

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-509273

(P2012-509273A)

(43) 公表日 平成24年4月19日(2012.4.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 C 251/24 (2006.01)	C 0 7 C 251/24 C S P	4 C 0 6 9
C 0 7 D 207/09 (2006.01)	C 0 7 D 207/09 Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	4 H 0 0 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-536585 (P2011-536585)	(71) 出願人	596124151
(86) (22) 出願日	平成21年11月17日 (2009.11.17)		エンゾン ファーマシューティカルズ、イ
(85) 翻訳文提出日	平成23年7月12日 (2011.7.12)		ンコーポレーテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/064730		アメリカ合衆国 08807 ニュージャ
(87) 国際公開番号	W02010/057160		ージー州、ブリッジウォーター、ルート
(87) 国際公開日	平成22年5月20日 (2010.5.20)		202/206 685
(31) 優先権主張番号	61/115,378	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成20年11月17日 (2008.11.17)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100122389
			弁理士 新井 栄一
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 核酸送達系のための放出可能融合性脂質

(57) 【要約】

本発明は、オリゴヌクレオチドの送達のための放出可能融合性脂質、及び前記を含有するナノ粒子組成物、並びに前記を用いて遺伝子発現を調節する方法に関する。特に、本発明は、イミンリンカー及び両性イオン部分を含有する放出可能融合性脂質に関する。

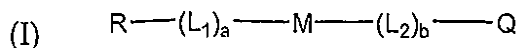
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) の化合物：

【化 1】



[式中、

R は水溶性の中性電荷部分又は両性イオン含有部分であり、

$L_1 \sim 2$ は独立に選択される二官能性リンカーであり、

M はイミン含有部分であり、

10

Q は置換また非置換、飽和又は不飽和の $C_4 \sim 30$ 含有部分であり、

(a) は 0 又は正の整数であり、

(b) は 0 又は正の整数である]。

【請求項 2】

M が、 $-N=CR_1-$ 又は $-CR_1=N-$ (式中、 R_1 は水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_3 \sim 8$ 分岐アルキル、 $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、 $C_1 \sim 6$ 置換アルキル、 $C_3 \sim 8$ 置換シクロアルキル、アリール及び置換アリールである) である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

両性イオン含有部分が、アミン及び酸を含み、酸性プロトンがアミンから 3 ～ 8 原子に位置する、請求項 1 に記載の化合物。

20

【請求項 4】

酸が、カルボン酸、硫酸又はリン酸である、請求項 3 に記載の化合物。

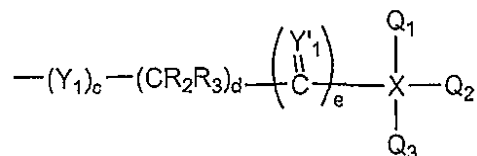
【請求項 5】

両性イオン含有部分が、アミノ酸の両性イオン形態である、請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 6】

Q が、次式 (I a)：

【化 2】



30

[式中、

Y_1 及び Y'_1 は独立に O、S 又は NR_4 であり、

(c) は 0 又は 1 であり、

(d) は 0 又は正の整数であり、

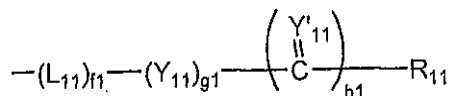
(e) は 0 又は 1 であり、

X は C、N 又は P であり、

Q_1 は H、 $C_1 \sim 3$ アルキル、 NR_5 、OH 又は

【化 3】

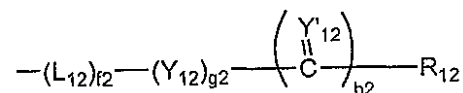
40



であり、

Q_2 は H、 $C_1 \sim 3$ アルキル、 NR_6 、OH 又は

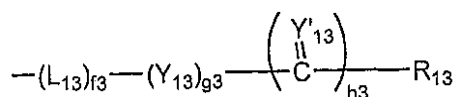
【化 4】



であり、

50

Q₃ は孤立電子対、(= O)、H、C₁ ~ C₃ アルキル、NR₇、OH 又は
【化 5】



であるが、

ただし、

(i) X が C であるとき、Q₃ は孤立電子対又は (= O) ではなく、

(i i) X が N であるとき、Q₃ は孤立電子対であり、

(i i i) X が P であるとき、Q₃ は (= O) であり、(e) は 0 であり、

10

L₁₁、L₁₂ 及び L₁₃ は独立に選択される二官能性スパーサーであり、

Y₁₁、Y'₁₁、Y₁₂、Y'₁₂、Y₁₃ 及び Y'₁₃ は独立に O、S 又は NR₈ であり、

R₁₁、R₁₂ 及び R₁₃ は独立に置換又は非置換、飽和又は不飽和の C₄ ~ C₃₀ であり、

(f 1)、(f 2) 及び (f 3) は独立に 0 又は 1 であり、

(g 1)、(g 2) 及び (g 3) は独立に 0 又は 1 であり、

(h 1)、(h 2) 及び (h 3) は独立に 0 又は 1 であり、

R₂ ~ R₃ は水素、ヒドロキシル、アミン、置換アミン、C₁ ~ C₆ アルキル、C₂ ~ C₆ アルケニル、C₂ ~ C₆ アルキニル、C₃ ~ C₁₉ 分岐アルキル、C₃ ~ C₈ シクロアルキル、C₁ ~ C₆ 置換アルキル、C₂ ~ C₆ 置換アルケニル、C₂ ~ C₆ 置換アルキニル、C₃ ~ C₈ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、C₁ ~ C₆ ヘテロアルキル及び置換 C₁ ~ C₆ ヘテロアルキルからなる群から独立に選択され、

20

R₄ ~ R₈ は水素、C₁ ~ C₆ アルキル、C₂ ~ C₆ アルケニル、C₂ ~ C₆ アルキニル、C₃ ~ C₁₉ 分岐アルキル、C₃ ~ C₈ シクロアルキル、C₁ ~ C₆ 置換アルキル、C₂ ~ C₆ 置換アルケニル、C₂ ~ C₆ 置換アルキニル、C₃ ~ C₈ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、C₁ ~ C₆ ヘテロアルキル及び置換 C₁ ~ C₆ ヘテロアルキルからなる群から独立に選択されるが、

ただし、Q は R₁₁、R₁₂ 及び R₁₃ の少なくとも一つ又は二つを含む]

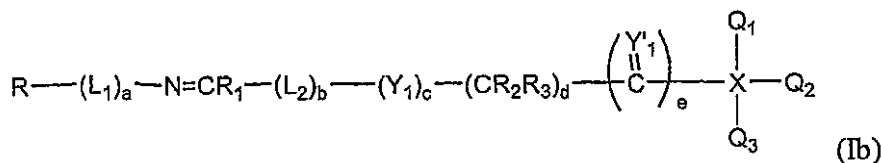
を有する、請求項 1 に記載の化合物。

30

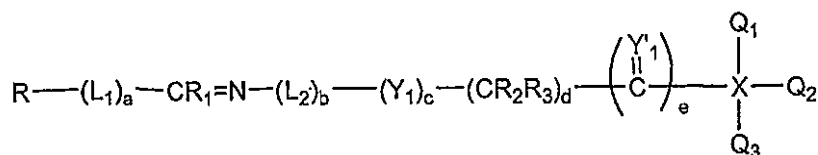
【請求項 7】

式 (I b) 又は (I ' b) :

【化 6】



又は



40

を有する、請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 8】

Q₁ ~ Q₃ が、独立に C₁₂ ~ C₂₂ アルキル、C₁₂ ~ C₂₂ アルケニル、C₁₂ ~ C₂₂ アルキルオキシ、ラウロイル (C 1 2)、ミリストイル (C 1 4)、パルミトイル (C 1 6)、ステアロイル (C 1 8)、オレオイル (C 1 8) 及びエルコイル (C 2 2)、飽和又は不飽和の C 1 2 アルキルオキシ、C 1 4 アルキルオキシ、C 1 6 アルキルオキシ、C 1

50

8 アルキルオキシ、C₂₀ アルキルオキシ及びC₂₂ アルキルオキシ、並びに飽和又は不飽和のC₁₂ アルキル、C₁₄ アルキル、C₁₆ アルキル、C₁₈ アルキル、C₂₀ アルキル及びC₂₂ アルキルから選択される基を含む、請求項6に記載の化合物。

【請求項9】

L₁₁、L₁₂ 及び L₁₃ が、
 - (C R₃₁ R₃₂) q₁ - 及び
 - Y₂₆ (C R₃₁ R₃₂) q₁ -
 [式中、
 Y₂₆ はO、N R₃₃ 又はSであり、
 R₃₁ ~ R₃₂ は水素、ヒドロキシル、C₁ ~ C₆ アルキル、C₃ ~ C₁₂ 分岐アルキル、C₃ ~ C₈ シクロアルキル、C₁ ~ C₆ 置換アルキル、C₃ ~ C₈ 置換シクロアルキル、C₁ ~ C₆ ヘテロアルキル、置換C₁ ~ C₆ ヘテロアルキル、C₁ ~ C₆ アルコキシ、フェノキシ及びC₁ ~ C₆ ヘテロアルコキシからなる群から独立に選択され、
 R₃₃ は水素、C₁ ~ C₆ アルキル、C₃ ~ C₁₂ 分岐アルキル、C₃ ~ C₈ シクロアルキル、C₁ ~ C₆ 置換アルキル、C₃ ~ C₈ 置換シクロアルキル、C₁ ~ C₆ ヘテロアルキル、置換C₁ ~ C₆ ヘテロアルキル、C₁ ~ C₆ アルコキシ、フェノキシ及びC₁ ~ C₆ ヘテロアルコキシからなる群から選択され、
 (q₁) は0又は正の整数である]
 からなる群から独立に選択される、請求項6に記載の化合物。

10

20

【請求項10】

L₁₁、L₁₂ 及び L₁₃ が、-CH₂-、-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₄-、-(CH₂)₅-、-(CH₂)₆-、-O(CH₂)₂-、-O(CH₂)₃-、-O(CH₂)₄-、-O(CH₂)₅-、-O(CH₂)₆- 及びCH(OH)- からなる群から独立に選択される、請求項8に記載の化合物。

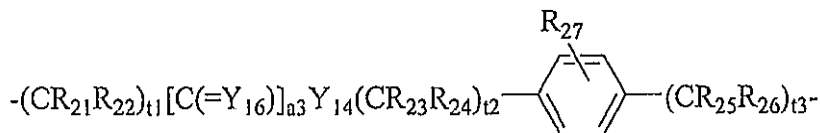
30

40

【請求項11】

L₁ が、
 - (C R₂₁ R₂₂) t₁ - [C(=Y₁₆)] a₃ -、
 - (C R₂₁ R₂₂) t₁ Y₁₇ - (C R₂₃ R₂₄) t₂ - (Y₁₈) a₂ - [C(=Y₁₆)] a₃ -、
 - (C R₂₁ R₂₂ C R₂₃ R₂₄ Y₁₇) t₁ - [C(=Y₁₆)] a₃ -、
 - (C R₂₁ R₂₂ C R₂₃ R₂₄ Y₁₇) t₁ (C R₂₅ R₂₆) t₄ - (Y₁₈) a₂ - [C(=Y₁₆)] a₃ -、
 - [(C R₂₁ R₂₂ C R₂₃ R₂₄) t₂ Y₁₇] t₃ (C R₂₅ R₂₆) t₄ - (Y₁₈) a₂ - [C(=Y₁₆)] a₃ -、
 - (C R₂₁ R₂₂) t₁ - [(C R₂₃ R₂₄) t₂ Y₁₇] t₃ (C R₂₅ R₂₆) t₄ - (Y₁₈) a₂ - [C(=Y₁₆)] a₃ -、
 - (C R₂₁ R₂₂) t₁ (Y₁₇) a₂ [C(=Y₁₆)] a₃ (C R₂₃ R₂₄) t₂ -、
 - (C R₂₁ R₂₂) t₁ (Y₁₇) a₂ [C(=Y₁₆)] a₃ Y₁₄ (C R₂₃ R₂₄) t₂ - Y₁₅ - (C R₂₃ R₂₄) t₃ -、
 - (C R₂₁ R₂₂) t₁ (Y₁₇) a₂ [C(=Y₁₆)] a₃ Y₁₄ (C R₂₃ R₂₄) t₂ - Y₁₅ - (C R₂₃ R₂₄) t₃ -、
 - (C R₂₁ R₂₂) t₁ (Y₁₇) a₂ [C(=Y₁₆)] a₃ (C R₂₃ R₂₄ C R₂₅ R₂₆ Y₁₉) t₂ (C R₂₇ C R₂₈) t₃ -、
 - (C R₂₁ R₂₂) t₁ (Y₁₇) a₂ [C(=Y₁₆)] a₃ Y₁₄ (C R₂₃ R₂₄ C R₂₅ R₂₆ Y₁₉) t₂ (C R₂₇ C R₂₈) t₃ -、及び

【化 7】



[式中、

Y₁₆ は O、NR₂₈ 又は S であり、Y₁₄ ~ Y₁₅ 及び Y₁₇ ~ Y₁₉ は独立に O、NR₂₉ 又は S であり、

R₂₁ ~ R₂₇ は水素、ヒドロキシル、アミン、C₁ ~ C₆ アルキル、C₃ ~ C₁₂ 分岐アルキル、C₃ ~ C₈ シクロアルキル、C₁ ~ C₆ 置換アルキル、C₃ ~ C₈ 置換シクロアルキル、アリーール、置換アリーール、アラールキル、C₁ ~ C₆ ヘテロアルキル、置換 C₁ ~ C₆ ヘテロアルキル、C₁ ~ C₆ アルコキシ、フェノキシ及び C₁ ~ C₆ ヘテロアルコキシからなる群から独立に選択され、

R₂₈ ~ R₂₉ は水素、C₁ ~ C₆ アルキル、C₃ ~ C₁₂ 分岐アルキル、C₃ ~ C₈ シクロアルキル、C₁ ~ C₆ 置換アルキル、C₃ ~ C₈ 置換シクロアルキル、アリーール、置換アリーール、アラールキル、C₁ ~ C₆ ヘテロアルキル、置換 C₁ ~ C₆ ヘテロアルキル、C₁ ~ C₆ アルコキシ、フェノキシ及び C₁ ~ C₆ ヘテロアルコキシからなる群から独立に選択され、

(t₁)、(t₂)、(t₃) 及び (t₄) は独立に 0 又は正の整数であり、(a₂) 及び (a₃) は独立に 0 又は 1 である]

からなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 12】

L₁ が、-CH₂-、-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₄-、-(CH₂)₅-、-(CH₂)₆-、-NH(CH₂)-、-CH(NH₂)CH₂-、-(CH₂)₄-C(=O)-、-(CH₂)₅-C(=O)-、-(CH₂)₆-C(=O)-、-CH₂CH₂O-CH₂O-C(=O)-、-(CH₂CH₂O)₂-CH₂O-C(=O)-、-(CH₂CH₂O)₃-CH₂O-C(=O)-、-(CH₂CH₂O)₂-C(=O)-、-CH₂CH₂O-CH₂CH₂NH-C(=O)-、-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂NH-C(=O)-、-CH₂-O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂NH-C(=O)-、-CH₂-O-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂NH-C(=O)-、-CH₂-O-CH₂CH₂O-CH₂C(=O)-、-CH₂-O-(CH₂CH₂O)₂-CH₂C(=O)-、-(CH₂)₄-C(=O)NH-、-(CH₂)₅-C(=O)NH-、-(CH₂)₆-C(=O)NH-、-CH₂CH₂O-CH₂O-C(=O)-NH-、-(CH₂CH₂O)₂-CH₂O-C(=O)-NH-、-(CH₂CH₂O)₃-CH₂O-C(=O)-NH-、-(CH₂CH₂O)₂-C(=O)-NH-、-CH₂CH₂O-CH₂CH₂NH-C(=O)-NH-、-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂NH-C(=O)-NH-、-CH₂-O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂NH-C(=O)-NH-、-CH₂-O-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂NH-C(=O)-NH-、-CH₂-O-CH₂CH₂O-CH₂C(=O)-NH-、-CH₂-O-(CH₂CH₂O)₂-CH₂C(=O)-NH-、-(CH₂CH₂O)₂-、-CH₂CH₂O-CH₂O-、

10

20

30

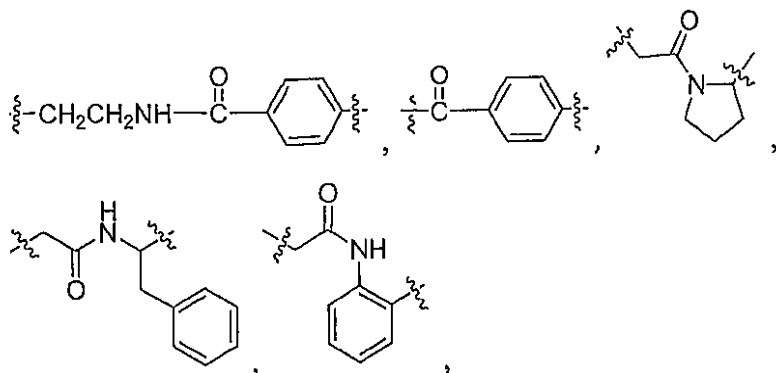
40

50

- (CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂NH-、
- (CH₂CH₂O)₃-CH₂CH₂NH-、
- CH₂CH₂O-CH₂CH₂NH-、
- (CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂NH-、
- CH₂-O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂NH-、
- CH₂-O-(CH₂CH₂O)₂-CH₂CH₂NH-、
- CH₂-O-CH₂CH₂O-、
- CH₂-O-(CH₂CH₂O)₂-、

【化 8】

10



20

- C(=O)NH(CH₂)₂-、-CH₂C(=O)NH(CH₂)₂-、
- C(=O)NH(CH₂)₃-、-CH₂C(=O)NH(CH₂)₃-、
- C(=O)NH(CH₂)₄-、-CH₂C(=O)NH(CH₂)₄-、
- C(=O)NH(CH₂)₅-、-CH₂C(=O)NH(CH₂)₅-、
- C(=O)NH(CH₂)₆-、-CH₂C(=O)NH(CH₂)₆-、
- C(=O)O(CH₂)₂-、-CH₂C(=O)O(CH₂)₂-、
- C(=O)O(CH₂)₃-、-CH₂C(=O)O(CH₂)₃-、
- C(=O)O(CH₂)₄-、-CH₂C(=O)O(CH₂)₄-、
- C(=O)O(CH₂)₅-、-CH₂C(=O)O(CH₂)₅-、
- C(=O)O(CH₂)₆-、-CH₂C(=O)O(CH₂)₆-、

30

- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)NH(CH₂)₂-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)NH(CH₂)₃-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)NH(CH₂)₄-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)NH(CH₂)₅-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)NH(CH₂)₆-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)O(CH₂)₂-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)O(CH₂)₃-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)O(CH₂)₄-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)O(CH₂)₅-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)O(CH₂)₆-、

40

- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)(CH₂)₂-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)(CH₂)₃-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)(CH₂)₄-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)(CH₂)₅-、及び
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)(CH₂)₆- からなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 13】

L₂ が、

- (CR'₂₁R'₂₂)_{t'}₁-[C(=Y'₁₆)]_{a'}₃(CR'₂₇CR'₂₈)_{t'}₂-、
- (CR'₂₁R'₂₂)_{t'}₁Y'₁₄-(CR'₂₃R'₂₄)_{t'}₂-(Y'₁₅

50

$$\begin{aligned} &)_{a'2} - [C(=Y'_{16})]_{a'3} (CR'_{27} CR'_{28})_{t'3} - \\ & - (CR'_{21} R'_{22} CR'_{23} R'_{24} Y'_{14})_{t'1} - [C(=Y'_{16})]_{a'3} (CR'_{27} CR'_{28})_{t'2} - \\ & - (CR'_{21} R'_{22} CR'_{23} R'_{24} Y'_{14})_{t'1} (CR'_{25} R'_{26})_{t'2} - (Y'_{15})_{a'2} - [C(=Y'_{16})]_{a'3} (CR'_{27} CR'_{28})_{t'3} - \\ & - [(CR'_{21} R'_{22} CR'_{23} R'_{24})_{t'2} Y'_{14}]_{t'1} (CR'_{25} R'_{26})_{t'2} - (Y'_{15})_{a'2} - [C(=Y'_{16})]_{a'3} (CR'_{27} CR'_{28})_{t'3} - \\ & - (CR'_{21} R'_{22})_{t'1} - [(CR'_{23} R'_{24})_{t'2} Y'_{14}]_{t'2} (CR'_{25} R'_{26})_{t'3} - (Y'_{15})_{a'2} - [C(=Y'_{16})]_{a'3} (CR'_{27} CR'_{28})_{t'4} - \\ & - (CR'_{21} R'_{22})_{t'1} (Y'_{14})_{a'2} [C(=Y'_{16})]_{a'3} (CR'_{23} R'_{24})_{t'2} - \\ & - (CR'_{21} R'_{22})_{t'1} (Y'_{14})_{a'2} [C(=Y'_{16})]_{a'3} Y'_{15} (CR'_{23} R'_{24})_{t'2} - \\ & - (CR'_{21} R'_{22})_{t'1} (Y'_{14})_{a'2} [C(=Y'_{16})]_{a'3} (CR'_{23} R'_{24})_{t'2} - Y'_{15} - (CR'_{23} R'_{24})_{t'3} - \\ & - (CR'_{21} R'_{22})_{t'1} (Y'_{14})_{a'2} [C(=Y'_{16})]_{a'3} Y'_{14} (CR'_{23} R'_{24})_{t'2} - Y'_{15} - (CR'_{23} R'_{24})_{t'3} - \\ & - (CR'_{21} R'_{22})_{t'1} (Y'_{14})_{a'2} [C(=Y'_{16})]_{a'3} (CR'_{23} R'_{24} CR'_{25} R'_{26} Y'_{15})_{t'2} (CR'_{27} CR'_{28})_{t'3} - \\ & - (CR'_{21} R'_{22})_{t'1} (Y'_{14})_{a'2} [C(=Y'_{16})]_{a'3} Y'_{17} (CR'_{23} R'_{24} CR'_{25} R'_{26} Y'_{15})_{t'2} (CR'_{27} CR'_{28})_{t'3} - \text{及び} \\ & \text{【化 9】} \end{aligned}$$

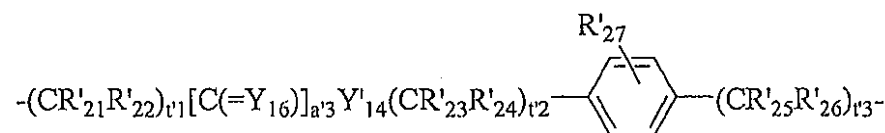
10

20

30

40

50



[式中、

Y'_{16} は O、 NR'_{28} 又は S であり、

$Y'_{14} \sim 15$ 及び Y'_{17} は独立に O、 NR'_{29} 又は S であり、

$R'_{21} \sim 27$ は水素、ヒドロキシル、アミン、 $C_{1 \sim 6}$ アルキル、 $C_{3 \sim 12}$ 分岐アルキル、 $C_{3 \sim 8}$ シクロアルキル、 $C_{1 \sim 6}$ 置換アルキル、 $C_{3 \sim 8}$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $C_{1 \sim 6}$ ヘテロアルキル、置換 $C_{1 \sim 6}$ ヘテロアルキル、 $C_{1 \sim 6}$ アルコキシ、フェノキシ及び $C_{1 \sim 6}$ ヘテロアルコキシからなる群から独立に選択され、

$R'_{28} \sim 29$ は水素、 $C_{1 \sim 6}$ アルキル、 $C_{3 \sim 12}$ 分岐アルキル、 $C_{3 \sim 8}$ シクロアルキル、 $C_{1 \sim 6}$ 置換アルキル、 $C_{3 \sim 8}$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $C_{1 \sim 6}$ ヘテロアルキル、置換 $C_{1 \sim 6}$ ヘテロアルキル、 $C_{1 \sim 6}$ アルコキシ、フェノキシ及び $C_{1 \sim 6}$ ヘテロアルコキシからなる群から独立に選択され、

($t'1$)、($t'2$)、($t'3$) 及び ($t'4$) は独立に 0 又は正の整数であり、

($a'2$) 及び ($a'3$) は独立に 0 又は 1 である]

からなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 14】

L_2 が、

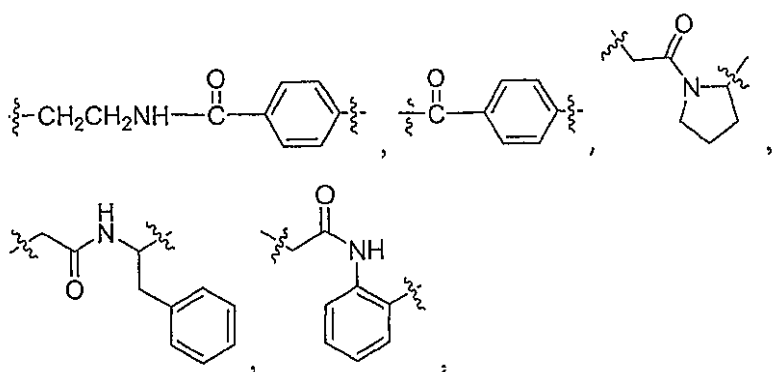
-CH₂-、-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₄-、-(CH₂)₅-、-(CH₂)₆-、-NH(CH₂)-、

$-CH(NH_2)CH_2-$ 、
 $-O(CH_2)_2-$ 、 $-C(=O)O(CH_2)_3-$ 、 $-C(=O)NH(CH_2)_3-$ 、
 $-C(=O)(CH_2)_2-$ 、 $-C(=O)(CH_2)_3-$ 、
 $-CH_2-C(=O)-O(CH_2)_3-$ 、
 $-CH_2-C(=O)-NH(CH_2)_3-$ 、
 $-CH_2-OC(=O)-O(CH_2)_3-$ 、
 $-CH_2-OC(=O)-NH(CH_2)_3-$ 、
 $-(CH_2)_2-C(=O)-O(CH_2)_3-$ 、
 $-(CH_2)_2-C(=O)-NH(CH_2)_3-$ 、
 $-CH_2C(=O)O(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ 、
 $-CH_2C(=O)NH(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ 、
 $-(CH_2)_2C(=O)O(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ 、
 $-(CH_2)_2C(=O)NH(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ 、
 $-CH_2C(=O)O(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2-$ 、
 $-(CH_2)_2C(=O)O(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2-$ 、
 $-(CH_2CH_2O)_2-$ 、 $-CH_2CH_2O-CH_2O-$ 、
 $-(CH_2CH_2O)_2-CH_2CH_2NH-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_3-CH_2CH_2NH-$ 、

10

$-CH_2CH_2O-CH_2CH_2NH-$ 、
 $-CH_2-O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2NH-$ 、
 $-CH_2-O-(CH_2CH_2O)_2-CH_2CH_2NH-$ 、
 $-CH_2-O-CH_2CH_2O-$ 、 $-CH_2-O-(CH_2CH_2O)_2-$ 、
【化10】

20



30

$-(CH_2)_2NHC(=O)-(CH_2CH_2O)_2-$ 、
 $-C(=O)NH(CH_2)_2-$ 、 $-CH_2C(=O)NH(CH_2)_2-$ 、
 $-C(=O)NH(CH_2)_3-$ 、 $-CH_2C(=O)NH(CH_2)_3-$ 、
 $-C(=O)NH(CH_2)_4-$ 、 $-CH_2C(=O)NH(CH_2)_4-$ 、
 $-C(=O)NH(CH_2)_5-$ 、 $-CH_2C(=O)NH(CH_2)_5-$ 、
 $-C(=O)NH(CH_2)_6-$ 、 $-CH_2C(=O)NH(CH_2)_6-$ 、
 $-C(=O)O(CH_2)_2-$ 、 $-CH_2C(=O)O(CH_2)_2-$ 、
 $-C(=O)O(CH_2)_3-$ 、 $-CH_2C(=O)O(CH_2)_3-$ 、
 $-C(=O)O(CH_2)_4-$ 、 $-CH_2C(=O)O(CH_2)_4-$ 、
 $-C(=O)O(CH_2)_5-$ 、 $-CH_2C(=O)O(CH_2)_5-$ 、
 $-C(=O)O(CH_2)_6-$ 、 $-CH_2C(=O)O(CH_2)_6-$ 、
 $-(CH_2CH_2)_2NHC(=O)NH(CH_2)_2-$ 、
 $-(CH_2CH_2)_2NHC(=O)NH(CH_2)_3-$ 、
 $-(CH_2CH_2)_2NHC(=O)NH(CH_2)_4-$ 、
 $-(CH_2CH_2)_2NHC(=O)NH(CH_2)_5-$ 、
 $-(CH_2CH_2)_2NHC(=O)NH(CH_2)_6-$ 、

40

50

- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)O(CH₂)₂-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)O(CH₂)₃-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)O(CH₂)₄-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)O(CH₂)₅-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)O(CH₂)₆-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)(CH₂)₂-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)(CH₂)₃-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)(CH₂)₄-、
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)(CH₂)₅-、及び
- (CH₂CH₂)₂NHC(=O)(CH₂)₆-

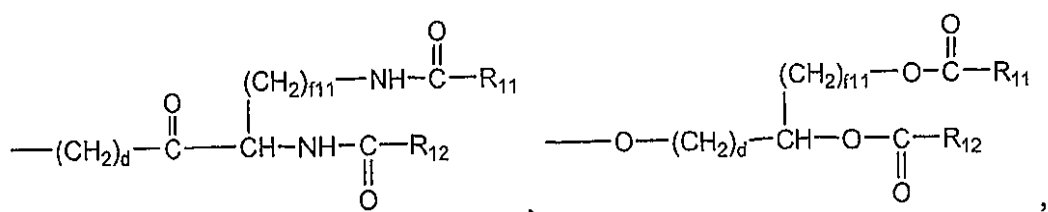
10

からなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

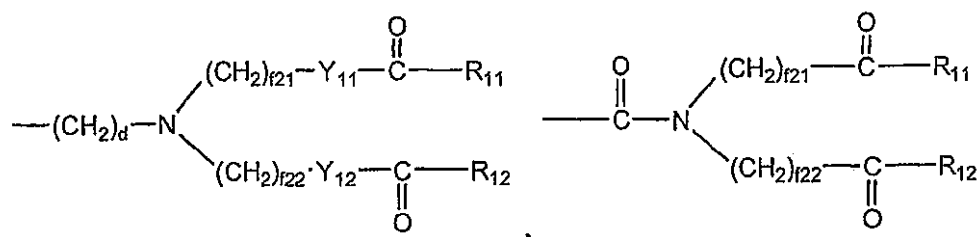
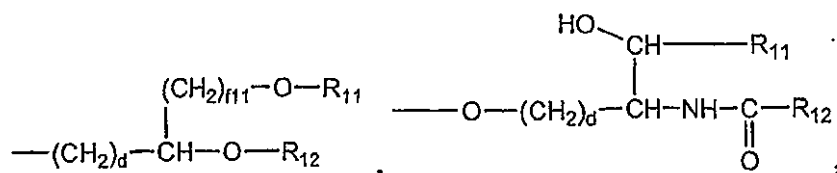
【請求項 15】

Q が、

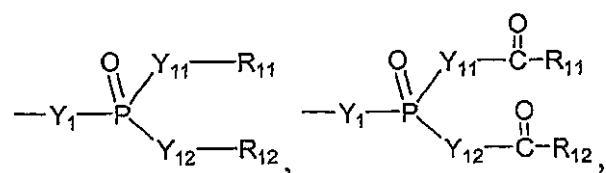
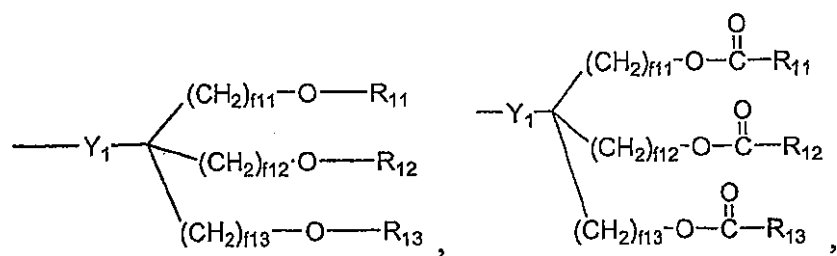
【化 11】



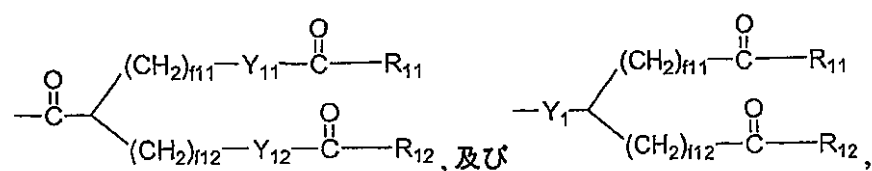
20



30



40



[式中、

Y₁ は O、S 又は N R_{3 1} であり、

50

R_{11} 、 R_{12} 及び R_{13} は独立に置換又は非置換、飽和又は不飽和の C_{4-30} であり、

R_{31} は水素、メチル又はエチルであり、

(d) は 0、又は正の整数であり、

(f_{11})、(f_{12}) 及び (f_{13}) は独立に 0、1、2、3 又は 4 であり、

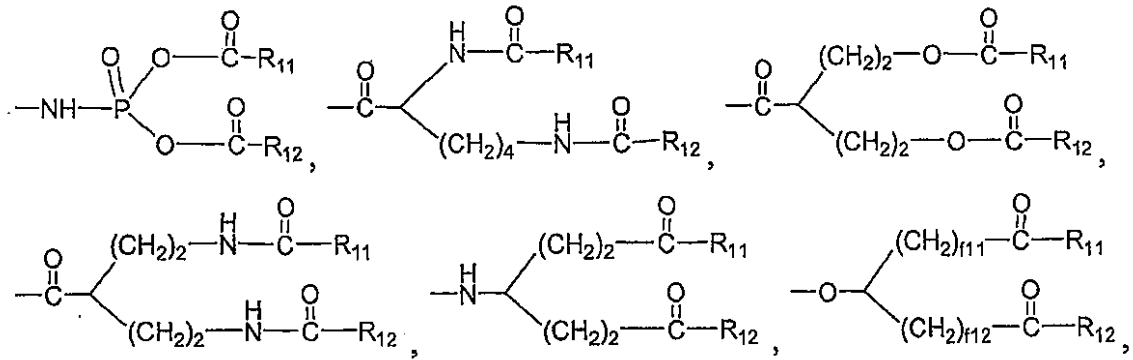
(f_{21}) 及び (f_{22}) は独立に 1、2、3 又は 4 である]

からなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 16】

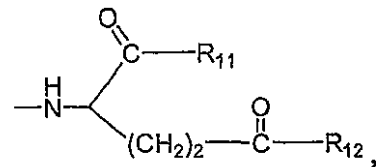
Q が、

[illegible]



10

及び



[式中、 $R_{11} \sim R_{13}$ は独立に同じ又は異なる $C_{12} \sim C_{22}$ の飽和又は不飽和の脂肪族炭化水素であり、

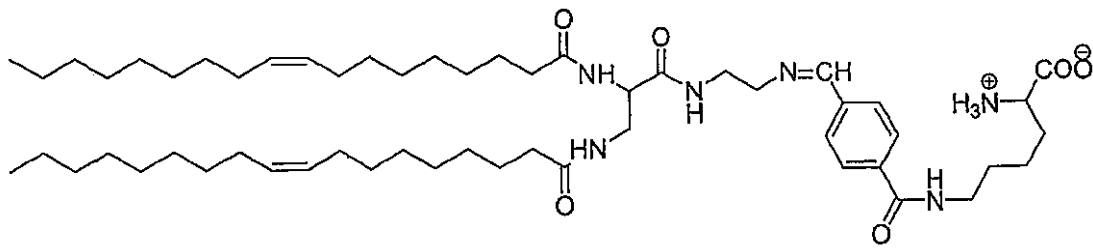
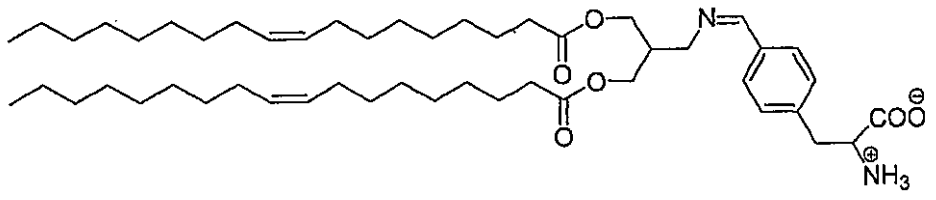
(f_{11})、(f_{12}) 及び (f_{13}) は独立に 0、1、2、3 又は 4 であり、(f_{21}) 及び (f_{22}) は独立に 1、2、3 又は 4 である]

