(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2020-172500
(P2020-172500A)
(43)公開日　令和2年10月22日(2020.10.22)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C07C 49/203	(2006.01)	C07C 49/203	CSPZ	4B065
C07C 49/557	(2006.01)	C07C 49/557	ZNA	4C055
C07C 271/34	(2006.01)	C07C 271/34		4C076
C07C 271/16	(2006.01)	C07C 271/16		4C084
C07C 31/02	(2006.01)	C07C 31/02		4C085

審査請求 有　請求項の数 25　ＯＬ　外国語出願　（全 125 頁）　最終頁に続く

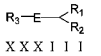
(21)出願番号　特願2020-109623 (P2020-109623)
(22)出願日　令和2年6月25日 (2020.6.25)
(62)分割の表示　特願2017-190496 (P2017-190496)の分割
原出願日　平成21年11月10日 (2009.11.10)
(31)優先権主張番号　61/225,898
(32)優先日　平成21年7月15日 (2009.7.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/171,439
(32)優先日　平成21年4月21日 (2009.4.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国 (US)

(71)出願人　513146871
アルブータス・バイオファーマー・コーポレイション
カナダ国　Ｖ５Ｊ　５Ｊ８　ブリティッシュコロンビア州　バーナビー　グレンリヨン　パークウェイ　１００－８９００
(74)代理人　100108453
弁理士　村山　靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広　信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部　達彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】治療薬を送達するための新規な脂質及び組成物

(57)【要約】　（修正有）
【課題】核酸のインビボ送達のために、並びにインビボ治療使用に好適な核酸－脂質粒子組成物のために有利である脂質を含む陽イオン性脂質及び脂質粒子、加えて、これら組成物を製作する方法、並びに例えば、種々の疾患状態を治療するために、これら組成物を使用して核酸を細胞に導入する方法を提供する。
【解決手段】式ＸＸＸＩＩＩまたはＸＸＸＶＩＩＩで表される構造を有する脂質、又はその塩若しくは異性体によって達成される。


ＸＸＸＩＩＩ

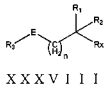
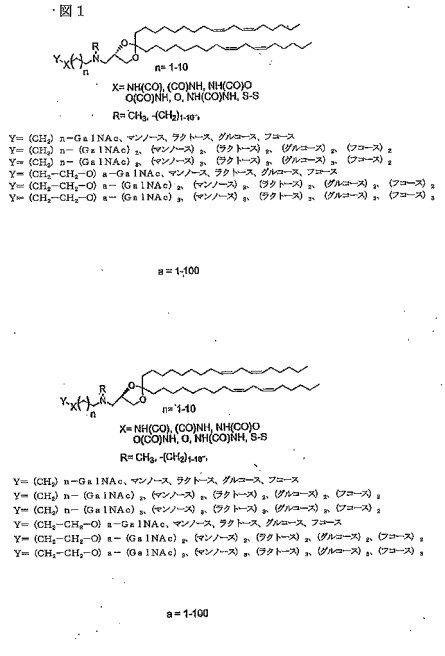
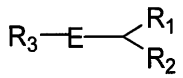

ＸＸＸＶＩＩＩ

図１



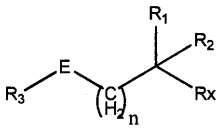
【選択図】図１

【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記構造を有し、
【化１】



ＸＸＸＩＩＩ

式中、
R_1及びR_2は、各存在において各々独立して、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルキル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルケニル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルキニル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アシル、又は－リンカー－リガンドであり、
R_3は、Ｈ、随意に置換されたC_1～C_{10}アルキル、随意に置換されたC_2～C_{10}アルケニル、随意に置換されたC_2～C_{10}アルキニル、アルキルヘトロ環、アルキルホスフェート、アルキルホスホロチオアート、アルキルホスホロジチオアート、アルキルホスホネート、アルキルアミン、ヒドロキシアルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、ω－チオホスホアルキル、随意に置換されたポリエチレングリコール（ＰＥＧ、分子量：１００～４０Ｋ）、随意に置換されたｍＰＥＧ（分子量：１２０～４０Ｋ）、ヘテロアリール、ヘテロ環、又はリンカー－リガンドであり、
Ｅは、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｑ）、Ｃ（Ｏ）、Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）、（Ｑ）Ｎ（ＣＯ）Ｏ、Ｏ（ＣＯ）Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）、ＮＳ（Ｏ）$_2$Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）$_2$、Ｎ（Ｑ）Ｓ（Ｏ）$_2$、ＳＳ、Ｏ＝Ｎ、アリール、ヘテロアリール、環式、又はヘテロ環であり、及び
Ｑは、Ｈ、アルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、又はω－チオホスホアルキルである、脂質、又はその塩若しくは異性体。
【請求項２】
下記構造を有し
【化２】



ＸＸＸＶＩＩＩ

式中、
Ｅは、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｑ）、Ｃ（Ｏ）、Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）、（Ｑ）Ｎ（ＣＯ）Ｏ、Ｏ（ＣＯ）Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）、ＮＳ（Ｏ）$_2$Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）$_2$、Ｎ（Ｑ）Ｓ（Ｏ）$_2$、ＳＳ、Ｏ＝Ｎ、アリール、ヘテロアリール、環式、又はヘテロ環であり、
Ｑは、Ｈ、アルキル、ω－アムニノアルキル、ω－（置換）アムニノアルキル、ω－ホスホアルキル、又はω－チオホスホアルキルであり、
R_1、R_2、及びR_xは、各存在において各々独立して、Ｈ、随意に置換されたC_1～C_{10}アルキル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルキル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルケニル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルキニル、又は随意に置換されたC_{10}～C_{30}アシル、又はリンカー－リガンドであり、ただしR_1、R_2、及びR_xの少なくとも１つはＨではなく、
R_3は、Ｈ、随意に置換されたC_1～C_{10}アルキル、随意に置換されたC_2～C_{10}

アルケニル、随意に置換されたＣ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルキニル、アルキルヘトロ環、アルキルホスフェート、アルキルホスホロチオアート、アルキルホスホロジチオアート、アルキルホスホネート、アルキルアミン、ヒドロキシアルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、ω－チオホスホアルキル、随意に置換されたポリエチレングリコール（ＰＥＧ、分子量：１００～４０Ｋ）、随意に置換されたｍＰＥＧ（分子量：１２０～４０Ｋ）、ヘテロアリール、ヘテロ環、又はリンカー－リガンドであり、

ｎは、１、２、又は３である、脂質、又はその塩若しくは異性体。

【請求項３】

請求項１又は２に記載の脂質を含む脂質粒子。

【請求項４】

請求項１に記載の脂質を含む、請求項３に記載の脂質粒子。

【請求項５】

前記脂質粒子が、中性脂質、及び凝集を低減することが可能な脂質をさらに含む、請求項３に記載の脂質粒子。

【請求項６】

前記脂質粒子が、

ａ．請求項１又は２に記載の脂質と、

ｂ．ＤＳＰＣ、ＤＰＰＣ、ＰＯＰＣ、ＤＯＰＥ、及びＳＭから選択される中性脂質と、

ｃ．ステロールと

ｄ．ＰＥＧ－ＤＭＧとから本質的になり、

モル比が、約２０～６０％脂質：５～２５％中性脂質：２５～５５％ステロール：０．５～１５％ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡである、請求項４に記載の脂質粒子。

【請求項７】

治療薬をさらに含む、請求項３に記載の脂質粒子。

【請求項８】

前記治療薬が核酸である、請求項７に記載の脂質粒子。

【請求項９】

前記核酸がプラスミドである、請求項８に記載の脂質粒子。

【請求項１０】

前記核酸が、免疫賦活化オリゴヌクレオチドである、請求項８に記載の脂質粒子。

【請求項１１】

前記核酸が、ｓｉＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、マイクロＲＮＡ、アンタゴｍｉｒ、アプタマー、及びリボザイムからなる群から選択される、請求項８に記載の脂質粒子。

【請求項１２】

前記核酸がｓｉＲＮＡである、請求項１１に記載の脂質粒子。

【請求項１３】

請求項８に記載の脂質粒子及び薬学的に許容される賦形剤、担体、又は希釈剤を含む医薬組成物。

【請求項１４】

請求項７に記載の脂質粒子を細胞に提供することを含む、細胞の標的遺伝子の発現を調節する方法。

【請求項１５】

前記治療薬が、ｓｉＲＮＡ、アンタゴｍｉｒ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、及びｓｉＲＮＡ、リボザイム、アプタマー、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現可能なプラスミドから選択される、請求項１４に記載の方法。

【請求項１６】

前記核酸が、前記ポリペプチド又はその機能的変異体若しくは断片をコードするプラスミドであり、そのため前記ポリペプチド又はその機能的変異体若しくは断片の発現が増加

される、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
対象体でポリペプチドが過剰発現されることを特徴とする疾患又は障害を治療する方法であって、前記対象体に、請求項１３に記載の医薬組成物を提供することを含み、前記治療薬が、ｓｉＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、及びｓｉＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現可能なプラスミドから選択され、前記ｓｉＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、又はアンチセンスＲＮＡが、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと特異的に結合するポリヌクレオチド又はその相補体を含む方法。
【請求項１８】
対象体でポリペプチドが過小発現されることを特徴とする疾患又は障害を治療する方法であって、前記対象体に、請求項１３に記載の医薬組成物を提供することを含み、前記治療薬が、前記ポリペプチド又はその機能的変異体若しくは断片をコードするプラスミドである方法。
【請求項１９】
対象体において免疫応答を誘導する方法であって、前記対象体に、請求項１３に記載の医薬組成物を提供することを含み、前記治療薬が免疫賦活化オリゴヌクレオチドである方法。
【請求項２０】
前記医薬組成物が、ワクチン又は抗原と組み合わせて前記患者に提供される、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
請求項９に記載の脂質粒子と、疾患又は病原体に関連する抗原とを含むワクチン。
【請求項２２】
前記抗原が腫瘍抗原である、請求項２２に記載のワクチン。
【請求項２３】
前記抗原が、ウイルス抗原、細菌抗原、又は寄生虫抗原である、請求項２２に記載のワクチン。
【請求項２４】
前記モル比が、５２％脂質：５％中性脂質：３０％ステロール：１３％ＰＥＧ－ＤＭＧである、請求項７に記載の脂質粒子。
【請求項２５】
前記標的遺伝子が、第ＶＩＩ因子、Ｅｇ５、ＰＣＳＫ９、ＴＰＸ２、ａｐｏＢ、ＳＡＡ、ＴＴＲ、ＲＳＶ、ＰＤＧＦベータ遺伝子、Ｅｒｂ－Ｂ遺伝子、Ｓｒｃ遺伝子、ＣＲＫ遺伝子、ＧＲＢ２遺伝子、ＲＡＳ遺伝子、ＭＥＫＫ遺伝子、ＪＮＫ遺伝子、ＲＡＦ遺伝子、Ｅｒｋ１／２遺伝子、ＰＣＮＡ（ｐ２１）遺伝子、ＭＹＢ遺伝子、ＪＵＮ遺伝子、ＦＯＳ遺伝子、ＢＣＬ－２遺伝子、サイクリンＤ遺伝子、ＶＥＧＦ遺伝子、ＥＧＦＲ遺伝子、サイクリンＡ遺伝子、サイクリンＥ遺伝子、ＷＮＴ－１遺伝子、ベータカテニン遺伝子、ｃ－ＭＥＴ遺伝子、ＰＫＣ遺伝子、ＮＦＫＢ遺伝子、ＳＴＡＴ３遺伝子、サバイビン遺伝子、Ｈｅｒ２／Ｎｅｕ遺伝子、ＳＯＲＴ１遺伝子、ＸＢＰ１遺伝子、トポイソメラーゼＩ遺伝子、トポイソメラーゼＩＩアルファ遺伝子、ｐ７３遺伝子、ｐ２１（ＷＡＦ１／ＣＩＰ１）遺伝子、ｐ２７（ＫＩＰ１）遺伝子、ＰＰＭ１Ｄ遺伝子、ＲＡＳ遺伝子、カベオリンＩ遺伝子、ＭＩＢ　Ｉ遺伝子、ＭＴＡＩ遺伝子、Ｍ６８遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、及びｐ５３腫瘍抑制遺伝子からなる群から選択される、請求項１５に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
優先権主張
本出願は、２００８年１１月１０日に出願された、米国特許出願第６１／１１３，１７９号、２００９年２月２０日に出願された米国特許出願第６１／１５４，３５０号、２０

０９年４月２１日に出願された米国特許出願第６１／１７１，４３９号、２００９年６月９日に出願された米国特許出願第６１／１８５，４３８号、２００９年７月１５日に出願された米国特許出願第６１／２２５，８９８号、及び２００９年８月１４日に出願された米国特許出願第６１／２３４，０９８号に対する優先権を主張するものであり、これらの各々の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】

政府支援

本明細書に記載されている研究は、少なくとも部分的には、国立アレルギー感染症研究所により授与された認可番号ＨＨＳＮ２６６２００６０００１２Ｃに基づく米国政府からの資金を使用して行われた。したがって、米国政府は、本発明に一定の権利を有し得る。

【０００３】

本発明は、脂質粒子を使用した治療薬送達の分野に関する。具体的には、本発明は、核酸のインビボ送達のために、並びにインビボ治療使用に好適な核酸－脂質粒子組成物のために有利である脂質を含む陽イオン性脂質及び脂質粒子を提供する。加えて、本発明は、これら組成物を製作する方法、並びに例えば、種々の疾患状態を治療するために、これら組成物を使用して核酸を細胞に導入する方法を提供する。

【背景技術】

【０００４】

関連技術の説明

治療用核酸には、例えば、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、プラスミド、免疫刺激核酸、アンチセンス、アンタゴｍｉｒ（ａｎｔａｇｏｍｉｒ）、抗ｍｉｒ（ａｎｔｉｍｉｒ）、マイクロＲＮＡ模倣体、スーパーｍｉｒ（ｓｕｐｅｒｍｉｒ）、Ｕ１アダプター、及びアプタマーが含まれる。これらの核酸は、様々な機序により作用する。ｓｉＲＮＡ又はｍｉＲＮＡの場合、これらの核酸は、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）と名付けられたプロセスにより、特定タンパク質の細胞内レベルを下方制御することができる。ｓｉＲＮＡ又はｍｉＲＮＡが細胞質に導入された後、これらの二本鎖ＲＮＡ構築体は、ＲＩＳＣと名付けられたタンパク質に結合することができる。ｓｉＲＮＡ又はｍｉＲＮＡのセンスＤＮＡは、ＲＩＳＣ複合体から解離し、結合ｓｉＲＮＡ又はｍｉＲＮＡの配列に相補的な配列を有するｍＲＮＡを認識及び結合することができるテンプレートをＲＩＳＣ内に提供する。相補的ｍＲＮＡが結合すると、ＲＩＳＣ複合体は、そのｍＲＮＡを切断し、切断された鎖を放出する。ＲＮＡｉは、タンパク質合成をコードする対応するｍＲＮＡの特異的破壊を標的とすることにより、特定タンパク質の下方制御を提供することができる。

【０００５】

ｓｉＲＮＡ及びｍｉＲＮＡ構築体は、標的タンパク質に対する任意のヌクレオチド配列を用いて合成することができるため、ＲＮＡｉの治療用途は非常に広範である。現在まで、ｓｉＲＮＡ構築体は、インビトロ及びインビボモデルの両方において、標的タンパク質を特異的に下方制御する能力を示している。加えて、ｓｉＲＮＡ構築体は、臨床研究で現在評価中である。

【０００６】

しかしながら、ｓｉＲＮＡ又はｍｉＲＮＡ構築体が現在直面している２つの問題は、第１には、それらが血漿中でのヌクレアーゼ消化に対して感受性であること、第２には、遊離ｓｉＲＮＡ又はｍｉＲＮＡとして全身性に投与される場合、それらがＲＩＳＣに結合することができる細胞内区画への接近を得る能力に制限があることである。化学的に修飾されたヌクレオチドリンカー、例えばホスホチオアート基を分子内に組み込むことにより、これらの二本鎖構築体を安定化することができる。しかしながら、これらの化学的修飾は、ヌクレアーゼ消化からの限定的な保護を提供するに過ぎず、構築体の活性を減少させる場合がある。ｓｉＲＮＡ又はｍｉＲＮＡの細胞内送達は、ポリマー、陽イオン性リポソームなどの担体系を使用することにより、又は構築体を化学的に修飾することにより、例えばコレステロール分子を共有結合で結合させることにより促進することができる。しかし

ながら、改良された送達系には、ｓｉＲＮＡ及びｍｉＲＮＡ分子の効力を増加させ、化学的修飾の必要性を低減又は排除することが必要とされている。

【０００７】

アンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボザイムは、ｍＲＮＡがタンパク質に翻訳されることを阻害することもできる。アンチセンス構築体の場合、これらの一本鎖デオキシ核酸は、標的タンパク質ｍＲＮＡの配列に相補的な配列を有しており、ワトソン‐クリック型塩基対によりｍＲＮＡに結合することができる。この結合は、標的ｍＲＮＡの翻訳を防止するか、及び／又はｍＲＮＡ転写物のＲＮａｓｅＨ消化を誘発するかのいずれかである。結果的に、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、作用特異性（つまり、特定の疾患関連タンパク質の下方制御）に非常に大きな可能性を有する。現在まで、これらの化合物は、炎症性疾患、癌、及びＨＩＶのモデルを含む幾つかのインビトロ及びインビボモデルにおいて将来性を示している（Ａｇｒａｗａｌ，Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ．１４：３７６－８７（１９９６）に概説されている）。アンチセンスは、染色体ＤＮＡと特異的にハイブリダイズすることにより細胞活動に影響を与えることもできる。幾つかのアンチセンス薬物の先端的ヒト臨床評価が、現在進行中である。これらの薬物の標的には、ｂｃｌ２及びアポリポタンパク質Ｂ遺伝子並びにｍＲＮＡ産物が含まれる。

【０００８】

免疫刺激核酸には、デオキシリボ核酸及びリボ核酸が含まれる。デオキシリボ核酸の場合、特定の配列又はモチーフは、哺乳動物中で不正な免疫刺激を示す。これらの配列又はモチーフには、ＣｐＧモチーフ、ピリミジンに富む配列、及びパリンドローム配列が含まれる。デオキシリボ核酸中のＣｐＧモチーフは、エンドソーム受容体、トール様受容体９（ＴＬＲ－９）により特異的に認識され、その後それにより先天性及び後天性の免疫刺激経路が両方とも誘発されると考えられている。特定の免疫刺激リボ核酸配列も報告されている。これらのＲＮＡ配列は、トール様受容体６及び７（ＴＬＲ－６及びＴＬＲ－７）に結合することにより、免疫活性化を誘発すると考えられている。加えて、二本鎖ＲＮＡは、免疫刺激性であることも報告されており、ＴＬＲ－３に結合することにより活性化すると考えられている。

【０００９】

治療用核酸の使用に関する１つの周知の問題は、リン酸ジエステルヌクレオチド間結合の安定性、及びこのリンカーのヌクレアーゼに対する感受性に関する。血清中にエキソヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼが存在すると、リン酸ジエステルリンカーを有する核酸の迅速な消化がもたらされ、したがって、治療用核酸は、血清の存在下又は細胞内で非常に短い半減期を示す場合がある。（Ｚｅｌｐｈａｔｉ，Ｏ．，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ．Ｒｅｓ．Ｄｅｖ．３：３２３－３３８（１９９３）；及びＴｈｉｅｒｒｙ，Ａ．Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，ｐｐ１４７－１６１ ｉｎ Ｇｅｎｅ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ：Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ＲＮＡ ａｎｄ ＤＮＡ（Ｅｄｓ．Ｅｒｉｃｋｓｏｎ，ＲＰ ａｎｄ Ｉｚａｎｔ，ＪＧ；Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９９２））。現在開発中の治療用核酸は、これらの及び他の既知の問題のため、天然核酸に見出される基本的リン酸ジエステル化学を使用しない。

【００１０】

この問題は、血清又は細胞内消化を低減する化学的修飾により部分的に克服されている。ヌクレオチド間リン酸ジエステル結合における修飾（例えば、ホスホロチオアート、メチルホスホネート、又はホスホルアミダート結合を使用して）、ヌクレオチド塩基における修飾（例えば、５－プロピニル－ピリミジン）、又は糖における修飾（例えば、２’修飾糖）が試験されている（Ｕｈｌｍａｎｎ Ｅ．，ｅｔ ａｌ．Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ：Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ．Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ，Ｖｏｌ．Ｘ．，ｐｐ ６４－８１ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｃ．（１９９７））。他には、２’－５’糖結合を使用して安定性を向上させる試みがなされている（例えば米国特許第５，５３２，１３０号を参照）。他の変更が

試みられている。しかしながら、これらの解決策はいずれも、完全に満足のいくものではないことが判明しており、インビボ遊離治療用核酸は、依然として効力が限定的である。

【００１１】

加えて、ｓｉＲＮＡ及びｍｉＲＮＡに関して上記で注記されているように、治療用核酸には細胞膜を通過する能力に制限があると共に（Ｖｌａｓｓｏｖ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ １１９７：９５－１０８２（１９９４）を参照）、補体媒介性アナフィラキシーなどの全身毒性、凝固特性の変更、及び血球減少に関する問題が残されている（Ｇａｌｂｒａｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ．４：２０１-２０６（１９９４））。

効力の向上を試みるために、研究者らは、化学修飾された又は未修飾の核酸を送達するための脂質に基づくの担体系も使用してきた。Ｚｅｌｐｈａｔｉ，Ｏ ａｎｄ Ｓｚｏｋａ，Ｆ．Ｃ．，Ｊ．Ｃｏｎｔｒ．Ｒｅｌ．４１：９９－１１９（１９９６）において、著者らは、陰イオン性（従来型）リポソーム、ｐＨ感受性リポソーム、免疫リポゾーム、膜融合性リポソーム、及び陽イオン性脂質／アンチセンス凝集体に言及している。同様に、陽イオン性リポソーム中のｓｉＲＮＡが、全身性に投与されており、これらの核酸－脂質粒子は、非ヒト霊長類を含む哺乳動物で標的タンパク質の下方制御の向上を提供することが報告されている（Ｚｉｍｍｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ４４１：１１１－１１４（２００６））。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１２】

【非特許文献１】Ａｇｒａｗａｌ，Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ．１４：３７６－８７（１９９６）

【非特許文献２】Ｚｅｌｐｈａｔｉ，Ｏ．，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ．Ｒｅｓ．Ｄｅｖ．３：３２３－３３８（１９９３）

【非特許文献３】Ｔｈｉｅｒｒｙ，Ａ．Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，ｐｐ１４７－１６１ ｉｎ Ｇｅｎｅ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ：Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ＲＮＡ ａｎｄ ＤＮＡ（Ｅｄｓ．Ｅｒｉｃｋｓｏｎ，ＲＰ ａｎｄ Ｉｚａｎｔ，ＪＧ；Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９９２）

【非特許文献４】Ｕｈｌｍａｎｎ Ｅ．，ｅｔ ａｌ．Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ：Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ．Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ，Ｖｏｌ．Ｘ．，ｐｐ ６４－８１ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｃ．（１９９７）

【非特許文献５】Ｖｌａｓｓｏｖ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ １１９７：９５－１０８２（１９９４）

【非特許文献６】Ｇａｌｂｒａｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ．４：２０１-２０６（１９９４）

【非特許文献７】Ｚｅｌｐｈａｔｉ，Ｏ ａｎｄ Ｓｚｏｋａ，Ｆ．Ｃ．，Ｊ．Ｃｏｎｔｒ．Ｒｅｌ．４１：９９－１１９（１９９６）

【非特許文献８】Ｚｉｍｍｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ４４１：１１１－１１４（２００６）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１３】

こうした進歩にもかかわらず、一般的な治療使用に好適な脂質－治療用核酸組成物の向上は、当該技術分野で依然として必要とされている。好ましくは、これらの組成物は、核酸を高効率で封入化し、高い薬物：脂質比率を有し、血清中での分解及びクリアランスから封入化核酸を保護し、全身性送達に好適であり、封入化核酸の細胞内の送達を提供するだろう。加えて、これらの脂質－核酸粒子は、十分に耐用性であり、適切な治療指数を提

供すべきであり、したがって有効用量の核酸による患者治療は、患者に対する著しい毒性及び／又はリスクを伴わない。本発明は、そのような組成物、組成物を製作する方法、及び疾患を治療する目的を含む、核酸を細胞に導入するための組成物の使用方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

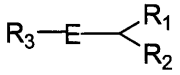
【００１４】

本発明は、新規な陽イオン性脂質、並びにそれを含む脂質粒子を提供する。これらの脂質粒子は、活性薬剤をさらに含むことができ、細胞に活性薬剤を送達するために、本発明の関連方法に従って使用することができる。

【００１５】

１つの態様では、本発明は、以下の構造を有する脂質、並びにその対応する塩及び異性体を提供する：

【化１】



XXXIII

式中、

R_1及びR_2は、各存在において各々独立して、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルキル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルケニル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルキニル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アシル、又はリンカーリガンドであり、

R_3は、H、随意に置換されたC_1～C_{10}アルキル、随意に置換されたC_2～C_{10}アルケニル、随意に置換されたC_2～C_{10}アルキニル、アルキルヘトロ環（ａｌｋｙｌｈｅｔｒｏｃｙｃｌｅ）、アルキルホスフェート、アルキルホスホロチオアート、アルキルホスホロジチオアート、アルキルホスホネート、アルキルアミン、ヒドロキシアルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、ω－チオホスホアルキル、随意に置換されたポリエチレングリコール（ＰＥＧ、分子量：１００～４０Ｋ）、随意に置換されたｍＰＥＧ（分子量：１２０～４０Ｋ）、ヘテロアリール、ヘテロ環、又はリンカーリガンドであり、

Ｅは、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｑ）、Ｃ（Ｏ）、Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）、（Ｑ）Ｎ（ＣＯ）Ｏ、Ｏ（ＣＯ）Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）、ＮＳ（Ｏ）$_2$Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）$_2$、Ｎ（Ｑ）Ｓ（Ｏ）$_2$、ＳＳ、Ｏ＝Ｎ、アリール、ヘテロアリール、環式、又はヘテロ環であり、及び

Ｑは、Ｈ、アルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、又はω－チオホスホアルキルである。

【００１６】

別の態様では、本発明は、本発明の脂質を含む脂質粒子を提供する。ある実施形態では、脂質粒子は、中性脂質、及び粒子凝集を低減することが可能な脂質をさらに含む。１つの実施形態では、脂質粒子は、（ｉ）本発明の少なくとも１つの脂質、（ｉｉ）ＤＳＰＣ、ＤＰＰＣ、ＰＯＰＣ、ＤＯＰＥ、及びＳＭから選択される中性脂質、（ｉｉｉ）ステロール、例えばコレステロール、及び（ｉｖ）ｐｅｇ－脂質、例えば、ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡから本質的になり、モル比は、約２０～６０％陽イオン性脂質：５～２５％中性脂質：２５～５５％ステロール；０．５～１５％ＰＥＧ－脂質である。１つの実施形態では、本発明の脂質は光学的に純粋である。

【００１７】

さらなる関連実施形態では、本発明は、治療薬をさらに含む本発明の脂質粒子を含む。１つの実施形態では、治療薬は核酸である。１つの実施形態では、核酸は、プラスミド、

免疫賦活化オリゴヌクレオチド、一本鎖オリゴヌクレオチド、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、アンタゴｍｉｒ；二本鎖オリゴヌクレオチド、例えばｓｉＲＮＡ；アプタマー、又はリボザイムである。

【００１８】

さらに別の関連実施形態では、本発明は、本発明の脂質粒子及び薬学的に許容される賦形剤、希釈剤の担体を含む医薬組成物を含む。

【００１９】

本発明は、他の関連実施形態では、細胞における標的遺伝子の発現を調節する方法であって、細胞に本発明の脂質粒子又は医薬組成物を提供することを含む方法をさらに含む。標的遺伝子は、野生型遺伝子であってもよい。別の実施形態では、標的遺伝子は、１つ以上の突然変異を含有している。特定の実施形態では、本方法は、１つ以上の突然変異を含有する標的遺伝子の発現を特異的に調節することを含む。特定の実施形態では、脂質粒子は、免疫賦活化オリゴヌクレオチド、一本鎖オリゴヌクレオチド、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、アンタゴｍｉｒ；二本鎖オリゴヌクレオチド、例えばｓｉＲＮＡ、アプタマー、リボザイムから選択される治療薬を含む。１つの実施形態では、核酸は、ｓｉＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー、又はリボザイムをコードするプラスミドである。

【００２０】

本発明の１つの態様では、標的遺伝子は、第ＶＩＩ因子、Ｅｇ５、ＰＣＳＫ９、ＴＰＸ２、ａｐｏＢ、ＳＡＡ、ＴＴＲ、ＲＳＶ、ＰＤＧＦベータ遺伝子、Ｅｒｂ－Ｂ遺伝子、Ｓｒｃ遺伝子、ＣＲＫ遺伝子、ＧＲＢ２遺伝子、ＲＡＳ遺伝子、ＭＥＫＫ遺伝子、ＪＮＫ遺伝子、ＲＡＦ遺伝子、Ｅｒｋ１／２遺伝子、ＰＣＮＡ（ｐ２１）遺伝子、ＭＹＢ遺伝子、ＪＵＮ遺伝子、ＦＯＳ遺伝子、ＢＣＬ－２遺伝子、サイクリンＤ遺伝子、ＶＥＧＦ遺伝子、ＥＧＦＲ遺伝子、サイクリンＡ遺伝子、サイクリンＥ遺伝子、ＷＮＴ－１遺伝子、ベータカテニン遺伝子、ｃ－ＭＥＴ遺伝子、ＰＫＣ遺伝子、ＮＦＫＢ遺伝子、ＳＴＡＴ３遺伝子、サバイビン遺伝子、Ｈｅｒ２／Ｎｅｕ遺伝子、ＳＯＲＴ１遺伝子、ＸＢＰ１遺伝子、トポイソメラーゼＩ遺伝子、トポイソメラーゼＩＩアルファ遺伝子、ｐ７３遺伝子、ｐ２１（ＷＡＦ１／ＣＩＰ１）遺伝子、ｐ２７（ＫＩＰ１）遺伝子、ＰＰＭ１Ｄ遺伝子、ＲＡＳ遺伝子、カベオリンＩ遺伝子、ＭＩＢ　Ｉ遺伝子、ＭＴＡＩ遺伝子、Ｍ６８遺伝子、腫瘍抑制遺伝子中の突然変異、ｐ５３腫瘍抑制遺伝子、及びそれらの組合せからなる群から選択される。

