを含む凝集体を指す。溶媒は水であってよく、このケースでは、溶媒和物は水和物であってよい。代わりに、溶媒は有機溶媒であってよい。したがって、本発明の化合物は、一水和物、二水和物、半水化物、セスキ水和物、三水和物、四水和物などを含めた水和物、ならびに対応する溶媒和形態として存在し得る。本発明の化合物は真の溶媒和物であってよいが、その一方で、他のケースでは、本発明の化合物は、単に外来性の水を保持してもよいし、または水とある外来性溶媒の混合物であってよい。

【0076】

「医薬組成物」とは、本発明の化合物と、哺乳動物、例えば、ヒトに生物活性化合物を送達するために当技術分野で一般的に認められた媒体との製剤を指す。このような媒体として、このためのすべての薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤が挙げられる。

【0077】

「有効量」または「治療有効量」とは、哺乳動物、好ましくはヒトに投与された場合、哺乳動物、好ましくはヒトにおける処置を実行するのに十分である、本発明の化合物、またはこれを含む脂質ナノ粒子の量を指す。「治療有効量」を構成する本発明の脂質ナノ粒子の量は、化合物、状態およびその重症度、投与方式、ならびに処置すべき哺乳動物の年齢に応じて変動することになるが、当業者であれば、自身の知識および本開示を考慮して規定通りに決定することができる。

【0078】

本明細書で使用される「処置する」または「処置」は、目的の疾患または状態を有する哺乳動物、好ましくはヒトにおける目的の疾患または状態の処置を網羅し、

(i) 哺乳動物において、特に、このような哺乳動物がその状態に罹りやすくなっているが、それを有するとまだ診断されていない場合、その疾患もしくは状態が生じるのを防止

10

20

30

40

50

すること、

(i i) 疾患もしくは状態を阻害する、すなわち、その発症を抑止すること、

(i i i) 疾患もしくは状態を緩和する、すなわち、その疾患もしくは状態の退行を引き起こすこと、または

(i v) 疾患もしくは状態に起因する症状を緩和する、すなわち、根底にある疾患もしくは状態に対処することなく疼痛を緩和すること

を含む。本明細書で使用される場合、「疾患」および「状態」という用語は、交換可能に使用してもよいし、または特定の疾病もしくは状態が公知の原因物質を有さないこともあり（そのため、原因がまだ解決されておらず）、したがって疾患としてまだ認識されていないが、望ましくない状態もしくは症候群としてのみ認識され、程度の差はあるが特定の一連の症状が臨床医により確認されているという点で異なる場合もある。

10

【 0 0 7 9 】

本発明の化合物またはこれらの薬学的に許容される塩は、1つまたは複数の不斉中心を含有することができ、したがって、アミノ酸に対して、絶対立体化学の点から (R) - もしくは (S) - 、または (D) - もしくは (L) - と定義することができるエナンチオマー、ジアステレオマー、および他の立体異性形態を生じることができる。本発明の実施形態は、すべてのこのような可能な異性体、ならびにこれらのラセミおよび光学的に純粋な形態を含むことを意図する。光学活性 (+) および (-) 、 (R) - および (S) - 、または (D) - および (L) - 異性体は、キラルシントロンもしくはキラル試薬を使用して調製してもよいし、または従来技術、例えば、クロマトグラフィーおよび分別再結晶を使用して分割してもよい。個々のエナンチオマーの調製/単離の従来技術は、適切な光学的に純粋な前駆体からのキラル合成、または、例えば、キラル高速液体クロマトグラフィー (H P L C) を使用したラセミ体（または塩もしくは誘導体のラセミ体）の分割を含む。本明細書に記載の化合物がオレフィン二重結合または他の幾何的不斉中心を含有する場合、他に特定されていない限り、化合物は、EとZの両方の幾何異性体を含むことが意図される。同様に、すべての互変異性形態もまた含まれることが意図される。

20

【 0 0 8 0 】

「立体異性体」とは、同じ結合により結合した同じ原子で構成されるが、交換可能ではない異なる三次元構造を有する化合物を指す。本発明の実施形態は、様々な立体異性体およびその混合物を想定し、「エナンチオマー」を含み、「エナンチオマー」とは、その分子が互いに重ね合わせ不可能なミラーイメージである2つの立体異性体を指す。

30

【 0 0 8 1 】

「互変異性体」とは、分子の1個の原子から、同じ分子の別の原子へのプロトン移動を指す。本発明の実施形態は任意の前記化合物の互変異性体を含む。

化合物

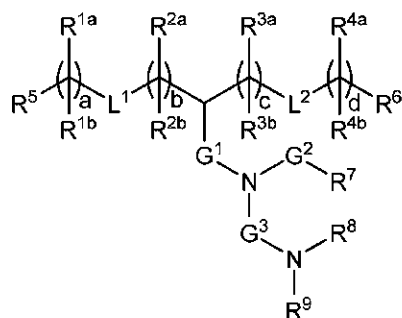
【 0 0 8 2 】

ある態様では、本発明は、オリゴヌクレオチドと共に脂質ナノ粒子を形成するために、他の脂質成分、例えば、中性脂質、荷電脂質、ステロイドおよび/またはポリマーコンジュゲート脂質などと組み合わせることが可能である新規脂質化合物を提供する。理論に制約されることを望むことなく、これらの脂質ナノ粒子は、血清中でオリゴヌクレオチドを分解から遮蔽し、*i n v i t r o*および*i n v i v o*でのオリゴヌクレオチドの細胞への有効な送達を提供すると考えられている。

40

一実施形態では、脂質化合物は、式 (I) :

【化 3】



I

(式中、

L¹ および L² は、それぞれ独立して、-O(C=O)-、-(C=O)O-、-C(=O)-、-O-、-S(O)_x-、-S-S-、-C(=O)S-、-SC(=O)-、-NR^aC(=O)-、-C(=O)NR^a-、-NR^aC(=O)NR^a-、-OC(=O)NR^a-、-NR^aC(=O)O- または直接結合であり、

G¹ は、C₁~C₂ アルキレン、-(C=O)-、-O(C=O)-、-SC(=O)-、-NR^aC(=O)- または直接結合であり、

G² は、-C(=O)-、-(C=O)O-、-C(=O)S-、-C(=O)NR^a- または直接結合であり、

G³ は C₁~C₆ アルキレンであり、

R^a は、H または C₁~C₁₂ アルキルであり、

R^{1a} および R^{1b} は、出現ごとに、独立して、(a) H もしくは C₁~C₁₂ アルキルであるか、または (b) R^{1a} は、H もしくは C₁~C₁₂ アルキルであり、R^{1b} とそれが結合している炭素原子は、隣接する R^{1b} とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素-炭素二重結合を形成し、

R^{2a} および R^{2b} は、出現ごとに、独立して、(a) H もしくは C₁~C₁₂ アルキルであるか、または (b) R^{2a} は、H もしくは C₁~C₁₂ アルキルであり、R^{2b} とそれが結合している炭素原子は、隣接する R^{2b} とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素-炭素二重結合を形成し、

R^{3a} および R^{3b} は、出現ごとに、独立して、(a) H もしくは C₁~C₁₂ アルキルであるか、または (b) R^{3a} は、H もしくは C₁~C₁₂ アルキルであり、R^{3b} とそれが結合している炭素原子は、隣接する R^{3b} とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素-炭素二重結合を形成し、

R^{4a} および R^{4b} は、出現ごとに、独立して、(a) H もしくは C₁~C₁₂ アルキルであるか、または (b) R^{4a} は、H もしくは C₁~C₁₂ アルキルであり、R^{4b} とそれが結合している炭素原子は、隣接する R^{4b} とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素-炭素二重結合を形成し、

R⁵ および R⁶ は、それぞれ独立して、H またはメチルであり、

R⁷ は C₄~C₂₀ アルキルであり、

R⁸ および R⁹ は、それぞれ独立して、C₁~C₁₂ アルキルであるか、または R⁸ および R⁹ は、それらが結合している窒素原子と一緒にあって、5、6 または 7 員の複素環を形成し、

a、b、c および d は、それぞれ独立して、1~24 の整数であり、

x は 0、1 または 2 である)

の構造またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体を有する。

一部の実施形態では、L¹ および L² は、それぞれ独立して、-O(C=O)-、-(C

= 0) O - または直接結合である。他の実施形態では、G¹ および G² は、それぞれ独立して、- (C = O) - または直接結合である。一部の異なる実施形態では、L¹ および L² は、それぞれ独立して、- O (C = O) -、- (C = O) O - または直接結合であり、G¹ および G² は、それぞれ独立して、- (C = O) - または直接結合である。

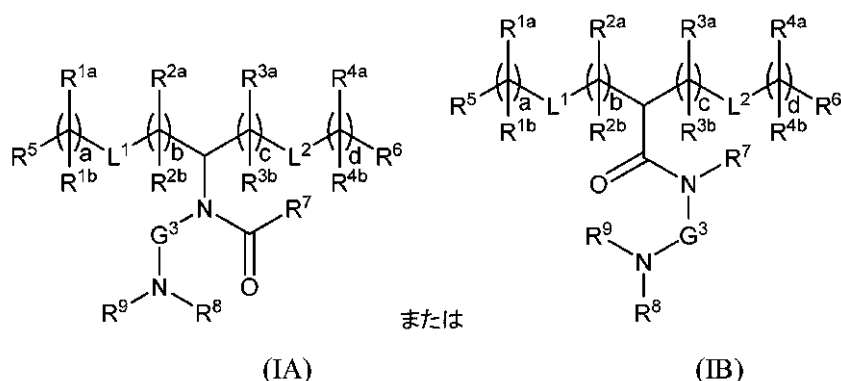
【 0 0 8 3 】

一部の異なる実施形態では、L¹ および L² は、それぞれ独立して、-C(=O)-、-O-、-S(O)_x-、-S-S-、-C(=O)S-、-SC(=O)-、-NR^a-、-NR^aC(=O)-、-C(=O)NR^a-、-NR^aC(=O)NR^a-、-OC(=O)NR^a-、-NR^aC(=O)O-、-NR^aS(O)_xNR^a-、-NR^aS(O)_x- または -S(O)_xNR^a- である。

【 0 0 8 4 】

前述の実施形態の他の実施形態では、化合物は、以下の構造（I A）または（I B）：

【化 4】



の 1 つを有する。

【 0 0 8 5 】

一部の実施形態では、化合物は構造 (I A) を有する。他の実施形態では、化合物は構造 (I B) を有する。

【 0 0 8 6 】

前述の実施形態のいずれかでは、 L^1 または L^2 の 1 つは $-O(C=O)-$ である。例えば、一部の実施形態では、 L^1 および L^2 のそれぞれは $-O(C=O)-$ である。

【 0 0 8 7 】

前述の実施形態のいずれかの一部の異なる実施形態では、 L^1 または L^2 の 1 つは - (C = 0) O - である。例えば、一部の実施形態では、 L^1 および L^2 のそれぞれは - (C = 0) O - である。

【 0 0 8 8 】

異なる実施形態では、 L^1 または L^2 の 1 つは直接結合である。本明細書で使用される場合、「直接結合」は基（例えば、 L^1 または L^2 ）が不在であることを意味する。例えば、一部の実施形態では、 L^1 および L^2 のそれぞれは直接結合である。

【 0 0 8 9 】

前述の実施形態の他の異なる実施形態では、 R^{1a} および R^{1b} の少なくとも 1 つの出現に対して、 R^{1a} は H または $C_{1\sim 12}$ アルキルであり、 R^{1b} とそれが結合している炭素原子は、隣接する R^{1b} とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素 - 炭素二重結合を形成する。

【 0 0 9 0 】

さらに他の異なる実施形態では、R^{4a}およびR^{4b}の少なくとも1つの出現に対して、R^{4a}はHまたはC₁~C₁₂アルキルであり、R^{4b}とそれが結合している炭素原子は、隣接するR^{4b}とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素-炭素二重結合を

形成する。

【 0 0 9 1 】

さらなる実施形態では、 R^{2a} および R^{2b} の少なくとも1つの出現に対して、 R^{2a} はHまたは $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、 R^{2b} とそれが結合している炭素原子は、隣接する R^{2b} とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素 - 炭素二重結合を形成する。

【 0 0 9 2 】

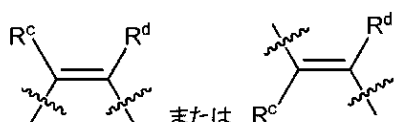
前述の実施形態のいずれかの他の異なる実施形態では、 R^{3a} および R^{3b} の少なくとも1つの出現に対して、 R^{3a} はHまたは $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、 R^{3b} とそれが結合している炭素原子は、隣接する R^{3b} とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素 - 炭素二重結合を形成する。

10

【 0 0 9 3 】

「炭素 - 炭素」二重結合は、以下の構造の1つを指すと理解されている：

【化 5 】



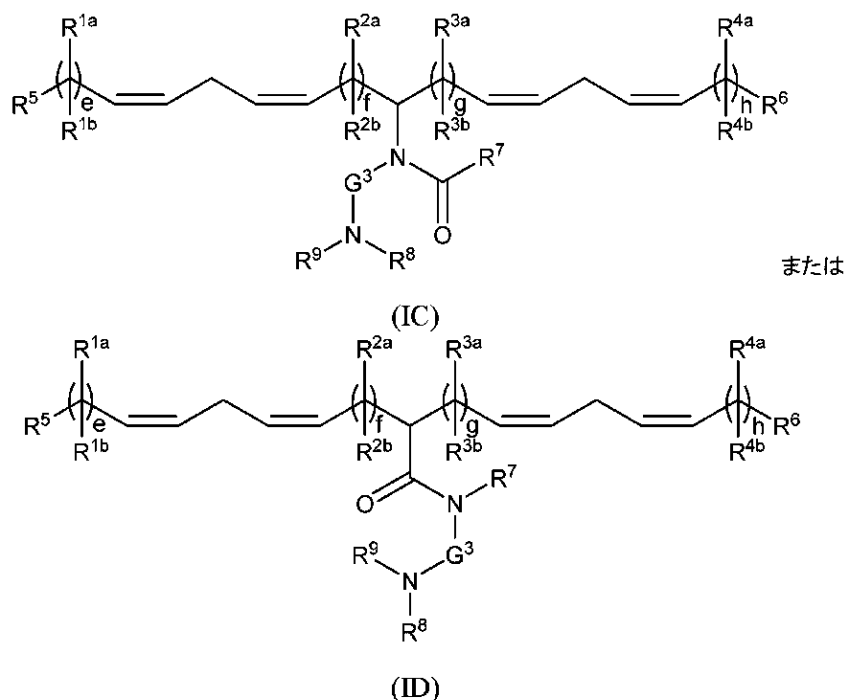
(式中、 R^c および R^d は、出現ごとに、独立して、Hまたは置換基である)。例えば、一部の実施形態では、 R^c および R^d は、出現ごとに、独立して、H、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキルまたはシクロアルキル、例えばHまたは $C_1 \sim C_{12}$ アルキルである。

20

【 0 0 9 4 】

様々な他の実施形態では、化合物は、以下の構造 (IC) または (ID)：

【化 6 】



30

40

(式中、e、f、gおよびhは、それぞれ独立して、1 ~ 12の整数である)の1つを有する。

【 0 0 9 5 】

一部の実施形態では、化合物は構造 (IC) を有する。他の実施形態では、化合物は構造

50

(I D) を有する。

【 0 0 9 6 】

構造 (I C) または (I D) の化合物の様々な実施形態では、 e 、 f 、 g および h は、それぞれ独立して、 4 ~ 1 0 の整数である。

【 0 0 9 7 】

前述のある特定の実施形態では、 a 、 b 、 c および d は、それぞれ独立して、 2 ~ 1 2 の整数または 4 ~ 1 2 の整数である。他の実施形態では、 a 、 b 、 c および d は、それぞれ独立して、 8 ~ 1 2 または 5 ~ 9 の整数である。一部の特定の実施形態では、 a は 0 である。一部の実施形態では、 a は 1 である。他の実施形態では、 a は 2 である。さらなる実施形態では、 a は 3 である。さらに他の実施形態では、 a は 4 である。一部の実施形態では、 a は 5 である。他の実施形態では、 a は 6 である。さらなる実施形態では、 a は 7 である。さらに他の実施形態では、 a は 8 である。一部の実施形態では、 a は 9 である。他の実施形態では、 a は 1 0 である。さらなる実施形態では、 a は 1 1 である。さらに他の実施形態では、 a は 1 2 である。一部の実施形態では、 a は 1 3 である。他の実施形態では、 a は 1 4 である。さらなる実施形態では、 a は 1 5 である。さらに他の実施形態では、 a は 1 6 である。

10

【 0 0 9 8 】

一部の実施形態では、 b は 1 である。他の実施形態では、 b は 2 である。さらなる実施形態では、 b は 3 である。さらに他の実施形態では、 b は 4 である。一部の実施形態では、 b は 5 である。他の実施形態では、 b は 6 である。さらなる実施形態では、 b は 7 である。さらに他の実施形態では、 b は 8 である。一部の実施形態では、 b は 9 である。他の実施形態では、 b は 1 0 である。さらなる実施形態では、 b は 1 1 である。さらに他の実施形態では、 b は 1 2 である。一部の実施形態では、 b は 1 3 である。他の実施形態では、 b は 1 4 である。さらなる実施形態では、 b は 1 5 である。さらに他の実施形態では、 b は 1 6 である。

