

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5475643号
(P5475643)

(45) 発行日 平成26年4月16日(2014. 4. 16)

(24) 登録日 平成26年2月14日(2014. 2. 14)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 C 279/14 (2006. 01)

C O 7 C 279/14 C S P

C O 7 D 213/56 (2006. 01)

C O 7 D 213/56 Z N A

C O 7 D 233/64 (2006. 01)

C O 7 D 233/64

A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 31/7105 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7105

請求項の数 36 (全 138 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-506690 (P2010-506690)
 (86) (22) 出願日 平成20年5月2日(2008. 5. 2)
 (65) 公表番号 特表2010-528985 (P2010-528985A)
 (43) 公表日 平成22年8月26日(2010. 8. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/062526
 (87) 国際公開番号 W02008/137758
 (87) 国際公開日 平成20年11月13日(2008. 11. 13)
 審査請求日 平成23年4月20日(2011. 4. 20)
 (31) 優先権主張番号 60/916, 131
 (32) 優先日 平成19年5月4日(2007. 5. 4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/947, 282
 (32) 優先日 平成19年6月29日(2007. 6. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 507328184
 マリーナ バイオテック, インコーポレイ
 テッド
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9802
 1-7266, ボセル, モンテ ヴィラ
 パークウェイ 3830
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100156122
 弁理士 佐藤 剛

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミノ酸脂質およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I に示される構造を含む化合物:



式 I

およびその塩であって、ここで

Xaa は、式 $-NR^N - CR^1R^2 - (C=O) -$ を有する D-アミノ酸残基もしくは L-アミノ酸残基であって、そのアミノ酸はノルアルギニン、ピリジルアラニン又はそれらの N-メチル化バージョンであり、

R¹ は、前記アミノ酸の置換されているかもしくは置換されていない塩基性側鎖であり

;

R² は、水素であり;R^N は、水素であり;

R³ は独立して、置換されているかもしくは置換されていない C (6-22) アルキルもしくは C (6-22) アルケニルであり;

R⁴ は独立して、置換されているかもしくは置換されていない C (6-22) アルキルもしくは C (6-22) アルケニルであり;

Z は、NH、O、もしくは水素、炭素、酸素、窒素、および硫黄原子から選択される 1~40 個の原子からなる有機性リンカーである、化合物。

【請求項 2】

Xaa は、下記式:

Chemical structures of 2,6-diaminocaproic acid and 2,6-diaminocaproic acid hydrochloride.

The image displays two chemical structures side-by-side. The structure on the left is 2,2-dimethyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4(1H)-one, which features a six-membered ring with two methyl groups on the nitrogen at position 1, a carbonyl group at position 4, and a double bond between positions 2 and 3. The structure on the right is 2,2-dimethyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4(1H)-one, which is identical to the one on the left.

The image shows two chemical structures. The left structure is 1,2,3,4-tetrahydro-1,2,4-triazine-5-carboxamide, which consists of a six-membered ring with two nitrogen atoms at positions 1 and 4, and a carboxamide group at position 5. The right structure is a derivative of the left one, where the nitrogen at position 1 is substituted with a methyl group, and the nitrogen at position 4 is substituted with a methylamino group (NHCH₃).

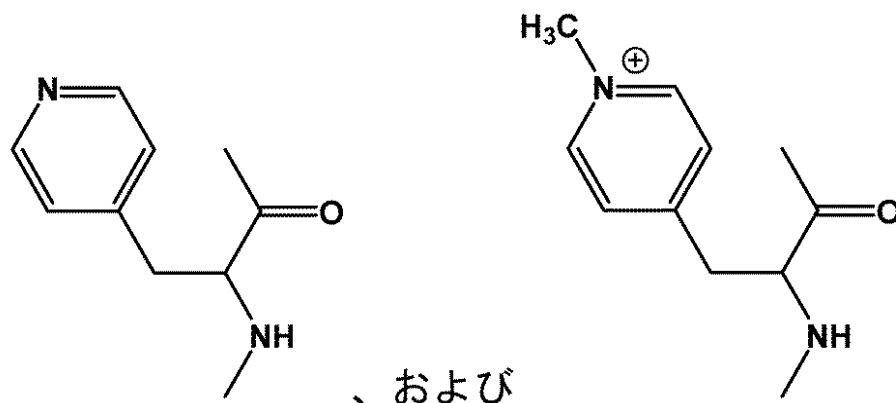
、および

50

【請求項 3】

X a a は、下記式：

【化 2】



10

のいずれか 1 に示される構造を有するアミノ酸残基である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

R³ および R⁴ は、C (6 - 22) アルキルであり、かつ同じであるかもしくは異なっている、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

R³ および R⁴ は、C (6 - 22) アルケニルであり、かつ同じであるかもしくは異なっている、請求項 1 に記載の化合物。

20

【請求項 6】

R³ は C (6 - 22) アルキルであり、R⁴ は C (6 - 22) アルケニルである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 7】

R⁴ は、C (6 - 22) アルキルであり、R³ は、C (6 - 22) アルケニルである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 8】

Z は NH である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 9】

Z は O である、請求項 1 に記載の化合物。

30

【請求項 10】

X a a は、5 ~ 7.5 の pK a を有する官能基を含む側鎖を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の化合物のマルチマーを含む化合物であって、ここで 2 つ以上の請求項 1 に記載の化合物が架橋されている、化合物。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の化合物の結合体を含む化合物であって、ここでペプチドは、前記ノルアルギニンまたはピリジルアラニンの側鎖に結合体化されている、化合物。

40

【請求項 13】

オリゴマーフレームワークもしくはポリマーフレームワークに結合した請求項 1 に記載の化合物を含む、化合物。

【請求項 14】

薬学的薬物化合物に結合した請求項 1 に記載の化合物を含む、化合物。

【請求項 15】

(C10 アシル) - nor Arg - NH - (C10 アルキル)、(C12 アシル) - nor Arg - NH - (C12 アルキル)、(C14 アシル) - nor Arg - NH - (C14 アルキル)、(C16 アシル) - nor Arg - NH - (C16 アルキル)、(C18 アシル) - nor Arg - NH - (C18 アルキル)、(C16 アシル) - nor Ar

50

g-NH-(C12アルキル)、(C18オレイック)-norArg-NH-(C12アルキル)、(C18オレイック)-norArg-NH-(C16アルキル)、(C18オレイック)-norArg-NH-(C18アルキル)、(C10アシル)-4-Pal-NH-(C10アルキル)、(C12アシル)-4-Pal-NH-(C12アルキル)、(C14アシル)-4-Pal-NH-(C14アルキル)、(C16アシル)-4-Pal-NH-(C16アルキル)、(C18アシル)-4-Pal-NH-(C18アルキル)、(C18オレイック)-4-Pal-NH-(C16アルキル)、(C10アシル)-4-Pal(Me)-NH-(C10アルキル)、(C12アシル)-4-Pal(Me)-NH-(C12アルキル)、(C14アシル)-4-Pal(Me)-NH-(C14アルキル)、(C16アシル)-4-Pal(Me)-NH-(C16アルキル)、および(C18アシル)-4-Pal(Me)-NH-(C18アルキル)から選択される、請求項1に記載の化合物。

10

【請求項16】

(C12アルキル)-(C=O)-norArg-NH-(C12アルキル)である、化合物N-(4-グアニジノ-1-オキソ-1-(ドデシルアミノ)ブタン-2-イル)ドデカンアミド。

【請求項17】

C18(オレイック)-norArg-NH-(C16アルキル)である化合物N-(4-グアニジノ-1-オキソ-1-(ヘキサデシルアミノ)ブタン-2-イル)オクタデカー9-エナミド。

20

【請求項18】

請求項1～17のいずれか1項に従う1個以上の化合物および1つ以上の治療核酸を含む、組成物。

【請求項19】

前記治療核酸は、遺伝子抑制剤である、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

前記治療核酸は、RNAi誘導剤である、請求項18に記載の組成物。

【請求項21】

前記治療核酸は、二本鎖RNAである、請求項18に記載の組成物。

【請求項22】

前記治療核酸はmdRNAである、請求項18に記載の組成物。

30

【請求項23】

前記治療核酸は、改変ヌクレオシドを含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項24】

1種以上の非カチオン性脂質もしくはステロールをさらに含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項25】

コレステリルヘミスクシネートをさらに含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項26】

1種以上のカチオン性脂質をさらに含む、請求項18に記載の組成物。

40

【請求項27】

1種以上のpeg化脂質もしくはpeg化ステロールをさらに含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項28】

前記核酸は、複合体を形成する、請求項18に記載の組成物。

【請求項29】

前記組成物は、リポソームを含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項30】

前記組成物は、エマルジョンである、請求項18に記載の組成物。

【請求項31】

50

前記組成物は、ミセル分散物である、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

請求項 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の 1 種以上の化合物、および 1 種以上の薬物因子もしくは生物学的に活性な薬剤を含む、薬学的組成物。

【請求項 3 3】

治療核酸を細胞に送達するための組成物であって、該組成物は、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の化合物を 1 種以上の治療核酸とともに含む、組成物。

【請求項 3 4】

細胞における遺伝子の発現を阻害するための組成物であって、該組成物は、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の化合物を 1 種以上の核酸とともに含む、組成物。

10

【請求項 3 5】

関節リウマチ、肝臓疾患、脳炎、骨折、心疾患、肝炎およびインフルエンザを含むウイルス疾患、敗血症、ならびに癌を含む疾患を処置するための医薬の調製における、組成物の使用であって、該組成物は、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の化合物を 1 種以上の治療核酸とともに含む、使用。

【請求項 3 6】

関節リウマチ、肝臓疾患、脳炎、骨折、心疾患、肝炎およびインフルエンザを含むウイルス疾患、敗血症、ならびに癌から選択される疾患を処置するための組成物であって、該組成物は、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の化合物を 1 種以上の治療核酸とともに含む、組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(発明の分野)

本発明は、種々の分子を細胞に送達するために有用な脂質を含む、新規な薬物送達増強剤に関する。本発明は、ある範囲の化合物、組成物、処方物、最終的には薬物送達に指向されるこのような薬剤の方法および使用、治療、ならびに疾患および状態（被験体における遺伝子発現もしくは遺伝子活性の調節に応答するものを含む）の診断および処置を提供する。より具体的には、本発明は、化合物、リポソーム、ラメラ小胞、エマルジョン、ミセル、懸濁物、粒子、溶液ならびに薬物増強組成物および処方物の他の形態、ならびに治療方法およびこれら送達物質のための使用に関する。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

(背景)

被験体への治療化合物の送達は、上記化合物が標的細胞もしくは標的組織に達する能力が制限されていること、または細胞内への上記化合物の侵入もしくは行き来（t r a f f i c k i n g）の制限によって、妨げられ得る。治療物質の送達は、細胞の膜によって一般に制限されている。送達に対するこれらの障壁および制限は、結果を達成するために所望されるより遙かに高濃度の化合物を使用する必要性を生じ得、このことは、毒性効果および副作用の危険性をもたらす。

40

【0 0 0 3】

送達のための 1 つの戦略は、脂質もしくはポリマーキャリア分子を使用して、細胞への化合物の輸送を改善することである。これら物質は、細胞への選択的侵入のために存在する機構を利用し得る一方で、核酸およびタンパク質のような外因性分子をなお排除し得る。例えば、カチオン性脂質は、薬物因子と相互作用し得、細胞膜との接触を提供し得る。脂質分子はまた、薬物因子のためのキャリアとしてのリポソームもしくは粒子へと組織化され得る。リポソーム薬物キャリアは、薬物分子が分解するのから保護し得ると同時に、細胞によるその取り込みを改善し得る。また、リポソーム薬物キャリアは、特定の化合物を、静電的相互作用および他の相互作用によって包み得るかもしくは結合し得、そして負に荷電した細胞膜と相互作用して、膜を横切って輸送し得る。

50

【0004】

調節性RNAの理解ならびにとりわけRNA干渉（RNAi）、RNAi治療、RNA薬物、アンチセンス治療、および遺伝子療法の開発は、活性核酸薬剤を細胞に導入する有効な手段の必要性を増大させた。一般に、核酸は、細胞もしくは血漿中で制限された時間にわたってのみ安定である。しかし、核酸ベースの薬剤は、細胞送達のために分散され得る組成物および処方物中で安定であり得る。

【0005】

本開示は、薬物および生物学的に活性な分子の全身送達および局所送達を改善するための化合物、組成物、方法および使用を提供する。とりわけ、本願は、生物学的に活性な分子の送達の効率を増す送達構造物およびキャリアを作製および使用するための新規な化合物および組成物を提供する。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

(要旨)

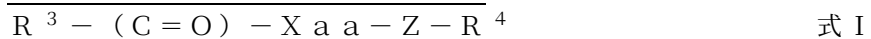
本開示は、最終的には治療剤として使用するための薬物因子の細胞内送達およびインビボ送達のための、新規な化合物、組成物および処方物を提供する。本開示の化合物および組成物は、疾患状態もしくは表現型を変化させるために、選択された細胞、組織、器官もしくは区画への薬物因子の送達のために有用である。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

20

(項目1)

式Iに示される構造を含む化合物：



およびその塩であって、ここで

Xaaは、式- $NR^N - CR^1R^2 - (C=O) -$ を有する任意のD-アミノ酸残基もしくはL-アミノ酸残基、または式- $\{NR^N - CR^1R^2 - (C=O)\}_n -$ を有する $n = 2 \sim 20$ のアミノ酸残基のペプチドであり、ここで

R^1 は、独立して、各存在について、非水素、アミノ酸の、置換されたかもしくは置換されていない側鎖であり；

R^2 は独立して、各存在について、水素、または炭素、酸素、窒素、硫黄、および水素原子からなりかつ1～20個の炭素原子を有する有機基、またはC(1-5)アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、C(3-5)アルケニル、C(3-5)アルキニル、C(1-5)アルカノイル、C(1-5)アルカノイルオキシ、C(1-5)アルコキシ、C(1-5)アルコキシ-C(1-5)アルキル、C(1-5)アルコキシ-C(1-5)アルコキシ、C(1-5)アルキル-アミノ-C(1-5)アルキル、C(1-5)ジアルキル-アミノ-C(1-5)アルキル、ニトロ-C(1-5)アルキル、シアノ-C(1-5)アルキル、アリール-C(1-5)アルキル、4-ピフェニル-C(1-5)アルキル、カルボキシル、もしくはヒドロキシルであり、

30

R^N は独立して、各存在について、水素、または炭素、酸素、窒素、硫黄、および水素原子からなりかつ1～20個の炭素原子を有する有機基、またはC(1-5)アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、C(3-5)アルケニル、C(3-5)アルキニル、C(1-5)アルカノイル、C(1-5)アルカノイルオキシ、C(1-5)アルコキシ、C(1-5)アルコキシ-C(1-5)アルキル、C(1-5)アルコキシ-C(1-5)アルコキシ、C(1-5)アルキル-アミノ-C(1-5)アルキル、C(1-5)ジアルキル-アミノ-C(1-5)アルキル、ニトロ-C(1-5)アルキル、シアノ-C(1-5)アルキル、アリール-C(1-5)アルキル、4-ピフェニル-C(1-5)アルキル、カルボキシル、もしくはヒドロキシルであり、

40

R^3 は独立して、天然に存在するかもしくは合成の脂質、リン脂質、糖脂質、トリアシルグリセロール、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、セラミド、スフィンゴミエリン、セレブロシド、もしくはガングリオシドに由来する親油性テイルであり、ここで該テイル

50

は、ステロイド；または置換されているかもしくは置換されていないC（3－22）アルキル、C（6－12）シクロアルキル、C（6－12）シクロアルキル－C（3－22）アルキル、C（3－22）アルケニル、C（3－22）アルキニル、C（3－22）アルコキシ、もしくはC（6－12）アルコキシ－C（3－22）アルキルを含み得；

R⁴は独立して、天然に存在するかもしくは合成の脂質、リン脂質、糖脂質、トリアシルグリセロール、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、セラミド、スフィンゴミエリン、セレブロシド、もしくはガングリオシドに由来する親油性テイルであり、ここで該テイルは、ステロイド；または置換されているかもしくは置換されていないC（3－22）アルキル、C（6－12）シクロアルキル、C（6－12）シクロアルキル－C（3－22）アルキル、C（3－22）アルケニル、C（3－22）アルキニル、C（3－22）アルコキシ、もしくはC（6－12）アルコキシ－C（3－22）アルキルを含み得；

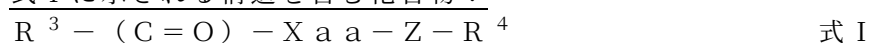
10

ここでR³およびR⁴のうちのいずれか一方は、上記のような親油性テイルであり、他方は、アミノ酸末端基であるか、またはR³およびR⁴の両方が親油性テイルであり；該アミノ酸末端基は、水素、ヒドロキシル、アミノ、もしくは有機保護基であり；

Zは、NH、O、S、－CH₂S－、－CH₂S（O）－、または水素、炭素、酸素、窒素、および硫黄原子から選択される1～40個の原子からなる有機性リンカーである、化合物。

（項目2）

式Iに示される構造を含む化合物：



20

およびその塩であって、ここで

Xaaは、式－NR^N－CR¹R²－（C＝O）－を有するD－アミノ酸残基もしくはL－アミノ酸残基であり、ここで

R¹は、アミノ酸の、置換されているかもしくは置換されていない塩基性側鎖であり；

R²は、水素、もしくはC（1－5）アルキルであり、

R^Nは、水素、もしくはC（1－5）アルキルであり、

R³は独立して、置換されているかもしくは置換されていないC（6－22）アルキルもしくはC（6－22）アルケニルであり；

R⁴は独立して、置換されているかもしくは置換されていないC（6－22）アルキルもしくはC（6－22）アルケニルであり；

30

Zは、NH、O、もしくは水素、炭素、酸素、窒素、および硫黄原子から選択される1～40個の原子からなる有機性リンカーである、化合物。

（項目3）

Xaaは、アルギニン、ホモアルギニン、ノルアルギニン、ノルーノルアルギニン、オルニチン、リジン、ホモリジン、ヒスチジン、1－メチルヒスチジン、ピリジルアラニン、アスパラギン、N－エチルアスパラギン、グルタミン、4－アミノフェニルアラニン、これらのN－メチル化バージョン、およびこれらの側鎖改変誘導体から選択される、項目2に記載の化合物。

40

（項目4）

Xaaは、アルギニン、そのN－メチル化バージョン、もしくはその側鎖改変誘導体である、項目2に記載の化合物。

（項目5）

Xaaは、ノルアルギニン、そのN－メチル化バージョン、もしくはその側鎖改変誘導体である、項目2に記載の化合物。

（項目6）

Xaaは、リジン、そのN－メチル化バージョン、もしくはその側鎖改変誘導体である、項目2に記載の化合物。

（項目7）

50

X a aは、ヒスチジン、そのN-メチル化バージョン、もしくはその側鎖改変誘導体である、項目2に記載の化合物。

(項目8)

X a aは、ピリジルアラニン、そのN-メチル化バージョン、もしくはその側鎖改変誘導体である、項目2に記載の化合物。

(項目9)

X a aはシステインもしくはセリンである、項目2に記載の化合物。

(項目10)

R²は水素である、項目2に記載の化合物。

(項目11)

R^Nは水素である、項目2に記載の化合物。

(項目12)

R³およびR⁴は、C(6-22)アルキルであり、かつ同じであるかもしくは異なっている、項目2に記載の化合物。

(項目13)

R³およびR⁴は、C(6-22)アルケニルであり、かつ同じであるかもしくは異なっている、項目2に記載の化合物。

(項目14)

R³はC(6-22)アルキルであり、R⁴はC(6-22)アルケニルである、項目2に記載の化合物。

(項目15)

R⁴は、C(6-22)アルキルであり、R³は、C(6-22)アルケニルである、項目2に記載の化合物。

(項目16)

ZはNHである、項目2に記載の化合物。

(項目17)

ZはOである、項目2に記載の化合物。

(項目18)

X a aは、2~20個のアミノ酸残基のペプチドである、項目2に記載の化合物。

(項目19)

X a aは、5~7.5のpK_aを有する官能基を含む側鎖を有する、項目2に記載の化合物。

(項目20)

X a aは、3, 5-ジヨードチロシン、1-メチルヒスチジン、2-メチル酪酸、2-
o-アニシルプロパン酸、meso-酒石酸、4, 6-ジメチルピリミジンアミンp-フ
タル酸、クレアチニン、酪酸、N, N-ジメチルー1-ナフチルアミン、ペンタン酸、4
-メチルペンタン酸、N-メチルアニリン、1, 10-フェナントロリン、3-ピリジン
カルボン酸、ヘキサン酸、プロパン酸、4-アミノ安息香酸、2-メチルプロパン酸、ヘ
プタン酸、オクタン酸、シクロヘキサンカルボン酸、キノリン、3-キノリンアミン、2
-アミノ安息香酸、4-ピリジンカルボン酸、ノナン酸、メラミン、8-キノリノール、
トリメチル酢酸、6-メトキシキノリン、4-(メチルアミノ)安息香酸、p-メチルア
ニリン、3-(メチルアミノ)安息香酸、リンゴ酸、N-エチルアニリン、2-ベンジル
ピリジン、3, 6-ジニトロフェノール、N, N-ジメチルアニリン、2, 5-ジメチル
ピペラジン、p-フェネチジン、5-メチルキノリン、2-フェニルベンゾイミダゾール
、ピリジン、ピコリン酸、3, 5-ジヨードチロシン、p-アニシジン、2-(メチルア
ミノ)安息香酸、2-チアゾールアミン、グルタル酸、アジピン酸、イソキノリン、イタ
コン酸、o-フタル酸、ベンゾイミダゾール、ピペラジン、ヘプタン二酸、アクリジン、
フェナントリジン、コハク酸、メチルコハク酸、4-メチルキノリン、3-メチルピリジ
ン、7-イソキノリノール、マロン酸、メチルマロン酸、2-メチルキノリン、2-エチ
ルピリジン、2-メチルピリジン、4-メチルピリジン、ヒスタミン、ヒスチジン、マレ

10

20

30

40

50

イン酸、c i s - 1 , 2 - シクロヘキサンジアミン、 3 , 5 - ジメチルピリジン、 2 - エチルベンゾイミダゾール、 2 - メチルベンゾイミダゾール、 カコジル酸、 ペリミジン、 クエン酸、 イソクエン酸、 2 , 5 - ジメチルピリジン、 パパベリン、 6 - ヒドロキシ - 4 - メチルプテリジン、 L - チロキシン、 3 , 4 - ジメチルピリジン、 メトキシピリジン、 t r a n s - 1 , 2 - シクロヘキサンジアミン、 2 , 5 - ピリジンジアミン、 1 - 1 - メチルヒスチジン、 1 - 3 - メチルヒスチジン、 2 , 3 - ジメチルピリジン、 キサントプテリン、 1 , 2 - プロパンジアミン、 N , N - ジエチルアニリン、 アロキサン酸、 2 , 6 - ジメチルピリジン、 L - カルノシン、 2 - ピリジンアミン、 N - b - アラニルヒスチジン、 ピロカルピン、 1 - メチルイミダゾール、 1 H - イミダゾール、 2 , 4 - ジメチルピリジン、 4 - ニトロフェノール、 2 - ニトロフェノール、 チロシンアミド、 5 - ヒドロキシキナゾリン、 1 , 1 - シクロプロパンジカルボン酸、 2 , 4 , 6 - トリメチルピリジン、 ペロナール、 2 , 3 - ジクロロフェノール、 1 , 2 - エタンジアミン、 1 - イソキノリンアミン、 およびこれらの組み合わせから選択される放出官能基を含む側鎖を有する、項目 2 に記載の化合物。

10

(項目 2 1)

項目 1 に記載の化合物のマルチマーを含む化合物であって、ここで 2 つ以上の項目 1 に記載の化合物が架橋されている、化合物。

(項目 2 2)

項目 1 に記載の化合物の結合体を含む化合物であって、ここでペプチドは、前記アミノ酸残基の側鎖に結合体化されている、化合物。

20

(項目 2 3)

オリゴマーフレームワークもしくはポリマーフレームワークに結合した項目 1 に記載の化合物を含む、化合物。

(項目 2 4)

薬学的薬物化合物に結合した項目 1 に記載の化合物を含む、化合物。

(項目 2 5)

(C 1 0 アシル) - A r g - N H - (C 1 0 アルキル) 、 (C 1 2 アシル) - A r g - N H - (C 1 2 アルキル) 、 (C 1 4 アシル) - A r g - N H - (C 1 4 アルキル) 、 (C 1 6 アシル) - A r g - N H - (C 1 6 アルキル) 、 (C 1 8 アシル) - A r g - N H - (C 1 8 アルキル) 、 (C 1 2 アシル) - A r g - N H - (C 1 4 アルキル) 、 (C 1 8 オレイック) - A r g - N H - (C 1 6 アルキル) 、 (C 1 0 アシル) - ホモ A r g - N H - (C 1 0 アルキル) 、 (C 1 2 アシル) - ホモ A r g - N H - (C 1 2 アルキル) 、 (C 1 4 アシル) - ホモ A r g - N H - (C 1 4 アルキル) 、 (C 1 6 アシル) - ホモ A r g - N H - (C 1 6 アルキル) 、 (C 1 8 アシル) - ホモ A r g - N H - (C 1 8 アルキル) 、 (C 1 0 アシル) - n o r A r g - N H - (C 1 0 アルキル) 、 (C 1 2 アシル) - n o r A r g - N H - (C 1 2 アルキル) 、 (C 1 4 アシル) - n o r A r g - N H - (C 1 4 アルキル) 、 (C 1 6 アシル) - n o r A r g - N H - (C 1 6 アルキル) 、 (C 1 8 アシル) - n o r A r g - N H - (C 1 8 アルキル) 、 (C 1 6 アシル) - n o r A r g - N H - (C 1 2 アルキル) 、 (C 1 8 オレイック) - n o r A r g - N H - (C 1 2 アルキル) 、 (C 1 8 オレイック) - n o r A r g - N H - (C 1 6 アルキル) 、 (C 1 8 オレイック) - n o r A r g - N H - (C 1 8 アルキル) 、 (C 1 0 アシル) - n o r n o r A r g - N H - (C 1 0 アルキル) 、 (C 1 2 アシル) - n o r n o r A r g - N H - (C 1 2 アルキル) 、 (C 1 4 アシル) - n o r n o r A r g - N H - (C 1 4 アルキル) 、 (C 1 6 アシル) - n o r n o r A r g - N H - (C 1 6 アルキル) 、 (C 1 8 アシル) - n o r n o r A r g - N H - (C 1 8 アルキル) 、 (C 1 0 アシル) - 4 - P a l - N H - (C 1 0 アルキル) 、 (C 1 2 アシル) - 4 - P a l - N H - (C 1 2 アルキル) 、 (C 1 4 アシル) - 4 - P a l - N H - (C 1 4 アルキル) 、 (C 1 6 アシル) - 4 - P a l - N H - (C 1 6 アルキル) 、 (C 1 8 アシル) - 4 - P a l - N H - (C 1 8 アルキル) 、 (C 1 8 オレイック) - 4 - P a l - N H - (C 1 6 アルキル) 、 (C 1 0 アシル) - 4 - P a l (M e) - N H - (C 1 0 アルキル) 、 (C 1 2 アシル

30

40

50

)-4-Pal(Me)-NH-(C12アルキル)、(C14アシル)-4-Pal(Me)-NH-(C14アルキル)、(C16アシル)-4-Pal(Me)-NH-(C16アルキル)、および(C18アシル)-4-Pal(Me)-NH-(C18アルキル)から選択される、項目1に記載の化合物。

(項目26)

C12-norArg-C12である、化合物N-(4-グアニジノ-1-オキソ-1-(ドデシルアミノ)ブタン-2-イル)ドデカンアミド。

(項目27)

C18(オレイック)-norArg-C16である化合物N-(4-グアニジノ-1-オキソ-1-(ヘキサデシルアミノ)ブタン-2-イル)オクタデカ-9-エナミド。

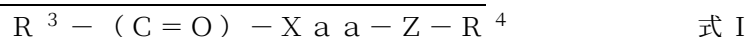
10

(項目28)

(C18オレイック)-(1-CH₃-His)-NH-(C16アルキル)である、化合物N-(3-(1-メチル-1H-イミダゾール-4-イル)-1-オキソ-1-(ヘキサデシルアミノ)プロパン-2-イル)オクタデカ-9-エナミド。

(項目29)

式Iに示される構造を含む化合物およびその塩：



であって、ここで

Xaaは、式-NR^N-CR¹R²-(C=O)-を有するD-アミノ酸もしくはL-アミノ酸残基であり、ここで

20

R¹は、置換されているかもしくは置換されていない、アミノ酸の塩基性側鎖であり；

R²は、水素、もしくはC(1-5)アルキルであり、

R^Nは、水素、もしくはC(1-5)アルキルであり、

R³は、独立して、置換されているかもしくは置換されていない、C(6-22)アルキルもしくはC(6-22)アルケニルであり；

R⁴は水素であり；

Zは、NH、O、もしくは水素、炭素、酸素、窒素、および硫黄原子から選択される1~40個の原子からなる有機性リンカーである；

化合物。

30

(項目30)

Xaa、アルギニン、ホモアルギニン、ノルアルギニン、ノル-ノルアルギニン、オルニチン、リジン、ホモリジン、ヒスチジン、1-メチルヒスチジン、ピリジルアラニン、アスパラギン、N-エチルアスパラギン、グルタミン、4-アミノフェニルアラニン、これらのN-メチル化バージョン、およびこれらの側鎖改変誘導体から選択される、項目29に記載の化合物。

(項目31)

Xaaは、アルギニン、そのN-メチル化バージョン、もしくはその側鎖改変誘導体である、項目29に記載の化合物。

(項目32)

Xaaは、ノルアルギニン、そのN-メチル化バージョン、もしくはその側鎖改変誘導体である、項目29に記載の化合物。

40

(項目33)

Xaaは、リジン、そのN-メチル化バージョン、もしくはその側鎖改変誘導体である、項目29に記載の化合物。

(項目34)

Xaaは、ヒスチジン、そのN-メチル化バージョン、もしくはその側鎖改変誘導体である、項目29に記載の化合物。

(項目35)

Xaaは、ピリジルアラニン、そのN-メチル化バージョン、もしくはその側鎖改変誘導

50

体である、項目 29 に記載の化合物。

(項目 36)

Xaa は、システインもしくはセリンである、項目 29 に記載の化合物。

(項目 37)

R² は水素である、項目 29 に記載の化合物。

(項目 38)

R^N は水素である、項目 29 に記載の化合物。

(項目 39)

R³ は、C (6-22) アルキルである、項目 29 に記載の化合物。

(項目 40)

R³ は、C (6-22) アルケニルである、項目 29 に記載の化合物。

(項目 41)

Z は NH である、項目 29 に記載の化合物。

(項目 42)

Z は O である、項目 29 に記載の化合物。

(項目 43)

Xaa は、2~20 アミノ酸残基のペプチドである、項目 29 に記載の化合物。

(項目 44)

Xaa は、5~7.5 の pKa を有する官能基を含む側鎖を有する、項目 29 に記載の化合物。

(項目 45)

Xaa は、3, 5-ジヨードチロシン、1-メチルヒスチジン、2-メチル酪酸、2-
o-アニシルプロパン酸、meso-酒石酸、4, 6-ジメチルピリミジンアミン p-
フタル酸、クレアチニン、酪酸、N, N-ジメチルー1-ナフチルアミン、ペンタン酸、
4-メチルペンタン酸、N-メチルアニリン、1, 10-フェナントロリン、3-ピリジ
ンカルボン酸、ヘキサ酸、プロパン酸、4-アミノ安息香酸、2-メチルプロパン酸、
ヘプタン酸、オクタン酸、シクロヘキサンカルボン酸、キノリン、3-キノリンアミン、
2-アミノ安息香酸、4-ピリジンカルボン酸、ノナン酸、メラミン、8-キノリノール
、トリメチル酢酸、6-メトキシキノリン、4-(メチルアミノ)安息香酸、p-メチル
アニリン、3-(メチルアミノ)安息香酸、リンゴ酸、N-エチルアニリン、2-ベンジ
ルピリジン、3, 6-ジニトロフェノール、N, N-ジメチルアニリン、2, 5-ジメチ
ルピペラジン、p-フェネチジン、5-メチルキノリン、2-フェニルベンゾイミダゾ
ール、ピリジン、ピコリン酸、3, 5-ジヨードチロシン、p-アニシジン、2-(メチル
アミノ)安息香酸、2-チアゾールアミン、グルタル酸、アジピン酸、イソキノリン、イ
タコン酸、o-フタル酸、ベンゾイミダゾール、ピペラジン、ヘプタン二酸、アクリジン
、フェナントリジン、コハク酸、メチルコハク酸、4-メチルキノリン、3-メチルピリ
ジン、7-イソキノリノール、マロン酸、メチルマロン酸、2-メチルキノリン、2-エ
チルピリジン、2-メチルピリジン、4-メチルピリジン、ヒスタミン、ヒスチジン、マ
レイン酸、cis-1, 2-シクロヘキサンジアミン、3, 5-ジメチルピリジン、2-
エチルベンゾイミダゾール、2-メチルベンゾイミダゾール、カコジル酸、ペリミジン、
クエン酸、イソクエン酸、2, 5-ジメチルピリジン、パパベリン、6-ヒドロキシ-4
-メチルプテリジン、L-チロキシン、3, 4-ジメチルピリジン、メトキシピリジン、
trans-1, 2-シクロヘキサンジアミン、2, 5-ピリジンジアミン、1-1-メ
チルヒスチジン、1-3-メチルヒスチジン、2, 3-ジメチルピリジン、キサントプテ
リン、1, 2-プロパンジアミン、N, N-ジエチルアニリン、アロキサン酸、2, 6-
ジメチルピリジン、L-カルノシン、2-ピリジンアミン、N-b-アラニルヒスチジン
、ピロカルピン、1-メチルイミダゾール、1H-イミダゾール、2, 4-ジメチルピリ
ジン、4-ニトロフェノール、2-ニトロフェノール、チロシンアミド、5-ヒドロキシ
キナゾリン、1, 1-シクロプロパンジカルボン酸、2, 4, 6-トリメチルピリジン、
ベロナール、2, 3-ジクロロフェノール、1, 2-エタンジアミン、1-イソキノリン

10

20

30

40

50

アミン、およびこれらの組み合わせから選択される放出官能基を含む塩基性側鎖を有する、項目 29 に記載の化合物。

(項目 46)

項目 29 に従う 2 つ以上の化合物が架橋されている、項目 29 に記載の化合物のマルチマーを含む化合物。

(項目 47)

ペプチドは、前記アミノ酸残基の側鎖に結合体化されている、項目 29 に記載の化合物の結合体を含む化合物。

(項目 48)

オリゴマー化合物フレームワークもしくはポリマーフレームワークに結合されている、項目 29 に記載の化合物を含む化合物。

(項目 49)

薬学的薬物化合物に結合された、項目 29 に記載の化合物を含む化合物。

(項目 50)

項目 1 ～ 49 のいずれか 1 項に従う 1 個以上のアミノ酸脂質および 1 つ以上の治療核酸を含む、組成物。

(項目 51)

前記治療核酸は、遺伝子抑制剤である、項目 50 に記載の組成物。

(項目 52)

前記治療核酸は、RNAi 誘導剤である、項目 50 に記載の組成物。

(項目 53)

前記治療核酸は、二本鎖 RNA である、項目 50 に記載の組成物。

(項目 54)

前記治療核酸は mRNA である、項目 50 に記載の組成物。

(項目 55)

前記治療核酸は、改変ヌクレオシドを含む、項目 50 に記載の組成物。

(項目 56)

1 種以上の非アミノ酸非カチオン性脂質もしくはステロールをさらに含む、項目 50 に記載の組成物。

(項目 57)

コレステリルヘミスクシネートをさらに含む、項目 50 に記載の組成物。

(項目 58)

1 種以上の非アミノ酸カチオン性脂質をさらに含む、項目 50 に記載の組成物。

(項目 59)

1 種以上の peg 化脂質もしくは peg 化ステロールをさらに含む、項目 50 に記載の組成物。

(項目 60)

前記核酸は、1 種以上のアミノ酸脂質と複合体を形成する、項目 50 に記載の組成物。

(項目 61)

前記組成物は、リポソームを含む、項目 50 に記載の組成物。

(項目 62)

前記組成物は、エマルジョンである、項目 50 に記載の組成物。

(項目 63)

前記組成物は、ミセル分散物である、項目 50 に記載の組成物。

(項目 64)

項目 1 ～ 49 のいずれか 1 項に記載の 1 種以上のアミノ酸脂質化合物、および 1 種以上の薬物因子もしくは生物学的に活性な薬剤を含む、薬学的組成物。

(項目 65)

治療核酸を細胞に送達するための方法であって、該方法は、項目 50 に記載の組成物を調製する工程、および細胞を該組成物で処理する工程を包含する、方法。

10

20

30

40

50

(項目 66)

細胞における遺伝子の発現を阻害するための方法であって、該方法は、項目 50 に記載の組成物を調製する工程、および細胞を該組成物で処理する工程を包含する、方法。

(項目 67)

哺乳動物における遺伝子の発現を阻害するための方法であって、該方法は、項目 50 に記載の組成物を調製する工程、および該哺乳動物に該組成物を投与する工程を包含する、方法。

(項目 68)

ヒトにおける疾患を処置するための方法であって、該疾患は、関節リウマチ、肝臓疾患、脳炎、骨折、心疾患、肝炎およびインフルエンザを含むウイルス疾患、敗血症、ならびに癌から選択され、該方法は、項目 50 に記載の組成物を調製する工程、および該組成物を該ヒトに投与する工程を包含する、方法。

10

(項目 69)

関節リウマチ、肝臓疾患、脳炎、骨折、心疾患、肝炎およびインフルエンザを含むウイルス疾患、敗血症、ならびに癌を含む疾患を処置するための医薬の製造における、項目 50 に記載の組成物の使用。

(項目 70)

関節リウマチ、肝臓疾患、脳炎、骨折、心疾患、肝炎およびインフルエンザを含むウイルス疾患、敗血症、ならびに癌から選択される疾患を処置するための、項目 50 に記載の組成物の使用。

20

【0007】

いくつかの局面において、本開示は、RNA 構造物を細胞に送達して、RNA 干渉、アンチセンス効果、もしくはゲノム発現の調節の応答を生じるための化合物、組成物および方法を提供する。

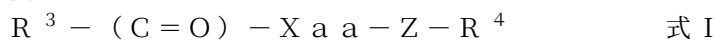
【0008】

本発明は、薬物因子の送達および投与、ならびに薬物送達系において使用するための親油性化合物である、ある範囲のアミノ酸脂質を提供する。本開示のアミノ酸脂質は、アミノ酸残基および 1 つ以上の親油性テイルを含む分子である。

【0009】

30

いくつかの局面において、本発明は、ある範囲の、式 I に示されるようなアミノ酸脂質化合物を提供する：



ここで

Xaa は、式 $-NR^N - CR^1R^2 - (C=O) -$ を有する任意の D-アミノ酸もしくは L-アミノ酸残基であるか、または式 $- \{NR^N - CR^1R^2 - (C=O)\}_n -$ を有する $n = 2 \sim 20$ アミノ酸残基のペプチドであり、

ここで

R^1 は独立して、各存在について、非水素、アミノ酸の、置換されているかもしくは置換されていない側鎖であり；

40

R^2 は独立して、各存在について、水素、または炭素、酸素、窒素、硫黄、および水素原子からなり、かつ 1 ～ 20 個の炭素原子を有する有機基、または C (1-5) アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、C (3-5) アルケニル、C (3-5) アルキニル、C (1-5) アルカノイル、C (1-5) アルカノイルオキシ、C (1-5) アルコキシ、C (1-5) アルコキシ-C (1-5) アルキル、C (1-5) アルコキシ-C (1-5) アルコキシ、C (1-5) アルキル-アミノ-C (1-5) アルキル、C (1-5) ジアルキル-アミノ-C (1-5) アルキル、ニトロ-C (1-5) アルキル、シアノ-C (1-5) アルキル、アリール-C (1-5) アルキル、4-ビフェニル-C (1-5) アルキル、カルボキシル、もしくはヒドロキシルであり、

R^N は独立して、各存在について、水素、または炭素、酸素、窒素、硫黄、および水

50

素原子からなり、かつ1～20個の炭素原子を有する有機基、またはC(1-5)アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、C(3-5)アルケニル、C(3-5)アルキニル、C(1-5)アルカノイル、C(1-5)アルカノイルオキシ、C(1-5)アルコキシ、C(1-5)アルコキシ-C(1-5)アルキル、C(1-5)アルコキシ-C(1-5)アルコキシ、C(1-5)アルキル-アミノ-C(1-5)アルキル、C(1-5)ジアルキル-アミノ-C(1-5)アルキル、ニトロ-C(1-5)アルキル、シアノ-C(1-5)アルキル、アリール-C(1-5)アルキル、4-ビフェニル-C(1-5)アルキル、カルボキシル、もしくはヒドロキシルであり、

R³は独立して、天然に存在するかもしれないもしくは合成の脂質、リン脂質、糖脂質、トリアシルグリセロール、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、セラミド、スフィンゴミエリン、セレブロシド、もしくはガングリオシドに由来する親油性テイルであり、ここで上記テイルは、ステロイド；または置換されているかもしれないもしくは置換されていないC(3-22)アルキル、C(6-12)シクロアルキル、C(6-12)シクロアルキル-C(3-22)アルキル、C(3-22)アルケニル、C(3-22)アルキニル、C(3-22)アルコキシ、もしくはC(6-12)アルコキシ-C(3-22)アルキルを含み得；

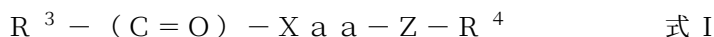
R⁴は、独立して、天然に存在するかもしれないもしくは合成の脂質、リン脂質、糖脂質、トリアシルグリセロール、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、セラミド、スフィンゴミエリン、セレブロシド、もしくはガングリオシドから由来する親油性テイルであり、ここで上記テイルは、ステロイド；または置換されているかもしれないもしくは置換されていないC(3-22)アルキル、C(6-12)シクロアルキル、C(6-12)シクロアルキル-C(3-22)アルキル、C(3-22)アルケニル、C(3-22)アルキニル、C(3-22)アルコキシ、もしくはC(6-12)アルコキシ-C(3-22)アルキルを含み得；

ここでR³およびR⁴のうちのいずれか一方は、上記で定義される親油性テイルであり、そして他方はアミノ酸末端基であるか、またはR³およびR⁴の両方が親油性テイルであり；上記アミノ酸末端基は、水素、ヒドロキシル、アミノ、もしくは有機保護基であり；

Zは、NH、O、S、-CH₂S-、-CH₂S(O)-、または水素、炭素、酸素、窒素、および硫黄原子から選択される1～40個の原子からなる有機性リンカーである。

【0010】

いくつかの点において、本発明は、ある範囲の式Iに示されるアミノ酸脂質化合物およびその塩を提供し：



ここで

Xaaは、式-NR^N-CR¹R²-(C=O)-を有するD-アミノ酸残基もしくはL-アミノ酸残基であり、

ここで

R¹は、アミノ酸の、置換されているかもしれないもしくは置換されていない塩基性側鎖であり；

R²は、水素、もしくはC(1-5)アルキルであり、

R^Nは、水素、もしくはC(1-5)アルキルであり、

R³は独立して、置換されているかもしれないもしくは置換されていないC(6-22)アルキルもしくはC(6-22)アルケニルであり；

R⁴は独立して、置換されているかもしれないもしくは置換されていないC(6-22)アルキルもしくはC(6-22)アルケニルであり；

Zは、NH、O、もしくは水素、炭素、酸素、窒素、および硫黄原子から選択される1～40個の原子からなる有機性リンカーである。

【0011】

いくつかの実施形態において、上記アミノ酸脂質化合物は、アルギニン、ホモアルギニ

ン、ノルアルギニン、ノルーノルアルギニン、オルニチン、リジン、ホモリジン、ヒスチジン、1-メチルヒスチジン、ピリジルアラニン、アスパラギン、N-エチルアスパラギン、グルタミン、4-アミノフェニルアラニン、これらのN-メチル化バージョン、およびこれらの側鎖改変誘導体から選択されるXaaを含み得る。いくつかの実施形態において、上記アミノ酸脂質化合物は、システインおよびセリンから選択されるXaaを含み得る。

【0012】

特定の実施形態において、R³およびR⁴は、C(6-22)アルキルであり得、そして同じであってもよいし、異なってもよい。いくつかの実施形態において、R³およびR⁴は、C(6-22)アルケニルであり得、そして同じであってもよいし、異なってもよい。

10

【0013】

特定の実施形態において、Xaaは、2~20アミノ酸残基のペプチドであり得る。

【0014】

いくつかの実施形態において、Xaaは、5~7.5のpKaを有する官能基を含む側鎖を有し得る。

【0015】

いくつかの局面において、上記アミノ酸脂質化合物は、架橋される上記アミノ酸脂質化合物の2つ以上のマルチマーであり得る。

【0016】

20

いくつかの実施形態において、上記アミノ酸脂質化合物は、上記アミノ酸残基の側鎖に結合体化されたペプチドを有する結合体であり得る。

【0017】

特定の実施形態において、上記アミノ酸脂質化合物は、オリゴマーフレームワークもしくはポリマーフレームワークに結合され得る。

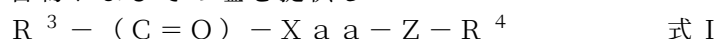
【0018】

いくつかの実施形態において、上記アミノ酸脂質化合物は、薬学的薬物化合物に結合され得る。

【0019】

いくつかの局面において、本発明は、ある範囲の式Iに示されるようなアミノ酸脂質化合物およびその塩を提供し：

30



ここで

Xaaは、式-NR^N-CR¹R²-(C=O)-を有するD-アミノ酸もしくはL-アミノ酸残基であり、

R¹は、アミノ酸の、置換されているかもしくは置換されていない塩基性側鎖であり；

R²は、水素、もしくはC(1-5)アルキルであり、

R^Nは、水素、もしくはC(1-5)アルキルであり、

R³は独立して、置換されているかもしくは置換されていないC(6-22)アルキルもしくはC(6-22)アルケニルであり；

40

R⁴は水素であり；

Zは、NH、O、もしくは水素、炭素、酸素、窒素、および硫黄原子から選択される1~40個の原子からなる有機性リンカーである。

【0020】

いくつかの点において、本開示は、1種以上のアミノ酸脂質化合物および1種以上の治療核酸を含む組成物を包含する。上記治療核酸は、遺伝子抑制剤、もしくはRNAi誘導剤、もしくは二本鎖RNA、もしくはmdRNAであり得るか、または改変ヌクレオシドを含み得る。

【0021】

50

いくつかの実施形態において、本開示は、1種以上のアミノ酸脂質化合物および1種以上のさらなる非アミノ酸脂質もしくはポリマー脂質を含む組成物を包含する。いくつかの実施形態において、上記組成物は、コレステリルヘミスクシネートを含み得る。

【0022】

いくつかの局面において、本開示は、1種以上のアミノ酸脂質化合物およびアミノ酸脂質と複合体を形成し得る1種以上の核酸を含む組成物を包含する。

【0023】

特定の実施形態において、本開示は、リポソームを形成する1種以上のアミノ酸脂質化合物を含む組成物を包含する。

【0024】

いくつかの局面において、本開示は、エマルジョンを形成する1種以上のアミノ酸脂質化合物を含む組成物を包含する。

【0025】

いくつかの実施形態において、本開示は、ミセル分散物を形成する1種以上のアミノ酸脂質化合物を含む組成物を包含する。

【0026】

特定の局面において、本開示は、1種以上のアミノ酸脂質化合物および1種以上の薬物因子もしくは生物学的に活性な薬剤を含む組成物を包含する。

【0027】

いくつかの局面において、本開示は、治療核酸を細胞に送達するための方法を包含し、上記方法は、1種以上のアミノ酸脂質化合物を含む組成物を調製する工程および細胞を上記組成物で処理する工程によるものである。

【0028】

いくつかの実施形態において、本開示は、細胞における遺伝子の発現を阻害するための方法を包含し、上記方法は、1種以上のアミノ酸脂質化合物を含む組成物を調製する工程および細胞を上記組成物で処理する工程を包含する。

【0029】

特定の局面において、本開示は、哺乳動物における遺伝子の発現を阻害するための方法を包含し、上記方法は、1種以上のアミノ酸脂質化合物を含む組成物を調製する工程および上記組成物を上記哺乳動物に投与する工程を包含する。

【0030】

いくつかの実施形態において、本開示は、ヒトにおける疾患を処置するための方法を包含し、上記疾患は、関節リウマチ、肝臓疾患、脳炎、骨折、心疾患、肝炎およびインフルエンザを含むウイルス疾患、ならびに癌から選択され、上記方法は、1種以上のアミノ酸脂質化合物を含む組成物を調製する工程および上記組成物を上記ヒトに投与する工程を包含する。

【0031】

いくつかの局面において、本開示は、関節リウマチ、肝臓疾患、脳炎、骨折、心疾患、肝炎およびインフルエンザを含むウイルス疾患、ならびに癌を含む疾患を処置するための医薬の製造における、1種以上のアミノ酸脂質化合物を含む組成物の使用を包含する。

【0032】

いくつかの実施形態において、本開示は、関節リウマチ、肝臓疾患、脳炎、骨折、心疾患、肝炎およびインフルエンザを含むウイルス疾患、ならびに癌から選択される疾患を処置するための、1種以上のアミノ酸脂質化合物を含む組成物の使用を包含する。

【0033】

この要旨は、発明の詳細な説明、ならびに図面および添付の実施例および特許請求の範囲と一緒に、全体として、本発明の開示を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】本発明のリポソーム実施形態の代表的模式図。ここでアミノ酸脂質は、他の脂質

10

20

30

40

50

とともに、二重層小胞10を形成する。この実施形態において、上記リポソームの外側層は、上記脂質のうちの1つのヘッド基に結合されたポリエチレングリコール鎖20によって保護されている。上記リポソームの外側層はまた、細胞もしくは組織の特異的標的化のためのリガンド30を示す。上記リポソーム小胞は、この実施形態において、この実施形態においてプールされた、濃縮RNAナノ粒子40、二本鎖RNA二重鎖ペプチド結合体50、三本鎖mdRNA60、ダイサー基質RNA70、長いオーバーハング付きdsRNA80、および平滑末端付きsiRNA90を含む活性干渉RNA成分の搭載物(cargo)を含む。

【図2】アミノ酸脂質C12-norArg-C12で形成された球形の脂質二重層小胞粒子を示す本発明のリポソーム実施形態のJEOL 1230 TEMで得られる透過型電子顕微鏡写真。上記顕微鏡写真の長さのマーカーは、0.5μmであり、そのサンプルをは、3% ウラニルアセテートで染色された。上記リポソーム処方物の脂質部分は、総脂質のモル%として、それぞれ、[30%/20%/49%/1%]の量の[C12-norArg(NH₃⁺Cl⁻)-C12/DSPC/コレステロール/DSP-PEG-2000]であった。上記リポソームは、抗インフルエンザ活性ダイサー基質dsRNA DX3030を含んだ。

10

【図3】図3において、A549細胞におけるインビトロアッセイから得られたPPIB遺伝子ノックダウン活性の例が示される。干渉RNAの2つのアミノ酸脂質処方物に対する正規化PPIB mRNA発現値の25nM、10nM、1nM、および0.1nMのRNAにおける濃度応答を、RNAiMAXの結果と比較した。式1は、[C12-norArg(NH₃Cl)-C12/DOPE/CHOL(50/32/18)]であり、式2は、[C12-norArg(NH₃Cl)-C12/CHEMS/DLPE(50/32/18)]であった。本開示のアミノ酸脂質組成物中の干渉RNAによる上記PPIB遺伝子ノックダウンは、RNAiMAXで得られるものを上回り得る。

20

【図4】図4において、9L/LacZ細胞におけるインビトロ活性から得られたLacZ遺伝子ノックダウン活性の例が示される。干渉RNAの2つのアミノ酸脂質処方物に対する正規化β-ガラクトシダーゼ発現値の25nM、10nM、1nM、および0.1nMのRNAにおける濃度応答を、RNAiMAXの結果と比較した。式1は、[C12-norArg(NH₃Cl)-C12/DOPE/CHOL(50/32/18)]であり、式2は、[C12-norArg(NH₃Cl)-C12/CHEMS/DLPE(50/32/18)]であった。本開示のアミノ酸脂質組成物中の干渉RNAによる上記LacZ遺伝子ノックダウンは、RNAiMAXで得られたものを上回り得る。

30

【図5】図5において、HepG2細胞におけるインビトロアッセイから得られたApoB遺伝子ノックダウン活性の例が示される。干渉RNAの3つのアミノ酸脂質処方物に対する正規化ApoB mRNA発現値の25nM、2.5nM、および0.25nM RNAにおける濃度応答が、示される。式1は、[非アミノ酸カチオン性脂質/DSPC/chol./DMPE-PEG2k(40/10/48/2)]であった。式2および式3はともに、[C18:1-norArg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k(50/32/16/2)]であった。

【発明を実施するための形態】

40

【0035】

(詳細な説明)

本開示は、一般に、薬物因子の送達のための新規な化合物、組成物およびその使用に関する。本開示の化合物および組成物は、選択された細胞、組織、器官もしくは被験体に治療剤を送達するために有用である。

【0036】

本開示は、一般に、脂質の化学、ならびに脂質様構造および薬物送達を行うための物質の使用に関する。

【0037】

本開示の化合物および組成物は、治療剤、予防剤、および新断罪(例えば、核酸、ポリ

50

ヌクレオチド、ペプチド、タンパク質、および低分子化合物ならびに薬物)の送達のために有用である。

【0038】

本開示の化合物および組成物は、リポソーム、ラメラ小胞、エマルジョン、ミセル、懸濁物、粒子、および溶液のような形態の治療剤の送達に有用である。これら形態は、種々の直径のナノ粒子を含み得る。

