

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5749494号
(P5749494)

(45) 発行日 平成27年7月15日 (2015. 7. 15)

(24) 登録日 平成27年5月22日 (2015. 5. 22)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 317/28 (2006. 01)
 A 6 1 K 47/22 (2006. 01)
 A 6 1 K 48/00 (2006. 01)
 A 6 1 K 31/7105 (2006. 01)
 A 6 1 K 39/00 (2006. 01)

C O 7 D 317/28 C S P
 A 6 1 K 47/22 Z N A
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 31/7105
 A 6 1 K 39/00 G

請求項の数 24 (全 117 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-541545 (P2010-541545)
 (86) (22) 出願日 平成20年12月31日 (2008. 12. 31)
 (65) 公表番号 特表2011-509258 (P2011-509258A)
 (43) 公表日 平成23年3月24日 (2011. 3. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/088676
 (87) 国際公開番号 W02009/086558
 (87) 国際公開日 平成21年7月9日 (2009. 7. 9)
 審査請求日 平成23年11月18日 (2011. 11. 18)
 (31) 優先権主張番号 61/018, 616
 (32) 優先日 平成20年1月2日 (2008. 1. 2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/018, 627
 (32) 優先日 平成20年1月2日 (2008. 1. 2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 510184830
 テクミラ ファーマシューティカルズ コ
 ーポレーション
 カナダ国 ブイ5ジェイ 5ジェイ8 ブ
 リティッシュ コロンビア, パーナビー
 , グレンリオン パークウェイ 890
 O
 (73) 特許権者 502087932
 ザ ユニヴァーシティ オブ ブリティッ
 シュ コロンビア
 カナダ国 ブイ6ティー 1ゼット3 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 103-619
 O

最終頁に続く

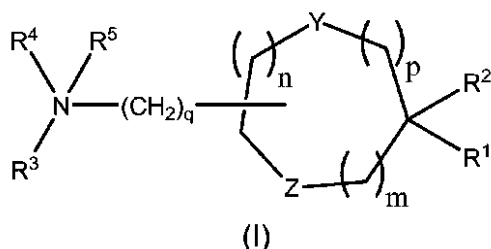
(54) 【発明の名称】 核酸の送達のための改善された組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の構造 (I) :

【化 7 2】



を有するアミノ脂質であって、ここで、

R^1 および R^2 は、同じであるか、または異なり、そして独立して、必要に応じて置換される $C_{12} - C_{24}$ アルケニル、必要に応じて置換される $C_{12} - C_{24}$ アルキニルまたは必要に応じて置換される $C_{12} - C_{24}$ アシルであり；

R^3 および R^4 は、同じであるか、もしくは異なり、そして独立して、必要に応じて置換される $C_1 - C_6$ アルキル、必要に応じて置換される $C_1 - C_6$ アルケニルもしくは必要に応じて置換される $C_1 - C_6$ アルキニルであるか、または R^3 および R^4 は、結合する

ことにより、4 から 6 個の炭素原子、ならびに窒素および酸素から選択される 1 または 2 個のヘテロ原子の必要に応じて置換される複素環式環を形成し得；

R⁵ は、存在しないか、または存在し、存在するときは、水素または C₁ - C₆ アルキルであり；

m、n および p は、同じであるか、または異なり、独立して 0 または 1 であるが、但し、m、n および p は、同時に 0 ではなく；

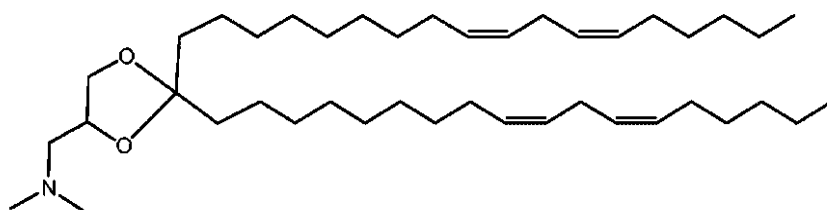
q は、0、1、2、3 または 4 であり；そして

Y および Z は、同じであるか、または異なり、独立して O、S または NH である、アミノ脂質。

【請求項 2】

以下の構造：

【化 7 3】



を有する、請求項 1 に記載のアミノ脂質。

【請求項 3】

請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載のアミノ脂質を含む脂質粒子。

【請求項 4】

請求項 2 に記載のアミノ脂質を含む、請求項 3 に記載の脂質粒子。

【請求項 5】

中性脂質および粒子凝集を減少させることができる脂質をさらに含む、請求項 3 に記載の脂質粒子。

【請求項 6】

20 ~ 60 % DLin - K - DMA : 5 ~ 25 % 中性脂質 : 25 ~ 55 % Chol : 0 . 5 ~ 15 % PEG - S - DMG、PEG - C - DOMG または PEG - DMA のモル比で

：

(i) DLin - K - DMA ；

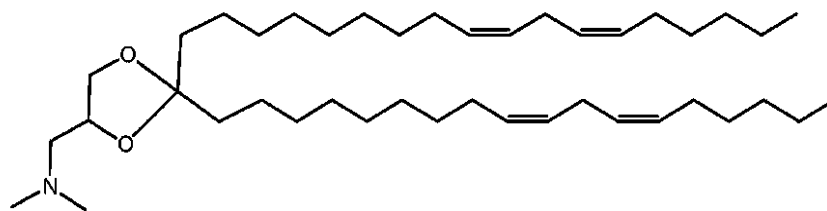
(ii) ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC)、1, 2 - ジオレオイル - sn - 3 - ホスホエタノールアミン (DOPE) およびスフィンゴミエリン (SM) から選択される中性脂質；

(iii) コレステロール；および

(iv) PEG - S - DMG、PEG - C - DOMG または PEG - DMA

から本質的になる、請求項 5 に記載の脂質粒子であって、ここで、該 DLin - K - DMA は、以下の式

【化 4】



DLin-K-DMA.

10

20

30

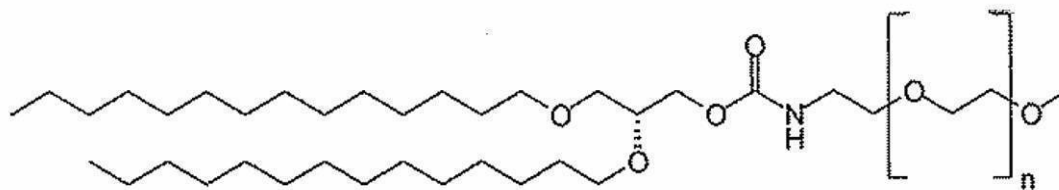
40

50

を有し、

該 PEG - C - DOMG は、以下の式：

【化 4 A】

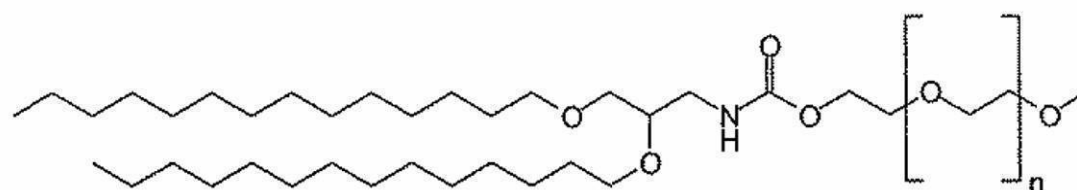


10

を有し、

該 PEG - DMA は、以下の式：

【化 4 B】

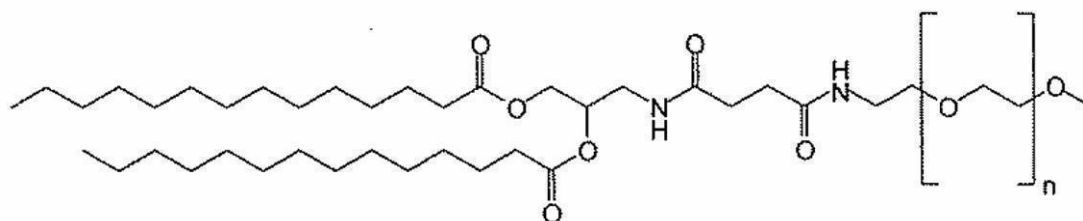


20

を有し、

該 PEG - S - DMG は、以下の式：

【化 4 C】



30

を有する、

脂質粒子。

【請求項 7】

2.0 ~ 6.0 % アミノ脂質：5 ~ 2.5 % 中性脂質：2.5 ~ 5.5 % コレステロール：0.5 ~ 1.5 % PEG - C - DOMG のモル比で：

40

(i) 1つ以上のアミノ脂質；

(ii) DSPC、POPC、DOPE および SM から選択される 1つ以上の中性脂質；

(iii) コレステロール；および

(iv) PEG - C - DOMG

を含む、脂質粒子であって、該アミノ脂質が、請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載のアミノ脂質である、脂質粒子。

【請求項 8】

治療剤をさらに含む、請求項 3 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の脂質粒子。

【請求項 9】

前記治療剤が、核酸である、請求項 8 に記載の脂質粒子。

50

【請求項 10】

前記核酸が、プラスミドである、請求項 9 に記載の脂質粒子。

【請求項 11】

前記核酸が、免疫賦活性オリゴヌクレオチドである、請求項 9 に記載の脂質粒子。

【請求項 12】

前記核酸が：s i R N A、マイクロ R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイムからなる群から選択される、請求項 9 に記載の脂質粒子。

【請求項 13】

前記核酸が、s i R N Aである、請求項 12 に記載の脂質粒子。

【請求項 14】

請求項 8 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の脂質粒子および薬学的に許容可能な賦形剤、キャリアまたは希釈剤を含む、薬学的組成物。

【請求項 15】

細胞によるポリペプチドの発現を調節するための組成物であって、請求項 8 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の脂質粒子を含む、組成物。

【請求項 16】

前記治療剤が、s i R N A、マイクロ R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A、マイクロ R N A およびアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択され、ここで、該 s i R N A、マイクロ R N A またはアンチセンス R N A が、前記ポリペプチドの発現を低下させるように、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的に結合するポリヌクレオチドまたはその相補物を含む、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記核酸が、前記ポリペプチドまたはその機能的なバリエーションもしくはフラグメントの発現を増加させるような、該ポリペプチドまたはその機能的なバリエーションもしくはフラグメントをコードするプラスミドである、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 18】

被験体におけるポリペプチドの過剰発現を特徴とする疾患または障害を処置するための請求項 14 に記載の薬学的組成物であって、ここで、前記治療剤は、s i R N A、マイクロ R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A、マイクロ R N A およびアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択され、ここで、該 s i R N A、マイクロ R N A またはアンチセンス R N A は、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的に結合するポリヌクレオチドまたはその相補物を含む、薬学的組成物。

【請求項 19】

被験体におけるポリペプチドの過小発現を特徴とする疾患または障害を処置するための請求項 14 に記載の薬学的組成物であって、ここで、前記治療剤は、該ポリペプチドまたはその機能的なバリエーションもしくはフラグメントをコードするプラスミドである、薬学的組成物。

【請求項 20】

被験体において免疫応答を誘導するための請求項 14 に記載の薬学的組成物であって、ここで、前記治療剤は、免疫賦活性オリゴヌクレオチドである、薬学的組成物。

【請求項 21】

前記薬学的組成物が、ワクチンまたは抗原と併用して前記被験体に提供されるものであることを特徴とする、請求項 20 に記載の薬学的組成物。

【請求項 22】

請求項 11 に記載の脂質粒子および疾患または病原体に関連する抗原を含むワクチン。

【請求項 23】

前記抗原が、腫瘍抗原である、請求項 22 に記載のワクチン。

【請求項 24】

10

20

30

40

50

前記抗原が、ウイルス抗原、細菌抗原または寄生生物抗原である、請求項 22 に記載のワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連する出願への相互参照)

本願は、2008年1月2日に出願された米国仮特許出願第61/018,616号、2008年1月2日に出願された米国仮特許出願第61/018,627号、2008年3月26日に出願された米国仮特許出願第61/039,748号、および2008年5月1日に出願された米国仮特許出願第61/049,568号の利益を、米国特許法§ 119(e)のもとに主張する。これら(4つ)の仮特許出願は、それらの全体が、参考により本明細書中に援用される。

【0002】

(配列表に関する申告)

本願に関連する配列表は、紙の写しの代わりにテキストファイルフォーマットで提供され、そして本明細書中に参考により援用される。その配列表を含むテキストファイルの名称は、480208__457PC__SEQUENCE__LISTING.txtである。そのテキストファイルは、8KBであり、2008年12月31日に作成され、EFS-Webを介して電子的に出願されている。

【0003】

背景

技術分野

本発明は、脂質粒子を用いる治療剤送達分野に関する。特に、本発明は、陽イオン性脂質、およびこれらの脂質を含む脂質粒子(これらは、核酸のインビボ送達にとって有益である)ならびにインビボでの治療的な用途に適した核酸-脂質粒子組成物を提供する。さらに、本発明は、これらの組成物を調製する方法、ならびにこれらの組成物を用いて、例えば、様々な疾患状態の処置のために、核酸を細胞に導入する方法を提供する。

【背景技術】

【0004】

関連技術の説明

治療的な核酸としては、例えば、低分子干渉RNA(sRNA)、マイクロRNA(miRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、プラスミドおよび免疫刺激核酸が挙げられる。これらの核酸は、種々の機序を介して作用する。sRNAまたはmiRNAの場合、これらの核酸は、RNA干渉(RNAi)と呼ばれるプロセスを介して特定のタンパク質の細胞内レベルをダウンレギュレートし得る。sRNAまたはmiRNAを細胞質に導入した後、これらの二本鎖RNA構築物は、RISCと呼ばれるタンパク質に結合し得る。sRNAまたはmiRNAのセンス鎖は、RISC複合体からはずされ、その結合されているsRNAまたはmiRNAの配列と相補的な配列を有するmRNAを認識し得、それに結合し得る鋳型をRISC内に提供する。RISC複合体は、相補的なmRNAと結合すると、そのmRNAを切断し、切断した鎖を放出する。RNAiは、タンパク質合成のためにコードする対応するmRNAの特異的な破壊を標的化することによって、特定のタンパク質のダウンレギュレーションをもたらす得る。

【0005】

sRNAおよびmiRNA構築物が、標的タンパク質に対する任意のヌクレオチド配列を用いて合成され得るので、RNAiの治療的な用途は、極めて広い。現在までに、sRNA構築物は、インビトロとインビボの両方のモデルにおいて標的タンパク質を特異的にダウンレギュレートする能力を示している。さらに、sRNA構築物は、現在、臨床研究において評価されている。

【0006】

しかしながら、現在、sRNAまたはmiRNA構築物が直面している2つの問題は

、第1に、血漿中のヌクレアーゼ消化に対する感受性、第2に、遊離 *siRNA* または *miRNA* として全身投与されたときにそれらが *RISC* に結合し得る細胞内コンパートメントに接近する能力の限界である。これらの二本鎖構築物は、分子内の化学修飾されたヌクレオチドリンカー、例えば、ホスホチオエート基の組み込みによって安定化され得る。しかしながら、これらの化学修飾は、ヌクレアーゼ消化からの限定された保護を提供するだけであり、構築物の活性を低下させ得る。*siRNA* または *miRNA* の細胞内送達は、ポリマー、陽イオン性リボソームなどのキャリア系を使用することによって、または構築物の化学修飾、例えば、コレステロール分子の共有結合によって、促進され得る[参考文献]。しかしながら、*siRNA* および *miRNA* 分子の効力を高めるため、ならびに化学修飾の必要性を低下させるか、または排除するために、改善された送達系が必要とされている。

10

【0007】

アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイムもまた、タンパク質への *mRNA* 翻訳を阻害し得る。アンチセンス構築物の場合、これらの一本鎖デオキシ核酸は、標的タンパク質 *mRNA* の配列に対する相補的配列を有し、そしてワトソン-クリック塩基対形成によってその *mRNA* に結合し得る。この結合は、標的 *mRNA* の翻訳を妨げ、そして/または *mRNA* 転写物の *RNase H* 分解の引き金を引く。その結果として、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、作用の特異性(すなわち、特異的な疾患関連タンパク質のダウンレギュレーション)についておびただしい能力を有する。現在までに、これらの化合物は、炎症性疾患、癌および *HIV* のモデルをはじめとしたいくつかのインビトロおよびインビボのモデルにおいて見込みを示している(非特許文献1に概説されている)。アンチセンスは、染色体 *DNA* と特異的にハイブリダイズすることによって細胞活性にも影響を及ぼし得る。いくつかのアンチセンス薬物のヒトにおける高度な臨床上的評価が、現在進行中である。これらの薬物に対する標的には、*bcl2* 遺伝子およびアポリポタンパク質 *B* 遺伝子ならびに *mRNA* 産物が含まれる。

20

【0008】

免疫刺激核酸には、デオキシリボ核酸およびリボ核酸が含まれる。デオキシリボ核酸の場合、ある特定の配列またはモチーフが、哺乳動物において免疫刺激を誘発すると示されている。これらの配列またはモチーフとしては、*CpG* モチーフ、ピリミジンリッチ配列およびパ lindローム配列が挙げられる。デオキシリボ核酸における *CpG* モチーフは、エンドソームのレセプターである *tol1* 様レセプター9(*TLR-9*)(これは、その後、生得免疫刺激経路と獲得免疫刺激経路の両方の引き金を引く)によって特異的に認識されると考えられている。ある特定の免疫刺激リボ核酸配列もまた報告されている。これらの *RNA* 配列は、*tol1* 様レセプター6および7(*TLR-6* および *TLR-7*) に結合することによって、免疫の活性化の引き金を引くと考えられている。さらに、二本鎖 *RNA* は、免疫刺激性であるとも報告されており、*TLR-3* への結合を介して活性化すると考えられている。

30

【0009】

治療的な核酸の使用に伴う1つの周知の問題は、ホスホジエステルヌクレオチド間結合の安定性およびこのリンカーのヌクレアーゼに対する感受性に関するものである。血清中にエキソヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼが存在することにより、ホスホジエステルリンカーを有する核酸は迅速に消化され、それゆえ、治療的な核酸は、血清の存在下または細胞内において非常に短い半減期を有し得る(非特許文献2; および非特許文献3)。これらの問題および他の公知の問題のために、現在開発されている治療的な核酸は、天然の核酸に見られる基本的なホスホジエステル化学を使用していない。

40

【0010】

この問題は、血清または細胞内の分解を減少させる化学修飾によって部分的に克服されている。ヌクレオチド間のホスホジエステル架橋(例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネートまたはホスホルアミデート結合を用いる)、ヌクレオチド塩基(例えば、5-プロピニル-ピリミジン)または糖(例えば、2'-修飾された糖)において、修飾が

50

試験されている（非特許文献４）。他のものは、２' - 5' 糖結合を用いて安定性を改善するように試みている（例えば、米国特許第 5, 532, 130 号を参照のこと）。他の変更が試みられている。しかしながら、これらの解決策のいずれもが、完全に十分であると証明されておらず、インビボにおける遊離治療的核酸は、なおも限定的な有効性しか有していない。

【 0 0 1 1 】

さらに、s i R N A および m i R N A に関して上で述べたように、治療的核酸が細胞膜を通過する能力が限定されているという問題（非特許文献 5 を参照のこと）および全身性の毒性（例えば、補体媒介性のアナフィラキシー、凝固特性の変化および血球減少症）（非特許文献 6）に関連する問題が残っている。

10

【 0 0 1 2 】

有効性を改善するように試みるために、研究者らは、化学修飾された、または未改変の、治療的核酸を送達するために、脂質ベースのキャリア系を使用した。非特許文献 7 では、この著者らは、陰イオン性（従来の）リポソーム、pH 感受性リポソーム、免疫リポソーム、融合性リポソームおよび陽イオン性脂質 / アンチセンス凝集物の使用について言及している。同様に、s i R N A を、陽イオン性リポソーム内において全身投与しており、そしてこれらの核酸 - 脂質粒子は、非ヒト霊長類を含む哺乳動物において標的タンパク質の改善されたダウンレギュレーションをもたらすと報告されている（非特許文献 8）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

20

【 0 0 1 3 】

【非特許文献 1】A g r a w a l , T r e n d s i n B i o t e c h . 14 : 376 - 387 (1996)

【非特許文献 2】Z e l p h a t i , O . ら、A n t i s e n s e . R e s . D e v . 3 : 323 - 338 (1993)

【非特許文献 3】T h i e r r y , A . R . ら、p p 147 - 161 G e n e R e g u l a t i o n : B i o l o g y o f A n t i s e n s e R N A a n d D N A (E d s . E r i c k s o n , R P a n d I z a n t , J G ; R a v e n P r e s s , N Y (1992)

【非特許文献 4】U h l m a n n E . ら、A n t i s e n s e : C h e m i c a l M o d i f i c a t i o n s . E n c y c l o p e d i a o f C a n c e r , V o l . X . , p p 64 - 81 A c a d e m i c P r e s s I n c . (1997)

30

【非特許文献 5】V l a s s o v ら、B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a 1197 : 95 - 1082 (1994)

【非特許文献 6】G a l b r a i t h ら、A n t i s e n s e N u c l . A c i d D r u g D e s . 4 : 201 - 206 (1994)

【非特許文献 7】Z e l p h a t i , O a n d S z o k a , F . C , J . C o n t r . R e l . 41 : 99 - 119 (1996)

【非特許文献 8】Z i m m e r m a n n ら、N a t u r e 441 : 111 - 114 (2006)

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 4 】

この発展にもかかわらず、全般的な治療的用途に適した脂質 - 治療的核酸組成物の改善が、当該分野においてなおも必要とされている。好ましくは、これらの組成物は、高効率で核酸を被包し得、高い薬物：脂質比を有し得、被包された核酸を血清中での分解およびクリアランスから保護し得、全身性送達に適し得、そして被包された核酸の細胞内送達をもたらし得る。さらに、これらの脂質 - 核酸粒子は、核酸の有効量での患者の処置がその患者に対して有意な毒性および / またはリスクを伴わないように、良好な耐容性を示すべきであり、適切な治療指数をもたらすべきである。本発明は、そのような組成物、その組

50

成物を調製する方法、およびその組成物を使用して核酸を細胞に導入する方法（疾患の処置のための方法を含む）を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0015】

簡単な要約

本発明は、新規のアミノ脂質、ならびにそれらを含む脂質粒子を提供する。これらの脂質粒子は、活性な薬剤をさらに含み得、そして本発明の関連する方法に従って使用されることにより、その活性な薬剤を細胞に送達し得る。

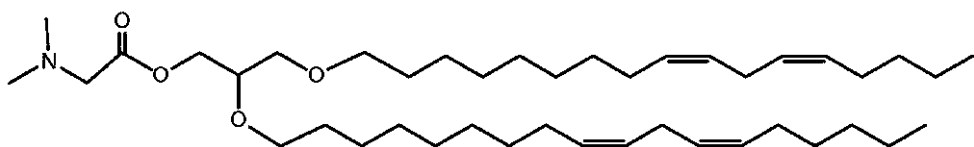
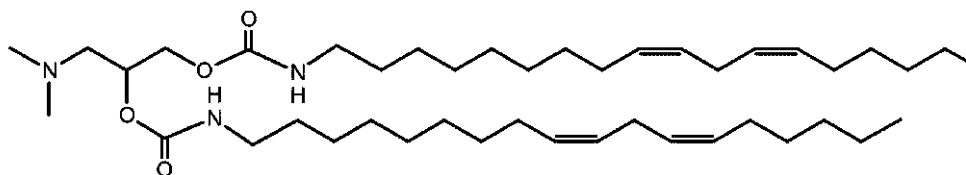
【0016】

1つの実施形態において、本発明は、以下：

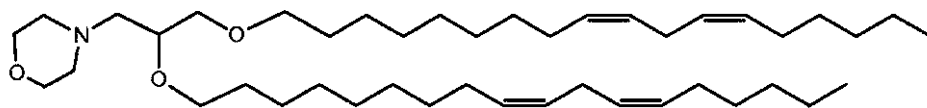
10

【0017】

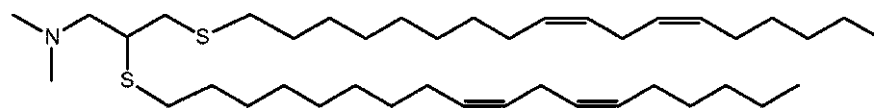
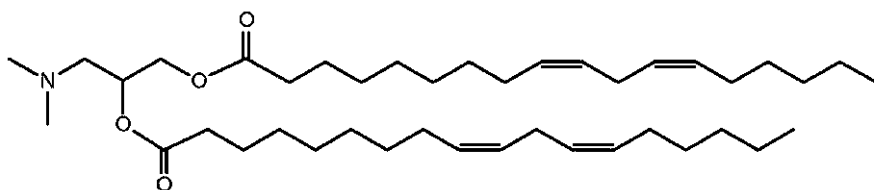
【化1】



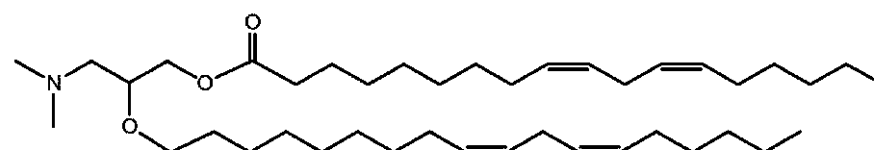
20



30

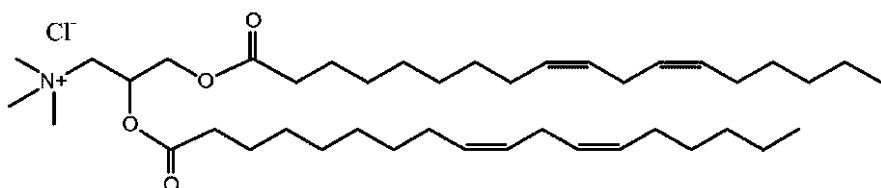
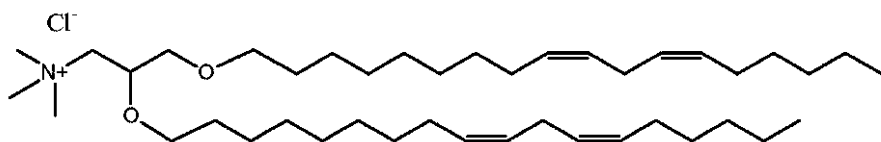


40

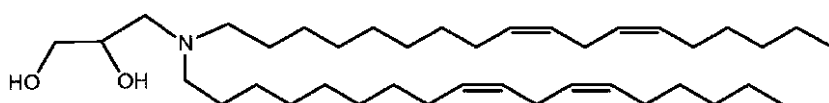
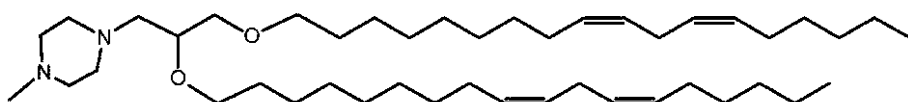


【0018】

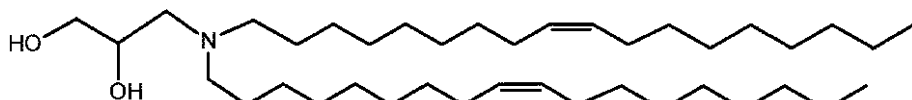
【化 2】



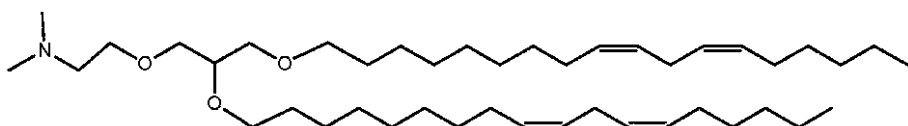
10



20



および



30

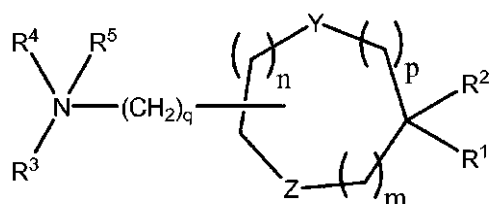
からなる群から選択される構造を有するアミノ脂質を提供する。

【 0 0 1 9 】

関連する実施形態において、本発明は、以下の構造 (I) :

【 0 0 2 0 】

【化 3】



40

(I)

または塩を有するアミノ脂質を含み、ここで、

R^1 および R^2 は、同じであるか、または異なり、そして独立して、必要に応じて置換される $C_{12} - C_{24}$ アルキル、必要に応じて置換される $C_{12} - C_{24}$ アルケニル、必要に応じて置換される $C_{12} - C_{24}$ アルキニルまたは必要に応じて置換される $C_{12} - C_{24}$ アシルであり；

50

R^3 および R^4 は、同じであるか、もしくは異なり、そして独立して、必要に応じて置換される $C_1 - C_6$ アルキル、必要に応じて置換される $C_1 - C_6$ アルケニルもしくは必要に応じて置換される $C_1 - C_6$ アルキニルであるか、または R^3 および R^4 は、結合することにより、4 ~ 6 個の炭素原子、ならびに窒素および酸素から選択される 1 または 2 個のヘテロ原子の必要に応じて置換される複素環式環を形成し得；

R^5 は、存在しないか、または第 4 級アミンをもたらすために水素もしくは $C_1 - C_6$ アルキルであり；

m 、 n および p は、同じであるか、または異なり、そして独立して 0 または 1 であるが、但し、 m 、 n および p は、同時に 0 ではなく；

q は、0、1、2、3 または 4 であり；そして

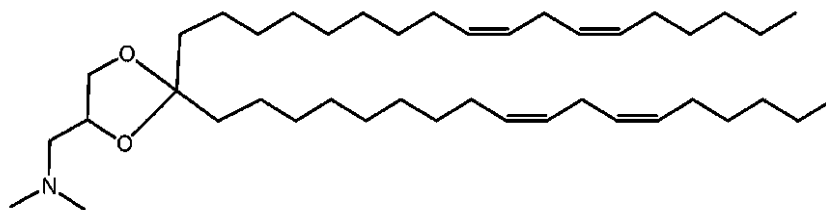
Y および Z は、同じであるか、または異なり、そして独立して O、S または NH である。

【0021】

1 つの特定の実施形態において、アミノ脂質は、以下の構造：

【0022】

【化 4】



DLin-K-DMA.

を有する。

【0023】

関連する実施形態において、アミノ脂質は、DLin-K-DMA の (R) または (S) エナンチオマーである。

【0024】

さらに関連する実施形態において、本発明は、本発明の上記アミノ脂質の 1 つ以上を含む脂質粒子を含む。ある特定の実施形態において、粒子は、1 つ以上の中性脂質および粒子凝集を減少させることができる 1 つ以上の脂質をさらに含む。1 つの特定の実施形態において、脂質粒子は、約 20 ~ 60 % DLin-K-DMA : 5 ~ 25 % 中性脂質 : 25 ~ 55 % Chol : 0.5 ~ 15 % PEG-S-DMG、PEG-C-DOMG または PEG-DMA というモル比で：(i) DLin-K-DMA；(ii) DSPC、POPC、DOPE および SM から選択される中性脂質；(iii) コレステロール；および (iv) PEG-S-DMG、PEG-C-DOMG または PEG-DMA から本質的になるか、またはそれらからなる。

【0025】

追加の関連する実施形態において、本発明は、1 つ以上の活性な薬剤または治療剤をさらに含む本発明の脂質粒子を含む。1 つの実施形態において、本発明の脂質粒子は、核酸である活性な薬剤または治療剤を含む。様々な実施形態において、その核酸は、プラスミド、免疫賦活性オリゴヌクレオチド、siRNA、マイクロRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムである。

【0026】

なおも別の関連する実施形態において、本発明は、本発明の脂質粒子および薬学的に許容可能な賦形剤、キャリアまたは希釈剤を含む薬学的組成物を含む。1 つの実施形態において、その薬学的組成物は、本発明の上記アミノ脂質、1 つ以上の中性脂質、粒子凝集を減少させることができる 1 つ以上の脂質、および選択されたポリペプチドの発現を減少させることができる 1 つ以上の siRNA のうちの 1 つ以上を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる脂質粒子から本質的になる。1 つの特定の実施形態におい

10

20

30

40

50

て、その脂質粒子は、約20～60%DLin-K-DMA：5～25%中性脂質：25～55%Chol：0.5～15%PEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMAというモル比で：(i)DLin-K-DMA；(ii)DSPC、POPC、DOPEおよびSMから選択される中性脂質；(iii)コレステロール；および(iv)PEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMAから本質的になるか、またはそれらからなる。

【0027】

本発明は、他の関連する実施形態において、細胞によるポリペプチドの発現を調節する方法をさらに含み、その方法は、本発明の脂質粒子または薬学的組成物を細胞に提供する工程を包含する。ある特定の実施形態において、その脂質粒子は、本発明の上記アミノ脂質、1つ以上の中性脂質、粒子凝集を減少させることができる1つ以上の脂質、および選択されたポリペプチドの発現を減少させることができる1つ以上のsiRNAのうちの1つ以上を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。1つの特定の実施形態において、その脂質粒子は、約20～60%DLin-K-DMA：5～25%中性脂質：25～55%Chol：0.5～15%PEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMAというモル比で：(i)DLin-K-DMA；(ii)DSPC、POPC、DOPEおよびSMから選択される中性脂質；(iii)コレステロール；および(iv)PEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMAから本質的になるか、またはそれらからなる。特定の実施形態において、その脂質粒子は、siRNA、マイクロRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびsiRNA、マイクロRNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択される治療剤を含み、ここで、そのsiRNA、マイクロRNAまたはアンチセンスRNAは、ポリペプチドの発現を減少させるような、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的に結合するポリヌクレオチドまたはその相補物を含む。別の実施形態では、その核酸は、そのポリペプチドまたはその機能的なバリエーションまたはフラグメントの発現を増加させるような、そのポリペプチドまたはその機能的なバリエーションもしくはフラグメントをコードするプラスミドである。

【0028】

なおもさらに関連する実施形態において、本発明は、被験体内のポリペプチドの過剰発現を特徴とする疾患または障害を処置する方法を含み、その方法は、本発明の脂質粒子または薬学的組成物をその被験体に提供する工程を包含し、ここで、その治療剤は、siRNA、マイクロRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびsiRNA、マイクロRNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択され、そのsiRNA、マイクロRNAまたはアンチセンスRNAは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的に結合するポリヌクレオチドまたはその相補物を含む。

【0029】

別の関連する実施形態では、本発明は、被験体内のポリペプチドの過小発現を特徴とする疾患または障害を処置する方法を含み、その方法は、本発明の薬学的組成物をその被験体に提供する工程を包含し、ここで、その治療剤は、そのポリペプチドまたはその機能的なバリエーションもしくはフラグメントをコードするプラスミドである。

【0030】

さらなる実施形態において、本発明は、被験体において免疫応答を誘導する方法を含み、その方法は、本発明の薬学的組成物をその被験体に提供する工程を包含し、ここで、その治療剤は、免疫賦活性オリゴヌクレオチドである。特定の実施形態において、その薬学的組成物は、ワクチンまたは抗原と併用して患者に提供される。

【0031】

関連する実施形態において、本発明は、本発明の脂質粒子および疾患または病原体に関連する抗原を含むワクチンを含む。1つの実施形態において、その脂質粒子は、免疫賦活性の核酸またはオリゴヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、その抗原は、腫瘍

抗原である。別の実施形態では、その抗原は、ウイルス抗原、細菌抗原または寄生生物抗原である。

【 0 0 3 2 】

本発明は、本発明の脂質粒子および薬学的組成物を調製する方法、ならびにこれらの脂質粒子および薬学的組成物の調製において有用なキットをさらに含む。

【 0 0 3 3 】

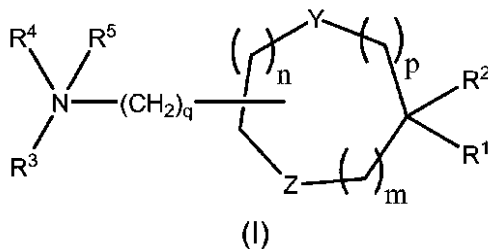
本発明は、約 2 0 ~ 6 0 % アミノ脂質 : 5 ~ 2 5 % 中性脂質 : 2 5 ~ 5 5 % C h o l : 0 . 5 ~ 1 5 % P E G - C - D O M G というモル比で : 陽イオン性脂質またはアミノ脂質 (本発明のそれらのうちのいずれかを含む) ; 必要に応じて D S P C 、 P O P C 、 D O P E および S M から選択され得る中性脂質 ; コレステロール ; および P E G - C - D O M G を含む脂質粒子も含む。1つの実施形態において、その脂質粒子は、アミノ脂質 D L i n - K - D M A を含む。関連する実施形態において、その脂質粒子は、治療剤をさらに含む。1つの実施形態において、その治療剤は、核酸である。1つの特定の実施形態において、その核酸は、s i R N A である。本発明は、脂質粒子および薬学的に許容可能な賦形剤、キャリアまたは希釈剤を含む薬学的組成物、ならびに細胞によるポリペプチドの発現を調節する方法、またはその脂質粒子を細胞または被験体に提供する工程を包含する疾患を処置もしくは予防する方法をさらに企図する。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される :

(項目 1)

以下の構造 (I) :

【 化 7 2 】



を有するアミノ脂質であって、ここで、

R^1 および R^2 は、同じであるか、または異なり、そして独立して、必要に応じて置換される $C_{12} - C_{24}$ アルキル、必要に応じて置換される $C_{12} - C_{24}$ アルケニル、必要に応じて置換される $C_{12} - C_{24}$ アルキニルまたは必要に応じて置換される $C_{12} - C_{24}$ アシルであり ;

R^3 および R^4 は、同じであるか、もしくは異なり、そして独立して、必要に応じて置換される $C_1 - C_6$ アルキル、必要に応じて置換される $C_1 - C_6$ アルケニルもしくは必要に応じて置換される $C_1 - C_6$ アルキニルであるか、または R^3 および R^4 は、結合することにより、4 から 6 個の炭素原子、ならびに窒素および酸素から選択される 1 または 2 個のヘテロ原子の必要に応じて置換される複素環式環を形成し得 ;

R^5 は、存在しないか、または存在し、存在するときは、水素または $C_1 - C_6$ アルキルであり ;

m 、 n および p は、同じであるか、または異なり、独立して 0 または 1 であるが、但し、 m 、 n および p は、同時に 0 ではなく ;

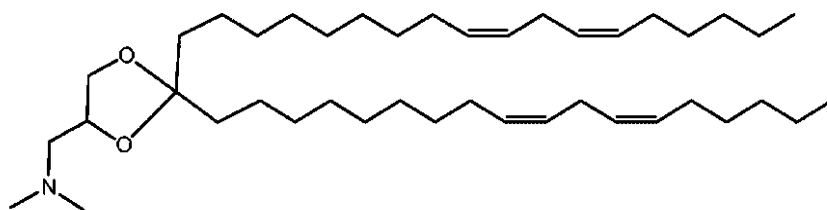
q は、0、1、2、3 または 4 であり ; そして

Y および Z は、同じであるか、または異なり、独立して O、S または NH である、アミノ脂質。

(項目 2)

以下の構造 :

【化 7 3】



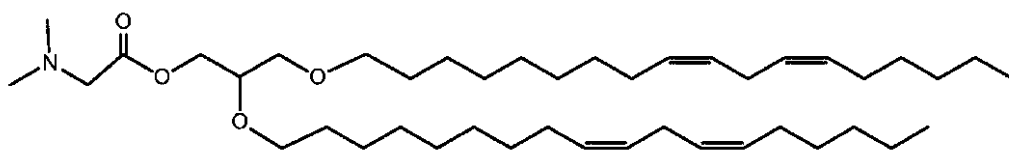
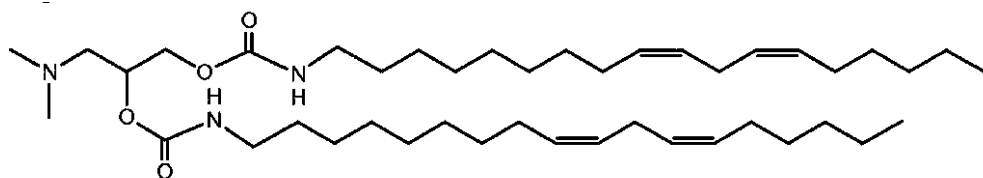
を有する、項目 1 に記載のアミノ脂質。

10

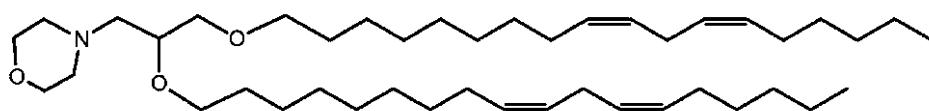
(項目 3)

以下：

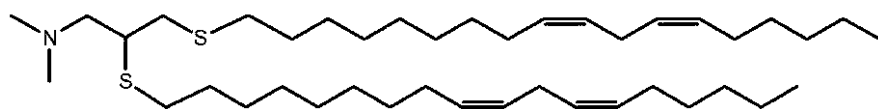
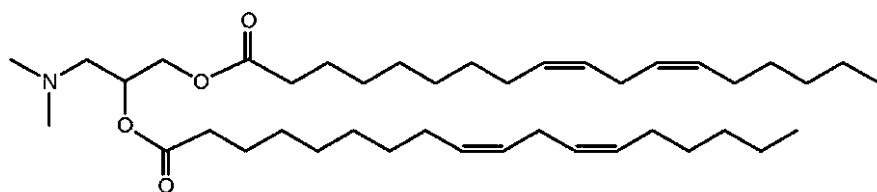
【化 7 4】



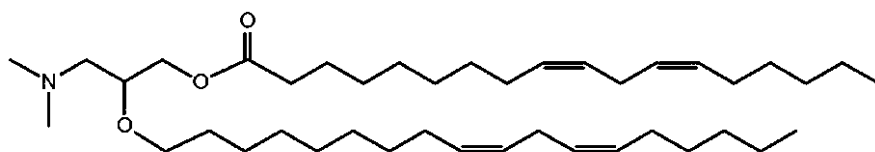
20



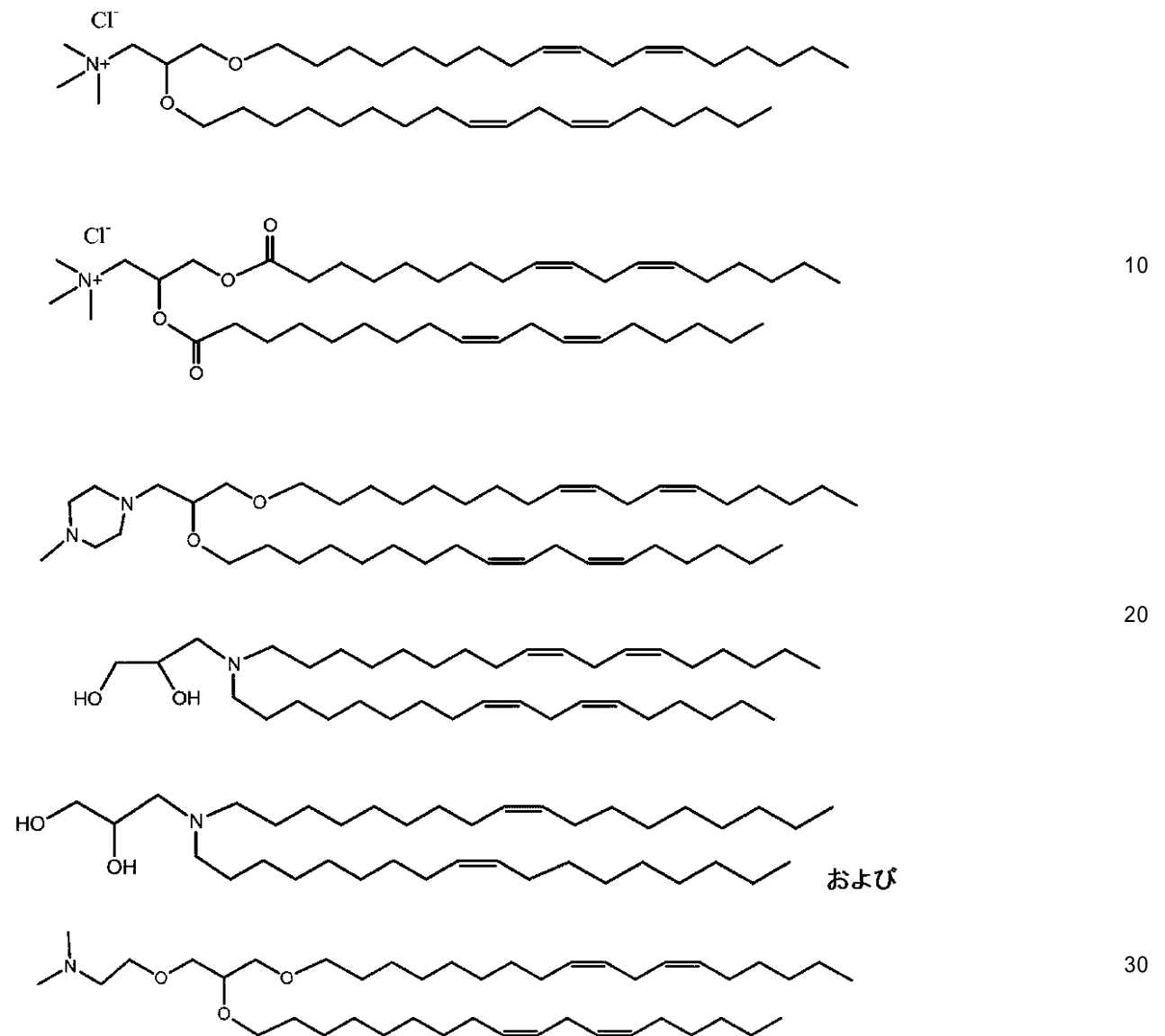
30



40



【化 7 5】



からなる群から選択される構造を有するアミノ脂質。

(項目 4)

項目 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のアミノ脂質を含む脂質粒子。

(項目 5)

項目 2 に記載のアミノ脂質を含む、項目 4 に記載の脂質粒子。

(項目 6)

中性脂質および粒子凝集を減少させることができる脂質をさらに含む、項目 4 に記載の脂質粒子。

(項目 7)

約 20 ~ 60 % D L i n - K - D M A : 5 ~ 25 % 中性脂質 : 25 ~ 55 % C h o l : 0 . 5 ~ 15 % P E G - S - D M G、P E G - C - D O M G または P E G - D M A のモル比で：

(i) D L i n - K - D M A ;

(i i) D S P C、P O P C、D O P E および S M から選択される中性脂質；

(i i i) コレステロール；および

(i v) P E G - S - D M G、P E G - C - D O M G または P E G - D M A

から本質的になる、項目 6 に記載の脂質粒子。

(項目 8)

約 20 ~ 60 % 陽イオン性脂質またはアミノ脂質 : 5 ~ 25 % 中性脂質 : 25 ~ 55 % コレステロール : 0 . 5 ~ 15 % PEG - C - DOMG のモル比で :

(i) 1 つ以上の陽イオン性脂質またはアミノ脂質 ;