20

【 0 0 9 9 】

一部の実施形態では、 c は 1 である。他の実施形態では、 c は 2 である。さらなる実施形態では、 c は 3 である。さらに他の実施形態では、 c は 4 である。一部の実施形態では、 c は 5 である。他の実施形態では、 c は 6 である。さらなる実施形態では、 c は 7 である。さらに他の実施形態では、 c は 8 である。一部の実施形態では、 c は 9 である。他の実施形態では、 c は 1 0 である。さらなる実施形態では、 c は 1 1 である。さらに他の実施形態では、 c は 1 2 である。一部の実施形態では、 c は 1 3 である。他の実施形態では、 c は 1 4 である。さらなる実施形態では、 c は 1 5 である。さらに他の実施形態では、 c は 1 6 である。

30

【 0 1 0 0 】

一部の特定の実施形態では、 d は 0 である。一部の実施形態では、 d は 1 である。他の実施形態では、 d は 2 である。さらなる実施形態では、 d は 3 である。さらに他の実施形態では、 d は 4 である。一部の実施形態では、 d は 5 である。他の実施形態では、 d は 6 である。さらなる実施形態では、 d は 7 である。さらに他の実施形態では、 d は 8 である。一部の実施形態では、 d は 9 である。他の実施形態では、 d は 1 0 である。さらなる実施形態では、 d は 1 1 である。さらに他の実施形態では、 d は 1 2 である。一部の実施形態では、 d は 1 3 である。他の実施形態では、 d は 1 4 である。さらなる実施形態では、 d は 1 5 である。さらに他の実施形態では、 d は 1 6 である。

40

【 0 1 0 1 】

一部の実施形態では、 e は 1 である。他の実施形態では、 e は 2 である。さらなる実施形態では、 e は 3 である。さらに他の実施形態では、 e は 4 である。一部の実施形態では、 e は 5 である。他の実施形態では、 e は 6 である。さらなる実施形態では、 e は 7 である。さらに他の実施形態では、 e は 8 である。一部の実施形態では、 e は 9 である。他の実施形態では、 e は 1 0 である。さらなる実施形態では、 e は 1 1 である。さらに他の実施形態では、 e は 1 2 である。

50

【 0 1 0 2 】

一部の実施形態では、f は 1 である。他の実施形態では、f は 2 である。さらなる実施形態では、f は 3 である。さらに他の実施形態では、f は 4 である。一部の実施形態では、f は 5 である。他の実施形態では、f は 6 である。さらなる実施形態では、f は 7 である。さらに他の実施形態では、f は 8 である。一部の実施形態では、f は 9 である。他の実施形態では、f は 1 0 である。さらなる実施形態では、f は 1 1 である。さらに他の実施形態では、f は 1 2 である。

【 0 1 0 3 】

一部の実施形態では、g は 1 である。他の実施形態では、g は 2 である。さらなる実施形態では、g は 3 である。さらに他の実施形態では、g は 4 である。一部の実施形態では、g は 5 である。他の実施形態では、g は 6 である。さらなる実施形態では、g は 7 である。さらに他の実施形態では、g は 8 である。一部の実施形態では、g は 9 である。他の実施形態では、g は 1 0 である。さらなる実施形態では、g は 1 1 である。さらに他の実施形態では、g は 1 2 である。

10

【 0 1 0 4 】

一部の実施形態では、h は 1 である。他の実施形態では、e は 2 である。さらなる実施形態では、h は 3 である。さらに他の実施形態では、h は 4 である。一部の実施形態では、e は 5 である。他の実施形態では、h は 6 である。さらなる実施形態では、h は 7 である。さらに他の実施形態では、h は 8 である。一部の実施形態では、h は 9 である。他の実施形態では、h は 1 0 である。さらなる実施形態では、h は 1 1 である。さらに他の実施形態では、h は 1 2 である。

20

【 0 1 0 5 】

一部の他の様々な実施形態では、a および d は同じである。一部の他の実施形態では、b および c は同じである。一部の他の特定の実施形態では、a および d は同じであり、b および c は同じである。

【 0 1 0 6 】

a と b の合計および c と d の合計は、所望の特性を有する脂質を得るために変化させることができる因子である。一実施形態では、a および b は、これらの合計が、1 4 ~ 2 4 の範囲の整数となるように選択される。他の実施形態では、c および d は、これらの合計が 1 4 ~ 2 4 の範囲の整数となるように選択される。さらなる実施形態では、a と b の合計および c と d の合計は同じである。例えば、一部の実施形態では、a と b の合計および c と d の合計は両方とも、1 4 ~ 2 4 の範囲であってよい同じ整数である。またさらなる実施形態では、a、b、c および d は、a と b の合計および c と d の合計が 1 2 またはそれ超となるように選択される。

30

【 0 1 0 7 】

R¹a、R²a、R³a および R⁴a における置換基は特に限定されていない。一部の実施形態では、R¹a、R²a、R³a および R⁴a の少なくとも 1 つは H である。ある特定の実施形態では R¹a、R²a、R³a および R⁴a は出現ごとに H である。ある特定の他の実施形態では、R¹a、R²a、R³a および R⁴a の少なくとも 1 つは C₁ ~ C₁₂ アルキルである。ある特定の他の実施形態では、R¹a、R²a、R³a および R⁴a の少なくとも 1 つは C₁ ~ C₈ アルキルである。ある特定の他の実施形態では、R¹a、R²a、R³a および R⁴a の少なくとも 1 つは C₁ ~ C₆ アルキルである。前述の実施形態の一部では、C₁ ~ C₈ アルキルは、メチル、エチル、n - プロピル、イソ - プロピル、n - ブチル、イソ - ブチル、tert - ブチル、n - ヘキシルまたは n - オクチルである。

40

【 0 1 0 8 】

前述のもののある特定の実施形態では、R¹a、R¹b、R⁴a および R⁴b は、出現ごとに C₁ ~ C₁₂ アルキルである。

【 0 1 0 9 】

前述のもののあるさらなる実施形態では、R¹b、R²b、R³b および R⁴b の少なくとも

50

1つはHであるか、またはR^{1b}、R^{2b}、R^{3b}およびR^{4b}は出現ごとにHである。

【0110】

前述のもののある特定の実施形態では、R^{1b}とそれが結合している炭素原子は、隣接するR^{1b}とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素-炭素二重結合を形成する。前述のものの他の実施形態では、R^{4b}とそれが結合している炭素原子は、隣接するR^{4b}とそれが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素-炭素二重結合を形成する。

【0111】

R⁵およびR⁶における置換基は、前述の実施形態では特に限定されない。ある特定の実施形態では、R⁵またはR⁶の1つはメチルである。他の実施形態では、R⁵またはR⁶のそれぞれはメチルである。

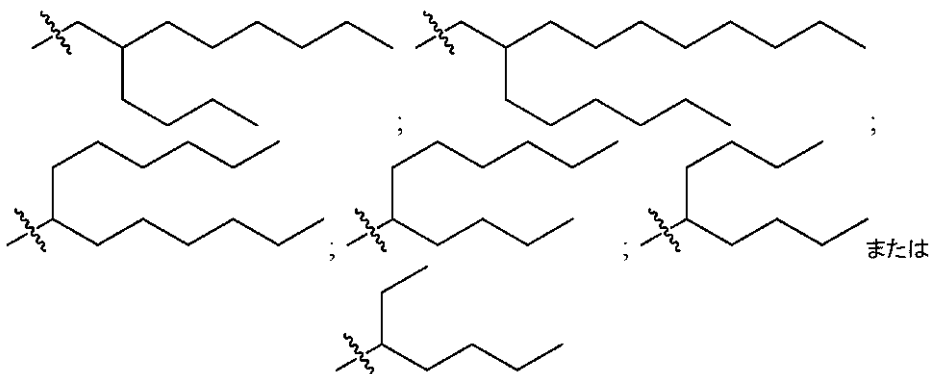
【0112】

R⁷における置換基は、前述の実施形態では特に限定されていない。ある特定の実施形態では、R⁷はC₆~C₁₆アルキルである。一部の他の実施形態では、R⁷はC₆~C₉アルキルである。これらの実施形態の一部では、R⁷は、- (C=O)OR^b、- O(C=O)R^b、- C(=O)R^b、- OR^b、- S(O)_xR^b、- S-SR^b、- C(=O)SR^b、- SC(=O)R^b、- NR^aR^b、- NR^aC(=O)R^b、- C(=O)NR^aR^b、- NR^aC(=O)NR^aR^b、- OC(=O)NR^aR^b、- NR^aC(=O)OR^b、- NR^aS(O)_xNR^aR^b、- NR^aS(O)_xR^bまたは- S(O)_xNR^aR^bで置換されており、ここで、R^aはHまたはC₁~C₁₂アルキルであり、R^bはC₁~C₁₅アルキルであり、xは0、1または2である。例えば、一部の

【0113】

前述の実施形態の様々な実施形態では、R^bは、分枝状C₁~C₁₅アルキルである。例えば、一部の実施形態では、R^bは、以下の構造：

【化7】



の1つを有する。

【0114】

前述の実施形態のある特定の他の実施形態では、R⁸またはR⁹の1つはメチルである。他の実施形態では、R⁸とR⁹の両方はメチルである。

【0115】

一部の異なる実施形態では、R⁸およびR⁹は、それらが結合している窒素原子と一緒にあって、5、6または7員の複素環を形成する。前述のものの一部の実施形態では、R⁸およびR⁹は、それらが結合している窒素原子と一緒にあって、5員の複素環、例えば、ピロリジニル環を形成する。前述の実施形態の一部の異なる実施形態では、R⁸およびR⁹は、それらが結合している窒素原子と一緒にあって、6員の複素環、例えば、ピペラジニル環を形成する。

【 0 1 1 6 】

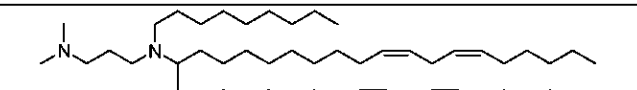
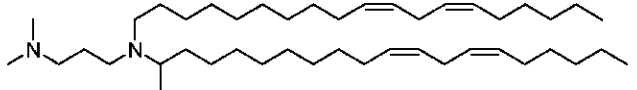
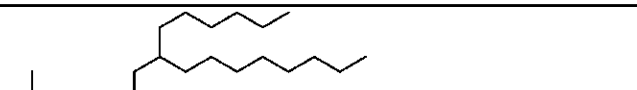
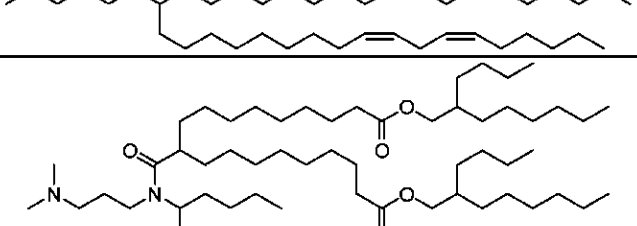
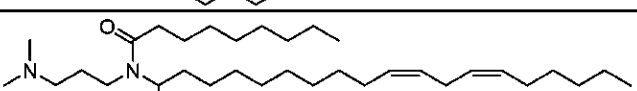
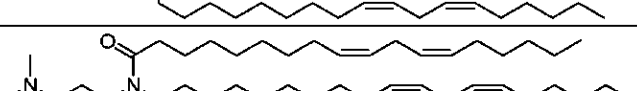
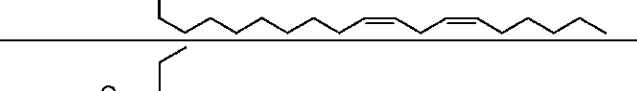
前述の化合物のさらに他の実施形態では、 G^3 は、 $C_2 \sim C_4$ アルキレン、例えば C_3 アルキレンである。

【 0 1 1 7 】

様々な異なる実施形態では、化合物は、以下の表 1 に記載の構造の 1 つを有する。

【表 1 - 1】

表1
代表的化合物

No.	構造	調製方法
1		A
2		A
3		A
4		B
5		A
6		A
7		A

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

No.	構造	調製方法
8		A
9		A
10		A
11		A
12		A
13		A
14		A

10

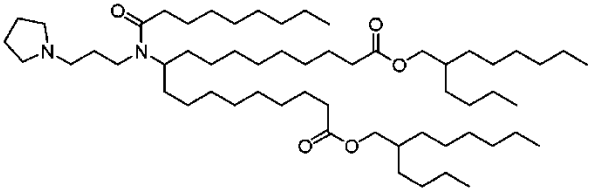
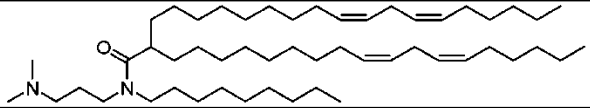
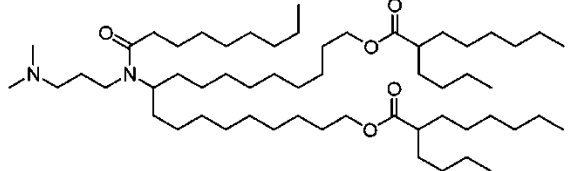
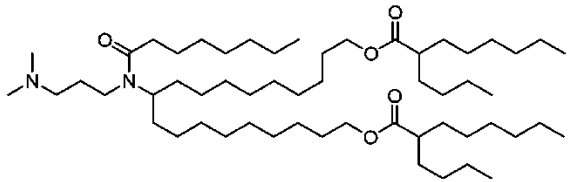
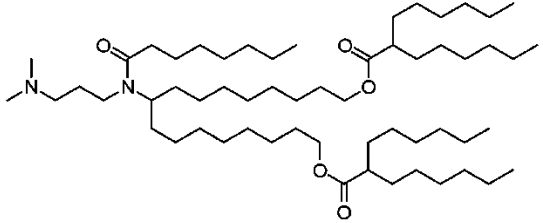
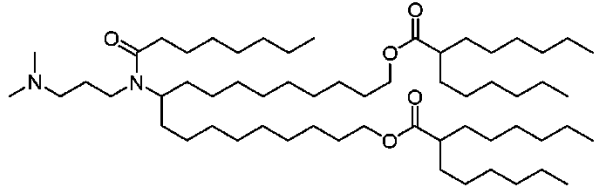
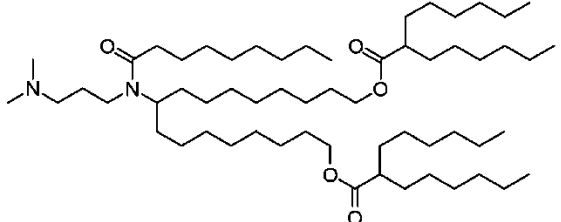
20

30

40

50

【表 1 - 3】

No.	構造	調製方法
15		A
16		B
17		C
18		A
19		A
20		A
21		A

10

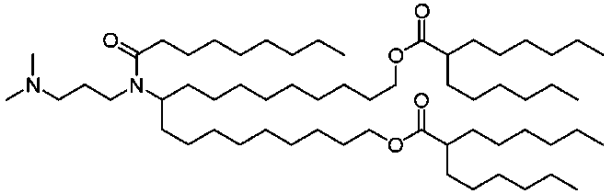
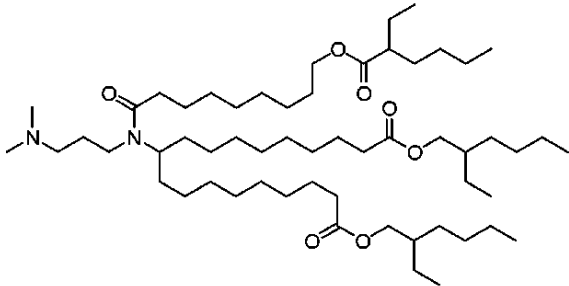
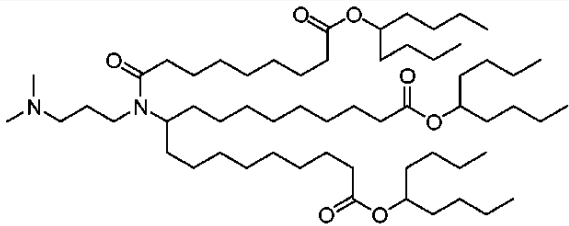
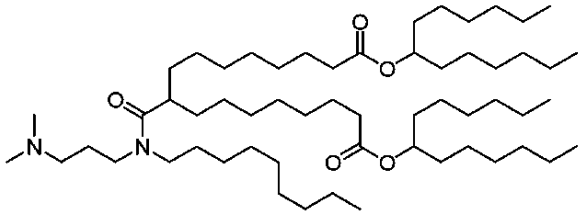
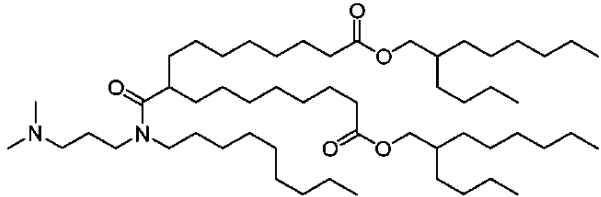
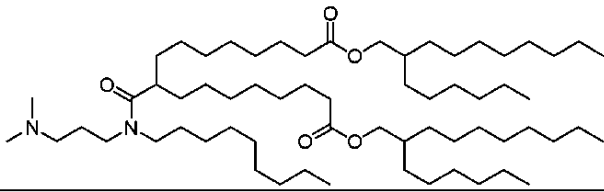
20