【0039】

いくつかの点において、本開示の化合物および組成物は、リポソームにおいて治療剤を送達するために有用である。これら実施形態において、上記治療剤は、上記搭載物として言及され得る。例えば、図1は、本発明のリポソーム実施形態の模式的代表図を示す。この図において、アミノ酸脂質は、他の脂質とともに二重層小胞10を形成する。この実施形態において、上記リポソームの外側層は、上記脂質のうちの1つのヘッド基に結合されたポリエチレングリコール鎖20によって保護される。上記リポソームの外側層はまた、細胞もしくは組織の特異的標的化のためのリガンド30を示す。上記リポソーム小胞は、この実施形態において、この実施形態においてプールされる、濃縮RNAナノ粒子40、二本鎖RNA二重鎖ペプチド結合体50、三本鎖mdRNA60、ダイサー基質RNA70、長いオーバーハング付きdsRNA80、および平滑末端付きsiRNA90を含む活性干渉RNA成分の搭載物を含む。治療搭載物の他の形態は、マイクロRNAもしくはヘアピンRNAの形態を含み得る。

10

【0040】

いくつかの局面において、本開示の化合物および組成物は、放出可能な形態もしくは組成物中での治療剤の送達を提供し得る。放出可能な形態および組成物は、活性薬剤を結合および放出する分子、活性薬剤を結合しかつ上記薬剤の放出を補助する部分を解放する分子、活性薬剤を結合しかつその後上記薬剤の放出を補助するために生物学的区画内形態において変化される分子、および放出メディエーター化合物と混合される活性薬剤を結合する分子を含む組成物を含む。

20

【0041】

(アミノ酸脂質)

本発明は、薬物因子の送達および投与、ならびに薬物送達系において使用するための親油性化合物である、ある範囲のアミノ酸脂質を提供する。本開示のアミノ酸脂質は、アミノ酸残基および1つ以上の親油性テイルを含む分子である。

30

【0042】

いくつかの実施形態において、アミノ酸脂質は、親水性部分および親油性部分を有する分子である。上記親水性部分は、アミノ酸残基によって提供され得る。上記親油性部分は、1つ以上の親油性テイルを含み得る。

【0043】

いくつかの実施形態において、アミノ酸脂質は、疎水性アミノ酸残基および1つ以上の親油性テイルを含む親油性分子である。

【0044】

いくつかの実施形態において、上記アミノ酸脂質は、比較的低い細胞傷害性を提供し、そして対応して、特定の他の脂質に対して細胞保護効果を提供する。いくつかの実施形態において、上記アミノ酸脂質は、薬学的に受容可能であるか、生体分解性であるか、もしくは生体適合性である。

40

【0045】

アミノ酸脂質は、送達増強テイルもしくは脂質様テイルを、アミノ酸のN末端もしくはC末端のいずれか、または両方の末端において置換することによって、形成され得る。いくつかの実施形態において、上記アミノ酸コアは、1種以上のアミノ酸を含み得るか、または2~20個のアミノ酸残基のペプチドであり得る。

【0046】

アミノ酸脂質は、カチオン性もしくは非カチオン性であり得、ここで非カチオン性とは

50

、中性もしくはアニオン性を包含する。本明細書において使用される場合、種の物理的状态もしくはイオン性とは、別段特定されなければ、約pH7を有する環境をいう。

【0047】

本開示のアミノ酸脂質は、低細胞毒性を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のアミノ酸脂質は、他の構造の脂質に対して細胞保護効果を提供し得る。

【0048】

いくつかの局面において、本開示のアミノ酸脂質は、放出可能な形態において、治療剤の送達を提供し得る。放出可能な形態および組成物は、治療効果を提供するために、細胞による薬剤の十分な取り込みを提供するように設計される。

【0049】

放出可能な形態は、活性薬剤を結合および放出するアミノ酸脂質を包含する。いくつかの実施形態において、上記活性薬剤の放出は、酸不安定性リンカーによって提供され得る。

【0050】

酸不安定性リンカーの例としては、オルトエステル基、ヒドラゾン、cis-アセトニル、アセタール、ケタール、シリルエーテル、シラザン、イミン、シトラコン酸無水物 (citric anhydride)、マレイン酸無水物、クラウンエーテル、アザクラウンエーテル、チアクラウンエーテル、ジチオベンジル基、cis-アコニット酸、cis-カルボン酸アルカトリエン、メタクリル酸、およびこれらの混合物を含むリンカーが挙げられる。

【0051】

酸不安定性基およびリンカーの例は、米国特許第7,098,032号；同第6,897,196号；同第6,426,086号；同第7,138,382号；同第5,563,250号；および同第5,505,931号に与えられる。

【0052】

本開示の化合物および組成物の放出可能な形態は、活性薬剤を結合しかつ上記薬剤の放出を補助する部分を解放する分子を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸脂質は、細胞への薬剤の送達を補助するエタノールのような低分子を放出する基を含み得る。アミノ酸脂質は、活性薬剤を結合して、その後、細胞と接触し得るか、またはその後、生理学的pHより低い局所的pHを有する生物学的区画内に輸送し、酸性環境において加水分解されて、上記薬剤の送達を補助するためにエタノールを放出し得る。いくつかの実施形態において、上記薬剤の送達を補助する、エタノールのような低分子は、脂質成分に結合され得る。

【0053】

いくつかの実施形態において、アミノ酸脂質は、低分子（例えば、細胞への薬剤の送達を補助するエタノール）を放出する化合物と混合され得る。

【0054】

本開示の化合物および組成物の放出可能な形態としては、活性薬剤を結合して、その後、細胞と接触し得るか、またはその後、生理学的pHより低い局所的pHを有する生物学的区画内に送達し、酸性環境においてカチオン性形態へと変化されて、上記薬剤の放出を補助し得るアミノ酸脂質を含む。

【0055】

いくつかの実施形態において、アミノ酸脂質は、活性薬剤を結合し得、そして酸性環境においてカチオン性形態へと変化されて、活性薬剤の放出を補助し得る化合物と混合され得る。

【0056】

加水分解可能かつ変化可能な基の例は、米国特許第6,849,272号；同第6,200,599号；ならびにZ. H. Huang and F. C. Szoka, 「Bioresponsive liposomes and their use for macromolecular delivery」, in: G. Gregoriadis

10

20

30

40

50

(編), Liposome Technology, 第3版 (CRC Press 2006) に示される。

【0057】

いくつかの実施形態において、本開示の化合物および組成物の放出可能な形態としては、活性薬剤を結合し得、そして酸性環境において中性形態へと変化されて、活性薬剤の放出を補助し得る脂質もしくは化合物と混合され得るアミノ酸脂質を含む。上記酸性環境は、細胞と接触した後に、または生理学的 pH より低い局所的 pH を有する生物学的区画内に輸送された後に、侵入され得る。

【0058】

アニオン性形態から中性形態へと変化可能な脂質の例としては、米国特許第 6, 897, 196 号；同第 6, 426, 086 号；および同第 7, 108, 863 号に記載されるようなコレステリルヘミスクシネート (CHEMS) が挙げられる。

【0059】

いくつかの実施形態において、本開示の化合物および組成物の放出可能な形態は、活性薬剤を結合し得、そして pH 感受性ポリマー物質と混合され得るアミノ酸脂質を含む。

【0060】

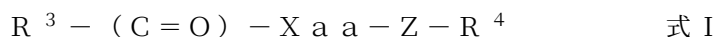
pH 感受性ポリマー物質の例は、米国特許第 6, 835, 393 号に示される。

【0061】

いくつかの実施形態において、上記活性薬剤の放出は、酵素切断可能なペプチドによって提供され得る。

【0062】

いくつかの局面において、本発明は、式 I に示されるような、ある範囲のアミノ酸脂質およびその塩を提供し：



ここで

Xaa は、式 $-NR^N - CR^1R^2 - (C=O) -$ を有する任意の D-アミノ酸残基もしくは L-アミノ酸残基、または式 $- \{NR^N - CR^1R^2 - (C=O)\}_n -$ を有する $n = 2 \sim 20$ アミノ酸残基のペプチドであり、

ここで

R^1 は独立して、各存在について、非水素、アミノ酸の、置換されているかもしくは置換されていない側鎖であり；

R^2 は独立して、各存在について、水素、または炭素、酸素、窒素、硫黄、および水素原子からなりかつ $1 \sim 20$ 個の炭素原子を有する有機基、または C (1-5) アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、C (3-5) アルケニル、C (3-5) アルキニル、C (1-5) アルカノイル、C (1-5) アルカノイルオキシ、C (1-5) アルコキシ、C (1-5) アルコキシ-C (1-5) アルキル、C (1-5) アルコキシ-C (1-5) アルコキシ、C (1-5) アルキル-アミノ-C (1-5) アルキル、C (1-5) ジアルキル-アミノ-C (1-5) アルキル、ニトロ-C (1-5) アルキル、シアノ-C (1-5) アルキル、アリール-C (1-5) アルキル、4-ビフェニル-C (1-5) アルキル、カルボキシル、もしくはヒドロキシルであり、

R^N は独立して、各存在について、水素、または炭素、酸素、窒素、硫黄、および水素原子からなりかつ $1 \sim 20$ 個の炭素原子を有する有機基、または C (1-5) アルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、C (3-5) アルケニル、C (3-5) アルキニル、C (1-5) アルカノイル、C (1-5) アルカノイルオキシ、C (1-5) アルコキシ、C (1-5) アルコキシ-C (1-5) アルキル、C (1-5) アルコキシ-C (1-5) アルコキシ、C (1-5) アルキル-アミノ-C (1-5) アルキル、C (1-5) ジアルキル-アミノ-C (1-5) アルキル、ニトロ-C (1-5) アルキル、シアノ-C (1-5) アルキル、アリール-C (1-5) アルキル、4-ビフェニル-C (1-5) アルキル、カルボキシル、もしくはヒドロキシルであり、

R^3 は、天然に存在するかもしくは合成のリン脂質、糖脂質、トリアシルグリセロール

10

20

30

40

50

、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、セラミド、スフィンゴミエリン、セレブロシド、もしくはガングリオシドに由来する親油性テイル；または置換されているかもしくは置換されていない、C (3-22) アルキル、C (6-12) シクロアルキル、C (6-12) シクロアルキル-C (3-22) アルキル、C (3-22) アルケニル、C (3-22) アルキニル、C (3-22) アルコキシ、もしくはC (6-12) アルコキシ-C (3-22) アルキル；または任意の他の天然に存在するかもしくは合成の脂質の親油性テイル、または本明細書において以下に記載されるさらなる送達脂質のうちのいずれか1つの親油性テイルであり、ステロイドを含み得；

R⁴ は、天然に存在するかもしくは合成のリン脂質、糖脂質、トリアシルグリセロール、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、セラミド、スフィンゴミエリン、セレブロシド、もしくはガングリオシドに由来する親油性テイル；または置換されているかもしくは置換されていない、C (3-22) アルキル、C (6-12) シクロアルキル、C (6-12) シクロアルキル-C (3-22) アルキル、C (3-22) アルケニル、C (3-22) アルキニル、C (3-22) アルコキシ、もしくはC (6-12) アルコキシ-C (3-22) アルキル；または任意の他の天然に存在するかもしくは合成の脂質の親油性テイル、または本明細書において以下に記載されるさらなる送達脂質の親油性テイルであり、ステロイドを含み得；

Z は、NH、O、S、-CH₂S-、-CH₂S(O)-、または水素、炭素、酸素、窒素、および硫黄原子から選択される1~40個の原子からなる有機リンカーである。

【0063】

いくつかの実施形態において、R³ は独立して、置換されているかもしくは置換されていない、C (6-22) アルキルもしくはC (6-22) アルケニルであり；R⁴ は独立して、置換されているかもしくは置換されていない、C (6-22) アルキルもしくはC (6-22) アルケニルである。

【0064】

上記残基X_aは、D-立体中心もしくはL-立体中心であり得る。

【0065】

いくつかの実施形態において、上記アミノ酸コアは、ペプチドのN末端およびC末端において親油性テイルを有する、2~20アミノ酸残基のペプチドであり得る。

【0066】

いくつかの実施形態において、R¹ は、非水素、アミノ酸の、置換されているかもしくは置換されていない側鎖であり、ここで側鎖の置換基は、水素、炭素、酸素、窒素、および硫黄原子から選択される1~40個の原子からなる有機基である。

【0067】

いくつかの実施形態において、Zは、アルキルもしくは有機リンカー合成ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール鎖(PEG)、もしくはPEGコポリマー（例えば、PEG-ポリウレタンもしくはPEG-ポリプロピレン）である。例えば、J. Milton Harris, Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications (1992) を参照のこと。

【0068】

いくつかの実施形態において、本発明は、上記式Iに示されるような、ある範囲のアミノ酸脂質を提供し：

X_aは、一般式-NR^N-CR¹R²-(C=O)-を有する任意のD-アミノ酸もしくはL-アミノ酸であり、ここで

R¹ は、非水素、アミノ酸の、置換されているかもしくは置換されていない塩基性側鎖であり；

R² は、水素、もしくはC (1-5) アルキルであり、

R^N は、水素、もしくはC (1-5) アルキルであり、

R³ は、天然に存在するかもしくは合成のリン脂質、糖脂質、トリアシルグリセロール

10

20

30

40

50

、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、セラミド、スフィンゴミエリン、セレブロシド、もしくはガングリオシドに由来する親油性テイル；または置換されているかもしくは置換されていない、C (3-22) アルキル、C (6-12) シクロアルキル、C (6-12) シクロアルキル-C (3-22) アルキル、C (3-22) アルケニル、C (3-22) アルキニル、C (3-22) アルコキシ、もしくはC (6-12) アルコキシ-C (3-22) アルキル；または任意の他の天然に存在するかもしくは合成の脂質の親油性テイル、または本明細書において以下に記載されるさらなる送達脂質のうちのいずれか1つの親油性テイルであり、そしてステロイドを含み得；

R⁴ は、天然に存在するかもしくは合成のリン脂質、糖脂質、トリアシルグリセロール、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、セラミド、スフィンゴミエリン、セレブロシド、もしくはガングリオシドに由来する親油性テイル；または置換されているかもしくは置換されていない、C (3-22) アルキル、C (6-12) シクロアルキル、C (6-12) シクロアルキル-C (3-22) アルキル、C (3-22) アルケニル、C (3-22) アルキニル、C (3-22) アルコキシ、もしくはC (6-12) アルコキシ-C (3-22) アルキル；または任意の他の天然に存在するかもしくは合成の脂質の親油性テイル、または本明細書において以下に記載されるさらなる送達脂質のうちのいずれか1つの親油性テイルであり、そしてステロイドを含み得；

Z は、NH、O、S、-CH₂S-、-CH₂S(O)-、または水素、炭素、酸素、窒素、および硫黄原子から選択される1~40個の原子からなる有機リンカーである。

【0069】

いくつかの実施形態において、本発明は、上記の式 I に示されるような範囲のアミノ酸脂質を提供し、ここで：

X a a は、一般式-NR^N-CR¹R²-(C=O)-を有する任意のD-アミノ酸もしくはL-アミノ酸であり、ここで

R¹ は、非水素、アミノ酸の、置換されているかもしくは置換されていない塩基性側鎖であり；

R² は、水素、もしくはC (1-5) アルキルであり、

R^N は、水素、もしくはC (1-5) アルキルであり、

R³ は、置換されているかもしくは置換されていない、C (3-22) アルキル、C (6-12) シクロアルキル、C (6-12) シクロアルキル-C (3-22) アルキル、C (3-22) アルケニル、C (3-22) アルキニル、C (3-22) アルコキシ、もしくはC (6-12) アルコキシ-C (3-22) アルキルであり；

R⁴ は、置換されているかもしくは置換されていない、C (3-22) アルキル、C (6-12) シクロアルキル、C (6-12) シクロアルキル-C (3-22) アルキル、C (3-22) アルケニル、C (3-22) アルキニル、C (3-22) アルコキシ、もしくはC (6-12) アルコキシ-C (3-22) アルキルであり；

Z は、NH、O、S、-CH₂S-、-CH₂S(O)-、または水素、炭素、酸素、窒素、および硫黄原子から選択される1~40個の原子からなる有機リンカーである。

【0070】

いくつかの実施形態において、本発明は、上記の式 I に示されるような範囲のアミノ酸脂質を提供し、ここで：

X a a は、一般式-NR^N-CR¹R²-(C=O)-を有する任意のD-アミノ酸もしくはL-アミノ酸であり、ここで

R¹ は、非水素、アミノ酸の、置換されているかもしくは置換されていない塩基性側鎖であり；

R² は、水素、もしくはC (1-5) アルキルであり、

R^N は、水素、もしくはC (1-5) アルキルであり、

R³ は、置換されているかもしくは置換されていない、C (3-22) アルキル、C (6-12) シクロアルキル、C (6-12) シクロアルキル-C (3-22) アルキル、C (3-22) アルケニル、C (3-22) アルキニル、C (3-22) アルコキシ、も

しくはC(6-12)アルコキシ-C(3-22)アルキルであり；

R⁴は、置換されているかもしくは置換されていない、C(3-22)アルキル、C(6-12)シクロアルキル、C(6-12)シクロアルキル-C(3-22)アルキル、C(3-22)アルケニル、C(3-22)アルキニル、C(3-22)アルコキシ、もしくはC(6-12)アルコキシ-C(3-22)アルキルであり；

ZはNHである。

【0071】

いくつかの実施形態において、本発明は、上記の式Iに示されるような範囲のアミノ酸脂質を提供し、ここで：

Xaaは、一般式-NR^N-CR¹R²-(C=O)-を有する任意のD-アミノ酸もしくはL-アミノ酸であり、ここで

10

R¹は、非水素、アミノ酸の、置換されているかもしくは置換されていない塩基性側鎖であり；

R²は、水素、もしくはC(1-5)アルキルであり、

R^Nは、水素、もしくはC(1-5)アルキルであり、

R³は、置換されているかもしくは置換されていない、C(3-22)アルキル、C(6-12)シクロアルキル、C(6-12)シクロアルキル-C(3-22)アルキル、C(3-22)アルケニル、C(3-22)アルキニル、C(3-22)アルコキシ、もしくはC(6-12)アルコキシ-C(3-22)アルキルであり；

R⁴は、置換されているかもしくは置換されていない、C(3-22)アルキル、C(6-12)シクロアルキル、C(6-12)シクロアルキル-C(3-22)アルキル、C(3-22)アルケニル、C(3-22)アルキニル、C(3-22)アルコキシ、もしくはC(6-12)アルコキシ-C(3-22)アルキルであり；

20

ZはOである。

【0072】

例えば、Xaaが塩基性側鎖を有するカチオン性アミノ酸脂質が、調製され得る。塩基性側鎖を有するアミノ酸の例としては、アルギニン(Arg)、ホモアルギニン(ホモArg)(側鎖-(CH₂)₄NH(C=NH)NH₂)、ノルアルギニン(norArg)(側鎖-(CH₂)₂NH(C=NH)NH₂)、ノルノルアルギニン(nornorArg)(側鎖-(CH₂)NH(C=NH)NH₂)、オルニチン、リジン、ホモリジン、ヒスチジン、1-メチルヒスチジン、ピリジラルアニン(Pal)、アスパラギン、N-エチルアスパラギン、グルタミン、および4-アミノフェニラルアニン、ならびにこれらの側鎖改変誘導体が挙げられる。

30

【0073】

本明細書において使用される場合、用語「ホモ」とは、アミノ酸に言及する場合、さらなる炭素がその側鎖に付加されていることを意味する一方で、用語「ノル」とは、アミノ酸に言及する場合、炭素が、その側鎖から除去されていることを意味する。従って、ホモリジンとは、側鎖-(CH₂)₅NH₂に言及する。

【0074】

例えば、Xaaがグルタミン酸もしくはアスパラギン酸であるアニオン性アミノ酸脂質が調製され得る。

40

【0075】

上記アミノ酸側鎖がイオン化可能な基もしくは置換基を含む、カチオン性アミノ酸脂質およびアニオン性アミノ酸脂質がまた、調製され得る。

【0076】

例えば、Xaaがロイシン、バリン、アラニン、もしくはセリンである非カチオン性アミノ酸脂質が調製され得る。

【0077】

いくつかの実施形態において、Xaaは、N^G-メチルアルギニン、対称もしくは非対称のN^G、N^G-ジメチルアルギニン、N^G-メチル-ホモアルギニン、対称もしくは非

50

対称の N^G , N^G -ジメチル-ホモアルギニン、 N^G -メチル-ノルアルギニン、対称もしくは非対称の N^G , N^G -ジメチル-ノルアルギニン、または N^G -メチル-ノル-ノルアルギニン、対称もしくは非対称の N^G , N^G -ジメチル-ノル-ノルアルギニンである。

【0078】

いくつかの実施形態において、X a a は、 N^G -エチルアルギニン、対称もしくは非対称の N^G , N^G -ジエチルアルギニン、 N^G -エチル-ホモアルギニン、対称もしくは非対称の N^G , N^G -ジエチル-ホモアルギニン、 N^G -エチル-ノルアルギニン、対称もしくは非対称の N^G , N^G -ジエチル-ノルアルギニン、または N^G -エチル-ノル-ノルアルギニン、対称もしくは非対称の N^G , N^G -ジエチル-ノル-ノルアルギニンである。

10

【0079】

特定の実施形態において、X a a は、 N^G -アルキルアルギニン、対称もしくは非対称の N^G , N^G -ジアルキルアルギニン、 N^G -アルキル-ホモアルギニン、対称もしくは非対称の N^G , N^G -ジアルキル-ホモアルギニン、 N^G -アルキル-ノルアルギニン、対称もしくは非対称の N^G , N^G -ジアルキル-ノルアルギニン、または N^G -アルキル-ノル-ノルアルギニン、対称もしくは非対称の N^G , N^G -ジアルキル-ノル-ノルアルギニンである。

【0080】

いくつかの実施形態において、X a a は、グアニジンもしくはアミジンを含む側鎖を有するアミノ酸である。例えば、上記 X a a 残基の側鎖は、グアニド、アミジノ、ジヒドロイミダゾール、4-グアニド-フェニル、4-アミジノ-フェニル、N-アミジノ-ピペリジン、N-アミジノ-ピペラジン、4, 5-ジヒドロイミダゾール、2-(N-アミジノ)-ピロリジニル、もしくは4-[(2-アミノピリミジニル)] エチルのような基を含み得る。

20

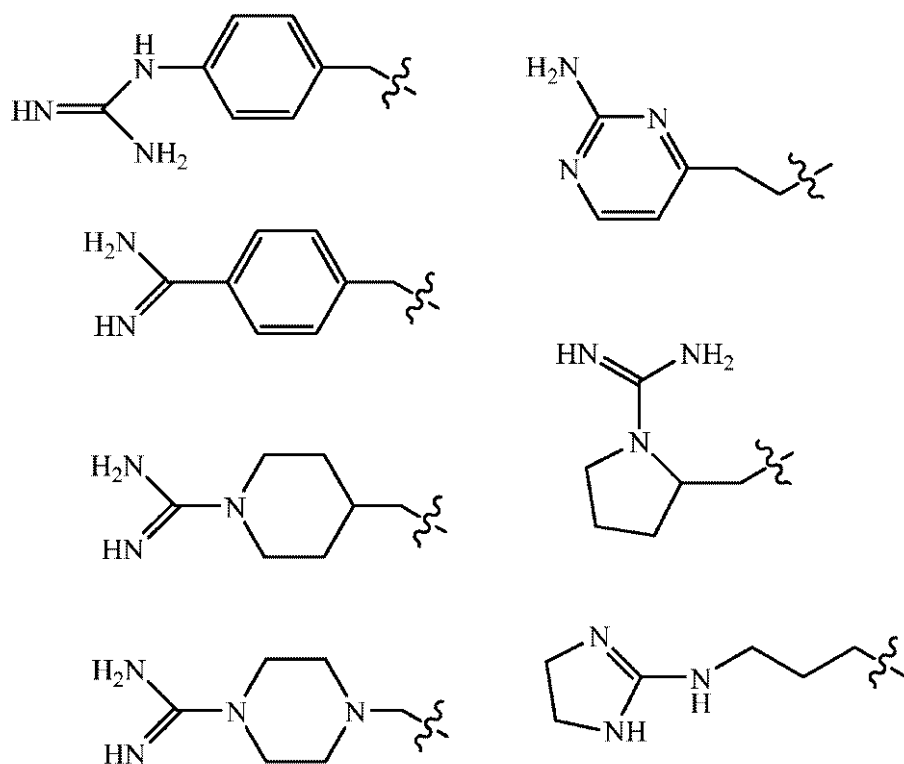
【0081】

X a a 側鎖の例としては、以下の構造およびそれらの塩形態が挙げられる：

【0082】

【化1】

30



40

50

アミノ酸脂質の放出可能な形態に適したアミノ酸の置換された側鎖の例としては、約 5 ～約 7.5、または約 6 ～約 7 の pK_a を有する放出官能基 (releasing functional group) が挙げられる。一般に、弱塩基である放出官能基は、 pK_a より高い局所的 pH において優れた中性形態を示し得、そして pK_a より低い局所的 pH において優れたイオン性形態を示し得る。弱酸である放出官能基は、 pK_a より高い局所的 pH においてイオン性形態を示し得、 pK_a より低い局所的 pH において中性形態を示し得る。例えば、P. Heinrich Stahl, Handbook of Pharmaceutical Salts, (2002) を参照のこと。

【0083】

いくつかの実施形態において、Xaa は、5 ～ 7.5 の pK_a を有する官能基を含む側鎖を有し得る。

10

【0084】

アミノ酸脂質の放出可能な形態に適したアミノ酸の置換された側鎖の例としては、1-メチルヒスチジンが挙げられる。

【0085】

アミノ酸脂質の放出可能な形態に適したアミノ酸の置換された側鎖の例としては、3,5-ジヨードーチロシンが挙げられる。

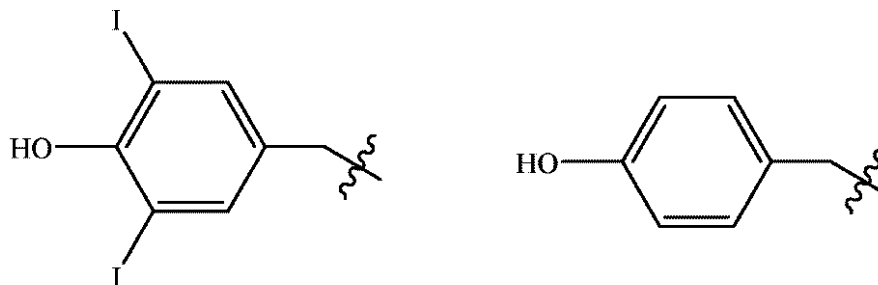
【0086】

アミノ酸脂質の放出可能な形態に適したアミノ酸の置換された側鎖の例としては、以下の構造が挙げられる：

20

【0087】

【化 2】



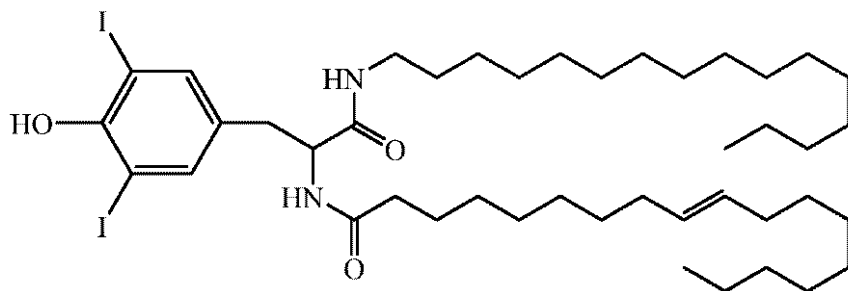
30

アミノ酸脂質の例としては、以下の構造が挙げられる：

【0088】

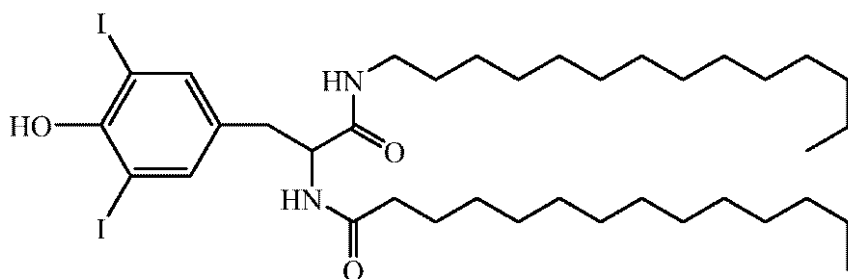
【化 3】

化合物 1



10

化合物 2



20

アミノ酸脂質の放出可能な形態に適したアミノ酸の側鎖上の置換基の例としては、以下に由来する放出官能基が挙げられる：3, 5-ジヨードチロシン、1-メチルヒスチジン、2-メチル酪酸、2-θ-アニシルプロパン酸、meso-酒石酸、4, 6-ジメチルピリミジンアミン、p-フタル酸、クレアチニン、酪酸、N, N-ジメチル-1-ナフチルアミン、ペンタン酸、4-メチルペンタン酸、N-メチルアニリン、1, 10-フェナントロリン、3-ピリジンカルボン酸、ヘキサン酸、プロパン酸、4-アミノ安息香酸 (animobenzoic acid)、2-メチルプロパン酸、ヘプタン酸、オクタン酸、シクロヘキサンカルボン酸、キノリン、3-キノリンアミン、2-アミノ安息香酸、4-ピリジンカルボン酸、ノナン酸 (nonanic acid)、メラミン、8-キノリノール、トリメチル酢酸、6-メトキシキノリン、4-(メチルアミノ)安息香酸、p-メチルアニリン、3-(メチルアミノ)安息香酸、リンゴ酸、N-エチルアニリン、2-ベンジルピリジン、3, 6-ジニトロフェノール、N, N-ジメチルアニリン、2, 5-ジメチルピペラジン、p-フェネチジン、5-メチルキノリン、2-フェニルベンゾイミダゾール、ピリジン、ピコリン酸、3, 5-ジヨードチロシン (diiodityrosine)、p-アニシジン、2-(メチルアミノ)安息香酸、2-チアゾールアミン、グルタル酸、アジピン酸、イソキノリン、イタコン酸、o-フタル酸、ベンゾイミダゾール、ピペラジン、ヘプタン二酸、アクリジン、フェナントリジン、コハク酸、メチルコハク酸、4-メチルキノリン、3-メチルピリジン、7-イソキノリノール、マロン酸、メチルマロン酸、2-メチルキノリン、2-エチルピリジン、2-メチルピリジン、4-メチルピリジン、ヒスタミン、ヒスチジン、マレイン酸、cis-1, 2-シクロヘキサンジアミン、3, 5-ジメチルピリジン、2-エチルベンゾイミダゾール、2-メチルベンゾイミダゾール、カコジル酸、ペリミジン、クエン酸、イソクエン酸、2, 5-ジメチルピリジン、パパベリン、6-ヒドロキシ-4-メチルプテリジン、L-チロキシン、3, 4-ジメチルピリジン、メトキシピリジン、trans-1, 2-シクロヘキサンジアミン、2, 5-ピリジンジアミン、1-1-メチルヒスチジン、1-3-メチルヒスチジン、2, 3-ジメチルピリジン、キサントプテリン、1, 2-プロパンジアミン、N, N

30

40

50

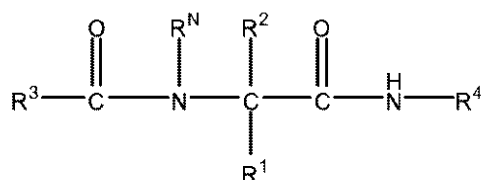
ージエチルアニリン、アロキサン酸 (alloxanic acid)、2, 6-ジメチルピリジン、L-カルノシン、2-ピリジンアミン、N- β -アラニルヒスチジン、ピロカルピン、1-メチルイミダゾール、1H-イミダゾール、2, 4-ジメチルピリジン、4-ニトロフェノール、2-ニトロフェノール、チロシナムイド、5-ヒドロキシキナゾリン、1, 1-シクロプロパンジカルボン酸、2, 4, 6-トリメチルピリジン、ペロナール、2, 3-ジクロロフェノール、1, 2-エタンジアミン、1-イソキノリンアミン、ならびにこれらの組み合わせ。

【0089】

いくつかの実施形態において、ある範囲の、式 I に対応するアミノ酸脂質は、以下の構造によって表され：

【0090】

【化 4】

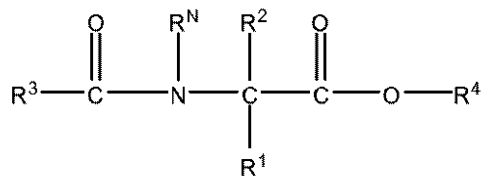


構造 1A

および

【0091】

【化 5】



構造 1B

ここで R^1 、 R^2 、 R^{N} 、 R^3 、および R^4 は、上記のとおりに定義される。

【0092】

いくつかの実施形態において、 R^3 および R^4 は独立して、十分な親油性特徴もしくは親油性（例えば、水／オクタノール分配によって定義される）を付与して、膜を横断する送達もしくは細胞による取り込みを提供する選択された脂質様テイルである。これらテイルは、アミノ酸脂質構造において使用される場合、両親媒性分子を提供する。脂質様テイルは、とりわけ、リン脂質、糖脂質、トリアシルグリセロール、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、セラミド、スフィンゴミエリン、セレブロシド、もしくはガングリオシドに由来し得、そしてステロイドを含み得る。

【0093】

特定の実施形態において、 R^3 および R^4 は独立して、グリセロール骨格を有する脂質様テイルであり得る。

【0094】

いくつかの実施形態において、 R^3 および R^4 は独立して、C3アルキル、C4アルキル、C5アルキル、C6アルキル、C7アルキル、C8アルキル、C9アルキル、C10アルキル、C11アルキル、C12アルキル、C13アルキル、C14アルキル、C15アルキル、C16アルキル、C17アルキル、C18アルキル、C19アルキル、C20アルキル、C21アルキル、もしくはC22アルキルであり得る。

【0095】

いくつかの実施形態において、 R^3 および R^4 は独立して、以下の構造のうちの1つを

10

20

30

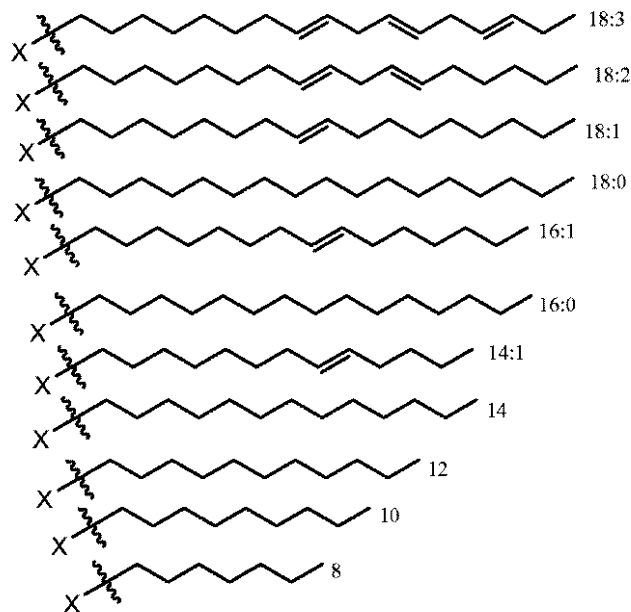
40

50

有する親油性テイルであり得る：

【0096】

【化6】



10

上記の構造において、Xは、上記アミノ酸残基末端に直接結合され、かつ数字の名称（例えば、「18:3」）における原子のうちの1つとして計数される、上記テイルの原子を表す。いくつかの実施形態において、Xは、炭素、窒素、もしくは酸素原子であり得る。

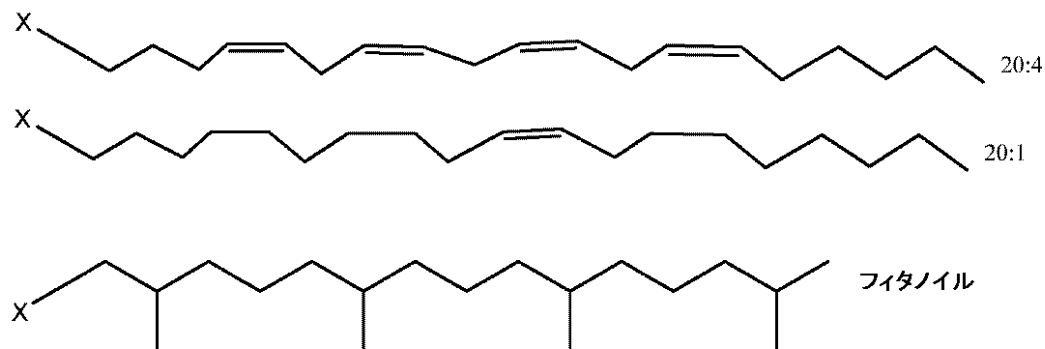
20

【0097】

いくつかの実施形態において、 R^3 および R^4 は独立して、以下の構造のうちの1つを有する親油性テイルであり得る：

【0098】

【化7】



30

ここでXは、上記で定義されるとおりである。

【0099】

いくつかの実施形態において、 R^3 および R^4 は独立して、コレステロール、ステロール、もしくはステロイド（例えば、ゴナン、エストラン、アンドロスタン、プラグナン、コラン、コレスタン、エルゴスタン、カンベスタン、ポリフェラストン、スチグマスタン、ゴルゴスタン、ラノスタン、シクロアルタン、および前述のうちのいずれかのステロール誘導体もしくは動物ステロール誘導体、ならびにそれらの生物学的中間体および前駆体）を含み得る選択された脂質様テイルであり、これらとしては、例えば、コレステロール、ラノステロール、スチグマスタノール、ジヒドロラノステロール、チモステロール、チ

40

50

モステノール、デスモテロール、7-デヒドロコレステロール、ならびにこれらの混合物および誘導体が挙げられ得る。

【0100】

特定の実施形態において、 R^3 および R^4 は独立して、脂肪酸様テイル（例えば、ミリスチン酸（C14：0）アルケニル、パルミチン酸（C16：0）アルケニル、ステアリン酸（C18：0）アルケニル、オレイン酸（C18：1，炭素9において二重結合）アルケニル、リノール酸（C18：2，炭素9もしくは炭素12において二重結合）アルケニル、リノレン酸（linolenic acid）（C18：3，炭素9、炭素12、もしくは炭素15において二重結合）アルケニル、アラキドン酸（C20：4，炭素5、炭素8、炭素11、もしくは炭素14において二重結合）アルケニル、およびエイコサペンタエン酸（C20：5，炭素5、炭素8、炭素11、炭素14、もしくは炭素17において二重結合）アルケニルに由来するテイル）に由来し得る。脂肪酸様テイルの他の例は、Donald Voet and Judith Voet, Biochemistry, 第3版（2005），p. 383に見いだされる。

10

【0101】

いくつかの実施形態において、 R^3 および R^4 は独立して、イソプレノイドに由来し得る。

【0102】

本明細書において使用される場合、用語「アミノ酸」とは、天然に存在するアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸を含む。従って、本発明のアミノ酸脂質は、遺伝的にコードされるアミノ酸、天然に存在する遺伝的にコードされていないアミノ酸、もしくは合成アミノ酸から製造され得る。

20

【0103】

アミノ酸の例としては、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、およびValが挙げられる。

【0104】

アミノ酸の例としては、アゼチジン、2-アミノオクタデカン酸、2-アミノアジピン酸、3-アミノアジピン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、2,3-ジアミノ酪酸、2,4-ジアミノ酪酸、2-アミノイソ酪酸、4-アミノイソ酪酸、2-アミノピメリン酸、2,2'-ジアミノピメリン酸、6-アミノヘキサ酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、デスモシン、オルニチン、シトルリン、N-メチルイソロイシン、ノルロイシン、tert-ロイシン、フェニルグリシン、t-ブチルグリシン、N-メチルグリシン、サルコシン（sarcosine）、N-エチルグリシン、シクロヘキシルグリシン、4-オキソシクロヘキシルグリシン、N-エチルアスパラギン、シクロヘキシルアラニン、t-ブチルアラニン、ナフチルアラニン、ピリジルアラニン、3-クロロアラニン、3-ベンゾチエニルアラニン、4-ハロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、2-フルオロフェニルアラニン、3-フルオロフェニルアラニン、4-フルオロフェニルアラニン、ペニシラミン、2-チエニルアラニン、メチオニン、メチオニンスルホキシド、ホモアルギニン、ノルアルギニン、ノル-ノルアルギニン、N-アセチルリジン、4-アミノフェニルアラニン、N-メチルバリン、ホモシステイン、ホモセリン、ヒドロキシリジン、アロ-ヒドロキシリジン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスモシン、アロ-イソロイシン、6-N-メチルリジン、ノルバリン、O-アリル-セリン、O-アリル-スレオニン、 α -アミノヘキサ酸、 α -アミノ吉草酸、ピログルタミン酸、およびこれらの誘導体が挙げられる。

30

40

【0105】

本明細書において使用される場合、用語「アミノ酸」とは、 α -アミノ酸および β -アミノ酸を含む。

【0106】

50

アミノ酸残基の例は、Fasman, CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, CRC Press, Inc. (1989) において見いだされ得る。

【0107】

一般に、化合物は、1個以上のキラル中心を含み得る。1個以上のキラル中心を含む化合物は、「異性体」、「立体異性体」、「ジアステレオマー」、「鏡像異性体」、「光学異性体」、もしくは「ラセミ混合物」として記載されるものを包含し得る。立体化学的命名法の約束ごとは、例えば、Cahn, IngoldおよびPrelogの立体異性体命名規則、ならびに立体化学の決定および立体異性体の分離のための方法が、当該分野で公知である。例えば、Michael B. Smith and Jerry March, March's Advanced Organic Chemistry, 第5版, 2001を参照のこと。本開示の化合物および構造物は、特定された化合物もしくは構造物について存在すると理解される、全ての考えられる異性体、立体異性体、ジアステレオマー、鏡像異性体、および／もしくは光学異性体（その任意の混合物、ラセミ混合物もしくは他のものを包含する）を包含することを意味する。

10

【0108】

アミノ酸脂質の例としては、 $R^3 - (C=O) - Arg - NH - R^4$ が挙げられ、ここでArgは、D-アルギニンもしくはL-アルギニンであり、そして R^3 および R^4 は独立して、アルキルもしくはアルケニルである。

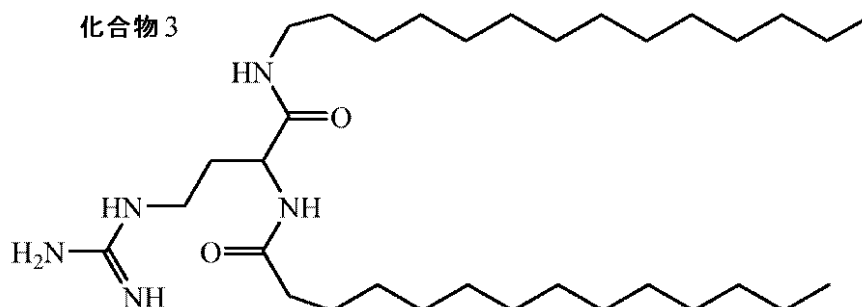
【0109】

アミノ酸脂質の例としては、以下の構造物が挙げられる：

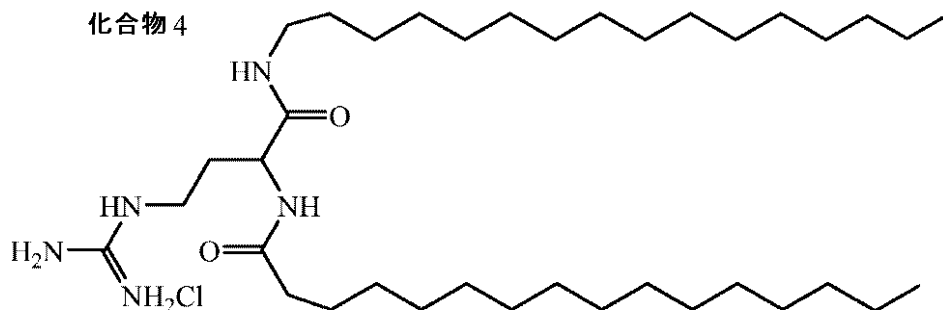
20

【0110】

【化8】



30

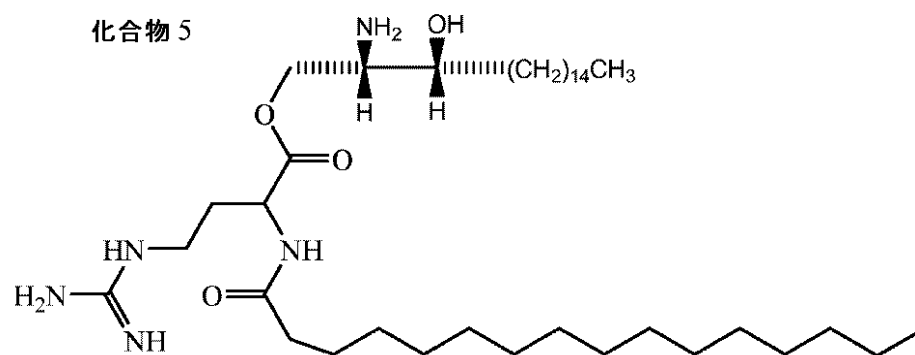


40

アミノ酸脂質の例としては、以下の構造物が挙げられる：

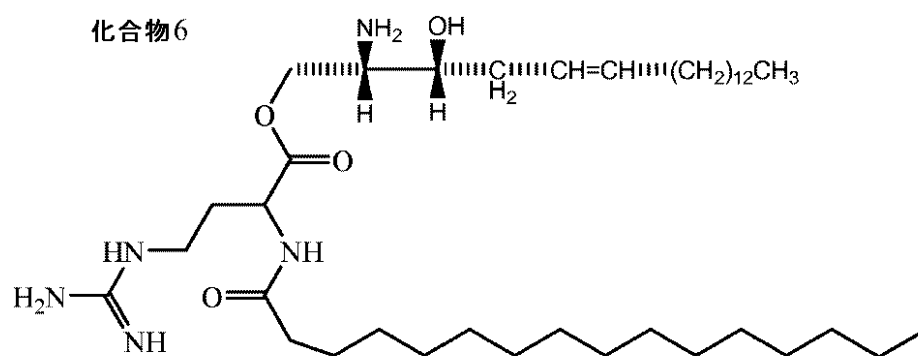
【0111】

【化 9】



【 0 1 1 2 】

【化 1 0】

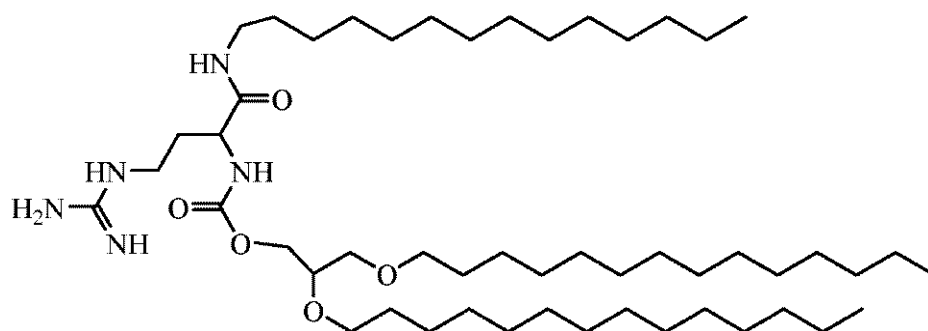


アミノ酸脂質の例としては、以下の構造物が挙げられる：

【 0 1 1 3 】

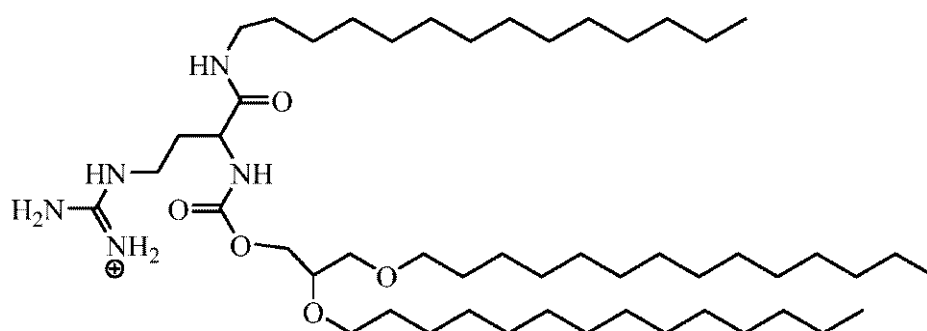
【化 1 1】

化合物 7



10

化合物 8

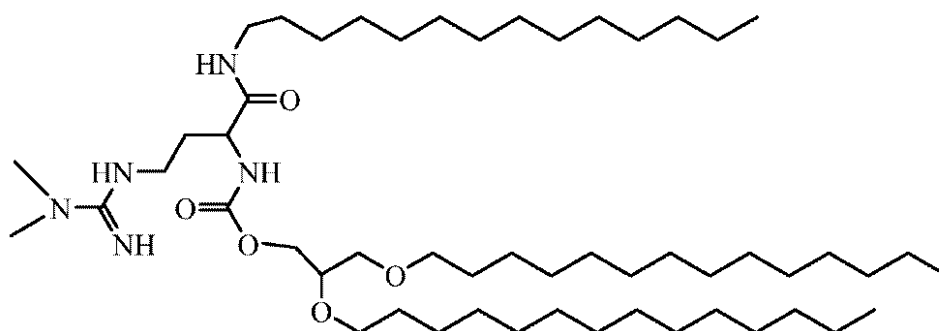


20

【 0 1 1 4】

【化 1 2】

化合物 9



30

40

アミノ酸脂質の例としては、 $R^3 - (C=O) - \text{norArg} - \text{NH} - R^4$ が挙げられ、ここで norArg は、D-ノルアルギニンもしくはL-ノルアルギニンであり、 R^3 および R^4 は独立して、アルキルもしくはアルケニルである。

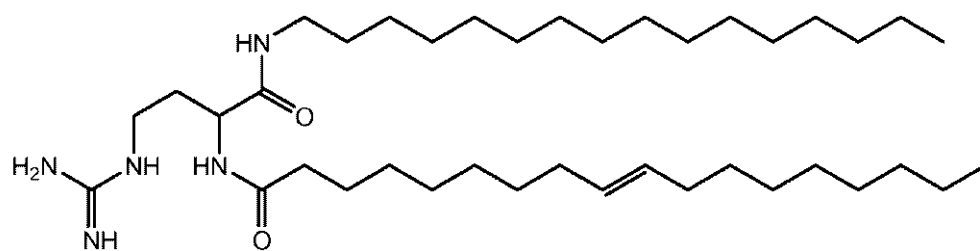
【 0 1 1 5】

アミノ酸脂質の例としては、以下の構造物が挙げられる：

【 0 1 1 6】

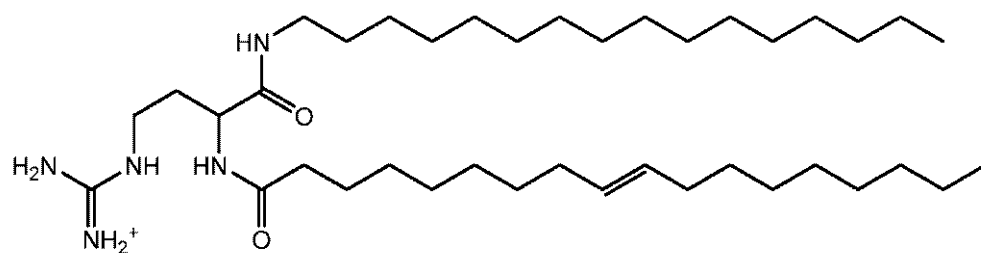
【化 1 3】

化合物 10



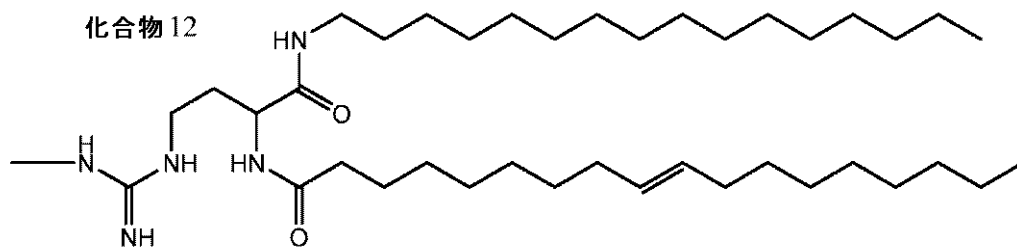
10

化合物 11



20

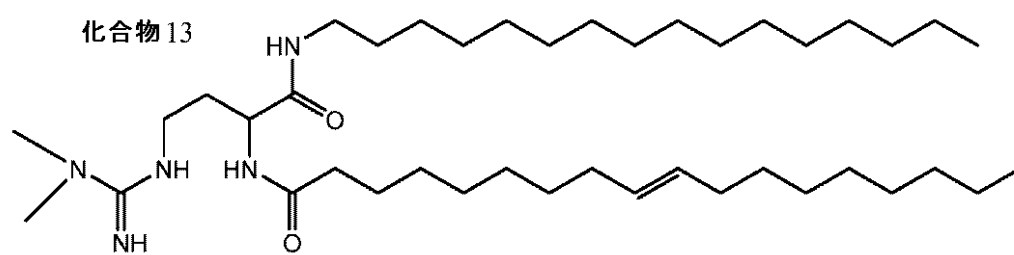
化合物 12



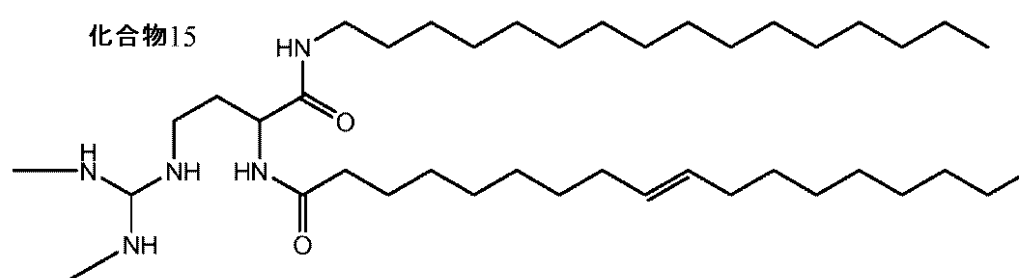
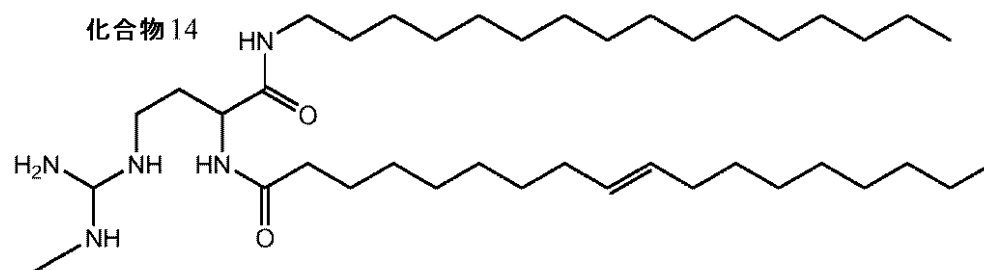
【 0 1 1 7 】