(i i) DSPC、POPC、DOPE および SM から選択される 1 つ以上の中性脂質 ;

(i i i) コレステロール ; および

(i v) PEG - C - DOMG

を含む、脂質粒子。

(項目 9)

前記アミノ脂質が、項目 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のアミノ脂質である、項目 8 に記載の脂質粒子。

(項目 10)

治療剤をさらに含む、項目 4 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の脂質粒子。

(項目 11)

前記治療剤が、核酸である、項目 10 に記載の脂質粒子。

(項目 12)

前記核酸が、プラスミドである、項目 11 に記載の脂質粒子。

(項目 13)

前記核酸が、免疫賦活性オリゴヌクレオチドである、項目 11 に記載の脂質粒子。

(項目 14)

前記核酸が : siRNA、マイクロRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイムからなる群から選択される、項目 11 に記載の脂質粒子。

(項目 15)

前記核酸が、siRNA である、項目 14 に記載の脂質粒子。

(項目 16)

項目 10 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の脂質粒子および薬学的に許容可能な賦形剤、キャリアまたは希釈剤を含む、薬学的組成物。

(項目 17)

細胞によるポリペプチドの発現を調節する方法であって、項目 10 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の脂質粒子を細胞に提供する工程を包含する、方法。

(項目 18)

治療剤が、siRNA、マイクロRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、マイクロRNA およびアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択され、ここで、該 siRNA、マイクロRNA またはアンチセンス RNA が、ポリペプチドの発現を低下させるように、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的に結合するポリヌクレオチドまたはその相補物を含む、項目 17 に記載の方法。

(項目 19)

核酸が、ポリペプチドまたはその機能的なバリエーションもしくはフラグメントの発現を増加させるような、ポリペプチドまたはその機能的なバリエーションもしくはフラグメントをコードするプラスミドである、項目 17 に記載の方法。

(項目 20)

被験体におけるポリペプチドの過剰発現を特徴とする疾患または障害を処置する方法であって、項目 16 に記載の薬学的組成物を被験体に提供する工程を包含し、ここで、治療剤は、siRNA、マイクロRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、マイクロRNA およびアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択され、ここで、該 siRNA、マイクロRNA またはアンチセンス RNA は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的に結合するポリヌクレオチドまたはその相補物を含む、方法。

(項目 21)

10

20

30

40

50

被験体におけるポリペプチドの過小発現を特徴とする疾患または障害を処置する方法であって、項目 16 に記載の薬学的組成物を被験体に提供する工程を包含し、ここで、治療剤は、ポリペプチドまたはその機能的なバリエーションもしくはフラグメントをコードするプラスミドである、方法。

(項目 22)

被験体において免疫応答を誘導する方法であって、項目 16 に記載の薬学的組成物を被験体に提供する工程を包含し、ここで、治療剤は、免疫賦活性オリゴヌクレオチドである、方法。

(項目 23)

薬学的組成物が、ワクチンまたは抗原と併用して患者に提供される、項目 22 に記載の方法。

10

(項目 24)

項目 13 に記載の脂質粒子および疾患または病原体に関連する抗原を含むワクチン。

(項目 25)

前記抗原が、腫瘍抗原である、項目 24 に記載のワクチン。

(項目 26)

前記抗原が、ウイルス抗原、細菌抗原または寄生生物抗原である、項目 24 に記載のワクチン。

【図面の簡単な説明】

【0034】

20

図面のいくつかの図の簡単な説明

【図 1】図 1 は、核酸の被包および得られるベシクルの安定性に対する様々なエタノール濃度の影響を図示している。図 1 A は、32、34 および 36 % エタノールの存在下における DLinDMA / DSPC / CH / PEG - S - DMG (40 : 10 : 48 : 2 モル比) ベシクル内の 16 mer ホスホジエステルオリゴヌクレオチドの被包の量を示すグラフである。図 1 B は、32、34 および 36 % エタノールにおける負荷前および負荷の 30 分後および 60 分後のベシクルのサイズを示す棒グラフである。

【図 2】図 2 は、核酸の被包に対する時間および温度の影響を示している。図 2 A は、記載されたインキュベーション時点での 30 および 40 における DLinDMA / DSPC / CH / PEG - S - DMG ベシクル内の 16 mer ホスホジエステルオリゴヌクレオチドの被包の量を示すグラフである。図 2 B は、インキュベーション前ならびに 40 におけるインキュベーションの 15 分後、30 分後および 60 分後のベシクルのサイズを示す棒グラフである。

30

【図 3】図 3 は、インビボにおいて第 VII 因子の発現を減少させる第 VII 因子 siRNA を含む核酸 - 脂質粒子の様々な脂質処方物の能力を示すグラフである。DLin - K - DMA、DLinDMA または DLinDAP を含む粒子内の様々な第 VII 因子 siRNA 投薬量で処置した後の第 VII 因子レベルが示されている。

【図 4】図 4 は、記載される様々な PEG - 脂質を含む様々な濃度の DLin - DMA 脂質粒子処方物を投与した後の残留 FVII の量を比較しているグラフである。

【図 5】図 5 は、記載される様々な PEG - 脂質を含む様々な濃度の DLin - K - DMA 脂質粒子処方物を投与した後の残留 FVII の量を比較しているグラフである。

40

【図 6】図 6 は、記載される脂質処方物を様々な siRNA 投薬量で投与した後に存在する血清 ALT レベルを示すグラフである。

【図 7】図 7 A および図 7 B は、PEG - C - DOMG または PEG - S - DMG を含む DLin - K - DMA 脂質粒子の相対的な耐容性を証明している。図 7 A は、様々な siRNA 投薬量で脂質粒子を用いて処置した後の血清 ALT レベルを示しており、図 7 B は、様々な siRNA 投薬量で脂質粒子を用いて処置した後の動物の体重の変化を示している。

【発明を実施するための形態】

【0035】

50

詳細な説明

本発明は、治療剤などの活性な薬剤のインビボ送達のために脂質粒子内で使用されるときに利点を提供する陽イオン性脂質の発見に一部基づく。特に、添付の実施例によって説明されるように、本発明は、インビボにおける核酸の高活性および組成物の改善された耐容性を提供することにより、以前に報告された脂質 - 核酸粒子組成物と比べて有意に高い治療指数をもたらす、本発明に記載の陽イオン性脂質を含む核酸 - 脂質粒子組成物を提供する。さらに、ある特定の治療的な核酸 - 脂質粒子を用いた際に観察される毒性の改善をもたらす組成物および使用方法が開示される。

【0036】

ある特定の実施形態において、本発明は、詳細には、*siRNA* 分子を送達するための改善された組成物を提供する。これらの組成物が、標的タンパク質のタンパク質レベルおよび/または *mRNA* レベルのダウンレギュレートにおいて有効であることが本明細書中で示される。さらに、これらの改善された組成物の活性は、ある特定の陽イオン性脂質の存在に依存し、そして処方物中の陽イオン性脂質のモル比は、活性に影響し得ることが示される。

【0037】

本発明の脂質粒子および組成物は、インビトロまたはインビボの両方における会合または被包された治療剤の細胞への送達をはじめとした種々の目的のために使用され得る。したがって、本発明は、疾患または障害を処置する必要のある被験体を、適当な治療剤と会合された本発明の脂質粒子と接触させることによって、その被験体におけるその疾患または障害を処置する方法を提供する。

【0038】

本明細書中に記載されるように、本発明の脂質粒子は、例えば、*siRNA* 分子およびプラスミドを含む核酸の送達に特に有用である。ゆえに、本発明の脂質粒子および組成物は、標的遺伝子の発現を減少させる核酸（例えば、*siRNA*）または所望のタンパク質の発現を増加させるために使用され得る核酸（例えば、その所望のタンパク質をコードするプラスミド）と会合された本発明の脂質粒子と細胞を接触させることによって、インビトロとインビボの両方において標的遺伝子および標的タンパク質の発現を調節するために使用され得る。

【0039】

本発明の陽イオン性脂質、ならびに脂質粒子およびそれを含む組成物、そして治療剤を送達するため、ならびに遺伝子およびタンパク質の発現を調節するためにそれらを使用することに関する様々な例示的な実施形態が、以下でさらに詳細に説明される。

【0040】

A. アミノ脂質

本発明は、治療剤を細胞にインビボ送達するために本発明の脂質粒子において有利に使用される新規アミノ脂質を提供し、それらとしては、以下の構造：

【0041】

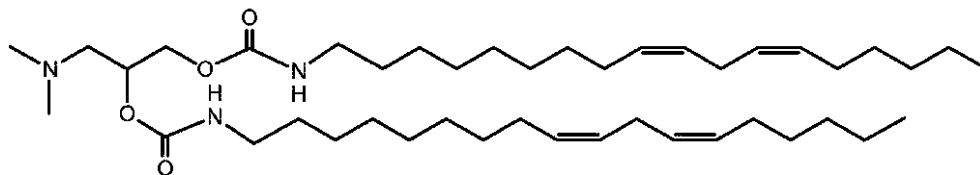
10

20

30

【化 5】

1,2-ジリノレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-C-DAP)

C₄₃H₇₉N₃O₄

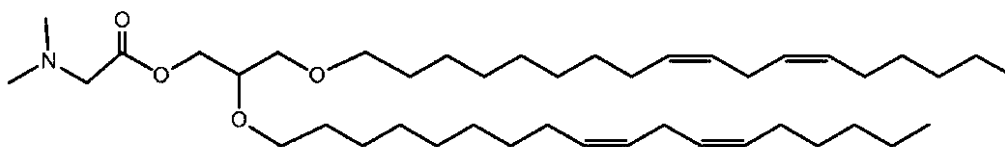
正確な質量: 701.61

分子量: 702.11

C, 73.56; H, 11.34; N, 5.98; O, 9.12

10

1,2-ジリノレイルオキシ-3-(ジメチルアミノ)アセトキシプロパン (DLin-DAC)

C₄₃H₇₉NO₄

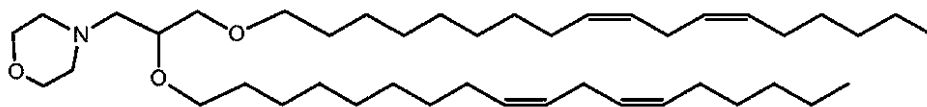
正確な質量: 673.60

分子量: 674.09

C, 76.62; H, 11.81; N, 2.08; O, 9.49

20

1,2-ジリノレイルオキシ-3-モルホリノプロパン (DLin-MA)

C₄₃H₇₉NO₃

正確な質量: 657.61

分子量: 658.09

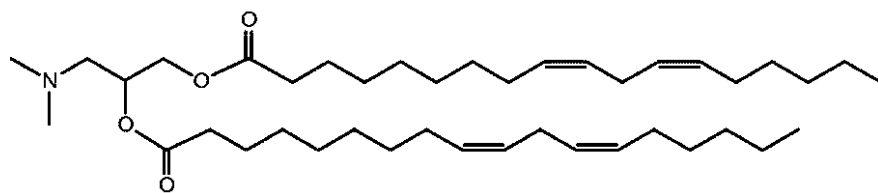
C, 78.48; H, 12.10; N, 2.13; O, 7.29

30

【 0 0 4 2 】

【化 6】

1,2-ジリノレオイル-3-ジメチルアミノプロパン (DLinDAP)


 $C_{41}H_{73}NO_4$

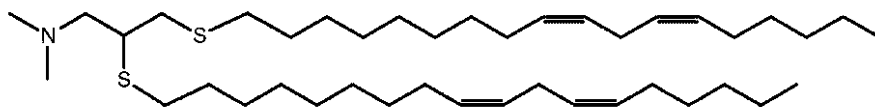
正確な質量: 643.55

分子量: 644.02

C, 76.46; H, 11.43; N, 2.17; O, 9.94

10

1,2-ジリノレイルチオ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-S-DMA)


 $C_{41}H_{77}NS_2$

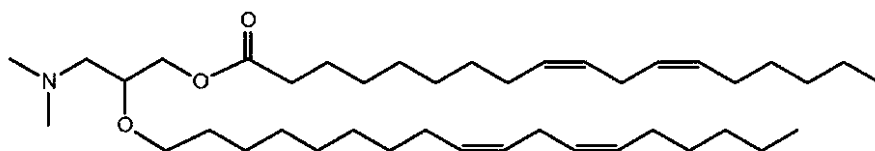
正確な質量: 647.55

分子量: 648.19

C, 75.97; H, 11.97; N, 2.16; S, 9.89

20

1-リノレオイル-2-リノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-2-DMAP)


 $C_{41}H_{75}NO_3$

正確な質量: 629.57

分子量: 630.04

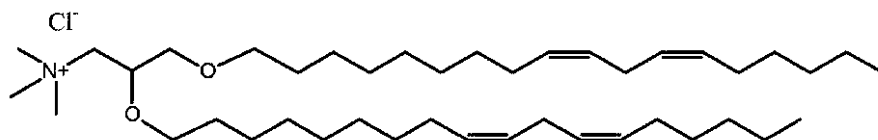
C, 78.16; H, 12.00; N, 2.22; O, 7.62

30

【 0 0 4 3 】

【化 7】

1,2-ジリノレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパン塩化物塩 (DLin-TMA.Cl)

C₄₂H₈₀ClNO₂

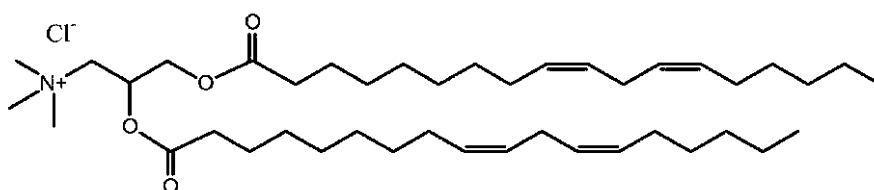
正確な質量: 665.59

分子量: 666.54

C, 75.68; H, 12.10; Cl, 5.32; N, 2.10; O, 4.80

10

1,2-ジリノレイル-3-トリメチルアミノプロパン塩化物塩 (DLin-TAP.Cl)

C₄₂H₇₆ClNO₄

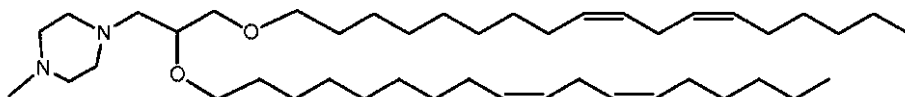
正確な質量: 693.55

分子量: 694.51

C, 72.63; H, 11.03; Cl, 5.10; N, 2.02; O, 9.21

20

1,2-ジリノレイルオキシ-3-(N-メチルピペラジノ)プロパン (DLin-MPZ)

C₄₄H₈₂N₂O₂

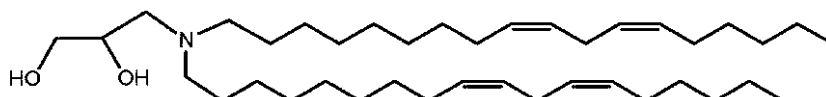
正確な質量: 670.64

分子量: 671.13

C, 78.74; H, 12.32; N, 4.17; O, 4.77

30

3-(N,N-ジリノレイルアミノ)-1,2-プロパンジオール (DLinAP)

C₃₉H₇₃NO₂

正確な質量: 587.56

分子量: 588.00

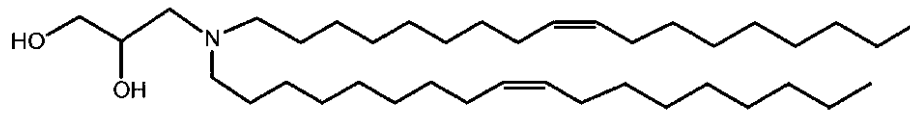
C, 79.66; H, 12.51; N, 2.38; O, 5.44

40

【 0 0 4 4 】

【化 8】

3-(N,N-ジオレイルアミノ)-1,2-プロパンジオール(DOAP)

C₃₉H₇₇NO₂

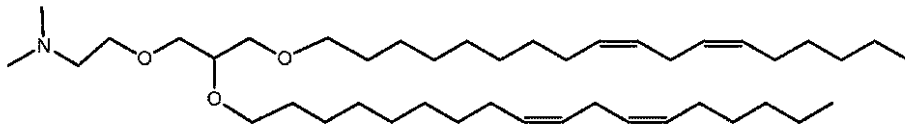
正確な質量: 591.60

分子量: 592.03

C, 79.12; H, 13.11; N, 2.37; O, 5.40

10

1,2-ジリノレイルオキソ-3-(2-N,N-ジメチルアミノ)エトキシプロパン(DLin-EG-DMA)

C₄₃H₈₁NO₃

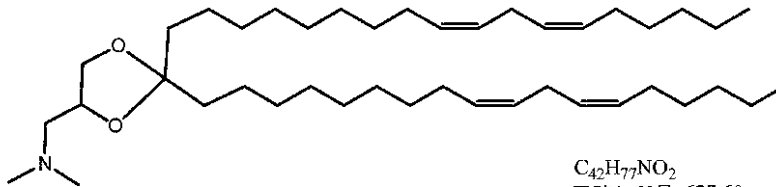
正確な質量: 659.62

分子量: 660.11

C, 78.24; H, 12.37; N, 2.12; O, 7.27

20

2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキサラン(DLin-K-DMA)

C₄₂H₇₇NO₂

正確な質量: 627.60

分子量: 628.07

C, 80.32; H, 12.36; N, 2.23; O, 5.09

30

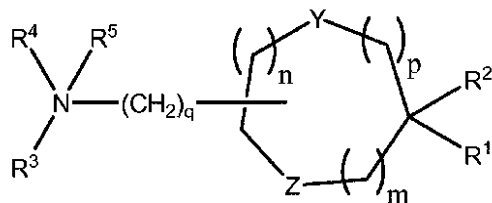
を有するアミノ脂質（それらの（R）および（S）エナンチオマーを含む）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0045】

本発明の1つの実施形態において、アミノ脂質は、以下の構造（I）：

【0046】

【化 9】



(I)

40

またはその塩を有し、ここで、

R¹ および R² は、同じであるか、または異なり、そして独立して、必要に応じて置換される C₁₋₂₄ アルキル、必要に応じて置換される C₁₋₂₄ アルケニル、必要に応じて置換される C₁₋₂₄ アルキニルまたは必要に応じて置換される C₁₋₂₄ アルキニル

50

$2, 4$ アシルであり；

R^3 および R^4 は、同じであるか、もしくは異なり、そして独立して、必要に応じて置換される $C_1 - C_6$ アルキル、必要に応じて置換される $C_1 - C_6$ アルケニルもしくは必要に応じて置換される $C_1 - C_6$ アルキニルであるか、または R^3 および R^4 は、結合することにより、4 ~ 6 個の炭素原子、ならびに窒素および酸素から選択される 1 または 2 個のヘテロ原子の必要に応じて置換される複素環式環を形成し得；

R^5 は、存在しないか、または第 4 級アミンをもたらすために水素もしくは $C_1 - C_6$ アルキルであり；

m 、 n および p は、同じであるか、または異なり、そして独立して 0 または 1 であるが、但し、 m 、 n および p は、同時に 0 ではなく；

q は、0、1、2、3 または 4 であり；そして

Y および Z は、同じであるか、または異なり、そして独立して O、S または NH である。

【0047】

「アルキル」とは、1 ~ 24 個の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖の非環式または環式の飽和脂肪族炭化水素のことを意味する。代表的な飽和直鎖アルキルとしては、メチル、エチル、 n -プロピル、 n -ブチル、 n -ペンチル、 n -ヘキシルなどが挙げられる；一方、飽和分枝鎖アルキルとしては、イソプロピル、*sec*-ブチル、イソブチル、*tert*-ブチル、イソペンチルなどが挙げられる。代表的な飽和環式アルキルとしては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどが挙げられる；一方、不飽和環式アルキルとしては、シクロペンテニルおよびシクロヘキセニルなどが挙げられる。

【0048】

「アルケニル」とは、隣接炭素原子間に少なくとも 1 つの二重結合を含む、上で定義されたようなアルキルのことを意味する。アルケニルは、*cis* と *trans* の両方の異性体を含む。代表的な直鎖および分枝鎖のアルケニルとしては、エチレニル、プロピレニル、1-ブテニル、2-ブテニル、イソブチレニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-メチル-1-ブテニル、2-メチル-2-ブテニル、2,3-ジメチル-2-ブテニルなどが挙げられる。

【0049】

「アルキニル」とは、隣接炭素間に少なくとも 1 つの三重結合をさらに含む、上で定義されたような任意のアルキルまたはアルケニルのことを意味する。代表的な直鎖および分枝鎖のアルキニルとしては、アセチレニル、プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、3-メチル-1-ブチニルなどが挙げられる。

【0050】

「アシル」とは、接着点における炭素が、以下で定義されるようなオキソ基で置換されている任意のアルキル、アルケニルまたはアルキニルのことを意味する。例えば、 $-C(=O)$ アルキル、 $-C(=O)$ アルケニルおよび $-C(=O)$ アルキニルが、アシル基である。

【0051】

「複素環」とは、飽和、不飽和または芳香族であり、かつ、窒素、酸素および硫黄から独立して選択される 1 または 2 個のヘテロ原子（その窒素および硫黄ヘテロ原子は、必要に応じて酸化され得、窒素ヘテロ原子は、必要に応じて四級化され得る）を含む 5 ~ 7 員の単環式または 7 ~ 10 員の二環式の複素環式環のことを意味し、それには、上記の複素環のいずれかがベンゼン環に融合された二環式の環が含まれる。複素環は、任意のヘテロ原子または炭素原子を介して結合され得る。複素環には、以下で定義されるようなヘテロアリールが含まれる。複素環としては、モルホリニル、ピロリジノニル、ピロリジニル、ピペリジニル (*piperidinyl*)、ピペリジニル (*piperizynyl*)、ヒダントイニル、バレロラクタミル、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピリジニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラ

10

20

30

40

50

ヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニルなどが挙げられる。

【0052】

用語「必要に応じて置換されるアルキル」、「必要に応じて置換されるアルケニル」、「必要に応じて置換されるアルキニル」、「必要に応じて置換されるアシル」および「必要に応じて置換される複素環」とは、置換されるとき、少なくとも1つの水素原子が、ある置換基で置き換えられることを意味する。オキソ置換基(=O)の場合、2つの水素原子が置き換えられる。この点において、置換基としては、オキソ、ハロゲン、複素環、-CN、-OR^x、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^xおよび-SO_nNR^xR^yが挙げられ、ここで、nは、0、1または2であり、R^xおよびR^yは、同じであるか、または異なり、そして独立して、水素、アルキルまたは複素環であり、そして前記アルキル置換基および複素環置換基の各々は、オキソ、ハロゲン、-OH、-CN、アルキル、-OR^x、複素環、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^xおよび-SO_nNR^xR^yのうちの1つ以上でさらに置換され得る。

10

【0053】

「ハロゲン」とは、フルオロ、クロロ、ブロモおよびヨードのことを意味する。

【0054】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、保護基の使用を必要とし得る。保護基の方法論は、当業者に周知である(例えば、PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, Green, T.W.ら、Wiley-Interscience, New York City, 1999を参照のこと)。簡潔には、本発明の文脈内の保護基は、官能基の望まれない反応性を減少させるか、または排除する任意の基である。保護基は、官能基に付加されることにより、ある特定の反応中における反応性を遮蔽し、次いで、除去されることにより、もとの官能基が現れ得る。いくつかの実施形態において、「アルコール保護基」が使用される。「アルコール保護基」は、アルコール官能基の望まれない反応性を減少させるか、または排除する任意の基である。保護基は、当該分野で周知の手法を用いて、付加および除去され得る。

20

【0055】

本発明の化合物は、実施例においてより詳細に説明される方法を含む公知の有機合成手法によって調製され得る。通常、上記の構造(I)の化合物は、以下の反応スキーム1または2によって生成され得、ここで、別段示されない限り、すべての置換基は、上で定義されたとおりである。

30

【0056】

構造(I)の化合物(mは1であり、pは0である)は、反応スキーム1に従って調製され得る。ケトン1およびグリニャール試薬2(Pは、トリチルなどのアルコール保護基である)は、購入され得るか、または当業者に公知の方法に従って調製され得る。1と2との反応によって、アルコール3が得られる。例えば弱酸(mild acid)での処理による、3の脱保護の後、適切な臭素化試薬、例えば、三臭化リン(phosphorous tribromide)を用いる臭素化によって、それぞれ4および5が得られる。臭化物5を6で処理することによって、複素環式化合物7が得られる。次いで、7をアミン8で処理することによって、mが1であり、R⁵が存在しない、構造(I)の化合物が得られる(9)。さらに9を塩化物10で処理することによって、mが1であり、R⁵が存在する、構造(I)化合物が得られる。

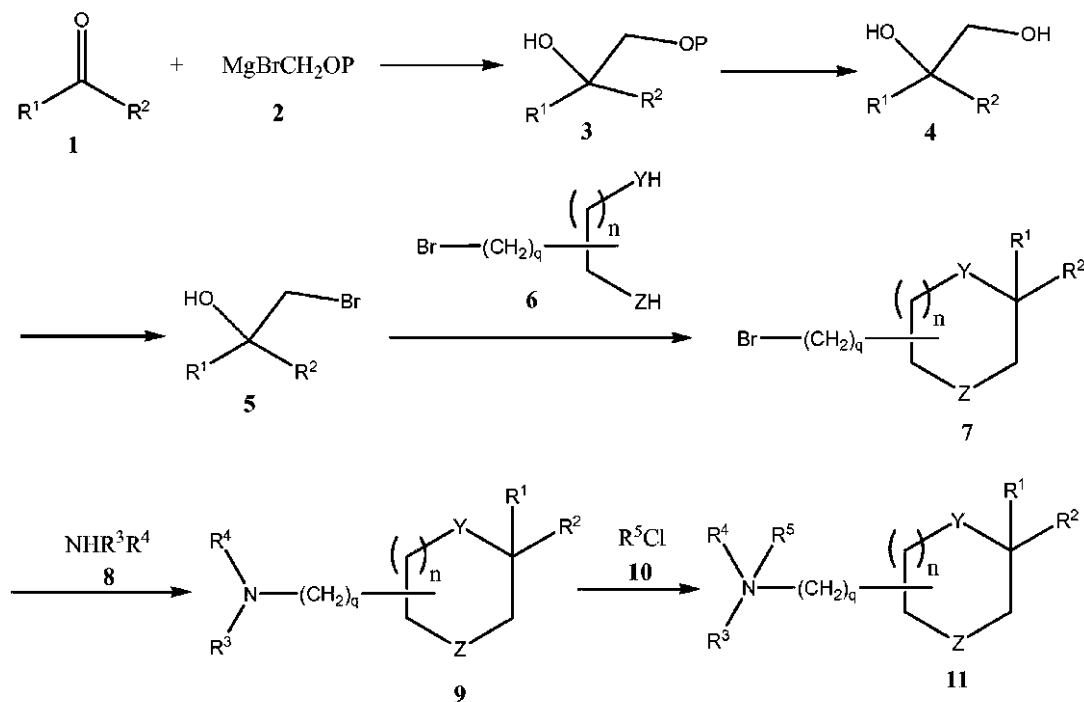
40

【0057】

1. 反応スキーム1

【0058】

【化 10】



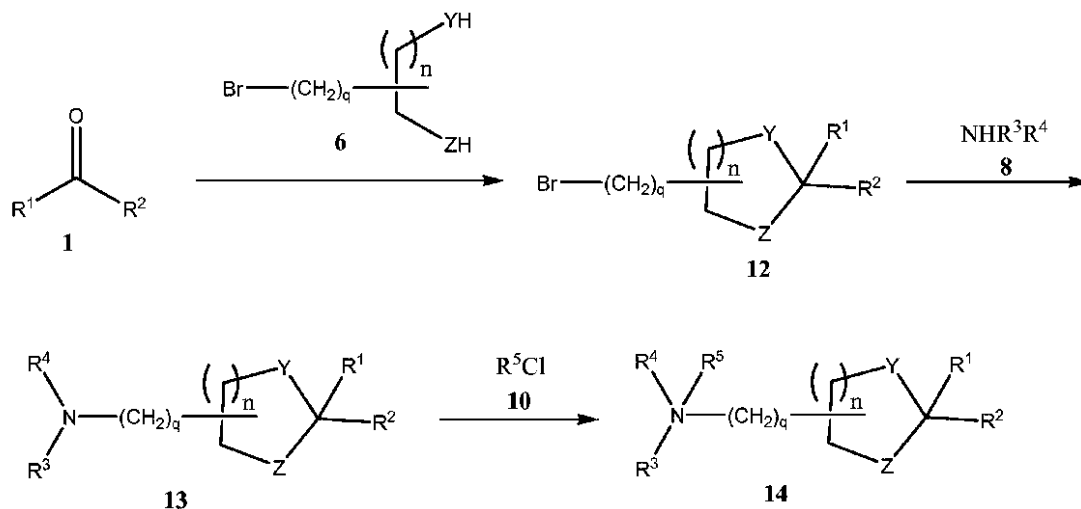
mおよびpが0である構造(I)の化合物は、反応スキーム2に従って調製され得る。ケトン1および臭化物6は、購入され得るか、または当業者に公知の方法に従って調製され得る。1と6との反応によって、複素環12が得られる。12をアミン8で処理することによって、mが0であり、R⁵が存在しない、構造(I)の化合物が得られる(13)。13を10でさらに処理することにより、wが0であり、R⁵が存在する、構造(I)の化合物が生成される。

【0059】

2. 反応スキーム2

【0060】

【化 11】



mおよびpが1であり、nが0である、ある特定の実施形態において、本発明の化合物は、反応スキーム3に従って調製され得る。化合物12および13は、購入され得るか、または当業者に公知の方法に従って調製され得る。12と13との反応によって、R⁵が存在しない構造(I)の化合物が得られる(14)。R⁵が存在する他の実施形態において、13を、10で処理することにより、構造15の化合物を得ることができる。

【0061】

10

20

30

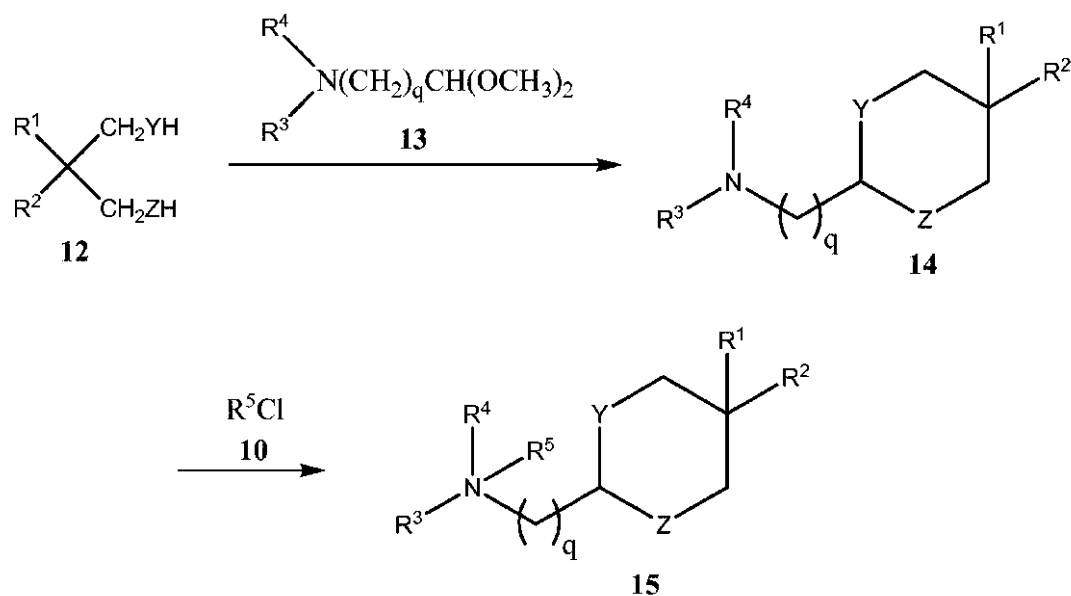
40

50

3. 反応スキーム 3

【0062】

【化12】



10

m または p が 1 であり、n が 0 である、ある特定の他の実施形態において、本発明の化合物は、反応スキーム 4 に従って調製され得る。化合物 16 は、購入され得るか、または当業者に公知の方法に従って調製され得、そして 13 と反応することにより、R⁵ が存在しない構造 (I) の化合物が得られる (17)。R⁵ が存在する構造 (I) の他の実施形態は、17 を 10 で処理することによって調製されることにより、構造 18 の化合物を得ることができる。

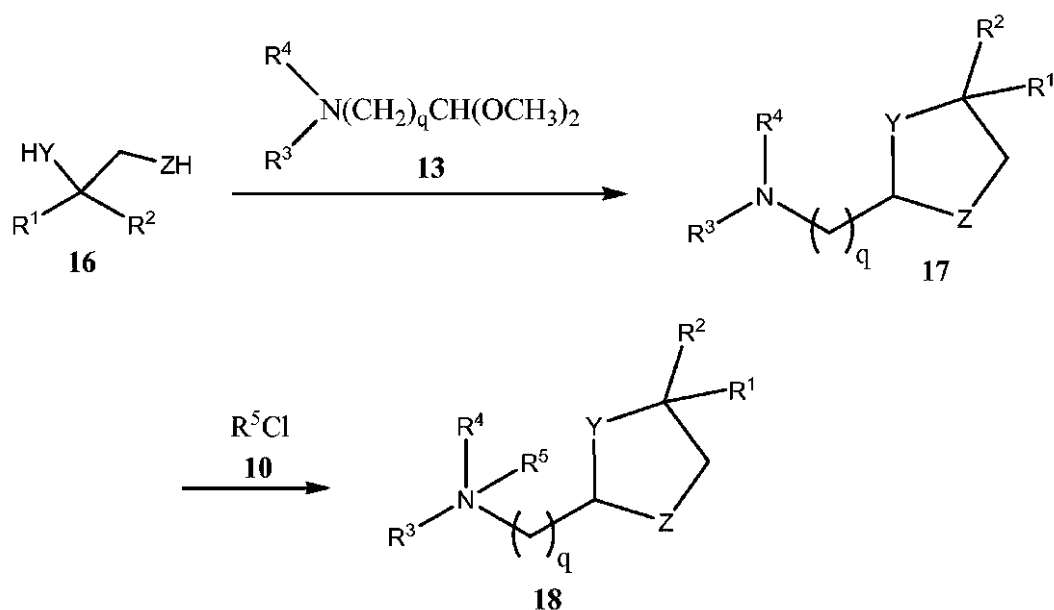
20

【0063】

4. 反応スキーム 4

【0064】

【化13】



30

40

n が 1 であり、m および p が 0 である、構造 (I) のある特定の実施形態において、本発明の化合物は、反応スキーム 5 に従って調製され得る。化合物 19 は、購入され得るか、または当業者に公知の方法に従って調製され得る。19 をホルムアルデヒドと反応させた後、任意のアルコール保護基 (P) を除去することによって、アルコール 20 が得られる。20 を臭素化した後、アミン 8 で処理することによって、22 が得られる。次いで、

50

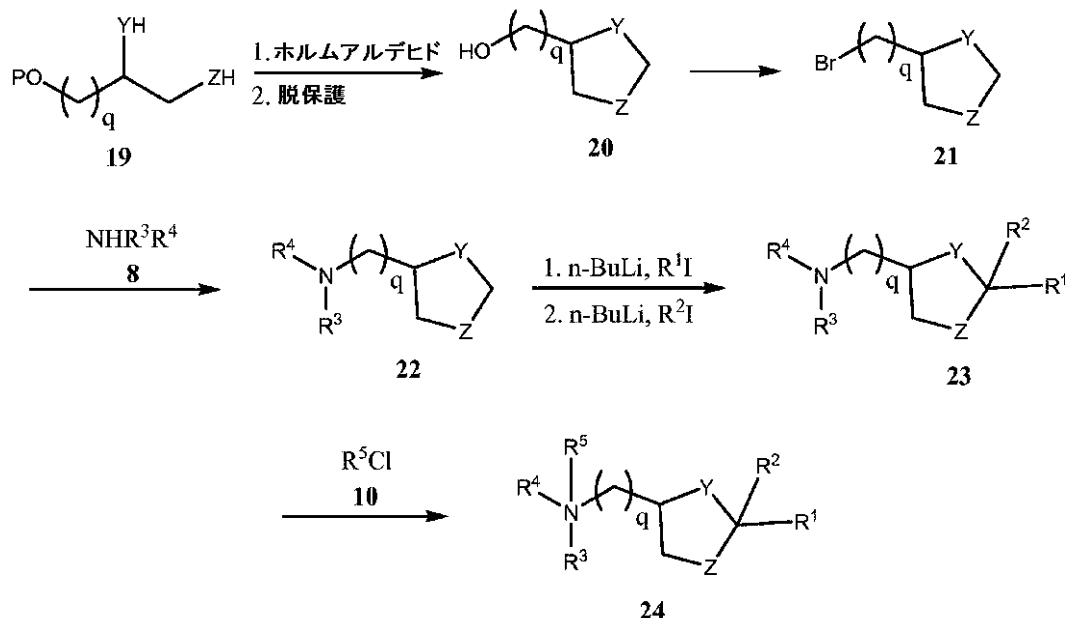
化合物 22 を n -ブチルリチウムおよび $R^1 I$ で処理した後、 n -ブチルリチウムおよび $R^2 I$ でさらに処理することにより、 R^5 が存在しない構造 (I) の化合物を得ることができる (23)。23 を 10 でさらに処理することによって、 R^5 が存在する構造 (I) の化合物が得られる (24)。

【0065】

5. 反応スキーム 5

【0066】

【化 14】



10

20

特定の実施形態において、本発明のアミノ脂質は、陽イオン性脂質である。本明細書で使用されるとき、用語「アミノ脂質」は、1または2つの脂肪酸または脂肪アルキル鎖、およびプロトン化されることにより生理学的 pH において陽イオン性脂質を形成し得るアミノ頭部基（アルキルアミノまたはジアルキルアミノ基を含む）を有する脂質を含むと意味される。

30

【0067】

他のアミノ脂質は、代替の脂肪酸基および他のジアルキルアミノ基（アルキル置換基が異なるもの（例えば、 N -エチル- N -メチルアミノ-、 N -プロピル- N -エチルアミノ-など）を含む）を有するアミノ脂質を含み得る。 R^{11} および R^{12} の両方が長鎖アルキル基またはアシル基である実施形態の場合、それらは、同じであり得るか、または異なり得る。一般に、特に、濾過滅菌のために複合体を約 0.3 ミクロン未満のサイズに揃えなければならないとき、より飽和の少ないアシル鎖を有するアミノ脂質のほうが、より容易にサイズが揃えられる。 $C_{14} \sim C_{22}$ の範囲の炭素鎖長を有する不飽和脂肪酸を含むアミノ脂質が、好ましい。他の骨格を使用することによっても、アミノ脂質のアミノ基と、脂肪酸部分または脂肪アルキル部分とを引き離すことができる。適当な骨格は、当業者

40

【0068】

ある特定の実施形態において、本発明のアミノ脂質または陽イオン性脂質は、少なくとも1つのプロトン化可能な基または脱プロトン化可能な基を有し、その脂質は、生理学的 pH（例えば、pH 7.4）以下のある pH において、正に帯電し、そして第2の pH において、好ましくは生理学的 pH 以上において中性である。当然のことながら、pH の関数としてのプロトンの付加または除去は、平衡過程であり、および帯電している脂質または中性の脂質に対する言及は、優勢な種の性質のことを指し、その脂質のすべてが帯電しているか、または中性の形態で存在する必要はないことが理解される。2つ以上のプロトン化可能もしくは脱プロトン化可能な基を有するか、または双性イオン性である脂質は、

50

本発明における使用から排除されない。

【0069】

ある特定の実施形態において、本発明に記載のプロトン化可能な脂質は、約4～約11の範囲の、プロトン化可能な基の pK_a を有する。これらの脂質が、より低 pH の製剤化段階において陽イオン性であるので、最も好ましいのは、約4～約7の pK_a であるが、粒子は、およそ pH 7.4の生理学的 pH において、大部分は（完全ではないが）表面中和される。この pK_a の利点の1つは、粒子の外表面と会合された少なくともいくつかの核酸が、生理学的 pH においてその静電相互作用を失い、単純透析によって除去され；ゆえに、クリアランスに対する粒子の感受性を大きく減少させる点である。

【0070】

B. 脂質粒子

本発明は、上に記載したアミノ脂質のうちの1つ以上を含む脂質粒子も提供する。脂質粒子としては、リポソームが挙げられるが、これに限定されない。本明細書中で使用されるとき、リポソームは、水性内部を囲い込む脂質含有膜を有する構造である。リポソームは、1つ以上の脂質膜を有し得る。本発明は、単層と称される単層状リポソームと、多層と称される多層状のリポソームの両方を企図する。脂質粒子は、核酸と複合体形成されるとき、例えば、Felgner, Scientific Americanに記載されているようにDNA層の間に挟まれた陽イオン性脂質二重層から構成されるリポプレックス(lipoplexes)でもあり得る。

【0071】

本発明の脂質粒子は、1つ以上の追加の脂質および/またはコレステロールなどの他の成分をさらに含み得る。他の脂質は、種々の目的のために（例えば、脂質の酸化を防止するため、またはリポソーム表面上にリガンドを接着させるために）本発明のリポソーム組成物に含められ得る。両親媒性、中性、陽イオン性および陰イオン性の脂質を含むいくつかの脂質のうちのいずれかが、本発明のリポソームに存在し得る。そのような脂質は、単独で、または組み合わせて、使用され得る。存在し得る追加の脂質成分の特定の例は、以下に記載される。

【0072】

本発明の脂質粒子に存在し得る追加の成分としては、ポリアミドオリゴマーなどの二重層安定化成分（例えば、米国特許第6,320,017号を参照のこと）、ペプチド、タンパク質、界面活性剤、脂質誘導体（例えば、ホスファチジルエタノールアミンに結合されたPEGおよびセラミドに結合体化されたPEG（米国特許第5,885,613号を参照のこと））が挙げられる。

【0073】

特定の実施形態において、脂質粒子は、第2のアミノ脂質または陽イオン性脂質、中性脂質、ステロール、および形成中に脂質粒子の凝集を減少させるために選択される脂質のうちの1つ以上を含み、その凝集の減少は、形成中の電荷誘導性の凝集を防止する粒子の立体的安定化に起因するものであり得る。

【0074】

形成中の粒子の凝集を減少させる脂質の例としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)で修飾された脂質、モノシアロガングリオシドGm1およびポリアミドオリゴマー（「PAO」）（米国特許第6,320,017号に記載されている）が挙げられる。PEG、Gm1またはATT Aのような製剤化中の凝集を防止する、無電荷で親水性で立体障害性の部分を有する他の化合物も、本発明の方法および組成物におけるように使用するために脂質に結合され得る。ATT A - 脂質は、例えば、米国特許第6,320,017号に記載されており、PEG - 脂質結合体は、例えば、米国特許第5,820,873号、同第5,534,499号および同第5,885,613号に記載されている。代表的には、凝集を減少させるために選択される脂質成分の濃度は、約1～15%（脂質のモルパーセント基準）である。

【0075】

本発明において有用な PEG 修飾脂質（または脂質 - ポリオキシエチレン結合体）の特定の例は、PEG 部分を脂質ベシクルの表面に固定する種々の「アンカー」脂質部分を有し得る。適当な PEG 修飾脂質の例としては、PEG 修飾ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジン酸、本明細書中で参考として援用される同時係属中の US N O 8 / 4 8 6 , 2 1 4 に記載されている PEG - セラミド結合体（例えば、PEG - Cer C 1 4 または PEG - Cer C 2 0 ）、PEG 修飾ジアルキルアミンおよび PEG 修飾 1 , 2 - ジアシルオキシプロパン - 3 - アミンが挙げられる。特に好ましいのは、PEG 修飾ジアルシルグリセロールおよび PEG 修飾ジアルキルグリセロールである。

【 0 0 7 6 】

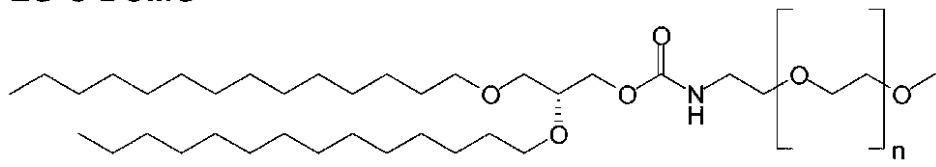
特定の実施形態において、PEG - 脂質は、以下：

【 0 0 7 7 】

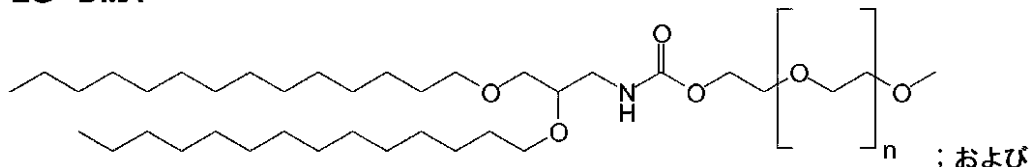
【 化 1 5 】

10

PEG-C-DOMG

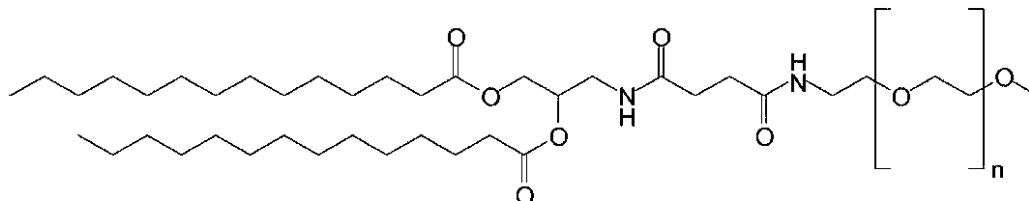


PEG - DMA



20

PEG-S-DMG



30

から選択される。

【 0 0 7 8 】

PEG または A T T A などの立体的に大きい部分が脂質アンカーに結合体化される実施形態において、脂質アンカーの選択は、その結合体が脂質粒子と有する会合のタイプに依存する。mePEG (mw 2000) - ジアステアロイルホスファチジルエタノールアミン (PEG - DSP E) が、その粒子が循環から取り除かれるまで（おそらくおよそ数日間）リボソームと会合されたままであることは、周知である。PEG - Cer C 2 0 などの他の結合体は、類似の滞留能力を有する。しかしながら、PEG - Cer C 1 4 は、血清に曝露されたときに、いくつかのアッセイでは 60 分未満の $T_{1/2}$ で、迅速に処方物から放される。米国特許出願 S N O 8 / 4 8 6 , 2 1 4 において説明されているように、少なくとも 3 つの特徴：アシル鎖の長さ、アシル鎖の飽和、および立体障害頭部基のサイズが、放出の速度に影響する。これらの特徴の適当なバリエーションを有する化合物が、本発明にとって有用であり得る。いくつかの治療的な用途のために、PEG 修飾脂質が、インビボにおいて核酸 - 脂質粒子から迅速に失われることが好ましいことがあり、ゆえに、PEG 修飾脂質は、比較的短い脂質アンカーを有し得る。他の治療的な用途では、核酸 - 脂質粒子が、より長い血漿循環残存時間を示すことが好ましいことがあり、ゆえに、PEG 修飾脂質は、比較的長い脂質アンカーを有し得る。

