

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6774965号
(P6774965)

(45) 発行日 令和2年10月28日 (2020. 10. 28)

(24) 登録日 令和2年10月7日 (2020. 10. 7)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 205/04 (2006. 01)

C O 7 D 205/04 C S P

C O 7 D 207/08 (2006. 01)

C O 7 D 207/08

A 6 1 K 31/397 (2006. 01)

A 6 1 K 31/397

A 6 1 K 31/40 (2006. 01)

A 6 1 K 31/40

A 6 1 K 48/00 (2006. 01)

A 6 1 K 48/00

請求項の数 16 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-558336 (P2017-558336)
 (86) (22) 出願日 平成28年12月26日 (2016. 12. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2016/088751
 (87) 国際公開番号 W02017/111172
 (87) 国際公開日 平成29年6月29日 (2017. 6. 29)
 審査請求日 令和1年12月12日 (2019. 12. 12)
 (31) 優先権主張番号 特願2015-254113 (P2015-254113)
 (32) 優先日 平成27年12月25日 (2015. 12. 25)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000001029
 協和キリン株式会社
 東京都千代田区大手町一丁目9番2号
 (74) 代理人 100079108
 弁理士 稲葉 良幸
 (74) 代理人 100109346
 弁理士 大貫 敏史
 (74) 代理人 100117189
 弁理士 江口 昭彦
 (74) 代理人 100134120
 弁理士 内藤 和彦
 (74) 代理人 100152331
 弁理士 山田 拓

最終頁に続く

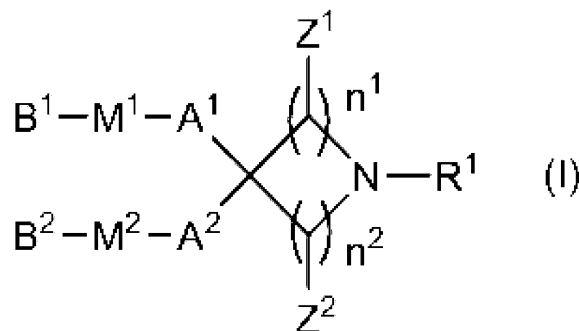
(54) 【発明の名称】 カチオン性脂質としての化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

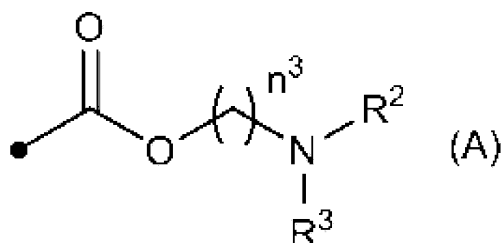
式 (I)

【化 1】



[式中、 R^1 は、水素原子、C1-C3アルキル、ヒドロキシC2-C4アルキル、ジC1-C3アルキルアミノC2-C4アルキル、式(A)

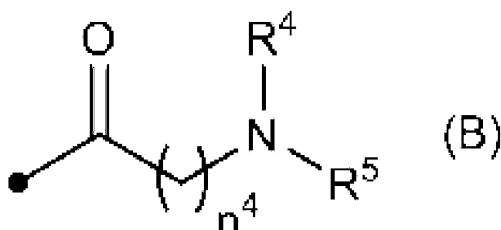
【化 2】



(式中、 R^2 および R^3 は同一または異なって、水素原子もしくはC1-C3アルキルであるか、または R^2 および R^3 が結合する窒素原子と一緒になってC2-C6含窒素複素環を形成してもよく、 n^3 は2~6の整数である)、または式(B)

10

【化 3】



(式中、 R^4 および R^5 は同一または異なって、水素原子もしくはC1-C3アルキルであるか、または R^4 および R^5 が結合する窒素原子と一緒になってC2-C6含窒素複素環を形成してもよく、 n^4 は1~6の整数である)であり、

20

n^1 は0~4の整数であり、 n^2 は1~4の整数であり(但し、 n^1 が0であり、 n^2 が1である場合を除く)、

Z^1 は、結合する炭素ごとにそれぞれ独立して、水素原子またはC1-C3アルキルであり、

Z^2 は、結合する炭素ごとにそれぞれ独立して、水素原子またはC1-C3アルキルであり、

A^1 および A^2 は同一または異なって、直鎖状のC8-C20アルキレンもしくはC8-C20アルケニレンであるか、またはC6-C18アルキレンオキシC1-C3アルキレンもしくはC6-C18アルケニレンオキシC1-C3アルキレンであり、

M^1 および M^2 は同一または異なって、-OC(O)-、-C(O)O-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(S)-、-C(S)O-、-SS-、-C(R^6)=N-、-N=C(R^6)-、-C(R^6)=N-O-、-O-N=C(R^6)-、-N(R^6)C(O)-、-C(O)N(R^6)-、-N(R^6)C(S)-、-C(S)N(R^6)-、-N(R^6)C(O)N(R^7)-、-N(R^6)C(O)O-、-OC(O)N(R^6)-および-OC(O)O-からなる群から選ばれ、

30

R^6 および R^7 は同一または異なって、水素原子またはC1-C4アルキルであり、

B^1 および B^2 は同一または異なって、直鎖状のC1-C16アルキルまたはC2-C16アルケニルである]で表わされる化合物、またはその製薬上許容し得る塩。

【請求項 2】

M^1 および M^2 が同一または異なって、-OC(O)-、-C(O)O-、-N(R^6)C(O)-および-C(O)N(R^6)-からなる群から選ばれる、請求項1記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩。

【請求項 3】

M^1 および M^2 が同一または異なって、-OC(O)-または-C(O)O-である、請求項2記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩。

40

【請求項 4】

A^1 および A^2 が同一または異なって、直鎖状のC8-C20アルキレンまたはC8-C20アルケニレンである、請求項1~3のいずれか1項に記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩。

【請求項 5】

B^1 - M^1 - A^1 -および B^2 - M^2 - A^2 -が同一である、請求項1~4のいずれか1項に記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩。

【請求項 6】

R^1 がC1-C3アルキルである、請求項1~5のいずれか1項に記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩。

50

【請求項 7】

n^1 が1であり、 n^2 が1～3の整数である、請求項1～6のいずれか1項に記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩。

【請求項 8】

n^1 および n^2 がともに1である、請求項1～7のいずれか1項に記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩。

【請求項 9】

請求項1～8のいずれか1項に記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩および核酸を含有する組成物。

【請求項 10】

中性脂質および/または高分子をさらに含む、請求項9記載の組成物。

【請求項 11】

核酸が、RNA干渉(RNAi)を利用した標的遺伝子の発現抑制作用を有する核酸である、請求項9または10に記載の組成物。

【請求項 12】

標的遺伝子が、肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓において発現する遺伝子である、請求項11記載の組成物。

【請求項 13】

静脈内投与用である、請求項9～12のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 14】

請求項9～13のいずれか1項に記載の組成物を含む、医薬。

【請求項 15】

請求項9～13のいずれか1項に記載の組成物を含む、肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓に関連する疾患の治療剤。

【請求項 16】

肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓に関連する疾患の治療用の請求項9～13のいずれか1項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、カチオン性脂質としての新規化合物および該新規化合物を含有する組成物等に関する。

【背景技術】

【0002】

カチオン性脂質は、一つまたは複数の炭化水素基を含む脂質親和性領域と、少なくとも一つのプラスに帯電した極性ヘッドグループを含む親水性領域を有する両親媒性分子である。カチオン性脂質と核酸等の巨大分子が、総荷電としてプラスに帯電する複合体を形成することにより、核酸等の巨大分子が細胞の細胞膜を通過して細胞質に入りやすくなるため、カチオン性脂質は有用である。インビトロおよびインビボにおいて行うことのできるこのプロセスは、トランスフェクションとして知られている。

【0003】

特許文献1～4は、インビボにて核酸を細胞内に送達するために、および疾患の治療に好適な核酸-脂質粒子組成物に使用するために有用であるカチオン性脂質および該脂質を含む脂質粒子を開示している。

【0004】

特許文献1には、例えば、

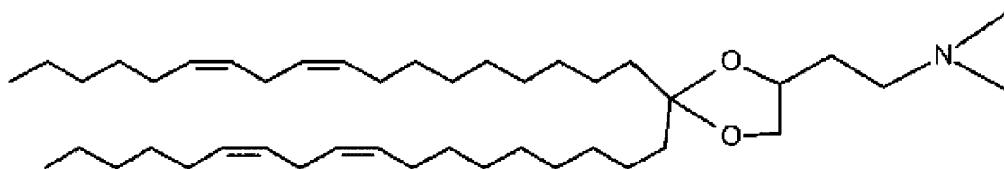
10

20

30

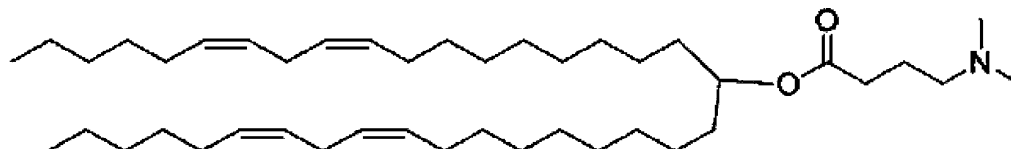
40

【化 1】



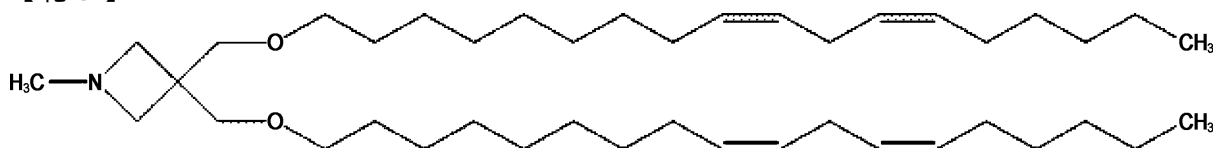
2,2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1,3]-ジオキソラン(2,2-dilinoleyl-4-(2-dimethylaminoethyl)-[1,3]-dioxolane; DLin-KC2-DMA)等、特許文献2には、例えば、

【化 2】



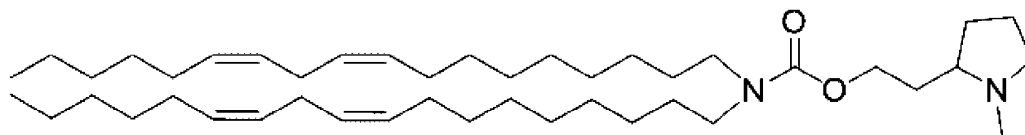
(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル 4-(ジメチルアミノ)ブタノアート((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(dimethylamino)butanoate; DLin-MC3-DMA)等、特許文献3には、例えば、

【化 3】



1-メチル-3,3-ビス{[(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ]メチル}アゼチジン(1-methyl-3,3-bis{[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-diene-1-yloxy]methyl}azetidine)等、特許文献4には、例えば、

【化 4】

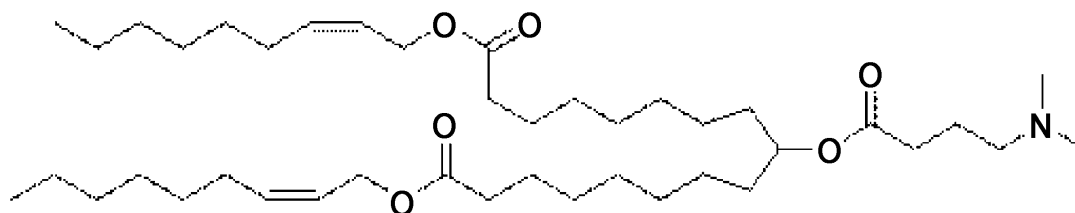


2-(1-メチルピロリジン-2-イル)エチル ジ[(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル]カルバマート(2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethyl di[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienyl]carbamate)等のカチオン性脂質が開示されている。

【0005】

また、非特許文献1には、カチオン性脂質の脂肪鎖の一部に生分解性基を入れることにより、インビボでの核酸の細胞への送達能はそのままに、肝臓での毒性を軽減できることが開示され、例えば、

【化 5】



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}ヘプタデカンジオアート(Di[(Z)-non-2-en-1-yl] 9-{[4-(dimethylamino)butanoyl]oxy}heptadecanediolate)等のカチオン性脂質が開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献 1】国際公開第2010/042877号

10

20

30

40

50

【特許文献2】国際公開第2010/054401号

【特許文献3】国際公開第2012/108397号

【特許文献4】国際公開第2014/007398号

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Molecular Therapy [モレキュラー・セラピー], 2013年, 第21巻, p.15 70-1578.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、例えば、細胞内等に核酸を導入することのできるカチオン性脂質としての新規化合物および該新規化合物を含有する組成物等を提供することにある。

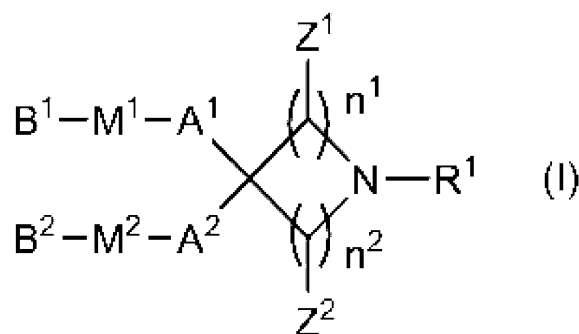
【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は以下の(1)～(30)に関する。

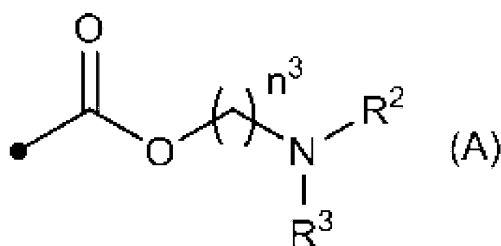
(1) 式(I)

【化6】



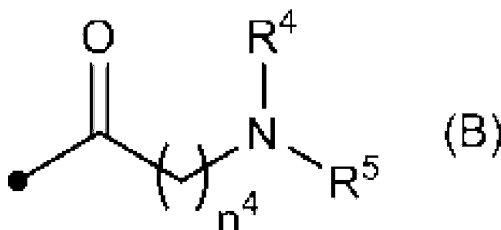
[式中、 R^1 は、水素原子、C1-C3アルキル、ヒドロキシC2-C4アルキル、ジC1-C3アルキルアミノC2-C4アルキル、式(A)

【化7】



(式中、 R^2 および R^3 は同一または異なって、水素原子もしくはC1-C3アルキルであるか、または R^2 および R^3 が結合する窒素原子と一緒になってC2-C6含窒素複素環を形成してもよく、 n^3 は2～6の整数である)、または式(B)

【化8】



(式中、 R^4 および R^5 は同一または異なって、水素原子もしくはC1-C3アルキルであるか、または R^4 および R^5 が結合する窒素原子と一緒になってC2-C6含窒素複素環を形成してもよく、 n^4 は1～6の整数である)であり、

n^1 は0～4の整数であり、 n^2 は1～4の整数であり(但し、 n^1 が0であり、 n^2 が1である場合

10

20

30

40

50

を除く)、

Z^1 は、結合する炭素ごとにそれぞれ独立して、水素原子またはC1-C3アルキルであり、

Z^2 は、結合する炭素ごとにそれぞれ独立して、水素原子またはC1-C3アルキルであり、

A^1 および A^2 は同一または異なって、直鎖状または分岐状のC8-C20アルキレンもしくはC8-C20アルケニレンであるか、またはC6-C18アルキレンオキシC1-C3アルキレンもしくはC6-C18アルケニレンオキシC1-C3アルキレンであり、

M^1 および M^2 は同一または異なって、-OC(O)-、-C(O)O-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(S)-、-C(S)O-、-SS-、-C(R⁶)=N-、-N=C(R⁶)-、-C(R⁶)=N-O-、-O-N=C(R⁶)-、-N(R⁶)C(O)-、-C(O)N(R⁶)-、-N(R⁶)C(S)-、-C(S)N(R⁶)-、-N(R⁶)C(O)N(R⁷)-、-N(R⁶)C(O)O-、-OC(O)N(R⁶)-および-OC(O)O-からなる群から選ばれ、

R^6 および R^7 は同一または異なって、水素原子またはC1-C4アルキルであり、

B^1 および B^2 は同一または異なって、直鎖状または分岐状のC1-C16アルキルまたはC2-C16アルケニルである]で表わされる化合物、またはその製薬上許容し得る塩（カチオン性脂質）。

(2) M^1 および M^2 が同一または異なって、-OC(O)-、-C(O)O-、-N(R⁶)C(O)-および-C(O)N(R⁶)-からなる群から選ばれる、上記(1)記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩（カチオン性脂質）。

(3) M^1 および M^2 が同一または異なって、-OC(O)-または-C(O)O-である、上記(2)記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩（カチオン性脂質）。

(4) A^1 および A^2 が同一または異なって、直鎖状または分岐状のC8-C20アルキレンまたはC8-C20アルケニレンである、上記(1)～(3)のいずれかに記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩（カチオン性脂質）。

(5) B^1 - M^1 - A^1 -および B^2 - M^2 - A^2 -が同一である、上記(1)～(4)のいずれかに記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩（カチオン性脂質）。

(6) R^1 がC1-C3アルキルである、上記(1)～(5)のいずれかに記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩（カチオン性脂質）。

(7) n^1 が1であり、 n^2 が1～3の整数である、上記(1)～(6)のいずれかに記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩（カチオン性脂質）。

(8) n^1 および n^2 がともに1である、上記(1)～(7)のいずれかに記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩（カチオン性脂質）。

(9) 上記(1)～(8)のいずれかに記載の化合物、またはその製薬上許容し得る塩（カチオン性脂質）および核酸を含有する組成物。

(10) 中性脂質および/または高分子をさらに含有する、上記(9)記載の組成物。

(11) 化合物、またはその製薬上許容し得る塩（カチオン性脂質）と核酸とが複合体を形成しているか、または化合物、またはその製薬上許容し得る塩（カチオン性脂質）に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと核酸とが複合体を形成している、上記(9)または(10)記載の組成物。

(12) 複合体を封入する脂質膜を含有する、上記(11)記載の組成物。

(13) 核酸が、RNA干渉(RNAi)を利用した標的遺伝子の発現抑制作用を有する核酸である、上記(9)～(12)のいずれかに記載の組成物。

(14) 標的遺伝子が、肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓において発現する遺伝子である、上記(13)記載の組成物。

(15) 静脈内投与用である、上記(9)～(14)のいずれかに記載の組成物。

(16) 上記(9)～(15)のいずれかに記載の組成物を用いて核酸を細胞内に導入する方法。

(17) 細胞が、哺乳動物の肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓にある細胞である、上記(16)記載の方法。

(18) 組成物の静脈内投与によって核酸を細胞内に導入する、上記(16)または(17)記載の方法。

(19) 上記(9)～(15)のいずれかに記載の組成物を哺乳動物に投与する工程を含む、肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓に関連する疾患の治療方法。

10

20

30

40

50

(20) 静脈内投与する、上記(19)記載の方法。

(21) 上記(9)～(15)のいずれかに記載の記載の組成物を含む、医薬。

(22) 上記(9)～(15)のいずれかに記載の記載の組成物を含む、疾患の治療に用いるための医薬。

(23) 疾患が、肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓に関連する疾患である、上記(22)に記載の医薬。