30

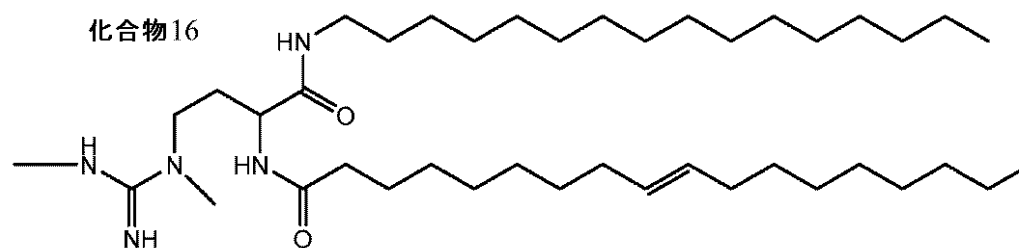
【化 1 4】



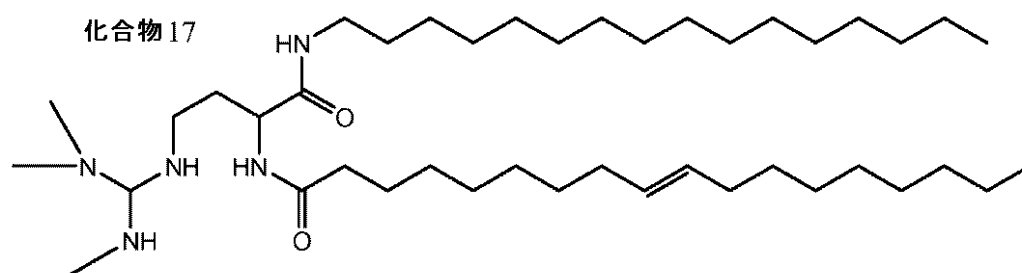
10



20



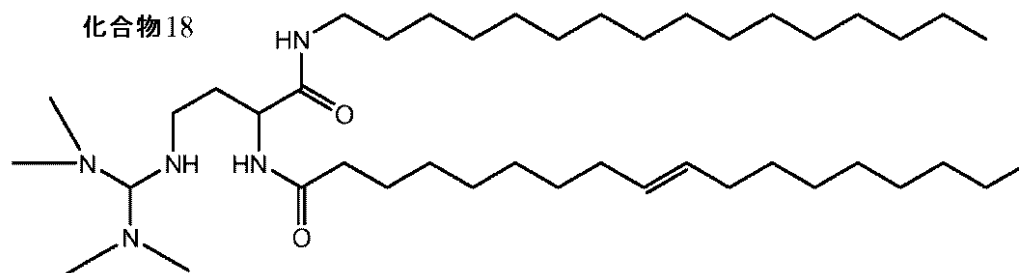
30



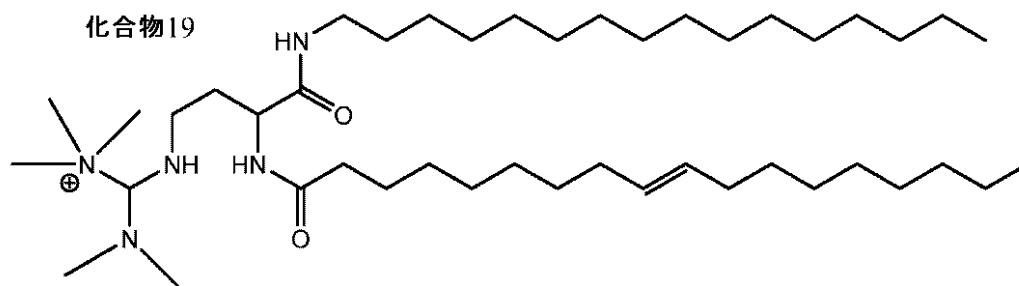
40

【 0 1 1 8 】

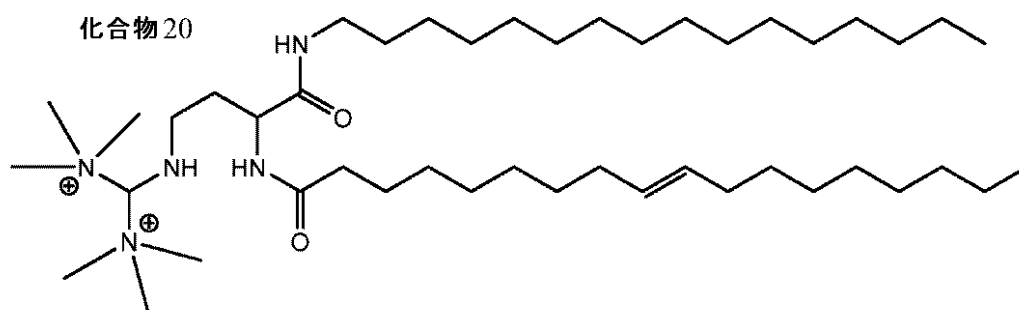
【化 1 5】



10



20



アミノ酸脂質の例としては、 $R^3 - (C=O) - \text{no r n o r A r g} - \text{NH} - R^4$ が挙げられ、ここでno r n o r A r gは、D-ノルーノルアルギニンもしくはL-ノルーノルアルギニンであり、 R^3 および R^4 は独立して、アルキル（例えば、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、およびウンデシル）である。

30

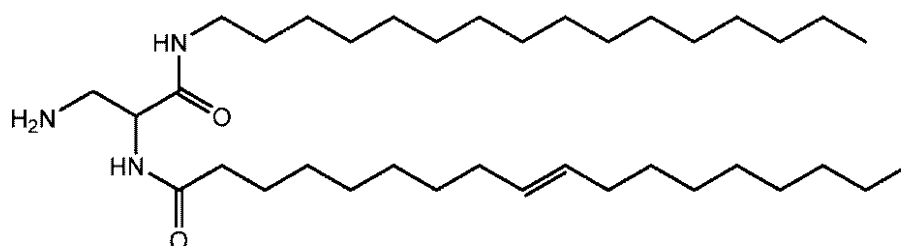
【0 1 1 9】

アミノ酸脂質の例としては、以下の構造物が挙げられる：

【0 1 2 0】

【化 1 6】

化合物 21

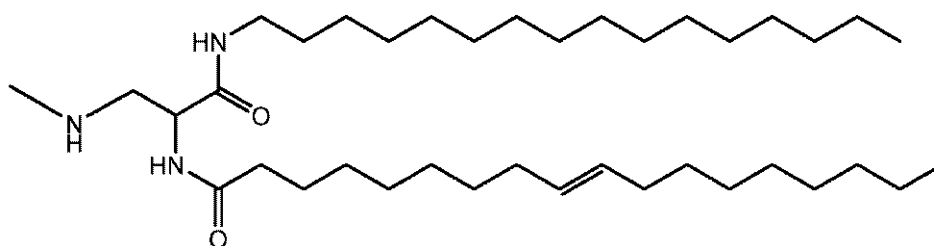


40

【0 1 2 1】

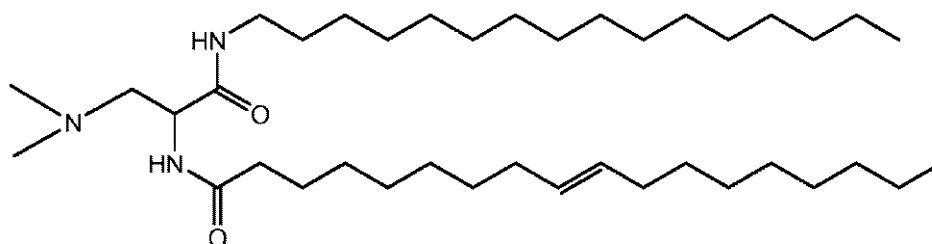
【化 1 7】

化合物 22



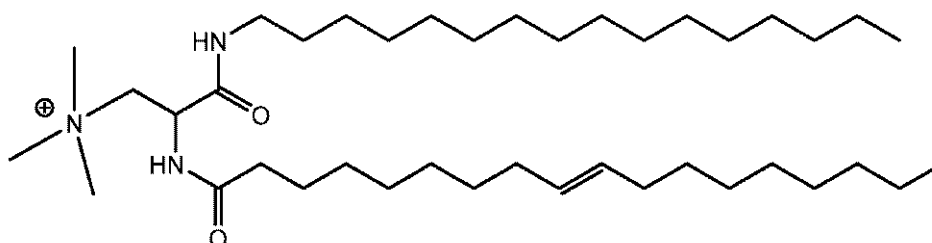
10

化合物 23



20

化合物 24



30

アミノ酸脂質の例としては、 $R^3 - (C=O) - \text{ホモArg} - \text{NH} - R^4$ が挙げられ、ここでホモArgは、D-ホモアルギニンもしくはL-ホモアルギニンであり、 R^3 および R^4 は独立して、アルキル（例えば、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、およびウンデシル）である。

【0 1 2 2】

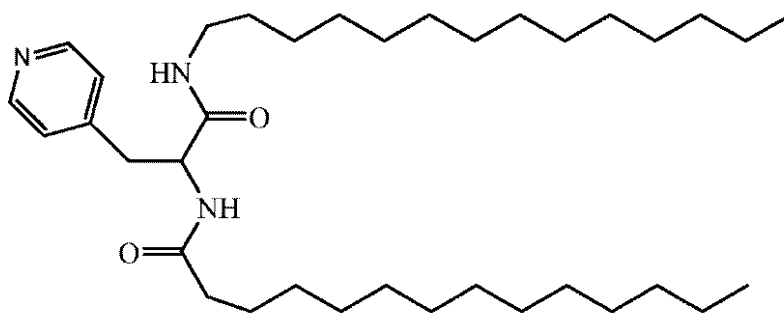
アミノ酸脂質の例としては、 $R^3 - (C=O) - 4\text{-ピリジルアラニン} - \text{NH} - R^4$ が挙げられ、ここで上記ピリジルアラニンは、D-ピリジルアラニンもしくはL-ピリジルアラニンであり、 R^3 および R^4 は独立して、アルキル（例えば、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、およびウンデシル）である。 $R^3 - (C=O) - \text{ピリジルアラニン} - \text{NH} - R^4$ アミノ酸脂質の例は、薬学的に受容可能なピリジル塩（例えば、4-[N-メチルピリジル]アラニנקロリド）を含む。ピリジルアラニンアミノ酸脂質の例としては、以下の構造物が挙げられる：

40

【0 1 2 3】

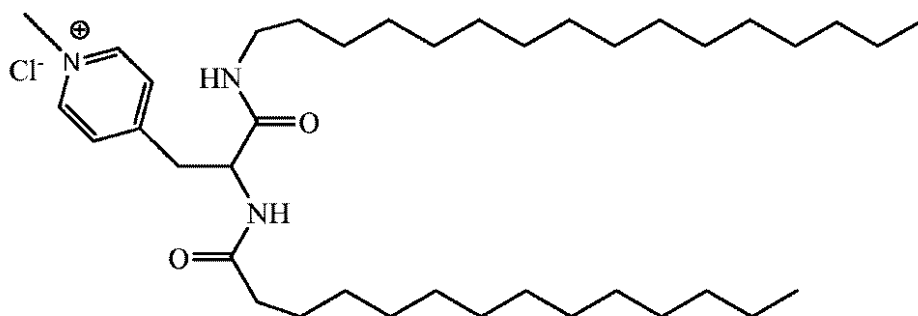
【化 1 8】

化合物 25



10

化合物 26



20

アミノ酸脂質の例としては、 $R^3 - (C=O) - \text{Lys} - \text{NH} - R^4$ が挙げられ、ここで R^3 および R^4 は独立して、アルキルもしくはアルケニルである。

【0 1 2 4】

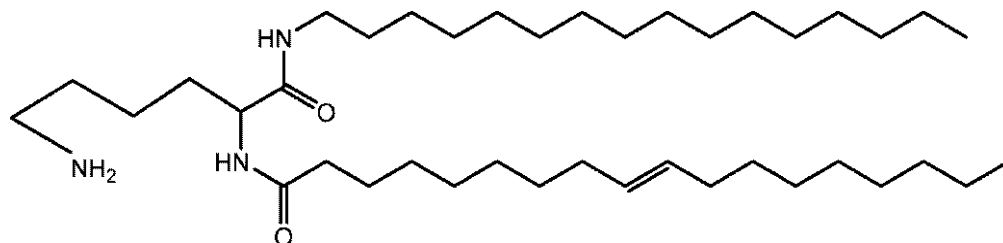
30

アミノ酸脂質の例としては、以下の構造物が挙げられる：

【0 1 2 5】

【化 1 9】

化合物 27

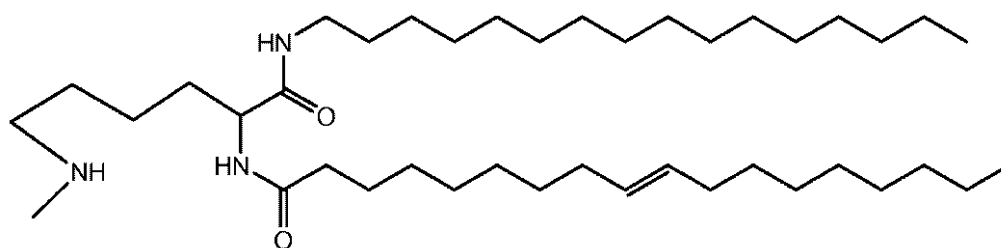


40

【0 1 2 6】

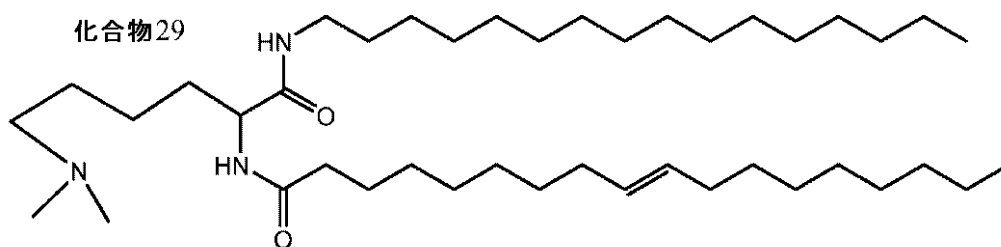
【化 2 0】

化合物28



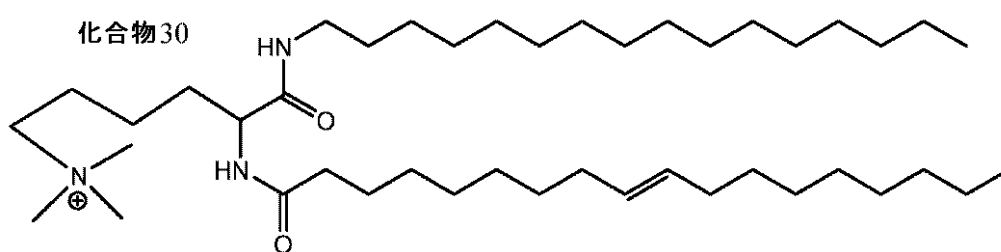
10

化合物29



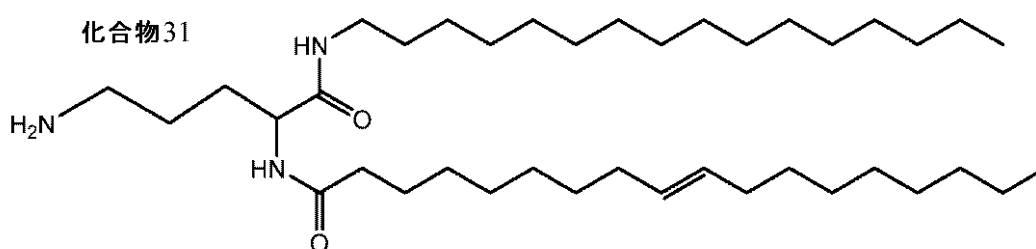
20

化合物30

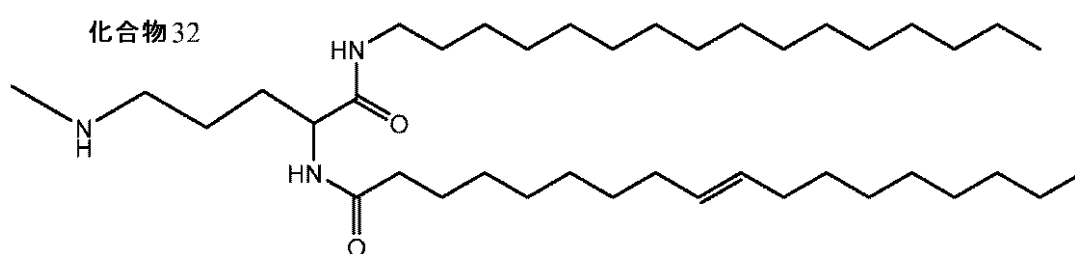


30

化合物31



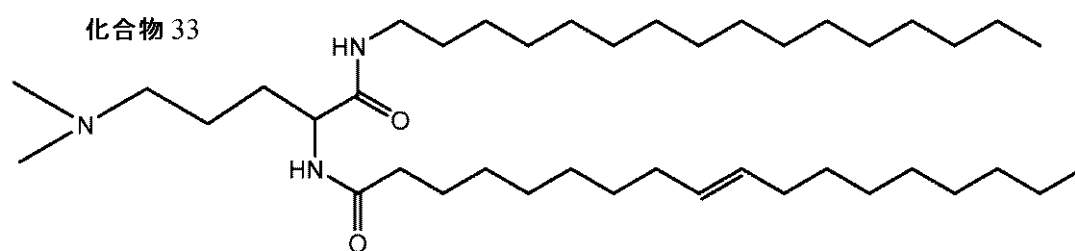
化合物32



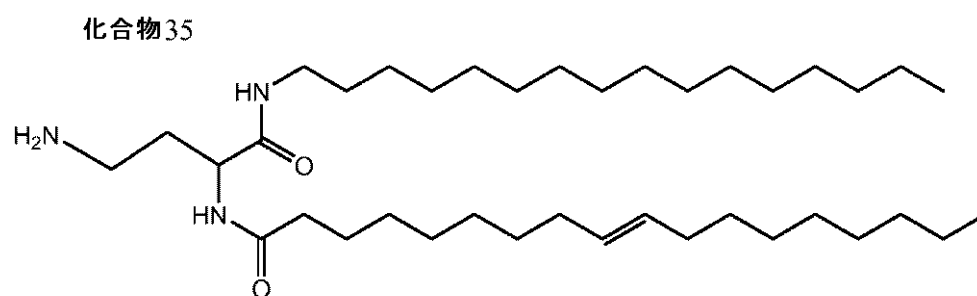
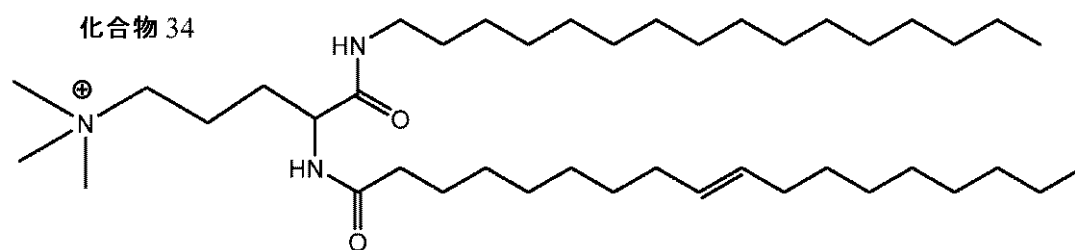
40

【 0 1 2 7】

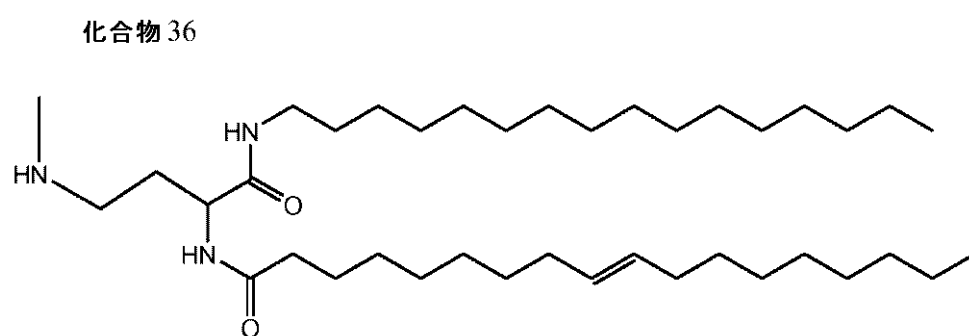
【化 2 1】



10



20



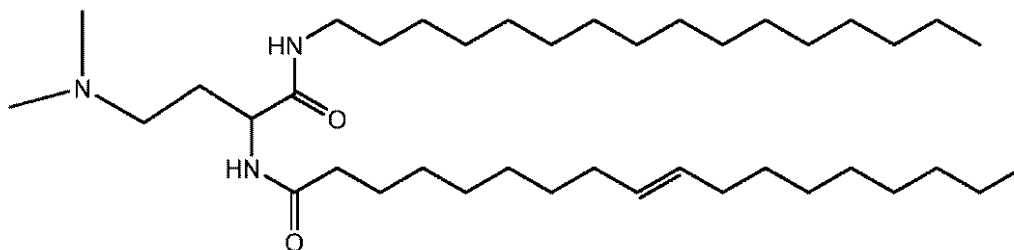
30

【 0 1 2 8】

40

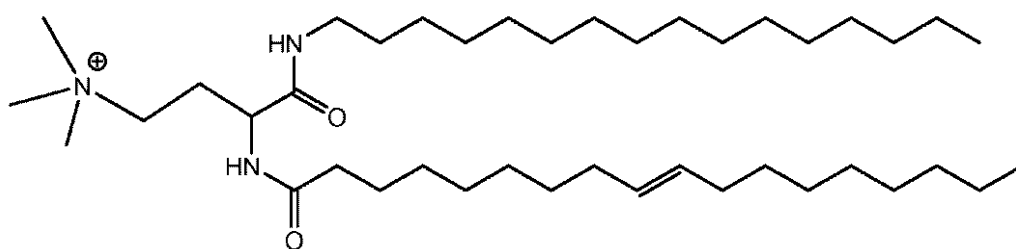
【化 2 2】

化合物 37



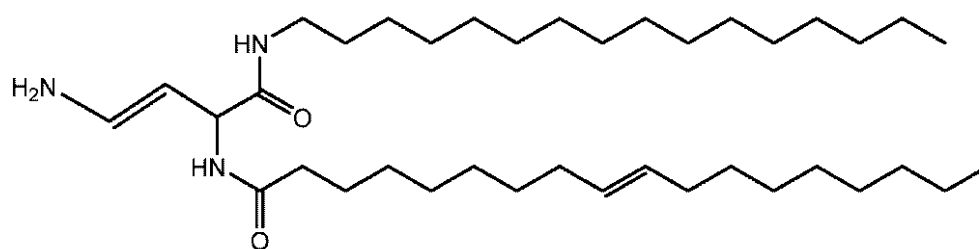
10

化合物 38



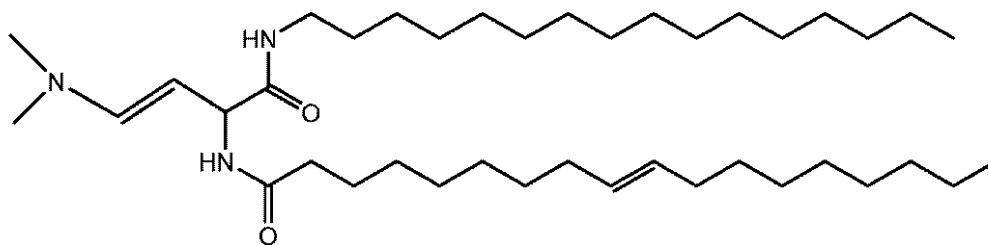
20

化合物 39



30

化合物 40



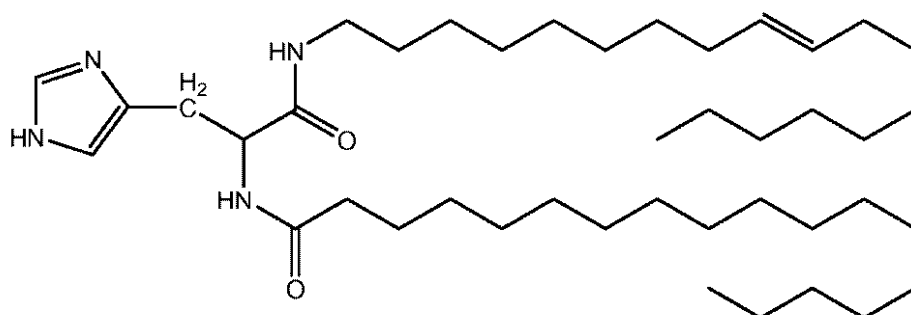
40

アミノ酸脂質の例としては、 $R^3 - (C=O) - His - NH - R^4$ が挙げられ、ここで R^3 および R^4 は独立して、アルキルもしくはアルケニルである。His アミノ酸脂質の例としては、以下の構造物が挙げられる：

【0 1 2 9】

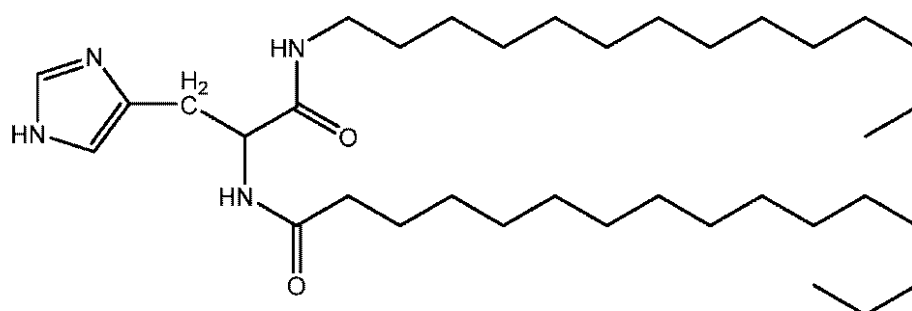
【化 2 3】

化合物 41



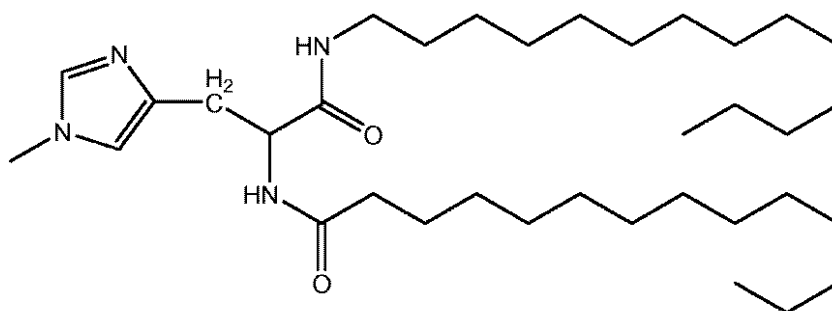
10

化合物 42



20

化合物 43



30

アミノ酸脂質の例としては、 $R^3 - (C=O) - Xaa - O - R^4$ が挙げられ、ここで R^3 はアルキルであり、 R^4 はスフィンゴイド (sphingoid) である。 40

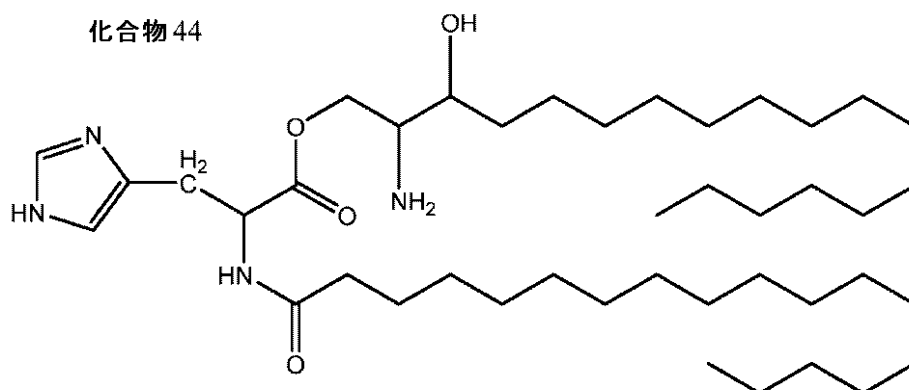
【0130】

アミノ酸脂質の例としては、以下の構造物が挙げられる：

【0131】

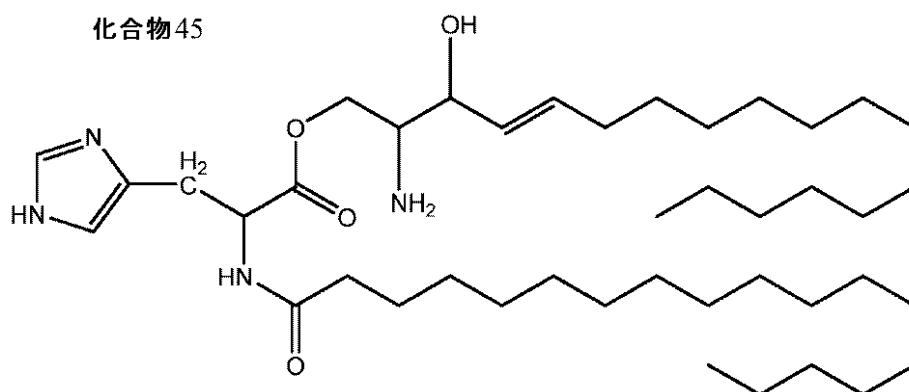
【化 2 4】

化合物 44



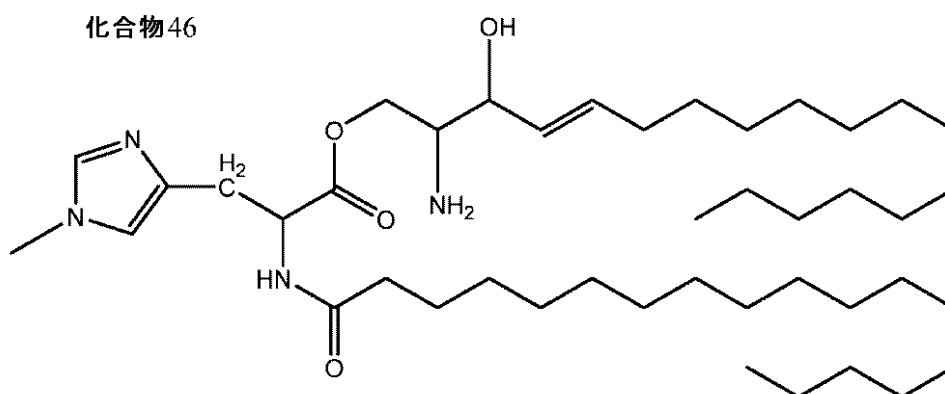
10

化合物 45



20

化合物 46



30

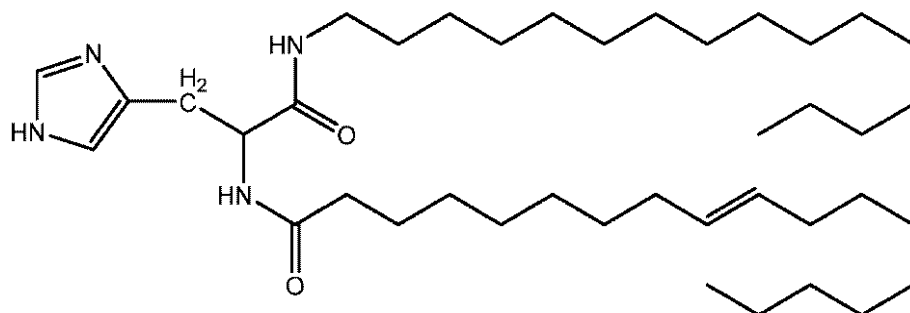
アミノ酸脂質の例としては、 $R^3 - (C=O) - X a a - NH - R^4$ が挙げられ、ここで R^3 および R^4 は、アルキルもしくはアルケニルである。アミノ酸脂質の例としては、以下の構造物が挙げられる：

40

【0 1 3 2】

【化 2 5】

化合物 47



10

アミノ酸脂質の例としては、(C10アシル) - Arg - NH - (C10アルキル)、(C12アシル) - Arg - NH - (C12アルキル)、(C14アシル) - Arg - NH - (C14アルキル)、(C16アシル) - Arg - NH - (C16アルキル)、(C18アシル) - Arg - NH - (C18アルキル)、(C10アシル) - ホモArg - NH - (C10アルキル)、(C12アシル) - ホモArg - NH - (C12アルキル)、(C14アシル) - ホモArg - NH - (C14アルキル)、(C16アシル) - ホモArg - NH - (C16アルキル)、(C18アシル) - ホモArg - NH - (C18アルキル)、(C10アシル) - norArg - NH - (C10アルキル)、(C12アシル) - norArg - NH - (C12アルキル)、(C14アシル) - norArg - NH - (C14アルキル)、(C16アシル) - norArg - NH - (C16アルキル)、(C18アシル) - norArg - NH - (C18アルキル)、(C10アシル) - nor norArg - NH - (C10アルキル)、(C12アシル) - nor norArg - NH - (C12アルキル)、(C14アシル) - nor norArg - NH - (C14アルキル)、(C16アシル) - nor norArg - NH - (C16アルキル)、(C18アシル) - nor norArg - NH - (C18アルキル)、(C10アシル) - 4-Pal - NH - (C10アルキル)、(C12アシル) - 4-Pal - NH - (C12アルキル)、(C14アシル) - 4-Pal - NH - (C14アルキル)、(C16アシル) - 4-Pal - NH - (C16アルキル)、(C18アシル) - 4-Pal - NH - (C18アルキル)、(C10アシル) - 4-Pal (Me) - NH - (C10アルキル)、(C12アシル) - 4-Pal (Me) - NH - (C12アルキル)、(C14アシル) - 4-Pal (Me) - NH - (C14アルキル)、(C16アシル) - 4-Pal (Me) - NH - (C16アルキル)、および (C18アシル) - 4-Pal (Me) - NH - (C18アルキル) が挙げられる。

20

30

【0133】

一般に、名称「C14 - norArg - C14」とは、例えば、(C13アルキル) - (C=O) - norArg - NH - (C14アルキル) をいい、これは、(C14アシル) - norArg - NH - (C14アルキル) と同じである。

40

【0134】

アミノ酸脂質の例としては、(C10アシル) - D-Arg - L-Arg - NH - (C10アルキル)、(C12アシル) - D-Arg - L-Arg - NH - (C12アルキル)、(C14アシル) - D-Arg - L-Arg - NH - (C14アルキル)、(C16アシル) - D-Arg - L-Arg - NH - (C16アルキル)、(C18アシル) - D-Arg - L-Arg - NH - (C18アルキル)、(C10アシル) - D-ホモArg - L-ホモArg - NH - (C10アルキル)、(C12アシル) - D-ホモArg - L-ホモArg - NH - (C12アルキル)、(C14アシル) - D-ホモArg - L-ホモArg - NH - (C14アルキル)、(C16アシル) - D-ホモArg - L-ホモArg - NH - (C16アルキル)、(C18アシル) - D-ホモArg - L-ホモArg

50

-NH-(C18アルキル)、(C10アシル)-D-norArg-L-norArg
 -NH-(C10アルキル)、(C12アシル)-D-norArg-L-norArg
 -NH-(C12アルキル)、(C14アシル)-D-norArg-L-norArg
 -NH-(C14アルキル)、(C16アシル)-D-norArg-L-norArg
 -NH-(C16アルキル)、(C18アシル)-D-norArg-L-norArg
 -NH-(C18アルキル)、(C10アシル)-D-norArg-L-norArg
 -NH-(C10アルキル)、(C12アシル)-D-norArg-L-norArg
 -NH-(C12アルキル)、(C14アシル)-D-norArg-L-norArg
 -NH-(C14アルキル)、(C16アシル)-D-norArg-L-norArg
 -NH-(C16アルキル)、(C18アシル)-D-norArg-L-norArg
 -NH-(C18アルキル)が挙げられる。

10

【0135】

アミノ酸脂質の例としては、(C10アシル)-His-Arg-NH-(C10アル
 キル)、(C12アシル)-His-Arg-NH-(C12アルキル)、(C14アシ
 ル)-His-Arg-NH-(C14アルキル)、(C16アシル)-His-Arg
 -NH-(C16アルキル)、(C18アシル)-His-Arg-NH-(C18アル
 キル)、(C10アシル)-His-Arg-NH-(C10アルキル)、(C12アシ
 ル)-His-Arg-NH-(C12アルキル)、(C14アシル)-His-Arg
 -NH-(C14アルキル)、(C16アシル)-His-Arg-NH-(C16アル
 キル)、(C18アシル)-His-Arg-NH-(C18アルキル)、(C10アシ
 ル)-His-Arg-(C10アルキル)、(C12アシル)-His-Arg-NH
 -(C12アルキル)、(C14アシル)-His-Arg-NH-(C14アルキル)
 、(C16アシル)-His-Arg-NH-(C16アルキル)、(C18アシル)-
 His-Arg-NH-(C18アルキル)、(C10アシル)-His-Arg-NH
 -(C10アルキル)、(C12アシル)-His-Arg-NH-(C12アルキル)
 、(C14アシル)-His-Arg-NH-(C14アルキル)、(C16アシル)-
 His-Arg-NH-(C16アルキル)、(C18アシル)-His-Arg-NH
 -(C18アルキル)が挙げられる。

20

【0136】

アミノ酸脂質の例としては、(C10アシル)-His-Asp-NH-(C10アル
 キル)、(C12アシル)-His-Asp-NH-(C12アルキル)、(C14アシ
 ル)-His-Asp-NH-(C14アルキル)、(C16アシル)-His-Asp
 -NH-(C16アルキル)、(C18アシル)-His-Asp-NH-(C18アル
 キル)、(C10アシル)-His-Asp-NH-(C10アルキル)、(C12アシ
 ル)-His-Asp-NH-(C12アルキル)、(C14アシル)-His-Asp
 -NH-(C14アルキル)、(C16アシル)-His-Asp-NH-(C16アル
 キル)、(C18アシル)-His-Asp-NH-(C18アルキル)、(C10アシ
 ル)-His-Asp-(C10アルキル)、(C12アシル)-His-Asp-NH
 -(C12アルキル)、(C14アシル)-His-Asp-NH-(C14アルキル)
 、(C16アシル)-His-Asp-NH-(C16アルキル)、(C18アシル)-
 His-Asp-NH-(C18アルキル)、(C10アシル)-His-Asp-NH
 -(C10アルキル)、(C12アシル)-His-Asp-NH-(C12アルキル)
 、(C14アシル)-His-Asp-NH-(C14アルキル)、(C16アシル)-
 His-Asp-NH-(C16アルキル)、(C18アシル)-His-Asp-NH
 -(C18アルキル)が挙げられる。

30

40

【0137】

アミノ酸脂質の例としては、(C10アシル)-Pal-Arg-NH-(C10アル
 キル)、(C12アシル)-Pal-Arg-NH-(C12アルキル)、(C14アシ
 ル)-Pal-Arg-NH-(C14アルキル)、(C16アシル)-Pal-Arg

50

$\text{—NH—(C16アルキル)、(C18アシル)—Pal—Arg—NH—(C18アルキル)、(C10アシル)—Pal—Arg—NH—(C10アルキル)、(C12アシル)—Pal—Arg—NH—(C12アルキル)、(C14アシル)—Pal—Arg—NH—(C14アルキル)、(C16アシル)—Pal—Arg—NH—(C16アルキル)、(C18アシル)—Pal—Arg—NH—(C18アルキル)、(C10アシル)—Pal—Arg—(C10アルキル)、(C12アシル)—Pal—Arg—NH—(C12アルキル)、(C14アシル)—Pal—Arg—NH—(C14アルキル)、(C16アシル)—Pal—Arg—NH—(C16アルキル)、(C18アシル)—Pal—Arg—NH—(C18アルキル)、(C10アシル)—Pal—Arg—NH—(C10アルキル)、(C12アシル)—Pal—Arg—NH—(C12アルキル)、(C14アシル)—Pal—Arg—NH—(C14アルキル)、(C16アシル)—Pal—Arg—NH—(C16アルキル)、(C18アシル)—Pal—Arg—NH—(C18アルキル)}$ が挙げられる。

10

【0138】

アミノ酸脂質は、ポリマー種もしくはマルチマー種（例えば、ダイマー、トリマー、もしくはテトラマー）として調製され得る。上記ポリマー種もしくはマルチマー種は、単一のアミノ酸脂質から調製され得るか、または1種より多くの種から調製され得る。ポリマー種もしくはマルチマーのアミノ酸脂質種は、いくつかの実施形態において、上記アミノ酸の側鎖上にスルフヒドリル基もしくは他の架橋可能な基を、または連結されるかもしくは固定された（tethered）アミノ酸構造物（例えば、デスモシンもしくはシトルリン）を提供することによって、調製され得る。他の実施形態において、ポリマーもしくはマルチマーのアミノ酸脂質種は、生体結合体リンカー化合物で調製され得る。

20

【0139】

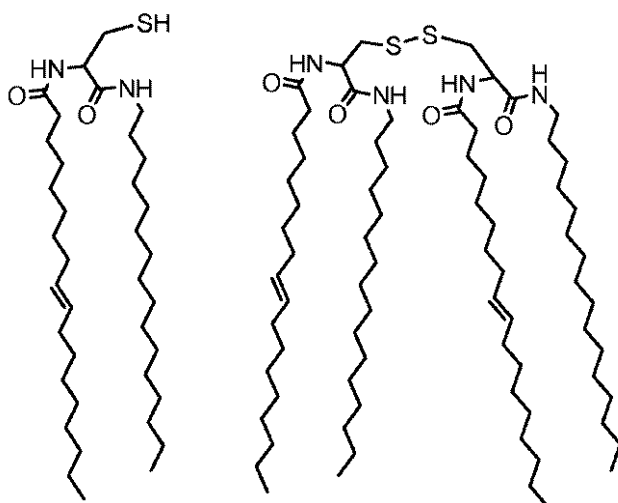
アミノ酸脂質の例としては、以下の構造物が挙げられる：

【0140】

【化26】

化合物48

化合物49



30

40

アミノ酸脂質は、上記アミノ酸側鎖に共有結合したペプチドもしくはポリマー鎖を有する結合体として調製され得る。上記ペプチドもしくはポリマー鎖は、上記アミノ酸側鎖の反応性基を使用して（例えば、システインもしくはメチオニンの、それぞれ、チオール基もしくはメチルメルカプタン基を、またはセリンのアルコール基、もしくはリジンのアミノ基）結合され得る。上記ペプチドもしくはポリマー鎖は、置換されたかもしくは改変されたアミノ酸側鎖の任意の反応性基を使用して結合され得る。種々のリンカー基（例えば、NHS、マレイミド、ならびに生体結合体技術およびリンカー）が、使用され得る。

50

【0141】

アミノ酸脂質は、オリゴマーフレームワークもしくはポリマーフレームワークに結合された構築物として調製され得る。例えば、アミノ酸脂質は、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、オリゴヌクレオチドネットワークもしくは格子、ポリ（アミノ酸）、炭水化物、デキストラン、ヒドロゲル、またはデンプンに結合され得る。

【0142】

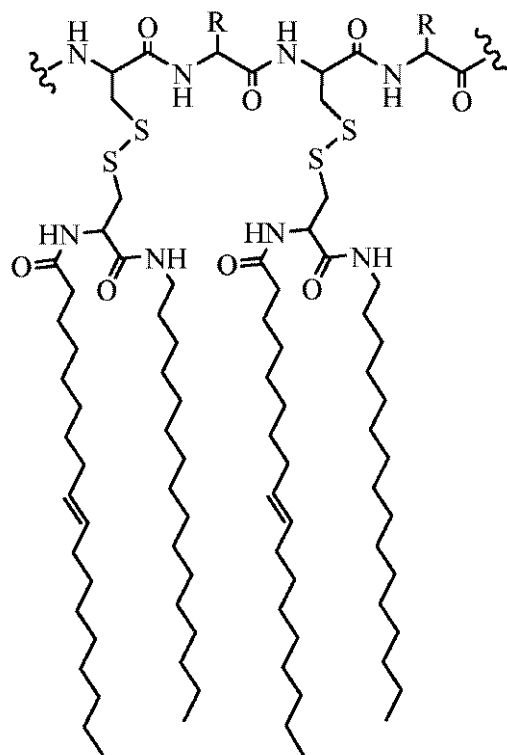
アミノ酸脂質は、薬学的薬物化合物もしくは組成物、または生物学的に活性な薬剤に結合された構築物として調製され得る。例えば、アミノ酸脂質は、核酸薬物（例えば、調節性RNAもしくは干渉RNA）に結合体化され得る。

【0143】

アミノ酸脂質の例としては、以下の構造物が挙げられる：

【0144】

【化27】



ここでRは、任意のアミノ酸側鎖である。

【0145】

本開示の化合物および組成物は、可溶化もしくは官能化する基もしくは構造（ポリマー構造を含む）を組み込み得る。例えば、R. L. Dunn and R. M. Ottenbrite, *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, ACS Symp. Ser. 469 (1991)を参照のこと。アミノ酸脂質は、可溶性を増強するために（例えば、ジオールを結合するために、四級アンモニウムもしくは荷電した基を調製するために、ヒドロキシルもしくはアミン基（例えば、アルコール、ポリオール、もしくはポリエーテル）を結合するために、またはポリエチレニミン、ポリエチレングリコールもしくはポリプロピレングリコールを結合するために）誘導体化され得る。結合されたポリマー成分（例えば、ポリエチレングリコール）の分子量は、任意の値（例えば、200Da、300Da、400Da、500Da、600Da、750Da、1000Da、1250Da、1500Da、2000Da、3000Da、4000Da、5000Da、7500Da、10,000Da、15,000Da、20,000Da、25,000Da、もしくは30,000Da以上）であり得る。例えば、ポリエチレングリコール鎖は、アミノ酸側鎖のアミノ基もしくは他の反応性基

を介して結合され得る。

【0146】

一般に、本明細書において使用される場合、一般的化学用語とは、別段特定されなければ、特定されたタイプのうちの全ての基（原子の任意の数およびタイプを有する基を含む）をいう。例えば、「アルケニル」とは、広義には、下記で定義されるように、2～22個の炭素原子を有するアルキルをいう一方で、(C18:1)アルケニルとは、18個の炭素原子および1個の二重結合を有するアルケニルをいう。

【0147】

用語「アルキル」とは、本明細書において使用される場合、飽和、分枝もしくは非分枝の、置換されているかもしくは置換されていない、1～22個の炭素原子を含む脂肪族基をいう。この定義は、他の基（例えば、アルコキシ、アルカノイル、アラキル、および以下に定義される他の基）のアルキル部分に適用される。用語「シクロアルキル」とは、本明細書において使用される場合、飽和の、置換されているかもしくは置換されていない、3～12個の炭素原子を含む環式アルキル基をいう。本明細書において使用される場合、用語「C(1-5)アルキル」とは、C(1)アルキル、C(2)アルキル、C(3)アルキル、C(4)アルキル、およびC(5)アルキルを含む。同様に、用語「C(3-22)アルキル」とは、C(1)アルキル、C(2)アルキル、C(3)アルキル、C(4)アルキル、C(5)アルキル、C(6)アルキル、C(7)アルキル、C(8)アルキル、C(9)アルキル、C(10)アルキル、C(11)アルキル、C(12)アルキル、C(13)アルキル、C(14)アルキル、C(15)アルキル、C(16)アルキル、C(17)アルキル、C(18)アルキル、C(19)アルキル、C(20)アルキル、C(21)アルキル、およびC(22)アルキルを含む。

【0148】

用語「アルケニル」とは、本明細書において使用される場合、不飽和の、分枝もしくは非分枝の、置換されているかもしくは置換されていない、2～22個の炭素原子および少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を有するアルキルもしくはシクロアルキルをいう。用語「アルキニル」とは、本明細書において使用される場合、不飽和の、分枝もしくは非分枝の、置換されているかもしくは置換されていない、2～22個の炭素原子および少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を有するアルキルもしくはシクロアルキルをいう。

【0149】

用語「アルコキシ」とは、本明細書において使用される場合、酸素原子に共有結合されたアルキル、シクロアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル基をいう。用語「アルカノイル」とは、本明細書において使用される場合、 -C(=O)- アルキルをいい、これは、代わりに、「アシル」ともいわれ得る。用語「アルカノイルオキシ」とは、本明細書において使用される場合、 -O-C(=O)- アルキル基をいう。用語「アルキルアミノ」とは、本明細書において使用される場合、基 -NRR' であって、ここでRおよびR'は、各々、水素もしくはアルキルのいずれかであり、かつRおよびR'のうちの少なくとも一方は、アルキルであるものをいう。アルキルアミノは、ピペリジノのような基を含み、ここでRおよびR'は環を形成する。用語「アルキルアミノアルキル」とは、 -アルキル-NRR' をいう。

【0150】

用語「アリール」とは、本明細書において使用される場合、各環中に4～12個の原子の任意の安定な単環式、二環式もしくは多環式の炭素環系であって、ここで少なくとも1個の環は、芳香族であるものをいう。アリールのいくつかの例としては、フェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、インダニル、およびビフェニルが挙げられる。アリール置換基が、二環式でありかつ一方の環が非芳香族である場合、結合は、上記芳香族環に対してであることが理解される。任意のアリールは、置換されていても、置換されていなくてもよい。

【0151】

用語「ヘテロアリール」とは、本明細書において使用される場合、各環において4～1

10

20

30

40

50

2 個の原子の任意の安定な単環式、二環式、もしくは多環式の炭素環系であって、ここで少なくとも一方の環が歩行族でありかつ酸素、窒素および硫黄から選択される 1～4 個のヘテロ原子を含むものをいう。ヘテロアリールのいくつかの例としては、アクリジニル、キノキサリニル、ピラゾリル、インドリル、ベンゾトリアゾリル、フラニル、チエニル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、キノリニル、イソキノリニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、ピリジニル、ピリミジニル、ピロリル、およびテトラヒドロキノリニルが挙げられる。ヘテロアリールとしては、窒素含有ヘテロアリールの N-オキシド誘導体が挙げられる。

【0152】

用語「複素環」もしくは「ヘテロシクリル」とは、本明細書において使用される場合、5～22 個の原子の芳香族もしくは非芳香族の環系であって、ここで上記環原子のうちの 1～4 個が酸素、窒素、および硫黄から選択されるヘテロ原子であるものをいう。従って、複素環は、そのヘテロアリールまたはジヒドロもしくはテトラヒドロ (tetrahydro) バージョンであり得る。

【0153】

用語「アロイル」とは、本明細書において使用される場合、芳香族カルボン酸（例えば、置換された安息香酸）に由来するアリールラジカルをいう。用語「アラルキル」とは、本明細書において使用される場合、アルキル基に結合したアリール基（例えば、ベンジル基）をいう。

【0154】

用語「カルボキシル」とは、本明細書において使用される場合、式 $-C(=O)OH$ もしくは $-C(=O)O^-$ の基を表す。用語「カルボニル」および「アシル」とは、本明細書において使用される場合、酸素原子が炭素原子に二重結合している基 $>C=O$ をいう。用語「ヒドロキシル」とは、本明細書において使用される場合、 $-OH$ もしくは $-O^-$ をいう。用語「ニトリル」もしくは「シアノ」とは、本明細書において使用される場合、 $-CN$ をいう。用語「ハロゲン」もしくは「ハロ」とは、フルオロ ($-F$)、クロロ ($-Cl$)、ブロモ ($-Br$)、およびヨード ($-I$) をいう。

【0155】

用語「置換されている」とは、本明細書において使用される場合、1 個以上の置換もしくは置換基を有する原子であって、上記置換もしくは置換基が同じであっても異なってもよく、かつ水素置換基を含み得るものに言及する。従って、用語、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルカノイル、アルカノイルオキシ、アルキルアミノ、アルキルアミノアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、アロイル、およびアラルキルとは、本明細書において使用される場合、置換されているバリエーションを含む基に言及する。置換されているバリエーションは、直鎖状の、分枝状の、および環式のバリエーション、ならびに上記基のうちの任意の炭素原子に結合された 1 個以上の水素を置換する置換基を有する基を含む。上記基のうちの炭素原子に結合され得る置換基としては、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルカノイル、アルカノイルオキシ、アルキルアミノ、アルキルアミノアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、アロイル、アラルキル、アシル、ヒドロキシル、シアノ、ハロ、ハロアルキル、アミノ、アミノアシル、アルキルアミノアシル、アシルオキシ、アリールオキシ、アリールオキシアルキル、メルカプト、ニトロ、カルバミル、カルバモイル、および複素環が挙げられる。例えば、用語、エチルとしては、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CHFCH_3$ 、 $-CF_2CH_3$ 、 $-CHFCH_2F$ 、 $-CHFCHF_2$ 、 $-CHF CF_3$ 、 $-CF_2CH_2F$ 、 $-CF_2CHF_2$ 、 $-CF_2CF_3$ 、および上記の他のバリエーションが挙げられるが、これらに限定されない。一般に、置換基は、任意の原子もしくは原子の基でさらに置換され得る。