20

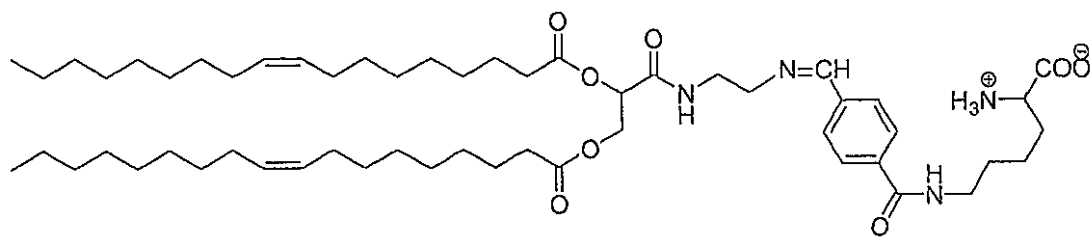
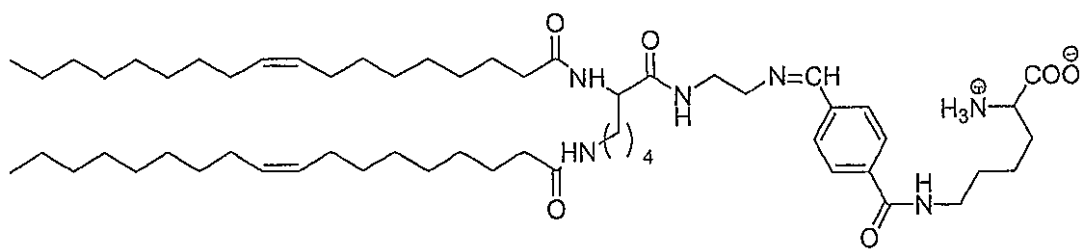
からなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 17】

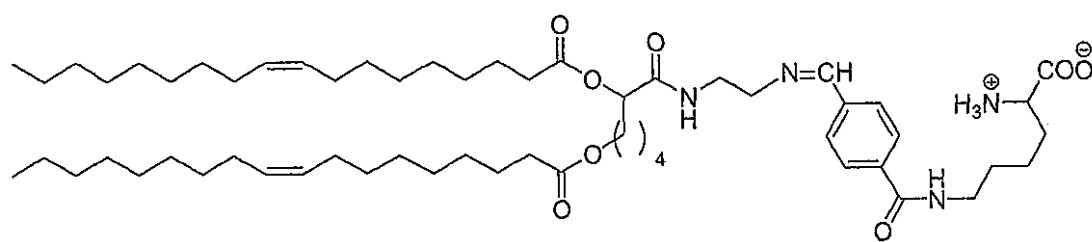
【化 13】



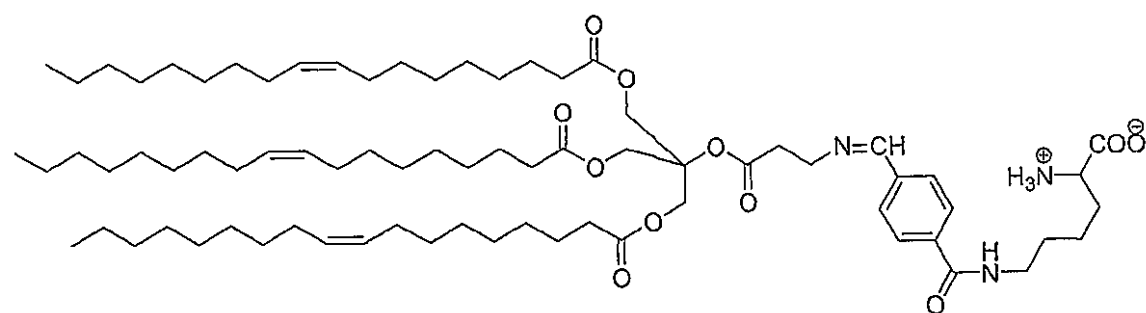
30



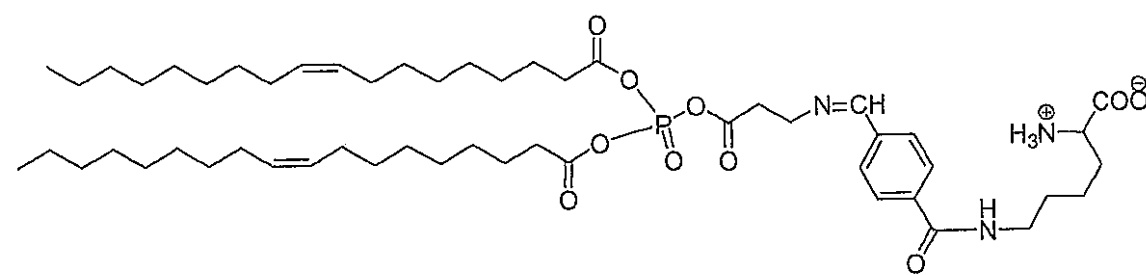
10

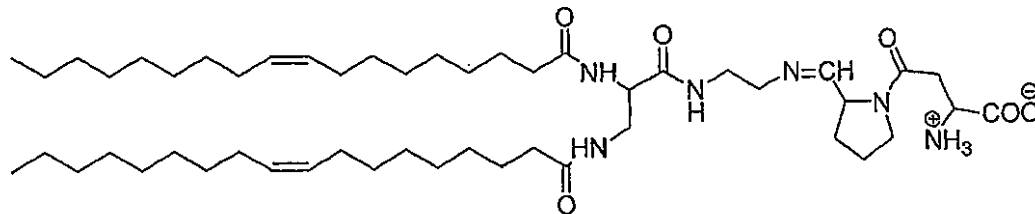
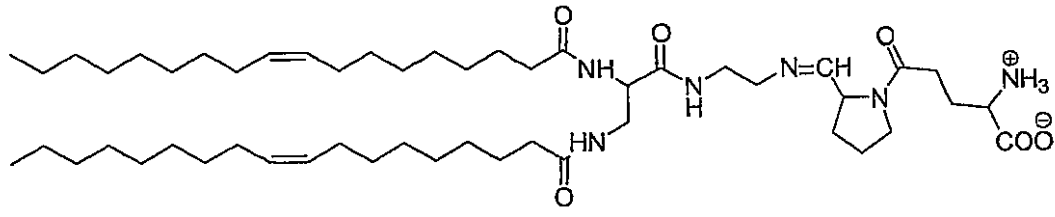
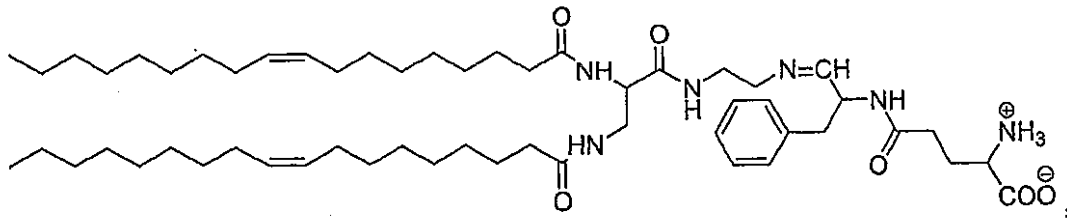
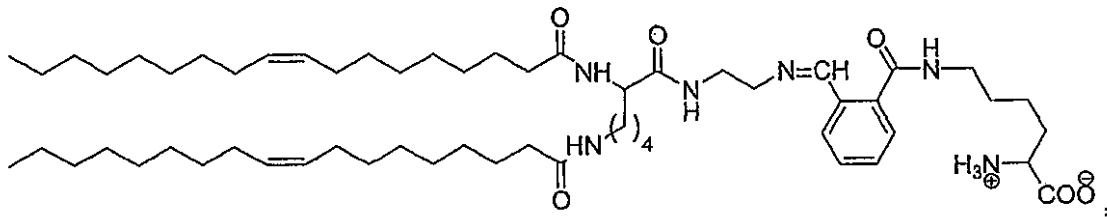
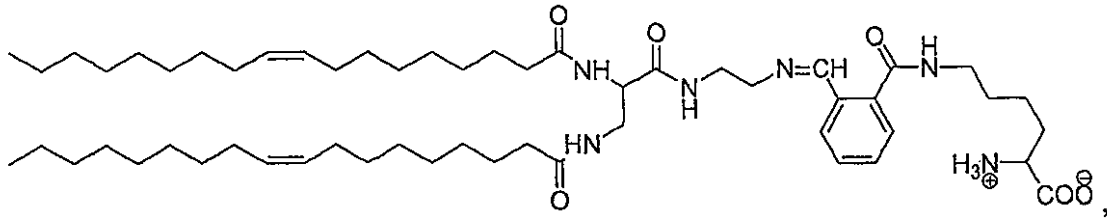
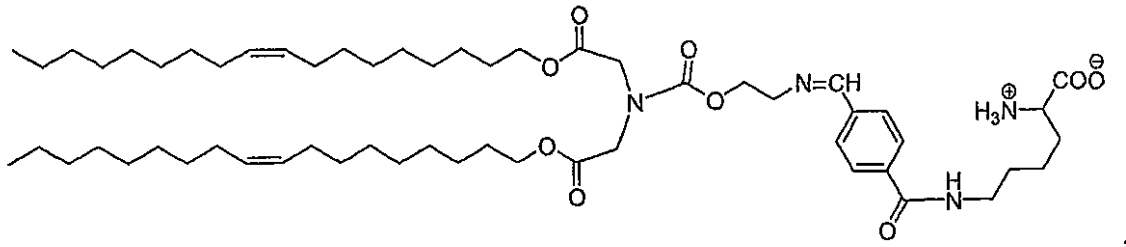


20



30





からなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

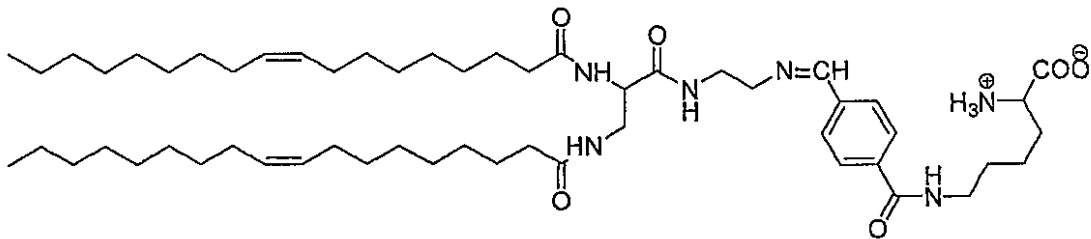
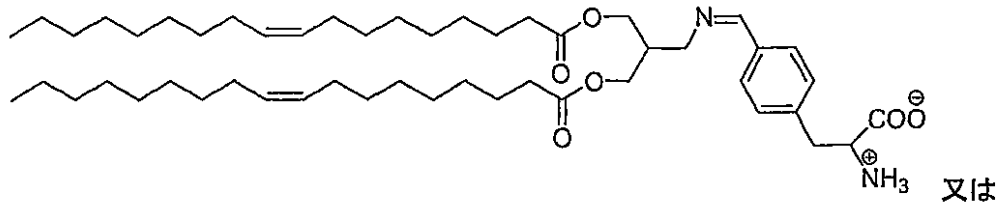
【請求項 18】

請求項 1 に記載の式 (I) の化合物を含むナノ粒子組成物。

【請求項 19】

式 (I) の化合物が、

【化 1 4】



10

である、請求項 1 8 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 2 0】

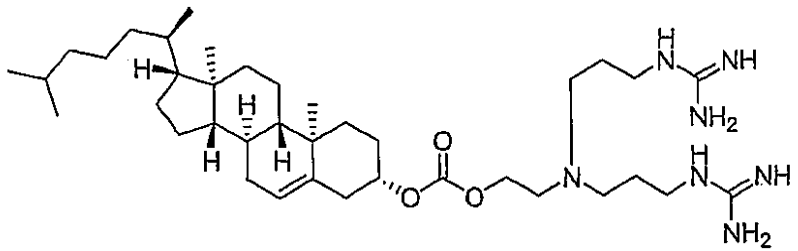
カチオン性脂質及び P E G 脂質をさらに含む、請求項 1 8 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 2 1】

カチオン性脂質が、

【化 1 5】

20



である、請求項 2 0 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 2 2】

P E G 脂質が、P E G - D S P E、P E G - ジバルミトイルグリカミド、C 1 6 m P E G - セラミド及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 2 0 に記載のナノ粒子組成物。

30

【請求項 2 3】

コレステロールをさらに含む、請求項 2 0 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 2 4】

カチオン性脂質が、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質の約 1 0 % ~ 約 9 9 . 9 % の範囲のモル比を有する、請求項 2 0 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 2 5】

カチオン性脂質が、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質の約 1 5 % ~ 約 2 5 % の範囲のモル比を有する、請求項 2 0 に記載のナノ粒子組成物。

40

【請求項 2 6】

カチオン性脂質と、式 (I) の化合物を含む融合性脂質と、P E G 脂質とコレステロールとのモル比が、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質の約 1 5 ~ 2 5 %、2 0 ~ 7 8 %、0 ~ 5 0 %、2 ~ 1 0 % である、請求項 2 4 に記載のナノ粒子組成物。

【請求項 2 7】

請求項 1 8 に記載のナノ粒子組成物とともに封入された核酸を含むナノ粒子。

【請求項 2 8】

核酸が、一本鎖又は二本鎖のオリゴヌクレオチドである、請求項 2 7 に記載のナノ粒子

。

【請求項 2 9】

50

核酸が、デオキシヌクレオチド、リボヌクレオチド、ロックド核酸 (LNA)、低分子干渉RNA (siRNA)、マイクロRNA (miRNA)、アプタマー、ペプチド核酸 (PNA)、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド (PMO)、トリシクロ-DNA、二本鎖オリゴヌクレオチド (デコイODN)、触媒RNA (RNAi)、アプタマー、シュビーゲルマー、CpGオリゴマー及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項27に記載のナノ粒子。

【請求項30】

オリゴヌクレオチドが、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項28に記載のナノ粒子。

【請求項31】

オリゴヌクレオチドが、ホスホジエステル結合又はホスホロチオエート結合、及びそれらの組合せを有する、請求項28に記載のナノ粒子。

【請求項32】

オリゴヌクレオチドが、LNAを含む、請求項28に記載のナノ粒子。

【請求項33】

オリゴヌクレオチドが、約8個～50個のヌクレオチドを有する、請求項28に記載のナノ粒子。

【請求項34】

オリゴヌクレオチドが、癌遺伝子、プロ血管新生経路遺伝子、プロ細胞増殖経路遺伝子、ウイルス感染因子遺伝子及びプロ炎症経路遺伝子の発現を抑制する、請求項28に記載のナノ粒子。

【請求項35】

オリゴヌクレオチドが、アンチセンスbc1-2オリゴヌクレオチド、アンチセンスHIF-1オリゴヌクレオチド、アンチセンススルビニンオリゴヌクレオチド、アンチセンスErbb3オリゴヌクレオチド、アンチセンスPIK3CAオリゴヌクレオチド、アンチセンスHSP27オリゴヌクレオチド、アンチセンスアンドロゲン受容体オリゴヌクレオチド、アンチセンスGli2オリゴヌクレオチド及びアンチセンスカテニンオリゴヌクレオチドからなる群から選択される、請求項28に記載のナノ粒子。

【請求項36】

オリゴヌクレオチドが、配列番号1、配列番号2及び3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15並びに配列番号16に示される8個以上の連続ヌクレオチドを含み、各核酸が、天然核酸又は修飾核酸である、請求項28に記載のナノ粒子。

【請求項37】

核酸と式(I)の化合物との電荷比が約1:20～約20:1の範囲である、請求項27に記載のナノ粒子。

【請求項38】

ナノ粒子が、約50nm～約150nmの範囲のサイズを有する、請求項27に記載のナノ粒子。

【請求項39】

請求項27に記載のナノ粒子を、それを必要とする哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における疾患を治療する方法。

【請求項40】

細胞と請求項27に記載のナノ粒子とを接触させることを含む、細胞にオリゴヌクレオチドを導入する方法。

【請求項41】

ヒト細胞又はヒト組織と請求項27に記載のナノ粒子とを接触させることを含む、ヒト細胞又はヒト組織における遺伝子発現を抑制する方法。

【請求項42】

10

20

30

40

50

細胞又は組織が、癌細胞又は癌組織である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

有効量の請求項 2 7 に記載のナノ粒子を、それを必要とする哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における遺伝子発現をダウンレギュレートする方法。

【請求項 4 4】

癌細胞と請求項 2 7 に記載のナノ粒子とを接触させることを含む、癌細胞の増殖又は成長を抑制する方法。

【請求項 4 5】

抗癌剤を投与することをさらに含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸送達系のための放出可能融合性脂質に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸を使用する療法は、過去数年にわたり様々な疾患を治療する試みとして提案されてきた。アンチセンス療法等の療法は、治療遺伝子が、疾患に関連する遺伝子発現を選択的に調節し、他の治療方式を使用する場合に起こる副作用を最小限に抑えることができるため、疾患の治療において強力な手段である。

【0003】

20

しかし、核酸を使用する療法は、遺伝子の安定性が低いことや、送達の効果がないことにより限界があった。いくつかの遺伝子送達系が、該障害を克服し、インビトロ及びインビボで癌細胞又は癌組織等の標的領域に治療遺伝子を効果的に導入するために提案された。送達を改善し、治療遺伝子の細胞取込みを増進するためのこのような試みは、リボソームの利用を対象とする。

【0004】

プラスミドの送達においてはある程度の進展があったが、現在利用できるリボソームはオリゴヌクレオチドを体内に効果的に送達するものではない。オリゴヌクレオチドの送達において、望ましい送達系は、オリゴヌクレオチドの負電荷を中和するのに十分に足りる正電荷を含んでいなければならない。最近、（非特許文献 1）及び（非特許文献 2）に各々記載されている被覆カチオン性リボソーム（CCL）及び安定核酸脂質粒子（SNALP）により、小型で、核酸封入率が高く、血清安定性が良好で、循環時間の長いナノ粒子が得られることが報告された。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】Stuart, D.D., et al Biochim. Biophys. Acta, 2000, 1463:219 ~ 229

【非特許文献 2】Semple, S.C., et al, Biochim. Biophys. Acta, 2001, 1510:152 ~ 166

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0006】

そのような試み及び前進にもかかわらず、核酸送達系を改善することが引き続き必要とされている。本発明はこの必要性に対処するものである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

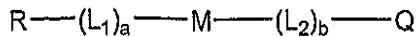
本発明は、核酸送達のためのイミンリンカー及び両性イオン部分を含有する放出可能融合性脂質、並びに前記を含有するナノ粒子組成物を提供する。オリゴヌクレオチド等のポリ核酸は、カチオン性脂質、本明細書に記載の放出可能融合性脂質及びPEG脂質の混合物を含有するナノ粒子複合体中に封入される。

【0008】

50

本発明のこの態様によれば、核酸（即ち、オリゴヌクレオチド）の送達のための放出可能融合性脂質は、式（I）：

【化1】



（式中、

Rは水溶性の中性電荷部分又は両性イオン含有部分であり、

L_1 、 L_2 は独立に選択される二官能性リンカーであり、

Mはイミン含有部分であり、

Qは置換又は非置換、飽和又は不飽和のC₄～C₃₀含有部分であり、

（a）は0又は正の整数であり、

（b）は0又は正の整数である）

を有する。

【0009】

本発明は、核酸送達のためのナノ粒子組成物も提供する。本発明によれば、核酸（即ち、オリゴヌクレオチド）送達のためのナノ粒子組成物は、

（i）カチオン性脂質、

（ii）式（I）の化合物、及び

（iii）PEG脂質

を含むことができる。

【0010】

本発明の別の態様において、インビボ及びインビトロで細胞又は組織に核酸（好ましくはオリゴヌクレオチド）を送達する方法が提供される。本明細書に記載の方法で導入されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を調節できる。

【0011】

本発明の別の態様は、標的遺伝子、即ち、癌遺伝子、及び哺乳動物、好ましくはヒトの疾患と関連する遺伝子の発現を抑制する方法を提供する。該方法は、細胞、例えば癌細胞又は癌組織を、本明細書に記載のナノ粒子組成物から調製したナノ粒子／ナノ粒子複合体と接触させることを含む。ナノ粒子中に封入されたオリゴヌクレオチドは放出され、次いで処理される細胞又は組織におけるmRNA又はタンパク質のダウンレギュレーションに介在する。ナノ粒子での治療により、癌細胞の増殖の抑制等、悪性疾患の治療における標的遺伝子発現の調節（及びそれと関連する付帯利益）が可能となる。このような療方は、単一の治療として、又は一つ又は複数の有用な及び／又は認可された治療との併用療法の一部として行われてもよい。

【0012】

さらなる態様は、式（I）の化合物並びに前記を含有するナノ粒子を製造する方法を含む。

【0013】

本明細書に記載の放出可能融合性脂質を含有するナノ粒子組成物は、核酸をインビボ並びにインビトロで投与する手段を提供する。

【0014】

本明細書に記載の放出可能融合性脂質を含有するナノ粒子は、細胞及び細胞内コンパートメントに侵入した際、ナノ粒子中に封入された核酸の放出を補助できる。任意の理論に拘束されずに、このような特徴は、酸不安定リンカーにある程度起因する。イミン系リンカーは、酸に不安定であり、癌細胞及びエンドソーム等の酸性環境で加水分解される。したがって、イミン系リンカーは、ナノ粒子の破壊を促進でき、それにより核酸の細胞内放出を可能にする。

【0015】

両性イオンに帯電した群を含有する放出可能融合性脂質は、核酸の細胞取込みを促進する。極性であるが、中性に帯電した群は、ナノ粒子の細胞膜の通過を促進する。

【0016】

本明細書に記載の放出可能融合性脂質は、体液中のナノ粒子複合体及び核酸を安定させる。ナノ粒子複合体は、ヌクレアーゼから核酸分子を保護し、それによりポリ核酸を分解から保護することができる。

【0017】

本明細書に記載のナノ粒子送達系により、十分な量の治療用オリゴヌクレオチドを、EPR (Enhanced Permeation and Retention) 効果により癌細胞等の所望の標的領域で選択的に利用することが可能となる。標的領域での治療用核酸は、特に癌細胞又は癌組織において標的遺伝子の発現を調節できる。

【0018】

本明細書に記載のナノ粒子は、生物活性分子、例えば小分子化学療法薬、並びに1種又は複数の異なる種類の治療用核酸の送達においても使用され、それにより疾患の治療において相乗効果を得ることができる。

【0019】

他の及びさらなる利点は、以下の説明から明らかとなろう。

【0020】

本発明の目的のために、「残基」という用語は、例えば、別の化合物との置換反応を経た後に残るC₆～C₃₀炭化水素等を指す、化合物の部分の意味すると理解されるものとする。

【0021】

本発明の目的のために、「アルキル」という用語は、直鎖、分岐鎖及び環状のアルキル基を含む飽和脂肪族炭化水素を指す。「アルキル」という用語は、アルキルチオアルキル基、アルコキシアルキル基、シクロアルキルアルキル基、ヘテロシクロアルキル基及びC₁～C₆アルキルカルボニルアルキル基も含む。アルキル基は、1～12個の炭素を有することが好ましい。アルキル基は、より好ましくは約1～7個の炭素、さらにより好ましくは約1～4個の炭素の低級アルキルである。アルキル基は、置換又は非置換であってよい。置換される場合、置換基(複数可)としては、好ましくはハロ基、オキシ基、アジド基、ニトロ基、シアノ基、アルキル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アルキルチオアルキル基、アルコキシアルキル基、アルキルアミノ基、トリハロメチル基、ヒドロキシ基、メルカプト基、ヒドロキシ基、シアノ基、アルキルシリル基、シクロアルキル基、シクロアルキルアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、ヘテロアリール基、アルケニル基、アルキニル基、C₁～C₆ヒドロカルボニル基、アリール基及びアミノ基が挙げられる。

【0022】

本発明の目的のために、「置換」という用語は、官能基又は化合物に含有される一つ又は複数の原子を、ハロ基、オキシ基、アジド基、ニトロ基、シアノ基、アルキル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アルキルチオアルキル基、アルコキシアルキル基、アルキルアミノ基、トリハロメチル基、ヒドロキシ基、メルカプト基、ヒドロキシ基、シアノ基、アルキルシリル基、シクロアルキル基、シクロアルキルアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、ヘテロアリール基、アルケニル基、アルキニル基、C₁～C₆アルキルカルボニルアルキル基、アリール基及びアミノ基の群に由来する部分の一つに付加するか、又はそれと置き換えることを指す。

【0023】

本発明の目的のために、「アルケニル」という用語は、直鎖、分岐鎖及び環状の基を含む、少なくとも一つの炭素-炭素二重結合を含有する基を指す。アルケニル基は、好ましくは約2～12個の炭素を有する。アルケニル基は、より好ましくは約2～7個の炭素、さらにより好ましくは約2～4個の炭素の低級アルケニルである。アルケニル基は、置換又は非置換であってよい。置換される場合、置換基(複数可)としては、好ましくはハロ基、オキシ基、アジド基、ニトロ基、シアノ基、アルキル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アルキルチオアルキル基、アルコキシアルキル基、アルキルアミノ基、トリハロメチル基、ヒドロキシ基、メルカプト基、ヒドロキシ基、シアノ基、アルキルシリル基、

10

20

30

40

50

シクロアルキル基、シクロアルキルアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、ヘテロアリー
ル基、アルケニル基、アルキニル基、 $C_1 \sim 6$ ヒドロカルボニル基、アリール基及びアミ
ノ基が挙げられる。

【0024】

本発明の目的のために、「アルキニル」という用語は、直鎖、分岐鎖及び環状の基を含
む、少なくとも一つの炭素-炭素三重結合を含有する基を指す。アルキニル基は、好まし
くは約2～12個の炭素を有する。アルキニル基は、より好ましくは約2～7個の炭素、
さらにより好ましくは約2～4個の炭素の低級アルキニルである。アルキニル基は、置換
又は非置換であってよい。置換される場合、置換基(複数可)としては、好ましくはハロ
基、オキシ基、アジド基、ニトロ基、シアノ基、アルキル基、アルコキシ基、アルキルチ
オ基、アルキルチオアルキル基、アルコキシアルキル基、アルキルアミノ基、トリハロメ
チル基、ヒドロキシル基、メルカプト基、ヒドロキシ基、シアノ基、アルキルシリル基、
シクロアルキル基、シクロアルキルアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、ヘテロアリー
ル基、アルケニル基、アルキニル基、 $C_1 \sim 6$ ヒドロカルボニル基、アリール基及びアミ
ノ基が挙げられる。「アルキニル」の例としては、プロパルギル、プロピン及び3-ヘキ
シンが挙げられる。

10

【0025】

本発明の目的のために、「アリール」という用語は、少なくとも一つの芳香族環を含有
する芳香族炭化水素環系を指す。芳香族環は、他の芳香族炭化水素環又は非芳香族炭化水
素環と場合により縮合していてもよく、又はさもなければ結合していてもよい。アリー
ル基の例としては、例えば、フェニル、ナフチル、1,2,3,4-テトラヒドロナフタレ
ン及びビフェニルが挙げられる。アリール基の好ましい例としては、フェニル及びナフチ
ルが挙げられる。

20

【0026】

本発明の目的のために、「シクロアルキル」という用語は、 $C_3 \sim 8$ 環状炭化水素を指
す。シクロアルキルの例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シ
クロヘキシル、シクロヘプチル及びシクロオクチルが挙げられる。

【0027】

本発明の目的のために、「シクロアルケニル」という用語は、少なくとも一つの炭素-
炭素二重結合を含有する $C_3 \sim 8$ 環状炭化水素を指す。シクロアルケニルの例としては、
シクロペンテニル、シクロペンタジエニル、シクロヘキセニル、1,3-シクロヘキサジ
エニル、シクロヘプテニル、シクロヘプタトリエニル及びシクロオクテニルが挙げられる
。

30

【0028】

本発明の目的のために、「シクロアルキルアルキル」という用語は、 $C_3 \sim 8$ シクロア
ルキル基で置換されたアルキル基を指す。シクロアルキルアルキルの例としては、シクロ
プロピルメチル及びシクロペンチルエチルが挙げられる。

【0029】

本発明の目的のために、「アルコキシ」という用語は、酸素橋を介して親分子部分に結
合した、示された数の炭素原子のアルキル基を指す。アルコキシ基の例としては、例えば
、メトキシ、エトキシ、プロポキシ及びイソプロポキシが挙げられる。

40

【0030】

本発明の目的のために、「アルキルアリール」基は、アルキル基で置換されたアリー
ル基を指す。

【0031】

本発明の目的のために、「アラルキル」基は、アリール基で置換されアルキル基を指す
。

【0032】

本発明の目的のために、「アルコキシアルキル」基は、アルコキシ基で置換されアルキ
ル基を指す。

50

【 0 0 3 3 】

本発明の目的のために、「アルキルチオアルキル」基という用語は、アルキル - S - アルキルチオエーテル、例えばメチルチオメチル又はメチルチオエチルを指す。

【 0 0 3 4 】

本発明の目的のために、「アミノ」という用語は、一つ又は複数の水素ラジカルを有機ラジカルで置き換えることによってアンモニアから誘導される当技術分野で公知の窒素含有基を指す。例えば、「アシルアミノ」及び「アルキルアミノ」という用語は、各々、アシル置換基及びアルキル置換基を有する特定の N - 置換有機ラジカルを指す。

【 0 0 3 5 】

本発明の目的のために、「アルキルカルボニル」という用語は、アルキル基で置換されたカルボニル基を指す。

【 0 0 3 6 】

本発明の目的のために、「ハロゲン」又は「ハロ」という用語は、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素を指す。

【 0 0 3 7 】

本発明の目的のために、「ヘテロシクロアルキル」という用語は、窒素、酸素及び硫黄から選択される少なくとも一つのヘテロ原子を含有する非芳香族環系を指す。ヘテロシクロアルキル環は、他のヘテロシクロアルキル環及び / 又は非芳香族炭化水素環と場合により縮合していてもよく、又はさもなければ結合していてもよい。好ましいヘテロシクロアルキル基は、3 ~ 7 員を有する。ヘテロシクロアルキル基の例としては、例えばピペラジン、モルホリン、ピペリジン、テトラヒドロフラン、ピロリジン及びピラゾールが挙げられる。好ましいヘテロシクロアルキル基としては、ピペリジニル、ピペラジニル、モルホリニル及びピロリジニルが挙げられる。

【 0 0 3 8 】

本発明の目的のために、「ヘテロアリール」という用語は、窒素、酸素及び硫黄から選択される少なくとも一つのヘテロ原子を含有する芳香族環系を指す。ヘテロアリール環は、一つ又は複数のヘテロアリール環、芳香族もしくは非芳香族炭化水素環、又はヘテロシクロアルキル環と縮合していてもよく、又はさもなければ結合していてもよい。ヘテロアリール環の例としては、例えばピリジン、フラン、チオフエン、5, 6, 7, 8 - テトラヒドロイソキノリン及びピリミジンが挙げられる。ヘテロアリール基の好ましい例としては、例えばチエニル、ベンゾチエニル、ピリジル、キノリル、ピラジニル、ピリミジル、イミダゾリル、ベンズイミダゾリル、フラニル、ベンゾフラニル、チアゾリル、ベンゾチアゾリル、イソキサゾリル、オキサジアゾリル、イソチアゾリル、ベンズイソチアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ピロリル、インドリル、ピラゾリル及びベンゾピラゾリルが挙げられる。

【 0 0 3 9 】

本発明の目的のために、「ヘテロ原子」という用語は、窒素、酸素及び硫黄を指す。

【 0 0 4 0 】

いくつかの実施形態において、置換アルキルとしては、カルボキシアルキル、アミノアルキル、ジアルキルアミノ、ヒドロキシアルキル及びメルカプトアルキルが挙げられ、置換アルケニルとしては、カルボキシアルケニル、アミノアルケニル、ジアルケニルアミノ、ヒドロキシアルケニル及びメルカプトアルケニルが挙げられ、置換アルキニルとしては、カルボキシアルキニル、アミノアルキニル、ジアルキニルアミノ、ヒドロキシアルキニル及びメルカプトアルキニルが挙げられ、置換シクロアルキルとしては、4 - クロロシクロヘキシル等の部分が挙げられ、アリールとしては、ナフチル等の部分が挙げられ、置換アリールとしては、3 - プロモフェニル等の部分が挙げられ、アラルキルとしては、トリル等の部分が挙げられ、ヘテロアルキルとしては、エチルチオフエン等の部分が挙げられ、置換ヘテロアリールとしては、3 - メトキシチオフエン等の部分が挙げられ、アルコキシとしては、メトキシ等の部分が挙げられ、フェノキシとしては、3 - ニトロフェノキシ等の部分が挙げられる。ハロは、フルオロ、クロロ、ヨード及びプロモを含むと理解され

10

20

30

40

50

るものとする。

【0041】

本発明の目的のために、「正の整数」とは、1以上の整数を含むと理解されるものとし、当業者であれば、当業者の合理性の範囲内であることが理解されよう。

【0042】

本発明の目的のために、「結合した」という用語は、一つの基の別の基への共有（好ましくは）結合又は非共有結合、即ち、化学反応による前記結合を含むと理解されるものとする。

【0043】

本発明の目的のために、「有効量」及び「十分量」という用語は、所望の効果又は治療効果を達成する量を意味するものとし、このような効果は当業者により理解されている。

【0044】

本明細書に記載のナノ粒子組成物を使用して形成される「ナノ粒子」及び／又は「ナノ粒子複合体」という用語は、脂質系ナノ複合体を指す。ナノ粒子は、カチオン性脂質、融合性脂質及びPEG脂質の混合物に封入されたオリゴヌクレオチド等の核酸を含有する。あるいは、ナノ粒子は、核酸なしで形成されていてもよい。

【0045】

本発明の目的のために、「治療用オリゴヌクレオチド」とは、医薬品又は診断薬として使用するオリゴヌクレオチドを指す。

【0046】

本発明の目的のために、「遺伝子発現の調節」という用語は、投与経路に関わらず、本明細書に記載のナノ粒子での処理なしに観察された遺伝子発現と比較して、好ましくは癌及び炎症と関連する任意の種類の遺伝子のダウンレギュレーション又はアップレギュレーションを広範に含むと理解されるものとする。

【0047】

本発明の目的のために、「標的遺伝子の発現の抑制」とは、本明細書に記載のナノ粒子での処理なしに観察されたものと比較したとき、mRNA発現又は翻訳されたタンパク質の量を減少させるか、又は減弱させることを意味すると理解されるものとする。このような抑制の適切なアッセイとしては、例えばドットプロット、ノーザンプロット、in situハイブリダイゼーション、ELISA、免疫沈降、酵素機能、並びに当業者に公知の表現型アッセイ等の当業者に公知の技法を用いたタンパク質又はmRNAレベルの検査が挙げられる。処理した状態は、例えば細胞、好ましくは癌細胞又は癌組織のmRNAレベルの減少により確認できる。

【0048】

大まかに言って、抑制又は処理の成功は、所望の反応が得られた場合に生じるとみなされるものとする。例えば、抑制又は処理の成功は、例えば、腫瘍増殖抑制と関連する遺伝子の10%以上（即ち、20%、30%、40%）のダウンレギュレーションを得ることと定義できる。あるいは、処理の成功は、本明細書に記載のナノ粒子での処理なしに観察されたものと比較したとき、当業者により企図される他の臨床的指標を含め、癌細胞又は癌組織における癌遺伝子mRNAレベルの少なくとも20%、好ましくは30%、より好ましくは40%以上（即ち、50%又は80%）の低下を得ることと定義できる。

【0049】

さらに、説明の簡便性のための単数形の用語の使用は、それだけに限定されることは決して意図されない。したがって、例えば、オリゴヌクレオチド、コレステロール類似体、カチオン性脂質、放出可能融合性脂質、PEG脂質等を含む組成物についての言及は、オリゴヌクレオチド、コレステロール類似体、カチオン性脂質、放出可能融合性脂質、PEG脂質等の一つ又は複数の分子を指す。オリゴヌクレオチドは、同一又は異なる種類の遺伝子であってよいことも企図される。本明細書に開示された特定の構成、工程段階及び物質は若干変化し得るため、本発明はこのような構成、工程段階及び物質に限定されないことも理解されたい。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲及びその等価物により限定されるため、本明細書で使用する専門用語は、特定の実施形態を記載する目的のためだけに使用され、限定することは意図されないことも理解されたい。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 1 】