40

【 0 0 7 9 】

50

適切に機能するために、凝集防止化合物が必ずしも脂質の結合体化を必要とするわけではないことに注意すべきである。溶液中の遊離 P E G または遊離 A T T A は、凝集を防止するのに十分であり得る。粒子が製剤化後に安定である場合、P E G または A T T A は、被験体に投与する前に透析して除去され得る。

【 0 0 8 0 】

中性脂質は、脂質粒子内に存在するとき、生理学的 p H において無電荷型または中性の双性イオン型で存在するいくつかの脂質種のうちの任意のものであり得る。そのような脂質としては、例えば、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、ケファリンおよびセレブロシドが挙げられる。本明細書中に記載される粒子において使用するための中性脂質の選択は、一般に、例えば、リポソームのサイズおよび血流中のリポソームの安定性を考慮することによって導かれる。好ましくは、中性脂質成分は、2つのアシル基を有する脂質（すなわち、ジアシルホスファチジルコリンおよびジアシルホスファチジルエタノールアミン）である。様々な鎖の長さおよび飽和度の種々のアシル鎖基を有する脂質が、利用可能であるか、または周知の手法によって単離もしくは合成され得る。1つの群の実施形態において、C₁₄ ~ C₂₂ の範囲の炭素鎖長を有する飽和脂肪酸を含む脂質が、好ましい。別の群の実施形態では、C₁₄ ~ C₂₂ の範囲の炭素鎖長を有するモノまたはジ不飽和脂肪酸を有する脂質が、使用される。さらに、飽和脂肪酸鎖と不飽和脂肪酸鎖との混合物を有する脂質が、使用され得る。好ましくは、本発明において使用される中性脂質は、D O P E、D S P C、P O P C または任意の関連するホスファチジルコリンである。本発明において有用な中性脂質は、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、またはセリンおよびイノシトールなどの他の頭部基を有するリン脂質からも構成され得る。

【 0 0 8 1 】

脂質混合物のステロール成分は、存在するとき、リポソーム、脂質ベシクルまたは脂質粒子の調製の分野において従来から使用されているステロールのいずれかであり得る。好ましいステロールは、コレステロールである。

【 0 0 8 2 】

ほぼ生理学的 p H において正味の正電荷を有する他の陽イオン性脂質もまた、上で具体的に説明したものに加えて、本発明の脂質粒子に含められ得る。そのような陽イオン性脂質としては、N, N - ジオレイル - N, N - ジメチルアンモニウムクロリド（「D O D A C」）；N - （2, 3 - ジオレイルオキシ）プロピル - N, N - N - トリエチルアンモニウムクロリド（「D O T M A」）；N, N - ジステアシル - N, N - ジメチルアンモニウムブロミド（「D D A B」）；N - （2, 3 - ジオレオイルオキシ）プロピル - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロリド（「D O T A P」）；1, 2 - ジオレイルオキシ - 3 - トリメチルアミノプロパン塩化物塩（「D O T A P . C l」）；3 - （N - （N', N' - ジメチルアミノエタン） - カルバモイル）コレステロール（「D C - C h o l」）、N - （1 - （2, 3 - ジオレイルオキシ）プロピル） - N - 2 - （スペルミンカルボキサミド）エチル） - N, N - ジメチルアンモニウムトリフルオロアセテート（「D O S P A」）、ジオクタデシルアミドグリシルカルボキシスベルミン（「D O G S」）、1, 2 - ジオレオイル - s n - 3 - ホスホエタノールアミン（「D O P E」）、1, 2 - ジオレオイル - 3 - ジメチルアンモニウムプロパン（「D O D A P」）、N, N - ジメチル - 2, 3 - ジオレイルオキシ）プロピルアミン（「D O D M A」）およびN - （1, 2 - ジミリスチルオキシプロパ - 3 - イル） - N, N - ジメチル - N - ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（「D M R I E」）が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、陽イオン性脂質のいくつかの市販の調製物（例えば、L I P O F E C T I N（G I B C O / B R L から入手可能なD O T M A およびD O P E を含む）およびL I P O F E C T A M I N E（G I B C O / B R L から入手可能なD O S P A およびD O P E を含む））が使用され得る。特定の実施形態において、陽イオン性脂質は、アミノ脂質である。

【 0 0 8 3 】

本発明の脂質粒子における使用に適した陰イオン性脂質としては、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、N - ドデカノイルホスファチジルエタノールアミン、N - スクシニルホスファチジルエタノールアミン、N - グルタリルホスファチジルエタノールアミン、リシルホスファチジルグリセロールおよび中性脂質に結合される他の陰イオン性修飾基が挙げられるが、これらに限定されない。

【0084】

数多くの実施形態において、両親媒性脂質が、本発明の脂質粒子に含められる。「両親媒性脂質」とは、脂質材料の疎水性部分が疎水性相に向きつつ、親水性部分が水性相に向かっている、任意の適当な材料のことを指す。そのような化合物としては、リン脂質、アミノ脂質およびスフィンゴ脂質が挙げられるが、これらに限定されない。代表的なリン脂質としては、スフィンゴミエリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジイルノシトール、ホスファチジン酸、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリンまたはジリノレオイルホスファチジルコリンが挙げられる。スフィンゴ脂質、スフィンゴ糖脂質ファミリー、ジアシルグリセロールおよび - アシルオキシ酸などのリンを欠く他の化合物もまた使用され得る。さらに、そのような両親媒性の脂質は、トリグリセリドおよびステロールなどの他の脂質と容易に混合され得る。

【0085】

プログラム可能な融合脂質もまた、本発明の脂質粒子に含めるのに適している。そのような脂質粒子は、細胞膜と融合する傾向が低く、所与のシグナル事象が生じるまで積載物を送達する。このことにより、生物または疾患部位への注射後、細胞との融合を開始する前に、その脂質粒子がより均等に分配されることが可能になる。そのシグナル事象は、例えば、pH、温度、イオン環境の変化または時間であり得る。後者の場合、融合遅延成分または融合「覆い隠し(cloaking)」成分(例えば、ATTA-脂質結合体またはPEG-脂質結合体)は、単純に時間とともに脂質粒子膜から放され得る。脂質粒子が適切に身体に分配されるまでに、その脂質粒子は、融合性になるために十分な覆い隠し剤を失う。他のシグナル事象では、疾患部位または標的細胞と関連するシグナル(例えば、炎症の部位における高温)を選択することが望ましい。

【0086】

ある特定の実施形態において、細胞型または組織に特異的な標的化部分を用いて、本発明の脂質粒子を標的化することが望ましい。種々の標的化部分(例えば、リガンド、細胞表面レセプター、糖タンパク質、ビタミン(例えば、リボフラビン)およびモノクローナル抗体)を用いる脂質粒子の標的化は、以前に報告されている(例えば、米国特許第4,957,773号および同第4,603,044号を参照のこと)。標的化部分は、タンパク質全体またはそのフラグメントを含み得る。標的化の機序は、一般に、標的化部分が、標的、例えば、細胞表面レセプターと相互作用するのに利用可能であるような様式においては、標的化剤が脂質粒子の表面上に位置することを必要とする。種々の異なる標的化剤および標的化方法が、当該分野において公知であり、利用可能であり、それらには、例えば、Sapra, P. and Allen, TM, Prog. Lipid Res. 42(5):439-62(2003);およびAbra, RMら、J. Liposome Res. 12:1-3,(2002)に記載されているものが含まれる。

【0087】

標的化のためにポリエチレングリコール(PEG)鎖などの親水性ポリマー鎖の表面コーティングを有する脂質粒子、すなわち、リポソームを使用することが提案されている(Allenら、Biochimica et Biophysica Acta 1237:99-108(1995);DeFreesら、Journal of the American Chemistry Society 118:6101-6104(

1996); Blumeら、Biochimica et Biophysica Acta 1149:180-184(1993); Klibanovら、Journal of Liposome Research 2:321-334(1992); 米国特許第5,013,556号; Zalipsky, Bioconjugate Chemistry 4:296-299(1993); Zalipsky, FEBS Letters 353:71-74(1994); Zalipsky, Stealth Liposomes Chapter 9(Lasic and Martin, Eds) CRC Press, Boca Raton FL(1995)。1つのアプローチでは、脂質粒子を標的化するための抗体などのリガンドが、脂質粒子を形成する脂質の極性頭部基に連結される。別のアプローチでは、標的リガンドが、親水性ポリマーコーティングを形成するPEG鎖の遠位末端に結合される(Klibanovら、Journal of Liposome Research 2:321-334(1992); Kirpotinら、FEBS Letters 388:115-118(1996))。

【0088】

標的化剤を結合するために標準的な方法が用いられ得る。例えば、標的化剤の結合のために活性化され得るホスファチジルエタノールアミン、または脂質誘導体化プレオマイシンなどの誘導体化された脂肪親和性化合物が、使用され得る。抗体によって標的化されたりリポソームは、例えば、プロテインAを組み込むリポソームを用いて構築され得る(Renneisenら、J. Bio. Chem., 265:16337-16342(1990)およびLeonettiら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 87:2448-2451(1990)を参照のこと)。抗体結合体化の他の例は、米国特許第6,027,726号(その教示が本明細書中で参考として援用される)に開示されている。標的化部分の例としては、新生物または腫瘍に関連する抗原を含む細胞成分に特異的な他のタンパク質も挙げられ得る。標的化部分として使用されるタンパク質は、共有結合を介してリポソームに結合され得る(Heath, Covalent Attachment of Proteins to Liposomes, 149 Methods in Enzymology 111-119(Academic Press, Inc. 1987)を参照のこと)。他の標的化方法としては、ビオチン-アビジン系が挙げられる。

【0089】

1つの例示的な実施形態において、脂質粒子は、本発明のアミノ脂質と、中性脂質(アミノ脂質以外)と、ステロール(例えば、コレステロール)と、PEG修飾脂質(例えば、PEG-S-DMG、PEG-C-DMGまたはPEG-DMA)との混合物を含む。ある特定の実施形態において、その脂質混合物は、本発明のアミノ脂質、中性脂質、コレステロールおよびPEG修飾脂質からなるか、またはそれらから本質的になる。さらに好ましい実施形態において、脂質粒子は、約20~70%アミノ脂質:5~45%中性脂質:20~55%コレステロール:0.5~15%PEG修飾脂質というモル比での上記の脂質混合物からなるか、またはそれらから本質的になる。

【0090】

特定の実施形態において、脂質粒子は、例えば、約20~60%DLin-K-DMA:5~25%DSPC:25~55%Chol:0.5~15%PEG-S-DMG、PEG-C-DMGまたはPEG-DMAというモル比で、DLin-K-DMA、DSPC、CholおよびPEG-S-DMG、PEG-C-DMGまたはPEG-DMAからなるか、またはそれらから本質的になる。特定の実施形態において、その脂質モル比は、約40/10/40/10(mol%DLin-K-DMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMGまたはDLin-K-DMA/DSPC/Chol/PEG-C-DMGまたはDLin-K-DMA/DSPC/Chol/PEG-DMA)または35/15/40/10mol%DLin-K-DMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMGもしくはDLin-K-DMA/DSPC/Chol/PEG-C-DMGもしくはDLin-K-DMA/DSPC/Chol/PEG-DMAである。別の群の実施

形態では、これらの組成物中の中性脂質は、POPC、DOPEまたはSMで置き換えられる。

【0091】

C. 治療剤 - 脂質粒子組成物および処方物

本発明は、本発明の脂質粒子および活性な薬剤を含む組成物を含み、ここで、その活性な薬剤は、その脂質粒子と会合されている。特定の実施形態において、活性な薬剤は、治療剤である。特定の実施形態において、活性な薬剤は、脂質粒子の水性の内部の中に被包されている。他の実施形態において、活性な薬剤は、脂質粒子の1つ以上の脂質層の中に存在する。他の実施形態において、活性な薬剤は、脂質粒子の外部または内部の脂質表面に結合されている。

10

【0092】

「完全に被包された」は、本明細書中で使用されるとき、粒子内の核酸が、遊離DNAまたは遊離RNAを著しく分解し得る血清またはヌクレアーゼアッセイに曝露された後に著しく分解されないことを示す。完全に被包された系では、通常100%の遊離核酸を分解し得る処理において、好ましくは25%未満の粒子核酸が分解され、より好ましくは10%未満、最も好ましくは5%未満の粒子核酸が分解される。あるいは、完全な被包は、Oligreen（登録商標）アッセイによって判定され得る。Oligreen（登録商標）は、溶液中のオリゴヌクレオチドおよび一本鎖DNAもしくはRNAを定量するための超高感度の蛍光核酸染色である（Invitrogen Corporation, Carlsbad, CAから入手可能）。完全に被包されたとは、その粒子が、血清安定性であること、すなわち、その粒子が、インビボ投与された際にその構成要素に迅速に分解しないことも示唆する。

20

【0093】

活性な薬剤は、本明細書中で使用されるとき、細胞、組織、器官または被験体に対して所望の効果を発揮することができる任意の分子または化合物を包含する。そのような効果は、例えば、生物学的、生理学的、または美容的であり得る。活性な薬剤は、任意のタイプの分子または化合物であり得、それらとしては、例えば、核酸、ペプチドおよびポリペプチド（例えば、抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体フラグメント；ヒト化抗体、組換え抗体、組換えヒト抗体およびPrimatized^{商標}抗体）を含む）、サイトカイン、成長因子、アポトーシス因子、分化誘導因子、細胞表面レセプターおよびそのリガンド；ホルモン；ならびに有機小分子または有機小化合物を含む小分子が挙げられる。

30

【0094】

1つの実施形態において、活性な薬剤は、治療剤またはその塩もしくは誘導体である。治療剤の誘導体は、治療的に活性なそれ自体であってもよいし、さらに改変された際に活性になるプロドラッグであってもよい。したがって、1つの実施形態において、治療剤の誘導体は、未改変の薬剤と比べて、治療活性のうちのいくつか、またはすべてを保持するが、別の実施形態では、治療剤の誘導体は、治療活性を欠く。

【0095】

様々な実施形態において、治療剤には、任意の治療的に有効な薬剤または薬物（例えば、抗炎症性化合物、抗うつ薬、刺激剤、鎮痛薬、抗生物質、受胎調節剤、解熱薬、血管拡張薬、抗血管新生薬、細胞血管作動薬（cytovascular agents）、シグナル伝達阻害剤、心臓血管薬、例えば、抗不整脈剤、血管収縮薬、ホルモンおよびステロイド）が含まれる。

40

【0096】

ある特定の実施形態において、治療剤は、抗腫瘍薬、抗癌薬、腫瘍薬、抗悪性腫瘍剤などとも称されることがあるオンコロジー薬である。本発明に従って使用され得るオンコロジー薬の例としては、アドリマイシン、アルケラン（alkeran）、アロプリノール、アルトレタミン（altretamine）、アミホスチン（amifostine）、アナストロゾール、araC、三酸化ヒ素、アザチオプリン、ベキサロテン、bic

50

NU、ブレオマイシン、ブスルファン静注、ブスルファン経口、カペシタビン (Xeloda)、カルボプラチン、カルムスチン、CCNU、セレコキシブ、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、シクロスポリンA、シタラピン、シトシンアラビノシド、ダウノルビシン、シトキサン (cytoxan)、ダウノルビシン、デキサメタゾン、デクスラゾキサン、ドセタキセル、ドキシソルビシン、ドキシソルビシン、DTIC、エピルビシン、エストラムスチン、リン酸エトポシド、エトポシドおよびVP-16、エキセメスタン、FK506、フルダラビン、フルオロウラシル、5-FU、ゲムシタビン (Gemzar)、ゲムツズマブ-オゾガミシン、酢酸ゴセレリン、ハイドレア (hydreia)、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、メシル酸イマチニブ、インターフェロン、イリノテカン (Campthostar、CPT-111)、レトロゾール、ロイコボリン、ロイスタチン、ロイプロリド、レバミゾール、アリトレチノイン、メゲストロール、メルファラン、L-PAM、メスナ (mesna)、メトトレキサート、メトキサレン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ナイトロジェンマスタード、パクリタキセル、パミドロネート、ペガデマゼ、ペントスタチン、ボルフィマーナトリウム、プレドニゾン、リツキサン、ストレプトゾシン、STI-571、タモキシフェン、タキソテル、テモゾロミド、テニポシド、VM-26、トポテカン (Hy camtin)、トレミフェン、トレチノイン、ATRA、バルルビシン、ベルバン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、VP16およびビノレルピンが挙げられるが、これらに限定されない。本発明に従って使用され得るオンコロジー薬の他の例は、エリブチシンおよびエリブチシンアナログまたは誘導体、エボチロン、細胞内キナーゼインヒビターならびにカンプト

10

20

【0097】

1. 核酸 - 脂質粒子

ある特定の実施形態において、本発明の脂質粒子は、核酸と会合されることにより、核酸 - 脂質粒子を生じる。特定の実施形態において、核酸は、脂質粒子内に完全に被包される。本明細書中で使用されるとき、用語「核酸」は、任意のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含むと意味される。最大50ヌクレオチドを含むフラグメントが、一般にオリゴヌクレオチドと呼ばれ、それよりも長いフラグメントは、ポリヌクレオチドと呼ばれる。特定の実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、20~50ヌクレオチド長である。

30

【0098】

本発明の文脈において、用語「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」とは、天然に存在する塩基、糖および糖間 (バックボーン) 結合からなるヌクレオチドモノマーまたはヌクレオチドモノマーのポリマーまたはオリゴマーのことを指す。用語「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、同様に機能する天然に存在しないモノマーまたはその一部を含むポリマーまたはオリゴマーも含む。そのような修飾オリゴヌクレオチドまたは置換オリゴヌクレオチドは、例えば、細胞の取り込みが高く、ヌクレアーゼの存在下において安定性が高いという特性を有するので、天然型よりも好ましいことが多い。

【0099】

オリゴヌクレオチドは、デオキシリボオリゴヌクレオチドまたはリボオリゴヌクレオチドとして分類される。デオキシリボオリゴヌクレオチドは、この糖の5'および3'炭素においてホスフェートに共有結合したデオキシリボースと呼ばれる5-炭素糖からなり、交互の非分枝鎖ポリマーを形成する。リボオリゴヌクレオチドは、5-炭素糖がリボースである同様の繰り返し構造からなる。

40

【0100】

本発明に記載の脂質 - 核酸粒子内に存在する核酸は、知られている任意の形態の核酸を含む。本明細書中で使用される核酸は、一本鎖のDNAもしくはRNA、または二本鎖のDNAもしくはRNA、あるいはDNA-RNAハイブリッドであり得る。二本鎖DNAの例としては、構造遺伝子、遺伝子 (調節領域および終結領域を含む) および自己複製系

50

(例えば、ウイルスDNAまたはプラスミドDNA)が挙げられる。二本鎖RNAの例としては、siRNAおよび他のRNA干渉剤が挙げられる。一本鎖核酸としては、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、マイクロRNAおよび三重鎖形成オリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0101】

本発明の核酸は、通常、核酸の特定の形態に依存する様々な長さであり得る。例えば、特定の実施形態において、プラスミドまたは遺伝子は、約1,000~100,000ヌクレオチド残基長であり得る。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、約10~100ヌクレオチド長の範囲であり得る。様々な関連する実施形態において、一本鎖、二本鎖および三本鎖のすべてのオリゴヌクレオチドは、約10~約50ヌクレオチド長、約20~約50ヌクレオチド長、約15~約30ヌクレオチド長、約20~約30ヌクレオチド長の長さの範囲であり得る。

10

【0102】

特定の実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチド(またはその鎖)は、標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするか、または相補的である。「特異的にハイブリダイズ可能」および「相補的」は、DNA標的またはRNA標的とオリゴヌクレオチドとの間に安定かつ特異的な結合が生じるのに十分な程度の相補性を示すために使用される用語である。オリゴヌクレオチドは、特異的にハイブリダイズ可能であるその標的核酸配列に対して100%相補的である必要はないことが理解される。標的へのオリゴヌクレオチドの結合が、標的分子の正常な機能を妨害することにより、有用性またはそのオリゴヌクレオチドからの発現が失われ、そして特異的な結合が望まれる条件下、すなわち、インビボアッセイもしくは治療的な処置の場合は生理学的条件下、またはインビトロアッセイの場合はそのアッセイが行われる条件下において、非標的配列へのそのオリゴヌクレオチドの非特異的な結合を回避するのに十分な程度の相補性が存在するとき、そのオリゴヌクレオチドは、特異的にハイブリダイズ可能である。したがって、他の実施形態では、このオリゴヌクレオチドは、それが標的化しているか、またはそれが特異的にハイブリダイズする遺伝子またはmRNA配列の領域と比べて、1、2または3塩基の置換を含む。

20

【0103】

RNA干渉核酸

特定の実施形態において、本発明の核酸-脂質粒子は、RNA干渉(RNAi)分子と会合される。RNAi分子を用いるRNA干渉法は、目的の遺伝子またはポリヌクレオチドの発現を破壊するために使用され得る。最近5年間で、低分子干渉RNA(siRNA)が、本質的に、開発中の次世代の標的化オリゴヌクレオチド薬物としてアンチセンスODNおよびリボザイムに取って代わった。siRNAは、RNAi誘導サイレンシング複合体(RISC)として知られる細胞質の多タンパク質複合体と会合し得る通常21~30ヌクレオチド長のRNA二重鎖である。siRNAを搭載したRISCは、相同なmRNA転写物の分解を媒介するので、siRNAは、高い特異性でタンパク質発現をノックダウンするように設計され得る。他のアンチセンス技術とは異なり、天然のメカニズムを介するsiRNA機能は、非コードRNAを介して遺伝子発現を調節するように進化した。このことは、一般に、それらの活性が、アンチセンスODNまたはリボザイムよりも、インビトロおよびインビボにおいてより強力である理由であると考えられている。種々のRNAi試薬(臨床的に関連性のある標的を標的化するsiRNAを含む)が、例えば、de Fougereolles, A.ら、Nature Reviews 6:443-453(2007)に記載されているように、現在、医薬開発中である。

30

40

【0104】

初めて報告されたRNAi分子は、RNAセンス鎖とRNAアンチセンス鎖の両方を含むRNA:RNAハイブリッドだったが、現在、DNAセンス:RNAアンチセンスハイブリッド、RNAセンス:DNAアンチセンスハイブリッド、およびDNA:DNAハイブリッドが、RNAiを媒介することができると証明されている(Lamberton, J. S. and Christian, A. T., (2003) Molecular B

50

i o t e c h n o l o g y 24:111-119)。したがって、本発明は、これらの様々なタイプの二本鎖分子のいずれかを含むRNAi分子の使用を含む。さらに、RNAi分子が、種々の形態で使用され得、そして細胞に導入され得ることが理解される。したがって、本明細書中で使用されるとき、RNAi分子は、細胞においてRNAi応答を誘導することができる任意およびすべての分子を包含し、それらとしては、2本の別々の鎖、すなわち、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む二本鎖ポリヌクレオチド、例えば、低分子干渉RNA (siRNA)；二本鎖領域を形成する相補的配列のヘアピンループを含むポリヌクレオチド、例えば、shRNAi分子、および単独で、または別のポリヌクレオチドと組み合わせて、二本鎖ポリヌクレオチドを形成することができる1つ以上のポリヌクレオチドを発現する発現ベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0105】

RNA干渉 (RNAi) は、標的ポリヌクレオチドの発現を特異的に阻害するために使用され得る。遺伝子および核酸の発現の二本鎖RNA媒介性の抑制は、dsRNA、siRNAまたはshRNAを細胞または生物に導入することによって、本発明に従って達成され得る。siRNAは、二本鎖RNA、すなわち、RNAとDNAの両方、例えば、1本のRNA鎖および1本のDNA鎖を含むハイブリッド分子であり得る。siRNAを細胞に直接導入することにより、哺乳動物細胞においてRNAiが引き起こされ得ることが証明されている (Elshabir, S. M. ら、Nature 411:494-498 (2001))。さらに、哺乳動物細胞における抑制は、RNAレベルで生じ、そして標的化遺伝子に特異的であり、RNA抑制とタンパク質抑制との間には強い相関があった (Caplen, N. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9746-9747 (2001))。さらに、HeLaS3、COS7、293、NIH/3T3、A549、HT-29、CHO-K1およびMCF-7細胞を含む多岐にわたる細胞株が、いくらかのレベルのsiRNAサイレンシングに感受性であることが示されている (Brown, D. ら、TechNotes 9(1):1-7、<http://www.dot.ambion.dot.com/techlib/tn/91/912.html>において入手可能 (9/1/02))。

20

【0106】

特定のポリヌクレオチドを標的化するRNAi分子は、当該分野で公知の手順に従って容易に調製され得る。有効なsiRNA分子の構造上の特徴は、同定されている。Elshabir, S. M. ら (2001) Nature 411:494-498およびElshabir, S. M. ら (2001), EMBO 20:6877-6888。したがって、当業者は、多岐にわたる様々なsiRNA分子が、特定の遺伝子または転写物を標的化するために使用され得ることを理解するだろう。ある特定の実施形態において、本発明に記載のsiRNA分子は、二本鎖であり、16~30または18~25ヌクレオチド長 (その中間の各整数を含む) である。1つの実施形態において、siRNAは、21ヌクレオチド長である。ある特定の実施形態において、siRNAは、0~7ヌクレオチドの3'オーバーハングまたは0~4ヌクレオチドの5'オーバーハングを有する。1つの実施形態において、siRNA分子は、2ヌクレオチドの3'オーバーハングを有する。1つの実施形態において、siRNAは、2ヌクレオチドの3'オーバーハングを有する21ヌクレオチド長である (すなわち、それらは、センス鎖とアンチセンス鎖との間に19ヌクレオチドの相補的領域を含む)。ある特定の実施形態において、オーバーハングは、UUまたはdTdTの3'オーバーハングである。

30

40

【0107】

1塩基対のミスマッチでさえも、サイレンシングを減少させると示されているので、一般に、siRNA分子は、標的DNA分子の一方の鎖に完全に相補的である。他の実施形態において、siRNAは、例えば、2'-デオキシ-または2'-O-メチル修飾などの修飾されたバックボーン組成を有し得る。しかしながら、好ましい実施形態において、siRNAの鎖全体が、2'-デオキシまたは2'-O-修飾塩基を用いて作製されたものではない。

50

【0108】

1つの実施形態において、*siRNA* 標的部位は、*AA* ジヌクレオチド配列の出現について標的 *mRNA* 転写物配列をスキャンすることによって選択される。3' 隣接の約 19ヌクレオチドと組み合わせられた各 *AA* ジヌクレオチド配列は、潜在的な *siRNA* 標的部
位である。1つの実施形態において、調節領域に結合するタンパク質が *siRNP* エンド
ヌクレアーゼ複合体の結合を妨害し得るので、*siRNA* 標的部位は、5' および 3' 非
翻訳領域 (UTR) または開始コドン付近 (約 75 塩基以内) の領域内に優先的に配置し
ない (Elshabir, S. ら、Nature 411: 494 - 498 (2001)
; Elshabir, S. ら、EMBO J. 20: 6877 - 6888 (2001))
。さらに、潜在的な標的部位は、www.ncbi.nlmにおけるNCBIサーバー上
で利用可能なBLASTN2.0.5などの適切なゲノムデータベースと比較され得、そ
して他のコード配列と著しく相同な潜在的標的配列が除外され得る。

10

【0109】

特定の実施形態において、短いヘアピンRNAは、本発明の核酸 - 脂質粒子の核酸成分
を構成する。短いヘアピンRNA (*shRNA*) は、標的遺伝子の発現を配列特異的に減
少させることができるヘアピンRNAの形態である。短いヘアピンRNAは、一般に、細
胞環境における分解に対してより安定であり、かつ感受性が低いので、遺伝子発現の抑制
の際に *siRNA* よりも利点をもたらし得る。そのような短いヘアピンRNAに媒介され
る遺伝子サイレンシングは、種々の正常細胞株および癌細胞株、ならびに哺乳動物細胞 (
マウスおよびヒトの細胞を含む) において機能することが確認されている。Paddis
on, P. ら、Genes Dev. 16 (8): 948 - 58 (2002)。さらに、
操作された *shRNA* をコードする染色体遺伝子を有するトランスジェニック細胞株が、
作製されている。これらの細胞は、*shRNA* を恒常的に合成することができ、それによ
り、子孫細胞に受け継がれ得る持続的または構成的な遺伝子サイレンシングが促進される
。Paddison, P. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (3): 1443 - 1448 (2002)。

20

【0110】

shRNA は、ステムループ構造を含む。ある特定の実施形態において、それらは、代
表的には 19 ~ 29ヌクレオチド長またはその中間の任意の数の、不定のステム長を含み
得る。ある特定の実施形態において、ヘアピンは、19 ~ 21ヌクレオチドのステムを含
むが、他の実施形態では、ヘアピンは、27 ~ 29ヌクレオチドのステムを含む。ある特
定の実施形態において、ループサイズは、4 ~ 23ヌクレオチド長であるが、ループサイ
ズは、サイレンシング活性に著しく影響しなければ23ヌクレオチドより長くてもよい。
shRNA 分子は、効力を低下させなければ、*shRNA* のステムの2本の鎖の間にミス
マッチ、例えば、G - U mismatchesを含んでもよい。実際に、ある特定の実施形態におい
て、*shRNA* は、例えば、細菌内での増殖中にヘアピンを安定化させるために、ヘアピ
ンステムにおいて1つまたはいくつかのG - U対形成を含むように設計される。しかしな
がら、代表的には、標的 *mRNA* (アンチセンス鎖) に結合するステムの部分とその *mR*
NA との間の相補性が必要とされ、この領域内の1塩基対の mismatchesでさえも、サイレ
ンシングを無効にし得る。5' および 3' オーバーハングは、*shRNA* 機能にとって重
大ではないらしいので、それらは必要ではないが、存在してもよい (Paddison
& Dev. 16 (8): 948 - 58)。

30

40

【0111】

マイクロRNA

マイクロRNA (*miRNA*) は、植物および動物のゲノム内のDNAから転写される
が、タンパク質に翻訳されない、高度に保存されたクラスの小RNA分子である。プロセ
シングされた *miRNA* は、RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) に組み込まれ
る一本鎖の約 17 ~ 25ヌクレオチド (nt) のRNA分子であり、発生、細胞増殖、ア
ポトーシスおよび分化の鍵となる制御因子として同定されている。それらは、特定の *mR*
NA の 3' 非翻訳領域に結合することによって遺伝子発現の制御に関与すると考えられて

50

いる。RISCは、翻訳の阻害、転写物の切断、またはその両方を介して、遺伝子発現のダウンレギュレーションを媒介する。RISCは、広範囲の真核生物の核における転写性のサイレンシングにも関わる。

【0112】

現在までに同定されているmiRNA配列の数は、多く、かつ増加しており、それらの例示的な例は、例えば：“miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature” Griffiths - Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. NAR, 2006, 34, Database Issue, D140 - D144; “The microRNA Registry” Griffiths - Jones S. NAR, 2004, 32, Database Issue, D109 - D111; および <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/> に見られる。

10

【0113】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

1つの実施形態において、核酸は、標的ポリヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。用語「アンチセンスオリゴヌクレオチド」または単に「アンチセンス」は、標的化ポリヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドを含むと意味される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、選択された配列に相補的な一本鎖のDNAまたはRNAである。アンチセンスRNAの場合、それらは、相補的なRNA鎖に結合することによって、その翻訳を妨げる。アンチセンスDNAを使用することにより、特異的で相補的な（コードまたは非コード）RNAを標的化することができる。結合が生じる場合、このDNA/RNAハイブリッドは、酵素のRNase Hによって分解され得る。特定の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約10～約50ヌクレオチド、より好ましくは、約15～約30ヌクレオチドを含む。この用語は、所望の標的遺伝子に対して正確に相補的でないかもしれないアンチセンスオリゴヌクレオチドも包含する。したがって、標的非特異的な活性がアンチセンスにおいて見られる場合、または標的配列との1つ以上のミスマッチを含むアンチセンス配列が特定の用途にとって最も好ましい場合に、本発明が、利用され得る。

20

【0114】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、タンパク質合成の標的化された有効なインヒビターであると証明されており、その結果として、それを用いることにより、標的化された遺伝子によるタンパク質合成を特異的に阻害することができる。タンパク質合成を阻害するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性は、確立されている。例えば、ポリガラクトナーゼおよびムスカリン2型アセチルコリンレセプターの合成は、それらのそれぞれのmRNA配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドによって阻害される（米国特許第5,739,119号および米国特許第5,759,829号）。さらに、アンチセンス阻害の例は、核タンパク質のサイクリン、多剤耐性遺伝子（MDG1）、ICAM-1、E-セレクトイン、STK-1、線条体のGABA_AレセプターおよびヒトEGFを用いて証明されている（Jaskulskiら、Science. 1988 Jun 10; 240(4858): 1544-6; Vasanthakumar and Ahmed, Cancer Commun. 1989; 1(4): 225-32; Perisら、Brain Res Mol Brain Res. 1998 Jun 15; 57(2): 310-20; 米国特許第5,801,154号; 米国特許第5,789,573号; 米国特許第5,718,709号および米国特許第5,610,288号）。さらに、アンチセンス構築物は、種々の異常な細胞増殖、例えば、癌を阻害すること、そしてそれを処置するために使用され得ることも報告されている（米国特許第5,747,470号; 米国特許第5,591,317号および米国特許第5,783,683号）。

30

40

【0115】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを作製する方法は、当該分野で公知であり、任意のポ

50

リヌクレオチド配列を標的化するアンチセンスオリゴヌクレオチドを作製するために容易に適應され得る。所与の標的配列に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド配列の選択は、選択された標的配列の解析、ならびに二次構造、 T_m 、結合エネルギーおよび相対的な安定性の決定に基づく。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ダイマー、ヘアピン、または宿主細胞における標的mRNAへの特異的結合を減少させ得るかもしくは妨げ得る他の二次構造を相対的に形成することができないことに基づいて選択され得る。mRNAの高度に好ましい標的領域は、AUG翻訳開始コドンにおける領域またはその付近の領域、およびそのmRNAの5'領域に実質的に相補的な配列を含む。これらの二次構造解析および標的部位の選択の考慮は、例えば、OLIGOプライマー解析ソフトウェアのv. 4 (Molecular Biology Insights) および/またはBLAST N2.0.5アルゴリズムソフトウェア(Altschulら、Nucleic Acids Res. 1997, 25(17): 3389-402)を用いて、行われ得る。

【0116】

リボザイム

本発明の別の実施形態によると、核酸-脂質粒子は、リボザイムと会合される。リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を有する特定の触媒ドメインを有するRNA-タンパク質複合体である(Kim and Cech, Proc Natl Acad Sci USA. 1987 Dec; 84(24): 8788-92; Forster and Symons, Cell. 1987 Apr 24; 49(2): 211-20)。例えば、たくさんリボザイムが、しばしばオリゴヌクレオチド基質内のいくつかのリン酸エステルの中の1つだけを切断する高度の特異性によって、リン酸エステル転移反応を加速させる(Cechら、Cell. 1981 Dec; 27(3 Pt 2): 487-96; Michel and Westhof, J Mol Biol. 1990 Dec 5; 216(3): 585-610; Reinhold-Hurek and Shub, Nature. 1992 May 14; 357(6374): 173-6)。この特異性は、特異的な塩基対形成相互作用を介して、化学反応前に基質がリボザイムの内部のガイド配列(「IGS」)に結合する必要があることに起因している。

【0117】

天然に存在する酵素的RNAの少なくとも6つの基本的な多様性が現在知られている。各々は、生理学的条件下においてイントランスで(in trans) RNAホスホジエステル結合の加水分解を触媒し得る(ゆえに、他のRNA分子を切断し得る)。一般に、酵素的核酸は、まず標的RNAに結合することによって作用する。そのような結合は、標的RNAを切断するように作用する分子の酵素的部分と近位に保持されている酵素的核酸の標的結合部分を介して生じる。したがって、酵素的核酸は、まず、標的RNAを認識し、次いで相補的な塩基対形成によってそれに結合し、いったん正確な部位に結合したら、標的RNAを切断するように酵素的に作用する。そのような標的RNAの戦略的な切断は、コードされるタンパク質の合成を指示する能力を破壊する。酵素的核酸は、そのRNA標的に結合し、切断した後、その核酸がそのRNAから放出されることにより、別の標的を捜し、そして繰り返し新しい標的に結合して切断し得る。

【0118】

酵素的核酸分子は、例えば、ハンマーヘッド型、ヘアピン型、肝炎ウイルス、グループIイントロンまたはRNase P RNA(RNAガイド配列と会合した状態)またはNeurospora VS RNAモチーフとして形成され得る。ハンマーヘッド型モチーフの特定の例は、Rossiら、Nucleic Acids Res. 1992 Sep 11; 20(17): 4559-65に記載されている。ヘアピンモチーフの例は、Hampelら(Eur. Pat. Appl. Publ. No. EP0360257)、Hampel and Tritz, Biochemistry 1989 Jun 13; 28(12): 4929-33; Hampelら、Nucleic Acids Res. 1990 Jan 25; 18(2): 299-304および米国特許第5,631,359号に記載されている。肝炎ウイルスモチーフの例は、Perrotta

and Been, Biochemistry. 1992 Dec 1; 31(47): 11843-52 によって報告されており; RNase P モチーフの例は、Guerrier-Takadaら、Cell. 1983 Dec; 35(3 Pt 2): 849-57 によって報告されており; Neurospora VS RNA リボザイムモチーフは、Collins (Saville and Collins, Cell. 1990 May 18; 61(4): 685-96; Saville and Collins, Proc Natl Acad Sci USA. 1991 Oct 1; 88(19): 8826-30; Collins and Olive, Biochemistry. 1993 Mar 23; 32(11): 2795-9) によって報告されており; そしてグループ I イントロンの例は、米国特許第 4,987,071 号に記載されている。本発明に従って使用される酵素的核酸分子の重要な特徴は、それらが、標的遺伝子の DNA 領域または RNA 領域の 1 つ以上に相補的である特異的な基質結合部位を有すること、およびその分子に RNA 切断活性を付与するヌクレオチド配列を基質結合部位内または基質結合部位周辺に有することである。したがって、リボザイム構築物は、本明細書中で述べられる特定のモチーフに限定される必要はない。

10

【0119】

任意のポリヌクレオチド配列に対して標的化されたリボザイムを作製する方法は、当該分野で公知である。リボザイムは、国際特許出願公開番号 WO 93/23569 および国際特許出願公開番号 WO 94/02595 (各々が、明確に本明細書中で参考として援用される) に記載されているように設計され得、そして合成され得ることにより、それらに

20

【0120】

リボザイム活性は、リボザイムの結合アームの長さを変更すること、または血清リボヌクレアーゼによる分解を防止する修飾を有するリボザイムを化学的に合成すること (例えば、国際特許出願公開番号 WO 92/07065; 国際特許出願公開番号 WO 93/15187; 国際特許出願公開番号 WO 91/03162; 欧州特許出願公開番号 92110298.4; 米国特許第 5,334,711 号; および国際特許出願公開番号 WO 94/13688 を参照のこと。これらは、酵素的 RNA 分子の糖部分になされ得る様々な化学修飾を記載している)、細胞内でのそれらの有効性を高める修飾、および RNA 合成時間を短縮し、化学的必要性を低下させるステム II 塩基の除去によって、最適化され得る。

30

【0121】

免疫賦活性オリゴヌクレオチド

本発明の脂質粒子に会合される核酸は、免疫賦活性であり得、それらは、哺乳動物または他の患者であり得る被験体に投与されたときに免疫応答を誘導することができる免疫賦活性オリゴヌクレオチド (ISS; 一本鎖または二本鎖) を含む。ISS としては、例えば、ヘアピン二次構造 (Yamamoto S. ら (1992) J. Immunol. 148: 4072-4076 を参照のこと) または CpG モチーフ、ならびに他の公知の ISS の特徴 (例えば、マルチ G ドメイン、WO 96/11266 を参照のこと) をもたらすある特定のパンドロームが挙げられる。

【0122】

その免疫応答は、生得免疫応答であってもよいし、獲得免疫応答であってもよい。免疫系は、脊椎動物のより先天性の免疫系および後天性の獲得免疫系に分けられ、後者は、体液性細胞性構成要素にさらに分けられる。特定の実施形態において、免疫応答は、粘膜性であり得る。

40

【0123】

特定の実施形態において、免疫賦活性核酸は、脂質粒子と併用して投与されるときは単なる免疫賦活性であり、そして「遊離型」で投与されるときは免疫賦活性でない。本発明によると、そのようなオリゴヌクレオチドは、免疫賦活性であると考えられる。

【0124】

免疫賦活性核酸は、免疫応答を惹起するために、それらが、標的ポリヌクレオチドに特

50

異的に結合し、そしてその発現を低下させる必要がないとき、配列特異的でないと考えられる。したがって、ある特定の免疫賦活性核酸は、天然に存在する遺伝子またはmRNAの領域に対応する配列を含み得るが、それらは、なおも配列特異的でない免疫賦活性核酸と考えられ得る。

【 0 1 2 5 】

1つの実施形態において、免疫賦活性の核酸またはオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのCpGジヌクレオチドを含む。そのオリゴヌクレオチドまたはCpGジヌクレオチドは、メチル化されていなくてもよいし、メチル化されていてもよい。別の実施形態では、免疫賦活性核酸は、メチル化されたシトシンを有する少なくとも1つのCpGジヌクレオチドを含む。1つの実施形態において、その核酸は、単一のCpGジヌクレオチドを含み、ここで、前記CpGジヌクレオチド中のシトシンは、メチル化されている。特定の実施形態において、その核酸は、配列5' T A A C G T T G A G G G G C A T 3' (配列番号2)を含む。代替の実施形態では、その核酸は、少なくとも2つのCpGジヌクレオチドを含み、ここで、そのCpGジヌクレオチド中の少なくとも1つのシトシンは、メチル化されている。さらなる実施形態において、その配列内に存在するCpGジヌクレオチド中の各シトシンは、メチル化されている。別の実施形態では、その核酸は、複数のCpGジヌクレオチドを含み、ここで、前記CpGジヌクレオチドのうちの少なくとも1つは、メチル化されたシトシンを含む。

【 0 1 2 6 】

1つの特定の実施形態において、その核酸は、配列5' T T C C A T G A C G T T C C T G A C G T 3' (配列番号33)を含む。別の特定の実施形態において、その核酸配列は、配列5' T C C A T G A C G T T C C T G A C G T 3' (配列番号31)を含み、ここで、太字で示されている2つのシトシンは、メチル化されている。特定の実施形態において、ODNは、以下に示されるようなODN#1、ODN#2、ODN#3、ODN#4、ODN#5、ODN#6、ODN#7、ODN#8およびODN#9からなるODNの群から選択される。

【 0 1 2 7 】

【表1 - 1】

表1. 例示的な免疫賦活性オリゴヌクレオチド(ODN)

ODN名	配列番号	ODN配列(5'-3') .
ODN 1 (INX-6295) ヒトc-myc	配列番号 2	5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3
* ODN 1m (INX-6303)	配列番号 4	5'-TAAZGTTGAGGGGCAT-3
ODN 2 (INX-1826)	配列番号 1	5'-TCCATGACGTTCCCTGACGTT-3
* ODN 2m (INX-1826m)	配列番号 31	5'-TCCATGAZGTTCCCTGAZGTT-3

【 0 1 2 8 】

【表 1 - 2】

ODN 名	配列番号	ODN 配列 (5'-3') .
ODN 3 (INX-6300)	配列番号 3	5'-TAAGCATACGGGGTGT-3
ODN 5 (INX-5001)	配列番号 5	5'-AACGTT-3
ODN 6 (INX-3002)	配列番号 6	5'-GATGCTGTGTCGGGGTCTCCGGGC-3'
ODN 7 (INX-2006)	配列番号 7	5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'
ODN 7m (INX-2006m)	配列番号 32	5'-TZGTZGTTTTGTZGTTTTGTZGTT-3'
ODN 8 (INX-1982)	配列番号 8	5'-TCCAGGACTTCTCTCAGGTT-3'
ODN 9 (INX-G3139)	配列番号 9	5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3'
ODN 10 (PS-3082)	配列番号 10	5'-TGCATCCCCCAGGCCACCAT-3
マウス細胞内 接着分子-1		
ODN 11 (PS-2302)	配列番号 11	5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
ヒト細胞内 接着分子-1		
ODN 12 (PS-8997)	配列番号 12	5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
ヒト細胞内 接着分子-1		
ODN 13 (US3)	配列番号 13	5'-GGT GCTCACTGC GGC-3'
ヒトerb-B-2		
ODN 14 (LR-3280)	配列番号 14	5'-AACC GTT GAG GGG CAT-3'
ヒトc-myc		

【 0 1 2 9 】

【表 1 - 3】

ODN 名	配列番号	ODN 配列 (5'-3') .
ODN 15 (LR-3001) ヒトc-myc	配列番号 15	5'-TAT GCT GTG CCG GGG TCT TCG GGC-3'
ODN 16 (lnx-6298)	配列番号 16	5'-GTGCCG GGGTCTTCGGGC-3'
ODN 17 (hIGF-1R) ヒトインスリン 成長因子1-レセプター	配列番号 17	5'-GGACCCTCCTCCGGAGCC-3'
ODN 18 (LR-52) ヒトインスリン 成長因子1-レセプター	配列番号 18	5'-TCC TCC GGA GCC AGA CTT-3'
ODN 19 (hEGFR) ヒト上皮成長因子- レセプター	配列番号 19	5'-AAC GTT GAG GGG CAT-3'
ODN 20 (EGFR) 上皮成長因子- レセプター	配列番号 20	5'-CCGTGGTCA TGCTCC-3'
ODN 21 (hVEGF) ヒト血管内皮成長因子	配列番号 21	5'-CAG CCTGGCTCACCG CCTTGG-3'
ODN 22 (PS-4189) マウスホスホキナーゼ C-アルファ	配列番号 22	5'-CAG CCA TGG TTC CCC CCA AC-3'
ODN 23 (PS-3521)	配列番号 23	5'-GTT CTC GCT GGT GAG TTT CA-3'

【 0 1 3 0 】

10

20

30

40

【表 1 - 4】

ODN名	配列番号	ODN配列 (5'-3') .
ODN 24 (hBcl-2) ヒトBcl-2	配列番号 24	5'-TCT CCCAGCGTGCGCCAT-3'
ODN 25 (hC-Raf-1) ヒトC-Raf-s	配列番号 25	5'-GTG CTC CAT TGA TGC-3'
ODN #26 (hVEGF-R1) ヒト血管内皮成長因子 レセプター-1	配列番号 26	5'- GAGUUCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAA AGUCUG-3'
ODN #27	配列番号 27	5'-RRCGY-3'
ODN # 28 (INX-3280) .	配列番号 28	5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'
ODN #29 (INX-6302)	配列番号 29	5'-CAACGTTATGGGGAGA-3'
ODN #30 (INX-6298) ヒトc-myc	配列番号 30	5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3'