【0156】

本発明のアミノ酸脂質もしくはその改変体は、当該分野で公知の方法によって合成され得る。

【0157】

種々の有機基および保護基を調製するための方法は、当該分野で公知であり、それらの使用および改変は、一般に、当業者の能力の範囲内である。例えば、Stanley R. Sandler and Wolf Karo, Organic Functional Group Preparations (1989); Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques (1996); Leroy G. Wade, Compendium Of Organic Synthetic Methods (1980)を参照のこと;保護基の例は、T. W. Greene and P. G. M. Wuts, Protective Groups In Organic Synthesis (第3版, 1991)において見いだされる。

10

【0158】

十分に塩基性である本発明のペプチドおよびタンパク質組成物の薬学的に受容可能な塩は、例えば、無機酸もしくは有機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、クロロスルホン酸、トリフルオロ酢酸、クエン酸、マレイン酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マレイン酸、マロン酸、フマル酸、もしくは酒石酸）、およびアルカンスルホン酸もしくはアレーンスルホン酸（例えば、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、クロロベンゼンスルホン酸、トルエンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、およびカンファースルホン酸）との酸付加塩であり得る。

【0159】

20

十分に酸性である本発明の終えもしくはタンパク質組成物の薬学的に受容可能な塩は、アルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩もしくはカリウム塩）、またはアルカリ土類金属塩（例えば、カルシウム塩もしくはマグネシウム塩）、または亜鉛塩もしくはマンガン塩、またはアンモニウム塩もしくは生理学的に受容可能なカチオンを提供する有機塩基との塩（例えば、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、エチレンジアミン、トロメタミン、N-メチルグルカミン、ピペリジン、モルホリンもしくはトリスー（2-ヒドロキシエチル）アミンとの塩）であり得、そしてアミノ酸の塩（例えば、アルギネート）、および有機酸（例えば、グルクロン酸もしくはガラクトン酸）との塩を含む。例えば、Berger, J. Pharm. Sci. 66:1-19, 1977を参照のこと。

30

【0160】

他の成分の中でも干渉RNA薬剤と、脂質、ペプチド、もしくはタンパク質とを含む本開示の組成物の塩もしくは薬学的に受容可能な塩は、上記干渉RNA薬剤と、上記脂質、ペプチド、もしくはタンパク質との塩複合体を含み得る。上記干渉RNA薬剤と、上記脂質、ペプチド、もしくはタンパク質との塩複合体は、干渉RNA薬剤の薬学的に受容可能な塩から、または上記脂質、ペプチド、もしくはタンパク質の薬学的に受容可能な塩から、形成され得る。

【0161】

本開示のいくつかの化合物は、上記化合物を塩基付加塩もしくは酸付加塩のいずれかへと作製させ得る塩基性官能基および酸性官能基の両方を含み得る。

40

【0162】

本発明のいくつかの化合物、ペプチドおよび／もしくはタンパク質組成物は、1個以上のキラル中心および／もしくは幾何異性中心（E-異性体およびZ-異性体）を有し得、そして本発明は、全てのこのような光学異性体、ジアステレオマー、幾何異性体、およびこれらの混合物を包含することが理解されるべきである。

【0163】

本発明は、本明細書で開示される化合物、ペプチドおよび／もしくはタンパク質組成物の任意のおよび全ての、互変異形態、溶解しているかもしくは溶解していない形態、水和しているかもしくは水和していない形態、ならびに任意の原子同位体形態を包含する。

【0164】

50

(さらなる送達脂質)

本発明のいくつかの局面において、アミノ酸脂質およびさらなる非アミノ酸脂質は、調節性RNA成分、RNAアンタゴニスト、干渉RNA、もしくは核酸の送達および投与のために使用され得る。より具体的には、本発明の組成物は、非アミノ酸カチオン性脂質および非アミノ酸非カチオン性脂質とともに、1種以上のアミノ酸脂質を含み得る。

【0165】

非アミノ酸カチオン性脂質は、モノカチオン性であってもよいし、ポリカチオン性であってもよい。いくつかの非アミノ酸カチオン性脂質は、中性脂質および特定のpHにおいてほぼゼロの正味の電荷を有する脂質（例えば、双性イオン性脂質）を含む。非アミノ酸非カチオン性脂質はまた、アニオン性脂質を含む。

10

【0166】

いくつかの実施形態において、組成物は、RNA成分と、アミノ酸脂質および非アミノ酸カチオン性脂質との混合物もしくは複合体である。いくつかの実施形態において、組成物は、1種以上の調節性RNAもしくは干渉RNA薬剤と、1種以上のアミノ酸脂質および1種以上の非アミノ酸カチオン性脂質との混合物もしくは複合体であり得る。

【0167】

本開示の化合物および組成物は、種々の標的化リガンドもしくは薬剤と混合もしくは結合されて、生物の細胞、組織、器官もしくは領域へと、活性薬剤を送達し得る。標的化剤の例としては、抗体、レセプターのリガンド、ペプチド、タンパク質、レクチン、(ポリ) サッカリド、ガラクトース、マンノース、シクロデキストリン、核酸、DNA、RNA、アプタマー、およびポリアミノ酸を含む。

20

【0168】

非アミノ酸カチオン性脂質の例としては、N-[1-(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(DOTMA); 1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DOTAP); 1,2-ビス(ジミリストイルオキシ(dimyrstoyloxy))-3-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DMTAP); 1,2-ジミリスチルオキシ(dimyristyloxy)プロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DMRIE); ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(DDAB); 3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル)コレステロール(DC-Chol); 3β-[N',N'-ジグアニジノエチル-アミノエタン)カルバモイルコレステロール(BGTC); 2-(2-(3-(ビス(3-アミノプロピル)アミノ)プロピルアミノ)アセトアミド)-N,N-ジテトラデシルアセトアミド(RPR209120); これらの薬学的に受容可能な塩、およびこれらの混合物が挙げられる。

30

【0169】

非アミノ酸カチオン性脂質の例としては、1,2-ジオルカノイル(dialkenoyl)-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(EPC)(例えば、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン、これらの薬学的に受容可能な塩、およびこれらの混合物が挙げられる。

40

【0170】

非アミノ酸カチオン性脂質の例としては、1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DSDMA)、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)、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)、および1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DLenDMA)が挙げられる。

【0171】

非アミノ酸ポリカチオン性脂質の例としては、テトラメチルテトラパルミトイルスベルミン(TMTPS)、テトラメチルテトラオレイルスベルミン(TMTOS)、テトラメチルテトララウリルスベルミン(TMTLS)、テトラメチルテトラミリスチルスベルミ

50

ン (TMTMS)、テトラメチルジオレイルスペルミン (TMDOS)、これらの薬学的に受容可能な塩、およびこれらの混合物が挙げられる。

【0172】

非アミノ酸ポリカチオン性脂質の例としては、2, 5-ビス (3-アミノプロピルアミノ) -N- (2- (ジオクタデシルアミノ) -2-オキソエチル) ペンタンアミド (DOGS) ; 2, 5-ビス (3-アミノプロピルアミノ) -N- (2- (ジ (Z) -オクタデカ-9-ジエニルアミノ) -2-オキソエチル) ペンタンアミド (DOGS-9-エン) ; 2, 5-ビス (3-アミノプロピルアミノ) -N- (2- (ジ (9Z, 12Z) -オクタデカ-9, 12-ジエニルアミノ) -2-オキソエチル) ペンタンアミド (DLingS) ; 3-β- (N⁴- (N¹, N⁸-ジカルボベンゾキシスペルミジン) カルバモイル) コレステロール (GL-67) ; (9Z, 9'Z) -2- (2, 5-ビス (3-アミノプロピルアミノ) ペンタンアミド) プロパン-1, 3-ジイル-ジオクタデカ-9-エノエート (DOSPER) ; 2, 3-ジオレイルオキシ-N- [2 (スペルミンカルボキサミド) エチル] -N, N-ジメチル-1-プロパンアミニウム (propanaminium) トリフルオロアセテート (DOSPA) ; これらの薬学的に受容可能な塩、およびこれらの混合物が挙げられる。

10

【0173】

非アミノ酸カチオン性脂質の例としては、DS404-28 BGT C (CAS 182056-06-0)、DOSPER (CAS 178532-92-8)、GL-67 (179075-30-0)、RPR209120 (CAS 433292-13-8)、DOGS (12050-77-7)、DOGS (9-en, C18:1)、DLingS (C18:2)、およびDOTMA (104162-48-3) が挙げられる。

20

【0174】

非アミノ酸カチオン性脂質の例は、米国特許第4, 897, 355号; 同第5, 279, 833号; 同第6, 733, 777号; 同第6, 376, 248号; 同第5, 736, 392号; 同第5, 334, 761号; 同第5, 459, 127号; 同第2005/0064595号; 同第5, 208, 036号; 同第5, 264, 618号; 同第5, 279, 833号; 同第5, 283, 185号; 同第5, 753, 613号; および同第5, 785, 992号に記載されている。

【0175】

30

いくつかの実施形態において、上記組成物は、RNA成分と、アミノ酸脂質および非アミノ酸非カチオン性脂質との混合物もしくは複合体である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、1種以上のRNA成分と、1種以上のアミノ酸脂質および1種以上の非アミノ酸非カチオン性脂質との混合物もしくは複合体である。

【0176】

非アミノ酸非カチオン性脂質としては、中性、双イオン性、およびアニオン性の脂質が挙げられる。従って、非カチオン性の双イオン性脂質は、カチオン性のヘッド基を含み得る。

【0177】

非アミノ酸非カチオン性脂質の例としては、1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロール (DLG) ; 1, 2-ジミルストイル-sn-グリセロール (DMG) ; 1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール (DPG) ; 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロール (DSG) ; 1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (ナトリウム塩; DLPA) ; 1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (ナトリウム塩; DMPA) ; 1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (ナトリウム塩; DPPA) ; 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (ナトリウム塩; DSPA) ; 1, 2-ジアラキドニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DAPC) ; 1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DLPC) ; 1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DMPC) ; 1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-0-エチル-3-ホスホコリン

40

50

ン（クロリドもしくはトリフレート；DPePC）；1，2-ジパルミトイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホコリン（DPPC）；1，2-ジステアロイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）；1，2-ジラウロイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DLPE）；1，2-ジミリストイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DMPE）；1，2-ジパルミトイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DPPE）；1，2-ジステアロイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DSPE）；1，2-ジラウロイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホグリセロール（ナトリウム塩；DLPG）；1，2-ジミリストイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホグリセロール（ナトリウム塩；DMPG）；1，2-ジミリストイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホ-*s n*-1-グリセロール（アンモニウム塩；DMP-*s n*-1-G）；1，2-ジパルミトイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホグリセロール（ナトリウム塩；DPPG）；1，2-ジステアロイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホグリセロ（ナトリウム塩；DSPG）；1，2-ジステアロイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホ-*s n*-1-グリセロール（ナトリウム塩；DSP-*s n*-1-G）；1，2-ジパルミトイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン（ナトリウム塩；DPPS）；1-パルミトイル-2-リノレオイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホコリン（PLiNoPC）；1-パルミトイル-2-オレオイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホコリン（POPC）；1-パルミトイル-2-オレオイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホグリセロール（ナトリウム塩；POP G）；1-パルミトイル-2-オレオイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホグリセロール（ナトリウム塩；POP G）；1-パルミトイル-2-オレオイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホグリセロール（アンモニウム塩；POP G）；1-パルミトイル-2-4-*s n*-グリセロ-3-ホスホコリン（Polyso-PC）；1-ステアロイル-2-lyso-*s n*-グリセロ-3-ホスホコリン（S-lyso-PC）；およびこれらの混合物が挙げられる。

【0178】

非アミノ酸非カチオン性脂質の例としては、ポリマー化合物およびポリマー-脂質結合体もしくはポリマー脂質（例えば、300、500、1000、1500、2000、3500、もしくは5000の分子量のPEG領域を有するpeg化脂質（ポリエチレングリコール、N-（カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-2000）-1，2-ジミリストイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（ナトリウム塩；DMP E-MPEG-2000）；N-（カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-5000）-1，2-ジミリストイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（ナトリウム塩；DMPE-MPEG-5000）；N-（カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 2000）-1，2-ジパルミトイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（ナトリウム塩；DPPE-MPEG-2000）；N-（カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 5000）-1，2-ジパルミトイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（ナトリウム塩；DPPE-MPEG-5000）；N-（カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 750）-1，2-ジステアロイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（ナトリウム塩；DSPE-MPEG-750）；N-（カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 2000）-1，2-ジステアロイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（ナトリウム塩；DSPE-MPEG-2000）；N-（カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 5000）-1，2-ジステアロイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（ナトリウム塩；DSPE-MPEG-5000）；コレステリル硫酸ナトリウム（SCS）；これらの薬学的に受容可能な塩、およびこれらの混合物が挙げられる））が挙げられる。

【0179】

非アミノ酸非カチオン性脂質の例としては、ポリマー脂質（例えば、DOPE-PEG、DLPE-PEG、DDPE-PEG DLiNPE-PEG、およびジアシルグリセロール-PEG-2000もしくはジアシルグリセロール-5000）が挙げられる。

【0180】

10

20

30

40

50

非アミノ酸非カチオン性脂質の例としては、ポリマー脂質（例えば、複数分枝のpeg化化合物（例えば、DSPE-PTEO20およびDSPE-AM0530K））が挙げられる。

【0181】

非アミノ酸非カチオン性脂質の例としては、ポリマー脂質（例えば、DSPE-PG8Gポリグリセリン脂質）が挙げられる。

【0182】

非アミノ酸非カチオン性脂質の例としては、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、ジフィタノイルホスファチジルエタノールアミン（DPHPE）、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン（DOPC）、および1, 2-ジフィタノイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン（DPHPC）が挙げられる。

10

【0183】

非アミノ酸非カチオン性脂質の例としては、コレステロール、ステロール、およびステロイド（例えば、ゴナン、エストラン、アンドロスタン、プラグナン、コラン、コレスタン、エルゴスタン、カンペスタン、ポリフェラスタン、スチグマスタン、ゴルゴスタン、ラノスタン、シクロアルタン、ならびに前述のうちのいずれかのステロールもしくは動物ステロール誘導体、ならびにこれらの生物学的中間体および前駆体が挙げられ、これらとしては、例えば、コレステロール、ラノステロール、スチグマステロール、ジヒドロラノステロール、チモステロール、チモステノール、デスモテロール、7-デヒドロコレステロール、ならびにこれらの混合物もしくは誘導体が挙げられ得る。

20

【0184】

非アミノ酸非カチオン性脂質の例としては、peg化コレステロール、およびコレスタン3-オキソ（C1-22アシル）-誘導体（例えば、コレステリルアセテート、コレステリルアラキドネート、コレステリルブチレート、コレステリルヘキサノエート、コレステリルカプリレート、コレステリル n-デカノエート、コレステリルドデカノエート、コレステリルミリステート、コレステリルパルミテート、コレステリルベヘネート、コレステリルステアレート、コレステリルネルボネート、コレステリルペラルゴネート、コレステリル n-バレレート、コレステリルオレエート、コレステリルエライデート、コレステリルエルケート、コレステリルヘプタノエート、コレステリルリノレライデート、コレステリルリノレエート、ならびにこれらの混合物および誘導体が挙げられる。

30

【0185】

非アミノ酸非カチオン性脂質の例としては、植物ステロール（フィトステロール、 β -シトステロール、カンペステロール、エルゴステロール、ブラシカステロール、 δ -7-スチグマステロール、 δ -7-アベナステロール、ならびにこれらの混合物および誘導体が挙げられる）に由来する化合物が挙げられる。

【0186】

非アミノ酸非カチオン性脂質の例としては、胆汁酸、コール酸、ケノデオキシコール酸、グリココール酸、タウ路コール酸、デオキシコール酸、リトコール酸、メチル-リトコール酸、ならびにこれらの混合物および誘導体が挙げられる。

【0187】

非アミノ酸非カチオン性脂質の例としては、ステロイド（グルココルチコイド、コルチゾール、ヒドロコルチゾン、コルチコステロン、 Δ^5 -プレグネノロン、プロゲステロン、デオキシコルチコステロン、17-OH-プレグネノロン、17-OH-プロゲステロン、11-ジオキシコルチゾール、デヒドロエピアンドロステロン、硫酸デヒドロエピアンドロステロン、アンドロステンジオン、アルドステロン、18-ヒドロキシコルチコステロン、テトラヒドロコルチゾール、テトラヒドロコルチゾン、コルチゾン、プレドニゾン、6 α -メチルプレドニゾン（methylprednisone）、9 α -フルオロ-16 α -ヒドロキシプレドニゾロン、9 α -フルオロ-16 α -メチルプレドニゾロン、9 α -フルオロコルチゾール、ならびにこれらの混合物および誘導体が挙げられる）に由来する化合物が挙げられる。

40

50

【0188】

非アミノ酸非カチオン性脂質の例としては、ステロイド（アンドロゲン（androge n）、テストステロン、ジヒドロテストステロン、アンドロステンジオール、アンドロス テンジオン、アンドロステンジオン、3 α , 5 α -アンドロスタンジオール、ならびにこ れらの混合物および誘導体が挙げられる）に由来する化合物が挙げられる。

【0189】

非アミノ酸非カチオン性脂質の例としては、ステロイド（エストロゲン、エストリオール、エストロン、エストラジオール、ならびにこれらの混合物および誘導体が挙げられる）に由来する化合物が挙げられる。

【0190】

非アミノ酸非カチオン性脂質の例としては、ルミステロールおよびビタミンD化合物に由来する化合物が挙げられる。

【0191】

非アミノ酸非カチオン性脂質の例としては、C10:0~C22:6に及ぶテイルを有する脂質（例えば、DDPE（C10:0）（CAS 253685-27-7）、DLPE（C12:0）（CAS 59752-57-7）、DSPE（C18:0）（CAS 1069-79-0）、DOPE（C18:1）（CAS 4004-05-1）、DLinPE（C18:2）（CAS 20707-71-5）、DLenPE（C18:3）（CAS 34813-40-6）、DARAPE（C20:4）（CAS 5634-86-6）、DDHAPE（C22:6）（CAS 123284-81-1）、DPhPE（16:0 [(CH₃)₄] ）（CAS 201036-16-0））が挙げられる。

【0192】

非アミノ酸アニオン性脂質の例としては、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルコリン、血小板活性化因子（PAF）、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジル-DL-グリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルイノシトール（pi（4）p, pi（4, 5）p2）、カルジオリピン（ナトリウム塩）、リゾホスファチド、水素化リン脂質、スフィンゴ脂質、ガングリオシド、フィトスフィンゴシン、スフィンガニン、これらの薬学的に受容可能な塩、およびこれらの混合物が挙げられる。

【0193】

（調節性RNAおよびRNA干渉のための使用）

いくつかの局面において、本開示は、一般に、調節性RNAおよびRNA干渉、アンチセンス治療、ならびにRNA治療剤の送達分野に関する。より具体的には、本発明は、リボ核酸のための組成物および処方物、ならびにこれらの医薬のための使用および治療剤としての送達のための使用に関する。本発明は、一般に、細胞における遺伝子発現の遺伝子特異的阻害のためのRNA干渉において、または疾患状態もしくは表現型を変化させるための哺乳動物において、リボ核酸を使用するための方法に関する。

【0194】

RNA干渉とは、短い干渉RNA（siRNA）といわれる二本鎖RNA（dsRNA）によって媒介される配列特異的転写後遺伝子抑制の方法に関する。Fireら, Nature 391:806, 1998およびHamiltonら, Science 286:950-951, 1999を参照のこと。RNAiは、多様な叢（flora）および種族（phyla）によって共有され、そして外来遺伝子の発現に対する、進化的に保存された細胞性防御機構であると考えられる。Fireら, Trends Genet. 15:358, 1999を参照のこと。

【0195】

RNAiは、従って、小さな非コードRNAを使用して、遺伝子発現を抑制（silence）する、遍在性の内因性機構である。Dykxhoorn, D. M. およびJ. Lieberman, Annu. Rev. Biomed. Eng. 8:377-402, 2008

10

20

30

40

50

006を参照のこと。RNAiは、細胞死、分化、および発生に關与する重要な遺伝子を調節し得る。RNAiはまた、トランスポゾンおよびウイルスによってコードされる遺伝的要素を侵入させないようにゲノムを防御し得る。siRNAが細胞に導入される場合、上記siRNAは、上記内因性RNAi機構に結合して、相補的配列を含むmRNAの発現を高い特異性で破壊する。任意の疾患原因遺伝子および任意の細胞型もしくは組織は、潜在的に標的にされ得る。この技術は、遺伝子機能分析、ならびに薬物標的発見および確認のために迅速に利用されてきた。RNAiの利用はまた、治療に非常に有望であるが、siRNAをインビボで細胞へ導入することには、重大な障害が未だ残っている。

【0196】

RNAiの機構は、未だ完全には特徴づけられていないものの、標的mRNAの切断を介している。上記RNAi応答は、RNA誘導性抑制複合体(RISC)として公知であるエンドヌクレアーゼ複合体を要し、このエンドヌクレアーゼ複合体は、上記siRNA二本鎖のアンチセンス鎖に対して相補的な一本鎖RNAの切断を媒介する。上記標的RNAの切断は、上記siRNA二重鎖のアンチセンス鎖に対して相補的な領域の中央部で起こる(Elbashirら, Genes Dev. 15:188, 2001)。

【0197】

RNAiを行うための1つの方法は、細胞においてsiRNAを導入するかまたは発現させることである。もう1つの方法は、ダイサーといわれる内因性リボヌクレアーゼI型酵素を使用することである。ダイサーの1つの活動は、長いdsRNAをsiRNAへと処理することである。Hamiltonら, Science 286:950-951, 1999; Bernsteinら, Nature 409:363, 2001を参照のこと。ダイサーから得られたsiRNAは、代表的には、全体的な長さが約21~23ヌクレオチドであり、約19塩基対が二重鎖になっている。Hamiltonら, 前出; Elbashirら, Genes Dev. 15:188, 2001を参照のこと。本質的に、長いdsRNAは、siRNAの前駆体として細胞へと導入され得る。

【0198】

本発明は、脂質、アミノ酸脂質、および中性もしくは合成のポリマーを含む種々の成分と組み合わせて、調節性RNA、干渉核酸もしくはその前駆体を含む、ある範囲の組成物、処方物および方法を提供する。

【0199】

用語「dsRNA」とは、本明細書において使用される場合、例えば、RNA干渉(「RNAi」)もしくは配列特異的様式で遺伝子抑制を促進することによって、少なくとも1つのリボヌクレオチド分子を含みかつ遺伝子発現を阻害もしくはダウンレギュレートし得る任意の核酸分子をいう。本開示のdsRNAは、RNAiによる遺伝子抑制を媒介するために、ダイサーのためのまたはRISCと会合するための適切な基質であり得る。上記dsRNAの一方のもしくは両方の鎖は、末端ホスフェート基(例えば、5'-ホスフェートまたは5', 3'-ジホスフェート)をさらに含み得る。本明細書において使用される場合、dsRNA分子は、少なくとも1つのリボヌクレオチドに加えて、置換、化学的に改変されたヌクレオシド、および非ヌクレオチドをさらに含み得る。特定の実施形態において、dsRNA分子は、上記ヌクレオチド位置の最大100%までのリボヌクレオチドを含む。

【0200】

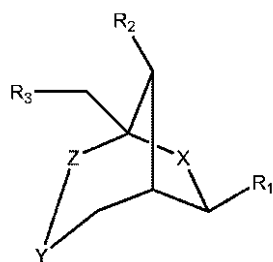
dsRNA分子の例は、例えば、米国特許出願第11/681,725号、米国特許第7,022,828号および同第7,034,009号、ならびにPCT国際出願公開WO/2003/070897において見いだされ得る。

【0201】

改変ヌクレオシドの例は、米国特許第6,403,566、同第6,509,320号、同第6,479,463号、同第6,191,266号、同第6,083,482号、同第5,712,378号、および同第5,681,940号において見いだされる。改変ヌクレオシドは、以下の構造を有し得る：

【0202】

【化28】



ここでXは、OもしくはCH₂であり、YはOであり、そしてZはCH₂であり；R₁は、アデニン、シトシン、グアニン、ヒポキサンチン、ウラシル、チミン、および複素環の群から選択され、ここで上記複素環は、置換された1, 3-ジアジン、置換されていない1, 3-ジアジン、および置換されていない7H-イミダゾ[4, 5]1, 3-ジアジンの群から選択され；そしてR₂、R₃は、独立して、H、OH、DMTO、TBDMSO、BnO、THPO、AcO、BzO、OP(NiPr₂)O(CH₂)₂CN、OPO₃

H、ジホスフェート、およびトリホスフェートの群から選択され、ここでR₂およびR₃は一緒になって、PhCHO₂、TIPDSO₂もしくはDTBSO₂であり得る。本明細書において使用される場合、略語「Ac」とは、アセチルをいう；略語「Bn」とは、ベンジルをいう；略語「Bz」とは、ベンゾイルをいう；略語「DMT」とは、ジメトキシトリチルをいう；略語「THP」とは、テトラヒドロピラニルをいう；略語「TBDMS」とは、tert-ブチルジメチルシリルをいう；略語「TIPDS」とは、テトライソプロピルジシリルをいう；そして略語「DTBS」とは、ジ(tert-ブチル)シリルをいう。

【0203】

さらに、本明細書において使用される場合、用語「dsRNA」、「RNAi誘導剤」、および「RNAi薬剤」とは、配列特異的RNAiを誘導し得る核酸分子(meroduplex RNA(mdRNA)、ニック形成(nicked)dsRNA(ndsRNA)、ギャップ形成(gapped)dsRNA(gdsRNA)、短い干渉核酸(siRNA)、siRNA、マイクロRNA(miRNA)、一本鎖RNA、短いヘアピンRNA(shRNA)、短い干渉オリゴヌクレオチド、短い干渉置換オリゴヌクレオチド、短い干渉改変オリゴヌクレオチド、化学改変dsRNA、および転写後遺伝子抑制RNA(ptgsRNA)、ならびに上記のうちのいずれかの前駆体が挙げられる)を媒介し得る核酸分子を記載するために使用される他の用語と同義であることを意味する。

【0204】

用語「大きな二本鎖(ds) RNA」とは、約40塩基対(bp)～約100bp以上、特に、約300bp～約500bpまでより長い任意の二本鎖RNAをいう。大きなdsRNAの配列は、mRNAのセグメントもしくはmRNA全体を表し得る。二本鎖構造は、自己相補性核酸分子によって、もしくは2つ以上の別個の相補的核酸分子鎖のアニーリングによって形成され得る。

【0205】

いくつかの局面において、dsRNAは、第1鎖(アンチセンス)および第2鎖(センス)を含む2つの別個のオリゴヌクレオチドを含み、ここで上記アンチセンス鎖およびセンス鎖は、自己相補的(すなわち、各鎖は、二重鎖もしくは二本鎖構造を形成する他方の鎖および2つの別個の鎖中のヌクレオチド配列に対して相補的であるヌクレオチド配列を含む)であり、例えば、ここで上記二本鎖領域は、約15～約24塩基対もしくは約26～約40塩基対であり；上記アンチセンス鎖は、標的核酸分子もしくはその一部分(例えば、ヒトmRNA)におけるヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む；そして上記センス鎖は、上記標的核酸配列もしくはその一部分に対応する(すなわち、相同な)ヌクレオチド配列(例えば、約15～約25ヌクレオチドもしくは約26～約40ヌクレオチドのセンス鎖は、上記標的核酸もしくはその一部分に対応する)を含む。

【0206】

いくつかの実施形態において、上記 dsRNA は、単一のオリゴヌクレオチドから組み立てられ得る。ここで上記 dsRNA の自己相補的センス鎖およびアンチセンス鎖は、核酸ベースのリンカーもしくは非核酸ベースのリンカーによって一緒に連結される。いくつかの実施形態において、上記 dsRNA 分子の第 1（アンチセンス）鎖および第 2（センス）鎖は、本明細書において記載されかつ当該分野で公知のヌクレオチドリンカーもしくは非ヌクレオチドリンカーによって共有結合される。いくつかの実施形態において、第 1 の dsRNA 分子は、当該分野で公知のヌクレオチドリンカーもしくは非ヌクレオチドリンカーによって、少なくとも 1 つの第 2 の dsRNA 分子に共有結合され、ここで上記第 1 の dsRNA 分子は、同じであるかもしくは異なり得る複数の他の dsRNA 分子、またはこれらの任意の組み合わせに連結され得る。いくつかの実施形態において、上記連結された dsRNA は、上記連結された dsRNA と meroduplex を形成する第 3 の鎖を含み得る。

10

【0207】

いくつかの点において、本明細書に記載される dsRNA 分子は、3 本以上の鎖（例えば、「A」（第 1 のもしくはアンチセンス）鎖、「S1」（第 2 の）鎖、および「S2」（第 3 の）鎖、ここで上記「S1」鎖および「S2」鎖は、上記「A」鎖の重複しない領域と相補的でありかつ塩基対（bp）を形成する（例えば、mdRNA は、A:S1S2 の形態を有し得る））を有する meroduplex RNA（mdRNA）を形成する。上記 S1、S2、もしくはより多くの鎖は一緒に、上記「A」鎖に対するセンス鎖を本質的に含む。上記「S1」鎖および「A」鎖のアニーリングによって形成される上記二本鎖領域は、上記「S2」鎖および「A」鎖のアニーリングによって形成される二本鎖領域と異なりかつ重複しない。mdRNA 分子は、「ギャップ形成」分子であり、これは、0 ヌクレオチドから最大約 10 ヌクレオチドまでの範囲に及ぶ「ギャップ」を意味する。いくつかの実施形態において、上記 A:S1 二重鎖は、上記 A:S1 二重鎖と上記 A:S2 二重鎖との間に位置する、上記「A」鎖において少なくとも 1 つの対形成していないヌクレオチド（最大約 10 個までの対形成していないヌクレオチド）から生じ、上記「A」鎖、「S1」鎖、もしくは「S2」鎖のうちの 1 対状の 3' 末端において任意の 1 つ以上の対形成していないヌクレオチドとは異なるギャップによって、上記 A:S2 二重鎖から分離される。いくつかの実施形態において、上記 A:S1 二重鎖は、上記 A:B2 二重鎖から、上記 A:S1 二重鎖と、上記 A:S2 二重鎖との間でゼロヌクレオチドのギャップ（すなわち、2 つのヌクレオチドの間のホスホジエステル結合のみが上記ポリヌクレオチド分子において破壊されているかもしくは失われているニック）によって隔てられている（これはまた、ニック形成 dsRNA（ndsRNA）とも言及され得る）。例えば、A:S1S2 は、合計約 14 塩基対～約 40 塩基対を合わせた少なくとも 2 つの二本鎖領域を有する dsRNA から構成され得、上記二本鎖領域は、約 0～約 10 ヌクレオチド（必要に応じて、平滑末端を有する）のギャップによって分離されるか、または A:S1S2 は、最大 10 個までのヌクレオチドのギャップによって分離された少なくとも 2 つの二本鎖領域を有する dsRNA を含み得、ここで上記二本鎖領域のうちの少なくとも一方は、約 5 塩基対～13 塩基対を含む。

20

30

40

【0208】

本明細書において記載されるように、3 本以上の鎖を含む dsRNA 分子は、「meroduplex」RNA（mdRNA）と言及され得る。mdRNA 分子の例は、米国仮特許出願第 60/934,930 号および同第 60/973,398 号において見いだされ得る。

【0209】

dsRNA もしくは大きな dsRNA は、置換もしくは改変を含み得、ここで上記置換もしくは改変は、ホスフェート骨格結合、糖、塩基、もしくはヌクレオシドにおいて存在し得る。このようなヌクレオシド置換は、天然の標準でないヌクレオシド（例えば、5-メチルウリジンもしくは 5-メチルシチジンもしくは 2-チオリボチミジン）を含み得、

50

このような骨格、糖、もしくはヌクレオシド改変は、アルキルもしくはヘテロ原子置換または付加（例えば、メチル、アルコキシアルキル、ハロゲン、窒素もしくは硫黄）、または当該分野で公知の他の改変を含み得る。

【0210】

さらに、本明細書において使用される場合、用語「RNAi」とは、配列特異的RNA干渉（例えば、転写後遺伝子抑制、翻訳阻害、もしくはエピジェネティクス）を記載するために使用される他の用語と等価であることを意味する。例えば、本開示のdsRNA分子は、転写後レベルもしくは転写前レベルまたはこれらの任意の組み合わせにおいて、遺伝子をエピジェネティックに（epigenetically）抑制するために使用され得る。

10

【0211】

いくつかの局面において、本発明は、1種以上の送達成分とともに、1種以上の遺伝子もしくは標的転写物に対して標的化される1つ以上のRNAi誘導薬剤を含む組成物を提供する。送達成分の例としては、脂質、ペプチド、ポリマー、ポリマー脂質、およびこれらの結合体が挙げられる。

【0212】

本開示の組成物および処方物は、インタクトな哺乳動物被験体（ヒトを含む）における細胞へのRNAi誘導実体（例えば、dsRNA、siRNA、mdRNA、miRNA、shRNA、もしくはRNAi誘導ベクター）の送達のために使用され得、そしてまた、培養物中の細胞へのこれら薬剤の送達のために使用され得る。

20

【0213】

本開示はまた、哺乳動物の身体内の細胞、器官および組織への、1種以上のRNA誘導薬剤もしくは実体の送達のための方法を提供する。いくつかの点において、RNAi誘導実体を含む組成物は、身体内に輸送されるべき種々の経路によって導入され得、そして標的転写物の発現が変えられる1つ以上の器官もしくは組織における細胞によって取り込まれ得る。

【0214】

一般に、本開示は、種々の異所性のプロセスによって特徴づけられる疾患もしくは障害を予防および処置するために有用な治療剤であるRNA誘導薬剤を包含する。例えば、哺乳動物に感染するウイルスは、宿主細胞の細胞性機構を管理することによって、複製し得る。例えば、Fields Virology（2001）を参照のこと。従って、dsRNAは、ウイルス生成もしくは複製を制御するウイルス経路を破壊するために有用である。

30

【0215】

本開示は、標的ウイルスの系統に対して広いスペクトルの効力を有する1種以上の治療的RNA誘導薬剤を使用することによって、被験体におけるウイルス感染を処置もしくは予防するための方法を含む。本発明のRNA誘導薬剤は、公知の改変系統もしくはウイルスの改変体におけるウイルス遺伝子の配列に標的化され得、これら改変体の標的化されたウイルス遺伝子の配列特異的遺伝子抑制を示し得る。例えば、RNA誘導薬剤は、インフルエンザの季節性系統、およびインフルエンザの改変系統に対して標的化され得、そしてこれらに対する効力を示し得る。

40

【0216】

本開示の組成物および処方物は、インビトロで、種々の細胞へ薬物因子もしくは生物学的に活性な薬剤を送達するために使用され得る。インビトロ送達が含まれる細胞の例としては、上皮細胞（例えば、A549）、不死化細胞株（例えば、HeLa）、肝癌細胞（例えば、HepG2）、ラット神経膠肉腫細胞（例えば、9L/LacZ）、ヒト単球（例えば、THP-1）、Madin-Darbyイヌ腎臓細胞（MDCK）、種々の線維芽細胞株、およびとりわけ、種々の血清の存在もしくは非存在下で培養されている初代細胞が挙げられる。

【0217】

50

本開示の組成物および処方物は、インビトロで、種々の細胞、組織もしくは器官に薬物因子もしくは生物学的に活性な薬剤を送達するために使用され得る。インビボで薬剤を送達するためのモダリティーとしては、局所経路、経腸経路、および非経口経路が挙げられる。薬剤をインビボで送達するためのモダリティーの例としては、粒子もしくは小滴の吸入、経鼻液滴もしくは経鼻-咽頭（pharyngeal）液滴の送達、粒子、または懸濁物、経皮的および経粘膜経路、ならびに筋肉内、皮下、静脈内、動脈内、心臓内、鞘内、骨内、腹腔内、および硬膜外経路による注射もしくは注入が挙げられる。

【0218】

いくつかの実施形態において、薬剤は、哺乳動物被験体に由来する細胞、組織もしくは器官への直接曝露によって、エキソビボで投与され得る。

10

【0219】

本開示の組成物もしくは処方物を使用して送達されるべき薬物因子もしくは生物学的に活性な薬剤は、任意の形態（例えば、純粋な形態、結晶形態、固体形態、ナノ粒子、濃縮形態、複合体化形態、もしくは結合体化形態が挙げられる）において見いだされ得る。

【0220】

本発明はまた、哺乳動物の身体内の器官および組織への1種以上のRNAi誘導実体の送達のための方法を提供する。いくつかの実施形態において、RNAi誘導実体、1種以上のアミノ酸脂質、および1種以上のさらなる脂質成分を含む組成物は、種々の経路によって導入されて、上記身体内に輸送されかつ1種以上の器官もしくは組織中の細胞によって取り込まれ、ここで標的転写物の発現が、変化させられる。

20

【0221】

本開示は、核酸および遺伝子抑制RNAの治療的送達に有用な種々の脂質を含む薬学的に受容可能な核酸組成物を提供する。特に、本発明は、標的核酸配列の翻訳もしくは遺伝子の発現を低下させるか、ダウンレギュレートするか、または抑制するために、dsRNAのインビトロおよびインビボでの送達のための組成物および方法を提供する。これら組成物および方法は、哺乳動物における疾患の予防および／もしくは処置のために使用され得る。本発明の例示的方法において、リボ核酸分子（例えば、siRNAもしくはshRNA）は、細胞もしくは被験体（例えば、哺乳動物）へ投与され得る組成物を処方するために、アミノ酸脂質と接触させられる。いくつかの実施形態において、本発明は、核酸含有組成物と、細胞とを接触させることによって、siRNAもしくはshRNAを細胞内に送達するための方法を提供する。

30

【0222】

例示的实施形態において、本発明は、アミノ酸脂質、およびポリマー脂質と混合もしくは複合体化されて、核酸分子（例えば、二本鎖RNA（dsRNA）、短い干渉RNA（siRNA）、もしくは短いヘアピンRNA（shRNA））の細胞内送達を増強する組成物を提供する、上記核酸分子を含む組成物を包含する。いくつかの実施形態において、本発明の送達組成物は、dsRNAおよび1つ、2つもしくはそれ以上のアミノ酸脂質を含み得、このアミノ酸脂質は、カチオン性であってもよいし、非カチオン性であってもよい。いくつかのバリエーションにおいて、送達組成物は、dsRNA、アミノ酸脂質、および1種以上のポリマー脂質を含み得る。いくつかの実施形態において、送達組成物は、dsRNA、アミノ酸脂質、1種以上のさらなる脂質、および1種以上のポリマー脂質を含み得る。本発明の組成物は、干渉RNA薬剤としてdsRNAを組み込み得る安定な粒子を形成し得る。本発明の組成物および処方物は、さらなる送達増強成分もしくは賦形剤を含み得る。

40

【0223】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、約5nm～約400nmの直径を有する安定なRNA-脂質粒子を含む。いくつかの実施形態において、上記粒子は、約10nm～約300nmの均一な直径を有し得る。いくつかの実施形態において、上記粒子は、約50nm～約150nmの均一な直径を有し得る。

【0224】

50

本発明の例示的な組成物において、二本鎖RNAは、アミノ酸脂質と混合もしくは複合体化されて、標的細胞と裸のdsRNAとを接触させることに比較して、上記dsRNAの細胞内送達を増強する組成物を形成し得る。

【0225】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、1種以上のアミノ酸脂質を含み得、上記アミノ酸脂質は、脂質および送達増強成分（任意のポリマー成分を含むが、上記RNA成分は含まない）の総量の約0.5%～約70%（mol%）である。いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、約10%～約55%の1種以上のアミノ酸脂質を含み得る。いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、約15%～約35%の1種以上のアミノ酸脂質を含み得る。

10

【0226】

特定の実施形態において、本発明の組成物は、1種以上の非アミノ酸非カチオン性脂質を含み得、ここで上記非アミノ酸非カチオン性脂質は、脂質および送達増強成分（任意のポリマー成分を含むが、上記RNA成分は含まない）の総量の約2%～約95%（mol%）である。いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、約20%～約75%、もしくは約45%～約75%、もしくは約45%～約55%の1種以上の非カチオン性脂質を含み得る。いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、約10%～約50%の1種以上の非カチオン性脂質を含み得る。

【0227】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、1種以上のポリマー脂質を含み得、ここで上記ポリマー脂質は、脂質および送達増強成分（任意のポリマー成分を含むが、上記RNA成分は含まない）の総量の約0.2%～約20%（mol%）である。いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、約0.5%～約10%の1種以上のポリマー脂質を含み得る。いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、上記組成物の約1%～約5%の1種以上のポリマー脂質を含み得る。

20

【0228】

（核酸治療剤の組成物および使用）

いくつかの実施形態において、本発明は、哺乳動物被験体における疾患もしくは障害を処置するための方法を提供する。干渉RNA、アミノ酸脂質、非アミノ酸非カチオン性脂質、ポリマー脂質、および1種以上の送達増強成分もしくは賦形剤を含む本発明の組成物の治療上有効な量は、上記組成物によって減少され得るか、低下され得るか、ダウンレギュレートされ得るか、または抑制され得る遺伝子の発現もしくは過剰発現と関連する疾患もしくは障害を有する被験体に、投与され得る。

30

【0229】

本発明は、上記被験体に治療上有効量の組成物を投与することによって、肺の疾患（例えば、呼吸窮迫、喘息、嚢胞性線維症、肺線維症、慢性閉塞性肺疾患、気管支炎、もしくは気腫）を処置するための方法を包含する。

【0230】

本発明は、関節リウマチ、肝臓疾患、脳炎、骨折、心疾患、ウイルス疾患（肝炎およびインフルエンザが挙げられる）、もしくは癌を処置するための方法を包含する。

40

【0231】

リポソームを作製するための方法は、例えば、G. Gregoriadis, Liposome Technology (CRC Press 1984), M. J. Ostror, Liposomes (Marcel Dekker 1987); Subhash C. Basu and Manju Basu, Liposome Methods and Protocols (2002) に示される。

【0232】

上記核酸成分、アミノ酸脂質、および任意のさらなる成分は、適切な培地（例えば、細胞培養培地）中で一緒に最初に混合され得、その後、1種以上のさらなる脂質もしくは化合物が、上記混合物に添加され得る。あるいは、上記アミノ酸脂質は、適切な培地（例え

50

ば、細胞培養培地) 中で一緒に最初に混合され得、その後、上記核酸成分が、添加され得る。

【0233】

本発明の特定の実施形態において、dsRNAは、1種以上のアミノ酸脂質、または1種以上のアミノ酸脂質および非アミノ酸非カチオン性脂質の組み合わせと混合される。

【0234】

いくつかの実施形態において、アミノ酸脂質トランスフェクション/送達処方物は、乾燥調製物の再水和によって調製され得る。上記脂質は、CHCl₃中に可溶化され得、窒素下で乾燥させられ得、そしてpH7.4の10mM HEPES、5% デキストロース中に再水和され得、例えば、超音波処理されて、リポソームを形成し得る。リポソームは、HEPESデキストロース中で希釈され得る。上記dsRNAは、0.0008 μmol/mLで、10mM HEPES、5% デキストロース、pH7.4中で希釈される。1容積のリポソームは、1容積のdsRNAに添加され得、そしてボルテックスされ得(自己アセンブリ)、100nM~6.25nM dsRNAの最終dsRNA濃度を提供する。この混合物は、細胞培養培地の存在下で、1~4倍に希釈され得る。

10

【0235】

上記干渉RNA薬剤はまた、アミノ酸脂質もしくはポリマー脂質と複合体化され得るか、または結合体化され得、1種以上の非アミノ酸非カチオン性脂質、または1種以上の非アミノ酸非カチオン性と非アミノ酸カチオン性脂質との組み合わせと混合され得る。

【0236】

干渉RNA薬剤およびアミノ酸脂質は、一緒に最初に混合され得、続いて、1種以上の非アミノ酸非カチオン性脂質が添加されるか、または非アミノ酸非カチオン性脂質と非アミノ酸カチオン性脂質との組み合わせが、適切な培地(例えば、細胞培養培地)に添加され得る。あるいは、上記アミノ酸脂質および非アミノ酸脂質成分は、最初に混合され得、続いて、適切な培地中に上記RNA薬剤が添加される。

20

【0237】

いくつかの実施形態において、本開示は、アミノ酸脂質および分散剤と混合もしくは複合体化されて、薬物もしくは活性薬剤の細胞内送達を提供する組成物を形成する上記薬物もしくは活性薬剤を含むミセル分散組成物を包含する。

【0238】

特定の実施形態において、本開示の分散組成物は、1種以上の薬物もしくは活性薬剤、1種以上のアミノ酸脂質、および1種以上の分散剤を含み得る。いくつかのバリエーションにおいて、送達組成物は、薬物もしくは活性薬剤、分散剤、アミノ酸脂質、および選択的なポリマー脂質を含み得る。本開示の分散組成物は、上記薬物もしくは活性薬剤を組み込み得る安定な粒子を形成し得る。

30

【0239】

いくつかの局面において、本開示の分散組成物は、約5nm~約400nmの直径を有する安定な核酸分散粒子を含み得る。いくつかの実施形態において、上記粒子は、約10nm~約300nmの均一な直径を有し得る。いくつかの実施形態において、上記粒子は、約50nm~約150nmの均一な直径を有し得る。

40

【0240】

ミセル分散物を使用して処方され得、そして薬物もしくは活性薬剤(RNAi治療剤が挙げられる)のバイオアベイラビリティを改善し得る。従来の脂質-薬物複合体は、親水性コアもしくは水性コアを維持する脂質二重層もしくはリポソーム構造を含み得る一方で、ミセル分散物は、疎水性油コア様を有する分散液滴もしくはナノ粒子を提供し得る。上記分散ナノ粒子は、連続水相に懸濁され得る。分散構造は、活性薬剤を送達するためにリポソーム構造を使用することにおいて特有のいくつかの欠点を回避し得、そして上記親油性コアが原因で、送達における利点を提供し得る。

【0241】

本開示は、薬物もしくは医薬のために、およびRNA薬剤の送達および投与のために、

50

脂質および分散剤を含むある範囲のミセル分散組成物を提供する。

【0242】

分散剤の例としては、合成化合物（ポリオキシグリセリド（例えば、ポリグリコール化（polyglycolated）カプリルグリセリド）、エトキシジグリコール、peg化脂肪グリセリド、ジエチレングリコールモノエチルエーテル、およびこれらの混合物が挙げられる）が挙げられる。分散剤の例としては、LABRAFIL、LABRASOL、ARLATONE、TRANSCUTOL、およびこれらの混合物が挙げられる。分散剤の例としては、合成化合物（例えば、アルキルホスホ-N-メチルエタノールアミンおよびアルコキシサルコシン（alkoylsarcosine））が挙げられる。分散剤の例としては、FOS-MEAおよびCRODASINICが挙げられる。

10

【0243】

いくつかの実施形態において、本開示の送達組成物は、薬物もしくは活性薬剤、1種以上の油、1種以上のアミノ酸脂質、ならびに乳化剤および安定化脂質（stabilizer lipid）を含み得る。いくつかのバリエーションにおいて、送達組成物は、薬物もしくは活性薬剤、油、脂質乳化剤、アミノ酸脂質、非カチオン性脂質、およびポリマー脂質を含み得る。

【0244】

本開示の組成物は、薬物もしくは活性薬剤を組み込み得る安定な粒子を形成し得る。いくつかの局面において、本開示の組成物は、約5nm～約400nmの直径を有する、安定な薬物もしくは活性薬剤のエマルジョン粒子を含む。いくつかの実施形態において、上記粒子は、約10nm～約300nmの均一な直径を有し得る。いくつかの実施形態において、上記粒子は、約50nm～約150nmの均一な直径を有し得る。

20

【0245】

本開示の例示的な組成物において、薬物もしくは活性薬剤は、油、乳化剤、アミノ酸脂質、およびポリマー安定化脂質と混合もしくは複合体化されて、上記薬物もしくは活性薬剤の細胞内送達を増強する組成物を形成し得る。

【0246】

水中油エマルジョンが使用されて処方され得、薬物もしくは活性薬剤（RNAi治療剤が挙げられる）のバイオアベイラビリティを改善し得る。

【0247】

従来の脂質-薬物複合体は、親水性もしくは水性コアを維持する脂質二重層もしくはリポソーム構造を含み得る一方で、水中油エマルジョンは、疎水性の油コアを囲んでいる脂質層を有するエマルジョン液滴もしくはナノ粒子を提供し得る。上記エマルジョン液滴もしくはナノ粒子は、連続水相において懸濁され得る。エマルジョン構造は、活性薬剤の送達のためにリポソーム構造を使用することにおいて特有のいくつかの欠点を回避し得、そして上記親油性コアが原因で、送達における利点を提供し得る。

30

【0248】

ある範囲の新規なエマルジョン組成物は、油、乳化剤、および脂質成分と干渉RNA薬剤との新規な組成物および使用を含む、本開示において提供される。

【0249】

油の例としては、合成油、プロピレングリコールの脂肪酸エステル、エチレングリコールのエーテル、グリセリル油、コレステリル油、植物性油、堅果油（nut oil）、精油、鉱油、脂溶性化合物（例えば、トコフェロールおよびビタミンE）、およびこれらの混合物が挙げられる。油の例としては、合成油（例えば、CAPRYOL 90（プロピレングリコールモノエステル）、CAPRYOL PGM C（プロピレングリコールモノエステル）、LABRAFAC PC（プロピレングリコールモノエステル）、LABRAFAC PG（プロピレングリコールジエステル）、LAUROGLYCOL 90（プロピレングリコールモノエステル）、LAUROGLYCOL FCC（プロピレングリコールモノエステル）、PLUROL OLEIQUECC 497（プロピレングリコールモノエステル）、LABRAFAC LIPOPHILE WL 1349（ト

40

50

リグリセリド)、PECEOL(グリセリルモノエステル)、MAISINE 35-1(グリセリルモノエステル)、およびこれらの混合物)が挙げられる。

【0250】

(RNA治療剤のための組成物および方法)

本発明は、調節性RNAを使用して(例えば、RNA干渉によって)、遺伝子発現を変化させるための組成物および方法を提供する。本発明の組成物は、リボ核酸薬剤を、RNAiの応答を生じ得る細胞へと送達し得る。本発明にとって有用な核酸薬剤の例としては、二本鎖核酸、改変もしくは分解耐性核酸、RNA、siRNA、siRNA、shRNA、miRNA、piRNA、RNAアンタゴニスト、一本鎖核酸、DNA-RNAキメラ、アンチセンス核酸、およびリボザイムが挙げられる。本明細書において使用される場合、用語、siRNA、siRNA、およびshRNAは、それぞれ、siRNA、siRNA、およびshRNAの前駆体を含む。例えば、用語siRNAは、ダイサー酵素の基質として適切である、RNAもしくは二本鎖RNAを含む。

10

【0251】

本発明にとって有用なリボ核酸薬剤は、種々の遺伝子に標的化され得る。標的として適したヒト遺伝子の例としては、とりわけ、TNF、FLT1、VEGFファミリー、ERBBファミリー、PDGFRファミリー、BCR-ABL、およびMAPKファミリーが挙げられる。標的およびそれに対する核酸配列として適したヒト遺伝子の例としては、PCT/US08/55333、PCT/US08/55339、PCT/US08/55340、PCT/US08/55341、PCT/US08/55350、PCT/US08/55353、PCT/US08/55356、PCT/US08/55357、PCT/US08/55360、PCT/US08/55362、PCT/US08/55365、PCT/US08/55366、PCT/US08/55369、PCT/US08/55370、PCT/US08/55371、PCT/US08/55372、PCT/US08/55373、PCT/US08/55374、PCT/US08/55375、PCT/US08/55376、PCT/US08/55377、PCT/US08/55378、PCT/US08/55380、PCT/US08/55381、PCT/US08/55382、PCT/US08/55383、PCT/US08/55385、PCT/US08/55386、PCT/US08/55505、PCT/US08/55511、PCT/US08/55515、PCT/US08/55516、PCT/US08/55519、PCT/US08/55524、PCT/US08/55526、PCT/US08/55527、PCT/US08/55532、PCT/US08/55533、PCT/US08/55542、PCT/US08/55548、PCT/US08/55550、PCT/US08/55551、PCT/US08/55554、PCT/US08/55556、PCT/US08/55560、PCT/US08/55563、PCT/US08/55597、PCT/US08/55599、PCT/US08/55601、PCT/US08/55603、PCT/US08/55604、PCT/US08/55606、PCT/US08/55608、PCT/US08/55611、PCT/US08/55612、PCT/US08/55615、PCT/US08/55618、PCT/US08/55622、PCT/US08/55625、PCT/US08/55627、PCT/US08/55631、PCT/US08/55635、PCT/US08/55644、PCT/US08/55649、PCT/US08/55651、PCT/US08/55662、PCT/US08/55672、PCT/US08/55676、PCT/US08/55678、PCT/US08/55695、PCT/US08/55697、PCT/US08/55698、PCT/US08/55701、PCT/US08/55704、PCT/US08/55708、PCT/US08/55709、およびPCT/US08/55711に開示されているものが挙げられる。