【 図 1 】 実施例 6 ~ 1 1 に記載の化合物 6 を調製するための反応スキームを概略的に例示する図である。

【 図 2 】 実施例 1 2 ~ 1 5 に記載の化合物 1 0 を調製するための反応スキームを概略的に例示する図である。

10

【 発明を実施するための形態 】

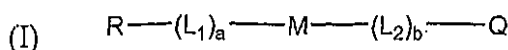
【 0 0 5 2 】

A . 概要

1 . 式 (I) の放出可能融合性脂質

本発明の一態様において、式 (I) の化合物 :

【 化 2 】



[式中、

R は水溶性の中性電荷部分又は両性イオン含有部分であり、

20

$L_1 \sim 2$ は独立に選択される二官能性リンカーであり、

M はイミン含有部分であり、

Q は置換また非置換、飽和又は不飽和の C 4 ~ 3 0 含有部分であり、

(a) は 0 又は正の整数、好ましくは 0 又は約 1 ~ 約 1 0 (例えば 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6) の整数であり、

(b) は 0 又は正の整数、好ましくは 0 又は約 1 ~ 約 1 0 (例えば 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6) の整数である]

が提供される。

【 0 0 5 3 】

(a) 及び (b) が 2 以上であるとき、 L_1 及び L_2 は独立に同一又は異なる。

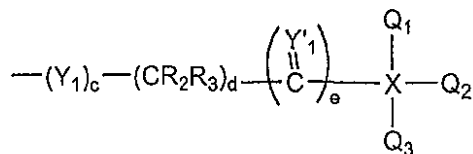
30

【 0 0 5 4 】

一つの好ましい態様において、本明細書に記載の式の化合物は、Q 炭化水素基 (脂肪族) を含む。Q 基は、式 (I a) :

【 化 3 】

(Ia)



40

[式中、

Y_1 及び Y'_1 は独立に O 、 S 又は NR_4 、好ましくは酸素であり、

(c) は 0 又は 1 であり、

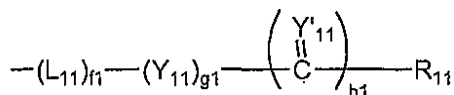
(d) は 0 又は正の整数、好ましくは 0 又は約 1 ~ 約 1 0 (例えば 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6) の整数であり、

(e) は 0 又は 1 であり、

X は C 、 N 又は P であり、

Q_1 は H 、 $C_{1 \sim 3}$ アルキル、 NR_5 、 OH 又は

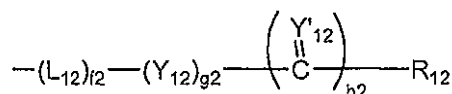
【化 4】



であり、

Q₂ は H、C₁ ~ 3 アルキル、NR₆、OH 又は

【化 5】

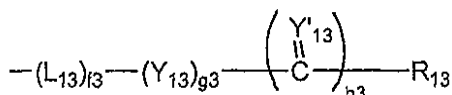


10

であり、

Q₃ は孤立電子対、(=O)、H、C₁ ~ 3 アルキル、NR₇、OH 又は

【化 6】



であるが、

ただし、

(i) X が C であるとき、Q₃ は孤立電子対又は (=O) ではなく、

(ii) X が N であるとき、Q₃ は孤立電子対であり、

20

(iii) X が P であるとき、Q₃ は (=O) であり、(e) は 0 であり、

L₁₁、L₁₂ 及び L₁₃ は独立に選択される二官能性スペーサーであり、

Y₁₁、Y₁₂ 及び Y₁₃ は独立に O、S 又は NR₈、好ましくは O 又は NR₈ であり、

Y'₁₁、Y'₁₂ 及び Y'₁₃ は独立に O、S 又は NR₈、好ましくは酸素であり、

R₁₁、R₁₂ 及び R₁₃ は独立に置換又は非置換、飽和又は不飽和の C₄ ~ 30 であり、

(f₁)、(f₂) 及び (f₃) は独立に 0 又は 1 であり、

(g₁)、(g₂) 及び (g₃) は独立に 0 又は 1 であり、

(h₁)、(h₂) 及び (h₃) は独立に 0 又は 1 であり、

R₂ ~ 3 は水素、ヒドロキシル、アミン、置換アミン、C₁ ~ 6 アルキル、C₂ ~ 6 アルケニル、C₂ ~ 6 アルキニル、C₃ ~ 19 分岐アルキル、C₃ ~ 8 シクロアルキル、C₁ ~ 6 置換アルキル、C₂ ~ 6 置換アルケニル、C₂ ~ 6 置換アルキニル、C₃ ~ 8 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、C₁ ~ 6 ヘテロアルキル及び置換 C₁ ~ 6 ヘテロアルキル、好ましくは水素、ヒドロキシル、アミン、メチル、エチル及びプロピルからなる群から独立に選択され、

30

R₄ ~ 8 は水素、C₁ ~ 6 アルキル、C₂ ~ 6 アルケニル、C₂ ~ 6 アルキニル、C₃ ~ 19 分岐アルキル、C₃ ~ 8 シクロアルキル、C₁ ~ 6 置換アルキル、C₂ ~ 6 置換アルケニル、C₂ ~ 6 置換アルキニル、C₃ ~ 8 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、C₁ ~ 6 ヘテロアルキル及び置換 C₁ ~ 6 ヘテロアルキル、好ましくは水素、メチル、エチル及びプロピルからなる群から独立に選択されるが、

40

ただし、Q は R₁₁、R₁₂ 及び R₁₃ の少なくとも一つ又は二つ (例えば 1、2、3) を含む]

を有する。

【0055】

本発明の範囲内で企図される二官能性リンカーと二官能性スペーサーとの組合せとしては、リンカー基及びスペーサー基の変数と置換基との組合せが許容されることにより、このような組合せにより式 (I) の安定な化合物がもたらされるものが挙げられる。例えば、値と置換基との組合せは、酸素、窒素又はカルボニルをイミンに直接隣接して配置させることを許容しない。

50

【 0 0 5 6 】

好ましくは、Qは R_{11} 、 R_{12} 及び R_{13} の少なくとも二つを含む。

【 0 0 5 7 】

(d)が2以上であるとき、各発生時に $-C(R_2R_3)-$ 基は同一又は異なる。

【 0 0 5 8 】

本発明の一つの好ましい態様において、イミン含有部分は、次式：

$-N=CR_1-$ 又は $CR_1=N-$

(式中、 R_1 は水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_3 \sim 8$ 分岐アルキル、 $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、 $C_1 \sim 6$ 置換アルキル、 $C_3 \sim 8$ 置換シクロアルキル、アリール及び置換アリール、好ましくは水素、メチル、エチル又はプロピルである)を有する。

10

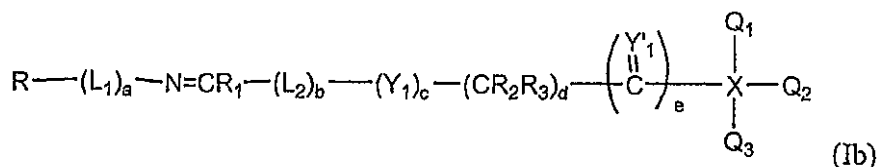
【 0 0 5 9 】

一実施形態において、酸不安定Mリンカーは $-N=CH-$ 又は $-CH=N-$ である。

【 0 0 6 0 】

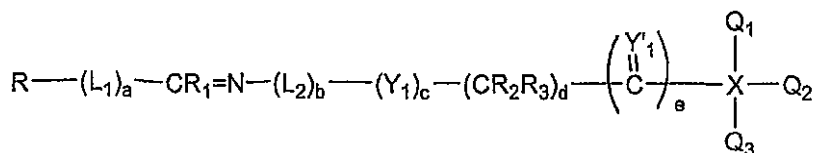
本発明によれば、本明細書に記載の放出可能融合性脂質は、式(Ib)又は(I' b)：

【 化 7 】



20

又は



を有する。

【 0 0 6 1 】

30

2. 水溶性の中性電荷部分又は両性イオン含有部分：R基

本明細書に記載の化合物は、末端両性イオンを含む。一実施形態において、両性イオンは、アミン及び酸を含む。酸性プロトンは、アミンから3～8原子に位置する(例えば、酸性プロトンは、アミンから3、4、5、6、7又は8原子に位置する)。好ましくは、酸性プロトンは、アミンから3～6原子に位置する。

【 0 0 6 2 】

酸としては、それだけに限らないが、カルボン酸、スルホン酸又はリン酸が挙げられる。

【 0 0 6 3 】

さらなる実施形態において、両性イオン含有部分は、アミノ酸の両性イオン形態である。R基のいくつかの例示的例としては、それだけに限らないが、

40

$-CH(COO)(NH_3)$ 、

$lys = -HN-(CH_2)_4CH(COO)(NH_3)$ 、

$glu = -C(=O)-(CH_2)_2CH(COO)(NH_3)$ 及び

$asp = -C(=O)-(CH_2)CH(COO)(NH_3)$

が挙げられる。

【 0 0 6 4 】

別の実施形態において、両性イオン含有部分は、アミノ酸の両性イオン形態の誘導体である。アミノ酸は、天然のアミノ酸、又は天然のアミノ酸の誘導体であってよい。アミノ酸の類似体及び誘導体のいくつかの例としては、2-アミノアジピン酸、3-アミノアジ

50

ピン酸、アラニン、アミノプロピオン酸、2 - アミノ酪酸、4 - アミノ酪酸、ピペリジン酸、6 - アミノカプロン酸、2 - アミノヘプタン酸、2 - アミノイソ酪酸、3 - アミノイソ酪酸、2 - アミノピメリン酸、2, 4 - アミノ酪酸、デスモシン、2, 2 - ジアミノピメリン酸、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、N - エチルグリシン、N - エチルアスパラギン、3 - ヒドロキシプロリン、4 - ヒドロキシプロリン、イソデスモシン、アロイソロイシン、N - メチルグリシン又はサルコシン、N - メチルイソロイシン、6 - N - メチルリジン、N - メチルバリン、ノルバリン、ノルロイシン、オルニチン等が挙げられ、枚挙にいとまがなく、それらは、本明細書に参照により組み込まれている、63 Fed. Reg., 29620、29622に列挙されている。

【 0 0 6 5 】

10

3 . 二官能性リンカー : L₁ 基及び L₂ 基

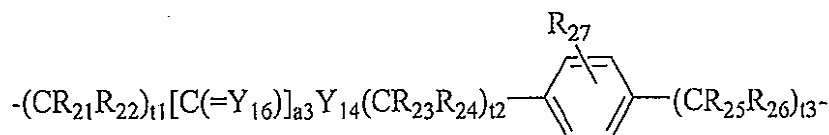
本発明によれば、式 (I) の化合物に含まれる L₁ 基は、

- (C R₂₁ R₂₂)_{t1} - [C (= Y₁₆)]_{a3} - 、
 - (C R₂₁ R₂₂)_{t1} Y₁₇ - (C R₂₃ R₂₄)_{t2} - (Y₁₈)_{a2} - [C (= Y₁₆)]_{a3} - 、
 - (C R₂₁ R₂₂ C R₂₃ R₂₄ Y₁₇)_{t1} - [C (= Y₁₆)]_{a3} - 、
 - (C R₂₁ R₂₂ C R₂₃ R₂₄ Y₁₇)_{t1} (C R₂₅ R₂₆)_{t4} - (Y₁₈)_{a2} - [C (= Y₁₆)]_{a3} - 、
 - [(C R₂₁ R₂₂ C R₂₃ R₂₄)_{t2} Y₁₇]_{t3} (C R₂₅ R₂₆)_{t4} - (Y₁₈)_{a2} - [C (= Y₁₆)]_{a3} - 、
 - (C R₂₁ R₂₂)_{t1} - [(C R₂₃ R₂₄)_{t2} Y₁₇]_{t3} (C R₂₅ R₂₆)_{t4} - (Y₁₈)_{a2} - [C (= Y₁₆)]_{a3} - 、
 - (C R₂₁ R₂₂)_{t1} (Y₁₇)_{a2} [C (= Y₁₆)]_{a3} (C R₂₃ R₂₄)_{t2} - 、
 - (C R₂₁ R₂₂)_{t1} (Y₁₇)_{a2} [C (= Y₁₆)]_{a3} (C R₂₃ R₂₄)_{t2} - Y₁₅ - (C R₂₃ R₂₄)_{t3} - 、
 - (C R₂₁ R₂₂)_{t1} (Y₁₇)_{a2} [C (= Y₁₆)]_{a3} Y₁₄ (C R₂₃ R₂₄)_{t2} - Y₁₅ - (C R₂₃ R₂₄)_{t3} - 、
 - (C R₂₁ R₂₂)_{t1} (Y₁₇)_{a2} [C (= Y₁₆)]_{a3} (C R₂₃ R₂₄ C R₂₅ R₂₆ Y₁₉)_{t2} (C R₂₇ C R₂₈)_{t3} - 、
 - (C R₂₁ R₂₂)_{t1} (Y₁₇)_{a2} [C (= Y₁₆)]_{a3} Y₁₄ (C R₂₃ R₂₄ C R₂₅ R₂₆ Y₁₉)_{t2} (C R₂₇ C R₂₈)_{t3} - 、及び

20

30

【 化 8 】



[式 中、

40

Y₁₆ は O、N R₂₈ 又は S、好ましくは酸素であり、

Y₁₄ ~ Y₁₅ 及び Y₁₇ ~ Y₁₉ は独立に O、N R₂₉ 又は S、好ましくは O 又は N R₂₉ であり、

R₂₁ ~ R₂₇ は水素、ヒドロキシル、アミン、C₁ ~ C₆ アルキル、C₃ ~ C₁₂ 分岐アルキル、C₃ ~ C₈ シクロアルキル、C₁ ~ C₆ 置換アルキル、C₃ ~ C₈ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、C₁ ~ C₆ ヘテロアルキル、置換 C₁ ~ C₆ ヘテロアルキル、C₁ ~ C₆ アルコキシ、フェノキシ及び C₁ ~ C₆ ヘテロアルコキシ、好ましくは水素、メチル、エチル又はプロピルの中から独立に選択され、

R₂₈ ~ R₂₉ は水素、C₁ ~ C₆ アルキル、C₃ ~ C₁₂ 分岐アルキル、C₃ ~ C₈ シクロアルキル、C₁ ~ C₆ 置換アルキル、C₃ ~ C₈ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、

50

アラルキル、 $C_1 \sim 6$ ヘテロアルキル、置換 $C_1 \sim 6$ ヘテロアルキル、 $C_1 \sim 6$ アルコキシ、フェノキシ及び $C_1 \sim 6$ ヘテロアルコキシ、好ましくは水素、メチル、エチル又はプロピルの中から独立に選択され、

(t_1)、(t_2)、(t_3) 及び (t_4) は独立に 0 又は正の整数、好ましくは 0 又は約 1 ~ 約 10 (例えば 1、2、3、4、5、6) の正の整数であり、

(a_2) 及び (a_3) は独立に 0 又は 1 である]

の中から選択される。

【0066】

本発明の範囲内で企図される二官能性 L_1 リンカーとしては、変数と置換基との組合せが許容されることにより、このような組合せにより式 (I) の安定な化合物がもたらされるものが挙げられる。例えば、(a_3) が 0 であるとき、 Y_{17} は Y_{14} に直接結合しない。

10

【0067】

本発明の目的のために、二官能性リンカーの値が 2 以上の正の整数であるとき、同一又は異なる二官能性リンカーを使用できる。

【0068】

(t_1)、(t_2)、(t_3) 及び (t_4) が各々独立に 2 以上であるとき、各発生時に $R_{21} \sim R_{28}$ は独立に同一又は異なる。

【0069】

一実施形態において、 $Y_{14 \sim 15}$ 及び $Y_{17 \sim 19}$ は O 又は NH であり、 $R_{21 \sim 29}$ は独立に水素又はメチルである。

20

【0070】

別の実施形態において、 Y_{16} は O であり、 $Y_{14 \sim 15}$ 及び $Y_{17 \sim 19}$ は O 又は NH であり、 $R_{21 \sim 29}$ は水素である。

【0071】

ある種の実施形態において、 L_1 は、

- (CH_2) $_{t_1}$ - [$C(=O)$] $_{a_3}$ - 、
- (CH_2) $_{t_1}$ Y_{17} - (CH_2) $_{t_2}$ - (Y_{18}) $_{a_2}$ - [$C(=O)$] $_{a_3}$ - 、
- ($CH_2CH_2Y_{17}$) $_{t_1}$ - [$C(=O)$] $_{a_3}$ - 、
- ($CH_2CH_2Y_{17}$) $_{t_1}$ (CH_2) $_{t_4}$ - (Y_{18}) $_{a_2}$ - [$C(=O)$] $_{a_3}$ -
- [$(CH_2CH_2)_{t_2}Y_{17}]_{t_3}$ (CH_2) $_{t_4}$ - (Y_{18}) $_{a_2}$ - [$C(=O)$] $_{a_3}$ - 、
- (CH_2) $_{t_1}$ - [$(CH_2)_{t_2}Y_{17}]_{t_3}$ (CH_2) $_{t_4}$ - (Y_{18}) $_{a_2}$ - [$C(=O)$] $_{a_3}$ - 、
- (CH_2) $_{t_1}$ (Y_{17}) $_{a_2}$ [$C(=O)$] $_{a_3}$ (CH_2) $_{t_2}$ - 、
- (CH_2) $_{t_1}$ (Y_{17}) $_{a_2}$ [$C(=O)$] $_{a_3}$ Y_{14} (CH_2) $_{t_2}$ - 、
- (CH_2) $_{t_1}$ (Y_{17}) $_{a_2}$ [$C(=O)$] $_{a_3}$ (CH_2) $_{t_2}$ - Y_{15} - (CH_2) $_{t_3}$ - 、
- (CH_2) $_{t_1}$ (Y_{17}) $_{a_2}$ [$C(=O)$] $_{a_3}$ Y_{14} (CH_2) $_{t_2}$ - Y_{15} - (CH_2) $_{t_3}$ - 、
- (CH_2) $_{t_1}$ (Y_{17}) $_{a_2}$ [$C(=O)$] $_{a_3}$ ($CH_2CH_2Y_{19}$) $_{t_2}$ (CH_2) $_{t_3}$ - 、及び
- (CH_2) $_{t_1}$ (Y_{17}) $_{a_2}$ [$C(=O)$] $_{a_3}$ Y_{14} ($CH_2CH_2Y_{19}$) $_{t_2}$ (CH_2) $_{t_3}$ -

30

40

[式中、

$Y_{14 \sim 15}$ 及び $Y_{17 \sim 19}$ は独立に O 又は NH であり、

(t_1)、(t_2)、(t_3) 及び (t_4) は独立に 0 又は正の整数、好ましくは 0 又は約 1 ~ 約 10 (例えば 1、2、3、4、5、6) の正の整数であり、

(a_2) 及び (a_3) は独立に 0 又は 1 である]

50

の中から独立に選択される。

【 0 0 7 2 】

(t 1) 又は (t 3) が 2 以上であるとき、各発生時に Y_{17} は同一又は異なる。

【 0 0 7 3 】

(t 2) が 2 以上であるとき、各発生時に Y_{19} は同一又は異なる。

【 0 0 7 4 】

さらなる実施形態及び / 又は代替実施形態において、 L_1 基の例示的例は、

- CH_2 - 、 - $(CH_2)_2$ - 、 - $(CH_2)_3$ - 、 - $(CH_2)_4$ - 、 - $(CH_2)_5$
- 、 - $(CH_2)_6$ - 、 - $NH(CH_2)$ - 、
- $CH(NH_2)CH_2$ - 、
- $(CH_2)_4 - C(=O)$ - 、 - $(CH_2)_5 - C(=O)$ - 、 - $(CH_2)_6 - C(=O)$ - 、
- $CH_2CH_2O - CH_2O - C(=O)$ - 、
- $(CH_2CH_2O)_2 - CH_2O - C(=O)$ - 、
- $(CH_2CH_2O)_3 - CH_2O - C(=O)$ - 、
- $(CH_2CH_2O)_2 - C(=O)$ - 、
- $CH_2CH_2O - CH_2CH_2NH - C(=O)$ - 、
- $(CH_2CH_2O)_2 - CH_2CH_2NH - C(=O)$ - 、
- $CH_2 - O - CH_2CH_2O - CH_2CH_2NH - C(=O)$ - 、
- $CH_2 - O - (CH_2CH_2O)_2 - CH_2CH_2NH - C(=O)$ - 、
- $CH_2 - O - CH_2CH_2O - CH_2C(=O)$ - 、
- $CH_2 - O - (CH_2CH_2O)_2 - CH_2C(=O)$ - 、
- $(CH_2)_4 - C(=O)NH$ - 、 - $(CH_2)_5 - C(=O)NH$ - 、
- $(CH_2)_6 - C(=O)NH$ - 、
- $CH_2CH_2O - CH_2O - C(=O) - NH$ - 、
- $(CH_2CH_2O)_2 - CH_2O - C(=O) - NH$ - 、
- $(CH_2CH_2O)_3 - CH_2O - C(=O) - NH$ - 、
- $(CH_2CH_2O)_2 - C(=O) - NH$ - 、
- $CH_2CH_2O - CH_2CH_2NH - C(=O) - NH$ - 、
- $(CH_2CH_2O)_2 - CH_2CH_2NH - C(=O) - NH$ - 、
- $CH_2 - O - CH_2CH_2O - CH_2CH_2NH - C(=O) - NH$ - 、
- $CH_2 - O - (CH_2CH_2O)_2 - CH_2CH_2NH - C(=O) - NH$ - 、
- $CH_2 - O - CH_2CH_2O - CH_2C(=O) - NH$ - 、
- $CH_2 - O - (CH_2CH_2O)_2 - CH_2C(=O) - NH$ - 、
- $(CH_2CH_2O)_2$ - 、 - $CH_2CH_2O - CH_2O$ - 、
- $(CH_2CH_2O)_2 - CH_2CH_2NH$ - 、
- $(CH_2CH_2O)_3 - CH_2CH_2NH$ - 、
- $CH_2CH_2O - CH_2CH_2NH$ - 、
- $(CH_2CH_2O)_2 - CH_2CH_2NH$ - 、
- $CH_2 - O - CH_2CH_2O - CH_2CH_2NH$ - 、
- $CH_2 - O - (CH_2CH_2O)_2 - CH_2CH_2NH$ - 、
- $CH_2 - O - CH_2CH_2O$ - 、
- $CH_2 - O - (CH_2CH_2O)_2$ - 、

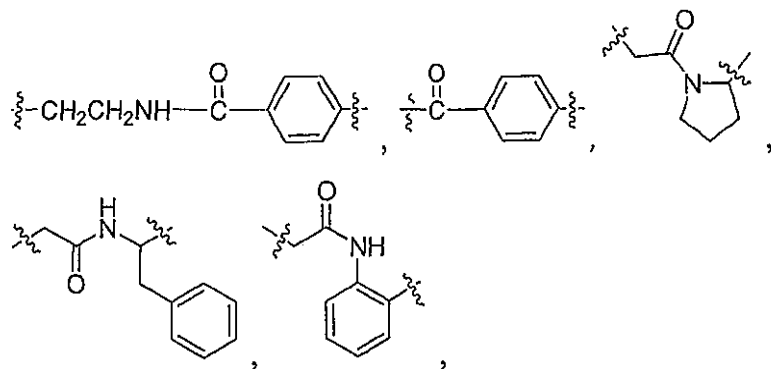
10

20

30

40

【化 9】



10

- C (= O) NH (CH₂)₂ - 、 - CH₂ C (= O) NH (CH₂)₂ - 、
 - C (= O) NH (CH₂)₃ - 、 - CH₂ C (= O) NH (CH₂)₃ - 、
 - C (= O) NH (CH₂)₄ - 、 - CH₂ C (= O) NH (CH₂)₄ - 、
 - C (= O) NH (CH₂)₅ - 、 - CH₂ C (= O) NH (CH₂)₅ - 、
 - C (= O) NH (CH₂)₆ - 、 - CH₂ C (= O) NH (CH₂)₆ - 、
 - C (= O) O (CH₂)₂ - 、 - CH₂ C (= O) O (CH₂)₂ - 、
 - C (= O) O (CH₂)₃ - 、 - CH₂ C (= O) O (CH₂)₃ - 、
 - C (= O) O (CH₂)₄ - 、 - CH₂ C (= O) O (CH₂)₄ - 、
 - C (= O) O (CH₂)₅ - 、 - CH₂ C (= O) O (CH₂)₅ - 、
 - C (= O) O (CH₂)₆ - 、 - CH₂ C (= O) O (CH₂)₆ - 、
 - (CH₂ CH₂)₂ NHC (= O) NH (CH₂)₂ - 、
 - (CH₂ CH₂)₂ NHC (= O) NH (CH₂)₃ - 、
 - (CH₂ CH₂)₂ NHC (= O) NH (CH₂)₄ - 、
 - (CH₂ CH₂)₂ NHC (= O) NH (CH₂)₅ - 、
 - (CH₂ CH₂)₂ NHC (= O) NH (CH₂)₆ - 、
 - (CH₂ CH₂)₂ NHC (= O) O (CH₂)₂ - 、
 - (CH₂ CH₂)₂ NHC (= O) O (CH₂)₃ - 、
 - (CH₂ CH₂)₂ NHC (= O) O (CH₂)₄ - 、
 - (CH₂ CH₂)₂ NHC (= O) O (CH₂)₅ - 、
 - (CH₂ CH₂)₂ NHC (= O) O (CH₂)₆ - 、
 - (CH₂ CH₂)₂ NHC (= O) (CH₂)₂ - 、
 - (CH₂ CH₂)₂ NHC (= O) (CH₂)₃ - 、
 - (CH₂ CH₂)₂ NHC (= O) (CH₂)₄ - 、
 - (CH₂ CH₂)₂ NHC (= O) (CH₂)₅ - 、 及び
 - (CH₂ CH₂)₂ NHC (= O) (CH₂)₆ - の中から選択される。

20

30

【0075】

ある種の実施形態において、L₂は、

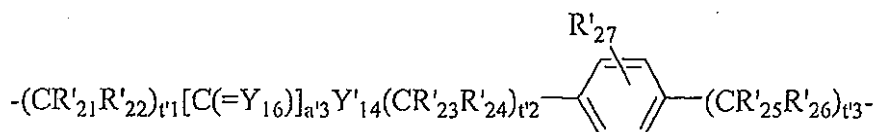
- (CR' _{2 1} R' _{2 2})_{t' 1} - [C (= Y' _{1 6})]_{a' 3} (CR' _{2 7} CR' _{2 8})_{t' 2} - 、
 - (CR' _{2 1} R' _{2 2})_{t' 1} Y' _{1 4} - (CR' _{2 3} R' _{2 4})_{t' 2} - (Y' _{1 5})_{a' 2} - [C (= Y' _{1 6})]_{a' 3} (CR' _{2 7} CR' _{2 8})_{t' 3} - 、
 - (CR' _{2 1} R' _{2 2} CR' _{2 3} R' _{2 4} Y' _{1 4})_{t' 1} - [C (= Y' _{1 6})]_{a' 3} (CR' _{2 7} CR' _{2 8})_{t' 2} - 、
 - (CR' _{2 1} R' _{2 2} CR' _{2 3} R' _{2 4} Y' _{1 4})_{t' 1} (CR' _{2 5} R' _{2 6})_{t' 2} - (Y' _{1 5})_{a' 2} - [C (= Y' _{1 6})]_{a' 3} (CR' _{2 7} CR' _{2 8})_{t' 3} - 、
 - [(CR' _{2 1} R' _{2 2} CR' _{2 3} R' _{2 4})_{t' 2} Y' _{1 4}]_{t' 1} (CR' _{2 5} R' _{2 6})_{t' 2} - (Y' _{1 5})_{a' 2} - [C (= Y' _{1 6})]_{a' 3} (CR' _{2 7} CR' _{2 8})_{t' 3} - 、

40

50

$-(CR'_{21}R'_{22})_{t'1}-(CR'_{23}R'_{24})_{t'2}Y'_{14}]_{t'2}(CR'_{25}R'_{26})_{t'3}-(Y'_{15})_{a'2}-[C(=Y'_{16})]_{a'3}(CR'_{27}CR'_{28})_{t'4}-$
 $-(CR'_{21}R'_{22})_{t'1}(Y'_{14})_{a'2}[C(=Y'_{16})]_{a'3}(CR'_{23}R'_{24})_{t'2}-$
 $-(CR'_{21}R'_{22})_{t'1}(Y'_{14})_{a'2}[C(=Y'_{16})]_{a'3}Y'_{15}(CR'_{23}R'_{24})_{t'2}-$
 $-(CR'_{21}R'_{22})_{t'1}(Y'_{14})_{a'2}[C(=Y'_{16})]_{a'3}(CR'_{23}R'_{24})_{t'2}-Y'_{15}-(CR'_{23}R'_{24})_{t'3}-$
 $-(CR'_{21}R'_{22})_{t'1}(Y'_{14})_{a'2}[C(=Y'_{16})]_{a'3}Y'_{14}(CR'_{23}R'_{24})_{t'2}-Y'_{15}-(CR'_{23}R'_{24})_{t'3}-$
 $-(CR'_{21}R'_{22})_{t'1}(Y'_{14})_{a'2}[C(=Y'_{16})]_{a'3}(CR'_{23}R'_{24}CR'_{25}R'_{26}Y'_{15})_{t'2}(CR'_{27}CR'_{28})_{t'3}-$
 $-(CR'_{21}R'_{22})_{t'1}(Y'_{14})_{a'2}[C(=Y'_{16})]_{a'3}Y'_{17}(CR'_{23}R'_{24}CR'_{25}R'_{26}Y'_{15})_{t'2}(CR'_{27}CR'_{28})_{t'3}-$ 、及び
【化 10】

10



20

[式中、

Y'_{16} は O、 NR'_{28} 又は S、好ましくは酸素であり、

$Y'_{14} \sim 15$ 及び Y'_{17} は独立に O、 NR'_{29} 又は S、好ましくは O 又は NR'_{29} であり、

$R'_{21} \sim 27$ は水素、ヒドロキシル、アミン、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_3 \sim 12$ 分岐アルキル、 $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、 $C_1 \sim 6$ 置換アルキル、 $C_3 \sim 8$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $C_1 \sim 6$ ヘテロアルキル、置換 $C_1 \sim 6$ ヘテロアルキル、 $C_1 \sim 6$ アルコキシ、フェノキシ及び $C_1 \sim 6$ ヘテロアルコキシ、好ましくは水素、メチル、エチル又はプロピルの中から独立に選択され、

30

$R'_{28} \sim 29$ は水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_3 \sim 12$ 分岐アルキル、 $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、 $C_1 \sim 6$ 置換アルキル、 $C_3 \sim 8$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $C_1 \sim 6$ ヘテロアルキル、置換 $C_1 \sim 6$ ヘテロアルキル、 $C_1 \sim 6$ アルコキシ、フェノキシ及び $C_1 \sim 6$ ヘテロアルコキシ、好ましくは水素、メチル、エチル又はプロピルの中から独立に選択され、

$(t'1)$ 、 $(t'2)$ 、 $(t'3)$ 及び $(t'4)$ は独立に 0 又は正の整数、好ましくは 0 又は約 1 ~ 約 10 (例えば 1、2、3、4、5、6) の正の整数であり、

$(a'2)$ 及び $(a'3)$ は独立に 0 又は 1 である]

の中から独立に選択される。

40

【0076】

本発明の範囲内で企図される二官能性 L_2 リンカーとしては、リンカー基の変数と置換基との組合せが許容されることにより、このような組合せにより式 (I) の安定な化合物がもたらされるものが挙げられる。例えば、 $(a'3)$ が 0 であるとき、 Y'_{14} は Y'_{14} 又は Y'_{17} に直接結合しない。

【0077】

本発明の目的のために、放出可能リンカーを含む二官能性 L_2 リンカーの値が、2 以上の正の整数であるとき、同一又は異なる二官能性リンカーを使用できる。

【0078】

一実施形態において、 $Y'_{14} \sim 15$ 及び Y'_{17} は O 又は NH であり、 $R'_{21} \sim 2$

50

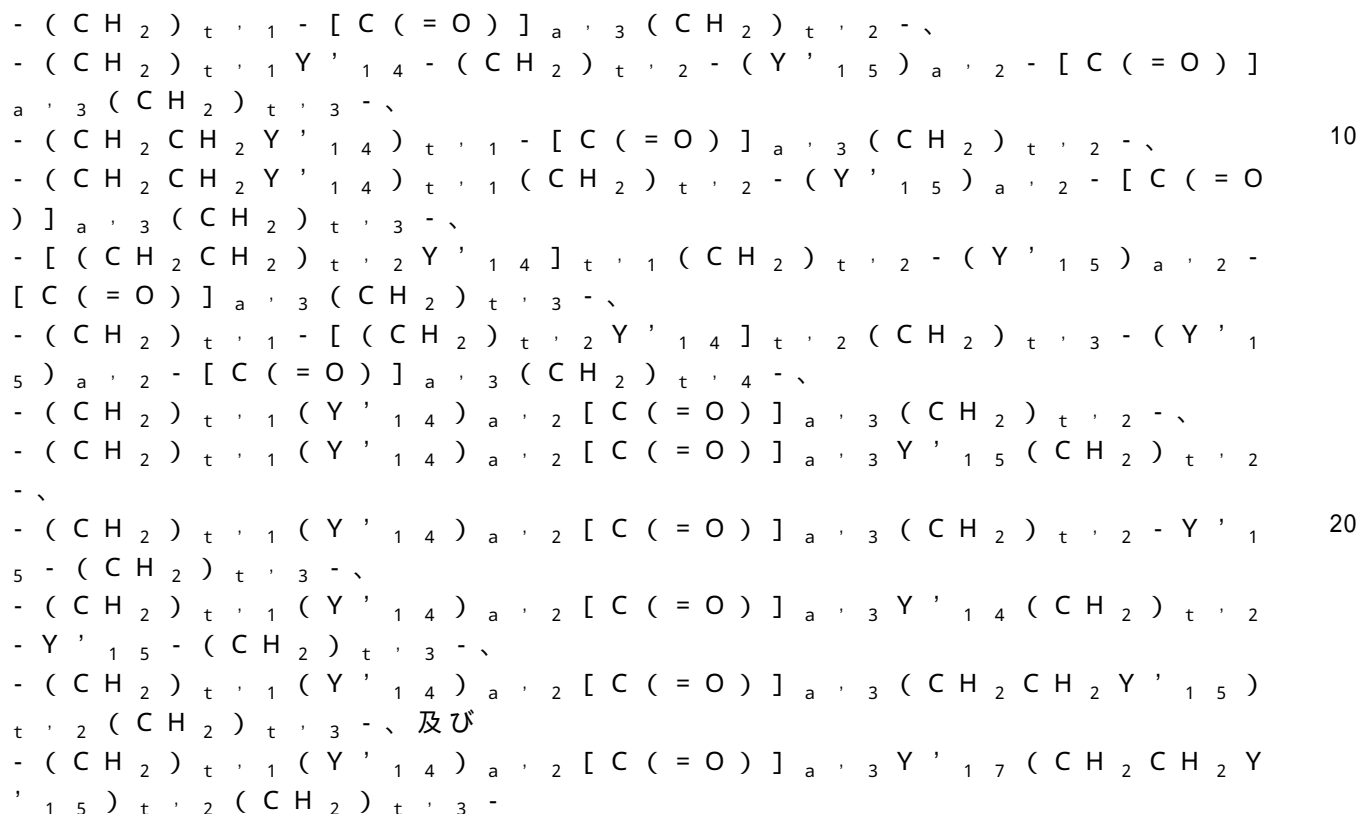
₉ は独立に水素又はメチルである。

【0079】

別の実施形態において、 Y'_{16} はOであり、 $Y'_{14} \sim 15$ 及び Y'_{17} はO又はNHであり、 $R'_{21} \sim 29$ は水素である。

【0080】

ある種の実施形態において、 L_2 は、



[式中、

$Y'_{14} \sim 15$ 及び Y'_{17} は独立にO又はNHであり、
 $(t'1)$ 、 $(t'2)$ 、 $(t'3)$ 及び $(t'4)$ は独立に0又は正の整数、好ましくは0又は約1～約10（例えば1、2、3、4、5、6）の正の整数であり、
 $(a'2)$ 及び $(a'3)$ は独立に0又は1である]
 の中から選択される。