【００２１】

別の実施形態では、核酸は、ポリペプチド又はその機能的変異体若しくは断片をコードするプラスミドであり、そのためポリペプチド又はその機能的変異体若しくは断片の発現が増加される。

【００２２】

またさらなる関連実施形態では、本発明は、対象体でポリペプチドが過剰発現されることを特徴とする疾患又は障害を治療する方法であって、対象体に、本発明の脂質粒子又は医薬組成物を提供することを含み、治療薬が、ｓｉＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、及びｓｉＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現可能なプラスミドから選択され、ｓｉＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、又はアンチセンスＲＮＡが、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと特異的に結合するポリヌクレオチド又はその相補体を含む方法を含む。

【００２３】

別の関連実施形態では、本発明は、対象体でポリペプチドが過小発現されることを特徴とする疾患又は障害を治療する方法であって、対象体に、本発明の医薬組成物を提供することを含み、治療薬が、ポリペプチド又はその機能的変異体若しくは断片をコードするプラスミドである方法を含む。

【００２４】

さらなる実施形態では、本発明は、対象体において免疫応答を誘導する方法であって、

対象体に、本発明の医薬組成物を提供することを含み、治療薬が免疫賦活化オリゴヌクレオチドである方法を含む。特定の実施形態では、医薬組成物は、ワクチン又は抗原と組み合わせて患者に提供される。

【００２５】

関連実施形態では、本発明は、本発明の脂質粒子と、疾患又は病原体に関連する抗原とを含むワクチンを含む。１つの実施形態では、脂質粒子は、免疫賦活化核酸又はオリゴヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、抗原は、腫瘍抗原である。別の実施形態では、抗原は、ウイルス抗原、細菌抗原、又は寄生虫抗原である。

【００２６】

本発明は、本発明の脂質粒子及び医薬組成物を調製する方法、並びにこれらの脂質粒子及び医薬組成物の調製に有用なキットをさらに含む。

【００２７】

別の態様では、本発明は、作用剤、例えば治療薬又は診断薬、及び本発明の脂質を含む組成物を評価する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【００２８】

【図１】標的指向性リガンドが結合された光学的純粋な脂質の模式図である。

【図２】本発明の脂質の特徴を示す模式図である。

【図３】様々な陽イオン性脂質を含有する０．０５又は０．００５ｍｇ／ｋｇの脂質粒子を投与した動物中の相対的ＦＶＩＩタンパク質レベルを例示するグラフを示す図である。

【図４】実施例に記載されている方法を使用して試験された例示的な脂質のＥＣ５０及びｐＫａ値を示す表である。

【発明を実施するための形態】

【００２９】

本発明は、治療薬をインビボ送達するための脂質粒子で使用される際に利点を提供する陽イオン性脂質の発見に部分的に基づく。特に、添付の実施例により例示されているように、本発明は、本発明による陽イオン性脂質を含む核酸－脂質粒子組成物を提供する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されている組成物は、核酸の活性亢進及び／又はインビボでの組成物の耐用性の向上を提供し、それにより、以前に記載されている脂質－核酸粒子組成物と比較して、治療指数の著しい増加をもたらすことができる。加えて、特定の治療用核酸－脂質粒子で観察される毒性の軽減を提供することができる組成物及び使用方法が開示される。

【００３０】

ある実施形態では、本発明は、ｓｉＲＮＡ分子を送達するための改良された組成物を提供する。本明細書では、これらの組成物は、タンパク質レベル及び／又は標的タンパク質のｍＲＮＡレベルを下方制御するのに有効であることが示される。さらに、これらの改良された組成物の活性は、特定の陽イオン性脂質の存在に依存し、製剤中の陽イオン性脂質のモル比は、活性に影響を及ぼす場合があることが示される。

【００３１】

本発明の脂質粒子及び組成物は、インビトロ及びインビボの両方で、結合された又は封入された治療薬を細胞に送達すること含む、様々な目的に使用することができる。したがって、本発明は、好適な治療薬に結合した本発明の脂質粒子と対象体を接触させることにより、その必要性のある対象体の疾患又は障害を治療する方法を提供する。

【００３２】

本明細書に記載されているように、本発明の脂質粒子は、例えば、ｓｉＲＮＡ分子及びプラスミドを含む核酸の送達に特に有用である。したがって、本発明の脂質粒子及び組成物は、標的遺伝子発現（例えば、ｓｉＲＮＡ）を低減させる核酸、又は所望のタンパク質の発現を増加させるために使用することができる核酸（例えば、所望のタンパク質をコードするプラスミド）に結合された本発明の脂質粒子を細胞と接触させることにより、インビトロ及びインビボの両方で、標的遺伝子及びタンパク質の発現を調節するために使用す

ることができる。

【００３３】

本発明の陽イオン性脂質並びにそれを含む脂質粒子及び組成物、並びに治療薬を送達し遺伝子及びタンパク質発現を調節するためのそれらの使用に関する種々の例示的実施形態は、下記でさらに詳細に記載されている。

【００３４】

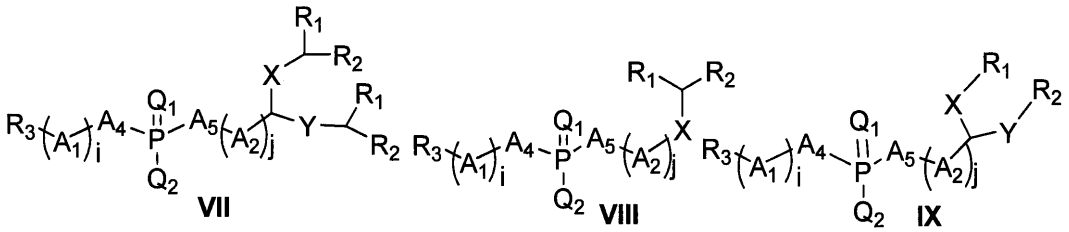
脂質

本発明は、ある設計特徴を有する新規な脂質を提供する。図２に示されているように、脂質の設計特徴には、以下のうちの少なくとも１つが含まれる：様々なｐＫａを有する頭部基、陽イオン性の一級、二級、及び三級モノアミン、ジアミン、及びトリアミン、オリゴアミン／ポリアミン、低ｐＫａの頭部基－イミダゾール及びピリジン、グアニジウム、陰イオン性、双性イオン性、及び疎水性尾部は、対称鎖及び／又は非対称鎖、長鎖及びより短い鎖、飽和鎖及び不飽和鎖を含有していてもよく、骨格は、骨格グリセリド及び非環式類似体、エーテル、エステル、ホスフェート及び類似体、スルホネート及び類似体、ジスルフィド、アセタール及びケタールのようなｐＨ感受性結合、イミン及びヒドラゾン、並びにオキシムとの環式、スピロ、二環式、及び多環式結合。

【００３５】

１つの実施形態では、本脂質は、以下の構造、又はその塩若しくは異性体のうちの１つを有する：

【化２】



式中、

R_1及びR_2は、各存在において各々独立して、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルキル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルケニル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルキニル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アシル、又は－リンカー－リガンドであり、

R_3は、各存在において独立して、Ｈ、随意に置換されたC_1～C_{10}アルキル、随意に置換されたC_2～C_{10}アルケニル、随意に置換されたC_2～C_{10}アルキニル、アルキルヘトロ環（ａｌｋｙｌｈｅｔｒｏｃｙｃｌｅ）、アルキルホスフェート、アルキルホスホロチオアート、アルキルホスホロジチオアート、アルキルホスホネート、アルキルアミン、ヒドロキシアルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、ω－チオホスホアルキル、随意に置換されたポリエチレングリコール（ＰＥＧ、分子量：１００～４０Ｋ）、随意に置換されたｍＰＥＧ（分子量：１２０～４０Ｋ）、ヘテロアリール、ヘテロ環、又はリンカー－リガンドであり、

Ｘ及びＹは、各々独立して、Ｏ、Ｓ、アルキル、又はＮ（Ｑ）であり、

Q_1は、各存在において独立してＯ又はＳであり、

Q_2は、各存在において独立して、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｑ）、アルキル、又はアルコキシであり、

A_1、A_2、A_4、及びA_5は、各々独立して、Ｏ、Ｓ、CH_2、ＣＨＲ、又はCF_2であり、

ｉ及びｊは、０～１０である。

【００３６】

１つの実施形態では、Ｘ及びＹは、独立して（ＣＯ）、Ｏ（ＣＯ）、Ｏ（ＣＯ）Ｎ、Ｎ（ＣＯ）Ｏ、（ＣＯ）Ｏ、Ｏ（ＣＯ）Ｏ、スルホネート、又はホスフェートであってもよ

い。
【００３７】
不飽和アルキル鎖を含む陽イオン性脂質が、膜流動性の増加した脂質核酸粒子を形成するのに特に有用であることを見出した。１つの実施形態では、R_1又はR_2の少なくとも１つは、少なくとも１つの、少なくとも２つの、又は少なくとも３つの、不飽和、例えば二重結合又は三重結合の部位を含む。
【００３８】
１つの実施形態では、R_1又はR_2の１つのみが、少なくとも１つの、少なくとも２つの、又は少なくとも３つの不飽和部位を含む。
【００３９】
１つの実施形態では、R_1又はR_2は両方とも、少なくとも１つの、少なくとも２つの、又は少なくとも３つの不飽和部位を含む。
【００４０】
１つの実施形態では、R_1及びR_2は、異なる数の不飽和を含み、例えば、R_1及びR_2のうちの１つは、１つの部位の不飽和を有し、他方は、２つ又は３つの不飽和部位を有する。
【００４１】
１つの実施形態では、R_1及びR_2は両方とも、同じ数の不飽和部位を含む。
【００４２】
１つの実施形態では、R_1及びR_2は、異なるタイプの不飽和を含み、例えば、R_1及びR_2のうちの１つの不飽和は二重結合であり、他方の不飽和は三重結合である。
【００４３】
１つの実施形態では、R_1及びR_2は両方とも、同じタイプの不飽和、例えば、二重結合又は三重結合を含む。
【００４４】
１つの実施形態では、R_1又はR_2のうちの少なくとも１つは、少なくとも１つの二重結合及び少なくとも１つの三重結合を含む。
【００４５】
１つの実施形態では、R_1又はR_2のうちの１つのみが、少なくとも１つの二重結合及び少なくとも１つの三重結合を含む。
【００４６】
１つの実施形態では、R_1及びR_2は両方とも、少なくとも１つの二重結合及び少なくとも１つの三重結合を含む。
【００４７】
１つの実施形態では、R_1及びR_2は両方とも同じであり、例えば、R_1及びR_2は両方とも、リノレイル（Ｃ１８）であるか、又はR_1及びR_2は両方とも、ヘプタデカ－９－エニルである。
【００４８】
１つの実施形態では、R_1及びR_2は互いに異なる。
【００４９】
１つの実施形態では、R_1及びR_2のうちの少なくとも１つは、コレステロールである。
【００５０】
１つの実施形態では、R_1及びR_2のうちの１つは、－リンカー－リガンドである。
【００５１】
１つの実施形態では、R_1及びR_2のうちの１つは、－リンカー－リガンドであり、リガンドは脂肪親和性である。
【００５２】
１つの実施形態では、R_1又はR_2のうちの少なくとも１つは、１つ又は両方のＨがＦにより置換されている少なくとも１つのCH_2基、例えばＣＨＦ又はCF_2を含む。１つ

の実施形態では、R_1及びR_2は両方とも、１つ又は２つのＨがＦにより置換されている少なくとも１つのCH_2基、例えばＣＨＦ又はCF_2を含む。

【００５３】

１つの実施形態では、R_1及びR_2のうちの１つのみが、１つ又は両方のＨがＦにより置換されている少なくとも１つのCH_2基を含む。

【００５４】

１つの実施形態では、R_1又はR_2のうちの少なくとも１つは、CH_2F、CHF_2、又はCF_3が末端にある。１つの実施形態では、R_1又はR_2は両方とも、CH_2F、CHF_2、又はCF_3が末端にある。

【００５５】

１つの実施形態では、R_1又はR_2のうちの少なくとも１つは、$-(CF_2)_y-Z''-(CH_2)_y-CH_3$であり、ここで各ｙは、独立して１～１０であり、Ｚ’’は、Ｏ、Ｓ、又はＮ（Ｑ）である。

【００５６】

１つの実施形態では、R_1及びR_2は両方とも、$-(CF_2)_y-Z''-(CH_2)_y-CH_3$であり、ここで各ｙは、独立して１～１０であり、Ｚ’’は、Ｏ、Ｓ、又はＮ（Ｑ）である。

【００５７】

１つの実施形態では、R_1又はR_2のうちの少なくとも１つは、$-(CF_2)_y-Z''-(CH_2)_y-CH_3$であり、ここで各ｙは、独立して１～１０であり、Ｚ’’は、Ｏ、Ｓ、又はＮ（Ｑ）である。

【００５８】

１つの実施形態では、R_1及びR_2は両方とも、$-(CF_2)_y-Z''-(CH_2)_y-CH_3$であり、ここで各ｙは、独立して１～１０であり、Ｚ’’は、Ｏ、Ｓ、又はＮ（Ｑ）である。

【００５９】

１つの実施形態では、R_1又はR_2のうちの少なくとも１つは、$-(CF_2)_y-(CF_2)_y-CF_3$であり、ここで各ｙは独立して１～１０である。

【００６０】

１つの実施形態では、R_1又はR_2は両方とも、$-(CF_2)_y-(CF_2)_y-CF_3$であり、ここで各ｙは独立して１～１０である。

【００６１】

１つの実施形態では、R_3は、メチル、エチル、ポリアミン、$-(CH_2)_h-$ヘテロアリール、$-(CH_2)_h-N(Q)_2$、$-O-N(Q)_2$、$-(CH_2)_h-Z''-(CH_2)_h-$ヘテロアリール、リンカー－リガンド、$-(CH_2)_h-$ヘテル環（ｈｅｔｅｒｃｙｃｌｅ）、及び$-(CH_2)_h-Z''-(CH_2)_h-$ヘテロ環からなる群から選択され、ここで各ｈは、独立して０～１３であり、Ｚ’’は、Ｏ、Ｓ、又はＮ（Ｑ）である。

【００６２】

１つの実施形態では、リガンドは、膜融合性ペプチドである。

【００６３】

１つの実施形態では、脂質は、ラセミ混合物である。

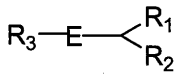
【００６４】

１つの実施形態では、脂質は、１つのジアステレオマーが濃縮されており、例えば脂質は、少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なくとも８０％、又は少なくとも７０％のジアステレオマー的過剰を示す。

【００６５】

１つの実施形態では、脂質は、１つの鏡像異性体が濃縮されており、例えば脂質は、少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なくとも８０％、又は少なくとも７０％の鏡像異性体的過剰を示す。

【００６６】
１つの実施形態では、脂質はキラル的に純粋であり、例えば単一の光学異性体である。
【００６７】
１つの実施形態では、脂質は、１つの光学異性体が濃縮されている。
【００６８】
二重結合が存在する場合（例えば、炭素－炭素二重結合又は炭素－窒素二重結合）、二重結合に関する立体配置に異性が存在する場合がある（つまり、ｃｉｓ／ｔｒａｎｓ又はＥ／Ｚ異性）。二重結合の立体配置が化学構造に示される場合、対応する異性体も存在する場合があることが理解される。異性体が存在する量は、異性体の相対的安定性及び異性体間の変換に必要なエネルギーに依存して様々であり得る。したがって、幾つかの二重結合は、実用的な目的では、単一の立体配置だけで存在するが、他の二重結合は（例えば、相対的安定性が類似しており、変換エネルギーが低い場合）、不可分な立体配置の平衡混合物として存在する場合がある。
【００６９】
１つの態様では、本脂質は、式ＸＸＸＩＩＩの化合物、又はその塩若しくは異性体である：
【化３】



XXXIII

式中、
R_1及びR_2は、各存在において各々独立して、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルキル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルケニル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルキニル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アシル、又は－リンカー－リガンドであり、
R_3は、Ｈ、随意に置換されたC_1～C_{10}アルキル、随意に置換されたC_2～C_{10}アルケニル、随意に置換されたC_2～C_{10}アルキニル、アルキルヘトロ環、アルキルホスフェート、アルキルホスホロチオアート、アルキルホスホロジチオアート、アルキルホスホネート、アルキルアミン、ヒドロキシアルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、ω－チオホスホアルキル、随意に置換されたポリエチレングリコール（ＰＥＧ、分子量：１００～４０Ｋ）、随意に置換されたｍＰＥＧ（分子量：１２０～４０Ｋ）、ヘテロアリール、ヘテロ環、又はリンカー－リガンドであり、
Ｅは、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｑ）、Ｃ（Ｏ）、Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）、（Ｑ）Ｎ（ＣＯ）Ｏ、Ｏ（ＣＯ）Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）、ＮＳ（Ｏ）$_2$Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）$_2$、Ｎ（Ｑ）Ｓ（Ｏ）$_2$、ＳＳ、Ｏ＝Ｎ、アリール、ヘテロアリール、環式、又はヘテロ環であり、及び
Ｑは、Ｈ、アルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、又はω－チオホスホアルキルである。
【００７０】
１つの実施形態では、R_1及びR_2は、各存在において各々独立して、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルキル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルコキシ、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルケニル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルケニルオキシ、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルキニル、随意に置換されたC_{10}～C_{30}アルキニルオキシ、又は随意に置換されたC_{10}～C_{30}アシルである。
【００７１】
別の実施形態では、R_3は、Ｈ、随意に置換されたC_1～C_{10}アルキル、随意に置換

されたＣ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルケニル、随意に置換されたＣ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルキニル、随意に置換されたアルキルヘテロ環、随意に置換されたヘテロ環アルキル、随意に置換されたアルキルホスフェート、随意に置換されたホスホアルキル、随意に置換されたアルキルホスホロチオアート、随意に置換されたホスホロチオアルキル、随意に置換されたアルキルホスホロジチオアート、随意に置換されたホスホロジチオアルキル、随意に置換されたアルキルホスホネート、随意に置換されたホスホノアルキル、随意に置換されたアミノ、随意に置換されたアルキルアミノ、随意に置換されたジ（アルキル）アミノ、随意に置換されたアミノアルキル、随意に置換されたアルキルアミノアルキル、随意に置換されたジ（アルキル）アミノアルキル、随意に置換されたヒドロキシアルキル、随意に置換されたポリエチレングリコール（ＰＥＧ、分子量：１００～４０Ｋ）、随意に置換されたｍＰＥＧ（分子量：１２０～４０Ｋ）、随意に置換されたヘテロアリール、随意に置換されたヘテロ環、又はリンカー－リガンドである。

【００７２】

さらに別の実施形態では、Ｅは、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｎ（Ｑ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）－、－Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）－、Ｓ（Ｏ）、－Ｎ（Ｑ）Ｓ（Ｏ）$_{2}$Ｎ（Ｑ）－、－Ｓ（Ｏ）$_{2}$－、－Ｎ（Ｑ）Ｓ（Ｏ）$_{2}$－、－ＳＳ－、－Ｏ－Ｎ＝、＝Ｎ－Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）－Ｎ（Ｑ）－Ｎ＝、－Ｎ（Ｑ）－Ｎ＝、－Ｎ（Ｑ）－Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）Ｓ－、アリーレン、ヘテロアリーレン、シクルアルキレン（ｃｙｃｌａｌｋｙｌｅｎｅ）、又はヘテロシクリレン（ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｙｌｅｎｅ）であり、及び

Ｑは、Ｈ、アルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、又はω－チオホスホアルキルである。

【００７３】

別の実施形態では、脂質は、式ＸＸＸＩＩＩの化合物であり、式中Ｅは、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｑ）、Ｃ（Ｏ）、Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）、（Ｑ）Ｎ（ＣＯ）Ｏ、Ｏ（ＣＯ）Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）、ＮＳ（Ｏ）２Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）$_{2}$、Ｎ（Ｑ）Ｓ（Ｏ）２、ＳＳ、Ｏ＝Ｎ、アリール、ヘテロアリール、環式、又はヘテロ環である。

【００７４】

１つの実施形態では、脂質は、式ＸＸＸＩＩＩの化合物であり、式中Ｒ$_{3}$は、Ｈ、随意に置換されたＣ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルケニル、随意に置換されたＣ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルキニル、アルキルヘトロ環、アルキルホスフェート、アルキルホスホロチオアート、アルキルホスホロジチオアート、アルキルホスホネート、アルキルアミン、ヒドロキシアルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、ω－チオホスホアルキル、随意に置換されたポリエチレングリコール（ＰＥＧ、分子量：１００～４０Ｋ）、随意に置換されたｍＰＥＧ（分子量：１２０～４０Ｋ）、ヘテロアリール、ヘテロ環、又はリンカー－リガンドである。

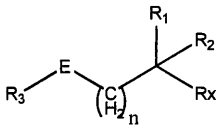
【００７５】

さらに別の実施形態では、脂質は、式ＸＸＸＩＩＩの化合物であり、式中Ｒ$_{1}$及びＲ$_{2}$は、各存在において各々独立して、随意に置換されたＣ$_{10}$～Ｃ$_{30}$アルキル、随意に置換されたＣ$_{10}$～Ｃ$_{30}$アルキニル、随意に置換されたＣ$_{10}$～Ｃ$_{30}$アシル、又は－リンカー－リガンドである。

【００７６】

１つの実施形態では、本発明は、式ＸＸＸＶＩＩＩの脂質、又はその塩若しくは異性体を特色とする：

【化４】



ＸＸＸＶＩＩＩ

式中、
Ｅは、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｑ）、Ｃ（Ｏ）、Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）、（Ｑ）Ｎ（ＣＯ）Ｏ、Ｏ（ＣＯ）Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）、ＮＳ（Ｏ）２Ｎ（Ｑ）、Ｓ（Ｏ）２、Ｎ（Ｑ）Ｓ（Ｏ）２、ＳＳ、Ｏ＝Ｎ、アリール、ヘテロアリール、環式、又はヘテロ環であり、
Ｑは、Ｈ、アルキル、ω－アムニノアルキル（ａｍｎｉｍｏａｌｋｙｌ）、ω－（置換）アムニノアルキル、ω－ホスホアルキル、又はω－チオホスホアルキルであり、
$Ｒ_{1}$、$Ｒ_{2}$、及び$Ｒ_{x}$は、各存在において各々独立して、Ｈ、随意に置換された$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{10}$アルキル、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アルキル、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アルケニル、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アルキニル、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アシル、又はリンカー－リガンドであり、ただし$Ｒ_{1}$、$Ｒ_{2}$、及び$Ｒ_{x}$の少なくとも１つはＨではなく、
$Ｒ_{3}$は、Ｈ、随意に置換された$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{10}$アルキル、随意に置換された$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{10}$アルケニル、随意に置換された$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{10}$アルキニル、アルキルヘトロ環、アルキルホスフェート、アルキルホスホロチオアート、アルキルホスホロジチオアート、アルキルホスホネート、アルキルアミン、ヒドロキシアルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、ω－チオホスホアルキル、随意に置換されたポリエチレングリコール（ＰＥＧ、分子量：１００～４０Ｋ）、随意に置換されたｍＰＥＧ（分子量：１２０～４０Ｋ）、ヘテロアリール、ヘテロ環、又はリンカー－リガンドであり、
ｎは、０、１、２、又は３である。

【００７７】
幾つかの実施形態では、$Ｒ_{1}$及び$Ｒ_{2}$の各々は、各存在において独立して、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アルキル、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アルケニル、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アルキニル、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アシル、又はリンカー－リガンドである。

【００７８】
幾つかの実施形態では、$Ｒ_{x}$は、Ｈ又は随意に置換された$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{10}$アルキルである。

【００７９】
幾つかの実施形態では、$Ｒ_{x}$は、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アルキル、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アルケニル、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アルキニル、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アシル、又はリンカー－リガンドである。

【００８０】
１つの実施形態では、$Ｒ_{1}$及び$Ｒ_{2}$は、各存在において互いに独立して、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アルキル、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アルコキシ、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アルケニル、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アルケニルオキシ、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アルキニル、随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アルキニルオキシ、又は随意に置換された$Ｃ_{10}$～$Ｃ_{30}$アシル、又は－リンカー－リガンドである。

【００８１】
１つの実施形態では、$Ｒ_{3}$は、各存在において独立して、Ｈ、随意に置換された$Ｃ_{1}$～

C_{10}アルキル、随意に置換されたC_2～C_{10}アルケニル、随意に置換されたC_2～C_{10}アルキニル、随意に置換されたアルキルヘテロ環、随意に置換されたヘテロ環アルキル、随意に置換されたアルキルホスフェート、随意に置換されたホスホアルキル、随意に置換されたアルキルホスホロチオアート、随意に置換されたホスホロチオアルキル、随意に置換されたアルキルホスホロジチオアート、随意に置換されたホスホロジチオアルキル、随意に置換されたアルキルホスホネート、随意に置換されたホスホノアルキル、随意に置換されたアミノ、随意に置換されたアルキルアミノ、随意に置換されたジ（アルキル）アミノ、随意に置換されたアミノアルキル、随意に置換されたアルキルアミノアルキル、随意に置換されたジ（アルキル）アミノアルキル、随意に置換されたヒドロキシアルキル、随意に置換されたポリエチレングリコール（ＰＥＧ、分子量：１００～４０Ｋ）、随意に置換されたｍＰＥＧ（分子量：１２０～４０Ｋ）、随意に置換されたヘテロアリール、又は随意に置換されたヘテロ環、又はリンカー－リガンドである。

【００８２】

１つの実施形態では、Ｘ及びＹは、各々独立して、－Ｏ－、－Ｓ－、アルキレン、－Ｎ（Ｑ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｏ（ＣＯ）－、－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）－、－Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ、－ＯＣ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＳ（Ｏ）（Q_2）Ｏ－、又は－ＯＰ（Ｏ）（Q_2）Ｏ－である。

【００８３】

１つの実施形態では、Ｑは、Ｈ、アルキル、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、又はω－チオホスホアルキルである。

【００８４】

１つの実施形態では、Q_1は、各存在において独立して、Ｏ又はＳである。

【００８５】

１つの実施形態では、Q_2は、各存在において独立して、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｑ）（Ｑ）、アルキル、又はアルコキシである。

【００８６】

１つの実施形態では、A_1、A_2、A_4、及びA_5は、各々独立して、－Ｏ－、－Ｓ－、－CH_2－、－CHR^5－、－CR^5R^5－、－ＣＨＦ－、又は－CF_2－である。

【００８７】

１つの実施形態では、Ｅは、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｎ（Ｑ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）、－Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）－、－$S(O)_2$－、－ＳＳ－、－Ｏ－Ｎ＝、＝Ｎ－Ｏ－、アリーレン、ヘテロアリーレン、シクロアルキルエン、又はヘテロシクリレンである。

【００８８】

１つの実施形態では、ｉ及びｊは、各々独立して、０～１０である。

【００８９】

幾つかの状況では、R_3は、ω－アミノアルキル、ω－（置換）アミノアルキル、ω－ホスホアルキル、又はω－チオホスホアルキルであり、これらの各々は、随意に置換されている。ω－（置換）アミノアルキル基の例には、２－（ジメチルアミノ）エチル、３－（ジイソプロピルアミノ）プロピル、又は３－（Ｎ－エチル－Ｎ－イソプロピルアミノ）－１－メチルプロピルが含まれる。

