

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-540101

(P2024-540101A)

(43)公表日 令和6年10月31日(2024.10.31)

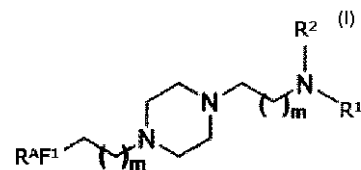
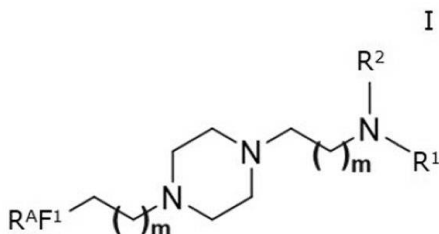
(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
C 0 7 D	295/13 (2006.01)	C 0 7 D	295/13	C S P 4 C 0 7 6
C 0 7 D	295/15 (2006.01)	C 0 7 D	295/15	
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51	
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/22	
A 6 1 K	47/14 (2017.01)	A 6 1 K	47/14	
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全85頁) 最終頁に続く		
(21)出願番号	特願2024-525401(P2024-525401)		(71)出願人	522488845
(86)(22)出願日	令和4年11月2日(2022.11.2)			ジフィウス エヌバイ
(85)翻訳文提出日	令和6年6月18日(2024.6.18)			ベルギー国 9 8 2 0 メレルベーケ ハ
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/080576			イデストラート 1 9
(87)国際公開番号	WO2023/078946		(74)代理人	100147485
(87)国際公開日	令和5年5月11日(2023.5.11)			弁理士 杉村 憲司
(31)優先権主張番号	21205899.4		(74)代理人	230118913
(32)優先日	令和3年11月2日(2021.11.2)			弁護士 杉村 光嗣
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		(74)代理人	100181847
	欧州特許庁(EP)			弁理士 大島 かおり
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		(72)発明者	ソフィー ヴァランボワ
				ベルギー国 8 0 2 0 オーストカンブ
				レーゲヴェーク 1 5 7 バス シー
			(72)発明者	アシクル ハック エイケイエム
				ベルギー国 8 0 2 0 オーストカンブ
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 オリゴヌクレオチド送達のための脂質ナノ粒子

(57)【要約】

本発明は、式 (I) :

【化1】

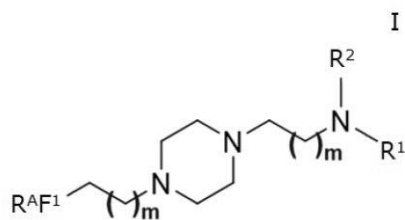


に記載のイオン化可能な脂質様化合物、または薬学的に許容されるその塩、互変異性体、もしくは立体異性体に関する。また、本発明は、式 I に記載のイオン化可能な脂質様化合物および 1 以上の RNA 分子を含む脂質ナノ粒子、並びに、このような脂質ナノ粒子を含む医薬組成物またはワクチンを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

【化 1】



10

式 (I) :

に記載の化合物であって、

各 m は、独立して 1、2、3、4、または 5 であり、

F^1 は、エステルまたはアミド官能基であり、

R^A は、分岐しているまたは分岐していない $C_4 - C_{30}$ アルキルであり、

R^1 は、 $-L^1N[L^2F^2R^B]_2$ または $-L^3F^3R^C$ であり、かつ、

R^2 は、 $-L^4F^4R^D$ であり、

ここで、

各 L^1 、 L^2 、 L^3 、および L^4 は、独立して、 $C_2 - C_{10}$ アルキレンであり、

20

各 F^2 、 F^3 、および F^4 は、独立して、エステルまたはアミド官能基であり、かつ、

各 R^B 、 R^C 、および R^D は、独立して、分岐している $C_4 - C_{30}$ アルキルである、

化合物、または、その薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体。

【請求項 2】

R^A が分岐している、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

R^1 が $-L^3F^3R^C$ である、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

F^1 がエステルであり、例えば $-F^1R^A$ が $-O-C(=O)-R^A$ の構造を有する、
請求項 1～3 のいずれかに記載の化合物。

30

【請求項 5】

F^2 、 F^3 、および F^4 がエステルであり、例えば $-F^2R^B$ 、 $-F^3R^C$ 、および $-F^4R^D$ が $-O-C(=O)-R$ の構造を有し、 R がそれぞれ R^B 、 R^C 、および R^D である、
請求項 1～4 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 6】

各 m が、1、2、または 3 であり、

例えば、各 m が 1 である、

請求項 1～5 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 7】

各 R^A 、 R^B 、 R^C 、および R^D が、ウンデカン - 5 - イル、トリデカン - 6 - イル、
ペンタデカン - 7 - イル、ヘプタデカン - 8 - イル、およびノナデカン - 9 - イルから独立して選択される、
請求項 1～6 のいずれかに記載の化合物。

40

【請求項 8】

各 R^A 、 R^B 、 R^C および R^D が、ウンデカン - 5 - イルである、請求項 1～7 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 9】

各 R^A 、 R^B 、 R^C および R^D がペンタデカン - 7 - イルである、請求項 1～7 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 10】

少なくとも 1 つの請求項 1～9 のいずれかに記載の化合物および 1 つ以上のオリゴヌク

50

レオチドを含む、脂質ナノ粒子（LNP）。

【請求項 11】

前記オリゴヌクレオチドが、RNA または DNA、好ましくは少なくとも 5000 nt の長さを有するオリゴヌクレオチド、例えば少なくとも 5000 nt の長さを有する RNA である、請求項 10 に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項 12】

前記脂質ナノ粒子が、
少なくとも 1 つの PEG または PEG 複合体、
少なくとも 1 つのステロール、並びに、
少なくとも 1 つのリン脂質、および／または、少なくとも 1 つの第 2 のイオン化可能な脂質、
をさらに含む、請求項 10 または 11 に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項 13】

前記式（I）に記載の化合物、または、その薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体が、12.5～60 mol% の濃度で前記 LNP 中に存在する、請求項 10～12 のいずれかに記載の脂質ナノ粒子。

【請求項 14】

前記脂質ナノ粒子が、少なくとも 1 つの第 2 のイオン化可能な脂質を含み、前記イオン化可能な脂質または脂質様化合物の全体濃度が 12.5～60 mol% である、請求項 10～13 のいずれかに記載の脂質ナノ粒子。

【請求項 15】

前記 LNP がリン脂質を含み、
前記リン脂質が前記 LNP 中に 0.5～35 mol% の濃度で存在し、
前記リン脂質が好ましくは DOPE である、請求項 10～14 のいずれかに記載の脂質ナノ粒子。

【請求項 16】

ステロールが 30～50 mol% の濃度で存在し、
前記ステロールは、好ましくはコレステロールである、請求項 10～15 のいずれかに記載の脂質ナノ粒子。

【請求項 17】

0.5～5 mol% の濃度の PEG 複合体を含み、
前記 PEG 複合体は、好ましくは DMG-PEG である、
請求項 10～16 のいずれかに記載の脂質ナノ粒子。

【請求項 18】

請求項 10～17 のいずれかに記載の 1 つ以上の脂質ナノ粒子、および、任意に、薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物またはワクチン。

【請求項 19】

疾患の治療および／または予防における使用のための、請求項 18 に記載の医薬組成物またはワクチン。

【請求項 20】

関心のある遺伝子をコードする RNA を含む、治療的使用のための医薬組成物の調製に使用するための、請求項 1～9 のいずれかに記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に自己増幅 RNA（saRNA）のような RNA の送達のために、オリゴヌクレオチドの送達のために使用することができる他の脂質成分と組み合わせた、これらの新規な脂質／リピドイド（lipidoid）を含む、新規な脂質および脂質ナノ粒子（LNP）に関する。本発明はまた、治療用製品およびそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

生体系において所望の応答を行うための核酸の送達に関連する多くの課題がある。covid-19の世界的大流行とその対応として開発されたワクチンは、核酸系予防ワクチンが膨大な可能性を秘めていることを示している。ワクチンとして、または、治療的な内容においても、使用されるmRNAやsaRNAは、しかしながら、プラズマ、間質、リンパ液中のヌクレアーゼ分解を受けやすいという問題に直面している。さらに、遊離RNAは、関連する翻訳機関が存在する細胞内コンパートメントへのアクセスを獲得する能力が限られている。

【0003】

中性脂質、コレステロール、PEG、PEG化脂質などの他の脂質成分とカチオン性脂質から形成された脂質ナノ粒子（LNP）は、血漿中のRNAの劣化を防止し、オリゴヌクレオチドの細胞取り込みを容易にするために使用されている。当技術分野において現在知られているLNPは、従来のmRNAまたはsiRNAの送達のために特異的に設計され、最適化される。一方、自己増幅RNA（saRNA）のようなより大きなRNA構築物の使用に焦点を当てた次世代オリゴヌクレオチドベースの治療薬が開発されている。SaRNAは、RNAが自己増幅を可能にする機構を備えているという利点を有し、それによって、治療におけるより低い濃度のRNAの使用を可能にする。saRNAは、典型的には長くて負に荷電した分子であるので、良好な送達系を必要とする。これらのLNPは、ヌクレアーゼの作用からオリゴヌクレオチドを保護し、負に荷電した細胞膜と相互作用することによってそれを細胞内に送達することができなければならない。

【0004】

LNPにおける負に荷電したRNAのカプセル化は、正に荷電したアミノ脂質との相互作用に大きく依存する。このようにしてLNPの脂質を選択することは、RNA分子の捕捉とエンドソーム脱出の促進するのに役立つので、非常に重要である。いくつかの研究が示しているように、永久的な正電荷をもつカチオン性脂質の中には、効率が悪く、毒性が強いと思われるものもあるため、他の脂質の使用が推奨される。本発明による脂質または脂質様化合物は、低pHでプロトン化されるが、生理学的pHでは比較的中性の表面電荷を示す。これには2つの利点がある。すなわち、生体液（例えば、アルブミン）中の荷電（マクロ）分子の大量の結合のような非特異的な脂質-タンパク質相互作用を防ぎ、エンドソームの酸性環境内での化合物のプロトン化によるRNAのエンドソーム脱出を促進する。酸性化により膜が破壊され、RNAがエンドソームから脱出することが示されている。従って、これらの化合物はRNAの効率的なカプセル化および送達に寄与する。

【0005】

LNPは、一般に、2つ以上のさらなる賦形剤：(i) LNP二重層の安定性を高め、膜融合を促進するステロール、(ii) 任意に、LNP二重層構造を強化し、エンドソーム脱出を助けるリン脂質、および(iii) LNP二重層に挿入し、LNP凝集を減少させ、立体障害によりタンパク質の非特異的結合を減少させ、免疫細胞による非特異的エンドサイトーシスを減少させるPEGコーティングを提供する、脂質-ポリエチレングリコール（PEG）複合体（コンジュゲート）、と共に処方される。

【0006】

US 9 439 968は、アルキルアミンのアクリレートへのコンジュゲート（共役）付加から調製されたリポイドを含むLNPの調製、製造および治療的使用のための組成物および方法を開示する。前記リポイドのいくつかは、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OR}^B$ 水分を含み、これにより、特定されたリポイド R^B のそれぞれは直鎖アルキルである。これらの脂質は、低分子干渉RNA構築物、すなわち短鎖RNAの送達のために設計された。

【0007】

Blakneyら（2019）は、saRNAに適したLNP製剤について論じている。それにもかかわらず、RNAのようなオリゴヌクレオチド、特にsaRNAまたは他の大きなRNA構築物の送達のための、他の改良されたイオン化可能な脂質および脂質ナノ粒子の必要性が依然として存在する。好ましくは、これらの脂質ナノ粒子は、最適な薬物：脂質比を提供し、

10

20

30

40

50

血清中の分解およびクリアランスから核酸を保護し、全身送達に適し、核酸の細胞内送達を提供する。さらに、これらの脂質-核酸粒子は、相容性が良好であり、適切な予防／治療インデックスを提供すべきであり、その結果、核酸の有効用量での対象投与／患者の治療は、患者に対する許容できない毒性および／またはリスクと関連しない。本発明は、これらおよび／または関連する利点を提供する。

【発明の概要】

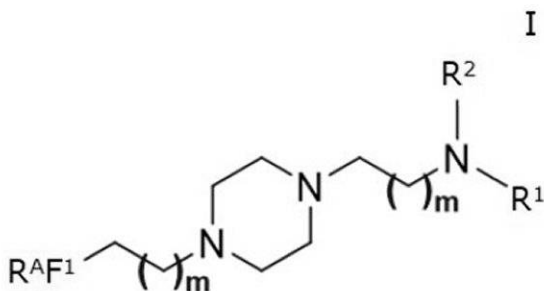
【0008】

本発明およびその実施形態は、上述した問題の1つまたは複数に対する解決策を提供するのに役立ち、所望の特性の1つまたは複数を満たす。この目的のために、本発明は、式(I)に記載のイオン化可能な脂質様化合物、またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体に関する。

10

【0009】

【化1】



20

ここで、 m 、 F^1 、 R^A 、 R^1 および R^2 は本明細書において定義されるとおりである。

【0010】

第2の態様では、本発明はまた、オリゴヌクレオチド、特にRNAを封入し、式Iによるイオン化可能な脂質の少なくとも1つまたはその薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体を含む脂質ナノ粒子に関する。

【0011】

30

さらなる態様において、ワクチンを含む医薬組成物は、第2の態様による少なくとも1つの核酸を有する少なくとも1つの脂質ナノ粒子を含むように提供される。前記医薬組成物またはワクチンは、感染症などの疾患を治療または予防するために使用することができる。そのような使用は、例えば、自己複製RNA分子の形成で、本明細書に記載されるように脂質ナノ粒子中にカプセル化または処方された目的の遺伝子をコードするRNA構築物の有効量を対象に投与すること、および／または本発明による組成物を使用することを含む。例えば、本発明は、対象における免疫応答を誘導するための抗原をコードする本発明のカプセル化自己複製RNA分子の使用、またはRNAベースのタンパク質置換療法におけるカプセル化RNAの使用を提供する。医薬組成物またはワクチンは、さらに、薬学的に許容される担体を含むことができる。

40

【0012】

別の態様では、本発明は、RNAなどのオリゴヌクレオチドの送達に適した化合物に関し、前記化合物は、第1の態様の実施形態のいずれかで定義された式(I)によるイオン化可能な脂質様化合物、またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体である。

【0013】

本発明の態様のさらなる実施形態は、詳細な説明および特許請求の範囲に提供される。

【0014】

定義

本明細書において使用される場合、以下の用語は、以下の意味を有する：

50

【0015】

本明細書で使用される「1つの(A)」、「1つの(a)」、および「前記(the)」は、文脈が明確に別段の指示をしない限り、単数および複数の参照の両方を意味する。一例として、「コンパートメント」は、1つ以上のコンパートメントを意味する。

【0016】

ここで使用される「約」は、パラメータ、量、時間的持続時間などの測定可能な値を意味し、これまで開示された発明で実行するのに適切である、 $+/-20\%$ 以下、好ましくは $+/-10\%$ 以下、より好ましくは $+/-5\%$ 以下、さらに好ましくは $+/-1\%$ 以下、さらにより好ましくは $+/-0.1\%$ 以下の、規定値からの変動を包含することを意味する。しかしながら、修飾語「約」が参照する値自体もまた、具体的に開示されていることを理解されたい。

10

【0017】

本明細書で使用される「含む(Comprise)」、「含んでいる(comprising)」、および「含む(comprises)」、および「から構成される(compri sed of)」は、「含む(include)」、「含んでいる(including)」、「含む(includes)」または「含有する(contain)」、「含有している(containing)」、「含有する(contains)」と同義であり、コンポーネントなど、その後に続くものの存在を指定する包括的またはオープンエンドの用語であり、当技術分野で知られている、または本明細書に開示されている、言及されていない追加の構成要素、特徴、要素、部材、ステップの存在を排除または除外しない。

20

【0018】

エンドポイント(端点)による数値範囲の記載には、記載された端点だけでなく、その範囲内に含まれるすべての数値および分数が含まれる。

【0019】

明細書中の「mol%」という表現は、特に定義しない限り、全体的な配合に基づくそれぞれの成分のモルの相対量を意味する。モルは、正確に $6.02214076 \times 10^{23}$ 粒子と定義され、これは原子、分子、イオン、または電子であってもよい。

【0020】

「1つ以上」または「少なくとも1つ」という用語は、部材のグループの1つ以上または少なくとも1つの部材のように、それ自体は明白であるが、さらなる例示により、用語は、特に、前記部材のいずれか1つ、または前記部材のいずれか2つ以上(例えば、前記部材の ≥ 3 、 ≥ 4 、 ≥ 5 、 ≥ 6 または ≥ 7 等)への言及を包含し、これらの部材のすべてまでを包含する。

30

【0021】

本明細書を通して「1つの実施形態」または「一実施形態」への言及は、本発明の少なくとも1つの実施形態に、本実施形態に関連して記載される特定の特徴または構造または特性が含まれることを意味する。従って、本明細書中の様々な場所における「一実施形態における」または「一実施形態における」というフレーズの外観は、必ずしも全てが同一実施形態を参照しているわけではないが、そうであってもよい。さらに、特定の特徴、構造または特性は、1つ以上の実施形態において、本開示から当業者には明らかなように、任意の適切な方法で組み合わせることができる。さらに、本明細書に記載されるいくつかの実施形態は、他の実施形態に含まれるが他に含まれないいくつかの特徴を含むが、異なる実施形態の特徴の組合せは、本発明の範囲内であることを意味し、当業者に理解されるように、異なる実施形態を形成する。例えば、以下の請求項において、請求項に記載された実施形態のいずれも、任意の組み合わせで使用することができる。

40

【0022】

別段の定義がない限り、技術用語および科学用語を含む、発明を開示する際に使用されるすべての用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解される意味を有する。さらなるガイダンスにより、本発明の教示をより良く理解するために、明細書で使用される用語の定義が含まれる。本明細書で使用される用語または定義は、本発明の理

50

解を助けるためにのみ提供される。

【0023】

用語「脂質」は、分枝脂肪酸または非分枝脂肪酸のエステルを含み、一般に水に難溶性であるが、多くの有機溶媒に可溶性であることを特徴とする有機化合物の群を意味するが、これらに限定されない。脂質は、通常、少なくとも3つのクラスに分けられる：(1) 脂肪および油並びにワックスを含む「単純な脂質」；(2) リン脂質または糖脂質を含む「複合脂質」；および(3) ステロイドのような「誘導脂質」。

【0024】

本発明の文脈において、ステロイドアルコールとしても知られる用語「ステロール」は、植物、動物および真菌に自然に存在する、またはいくつかの細菌によって産生され得るステロイドのサブグループである。

10

【0025】

用語「中性脂質」とは、選択されたpHにおいて非荷電または中性両性形態のいずれかで存在する多数の脂質種のいずれかをいう。生理学的pHにおいて、このような脂質には、ホスファチジルコリン、例えば、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC)、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (POPC)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)；ホスファチジルエタノールアミン、例えば、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DOPE)、スフィンゴミエリン (SM)、セラミド；ステロイド、例えば、ステロールおよびそれらの誘導体が含まれるがこれらに限定されない。中性脂質は、合成または天然由来であってもよい。

20

【0026】

用語「荷電脂質」は、正に荷電した形態、すなわち「カチオン性脂質」または負に荷電した形態、すなわち「アニオン性脂質」のいずれかで、pH 3からpH 9までのすべてのpH値で存在する、多数の脂質種のいずれかを意味する。荷電脂質は、合成または天然由来であってもよい。荷電脂質の例には、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジイノシトール、ステロールヘミスクシネート、ジアルキルトリメチルアンモニウムプロパン（例えば、DOTAP、DOTMA）、ジアルキルジメチルアミノプロパン、エチルホスホコリン、ジメチルアミノエタンカルバモイルステロール（例えば、DC-Chol）が含まれる。

30

【0027】

本明細書において使用される用語「イオン化可能」は、例えば、「イオン化可能な脂質」、「イオン化可能な脂質様構造」または「イオン化可能なアミノ脂質」または「イオン化可能な化合物」は、pHに依存して化合物が中性または荷電しているという特性を意味する。典型的には、本発明の文脈において、イオン化可能な脂質は、イオン化可能なカチオン性脂質であり、ある値以下のpHに曝露されたときにのみプロトン化される、1または複数の第1級、第2級または第3級アミノ基を含む。式Iによる単一のイオン化可能なアミノ脂質内の異なる窒素は、異なるpHでプロトン化され得る（すなわち、異なる窒素は異なるpKaを有し得る）。このようなイオン化可能なカチオン性脂質中のイオン化可能な窒素の数が多いことに依存して、このような脂質は、RNAを錯体形成するために利用可能なより高いカチオン電荷を有することができる。

40

【0028】

用語「脂質ナノ粒子」は、ナノメートル（例えば、1~1000nm）のオーダーの少なくとも1つの寸法を有する粒子を意味し、分子間力によって互いに物理的に結合した複数の脂質分子を含む。脂質ナノ粒子は、例えば、マイクロスフェア（微小球）（単層および多層ベシクル、例えばリポソームを含む）、エマルジョン中の分散相、ミセルまたは懸濁液中の内部相であり得る。活性剤または治療剤、例えば核酸は、脂質ナノ粒子の脂質部分、または脂質ナノ粒子の脂質部分の一部または全部によって包まれた水性スペースに封

50

入され、それによって、宿主生物または細胞のメカニズム、例えば有害な免疫反応によって誘導される酵素的分解または他の望ましくない効果からそれを保護する。

【0029】

本明細書で使用される「脂質カプセル化」とは、完全なカプセル化または部分的なカプセル化を伴って、活性剤または治療剤、例えば核酸（例えば、mRNA）を提供する脂質ナノ粒子を指し、核酸はナノ粒子内に完全に組み込まれているか、または（部分的に）ナノ粒子表面と会合していることとしてもよい。一実施形態によると、核酸（例えば、saRNAまたはmRNA）は、脂質ナノ粒子中に完全にカプセル化される。

【0030】

用語「オリゴヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」は、本明細書中で使用される場合、少なくとも2つのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを一本鎖または二本鎖形成で含有するポリマーを指し、DNA、RNA、およびそれらのハイブリッドを含む。DNAは、アンチセンス分子、プラスミドDNA、cDNA、PCR産物、またはベクターの形態であり得る。RNAは、自己増幅RNA（saRNA）、小型ヘアピンRNA（shRNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、アンチセンスRNA、miRNA、micRNA、多価RNA、ダイサー基質RNAまたはウイルスRNA（vRNA）、ガイドRNA（gRNA）、およびそれらの組合せの形態であり得る。核酸には、既知のヌクレオチド類似体または修飾された骨格残基または結合を含有する核酸が含まれ、これらは、合成、天然に存在する、および非天然由来であり、参照核酸と同様の結合特性を有する。このような類似体の実施例としては、ホスホロチオエート、ホスホラミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2'-O-メチルリボヌクレオチド、およびペプチド核酸（PNA）が挙げられるが、これらに限定されない。特に限定されない限り、用語は、参照核酸と同様の結合特性を有する天然ヌクレオチドの既知の類似体を含む核酸を包含する。特に明記しない限り、特定の核酸配列はまた、その保存的に修飾された変異体（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オーソログ、一塩基多型、および相補的配列、並びに明示的に示された配列も含み得る。具体的には、縮重コドン置換は、1以上の選択された（または全ての）コドンの第3の位置が、混合塩基および／またはデオキシイノシン残渣で置換される配列を生成することによって達成され得る。「ヌクレオチド」は、糖デオキシリボース（DNA）またはリボース（RNA）、塩基、およびリン酸基を含む。ヌクレオチドはリン酸基を介して互いに結合している。「塩基」には、さらに、天然化合物であるアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン、および天然アナログを含むプリンおよびピリミジン、並びにプリンおよびピリミジンの合成誘導体が含まれ、これらには、アミン、アルコール、チオール、カルボキシレート、およびアルキルハライドなどの新規の反応性を配置する修飾が含まれるが、これらに限定されない。

【0031】

本明細書中で用いる「緩衝剤」には、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、塩化アンモニウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、クエン酸カルシウム、グルビオン酸カルシウム、グルセプト酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、d-グルコン酸、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、ラクトビオン酸カルシウム、プロパン酸、レブリン酸カルシウム、ペンタン酸、第二リン酸カルシウム、リン酸、第三リン酸カルシウム、水酸化リン酸カルシウム、酢酸カリウム、塩化カリウム、グルコン酸カリウム、カリウム混合物、第二リン酸カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸カリウム混合物、酢酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム、一塩基性リン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム混合物、トロメタミン、アミノスルホン酸緩衝液（例えば、HEPES）、水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウム、アルギン酸、パイロジェンフリー水、等張食塩水、リンゲル液、エチルアルコール、および／またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【0032】

本明細書中で使用される用語「N/P比」（またはN:P比）は、RNA中の錯化脂質／リン酸基中の窒素原子のモル比である。この比率は、イオン化可能なアミノ脂質のイオ

10

20

30

40

50

ン化されたアミノ（N⁺）基のカチオン電荷と核酸の骨格のリン酸（PO₄⁻）基のアニオンイオン電荷との間の相互作用を表し、イオン化可能なアミノ-脂質とのRNAの複合体形成の基礎となる。式Iの脂質のようなイオン化上記脂質を含有する脂質ナノ粒子のN/P比を決定するために、LNPが処方されるpHでの正に荷電した窒素原子の数が考慮される。脂質/核酸複合体（例えば、脂質/RNA）のN/P比は、その正味表面電荷、脂質/核酸複合体を含むLNPのサイズおよび安定性のような他の特性に潜在的に影響し得る。

【0033】

「薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤」には、ヒトまたは家畜での使用が許容されるものとしてEMAおよび／または米国食品医薬品局のような行政機関によって承認された、補助剤、担体、賦形剤、滑剤、甘味剤、希釈剤、防腐剤、染料／着色剤、香料、界面活性剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、安定剤、等張剤、溶剤、または乳化剤が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0034】

「薬学的に許容される塩」には、酸および塩基付加塩の両方が含まれる。

【0035】

「医薬組成物」とは、本発明の化合物および生物学的に活性のある化合物を哺乳動物、例えば、ヒトに送達するために当該技術分野で一般に受け入れられている媒体の配合物を用いる。そのような媒体は、そのための全ての薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む。

【0036】

「有効な量」または「治療上有効な量」とは、本発明の化合物またはそれを含む脂質ナノ粒子の量を指し、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトに投与するとき、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて治療を行うのに十分な量である。「治療上有効な量」を構成する本発明の脂質ナノ粒子の量は、化合物、その症状および重症度、投与方法、および治療される動物の年齢に依存して変化するが、自己の知識および本開示を考慮して当業者によって日常的に決定することができる。

20

【0037】

本明細書で使用される用語「自己複製」および「自己増幅」は、互換的に使用され、該分子の自己複製または自己増幅を可能にするそれらの配列特異的シグナルまたは特徴的配列（signature sequence）内に含むRNAなどの分子に関連する。

30

【0038】

本明細書で使用される「治療すること」または「治療」は、対象の疾患または疾病を有する哺乳動物、好ましくは、ヒトにおける、対象の疾患または疾病の治療を包含し、

（i）特に、哺乳動物が疾患または疾病にかかりやすいが、まだその疾患または疾病を有すると診断されていない場合、哺乳動物の疾患または疾病の発生を防止し、またはその発生確率もしくは（症状の）重症度を減少させること、

（ii）疾患または疾病の抑制、すなわちその発症の減速や停止、

（iii）疾患または疾病を緩和すること、すなわち、疾患または疾病の退行を引き起こすこと、

（iv）疾患または疾病に起因する症状を緩和すること、例えば、基礎疾患または疾病に対処することなく疼痛を緩和すること、を含む。従って、ワクチン接種のような予防的処置が含まれ、それによって、病原体、例えばウイルスまたは細菌による感染を介する疾患は、発生率および／または重症度において予防または低減される。本明細書中で使用される場合、用語「疾患」および「疾病」は、互換的に使用されてもよく、または特定の疾患または疾病が既知の原因物質を有していなくてもよく（そのため、病因はまだ解明されておらず）、したがって、それは、まだ疾患として認識されていないが、好ましくない症状または症候群としてのみ認識され、ここで、多かれ少なかれ特定の症状のセットが、臨床家によって同定されている。

40

【0039】

「立体異性体」とは、同じ結合によって結合されているが、互換性のない異なる三次元

50

構造を有する同じ原子からなる化合物をいう。本発明の実施形態は、種々の立体異性体およびそれらの混合物を意図し、「エナンチオマー（鏡像異性体）」を含み、これは、分子が互いの重ね合わせできない鏡像である2つの立体異性体を指す。

【0040】

「互変異性体（tautomer）」は、分子の1つの原子から同じ分子の別の原子へのプロトンシフトを指す。本発明の実施形態は、いずれかの前記化合物の互変異性体を含む。

【0041】

「アルキル」とは、炭素原子と水素原子のみからなる非分枝（直鎖またはリニアとも呼ばれる）または分枝炭化水素鎖ラジカルを指し、これは、飽和または不飽和（すなわち、1つまたは複数の二重結合および／または三重結合を含む）であり、例えば1～4個の炭素原子（C1～C4アルキル）、4～20の炭素原子（C4～C20アルキル）、6～16個の炭素原子（C6～C16アルキル）、6～9個の炭素原子（C6～C9アルキル）、11～20個の炭素原子（C11～C20アルキル）、1～12個の炭素原子（C1～C12アルキル）、2～6個の炭素原子（C2～C6アルキル）または1～6個の炭素原子（C1～C6アルキル）を有し、これは、メチル、エチル、n-プロピル、1-メチルエチル（イソプロピル）、n-ブチル、n-ペンチル、1,1-ジメチルエチル（t-ブチル）、3-メチルヘキシル、2-メチルヘキシル、エテニル、プロパ-1-エニル、ブト-1-エニル、ペンタ-1-エニル、ペンタ-1,4-ジエニル、エチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニルなどの単結合によって分子の残りに結合される。明細書に特に明記しない限り、アルキル基は任意に置換されている。