【0081】

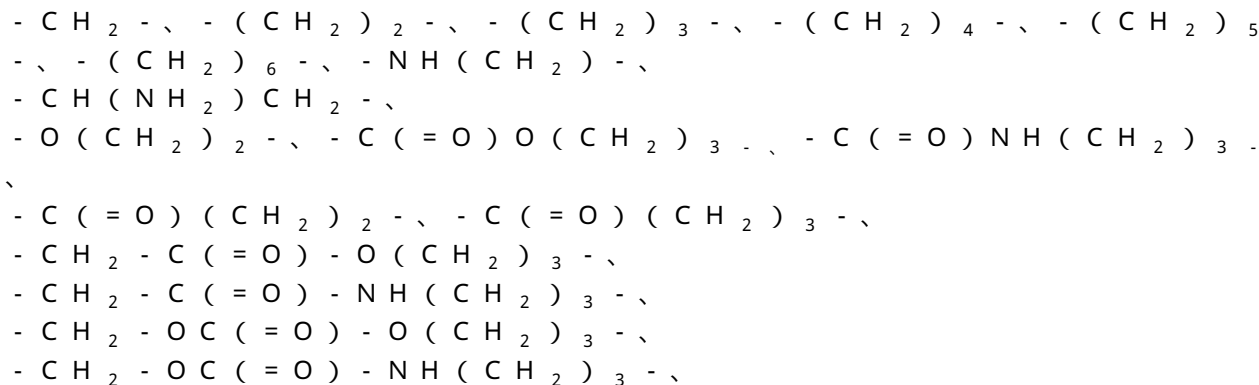
$(t'1)$ 又は $(t'2)$ が2以上であるとき、各発生時に Y'_{14} は同一又は異なる。

【0082】

$(t'2)$ が2以上であるとき、各発生時に Y'_{15} は同一又は異なる。

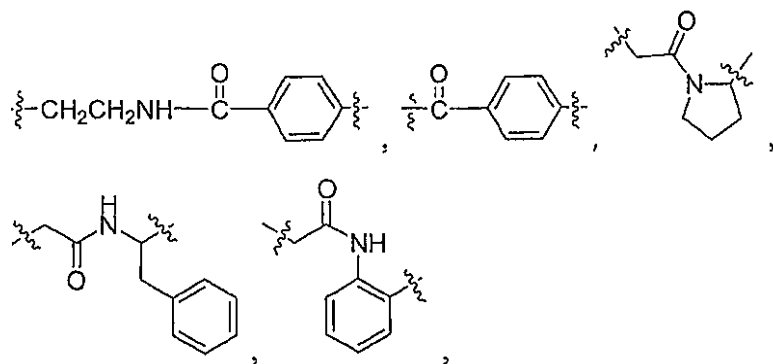
【0083】

さらなる実施形態及び/又は代替実施形態において、 L_2 基の例示的例は、



- (CH₂)₂ - C(=O) - O(CH₂)₃ - 、
- (CH₂)₂ - C(=O) - NH(CH₂)₃ - 、
- CH₂ C(=O) O(CH₂)₂ - O - (CH₂)₂ - 、
- CH₂ C(=O) NH(CH₂)₂ - O - (CH₂)₂ - 、
- (CH₂)₂ C(=O) O(CH₂)₂ - O - (CH₂)₂ - 、
- (CH₂)₂ C(=O) NH(CH₂)₂ - O - (CH₂)₂ - 、
- CH₂ C(=O) O(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂ - 、
- (CH₂)₂ C(=O) O(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂ - 、
- (CH₂CH₂O)₂ - 、 - CH₂CH₂O - CH₂O - 、
- (CH₂CH₂O)₂ - CH₂CH₂NH - 、 - (CH₂CH₂O)₃ - CH₂CH₂ 10
- NH - 、
- CH₂CH₂O - CH₂CH₂NH - 、
- CH₂ - O - CH₂CH₂O - CH₂CH₂NH - 、
- CH₂ - O - (CH₂CH₂O)₂ - CH₂CH₂NH - 、
- CH₂ - O - CH₂CH₂O - 、 - CH₂ - O - (CH₂CH₂O)₂ - 、

【化 1 1】



20

- (CH₂)₂ NHC(=O) - (CH₂CH₂O)₂ - 、
- C(=O)NH(CH₂)₂ - 、 - CH₂C(=O)NH(CH₂)₂ - 、
- C(=O)NH(CH₂)₃ - 、 - CH₂C(=O)NH(CH₂)₃ - 、
- C(=O)NH(CH₂)₄ - 、 - CH₂C(=O)NH(CH₂)₄ - 、
- C(=O)NH(CH₂)₅ - 、 - CH₂C(=O)NH(CH₂)₅ - 、
- C(=O)NH(CH₂)₆ - 、 - CH₂C(=O)NH(CH₂)₆ - 、
- C(=O)O(CH₂)₂ - 、 - CH₂C(=O)O(CH₂)₂ - 、
- C(=O)O(CH₂)₃ - 、 - CH₂C(=O)O(CH₂)₃ - 、
- C(=O)O(CH₂)₄ - 、 - CH₂C(=O)O(CH₂)₄ - 、
- C(=O)O(CH₂)₅ - 、 - CH₂C(=O)O(CH₂)₅ - 、
- C(=O)O(CH₂)₆ - 、 - CH₂C(=O)O(CH₂)₆ - 、
- (CH₂CH₂)₂ NHC(=O)NH(CH₂)₂ - 、
- (CH₂CH₂)₂ NHC(=O)NH(CH₂)₃ - 、
- (CH₂CH₂)₂ NHC(=O)NH(CH₂)₄ - 、
- (CH₂CH₂)₂ NHC(=O)NH(CH₂)₅ - 、
- (CH₂CH₂)₂ NHC(=O)NH(CH₂)₆ - 、
- (CH₂CH₂)₂ NHC(=O)O(CH₂)₂ - 、
- (CH₂CH₂)₂ NHC(=O)O(CH₂)₃ - 、
- (CH₂CH₂)₂ NHC(=O)O(CH₂)₄ - 、
- (CH₂CH₂)₂ NHC(=O)O(CH₂)₅ - 、
- (CH₂CH₂)₂ NHC(=O)O(CH₂)₆ - 、
- (CH₂CH₂)₂ NHC(=O)(CH₂)₂ - 、
- (CH₂CH₂)₂ NHC(=O)(CH₂)₃ - 、
- (CH₂CH₂)₂ NHC(=O)(CH₂)₄ - 、

30

40

50

- $(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_5$ -、及び
- $(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_6$ - の中から選択される。

【0084】

さらなる実施形態において、二官能性リンカー L_1 及び L_2 は、置換、飽和又は不飽和、分岐又は直鎖の $C_{3 \sim 50}$ アルキル（即ち、 $C_{3 \sim 40}$ アルキル、 $C_{3 \sim 20}$ アルキル、 $C_{3 \sim 15}$ アルキル、 $C_{3 \sim 10}$ アルキル等）を有するスペーサーであってよく、一つ又は複数の炭素は、 NR_6 、 O 、 S 又は $\text{C}(=\text{Y})$ 、（好ましくは O 又は NH ）で場合により置き換えられるが、置き換えられる炭素は 70% を超えない（即ち、60%、50%、40%、30%、20%、10% 未満）。

【0085】

10

4. 二官能性スペーサー： L_{11} 基、 L_{12} 基及び L_{13} 基

本発明によれば、二官能性スペーサー $L_{11 \sim 13}$ は、

- $(\text{CR}_{31}\text{R}_{32})_{q1}$ - 及び
- $\text{Y}_{26}(\text{CR}_{31}\text{R}_{32})_{q1}$ -

[式中、

Y_{26} は O 、 NR_{33} 又は S 、好ましくは酸素又は NR_{33} であり、

$\text{R}_{31 \sim 32}$ は水素、ヒドロキシル、 $C_{1 \sim 6}$ アルキル、 $C_{3 \sim 12}$ 分岐アルキル、 $C_{3 \sim 8}$ シクロアルキル、 $C_{1 \sim 6}$ 置換アルキル、 $C_{3 \sim 8}$ 置換シクロアルキル、 $C_{1 \sim 6}$ ヘテロアルキル、置換 $C_{1 \sim 6}$ ヘテロアルキル、 $C_{1 \sim 6}$ アルコキシ、フェノキシ及び $C_{1 \sim 6}$ ヘテロアルコキシ、好ましくは水素、メチル、エチル又はプロピルの中から独立に選

20

択され、
 R_{33} は水素、ヒドロキシル、 $C_{1 \sim 6}$ アルキル、 $C_{3 \sim 12}$ 分岐アルキル、 $C_{3 \sim 8}$ シクロアルキル、 $C_{1 \sim 6}$ 置換アルキル、 $C_{3 \sim 8}$ 置換シクロアルキル、 $C_{1 \sim 6}$ ヘテロアルキル、置換 $C_{1 \sim 6}$ ヘテロアルキル、 $C_{1 \sim 6}$ アルコキシ、フェノキシ及び $C_{1 \sim 6}$ ヘテロアルコキシ、好ましくは水素、メチル、エチル又はプロピルの中から選択され、
 ($q1$) は 0 又は正の整数であり、好ましくは 0 又は約 1 ~ 約 10（例えば 1、2、3、4、5、6）の整数である]

の中から独立に選択される。

【0086】

本発明の範囲内で企図される二官能性スペーサーとしては、変数と置換基との組合せが許容されることにより、このような組合せにより式 (I) の安定な化合物がもたらされるものが挙げられる。

30

【0087】

($q1$) が 2 以上であるとき、各発生時に R_{31} 及び R_{32} は独立に同一又は異なる。

【0088】

一つの好ましい実施形態において、 $\text{R}'_{31 \sim 33}$ は水素又はメチルである。

【0089】

ある種の好ましい実施形態において、 $\text{R}_{31 \sim 32}$ は水素又はメチルであり、 Y_{26} は O 又は NH である。

【0090】

40

($q1$) が 2 以上であるとき、 $\text{C}(\text{R}_{31})(\text{R}_{32})$ 部分は同一又は異なる。

【0091】

さらなる実施形態及び / 又は代替実施形態において、 $L_{11 \sim 13}$ は、

- CH_2 -、- $(\text{CH}_2)_2$ -、- $(\text{CH}_2)_3$ -、- $(\text{CH}_2)_4$ -、- $(\text{CH}_2)_5$ -、- $(\text{CH}_2)_6$ -、
- $\text{O}(\text{CH}_2)_2$ -、- $\text{O}(\text{CH}_2)_3$ -、- $\text{O}(\text{CH}_2)_4$ -、- $\text{O}(\text{CH}_2)_5$ -、
- $\text{O}(\text{CH}_2)_6$ -、 $\text{CH}(\text{OH})$ -、
- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$ - CH_2CH_2 -、
- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2$ - CH_2CH_2 -、
- $\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3$ -、- $\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3$ -、

50

$-C(=O)(CH_2)_2-$ 、 $-C(=O)(CH_2)_3-$ 、
 $-CH_2-C(=O)-O(CH_2)_3-$ 、
 $-CH_2-C(=O)-NH(CH_2)_3-$ 、
 $-CH_2-OC(=O)-O(CH_2)_3-$ 、
 $-CH_2-OC(=O)-NH(CH_2)_3-$ 、
 $-(CH_2)_2-C(=O)-O(CH_2)_3-$ 、
 $-(CH_2)_2-C(=O)-NH(CH_2)_3-$ 、
 $-CH_2C(=O)O(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ 、
 $-CH_2C(=O)NH(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ 、
 $-(CH_2)_2C(=O)O(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ 、
 $-(CH_2)_2C(=O)NH(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ 、
 $-CH_2C(=O)O(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2-$ 、及び
 $-(CH_2)_2C(=O)O(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2-$

10

の中から独立に選択される。

【0092】

5. Q基

本発明によれば、Q基は一つ又は複数の置換又は非置換、飽和又は不飽和のC4～30含有部分を含有する。Q基は一つ又は複数のC4～30の飽和又は不飽和脂肪族炭化水素を含む。

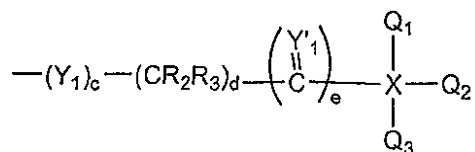
20

【0093】

Q基は、式(Ia)、

【化12】

(Ia)



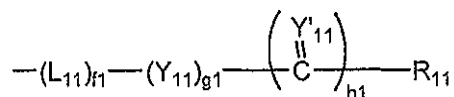
[式中、

XはC、N又はPであり、

Q₁はH、C₁～3アルキル、NR₅、OH又は

30

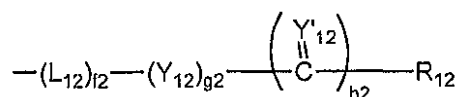
【化13】



であり、

Q₂はH、C₁～3アルキル、NR₆、OH又は

【化14】

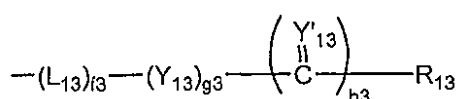


40

であり、

Q₃は孤立電子対、(=O)、H、C₁～3アルキル、NR₇、OH又は

【化15】



であり、

L₁₁、L₁₂及びL₁₃は独立に選択される二官能性スペーサーであり、

Y₁₁、Y'₁₁、Y₁₂、Y'₁₂、Y₁₃及びY'₁₃は独立にO、S又はNR₈であり、

50

R_{11} 、 R_{12} 及び R_{13} は独立に（置換又は非置換）飽和又は不飽和の C_{4-30} であり、

全ての他の変数は上に定義されたとおりであるが、

ただし、 Q は R_{11} 、 R_{12} 及び R_{13} の少なくとも一つ又は二つを含む]
により表される。

【0094】

一つの好ましい実施形態において、 R_{11} 、 R_{12} 及び R_{13} は独立に飽和又は不飽和の C_{4-30} 脂肪族炭化水素を含む。より好ましくは、各脂肪族炭化水素は、飽和又は不飽和の C_{8-24} 炭化水素（さらにより好ましくは、 C_{12-22} 炭化水素、 C_{12-22} アルキル、 C_{12-22} アルケニル、 C_{12-22} アルコキシ）である。脂肪族炭化水素の例としては、それだけに限らないが、ラウロイル（ C_{12} ）、ミリストイル（ C_{14} ）、パルミトイル（ C_{16} ）、ステアロイル（ C_{18} ）、オレオイル（ C_{18} ）及びエルコイル（ C_{22} ）、飽和又は不飽和の C_{12} アルキルオキシ、 C_{14} アルキルオキシ、 C_{16} アルキルオキシ、 C_{18} アルキルオキシ、 C_{20} アルキルオキシ及び C_{22} アルキルオキシ、並びに飽和又は不飽和の C_{12} アルキル、 C_{14} アルキル、 C_{16} アルキル、 C_{18} アルキル、 C_{20} アルキル及び C_{22} アルキルが挙げられる。

10

【0095】

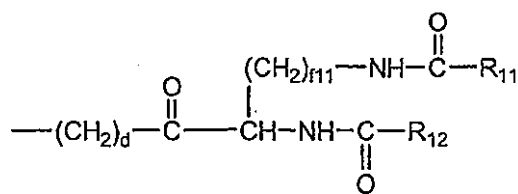
好ましくは、 R_{11} 、 R_{12} 及び R_{13} の少なくとも二つは独立に飽和又は不飽和の C_{8-24} 炭化水素（より好ましくは C_{12-22} 炭化水素）を含む。

【0096】

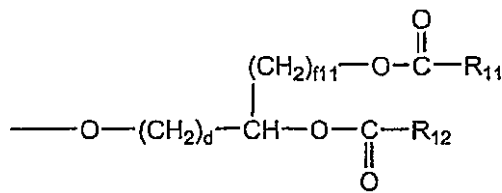
20

Q 基のいくつかの例は、次式：

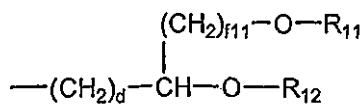
【化16】



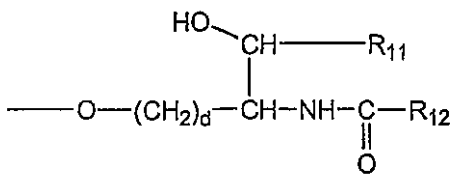
(例えば、 d は 0 であり、 f_{11} は 1 又は 4 である);



(例えば、 d は 1 であり、 f_{11} は 1 である);



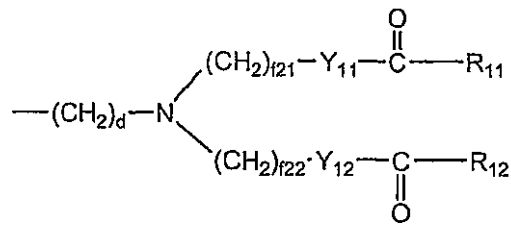
(例えば、 d は 1 であり、 f_{11} は 1 である);



(例えば、 d は 1 である);

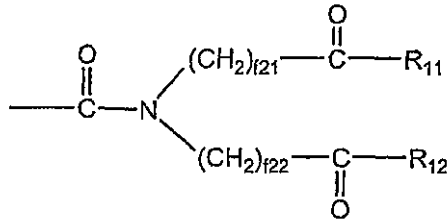
30

40

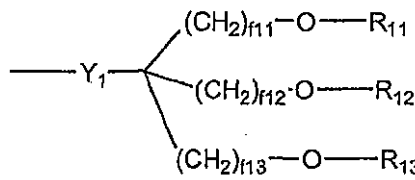


(例えば、 Y_{11} 及び Y_{12} はO又はNHであり、 $(f21)$ 及び $(f22)$ は

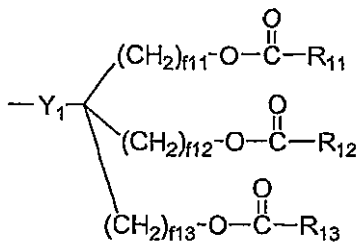
1、2又は3である);



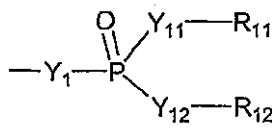
(例えば、 $(f21)$ 及び $(f22)$ は1、2又は3である);



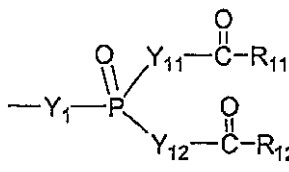
(例えば、 Y_1 はNH又はOである);



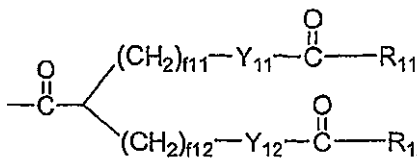
(例えば、 $(f11)$ 、 $(f12)$ 及び $(f13)$ は独立に1又は2である);



(例えば、 Y_1 、 Y_{11} 及び Y_{12} はOである);



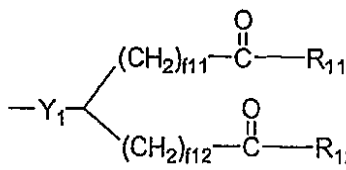
(例えば、 Y_1 、 Y_{11} 及び Y_{12} はOである)



(例えば、 $f11$ 及び $f12$ は1又は2であり、 Y_{11} 及び Y_{12} は

O又はNHである);

及び



(例えば、 $(f11)$ 及び $(f12)$ は1又は2である)

[式中、

Y_1 は O、S 又は NR_{31} 、好ましくは酸素又は NH であり、

R_{11} 、 R_{12} 及び R_{13} は独立に置換又は非置換、飽和又は不飽和の C_{4-30} (アル

10

20

30

40

50

キル、アルケニル、アルコキシ)であり、

R_{31} は水素、メチル又はエチルであり、

(d) は 0 又は正の整数、好ましくは 0 又は約 1 ~ 約 10 (例えば 1、2、3、4、5、6) の整数であり、

(f11)、(f12) 及び (f13) は独立に 0、1、2、3 又は 4 であり、

(f21) 及び (f22) は独立に 1、2、3 又は 4 である]

により表される。

【0097】

ある種の実施形態において、Q 基は、ジアシルグリセロール、ジアシルグリカミド、ジアルキルプロピル、ホスファチジルエタノールアミン又はセラミドを含む。適切なジアシルグリセロール又はジアシルグリカミドは、約 C_4 ~ 約 C_{30} 、好ましくは約 C_8 ~ 約 C_{24} の飽和又は不飽和の炭素原子を独立に含有するアルキル鎖長を有する、ジアルキルグリセロール基又はジアルキルグリカミド基を含む。ジアルキルグリセロール基又はジアルキルグリカミド基は、一つ又は複数の置換アルキル基をさらに含むことができる。

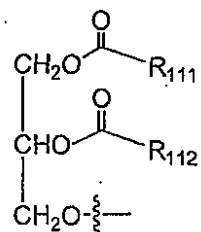
10

【0098】

本明細書で使用する「ジアシルグリセロール」(DAG) という用語は、二つの脂肪アシル鎖 R_{111} 及び R_{112} を有する化合物を指す。 R_{111} 及び R_{112} は、同一又は異なる約 4 ~ 約 30 個 (好ましくは約 8 ~ 約 24 個) の炭素を有し、エステル結合によりグリセロールに結合している。アシル基は、飽和であってもよく、又は様々な不飽和度を含む不飽和であってもよい。DAG は次の一般式:

20

【化17】



を有する。

【0099】

DAG の例は、ジラウリルグリセロール (C_{12})、ジミリスチルグリセロール (C_{14} 、DMG)、ジパルミトイルグリセロール (C_{16} 、DPG)、ジステアリルグリセロール (C_{18} 、DSG)、ジオレオイルグリセロール (C_{18})、ジエルコイル (C_{22})、ジラウリルグリカミド (C_{12})、ジミリスチルグリカミド (C_{14})、ジパルミトイルグリカミド (C_{16})、ジステリルグリカミド (C_{18})、ジオレオイルグリカミド (C_{18})、ジエルコイルグリカミド (C_{22}) の中から選択できる。当業者であれば、他のジアシルグリセロールも企図されることを容易に認識されよう。

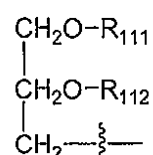
30

【0100】

「ジアルキルオキシプロピル」という用語は、二つのアルキル鎖 R_{111} 及び R_{112} を有する化合物を指す。 R_{111} 及び R_{112} アルキル基は、同一又は異なる約 4 ~ 約 30 個 (好ましくは約 8 ~ 約 24 個) の炭素を含む。アルキル基は、飽和であってもよく、又は様々な不飽和度を有していてもよい。ジアルキルオキシプロピルは次の一般式:

40

【化18】



[式中、 R_{111} 及び R_{112} アルキル基は約 4 ~ 約 30 個 (好ましくは約 8 ~ 約 24 個) の炭素を有する同一又は異なるアルキル基である] を有する。アルキル基は、飽和であ

50

ってもよく、又は不飽和であってもよい。適切なアルキル基としては、それだけに限らないがラウリル（C 1 2）、ミリスチル（C 1 4）、パルミチル（C 1 6）、ステアリル（C 1 8）及びオレオイル（C 1 8）及びイコシル（C 2 0）が挙げられる。

【 0 1 0 1 】

一実施形態において、 R_{111} 及び R_{112} はいずれも同一である。即ち、 R_{111} 及び R_{112} はいずれもミリスチル（C 1 4）又はいずれもオレオイル（C 1 8）等である。別の実施形態において、 R_{111} 及び R_{112} は異なる。即ち、 R_{111} はミリスチル（C 1 4）であり、 R_{112} はステアリル（C 1 8）である。

【 0 1 0 2 】

別の実施形態において、Q基は、ホスファチジルエタノールアミン（PE）を含むことができる。放出可能融合性脂質の結合に有用なホスファチジルエタノールアミンは、約4～約30個（好ましくは約8～約24個）の炭素の範囲の炭素鎖長を有する飽和又は不飽和の脂肪酸を含有できる。適切なホスファチジルエタノールアミンとしては、それだけに限らないがジミリスチルホスファチジルエタノールアミン（DMPE）、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）及びジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）が挙げられる。

10

【 0 1 0 3 】

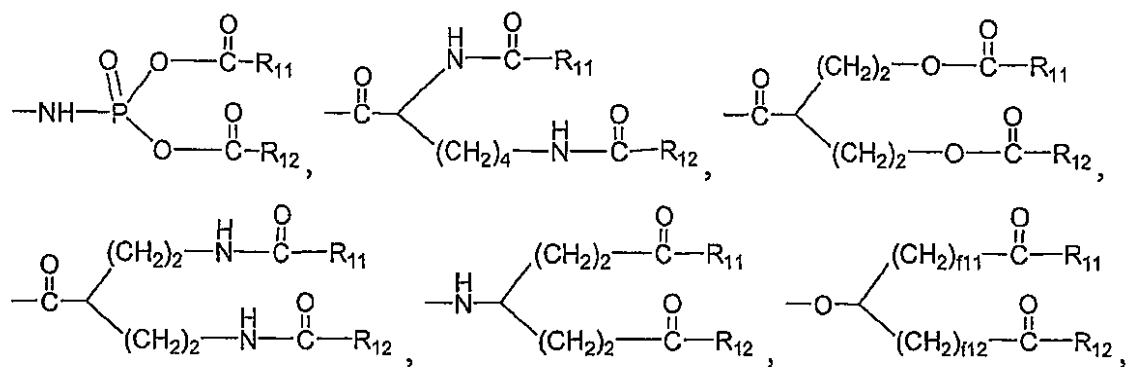
さらに別の実施形態において、Q基は、セラミド（Cer）を含むことができる。セラミドは、一つだけアシル基を有する。セラミドは、約4～約30個（好ましくは約8～約24個）の炭素の範囲の炭素鎖長を有する飽和又は不飽和の脂肪酸を有することができる。

20

【 0 1 0 4 】

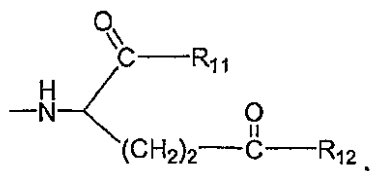
一つの好ましい実施形態は、

[illegible]



10

及び



【0105】

[式中、 $R_{11} \sim R_{13}$ は独立に同一又は異なる $C_{12} \sim C_{22}$ の飽和又は不飽和の脂肪族炭素原子、例えばジラウリル (C_{12})、ジミリスチル (C_{14})、ジパルミトイル (C_{16})、ジステアリル (C_{18})、ジオレオイル (C_{18}) 及びジエルコイル (C_{22}) であり、

20

(f_{11})、(f_{12}) 及び (f_{13}) は独立に 0、1、2、3 又は 4 であり、

(f_{21}) 及び (f_{22}) は独立に 1、2、3 又は 4 である]

を含む。

【0106】

B. 式 (I) の放出可能融合性脂質の調製

代表的な特定の化合物の合成を実施例に示す。しかし、一般に、本発明の化合物は、いくつかの方式で調製できる。本発明によれば、本明細書に記載の式 (I) の化合物を調製する方法は、アミン含有化合物とアルデヒド含有化合物とを反応させて、イミン部分を有する融合性脂質を得ることを含む。アミンは第 1 級アミンであってよく、アルデヒドは脂肪族置換基又は芳香族置換基をさらに含有できる。

30

【0107】

融合性脂質の調製の一つの代表例は図 1 及び図 2 に示されている。最初に、カップリング剤、例えば EDC 又は DIPC の存在下で、脂質を求核多官能性リンカー (化合物 1) と結合させて化合物 2 を得る。反応は、不活性溶媒、例えば塩化メチレン、クロロホルム、トルエン、DMF 又はそれらの混合物中で行われることが好ましい。反応は、塩基、例えば DMAP、DIEA、ピリジン、トリエチルアミン等の存在下で、 $-4 \sim 約 70$ (例えば、 $-4 \sim 約 50$) の温度で行われることも好ましい。一つの好ましい実施形態において、反応は、 $0 \sim 約 25$ 又は $0 \sim ほぼ室温$ の温度で行われる。

40

【0108】

化合物 2 の末端官能基を、二官能性リンカー、例えば化合物 4 とさらに結合させ、次いでアミン保護基を除去し、末端アミンを有する脂質化合物 (化合物 6) を得る。

【0109】

両性イオン部分を含む化合物、例えば、Fmoc-Lys(OMe)-NH₂ を、二官能性リンカー、例えば化合物 7 と反応させて、保護アルデヒドを有する化合物 8 を得る。アルデヒド保護基を除去する。化合物 9 のアルデヒドをアミン含有脂質 (化合物 6) と脱水条件下で反応させて、次いでアミン保護基を除去し、鹼化させて、イミン結合を含む融合性脂質を得る。

【0110】

求核多官能性リンカーへの脂質の結合は、当業者に公知のカップリング剤、例えば 1,

50

3 - ジイソプロピルカルボジイミド (DIPC)、ジアルキルカルボジイミド、2 - ハロ - 1 - アルキルピリジニウムハロゲン化物、1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド (EDC)、プロパンホスホン酸環状無水物 (PPACA) 及びフェニルジクロロホスフェートを用いて、塩基の存在下で標準的な有機合成法を用いて行うことができる。さらに、イミン結合の形成は、分子篩、共沸、酸触媒脱水等の脱水の標準的な有機合成法を用いて行うことができる。

【0111】

別の実施形態において、NHS エステル又は PNP エステル等の活性化された脂質酸を使用して、求核多官能性リンカー、例えば化合物 1 と反応させてもよい。

【0112】

あるいは、脂質が NHS 又は PNP 等の離脱基で活性化される場合、カップリング剤は必要なく、反応は塩基の存在下で進められる。

【0113】

アミン含有化合物からの保護基の除去は、強酸、例えばトリフルオロ酢酸 (TFA)、HCl、硫酸等、又は接触水素化、ラジカル反応等により行うことができる。あるいは、Fmoc 等のアミン保護基の除去は、ピペリジン又は DMAPI 等の塩基により行うことができる。一つの好ましい実施形態において、Boc 基の脱保護は、ジオキサン中の HCl 溶液で行われる。脱保護反応は、-4 ~ 約 50 の温度で行うことができる。好ましくは、反応は 0 ~ 約 25 又は室温の温度で行われる。より好ましい実施形態において、Boc 基の脱保護は室温で行われる。

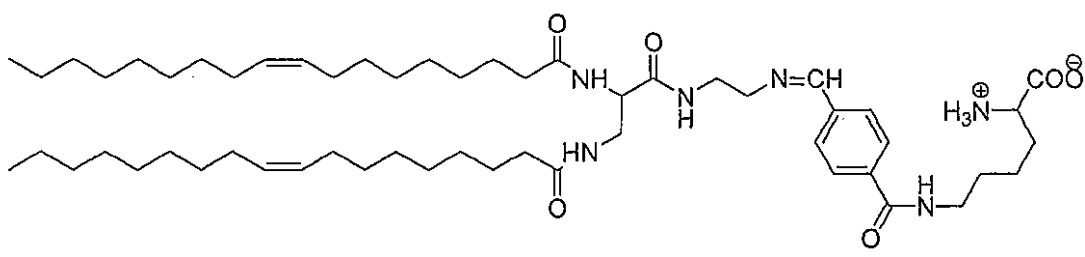
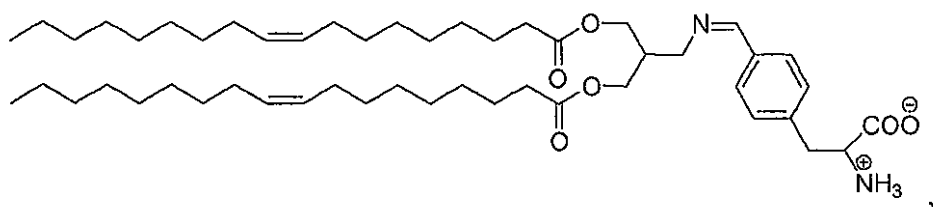
【0114】

例えば、本明細書に記載の方法により調製される化合物は、

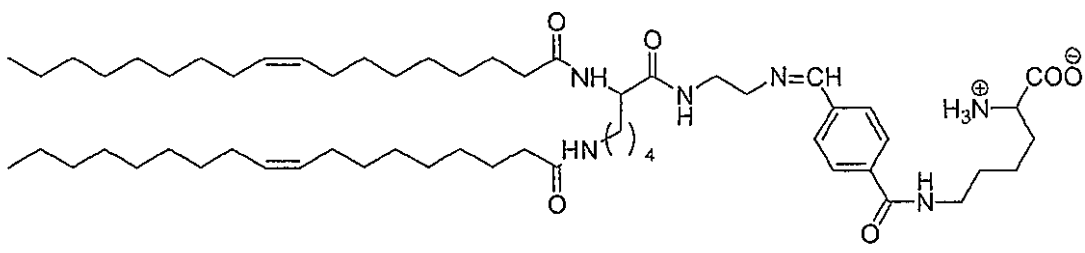
10

20

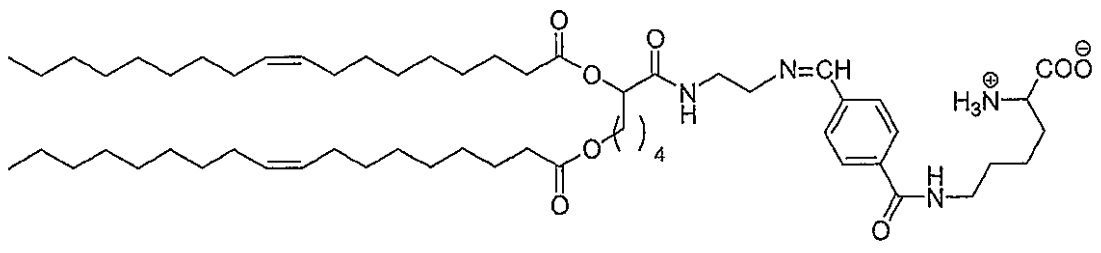
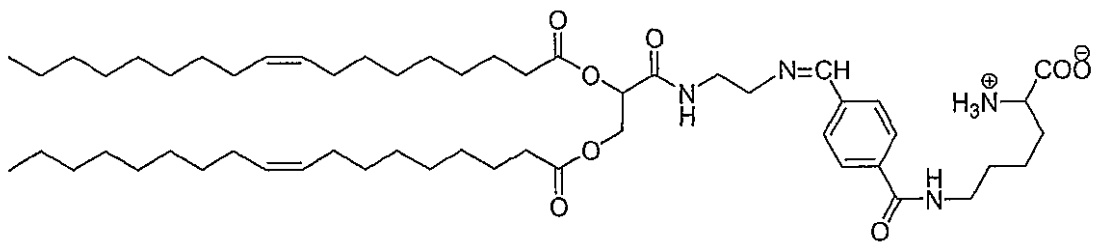
【化 20】