・「Z」は、メチル化されたシトシン残基を表している。

・ 注意：ODN14は、15merオリゴヌクレオチドであり、ODN1は、ODN1を16merにする、5'末端に付加されたチミジンを含む同じオリゴヌクレオチドである。ODN14とODN1との間の生物学的活性の差は検出されず、その両方が同様の免疫賦活活性を示した(Muiら、2001)

本発明の組成物および方法において使用するために適したオリゴヌクレオチド(ODN)の追加の特定の核酸配列は、米国特許出願60/379,343、米国特許出願番号09/649,527、国際公開WO02/069369、国際公開番号WO01/15726、米国特許第6,406,705号およびRaneyら、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 298:1185-1192(2001)に記載されている。ある特定の実施形態において、本発明の組成物および方法において使用されるODNは、CpGモチーフ内にホスホジエステル(「PO」)バックボーンもしくはホスホロチオエート(「PS」)バックボーンおよび/または少なくとも1つのメチル化されたシトシン残基を有する。

【0131】

核酸修飾

1990年代において、DNAベースのアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)およびリボザイム(RNA)が、薬物のデザインおよび開発に対して興奮させる新しいパラダイムをもたらしたが、それらのインビボでの適用は、エンド-およびエキソ-ヌクレアーゼ活性ならびに首尾よい細胞内送達の喪失によって妨害された。この分解の問題は、オリゴヌクレオチド(オリゴ)薬物がヌクレアーゼ酵素によって認識されるのを妨害するがそれらの作用機序を阻害しない化学修飾に対する大規模な研究の後、効果的に克服された。この研究は、現在開発過程のアンチセンスODN薬物が、未修飾分子における

数分間に対して、インピボにおいて数日間インタクトなままであるほど、成功した (Kurreck, J. 2003. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. Eur J Biochem 270:1628-44)。しかしながら、細胞内送達および作用機序の問題は、アンチセンスODNおよびリボザイムが臨床的な製品になることを非常に限定している。

【0132】

RNA二重鎖は、本質的に、一本鎖のDNAまたはRNAよりもヌクレアーゼに対して安定性であり、そしてアンチセンスODNとは異なり、未修飾 siRNAは、いったん細胞質に到達すると良好な活性を示す。たとえそうであっても、アンチセンスODNおよびリボザイムを安定化させるために開発された化学修飾は、siRNAに意図的に適用されることにより、どれくらいの化学修飾が耐性を示し得るか、薬物動態学的および薬力学的な活性が高められ得るか否かも判定される。siRNA二重鎖によるRNA干渉には、異なる機能を有するアンチセンス鎖およびセンス鎖が必要である。その両方が、siRNAのRISCへの侵入を可能にするために必要であるが、いったん負荷されると、2本の鎖は分離し、そしてセンス鎖は分解されるのに対し、アンチセンス鎖は残留することにより、RISCを標的mRNAに導く。RISCへの侵入は、標的mRNAの認識および切断よりも構造的に厳格性の低いプロセスである。その結果として、センス鎖の多くの異なる化学修飾が可能であるが、限られた変更だけがアンチセンス鎖によって許容される (Zhangら、2006)。

【0133】

当該分野で公知のとおり、ヌクレオシドは、塩基と糖の組み合わせである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合されたリン酸基をさらに含むヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドの場合、リン酸基は、その糖の2'、3'または5'ヒドロキシル部分のいずれかに結合され得る。オリゴヌクレオチドを形成する際、リン酸基は、隣接するヌクレオシドを互いに共有結合することにより、線状の重合体化合物を形成する。そして、この線状の重合体構造のそれぞれの末端がさらに結合されることにより、環状構造が形成され得る。オリゴヌクレオチド構造内において、リン酸基は、一般にオリゴヌクレオチドのヌクレオシド間バックボーンを形成すると言われる。RNAおよびDNAの通常の結合またはバックボーンは、3'-5'ホスホジエステル結合である。

【0134】

本発明に記載の脂質-核酸粒子において使用される核酸は、公知である任意の形態の核酸を含む。したがって、その核酸は、ヌクレアーゼ耐性および血清安定性を高めるために以前に使用されたタイプの修飾された核酸であり得る。驚いたことに、しかしながら、許容可能な治療的な生成物は、天然の核酸ポリマーのホスホジエステル結合に対する修飾を有しない核酸から脂質-核酸粒子を製剤化する本発明の方法を用いても調製され得、そして未修飾のホスホジエステル核酸(すなわち、すべての結合がホスホジエステル結合である核酸)を使用することが、本発明の好ましい実施形態である。

【0135】

a. バックボーン修飾

本発明において有用なアンチセンス、siRNAおよび他のオリゴヌクレオチドとしては、修飾されたバックボーンまたは非天然のヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドが挙げられるが、これに限定されない。修飾されたバックボーンを有するオリゴヌクレオチドは、バックボーン内にリン原子を保持するオリゴヌクレオチドおよびバックボーン内にリン原子を有しないオリゴヌクレオチドを含む。ヌクレオシド間バックボーン内にリン原子を有しない修飾されたオリゴヌクレオチドもまた、オリゴヌクレオチドと考えられ得る。修飾されたオリゴヌクレオチドバックボーンとしては、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリ-エステル、メチルホスホネートおよび他のアルキルホスホネート(3

' - アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含む)、ホスフィネート、ホスホルアミデート(3' - アミノホスホルアミデートおよびアミノアルキルホスホルアミデートを含む)、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、ホスホロセレネート、メチルホスホネートまたはO - アルキルホスホトリエステル結合、ならびに通常の3' - 5'結合を有するボラノホスフェート、これらの2' - 5'結合アナログ、および反転した極性を有するもの(ヌクレオシド単位の隣接する対では、3' - 5'と5' - 3'または2' - 5'と5' - 2'とが結合する)が挙げられる。本発明に記載の核酸内に存在し得る特定の修飾の特定の非限定的な例を表2に示す。

【0136】

様々な塩、混合塩および遊離酸型もまた含まれる。上記結合の生成を教示する代表的な米国特許としては、米国特許第3,687,808号;同第4,469,863号;同第4,476,301号;同第5,023,243号;同第5,177,196号;同第5,188,897号;同第5,264,423号;同第5,276,019号;同第5,278,302号;同第5,286,717号;同第5,321,131号;同第5,399,676号;同第5,405,939号;同第5,453,496号;同第5,455,233号;同第5,466,677号;同第5,476,925号;同第5,519,126号;同第5,536,821号;同第5,541,306号;同第5,550,111号;同第5,563,253号;同第5,571,799号;同第5,587,361号;および同第5,625,050号が挙げられるが、これらに限定されない。

【0137】

ある特定の実施形態において、その中にリン原子を含まない修飾されたオリゴヌクレオチドバックボーンは、短鎖アルキルまたはシクロアルキルのヌクレオシド間結合、ヘテロ原子とアルキルもしくはシクロアルキルのヌクレオシド間結合の混合、または1つ以上の短鎖のヘテロ原子もしくは複素環式のヌクレオシド間結合によって形成されるバックボーンを有する。これらとしては、例えば、モルホリノ結合を有するもの(ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される);シロキサンのバックボーン;スルフィド、スルホキシドおよびスルホンバックボーン;ホルムアセチルおよびチオホルムアセチルバックボーン;メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチルバックボーン;アルケン含有バックボーン;スルファメートバックボーン;メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノバックボーン;スルホネートおよびスルホンアミドバックボーン;アミドバックボーン;ならびに混成されたN、O、SおよびCH₂構成部分を有するその他のものが挙げられる。上記のオリゴヌクレオシドを記載している代表的な米国特許としては、米国特許第5,034,506号;5,166,315号;同第5,185,444号;同第5,214,134号;同第5,216,141号;同第5,235,033号;同第5,264,562号;同第5,264,564号;同第5,405,938号;同第5,434,257号;同第5,466,677号;同第5,470,967号;同第5,489,677号;同第5,541,307号;同第5,561,225号;同第5,596,086号;同第5,602,240号;同第5,610,289号;同第5,602,240号;同第5,608,046号;同第5,610,289号;同第5,618,704号;同第5,623,070号;同第5,663,312号;同第5,633,360号;同第5,677,437号;および同第5,677,439号が挙げられるが、これらに限定されない。

【0138】

ホスホロチオエートバックボーン修飾(表2, #1)(ホスホジエステル結合内の非架橋酸素が硫黄で置換されている)は、ヌクレアーゼ分解に対して核酸薬物を安定化させるために配備された最も古く最も一般的な手段の1つである。通常、PS修飾は、活性に対して大きく影響せずに、両方のsiRNA鎖に対して広範になされ得るらしい(Kurreck, J., Eur. J. Biochem. 270:1628-44, 2003)。しかしながら、PSオリゴは、熱心にタンパク質と非特異的に会合すると知られており、そ

10

20

30

40

50

の結果、特に i . v . 投与の際に毒性が生じる。ゆえに、P S 修飾は、通常、3' および 5' 末端における 1 つまたは 2 つの塩基に制限される。ボラノホスフェートリンカー（表 2 , # 2 ）は、P S よりも明らかに安定性であり、s i R N A 活性を高め、そして低毒性を有する、最近の修飾である（H a l l ら、N u c l e i c A c i d s R e s . 3 2 : 5 9 9 1 - 6 0 0 0 , 2 0 0 4 ）。

【 0 1 3 9 】

【表 2 - 1】

表2. siRNAおよび他の核酸に適用される化学修飾

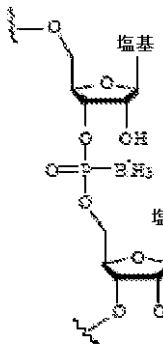
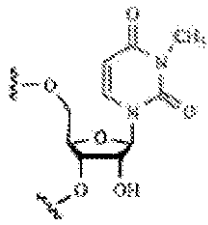
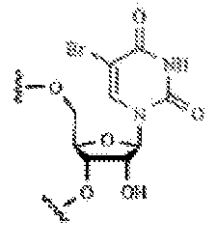
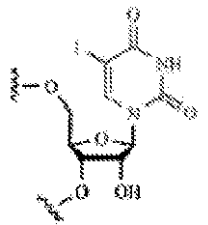
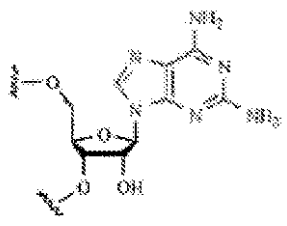
#	省略形	名称	修飾部位	構造
1	PS	ホスホロチオエート	バックボーン	

10

20

【 0 1 4 0 】

【表 2 - 2】

2	PB	ポリノホスフェート	バックボーン	
3	N3-MU	N3-メチル-ウリジン	塩基	
4	5'-BU	5'-ブromo-ウラシル	塩基	
5	5'-IU	5'-ヨード-ウラシル	塩基	
6	2,6-DP	2,6-ジアミノプリン	塩基	

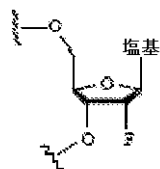
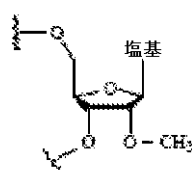
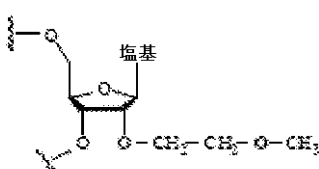
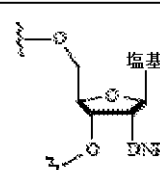
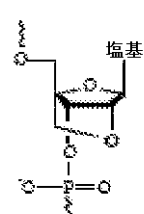
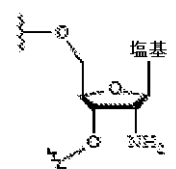
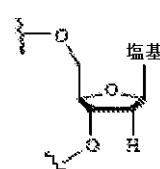
10

20

30

【 0 1 4 1 】

【表 2 - 3】

7	2'-F	2'-フルオロ	糖	
8	2'-OME	2''-O-メチル	糖	
9	2'-O-MOE	2'-O-(2-メトキシエチル)	糖	
10	2'-DNP	2'-O-(2,4-ジニトロフェニル)	糖	
11	LNA	ロックされた核酸 (2'-酸素をリボース 環の4'-炭素と接続 するメチレン架橋)	糖	
12	2'-アミノ	2'-アミノ	糖	
13	2'-デオキシ	2'-デオキシ	糖	

【 0 1 4 2 】

【表 2 - 4】

14	4'-チオ	4'-チオ- リボヌクレオチド	糖	
----	-------	--------------------	---	--

他の有用な核酸誘導体としては、架橋酸素原子（リン酸エステル結合を形成するもの）が - S - 、 - N H - 、 - C H 2 - など置換されている核酸分子が挙げられる。ある特定

10

20

30

40

50

の実施形態において、使用されるアンチセンス、*siRNA*または他の核酸への変更は、核酸と会合される負電荷に完全に影響を及ぼさないだろう。したがって、本発明は、結合の部分が、例えば、中性のメチルホスホネートまたはホスホルアミデート結合で置換されている、アンチセンス、*siRNA*および他の核酸の使用を企図する。中性の結合が使用されるとき、ある特定の実施形態において、80%未満の核酸結合が、そのように置換されるか、または50%未満の結合がそのように置換される。

【0143】

b. 塩基修飾

塩基修飾は、バックボーンおよび糖に対する修飾よりも一般的ではない。0.3 - 6に示される修飾のすべてが、ヌクレアーゼに対して*siRNA*を安定化させ、そして活性に対してほとんど影響を有しないらしい(Zhang, H. Y., Du, Q., Wahlestedt, C, Liang, Z. 2006. RNA Interference with chemically modified *siRNA*. Curr Top Med Chem 6: 893 - 900)。

【0144】

したがって、オリゴヌクレオチドは、核酸塩基(当該分野では単に「塩基」と称されることが多い)の修飾または置換も含み得る。本明細書中で使用されるとき、「未修飾の」または「天然の」核酸塩基は、プリン塩基であるアデニン(A)およびグアニン(G)ならびにピリミジン塩基であるチミン(T)、シトシン(C)およびウラシル(U)を含む。修飾された核酸塩基としては、他の合成および天然の核酸塩基(例えば、5 - メチルシトシン(5 - me - Cまたはm5c)、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2 - アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6 - メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2 - プロピルおよび他のアルキル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミンおよび2 - チオシトシン、5 - ハロウラシルおよびシトシン、5 - プロピニルウラシルおよびシトシン、6 - アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5 - ウラシル(プソイドウラシル)、4 - チオウラシル、8 - ハロ、8 - アミノ、8 - チオール、8 - チオアルキル、8 - ヒドロキシルおよび他の8 - 置換アデニンおよびグアニン、5 - ハロ、特に、5 - プロモ、5 - トリフルオロメチルおよび他の5 - 置換ウラシルおよびシトシン、7 - メチルグアニンおよび7 - メチルアデニン、8 - アザグアニンおよび8 - アザアデニン、7 - デアザグアニンおよび7 - デアザアデニン、ならびに3 - デアザグアニンおよび3 - デアザアデニンが挙げられる。

【0145】

ある特定の核酸塩基は、本発明のオリゴマー化合物(5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジンならびにN - 2、N - 6およびO - 6置換プリン(2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシルおよび5 - プロピニルシトシンを含む)を含む)の結合親和性を増加させるために特に有用である。5 - メチルシトシン置換は、核酸二重鎖の安定性を0.6 ~ 1.2 増加させると示されている(Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications 1993, CRC Press, Boca Raton, pages 276 - 278)。これらは、特定の実施形態において、2' - O - メトキシエチル糖修飾と組み合わせられ得る。これらの修飾された核酸塩基ならびに他の修飾された核酸塩基のある特定のものの生成を教示する米国特許としては、上で述べた米国特許第3,687,808号ならびに米国特許第4,845,205号;同第5,130,302号;同第5,134,066号;同第5,175,273号;同第5,367,066号;同第5,432,272号;同第5,457,187号;同第5,459,255号;同第5,484,908号;同第5,502,177号;同第5,525,711号;同第5,552,540号;同第5,587,469号;同第5,594,121号;同第5,596,091号;同第5,614,617号;および同第5,681,941号が挙げられるが、これらに限定されない。

【0146】

c. 糖修飾

糖基におけるほとんどの修飾は、化学的に反応性の便利な部位を提供する、RNA糖環の2'-OHにおいて生じる。Manoharan, M. 2004. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. Curr Opin Chem Biol 8:570-9; Zhang, H. Y., Du, Q., Wahlestedt, C, Liang, Z. 2006. RNA Interference with chemically modified siRNA. Curr Top Med Chem 6:893-900)。2'-Fおよび2'-OME(0.7および8)が、一般的であり、その両方が、安定性を高め、2'-OME修飾は、1本の鎖あたり4ヌクレオチド未満に制限される限り、活性を低下させない(Holen, T., Amarzguioi, M., Babai, E., Prydz, H. 2003。一本鎖および二本鎖siRNAの同様の挙動は、それらが共通のRNAi経路を介して作用することを示唆する。Nucleic Acids Res 31:2401-7)。修飾塩基がその分子の中央領域に限定されるとき、2'-O-MOE(0.9)は、siRNAにおいて最も有効である(Prakash, T. P., Allerson, C. R., Dande, P., Vickers, T. A., Sioufi, N., Jarres, R., Baker, B. F., Swayze, E. E., Griffey, R. H., Bhat, B. 2005. Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells. J Med Chem 48:4247-53)。活性を失わせることなくsiRNAを安定化させると見出されている他の修飾を、0.10-14に示す。【0147】

修飾されたオリゴヌクレオチドは、1つ以上の置換された糖部分も含み得る。例えば、本発明は、以下のもののうちの1つを2'位に含むオリゴヌクレオチドを含む：OH；F；O-、S-もしくはN-アルキル、O-アルキル-O-アルキル、O-、S-もしくはN-アルケニルまたはO-、S-もしくはN-アルキニル(ここで、そのアルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換または非置換のC₁~C₁₀アルキルまたはC₂~C₁₀アルケニルおよびアルキニルであり得る)。O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)₂ON(CH₃)₂、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂およびO(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂(nおよびmは1~約10である)が特に好ましい。他の好ましいオリゴヌクレオチドは、以下のもののうちの1つを2'位に含む：C₁~C₁₀低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリール(alkaryl)、アラールキル、O-アルカリールまたはO-アラールキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態学的特性を改善するための基またはオリゴヌクレオチドの薬力学的特性を改善するための基および同様の特性を有する他の置換基。1つの修飾としては、2'-メトキシエトキシ(2'-O-(2'-メトキシエチル)または2'-MOEとしても知られる2'-O-CH₂CH₂OCH₃)(Martinら、Helv. Chim. Acta 1995, 78, 486-504)、すなわち、アルコキシアルコキシ基が挙げられる。他の修飾としては、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、2'-DMAOEとしても知られるO(CH₂)₂ON(CH₃)₂基、および2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(2'-DMAEOE)が挙げられる。【0148】

追加の修飾としては、2'-メトキシ(2'-O-CH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)および2'-フルオロ(2'-F)が挙げられる。同様の修飾が、オリゴヌクレオチド上の他の位置、特に、3'末端ヌクレオチド上また

は2' - 5' 結合されたオリゴヌクレオチド上の糖の3' 位および5' 末端ヌクレオチドの5' 位においても行われ得る。オリゴヌクレオチドは、ペントフラノシル糖の代わりに、シクロブチル部分などの糖模倣物も有し得る。そのような修飾された糖構造の生成を教示する代表的な米国特許としては、米国特許第4, 981, 957号；同第5, 118, 800号；同第5, 319, 080号；同第5, 359, 044号；同第5, 393, 878号；同第5, 446, 137号；同第5, 466, 786号；同第5, 514, 785号；同第5, 519, 134号；同第5, 567, 811号；同第5, 576, 427号；同第5, 591, 722号；同第5, 597, 909号；同第5, 610, 300号；同第5, 627, 053号；同第5, 639, 873号；同第5, 646, 265号；同第5, 658, 873号；同第5, 670, 633号；および同第5, 700, 920号が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0149】

他のオリゴヌクレオチド模倣物において、糖とヌクレオシド間結合の両方、すなわち、ヌクレオチド単位のバックボーンは、新規の基で置換されるが、塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。1つのそのようなオリゴマー化合物である、優れたハイブリダイゼーション特性を有すると示されているオリゴヌクレオチド模倣物は、ペプチド核酸(PNA)と称される。PNA化合物において、オリゴヌクレオチドの糖 - バックボーンは、アミド含有バックボーン、特に、アミノエチルグリシンバックボーンで置換される。その核酸塩基は、保持され、そのバックボーンのアミド部分のアザ窒素原子に直接または間接的に結合される。PNA化合物の生成を教示する代表的な米国特許としては、米国特許第5, 539, 082号；同第5, 714, 331号；および同第5, 719, 262号が挙げられるが、これらに限定されない。PNA化合物のさらなる教示は、Nielsenら(Science, 1991, 254, 1497 - 1500)に見られる。

20

【0150】

本発明の特定の実施形態は、ホスホロチオエートバックボーンを有するオリゴヌクレオチドならびにヘテロ原子バックボーン、特に、上で参照された米国特許第5, 489, 677号の $-CH_2-NH-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ (メチレン(メチルイミノ)またはMMIバックボーンと称される)、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_2)-N(CH_3)-CH_2-$ および $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ (ここで、天然のホスホジエステルバックボーンは、 $-O-P-O-CH_2-$ と表現される)および上で参照された米国特許第5, 602, 240号アミドバックボーンを有するオリゴヌクレオチドである。上で参照された米国特許第5, 034, 506号のモルホリノバックボーン構造を有するオリゴヌクレオチドも好ましい。

30

【0151】

d. キメラオリゴヌクレオチド

所与の化合物におけるすべての位置が均一に修飾される必要はなく、実際に、上述の修飾のうちの2つ以上が、1つの化合物、またはオリゴヌクレオチド内の1つのヌクレオシドにさえ組み込まれ得る。本発明のある特定の好ましいオリゴヌクレオチドは、キメラオリゴヌクレオチドである。「キメラオリゴヌクレオチド」または「キメラ」は、本発明の文脈において、2つ以上の化学的に異なる領域(各々が、少なくとも1つのヌクレオチドで構成されている)を含むオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、代表的には、1つ以上の有益な特性(例えば、高いヌクレアーゼ耐性、細胞への多くの取り込み、RNA標的に対する高い結合親和性)を付与する修飾ヌクレオチドの少なくとも1つの領域、およびRNaseH切断に対する基質である領域を含む。

40

【0152】

1つの実施形態において、キメラオリゴヌクレオチドは、標的結合親和性を増加させるために修飾された少なくとも1つの領域を含む。標的に対するオリゴヌクレオチドの親和性は、オリゴヌクレオチド/標的対の T_m (オリゴヌクレオチドと標的が解離する温度であり；解離は、分光光度的に検出される)を測定することによって通例の通りに判定され

50

る。T_mが高いほど、標的に対するオリゴヌクレオチドの親和性が高い。1つの実施形態において、標的mRNA結合親和性を増加させるために修飾されたオリゴヌクレオチドの領域は、糖の2'位において修飾された少なくとも1つのヌクレオチド、最も好ましくは、2'-O-アルキル、2'-O-アルキル-O-アルキルまたは2'-フルオロ-修飾ヌクレオチドを含む。そのような修飾は、オリゴヌクレオチドに通例の通りに組み込まれ、これらのオリゴヌクレオチドは、所与の標的に対して2'-デオキシオリゴヌクレオチドよりも高いT_m(すなわち、より高い標的結合親和性)を有すると示されている。そのような高い親和性の影響は、標的遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害を非常に高めることになる。

【0153】

別の実施形態では、キメラオリゴヌクレオチドは、RNAseHに対する基質として作用する領域を含む。当然のことながら、オリゴヌクレオチドが、本明細書中に記載される様々な修飾の任意の組み合わせを含み得ることが理解される。

【0154】

本発明のオリゴヌクレオチドの別の修飾は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布もしくは細胞取り込みを高める、1つ以上の部分または結合体をオリゴヌクレオチドに化学的に結合することを含む。そのような結合体およびそれを調製する方法は、当該分野で公知である。

【0155】

治療的有効性などのインビボでの有用性について、合理的な経験則は、チオ化された(thioated)バージョンの配列が遊離型で働く場合、同じ配列の任意の化学の被包された粒子も有効であるということを当業者は理解するだろう。被包された粒子は、アンチセンス治療に対して別段応答性であると知られていない状態およびモデルにおいて有効性を示す、より広範囲のインビボ有用性も有し得る。本発明を適用することにより、現在アンチセンス治療に対して応答する古いモデルを見出し得ることを当業者は承知している。さらに、当業者らは、本発明を使用することによって、見捨てられたアンチセンス配列または化学を再考し得、そして有効性を見出し得る。

【0156】

本発明に従って使用されるオリゴヌクレオチドは、固相合成の周知の手法によって便利に、かつ通例の通りに、作製され得る。そのような合成のための装置は、Applied Biosystemsを含むいくつかのベンダーによって販売されている。そのような合成のための他の任意の手段も使用され得る；オリゴヌクレオチドの実際の合成は、十分に、業務従事者の能力の範囲内である。ホスホロチオエートおよびアルキル化された誘導体などの他のオリゴヌクレオチドを調製するために同様の手法を使用することも周知である。

【0157】

核酸-脂質粒子の特徴

ある特定の実施形態において、本発明は、脂質に被包された核酸粒子を生成するための方法および組成物に関し、ここで、核酸が、脂質層内に被包される。siRNAオリゴヌクレオチドを組み込んでいるそのような核酸-脂質粒子は：(1)薬物と脂質との比；(2)被包効率；および(3)粒径をはじめとした種々の生物物理学的パラメータを用いて特徴付けられる。高い薬物と脂質との比、高い被包効率、良好なヌクレアーゼ耐性および血清安定性、ならびに調節可能な粒径(一般に200nm未満の直径)が望ましい。さらに、ヌクレアーゼ耐性を与えるための核酸の修飾が、治療薬のコストに加えられるが、多くの場合において単に限られた耐性を提供するだけであるので、核酸ポリマーの性質が、重要である。別段述べられない限り、これらの基準は、以下のとおり本明細書中で計算される：

薬物と脂質との比は、規定された体積の調製物中の核酸の量を、同じ体積中の脂質の量で除算したものである。これは、モルあたりのモル基準または重量あたりの重量基準またはモルあたりの重量基準に基づき得る。最終的な投与の準備のできた処方物の場合、透析

10

20

30

40

50

、クロマトグラフィおよび/または酵素（例えば、ヌクレアーゼ）消化を用いることにより、できるだけ多くの外部核酸を除去した後に核酸：脂質比を計算する；

被包効率とは、出発混合物の薬物と脂質との比を、最終的な投与に適格な処方物の薬物と脂質との比で除算したもののことを指す。これは、相対的な効率の尺度である。絶対的な効率の尺度のために、投与に適格な処方物に最終的になる、出発混合物に加えられた核酸の総量もまた計算され得る。製剤化のプロセス中に失われる脂質の量もまた計算され得る。効率は、処方物の消耗量（w a s t a g e）および実質量（e x p e n s e）の尺度であり；そして

サイズは、形成される粒子のサイズ（直径）を示す。サイズ分布は、N i c o m p M o d e l 3 7 0 サブミクロン粒子寸法測定器において準弾性光散乱（Q E L S）を用いて測定され得る。200nm未満の粒子が、新生物および炎症部位などの新生血管形成された（漏出性）組織への分配のために好ましい。

【0158】

薬学的組成物

特に治療剤と会合されているときの、本発明の脂質粒子は、例えば、投与経路および標準的な薬務に従って選択される、薬学的に許容可能な希釈剤、賦形剤またはキャリア（例えば、生理食塩水またはリン酸緩衝液）をさらに含む薬学的組成物として製剤化され得る。

【0159】

特定の実施形態において、本発明の脂質 - 核酸粒子を含む薬学的組成物は、標準的な手法に従って調製され、薬学的に許容可能なキャリアをさらに含む。一般に、通常の食塩水が、薬学的に許容可能なキャリアとして使用される。他の適当なキャリアとしては、例えば、水、緩衝水、0.9%食塩水、0.3%グリシンなど（安定性を高めるための糖タンパク質（例えば、アルブミン、リボタンパク質、グロブリンなど）を含む）が挙げられる。食塩水または他の塩含有キャリアを含む組成物において、キャリアは、好ましくは、脂質粒子形成後に加えられる。したがって、脂質 - 核酸組成物が形成された後に、その組成物が、通常の食塩水などの薬学的に許容可能なキャリアに希釈され得る。

【0160】

得られる薬学的調製物は、従来の周知の滅菌手法によって滅菌され得る。次いで、水溶液は、使用にむけて包装され得るか、または無菌条件下で濾過され、凍結乾燥され得、凍結乾燥された調製物は、投与前に滅菌水溶液と組み合わせられる。本組成物は、生理学的条件に近づけるために必要に応じて薬学的に許容可能な補助剤物質（例えば、pH調整剤および緩衝剤、張度調整剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムなど）を含み得る。さらに、脂質懸濁液は、保存時のフリーラジカルおよび脂質過酸化傷害に対して脂質を保護する脂質保護剤を含み得る。脂肪親和性フリーラジカルクエンチャー（例えば、 α -トコフェロールおよびフェリオキサミンなどの水溶性鉄特異的キレート剤）が適当である。

【0161】

薬学的処方物中の脂質粒子または脂質 - 核酸粒子の濃度は、大きく変動し得、すなわち、約0.01%未満、通常、約0.05~5%または少なくとも約0.05~5%から、ほぼ10~30重量%に変動し得、そしてその濃度は、選択される特定の投与様式に従って、主に液量、粘性などによって選択される。例えば、処置に関連する体積負荷を低下させるためにその濃度を上昇させてもよい。これは、アテローム性動脈硬化症関連のうっ血性心不全または重篤な高血圧症を有する患者において特に望ましいことがある。あるいは、刺激性の脂質から構成される複合体を希釈して、濃度を低下させることにより、投与部位における炎症が和らげられ得る。1つの群の実施形態において、核酸は、付着された標識を有し、そして診断のために使用され得る（相補的な核酸の存在を示すことによって）。この例において、投与される複合体の量は、使用される特定の標識、診断される疾患状態、および臨床医の判断に依存するが、一般に、約0.01~約50mg/kg体重、好ましくは、約0.1~約5mg/kg体重である。

【 0 1 6 2 】

上で述べたように、本発明の脂質 - 治療剤（例えば、核酸）粒子は、ポリエチレングリコール（PEG）で修飾されたリン脂質、PEG - セラミドもしくはガングリオシド G_M で修飾された脂質、または凝集を防止するかもしくは限定するのに有効な他の脂質を含み得る。そのような成分の添加は、単に複合体の凝集を防止するだけではない。むしろ、それは、循環中の残存時間を延長するため、および標的組織への脂質 - 核酸組成物の送達を増加させるための手段も提供し得る。

【 0 1 6 3 】

本発明は、キットの形態でも脂質 - 治療剤組成物を提供する。キットは、代表的には、そのキットの様々なエレメントを保持するために区画化された容器を備える。キットは、本発明の粒子または薬学的組成物を好ましくは脱水された形態または濃縮された形態で、その再水和または希釈および投与についての指示書とともに含む。ある特定の実施形態において、粒子は、活性な薬剤を含むが、他の実施形態では、含まない。

【 0 1 6 4 】

D . 製造方法

本発明の方法および組成物は、ある特定の陽イオン性脂質を利用し、その脂質の合成、調製および特徴づけは、以下および添付の実施例において説明される。さらに、本発明は、脂質粒子（治療剤、例えば、核酸と会合された脂質粒子を含む）を調製する方法を提供する。本明細書中に記載される方法において、脂質の混合物は、核酸の緩衝水溶液と混合されることにより、脂質粒子内に被包された核酸を含む中間体混合物が生成され、ここで、その被包された核酸は、約 3 w t % ~ 約 2 5 w t %、好ましくは 5 ~ 1 5 w t % という核酸 / 脂質比で存在する。その中間体混合物は、脂質で被包された核酸粒子を得るために、必要に応じて大きさが揃えられ得、ここで、その脂質部分は、好ましくは 3 0 ~ 1 5 0 n m の直径、より好ましくは約 4 0 ~ 9 0 n m の直径を有する単層ベシクルである。次いで、pH を上げることにより、脂質 - 核酸粒子上の表面電荷の少なくとも一部を中和し、ゆえに、少なくとも部分的に表面が中和された脂質で被包された核酸組成物が提供される。

【 0 1 6 5 】

上に記載したように、これらの陽イオン性脂質のいくつかは、アミノ基の pK_a 未満の pH において帯電しており、 pK_a より高い pH において実質的に中性である、アミノ脂質である。これらの陽イオン性脂質は、滴定可能な陽イオン性脂質と呼ばれ、2 工程プロセスを用いて本発明の処方物において使用され得る。第 1 に、核酸の存在下において、滴定可能な陽イオン性脂質および他のベシクル成分を用いて、低 pH において脂質ベシクルを形成し得る。この様式において、ベシクルが、核酸を被包し、捕捉する。第 2 に、媒質の pH を、存在する滴定可能な陽イオン性脂質の pK_a より高いレベルに、すなわち、生理学的 pH またはそれ以上に上昇させることによって、新しく形成されたベシクルの表面電荷を中和し得る。このプロセスの特に有益な局面は、任意の表面に吸着された核酸の容易な除去と、中性の表面を有する結果として生じる核酸送達ベシクルとの両方を含む。中性の表面を有するリポソームまたは脂質粒子が、循環からの迅速なクリアランスを妨害し、そして陽イオン性リポソーム調製物に関連するある特定の毒性を回避すると予想される。核酸 - 脂質粒子の製剤化におけるそのような滴定可能な陽イオン性脂質のこれらの使用に関する追加の詳細は、米国特許第 6 , 2 8 7 , 5 9 1 号および米国特許第 6 , 8 5 8 , 2 2 5 号（本明細書中で参考として援用される）に提供されている。

【 0 1 6 6 】

この様式で形成されたベシクルは、高含有量の核酸を有する一様なベシクルサイズの処方物を提供することがさらに述べられる。さらに、それらのベシクルは、約 3 0 ~ 約 1 5 0 n m、より好ましくは約 3 0 ~ 約 9 0 n m のサイズ範囲を有する。

【 0 1 6 7 】

いかなる特定の理論にも拘束されるつもりはないが、核酸被包の非常に高い効率、低 pH における静電相互作用の結果であると考えられる。酸性 pH（例えば、pH 4 . 0）

において、ベシクル表面は、帯電しており、静電相互作用を介して核酸の一部に結合する。外部の酸性緩衝液が、より中性の緩衝液（例えば、 $\text{pH } 7.5$ ）に交換されるとき、脂質粒子またはリポソームの表面が中和され、任意の外部の核酸の除去が可能になる。製剤化プロセスに対するより詳細な情報は、様々な刊行物（例えば、米国特許第 6,287,591 号および米国特許第 6,858,225 号）に提供されている。

【0168】

上記のことを考慮して、本発明は、脂質/核酸処方物を調製する方法を提供する。本明細書中に記載される方法において、脂質の混合物は、核酸の緩衝水溶液と混合されることにより、例えば脂質粒子内に被包された核酸を含む中間体混合物が生成され、ここで、その被包された核酸は、約 10 wt% ~ 約 20 wt% という核酸/脂質比で存在する。その中間体混合物は、脂質で被包された核酸粒子を得るために、必要に応じて大きさが揃えられ得、ここで、その脂質部分は、好ましくは 30 ~ 150 nm の直径、より好ましくは約 40 ~ 90 nm の直径を有する単層ベシクルである。次いで、 pH を上げることにより、脂質-核酸粒子上の表面電荷の少なくとも一部を中和し、ゆえに、少なくとも部分的に表面が中和された脂質で被包された核酸組成物が提供される。

10

【0169】

ある特定の実施形態において、脂質の混合物は、少なくとも 2 つの脂質成分：その脂質が、 pKa より低い pH において陽イオン性であり、 pKa より高い pH において中性であるような pKa を有する脂質から選択される本発明の第 1 アミノ脂質成分、および脂質-核酸粒子形成中の粒子凝集を防止する脂質から選択される第 2 脂質成分を含む。特定の

20

【0170】

本発明の核酸-脂質粒子を調製する際、脂質の混合物は、代表的には有機溶媒中の脂質の溶液である。次いで、この脂質の混合物は、乾燥されることにより薄膜を形成し得るか、または凍結乾燥されることにより粉末を形成し、その後水性緩衝液で水和されることにより、リポソームが形成され得る。あるいは、好ましい方法において、脂質混合物は、エタノールなどの水混和性アルコール中に可溶化され得、そしてこのエタノール性溶液を水性緩衝液に加えることにより、自発的なリポソーム形成がもたらされる。ほとんどの実施形態において、アルコールは、市販されている形態で使用される。例えば、エタノールは、無水エタノール（100%）または 95% エタノール（残りの部分は水である）として

30

【0171】

1 つの例示的な実施形態において、脂質の混合物は、アルコール溶媒中の、陽イオン性アミノ脂質と、中性脂質（アミノ脂質以外）と、ステロール（例えば、コレステロール）と、PEG 修飾脂質（例えば、PEG-S-DMG、PEG-C-DOMG または PEG-DMA）との混合物である。好ましい実施形態において、脂質混合物は、アルコール中、より好ましくはエタノール中の、陽イオン性アミノ脂質、中性脂質、コレステロールおよび PEG 修飾脂質から本質的になる。さらに好ましい実施形態において、第 1 の溶液は、約 20 ~ 70% アミノ脂質：5 ~ 45% 中性脂質：20 ~ 55% コレステロール：0 . 5 ~ 15% PEG 修飾脂質というモル比の上記の脂質混合物からなる。なおもさらに好ましい実施形態において、第 1 の溶液は、より好ましくは約 20 ~ 60% DLin-K-DMA：5 ~ 25% DSPC：25 ~ 55% Chol：0 . 5 ~ 15% PEG-S-DMG、PEG-C-DOMG または PEG-DMA というモル比で、DLin-K-DMA、DSPC、Chol および PEG-S-DMG、PEG-C-DOMG または PEG-DMA から本質的になる。別の群の好ましい実施形態において、これらの組成物中の中性脂質は、POPC、DOPC または SM で置き換えられる。

40

【0172】

本発明によると、脂質混合物は、核酸を含み得る緩衝水溶液と混合される。その緩衝水溶液は、代表的には、その緩衝液が脂質混合物中のプロトン化可能な脂質の pKa 未満の

50

pHを有する溶液である。適当な緩衝液の例としては、クエン酸、リン酸、酢酸およびMESが挙げられる。特に好ましい緩衝液は、クエン酸緩衝液である。好ましい緩衝液は、被包される核酸の化学に応じて1~1000mMの陰イオンの範囲であり、緩衝液濃度の最適化は、高い負荷レベルを達成するために重要であり得る（例えば、米国特許第6,287,591号および米国特許第6,858,225号を参照のこと）。あるいは、塩化物、硫酸塩などでpH5~6に酸性化された純水が、有用であり得る。この場合、5%グルコースを加えること、または粒子が、エタノールを除去するため、pHを上げるために透析されるか、もしくは通常の食塩水などの薬学的に許容可能なキャリアと混合されるとき、その粒子膜を超えて浸透ポテンシャルを釣り合わせる別の非イオン性溶質を加えることが、適当であり得る。緩衝液中の核酸の量は、変動し得るが、代表的には、約0.01mg/mL~約200mg/mL、より好ましくは約0.5mg/mL~約50mg/mLである。

【0173】

脂質の混合物と治療的核酸の緩衝水溶液とを混合することにより、中間体混合物が得られる。その中間体混合物は、代表的には、被包された核酸を有する脂質粒子の混合物である。さらに、その中間体混合物は、負に帯電した核酸のイオン性引力および脂質粒子表面上の正に帯電した脂質（アミノ脂質、またはプロトン化可能な第1脂質成分を構成している他の脂質は、その脂質上のプロトン化可能な基のpK_a未満のpHを有する緩衝液中で正に帯電している）に起因して、脂質粒子（リボソームまたは脂質ベシクル）の表面に付着されたいくらかの核酸も含み得る。1つの群の好ましい実施形態において、脂質の混合物は、脂質のアルコール溶液であり、その溶液の各々の体積は、混合されるときに、得られるアルコール含有量が約20体積%~約45体積%になるように調整される。混合物を混合する方法は、しばしば、生成される処方物の規模に応じて、種々のプロセスのいずれかを含み得る。例えば、総体積が約10~20mL以下であるとき、その溶液は、試験管内で混合され得、そしてボルテックスミキサーを用いて共に攪拌され得る。大規模プロセスは、適当な生成規模のガラス製品内において行われ得る。

【0174】

必要に応じて、脂質混合物と治療剤（核酸）の緩衝水溶液とを混合することによって生成される、脂質に被包された治療剤（例えば、核酸）の複合体は、所望のサイズの範囲および比較的狭い分布の脂質粒径を達成するために、大きさを揃えられ得る。好ましくは、本明細書中に提供される組成物は、約70~約200nm、より好ましくは約90~約130nmの平均直径の大きさに揃えられる。所望のサイズにリボソームの大きさを揃えるために、いくつかの手法が利用可能である。大きさを揃える1つの方法は、本明細書中で参考として援用される米国特許第4,737,323号に記載されている。バスまたはプローブ超音波処理によってリボソーム懸濁液を超音波処理することにより、サイズが約0.05ミクロン未満の小型の単層ベシクル（SUV）まで、漸進的にサイズが縮小される。均質化は、大きなリボソームをより小さなリボソームに断片化する剪断エネルギーに依存する別の方法である。代表的な均質化手順では、選択されたリボソームサイズ、代表的には約0.1~0.5ミクロンが観察されるまで、多層ベシクルを標準的なエマルジョンホモジナイザーに通して再循環する。両方の方法において、粒径分布は、従来のレーザービーム粒径測定によってモニターされ得る。本明細書中のある特定の方法の場合、押出しを用いることにより、均一なベシクルサイズが得られる。

【0175】

小孔ポリカーボネート膜または非対称セラミック膜を介するリボソーム組成物の押出しによって、比較的明確に限定されたサイズ分布がもたらされる。代表的には、所望のリボソーム複合体のサイズ分布が達成されるまで、懸濁液を、膜を介して1回以上循環させる。そのリボソームは、連続的に小孔の膜を介して押し出されることにより、徐々に小さいサイズのリボソームが達成され得る。いくつかの場合において、形成される脂質-核酸組成物は、いかなるサイズ揃えもせずに、使用され得る。

【0176】

特定の実施形態において、本発明の方法は、脂質 - 核酸組成物の脂質部分上の表面電荷の少なくともいくらかを中和する工程をさらに包含する。表面電荷を少なくとも部分的に中和することによって、被包されていない核酸が、脂質粒子表面から解放され、そして従来の手法を用いて組成物から除去され得る。好ましくは、被包されていない核酸および表面に吸着された核酸が、緩衝溶液を交換することによって、得られる組成物から除去される。例えば、クエン酸緩衝液（pH 約 4.0、組成物を形成するために使用される）を HEPES 緩衝食塩水（HBS pH 約 7.5）溶液で置換することによって、リボソーム表面の中和およびその表面からの核酸の放出がもたらされる。次いで、放出された核酸は、標準的な方法を用いるクロマトグラフィを介して除去され得、次いで、使用される脂質の pK_a より高い pH を有する緩衝液に切り換えられ得る。

10

【0177】

必要に応じて、脂質ベシクル（すなわち、脂質粒子）は、水性緩衝液中の水和によって形成され得、そして核酸を加える前に上に記載された方法のいずれかを用いて一定の大きさに揃えられ得る。上に記載されたように、水性緩衝液は、アミノ脂質の pK_a よりも低い pH であるべきである。次いで、これらの一定の大きさに揃えられ、予め形成されたベシクルに核酸の溶液が加えられ得る。そのような「予め形成された」ベシクル内への核酸の被包を可能するために、混合物は、エタノールなどのアルコールを含むべきである。エタノールの場合、それは、約 20%（w/w）～約 45%（w/w）の濃度で存在すべきである。さらに、脂質ベシクルの組成および核酸の性質に応じて、水性緩衝液 - エタノール混合物中の予め形成されたベシクルと核酸との混合物を約 25 ～ 約 50 の温度に温める必要があることがある。脂質ベシクル中の核酸の所望のレベルを達成するための被包プロセスの最適化は、エタノール濃度および温度などの変量の操作が必要であることは、当業者に明らかであろう。核酸の被包のための適当な条件の例は、実施例に提供される。いったん核酸が予め形成されたベシクル内に被包されたら、外部の pH を上げることで、少なくとも部分的に表面電荷を中和し得る。次いで、被包されていない核酸および表面に吸着されている核酸は、上に記載されたように除去され得る。

20

【0178】

E. 使用方法

本発明の脂質粒子は、インビトロまたはインビボにおいて治療剤を細胞に送達するために使用され得る。特定の実施形態において、治療剤は、本発明の核酸 - 脂質粒子を用いて細胞に送達される核酸である。本発明の脂質粒子および関連する薬学的組成物を使用する様々な方法の以下の説明は、核酸 - 脂質粒子に関する説明によって例証されるが、これらの方法および組成物が、その処置の恩恵を受け得る任意の疾患または障害を処置するための任意の治療剤を送達するために容易に適応され得ることが理解される。

30

【0179】

ある特定の実施形態において、本発明は、核酸を細胞に導入するための方法を提供する。細胞に導入するための好ましい核酸は、siRNA、免疫刺激オリゴヌクレオチド、プラスミド、アンチセンスおよびリボザイムである。これらの方法は、細胞内送達が生じるのに十分な時間にわたって、本発明の粒子または組成物を細胞と接触させることによって行われ得る。

40

【0180】

本発明の組成物は、ほとんどの任意の細胞型に吸着され得る。核酸 - 脂質粒子は、いったん吸着されると、細胞の一部によってエンドサイトーシスによって取り込まれ得るか、脂質を細胞膜と交換し得るか、または細胞と融合し得る。その複合体の核酸部分の移入または取り込みが、これらの経路のうちのいずれかを介して生じ得る。本発明の範囲に関して限定する意図はないが、エンドサイトーシスによって細胞に取り込まれる粒子の場合、その粒子は、次いで、エンドソーム膜と相互作用し、おそらく非二重層の相の形成によってエンドソーム膜の不安定化をもたらし、被包された核酸が細胞質に導入されることが考えられる。同様に、粒子と細胞の原形質膜との直接的な融合の場合、融合が生じる際、リボソーム膜は、細胞膜に統合され、そしてリボソームの内容物が細胞内の液体と混合される。