【0042】

「分岐アルキル」とは、当該技術分野においてその通常の意味を与えられ、典型的には、他の点では1つ以上のアルキル置換基を有する直鎖アルキル基を指す。したがって、このようなアルキル基は、第二級炭素ラジカル（第二級炭素ラジカルは、2つの他の炭素原子に結合した炭素ラジカルである）、第三級炭素（第三級炭素は、3つの他の炭素原子に結合した炭素原子である）、または第四級炭素（第四級炭素は、4つの他の炭素原子に結合した炭素原子である）を含み得る。第二級炭素ラジカルを有する分岐アルキル鎖において、分子の残りへのアルキル鎖の結合点は、1つの他の炭素原子のみに共有結合される炭素原子を介さない。本明細書で用いる分岐アルキルは、例えば、4から30個の炭素原子（C4～C30アルキル）を有することができ、ここで、残りの分子との結合点は、第2（2番目の炭素原子）、第3、第4、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第15、第13、第14、または、第15炭素原子を介して行われ、例えば、ヘプタデカン-8-イルである。分枝鎖アルキルは、例えば、3つの他の炭素原子に結合した炭素原子を含む、4～30個の炭素原子（C4～C30アルキル）を有することができる。分枝鎖アルキルは、例えば、4個の他の炭素原子に結合した炭素原子を含む、4～30個の炭素原子（C4～C30アルキル）を有することができる。例えば、3,5,5-トリメチルヘキシルフェニルは、3つのメチル分岐（すなわち、1つの第三級および1つの第四級炭素）を有するアルキル基（ヘキシル）であり、したがってフェニル基に結合した分枝アルキルである。特に断らない限り、分岐アルキルはそのすべての異性体を含む。

【0043】

「アルキレン」または「アルキレン鎖」とは、飽和または不飽和（すなわち、1つまたは複数の二重結合および／または三重結合を含む）であり、例えば、1～24個の炭素原子（C1-C24アルキレン）1～15個の炭素原子（C1-C15アルキレン）、1～12個の炭素原子（C1-C12アルキレン）、1～8個の炭素原子（C1-C8アルキレン）、2～6個の炭素原子（C2～C6アルキレン）、2～4個の炭素原子（C2-C4アルキレン）、1～2個の炭素原子（C1-C2アルキレン）を有する、例えば、メチレン、エチレン、プロピレン、n-ブチレン、エテニレン、プロペニレン、n-ブテニレン、プロピニレン、n-ブチニレンなどの、分子の残りの部分を炭素と水素のみからなるラジカル基に連結する非分岐または分岐の二価炭化水素鎖を指す。アルキレン鎖の、分子の残りの部分およびラジカル基への結合点は、鎖内の1つの炭素または任意の2つの炭

素を介することができる。明細書中に特に明記しない限り、アルキレン鎖は、任意に置換されてもよい。

【0044】

本明細書において使用される用語「置換」は、少なくとも1つの水素原子（例えば、1、2、3またはすべての水素原子）が、以下に限定されるものではないが、ハロゲン原子、例えば、F、Cl、Br、またはI；オキシ基（=O）；ヒドロキシル基（-OH）；C1-C12アルキル基；シクロアルキル基；-（C=O）OR'；-O（C=O）R'；-C（=O）R'；-OR'または；-S（O）xR'；-S-SR'；-C（=O）SR'；-SC（=O）R'；-NR'R'；-NR'C（=O）R'；-C（=O）R'；-C（=O）NR'R'；-NR'C（=O）NR'R'；-OC（=O）NR'R'；-NR'C（=O）OR'；-NR'S（O）xNR'R'；-NR'S（O）xR'；および-S（O）xNR'R'、式中、R'は、それぞれ独立して、H、C1-C20アルキルまたはシクロアルキルであり、xは0、1、または2である、上記の基のいずれか（例えば、アルキル、アルキレン、またはヘテロシクリル）を意味する。

【0045】

エステルまたはアミド官能基は、本明細書では、-C（=O）O-または-O C（=O）-または-NHC（=O）-または-C（=O）NH-と定義される。請求項1において使用されるように、エステルまたはアミド官能基は、

-C（=O）OR^Aもしくは-O C（=O）R^Aもしくは-NHC（=O）R^Aもしくは-C（=O）NHR^Aに従って、R^A基の隣に、または、

-C（=O）OR^Bもしくは-O C（=O）R^Bもしくは-NHC（=O）R^Bもしくは-C（=O）NHR^Bに従って、R^B基の隣に、または、

-C（=O）OR^Cもしくは-O C（=O）R^Cもしくは-NHC（=O）R^Cもしくは-C（=O）NHR^Cに従って、R^C基の隣に、または、

-C（=O）OR^Dまたは-O C（=O）R^Dまたは-NHC（=O）R^Dまたは-C（=O）NHR^Dに従って、R^D基の隣に、配置できる。

20

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】図1は、本発明の例示的な化合物を使用してマウスに投与されたsaRNAをコードするルシフェラーゼの経時的なインビボ発現（三角グラフ）と、ネガティブコントロール（円グラフ）、C12~200（四角グラフ）、比較化合物C1（菱形グラフ）：（A）化合物8~27、（B）化合物8~41との比較を示す。

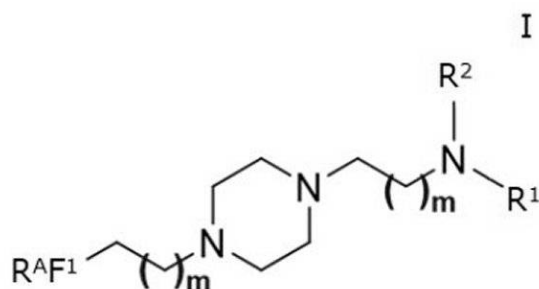
30

【発明を実施するための形態】

【0047】

第1の態様において、本発明は、式（I）：

【化2】



40

に記載の化合物であって、

各mは、独立して1、2、3、4、または5であり、

F¹は、エステルまたはアミド官能基であり、

50

R^A は、分岐しているまたは分岐していない $C_4 - C_{30}$ アルキルであり、

R^1 は、 $-L^1 N [L^2 F^2 R^B]_2$ または $-L^3 F^3 R^C$ であり、かつ、

R^2 は、 $-L^4 F^4 R^D$ であり、

ここで、

各 L^1 、 L^2 、 L^3 、および L^4 は、独立して、 $C_2 - C_{10}$ アルキレンであり、

各 F^2 、 F^3 、および F^4 は、独立して、エステルまたはアミド官能基であり、

各 R^B 、 R^C 、および R^D は、独立して、分岐している $C_4 - C_{30}$ アルキルである、イオン化可能な脂質様化合物、または薬学的に許容されるその塩、互変異性体、もしくは立体異性体に関する。

【0048】

10

式 I に記載の化合物は、他の化合物の中でも、分岐した脂質部分と組み合わせた多数のイオン化高窒素によって特徴付けられ、脂質ナノ粒子、特に自己増幅 RNA 構築物のような大きな RNA 構築物（例えば、5000 nt 以上を有する）における RNA 分子の効率的なカプセル化を可能にし、前記脂質ナノ粒子は、上記 RNA 貨物を細胞に送達するのに熟練していることが見出された。

【0049】

一実施形態では、式 (I) によるイオン化可能な脂質様化合物またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体は、少なくとも 1 つのアミド官能基を含む。一実施形態では、式 (I) によるイオン化可能な脂質様化合物またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体は、少なくとも 2 つのアミド官能基を含む。一実施形態では、式 (I) によるイオン化可能な脂質様化合物またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体は、少なくとも 3 つのアミド官能基を含む。一実施形態では、式 (I) によるイオン化可能な脂質様化合物またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体は、少なくとも 4 つのアミド官能基を含む。

20

【0050】

一実施形態によると、式 (I) に記載のイオン化可能な脂質様化合物またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体は、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つのエステル官能基 $-CH_2 - C(=O) - O - R$ または $-CH_2 - O - C(=O) - R$ を含み、ここで R は R^A 、 R^B 、 R^C および R^D アルキル鎖である。一実施形態では、式 (I) によるイオン化可能な脂質様化合物またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体は、少なくとも 3 つのエステル官能基を含む。一実施形態では、式 (I) によるイオン化可能な脂質様化合物またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体は、4 つのエステル官能基を含む。一実施形態では、 F^2 、 F^3 および F^4 は、エステルである。さらなる実施形態において、 $F^2 R^B$ 、 $F^3 R^C$ 、 $F^4 R^D$ は式 $-O - C(=O) - R$ に従い、 R はそれぞれ R^B 、 R^C および R^D を示す。一実施形態では、 $-F^1 R^A$ 、 $-F^2 R^B$ 、 $-F^3 R^C$ および $-F^4 R^D$ のそれぞれは、それぞれ、 $-R^A$ 、 $-R^B$ 、 $-R^C$ および $-R^D$ である $-O - C(=O) - R$ に従うエステルである。

30

【0051】

一実施形態では、それぞれの分岐または非分岐アルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、 $C_8 - C_{30}$ アルキル鎖である。一実施形態では、それぞれの分岐または非分岐アルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、 $C_8 - C_{23}$ アルキル鎖である。一実施形態では、それぞれの分岐または非分岐アルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、 $C_8 - C_{20}$ アルキル鎖である。一実施形態では、それぞれの分岐または非分岐アルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、 $C_{11} - C_{30}$ アルキル鎖である。一実施形態では、それぞれの分岐または非分岐アルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、 $C_{11} - C_{23}$ アルキル鎖である。一実施形態では、それぞれの分岐または非分岐アルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、 $C_{11} - C_{20}$ アルキル鎖である。

40

【0052】

一実施形態では、各 R^B 、 R^C および R^D は分岐したアルキルである。さらなる実施形態では、各 R^A 、 R^B 、 R^C および R^D は分岐したアルキルである。一実施形態において、各分岐

50

したアルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、C8 - C30アルキル鎖である。一実施形態において、各分岐したアルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、C8 - C23アルキル鎖である。一実施形態において、各分岐したアルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、C8 - C20アルキル鎖である。一実施形態において、各分岐したアルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、C11 - C30アルキル鎖である。一実施形態において、各分岐したアルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、C11 - C23アルキル鎖である。一実施形態において、各分岐したアルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、C11 - C20アルキル鎖である。

【0053】

一実施形態では、各 R^A 、 R^B 、 R^C および R^D は、非置換である

10

【0054】

一実施形態では、各分岐アルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、次のものから独立して選択される：ヘンイコサン (henicosan) -2 - イル、ドコサン (docosan) -2 - イル、トリコサン (tricosan) -2 - イル、テトラコサン (tetracosan) -2 - イル、ペンタコサン (pentacosan) -2 - イル、ヘキサコサン (hexacosan) -2 - イル、ヘプタコサン (heptacosan) -2 - イル、オクタコサン (octacosan) -2 - イル、ノナコサン (nonacosan) -2 - イル、トリアコンタン (triacontan) -2 - イル、ヘンイコサン -3 - イル、ドコサン -3 - イル、トリコサン -3 - イル、テトラコサン -3 - イル、ペンタコサン -3 - イル、ヘキサコサン -3 - イル、ヘプタコサン -3 - イル、オクタコサン -3 - イル、ノナコサン -3 - イル、トリアコンタン -3 - イル、ヘンイコサン -4 - イル、ドコサン -4 - イル、トリコサン -4 - イル、テトラコサン -4 - イル、ペンタコサン -4 - イル、ヘキサコサン -4 - イル、ヘプタコサン -4 - イル、オクタコサン -4 - イル、ノナコサン -4 - イル、トリアコンタン -4 - イル、ヘンイコサン -5 - イル、ドコサン -5 - イル、トリコサン -5 - イル、テトラコサン -5 - イル、ペンタコサン -5 - イル、ヘキサコサン -5 - イル、ヘプタコサン -5 - イル、オクタコサン -5 - イル、ノナコサン -5 - イル、トリアコンタン -5 - イル、ヘンイコサン -6 - イル、ドコサン -6 - イル、トリコサン -6 - イル、テトラコサン -6 - イル、ペンタコサン -6 - イル、ヘキサコサン -6 - イル、ヘプタコサン -6 - イル、オクタコサン -6 - イル、ノナコサン -6 - イル、トリアコンタン -6 - イル、ヘンイコサン -7 - イル、ドコサン -7 - イル、トリコサン -7 - イル、テトラコサン -7 - イル、ペンタコサン -7 - イル、ヘキサコサン -7 - イル、ヘプタコサン -7 - イル、オクタコサン -7 - イル、ノナコサン -7 - イル、トリアコンタン -7 - イル、ヘンイコサン -8 - イル、ドコサン -8 - イル、トリコサン -8 - イル、テトラコサン -8 - イル、ペンタコサン -8 - イル、ヘキサコサン -8 - イル、ヘプタコサン -8 - イル、オクタコサン -8 - イル、ノナコサン -8 - イル、トリアコンタン -8 - イル、ヘンイコサン -9 - イル、ドコサン -9 - イル、トリコサン -9 - イル、テトラコサン -9 - イル、ペンタコサン -9 - イル、ヘキサコサン -9 - イル、ヘプタコサン -9 - イル、オクタコサン -9 - イル、ノナコサン -9 - イル、トリアコンタン -9 - イル、ヘンイコサン -10 - イル、ドコサン -10 - イル、トリコサン -10 - イル、テトラコサン -10 - イル、ペンタコサン -10 - イル、ヘキサコサン -10 - イル、ヘプタコサン -10 - イル、オクタコサン -10 - イル、ノナコサン -10 - イル、トリアコンタン -10 - イル、ドコサン -11 - イル、トリコサン -11 - イル、テトラコサン -11 - イル、ペンタコサン -11 - イル、ヘキサコサン -11 - イル、ヘプタコサン -11 - イル、オクタコサン -11 - イル、ノナコサン -11 - イル、トリアコンタン -11 - イル、テトラコサン -12 - イル、ペンタコサン -12 - イル、ヘキサコサン -12 - イル、ヘプタコサン -12 - イル、オクタコサン -12 - イル、ノナコサン -12 - イル、トリアコンタン -12 - イル、ヘキサコサン -13 - イル、ヘプタコサン -13 - イル、オクタコサン -13 - イル、ノナコサン -13 - イル、トリアコンタン -13 - イル、オクタコサン -14 - イル、ノナコサン -14 - イル、トリアコンタン -14 - イル、トリアコンタン -15 - イル、ブタン (butan) -2 - イル、ペンタン (pentan) -2 - イル、ヘキサン (hexan) -2 - イル、ヘプタン (heptan) -2 - イル、オクタン (octan) -2 - イル、ノナン (nonan) -2 - イル、デカン (decan) -2 - イル、ヘキサン -3 - イル、ヘプタン -3 - イル、オクタン -3 - イル、ノナン -3 - イル、デカン -3 - イル、

20

30

40

50

オクタン-4-イル、ノナン-4-イル、デカン-4-イル、デカン-5-イル、アンデカン (undecan) -2-イル、ドデカン (dodecan) -2-イル、トリデカン (tridecan) -2-イル、テトラデカン (tetradecan) -2-イル、ペンタデカン (pentadecan) -2-イル、ヘキサデカン (hexadecan) -2-イル、ヘプタデカン (heptadecan) -2-イル、オクタデカン (octadecan) -2-イル、ノナデカン (nonadecan) -2-イル、エイコサン (eicosan) -2-イル、アンデカン-3-イル、ドデカン-3-イル、トリデカン-3-イル、テトラデカン-3-イル、ペンタデカン-3-イル、ヘキサデカン-3-イル、ヘプタデカン-3-イル、オクタデカン-3-イル、ノナデカン-3-イル、エイコサン-3-イル、アンデカン-4-イル、ドデカン-4-イル、トリデカン-4-イル、テトラデカン-4-イル、ペンタデカン-4-イル、ヘキサデカン-4-イル、ヘプタデカン-4-イル、オクタデカン-4-イル、ノナデカン-4-イル、エイコサン-4-イル、アンデカン-5-イル、ドデカン-5-イル、トリデカン-5-イル、テトラデカン-5-イル、ペンタデカン-5-イル、ヘキサデカン-5-イル、ヘプタデカン-5-イル、オクタデカン-5-イル、ノナデカン-5-イル、エイコサン-5-イル、ドデカン-6-イル、トリデカン-6-イル、テトラデカン-6-イル、ペンタデカン-6-イル、ヘキサデカン-6-イル、ヘプタデカン-6-イル、オクタデカン-6-イル、ノナデカン-6-イル、エイコサン-6-イル、テトラデカン-7-イル、ペンタデカン-7-イル、ヘキサデカン-7-イル、ヘプタデカン-7-イル、オクタデカン-7-イル、ノナデカン-7-イル、エイコサン-7-イル、ヘキサデカン-8-イル、ヘプタデカン-8-イル、オクタデカン-8-イル、ノナデカン-8-イル、エイコサン-8-イル、オクタデカン-9-イル、ノナデカン-9-イル、および、エイコサン-9-イル。一実施形態では、C4-C30アルキル鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) の分子の残りへの結合点は、アルキル鎖内の第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14または第15の炭素原子を介してよい。一実施形態によると、脂質ナノ粒子は、式(I)に記載の少なくとも1つのイオン化可能な脂質様構造、またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体を含み、各 R^A 、 R^B 、 R^C および R^D は、独立して、ウンデカン-5-イル、トリデカン-6-イル、ペンタデカン-7-イル、ヘプタデカン-8-イル、およびノナデカン-9-イルから選択される。一実施形態では、各分岐アルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、ヘプタデカン-8-イルおよびノナデカン-9-イルから選択される。一実施形態では、各 R^A 、 R^B 、 R^C および R^D は、ペンタデカン-7-イルである。一実施形態によると、アルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、1つ以上のアルキル基で置換される。一実施形態では、アルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、1つまたは複数のメチル基またはエチル基で置換される。一実施形態では、アルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、プロピル、ブチルまたはペンチルのいずれかのアイソマーで置換される。一実施形態では、アルキル側鎖 (R^A 、 R^B 、 R^C および R^D) は、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、またはノニルのいずれかのアイソマーで置換される。これらのアルキル鎖は、大きな無極性 (apolar) ゾーンと、大きなオリゴヌクレオチドのカプセル化のための脂質様化合物の良好な球状位置を提供する。

【0055】

一実施形態では、各 R^A 、 R^B 、 R^C および R^D は、ウンデカン-5-イル、トリデカン-6-イル、ペンタデカン-7-イル、ヘプタデカン-8-イル、およびノナデカン-9-イルから独立して選択される。一実施形態では、各 R^A 、 R^B 、 R^C および R^D は、ウンデカン-5-イル、トリデカン-6-イル、ペンタデカン-7-イル、ヘプタデカン-8-イルおよびノナデカン-9-イルから選択される。一実施形態では、各 R^A 、 R^B 、 R^C および R^D は、ペンタデカン-7-イルである。一実施形態では、各 R^A 、 R^B 、 R^C および R^D はウンデカン-5-イルである。

【0056】

一実施形態では、各 L^1 、 L^2 、 L^3 および L^4 は、独立して、C2-C8アルキレンである。一実施形態では、各 L^1 、 L^2 、 L^3 および L^4 は、独立して、C2-C6アルキレンである。一実施形態では、各 L^1 、 L^2 、 L^3 および L^4 は、独立して、以下から選択されるものである：エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチ

レン、ノニレンおよびデシレン。一実施形態によると、 L^1 、 L^2 、 L^3 および／または L^4 は、シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、シクロヘキサン、シクロヘプタンまたはシクロオクタンを含む。一実施形態では、 L^1 、 L^2 、 L^3 および／または L^4 は、F、Cl、Br、またはIのようなハロゲン原子、オキソ基 ($=O$)；水酸基 ($-OH$)； $C1-C8$ アルキル基；シクロアルキル基； $-(C=O)OR'$ ； $-O(C=O)R'$ ； $-C(=O)R'$ ； $-OR'$ ； $-S(O)_xR'$ ； $-S-SR'$ ； $-C(=O)SR'$ ； $-SC(=O)R'$ ； $-NR'R'$ ； $-NR'C(=O)R'$ ； $-C(=O)R'$ ； $-C(=O)NR'R'$ ； $-NR'C(=O)NR'R'$ ； $-OC(=O)NR'R'$ ； $-NR'C(=O)OR'$ ； $-NR'S(O)_xNR'R'$ ； $-NR'S(Q)R'$ ；および／または $-S(O)_xNR'R'$ である。

10

【0057】

一実施形態によると、 L^1 はエチレンであり、 L^2 、 L^3 および L^4 はブチレンである。一実施形態では、 L^1 はエチレンであり、 L^2 、 L^3 および L^4 はヘキシレンである。

【0058】

一実施形態では、各 L^1 、 L^2 、 L^3 および／または L^4 は、非置換である。

【0059】

本発明の実施形態による $-F^1R^A$ の構成例は、 $-C(=O)NH-R^A$ 、 $-NHC(=O)-R^A$ 、 $-C(=O)O-R^A$ 、 $-OC(=O)-R^A$ であり、 R^A は、ウンデカン-5-イル、トリデカン-6-イル、ペンタデカン-7-イル、ヘプタデカン-8-イル、またはノナデカン-9-イルである。一実施形態では、 $-F^1R^A$ は $-OC(=O)-R^A$ である。さらなる実施形態では、 R^A はウンデカン-5-イルである。

20

【0060】

一実施形態では、 R^1 は $-L^3F^2R^B$ である。

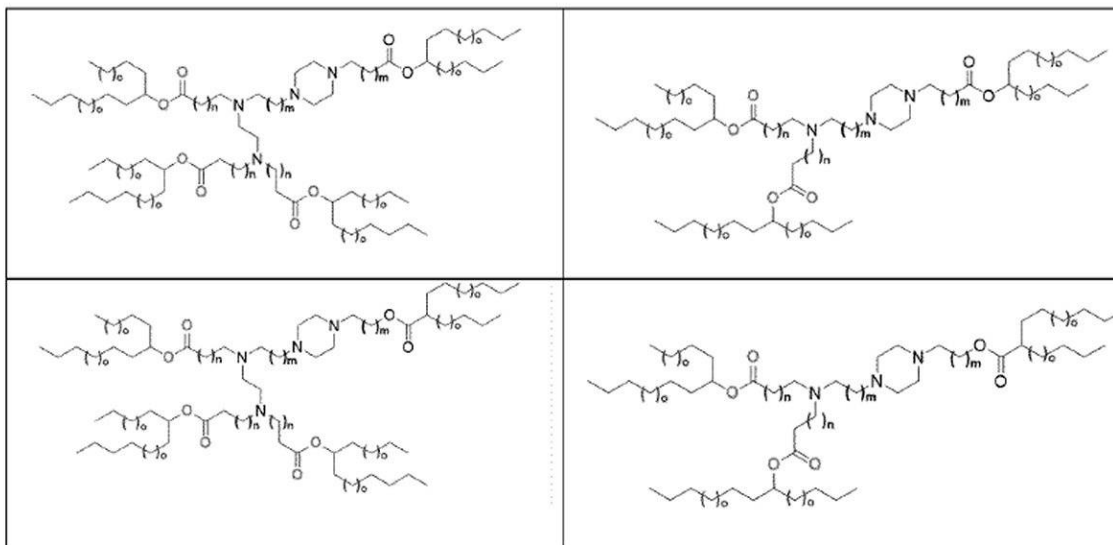
【0061】

式 (I) に従うイオン化可能な脂質様化合物の実施例を表 1 に示す。

【0062】

表 1：各 m が独立して 1、2、3、4 または 5 であり、各 n が独立して 1、2、3、4 または 5 であり、各 o が独立して 1、2、3、4 または 5 である構造の例。

【化 3-1】

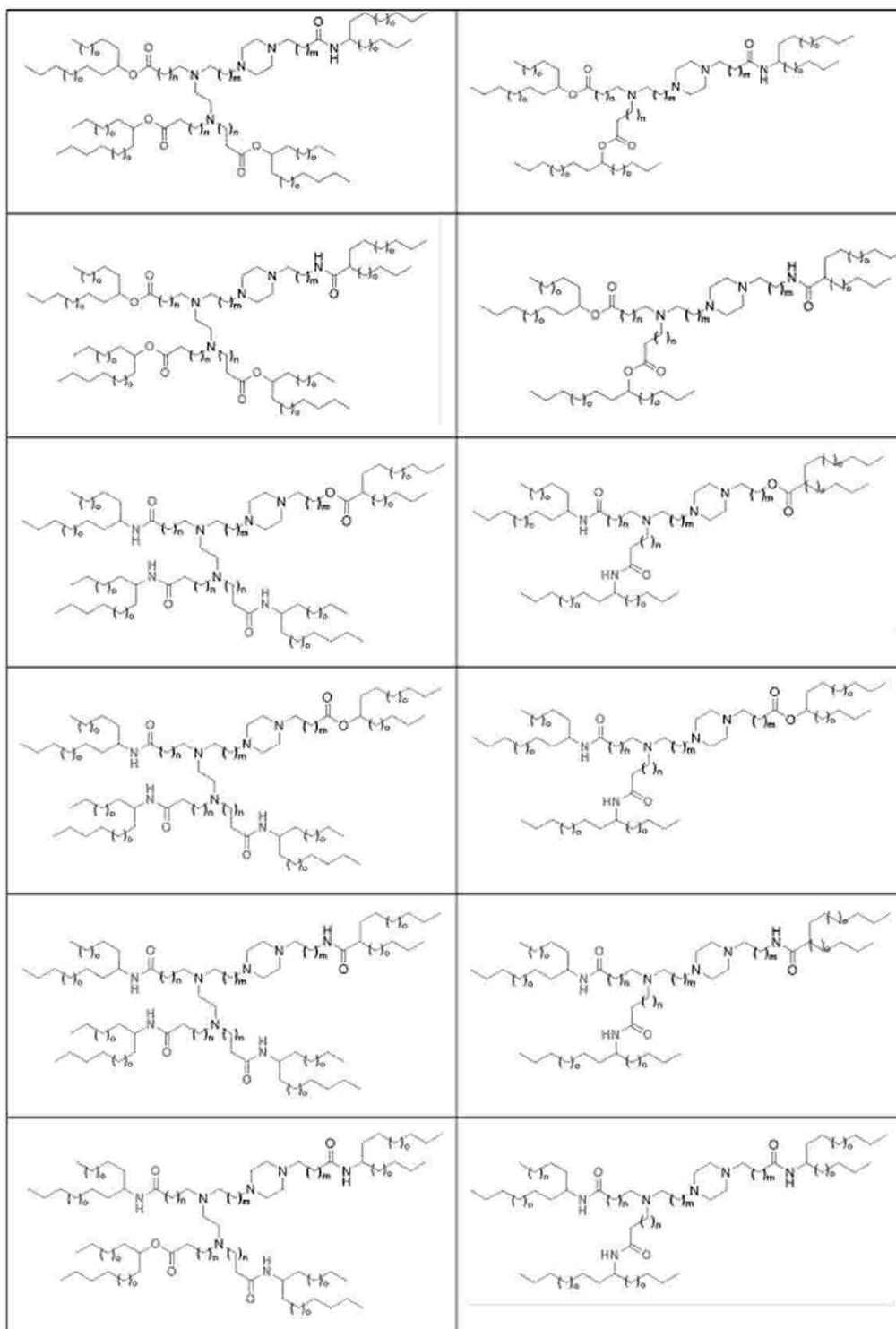


30

40

50

【化 3 - 2】



10

20

30

40

【 0 0 6 3 】

本発明はまた、表 1 に開示される化合物にも及び、その薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体をさらに含むことが理解されよう。実施例の 1. 1 に基づくスキーム（表 1 の構造についての m、n および o の定義は、例のセクション 1. 1 のスキームにおいて提供される構造に等しく適用される）に記載される式による化合物、並びに式 I に基づく化合物の範囲に該当する実施例において記載される化合物は、等しく代表的な実施形態とみなされる。

【 0 0 6 4 】

いくつかの脂質様化合物およびそれらに対応するLNPは、pH変化に応答するので、プ

50

ロトン化または脱プロトン化され得る。低いpHでは、これらの化合物の窒素基はプロトン化される。

【0065】

本発明の一実施形態では、表1に示す構造の各nは、1、3または5である。一実施形態によると、表1に示す構造の各mは、1、3または5である。一実施形態によると、各mは1、3または5である。一実施形態では、 L^1 、 L^2 、 L^3 および L^4 は、エチレンである。一実施形態では、 L^1 、 L^2 、 L^3 および L^4 はブチレンである。一実施形態によると、 L^1 、 L^2 、 L^3 および L^4 はヘキセンである。一実施形態では、表1に示す構造の各oは、3、4または5である。

【0066】

第2の態様において、本発明は、式Iに記載の化合物の少なくとも1つを含む1または複数の脂質ナノ粒子（LNP）に関し、オリゴヌクレオチドの処方（製剤）について本明細書の実施形態において定義される、特に治療方法において使用するための上記LNPに関する。

【0067】

従って、脂質ナノ粒子（LNP）は、1つ以上のオリゴヌクレオチドを含む。一実施形態では、前記オリゴヌクレオチドは、RNAまたはDNA、好ましくは、少なくとも1000bp、より好ましくは2000bp、3000bp、4000bp、5000bpまたはそれ以上の長さを有する自己増幅RNA（saRNA）などのオリゴヌクレオチドである。一実施形態では、1つ以上のsaRNA分子または1つ以上の他のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1000bp、より好ましくは2000bp、3000bp、4000bp、5000bpまたはそれ以上の最小長を有する。オリゴヌクレオチドの長さは、多数の塩基対（bp）または多数のヌクレオチド（nt）で表され得る。本発明の文脈において、「塩基対」および「ヌクレオチド」という用語は、オリゴヌクレオチド（例えば、DNAまたはRNA）の長さの文脈において使用される場合、互換的に使用され、ここで、1塩基対（bp）は、1つのヌクレオチド（nt）の等価物であると考えられる。

【0068】

一実施形態では、前記オリゴヌクレオチドはmRNAのようなRNA分子である。特定の実施形態において、前記RNAは、少なくとも1000bp、より好ましくは2000bp、3000bp、4000bp、5000bpまたはそれ以上の最小長を有する。特に好ましい実施形態において、前記RNAは自己増幅RNAである。本明細書に提供される脂質ナノ粒子は、特定のサイズ、すなわち長さのRNA、好ましくは自己増幅RNA（saRNA）のRNAと組み合わせて使用するのに特に適していることが見出された。saRNAは、典型的には従来のmRNAよりも大きいので、最新技術に記載された脂質ナノ粒子は、しばしば、不十分なカプセル化、または最適以下のin vivo送達、ひいては、RNAによってコードされる目的の遺伝子の発現をもたらす。実施例に示されるように、式Iに従う化合物は、大きなRNA分子（saRNA構築物など）の効率的なカプセル化を可能にし、一方、得られた脂質ナノ粒子は、RNAの良好な機能性（細胞内送達および発現）を可能にすることが現在見出されている。一実施形態では、脂質ナノ粒子組成物は、saRNAなど、具体的には、5000bp以上に相当する長さを有するmRNAのRNAオリゴヌクレオチドを含む。（sa）RNAのサイズは、500～50000bp、好ましくは1000～40000bp、より好ましくは5000～30000nt、または8000～16000bpであり得る。より好ましくは、saRNAのような前記RNAのサイズは、5000～20000bp、好ましくは6000～19000bp、好ましくは7000～18000bp、好ましくは8000～17000bp、より好ましくは8000～16000bpであり得る。特定の実施形態によれば、LNP中にカプセル化されたRNAは、少なくとも8000、少なくとも9000、または少なくとも10000ntである。さらに、前記実施形態によれば、RNAは20000、18000または16000ntを超えない。