20

30

40

【0252】

本開示の送達されるべきRNAは、ウイルス遺伝子の領域に相補的な配列を有し得る。

50

例えば、本発明のいくつかの組成物および方法は、インフルエンザウイルスのウイルスゲノムの発現を調節するために有用である。いくつかの実施形態において、本発明は、RNA干渉によってインフルエンザの発現および感染活動を変化させるための組成物および方法を提供する。インフルエンザの発現および／もしくは活動は、例えば、インフルエンザのRNAポリメラーゼサブユニットの領域に相補的な配列を有する短い干渉RNA分子を細胞に送達することによって変化させられ得る。インフルエンザウイルスに標的化されるRNAの例は、米国特許出願公開第20070213293 A1号に示される。

【0253】

いくつかの実施形態において、本発明は、被験体に、有効量のRNAi誘導化合物（例えば、短い干渉オリゴヌクレオチド分子、もしくはその前駆体）を含む組成物を投与することによって、被験体における標的転写物の発現を阻害するための組成物および方法を提供する。RNAiは、メッセンジャーRNA（mRNAs）を標的化しかつ翻訳を減少させるために、小さな干渉RNA（siRNA）を使用する。本発明において使用される場合、siRNAは、ダイサープロセシングのための前駆体（例えば、siRNAに処理される長いdsRNA）であり得る。本発明は、標的転写物の発現または上記標的転写物によってコードされるペプチドもしくはタンパク質の活性と関連する疾患もしくは状態を処置もしくは予防するための方法を提供する。

10

【0254】

RNAiに基づく治療戦略は、ウイルスもしくは微生物の増殖もしくは機能を妨げることによって、および上記疾患の経路における内因性遺伝子産物の機能を妨げることによって、広い範囲の疾患を処置するために使用され得る。

20

【0255】

いくつかの実施形態において、本発明は、RNAi誘導実体（例えば、短い干渉オリゴヌクレオチド分子、およびその前駆体）の送達のための新規な組成物および方法を提供する。特に、本発明は、被験体の細胞、組織、および／もしくは器官の1種以上の転写物に標的化されるRNAi誘導実体を含む組成物を提供する。

【0256】

siRNAは、長さが相補性約19ヌクレオチドの領域を有する2つのRNA鎖であり得る。siRNAは、必要に応じて、1つまたは2つの一本鎖突出部もしくはループを含む。

30

【0257】

shRNAは、自己相補性の領域を有する単一のRNA鎖であり得る。上記単一のRNA鎖は、ステムおよびループを有し、必要に応じて、上記RNAの5'部分および／もしくは3'部分において1つ以上の対形成していない部分を有するヘアピン構造を形成し得る。

【0258】

上記活性治療薬剤は、インビボでのヌクレアーゼ分解に対して改善された耐性、および／もしくはRNAi活性を維持する改善された細胞取り込みを有する、化学的に改変されたRNAであり得る。

【0259】

本発明のsiRNA薬剤は、標的遺伝子の領域に相補的な配列を有し得る。本発明のsiRNAは、29～50塩基対（例えば、標的遺伝子の領域に相補的な配列を有するdsRNA）を有し得る。あるいは、二本鎖核酸は、dsDNAであり得る。

40

【0260】

特定の実施形態において、上記活性薬剤は、遺伝子性生物の発現を変化させ得る短い干渉核酸（siRNA）、短い干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、マイクロRNA、もしくは短いヘアピンRNA（shRNA）であり得る。

【0261】

被験体における特定の疾患状態と関連する1種以上の異なる遺伝子（発現が、上記選択された疾患状態と関連する原因因子もしくは寄与因子として異所性に増大されることが公

50

知である多数の遺伝子のうちのいずれかを含む)の発現を標的とする匹敵する方法および組成物が、提供される。

【0262】

本発明のRNAi誘導化合物は、疾患状態のための他の公知の処置とともに投与され得る。

【0263】

いくつかの実施形態において、本発明は、送達増強化合物と混合もしくは複合体化されるか、または結合体化される小さな核酸分子(例えば、短い干渉核酸、短い干渉RNA、二本鎖RNA、マイクロRNA、もしくは短いヘアピンRNA)を含む組成物を特徴とする。

10

【0264】

本明細書において使用される場合、用語「調節性RNA」、「短い干渉核酸」、「siRNA」、「短い干渉RNA」、「短い干渉オリゴヌクレオチド分子」、および「化学的に改変された短い干渉核酸分子」とは、配列特異の様式においてRNA干渉(RNAi)もしくは遺伝子抑制を媒介することによって、遺伝子発現、もしくは例えば、ウイルス複製を調節、阻害もしくはダウンレギュレートすることができる任意の核酸分子をいう。調節性RNAは、一本鎖RNAアンタゴニストを含む。

【0265】

いくつかの実施形態において、上記siRNAは、自己相補性のセンス領域およびアンチセンス領域を含む二本鎖ポリヌクレオチド分子であり、ここで上記アンチセンス領域は、発現、もしくはその一部をダウンレギュレートするための標的リボ核酸分子におけるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、そして上記センス領域は、上記標的リボ核酸配列もしくはその一部に対応する(すなわち、上記標的リボ核酸配列もしくはその一部に配列において実質的に同一である)ヌクレオチド配列を含む。

20

【0266】

本明細書において使用される場合、「siRNA」とは、比較的短い二本鎖核酸である小さい干渉リボ核酸、または必要に応じてその長い方の前駆体を意味する。本発明の範囲内の有用なsiRNAの長さは、いくつかの実施形態において、約20~50bpの長さであることが好ましい。しかし、有用なsiRNA(siRNAを含む)の長さに特定の限定はない。例えば、siRNAは、存在するsiRNAの最終的もしくはプロセシングされた形態とは実質的に異なる前駆体形態にある細胞へと最初に示され得、送達する際に、もしくは送達後に標的細胞へと、遺伝子抑制活性を発揮し得る。siRNAの前駆体形態は、例えば、送達時にもしくは送達した後にプロセシング、分解、改変もしくは切断されて、遺伝子抑制を媒介するために細胞内で活性であるsiRNAを生じる前駆体配列要素を含み得る。いくつかの実施形態において、有用なsiRNAは、上記標的細胞内で活性なプロセシングされたsiRNAを生じる、例えば、約100~200塩基対、もしくは50~100塩基対、もしくは約50塩基対未満の前駆体長を有する。他の実施形態において、有用なsiRNAもしくはsiRNA前駆体は、約10~49bp、もしくは15~35bp、もしくは約21~30bpの長さである。

30

【0267】

本発明の特定の実施形態において、ポリヌクレオチド送達増強ポリペプチドは、核酸分子(siRNAの大きな核酸前駆体を含む)の送達を容易にするために使用され得る。例えば、本明細書中の方法および組成物は、所望のsiRNAに「前駆体」を示すより大きな核酸の送達を増強するために使用され得、ここで上記前駆体アミノ酸は、切断され得るかまたは別の方法で標的細胞への送達前、送達の間もしくは送達後にプロセシングされて、標的細胞内での遺伝子発現を変化させるために活性なsiRNAを形成し得る。

40

【0268】

例えば、dsRNA前駆体ポリヌクレオチドは、2つ以上のループ構造、ならびに自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を含むステムを有する環状の一本鎖ポリヌクレオチドとして選択され得、ここで上記アンチセンス領域は、標的核酸分子もしくはその

50

一部分におけるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、そして上記センス領域は、上記標的核酸配列もしくはその一部分に対応するヌクレオチド配列を有し、ここで上記環状ポリヌクレオチドは、RNAiを誘導し得る活性なdsRNA分子を生成するためにインビボもしくはインビトロでプロセシングされ得る。

【0269】

本発明のsiRNA分子、特に非前駆体形態は、30塩基対未満、もしくは約17～19bp、もしくは19～21bp、もしくは21～23bpであり得る。

【0270】

siRNAは、哺乳動物系において選択的遺伝子抑制を媒介し得る。短いループおよびステム中い19～27塩基対を有するヘアピンRNAはまた、上記二本鎖システム中の配列に相補的な遺伝子の発現を選択的に抑制する。哺乳動物細胞は、短いヘアピンRNAをsiRNAへと変換して、選択的遺伝子抑制を媒介し得る。

【0271】

RISCは、上記siRNA二重鎖のアンチセンス鎖に相補的な配列を有する一本鎖RNAの切断を媒介する。標的RNAの切断は、上記siRNA二重鎖のアンチセンス鎖に相補的な領域内で起こる。21ヌクレオチドのsiRNA二重鎖は、代表的には、2つのヌクレオチド3'突出部を含む場合に最も活性である。

【0272】

2-ヌクレオチド3'突出部を有する21マー-siRNA二重鎖の上記3'突出セグメントを、デオキシリボヌクレオチドと置換することは、RNAi活性に対して有害な効果を有さなくてもよい。上記siRNAの各鎖の最大4ヌクレオチドまでを、デオキシリボヌクレオチドで置換することは、許容され得る。

【0273】

あるいは、siRNAは、単一もしくは複数のsiRNAをコードし、標的細胞内のこれらの発現を指向するポリヌクレオチドベクターによって発現される単一もしくは複数の転写生成物として送達され得る。これらの実施形態において、上記標的細胞内で発現されるべき上記siRNAの最終転写生成物の二本鎖部分は、例えば、15～49bp、15～35bp、もしくは約21～30bpの長さであり得る。

【0274】

本発明のいくつかの実施形態において、2つの鎖が対形成されるsiRNAの二本鎖領域は、突出もしくはミスマッチ部分、またはその両方を含み得る。2つの鎖が対形成されるsiRNAの二本鎖部分は、完全に対形成されたヌクレオチドセグメントに限定されず、例えば、ミスマッチ（対応するヌクレオチドが相補的でない）、突出（一方の鎖で対応する相補的ヌクレオチドを欠いている）、または突出部に起因して、対形成していない部分を含み得る。対形成していない部分は、これらがsiRNA形成を干渉しない程度にまで含まれ得る。いくつかの実施形態において、「突出（bulge）」とは、1～2個の対形成していないヌクレオチドを含み得、2つの鎖が対形成するsiRNAの二本鎖領域が、約1～7個、もしくは約1～5個の突出を含み得る。さらに、siRNAの上記二本鎖領域に含まれる「ミスマッチ」部分は、約1～7、もしくは約1～5の数で存在し得る。最も頻繁に、ミスマッチの場合に、上記ヌクレオチドのうちの1つは、グアニンであり、他方はウラシルである。このようなミスマッチ形成は、例えば、センスRNAをコードする対応するDNA中のCからTへの変異、GからAへの変異、またはこれらの混合物に起因し得るが、他の原因もまた、企図される。

【0275】

本発明のsiRNAの末端構造は、上記siRNAが、標的遺伝子の発現を抑制するためにその活性を保持する限りにおいて、平滑もしくは粘着性（突出性）かのいずれかであり得る。上記粘着性（突出性）末端構造は、3'突出部に制限されないが、遺伝子抑制を誘導するための滑精を保持する限りにおいて、5'突出構造を含む。さらに、突出するヌクレオチドの数は、2ヌクレオチドもしくは3ヌクレオチドに制限されないが、遺伝子抑制を誘導するための活性を保持する限りにおいて、任意のヌクレオチド数であり得る。例

えば、突出部は、1～約8ヌクレオチド、もしくは2～4ヌクレオチドを含み得る。

【0276】

突出末端構造を有する siRNA の長さは、対形成された二重鎖部分および各末端の任意の突出部分について表され得る。例えば、2-bp 3' アンチセンス突出部を有する 25/27 マー siRNA 二重鎖は、25 マーセンス鎖および 27 マーアンチセンス鎖を有し、ここで上記対形成された部分は、25 bp の長さを有する。

【0277】

任意の突出部の配列は、標的遺伝子に対して低い特異性を有し得、そして上記標的遺伝子配列に対して相補的（アンチセンス）でなくてもよいし、同一（センス）でなくてもよい。上記 siRNA が遺伝子抑制についての活性を保持している限りにおいて、上記 siRNA は、突出部分において、低分子量構造（例えば、tRNA、rRNA、ウイルス RNA、もしくは人工 RNA 分子のような天然の RNA 分子）を含み得る。

【0278】

上記 siRNA の末端構造は、上記二本鎖核酸のうちの一方側の末端がリンカー核酸（例えば、リンカー RNA）によって接続されているステムループ構造を有し得る。上記二本鎖領域（ステム部分）の長さは、例えば、15～49 bp、もしくは15～35 bp、もしくは約21～30 bp の長さであり得る。あるいは、標的細胞において発現されるべき siRNA の最終的な転写性生物である上記二本鎖領域の長さは、例えば、約15～49 bp、もしくは15～35 bp、もしくは約21～30 bp の長さであり得る。

【0279】

上記 siRNA は、標的核酸分子におけるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、もしくはその一部分を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み得、ここで上記一本鎖ポリヌクレオチドは、末端ホスフェート基（例えば、5'-ホスフェート（例えば、Martinezら, Cell. 110: 563-574, 2002、およびSchwarzら, Molecular Cell 10: 537-568, 2002を参照のこと）または5', 3'-ジホスフェート）を含み得る。

【0280】

本明細書において使用される場合、用語 siRNA は、天然に存在する RNA もしくは DNA のみを含む分子に限定されないが、化学的に改変されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドもまた包含する。いくつかの実施形態において、本発明の短い干渉核酸分子は、2'-ヒドロキシ（2'-OH）含有ヌクレオチドを欠いている。いくつかの実施形態において、短い干渉核酸は、RNAi を媒介するための2'-ヒドロキシ基を有するヌクレオチドの存在を要せず、よって、本発明の短い干渉核酸分子は、必要に応じて、いかなるリボヌクレオチド（例えば、2'-OH基を有するヌクレオチド）をも含まない。しかし、RNAi を補助するために siRNA 分子内にリボヌクレオチドの存在を要しない siRNA 分子は、2'-OH基を有する1つ以上のヌクレオチドを含む結合されたリンカーもしくは他の結合もしくは会合された基、部分、もしくは鎖を有する。siRNA 分子は、上記ヌクレオチド位置の少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、もしくは50%においてリボヌクレオチドを含み得る。

【0281】

本明細書において使用される場合、用語 siRNA は、配列特異的 RNAi を媒介し得る核酸分子（例えば、とりわけ、短い干渉 RNA（siRNA）分子、二本鎖 RNA（dsRNA）分子、マイクロ RNA 分子、短いヘアピン RNA（shRNA）分子、短い干渉オリゴヌクレオチド分子、短い干渉核酸分子、短い干渉改変オリゴヌクレオチド分子、化学的に改変された siRNA 分子、および転写後遺伝子抑制 RNA（ptgsRNA）分子）を包含する。

【0282】

いくつかの実施形態において、siRNA 分子は、別個のセンス配列もしくは領域およびアンチセンス配列もしくは領域を含み、ここで上記センス領域およびアンチセンス領域は、ヌクレオチドリンカー分子もしくは非ヌクレオチドリンカー分子によって共有結合さ

10

20

30

40

50

れるか、またはイオン性共有結合、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、および／もしくは積み重ね (stacking) 相互作用によって、非共有結合的に連結される。

【0283】

「アンチセンスRNA」は、標的遺伝子mRNAに結合することによってRNAiを誘導し得る、上記標的遺伝子mRNAに相補的な配列を有するRNA鎖である。

【0284】

「センスRNA」は、アンチセンスRNAに相補的な配列を有するRNA鎖であり、その相補的アンチセンスRNAにアニールして、siRNAを形成する。

【0285】

本明細書において使用される場合、用語「RNAi構築物」もしくは「RNAi前駆体」とは、RNAi誘導化合物（例えば、小さな干渉RNA (siRNA)、ヘアピンRNA、およびインビボで切断されて、siRNAを形成し得る他のRNA種をいう。RNAi前駆体はまた、本明細書において、細胞においてdsRNAもしくはヘアピンRNAを形成する転写物および／またはインビボでsiRNAを生じ得る転写物を生じ得る発現ベクター (RNAi発現ベクターともいう) を含む。

【0286】

siハイブリッド分子は、siRNAに類似の機能を有する二本鎖核酸である。二本鎖RNA分子の代わりに、siハイブリッドは、RNA鎖およびDNA鎖から構成される。好ましくは、上記RNA鎖は、標的mRNAに結合するアンチセンス鎖である。上記DNA鎖とRNA鎖のハイブリダイゼーションによって作り出された上記siハイブリッドは、ハイブリダイズした相補的部分および好ましくは、少なくとも1つの3'突出末端を有する。

【0287】

本発明において使用するためのsiRNAは、2つの別個のオリゴヌクレオチドから組み立てられ得、ここで一方の鎖はセンス鎖であり、他方はアンチセンス鎖であり、上記アンチセンス鎖およびセンス鎖は、自己相補性である（すなわち、各鎖は、他方の鎖におけるヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む；例えば、上記アンチセンス鎖およびセンス鎖が二重鎖もしくは二本鎖構造を形成する（ここで例えば、上記二本鎖領域が、約19塩基対である））。上記アンチセンス鎖は、標的核酸分子もしくはその一部分におけるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、そして上記センス鎖は、上記標的核酸配列もしくはその一部分に対応するヌクレオチド配列を含み得る。あるいは、上記siRNAは、単一のオリゴヌクレオチドから組み立てられ得、ここで上記siRNAの自己相補性のセンス領域およびアンチセンス領域は、核酸ベースのリンカーもしくは非核酸ベースのリンカーによって連結される。

【0288】

いくつかの実施形態において、細胞内送達のためのsiRNAは、自己相補性のセンス領域およびアンチセンス領域を有する二重鎖、非対称二重鎖、ヘアピンもしくは非対称ヘアピン二次構造を有するポリヌクレオチドであり得、ここで上記アンチセンス領域は、別個の標的核酸分子もしくはその一部分におけるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、そして上記センス領域は、上記標的核酸配列もしくはその一部分に対応するヌクレオチド配列を含む。

【0289】

siRNAにおいて行われ得る化学的改変の例としては、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド、「ユニバーサル塩基」ヌクレオチド、「非環式」ヌクレオチド、5-C-メチルヌクレオチド、ならびに末端グリセリルおよび／もしくは逆方向 (inverted) デオキシ脱塩基 (abasic) 残基組み込みが挙げられる。

【0290】

s i R N A分子の上記アンチセンス領域は、上記アンチセンス領域の3' -末端においてホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み得る。上記アンチセンス領域は、上記アンチセンス領域の5' -末端において約1 ~ 約5個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み得る。s i R N A分子の上記3' 末端ヌクレオチド突出部は、核酸の糖、塩基、もしくは骨格において化学的に改変されている、リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドを含み得る。上記3' 末端ヌクレオチド突出部は、1種以上のユニバーサル塩基リボヌクレオチドを含み得る。上記3' -末端ヌクレオチド突出部は、1つ以上の非環式ヌクレオチドを含み得る。

【0291】

例えば、化学的に改変されているs i R N Aは、1つの鎖において1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、もしくはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有し得るか、または各鎖において1 ~ 8個もしくはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有し得る。上記ホスホロチオエートヌクレオチド間連結は、上記s i R N A二重鎖の一方もしくは両方のオリゴヌクレオチド鎖に、例えば、上記センス鎖、上記アンチセンス鎖、もしくはその両方の鎖に、存在し得る。

【0292】

s i R N A分子は、上記センス鎖、上記アンチセンス鎖、もしくは両方の鎖の、上記3' 末端、上記5' 末端、または上記3' 末端および5' 末端の両方において1個以上のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み得る。例えば、例示的s i R N A分子は、上記センス鎖、上記アンチセンス鎖、またはその両方の鎖の5' 末端において1個、2個、3個、4個、5個、もしくはそれ以上の連続するホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み得る。

【0293】

特定の実施形態において、s i R N A分子は、上記センス鎖、上記アンチセンス鎖、またはその両方の鎖において、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、もしくはそれ以上のピリミジンホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。

【0294】

いくつかの実施形態において、s i R N A分子は、上記センス鎖、上記アンチセンス鎖、またはその両方の鎖において、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、もしくはそれ以上のプリンホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。

【0295】

s i R N A分子は、環状核酸分子を含み得、ここで上記s i R N Aは、約38 ~ 約70ヌクレオチド、例えば、約38ヌクレオチド、40ヌクレオチド、45ヌクレオチド、50ヌクレオチド、55ヌクレオチド、60ヌクレオチド、65ヌクレオチド、もしくは70ヌクレオチドの長さであり、約18 ~ 約23塩基対、例えば、約18塩基対、19塩基対、20塩基対、21塩基対、22塩基対、もしくは23塩基対を有し、ここで上記環状オリゴヌクレオチドは、約19塩基対を有するダンベル形構造および2つのループを形成する。

【0296】

環状s i R N A分子は、2つのループモチーフを含み得、ここで上記s i R N A分子の一方もしくは両方のループ部分は生分解性である。例えば、環状s i R N A分子の上記ループ部分は、3' 末端突出部（例えば、約2ヌクレオチドを含む3' 末端ヌクレオチド突出部）を有する二本鎖s i R N A分子を生じるように、インビボで変換され得る。

【0297】

s i R N A分子における改変ヌクレオチドは、上記アンチセンス鎖、上記センス鎖、もしくはその両方に存在し得る。例えば、改変ヌクレオチドは、ノーザンコンフォメーション (Northern conformation) (例えば、ノーザン擬回転サイクル (Northern pseudorotation cycle) ; 例えば、Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag 編, 1984を参照のこと) を有し得る。ノーザンコ

10

20

30

40

50

ンフォメーションを有するヌクレオチドの例としては、ロックされた (l o c k e d) 核酸 (LNA) ヌクレオチド (例えば、2'-O、4'-C-メチレン- (D-リボフラノシル) ヌクレオチド)、2'-メトキシエトキシ (MOE) ヌクレオチド、2'-メチル-チオ-エチル、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-クロロヌクレオチド、2'-アジドヌクレオチド、および2'-O-メチルヌクレオチドが挙げられる。

【0298】

化学的に改変されているヌクレオチドは、ヌクレアーゼ分解に対して耐性であり得ると同時に、RNAiを媒介する能力を維持し得る。

【0299】

二本鎖siRNA分子の上記センス鎖は、上記センス鎖の3'末端、5'末端、もしくは3'末端および5'末端の両方において、末端キャップ部分 (例えば、逆方向デオキシ脱塩基部分) を有し得る。

【0300】

結合体の例としては、V a r g e e s e ら、米国特許出願第10/427, 160号 (2003年8月30日出願、図面を含め、その全体が本明細書に参考として援用される) に記載される結合体およびリガンドが挙げられる。

【0301】

本発明のいくつかの実施形態において、上記結合体は、上記化学的に改変されているsiRNA分子に、生分解性リンカーを介して共有結合され得る。例えば、上記結合体分子は、上記化学的に改変されているsiRNA分子の上記センス鎖、上記アンチセンス鎖、もしくはその両方の鎖のいずれかの3'末端において結合され得る。

【0302】

特定の実施形態において、上記結合体分子は、上記化学的に改変されているsiRNA分子の上記センス鎖、上記アンチセンス鎖、もしくはその両方の鎖のいずれかの5'末端において結合される。いくつかの実施形態において、上記結合体分子は、上記化学的に改変されているsiRNA分子の上記センス鎖、上記アンチセンス鎖、もしくはその両方の鎖のいずれかの3'末端および5'末端の両方、またはこれらの組み合わせに結合される。

【0303】

いくつかの実施形態において、結合体分子は、化学的に改変されているsiRNA分子を生物学的系 (例えば、細胞) へと送達するのを容易にする分子を含む。

【0304】

いくつかの実施形態において、上記化学的に改変されているsiRNA分子に結合された結合体分子は、ポリエチレングリコール、ヒト血清アルブミン、または細胞取り込みを媒介し得る細胞レセプターのリガンドである。化学的に改変されているsiRNA分子に結合され得る、本発明によって企図される具体的結合体分子の例は、V a r g e e s e ら、米国特許出願公開第20030130186号および同第20040110296号に記載されている。

【0305】

siRNAは、上記siRNAの上記センス領域を、上記siRNAの上記アンチセンス領域につなぐヌクレオチドリinker、非ヌクレオチドリinker、もしくは混合したヌクレオチド/非ヌクレオチドリinkerを含み得る。いくつかの実施形態において、ヌクレオチドリinkerは、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、もしくは10ヌクレオチドの長さであり得る。いくつかの実施形態において、上記ヌクレオチドリinkerは、核酸アプタマーであり得る。本明細書において使用される場合、用語「アプタマー」または「核酸アプタマー」は、標的分子に特異的に結合する核酸分子を包含し、ここで上記核酸分子は、その天然の状況において、上記標的分子によって認識される配列を含む。あるいは、アプタマーは、標的分子に結合する核酸分子であって、上記標的分子が核酸に天然には結合しないものであり得る。

10

20

30

40

50

【0306】

例えば、上記アプタマーは、タンパク質のリガンド結合ドメインに結合し、それによって、天然に存在するリガンドと、上記タンパク質との相互作用を妨げるするために使用され得る。例えば、Goldら, *Annu. Rev. Biochem.* 64:763, 1995; Brody and Gold, *J. Biotechnol.* 74:5, 2000; Sun, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2:100, 2000; Kussner, *J. Biotechnol.* 74:27, 2000; Hermann and Patel, *Science* 287:820, 2000; および Jayasena, *Clinical Chemistry* 45:1628, 1999を参照のこと。

【0307】

非ヌクレオチドリinkerは、脱塩基ヌクレオチド、ポリマー、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、脂質、ポリ炭化水素 (polyhydrocarbon)、または他のポリマー化合物 (例えば、2~100の間のエチレングリコール単位を有するもののようなポリエチレングリコール) であり得る。具体的な例としては、Seela and Kaiser, *Nucleic Acids Res.* 18:6353, 1990、および *Nucleic Acids Res.* 15:3113, 1987; Cload and Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* 113:6324, 1991; Richardson and Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* 113:5109, 1991; Maら, *Nucleic Acids Res.* 21:2585, 1993、および *Biochemistry* 32:1751, 1993; Durandら, *Nucleic Acids Res.* 18:6353, 1990; McCurdyら, *Nucleosides & Nucleotides* 10:287, 1991; Jaschkeら, *Tetrahedron Lett.* 34:301-304, 1993; Onoら, *Biochemistry* 30:9914, 1991; Arnoldら, 国際公開番号WO 89/02439; Usmanら, 国際公開番号WO 95/06731; Dudyczら, 国際公開番号WO 95/11910、ならびに Ferentz and Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* 113:4000, 1991によって記載されるものが挙げられる。

【0308】

「非ヌクレオチドリinker」とは、糖および／もしくはホスフェート置換のいずれかを含み、その残りの塩基がそれらの酵素活性を示すことを可能にする、1つ以上のヌクレオチド単位の代わりに核酸鎖へ組み込まれ得る基もしくは化合物をいう。上記基もしくは化合物は、例えば、上記糖のC1位において、一般に認識されるヌクレオチド塩基 (例えば、アデノシン、グアニン、シトシン、ウラシルもしくはチミン) を含まない点において脱塩基性であり得る。

【0309】

いくつかの実施形態において、改変 siRNA 分子は、ホスフェート骨格改変を有し得、上記改変は、1つ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、モルホリノ、アミデートカルバメート、カルボキシメチル、アセトアミデート、ポリアミド、スルホネート、スルホンアミド、スルファメート、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、および／もしくはアルキルシリル置換を含む。オリゴヌクレオチド骨格改変の例は、Hunziker and Leumann, *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, in Modern Synthetic Methods*, VCH, pp. 331~417, 1995、および Mesmaekerら, *Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, in Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, ACS, pp. 24-39, 1994に示されている。

【0310】

siRNA 分子 (これは、化学的に改変されてい得る) は、(a) 上記 siRNA 分子

10

20

30

40

50

の2つの相補鎖の合成；および(b)上記2つの相補鎖を、二本鎖siRNA分子を得るのに適した条件下で一緒にアニールすることによって合成され得る。いくつかの実施形態において、上記siRNA分子の相補性部分の合成は、固相オリゴヌクレオチド合成によって、または固相直列オリゴヌクレオチド合成によってである。

【0311】

オリゴヌクレオチド(例えば、特定の改変されたオリゴヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを欠いているオリゴヌクレオチドの一部)は、例えば、Caruthersら, *Methods in Enzymology* 211:3-19, 1992; Thompsonら, 国際PCT公開番号WO 99/54459; Wincottら, *Nucleic Acids Res.* 23:2677-2684, 1995; Wincottら, *Methods Mol. Bio.* 74:59, 1997; Brennanら, *Biootechnol Bioeng.* 61:33-45, 1998; およびBrennan, 米国特許第6,001,311号に記載されているように、当該分野で公知のプロトコルを使用して合成される。RNA(本発明の特定のsiRNA分子を含む)の合成は、例えば、Usmanら, *J. Am. Chem. Soc.* 109:7845, 1987; Scaringerら, *Nucleic Acids Res.* 18:5433, 1990; およびWincottら, *Nucleic Acids Res.* 23:2677-2684, 1995; Wincottら, *Methods Mol. Bio.* 74:59, 1997に記載されるように、一般的手順に従う。

【0312】

「非対称ヘアピン」とは、本明細書において使用される場合、アンチセンス領域、ヌクレオチドもしくは非ヌクレオチドを含み得るループ部分、および上記アンチセンス領域より少ない(センス領域が上記アンチセンス領域と塩基対して、得ループを有する二重鎖を形成するに十分相補的なヌクレオチドを有する程度にまで)ヌクレオチドを含むセンス領域を含む直鎖状のsiRNA分子である。

【0313】

「非対称二重鎖」とは、本明細書において使用される場合、センス領域およびアンチセンス領域を含む2つの別個の鎖を有するsiRNA分子であって、ここで上記センス領域は、上記アンチセンス領域と塩基対形成して、二重鎖を形成するに十分相補的なヌクレオチドを有する程度にまで、上記アンチセンス領域より少ないヌクレオチドを含むものである。

【0314】

「中程度の遺伝子発現」とは、本明細書において使用される場合、細胞に存在するmRNAレベルの、またはmRNA翻訳の、または標的遺伝子によってコードされるタンパク質もしくはタンパク質サブユニットの合成の、アップレギュレーションもしくはダウンレギュレーションを含み得る、上記標的遺伝子の発現をアップレギュレートするかダウンレギュレートすることである。

【0315】

用語「阻害する」、「ダウンレギュレートする」、もしくは「発現を減少させる」とは、本明細書において使用される場合、上記遺伝子の発現、または1種以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットをコードするRNA分子もしくは等価なRNA分子のレベル、または標的遺伝子によってコードされる1種以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットのレベルもしくは活性が、本発明の核酸分子(例えば、siRNA)の非存在下で認められるものより低く低下することを意味する。

【0316】

「遺伝子抑制」とは、本明細書において使用される場合、細胞における遺伝子発現の部分的もしくは完全な阻害をいい、そして「遺伝子ノックダウン」ともいわれ得る。遺伝子抑制の程度は、当該分野で公知の方法によって決定され得、上記方法のうちのいくつかは、国際公開番号WO 99/32619にまとめられている。

【0317】

本明細書において使用される場合、用語「リボ核酸」および「RNA」とは、少なくとも1つのリボヌクレオチド残基を含む分子をいう。リボヌクレオチドは、 β -D-リボフラノース部分の2'部分においてヒドロキシル基を有するヌクレオチドである。これら用語は、二本鎖RNA、一本鎖RNA、単離されたRNA（例えば、部分的に精製されたRNA、本質的に純粋なRNA、合成RNA、組換え生成RNA、ならびに1もしくは数個のヌクレオチドの付加、欠失、置換、改変、および／もしくは変化だけ天然に存在するRNAとは異なる、改変および変化させたRNAを包含する。RNAの変化は、非ヌクレオチド物質を（例えば、siRNAの末端に対してまたは内部に（例えば、RNAの1個以上のヌクレオチドにおいて））付加することを包含し得る。

【0318】

10

RNA分子中のヌクレオチドは、標準的でないヌクレオチド（例えば、天然に存在しないヌクレオチドまたは化学合成されたヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチド）を含む。これら変化させられたRNAは、アナログといわれ得る。

【0319】

「高度に保存された配列領域」とは、標的遺伝子中の1つ以上の領域のヌクレオチド配列が、一方の世代から他方の世代へ、または一方の生物学的系から他方の生物学的系へ顕著に変動していないことを意味する。

【0320】

「センス領域」とは、siRNA分子のアンチセンス領域に対して相補性を有する上記siRNA分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、siRNA分子の上記センス領域は、標的核酸配列と相同性を有する核酸配列を含み得る。

20

【0321】

「アンチセンス領域」とは、標的核酸配列に対して相補性を有するsiRNA分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、siRNA分子の上記アンチセンス領域は、上記siRNA分子のセンス領域に対して相補性を有する核酸配列を含み得る。

【0322】

「標的核酸」とは、発現もしくは活性が変化させられるべき任意の核酸配列を意味する。標的核酸は、DNAもしくはRNAであり得る。

【0323】

「相補性」とは、伝統的なワトソン-クリックもしくは他の非伝統的な結合モデルのいずれかによって、核酸が別の核酸配列と水素結合を形成し得ることを意味する。

30

【0324】

用語「生分解性リンカー」とは、本明細書において使用される場合、一方の分子を別の分子に（例えば、生物学的に活性な分子をsiRNA分子もしくはsiRNA分子のセンス鎖およびアンチセンス鎖に）つなぐための生分解性リンカーとして示される、核酸リンカー分子もしくは非核酸リンカー分子をいう。上記生分解性リンカーは、その安定性が特定の目的（例えば、特定の組織もしくは細胞型への送達）のために変化させられ得るように示される。核酸ベースの生分解性リンカー分子の安定性は、例えば、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、および化学的に改変されているヌクレオチド（例えば、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-アミノ、2'-O-アミノ、2'-C-アリル、2'-O-アリル、および他の2'-改変もしくは塩基改変ヌクレオチド）の組み合わせによって、種々に変化させられ得る。上記生分解性核酸リンカー分子は、ダイマー、トリマー、テトラマーもしくはそれより長い核酸分子であり得る（例えば、約2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、15ヌクレオチド、16ヌクレオチド、17ヌクレオチド、18ヌクレオチド、19ヌクレオチド、もしくは20ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドは、リンベースの結合（例えば、ホスホルアミデートもしくはホスホジエステル結合）を有する単一のヌクレオチドを含み得る）。上記生分解性核酸リンカー分子はまた、核酸骨格、核酸糖、もしくは核酸塩基の改変を含み得る。

40

50

【0325】

本明細書に記載されるような2'-改変ヌクレオチドとの連結において、「アミノ」とは、改変され得るかもしくは非改変であり得る2'-NH₂もしくは2'-O-NH₂を意味する。このような改変された基は、例えば、Ecksteinら、米国特許第5,672,695号およびMatulic-Adamicら、米国特許第6,248,878号に記載されている。

【0326】

本発明において使用するために核酸分子を送達するための補助的もしくは補完的方法は、例えば、Akhtarら、Trends Cell Bio. 2:139, 1992; 「Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics」, Akhtar編, 1995, Maurerら、Mol. Membr. Biol. 16:129-140, 1999; Holland and Huang, Handb. Exp. Pharmacol. 137:165-192, 1999; およびLeeら、ACS Symp. Ser. 752:184-192, 2000に記載される。Sullivanら、国際PCT公開番号WO94/02595は、酵素性核酸分子の送達のための一般的方法をさらに記載する。

【0327】

核酸分子は、1種以上のさらなる成分（例えば、薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、賦形剤、アジュバント、乳化剤、緩衝化剤、安定化剤、もしくは保存剤）を含む処方物内で投与され得る。

【0328】

本明細書において使用される場合、用語「キャリア」とは、薬学的に受容可能な固体もしくは液体希釈剤、溶媒、充填剤、または封入物質（encapsulating material）を意味する。キャリアの例としては、生理食塩水、生物学的および薬学的緩衝系、および生物学的に受容可能な媒体を含む。水含有液体キャリアは、薬学的に受容可能な添加剤（例えば、酸性化剤、アルキル化剤、抗微生物性保存剤、抗酸化剤、緩衝化剤、キレート化剤、錯化剤、可溶化剤、湿潤剤（humectant）、溶媒、懸濁剤および／もしくは増粘剤、張性剤（tonicity agent）、湿潤剤（wetting agent）、もしくは他の生物適合性の物質を含み得る。上記分類の成分の例は、U. S. Pharmacopeia National Formulary, 1990, pp. 1857-1859、ならびにRaymond C. Roweら、Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第5版, 2006、および「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」, 第21版, 2006、編者David B. Troyにおいて見いだされ得る。

【0329】

保存剤の例としては、フェノール、メチルパラベン、パラベン、m-クレゾール、チオメルサル（thiomersal）、塩化ベンザルコニウム、およびこれらの混合物が挙げられる。

【0330】

界面活性剤の例としては、オレイン酸、ソルビタントリオレート、ポリソルベート、レシチン、ホスファチジルコリン（phosphatidylcholine）、種々の長鎖ジグリセリドおよびリン脂質、ならびにこれらの混合物が挙げられる。

【0331】

リン脂質の例としては、ホスファチジルコリン、レシチン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、およびホスファチジルエタノールアミン、ならびにこれらの混合物が挙げられる。

【0332】

分散剤の例としては、エチレンジアミン四酢酸が挙げられる。

【0333】

気体の例としては、窒素、ヘリウム、クロロフルオロカーボン（CFC）、ヒドロフルオロカーボン（HFC）、二酸化炭素、空気、およびこれらの混合物が挙げられる。

【0334】

特定の実施形態において、上記 siRNA および／もしくは上記ポリペプチドは、リソソーム中に包まれ得るか、またはリポソームに対して内部もしくは外部のいずれかに存在し得るか、またはリポソーム層内に存在し得るか、またはイオン導入法によって投与され得るか、または他のビヒクル（例えば、ヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノ粒子、生体接着性ミクロスフェア、もしくはタンパク質性ベクター）に組み込まれ得る。例えば、O'Hare and Normand, PCT 国際公開番号 WO 00/53722 を参照のこと。あるいは、核酸組成物は、直接注射によって、もしくは注入ポンプの使用によって、局所的に送達され得る。本発明の核酸分子の直接注射は、皮下、筋肉内、もしくは皮内であろうと、標準的な針およびシリンジの方法を使用して、またはニードルレス技術（例えば、Conry ら, Clin. Cancer Res. 5:2330-2337, 1999、および Barry ら, 国際 PCT 国際公開番号 WO 99/31262 に記載されているもの）によって行い得る。

10

【0335】

本発明の組成物は、薬学的因子として有効に使用され得る。薬学的因子は、患者における疾患状態もしくは他の有害な状態の発生もしくは重篤度を予防させるか、変化させるか、または患者における疾患状態もしくは他の有害な状態の発生もしくは重篤度を処置する（検出可能なもしくは測定可能な程度にまで 1 つ以上の症状を緩和する）。

20

【0336】

いくつかの実施形態において、本発明は、脂質と組み合わせるか、複合体化させるか、または結合体化され、薬学的に受容可能なキャリア（例えば、希釈剤、安定化剤、もしくは緩衝剤）とともにさらに処方され得る 1 種以上のポリ核酸（代表的には、1 種以上の siRNA）の存在もしくは投与を特徴とする薬学的組成物および方法を提供する。

【0337】

代表的には、上記 siRNA は、上記被験体の疾患状態もしくは有害な状態と関連する原因因子もしくは寄与因子として、上昇したレベルで発現される遺伝子を標的とする。この文脈において、上記 siRNA は、1 種以上の関連する疾患症状の重篤度もしくは再発を予防するか、緩和するか、または低下させるレベルにまで、遺伝子の発現を効率的にダウンレギュレートする。あるいは、上記標的遺伝子の発現が疾患もしくは他の有害な状態の結果もしくは結末として必ずしも上昇するわけではない種々の異なる疾患モデルについて、にもかかわらず、上記標的遺伝子のダウンレギュレーションは、遺伝子発現を低下させる（すなわち、上記標的遺伝子の選択された mRNA および／もしくはタンパク質生成物のレベルを低下させる）ことによって、治療的結果を生じる。あるいは、本発明の siRNA は、ある遺伝子の発現を低下させるために標的化され得、上記遺伝子は、発現が上記標的遺伝子の生成物もしくは活性によって負に調節される「下流」遺伝子のアップレギュレーションを生じ得る。

30

【0338】

本開示のこの siRNA は、任意の形態において、例えば、経皮的にもしくは局所注射によって（例えば、乾癬を処置するための乾癬斑（psoriatic plaque）での、または感染性関節炎もしくは RA に罹患している患者の関節への局所投与）投与され得る。より詳細な実施形態において、本発明は、TNF- α の mRNA に対して指向される治療上有効量の siRNA（これは、上記 TNF- α RNA を効率的にダウンレギュレートし、それによって、1 つ以上の TNF- α 関連炎症状態を低下もしくは予防する）を投与するための処方物および方法を提供する。匹敵する方法および組成物は提供され、これらは、動物被験体における選択された疾患状態と関連する 1 種以上の異なる遺伝子（発現が、上記選択された疾患状態と関連する原因因子もしくは寄与因子として異所性に増大されることが公知である多数の遺伝子のうちのいずれかを含む）の発現を標的とする。

40

50

【0339】

本発明の組成物はまた、経口投与のための錠剤、カプセル剤もしくはエリキシル剤、直腸投与のための坐剤、注射用投与のための滅菌液剤、懸濁物、および当該分野で公知の他の形態として処方および使用され得る。

【0340】

薬理学的組成物もしくは処方物は、細胞もしくは患者（例えば、ヒトを含む）への投与（例えば、全身投与）に適した形態にある組成物もしくは処方物をいう。適切な形態は、一部は、用途もしくは侵入経路（例えば、経口、経皮、経上皮、または注射によって）に依存する。このような形態は、上記組成物もしくは処方物が標的細胞（すなわち、負に荷電した核酸が送達に望ましい細胞）に達しないように妨げない。例えば、上記血流に注射された薬理学的組成物は、可溶性であるはずである。他の因子は、当該分野で公知であり、毒性のような考慮事項を含む。

10

【0341】

「全身投与」とは、血流における薬物のインビボの全身吸収もしくは蓄積、続いて、身体全体への分布を意味する。全身吸収をもたらす投与経路は、静脈内、皮下、腹腔内、吸入、経口、肺内、および筋肉内が挙げられるが、これらに限定されない。

【0342】

本発明の核酸分子を有する処方物に適した薬剤の例としては、以下が挙げられる：CNSへの薬物の侵入を増強し得るP-糖タンパク質インヒビター（例えば、Pluronic P85）（Jolliet-Riant and Tillement, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 13:16-26, 1999）；脳内移植後の徐放性送達のための生分解性ポリマー（例えば、ポリ（DL-ラクチド-コグリコリド）ミクロスフェア（Emerich, D. F. ら, *Cell Transplant* 8:47-58, 1999, Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.））；および血液脳関門を超えて薬物を送達し得かつ神経取り込み機構を変化させ得る装填されたナノ粒子（例えば、ポリブチルシアノアクリレートから製造されたもの）（Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry 23:941-949, 1999）。本発明の核酸分子の送達戦略の他の例としては、Boado ら, *J. Pharm. Sci.* 87:1308-1315, 1998；Tyler ら, *FEBS Lett.* 421:280-284, 1999；Pardridge ら, *PNAS USA* 92:5592-5596, 1995；Boado, *Adv. Drug Delivery Rev.* 15:73-107, 1995；Aldrian-Herrada ら, *Nucleic Acids Res.* 26:4910-4916, 1998；およびTyler ら, *PNAS USA* 96:7053-7058, 1999に記載される物質が挙げられる。

20

30

【0343】

本発明はまた、薬学的に有効な量の望ましい化合物を薬学的に受容可能なキャリアもしくは希釈剤中に含む、貯蔵もしくは投与のために調製された組成物を含む。治療的使用のための受容可能なキャリアもしくは希釈剤は、薬学分野で周知であり、そして例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro 編. 1985) に記載されている。例えば、保存剤、安定化剤、色素および矯味矯臭剤が提供され得る。これらとしては、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、およびp-ヒドロキシ安息香酸のエステルが挙げられる。さらに、抗酸化剤および懸濁剤が使用され得る。

40

【0344】

薬学的に有効な用量は、ある程度の疾患状態にまで、症状の発生を予防、阻害、または症状を緩和するために必要とされる用量である。活性核酸の0.01mg/kg~50mg/kg 体重/日の量は、投与されるべきである。

【0345】

水性懸濁物は、水性懸濁物の製造に適した賦形剤と混合した状態で、活性な物質を含む

50

。このような賦形剤は、懸濁剤（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガム、およびアカシアガムである；分散剤もしくは湿潤剤は、天然に存在するホスファチド（例えば、レシチン、もしくはアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンステアレート）もしくはエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物（例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール）もしくはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールに由来する部分エステルとの縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート）、またはエチレンオキシドと脂肪酸由来の部分エステルおよびヘキシトール無水物との縮合生成物（例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレエート））であり得る。上記水性懸濁物はまた、1種以上の保存剤（例えば、安息香酸エチル、もしくはn-プロピルベンゾエート、p-ヒドロキシベンゾエート、1種以上の着色剤、1種以上の矯味矯臭剤、および1種以上の甘味剤（例えば、スクロースもしくはサッカリン）を含み得る。

10

【0346】

油性懸濁物は、上記活性成分を、植物性油（例えば、ラッカセイ油、オリーブ油、ごま油もしくはココナツ油）中で、または鉱油（例えば、流動パラフィン）中で懸濁することによって処方され得る。上記油性懸濁物は、濃化剤（例えば、蜜蝋、固形パラフィンもしくはセチルアルコール）を含み得る。甘味剤および矯味矯臭剤は、好ましい経口処方物を提供するために添加され得る。これら組成物は、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）の添加によって保存され得る。

20

【0347】

水を添加することによって水性懸濁物の調製に適した分散性の粉末および顆粒は、分散剤もしくは湿潤剤、懸濁剤および1種以上の保存剤と混合した状態で、上記活性成分を提供する。さらなる賦形剤（例えば、甘味剤、矯味矯臭剤および着色剤）もまた、存在し得る。

【0348】

本発明の薬学的組成物はまた、水中油エマルジョンの形態で存在し得る。上記油相は、植物性油もしくは鉱油またはこれらの混合物であり得る。適切な乳化剤は、天然に存在するガム（例えば、アカシアガムもしくはトラガカントガム）、天然に存在するホスファチド（例えば、ダイズ、レシチン、および脂肪酸およびヘキシトール無水物に由来するエステルもしくは部分エステル（例えば、ソルビタンモノオレエート））、およびエチレンオキシドとの上記部分エステルの縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）であり得る。上記エマルジョンはまた、甘味剤および矯味矯臭剤を含み得る。

30

【0349】

上記薬学的組成物は、滅菌注射用水性懸濁物もしくは滅菌注射用油性懸濁物の形態で存在し得る。上記懸濁物は、上記で言及した適切な分散剤もしくは湿潤剤および懸濁剤を使用して、公知の技術に従って処方され得る。上記滅菌注射用懸濁物はまた、非毒性の非経口的に（parentally）受容可能な希釈剤もしくは溶媒中の、例えば、1, 3-ブタンジオール中の溶液としての、滅菌注射用溶液もしくは懸濁物であり得る。使用され得る上記受容可能なビヒクルおよび溶媒の中には、水、リンゲル溶液、および等張性の塩化ナトリウム溶液がある。さらに、滅菌不揮発性油が、溶媒もしくは懸濁媒体として従来から使用されている。この目的のために、任意の刺激の強くない不揮発性油が使用され得、上記不揮発性油としては、合成もののグリセリドもしくはジグリセリドが挙げられる。さらに、脂肪酸（例えば、オレイン酸）は、注射調製物中での使用が見いだされる。

40

【0350】

上記 siRNA はまた、坐剤の形態で（例えば、薬物の直腸投与のために）投与され得る。これら組成物は、上記薬物と、常温で固体であるが、直腸温で液体であり、従って、直腸で溶解して、上記薬物を放出する適切な非刺激性賦形剤と混合することによって、調製され得る。このような物質としては、カカオ脂およびポリエチレングリコールが挙げら

50

れる。

【0351】

上記 siRNA は、ヌクレアーゼ耐性基（例えば、2'-アミノ、2'-C-アリル、2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-H）での改変によって安定性を増強するために広範囲に改変され得る。総説については、Usman and Cedergren, TIBS 17:34, 1992; Usman ら, Nucleic Acids Symp. Ser. 31:163, 1994 を参照のこと。siRNA 構築物は、一般的な方法を使用してゲル電気泳動によって精製され得るか、または高速液体クロマトグラフィーによって精製され得、そして水に再懸濁され得る。

【0352】

改変（塩基、糖、および／もしくはホスフェート）を有する化学合成されている核酸分子は、血清リボヌクレアーゼによるそれらの分解を防止し得、それらの効力を増大させ得る。例えば、Eckstein ら, 国際公開番号 WO92/07065; Perrault ら, Nature 344:565, 1990; Pieken ら, Science 253, 314, 1991; Usman and Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 17:334, 1992; Usman ら, 国際公開番号 WO93/15187; および Rossi ら, 国際公開番号 WO91/03162; Sproat, 米国特許第 5, 334, 711 号; ならびに Gold ら, 米国特許第 6, 300, 074 号を参照のこと。上記参考文献の全ては、本明細書に記載される核酸分子の塩基、ホスフェートおよび／もしくは糖部分に対して行われ得る種々の化学的改変を記載する。

【0353】

ヌクレアーゼ安定性および効力において顕著な増強を有する、核酸分子へと導入され得る糖、塩基およびホスフェート改変を記載する当該分野のいくつかの例がある。例えば、オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ耐性基（例えば、2'-アミノ、2'-C-アリル、2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-H、ヌクレオチド塩基改変）での改変によって、安定性を増強および／もしくは生物学的活性を増強するために改変される。総説については、Usman and Cedergren, TIBS 17:34, 1992; Usman ら, Nucleic Acids Symp. Ser. 31:163, 1994; Burgin ら, Biochemistry 35:14090, 1996 を参照のこと。核酸分子の糖改変は、当該分野で広範囲に記載されている。Eckstein ら, 国際公開 PCT 番号 WO92/07065; Perrault ら, Nature 344:565-568, 1990; Pieken ら, Science 253:314-317, 1991; Usman and Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 17:334-339, 1992; Usman ら, 国際公開 PCT 番号 WO93/15187; Sproat, 米国特許第 5, 334, 711 号および Beigelman ら, J. Biol. Chem. 270:25702, 1995; Beigelman ら, 国際 PCT 公開番号 WO97/26270; Beigelman ら, 米国特許第 5, 716, 824 号; Usman ら, 米国特許第 5, 627, 053 号; Woolf ら, 国際 PCT 公開番号 WO98/13526; Thompson ら, Karpeisky ら, Tetrahedron Lett. 39:1131, 1998; Earnshaw and Gait, Biopolymers (Nucleic Acid Sciences) 48:39-55, 1998; Verma and Eckstein, Annu. Rev. Biochem. 67:99-134, 1998; ならびに Burlina ら, Bioorg. Med. Chem. 5:1999-2010, 1997 を参照のこと。このような刊行物は、触媒作用を変化させることなく糖、塩基および／もしくはホスフェート改変などを核酸分子に組み込む位置を決定するための一般的な方法およびストラテジーを記載する。このような教示に鑑みると、類似の改変が、細胞における siRNA が RNAi を促進する能力が顕著に阻害されない限りにおいて、本発明の siRNA 核酸分子を改変するために本明細書に記載されるように使用され得る

10

20

30

40

50

。

【0354】

オリゴヌクレオチドヌクレオチド間連結の、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、および／もしくは5'-メチルホスホネート連結での化学的改変が安定性を改善する一方で、過剰な改変は、いくらかの毒性もしくは低下した活性を引き起こし得る。従って、核酸分子を示す場合に、これらヌクレオチド間連結の量は、最小化されるべきである。これら連結の濃度の低下は、毒性を低下させるべきであり、これら分子の増大した有効性およびより高い特異性を生じる。

【0355】

いくつかの実施形態において、本発明は、1種以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、モルホリノ、アミデートカルバメート、カルボキシメチル、アセトアミデート、ポリアミド、スルホネート、スルホンアミド、スルファメート、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、および／もしくはアルキルシリル置換を含むホスフェート骨格改変による改変siRNA分子を特徴とする。オリゴヌクレオチド骨格改変の総説については、Hunziker and Leumann, *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties*, in *Modern Synthetic Methods*, VCH, 1995, pp. 331-417、およびMesmaekerら, 「*Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides*, in *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*」, ACS, 1994, pp. 24-39を参照のこと。

【0356】

核酸分子の送達のための方法は、Akhtarら, *Trends Cell Bio.* 2:139, 1992; 「*Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*」, 編者Akhtar, 1995; Maurerら, *Mol. Membr. Biol.* 16:129-140, 1999; Hofland and Huang, *Handb. Exp. Pharmacol.* 137:165-192, 1999; およびLeeら, *ACS Symp. Ser.* 752:184-192, 2000に記載されている。Beigelmanら, 米国特許第6, 395, 713号、およびSullivanら, PCT WO94/02595は、核酸分子の送達のための一般的方法をさらに記載する。これらプロトコルは、実質的に任意の核酸分子の送達のために利用され得る。核酸分子は、当業者に公知の種々の方法によって（リポソームによって、イオン導入法によって、または他のビヒクル（例えば、生分解性ポリマー、ヒドロゲル、シクロデキストリン（例えば、Gonzalezら, *Bioconjugate Chem.* 10:1068-1074, 1999; Wangら, 国際PCT公開番号WO03/47518およびWO 03/46185を参照のこと）、ポリ（乳酸-コグリコール酸）（PLGA）およびPLCAマイクロスフェア（例えば、米国特許第6, 447, 796号および米国特許出願公開第US 2002130430号を参照のこと）、生分解性ナノカプセル、ならびに生体接着性マイクロスフェア）への組み込みによって、あるいはタンパク質性ベクターによって（O'Har

and Normand, 国際PCT公開番号WO00/53722）、内部もしくは外部へ封入されることが挙げられるが、これらに限定されない）、細胞に投与され得る。あるいは、上記核酸/ビヒクル組み合わせは、直接注射によって、または注入ポンプの使用によって、局所的に送達される。本発明の核酸分子の直接注射は、皮下、筋肉内、または皮内であろうと、標準的な針およびシリンジ技術を使用して、またはニードルレス技術（例えば、Conryら, *Clin. Cancer Res.* 5:2330-2337, 1999、およびBarryら, 国際PCT公開番号WO 99/31262において記載されるもの）によって、行い得る。本発明の分子は、薬学的因子として使用され得る。薬学的因子は、被験体における疾患状態の発生を予防させるか、変化させるか、または被験体における疾患状態を処置する（ある程度まで症状を緩和し、好ましくは、上記症状