(24) 静脈内投与用である、上記(21)～(23)のいずれかに記載の医薬。

(25) 上記(9)～(15)のいずれかに記載の組成物を含む、肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓に関連する疾患の治療剤。

(26) 静脈内投与用である、上記(25)記載の肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓治療剤。 10

(27) 上記(9)～(15)のいずれかに記載の組成物をそれを必要とする患者に投与することを含む、肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓に関連する疾患の治療方法。

(28) 静脈内投与する、上記(27)記載の方法。

(29) 肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓に関連する疾患の治療用の上記(9)～(15)のいずれかに記載の組成物。

(30) 静脈内投与用の、上記(29)記載の組成物。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、例えば、細胞内等に核酸を導入することのできるカチオン性脂質として 20
の新規化合物および該新規化合物を含有する組成物等を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】実施例5および6で得られた製剤1～3(化合物1～3のそれぞれを含有する組成物)を、それぞれヒト膵臓癌細胞株MIA-PaCa2に処理した際のHPRT1のmRNAの発現量をRT-PCRによる準定量により評価した。検体のmRNA量は、GAPDHのmRNA量に対するHPRT1のmRNA量を算出し、陰性対照処理群における当該値を1としたときの相対的な割合として算出した。縦軸はこのように算出した検体のmRNA量の相対値を示し、横軸は製剤番号および製剤中のsiRNA濃度(nM)を示す。

【図2】実施例5および6で得られた製剤1～3(化合物1～3のそれぞれを含有する組成物)を、それぞれヒト肺癌細胞株NCI-H358に処理した際のHPRT1のmRNAの発現量をRT-PCRによる準定量により評価した。検体のmRNA量は、GAPDHのmRNA量に対するHPRT1のmRNA量を算出し、陰性対照処理群における当該値を1としたときの相対的な割合として算出した。縦軸はこのように算出した検体のmRNA量の相対値を示し、横軸は製剤番号および製剤中のsiRNA濃度(nM)を示す。 30

【図3】実施例7および8で得られた製剤4～8(化合物1～4のそれぞれを含有する組成物)を、それぞれヒト膵臓癌細胞株MIA-PaCa2に処理した際のHPRT1のmRNAの発現量をRT-PCRによる準定量により評価した。検体のmRNA量は、GAPDHのmRNA量に対するHPRT1のmRNA量を算出し、陰性対照処理群における当該値を1としたときの相対的な割合として算出した。縦軸はこのように算出した検体のmRNA量の相対値を示し、横軸は製剤番号および製剤中のsiRNA濃度(nM)を示す。 40

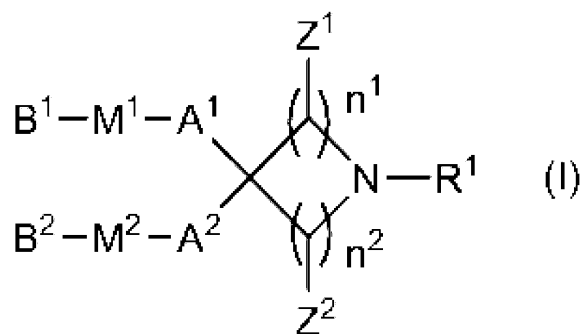
【図4】実施例7および8で得られた製剤4～8(化合物1～4のそれぞれを含有する組成物)を、それぞれヒト肺癌細胞株NCI-H358に処理した際のHPRT1のmRNAの発現量をRT-PCRによる準定量により評価した。検体のmRNA量は、GAPDHのmRNA量に対するHPRT1のmRNA量を算出し、陰性対照処理群における当該値を1としたときの相対的な割合として算出した。縦軸はこのように算出した検体のmRNA量の相対値を示し、横軸は製剤番号および製剤中のsiRNA濃度(nM)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の化合物は、

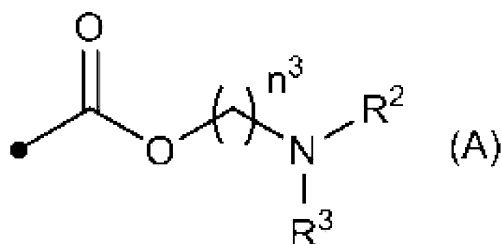
式(I)
【化9】



10

[式中、R¹は、水素原子、C1-C3アルキル、ヒドロキシC2-C4アルキル、ジC1-C3アルキルアミノC2-C4アルキル、式(A)

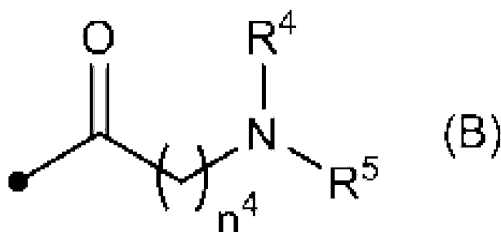
【化10】



20

(式中、R²およびR³は同一または異なって、水素原子もしくはC1-C3アルキルであるか、またはR²およびR³が結合する窒素原子と一緒になってC2-C6含窒素複素環を形成してもよく、n³は2~6の整数である)、または式(B)

【化11】



30

(式中、R⁴およびR⁵は同一または異なって、水素原子もしくはC1-C3アルキルであるか、またはR⁴およびR⁵が結合する窒素原子と一緒になってC2-C6含窒素複素環を形成してもよく、n⁴は1~6の整数である)であり、

n¹は0~4の整数であり、n²は1~4の整数であり(但し、n¹が0であり、n²が1である場合を除く)、

Z¹は、結合する炭素ごとにそれぞれ独立して、水素原子またはC1-C3アルキルであり、

Z²は、結合する炭素ごとにそれぞれ独立して、水素原子またはC1-C3アルキルであり、

A¹およびA²は同一または異なって、直鎖状または分岐状のC8-C20アルキレンもしくはC8-C20アルケニレンであるか、またはC6-C18アルキレンオキシC1-C3アルキレンもしくはC6-C18アルケニレンオキシC1-C3アルキレンであり、

40

M¹およびM²は同一または異なって、-OC(O)-、-C(O)O-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(S)-、-C(S)O-、-SS-、-C(R⁶)=N-、-N=C(R⁶)-、-C(R⁶)=N-O-、-O-N=C(R⁶)-、-N(R⁶)C(O)-、-C(O)N(R⁶)-、-N(R⁶)C(S)-、-C(S)N(R⁶)-、-N(R⁶)C(O)N(R⁷)-、-N(R⁶)C(O)O-および-OC(O)N(R⁶)-、-OC(O)O-からなる群から選ばれ、

R⁶およびR⁷は同一または異なって、水素原子またはC1-C4アルキルであり、

B¹およびB²は同一または異なって、直鎖状または分岐状のC1-C16アルキルまたはC2-C16アルケニルで表わされる化合物である。

【0013】

式(I)で表される化合物は、二つの炭化水素基を含む脂質親和性領域と、一つのプラス

50

に帯電し得る極性ヘッドグループを含む親水性領域を有し、カチオン性脂質としての性質を有する。

【0014】

以下、式(1)で表される化合物を化合物(1)ということもある。他の式番号の化合物についても同様である。また、以下、式(1)で表される化合物、またはその製薬上許容し得る塩を、総称して「カチオン性脂質」ということもある。

【0015】

C1-C3アルキルとしては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびシクロプロピル等が挙げられる。

本発明において、C1-C3アルキルである場合を例示して説明すると、C1-C3アルキルのC1-C3は、炭素数が1~3であることを意味する。

【0016】

ヒドロキシC2-C4アルキルとは、C2-C4アルキルのいずれかの炭素にヒドロキシが置換されていることを意味し、C2-C4アルキル部分としては、例えばエチル、プロピルおよびブチル等が挙げられる。

【0017】

ジC1-C3アルキルアミノC2-C4アルキルとは、C2-C4アルキルのいずれかの炭素にジC1-C3アルキルアミノが置換されていることを意味し、C2-C4アルキル部分としては、例えばエチル、プロピルおよびブチル等が挙げられる。

ジC1-C3アルキルアミノにおけるC1-C3アルキル部分としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびシクロプロピル等が挙げられ、C1-C3アルキル部分は同一でも異なってもよい。

【0018】

C2-C6含窒素複素環としては、例えばアジリジン環、アゼチジン環、ピロリジン環、ピペリジン環およびアゼパン環等が挙げられ、C2-C6含窒素複素環は同一または異なって、1~3個のC1-C3アルキル（前記と同義）、ヒドロキシまたはメトキシ等で置換されていてもよい。

【0019】

直鎖状または分岐状のC8-C20アルキレンとしては、例えばオクチレン、ノニレン、ウンデシレン、トリデシレン、テトラデシレン、2,6,10-トリメチルウンデシレン、ペンタデシレン、3,7,11-トリメチルドデシレン、ヘキサデシレン、ヘプタデシレン、オクタデシレン、ノナデシレン、2,6,10,14-テトラメチルペンタデシレンおよび3,7,11,15-テトラメチルヘキサデシレン等が挙げられ、好ましくはノニレン、ウンデシレン、トリデシレンまたはヘキサデシレンであり、より好ましくはノニレンまたはウンデシレンである。

直鎖状または分岐状のC8-C20アルキレンとしての記載において、2,6,10-トリメチルウンデシレンを例にして説明すると、置換基の置換位置を示す2,6,10-は、含窒素複素環の炭素原子に結合するA¹およびA²における炭素原子を1位とする。

【0020】

直鎖状または分岐状のC8-C20アルケニレンとしては、直鎖状または分岐状のC8-C20アルキレンにおいて1以上の2重結合を含む基であればよく、例えば(Z)-テトラデカ-9-エニレン、(Z)-ヘキサデカ-9-エニレン、(Z)-オクタデカ-6-エニレン、(Z)-オクタデカ-9-エニレン、(E)-オクタデカ-9-エニレン、(Z)-オクタデカ-11-エニレン、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニレンおよび(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエニレン等が挙げられ、好ましくは(Z)-テトラデカ-9-エニレン、(Z)-ヘキサデカ-9-エニレン、(Z)-オクタデカ-9-エニレン、(Z)-オクタデカ-11-エニレンまたは(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニレンである。

直鎖状または分岐状のC8-C20アルケニレンとしての記載において、(Z)-テトラデカ-9-エニレンを例にして説明すると、二重結合の位置を示す-9-は、含窒素複素環の炭素原子に結合するA¹およびA²における炭素原子を1位とする。

【0021】

10

20

30

40

50

C6-C18アルキレンオキシC1-C3アルキレンにおけるC1-C3アルキレン部分としては、例えばメチレン、エチレンおよびプロピレン等が挙げられる。

C6-C18アルキレンオキシC1-C3アルキレンにおけるC6-C18アルキレン部分としては、例えばヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン、ノニレン、デシレン、ウンデシレン、トリデシレン、テトラデシレン、2,6,10-トリメチルウンデシレン、ペンタデシレン、3,7,11-トリメチルドデシレン、ヘキサデシレン、ヘプタデシレンおよびオクタデシレン等が挙げられ、好ましくは、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン、ノニレン、デシレンが挙げられる。

【0022】

C6-C18アルケニレンオキシC1-C3アルキレンにおけるC1-C3アルキレン部分としては、例えばメチレン、エチレンおよびプロピレンが挙げられ、C6-C18アルケニレン部分としては、C6-C18アルキレンオキシC1-C3アルキレンにおけるC6-C18アルキレン部分において1以上の2重結合を含む部分であればよく、例えば(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニルおよび(E)-オクタデカ-9-エニル等が挙げられ、好ましくは(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(Z)-イコサ-11-エニルまたは(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニルである。

C6-C18アルキレンオキシC1-C3アルキレンおよびC6-C18アルケニレンオキシC1-C3アルキレンを構成するC1-C3アルキレン部分は、式(1)中の含窒素複素環側に位置する。

【0023】

C1-C4アルキルとしては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、iso-ブチル、sec-ブチル、tert-ブチルおよびシクロブチル等が挙げられる。

【0024】

直鎖状または分岐状のC1-C16アルキルとしては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、tert-ブチル、ヘキシル、オクチル、ノニル、デシル、ドデシル、テトラデシル、3,7,11-トリメチルドデシルおよびヘキサデシル等が挙げられ、好ましくはオクチル、ノニル、デシルまたはドデシルである。

直鎖状または分岐状のC1-C16アルキルとしての記載において、3,7,11-トリメチルドデシルを例にして説明すると、置換基の置換位置を示す3,7,11-は、M¹およびM²に結合するB¹およびB²における炭素原子を1位とする。

【0025】

直鎖状または分岐状のC2-C16のアルケニルとしては、直鎖状または分岐状のC1-C16アルキルにおける直鎖状または分岐状のC2-C16アルキルにおいて1以上の2重結合を含む基であればよく、例えば(Z)-ブタ-2-エニル、(Z)-ペンタ-2-エニル、(Z)-ヘキサ-2-エニル、(Z)-ヘプタ-2-エニル、(Z)-オクタ-2-エニル、(Z)-ノナ-2-エニル、(Z)-ノナ-3-エニル、(E)-ノナ-2-エニル、ノナ-8-エニル、(Z)-ドデカ-2-エニル、(Z)-ドデカ-2-エニルおよび(Z)-トリデカ-2-エニル等が挙げられ、好ましくは(Z)-ヘプタ-2-エニル、(Z)-ノナ-2-エニル、(Z)-ノナ-3-エニル、ノナ-8-エニル、(Z)-ドデカ-2-エニルまたは(Z)-トリデカ-2-エニルである。

直鎖状または分岐状のC2-C16のアルケニルとしての記載において、(Z)-ブタ-2-エンを例にして説明すると、置換基の置換位置を示す-2-は、M¹およびM²に結合するB¹およびB²における炭素原子を1位とする。

【0026】

本発明においては、直鎖状または分岐状のC8-C20アルケニレンの二重結合にメチレンビラジカルが形式的に付加したシクロプロパン環を有する基も、C8-C20直鎖状または分岐状のアルケニレンに包含される。さらに、C6-C18アルケニレンオキシC1-C3アルキレンにおけるC6-C18アルケニレン部分および直鎖状または分岐状のC2-C16アルケニルの場合も同様である。

(Z)-ノナ-2-エンを例にして説明すると、シクロプロパン環を有する以下の基も、本発

10

20

30

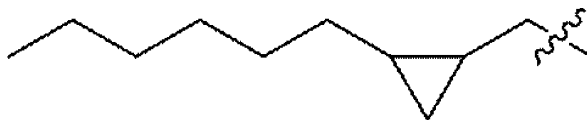
40

50

明における直鎖または分岐状のC8-C20アルケニレンに包含される。

【 0 0 2 7 】

【 化 1 2 】



【 0 0 2 8 】

A¹およびA²は同一または異なって、直鎖状または分岐状のC8-C20アルキレンまたはC8-C20アルケニレンであることが好ましく、同一または異なって、直鎖状のC8-C20のアルキレンであることが好ましい。A¹およびA²は同一であり、直鎖状または分岐状のC8-C20アルキレンまたはC8-C20アルケニレンであることが好ましく、同一であり、直鎖状のC8-C20アルキレンであることがより好ましい。

10

【 0 0 2 9 】

M¹およびM²は同一または異なって、-OC(O)-、-C(O)O-、-C(S)O-、-SS-、-N(R⁶)C(O)-、-C(O)N(R⁶)-、-C(S)(NR⁶)-、-N(R⁶)C(O)N(R⁷)-、-N(R⁶)C(O)O-、-OC(O)N(R⁶)-または-OC(O)O-であることが好ましく、-OC(O)-、-C(O)O-、-N(R⁶)C(O)-、-C(O)N(R⁶)-、-N(R⁶)C(O)N(R⁷)-、-N(R⁶)C(O)O-、-OC(O)N(R⁶)-または-OC(O)O-であることがより好ましく、-OC(O)-、-C(O)O-、-N(R⁶)C(O)-または-C(O)N(R⁶)-であることがさらに好ましく、-OC(O)-または-C(O)O-であることがよりさらに好ましい。

M¹およびM²としての記載において、M¹およびM²が-OC(O)-である場合を例にして説明すると、-OC(O)-は、B¹-OC(O)-A¹またはB²-OC(O)-A²として結合していることを意味する。

20

【 0 0 3 0 】

R⁶およびR⁷は同一または異なって、水素原子、メチルまたはエチルであることが好ましく、同一または異なって、水素原子またはメチルであることがより好ましく、同一であり、水素原子またはメチルであることがさらに好ましく、水素原子であることがよりさらに好ましい。

【 0 0 3 1 】

B¹およびB²は同一または異なって、直鎖状のC1-C16アルキルまたはC2-C16アルケニルであることが好ましく、同一であり、直鎖状のC1-C16アルキルまたはC2-C16アルケニルであることがより好ましく、同一であり、直鎖状のC2-C16アルケニルであることがさらに好ましい。

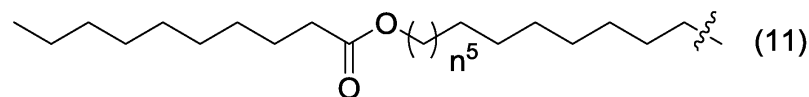
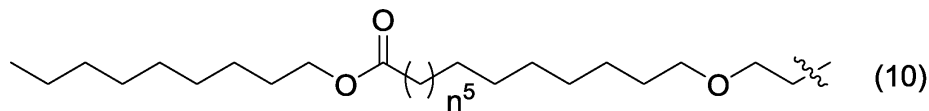
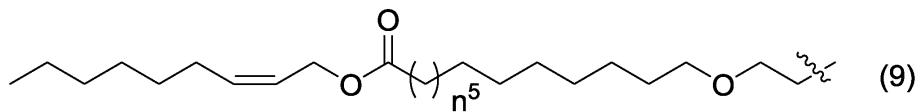
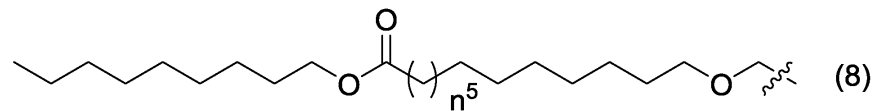
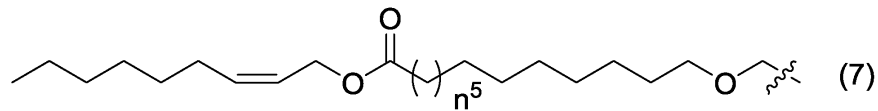
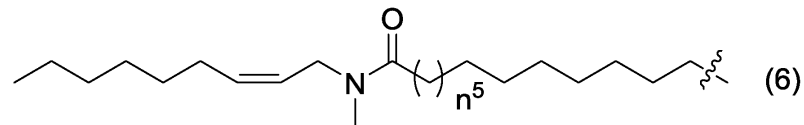
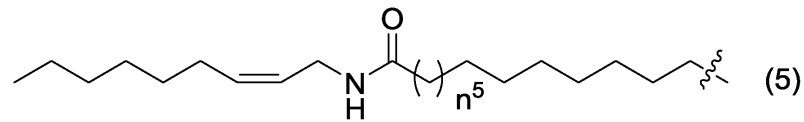
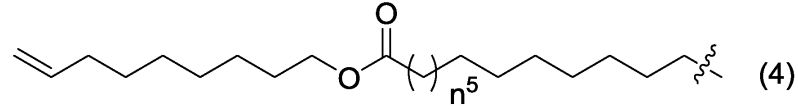
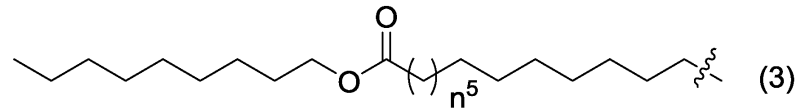
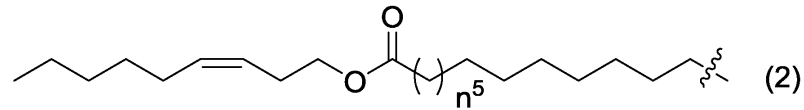
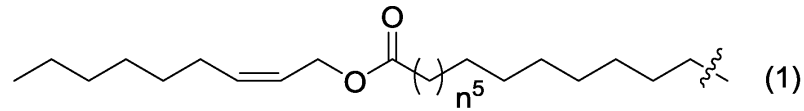
30