【0069】

saRNA中のmRNA構築物の自己複製性の性質は、RNAウイルスのゲノムRNAに基づくが、1つ以上の構造タンパク質をコードする遺伝子を欠く。自己複製RNA分子は、翻訳

10

20

30

40

50

されてRNAウイルスの非構造タンパク質や自己複製RNAによってコードされる異種タンパク質をつくることができる。

【0070】

自己複製RNA分子は、自己複製RNA分子が感染性ウイルス粒子の産生を誘導できないように設計されている。自己複製を達成するのに適切なシステムの1つは、アルファウイルスに基づくRNAレプリコンを用いることである。これらの+鎖レプリコンは、細胞に運ばれた後に翻訳され、レプリカーゼ（またはレプリカーゼ-トランスクリプターゼ）を与える。レプリカーゼはポリタンパク質として翻訳され、自己切断して複製複合体を提供し、+鎖に送達されたRNAのゲノム-鎖コピーを作成する。これらの-鎖転写産物は、それ自体が転写されて+鎖親RNAのコピーをさらに与え、また所望の遺伝子産物をコードするサブゲノム転写産物を与えることができる。このように、サブゲノム転写物の翻訳は、細胞による所望の遺伝子産物のin situ発現をもたらす。適切なアルファウイルスレプリコンは、シンドビスウイルス (Sindbis virus)、セムリキフォレストウイルス (Semliki Forest Virus)、東部ウマ脳炎ウイルス (eastern equine encephalitis virus)、ベネズエラ馬脳炎ウイルス (Venezuelan Equine Encephalitis Virus) などからのレプリカーゼを使用することができる。

10

【0071】

好ましい自己複製RNA分子は、(i) 自己複製RNA分子からRNAを転写することができるRNA依存性RNAポリメラーゼ、および(ii) 本明細書に記載されるようなタンパク質/ペプチドをコードする。ポリメラーゼは、アルファウイルス複製物、例えば、アルファウイルスタンパク質nsP4を含むものであり得る。

20

【0072】

天然のアルファウイルスゲノムは、非構造レプリカーゼポリタンパク質に加えて、構造ビリオンタンパク質をコードするが、本発明のアルファウイルスベースの自己複製RNA分子は、アルファウイルス構造タンパク質をコードしないことが好ましい。このように、自己複製するRNAは、細胞内で自身のゲノムRNAコピーをつくることができるが、RNAを含むアルファウイルスビリオンをつくることはできない。これらのビリオンを産生できないということは、野生型アルファウイルスとは異なり、自己複製するRNA分子は感染性の形成でそれ自身を永續させることができないことを意味する。野生型ウイルスの持続に必要なアルファウイルス構造タンパク質は、本発明の自己複製RNAには存在せず、それらの位置は、所望の遺伝子産物をコードする遺伝子によって決定され、その結果、サブゲノム転写産物は、構造アルファウイルスビリオンタンパク質ではなく所望の遺伝子産物をコードする。したがって、特定の実施形態では、本発明の自己複製RNA分子は、非構造アルファウイルスタンパク質をコードする配列と、目的のタンパク質/ペプチド（例えば、ワクチンの抗原）をコードする配列とを含む。より具体的には、本発明の自己複製RNA分子は、4つの非構造アルファウイルスタンパク質をコードする配列と、目的のタンパク質/ペプチド（例えば、ワクチンのための抗原）をコードする配列とを含む。好ましくは、自己複製RNA分子は、少なくとも1つの構造的アルファウイルスタンパク質を産生する能力を欠くように設計されたアルファウイルスに由来する。より好ましくは、自己複製RNA分子は、少なくとも2つ、より好ましくは全ての構造的アルファウイルスタンパク質を産生する能力を欠くように操作されたアルファウイルスに由来する。特定の実施形態において、本発明の自己複製RNA分子は、5'から3'のオーダーで、(i) 非構造的なタンパク質媒介増幅に必要な5'配列、(ii) アルファウイルス、特にベネズエラウマ脳炎ウイルスをコードするヌクレオチド配列、非構造的なタンパク質nsP1、nsP2、nsP3、およびnsP4、(iii) 関心のあるタンパク質/ペプチドをコードする異種核酸配列（例えば、ワクチンのための抗体）に操作可能に連結されたプロモーターであって、前記異種核酸配列は、アルファウイルス構造的タンパク質遺伝子の1つまたはすべてを置き換えられている、プロモーター、(iv) 非構造的なタンパク質媒介増幅に必要な3'配列、および(v) ポリアデニル酸系 (polyadenylate tract) を含む。

30

40

【0073】

50

最近、saRNA（RNAレプリコン）ワクチン接種は革新的なナノテクノロジーに基づくワクチン接種戦略として認識されている。前述したように、ウイルスレプリコン粒子（すなわち、ウイルスのカプシドタンパク質にカプセル化されたRNA）とは異なり、sa-mRNAはin vitro転写によってのみ産生される。このように、製造プロセス全体は完全に無細胞であり、その組成が正確に定義された治療薬となる。sa-mRNAワクチンは、それらの非複製対応物と比較して、持続期間（約2か月）および発現の大きさを延長するなど、いくつかの魅力的な特徴を有する。加えて、sa-mRNAの細胞内複製は一過性であり、二本鎖RNA（dsRNA）はパターン認識受容体を誘発することによりインターフェロン媒介宿主防御機構を誘導する可能性がある。これにより、挿入された標的分子に対する強い抗原特異的免疫応答が生じる。したがって、sa-mRNAベクター系は、高い一過性の導入遺伝子発現および固有のアジュバント効果を提供するため、ワクチン開発に理想的に適している。

10

【0074】

別法として、saRNA構築物は、治療用タンパク質またはペプチドの送達に有用な本明細書に記載されたLNPの使用のために考慮され、例えば、タンパク質置換療法において、特に、細胞に送達されるとき、従来のmRNAと比較してsaRNAの典型的に長い発現プロファイルのために、有用である。タンパク質置換療法は反復的な性質を持っているため、効率的なカプセル化、良好な細胞送達および高い全身性忍容性（例えば、低毒性を含む）を有するLNPを必要とする。本明細書に開示される化合物およびLNPは、その必要性に対処するための好ましい特性を示す。

20

【0075】

いくつかの実施形態では、自己増幅RNA分子は、RNAウイルスのゲノムRNAに基づくが、1つ以上の構造タンパク質をコードする遺伝子を欠く。自己増幅RNA分子は、翻訳されて、RNAウイルスの非構造タンパク質および自己増幅RNAによってコードされる異種タンパク質を産生することができる。

【0076】

いくつかの実施形態では、自己増幅RNA分子は、自己増幅RNA分子が感染性ウイルス粒子の産生を誘導できないように設計され得る。これは、例えば、自己増幅RNAにおいてウイルス粒子を産生するのに必要な構造タンパク質をコードする1つ以上のウイルス遺伝子を省略することによって達成することができる。例えば、自己増幅RNA分子が、シンドビスウイルス（Sindbis virus）（SIN）、セムリキフォレストウイルス（Semliki Forest Virus）、ベネズエラ馬脳炎ウイルス（Venezuelan Equine Encephalitis Virus）（VEEV）のようなアルファウイルスに基づく場合、キャプシドおよび／またはエンベロープ糖タンパク質のようなウイルス構造タンパク質をコードする1以上の遺伝子を省略することができる。所望であれば、本発明の自己増幅RNA分子は、弱毒化または毒性の感染性ウイルス粒子の産生を誘導するか、またはその後の一回の感染が可能なウイルス粒子を産生するように設計することができる。

30

【0077】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される自己増幅RNA分子は、2以上のオープンリーディングフレームから複数のヌクレオチド配列を発現するように操作され得、それによって、2以上の抗原などのタンパク質を、サイトカインまたは他の免疫調節因子と共に共発現させ、これは、免疫応答の発生を増強することができる。このような自己複製RNA分子は、例えば、二価または多価ワクチンとして、または遺伝子治療の応用において、同時に様々な遺伝子産物（例えば、タンパク質）を生産する際に、特に有用である可能性がある。

40

【0078】

一実施形態では、脂質ナノ粒子中の脂質とオリゴヌクレオチドとのモル比は、1：1～100：1である。いくつかの実施形態では、リポソーム中の脂質対mRNAの比は、約5：1から約80：1、約10：1から約75：1、約15：1から約60：1、約15：1から約50：1および／または少なくとも40：1であり得る。これらの比は、脂質

50

ナノ粒子への最適なRNA吸着を保証する。

【0079】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、30 nm～250 nm、40 nm～250 nm、50 nm～250 nm、50～150 nm、50～130 nm、60 nm～230 nm、70 nm～210 nm、70 nm～200 nm、80 nm～200 nm、90 nm～200 nm、70～190 nm、80 nm～190 nm、70 nm～180 nm、70 nm～150 nm、70 nm～130 nm、70 nm～110 nm、80～150 nm、80～130 nm、80～120 nm、90 nm～110 nm、または、約30 nm、35 nm、40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nm、or 150 nm、160 nm、170 nm、180 nm、190 nm、200 nm、210 nm、220 nm、230 nm、240 nm、250 nmの平均直径（平均粒子サイズとも言う）を有し、実質的に毒性がない。

10

【0080】

特定実施形態では、粒子の直径は、1 nmから1000 nmの範囲である。特定の実施形態では、粒子の直径は、200 nmから300 nmの範囲である。特定の実施形態では、粒子の直径は、300 nmから400 nmの範囲である。特定の実施形態では、粒子の直径は、400 nmから500 nmの範囲である。特定の実施形態では、粒子の直径は、600 nmから700 nmの範囲である。特定の実施形態では、粒子の直径は、700 nmから800 nmの範囲である。特定の実施形態では、粒子の直径は、800 nmから900 nmの範囲である。特定の実施形態では、粒子の直径は、100 nmから1000 nmの範囲である。特定の実施形態では、粒子の直径は、20 nmから2000 nmの範囲である。

20

【0081】

一実施形態では、本発明による前記脂質ナノ粒子中のイオン化可能なカチオン性脂質とオリゴヌクレオチド（saRNAなど）との間のN/P比は、5：1～50：1である。いくつかの実施形態では、LNPにおけるN/P比は、約5：1から約45：1、約10：1から約45：1、約15：1から約40：1、約20：1から約40：1、約30：1から約50：1であり得る。これらの比率は、特に、RNAが5000 ntを超える、6000 ntを超える、7000 ntを超える、8000 ntを超える、上記9000 ntを超えるなどの特定の長さである場合に、脂質ナノ粒子への最適なRNA吸着を保証する。

30

【0082】

一実施形態では、本発明による脂質ナノ粒子組成物は、-30 mVから+30 mVの範囲のゼータ電位を有する。ゼータ電位は粒子表面の電荷のインジケータであり、負のゼータ電位は粒子表面がほとんどRNAで覆われていることを示し、正のゼータ電位は複合脂質がRNA吸着によって飽和していないことを示す。ゼータ電位は、最先端で記載された組成物の方が高く、これは、脂質ナノ粒子の表面上のオリゴヌクレオチドの結合が少ないことを示す。本発明と技術水準との間に、粒子サイズに有意な差はない。

【0083】

本発明のLNPは、saRNA（または他の大きなRNA分子）の文脈で使用するのに特に有用であるという事実にもかかわらず、後者は、DNAまたはRNAのような他のオリゴヌクレオチドを複合化するために使用することもできる。いくつかの実施形態では、LNPは、長鎖RNA、コード（コーディング）RNA、非コード（非コード）RNA、ロング非コードRNA、一本鎖RNA（ssRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、直鎖RNA（linRNA）、環状RNA（circRNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランス増幅mRNA、RNAオリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉RNA（siRNA）、低分子ヘアピンRNA（shRNA）、アンチセンスRNA（asRNA）、CRISPR/Cas9ガイドRNA（gRNA）、リボスイッチ、免疫刺激性（免疫賦活性）RNA（isRNA）、リボザイム、アプタマー、リボソームRNA（rRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、ウイルスR

40

50

NA (vRNA)、レトロウイルスRNAまたはレプリコンRNA、低分子核内RNA (snRNA)、低分子核小体RNA (snoRNA)、マイクロRNA (miRNA)、およびPiwi相互作用RNA (piRNA) をカプセル化する。

【0084】

いくつかの実施形態では、LNPは、修飾されたRNA分子をカプセル化する。いくつかの実施形態では、RNA分子の修飾は、骨格修飾並びに糖修飾または塩基修飾を含む化学修飾を含む。この文脈において、本明細書中で定義される修飾されたRNA分子は、ヌクレオチド類似体／修飾、例えば、主鎖（バックボーン）修飾、糖修飾または塩基修飾を含む。本開示に関連する主鎖修飾は、RNA分子に含まれるヌクレオチドの主鎖のリン酸塩が化学的に修飾される、修飾である。本開示に関連する糖修飾は、RNA分子のヌクレオチドの糖の化学修飾である。さらに、本開示に関連する塩基修飾は、RNA分子のヌクレオチドの塩基部分の化学修飾である。この文脈において、ヌクレオチド類似体または修飾は、転写および／または翻訳に適用可能なヌクレオチド類似体から選択される。さらなる実施形態では、修飾されたRNAは、6 - アザ - シチジン、2 - チオ - シチジン、 α - チオシチジン、シュード - イソ - シチジン（擬イソシチジン）、5 - アミノアリル - ウリジン、5 - ヨード - ウリジン、N1 - メチル - プソイドウリジン、5, 6 - ジヒドロウリジン、 α - チオ - ウリジン、4 - チオ - ウリジン、6 - アザ - ウリジン、5 - ヒドロキシ - ウリジン、デオキシ - チミジン、5 - メチル - ウリジン、ピロロ - シチジン、イノシン、 α - チオ - グアノシン、6 - メチル - グアノシン、5 - メチル - シトジン、8 - オキソ - グアノシン、7 - デアザ - グアノシン、N1 - メチル - アデノシン、2 - アミノ - 6 - クロロ - プリン、N6 - メチル - 2 - アミノ - プリン、プソイド - イソ - シチジン、6 - クロロ - プリン、N6 - メチル - アデノシン、 α - チオ - アデノシン、8 - アジド - アデノシン、7 - デザ - アデノシンから選択されるヌクレオチド修飾を含む。

【0085】

式 (I) による脂質様化合物または薬学的に許容される塩は、好ましくは、約 5 ~ 60 mol%、好ましくは 12.5 ~ 60 mol%、およびより好ましくは 20 ~ 45 mol% の濃度でLNP配合中に存在する。

【0086】

LNPは、(i) LNP二重層の安定性を高め、膜融合を促進するステロール；(ii) 任意に、LNP二重層構造を強化し、エンドソームエスケープ（脱出）を助けるリン脂質；および(iii) LNP二重層に挿入し、LNP凝集を減少させ、立体障害によりタンパク質の非特異的結合を減少させ、かつ、免疫細胞による非特異的エンドサイトーシスを減少させるPEGコーティングを提供する、脂質 - ポリエチレングリコール (PEG) コンジュゲートを有する、2つ以上の賦形剤と共に一般的に処方される。さらなる実施形態では、LNPは、さらに、1つ以上の緩衝剤を含み得る。

【0087】

一実施形態では、式 (I) の脂質様構造の他に、本発明によるLNPは、さらに、以下を含む：

- 少なくともPEGまたはPEG複合体、
- 少なくとも1つのステロール、および
- 任意に、少なくとも1つのリン脂質および／または少なくとも1つの第2のイオン化可能な脂質。

【0088】

一実施形態では、第2のイオン化可能な脂質は式 (I) の化合物である。一実施形態では、第2のイオン化可能な脂質は式 (I) の化合物ではない。

【0089】

一実施形態では、PEGまたはPEG複合体（コンジュゲート）は、本発明によるLNP配合物中に0.2 ~ 10 mol%、好ましくは0.5 ~ 5 mol%の濃度で存在する。PEG化合物は、好ましくは、PEG - セラミド、PEG - DMG、PEG - PE、ポロキサマー、およびDSPECカルボキシPEGから選択される。例えば、特定の実施形態では、PEG化合物は、C14

PEG2000 DMG、C15 PEG2000 DMG、C16 PEG2000 DMG、C18 PEG2000 DMG、C14 PEG 2000セラミド、C15 PEG2000セラミド、C16 PEG2000セラミド、C18 PEG2000セラミド、C14 PEG2000 PE、C15 PEG2000 PE、C16 PEG2000 PE、C18 PEG2000 PE、C14 PEG350 PE、C14 PEG5000 PE、ポロキサマーF-127、ポロキサマーF-68、ポロキサマーL-64、またはDSPEカルボキシPEGである。特に好ましい態様において、前記PEG結合体はDMG-PEGである。

【0090】

一実施形態では、ステロール化合物は、本発明によるLNP配合中に30～60mol%、好ましくは30～50mol%、より好ましくは40～50mol%の濃度で存在する。前記ステロールは、好ましくは、エルゴステロール、カンペステロール、オキシステロール、アントロステロール、デスモステロール、ニカステロール、シトステロール、スチグマステロール、コレステロールまたはその誘導体（派生物）、例えば、3β[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-コレステロール)の群から選択される。好ましい態様において、前記ステロールはコレステロールである。

10

【0091】

一実施形態では、本発明によるLNP配合は、少なくとも1つのリン脂質を含む。リン脂質の非限定的な例としては、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン(POPE)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート(DOPE-マル(mal))、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、ジミリスチルホスホエタノールアミン(DMPE)、ジステアロイル-ホスファチジル-エタノールアミン(DSPE)、DLPE(1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、DPPS(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン)、16-O-モノメチルPE、16-O-ジメチルPE、18-1-トランスPE、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(SOPE)である。リン脂質はLNP二重層構造を強化し、エンドソームの脱出を助ける。一実施形態では、ナノ粒子組成物中のリン脂質はDOPEである。一実施形態では、LNPはリン脂質を含み、リン脂質は、前記LNP中に0.2～45mol%、好ましくは0.5～35mol%の濃度で存在し、前記リン脂質は好ましくはDOPEである。

20

30

【0092】

一実施形態では、本発明によるLNP配合物は、式(I)に記載の脂質様構造以外の少なくとも1つの第2のイオン化可能な脂質を含む。可能性のある非限定的な第2のイオン化可能な脂質は、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)；N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)；N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド(DDAB)；N-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTAP)；N-(1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル)-N-2-(スベルミンカルボキサミド)エチル-N,N-ジメチルアンモニウムトリフルオロ酢酸(DOSPA)、ジオクタデシルアミドグリシルカルボキシスベルミン(DOGS)、1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン(DODAP)、3-(N,N-ジオレイルアミノ)-1,2-プロパンジオール(DOAP)、N,N-ジメチル-2,3-ジオレオイルオキシ)プロピルアミン(DODMA)、およびN-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DMRIE)、1,2-ジリノレイルオキシ-N

40

50

、N-ジメチルアミノプロパン (DLinDMA)、1,2-ジリノレイオキシ-3-(ジメチルアミノ)アセトキシプロパン (DLin-DAC)、1,2-ジリノレイオキシ-3-モルホリノプロパン (DLin-MA)、1,2-ジリノレイオイル-3-ジメチルアミノプロパン (DLinDAP)、1,2-ジリノレイルチオ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-S-DMA)、1-リノレイオイル-2-リノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-2-DMAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩 (DLin-TMA.Cl)、1,2-ジリノレイオイル-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩 (DLin-TAP.Cl)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(N-メチルピペラジノ)プロパン (DLin-MPZ)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(2-N,N-ジメチルアミノ)エトキシプロパン (DLin-EG-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン (DLin-KC2-DMA)、ジリノレイル-メチル-4-ジメチルアミンブチレート (DLin-MC3-DMA)、ジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-(4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカン二酸塩 (L319)、1,1'-((2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オール)(C12-200)、3,6-ビス({4-[ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ]ブチル})ピペラジン-2,5-ジオン(cKK-E12)である。前記第2のイオン性脂質は、0.5~40mol%、好ましくは0.5~30mol%の濃度で本発明のLNP配合中に存在する。より好ましい実施形態において、第2のイオン化可能な脂質は、C12-200またはDLin-KC2-DMA、または、その薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体である。

10

20

【0093】

一実施形態では、脂質ナノ粒子は、少なくとも1つの第2のイオン化可能な脂質を含み、式(I)による前記イオン化可能な脂質様構造またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体、および、前記第2のイオン化可能な脂質の全体の濃度は、12.5~60mol%、好ましくは25~50mol%、およびより好ましくは30~40mol%の濃度で前記LNP中に存在する。

【0094】

一実施形態では、本発明によるLNP配合は、脂質の多くの市販調製物を含む。これらは、例えば、リポフェクチン(LIPOFECTIN)(登録商標)(DOTMAおよび1,2-ジオレイオイル-sn-3ホスホエタノールアミン(DOPE)を含む市販のカチオン性リポソーム、GIBCO/BRL、Grand Island, N.Y.)、リポフェクタミン(LIPOFECTAMINE)(登録商標)(N-(1-(2,3ジオレイルオキシ)プロピル)-N-(2-(スペルミンカルボキサミド)エチル)-N,N-ジメチルアンモニウム トリフルオロ酢酸(DOSPA)および(DOPE)を含む市販のカチオン性リポソーム、GIBCO/BRL)、およびトランスフェクタム(TRANSFECTAM)(登録商標)(エタノール中にジオクタデシルアミドグリシルカルボキシルスペルミン(DOGS)を含む市販のカチオン性脂質、Promega Corp., Madison, Wis.)を含む。

30

【0095】

一実施形態では、本発明によるLNP配合物は、式(I)に記載のまたは表1から選択された少なくとも2つの脂質または脂質様化合物を含む。少なくとも2つのイオン化可能な脂質または脂質様化合物の存在は、saRNAのようなオリゴヌクレオチドのカプセル化、並びにLNPのin vivoデリバリーにポジティブな(正の)影響を与えることが見出された。

40

【0096】

一実施形態では、脂質ナノ粒子は、12.5~60mol%の濃度の、式(I)に記載の少なくとも1つのイオン化可能な脂質様構造、またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体；0.5~35mol%の濃度のDOPE；30~50mol%の濃度のコレステロール；および0.5~5mol%の濃度のDMG-PEGを含み、ここで濃

50

度の合計は、100%を超えない。

【0097】

一実施形態では、脂質ナノ粒子は、少なくとも2つの化合物：式(I)に記載の1つのイオン化可能な脂質様構造、またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体、および第2のイオン化可能な脂質様化合物を含む。さらに別の実施形態では、第1の化合物は式(I)に記載のイオン化可能な脂質様構造であり、第2の化合物は別のイオン化可能な脂質様化合物であり、2:1~1:1の比で存在する。一実施形態では、式(I)に記載の第1のイオン化可能な脂質様構造、またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体、および第2のイオン化可能な脂質または脂質様化合物が等モル比でLNP組成物中に存在する。従って、第1および第2の脂質または脂質様化合物は、組成物中に1:1の比で存在する。一実施形態では、前記組成物の全体的な寄与は、脂質ナノ粒子組成全体において50mol%を超えず、好ましくは、前記組成物の全体的な寄与は、少なくとも25mol%であり、より好ましくは、前記組成物の全体的な寄与は、約35mol%である。特定の実施形態では、前記2つの化合物は、等モル比でLNP中に存在し、それによって、前記第1のイオン化可能な脂質様化合物は、10~30mol%の間で存在し、前記第2のイオン化可能な脂質様化合物は、10~30mol%の間で存在する。別の特定の実施形態では、第1のイオン性脂質と第2のイオン性脂質との比は、1:1より高く、両方の脂質は、10~30mol%で存在する。

10

【0098】

LNPは、この分野で公知の任意の方法を用いて調製することができる。これらは、噴霧乾燥、単一および二重エマルジョン溶媒蒸発、溶媒抽出、相分離、単純および複合コアセルベーション、並びに当業者に公知の他の方法が含まれるが、これらに限定されない。ある態様において、粒子を調製する方法は、二重乳化プロセスおよび噴霧乾燥である。粒子を調製するのに使用される条件は、所望のサイズまたは特性（例えば、疎水性、親水性、外部形態、「粘着性」、形状など）の粒子を得るために変更され得る。粒子および条件（例えば、溶媒、温度、濃度、空気流量など）を調製する方法も、カプセル化される薬剤に依存し得る。カプセル化された薬剤の送達のための粒子を作製するために開発された方法は、文献に記載されている。

20

【0099】

本発明に係る脂質ナノ粒子を調製することができる。より一般的には、以下を含む方法を用いてLNPを調製することができる：

30

- 式(I)に記載の1つ以上のイオン化可能な脂質、式(I)と異なるリン脂質、ステロール、PEG脂質、および適当なアルコール溶媒を含む第1のアルコール組成物の調製；
- 1以上の核酸および水系の溶媒を含む第2の水性組成物の調製；
- 前記第1および第2の組成物のマイクロ流体混合装置内での混合。

【0100】

さらなる工程において、脂質成分を、エタノールのようなアルコール性ビヒクル中の適当な濃度で混合する。それに加えて、核酸を含む水性組成物を添加し、続いてマイクロ流体混合装置に装填する。

【0101】

マイクロ流体混合の目的は、低圧精密混合装置において、複数サンプル（すなわち、脂質相および核酸相）の完全かつ急速混合を達成することである。このような試料混合は、典型的には、異なる種のフロー間の拡散効果を高めることによって達成される。複数の低圧の正確な混合装置を使用することができる。

40

【0102】

本発明のLNPを調製するのに適した他の技術としては、例えば水性溶媒およびアルコール性溶媒などの適当な分散媒中に成分を分散させ、以下の方法のうちの1つ以上を適用することが挙げられる：エタノール希釈法、簡易水和法、超音波処理、加熱、ボルテックス、エーテル注入法、フランス（French）プレス法、コール酸法、 Ca^{2+} 融解法、凍結融解法、逆相蒸発法、Tジャンクション混合、マイクロ流体力学的集束法（Microfluidi

50

c Hydrodynamic Focusing)、スタガードヘリングボーン (Staggered Herringbone) 混合など。

【0103】

上記のいずれかの方法によって調製された粒子が所望の範囲外の粒度範囲を有する場合、粒子は、例えば、ふるい (sieve) を使用してサイズ決定され得る。粒子はまた、コーティングされてもよい。ある実施形態では、粒子は、ターゲティング剤で被覆される。他の実施形態では、粒子は、所望の表面特性 (例えば、特定の電荷) を達成するために被覆される。

【0104】

本発明の別の態様では、上記に定義される1つ以上の脂質ナノ粒子を含む医薬組成物または (RNA) ワクチンが開示される。前記組成物またはワクチンは、獣医学的およびヒトの使用に特に有用である。

【0105】

医薬組成物またはワクチンは、複数の緩衝剤のうちの1つを含む水性液体中に製剤化することができる。緩衝剤の例としては、限定されないが、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、塩化アンモニウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、クエン酸カルシウム、グルビオン酸カルシウム、グルセプト酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、d-グルコン酸、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、ラクトビオン酸カルシウム、プロパン酸、レブリン酸カルシウム、ペンタン酸、第二リン酸カルシウム、リン酸、第三リン酸カルシウム、水酸化リン酸カルシウム、酢酸カリウム、塩化カリウム、グルコン酸カリウム、カリウム混合物、リン酸二カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸カリウム混合物、酢酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、第二リン酸ナトリウム、第一リン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム混合物、トロメタミン、アミノスルホン酸緩衝液 (例えば、HEPES)、水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウム、アルギン酸、パイロジェンフリー水、等張食塩水、リンゲル液、エチルアルコール、および／またはそれらの組み合わせが挙げられる。

【0106】

適切な投与経路には、非経口投与が含まれる。非経口投与に適した製剤、例えば、関節内、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮内または皮下注射であって、水性および非水性、等張性の無菌注射溶液または懸濁液を含み、これらは抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および製剤を意図されるレシピエントの血液と等張させる溶質、並びに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、および防腐剤を含み得る水性および非水性の無菌懸濁液を含むが、これらに限定されない。本発明の実施において、組成物は、好ましくは、例えば、静脈内注入、経口的、局所的、腹腔内、膀胱内、または髄腔内に投与される。

【0107】

(自己複製) RNA分子の組成は、アンプルおよびバイアルのような、単位用量またはマルチ (多回) 用量の密封容器で提供することができる。注射用溶液および懸濁液は、滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製することができる。(自己複製) RNA分子によってトランスフェクトされた細胞もまた、静脈内または非経口的に投与することができる。

【0108】

前記組成物またはワクチンは、予め定められた期間内に投与される一連の2回以上の投与を必要とする単回用量または多回用量として投与することができる。このような期間は、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間から1年間とすることができる。

【0109】

一実施形態では、組成物またはワクチンは、年1回または2年1回など、定期的に投与される。適当な用量は、0.05~1 ml、より好ましくは0.25~0.75 ml、例えば0.5 mlである。

【0110】

医薬組成物またはワクチンは、好ましくは滅菌され、従来の滅菌技術によって滅菌され

10

20

30

40

50

得る。ワクチンまたは組成物は、pH調整および／または緩衝剤および緊張性調整剤、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどのような生理学的状態に近い、薬学的に許容される補助物質を含有することができる。

【0111】

組成物またはワクチンの浸透圧（浸透張力）は、ナトリウム塩、例えば、塩化ナトリウムで調節しなければならない。非経口投与のための医薬組成物の浸透圧は、典型的には0.9%または9mg/ml NaClである。

【0112】

本発明のワクチンは、200mOsm/kgから400mOsm/kgの間、例えば240～360mOsm/kgまたは290～310mOsm/kgの間の重量モル浸透圧濃度（浸透圧）を有することができる。

【0113】

防腐剤を含まないワクチンが望ましい。しかしながら、所望により、本発明のワクチンは、フェノールおよび2-フェノキシエタノールのような1つまたは複数の防腐剤を含むことができる。水銀を含有する防腐剤であるチオマーサルは、水銀を含有しない組成物が好ましいので避けるべきである。

【0114】

本発明のワクチンは、好ましくは非発熱性であり、例えば、用量あたり<1EU（エンドトキシン単位、標準的測定値）、好ましくは用量あたり<0.1EUを含有する。ワクチンは、好ましくは、グルテンを含まない。

【0115】

好ましい実施形態では、組成物またはRNAワクチンは、saRNA分子を含み、該各saRNA分子は、非構造アルファウイルスタンパク質をコードする配列、および抗原をコードする1つまたは複数の配列を含む。