50

インビトロにおいて行われるとき、細胞と脂質 - 核酸組成物との接触は、生物学的に適合性の媒質中で生じる。組成物の濃度は、特定の用途に応じて広く変動し得るが、一般に、約 $1 \mu\text{mol}$ ~ 約 10 mmol である。ある特定の実施形態において、脂質 - 核酸組成物による細胞の処置は、一般に、生理学的温度 (約 37°C) において、約 $1 \sim 24$ 時間、好ましくは、約 $2 \sim 8$ 時間行われる。インビトロでの適用では、核酸の送達は、起源が植物であるか動物であるか、脊椎動物の細胞あるか無脊椎動物であるか、およびどの組織またはタイプであるかに関係なく、培地中で生育されている任意の細胞への送達であり得る。好ましい実施形態において、細胞は、動物細胞、より好ましくは、哺乳動物細胞、最も好ましくはヒト細胞である。

【0181】

1つの群の実施形態において、約 $10^3 \sim 10^5$ 細胞 / mL 、より好ましくは約 2×10^4 細胞 / mL の細胞密度を有する $60 \sim 80\%$ コンフルエントでプレーティングされた細胞に脂質 - 核酸粒子懸濁液を加える。細胞に加えられる懸濁液の濃度は、好ましくは約 $0.01 \sim 20 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、より好ましくは約 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ である。

【0182】

代表的な適用法は、siRNAの細胞内送達をもたらすことにより、特定の細胞標的をノックダウンするか、またはサイレンシングするための周知の手順を用いることを含む。あるいは、適用法は、治療的に有用なポリペプチドをコードするDNAまたはmRNA配列の送達を含む。この様式では、欠損しているか、または存在しない遺伝子産物を補給することによって、遺伝性疾患に対する治療が提供される (すなわち、Duchenneジストロフィーの場合は、Kunkelら、Brit. Med. Bull. 45 (3) : 630 - 643 (1989) を参照し、嚢胞性線維症の場合はGoodfellow, Nature 341 : 102 - 103 (1989) を参照すること)。本発明の組成物に対する他の用途は、細胞内へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入を含む (Bennettら、Mol. Pharm. 41 : 1023 - 1033 (1992) を参照のこと)。

【0183】

本発明の方法は、インビトロ、エキソビボまたはインビボにおいて実施され得る。例えば、本発明の組成物は、当業者に公知の方法を用いて、インビボにおいて核酸を細胞に送達するためにも使用され得る。DNAまたはmRNA配列を送達するための本発明の適用法に関して、本明細書中で参考として援用されるZhuら、Science 261 : 209 - 211 (1993) には、DOTMA - DOPE複合体を用いたサイトメガロウイルス (CMV) - クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 発現プラスミドの静脈内送達に記載されている。本明細書中で参考として援用されるHydeら、Nature 362 : 250 - 256 (1993) には、リボソームを用いた、マウスの気道の上皮および肺の中の肺胞への嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (CFTF) 遺伝子の送達に記載されている。本明細書中で参考として援用されるBrighamら、Am. J. Med. Sci. 298 : 278 - 281 (1989) には、細胞内の酵素であるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) をコードする機能性原核生物遺伝子によるマウスの肺のインビボトランスフェクションに記載されている。したがって、本発明の組成物は、感染症の処置において使用され得る。

【0184】

インビボ投与の場合、薬学的組成物は、好ましくは、非経口的に、すなわち、関節内、静脈内、腹腔内、皮下または筋肉内に投与される。特定の実施形態において、薬学的組成物は、ボーラス注射によって静脈内または腹腔内に投与される。1つの例として、本明細書中で参考として援用されるStadlerらの米国特許第5,286,634号を参照のこと。細胞内の核酸送達は、Straubingerら、METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, New York. 101 : 512 - 527 (1983) ; Manninoら、Biotechniques 6 : 682 - 690 (1988) ; Nicolauら、Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6 : 239 - 271 (1989) およびBehr, Ace. C

10

20

30

40

50

hem. Res. 26: 274 - 278 (1993) においても論じられている。脂質ベースの治療薬を投与するなほ他の方法は、例えば、Rahmanら、米国特許第3,993,754号; Sears, 米国特許第4,145,410号; Papahadjopoulosら、米国特許第4,235,871号; Schneider, 米国特許第4,224,179号; Lenkら、米国特許第4,522,803号; および Fountainら、米国特許第4,588,578号に記載されている。

【0185】

他の方法において、薬学的調製物は、調製物を組織に直接適用することによって標的組織と接触され得る。その適用法は、局所的な「開放系(open)」または「閉鎖系(closed)」の手技によって行われ得る。「局所的」とは、その環境(例えば、皮膚、中咽頭、外耳道など)に露出される組織への薬学的調製物の直接的な適用のことを意味する。「開放系」の手技は、患者の皮膚を切開する工程、およびその下にある、薬学的調製物が適用される組織を直接明視化する工程を包含する手技である。これは、一般に、外科的手順(例えば、肺に到達する開胸術、腹部の内臓に到達する開腹術、または標的組織に対する他の直接的な外科的アプローチ)によって達成される。「閉鎖系」の手技は、内部の標的組織を直接明視化しないが、皮膚の小さい創傷を通じて器具を挿入することによって到達する、侵襲性の手技である。例えば、調製物は、洗浄針によって腹膜に投与され得る。同様に、脊髄麻酔または脊髄のメトリザマイドイメージングのために通常行われるような、腰椎穿刺中の注入後に患者を適切な位置にすることによって、薬学的調製物が髄膜または脊髄に投与され得る。あるいは、調製物は、内視鏡デバイスを介して投与され得る。

【0186】

脂質-核酸組成物は、肺に吸入されるエアロゾルとして(Brighamら、Am. J. Sci. 298(4): 278 - 281 (1989)を参照のこと)または疾患部位における直接的な注射によって(Culver, Human Gene Therapy, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, New York, pp. 70 - 71 (1994))も投与され得る。

【0187】

本発明の方法は、種々の被験体または宿主において実施され得る。好ましい被験体または宿主としては、哺乳動物種(例えば、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジなど)が挙げられる。特定の実施形態において、被験体は、疾患または障害の処置または予防の必要のあるヒトなどの哺乳動物、例えば、疾患もしくは障害と診断されている被験体、または疾患もしくは障害に対してリスクがあると考えられる被験体である。

【0188】

本発明の脂質-治療剤粒子に対する投薬量は、治療剤と脂質との比、ならびに患者の年齢、体重および状態に基づく投与する医師の見解に依存する。

【0189】

1つの実施形態において、本発明は、標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリペプチドの発現を調節する方法を提供する。これらの方法は、一般に、標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリペプチドの発現を調節することができる核酸と会合されている本発明の脂質粒子と細胞とを接触させる工程を包含する。本明細書中で使用されるとき、用語「調節する」とは、標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリペプチドの発現を変化させることを指す。様々な実施形態において、調節するとは、増加させることもしくは増強することを含み得るか、または減少させることもしくは低下させることを含み得る。標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリペプチドの発現のレベルを測定する方法は、当該分野において公知であり、利用可能であり、それらとしては、例えば、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を使用する方法および免疫組織化学的手法が挙げられる。特定の実施形態において、標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリペプチドの発現のレベルは、適切なコントロール値と比べて、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%または50%超、上昇するか、または低下する。

【0190】

例えば、所望のポリペプチドの発現を増加させる場合、核酸は、所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターであり得る。他方で、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現の低下が望まれる場合、核酸は、標的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることによって標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリペプチドの発現を妨害するポリヌクレオチド配列を含む、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、*siRNA*またはマイクロRNAであり得る。あるいは、その核酸は、そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチド、*siRNA*またはマイクロRNAを発現するプラスミドであり得る。

【0191】

1つの特定の実施形態において、本発明は、細胞によるポリペプチドの発現を調節する方法を提供し、この方法は、例えば、約20～60%DLin-K-DMA：5～25%DSPC：25～55%Chol：0.5～15%PEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMAというモル比で、DLin-K-DMA、DSPC、CholおよびPEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMAからなるか、またはそれらから本質的になる脂質粒子を細胞に提供する工程を包含し、ここで、その脂質粒子は、そのポリペプチドの発現を調節することができる核酸と会合されている。特定の実施形態において、脂質モル比は、約40/10/40/10(mol%DLin-K-DMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMA)である。別の群の実施形態では、これらの組成物中の中性脂質は、POPC、DOPEまたはSMで置き換えられる。

【0192】

特定の実施形態において、核酸活性薬剤または治療剤は、*siRNA*、マイクロRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、および*siRNA*、マイクロRNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択され、ここで、その*siRNA*、マイクロRNAまたはアンチセンスRNAが、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的に結合するポリヌクレオチドまたはその相補物を含み、その結果、ポリペプチドの発現が減少する。

【0193】

他の実施形態において、核酸は、ポリペプチドまたはその機能的なバリエーションもしくはフラグメントをコードするプラスミドであり、その結果、そのポリペプチドまたはその機能的なバリエーションもしくはフラグメントの発現が増加する。

【0194】

関連する実施形態において、本発明は、被験体におけるポリペプチドの過剰発現を特徴とする疾患または障害を処置する方法を提供し、この方法は、その被験体に本発明の薬学的組成物を提供する工程を包含し、ここで、その治療剤は、*siRNA*、マイクロRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、および*siRNA*、マイクロRNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択され、ここで、その*siRNA*、マイクロRNAまたはアンチセンスRNAは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的に結合するポリヌクレオチドまたはその相補物を含む。

【0195】

1つの実施形態において、薬学的組成物は、例えば、約20～60%DLin-K-DMA：5～25%DSPC：25～55%Chol：0.5～15%PEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMAというモル比で、DLin-K-DMA、DSPC、CholおよびPEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMAからなるか、またはそれらから本質的になる脂質粒子を含み、ここで、その脂質粒子は、治療的核酸に会合されている。特定の実施形態において、脂質モル比は、約40/10/40/10(mol%DLin-K-DMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMA)である。別の群の実施形態では、これらの組成物中の中性脂質は、POPC、DOPEまたはSMと置き換えられる。

【0196】

別の関連する実施形態では、本発明は、被験体におけるポリペプチドの過小発現を特徴とする疾患または障害を処置する方法を含み、この方法は、その被験体に本発明の薬学的組成物を提供する工程を包含し、ここで、その治療剤は、そのポリペプチドまたはその機能的なバリエーションもしくはフラグメントをコードするプラスミドである。

【0197】

1つの実施形態において、薬学的組成物は、例えば、約20～60%DLin-K-DMA:5～25%DSPC:25～55%Chol:0.5～15%PEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMAというモル比で、DLin-K-DMA、DSPC、CholおよびPEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMAからなるか、またはそれらから本質的になる脂質粒子を含み、ここで、その脂質粒子は、治療的核酸に会合されている。特定の実施形態において、脂質モル比は、約40/10/40/10(mol%DLin-K-DMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMA)である。別の群の実施形態では、これらの組成物中の中性脂質は、POPC、DOPEまたはSMと置き換えられる。

10

【0198】

本発明は、被験体において免疫応答を誘導する方法をさらに提供し、この方法は、その被験体に本発明の薬学的組成物を提供する工程を包含し、ここで、その治療剤は、免疫賦活性オリゴヌクレオチドである。ある特定の実施形態において、免疫応答は、体液性免疫応答または粘膜免疫応答である。1つの実施形態において、薬学的組成物は、例えば、約20～60%DLin-K-DMA:5～25%DSPC:25～55%Chol:0.5～15%PEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMAというモル比で、DLin-K-DMA、DSPC、CholおよびPEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMAからなるか、またはそれらから本質的になる脂質粒子を含み、ここで、その脂質粒子は、治療的核酸と会合されている。特定の実施形態において、脂質モル比は、約40/10/40/10(mol%DLin-K-DMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEG-DMA)である。別の群の実施形態では、これらの組成物中の中性脂質は、POPC、DOPEまたはSMと置き換えられる。

20

【0199】

さらなる実施形態において、薬学的組成物は、ワクチンまたは抗原と併用して被験体に提供される。したがって、本発明自体が、免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含み、また、免疫応答が望まれる抗原と会合されている、本発明の脂質粒子を含むワクチンを提供する。特定の実施形態において、その抗原は、腫瘍抗原であるか、または感染物質、例えば、ウイルス、細菌または寄生生物と会合されている。

30

【0200】

種々の腫瘍抗原、感染物質抗原、および他の疾患に関連する抗原が、当該分野で周知であり、これらの例は、本明細書中で引用される参考文献に記載されている。本発明における使用に適した抗原の例としては、ポリペプチド抗原およびDNA抗原が挙げられるが、これらに限定されない。抗原の特定の例は、A型肝炎、B型肝炎、痘瘡、ポリオ、炭疽、インフルエンザ、チフス、破傷風、麻疹、ロタウイルス、ジフテリア、百日咳、結核および風疹の抗原である。好ましい実施形態において、抗原は、B型肝炎組換え抗原である。別の局面では、抗原は、A型肝炎組換え抗原である。別の局面では、抗原は、腫瘍抗原である。そのような腫瘍関連抗原の例は、MUC-1、EBV抗原およびパーキットリンパ腫に関連する抗原である。さらなる局面では、抗原は、チロシナーゼ関連タンパク質腫瘍抗原組換え抗原である。当業者は、本発明における使用に適した他の抗原を承知しているだろう。

40

【0201】

本発明における使用に適した腫瘍関連抗原は、単一の腫瘍タイプを示唆し得、いくつかのタイプの腫瘍間で共有され得、そして/または正常細胞と比較して腫瘍細胞においても

50

っぱら発現され得るか、もしくは過剰発現され得る、変異した分子と変異していない分子の両方を含む。タンパク質および糖タンパク質に加えて、炭水化物、ガングリオシド、糖脂質およびムチンの発現の腫瘍特異的パターンもまた考証されている。本癌ワクチンにおいて使用するための例示的な腫瘍関連抗原としては、癌遺伝子、癌抑制遺伝子、および腫瘍細胞に特有の変異または再配列を有する他の遺伝子のタンパク質産物、再活性化された胚性遺伝子産物、癌胎児性抗原、組織特異的（しかしながら腫瘍特異的でない）分化抗原、成長因子レセプター、細胞表面炭水化物残基、外来性ウイルスタンパク質、ならびにいくつかのその他の自己タンパク質が挙げられる。

【0202】

腫瘍関連抗原の特定の実施形態としては、例えば、変異した抗原（例えば、Ras p21 癌原遺伝子、腫瘍抑制因子 p53 および BCR-ab1 癌遺伝子のタンパク質産物ならびに CDK4、MUM1、カスパーゼ8 および ベータカテニン）；過剰発現される抗原（例えば、ガレクチン4、ガレクチン9、炭酸脱水酵素、アルドラーゼA、PRAME、Her2/neu、ErbB-2 および KSA）、癌胎児抗原（例えば、アルファフェトプロテイン（AFP）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG））；自己抗原（例えば、癌胎児抗原（CEA）およびメラノサイト分化抗原（例えば、Mart1/MelanA、gp100、gp75、チロシナーゼ、TRP1 および TRP2））；前立腺関連抗原（例えば、PSA、PAP、PSMA、PSM-P1 および PSM-P2）；再活性化された胚性遺伝子産物（例えば、MAGE1、MAGE3、MAGE4、GAGE1、GAGE2、BAGE、RAGE および 他の癌精巢抗原（例えば、NY-ESO1、SSX2 および SCP1））；ムチン（例えば、Muc-1 および Muc-2）；ガングリオシド（例えば、GM2、GD2 および GD3）、中性の糖脂質および糖タンパク質（例えば、Lewis(y) および グロボ-H）；および糖タンパク質（例えば、Tn、Thompson-Freidenreich 抗原（TF）および sTn）が挙げられる。細胞全体および腫瘍細胞可溶化物ならびにその免疫原性部分、ならびにB細胞リンパ腫に対して使用するためのBリンパ球のモノクローナル増殖時に発現される免疫グロブリンイディオタイプもまた、本明細書中で腫瘍関連抗原として含められる。

【0203】

病原体としては、感染物質、例えば、哺乳動物、より詳細にはヒトに感染するウイルスが挙げられるが、これに限定されない。感染性ウイルスの例としては：Retroviridae（例えば、ヒト免疫不全ウイルス（例えば、HIV-1（HTLV-III、LAV または HTLV-III/LAV とも称される）または HIV-III）；および HIV-LP などの他の分離されたもの；Picornaviridae（例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；Calciviridae（例えば、胃腸炎を引き起こす系統）；Togaviridae（例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；Flaviridae（例えば、デング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；Coronaviridae（例えば、コロナウイルス）；Rhabdoviridae（例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；Coronaviridae（例えば、コロナウイルス）；Rhabdoviridae（例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；Filoviridae（例えば、エボラウイルス）；Paramyxoviridae（例えば、パラインフルエンザウイルス、耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス）；Orthomyxoviridae（例えば、インフルエンザウイルス）；Bungaviridae（例えば、ハンタンウイルス、ブニアウイルス、フレボウイルスおよびナイロウイルス）；Arenaviridae（出血熱ウイルス）；Reoviridae（例えば、レオウイルス、オルビウイルスおよびロタウイルス）；Birnaviridae；Hepadnaviridae（B型肝炎ウイルス）；Parvoviridae（パルボウイルス）；Papovaviridae（パピローマウイルス、ポリオーマウイルス）；Adenoviridae（ほとんどのアデノウイルス）；Herpesviridaeの単純ヘルペスウイルス（HSV）1 および 2、水

10

20

30

40

50

痘带状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）、ヘルペスウイルス；Poxviridae（天然痘ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス）；およびIridoviridae（例えば、アフリカブタ熱ウイルス）；ならびに未分類のウイルス（例えば、海綿状脳障害の病原学的物質、デルタ肝炎の病原体（B型肝炎ウイルスの欠損サテライトと考えられる）、非A型、非B型肝炎の病原体（クラス1＝内部伝染性；クラス2＝非経口伝染性（すなわち、C型肝炎）；ノーウォークおよび関連ウイルスならびにアストロウイルス）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0204】

また、グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌は、脊椎動物において抗原として働く。そのようなグラム陽性細菌としては、*Pasteurella*種、*Staphylococci*種および*Streptococcus*種が挙げられるが、これらに限定されない。グラム陰性細菌としては、*Escherichia coli*、*Pseudomonas*種および*Salmonella*種が挙げられるが、これらに限定されない。感染性の細菌の特定の例としては：*Helicobacter pylori*、*Borrelia burgdorferi*、*Legionella pneumophila*、*Mycobacteria* spp（例えば、*M. tuberculosis*、*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. kansasii*、*M. goodii*）、*Staphylococcus aureus*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria meningitidis*、*Listeria monocytogenes*、*Streptococcus pyogenes*（A群連鎖球菌属）、*Streptococcus agalactiae*（B群連鎖球菌属）、*Streptococcus*（ピリダンス型）、*Streptococcus faecalis*、*Streptococcus bovis*、*Streptococcus*（嫌気性種）、*Streptococcus pneumoniae*、病原性*Campylobacter* sp.、*Enterococcus* sp.、*Haemophilus influenzae*、*Bacillus anthracis*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Corynebacterium* sp.、*Erysipelothrix rhusiopathiae*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium tetani*、*Enterobacter aerogenes*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pasteurella multocida*、*Bacteroides* sp.、*Fusobacterium nucleatum*、*Streptobacillus moniliformis*、*Treponema pallidum*、*Treponema pertenue*、*Leptospira*、*Rickettsia*および*Actinomyces israelii*が挙げられるがこれらに限定されない。

【0205】

病原体の追加の例としては、哺乳動物、より詳細にはヒトに感染する感染性の真菌が挙げられるが、これに限定されない。感染性の真菌の例としては：*Cryptococcus neoformans*、*Histoplasma capsulatum*、*Coccidioides immitis*、*Blastomyces dermatitidis*、*Chlamydia trachomatis*、*Candida albicans*が挙げられるが、これらに限定されない。感染性の寄生物の例としては、*Plasmodium*（例えば、*Plasmodium falciparum*、*Plasmodium malariae*、*Plasmodium ovale*および*Plasmodium vivax*）が挙げられる。他の感染性の生物（すなわち、原生生物）としては、*Toxoplasma gondii*が挙げられる。

【実施例】

【0206】

実施例 1

2, 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノメチル - [1, 3] - ジオキソラン (DL

10

20

30

40

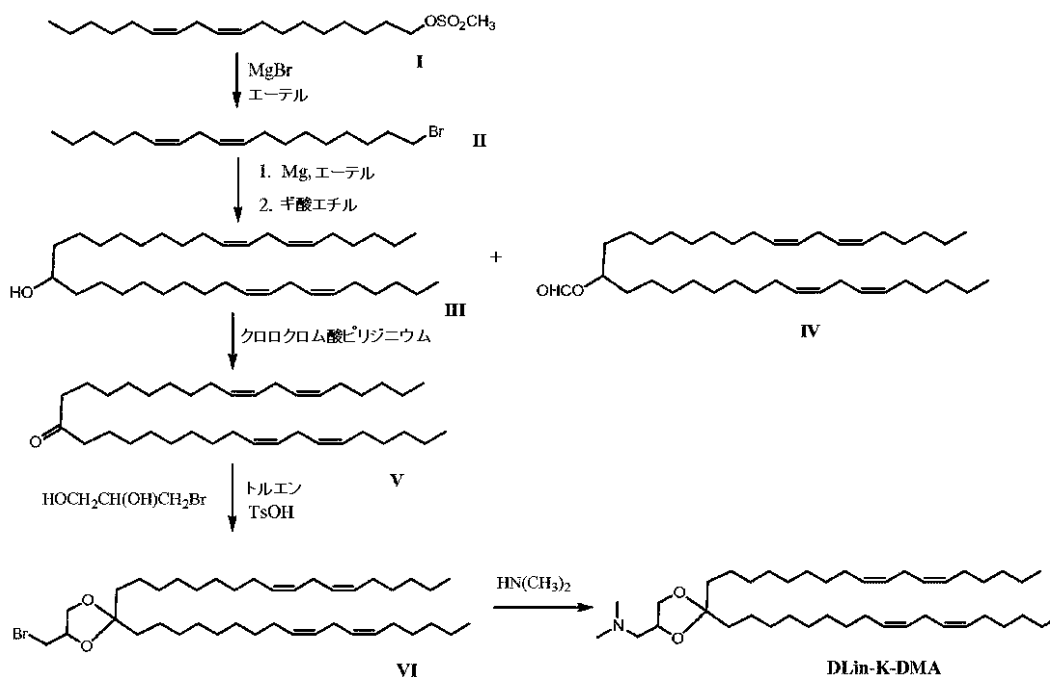
50

i n - K - D M A) の合成

以下の概略図に示され、以下に記載されるように、D L i n - K - D M A を合成した。

【 0 2 0 7 】

【 化 1 6 】



臭化リノレイル (I I) の合成

無水エーテル (3 0 0 m L) 中の、リノレイルメタンスルホネート (6 . 2 g , 1 8 m m o l) とマグネシウムブロミドエーテレート (1 7 g , 5 5 m m o l) との混合物をアルゴン下で一晩 (2 1 時間) 撹拌した。得られた懸濁液を 3 0 0 m L の冷水に注ぎ込んだ。振盪した後、有機相を分離した。水相をエーテル (2 × 1 5 0 m L) で抽出した。併せたエーテル相を水 (2 × 1 5 0 m L) 、ブライン (1 5 0 m L) で洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、6 . 5 g の無色油状物を得た。その粗生成物を、ヘキサン類で溶出されるシリカゲル (2 3 0 ~ 4 0 0 メッシュ , 3 0 0 m L) におけるカラムクロマトグラフィで精製した。これにより、6 . 2 g (約 1 0 0 %) の臭化リノレイル (I I) が得られた。

【 0 2 0 8 】

【 化 1 7 】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.27-5.45 (4H, m, 2 x $\text{CH}=\text{CH}$), 3.42 (2H, t, CH_2Br), 2.79 (2H, t, $\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$), 2.06 (4H, q, 2 x アリル位 CH_2), 1.87 (2H, クインテット, CH_2), 1.2-1.5 (16H, m), 0.90 (3H, t, CH_3) ppm.

ジリノレイルメタノール (I I I) の合成

窒素下の 2 0 0 m L の無水エーテル中の、1 つの結晶のヨウ素を含む Mg 回転物 (0 . 4 5 g , 1 8 . 7 m m o l) の懸濁液に、室温において 5 0 m L の無水エーテル中の臭化リノレイル (I I) の溶液を加えた。得られた混合物を窒素下で一晩還流した。その混合物を室温に冷却した。窒素下のその濁った混合物に、3 0 m L の無水エーテル中のギ酸エチル (0 . 6 5 g , 1 8 . 7 m m o l) の溶液を室温において滴下した。滴下した後、その混合物を室温において一晩 (2 0 時間) 撹拌した。エーテル層を 1 0 % H_2SO_4 水溶液 (1 0 0 m L) 、水 (2 × 1 0 0 m L) 、ブライン (1 5 0 m L) で洗浄し、次いで、無水 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、5 . 0 g の青白色油状物を得た。溶出剤としてヘキサン類中の 0 ~ 7 % エーテル勾配を用いるシリカゲル (2 3 0 ~ 4 0 0 メッシュ , 3 0 0 m L) におけるカラムカラムクロマトグラフィによって、2 つの生

10

20

30

40

50

成物、ジリノレイルメタノール (2 . 0 g , I I I) およびジリノレイルメチルホルメート (1 . 4 g , I V) を得た。

【 0 2 0 9 】

【 化 1 8 】

ジリノレイルメチルホルメート(IV)の¹H NMR (400 MHz,

CDCl₃) δ: 8.10 (1H, s, CHO), 5.27-5.45 (8H, m, 4 x CH=CH), 4.99 (1H,

クインテット, OCH), 2.78 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2.06 (8H, q, 4 x アリル位CH₂), 1.5-1.6

(4H, m, 2 x CH₂), 1.2-1.5 (32H, m), 0.90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

10

ジリノレイルメチルホルメート (I V , 1 . 4 g) および K O H (0 . 2 g) を窒素下、室温において一晩、85% EtOH 中で攪拌した。反応が完了した後、溶媒の半分を蒸発させた。得られた混合物を 150 mL の 5% HCl 溶液に注ぎ込んだ。水相をエーテル (3 x 100 mL) で抽出した。併せたエーテル抽出物を水 (2 x 100 mL)、ブライン (100 mL) で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、1.0 g のジリノレイルメタノール (I I I) を無色油状物として得た。全体として、3.0 g (60%) のジリノレイルメタノールが得られた。ジリノレイルメタノール (I I I) に対する ¹H NMR (400 MHz , C D C l ₃) : p p m .

【 0 2 1 0 】

ジリノレイルケトン (V) の合成

20

100 mL の C H ₂ C l ₂ 中の、ジリノレイルメタノール (2 . 0 g , 3 . 8 m m o l) および無水炭酸ナトリウム (0 . 2 g) との混合物に、クロロクロム酸ピリジニウム (P C C , 2 . 0 g , 9 . 5 m m o l) を加えた。得られた懸濁液を室温において 60 分間攪拌した。次いで、エーテル (300 mL) をその混合物に加え、得られた茶色懸濁液をシリカゲルのパッドで濾過した (300 mL) 。そのシリカゲルパッドをエーテルでさらに洗浄した (3 x 200 mL) 。そのエーテル濾液と洗浄液とを混合した。溶媒を蒸発させることにより、3.0 g の油性残渣を粗生成物として得た。その粗生成物を、ヘキサン類中の 0 ~ 3% エーテルで溶出されるシリカゲル (230 ~ 400 メッシュ , 250 mL) におけるカラムクロマトグラフィで精製した。これにより、1.8 g (90%) のジリノレイルケトン (V) が得られた。

【 0 2 1 1 】

【 化 1 9 】

¹H NMR (400 MHz,

CDCl₃) δ: 5.25-5.45 (8H, m, 4 x CH=CH), 2.78 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2.39

(4H, t, 2 x COCH₂), 2.05 (8H, q, 4 x アリル位CH₂), 1.45-1.7 (4H, m), 1.2-1.45 (32H,

m), 0.90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

30

2 , 2 - ジリノレイル - 4 - ブロモメチル - [1 , 3] - ジオキソラン (V I) の合成

200 mL のトルエン中の、ジリノレイルメタノール (V , 1 . 3 g , 2 . 5 m m o l) と、3 - ブロモ - 1 , 2 - プロパンジオール (1 . 5 g , 9 . 7 m m o l) と、p - トルエンスルホン酸水和物 (0 . 16 g , 0 . 84 m m o l) との混合物を、Dean - S t a r k チューブを用いて窒素下において 3 日間還流することにより、水を除去した。得られた混合物を室温に冷却した。有機相を水 (2 x 50 mL)、ブライン (50 mL) で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、黄色がかった油性残渣が得られた。溶出剤としてヘキサン類中の 0 ~ 6% エーテル勾配を用いるシリカゲル (230 ~ 400 メッシュ , 100 mL) におけるカラムカラムクロマトグラフィによって、0.1 g の純粋 V I および 1.3 g の V I と出発物質との混合物が得られた。

【 0 2 1 2 】

40

【化 2 0】

 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ :

5.27-5.45 (8H, m, 4 x $\text{CH}=\text{CH}$), 4.28-4.38 (1H, m, OCH), 4.15 (1H, dd, OCH), 3.80 (1H, dd, OCH), 3.47 (1H, dd, CHBr), 3.30 (1H, dd, CHBr), 2.78 (4H, t, 2 x $\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$), 2.06 (8H, q, 4 x アリル位 CH_2), 1.52-1.68 (4H, m, 2 x CH_2), 1.22-1.45 (32H, m), 0.86-0.94 (6H, m, 2 x CH_3) ppm.

2, 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノメチル - [1, 3] - ジオキソラン (DLin - K - DMA) の合成

10

無水ジメチルアミンを、2, 2 - ジリノレイル - 4 - ブロモメチル - [1, 3] - ジオキソラン (VI) およびジリノレイルケトン (V) との 1.3 g の混合物を含む無水 THF 溶液 (100 mL) 中に、0 において 10 分間泡立てて流した。次いで、その反応フラスコを密閉し、その混合物を室温において 6 日間撹拌した。溶媒を蒸発させることにより、1.5 g の残渣が残った。その粗生成物を、ジクロロメタン中の 0 ~ 5 % メタノール勾配で溶出されるシリカゲル (230 ~ 400 メッシュ, 100 mL) におけるカラムクロマトグラフィで精製した。これにより、0.8 g の所望の生成物である DLin - K - DMA が得られた。

【0213】

20

【化 2 1】

 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.25-5.45 (8, m, 4x $\text{CH}=\text{CH}$), 4.28-4.4

(1H, m, OCH), 4.1 (1H, dd, OCH), 3.53 (1H, t OCH), 2.78 (4H, t, 2 x $\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$), 2.5-2.65 (2H, m, NCH_2), 2.41 (6H, s, 2 x NCH_3), 2.06 (8H, q, 4 x アリル位 CH_2), 1.56-1.68 (4H, m, 2 x CH_2), 1.22-1.45 (32H, m), 0.90 (6H, t, 2 x CH_3) ppm.

実施例 2

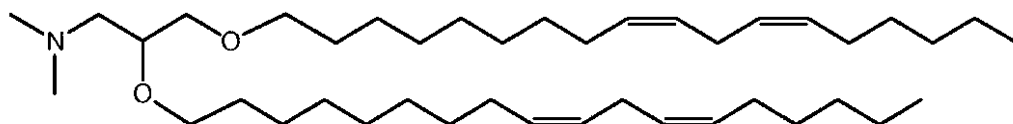
1, 2 - ジリノレイルオキシ - N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパン (DLinDMA) の合成

30

DLinDMA を以下に記載されるように合成した。

【0214】

【化 2 2】



1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLinDMA)

120 mL の無水ベンゼン中の NaH (95%, 5.2 g, 0.206 mol) の懸濁液に、アルゴン下の 40 mL の無水ベンゼン中の N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパン - 1, 2 - ジオール (2.8 g, 0.0235 mol) を滴下した。滴下した後、得られた混合物を室温において 15 分間撹拌した。75 mL の無水ベンゼン中のリノレイルメタンスルホネート (99%, 20 g, 0.058 mol) をアルゴン下、室温において上記混合物に滴下した。室温において 30 分間撹拌した後、その混合物をアルゴン下で一晩還流した。冷却した後、得られた懸濁液を、250 mL の 1 : 1 (V : V) エタノール - ベンゼン溶液で滴下して処理した。有機相を水 (150 mL)、ブライン (2 x 200 mL) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を真空中で蒸発させることにより、17.9 g の淡色油状物を粗生成物として得た。その粗生成物を、塩化メチレン中の 0 ~ 5 % メタノール勾配を用いるシリカゲルにおけるカラムカラムクロマトグラフィによって 2 回精製したところ、10.4 g の純粋な DLinDMA が得られた。

50

【 0 2 1 5 】

【 化 2 3 】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.35 (8H, m, $\text{CH}=\text{CH}$), 3.5 (7H, m, OCH), 2.75 (4H, t, 2 x CH_2), 2.42 (2H, m, NCH_2), 2.28 (6H, s, 2 x NCH_3), 2.05 (8H, q, CH_2), 1.56 (4H, m, 2 x CH_2), 1.28 (32H, m, 16 x CH_2), 0.88 (6H, t, 2 x CH_3) ppm.

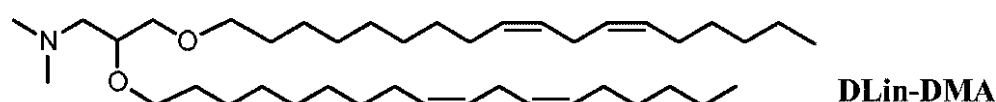
実施例 3

1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - トリメチルアミノプロパンクロリド (DLin - TMA - Cl) の合成 10

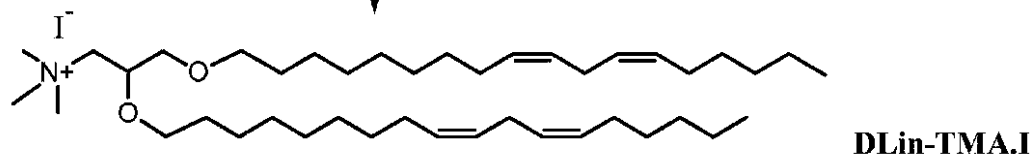
概略図に示され、以下に記載されるように、DLin - TMA - Cl を合成した。

【 0 2 1 6 】

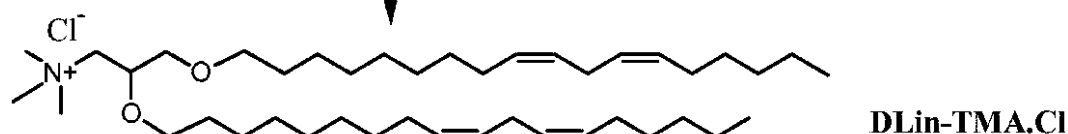
【 化 2 4 】



↓ CH_3I



↓ HCl
 NaCl



1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin - DMA) の合成

リノレイルメタンスルホネートによる 3 - ジメチルアミノ - 1, 2 - プロパンジオールのエーテル化に基づいて、実施例 2 に記載されたように DLin - DMA を調製した。

【 0 2 1 7 】

1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - トリメチルアミノプロパンヨウ化物 (DLin - TMA - I) の合成 40

20 mL の無水 CH_2Cl_2 中の、1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin - DMA, 5.5 g, 8.9 mmol) と、 CH_3I (7.5 mL, 120 mmol) との混合物を窒素下、室温において 7 日間攪拌した。溶媒および過剰量のヨードメタンを蒸発させることにより、7.0 g の黄色シロップ状物を粗 DLin - TMA - I として得て、それをさらに精製することなく以下の工程において使用した。

【 0 2 1 8 】

1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - トリメチルアミノプロパンクロリド (DLin - TMA - Cl) の調製

上記粗 1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - トリメチルアミノプロパンヨウ化物 (DLin - TMA - I, 7.0 g) を分液漏斗において 150 mL の CH_2Cl_2 に溶解した。 50

40 mL の 1 N HCl メタノール溶液を加え、得られた溶液を十分に振盪した。その溶液に、50 mL のブラインを加え、その混合物を十分に振盪した。有機相を分離した。水相を 15 mL の CH₂Cl₂ で抽出した。次いで、有機相および抽出物を混合した。これにより、イオン交換の第 1 工程が完了した。このイオン交換工程を、さらに 4 回繰り返した。最後の有機相をブライン (100 mL) で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、6.0 g の黄色油状物として得た。その粗生成物を、クロロホルム中の 0 ~ 15 % メタノール勾配で溶出されるシリカゲル (230 ~ 400 メッシュ, 250 mL) におけるカラムクロマトグラフィで精製した。これにより、2.3 g の 1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - トリメチルアミノプロパンクロリド (DLin-DMA-Cl) を無色シロップ状物として得た。

10

【0219】

【化25】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.26-5.46 (8H, m, 4 x CH=CH), 3.95-4.15 (2H, m, NCH₂), 3.71 (1H, dd, OCH), 3.35-3.65 (6H, m, 3 x OCH₂), 3.51 (9H, s, 3 x NCH₃), 2.77 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2.05 (8H, q, 4 x アリル位 CH₂), 1.75-2.0 (2H, br.), 1.49-1.75 (4H, m, 2 x CH₂), 1.2-1.45 (30H, m), 0.89 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

実施例 4

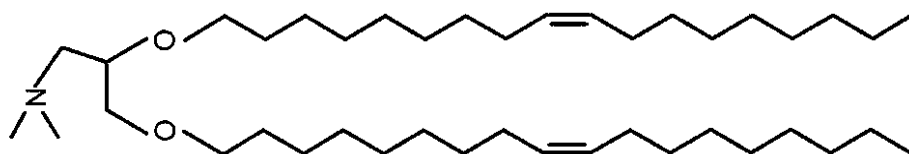
1, 2 - ジオレイルオキシ - N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパン (DODMA) の合成

20

以下に示されるように DODMA を合成した。

【0220】

【化26】



1, 2 - ジオレイルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DODMA)

30

オレイルメシレートのリノレイルメシレートに置き換えたことを除いて、同じ様式で DLinDMA を合成した。

【0221】

ベンゼン (800 mL) を、スターバーを含むアルゴン下の 3 L ナシ形丸底フラスコ中の水素化ナトリウム (52 g, 95 %, 2.06 mol) に加えた。そのアルゴン下の反応フラスコに、ベンゼン (200 mL) 中の N, N - ジメチルアミノプロパン - 1, 2 - ジオール (28.1 g, 234.8 mmol) の溶液をゆっくり加え、さらに 50 mL のベンゼンですすぎ、10 分間攪拌した。

【0222】

アルゴン下のその反応混合物に、ベンゼン (200 mL) 中のオレイルメシレート (200.3 g, 578.9 mmol) を加え、1200 mL のベンゼンですらにすすいだ。その反応混合物をアルゴン下で一晩還流した。

40

【0223】

その反応混合物を 4 L エルレンマイヤーフラスコに移し、エタノール (100 mL) をアルゴン下でゆっくり加えることにより、未反応の水素化ナトリウムをクエンチした。さらなるエタノール (1300 mL) を加えることにより、ベンゼン : エタノールが 1 : 1 となるように総エタノール含有量を 1400 mL にした。その反応混合物 (800 mL) を 2 L 分液漏斗に等分し、240 mL の水を加えた (ベンゼン : エタノール : 水 1 : 1 : 0.6 v/v)。有機相を回収し、水層をベンゼン (100 mL) で再抽出した。

【0224】

50

アルゴン下のその反応混合物にベンゼン (200 mL) 中のオレイルメシレート (200.3 g, 578.9 mmol) を加え、さらなる 1200 mL のベンゼンですすいだ。その反応混合物をアルゴン下で一晩還流した。この工程を再度繰り返した。

【0225】

併せた有機画分を無水硫酸マグネシウム (30 g) で乾燥し、焼結ガラス漏斗を用いて真空下で濾過した。rotovap (水浴 50 ~ 60 °C) において溶媒を除去した。粘稠性の油性生成物をジクロロメタン (300 mL) に再溶解し、濾紙およびシリカゲル 60 (80 g, 230 ~ 400 メッシュ) を用いて焼結ガラス漏斗で真空濾過した。rotovap においてジクロロメタンを 50 ~ 60 °C において除去した。

【0226】

その生成物をカラムカラムクロマトグラフィで精製した。合計 151 g の生成物を 2 つの約 75 g のアリコートに分割し、2 本の 600 g のシリカゲル 60 カラム上に充填した。カラムに充填する前に、その生成物をジクロロメタン中の 2% MeOH (約 1:1 w/v) に溶解した。生成物が出現するまで、ジクロロメタン中の 2% MeOH (約 1 L) を使用した。ジクロロメタン中の約 1 L の 5%、7.5%、次いで 10% MeOH を用いて、カラムを溶出し、約 200 mL の画分を回収した。

【0227】

TLC における上または下のスポットの画分 (不純物) および生成物を、純粋な画分と別々に rotovap に供した。不純な DODMA を他のバッチから回収し、それらを併せて、2 回目のカラムに入れて精製した。DODMA の収量は、95 g だった。

【0228】

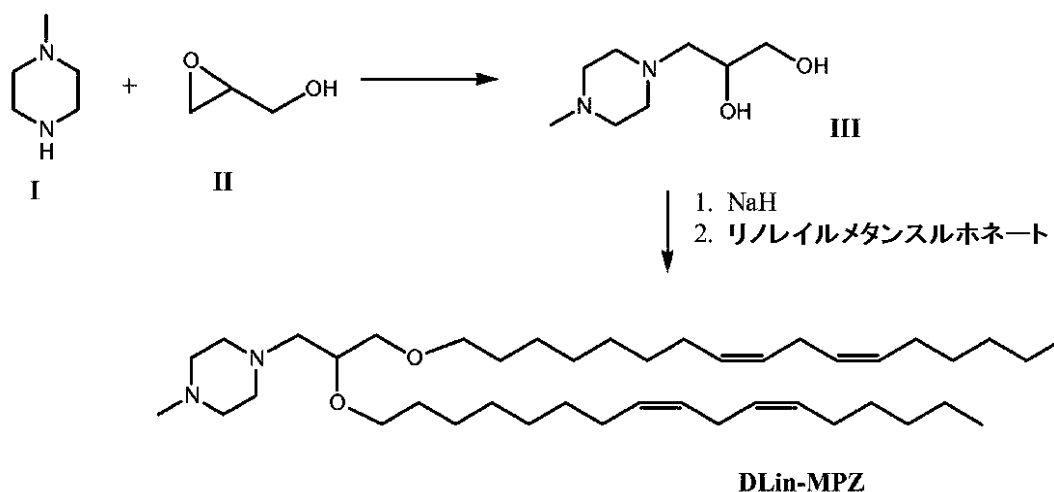
実施例 5

1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - (N - メチルピペラジノ) プロパン (DLin - MPZ) の合成

模式図に示され、以下に記載されるように、DLin - MPZ を合成した。

【0229】

【化 27】



3 - (N - メチルピペラジノ) - 1, 2 - プロパンジオール (III) の合成

無水 CH_2Cl_2 (100 mL) 中の、1 - メチルピペラジン (1.02 g, 10.2 mmol) の溶液に、グリシドール (0.75 g, 9.7 mmol) を滴下した。得られた混合物を室温において 2 日間攪拌した。溶媒を蒸発させることにより、油性残渣を得た。その残渣を 100 mL のベンゼンに再溶解した。溶媒を蒸発させた後に、1.8 g の粘稠性油状物を粗生成物として得た。その粗生成物を、さらに精製することなく、以下の工程において使用した。

【0230】

1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - N - メチルピペラジノプロパン (DLin - MPZ) の合成

窒素下の100 mLの無水ベンゼン中のNaH(2.0 g, 60%, 50 mmol)の懸濁液に、5 mLの無水ベンゼン中の3-(N-メチルピペラジノ)-1,2-プロパンジオール(III, 0.74 g, 4.2 mmol)の溶液を滴下した。得られた混合物を室温において20分間攪拌した。次いで、20 mLの無水ベンゼン中のリノレイルメタンスルホネート(3.2 g, 9.3 mmol)の溶液を滴下した。室温において20分間攪拌した後、その混合物を窒素下で一晩還流した。冷却した後、その混合物に40 mLの1:1(V:V)エタノール-ベンゼンをゆっくり加えた後、さらに60 mLのベンゼンおよび100 mLのEtOHを加えた。有機相を水(200 mL)で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、3.0 gの黄色油状物を粗生成物として得た。クロロホルム中の0~8%メタノール勾配で溶出されるシリカゲル(230~400メッシュ, 250 mL)におけるカラムカラムクロマトグラフィを繰り返すことによって、その粗生成物を精製した。これにより、1.1 g(39%)の1,2-ジリノレイルオキシ-3-N-メチルピペラジノプロパン(DLin-MPZ)を黄色がかった油状物として得た。

【0231】

【化28】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)

δ: 5.27-5.45 (8H, m, 4 x CH=CH), 3.37-3.65 (7H, m, OCHおよび3 x OCH₂), 2.77 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2.33-2.74 (10H, br.および m, 5 x NCH₂), 2.31 (3H, s, NCH₃), 2.06 (8H, q, 4 x アリル位 CH₂), 1.49-1.63 (4H, m, 2 x CH₂), 1.2-1.45 (32H, m), 0.89 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

実施例 6

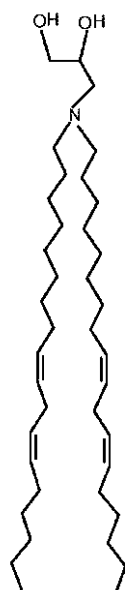
3-(N,N-ジリノレイルアミノ)-1,2-プロパンジオール(DLinAP)の合成

【0232】

【化29】



DOAP

3-(ジオレイルアミノ)-1,2-
プロパンジオール

DLinAP

3-(ジリノレイルアミノ)-1,2-
プロパンジオール

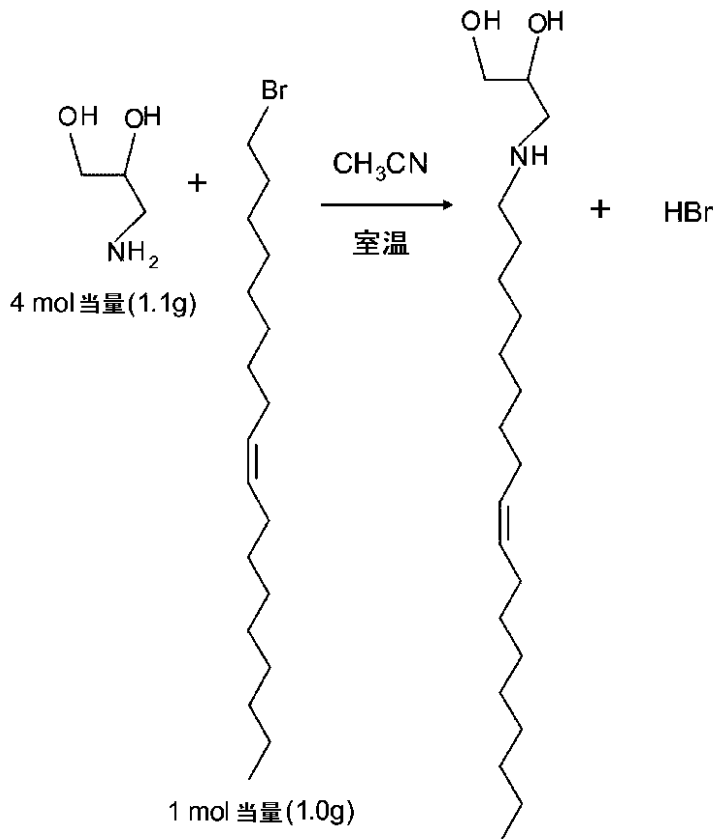
DOAPを合成した後に以下に記載される手順を行い、オレイルBrの代わりにリノレイルメタンスルホネートを用いたことを除いて同じ様式で、DLinAPを合成した。