の全てを緩和する)。

【0357】

「RNA」とは、少なくとも1つのリボヌクレオチド残基を含む分子を意味する。「リボヌクレオチド」とは、 β -D-リボフラノース部分の2'位においてヒドロキシル基を有するヌクレオチドを意味する。この用語は、二本鎖RNA、一本鎖RNA、単離されたRNA（例えば、部分的に精製されたRNA、本質的に純粋なRNA、合成RNA、組換え生成されたRNA、ならびに1もしくは数個のヌクレオチドの付加、欠失、置換および／もしくは変化だけ天然に存在するRNAとは異なる変化したRNAを包含する。このような変化は、例えば、上記siRNAの末端に対して、または内部に（例えば、上記RNAの1つ以上のヌクレオチドにおいて）、非ヌクレオチド物質を付加することを包含し得る。本発明のRNA分子中のヌクレオチドはまた、標準的ではないヌクレオチド（例えば、天然に存在しないヌクレオチドまたは化学合成されたヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチド）を含み得る。これら変化させられたRNAは、アナログもしくは天然に存在するRNAのアナログとして言及され得る。

10

【0358】

「キャップ構造」とは、上記オリゴヌクレオチドのいずれかの末端において組み込まれた化学的改変を意味する（例えば、Adami cら、米国特許第5,998,203号（本明細書に参考として援用される）を参照のこと）。これら末端改変は、上記核酸分子がエキソヌクレアーゼ分解しないように保護し、細胞内の送達および／もしくは局在化を補助し得る。上記キャップは、5'末端（5'キャップ）もしくは3'末端（3'キャップ）において存在してもよいし、または両方の末端に存在していてもよい。非限定的な例において、上記5'キャップとしては、グリセリル、逆方向デオキシ脱塩基残基（部分）；4'，5'-メチレンヌクレオチド；1-（ β -D-エリスロフラノシル）ヌクレオチド；4'-チオヌクレオチド；炭素環式ヌクレオチド；1,5-無水ヘキシトールヌクレオチド；L-ヌクレオチド； α -ヌクレオチド；改変塩基ヌクレオチド；ホスホロジチオエート連結；スレオ-ペンントフラノシルヌクレオチド；非環式3',4'-secoヌクレオチド；非環式3,4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド；非環式3,5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、3'-3'-逆方向ヌクレオチド部分；3'-3'-逆方向脱塩基部分；3'-2'-逆方向ヌクレオチド部分；3'-2'-逆方向脱塩基部分；1,4-ブタンジオールホスフェート；3'-ホスホリアルミデート；ヘキシルホスフェート；アミノヘキシルホスフェート；3'-ホスフェート；3'-ホスホロチオエート；ホスホロジチオエート；または架橋もしくは非架橋メチルホスホネート部分が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0359】

上記3'キャップの例としては、グリセリル、逆方向デオキシ脱塩基残基（部分）、4'，5'-メチレンヌクレオチド；1-（ β -D-エリスロフラノシル）ヌクレオチド；4'-チオヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド；5'-アミノアルキルホスフェート；1,3-ジアミノ-2-プロピルホスフェート；3'-アミノプロピルホスフェート；6'-アミノヘキシルホスフェート；1,2-アミノドデシルホスフェート；ヒドロキシプロピル；1,5-無水ヘキシトールヌクレオチド；L-ヌクレオチド； α -ヌクレオチド；改変塩基ヌクレオチド；ホスホロジチオエート；スレオ-ペンントフラノシルヌクレオチド；非環式3',4'-secoヌクレオチド；3,4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド；3,5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、5'-5'-逆方向ヌクレオチド部分；5'-5'-逆方向脱塩基部分；5'-ホスホリアルミデート；5'-ホスホロチオエート；1,4-ブタンジオールホスフェート；5'-アミノ；架橋および／もしくは非架橋5'-ホスホリアルミデート、ホスホロチオエートおよび／またはホスホロジチオエート、架橋もしくは非架橋メチルホスホネートならびに5'-メルカプト部分（より詳細については、Beaucage and Lyster, Tetrahedron 49:1925, 1993；本明細書に参考として援用される、を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。

40

50

【0360】

用語「非ヌクレオチド」とは、糖および／もしくはホスフェート置換のいずれかを含み、そしてその残りの塩基が、それらの酵素活性を示すことを可能にする、1種以上のヌクレオチド単位の代わりに核酸鎖へ組み込まれ得る基もしくは化合物をいう。上記基もしくは化合物は、一般に認識されるヌクレオチド塩基（例えば、アデノシン、グアニン、シトシン、ウラシルもしくはチミン）を含まず、従って、1'位において塩基を欠いているという点で、脱塩基である。

【0361】

「ヌクレオチド」とは、本明細書において使用される場合、天然の塩基（標準的）および当該分野で周知の改変塩基を含むことは当該分野で認識されているとおりである。このような塩基は、一般に、ヌクレオチド糖部分の1'位に位置する。ヌクレオチドは、一般に、塩基、糖、およびホスフェート基を含む。上記ヌクレオチドは、上記糖、ホスフェートおよび／もしくは塩基部分において改変されていなくてもよいし、改変されていてもよい（ヌクレオチドアナログ、改変ヌクレオチド、非天然のヌクレオチド、標準的でないヌクレオチドなどとして交換可能に言及される）；例えば、Usman and McSwiggen, 前出；Ecksteinら, 国際PCT公開番号WO92/07065；Usmanら, 国際PCT公開番号WO93/15187；Uhlman & Peyman, 前出（全て本明細書に参考として援用される）を参照のこと。当該分野で公知の改変された核酸塩基のいくつかの例があり、Limbachら, Nucleic Acids Res. 22:2183, 1994によってまとめられる。核酸分子に導入され得る塩基改変の非限定的な例のいくつかとしては、イノシン、プリン、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル、プソイドウラシル、2, 4, 6-トリメトキシベンゼン、3-メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、5-アルキルシチジン（例えば、5-メチルシチジン）、5-アルキルウリジン（例えば、リボチミジン）、5-ハロウリジン（例えば、5-ブロモウリジン）または6-アザピリミジンもしくは6-アルキルピリミジン（例えば、6-メチルウリジン）、プロピンなどが挙げられる（Burginら, Biochemistry 35:14090, 1996；Uhlman & Peyman, 前出）。この局面における「改変された塩基」とは、1'位のアデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルまたはその等価物以外のヌクレオチド塩基を意味する。

【0362】

「標的部位」もしくは「標的配列」もしくは「標的化配列」とは、上記標的配列に相補的なそのアンチセンス領域内の配列を含むsiRNA構築物によって媒介される切断のために、「標的化」される標的核酸（例えば、RNA）内の配列を意味する。

【0363】

上記siRNA分子は、カチオン性脂質と複合体化され得るか、リボソーム内にパッケージされ得るか、または別の方法で標的細胞もしくは組織に送達され得る。上記核酸もしくは核酸複合体は、性愛ポリマー中への組み込みありまたはなしで、注射、注入ポンプもしくはステントを介して局所投与され得る。別の実施形態において、ポリエチレングリコール（PEG）は、本発明のsiRNA化合物、ポリペプチドに、または両方に共有結合され得る。上記結合されたPEGは、任意の分子量（好ましくは、約2,000～約50,000ダルトン（Da））であり得る。

【0364】

上記センス領域は、リンカー分子（例えば、ポリヌクレオチドリンカーもしくは非ヌクレオチドリンカー）を介して、上記アンチセンス領域に接続され得る。

【0365】

「逆方向反復（inverted repeat）」とは、上記反復が転写された場合に二本鎖siRNAを形成することができるよう位置したセンス要素およびアンチセンス要素を含む核酸配列をいう。上記逆方向反復は、必要に応じて、上記反復の2つの要素の間に、リンカーもしくは異種配列（例えば、自己切断リボザイム）を含み得る。上記逆

方向反復の上記要素は、二本鎖RNAを形成するに十分な長さを有する。代表的には、上記逆方向反復の各要素は、約15～約100ヌクレオチドの長さ、好ましくは約20～30塩基のヌクレオチド、好ましくは、約20～25ヌクレオチドの長さ（例えば、20ヌクレオチド、21ヌクレオチド、22ヌクレオチド、23ヌクレオチド、24ヌクレオチド、25ヌクレオチド、26ヌクレオチド、27ヌクレオチド、28ヌクレオチド、29ヌクレオチド、もしくは30ヌクレオチドの長さ）である。

【0366】

「核酸」とは、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドおよび一歩字形態もしくは二本鎖形態のそれらのポリマーをいう。この用語は、公知のヌクレオチドアナログまたは改変骨格残基もしくは連結（これらは、合成、天然に存在する、および天然に存在しない、参照核酸として類似の結合特性を有し、上記参照ヌクレオチドに類似の様式で代謝される）を含む核酸を包含する。このようなアナログの例としては、ホスホロチオエート、ホスホリアミデート、メチルホスホネート、キラルーメチルホスホネート、2'-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸（PNA）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0367】

「大きな二本鎖RNA」とは、約40bpより大きい（例えば、100bpより大きい、またはより具体的には、300bpより大きい）サイズを有する任意の二本鎖RNAをいう。大きなdsRNAの配列は、mRNAのセグメントもしくはmRNA全体を示し得る。上記大きなdsRNAの最大サイズは、本明細書において限定されない。上記二本鎖RNAは、上記改変が上記ホスフェート糖骨格に対してもしくは上記ヌクレオチドに対してであり得る改変塩基を含み得る。このような改変は、窒素もしくは硫黄、ヘテロ原子もしくは当該分野で公知の任意の他の改変を含み得る。

20

【0368】

上記二本鎖構造は、自己相補的RNA鎖（例えば、ヘアピンもしくはマイクロRNAについて存在する）によって、または2つの異なる相補的RNA鎖のアニーリングによって、形成され得る。

【0369】

「重複（overlapping）」とは、2つのRNAフラグメントが、一方の鎖上に複数のヌクレオチドによって重複する配列を有する場合、例えば、上記複数のヌクレオチド（nt）が2～5ヌクレオチド程度の、もしくは5～10ヌクレオチドまで、またはそれ以上に達する場合をいう。

30

【0370】

「1つ以上のdsRNA」とは、一次配列に基づいて互いに異なるdsRNAをいう。

【0371】

「標的遺伝子もしくはmRNA」とは、任意の遺伝子もしくは目的のmRNAをいう。標的遺伝子もしくはmRNAは、発生的遺伝子および調節性遺伝子、ならびに代謝遺伝子もしくは構造遺伝子または酵素をコードする遺伝子を含み得る。上記標的遺伝子は、内因性であってもよいし、外因性であってもよい。上記標的遺伝子は、表現型が調査されている細胞において、もしくは生物において、表現型特徴に直接的もしくは間接的に影響を及ぼす様式において発現され得る。このような細胞としては、成体もしくは胚性動物もしくは植物の体（不死化細胞株または初代細胞培養物中に存在するような配偶子もしくは任意の単離された細胞を含む）の任意の細胞が挙げられる。

40

【0372】

（抗敗血症効果のための使用）

いくつかの局面において、本開示は、一般に、敗血症の分野に関する。より具体的には、本発明は、アミノ酸脂質の組成物および処方物、ならびに医薬のためおよび治療剤としてのそれらの使用に関する。本発明は、一般に、敗血症、敗血性ショック、炎症性敗血症、敗血症、もしくは全身性炎症反応症候群を予防、処置、もしくは改善するために、アミノ酸脂質を使用するための方法に関する。

50

【0373】

敗血症は、免疫系が損なわれているかまたは打ちのめされた場合に感染によって、または特定の化学療法剤に起因して、引き起こされ得る。例えば、グラム陰性細菌のエンドトキシンは、敗血性ショックを誘導し得る。グラム陰性敗血症は、集中治療中の死亡の主要な原因である。抗微生物治療単独は、敗血症症例における死亡を予防するには不十分であり得る。敗血症は、先天的免疫応答の広がった活性化が付随し得、種々の炎症性メディエーターの制御されない生成がもたらされる。上記制御されない全身性炎症応答は、死亡を引き起こし得る。

【0374】

本開示のアミノ酸脂質は、特定のエンドトキシン（例えば、リポポリサッカリド）に対して上記免疫応答を低下させることに関して活性であり得る。本開示のカチオン性の両親媒性アミノ酸脂質は、エンドトキシンを結合および中和し得、それによって、免疫応答を低下させ得る。従って、本開示は、敗血症、敗血性ショック、炎症性敗血症、敗血症、もしくは全身性炎症反応症候群を予防、処置もしくは改善するための医薬および方法におけるアミノ酸脂質の使用を企図する。

【0375】

（活性薬剤の送達のための使用）

本発明の化合物および組成物は、上記のように、または当該分野で公知のように、任意の生理学的に活性な薬剤、ならびに活性薬剤の任意の組み合わせの送達のために使用され得る。上記活性薬剤は、望ましい生理学的効果もしくは改善効果を提供するに十分な量において、本発明の組成物および使用において存在し得る。

【0376】

本発明の化合物および組成物は、哺乳動物被験体においてある範囲の薬物因子および生物学的に活性な薬剤（低分子化合物および薬物、ペプチド、タンパク質、およびワクチン因子が挙げられる）の送達を増強することに関する。

【0377】

活性薬剤の例としては、ペプチド、タンパク質、核酸、二本鎖RNA、増血剤、抗感染剤；抗痴呆剤；抗ウイルス剤、抗腫瘍剤、解熱剤、鎮痛剤、抗炎症剤、抗潰瘍剤、抗アレルギー剤、抗鬱剤、向精神薬、強心剤、抗不整脈薬（antiarrhythmic）、血管拡張薬、抗高血圧薬、降圧利尿薬、抗糖尿病薬、抗凝固薬、コレステロール低下剤、骨粗鬆症のための治療剤、ホルモン、抗生物質、ワクチン、サイトカイン、ホルモン、増殖因子、心血管因子、細胞接着因子、中枢神経系因子もしくは末梢神経系因子、体液性電解質因子（humoral electrolyte factor）、血管の有機物質（hemal organic substance）、骨増殖因子、胃腸因子、腎臓因子、結合組織因子、感覚器官因子、免疫系因子、呼吸器系因子、生殖器因子、アンドロゲン、エストロゲン、プロスタグランジン、ソマトトロピン、ゴナドトロピン、インターロイキン、ステロイド、細菌トキシド、抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体フラグメント、および免疫グロブリンが挙げられる。

【0378】

活性薬剤の例としては、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、インスリン、第VII因子、第IX因子、インターフェロン、ヘパリン、ヒルゲン（hirugen）、ヒルロス、およびヒルジンが挙げられる。

【0379】

活性薬剤の例としては、モルフィン、ヒドロモルフォン、オキシモルフォン、レボルファノール（levorphanol）、レバロルファン、コデイン、ナルメフェン、ナロルフィン、ナロキソン（naloxone）、ナルトレキソン、ブプレノルフィン、ブトルファノール、またはナルブフィン（nalbuphine）、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、フルドロコルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、トリアムシノロン、デキサメタゾン、ベタメタゾン、パラメタゾン（paramethosone）、フルオシノロン、コルヒチン、アセトアミノフェン、非ステロイド性抗炎症剤

NSAID、アシクロビル、リババリン (ribavirin)、トリフルオロチミジン (trifluorothyridine)、Ara-A アラビノフラノシルアデニン、アシルグアノシン、ノルデオキシグアノシン、アジドチミジン、ジデオキシシアデノシン、dideoxysitidine、スピロノラクトン、テストステロン、エストラジオール、プロゲスチン、ゴナドトロピン、エストロゲン、プロゲステロン、パパベリン、ニトログリセリン、血管作用性腸管ペプチド、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、サイプロヘプタジン、ドクサピン、イミプラミン、シメチジン、デキストロメトर्फアン、クロザリル、スーパーオキシドジスムターゼ、ニューロエンケファリナーゼ (neuroenkephalinase)、アンフォテリシン B、グリセオフルビン、ミコナゾール、ケトコナゾール、チオコナゾール、イトラコナゾール、フルコナゾール、セファロスポリン、テトラサイクリン、アミノグルコシド、エリスロマイシン (erythromycin)、ゲンタマイシン、ポリミキシン B、5-フルオロウラシル、ブレオマイシン、メトトレキサート、ヒドロキシウレア、ジデオキシイノシン、フロクスウリジン、6-メルカプトプリン、ドキシルピシン、ダウノルピシン、イダルビシン (idarubicin)、タキソール、パクリタキセル、トコフェロール、キニジン、プラゾシン、ベラパミル、ニフェジピン、ジルチアゼム、組織プラスミノゲン活性化因子 TPA、上皮増殖因子 EGF、線維芽細胞増殖因子 FGF-酸性もしくは塩基性、血小板由来増殖因子 PDGF、トランスホーミング増殖因子 TGF- α もしくは β 、血管作用性腸管ペプチド、腫瘍壊死因子 TNF、視床下部放出因子 (hypothalamic releasing factor)、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン TSH、副腎皮質刺激ホルモン ACTH、副甲状腺ホルモン PTH、濾胞刺激ホルモン FSH、黄体形成ホルモン放出ホルモン LHRH、エンドルフィン、グルカゴン、カルシトニン、オキシトシン、カルベトシン、アルドエテコン (aldosterone)、エンケファリン、ソマトスタチン、ソマトトロピン、ソマトメジン、 α -メラニン細胞刺激ホルモン、リドカイン、スフェンタニル (sufentanil)、テルブタリン、ドロペリドール、スコポラミン、ゴナドレリン、シクロピロックス、ブスピロン、クロモリンナトリウム、ミダゾラム、シクロスポリン、リシノプリル、カプトプリル、デラプリル、ラニチジン、ファモチジン、スーパーオキシドジスムターゼ、アスパラギナーゼ、アルギナーゼ、アルギニンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、リボヌクレアーゼ、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、ボンベシン、サブスタンス P、バソプレッシン、 α -グロブリンs、トランスフェリン、フィブリノゲン、 β -リポタンパク質、 β -グロブリン、プロトロンビン、セルロプラスミン、 α 2-糖タンパク質、 α 2-グロブリン、フェチュイン、 α 1-リポタンパク質、 α 1-グロブリン、アルブミン、およびプレアルブミンが挙げられる。

【0380】

活性薬剤の例としては、オピオイドもしくはオピオイドアンタゴニスト (例えば、モルフィン、ヒドロモルフォン、オキシモルフォン、レボルファノール、レバロルファン、コデイン、ナルメフェン、ナロルフィン、ナロキソン、ナルトレキソン、ブプレノルフィン、ブトルファノール、およびナルブフィン) ; コルチコステロン (例えば、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、フルドコルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、トリアムシノロン、デキサメタゾン、ベタメタゾン、パラメタゾン、およびフルオシノロン) ; 他の抗炎症剤 (例えば、コルヒチン、イブプロフェン、インドメタシン、およびピロキシカム) ; 抗ウイルス剤 (例えば、アシクロビル、リババリン、トリフルオロチミジン、Ara-A (アラビノフラノシルアデニン)、アシルグアノシン、ノルデオキシグアノシン、アジドチミジン、ジデオキシシアデノシン、およびジデオキシシチジン) ; 抗アンドロゲン (例えば、スピロノラクトン) ; アンドロゲン (例えば、テストステロン) ; エストロゲン (例えば、エストラジオール) ; プロゲスチン; 筋弛緩剤 (例えば、パパベリン) ; 血管拡張薬 (例えば、ニトログリセリン、血管作用性腸管ペプチドおよびカルシトニン関連遺伝子ペプチド) ; 抗ヒスタミン剤 (例えば、サイプロヘプタジン) ; ヒスタミンレセプター部位ブロック活性を有する薬剤 (例えば、ドクサピン、イミプラミン、およびシメチジン) ; 鎮咳薬 (例えば、デキストロメトर्फアン) ; 神経弛緩

10

20

30

40

50

薬（例えば、クロザリル）；抗不整脈薬；抗癲癇薬；酵素（例えば、スーパーオキシドジスムターゼおよびニューロエンケファリナーゼ）；抗真菌剤（例えば、アンフォテリシン B、グリセオフルビン、ミコナゾール、ケトコナゾール、チオコナゾール、イトラコナゾール、およびフルコナゾール）；抗細菌剤（例えば、ペニシリン、セファロスポリン、テトラサイクリン、アミノグルコシド、エリスロマイシン、ゲンタマイシン、ポリミキシン B）；抗癌剤（例えば、5-フルオロウラシル、ブレオマイシン、メトトレキサート、およびヒドロキシウレア、ジデオキシイノシン、フロクスウリジン、6-メルカプトプリン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、タキソール、およびパクリタキセル）；抗酸化剤（例えば、トコフェロール、レチノイド、カロチノイド、ユビキノン、金属キレート化剤、およびフィチン酸）；抗不整脈薬（例えば、キニジン）；降圧剤（例えば、プラゾシン、ベラパミル、ニフェジピン、およびジルチアゼム）；鎮痛薬（例えば、アセトアミノフェンおよびアスピリン）；モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体（ヒト化抗体、および抗体フラグメントを含む）；アンチセンスオリゴヌクレオチド；ならびに RNA、調節性 RNA、干渉 RNA、DNA、およびウイルスベクター（治療用ペプチドおよびタンパク質をコードする遺伝子を含む）が挙げられる。

10

【0381】

（投与のための組成物および処方物）

本明細書において使用される場合、用語「投与する」および「投与」とは、化合物もしくは組成物を作用部位に直接的にもしくは間接的に送達するための全ての手段を包含する。本開示の化合物および組成物は単独で投与されてもよいし、本明細書で開示されていない他の化合物、組成物、もしくは治療剤と組み合わせて投与されてもよい。

20

【0382】

本発明の組成物および方法は、種々の粘膜投与様式によって（経口、直腸、膣、経鼻、肺内、もしくは皮内送達によるもの、または眼、耳、皮膚もしくは他の粘膜表面への局所送達によるものが挙げられる）、被験体に投与され得る。本発明のいくつかの局面において、上記粘膜組織層は、上皮細胞層を含む。上記上皮細胞は、肺、気管、気管支、肺胞、鼻、口内、表皮、もしくは胃腸管のものであり得る。本発明の組成物は、従来の作動器（例えば、機械式スプレーデバイス、加圧式、電子作動式、もしくは他のタイプの作動器）を使用して、投与され得る。

【0383】

本発明の組成物は、鼻スプレーもしくは肺スプレーとして水溶液中で投与され得、そして当業者に公知の種々の方法によって、スプレー形態で分与され得る。本発明の組成物の肺送達は、小滴、粒子、もしくはスプレー（これらは、例えば、エアロゾル化され得るか、霧状にされ得るか、または噴霧され得る）の形態において、上記組成物を投与することによって、達成され得る。肺送達は、上記組成物を、小滴、粒子、もしくはスプレーの形態において、鼻経路もしくは気管支経路を介して投与することによって、行われ得る。上記組成物、スプレー、もしくはエアロゾルの粒子は、液体形態もしくは固体形態のいずれかにおいて存在し得る。鼻スプレーとして液体を分与するために好ましいシステムは、米国特許第 4, 511, 069 号において開示されている。このような処方物は、本発明に従う組成物を水に溶解して、水溶液を生成し、そして上記溶液を滅菌することによって、従来通りに調製され得る。上記処方物は、複数用量容器において（例えば、米国特許第 4, 511, 069 号で開示されている密封分与システムにおいて）与えられ得る。他の適切な鼻スプレー送達システムは、Transdermal Systemic Medication, Y. W. Chien 編, Elsevier Publishers, New York, 1985；および米国特許第 4, 778, 810 号において記載されている。さらなるエアロゾル送達形態としては、例えば、圧縮空気式ネブライザー、ジェットネブライザー、超音波式ネブライザー、および圧電式ネブライザーが挙げられ得、これらは、薬学的溶媒（例えば、水、エタノール、もしくはこれらの混合物）に溶解もしくは懸濁される上記生物学的に活性な薬剤を送達する。

30

40

【0384】

50

本発明の鼻スプレー溶液および肺スプレー溶液は、代表的には、送達されるべき薬物を含み得、必要に応じて、表面活性剤（例えば、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート-80）、および1種以上の緩衝液とともに処方され得る。本発明のいくつかの実施形態において、上記鼻スプレー溶液は、プロペラントをさらに含む。上記鼻すぷれー溶液のpHは、約pH6.8〜7.2であり得る。上記使用される薬学的溶媒はまた、pH4〜6のわずかに酸性の水性緩衝液であり得る。他の成分は、化学的安定性を増強もしくは維持するために添加され得る（保存剤、界面活性剤、分散剤もしくはガスが挙げられる）。

【0385】

いくつかの実施形態において、本発明は、本発明の組成物を含む溶液と、該、粘膜、もしくは鼻内スプレーもしくはエアロゾルのための作動器とを含む薬学的製品である。

10

【0386】

本発明の組成物の投与形態は、液滴もしくはエマルジョンの形態の、またはエアロゾルの形態の、液体であり得る。

【0387】

本発明の組成物の投与形態は固体であり得、この固体は、投与前に液体中で再構成され得る。上記固体は、散剤として投与され得る。上記固体は、カプセル剤、錠剤もしくはゲルの形態で存在し得る。

【0388】

本発明の範囲内の肺送達のための組成物を処方するために、上記生物学的に活性な薬剤は、種々の薬学的に受容可能な添加剤もしくは送達増強成分、ならびに上記活性薬剤の分散のためのベース（base）もしくはキャリアと合わせられ得る。添加剤もしくは送達増強成分の例としては、pH制御薬剤（例えば、アルギニン、水酸化ナトリウム、グリシン、塩酸、クエン酸、およびこれらの混合物）が挙げられる。他の添加剤もしくは送達増強成分としては、局所麻酔剤（例えば、ベンジルアルコール）、等張剤（isotonicizing agent）（例えば、塩化ナトリウム、マンニトール、ソルビトール）、吸着インヒビター（例えば、Tween 80）、溶解度増強剤（例えば、シクロデキストリンおよびその誘導体）、安定化剤（例えば、血清アルブミン）、および還元剤（例えば、グルタチオン）が挙げられる。粘膜送達のための組成物が液体である場合、上記処方物の張性は、調和として採用される0.9%（w/v）生理食塩水溶液の張性に関して測定される場合、代表的には、実質的な、不可逆的な組織損傷が投与部位の粘膜において誘導されない値に調節される。一般には、上記溶液の張性は、約1/3〜3、より代表的には、1/2〜2、およびもっとも頻繁には、3/4〜1.7の値に調節される。

20

30

【0389】

上記生物学的に活性な薬剤は、ベースもしくはビヒクル中に分散され得、これらベースもしくはビヒクルは、上記活性薬剤を分散させる能力を有する親水性化合物および任意の望ましい添加剤を含み得る。上記ベースは、広い範囲の適切なキャリア（ポリカルボン酸もしくはその塩、カルボン酸無水物（例えば、マレイン酸無水物）と、他のモノマー（例えば、メチル（メタ）アクリレート、非環式の酸などとのコポリマー、親水性ビニルポリマー（例えば、ポリビニルアセテート、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン）、セルロース誘導体（例えば、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなど）、および天然のポリマー（例えば、キトサン、コラーゲン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、ヒアルロン酸、およびこれらの非毒性金属塩）が挙げられるが、これらに限定されない）から選択され得る。生分解性ポリマーは、ベースもしくはキャリア（例えば、ポリ乳酸、ポリ（乳酸-グリコール酸）コポリマー、ポリヒドロキシ酪酸、ポリ（ヒドロキシ酪酸-グリコール酸）コポリマーおよびこれらの混合物）として選択され得る。代わりに、またはさらに、合成脂肪酸エステル（例えば、ポリグリセリン脂肪酸エステル、脂肪酸エステル、スクロース脂肪酸エステルなど）は、キャリアとして使用され得る。親水性ポリマーおよび他のキャリアは単独で使用され得るか、または組み合わせて使用され得、そして増強された構造完全性は、部分的結晶化、イオン結合、架橋などによって

40

50

、上記キャリアに付与され得る。上記キャリアは、種々の形態（流体もしくは粘性の溶液、ゲル、ペースト、散剤、マイクロスフェアおよび上記鼻粘膜への直接適用のためのフィルムが挙げられる）に適用され得る。この文脈において選択されるキャリアの使用は、上記生物学的に活性な薬剤の吸収の促進を生じ得る。

【0390】

上記生物学的に活性な薬剤は、種々の方法に従って上記ベースもしくはキャリアと合わせられ得、上記活性薬剤の放出は、希釈、上記キャリアの分散、または水チャネルのエアロゾル化処方物によってであり得る。いくつかの状況において、上記活性薬剤は、適切なポリマー（例えば、イソブチル 2-シアノアクリレートから調製されたマイクロカプセル（マイクロスフェア）もしくはナノ粒子（ナノスフェア）に分散させられ（例えば、M i c h a e l ら, J. P h a r m a c y P h a r m a c o l. 43:1-5, 1991を参照のこと）、そして鼻粘膜に適用される生体適合性分散媒体中に分散させられ、このことは、保護された時間にわたって維持された送達および生物学的活性を生じる。

10

【0391】

粘膜送達、鼻送達、もしくは肺送達のための処方物は、ベースもしくは賦形剤として、親水性低分子量化合物を含み得る。このような親水性低分子量化合物は、通過媒体（p a s s a g e m e d i u m）を提供し、この媒体を介して、水溶性活性薬剤（例えば、生理学的に活性なペプチドもしくはタンパク質）が、上記ベースを介して、上記活性薬剤が吸収される新体表面へと分散させられ得る。上記親水性低分子量化合物は、必要に応じて、上記粘膜もしくは上記投与雰囲気から水分を吸収し、そして上記水溶性活性ペプチドを溶解する。上記親水性低分子量化合物の分子量は、一般に、多くて10,000であり、好ましくは、多くて3000である。親水性低分子量化合物の例としては、ポリオール化合物（例えば、オリゴ糖、二糖、および単糖（スクロース、マンニトール、ラクトース、L-アラビノース、D-エリトロース、D-リボース、D-キシロース、D-マンノース、D-ガラクトース、ラクツロース、セロビオース、ゲンチビオース（g e n t i b i o s e）、グリセリン、ポリエチレングリコール、およびこれらの混合物が挙げられる））が挙げられる。親水性低分子量化合物のさらなる例としては、N-メチルピロリドン、アルコール（例えば、オリゴビニルアルコール、エタノール、エチレングリコール、プロピレングリコールなど）、およびこれらの混合物が挙げられる。

20

【0392】

本発明の組成物は、代わりに、生理学的条件に近づけるために必要とされる場合、薬学的に受容可能なキャリア物質として、例えば、pH調節剤および緩衝化剤、張性調節剤、および湿潤剤（例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレエート、およびこれらの混合物を含み得る。固体組成物については、従来の非毒性の薬学的に受容可能なキャリアが使用され得、上記キャリアとしては、例えば、製薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。

30

【0393】

本発明の特定の実施形態において、上記生物学的に活性な薬剤は、時間放出処方物において（例えば、遅延放出ポリマーを含む組成物において）投与され得る。上記活性薬剤は、急速な放出に対して保護されるキャリア（例えば、制御放出ビヒクル（例えば、ポリマー、マイクロ封入送達系もしくは生体接着性ゲル）とともに調製され得る。上記活性薬剤の長期送達は、本発明の種々の組成物において、吸収を遅延させる組成物因子（例えば、アルミニウムモノステアレートヒドロゲルおよびゼラチン）中に含めることによって、もたらされ得る。

40

【0394】

本発明の特定の実施形態において、組成物は、1種以上の天然もしくは合成界面活性剤を含み得る。特定の天然界面活性剤は、ヒト肺（肺界面活性剤）に見いだされ、そして肺胞の空気-液体界面において単層を形成し、そして呼息時に表面張力をほぼゼロへと低

50

下させ、肺泡虚脱を防止するリン脂質およびタンパク質の複合混合物である。肺界面活性剤のうちの90%超（重量で）が、リン脂質から構成され、約40～80%がDPPCであり、その残りが不飽和ホスファチジルコリン POPG、POPCおよびホスファチジルグリセロールである。界面活性剤の残りの10%（重量で）は、血漿タンパク質およびアポプロテイン（例えば、表面タンパク質（SP）-A、SP-B、SP-CおよびSP-D）から構成される。

【0395】

本発明において使用され得る天然界面活性剤の例としては、SURVANTATM（ベラクタント（beractant））、CUROSURFTM（ポラクタントα（poractant alpha））およびINFASURFTM（カルファクタント（calfactant））、およびこれらの混合物が挙げられる。

10

【0396】

合成界面活性剤の例としては、シナプルチド（sinapultide）；ジパルミトイルホスファチジルコリン、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロールおよびパルミチン酸の混合物；SURFAXINTM（ルシナクタント（lucinactant））；ならびにEXOSURFTM（コルフোসセリル（colfosceril））；チロキサポール、DPPC、およびヘキサデカノールを含み得る成分；ならびにこれらの混合物が挙げられる。

【0397】

本発明の組成物は、当該分野で公知の方法によって調製され得る。上記脂質組成物を作製するための方法としては、エタノール注入法および規定された孔サイズの積層（stacked）ポリカーボネート膜フィルタを備えるNorthern Lipids Lipex Extruderシステムを用いる押し出し法が挙げられる。プローブチップおよびバス超音波処理器を使用する超音波処理は、均一なサイズの脂質粒子を生成するために使用され得る。均質かつ単分散性粒径は、上記核酸成分を添加することなく得られ得る。インビトロトランスフェクション組成物については、上記核酸成分は、上記トランスフェクション剤が作製され、さらなる緩衝剤成分によって安定化した後に、添加され得る。インビボ送達組成物については、上記核酸成分は、上記処方物の一部である。

20

【0398】

本発明の組成物および処方物は、種々の経路によって、例えば、静脈内経路、非経口経路、もしくは腹腔内経路を介した全身送達をもたらすために投与され得る。いくつかの実施形態において、薬剤は、細胞内に、例えば、標的組織（例えば、肺もしくは肝臓）の細胞に、または炎症組織に送達され得る。被験体の細胞を取り出し、上記取り出された細胞に薬剤を送達し、そして上記細胞を被験体に再導入することによる、薬剤の送達のための組成物および方法が、本開示内に包含される。いくつかの実施形態において、本発明は、薬剤をインビボで送達するための方法を提供する。組成物は、被験体に、静脈内投与、皮下投与、もしくは腹腔内投与され得る。いくつかの実施形態において、本発明は、哺乳動物被験体の肺へ薬剤をインビボで送達するための方法を提供する。

30

【0399】

（さらなる実施形態）

40

本明細書に引用される全ての刊行物、参考文献、特許、特許公開および特許出願は、各々その全体が本明細書に具体的に援用される。

【0400】

本発明は、特定の実施形態に関連して記載し、多くの詳細が例示目的で示されてきたが、本発明がさらなる実施形態を包含し、そして本明細書に記載される詳細のうちのいくらかが、本発明から逸脱することなくかなり変動し得ることは、当業者にとって明らかである。本発明は、このようなさらなる実施形態、改変および等価物を包含する。特に、本発明は、種々の例示的成分および例の特徴、用語、もしくは要素の任意の組み合わせを包含する。

【0401】

50

本発明および特許請求の範囲を記載するにあたって、用語「1つの、ある(a)」、「1つの、ある(an)」、「上記、この、その(the)」および類似の用語の本明細書での使用は、単数形および複数形の両方を含むと解釈されるべきである。

【0402】

用語「含む、包含する(comprising)」、「有する」、「含む、包含する(including)」および「含む(Containing)」は、例えば、「～を含む(～が挙げられる)が、これらに限定されない」を意味する、開放系の用語として解釈されるべきである。従って、「含む、包含する(comprising)」、「有する(having)」、「含む、包含する(including)」および「含む(Containing)」のような用語は、包括的であって、排他的ではないと解釈されるべきである。

10

【0403】

本明細書中の値の範囲の記載は、上記範囲内の値のうちのいくつかが明確に記載されようとそうでなかろうと、本明細書に個々に記載されているかのように、上記範囲内に入る各々の値および任意の別個の値に個々に言及する。例えば、範囲「4～12」は、値5、5.1、5.35、および4以上12以下の任意の他の自然数、整数、分数、もしくは有理数を含むが、これらに限定されない。本明細書において使用される特定の値は、例示として理解され、本発明の範囲を限定するとは理解されない。

【0404】

本明細書中の炭素原子数の範囲の記載は、上記範囲内の値のうちのいくつかが明確に記載されようとそうでなかろうと、本明細書に個々に記載されているかのように、上記範囲内に入る各々の値および任意の別個の値に個々に言及する。例えば、用語「C1-22」とは、種C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19、C20、C21、およびC22を含むが、これらに限定されない。

20

【0405】

本明細書において提供される技術用語の定義は、記載されていなくても、当業者に公知のこれらの用語に関連した意味を含むと解釈されるべきであって、本発明の範囲を限定するとは意図されない。本明細書において提供される技術用語の定義は、当該分野での別の選択肢的定義が本明細書に提供される定義と矛盾する場合は、上記選択肢的定義もしくは本明細書に参考として援用される定義に優先すると解釈されるものとする。

30

【0406】

本明細書に示される実施例、および本明細書において使用される例示的な言葉は、例示目的に過ぎず、本発明の範囲を限定するとは意図しない。

【0407】

例の列挙(例えば、本発明に適した化合物もしくは分子の列挙)が示される場合、上記列挙された化合物もしくは分子の混合物もまた適していることは、当業者に明らかである。

【実施例】

【0408】

(実施例1: C10-Arg-C10 N-(5-グアニジノ-1-オキソ-1-(デシルアミノ)ペンタン-2-イル)デカンアミドの調製)

Fmoc-Arg(Pbf)-樹脂。30ml 固相合成用反応容器中、3gの2-クロロトリチルクロリド樹脂と、30mlの乾燥DCM中の1.3mmol/g置換(Novabiochem, 01-64-0114)に、5.06g(11.7mmol, 3当量)のFmoc-Arg(Pbf)-OH(Mw=648.8, Novabiochem, 04-12-1145)および2.23ml(12.87mmol, 3.3当量)のDIPEA(Alldrich, Mw=129.2, d=0.74)を添加した。

40

【0409】

Arg(Pbf)-樹脂。2時間後に、上記樹脂を、3×DCM/MeOH/DIPE

50

A (17:2:1)、3×DCM、2×DMF、3×DCMで洗浄し、Fmoc基を、30mlの20% ピペリジン/DMFで30分間脱保護した。

【0410】

C10-Arg(Pbf)-樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、カップリング反応のために、30mlのDMF中の1.48g(11.7mmol)のデカン酸(Sigma, Mw=127.27)、5.54g(11.7mmol)のHCTU(Mw=473.7)および2.23ml(12.87mmol)のDIPEA(Mw=129.2, d=0.74)を添加した。

【0411】

反応の1時間後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった(遊離アミノ基が存在しない)。

10

【0412】

C10-Arg(Pbf)-OH(Mw=580.83)を、1% TFA/DCM(2分間にわたって5×30mlを、2mlの10% ピリジン/MeOHでフラスコへと濾過する)によって上記樹脂から切断し、溶媒をエバポレートした。

【0413】

C10-Arg(Pbf)-C10(Mw=720.13)。第2のカップリングを、溶液で行った。前の反応からの油状残渣に、50mlのDMF中の2.32ml(11.7mmol)のC10-アミン(Sigma, Mw=157.3, d=0.792)、5.54g(11.7mmol)のHCTU(Mw=473.7)および2.23ml(12.87mmol)のDIPEA(Mw=129.2, d=0.74)を添加した。1時間後に、100mlのAcOEtを添加し、有機層を、分離漏斗中、3×0.5M HCl、3×10% NaCO₃および3×NaClで洗浄した。AcOEt層を、無水MgSO₄で乾燥させ、エバポレートした。

20

【0414】

C10-Arg-C10(Mw=467.8)。前の反応からの油状残渣に、100mlの95% TFA/DCM 2.5% TISを添加し、3時間後、溶媒をエバポレートした。残渣を、AcCN/0.5M HCl 1:1に溶解し、C18 Phenomenexカラム(Phenomenex RP, 250×21.2mm, Serial No.: 234236-1, カラム容積83ml)上でRP_Akta Explorerによって精製し、3 CV内の移動相として、水を使用する0~100% アセトニトリル勾配; X=215nmで溶出した。アセトニトリルをエバポレートし、その生成物を凍結乾燥した。

30

【0415】

(実施例2: C10-D-Arg-C10 N-(5-グアニジノ-1-オキソ-1-(デシルアミノ)ペンタン-2-イル)デカンアミドの調製)

Fmoc-D-Arg(Pmc)-樹脂。30ml 固相合成用反応容器中、3gの2-クロトリチルクロリド樹脂と、30mlの乾燥DCM中の1.3mmol/g 置換(Novabiochem, 01-64-0114)に、5.06g(11.7mmol, 3当量)のFmoc-D-Arg(Pmc)-OH(Mw=662.8, Novabiochem, 04-12-1145)および2.23ml(12.87mmol, 3.3当量)のDIPEA(Aldrich, Mw=129.2, d=0.74)を添加した。

40

【0416】

D-Arg(Pmc)-樹脂。2時間後に、上記樹脂を、3×DCM/MeOH/DIPEA(17:2:1)、3×DCM、2×DMF、3×DCMで洗浄し、Fmoc基を、30mlの20% ピペリジン/DMFで30分間にわたって脱保護した。

【0417】

C10-D-Arg(Pmc)-樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、そしてカップリング反応のために、30ml

50

のDMF中の1.48 g (11.7 mmol) のデカン酸 (Sigma, $M_w = 127.27$)、5.54 g (11.7 mmol) のHCTU ($M_w = 473.7$) および2.23 ml (12.87 mmol) のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

【0418】

反応の1時間後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、そして反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった（遊離アミノ基はない）。

【0419】

C10-D-Arg (Pmc)-OH ($M_w = 591.84$) を、1% TFA/DCMによって上記樹脂から切断し（2分間にわたって5×30 mlを、2 mlの10% ピリジン/MeOHでフラスコへと濾過した）、溶媒をエバポレートした。

【0420】

C10-D-Arg (Pmc)-C10 ($M_w = 732.14$)。第2のカップリングを溶液で行った。前の反応からの上記油状残渣に、50 mlのDMF中の2.32 ml (11.7 mmol) のC10-アミン (Sigma, $M_w = 157.3$, $d = 0.792$)、5.54 g (11.7 mmol) のHCTU ($M_w = 473.7$) および2.23 ml (12.87 mmol) のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。1時間後に、100 mlのAcOEtを添加し、有機層を、分離漏斗中、3×0.5 M HCl、3×10% NaCO₃ および3×NaClで洗浄した。AcOEt層を、無水MgSO₄で乾燥させ、エバポレートした。

【0421】

C10-D-Arg-C10 ($M_w = 467.8$)。前の反応からの上記油状残渣に、100 mlの95% TFA/DCM 2.5% TISを添加し、3時間後に、溶媒をエバポレートした。残渣を、AcCN/0.5 M HCl 1:1中に溶解し、そしてC18 Phenomenexカラム (Phenomenex RP, 250×21.2 mm, Serial No.: 234236-1, カラム容積 83 ml) 上のRP_Akta Explorerによって精製し、そして3 CV内の移動相として水を使用して、0~100% アセトニトリル勾配; $\lambda = 215$ nmで溶出した。アセトニトリルをエバポレートし、その生成物を凍結乾燥した。

【0422】

(実施例3: C12-Arg-C12 N-(5-グアニジノ-1-オキソ-1-(ドデシルアミノ)ペンタン-2-イル)ドデカンアミドの調製)

Fmoc-Arg (Pbf)-樹脂。200 ml 固相合成用反応容器中、5 gの2-クロロトリチルクロリド樹脂と、50 mlの乾燥DCM中の1.3 mmol/g置換 (Novabiochem, 01-64-0114) に、8.434 g (13 mmol, 2当量) のFmoc-Arg (Pbf)-OH ($M_w = 648.8$, Novabiochem, 04-12-1145) および2.26 ml (13 mmol, 2当量) のDIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

【0423】

Arg (Pbf)-樹脂。2時間後に、上記樹脂を、3×DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1)、3×DCM、2×DMF、3×DCMで洗浄し、Fmoc基を、50 mlの20% ピペリジン/DMFで2回、15分間にわたって脱保護した。

【0424】

C12-Arg (Pbf)-樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、カップリング反応のために、50 mlのDMF中の1.95 g (9.75 mmol) のドデカン酸 (Sigma, $M_w = 200.32$)、4.033 g (9.75 mmol) のHCTU ($M_w = 417.7$) および1.7 ml (9.75 mmol) のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

【0425】

反応の1時間後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった（遊離アミノ基はない）。

【0426】

C12-Arg(Pbf)-OH ($M_w = 608.9$) を、上記樹脂から、1% TFA/DCMによって切断し（2分間にわたって5×30mlを、2mlの10% ピリジン/MeOHでフラスコへと濾過した）、溶媒をエバポレートした。

【0427】

C12-Arg(Pbf)-C12 ($M_w = 776.13$)。第2のカップリングを溶液で行った。前の反応工程からの油状残渣に、50mlのDCM中の1.246g (6.5mmol) のEDC*HCl ($M_w = 191.7$)、1.06g (7.15mmol, 1.1当量) のHOBt*H₂O ($M_w = 153$)、および5.65ml (31.5mmol, 5当量) のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加して、-COOHを予め活性化し、続いて、1.32g (7.15mmol) のC12-アミン (Sigma, $M_w = 185.36$) を20分間後に添加した。1時間後に、100mlのAcOEtを添加し、有機層を、分離漏斗中、3×0.5M HCl、3×10% NaCO₃ および3×NaClで洗浄した。AcOEt層を、無水MgSO₄で乾燥させ、エバポレートした。その生成物を、TELEDYNE Isco Combiflash Rf 機器、40g 順相 (normal phase) シリカゲルカラム、5 CV (カラム容積) に対して100% DCM、および10 CVに対して0~5% MeOH、検出 254 nm、流速40ml/分で精製した。

【0428】

C12-Arg-C12 ($M_w = 523.8$)。前の反応からの上記油状残渣に、50mlの85% TFA/DCM 2.5% TISを添加し、3時間後、溶媒をエバポレートした。その生成物を、0.5M HClで沈澱させた。

【0429】

(実施例4: C12-Arg-C14 N-(5-グアニジノ-1-オキソ-1-(テトラデシルアミノ)ペンタン-2-イル)ドデカンアミドの調製)

Fmoc-Arg(Pbf)-樹脂。200ml 固相合成用反応容器中、5gの2-クロロトリチルクロリド樹脂と、50mlの乾燥DCM中の1.3mmol/g置換 (Novabiochem, 01-64-0114) に、8.434g (13mmol, 2当量) のFmoc-Arg(Pbf)-OH ($M_w = 648.8$, Novabiochem, 04-12-1145) および2.26ml (13mmol, 2当量) のDIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

【0430】

Arg(Pbf)-樹脂。2時間後に、上記樹脂を、3×DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1)、3×DCM、2×DMF、3×DCMで洗浄し、Fmoc基を、50mlの20% ピペリジン/DMFで15分間にわたって2回脱保護した。

【0431】

C12-Arg(Pbf)-樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、カップリング反応のために、50mlのDMF中の1.95g (9.75mmol) のドデカン酸 (Sigma, $M_w = 200.32$)、4.033g (9.75mmol) のHCTU ($M_w = 417.7$) および1.7ml (9.75mmol) のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

【0432】

反応の1時間後に、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった（遊離アミノ基はない）。

【0433】

C12-Arg(Pbf)-OH ($M_w = 608.9$) を、1% TFA/DCMによ

って上記樹脂から切断し（2分間にわたって5×30mlを、2mlの10% ピリジン／MeOHでフラスコへと濾過した）、溶媒をエバポレートした。

【0434】

C12-Arg(Pbf)-C14 ($M_w = 804.13$)。第2のカップリングを溶液で行った。前の工程からの上記油状残渣に、50mlのDCM中の1.246g (6.5mmol)のEDC・HCl ($M_w = 191.7$)、1.06g (7.15mmol, 1.1当量)のHOBt・H₂O ($M_w = 153$)、および5.65ml (31.5mmol, 5当量)のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加して、-COOHを予め活性化し、続いて、1.52g (7.15mmol)のC14-アミン (Sigma, $M_w = 213.41$)を20分後に添加した。1時間後に、100mlのAcOEtを添加し、有機層を、分離漏斗中、3×0.5M HCl、3×10% NaCO₃ および3×NaClで洗浄した。AcOEt層を、無水MgSO₄で乾燥させ、エバポレートした。その生成物を、TELEDYNE Isco Combiflash Rf 機器、40g 順相シリカゲルカラム、5 CV (カラム容積)に対して100% DCM および10 CVに対して0~5% MeOH、検出254nm、流速40ml/分で精製した。

10

【0435】

C12-Arg-C14 ($M_w = 551.8$)。前の反応からの上記油状残渣に、50mlの85% TFA/DCM 2.5% TISを添加し、3時間後に、溶媒をエバポレートした。その生成物を、0.5M HClで沈澱させた。

20

【0436】

(実施例5)

実施例1~4と類似の様式において、C14-Arg-C14 (収量: 1.6g)、C16-Arg-C16、およびC18-Arg-C18を作製した。

【0437】

(実施例6: C18 (オレイック (oleic)) -Arg-C16 N- (5-グアニジノ-1-オキソ-1- (ヘキサデシルアミノ) ペンタン-2-イル) オクタデカ-9-エナミドの調製)

Fmoc-Arg(Pbf)-樹脂。60ml 固相合成用反応容器中、5gの2-クロロトリチルクロリド樹脂と、50mlの乾燥DCM中の1.3mmol/g置換 (Novabiochem, 01-64-0114)に、8.4g (13mmol, 2当量)のFmoc-Arg(Pbf)-OH ($M_w = 648.8$, Novabiochem, 04-12-1145) および2.26ml (13mmol, 2当量)のDIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加した。

30

【0438】

Arg(Pbf)-樹脂。2時間後に、上記樹脂を、3×DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1)、3×DCM、2×DMF、3×DCMで洗浄し、Fmoc基を、50mlの20% ピペリジン/DMFで15分間にわたって、2回脱保護した。

【0439】

C18_{オレイック}-Arg(Pbf)-樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、カップリング反応のために、50mlのDMF中の3.1ml (9.75mmol)のオレイン酸 (Sigma, $M_w = 282.47$; $d = 0.891$)、4g (9.75mmol)のHCTU ($M_w = 413.7$) および1.7ml (9.75mmol)のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加した。

40

【0440】

反応の1時間後に、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった (遊離アミノ基はない)。

【0441】

50

C18 オレィック-Arg (Pbf)-OH ($M_w = 690.83$) を、1% TFA / DCM によって上記樹脂から切断し (2 分間にわたって $5 \times 50 \text{ ml}$ を、2 ml の 10% ピリジン / MeOH でフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

【0442】

C18 オレィック-Arg (Pbf)-C16 ($M_w = 850.13$)。第2のカップリングを溶液で行った。前の工程からの上記油状残渣に、50 ml の DCM 中の 1.437 g (7.5 mmol) の EDC*HCl ($M_w = 191.7$)、1.178 g (7.7 mmol) の HOBt*H₂O ($M_w = 153$)、および 6.5 ml (37.5 mmol, 5 当量) の DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加して、-COOH を脱保護し、続いて、1.86 g (7.7 mmol) の C16-アミン (Sigma, $M_w = 241.46$) を 20 分後に添加した。一晩の反応後に、有機層を、分離漏斗中、 $3 \times 0.5 \text{ M HCl}$ 、 $3 \times 10\% \text{ NaCO}_3$ および $3 \times \text{NaCl}$ で洗浄した。DCM 層を、無水 MgSO_4 で乾燥させ、エバポレートした。その生成物を、TELEDYNE Isco Combiflash R_f 機器、40 g 順相シリカゲルカラム、5 CV (カラム容積) に対して 100% DCM および 10 CV に対して 0~5% MeOH、検出 215 nm、流速 40 ml / 分で精製した。

10

【0443】

C18 オレィック-Arg-C16 ($M_w = 661.8$)。前の反応からの上記油状残渣に、100 ml の 95% TFA / DCM 2.5% TIS を添加し、3 時間後に、溶媒をエバポレートした。生成物を 0.5 M HCl で沈澱させ、精製した。収量：1.8 g。

20

【0444】

(実施例 7 : C8-ホモ Arg-C8 N-(6-グアニジノ-1-オキソ-1-(オクチルアミノ)ヘキサノ-2-イル)オクタンアミドの調製)

Fmoc-hArg (ジBoc)-樹脂。30 ml 固相合成用反応容器中、3 g の 2-クロトリチルクロリド樹脂と、30 ml の乾燥 DCM 中の 1.3 mmol / g 置換 (Novabiochem, 01-64-0114) に、3.57 g (5.85 mmol, 1.5 当量) の Fmoc-hArg (ジBoc)-OH ($M_w = 610.69$, Novabiochem) および 2.04 ml (11.7 mmol, 3.0 当量) の DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

30

【0445】

hArg (ジBoc)-樹脂。2 時間後に、上記樹脂を、 $3 \times \text{DCM} / \text{MeOH} / \text{DIPEA}$ (17:2:1)、 $3 \times \text{DCM}$ 、 $2 \times \text{DMF}$ 、 $3 \times \text{DCM}$ で洗浄し、Fmoc 基を、30 ml の 20% ピペリジン / DMF で 30 分間にわたって脱保護した。