【0116】

本発明の組成物またはRNAワクチンの自己複製RNA含有量は、一般に、用量当たりのRNA量で表される。好ましい用量は、0.1～100μg自己複製RNA、好ましくは0.5～90μg自己複製RNA、好ましくは0.1～75μg自己複製RNA、好ましくは0.1～50μg自己複製RNA、好ましくは0.5～50μg自己複製RNA、好ましくは0.5～25μg自己複製RNA、より好ましくは0.5～10μg自己複製RNA、より好ましくは1～10μg、さらに好ましくは1～5μg自己複製RNAであり、発現はるかに低いレベルで見ることができる（例えば、インビトロ使用中に0.05μg自己複製RNA/用量）。

【0117】

好ましくは、前記アルファウイルスはベネズエラウマ脳炎ウイルスである（VEEV）。より特定の実施では、アルファウイルスは、TC-83株などの弱毒化ベネズエラ馬脳炎ウイルス（VEEV）、または少なくとも90%の配列同一性を有する株、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する株である。TC-83株は公に入手可能であり、そのゲノムは受託番号（受け入れ番号）L01443.1でGenbankに存在する。

【0118】

例えば、US2015299728、W01999018226およびUS7332322に開示されているように、自己複製RNA分子の生成およびワクチン接種のためのそれらの使用を改善する、種々の遺伝子改変された、アルファウイルスの変異体（バリエーション）が生成されており、これらは全て参照により本明細書に組み込まれる。特に、レプリコンの5'UTRに3番目のヌクレオチドとしてグアニンを有すること、および／または非構造タンパク質2（Nonstructural Protein 2）（nsP2）にQ739L突然変異を有することが有益であることが見出されている。したがって、本発明の特定の実施形態において、自己複製RNA分子は、5'UTR領域におけるA3G突然変異を含む。別の特定の実施形態では、自己複製

RNA分子は、非構造タンパク質2（nsP2）におけるQ739L突然変異を含む。好ましい態様において、自己複製RNA分子は、アルファウイルス、特にVEEV、特にVEEV TC-83の非構造タンパク質をコードする配列を含み、ここで、自己複製RNA分子は、5'UTRにおけるA3G突然変異およびnsP2におけるQ739L突然変異を含む。さらに好ましい態様において、自己複製RNA分子は、VEEV TC-83の非構造タンパク質nsP1、nsP2、nsP3およびnsP4をコードし、ここで、好ましくはQ739L突然変異がnsP2に存在する。

【0119】

別の態様では、本発明は、ヒトおよび／または獣医学障害の両方のための、疾患の治療および／または予防における使用のための医薬組成物またはワクチンに関する。本発明は、本発明による1つ以上のLNPを含むワクチンを提供する。本発明のワクチンは、免疫応答、特に疾患関連抗原に対する免疫応答、または疾患関連抗原を発現する細胞、例えば癌に対する免疫応答を誘導するために使用することができる。従って、ワクチンは、疾患関連抗原または疾患関連抗原を発現する細胞、例えば癌を含む疾患の予防的および／または治療的処置のために使用され得る。好ましくは、前記免疫反応はT細胞応答である。1つの実施形態では、疾患関連抗原は、腫瘍抗原または感染症に連結された抗原である。本明細書に記載されるLNPに含まれるRNAによってコードされる抗原は、好ましくは、疾患関連抗原であるか、または疾患関連抗原または疾患関連抗原を発現する細胞に対する免疫応答を誘発する。

【0120】

別の実施形態では、本明細書に記載されるLNPは、特定のタンパク質が不完全または欠損している対象において、タンパク質置換療法のフレームワーク内で使用され得る。さらなる実施形態において、本明細書に記載されるようなLNPおよび製剤は、まれな（遺伝的）疾患のためのタンパク質置換療法において使用され得る。

【0121】

本発明によるワクチンまたは医薬組成物は、ウイルス、細菌、真菌および／または寄生虫によって引き起こされる感染症の予防および／または治療に使用することができる。

【0122】

限定することを望むことなく、前記ウイルスは、コロナウイルス（Coronaviruses）、オルソミクソウイルス（Orthomyxoviruses）、パラミクソウイルス科ウイルス（Paramyxoviridae viruses）、ニューモウイルス（Pneumoviruses）、ルブラウイルス（Rubulaviruses）、パラミクソウイルス（Paramyxoviruses）、メタニューモウイルス（Metapneumoviruses）およびモルビリウイルス（Morbilliviruses）、ポックスウイルス科（Poxviridae）、オルトポックスウイルス（Orthopoxvirus）、例えば、真性痘瘡（Variola vera）、ピコルナウイルス（Picornaviruses）、エンテロウイルス（Enteroviruses）、ライノウイルス（Rhinoviruses）、ヘパルナウイルス（Heparnaviruses）、カーディオウイルス（Cardioviruses）、アフトウイルス（Aphthoviruses）、ブニヤウイルス（Bunyavirus）、ヘパルナウイルス（Heparnaviruses）、フィロウイルス（Filoviruses）、トガウイルス（Togaviruses）、フラビウイルス（Flaviviruses）、ペスチウイルス（Pestiviruses）、ヘパドナウイルス（Hepadnaviruses）、その他の肝炎ウイルス、ラブドウイルス（Rhabdoviruses）、カリシウイルス科（Caliciviridae）、レトロウイルス、レオウイルス（Reoviruses）、パルボウイルス（Parvoviruses）、ヘルペスウイルス、パポバウイルス（Papovaviruses）、アデノウイルス（Adenoviruses）に属するウイルスであってよい。

【0123】

限定的ではないが、真菌は、*Epidermophyton floccosum*（エピデルモフィトン・フロッコサム）、*Microsporum audouini*（ミクロスポラム・アドウイニ）、*Microsporum canis*（ミクロスポラム・カニス）、*Microsporum distortum*（ミクロスポラム・ジストルツム）、*Microsporum equinum*（ミクロスポラム・エクイナム）、*Microsporum gypsum*（ミクロスポラム・ギプサム）、*Microsporum nanum*（

Microsporum nanum)、トリコフィトン・コンセントリック (*Trichophyton concentricum*)、トリコフィトン・エクイヌム (*Trichophyton equinum*)、トリコフィトン・ガリネ (*Trichophyton gallinae*)、トリコフィトン・ギプセウム (*Trichophyton gypseum*)、トリコフィトン・メグニーニ (*Trichophyton megnini*)、トリコフィトン・メンタグロフィテス (*Trichophyton mentagrophytes*)、トリコフィトン・ワインケアナム (*Trichophyton quinckeanum*)、トリコフィトン・ルブルム (*Trichophyton rubrum*)、トリコフィトン・シェーンライン (*Trichophyton schoenleini*)、トリコフィトン・トンズランス (*Trichophyton tonsurans*)、トリコフィトン・ベルコースム (*Trichophyton verrucosum*)、T・ベルコースム変種アルBUM (*T. verrucosum* var. *album*)、変種ディスコイデス (var. *discoides*)、変種オクラセウム (var. *ochraceum*)、トリコフィトン・ビオラセウム (*Trichophyton violaceum*)、および／もしくは、トリコフィトン・ファビフォーム (*Trichophyton faviforme*)を含む皮膚糸状菌 (*Dermatophytes*)から；またはアスペルギルス・フミガーツス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・フラバス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*)、アスペルギルス・シドウィ (*Aspergillus sydowi*)、アスペルギルス・フラバトウス (*Aspergillus flavatus*)、アスペルギルス・グラウクス (*Aspergillus glaucus*)、ブラストシゾミセス・キャピタトウス (*Blastoschizomyces capitatus*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・エノラーゼ (*Candida enolase*)、カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、カンジダ・グラブラタ (*Candida glabrata*)、カンジダ・クルセイ (*Candida krusei*)、カンジダ・パラプローシス (*Candida parapsilosis*)、カンジダ・ステラトイデア (*Candida stellatoidea*)、カンジダ・クセイ (*Candida kusei*)、カンジダ・パラクセイ (*Candida parakwsei*)、カンジダ・ルシタニア (*Candida lusitaniae*)、カンジダ・プソイドトロピカリス (*Candida pseudotropicalis*)、カンジダ・ギリエルモンディ (*Candida guilliermondi*)、クラドスポリウム・カリオニイ (*Cladosporium carionii*)、コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)、ブラストミセス・デルマティティジス (*Blastomyces dermatidis*)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、ジオトリカム・クラバタム (*Geotrichum clavatum*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム (*Histoplasma capsulatum*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、微胞子虫 (*Microsporidia*)、*Encephalitozoon* spp.、セプタータ・インテスティナリス (*Septata intestinalis*)、および、エンテロサイトゾーン・ビエネウシ (*Enterocytozoon bieneusi*)から選択され得、あまり一般的ではないのは、ブラキオラ属 (*Brachiola* spp.)、マイクロスפורジウム属 (*Microsporidium* spp.)、ノセマ属 (*Nosema* spp.)、プレイストフォラ属 (*Pleistophora* spp.)、トラチプレイストフォラ属 (*Trachipleistophora* spp.)、ヴィタフォルマ属 (*Vittaforma* spp.)、パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス (*Paracoccidioides brasiliensis*)、ニューモシスチス・カリニ (*Pneumocystis carinii*)、ピシウム・インシディオサム (*Pythium insidiosum*)、ピティロスポルム・オーバル (*Pityrosporum ovale*)、サッカロミセス・セレビスエ (*Sacharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ブラウディ (*Saccharomyces boulardii*)、サッカロミセス・ポンベ、(*Saccharomyces pombe*)、セドスポリウム・アピオスペルム、(*Scedosporium apiospermum*)、スポロトリクス・シェンキー (*Sporothrix schenckii*)、トリコスポロン・ベイジュリー (*Trichosporon beigeli*)、トキシプラズマ・ゴンディ (*Toxoplasma gondii*)、ペニシリウム・マルネフェイ (*Penicillium marneffeii*)、マラセチア属 (*Malassezia* spp.)、フォンセカイア属 (*Fonsecaea* spp.)、ワンギエラ属 (*Wangiella* spp.)、スポロトリクス属 (*Sporothrix* spp.)、バシディオボルス属 (*Basidiobolus* spp.)、コニディオボルス属 (*Conidiobolus* spp.)、リゾプス属 (*Rhizopus* spp.)、ムコール属 (

10

20

30

40

50

Mucor spp)、アブシディア属 (Absidia spp.)、モルティエレラ属 (Mortierella spp)、カニングメラ属 (Cunninghamella spp.)、サクセナエア属 (Saksenaea spp.)、アルタナリア属 (Alternaria spp.)、クルブラリア属 (Curvularia spp.)、ヘルミントスポリウム属 (Helminthosporium spp.)、フザリウム属 (Fusarium spp.)、アスペルギルス属 (Aspergillus spp.)、ペニシリウム属 (Penicillium spp.)、モノリニア属 (Monolinia spp.)、リゾクトニア属 (Rhizoctonia spp.)、パエシロマイセス属 (Paecilomyces spp.)、ピトミセス属 (Pithomyces spp) および、クラドスポリウム属 (Cladosporium spp) である。

【0124】

限定されることなく、寄生虫は、熱帯熱マラリア原虫 (P.falciparum)、プラスモディウム・ビバックス (P.vivax)、四日熱マラリア原虫 (P.malariae)、または、卵形マラリア原虫 (P.ovale) のような、プラスモジウム属 (Plasmodium genus) から選択され得る。したがって、本発明は、マラリアに対する免疫化のために使用され得る。いくつかの実施形態では、免疫原は、

ウオジラミ科 (Caligidae family) 科由来の寄生虫、特にレペオフテイラス (Lepeophtheirus) およびカリグス (Caligus) 属由来のもの、例えば、レペオフテイラス・サルモニス (Lepeophtheirus salmonis)、または、カリガス・ロジャークレッセイ (Caligus rogercresseyi) のような船虫 (sea lice) に対する免疫応答を誘発する。

【0125】

限定的なものではないが、細菌 (バクテリア) は、ナイセリア・メニンギティディス (Neisseria meningitidis)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pneumoniae)、ストレプトコッカス・ピオゲネス (Streptococcus pyogenes)、モラクセラ・カタラーリス (Moraxella catarrhalis)、ボルデテラ・パータシス (Bordetella pertussis)、スタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus)、クロストリジウム・テタニ (Clostridium tetani)、コリネバクテリウム・ジフテリア (Corynebacterium diphtheriae)、ヘモフィルス・インフルエンザエ (Haemophilus influenzae)、シュードモナス・エルギノーサ (Pseudomonas aeruginosa)、ストレプトコッカス・アガラクチア (Streptococcus agalactiae)、クラミジア・トラコマチス (Chlamydia trachomatis)、クラミジア・ニューモニエ (Chlamydia pneumoniae)、ヘリコバクター・ピロリ (Helicobacter pylori)、エシェリキア・コリ (Escherichia coli)、バチルス・アントラシス (Bacillus anthracis)、エルシニア・ペスティス (Yersinia pestis)、スタフィロコッカス・エピデルミディス (Staphylococcus epidermis)、クロストリジウム・パーFRINGENS (Clostridium perfringens) またはクロストリジウム・ボツリヌム (Clostridium botulinum)、レジオネラ・ニューモフィラ (Legionella pneumophila)、コクシエラ・ブルネッティ (Coxiella burnetii)、ブルセラ (Brucella)、フランシセラ (Francisella)、ナイセリア・ゴノレア (Neisseria gonorrhoeae)、トレポネマ・パリズム (Treponema pallidum)、ヘモフィルス・デュクレイ (Haemophilus ducreyi)、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) またはエンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium)、スタフィロコッカス・サブロフィチカス (Staphylococcus saprophyticus)、エルシニア・エンテロコリティカ (Yersinia enterocolitica)、マイコバクテリウム・ツベルクローシス (Mycobacterium tuberculosis)、リケッチア (Rickettsia)、リステリア・モノサイトゲネス (Listeria monocytogenes)、ビブリオ・コレレ (Vibrio cholerae)、サルモネラ・チフィ (Salmonella typhi)、ボレリア・ブルグドルフェリ (Borrelia burgdorferi)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (Porphyromonas gingivalis)、クレブシエラ (Klebsiella) から選択され得る。

【0126】

一実施形態では、癌の治療は、本発明の一実施形態による有効量のワクチンまたは医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。ある実施形態では、本方法は、

抗癌剤を投与することをさらに含む。

【0127】

限定することなく、前記腫瘍 - 抗原は、がん - 精巢抗原、例えば、NY-ESO-1、SSX2、SCP1、並びに、RAGE、BAGE、GAGE、およびMAGEファミリーのポリペプチド、例えば、GAGE-1、GAGE-2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、MAGE-12（これは、例えば、黒色腫、肺、頭頸部、NSCLC、乳房、胃腸、膀胱の腫瘍に対処するために使用できる）；

（b）変異抗原、例えば、p53（結腸直腸がん、肺がん、頭頸部がんなどのさまざまな固形腫瘍に関連）、p21/Ras（黒色腫、膵臓がん、結腸直腸がんなどに関連）、CDK4（例えば、黒色腫に関連）、MUM1（例えば、黒色腫に関連）、カスパーゼ-8（頭頸部がんなどに関連）、CIA 0205（膀胱がんなどに関連）、HLA-A2-R1701、ベータカテニン（黒色腫などに関連）、TCR（T細胞非ホジキンリンパ腫などに関連）、BCR-ab 1（慢性骨髄性白血病などに関連）、トリオースリン酸イソメラーゼ、KIA 0205、CDC-27、およびLDLR-FUT；

（c）過剰発現された抗原、例えば、ガレクチン4（結腸直腸癌などに関連）、ガレクチン9（例えば、ホジキン病に関連）、プロテイナーゼ3（例えば、慢性骨髄性白血病に関連）、WT1（例えば、さまざまな白血病に関連）、炭酸脱水酵素（例えば、腎臓癌に関連）、アルドラーゼA（例えば、肺癌に関連）、PRAME（黒色腫などに関連）、HER-2/neu（乳がん、結腸がん、肺がん、卵巣がんなどに関連）、マンマグロビン、アルファフェトプロテイン（肝癌などに関連）、KSA（結腸直腸癌などに関連）、ガストリン（膵臓がんや胃がんなどに関連）、テロメラーゼ触媒タンパク質、MUC-1（乳がんや卵巣がんなどに関連）、G-250（腎細胞癌などに関連）、p53（乳がん、結腸がんなどに関連）、および癌胎児性抗原（例えば、乳がん、肺がん、および結腸直腸がんなどの消化管のがんに関連）；

（d）共有抗原、例えば、黒色腫-メラノサイト分化抗原例えば、MART-1/Melan A、gp100、MC1R、メラノサイト刺激ホルモン受容体、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連プロテイン-1/TRP1、およびチロシナーゼ関連プロテイン-2/TRP2（黒色腫などに関連）；（e）前立腺関連抗原、例えば、前立腺癌に関連するPAP、PSA、PSMA、PSH-P1、PSM-P1、PSM-P2など；

（f）免疫グロブリンイディオタイプ（例えば、骨髄腫やB細胞リンパ腫に関連）、から選択され得る。特定の実施形態では、腫瘍免疫原には、p15、Hom/Mel-40、H-Ras、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、エプスタイン・バーウイルス抗原、EBNA、E6とE7を含む、ヒトパピローマウイルス（HPV）抗原、B型およびC型肝炎ウイルス抗原、ヒトT細胞リンパ向性ウイルス抗原、TSP-180、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、mn-23H1、TAG-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、p16、TAGE、PSCA、CT7、43-9F、5T4、791 Tgp72、ベータ-HCG、BCA225、BTAA、CA125、CA 15-3（CA 27.29/BCAA）、CA195、CA242、CA-50、CAM43、CD68/KP1、CO-029、FGF-5、Ga733（EpCAM）、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90（Mac-2結合タンパク質/シクロフィリンC関連タンパク質）、TAAL6、TAG72、TLP、TPS等が含まれるが、これに限定されない。

【0128】

本発明をさらに例示する以下の非限定的な実施例によって、さらに本発明は説明され、それらは本発明の範囲を限定することを意図するものではなく、またそのように解釈されるべきではない。