【 0 2 3 3 】

工程 1 :

【 0 2 3 4 】

【 化 3 0 】



10

20

(±)-3-アミノ-1,2-プロパンジオールを、窒素下において3.0 mol 等量過剰な第1級アミンを用いて、アセトニトリル中のオレイルブロミドで室温においてアルキル化した。その反応をTLCによってモニターした。オレイルブロミドの喪失は、反応完了の示唆であった。その生成物を臭化水素酸塩として沈殿させた。

30

【 0 2 3 5 】

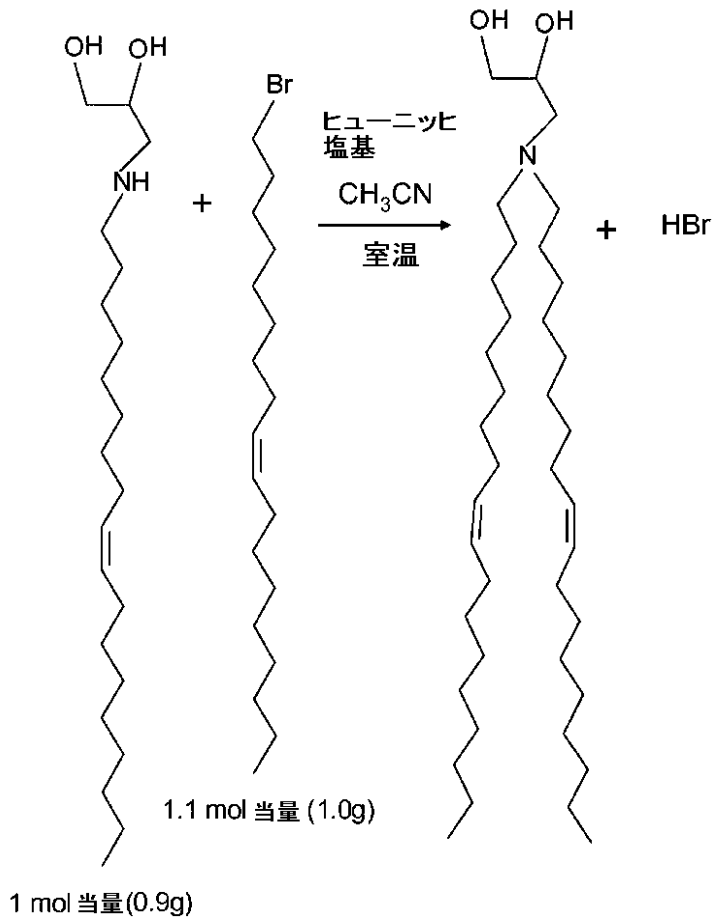
工程 2 :

工程1からの第二級アミン(0.9 g, 1 mol 当量)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(ヒューニッヒ塩基)(0.5 g, 1.5 mol 当量)、オレイルブロミド(1.0 g, 1.1 mol 当量)および20 mLのアセトニトリルを丸底フラスコに入れ、室温で撹拌した。反応が完了した後、TLCを行った。その反応混合物をrotovapにおいて乾燥させた。残渣を CH_2Cl_2 (10~20 mL)に溶解し、蒸留水(10~20 mL)で洗浄した。水層を3× CH_2Cl_2 (10~20 mL)で洗浄した。併せた有機画分を MgSO_4 で乾燥し、溶媒を、rotovapを用いて除去し、カラムカラムクロマトグラフィで精製した。

40

【 0 2 3 6 】

【化 3 1】



10

20

実施例 7

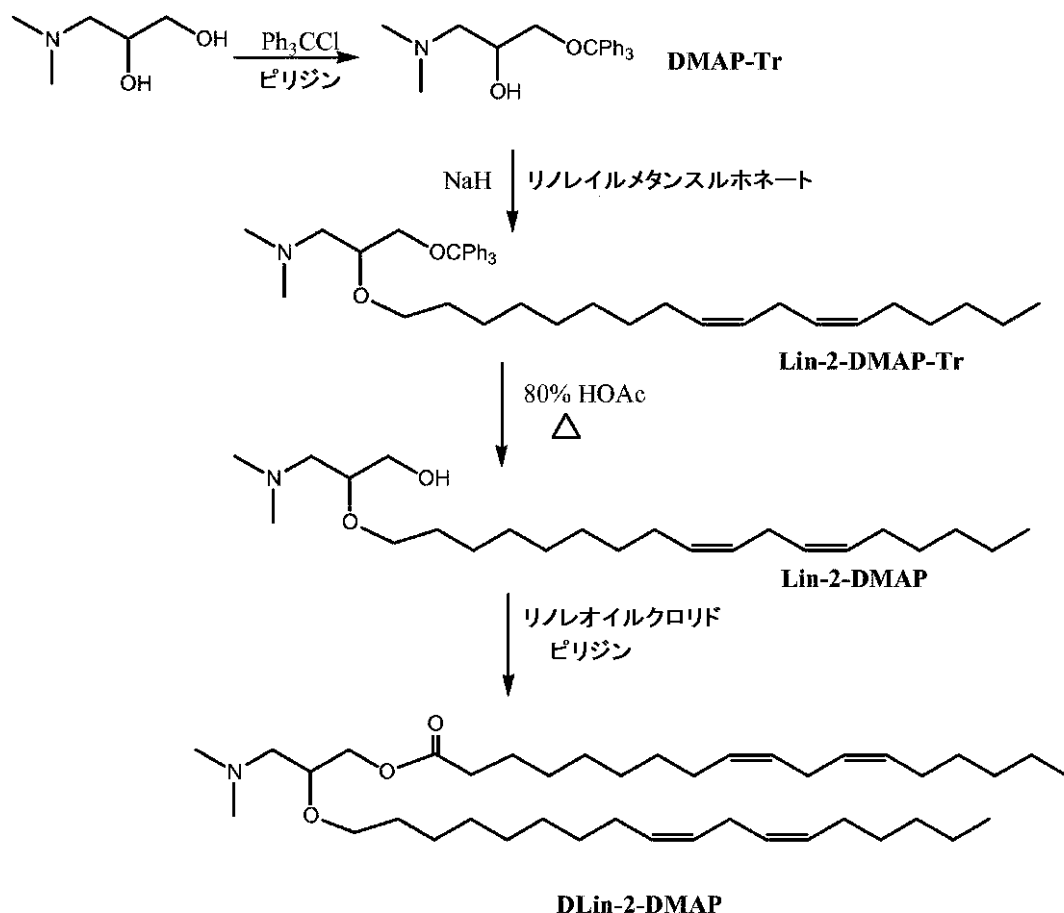
2 - リノレオイルオキシル (L I N O L E Y O L O X Y L) - 3 - リノレイルオキシル
- 1 - N , N - ジメチルアミノプロパン (D L i n - 2 - D M A P) の合成

模式図に示され、以下に記載されるように、D L i n - 2 - D M A P を合成した。

30

【 0 2 3 7 】

【化 3 2】



10

20

1 - トリフェニルメチルオキシ - 3 - (N , N - ジメチルアミノ) - 2 - プロパノール (DMAP - Tr) の合成

乾燥ピリジン (100 mL) 中の、3 - (ジメチルアミノ) - 1 , 2 - プロパンジオール (3 . 0 g , 25 mmol) と、トリフェニルメチルクロリド (7 . 75 g , 27 . 8 mmol) との混合物を 30 分間還流した。冷却した後、溶媒のほとんどを真空中で蒸発させ、得られた残渣を 400 mL のジクロロメタンに再溶解した。有機相を水 (3 × 200 mL) 、ブライン (150 mL) で洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、6 . 3 g の黄色油状物を粗生成物として得た。その粗生成物を、ジクロロメタン中の 0 ~ 10 % メタノール勾配で溶出されるシリカゲル (230 ~ 400 メッシュ , 500 mL) におけるカラムクロマトグラフィで精製した。これにより、4 . 0 g の生成物 (DMAP - Tr) を黄色油状物として得た。

30

【 0 2 3 8 】

1 - トリフェニルメチルオキシ - 2 - リノレイルオキシ - 3 - N , N - ジメチルアミノプロパン (Lin - 2 - DMAP - Tr) の合成

40

NaH (60 % , 2 . 17 g , 54 mmol) を窒素下においてヘキサン類 (3 × 40 mL) で洗浄し、次いで、無水ベンゼン (60 mL) に懸濁した。その懸濁液に、20 mL の無水ベンゼン中の DMAP - Tr (4 . 0 g , 11 mmol) を滴下した。得られた混合物を、室温において 20 分間攪拌した後、40 mL の無水ベンゼン中のリノレイルメタンサルホネート (4 . 5 g , 13 mmol) の溶液を窒素下において滴下した。その混合物を室温において 30 分間攪拌し、次いで、一晩還流した。室温に冷却した後、30 mL の 1 : 1 (V : V) エタノール - ベンゼン溶液を窒素下において滴下した後、100 mL のベンゼンおよび 100 mL の水を滴下した。振盪した後、水相を分離した。有機相をブライン (2 × 100 mL) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、6 . 8 g の黄色がかった油状物を得た。その粗生成物を、クロロホルム中

50

の0～3%メタノール勾配で溶出されるシリカゲルカラム(230～400メッシュ, 400 mL)におけるクロマトグラフィに供した。5.8 g (84%)の所望の生成物(Lin-2-DMAP-Tr)を黄色がかった油状物として得た。

【0239】

2-リノレイルオキシ-3-(N,N-ジメチルアミノ)-1-プロパノール(Lin-2-DMAP)の合成

Lin-2-DMAP-Tr(5.8 g, 9.2 mmol)を、窒素下において10分間、80%HOAc(25 mL)中で還流した。室温に冷却した後、その混合物を水(100 mL)で希釈した。得られた水溶液を、0.5%NaOH溶液を用いて約pH6に中和した。次いで、水相をジクロロメタン(4×100 mL)で抽出した。併せた有機相を0.1%NaOH溶液(100 mL)、水(100 mL)、ブライン(100 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、生成物と出発物質との5.6 gの混合物を黄色がかった油状物として得た。その混合物を、クロロホルム中の0～10%メタノール勾配で溶出されるシリカゲルカラム(230～400メッシュ, 400 mL)におけるクロマトグラフィに供した。2.2 g (62%)の所望の生成物(Lin-2-DMAP)を黄色がかった油状物として得た。

【0240】

【化33】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.28-5.43 (4H, m,

CH=CH), 4.25 (1H, br, OH), 3.78 (1H, dd, J = 11および4.8 Hz, OCH), 3.68 (1H, dd,

J = 11および6.8 Hz, OCH), 3.49 (3H, m, OCHおよびOCH₂), 2.77 (2H, t, =CH-CH₂-

CH=), 2.50-2.65 (2H, m, NCH₂), 2.32 (6H, s, 2×NCH₃), 2.05 (4H, q, アリル位2×

CH₂), 1.55 (2H, m, CH₂), 1.30 (16H, m, 8×CH₂), 0.89 (3H, t, CH₃) ppm.

2-リノレイルオキシ-3-リノレイルオキシ-1-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLin-2-DMAP)の合成

無水ベンゼン(50 mL)中のリノール酸(2.36 g, 8.4 mmol)の溶液に、窒素下において塩化オキサリル(1.45 g, 11.4 mmol)を滴下した。得られた混合物を室温において4時間攪拌した。溶媒および過剰量の塩化オキサリルを真空中で除去することにより、リノレイルオキシクロリドを淡い黄色がかった油状物として得た。

【0241】

上記リノレイルオキシクロリドを無水ベンゼン(85 mL)に再溶解した。得られた溶液に、15 mLの無水ベンゼン中の、Lin-2-DMAP(2.9 g, 7.5 mmol)および乾燥ピリジン(1 mL)の溶液を滴下した。次いで、その混合物を窒素下、室温において2日間攪拌し、懸濁液を得た。その混合物をベンゼン(100 mL)で希釈した。有機相を3:5(V:V)エタノール-水の溶液(320 mL)、ブライン(2×75 mL)で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥した。溶媒を真空中で除去することにより、5.2 gの油状物を得た。その粗生成物を、クロロホルム中の0～4%メタノール勾配で溶出されるシリカゲル(230～400メッシュ, 450 mL)におけるカラムクロマトグラフィで精製した。これにより、3.9 g (80%)のDLin-2-DMAPを黄色がかった油状物として得た。

【0242】

【化 3 4】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.25 (8H, m, 4 x $\text{CH}=\text{CH}$), 4.17 (1H, dd, $J = 11.6$ および 4 Hz, OCH), 3.96 (1H, dd, $J = 11.6$ および 5.2 Hz, OCH), 3.53-3.64 (1H, m, OCH), 3.35-3.53 (2H, m, OCH_2), 2.68 (4H, t, $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$), 2.41 (2H, m, CH_2), 2.25 (6H, s, 2 x NCH_3), 2.21 (2H, m, CH_2), 1.96 (8H, q, アリル位 4 x CH_2), 1.4-1.6 (4H, m, 2 x CH_2), 1.21 (30H, s, 15 x CH_2), 0.80 (6H, t, 2 x CH_3) ppm.

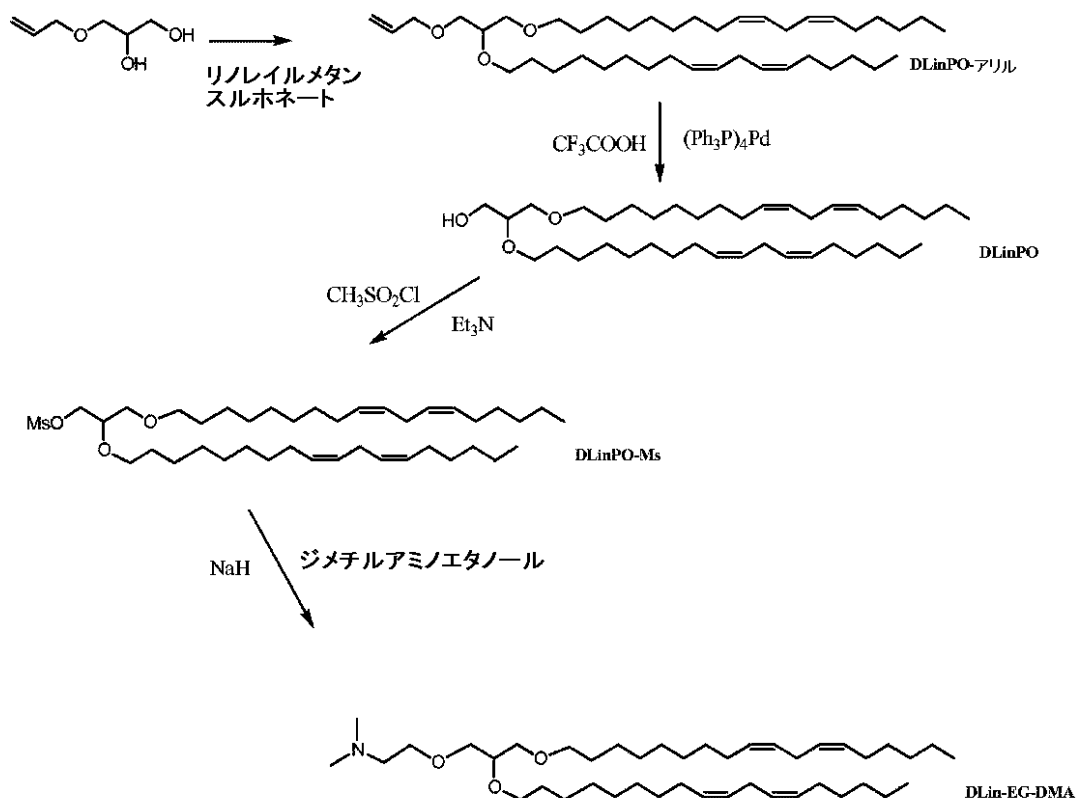
実施例 8

1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - (2 - N , N - ジメチルアミノ) エトキシプロパン (D L i n - E G - D M A) の合成

模式図に示され、以下に記載されるように、D L i n - E G - D M A を合成した。

【 0 2 4 3 】

【化 3 5】



1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - アリルオキシプロパン (D L i n P O - アリル) の合成

NaH (10 g , 60% , 250 mmol) を、窒素下においてヘキサン類 (3 x 75 mL) で 3 回洗浄し、次いで、200 mL の無水ベンゼンに懸濁した。その NaH 懸濁液に、10 mL の無水ベンゼン中の 3 - アリルオキシ - 1, 2 - プロパンジオール (4.2 g , 32 mmol) の溶液を滴下した。得られた混合物を室温において 15 分間攪拌した。次いで、90 mL の無水ベンゼン中のリノレイルメタンスルホネート (25.8 g , 74.9 mmol) の溶液を滴下した。得られた混合物を窒素下、室温において 30 分間攪拌し、そして一晩還流した。冷却した後、その混合物に 100 mL の 1 : 1 (V : V) エタノール - ベンゼンをゆっくり加え、その後、さらに 300 mL のベンゼンを加えた。有機相を水 (300 mL)、ブライン (2 x 300 mL) で洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、22.2 g の黄色油状物を粗生成物として得た。

その粗生成物を、ヘキサン類中の0～8%エーテル勾配で溶出されるシリカゲル(230～400メッシュ, 1200mL)におけるカラムクロマトグラフィで精製した。これにより、12.4g(62%)の1,2-ジリノレイルオキシ-3-アリルオキシプロパン(DLinPO-アリル)を無色油状物として得た。

【0244】

1,2-ジリノレイルオキシ-3-ヒドロキシプロパン(DLinPO)の合成

エタノール(80mL)中の、1,2-ジリノレイルオキシ-3-アリルオキシプロパン(DLinPO-アリル, 4.8g, 7.6mmol)と、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(1.2g, 触媒)と、トリフルオロ酢酸(5mL)との混合物を、窒素下、暗黒中で一晩(25時間)還流した。茶色がかった溶液が得られた。溶媒を蒸発させることにより、その混合物の体積を半分減少させ、得られた残渣を200mLの酢酸エチルに溶解した。有機相を水(2×100mL)、ブライン(100mL)で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、5.5gの黄色がかった油状物を粗生成物として得た。その粗生成物を、ジクロロメタン中の0～2%メタノール勾配で溶出されるシリカゲル(230～400メッシュ, 100mL)におけるカラムクロマトグラフィを繰り返すことによって精製した。これにより、2.8g(63%)の1,2-ジリノレイルオキシ-3-ヒドロキシプロパン(DLinPO)を黄色がかった油状物として得た。

【0245】

【化36】

¹H NMR (400 MHz,

CDCl₃) δ: 5.27-5.45 (8H, m, 4 x CH=CH), 3.67-3.78 (1H, dd, OCH), 3.58-3.67 (2H, m, OCH₂), 3.4-3.58 (6H, m, 3 x OCH₂), 2.78 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2.06 (8H, q, 4 x アリル位 CH₂), 1.49-1.67 (4H, m, 2 x CH₂), 1.23-1.45 (32H, m), 0.90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

1,2-ジリノレイルオキシ-3-メチルスルホニルオキシプロパン(methylsulfonyloxypropane)(DLinPO-MS)の合成

窒素下の100mLの無水ジクロロメタン中の、1,2-ジリノレイルオキシ-3-ヒドロキシプロパン(DLinPO, 3.6g, 6.1mmol)および無水トリエチルアミン(1.6mL, 11.5mmol)の溶液に、塩化メチルスルホニル(0.8mL, 9.1mmol)を滴下した。得られた混合物を室温において一晩(23時間)攪拌した。その反応混合物を100mLのジクロロメタンで希釈した。有機相を水(2×100mL)、ブライン(100mL)で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、4.1gの茶色がかった油状物を粗生成物DLinPO-MSとして得た。その粗生成物を、さらに精製することなく、以下の工程において使用した。

【0246】

1,2-ジリノレイルオキシ-3-(2-N,N-ジメチルアミノ)エトキシプロパン(DLin-EG-DMA)の合成

NaH(1.37g, 60%, 34.2mmol)を窒素下においてヘキサン類(2×15mL)で2回洗浄し、次いで、120mLの無水ベンゼンに懸濁した。そのNaH懸濁液に、10mLの無水ベンゼン中のジメチルアミノエタノール(0.44g, 4.9mmol)の溶液を滴下した。得られた混合物を室温において20分間攪拌した。次いで、20mLの無水ベンゼン中の1,2-ジリノレイルオキシ-3-メチルスルホニルオキシプロパン(DLinPO-MS, 3.4g, 5.1mmol)の溶液を滴下した。得られた混合物を窒素下、室温において20分間攪拌し、一晩還流した。冷却した後、その混合物に100mLの1:1(V:V)エタノール-ベンゼンをゆっくり加え、その後、さらに50mLのベンゼンおよび70mLのエタノールを加えた。有機相を水(200mL)

で洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、3.2 gの黄色がかった油状物を粗生成物として得た。その粗生成物を、クロロホルム中の0～6%メタノール勾配で溶出されるシリカゲル(230～400メッシュ, 300 mL)におけるカラムクロマトグラフィで精製した。これにより、0.34 g(11%)の1,2-ジリノレイルオキシ-3-(2-N,N-ジメチルアミノ)エトキシプロパン(DLin-EG-DMA)を青白色油状物として得た。

【0247】

【化37】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.27-5.46 (8H, m, 4 x $\text{CH}=\text{CH}$), 3.62 (2H, t, OCH_2), 3.35-3.60 (9H, m, OCH および 4 x OCH_2), 2.78 (4H, t, 2 x $\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$), 2.61 (2H, t, NCH_2), 2.35 (6H, s, 2 x NCH_3), 2.05 (8H, q, 4 x アリル位 CH_2), 1.49-1.65 (4H, m, 2 x CH_2), 1.23-1.45 (32H, m), 0.90 (6H, t, 2 x CH_3) ppm.

10

実施例9

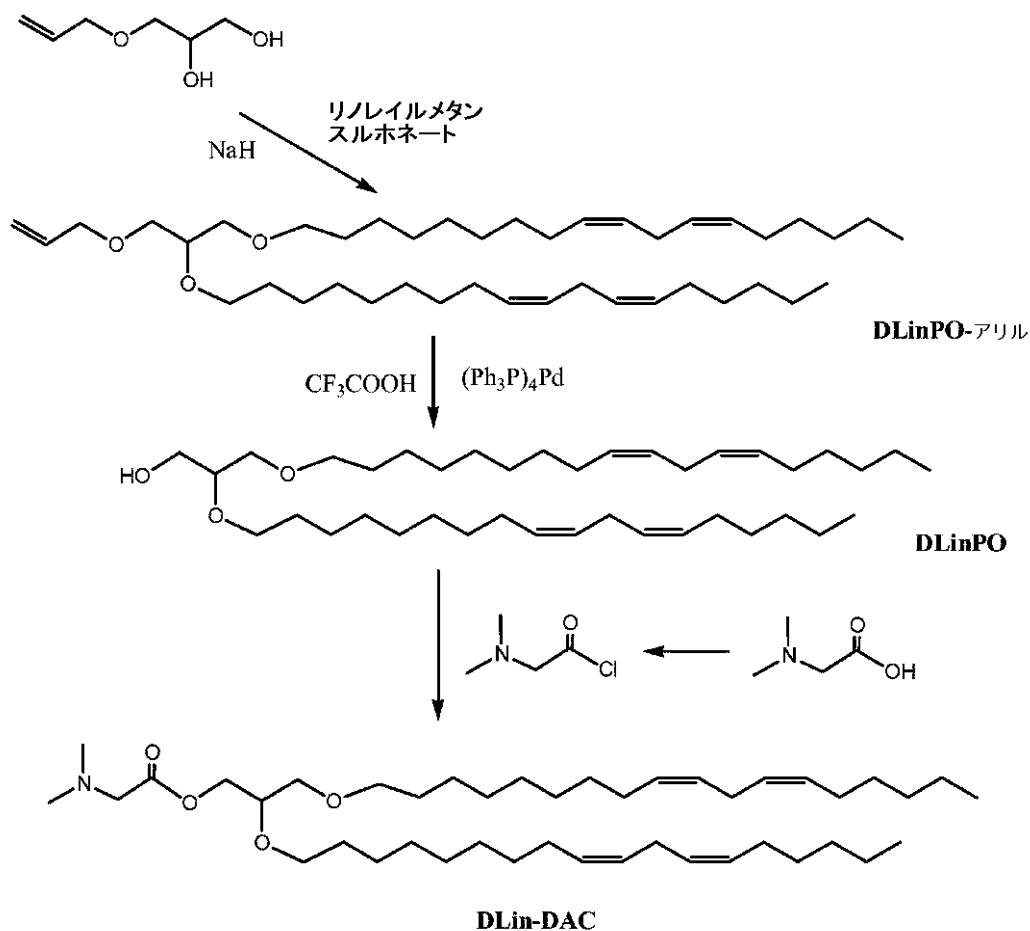
1,2-ジリノレイルオキシ-3-(ジメチルアミノ)アセトキシプロパン(DLin-DAC)の合成

模式図に示され、以下に記載されるように、DLin-DACを合成した。

【0248】

【化38】

20



30

40

1,2-ジリノレイルオキシ-3-アリルオキシプロパン(DLinPO-アリル)の合成

NaH (60%, 10 g, 250 mmol) を窒素下においてヘキサン類(3 x 75 mL)で洗浄し、次いで、無水ベンゼン(200 mL)に懸濁した。その懸濁液に、10 mLの無水ベンゼン中の3-アリルオキシ-1,2-プロパンジオール(4.2 g, 32 mmol)

50

mol)を滴下した。得られた混合物を室温において10分間攪拌した後、90mLの無水ベンゼン中のリノレイルメタンスルホネート(25.8g, 74.9mmol)の溶液を窒素下において滴下した。その混合物を室温において30分間攪拌し、次いで、一晚還流した。室温に冷却した後、100mLの1:1(V:V)エタノール-ベンゼン溶液を窒素下において滴下し、その後、300mLのベンゼンを滴下した。有機相を水(300mL)、ブライン(2×300mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、22.2gの黄色がかった油状物を粗生成物として得た。その粗生成物のカラム精製(1200mLシリカゲル、230~400メッシュ、ヘキサン類中の0~8%ジエチルエーテル勾配で溶出される)によって、12.4g(62%)の無色油状物DLinPO-アシルが得られた。

10

【0249】

2,3-ジリノレイルオキシ-1-プロパノール(DLinPO)の合成

180mLのエタノール中のDLinPO-アシル(12.4g, 19.7mmol)の溶液に、トリフルオロ酢酸(13mL)を加えた後、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(3.1g, 2.7mmol)を加えた。得られた懸濁液を窒素下、暗黒中において一晚還流した。溶媒を蒸発させた後、酢酸エチル(400mL)をその残渣に加えた。有機相を水(2×100mL)、ブライン(100mL)で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥した。溶媒を除去したところ、12gの黄色がかった油状物が得られた。その油性材料を、ジクロロメタン中の0~1.5%メタノール勾配で溶出されるシリカゲル(230~400メッシュ, 500mL)におけるカラムクロマトグラフィで精製した。これにより、5.8g(50%)の生成物DLinPOを得た。

20

【0250】

1,2-ジリノレイルオキシ-3-(ジメチルアミノ)アセトキシプロパン(DLin-DAC)の合成

N,N-ジメチルグリシンヒドロクロライド(1.0g, 6.7mmol)を5mLの塩化オキサリル中で60分間還流した。過剰量の塩化オキサリルを真空中で除去した。その残渣に、50mLの無水ベンゼンを加え、溶媒を蒸発させることにより、わずかに茶色がかかった固体を得た。その粗N,N-ジメチルグリシンアシルクロリド塩を以下の工程において直接用いた。

【0251】

上記粗アシルクロリドを、窒素下において50mLの無水ジクロロメタンに懸濁した。その懸濁液に、20mLの無水ジクロロメタン中の、DLinPO(1.0g, 1.7mmol)および乾燥トリエチルアミン(1.4mL, 11mmol)の溶液を滴下した。得られた混合物を窒素下、室温において一晚攪拌した。次いで、100mLのジクロロメタンを加えた。有機相を水(2×75mL)、ブライン(75mL)で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、1.1gの淡い茶色がかかった油状物を出発物質と生成物との混合物として得た。所望の生成物DLin-DAC、0.24g(20%)を、ヘキサン類中の0~40%酢酸エチル勾配で溶出されるシリカゲル(230~400メッシュ, 200mL)におけるカラムカラムクロマトグラフィによって単離した。

30

40

【0252】

【化 3 9】

1H

NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.36 (8H, m, 4 x CH=CH), 4.34 (1H, dd, J = 11.2 および 3.6 Hz, OCH), 4.18 (1H, dd, J = 11.6 および 5.6 Hz, OCH), 3.64 (1H, m, OCH), 3.4-3.6 (6H, m, 3 x OCH_2), 3.34 (2H, s, NCH_2), 2.78 (4H, t, =CH-CH₂-CH=), 2.50 (6H, s, 2 x NCH_3), 2.05 (8H, q, アリル位 4 x CH_2), 1.5-1.63 (4H, m, 2 x CH_2), 1.3 (32H, m, 16 x CH_2), 0.90 (6H, t, 2 x CH_3) ppm.

10

実施例 1 0

1, 2 - ジリノレオイル - 3 - ジメチルアミノプロパンの合成

1, 2 - ジリノレオイル - 3 - N, N - ジメチルアミノプロパン (DLin-DAP) を以下に記載されるように合成した。

【0 2 5 3】

800 mL の無水ベンゼン中のリノール酸 (99%, 49.7 g, 0.177 mol) の溶液に、塩化オキサリル (99%, 29.8 g, 0.235 mol) をアルゴン下で滴下した。滴下した後、得られた混合物を、気泡が放出されなくなるまで、室温において 2 時間撹拌した。溶媒および過剰量の塩化オキサリルを真空中で除去した。その残渣に、無水ベンゼン (1 L) を加えた後、無水ベンゼン (100 mL) 中の、3 - N, N - ジメチルアミノ - 1, 2 - プロパンジオールおよび乾燥ピリジンの溶液を滴下した。得られた混合物を室温において 2 日間撹拌した。溶媒を蒸発させると、64 g の黄色がかったシロップ状物が得られた。粗生成物を、クロロホルム中の 0 ~ 5 % メタノール勾配を用いるシリカゲルにおけるカラムカラムクロマトグラフィによって 3 回精製することによって、19 g の純粋な DLin-DAP を得た。

20

【0 2 5 4】

【化 4 0】

¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.49 (1H, m), 5.43-

5.26 (8H, m), 4.41 (1H, dd), 4.13 (1H, dd), 3.15-3.35 (2H, m), 2.82 (6H, s, 2 x NCH_3), 2.76 (4H, t), 2.35-2.6 (2H, m), 2.31 (2H, t), 2.03 (8H, q, エニル CH_2), 1.53-1.68 (4H, m, 2 x CH_2), 1.2-1.4 (28H, m, 14 x CH_2), 0.88 (6H, t, 2 x CH_3) ppm.

30

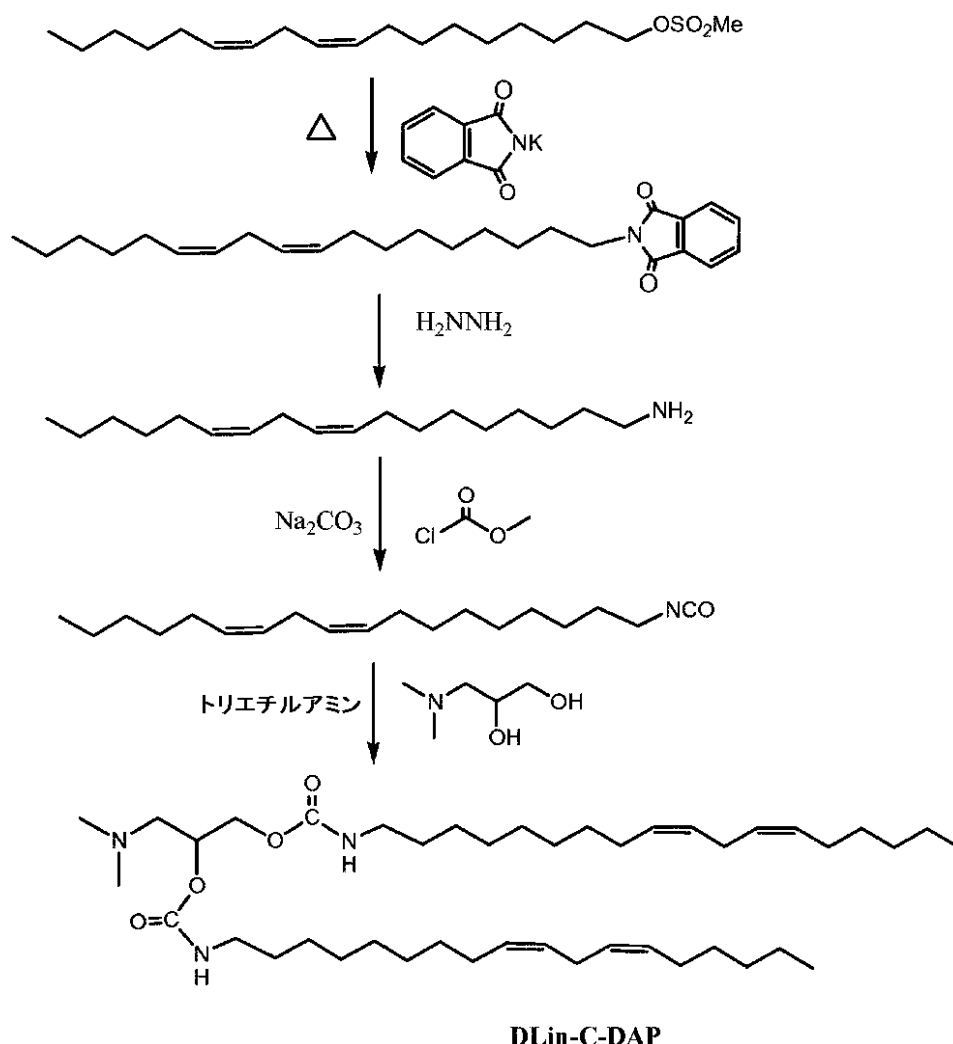
実施例 1 1

DLin-C-DAP の合成

模式図に示され、以下に記載されるように、DLin-C-DAP を合成した。

【0 2 5 5】

【化 4 1】



リノレイルフタルイミドの調製

250 mL の無水 DMF 中の、カリウムフタルイミド (11.2 g, 59.5 mmol) と、リノレイルメタンスルホネート (9.3 g, 27 mmol) との混合物を、窒素下、70 °C において一晩攪拌した。得られた懸濁液を 500 mL の冷水に注ぎ込んだ。水相を EtOAc (3 × 200 mL) で抽出した。併せた抽出物を水 (200 mL)、ブライン (200 mL) で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、固体と油性材料との混合物を得た。その混合物に、300 mL のヘキサン類を加えた。固体を濾過し、ヘキサン類 (2 × 25 mL) で洗浄した。その濾液および洗浄液を混合し、溶媒を蒸発させることにより、11 g の黄色油状物を粗生成物として得た。その粗生成物をさらに精製することなく、次の工程において使用した。

【0256】

リノレイルアミンの調製

上記粗リノレイルフタルイミド (11 g, 約 27 mmol) およびヒドラジン (10 mL) を、窒素下において一晩、350 mL のエタノール中で還流した。その混合物を約 40 ~ 50 °C に冷却した後、得られた白色固体を濾過し、固体を温 EtOH (2 × 30 mL) で洗浄した。濾液および洗浄液を混合し、溶媒を蒸発させた。その残渣に 400 mL のクロロホルムを加えたところ、白色固体が沈殿した。その固体を再度濾過した。得られた濾液の有機相を水 (2 × 100 mL)、ブライン (100 mL) で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を真空中で除去することにより、7.3 g の黄色油状物を粗生成物として得た。この粗生成物をさらに精製することなく、次の工程で使用した。純粋なリノ

レイルアミンを、クロロホルム中の 0 ~ 20 %メタノール勾配で溶出されるシリカゲルにおけるカラムカラムクロマトグラフィによって得た。

【0257】

【化42】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.35 (4H, m, 2 x $\text{CH}=\text{CH}$), 2.76 (2H, t, J = 6.8 Hz, $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$), 2.68 (2H, t, J = 6.8 Hz, NCH_2), 2.04 (4H, q, アリル位 2 x CH_2), 1.61 (2H, br., NH_2), 1.44 (2H, m, CH_2), 1.29 (18H, m, 9 x CH_2), 0.88 (6H, t, 2 x CH_3) ppm.

10

リノレイルイソシアネートの調製

無水炭酸ナトリウム (11 g) を、十分に攪拌しながら窒素下において無水 CH_2Cl_2 (200 mL) 中のリノレイルアミン (7.3 g, 約 27 mmol) の溶液に懸濁した。その懸濁液を、氷浴を用いて 0 ~ 5 °C に冷却した。その懸濁液に、10 mL の無水 CH_2Cl_2 中のジホスゲン (8.2 g, 41 mmol) を激しく攪拌しながら加えた。加えた後、得られた懸濁液を窒素下、0 ~ 5 °C において 60 分間、次いで、室温において 2 時間攪拌した。反応が完了した後、その混合物に 100 mL の水を加え、その混合物を室温において 30 分間攪拌した。有機層を分離し、水 (100 mL) およびブライン (100 mL) で洗浄した。無水 Na_2SO_4 で乾燥した後、溶媒を蒸発させることにより、7.6 g の黄色油状物を粗生成物として得た。その粗生成物をさらに精製することなく、以下の工程において使用した。

20

【0258】

3 - (ジメチルアミノ) - 1, 2 - プロパンジオールを用いたリノレイルイソシアネートの縮合

窒素下の 150 mL の無水ベンゼン中の上記粗リノレイルイソシアネート (7.6 g, 約 25 mmol) の溶液に、20 mL の無水ベンゼン中の 3 - (ジメチルアミノ) - 1, 2 - プロパンジオール (0.99 g, 8.3 mmol) の溶液を滴下した。得られた混合物を室温において 60 分間攪拌し、次いで、4 時間還流した後、室温において一晩攪拌した。その混合物を 150 mL のベンゼンで希釈した後、有機相を水 (3 x 100 mL)、ブライン (100 mL) で洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、8.4 g の黄色油状物を得た。その油性材料のカラム精製 (500 mL シリカゲル、230 ~ 400 メッシュ、クロロホルム中の 0 ~ 3 %メタノール勾配で溶出される) によって、2.2 g (38 %) の黄色がかった油状物を生成物 DLin-C-DAP として得た。

30

【0259】

【化43】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.37 (8H, m, 4 x $\text{CH}=\text{CH}$), 5.06 (1H, br. CONH), 4.91 (1H, br. CONH), 4.79 (1H, m, OCH), 4.28 (1H, br. d, J = 11 Hz, OCH), 4.16 (1H, dd, J = 12 および 6 Hz, OCH), 3.16 (4H, m, 2 x NCH_2), 2.77 (4H, t, J = 6.4 Hz, $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$), 2.4-2.7 (2H, m, NCH_2), 2.33 (6H, s, 2 x NCH_3), 2.05 (8H, m, アリル位 4 x CH_2), 1.4-1.55 (4H, m, 2 x CH_2), 1.29 (40H, s, 20 x CH_2), 0.89 (6H, t, 2 x CH_3) ppm.

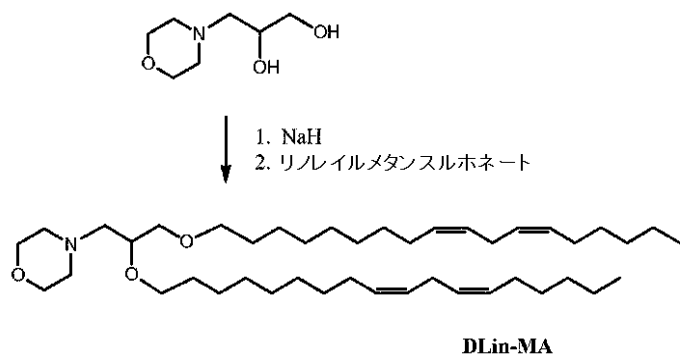
40

実施例 12

1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - モルホリノプロパン (DLin-MA) の合成
模式図に示され、以下に記載されるように、 DLin-MA を合成した。

【0260】

【化 4 4】



10

窒素下の 150 mL の無水ベンゼン中の NaH (7.6 g, 95%, 0.30 mol) の懸濁液に、10 mL の無水ベンゼン中の 3-(N-モルホリノ)-1,2-プロパンジオール (1.02 g, 6.3 mmol) の溶液を滴下した。得られた混合物を室温において 20 分間撹拌した。次いで、20 mL の無水ベンゼン中のリノレイルメタンサルホネート (5 g, 14.5 mmol) の溶液を滴下した。室温において 20 分間撹拌した後、その混合物を窒素下で一晩還流した。冷却した後、その混合物に 100 mL の 1:1 (V:V) エタノール-ベンゼンをゆっくり加え、その後、90 mL の EtOH を加えた。有機相を水 (240 mL) で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、黄色油状物を粗生成物として得た。その粗生成物を、ジクロロメタン中の 0~8% 20
メタノール勾配で溶出されるシリカゲル (230~400 メッシュ) におけるカラムクロマトグラフィで精製した。これにより、2 g の 1,2-ジリノレイルオキシ-3-N-モルホリノプロパン (DLin-MA) を黄色がかった油状物として得た。

【0261】

【化 4 5】

¹H NMR (400

MHz, CDCl₃) δ: 5.27-5.45 (8H, m, 4 x CH=CH), 3.3-3.8 (11H, m, OCH および 5 x OCH₂), 2.78 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2.4-2.6 (6H, br. および m, 3 x NCH₂), 2.07 (8H, q, 4 x アリル位 CH₂), 1.49-1.63 (4H, m, 2 x CH₂), 1.2-1.5 (32H, m), 0.89 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

30

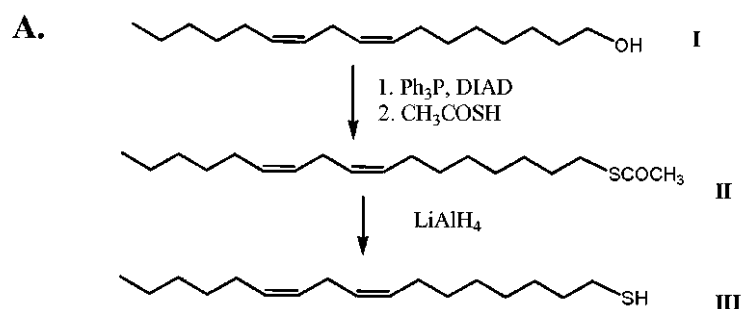
実施例 13

1,2-ジリノレイルチオ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-S-DMA) の合成

概略図に示され、以下に記載されるように、DLin-S-DMA を合成した。

【0262】

【化 4 6】



40

リノレイルチオアセテート (II) の合成

50

窒素下、0～5℃の250 mLの無水THF中のトリフェニルホスフィン(18.0 g, 68.2 mmol)の溶液に、アゾジカルボン酸ジイソプロピル(DIAD, 14.7 mL, 68 mmol)を滴下した。滴下した後、得られた混合物を0～5℃において45分間攪拌した。黄色懸濁液が得られた。次いで、その黄色懸濁液に、リノレイルアルコール(I, 9.1 g, 34 mmol)およびチオール酢酸(5.1 mL, 68 mmol)の溶液を窒素下、0～5℃において30分間にわたって滴下した。得られた混合物を0～5℃において1時間攪拌し、次いで、室温に温めた。室温において60分間攪拌した後、茶色溶液が得られた。溶媒を蒸発させることにより、茶色がかった油性残渣を得た。その残渣を600 mLのエーテルに再溶解した。エーテル相を水(2×250 mL)、ブライン(250 mL)で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、31 gの茶色油状物が得られ、それは、一晩で部分的に凝固した。この粗混合物を100 mLのヘキサン類で処理した。固体を濾過し、ヘキサン類(2×30 mL)で洗浄した。濾液および洗浄液を混合し、溶媒を蒸発させることにより、13 gの茶色油状物を粗生成物として得た。その粗生成物を、ヘキサン類中の0～3%エーテル勾配で溶出されるシリカゲル(230～400メッシュ, 600 mL)におけるカラムカラムクロマトグラフィによって2回精製した。これにより、10.0 g(91%)のリノレイルチオアセテート(II)を黄色がかった油状物として得た。

【0263】

【化47】

1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.27-5.45 (4H, m, 2 x CH=CH), 2.87 (2H, t, SCH₂), 2.78 (2H, t, C=C-CH₂-C=C), 2.33 (3H, s, COCH₃), 2.06 (4H, q, 2 xアリル位CH₂), 1.5-1.62 (2H, m, CH₂), 1.24-1.55 (16H, m), 0.90 (3H, t, CH₃) ppm.