【 0 0 3 2 】

B¹-M¹-A¹およびB²-M²-A²は同一であることが好ましい。B¹-M¹-A¹およびB²-M²-A²は同一または異なって、以下の構造(1)~(11)であることが好ましく、同一であり、以下の(1)~(11)構造であることがより好ましく、以下の(1)~(4)構造であることがさらに好ましい。

【 0 0 3 3 】

【化 1 3】



【0034】

上記(1)～(11)構造において、波線の結合は、式(1)中の含窒素複素環の炭素原子への結合手である。

n^5 は、1～10の整数であることが好ましく、1～5の整数であることがより好ましく、2～4の整数であることがさらに好ましく、2または4であることがよりさらに好ましい。

【0035】

R^1 は、C1-C3アルキル、上記式(A)または上記式(B)であることが好ましく、C1-C3アルキルまたは上記式(A)であることがより好ましく、C1-C3アルキルであることがさらに好ましい。

R^1 がC1-C3アルキルである場合、メチル、エチル、プロピルまたはシクロプロピルであることが好ましく、メチルまたはエチルであることがより好ましく、メチルであることが

10

20

30

40

50

さらに好ましい。

R^1 が式(A)である場合、 R^2 および R^3 は、同一または異なって、水素原子またはC1-C3アルキルであることが好ましく、 R^1 が式(B)である場合、 R^4 および R^5 は、同一または異なって、水素原子またはC1-C3アルキルであることが好ましい。

【0036】

R^2 と R^3 が結合する窒素原子と一緒にになってC2-C6含窒素複素環を形成する場合、 R^2 と R^3 は結合する窒素原子と一緒にになってアゼチジン環、ピロリジン環、ピペリジン環またはアゼパン環であることが好ましく、ピロリジン環またはピペリジン環であることがより好ましい。

R^2 と R^3 が同一または異なって、C1-C3アルキルである場合、 R^3 はメチルまたはエチルであることが好ましく、メチルであることがより好ましい。

R^2 と R^3 が同一であり、メチルであることが好ましい。

【0037】

n^3 は2~4の整数であることが好ましく、3であることがより好ましい。

【0038】

R^4 と R^5 が結合する窒素原子と一緒にになってC2-C6含窒素複素環を形成する場合、 R^4 と R^5 は結合する窒素原子と一緒にになってピロリジン環またはピペリジン環であることが好ましい。

R^4 と R^5 が同一または異なって、C1-C3アルキルである場合、 R^4 と R^5 はメチルまたはエチルであることが好ましく、メチルであることがより好ましい。

R^4 と R^5 が同一であり、メチルであることが好ましい。

【0039】

n^4 は2~4の整数であることが好ましく、3であることがより好ましい。

【0040】

n^1 は1であることが好ましい。 n^1 が1である場合、 n^2 は1~3の整数であることが好ましく、1または2であることがより好ましく、1であることがさらに好ましい。

【0041】

Z^1 は、結合する炭素ごとにそれぞれ独立して、水素原子またはメチルであることが好ましく、水素原子であることがより好ましい。

【0042】

Z^2 は、結合する炭素ごとにそれぞれ独立して、水素原子またはC1-C3アルキルであることが好ましく、水素原子またはメチルであることがより好ましく、水素原子であることがさらに好ましい。

【0043】

本発明において、用語「結合する炭素ごとにそれぞれ独立して」とは、式(1)に2つ以上の Z^1 が存在する場合において、 Z^1 が結合する炭素原子ごとに、それぞれの Z^1 が同一または異なって、水素原子またはC1-C3アルキルを選択できることを意味する。例えば、式(1)中に Z^1 が2つ存在する場合、それぞれの Z^1 が同一であることを意味するだけでなく、一方の Z^1 が水素原子であり、他方の Z^1 がC1-C3アルキルである場合や、2つの Z^1 が異なるC1-C3アルキルである場合も包含することを意味する。式(1)に2つ以上の Z^2 が存在する場合においても同様である。

【0044】

n^1 と n^2 がともに1である時、 Z^1 と Z^2 が同一または異なって、水素原子またはメチルであることが好ましく、 Z^1 が水素原子またはメチルであり、 Z^2 が水素原子であることがより好ましく、 Z^1 と Z^2 が同一であり、水素原子であることがさらに好ましい。

【0045】

本発明の式(1)で表わされる化合物、またはその製薬上許容し得る塩(カチオン性脂質)の製造法について説明する。

以下に示す製造法において、定義した基が該製造法の条件下で変化するかまたは該製造法を実施するのに不適切な場合、有機合成化学で常用される保護基の導入および除去方法

10

20

30

40

50

[例えば、プロテクティブ・グループ・イン・オーガニック・シンセシス第3版(Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、グリーン(T.W.Greene)著、John Wiley & Sons Inc.(1999年)等に記載の方法]等を用いることにより、目的化合物を製造することができる。また、必要に応じて置換基導入等の反応工程の順序を変えることもできる。

【0046】

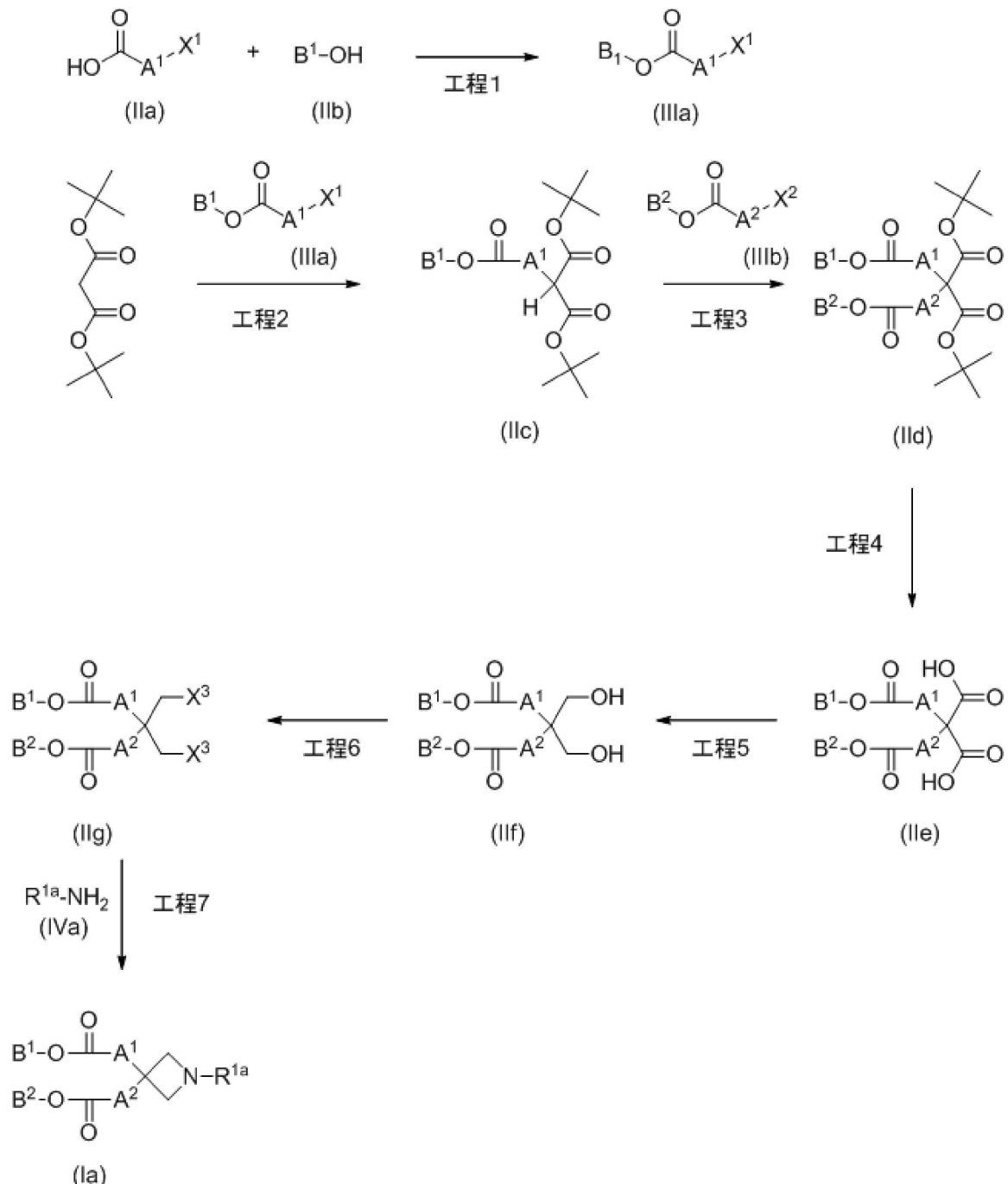
製造法1

化合物(I)のうち、 n^1 および n^2 がともに1であり、 Z^1 および Z^2 がともに水素原子であり、 R^1 が水素原子、C1-C3アルキル、ヒドロキシC2-C4アルキルまたはジC1-C3アルキルアミノC2-C4アルキルであり、 M^1 および M^2 が同一であり、 $-OC(O)-$ である化合物(Ia)は、例えば、

10

【0047】

【化14】



20

30

40

(式中、 A^1 、 A^2 、 B^1 および B^2 はそれぞれ前記と同義であり、 R^{1a} は水素原子、C1-C3アル

50

キル、ヒドロキシC2-C4アルキルまたはジC1-C3アルキルアミノC2-C4アルキルであり、 X^1 、 X^2 および X^3 は同一または異なって、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、トリフルオロメタンスルホニルオキシ、メタンスルホニルオキシ、ベンゼンスルホニルオキシおよびp-トルエンスルホニルオキシ等の脱離基を表す)

【0048】

工程1

化合物(IIIa)は化合物(IIa)と化合物(IIb)を、無溶媒でまたは溶媒中、1~10当量の縮合剤と、1~10当量の塩基の存在下、室温~200 で、5分間~100時間反応させることにより製造することができる。

【0049】

10

溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、1,4-ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンおよびピリジン等が挙げられ、これらは単独でまたは混合して用いることができる。

【0050】

縮合剤としては、例えば塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド水和物、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩およびO-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩等が挙げられる。

20

【0051】

塩基としては、例えば炭酸カリウム、炭酸セシウム、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリンおよびピリジン等が挙げられる。

【0052】

化合物(IIa)は市販品、または公知の方法[例えば「新実験化学講座14 有機化合物の合成と反応(II)」、初版、丸善(1977年)]もしくはそれに準じた方法によって得ることができる。

化合物(IIb)は市販品として得ることができる。

30

【0053】

工程2および3

化合物(IIc)は、マロン酸ジtert-ブチルと化合物(IIIa)を、無溶媒でまたは溶媒中、1~10当量の塩基の存在下、室温~200 で、5分間~100時間反応させることにより製造することができる。

化合物(IIId)は、化合物(IIc)と化合物(IIIf)を、無溶媒でまたは溶媒中、1~10当量の塩基の存在下、室温~200 で、5分間~100時間反応させることにより製造することができる。

【0054】

溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、1,4-ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンおよびピリジン等が挙げられ、これらは単独でまたは混合して用いることができる。

40

【0055】

塩基としては、例えば炭酸カリウム、炭酸セシウム、ナトリウムメトキシド、カリウムtert-ブトキシド、水素化ナトリウム、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン、ピリジンおよび1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン(DBU)等が挙げられる。

【0056】

50

A¹とA²およびB¹とB²が同一である場合の化合物(IIId)は、工程2において、2当量以上の化合物(IIIIa)を用いることにより製造することができる。

【0057】

マロン酸ジtert-ブチルは市販品として得ることができる。

化合物(IIIIb)は化合物(IIIIa)と同様の方法で製造することができる。

【0058】

工程4

化合物(IIe)は化合物(IIId)を、無溶媒でまたは溶媒中、5～100当量の酸と、-78 ～100で、5分間～100時間反応させることにより製造することができる。

【0059】

溶媒としては、例えば、工程1で例示したものが挙げられる。

【0060】

酸としては、例えば、トリフルオロ酢酸、トリクロロ酢酸、塩酸、硫酸および臭化水素酸等が挙げられる。

【0061】

工程5

化合物(IIIf)は化合物(IIe)を、溶媒中、4当量～大過剰量の還元剤と、必要に応じて触媒量～10当量の添加剤の存在下、-20 ～150で、5分間～72時間反応させることにより製造することができる。触媒量は0.01当量～0.5当量であることを意味する。

【0062】

溶媒としては、例えばトルエン、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタンおよび1,4-ジオキサン等が挙げられ、これらは単独でまたは混合して用いることができる。

【0063】

還元剤としては、例えばボラン・テトラヒドロフラン錯体、ボラン・ジメチルスルフィド錯体、水素化アルミニウムリチウム、水素化ホウ素リチウム、水素化トリエチルホウ素リチウム、水素化ジイソブチルアルミニウムおよび水素化ビス(2-メトキシエトキシ)アルミニウムナトリウム等が挙げられる。

【0064】

添加剤としては、例えば塩化アルミニウム、塩化セリウム、四塩化チタンおよびチタニウムテトライソプロポキシド等が挙げられる。

【0065】

工程6

化合物(IIIg)は化合物(IIIf)を、無溶媒でまたは溶媒中、2当量以上のハロゲン化試薬または擬ハロゲン化試薬と、必要により好ましくは1～10当量の塩基および必要により好ましくは1～10当量の添加剤の存在下、-20 ～150で、5分間～100時間反応させることにより製造することができる。

【0066】

溶媒としては、例えば、工程5で例示したものが挙げられる。

【0067】

ハロゲン化試薬または擬ハロゲン化試薬としては、例えば塩化チオニル、塩化スルフリル、三塩化リン、五塩化リン、オキシ塩化リン、三臭化リン、臭化水素、ヨウ化水素、無水メシル酸、メシル酸クロリド、無水トシル酸、ベンゼンスルホン酸クロリド、無水ベンゼンスルホン酸、トシル酸クロリドおよび無水トリフルオロメタンスルホン酸等が挙げられる。

【0068】

塩基としては、例えばピリジン、2,6-ルチジン、2,4,6-コリジン、トリエチルアミンおよびN,N-ジイソプロピルエチルアミン等が挙げられる。

【0069】

添加剤としては、例えば塩化ナトリウム、臭化ナトリウム、臭化リチウムおよび塩化リ

10

20

30

40

50

チウム等が挙げられる。

【 0 0 7 0 】

工程7

化合物(Ia)は化合物(II f)と1当量～大過剰量の化合物(IVa)を、無溶媒でまたは溶媒中、室温～200 で、5分間～100時間反応させることにより製造することができる。

【 0 0 7 1 】

溶媒としては、例えば、工程2および3で例示したものが挙げられる。

【 0 0 7 2 】

化合物(IVa)は、市販品として得ることができる。

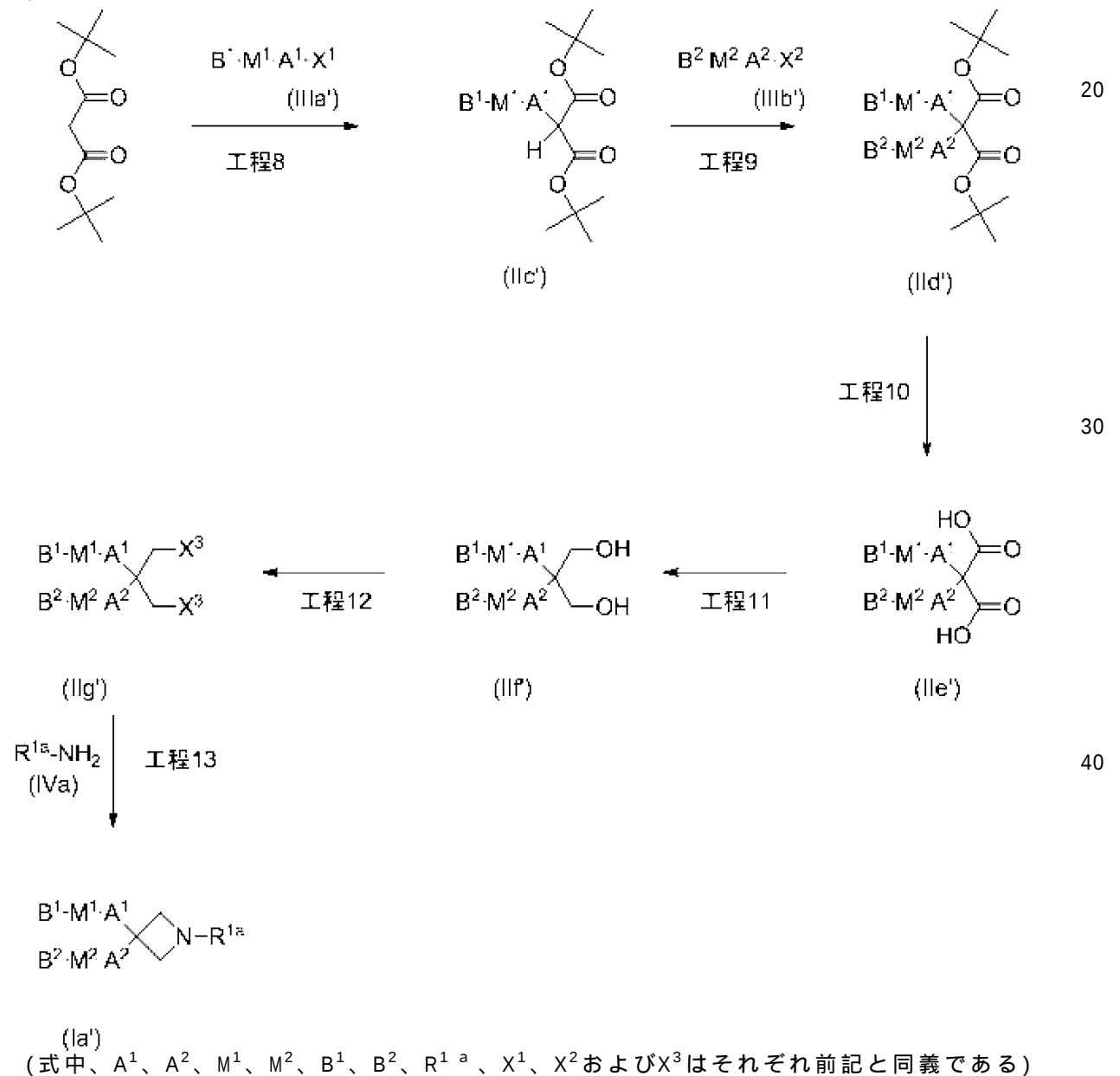
【 0 0 7 3 】

製造法2

化合物(I)のうち、 n^1 および n^2 がともに1であり、 Z^1 および Z^2 がともに水素原子であり、 R^1 が水素原子、C1-C3アルキル、ヒドロキシC2-C4アルキルまたはジC1-C3アルキルアミノC2-C4アルキルである化合物(Ia')は、例えば、以下の方法によって製造することができる。