30

40

50

【表 1 - 4】

No.	構造	調製方法
22		A
23		A
24		A
25		B
26		B
27		B

10

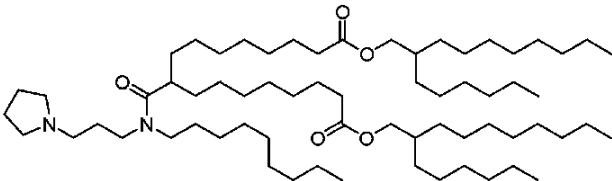
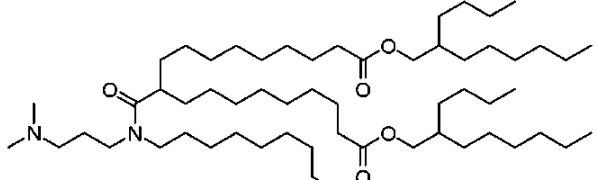
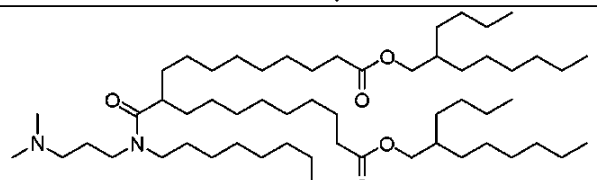
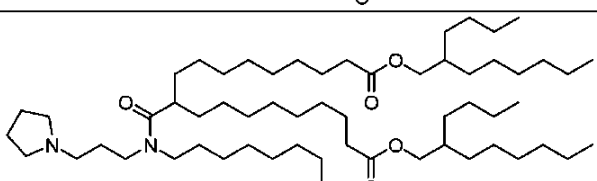
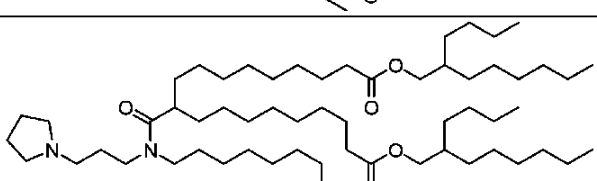
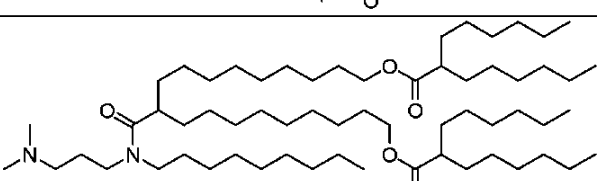
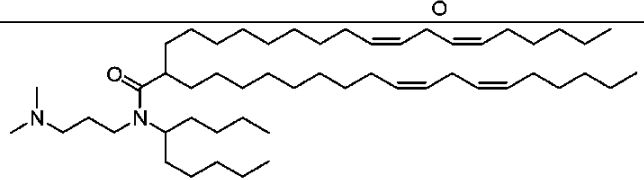
20

30

40

50

【表 1 - 5】

No.	構造	調製方法
28		B
29		B
30		B
31		B
32		B
33		B
34		B

10

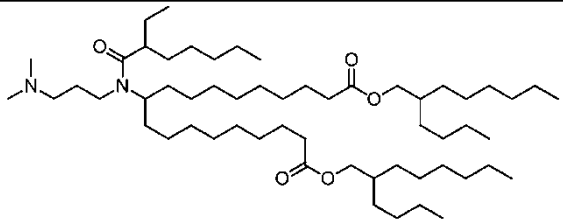
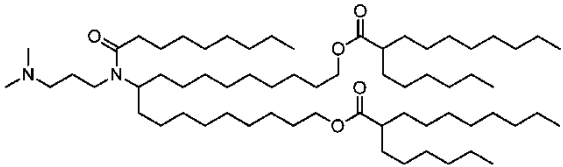
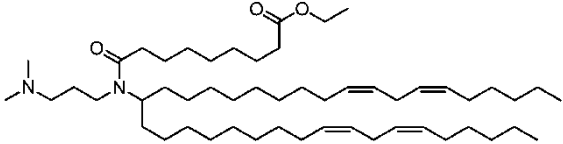
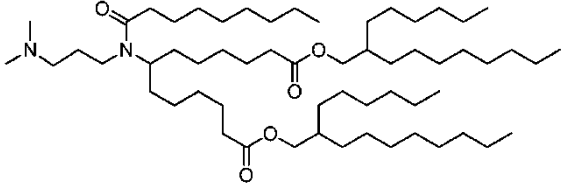
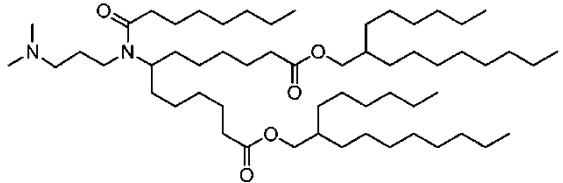
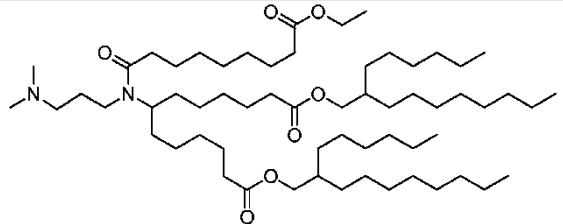
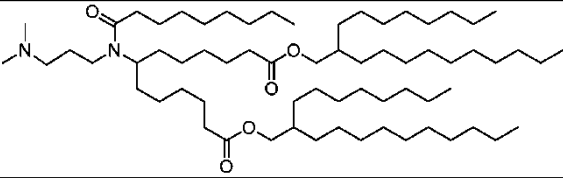
20

30

40

50

【表 1 - 6】

No.	構造	調製方法
35		A
36		C
37		A
38		A
39		A
40		A
41		A

10

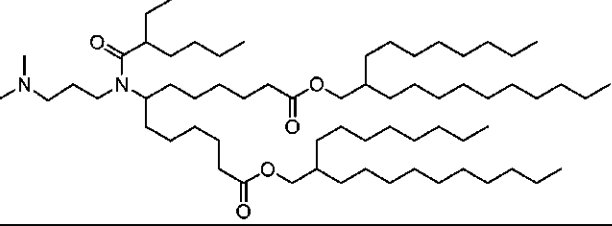
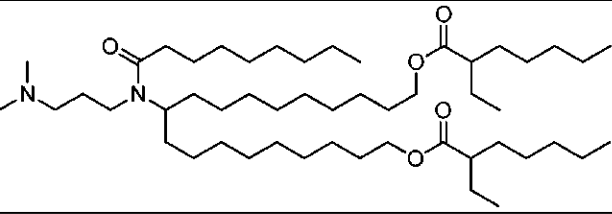
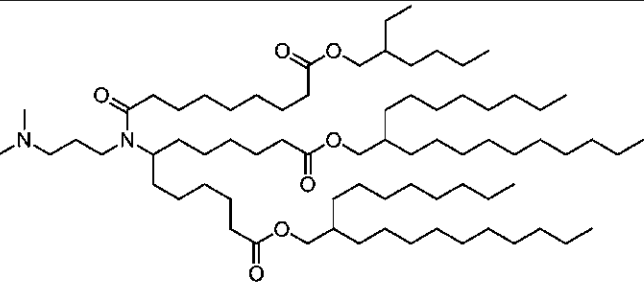
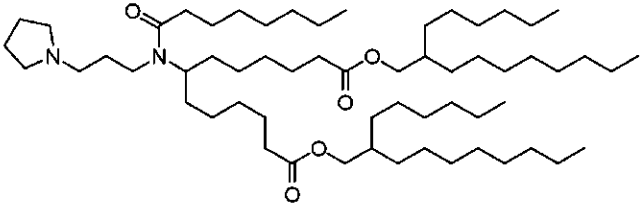
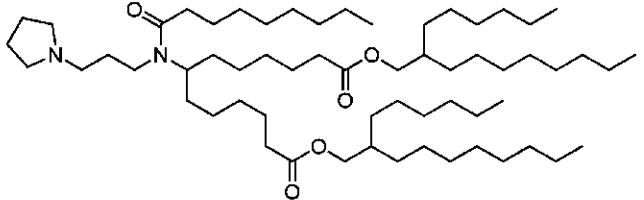
20

30

40

50

【表 1 - 7】

No.	構造	調製方法
42		A
43		C
44		A
45		A
46		A

【0118】

上に記載されているような式 (I) の化合物の任意の実施形態、および上に記載されているような式 (I) の化合物における任意の特定の置換基および / または変数は、式 (I) の化合物の他の実施形態ならびに / または置換基および / もしくは変数と独立して組み合わせることによって、上に具体的に記載されていない本発明の実施形態を形成することができることが理解されている。加えて、特定の実施形態および / または請求項において、置換基および / または変数の一覧が任意の特定の R 基、L 基、G 基または変数 a ~ h、または x に対して列挙されている場合、それぞれ個々の置換基および / または変数は、特定の実施形態および / または請求項から削除されてもよく、置換基および / または変数の残りの一覧は、本発明の範囲内にあると考えられることが理解されている。

【0119】

本記載では、示されている式の置換基および / または変数の組合せは、このような寄与が安定した化合物をもたらす場合のみ許容できることが理解されている。

【0120】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、式 (I) の化合物のいずれか 1 つまたは複数と、治療剤を含む組成物が提供される。例えば、一部の実施形態では、組成物は、式 (I) の化合物のいずれかと、治療剤と、中性脂質、ステロイドおよびポリマーコンジュゲート脂質から選択される 1 種または複数の賦形剤とを含む。他の薬学的に許容される賦形剤および / または担体もまた、組成物の様々な実施形態に含まれている。

【 0 1 2 1 】

一部の実施形態では、中性脂質は、D S P C、D P P C、D M P C、D O P C、P O P C、D O P E および S M から選択される。一部の実施形態では、中性脂質は D S P C である。様々な実施形態では、化合物と中性脂質とのモル比は、約 2 : 1 ~ 約 8 : 1 の範囲である。

10

【 0 1 2 2 】

様々な実施形態では、組成物は、ステロイドまたはステロイドアナログをさらに含む。ある特定の実施形態では、ステロイドまたはステロイドアナログはコレステロールである。これらの実施形態の一部では、化合物とコレステロールとのモル比は、約 2 : 1 ~ 1 : 1 の範囲である。

【 0 1 2 3 】

様々な実施形態では、ポリマーコンジュゲート脂質はペグ化脂質である。例えば、一部の実施形態は、ペグ化ジアシルグリセロール (P E G - D A G)、例えば、1 - (モノメトキシ - ポリエチレングリコール) - 2 , 3 - ジミリストイルグリセロール (P E G - D M G)、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン (p h o s p h a t i d y l e t h a n o l o a m i n e) (P E G - P E)、P E G スクシネートジアシルグリセロール (P E G - S - D A G)、例えば、4 - O - (2 ' , 3 ' - ジ (テトラデカノイルオキシ) プロピル - 1 - O - (- メトキシ (ポリエトキシ) エチル) ブタンジオエート (P E G - S - D M G)、ペグ化セラミド (P E G - c e r)、または P E G ジアルコキシプロピルカルバメート、例えば、- メトキシ (ポリエトキシ) エチル - N - (2 , 3 - ジ (テトラデカンオキシ) プロピル) カルバメートまたは 2 , 3 - ジ (テトラデカンオキシ) プロピル - N - (- メトキシ (ポリエトキシ) エチル) カルバメートなどを含む。様々な実施形態では、化合物とペグ化脂質とのモル比は、約 1 0 0 : 1 ~ 約 2 5 : 1 の範囲である。

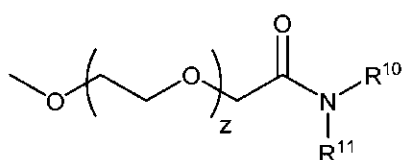
20

【 0 1 2 4 】

一部の実施形態では、組成物は、以下の構造 (I I) :

30

【 化 8 】



(II)

40

(式中、

R 1 0 および R 1 1 は、それぞれ独立して、1 0 ~ 3 0 個の炭素原子を含有する直鎖状または分枝状の、飽和または不飽和のアルキル鎖であり、アルキル鎖は、1 つまたは複数のエステル結合により、任意選択で分断されており、

z は、3 0 ~ 6 0 の範囲の平均値を有する)

を有するペグ化脂質またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体を含む。

【 0 1 2 5 】

一部の実施形態では、R 1 0 および R 1 1 は、それぞれ独立して、1 2 ~ 1 6 個の炭素原子を含有する、直鎖状の、飽和したアルキル鎖である。他の実施形態では、z の平均は約

50

45である。

【0126】

前述の組成物の一部の実施形態では、治療剤は核酸を含む。例えば、一部の実施形態では、核酸は、アンチセンス、プラスミドDNAおよびメッセンジャーRNAから選択される。

【0127】

他の異なる実施形態では、本発明は、それを必要とする患者に治療剤を投与するための方法であって、前述の組成物のいずれかを調製または準備するステップと、組成物を患者に投与するステップとを含む方法を対象とする。

【0128】

投与の目的のために、本発明の化合物（通常、治療剤と組み合わせた脂質ナノ粒子の形態で）は、原末（raw chemical）として投与してもよいし、または医薬組成物として製剤化してもよい。本発明の医薬組成物は、式（I）の化合物と、1種または複数の薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤とを含む。式（I）の化合物は、例えば、目的の特定疾患または状態を処置するために、脂質ナノ粒子を形成し、治療剤を送達するのに有効である量で、組成物中に存在する。適当な濃度および投薬量は、当業者により容易に決定することができる。

10

【0129】

本発明の組成物の投与は、同様の有用性を果たすための薬剤の容認された投与モードのいずれかを介して行うことができる。本発明の医薬組成物は、固体、半固体、液体または気体の形態の調製物、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏剤、液剤、懸濁剤、坐剤、注射剤、吸入剤、ゲル剤、マイクロスフェア、およびエアゾール剤に製剤化することができる。このような医薬組成物を投与する典型的な経路として、限定されないが、経口、局所、経皮、吸入、非経口、舌下、口腔内頬側、直腸、経膈、および鼻腔内が挙げられる。本明細書で使用される非経口という用語は、皮下注射、静脈内、筋肉内、皮内、胸骨内注射または注入技術を含む。本発明の医薬組成物は、組成物を患者に投与すると、その中に含有されている活性成分が生物学的に利用可能となるように製剤化される。対象または患者に投与される組成物は、1つまたは複数の用量単位の形態をとり、この場合、例えば、錠剤は、単一用量単位であってよく、エアゾール剤形態の本発明の化合物の容器は、複数の用量単位を保持することができる。このような剤形を調製する実際の方法は公知であるか、または当業者には明らかであろう。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、20版（Philadelphia College of Pharmacy and Science、2000年）を参照されたい。投与される組成物は、いずれにしても、本発明の教示に従って、目的の疾患または状態の処置のための本発明の化合物またはその薬学的に許容される塩の治療有効量を含有する。

20

30

【0130】

本発明の医薬組成物は、固体または液体の形態であってよい。一態様では、担体（複数可）は微粒子であり、これによって、組成物は、例えば、錠剤または散剤の形態である。担体（複数可）は液体であってよく、組成物は、例えば、経口シロップ剤、注射液または、例えば、吸入投与に有用であるエアゾール剤である。

40

【0131】

経口投与が意図される場合、医薬組成物は、好ましくは、固体または液体のいずれかの形態であり、半固体、半液体、懸濁剤およびゲル剤の形態は、本明細書で固体または液体のいずれかと考えられる形態に含まれる。

【0132】

経口投与のための固体組成物として、医薬組成物は、散剤、顆粒剤、圧縮錠剤、丸剤、カプセル剤、チューインガム、カシエ剤などの形態に製剤化することができる。このような固体組成物は、通常1種または複数の不活性希釈剤または食用担体を含有する。加えて、以下の1つまたは複数が存在し得る：結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、微結晶性セルロース、トラガカントガムまたはゼラチンなど；賦形剤、

50

例えば、デンプン、ラクトースまたはデキストリンなど；崩壊剤、例えば、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、PrimoGel、コーンスターチなど；滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはステロテックスなど；流動促進剤、例えば、コロイド状二酸化ケイ素など；甘味剤、例えば、スクロースまたはサッカリンなど；香味剤、例えば、ペパーミント、サルチル酸メチルまたはオレンジ香味料など；および着色剤。

【0133】

医薬組成物がカプセル剤、例えば、ゼラチンカプセル剤の形態である場合、医薬組成物は、上記タイプの材料に加えて、液体担体、例えば、ポリエチレングリコールまたは油などを含有してもよい。

【0134】

医薬組成物は、液体の形態、例えば、エリキシル剤、シロップ剤、液剤、乳剤または懸濁剤などであってよい。液体は、2つの例として、経口投与用または注射による送達のためのものであってよい。経口投与が意図される場合、好ましい組成物は、本化合物に加えて、甘味剤、防腐剤、染料／着色剤および香味向上剤の1種または複数を含む。注射による投与が意図される組成物では、界面活性薬剤、防腐剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、緩衝液、安定剤および等張剤の1種または複数が含まれてもよい。

【0135】

本発明の液体医薬組成物は、これらが、液剤、懸濁剤または他の同様の形態であろうと、以下のアジュバントの1種または複数を含み得る：無菌希釈剤、例えば、注射用の水、食塩水、好ましくは生理的食塩水、リンゲル溶液、等張性塩化ナトリウムなど、不揮発性油、例えば、溶媒または懸濁媒としての役目を果たすことができる合成モノまたはジグリセリド、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の溶媒など；抗菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなど；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなど；キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸など；緩衝剤、例えば、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩など、および張性調整剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロースなど；抗凍結剤として作用する薬剤、例えば、スクロースまたはトレハロースなど。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは複数回投与バイアルに封入することができる。生理的食塩水は好ましいアジュバントである。注射用医薬組成物は好ましくは無菌である。