【００９０】

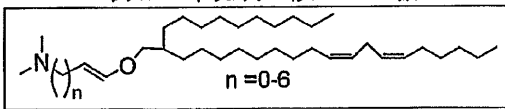
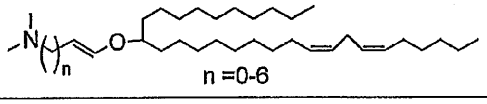
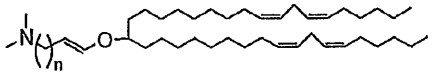
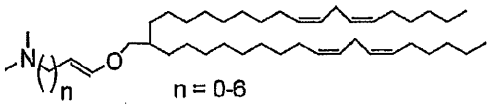
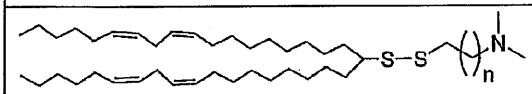
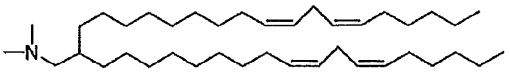
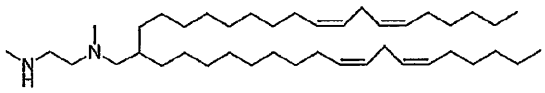
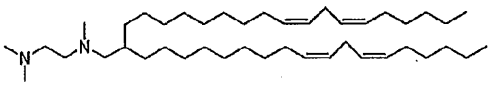
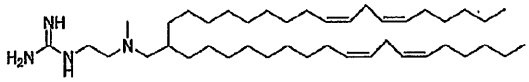
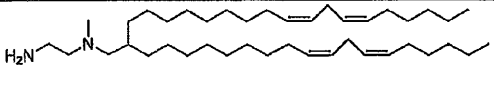
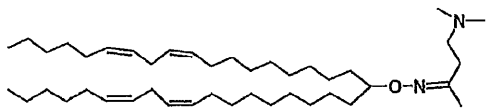
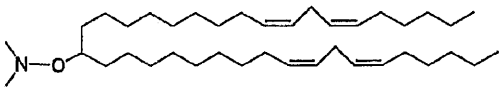
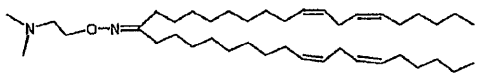
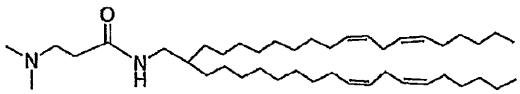
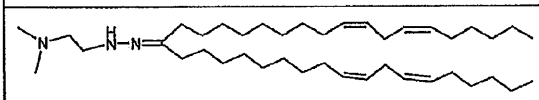
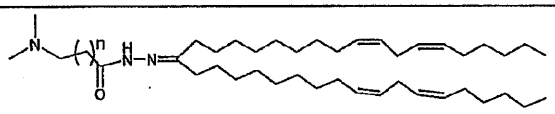
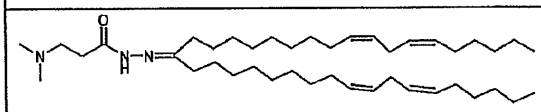
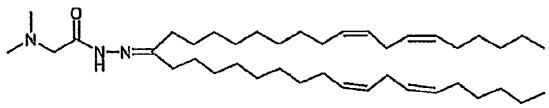
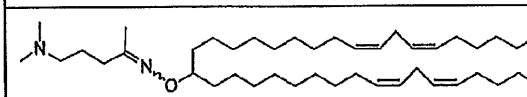
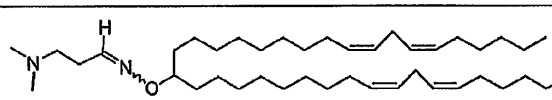
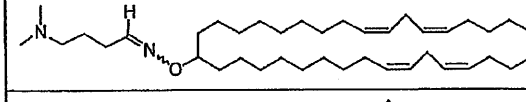
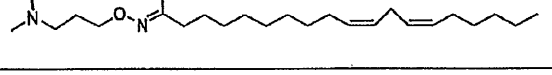
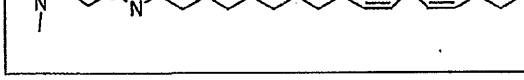
１つの実施形態では、Ｘ及びＹは、独立して－Ｏ－、－Ｓ－、アルキレン、又は－Ｎ（Ｑ）－であってもよい。

【００９１】

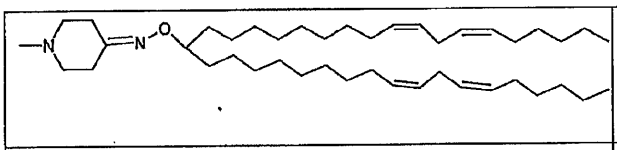
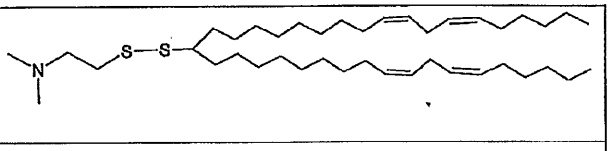
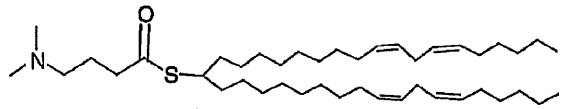
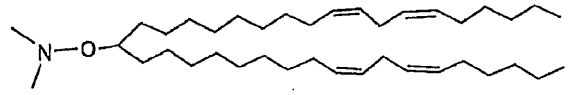
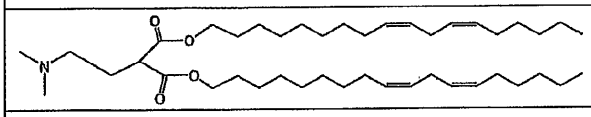
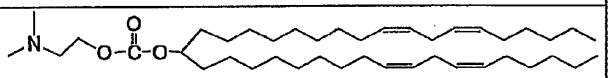
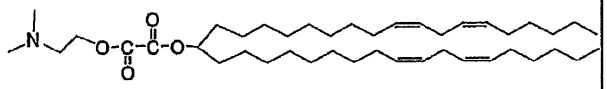
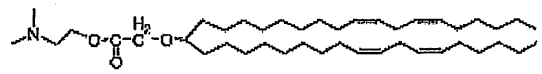
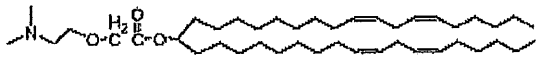
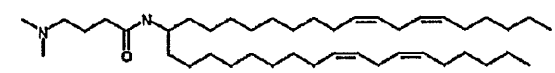
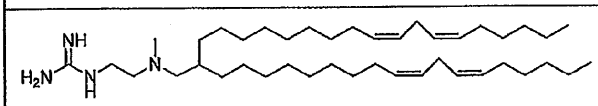
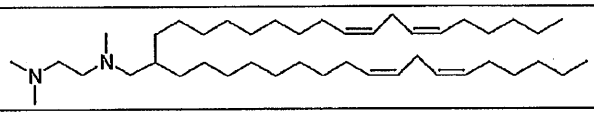
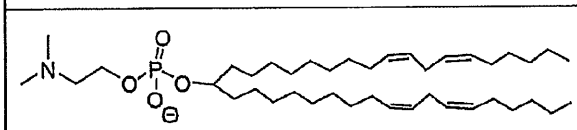
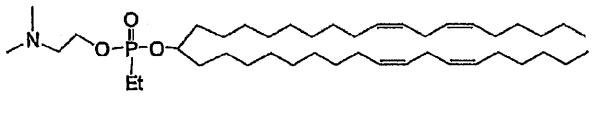
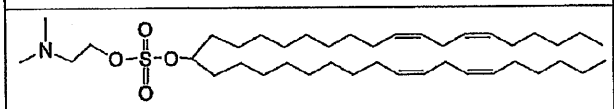
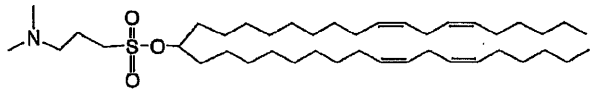
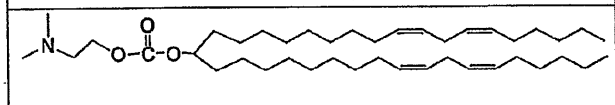
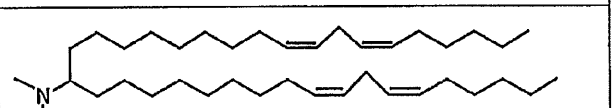
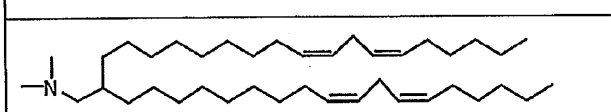
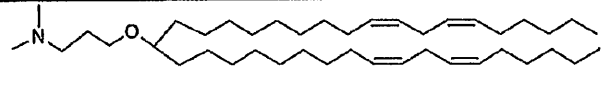
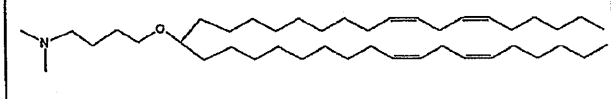
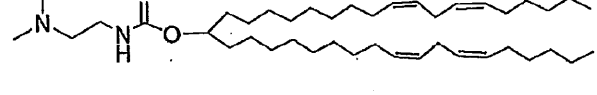
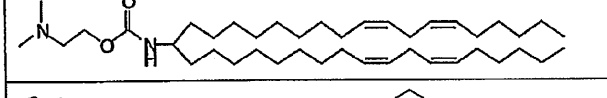
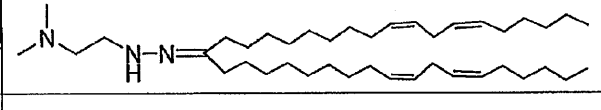
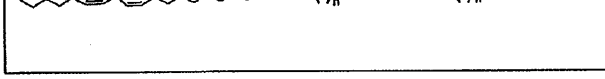
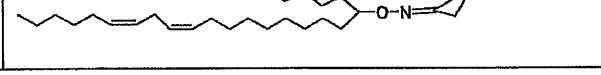
１つの実施形態では、陽イオン性脂質は、下記の表１に示されている脂質からなる群から選択される。

【表１Ａ】

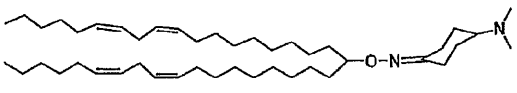
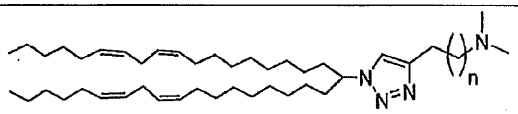
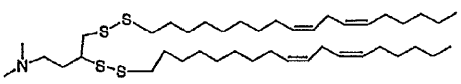
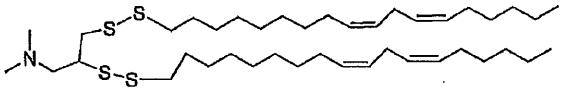
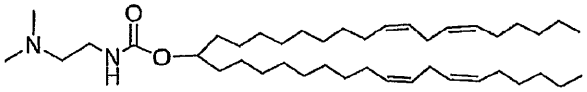
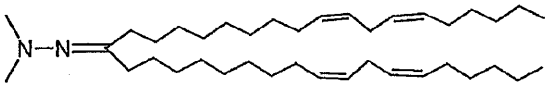
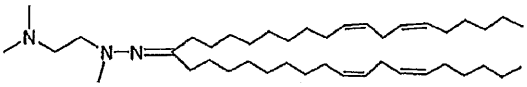
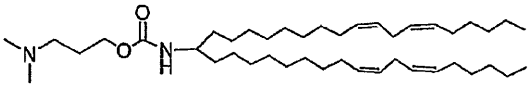
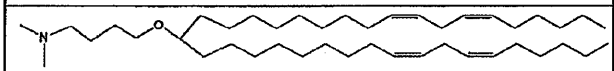
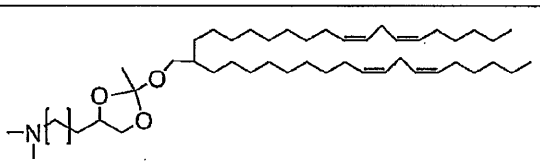
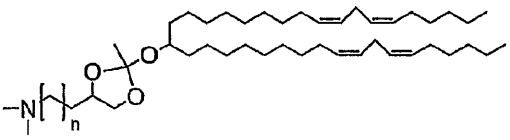
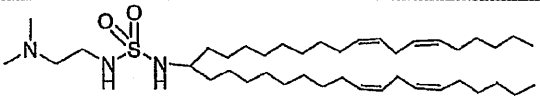
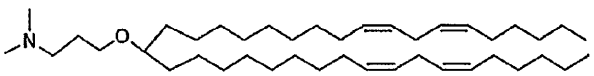
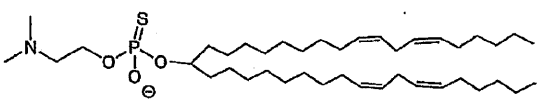
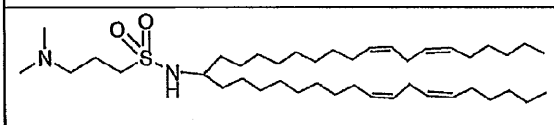
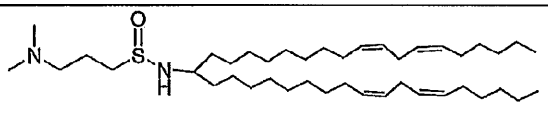
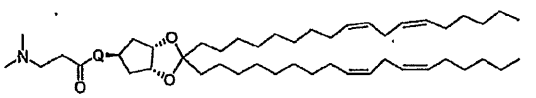
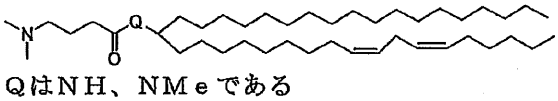
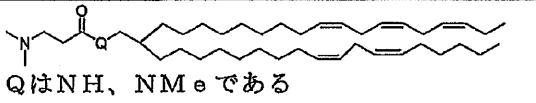
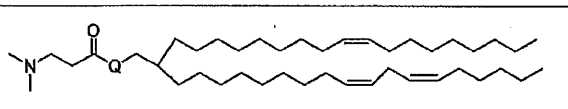
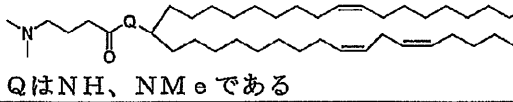
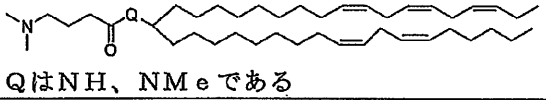
表１：本発明の幾つかの陽イオン性脂質。

 n =0-6	 n =0-6
 n = 0-6	 n = 0-6
 n = 0-6	
	
	
	
	
	 n = 0-6
	
	
	
	

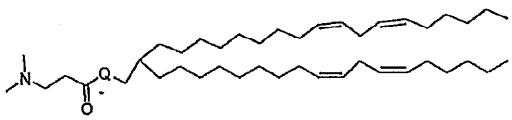
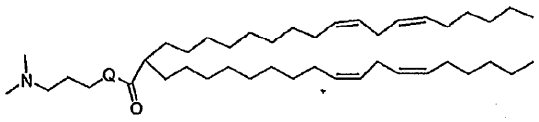
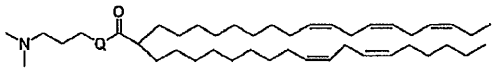
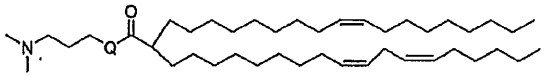
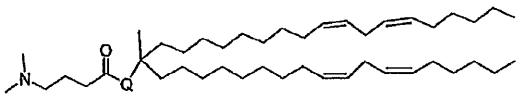
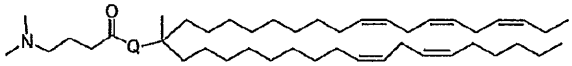
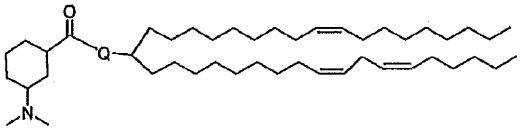
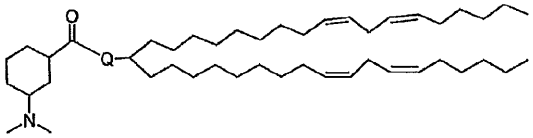
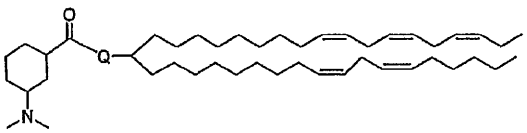
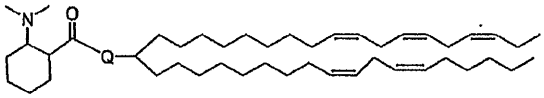
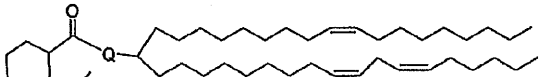
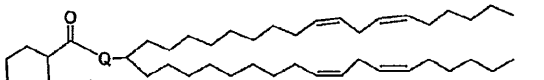
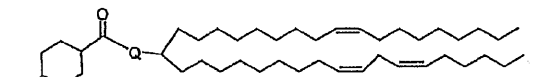
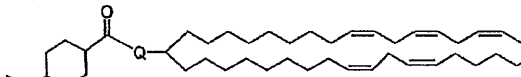
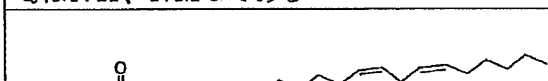
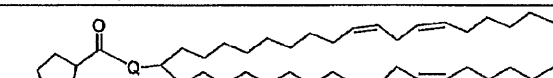
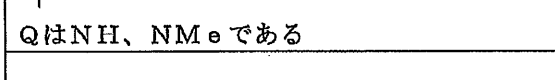
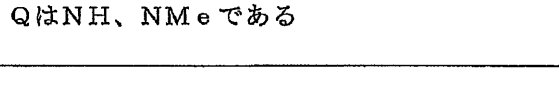
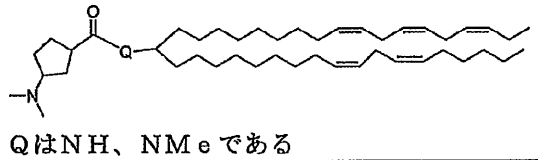
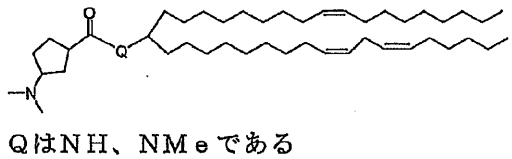
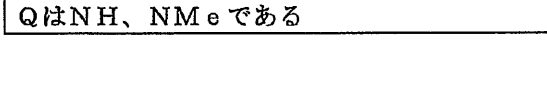
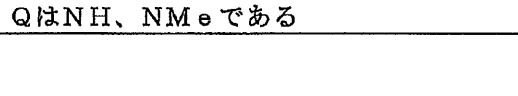
【表１Ｂ】

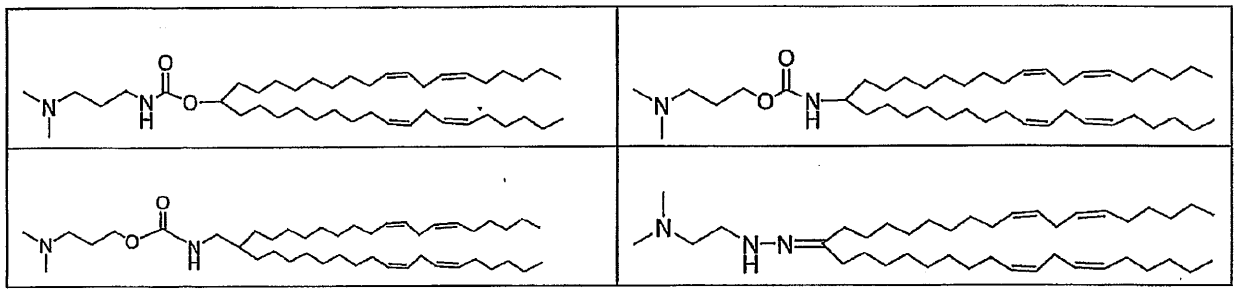
【表１Ｃ】

	 n = 0-6
	
	
	
	
	
	
	
	
 QはNH、NMeである	 QはNH、NMeである
 QはNH、NMeである	 QはNH、NMeである
 QはNH、NMeである	 QはNH、NMeである

【表１Ｄ】

 ＱはＮＨ、ＮＭｅである	 ＱはＮＨ、ＮＭｅである
 ＱはＮＨ、ＮＭｅである	 ＱはＮＨ、ＮＭｅである
 ＱはＮＨ、ＮＭｅである	 ＱはＮＨ、ＮＭｅである
 ＱはＮＨ、ＮＭｅである	 ＱはＮＨ、ＮＭｅである
 ＱはＮＨ、ＮＭｅである	 ＱはＮＨ、ＮＭｅである
 ＱはＮＨ、ＮＭｅである	 ＱはＮＨ、ＮＭｅである
 ＱはＮＨ、ＮＭｅである	 ＱはＮＨ、ＮＭｅである
 ＱはＮＨ、ＮＭｅである	 ＱはＮＨ、ＮＭｅである
 ＱはＮＨ、ＮＭｅである	 ＱはＮＨ、ＮＭｅである
 ＱはＮＨ、ＮＭｅである	 ＱはＮＨ、ＮＭｅである
 ＱはＮＨ、ＮＭｅである	 ＱはＮＨ、ＮＭｅである

【表１Ｅ】



【００９２】
脂質のジアステレオマーは全てが示されているとは限らないが、本発明の１つの態様は、全てのジアステレオマーを提供するものであり、したがって、キラル的に純粋な脂質及びジアステレオマー的に濃縮された脂質も、本発明の一部である。
【００９３】
１つの実施形態では、R_3は、－リンカー－リガンドである。
【００９４】
特定の実施形態では、本発明の脂質は、陽イオン性脂質である。本明細書で使用されるとき、「陽イオン性脂質」という用語は、１つ又は２つの脂肪酸又は脂肪アルキル鎖及び生理学的なｐＨでプロトン化されて陽イオン性脂質を形成することができるアミノ頭部基（アルキルアミノ又はジアルキルアミノ基を含む）を有する脂質を含むことが意図されている。幾つかの実施形態では、陽イオン性脂質は、「アミノ脂質」と呼ばれる。
【００９５】
他の陽イオン性脂質には、アルキル置換基が異なるもの（例えば、Ｎ－エチル－Ｎ－メチルアミノ－、Ｎ－プロピル－Ｎ－エチルアミノ－など）を含む、代替的な脂肪酸基及び他のジアルキルアミノ基を有するものが含まれるだろう。R_1及びR_2が両方とも長鎖アルキル又はアシル基である実施形態の場合、それらは、同じであってもよく又は異なっていてもよい。一般的に、より低飽和のアシル鎖を有する脂質（例えば、陽イオン性脂質）は、特に複合体がろ過滅菌するために約０．３マイクロメートル未満にサイズ化される場合、より容易にサイズ化することができる。C_{10}～C_{20}の範囲の炭素鎖長を有する不飽和脂肪酸を含有する陽イオン性脂質が典型的である。他の骨格を使用して、アミノ基（例えば、陽イオン性脂質のアミノ基）と、陽イオン性脂質の脂肪酸又は脂肪アルキル部分とを分離することもできる。好適な骨格は当業者に公知である。
【００９６】
ある実施形態では、本発明の陽イオン性脂質は、少なくとも１つのプロトン化可能な基又は脱プロトン化可能な基を有しており、そのため脂質は、生理学的なｐＨ（例えば、ｐＨ７．４）以下で正に荷電され、第２のｐＨで、好ましくは生理学的なｐＨで又はそれを超えたｐＨで中性である。そのような脂質も、陽イオン性脂質と呼ばれる。無論、ｐＨの関数としてのプロトンの付加又は脱離が、平衡プロセスであり、荷電脂質又は中性脂質への言及は、支配的な種の性質を指し、脂質の全てが荷電形態又は中性形態にあることを必要としないことが理解されるだろう。複数のプロトン化可能な基又は脱プロトン化可能な基を有するか、又は双性イオンである脂質は、本発明における使用から除外されない。
【００９７】
ある実施形態では、本発明によるプロトン化可能な脂質（つまり、陽イオン性脂質）は、プロトン化可能な基のｐＫａが約４～約１１の範囲である。典型的には、脂質は、脂質粒子に組み込まれた際に、約４～約７のｐＫａ、例えば約５．５～６．８など、約４～約７のｐＫａを有するだろう。そのような脂質は、より低いｐＨの製剤段階では陽イオン性であるが、粒子は、ｐＨ７．４付近の生理学的なｐＨでは、表面がほとんど（完全でないが）中性化されるだろう。約４～７の範囲のｐＫａの有益性の１つは、粒子の外側表面に結合している少なくともある程度の核酸が、生理学的なｐＨでその静電的相互作用を喪失

し、簡単な透析により除去されるということであり、したがってクリアランスに対する粒子の感受性が大幅に低減される。脂質粒子内の脂質のｐＫａ測定は、例えば、Ｃｕｌｌｉｓ ｅｔ ａｌ．，（１９８６）Ｃｈｅｍ Ｐｈｙｓ Ｌｉｐｉｄｓ ４０，１２７－１４４に記載されている方法を使用して、蛍光プローブである２－（ｐ－トルイジノ）－６－ナフタレンスルホン酸（ＴＮＳ）を使用することにより実施することができる。

【００９８】

１つの実施形態では、本発明の製剤は、少なくとも７５％、少なくとも８０％、又は少なくとも９０％が封入される。

【００９９】

１つの実施形態では、本発明の製剤は、アポリポタンパク質をさらに含む。本明細書で使用されるとき、「アポリポタンパク質」又は「リポタンパク質」という用語は、当業者に公知のアポリポタンパク質並びにその変異体及び断片、並びに下記に記載されているアポリポタンパク質アゴニスト、その類似体又は断片を指す。

【０１００】

好適なアポリポタンパク質には、これらに限定されないが、ＡｐｏＡ－Ｉ、ＡｐｏＡ－ＩＩ、ＡｐｏＡ－ＩＶ、ＡｐｏＡ－Ｖ、及びＡｐｏＥ、並びに活性多形型形態、アイソフォーム、変異体、及び突然変異体、並びにそれらの断片又は切断型形態が含まれる。ある実施形態では、アポリポタンパク質は、チオール含有アポリポタンパク質である。「チオール含有アポリポタンパク質」は、少なくとも１つのシステイン残基を含有するアポリポタンパク質、変異体、断片、又はアイソフォームを指す。最も一般的なチオール含有アポリポタンパク質は、１つのシステイン残基を含有するＡｐｏＡ－Ｉ Ｍｉｌａｎｏ（ＡｐｏＡ－$Ｉ_{Ｍ}$）及びＡｐｏＡ－Ｉ Ｐａｒｉｓ（ＡｐｏＡ－$Ｉ_{Ｐ}$）である（Ｊｉａ ｅｔ ａｌ．，２００２，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．２９７：２０６－１３；Ｂｉｅｌｉｃｋｉ ａｎｄ Ｏｄａ，２００２，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４１：２０８９－９６）。ＡｐｏＡ－ＩＩ、ＡｐｏＥ２、及びＡｐｏＥ３も、チオール含有アポリポタンパク質である。その組換え的に産生された形態を含む単離されたＡｐｏＥ及び／又はその活性断片及びポリペプチド類似体は、米国特許第５，６７２，６８５号；同第５，５２５，４７２号；同第５，４７３，０３９号；同第５，１８２，３６４号；同第５，１７７，１８９号；同第５，１６８，０４５号；同第５，１１６，７３９号に記載されており、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。ＡｐｏＥ３は、Ｗｅｉｓｇｒａｂｅｒ，ｅｔ ａｌ．，“Ｈｕｍａｎ Ｅ ａｐｏｐｒｏｔｅｉｎ ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｉｔｙ：ｃｙｓｔｅｉｎｅ－ａｒｇｉｎｉｎｅ ｉｎｔｅｒｃｈａｎｇｅｓ ｉｎ ｔｈｅ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ｔｈｅ ａｐｏ－Ｅ ｉｓｏｆｏｒｍｓ，”Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（１９８１）２５６：９０７７－９０８３；及びＲａｌｌ，ｅｔ ａｌ．，“Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ｂａｓｉｓ ｆｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｂｉｎｄｉｎｇ ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｉｔｙ ｏｆ ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ ｆｒｏｍ ｔｙｐｅ ＩＩＩ ｈｙｐｅｒｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎｅｍｉｃ ｓｕｂｊｅｃｔｓ，”Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（１９８２）７９：４６９６－４７００に記載されている。ＧｅｎＢａｎｋ受入番号Ｋ００３９６も参照されたい。

【０１０１】

ある実施形態では、アポリポタンパク質は、その成熟形態であってもよく、そのプレプロアポリポタンパク質形態であってもよく、又はそのプロアポリポタンパク質形態であってもよい。プロＡｐｏＡ－Ｉ及び成熟ＡｐｏＡ－Ｉ（可能な場合）（Ｄｕｖｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ．Ｔｈｒｏｍｂ．Ｖａｓｃ．Ｂｉｏｌ．１６（１２）：１４２４－２９）、ＡｐｏＡ－Ｉ Ｍｉｌａｎｏ（Ｋｌｏｎ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．７９：（３）１６７９－８７；Ｆｒａｎｃｅｓｃｈｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６０：１６３２－３５）、ＡｐｏＡ－Ｉ Ｐａｒｉｓ（Ｄａｕｍ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．７７：６１４－２２）、ＡｐｏＡ

－ＩＩ（Ｓｈｅｌｎｅｓｓ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６０（１４）：８６３７－４６；Ｓｈｅｌｎｅｓｓ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５９（１５）：９９２９－３５）、ＡｐｏＡ－ＩＶ（Ｄｕｖｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｅｕｒｏ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０１（２）：３７３－８３）、及びＡｐｏＥ（ＭｃＬｅａｎ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５８（１４）：８９９３－９０００）のホモダイマー及びヘテロダイマーも、本発明の範囲内で使用することができる。