【 0 0 7 4 】

【 化 1 5 】



【 0 0 7 5 】

10

20

30

40

50

工程8および工程9

化合物(IIc')は、化合物(IIla)の代わりに化合物(IIla')を用いることで、工程2と同様の方法により製造することができる。

化合物(IIId')は、化合物(IIc)および(IIlb)の代わりに化合物(IIc')および(IIlb')を用い、工程3と同様の方法により製造することができる。

【0076】

化合物(IIla')および化合物(IIlb')のうち、M¹およびM²が-OC(O)-であるものは製造法1の工程1で示した方法で製造することができる。

化合物(IIla')および化合物(IIlb')のうち、M¹およびM²が-OC(O)-以外であるものも対応する市販原料を用いることで製造することができる。

10

【0077】

工程10

化合物(IIe')は化合物(IIId)の代わりに化合物(IIId')を用いることで、工程4と同様の方法により製造することができる。

【0078】

工程11

化合物(IIIf')は化合物(IIe)の代わりに化合物(IIe')を用いることで、工程5と同様の方法により製造することができる。

【0079】

工程12

化合物(IIg')は化合物(IIIf)の代わりに化合物(IIIf')を用いることで、工程6と同様の方法により製造することができる。

20

【0080】

工程13

化合物(Ia')は化合物(IIg)の代わりに化合物(IIg')を用いることで、工程7と同様の方法により製造することができる。

【0081】

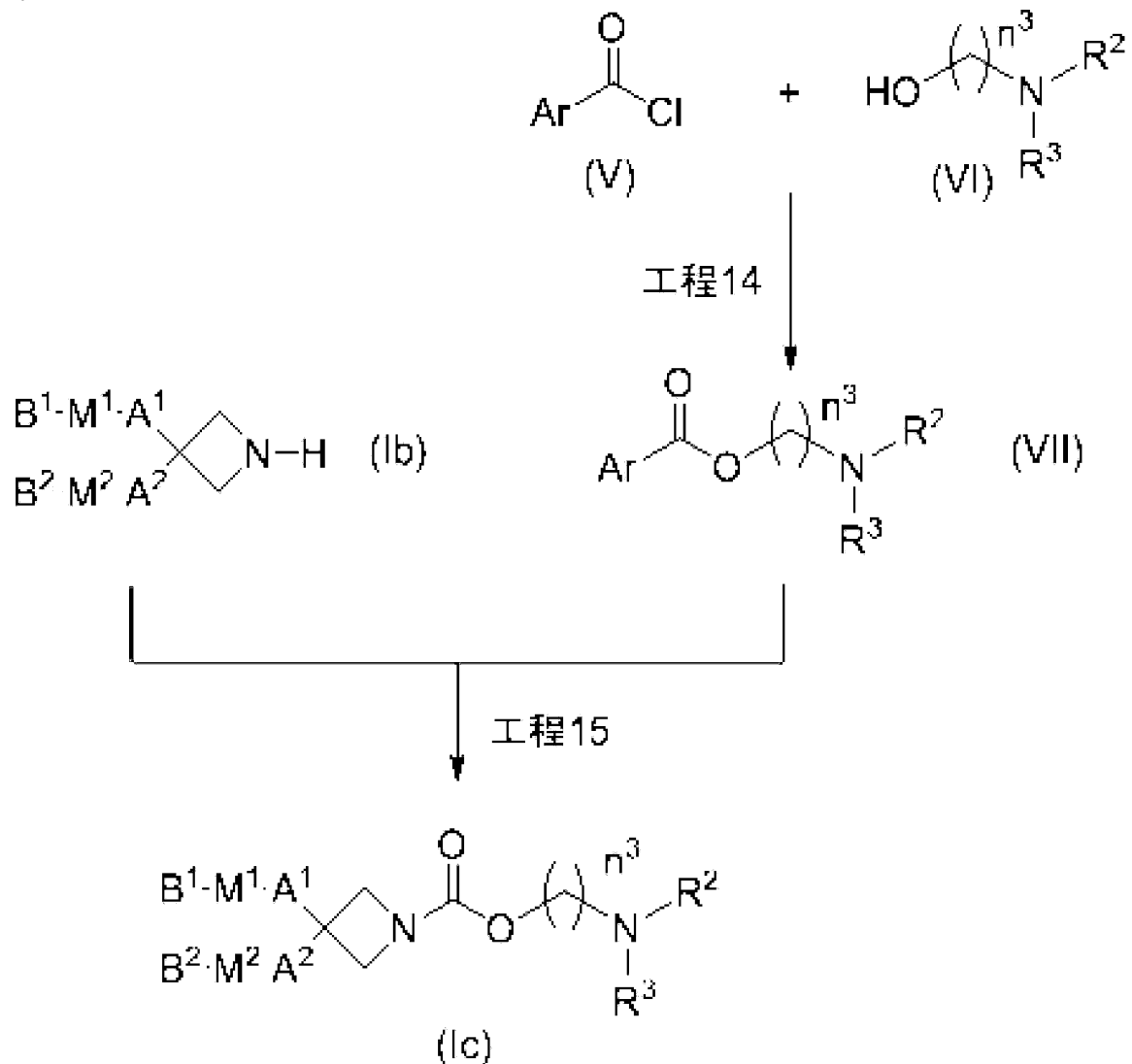
製造法3

化合物(I)のうち、n¹およびn²がともに1であり、Z¹およびZ²がともに水素原子であり、R³が式(A)である化合物(Ic)は、例えば、以下の方法によって製造することができる。

30

【0082】

【化 16】



(式中、 A^1 、 A^2 、 B^1 、 B^2 、 M^1 、 M^2 、 R^2 、 R^3 および n^3 はそれぞれ前記と同義であり、Arはp-ニトロフェニル、o-ニトロフェニルおよびp-クロロフェニル等の置換フェニル基または無置換フェニル基を表す)

【0083】

工程14

化合物(VII)は化合物(V)と化合物(VI)を、無溶媒でまたは溶媒中、必要により好ましくは1~10当量の添加剤および/または必要により好ましくは1~10当量の塩基の存在下、-20 ~ 150 で、5分間~72時間反応させることにより製造することができる。

【0084】

溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、1,4-ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド等が挙げられ、これらは単独でまたは混合して用いることができる。

【0085】

添加剤としては、例えば、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールおよび4-ジメチルアミノピリジン等が挙げられる。

【0086】

塩基としては、例えば炭酸カリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、ナトリウムメトキシド、カリウム tert-ブトキシド、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルア

ミン、N-メチルモルホリン、ピリジンおよび1,8-ジアザビスクロ[5.4.0]-7-ウンデセン(D BU)等が挙げられる。

【0087】

化合物(V)は、市販品として得ることができる。

化合物(VI)は、市販品としてまたは公知の方法(例えば、「第5版実験化学講座14 有機化合物の合成II」、第5版、p.1、丸善(2005年))もしくはそれに準じた方法によって得ることができる。

【0088】

工程15

化合物(Ic)は化合物(Ib)と化合物(VII)を、無溶媒でまたは溶媒中、必要により1~10当量の添加剤および/または必要により1~10当量の塩基の存在下、-20 ~ 150 で、5分間~72時間反応させることにより製造することができる。

10

【0089】

化合物(Ib)は製造法2の工程13で化合物(IVa)としてアンモニアを用いることによって製造することができる。

【0090】

溶媒、添加剤および塩基としては、例えば、それぞれ工程14で例示したものが挙げられる。

【0091】

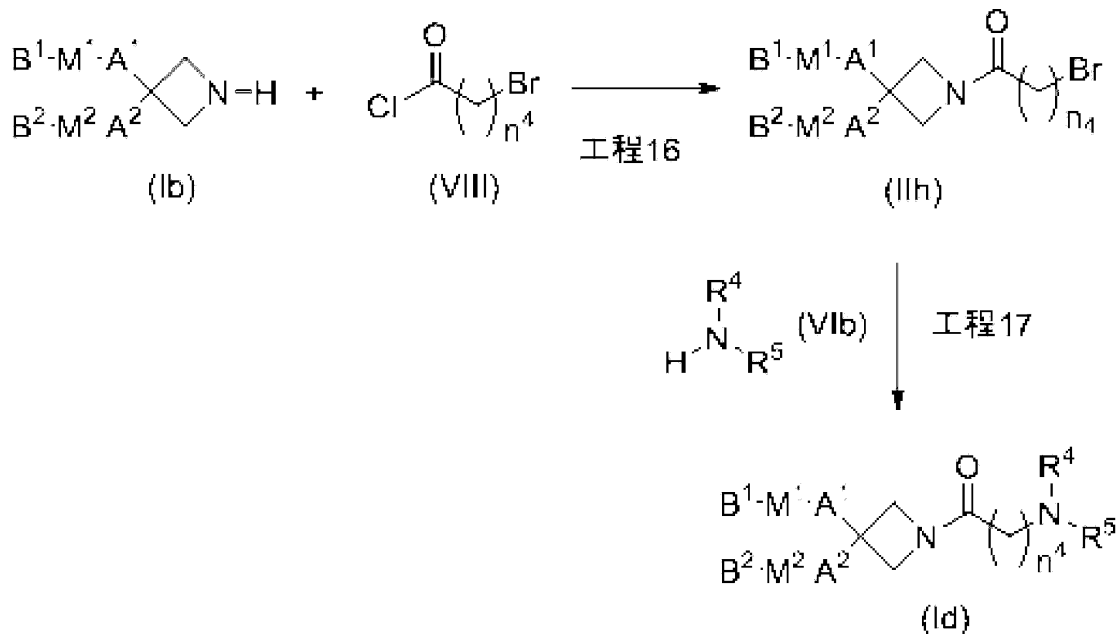
製造法4

20

化合物(I)のうち、 n^1 および n^2 がともに1であり、 Z^1 および Z^2 がともに水素原子であり、 R^3 が式(B)である化合物(Id)は、例えば、以下の方法によって製造することができる。

【0092】

【化17】



30

(式中、 A^1 、 A^2 、 M^1 、 M^2 、 B^1 、 B^2 、 R^4 、 R^5 および n^4 はそれぞれ前記と同義である)

【0093】

工程16

化合物(IIIh)は化合物(Ib)と化合物(VIII)を、無溶媒でまたは溶媒中、必要により好ましくは1~10当量の塩基の存在下、-20 ~ 150 で、5分間~72時間反応させることにより製造することができる。

【0094】

溶媒としては、例えば、工程14で例示したものが挙げられる。

【0095】

50

塩基としては、例えば、工程6で例示したものが挙げられる。

【0096】

化合物(VIII)は、市販品として得ることができる。

【0097】

工程17

化合物(Id)は化合物(IIh)と1~20当量の化合物(VIb)を、無溶媒でまたは溶媒中、必要により1~10当量の塩基の存在下、室温~200 で、5分間~100時間反応させることにより製造することができる。

【0098】

溶媒としては、例えば、工程2および3で例示したものが挙げられる。

10

【0099】

塩基としては、例えば、工程14で例示したものが挙げられる。

【0100】

化合物(VIb)は、市販品として得ることができる。

【0101】

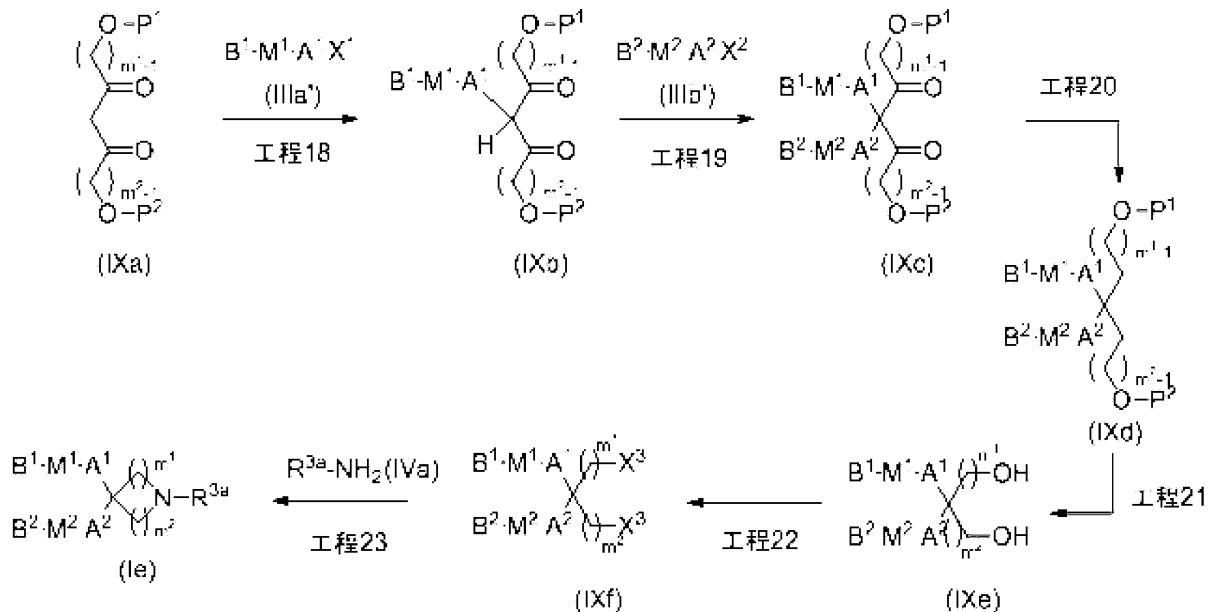
製造法5

化合物(I)のうち、 n^1 および n^2 が同一または異なって1~4の整数であり(但し、 n^1 および n^2 がともに1である場合を除く)、 R^1 が水素原子、C1-C3のアルキル、ヒドロキシC2-C4アルキルまたはC1-C3ジアルキルアミノC2-C4アルキルであり、 Z^1 および Z^2 が水素原子である化合物(Ie)は、例えば、以下の方法によって製造することができる。

20

【0102】

【化18】



30

[式中、 A^1 、 A^2 、 M^1 、 M^2 、 B^1 、 B^2 、 R^{3a} 、 X^1 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義であり、 m^1 および m^2 は同一または異なって、1~4の整数であり(但し、 m^1 および m^2 がともに1である場合を除く)、 P^1 および P^2 は同一または異なって、保護基を表す]

40

【0103】

工程18および工程19

化合物(IXb)は、マロン酸ジtert-ブチルの代わりに化合物(IXa)を用い、工程2と同様の方法により製造することができる。

化合物(IXc)は、化合物(IIc)の代わりに化合物(IXb)を用い、工程3と同様の方法により製造することができる。

$B^1-M^1-A^1$ と $B^2-M^2-A^2$ が同一である場合の化合物(IXc)は、工程18において、2当量以上の化合物(IIIa')を用いることにより製造することができる。

P^1 および P^2 としては有機合成化学で常用される保護基[例えば、プロテクティブ グル

50

ープス イン オーガニック シンセシス第3版(Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、グリーン(T.W.Greene)著、John Wiley & Sons Inc.(1999年)等に記載の保護基]を用いることができる。

【0104】

化合物(IXa)は公知の方法[例えば、「新実験化学講座14 有機化合物の合成と反応(II)」、初版、丸善(1977年)]もしくはそれに準じた方法によって得られる。

【0105】

工程20

化合物(IXd)は、化合物(IXc)を公知の方法[例えば、「新実験化学講座15 酸化と還元(II)」、初版、丸善(1977年)]もしくはそれに準じた方法で還元することにより製造することができる。

10

【0106】

工程21

化合物(IXe)は、化合物(IXd)の保護基 P^1 および P^2 をそれぞれ適切な方法で除去することにより製造することができる。

保護基の除去方法としては、有機合成化学で常用される保護基の除去方法[例えば、プロテクティブ グループス イン オーガニック シンセシス第3版(Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、グリーン(T.W.Greene)著、John Wiley & Sons Inc.(1999年)等に記載の除去方法]を用いることができ、これにより目的とする化合物を製造することができる。

20

【0107】

工程22

化合物(IXf)は、化合物(II f)の代わりに化合物(IXe)を用い、工程6と同様の方法により製造することができる。

【0108】

工程23

化合物(IXe)は、化合物(II g)の代わりに化合物(IXf)を用い、工程7と同様の方法により製造することができる。

【0109】

化合物(I)のうち、化合物(Ia)~(Ie)以外の化合物は、目的とする化合物の構造に適した原料や試薬等を採用することにより、上記の製造法に準じて、または有機合成化学で常用される一般的な製造方法を適用することによって製造することができる。

30

【0110】

上記各製造法における中間体および目的化合物は、有機合成化学で常用される分離精製法、例えば、ろ過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、再結晶および/または各種クロマトグラフィー等により単離精製することができる。中間体を特に精製することなく次の反応に供してもよい。

【0111】

本発明の化合物(I)において、構造中の窒素原子上の孤立電子対に水素イオンが配位してもよく、その場合には、製薬上許容し得る陰イオンと塩を形成していてもよく、本発明においては、式(I)で表される化合物、またはその製薬上許容し得る塩として、構造中の窒素原子上の孤立電子対に水素イオンが配位したカチオン性脂質も包含される。

40

【0112】

本発明において、製薬上許容し得る陰イオンとしては、例えば塩化物イオン、臭化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオンおよびリン酸イオン等の無機イオンならびに酢酸イオン、シュウ酸イオン、マレイン酸イオン、フマル酸イオン、クエン酸イオン、安息香酸イオンおよびメタンスルホン酸イオン等の有機酸イオン等が挙げられる。

本発明の式(I)で表される化合物の製薬上許容し得る塩としては、例えば塩酸塩、臭酸塩、硝酸塩、硫酸塩、リン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩、安息香酸塩およびメタンスルホン酸塩等が挙げられる。

50

【 0 1 1 3 】

本発明の化合物(1)の中には、幾何異性体もしくは光学異性体等の立体異性体または互変異性体等が存在し得るものもあるが、本発明の化合物(1)は、これらを含め、全ての可能な異性体およびそれらの混合物を包含する。

【 0 1 1 4 】

本発明の化合物(1)中の各原子の一部またはすべては、それぞれ対応する同位体原子で置き換わっていてもよく、化合物(1)は、これら同位体原子で置き換わった化合物も包含する。例えば、化合物(1)中の水素原子の一部またはすべては、原子量2の水素原子(重水素原子)であってもよい。