【0136】

非経口または経口投与のいずれかを意図する本発明の液体医薬組成物は、適切な投薬量が得られるように、ある量の本発明の化合物を含むべきである。

【0137】

本発明の医薬組成物は局所投与を意図してもよく、この場合、担体は、液剤、乳剤、軟膏剤またはゲル基剤を適切に含むことができる。基剤は例えば、以下の1種または複数を含むことができる：ワセリン、ラノリン、ポリエチレングリコール、蜜蝋、鉱油、希釈剤、例えば、水およびアルコールなど、ならびに乳化剤および安定剤。増粘剤は、局所投与用医薬組成物中に存在し得る。経皮投与が意図される場合、組成物は、経皮パッチまたはイオントホレーシスデバイスを含むことができる。

【0138】

本発明の医薬組成物は、例えば、直腸内で融解して、薬物を放出する坐剤の形態で、直腸投与を意図することができる。直腸投与用組成物は、適切な非刺激性賦形剤として油性基剤を含むしてもよい。このような基剤として、限定されないが、ラノリン、ココアバターおよびポリエチレングリコールが挙げられる。

【0139】

本発明の医薬組成物は、固体または液体用量単位の物理的形態を改変する様々な材料を含むことができる。例えば、組成物は、活性成分の周囲にコーティングシェルを形成する材料を含むことができる。コーティングシェルを形成する材料は通常不活性であり、例えば、糖、セラック、および他の腸溶コーティング剤から選択することができる。代わりに、

10

20

30

40

50

活性成分をゼラチンカプセル剤に入れることができる。

【0140】

固体または液体形態の本発明の医薬組成物は、本発明の化合物に結合し、これによって、化合物の送達を補助する薬剤を含むことができる。この能力で作用することができる適切な薬剤として、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体、またはタンパク質が挙げられる。

【0141】

本発明の医薬組成物は、エアゾール剤として投与することができる用量単位からなってもよい。エアゾール剤という用語は、コロイド状の性質のものから加圧パッケージからなる系までにわたって様々な系を表すのに使用される。送達は、液化性もしくは圧縮された気体によるものであっても、または活性成分を分配する適切なポンプシステムによるものであってもよい。本発明の化合物のエアゾール剤は、活性成分（複数可）を送達するために単相、二相、または三相系で送達することができる。エアゾール剤の送達は、一緒になってキットを形成することができる、必要な容器、活性因子、弁、副容器などを含む。当業者は、過度の実験を行わずに、好ましいエアゾール剤を決定することができる。

【0142】

本発明の医薬組成物は、薬学分野において周知の方法により調製することができる。例えば、注射による投与を意図する医薬組成物は、溶液を形成するために、本発明の脂質ナノ粒子を、無菌の、蒸留水または他の担体と組み合わせることによって調製することができる。界面活性剤は、均一溶液または懸濁液の形成を促進するために加えることができる。界面活性剤は、水系送達系において化合物の溶解または均一な懸濁を促進するために、本発明の化合物と非共有結合的に相互作用する化合物である。

【0143】

本発明の組成物またはこれらの薬学的に許容される塩は、治療有効量で投与されるが、この治療有効量は、利用する特定の治療剤の活性、治療剤の代謝安定性および作用期間、患者の年齢、体重、全般的な健康状態、性別、および食事、投与のモードおよび時間、排出速度、薬物の組合せ、特定の障害または状態の重症度、ならびに治療を受ける対象を含めた、様々な因子に応じて変動することになる。

【0144】

本発明の組成物はまた、1種または複数の他の治療剤の投与と同時に、投与前に、または投与後に投与することもできる。このような併用療法は、本発明の組成物と、1種または複数の追加の活性薬剤の単一の医薬投与製剤の投与、ならびに本発明の組成物と、それ自体別個の医薬投与製剤である各活性薬剤の投与を含む。例えば、本発明の組成物および他の活性薬剤は、錠剤もしくはカプセル剤などの単一の経口投与組成物として一緒に患者に投与することができ、または各薬剤を別個の経口投与製剤として投与することができる。別個の投与製剤を使用する場合、本発明の化合物および1種または複数の追加的活性薬剤は、本質的に同じ時間、すなわち、同時に、または時間をずらして別々に、すなわち、逐次的に投与することができ、併用療法は、これらのすべてのレジメンを含むと理解されている。

【0145】

上記化合物および組成物のための調製方法は、本明細書で以下に記載されており、および/または当技術分野で公知である。

【0146】

本明細書に記載のプロセスにおいて、中間体化合物の官能基を適切な保護基で保護することが必要であり得ることは、当業者であれば理解している。このような官能基として、ヒドロキシ、アミノ、メルカプトおよびカルボン酸が挙げられる。ヒドロキシの適切な保護基として、トリアルキルシリルまたはジアルキルアルキルシリル（例えば、*t*-ブチルジメチルシリル、*t*-ブチルジフェニルシリルまたはトリメチルシリル）、テトラヒドロピラニル、ベンジルなどが挙げられる。アミノ、アミノおよびグアニジノの適切な保護基として、*t*-ブトキシカルボニル、ベンジロキシカルボニルなどが挙げられる。メルカ

10

20

30

40

50

プトの適切な保護基として、 $-C(O)-R''$ （式中、 R'' は、アルキル、アリアルまたはアリアルアルキルである）、 p -メトキシベンジル、トリチルなどが挙げられる。カルボン酸の適切な保護基として、アルキル、アリアルまたはアリアルアルキルエステルが挙げられる。保護基は、当業者に公知であり、本明細書に記載されているような標準技術に従って付加または除去することができる。保護基の使用は、Green, T. W. および P. G. M. Wutz、Protective Groups in Organic Synthesis（1999年）、3版、Wileyにおいて詳細に記載されている。当業者であれば理解しているように、保護基はまた、ポリマー樹脂、例えば、Wang樹脂、Rink樹脂または2-クロロトリチル-クロリド樹脂などであってもよい。

【0147】

本発明の化合物のこのような保護された誘導体は、そのままでは薬理的活性を保有し得ないが、これらが哺乳動物に投与され、その後体内で代謝されて、薬理的活性のある本発明の化合物を形成することができることもまた当業者により理解されている。したがって、このような誘導体は「プロドラッグ」として記載することができる。本発明の化合物のすべてのプロドラッグは、本発明の範囲内に含まれる。

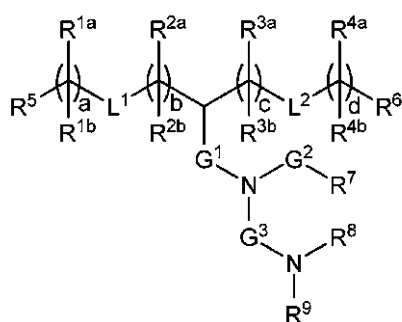
【0148】

さらに、遊離塩基または酸形態で存在するすべての本発明の化合物は、当業者に公知の方法により適当な無機塩基もしくは有機塩基または無機酸もしくは有機酸で処理することによって、これらの薬学的に許容される塩に変換することができる。本発明の化合物の塩は、標準技術によりこれらの遊離塩基または遊離酸の形態に変換することができる。

【0149】

以下の反応スキームは、本発明の化合物、すなわち、式(I)の化合物：

【化9】



(I)

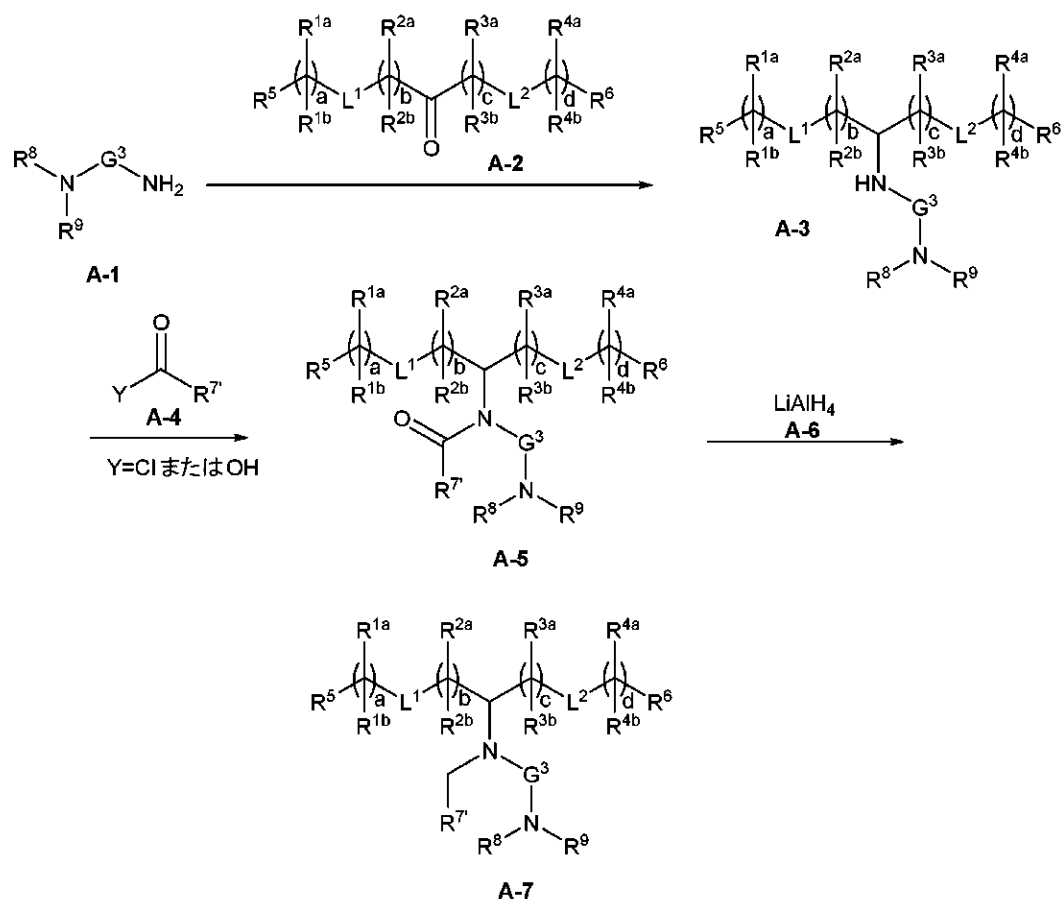
（式中、 R^{1a} 、 R^{1b} 、 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{3a} 、 R^{3b} 、 R^{4a} 、 R^{4b} 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 L^1 、 L^2 、 G^1 、 G^2 、 G^3 、 a 、 b 、 c および d は本明細書で定義された通りである）

またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体を作製する方法を例示している。当業者は、同様の方法で、または当業者に公知の他の方法を組み合わせることによりこれらの化合物を作製することができることが理解されている。当業者であれば、適当な開始構成成分を使用し、必要に応じて合成パラメーターを改変することによって、以下に具体的に図示されていない他の式(I)の化合物を、以下に記載されているものと同様の方式で作製することができることもまた理解されている。一般的に、開始構成成分は、Sigma Aldrich、Lancaster Synthesis, Inc.、Maybridge、Matrix Scientific、TCIおよびFluorochem USAなどの供給元から得てもよいし、または当業者に公知の情報元に従い合成してもよいし（例えば、Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure、5版（Wiley、2000年12月）を参照されたい）、または本発明に記載の通り調製してもよ

い。

【化 1 0】

一般反応スキーム 1



10

20

30

【0 1 5 0】

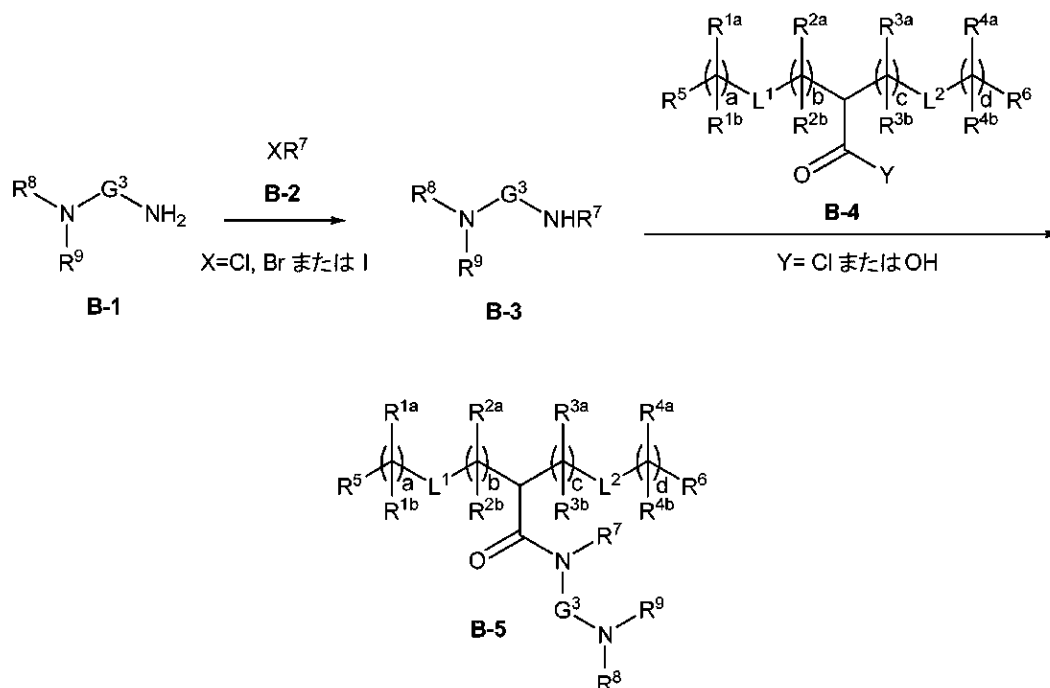
構造 (I) の化合物の実施形態 (例えば、化合物 A - 5 および A - 7) は、一般反応スキーム 1 (「方法 A」) (式中、 R^1a 、 R^1b 、 R^2a 、 R^2b 、 R^3a 、 R^3b 、 R^4a 、 R^4b 、 R^5 、 R^6 、 R^8 、 R^9 、 L^1 、 L^2 、 G^1 、 G^2 、 G^3 、 a 、 b 、 c および d は、本明細書で定義された通りであり、 R^7 は R^7 または $C_3 \sim C_{19}$ アルキルを表す) に従い調製することができる。一般反応スキーム 1 を参照すると、構造 A - 1 および A 2 の化合物は、商業源から購入するか、または当業者に精通している方法に従い調製することができる。A - 1 および A - 2 の溶液を還元剤 (例えば、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム) で処理して、任意の必要なワークアップ後、A - 3 を得る。A - 3 および塩基 (例えば、トリメチルアミン、DMA P) の溶液は、塩化アシル A - 4 (またはカルボン酸および DCC) で処理して、任意の必要なワークアップおよび / または精製後、A - 5 を得る。A - 5 は、 $LiAlH_4$ A - 6 で還元して、任意の必要なワークアップおよび / または精製後、A - 7 を得ることができる。

40

50

【化 1 1】

一般反応スキーム 2



10

20

【0 1 5 1】

構造 (I) の化合物の実施形態 (例えば、化合物 B - 5) は、一般反応スキーム 2 (「方法 B」) (式中、R^{1a}、R^{1b}、R^{2a}、R^{2b}、R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、L¹、L²、G³、a、b、c および d は本明細書で定義された通りである) に従い調製することができる。一般反応スキーム 2 を参照すると、構造 B - 1 および B - 2 の化合物は、商業源から購入するか、または当業者に精通している方法に従い調製することができる。B - 1 (過剰量)、B - 2 および塩基 (例えば、炭酸カリウム) の混合物は、任意の必要なワークアップ後、加熱して B - 3 を得る。B - 3 および塩基 (例えばトリメチルアミン、DMA P) の溶液を塩化アシル B - 4 (またはカルボン酸および DCC) で処理して、任意の必要なワークアップおよび / または精製後、B - 5 を得る。

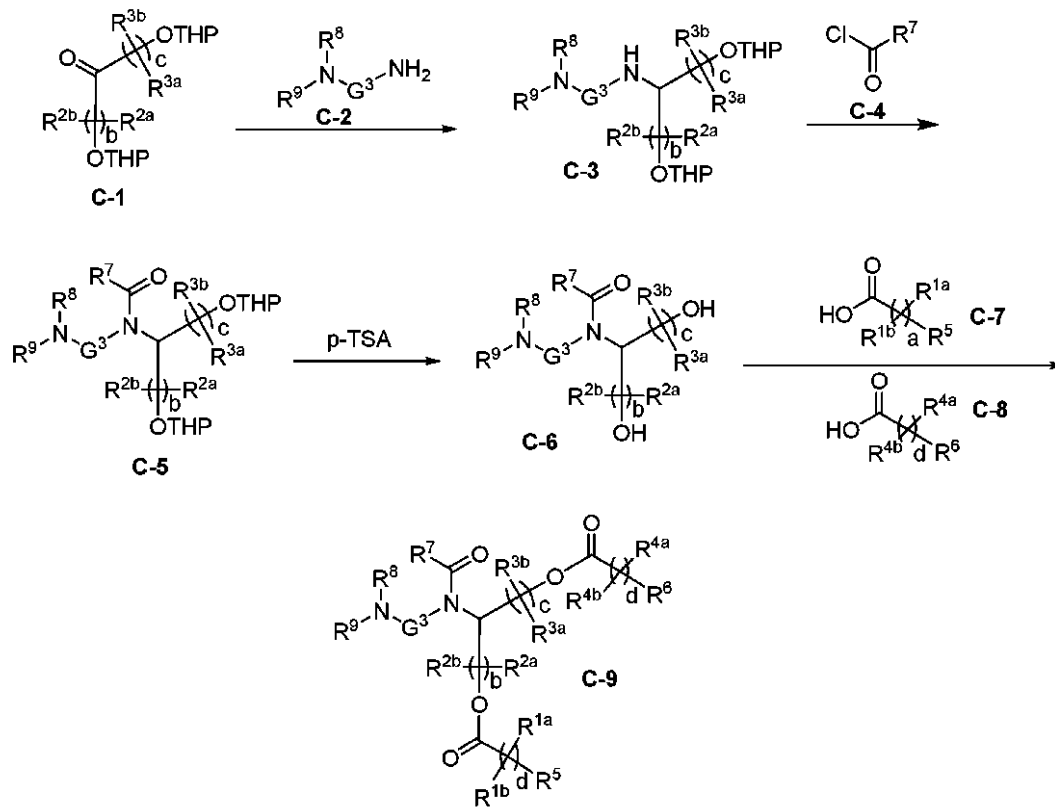
30

40

50

【化 1 2】

一般反応スキーム 3



【0152】

式(I)の化合物の他の実施形態(例えば、C-9)は、一般反応スキーム3に従い調製する。一般反応スキーム3に例示されているように、適切に保護されたケトン(C-1)を、アミンC-2を用いた還元的アミノ化条件下で反応させて、C-3を生成する。酸塩化物C-4を用いたC-3のアシル化は、アシル化した生成物C-5を生成する。C-5上のアルコール保護基を除去して、これに続いてC-7および/またはC-8ならびに適当な活性化試薬(例えば、DCC)と反応させて、所望の化合物C-9を生成する。