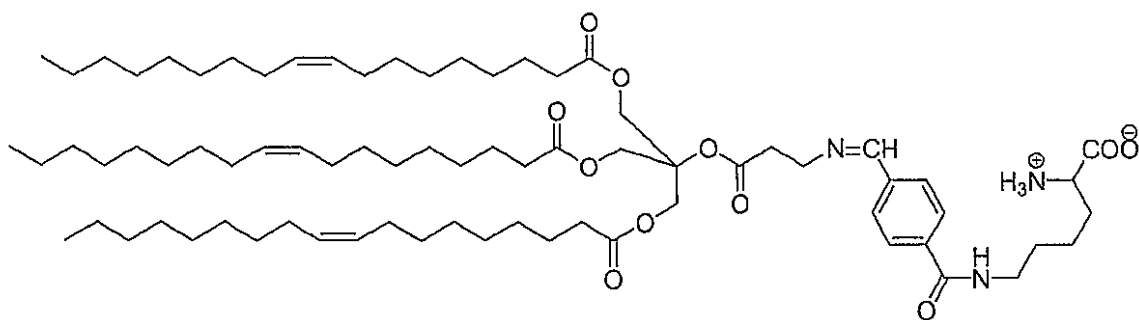
10



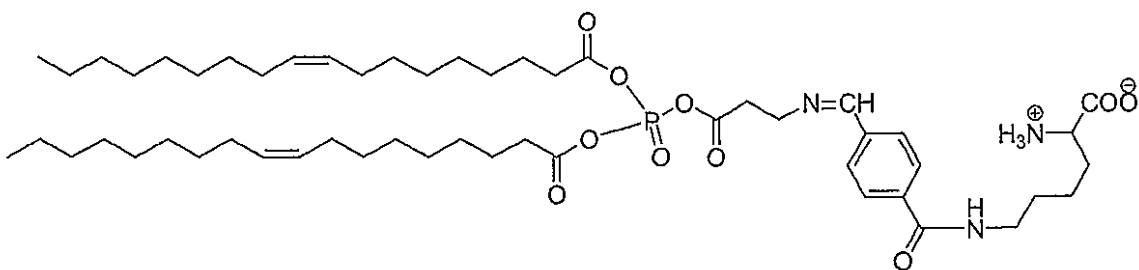
20



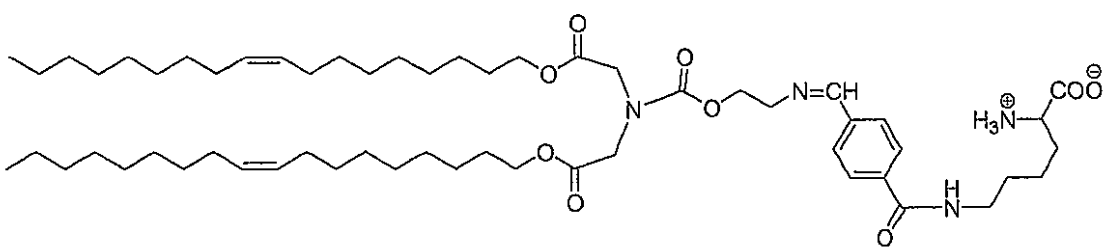
30



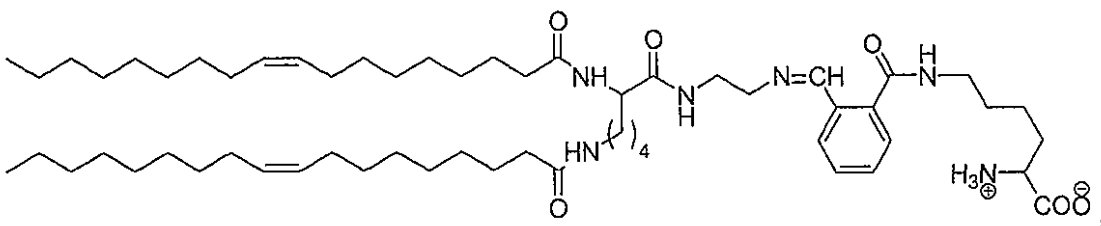
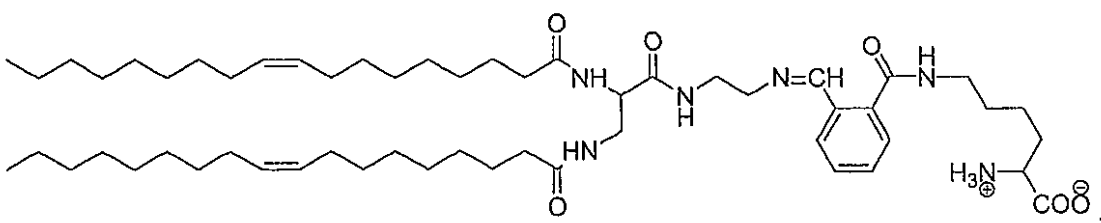
10

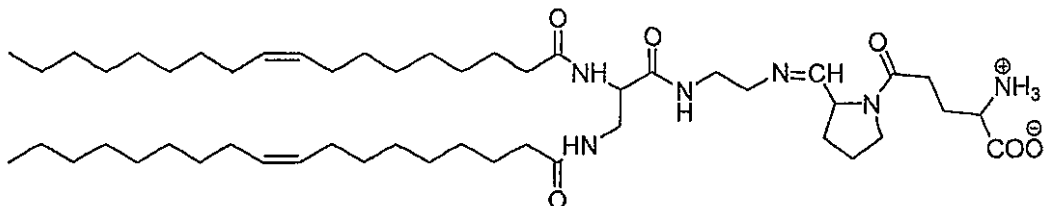
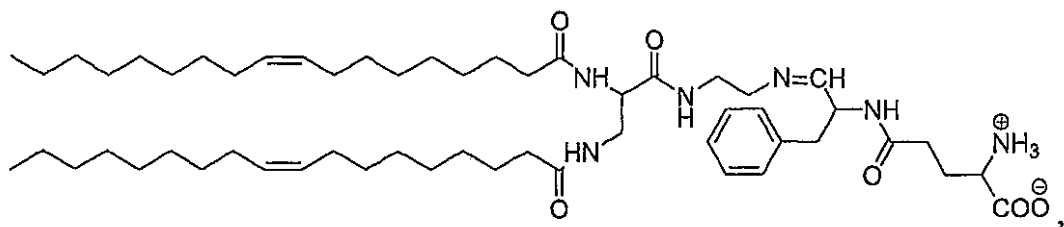


20

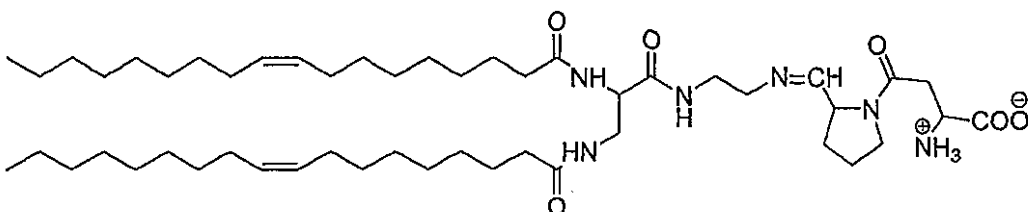


30





, 及び



10

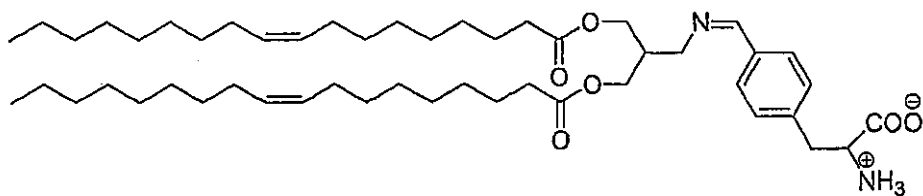
20

を含む。

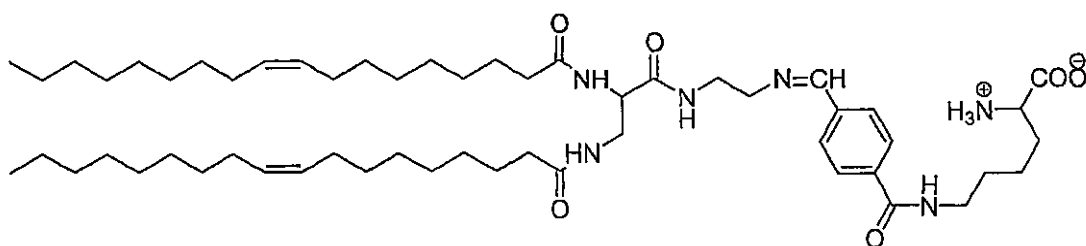
【 0 1 1 5 】

好ましくは、式 (I) の放出可能融合性脂質は、

【 化 2 1 】



又は



30

を含む。

【 0 1 1 6 】

C . ナノ粒子組成物

1 . 概要

本発明の一つにおいて、核酸の送達のための式 (I) の放出可能融合性脂質を含有するナノ粒子組成物が提供される。

40

【 0 1 1 7 】

本発明によれば、ナノ粒子組成物はカチオン性脂質、式 (I) の放出可能融合性脂質及び P E G 脂質を含有する。

【 0 1 1 8 】

本発明の一つの好ましい態様において、ナノ粒子組成物はコレステロールを含む。

【 0 1 1 9 】

本発明のさらなる態様において、本明細書に記載のナノ粒子組成物は、当技術分野で公知の融合性脂質 (非カチオン性脂質) を含有できる。カチオン性脂質の混合物、異なる融

50

合性脂質の混合物及び／又は異なる任意選択のPEG脂質の混合物を含有するナノ粒子組成物も企図される。

【0120】

別の好ましい態様において、ナノ粒子組成物は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質の約10%～約99.9%の範囲のモル比でカチオン性脂質を含有する。

【0121】

カチオン性脂質成分は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質の約2%～約60%、約5%～約50%、約10%～約45%、約15%～約25%又は約30%～約40%の範囲であってよい。

【0122】

一つの好ましい実施形態において、カチオン性脂質は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質の約15%～約25%（即ち15、17、18、20又は25%）の量で存在する。

【0123】

本発明によれば、ナノ粒子組成物は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質の約20%～約85%、約25%～約85%、約60%～約80%（例えば65、75、78又は80%）のモル比で、コレステロール系及び／又は非コレステロール系融合性脂質を含む、総融合性脂質（好ましくは本明細書に記載の放出可能融合性脂質）を含有する。一つの好ましい実施形態において、総融合性／非カチオン性脂質は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質の約80%である。

【0124】

ある種の実施形態において、非コレステロール系融合性／非カチオン性脂質は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質の約25%～約78%（25、35、47、60又は78%）又は約60～約78%のモル比で存在する。一実施形態において、非コレステロール系融合性／非カチオン性脂質は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質の約60%である。

【0125】

ある種の実施形態において、ナノ粒子組成物は、非コレステロール融合性脂質に加えて、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質の約0%～約60%、約10%～約60%又は約20%～約50%（例えば20、30、40又は50%）の範囲のモル比でコレステロールを含む。一実施形態において、コレステロールは、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質の約20%である。

【0126】

ある種の実施形態において、ナノ粒子組成物中に含有されるPEG脂質は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質の約0.5%～約20%、約1.5%～約18%のモル比の範囲である。ナノ粒子組成物の一実施形態において、PEG脂質は、総脂質の約2%～約10%（例えば2、3、4、5、6、7、8、9又は10%）のモル比で含まれる。例えば、総PEG脂質は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質の約2%である。

【0127】

本発明の目的のために、ナノ粒子組成物中に含有される放出可能融合性脂質の量は、ナノ粒子組成物中に存在する場合、本明細書に記載の放出可能融合性脂質単独の量、又は式（I）の放出可能融合性脂質と任意の追加の当技術分野で公知の融合性脂質（放出可能又は放出不可能のいずれか）との総量を意味すると理解されるものとする。

【0128】

2. 式（I）の放出可能融合性脂質及び任意選択の当技術分野で公知の融合性／非カチオン性脂質

本発明によれば、本明細書に記載のナノ粒子組成物は、式（I）の放出可能融合性脂質を含有する。任意の理論に拘束されずに、式（I）の放出可能融合性脂質は、ナノ粒子中に封入された核酸のエンドソームからの放出、及びナノ粒子が細胞に侵入した後、ナノ粒子からの放出を促す。

【0129】

本発明のさらなる態様において、本明細書に記載のナノ粒子組成物は、追加の当技術分

10

20

30

40

50

野で公知の融合性脂質を含むことができる。ナノ粒子組成物で有用な追加の適切な当技術分野で公知の融合性脂質としては、中性の融合性 / 非カチオン性脂質又はアニオン性融合性脂質が挙げられる。

【 0 1 3 0 】

中性脂質としては、選択された pH、好ましくは生理学的 pH で非荷電又は中性いずれかの両性イオン形態で存在する脂質が挙げられる。このような当技術分野で公知の融合性脂質の例としては、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、コレステロール、セレブロシド及びジアシルグリセロールが挙げられる。

【 0 1 3 1 】

アニオン性脂質としては、生理学的 pH で負に帯電した脂質が挙げられる。これらの脂質としては、それだけに限らないが、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、N - ドデカノイルホスファチジルエタノールアミン、N - スクシニルホスファチジルエタノールアミン、N - グルタリルホスファチジルエタノールアミン、リジルホスファチジルグリセロール、パルミトイルオレイオイルホスファチジルグリセロール (P O P G) 及び他のアニオン性修飾基で修飾された中性脂質が挙げられる。

【 0 1 3 2 】

多くの当技術分野で公知の融合性脂質としては、疎水性部分及び極性頭部基を一般に有する両親媒性脂質が挙げられ、水溶液中でベシクルを形成できる。

【 0 1 3 3 】

企図される融合性脂質としては、天然及び合成のリン脂質及び関連の脂質が挙げられる。

【 0 1 3 4 】

非カチオン性脂質の非限定的リストは、リン脂質及び非リン脂質関連物質、例えばレシチン、リゾレシチン、ジアシルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンイノシトール、スフィンゴミエリン、セファリン、セラミド、カルジオリピン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、セレブロシド、ジセチルホスフェート、

- 1 , 2 - ジラウロイル - s n - グリセロール (D L G) ;
- 1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロール (D M G) ;
- 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロール (D P G) ;
- 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロール (D S G) ;
- 1 , 2 - ジラウロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジン酸 (D L P A) ;
- 1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジン酸 (D M P A) ;
- 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジン酸 (D P P A) ;
- 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジン酸 (D S P A) ;
- 1 , 2 - ジアラキドイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D A P C) ;
- 1 , 2 - ジラウロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D L P C) ;
- 1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D M P C) ;
- 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (D P e P C) ;
- 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン又はジパルミトイルホスファチジルコリン又はジパルミトイルホスファチジルコリン (D P P C) ;
- 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン又はジステアロイルホスファチジルコリン又はジステアロイルホスファチジルコリン (D S P C) ;
- 1 , 2 - ジラウロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (D L P E) ;
- 1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン又はジミリストイルホスホエタノールアミン (D M P E) ;
- 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン又はジパルミト

10

20

30

40

50

イルホスファチジル - エタノールアミン (D P P E) ;
 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン又はジステアロ
 イルホスファチジル - エタノールアミン (D S P E) ;
 1 , 2 - ジラウロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (D L P G) ;
 1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (D M P G) ;
 1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホ - s n - 1 - グリセロール (D M
 P - s n - 1 - G) ;
 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール又はジパルミトイル
 ホスファチジルグリセロール (D P P G) ;
 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (D S P G) ; 10
 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホ - s n - 1 - グリセロール (D S
 P - s n - 1 - G) ;
 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリン (D P P S) ;
 1 - パルミトイル - 2 - リノレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (P L i n o
 P C) ;
 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン又はパルミトイ
 ルオレオイルホスファチジルコリン (P O P C) ;
 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (P O P
 G) ;
 1 - パルミトイル - 2 - l y s o - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (P - l y s o - 20
 P C) ;
 1 - ステアロイル - 2 - l y s o - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (S - l y s o -
 P C) ;
 1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン又はジオレオイル
 ホスファチジルエタノールアミン (D O P E) ;
 ジフィタノイルホスファチジルエタノールアミン (D P h P E) ;
 1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン又はジオレオイルホスファチ
 ジルコリン又はジオレオイルホスファチジルコリン (D O P C) ; 及び
 1 , 2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D P h P C) 、
 ジオレオイルホスファチジルグリセロール (D O P G) ; 30
 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 (P O P E) ;
 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 (D O P E - m a l) ;
 1 6 - O - モノメチル P E ;
 1 6 - O - ジメチル P E ;
 1 8 - 1 - t r a n s P E ; 1 - ステアロイル - 2 - オレオイル - ホスファチジエタノ
 ールアミン (S O P E) ;
 1 , 2 - ジエライドイル - s n - グリセロ - 3 - ホホエタノールアミン (t r a n s D O
 P E) ; それらの薬学的に許容される塩及び混合物の中から選択される。融合性脂質の詳細
 は、米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 2 9 3 4 4 9 号明細書及び第 2 0 0 6 / 0 0 5 1 40
 4 0 5 号明細書に記載されている。

【 0 1 3 5 】

非カチオン性脂質としては、ステロール又はステロイドアルコール、例えばコレステロ
ールが挙げられる。

【 0 1 3 6 】

追加の非カチオン性脂質としては、例えば、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキ
 サデシルアミン、アセチルパルミテート、グリセロールリシノレート、ヘキサデシルステ
 アレート、イソプロピルミリステート、両性アクリルポリマー、トリエタノールアミンラ
 ウリルサルフェート、アルキルアリアルサルフェートポリエチルオキシ化脂肪酸アミド
 及びジオクタデシルジメチルアンモニウムブロミドがある。 50

【 0 1 3 7 】

企図されるアニオン性脂質としては、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルコリン、血小板活性化因子 (P A F)、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジル - D L - グリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルイノシトール、カルジオリピン、リゾホスファチジド、水素化リン脂質、スフィンゴ脂質、ガングリオシド、フィトスフィンゴシン、スフィンガニン、それらの薬学的に許容される塩及び混合物が挙げられる。

【 0 1 3 8 】

本明細書に記載のナノ粒子組成物の調製に有用な適切な非カチオン性脂質としては、ジアシルホスファチジルコリン (例えば、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン及びジリノレオイルホスファチジルコリン)、ジアシルホスファチジルエタノールアミン (例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン及び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)、セラミド又はスフィンゴミエリンが挙げられる。これらの脂質中のアシル基は、飽和及び不飽和の炭素鎖を有する脂肪酸、例えばリノイル、イソステアリル、オレイル、エライジル、ペトロセリニル、リノレニル、エレオステアリル、アラキジル、ミリストイル、パルミトイル及びラウロイルであることが好ましい。アシル基は、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル又はオレオイルであることがより好ましく、飽和及び不飽和の $C_8 \sim C_{30}$ (好ましくは $C_{10} \sim C_{24}$) 炭素鎖を有する脂肪酸であることがより好ましい。

【 0 1 3 9 】

本明細書に記載のナノ粒子組成物で有用な様々なホスファチジルコリンとしては、
 1, 2 - ジデカノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D D P C、 $C_{10} : 0$ 、 $C_{10} : 0$) ;
 1, 2 - ジラウロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D L P C、 $C_{12} : 0$ 、 $C_{12} : 0$) ;
 1, 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D M P C、 $C_{14} : 0$ 、 $C_{14} : 0$) ;
 1, 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D P P C、 $C_{16} : 0$ 、 $C_{16} : 0$) ;
 1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D S P C、 $C_{18} : 0$ 、 $C_{18} : 0$) ;
 1, 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D O P C、 $C_{18} : 1$ 、 $C_{18} : 1$) ;
 1, 2 - ジエルコイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D E P C、 $C_{22} : 1$ 、 $C_{22} : 1$) ;
 1, 2 - ジエイコサペンタエノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (E P A - P C、 $C_{20} : 5$ 、 $C_{20} : 5$) ;
 1, 2 - ジドコサヘキサエノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D H A - P C、 $C_{22} : 6$ 、 $C_{22} : 6$) ;
 1 - ミリストイル - 2 - パルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (M P P C、 $C_{14} : 0$ 、 $C_{16} : 0$) ;
 1 - ミリストイル - 2 - ステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (M S P C、 $C_{14} : 0$ 、 $C_{18} : 0$) ;
 1 - パルミトイル - 2 - ステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (P M P C、 $C_{16} : 0$ 、 $C_{14} : 0$) ;
 1 - パルミトイル - 2 - ステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (P S P C、 $C_{16} : 0$ 、 $C_{18} : 0$) ;
 1 - ステアロイル - 2 - ミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (S M P C、 $C_{18} : 0$ 、 $C_{14} : 0$) ;

1 - ステアロイル - 2 - パルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (S P P C、C 1 8 : 0、C 1 6 : 0) ;
 1 , 2 - ミリス托イル - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (M O P C、C 1 4 : 0、C 1 8 : 0) ;
 1 , 2 - パルミトイル - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (P O P C、C 1 6 : 0、C 1 8 : 1) ;
 1 , 2 - ステアロイル - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (P O P C、C 1 8 : 0、C 1 8 : 1)、それらの薬学的に許容される塩及び混合物が挙げられる。

【 0 1 4 0 】

本明細書に記載のナノ粒子組成物で有用な様々なリゾホスファチジルコリンとしては、
 1 - ミリス托イル - 2 - l y s o - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (M - L y s o P C、C 1 4 : 0) ;
 1 - パルミトイル - 2 - l y s o - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (P - L y s o P C、C 1 6 : 0) ;
 1 - ステアロイル - 2 - l y s o - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (S - L y s o P C、C 1 8 : 0)、それらの薬学的に許容される塩及び混合物が挙げられる。

【 0 1 4 1 】

本明細書に記載のナノ粒子組成物で有用な様々なホスファチジルグリセロールとしては、
 水素化大豆ホスファチジルグリセロール (H S P G) ;
 非水素化卵ホスファチジルグリセロール (E P G) ;
 1 , 2 - ジミリス托イル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (D M P G、C 1 4 : 0、C 1 4 : 0) ;
 1 , 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (D P P G、C 1 6 : 0、C 1 6 : 0) ;
 1 , 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (D S P G、C 1 8 : 0、C 1 8 : 0) ;
 1 , 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (D O P G、C 1 8 : 1、C 1 8 : 1) ;
 1 , 2 - ジエルコイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (D E P G、C 2 2 : 1、C 2 2 : 1) ;
 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (P O P G、C 1 6 : 0、C 1 8 : 1)、それらの薬学的に許容される塩及び混合物の中から選択される。

【 0 1 4 2 】

本明細書に記載のナノ粒子組成物で有用な様々なホスファチジン酸としては、
 1 , 2 - ジミリス托イル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジン酸 (D M P A、C 1 4 : 0、C 1 4 : 0) ;
 1 , 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジン酸 (D P P A、C 1 6 : 0、C 1 6 : 0) ;
 1 , 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジン酸 (D S P A、C 1 8 : 0、C 1 8 : 0)、それらの薬学的に許容される塩及び混合物が挙げられる。

【 0 1 4 3 】

本明細書に記載のナノ粒子組成物で有用な様々なホスファチジリエタノールアミンとしては、
 水素化大豆ホスファチジリエタノールアミン (H S P E) ;
 非水素化卵ホスファチジリエタノールアミン (E P E) ;
 1 , 2 - ジミリス托イル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (D M P E、C 1 4 : 0、C 1 4 : 0) ;

10

20

30

40

50

1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DPPE、C 16 : 0、C 16 : 0) ;

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 (DSPE、C 18 : 0、C 18 : 0) ;

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、C 18 : 1、C 18 : 1) ;

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 (DEPE、C 22 : 1、C 22 : 1) ;

1, 2 - ジエルコイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (POPE、C 16 : 0、C 18 : 1)、それらの薬学的に許容される塩及び混合物が挙げられる。

10

【0144】

本明細書に記載のナノ粒子組成物で有用な様々なホスファチジルセリンとしては、

1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリン (DMPS、C 14 : 0、C 14 : 0) ;

1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリン (DPPS、C 16 : 0、C 16 : 0) ;

1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリン (DSPS、C 18 : 0、C 18 : 0) ;

1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリン (DOPS、C 18 : 1、C 18 : 1) ;

20

1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - 3 - ホスホ - L - セリン (POPS、C 16 : 0、C 18 : 1)、それらの薬学的に許容される塩及び混合物が挙げられる。

【0145】

一つの好ましい実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子組成物の調製に有用な適切な中性脂質としては、例えば、

ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、

ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE)、

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)、

卵ホスファチジルコリン (EPC)、

ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、

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)、

パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC)、

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グリセロール (DOPG)、

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 - mal)、コレステロール、それらの薬学的に許容される塩及び混合物が挙げられる。

30

【0146】

ある種の好ましい実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子組成物は、DSPC、EPC、DOPE等及びそれらの混合物を含む。

40

【0147】

本発明のさらなる態様において、ナノ粒子組成物は、ステロール等の非カチオン性脂質を含有する。ナノ粒子組成物は、好ましくはコレステロール又はその類似体、より好ましくはコレステロールを含有する。

【0148】

3. カチオン性脂質

本発明によれば、本明細書に記載のナノ粒子組成物は、カチオン性脂質を含むことができる。企図される適切な脂質としては、例えば、

N - [1 - (2, 3 - ジオレオイルオキシ) プロピル] - N, N, N - トリメチルアンモ

50

ニウムクロリド (DOTMA) ;

1, 2 - ビス (オレオイルオキシ) - 3 - 3 - (トリメチルアンモニウム) プロパン又は
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) ;

1, 2 - ビス (ジミルストイルオキシ) - 3 - 3 - (トリメチルアンモニア) プロパン (DMTAP) ;

1, 2 - ジミリスチルオキシプロピル - 3 - ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムプロ
ミド又は 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プロミド (DMRIE) ;

ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド又は N, N - ジステアシル - N, N - ジメ
チルアンモニウムプロミド (DDAB) ;

3 - (N - (N', N' - ジメチルアミノエタン) カルバモイル) コレステロール (DC
- コレステロール) ;

3 - [N', N' - ジグアニジノエチル - アミノエタン) カルバモイルコレステロール
(BGTC) ;

2 - (2 - (3 - (ビス (3 - アミノプロピル) アミノ) プロピルアミノ) アセトアミド
) - N, N - ジテトラデシルアセトアミド (RPR209120) ;

1, 2 - ジアルケノイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (即ち、1, 2 - ジ
オレオイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン、1, 2 - ジステアロイル - sn
- グリセロ - 3 - エチルホスホコリン及び 1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3
- エチルホスホコリン) ;

テトラメチルテトラパルミトイルスペルミン (TMTPS) ;

テトラメチルテトラオレイルスぺルミン (TMTOS) ;

テトラメトリテトララウリルスぺルミン (TMTLS) ;

テトラメチルテトラミリスチルスぺルミン (TMTMS) ;

テトラメチルジオレイルスぺルミン (TMDOS) ;

2, 5 - ビス (3 - アミノプロピルアミノ) - N - (2 - (ジオクタデシルアミノ) - 2
- オキシエチル) ペンタンアミド (DOGS) ;

2, 5 - ビス (3 - アミノプロピルアミノ) - N - (2 - (ジ (Z) - オクタデカ - 9 -
ジエニルアミノ) - 2 - オキシエチル) ペンタンアミド (DOGS - 9 - エン) ;

2, 5 - ビス (3 - アミノプロピルアミノ) - N - (2 - (ジ (9Z, 12Z) - オクタ
デカ - 9, 12 - ジエニルアミノ) - 2 - オキシエチル) ペンタンアミド (DLINGS
) ;

N4 - スペルミンコレステリルカルバメート (GL - 67) ;

(9Z, 9'Z) - 2 - (2, 5 - ビス (3 - アミノプロピルアミノ) ペンタンアミド)
プロパン - 1, 3 - ジイル - ジオクタデカ - 9 - エノエート (DOSPER) ;

2, 3 - ジオレイルオキシ - N - [2 (スペルミンカルボキサミド) エチル] - N, N -
ジメチル - 1 - プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA) ;

1, 2 - ジミリストイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン ; 1, 2 - ジステアロ
イル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン ;

ジオクタデシルジメチルアンモニウム (DODMA) ;

ジステアシルジメチルアンモニウム (DSDMA) ;

N, N - ジオレイル - N, N - ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC) ; それらの
薬学的に許容される塩及び混合物が挙げられる。

【0149】

カチオン性脂質の詳細は米国特許出願公開第 2007/0293449 号明細書及び米
国特許第 4, 897, 355 号明細書、第 5, 279, 833 号明細書、第 6, 733,
777 号明細書、第 6, 376, 248 号明細書、第 5, 736, 392 号明細書、第 5
, 686, 958 号明細書、第 5, 334, 761 号明細書、第 5, 459, 127 号明
細書、第 2005/0064595 号明細書、第 5, 208, 036 号明細書、第 5, 2

10

20

30

40

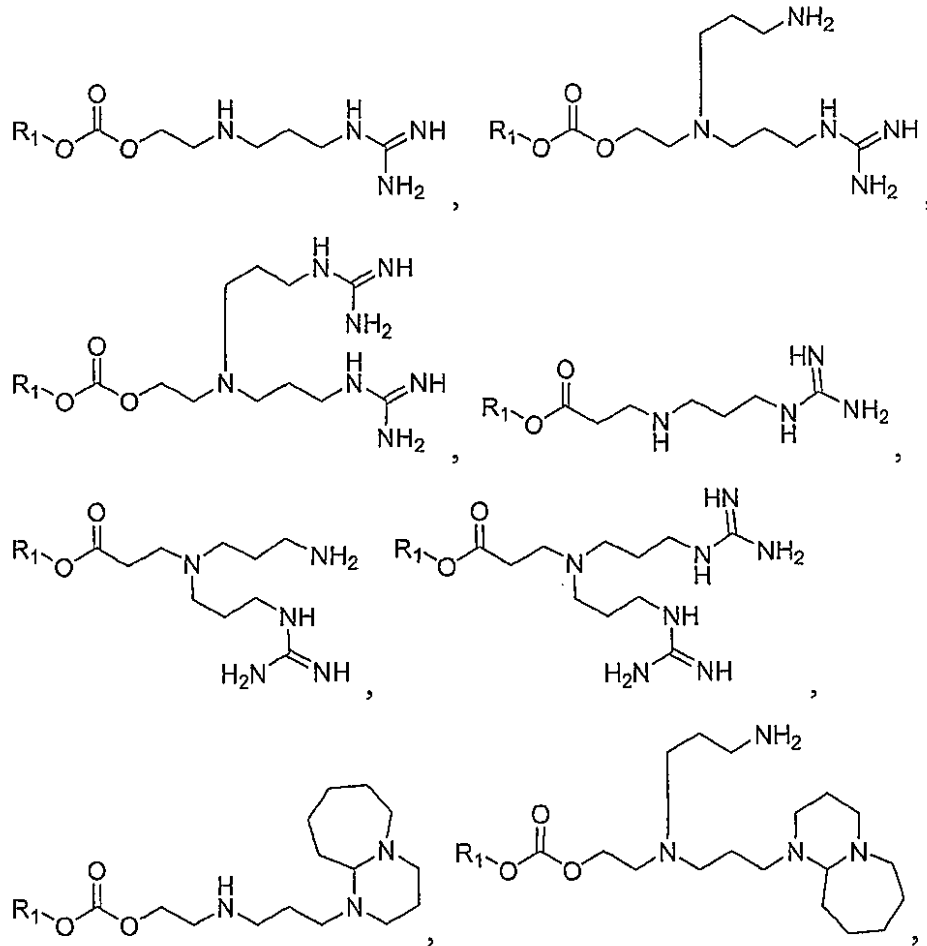
50

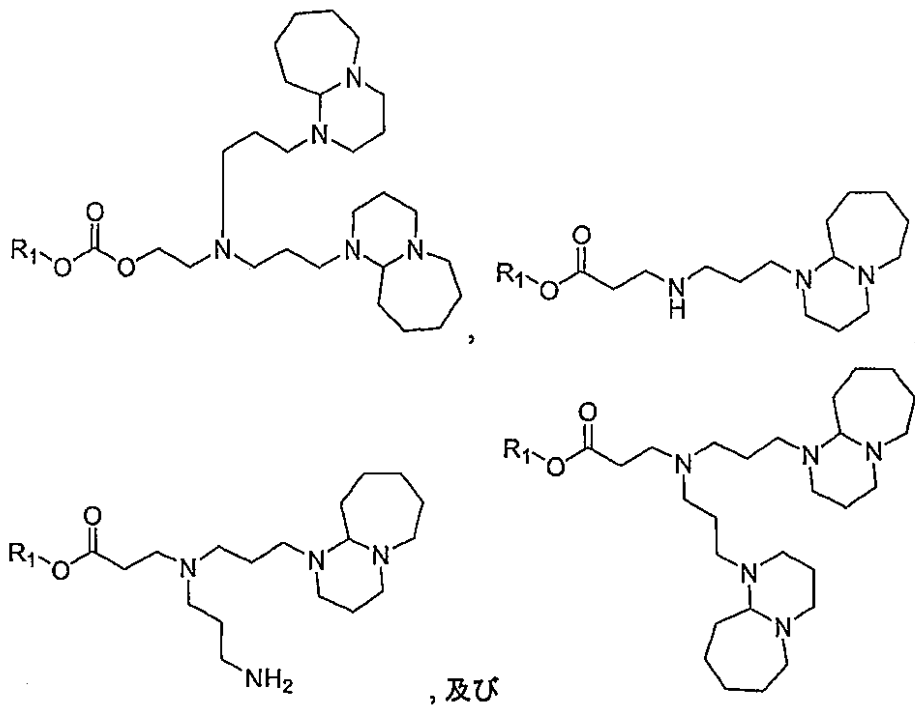
64, 618号明細書、第5, 279, 833号明細書、第5, 283, 185号明細書、第5, 753, 613号明細書及び第5, 785, 992号明細書にも記載されている。

【0150】

一つの好ましい態様において、カチオン性脂質は、選択されたpH、例えばpH<13（例えばpH6~12、pH6~8）で正味の正電荷を担持するであろう。ナノ粒子組成物の一つの好ましい実施形態は、次の構造式を有する本明細書に記載のカチオン性脂質

【化22】





10

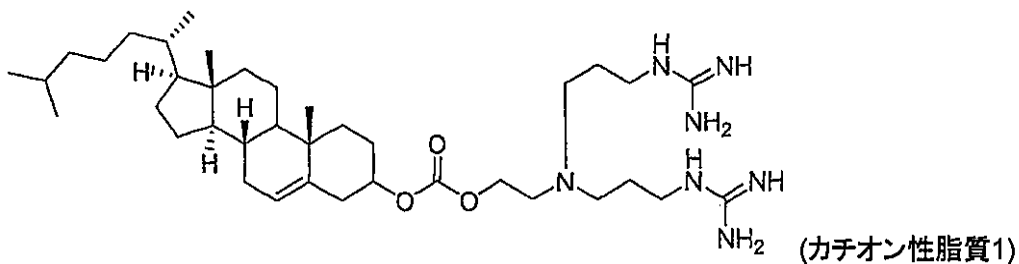
20

(式中、 R_1 はコレステロール又はその類似体である)。
を含む。

【0151】

より好ましくは、ナノ粒子組成物は、次の構造式を有するカチオン性脂質

【化23】



30

を含む。

【0152】

カチオン性脂質の詳細は、その内容が参照により本明細書に組み込まれている、PCT/US09/52396にも記載されている。

【0153】

さらに、カチオン性脂質を含む市販の製剤、例えばLIPOFECTIN(登録商標)(DOTMA及びDOPEを含有するカチオン性リポソーム、GIBCO/BRL、Grand Island、New York、USA製)、LIPOFECTAMINE(登録商標)(DOSPA及びDOPEを含有するカチオン性リポソーム、GIBCO/BRL、Grand Island、New York、USA製)及びTRANSFECTAM(登録商標)(DOGSを含有するカチオン性リポソーム、Promega Corp.、Madison、Wisconsin、USA製)を使用できる。

40

【0154】

4. PEG脂質

本発明によれば、本明細書に記載のナノ粒子組成物はPEG脂質を含有する。PEG脂質は、本明細書に記載のナノ粒子の循環を延長し、身体からのナノ粒子の早期排出を防ぐ。PEG脂質は、免疫原性を減少させ、ナノ粒子の安定性を高める。

【0155】

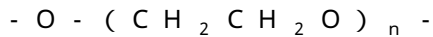
50

ナノ粒子組成物で有用なPEG脂質としては、PEG化形態の融合性／非カチオン性脂質が挙げられる。PEG脂質としては、例えばジアシルグリセロールに結合したPEG (PEG-DAG)、ジアシルグリカミドに結合したPEG、ジアルキルオキシプロピルに結合したPEG (PEG-DAA)、リン脂質に結合したPEG、例えばホスファチジルエタノールアミンに結合したPEG (PEG-PE)、セラミドに結合したPEG (PEG-Cer)、コレステロール誘導体に結合したPEG (PEG-Chol) 又はそれらの混合物が挙げられる。各々の内容が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第5,885,613号明細書及び第5,820,873号明細書、並びに米国特許出願第2006/051405号明細書参照。

【0156】

10

PEGは、次の構造式：



(式中、(n)は、PEG脂質のポリマー部分が約200～約100000ダルトン、好ましくは約200～約20000ダルトンの数平均分子量を有するように、約5～約2300、好ましくは約5～約460の正の整数である)で一般に表される。(n)は、ポリマーの重合度を表し、ポリマーの分子量に依存する。

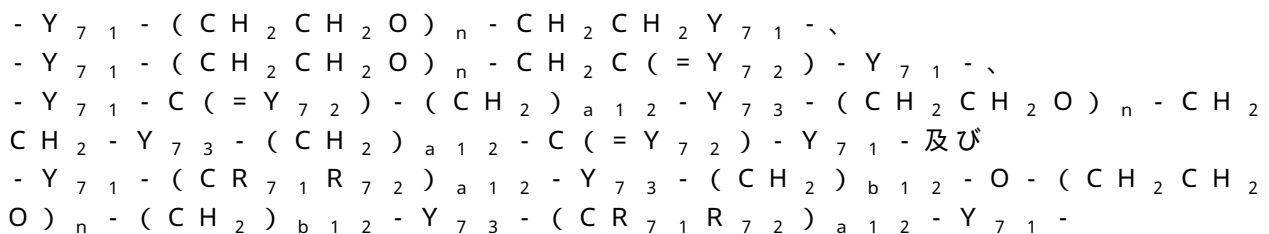
【0157】

一つの好ましい態様において、PEGは約200～約20000ダルトン、より好ましくは約500～約10000ダルトン、さらにより好ましくは約1000～約5000ダルトン(即ち、約1500～約3000ダルトン)の範囲の数平均分子量を有するポリエチレングリコールである。一実施形態において、PEGは約2000ダルトンの分子量を有する。別の実施形態において、PEGは約750ダルトンの分子量を有する。