【 0 1 1 5 】

本発明の化合物(1)中の各原子の一部またはすべてが、それぞれ対応する同位体原子で置き換わった化合物は、市販のビルディングブロックを用いて、上記各製造法と同様な方法で製造することができる。また、化合物(1)中の水素原子の一部またはすべてが重水素原子で置き換わった化合物は、例えば、イリジウム錯体を触媒として用い、重水を重水素源として用いてアルコール、カルボン酸等を重水素化する方法[ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティ(J. Am. Chem. Soc.), Vol. 124, No. 10, 2092(2002)参照]等を用いて製造することができる。

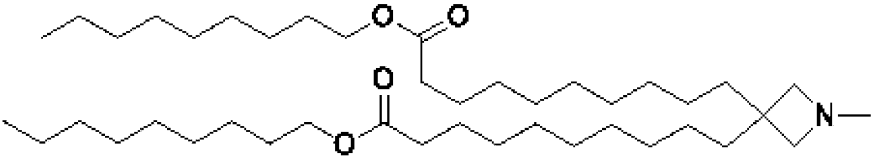
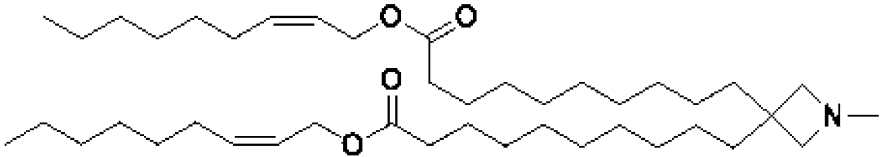
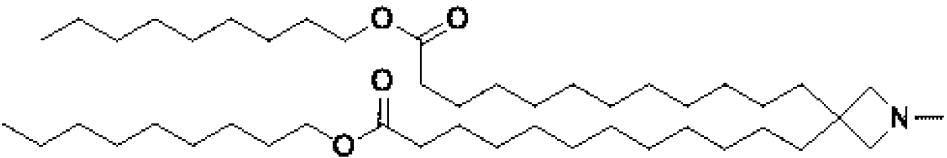
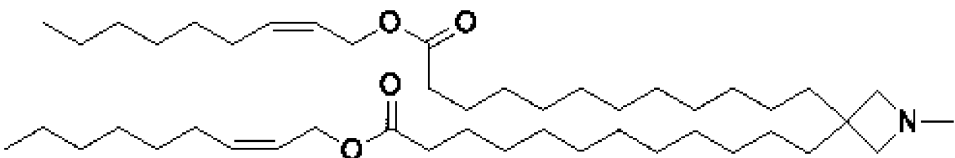
【 0 1 1 6 】

本発明の化合物(1)の具体例を表1～表3に示す。ただし、本発明の化合物(1)はこれらに限定されるものではない。

【 0 1 1 7 】

【表 1】

表1

化合物番号	構造式
1	
2	
3	
4	

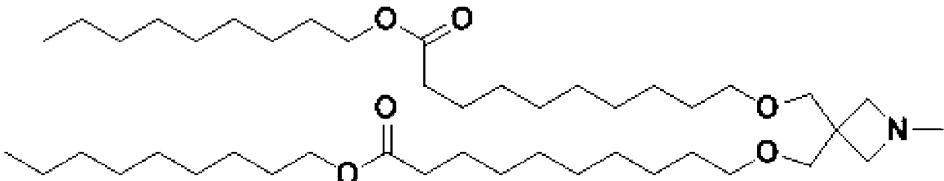
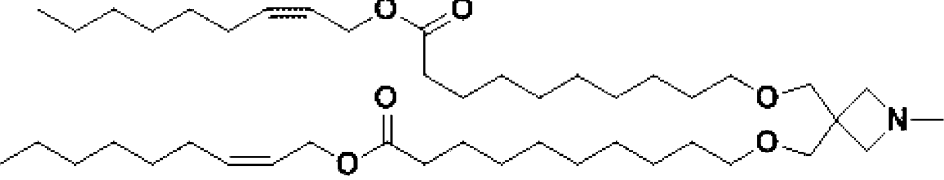
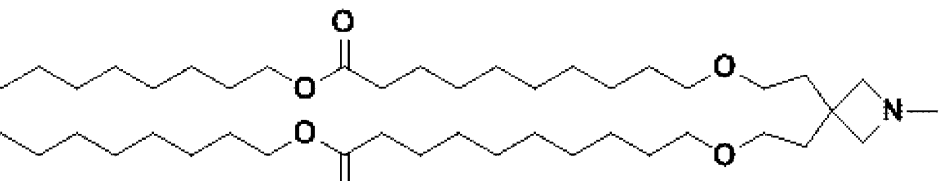
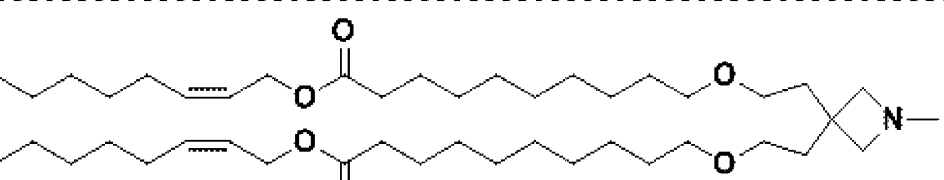
【 0 1 1 8 】

【表 2】

表 2

化合物番号

構造式

5		10
6		20
7		30
8		

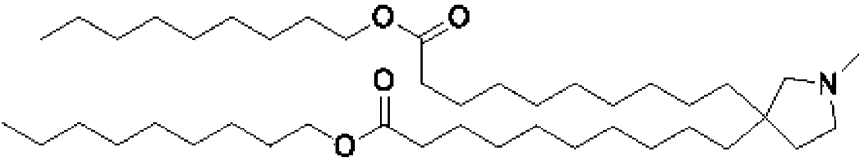
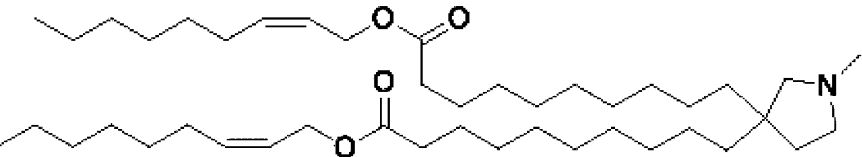
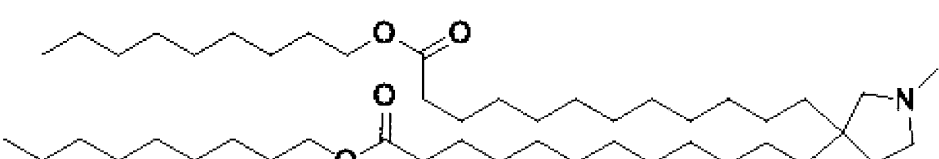
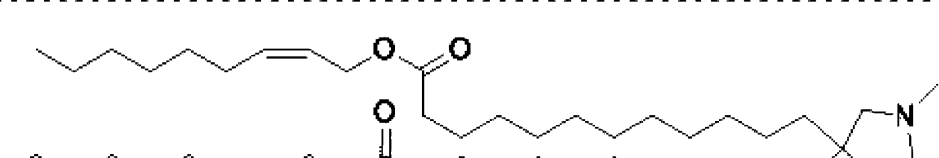
【 0 1 1 9 】

【表 3】

表3

化合物番号

構造式

9		10
10		
11		20
12		

【0120】

本発明で用いられる核酸としては、例えばヌクレオチドおよび/またはヌクレオチドと同等の機能を有する分子が重合した分子であれば、いかなる分子であってもよい。

30

核酸としては、例えばリボヌクレオチドの重合体であるリボ核酸(RNA)、デオキシリボヌクレオチドの重合体であるデオキシリボ核酸(DNA)、RNAとDNAとからなるキメラ核酸、およびこれらの核酸の少なくとも一つのヌクレオチドが該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子で置換されたヌクレオチド重合体等が挙げられる。

ヌクレオチドおよび/またはヌクレオチドと同等の機能を有する分子が重合した分子の構造を少なくとも一部に含む誘導体も、本発明で用いられる核酸に含まれる。

本発明において、ウラシルUと、チミンTとは、それぞれ読み替えることができる。

【0121】

ヌクレオチドと同等の機能を有する分子としては、例えばヌクレオチド誘導体等が挙げられる。

40

【0122】

ヌクレオチド誘導体としては、例えばヌクレオチドに修飾を施した分子であればいかなる分子であってもよいが、例えばRNAまたはDNAと比較して、ヌクレアーゼ耐性を向上させるかもしくはその他の分解因子から安定化させるため、相補鎖核酸とのアフィニティーをあげるため、細胞透過性をあげるため、または可視化させるために、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドに修飾を施した分子等が好適に用いられる。

【0123】

ヌクレオチド誘導体としては、例えば糖部修飾ヌクレオチド、リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチドおよび塩基修飾ヌクレオチド等が挙げられる。

【0124】

50

糖部修飾ヌクレオチドとしては、例えばヌクレオチドの糖の化学構造の一部またはすべてが、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよいが、2'-修飾ヌクレオチドが好ましく用いられる。

【0125】

糖部修飾ヌクレオチドにおける修飾基としては、例えば、2'-シアノ、2'-アルキル、2'-置換アルキル、2'-アルケニル、2'-置換アルケニル、2'-ハロゲン、2'-O-シアノ、2'-O-アルキル、2'-O-置換アルキル、2'-O-アルケニル、2'-O-置換アルケニル、2'-S-アルキル、2'-S-置換アルキル、2'-S-アルケニル、2'-S-置換アルケニル、2'-アミノ、2'-NH-アルキル、2'-NH-置換アルキル、2'-NH-アルケニル、2'-NH-置換アルケニル、2'-SO-アルキル、2'-SO-置換アルキル、2'-カルボキシ、2'-CO-アルキル、2'-CO-置換アルキル、2'-Se-アルキル、2'-Se-置換アルキル、2'-SiH₂-アルキル、2'-SiH₂-置換アルキル、2'-ONO₂、2'-NO₂、2'-N₃、2'-アミノ酸残基(アミノ酸のカルボン酸から水酸基が除去されたもの)および2'-O-アミノ酸残基(前記アミノ酸残基と同義)等が挙げられる。

10

【0126】

糖部修飾ヌクレオチドとしては、例えば糖部に架橋構造を導入することにより2つの環状構造を有する架橋構造型人工核酸(Bridged Nucleic Acid)(BNA)が挙げられる。

架橋構造型人工核酸としては、例えば2'位の酸素原子と4'位の炭素原子がメチレンを介して架橋したロックド人工核酸(Locked Nucleic Acid)(LNA) [“テトラヘドロンレターズ(Tetrahedron Letters)”, Volume 38, Issue 50, 1997, Pages 8735-8738、および“テトラヘドロン (Tetrahedron)”, Volume 54, Issue 14, 1998, Pages 3607-3630]ならびにエチレン架橋構造型人工核酸(Ethylene bridged nucleic acid)(ENA) [“ヌクレイックアシッドリサーチ(Nucleic Acid Research)”, 32, e175(2004)]等が挙げられる。

20

【0127】

糖部修飾ヌクレオチドとしては、ペプチド核酸(PNA)[Acc. Chem. Res., 32, 624(1999)]、オキシペプチド核酸(OPNA)[J. Am. Chem. Soc., 123, 4653(2001)]、ペプチドリボ核酸(PRNA)[J. Am. Chem. Soc., 122, 6900(2000)]等も挙げられる。

【0128】

糖部修飾ヌクレオチドにおける修飾基としては、2'-シアノ、2'-ハロゲン、2'-O-シアノ、2'-アルキル、2'-置換アルキル、2'-O-アルキル、2'-O-置換アルキル、2'-O-アルケニル、2'-O-置換アルケニル、2'-Se-アルキル、2'-Se-置換アルキルが好ましく、2'-シアノ、2'-フルオロ、2'-クロロ、2'-ブロモ、2'-トリフルオロメチル、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-O-イソプロピル、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-[2-(メトキシ)エチル]、2'-O-(3-アミノプロピル)、2'-O-[2-(N,N-ジメチルアミノオキシ)エチル]、2'-O-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロピル]、2'-O-{2-[2-(N,N-ジメチルアミノ)エトキシ]エチル}、2'-O-[2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル]、2'-Se-メチルがより好ましく、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-フルオロがさらに好ましく、2'-O-メチルおよび2'-O-エチルがよりさらに好ましい。

30

【0129】

糖部修飾ヌクレオチドにおける修飾基は、修飾基の大きさから好ましい範囲を定義することもでき、フルオロから-O-ブチルまでの大きさに相当する修飾基であることが好ましく、-O-メチルから-O-エチルまでの大きさに相当する修飾基であることがより好ましい。

40

【0130】

糖部修飾ヌクレオチドにおける修飾基におけるアルキルとしては、例えばC1-C6アルキル等が挙げられ、具体的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチルおよびヘキシル等が挙げられる。

【0131】

糖部修飾ヌクレオチドにおける修飾基におけるアルケニルとしては、例えばC3-C6のアルケニル等が挙げられ、具体的にはアリル、1-プロペニル、ブテニル、ペンテニルおよび

50

ヘキセニル等が挙げられる。

【0132】

糖部修飾ヌクレオチドにおける修飾基におけるハロゲンとしては、例えばフッ素原子、塩素原子、臭素原子およびヨウ素原子等が挙げられる。

【0133】

アミノ酸残基におけるアミノ酸としては、例えば脂肪族アミノ酸(具体的には、グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン等)、ヒドロキシアミノ酸(具体的には、セリンおよびトレオニン等)、酸性アミノ酸(具体的には、アスパラギン酸およびグルタミン酸等)、酸性アミノ酸アミド(具体的には、アスパラギンおよびグルタミン等)、塩基性アミノ酸(具体的には、リジン、ヒドロキシリジン、アルギニンおよびオルニチン等)、含硫アミノ酸(具体的には、システイン、シスチンおよびメチオニン等)ならびにイミノ酸(具体的には、プロリンおよび4-ヒドロキシプロリン等)等が挙げられる。

10

【0134】

糖部修飾ヌクレオチドにおける修飾基における置換アルキルおよび置換アルケニルにおける置換基としては、例えばハロゲン(前記と同義)、ヒドロキシ、スルファニル、アミノ、オキソ、-O-アルキル(-O-アルキルのアルキル部分は前記C1-C6アルキルと同義)、-S-アルキル(-S-アルキルのアルキル部分は前記C1-C6アルキルと同義)、-NH-アルキル(-NH-アルキルのアルキル部分は前記C1-C6アルキルと同義)、ジアルキルアミノオキシ(ジアルキルアミノオキシの2つのアルキル部分は同一または異なって前記C1-C6アルキルと同義)、ジアルキルアミノ(ジアルキルアミノの2つのアルキル部分は同一または異なって前記C1-C6アルキルと同義)およびジアルキルアミノアルキレンオキシ(ジアルキルアミノアルキレンオキシのアルキル部分は同一または異なって前記C1-C6アルキルと同義であり、アルキレン部分は前記C1-C6アルキルから水素原子が1つ除かれたものを意味する)等が挙げられ、置換数は好ましくは1~3である。

20

【0135】

リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合の化学構造の一部またはすべてが、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよい。

リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチドとしては、例えばリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がホスホロジチオエート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がアルキルホスホネート結合に置換されたヌクレオチドおよびリン酸ジエステル結合がホスホロアミデート結合に置換されたヌクレオチド等が挙げられる。

30

【0136】

塩基修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドの塩基の化学構造の一部またはすべてが、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよい。

塩基修飾ヌクレオチドとしては、例えば、塩基内の酸素原子が硫黄原子で置換されたもの、水素原子がC1-C6アルキルで置換されたもの、メチルが水素原子もしくはC2-C6アルキルで置換されたものおよびアミノがC1-C6アルキルまたはC1-C6アルカノイル等の保護基で保護されたもの等が挙げられる。

40

【0137】

ヌクレオチド誘導体として、ヌクレオチドまたは糖部、リン酸ジエステル結合もしくは塩基の少なくとも一つが修飾されたヌクレオチド誘導体に脂質、リン脂質、フェナジン、フォレート、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリンおよび色素等の別の化学物質を付加したものも挙げられ、例えば5'-ポリアミン付加ヌクレオチド誘導体、コレステロール付加ヌクレオチド誘導体、ステロイド付加ヌクレオチド誘導体、胆汁酸付加ヌクレオチド誘導体、ビタミン付加ヌクレオチド誘導体、緑色蛍光色素(Cy3)付加ヌクレオチド誘導体、赤色蛍光色素(Cy5)付加ヌクレオチド誘導体、フルオロセイン(6-FAM)付加ヌクレオチド誘導体およびビオチン付加ヌクレオチド

50

誘導体等が挙げられる。

【0138】

本発明で用いられる核酸においては、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体が、該核酸内の他のヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体とアルキレン構造、ペプチド構造、ヌクレオチド構造、エーテル構造およびエステル構造ならびにこれらの2つ以上を組み合わせた構造等の架橋構造を形成してもよい。

【0139】

本発明で用いられる核酸としては、好ましくは標的遺伝子の発現を抑制する核酸であり、より好ましくはRNA干渉(RNAi)を利用した標的遺伝子の発現抑制作用を有する核酸である。

10

【0140】

本発明における標的遺伝子としては、mRNAを産生して発現する遺伝子であれば特に限定されないが、例えば腫瘍または炎症に関連する遺伝子が挙げられる。

標的遺伝子となる腫瘍または炎症に関連する遺伝子としては、具体的には、血管内皮増殖因子受容体(vascular endothelial growth factor receptor)、線維芽細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子受容体、血小板由来増殖因子、血小板由来増殖因子受容体、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、クルッペル様因子(Kruppel-like factor)、エクスプレッドシーケンスタグ(Ets)転写因子、核因子、低酸素誘導因子、細胞周期関連因子、染色体複製関連因子、染色体修復関連因子、微小管関連因子、増殖シグナル経路関連因子、増殖関連転写因子およびアポトーシス関連因子等のタンパク質をコードする遺伝子等が挙げられ、具体的には血管内皮増殖因子遺伝子、血管内皮増殖因子受容体遺伝子、線維芽細胞増殖因子遺伝子、線維芽細胞増殖因子受容体遺伝子、血小板由来増殖因子遺伝子、血小板由来増殖因子受容体遺伝子、肝細胞増殖因子遺伝子、肝細胞増殖因子受容体遺伝子、クルッペル様因子遺伝子、エクスプレッドシーケンスタグ(Ets)転写因子遺伝子、核因子遺伝子、低酸素誘導因子遺伝子、細胞周期関連因子遺伝子、染色体複製関連因子遺伝子、染色体修復関連因子遺伝子、微小管関連因子遺伝子(例えば、CKAP5遺伝子等)、増殖シグナル経路関連因子遺伝子(例えば、KRAS遺伝子等)、増殖関連転写因子遺伝子およびアポトーシス関連因子(例えば、BCL-2遺伝子等)等が挙げられる。