【0129】

実施例

1. 式Iによる化合物の合成

本セクションの手順は、説明のために提供されたものであり、いかなる限定をするものではない。

10

20

30

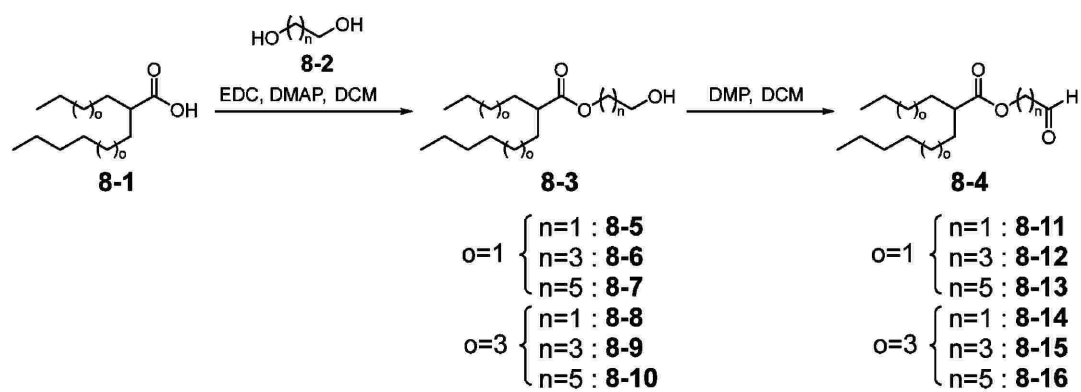
40

50

【化 4 - 1】

1.1 一般的な合成スキーム

1.1.1 化合物 8-4 への合成経路



10

20

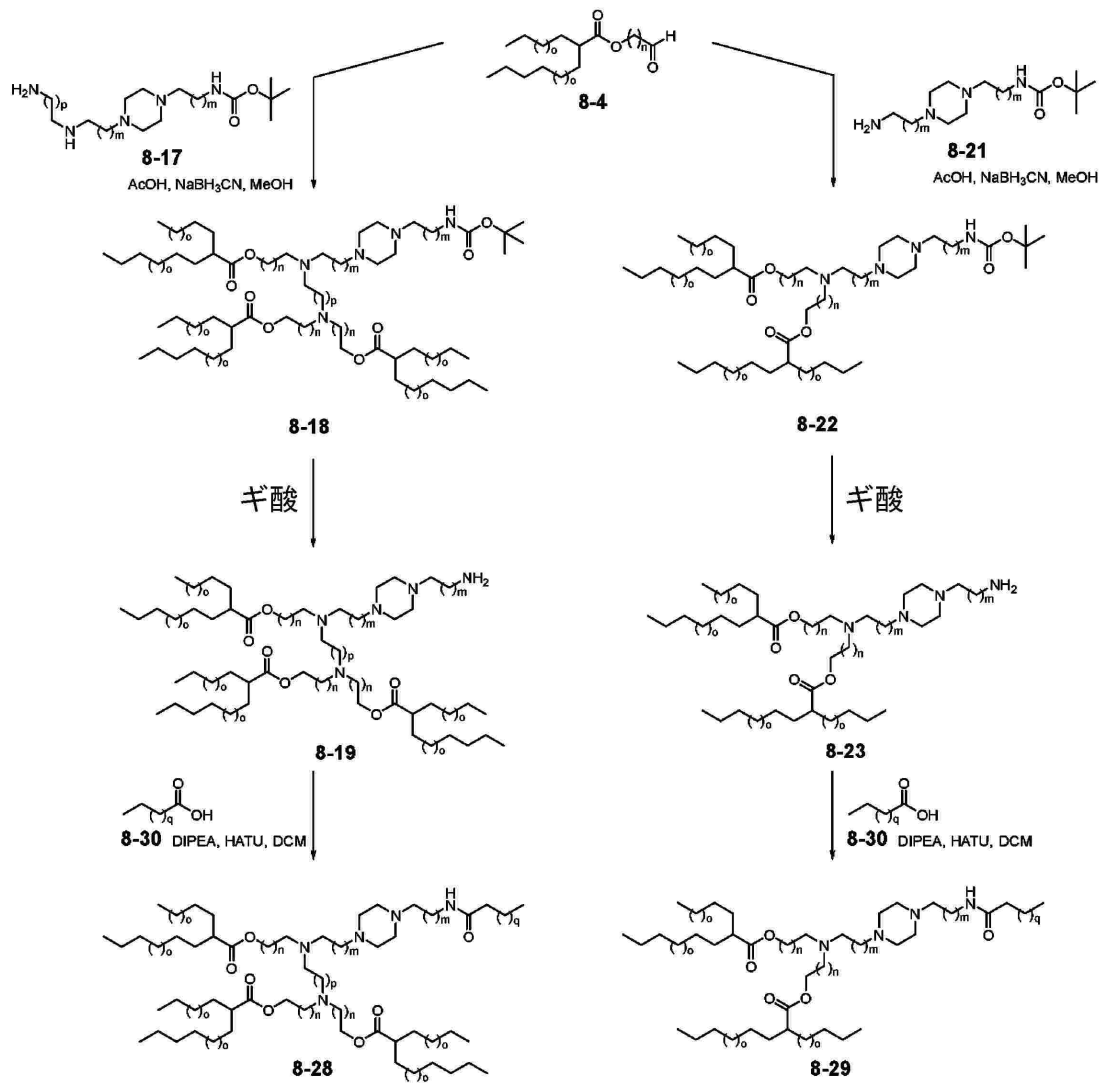
30

40

50

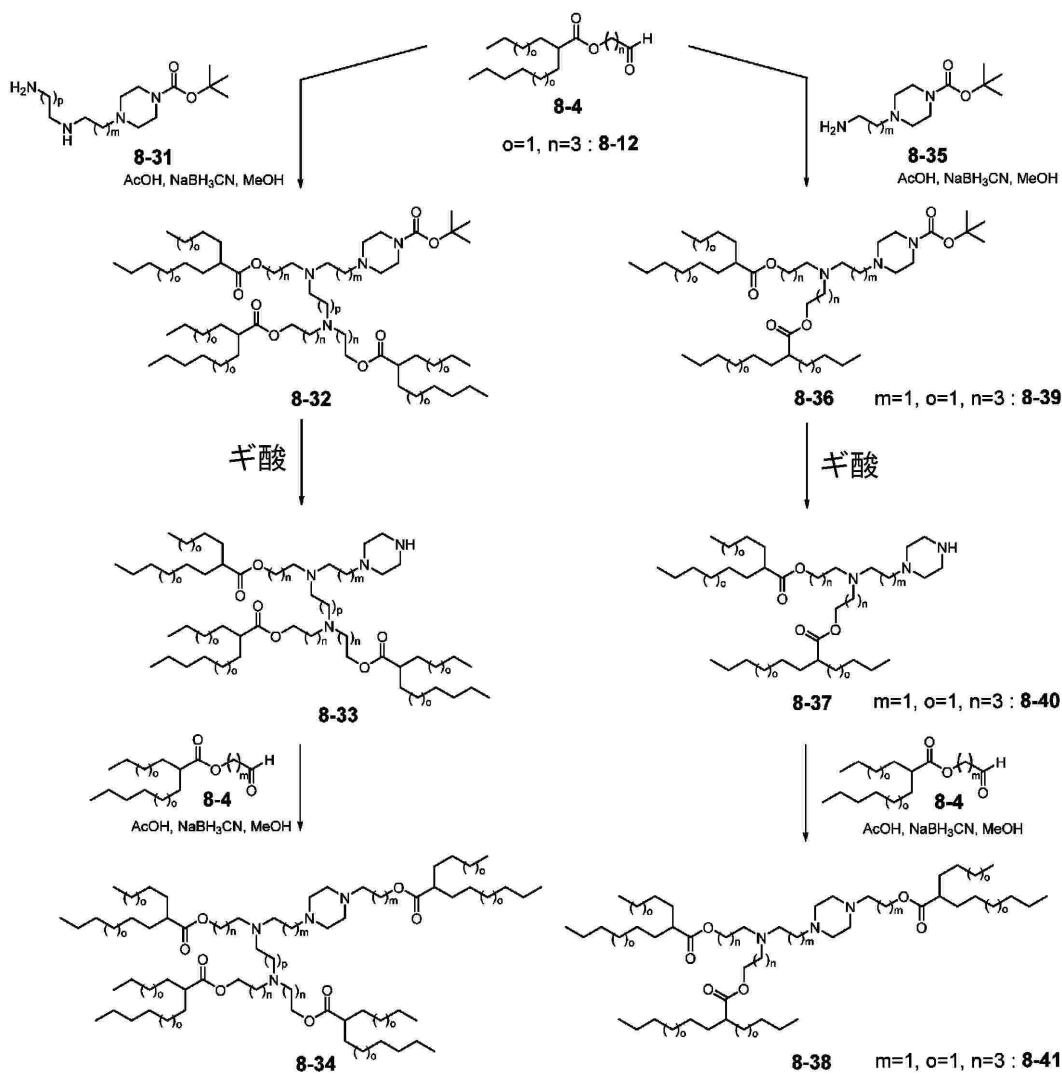
【化 4 - 3】

1.1.3 化合物 8-28 および 8-29 への合成経路



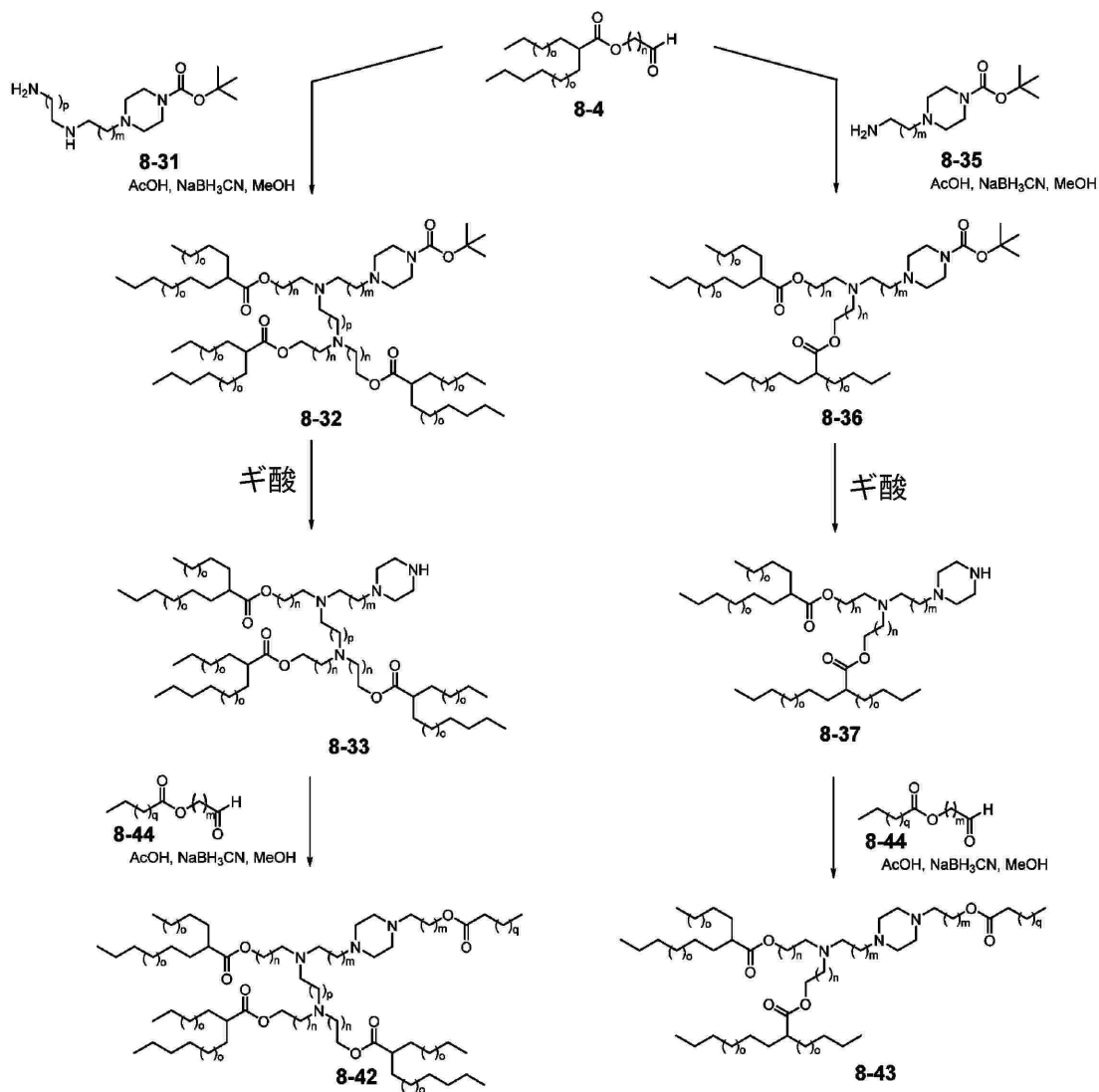
【化 4 - 4】

1.1.4 化合物 8-34 および 8-38 への合成経路



【化 4 - 5】

1.1.5 化合物 8-42 および 8-43 への合成経路



10

20

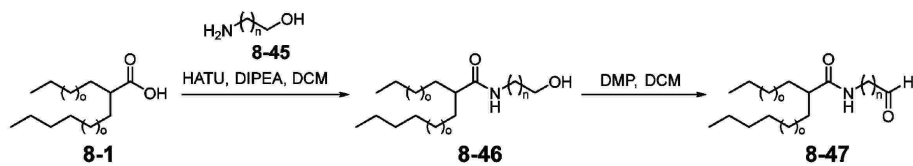
30

40

50

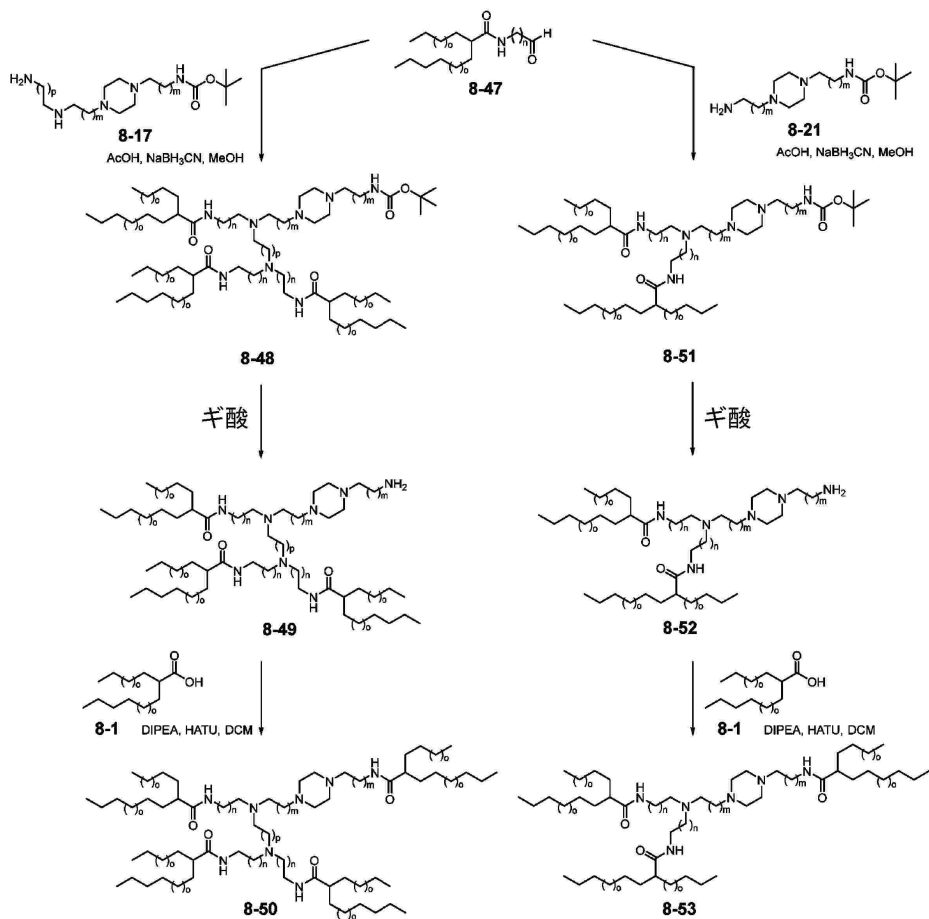
【化 4 - 6】

1.1.6 化合物 8-47 への合成経路



10

1.1.7 化合物 8-50 および 8-53 への合成経路



20

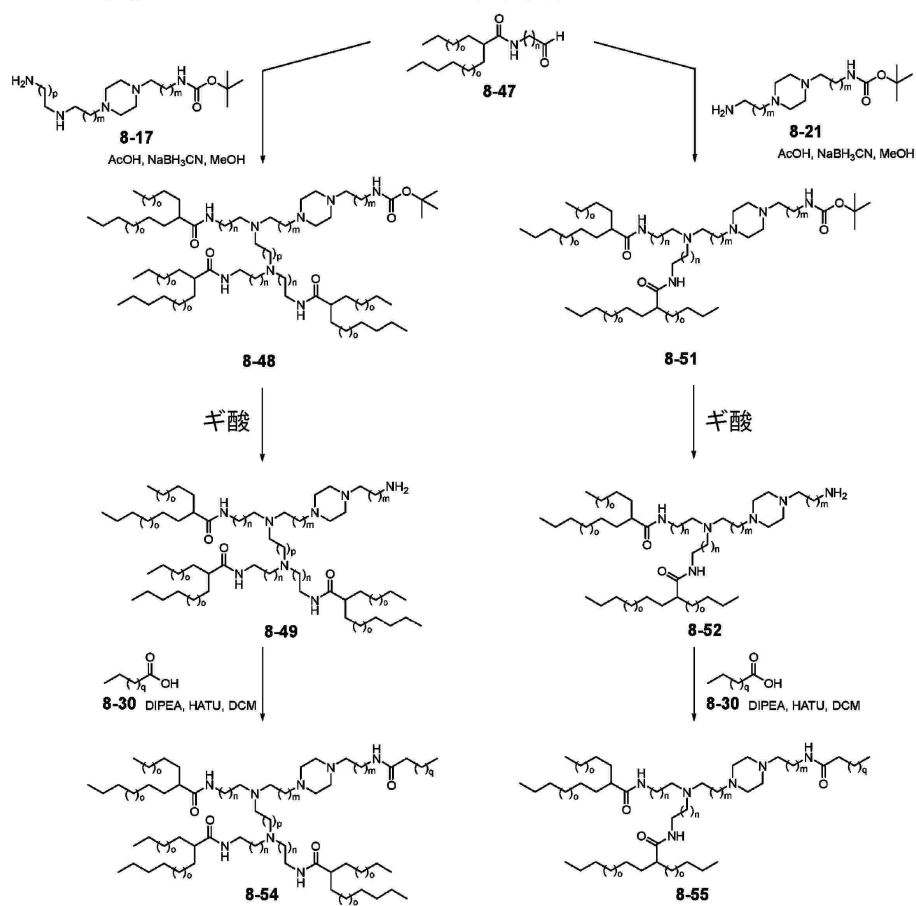
30

40

50

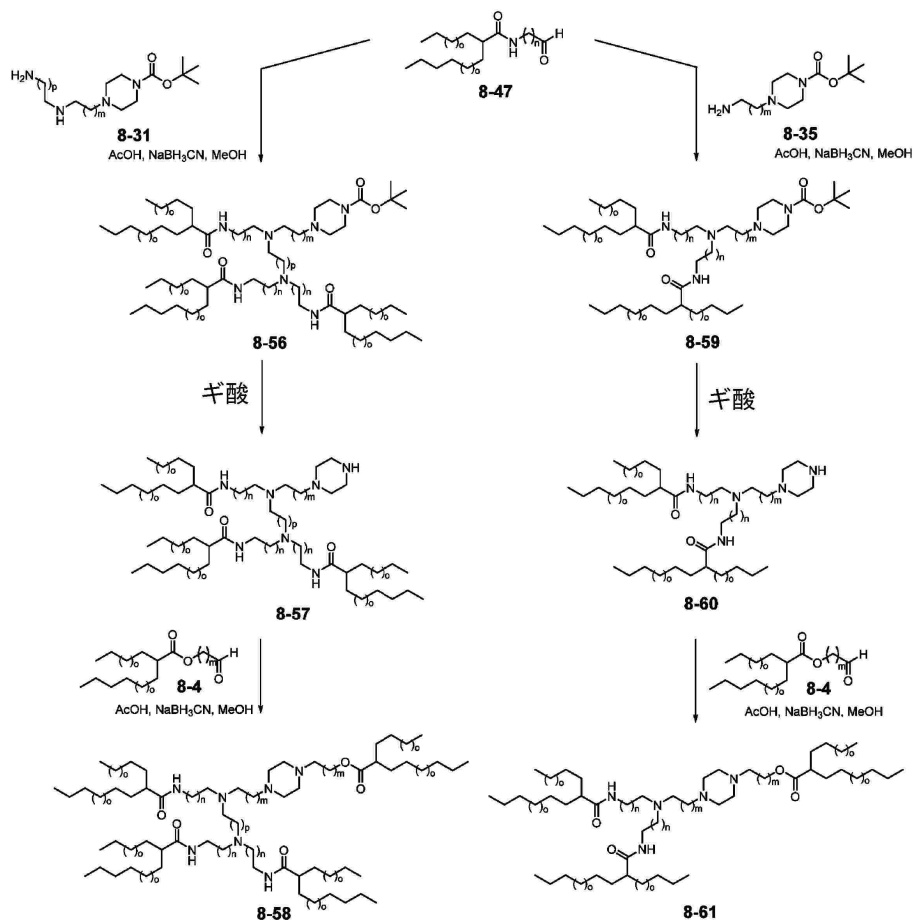
【化 4 - 7】

1.1.8 化合物 8-54 および 8-55 への合成経路



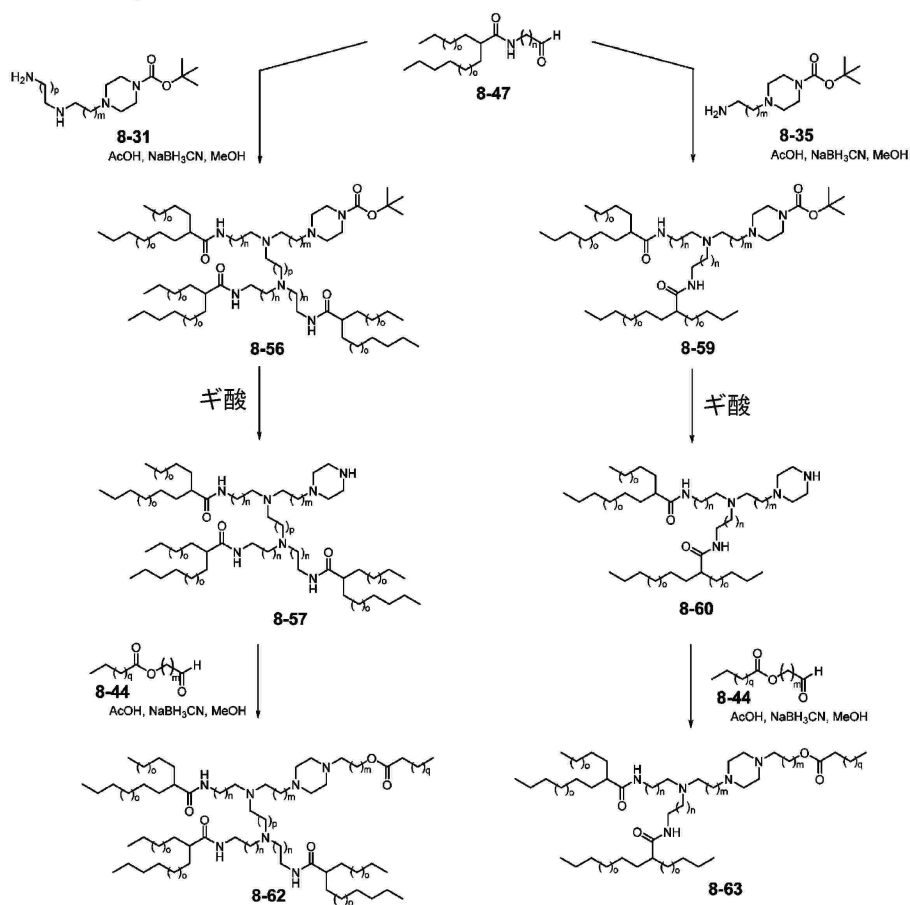
【化 4 - 8】

1.1.9 化合物 8-58 および 8-61 への合成経路



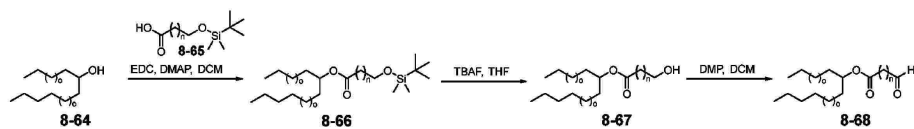
【化 4 - 9】

1.1.10 化合物 8-62 および 8-63 への合成経路

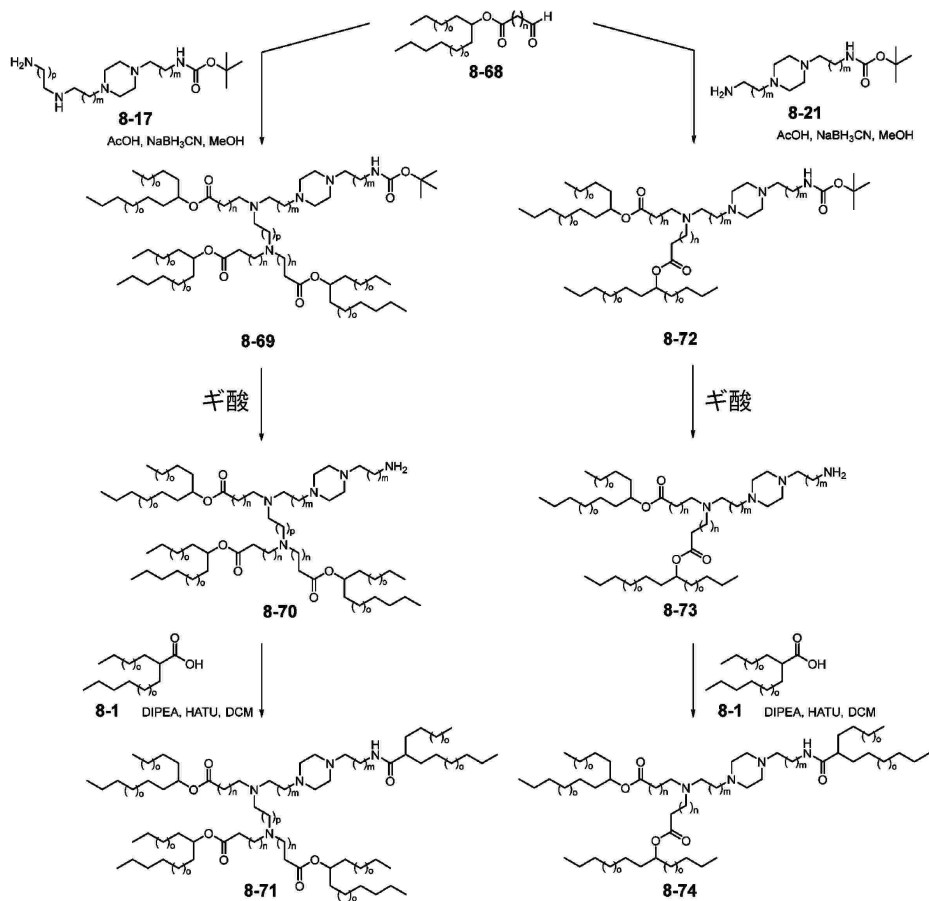


【化 4 - 1 0】

1.1.1.11 化合物 8-68 への合成経路



1.1.1.12 化合物 8-71 および 8-74 への合成経路



10

20

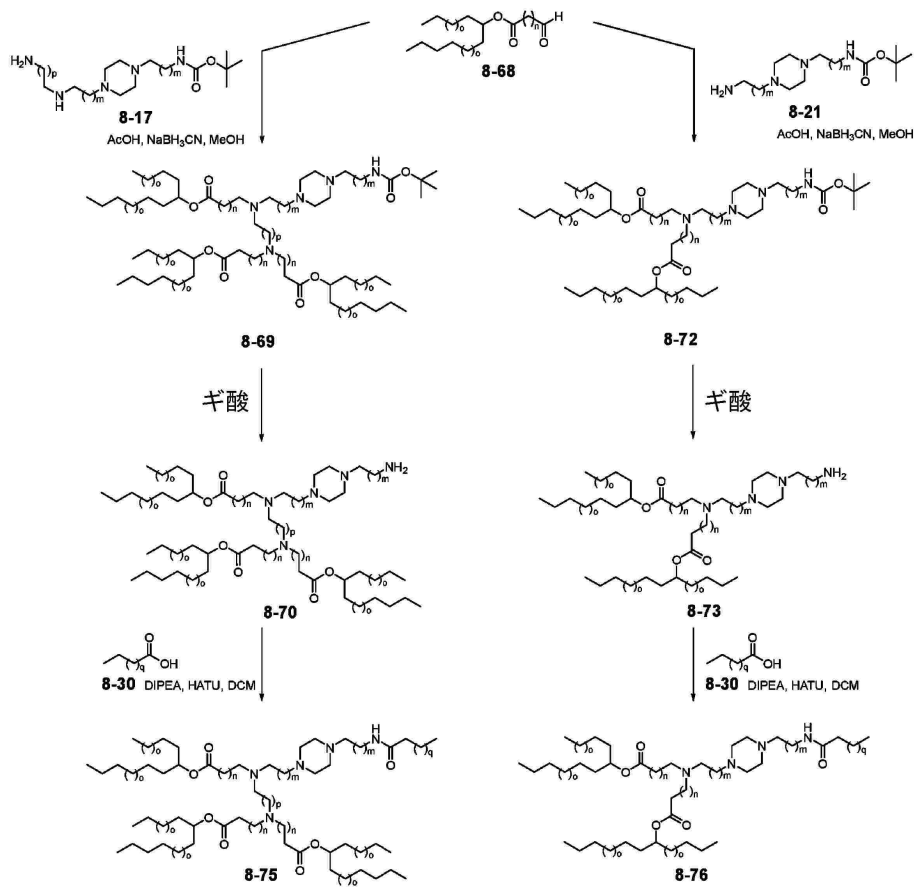
30

40

50

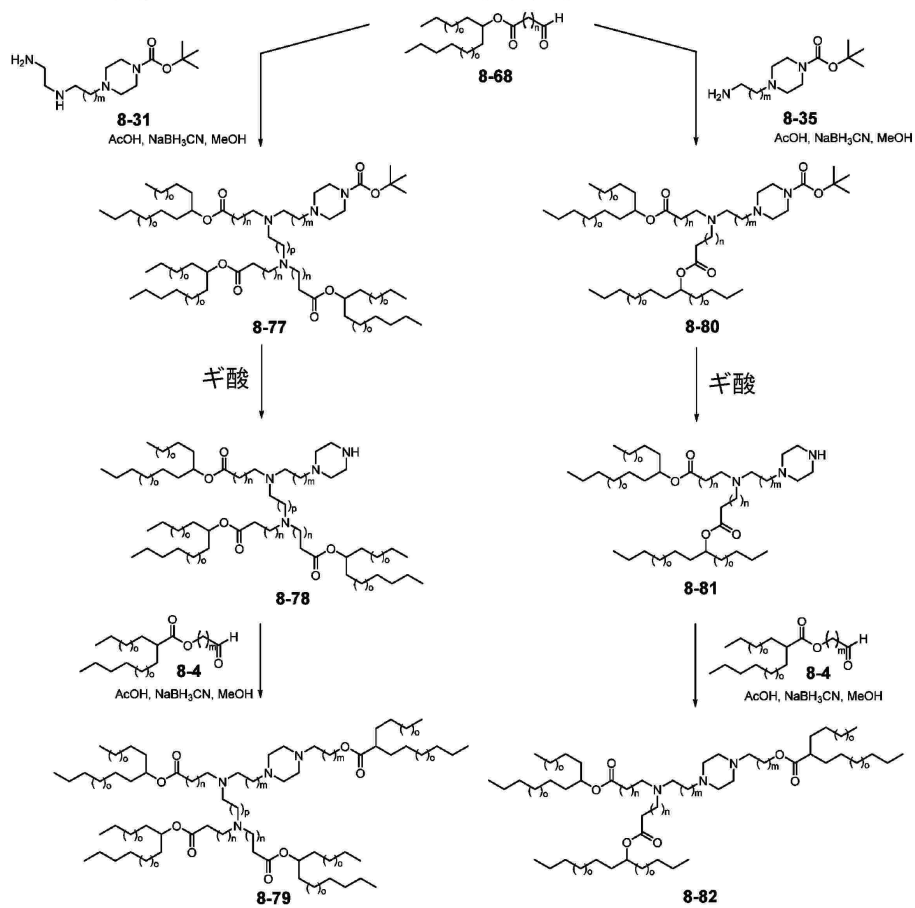
【化 4 - 1 1】

1.1.13 化合物 8-75 および 8-76 への合成経路



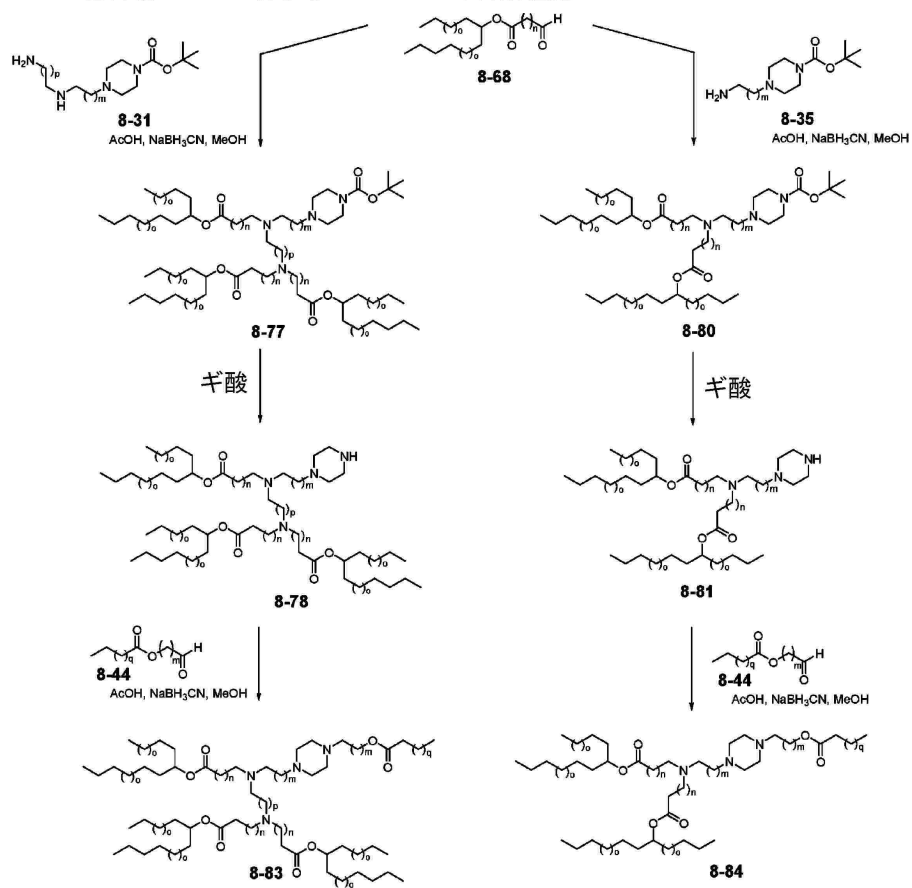
【化 4 - 1 2】

1.1.14 化合物 8-79 および 8-82 への合成経路



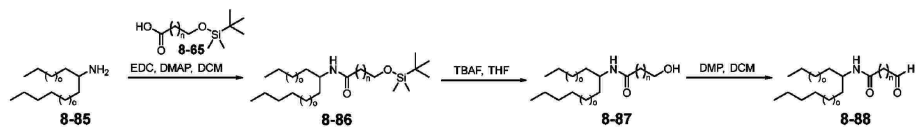
【化 4 - 1 3】

1.1.15 化合物 8-83 および 8-84 への合成経路



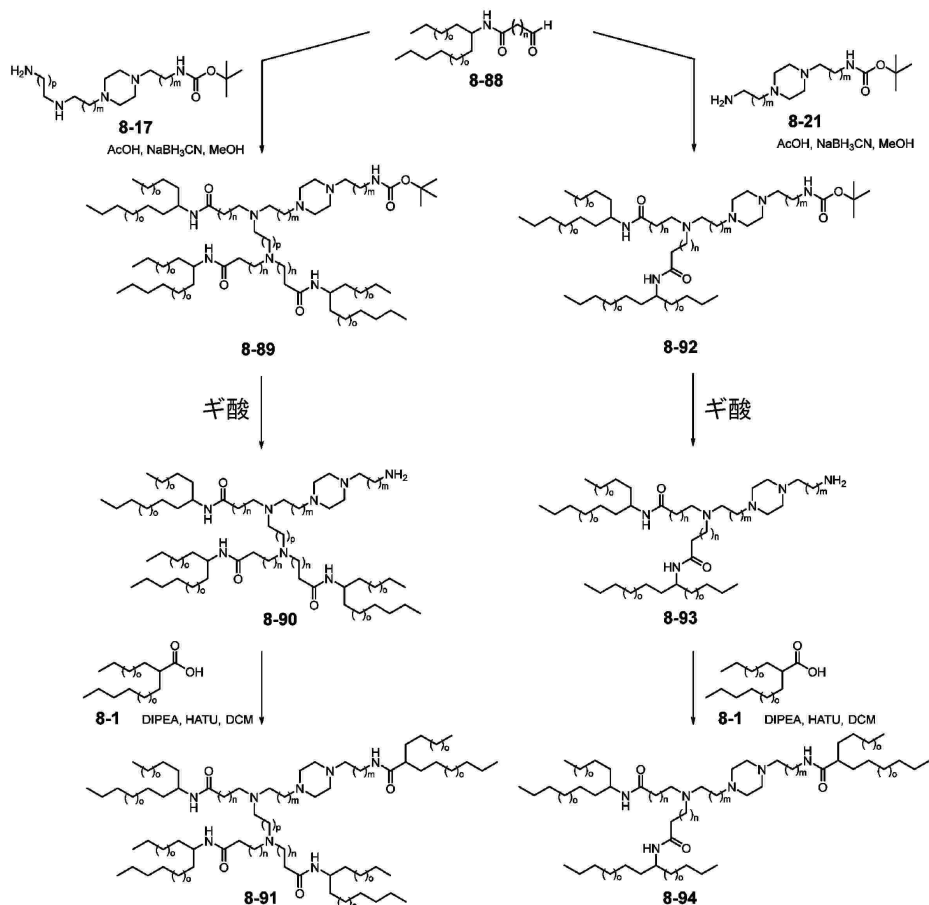
【化 4 - 1 4】

1.1.16 化合物 8-88 への合成経路



10

1.1.17 化合物 8-91 および 8-94 への合成経路



20

30

40

50

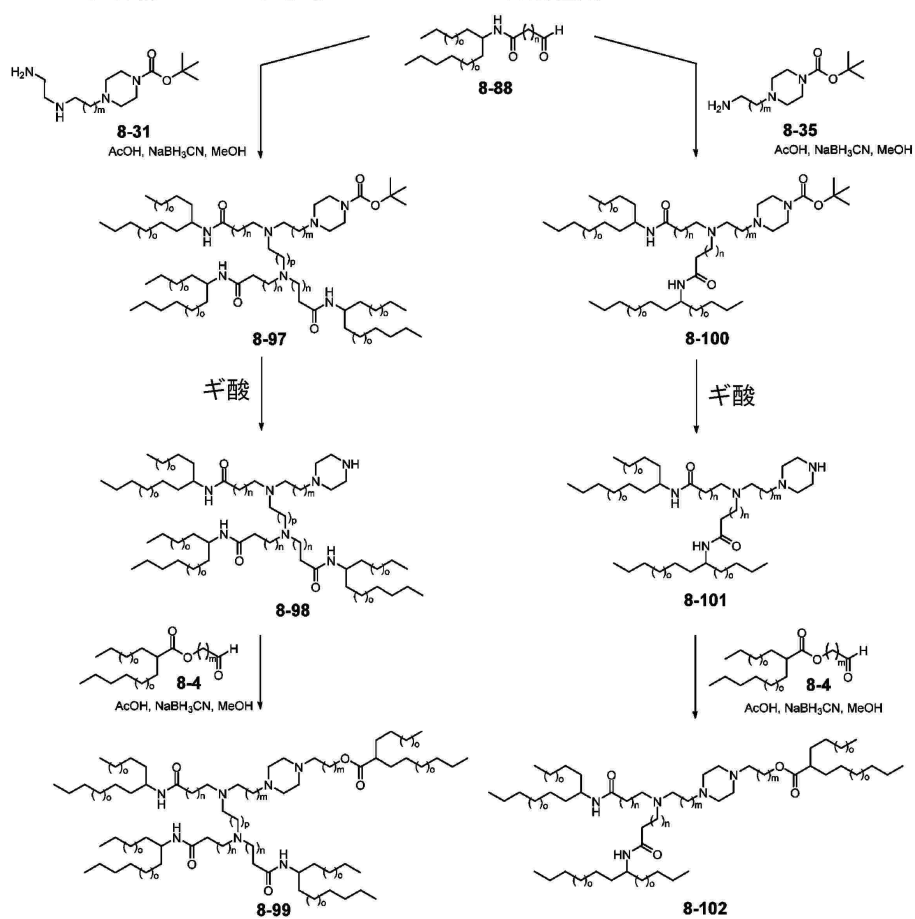
【化 4 - 1 5】

1.1.18 化合物 8-95 および 8-96 への合成経路



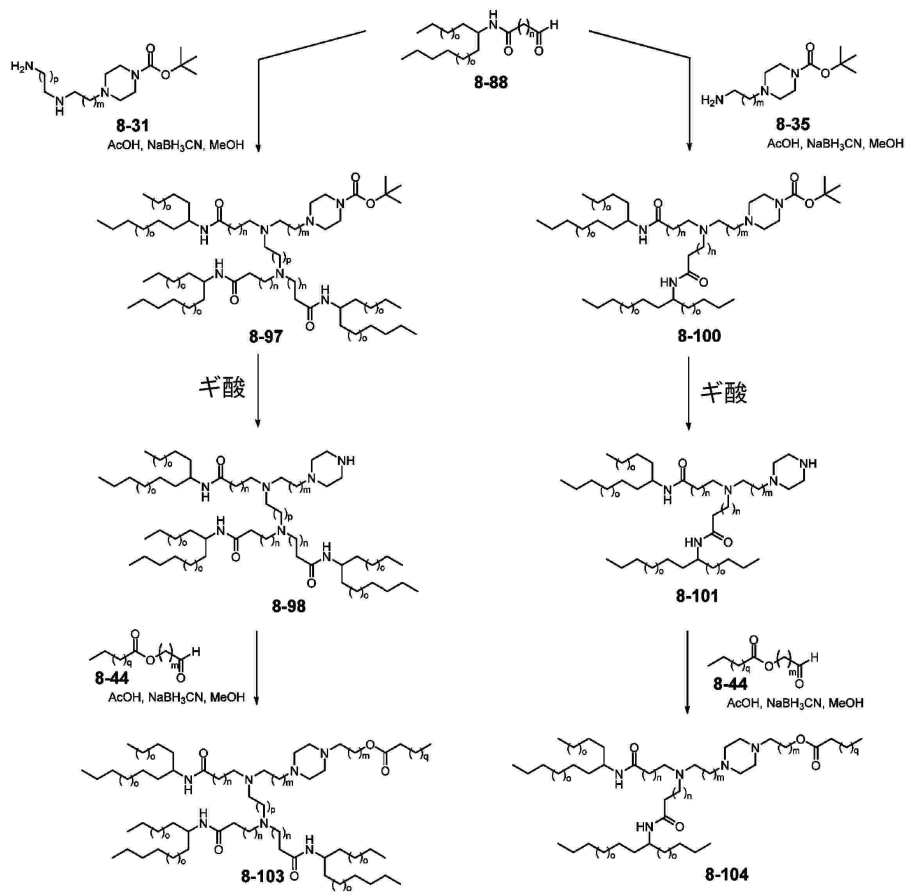
【化 4 - 1 6】

1.1.19 化合物 8-99 および 8-102 への合成経路



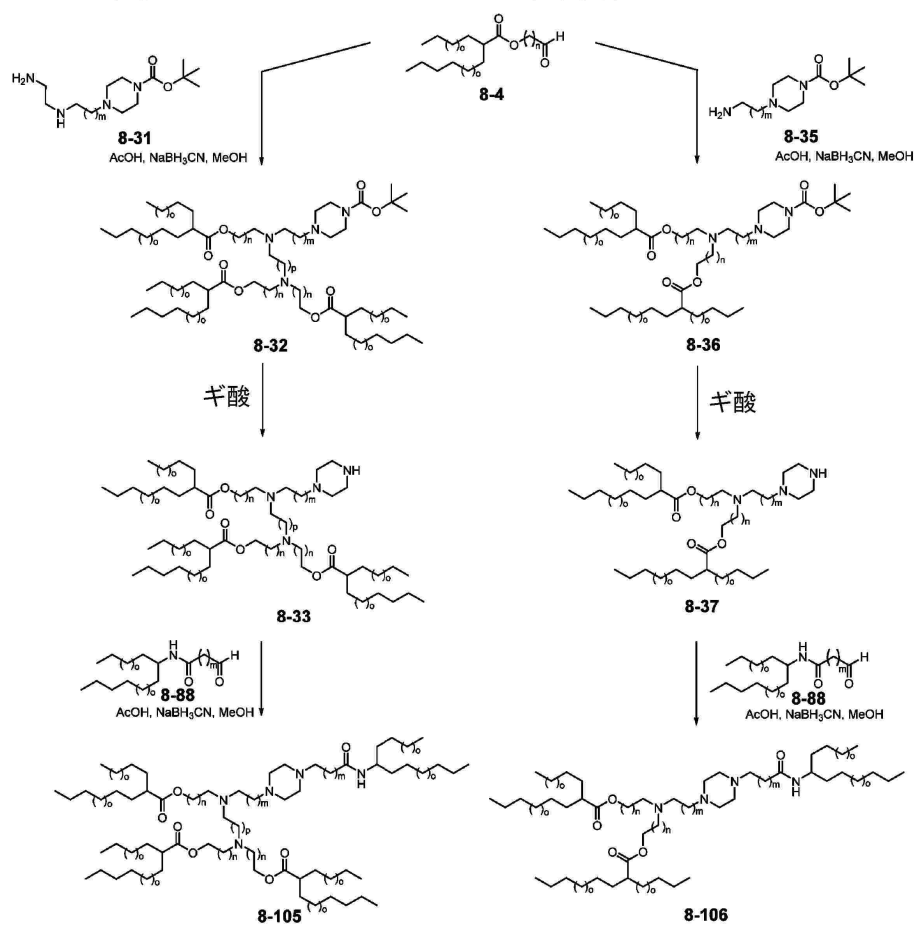
【化 4 - 1 7】

1.1.20 化合物 8-103 および 8-104 への合成経路



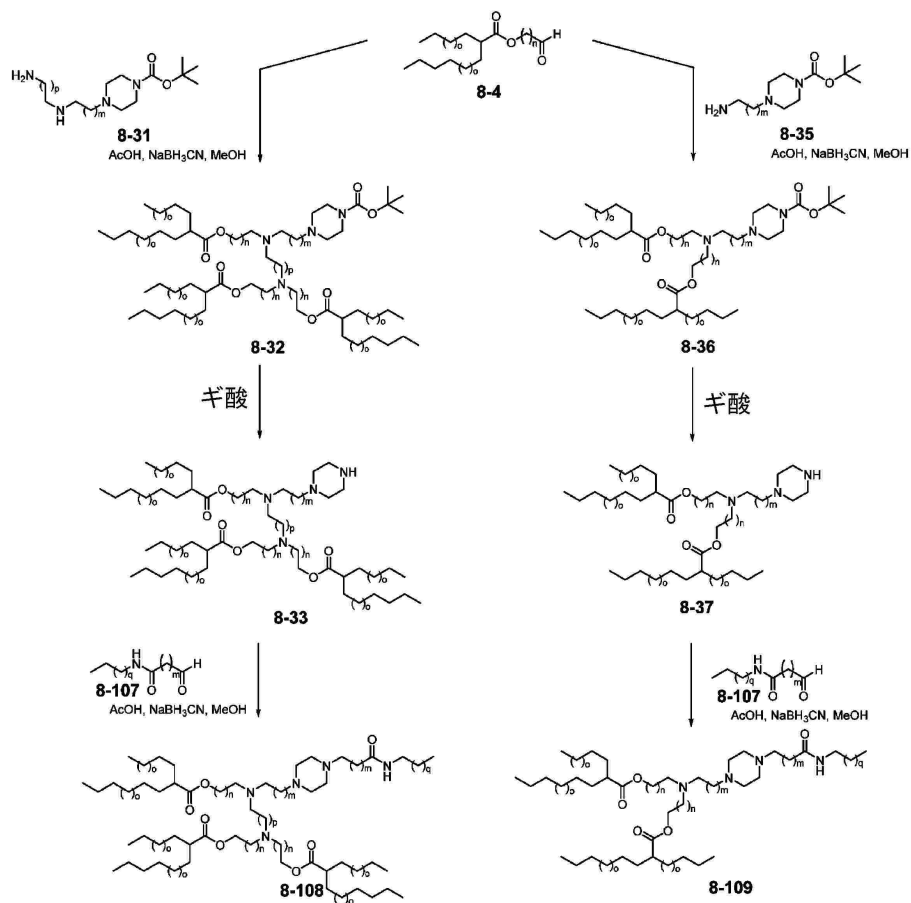
【化 4 - 1 8】

1.1.21 化合物 8-105 および 8-106 への合成経路



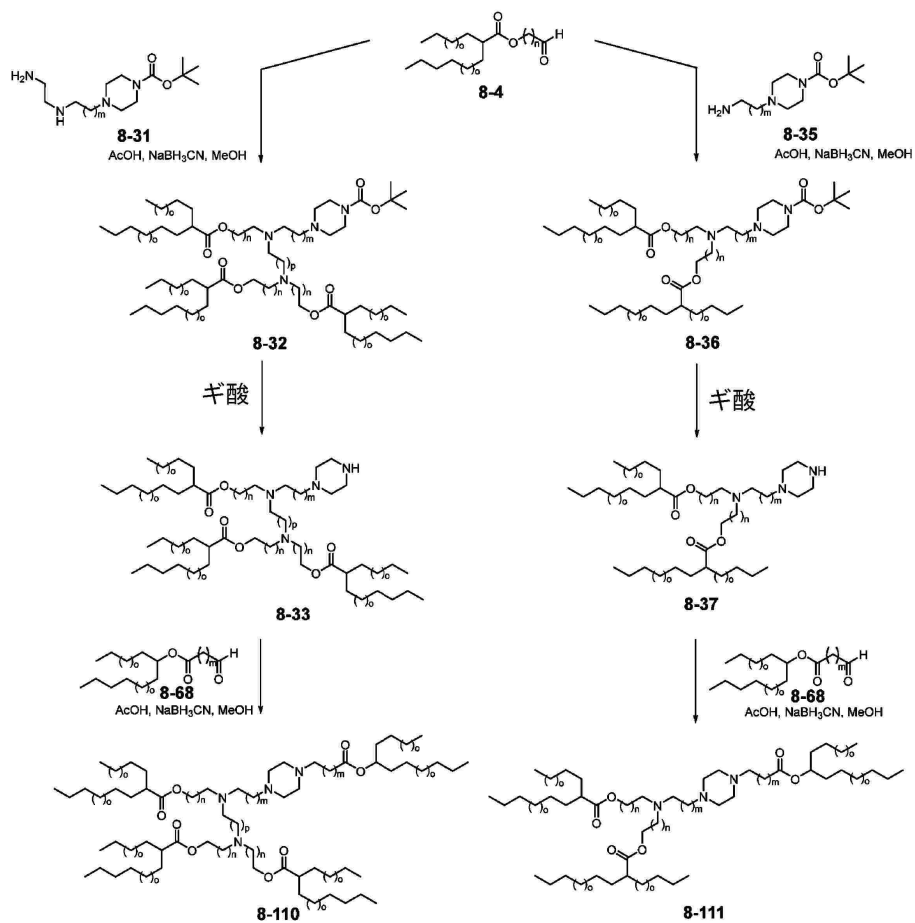
【化 4 - 1 9】

1.1.22 化合物 8-108 および 8-109 への合成経路



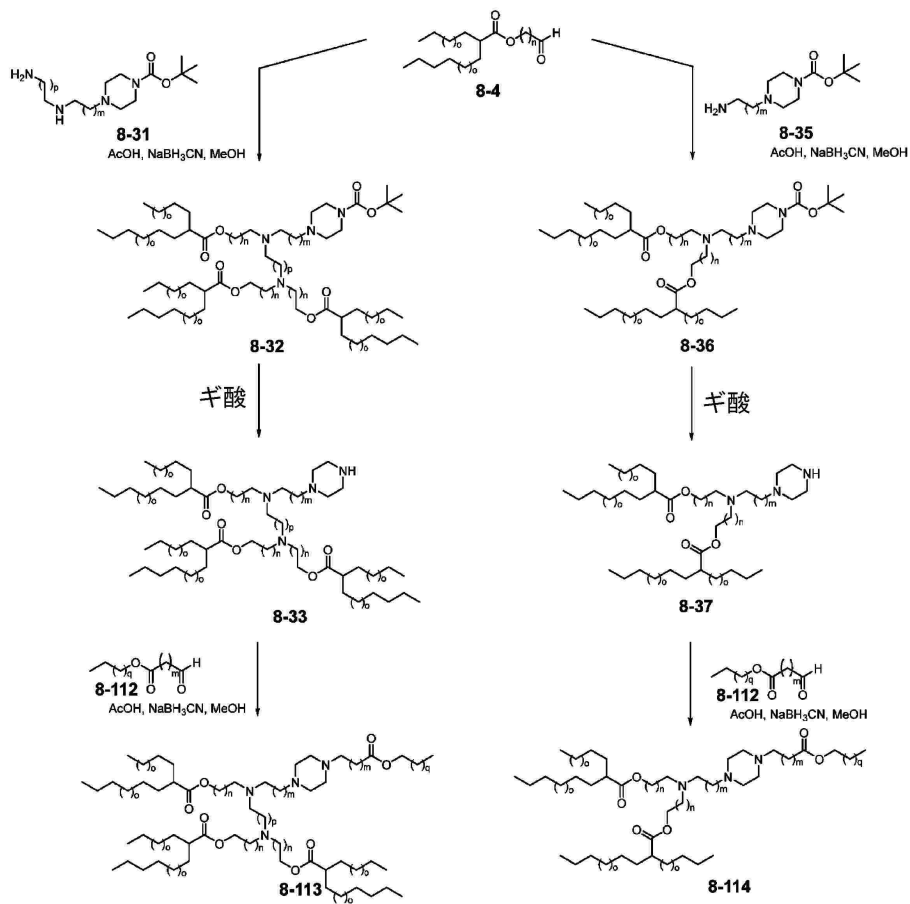
【化 4 - 2 0】

1.1.23 化合物 8-110 および 8-111 への合成経路



【化 4 - 2 1】

1.1.24 化合物 8-113 および 8-114 への合成経路



10

20

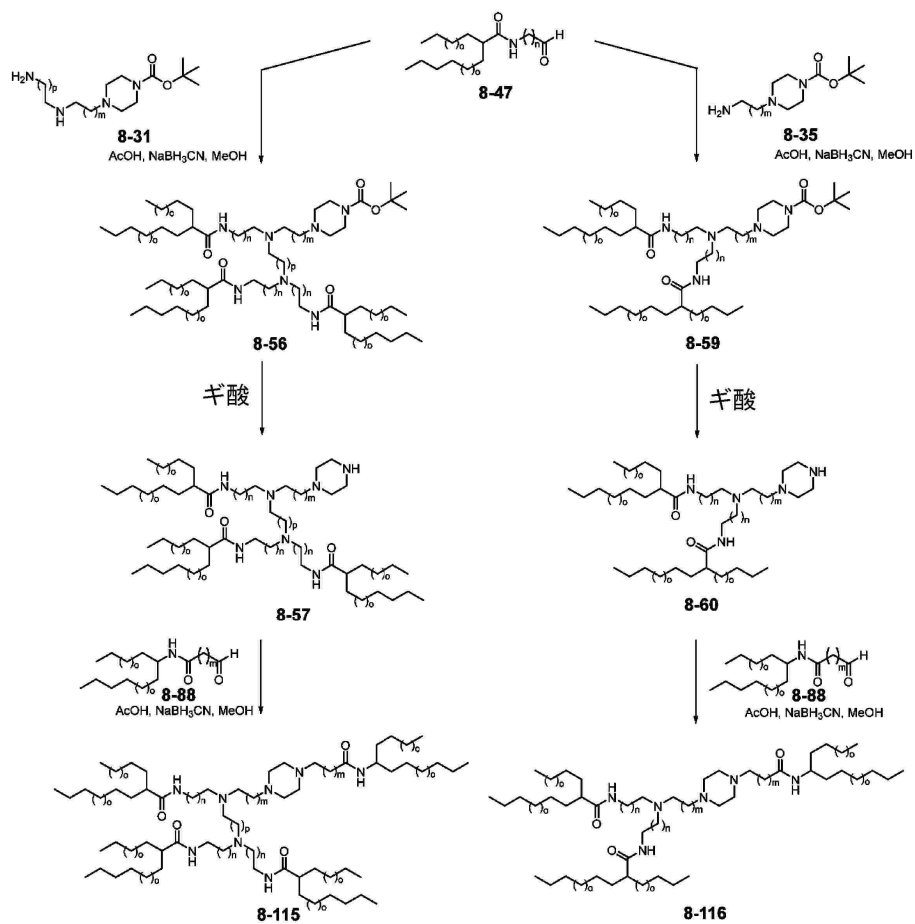
30

40

50

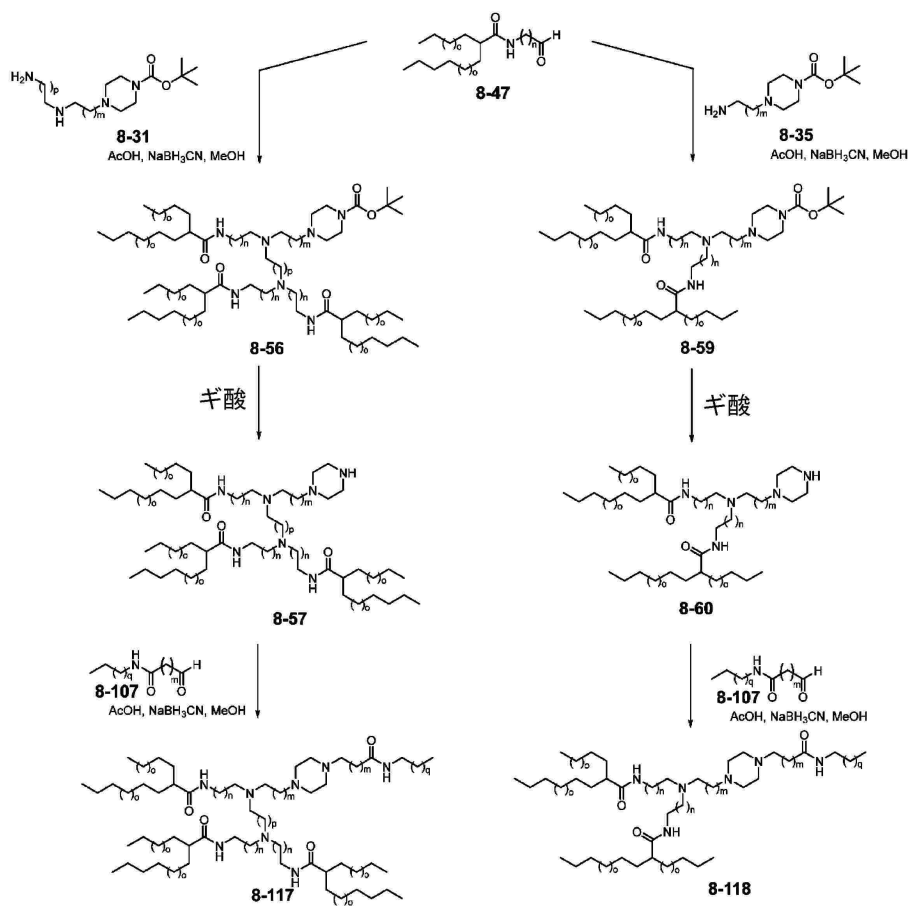
【化 4 - 2 2】

1.1.25- 化合物 8-115 および 8-116 への合成経路



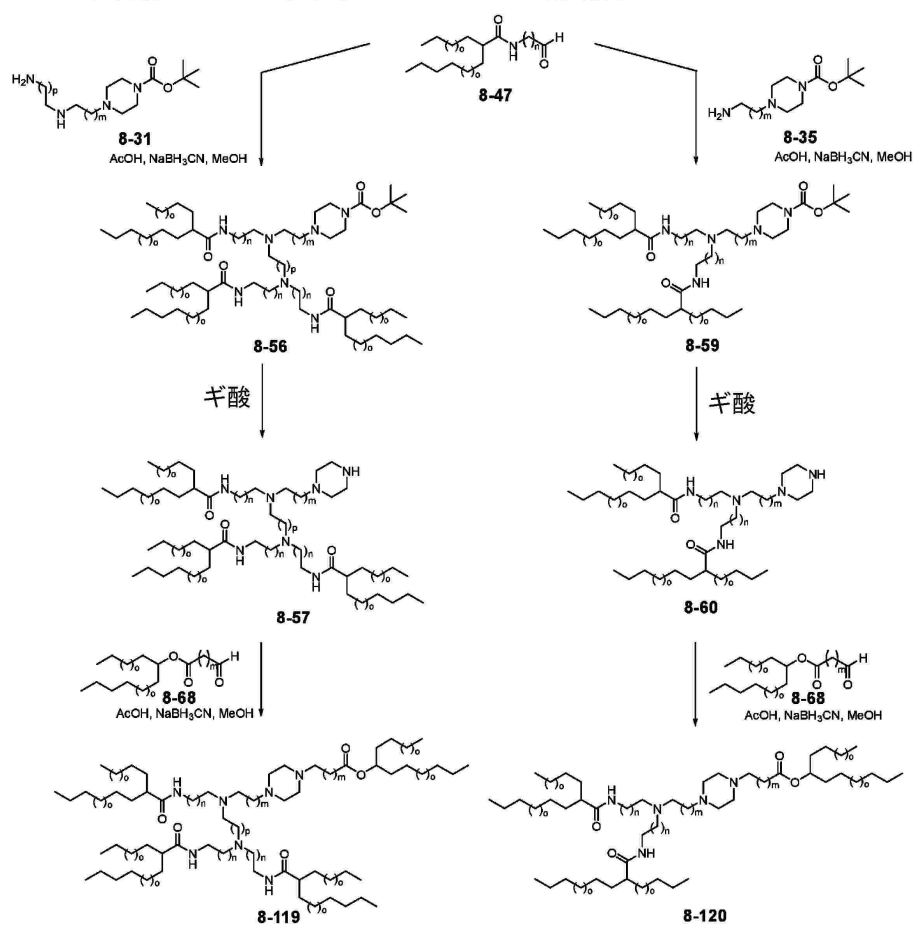
【化 4 - 2 3】

1.1.26 化合物 8-117 および 8-118 への合成経路



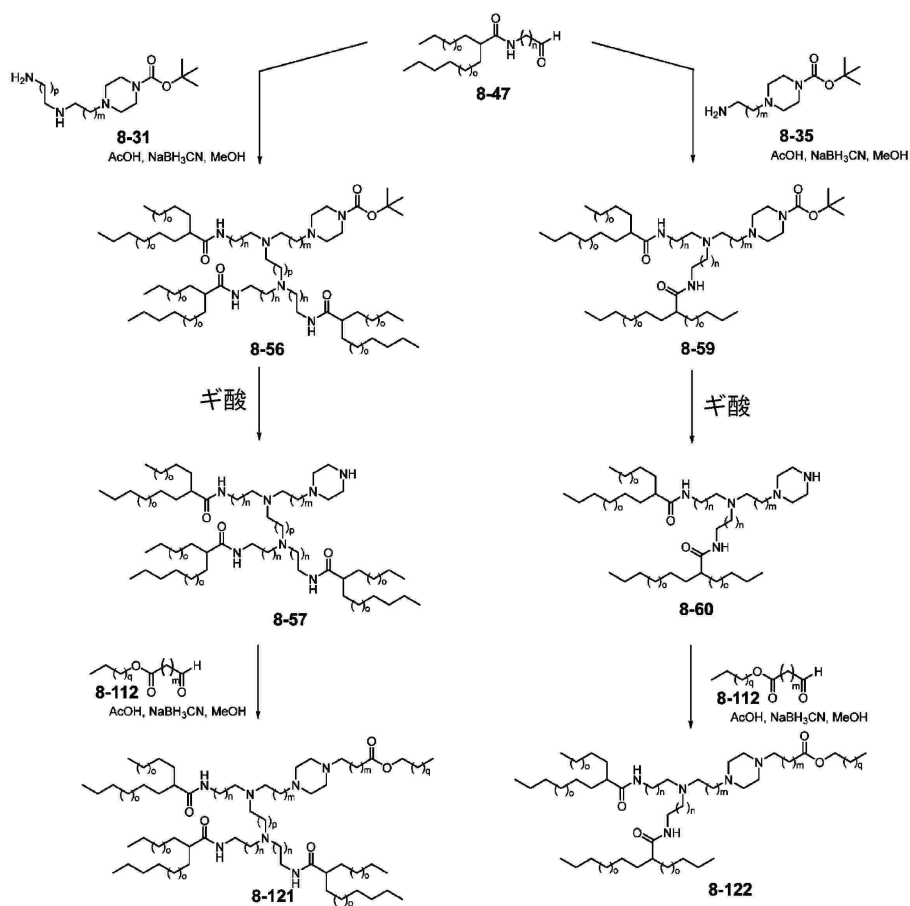
【化 4 - 2 4】

1.1.27 化合物 8-119 および 8-120 への合成経路



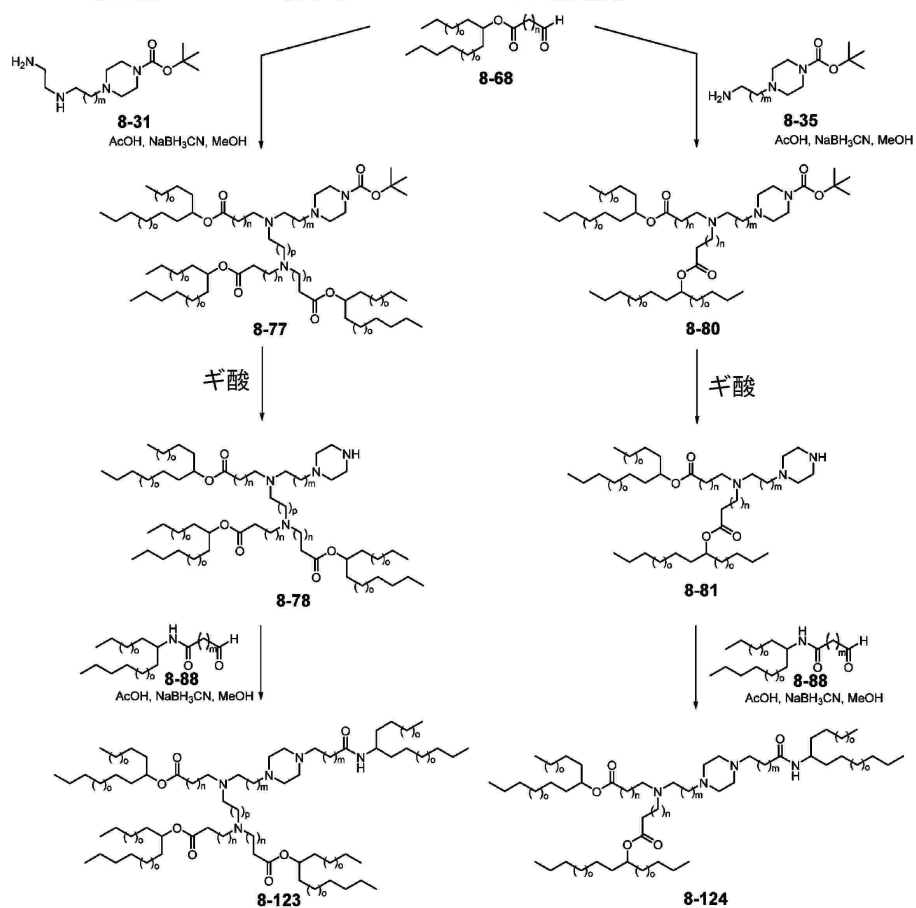
【化 4 - 2 5】

1.1.28 化合物 8-121 および 8-122 への合成経路



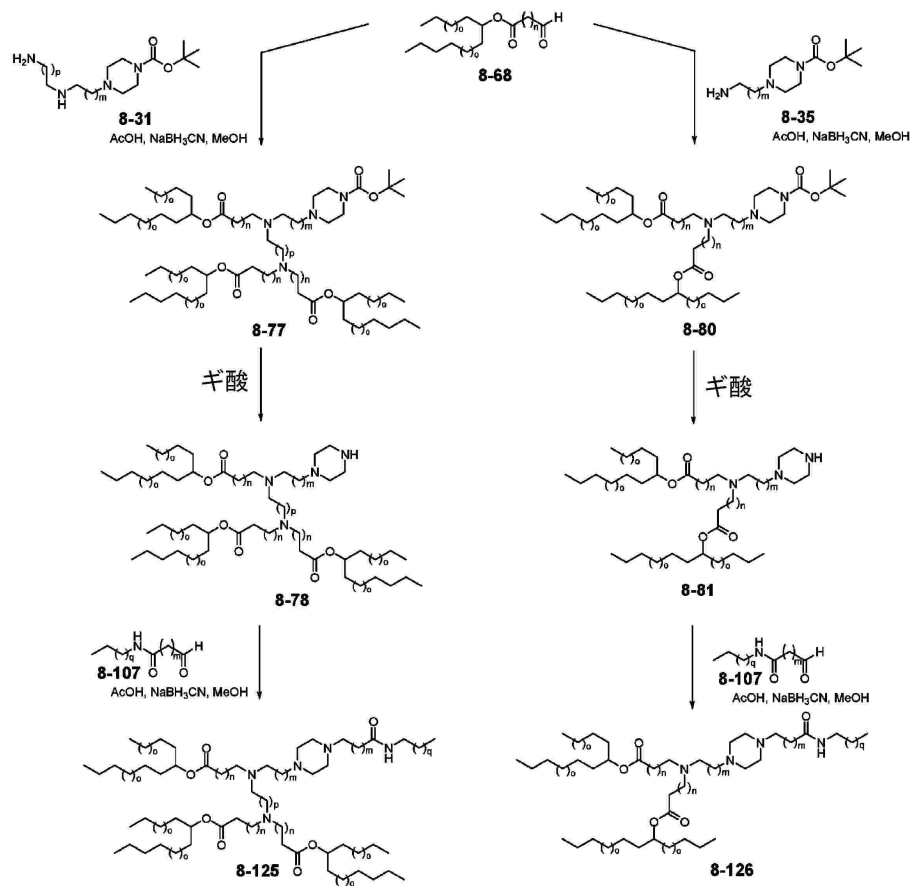
【化 4 - 2 6】

1.1.29 化合物 8-123 および 8-124 への合成経路



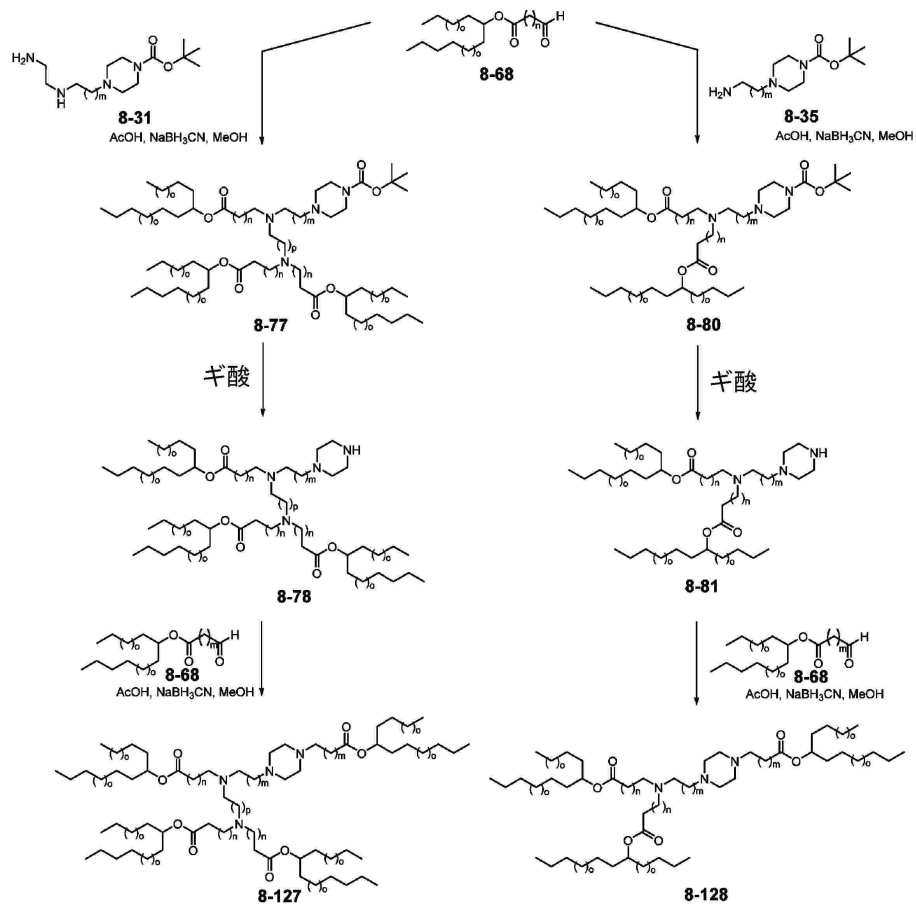
【化 4 - 2 7】

1.1.30 化合物 8-125 および 8-126 への合成経路



【化 4 - 2 8】

1.1.31 化合物 8-127 および 8-128 への合成経路



10

20

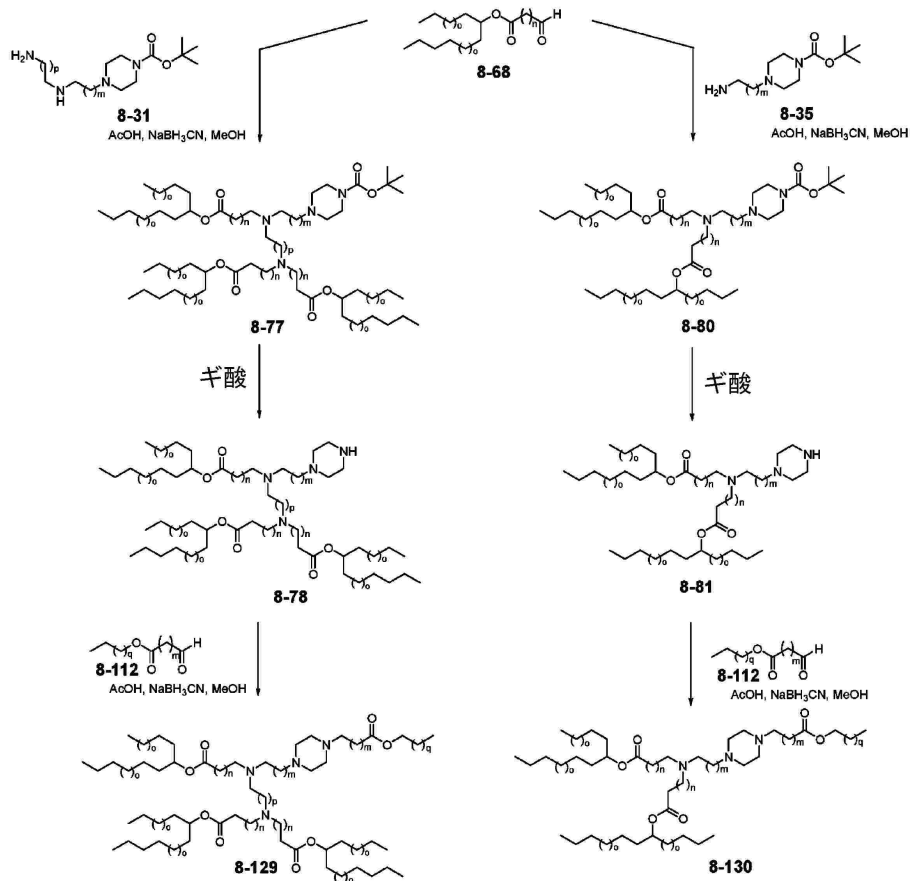
30

40

50

【化 4 - 2 9】

1.1.32 化合物 8-129 および 8-130 への合成経路



10

20

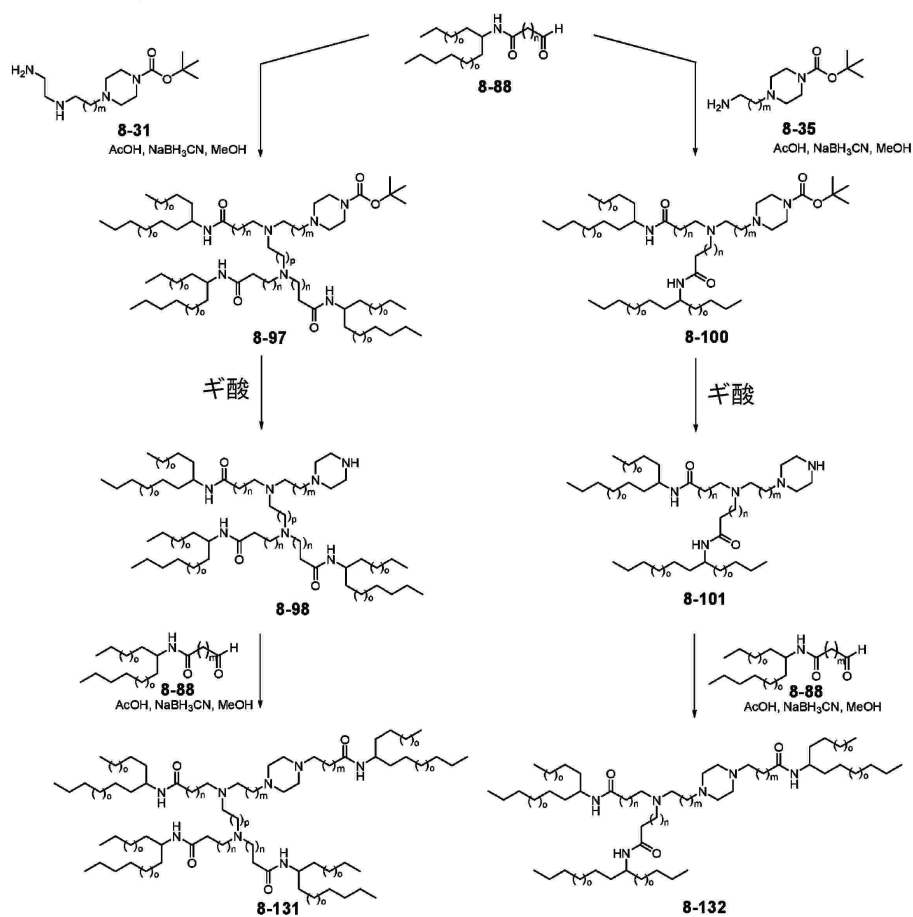
30

40

50

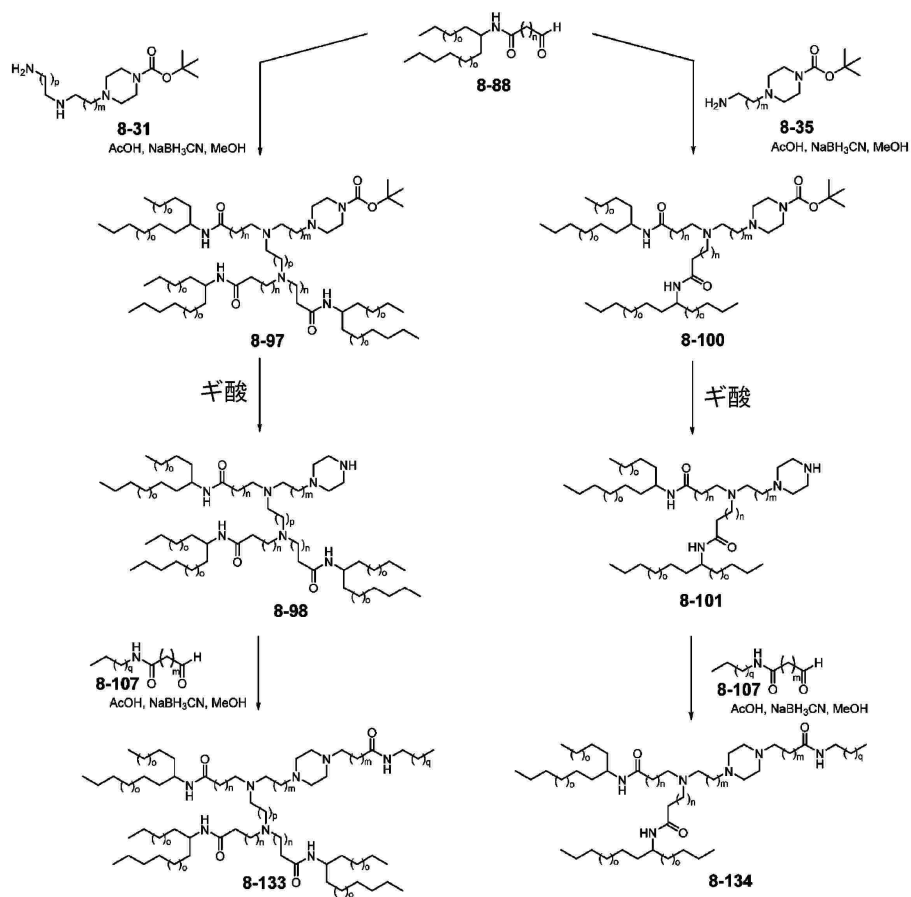
【化 4 - 3 0】

1.1.33 化合物 8-131 および 8-132 への合成経路



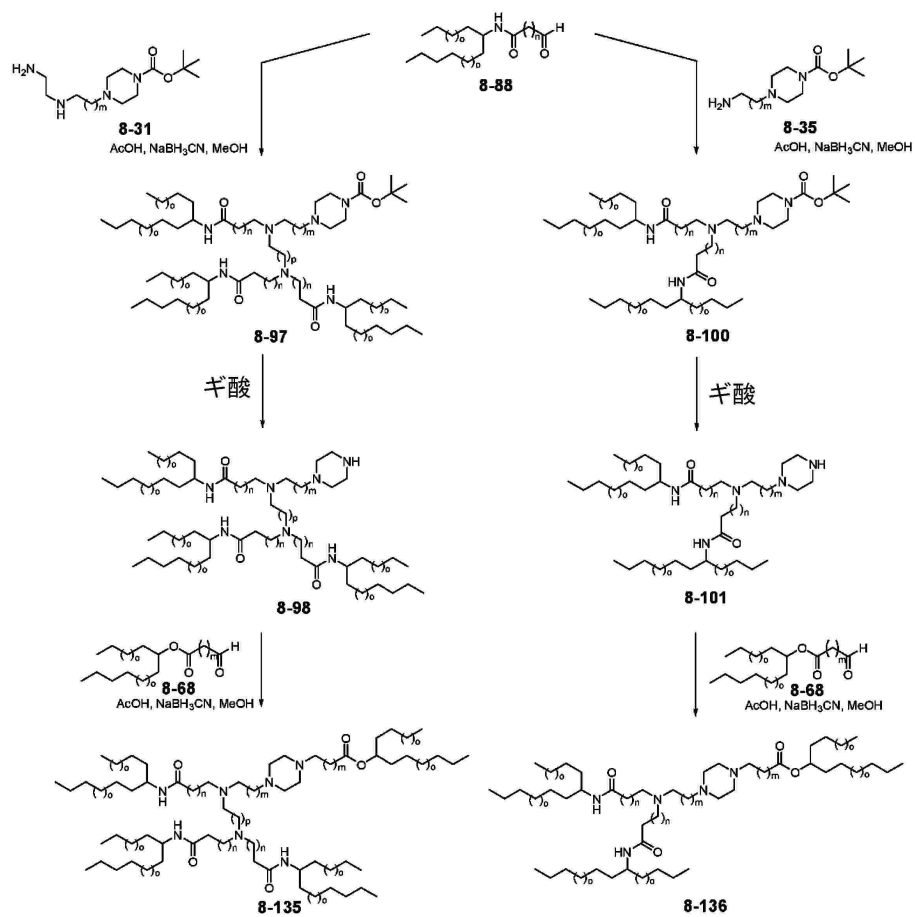
【化 4 - 3 1】

1.1.34 化合物 8-133 および 8-134 への合成経路



【化 4 - 3 2】

1.1.35 化合物 8-135 および 8-136 への合成経路



10

20

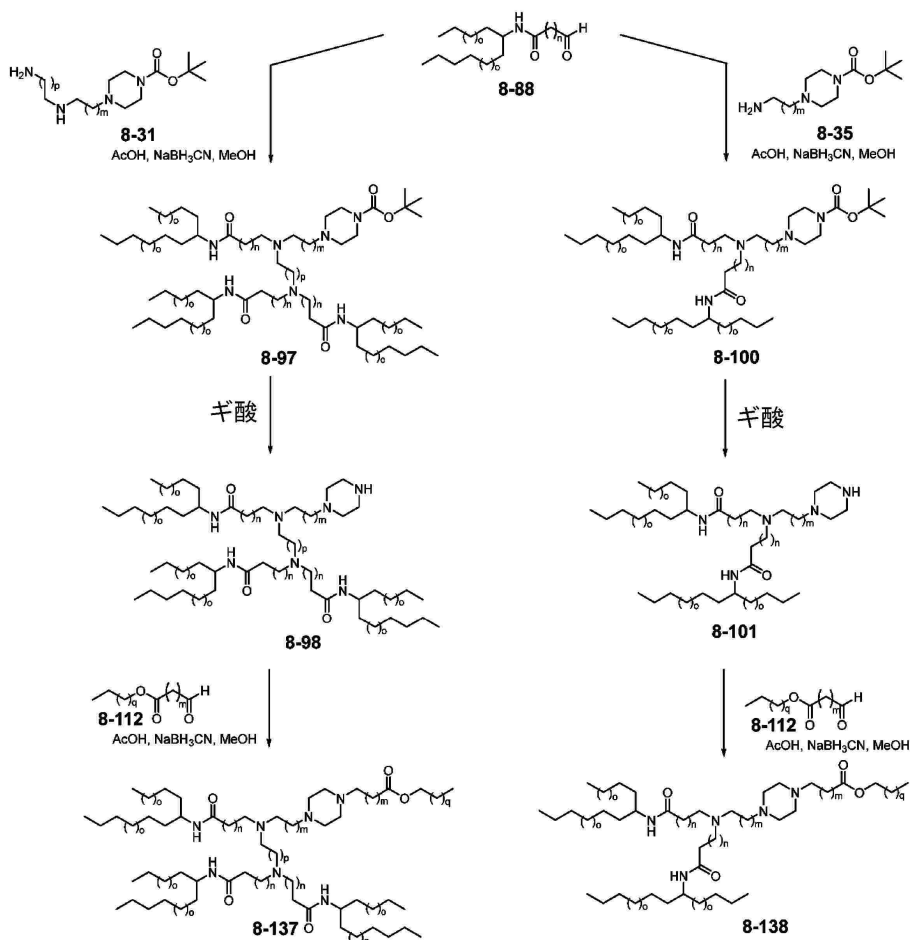
30

40

50

【化 4 - 3 3】

1.1.36 化合物 8-137 および 8-138 への合成経路



10

20

30

40

50

【0130】

1.2. 実験プロトコルの概略

一般的な考慮事項

特に断りのない限り、すべての化学物質および溶媒は、それぞれのサプライヤーが入手したとおりに使用された。アセトン（99+％）、ジクロロメタン（99.8+％）、酢酸エチル（99.5+％）、エタノール（99.8％）、トルエン（99.85％）、1,2-ジクロロエタン（99.8+％）、メタノール（99.8+％）、アンモニア（メタノール中7N）およびヘプタン（99+％）を市販品から購入した。ミリポア水（MILLI-Q IQ 7005精製システム）を使用した。

【0131】

クロマトグラフィー精製は、市販の通常相シリカフラッシュカートリッジ（12、40、または80g）を用いて、20～30 mL／分の流速でELSDおよびUV検出器を有する自動フラッシュクロマトグラフィーNextGen300+システムを用いて行った。薄層クロマトグラフィー（TLC）分析を、プレコートTLCアルミニウムシート（DC Kleselgel 60 F254）/UV254（層：蛍光インジケータUV254を有する0.20 mmシリカゲル）を用いて行った。254 nmの紫外線でスポットを検出した。

【0132】