【0446】

C8-hArg (ジBoc)-樹脂。Fmoc 脱保護の後、上記樹脂を、 $3 \times \text{DCM}$ 、 $2 \times \text{MeOH}$ および $3 \times \text{DCM}$ で洗浄し、カップリング反応のために、30 ml の DMF 中の 1.854 ml (11.7 mmol) の C8 酸 (Sigma, $M_w = 144.22$, $d = 0.91$)、4.84 g (11.7 mmol) の HCTU ($M_w = 413.7$) および 2.23 ml (12.87 mmol) の DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

40

【0447】

反応の 1 時間後に、上記樹脂を、 $3 \times \text{DCM}$ 、 $2 \times \text{MeOH}$ および $3 \times \text{DCM}$ で洗浄し、反応の進行を、Kaiser 試験によってチェックしたところ、陰性であった (遊離アミノ基はない)。

【0448】

C8-hArg (ジBoc)-OH ($M_w = 514.68$) を、上記樹脂から、1% TFA / DCM によって切断し (2 分間にわたって $5 \times 30 \text{ ml}$ を、2 ml の 10% ピリジン / MeOH でフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

【0449】

50

C8-hArg (ジBoc)-C8 ($M_w = 625.93$)。第2のカップリングを溶液で行った。前の反応からの上記油状残渣に、50 mlのDMF中の1.93 ml (11.7 mmol)のC8-アミン (Sigma, $M_w = 129.25$, $d = 0.782$)、4.84 g (11.7 mmol)のHCTU ($M_w = 473.7$)および2.23 ml (12.87 mmol)のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加した。1時間後に、100 mlのAcOEtを添加し、有機層を、分離漏斗中、 3×0.5 M HCl、 $3 \times 10\%$ NaCO₃および $3 \times$ NaClで洗浄した。AcOEt層を、無水MgSO₄で乾燥させ、エバポレートした。

【0450】

C8-hArg-C8 ($M_w = 426.8$)。前の反応からの上記油状残渣に、100 mlの95% TFA/DCM 2.5% TISを添加し、1時間後に、溶媒をエバポレートした。残渣を、MeOH/AcCN/0.5 M HCl 1:1:1に溶解し、RP_Akta Explorerによって、C18 Phenomenexカラム (Phenomenex RP, 250×21.2 mm, Serial No.: 234236-1, カラム容積8.3 ml)で精製し、3 CV内の移動相として水を使用して、50~100% アセトニトリル勾配; $l = 215$ nmで溶出した。アセトニトリルをエバポレートし、その生成物を凍結乾燥した。

【0451】

(実施例8: C10-ホモArg-C10 N-(6-グアニジノ-1-オキソ-1-(デシルアミノ)ヘキサン-2-イル)デカンアミドの調製)

Fmoc-hArg (ジBoc)-樹脂。30 ml 固相合成用反応容器中、3 gの2-クロロトリチルクロリド樹脂と、30 mlの乾燥DCM中の1.3 mmol/g置換 (Novabiochem, 01-64-0114)に、3.57 g (5.85 mmol, 1.5当量)のFmoc-hArg (ジBoc)-OH ($M_w = 610.69$, Novabiochem)および2.04 ml (11.7 mmol, 3.0当量)のDIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加した。

【0452】

hArg (ジBoc)-樹脂。2時間後に、上記樹脂を、 $3 \times$ DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1)、 $3 \times$ DCM、 $2 \times$ DMF、 $3 \times$ DCMで洗浄し、Fmoc基を、30 mlの20% ピペリジン/DMFで30分間にわたって脱保護した。

【0453】

C10-hArg (ジBoc)-樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、 $3 \times$ DCM、 $2 \times$ MeOHおよび $3 \times$ DCMで洗浄し、カップリング反応のために、30 mlのDMF中の1.48 g (11.7 mmol)のデカン酸 (Sigma, $M_w = 127.27$)、5.54 g (11.7 mmol)のHCTU ($M_w = 473.7$)および2.23 ml (12.87 mmol)のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加した。

【0454】

反応の1時間後に、上記樹脂を、 $3 \times$ DCM、 $2 \times$ MeOHおよび $3 \times$ DCMで洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった(遊離アミノ基はない)。

【0455】

C10-hArg (ジBoc)-OH ($M_w = 541.78$)を、1% TFA/DCMによって上記樹脂から切断し(2分間にわたって 5×30 mlを、2 mlの10% ピリジン/MeOHでフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

【0456】

C10-hArg (ジBoc)-C10 ($M_w = 682.08$)。第2のカップリングを溶液で行った。前の反応からの上記油状残渣に、50 mlのDMF中の2.32 ml (11.7 mmol)のC10-アミン (Sigma, $M_w = 157.3$, $d = 0.792$)、5.54 g (11.7 mmol)のHCTU ($M_w = 473.7$)および2.23 ml (12.87 mmol)のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加し

10

20

30

40

50

た。1時間後に、100mlのAcOEtを添加し、有機層を、分離漏斗中、3×0.5M HCl、3×10% NaCO₃および3×NaClで洗浄した。AcOEt層を、無水MgSO₄で乾燥させ、エバポレートした。

【0457】

C10-hArg-C10 (M_w = 481.8)。前の反応からの上記油状残渣に、100mlの95% TFA/DCM 2.5% TISを添加し、1時間後に、溶媒をエバポレートした。残渣を、MeOH/0.5M HCl 1:1中に溶解し、H₂Oで沈澱させた。

【0458】

(実施例9: C12-ホモArg-C12 N-(6-グアニジノ-1-オキソ-1-(ドデシルアミノ)ヘキサノ-2-イル)ドデカンアミドの調製)

実施例8に類似の様式で、C12-ホモArg-C12 (収量: 1g)を作製した。

【0459】

(実施例10: C8-nor-norArg-C8 N-(3-グアニジノ-1-オキソ-1-(オクチルアミノ)プロパン-2-イル)オクタンアミドの調製)

Fmoc-Dap(Boc)-樹脂。30ml 固相合成用反応容器中、3gの2-クロトリチルクロリド樹脂と、30mlの乾燥DCM中の1.3mmol/g置換(Novabiochem, 01-64-0114)に、2.5g(5.85mmol, 1.5当量)のFmoc-Dap(Boc)-OH (M_w = 426.5, (Fmoc-(N-β-Boc)-L-α, β-ジアミノプロピオン酸), AnaSpec, 22140)および2.03ml(11.7mmol, 3.0当量)のDIPEA (Aldrich, M_w = 129.2, d = 0.74)を添加した。

【0460】

Dap-(Boc)-樹脂。2時間後に、上記樹脂を、3×DCM/MeOH/DIPEA(17:2:1)、3×DCM、2×DMF、3×DCMで洗浄し、Fmoc基を、30mlの20% ピペリジン/DMFで30分間にわたって脱保護した。

【0461】

C8-Dap(Boc)-樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、カップリング反応のために、30mlのDMF中の1.236ml(11.7mmol)のC8酸(Sigma, M_w = 144.22, d = 0.910), 4.84g(11.7mmol)のHCTU (M_w = 413.7)および2.23ml(12.87mmol)のDIPEA (M_w = 129.2, d = 0.74)を添加した。

【0462】

反応の1時間後に、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった(遊離アミノ基はない)。

【0463】

C8-Dap(Boc)-OH (M_w = 330.49)を、上記樹脂から1% TFA/DCMによって切断し(2分間にわたって5×30mlを、2mlの10% ピリジン/MeOHでフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

【0464】

C8-Dap(Boc)-C8 (M_w = 441.74)。第2のカップリングを溶液で行った。前の反応からの上記油状残渣に、50mlのDMF中の2.32ml(11.7mmol)のC8-アミン(Sigma, M_w = 129.25, d = 0.782), 4.84g(11.7mmol)のHCTU (M_w = 473.7)および2.23ml(12.87mmol)のDIPEA (M_w = 129.2, d = 0.74)を添加した。1時間後に、100mlのAcOEtを添加し、有機層を、分離漏斗中、3×0.5M HCl、3×10% NaCO₃および3×NaClで洗浄した。AcOEt層を、無水MgSO₄で乾燥させ、エバポレートした。

10

20

30

40

50

【0465】

C8-Dap-C8 ($M_w = 341.74$)。前の反応からの上記油状残渣に、100 mlの80% TFA/DCM 2.5% TISを添加し、1時間後に、溶媒をエバポレートした。

【0466】

C8-nor-norArg (ジBoc)-C8 ($M_w = 583.74$)。上記残渣を、50 mlのDCM中に溶解し、pHをTEAで9に調節した。2.23 g (5.85 mM, 1.5当量)の1,3-ジ-Boc-2-(トリフルオロメチルスルホニル)グアニジン ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033)を添加し、4時間後に、DCMをエバポレートした。

10

【0467】

C8-nor-norArg-C8 ($M_w = 384.8$)。前の反応からの上記油状残渣に、100 mlの95% TFA/DCM 2.5% TISを添加し、3時間後に、溶媒をエバポレートした。残渣を、MeOH/AcCN/0.5M HCl 1:1:1中に溶解し、RP_Akta Explorerによって、C18 Phenomenexカラム (Phenomenex RP, 250×21.2 mm, Serial No.: 234236-1, カラム容積83 ml) 上で精製し、3 CV内の移動相として水を使用して50~100% アセトニトリル勾配; $l = 215$ nmで溶出した。アセトニトリルをエバポレートし、その生成物を凍結乾燥した。

20

【0468】

(実施例11: C10-nor-norArg-C10 N-(3-グアニジノ-1-オキソ-1-(デシルアミノ)プロパン-2-イル)デカンアミドの調製)

Fmoc-Dap(Boc)-樹脂。30 ml 固相合成用反応容器中、3 gの2-クロロトリチルクロリド樹脂と、30 mlの乾燥DCM中の1.3 mmol/g置換 (Novabiochem, 01-64-0114)に、2.5 g (5.85 mmol, 1.5当量)のFmoc-Dap(Boc)-OH ($M_w = 426.5$, (Fmoc-(N-β-Boc)-L-α, β-ジアミノプロピオン酸), AnaSpec, 22140)および2.03 ml (11.7 mmol, 3.0当量)のDIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加した。

30

【0469】

Dap(Boc)-樹脂。2時間後に、上記樹脂を、3×DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1)、3×DCM、2×DMF、3×DCMで洗浄し、Fmoc基を、30 mlの20% ピペリジン/DMFで30分間にわたって脱保護した。

【0470】

C10-Dap(Boc)-樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、カップリング反応のために、30 mlのDMF中の1.48 g (11.7 mmol)のデカン酸 (Sigma, $M_w = 172.27$)、4.83 g (11.7 mmol)のHCTU ($M_w = 413.7$)および2.23 ml (12.87 mmol)のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加した。

【0471】

反応の1時間後に、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった(遊離アミノ基はない)。

40

【0472】

C10-Dap(Boc)-OH ($M_w = 357.54$)を、上記樹脂から1% TFA/DCMによって切断し(2分間にわたって5×30 mlを、2 mlの10% ピリジン/MeOHでフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

【0473】

C10-Dap(Boc)-C10 ($M_w = 496.84$)。第2のカップリングを溶液中で行った。前の反応からの上記油状残渣に、50 mlのDMF中の2.32 ml (1

50

1. 7 mmol) の C10-アミン (Sigma, $M_w = 157.3$, $d = 0.792$)、4.83 g (11.7 mmol) の HCTU ($M_w = 473.7$) および 2.23 ml (12.87 mmol) の DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) に添加した。2 時間後に、100 ml の AcOEt を添加し、有機層を、分離漏斗中、 3×0.5 M HCl、 $3 \times 10\%$ NaCO₃ および $3 \times$ NaCl で洗浄した。AcOEt 層を、無水 MgSO₄ で乾燥させ、エバポレートした。

【0474】

C10-Dap-C10 ($M_w = 397.8$)。前の反応からの上記油状残渣に、100 ml の 80% TFA/DCM 2.5% TIS を添加し、1 時間後に、溶媒をエバポレートした。

【0475】

C10-nor-norArg (ジBoc)-C10 ($M_w = 640.8$)。上記残渣を、50 ml の DCM 中に溶解し、pH を TEA で 9 に調節した。2.23 g (5.85 mM, 1.5 当量) の 1,3-ジ-Boc-2-(トリフルオロメチルスルホニル) グアニジン ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033) を添加し、4 時間後に、DCM をエバポレートした。

【0476】

C10-nor-norArg-C10 ($M_w = 439.8$)。前の反応からの上記油状残渣に、100 ml の 80% TFA/DCM 2.5% TIS を添加し、1 時間後に、溶媒をエバポレートした。残渣を、AcCN/MeOH/0.5 M HCl 1:1:1 の溶解し、RP_Akta Explorer によって C18 Phenomenex カラム (Phenomenex RP, 250×21.2 mm, Serial No.: 234236-1, カラム容積 83 ml) 上で精製し、3 CV 内の移動相として水を使用して 50~100% アセトニトリル勾配; $l = 215$ nm で溶出した。アセトニトリルをエバポレートし、その生成物を凍結乾燥した。収量: 1.6 g。

【0477】

(実施例 12: C12-nor-norArg-C12 N-(3-グアニジノ-1-オキソ-1-(ドデシルアミノ)プロパン-2-イル)ドデカンアミドの調製)

Fmoc-Dap(Boc)-樹脂。30 ml 固相合成用反応容器中、3 g の 2-クロロトリチルクロリド樹脂と、30 ml の乾燥 DCM 中の 1.3 mmol/g 置換 (Novabiochem, 01-64-0114) に、2.5 g (5.85 mmol, 1.5 当量) の Fmoc-Dap(Boc)-OH ($M_w = 426.5$, (Fmoc-(N-β-Boc)-L-α, β-ジアミノプロピオン酸), AnaSpec, 22140) および 2.03 ml (11.7 mmol, 3.0 当量) の DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

【0478】

Dap(Boc)-樹脂。2 時間後に、上記樹脂を、 $3 \times$ DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1)、 $3 \times$ DCM、 $2 \times$ DMF、 $3 \times$ DCM で洗浄し、Fmoc 基を、30 ml の 20% ピペリジン/DMF で 30 分間にわたって脱保護した。

【0479】

C12-Dap(Boc)-樹脂。Fmoc 脱保護の後、上記樹脂を、 $3 \times$ DCM、 $2 \times$ MeOH および $3 \times$ DCM で洗浄し、そしてカップリング反応のために、30 ml の DMF 中の 2.34 g (11.7 mmol) の C12-酸 (Sigma, $M_w = 200.32$)、4.48 g (11.7 mmol) の HCTU ($M_w = 473.7$) および 2.23 ml (12.87 mmol) の DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

【0480】

反応の 1 時間後に、上記樹脂を、 $3 \times$ DCM、 $2 \times$ MeOH および $3 \times$ DCM で洗浄し、反応の進行を、Kaiser 試験によってチェックしたところ、陰性であった (遊離アミノ基はない)。

10

20

30

40

50

【0481】

C12-Dap (Boc)-OH ($M_w = 386.59$) を、上記樹脂から 1% TFA/DCM によって切断し (2 分間にわたって $5 \times 30 \text{ ml}$ を、 2 ml の 10% ピリジン/MeOH でフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

【0482】

C12-Dap (Boc)-C12 ($M_w = 553.95$)。第 2 のカップリングを溶液で行った。前の反応からの上記油状残渣に、 50 ml の DMF 中の 2.168 g (11.7 mmol) の C12-アミン (Sigma, $M_w = 185.36$)、 4.48 g (11.7 mmol) の HCTU ($M_w = 473.7$) および 2.23 ml (12.87 mmol) の DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。1 時間後に、 100 ml の AcOEt を添加し、有機層を、分離漏斗中、 $3 \times 0.5 \text{ M}$ HCl、 $3 \times 10\%$ NaCO₃ および $3 \times \text{NaCl}$ で洗浄した。AcOEt 層を、無水 MgSO₄ で乾燥させ、エバポレートした。

10

【0483】

C12-Dap-C12 ($M_w = 453.9$)。前の反応からの上記油状残渣に、 100 ml の 80% TFA/DCM 2.5% TIS を添加し、1 時間後に、溶媒をエバポレートした。

【0484】

C12-nor-norArg (ジBoc)-C12 ($M_w = 696.13$)。上記残渣を、 50 ml の DCM 中に溶解し、pH を TEA で 9 に調節した。 2.23 g (5.85 mM , 1.5 当量) の 1,3-ジ-Boc-2-(トリフルオロメチルスルホニル)グアニジン ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033) を添加し、4 時間後に、DCM をエバポレートした。

20

【0485】

(実施例 13: C8-norArg-C8 N-(4-グアニジノ-1-オキソ-1-(オクチルアミノ)ブタン-2-イル)オクタンアミドの調製)

Fmoc-Dab (Boc)-樹脂。 30 ml 固相合成用反応容器中、 3 g の 2-クロロトリチルクロリド樹脂と、 30 ml の乾燥 DCM 中の 1.3 mmol/g 置換 (Novabiochem, 01-64-0114) に、 2.577 g (5.85 mmol , 1.5 当量) の Fmoc-Dab (ジBoc)-OH ($M_w = 440.5$, (Fmoc-(N-γ-Boc)-L-α, γ-ジアミノ酪酸, AnaSpec, 28246) および 2.23 ml (12.87 mmol , 3.3 当量) の DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

30

【0486】

Arg-Dab (Boc)-樹脂。2 時間後に、上記樹脂を、 $3 \times \text{DCM/MeOH/DIPEA}$ (17:2:1)、 $3 \times \text{DCM}$ 、 $2 \times \text{DMF}$ 、 $3 \times \text{DCM}$ で洗浄し、Fmoc 基を、 30 ml の 20% ピペリジン/DMF で 30 分間にわたって脱保護した。

【0487】

C8-Dab (Boc)-樹脂。Fmoc 脱保護の後、上記樹脂を、 $3 \times \text{DCM}$ 、 $2 \times \text{MeOH}$ および $3 \times \text{DCM}$ で洗浄し、カップリング反応のために、 30 ml の DMF 中の 1.48 g (11.7 mmol) の C8 酸 (Sigma, $M_w = 144.22$, $d = 0.910$)、 4.84 g (11.7 mmol) の HCTU ($M_w = 413.7$) および 2.23 ml (12.87 mmol) の DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

40

【0488】

反応の 1 時間後に、上記樹脂を、 $3 \times \text{DCM}$ 、 $2 \times \text{MeOH}$ および $3 \times \text{DCM}$ で洗浄し、反応の進行を、Kaiser 試験によってチェックしたところ、陰性であった (遊離アミノ基はない)。

【0489】

C8-Dab (Boc)-OH ($M_w = 344.49$) を、上記樹脂から 1% TFA

50

／DCMによって切断し（2分間にわたって5×30mlを、2mlの10% ピリジン／MeOHでフラスコへと濾過した）、溶媒をエバポレートした。

【0490】

C8-Dab (Boc)-C8 ($M_w = 455.74$)。第2のカップリングを溶液で行った。前の反応からの上記油状残渣に、50ml DMF中の2.32ml (11.7mmol) のC8-アミン (Sigma, $M_w = 1293.25$, $d = 0.782$)、4.84g (11.7mmol) のHCTU ($M_w = 473.7$) および2.23ml (12.87mmol) のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。1時間後に、100mlのAcOEtを添加し、有機層を分離漏斗中、3×0.5M HCl、3×10% NaCO₃ および3×NaClで洗浄した。AcOEt層を、無水MgSO₄で乾燥させ、エバポレートした。

10

【0491】

C8-Dab-C8 ($M_w = 355.74$)。前の反応からの上記油状残渣に、100mlの80% TFA／DCM 2.5% TISを添加し、1時間後に、溶媒をエバポレートした。

【0492】

C8-norArg (ジBoc)-C8 ($M_w = 597.74$)。上記残渣を、50mlのDCM中に溶解し、pHをTEAで9に調節した。2.23g (5.85mM, 1.5当量) の1,3-ジ-*Boc*-2-(トリフルオロメチルスルホニル) グアニジン ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033) を添加し、4時間後に、DCMをエバポレートした。

20

【0493】

C8-norArg-C8 ($M_w = 398.8$)。前の反応からの上記油状残渣に、100mlの95% TFA／DCM 2.5% TISを添加し、3時間後に、溶媒をエバポレートした。残渣を、MeOH／AcCN／0.5M HCl 1:1:1に溶解し、RP_Akta ExplorerによってC18 Phenomenexカラム (Phenomenex RP, 250×21.2mm, Serial No.: 234236-1, カラム容積 83ml) 上で精製し、3 CV内の移動相として水を使用して50~100% アセトニトリル勾配; $l = 215$ nmで溶出した。アセトニトリルをエバポレートし、その生成物を凍結乾燥した。収量: 1.1g。

30

【0494】

(実施例14)

実施例13に類似の様式で、C10-norArg-C10 (収量: 1.2g)、C12-norArg-C12 (収量: 2.9g)、C14-norArg-C14 (収量: 630mg)、およびC16-norArg-C16 (収量: 1.0g) を作製した。

【0495】

(実施例15: C12-norArg-C12 N-(4-グアニジノ-1-オキソ-1-(ドデシルアミノ)ブタン-2-イル)ドデカンアミドの調製)

Fmoc-Dab (Boc)-樹脂。500ml 固相合成用反応容器中、8gの2-クロロトリチルクロリド樹脂と、100mlの乾燥DCM中の1.3mmol/g置換 (Novabiochem, 01-64-0114) に、5g (11.35mmol, 1.2当量) のFmoc-Dab (Boc)-OH ($M_w = 440.5$, (Fmoc-(N-γ-Boc)-L-α, γ-ジアミノ酪酸, AnaSpec, 28246) および4ml (22.7mmol, 2.0当量) のDIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

40

【0496】

Dab (Boc)-樹脂。振盪器上での振盪2時間後に、上記樹脂を、3×DCM／MeOH／DIPEA (17:2:1)、3×DCM、2×DMF、3×DCMで洗浄し、Fmoc基を、50mlの20% ピペリジン／DMFで15分間にわたって2回脱保護した。

50

【0497】

C12-Dab(Boc)-樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、カップリング反応のために、100mlのDMF中の4.54g(22.7mmol)のC12-酸(Sigma, $M_w = 200.32$)、9.48g(22.7mmol)のHCTU($M_w = 413.7$)および4.52ml(26mmol)のDIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加した。

【0498】

反応の1時間後に、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった(遊離アミノ基はない)。

【0499】

C12-Dab(Boc)-OH($M_w = 400.59$)を、上記樹脂から1% TFA/DCMによって切断し(2分間にわたって5×50mlを、10mlの10% ピリジン/MeOHでフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

【0500】

C12-Dab(Boc)-C12($M_w = 567.95$)。第2のカップリングを溶液で行った。前の反応からの上記油状残渣に、50ml DMF中の2.168g(11.7mmol)のC12-アミン(Sigma, $M_w = 185.36$)、4.48g(11.7mmol)のHCTU($M_w = 413.7$)および2.23ml(12.87mmol)のDIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加した。1時間後に、100mlのAcOEtを添加し、有機層を、分離漏斗中、3×0.1M HCl、3×5% NaCO₃および3×NaClで洗浄した。AcOEt層を、無水MgSO₄で乾燥させ、エバポレートした。

【0501】

C12-Dab-C12($M_w = 467.9$)。前の反応からの上記油状残渣に、150mlの80% TFA/DCM 2.5% TISを濾過し、1時間後に、溶媒をエバポレートした。

【0502】

C12-norArg(ジBoc)-C12($M_w = 710.13$)。上記残渣を、50mlのDCM中に溶解し、pHをTEAで9~10に調節した。9g(23mM)の1,3-ジ-Boc-2-(トリフルオロメチルスルホニル)グアニジン($M_w = 391.36$, Aldrich 15033)を添加し、3時間後に、DCMをエバポレートした。その生成物を、TELEDYNE Isco Combiflash R_f機器、120g 順相シリカゲルカラム上で、5.4 CV(カラム容積)に対して100% DCMおよび6.3 CVに対して0~5% MeOH、検出215nm、流速70ml/分で精製した。

【0503】

C12-norArg-C12($M_w = 509.92$)。前の反応からの上記残渣に、150mlの70% TFA/DCM 2.5% TISを添加し、1時間後に、溶媒をエバポレートした。残渣を、0.5M HClによって沈澱させた。

【0504】

(実施例16: C18-norArg-C18 N-(4-グアニジノ-1-オキソ-1-(オクタデシルアミノ)ブタン-2-イル)オクタデカンアミドの調製)

Fmoc-Dab(Boc)-樹脂。30ml 固相合成用反応容器中、3gの2-クロロトリチルクロリド樹脂と、30mlの乾燥DCM中の1.3mmol/g置換(Novabiochem, 01-64-0114)に、2.577g(5.85mmol, 1.5当量)のFmoc-Dab(Boc)-OH($M_w = 440.5$, (Fmoc-(N-γ-Boc)-L-α, γ-ジアミノ酪酸, AnaSpec, 28246)および2.03ml(11.7mmol, 3.0当量)のDIPEA(Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加した。

10

20

30

40

50

【0505】

Dab (Boc) - 樹脂。2 時間後に、上記樹脂を、3 × DCM / MeOH / DIPEA (17 : 2 : 1)、3 × DCM、2 × DMF、3 × DCM で洗浄し、Fmoc 基を、30 ml の 20 % ピペリジン / DMF で 30 分間にわたって脱保護した。

【0506】

C18-Dab (Boc) - 樹脂。Fmoc 脱保護の後、上記樹脂を、3 × DCM、2 × MeOH および 3 × DCM 2 で洗浄し、カップリング反応のために、30 ml の DMF 中の 2.21 g (7.8 mmol) の C18 酸 (Sigma, $M_w = 284.48$)、3.32 g (7.8 mmol) の HCTU ($M_w = 473.7$) および 1.49 ml (8.58 mmol) の DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

10

【0507】

反応の 1 時間後に、上記樹脂を、3 × DCM、2 × MeOH および 3 × DCM で洗浄し、反応の進行を、Kaiser 試験によってチェックしたところ、陰性であった (遊離アミノ基はない)。

【0508】

C18-Dab (Boc) - OH ($M_w = 568.56$) を、上記樹脂から 1 % TFA / DCM によって切断し (2 分間にわたって 5 × 30 ml を、2 ml の 10 % ピリジン / MeOH でフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

【0509】

C18-Dab (Boc) - C18 ($M_w = 735.95$)。第 2 のカップリングを溶液中で行った。前の反応からの上記油状残渣に、50 ml DMF 中の 2.1 g (7.8 mmol) の C18 - アミン (Sigma, $M_w = 269.52$)、3.32 g (7.8 mmol) の HCTU ($M_w = 473.7$) および 1.49 ml (8.58 mmol) の DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。1 時間後に、100 ml の AcOEt を添加し、有機層を、分離漏斗中、3 × 0.5 M HCl、3 × 10 % NaCO₃ および 3 × NaCl で洗浄した。AcOEt 層を、無水 MgSO₄ で乾燥させ、エバポレートした。

20

【0510】

C18-Dab - C18 ($M_w = 635.9$)。前の反応からの上記油状残渣に、100 ml の 80 % TFA / DCM 2.5 % TIS を添加し、1 時間後に、溶媒をエバポレートした。

30

【0511】

C18-norArg (ジBoc) - C18 ($M_w = 872.13$)。上記残渣を、50 ml の DCM 中に溶解し、pH を TEA で 9 に調節した。2.23 g (5.85 mM, 1.5 当量) の 1,3-ジ-Boc-2-(トリフルオロメチルスルホニル) グアニジン ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033) を添加し、4 時間後に、DCM をエバポレートした。

【0512】

C18-norArg - C18 ($M_w = 677.92$)。前の反応からの上記油状残渣に、100 ml の 95 % TFA / DCM 2.5 % TIS を添加し、3 時間後に、溶媒をエバポレートした。残渣を、AcCN / 0.5 M HCl 1 : 1 の混合物によって沈澱させた。

40

【0513】

(実施例 17 : C18 (オレイック) - norArg - C8 N - (4-グアニジノール-オキソ-1-(オクチルアミノ)ブタン-2-イル)オクタデカ-9-エナミドの調製)

Fmoc-Dab (Boc) - 樹脂。50 ml 固相合成用反応容器中、5 g の 2-クロロトリチルクロリド樹脂と、50 ml の乾燥 DCM 中の 1.3 mmol / g 置換 (Novabiochem, 01-64-0114) に、5.726 g (13 mmol, 2 当量) の Fmoc-Dab (Boc) - OH ($M_w = 440.5$, (Fmoc-(N-γ-B

50

oc) - L - α , γ - ジアミノ酪酸, AnaSpec, 28246) および 2.26 ml (13 mmol, 2.0 当量) の DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

【0514】

Dab (Boc) - 樹脂。2 時間後に、上記樹脂を、3 × DCM / MeOH / DIPEA (17 : 2 : 1)、3 × DCM、2 × DMF、3 × DCM で洗浄し、Fmoc 基を、40 ml の 20 % ピペリジン / DMF で 2 回、30 分にわたって脱保護した。

【0515】

C18 オレック - Dab (Boc) - 樹脂。Fmoc 脱保護の後、上記樹脂を、3 × DCM、2 × MeOH および 3 × DCM で洗浄し、カップリング反応のために、50 ml DMF 中の 3.7 g (13 mmol) のオレイン酸 (Sigma, $M_w = 282.47$, $d = 0.891$)、5.37 g (13 mmol) の HCTU ($M_w = 413.7$) および 2.62 ml (13 mmol) の DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

10

【0516】

反応の 2 時間後に、上記樹脂を、3 × DCM、2 × MeOH および 3 × DCM で洗浄し、反応の進行を、Kaiser 試験によってチェックしたところ、陰性であった (遊離アミノ基はない)。

【0517】

C18 オレック - Dab (Boc) - OH ($M_w = 538.56$) を、上記樹脂から 1 % TFA / DCM によって切断し (2 分間にわたって 5 × 50 ml を、2 ml の 10 % ピリジン / MeOH でフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

20

【0518】

C18 オレック - Dab (Boc) - C8 ($M_w = 594.01$)。第 2 のカップリングを溶液で行った。前の反応からの上記油状残渣に、50 ml DMF 中の 1.227 g (9.75 mmol) の C8 - アミン (Sigma, $M_w = 129.25$)、4.033 g (9.75 mmol) の HCTU ($M_w = 413.7$) および 1.69 ml (9.75 mmol) の DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。4 時間後に、100 ml の AcOEt 添加し、有機層を、分離漏斗中、3 × 0.5 M HCl、3 × 10 % NaCO₃ および 3 × NaCl で洗浄した。AcOEt 層を、無水 MgSO₄ で乾燥させ、エバポレートした。

30

【0519】

C18 オレック - Dab - C8 ($M_w = 493.92$)。前の反応からの上記油状残渣に、70 ml の 80 % TFA / DCM 2.5 % TIS を添加し、20 分後、溶媒を、減圧下で除去した。

【0520】

C18 オレック - norArg (ジBoc) - C8 ($M_w = 735.95$)。上記残渣を、50 ml の DCM 中に溶解し、pH を TEA で 9 に調節した。2.543 g (6.5 mM, 1 当量) の 1,3-ジ-Boc-2-(トリフルオロメチルスルホニル) グアニジン ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033) を添加し、4 時間後に、DCM をエバポレートした。

40

【0521】

C18 オレック - norArg - C8 ($M_w = 535.89$)。前の反応からの上記油状残渣に、100 ml の 80 % TFA / DCM 2.5 % TIS を添加し、20 分後、溶媒をエバポレートした。粗製生成物を、TELEDYNE Isco Combiflash R_f 機器で、40 g 順相シリカゲルカラム、3 CV (カラム容積) に対して 100 % DCM および 7 CV に対して 0 ~ 15 % MeOH、検出 214 nm、流速 45 ml / 分を使用して精製した。TLC : R_f = 0.2 (CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)。DCM / MeOH をエバポレートし、残渣を 0.1 M HCl によって沈澱させた。収量 : 0.7 g。

50

【0522】

(実施例18: C18 (オレイック) - norArg - C12 N - (4-グアニジノ-1-オキソ-1-(ドデシルアミノ)ブタン-2-イル)オクタデカ-9-エナミドの調製)

Fmoc-Dab (Boc) - 樹脂。50 ml 固相合成用反応容器中、5 gの2-クロトリチルククロリド樹脂と、50 mlの乾燥DCM中の1.3 mmol/g置換 (Novabiochem, 01-64-0114) に、5.726 g (13 mmol, 2当量) のFmoc-Dab (Boc) - OH ($M_w = 440.5$, (Fmoc-(N- γ -Boc)-L- α , γ -ジアミノ酪酸, AnaSpec, 28246) および2.26 ml (13 mmol, 2.0当量) のDIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

10

【0523】

Dab (Boc) - 樹脂。2時間後に、上記樹脂を、3×DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1)、3×DCM、2×DMF、3×DCMで洗浄し、Fmoc基を、40 mlの20% ピペリジン/DMFで2回、30分間にわたって脱保護した。

【0524】

C18オレイック-Dab (Boc) - 樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、カップリング反応のために、50 ml DMF中の3.7 g (13 mmol) のオレイン酸 (Sigma, $M_w = 282.47$, $d = 0.891$)、5.37 g (13 mmol) のHCTU ($M_w = 413.7$) および2.62 ml (13 mmol) のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

20

【0525】

反応の2時間後に、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった (遊離アミノ基はない)。

【0526】

C18オレイック-Dab (Boc) - OH ($M_w = 538.56$) を、上記樹脂から1% TFA/DCMによって切断し (2分間にわたって5×50 mlを、2 mlの10% ピリジン/MeOHでフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

30

【0527】

C18オレイック-Dab (Boc) - C12 ($M_w = 650.03$)。第2のカップリングを溶液中で行った。前の反応からの上記油状残渣に、50 ml DMF中の1.76 g (9.75 mmol) のC12-アミン (Sigma, $M_w = 185.36$)、4.033 g (9.75 mmol) のHCTU ($M_w = 413.7$) および1.69 ml (9.75 mmol) のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。4時間後に、100 mlのAcOEtを添加し、有機層を、分離漏斗中、3×0.5M HCl、3×10% NaCO₃ および3×NaClで洗浄した。AcOEt層を、無水MgSO₄で乾燥させ、エバポレートした。

【0528】

C18オレイック-Dab-C12 ($M_w = 549.91$)。前の反応からの上記油状残渣に、70 mlの80% TFA/DCM 2.5% TISを添加し、20分間後、溶媒を減圧下で除去した。

40

【0529】

C18オレイック-norArg (ジBoc) - C12 ($M_w = 792.5$)。上記残渣を、50 mlのDCM中に溶解し、pHをTEAで9に調節した。2.543 g (6.5 mM, 1当量) の1,3-ジ-Boc-2-(トリフルオロメチルスルホニル)グアニジン ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033) を添加し、4時間後に、DCMをエバポレートした。

【0530】

50

C18オレイック-norArg-C12 ($M_w = 591.55$)。前の反応からの上記油状残渣に、100mlの80% TFA/DCM 2.5% TISを添加し、20分後に、溶媒をエバポレートした。粗製生成物を、TELEDYNE Isco Combiflash Rf 機器で、40g 順相シリカゲルカラム、3 CV (カラム容積) に対して100% DCMおよび10 CVに対して0~20% MeOH、検出214nm、流速45ml/分を使用して、精製した。TLC: Rf=0.2 (CH₂Cl₂: MeOH=9:1)。DCM/MeOHをエバポレートし、残渣を0.1M HClによって沈澱させた。

【0531】

(実施例19: C18 (オレイック)-norArg-C16 N-(4-グアニジノ-1-オキソ-1-(ヘキサデシルアミノ)ブタン-2-イル)オクタデカ-9-エナミドの調製)

10

Fmoc-Dab(Boc)-樹脂。50ml 固相合成用反応容器中、5gの2-クロロトリチルクロリド樹脂と、50mlの乾燥DCM中の1.3mmol/g置換(Novabiochem, 01-64-0114)に、5.726g (13mmol, 2当量)のFmoc-Dab(Boc)-OH ($M_w = 440.5$, (Fmoc-(N-γ-Boc)-L-α, γ-ジアミノ酪酸, AnaSpec, 28246)および2.26ml (13mmol, 2.0当量)のDIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, d=0.74)を添加した。

【0532】

20

Dab(Boc)-樹脂。2時間後に、上記樹脂を、3×DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1)、3×DCM、2×DMF、3×DCMで洗浄し、Fmoc基を、40mlの20% ピペリジン/DMFで2回、30分間にわたって脱保護した。

【0533】

C18オレイック-Dab(Boc)-樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、カップリング反応のために、50ml DMF中の3.7g (13mmol)のオレイン酸 (Sigma, $M_w = 282.47$, d=0.891)、5.37g (13mmol)のHCTU ($M_w = 413.7$)および2.62ml (13mmol)のDIPEA ($M_w = 129.2$, d=0.74)を添加した。

30

【0534】

反応の2時間後に、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった(遊離アミノ基はない)。

【0535】

C18オレイック-Dab(Boc)-OH ($M_w = 538.56$)を、上記樹脂から1% TFA/DCMによって切断し(2分間にわたって5×50mlを、2mlの10% ピリジン/MeOHでフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

【0536】

C18オレイック-Dab(Boc)-C16 ($M_w = 705.95$)。第2のカップリングを溶液で行った。前の反応からの上記油状残渣に、50ml DMF中の2.354g (9.75mmol)のC16-アミン (Sigma, $M_w = 241.46$)、4.033g (9.75mmol)のHCTU ($M_w = 413.7$)および1.69ml (9.75mmol)のDIPEA ($M_w = 129.2$, d=0.74)を添加した。4時間後に、100mlのAcOEtを添加し、有機層を、分離漏斗中、3×0.5M HCl、3×10% NaCO₃および3×NaClで洗浄した。AcOEt層を、無水MgSO₄で乾燥させ、エバポレートした。

40

【0537】

C18オレイック-Dab-C16 ($M_w = 605.9$)。前の反応からの上記油状残渣に、70mlの80% TFA/DCM 2.5% TISを添加し、20分間後、溶

50

媒を減圧下で除去した。

【0538】

C18オレイック-norArg (ジBoc)-C16 ($M_w = 842.13$)。上記残渣を、50mlのDCM中に溶解し、pHをTEAで9に調節した。2.543g (6.5mM, 1当量)の1,3-ジ-*Boc*-2-(トリフルオロメチルスルホニル)グアニジン ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033)を添加し、4時間後に、DCMをエバポレートした。

【0539】

C18オレイック-norArg-C16 ($M_w = 647.92$)。前の反応からの上記油状残渣に、100mlの80% TFA/DCM 2.5% TISを添加し、20分後に、溶媒をエバポレートした。粗製生成物を、TELEDYNE Isco Combiflash R_f機器で48g 順相シリカゲルカラム、3 CV (カラム容積)に対して100% DCMおよび10 CVに対して0~20% MeOH、検出214nm、流速45ml/分を使用して、精製した。DCM/MeOHをエバポレートし、残渣を0.1M HClによって沈澱させた。

10

【0540】

(実施例20: C18 (オレイック)-norArg-C18 N-(4-グアニジノ-1-オキソ-1-(オクタデシルアミノ)ブタン-2-イル)オクタデカ-9-エナミドの調製)

Fmoc-Dab (Boc)-樹脂。60ml 固相合成用反応容器中、5gの2-クロロトリチルクロリド樹脂と、50mlの乾燥DCM中の1.3mmol/g置換 (Novabiochem, 01-64-0114)に、5.726g (13mmol, 2当量)のFmoc-Dab (Boc)-OH ($M_w = 440.5$, (Fmoc-(N-γ-Boc)-L-α, γ-ジアミノ酪酸, AnaSpec, 28246)および2.26ml (13mmol, 2.0当量)のDIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加した。

20

【0541】

Dab (Boc)-樹脂。3時間後に、上記残渣を、3×DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1)、3×DCM、2×DMF、3×DCMで洗浄し、Fmoc基を、50mlの20% ピペリジン/DMFで2回、15分間にわたって脱保護した。

30

【0542】

C18:1-Dab (Boc)-樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、カップリング反応のために、50ml DMF中の3.7g (13mmol)のオレイン酸 (Sigma, $M_w = 282.47$, $d = 0.891$)、5.37g (13mmol)のHCTU ($M_w = 413.7$)および2.62ml (13mmol)のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加した。

【0543】

反応の1時間後に、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった (遊離アミノ基はない)。

40

【0544】

C18:1-Dab (Boc)-OH ($M_w = 566.56$)を、上記樹脂から1% TFA/DCMによって切断し (2分間にわたって5×50mlを、2mlの10% ピリジン/MeOHでフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

【0545】

C18:1-Dab (Boc)-C18:1 ($M_w = 734.95$)。第2のカップリングを溶液で行った。前の反応からの上記油状残渣に、50ml DMF中の3.725g (9.75mmol)のオレイルアミン (Sigma, $M_w = 267.49$, 70%)、4.033g (9.75mmol)のHCTU ($M_w = 413.7$)および1.69ml (9.75mmol)のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加した。

50

4時間後に、100mlのAcOEtを添加し、有機層を、分離漏斗中、3×0.5M HCl、3×10% NaCO₃および3×NaClで洗浄した。AcOEt層を、無水MgSO₄で乾燥させ、エバポレートした。

【0546】

C18:1-Dab-C18 (M_w = 635.9)。前の反応からの上記油状残渣に、100mlの80% TFA/DCM 2.5% TISを添加し、20分後に、溶媒をエバポレートした。

【0547】

C18:1-norArg (ジBoc) - C18:1 (M_w = 874.13)。上記残渣を、50mlのDCM中に溶解し、pHをTEAで9に調節した。2.348g (6mM, 1当量)の1,3-ジ-Boc-2-(トリフルオロメチルスルホニル)グアニジン (M_w = 391.36, Aldrich 15033)を添加し、4時間後に、DCMをエバポレートした。

【0548】

C18:1-norArg-C18:1 (M_w = 674.1)。前の反応からの上記油状残渣に、100mlの95% TFA/DCM 2.5% TISを添加し、3時間後に、溶媒をエバポレートした。粗製生成物を、TELEDYNE Isco Combiflash R_f 機器で、48g 順相シリカゲルカラム、3 CV (カラム容積)に対して100% DCMおよび10 CVに対して0~20% MeOH、検出214nm、流速45ml/分を使用して精製した。DCM/MeOHをエバポレートし、残渣を0.1M HClによって沈澱させた。収量: 3.2g。

【0549】

(実施例21: C10-[4-Pal(N-CH₃)]-C10-4-(3-(デシルアミノ)-3-オキソ-2-デカンアミドプロピル)-1-メチルピリジニウムクロリドの調製)

Fmoc-4-Pal-樹脂。30ml 固相合成用反応容器中、3gの2-クロトリチルクロリド樹脂と、30mlの乾燥DCM中の1.3mmol/g置換(Novabiochem, 01-64-0114)に、2.27g (5.85mmol, 1.5当量)のFmoc-4-Pal-OH (Fmoc-4-ピリジニルアラニン, M_w = 388.42, Advanced ChemTech, FX4140)および2.03ml (11.7mmol, 3.0当量)のDIPEA (Aldrich, M_w = 129.2, d = 0.74)を添加した。

【0550】

4-Pal-樹脂。2時間後に、上記樹脂を、3×DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1)、3×DCM、2×DMF、3×DCMで洗浄し、Fmoc基を、30mlの20% ピペリジン/DMFで30分間にわたって脱保護した。

【0551】

C10-4-Pal-樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、カップリング反応のために、30mlのDMF中の1.48g (11.7mmol)のデカン酸 (Sigma, M_w = 127.27)、5.54g (11.7mmol)のHCTU (M_w = 473.7)および2.23ml (12.87mmol)のDIPEA (M_w = 129.2, d = 0.74)を添加した。

【0552】

反応の1時間後に、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった(遊離アミノ基はない)。

【0553】

C10-4-Pal-OH (M_w = 320.46)を、上記樹脂から1% TFA/DCMによって切断し(2分間にわたって5×30mlを、2mlの10% ピリジン/MeOHでフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

【0554】

C10-4-Pal-C10 ($M_w = 459.76$)。第2のカップリングを溶液で行った。前の反応からの上記油状残渣に、50 ml DMF中の2.32 ml (11.7 mmol) のC10-アミン (Sigma, $M_w = 157.3$, $d = 0.792$)、5.54 g (11.7 mmol) のHCTU ($M_w = 473.7$) および2.23 ml (12.87 mmol) のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。1時間後に、100 mlのAcOEtを添加し、有機層を、分離漏斗中、 $3 \times 0.5M$ HCl、 $3 \times 10\%$ NaCO₃ および $3 \times NaCl$ で洗浄した。AcOEt層を、無水MgSO₄で乾燥させ、エバポレートした。残渣を、AcCN/0.5M HCl 1:1中に溶解し、RP_Akta Explorerによって、C18 Phenomenexカラム (Phenomenex RP, 250×21.2 mm, Serial No.: 234236-1, カラム容積 83 ml) で精製し、2 CV内の移動相として水を使用して30~100% アセトニトリル勾配; $l = 215$ nmで溶出した。アセトニトリルをエバポレートし、その生成物を凍結乾燥した。

10

【0555】

C10-4-Pal (Me)-C10 ($M_w = 474.76$)。メチル化を溶液で行った。20 mlのTHF中に溶解した0.4 g (0.87 mM) のC10-4-Pal-C10 ($M_w = 459.76$) に、83 μ l (0.87 mmol) の硫酸ジメチル (Sigma, $M_w = 126.13$, $d = 1.325$) を添加した。一晩の反応の後に、同量の硫酸ジメチルを添加し、1時間後に、その生成物を、0.5M HCl/AcCN混合物で沈澱させた。

20

【0556】

(実施例22: C12-[4-Pal (N-CH₃)]-C12-4-(3-(ドデシルアミノ)-3-オキソ-2-ドデカンアミドプロピル)-1-メチルピリジニウムクロリドの調製)

Fmoc-4-Pal-樹脂。200 ml 固相合成用反応容器中、6.5 gの2-クロロトリチルクロリド樹脂と、70 mlの乾燥DCM中の1.3 mmol/g置換 (Novabiochem, 01-64-0114) に、3.5 g (9.01 mmol, 1.5当量) のFmoc-4-Pal-OH (Fmoc-4-ピリジニルアラニン, $M_w = 388.42$, Advanced ChemTech, FX4140) および3.132 ml (18 mmol, 2.2当量) のDIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

30

【0557】

4-Pal-樹脂。2時間後に、上記樹脂を、 $3 \times DCM/MeOH/DIPEA$ (17:2:1)、 $3 \times DCM$ 、 $2 \times DMF$ 、 $3 \times DCM$ で洗浄し、Fmoc基を、70 mlの20% ピペリジン/DMFで15分間にわたって2回脱保護した。

【0558】

C12-4-Pal-樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、 $3 \times DCM$ 、 $2 \times MeOH$ および $3 \times DCM$ で洗浄し、カップリング反応のために、70 mlのDMF中の2.549 g (12.675 mmol, 1.5当量) のラウリン酸 (Sigma, $M_w = 200.32$)、5.3 g (12.675 mmol) のHCTU ($M_w = 417.7$) および2.2 ml (12.675 mmol) のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

40

【0559】

反応の1時間後に、上記樹脂を、 $3 \times DCM$ 、 $2 \times MeOH$ および $3 \times DCM$ で洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった (遊離アミノ基はない)。

【0560】

C12-4-Pal-OH ($M_w = 346.7$) を、上記樹脂から1% TFA/DCMによって切断し (2分間にわたって 5×30 mlを、2 mlの10% ピリジン/Me

50

OHでフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

【0561】

C12-4-Pal-C12 ($M_w = 515.7$)。第2のカップリングを溶液で行った。前の反応からの上記油状残渣に、70 mlのDCM中の2.3 g (12 mmol)のEDC*HCl ($M_w = 191.7$)、1.86 g (12 mmol)のHOBT*H₂O ($M_w = 153.1$)および10.44 ml (60 mmol, 5当量)のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加した。予備活性化工程を20分間行い、次いで、2.22 g (12 mmol)のC12-アミン (Sigma, $M_w = 185.36$)を添加した。一晩の反応の後に、上記有機層を、分離漏斗中、3×0.5M HCl、3×10% NaCO₃ および3×NaClで洗浄した。DCMを無水MgSO₄で乾燥させ、エバポレートした。その生成物を、TELEDYNE Isco Combiflash R_f 機器、40 g 順相シリカゲルカラム、5 CV (カラム容積) に対して100% DCMおよび10 CVに対して0~5% MeOH、検出254 nm、流速40 ml/分で精製した。

10

【0562】

C12-4-Pal(Me)-C12 ($M_w = 530.8$)。メチル化を溶液で行った。50 mlのTHFに溶解した4 g (7.75 mM)のC12-4-Pal-C12 ($M_w = 415.7$)に、1.1 ml (11.625 mmol)の硫酸ジメチル (Sigma, $M_w = 126.13$, $d = 1.325$)を添加した。一晩の反応の後に、0.5 mlの硫酸ジメチルを添加し、1時間後に、上記溶媒をエバポレートし、その生成物を0.5 M HClで沈澱させた。

20

【0563】

(実施例23: C18オレイック-[4-Pal]-C16 N-(1-オキソ-3-(ピリジン-4-イル)-1-(ヘキサデシルアミノ)プロパン-2-イル)オクタデカ-9-エナミドの調製)

Fmoc-4-Pal-樹脂。50 ml 固相合成用反応容器中、5 gの2-クロトリチルクロリド樹脂と、50 mlの乾燥DCM中の1.3 mmol/g置換 (Novabiochem, 01-64-0114)に、3.787 g (9.75 mmol, 1.5当量)のFmoc-4-Pal-OH ($M_w = 388.42$, Advanced ChemTech) および1.7 ml (9.75 mmol, 1.5当量)のDIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)に添加した。

30

【0564】

4-Pal-樹脂。2時間後に、上記樹脂を、3×DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1)、3×DCM、2×DMF、3×DCMで洗浄し、Fmoc基を、40 mlの20% ピペリジン/DMFで2回、15分間にわたって脱保護した。

【0565】

C18オレイック-4-Pal-樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、カップリング反応のために、50 ml DMF中の3.7 g (13 mmol)のオレイン酸 (Sigma, $M_w = 282.47$, $d = 0.891$)、5.37 g (13 mmol)のHCTU ($M_w = 413.7$) および2.62 ml (13 mmol)のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)を添加した。

40

【0566】

反応の2時間後に、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった(遊離アミノ基はない)。

【0567】

C18オレイック-4-Pal-OH ($M_w = 430.62$)を、上記樹脂から1% TFA/DCMによって切断し(2分間にわたって5×50 mlを、2 mlの10% ピリジン/MeOHでフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

【0568】

50

C18オレイック-4-Pal-C16 ($M_w = 654.06$)。第2のカップリングを溶液で行った。前の反応からの上記油状残渣に、50 ml DMF中の2.354 g (9.75 mmol) のC16-アミン (Sigma, $M_w = 241.46$)、4.033 g (9.75 mmol) のHCTU ($M_w = 413.7$) および1.69 ml (9.75 mmol) のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。4時間後に、100 mlのAcOEtを添加し、有機層を、分離漏斗中、 $3 \times 0.5M$ HCl、 $3 \times 10\%$ $NaCO_3$ および $3 \times NaCl$ で洗浄した。AcOEt層を、無水 $MgSO_4$ で乾燥させ、エバポレートした。粗製生成物を、TELEDYNE Isco Combiflash Rf 機器で、48 g 順相シリカゲルカラム、3 CV (カラム容積) に対して100% DCMおよび10 CVに対して0~20% MeOH、検出214 nm、流速45 ml/分を用いて精製した。DCM/MeOHをエバポレートし、残渣を0.1 M HClによって沈澱させた。収量: 0.75 g。

【0569】

(実施例24: (C18オレイック)-(1-CH₃-His)-NH-(C16アルキル)-N-(3-(1-メチル-1H-イミダゾール-4-イル)-1-オキソ-1-(ヘキサデシルアミノ)プロパン-2-イル)オクタデカ-9-エナミドの調製)

Fmoc-His(1-Me)-樹脂。60 ml 固相合成用反応容器中、1.7 gの2-クロロトリチルクロリド樹脂と、30 mlの乾燥DCM中の1.3 mmol/g置換 (Novabiochem, 01-64-0114) に、1 g (2.5 mmol, 1.2 当量) のFmoc-His(1-Me)-OH ($M_w = 391.43$, ChemImplex) および0.435 ml (2.5 mmol, 1.2 当量) のDIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

【0570】

His(1-Me)-樹脂。2時間後に、上記樹脂を、 $3 \times DCM/MeOH/DIPEA$ (17:2:1)、 $3 \times DCM$ 、 $2 \times DMF$ 、 $3 \times DCM$ で洗浄し、Fmoc基を、2回、50 mlの20% ピペリジン/DMFで15分間にわたって脱保護した。

【0571】

C18オレイック-His(1-Me)-樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、 $3 \times DCM$ 、 $2 \times MeOH$ および $3 \times DCM$ で洗浄し、カップリング反応のために、50 ml DMF中の1.247 g (4.4 mmol) のオレイン酸 (Sigma, $M_w = 282.47$; $d = 0.891$)、1.82 g (4.4 mmol) のHCTU ($M_w = 413.7$) および0.765 ml (9.1 mmol) のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。

【0572】

反応の2時間後に、上記樹脂を、 $3 \times DCM$ 、 $2 \times MeOH$ および $3 \times DCM$ で洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックしたところ、陰性であった (遊離アミノ基はない)。

【0573】

C18オレイック-His(1-Me)-OHを、上記樹脂から1% TFA/DCMによって切断し (2分間にわたって 5×50 mlを、2 mlの10% ピリジン/MeOHでフラスコへと濾過した)、溶媒をエバポレートした。