20

【0158】

あるいは、ポリエチレングリコール(PEG)残基部分は、次の構造式：



30

[式中、

Y_{71} 及び Y_{73} は独立にO、S、SO、SO₂、NR₇₃ 又は結合であり、

Y_{72} はO、S又はNR₇₄、好ましくは酸素であり、

R₇₁～₇₄ は水素、C₁～₆ アルキル、C₂～₆ アルケニル、C₂～₆ アルキニル、C₃～₁₉ 分岐アルキル、C₃～₈ シクロアルキル、C₁～₆ 置換アルキル、C₂～₆ 置換アルケニル、C₂～₆ 置換アルキニル、C₃～₈ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、C₁～₆ ヘテロアルキル、置換C₁～₆ ヘテロアルキル、C₁～₆ アルコキシ、アリールオキシ、C₁～₆ ヘテロアルコキシ、ヘテロアリールオキシ、C₂～₆ アルカノイル、アリールカルボニル、C₂～₆ アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、C₂～₆ アルカノイルオキシ、アリールカルボニルオキシ、C₂～₆ 置換アルカノイル、置換アリールカルボニル、C₂～₆ 置換アルカノイルオキシ、置換アリールオキシカルボニル、C₂～₆ 置換アルカノイルオキシ及び置換アリールカルボニルオキシ、好ましくは水素、メチル、エチル又はプロピルから独立に選択され、

40

(a₁₂) 及び (b₁₂) は独立に0又は正の整数、好ましくは0又は約1～約6(即ち、1、2、3、4、5、6)の整数、より好ましくは1又は2であり、

(n)は約5～約2300、好ましくは約5～約460の整数である]

で表すことができる。

【0159】

PEGの末端部分は、H、NH₂、OH、CO₂H、C₁～₆ アルキル(例えばメチル

50

、エチル、プロピル)、 $C_1 \sim 6$ アルコキシ、アシル又はアリールで終わることができる。一つの好ましい実施形態において、PEGの末端ヒドロキシル基は、メトキシ基又はメチル基で置換されている。一つの好ましい実施形態において、PEG脂質で使用するPEGはメトキシPEGである。

【0160】

PEGは脂質に直接結合していてもよく、又はリンカー部分を介して結合していてもよい。脂質構造への結合のためのポリマーは、米国特許第5,122,614号明細書及び第5,808,096号明細書に記載の活性化法、並びに当業者に公知の他の技法を用いて過度に実験するまでもなく適切に活性化されたポリマーに変換される。

【0161】

PEG脂質の調製に有用な活性化PEGの例としては、例えばメトキシポリエチレングリコールスクシネート、mPEG-NHS、メトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルスクシネート、メトキシポリエチレングリコール酢酸(mPEG-CH₂COOH)、メトキシポリエチレングリコールアミン(mPEG-NH₂)及びメトキシポリエチレングリコールトレシレート(mPEG-TRES)が挙げられる。

【0162】

ある種の態様において、末端カルボン酸基を有するポリマーは、PEG脂質の調製のために使用できる。高純度で末端カルボン酸を有するポリマーを調製する方法は、その内容が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許出願第11/328,662号に記載されている。

【0163】

別の態様において、末端アミン基を有するポリマーは、PEG脂質を製造するために使用できる。高純度で末端アミンを含有するポリマーを調製する方法は、それらの各々の内容が参照により組み込まれている、米国特許出願第11/508,507号及び第11/537,172号に記載されている。

【0164】

PEG及び脂質は、結合部分、即ち非エステル含有リンカー部分又はエステル含有リンカー部分を介して結合できる。適切な非エステル含有リンカーとしては、それだけに限らないが、アミドリリンカー部分、アミノリンカー部分、カルボニルリンカー部分、カルバメートリンカー部分、カーボネート(OC(=O)O)リンカー部分、尿素リンカー部分、エーテルリンカー部分、スクシニルリンカー部分及びそれらの組合せが挙げられる。適切なエステルリンカー部分としては、例えばスクシノイル、ホスフェートエステル(-O-P(=O)(OH)-O-)、スルホン酸エステル及びそれらの組合せが挙げられる。

【0165】

一実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子組成物は、ポリエチレングリコール-ジアシルグリセロール(PEG-DAG)又はポリエチレン-ジアシルグリカミドを含むことができる。適切なポリエチレングリコール-ジアシルグリセロール複合体又はポリエチレングリコール-ジアシルグリカミド複合体としては、約 $C_4 \sim$ 約 C_{30} (好ましくは約 $C_8 \sim$ 約 C_{24})の飽和又は不飽和の炭素原子を独立に含有するアルキル鎖長を有する、ジアルキルグリセロール基又はジアルキルグリカミド基が挙げられる。ジアルキルグリセロール基又はジアルキルグリカミド基は、一つ又は複数の置換アルキル基をさらに含むことができる。

【0166】

本明細書で使用する「ジアシルグリセロール」(DAG)という用語は、二つの脂肪アシル鎖 R_{111} 及び R_{112} を有する化合物を指す。 R_{111} 及び R_{112} は、約4~約30個(好ましくは約8~約24個)の炭素の長さの同一又は異なる炭素鎖を有し、エステル結合によりグリセロールに結合する。アシル基は、飽和であってもよく、又は様々な不飽和度を含む不飽和であってもよい。DAGは次の一般式：

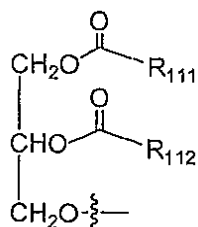
10

20

30

40

【化 2 4】



を有する。

【0167】

10

一つの好ましい実施形態において、PEG - ジアシルグリセロール複合体は、PEG - ジラウリルグリセロール (C 1 2)、PEG - ジミリスチルグリセロール (C 1 4、DMG)、PEG - ジパルミトイルグリセロール (C 1 6、DPG) 又は PEG - ジステアリルグリセロール (C 1 8、DSG) である。当業者であれば、他のジアシルグリセロールも、PEG - ジアシルグリセロール複合体で企図されることを容易に認識されよう。本明細書で使用する適切な PEG - ジアシルグリセロール複合体及びそれを製造し使用する方法は、各々の内容が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 0 7 7 8 2 9 号及び PCT 特許出願第 C A 0 2 / 0 0 6 6 9 号に記載されている。

【0168】

20

PEG - ジアシルグリセロール複合体の例としては、PEG - ジラウリルグリセロール (C 1 2)、PEG - ジミリスチルグリセロール (C 1 4)、PEG - ジパルミトイルグリセロール (C 1 6)、PEG - ジステリルグリセロール (C 1 8) の中から選択できる。PEG - ジアシルグリカミド複合体の例としては、PEG - ジラウリルグリカミド (C 1 2)、PEG - ジミリスチルグリカミド (C 1 4)、PEG - ジパルミトイルグリカミド (C 1 6) 及び PEG - ジステリルグリカミド (C 1 8) が挙げられる。

【0169】

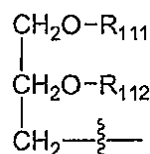
別の実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子組成物は、ポリエチレングリコール - ジアルキルオキシプロピル複合体 (PEG - DAA) を含むことができる。

【0170】

30

「ジアルキルオキシプロピル」という用語は、二つのアルキル鎖 R_{111} 及び R_{112} を有する化合物を指す。 R_{111} 及び R_{112} アルキル基は、約 4 ~ 約 30 個 (好ましくは約 8 ~ 約 24 個) の間の炭素の同一又は異なる炭素鎖長を含む。アルキル基は飽和であってもよく、又は様々な不飽和度を有していてもよい。ジアルキルオキシプロピルは次の一般式:

【化 2 5】



40

(式中、 R_{111} 及び R_{112} アルキル基は、約 4 ~ 約 30 個 (好ましくは約 8 ~ 約 24 個) の炭素を有する同一又は異なるアルキル基である) を有する。アルキル基は、飽和であってもよく、又は不飽和であってもよい。適切なアルキル基の例としては、それだけに限らないがラウリル (C 1 2)、ミリスチル (C 1 4)、パルミチル (C 1 6)、ステアリル (C 1 8)、オレオイル (C 1 8) 及びイコシル (C 2 0) が挙げられる。

【0171】

一実施形態において、 R_{111} 及び R_{112} はいずれも同一である。即ち、 R_{111} 及び R_{112} はいずれもミリスチル (C 1 4)、いずれもステアリル (C 1 8) 又はいずれもオレオイル (C 1 8) 等である。別の実施形態において、 R_{111} 及び R_{112} は異なる。即ち、 R_{111} はミリスチル (C 1 4) であり、 R_{112} はステアリル (C 1 8) で

50

ある。好ましい実施形態において、PEG - ジアルキルプロピル複合体は同一の R_{111} 及び R_{112} を含む。

【0172】

さらに別の実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子組成物は、ホスファチジルエタノールアミンに結合したPEG (PEG - PE) を含むことができる。PEG 脂質の結合に有用なホスファチジルエタノールアミンは、約4～約30個（好ましくは約8～約24個）の炭素の範囲の炭素鎖長を有する飽和又は不飽和の脂肪酸を含有できる。適切なホスファチジルエタノールアミンとしては、それだけに限らないが、ジミリスティルホスファチジルエタノールアミン (DMPE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPE)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) 及びジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE) が挙げられる。

10

【0173】

さらに別の実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子組成物は、セラミドに結合したPEG (PEG - Cer) を含むことができる。セラミドはアシル基を一つだけ有する。セラミドは、約4～約30個（好ましくは約8～約24個）の炭素の範囲の炭素鎖長を有する飽和又は不飽和の脂肪酸を有することができる。

【0174】

代替実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子組成物は、コレステロール誘導体に結合したPEGを含むことができる。「コレステロール誘導体」という用語は、その修飾、即ち置換及び/又は欠失を含むコレステロール構造を含有する任意のコレステロール類似体を意味する。本明細書においてコレステロール誘導体という用語は、ステロイドホルモン及び胆汁酸も含む。

20

【0175】

PEG 脂質の例示的例としては、N - (カルボニルメトキシポリエチレングリコール) - 1, 2 - ジミリスティル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (2kDa mPEG - DMPE 又は 5kDa mPEG - DMPE)、N - (カルボニルメトキシポリエチレングリコール) - 1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (2kDa mPEG - DPE 又は 5kDa mPEG - DPE)、N - (カルボニルメトキシポリエチレングリコール) - 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 (750kDa mPEG - DSPE、 2kDa mPEG - DSPE、 5kDa mPEG - DSPE) 並びにそれらの薬学的に許容される塩（即ち、ナトリウム塩）及びそれらの混合物が挙げられる。

30

【0176】

ある種の好ましい実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子組成物は、PEG が約200～約20000、好ましくは約500～約10000、より好ましくは約1000～約5000の分子量を有する、PEG - DAG 又は PEG - セラミドを有するPEG 脂質を含む。

【0177】

PEG - DAG 及び PEG - セラミドのいくつかの例示的实施形態を表1に示す：

【表 1】

表1

PEG-脂質	
PEG-DAG	mPEG-ジミリスティルグリセロール
	mPEG-ジパルミトイルグリセロール
	mPEG-ジステアロイルグリセロール
PEG-セラミド	mPEG-CerC8
	mPEG-CerC14
	mPEG-CerC16
	mPEG-CerC20

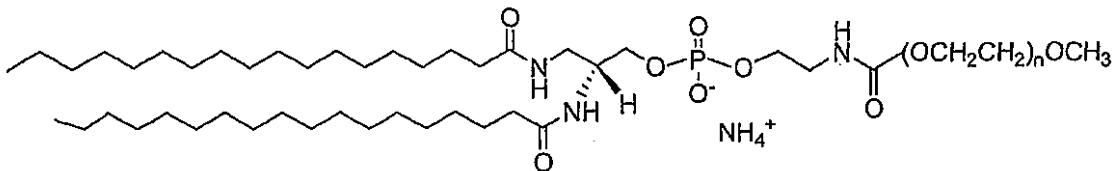
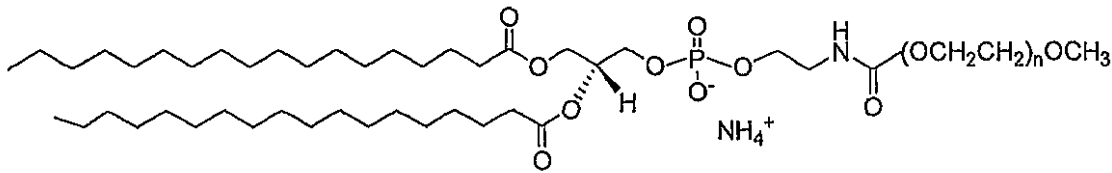
10

【0178】

好ましくは、本明細書に記載のナノ粒子組成物は、PEG-DSPPE、PEG-ジパルミトイルグリカミド(C16)、PEG-セラミド(C16)等及びそれらの混合物の中から選択されるPEG脂質を含む。mPEG-DSPPE、mPEG-ジパルミトイルグリカミド(C16)及びmPEG-セラミド(C16)の構造は以下のとおりである：

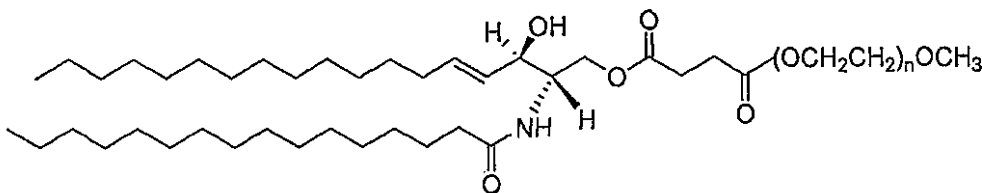
【化26】

20



及び

30



(式中、(n)は、約5～約2300、好ましくは約5～約460の整数である)。

【0179】

一つの好ましい実施形態において、(n)は約45である。

【0180】

さらなる実施形態において、及びPEG等のPAO系ポリマーの代替物として、一つ又は複数の効果的な非抗原性物質、例えばデキストラン、ポリビニルアルコール、炭水化物系ポリマー、ヒドロキシプロピルメタクリルアミド(HPMA)、ポリアルキレンオキシド及び/又はそれらのコポリマーを使用できる。PEGの代わりに使用できる適切なポリマーの例としては、それだけに限らないが、ポリビニルピロリドン、ポリメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミド及びポリジメチルアクリルアミド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸及び誘導体化セルロース、例えばヒドロキシメチルセルロース又はヒドロキシエチルセルロースが挙げられる。その内容が参照により本明細書に組み込まれている、同一出願人による米国特許第6,153,655号明細書も参照のこと。当業者であれば、同じ種類の活性化が、PEG等のPAOについても本明細書に記載されているように使用できることを理解されよ

40

50

う。当業者は、前記リストは単に例示であり、本明細書に記載の特性を有する全てのポリマー材料が企図されることをさらに理解されよう。本発明の目的のために、「実質的に又は効果的に非抗原性」という用語は、非毒性であり、哺乳動物において感知できるほどの免疫原性反応を誘発しないことが当技術分野で理解されている全ての物質を意味する。

【0181】

さらにさらなる実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子は、ケタール又はイミン等の放出可能リンカーを有するPEG脂質を含むことができる。このような放出可能PEG脂質により、送達系が細胞に侵入した後、核酸（オリゴヌクレオチド）を送達系から解離できる。このような放出可能PEG脂質のさらなる詳細は、それらの各々の内容が参照により本明細書に組み込まれている、各々「Releasable Polymeric Lipids Based on Imine Moiety For Nucleic Acids Delivery System」及び「Releasable Polymeric Lipids Based on Ketal or Acetal Moiety For Nucleic Acids Delivery System」という表題の米国仮特許出願第61/115,379号及び第61/115,371号、並びに同日に出願された「Releasable Polymeric Lipids For Nucleic Acids Delivery Systems」という表題のPCT特許出願第____号にも記載されている。

10

【0182】

5. 核酸/オリゴヌクレオチド

本明細書に記載のナノ粒子組成物は、様々な核酸を細胞又は組織に送達するために使用できる。核酸としては、プラスミド及びオリゴヌクレオチドが挙げられる。好ましくは、本明細書に記載のナノ粒子組成物は、オリゴヌクレオチドの送達のために使用される。

20

【0183】

本発明の範囲をより十分に理解するために、以下の用語を定義する。当業者は、「核酸」又は「ヌクレオチド」という用語が、別段の指示がない限り一本鎖であるか又は二本鎖であるデオキシリボ核酸（「DNA」）、リボ核酸（「RNA」）、並びにそれらの任意の化学修飾体又は類似体、例えばロックド（Locked）核酸（LNA）に適用されることを認識されよう。当業者は、「核酸」という用語には、ポリ核酸、その誘導体、修飾体及び類似体が含まれることを容易に理解されよう。「オリゴヌクレオチド」とは、例えば約2～約200ヌクレオチド長、好ましくは約8～約50ヌクレオチド長、より好ましくは約8～約30ヌクレオチド長、さらにより好ましくは約8～約20ヌクレオチド長又は約15～約28ヌクレオチド長の大きさがある、一般に比較的短いポリヌクレオチドである。本発明によるオリゴヌクレオチドは、別段の指示がない限り、一般に合成核酸であり、一本鎖である。「ポリヌクレオチド」及び「ポリ核酸」という用語は、本明細書において同義的にも使用できる。

30

【0184】

オリゴヌクレオチド（類似体）は、一種類のオリゴヌクレオチドに限定されないが、その代わり、広範なこのような部分と連携するように設計されており、リンカーは、3'-又は5'-末端、通常ヌクレオチドのPO₄基又はSO₄基の一つ又は複数に結合できることが理解される。企図される核酸分子は、ホスホロチオエート、インターヌクレオチド結合修飾、糖修飾、核酸塩基修飾及び/又はホスフェート骨格修飾を挙げることができる。オリゴヌクレオチドは、天然のホスホロジエステル骨格又はホスホロチオエート骨格、又は任意の他の修飾骨格類似体、例えばLNA（ロックド核酸）、PNA（ペプチド骨格を有する核酸）、CpGオリゴマー等を含み、それらは、その内容が参照により本明細書に組み込まれている、Tides 2002, Oligonucleotide and Peptide Technology Conferences, May 6-8, 2002, Las Vegas, NV及びOligonucleotide & Peptide Technologies, 18th & 19th November 2003, Hamburg, Germanyにて開示されている。

40

【0185】

本発明で企図されるオリゴヌクレオチドの修飾は、例えば、追加の電荷、分極率、水素結合、静電相互作用及び官能性をオリゴヌクレオチドに取り込む官能性部分の付加又は置換を含む。このような修飾としては、それだけに限らないが、2'位糖修飾、5位ピリミジン修飾、8位プリン修飾、環外アミンでの修飾、4-チオウリジンの置換、5-プロモ

50

ウラシル又は 5 - ヨードウラシルの置換、骨格修飾、メチル化、イソ塩基のイソシチジン及びイソグアニジン等の塩基対合組合せ、並びに類似の組合せが挙げられる。本発明の範囲内で企図されるオリゴヌクレオチドとしては、3' 及び/又は 5' キャップ構造も挙げることができる。

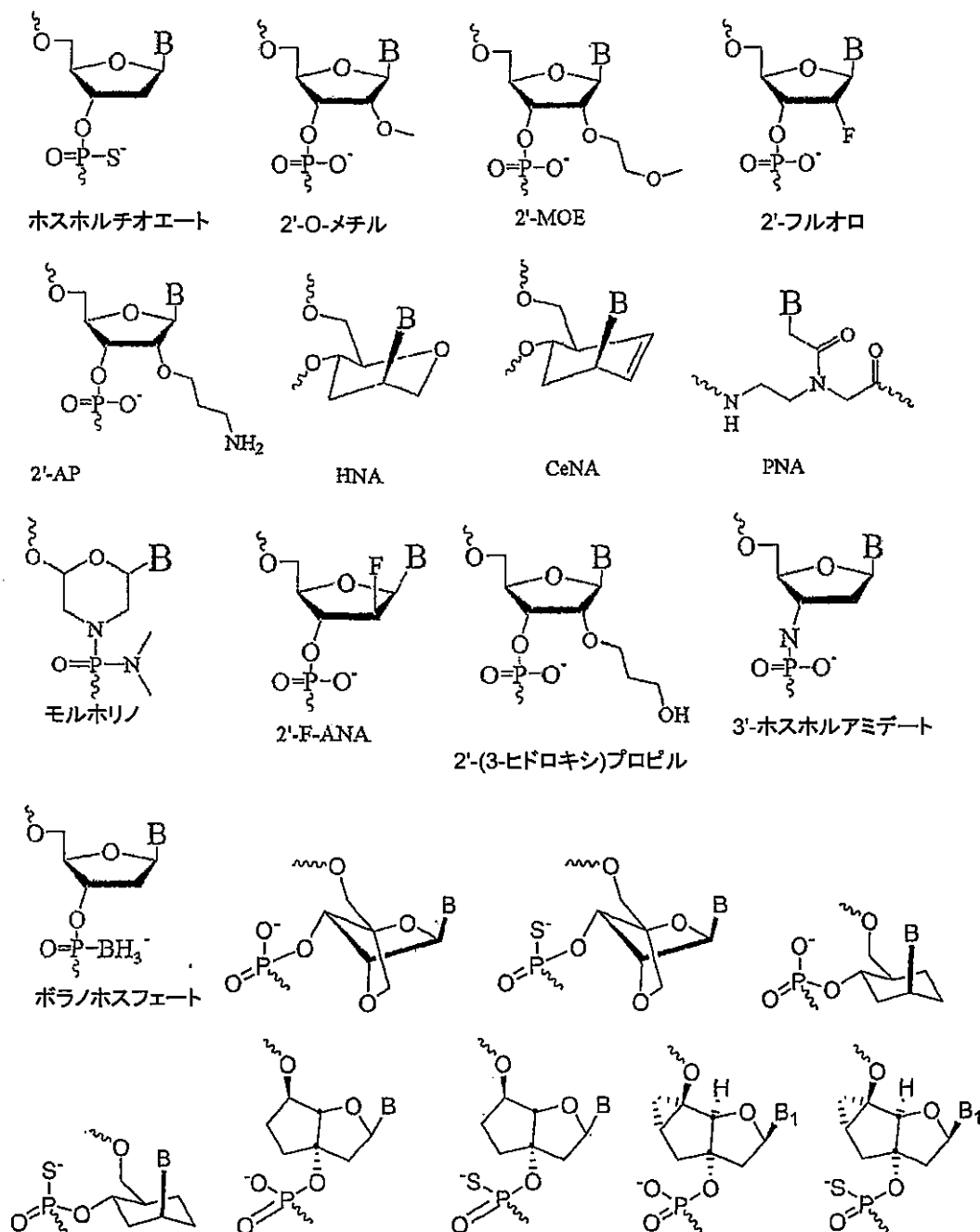
【0186】

本発明の目的のために、「キャップ構造」は、オリゴヌクレオチドのいずれかの末端で取り込まれた化学修飾を意味すると理解されるものとする。キャップは、5' - 末端 (5' - キャップ) 又は 3' - 末端 (3' - キャップ) に存在してもよく、又は両末端に存在してもよい。5' - キャップの非限定的例としては、脱塩基残基 (部分)、4' , 5' - メチレンヌクレオチド、1 - (- D - エリスロフラノシル) ヌクレオチド、4' - チオヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド、1 , 5 - アンヒドロヘキトールヌクレオチド、L - ヌクレオチド、ヌクレオチド、修飾塩基ヌクレオチド、ホスホロジチオエート結合、スレオペントフラノシルヌクレオチド、非環式 3' , 4' - セコヌクレオチド、非環式 3 , 4 - ジヒドロキシブチルヌクレオチド、非環式 3 , 5 - ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、3' - 3' - 逆位ヌクレオチド部分、3' - 3' - 逆位脱塩基部分、3' - 2' - 逆位ヌクレオチド部分、3' - 2' - 逆位脱塩基部分、1 , 4 - ブタンジオールホスフェート、3' - ホスホルアミデート、ヘキシルホスフェート、アミノヘキシルホスフェート、3' - ホスフェート、3' - ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート又は架橋もしくは非架橋メチルホスホネート部分が挙げられる。詳細は、その内容が参照により本明細書に組み込まれている、WO 97/26270 に記載されている。3' - キャップとしては、例えば、4' , 5' - メチレンヌクレオチド、1 - (- D - エリスロフラノシル) ヌクレオチド、4' - チオヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド、5' - アミノアルキルホスフェート、1 , 3 - ジアミノ - 2 - プロピルホスフェート、3 - アミノプロピルホスフェート、6 - アミノヘキシルホスフェート、1 , 2 - アミノドデシルホスフェート、ヒドロキシプロピルホスフェート、1 , 5 - アンヒドロヘキトールヌクレオチド、L - ヌクレオチド、ヌクレオチド、修飾塩基ヌクレオチド、ホスホロジチオエート、スレオペントフラノシルヌクレオチド、非環式 3' , 4' - セコヌクレオチド、3 , 4 - ジヒドロキシブチルヌクレオチド、3 , 5 - ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、5' - 5' - 逆位ヌクレオチド部分、5' - 5' - 逆位脱塩基部分、5' - ホスホルアミデート、5' - ホスホロチオエート、1 , 4 - ブタンジオールホスフェート、5' - アミノ、架橋及び/もしくは非架橋 5' - ホスホルアミデート、ホスホロチオエート及び/又はホスホロジチオエート、架橋もしくは非架橋メチルホスホネート及び 5' - メルカプト部分を挙げることができる。その内容が参照により本明細書に組み込まれている、Beaucage and Iyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925 も参照のこと。

【0187】

ヌクレオシド類似体の非限定的リストは、次の構造式：

【化 27】



10

20

30

40

50

を有する。それらの各々の内容が、参照により本明細書に組み込まれている、Freier & A
 Itmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443及びUhlmann; Curr. Opinion in Drug D
 evelopment, 2000, 3(2), 293-213に記載のヌクレオシド類似体のさらなる例を参照のこと。

【0188】

本明細書で使用する場合、「アンチセンス」という用語は、遺伝子産物をコードするか
 、又は調節配列をコードする特定のDNA配列又はRNA配列に相補的であるヌクレオチ
 ド配列を指す。「アンチセンス鎖」という用語は、「センス」鎖に相補的である核酸鎖に
 関して使用される。細胞代謝の通常の動作において、DNA分子のセンス鎖は、ポリペプ
 チド及び/又は他の遺伝子産物をコードする鎖である。センス鎖は、メッセンジャーRN
 A(「mRNA」)転写物(アンチセンス鎖)の合成のためのテンプレートとしての役割
 を果たし、次いで任意のコードされた遺伝子産物の合成を導く。アンチセンス核酸分子は
 、合成を含む当技術分野で公知の任意の方法により調製できる。細胞へ一旦導入されると
 、この転写鎖は、細胞により産生される天然配列と組み合わせたり、二本鎖を形成する。次

いで、これらの二本鎖はmRNAのさらなる転写又はその翻訳のいずれかを阻害する。「負」又は(-)の呼称がアンチセンス鎖を指すことも当技術分野で公知であり、「正」又は(+)がセンス鎖を指すことも当技術分野で公知である。

【0189】

本発明の目的のために、「相補的」とは、核酸配列が、別の核酸配列との水素結合(複数可)を形成することを意味すると理解されるものとする。パーセント相補性は、第2の核酸配列と水素結合、即ちワトソンクリック塩基対合を形成できる核酸分子中の隣接残基の割合を指す。即ち、10の内5、6、7、8、9、10は、50%、60%、70%、80%、90%及び100%相補性である。「完全な相補性」とは、核酸配列の全ての隣接残基が、第2の核酸配列中の同数の隣接残基と水素結合を形成することを意味する。

10

【0190】

本明細書に記載のナノ粒子で有用な核酸(例えば一つ又は複数の同一又は異なるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド誘導体)は、約5~約1000個の核酸、例えば好ましくは約8~約50ヌクレオチド長(例えば、約8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30)の大きさがある好ましくは比較的短いポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0191】

一態様において、本明細書に記載のナノ粒子中に封入される有用な核酸としては、天然のホスホロジエステル骨格もしくはホスホロチオエート骨格又は任意の他の修飾骨格類似体を有するオリゴヌクレオチド及びオリゴデオキシヌクレオチド、例えば

20

LNA(ロックド核酸)；

PNA(ペプチド骨格を有する核酸)；

低分子干渉RNA(sRNA)；

マイクロRNA(miRNA)；

ペプチド骨格を有する核酸(PNA)；

ホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド(PMO)；

トリシクロ-DNA；

デコイODN(二本鎖オリゴヌクレオチド)；

触媒RNA配列(RNAi)；

30

リボザイム；

アプタマー；

シュビーゲルマー(L-立体配座オリゴヌクレオチド)；

CpGオリゴマー等、例えば、

その内容が参照により本明細書に組み込まれている、Tides 2002, Oligonucleotide and Peptide Technology Conferences, May 6-8, 2002, Las Vegas, NV及びOligonucleotide & Peptide Technologies, 18th & 19th November, 2003, Hamburg, Germanyにて開示されているものが挙げられる。

【0192】

ナノ粒子中に封入された核酸の別の態様において、オリゴヌクレオチドは、以下の表2に列挙されているものを含む、任意の適切な当技術分野で公知のヌクレオチド類似体及び誘導体の場合により含むことができる。

40

【表 2】

表2.代表的なヌクレオチド類似体及び誘導体

4-アセチルシチジン	5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン
5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン	β ,D-マンノシルクエオシン
2'-O-メチルシチジン	5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン
5-メトキシカルボニルメチルウリジン	5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン
5-メトキシウリジン	5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン
ジヒドロウリジン	2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン
2'-O-メチルプソイドウリジン	N-[(9- β -D-リボフラノシル-2-メチルチオプリン-6-イル)カルバモイル]トレオニン
D-ガラクトシルクエオシン	N-[(9- β -D-リボフラノシルプリン-6-イル)N-メチルカルバモイル]トレオニン
2'-O-メチルグアノシン	ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル
2'-ハロ-アデノシン	2'-ハロ-シチジン
2'-ハロ-グアノシン	2'-ハロ-チミン
2'-ハロ-ウリジン	2'-ハロ-メチルシチジン
2'-アミノ-アデノシン	2'-アミノ-シチジン
2'-アミノ-グアノシン	2'-アミノ-チミン
2'-アミノ-ウリジン	2'-アミノ-メチルシチジン
イノシン	ウリジン-5-オキシ酢酸
N6-イソペンテニルアデノシン	ワイプトキソシン
1-メチルアデノシン	プソイドウリジン
1-メチルプソイドウリジン	クエオシン
1-メチルグアノシン	2-チオシチジン
1-メチルイノシン	5-メチル-2-チオウリジン
2,2-ジメチルグアノシン	2-チオウリジン
2-メチルアデノシン	4-チオウリジン
2-メチルグアノシン	5-メチルウリジン
3-メチルシチジン	N-[(9- β -D-リボフラノシルプリン-6-イル)-カルバモイル]トレオニン
5-メチルシチジン	2'-O-メチル-5-メチルウリジン
N6-メチルアデノシン	2'-O-メチルウリジン
7-メチルグアノシン	ワイプトシン
5-メチルアミノメチルウリジン	3-(3-アミノ-3-カルボキシ-プロピル)ウリジン
ロックドアデノシン	ロックドシチジン
ロックドグアノシン	ロックドチミン
ロックドウリジン	ロックドメチルシチジン

【0193】

一つの好ましい態様において、ナノ粒子に封入された標的オリゴヌクレオチドとしては、例えばそれだけに限らないが、癌遺伝子、プロ血管新生経路遺伝子、プロ細胞増殖経路遺伝子、ウイルス感染因子遺伝子及びプロ炎症経路遺伝子が挙げられる。

【0194】

10

20

30

40

50

一つの好ましい実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子中に封入されたオリゴヌクレオチドは、腫瘍細胞を標的とするか、又は腫瘍細胞及び／もしくは抗癌療法に対する腫瘍細胞の耐性と関連する遺伝子もしくはタンパク質の発現のダウンレギュレートに関わる。例えば、癌と関連する任意の当技術分野で公知の細胞タンパク質をダウンレギュレートするためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば BCL-2 は本発明で利用できる。その内容が参照により本明細書に組み込まれている、2004年4月9日出願された米国特許出願公開第10/822,205号明細書を参照のこと。好ましい治療用オリゴヌクレオチドの非限定的例としては、アンチセンス bcl-2 オリゴヌクレオチド、アンチセンス HIF-1 オリゴヌクレオチド、アンチセンススルビピンオリゴヌクレオチド、アンチセンス ErbB3 オリゴヌクレオチド、アンチセンス PIK3CA オリゴヌクレオチド、アンチセンス HSP27 オリゴヌクレオチド、アンチセンスアンドロゲン受容体オリゴヌクレオチド、アンチセンス Gli2 オリゴヌクレオチド及びアンチセンス カテニンオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0195】

より好ましくは、本明細書に記載の本発明によるオリゴヌクレオチドとしては、ホスホロチオエート骨格及び LNA が挙げられる。

【0196】

一つの好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、例えばアンチセンススルビピン LNA、アンチセンス ErbB3 LNA 又はアンチセンス HIF1-LNA であってよい。

【0197】

別の好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、例えば、Genasense (登録商標) (別名オブリメルセンナトリウム、Genta Inc.、Berkeley Heights、NJ 製) と同一又は実質的に同様のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドであってよい。Genasense (登録商標) は、18-メルホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号4) であり、ヒト bcl-2 mRNA の開始配列の最初の六つのコドンに相補的である (ヒト bcl-2 mRNA は当技術分野で公知であり、例えば配列番号19として参照により本明細書に組み込まれている米国特許第6,414,134号明細書に記載されている)。

【0198】

企図される好ましい実施形態は、以下を含む：

(i) アンチセンススルビピン LNA オリゴマー (配列番号1)

^mC_s - T_s - ^mC_s - A_s - a_s - t_s - c_s - a_s - t_s - g_s - g_s - ^mC_s - A_s - G_s - c_s ;

大文字は LNA を表し、「s」はホスホロチオエート骨格を表す。

【0199】

(ii) アンチセンス Bcl2 siRNA :

SENSE 5' - g c a u g c g g c c u c u g u u u g a d T d T - 3' (配列番号2)

ANTISENSE 3' - d T d T c g u a c g c c g g a g a c a a a c u - 5' (配列番号3)

d T は DNA を表す。

【0200】

(iii) Genasense (ホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド) : (配列番号4)

t_s - c_s - t_s - c_s - c_s - c_s - a_s - g_s - c_s - g_s - t_s - g_s - c_s - g_s - c_s - c_s - c_s - a_s - t_s

小文字は DNA を表し、「s」はホスホロチオエート骨格を表す。

【0201】

(iv) アンチセンス HIF1 LNA オリゴマー (配列番号5)

10

20

30

40

50

T_s G_s G_s c_s a_s a_s g_s c_s a_s t_s c_s c_s T_s G_s T_s a
大文字は LNA を表し、「s」はホスホロチオエート骨格を表す。

【0202】

(v) アンチセンス ErbB3 LNA オリゴマー (配列番号 6)
T_s A_s G_s c_s c_s t_s g_s t_s c_s a_s c_s t_s t_s M^e C_s T_s M^e C_s
大文字は LNA を表し、「s」はホスホロチオエート骨格を表す。

【0203】

(vi) アンチセンス ErbB3 LNA オリゴマー (配列番号 7)
G_s M^e C_s T_s c_s c_s a_s g_s a_s c_s a_s t_s c_s a_s M^e C_s T_s M^e C_s
大文字は LNA を表し、「s」はホスホロチオエート骨格を表す。

10

【0204】

(vii) アンチセンス PIK3CA LNA オリゴマー (配列番号 8)
A_s G_s M^e C_s c_s a_s t_s t_s c_s a_s t_s t_s c_s c_s A_s M^e C_s M^e C_s
大文字は LNA を表し、「s」はホスホロチオエート骨格を表す。

【0205】

(viii) アンチセンス PIK3CA LNA オリゴマー (配列番号 9)
T_s T_s A_s t_s t_s g_s t_s g_s c_s a_s t_s c_s t_s M^e C_s A_s G_s
大文字は LNA を表し、「s」はホスホロチオエート骨格を表す。

【0206】

(ix) アンチセンス HSP27 LNA オリゴマー (配列番号 10)
C_s G_s T_s g_s t_s a_s t_s t_s t_s c_s c_s g_s c_s G_s T_s G_s
大文字は LNA を表し、「s」はホスホロチオエート骨格を表す。