20

【0141】

本発明における標的遺伝子としては、肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓において発現する遺伝子が好ましく、例えば腫瘍または炎症に関連する遺伝子、B型肝炎ウイルスゲノム、C型肝炎ウイルスゲノム、アポリポタンパク質(APO)、ヒドロキシメチルグルタリル(HMG)CoA還元酵素、ケキシン 9 型セリンプロテアーゼ(PCSK9)、第12因子、グルカゴン受容体、グルココルチコイド受容体、ロイコトリエン受容体、トロンボキサンA2受容体、ヒスタミンH1受容体、炭酸脱水酵素、アンギオテンシン変換酵素、レニン、p53、チロシンホスファターゼ(PTP)、ナトリウム依存性グルコース輸送担体、腫瘍壊死因子、インターロイキン、ヘプシジン、トランスサイレチン、アンチトロンピン、プロテインCおよびマトリブターゼ酵素(例えば、TMPRSS6遺伝子等)等のタンパク質をコードする遺伝子等が挙げられる。

30

【0142】

標的遺伝子の発現を抑制する核酸としては、例えば蛋白質等をコードする遺伝子(標的遺伝子)のmRNAの一部の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含み、かつ標的遺伝子の発現を抑制する核酸であれば、例えばsiRNA(short interference RNA)およびmiRNA(micro RNA)等の二本鎖核酸、shRNA(short hairpin RNA)、アンチセンス核酸およびリボザイム等の一本鎖核酸等、いずれの核酸を用いてもよいが、二本鎖核酸が好ましい。

40

【0143】

標的遺伝子のmRNAの一部の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む核酸をアンチセンス鎖核酸といい、アンチセンス鎖核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む核酸をセンス鎖核酸ともいう。センス鎖核酸は、標的遺伝子の一部の塩基配列からなる核酸そのもの等、アンチセンス鎖核酸と対合して二重鎖形成部ができる核酸をいう。

50

【0144】

二本鎖核酸とは、二本の鎖が対合し二重鎖形成部を有する核酸をいう。二重鎖形成部とは、二本鎖核酸を構成するヌクレオチドまたはその誘導体が塩基対を構成して二重鎖を形成している部分（二重鎖形成部）をいう。

二重鎖形成部を構成する塩基対は、通常15～27塩基対であり、15～25塩基対が好ましく、15～23塩基対がより好ましく、15～21塩基対がさらに好ましく、15～19塩基対がよりさらに好ましい。

【0145】

二重鎖形成部のアンチセンス鎖核酸としては、例えば標的遺伝子のmRNAの一部配列からなる核酸、または該核酸において1～3塩基、好ましくは1～2塩基、より好ましくは1塩基が置換、欠失もしくは付加され、かつ標的蛋白質の発現抑制活性を有する核酸が好適に用いられる。二本鎖核酸を構成する一本鎖の核酸は、通常15～30塩基（ヌクレオシド）の連なりからなるが、15～29塩基が好ましく、15～27塩基がより好ましく、15～25塩基がさらに好ましく、17～23塩基がよりさらに好ましく、19～21塩基が特に好ましい。

【0146】

二本鎖核酸を構成するアンチセンス鎖、センス鎖のいずれか一方、または両方の核酸は、二重鎖形成部に続く3'側または5'側に二重鎖を形成しない部分を有してもよい。この二重鎖を形成しない部分を突出部（オーバーハング）ともいう。

【0147】

突出部を有する二本鎖核酸としては、例えば少なくとも一方の鎖の3'末端または5'末端に1～4塩基、通常は1～3塩基からなる突出部を有する二本鎖核酸が挙げられる。

突出部を有する二本鎖核酸において、突出部は、2塩基からなる突出部であることが好ましく、dTdTまたはUUからなる突出部であることがより好ましい。

突出部は、アンチセンス鎖のみ、センス鎖のみ、およびアンチセンス鎖とセンス鎖の両方に有することができるが、アンチセンス鎖とセンス鎖の両方に突出部を有する二本鎖核酸が好ましい。

【0148】

二重鎖形成部に続いて標的遺伝子のmRNAの塩基配列と一部またはすべてが一致する配列、または、二重鎖形成部に続いて標的遺伝子のmRNAの相補鎖の塩基配列と一部またはすべてが一致する配列を用いてもよい。

標的遺伝子の発現を抑制する核酸としては、例えばDicer等のリボヌクレアーゼの作用により二本鎖核酸を生成する核酸分子（国際公開第2005/089287号）や、3'末端や5'末端の突出部を有していない二本鎖核酸等を用いることもできる。

【0149】

二本鎖核酸がsiRNAである場合、好ましくはアンチセンス鎖は、5'末端側から3'末端側に向って少なくとも1～17番目の塩基（ヌクレオシド）の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する17塩基の配列と相補的な塩基の配列であり、より好ましくはアンチセンス鎖は、5'末端側から3'末端側に向って1～19番目の塩基の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する19塩基の配列と相補的な塩基の配列であるか、5'末端側から3'末端側に向って1～21番目の塩基の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する21塩基の配列と相補的な塩基の配列であるか、5'末端側から3'末端側に向って1～25番目の塩基の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する25塩基の配列と相補的な塩基の配列である。

【0150】

本発明で用いられる核酸がsiRNAである場合、好ましくは核酸中の糖の10～70%、より好ましくは15～60%、さらに好ましくは20～50%が、2'位において修飾基で置換されたりボースである。本発明における2'位において修飾基で置換されたりボースとは、リボースの2'位の水酸基が修飾基に置換されているものを意味し、リボースの2'位の水酸基と立体配置が同じであっても異なってもよいが、好ましくはリボースの2'位の水酸基と立体配置が同じである。2'位において修飾基で置換されたりボースにおける修飾基としては、糖部修飾ヌクレオチドにおける2'-修飾ヌクレオチドにおける修飾基として例示し

たものおよび水素原子が挙げられ、2'-シアノ、2'-ハロゲン、2'-O-シアノ、2'-アルキル、2'-置換アルキル、2'-O-アルキル、2'-O-置換アルキル、2'-O-アルケニル、2'-O-置換アルケニル、2'-Se-アルキルまたは2'-Se-置換アルキルが好ましく、2'-シアノ、2'-フルオロ、2'-クロロ、2'-ブromo、2'-トリフルオロメチル、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-O-イソプロピル、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-[2-(メトキシ)エチル]、2'-O-(3-アミノプロピル)、2'-O-[2-(N,N-ジメチル)アミノオキシ]エチル、2'-O-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロピル]、2'-O-{2-[2-(N,N-ジメチルアミノ)エトキシ]エチル}、2'-O-[2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル]、2'-Se-メチル、水素原子がより好ましく、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-フルオロまたは水素原子がさらに好ましく、2'-O-メチルまたは2'-O-フルオロがよりさらに好ましい。

10

【0151】

本発明で用いられる核酸は、核酸の構造中のリン酸部、エステル部等に含まれる酸素原子等が、例えば硫黄原子等の他の原子に置換された誘導体を包含する。

【0152】

アンチセンス鎖およびセンス鎖の5'末端の塩基に結合する糖は、それぞれ5'位の水酸基が、リン酸基もしくは前記修飾基、または生体内の核酸分解酵素等でリン酸基もしくは前記修飾基に変換される基によって修飾されていてもよい。

【0153】

アンチセンス鎖およびセンス鎖の3'末端の塩基に結合する糖は、それぞれ3'位の水酸基が、リン酸基もしくは前記修飾基、または生体内の核酸分解酵素等でリン酸基もしくは前記修飾基に変換される基によって修飾されていてもよい。

20

【0154】

一本鎖核酸としては、例えば標的遺伝子の連続する15~27塩基(ヌクレオシド)、好ましくは15~25塩基、より好ましくは15~23塩基、さらに好ましくは15~21塩基、よりさらに好ましくは15~19塩基からなる配列の相補配列からなる核酸、または該核酸において1~3塩基、好ましくは1~2塩基、より好ましくは1塩基が置換、欠失もしくは付加され、かつ標的蛋白質の発現抑制活性を有する核酸であればいずれでもよい。

一本鎖核酸は、好ましくは15~30塩基(ヌクレオシド)、より好ましくは15~27塩基、さらに好ましくは15~25塩基、よりさらに好ましくは15~23塩基の連なりからなる。

【0155】

30

一本鎖核酸として、二本鎖核酸を構成するアンチセンス鎖およびセンス鎖を、スパーサー配列(スパーサーオリゴヌクレオチド)を介して連結したものをを用いてもよい。スパーサーオリゴヌクレオチドとしては6~12塩基の一本鎖核酸が好ましく、その5'末端側の配列は2個のUであるのが好ましい。スパーサーオリゴヌクレオチドの例として、UUCAAGAGAの配列からなる一本鎖核酸が挙げられる。スパーサーオリゴヌクレオチドによってつながれるアンチセンス鎖およびセンス鎖の順番はどちらが5'側になってもよい。

二本鎖核酸を構成するアンチセンス鎖およびセンス鎖が、スパーサーオリゴヌクレオチドを介して連結した一本鎖核酸としては、例えばステムループ構造によって二重鎖形成部を有するshRNA等の一本鎖核酸であることが好ましい。shRNA等の一本鎖核酸は、通常50~70塩基長である。

40

【0156】

リボヌクレアーゼ等の作用により、一本鎖核酸または二本鎖核酸を生成するように設計した、70塩基長以下、好ましくは50塩基長以下、さらに好ましくは30塩基長以下の核酸を用いてもよい。

【0157】

本発明で用いられる核酸は、既知のRNAまたはDNA合成法、およびRNAまたはDNA修飾法を用いて製造することができる。

【0158】

本発明の組成物は、本発明の式(I)で表される化合物、またはその製薬上許容し得る塩(カチオン性脂質)および核酸を含有する。

50

本発明の組成物は、例えば本発明のカチオン性脂質と核酸との複合体であってよい。

本発明の組成物は、本発明のカチオン性脂質と、中性脂質および／または高分子と、核酸とを含有する組成物であり、例えば、本発明のカチオン性脂質と、中性脂質および／または高分子と、核酸との複合体であってよい。

本発明の組成物は、脂質膜を含有し、複合体が脂質膜により封入されていてもよい。

脂質膜は、脂質一重膜(脂質1分子膜)でも脂質二重膜(脂質2分子膜)であってよい。脂質膜に、本発明のカチオン性脂質、中性脂質および／または高分子を含有していてもよい。

複合体および／または脂質膜に、本発明の式(1)で表される化合物、またはその製薬上許容し得る塩であるカチオン性脂質以外のカチオン性脂質を含有していてもよい。

10

【0159】

本発明の組成物としては、例えば本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質と核酸との複合体、または本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質に中性脂質および／または高分子と、核酸との複合体、ならびに複合体を封入する脂質膜を含有し、脂質膜に本発明のカチオン性脂質を含有する組成物等も挙げられる。この場合の脂質膜も、脂質一重膜(脂質1分子膜)でも脂質二重膜(脂質2分子膜)であってよい。また、脂質膜に、本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質、中性脂質および／または高分子を含有していてもよい。

【0160】

本発明の組成物において、本発明のカチオン性脂質と核酸との複合体を含有する組成物、本発明のカチオン性脂質と核酸との複合体および複合体を封入する脂質膜を含有し、脂質膜に本発明のカチオン性脂質を含有する組成物、ならびに本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質と核酸との複合体および複合体を封入する脂質膜を含有し、脂質膜に本発明のカチオン性脂質を含有する組成物が好ましく、本発明のカチオン性脂質と核酸との複合体を含有する組成物、ならびに本発明のカチオン性脂質と核酸との複合体および複合体を封入する脂質膜を含有し、脂質膜に本発明のカチオン性脂質を含有する組成物がより好ましい。

20

いずれの組成物においても、脂質膜に、中性脂質および／または高分子を含有していてもよい。また、複合体および／または脂質膜に、本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質を含有していてもよい。

30

【0161】

複合体の形態としては、例えば核酸と脂質一重(一分子)層からなる膜(逆ミセル)との複合体、核酸とリポソームとの複合体および核酸とミセルとの複合体等が挙げられ、好ましくは核酸と脂質一重層からなる膜との複合体または核酸とリポソームとの複合体である。

【0162】

複合体を封入する脂質膜を含有する組成物としては、例えば複合体を任意の数の脂質膜で封入するリポソームおよび脂質ナノ粒子等が挙げられる。

【0163】

本発明の組成物には、一種または複数種の本発明のカチオン性脂質を使用してよく、本発明のカチオン性脂質には、本発明のカチオン性脂質に加え、本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質を混合してもよい。

40

【0164】

本発明の式(1)で表される化合物、またはその製薬上許容し得る塩であるカチオン性脂質以外のカチオン性脂質としては、例えば特開昭61-161246号公報(米国特許5049386号明細書)中で開示される、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)およびN-(2,3-ジ-(9-(Z)-オクタデセノイルオキシ))-プロパ-1-イル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTAP)等、国際公開第91/16024号および国際公開第97/019675号中で開示される、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシプロピル)]-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチル臭化アンモニウム(DORIE)および2,3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スベルミンカルボキシアミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパナミニウムトリフルオロ酢酸

50

(DOSPA)等、国際公開第2005/121348号中で開示される、DLinDMA等、国際公開第2009/086558号中で開示される、DLin-K-DMA等、国際公開第2011/136368号中で開示される、(3R2R)-3,4-ビス((Z)-ヘキサデカ-9-エニルオキシ)-1-メチルピロリジンおよびN-メチル-N,N-ビス(2-((Z)-オクタデカ-6-エニルオキシ)エチル)アミン等が挙げられる。

本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質としては、好ましくはDOTMA、DOTAP、DORIE、DOSPA、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキサラン(DLin-K-DMA)等の2つの非置換アルキル基を有する3級アミン部位または3つの非置換アルキル基を有する4級アンモニウム部位を有するカチオン性脂質であり、より好ましくは、3級アミン部位を有するカチオン性脂質である。

10

3級アミン部位および4級アンモニウム部位の非置換アルキル基はメチル基であることが好ましい。

本発明の組成物は、核酸に加え、核酸と化学的に近似した化合物を含有してもよい。

【0165】

本発明の組成物は、公知の製造方法またはそれに準じて製造することができ、いかなる製造方法で製造されたものであってよい。例えば、組成物の1つであるリポソームを含有する組成物の製造には、公知のリポソームの調製方法が適用できる。

公知のリポソームの調製方法としては、例えばバンガム(Bangham)らのリポソーム調製法[“ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J.Mol.Biol.)”,1965年,第13巻,p.238-252参照]、エタノール注入法[“ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー(J.Cell Biol.)”,1975年,第66巻,p.621-634参照]、フレンチプレス法[“エフイービーエス・レターズ(FEBS Lett.)”,1979年,第99巻,p.210-214参照]、凍結融解法[“アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス(Arch.Biochem.Biophys.)”,1981年,第212巻,p.186-194参照]、逆相蒸発法[“プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)”,1978年,第75巻,p.4194-4198参照]およびpH勾配法(例えば特許第2572554号公報、特許第2659136号公報等参照)等が挙げられる。

20

リポソームの製造の際にリポソームを分散させる溶液としては、例えば水、酸、アルカリ、種々の緩衝液、生理食塩水およびアミノ酸輸液等が挙げられる。

リポソームの製造の際には、例えばクエン酸、アスコルビン酸、システインおよびエチレンジアミン四酢酸(EDTA)等の抗酸化剤、例えばグリセリン、ブドウ糖および塩化ナトリウム等の等張化剤等を添加してもよい。

30

本発明のカチオン性脂質、または本発明のカチオン性脂質と本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質との混合物等を、例えばエタノール等の有機溶媒に溶解し、溶媒を除去した後、生理食塩水等を添加、振とう攪拌することで、リポソームを形成させることができる。

【0166】

本発明の組成物は、例えば、本発明のカチオン性脂質、または本発明のカチオン性脂質と本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質との混合物を、クロロホルムに予め溶解し、次いで核酸の水溶液とメタノールを加えて混合してカチオン性脂質/核酸の複合体を形成させ、さらにクロロホルム層を取り出し、取り出したクロロホルム層にポリエチレングリコール化リン脂質と中性の脂質と水を加えて油中水型(W/O)エマルジョンを形成し、逆相蒸発法で処理して製造する方法(特表2002-508765号公報参照)や、核酸を、酸性の電解質水溶液に溶解し、例えば、本発明のカチオン性脂質、または本発明のカチオン性脂質と本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質との混合物(エタノール中)を加え、エタノール濃度を20v/v%まで下げて核酸内包リポソームを調製し、サイジングろ過し、透析によって、過剰のエタノールを除去した後、試料をさらにpHを上げて透析して組成物表面に付着した核酸を除去して製造する方法(特表2002-501511号公報およびバイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ(Biochimica et Biophysica Acta),2001年,第1510巻,p.152-166参照)等によって製造することができる。

40

50

【0167】

本発明の組成物のうち、本発明のカチオン性脂質と核酸との複合体、または本発明のカチオン性脂質に中性脂質および／または高分子と、核酸との複合体、ならびに複合体を封入した脂質膜を含有する脂質ナノ粒子を含有する組成物は、例えば、国際公開第02/28367号および国際公開第2006/080118号等に記載の製造方法に従って製造することができる。

【0168】

国際公開第02/28367号および国際公開第2006/080118号等に記載の製造方法に従って本発明の組成物を製造する場合には、本発明のカチオン性脂質、核酸、中性脂質および／または高分子、ならびに本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質から適宜選択した成分を用いて複合体を製造し、水または0～40%エタノール水溶液中に、複合体を溶解させずに分散させ(A液)、別途、複合体を封入する脂質膜成分を、例えばエタノール水溶液中に溶解させ(B液)、体積比1:1～10:1のA液とB液を混合し、さらに適宜に水を加えることで本発明の組成物を製造することができる。

10

A液およびB液中のカチオン性脂質としては、一種または複数種の本発明のカチオン性脂質または本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質を使用してよく、本発明のカチオン性脂質と本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質を組み合わせることで混合して使用してもよい。

【0169】

本発明において、本発明のカチオン性脂質と核酸との複合体、または本発明のカチオン性脂質と、中性脂質および／または高分子と、核酸との複合体、ならびに複合体を封入した脂質膜を含有する組成物、本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質と核酸との複合体、または本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質と、中性脂質および／または高分子と、核酸との複合体、ならびに複合体を封入する脂質膜を含有し、脂質膜に本発明のカチオン性脂質を含有する組成物等の製造中および製造後に、複合体中の核酸と脂質膜中のカチオン性脂質との静電相互作用や、複合体中のカチオン性脂質と脂質膜中のカチオン性脂質との融合によって、複合体および膜の構造が変異したものも、本発明の組成物に包含される。

20

【0170】

国際公開第02/28367号および国際公開第2006/080118号等に記載の製造方法に従って、核酸、好ましくは二本鎖核酸と、本発明のカチオン性脂質および／または本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質を含有するリボソームとの複合体を製造し、水または0～40%エタノール水溶液中に、複合体を溶解させずに分散させ(A液)、別途、本発明のカチオン性脂質および／または本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質を、エタノール水溶液中に溶解させ(B液)、体積比1:1～10:1のA液とB液を混合すること、または、さらに適宜に水を加えることでも、本発明の組成物と核酸を含有する組成物を製造することができる。