【0574】

C18オレイック-His(1-Me)-C16 ($M_w = 657.07$)。第2のカップリングを溶液で行った。前の工程からの油状残渣に、50 ml DMF中の0.604 g (2.5 mmol) のC16アミン (Sigma)、1.034 g (2.5 mmol) のHCTU ($M_w = 413.7$) および0.435 ml (2.5 mmol) のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加した。一晩の反応の後に、有機層を、酢酸 (acetic acetate) で希釈し、分離漏斗中、 $3 \times 0.5M$ HCl、 $3 \times 10\%$ $NaCO_3$ および $3 \times NaCl$ で洗浄した。AcOEt層を、無水 $MgSO_4$ で乾燥させ、エバポレートした。上記粗製生成物を、TELEDYNE Isco Comb

10

20

30

40

50

i Flash R_f 機器、40 g 順相シリカゲルカラム、5 CV (カラム容積) に対して100% DCMおよび10 CVに対して0~20% MeOH、検出214 nm、流速40 ml/分で精製した。精製した生成物を、0.1 M HClで沈澱させた。収量: 1 g。

【0575】

(実施例25: (C18オレック) - (3', 5'-ジヨード-Tyr) - NH - (C16アルキル) (E) - N - (1 - (ヘキサデシルアミノ) - 3 - (4-ヒドロキシ-3, 5-ジヨードフェニル) - 1-オキソプロパン-2-イル) オクタデカ-9-エナミド) の調製)

(提唱される調製)

Fmoc-Tyr (3', 5'-ジI) - 樹脂。50 ml 固相合成用反応容器中、5 gの2-クロロトリチルクロリド樹脂と、50 mlの乾燥DCM中の1.3 mmol/g置換 (Novabiochem, 01-64-0114) に、6.388 g (9.75 mmol, 1.5当量) のFmoc-Tyr (3', 5'-ジI) - OH ($M_w = 655.2$, AnaSpec) および1.69 ml (9.75 mmol, 1.5当量) のDIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加する。

【0576】

Tyr (3', 5'-ジI) - 樹脂。3時間後に、上記樹脂を、3×DCM/MeOH/H/DIPEA (17:2:1)、3×DCM、2×DMF、3×DCMで洗浄し、Fmoc基を、40 mlの20% ピペリジン/DMFで2回、30分間にわたって脱保護する。

【0577】

C18オレック-Tyr (3', 5'-ジI) - 樹脂。Fmoc脱保護の後、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、カップリング反応のために、50 ml DMF中の3.7 g (13 mmol) のオレイン酸 (Sigma, $M_w = 282.47$, $d = 0.891$)、5.37 g (13 mmol) のHCTU ($M_w = 413.7$) および2.62 ml (13 mmol) のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加する。

【0578】

反応の3時間後に、上記樹脂を、3×DCM、2×MeOHおよび3×DCMで洗浄し、反応の進行を、Kaiser試験によってチェックする。

【0579】

C18オレック-Tyr (3', 5'-ジI) - OH ($M_w = 697.43$) を、上記樹脂から1% TFA/DCMによって切断し (2分間にわたって5×50 mlを、2 mlの10% ピリジン/MeOHでフラスコへと濾過する)、溶媒をエバポレートする。

【0580】

C18オレック-Tyr (3', 5'-ジI) - C16 ($M_w = 920.38$)。第2のカップリングを溶液で行う。前の反応からの上記油状残渣に、50 ml DMF中の2.354 g (9.75 mmol) のC16-アミン (Sigma, $M_w = 241.46$)、4.033 g (9.75 mmol) のHCTU ($M_w = 413.7$) および1.69 ml (9.75 mmol) のDIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) を添加する。4時間後に、100 mlのAcOEtを添加し、有機層を、分離漏斗中、3×0.5 M

HCl、3×10% NaCO₃ および3×NaClで洗浄する。AcOEt層を無水MgSO₄で乾燥させ、エバポレートする。粗製生成物を、TELEDYNE Isco

Combiflash R_f 機器で、48 g 順相シリカゲルカラム、3 CV (カラム容積) に対して100% DCMおよび10 CVに対して0~20% MeOH、検出214 nm、流速45 ml/分を使用して精製する。DCM/MeOHをエバポレートし、残渣を、AcCN/H₂Oの混合物で沈澱させる。

【0581】

10

20

30

40

50

(実施例 26 : 9 L 細胞における Lac Z 遺伝子発現ノックダウンの例示的インビトロアッセイ)

9 L / Lac Z は、細菌ガラクトシダーゼをコードする Lac Z 遺伝子を安定に発現するラット神経膠肉腫細胞株である。Lac Z 遺伝子ノックダウン測定を、干渉 RNA 送達処方物のための一次活性 (primary activity) ベースのインビトロアッセイとして使用され得る。

【0582】

Lac Z 遺伝子ノックダウン測定のために、9 L / Lac Z 細胞を、RNAi 処方物でトランスフェクトし、β-ガラクトシダーゼアッセイを、トランスフェクション3日目

10

【0583】

9 L / Lac Z 細胞を、8000 細胞 / ウェル (96 ウェル) でプレートし、培地中で一晚インキュベートした。トランスフェクション時のコンフルエンスは、約 15 ~ 20 % であった。トランスフェクション複合体を、干渉 RNA を、OptiMEMTM 培地に添加し、ボルテックスし、送達処方物を、OptiMEMTM 培地に別個に添加し、ボルテックスし、そして最後に上記培地中の干渉 RNA と、上記培地中の送達処方物とを混合して、上記トランスフェクション複合体を作製することによって、調製した。インキュベートした細胞のための培地を、新たな無血清培地 (血清無しの OptiMEMTM) で弛緩し、トランスフェクション複合体を、各ウェルに添加した。細胞を、5 時間インキュベートし、次いで、100 μl の完全培地 (DMEM + 10 % ウシ胎児血清) の添加後に、37 °C および 5 % CO₂ で一晚インキュベートした。次の日に、トランスフェクションの 24 時間後に、上記培地を新たな完全培地に交換して、上記細胞を、37 °C および 5 % CO₂ でさらに 48 時間インキュベートした。

20

【0584】

Lac Z 遺伝子ノックダウンのために、上記回収した 9 L / Lac Z 細胞を PBS 中で洗浄し、M-PERTM Reagent (Pierce) 中で溶解し、室温で 15 分間インキュベートした。溶解物を、Micro BCA キット (Pierce, ThermoFisher Scientific) でのタンパク質アッセイおよび All-in-OneTM β-Galactosidase Assay Reagent (Pierce) での β-gal アッセイのために、各ウェルから採取した。

30

【0585】

(A549 細胞における PPIB 遺伝子発現ノックダウンのための例示的インビトロアッセイ)

サイクロフィリン B (PPIB) 遺伝子ノックダウン測定を、干渉 RNA 送達処方物のための一次活性ベースのインビトロアッセイとして使用し得る。サイクロフィリン B (PPIB) 遺伝子発現ノックダウンを、A549 ヒト肺胞基底上皮細胞において測定した。PPIB 遺伝子ノックダウン測定のために、A549 細胞を、干渉 RNA 処方物でトランスフェクトし、総 RNA を、トランスフェクションの 24 時間後に調製し、PPIB mRNA を、RT-PCR によってアッセイした。36B4 (酸性リボソームホスホ

40

【0586】

A549 細胞を、7,500 細胞 / ウェル (96 ウェル) で播種し、培地中で一晚インキュベートした。トランスフェクション時のコンフルエンスは、約 50 % であった。トランスフェクション複合体を、干渉 RNA を培地 (OptiMEMTM) に添加し、ボルテックスし、送達処方物を培地 (OptiMEMTM) に別個に添加し、ボルテックスし、そして最後に、上記培地中の干渉 RNA と、上記培地中の送達処方物とを混合し、室温で 20 分間インキュベートして、上記トランスフェクション複合体を作製することによって、調製した。インキュベートした細胞のための培地を、新たな OptiMEMTM で置換し、トランスフェクション複合体を各ウェルに添加した。細胞を、5 時間、37 °C および 5 % CO₂ でインキュベートし、次いで、完全培地を、(最終ウシ胎児血清濃度 10

50

%になるまで) 添加し、インキュベーションを、トランスフェクションの24時間後まで継続した。

【0587】

PPIB遺伝子ノックダウンのために、細胞を溶解し、RNAを調製した (Invisorb RNA Cell HTS 96-Kit/C, Invitex, Berlin、もしくはRNeasy 96 Kit, Qiagen)。定量的RT-PCRを、DNA Engine Opticon2サーマルサイクラー (BioRad) でOne-Step qRT-PCRキット (Invitrogen) を用いて行った。

【0588】

PPIBのために使用したプライマーは、以下であった：

10

(配列番号1)

5'-GGCTCCCAAGTTCTTCATCAC-3' (順方向) および

(配列番号2)

5'-CCTTCCGCACCACTC-3' (逆方向) と、

(配列番号3)

上記プローブのために、5'-FAM-CTAGATGGCAAGCATGTGGTGT TTTGG-TAMRA-3'。

【0589】

36B4については、プライマーは以下であった：

20

(配列番号4)

5'-TCTATCATCAACGGGTACAAACGA-3' (順方向) および

(配列番号5)

5'-CTTTTTCAGCAAGTGGGAAGGTG-3' (逆方向) と

(配列番号6)

上記プローブのための、5'-FAM-CCTGGCCCTTGTCGTGGAGAC GGATTA-TAMRA-3'。

【0590】

(マウスにおけるインフルエンザウイルス力価ノックダウンのための例示的インビボアッセイ)

マウスにおけるインフルエンザウイルス力価ノックダウン測定を、干渉RNAアミノ酸脂質送達処方物についての効力のインビボ尺度として使用し得る。

30

【0591】

このアッセイにおいて、代表的には、50 μ LのdsRNAアミノ酸脂質処方物、もしくはコントロール群についてはPBSを、ケタミン/キシラジンで麻酔した7~9週齢のBalb/Cマウスにおいて経鼻的に投与した。毎日の投与を、-2日目、-1日目、および0日目に、連続3日間にわたって行った。最後の投与の4時間後に、感染を誘導した。

【0592】

インフルエンザA/プエルトリコ/8/34 (PR8, サブタイプH1N1) でインフルエンザ感染を誘導した。感染のために、0.3%BSA/1XPBS/PSで希釈した50 μ Lの20pfu PR8を、ケタミン/キシラジンで麻酔したマウスに経鼻的に投与した。感染の48時間後に、その肺を採取し、600 μ Lの0.3%BSA/1XPBS/PS中でホモジナイズした。そのホモジネートを2回凍結融解して、上記ウイルスを遊離させた。TCID50アッセイ (Tissue-Culture Infectious Dose 50) を行って、肺ホモジネート中のウイルスを力価測定した。平底96ウェルプレートに、1ウェルあたり2 $\times$ 10⁴ MDCK細胞を播種し、24時間後に、上記血清含有培地を取り除いた。30 μ Lの肺ホモジネート (未希釈もしくは10倍~10⁷倍 (10倍ずつ) に希釈のいずれか) を、四連のウェルに添加した。1時間のインキュベーションの後に、4 μ g/ml トリプシンを含む170 μ Lの感染培地 (DMEM/0.3%BSA/10mM HEPES/PS) を、各ウェルに添加した。48時間に

40

50

わたって37℃でインキュベートした後、上記培養上清中のウイルスの存在もしくは非存在を、ニワトリ赤血球の血球凝集によって決定した。上記ウイルス力価を、SpearmanとKarberの式を使用して概算した。

【0593】

(siRNA濃度のための例示的SYBRTM Goldアッセイ)

処方物中のdsRNAの濃度を、SYBRTM Goldアッセイによって、以下のよう
に決定し得る：10μlのdsRNA処方物を100μl MeOHに添加し、5分間、
55℃でインキュベートする。50μlのヘパリン(200mg/ml)を添加し、そ
の溶液を、5分間、55℃でインキュベートする。790μlのPBS(リン酸緩衝化生
理食塩水)を添加し、そのサンプルを、遠沈管中で遠沈して、ペレットにする。上記ペ
レットのうちの90μlのサンプルを、10μlのSYBRTM Gold試薬(Molecular Probes,
Eugene, Oregon)とインキュベートする。蛍光を、発光535nmと励起495nmで読み取る。

【0594】

(例示的RNA単離およびApoBメッセージのノックダウンのための定量的RT-PCRアッセイ)

このハウスキーピング遺伝子プロトコル(肺もしくは全身)のために、1日目に、C57/B6もしくはBalb/C雌性マウス(8~10週齢)(マウス5匹/群)に、50μlもしくは200μLのdsRNA処方物を、それぞれ、鼻内投与経路もしくは静脈内投与経路によって、投与した。麻酔剤は、ケタミン/キシラジン(IP-0.2ml用量/マウス)であった。2日目に、肺モデルについては投与の1日後または連続3日間の投与の次の日のいずれかのマウスから全肺を単離し、全身モデルについては、肺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓および/もしくは全血を単離した。組織を、2mlのRNALATER RNA Stabilization Reagent(Qiagen 76106)を含む24ウェルプレートに配置した。プレートを、ドライアイス上に置いて、すぐに凍結し、ホモジネートを調製するまで-80℃で保存した。

【0595】

総RNAを、剖検時にRNALATER溶液中で保存した組織サンプルから抽出した。総RNAの単離を、Invitrogen PURELINK 96 RNA Isolation Kitを使用して、哺乳動物組織の単離のための製造業者のプロトコルに従って行った。次いで、これら総RNA単離物を、NanoDrop分光光度計を使用して定量し、次いで、質を、Agilent Bioanalyzer 2100システムを使用して確認して、RNA完全性を測定した。上記総RNAの質および量を測定した後に、上記サンプルを等しい濃度に対して正規化し、50~100ngの総RNAを、Applied Biosystems High Capacity cDNA Archive Kitを使用して、製造業者のプロトコルに従って、cDNAへと合成した。次いで、上記cDNAを、上記NanoDropを使用して濃度について再チェックし、次いで、qRT-PCR分析のために1:10希釈した。

【0596】

qRT-PCRを使用する上記遺伝子発現分析を、上記cDNAサンプル、および最終プライマー濃度200nMでのSYBR green技法を使用して行った。上記サンプルを、10μLの反応容積を使用するQuanta PerfectCt SYBR Green Fast Mix, ROXを使用して、実施した。上記サンプルを、384ウェルプレート形式を使用して、迅速サイクリング条件を使用するApplied Biosystems 7900HTプラットフォームで行った。次いで、データを、閾値0.2を使用するSDS 2.3ソフトウェアからエクスポートした。これらを、ユーザーによってExcelに入力されたアルゴリズムのQBASEソフトウェアを使用して、分析用にフォーマットした。内因性コントロールのために選択した遺伝子は、geNorm分析に基づいた。マウス肝臓については、サンプル GAPDHおよびPPIAおよびTBPは、遺伝子発現分析のための非常に良好で安定な正規化群(normalizer)であ

ることが示された。

【0597】

(血清コレステロールアッセイ)

このアッセイの目的は、dsRNAを投与して48時間後のマウス血中の血清コレステロールレベルを確認することであった。Invitrogen Amplex Red Cholesterol Assay Kit (cat # A12216)を使用した。マウス全血を採取し、Serum Separator Tubes (SST-BD cat # 365956)に入れ、次いで、遠心分離して、血清と、上記血液の残りとを分離した。上記血清をDI-H₂O 1:40中に希釈し、次いで、上記Amplexアッセイキットの1×反応緩衝液中でさらに1:5 (合計1:200)希釈した。標準を、20 μg/ml、10 μg/ml、8 μg/ml、6 μg/ml、4 μg/ml、2 μg/mlおよび1 μg/mlの濃度で、コレステロール参照標準から作製し、上記キットに補充した。サンプル、標準物質およびブランクを、平底黒色96ウェルプレート (Costar Catalogue # 3916)に添加した。上記Amplexアッセイ混合物を作製し、上記アッセイウェルに添加した。37℃でのインキュベーションの少なくとも30分後に、上記プレートを、Molecular Devices SpectraMax M5を使用して読み取った。「エンドポイント」プロトコルを選択し、励起範囲を、530~560 (好ましくは、544 nm)に設定し、発光検出は、~590 nmであった。一旦上記プレートが読み取った後、上記データをエクセルへとエクスポートし、ここでそのパーセントコントロール、パーセント低下および総血清コレステロール (μg/ml 単位)で計算した。

10

20

【0598】

(実施例27)

本開示のいくらかの二本鎖RNA (dsRNA)の構造を、表1に示す。

【0599】

【表 1】

表1:二本鎖RNA

RNA	配列
DX4227 ApoB	(配列番号 7) センス 5'-GGAAUC _m U _m UA _m UA _m U _m UGAUC _m CA _s A-3' (配列番号 8) アンチセンス 5'- _m U _m UGGAU _m CAAA _m UA _m UAAGA _m UUC _m Cs _m CsU-3'
DX3030 インフルエンザ	(配列番号 9) センス 5'-GGAUCUUUUUUCUUCGGAGACAA _d T _d G-3' (配列番号 10) アンチセンス 5'-CAUUGUCUCCGAAGAAUAAGAUC _{CUU} -3'
DX2816 非標的 Qneg	(配列番号 11) センス 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU _d T _d T-3' (配列番号 12) アンチセンス 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA _d T _d T-3'
DX2940 LacZ	(配列番号 13) センス 5'-CUACACAAAUCAGCGAUUU _d T _d T-3' (配列番号 14) アンチセンス 5'-AAAUCGCUGAUUUGUGUAG _d T _d C-3'
DX2742 PPIB MoCypB	(配列番号 15) センス 5'-GGAAAGACUGUUC _{CAAAAAU} -3' (配列番号 16) アンチセンス 5'-UUUUUGGAACAGUCUUUCC _{UU} -3'
DX 2744 G1498 インフルエンザ	(配列番号 17) センス 5'-GGAUCUUUUUUCUUCGGAG _d T _d T-3' (配列番号 18) アンチセンス 5'-CUCCGAAGAAAUAAGAUC _d T _d T-3'
DX 2918 Inm4 TNFa 改変	(配列番号 19) センス 5'-CCGTCAGCCGATTTGCTATTT-3' (配列番号 20) アンチセンス 5'- _p AUAGCAAATCGGCTGACGGTT-3'

表 1 において、「mU」は、2'-O-メチルウリジンを表し、「mC」は、2'-O-メチルシチジンを表し、「s」は、ホスホロチオエート連結を表す。

【0600】

(実施例 28)

本開示の活性 RNA 処方物を、干渉 RNA を緩衝液もしくは細胞培養培地に溶解し、ボルテックスし、送達処方物と、緩衝液もしくは細胞培養培地とを別個に混合し、ボルテックスし、最後に、上記干渉 RNA 混合物と、上記送達処方物混合物とを混合して、活性 RNA i トランスフェクション処方物を作製することによって、調製し得る。

【0601】

送達処方物を調製するために、アミノ酸脂質を、他の脂質および／もしくは賦形剤とともに、CHCl₃/MeOH に可溶化させ得、N₂ 下で乾燥させ得、そして 5% デキストロースを含む 10mM HEPES (pH 7.4) 中で水和させ得る。上記混合物を、超音波処理し得るか、または押し出しし得るか、透析し得るか、そして／または接線流濾

10

20

30

40

50

過 (t a n g e n t i a l f l o w f i l t e r) され得る。

【0602】

当該分野で公知の種々の希釈法はまた、本開示の活性RNA処方物を調製するために使用され得る。

【0603】

本開示の例示的干渉RNA処方物を、表2に示す。この実施例において、C8-Arg-C8という名称の上記アミノ酸脂質は、干渉siRNA治療剤の細胞内送達のための上記アミノ酸脂質自体の処方物を提供する。アミノ酸脂質の量は、送達成分（上記活性RNA薬剤を含まない）のモル%として示される。名称「C16-Arg-C14」とは、（C15アルキル）-（C=O）-Arg-NH-（C14アルキル）をいい、これは、（C16アシル）-Arg-NH-（C14アルキル）と同じである。

【0604】

【表2】

表2:dsRNA処方物

成分	量
dsRNA	50nM
C16-Arg-C14アミノ酸脂質	100モル%

本開示の例示的干渉RNA処方物を表3に示す。この実施例において、C14-norArg-C14と称される上記アミノ酸脂質は、干渉siRNA治療剤の細胞内送達のための上記アミノ酸脂質自体の処方物を提供する。アミノ酸脂質の量は、送達成分（上記活性RNA薬剤を含まない）のモル%として示される。名称「C14-norArg-C14」とは、（C13アルキル）-（C=O）-norArg-NH-（C14アルキル）をいい、これは、（C14アシル）-norArg-NH-（C14アルキル）と同じである。

【0605】

【表3】

表3:dsRNA 処方物

成分	量
dsRNA	50nM
C14-norArg-C14アミノ酸脂質	100モル%

本開示の例示的RNAi処方物を表4に示す。この実施例において、C10-norArg-C10と称される上記アミノ酸脂質は、同時送達処方物中で非カチオン性脂質と合わされる。名称「C10-norArg-C10」とは、（C9アルキル）-（C=O）-norArg-NH-（C10アルキル）をいい、これは、（C10アシル）-norArg-NH-（C12アルキル）と同じである。

【0606】

【表 4】

表4:dsRNA処方物

成分	量
dsRNA DX3030	50nM
C10-norArg-C10 アミノ酸脂質	50モル%
DOPE	50モル%

10

本開示の例示的RNA i 処方物を表 5 に示す。この実施例において、C 1 2 -ホモA r g -C 1 2 と称される上記アミノ酸脂質は、複数成分送達処方物中で、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、およびp e g 化脂質と合わされる。名称「C 1 2 -ホモA r g -C 1 2」とは、(C 1 1 アルキル) - (C = O) - ホモA r g - NH - (C 1 2 アルキル) をいい、これは、(C 1 2 アシル) - ホモA r g - NH - (C 1 2 アルキル) と同じである。

【 0 6 0 7 】

【表 5】

表5:dsRNA処方物

成分	量
dsRNA	25nM
C12-norArg-C12	30モル%
DSPC	20モル%
コレステロール	49モル%
DSPE-PEG2000	1モル%

20

本開示の例示的干渉RNAエマルジョン組成物を表 6 に示す。この実施例において、上記カチオン性アミノ酸脂質は、C 1 4 -n o r A r g -C 1 4 と称される。

30

【 0 6 0 8 】

【表 6】

表6:dsRNAエマルジョン

成分	量
dsRNA	25nM, N/P 4
C14-norArg-C14	11%(油相のw/w);
ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン	カチオン性脂質 対 乳化剤の1:1モル比
LABRAFAC PG	89%(油相のw/w)
水	80%

40

本開示の例示的干渉RNA分散組成物を表 7 に示す。この実施例において、上記カチオン性アミノ酸脂質は、C 1 4 -n o r A r g -C 1 4 と称される。

【 0 6 0 9 】

【表 7】

表7:dsRNA分散組成物

成分	量
dsRNA	25nM, N/P 4
C14-norArg-C14	12%(脂質／分散相のw/w)
LABRASOL	88%(脂質／分散相のw/w)
水	80%

10

(実施例 29)

本開示の干渉RNA組成物の例示的リポソーム処方を、表8に示す。

【0610】

【表 8】

表8:例示的処方物

組成(モル%)	
C18—norArg(NH ₃ Cl)—C18/DSPE—PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	10
C16—norArg(NH ₃ Cl)—C16/DSPE—PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	
C14—norArg(NH ₃ Cl)—C14/DMPE—PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	
C12—Arg(NH ₃ Cl)—C12/DSPE—PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	
C10—Arg(NH ₃ Cl)—C10/DSPE—PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	20
C8—Arg(NH ₃ Cl)—C8/DSPE—PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	
C10—D—Arg(NH ₃ Cl)—C18/DSPE—PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	
C12—D—Arg(NH ₃ Cl)—C16/DPPE—PEG5k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	
C14—D—Arg(NH ₃ Cl)—C14/DSPE—PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	30
C16—ホモArg(NH ₃ Cl)—C12/DSPE—PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	
C18—ホモArg(NH ₃ Cl)—C10/DMPE—PEG5k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	
C12—ホモArg(NH ₃ Cl)—C12/DSPE—PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	
C14—nornorArg(NH ₃ Cl)—C14/DSPE—PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	40
C16—nornorArg(NH ₃ Cl)—C16/DSPE—PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	

(実施例 30 : RNA 送達組成物の粒径)

リボソームアミノ酸脂質干渉 RNA 処方物の例を表 9 に示す。表 9 の処方物は、各々、1 . 8 の N / P を有し、約 0 . 08 ~ 0 . 19 の分散値で 106 ~ 139 nm の粒径を示した。

【0611】

【表9】

表9:RNA送達組成物の粒径

組成(モル%)	N/P	粒径(nm)	PDI
C12-norArg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k /DSPC/CHOL (30;1;20;49)	1.8	139	0.19
C12-Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/D SPC/CHOL (30;1;20;49)	1.8	106	0.08
C12-D-Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k /DSPC/CHOL (30;1;20;49)	1.8	112	0.19
C12-ホモArg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k /DSPC/CHOL (30/1/20/49)	1.8	119	0.15

アミノ酸脂質干渉RNA処方物の例を表10に示す。表10の処方は、1.5～1.9のN/P比を有し、約0.18～0.30の分散値で140～148nmの粒径を示した。

【0612】

【表10】

表10:RNA送達組成物の粒径

組成	N/P	粒径(nm)	PDI
C12-nor-Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k /DSPC/CHOL (30/1/20/49)	1.51	148.3	0.18
C12-Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/DS PC/CHOL (30/1/20/49)	1.51	148.3	0.18
C12-D-Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/ DSPC/CHOL (30/1/20/49)	1.51	148.3	0.18
C12-ホモArg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/ DSPC/CHOL (30/1/20/49)	1.89	140.3	0.30

JEOL 1230 TEMで得た本発明のリポソーム実施形態の透過型電子顕微鏡、図2に示す。図2は、アミノ酸脂質C12-norArg-C12で形成された球形の脂質二重層小胞粒子を示す。上記顕微鏡写真の長さのマーカーは、0.5μmであり、上記サンプルを、3% 酢酸ウラニルで染色した。上記リポソーム処方物の脂質部分は、総脂質の% (w/w) として、それぞれ、[30%/20%/49%/1%]の量の[C12-norArg(NH₃⁺Cl⁻)-C12/DSPC/コレステロール/DSPE-PEG-2000]であった。上記リポソームは、上記抗インフルエンザ活性ダイサー基質dsRNA DX3030を含んでいた。

【0613】

(実施例31:アミノ酸脂質RNA i2成分組成物についてのインビトロでのLacZ遺伝子ノックダウン活性)

アミノ酸脂質は、LacZ 活性ベースのインビトロアッセイによって、表 11 に示されるような効率的干渉 RNA 送達組成物を提供した。表 11 の結果は、アミノ酸脂質組成物中の干渉 RNA による遺伝子ノックダウンが、RNAiMAX (Invitrogen) で得られるものを上回り得ることを示した。

【0614】

【表 1 1】

表11: アミノ酸脂質干渉RNA処方物についてのLacZノックダウン

組成	Qnegに対する %ノックダウン
C8-norArg-C8:DOPE (1:1)	88
C10-norArg-C10:DOPE (1:1)	89
C12-norArg-C12:DOPE (1:1)	88
C8-L-Arg-C8:DOPE (1:1)	16
C10-L-Arg-C10:DOPE (1:1)	82
C12-L-Arg-C12:DOPE (1:1)	100
C8-D-Arg-C8:DOPE (1:1)	40
C10-D-Arg-C10:DOPE (1:1)	82
C12-D-Arg-C12:DOPE (1:1)	80
C8-ホモArg-C8:DOPE (1:1)	52
C10-ホモArg-C10:DOPE (1:1)	100
C12-ホモArg-C12:DOPE (1:1)	51
C8-nornorArg-C8:DOPE (1:1)	78
C10-nornorArg-C10:DOP E (1:1)	78
C8-norArg-C8:DPhPE (1:1)	43
C10-norArg-C10:DPhPE (1:1)	73
RNAI-MAX	92

表 1 1 において、d s R N A の最終濃度は、1 0 0 n M であり、N / P 比は、各組成物

10

20

30

40

50

について1.8であった。

【0615】

(実施例32：アミノ酸脂質RNAiリポソーム組成物についてのインビトロでのLacZ遺伝子ノックダウン)

アミノ酸脂質は、LacZ活性ベースのインビトロアッセイによって、表12において示されるように、効率的な干渉RNA送達組成物を提供した。

【0616】

【表12】

表12:アミノ酸脂質RNAi組成物についての正規化LacZ遺伝子ノックダウン

組成	% ノックダウン
C12-norArg(NH ₃ Cl)-C12/DPhPE/DSPE-PEG (50/49/1)	60
C12-Arg(NH ₃ Cl)-C12/DPhPE/DSPE-PEG (50/49/1)	94
C12-D-Arg(NH ₃ Cl)-C12/DPhPE/DSPE-PEG (50/49/1)	86
C12-ホモArg(NH ₃ Cl)-C12/DPhPE/DSPE-PEG (50/49/1)	81
RNAIMAX	82

表12の上記正規化LacZノックダウンの結果は、少なくとも60%ノックダウンが全てのアミノ酸脂質組成物について認められることを示した。表12の結果は、アミノ酸脂質組成物中の干渉RNAによる遺伝子ノックダウンが、RNAIMAXで認められるものを上回り得ることを示した。

【0617】

(実施例33：アミノ酸脂質RNAi組成物についてのインビトロでの遺伝子ノックダウン濃度応答)

いくつかの3成分のアミノ酸脂質RNAi組成物についての遺伝子ノックダウン活性を、インビトロで決定した。

【0618】

アミノ酸脂質は、A549細胞におけるPPIBノックダウン活性ベースのインビトロアッセイによって、図3に示されるように効果的な干渉RNA送達組成物を提供した。図3の結果は、アミノ酸脂質組成物中の干渉RNAによる遺伝子ノックダウンが、正規化PPIB値によって表されるように、RNAIMAXで得られるものを上回り得ることを示した。

【0619】

図3において、RNAIMAXの結果と比較して、2つのアミノ酸脂質処方物についての上記正規化PPIB値の濃度応答が示される。図3における処方物1は、[C12-norArg(NH₃Cl)-C12/DOPE/CHOL(50/32/18)]であり、処方物2は、[C12-norArg(NH₃Cl)-C12/CHEMS/DLPE(50/32/18)]であった。

【0620】

アミノ酸脂質は、9L細胞におけるLacZノックダウン活性ベースのインビトロアッセイによって、図4に示されるように、効果的な干渉RNA送達組成物を提供した。図4の結果は、アミノ酸脂質組成物中の干渉RNAによる遺伝子ノックダウンは、正規化β-ガラクトシダーゼ値によって表されるように、RNAIMAXで得られるものを上回り得

10

20

30

40

50

ることを示した。

【0621】

図4において、RNAIMAXについての結果と比較して、2つのアミノ酸脂質処方物についての上記正規化 β -ガラクトシダーゼ値の濃度応答が示される。図4における処方物1は、[C12-norArg(NH₃Cl)-C12/DOPE/CHOL(50/32/18)]であり、処方物2は、[C12-norArg(NH₃Cl)-C12/CHEMS/DLPE(50/32/18)]であった。

【0622】

3つの脂質成分を含むいくつかのアミノ酸脂質処方物についてのインビトロでの上記遺伝子ノックダウン活性データを、表13にまとめる。

【0623】

【表13】

表13: インビトロでのアミノ酸脂質RNAi組成物についての遺伝子ノックダウン

処方物	dsRNA(nM)	%ノックダウン (QNegに対する)	
		A549 PPIB	9L LacZ
C12norArgC12/CHEMS/chol. (50/32/18) (N/P=1.8)	25	85	95
	10	74	74
	1	9	49
C12norArgC12/DOPE/chol. (50/32/18) (N/P=5.0)	25	92	97
	10	93	91
	1	34	30
C12norArgC12/CHEMS/DLPE (50/32/18) (N/P=1.8)	25	98	97
	10	97	94
	1	23	39
C12norArg/chol./DLPE (50/32/18) (N/P=5.0)	25	78	83
	10	43	57
	1	2	24
RNAIMAX	25	87	89
	10	42	67
	1	7	16

表13に示されるように、10nM dsRNAの濃度で得られる結果は、C12-norArg-C12を含むこれら例示的アミノ酸脂質処方物が、RNAIMAXで得られる結果を上回るインビトロで遺伝子ノックダウン活性を提供することを示した。

【0624】

血清（ウシ胎児血清）の存在ありまたはなしで得られた3つの脂質成分を含むいくつかのアミノ酸脂質処方物についてのインビトロでの上記遺伝子ノックダウン活性データを、表14にまとめる。

【0625】

10

20

30

40

【表 1 4】

表14:血清有りまたはなしでの、インビトロでのアミノ酸脂質RNAi組成物についてのPPIB遺伝子ノックダウン

処方物	N:P	dsRNA (nM)	%ノックダウン (Qnegに対する)	
			血清あり	血清無し
C12-norArg-C12/CHEMS/ chol.	4	25	94	91
	4	2.5	69	83
	4	0.25	42	23
C12-norArg-C12/CHEMS/ chol.	4	25	96	95
	4	2.5	95	96
	4	0.25	65	47
RNAIMAX (固定量/調製物)	---	25	98	97
	---	2.5	97	94
	---	0.25	56	48

10

表14に示されるように、C12-norArg-C12を含む例示的アミノ酸脂質処方物は、血清の存在ありまたはなしで、インビトロで高いPPIB遺伝子ノックダウン活性を提供した。これらアミノ酸脂質処方物を、種々の再水和および希釈法によって作製した。

20

【0626】

3つおよび4つの脂質成分を含むいくつかのアミノ酸脂質処方物についてのインビトロでの上記遺伝子ノックダウン活性データを、表15にまとめる。

【0627】

【表 15】

表15: インビトロでのアミノ酸脂質RNAi組成物についてのLacZ遺伝子ノックダウン(KD)

組成	脂質の %(w/w)	dsRNA (nM)	Qnegに 対する%KD 9L/LacZ
C18:1-His(1-Me)-C16/C18:1-norArg-C16/chol.	8/42/50	25	90
		5	83
	16/32/50	25	91
		5	94
C18:1-His(1-Me)-C16/C18:1-norArg-C16/chol.	8/42/50	25	94
		5	90
	16/32/50	25	91
		5	91
C18:1-norArg-C16/CHEMS/chol.	50/32/18	25	43
		5	56
	50/32/18	25	72
		5	73
C18:1-norArg-C12/CHEMS/chol.	50/32/18	25	90
		5	92
C18:1-norArg-C8/CHEMS/chol.	50/32/18	25	92
		5	95
C18:2-norArg-C16/CHEMS/chol.	50/32/18	25	90
		5	33
	50/20/30	25	92
	50/24/26	25	93
	50/28/22	25	92
C18:1-norArg-C16/CHEMS/chol./DSPC	40/16/34/10	25	79
	40/19/31/10	25	82
	40/22/28/10	25	82
	40/26/24/10	25	88
C18:1-Pal-C16/C18:1-norArg-C16/chol.	4/46/50	25	72
	8/42/50	25	77
	16/32/50	25	88
	32/16/50	25	91

表15に示されるように、3つおよび4つの成分を含むいくつかのアミノ酸脂質処方物は、インビトロで高い9L/LacZ遺伝子ノックダウン活性を提供した。高い9L/LacZノックダウン活性を、アミノ酸脂質の混合物を使用する処方物およびさらなる脂質としてCHEMSもしくはコレステロールを有する処方物について得た。

【0628】

(実施例34: アミノ酸脂質RNAi組成物についてのインビトロでのApoB遺伝子ノックダウン濃度応答)

いくつかの4成分のアミノ酸脂質RNAi組成物についてのApoB遺伝子ノックダウン活性を、インビトロで決定した。

【0629】

図5において、HepG2細胞におけるインビトロアッセイから得られたApoB遺伝子ノックダウン活性の例を示す。干渉RNAの3つのアミノ酸脂質処方物について、正規化ApoB mRNA発現値の25nM、2.5nM、および0.25nM RNAの濃度応答を示す。処方物1は、[非アミノ酸カチオン性脂質/DSPC/cholesterol/DMPE-PEG2k(40/10/48/2)]であった。処方物2および3はともに、[C18:1-norArg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k(50/32/16/2)]であった。

【0630】

上記ApoB dsRNAは、DX4227(ApoB-2 P2098)であった。

10

【0631】

濃度応答を、HepG2細胞における%ApoB mRNA発現ノックダウンについて得た。HepG2細胞スクリーンに関して、そのプロトコルは、以下の通りであった：1日目に、上記HepG2細胞に、DMEM中で10%FBS、1×非必須アミノ酸、および0.125%炭酸水素ナトリウムを含む新たな増殖培地を補給した。2日目に、25μLの複合体を、ウェルに添加し、次いで、75μLのOPTIMEM中のHepG2単一細胞懸濁物をウェルに添加した(15000細胞/ウェル)。4時間後に、20%FBSを含む100μl DMEMを、各ウェルに添加した。3日目に、24時間で、上記細胞を溶解し、そのRNAを調製し、qRT-PCRを、ApoBおよびrGAPDH mRNAについて行った。

20

【0632】

いくつかの4成分のアミノ酸脂質RNA i組成物についてのApoB遺伝子ノックダウン活性を、表16にまとめる。

【0633】

【表 16】

表16: インビトロでのアミノ酸脂質RNAi組成物についてのApoB遺伝子ノックダウン

組成	N/P		UNT に対する %ノックダウン			
	pH 7.4	pH 5.0	100 nM	25 nM	2.5 nM	0.25 nM
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DLPE /DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	1.8	4.9	84	93	36	0
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DMP E/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	0.8	2.1	94	84	0	0
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DPPE /DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	0.8	2.1	96	82	19	0
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DPLC /DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	0.8	2.1	96	89	0	0
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DSPC /DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	0.8	2.1	94	89	37	0
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DLPE /DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	0.8	2.1	95	82	13	13
RNAIMAX	—	—		87	24	24

(実施例 35: アミノ酸脂質 RNA i 組成物についてのインビボでの A p o B 遺伝子ノックダウン)

3つおよび4つの成分のアミノ酸脂質 RNA i 組成物についての A p o B 遺伝子ノックダウン活性を、インビボで、マウスで決定した。インビボでの上記 A p o B m R N A 低下活性を、表 17 に示す。

【0634】

【表 17】

表17: インビボでのアミノ酸脂質RNAi組成物についてのApoB遺伝子
ノックダウン

組成	インビボでの %ノックダウン
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PE G2k (50/32/16/2)	88
C18:1-norArg-C16/chol. /DMPE-PEG2k (50/48/2)	45
C18:1-norArg-C16/CHEMS/chol. /DMPE-PE G2k (50/15/33/2)	46
C18:1-norArg-C16/CHEMS/chol. /DMPE-PE G2k (50/32/16/2)	88

10

インビボで、マウスでの上記A p o B遺伝子ノックダウン用量応答を、いくつかの4成分アミノ酸脂質RNAi組成物について得、マウス血清コレステロールレベルと比較した。インビボでの上記A p o B mRNA低下および対応する血清コレステロール低下を、表18にまとめる。

20

【0635】

【表 18】

表18:インビボでのアミノ酸脂質RNAi組成物についてのApoB遺伝子ノックダウン(KD)用量応答

組成	ApoB mRNA %KD (ApoB 9133)	ApoB mRNA %KD (ApoB 12211)	血清コレス テロール の%変化 (±増加/ 減少)
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DL PE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2) (N/P 1.8, 2mg/kg)	72.0	72.6	-7.1
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DL PE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2) (N/P 1.8, 1mg/kg)	35.2	39.6	-4.0
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DL PE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2) (N/P 1.8, 0.5mg/kg)	17.6	20.6	10.6
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DL PE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2) (N/P 0.8, 4mg/kg)	69.9	70.6	-38.9
C18:1-norArg-C16/CHEMS/DL PE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2) (N/P 0.8, 2mg/kg)	46.3	47.8	-14.5
PBS	—	1.2	0

(実施例36:アミノ酸脂質RNAi組成物についての抗ウイルス効果)

4成分を有するアミノ酸脂質干渉RNA処方物の例を、表19に示す。表19の処方物を使用して、マウスインフルエンザモデルにおいてインビボで抗ウイルス活性を決定した。

【0636】

10

20

30

40

【表 19】

表19:例示的 RNA 送達および比較処方物

群	組成	dsRNA	dsRNA用量 (量/kg/日)		脂質用量 ($\mu\text{mol/kg/日}$)
			mg	nmol	
1	C12-norArg(NH_3^+Cl^-)-C12/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	DX3030	2	120	36
2	C12-norArg(NH_3^+Cl^-)-C12/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	Qneg DX 2816	1.6	120	28.8
3	C14-norArg(NH_3^+Cl^-)-C14/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	DX3030	2	120	36
4	C14-norArg(NH_3^+Cl^-)-C14/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	Qneg DX 2816	1.6	120	28.8
5	C16-norArg(NH_3^+Cl^-)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	DX3030	2	120	36
6	C16-norArg(NH_3^+Cl^-)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	Qneg DX 2816	1.6	120	28.8
7	C18-norArg(NH_3^+Cl^-)-C18/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	DX3030	2	120	36
8	C18-norArg(NH_3^+Cl^-)-C18/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	Qneg DX 2816	1.6	120	28.8
9	C18オレイック-norArg(NH_3^+Cl^-)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	DX3030	2	120	36
10	C18オレイック-norArg(NH_3^+Cl^-)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	Qneg DX 2816	1.6	120	28.8
11	C12-norArg(NH_3^+Cl^-)-C12/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	なし	---	---	36
12	PBS	---	---	---	---

表19の処方物は、各々、表20に示されるように、1.8のN/Pを有し、約0.1

10

20

30

40

50

～0.3の分散値で、127～183 nmの粒径（群7～8を除いて）を示した。

【0637】

【表20】

表20:RNA送達および比較処方物の特徴付け

群	組成	N/P	サイズ(nm)	PDI
1	C12-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C12/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1.8	151.1	0.315
2	C12-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C12/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1.8	128	0.134
3	C14-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C14/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1.8	144.5	0.201
4	C14-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C14/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1.8	126.6	0.114
5	C16-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1.8	182.8	0.141
6	C16-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1.8	174	0.157
7	C18-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C18/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1.8	977.4	1
8	C18-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C18/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1.8	625	0.925
9	C18オレイック-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16 / DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1.8	139.3	0.155
10	C18オレイック-norArg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16 / DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	1.8	130.2	0.109

表19の処方物についてのウイルス力価低下の程度を、表21に示される。ウイルス力価低下についての各値は、8匹のマウスについてのデータを反映する。

【0638】

10

20

30

40

【表 2 1】

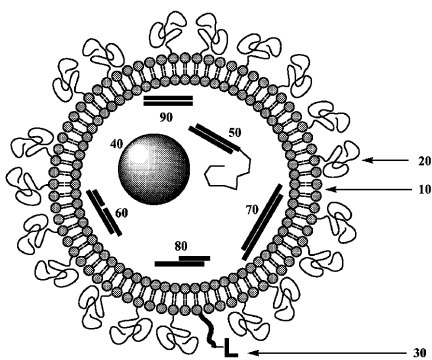
表21:RNAi送達処方物についてのウイルス力価低下

群	dsRNA	PBSコントロールと比較したウイルス力価の倍数低下 (平均)	PBSコントロールと比較した、ウイルス力価の倍数低下 (メジアン)	p値
1	DX3030	165. 0	1698. 0	0. 0002
2	Qneg DX2 816	2. 1	2. 3	0. 034
3	DX3030	25. 3	100. 0	0. 002
4	Qneg DX2 816	3. 8	5. 6	0. 008
5	DX3030	13. 8	17. 8	0. 0003
6	Qneg DX2 816	6. 3	6. 7	0. 002
7	DX3030	26. 7	31. 6	0. 001
8	Qneg DX2 816	2. 6	5. 6	0. 037
9	DX3030	25. 7	22. 8	0. 0002
10	Qneg DX2 816	20. 0	17. 8	0. 0003

一般に、表 2 1 の結果は、上記干渉 RNA アミノ酸脂質処方物が上記干渉 RNA をインビボで細胞に送達し、それによって、インフルエンザウイルス力価が、コントロールとしての PBS と比較して、約 1 6 0 0 倍以上まで低下することを示した。コントロール群は、Q n e g を投与した # 2、4、6、8、および 1 0 であった。

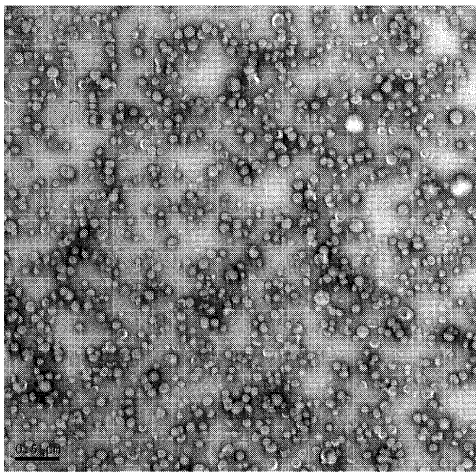
【図 1】

FIG. 1



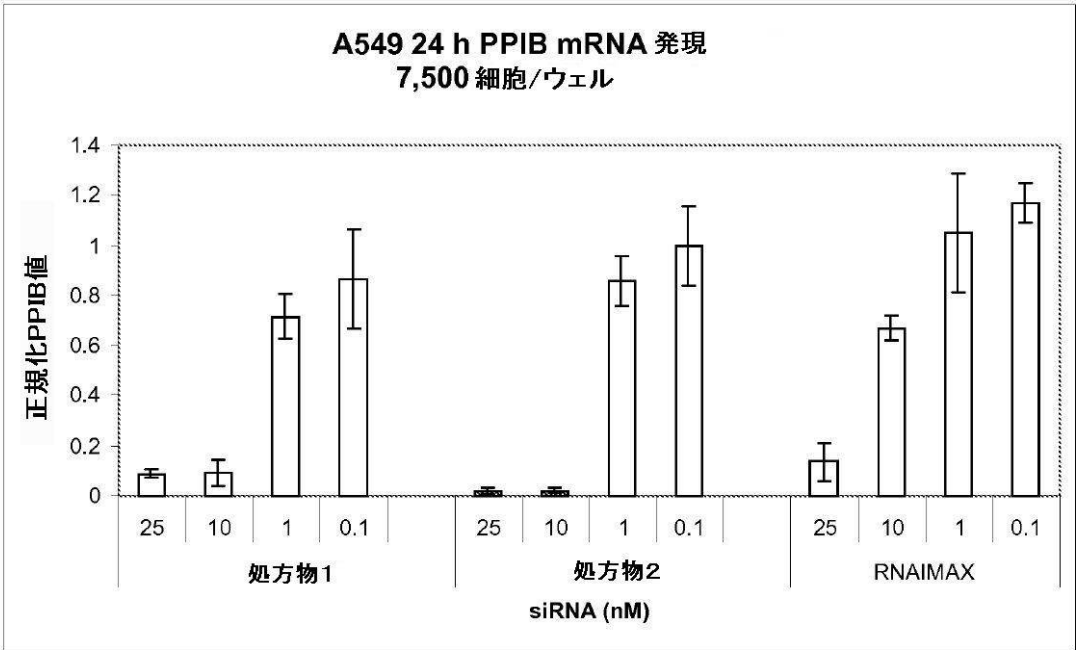
【図 2】

FIG. 2



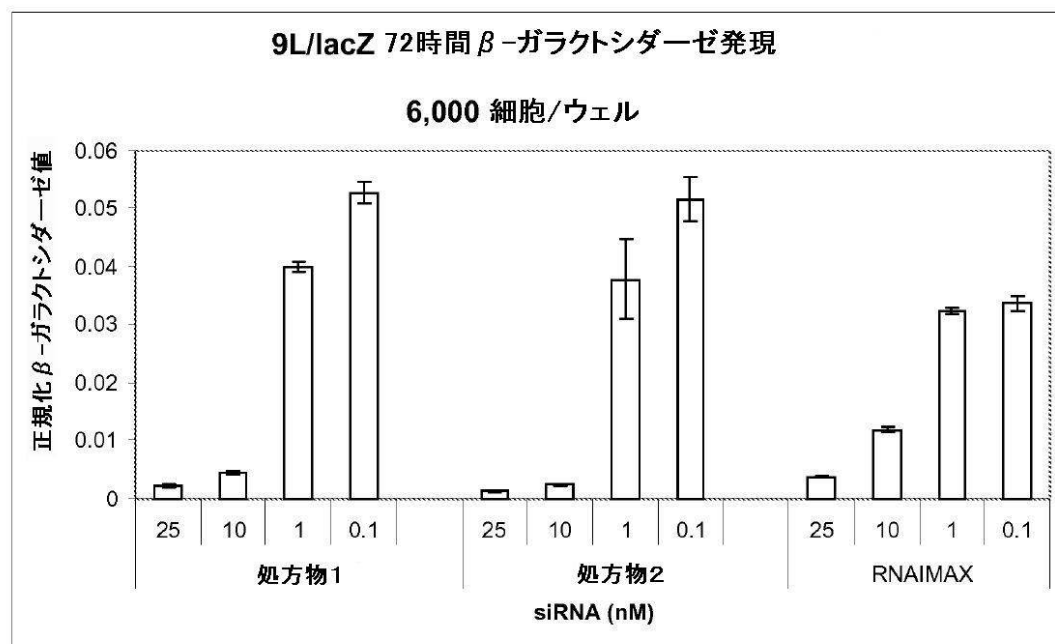
【図 3】

FIG. 3



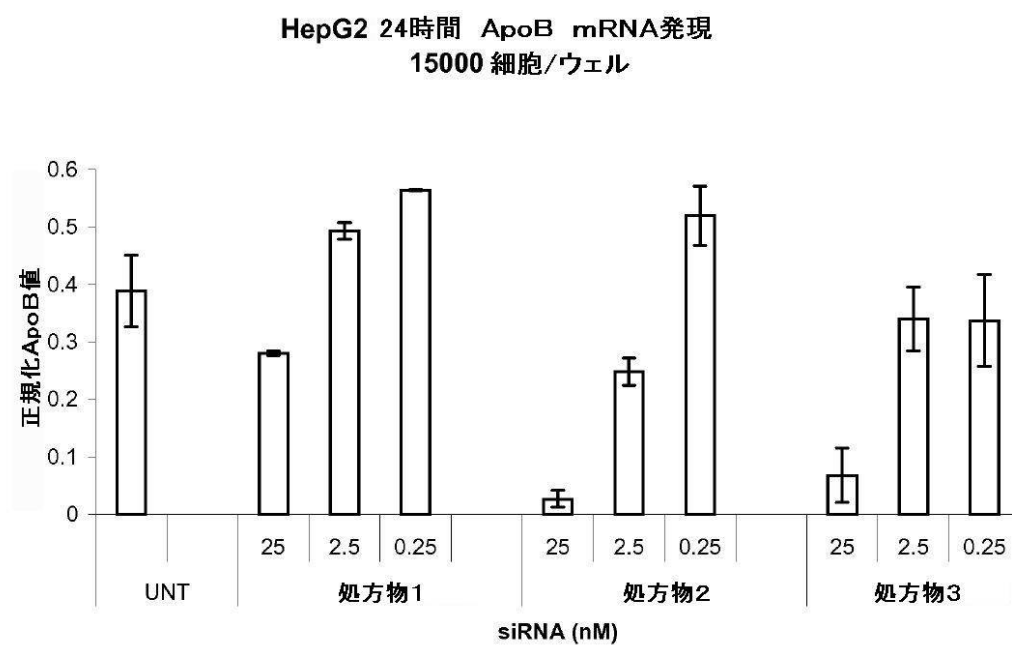
【図 4】

FIG. 4



【図 5】

FIG. 5



【配列表】

0005475643000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 47/18	(2006.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/22	(2006.01)	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 47/28	(2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/48	(2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 9/127	(2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 K 9/107	(2006.01)	A 6 1 K 9/107	
A 6 1 K 9/10	(2006.01)	A 6 1 K 9/10	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 19/08	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	
C 0 7 C 321/14	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 0 7 C 321/14	
C 1 2 N 15/113	(2010.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	G
		C 1 2 Q 1/68	A

- (31)優先権主張番号 60/953,667
 (32)優先日 平成19年8月2日(2007.8.2)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/972,590
 (32)優先日 平成19年9月14日(2007.9.14)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/972,653
 (32)優先日 平成19年9月14日(2007.9.14)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/022,571
 (32)優先日 平成20年1月22日(2008.1.22)
 (33)優先権主張国 米国(US)

- (72)発明者 クアイ, スティーブン シー.
 アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 7 2, ウッディンビル, エヌ. イー. ウッディンビル
 ーデュボール ロード 1 4 2 4 1, ピーエムビー 4 2 1
 (72)発明者 ヒューストン, マイケル イー.
 アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 7 4, サマミッシュ, 2 2 0 プレイス エヌイー 2
 8 1 8
 (72)発明者 ハービー, ピエロ
 アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 1 1, ボセル, ホール ロード 1 7 7 2 5 ナンバー
 1 0 5
 (72)発明者 アダミ, ロジャー シー.
 アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 2 9 6, スノーホーミッシュ, 4 3 アールディー ドライ
 ブ エス. イー. 1 4 3 2 6

- (72)発明者 ファム, リナータ
アメリカ合衆国 ワシントン 98028, ケンモア, エヌイー 193アールディー コ
ート 6233
- (72)発明者 プリーブ, マリー ジー.
アメリカ合衆国 ワシントン 98155, レイク フォレスト パーク, エヌイー 178
ティーエイチ ストリート 4663
- (72)発明者 フォスナフ, キャシー エル.
アメリカ合衆国 ワシントン 98072, ウッディンビル, 140ティーエイチ レーン
エヌイー 17917 ナンバー133
- (72)発明者 セス, シャグナ
アメリカ合衆国 ワシントン 98012, ボセル, 34ティーエイチ アベニュー エスイ
ー, 20032

審査官 目代 博茂

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2007/0010004 (US, A1)
国際公開第2004/074235 (WO, A1)
国際公開第99/033787 (WO, A1)
特表平10-507465 (JP, A)
米国特許出願公開第2003/0194445 (US, A1)
特表2004-501166 (JP, A)
特表2011-501742 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07C
CAplus/REGISTRY (STN)