核磁気共鳴（NMR）スペクトルは、Bruker Model Avance II 400（Deimos）およびBruker Model Avance II 700（Hera）フーリエ変換NMR分光計を用いて、303 KのCDCl₃で記録した（特に明記しない限り）。試料は、0.6～1.0 mLの重水素化溶媒（CDCl₃）に溶解した約10～30 mgの化合物を使用して調製した。caを用いて調製した。すべてのスペクトルは、TMS基準ピークまたは溶剤残留ピーク（例えば、¹Hについては $\delta = 0.00$ ppm、CDCl₃中の¹³Cについては $\delta = 77.16$ ppm）のいずれかを参照した。化学シフト（ δ ）はppmで報告され、結合定数（J）はHzで報告され、分割パターンはシングレット（一重項）（s）、ブロードシングレット（br s）、ダブルット（二重項）（d）、トリプレット（三重項）（t）、カルテット（四重項）（q）、クインテット（五重項）（quint）、セクステット（六重項）（sext）、セプテット（七重項）（sept）マルチプレット（多重項）（m）、またはそれらの組み合わせ、として割り当てられる。

【0133】

液体クロマトグラフィー - 質量分析（LC-MS）（Agilent LC/MSDおよび1260 Infinity II LC System + Open LAB CDS ChemStation EditionおよびThermo Scientific Charged Aerosol Detectors）試料を、0.1～1 mgの化合物をアセトニトリル：イソプロパノール（1：1）混合物（～0.5 mL）に溶解することによって調製した。逆相カラム（CSHフェニルヘキシルカラム、130 Å、2.5 μ m、2.1 mm × 50 mm）を用いた。2種類の方法を用いた。方法1：使用した溶離液は、50% A（H₂O中の0.1%ギ酸）、12.5% B（CH₃CN中の0.1%ギ酸）および37.5% c（イソプロパノール中の0.1%ギ酸）であり、流速は0.350 mL／minで33分間にわたった。方法2：使用した溶離液は、100% A（H₂O中の0.1%ギ酸）から100% B（CH₃CN中の0.1%ギ酸）まで、流速0.400 mL／分で13.5分間にわたった。

テーブル 1

10

20

30

40

50

【表 1】

使用される略語	
AcOH	酢酸
BOC	tert-ブチルオキシカルボニル
DCM	ジクロロメタン
DIPEA	ジイソプロピルエチルアミン
DMAP	4 - ジメチルアミノピリジン
DMP	デス - マーチンペルヨージナン
EDC	1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩
ESI	エレクトロスプレーイオン化
EtOAc	酢酸エチル
HATU	ヘキサフルオロリン酸アザベンゾトリアゾールテトラメチルウロニウム
MeOH	メタノール
MS	質量分析
NMR	核磁気共鳴
TBAF	テトラ - n - ブチルアンモニウムフルオリド
THF	テトラヒドロフラン

10

20

【0134】

1.2.1.化合物 8-11、8-12、8-13、8-14、8-15および8-16の調製
1.2.1.1.ステップ1:

Ar雰囲気下、ジオール 8-2 (3当量) を DCM に溶解した。この溶液に、カルボン酸 8-1 (1当量)、EDC・HCl (1.1当量) および DMAP (0.8~1当量) を順次添加した。溶液を室温で一晩攪拌した。次いで、反応混合物を (0.2M~0.5M) HCl で 2 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そして溶媒を真空中で蒸発させた。次いで、残渣を NextGen 300+フラッシュクロマトグラフィーシステム (100%ヘプタンから20%/80%ヘプタン/EtOAcへの勾配) 上で順相により精製し、エステル中間体 8-5、8-6、8-7、8-8、8-9および8-10を得た。

30

【0135】

1.2.1.2.ステップ2:

Ar雰囲気下、アルコール 8-3 (1当量) を DCM に溶解した。この溶液を Dess-Martin ペリオジナン試液 (1.2~1.3当量) で、部分的に、0~10℃で処理した。反応混合物を室温まで温め、4時間攪拌した。次に、反応混合物を飽和 Na₂S₂O₃ 溶液で処理した。水相を廃棄し、有機相を飽和 NaHCO₃ 液で 2 回洗浄した。合わせた有機相を無水硫酸マグネシウム上で乾燥し、真空中で蒸発させた。次に、粗残渣をヘプタンに懸濁し、濾過により白色固体を除去した。溶媒を真空中で蒸発させ、次いで残渣を NextGen 300+フラッシュクロマトグラフィーシステム (100%ヘプタンから60%/40%ヘプタン/EtOAcへの勾配) 上で順相により精製し、アルデヒド中間体 8-11、8-12、8-13、8-14、8-15および8-16を得た。

40

【0136】

1.2.2.化合物 8-27の調製

1.2.2.1 ステップ1:

50

Ar雰囲気下、アルデヒド中間体 8-12 (2.3 当量) を MeOH に溶解した。次いで、AcOH (1.5 当量、0.17 vol%) を溶液に加え、次いで、tert-ブチル N-{2-[4-(2-アミノエチル)ピペラジン-1-イル]エチル}カルバメート三塩酸塩 (1 当量) を加えた。1 分後、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (4 当量) を添加し、次いで室温で一晩攪拌した。溶媒を真空中で蒸発させた。次いで、残留物を NextGen 300+フラッシュクロマトグラフィーシステム (100% DCM から 95% / 3.5% / 1.5% DCM / MeOH / NH₃ 7 N 入り MeOH への勾配) 上で順相によって精製し、中間体 8-25 を得た。

【0137】

1.2.2.2. ステップ 2 :

Ar雰囲気下、BOC保護中間体 8-25 (1 当量) をギ酸に溶解した。次いで、反応混合物を室温で一晩攪拌させた。ギ酸を真空中で蒸発させた。残渣を飽和 NaHCO₃ 液で洗浄し、DCM で 3 回抽出した。有機相を合わせ、食塩水で洗浄し、DCM で 3 回抽出した。合わせた有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、真空中で蒸発させた。次に、残渣を NextGen 300+フラッシュクロマトグラフィーシステム (100% DCM から 95% / 3.5% / 1.5% DCM / MeOH / NH₃ 7 N 入り MeOH への勾配) で順相により精製し、中間体の 8-26 を得た。

【0138】

1.2.2.3. ステップ 3 :

Ar雰囲気下、ピペラジンをベースとする中間体 8-26 (1 当量)、2-ブチルオクタン酸 (1.4 当量) および HATU (1.5 当量) を DCM に溶解した。DIPEA (7 当量) を反応混合物に添加し、次いで反応混合物を室温で一晩攪拌した。粗混合物を食塩水で洗浄し、DCM で 3 回抽出した。合わせた有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、真空中で蒸発させた。次に、残渣を NextGen 300+フラッシュクロマトグラフィーシステム (100% DCM から 95% / 3.5% / 1.5% DCM / MeOH / NH₃ 7 N 入り MeOH への勾配) で順相により精製し、化合物 8-27 を得た。

【0139】

1.2.3. 化合物 8-41 の調製

1.2.3.1 ステップ 1 :

Ar雰囲気下、アルデヒド中間体 8-12 (2.3 当量) を MeOH に溶解した。次いで、AcOH (1.5 当量、0.17 vol%) を溶液に加え、次いで、tert-ブチル 4-(2-アミノエチル)ピペラジン-1-カルボキシル化 (1 当量) を加えた。1 分後、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (4 当量) を添加し、次いで室温で一晩攪拌した。溶媒を真空中で蒸発させた。次に、残渣を NextGen 300+フラッシュクロマトグラフィーシステム (100% DCM から 95% / 3.5% / 1.5% DCM / MeOH / NH₃ 7 N 入り MeOH への勾配) で順相により精製し、中間体 8-39 を得た。

【0140】

1.3.3.2. ステップ 2 :