リノレイルメルカプタン(III)の合成

窒素下、0～5℃の150 mLの無水エーテル中のLiAlH₄(4.7 g, 124 mmol)の懸濁液に、窒素下の200 mLの無水エーテル中に1つの結晶のヨウ素を含む溶液を滴下し、100 mLの無水エーテル中のリノレイルチオアセテート(II, 10.0 g, 30.8 mmol)の溶液を加えた。加えた後、その懸濁液を室温に温め、次いで、室温において4時間を攪拌した。得られた混合物を0～5℃に冷却し、10 mLのNaCl飽和水溶液を非常にゆっくり加えた。室温において60分間攪拌した後、その懸濁液を珪藻土のパッドで濾過した。固体をエーテル(3×100 mL)で洗浄した。濾液および洗浄液を混合し、溶媒を蒸発させることにより、7.2 g(83%)のリノレイルメルカプタン(III)を無色油状物として得た。

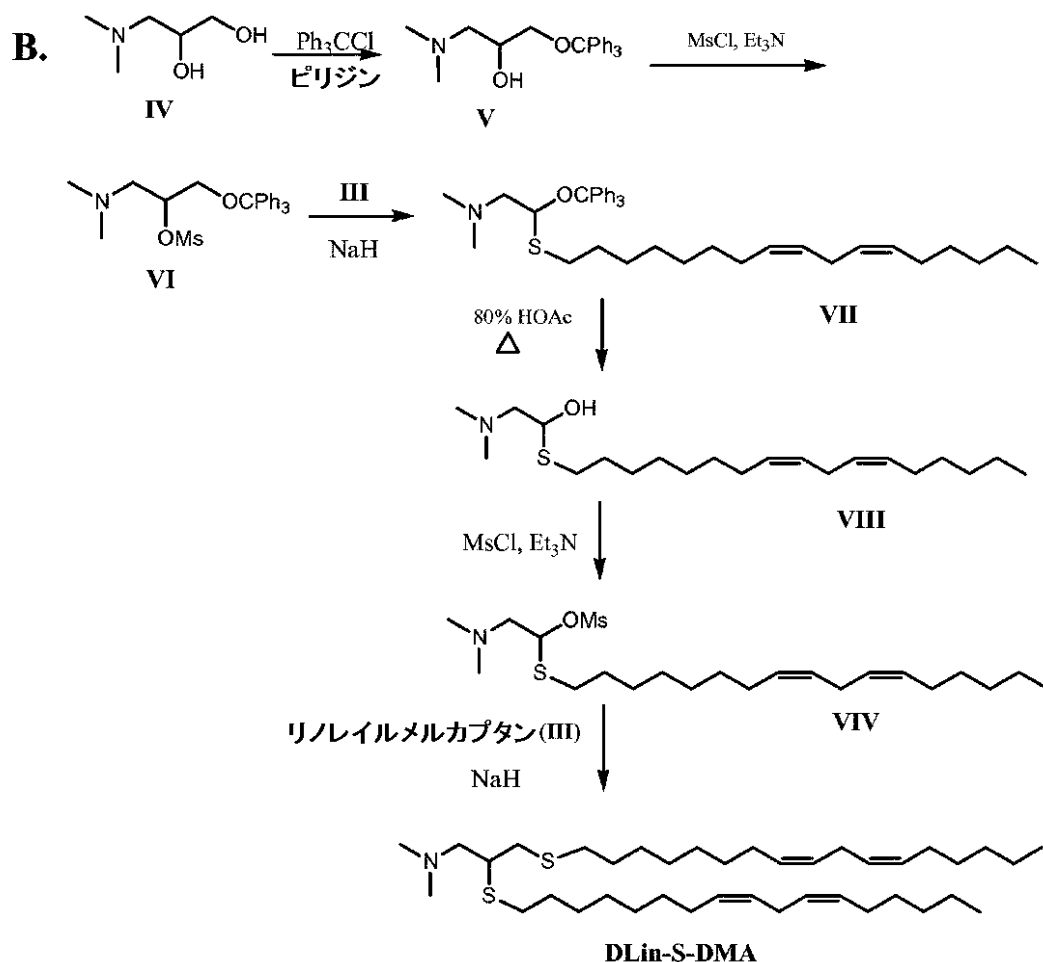
【0264】

【化48】

1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.27-5.5 (4H, m, 2 x CH=CH), 2.78 (2H, t, C=C-CH₂-C=C), 2.53 (2H, q, SCH₂), 2.06 (4H, q, 2 xアリル位CH₂), 1.5-1.62 (2H, m, CH₂), 1.23-1.45 (16H, m), 0.90 (3H, t, CH₃) ppm.

【0265】

【化 4 9】



1 - トリフェニルメチルオキシ - 2 - ヒドロキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (V) の合成

無水ピリジン (200 mL) 中の、3 - (ジメチルアミノ) - 1, 2 - プロパンジオール (IV, 6.3 g, 53 mmol) と、トリフェニルメチルクロリド (15.5 g, 55.6 mmol) との混合物を 40 分間還流した。室温に冷却した後、溶媒のほとんどを真空中で除去した。得られた油性残渣に、400 mL の酢酸エチルを加えた。大量の固体が形成された。その固体を濾過し、風乾した。濾液相を水 (2 × 150 mL)、ブライン (150 mL) で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、8.5 g の茶色油状物を粗生成物として得た。その粗生成物を、クロロホルム中の 0 ~ 10 % メタノール勾配で溶出されるシリカゲル (230 ~ 400 メッシュ, 500 mL) におけるカラムクロマトグラフィで精製した。これにより、4.1 g (21 %) の 1 - トリフェニルメチルオキシ - 2 - ヒドロキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (V) を黄色がかった固体として得た。

【0266】

1 - トリフェニルメチルオキシ - 2 - メチルスルホニルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (VI) の合成

窒素下の 150 mL の無水ジクロロメタン中の、1 - トリフェニルメチルオキシ - 2 - ヒドロキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (V, 4.2 g, 11.7 mmol) および無水トリエチルアミン (2.5 mL, 17.9 mmol) の溶液に、氷水冷浴を用いて塩化メチルスルホニル (1.0 mL, 13 mmol) を滴下した。滴下の後、冷浴を取り除き、混合物を窒素下、室温において一晚 (20 時間) 攪拌した。得られた混合物を 100 mL のジクロロメタンで希釈した。有機相を水 (2 × 100 mL)、ブライン (100 mL)

）で洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、4.3 gの黄色がかった油状物を粗生成物として得た（V I）。その粗生成物をさらに精製することなく、次の工程で使用した。

【0267】

1 - トリフェニルメチルオキシ - 2 - リノレイルチオ - 3 - ジメチルアミノプロパン（V I I）の合成

窒素下の100 mLの無水ベンゼン中の NaH （2.0 g, 95%, 79 mmol）の懸濁液に、30 mLの無水ベンゼン中のリノレイルメルカプタン（I I I, 3.1 g, 11 mmol）の溶液を滴下した。得られた混合物を室温において20分間撹拌した。次いで、30 mLの無水ベンゼン中の1 - トリフェニルメチルオキシ - 2 - メチルスルホニルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン（V I, 4.5 g, 10 mmol）の溶液を滴下した。室温において15分間撹拌した後、その混合物を窒素下において3日間、穏やかに還流した。冷却した後、その混合物に30 mLの1 : 1（V : V）エタノール - ベンゼンをゆっくり加えた。有機相を1 : 2エタノール - 水（360 mL）で1回洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、7.1 gの黄色がかった油状物を粗生成物として得た（V I I）。その粗生成物を、クロロホルム中の0 ~ 5 %メタノール勾配で溶出されるシリカゲル（230 ~ 400メッシュ, 250 mL）におけるカラムクロマトグラフィで精製した。これにより、5.5 g（88%）の1 - トリフェニルメチルオキシ - 2 - リノレイルチオ - 3 - ジメチルアミノプロパン（V I I）を黄色がかった油状物として得た。

【0268】

1 - ヒドロキシ - 2 - リノレイルチオ - 3 - ジメチルアミノプロパン（V I I I）の合成

1 - トリフェニルメチルオキシ - 2 - リノレイルチオ - 3 - ジメチルアミノプロパン（V I I, 5.5 g, 8.8 mmol）を、窒素下、150 mLの80%HOAcにおいて7時間還流した。冷却した後、溶媒を除去することにより、淡色の半固体を得た。その材料を200 mLの酢酸エチルに再溶解した。続いて、有機相を0.5%NaOH水溶液（100 mL）、水（100 mL）およびブライン（100 mL）で洗浄した。無水 Na_2SO_4 で乾燥した後、溶媒を蒸発させた。5.1 gの青白色固体が得られた。クロロホルム中の0 ~ 7 %メタノール勾配で溶出されるシリカゲル（230 ~ 400メッシュ, 250 mL）における粗生成物のカラムカラムクロマトグラフィにより、1.3 g（39%）の1 - ヒドロキシ - 2 - リノレイルチオ - 3 - ジメチルアミノプロパン（V I I I）を得た。

【0269】

【化50】

1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.27-5.53 (4H, m, 2 x CH=CH), 3.81 (1H, dd, OCH), 3.43 (1H, dd, OCH), 3.0-3.38 (1H, br.), 2.88 (1H, m, NCH), 2.7-2.82 (3H, m, C=C-CH₂-C=CおよびNCH), 2.52 (2H, t, SCH₂), 2.41 (6H, s, 2 x NCH₃), 2.06 (4H, q, 2 xアリアル位CH₂), 1.52-1.65 (2H, m, CH₂), 1.23-1.45 (16H, m), 0.90 (3H, t, CH₃) ppm.

1 - メチルスルホニルオキシキシ - 2 - リノレイルチオ - 3 - ジメチルアミノプロパン（V I V）の合成

窒素下の50 mLの無水ジクロロメタン中の、1 - ヒドロキシ - 2 - リノレイルチオ - 3 - ジメチルアミノプロパン（V I I I, 1.3 g, 3.2 mmol）および無水トリエチルアミン（0.7 mL, 5 mmol）の溶液に、塩化メチルスルホニル（0.5 g, 4.3 mmol）を滴下した。得られた混合物を室温において一晩（19時間）撹拌した。その反応混合物を50 mLのジクロロメタンで希釈した。有機相を水（2 x 50 mL）、

ブライン (50 mL) で洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、1.4 g の黄色がかった油状物を粗生成物として得た。その粗生成物をさらに精製することなく、以下の工程において使用した。

【 0270 】

1, 2 - ジリノレイルチオ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin - S - DMA) の合成

NaH (0.89 g, 60%, 22 mmol) を窒素下においてヘキサン類 (2×15 mL) で2回洗浄し、次いで、70 mL の無水ベンゼンに懸濁した。その懸濁液に、15 mL の無水ベンゼン中のリノレイルメルカプタン (III, 1.1 g, 3.9 mmol) の溶液を滴下した。得られた混合物を室温において20分間攪拌した。次いで、15 mL の無水ベンゼン中の1 - メチルスルホニルオキシ - 2 - リノレイルチオ - 3 - ジメチルアミノプロパン (VIV, 1.4 g, 3.0 mmol) の溶液を滴下した。室温において20分間攪拌した後、混合物を窒素下において2日間穏やかに還流した。冷却した後、その混合物に200 mL の1 : 1 (V : V) エタノール - ベンゼンをゆっくり加えた。有機相を水 (200 mL) で洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、2.5 g の黄色がかった油状物を粗生成物として得た。その粗生成物を、クロロホルム中の0 ~ 3 % メタノール勾配で溶出されるシリカゲル (230 ~ 400 メッシュ, 250 mL) におけるカラムカラムクロマトグラフィによって繰り返し精製した。これにより、0.4 g (20%) の1, 2 - ジリノレイルチオ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin - S - DMA) を黄色がかった油状物として得た。

【 0271 】

【 化 51 】

^1H NMR

(400 MHz, CDCl_3) δ : 5.27-5.48 (8H, m, 4 x $\text{CH}=\text{CH}$), 2.88-3.0 (1H, m), 2.83 (2H, d, CH_2), 2.7 (4H, t, 2 x $\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$), 2.63-2.73 (1H, m), 2.58 (4H, ダブルトリプレット, 2 x SCH_2), 2.39-2.49 (1H, m), 2.31 (6H, s, 2 x NCH_3), 2.06 (8H, q, 4 x アリル位 CH_2), 1.52-1.65 (4H, m, 2 x CH_2), 1.23-1.45 (32H, m), 0.90 (6H, t, 2 x CH_3) ppm.

実施例 14

1, 2 - ジリノレイル - 3 - トリメチルアミノプロパンクロリド (DLin - TAP . Cl) の合成

模式図に示され、以下に記載されるように、DLin - TAP . Cl を合成した。

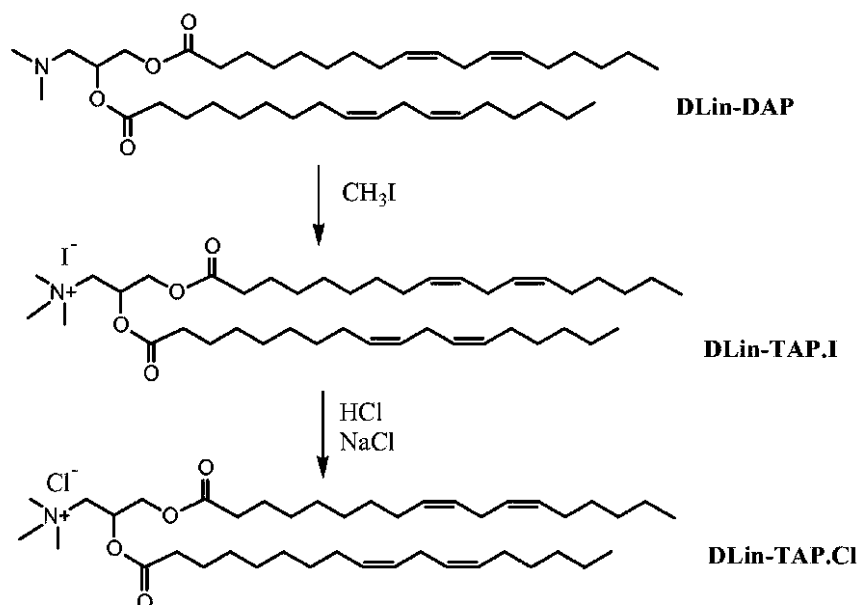
【 0272 】

10

20

30

【化 5 2】



10

1, 2 - ジリノレオイル - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin-DAP) の合成
 リノレオイルクロリドによる 3 - ジメチルアミノ - 1, 2 - プロパンジオールのエステ
 ル化に基づいて、実施例 10 に記載されている手順に従って DLin-DAP を調製した
 。

20

【0273】

1, 2 - ジリノレオイル - 3 - トリメチルアミノプロパンヨウ化物 (DLin-TAP
 . I) の合成
 20 mL の無水 CH₂Cl₂ 中の、1, 2 - ジリノレオイル - 3 - ジメチルアミノプロ
 パン (DLin-DAP, 5.5 g, 8.8 mmol) と CH₃I (7.5 mL, 120
 mmol) との混合物を窒素下、室温において 10 日間攪拌した。溶媒および過剰量のヨ
 ードメタンを蒸発させることにより、6.4 g の黄色シロップ状物を粗 DLin-TAP
 . I として得て、それをさらに精製することなく以下の工程において使用した。

30

【0274】

1, 2 - ジリノレオイル - 3 - トリメチルアミノプロパンクロリド (DLin-TAP
 . Cl) の調製
 上記 1, 2 - ジリノレオイル - 3 - トリメチルアミノプロパンヨウ化物 (DLin-T
 AP . I, 6.4 g) を、分液漏斗において 150 mL の CH₂Cl₂ に溶解した。35
 mL の 1 N HCl メタノール溶液を加え、得られた溶液を十分に振盪した。その溶液に
 、50 mL のブラインを加え、その混合物を十分に振盪した。有機相を分離した。水相を
 15 mL の CH₂Cl₂ で抽出した。次いで、有機相および抽出物を混合した。これによ
 り、イオン交換の第 1 工程が完了した。このイオン交換工程をさらに 4 回繰り返した。最
 後の有機相をブライン (75 mL) で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を蒸発
 させることにより、茶色がかった油状物を得た。その粗生成物を、クロロホルム中の 0 ~
 25 % メタノール勾配で溶出されるシリカゲル (230 ~ 400 メッシュ, 250 mL)
 におけるカラムクロマトグラフィで精製した。これにより、2.2 g の 1, 2 - ジリノレ
 オイル - 3 - トリメチルアミノプロパンクロリド (DLin-TAP . Cl) を白色蠟状
 物として得た。

40

【0275】

【化 5 3】

1H NMR (400 MHz,

CDCl₃) δ: 5.61 (1H, br. OCH), 5.25-5.45 (8H, m, 4 x CH=CH), 4.4-4.7 (2H, m, NCH₂), 4.11 (1H, dd, OCH), 3.80 (1H, dd, OCH), 3.51 (9H, s, 3 x NCH₃), 2.77 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2.2-2.5 (4H, m, 2 x COCH₂), 2.04 (8H, q, 4 x アリル位CH₂), 1.75-2.0 (2H, br.), 1.49-1.75 (4H, m, 2 x CH₂), 1.2-1.45 (28H, m), 0.89 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

10

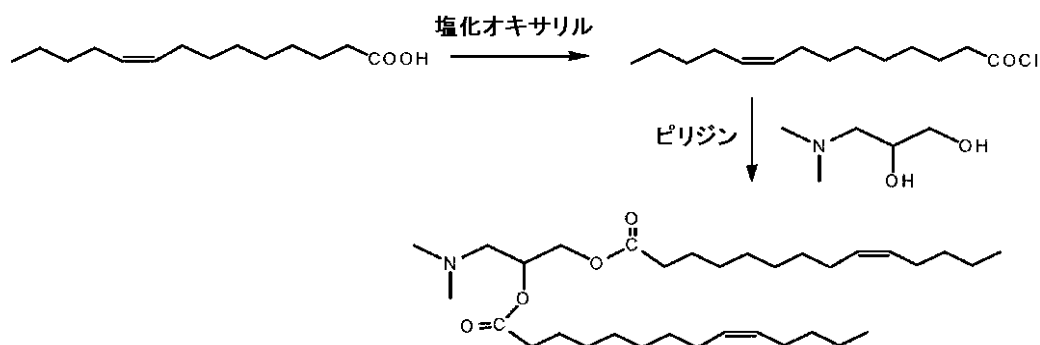
実施例 1 5

2, 3 - ジミリストレオロキシル - 1 - N, N - ジメチルアミノプロパン (DMDAP) の合成

概略図に示され、以下に記載されるように、DMDAP を合成した。

【 0 2 7 6 】

【化 5 4】



20

2, 3 - ジミリストレオロキシル - 1 - N, N - ジメチルアミノプロパン (DMDAP) の合成

無水ベンゼン (60 mL) 中のミリストレイン酸 (5.1 g, 22.5 mmol) の溶液に、アルゴン下で塩化オキサリル (3.93 g, 30.9 mmol) を滴下した。得られた混合物を室温において 2 時間攪拌した。溶媒および過剰量の塩化オキサリルを真空中で除去し、残渣を無水ベンゼン (75 mL) に溶解した。得られた溶液に、10 mL の無水ベンゼン中の、3 - (ジメチルアミノ) - 1, 2 - プロパンジオール (1.28 g, 10.7 mmol) および乾燥ピリジン (1.3 mL) の溶液を滴下した。次いで、その混合物をアルゴン下、室温において 3 日間攪拌し、懸濁液が得られた。固体を濾過し、ベンゼンで洗浄した。その洗浄液を濾液と混合した。併せた有機相をベンゼンで約 250 mL に希釈し、次いで、水 (100 mL)、希 NaOH 水溶液 (約 0.01%) およびブライン (2 x 100 mL) で洗浄した。各洗浄液中の水相をベンゼンで逆抽出した。最後に、有機相を無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を真空中で除去することにより、6.5 g の無色油状物を得た。その粗生成物を、ヘキサン類中の 0 ~ 30% 酢酸エチル勾配で溶出されるシリカゲル (230 ~ 400 メッシュ, 300 mL) におけるカラムクロマトグラフィーで精製した。これにより、3.4 g (59% 収率) の DMDAP が得られた。

30

40

【 0 2 7 7 】

【化 5 5】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.29-5.40 (4H, m, $\text{CH}=\text{CH}$), 5.18-5.26 (1H, m, OCH), 4.37 (1H, dd, $J = 11.6$ および 3.2 Hz, OCH), 4.09 (1H, dd, $J = 11.6$ および 6.0 Hz, OCH), 2.52 (2H, m, NCH_2), 2.35-2.27 (4H, m, 2 x COCH_2), 2.30 (6H, s, 2 x NCH_3), 2.02 (8H, m, アリル位 4 x CH_2), 1.62 (4H, m, 2 x CH_2), 1.30 (24H, m, 12 x CH_2), 0.90 (6H, t, 2 x CH_3) ppm.

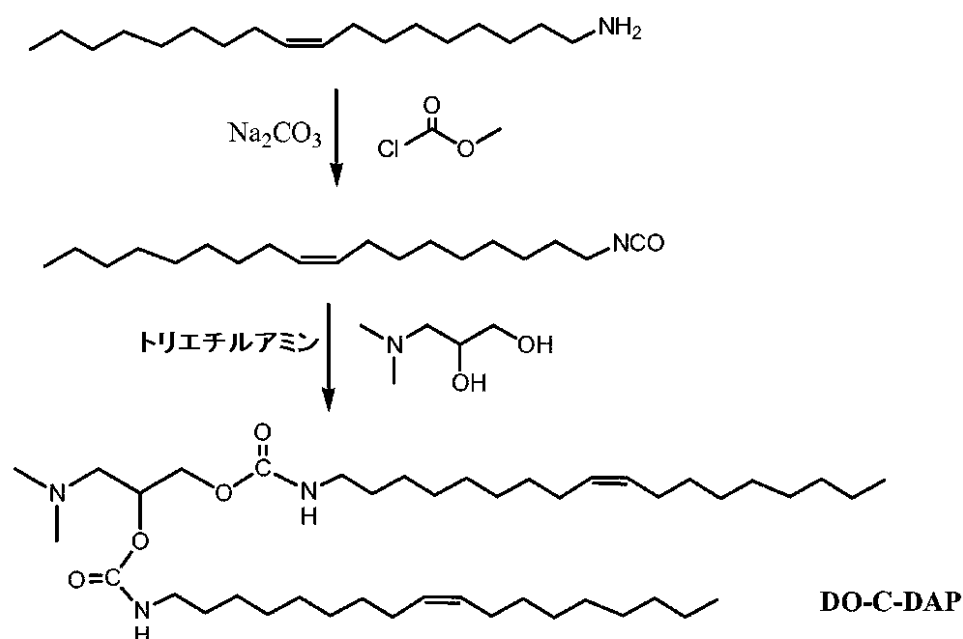
実施例 16

1, 2 - ジオレイルカルバモイルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DO - C - DAP) の合成

概略図に示され、以下に記載されるように、DO - C - DAP を合成した。

【0278】

【化 5 6】



オレイルイソシアネートの調製

無水炭酸ナトリウム (5 g, 47 mmol) を、無水 CH_2Cl_2 (100 mL) 中のオレイルアミン (3.83 g, 14.3 mmol) の溶液に、十分に搅拌しながら窒素下において懸濁した。その懸濁液を、氷浴を用いて 0 ~ 5 °C に冷却した。その懸濁液に、5 mL の無水 CH_2Cl_2 中のジホスゲン (3.86 g, 19.5 mmol) を激しく搅拌しながら加えた。加えた後、得られた懸濁液を窒素下、0 ~ 5 °C において 60 分間、次いで、室温において 2 時間搅拌した。反応が完了した後、水相の pH が約 6 になるまで有機相をはじめに水 (6 x 100 mL) で洗浄し、次いでブライン (100 mL) で洗浄した。無水 Na_2SO_4 で乾燥した後、溶媒を蒸発させることにより、4.4 g のわずかに茶色がかった油状物を粗生成物として得た。その粗生成物を、さらに精製することなく以下の工程において使用した。

【0279】

3 - (ジメチルアミノ) - 1, 2 - プロパンジオールを用いたオレイルイソシアネートの縮合

窒素下の 60 mL の無水ベンゼン中の上記粗オレイルイソシアネート (4.4 g, 約 15 mmol) の溶液に、10 mL の無水ベンゼン中の 3 - (ジメチルアミノ) - 1, 2 - プロパンジオール (0.59 g, 5 mmol) の溶液を滴下した。得られた混合物を室温

10

20

30

40

50

において90分間攪拌し、次いで、4時間還流した後、室温において一晩攪拌した。その混合物を100mLのベンゼンで希釈した後、有機相を水(4×75mL)、ブライン(75mL)で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、5.0gの黄色油状物を得た。その油性材料のカラム精製(400mLシリカゲル、230~400メッシュ、クロロホルム中の0~4%メタノール勾配で溶出される)によって、1.4g(39%)の黄色がかった油状物を生成物DO-C-DAPとして得た。

【0280】

【化57】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.35 (4H, m, 2 x CH=CH), 5.04 (1H, br. CONH), 4.90 (1H, br. CONH), 4.80 (1H, m, OCH), 4.28 (1H, br. d, J = 12 Hz, OCH), 4.16 (1H, dd, J = 12 および 6 Hz, OCH), 3.17 (4H, m, 2 x NCH₂), 2.38-2.65 (2H, m, NCH₂), 2.31 (6H, s, 2 x NCH₃), 2.02 (8H, m, アリル位 4 x CH₂), 1.4-1.55 (4H, m, 2 x CH₂), 1.28 (44H, s, 22 x CH₂), 0.88 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

10

実施例 17

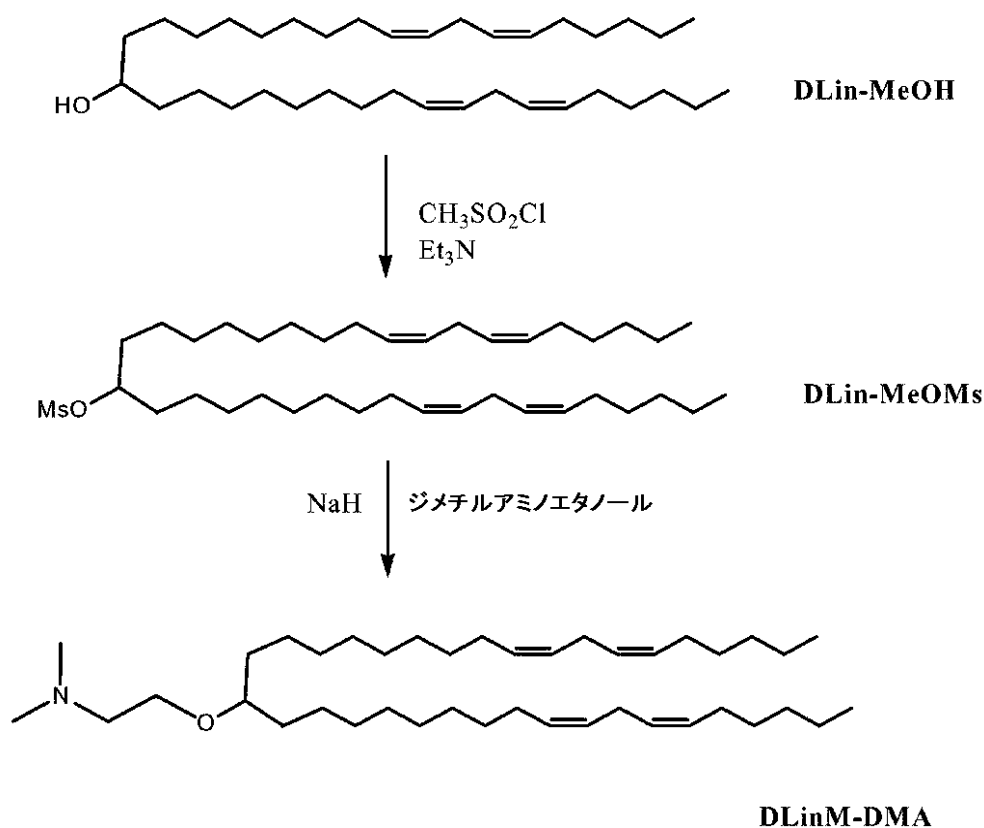
1-ジリノレイルメチルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-M-DMA)の合成

概略図に示され、以下に記載されるように、DLin-M-DMAを合成した。

20

【0281】

【化58】



30

40

ジリノレイルメタノール(DLin-MeOH)の合成

上に記載されたようにジリノレイルメタノール(DLin-MeOH)を調製した。

【0282】

ジリノレイルメチルメタンスルホネート(DLin-MeOMs)の合成

窒素下の100mLの無水ジクロロメタン中の、ジリノレイルメタノール(DLin-MeOH)

50

MeOH, 1.0 g, 1.9 mmol) および無水トリエチルアミン (0.4 mL, 2.9 mmol) の溶液に、塩化メチルスルホニル (0.20 mL, 2.6 mmol) を滴下した。得られた混合物を室温において一晩 (21 時間) 撹拌した。その反応混合物を 50 mL のジクロロメタンで希釈した。有機相を、水 (50 mL)、ブライン (75 mL) で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、1.26 g の黄色がかった油状物を粗生成物として DLin-MeOMs を得た。その粗生成物を、ヘキサン類中の 0 ~ 7 % エーテル勾配で溶出されるシリカゲル (230 ~ 400 メッシュ, 100 mL) におけるカラムクロマトグラフィで精製した。これにより、1.18 g のジリノレイルメチルメタンスルホネートを青白色油状物として得た。

【0283】

【化59】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.28-5.46 (8H, m, 4 x CH=CH), 4.71 (1H, クインテット, OCH), 3.00 (3H, s, OSO₂CH₃), 2.78 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2.06 (8H, q, 4 x アリル位 CH₂), 1.6-1.78 (4H, m, 2 x CH₂), 1.23-1.45 (36H, m), 0.90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

ジリノレイルメチルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin-M-DMA) の合成

NaH (0.50 g, 60 %, 12.5 mmol) を窒素下においてヘキサン類で 2 回洗浄し (2 x 15 mL)、次いで、75 mL の無水ベンゼンに懸濁した。その NaH 懸濁液に、5 mL の無水ベンゼン中のジメチルアミノエタノール (0.17 g, 1.9 mmol) の溶液を滴下した。得られた混合物を室温において 30 分間撹拌した。次いで、20 mL の無水ベンゼン中のジリノレイルメチルメタンスルホネート (DLin-MeOMs, 1.15 g, 1.9 mmol) の溶液を滴下した。得られた混合物を窒素下、室温において 20 分間撹拌し、次いで、一晩還流した。冷却した後、その混合物に 50 mL のエタノールをゆっくり加えた。有機相を水 (100 mL) で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を蒸発させることにより、1.06 g の黄色がかった油状物を粗生成物として得た。その粗生成物を、ジクロロメタン中の 0 ~ 5 % メタノール勾配で溶出されるシリカゲル (230 ~ 400 メッシュ, 100 mL) におけるカラムクロマトグラフィで精製した。これにより、60 mg (5 %) のジリノレイルメチルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin-M-DMA) を青白色油状物として得た。

【0284】

【化60】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ:

5.27-5.46 (8H, m, 4 x CH=CH), 3.73 (2H, t, OCH₂), 3.26 (1H, クインテット, OCH), 2.90 (2H, s, br., NCH₂), 2.78 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2.60 (6H, s, 2 x NCH₃), 2.06 (8H, q, 4 x アリル位 CH₂), 1.1-1.6 (36H, m), 0.90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

実施例 18

キラル型の 2, 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノメチル - [1, 3] - ジオキソラン (DLin-K-DMA) の合成

以下に記載され、以下の図に示されるように、(R) - および (S) - DLin-K-DMA を合成した。

【0285】

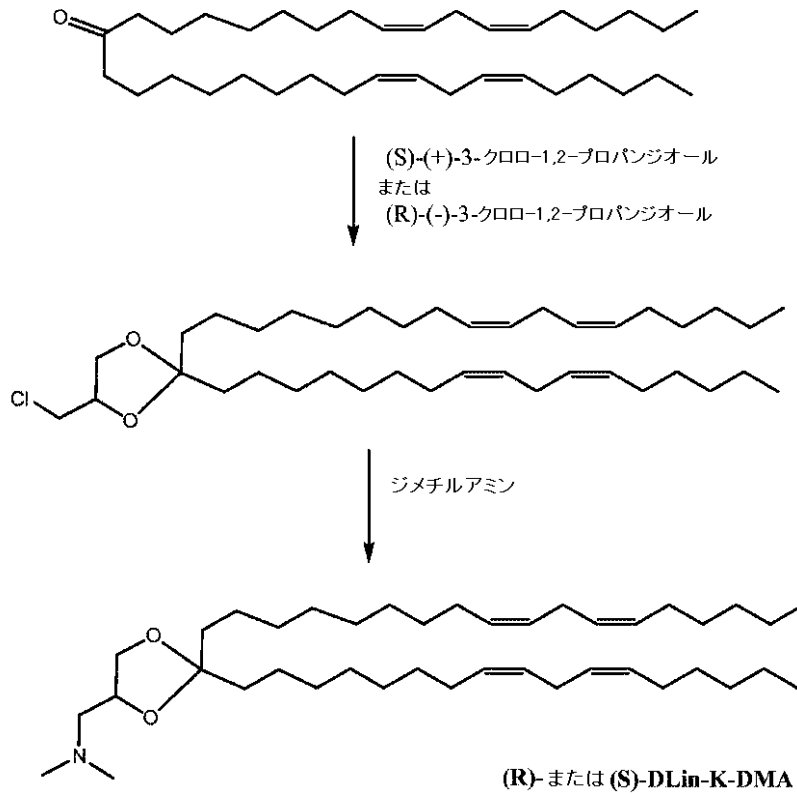
10

20

30

40

【化 6 1】



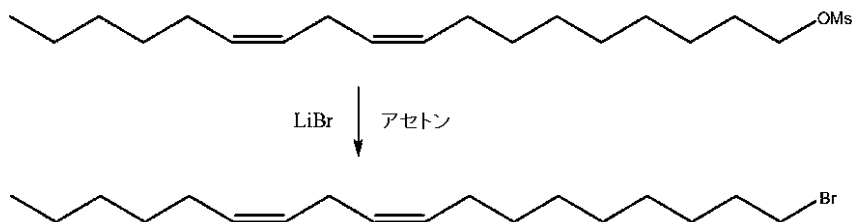
10

20

臭化リノレイルの合成

【 0 2 8 6 】

【化 6 2】



30

リノレイルメシレート(100g, 0.29mol)を、アセトン(1250mL)中の臭化リチウム(113.4g, 1.306mol)の攪拌混合物に室温において少しずつ加えた。その反応混合物を室温において16時間継続した。固体を減圧下で濾過し、アセトンで洗浄した。濾液を真空中で蒸発させ、得られた黄色液体を、ヘキサン類で溶出するフラッシュクロマトグラフィによって精製することにより、臭化リノレイル(90g, 95%)を無色液体として得た。

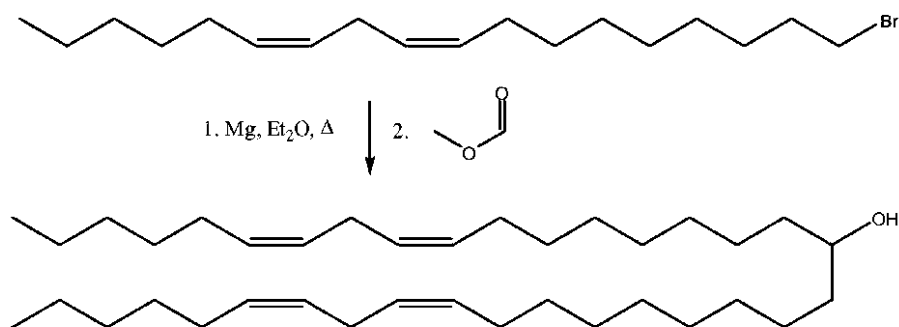
40

【 0 2 8 7 】

ジリノレイルメタノールの合成

【 0 2 8 8 】

【化 6 3】



10

無水エーテル（500 mL）中の臭化リノレイル（78 g，0.237 mol）の溶液を、無水エーテル（1000 mL）中にヨウ素の結晶を含むマグネシウム回転物（6.9 g，0.284 mol）の攪拌懸濁液に、窒素雰囲気下、室温において滴下した。得られた混合物を10時間還流し、次いで、室温に冷却した。その灰色混合物にギ酸メチル（14.5 g，0.241 mol）を滴下し、その反応を一晩継続した。その反応混合物に硫酸（5%，1000 mL）を慎重に加えた。エーテル相を分離し、水層をジエチルエーテルで洗浄した。併せた有機相を水およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。得られた油状物を、ヘキサン類中の0～5%エーテルで溶出するフラッシュクロマトグラフィによって精製することにより、ジリノレイルメチルホルメート（42 g）を得た。

20

【0289】

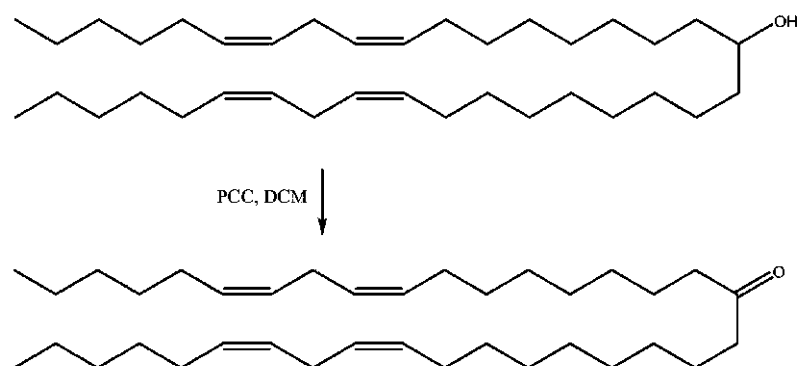
ジリノレイルメチルホルメート（42 g）と水酸化カリウム（9 g）との混合物を、85%エタノール（250 mL）中で室温において2時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、水性残渣を2 M塩酸で中和した。その水性残渣をエーテルで抽出した。併せた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮することにより、ジリノレイルメタノール（38 g）を淡黄色油状物として得た。

【0290】

ジリノレイルケトンの合成

【0291】

【化 6 4】



40

ピリジニウムクロクロメート（46.3 g，0.2155 mol）をジクロロメタン（750 mL）中のジリノレイルメタノール（38 g，0.0718 mol）の攪拌混合物に、室温において2時間にわたって少しずつ加えた。エーテルを加えることにより、その反応をクエンチした。得られた茶色混合物を、エーテルで溶出するFlorisilで濾過した。溶媒を減圧下で除去することにより、ジリノレイルケトン（36 g）を淡黄色油状物として得た。

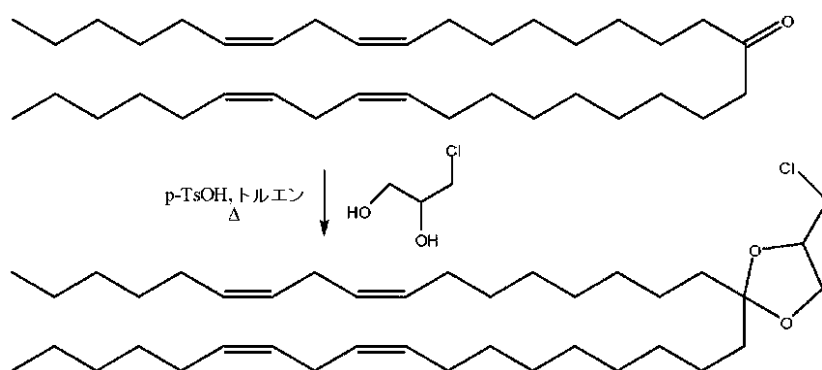
【0292】

2,2-ジリノレイル-4-クロロメチル-[1,3]-ジオキサランの合成

50

【 0 2 9 3 】

【 化 6 5 】



10

(S) - 2 , 2 - ジリノレイル - 4 - クロロメチル - [1 , 3] - ジオキソラン

ジリノレイルケトン (7 g) と、 (S) - (+) - 3 - クロロ - 1 , 2 - プロパンジオール (5 g) と、 p - トルエンスルホン酸 (0 . 0 5 g) と、トルエン (2 0 0 m L) との混合物を、 D e a n - S t a r k 装置を用いて 2 0 時間加熱還流した。その反応混合物を室温に冷却し、飽和炭酸水素ナトリウムおよびブラインで洗浄した。溶媒を真空中で除去し、その残渣をヘキサン類中の 2 % 酢酸エチルで溶出するフラッシュクロマトグラフィによって精製した。その生成物を淡黄色油状物として単離した (7 g) 。

20

【 0 2 9 4 】

(R) - 2 , 2 - ジリノレイル - 4 - クロロメチル - [1 , 3] - ジオキソラン

ジリノレイルケトン (8 g) と、 (R) - (-) - 3 - クロロ - 1 , 2 - プロパンジオール (5 g) と、 p - トルエンスルホン酸 (0 . 0 5 g) と、トルエン (2 0 0 m L) との混合物を、 D e a n - S t a r k 装置を用いて 2 0 時間加熱還流した。その反応混合物を室温に冷却し、飽和炭酸水素ナトリウムおよびブラインで洗浄した。溶媒を減圧下で除去し、その残渣を、ヘキサン類中の 2 % 酢酸エチルで溶出するフラッシュクロマトグラフィによって精製した。その生成物を淡黄色油状物として単離した (8 g) 。

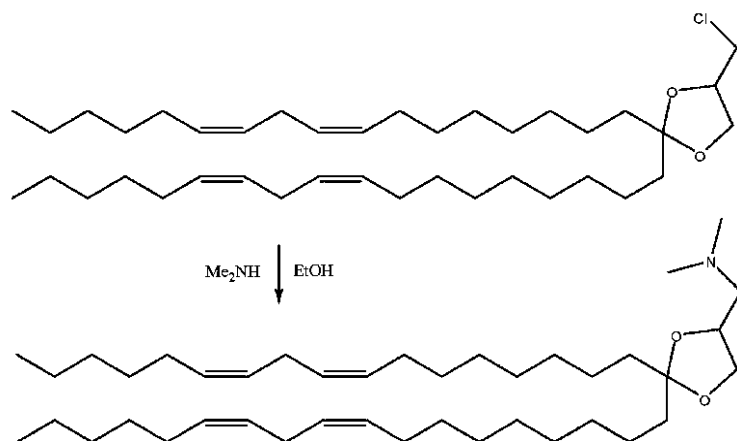
30

【 0 2 9 5 】

キラル D L i n - K - D M A の合成

【 0 2 9 6 】

【 化 6 6 】



40

(R) - D L i n - K - D M A の合成

T H F (5 0 m L) 中の、上記 (S) - ケタール (7 g) およびジメチルアミン (E t O H 中 3 3 % , 5 0 0 m L) の溶液を 3 0 p s i の圧力下で 1 週間、 9 0 ° C において加熱した。その溶液を減圧下で除去し、その残渣を、ヘキサン類中の 3 ~ 7 5 % 酢酸エチルで

50

【 0 2 9 7 】

THF (5 0 m L) 中の上記 (R) - ケタール (3 . 5 g) およびジメチルアミン (E t O H 中 3 3 % , 5 0 0 m L) の溶液を 3 0 p s i の圧力下で 1 週間、 8 5 ° C において加熱した。その溶液を真空中で除去することにより、その残渣を、ヘキサン類中の 3 ~ 7 5 % 酢酸エチルで溶出するフラッシュクロマトグラフィによって精製した。 (S) - D L i n - K - D M A を薄茶色液体として単離した (2 g) 。

10

MPEG2000-1, 2-ジ-O-アルキル-SN3-カルボモイルグリセリドの合成

【 0 2 9 9 】

【化 6 7】



40

50

クロロメタン中の5～10%メタノールの勾配で溶出することにより、所望のPEG-脂質I V aを白色固体として得た(105.30g, 83%)。

【0300】

【化68】

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 5.20-5.12(m, 1H), 4.18-4.01(m, 2H), 3.80-3.70(m, 2H), 3.70-3.20(m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 2.10-2.01(m, 2H), 1.70-1.60(m, 2H), 1.56-1.45(m, 4H), 1.31-1.15(m, 48H), 0.84(t, J= 6.5Hz, 6H). MS範囲
実測値: 2660-2836.

10

I V bの合成

1, 2 - ジ - O - ヘキサデシル - sn - グリセリドI b (1.00g, 1.848 mmol) およびDSC (0.710g, 1.5当量)を共にジクロロメタン(20mL) 20
に入れ、氷水混合物において0℃に冷却した。トリエチルアミン(1.00mL, 3当量)を加え、その反応物を一晩撹拌した。その反応物をTLCによって追跡し、DCMで希釈し、水(2回)、NaHCO₃溶液で洗浄し、そして硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で除去し、I I bの得られた残渣を高真空下において一晩維持した。この化合物を、さらに精製することなく次の反応に直接使用した。MP EG₂₀₀₀-NH₂ I I I (1.50g, 0.687 mmol, NOF Corporation, Japanから購入したもの) およびI I b (0.702g, 1.5当量)をアルゴン下でジクロロメタン(20mL)に溶解した。いくつかの実施形態において、化合物I I I中のxは、45
～49、好ましくは47～49、より好ましくは49の値を有する。その反応物を0℃に冷却した。ピリジン(1mL, 過剰量)を加え、その反応物を一晩撹拌した。その反応をTLCによってモニターした。溶媒および揮発性物質を真空下で除去し、その残渣をクロマトグラフィ(まず酢酸エチル、その後、勾配溶出として5～10% MeOH / DCM)によって精製することにより、必要とされる化合物I V bを白色固体として得た(1.46g, 76%)。

【0301】

【化69】

^1H

30

NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 5.17(t, J= 5.5Hz, 1H), 4.13(dd, J= 4.00Hz, 11.00 Hz, 1H), 4.05(dd, J= 5.00Hz, 11.00 Hz, 1H), 3.82-3.75(m, 2H), 3.70-3.20(m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 2.05-1.90(m, 2H), 1.80-1.70 (m, 2H), 1.61-1.45(m, 6H), 1.35-1.17(m, 56H), 0.85(t, J= 6.5Hz, 6H). MS範囲 実測値: 2716-2892.

I V cの合成

1, 2 - ジ - O - オクタデシル - sn - グリセリドI c (4.00g, 6.70 mmol) およびDSC (2.58g, 1.5当量)を共にジクロロメタン(60mL) 40
に入れ、氷水混合物中で0℃に冷却した。トリエチルアミン(2.75mL, 3当量)を加え、その反応物を一晩撹拌した。その反応物をTLCによって追跡し、DCMで希釈し、水(2回)、NaHCO₃溶液で洗浄し、そして硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で除去し、その残渣を高真空下において一晩維持した。この化合物を、さらに精製することなく次の反応のために直接使用した。MP EG₂₀₀₀-NH₂ I I I (1.50g, 0.687 mmol, NOF Corporation, Japanから購入したもの) およびI I c (0.760g, 1.5当量)をアルゴン下でジクロロメタン(20mL)に溶解した。いくつかの実施形態において、化合物I I Iにおけるxは、45
～49、好ましくは47～49、より好ましくは49の値を有する。その反応物を0℃に冷却した。ピリジン(1mL, 過剰量)を加え、その反応物を一晩撹拌した。その反応をTLCによっ 50

てモニターした。溶媒および揮発性物質を真空下で除去し、その残渣を、クロマトグラフィ（酢酸エチルの後、勾配溶出として5～10% MeOH / DCM）によって精製することにより、所望の化合物IVcを白色固体として得た（0.92g, 48%）。

【0302】

【化70】

¹H

NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5.22-5.15(m, 1H), 4.16(dd, J= 4.00Hz, 11.00 Hz, 1H), 4.06(dd, J= 5.00Hz, 11.00 Hz, 1H), 3.81-3.75(m, 2H), 3.70-3.20(m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 1.80-1.70 (m, 2H), 1.60-1.48(m, 4H), 1.31-1.15(m, 64H), 0.85(t, J= 6.5Hz, 6H). MS範囲 実測値: 2774-2948.