【０１０２】

ある実施形態では、アポリポタンパク質は、アポリポタンパク質の断片、変異体、又はアイソフォームであってもよい。「断片」という用語は、天然アポリポタンパク質のアミノ酸配列よりも短いアミノ酸配列を有する任意のアポリポタンパク質を指し、断片は、脂質結合特性を含む天然アポリポタンパク質の活性を保持する。「変異体」とは、アポリポタンパク質のアミノ酸配列における置換又は変更を意味し、置換又は変更、例えばアミノ酸残基の付加及び欠失は、脂質結合特性を含む天然アポリポタンパク質の活性を消失させない。したがって、変異体は、１つ以上のアミノ酸残基が化学的に類似しているアミノ酸と保守的に置換された本明細書で提供される天然アポリポタンパク質と、実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質又はペプチドを含むことができる。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、ロイシン、又はメチオニンなどの少なくとも１つの疎水性残基を別の残基に置換することが含まれる。同様に、例えば、本発明は、例えばアルギニンとリジンとの間、グルタミンとアスパラギンとの間、及びグリシンとセリンとの間などの、少なくとも１つの親水性残基の置換を企図する（米国特許第６，００４，９２５号、同第６，０３７，３２３号、及び同第６，０４６，１６６号を参照）。「アイソフォーム」という用語は、同じ機能、より大きな機能、又は部分的な機能、及び類似した配列、同一の配列、又は部分的な配列を有するタンパク質を指し、同じ遺伝子の産物であってもよいか、なくてもよい、通常は組織特異的である（Ｗｅｉｓｇｒａｂｅｒ １９９０，Ｊ．Ｌｉｐｉｄ Ｒｅｓ．３１（８）：１５０３－１１；Ｈｉｘｓｏｎ ａｎｄ Ｐｏｗｅｒｓ １９９１，Ｊ．Ｌｉｐｉｄ Ｒｅｓ．３２（９）：１５２９－３５；Ｌａｃｋｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６０（２）：７０３－６；Ｈｏｅｇ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６１（９）：３９１１－４；Ｇｏｒｄｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５９（１）：４６８－７４；Ｐｏｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｃｅｌｌ ５０（６）：８３１－４０；Ａｖｉｒａｍ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ．Ｔｈｒｏｍｂ．Ｖａｓｅ．Ｂｉｏｌ．１８（１０）：１６１７－２４；Ａｖｉｒａｍ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０１（８）：１５８１－９０；Ｂｉｌｌｅｃｋｅ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｄｒｕｇ Ｍｅｔａｂ．Ｄｉｓｐｏｓ．２８（１１）：１３３５－４２；Ｄｒａｇａｎｏｖ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５（４３）：３３４３５－４２；Ｓｔｅｉｎｍｅｔｚ ａｎｄ Ｕｔｅｒｍａｎｎ １９８５，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６０（４）：２２５８－６４；Ｗｉｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８０，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５５（２１）：１０４６４－７１；Ｄｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ｊ．Ｌｉｐｉｄ Ｒｅｓ．３６（１）：８０－８；Ｓａｃｒｅ ｅｔ ａｌ．，２００３，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５４０（１－３）：１８１－７；Ｗｅｅｒｓ，ｅｔ ａｌ．，２００３，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｃｈｅｍ．１００（１－３）：４８１－９２；Ｇｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００２，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７（３３）：２９９１９－２６；Ｏｈｔａ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５９（２３）：１４８８８－９３、及び米国特許第６，３７２，８８６号）。

【０１０３】

ある実施形態では、本発明の方法及び組成物は、アポリポタンパク質のキメラ構築体の使用を含む。例えば、アポリポタンパク質のキメラ構築体は、虚血再灌流保護特性を有す

るアポリポタンパク質ドメインに結合している、高い脂質結合力を有するアポリポタンパク質ドメインで構成されていてもよい。アポリポタンパク質のキメラ構築体は、アポリポタンパク質内にある個別の領域を含む構築体（つまり、相同性構築体）であってもよく、又はキメラ構築体は、アポリポタンパク質間で異なる個別の領域を含む構築体（つまり、異種性構築体）であってもよい。キメラ構築体を含む組成物は、特定の特徴（例えば、脂質結合、受容体結合、酵素性、酵素活性化、抗酸化特性、又は酸化還元特性）を有するように設計されたアポリポタンパク質変異体又はセグメントであるセグメントを含むこともできる（Ｗｅｉｓｇｒａｂｅｒ １９９０，Ｊ．Ｌｉｐｉｄ Ｒｅｓ．３１（８）：１５０３－１１；Ｈｉｘｓｏｎ ａｎｄ Ｐｏｗｅｒｓ １９９１，Ｊ．Ｌｉｐｉｄ Ｒｅｓ．３２（９）：１５２９－３５；Ｌａｃｋｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６０（２）：７０３－６；Ｈｏｅｇ ｅｔ ａｌ，１９８６，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６１（９）：３９１１－４；Ｇｏｒｄｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５９（１）：４６８－７４；Ｐｏｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｃｅｌｌ ５０（６）：８３１－４０；Ａｖｉｒａｍ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ．Ｔｈｒｏｍｂ．Ｖａｓｃ．Ｂｉｏｌ．１８（１０）：１６１７－２４；Ａｖｉｒａｍ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０１（８）：１５８１－９０；Ｂｉｌｌｅｃｋｅ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｄｒｕｇ Ｍｅｔａｂ．Ｄｉｓｐｏｓ．２８（１１）：１３３５－４２；Ｄｒａｇａｎｏｖ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５（４３）：３３４３５－４２；Ｓｔｅｉｎｍｅｔｚ ａｎｄ Ｕｔｅｒｍａｎｎ １９８５，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６０（４）：２２５８－６４；Ｗｉｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８０，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５５（２１）：１０４６４－７１；Ｄｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ｊ．Ｌｉｐｉｄ Ｒｅｓ．３６（１）：８０－８；Ｓｏｒｅｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ．Ｔｈｒｏｍｂ．Ｖａｓｃ．Ｂｉｏｌ．１９（９）：２２１４－２５；Ｐａｌｇｕｎａｃｈａｒｉ １９９６，Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ．Ｔｈｒｏｂ．Ｖａｓｃ．Ｂｉｏｌ．１６（２）：３２８－３８：Ｔｈｕｒｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１（１１）：６０６２－７０；Ｄｙｅｒ １９９１，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６６（２３）：１５０００９－１５；Ｈｉｌｌ １９９８，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７３（４７）：３０９７９－８４を参照）。

【０１０４】

本発明で使用されるアポリポタンパク質には、組換え、合成、半合成、又は精製されたアポリポタンパク質も含まれる。本発明により使用されるアポリポタンパク質又はその等価物を取得するための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、アポリポタンパク質は、例えば密度勾配遠心分離又は免疫親和性クロマトグラフィーで血漿又は天然産物から分離してもよく、又は合成的に、半合成的に、若しくは当業者に公知の組換えＤＮＡ技術を使用して生成してもよい（例えば、Ｍｕｌｕｇｅｔａ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．７９８（１－２）：８３－９０；Ｃｈｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９８０，Ｊ．Ｌｉｐｉｄ Ｒｅｓ．２１（３）：２８４－９１；Ｃｈｅｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｊ．Ｌｉｐｉｄ Ｒｅｓ．２８（８）：９１３－２９；Ｐｅｒｓｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．７１１：９７－１０９；米国特許第５，０５９，５２８号、同第５，８３４，５９６号、同第５，８７６，９６８号、及び同第５，７２１，１１４号；並びに国際公開第８６／０４９２０号及び国際公開第８７／０２０６２号を参照）。

【０１０５】

本発明で使用されるアポリポタンパク質には、ＡｐｏＡ－Ｉ、ＡｐｏＡ－Ｉ Ｍｉｌａｎｏ（ＡｐｏＡ－Ｉ$_{Ｍ}$）、ＡｐｏＡ－Ｉ Ｐａｒｉｓ（ＡｐｏＡ－Ｉ$_{Ｐ}$）、ＡｐｏＡ－ＩＩ、ＡｐｏＡ－ＩＶ、及びＡｐｏＥの活性を模倣するペプチド及びペプチド類似体などのアポリポタンパク質アゴニストをさらに含む。例えば、アポリポタンパク質は、米国特許

第６，００４，９２５号、同第６，０３７，３２３号、同第６，０４６，１６６号、及び同第５，８４０，６８８号に記載されているもののいずれかであってもよく、それらの内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０１０６】

アポリポタンパク質アゴニストペプチド又はペプチド類似体は、例えば、米国特許第６，００４，９２５号、同第６，０３７，３２３号、及び同第６，０４６，１６６号に記載されている技術などの、当該技術分野で公知である任意のペプチド合成技術を使用して、合成又は製造することができる。例えば、ペプチドは、Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ（１９６３，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５：２１４９－２１５４）により最初に記載されている固相合成技術を使用して調製することができる。他のペプチド合成技術は、Ｂｏｄａｎｓｚｋｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，２ｄ Ｅｄ．，（１９７６）、及び当業者が容易に入手可能な他の文献に見出すことができる。ポリペプチド合成技術の要約は、Ｓｔｕａｒｔ ａｎｄ Ｙｏｕｎｇ，Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ．Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，Ｉｌｌ．，（１９８４）に見出すことができる。ペプチドは、Ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｖｏｌ．ＩＩ，３ｄ Ｅｄ．，Ｎｅｕｒａｔｈ ｅｔ．ａｌ．，Ｅｄｓ．，ｐ．１０５－２３７，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．（１９７６）に記載されているような溶液法により合成することもできる。様々なペプチド合成に使用するための適切な保護基は、前述の文献並びにＭｃＯｍｉｅ，Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．（１９７３）に記載されている。本発明のペプチドは、例えば、アポリポタンパク質Ａ－Ｉのより大きな部分から、化学的に又は酵素的に切断することにより調製することもできる。

【０１０７】

ある実施形態では、アポリポタンパク質は、アポリポタンパク質の混合物であってもよい。１つの実施形態では、アポリポタンパク質は、均質な混合物、すなわち単一のタイプのアポリポタンパク質であってもよい。別の実施形態では、アポリポタンパク質は、アポリポタンパク質の異種性混合物、すなわち２つ以上の異なるアポリポタンパク質の混合物であってもよい。アポリポタンパク質の異種性混合物の実施形態は、例えば、動物供給源に由来するアポリポタンパク質及び半合成的供給源に由来するアポリポタンパク質の混合物を含むことができる。ある実施形態では、異種性混合物は、例えば、ＡｐｏＡ－Ｉ及びＡｐｏＡ－Ｉ Ｍｉｌａｎｏの混合物を含むことができる。ある実施形態では、異種性混合物は、例えば、ＡｐｏＡ－Ｉ Ｍｉｌａｎｏ及びＡｐｏＡ－Ｉ Ｐａｒｉｓの混合物を含むことができる。本発明の方法及び組成物に使用するための好適な混合物は、当業者であれば明白であろう。

【０１０８】

アポリポタンパク質が天然供給源から取得される場合、アポリポタンパク質は、植物又は動物供給源から取得することができる。アポリポタンパク質が動物供給源から取得される場合、アポリポタンパク質は、任意の種に由来してよい。ある実施形態では、アポリポタンパク質は、動物供給源から取得することができる。ある実施形態では、アポリポタンパク質は、ヒト供給源から取得することができる。本発明の好ましい実施形態では、アポリポタンパク質は、アポリポタンパク質が投与される個体と同じ種に由来する。

【０１０９】

脂質粒子

本発明は、上述の陽イオン性脂質の１つ以上を含む脂質粒子も提供する。脂質粒子には、リポソームが含まれるが、これに限定されない。本明細書で使用されるとき、リポソームとは、水性の内部を取り囲む脂質含有膜を有する構造である。リポソームは、１つ以上の脂質膜を有していてもよい。本発明は、単層膜と呼ばれる単一層状リポソーム及び多重層膜と呼ばれる複数層状リポソームの両方を企図する。また、脂質粒子は、核酸と複合体

化した際に、例えば、Ｆｅｌｇｎｅｒ，　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ａｍｅｒｉｃａｎに記載されているような、ＤＮＡ層の間に挟まれた陽イオン性脂質二分子膜で構成されるリポプレックスであってもよい。

【０１１０】

本発明の脂質粒子は、１つ以上のさらなる脂質及び／又はコレステロールなどの他の成分をさらに含んでいてもよい。他の脂質が、脂質酸化を防止するため又はリポソーム表面にリガンドを結合させるためなどの様々な目的で、本発明のリポソーム組成物に含まれていてもよい。両親媒性、中性、陽イオン性、及び陰イオン性脂質を含む多数の脂質のいずれが、本発明のリポソーム中に存在していてもよい。そのような脂質は、単独で又は組合せで使用することができる。存在していてもよいさらなる脂質成分の特定の例は、下記に記載されている。

【０１１１】

本発明の脂質粒子に存在していてもよいさらなる成分には、ポリアミドオリゴマーなどの二分子膜安定化成分（例えば、米国特許第６，３２０，０１７号を参照）、ペプチド、タンパク質、界面活性剤、ホスファチジルエタノールアミンに結合されたＰＥＧ及びセラミドに結合されたＰＥＧなどの脂質誘導体（米国特許第５，８８５，６１３号を参照）が含まれる。

【０１１２】

特定の実施形態では、脂質粒子には、第２のアミノ脂質又は陽イオン性脂質、中性脂質、ステロール、及び形成中の脂質粒子の凝集を低減するために選択される脂質のうちの１つ以上が含まれ、凝集の低減は、形成中の電荷誘導性凝集を防止する粒子の立体安定化の結果であり得る。

【０１１３】

形成中の粒子の凝集を低減する脂質の例には、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）修飾脂質、モノシアロガングリオシドＧｍ１、及びポリアミドオリゴマー（「ＰＡＯ」）（米国特許第６，３２０，０１７号に記載されているものなど）が含まれる。ＰＥＧ、Ｇｍ１、又はＡＴＴＡのような製剤中の凝集を防止する無荷電で親水性の立体障害部分を有する他の化合物を、本発明の方法及び組成物に使用するための脂質に結合させることもできる。ＡＴＴＡ脂質は、例えば米国特許第６，３２０，０１７号に記載されており、ＰＥＧ脂質結合体は、例えば米国特許第５，８２０，８７３号、同第５，５３４，４９９号、及び同第５，８８５，６１３号に記載されている。典型的には、凝集を低減するために選択される脂質成分の濃度は、約１～１５％である（脂質のモルパーセントによる）。

【０１１４】

本発明に有用なＰＥＧ修飾脂質（又は脂質－ポリオキシエチレン結合体）の特定の例は、脂質小胞の表面にＰＥＧ部分を固定するための様々な「係留」脂質部分を有することができる。好適なＰＥＧ修飾脂質の例には、ＰＥＧ修飾ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジン酸、参照により本明細書に組み込まれる同時係属の米国特許出願第０８／４８６，２１４号に記載されているＰＥＧ－セラミド結合体（例えば、ＰＥＧ－ＣｅｒＣ１４又はＰＥＧ－ＣｅｒＣ２０）、ＰＥＧ修飾ジアルキルアミン、及びＰＥＧ修飾１，２－ジアシルオキシプロパン－３－アミンが含まれる。特に、ＰＥＧ修飾ジアシルグリセロール及びジアルキルグリセロールが好ましい。

【０１１５】

ＰＥＧ又はＡＴＴＡなどの立体的に大きな部分が、脂質アンカーに結合される実施形態では、脂質アンカーの選択は、結合体が脂質粒子と共に有することになる結合のタイプに依存する。ｍＰＥＧ（分子量２０００）－ジアステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）は、粒子が循環から排除されるまで、おそらくは数日間程度、リポソームと結合したままであることは周知である。ＰＥＧ－ＣｅｒＣ２０などの他の結合体は、同様の滞留能力を有する。しかしながら、ＰＥＧ－ＣｅｒＣ１４は、幾つかのアッセイでは、血清と接触した際に６０分未満の$T_{1/2}$で迅速に交換して製剤から外へと出ていく。米国特許出願第０８／４８６，２１４号に例示されているように、少なくとも

３つの特徴：アシル鎖の長さ、アシル鎖の飽和度、及び立体障害性頭部基のサイズが、交換速度に影響を及ぼす。これらの特徴の好適な変異を有する化合物は、本発明に有用であり得る。幾つかの治療用途の場合、ＰＥＧ修飾脂質は、インビボで核酸－脂質粒子から迅速に失われることが好ましい場合があり、したがってＰＥＧ修飾脂質は比較的短い脂質アンカーを有するだろう。他の治療用途では、核酸－脂質粒子は、より長い血漿循環寿命を示すことが好ましい場合があり、したがってＰＥＧ修飾脂質は、比較的より長い脂質アンカーを有するだろう。

【０１１６】

凝集防止化合物は、適切に機能するために脂質結合を必ずしも必要としないことに留意すべきである。溶液中の遊離ＰＥＧ又は遊離ＡＴＴＡは、凝集を防止するのに十分であり得る。粒子が製剤後に安定している場合、ＰＥＧ又はＡＴＴＡは、対象体に投与する前に透析して取り除くことができる。

【０１１７】

中性脂質は、脂質粒子に存在する場合、生理学的なｐＨで無荷電の又は中性の双性イオン形態のいずれかで存在する多くの脂質種のいずれであってもよい。そのような脂質には、例えば、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、ケファリン、及びセレブロシドが含まれる。本明細書に記載されている粒子に使用するための中性脂質の選択は、一般的には、例えばリポソームのサイズ及び血流中のリポソームの安定性を考慮することにより導かれる。好ましくは、中性脂質成分は、２つのアシル基を有する脂質である（つまり、ジアシルホスファチジルコリン及びジアシルホスファチジルエタノールアミン）。様々な鎖長及び様々な飽和度のアシル鎖基を有する脂質は、入手可能であるか、又は周知の技術により単離又は合成することができる。１つの群の実施形態では、C_{10}～C_{20}の範囲の炭素鎖長を有する飽和脂肪酸を含有する脂質が好ましい。別の群の実施形態では、C_{10}～C_{20}の範囲の炭素鎖長を有するモノ飽和又はジ飽和脂肪酸を有する脂質が使用される。加えて、飽和及び不飽和脂肪酸鎖の混合物を有する脂質を使用することができる。好ましくは、本発明で使用される中性脂質は、ＤＯＰＥ、ＤＳＰＣ、ＰＯＰＣ、ＤＰＰＣ、又は任意の関連ホスファチジルコリンである。本発明に有用な中性脂質は、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、又はセリン及びイノシトールなどの他の頭部基を有するリン脂質で構成されていてもよい。

【０１１８】

脂質混合物のステロール成分は、存在する場合、リポソーム、脂質小胞、又は脂質粒子調製の分野で従来使用されているステロールのいずれであってもよい。好ましいステロールはコレステロールである。

【０１１９】

具体的に上述されているものに加えて、生理学的ｐＨ付近で正味正電荷を担持する他の陽イオン性脂質も、本発明の脂質粒子に含まれ得る。そのような陽イオン性脂質には、これらに限定されないが、以下のものが含まれる：Ｎ，Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド（「ＤＯＤＡＣ」）；Ｎ－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル－Ｎ，Ｎ－Ｎ－トリエチルアンモニウムクロリド（「ＤＯＴＭＡ」）；Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミド（「ＤＤＡＢ」）；Ｎ－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（「ＤＯＴＡＰ」）；１，２－ジオレイルオキシ－３－トリメチルアミノプロパンクロリド塩（「ＤＯＴＡＰ．Ｃｌ」）；３－（Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノエタン）－カルバモイル）コレステロール（「ＤＣ－Ｃｈｏｌ」）、Ｎ－（１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル）－Ｎ－２－（スペルミンカルボキサミド）エチル）－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムトリフルオルアセテート（「ＤＯＳＰＡ」）、ジオクタデシルアミドグリシルカルボキシスペルミン（「ＤＯＧＳ」）、１，２－ジレオイル－ｓｎ－３－ホスホエタノールアミン（「ＤＯＰＥ」）、１，２－ジオレオイル－３－ジメチルアンモニウムプロパン（「ＤＯＤＡＰ」）、Ｎ、Ｎ－ジメチル－２，３－ジオレイルオキシ）プロピルアミン（「ＤＯ

ＤＭＡ」）、及びＮ－（１，２－ジミリスチルオキシプロプ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（「ＤＭＲＩＥ」）。加えて、例えば、ＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮ（ＤＯＴＭＡ及びＤＯＰＥを含む、ＧＩＢＣＯ／ＢＲＬ社から入手可能）、及びＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（ＤＯＳＰＡ及びＤＯＰＥを含む、ＧＩＢＣＯ／ＢＲＬ社から入手可能）などの、多くの市販の陽イオン性脂質調製物を使用することができる。特定の実施形態では、陽イオン性脂質は、アミノ脂質である。

【０１２０】

本発明の脂質粒子に使用するのに好適な陰イオン性脂質には、これらに限定されないが、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ロアミン（Ｎ－ｄｏｄｅｃａｎｏｙｌ　ｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｅｔｈａｎｏｌｏａｍｉｎｅ）、Ｎ－スクシニルホスファチジルエタノールアミン、Ｎ－グルタリルホスファチジルエタノールアミン、リシルホスファチジルグリセロール、及び中性脂質に結合された他の陰イオン性修飾基が含まれる。

【０１２１】

多くの実施形態では、両親媒性脂質が、本発明の脂質粒子に含まれる。「両親媒性脂質」は、脂質物質の疎水性部分が疎水性相に向けて配置され、親水性部分が水相に向けて配置されている任意の好適な物質を指す。そのような化合物には、これらに限定されないが、リン脂質、アミノ脂質、及びスフィンゴ脂質が含まれる。代表的なリン脂質には、スフィンゴミエリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、パルミトイルオレオイルホスファトジルコリン（ｐａｌｍｉｔｏｙｌｏｌｅｏｙｌ　ｐｈｏｓｐｈａｔｄｙｌｃｈｏｌｉｎｅ）、リゾフォスファチジルコリン、リゾフォスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、又はジリノレオイルホスファチジルコリンが含まれる。スフィンゴ脂質、スフィンゴ糖脂質ファミリー、ジアシルグリセロール、及びδ－アシルオキシ酸などの他のリン欠失化合物を使用することもできる。加えて、そのような両親媒性脂質は、トリグリセリド及びステロールなどの他の脂質と、容易に混合することができる。

【０１２２】

また、本発明の脂質粒子への包含に好適なのは、プログラム可能な融合脂質である。そのような脂質粒子は、所定のシグナル事象が生じるまで、細胞膜と融合してそれらのペイロードを送達する傾向をほとんど示さない。これにより、脂質粒子は、生物又は疾患部位に注射された後、細胞との融合を開始する前に、より均一に分布することが可能になる。シグナル事象は、例えば、ｐＨ、温度、イオン環境、又は時間の変化であってもよい。後者の場合、ＡＴＴＡ－脂質結合体又はＰＥＧ－脂質結合体などの、融合遅延成分又は「被覆（ｃｌｏａｋｉｎｇ）」成分は、単に時間の経過と共に交換して脂質粒子膜から外に出ていくことができる。脂質粒子は、体内で適切に分布するまでに、十分な被覆剤を失って膜融合性になる。他のシグナル事象を用いる場合、炎症部位での温度上昇などの、疾患部位又は標的細胞に関連するシグナルを選択することが望ましい。

【０１２３】

ある実施形態では、細胞タイプ又は組織に特異的な標的指向性部分を使用して、本発明の脂質粒子を標的指向性にすることが望ましい。リガンド、細胞表面受容体、糖タンパク質、ビタミン（例えば、リボフラビン）、及びモノクローナル抗体などの様々な標的指向性部分を使用して、脂質粒子を標的指向性にすることは、以前に記載されている（例えば、米国特許第４，９５７，７７３号及び同第４，６０３，０４４号を参照）。標的指向性部分は、タンパク質全体又はその断片を含むことができる。標的指向性機序では、一般的に、標的指向性物質は、標的部分が標的、例えば細胞表面受容体との相互作用に利用可能なように、脂質粒子の表面に配置されていることが必要である。様々な異なる標的指向性物質及び方法は、例えば、Ｓａｐｒａ，　Ｐ．　ａｎｄ　Ａｌｌｅｎ，　ＴＭ，　Ｐｒｏｇ．　Ｌｉｐｉｄ　Ｒｅｓ．　４２（５）：４３９－６２　（２００３）；及びＡｂｒａ

, ＲＭ ｅｔ ａｌ．, Ｊ．Ｌｉｐｏｓｏｍｅ Ｒｅｓ．１２：１－３, （２００２）に記載されているものを含み、当該技術分野において公知であり、入手可能である。

【０１２４】

ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）鎖などの親水性ポリマー鎖で表面がコーティングされている脂質粒子、つまりリポソームの使用が、提唱されている（Ａｌｌｅｎ, ｅｔ ａｌ．, Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ １２３７：９９－１０８ （１９９５）；ＤｅＦｒｅｅｓ, ｅｔ ａｌ．, Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｓｏｃｉｅｔｙ １１８：６１０１－６１０４ （１９９６）；Ｂｌｕｍｅ, ｅｔ ａｌ．, Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ １１４９：１８０－１８４ （１９９３）；Ｋｌｉｂａｎｏｖ, ｅｔ ａｌ．, Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｌｉｐｏｓｏｍｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２：３２１－３３４ （１９９２）；米国特許第５，０１３５５６号；Ｚａｌｉｐｓｋｙ, Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４：２９６－２９９ （１９９３）；Ｚａｌｉｐｓｋｙ, ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ ３５３：７１－７４ （１９９４）；Ｚａｌｉｐｓｋｙ, ｉｎ Ｓｔｅａｌｔｈ Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ Ｃｈａｐｔｅｒ ９ （Ｌａｓｉｃ ａｎｄ Ｍａｒｔｉｎ, Ｅｄｓ） ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ, Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ Ｆｌ （１９９５））。１つの手法では、脂質粒子を標的指向性にするための、抗体などのリガンドを、脂質粒子を形成する脂質の極性頭部基に結合させる。別の手法では、親水性ポリマーコーティングを形成するＰＥＧ鎖の遠位端部に標的指向性リガンドを結合させる（Ｋｌｉｂａｎｏｖ, ｅｔ ａｌ．, Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｌｉｐｏｓｏｍｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２：３２１－３３４ （１９９２）；Ｋｉｒｐｏｔｉｎ ｅｔ ａｌ．, ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ ３８８：１１５－１１８ （１９９６））。

【０１２５】

標的指向性物質を結合させるためには、標準的方法を使用することができる。例えば、標的指向性物質を結合するために活性化することができるホスファチジルエタノールアミン、又は脂質誘導体化ブレオマイシンなどの誘導体化親油性化合物を使用することができる。抗体標的化リポソームは、例えば、プロテインＡが組み込まれているポソームを使用して構築することができる（Ｒｅｎｎｅｉｓｅｎ, ｅｔ ａｌ．, Ｊ．Ｂｉｏ．Ｃｈｅｍ．, ２６５：１６３３７－１６３４２ （１９９０） ａｎｄ Ｌｅｏｎｅｔｔｉ, ｅｔ ａｌ．, Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）, ８７：２４４８－２４５１ （１９９０）を参照）。抗体結合の他の例は、米国特許第６，０２７，７２６号に開示されており、それらの教示は、参照により本明細書に組み込まれる。標的指向性部分の例には、新生物又は腫瘍に関連する抗原を含む細胞成分に特異的な他のタンパク質も含まれ得る。標的指向性部分として使用されるタンパク質は、共有結合によりリポソームに結合することができる（Ｈｅａｔｈ, Ｃｏｖａｌｅｎｔ Ａｔｔａｃｈｍｅｎｔ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｔｏ Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ, １４９ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １１１－１１９ （Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ, Ｉｎｃ．１９８７）を参照）。他の標的指向化法には、ビオチン－アビジン系が含まれる。

【０１２６】

１つの例示的な実施形態では、脂質粒子は、本発明の陽イオン性脂質、中性脂質（陽イオン性脂質以外）、ステロール（例えば、コレステロール）、及びＰＥＧ修飾脂質（例えば、ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）の混合物を含む。ある実施形態では、脂質混合物は、本発明の陽イオン性脂質、中性脂質、コレステロール、及びＰＥＧ修飾脂質からなるか、又は本質的にからなる。さらなる好ましい実施形態では、脂質粒子は、約２０～７０％アミノ脂質：５～４５％中性脂質：２０～５５％コレステロール：０．５～１５％ＰＥＧ修飾脂質のモル比の上記脂質混合物からなるか、又は本質的にからなる。

【０１２７】

１つの実施形態では、脂質粒子は、本明細書に開示されている少なくとも２つの脂質を含む。例えば、陽イオン性脂質の混合物を脂質粒子に使用することができ、混合物は、モルに基づき２０～６０％の総脂質含有量を含む。

【０１２８】

特定の実施形態では、脂質粒子は、表１から選択される陽イオン性脂質、ＤＳＰＣ、Ｃｈｏｌ、及びＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡのいずれかからなるか、又は本質的にからなり、モル比は、例えば約２０～６０％陽イオン性脂質：５～２５％ＤＳＰＣ：２５～５５％Ｃｈｏｌ：０．５～１５％ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡである。特定の実施形態では、脂質モル比は、およそ４０／１０／４０／１０（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）、３５／１５／４０／１０（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）、又は５２／１３／３０／５（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）である。別の群の実施形態では、これらの組成物中の中性脂質、ＤＳＰＣは、ＰＯＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＯＰＥ、又はＳＭと置換される。

【０１２９】

治療薬－脂質粒子組成物及び製剤

本発明は、本発明の脂質粒子及び活性作用剤を含む組成物を含み、活性作用剤は脂質粒子に結合している。特定の実施形態では、活性作用剤は治療薬である。特定の実施形態では、活性作用剤は、脂質粒子の水性内部内に封入されている。他の実施形態では、活性作用剤は、脂質粒子の１つ以上の脂質層内に存在する。他の実施形態では、活性作用剤は、脂質粒子の外部又は内部脂質表面に結合している。

【０１３０】

本明細書で使用されるとき、「完全封入」とは、粒子中の核酸が、遊離核酸を著しく分解するであろう血清又はヌクレアーゼアッセイと接触した後で、著しくは分解されないことを示す。完全封入系では、好ましくは粒子核酸の２５％未満が、通常は遊離核酸を１００％分解する処理で分解され、より好ましくは粒子核酸の１０％未満が分解され、最も好ましくは粒子核酸の５％未満が分解される。あるいは、完全封入化は、Ｏｌｉｇｒｅｅｎ（登録商標）アッセイにより決定することができる。Ｏｌｉｇｒｅｅｎ（登録商標）は、溶液中のオリゴヌクレオチド及び一本鎖ＤＮＡを定量化するための超高感度蛍光核酸染色法である（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ社、カールズバッド、カリフォルニア州から入手可能）。完全封入化は、粒子が、血清安定性であり、すなわちインビボ投与時にそれらの構成成分へと急速には分解しないことも示唆する。