【0153】

以下の実施例は、例示の目的のために提供されるもので、限定ではない。

【実施例】

【0154】

(実施例1)

化合物1の合成

方法Aに従い、化合物5から化合物1を調製して、240mgの無色の油状物質を生成した(0.32mmol, 61%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 5.43-5.30 (m, 8H), 2.78 (t, 6.5 Hz, 4H), 2.39-2.25 (m, 7H), 2.22 (s, 6H), 2.06 (q, 6.8 Hz, 8H), 1.53 (五重線, 7.3 Hz, 2H), 1.41-1.11 (54H), 0.92-0.87 (m, 9H)。

(実施例2)

化合物2の合成

【0155】

化合物2を方法Aに従い以下の通り調製した:

化合物 7 (0 . 8 4 g , 0 . 9 6 m m o l) を T H F (1 5 m L) に溶解し、L A H (2 当量 1 . 9 2 m m o l 、 7 3 m g 、 M W 3 7 . 9 5) を室温で少しずつ加えた。反応混合物を 6 0 ° で一晩加熱した後、硫酸ナトリウム水和物を加えた。混合物を 2 時間攪拌し、シリカゲルの層を介して濾過した。濾液を濃縮して、わずかに黄色の油状物質を得た (0 . 8 6 g) 。粗生成物をシリカゲル上での重力カラムクロマトグラフィー (クロロホルム中 0 ~ 4 % M e O H) により精製した。これにより、所望の生成物を無色の油状物質として得た (4 2 0 m g 、 0 . 4 9 m m o l 、 5 1 %) 。¹H N M R (4 0 0 M H z , C D C l 3) : 5 . 4 3 - 5 . 3 0 (m , 1 2 H) , 2 . 7 8 (t , 6 . 4 H z , 6 H) , 2 . 4 0 - 2 . 2 5 (m , 7 H) , 2 . 2 2 (s , 6 H) , 2 . 0 6 (q , 6 . 8 H z , 1 2 H) , 1 . 5 3 (五重線 , 7 . 3 H z , 2 H) , 1 . 4 1 - 1 . 1 0 (5 8 H) , 0 . 9 0 (t , 6 . 8 H z , 9 H) . (実施例 3)

10

化合物 3 の合成

【 0 1 5 6 】

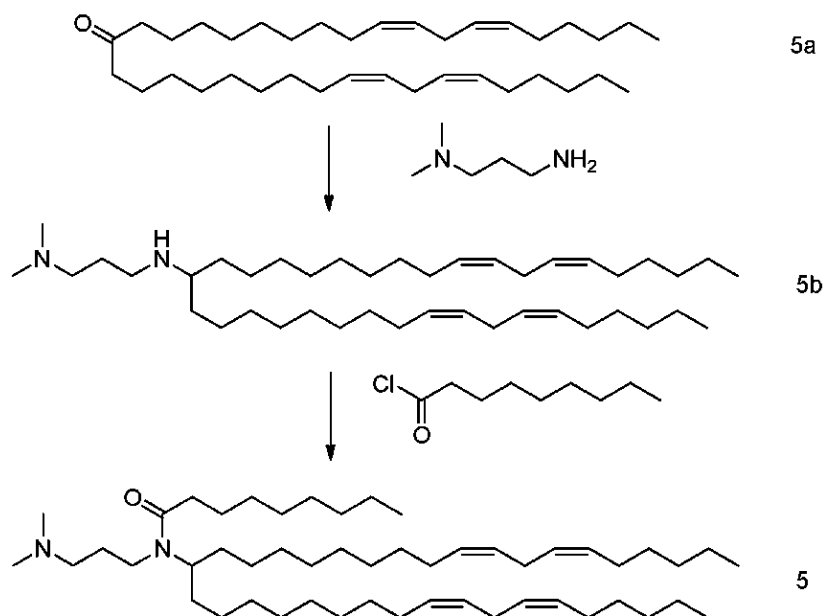
方法 A に従い、化合物 8 から化合物 3 を調製して、1 2 3 m g の無色の油状物質を生成した (0 . 1 5 m m o l 、 4 1 %) 。¹H N M R (4 0 0 M H z , C D C l 3) : 5 . 4 3 - 5 . 3 0 (m , 8 H) , 2 . 7 8 (t , 6 . 5 H z , 4 H) , 2 . 3 5 - 2 . 2 4 (m , 5 H) , 2 . 2 2 (s , 6 H) , 2 . 1 5 (d , 5 . 5 H z , 2 H) , 2 . 0 6 (q , 6 . 8 H z , 8 H) , 1 . 5 2 (五重線 , 7 . 3 H z , 2 H) , 1 . 4 0 - 1 . 0 9 (6 5 H) , 0 . 9 2 - 0 . 8 7 (m , 1 2 H) .

20

(実施例 4)

化合物 5 の合成

【 化 1 3 】



30

40

化合物 5 を方法 A に従い以下の通り調製した：

ステップ 1

【 0 1 5 7 】

3 - ジメチルアミン - 1 - プロピルアミン (6 m m o l 、 6 1 2 m g) およびケトン 5 a (3 . 1 6 g 、 6 m m o l) を D C E (2 5 m L) 中で混合し、次いでトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (8 . 4 9 m m o l 、 1 . 8 g) および A c O H (6 m m o l 、 0

50

．36 g、0.340 mL)で処理した。混合物を、Ar雰囲気下、室温で2日間撹拌した。1N NaOH(約20 mL)を加えることによって、反応混合物をクエンチし、生成物をヘキサンと酢酸エチル(約5%)の混合物で抽出した。有機抽出物を水/ブライン(1:1)、ブラインで洗浄し、乾燥させた(Na₂SO₄)。濃縮して、黄色の油状物質として、所望の生成物5bを得た(3.55 g)。いずれのさらなる精製なしに、粗生成物を次のステップで使用した。

ステップ2

【0158】

塩化ノナノイル(212 mg、1.2 mmol)のベンゼン(10 mL)中溶液を、化合物5b(600 mg、0.978 mmol)およびトリエチルアミン(5 mmol、0.7 mL、5当量)およびDMAP(20 mg)のベンゼン(10 mL)中溶液に、シリンジを介して、室温で10分間加えた。次いで、添加後、混合物をヘキサンと酢酸エチル(約5%)の混合物で希釈し、水で洗浄し、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗生成物(0.77 g)をシリカゲル上での重力カラムクロマトグラフィー(230~400メッシュシリカゲル、40 g、クロロホルム中MeOH、0~4%)により精製した。これによって、所望の生成物5を無色の油状物質として得た(563 mg、0.75 mmol、76%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 5.43 - 5.30 (m, 8H), 4.56 - 4.36 (br., 0.3H, アミド結合の周りでの遅い異性化のため), 3.64 (五重線, 7 Hz, 0.7H), 3.12 - 3.09 (m, 2H), 2.78 (t, 6.4 Hz, 4H), 2.33 - 2.25 (m, 4H), 2.23, 2.22 (2組の一重線, 6H), 2.06 (q類似, 6.8 Hz, 8H), 1.76 - 1.66 (m, 4H), 1.50 - 1.40 (m, 4H), 1.40 - 1.15 (46H), 0.90 (t, 6.7 Hz, 6H), 0.88 (t, 6.8 Hz, 3H)。(実施例5)

化合物6の合成

【0159】

化合物6を一般的手順Aに従い調製して、0.98 gのわずかに黄色の油状物質、1.13 mmol、58%を生成した。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 5.43 - 5.30 (m, 12H), 4.55 - 4.32 (br., 0.3H, アミド結合の周りでの遅い異性化のため), 3.63 (五重線類似, 7 Hz, 0.7H), 3.15 - 3.09 (m, 2H), 2.78 (t, 6.4 Hz, 6H), 2.33 - 2.25 (m, 4H), 2.22, 2.23 (2組の一重線, 6H), 2.06 (q類似, 6.8 Hz, 12H), 1.76 - 1.60 (m, 4H), 1.49 - 1.16 (54H), 0.90 (t類似, 6.8 Hz, 9H)。(実施例6)

化合物7の合成

化合物7を方法Aに従い以下の通り調製した：

【0160】

2-エチルヘプタン酸(1.5当量、0.83 mmol、130 mg)のベンゼン(6 mL)およびDMF(5~10 μL)中溶液に、塩化オキサリル(5当量、2.8 mmol、349 mg、0.24 mL)を室温に加えた。混合物を室温で30分間撹拌し、次いでAr下、60℃で2時間加熱した。混合物を濃縮した。残渣をベンゼン(6 mL)中に溶解させ、再度濃縮して、任意の塩化オキサリルを除去した。残留する油状物質(淡黄色)を4 mLのベンゼンの中に入れ、化合物5b(1当量、0.55 mmol、337 mg)およびトリエチルアミン(5当量、2.8 mmol、283 mg、390 μL)およびDMAP(10 mg)のベンゼン(6 mL)中溶液に、シリンジを介して室温で10分間加えた。添加後、生成した混合物を室温で一晩撹拌した。TLCは、あまり反応がなかったことを示した。反応物を濃縮し、よく乾燥させ、以下に使用した。残渣をDCM(20 mL

L) 中に溶解した。DMAP (200 mg、1.64 mmol) を加え、これに続いて DCC (1.64 mmol、338 mg) を加えた。混合物を 11 日間攪拌し、濾過した。濾液を 5% NaOH (100 mL) で洗浄した。有機相をブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過および濃縮により淡褐色の油状物質を得た (0.89 g)。粗生成物 (0.89 g) をシリカゲル上でのカラムクロマトグラフィー (クロロホルム中 0 ~ 4% MeOH) により精製した。これによって、所望の生成物を無色の油状物質として得た (122 mg、0.16 mmol、29%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 5.43 - 5.30 (m, 8H), 4.69 - 4.51 (非常に広幅, 推定 0.4 H アミド結合の周りでの遅い異性化のため), 3.72 (五重線類似, 6.9 Hz, 0.6H), 3.19 - 3.09 (m, 2H), 2.78 (t, 6.4 Hz, 4H), 2.55 (五重線類似, 6.5 Hz, 0.5H), 2.42 (五重線類似, 6.5 Hz, 0.5H), 2.29 (q 類似であるが, 2つの重なった三重線も考えられる, 6.9 Hz, 2H), 2.24, 2.23 (2組の一重線, 積分比が約 1:1, 6H), 2.09 - 2.02 (m, 8H), 1.77 - 1.58 (m, 4H), 1.55 - 1.15 (48H), 0.93 - 0.85 (m, 12H)。

(実施例 7)

化合物 8 の合成

【0161】

化合物 8 を一般的手順 A に従い調製して、0.39 g の無色の油状物質、0.46 mmol、56% を生成した。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 5.43 - 5.30 (m, 8H), 4.55 - 4.32 (非常に広幅, 推定 0.3 H, アミド結合の周りでの遅い異性化のため), 3.71 (五重線類似, 7 Hz, 0.7H), 3.17 - 3.08 (m, 2H), 2.78 (t, 6.4 Hz, 4H), 2.59 (五重線類似, 6.5 Hz, 0.5H), 2.46 (五重線類似, 6.5 Hz, 0.5H), 2.40 (t, 7 Hz, 1H), 2.31 (t, 7 Hz, 1H), 2.28, 2.25 (2組の一重線, 積分比が約 1:1, 6H), 2.09 - 2.02 (m, 8H), 1.79 - 1.69 (m, 2H), 1.66 - 1.57 (m, 2H), 1.55 - 1.16 (62H), 0.92 - 0.86 (m, 12H)。

(実施例 8)

化合物 9 の合成

10

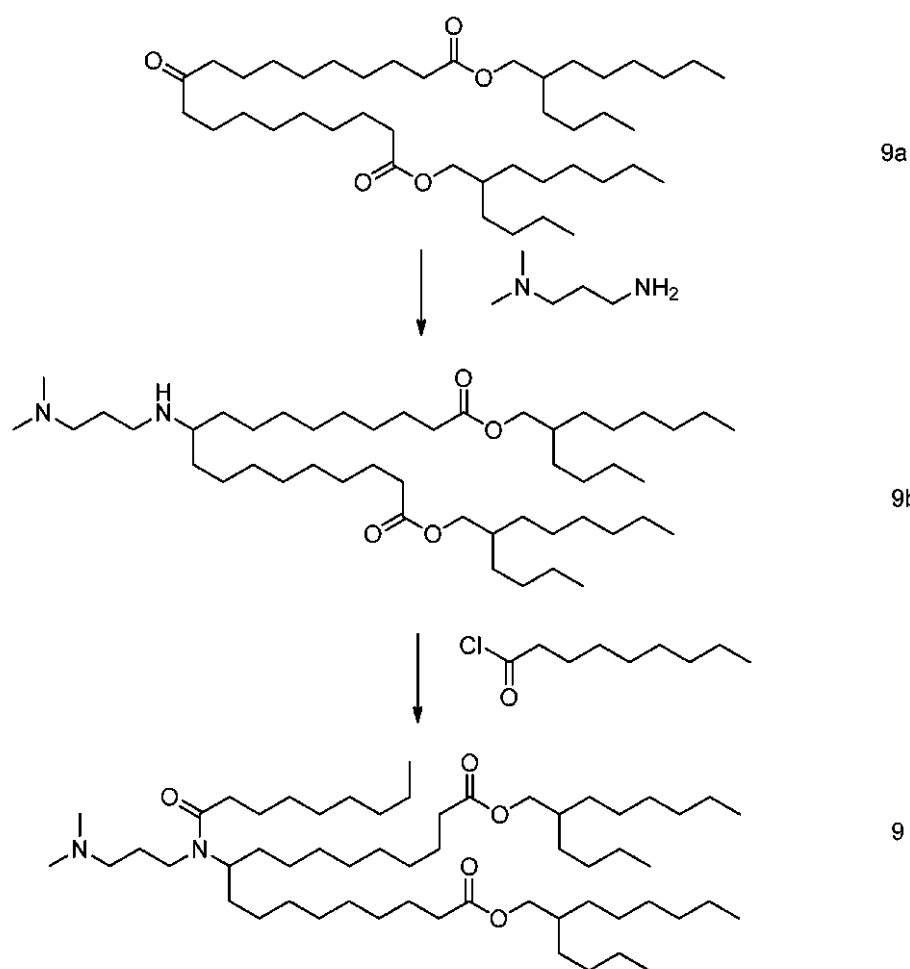
20

30

40

50

【化 1 4】



化合物 9 を方法 A に従い以下の通り調製した：

ステップ 1

3 - ジメチルアミン - 1 - プロピルアミン (1 当量 1.3 mmol、133 mg、163 μ L; MW 102.18、d 0.812) およびケトン 9a (1 当量、0.885 g、1.3 mmol) を DCE (8 mL) 中で混合し、次いで、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (1.4 当量、1.82 mmol、386 mg; MW 211.94) および AcOH (1 当量、1.3 mmol、78 mg、74 μ L、MW 60.05、d 1.06) で処理した。混合物を Ar 雰囲気下、室温で 2 日間撹拌した。反応混合物をヘキサン - EtOAc (9 : 1) で希釈し、0.1 N NaOH (20 mL) を加えることによってクエンチした。有機相を分離し、飽和 NaHCO₃、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、デカントし、濃縮して、所望の生成物 9b をわずかに黄色の濁った油状物質として得た (1.07 g、1.398 mmol)。

ステップ 2

【0162】

塩化ノナノイル (1.3 当量、1.27 mmol、225 mg) のベンゼン (10 mL) 中溶液を、ステップ 1 からの化合物 9b (0.75 g、0.98 mmol) およびトリエチルアミン (5 当量、4.90 mmol、0.68 mL) および DMAP (20 mg) のベンゼン (10 mL) 中溶液に、シリンジを介して室温で 10 分間加えた。添加後、混合物を室温で一晩撹拌した。メタノール (5.5 mL) を加えて、過剰な塩化アシルを除去した。3 時間後、シリカゲルのパッド (1.2 cm) を介して混合物を濾過した。濃縮に