20

【0207】

(x) アンチセンス HSP27 LNA オリゴマー (配列番号 11)
G_s G_s M^e C_s a_s c_s a_s g_s c_s c_s a_s g_s t_s g_s G_s M^e C_s G_s
大文字は LNA を表し、「s」はホスホロチオエート骨格を表す。

【0208】

(xi) アンチセンスアンドロゲン受容体 LNA オリゴマー (配列番号 12)
M^e C_s M^e C_s M^e C_s a_s a_s g_s g_s c_s a_s c_s t_s g_s c_s A_s G_s A_s
大文字は LNA を表し、「s」はホスホロチオエート骨格を表す。

30

【0209】

(xii) アンチセンスアンドロゲン受容体 LNA オリゴマー (配列番号 13)
A_s M^e C_s M^e C_s a_s a_s g_s t_s t_s t_s c_s t_s t_s c_s A_s G_s M^e C_s
大文字は LNA を表し、「s」はホスホロチオエート骨格を表す。

【0210】

(xiii) アンチセンス GLI2 LNA オリゴマー (配列番号 14)
M^e C_s T_s M^e C_s c_s t_s t_s g_s g_s t_s g_s c_s a_s g_s T_s M^e C_s T_s
大文字は LNA を表し、「s」はホスホロチオエート骨格を表す。

【0211】

(xiv) アンチセンス GLI2 LNA オリゴマー (配列番号 15)
T_s M^e C_s A_s g_s a_s t_s t_s c_s a_s a_s a_s c_s M^e C_s M^e C_s A_s
大文字は LNA を表し、「s」はホスホロチオエート骨格を表す。

40

【0212】

(xv) アンチセンス カテニン LNA オリゴマー (配列番号 16)
G_s T_s G_s t_s t_s c_s t_s a_s c_s a_s c_s c_s a_s T_s T_s A_s
大文字は LNA を表し、「s」はホスホロチオエート骨格を表す。

【0213】

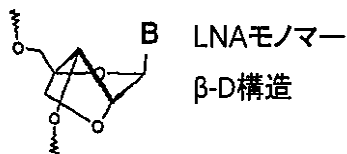
小文字は DNA 単位を表し、太字の大文字は LNA、例えば - D - オキシ - LNA 単位を表す。LNA モノマー中の全てのシトシン塩基は、5 - メチルシトシンである。下付き「s」はホスホロチオエート結合を表す。

50

【0214】

LNAは、以下に示すような2'-O、4'-Cメチレンビスクロヌクレオチドを含む：

【化28】



【0215】

10

各々の内容が参照により本明細書に組み込まれている、「LNA Oligonucleotides and the Treatment of Cancer」という表題の米国特許出願第11/272,124号及び「Oligomeric Compounds for the Modulation Survivin Expression」という表題の米国特許出願第10/776,934号に開示されているスルビピンLNAの詳細な説明を参照のこと。HIF-1調節については、米国特許第7,589,190号明細書及び米国特許出願公開第2004/0096864号明細書、Erbb3調節については米国特許出願公開第2008/0318894号明細書及びPCT/US09/063357、PIK3CA調節については米国特許出願公開第2009/0192110号明細書、HSP28調節についてはPCT/IB09/052860号、アンドロゲン受容体調節については米国特許出願公開第2009/0181916号明細書、カテニン調節については「RNA Antagonists Targeting GIL2」という表題の米国仮特許出願第61/081,135号及びPCT出願第PCT/IB09/006407号、並びに米国特許出願公開第2009/0005335号明細書及び第2009/0203137号明細書も参照のこと。適切な標的遺伝子のさらなる例は、その内容が参照により本明細書に組み込まれている、WO03/74654、PCT/US03/05028及び米国特許出願第10/923,536号に記載されている。

20

【0216】

さらなる実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子は、エンドソーム放出促進群に放出可能なように結合したオリゴヌクレオチドを含むことができる。エンドソーム放出促進群、例えば富ヒスチジンペプチドは、エンドソーム膜を破壊し、それにより治療薬の細胞質送達を促進することができる。富ヒスチジンペプチドは、細胞質へのオリゴヌクレオチドのエンドソーム放出を促進する。次いで、細胞内に放出されたオリゴヌクレオチドは、核へ移行できる。オリゴヌクレオチド-富ヒスチジンペプチド複合体のさらなる詳細は、各々の内容が参照により本明細書に組み込まれている、2008年11月17日に出願された米国仮特許出願第61/115,350号及び第61/115,326号、並びに同日に出願された「Releasable Conjugates For Nucleic Acids Delivery Systems」という表題のPCT特許出願第____号に記載されている。

30

【0217】

6. 標的基

場合により/好ましくは、本明細書に記載のナノ粒子組成物は、特定の細胞型又は組織型に対する標的リガンドをさらに含む。標的基は、リンカー分子、例えばアミド(amide)、アミド(amido)、カルボニル、エステル、ペプチド、ジスルフィド、シラン、ヌクレオシド、脱塩基ヌクレオシド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、脂質、ポリ炭化水素、リン酸エステル、ホスホルアミデート、チオホスフェート、アルキルホスフェート、マレイミジルリンカー又は光解離性リンカーを用いてナノ粒子組成物(好ましくは融合性脂質及びPEG脂質)の任意の成分に結合できる。当技術分野で公知の任意の技法は、過度に実験するまでもなくナノ粒子組成物の任意の成分に標的基を結合させるのに使用できる。

40

【0218】

例えば、標的化剤を、PEG脂質のポリマー部分に結合させて、ナノ粒子をインビボで

50

標的領域に導くことができる。本明細書に記載のナノ粒子の標的送達は、治療用核酸を封入するナノ粒子の細胞取込みを促進し、それにより治療効果を増強させる。ある種の態様において、いくつかの細胞透過性ペプチドを、腫瘍部位への標的送達のため様々な標的ペプチドと置き換えてもよい。

【0219】

本発明の一つの好ましい態様において、標的部位、例えば一本鎖抗体 (SCA) 又は一本鎖抗原結合抗体、モノクローナル抗体、細胞接着性ペプチド、例えばRGDペプチド及びセレクチン、細胞透過性ペプチド (CPP)、例えばTAT、ペネトラチン及び (Arg)₉、受容体リガンド、標的炭水化物分子又はレクチンにより、ナノ粒子は標的領域を特異的に対象とすることができる。その内容が参照により本明細書に組み込まれている、
J Pharm Sci. 2006 Sep; 95(9): 1856-72 Cell adhesion molecules for targeted drug deliveryを参照のこと。

10

【0220】

好ましい標的部分としては、一本鎖抗体 (SCA) 又は抗体の一本鎖可変フラグメント (sFv) が挙げられる。SCAは、標的腫瘍細胞の特異的分子を結合するか、又は認識することができる抗体のドメインを含有する。抗原結合部位を維持することに加えて、PEG脂質に結合したSCAは、抗原性を低下させ、血流中のSCAの半減期を増大することができる。

【0221】

「一本鎖抗体」(SCA)、「一本鎖抗原結合分子又は抗体」又は「一本鎖Fv」(sFv) という用語は、互換的に用いられる。一本鎖抗体は、抗原に対する結合親和性を有する。一本鎖抗体 (SCA) 又は一本鎖Fvsは、いくつかの方法で構築でき、既に構築されている。一本鎖抗原結合タンパク質の理論及び産生の詳細は、それらの各々の内容が参照により本明細書に組み込まれている、同一出願人による米国特許出願第10/915,069号明細書及び米国特許第6,824,782号明細書において見出される。

20

【0222】

通常、SCA又はFvドメインは、26-10、MOPC 315、741F8、520C9、McPC 603、D1.3、マウスphOx、ヒトphOx、RFL3.8sTCR、1A6、Se155-4、18-2-3、4-4-20、7A4-1、B6.2、CC49、3C2、2c、MA-15C5/K₁₂GO、Ox等として文献中でそれらの略語により知られているモノクローナル抗体の中から選択できる (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883(1988); Huston, J. S. et al., SIM News 38(4)(Supp): 11(1988); McCartney, J. et al., ICSU Short Reports 10: 114(1990); McCartney, J. E. et al., unpublished results(1990); Nedelman, M. A. et al., J. Nuclear Med. 32(Supp.): 1005(1991); Huston, J. S. et al., In: Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, PartB, edited by J. J. Langone, Methods in Enzymology 203: 46-88(1991); Huston, J. S. et al., In: Advances in the Applications of Monoclonal Antibodies in Clinical Oncology, Epenetos, A. A. (Ed.), London, Chapman & Hall(1993); Bird, R. E. et al., Science 242: 423-426(1988); Bedzyk, W. D. et al., J. Biol. Chem. 265: 18615-18620(1990); Colcher, D. et al., J. Nat. Cancer Inst. 82: 1191-1197(1990); Gibbs, R. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4001-4004(1991); Milenic, D. E. et al., Cancer Research 51: 6363-6371(1991); Pantoliano, M. W. et al., Biochemistry 30: 10117-10125(1991); Chaudhary, V. K. et al., Nature 339: 394-397(1989); Chaudhary, V. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1066-1070(1990); Batra, J. K. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 171: 1-6(1990); Batra, J. K. et al., J. Biol. Chem. 265: 15198-15202(1990); Chaudhary, V. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9491-9494(1990); Batra, J. K. et al., Mol. Cell. Biol. 11: 2200-2205(1991); Brinkmann, U. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8616-8620(1991); Seetharam, S. et al., J. Biol. Chem. 266: 17376-17381(1991); Brinkmann, U. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 307

30

40

50

5-3079(1992) ; Glockshuber, R. et al., Biochemistry 29: 1362-1367(1990) ; Skerra, A. et al., Bio/Technol. 9: 273-278(1991) ; Pack, P. et al., Biochemistry 31: 1579-1534(1992) ; Clackson, T. et al., Nature 352: 624-628(1991) ; Marks, J. D. et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991) ; Iverson, B. L. et al., Science 249: 659-662(1990) ; Roberts, V. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6654-6658(1990) ; Condra, J. H. et al., J. Biol. Chem. 265: 2292-2295(1990) ; Laroche, Y. et al., J. Biol. Chem. 266: 16343-16349(1991) ; Holvoet, P. et al., J. Biol. Chem. 266: 19717-19724(1991) ; Anand, N. N. et al., J. Biol. Chem. 266: 21874-21879(1991) ; Fuchs, P. et al., Biol. Technol. 9: 1369-1372(1991) ; Breitling, F. et al., Gene 104: 104-153(1991) ; Seehaus, T. et al., Gene 114: 235-237(1992) ; Takkinen, K. et al., Protein Engng. 4: 837-841(1991) ; Dreher, M. L. et al., J. Immunol. Methods 139: 197-205(1991) ; Mottez, E. et al., Eur. J. Immunol. 21: 467-471(1991) ; Traunecker, A. et al., Acad. Sci. USA 88: 8646-8650(1991) ; Traunecker, A.等、EMBOJ. 10:3655-3659(1991) ; Hoo, W. F. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4759-4763(1993) も参照のこと)。前記刊行物は各々参照により本明細書に組み込まれている。

10

20

【 0 2 2 3 】

標的基の非限定的リストは、血管内皮細胞増殖因子、F G F 2、ソマトスタチン及びソマトスタチン類似体、トランスフェリン、メラノトロピン、A p o E 及び A p o E ペプチド、フォンウィルブランド因子及びフォンウィルブランド因子ペプチド、アデノウイルスファイバータンパク質及びアデノウイルスファイバータンパク質ペプチド、P D 1 及び P D 1 ペプチド、E G F 及び E G F ペプチド、R G D ペプチド、葉酸塩、アニサミド等を含む。当業者により認識される他の任意選択の標的化剤も、本明細書に記載のナノ粒子で利用できる。

【 0 2 2 4 】

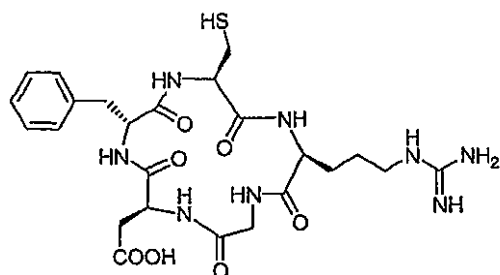
一つの好ましい実施形態において、本明細書に記載の化合物に有用な標的化剤としては、一本鎖抗体 (S C A)、R G D ペプチド、セレクチン、T A T、ペネトラチン、(A r g)₉、葉酸、アニサミド等が挙げられ、これらの薬剤の好ましい構造の一部は以下のとおりである：

C - T A T : (配列番号 : 1 7) C Y G R K K R R Q R R R ;

C - (A r g)₉ : (配列番号 : 1 8) C R R R R R R R R R ;

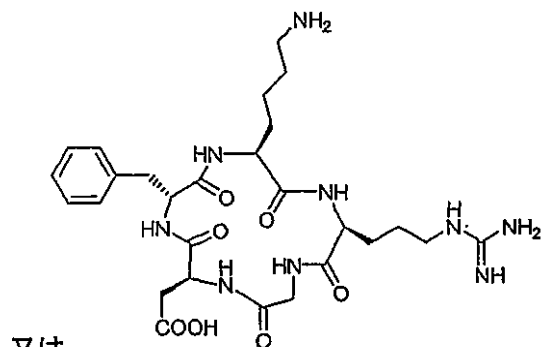
R G D は、直鎖又は環状の

【 化 2 9 】



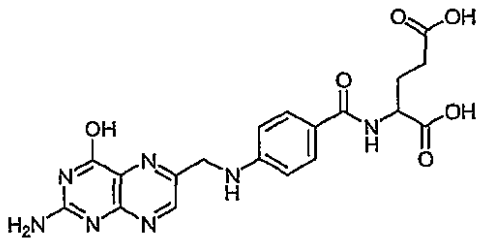
,

40



50

であってよく、
葉酸は
【化 3 0】



10

の残基であり、
アニサミドは、 p -MeO-Ph-C(=O)OHである。

【0225】

Arg₉は、例えばCRRRRRRRRRRを結合するためのシステインを含むことができ、TATは、CYGRKKRRRQRRRC等のペプチドの末端でさらなるシステインを付加できる。

【0226】

本発明の目的のために、明細書及び図面で使用する略語は、以下の構造を表す：

(i) C-diTAT (配列番号19) = CYGRKKRRRQRRRYGRKKRRRQRR-NH₂；

20

(ii) 直鎖RGD (配列番号20) = RGD C；

(iii) 環状RGD (配列番号21及び配列番号22) = c-RGDFC又はc-RGDFK；

(iv) RGD-TAT (配列番号23) = CYGRKKRRRQRRRGGRGDS-NH₂及び

(v) Arg₉ (配列番号24) = RRRRRRRRR

【0227】

あるいは、標的基は、糖及び炭水化物、例えばガラクトース、ガラクトサミン及びN-アセチルガラクトサミン；ホルモン、例えばエストロゲン、テストステロン、プロゲステロン、グルココルチゾン、アドレナリン、インスリン、グルカゴン、コルチゾール、ビタミンD、甲状腺ホルモン、レチノイン酸及び成長ホルモン；成長因子、例えばVEGF、EGF、NGF及びPDGF；神経伝達物質、例えばGABA、グルタメート、アセチルコリン；NOGO；イノシトール三リン酸；エピネフリン；ノルエピネフリン；一酸化窒素、ペプチド、ビタミン、例えば葉酸及びピリドキシン、薬物、抗体及びインビボ又はインビトロで細胞表面受容体と相互作用し得る任意の他の分子が挙げられる。

30

【0228】

D. ナノ粒子の調製

本明細書に記載のナノ粒子は、過度に実験するまでもなく当技術分野で公知の方法で調製できる。

【0229】

40

例えば、ナノ粒子は、第1の容器に水溶液（又は比較試験用に核酸なしの水溶液）中のオリゴヌクレオチド等の核酸を用意し、第2の容器に本明細書に記載のナノ粒子組成物を含有する有機脂質溶液を用意して、有機脂質溶液が水溶液と混ざり、核酸を封入するナノ粒子が製造されるように水溶液と有機脂質溶液とを混合することにより調製できる。該方法の詳細は、その内容が参照により本明細書に組み込まれている米国特許出願公開第2004/0142025号明細書に記載されている。

【0230】

あるいは、本明細書に記載のナノ粒子は、有機溶媒を利用して成分の混合中に単相を得る、界面活性剤透析法又は変性逆相法等の当技術分野で公知の任意の方法により調製できる。界面活性剤透析法では、核酸（即ち、siRNA）をカチオン性脂質の洗浄溶液と接

50

触させ、被覆核酸複合体を形成する。

【0231】

本発明の一実施形態において、カチオン性脂質とオリゴヌクレオチド等の核酸とを合わせて、約1:20~約20:1の電荷比、好ましくは約1:5~約5:1の比、より好ましくは約1:2~約2:1の比を得る。

【0232】

本発明の一実施形態において、カチオン性脂質とオリゴヌクレオチド等の核酸とを合わせて、約1:1~約20:1の電荷比、約1:1~約12:1の比、より好ましくは約2:1~約6:1の比を得る。あるいは、ナノ粒子組成物の窒素とホスフェート(N/P)との比は、約2:1~約5:1(即ち、2.5:1)の範囲である。

10

【0233】

別の実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子は、デュアルポンプシステムを用いて調製できる。一般に、該方法は、第1の容器に核酸を含有する水溶液及び第2の容器に記載のナノ粒子組成物を含有する脂質溶液を用意することを含む。二つの溶液をデュアルポンプシステムを用いて混合し、ナノ粒子を得る。次いで、得られた混合溶液を水性緩衝液で希釈し、形成したナノ粒子を透析により精製するか、且つ/又は単離することができる。ナノ粒子は、0.22µmのフィルターを介して濾過することにより滅菌されるようにさらに処理してもよい。

【0234】

核酸を含有するナノ粒子は、直径約5~約300nmの範囲である。好ましくは、ナノ粒子は、動的光散乱法(DLS)を用いる測定により、約150nm(例えば約50~150nm)未満の中位径、より好ましくは約100nm未満の中位径を有する。ナノ粒子の大部分は、約30~100nm(例えば59.5、66、68、76、80、93、96nm)、好ましくは約60~約95nmの中位径を有する。当業者は、DLS法と比較したとき、TEM等の他の当技術分野で公知の技法を用いる測定により、中位径数が半分に減少し得ることを認識されよう。本発明のナノ粒子は、多分散性により示されるように、実質的にサイズが均一である。

20

【0235】

場合により、ナノ粒子は、当技術分野で公知の任意の方法によりサイジングできる。サイズは当業者により所望されるように制御できる。サイジングは、所望のサイズ範囲を得、ナノ粒子サイズの分布を比較的狭めるために行うことができる。ナノ粒子を所望のサイズにサイジングするためにいくつかの技法を利用できる。その内容が参照により本明細書に組み込まれている、例えば、米国特許第4,737,323号明細書参照。

30

【0236】

本発明は、核酸(例えば、LNA又はsiRNA)が脂質多重膜構造(即ち、脂質二重層)に封入され、分解から保護されるように、血清安定ナノ粒子を調製する方法を提供する。本明細書に記載のナノ粒子は、水溶液中で安定である。ナノ粒子に含まれる核酸は、体液中に存在するヌクレアーゼから保護される。

【0237】

さらに、本発明に従って調製されるナノ粒子は、生理学的pHで中性であるか、又は正に帯電していることが好ましい。

40

【0238】

本明細書に記載のナノ粒子組成物を用いて調製されるナノ粒子又はナノ粒子複合体は、(i)カチオン性脂質、(ii)式(I)の化合物を含む融合性脂質、(iii)PEG脂質及び(iv)オリゴヌクレオチド等の核酸を含む。

【0239】

一実施形態において、ナノ粒子組成物は、カチオン性脂質、ジアシルホスファチジルエタノールアミンを場合により含む式(I)の化合物、ホスファチジルエタノールアミンに結合したPEG(PEG-PE)及びコレステロールと、

50

カチオン性脂質、ジアシルホスファチジルコリンを場合により含む式 (I) の化合物、ホスファチジルエタノールアミンに結合した PEG (PEG-PE) 及びコレステロールと

、カチオン性脂質、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、ジアシルホスファチジルコリンを場合により含む式 (I) の化合物、ジアシルホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンに結合した PEG (PEG-PE) 及びコレステロールと、

カチオン性脂質、ジアシルホスファチジルエタノールアミンを場合により含む式 (I) の化合物、セラミドに結合した PEG (PEG-Cer) 及びコレステロールと、

カチオン性脂質、ジアシルホスファチジルエタノールアミンを場合により含む式 (I) の化合物、ホスファチジルエタノールアミンに結合した PEG (PEG-PE)、セラミドに結合した PEG (PEG-Cer) 及びコレステロールと

の混合物を含む。

【0240】

さらなるナノ粒子組成物は、当技術分野で公知のカチオン性脂質 (複数可) を含有する組成物を修飾することにより調製できる。式 (I) の化合物を含有するナノ粒子組成物は、当技術分野で公知のカチオン性脂質を加えることにより修飾できる。その内容が参照により本明細書に組み込まれている米国特許出願公開第 2008/0020058 号明細書の表 I V に記載の当技術分野で公知の組成物を参照のこと。

【0241】

ナノ粒子の調製のためのナノ粒子組成物の非限定的リストを表 3 に示す。

【表 3】

表3

試料番号	ナノ粒子組成物	モル比	オリゴ
1	カチオン性脂質1: cpd 10: DSPC : Chol : DSPE-PEG	15:15:20:40:10	オリゴ-1
2	カチオン性脂質1: cpd 10: DSPC: Chol: DSPE-PEG	15:5:20:50:10	オリゴ-1
3	カチオン性脂質1: cpd 10: DSPC: Chol: DSPE-PEG	25:15:20:30:10	オリゴ-1
4	カチオン性脂質1: cpd 10: Chol: DSPE-PEG	20:47:30: 3	オリゴ-1
5	カチオン性脂質1: cpd 10: Chol: DSPE-PEG	17:60:20:3	オリゴ-1
6	カチオン性脂質1: cpd 10: DSPE-PEG	20:78: 2	オリゴ-1
7	カチオン性脂質1: cpd 10: Chol: C16mPEG-セラミド	17:60:20:3	オリゴ-2
8	カチオン性脂質1: cpd 10: Chol: DSPE-PEG: C16mPEG-セラミド	18:60:20:1:1	オリゴ-2

【0242】

一実施形態において、ナノ粒子中のカチオン性脂質 1 : 化合物 10 : コレステロール : PEG-DSPC : C16mPEG-セラミドのモル比は、各々約 18% : 60% : 20% : 1% : 1% のモル比である (試料番号 8)。

【0243】

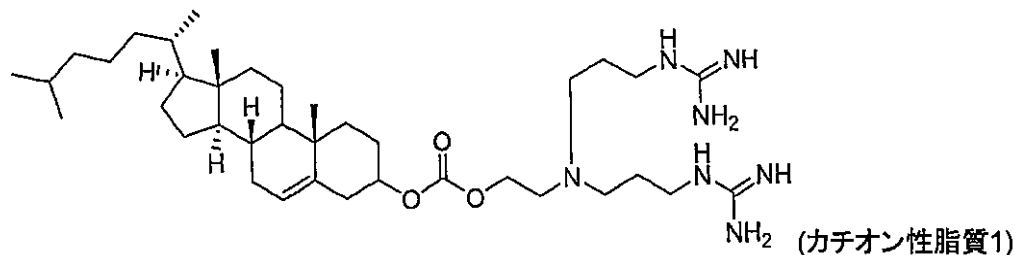
別の実施形態において、ナノ粒子は、カチオン性脂質 1、化合物 10、コレステロール及び C16mPEG-セラミドをナノ粒子組成物中に存在する総脂質の約 17% : 60%

: 20% : 3% のモル比で含有する (試料番号 7)。

【0244】

一実施形態において、組成物中に含有されるカチオン性脂質は、次の構造式：

【化31】



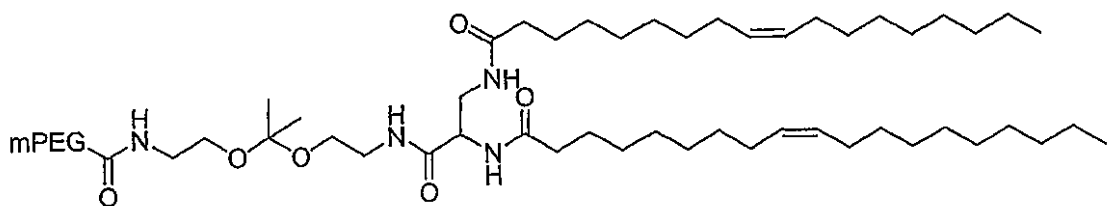
10

を有する。

【0245】

さらなる実施形態において、これらのナノ粒子組成物は、次の構造式を有する放出可能ポリマー脂質

【化32】



20

を含有する。

【0246】

そこでPEG脂質のポリマー部分は、約2000ダルトンの数平均分子量を有する。

【0247】

本明細書で使用するモル比は、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質に対する量を指す。

【0248】

F. 治療方法

本明細書に記載のナノ粒子は、単独で、又は他の療法と組み合わせて、細胞又は組織における標的遺伝子の発現レベルに関連しているか、又はそれに反応する任意の特質、疾患又は状態を予防するか、抑制するか、低減するか又は治療するための治療において使用できる。該方法は、本明細書に記載のナノ粒子を、それを必要とする哺乳動物に投与することを含む。

30

【0249】

本発明の一態様は、治療薬、例えば核酸/オリゴヌクレオチドを哺乳動物細胞にインビボ及び/又はインビトロで導入するか、又は送達する方法を提供する。

【0250】

本発明による方法は、細胞を本明細書に記載の化合物と接触させることを含む。送達は、インビボで適切な医薬組成物の一部として行われてもよく、又はエクスビボ環境もしくはインビトロ環境で細胞に対して直接行われてもよい。

40

【0251】

本発明は、オリゴヌクレオチドを哺乳動物に導入するのに有用である。本明細書に記載の化合物は、哺乳動物、好ましくはヒトに投与できる。

【0252】

本発明によれば、本発明は、哺乳動物の細胞又は組織において遺伝子発現を抑制するか、又はダウンレギュレート (もしくは調節) する方法を好ましくは提供する。遺伝子発現のダウンレギュレーション又は抑制は、インビボ、エクスビボ及び/又はインビトロで実現できる。該方法は、ヒトの細胞又は組織と核酸を封入するナノ粒子とを接触させるか、又はナノ粒子をそれを必要とする哺乳動物に投与することを含む。接触が起こると、本明

50

細書に記載のナノ粒子なしで観察されたものと比較して、少なくとも約 10 %、好ましくは少なくとも約 20 % 以上（例えば、少なくとも約 25 %、30 %、40 %、50 %、60 %）がインビボ、エキスビボ又はインビトロで実現された場合に、例えば mRNA レベル又はタンパク質レベルでの遺伝子発現の抑制又はダウンレギュレーションが成功したとみなされるものとする。

【0253】

本発明の目的のために、「抑制する」又は「ダウンレギュレートする」は、一つ又は複数のタンパク質サブユニットをコードする標的遺伝子の発現、又は RNA もしくは等価 RNA のレベル、あるいは一つ又は複数のタンパク質サブユニットの活性が、本明細書に記載のナノ粒子の不在化で観察されたものと比較して低減されることを意味すると理解されるものとする。

10

【0254】

一つの好ましい実施形態において、標的遺伝子としては、例えばそれだけに限らないが、癌遺伝子、プロ血管新生経路遺伝子、プロ細胞増殖経路遺伝子、ウイルス感染因子遺伝子及びプロ炎症経路遺伝子が挙げられる。

【0255】

好ましくは、標的遺伝子の遺伝子発現は、癌細胞又は癌組織、例えば脳腫瘍細胞、乳癌細胞、結腸直腸癌細胞、胃癌細胞、肺癌細胞、口腔癌細胞、膵臓癌細胞、前立腺癌細胞、皮膚癌細胞又は子宮頸癌細胞において抑制される。癌細胞又は癌組織は、以下のもの：固形腫瘍、リンパ腫、小細胞肺癌、急性リンパ性白血病（ALL）、膵臓癌、膠芽腫、卵巣癌、胃癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、子宮頸癌、脳腫瘍、KB 癌、肺癌、結腸癌、表皮癌等の一つ又は複数に由来するものであってよい。

20

【0256】

一つの特定の実施形態において、本明細書に記載の方法によるナノ粒子は、例えばアンチセンス bc1 - 2 オリゴヌクレオチド、アンチセンス HIF - 1 オリゴヌクレオチド、アンチセンススルビピンオリゴヌクレオチド、アンチセンス ErbB3 オリゴヌクレオチド、アンチセンス PIK3CA オリゴヌクレオチド、アンチセンス HSP27 オリゴヌクレオチド、アンチセンスアンドロゲン受容体オリゴヌクレオチド、アンチセンス Gli2 オリゴヌクレオチド及びアンチセンス カテニンオリゴヌクレオチドを含む。

【0257】

本発明によれば、ナノ粒子はオリゴヌクレオチド（各核酸が天然核酸又は修飾核酸である、配列番号 1、配列番号 2 及び 3、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15 並びに配列番号 16）を含むことができ、それを使用できる。本明細書で企図される療法は、前記ナノ粒子に封入された核酸を使用する。一実施形態において、8 個以上の連続アンチセンスヌクレオチドを含有する治療用ヌクレオチドを治療で使用できる。

30

【0258】

あるいは、哺乳動物を治療する方法も提供される。該方法は、有効量の本明細書に記載のナノ粒子を含有する医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む。該方法の有効性は、治療される状態に対する核酸の有効性に依存するであろう。本発明は、哺乳動物における様々な医学的状态を治療する方法を提供する。該方法は、有効量の封入された治療用核酸を含有するナノ粒子を、このような治療を必要とする哺乳動物に投与することを含む。本明細書に記載のナノ粒子は、とりわけ、疾患、例えば（それだけに限らないが）癌、炎症性疾患及び自己免疫疾患を治療するのに有用である。

40

【0259】

一実施形態において、有効量の本明細書に記載のナノ粒子を含有する医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、悪性腫瘍又は癌を有する患者を治療する方法も提供される。治療される癌は、以下のもの：固形腫瘍、リンパ腫、小細胞肺癌、急性リンパ性白血病（ALL）、膵臓癌、膠芽腫、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、前立腺癌、子宮

50

頸癌、脳腫瘍、K B 癌、肺癌、結腸癌、表皮癌等の一つ又は複数であってよい。ナノ粒子は、標的遺伝子の遺伝子発現をダウンレギュレートすることにより、新生物疾患を治療し、全身腫瘍組織量を減少させ、新生物の転移を予防し、哺乳動物における腫瘍／新生物の増殖の再発を予防するのに有用である。例えば、ナノ粒子は、転移性疾患（即ち、肺に転移する癌）の治療に有用である。

【0260】

さらに別の態様において、本発明は、インビボ又はインビトロで癌細胞の増殖又は成長を抑制する方法を提供する。該方法は、癌細胞を本明細書に記載のナノ粒子と接触させることを含む。一実施形態において、本発明は、細胞が E r b B 3 遺伝子を発現するインビボ又はインビトロで癌の増殖を抑制する方法を提供する。

10

【0261】

別の態様において、本発明は、例えば核において E r b B 3 mRNA に結合し得る、癌細胞内に核酸（例えば、アンチセンス E r b B 3 LNA オリゴヌクレオチド）を送達させる手段を提供する。結果として、E r b B 3 タンパク質発現が抑制され、それにより癌細胞の増殖が抑制される。該方法は、オリゴヌクレオチド（例えば、LNA を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド）を癌細胞に導入し、癌細胞又は癌組織における標的遺伝子（例えばスルビビン、H I F - 1 又は E r b B 3 ）発現を減少させる。

【0262】

あるいは、本発明は、癌細胞のアポトーシスを調節する方法を提供する。さらに別の態様において、インビボ又はインビトロで化学療法剤に対する癌細胞又は癌組織の感受性を高める方法も提供される。

20

【0263】

さらに別の態様において、インビボ又はインビトロで腫瘍細胞を殺滅する方法が提供される。該方法は、本明細書に記載の化合物を腫瘍細胞に導入して、E r b B 3 遺伝子等の遺伝子発現を減少させるステップと、腫瘍細胞と、腫瘍細胞の一部を殺滅するのに十分な量の少なくとも 1 種の抗癌剤（例えば、化学療法剤）とを接触させるステップとを含む。したがって、殺滅される腫瘍細胞部分は、本明細書に記載のナノ粒子の不在化で同量の化学療法剤により殺滅されるであろう部分よりも大きくてよい。

【0264】

本発明のさらなる態様において、抗癌剤／化学療法剤は、本明細書に記載の化合物と組み合わせ、同時に又は順次に使用できる。本明細書に記載の化合物は、抗癌剤の前に、又はそれと同時に、あるいは抗癌剤の投与後に投与できる。したがって、本明細書に記載のナノ粒子は、化学療法剤の治療前、治療中又は治療後に投与できる。

30

【0265】

さらにさらなる態様は、相乗的又は付加的な利益のために本明細書に記載の本発明の化合物と他の抗癌療法とを組み合わせることを含む。

【0266】

あるいは、本明細書に記載のナノ粒子組成物は、哺乳動物に対して負電荷又は中性電荷を好ましくは有する、医薬活性剤を送達するために使用できる。医薬活性剤／化合物を封入するナノ粒子は、それを必要とする哺乳動物に投与できる。医薬活性剤／化合物は、低分子量の分子を含む。通常、医薬活性剤は、約 1 5 0 0 ダルトン未満（即ち 1 0 0 0 ダルトン未満）の分子量を有する。

40

【0267】

さらなる実施形態において、本明細書に記載の化合物は、核酸、医薬活性剤又はそれらの組合せを送達するために使用できる。

【0268】

さらにさらなる実施形態において、治療と関連するナノ粒子は、相乗効果の利用のために一つ又は複数の治療用核酸（同一又は異なるいずれか、例えば同一又は異なるオリゴヌクレオチド）及び／又は一つもしくは複数の医薬活性剤の混合物を含有できる。

【0269】

50

G. ナノ粒子の医薬組成物 / 医薬製剤

本明細書に記載のナノ粒子を含む医薬組成物 / 医薬製剤は、薬学的に使用できる製剤への活性化化合物の加工を促進する賦形剤及び補助剤を含む、一つ又は複数の生理学的に許容される担体と共に製剤化できる。適切な製剤は、選択される投与経路、即ち、局所治療であるか、又は全身治療であるかに依存する。

【0270】

適切な形態は、ある程度、経口、経皮又は注射等の使用又は侵入経路に依存する。適切な製剤を調製する当技術分野で公知の考慮因子としては、それだけに限らないが、組成物又は製剤がその効果を発揮することを妨げるであろう毒性及び任意の欠点が挙げられる。

【0271】

本明細書に記載のナノ粒子の医薬組成物の投与は、経口、経肺、局所又は非経口であってよい。局所投与としては、それだけに限らないが、例えば膣送達及び直腸送達を含む、粘膜を介することを含む、表皮、経皮、眼の経路を介した投与が挙げられる。静脈内、動脈内、皮下、腹腔内又は筋肉内の注射又は注入を含む非経口投与も企図される。

【0272】

一つの好ましい実施形態において、治療用オリゴヌクレオチドを含有するナノ粒子は、静脈内 (i.v.) 又は腹腔内 (i.p.) に投与される。本発明の多くの態様において、非経口経路が好ましい。

【0273】

それだけに限らないが静脈注射、筋肉内注射及び皮下注射を含む注射について、本発明のナノ粒子は、水溶液中で、好ましくは生理学的に相容性の緩衝液、例えば生理食塩水緩衝液中で、又はそれだけに限らないがピロリドン又はジメチルスルホキシドを含む極性溶媒中で製剤化できる。

【0274】

ナノ粒子は、ボラス注入又は連続注入用に製剤化されてもよい。注射用製剤は、単位剤形、例えばアンプル又は多用量容器中に存在できる。有用な組成物として、それだけに限らないが、油性又は水性ビヒクル中の懸濁液、溶液又はエマルジョンが挙げられ、賦形剤、例えば懸濁化剤、安定化剤及び / 又は分散化剤を含有できる。非経口投与用の医薬組成物としては、水溶性形態の水溶液が挙げられる。水性注射用懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール又はデキストラン等の懸濁液の粘度を調節する物質を含有できる。懸濁液は、溶液中のナノ粒子の濃度を増加させる適切な安定剤及び / 又は薬剤も場合により含有できる。あるいは、ナノ粒子は、適当なビヒクル、例えば滅菌バイロジェンフリー水により使用前に構成するために粉末形態であってもよい。