【０１３１】

活性作用剤には、本明細書で使用されるとき、細胞、組織、器官、又は対象体に所望の効果を及ぼすことができる任意の分子又は化合物が含まれる。そのような効果は、例えば、生物学的であってもよく、生理学的であってもよく、又は美容的であってもよい。活性作用剤は、任意のタイプの分子又は化合物であってもよく、それらには、例えば核酸、ペプチド、及びポリペプチドが含まれ、例えば、それらには、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体断片などの抗体；ヒト化抗体、組換え抗体、組換えヒト抗体、及びＰｒｉｍａｔｉｚｅｄ（商標）抗体、サイトカイン、増殖因子、アポトーシス因子、分化誘導因子、細胞表面受容体、及びそれらのリガンド；ホルモン；及び有機低分子又は化合物を含む低分子が含まれる。

【０１３２】

１つの実施形態では、活性作用剤は、治療薬、又はその塩若しくは誘導体である。治療薬誘導体は、それら自体が治療的に活性であってもよく、又はさらに修飾された際に活性となるプロドラッグであってもよい。したがって、１つの実施形態では、治療薬誘導体は、未修飾の作用剤と比較して治療活性の幾つか又は全てを保持し、別の実施形態では、治療薬誘導体は治療活性を欠如する。

【０１３３】

種々の実施形態では、治療薬には、抗炎症化合物、抗うつ薬、刺激剤、鎮痛薬、抗生物

質、避妊薬、解熱薬、血管拡張薬、抗血管新生薬、細胞血管薬（ｃｙｔｏｖａｓｃｕｌａｒ　ａｇｅｎｔ）、シグナル伝達阻害剤、心血管薬、例えば抗不整脈薬、血管収縮薬、ホルモン、及びステロイドなどの、任意の治療上有効な作用剤又は薬物が含まれる。
ある実施形態では、治療薬は、抗腫瘍薬、抗癌薬、腫瘍薬、又は抗悪性腫瘍薬などとも呼ばれる腫瘍学的薬物である。本発明により使用することができる腫瘍学的薬物の例には、これらに限定されないが、以下のものが含まれる：アドリアマイシン、アルケラン、アロプリノール、アルトレタミン、アミホスチン、アナストロゾール、ａｒａＣ、三酸化二砒素、アザチオプリン、ベキサロテン、ｂｉＣＮＵ、ブレオマイシン、静脈用ブスルファン、経口ブスルファン、カペシタビン（Ｘｅｌｏｄａ）、カルボプラチン、カルマスティン、ＣＣＮＵ、セレコキシブ、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリビン、サイクロスポリンＡ、シタラビン、サイトシンアラビノサイド、ダウノルビシン、シトキサン、ダウノルビシン、デキサメタゾン、デクスラゾキサン、ドデタキセル、ドキソルビシン、ドキソルビシン、ＤＴＩＣ、エピルビシン、エストラムスチン、エトポシドホスフェート、エトポシド及びＶＰ－１６、エキセメスタン、ＦＫ５０６、フルダラビン、フルオロウラシル、５－ＦＵ、ゲムシタビン（ジェムザール）、ジェムツツマブ－オゾガミシン、酢酸ゴセレリン、ハイドレア、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、メシル酸イマチニブ、インターフェロン、イリノテカン（カンプトスター（Ｃａｍｐｔｏｓｔａｒ）、ＣＰＴ－１１１）、レトロゾール、ロイコボリン、ロイスタチン、ロイプロリド、レバミソール、リトレチノイン、メガストロール（ｍｅｇａｓｔｒｏｌ）、メルファラン、Ｌ－ＰＡＭ、メスナ、メトトレキサート、メトキサレン、ミトラマイシン、ミトマイシン、ミトキサントロン、ナイトロジェンマスタード、パクリタキセル、パミドロネート、ペガデマーゼ、ペントスタチン、ポルフィマーナトリウム、プレドニゾン、リツキサン、ストレプトゾシン、ＳＴＩ－５７１、タモキシフェン、タキソテール、テモゾロルアミド（ｔｅｍｏｚｏｌａｍｉｄｅ）、テニポシド、ＶＭ－２６、トポテカン（ハイカムチン）、トレミフェン、トレチノイン、ＡＴＲＡ、バルルビシン、ベルバン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ＶＰ１６、及びビノレルビン。本発明により使用することができる腫瘍学的薬物の他の例は、エリプチシン及びエリプチシン類似体又は誘導体、エポチロン、細胞内キナーゼ阻害剤、並びにカンプトテシン。

【０１３４】

核酸－脂質粒子

ある実施形態では、本発明の脂質粒子は、核酸と結合しており、核酸－脂質粒子がもたらされる。特定の実施形態では、核酸は、脂質粒子に完全に封入されている。本明細書で使用されるとき、「核酸」という用語は、任意のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含むことが意図されている。５０個までのヌクレオチドを含有する断片は、一般的にオリゴヌクレオチドと呼ばれ、より長い断片はポリヌクレオチドと呼ばれる。特定の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、１５～５０個のヌクレオチドの長さである。

【０１３５】

本発明の状況では、「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、天然塩基、糖、及び糖間（骨格）結合で構成されるヌクレオチド又はヌクレオシドモノマーのポリマー又はオリゴマーを指す。「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、同様に機能する非天然モノマー又はその部分を含むポリマー又はオリゴマーも指す。そのような修飾又は置換オリゴヌクレオチドは、例えば、細胞取り込みの増強及びヌクレアーゼの存在下での安定性の増加などの特性があるため、天然形態より好ましいことが多い。

【０１３６】

本発明による脂質－核酸粒子に存在する核酸は、既知のあらゆる形態の核酸を含む。本明細書で使用される核酸は、一本鎖ＤＮＡ若しくはＲＮＡ、又は二本鎖ＤＮＡ若しくはＲＮＡ、又はＤＮＡ‐ＲＮＡハイブリッドであってもよい。二本鎖ＤＮＡの例には、構造遺伝子、制御領域及び終止領域を含む遺伝子、及びウイルスＤＮＡ又はプラスミドＤＮＡなどの自己複製系が含まれる。二本鎖ＲＮＡの例には、ｓｉＲＮＡ及び他のＲＮＡ干渉試薬

が含まれる。一本鎖核酸には、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、マイクロＲＮＡ、三重鎖形成オリゴヌクレオチドが含まれる。本発明の脂質－核酸粒子に存在する核酸は、下記に記載されているオリゴヌクレオチド修飾の１つ以上を含んでいてもよい。

【０１３７】

本発明の核酸は、種々の長さであってもよく、一般的に核酸の特定形態に依存する場合がある。例えば、特定の実施形態では、プラスミド又は遺伝子は、約１，０００～１００，０００個のヌクレオチド残基の長さであってもよい。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約１０～１００個のヌクレオチドの範囲の長さであってもよい。種々の関連実施形態では、一本鎖、二本鎖、三本鎖のオリゴヌクレオチドは、約１０～約５０個のヌクレオチド、約２０～約５０個のヌクレオチド、約１５～約３０個のヌクレオチド、約２０～約３０個のヌクレオチドの範囲の長さであってもよい。

【０１３８】

特定の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド（又はその鎖）は、標的ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするか、又は相補的である。「特異的にハイブリダイズ可能な」及び「相補的な」とは、ＤＮＡ又はＲＮＡ標的とオリゴヌクレオチドとの間に安定的で特異的な結合が生じるような、十分な度合いの相補性を示すために使用される用語である。オリゴヌクレオチドは、特異的にハイブリダイズ可能なその標的核酸配列に１００％相補的である必要はないことが理解される。標的に対するオリゴヌクレオチドの結合が、標的分子の正常機能を妨害して、有用性又は標的分子からの発現の喪失を引き起こし、特異的結合が望ましい条件化で、つまりインビボアッセイ又は治療的処置の場合は生理学的条件下で、又はインビトロアッセイの場合はアッセイが実施される状態下で、非標的配列に対するオリゴヌクレオチドの非特異的結合を回避するのに十分な程度の相補性が存在する場合、オリゴヌクレオチドは、特異的にハイブリダイズ可能である。したがって、他の実施形態では、このオリゴヌクレオチドは、それが標的とするか又はそれが特異的にハイブリダイズする遺伝子又はｍＲＮＡ配列の領域と比較して、１、２、又は３塩基置換、例えばミスマッチを含む。

【０１３９】

ＲＮＡ干渉核酸

特定の実施形態では、本発明の核酸－脂質粒子は、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）分子と結合している。ＲＮＡｉ分子を使用するＲＮＡ干渉法は、目的の遺伝子又はポリヌクレオチドの発現を妨害するために使用することができる。低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）は、本質的に、開発中の次世代標的化オリゴヌクレオチド薬として、アンチセンスＯＤＮ及びリボザイムに取って代わった。

【０１４０】

ＳｉＲＮＡｓは、ＲＮＡｉ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）として知られている細胞質多タンパク質複合体と結合することができる通常１６～３０個のヌクレオチド長のＲＮＡ二本鎖である。ｓｉＲＮＡが負荷されたＲＩＳＣは、相同性ｍＲＮＡ転写物の分解を媒介し、したがってｓｉＲＮＡは、タンパク質発現を高度な特異性でノックダウンするように設計することができる。他のアンチセンスの技術とは異なり、ｓｉＲＮＡは、非コードＲＮＡによって遺伝子発現を制御するように進化した天然機序を介して機能する。これは、それらの活性が、インビトロ及びインビボで、アンチセンスＯＤＮ又はリボザイムのいずれよりも強力である理由であると一般的に考えられている。臨床的に関連する標的を標的とするｓｉＲＮＡｓを含む様々なＲＮＡｉ試薬が、例えば、ｄｅ Ｆｏｕｇｅｒｏｌｌｅｓ，Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ ６：４４３－４５３（２００７）に記載されているように、現在医薬開発中である。

【０１４１】

最初に記載されたＲＮＡｉ分子は、ＲＮＡセンス鎖及びＲＮＡアンチセンス鎖の両方を含むＲＮＡ：ＲＮＡハイブリッドであったが、ＤＮＡセンス：ＲＮＡアンチセンスのハイブリッド、ＲＮＡセンス：ＤＮＡアンチセンスのハイブリッド、及びＤＮＡ：ＤＮＡハイ

ブリッドは、ＲＮＡｉを媒介可能であることが、今では実証されている（Ｌａｍｂｅｒｔｏｎ，　Ｊ．Ｓ．　ａｎｄ　Ｃｈｒｉｓｔｉａｎ，　Ａ．Ｔ．，　（２００３）　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２４：１１１－１１９）。したがって、本発明は、これらの異なるタイプの二本鎖分子のいずれかを含むＲＮＡｉ分子の使用を含む。加えて、ＲＮＡｉ分子は、様々な形態で使用及び細胞に導入することができることが理解される。したがって、本明細書で使用されるとき、ＲＮＡｉ分子は、これらに限定されないが以下のものを含む、細胞でのＲＮＡｉ応答を誘導可能なありとあらゆる分子を包含する：２つの別々の鎖、つまりセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む二本鎖オリゴヌクレオチド、例えば低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）；非ヌクレオチジルリンカーにより共に結合された２つの別々の鎖を含む二本鎖オリゴヌクレオチド；二本鎖領域を形成する相補的配列のヘアピンループを含むオリゴヌクレオチド、例えばｓｈＲＮＡｉ分子；及び単独で又は別のポリヌクレオチドと組み合わせて二本鎖ポリヌクレオチドを形成可能な１つ以上のポリヌクレオチドを発現する発現ベクター。

【０１４２】

本明細書で使用されるとき、「一本鎖ｓｉＲＮＡ化合物」は、単一分子で構成されるｓｉＲＮＡ化合物である。一本鎖ｓｉＲＮＡ化合物は、鎖内対合により形成された二本鎖領域を含み、例えば、ヘアピン又はパンハンドル構造であってもよく、又は含んでいてもよい。一本鎖ｓｉＲＮＡ化合物は、標的分子に関してアンチセンスであってもよい。

【０１４３】

一本鎖ｓｉＲＮＡ化合物は、ＲＩＳＣに進入し、ＲＩＳＣ媒介性の標的ｍＲＮＡ切断に関与し得るのに十分な長さであり得る。一本鎖ｓｉＲＮＡ化合物は、少なくとも１４個のヌクレオチドの長さであり、他の実施形態では、少なくとも１５、２０、２５、２９、３５、又は５０個のヌクレオチドの長さである。ある実施形態では、一本鎖ｓｉＲＮＡ化合物は、２００、１００、又は６０個未満のヌクレオチドの長さである。

【０１４４】

ヘアピンｓｉＲＮＡ化合物は、１７、１８、１９、２９、２１、２２、２３、２４、若しくは２５個のヌクレオチド対と等しいか、又は少なくとも１７、１８、１９、２９、２１、２２、２３、２４、若しくは２５個のヌクレオチド対である二本鎖領域を有するだろう。二本鎖領域は、２００、１００、又は５０以下の長さであってもよいだろう。ある実施形態では、二本鎖領域の範囲は、１５～３０、１７～２３、１９～２３、及び１９～２１個のヌクレオチド対の長さである。ヘアピンは、一本鎖突出又は末端未対合領域を有してもよい。ある実施形態では、突出は、２～３個のヌクレオチドの長さである。幾つかの実施形態では、突出は、ヘアピンのセンス側にあり、幾つかの実施形態では、ヘアピンのアンチセンス側にある。

【０１４５】

「二本鎖ｓｉＲＮＡ化合物」は、本明細書で使用されるとき、鎖間ハイブリダイゼーションが二本鎖構造の領域を形成することができる、複数の、幾つかの場合は２本の鎖を含むｓｉＲＮＡ化合物である。

【０１４６】

二本鎖ｓｉＲＮＡ化合物のアンチセンス鎖は、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２５、２９、４０、若しくは６０個のヌクレオチドの長さと等しいか、又は少なくとも１４、１５、１６、１７、１８、１９、２５、２９、４０、若しくは６０個のヌクレオチドであってもよい。二本鎖ｓｉＲＮＡ化合物のアンチセンス鎖は、２００、１００、又は５０個以下のヌクレオチドの長さであってもよい。範囲は、１７～２５、１９～２３、及び１９～２１個のヌクレオチドの長さであってもよい。本明細書で使用されるとき、「アンチセンス鎖」という用語は、標的分子、例えば標的ＲＮＡに十分相補的なｓｉＲＮＡ化合物の鎖を意味する。

【０１４７】

二本鎖ｓｉＲＮＡ化合物のセンス鎖は、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２５、２９、４０、若しくは６０個のヌクレオチドの長さと等しいか、又は少なくとも１４、１

５、１６、１７、１８、１９、２５、２９、４０、若しくは６０個のヌクレオチドであってもよい。二本鎖ｓｉＲＮＡ化合物のセンス鎖は、２００、１００、又は５０個以下のヌクレオチドの長さであってもよい。範囲は、１７～２５、１９～２３、及び１９～２１個のヌクレオチドの長さであってもよい。

【０１４８】

二本鎖ｓｉＲＮＡ化合物の二本鎖部分は、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２９、４０、若しくは６０個のヌクレオチドの長さと等しいか、又は少なくとも１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２９、４０、若しくは６０個のヌクレオチドであってもよい。二本鎖ｓｉＲＮＡ化合物の二本鎖部分は、２００、１００、又は５０個以下のヌクレオチドの長さであってもよい。範囲は、１５～３０、１７～２３、１９～２３、及び１９～２１個のヌクレオチドの長さであってもよい。

【０１４９】

多くの実施形態では、ｓｉＲＮＡ化合物は、十分に大きいため、内因性分子、例えばダイサーにより切断されて、より小さなｓｉＲＮＡ化合物、例えばｓｉＲＮＡｓ作用剤を産生することができる。

【０１５０】

センス鎖及びアンチセンス鎖は、二本鎖ｓｉＲＮＡ化合物が、分子の１つの末端又は両端で一本鎖又は未対合領域を含むように選択してもよい。したがって、二本鎖ｓｉＲＮＡ化合物は、対になって突出、例えば、１～３個のヌクレオチドの１つ若しくは２つの５’突出若しくは３’突出、又は３’突出を含有するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む。突出は、１本の鎖が他方より長いための結果であってもよく、又は同じ長さの２本の鎖がずれて配置された結果であってもよい。幾つかの実施形態は、少なくとも１つの３’突出を有するだろう。１つの実施形態では、ｓｉＲＮＡ分子の両端は３’突出を有するだろう。幾つかの実施形態では、突出は２個のヌクレオチドである。

【０１５１】

ある実施形態では、二本鎖領域は、１５～３０、又は１８、１９、２０、２１、２２、及び２３個のヌクレオチドの長さ、例えば上記で考察されたｓｓｉＲＮＡ化合物の範囲にある。ｓｓｉＲＮＡ化合物は、天然ダイサーにより長鎖ｄｓｉＲＮＡｓからプロセスされた産物と長さ及び構造が類似している場合がある。ｓｓｉＲＮＡ化合物の２本の鎖が結合している、例えば共有結合で結合している実施形態も含まれる。必要な二本鎖領域及び３’突出を提供するヘアピン又は他の一本鎖構造も、本発明内にある。

【０１５２】

二本鎖ｓｉＲＮＡ化合物及び一本鎖ｓｉＲＮＡ化合物を含む、本明細書に記載されているｓｉＲＮＡ化合物は、標的ＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ、例えばタンパク質をコードする遺伝子の転写物のサイレンシングを媒介することができる。便宜上、そのようなｍＲＮＡも、本明細書ではサイレンシングされるｍＲＮＡと呼ばれる。そのような遺伝子も、標的遺伝子と呼ばれる。一般的に、サイレンシングされるＲＮＡは、内因性遺伝子又は病原体遺伝子である。加えて、ｍＲＮＡ以外のＲＮＡ、例えばｔＲＮＡ及びウイルスＲＮＡも標的とすることができる。

【０１５３】

本明細書で使用されるとき、「ＲＮＡｉを媒介する」という語句は、配列特異的な様式で標的ＲＮＡをサイレンシングする能力を指す。理論により束縛されることは望まないが、サイレンシングでは、ＲＮＡｉ機構又はプロセス、及びガイドＲＮＡ、例えば２１～２３個のヌクレオチドのｓｓｉＲＮＡ化合物が使用されると考えられている。

【０１５４】

１つの実施形態では、ｓｉＲＮＡ化合物は、標的ＲＮＡ、例えば標的ｍＲＮＡに対して「十分に相補的」であり、そのためｓｉＲＮＡ化合物は、標的ｍＲＮＡによりコードされたタンパク質の産生をサイレンシングする。別の実施形態では、ｓｉＲＮＡ化合物は、標的ＲＮＡ、例えば標的ＲＮＡに対して「正確に相補的」であり、ｓｉＲＮＡ化合物はアニ

ーリングして、例えば、正確な相補性領域において排他的にワトソンクリック塩基対で作られているハイブリッドを形成する。「十分に相補的」な標的ＲＮＡは、標的ＲＮＡに対して正確に相補的な内部領域（例えば、少なくとも１０個のヌクレオチド）を含むことができる。さらに、ある実施形態では、ｓｉＲＮＡ化合物は、単一ヌクレオチドの相違を特異的に識別する。この場合、ｓｉＲＮＡ化合物は、正確な相補性が、その領域（例えば、単一ヌクレオチド相違が７個のヌクレオチド以内）に見出される場合にのみＲＮＡｉを媒介する。

【０１５５】

マイクロＲＮＡ

マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）は、動物及び植物のゲノムにあるＤＮＡから転写されるが、タンパク質に翻訳されない高度に保存されたクラスの小型ＲＮＡ分子である。プロセスされたｍｉＲＮＡｓは、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）に組み込まれており、発生、細胞増殖、アポトーシス、及び分化の重要な調節因子であると特定された、一本鎖の約１７～２５個のヌクレオチド（ｎｔ）のＲＮＡ分子である。それらは、特定のｍＲＮＡの３’－非翻訳領域に結合することにより、遺伝子発現の制御に役割を果たすと考えられている。ＲＩＳＣは、翻訳阻害、転写物切断、又はその両方により、遺伝子発現の下方制御を媒介する。ＲＩＳＣは、広範囲の真核生物の核における転写サイレンシングにも関与している。

【０１５６】

現在までに多数のｍｉＲＮＡ配列が特定され、その数は増加しており、それらの例示的な例は、例えば、“ｍｉＲＢａｓｅ：ｍｉｃｒｏＲＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ，ｔａｒｇｅｔｓ ａｎｄ ｇｅｎｅ ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ” Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ－Ｊｏｎｅｓ Ｓ，Ｇｒｏｃｏｃｋ ＲＪ，ｖａｎ Ｄｏｎｇｅｎ Ｓ，Ｂａｔｅｍａｎ Ａ，Ｅｎｒｉｇｈｔ ＡＪ．ＮＡＲ，２００６，３４，Ｄａｔａｂａｓｅ Ｉｓｓｕｅ，Ｄ１４０－Ｄ１４４；“Ｔｈｅ ｍｉｃｒｏＲＮＡ Ｒｅｇｉｓｔｒｙ” Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ－Ｊｏｎｅｓ Ｓ．ＮＡＲ，２００４，３２，Ｄａｔａｂａｓｅ Ｉｓｓｕｅ，Ｄ１０９－Ｄ１１１に見出すことができ、ｈｔｔｐ：／／ｍｉｃｒｏｒｎａ．ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ／ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ／にも見出すことができる。

【０１５７】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

１つの実施形態では、核酸は、標的ポリヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。「アンチセンスオリゴヌクレオチド」又は単に「アンチセンス」という用語は、標的ポリヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドを含むことを意味する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、選択された配列、例えば標的遺伝子ｍＲＮＡに相補的なＤＮＡ又はＲＮＡの一本鎖である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、相補的ｍＲＮＡと結合することにより遺伝子発現を阻害すると考えられる。標的ｍＲＮＡとの結合は、それに結合することにより相補的ｍＲＮＡの翻訳を防止するか、又は標的ｍＲＮＡの分解に結びつくかのいずれかにより、遺伝子発現の阻害に結びつく場合がある。アンチセンスＤＮＡは、特定の相補的な（コード又は非コード）ＲＮＡを標的とするために使用することができる。結合が生じる場合、このＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドは、酵素ＲＮａｓｅＨで分解することができる。特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約１０～約５０個のヌクレオチド、より好ましくは約１５～約３０個のヌクレオチドを含む。この用語は、所望の標的遺伝子に正確には相補的でない場合があるアンチセンスオリゴヌクレオチドも包含する。したがって、本発明は、アンチセンスとの非標的特異的活性が見出される場合、又は標的配列との１つ以上のミスマッチを含有するアンチセンス配列が、特定の使用において最も好ましい場合、利用することができる。

【０１５８】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、タンパク質合成の有効な標的阻害剤であることが実証されており、結果的に、標的遺伝子によるタンパク質合成を特異的に阻害するために

使用することができる。タンパク質合成を阻害するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドの効力は、十分に確立されている。例えば、ポリガラクタウロナーゼ（ｐｏｌｙｇａｌａｃｔａｕｒｏｎａｓｅ）の合成、及び２型ムスカリンアセチルコリン受容体は、それらのそれぞれのｍＲＮＡ配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドにより阻害される（米国特許第５，７３９，１１９号及び米国特許第５，７５９，８２９号）。さらに、アンチセンス阻害の例は、核タンパク質サイクリン、多剤耐性遺伝子（ＭＤＧ１）、ＩＣＡＭ－１、Ｅ－セレクチン、ＳＴＫ－１、線条体$GABA_A$受容体、及びヒトＥＧＦで実証されている（Ｊａｓｋｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．１９８８ Ｊｕｎ １０；２４０（４８５８）：１５４４－６；Ｖａｓａｎｔｈａｋｕｍａｒ ａｎｄ Ａｈｍｅｄ，Ｃａｎｃｅｒ Ｃｏｍｍｕｎ．１９８９；１（４）：２２５－３２；Ｐｅｒｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ Ｍｏｌ Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．１９９８ Ｊｕｎ １５；５７（２）：３１０－２０；米国特許第５，８０１，１５４号；米国特許第５，７８９，５７３号；米国特許第５，７１８，７０９号、及び米国特許第５，６１０，２８８号）。さらに、アンチセンス構築体は、様々な異常細胞増殖（例えば、癌）を阻害及び治療するために使用できることも記載されている（米国特許第５，７４７，４７０号、米国特許第５，５９１，３１７号、及び米国特許第５，７８３，６８３号）。

【０１５９】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを生成する方法は、当該技術分野で公知であり、任意のポリヌクレオチド配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを生成するために容易に適用することができる。所与の標的配列に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの選択は、選択された標的配列、及び二次構造の決定、T_m、結合エネルギー、及び相対的安定性の分析に基づく。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、宿主細胞中で標的ｍＲＮＡに対する特異的結合を低減又は阻害することになる二量体、ヘアピン、又は他の二次構造を形成しないそれらの相対的能力に基づいて選択することができる。ｍＲＮＡの高度に好ましい標的部位は、ＡＵＧ翻訳開始コドンの領域又はその付近の領域、及びｍＲＮＡの５’領域に対して実質的に相補的な配列を含む。これらの二次構造の分析及び標的部位選択に関する考慮は、例えば、ＯＬＩＧＯプライマー分析ソフトウェア（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｉｎｓｉｇｈｔｓ社製）のｖ．４、及び／又はＢＬＡＳＴＮ ２．０．５アルゴリズムソフトウェア（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９９７，２５（１７）：３３８９－４０２）を使用して実施することができる。

【０１６０】

アンタゴｍｉｒ

アンタゴｍｉｒは、ＲＮＡｓｅ保護、並びに組織及び細胞取り込みの増強などの薬理学的特性に関する種々の修飾を内包するＲＮＡ様オリゴヌクレオチドである。アンタゴｍｉｒは、例えば、糖の完全な２’－Ｏ－メチル化、ホスホロチオアート骨格、及び例えば３’末端のコレステロール部分により、通常のＲＮＡと区別される。アンタゴｍｉｒは、アンタゴｍｉｒ及び内因性ｍｉＲＮＡを含む二本鎖を形成することにより内因性ｍｉＲＮＡｓを効率的にサイレンシングするために使用するができ、それによりｍｉＲＮＡ誘導性遺伝子サイレンシングを防止する。アンタゴｍｉｒ媒介性ｍｉＲＮＡサイレンシングの一例は、参照によりその全体が明示的に本明細書に組み込まれるＫｒｕｔｚｆｅｌｄｔ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ，２００５，４３８：６８５－６８９に記載されているｍｉＲ－１２２のサイレンシングである。アンタゴｍｉｒ ＲＮＡは、標準的固相オリゴヌクレオチド合成プロトコールを使用して合成することができる。米国特許出願第１１／５０２，１５８号、及び米国特許出願第１１／６５７，３４１号を参照されたい（これらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる）。

【０１６１】

アンタゴｍｉｒは、オリゴヌクレオチド合成用のリガンド結合モノマーサブユニット及びモノマーを含んでいてもよい。例示的なモノマーは、２００４年８月１０日に出願された米国特許出願１０／９１６，１８５号に記載されている。アンタゴｍｉｒは、２００４

年３月８日に出願されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２００４／０７０７０号に記載されているものなどの、ＺＸＹ構造を有していてもよい。アンタゴｍｉｒは、両親媒性部分と複雑体化されていてもよい。オリゴヌクレオチド作用剤と共に使用するための例示的な両親媒性部分は、２００４年３月８日に出願されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２００４／０７０７０号に記載されている。

【０１６２】

アプタマー

アプタマーは、高親和性及び高特異性で目的の特定分子と結合する核酸又はペプチド分子である（Ｔｕｅｒｋ ａｎｄ Ｇｏｌｄ, Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：５０５ （１９９０）；Ｅｌｌｉｎｇｔｏｎ ａｎｄ Ｓｚｏｓｔａｋ, Ｎａｔｕｒｅ ３４６：８１８ （１９９０））。大型タンパク質から小さな有機分子までの多数の異なる物質に結合するＤＮＡ又はＲＮＡアプタマーの生成が成功している。Ｅａｔｏｎ, Ｃｕｒｒ. Ｏｐｉｎ. Ｃｈｅｍ. Ｂｉｏｌ. １：１０－１６ （１９９７）、Ｆａｍｕｌｏｋ, Ｃｕｒｒ. Ｏｐｉｎ. Ｓｔｒｕｃｔ. Ｂｉｏｌ. ９：３２４－９（１９９９）、及びＨｅｒｍａｎｎ ａｎｄ Ｐａｔｅｌ, Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８７：８２０－５（２０００）を参照されたい。アプタマーは、ＲＮＡ又はＤＮＡに基づいていてもよく、リボスイッチを含んでいてもよい。リボスイッチは、小型標的分子に直接結合することができ、標的との結合が遺伝子活性に影響を及ぼすｍＲＮＡ分子の一部である。したがって、リボスイッチを含有するｍＲＮＡは、その標的分子が存在するか又は存在しないかに応じて、それ自体の活性の制御に直接的に関与する。一般的に、アプタマーは、低分子、タンパク質、核酸などの種々の分子標的に、並びに細胞、組織、及び生物にさえ結合するように、インビトロ選択法の数巡の繰り返し、又は同様にＳＥＬＥＸ（指数関数的な濃縮による系統的なリガンド進化）により操作される。アプタマーは、合成、組換え、及び精製法を含む任意の公知な方法により調製することができ、単独で又は同じ標的に特異的な他のアプタマーと組み合わせて使用することができる。さらに、本明細書により詳しく記載されているように、「アプタマー」という用語は、具体的には、所与の標識に対する複数の公知なアプタマーを比較することに由来するコンセンサス配列を含有する「第２のアプタマー」を含む。