30

40

50

より無色の油状物質を得た (0 . 7 0 g) 。

【 0 1 6 3 】

粗生成物 (0 . 7 0 g) をシリカゲル上でのフラッシュ乾燥カラムクロマトグラフィー (クロロホルム中 0 ~ 4 % MeOH) により精製した。これにより、457mgの無色の油状物質、0.50mmol、51%を生成した。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 4.54 - 4.36 (非常に広幅, 推定0.3H, アミド結合の周りでの遅い異性化のため), 3.977, 3.973 (2組の二重線, 5.8 Hz, 4H), 3.63 (五重線類似, 6.8 Hz, 0.7H), 3.14 - 3.09 (m, 2H), 2.33 - 2.25 (m, 8H), 2.23, 2.22 (2組の一重線, 6H), 1.76 - 1.56 (m, 10H), 1.49 - 1.39 (m, 4H), 1.37 - 1.11 (62H), 0.92 - 0.86 (m, 15H)。(実施例9)

10

化合物10の合成

【 0 1 6 4 】

化合物10を一般的手順Aに従い調製して、245mgの無色の油状物質を生成した (0 . 27mmol、2ステップに対する全収率53%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 4.87 (五重線類似, 6.3 Hz, 2H), 4.54 - 4.36 (非常に広幅, 推定0.3H, アミド結合の周りでの遅い異性化のため), 3.63 (五重線類似, 6.8 Hz, 0.7H), 3.14 - 3.09 (m, 2H), 2.33 - 2.25 (m, 8H), 2.23, 2.22 (2組の一重線, 6H), 1.76 - 1.56 (m, 8H), 1.55 - 1.39 (m, 12H), 1.37 - 1.11 (60H), 0.92 - 0.86 (m, 15H)。(実施例10)

20

化合物11の合成

【 0 1 6 5 】

化合物11を一般的手順Aに従い調製して、239mgの無色の油状物質を生成した (0 . 26mmol、2ステップに対する全収率52%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 4.87 (五重線類似, 6.3 Hz, 2H), 4.54 - 4.36 (非常に広幅, 推定0.3H, アミド結合の周りでの遅い異性化のため), 3.63 (五重線類似, 6.8 Hz, 0.7H), 3.14 - 3.09 (m, 2H), 2.33 - 2.25 (m, 8H), 2.23, 2.22 (2組の一重線, 6H), 1.76 - 1.56 (m, 8H), 1.55 - 1.39 (m, 12H), 1.37 - 1.11 (62H), 0.92 - 0.86 (m, 15H)。(実施例11)

30

化合物12の合成

【 0 1 6 6 】

化合物12を一般的手順Aに従い調製して、198mgの無色の油状物質を生成した (0 . 20mmol、2ステップに対する全収率46%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 4.54 - 4.36 (非常に広幅, 推定0.3H, アミド結合の周りでの遅い異性化のため), 3.974, 3.971 (2組の二重線, 5.8 Hz, 4H), 3.63 (五重線類似, 6.8 Hz, 0.7H), 3.14 - 3.09 (m, 2H), 2.33 - 2.25 (m, 8H), 2.23, 2.22 (2組の一重線, 6H), 1.76 - 1.56 (m, 10H), 1.49 - 1.39 (m, 4H), 1.37 - 1.11 (76H), 0.92 - 0.86 (m, 15H)。(実施例12)

40

化合物13の合成

【 0 1 6 7 】

化合物13を一般的手順Aに従い調製して、217mgの無色の油状物質を生成した (0 . 21mmol、2ステップに対する全収率49%)。¹H NMR (400 MHz,

50

CDC13) : 4.54 - 4.36 (非常に広幅, 推定0.3H, アミド結合の周りでの遅い異性化のため), 3.973, 3.970 (2組の二重線, 5.8 Hz, 4H), 3.63 (五重線類似, 6.8 Hz, 0.7H), 3.14 - 3.09 (m, 2H), 2.33 - 2.25 (m, 8H), 2.23, 2.22 (2組の一重線, 6H), 1.76 - 1.56 (m, 10H), 1.49 - 1.39 (m, 4H), 1.37 - 1.11 (78H), 0.92 - 0.86 (m, 15H).

(実施例13)

化合物14の合成

【0168】

10

化合物14を一般的手順Aに従い調製して、263mgの無色の油状物質を生成した(0.29mmol、2ステップに対する全収率39%)。¹H NMR (400 MHz, CDC13) : 4.54 - 4.36 (br., 推定0.3H, アミド結合の周りでの遅い異性化のため), 3.977, 3.973 (2組の二重線, 5.8 Hz, 4H), 3.63 (五重線類似, 6.8 Hz, 0.7H), 3.17 - 3.10 (m, 2H), 2.53 - 2.43 (m, 6H), 2.34 - 2.26 (m, 6H), 1.83 - 1.71 (m, 6H), 1.70 - 1.57 (m, 8H), 1.49 - 1.38 (m, 4H), 1.37 - 1.11 (60H), 0.92 - 0.86 (m, 15H).

(実施例14)

20

化合物15の合成

【0169】

化合物15を一般的手順Aに従い調製して、234mgの無色の油状物質を生成した(0.25mmol、2ステップに対する全収率34%)。¹H NMR (400 MHz, CDC13) : 4.54 - 4.36 (br., 推定0.3H, アミド結合の周りでの遅い異性化のため), 3.977, 3.973 (2組の二重線, 5.8 Hz, 4H), 3.63 (五重線類似, 6.8 Hz, 0.7H), 3.17 - 3.10 (m, 2H), 2.53 - 2.43 (m, 6H), 2.34 - 2.26 (m, 6H), 1.83 - 1.71 (m, 6H), 1.70 - 1.57 (m, 8H), 1.49 - 1.38 (m, 4H), 1.37 - 1.11 (62H), 0.92 - 0.86 (m, 15H).

30

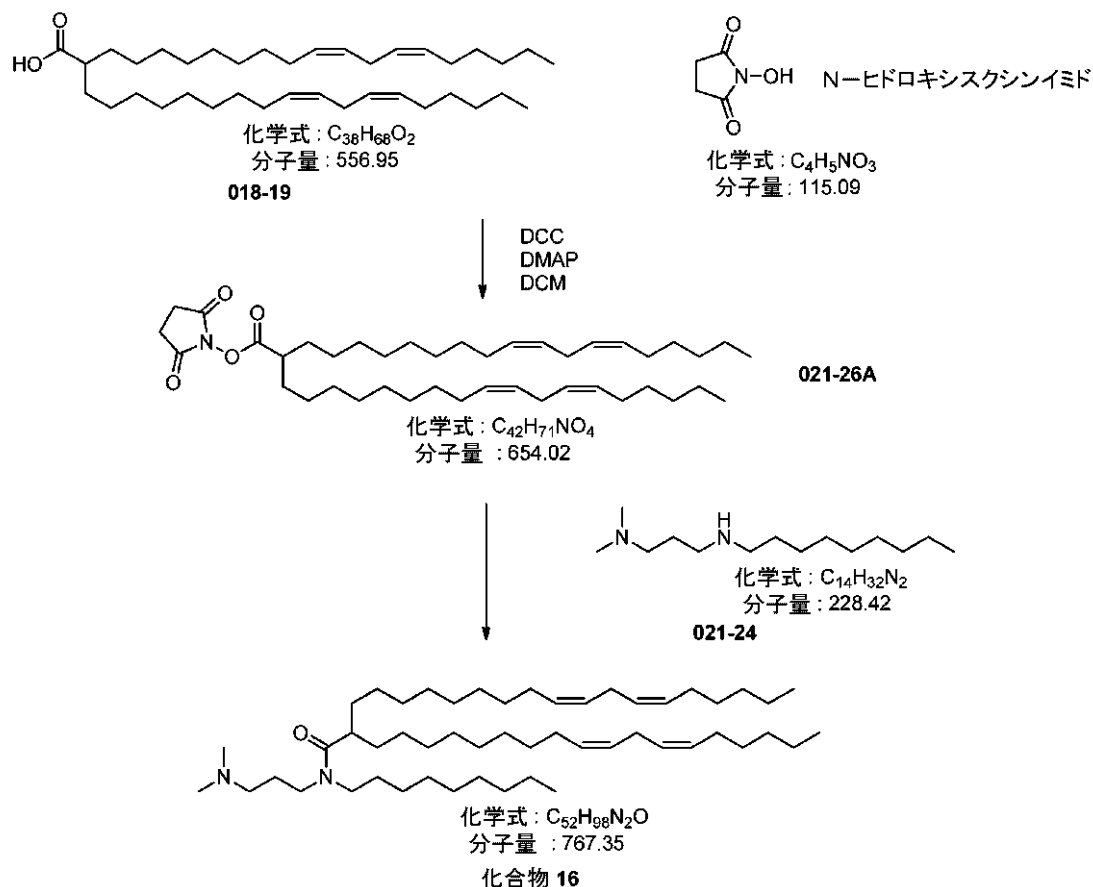
(実施例15)

化合物16の合成

40

50

【化 15】



10

20

化合物 16 を方法 B に従い以下の通り調製した:

【0170】

酸 018-19 (0.5 g、0.90 mmol)、N-ヒドロキシスクシンイミド (1.2 当量、1.08 mmol、124 mg) および DMAP (0.3 当量、0.27 mmol、33 mg) の DCM (20 mL) 中溶液に、DCC (2 当量、1.8 mmol、371 mg) を加えた。生成した混合物を室温で 16 時間撹拌した。次いで、反応混合物を濾過し、アミン 021-24 (1.26 mmol、288 mg) の DCM (10 mL) およびトリエチルアミン (5 mmol、696 μ L) 中溶液に加えた。15 日後、混合物を濃縮した。残渣をヘキサン/酢酸エチル/Et₃N (約 9:1:0.3) 中に溶解し、シリカゲルの小さなパッドを介して濾過し、ヘキサン/酢酸エチル/Et₃N (約 9:1:0.3) の混合物で洗浄した。濾液を濃縮し、黄色の油状物質を得た (580 mg)。黄色の油状物質をシリカゲル上でのカラムクロマトグラフィー (クロロホルム中 MeOH の勾配混合物で溶出、0~4.2%) により精製した。これにより、所望の生成物を無色の油状物質として得た (102 mg、0.13 mmol、14%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 5.43-5.30 (m, 8H), 3.38-3.29 (m, 3H), 3.28-3.23 (m, 1H), 2.78 (t, 6.4 Hz, 4H), 2.56-2.47 (m, 1H), 2.30-2.24 (m, 2H), 2.23, 2.22 (2 組の一重線, 6H), 2.09-2.02 (m, 8H), 1.71 (五重線類似, 7.4 Hz, 2H), 1.66-1.48 (水と重複; 推定 4H), 1.47-1.18 (m, 50H), 0.92-0.86 (m, 9H)。

(実施例 16)

30

40

50

化合物 24 の合成

【0171】

化合物 24 を一般的手順 A に従い調製して、279 mg のわずかに黄色の油状物質を生成した (0.29 mmol、2 ステップに対する全収率 44%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 4.88 (五重線類似, 6.3 Hz, 3H), 3.62 (五重線類似, 6.8 Hz, 1H), 3.14 - 3.08 (m, 2H), 2.33 - 2.25 (m, 10H), 2.23, 2.22 (2 組の一重線, 6H), 1.76 - 1.58 (m, 10H), 1.52 (q 類似, 6.7 Hz, 12H), 1.49 - 1.39 (m, 4H), 1.38 - 1.14 (50H), 0.89 (t 類似, 18H)。

(実施例 17)

化合物 35 の合成

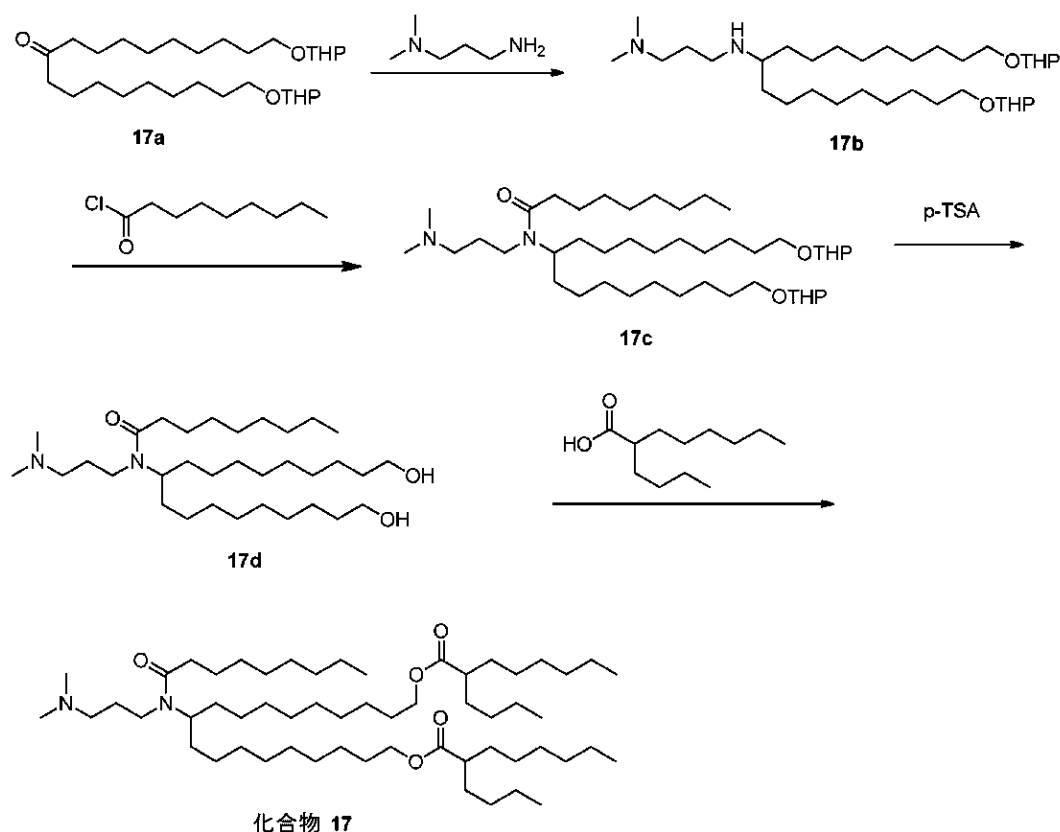
【0172】

化合物 35 を一般的手順 A に従い調製して、260 mg のわずかに黄色の油状物質を生成した (0.29 mmol、2 ステップに対する全収率 33%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 4.66 - 4.52 (非常に広幅, 推定 0.3 H, アミド結合の周りでの遅い異性化のため), 3.977, 3.973 (2 組の二重線, 5.8 Hz, 4H), 3.71 (五重線類似, 6.8 Hz, 0.7H), 3.19 - 3.09 (m, 2H), 2.54, 2.42 (2 組の五重線類似, 6.8 Hz, 積分比が約 1:1.2, 1H), 2.33 - 2.25 (m, 6H), 2.24, 2.22 (2 組の一重線, 6H), 1.77 - 1.11 (74H), 0.93 - 0.85 (m, 18H)。

(実施例 18)

化合物 17 の合成

【化 16】



10

20

30

40

50

化合物 17 を方法 C に従い以下の通り調製した：

ステップ 1

【0173】

3 - ジメチルアミノ - 1 - プロピルアミン (1 当量 4.14 mmol、423 mg、521 μ L) および ケトン 17a (1 当量、2.0 g、4.14 mmol) を DCE (30 mL) 中で混合し、次いで トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (1.4 当量、5.80 mmol、1.229 g) および AcOH (1 当量、4.14 mmol、249 mg、235 μ L) で処理した。混合物を Ar 雰囲気下、室温で 2 日間撹拌した。

【0174】

反応混合物をヘキサンおよび EtOAc (9:1、200 mL) の混合物で希釈し、NaOH 希釈溶液 (0.1 N、270 mL) を加えることによってクエンチした。2 つの相を分離した。有機相を飽和 NaHCO₃、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させて、シリカゲルのパッドを介して濾過した。パッドをヘキサンと EtOAc (9:1) の混合物 200 mL で洗浄した。次いで、パッドを DCM/MeOH/Et₃N (85:15:1) の混合物 200 mL で洗浄した。DCM/MeOH/Et₃N の洗浄液を濃縮することによって、所望の生成物 (17b) を無色の油状物質として得た (1.749 g、3.07 mmol、74%)。

ステップ 2

【0175】

塩化ノナノイル (0.333 mL) のベンゼン (10 mL) 中溶液を、化合物 17b (0.75 g) および トリエチルアミン (0.92 mL) および DMAP (20 mg) のベンゼン (20 mL) 中溶液に室温で加えた。混合物を室温で一晩撹拌した。MeOH (1 mL) を加え、混合物を継続して 2 時間撹拌した。シリカゲルのパッドを介して反応混合物を濾過した。濾液の濃縮により、所望の生成物 (17c) を黄色の油状物質として得た (0.945 g)。

ステップ 3

【0176】

17c (0.945 g、1.33 mmol) および EtOH (25 mL) を含有するフラスコに、p - トルエンスルホン酸水和物 (1.33 mmol、253 mg) を室温で加えた。生成した混合物を室温で一晩撹拌した。反応混合物を 85 で 2 時間加熱した。さらなる PTSA (160 mg) を加え、反応混合物を 75 で一晩継続して加熱した。混合物を濃縮した。残渣を DCM 中に溶解させ、NH₄OH 希釈溶液で洗浄した。有機相を、飽和炭酸水素ナトリウムとブラインの混合物で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。濃縮により、所望の生成物 (17d) をわずかに黄色の粘性油状物質として得た (0.799 g、1.47 mmol)。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (DCM 中 0 ~ 15 % メタノールと微量の トリエチルアミン (triethylamine)) により精製した。これによって 17d を無色の油状物質として得た (647 mg、1.20 mmol、90%)。

ステップ 4

【0177】

17d (216 mg、0.40 mmol)、2 - ブチルオクタン酸 (5 当量、2 mmol、401 mg)、および 4 - ジメチルアミノピリジン (DMAP) (5.5 当量、2.2 mmol、269 mg) のジクロロメタン (20 mL) 中溶液に、DCC (5.5 当量、2.2 mmol、454 mg) を加えた。4 日にわたり撹拌した後、3 mL の MeOH を加えた。混合物をもう 16 時間継続して撹拌した。混合物を濾過し、濾液を濃縮乾固させた。粗生成物をシリカゲル上での重力カラムクロマトグラフィー (DCM 中 MeOH、0 ~ 6 %) により精製した。これによって、所望の化合物 (17) をわずかに黄色の油状物質として得た (無色の油状物質、175 mg、0.19 mmol、48%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 4.07, 4.06 (2 組の三重線, 6.7 Hz, 4H), 3.64 (五重線類似, 6.8 Hz, 1H), 3.21 -

10

20

30

40

50

3.09 (2組の多重線, 2H), 3.00 - 2.37 (br, 6H), 2.36 - 2.20 (m, 6H), 2.05 - 1.85 (m, 2H), 1.79 - 1.53 (m, 10H), 1.52 - 1.39 (m, 8H), 1.37 - 1.03 (58H), 0.91 - 0.86 (m, 15H).