Ar雰囲気下、BOC保護中間体 8-39 (1 当量) をギ酸に溶解した。次いで、反応混合物を室温で一晩攪拌させた。ギ酸を真空中で蒸発させた。残渣を飽和 NaHCO₃ 液で洗浄し、DCM で 3 回抽出した。有機相を合わせ、食塩水で洗浄し、DCM で 3 回抽出した。合わせた有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、真空中で蒸発させた。次に、残渣を NextGen 300+フラッシュクロマトグラフィーシステム (100% DCM から 95% / 3.5% / 1.5% DCM / MeOH / NH₃ 7 N 入り MeOH への勾配) で順相により精製し、中間体の 8-40 を得た。

【0141】

1.2.3.3. ステップ 3 :

Ar雰囲気下で、アルデヒド中間体 8-11 (1.15 当量) を MeOH に溶解した。次いで、AcOH (7.5 当量、0.14 vol%) を溶液に加え、次いで、((2-(ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ブタン-4, 1-ジイル)ビス(2-ブ

10

20

30

40

50

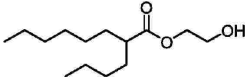
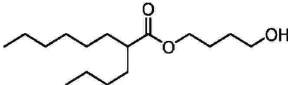
チルオクタン酸) 8 - 4 0 (1 当量) を加えた。1 分後、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (2 当量) を添加し、次いで室温で一晩攪拌した。溶媒を真空中で蒸発させた。次に、残渣をNextGen 300+フラッシュクロマトグラフィーシステム (1 0 0 % DCMから9 5 % / 3 . 5 % / 1 . 5 % DCM / MeOH / NH3 7 N入りMeOHへの勾配) で順相により精製し、透明オイルとして化合物 8 - 4 1 を得た。

【 0 1 4 2 】

【 表 2 - 1 】

- 1.3 詳細な実験プロトコル
- 1.3.1. 化合物8-11、8-12、8-13、8-14、8-15および8-16の調製
- 1.3.1.1. ステップ1：

10

サンプルコード	実験手順
8-5 	2 - ブチルオクタン酸 (6 . 0 0 g、3 0 . 0 mmol、1 当量)、エチレングリコール (5 . 5 8 g、8 9 . 9 mmol、3 当量)、EDC・HCl (6 . 3 2 g、3 3 . 0 mmol、1 . 1 当量)、およびDMAP (2 . 9 3 g、2 4 . 0 mmol、0 . 8 当量) を含むDCM (1 0 0 mL) を使用して、ステップ1 (1 . 2 . 1 . 1 .) を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィー (ヘプタン/EtOAc) により精製して、2 - ヒドロキシエチル 2 - ブチルオクタン酸 (5 . 3 1 g、2 1 . 7 mmol、収率 7 3 %) を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 267.2 [M+Na]⁺ ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.88 (3H, t, J = 6.85 Hz), 0.89 (3H, t, J = 7.06 Hz), 1.15 – 1.40 (12H, m), 1.40 – 1.54 (2H, m), 1.54 – 1.68 (2H, m), 1.90 (1H, t, J = 6.06 Hz), 2.36 (1H, tt, J = 13.29, 5.40 Hz), 3.80 – 3.86 (2H, m), 4.20 – 4.25 (2H, m).
8-6 	2 - ブチルオクタン酸 (6 . 0 0 g、3 0 . 0 mmol、1 当量)、ブタン - 1 , 4 - ジオール (8 . 1 0 g、8 9 . 9 mmol、3 当量)、EDC・HCl (6 . 3 2 g、3 3 . 0 mmol、1 . 1 当量)、およびDMAP (2 . 9 3 g、2 4 . 0 mmol、0 . 8 当量) を含むDCM (1 0 0 mL) を使用して、ステップ1 (1 . 2 . 1 . 1 .) を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィー (ヘプタン/EtOAc) により精製して、4 - ヒドロキシブチル 2 - ブチルオクタン酸 (4 . 8 1 g、1 7 . 7 mmol、収率 5 9 %) を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 295.2 [M+Na]⁺ ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.87 (3H, t, J = 6.94 Hz), 0.88 (3H, t, J = 7.08 Hz), 1.18 – 1.34 (12H, m), 1.37 (1H, t, J = 5.34 Hz) 1.39 – 1.50 (2H, m), 1.53 – 1.81 (6H, m), 2.30

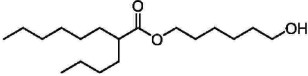
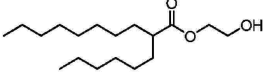
20

30

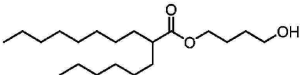
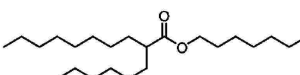
40

50

【表 2 - 2】

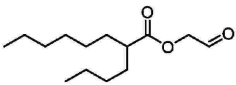
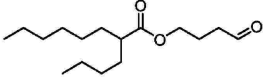
	(1H, tt, J = 13.44, 5.40 Hz), 3.69 (2H, q, J = 5.94 Hz), 4.11 (2H, t, J = 6.42 Hz).
8-7 	2 - ブチルオクタン酸 (4.64 g、23.2 mmol、1 当量)、1, 6 - ヘキサンジオール (8.22 g、69.6 mmol、3 当量)、EDC・HCl (4.89 g、25.5 mmol、1.1 当量) および DMA P (2.27 g、18.5 mmol、0.8 当量) を含む DCM (100 mL) を使用して、ステップ 1 (1.2.1.1.) を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィー (ヘプタン/EtOAc) により精製して、6 - ヒドロキシヘキシル 2 - ブチルオクタン酸 (4.77 g、15.9 mmol、収率 69%) を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 323.2 [M+Na]⁺ ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.87 (3H, t, J = 6.94 Hz), 0.88 (3H, t, J = 7.08 Hz), 1.17 - 1.31 (13H, m), 1.35 - 1.50 (6H, m), 1.52 - 1.69 (6H, m), 2.29 (1H, tt, J = 13.45, 5.31 Hz), 3.65 (2H, q, J = 6.15 Hz), 4.08 (2H, t, J = 6.62 Hz).
8-8 	2 - ヘキシルデカン酸 (5.00 g、19.5 mmol、1 当量)、エチレングリコール (3.63 g、58.5 mmol、3 当量)、EDC・HCl (4.11 g、21.5 mmol、1.1 当量)、および DMA P (2.38 g、19.5 mmol、1 当量) を含む DCM (60 mL) を使用して、ステップ 1 (1.2.1.1.) を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィー (ヘプタン/EtOAc) により精製して、2 - ヒドロキシエチル 2 - ヘキシルデカン酸 (3.68 g、12.2 mmol、収率 63%) を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 301.3 [M+H]⁺ ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.87 (6H, distorted t, J = 6.66 Hz), 1.17 - 1.36 (20H, m), 1.38 - 1.52 (2H, m), 1.52 - 1.70 (2H, m), 1.90 (1H, t, J = 6.03 Hz), 2.36 (1H, tt, J = 13.17, 5.42 Hz), 3.77 - 3.86 (2H, m), 4.19 - 4.26 (2H, m).