30

本製法により得られる組成物は、好ましくはカチオン性脂質と核酸との複合体および複合体を封入する脂質膜を含有する組成物であるか、または核酸とカチオン性脂質を含有する脂質一重層からなる膜(逆ミセル)との複合体および複合体を封入する脂質膜を含有する組成物である。該組成物における脂質膜は、脂質一重膜(脂質1分子膜)、脂質二重膜(脂質2分子膜)または多重膜のいずれであってもよい。

40

【0171】

本発明における核酸とリボソームとの複合体中のリボソームの大きさを、平均粒子径として、予め、好ましくは10nm～400nm、より好ましくは20nm～110nm、さらに好ましくは20nm～80nmに調節することが好ましい。複合体および／または脂質膜に、中性脂質および／または高分子を含有していてもよい。

A液は、リボソームと核酸との複合体を形成させることができれば、エタノール濃度は、20～70%であってもよい。

【0172】

等量のA液とB液を混合する代わりに、A液とB液を混合後に複合体が溶解せず、かつB液

50

中のカチオン性脂質が溶解しないエタノール濃度となる比でA液とB液を混合してもよい。好ましくは複合体が溶解せず、B液中のカチオン性脂質が溶解せず、かつエタノール濃度が20～60%のエタノール水溶液になるような比でA液とB液を混合することに代えてもよく、またはA液とB液を混合後に複合体が溶解しないようなエタノール濃度になるような比でA液とB液を混合し、さらに水を加えることで、B液中のカチオン性脂質が溶解しなくなるエタノール濃度にしてもよい。

【0173】

本製法により得られる組成物は、好ましくはカチオン性脂質と核酸との複合体および複合体を封入する脂質膜を含有する組成物であり、または、カチオン性脂質を含有する脂質一重層からなる膜(逆ミセル)と核酸との複合体および複合体を封入する脂質膜を含有し、脂質膜にカチオン性脂質を含有する組成物であり、本製法の製造性(収率および/または均一性)は優れている。

10

【0174】

本発明の組成物において、複合体中の本発明のカチオン性脂質の分子の総数は、核酸のリン原子の数に対して0.5～4倍であるのが好ましく、1.5～3.5倍であるのがより好ましく、2～3倍であるのがさらに好ましい。

複合体中の本発明のカチオン性脂質および本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質の分子の総数は、核酸のリン原子の数に対して0.5～4倍であるのが好ましく、1.5～3.5倍であるのがより好ましく、2～3倍であるのがさらに好ましい。

【0175】

20

本発明の組成物において、複合体および複合体を封入する脂質膜を含有する組成物中の本発明のカチオン性脂質の分子の総数は、核酸のリン原子の数に対して1～10倍であるのが好ましく、2.5～9倍であるのがより好ましく、3.5～8倍であるのがさらに好ましい。

組成物中の本発明のカチオン性脂質および本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質の分子の総数は、核酸のリン原子の数に対して1～10倍であるのが好ましく、2.5～9倍であるのがより好ましく、3.5～8倍であるのがさらに好ましい。

【0176】

中性脂質としては、単純脂質、複合脂質または誘導脂質のいかなるものであってもよく、例えばリン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴイドおよびステロール等が挙げられる。

30

【0177】

本発明の組成物において中性脂質を含有する場合には、中性脂質の分子の総数は、本発明のカチオン性脂質および本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質の分子の総数に対して0.1～2倍であるのが好ましく、0.2～1.5倍であるのがより好ましく、0.3～1.2倍であるのがさらに好ましい。

本発明の組成物は、中性脂質を、複合体に含有してもよく、複合体を封入する脂質膜に含有していてもよい。

中性脂質を、複合体を封入する脂質膜に含有していることが好ましく、複合体および複合体を封入する脂質膜のどちらにも含有していることがより好ましい。

【0178】

40

中性脂質におけるリン脂質としては、例えばホスファチジルコリン(具体的には大豆ホスファチジルコリン、卵黄ホスファチジルコリン(EPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)およびジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)等)、ホスファチジルエタノールアミン(具体的にはジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン(DMPE)、16-0-モノメチルホスファチジルエタノールアミン、16-0-ジメチルホスファチジルエタノールアミン、18-1-トランスホスファチジルエタノールアミン、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)お

50

よび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)等)、グリセロリン脂質(具体的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、ホスファチジリンシトール、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール(POPG)およびリゾホスファチジルコリン等)、スフィンゴリン脂質(具体的にはスフィンゴミエリン、セラミドホスホエタノールアミン、セラミドホスホグリセロールおよびセラミドホスホグリセロリン酸等)、グリセロホスホ脂質、スフィンゴホスホ脂質、天然レシチン(具体的には卵黄レシチンおよび大豆レシチン等)ならびに水素添加リン脂質(具体的には水素添加大豆ホスファチジルコリン等)等の天然または合成のリン脂質が挙げられる。

【0179】

10

中性脂質におけるグリセロ糖脂質としては、例えばスルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリドおよびグリコシルジグリセリド等が挙げられる。

【0180】

中性脂質におけるスフィンゴ糖脂質としては、例えばガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシドおよびガングリオシド等が挙げられる。

【0181】

中性脂質におけるスフィンゴイドとしては、例えばスフィンガン、イコサスフィンガンおよびスフィンゴシンならびにそれらの誘導体等が挙げられる。

誘導体としては、例えばスフィンガン、イコサスフィンガンまたはスフィンゴシン等の $-NH_2$ を $-NHCO(CH_2)_xCH_3$ (式中、 x は0~18の整数であり、中でも6、12または18が好ましい)に変換したもの等が挙げられる。

20

【0182】

中性脂質におけるステロールとしては、例えばコレステロール、ジヒドロコレステロール、ラノステロール、 β -シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、エルゴカステロール、フコステロールおよび 3β -[N-(N',N'-ジメチルアミノエチル)カルバモイル]コレステロール(DC-Chol)等が挙げられる。

【0183】

高分子としては、例えばタンパク質、アルブミン、デキストラン、ポリフェクト(polyfect)、キトサン、デキストラン硫酸、ポリ-L-リジン、ポリエチレンジイミン、ポリアスパラギン酸、スチレンマレイン酸共重合体、イソプロピルアクリルアミド-アクリルピロリドン共重合体、ポリエチレングリコール修飾デンドリマー、ポリ乳酸、ポリ乳酸ポリグリコール酸およびポリエチレングリコール化ポリ乳酸等が挙げられる。

30

高分子としては、例示した高分子の塩の1以上からなるミセルであってもよい。

【0184】

高分子の塩は、例えば金属塩、アンモニウム塩、酸付加塩、有機アミン付加塩およびアミノ酸付加塩等が挙げられる。

金属塩としては、例えばリチウム塩、ナトリウム塩およびカリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩およびカルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩ならびに亜鉛塩等が挙げられる。

40

アンモニウム塩としては、例えばアンモニウムおよびテトラメチルアンモニウム等の塩が挙げられる。

酸付加塩としては、例えば塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩およびリン酸塩等の無機酸塩、ならびに酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩およびクエン酸塩等の有機酸塩が挙げられる。

有機アミン付加塩としては、例えばモルホリンおよびピペリジン等の付加塩が挙げられる。

アミノ酸付加塩としては、例えばグリシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸およびリジン等の付加塩が挙げられる。

【0185】

本発明の組成物は、例えば糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1以上

50

の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体、または界面活性剤等を含有することが好ましく、複合体に含有していてもよく、複合体を封入する脂質膜に含有していてもよく、複合体および複合体を封入する脂質膜ともに含有していることがより好ましい。

【0186】

本発明の組成物が、糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体を含有する場合には、糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1以上の物質の脂質誘導体および脂肪酸誘導体の分子の総数は、本発明のカチオン性脂質および本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質の分子の総数に対して0.01~0.3倍であるのが好ましく、0.02~0.25倍であるのがより好ましく、0.03~0.15倍であるのがさらに好ましい。

10

【0187】

糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体、または界面活性剤としては、好ましくは、糖脂質、または水溶性高分子の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体であり、より好ましくは、水溶性高分子の脂質誘導体または脂肪酸誘導体である。

糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体、または界面活性剤は、分子の一部が本発明の組成物中の他の構成成分と例えば疎水性親和力または静電的相互作用等で結合する性質をもち、他の部分が組成物の製造時の溶媒と例えば親水性親和力または静電的相互作用等で結合する性質をもつ、2面性をもつ物質であるのが好ましい。

20

【0188】

糖、ペプチドまたは核酸の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えばショ糖、ソルビトールおよび乳糖等の糖、例えばカゼイン由来ペプチド、卵白由来ペプチド、大豆由来ペプチドおよびグルタチオン等のペプチド、または例えばDNA、RNA、プラスミド、siRNAおよびオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)等の核酸と、中性脂質もしくは本発明のカチオン性脂質、または例えばステアリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸およびラウリン酸等の脂肪酸とが結合した化合物等が挙げられる。

【0189】

糖の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えばグリセロ糖脂質またはスフィンゴ糖脂質等も含まれる。

30

【0190】

水溶性高分子の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えばポリエチレングリコール、ポリグリセリン、ポリエチレンジイミン、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、オリゴ糖、デキストリン、水溶性セルロース、デキストラン、コンドロイチン硫酸、ポリグリセリン、キトサン、ポリビニルピロリドン、ポリアスパラギン酸アミド、ポリ-L-リジン、マンナン、プルランもしくはオリゴグリセロール等またはそれらの誘導体と、中性脂質もしくは本発明のカチオン性脂質、または例えばステアリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸およびラウリン酸等の脂肪酸とが結合した化合物等が挙げられ、好ましくは、ポリエチレングリコールもしくはポリグリセリンの脂質誘導体または脂肪酸誘導体であり、より好ましくは、ポリエチレングリコールの脂質誘導体または脂肪酸誘導体である。

40

水溶性高分子の脂質誘導体または脂肪酸誘導体は、塩であってもよい。

【0191】

ポリエチレングリコールの脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えばポリエチレングリコール化脂質[具体的にはポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン(より具体的には1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG-DSPE)および1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG-DMPE)等)、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、クレモフォアイエル(CREMOPHOR EL)等]、ポリエチレングリコールソルビタン脂肪酸エステル類(具体的にはモノオレイン酸ポリオキシ

50

エチレンソルビタン等)ならびにポリエチレングリコール脂肪酸エステル類等が挙げられ、好ましくは、ポリエチレングリコール化脂質である。

【0192】

ポリグリセリンの脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えばポリグリセリン化脂質(具体的にはポリグリセリン-ホスファチジルエタノールアミン等)またはポリグリセリン脂肪酸エステル類等が挙げられ、好ましくは、ポリグリセリン化脂質である。

【0193】

界面活性剤としては、例えばモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン(具体的にはポリソルベート80等)、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール(具体的にはプルロニック(登録商標)F68等)、ソルビタン脂肪酸エステル(具体的にはソルビタンモノラウレートおよびソルビタンモノオレート等)、ポリオキシエチレン誘導体(具体的にはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60およびポリオキシエチレンラウリルアルコール等)、グリセリン脂肪酸エステルおよびポリエチレングリコールアルキルエーテル等が挙げられ、好ましくは、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、グリセリン脂肪酸エステルまたはポリエチレングリコールアルキルエーテルである。

【0194】

本発明の組成物中の複合体および脂質膜には、例えば水溶性高分子等による表面改質も任意に行うことができる[ラジック(D.D.Lasic)、マーティン(F.Martin)編,“ステルス・リポソームズ(Stealth Liposomes)”(米国),シーアールシー・プレス・インク(CRC Press Inc),1995年,p.93-102参照]。

表面改質に使用し得る水溶性高分子としては、例えばポリエチレングリコール、ポリグリセリン、ポリエチレンイミン、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、オリゴ糖、デキストリン、水溶性セルロース、デキストラン、コンドロイチン硫酸、ポリグリセリン、キトサン、ポリビニルピロリドン、ポリアスパラギン酸アミド、ポリ-L-リジン、マンナン、プルランおよびオリゴグリセロール等が挙げられ、好ましくはデキストラン、プルラン、マンナン、アミロペクチンまたはヒドロキシエチルデンプンである。

表面改質には、糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1以上の物質の脂質誘導体または脂肪酸誘導体等を用いることができる。表面改質は、本発明の組成物中の複合体および脂質膜に糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体、または界面活性剤を含有させる方法の1つである。

【0195】

標的化リガンドを、本発明の組成物の脂質成分の極性ヘッド残基に共有結合することにより本発明の組成物の表面に直接結合させることもできる(国際公開第2006/116107号参照)。

【0196】

本発明の組成物中の複合体または複合体を封入する脂質膜の平均粒子径は、所望により自由に選択できる。

平均粒子径を調節する方法としては、例えばエクストルージョン法、大きな多重膜リポソーム(MLV)等を機械的に粉碎(具体的にはマントンゴウリンまたはマイクロフルイダイザー等を使用)する方法[ミュラー(R.H.Muller)、ベニタ(S.Benita)、ボーム(B.Bohm)編著,“エマルジョン・アンド・ナノサスペンションズ・フォー・ザ・フォーミュレーション・オブ・ポアリー・ソラブル・ドラッグズ(Emulsion and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs)”,ドイツ,サイエンティフィック・パブリッシャーズ・シュットガルト(Scientific Publishers Stuttgart),1998年,p.267-294参照]等が挙げられる。

【0197】

本発明の組成物中の複合体の大きさは、平均粒子径が約5nm~200nmであるのが好ましく、約20nm~150nmであるのがより好ましく、約20nm~80nmであるのがさらに好ましい。

【0198】

本発明の組成物(複合体を封入する脂質膜)の大きさは、平均粒子径が約10nm～300nmであるのが好ましく、約30nm～200nmであるのがより好ましく、約50nm～150nmであるのがさらに好ましい。

【0199】

本発明の組成物中の複合体または複合体を封入する脂質膜の平均粒子径は、例えば動的光散乱法で測定することができる。

【0200】

本発明の組成物を、哺乳動物の細胞に導入することで、本発明の組成物中の核酸を細胞内に導入することができる。

【0201】

インビボにおける本発明の組成物の哺乳動物の細胞への導入は、インビボにおいて行うことのできる公知のトランスフェクションの手順に従って行えばよい。例えば、本発明の組成物を、人を含む哺乳動物に静脈内投与することで、例えば腫瘍または炎症の生じた臓器または部位へ送達され、送達臓器または部位の細胞内に本発明の組成物中の核酸を導入することができる。腫瘍または炎症の生じた臓器または部位としては、特に限定されないが、例えば胃および大腸等の消化管、肝臓、肺、脾臓、膵臓、腎臓、膀胱、脳および脊髄等の中枢神経系、皮膚、血管ならびに眼球等が挙げられる。また、本発明の組成物を、人を含む哺乳動物に静脈内投与することで、例えば肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系および/または脾臓へ送達され、送達臓器または部位の細胞内に本発明の組成物中の核酸を導入することができる。肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓の細胞は、正常細胞、腫瘍もしくは炎症に関連した細胞またはその他の疾患に関連した細胞のいずれでもよい。

【0202】

本発明の組成物中の核酸が、RNA干渉(RNAi)を利用した標的遺伝子の発現抑制作用を有する核酸であれば、インビボで哺乳動物の細胞内に、標的遺伝子の発現を抑制する核酸等を導入することができ、標的遺伝子の発現の抑制ができる。

投与対象は、人であることが好ましい。

【0203】

本発明における標的遺伝子が、例えば肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓において発現する遺伝子である場合、本発明の組成物を、肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓に関連する疾患の治療剤または予防剤として使用することができる。

本発明は、本発明の組成物を哺乳動物に投与する肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓に関連する疾患の治療方法も提供する。投与対象は、人であることが好ましく、肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓に関連する疾患に罹患している患者がより好ましい。

【0204】

本発明の組成物は、肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓に関連する疾患の治療剤または予防剤に関するインビボの薬効評価モデルにおいて、標的遺伝子を抑制することの有効性を検証するためのツールとして使用することもできる。

【0205】

本発明の組成物は、例えば血液成分等の生体成分(例えば血液および消化管等)中での核酸の安定化、副作用の低減または標的遺伝子の発現部位を含む組織または臓器への薬剤集積性の増大等を目的とする製剤としても使用できる。

【0206】

本発明の組成物を、医薬品の肝臓、肺、腎臓、消化管、中枢神経系または脾臓に関連する疾患等の治療剤または予防剤として使用する場合、投与経路としては、治療に際し最も効果的な投与経路を使用するのが望ましく、例えば口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内または静脈内等の非経口投与または経口投与が挙げられ、好ましくは静脈内投与または筋肉内投与であり、より好ましくは静脈内投与である。

【0207】

本発明の組成物の投与量は、投与対象の病状や年齢、投与経路等によって異なるが、例えば核酸に換算した1日投与量が約0.1 μ g ~ 1000mgとなるように投与すればよい。

【0208】

静脈内投与または筋肉内投与に適当な製剤としては、例えば注射剤が挙げられ、調製した本発明の組成物の分散液をそのまま注射剤等の形態としたものが挙げられる。

適当な製剤としては、好ましくは、分散液から例えば濾過または遠心分離等によって溶媒を除去した製剤、分散液を凍結乾燥した製剤、ならびに例えばマンニトール、ラクトース、トレハロース、マルトースおよびグリシン等の賦形剤を加えた分散液を凍結乾燥した製剤である。

【0209】

注射剤の場合、本発明の組成物の分散液または溶媒を除去または凍結乾燥した組成物に、例えば水、酸、アルカリ、種々の緩衝液、生理食塩水またはアミノ酸輸液等を混合して注射剤を調製することが好ましい。例えばクエン酸、アスコルビン酸、システインおよびEDTA等の抗酸化剤またはグリセリン、ブドウ糖および塩化ナトリウム等の等張化剤等を添加して注射剤を調製することも可能である。例えばグリセリン等の凍結保存剤を加えて凍結保存してもよい。

【0210】

次に、実施例、参考例および試験例により、本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例、参考例および試験例に限定されるものではない。

なお、実施例および参考例に示されたプロトン核磁気共鳴スペクトル(^1H NMR)は、400 MHzで測定されたものであり、化合物および測定条件によっては交換性プロトンが明瞭には観測されないことがある。なお、シグナルの多重度の表記としては通常用いられるものを用いている。

【0211】

参考例1

ジノニル11,11-ビス(ヒドロキシメチル)ヘニコサンジオアート(化合物II f-1)

工程1

ノナン-1-オール(東京化成工業社製, 6.03 g, 41.8 mmol)をジクロロメタン(30 mL)に溶解させ、10-プロモデカン酸(東京化成工業社製, 7.00 g, 27.9 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(東京化成工業社製, 8.01 g, 41.8 mmol)およびジメチルアミノピリジン(3.40 g, 27.9 mmol)を順次加えて、室温で終夜反応させた。反応混合物を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=98/2)で精製することにより、ノニル 10-プロモデカノアート(5.75 g, 収率55%)を得た。