【０１６３】

リボザイム

本発明の別の実施形態によると、核酸－脂質粒子は、リボザイムに結合している。リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を有する特異的触媒ドメインを有するＲＮＡ分子複合体である（Ｋｉｍ ａｎｄ Ｃｅｃｈ, Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ. １９８７ Ｄｅｃ；８４（２４）：８７８８－９２；Ｆｏｒｓｔｅｒ ａｎｄ Ｓｙｍｏｎｓ, Ｃｅｌｌ. １９８７ Ａｐｒ ２４；４９（２）：２１１－２０）。例えば、多くのリボザイムは、高度な特異性でリン酸エステル転移反応を加速し、オリゴヌクレオチド基質にある幾つかのリン酸エステルのうちの１つのみを切断することが多い（Ｃｅｃｈ ｅｔ ａｌ., Ｃｅｌｌ. １９８１ Ｄｅｃ；２７（３ Ｐｔ ２）：４８７－９６；Ｍｉｃｈｅｌ ａｎｄ Ｗｅｓｔｈｏｆ, Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ. １９９０ Ｄｅｃ ５；２１６（３）：５８５－６１０；Ｒｅｉｎｈｏｌｄ－Ｈｕｒｅｋ ａｎｄ Ｓｈｕｂ, Ｎａｔｕｒｅ. １９９２ Ｍａｙ １４；３５７（６３７４）：１７３－６）。この特異性は、化学反応の前に、基質が、特異的な塩基対合相互作用によりリボザイムの内部ガイド配列（「ＩＧＳ」）に結合する必要があることに起因している。

【０１６４】

天然酵素性ＲＮＡの少なくとも６塩基多様性が、現在のところ知られている。各々は、生理学的条件下で、ｔｒａｎｓ位にあるＲＮＡリン酸ジエステル結合の加水分解を触媒することができる（したがって、他のＲＮＡ分子を切断することができる）。一般的に、酵素性核酸は、まず標的ＲＮＡと結合することにより作用する。そのような結合は、標的ＲＮＡを切断するように作用する分子の酵素性部分に近接近して保持される酵素性核酸の標

的結合部分を介して生じる。したがって、酵素性核酸は、相補的塩基対合によりまず標的ＲＮＡを認識しその後標的ＲＮＡと結合し、正しい部位に結合すると酵素的に作用して標的ＲＮＡを切断する。このような標的ＲＮＡの戦略的切断により、コードされたタンパク質の合成を指図する標的ＲＮＡの能力が破壊されることになる。酵素性核酸は、そのＲＮＡ標的と結合しＲＮＡ標的を切断した後、そのＲＮＡから放出されて別の標的を探索し、新しい標的への結合及び切断を繰り返すことができる。

【０１６５】

酵素性核酸分子は、例えば、ハンマーヘッド、ヘアピン、肝炎δウイルス、グループＩイントロン、又はＲＮａｓｅＰ ＲＮＡ（ＲＮＡガイド配列と結合する）、又はニューロスポラ ＶＳ ＲＮＡモチーフに形成されていてもよい。ハンマーヘッドモチーフの特定の例は、Ｒｏｓｓｉ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９９２ Ｓｅｐ １１；２０（１７）：４５５９－６５により記載されている。ヘアピンモチーフの例は、Ｈａｍｐｅｌら（欧州特許出願公開第０３６０２５７号）、Ｈａｍｐｅｌ ａｎｄ Ｔｒｉｔｚ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １９８９ Ｊｕｎ １３；２８（１２）：４９２９－３３；Ｈａｍｐｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９９０ Ｊａｎ ２５；１８（２）：２９９－３０４；及び米国特許第５，６３１，３５９号）により記載されている。肝炎δウイルスモチーフの例は、Ｐｅｒｒｏｔｔａ ａｎｄ Ｂｅｅｎ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ．１９９２ Ｄｅｃ １；３１（４７）：１１８４３－５２に記載されており；ＲＮａｓｅＰモチーフの例は、Ｇｕｅｒｒｉｅｒ－Ｔａｋａｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ．１９８３ Ｄｅｃ；３５（３ Ｐｔ ２）：８４９－５７に記載されており；ニューロスポラ ＶＳ ＲＮＡリボザイムモチーフは、Ｃｏｌｌｉｎｓ（Ｓａｖｉｌｌｅ ａｎｄ Ｃｏｌｌｉｎｓ，Ｃｅｌｌ．１９９０ Ｍａｙ １８；６１（４）：６８５－９６；Ｓａｖｉｌｌｅ ａｎｄ Ｃｏｌｌｉｎｓ，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．１９９１ Ｏｃｔ １；８８（１９）：８８２６－３０；Ｃｏｌｌｉｎｓ ａｎｄ Ｏｌｉｖｅ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ．１９９３ Ｍａｒ ２３；３２（１１）：２７９５－９）に記載されており；及びグループＩイントロンの例は、米国特許第４，９８７，０７１号に記載されている。本発明により使用される酵素性核酸分子の重要な特徴は、酵素性核酸分子が、標的遺伝子ＤＮＡ又はＲＮＡ領域の１つ以上に相補的な特異的基質結合部位を有し、分子にＲＮＡ切断活性を与えるヌクレオチド配列をその基質結合部位内又はその周囲に有するということである。したがって、リボザイム構築体は、本明細書で言及されている特定のモチーフに限定する必要はない。

【０１６６】

任意のポリヌクレオチド配列に標的化されたリボザイムを生成する方法は、当該技術分野で公知である。リボザイムは、各々が参照により本明細書に具体的に組み込まれる国際公開第９３／２３５６９号及び国際公開第９４／０２５９５号に記載されているように設計することができ、インビトロ及びインビボで試験するためにそこに記載されているように合成することができる。

【０１６７】

リボザイム活性は、リボザイム結合アームの長さを変更することにより又は血清リボヌクレアーゼによるそれらの分解を防止する修飾を有するリボザイムを化学的に合成することにより（国際公開第９２／０７０６５号；国際公開第９３／１５１８７号；国際公開第９１／０３１６２号；欧州特許出願公開第９２１１０２９８．４号；米国特許第５，３３４，７１１号；及び国際公開第９４／１３６８８号、これらには、酵素性ＲＮＡ分子の糖部分に行うことができる種々の化学的修飾が記載されている）、細胞でのそれらの効力を増強する修飾により、及びステムＩＩ塩基を取り除いてＲＮＡ合成時間を短縮し化学的必要性を低減することにより、最適化することができる。

【０１６８】

免疫賦活化オリゴヌクレオチド

本発明の脂質粒子に結合された核酸は、免疫賦活性であってもよく、それらには、対象

体に投与された際に免疫応答を誘導可能な免疫賦活化オリゴヌクレオチド（ＩＳＳ；一本鎖又は二本鎖）が含まれ、対象体は哺乳動物であってもよく又は他の患者であってもよい。ＩＳＳには、例えば、ヘアピン二次構造に結びつくパリンドローム（Ｙａｍａｍｏｔｏ Ｓ．，ｅｔ ａｌ．（１９９２） Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：４０７２－４０７６を参照）、又はＣｐＧモチーフ、並びに他の公知のＩＳＳ特徴（多重Ｇドメインなど、国際公開第９６／１１２６６号を参照）が含まれる。

【０１６９】

免疫応答は、先天性免疫応答であってもよく又は適応免疫応答であってもよい。免疫系は、より先天性の免疫系及び脊椎動物の後天性の適応免疫系に分類され、それらの後者は、さらに体液性細胞性要素に分類される。特定の実施形態では、免疫応答は粘膜性であってもよい。

【０１７０】

特定の実施形態では、免疫賦活化核酸は、脂質粒子と組み合わせて投与された場合にのみ免疫賦活性であり、その遊離形態で投与された場合は免疫賦活性ではない。本発明によると、そのようなオリゴヌクレオチドは、免疫賦活性であるとみなされる。

【０１７１】

免疫賦活化核酸は、免疫応答を誘発するために標的ポリヌクレオチドと特異的に結合して標的ポリヌクレオチドの発現を低減することが必要とされない場合、非配列特異的であるとみなされる。したがって、ある免疫賦活化核酸は、天然遺伝子又はｍＲＮＡの領域に対応する配列を含む場合があるが、それらは、依然として非配列特異的免疫賦活化核酸であるとみなされる。

【０１７２】

１つの実施形態では、免疫賦活化核酸又はオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチド又はＣｐＧジヌクレオチドは、メチル化されていなくてもよく、又はメチル化されていてもよい。別の実施形態では、免疫賦活化核酸は、メチル化シトシンを有する少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドを含む。１つの実施形態では、核酸は、単一のＣｐＧジヌクレオチドを含み、前記ＣｐＧジヌクレオチドのシトシンはメチル化されている。特定の実施形態では、核酸は、配列５’ＴＡＡＣＧＴＴＧＡＧＧＧＧＣＡＴ３’を含む。代替的な実施形態では、核酸は、少なくとも２つのＣｐＧジヌクレオチドを含み、前記ＣｐＧジヌクレオチドの少なくとも１つのシトシンは、メチル化されている。さらなる実施形態では、配列中にあるＣｐＧジヌクレオチドの各シトシンはメチル化されている。別の実施形態では、核酸は、複数のＣｐＧジヌクレオチドを含み、前記ＣｐＧジヌクレオチドの少なくとも１つは、メチル化されたシトシンを含む。

【０１７３】

１つの特定の実施形態では、核酸は、配列５’ＴＴＣＣＡＴＧＡＣＧＴＴＣＣＴＧＡＣＧＴ３’を含む。別の特定の実施形態では、核酸配列は、配列５’ＴＣＣＡＴＧＡ<u>Ｃ</u>ＧＴＴＣＣＴＧＡ<u>Ｃ</u>ＧＴ３’を含み、下線で示されている２つのシトシンはメチル化されている。特定の実施形態では、ＯＤＮは、下記に示されているＯＤＮ＃１、ＯＤＮ＃２、ＯＤＮ＃３、ＯＤＮ＃４、ＯＤＮ＃５、ＯＤＮ＃６、ＯＤＮ＃７、ＯＤＮ＃８、及びＯＤＮ＃９からなる群から選択される。

【表２Ａ】

表３．例示的な免疫賦活化オリゴヌクレオチド（ＯＤＮ）

ＯＤＮの名称	配列番号	ＯＤＮの配列（５’－３’）
ODN 1 ヒトｃ－ｍｙｃ		5’-TAACGTTGAGGGGCAT-3
* ODN 1m		5’-TAAZGTTGAGGGGCAT-3
ODN 2		5’-TCCATGACGTTCCTGACGTT-3
* ODN 2m		5’-TCCATGAZGTTCCTGAZGTT-3
ODN 3		5’-TAAGCATACGGGGTGT-3
ODN 5		5’-AACGTT-3
ODN 6		5’-GATGCTGTGTCGGGGTCTCCGGGC-3’
ODN 7		5’-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3’
ODN 7m		5’-TZGTZGTTTTGTZGTTTTGTZGTT-3’
ODN 8		5’-TCCAGGACTTCTCTCAGGTT-3’
ODN 9		5’-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3’
ODN 10 マウス細胞内接着分子－１		5’-TGCATCCCCCAGGCCACCAT-3
ODN 11 ヒト細胞内接着分子－１		5’-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3’
ODN 12 ヒト細胞内接着分子－１		5’-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3’
ODN 13 ヒトｅｒｂ－Ｂ－２		5’-GGT GCTCACTGC GGC-3’
ODN 14 ヒトｃ－ｍｙｃ		5’-AACC GTT GAG GGG CAT-3’
ODN 15 ヒトｃ－ｍｙｃ		5’-TAT GCT GTG CCG GGG TCT TCG GGC-3’
ODN 16		5’-GTGCCG GGGTCTTCGGGC-3’
ODN 17 ヒトヒトインスリン増殖因子１－受容体		5’-GGACCCTCCTCCGGAGCC-3’
ODN 18 ヒトインスリン増殖因子１－受容体		5’-TCC TCC GGA GCC AGA CTT-3’
ODN 19 ヒト上皮増殖因子－受容体		5’-AAC GTT GAG GGG CAT-3’
ODN 20 上皮増殖因子－受容体		5’-CCGTGGTCA TGCTCC-3’
ODN 21 ヒト血管内皮増殖因子		5’-CAG CCTGGCTCACCG CCTTGG-3’
ODN 22 マウスホスホキナーゼＣ－アルファ		5’-CAG CCA TGG TTC CCC CCA AC-3’
ODN 23		5’-GTT CTC GCT GGT GAG TTT CA-3’

【表２Ｂ】

ＯＤＮの名称	配列番号	ＯＤＮの配列（５’－３’）
ODN 24 ヒトＢｃｌ－２		5’-TCT CCCAGCGTGCGCCAT-3’
ODN 25 ヒトＣ－Ｒａｆ－ｓ		5’-GTG CTC CAT TGA TGC-3’
ODN #26 ヒト血管内皮増殖因子受容体－１		5’-GAGUUCUGAUGAGGCCGAAAGG-CCGAAAGUCUG-3’
ODN #27		5’-RRCGYY-3’
ODN # 28		5’-AACGTTGAGGGGCAT-3’
ODN #29		5’-CAACGTTATGGGGAGA-3’
ODN #30 ヒトｃ－ｍｙｃ		5’-TAACGTTGAGGGGCAT-3’

「Ｚ」はメチル化シトシン残基を表す。ＯＤＮ１４は、１５量体オリゴヌクレオチドであり、ＯＤＮ１は、ＯＤＮ１を１６量体にするチミジンが５’末端に付加されている同じオリゴヌクレオチドである。ＯＤＮ１４とＯＤＮ１との間に生物活性の相異は検出されておらず、両方とも同様の免疫賦活化活性を示す（Ｍｕｉ　ｅｔ　ａｌ.,　２００１）。

【０１７４】

本発明の組成物及び方法で使用するのに好適なオリゴヌクレオチド（ＯＤＮ）のさらなる特定の核酸配列は、Ｒａｎｅｙ　ｅｔ　ａｌ.,　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ,　２９８：１１８５－１１９２　（２００１）に記載されている。ある実施形態では、本発明の組成物及び方法で使用されるＯＤＮは、リン酸ジエステル（「ＰＯ」）骨格又はホスホロチオアート（「ＰＳ」）骨格、及び／又はＣｐＧモチーフ中にある少なくとも１つのメチル化シトシン残基を有する。

【０１７５】

デコイオリゴヌクレオチド

転写因子は、周囲のゲノムＤＮＡが存在しない場合でさえ、比較的短い結合配列を認識するため、特定の転写因子のコンセンサス結合配列を保持する短鎖オリゴヌクレオチドを、生細胞の遺伝子発現を操作するためのツールとして使用することができる。この戦略には、そのような「デコイオリゴヌクレオチド」を細胞内に送達することが伴い、その後デコイオリゴヌクレオチドは、標的因子により認識及び結合される。デコイが転写因子のＤＮＡ結合部位を占有することにより、その後転写因子は標的遺伝子のプロモーター領域に結合できなくなる。デコイは、転写因子により活性化される遺伝子の発現を阻害するため、又は転写因子の結合により抑制される遺伝子を上方制御するためのいずれの治療薬としても使用することができる。デコイオリゴヌクレオチドの使用例は、Ｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ.,　Ｊ.　Ｃｌｉｎ.　Ｉｎｖｅｓｔ.,　２０００,　１０６:　１０７１－１０７５に見出すことができ、これは、参照によりその全体が明示的に本明細書に組み込まれる。

【０１７６】

スーパーｍｉｒ

スーパーｍｉｒは、リボ核酸（ＲＮＡ）又はデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）又はその両方又はその修飾体の一本鎖、二本鎖、又は部分的に二本鎖のオリゴマー又はポリマーを指し、それは、ｍｉＲＮＡと実質的に同一でり、その標的に関してアンチセンスであるヌクレオチド配列を有する。この用語は、天然核酸塩基、糖、及び共有結合のヌクレオシド（骨格）間結合で構成され、同様に機能する少なくとも１つの非天然部分を含有するオリゴヌ

クレオチドを含む。そのような修飾又は置換オリゴヌクレオチドは、例えば、細胞取り込みの増強、核酸標的に対する親和性の増強、及びヌクレアーゼの存在下における安定性の増加などの望ましい特性があるため、天然形態より好ましい。好ましい実施形態では、スーパーｍｉｒは、センスＤＮＡを含んでおらず、別の好ましい実施形態では、スーパーｍｉｒは、それほど自己ハイブリダイズしない。本発明で特徴づけられているスーパーｍｉｒは、二次構造を有していてもよいが、生理学的条件下では実質的に一本鎖である。実質的に一本鎖であるスーパーｍｉｒは、スーパーｍｉｒの約５０％未満（例えば、約４０％、３０％、２０％、１０％、又は５％未満）が、それ自体と二本鎖を形成する程度に一本鎖である。スーパーｍｉｒは、ヘアピンセグメントを含んでいてもよく、例えば、配列は、好ましくは３’末端で自己ハイブリダイズして二本鎖領域を形成することができ、例えば、二本鎖領域は、少なくとも１、２、３、又は４個のヌクレオチド、好ましくは８、７、６、又はｎ個未満のヌクレオチド、例えば５個のヌクレオチドである。二本鎖領域は、リンカー、例えばヌクレオチドリンカー、例えば３、４、５、又は６個のｄＴ、例えば修飾ｄＴにより結合されていてもよい。別の実施形態では、スーパーｍｉｒは、より短いオリゴ、例えば５、６、７、８、９、又は１０個のヌクレオチドの長さと、例えば、３’及び５’末端の一方又は両方で、スーパーｍｉｒの非末端又は中間部で、二本鎖を形成する。

【０１７７】

ｍｉＲＮＡ模倣体

ｍｉＲＮＡ模倣体は、１つ以上のｍｉＲＮＡｓの遺伝子サイレンシング能力を模倣するために使用することができるクラスの分子を表す。したがって、「マイクロＲＮＡ模倣体」という用語は、ＲＮＡｉ経路に入ることが可能であり遺伝子発現を制御することが可能な合成非コードＲＮＡを指す（つまり、ｍｉＲＮＡは、内因性ｍｉＲＮＡの供給源からの精製により得ることはできない）。ｍｉＲＮＡ模倣体は、成熟分子（例えば、一本鎖）又は模倣体前駆体（例えば、ｐｒｉ－又はＰｒｅ－ｍｉＲＮＡ）として設計することができる。ｍｉＲＮＡ模倣体は、限定ではないが、ＲＮＡ、修飾ＲＮＡ、ＤＮＡ、修飾ＤＮＡ、ロックド核酸、又は２’－Ｏ、４’－Ｃエチレン架橋核酸（ＥＮＡ）、又は上記の任意の組合せ（ＤＮＡ‐ＲＮＡハイブリッドを含む）を含むオリゴヌクレオチドを含む核酸（修飾又は修飾核酸）で構成されていてもよい。加えて、ｍｉＲＮＡ模倣体は、送達、細胞内区画化、安定性、特異性、機能性、鎖の使用、及び／又は効力に影響を及ぼし得る結合体を含むことができる。１つの設計では、ｍｉＲＮＡ模倣体は、二本鎖分子（例えば、約１６～約３１個のヌクレオチドの長さの二本鎖領域を有する）であり、所与のｍｉＲＮＡの成熟鎖と同一性を有する１つ以上の配列を含有する。修飾には、分子の一方又は両方の鎖における２’修飾（２’－Ｏメチル修飾及び２’Ｆ修飾を含む）、並びに核酸安定性及び／又は特異性を増強するヌクレオチド間修飾（例えば、ホルホルチオアート（ｐｈｏｒｐｈｏｒｔｈｉｏａｔｅ）修飾）が含まれていてもよい。加えて、ｍｉＲＮＡ模倣体は、突出を含んでいてもよい。突出は、いずれかの鎖の３’又は５’末端の１～６個のヌクレオチドで構成されていてもよく、安定性又は機能性を増強するために修飾されていてもよい。１つの実施形態では、ｍｉＲＮＡ模倣体は、１６～３１個のヌクレオチドの二本鎖領域、及び以下の化学修飾パターンの１つ以上を含む：センスＤＮＡは、１位及び２位（センスオリゴヌクレオチドの５’末端から数えて）ヌクレオチド並びに全てのＣ及びＵの２’－Ｏ－メチル修飾を含有し；アンチセンス鎖修飾には、全てのＣ及びＵの２’Ｆ修飾、オリゴヌクレオチドの５’末端のリン酸化、及び２位ヌクレオチド３’突出に結合された安定化ヌクレオチド間結合が含まれていてもよい。

【０１７８】

抗ｍｉｒ又はｍｉＲＮＡ阻害剤

「抗ｍｉｒ」、「マイクロＲＮＡ阻害剤」、「ｍｉＲ阻害剤」、又は「阻害剤」という用語は、同意語であり、特定のｍｉＲＮＡｓの能力を妨害するオリゴヌクレオチド又は修飾オリゴヌクレオチドを指す。一般的に、阻害剤は、本質的に、ＲＮＡ、修飾ＲＮＡ、ＤＮＡ、修飾ＤＮＡ、ロックド核酸（ＬＮＡ）、又は上記の任意の組合せを含むオリゴヌク

レオチドを含む核酸又は修飾核酸である。修飾には、２’修飾（２’－０アルキル修飾及び２’Ｆ修飾を含む）、及び送達、安定性、特異性、細胞内区画化、又は効力に影響を及ぼし得るヌクレオチド間修飾（例えば、ホスホロチオアート修飾）が含まれる。加えて、ｍｉＲＮＡ阻害剤は、送達、細胞内区画化、安定性、及び／又は効力に影響を及ぼし得る結合体を含むことができる。阻害剤は、一本鎖、二本鎖（ＲＮＡ／ＲＮＡ又はＲＮＡ／ＤＮＡ二本鎖）、及びヘアピン構造を含む様々な配置をとることができ、一般的には、マイクロＲＮＡ阻害剤は、標的とされるｍｉＲＮＡの成熟鎖（又は複数の鎖）と相補的な又は部分的に相補的な１つ以上の配列又は配列の部分を含み、加えて、ｍｉＲＮＡ阻害剤は、成熟ｍｉＲＮＡの逆相補体である配列の５’及び３’に位置しているさらなる配列も含んでいてよい。さらなる配列は、成熟ｍｉＲＮＡがそれに由来するｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ中の成熟ｍｉＲＮＡに隣接している配列の逆相補体であってもよく、又はさらなる配列は、任意の配列（Ａ、Ｇ、Ｃ、又はＵの混合物を有する）であってもよい。幾つかの実施形態では、さらなる配列の１つ又は両方は、ヘアピンを形成可能な任意の配列である。したがって、幾つかの実施形態では、ｍｉＲＮＡの逆相補体である配列は、５’側及び３’側でヘアピン構造により隣接される。マイクロＲＮＡ阻害剤は、二本鎖の場合、反対側の鎖にヌクレオチド間のミスマッチを含んでいてもよい。さらに、マイクロＲＮＡ阻害剤は、細胞内への阻害剤取り込みを促進するために、結合部分に結合されていてもよい。例えば、マイクロＲＮＡ阻害剤は、細胞内へのマイクロＲＮＡ阻害剤の受動取り込みを可能にするコレステリル５－（ビス（４－メトキシフェニル）（フェニル）メトキシ）－３ヒドロキシペンチルカルバメートに結合されていてもよい。ヘアピンｍｉＲＮＡ阻害剤を含むマイクロＲＮＡ阻害剤は、Ｖｅｒｍｅｕｌｅｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｄｏｕｂｌｅ－Ｓｔｒａｎｄｅｄ Ｒｅｇｉｏｎｓ Ａｒｅ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｄｅｓｉｇｎ Ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ Ｏｆ Ｐｏｔｅｎｔ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ ｏｆ ＲＩＳＣ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ，” ＲＮＡ １３：７２３－７３０（２００７）、及び国際公開第２００７／０９５３８７号、及び国際公開第２００８／０３６８２５号に詳細に記載されており、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。当業者であれば、所望のｍｉＲＮＡの配列をデータベースから選択し、本明細書で開示されている方法に有用な阻害剤を設計することができる。

【０１７９】

Ｕ１アダプター

Ｕ１アダプターは、ｐｏｌｙＡ部位を阻害し、標的遺伝子の末端エキソンの部位に相補的な標的ドメイン、及びＵ１ ｓｎＲＮＰのＵ１核内低分子ＲＮＡ成分に結合する「Ｕ１ドメイン」を有する二機能性オリゴヌクレオチドである（Ｇｏｒａｃｚｎｉａｋ，ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２７（３），２５７－２６３、これは参照によりその全体が明示的に本明細書に組み込まれる）。Ｕ１ ｓｎＲＮＰは、ｐｒｅ－ｍＲＮＡエキソン－イントロン境界に結合することにより、主としてスプライセオソーム形成の初期ステップを指図するように機能するリボ核タンパク質複合体である（Ｂｒｏｗｎ ａｎｄ Ｓｉｍｐｓｏｎ，１９９８，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｐｌａｎｔ ＭｏＩ Ｂｉｏｌ ４９：７７－９５）。Ｕ１ ｓｎＲＮＡ塩基対の５’末端のヌクレオチド２～１１は、ｐｒｅ ｍＲＮＡの５’ｓｓと結合する。１つの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、Ｕ１アダプターである。１つの実施形態では、Ｕ１アダプターは、少なくとも１つの他のｉＲＮＡ作用剤と組み合わせて投与することができる。

【０１８０】

オリゴヌクレオチド修飾

未修飾オリゴヌクレオチドは、幾つかの用途では、最適ではない場合があり、例えば、未修飾オリゴヌクレオチドは、例えば細胞ヌクレアーゼにより分解され易い場合がある。ヌクレアーゼは、核酸リン酸ジエステル結合を加水分解することができる。しかしながら、オリゴヌクレオチドの化学的修飾は、特性の向上を付与することができ、例えば、オリゴヌクレオチドを、ヌクレアーゼに対してより安定的にすることができる

【０１８１】
オリゴヌクレオチドは、サブユニット又はモノマーのポリマーであるため、下記に記載されている修飾、例えば塩基、糖、ホスフェート部分、又はホスフェート部分の非架橋酸素の修飾の多くは、オリゴヌクレオチド内で繰り返される位置で生じる。所与のオリゴヌクレオチドの全ての位置が均一に修飾される必要はなく、実際、前述した複数の修飾は、単一のオリゴヌクレオチドに組み込むことができ、又はオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオシドに組み込むことさえできる。
【０１８２】
幾つかの場合、修飾は、オリゴヌクレオチドの対象位置の全てで生じることになるが、多くの場合、実際はほとんどの場合、修飾は対象位置の全てで生じるとは限らないだろう。例としては、修飾は、３’又は５’末端位置のみで生じてもよく、内部領域でのみ生じてもよく、末端領域、例えば末端ヌクレオチドの位置でのみ又はオリゴヌクレオチドの最後の２、３、４、５、又は１０個のヌクレオチドでのみ生じてもよい。修飾は、二本鎖領域、一本鎖領域、又はその両方で生じてもよい。修飾は、二本鎖オリゴヌクレオチドの二本鎖領域でのみ生じてもよく、又は二本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖領域でのみ生じてもよい。例えば、非架橋酸素位置でのホスホロチオアート修飾は、一方又は両方の末端でのみ生じてもよく、末端領域、例えば末端ヌクレオチドの位置でのみ又は鎖の最後の２、３、４、５、若しくは１０個のヌクレオチドでのみ生じてもよく、又は二本鎖及び一本鎖領域、特に末端で生じてもよい。５’末端は、リン酸化することができる。
【０１８３】
本明細書に記載されている修飾は、複数のヌクレオチドに含まれている唯一の修飾又は唯一のタイプの修飾であってもよく、又は修飾は、本明細書に記載されている１つ以上の他の修飾と組み合わせることができる。本明細書に記載されている修飾は、オリゴヌクレオチドにおいて組み合わせることもでき、例えば、あるオリゴヌクレオチドの異なるヌクレオチドは、本明細書に記載されている異なる修飾を有する。
【０１８４】
幾つかの実施形態では、例えば、安定性を増強すること、突出に特定の核酸塩基を含めること、又は一本鎖突出、例えば５’突出若しくは３’突出若しくはその両方に修飾ヌクレオチド又はヌクレオチド代用物を含めることが、特に好ましい。例えば、突出にプリンヌクレオチドを含めることが望ましい場合がある。幾つかの実施形態では、３’又は５’突出の塩基の全て又は幾つかは、本明細書に記載されている修飾により修飾されているだろう。修飾には、例えばリボース糖の２’ＯＨ基における修飾の使用、例えばリボヌクレオチドの代りにデオキシリボヌクレオチド、例えばデオキシチミジンを使用すること、及びホスフェート基における修飾、例えばホスホチオアート修飾の使用が含まれる。突出は、標的配列と相同性である必要はない。
【０１８５】
特定の修飾は、下記でより詳細に議論されている。
【０１８６】
ホスフェート基
ホスフェート基は、負に荷電した種である。電荷は、２つの非架橋酸素原子に等しく分配されている。しかしながら、ホスフェート基は、酸素の１つを異なる置換基に置換することにより修飾することができる。ＲＮＡホスフェート骨格に対するこの修飾の１つの結果は、核酸分解に対するオリゴリボヌクレオチドの抵抗性の増加であり得る。したがって、理論により束縛されることは望まないが、幾つかの実施形態では、無荷電リンカー又は非対称電荷分布を有する荷電リンカーのいずれかをもたらす変更を導入することが望ましい場合がある。
【０１８７】
修飾ホスフェート基の例には、ホスホロチオアート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキル又はアリールホスホネート、及びホスホトリエステルが含まれる。ある実施形態では

、ホスフェート骨格部分の非架橋ホスフェート酸素原子のうちの１つは、下記のいずれかと置換することができる：Ｓ、Ｓｅ、BR_3（Ｒは水素、アルキル、アリールである）、Ｃ（つまり、アルキル基、アリール基など）、Ｈ、NR_2（Ｒは、水素、アルキル、アリール）、又はＯＲ（Ｒは、アルキル又はアリールである）。未修飾ホスフェート基の亜リン酸原子は、アキラルである。しかしながら、非架橋酸素の１つを上記の原子又は原子群の１つと置換することは、亜リン酸原子にキラル性を付与し、言いかえれば、このように修飾されたホスフェート基の亜リン酸原子は不斉中心である。不斉亜リン酸原子は、「Ｒ」配置（本明細書では、Ｒｐ）又は「Ｓ」配置（本明細書では、Ｓｐ）のいずれかを有することができる。