【0275】

経口投与について、本明細書に記載のナノ粒子は、ナノ粒子と、当技術分野で周知の薬学的に許容される担体とを合わせることにより製剤化できる。このような担体により、本発明のナノ粒子を、患者の経口摂取用に錠剤、ピル、トローチ、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、ペースト、スラリー、溶液、懸濁液、患者の飲料水での希釈用の濃縮液及び懸濁液、患者の食餌での希釈用の予混合剤等に製剤化できる。経口使用のための医薬製剤は、固体賦形剤を使用し、得られた混合物を場合により粉碎して、所望される場合、他の適切な補助剤を加えた後に顆粒の混合物を加工して、錠剤又は糖衣錠の核を得ることにより製造できる。有用な賦形剤としては、特に充填剤、例えば糖 (例えばラクトース、スクロース、マンニトール又はソルビトール)、セルロース製剤、例えばトウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン及びジャガイモデンプン、並びに他の物質、例えばゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム及び / 又はポリビニルピロリドン (PVP) がある。所望される場合、崩壊剤、例えば架橋ポリビニルピロリドン、寒天又はアルギン酸を加えてもよい。塩、例えばアルギン酸ナトリウムも使用できる。

【0276】

吸入投与については、本発明のナノ粒子は、圧縮バック又はネブライザーを用いるエア

10

20

30

40

50

ロゾルスプレー、及び適切な噴射剤の形態で好都合に送達できる。

【0277】

ナノ粒子は、例えば従来の座薬基剤、例えばココアバター又は他のグリセリドを用いて、直腸組成物、例えば座薬又は停留浣腸に製剤化してもよい。

【0278】

先に記載の製剤に加えて、ナノ粒子は、デポー製剤として製剤化されてもよい。このような長時間作用型製剤は、移植（例えば皮下又は筋肉内）により又は筋肉内注射により投与できる。本発明のナノ粒子は、適切なポリマー材料又は疎水性材料（例えば、薬理学的に許容される油のエマルジョン）と共に、イオン交換樹脂と共に、又はそれだけに限らないが難溶性の塩等の難溶性誘導体としてこの投与経路用に製剤化できる。

10

【0279】

さらに、ナノ粒子は、持続放出系、例えばナノ粒子を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスを用いて送達できる。様々な持続放出材料が確立されており、当業者に周知である。

【0280】

さらに、抗酸化剤及び懸濁化剤は、本明細書に記載のナノ粒子の医薬組成物中で使用できる。

【0281】

H. 用量

一つ又は複数の予め選択された遺伝子の発現を抑制するのに適した用量、例えば臨床状況における治療有効量の決定は、特に本明細書の開示内容に照らして、十分当業者の能力の範囲内である。

20

【0282】

本発明の方法で使用する任意の治療用核酸について、治療有効量は、最初にインビトロアッセイから推定できる。次いで、投与量は、有効な投与量を含む循環濃度範囲を得るために動物モデルでの使用に対して定式化できる。次いで、このような情報を使用して、患者に有用な投与量をより正確に決定できる。

【0283】

投与される医薬組成物の量は、そこに含まれる核酸の有効性に依存するであろう。一般に、治療で使用する核酸を含有するナノ粒子の量は、哺乳動物において所望の治療結果を効果的に実現する量である。必然的に、様々なナノ粒子の投与量は、そこに封入された核酸（例えばオリゴヌクレオチド）（又は医薬活性剤）に応じて若干変化するであろう。さらに、投与量は、当然ながら、剤形及び投与経路に応じて変化し得る。しかし、一般に、本明細書に記載のナノ粒子に封入された核酸は、約0.1～約1g/kg/週、好ましくは約1～約500mg/kg、より好ましくは1～約100mg/kg（即ち、約3～約90mg/kg/用量）の範囲の量で投与できる。

30

【0284】

上に示された範囲は、例示的であり、当業者は、臨床経験及び治療指示に基づき最適な用量を決定するであろう。さらに、正確な製剤、投与経路及び投与量は、患者の状態を考慮して個々の医師が選択できる。さらに、本明細書に記載のナノ粒子の毒性及び治療有効性は、当業者に周知の方法を用いて細胞培養又は実験動物において標準医薬操作により決定できる。

40

【0285】

あるいは、約1～約100mg/kg/用量（0.1～100mg/kg/用量）の量を、核酸の有効性に応じて治療で使用してもよい。単位剤形は、一般に、活性剤、オリゴヌクレオチドの約1mg～約60mgの範囲である。

【0286】

一実施形態において、本発明の治療は、本明細書に記載のナノ粒子を、約1～約60mg/kg/用量（約25～60mg/kg/用量、約3～約20mg/kg/用量）、例えば60、45、35、30、25、15、5又は3mg/kg/用量（単回投与計画又

50

は多回投与計画のいずれか)の量で哺乳動物に投与することを含む。例えば、本明細書に記載のナノ粒子は、 $q \times 3 \times d \times 9$ で5、25、30又は60 mg/kg/用量の量で静脈内に投与できる。別の例としては、治療プロトコルは、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、毎週約4～約18 mg/kg/用量、又は毎週約4～約9.5 mg/kg/用量(例えば、6週間のサイクルで3週間毎週約8 mg/kg/用量)で投与することを含む。

【0287】

あるいは、本明細書に記載のナノ粒子中に封入されたオリゴヌクレオチドの送達は、約0.1～約1000 μ M、好ましくは約10～約1500 μ M(即ち、約10～約1000 μ M、約30～約1000 μ M)の濃度のオリゴヌクレオチドと腫瘍細胞又は腫瘍組織とをインビボ、エクスピボ又はインビトロで接触させることを含む。

10

【0288】

組成物は、1日1回投与してもよく、複数週の治療プロトコルの一環として与えることができる複数回投与に分けてもよい。正確な用量は、当業者に認識されるように、状態の段階及び重症度、核酸に対する腫瘍等の疾患の感受性、及び治療される患者の個々の特性に依存するであろう。

【0289】

ナノ粒子が投与される本発明の全ての態様において、言及された投与量は、投与されるナノ粒子の量ではなくオリゴヌクレオチドの分子量に基づいている。

【0290】

治療は、所望の臨床結果が得られるまで1日又は数日行われることが企図される。治療用の核酸(又は医薬活性剤)を封入するナノ粒子の投与の正確な量、回数及び期間は、当然ながら、患者の性別、年齢及び医学的状态、並びに担当臨床医により決定された疾患の重症度に応じて変化するであろう。

20

【0291】

さらにさらなる態様は、相乗的又は付加的な利益のために、本明細書に記載の本発明のナノ粒子と他の抗癌療法とを組み合わせることを含む。

【実施例】

【0292】

以下の実施例は、本発明のさらなる理解を得るために利用されるが、本発明の有効な範囲を制限することを何ら意味するものではない。

30

【0293】

実施例において、全ての合成反応は、乾燥窒素又は乾燥アルゴンの雰囲気下で行われる。N-(3-アミノプロピル)-1,3-プロパンジアミン)、BOC-ON、LiOCl₄、コレステロール及び1H-ピラゾール-1-カルボキサミジンHClをAldrichから購入した。全ての他の試薬及び溶媒を、さらなる精製なしで使用した。スルビビン遺伝子を標的とするLNAオリゴ-1及びErB3遺伝子を標的とするオリゴ-2を社内で調製した。その配列を表4に示す。インターヌクレオチド結合はホスホロチオエートであり、^mCはメチル化シトシンを表し、大文字はLNAを示す。

【表4】

表4

40

LNAオリゴ	配列
オリゴ-1(配列番号1)	5'- ^m CT ^m CAatccatgg ^m CAGc-3'
オリゴ-2(配列番号6)	5'-TAGcctgtcactt ^m CT ^m C-3'

【0294】

以下の略語、例えばLNA(ロックド核酸オリゴヌクレオチド)、BACC(2-[N,N'-ジ(2-グアニジンプロピル)]アミノエチルコレステリルカーボネート)、Chol(コレステロール)、DIEA(ジイソプロピルエチルアミン)、DMAP(4-N,N-ジメチルアミノピリジン)、DOPE(L- -ジオレオイルホスファチジルエ

50

タノールアミン、Avanti Polar Lipids、USA又はNOF、Japan)、DLS(動的光散乱)、DSPC(1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)(NOF、Japan)、DSPE-PEG(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-(ポリエチレングリコール)2000アンモニウム塩又はナトリウム塩、Avanti Polar Lipids、USA及びNOF、Japan)、KD(ノーンダウン)、EPC(卵ホスファチジルコリン、Avanti Polar Lipids、USA)及びC16 mPEG-セラミド(N-パルミトイル-スフィンゴシン-1-スクシニル(メトキシプロピルエチレングリコール)2000、Avanti Polar Lipids、USA)は、実施例全体で使用され得る。他の略語、例えばFAM(6-カルボキシフルオレセイン)、FBS(ウシ胎児血清)、GAPDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ)、DMEM(ダルベッコの修飾イーグル培地)、MEM(修飾イーグル培地)、TEAA(テトラエチルアンモニウムアセテート)、TFA(トリフルオロ酢酸)、RT-qPCR(逆転写定量的ポリメラーゼ連鎖反応)も使用できる。

【0295】

(実施例1)

一般的NMR法

別段の指示がない限り、Varian Mercury 300 NMR分光計及び溶媒として重水素化クロロホルムを用いて300 MHzで¹H NMRスペクトル及び75.46 MHzで¹³C NMRスペクトルを得た。化学シフト()を、テトラメチルシラン(TMS)からのダウンフィールドで100万分の一(ppm)で報告する。

【0296】

(実施例2)

一般的なHPLC法

反応混合物、並びに中間体及び最終生成物の純度を、Beckman Coulter System Gold(登録商標)HPLC装置でモニターする。1 mL/分の流量で0.05% TFA中のアセトニトリル10~90%の勾配、又は1 mL/分の流量で50 mM TEAA緩衝液中のアセトニトリル25~35%の勾配を用いて、168 ダイオードアレイUV検出器を備えたZORBAX(登録商標)300SB C8逆相カラム(150×4.6 mm)又はPhenomenex Jupiter(登録商標)300A C18逆相カラム(150×4.6 mm)を使用する。アニオン交換クロマトグラフィーを、Waters製のAP-Emptyガラスカラムに充填したApplied Biosystems製のPoros 50HQ強アニオン交換樹脂を用いてGE Healthcare(Amersham Bioscience)製のAKTAエクスプローラー100Aで行った。脱塩は、Amersham Biosciences製のHiPrep 26/10脱塩カラム(PEG-オリゴ用)を用いて達成された。

【0297】

(実施例3)

一般的なmRNAダウンレギュレーション法

細胞を完全培地(F-12K又はDMEM、10% FBSで補足)中で維持する。各ウェル中に2.5×10⁵細胞を含有する12ウェルプレート(37℃)で終夜インキュベートする。細胞をOpti-MEM(登録商標)で1回洗浄し、Opti-MEM(登録商標)400 µLを各ウェルに加える。次いで、オリゴヌクレオチドを含有するナノ粒子又はLipofectamine 2000(登録商標)の溶液を各ウェルに加える。細胞を4時間インキュベートし、次いで各ウェルに培地600 µLを加え、24時間インキュベートする。処理の24時間後、ヒトスルビビン遺伝子等の標的遺伝子及びGAPDH等のハウスキーピング遺伝子の細胞内mRNAレベルを、RT-qPCRで定量する。mRNAの発現レベルを正規化する。

【0298】

(実施例4)

10

20

30

40

50

一般的なRNA調製法

インビトロmRNAダウンレギュレーションスクリーニングのために、製造業者の使用説明書に従って全RNAをRNAqueous Kit（登録商標）（Ambion）を用いて調製する。RNA濃度を、ナノドロップを用いてOD_{260nm}で決定する。

【0299】

（実施例5）

一般的なRT-qPCR法

全ての試薬はApplied Biosystems製である： High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（登録商標）（4368813）、20×PCRマスターミックス（4304437）、並びにヒトGAPDH（Cat. # 0612177）及びスルビピン（BIRK5 Hs00153353）用TaqMan（登録商標）遺伝子発現アッセイキット。全RNA 2.0 μgを、最終量50 μLでのcDNA合成に使用する。反応を、PCRサーモサイクラーで25にて10分間、37にて120分間、85にて5秒間行い、次いで4で貯蔵する。リアルタイムPCRを、50 - 2分間、95 - 10分間及び95 - 15秒間/60 - 1分間のプログラムで40サイクル行う。各qPCR反応については、cDNA 1 μLを最終量30 μLで使用する。

10

【0300】

（実施例6）

H-Dap-OMe：2HClの調製（化合物1）

20

H-Dap-(Boc)-OMe：HCl（5 g、19.63 mmol）を1.4-ジオキサン（130 mL）中の2 M HClで室温にて30分間処理した。溶媒を30～35にて真空下で除去した。残渣をジエチルエーテル中で再懸濁し、濾過した。単離した固体を真空下でP₂O₅で乾燥させ、生成物3.4 g（90%）を得た。¹³C NMR（DMSO-d₆） 38.95, 49.99, 53.53, 66.37, 166.77.

【0301】

（実施例7）

ジオレオイル-DAP-OMeの調製（化合物2）

無水DMF 26 mL中の化合物1（3.4 g、17.8 mmol）の溶液を無水DCM 170 mL中のオレイン酸（22.5 mL、20.0 g、71.1 mmol）の溶液に加えた。混合物を0～5まで冷却し、次いでEDC（20.5 g、106.7 mmol）及びDMAP（28.2 g、231.1 mmol）を加えた。反応混合物を終夜攪拌し、窒素下で室温まで昇温させた。反応の完了をTLC（DCM：MeOH = 90：1、v/v）でモニターした。反応混合物を試薬等級のDCM 200 mLで希釈し、1 N HCl（3×80 mL）及び0.5%水性NaHCO₃（3×80 mL）で洗浄した。得られた有機層を分離し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、30にて真空下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（DCM/MeOH/TEA = 95：5：0.1、v/v/v）で精製し、生成物7.0 g（61%）を生成した。¹³C NMR 14.15, 22.60, 25.55, 25.69, 27.20, 27.25, 29.18, 29.23, 29.29, 29.34, 29.55, 29.75, 29.78, 31.91, 36.43, 36.52, 41.53, 52.63, 53.58, 129.49, 129.54, 129.82, 129.85, 170.55, 173.59, 174.49.

30

40

【0302】

（実施例8）

ジオレオイル-Dap-OHの調製（化合物3）

水7 mL中のNaOH（0.87 g、21.63 mmol）の溶液をエタノール70 mL中の化合物2（7.0 g、10.8 mmol）の溶液に加えた。混合物を室温で終夜攪拌し、室温にて真空下で濃縮した。残渣を水63 mLに懸濁し、溶液を0～5にて1 N HClで酸性化した。水溶液をDCMで3回抽出した。得られた有機層を合わせて、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。溶媒を35にて真空下で除去し、生成物5.5 g（80%）を生成した。¹³C NMR 14.19, 22.75, 25.51, 25.68, 27.25, 27.29, 29.21,

50

29.26, 29.32, 29.38, 29.59, 29.79, 29.82, 31.95, 36.30, 36.37, 41.58, 55.15, 129.53, 129.91, 171.49, 175.67, 176.19.

【0303】

(実施例9)

BocNHCH₂CH₂NH₂の調製(化合物4)

無水DCM 150 mL中のBoc無水物(60 g、274.9 mmol)の溶液を、無水THF 250 mL及び無水DCM 200 mL中のエタン-1,2-ジアミン(41.3 g、687.3 mmol)の溶液に0~5 で1.5時間かけて徐々に加えた。反応混合物を終夜撹拌しながら、室温まで昇温させた。水300 mLを混合物に加え、それを30にて真空下で濃縮した。得られた水溶液をDCM(3×300 mL)で洗浄し、有機層を合わせ、0.5N HCl(3×300 mL)で抽出した。水層を合わせて、pHを9~10に4N NaOH溶液で調整し、次いでDCM(3×500 mL)で抽出した。有機層を合わせて、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。溶媒を35にて真空下で除去し、生成物17.6 g(40%)を生成した。¹³C NMR 28.23, 41.67, 43.19, 78.77, 155.93.

10

【0304】

(実施例10)

ジオレオイル-Dap-NHCH₂CH₂NHBocの調製(化合物5)

DMAP(6.2 g、5.12 mmol)を、無水DMF 50 mL及び無水DCM 400 mL中の化合物3(5.4 g、8.53 mmol)の溶液に加え、溶液を氷浴で冷却した。化合物4(2.73 g、17.1 mmol)及びEDC(6.6 g、34.1 mmol)を溶液に加え、溶液を室温まで昇温させながら終夜撹拌した。反応の完了をTLC(DCM/MeOH=9:1、v/v)でモニターし、反応混合物をDCM 500 mLで希釈し、0.2N HCl(3×500 mL)及び水(3×500 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。溶媒を35にて真空下で除去し、生成物5.6 g(85%)を生成した。¹³C NMR 14.16, 22.72, 25.52, 25.77, 27.23, 27.26, 28.43, 29.24, 29.35, 29.56, 29.79, 31.92, 36.50, 40.25, 40.38, 41.99, 55.22, 76.57-77.42 (CDCl₃), 79.41, 129.54, 129.86, 156.35, 170.44, 174.25, 175.35.

20

【0305】

(実施例11)

ジオレオイル-Dap-NHCH₂CH₂NH₂の調製(化合物6)

化合物5(5.6 g、7.2 mmol)を、DCM 95 mLに溶解させ、溶液をトリフルオロ酢酸 24 mLで室温にて30分間処理した。溶媒を室温にて真空下で除去し、残渣をDCM 200 mLに再度溶解させた。溶液を、pHが8~9になるまで水及び1% NaHCO₃で数回洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を30にて真空下で除去し、生成物4.13 g(85%)を生成した。¹³C NMR 14.15, 22.70, 25.62, 25.77, 27.25, 29.24, 29.35, 29.55, 29.78, 31.91, 36.43, 41.53, 54.95, 129.48, 129.85, 170.99, 174.43, 175.33.

30

【0306】

(実施例12)

4-(ジメチルアセタール)安息香酸の調製(化合物7)

4-ホルミル安息香酸(1.5 g、10 mmol)を無水メタノール 30 mLに溶解させ、次いでアセトニトリル(300 μL、0.3 mmol)中の1.0 M テトラフルオロホウ酸リチウム、オルトギ酸トリメチル(1.38 g、10 mmol)に加えた。反応混合物を終夜還流した。溶媒を除去し、残渣を沸騰ヘキサンに30分間懸濁した。混合物を室温まで冷却し、固体を濾過により単離し、生成物1.5 g(77%)を生成した。¹³C NMR (CD₃OD) 53.26, 103.88, 127.75, 130.47, 131.14, 144.29, 169.30.

40

【0307】

(実施例13)

化合物8の調製

50

FmocNH-Lys(OMe)-NH₂ (0.60 mmol) 及び DMAP (219.6 mg、1.80 mmol) を無水 DCM 及び無水 DMF に溶解させる。混合物を 0 ~ 5 まで冷却し、次いで EDC (345.6 mg、1.80 mmol) 及び化合物 7 (352.8 mg、1.80 mmol) を加える。反応混合物を N₂ 下で室温まで 0 にて終夜撹拌する。溶媒を除去し、残渣を DMF / IPA (10 mL / 100 mL) の混合溶媒から再結晶化し、生成物を得る。

【0308】

(実施例 14)

化合物 9 の調製

クロロホルム 6.75 mL 中の化合物 8 (0.46 mmol) を 86% のギ酸 1.68 mL で室温にて終夜処理する。溶媒を除去し、残渣を DCM / エチルエーテルで 2 回再結晶化し、生成物を得る。

【0309】

(実施例 15)

化合物 10 の調製

化合物 6 (0.30 mmol) を無水 DCM 10 mL 及び無水 DMF 2 mL に溶解させ、次いで化合物 9 (1.0 g、0.2 mmol)、分子篩 (2 g) 及び DIEA (25.8 mg、0.2 mmol) を加える。反応混合物を N₂ 下で室温にて終夜撹拌する。反応混合物を濾過し、濾過液を真空下で濃縮する。残渣をアセトニトリル - IPA から再結晶化する。非常に細かい固体懸濁液を遠心分離して生成物を得る。化合物をピペリジンで処理し、Fmoc を除去し、アミンを得る。アミン中間体を NaOH で処理し、メチルエステルを加水分解し、次いで酸性化して、化合物 10 を得る。

【0310】

(実施例 16)

LNA 脂質ナノ粒子組成物の調製

本実施例において、様々な核酸、例えば LNA 含有オリゴヌクレオチドを封入するナノ粒子組成物を調製する。例えば、カチオン性脂質 1、化合物 10、Chol、DSPC-PEG 及び C₁₆mPEG-セラミドを、90% エタノール (総脂質 30 µmol) 10 µL 中で 18:60:20:1:1 のモル比で混合する。LNA オリゴヌクレオチド (0.4 µmol) を 20 mM トリス緩衝液 (pH 7.4 ~ 7.6) 10 mL に溶解させる。37 まで加熱した後、二つの溶液をデュアルシリンジポンプにより混合し、次いで混合溶液を 20 mM トリス緩衝液 (300 mM NaCl、pH 7.4 ~ 7.6) 20 mL で希釈する。混合物を 37 で 30 分間インキュベートし、10 mM PBS 緩衝液 (138 mM NaCl、2.7 mM KCl、pH 7.4) で透析する。透析により混合物からエタノールを除去した後、安定な粒子が得られる。ナノ粒子溶液を遠心分離により濃縮する。ナノ粒子溶液を 15 mL の遠心分離濾過装置 (Amicon Ultra-15、Millipore、USA) に移す。遠心分離速度は 3000 rpm であり、遠心分離中の温度は 4 である。濃縮懸濁液を所与の時間後に収集し、0.22 µm のシリンジフィルター (Millex-GV、Millipore、USA) による濾過により滅菌する。

【0311】

ナノ粒子の直径及び多分散性を、Plus 90 Particle Size Analyzer Dynamic Light Scattering Instrument (Brookhaven、New York) で培地として水 (Sigma) 中で 25 ° で測定する。

【0312】

LNA オリゴヌクレオチドの封入効率を UV-VIS (Agilent 8453) で決定する。背景紫外線-vis スペクトルは、PBS 緩衝生理食塩水 (250 µL)、メタノール (625 µL) 及びクロロホルム (250 µL) からなる混合溶液である溶液を走査することにより得られる。封入された核酸の濃度を決定するために、メタノール (62

10

20

30

40

50

5 μL) 及びクロロホルム (250 μL) を PBS 緩衝生理食塩水ナノ粒子懸濁液 (250 μL) に加える。混合後、透明な溶液が得られ、この溶液を 260 nm での吸光度を測定する前に 2 分間超音波処理する。封入された核酸の濃度及び負荷効率を、方程式 (1) 及び (2) に従って計算する：

$$C_{en} (\mu\text{g} / \text{mL}) = A_{260} \times OD_{260} \text{ 単位} (\mu\text{g} / \text{mL}) \times \text{希釈係数} (\mu\text{L} / \mu\text{L}) (1)$$

希釈係数は、アッセイ体積 (μL) を試料貯蔵体積 (μL) で割ることにより得られる。

【0313】

$$\text{封入効率} (\%) = [C_{en} / C_{initial}] \times 100 (2)$$

C_{en} は、精製後にナノ粒子懸濁液に封入された核酸 (即ち、LNA オリゴヌクレオチド) の濃度であり、 $C_{initial}$ は、ナノ粒子懸濁液の形成前の最初の核酸 (LNA オリゴヌクレオチド) の濃度である。様々なナノ粒子組成物の例を、表 5 及び 6 に要約する。

【表 5】

表5

試料番号	ナノ粒子組成物	モル比	オリゴ
1	カチオン性脂質1: cpd 10: DSPC : Chol : PEG-DSPE	15:15:20:40:10	オリゴ-1
2	カチオン性脂質1: cpd 10: DSPC: Chol: PEG-DSPE	15:5:20:50:10	オリゴ-1
3	カチオン性脂質1: cpd 10: DSPC: Chol: PEG-DSPE	25:15:20:30:10	オリゴ-1
4	カチオン性脂質1: cpd 10: Chol: PEG-DSPE	20:47:30: 3	オリゴ-1
5	カチオン性脂質1: cpd 10: Chol: PEG-DSPE	17:60:20:3	オリゴ-1
6	カチオン性脂質1: cpd 10: PEG-DSPE	20:78: 2	オリゴ-1
7	カチオン性脂質1: cpd 10: Chol:C16mPEG-セラミド	17:60:20:3	オリゴ-2
8	カチオン性脂質1: cpd 10: Chol: PEG-DSPE: C16mPEG-セラミド	18:60:20:1:1	オリゴ-2

【表 6】

表6

試料番号	ナノ粒子組成物	モル比	オリゴ
NP1	カチオン性脂質1: cpd 10: Chol: PEG-DSPE: C16mPEG-セラミド	18:60:20:1:1	オリゴ-2
NP2	カチオン性脂質1: cpd 10: Chol: PEG-DSPE: C16mPEG-セラミド	18:60:20:1:1	FAM-オリゴ-2
NP3	カチオン性脂質1: cpd 10: Chol: PEG-DSPE: C16mPEG-セラミド	18:60:20:1:1	なし

10

【0314】

(実施例17)

ナノ粒子の安定性

ナノ粒子の安定性は、構造的完全性をPBS緩衝液中で4 にて経時的に保持するその能力として定義される。ナノ粒子のコロイド安定性は、平均径の変化を経時的にモニターすることにより評価される。表6の試料番号NP1で調製したナノ粒子を、10mM PBS緩衝液(138 mM NaCl、2.7 mM KCl、pH 7.4)中に分散させ、4 にて貯蔵する。所与の時間で、ナノ粒子懸濁液約20~50μLを取り出し、最大2mLの純水で希釈する。ナノ粒子のサイズを25 にてDLSで測定する。

20

【0315】

(実施例18)

インビトロでのナノ粒子の細胞取込み

本明細書に記載のナノ粒子に封入された核酸(LNAオリゴヌクレオチドオリゴ-2)の細胞取込み効率は、前立腺癌細胞(15PC3細胞株)等のヒト癌細胞で評価される。試料NP2のナノ粒子を、実施例16に記載の方法を用いて調製する。LNAオリゴヌクレオチド(オリゴ-2)を、蛍光顕微鏡試験のためにFAMで標識する。

30

【0316】

ナノ粒子を15PC3細胞株で評価する。細胞を完全培地(DMEM、10%FBSで補足)中で維持する。各ウェル中に 2.5×10^5 細胞を含有する12ウェルプレート(37 度)で終夜インキュベートする。細胞をOpti-MEMで1回洗浄し、Opti-MEM400mLを各ウェルに加える。次いで、細胞を、核酸を封入する試料番号NP2(200nM)のナノ粒子溶液(FAM-修飾オリゴ2)又は対照としてナノ粒子なしでの遊離核酸溶液(裸のFAM-修飾オリゴ2)で処理する。細胞を37 にて24時間インキュベートする。細胞をPBSで5回洗浄し、次いでウェル毎にHoechst溶液(2mg/mL)300mLで30分間染色し、次いでPBSで5回洗浄する。細胞を予備冷却(-20)した70%EtOHで-20 にて20分間固定させる。細胞を蛍光顕微鏡下で検査し、本明細書に記載のナノ粒子に封入された核酸の細胞取込みの効率を評価する。

40

【0317】

(実施例19)

様々なヒト癌細胞におけるmRNAダウンレギュレーションに対するナノ粒子のインビトロでの有効性

本明細書に記載のナノ粒子の有効性は、様々な癌細胞、例えばヒト表皮癌細胞(A431)、ヒト胃癌細胞(N87)、ヒト肺癌細胞(A549、HCC827又はH1581)、ヒト前立腺癌細胞(15PC3、LNCaP、PC3、CWR22、DU145)、

50

ヒト乳癌細胞 (MCF7、SKBR3)、結腸癌細胞 (SW480)、膵臓癌細胞 (BxPC3) 及び黒色腫 (518A2) で評価される。細胞は、以下のもの: アンチセンス ErbB3 オリゴヌクレオチドを封入するナノ粒子 (試料番号 NP1) 又はプラセボ空ナノ粒子 (試料番号 NP3) の内の一つで処理される。ErbB3 発現のダウンレギュレーションに対する各ナノ粒子のインビトロでの有効性は、実施例 3 に記載の方法で測定される。

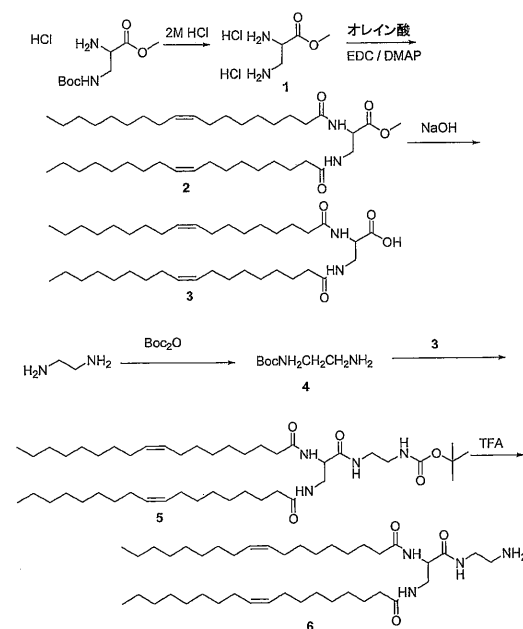
【0318】

(実施例 20)

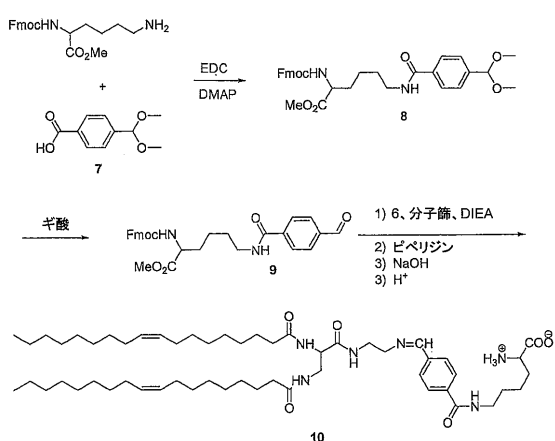
ヒト前立腺癌異種移植マウスモデルの腫瘍及び肝臓における mRNA ダウンレギュレーションに対するナノ粒子の有効性

本明細書に記載のナノ粒子のインビボでの有効性をヒト前立腺癌異種移植マウスにおいて評価する。15PC3 ヒト前立腺腫瘍を、 5×10^6 細胞/マウスを右脇腹に皮下注射することによりヌードマウスにおいて確立する。腫瘍が平均体積 100 mm^3 に達しとき、マウスを 1 グループ 5 匹に無作為に分類する。各グループのマウスをアンチセンス ErbB3 オリゴヌクレオチド (試料番号 NP1) 又は対応する裸のオリゴヌクレオチド (オリゴ 2) を封入するナノ粒子で処理する。ナノ粒子を、 15 mg/kg / 用量、 5 mg/kg / 用量、 1 mg/kg / 用量又は 0.5 mg/kg / 用量で $q3d \times 4$ (又は $q3d \times 10$) にて静脈内 (i.v.) に投与する。投与量は、ナノ粒子中のオリゴヌクレオチドの量に基づくものである。裸のオリゴヌクレオチドを、 30 mg/kg / 用量で腹腔内 (i.p.)、又は 25 mg/kg / 用量もしくは 45 mg/kg / 用量で静脈内に $q3d \times 4$ にて 12 日間投与する。マウスを最終投与の 24 時間後に屠殺する。血漿試料をマウスから採取し、 -20°C で貯蔵する。腫瘍試料及び肝臓試料もマウスから採取する。腫瘍及び肝臓の mRNA KD について試料を分析する。動物の生存を観察する。

【図 1】



【図 2】



【配列表】

2012509273000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 09/64730
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 9/127 (2009.01) USPC - 424/450 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) USPC- 424/450 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 435/458 435/320.1 435/455 977/704 977/797 977/800 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Patents/Scholar: nanoparticle, nucleotide, zwitterion, imine, amino acid lipid, diglyceride, cationic lipid, phenylalanine, releasable, cleavable		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	US 2008/0281044 A1 (Monahan et al.) 13 November 2008 (13.11.2008) para [0005], [0041], [0068], [0067], [0102], [0105]	1-2, 13-14 3-12, 17
Y	US 2006/0240554 A1 (Chen et al.) 26 October 2006 (26.10.2006) para [0016], [0085], Fig. 8	3-12, 17
Y	WO 2008/137758 A2 (Quay et al.) 13 November 2008 (13.11.2008) pg 2, ln 10-25, pg 10, ln 7-14 and ln 16-25, pg 20, ln 17-27, pg 22, ln 5-6	17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 21 March 2010 (21.03.2010)		Date of mailing of the international search report 26 MAR 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/64730

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I+: claims 1-17, drawn to a compound of Formula (I). The first invention encompasses the first claimed compound of claim 17. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional compound(s) to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected compound(s).

[Claims 15-16 were excluded from Group I, because they are drawn to a non-elected subject matter.]

Group II+, claims 18-44, drawn to a nanoparticle composition comprising a compound of Formula (I), a method of using and a method of preparing said nanoparticle composition. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect a specific compound of Formula (I) and a specific oligonucleotide to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected SEQ ID NO(s) and binding moieties.

- Please see extra sheet for continuation -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-14, 17 restricted to the first compound of claim 17

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/64730

***** SUPPLEMENTAL BOX *****

Continuation of: Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

The inventions listed as Groups I+ through II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Group I+ does not include the inventive concept of a nanoparticle composition, as required by Group II+.

The inventions of Group I+ share the technical feature of a compound of Formula (I). However, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art of US 2008/0281044 A1 to Monahan et al. (hereinafter 'Monahan') (13 November 2008) that discloses a compound of Formula (1):

(1) R-(L1)a-M-(L2)b-Q (para [0041], P-L2-M); wherein

R is a water soluble neutral charged or zwitterion-containing moiety (para [0041] and [0068], P is a membrane active polymer comprising zwitterion amphipathic polymers);

M is an imine-containing moiety (para [0041], [0102] and [0105], reversible linkage L2 is a pH-labile bond comprising imine);

Q is a substituted or unsubstituted, saturated or unsaturated C4-30-containing moiety (para [0041] and [0087]; M is a masking agent acting as a steric stabilizer comprising PEG);

(a) is 0; and (b) is 0 (para [0041]). As said compound was known at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

The inventions of Group II+ share the technical feature of a nanoparticle composition comprising a compound of Formula (I). However, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art, because Monahan discloses a compound of Formula (I), as set forth in the immediately preceding paragraph, and 2) Monahan further discloses a nanoparticle composition comprising a compound of Formula (I) (para [0061], "Examples of transfection reagents for delivery of polynucleotides to cells in vitro include, but are not limited to: liposomes..."). As said nanoparticle composition was known at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another technical feature of the inventions listed as Group II+ is the specific oligonucleotide sequence recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because US 2005/0014712 A1 to HANSEN, et al., in the context of MODULATION OF SURVIVIN EXPRESSION by OLIGOMERIC COMPOUNDS (title) discloses the claimed SEQ ID NO:1 (HANSEN, et al., SEQ ID NO 662). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ and II+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	
B 8 2 Y 5/00 (2011.01)	B 8 2 Y 5/00	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 ザオ , ホン
アメリカ合衆国 0 8 8 2 0 ニュージャージー州 , エディソン , ベラ ビスタ コート 3 4
- (72)発明者 ヤン , ウェイリ
アメリカ合衆国 0 8 8 5 4 ニュージャージー州 , ピスカタウェイ , ハーウィック コート 4 5 3
- (72)発明者 シー , リャンジュン
アメリカ合衆国 0 8 8 0 7 ニュージャージー州 , ブリッジウォーター , ドリトル ドライブ 1 5 0 3
- (72)発明者 ウー , デシュン
アメリカ合衆国 0 8 8 0 7 ニュージャージー州 , ブリッジウォーター , フランシス ドライブ 6
- (72)発明者 ロイゼン , マクシム
アメリカ合衆国 1 1 2 3 5 ニューヨーク州 , ブルックリン , アpartment ディー 2 , アベニュー ワイ 1 2 3 0

F ターム(参考) 4C069 AA06 BB02 BB38
4C076 AA65 AA95 BB11 CC26 CC41 DD52H DD52Q DD60H DD60Q DD70H
DD70Q EE59 FF21 FF31 FF63
4C084 AA13 AA19 MA02 MA05 MA38 NA03 NA12 NA13 ZB261 ZB262
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 MA38 NA03 NA12 NA13 ZB26
4H006 AA01 AA03 AB28