^1H -NMR (CDCl_3) δ : 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H), 1.23-1.37 (m, 20H), 1.37-1.45 (m, 2H), 1.57-1.66 (m, 4H), 1.80-1.89 (m, 2H), 2.29 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.40 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 4.06 (t, J = 6.8 Hz, 2H)。

工程2

マロン酸ジtert-ブチル(東京化成工業社製, 1.03 mL, 4.62 mmol)をテトラヒドロフラン(15 mL)に溶解させ、0 にて水素化ナトリウム(ナカライテスク社製, 油性60%, 0.55 g, 11.4 mmol)を加えて、発泡が収まるまでしばらく攪拌した。工程1にて得られたノニル 10-プロモデカノアート(5.24 g, 13.9 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(5 mL)を0 にて加えた後、70 にて2時間攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過し、減圧濃縮することで、10,10-ジ-tert-ブチル1,19-ジノニル ノナデカン-1,10,10,19-テトラカルボキシラートの粗生成物を得た。

得られた粗生成物をジクロロメタン(20 mL)に溶解させ、0 にてトリフルオロ酢酸(10 mL, 130 mmol)を加えて、室温にて2時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール=99/1 ~ 90/10)で精製することにより、2,2-ビス(10-(ノニロキシ)-10-オキソデシル)マロン酸(1.89 g, 収

10

20

30

40

50

率37%)を得た。

ESI-MS m/z : 695 ($M - H$)⁻

工程3

工程2で得られた2,2-ビス(10-(ノニロキシ)-10-オキソデシル)マロン酸(1.84 g, 2.64 mmol)をテトラヒドロフラン (10 mL)に溶解させ、0 にてボラン・テトラヒドロフラン錯体 (シグマアルドリッチ(Sigma-Aldrich)社製, 1 mol/L, 7.92 mL, 7.92 mmol)を加え、室温で終夜撹拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=90/10~40/60)で精製することで化合物II f-1 (0.400g, 収率23%)を得た。

10

ESI-MS m/z : 670 ($M + H$)⁺

【実施例1】

【0212】

ジノニル 10,10'-(1-メチルアゼチジン-3,3-ジイル)ビス(デカノアート)(化合物1)

工程1

参考例1で得られた化合物II f-1 (0.400 g, 0.598 mmol)をジクロロメタン(4 mL)に溶解させ、ピリジン (0.484 mL, 5.98 mmol)を加えた。0 にて、無水トリフルオロメタンスルホン酸 (ナカライテスク社製, 0.303 mL, 1.79 mmol)を加え、30分撹拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮することで、ジノニル11,11-ビス(((トリフルオロメチル)スルフォニル)オキシ)メチル)ヘニコサンジオアートの粗生成物 (0.558g)を得た。

20

得られた粗生成物 (0.558 g)をN,N-ジメチルアセトアミド (4 mL)に溶解させ、メチルアミン (東京化成工業社製, 約9.8 mol/Lメタノール溶液, 0.35 mL, 2.99 mmol)を加え、60 で1時間撹拌した。室温まで冷却後、反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(NHシリカゲル、ヘキサン/酢酸エチル=99/1~70/30)で精製することで、化合物1 (0.220 g, 収率55%)を得た。

ESI-MS m/z : 664($M + H$)⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 6H), 1.09-1.20 (m, 4H), 1.20-1.38 (m, 44H), 1.46-1.54 (m, 4H), 1.56-1.72 (m, 8H), 2.29 (t, J = 7.7 Hz, 4H), 2.31 (s, 3H), 2.93 (s, 4H), 4.06 (t, J = 6.7 Hz, 4H).

30

【実施例2】

【0213】

ジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル) 10,10'-(1-メチルアゼチジン-3,3-ジイル)ビス(デカノアート)(化合物2)

工程1

実施例1で得られた化合物1 (0.170 g, 0.205 mmol)をテトラヒドロフラン (1.5 mL)に溶解させ、水酸化リチウム1水和物 (Sigma-Aldrich社製, 0.086 g, 2.05 mmol)の水(0.5 mL)溶液を加え、1時間撹拌した。反応の進行が確認できなかったので、エタノール(1 mL)を加え、60 で2時間撹拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルにて水層を2回洗浄した。水層を1 mol/Lの塩酸にてpH4程度にした後、酢酸エチルで2回、クロロホルム/メタノール=9/1の混合溶媒で1回抽出した。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮することで、10,10'-(1-メチルアゼチジン-3,3-ジイル)ビス(デカン酸)の粗生成物を得た。

40

ESI-MS m/z : 410($M - H$)⁻

工程2

工程1で得られた10,10'-(1-メチルアゼチジン-3,3-ジイル)ビス(デカン酸)をジクロロメタン(1.5 mL)に溶解させ、(Z)-ノナ-2-エン-1-オール (東京化成工業社製, 0.138 g, 0.972 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(0.140 g, 0.729 mmol)、ジメチルアミノピリジン (0.0590 g, 0.486 mmol)を順次加えて、室温で終

50

夜反応させた。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(NHシリカゲル、ヘキサン/酢酸エチル=99/2~80/20)で精製することにより、化合物2 (0.0640 g, 収率47%)を得た。

ESI-MS m/z : 660($M + H$)⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H), 1.12-1.20 (m, 4H), 1.22-1.41 (m, 32H), 1.50-1.56 (m, 4H), 1.56-1.71 (m, 8H), 2.10 (dd, $J = 14.4, 7.2$ Hz, 4H), 2.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 2.36 (s, 3H), 3.01 (s, 4H), 4.62 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 5.49-5.55 (m, 2H), 5.61-5.67 (m, 2H).

【0214】

参考例2 ジノニル 13,13-ビス(ヒドロキシメチル)ペンタコサンジオエート(化合物II f-2) 10

参考例1と同様の方法で、10-プロモデカン酸の代わりに12-プロモデカン酸(Sigma-Aldrich社製, 5.00 g, 17.9 mmol)を用い、化合物II f-2 (0.180 g, 収率7%)を得た。

ESI-MS m/z : 726($M + H$)⁺;

【実施例3】

【0215】

ジノニル 12,12'-(1-メチルアゼチジン-3,3-ジイル)ジドデカノアート(化合物3)

実施例1と同様の方法で、参考例1で得られた化合物II f-1の代わりに参考例2で得られた化合物II f-2 (0.180 g, 0.248 mmol)を用い、化合物3 (0.120 g, 収率67%)を得た。

ESI-MS m/z : 720($M + H$)⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H), 1.11-1.20 (m, 4H), 1.23-1.35 (m, 52H), 1.49-1.55 (m, 4H), 1.57-1.66 (m, 8H), 2.29 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 2.31 (s, 3H), 2.94 (s, 4H), 4.06 (t, $J = 6.7$ Hz, 4H). 20

【実施例4】

【0216】

ジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル) 12,12'-(1-メチルアゼチジン-3,3-ジイル)ジドデカノアート(化合物4)

実施例2と同様の方法で、実施例1で得られた化合物1の代わりに実施例3で得られた化合物3を用い、化合物4 (0.0390 g, 収率36%)を得た。

ESI-MS m/z : 716($M + H$)⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H), 1.10-1.21 (m, 4H), 1.21-1.39 (m, 44H), 1.51-1.67 (m, 8H), 2.10 (q, $J = 6.9$ Hz, 4H), 2.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 2.42 (s, 3H), 3.11 (s, 4H), 4.62 (dt, $J = 6.8, 0.6$ Hz, 4H), 5.49-5.56 (m, 2H), 5.61-5.67 (m, 2H). 30

【実施例5】

【0217】

実施例1で得られた化合物1を用いて、以下のように組成物を調製した。用いた核酸は、センス鎖[5'-rGrCrCrArGrArCrUrUrUrGrUrUrGrGrArUrUrUrGrA-3' (rが付された塩基に結合する糖はリボースである): 配列番号1]と、アンチセンス鎖[5'-rArAmArUmCrCmArAmCrAmArAmGrUmCrUmGrGmCmUmU-3' (r, mが付された塩基に結合する糖は、それぞれリボース、2'位の水酸基がメトキシ基で置換されているリボースである): 配列番号2]からなる、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシル基転移酵素(Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1、以下HPRT1と表す)遺伝子の発現を抑制する抗HPRT1 siRNAであり、ジーンデザイン社から入手した(以下HPRT1 siRNAという)。核酸は蒸留水で24 mg/mLに調製して用いた。 40

化合物1/PEG-DMPE Na(日油社製)=57.3/5.52 (すべての数値単位はmmol/Lである)となるように、各試料を秤量し、塩酸およびエタノールを含有する水溶液に懸濁させ、vortex攪拌ミキサーで攪拌および、加温を繰り返して均一な懸濁液を得た。得られた懸濁液を室温下で、0.05 μ mのポリカーボネートメンブランフィルターに通し、化合物1/PEG-DMPE Naの粒子(リボソーム)の分散液を得た。粒子径測定装置で得られたリボソームの平均粒子径を測定し、30 nmから100 nmの範囲内であることを確認した。得られたリボソームの分散液と、HPRT1 siRNA溶液を、リボソームの分散液: HPRT1 siRNA溶液=3:1の割合で混合し、 50

さらに29倍量の蒸留水を加えて混合することで化合物1/PEG-DMPE Na/ HPRT1 siRNA複合体の分散液を調製した。

化合物1/PEG-DMPE Na(日油社製)/DSPC(日油社製)/コレステロール(日油社製)= 8.947/0.147/5.981/14.355(すべての数値単位はmmol/Lである)となるように、各試料を秤量しエタノールに溶解させ、脂質膜構成成分の溶液を調製した。

得られた脂質膜構成成分の溶液に4倍量のエタノールを追加し、得られた化合物1/PEG-DMPE Na/ HPRT1 siRNA複合体の分散液と、2:3の割合で混合し、さらに数倍量の蒸留水と混合し、粗製剤を得た。

得られた粗製剤はアミコンウルトラ(Millipore社製)を用いて濃縮後、生理食塩水で希釈し、0.2 μ mのフィルター(東洋濾紙社製)を用いてクリーンベンチ内でろ過した。得られた製剤のsiRNA濃度を測定し、投与濃度にあわせて生理食塩水を用いて希釈することで、製剤1(化合物1およびHPRT1 siRNAを含有する組成物)を得た。

【実施例 6】

【0218】

実施例2、3で得られた化合物2、3をそれぞれ用いて、実施例5と同様にして製剤2および3(化合物2、3のそれぞれ、およびHPRT1 siRNAを含有する組成物)を得た。

実施例5および6で得られた製剤1~3(組成物)の平均粒子径を粒子径測定装置で測定し、その結果を表4に示した。

【0219】

【表 4】

表4

化合物番号	1	2	3
製剤番号	1	2	3
得られた製剤の粒子径(nm)	101	109	114

【実施例 7】

【0220】

実施例5と同様にして、化合物1/PEG-DMPE Na/ HPRT1 siRNA複合体の分散液を調製した。

化合物1/PEG-DMPE Na(日油社製)/コレステロール(日油社製)= 8.947/0.147/20.336(すべての数値単位はmmol/Lである)となるように、各試料を秤量しエタノールに溶解させ、脂質膜構成成分の溶液を調製した。

得られた脂質膜構成成分の溶液に4倍量のエタノールを追加し、得られた化合物1/PEG-DMPE Na/ HPRT1 siRNA複合体の分散液と、2:3の割合で混合し、さらに数倍量の蒸留水と混合し、粗製剤を得た。

得られた粗製剤はアミコンウルトラ(Millipore社製)を用いて濃縮後、生理食塩水で希釈し、0.2 μ mのフィルター(東洋濾紙社製)を用いてクリーンベンチ内でろ過した。得られた組成物のsiRNA濃度を測定し、投与濃度にあわせて生理食塩水を用いて希釈することで、製剤4(化合物1およびHPRT1 siRNAを含有する組成物)を得た。

【実施例 8】

【0221】

実施例2~4で得られた化合物2~4をそれぞれ用いて、実施例7と同様にして製剤5~8(化合物2~4のそれぞれ、およびHPRT1 siRNAを含有する組成物)を得た。

実施例7および8で得られた製剤(組成物)の平均粒子径を粒子径測定装置で測定し、その結果を表5に示した。

【0222】

【表 5】

表5

化合物番号	1	2	3	4
製剤番号	4	5	6	7
得られた製剤 の粒子径(nm)	115	118	118	100

【 0 2 2 3 】

試験例1

実施例5および6で得られた製剤1～3(化合物1～3のそれぞれと、HPRT1 siRNAを含有する組成物)の活性を調べるため、以下に記載の方法で評価した。

ヒト膵臓癌細胞株MIA-PaCa2を、10%ウシ胎仔血清(FBS)を含むDMEM培地(ナカライテスク、08458-45)中、またヒト肺癌細胞株NCI-H358を、10%ウシ胎仔血清(FBS)を含むRPMI1640培地(ナカライテスク、30264-85)中、7500細胞数/80uL/ウェルで播種し、37℃、5%CO₂条件下で24時間培養した。その後、実施例5および6で調製した各種製剤をsiRNA濃度として終濃度0.3～100nMとなるようOpti-MEM培地(サーモフィッシャー(Thermo Fisher)、11058021)で希釈し、20uLを細胞に添加した。また陰性対照として、Opti-MEM培地20uLを細胞に添加した。

各種製剤を処理した細胞を37℃の5%CO₂インキュベーター内で24時間培養し、氷冷したリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline, PBS)で洗浄し、Thermo Fisher社 Cells-to-Ct Kit(Thermo Fisher、AM1729)を用い、添付の使用説明書に従いtotal RNAを回収、cDNAを作成した。

得られたcDNAをPCR反応の鋳型に用い、アプライド バイオシステムズ クwantスタジオ 12K フレックス(Applied Biosystems QuantStudio 12K Flex)(ABI社)を用いたTaqMan PCR(TaqMan Gene Expression、4331182)によりHPRT1遺伝子および構成的発現遺伝子であるGAPDH(D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)遺伝子に特異的なPCR増幅をそれぞれ行い、mRNA量の定量を行った。PCR反応の条件はTaqMan Gene Expression添付の使用説明書に従った。検体のmRNA量は、GAPDHのmRNA量に対するHPRT1のmRNA量を算出し、陰性対照処理群における当該値を1としたときの相対的な割合として算出した。HPRT1のmRNA量についての結果を図1および図2に示す。

【 0 2 2 4 】

試験例2

実施例7および8で得られた製剤4～8(化合物1～4のそれぞれと、HPRT1 siRNAを含有する組成物)の活性を調べるため、試験例1と同様の方法で評価した。HPRT1のmRNA量についての結果を図3および図4に示す。

【 0 2 2 5 】

図1、図2、図3および図4から明らかなように、実施例5～8で得られた製剤1～7を投与することによって、HPRT1 mRNA量が低下した。

よって、本発明の組成物は、核酸を細胞内等に導入することができ、本発明のカチオン性脂質は、インピボで細胞内に核酸を送達することを容易にすることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【 0 2 2 6 】

本発明のカチオン性脂質および核酸を含有する組成物を、哺乳動物等に投与することにより、該核酸を、例えば細胞内等に容易に導入することができる。

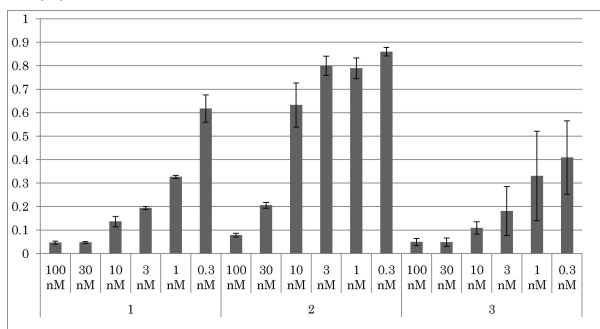
【配列表フリーテキスト】

【 0 2 2 7 】

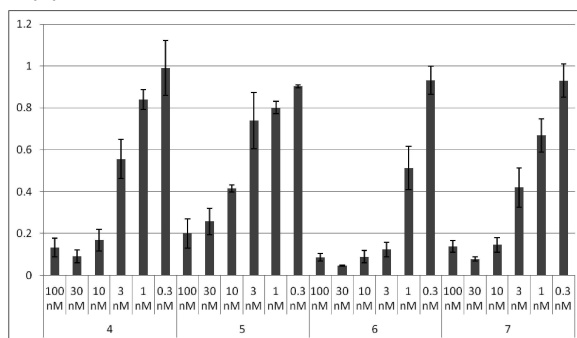
配列番号1：ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシル基転移酵素siRNA センス鎖

配列番号2：ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシル基転移酵素siRNA アンチセンス鎖

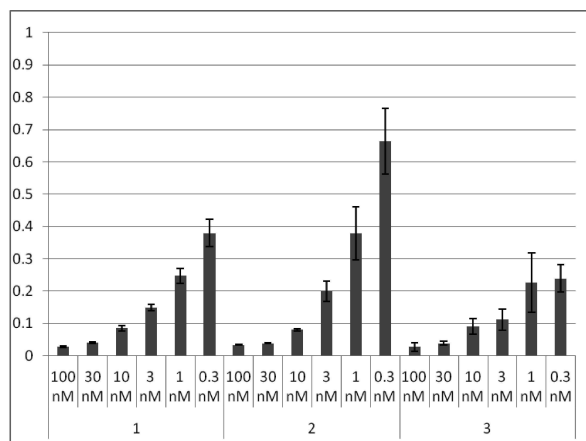
【図 1】



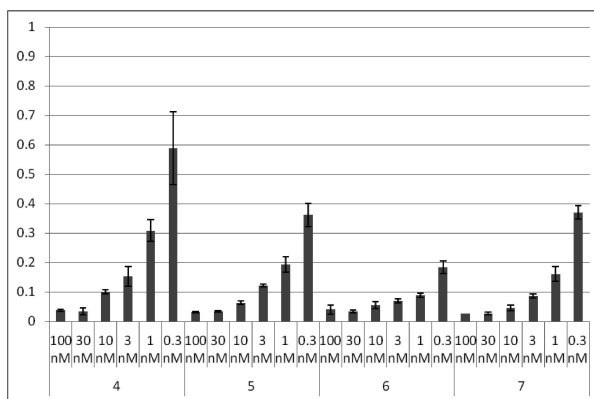
【図 3】



【図 2】



【図 4】



【配列表】

0006774965000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 0 5

(72)発明者 細江 慎太郎
東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社 本社内

(72)発明者 直井 智幸
東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社 本社内

審査官 神谷 昌克

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 1 1 6 1 2 6 (WO , A 1)
国際公開第 2 0 1 3 / 1 4 8 5 4 1 (WO , A 1)
国際公開第 2 0 1 5 / 0 7 4 0 8 5 (WO , A 1)
国際公開第 2 0 1 3 / 0 8 6 3 7 3 (WO , A 1)
国際公開第 2 0 1 2 / 1 0 8 3 9 7 (WO , A 1)
国際公開第 2 0 1 6 / 0 0 2 7 5 3 (WO , A 1)
Molecular Therapy , 2 0 1 3 年 , Vol.21, No.8 , pp.1570-1578

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C 0 7 D
A 6 1 K
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)