【０１８８】

ホスホロジチオアートは、両方の非架橋酸素が硫黄に置換されている。オリゴリボヌクレオチドジアステレオマーの形成を排除するホスホロジチオアートのリン中心は、アキラルである。したがって、理論により束縛されることは望まないが、キラル中心を排除する両非架橋酸素の修飾、例えばホスホロジチオアートの形成は、それらがジアステレオマー混合物を生成することができないという点で望ましい場合がある。したがって、非架橋酸素は、独立して、Ｓ、Ｓｅ、Ｂ、Ｃ、Ｈ、Ｎ、又はＯＲ（Ｒは、アルキル又はアリール）のいずれか１つであってもよい。

【０１８９】

ホスフェートリンカーは、架橋酸素（つまり、ホスフェートをヌクレオシドに結合させる酸素）を、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオアート）、及び炭素（架橋メチレンホスホネート）で置換することにより修飾することもできる。置換は、いずれの結合酸素で生じてもよく、又は結合酸素の両方で生じてもよい。架橋酸素が、ヌクレオシドの３’－酸素である場合、炭素との置換が好ましい。架橋酸素が、ヌクレオシドの５’－酸素である場合、窒素との置換が好ましい。

【０１９０】

ホスフェート基の置換

ホスフェート基は、非リン含有連結部分と置換することができる。理論により束縛されることは望まないが、荷電ホスホジエステル基は、核酸分解の反応中心であるため、中性の構造模倣体と置換することにより、ヌクレアーゼ安定性の増強が付与されるはずであると考えられる。さらに、理論により束縛されることは望まないが、幾つかの実施形態では、荷電ホスフェート基が中性部分と置換される変更を導入することが望ましい場合がある。

【０１９１】

ホスフェート基を置換することができる部分の例には、以下のものが含まれる：メチルホスホネート、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、及びメチレンオキシメチルイミノ。好ましい置換には、メチレンカルボニルアミノ及びメチレンメチルイミノ基が含まれる。

【０１９２】

ホスフェートに結合された酸素の少なくとも１つが置換されている、又はホスフェート基が非亜リン酸基により置換されている修飾ホスフェート結合は、「非ホスホジエステル骨格結合」とも呼ばれる。

【０１９３】

リボホスフェート骨格の置換

ホスフェートリンカー及びリボース糖が、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシド又はヌクレオチド代用物と置換されているオリゴヌクレオチド模倣骨格を構築することもできる。理論により束縛されることは望まないが、繰り返し荷電されている骨格が存在しないことにより、ポリアニオンを認識するタンパク質（例えば、ヌクレアーゼ）の結合が減少すると考

えられる。さらに、理論により束縛されることは望まないが、幾つかの実施形態では、塩基が中性代用物骨格により置換される変更を導入することが望ましい場合がある。例としては、モフィリノ（ｍｏｐｈｉｌｉｎｏ）、シクロブチル、ピロリジン、及びペプチド核酸（ＰＮＡ）ヌクレオシド代用物が含まれる。好ましい代用物は、ＰＮＡ代用物である。

【０１９４】

糖修飾

修飾ＲＮＡは、リボ核酸の糖基の全て又は幾つかの修飾を含むことができる。例えば、２’ヒドロキシル基（ＯＨ）は、修飾されていてもよく、又は多くの異なる「オキシ」又は「デオキシ」置換基と置換されていてもよい。理論により束縛されないが、ヒドロキシルは、脱プロトン化して２’－アルコキシドイオンを形成することがもはやできないため、安定性の増強が予測される。２’－アルコキシドは、リンカーリン原子に対する分子内求核攻撃により、分解を触媒する場合がある。さらに、理論により束縛されることは望まないが、幾つかの実施形態では、２’位におけるアルコキシド形成が可能ではない変更を導入することが望ましい場合がある。

【０１９５】

「オキシ」－２’ヒドロキシル基修飾の例には、以下のものが含まれる：アルコキシ又はアリールオキシ（ＯＲ、例えば、Ｒ＝Ｈ、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、又は糖）；ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、（Ｏ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_n$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＯＲ）；２’ヒドロキシルが、例えばメチレン架橋により、同じリボース糖の４’炭素に結合している「ロックド」核酸（ＬＮＡ）；Ｏ－アミン（アミン＝ＮＨ$_2$；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、又はジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ）、及びアミノアルコキシ、（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$ＡＭＩＮＥ、（例えば、アミン＝ＮＨ$_2$；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、又はジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ）。メトキシエチル基（ＭＯＥ）、（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＯＣＨ$_3$、ＰＥＧ誘導体）のみを含有するオリゴヌクレオチドが、ロバストなホスホロチオアート修飾で修飾されているものに匹敵するヌクレアーゼ安定性を示すことは注目に値する。

【０１９６】

「デオキシ」修飾には、以下のものが含まれる：水素（つまり、部分的にｄｓ　ＲＮＡの突出部分に特に関連するデオキシリボース糖）；ハロ（例えば、フルオロ）；アミノ（例えば、ＮＨ$_2$；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、又はアミノ酸）；ＮＨ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＮＨ）$_n$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－アミン（アミン＝ＮＨ$_2$；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、又はジヘテロアリールアミノ）、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ（Ｒ＝アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、又は糖）、シアノ；メルカプト；アルキルチオアルキル；チオアルコキシ；並びにアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニル、及びアルキニル、これらは、例えばアミノ官能性で随意に置換されていてもよい。好ましい置換基は、２’－メトキシエチル、２’－ＯＣＨ３、２’－Ｏ－アリル、２’－Ｃ－アリル、及び２’－フルオロである。

【０１９７】

糖基は、リボースの対応する炭素の立体化学配置とは反対の立体化学配置を有する１つ以上の炭素を含有することもできる。したがって、オリゴヌクレオチドは、例えばアラビノースを糖として含有するヌクレオチドを含んでいてもよい。モノマーは、糖の１’位にアルファ結合を有していてもよく、例えばアルファ－ヌクレオシドである。オリゴヌクレオチドは、Ｃ－１’の核酸塩基を欠如した「脱塩基」糖を含むこともできる。これらの脱塩基糖は、構成糖原子の１つ以上における修飾をさらに含有することもできる。オリゴヌクレオチドは、Ｌ型、例えばＬ－ヌクレオシドである１つ以上の糖を含有することもできる。

【０１９８】
末端修飾
オリゴヌクレオチドの３’及び５’末端は、修飾されていてもよい。そのような修飾は、分子の３’末端、５’末端、又は両端であってもよい。それらは、末端ホスフェート全体の、又はホスフェート基の原子の１つ以上の修飾又は置換を含んでいてもよい。例えば、オリゴヌクレオチドの３’及び５’末端は、標識部分、例えば蛍光体（例えば、ピレン、ＴＡＭＲＡ、フルオレセイン、Ｃｙ３、又はＣｙ５染料）、又は保護基（例えば、硫黄、ケイ素、ホウ素、又はエステルに基づく）などの他の官能性分子実体に結合されていてもよい。官能性分子実体は、ホスフェート基及び／又はリンカーを介して糖に結合されていてもよい。リンカーの末端原子は、ホスフェート基の結合原子、又は糖のＣ－３’若しくはＣ－５’、Ｏ、Ｎ、Ｓ、若しくはＣ基の結合原子に接続するか又は置換してもよい。あるいは、リンカーは、ヌクレオチド代用物（例えば、ＰＮＡ）の末端原子に接続するか又は置換してもよい。

【０１９９】
リンカー／ホスフェート官能性分子実体－リンカー／ホスフェート配列が、ｄｓＲＮＡの２本の鎖の間に挿入されている場合、この配列は、ヘアピン型ＲＮＡ作用剤のヘアピンＲＮＡループの代わりをすることができる。

【０２００】
調節活性に有用な末端修飾には、ホスフェート又はホスフェート類似体による５’末端の修飾が含まれる。例えば、好ましい実施形態では、ｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖は、５’リン酸化されているか、又は５’プライム末端にホスホリル類似体を含む。５’－ホスフェート修飾には、ＲＩＳＣ媒介性遺伝子サイレンシングと適合性をもつものが含まれる。好適な修飾には、以下のものが含まれる：５’－モノホスフェート（（ＨＯ）２（Ｏ）Ｐ－Ｏ－５’）；５’－ジホスフェート（（ＨＯ）２（Ｏ）Ｐ－Ｏ－Ｐ（ＨＯ）（Ｏ）－Ｏ－５’）；５’－トリホスフェート（（ＨＯ）２（Ｏ）Ｐ－Ｏ－（ＨＯ）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－Ｐ（ＨＯ）（Ｏ）－Ｏ－５’）；５’－グアノシンキャップ（７－メチル化又は非メチル化）（７ｍ－Ｇ－Ｏ－５’－（ＨＯ）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－（ＨＯ）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－Ｐ（ＨＯ）（Ｏ）－Ｏ－５’；５’－アデノシンキャップ（Ａｐｐｐ）、及び任意の修飾又は未修飾ヌクレオチドキャップ構造（Ｎ－Ｏ－５’－（ＨＯ）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－（ＨＯ）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－Ｐ（ＨＯ）（Ｏ）－Ｏ－５’）；５’－モノチオホスフェート（ホスホロチオアート；（ＨＯ）２（Ｓ）Ｐ－Ｏ－５’）；５’－モノジチオホスフェート（ホスホロジチオアート；（ＨＯ）（ＨＳ）（Ｓ）Ｐ－Ｏ－５’）、５’－ホスホロチオラート（（ＨＯ）２（Ｏ）Ｐ－Ｓ－５’）；酸素／硫黄で置換されたモノホスフェート、ジホスフェート、及びトリホスフェート（例えば、５’－アルファ－チオトリホスフェート、５’－ガンマ－チオトリホスフェートなど）、５’－ホスホルアミダート（（ＨＯ）２（Ｏ）Ｐ－ＮＨ－５’、（ＨＯ）（ＮＨ２）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－５’）、５’－アルキルホスホネート（Ｒ＝アルキル＝メチル、エチル、イソプロピル、プロピルなど、例えば、ＲＰ（ＯＨ）（Ｏ）－Ｏ－５’－）、（ＯＨ）２（Ｏ）Ｐ－５’－ＣＨ２－）、５’－アルキルエーテルホスホネート（Ｒ＝アルキルエーテル＝メトキシメチル（ＭｅＯＣＨ２－）、エトキシメチルなど、例えば、ＲＰ（ＯＨ）（Ｏ）－Ｏ－５’－）のさらなる任意の組合せ。

【０２０１】
また、末端修飾は、分布を監視するのに有用であってもよく、そのような場合、付加される好ましい基には、蛍光体（例えば、フルオルセイン（ｆｌｕｏｒｓｃｅｉｎ）、Ａｌｅｘａ染料、例えばＡｌｅｘａ４８８が含まれる。また、末端修飾は、取り込みの増強に有用であってもよく、このための有用な修飾には、コレステロールが含まれる。また、末端修飾は、ＲＮＡ作用剤を別の部分に架橋するのに有用であってもよく、このために有用な修飾には、マイトマイシンＣが含まれる。

【０２０２】
核酸塩基
アデニン、グアニン、シトシン、及びウラシルは、ＲＮＡに見出される最も一般的な塩

基である。これらの塩基を修飾又は置換して、特性が向上したＲＮＡを提供することができる。例えば、ヌクレアーゼ耐性オリゴリボヌクレオチドは、これらの塩基、又は合成及び天然核酸塩基（例えば、イノシン、チミン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌブラリン（ｎｕｂｕｌａｒｉｎｅ）、イソグアニシン（ｉｓｏｇｕａｎｉｓｉｎｅ）、又はツベルシジン（ｔｕｂｅｒｃｉｄｉｎｅ））、並びに上記の修飾のいずれか１つを用いて調製することができる。あるいは、上記の塩基のいずれかの置換又は修飾類似体、例えば、本明細書に記載されている「異常塩基」、「修飾塩基」、「非天然塩基」、及び「ユニバーサル塩基」を使用することができる。例としては、限定ではないが、以下のものが含まれる：２－アミノアデニン、アデニン及びグアニンの６－メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの２－プロピル及び他のアルキル誘導体、５－ハロウラシル及びシトシン、５－プロピニルウラシル及びシトシン、６－アゾウラシル、シトシン、及びチミン、５－ウラシル（プソイドウラシル）、４－チオウラシル、５－ハロウラシル、５－（２－アミノプロピル）ウラシル、５－アミノアリルウラシル、８－ハロ、アミノ、チオール、チオアルキル、ヒドロキシル、及び他の８－置換アデニン及びグアニン、５－トリフルオロメチル及び他の５－置換ウラシル及びシトシン、７－メチルグアニン、５－置換ピリミジン、６－アザピリミジン、並びに２－アミノプロピルアデニン、５－プロピニルウラシル、及び５－プロピニルシトシンを含むＮ－２、Ｎ－６、及びＯ－６置換プリン、ジヒドロウラシル、３－デアザ－５－アザシトシン、２－アミノプリン、５－アルキルウラシル、７－アルキルグアニン、５－アルキルシトシン、７－デアザアデニン、Ｎ６、Ｎ６－ジメチルアデニン、２，６－ジアミノプリン、５－アミノアリルウラシル、Ｎ３－メチルウラシル、置換１，２，４－トリアゾール、２－ピリジノン、５－ニトロインドール、３－ニトロピロール、５－メトキシウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸、５－メトキシカルボニルメチルウラシル、５－メチル－２－チオウラシル、５－メトキシカルボニルメチル－２－チオウラシル、５－メチルアミノメチル－２－チオウラシル、３－（３－アミノ－３カルボキシプロピル）ウラシル、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、N^4－アセチルシトシン、２－チオシトシン、Ｎ６－メチルアデニン、Ｎ６－イソペンチルアデニン、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、Ｎ－メチルグアニン、又はＯ－アルキル化塩基。さらなるプリン及びピリミジンには、米国特許第３，６８７，８０８号で開示されているもの、ｔｈｅ Ｃｏｎｃｉｓｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ Ｏｆ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ａｎｄ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ, ｐａｇｅｓ ８５８－８５９, Ｋｒｏｓｃｈｗｉｔｚ, Ｊ．Ｉ．, ｅｄ．Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ, １９９０で開示されているもの、及びＥｎｇｌｉｓｃｈ ｅｔ ａｌ．, Ａｎｇｅｗａｎｄｔｅ Ｃｈｅｍｉｅ, Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｅｄｉｔｉｏｎ, １９９１, ３０, ６１３で開示されているものが含まれる。

【０２０３】

陽イオン性基

オリゴヌクレオチドに対する修飾には、１つ以上の陽イオン性基を、ホスフェート又は修飾ホスフェート骨格部分の糖、塩基、及び／又はリン原子に結合させることが含まれていてもよい。陽イオン性基は、天然塩基、異常塩基、又はユニバーサル塩基の置換可能な任意の原子に結合させることができる。好ましい位置は、ハイブリダイゼーションを妨害しない、つまり塩基対合に必要とされる水素結合相互作用を妨害しない位置である。陽イオン性基は、例えば、糖のＣ２’位、又は環式又は非環式糖代用物の類似位置を介して結合させることができる。陽イオン性基には、以下のものが含まれていてもよい：例えば、Ｏ－アミン（アミン＝NH_2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、又はジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ）に由来する、例えばプロトン化アミノ基；アミノアルコキシ、例えばＯ（CH_2）$_n$アミン）（例えば、アミン＝NH_2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、又はジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ）；アミノ（例えば、NH_2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジ

アリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、又はアミノ酸）；又はＮＨ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＮＨ）$_n$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－アミン（アミン＝ＮＨ$_2$；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、又はジヘテロアリールアミノ）。

【０２０４】

オリゴヌクレオチド内での配置

幾つかの修飾は、好ましくは、特定の位置で、例えば鎖の内部位置で又はオリゴヌクレオチドの５’又は３’末端で、オリゴヌクレオチドに含まれていてもよい。好ましい位置でのオリゴヌクレオチドの修飾は、作用剤に好ましい特性を付与することができる。例えば、好ましい位置での特定の修飾は、最適な遺伝子サイレンシング特性、又はエンドヌクレアーゼ若しくはエキソヌクレアーゼ活性に対する耐性の増加を付与することができる。

【０２０５】

オリゴヌクレオチドの１つ以上のヌクレオチドは、２’－５’結合を有していてもよい。オリゴヌクレオチドの１つ以上のヌクレオチドは、逆の結合、例えば３’－３’、５’－５’、２’－２’、又は２’－３’結合を有していてもよい。

【０２０６】

二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの、ウリジンが２’－修飾ヌクレオチドである５’－ウリジン－アデニン－３’（５’－ＵＡ－３’）ジヌクレオチド、又は５’－ウリジンが２’－修飾ヌクレオチドである末端５’－ウリジン－グアニン－３’（５’－ＵＧ－３’）ジヌクレオチド、又は５’－シチジンが２’－修飾ヌクレオチドである末端５’－シチジン－アデニン－３’（５’－ＣＡ－３’）ジヌクレオチド、又は５’－ウリジンが２’－修飾ヌクレオチドである末端５’－ウリジン－ウリジン－３’（５’－ＵＵ－３’）ジヌクレオチド、又は５’－シチジンが２’－修飾ヌクレオチドである末端５’－シチジン－シチジン－３’（５’－ＣＣ－３’）ジヌクレオチド、又は５’－シチジンが２’－修飾ヌクレオチドである末端５’－シチジン－ウリジン－３’（５’－ＣＵ－３’）ジヌクレオチド、又は５’－ウリジンが２’－修飾ヌクレオチドである末端５’－ウリジン－シチジン－３’（５’－ＵＣ－３’）ジヌクレオチドを含む。これらの修飾を含む二本鎖オリゴヌクレオチドは、特にエンドヌクレアーゼ活性に対して安定化される。

【０２０７】

一般的な文献

本発明により使用されるオリゴリボヌクレオチド及びオリゴリボヌクレオシドは、固相合成で合成することができる。例えば、”Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ, ａ ｐｒａｃｔｉｃａｌ ａｐｐｒｏａｃｈ”, Ｅｄ. Ｍ. Ｊ. Ｇａｉｔ, ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ, １９８４；”Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｎｄ Ａｎａｌｏｇｕｅｓ, Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ”, Ｅｄ. Ｆ. Ｅｃｋｓｔｅｉｎ, ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ, １９９１（特に、１章、Ｍｏｄｅｒｎ ｍａｃｈｉｎｅ－ａｉｄｅｄ ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ、２章、Ｏｌｉｇｏｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ、３章、２’－Ｏ－－Ｍｅｔｈｙｌｏｌｉｇｏｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ－ ｓ: ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、４章、Ｐｈｏｓｐｈｏｒｏｔｈｉｏａｔｅ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ、５章、Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｐｈｏｓｐｈｏｒｏｄｉｔｈｉｏａｔｅｓ、６章、Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｏｌｉｇｏ－２’－ｄｅｏｘｙｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ ｍｅｔｈｙｌｐｈｏｓｐｈｏｎａｔｅｓ、及び７章、Ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｂａｓｅｓ）を参照されたい。他の特に有用な合成手順、試薬、保護基、及び反応条件は、以下の文献に記載されている：Ｍａｒｔｉｎ, Ｐ., Ｈｅｌｖ. Ｃｈｉｍ. Ａｃｔａ, １９９５, ７８, ４８６－５０４；Ｂｅａｕｃａｇｅ, Ｓ. Ｌ. ａｎｄ Ｉｙｅｒ, Ｒ. Ｐ., Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ, １９９２, ４８, ２２２３－２３１１、及びＢｅａｕｃａｇｅ, Ｓ. Ｌ. ａｎｄ Ｉｙｅｒ, Ｒ.

Ｐ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ，１９９３，４９，６１２３－６１９４、又はそこに引用されている文献。国際公開第００／４４８９５号、国際公開第０１／７５１６４号、又は国際公開第０２／４４３２１号に記載されている修飾を、本明細書で使用することができる。本明細書で列挙されている全ての出版物、特許、及び公開特許出願の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０２０８】

ホスフェート基の文献

ホスフィネートオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第５，５０８，２７０号に記載されている。アルキルホスホネートオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第４，４６９，８６３号に記載されている。ホスホラミダイトオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第５，２５６，７７５号又は米国特許第５，３６６，８７８号に記載されている。ホスホトリエステルオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第５，０２３，２４３号に記載されている。ボラノホスフェートオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第５，１３０，３０２号及び第５，１７７，１９８号に記載されている。３’－デオキシ－３’－アミノホスホルアミダートオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第５，４７６，９２５号に記載されている。３’－デオキシ－３’－メチレンホスホネートオリゴリボヌクレオチドは、Ａｎ，Ｈ，ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．２００１，６６，２７８９－２８０１に記載されている。硫黄架橋ヌクレオチドの調製は、Ｓｐｒｏａｔ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ １９８８，７，６５１及びＣｒｏｓｓｔｉｃｋ ｅｔ ａｌ．Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．１９８９，３０，４６９３に記載されている。

【０２０９】

糖基の文献

２’修飾に対する改変は、Ｖｅｒｍａ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９９８，６７，９９－１３４及びその中の文献全てに見出すことができる。リボースに対する特定の修飾は、以下の文献に見出すことができる：２’－フルオロ（Ｋａｗａｓａｋｉ ｅｔ．ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，１９９３，３６，８３１－８４１）、２’－ＭＯＥ（Ｍａｒｔｉｎ，Ｐ．Ｈｅｌｖ．Ｃｈｉｍ．Ａｃｔａ １９９６，７９，１９３０－１９３８）、「ＬＮＡ」（Ｗｅｎｇｅｌ，Ｊ．Ａｃｃ．Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．１９９９，３２，３０１－３１０）。

【０２１０】

ポスフェート基置換の文献

本明細書ではＭＭＩ結合オリゴリボヌクレオシドとしても特定されているメチレンメチルイミノ結合オリゴリボヌクレオシド、本明細書ではＭＤＨ結合オリゴリボヌクレオシドとしても特定されているメチレンジメチルヒドラゾ結合オリゴリボヌクレオシド、本明細書ではアミド－３結合オリゴリボヌクレオシドとしても特定されているメチレンカルボニルアミノ結合オリゴリボヌクレオシド、本明細書ではアミド－４結合のオリゴリボヌクレオシドとしても特定されているメチレンアミノカルボニル結合オリゴリボヌクレオシド、並びに例えばＭＭＩ及びＰＯ又はＰＳが交互する結合を有する混合骨格化合物は、米国特許第５，３７８，８２５号、第５，３８６，０２３号、第５，４８９，６７７号、並びに国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ９２／０４２９４号及び国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ９２／０４３０５号（それぞれ国際公開第９２／２０８２２号及び国際公開第９２／２０８２３号として公開されている）に記載されているように調製することができる。ホルムアセタール及びチオホルムアセタール結合オリゴリボヌクレオシドは、米国特許第５，２６４，５６２号及び同第５，２６４，５６４号に記載されているように調製することができる。エチレンオキシド結合オリゴリボヌクレオシドは、米国特許第５，２２３，６１８号に記載されているように調製することができる。シロキサン置換は、Ｃｏｒｍｉｅｒ，Ｊ．Ｆ．ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９８８，１６，４５８３に記載されている。カルボネート置換は、Ｔｉｔｔｅｎｓｏｒ，Ｊ．Ｒ．Ｊ．Ｃｈｅｍ

. Soc. C 1971, 1933に記載されている。カルボキシメチル置換は、Edge, M.D. et al. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 1972, 1991に記載されている。カルバメート置換は、Stirchak, E.P. Nucleic Acids Res. 1989, 17, 6129に記載されている。

【0211】

ホスフェート－リボース骨格置換の文献

シクロブチル糖代用化合物は、米国特許第5,359,044号に記載されているように調製することができる。 ピロリジン糖代用物は、米国特許第5,519,134号に記載されているように調製することができる。モルホリノ糖代用物は、米国特許第5,142,047号及び第5,235,033号、並びに他の関連特許開示に記載されているように調製することができる。ペプチド核酸（PNA）は、それ自身公知であり、Peptide Nucleic Acids（PNA）: Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5－23に引用されている種々の手順のいずれかに従って調製することができる。それらは、米国特許第5,539,083号に従って調製することもできる。

【0212】

末端修飾の文献

末端修飾は、Manoharan, M. et al. Antisense and Nucleic Acid Drug Development 12, 103－128 （2002）及びその中の文献に記載されている。

【0213】

核酸塩基の文献

N－2置換プリンヌクレオシドアミダイト（N－2 substitued purine nucleoside amidite）は、米国特許第5,459,255号に記載されているように調製することができる。 3－デアザプリンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5,457,191号に記載されているように調製することができる。

5,6－置換ピリミジンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5,614,617号に記載されているように調製することができる。 5－プロピニルピリミジンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5,484,908号に記載されているように調製することができる。

【0214】

リンカー

「リンカー」という用語は、化合物の2つの部分を接続する有機部分を意味する。 リンカーは、典型的には、以下のものを含む；直接結合又は酸素若しくは硫黄などの原子、NR^1、C（O）、C（O）NH、SO、SO_2、SO_2NH、又は置換若しくは非置換アルキル、置換若しくは非置換アルケニル、置換若しくは非置換アルキニル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリールアルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキニルヘテロアリールアルケニル、アルキニルヘテロアリールアルキニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘレロシクリルアルキニル（alkylhe

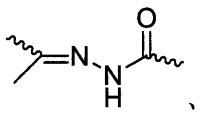
ｒｅｒｏｃｙｃｌｙｌａｌｋｙｎｙｌ）、アルケニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキニルヘテロシクリルアルキニル、アルキルアリール、アルケニルアリール、アルキニルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルヘテロアリール、アルキニルヘレロアリール（ａｌｋｙｎｙｌｈｅｒｅｒｏａｒｙｌ）などの原子鎖などの単位、ここで１つ以上のメチレンは、Ｏ、Ｓ、Ｓ（Ｏ）、SO_2、$N(R^1)_2$、Ｃ（Ｏ）、切断可能な結合部分、置換若しくは非置換アリール、置換若しくは非置換ヘテロアリール、又は置換若しくは非置換ヘテロ環式で中断又は終了されていてもよく、ここでR^1は、水素、アシル、脂肪族、又は置換脂肪族である。

【０２１５】

１つの実施形態では、リンカーは、$-[(P-Q-R)_q-X-(P'-Q'-R')_q]_{q''}-T-$であり、式中、

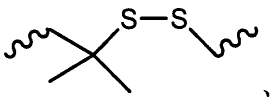
Ｐ、Ｒ、Ｔ、Ｐ’、Ｒ’、及びＴは、各存在において各々独立して、非存在、ＣＯ、ＮＨ、Ｏ、Ｓ、$OC(O)$、$NHC(O)$、CH_2、CH_2NH、CH_2O；$NHCH(R^a)C(O)$、$-C(O)-CH(R^a)-NH-$、$CH=N-O$、

【化５】



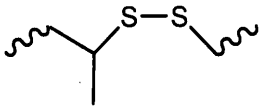
、

【化６】



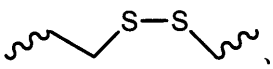
、

【化７】



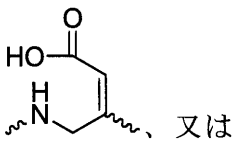
、

【化８】



、

【化９】



、又は

ヘテロシクリルであり、

Ｑ及びＱ’は、各存在において各々独立して、非存在、$-(CH_2)_n-$、$-C(R^1)(R^2)(CH_2)_n-$、$-(CH_2)_nC(R^1)(R^2)-$、$-(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2-$、又は$-(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2NH-$であり、

Ｘは、非存在であるか又は切断可能な結合基であり、
Ｒ^{a}は、Ｈ又はアミノ酸側鎖であり、
Ｒ^{1}及びＲ^{2}は、各存在において各々独立して、Ｈ，ＣＨ$_{3}$、ＯＨ，ＳＨ、又はＮ（Ｒ^{N}）$_{2}$であり、
Ｒ^{N}は、各存在において独立して、Ｈ、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、又はベンジルであり、
ｑ、ｑ’、及びｑ’’は、各存在において各々独立して、０～２０であり、反復単位は、同じであるか又は異なっていてもよく、
ｎは、各存在において独立して、１～２０であり、及び
ｍは、各存在において独立して、０～５０である。

【０２１６】
１つの実施形態では、リンカーは、少なくとも１つの切断可能な結合基を含む。

【０２１７】
ある実施形態では、リンカーは、分岐リンカーである。分岐リンカーの分岐点は、少なくとも三価であってもよいが、四価、五価、又は六価の原子、又はそのような多重結合価を示す基であってもよい。ある実施形態では、分岐点は、－Ｎ、－Ｎ（Ｑ）－Ｃ、－Ｏ－Ｃ、－Ｓ－Ｃ、－ＳＳ－Ｃ、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）－Ｃ、－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）－Ｃ、－Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）－Ｃ、又は－Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃであり、式中Ｑは、各存在において独立してＨ又は随意に置換されたアルキルである。他の実施形態では、分岐点は、グリセロール又はグリセロール誘導体である。

【０２１８】
切断可能な結合基
切断可能な結合基は、細胞の外では十分に安定しているが、標的細胞に進入すると、切断されて、リンカーが一緒に保持する２つの部分を放出するものである。好ましい実施形態では、切断可能な結合基は、対象体の血液中又は第２の基準条件下より（例えば、血液又は血清に見出される条件を模倣又は表すために選択することができる）、標的細胞内で又は第１の基準条件下で（例えば、細胞内の条件を模倣又は表すために選択することができる）、少なくとも１０倍以上、好ましくは少なくとも１００倍、より急速に切断される。
切断可能な結合基は、切断作用剤、例えばｐＨ、酸化還元電位、又は分解分子の存在に感受性である。一般的に、切断作用剤は、血清又は血液中よりも細胞内部で、より行き渡っているか、又はより高いレベル又は活性で見出される。そのような分解作用剤の例には、以下のものが含まれる：特定の基質のために選択される酸化還元剤又は基質特異性を有していない酸化還元剤、例えば、酸化若しくは還元酵素、又は還元により酸化還元的に切断可能な結合基を分解することができる、細胞に存在するメルカプタンなどの還元剤；エステラーゼ；エンドソーム又は酸性環境を作り出すことができる作用剤、例えば５以下のｐＨをもたらすもの；一般酸、ペプチダーゼ（基質特異的であり得る）、及びホスファターゼとして作用することにより、酸で切断可能な結合基を加水分解又は分解することができる酵素。