10

実施例20

核酸-脂質粒子の調製および特徴づけ

第VII因子を標的化するsiRNAを含む核酸脂質粒子を、以下に記載されるように調製し、特徴づけた。

【0303】

材料および方法：

脂質

ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、スフィンゴミエリン(SM)およびパルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)を、Northern Lipids (Vancouver, Canada)から購入した。1,2-ジオレオイルオキシ-3-ジメチルアンモニウムプロパン(DODAP)を、Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)から購入した。コレステロールを、Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, USA)またはSolvay Pharmaceuticals (Weesp, The Netherlands)から購入した。PEG-C-DOMGを、本明細書中に記載されているように合成した。PEG-S-DMGおよびPEG-DMAを、Heyesら(2006) Synthesis and Characterization of Novel Poly(ethylene glycol)-lipid Conjugates Suitable for Use in Drug Delivery, J. Controlled Release 112: 280-290に記載されているように合成した。

20

30

【0304】

緩衝液および溶媒

エタノール(100%)、メタノール、クロロホルム、クエン酸一水和物、クエン酸ナトリウム脱水物、HEPES、NaClおよびリン酸緩衝食塩水(PBS)のすべてを、商業的供給源から購入した。

【0305】

siRNA

siRNAを、Johnら(Johnら、Nature advance online publication, 26 September 2007 (DOI: 10.1038/nature06179))に記載されているように、化学的に合成した。これらの研究に使用されるsiRNAの配列は、以下のとおりだった：

【0306】

40

【化 7 1】

si-FVII センス, 5'-GGAUCAUCUCAAGUCUUACTT-3' (配列番号34);

si-FVII アンチセンス, 5'-GUAAGACUUGAGAUGAUCCTT-3' (配列番号35);

si-Luc センス, 5'-cuuAcGcuGAGuAcuucGATT-3' (配列番号36);

si-Luc アンチセンス, 5'-UCGAAGuACUcAGCGuAAGTT-3' (配列番号37);

10

小文字は、2' - O - Me 修飾されたヌクレオチドを示し；太字の文字は、2' - F 修飾されたヌクレオチドを示す。すべての siRNA が、各鎖の 3' 末端の 2 つのチミジン (T) 間にホスホロチオエート結合を含んだ。

【0307】

リポソーマル (Liposomal) siRNA 処方物の調製

40%陽イオン性脂質：10%DSPC：40%コレステロール：10%PEG-C-DOMGという適切な比(mol%)において、DSPC、コレステロールおよびPEG-C-DOMGとともに様々な陽イオン性脂質を含むリポソーマル siRNA 処方物を、修飾を用いて、Maurerら(Biophys J., 2001)に記載されているように調製した。各脂質の原液を無水エタノール中に調製した。あるいは、脂質を化学天秤上で秤量し、RNaseフリーの容器内で所望の比で混合し、無水エタノールを加えることにより、その脂質を溶解した。いくつかの場合において、その脂質または脂質混合物を完全に溶解するために加温(例えば、50℃)が必要である。いったん、その脂質をエタノールに溶解したら、混合しながら適切な体積の脂質を50mMクエン酸塩、pH4.0に加えることにより、8~10mMの脂質濃度および30~40体積%(代表的には、34%)の最終エタノール濃度でリポソームを形成した。

20

【0308】

これらの予め形成されたベシクル(PFV)を、以前に報告されているように(Hopeら、1986)2枚の積層80nmフィルターから3回押し出した。いくつかの場合において、脂質組成に応じて、リポソームを押し出すために加温が必要である。そのPFVの平均粒径は、QELSによって測定され、使用される脂質組成および製剤化条件に応じて、一般に50~120nm(より代表的には、70~80nm)だった。

30

【0309】

siRNAの原液を10mMクエン酸塩、30mM NaCl, pH6.0に溶解し、使用するまで4℃において保存した。製剤化する直前に、siRNA原液のアリコートをし、エタノールと50mMクエン酸塩、pH4.0との混合物に加えることにより、特定のPFV組成物において使用される濃度と等価な最終的なエタノール濃度、代表的には、34体積%エタノールを達成した。

【0310】

40

siRNAを調製した後、siRNAとPFVの両方を、所望のインキュベーション温度(使用される脂質組成に応じて25~45℃)において10分間平衡化した後、混合した。次いで、混合し続けながら、そのPFVにsiRNAをすぐに加え、得られた混合物を、選択された温度において30分間インキュベートした(混合し続けた)。インキュベーションが完了した後、そのサンプルを代表的には、50mMクエン酸塩またはPBS(またはHBS)、pH7.4中に2~3倍希釈し、タンジェンシャルフロー・ダイアフィルトレーションによってもとの体積に濃縮し、次いで、10~15体積のPBS(またはHBS)、pH7.4で洗浄することにより、残渣エタノールを除去し、外部緩衝液を交換した。いくつかの場合において、一般に、小さい処方物体積に関しては、インキュベーション混合物を、予め洗浄された透析チューブ(100K MWtカットオフ)に入れ、

50

そのサンプルを、PBS（またはHBS）、pH 7.4 に対して一晩透析した。緩衝液の交換およびエタノールの除去が完了した後、サンプルをタンジェンシャルフロー・ダイアフィルトレーションによって所望の siRNA 濃度に濃縮した。

【0311】

粒径解析

リポソーマル siRNA 処方物のサイズ分布を、NICOMP Model 380 サブミクロン粒子寸法測定器 (PSS NICOMP, Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA) を用いて測定した。粒子の平均直径は、通常、使用される脂質組成に応じて、50 ~ 120 nm の範囲だった。リポソーマル siRNA 処方物は、通常均一であり、使用される脂質組成および製剤化条件に応じて、20 ~ 50 nm の標準偏差（平均粒径からの）を有した。

10

【0312】

被包されていない（遊離） siRNA を定量するためのイオン交換クロマトグラフィ DEAE セファロースカラムまたは市販の遠心分離デバイス (Vivapure D Mini カラム, カタログ番号 VS-IX01DH24) を使用する陰イオン交換クロマトグラフィを用いて、リポソーム処方物中の遊離 siRNA の量を測定した。DEAE セファロースカラムの場合、siRNA 含有処方物を、HBS (145 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.5) で平衡化されたカラム（約 2.5 cm の床の高さ, 1.5 cm の直径）から溶出した。最初のサンプルおよび溶出サンプルのアリコートをし、それぞれ HPLC および A260 によって脂質および siRNA の含有量についてアッセイした。被包パーセントを、カラム前およびカラム後のサンプルの siRNA と脂質との相対的な比に基づいて計算した。

20

【0313】

Vivapure 遠心デバイスの場合、siRNA 含有処方物のアリコート (0.4 mL, < 1.5 mg/mL siRNA) を、遠心分離 (2000 × g, 5 分間) によって正に帯電した膜を通して溶出した。カラム前およびカラム後のサンプルのアリコートを、上に記載されたように解析することにより、サンプル中の遊離 siRNA の量を測定した。

【0314】

siRNA 濃度の測定

脂質を可溶化した後の 260 nm における吸光度を計測することによって siRNA 濃度を測定した。Bligh および Dyer (Bligh ら, Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917 (1959)) によって概説された手順に従って、脂質を可溶化した。簡潔には、リポソーマル siRNA 処方物のサンプルを、1:2.1:1 (水性サンプル:メタノール:クロロホルム) という体積比でクロロホルム/メタノールと混合した。その溶液が、混合した後に、完全に透き通らない（すなわち、単一の透き通らない相である）場合、さらに 50 ~ 100 mL (体積を記録した) のメタノールを加え、そのサンプルを再混合した。いったん、透き通った単相が得られたら、そのサンプルを、分光光度計を用いて 260 nm においてアッセイした。約 45 µg/mL = 1.0 OD という換算係数を使用し、1.0 cm のパス長を使用して、A260 の読み出しから siRNA 濃度を決定した。クロロホルム/メタノール/水単相における換算係数は、各脂質組成物に対して変動し (35 ~ 50 µg/mL = 1.0 OD)、新規脂質処方物の各々に対しては、既知量の siRNA を使用して経験的に決定される。

30

40

【0315】

脂質の濃度および比の測定

Alliance 2695 Separations Module (オートサンプラー、HPLC ポンプおよびカラムヒーター)、Waters 2424 Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) および Waters Empower HPLC ソフトウェア (バージョン 5.00.00.00, ビルド番号 1154; Waters Corporation, Milford, M

50

A, USA) からなる Waters Alliance HPLC システムを使用して、コレステロール、DSPC、PEG-脂質 (例えば、PEG-S-DMG) および陽イオン性脂質 (例えば、DLin-K-DMA) を、標準試料に対して測定した。90% エタノール中に 0.8 mg/mL の総脂質を含むサンプル (15 µL) を、55 に加熱された 2.5 µm 充填材、2.1 mm × 50 mm を有する逆相 XBridge C18 カラム (Waters Corporation, Milford, MA, USA) 上に注入し、そして 0.5 mL/分 という一定の流速の勾配溶出によってクロマトグラフィに供した。移動相の組成を、16 分間にわたって、10 mM NH₄HCO₃ : メタノール (20 : 80) から THF : 10 mM NH₄HCO₃ : メタノール (16 : 4 : 80) に変化させた。ELSD におけるガス圧を 25 psi に設定し、噴霧器の加熱器 - 冷却器の設定値およびドリフト管温度の設定値を、それぞれ 100% および 85 に設定した。測定された脂質濃度 (mg/mL) をモル濃度に変換し、相対的な脂質比を処方物中の総脂質についての mol% として表した。

10

【0316】

被包効率の決定

タンジェンシャルフロー・ダイアフィルトレーションまたは陰イオン交換クロマトグラフィによって外部の siRNA を除去した後に、捕捉効率を決定した。最初の処方物インキュベーション混合物中の、およびタンジェンシャルフロー・ダイアフィルトレーションの後の、siRNA および脂質の濃度を測定した (上に記載されたように)。siRNA と脂質との比 (wt/wt) をそのプロセス中の両方の点において測定し、siRNA と脂質との比の最後と最初との比を得て、その結果に 100 を乗算することにより、パーセンテージを得ることによって、被包効率を決定した。

20

【0317】

これらの研究の結果を表 5 に提供する。

【0318】

実施例 21

核酸 - 脂質粒子を用いた哺乳動物の遺伝子発現の制御

凝固カスケードにおいて重要なタンパク質である第 V II 因子 (FVII) は、肝臓 (肝細胞) において合成され、血漿中に分泌される。血漿中の FVII レベルは、単純なプレートベースの比色定量アッセイによって測定され得る。このように、FVII は、肝細胞由来タンパク質の siRNA 媒介性のダウンレギュレートを測定するため、ならびに核酸脂質粒子および siRNA の血漿濃度および組織分布のモニタリングのための簡便なモデルである。

30

【0319】

マウスにおける第 V II 因子のノックダウン

C57BL/6 マウスに静脈内 (ボラス) 注射した 24 時間後の FVII siRNA で処置された動物において、FVII 活性を評価した。マイクロプレートスケールにおいて、市販のキット (Biophen FVII Kit 商標; Aniaara Corp., Mason, OH) を製造者の指示書に従って使用して、FVII を測定した。未処置コントロールマウスに対する FVII の減少を測定し、その結果を、% 残留 FVII として表した。4 つの用量レベル (2、5、12.5、25 mg/kg の FVII siRNA) を、各新規リボソーム組成物の最初のスクリーニングにおいて使用し、そして最初のスクリーニングにおいて得られた結果に基づいて、その後の研究においてこの投薬を広げた。

40

【0320】

耐容性の測定

各新規リボソーマル siRNA 処方物の耐容性を、体重の変化、ケージサイド観察、臨床化学、およびいくつかの場合では血液学をモニターすることによって評価した。処置前および処置の 24 時間後に動物の体重を記録した。データは、体重の % 変化として記録した。体重測定に加えて、肝臓機能マーカーを含む完全な臨床化学パネルを、FVII 解析

50

のために採取された血清のアリコートを用いて、注射の24時間後に各用量レベル(2、5、12.5および25 mg/kg siRNA)において得た。解析のために、サンプルをCentral Laboratory for Veterinarians (Langley, BC) に送付した。いくつかの場合において、血液学解析に向けて、全血を採取するために追加のマウスを処置群に含めた。

【0321】

治療指数の決定

治療指数(TI)は、毒性の測定値と活性の測定値とを比較することによって生成される任意パラメータである。これらの研究の場合、TIは：

$TI = MTD(\text{最大耐用量}) / ED_{50}(\text{50\% FVIIノックダウンのための用量})$

10

として決定した。

【0322】

これらの研究に対するMTDは、体重の>7%減少、およびげっ歯類における肝臓損傷に対して良好な特異性を有する臨床化学マーカーであるアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)の>200倍増加をもたらす、最小用量として設定した。ED₅₀は、FVII用量-活性曲線から決定された。

【0323】

siRNA血漿レベルの測定

蛍光標識されたsiRNA(Cy-3標識ルシフェラーゼsiRNA)を使用して、Cy3蛍光の血漿レベルを、C57BL/6マウスにおけるIV注射の0.5および3時間後に評価した。まず、タンパク質含有生物学的マトリックスからCy3-siRNAを抽出し、次いで、その抽出物中のCy-3標識の量を蛍光によって解析することによって、測定を行った。血液をEDTA含有Vacutainerチューブ内に回収し、2~8、2500rpmにおいて10分間遠心することにより、血漿を単離した。その血漿をEppendorfチューブに移し、すぐにアッセイしたか、または-30の冷凍庫内で保存した。その血漿のアリコート(最大100μL)をPBS(145mM NaCl、10mMリン酸塩、pH7.5)で500μLに希釈し、次いで、メタノール(1.05mL)およびクロロホルム(0.5mL)を加え、そしてサンプルをボルテックスすることにより、透過した単相溶液を得た。さらに水(0.5mL)およびクロロホルム(0.5mL)を加え、得られたエマルジョンを、最低でも3分間、定期的に混合することによって持続した。その混合物を3000rpmで20分間遠心し、Cy-3標識を含む水(上)相を新しいチューブに移した。その溶液の蛍光を、550nmの励起波長(2nm帯域幅)および600nmの発光波長(16nm帯域幅)においてSLM蛍光光度計を用いて測定した。未処置動物からの血漿のアリコートを、Cy-3-siRNA(0~15μg/mL)を含む処方物および上に示されたように処理されたサンプルと組み合わせることによって、検量線を生成した。データを、血漿Cy-3濃度(μg/mL)として表した。

20

30

【0324】

siRNA体内分布の測定

Cy3蛍光の組織(肝臓および脾臓)レベルを、各新規リボソーマルsiRNA処方物について、C57BL/6マウスにおけるIV注射の0.5および3時間後に評価した。市販のフェノール/クロロホルム(Trizol(登録商標)試薬)抽出の後に、各組織の一部を総蛍光について解析し、細胞内送達を評定するために他の部分を共焦点顕微鏡によって評価した。各組織を回収した後、重量を量り、2片に分けた。

40

【0325】

食塩水で灌流された動物から得られた肝臓の切片(400~500mg)をFastprepチューブに正確に量り入れ、そしてFastprep FP120装置を用いて1mLのTrizol中でホモジナイズした。そのホモジネートのアリコート(代表的には、50mgの組織と等価)をEppendorfチューブに移し、Trizolをさらに加えることにより、最終体積1mLを達成した。クロロホルム(0.2mL)を加え、そ

50

の溶液を混合し、2～3分間インキュベートした後、 $12,000\times g$ で15分間遠心した。Cy3を含む水(上)相のアリコート(0.5mL)を0.5mLのPBSで希釈し、そのサンプルの蛍光を上に記載されたように測定した。

【0326】

食塩水で灌流処置された動物からの脾臓を、Fastprepチューブを用いて1mLのTrizol中でホモジナイズした。そのホモジネートにクロロホルム(0.2mL)を加え、2～3分間インキュベートし、 $2\sim 8$ 、 $12000\times g$ で15分間遠心した。上の水相のアリコートを0.5mLのPBSで希釈し、そのサンプルの蛍光を上に記載されたように測定した。そのデータを、注射された用量の%(各組織において)および組織Cy-3濃度($\mu g/mL$)として表した。

10

【0327】

共焦点顕微鏡観察用の調製では、食塩水で灌流された動物から回収された組織の全部または一部を市販の10%中性緩衝ホルマリン中で固定した。組織をPBS, pH7.5中ですすぎ、(<http://www.item.fraunhofer.de/reni/trimming/index.php>)において入手可能なRENI Guide to Organ Trimmingに従って解剖した。それらの検体をHistoPrep(Fisher Scientific, Ottawa ON, SH75-125D)で満たされた型の中に切断面を下にして置き、平衡点に達するまで液体窒素中で冷却して2-メチルブタン中で凍結した。次に、凍結ブロックを、クライオチャンバー(-18)内のクライオミクロトーム(CM1900; Leica Instruments, Germany)に固定し、そして2.5°のすきま角を有する使い捨てステンレス鋼刃(Feather S35, Fisher Scientific, Ottawa ON)で切断した。次いで、そのサンプルを10 μm の厚さに切断し、Superfrost/Plusスライド(Fisher Scientific, Ottawa ON, 12-550-15)上に回収し、室温において1分間乾燥し、-20で保存した。スライドをPBS中で3回すすぐことにより、HistoPrepを除去し、VectorshIELDハードセット(Vector Laboratories, Inc. Burlingame CA, H-1400)でマウントし、顕微鏡解析の間、凍結した。いくつかの場合において、TOTO-3(1:10, 000希釈)を用いて核を染色した。

20

【0328】

適切な蛍光色素の励起のために488nm(緑色)568nm(赤色)および633nm(青色)のレーザー線を使用する10 \times および60 \times 倍率のNikon免疫蛍光共焦点顕微鏡C1を用いて、蛍光を可視化し、像を捕捉した。生データを、ImageJ.1.37vを用いてインポートすることにより、Z積層型の複数(2～3つ)の切片を選択し、生成し、そしてAdobe Photoshop 9.0によって、異なるチャネルから得られた蛍光色素の励起の際に捕捉された像をマージした。

30

【0329】

これらの実験の結果を表6に提供する。本発明のマウスモデルにおける有用性を証明する処置は、同様の投与量および投与様式においてヒト疾患の条件に対して試験するための優秀な候補である。

40

【0330】

実施例22

核酸負荷および粒子安定性に対する負荷条件の影響

オリゴヌクレオチド負荷およびベシクル安定性に対する様々な負荷条件(エタノール濃度、時間、温度および核酸:脂質比を含む)の影響を測定した。

【0331】

オリゴヌクレオチド負荷およびベシクル安定性に対するエタノール濃度の影響

被包プロセス中のエタノールの存在は、脂質の再配列およびポリヌクレオチドの被包を促進するために必要である。しかしながら、エタノールの濃度が高すぎると、膜不安定性をもたらすので、必要なエタノールの量は、様々な脂質組成物に対して変動する。

50

【0332】

16mer のホスホジエステルオリゴヌクレオチド (ODN) を DL i nDMA / D S P C / C H / P E G - S - D M G (4 0 : 1 0 : 4 8 : 2 モル比) ベシクル内に被包するために 3 2、3 4 および 3 6 % エタノールを用いる影響を、図 1 A に示す。2 3 におけるインキュベーションの 3 0 分後、3 2 および 3 4 % エタノール含有混合物は、7 5 ~ 8 5 % の被包をもたらしただけであり、これは、6 0 分まで増加しなかった (図 1 A)。3 6 % エタノールサンプルにおいて見られた低い被包は、N i c o m p 粒子寸法測定器を用いて準弾性光散乱によって測定される、大きいベシクルサイズの増加と関連したことから (図 1 B)、そのベシクル膜が不安定化され、そして著しいベシクル間融合が生じたことが示唆される。このベシクル不安定性は、3 2 および 3 4 % エタノール含有サンプルを用いてインキュベーション時間を 6 0 分に延長するときにも生じ得 (図 1 B)、そして O D N 被包の喪失とも関連し得る (図 1 A)。

10

【0333】

オリゴヌクレオチド負荷ベシクル安定性に対する時間および温度の影響

O D N 被包の程度および動態に対する温度の影響を、DL i nDMA / D S P C / C H / P E G - S - D M G (4 0 : 1 0 : 4 2 : 8 , モル比) ベシクルを用いて特徴づけた。ベシクルを、3 4 % エタノールを含む 5 0 m M クエン酸塩、p H 4 緩衝液中において、O D N とともに 0 . 0 6 (w t / w t) の初期比でインキュベートした。3 0 のインキュベーション温度を用いたとき、7 0 % の最大被包が得られ、その 3 0 分後、被包効率は、測定値の誤差範囲内で変化しないままだった (図 2 A)。4 0 では、8 0 ~ 9 0 % の被包効率が、1 5 ~ 6 0 分間にわたって観察された (図 2 A)。準弾性光散乱によって、ベシクルサイズの変化もモニターした。3 0 (データ示さず) と 4 0 (図 3 B) の両方において、ベシクルサイズは、安定したままだった。

20

【0334】

被包効率に対する s i R N A と脂質との比および製剤化プロセスの影響

陽イオン性脂質含有ベシクルによって被包され得る s i R N A の量 (被包された s i R N A と脂質との比として測定される) は、所与の脂質組成および / または製剤化プロセスについて、飽和レベルに達し得る。

【0335】

予め形成されたベシクル法 (P F V) を用いたとき、被包された s i R N A と脂質との最大比が、約 0 . 0 5 0 (w t / w t) において観察された。表 1 に示されるように、0 . 0 6 1 (w t / w t) という s i R N A と脂質との初期比をインキュベーション混合において使用したとき、DL i nDMA / D S P C / C H / P E G - S - D M G (4 0 : 1 0 : 4 0 : 1 0 モル比) ベシクルにおいて 0 . 0 4 9 という最終被包比が得られ、これは、8 0 % 被包と関連した。しかしながら、0 . 2 4 4 というより高い s i R N A / 脂質初期比では、0 . 0 5 2 という同様の最終被包比が観察され、これは、2 1 % 被包と関連した。得られた最大 s i R N A / 脂質比は、s i R N A の負に帯電したバックボーンと相互作用するために利用可能な正電荷の量によって限定され得る。しかしながら、0 . 0 6 0 という s i R N A / 脂質比では、負電荷に対して約 3 倍過剰量の正電荷がなおも存在することから、これらの条件下での被包が、電荷相互作用によって制限されないことが示唆される。

30

40

【0336】

S e m p l e , S . C . ら、B i o c h i m B i o p h y s A c t a 1 5 1 0 : 1 5 2 - 6 6 (2 0 0 1) および S e m p l e , S . C . ら、M e h t o d s E n z y m o l 3 1 3 : 3 2 2 - 4 1 (2 0 0 0) に記載されているような代替の製剤化方法 (「従来法」) を用いると、より高い被包 s i R N A / 脂質比が得られた。簡潔には、陽イオン性ベシクルを s i R N A とともにインキュベートすることによって脂質再配列および s i R N A 被包を誘導する (P F V 法) 代わりに、脂質を 1 0 0 % エタノール中に可溶化し、p H 4 において s i R N A を含む水溶液に直接加える (最終的に 3 4 % エタノール)。

50

この方法を用いると、より高いインキュベーション *siRNA* / 脂質比を使用したとき、被包 *siRNA* / 脂質比の漸進的な増加が観察された（表 1）。0.060 および 0.120 という *siRNA* / 脂質の初期比では、ほぼ完全な被包が観察された；しかしながら、0.240 という *siRNA* / 脂質の初期比では、たった 61 % の被包しか得られなかったことから、プラトーに達したことが示唆される。このプラトーは、*siRNA* の陰イオン性バックボーンと相互作用するために利用可能な正電荷（すなわち、陽イオン性脂質）の飽和を反映し得る。得られた 0.147 という *siRNA* / 脂質比（wt/wt）（表 3）は、0.178 という理論上の電荷中和比に近い。

【0337】

PFV 手法を用いるとき、DLinDMA/CH/PEG-S-DMG から構成される処方物中の陽イオン性脂質のモル%を増加させることによって *siRNA* / 脂質比は増加されず、そして 70 モル%の DLinDMA では、*siRNA* と脂質との比は、50 および 60 モル%の DLinDMA において得られた比から有意に低下した（表 4）。

【0338】

【表 3】

表 3

製剤化方法	siRNA/脂質比 (wt/wt)		% 被包
	初期	最終	
PFV	0.061	0.049	80 %
PFV	0.244	0.052	21 %
従来	0.060	0.060	100 %
従来	0.120	0.113	94 %
従来	0.240	0.147	61 %

【0339】

【表 4】

表 4

脂質組成物	脂質モル比	siRNA/脂質比 (wt/wt)		% 被包
		初期	最終	
DLinDMA/CH/PEG-S-DMG	50:40:10	0.077	0.040	52
DLinDMA/CH/PEG-S-DMG	60:28:12	0.089	0.044	50
DLinDMA/CH/PEG-S-DMG	70:16:14	0.089	0.028	31

実施例 23

核酸 - 脂質粒子の薬物動態、体内分布および生物学的活性に対する陽イオン性脂質の影響

様々な核酸 - 脂質粒子のインビボにおける特徴に対する様々な陽イオン性脂質処方物の影響を、本質的には実施例 21 に記載されたように、C57BL/6 マウスにおいて第 V I I 因子 *siRNA* を用いて調べた。試験された様々な脂質組成物を表 5 に記載する。

【 0 3 4 0 】

4 0 / 1 0 / 4 0 / 1 0 (m o l % アミノ脂質 / D S P C / C h o l / P E G - S - D M G) という名目上の脂質比で、処方物を生成した。血漿、肝臓および脾臓中の C y - 3 蛍光を、実施例 2 1 に記載されたように評価した。いくつかの例外が存在するが、概して、F V I I 特異的 s i R N A とともに製剤化されたとき、I V 注射の 0 . 5 時間後に C y - 3 蛍光の最低血漿レベルおよび最高肝臓レベルを有する処方物が、第 V I I 因子モデルにおいて最大の活性を示した。これらの研究の結果を表 6 に要約する。

【 0 3 4 1 】

アミノ脂質リンカー化学の影響を評価するために、様々な脂質処方物が第 V I I 因子の発現をノックダウンする能力を、第 V I I 因子 s i R N A を用いる肝臓モデルにおいて測定した。各脂質における頭部基の構造は、同じだった。各処方物は、4 0 / 1 0 / 4 0 / 1 0 (m o l % アミノ脂質 / D S P C / C h o l / P E G - S - D M G) という名目上の脂質比において生成された。サンプルを、図 3 に示される用量で C 5 7 B L / 6 マウスの静脈内に注射した。血清中の第 V I I 因子レベルを、注射の 2 4 時間後に、コントロールマウスに対して測定した。5 0 % の第 V I I 因子減少を達成する用量 (m g / k g) は、ケタール結合 (D L i n - K - D M A 脂質) を用いるとき、エーテル結合 (D L i n D M A 脂質) と比べて約 1 0 倍、エステル結合 (D L i n D A P 脂質 ; 図 3) と比べて約 1 0 0 倍改善された。

【 0 3 4 2 】

【 表 5 】

表5-インビボにおいて試験された新規脂質処方物の処方物の特徴。

脂質組成物 ¹	siRNA と脂質と の名目上 の比 ² (wt/wt) ²	インキュベーション 条件	ダイアフィル トレーション 緩衝液	処方物の特徴		
				粒径 (nm)	siRNAと 脂質との 最終的な 比 (wt/wt)	siRNA 回収率 (%)
DLinTMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	0.061	室温/15分	PBS	185 ± 72	NA	84
DLinTAP/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	0.060	室温/15分	PBS	127 ± 41	NA	81
DOTAP/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	0.060	31°C/30分	PBS	71 ± 22	NA	47
DODMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	0.062	31°C/30分	PBS	66 ± 17	0.054	77
DLinDMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	0.063	31°C/30分	PBS	72 ± 23	NA	77
DLinDAC/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	0.061	室温/30分	PBS	74 ± 26	NA	60
DLin-C-DAP/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	0.060	31°C/30分	PBS	73 ± 25	NA	58
DLin-2-DMAP/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	0.062	31°C/30分	PBS	79 ± 26	NA	42
DLin-S-DMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	0.062	31°C/30分	PBS	69 ± 25	NA	46
DLinMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	0.061	31°C/30分, pH3	PBS	78 ± 35	NA	46
DLinAP/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	0.064	31°C/30分	PBS	75 ± 40	NA	32
DLinDAP/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	0.061	31°C/30分	HBS	73 ± 35	NA	NA
DLin-EG-DMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	0.061	31°C/30分	PBS	76 ± 27	NA	64
DLinMPZ/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	0.061	31°C/30分	PBS	75 ± 20	0.061	88
DLin-K-DMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	0.062	室温/30分	PBS	73 ± 20	0.060	76

1 各処方物に対する名目上の脂質比(mol%)は、40/10/40/10(mol%アミノ脂質/DSPC/Chol/PEG-S-DMG)だった

2 $\mu\text{g siRNA} / \mu\text{mol 総脂質}$ として表されるsiRNAと脂質との名目上の比は、別段述べられない限り、0.0466だった; wt/wt基準における変動は、様々なアミノ脂質の様々な分子量に起因する

【表 6】

表6-インビボにおいて試験された、選択された新規脂質処方物の薬物動態、体内分布および活性

脂質組成物 ¹	血漿Cy3濃度 (μ g当量/mL)		肝臓Cy3濃度 (%注射用量)		脾臓Cy3濃度 (%注射用量)		第VII因子活性
	0.5時間	3時間	0.5時間	3時間	0.5時間	3時間	
DLin-K-DMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	1.1	0.4	32.0	4.0	ND	ND	++++++
DLinDMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	15.3	0.7	50.0	17.0	0.79	0.17	++++
DLinMPZ/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	20.3	0.4	52.0	37.5	1.53	0.15	+++
DLinDAC/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	27.1	0.3	29.0	6.5	0.23	0.13	++
DLin-2-DMAP/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	17.5	8.8	20.5	2.5	0.34	0.11	++
DLinAP/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	86.2	23.1	11.5	5.0	0.37	0.24	++
DLin-C-DAP/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	69.4	19.0	28.5	13.5	0.79	0.12	+
DLin-S-DMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	10.7	5.4	2.5	0.0	0.02	0.04	+
DLinMA/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	20.2	0.4	10.5	4.5	0.12	0.32	+
DLinDAP/DSPC/Chol/PEG-S-DMG	46.6	3.3	20.5	16.5	0.74	0.22	+

¹ 以下の用量における<50%第VII因子ノックダウンに基づく第VII因子スコアリングシステム: +, 25 mg/kg; ++, 12.5 mg/kg, +++, 5 mg/kg; ++++, 2 mg/kg; +++++, 0.8 mg/kg; ++++++, 0.32 mg/kg; +++++++, 0.128 mg/kg

実施例 2 4

核酸 - 脂質粒子の耐容性および治療指数に対する陽イオン性脂質の影響

実施例 2 0 において概説されたように、様々な核酸 - 脂質処方物を調製した。各処方物に対する名目上の脂質比は、40 / 10 / 40 / 10 (mol % アミノ脂質 / DSPC / Chol / PEG-S-DMG) であり、siRNA と脂質との名目上の比は、0.0466 (μ g siRNA siRNA / μ mol 総脂質) だった。死亡率 / 罹患率、体重の変

10

20

30

40

50

化およびアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT；肝臓損傷に対する血漿マーカー）を、C57BL/6マウスへのIV注射の24時間後に、様々なsiRNA用量（2、5、12.5および25mg/kg）に対して測定した。25mg/kgのsiRNA用量における平均体重減少に基づいて、処方物を選別した。これらの研究の結果を表7に要約する。

【0344】

治療指数の推定値を、第VII因子用量反応曲線（例えば、実施例23、図2）におけるED₅₀値および最大耐用量（MTD）を決定する耐受性の評価から導くことによって、ある特定の処方物について決定した。これらの処方物に対するMTDを最低用量として設定することにより、7%体重減少、ALTの200倍増加および重篤な臨床的徴候無しがもたらされた。これらの研究の結果を表8に示す。

【0345】

【表 7】

表7-新規脂質処方物に対する耐容性の情報-体重、肝臓酵素、死亡率。

処方物	Δ体重(%)				ΔALT ¹ (倍率増加)				コメント/死亡率
	2 mg/ kg	5 mg/ kg	12.5 mg/kg	25 mg/kg	2 mg/ kg	5 mg/ kg	12.5 mg/ kg	25 mg/ kg	
DLinTMA /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	+0.1	-4.6	死亡	死亡	NC	NC	死亡	死亡	
DLinAP /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	+6.9	+4.7	-7.5	死亡	NC	NC	4	死亡	
DLinMPZ /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	+2.3	+4.0	-0.7	-14.7	NC	NC	3	183	25 mg/kgにおいて病気
DODMA /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	+3.8	-0.7	-12.8	-10.3	NC	NC	159	384	25mg/kgにおける1つの死亡例 (n=3)
DLin-K-DMA /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	+2.9	+1.4	-10.4	-9.1	NC	NC	192	200	25mg/kgにおいて病気. 25mg/kg における3つの死亡例(n=12)
DLin-C-DAP /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	+6.2	+7.1	+1.4	-9.0	NC	NC	3	562	25 mg/kgにおいて病気
DLinDMA /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	+4.2	+2.9	-10.2	-8.6	NC	NC	209	587	高用量は18.75である 複数の死亡例≥18.75
DLin-S-DMA /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	+5.2	+4.9	+2.2	-8.5	NC	NC	2	68	
DLin-EG-DMA /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	+2.9	+2.5	+0.2	-4.6	NC	NC	2	100	
DLin-2-DMAP /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	+2.0	+3.7	+3.0	+6.5	NC	NC	NC	NC	
DLinMA /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	+2.6	+1.9	+2.1	+1.2	NC	NC	NC	2	
DLinTAP /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	+2.3	+0.2	+3.1	+0.9	NC	NC	NC	NC	
DOTAP /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	+2.9	+4.4	+2.3	+0.7	NC	NC	NC	NC	高用量は17.5である
DLinDAC /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	+9.0	+4.3	+6.0	+0.5	NC	NC	NC	NC	
DLinDAP /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	ND	+5.4	-1.0	+0.4	ND	ND	NC	2	

¹ 未処置コントロール動物に対するALTの増加。NC=変化なし; ND=行わず。

【 0 3 4 6 】

10

20

30

40

【表 8】

表8:脂質粒子処方物の治療指数(TI)の比較

脂質組成物	ED50 (mg/kg)	MTD (mg/kg)	TI
DLinDAP /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	~15	>60	>4.0
DLinDMA /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	~1.0	12.5	12.5
DLin-K-DMA /DSPC/Chol/PEG-S-DMG	~0.1	15	150

TI=MTD/ED50; ED50 = 50%FVIIノックダウンを達成する最低用量

10

実施例 2 5

P E G - C - D O M G を含むリポソーマル S I R N A 処方物の耐容性の増強

陽イオン性脂質および P E G - 脂質の様々な組み合わせを含むリポソーマル処方物の活性および耐容性を試験した。P E G - S - D M G、P E G - c - D O M G または P E G - D M A (P E G - c - D M A と称される) とともに D L i n - D M A または D L i n - K - D M A を含むリポソーマル処方物を、実施例 2 0 および 2 1 に記載されたように調製し、評価した。評価された特定の処方物の組成および特徴を表 9 に要約する。

【 0 3 4 7 】

【表 9】

表9. リポソーマル処方物

DP-0342 要約 (DlinDMA, PEG-s-DMG, PEG-c-DOMG, PEG-c-DMA)							
サンプル	粒径 (nm)	総脂質 (mg/mL)	脂質比	総 siRNA (mg/mL)	遊離 siRNA (mg/mL)	% 遊離 siRNA	siRNA : 脂質 (被包 siRNA)
最終 A (PEG-s-DMG)	67.5	117.05	39.0 : 10.4 : 41.1 : 9.6	5.902	0.029	0.5	0.050
最終 B (PEG-c-DOMG)	70.4	80.72	38.0 : 10.7 : 41.2 : 10.1	4.022	0.138	3.4	0.048
最終 C (PEG-c-DMA)	72.5	84.90	39.7 : 10.4 : 40.2 : 9.6	4.507	0.134	3.0	0.052
DP-0343 要約 (Dlin-K-DMA, PEG-s-DMG, PEG-c-DOMG, PEG-c-DMA)							
サンプル	粒径 (nm)	総脂質 (mg/mL)	脂質比	総 siRNA (mg/mL)	遊離 siRNA (mg/mL)	% 遊離 siRNA	siRNA : 脂質 (被包 siRNA)
最終 A (PEG-s-DMG)	65.0	72.32	39.8 : 10.5 : 39.9 : 9.8	5.944	0.103	1.7	0.081
最終 B (PEG-c-DMA)	62.0	72.26	39.7 : 10.4 : 40.2 : 9.8	4.656	0.069	1.5	0.063
最終 C (PEG-c-DOMG)	61.0	168.58	40.0 : 10.5 : 39.8 : 9.7	10.143	0.028	0.3	0.060

これらの様々な処方物が F V I I レベルを低下させる能力およびそれらの耐容性を、実施例 2 1 に記載されたように調べた。

10

20

30

40

50

【0348】

図4に示されるように、試験されたPEG-脂質のいずれかとともに陽イオン性脂質DLin-DMAを含む処方物は、FVIIにおいて同様の用量依存的減少をもたらした。詳細には、DLin-DMAを含む処方物は、試験された3つすべてのPEG-脂質に対してほぼ等しいED50を有した。

【0349】

対照的に、図5に示されるように、DLin-K-DMAを含む処方物は、PEG-C-DOMGとともにより高い活性、およびPEG-S-DMGまたはPEG-DMA(PEG-C-DMA)とともにより低い活性を示した。

【0350】

しかしながら、様々な処方物の毒性に劇的な違いが観察された。図6に示されるように。DLin-K-DMAを含む処方物は、以下の毒性のランク順で、等価なDLin-DMA処方物よりも毒性が低かった：

DMA処方物：PEG-S-DMG >> PEG-C-DMA > PEG-C-DOMG

KDMA処方物：PEG-S-DMG >> PEG-C-DMA = PEG-C-DOMG
。さらに比較すると、PEG-C-DOMGを含むDLin-K-DMA処方物は、図7Aおよび7Bに示されるように、PEG-S-DMGを含むDLin-K-DMA処方物よりも有意に高い耐容性を示した。

【0351】

上に記載された様々な実施形態は、さらなる実施形態を提供するために組み合わせ得る。本明細書において言及された、および/またはApplication Data Sheet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刊行物のすべてが、本明細書中でそれらの全体が参考として援用される。実施形態の局面は、なおもさらなる実施形態を提供するために、必要であれば様々な特許、出願および公報の概念を使用するために改変され得る。

【0352】

上記の詳細な説明に鑑みて、これらの変更および他の変更が、実施形態に対してなされ得る。通常、以下の請求項において、使用される用語は、本明細書および請求項に開示される特定の実施形態に請求項を限定すると解釈されるべきでなく、そのような請求項が権利を与える等価物の全範囲とともにすべてのあり得る実施形態を含むと解釈されるべきである。したがって、請求項は、本開示によって限定されない。

10

20

30

【図 1】

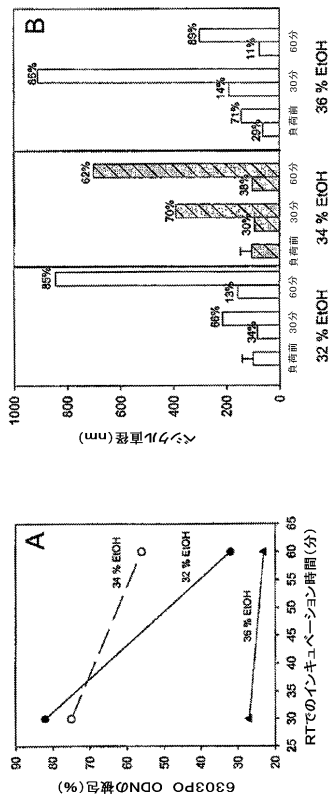


FIG. 1

【図 2】

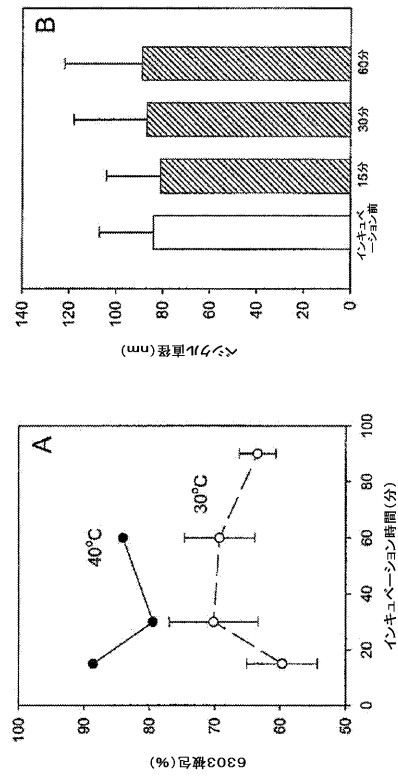


FIG. 2

【図 3】

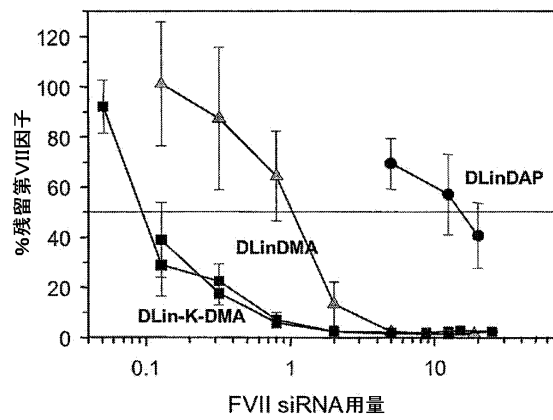


FIG. 3

【図 4】

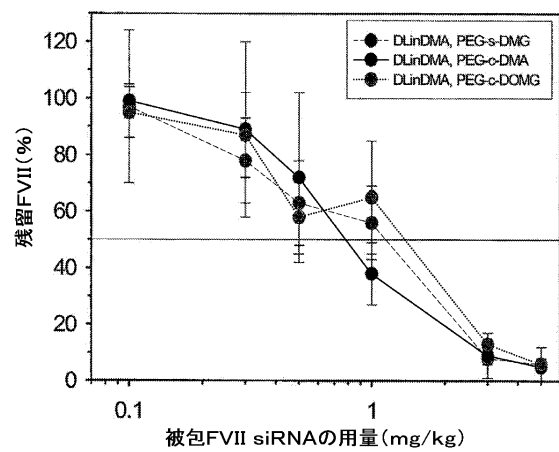


FIG. 4

【図5】

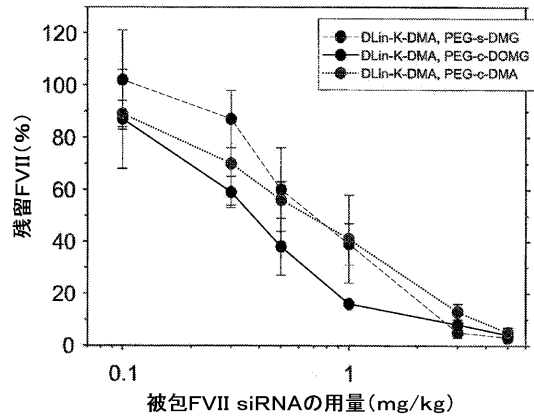


FIG. 5

【図6】

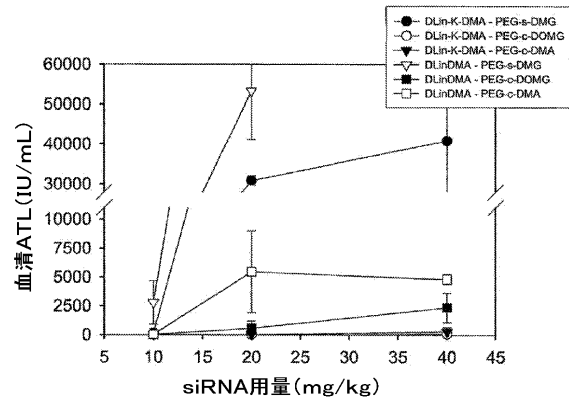


FIG. 6

【図7】

ALT (24時間)

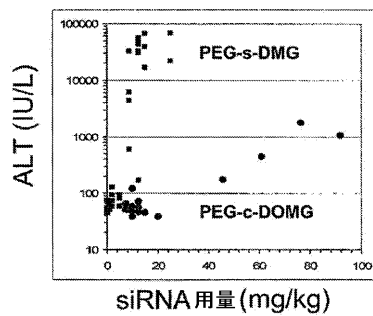


FIG. 7A

体重の変化 (24時間)

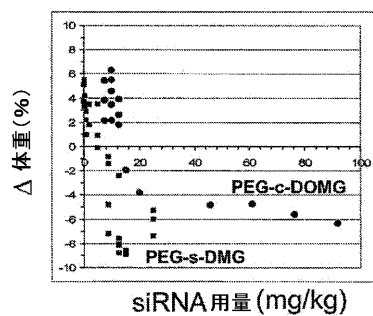


FIG. 7B

【配列表】

0005749494000001.app

0005749494000002.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 33/00	(2006.01)	A 6 1 P 33/00	
C 0 7 D 295/08	(2006.01)	C 0 7 D 295/08	Z
		C 0 7 D 295/08	A

(31)優先権主張番号 61/039,748

(32)優先日 平成20年3月26日(2008.3.26)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/049,568

(32)優先日 平成20年5月1日(2008.5.1)

(33)優先権主張国 米国(US)

(73)特許権者 509192318

アルニラム ファーマシューティカルズ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ サード ストリート 300 第3 フロア

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ホープ, マイケル ジェイ.

カナダ国 ブイ6アール 2ケー2 ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウェスト
11ティーエイチ アベニュー 3550

(72)発明者 センプル, ショーン シー.

カナダ国 ブイ4イー 3エル5 ブリティッシュ コロンビア, デルタ, マグノリア コー
ト 10836

(72)発明者 チェン, チャンシン

カナダ国 ブイ6エス 1ビー7 ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウェスト
18ティーエイチ アベニュー 3948

(72)発明者 マデン, トーマス ディー.

カナダ国 ブイ6エル 2エー1 ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウェスト
31エスティー アベニュー 2714

(72)発明者 ムイ, バーバラ

カナダ国 ブイ5ティー 2ジー3 ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, イースト
11ティーエイチ アベニュー 1158

(72)発明者 カリス, ビーター アール.

カナダ国 ブイ6アール 1エイチ4 ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウェス
ト 1エスティー アベニュー 3732

(72)発明者 シウフォリーニ, マルコ エー.

カナダ国 ブイ6ティー 1ゼット1 ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, メイン
モール 2036

(72)発明者 ワン, キム エフ.

カナダ国 ブイ6アール 2ブイ5 ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウェスト

13 ティーエイチ アベニュー 4595

(72)発明者 マノハラン, マティアー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02493, ウェストン, ローリング レーン 19

(72)発明者 カランソッタティル, ラジーブ ジー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01778, ウェイランド, ディーン ロード 25

(72)発明者 マスナ, スリニバサル

カナダ国 ブイ5ダブリュー 3イー7 プリティッシュ コロンビア, パンクーバー, プリ
ンス アルバート ストリート 6495

審査官 小出 直也

(56)参考文献 特開2004-003808(JP, A)

特表2007-527930(JP, A)

特表2008-501730(JP, A)

特表2011-507534(JP, A)

国際公開第2005/121348(WO, A1)

国際公開第94/019314(WO, A1)

Journal of Colloid and Interface Science, 1995年 7月 1日, 173(1), pp49-54

David A. Jaegerら, Journal of the American Chemical Society, 1989年, 111(8), p3001-3006

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D 201/00-521/00

CAplus/REGISTRY(STN)