【表 2 - 3】

8-9 	2 - ヘキシルデカン酸 (3. 00 g、11. 7 mmol、1 当量)、ブタン - 1, 4 - ジオール (3. 16 g、35. 1 mmol、3 当量)、EDC・HCl (2. 47 g、12. 9 mmol、1. 1 当量)、および DMAP (1. 43 g、11. 7 mmol、1 当量) を含む DCM (50 mL) を使用して、ステップ 1 (1. 2. 1. 1.) を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィー (ヘプタン/ EtOAc) により精製して、4 - ヒドロキシブチル 2 - ヘキシルデカン酸 (3. 37 g、10. 3 mmol、収率 88%) を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 351.3 [M+Na]⁺ ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.87 (6H, distorted t, J = 6.60 Hz), 1.16 - 1.34 (20H, m), 1.33 (1H, t, J = 5.36 Hz), 1.36 - 1.50 (2H, m), 1.50 - 1.80 (6H, m), 2.30 (1H, tt, J = 13.28, 5.34 Hz), 3.69 (2H, q, J = 5.90 Hz), 4.11 (2H, t, J = 6.35 Hz).
8-10 	2 - ヘキシルデカン酸 (10. 0 g、39. 0 mmol、1 当量)、1, 6 - ヘキサンジオール (13. 8 g、117 mmol、3 当量)、EDC・HCl (8. 22 g、42. 9 mmol、1. 1 当量)、および DMAP (3. 81 g、31. 2 mmol、0. 8 当量) を含む DCM (70 mL) を使用して、ステップ 1 (1. 2. 1. 1.) を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィー (ヘプタン/ EtOAc) により精製して、6 - ヒドロキシヘキシル 2 - ヘキシルデカン酸 (7. 89 g、22. 1 mmol、収率 57%) を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 357.3 [M+H]⁺ ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.87 (6H, distorted t, J = 6.66 Hz), 1.17 - 1.36 (21H, m), 1.36 - 1.48 (6H, m), 1.52 - 1.69 (6H, m), 2.29 (1H, tt, J = 13.48, 5.28 Hz), 3.65 (2H, q, J = 5.63 Hz), 4.07 (2H, t, J = 6.62 Hz). ¹³C NMR (101MHz, CDCl₃): δ 14.20, 14.23, 22.7, 22.8, 25.5, 25.9, 27.57, 27.61, 28.8, 29.36, 29.38, 29.6, 29.7, 31.8, 32.0, 32.7, 32.8, 46.0, 63.0, 64.1, 176.9.

【表 2 - 4】

1.3.1.2. ステップ 2 :

サンプルコード	実験手順
8-11 	出発物質として 8 - 5 (5.31 g、21.7 mmol、1 当量)、および DMP (11.1 g、26.1 mmol、1.2 当量) を含む DCM (100 mL) を使用して、ステップ 2 (1.2.1.2.) を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィー (ヘプタン/EtOAc) により精製して、2 - オキソエチル 2 - ブチルオクタン酸 (5.71 g、23.5 mmol、収率 54%) を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 243.2 [M+Na]⁺ ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.88 (3H, t, J = 5.93 Hz), 0.89 (3H, t, J = 7.98 Hz), 1.16 - 1.38 (12H, m), 1.42 - 1.54 (2H, m), 1.57 - 1.84 (2H, m), 2.46 (1H, tt, J = 13.18, 5.41 Hz), 4.65 (2H, d, J = 0.6 Hz), 9.61 (1H, t, J = 0.65 Hz).
8-12 	出発物質として 8 - 6 (4.81 g、17.7 mmol、1 当量)、および DMP (8.99 g、21.2 mmol、1.2 当量) を含む DCM (100 mL) を使用して、ステップ 2 (1.2.1.2.) を行った。4 時間後、さらに 0.1 当量の DMP (749 mg、1.77 mmol、0.1 当量) を加え、反応混合物を 1 時間攪拌した。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィー (ヘプタン/EtOAc) により精製して、4 - オキソブチル 2 - ブチルオクタン酸 (3.82 g、14.1 mmol、収率 80%) を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 293.2 [M+Na]⁺ ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.87 (3H, t, J = 6.90 Hz), 0.88 (3H, t, J = 7.10 Hz), 1.16 - 1.38 (12H, m), 1.38 - 1.51 (2H, m), 1.52 - 1.67 (2H, m), 1.93 - 2.03 (2H, m), 2.30 (1H, tt, J = 13.34, 5.38 Hz), 2.54 (2H, td, J = 7.23, 1.28 Hz), 4.11 (2H, t, J = 6.37 Hz), 9.80 (1H, t, J = 1.30 Hz).

10

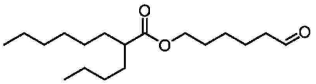
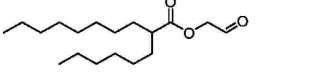
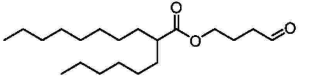
20

30

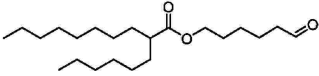
40

50

【表 2 - 5】

8-13 	出発物質として 8 - 7 (4.77 g、15.9 mmol、1 当量)、および DMP (8.09 g、19.1 mmol、1.2 当量) を含む DCM (100 mL) を使用して、ステップ 2 (1.2.1.2.) を行った。4 時間後、さらに 0.1 当量の DMP (674 mg、15.9 mmol、0.1 当量) を加え、反応混合物を 1 時間攪拌した。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィー (ヘプタン/エトOAc) により精製して、2 - オキソヘキシル 2 - ブチルオクタン酸 (3.29 g、11.0 mmol、収率 69%) を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 321.2 [M+Na]⁺ ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.87 (3H, t, J = 6.94 Hz), 0.88 (3H, t, J = 7.08 Hz), 1.16 - 1.36 (12H, m), 1.36 - 1.51 (4H, m), 1.51 - 1.60 (2H, m), 1.61 - 1.75 (4H, m), 2.31 (1H, tt, J = 13.44, 5.32 Hz), 2.45 (2H, td, J = 7.33, 1.67 Hz), 4.08 (2H, t, J = 6.56 Hz), 9.77 (1H, t, J = 1.69 Hz).
8-14 	出発物質として 8 - 8 (5.17 g、17.2 mmol、1 当量)、および DMP (8.76 g、20.7 mmol、1.2 当量) を含む DCM (100 mL) を使用して、ステップ 2 (1.2.1.2.) を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィー (ヘプタン/エトOAc) により精製して、2 - オキソエチル 2 - ヘキシルデカノエート (4.57 g、15.3 mmol、収率 89%) を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 299.2 [M+H]⁺ ¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 0.88 (6H, distortet t, J = 6.62 Hz), 1.16 - 1.37 (20H, m), 1.38 - 1.57 (2H, m), 1.58 - 1.75 (2H, m), 2.45 (1H, tt, J = 13.07, 5.41 Hz), 4.65 (2H, s), 9.60 (1H, s).
8-15 	出発物質として 8 - 9 (3.37 g、10.3 mmol、1 当量)、および DMP (5.22 g、12.3 mmol、1.2 当量) を含む DCM (50 mL) を使用して、ステップ 2 (1.2.1.

【表 2 - 6】

	2.) を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィー（ヘプタン／EtOAc）により精製して、4 - オキソブチル 2 - ヘキシルデカン酸（2.91 g、8.91 mmol、収率 87%）を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 349.3 [M+Na]⁺ ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.87 (6H, distortet t, J = 6.68 Hz), 1.12 - 1.36 (20H, m), 1.36 - 1.50 (2H, m), 1.50 - 1.67 (2H, m), 1.98 (2H, p, J = 6.80 Hz), 2.30 (1H, tt, J = 13.24, 5.39 Hz), 2.53 (2H, td, J = 10.85, 1.19 Hz), 4.11 (2H, t, J = 6.36 Hz), 9.80 (1H, t, J = 1.22 Hz).
8-16 	出発物質として 8 - 10（7.80 g、21.9 mmol、1 当量）、および DMP（11.1 g、26.3 mmol、1.2 当量）を含む DCM（150 mL）を使用して、ステップ 2（1.2.1.2.）を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィー（ヘプタン／EtOAc）により精製して、6 - オキソヘキシル 2 - ヘキシルデカン酸（6.93 g、19.5 mmol、収率 89%）を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 355.3 [M+H]⁺ ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.88 (6H, distorted t, J = 6.64 Hz), 1.18 - 1.34 (20H, m), 1.35 - 1.49 (4H, m), 1.52 - 1.63 (2H, m), 1.67 (4H, sext, J = 7.23 Hz), 2.25 - 2.39 (1H, tt, J = 13.44, 5.31 Hz), 2.44 (2H, td, J = 10.99, 1.65 Hz), 4.07 (2H, t, J = 6.56 Hz), 9.77 (1H, t, J = 1.68 Hz). ¹³C NMR (101MHz, CDCl₃): δ 14.20, 14.24, 21.8, 22.7, 22.8, 25.73, 27.57, 27.62, 28.6, 29.35, 29.39, 29.6, 29.7, 31.8, 32.0, 32.7, 43.9, 46.0, 63.8, 176.8, 202.4.

10

20

30

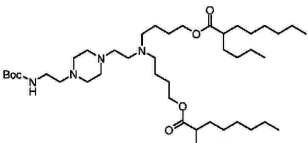
40

50

【表 2 - 7】

1.3.2. 化合物 8 - 27 の調製

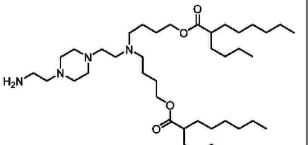
1.3.2.1. ステップ 1 :

サンプルコード	実験手順
8-25 	出発物質として、8 - 12 (500 mg、1.85 mmol、2.3 当量)、tert - ブチル N - {2 - [4 - (2 - アミノエチル) ピペラジン - 1 - イル] エチルカルバメート三塩酸塩 (307 mg、804 μmol、1 当量)、および還元剤として NaBH ₃ CN (202 mg、3.22 mmol、4 当量) を、0.17 体積% AcOH (690 μL、12.1 mmol、15 当量) とともに含む MeOH (402 mL) を使用して、ステップ 1 (1.2.2.1.) を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィーにより精製して、((2 - (4 - (2 - ((tert - ブトキシカルボニル) アミノ) エチル) ピペラジン - 1 - イル) エチル) アザンジイル) ビス (ブタン - 4, 1 - ジイル) ビス (2 - ブチルオクタン酸) (400 mg、511 μmol、収率 64%) を透明な油として得た。この化合物は完全に純粋ではなかったが、さらに精製せずに次のステップに使用した。 MS (ESI) m/z 391.5 [M+2H] ²⁺

10

20

1.3.2.2. ステップ 2 :

サンプルコード	実験手順
8-26 	出発物質として 8 - 25 (347 mg、444 μmol、1 当量) を含むギ酸 (10 mL) を使用して、ステップ 2 (1.2.2.2.) を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィーにより精製して、((2 - (4 - (2 - アミノエチル) ピペラジン - 1 - イル) エチル) アザンジイル) ビス (ブタン - 4, 1 - ジイル) ビス (2 - ブチルオクタン酸) (187 mg、275 μmol、収率 62%) を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 341.4 [M+2H] ²⁺ ¹H NMR (700MHz, CDCl₃): δ 0.84 (6H, t, J = 7.05 Hz), 0.85 (6H, t, J = 7.19 Hz), 1.16 - 1.32 (26H, m), 1.34 - 1.51 (8H, m), 1.51 - 1.62 (8H, m), 1.71 (2H, br s), 2.27 (2H, tt, J = 13.55, 5.26

30

40

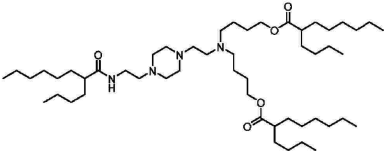
50

【表 2 - 8】

	Hz), 2.31 – 2.72 (16H, m), 2.76 (2H, t, <i>J</i> = 6.2 Hz), 4.04 (4H, t, <i>J</i> = 6.7 Hz) ¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ 14.0, 14.1, 22.60, 22.63, 23.7, 26.7, 27.4, 29.2, 29.7, 31.7, 32.2, 32.5, 38.8, 45.8, 51.4, 53.2, 53.8, 54.1, 56.8, 61.1, 64.0, 176.7.
--	---

10

1.3.2.3. ステップ3：

サンプルコード	実験手順
8-27 	8 - 26 (100 mg、147 μmol、1 当量)、2 - ブチルオクタン酸 (41.2 mg、206 μmol、1.4 当量)、HATU (83.7 mg、220 μmol、1.5 当量) および DIPEA (133 mg、1.03 mmol、7 当量) を含む DCM (0.5 mL) を使用して、ステップ3 (1.2.2.3.) を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィーにより精製して、(2 - (4 - (2 - (2 - ブチルオクタアミド) エチル) ピペラジン - 1 - イル) エチル) アザンジイル) ビス (ブタン - 4, 1 - ジイル) ビス (2 - ブチルオクタン酸) (103 mg、119 μmol、収率 81%) を透明な油として得た。 MS (ESI) <i>m/z</i> 432.5 [M+2H] ²⁺ ¹H NMR (700MHz, CDCl₃): δ 0.82 – 0.88 (18H, m), 1.16 – 1.32 (36H, m), 1.32 – 1.51 (10H, m), 1.52 – 1.63 (10H, m), 1.98 (1H, tt, <i>J</i> = 9.6, 5.1 Hz), 2.04 (2H, br s), 2.28 (2H, tt, <i>J</i> = 9.3, 5.3 Hz), 2.33 – 2.74 (16H, m), 3.32 (2H, q, <i>J</i> = 5.6 Hz), 4.04 (4H, t, <i>J</i> = 6.7 Hz), 5.98 (1H, t, <i>J</i> = 4.9 Hz). ¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ 13.9, 14.0, 14.04, 14.05, 22.55, 22.58, 22.7, 23.5, 26.6, 27.4, 27.6, 29.2, 29.3, 29.6, 29.8, 31.7, 31.8, 32.2, 32.5, 32.8, 33.1, 35.6, 45.7, 48.0, 51.3,

20

30

40

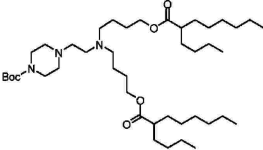
50

【表 2 - 9】

	52.7, 53.6, 54.1, 56.5, 56.6, 63.8, 176.2, 176.6.
--	---

10

1.3.3. 化合物 8 - 4 1 の調製
1.3.3.1 ステップ 1 :

サンプルコード	実験手順
8-39 	出発物質として、8 - 1 2 (1 . 0 0 g、3 . 7 0 m m o l、2 . 3 当量)、<i>t e r t</i> - ブチル 4 - (2 - アミノエチル) ピペラジン - 1 - カルボキシレート (3 6 9 m g、1 . 6 1 m m o l、1 当量)、および還元剤として NaBH_3CN (4 0 4 m g、6 . 4 3 m m o l、4 当量) を 0 . 1 7 v o l % AcOH (1 . 3 8 m L、2 4 . 1 m m o l、1 5 当量) とともに含む MeOH (8 0 4 m L) を使用して、ステップ 1 (1 . 2 . 3 . 1 .) を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィーにより精製して、((2 - (4 - (<i>t e r t</i> - ブトキシカルボニル) ピペラジン - 1 - イル) エチル) アザンジイル) ビス (ブタン - 4 , 1 - ジイル) ビス (2 - ブチルオクタン酸) (1 . 0 4 g、1 . 4 1 m m o l、収率 8 8 %) を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 738.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 0.88 (6H, t, J = 6.90 Hz), 0.89 (6H, t, J = 7.10 Hz), 1.17 - 1.36 (24H, m), 1.41 - 1.50 (13H, m), 1.52 - 1.63 (4H, m), 1.73 (8H, br s), 2.32 (2H, tt, J = 13.14, 5.45 Hz), 2.50 (4H, t, J = 4.8 Hz), 2.73 (2H, t, J = 5.3 Hz), 3.03 (6H, br s), 3.47 (4H, t, J = 4.8 Hz), 4.11 (4H, t, J = 5.9 Hz).

20

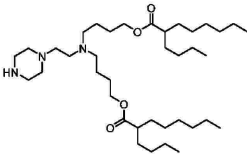
30

40

50

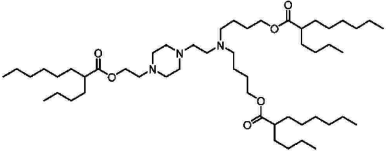
【表 2 - 1 0】

1.3.3.2. ステップ2：

サンプルコード	実験手順
8-40 	出発物質として8-39（490mg、664μmol、1当量）を含むギ酸（1mL）を使用して、ステップ2（1.2.3.2.）を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィーにより精製して、（（2-（ピペラジン-1-イル）エチル）アザンジイル）ビス（ブタン-4,1-ジイル）ビス（2-ブチルオクタン酸）（150mg、235μmol、収率36%）を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 319.9 [M+2H]²⁺ ¹H NMR (700MHz, CDCl₃): δ 0.84 (6H, t, J = 6.99 Hz), 0.85 (6H, t, J = 7.17 Hz), 1.15 – 1.31 (24H, m), 1.36 – 1.43 (4H, m), 1.43 – 1.47 (4H, m), 1.51 – 1.62 (8H, m), 1.94 (1H, br s), 2.27 (2H, tt, J = 13.48, 5.28 Hz), 2.34 – 2.45 (10H, m), 2.51 – 2.56 (2H, m), 2.85 (4H, t, J = 4.78 Hz), 4.03 (4H, t, J = 6.6 Hz). ¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ 13.9, 14.0, 22.5, 22.6, 23.7, 26.7, 27.4, 29.2, 29.6, 31.6, 32.2, 32.5, 45.7, 45.9, 51.2, 54.1, 55.0, 57.3, 63.9, 176.6.

【表 2 - 1 1】

1.3.3.3. ステップ3：

サンプルコード	実験手順
8-41	 出発物質として、8 - 40（81.5 mg、128 μmol、1当量）、8 - 11（35.6 mg、147 μmol、1.15当量）、および還元剤としてNaBH3CN（16.1 mg、256 μmol、2当量）を0.14 vol% AcOH（54.8 μL、958 μmol、7.5当量）とともに含むMeOH（40 mL）を使用して、ステップ3（1.2.3.3.）を行った。生成物を順相フラッシュクロマトグラフィーにより精製して、（（（2 - （4 - （2 - （（2 - ブチルオクタノイル）オキシ）エチル）ピペラジン - 1 - イル）エチル）アザンジイル）ビス（ブタン - 4, 1 - ジイル）ビス（2 - ブチルオクタノエート（71.8 mg、83.1 μmol、収率65%）を透明な油として得た。 MS (ESI) m/z 433.0 [M+2H]²⁺ ¹H NMR (700MHz, CDCl₃): δ 0.83 – 0.87 (18H, m), 1.17 – 1.31 (38H, m), 1.37 – 1.49 (10H, m), 1.53 – 1.62 (10H, m), 2.29 (3H, m), 2.33 – 2.67 (16H, m), 4.04 (4H, t, J = 6.7 Hz), 4.18 (2H, t, J = 5.9 Hz). ¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ 14.0, 14.1, 22.61, 22.62, 22.64, 22.7, 23.7, 26.7, 27.41, 27.44, 29.24, 29.25, 29.6, 29.7, 31.7, 32.2, 32.5, 45.7, 45.8, 51.5, 53.3, 53.7, 54.1, 56.7, 56.8, 61.4, 64.0, 176.5, 176.7.

【0143】

2. LNPの作成と試験

2.1 LNP配合物

カチオン性脂質、DOPE、コレステロール、およびDMG - PEG脂質を、モル比35:20:43.5:1.5、および、濃度100:25:20:25 μg / μL（C12-200の場合）または170:25:20:25 μg / μL（比較脂質の場合）でエタノールまたはDMSOに溶解した。脂質ナノ粒子（LNP）を、saRNAで約40 / 1のN / P比を標的とすることによって調製した。簡単に述べると、約9659ヌクレオチドのホタルルシフェラーゼsaRNAを、pH 4.5の5 mMクエン酸緩衝液中で0.5 mg / mLに希釈した。マイクロ流体ミキサー（Ignite

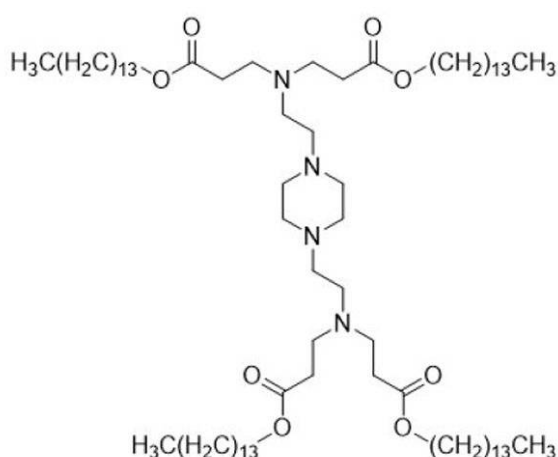
from Precision Nanosystems, California, USA) を用いて、脂質溶液とsaRNA水溶液を約1：3 (vol/vol) の比で混合し、全流量を10 ml/min以上とした。次いで、エタノールを除去し、外部緩衝液を透析法により10 mM TRIS-HCL、pH 7.4で置換した。最後に、脂質ナノ粒子を、0.2 μmの孔のある滅菌フィルターを通して濾過した。Zeta Sizer (Malvern Panalytical, UK) により測定した脂質ナノ粒子の粒径は50～150 nmであり、多分散度指数 (PI) は0.1～0.4であった。配合物の電荷もZeta Sizerにより測定し、20～-20 mVの範囲であった。

【0144】

得られた結果については以下の表3を参照のこと。コンパレータ化合物1は以下の構造を有する：

10

【化5】



20

C1

【0145】

2.2 カプセル化

30

LNP配合物中のsaRNAローディングを、前述のように、Quant-iT RiboGreenアッセイ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) を用いて定量した。14試料を、2% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) を含むまたは含まない1× Tris HCL-EDTA (TE) 緩衝液 (10 mM Tris-HCL、1 mM EDTA、pH 7.5) で10倍に希釈した。また、蛍光の変動を考慮するために、2% (v/v) Triton X-100を含むまたは含まない1×TEで標準溶液を調製した。このアッセイは、製造業者のプロトコルに従って実施した。試料をブラック96ウェルプレートにロードし、マイクロプレートリーダー (Tecan Infinite (登録商標) 200 PRO) 上で485 nmの励起および528 nmの発光で蛍光を分析した。カプセル化効率は80～100%の間で計算した。

40

得られた結果については以下の表3を参照のこと。

【0146】

2.3 in vivo 試験

雌SWISSマウス (6週齢) をJanvier Laboratories (Paris, France) から購入し、食品と水を自由に摂取できる個別換気ケージに入れた。マウスに、イソフルラン (Zoe tis, Louvain-La-Neuve, Belgium) を麻酔し (誘導5%、維持2%)、かつ、100 μL Tris-HCL (50 μL/脚) LNP - 配合ルシフェラーゼsaRNA合計1 μgを筋肉内注射した (各群n=7)。ルシフェラーゼ誘導生物発光の発現は、非侵襲的生体発光イメージング (In vivo Imaging System (IVIS) Lumina III, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) を介して測定され、200 μLのD-ルシフェリン (Gold

50

Bio, Saint Louis, Missouri, USA, #LUCK-1G) の皮下注射の 10 分後、0 日目（注射の前）、1 日目、3 日目、5 日目、7 日目、10 日目、15 日目および 20 日目に測定された。

【0147】

本発明の化合物を含む LNP 中で投与した場合、15 日目以降に先行技術の化合物と比較して saRNA のより高い発現を示す結果については、表 4 および図 1 を参照のこと。表 5 は、本発明の化合物の良好な忍容性を支持する。

【表 3】

表 3

脂質	LNP の特性		多分散指数 (PI)		カプセル化 (%)		ゼータ電位 (mV)	
	Z 平均 (nm)							
		± SD (%)		± SD (%)		± SD (%)		± SD (%)
C12-200	81.42	0.82	0.10	0.02	100.49	12.16	2.78	0.67
コンパレータ1	70.96	0.7	0.16	0.02	99.03	7.77	9.07	0.46
8-27	85.72	0.95	0.16	0.02	98.64	4.33	-12.65	0.6
8-41	81.44	0.91	0.23	0.01	99.04	3.29	-20.01	0.64

1020304050

表 4

脂質	LNPの生物発光発現									
	0日目	1日目	3日目	5日目	7日目	10日目	15日目	20日目		
対照	1.21E+04	8.08E+05	6.28E+05	2.05E+06	8.53E+05	6.52E+04	3.66E+04	4.08E+04		
C12-200	2.39E+04	3.36E+08	6.19E+08	4.79E+08	2.47E+08	2.20E+07	4.80E+05	9.12E+04		
コンパレータ1	3.32E+04	2.76E+07	1.28E+08	7.19E+07	8.88E+07	5.07E+06	8.46E+04	4.32E+04		
8-27	8.55E+04	1.40E+08	9.90E+08	7.71E+08	2.35E+08	6.86E+06	7.44E+05	8.29E+05		
8-41	5.33E+04	5.42E+07	7.43E+08	6.54E+08	4.67E+08	9.17E+06	1.88E+06	1.88E+06		

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5

脂質	体重 (g)															
	0日目	1日目	3日目	5日目	7日目	10日目	15日目	20日目								
	± SD*	± SD*	± SD*	± SD*	± SD*	± SD*	± SD*	± SD*	± SD*	± SD*	± SD*	± SD*	± SD*	± SD*	± SD*	
対照	28.89	2.63	29.07	3.01	29.63	2.19	29.89	2.69	30.41	2.91	30.09	2.74	31.45	3.42	32.56	3.05
C12-200	28.61	2.25	27.17	2.15	28.62	1.94	28.98	1.57	28.97	1.98	29.23	2.55	30.16	2.40	31.23	2.88
コンパレータ1	26.56	1.14	25.99	1.13	27.21	1.45	27.59	1.61	27.09	1.69	27.17	1.21	29.43	1.60	30.11	1.82
8-27	27.07	0.65	26.01	0.57	27.57	1.10	28.86	1.01	28.40	1.16	28.67	1.06	29.44	0.95	30.57	1.08
8-41	28.03	1.21	27.31	1.45	28.49	1.03	29.04	1.50	28.69	1.18	29.24	1.93	30.24	2.06	31.19	1.21

【0148】

実施例 3. 本発明の一実施形態によるLNPの配合

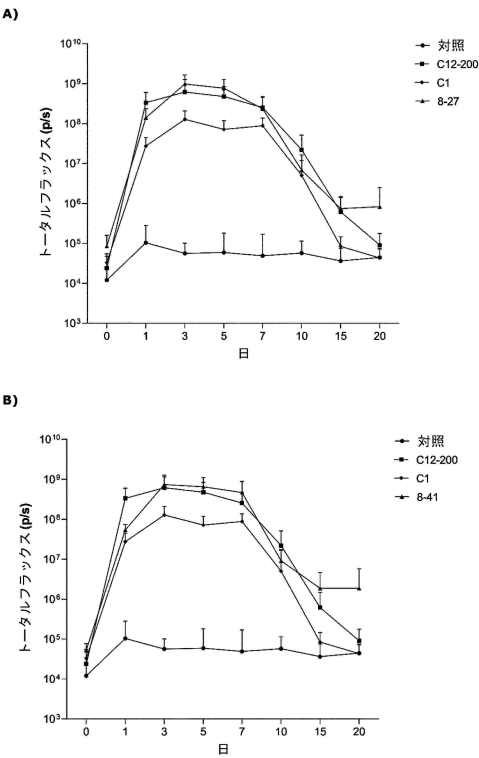
saRNAおよび表 1 に示される化合物の少なくとも 1 つを含むいくつかのLNPが得られる。これらのLNPは試験され、RNAを効率的にカプセル化し、in vivoでRNAを送達することが示されている。

LNPの実施例：

【表 6】

化合物	LNP A (濃度%)	LNP B (濃度%)	LNP C (濃度%)	LNP D (濃度%)
C12-200	0	17.5	0	0
Dlin-KC2-DMA	0	0	0	17.5
DOPE	20	15	0	15
DMG-PEG2000	1.5	1.5	1.5	1.5
コレステロール	43.5	48.5	50	48.5
式Iの化合物	35	17.5	48.5	17.5

【図面】
【図 1】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/080576

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. **A61K9/51 C07D241/04 A61K47/24 A61K47/22 A61K47/28**
ADD. **C07D295/15**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07D

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/232120 A1 (MODERNATX INC [US]) 20 December 2018 (2018-12-20) compounds 12-33; claims 1,16,171,172,224,270,272, 443, 481 -----	1-20
Y	WO 2014/028487 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]) 20 February 2014 (2014-02-20) paragraph [0157] - paragraph [0158]; claims 75-97,149,151 -----	1-20
Y	US 2012/295832 A1 (CONSTIEN RAINER [DE] ET AL) 22 November 2012 (2012-11-22) paragraph [0143]; claims 1,2 -----	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 February 2023

Date of mailing of the international search report

24/02/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wörth, Christian

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/080576

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018232120 A1	20-12-2018	EP 3638678 A1 US 2021198200 A1 WO 2018232120 A1	22-04-2020 01-07-2021 20-12-2018
WO 2014028487 A1	20-02-2014	CA 2884870 A1 EP 2882706 A1 US 2014161830 A1 US 2016114042 A1 US 2017152213 A1 WO 2014028487 A1	20-02-2014 17-06-2015 12-06-2014 28-04-2016 01-06-2017 20-02-2014
US 2012295832 A1	22-11-2012	US 2012295832 A1 US 2014162934 A1 US 2014162962 A1 US 2014170175 A1 US 2016324781 A1	22-11-2012 12-06-2014 12-06-2014 19-06-2014 10-11-2016

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24	
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28	
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z

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

レーゲヴェーク 1 5 7 バス シー

- (72)発明者 イティシュリ サファー
ベルギー国 8 0 2 0 オーストカンブ レーゲヴェーク 1 5 7 バス シー
- (72)発明者 ショーン マク キャファティ
ベルギー国 8 0 2 0 オーストカンブ レーゲヴェーク 1 5 7 バス シー
- (72)発明者 クリスティアーン カルドン
ベルギー国 8 0 2 0 オーストカンブ レーゲヴェーク 1 5 7 バス シー

F ターム (参考) 4C076 AA65 BB11 CC06 CC50 DD09F DD09H DD15F DD15H DD60F DD60H
DD63F DD63H DD70F DD70H EE23F EE23H FF16 FF43 FF65