(実施例19)

化合物36の合成

【0178】

化合物36を一般的手順Cに従い調製して、156mgの無色の油状物質を生成した(0.15mmol、最終ステップに対して38%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 4.07 (三重線, 6.7 Hz, 4H), 3.65 (五重線類似, 6.8 Hz, 1H), 3.21 (t類似, 6.8 Hz, 2H), 3.10 - 3.03 (br, 2H), 2.79, 2.78 (2組の一重線, 6H), 2.35 - 2.28 (m, 4H), 2.09 (五重線類似, 7.5 Hz, 2H), 1.67 - 1.54 (m, 10H), 1.54 - 1.38 (m, 8H), 1.38 - 1.03 (74H), 0.91 - 0.86 (m, 15H).

10

(実施例20)

化合物37の合成

【0179】

化合物37を一般的手順Aに従い調製して、397mgの無色の油状物質を生成した(0.49mmol、2ステップに対する全収率60%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 5.43 - 5.30 (m, 8H), 4.13 (q, 7.1 Hz, 2H), 4.56 - 4.34 (br, 0.3H), 3.63 (五重線類似, 6.9 Hz, 0.7H), 3.15 - 3.08 (m, 2H), 2.78 (t類似, 6.4 Hz, 4H), 2.39 - 2.21 (m, 12H), 2.06 (q類似, 6.9 Hz, 8H), 1.79 - 1.55 (m, 6H), 1.50 - 1.40 (m, 4H), 1.40 - 1.15 (m, 45H), 0.90 (t類似, 6.8 Hz, 6H).

20

(実施例21)

化合物38の合成

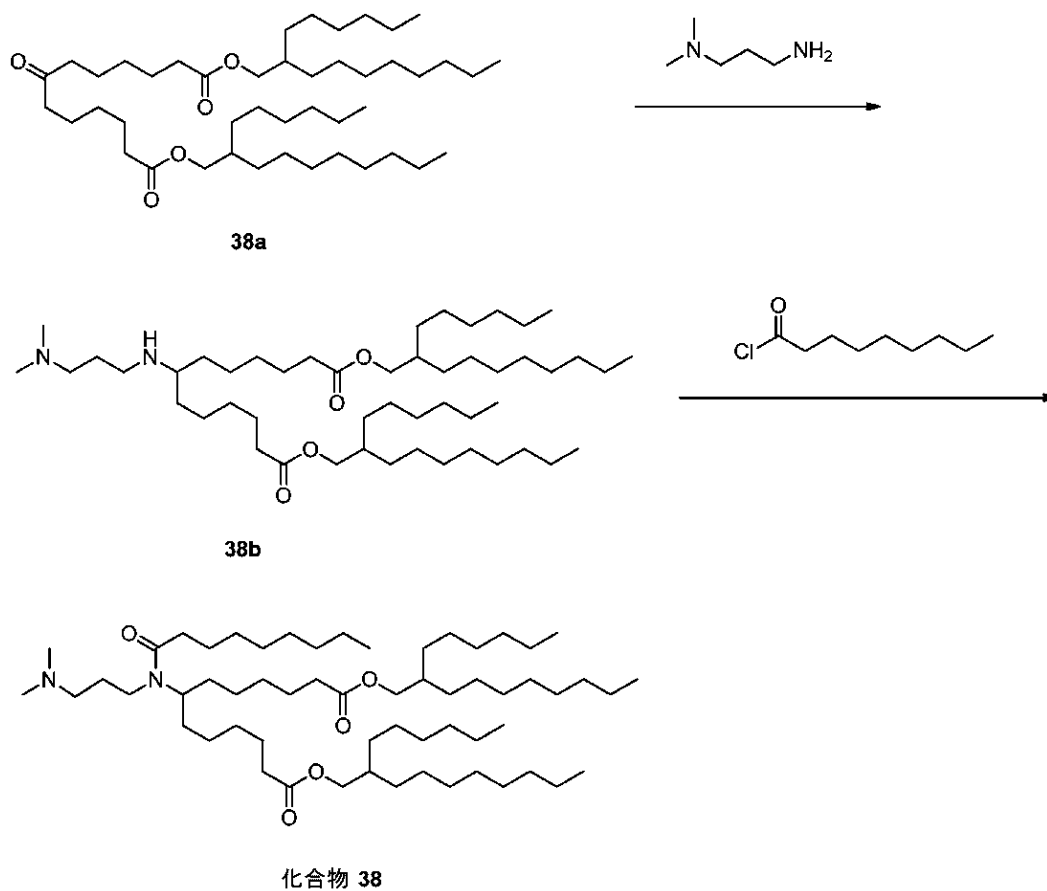
化合物38を方法Aに従い以下の通り調製した：

30

40

50

【化 17】



10

20

ステップ 1

【0180】

38a (1当量、1.266 g、1.79 mmol) の DCE (15 mL) 中溶液に、3-ジメチルアミノ-1-プロピルアミン (1当量、1.79 mmol、183 mg、2.25 μ L) を加え、これに続いて、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (1.4当量、2.51 mmol、531 mg) および AcOH (1当量、1.79 mmol、107 mg、101 μ L) を加えた。混合物を Ar 雰囲気下、室温で3日間撹拌した。

30

【0181】

残渣をヘキサン-EtOAc (9:1、150 mL) で希釈し、NaOH 希釈溶液 (0.12 N、100 mL)、飽和 NaHCO₃、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。シリカゲルのパッドを介して、有機相を濾過した。パッドを、ヘキサンと EtOAc (9:1) の混合物 200 mL で洗浄した。次いでパッドを DCM/MeOH/Et₃N (85:15:1) の混合物 200 mL で洗浄した。DCM/MeOH/Et₃N 洗浄液を濃縮し、高真空ラインで乾燥させて、所望の生成物 (38b) を無色の油状物質として得た (1.1 g、1.38 mmol、77%)。

40

ステップ 2

【0182】

塩化ノナノイル (1.5当量、0.68 mmol、120 mg) のベンゼン (5 mL) 中溶液を、38b (0.45 mmol、360 mg) およびトリエチルアミン (5当量、2.25 mmol、228 mg、314 μ L) および DMAP (10 mg) のベンゼン (10 mL) 中溶液に、Ar 下、室温で2分間加えた。添加後、混合物を室温で一晩撹拌した。MeOH (1 mL) を加え、混合物を継続して2時間撹拌した。シリカゲルのパッドを介して粗生成物を濾過した。濾液を濃縮した。残渣 (457 mg) を、シリカゲル上での

50

フラッシュカラムクロマトグラフィー（２３０～４００メッシュシリカゲル、４０ｇ、クロロホルム中MeOH、０～４．６％）により精製した。これによって、所望の生成物（３８）を無色の油状物質として得た（４１０mg、０．４４mmol、９８％）。¹H NMR（４００ MHz，CDCl₃）：４．６１－４．３５（br，推定０．４H，アミド結合の周りでの遅い異性化のため），３．９７４，３．９６４（２組の二重線，５．７ Hz，４H），３．６４（五重線類似，７．０ Hz，０．６H），３．１４－３．０８（m，２H），２．３４－２．２５（m，８H），２．２３（広幅なs，６H），１．７７－１．５８（m，１０H），１．５３－１．３９（m，４H），１．３７－１．１５（６６H），０．９２－０．８６（m，１５H）。

10

（実施例２２）

化合物３９の合成

【０１８３】

化合物３９を一般的手順Aに従い調製して、３７０mgの無色の油状物質を生成した（０．４０mmol、２ステップに対する全収率６９％）。¹H NMR（４００ MHz，CDCl₃）：４．６１－４．３５（br，推定０．４H，アミド結合の周りでの遅い異性化のため），３．９７４，３．９６４（２組の二重線，５．７ Hz，４H），３．６４（五重線類似，７．０ Hz，０．６H），３．１４－３．０８（m，２H），２．３４－２．２５（m，８H），２．２３０，２．２２１（２組の一重線，６H），１．７５－１．５８（m，１０H），１．５１－１．３９（m，４H），１．３７－１．１５（６４H），０．９２－０．８６（m，１５H）。

20

（実施例２３）

化合物４０の合成

【０１８４】

化合物４０を一般的手順Aに従い調製して、３８２mgの無色の油状物質を生成した（０．３９mmol、２ステップに対する全収率６８％）。¹H NMR（４００ MHz，CDCl₃）：４．６０－４．３５（br，推定０．３H，アミド結合の周りでの遅い異性化のため），４．１３（q，７．２ Hz，２H），３．９７３，３．９６４（２組の二重線，５．７ Hz，４H），３．６３（五重線類似，７．０ Hz，０．７H），３．１４－３．０８（m，２H），２．３４－２．２５（m，１０H），２．２２９，２．２２０（２組の一重線，６H），１．７５－１．５８（m，１２H），１．５１－１．３９（m，４H），１．３７－１．１５（６４H），０．８９（t類似，７．８ Hz，１２H）。

30

（実施例２４）

化合物４１の合成

【０１８５】

化合物４１を一般的手順Aに従い調製して、３０９mgの無色の油状物質を生成した（０．３０mmol、２ステップに対する全収率７３％）。¹H NMR（４００ MHz，CDCl₃）：４．６０－４．３５（br，推定０．３H，アミド結合の周りでの遅い異性化のため），３．９７２，３．９６２（２組の二重線，５．７ Hz，４H），３．６４（五重線類似，７．１ Hz，０．７H），３．１４－３．０８（m，２H），２．３４－２．２５（m，８H），２．２３，２．２２（２組の一重線，６H），１．７５－１．５８（m，１０H），１．５１－１．３９（m，４H），１．３５－１．２１（８２H），０．９２－０．８６（m，１５H）。

40

（実施例２５）

化合物４２の合成

【０１８６】

化合物４２を一般的手順Aに従い調製して、２３５mgの無色の油状物質を生成した（０

50

． 23 mmol、2ステップに対する全収率56%）。¹H NMR（400 MHz，CDCl₃）：4.75 - 4.49（br.，推定0.4 H，アミド結合の周りでの遅い異性化のため），3.97，3.96（2組の二重線，5.3 Hz，4 H），3.72（五重線類似，7 Hz，0.6 H），3.21 - 3.05（m，2 H），2.53，2.42（2組の五重線類似，6.6 Hz，積分比が約1：1.7，1 H），2.32 - 2.25（m，6 H），2.24，2.22（2組の一重線，6 H），1.78 - 1.56（m，10 H），1.53 - 1.39（m，6 H），1.38 - 1.17（7.6 H），0.93 - 0.85（m，1.8 H）。

（実施例26）

10

化合物43の合成

【0187】

化合物43を一般的手順Cに従い調製して、187 mgの無色の油状物質を生成した（0.23 mmol、最終ステップに対して57%）。¹H NMR（400 MHz，CDCl₃）：4.077，4.071（2組の三重線，6.7 Hz，4 H），4.56 - 4.34（br. 0.3 H），3.64（五重線類似，6.9 Hz，0.7 H），3.15 - 3.09（m，2 H），2.34 - 2.24（m，6 H），2.234 - 2.224（2組の一重線，6 H），1.76 - 1.58（m，10 H），1.55 - 1.39（m，8 H），1.39 - 1.10（4.8 H），0.92 - 0.86（m，1.5 H）。

20

（実施例27）

化合物44の合成

【0188】

化合物44を一般的手順Aに従い調製して、260 mgの無色の油状物質を生成した（0.22 mmol、2ステップに対する全収率53%）。¹H NMR（400 MHz，CDCl₃）：4.59 - 4.35（br.，推定0.3 H，アミド結合の周りでの遅い異性化のため），4.03 - 3.95（m，6 H），3.63（五重線類似，6.9 Hz，0.7 H），3.14 - 3.08（m，2 H），2.33 - 2.24（m，10 H），2.229，2.221（2組の一重線，6 H），1.75 - 1.57（m，12 H），1.51 - 1.40（m，4 H），1.40 - 1.08（8.7 H），0.92 - 0.86（m，1.8 H）。

30

（実施例28）

脂質ナノ粒子組成物を使用したルシフェラーゼmRNAの*in vivo*評価

【0189】

カチオン性脂質（MC3）、DSPC、コレステロールおよびPEG-脂質を、50：10：38.5：1.5のモル比で、エタノール中で可溶化した。脂質ナノ粒子（LNP）を、全脂質のmRNAに対する重量比約10：1～30：1で調製した。簡単に説明すると、10～50 mMのクエン酸塩緩衝剤中で、pH4で、mRNAを0.2 mg/mLに希釈した。シリンジポンプを使用して、15 mL/分より上の全流速で、エタノール性脂質溶液とmRNA水溶液を約1：5～1：3（vol/vol）の比で混合した。次いで、エタノールを除去し、外部の緩衝剤を透析によりPBSに置き換えた。最後に、脂質ナノ粒を、0.2 μm細孔の無菌フィルターを介して濾過した。脂質ナノ粒子の粒径は、Nicomp 370サブミクロン粒度計（Santa Barbara, CA）を使用した準弾性光散乱により判定した場合、直径70～90 nmであった。

40

【0190】

動物実験委員会（institutional animal care committee（ACC））およびカナダ動物管理協会（Canadian Council on Animal Care（CCAC））により確立されたガイドラインに従い、6～8週齢の雌のC57BL/6マウス（Charles River）において研究を実施した。異なる用量のmRNA-脂質ナノ粒子を尾静脈注射により全身投与し、投与後特定の時

50

点で（１、２、４、８および２４時間）動物を安楽死させた。肝臓および脾臓を、予め計量した管内に採取し、重量を判定し、液体窒素中で直ちに瞬間凍結し、分析用の処理が行われるまで - 80 で保存した。

【 0 1 9 1 】

肝臓に関して、約 50 mg を分析用に切開し、2 mL の Fast Prep 管（MP Biomedicals、Solon OH）内に入れた。1 / 4 インチのセラミック球（MP Biomedicals）を各管に加え、室温に平衡化させた 500 μ L の Glo 溶解緩衝剤 - GLB（Promega、Madison WI）を肝臓組織に加えた。Fast Prep 24 装置（MP Biomedicals）を、2 x 6.0 m / 秒で 15 秒間用いて、肝臓組織をホモジナイズした。ホモジネートを室温で 5 分間インキュベートしてから、GLB 中で 1 : 4 希釈し、Steady Glo Luciferase アッセイ系（Promega）を使用して評価した。具体的に、50 μ L の希釈された組織ホモジネートを 50 μ L の Steady Glo 基質と反応させ、10 秒間振盪させ、これに続いて 5 分間のインキュベーションを行い、次いで、Centro XS³ LB 960 照度計（Berthold Technologies、Germany）を使用して定量化した。アッセイしたタンパク質の量を BCA タンパク質アッセイキット（Pierce、Rockford IL）を使用して決定した。次いで、相対発光単位（RLU）をアッセイした全タンパク質（ μ g）に正規化した。RLU をルシフェラーゼ（ng）に変換するため、Quantilum Recombinant Luciferase（Promega）を用いて検量線を作成した。図 1 に提供されているデータに基づき、4 時間の時点が脂質製剤の効力評価用に選択された（実施例 29 を参照されたい）。

【 0 1 9 2 】

Trilink Biotechnologies 製 FLuc mRNA（L - 6107）は、もともとホタル、Photinus pyralis から単離したルシフェラーゼタンパク質を発現する。FLuc は、遺伝子発現と細胞生存度の両方を測定するために、哺乳動物細胞培養物に一般的に使用される。これは、基質、ルシフェリンの存在下で生物発光を発光する。このキャッピングおよびポリアデニル化された mRNA は、5 - メチルシチジンおよびプソイドウリジンで完全に置換されている。

（実施例 29）

in vivo で、ルシフェラーゼ mRNA 発現げっ歯類モデルを使用する、様々なカチオン性脂質を含有する脂質ナノ粒子製剤の効力の判定

【 0 1 9 3 】

表 2 に示されているカチオン性脂質は、以前核酸を用いて試験を行った。比較目的のため、これらの脂質を使用して、実施例 28 およびその全体が参照により本明細書に組み込まれている PCT / US 10 / 22614 に記載されているような株混合法を使用して、FLuc mRNA（L - 6107）を含有する脂質ナノ粒子もまた製剤化した。脂質ナノ粒子は、以下のモル比：50 % カチオン性脂質 / 10 % ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC） / 38.5 % コレステロール / 1.5 % PEG 脂質（「PEG - DMG」、すなわち、（1 - （モノメトキシ - ポリエチレングリコール） - 2,3 - ジミリスチルグリセロール、平均 PEG 分子量 2000）を使用して製剤化した。実施例 28 に記載の通り尾静脈注射を介した投与の 4 時間後、肝臓内のルシフェラーゼ発現を測定することによって、相対活性を決定した。0.3 および 1.0 mg の mRNA / kg の用量での活性を比較し、実施例 28 に記載の通り、投与の 4 時間後に測定したルシフェラーゼ（ng） / 肝臓（g）として表現した。

10

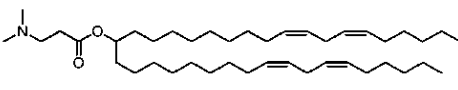
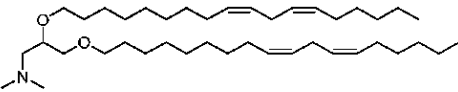
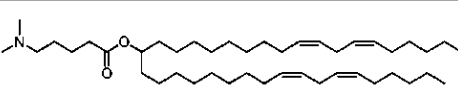
20

30

40

【表 2 - 1】

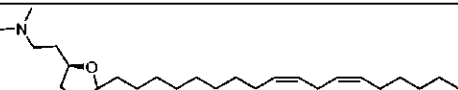
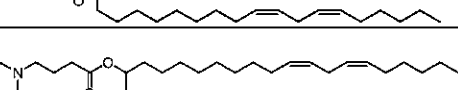
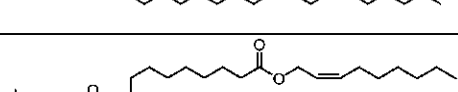
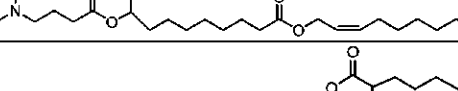
表2
mRNAで活性を示す脂質

化合物	肝臓 Luc @ 0.3mg/kg の用量	肝臓 Luc @ 1.0mg/kg の用量	構造
MC2	4 ± 1	N/D	
DLinDMA	13 ± 3	67 ± 20	
MC4	41 ± 10	N/D	

10

【表 2 - 2】

20

化合物	肝臓 Luc @ 0.3mg/kg の用量	肝臓 Luc @ 1.0mg/kg の用量	構造
XTC2	80 ± 28	237 ± 99	
MC3	198 ± 126	757 ± 528	
319 (2% PEG)	258 ± 67	681 ± 203	
137	281 ± 203	588 ± 303	

30

【0194】

40

本発明の新規の脂質および表3に示されている、選択された比較対照の脂質を、以下のモル比：50%カチオン性脂質 / 10%ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC) / 38.5%コレステロール / 1.5%PEG脂質(「PEG-DMA」2-[2-(メトキシ(ポリエチレングリコール2000)エトキシ)]-N,N-ジテトラデシルアセトアミド)を使用して製剤化した。実施例28に記載の通り尾静脈注射を介した投与の4時間後、肝臓内のルシフェラーゼ発現を測定することによって、相対活性を決定した。0.3および1.0mgのmRNA/kgの用量での活性を比較し、実施例28に記載の通り、投与の4時間後に測定したルシフェラーゼ(ng)/肝臓(g)として表現した。選択されたデータのプロットが図3に示されている(上から下へ：丸=化合物10；三角

50

形 = 化合物 6 ; 正方形 = M C 3) 。
【表 3 - 1 】

表3
例示的カチオン性脂質および比較対照の脂質

No.	pK _a	肝臓 Luc @ 0.3mg/kg (luc(ng)/ 肝臓(g))	肝臓 Luc @ 1.0mg/kg (luc(ng)/ 肝臓(g))	構造
MC3	6.09	603 ± 150	2876 ± 622	
A	7.05	*	*	
B	6.17	95 ± 41	1131 ± 384	
C	6.36	24 ± 4	77 ± 19	
1	5.64	54 ± 8	226 ± 20	
5	6.27	603 ± 167	3640 ± 601	
6	6.14	19 ± 4	211 ± 119	
7	5.93	833 ± 401	8859 ± 780	
8	5.35	105 ± 98	1238 ± 153	

10

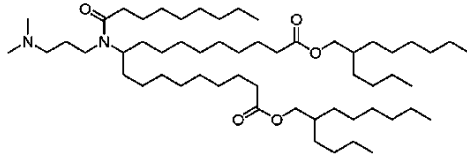
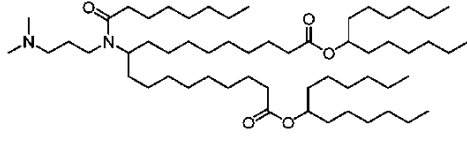
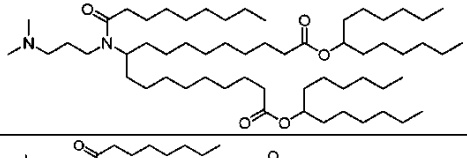
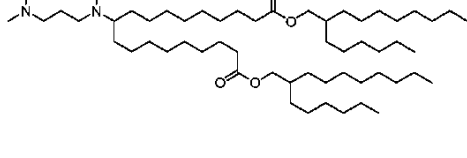
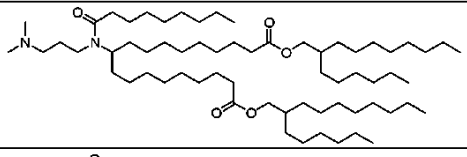
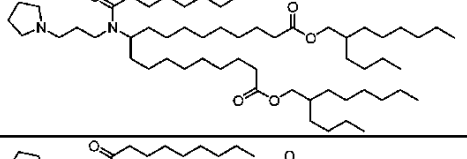
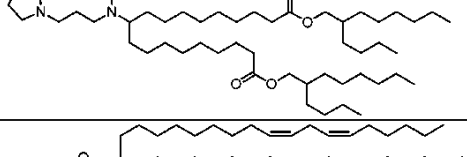
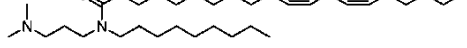
20

30

40

50

【表 3 - 2】

No.	pK _a	肝臓 Luc @ 0.3mg/kg (luc(ng)/ 肝臓(g))	肝臓 Luc @ 1.0mg/kg (luc(ng)/ 肝臓(g))	構造
9	6.27	2381 ± 1162	17157 ± 2470	
10	6.16	2379 ± 93	26181 ± 2900	
11	6.13	2273 ± 294	16502 ± 4301	
12	6.21	3336 ± 1394	13577 ± 1948	
13	6.22	1537 ± 777	10907 ± 2032	
14	6.33	2851 ± 438	15445 ± 3693	
15	6.32	2708 ± 924	15930 ± 4711	
16	6.37	231 ± 100	1185 ± 838	

10

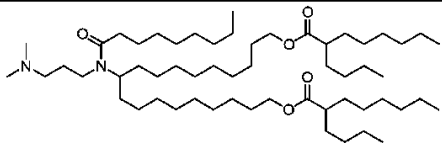
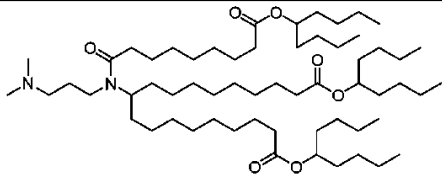
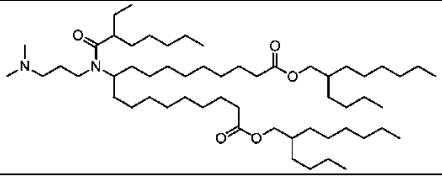
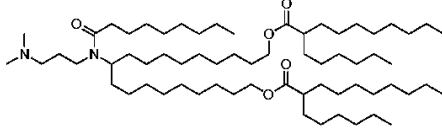
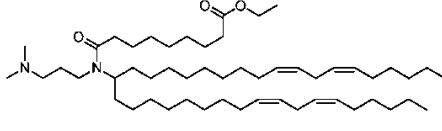
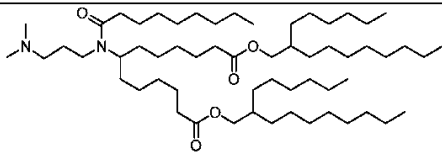
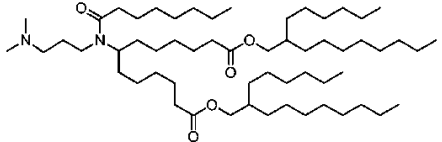
20

30

40

50

【表 3 - 3】

No.	pK _a	肝臓 Luc @ 0.3mg/kg (luc(ng)/ 肝臓(g))	肝臓 Luc @ 1.0mg/kg (luc(ng)/ 肝臓(g))	構造
17	6.29	837 ± 260	6703 ± 689	
24	6.14	1120 ± 376	7425 ± 2810	
35	5.97	1083 ± 350	8554 ± 4587	
36	6.13	541 ± 91	4736 ± 980	
37	5.61	*	*	
38	6.45	905 ± 443	5353 ± 2082	
39	6.45	779 ± 82	5180 ± 2116	

10

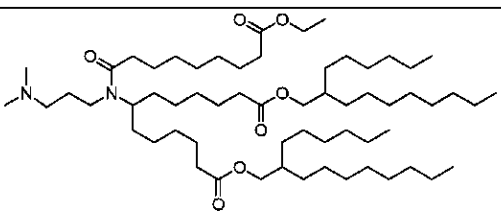
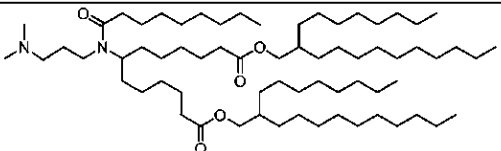
20

30

40

50

【表 3 - 4】

No.	pK _a	肝臓 Luc @ 0.3mg/kg (luc(ng)/ 肝臓(g))	肝臓 Luc @ 1.0mg/kg (luc(ng)/ 肝臓(g))	構造
40	6.57	753 ± 156	2203 ± 1555	
41	ND [†]	832 ± 298	7437 ± 1612	

* 試験していない; pK_aが範囲外

† 未確定

【 0 1 9 5 】

(実施例 3 0)

製剤化した脂質の p K a の判定

【 0 1 9 6 】

他の箇所に記載されているように、製剤化したカチオン性脂質の p K a は、核酸の送達のための L N P の有効性と相関する (J a y a r a m a n ら、A n g e w a n d t e C h e m i e、I n t e r n a t i o n a l E d i t i o n (2 0 1 2 年)、5 1 巻 (3 4 号)、8 5 2 9 ~ 8 5 3 3 頁; S e m p l e ら、N a t u r e B i o t e c h n o l o g y、2 8 巻、1 7 2 ~ 1 7 6 頁 (2 0 1 0 年) を参照されたい)。p K a の好ましい範囲は約 5 ~ 約 7 である。2 - (p - トルイジノ) - 6 - ナフタレンスルホン酸 (T N S) の蛍光に基づくアッセイを使用して、各カチオン性脂質の p K a を脂質ナノ粒子において決定した。P B S 中に、カチオン性脂質 / D S P C / コレステロール / P E G - 脂質 (5 0 / 1 0 / 3 8 . 5 / 1 . 5 m o l %) を総脂質濃度 0 . 4 m M で含む脂質ナノ粒子を、実施例 2 8 に記載されているようなインラインプロセスを使用して調製した。T N S は、蒸留水中 1 0 0 μ ストック溶液として調製した。1 0 m M H E P E S、1 0 m M M E S、1 0 m M 酢酸アンモニウム、1 3 0 m M N a C l (この p H は 2 . 5 ~ 1 1 の範囲である) を含有する 2 m L の緩衝液中で、ベシクルを 2 4 μ の脂質に希釈した。アリコート of T N S 溶液を加えて、最終濃度を 1 μ にし、ボルテックス混合した後、3 2 1 n m および 4 4 5 n m の励起および発光波長を使用する、S L M A m i n c o S e r i e s 2 L u m i n e s c e n c e S p e c t r o p h o t o m e t e r で、室温で蛍光強度を測定した。シグモイドのベストフィット分析を蛍光データに適用し、最大半量の蛍光強度を引き起こす p H として p K a を測定した (図 2 を参照されたい)。

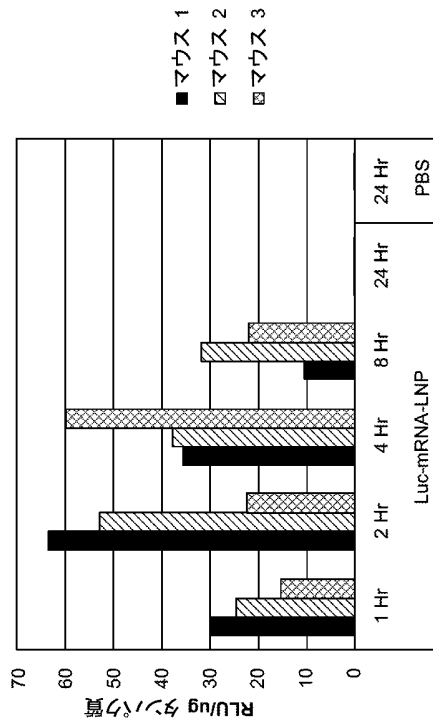
【 0 1 9 7 】

上に記載の様々な実施形態は、組み合わせて、さらなる実施形態を提供することができる。2 0 1 5 年 6 月 2 9 日に出願した米国仮特許出願第 6 2 / 1 8 6 , 2 1 0 号を含めて、本明細書に参照された、および / または出願データシートに列挙された米国特許、米国特許出願公報、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許公報のすべては、これらの全体が参照により本明細書に組み込まれている。実施形態の態様は、必要に応じて修正して、様々な特許、出願および公報の概念を利用し、またさらなる実施形態を提供する

ことができる。これらおよび他の変更は、上記に詳述された記載を考慮して実施形態に行うことができる。一般的に、以下の特許請求の範囲において、使用された用語は、特許請求の範囲を、本明細書および特許請求の範囲で開示された特定の実施形態に限定するものと解釈されるべきではなく、このような特許請求の範囲の権利が与えられている同等物の全範囲と共に、すべての可能な実施形態を含むものと解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は、本開示により限定されない。

【図面】

【図 1】



【図 2】

FIG. 1

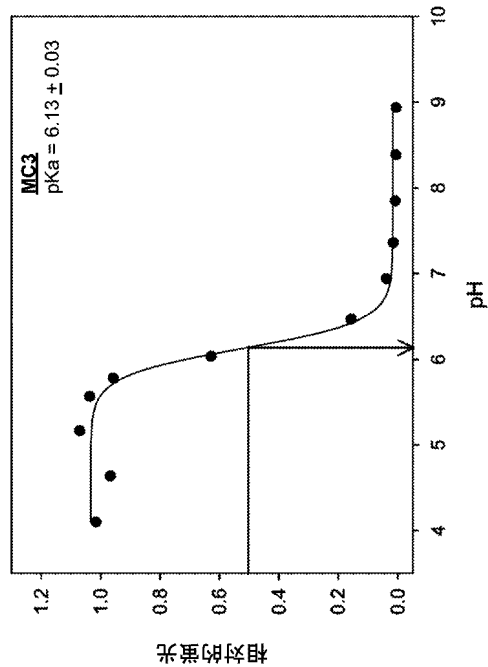


FIG. 2

10

20

30

40

50

【図 3】

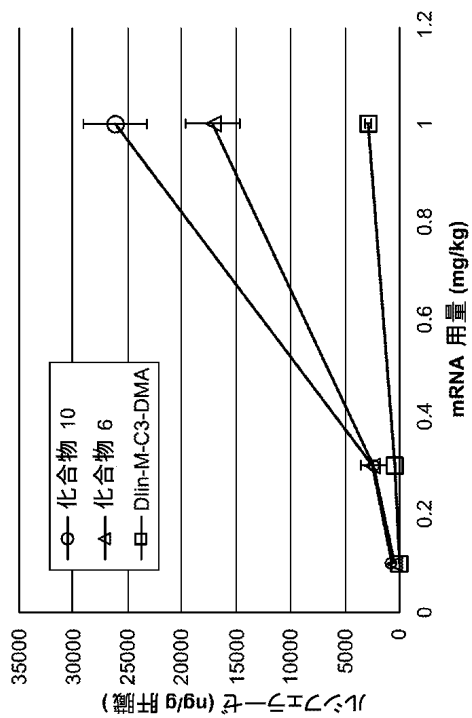


FIG. 3

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105
A 6 1 K	9/127(2006.01)	A 6 1 K	9/127
A 6 1 K	47/18 (2006.01)	A 6 1 K	47/18
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00

イッシュ コロンビア , リッチモンド , スノードン アベニュー 9 8 5 0

(72)発明者 アンセル , スティーブン エム .

カナダ国 ブイ 6 ジェイ 1 ダブリュー 5 プリティッシュ コロンビア , バンクーバー , ウェスト
8 ティーエイチ アベニュー 2 0 1 0 - 2 0 1

審査官 奥谷 暢子

(56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 2 7 8 5 6 (J P , A)

特表 2 0 1 8 - 5 2 6 3 2 1 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 C

A 6 1 K

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)