【０２１９】
ジスルフィド結合などの切断可能な結合基は、ｐＨに感受性であってもよい。ヒト血清のｐＨは７．４であるが、平均細胞内ｐＨは、わずかに低く、約７．１～７．３の範囲である。エンドソームは、５．５～６．０の範囲のより酸性のｐＨを有し、リソソームは、さらにより酸性である約５．０のｐＨを有する。幾つかのリンカーは、好ましいｐＨで切断される切断可能な結合基を有し、それにより陽イオン性脂質をリガンドから細胞内部に又は細胞の所望の区画に放出するだろう。

【０２２０】
リンカーは、特定の酵素により切断可能である切断可能な結合基を含むことができる。リンカーに組み込まれた切断可能な結合基のタイプは、標的とされる細胞に依存する場合がある。例えば、肝臓標的指向性リガンドは、エステル基を含むリンカーを介して陽イオ

ン性脂質に結合させることができる。肝細胞は、エステラーゼに富んでおり、したがってリンカーは、エステラーゼが豊富でない細胞タイプよりも肝細胞中でより効率的に切断されるだろう。エステラーゼが豊富な他の細胞タイプには、肺、腎皮質、及び精巣の細胞が含まれる。

【０２２１】

肝細胞及び滑膜細胞などの、ペプチダーゼが豊富な細胞タイプを標的とする場合、ペプチド結合を含有するリンカーを使用することができる。

【０２２２】

一般的に、切断可能な結合基候補の適合性は、切断可能な結合基候補を切断する分解作用剤（又は条件）の能力を試験することにより評価することができる。血液中での又は他の非標的組織と接触した際の切断耐性能力に関して、切断可能な結合基候補を試験することも望ましいだろう。したがって、第１の条件と第２の条件との間の切断に対する相対的感受性を決定することができ、この場合、第１は、標的細胞での切断を示すように選択され、第２は、他の組織又は生物学的液体、例えば血液又は血清での切断を示すように選択される。評価は、無細胞系中、細胞中、細胞培養中、器官若しくは組織培養中、又は動物全身で実施することができる。無細胞条件又は培養条件で初期評価を行い、動物全身でさらに評価することにより確認することが有用であり得る。好ましい実施形態では、有用な候補化合物は、血液又は血清（又は細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）よりも、細胞において（又は細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）少なくとも２、４、１０、又は１００倍、より急速に切断される。

【０２２３】

酸化還元的に切断可能な結合基

切断可能な結合基の１つのクラスは、還元又は酸化時に切断される酸化還元的に切断可能な結合基である。還元的に切断可能な結合基の一例は、ジスルフィド結合基（－Ｓ－Ｓ－）である。切断可能な結合基候補が、好適な「還元的に切断可能な結合基」であるかどうか、又は例えば特定のｉＲＮＡ部分及び特定の標的指向性作用剤と共に使用するのに好適であるかどうかを決定するためには、本明細書に記載されている方法を参考することができる。例えば、候補は、細胞、例えば標的細胞中で観察されるだろう切断速度を模倣する当該技術分野で公知の試薬を使用して、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）又は他の還元剤と共にインキュベーションすることにより評価することができる。候補は、血液又は血清条件を模倣するように選択される条件下で評価することもできる。好ましい実施形態では、候補化合物は、血液中で多くとも１０％切断される。好ましい実施形態では、有用な候補化合物は、血液（又は細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）よりも、細胞において（又は細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）少なくとも２、４、１０、又は１００倍、より急速に分解される。候補化合物の切断速度は、標準的酵素反応速度アッセイを使用して、細胞内媒質を模倣するように選択された条件下で決定し、細胞外媒質を模倣するように選択された条件と比較することができる。

【０２２４】

ホスフェートに基づく切断可能な結合基

ホスフェートに基づく切断可能な結合基は、ホスフェート基を分解又は加水分解する作用剤により切断される。細胞のホスフェート基を切断する作用剤の例は、細胞内のホスファターゼなどの酵素である。ホスフェートに基づく結合基の例は、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲｋ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＯＲｋ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＳＲｋ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲｋ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲｋ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲｋ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＯＲｋ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（ＯＲｋ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（Ｒｋ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｒｋ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｒｋ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（Ｒｋ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｒｋ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｒｋ）－Ｓ－である。好ましい実施形態は、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＯＨ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＳＨ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｏ

Ｈ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（ＯＨ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｈ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｈ）－Ｓ－である。好ましい実施形態は、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｏ－である。これらの候補は、上記に記載されているものと同様な方法を使用して評価することができる。

【０２２５】

酸で切断可能な結合基

酸で切断可能な結合基は、酸性条件下で切断される結合基である。好ましい実施形態では、酸で切断可能な結合基は、約６．５以下のｐＨ（例えば、約６．０、５．５、又は５．０以下）を有する酸性環境中で、又は一般酸として作用することができる酵素などの作用剤により切断される。細胞では、エンドソーム及びリソソームなどの特定の低ｐＨ細胞小器官は、酸で切断可能な結合基に切断環境を供給することができる。酸で切断可能な結合基の例には、これらに限定されないが、ヒドラゾン、エステル、及びアミノ酸のエステルが含まれる。酸で切断可能な基は、一般式－Ｃ＝ＮＮ－、Ｃ（Ｏ）Ｏ、又は－ＯＣ（Ｏ）を有していてもよい。好ましい実施形態は、エステル（アルコキシ基）の酸素に結合された炭素が、アリール基、置換アルキル基、又はジメチルペンチル若しくはｔ－ブチルなどの三級アルキル基である場合である。これらの候補は、上記に記載されているものと同様な方法を使用して評価することができる。

【０２２６】

エステルに基づく結合基

エステルに基づく切断可能な結合基は、細胞内のエステラーゼ及びアミダーゼなどの酵素により切断される。エステルに基づく切断可能な結合基の例には、これらに限定されないが、アルキレン、アルケニレン、及びアルキニレン基のエステルが含まれる。エステルの切断可能な結合基は、一般式－Ｃ（Ｏ）Ｏ－又は－ＯＣ（Ｏ）－を有する。これらの候補は、上記に記載されているものと同様な方法を使用して評価することができる。

【０２２７】

ペプチドに基づく切断基

ペプチドに基づく切断可能な結合基は、細胞内のペプチダーゼ及びプロテアーゼなどの酵素により切断される。ペプチドに基づく切断可能な結合基は、アミノ酸間で形成されて、オリゴペプチド（例えば、ジペプチド、トリペプチドなど）及びポリペプチドを産出するペプチド結合である。ペプチドに基づく切断可能な基は、アミド基（－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）を含まない。アミド基は、任意のアルキレン、アルケニレン、又はアルキニレン間で形成される場合がある。ペプチド結合は、アミノ酸間で形成されてペプチド及びタンパク質を産出する特別なタイプのアミド結合である。ペプチドに基づく切断基は、一般的に、アミノ酸間で形成されてペプチド及びタンパク質を産出するペプチドを産出するペプチド結合（つまり、アミド結合）に限定され、アミド官能基全体は含まない。ペプチドに基づく切断可能な結合基は、一般式－ＮＨＣＨＲ^{A}Ｃ（Ｏ）ＮＨＣＨＲ^{B}Ｃ（Ｏ）－を有し、Ｒ^{A}及びＲ^{B}は、２つの隣接したアミノ酸のＲ基である。これらの候補は、上記に記載されているものと同様な方法を使用して評価することができる。

【０２２８】

リガンド

多種多様な実体を、本発明のオリゴヌクレオチド及び脂質に結合することができる。好ましい部分は、直接的に又は介在的テザーを介して間接的に、好ましくは共有結合で結合されるリガンドである。

【０２２９】

好ましい実施形態では、リガンドは、それが組み込まれる分子の分布、標的指向性、又は寿命を変更する。好ましい実施形態では、リガンドは、例えば、そのようなリガンドが存在しない種と比較して、選択された標的、例えば、分子、細胞若しくは細胞タイプ、区画、例えば細胞若しくは器官区画、組織、器官、又は身体の領域に対する親和性の増強を提供する。選択された標的に対する親和性の増強を提供するリガンドも、標的指向性リガ

ンドと呼ばれる。本発明の脂質に結合するための好ましいリガンドは、標的指向性リガンドである。

【０２３０】

幾つかのリガンドは、エンドソーム性特性を有していてもよい。エンドソーム性リガンドは、エンドソームの溶解、及び／又は本発明の組成物若しくはその成分をエンドソームから細胞の細胞質に輸送することを促進する。エンドソーム性リガンドは、ｐＨ依存性の膜活性及び膜融合性を示すポリアニオン性ペプチド又はペプチド模倣体であってもよい。ある実施形態では、エンドソーム性リガンドは、エンドソームのｐＨでその活性立体構造をとると推定される。「活性」立体構造とは、エンドソーム性リガンドが、エンドソームの溶解、及び／又は本発明の組成物若しくはその成分をエンドソームから細胞の細胞質に輸送することを促進する立体構造である。例示的なエンドソーム性リガンドには、ＧＡＬＡペプチド（Ｓｕｂｂａｒａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９８７，２６：２９６４－２９７２）、ＥＡＬＡペプチド（Ｖｏｇｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１９９６，１１８：１５８１－１５８６）、及びそれらの誘導体（Ｔｕｒｋ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ，２００２，１５５９：５６－６８）が含まれる。ある実施形態では、エンドソーム性成分は、ｐＨの変化に応じて電荷又はプロトン化の変化を起こす化学基（例えば、アミノ酸）を含有していてもよい。エンドソーム性成分は、直鎖であってもよく又は分岐していてもよい。ペプチドに基づくエンドソーム性リガンドの例示的な一次配列は、表４に示されている。

【表３】

表４：エンドソーム性活性を有するペプチドのリスト。

名称	配列(NからC)	文献
GALA	AALEALAEALEALAEALEALAEAAAAGGC	1
EALA	AALAEALAEALAEALAEALAEALAAAAGGC	2
	ALEALAEALEALAEA	3
INF-7	GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG	4
Inf HA-2	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG	5
diINF-7	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC	5
diINF3	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC	6
GLF	GLFGALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAAGGSC	6
GALA-INF3	GLFEAIEGFIENGWEGLAEALAEALEALAAGGSC	6
INF-5	GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG K GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG	4

n、ノルロイシン

文献

1. Subbarao et al., Biochemistry, 1987, 26: 2964－2972.

2. Vogel et al., J. Am. Chem. Soc., 1996, 118: 1581－1586

3. Turk, M. J., Reddy, J. A. et al. (2002). Characterization of a novel pH－sensitive peptide that enhances drug release from folate－targeted liposomes at endosomal pHs. Biochim. Biophys. Acta 1559, 56－68.

4. Plank, C. Oberhauser, B. Mechtler, K. Koch, C. Wagner, E. (1994). The influence of endosome－disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus－like gene transfer systems, J. Biol. Chem. 269 129 18-12924.

5. Mastrobattista, E., Koning, G. A. et al. (2002). Functional characterization of an endosome－disruptive peptide and its application in cytosolic delivery of immunoliposome－entrapped proteins. J. Biol. Chem. 277, 27135－43.

6. Oberhauser, B., Plank, C. et al. (1995). Enhancing endosomal exit of nucleic acids using pH－sensitive viral fusion peptides. Deliv. Strategies Antisense Oligonucleotide Ther. 247－66.

【０２３１】

好ましいリガンドは、輸送、ハイブリダイゼーション、及び特異性の特性を向上するこ

とができ、その結果生じる天然若しくは修飾オリゴリボヌクレオチド、あるいは本明細書に記載されているモノマー及び／又は天然若しくは修飾リボヌクレオチドの任意の組合せを含むポリマー分子のヌクレアーゼ耐性を向上することもできる。

【０２３２】

リガンドは、一般的に、例えば取り込みを増強するための治療用修飾因子；診断用化合物又は例えば分布を監視するためのリポーター基；架橋剤；及びヌクレアーゼ耐性付与部分を含むことができる。一般的な例には、脂質、ステロイド、ビタミン、糖、タンパク質、ペプチド、ポリアミン、及びペプチド模倣体が含まれる。

【０２３３】

リガンドには、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）、高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）、又はグロブリン）などの天然物質；炭水化物（例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン、又はヒアルロン酸）；又は脂質が含まれていてもよい。また、リガンドは、合成ポリマー、例えば合成ポリアミノ酸、オリゴヌクレオチド（例えば、アプタマー）などの組換え又は合成分子であってもよい。ポリアミノ酸の例には、ポリリシン（ＰＬＬ）、ポリＬ－アスパラギン酸、ポリＬ－グルタミン酸、スチレン－マレイン酸無水物コポリマー、ポリ（Ｌ－ラクチド－コ－グリコリエド（ｇｌｙｃｏｌｉｅｄ））コポリマー、ジビニルエーテル－無水マレイン酸コポリマー、（Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドコポリマー（ＨＭＰＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリウレタン、ポリ（２－エチルアクリル酸）、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドコポリマー、又はポリホスファジンが含まれる。ポリアミンの例には、ポリエチレンイミン、ポリリシン（ＰＬＬ）、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、擬似ペプチド－ポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、陽イオン性脂質、陽イオン性ポルフィリン、ポリアミンの四級塩、又はアルファヘリックスペプチドが含まれる。

【０２３４】

リガンドは、標的指向性基、例えば細胞又は組織標的指向性作用剤、例えば腎臓細胞などの指定された細胞タイプに結合するレクチン、糖タンパク質、脂質、又はタンパク質、例えば抗体を含むこともできる。標的指向性基は、チロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントタンパク質Ａ、ムチン炭水化物、多価性ラクトース、多価性ガラクトース、Ｎ‐アセチルガラクトサミン、Ｎ－アセチル－グルコサミン（ｇｕｌｕｃｏｓａｍｉｎｅ）多価性マンノース、多価性フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価性ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタメート、ポリアスパルテート、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸エステル、ビタミンＢ１２、ビオチン、ＲＧＤペプチド、ＲＧＤペプチド模倣体、又はアプタマーであってもよい。表５には、標的指向性リガンド及びそれらの関連受容体の幾つかの例が示されている。

【表４】

表５：標的指向性リガンド及びそれらの関連受容体

肝細胞	リガンド	受容体
１）実質細胞（ＰＣ）（肝細胞）	ガラクトース	ＡＳＧＰ－Ｒ（アシオロ糖タンパク質受容体（Asiologlycoprotein receptor）
	ＧａｌＮＡｃ（ｎ－アセチル－ガラクトサミン	ＡＳＰＧ－Ｒ ＧａｌＮＡｃ受容体
	ラクトース	
	アシアロフェツイン	ASPG-r
２）シヌソイド内皮細胞（ＳＥＣ）	ヒアルロナン	ヒアルロナン受容体
	プロコラーゲン	プロコラーゲン受容体
	負荷電分子	スカベンジャー受容体
	マンノース	マンノース受容体
	Ｎ－アセチルグルコサミン	スカベンジャー受容体
	免疫グロブリン	Ｆｃ受容体
	LPS	ＣＤ１４受容体
	インスリン	受容体媒介性トランスサイトーシス
	トランスフェリン	受容体媒介性トランスサイトーシス
	アルブミン	非特異的
	糖－アルブミン結合体	
	マンノース－６－ホスフェート	マンノース－６－ホスフェート受容体
３）クッパー細胞（ＫＣ）	マンノース	マンノース受容体
	フコース	フコース受容体
	アルブミン	非特異的
	マンノース－アルブミン結合体	

【０２３５】

リガンドの他の例には、以下のものが含まれる：染料、挿入剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、プソラレン、マイトマイシンＣ）、ポルフィリン（ＴＰＰＣ４、テキサフィリン、サフィリン）、多環式芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ（例えば、ＥＤＴＡ）、親油性分子、例えばコレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、１－ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、１，３－ビス－Ｏ（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、１、３－プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、Ｏ３－（オレオイル）リトコール酸、Ｏ３－（オレオイル）コレン酸、ジメトキシトリチル、又はフェノキサジン）、及びペプチド結合体（例えば、アンテナペディアペプチド、Ｔａｔペプチド）、アルキル化剤、ホスフェート、アミ

ノ、メルカプト、ＰＥＧ（例えば、ＰＥＧ－４０Ｋ）、ＭＰＥＧ、［ＭＰＥＧ］$_2$、ポリアミノ、アルキル置換アルキル、放射性同位体標識マーカー、酵素、ハプテン（例えば、ビオチン）、輸送／吸収促進剤（例えば、アスピリン、ビタミンＥ、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン－イミダゾール結合体、テトラアザ大環状分子のＥｕ３＋複合体）、ジニトロフェニル、ＨＲＰ、又はＡＰ。

【０２３６】

リガンドは、タンパク質、例えば糖タンパク質、又はペプチド、例えば共リガンドに対する特異的親和性を有する分子、又は抗体、例えば癌細胞、内皮細胞、若しくは骨細胞などの指定された細胞タイプに結合する抗体であってもよい。また、リガンドには、ホルモン及びホルモン受容体が含まれていてもよい。また、それらには、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補助因子、多価性ラクトース、多価性ガラクトース、Ｎ‐アセチルガラクトサミン、Ｎ－アセチル－グルコサミン多価性マンノース、多価性フコース、又はアプタマーなどの非ペプチド種が含まれていてもよい。リガンドは、例えば、リポポリサッカリド、ｐ３８　ＭＡＰキナーゼの活性化因子、又はＮＦ－κＢの活性化因子であってもよい。

【０２３７】

リガンドは、例えば、細胞の細胞骨格を破壊することにより、例えば、細胞の微小管、微小繊維、及び／又は中間径フィラメントを破壊することにより、ｉＲＮＡ作用剤の細胞への取り込みを増加させることができる物質、例えば薬物であってもよい。薬物は、例えば、タキソン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャプラキノリド（ｊａｐｌａｋｉｎｏｌｉｄｅ）、ラトランクリンＡ、ファロイジン、スインホリドＡ、インダノシン、又はミオセルビン（ｍｙｏｓｅｒｖｉｎ）であってもよい。

【０２３８】

例えば、リガンドは、炎症反応を活性化することにより、ｉＲＮＡ作用剤の細胞への取り込みを増加させることができる。そのような効果有するだろう例示的なリガンドには、腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦａｌｐｈａ）、インターロイキン－１ベータ、又はガンマインターフェロンが含まれる。

【０２３９】

１つの態様では、リガンドは、脂質又は脂質に基づく分子である。そのような脂質又は脂質に基づく分子は、好ましくは血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）に結合する。ＨＳＡ結合リガンドは、結合体が、標的組織、例えば体内の非腎臓標的組織に分布することを可能にする。例えば、標的組織は、肝臓の実質細胞を含む肝臓であってもよい。ＨＳＡに結合することができる他の分子を、リガンドとして使用することもできる。例えば、ネプロキシン（ｎｅｐｒｏｘｉｎ）又はアスピリンを使用することができる。脂質又は脂質に基づくリガンドは、（ａ）結合体の分解に対する耐性を増加させることができ、（ｂ）標的細胞又は細胞膜に対する標的指向性及び輸送を増加させることができ、及び／又は（ｃ）血清タンパク質、例えばＨＳＡに対する結合を調節するために使用することができる。

【０２４０】

脂質に基づくリガンドは、標的組織に対する結合体の結合を調節、例えば制御するために使用することができる。例えば、ＨＳＡにより強く結合する脂質又は脂質に基づくリガンドは、腎臓を標的とする可能性はそれほどなく、したがって体内から除去される可能性もそれほどないだろう。ＨＳＡにそれほど強く結合しない脂質又は脂質に基づくリガンドは、結合体を腎臓に標的化するために使用することができる。

【０２４１】

好ましい実施形態では、脂質に基づくリガンドは、ＨＳＡに結合する。好ましくは、脂質に基づくリガンドは、結合体が好ましくは非腎臓組織に分布するように、十分な親和性でＨＳＡに結合する。しかしながら、親和性は、ＨＳＡ－リガンド結合が逆行できないほど強くないことが好ましい。

【０２４２】
別の好ましい実施形態では、脂質に基づくリガンドは、ＨＳＡに対して弱く結合するか又は全く結合せず、そのため結合体は、好ましくは腎臓に分布するだろう。腎臓細胞を標的とする他の部分も、脂質に基づくリガンドの代わり又はそれに加えて使用することができる。
【０２４３】
別の態様では、リガンドは、標的細胞、例えば増殖細胞によって取り込まれる部分、例えばビタミンである。これらは、例えば悪性又は非悪性タイプの望ましくない細胞増殖を特徴とする障害、例えば癌細胞を治療するのに特に有用である。例示的なビタミンには、ビタミンＡ、Ｅ、及びＫが含まれる。他の例示的なビタミンには、ビタミンＢ、例えば葉酸、Ｂ１２、リボフラビン、ビオチン、ピリドキサール、又は癌細胞により取り込まれる他のビタミン又は栄養素が含まれる。ＨＡＳ、低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）、及び高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）も含まれる。
【０２４４】
別の態様では、リガンドは、細胞浸透剤、好ましくはヘリックス型の細胞浸透剤である。好ましくは、作用剤は、両親媒性である。例示的な作用剤は、ｔａｔ又はアンテノペディア（ａｎｔｅｎｎｏｐｅｄｉａ）などのペプチドである。作用剤がペプチドである場合、ペプチジル模倣物質、逆転異性体、非ペプチド又は擬似ペプチド結合、及びＤ－アミノ酸の使用を含む修飾を施すことができる。好ましくは、ヘリックス型作用剤は、好ましくは親油性相及び疎油性相を有するアルファヘリックス作用剤である。
【０２４５】
リガンドは、ペプチド又はペプチド模倣物質であってもよい。ペプチド模倣物質（本明細書ではオリゴペプチド模倣物質とも呼ばれる）は、天然ペプチドに類似する明確な三次元構造にフォールディングすることが可能な分子である。ペプチド又はペプチド模倣部分は、約５～５０個のアミノ酸の長さ、例えば約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、又は５０個のアミノ酸の長さであってもよい（例えば、表６を参照）。

【表５】

表６．例示的な細胞浸透ペプチド

細胞浸透ペプチド	アミノ酸配列	文献
ペネトラチン	RQIKIWFQNRRMKWKK	Derossi et al., J. Biol. Chem. 269:10444, 1994
Ｔａｔ断片（４８～６０）	GRKKRRQRRRPPQC	Vives et al., J. Biol. Chem., 272:16010, 1997
シグナル配列に基づくペプチド	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	Chaloin et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 243:601, 1998
PVEC	LLIILRRRIRKQAHAHSK	Elmquist et al., Exp. Cell Res., 269:237, 2001
トランスポータン	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Pooga et al., FASEB J., 12:67, 1998
両親媒性モデルペプチド	KLALKLALKALKAALKLA	Oehlke et al., Mol. Ther., 2:339, 2000
Arg_9	RRRRRRRRR	Mitchell et al., J. Pept. Res., 56:318, 2000
細菌細胞壁浸透性	KFFKFFKFFK	
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	
セクロピンＰ１	SWLSKTAKKLENSAKKRISEGIAIAIQGGPR	
αーデフェンシン	ACYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC	
ｂーデフェンシン	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCCK	
バクテネシン（bactenecin）	RKCRIVVIRVCR	
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPGKR-NH2	
インドリシジン	ILPWKWPWWPWRR-NH2	

【０２４６】

ペプチド又はペプチド模倣物質は、例えば、細胞浸透ペプチド、陽イオン性ペプチド、両親媒性ペプチド、又は疎水性ペプチド（例えば、主としてＴｙｒ、Ｔｒｐ、又はＰｈｅで構成される）であってもよい。ペプチド部分は、デンドリマーペプチド、構造規制ペプチド、又は架橋ペプチドであってもよい。別の選択肢では、ペプチド部分は、疎水性膜移

行配列（ＭＴＳ）を含んでいてもよい。例示的な疎水性ＭＴＳ含有ペプチドは、アミノ酸配列ＡＡＶＡＬＬＰＡＶＬＬＡＬＬＡＰを有するＲＦＧＦである。疎水性ＭＴＳを含有するＲＦＧＦ類似体（例えば、アミノ酸配列ＡＡＬＬＰＶＬＬＡＡＰ）も、標的指向性部分であり得る。ペプチド部分は、ペプチド、オリゴヌクレオチド、及びタンパク質を含む大型極性分子を、細胞膜の向こう側に運搬することができる「送達」ペプチドであってもよい。例えば、ＨＩＶ　Ｔａｔタンパク質に由来する配列（ＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲＰＰＱ）及びショウジョウバエアンテナペディア（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　Ａｎｔｅｎｎａｐｅｄｉａ）タンパク質に由来する配列（ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ）は、送達ペプチドとして機能可能であることが見出されている。ペプチド又はペプチド模倣物質は、ファージディスプレイライブラリー又は１－ビーズ－１－化合物（ＯＢＯＣ）コンビナトリアルライブラリーから特定されたペプチドなどの、ＤＮＡのランダム配列によりコードされていてもよい。（Ｌａｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５４：８２－８４，１９９１）。好ましくは、組み込まれたモノマー単位によりｉＲＮＡ作用剤に結合されたペプチド又はペプチド模倣物質は、アルギニン－グリシン－アスパラギン酸（ＲＧＤ）－ペプチド又はＲＧＤ模倣体などの細胞標的指向性ペプチドである。ペプチド部分は、約５個のアミノ酸～約４０個のアミノ酸の長さの範囲であり得る。ペプチド部分は、安定性又は直接的な立体構造特性を増加させるなどの、構造修飾を有していてもよい。下記に記載されている構造修飾のいずれかを使用することができる。

【０２４７】

ＲＧＤペプチド部分は、内皮系腫瘍細胞又は乳癌腫瘍細胞などの腫瘍細胞を標的とするために使用することができる（Ｚｉｔｚｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６２：５１３９－４３，２００２）。ＲＧＤペプチドは、肺、腎臓、脾臓、又は肝臓を含む、様々な他の組織の腫瘍に対するｉＲＮＡ作用剤の標的化を容易にすることができる（Ａｏｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　８：７８３－７８７，２００１）。好ましくは、ＲＧＤペプチドは、腎臓に対するｉＲＮＡ作用剤の標的化を容易にするだろう。ＲＧＤペプチドは、直鎖であってもよく又は環式であってもよく、修飾されていてもよく、例えば、特定の組織に対する標的化を容易にするためにグリコシル化又はメチル化されていてもよい。例えば、グリコシル化ＲＧＤペプチドは、$\alpha_v\beta_3$を発現する腫瘍細胞にｉＲＮＡ作用剤を送達することができる（Ｈａｕｂｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊｏｕｒ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．，４２：３２６－３３６，２００１）。

【０２４８】

増殖細胞に豊富にあるマーカーを標的とするペプチドを使用することができる。例えば、ＲＧＤ含有ペプチド及びペプチド模倣物は、癌細胞、特に$\alpha_v\beta_3$インテグリンを提示する細胞を標的とすることができる。したがって、ＲＧＤペプチド、ＲＧＤを含有する環状ペプチド、Ｄ－アミノ酸を含有するＲＧＤペプチド、並びに合成ＲＧＤ模倣体を使用することができる。ＲＧＤに加えて、$\alpha_v\beta_3$インテグリンリガンドを標的とする他の部分を使用することができる。一般的に、そのようなリガンドは、増殖細胞及び血管新生（ａｎｇｉｏｇｅｎｅｉｓ）を制御するために使用することができる。ＰＥＣＡＭ－１、ＶＥＧＦ、又は他の癌遺伝子、例えば癌遺伝子を標的とするこのタイプのリガンドの好ましい結合体は、本明細書に記載されている。

【０２４９】

「細胞浸透ペプチド」は、細胞、例えば細菌細胞又は真菌細胞などの微生物細胞、又はヒト細胞などの哺乳動物細胞に浸透することが可能である。微生物細胞浸透ペプチドは、例えば、α－ヘリックス直鎖ペプチド（例えば、ＬＬ－３７又はセロピンＰ１（Ｃｅｒｏｐｉｎ　Ｐ１））、ジスルフィド結合含有ペプチド（例えば、α－デフェンシン、β－デフェンシン、又はバクテネシン（ｂａｃｔｅｎｅｃｉｎ））、又は１つ又は２つの支配的なアミノ酸のみを含有するペプチド（例えば、ＰＲ－３９又はインドリシジン）であってもよい。細胞浸透ペプチドは、核移行シグナル（ＮＬＳ）を含むこともできる。例えば、細胞浸透ペプチドは、ＨＩＶ－１　ｇｐ４１の融合ペプチドドメイン及びＳＶ４０大型Ｔ

抗原のＮＬＳに由来する、ＭＰＧなどの二分両親媒性ペプチドであってもよい。
【０２５０】
１つの実施形態では、ｉＲＮＡ作用剤及び／又は担体オリゴマーに結合された標的指向性ペプチドは、両親媒性α－ヘリックスペプチドであってもよい。例示的な両親媒性α－ヘリックスペプチドには、これらに限定されないが、以下のものが含まれる：セクロピン、リコトキシン（ｌｙｃｏｔｏｘｉｎ）、パラダキシン（ｐａｒａｄａｘｉｎ）、ブホリン、ＣＰＦ、ボンビニン－様ペプチド（ＢＬＰ）、カテリシジン、セラトトキシン（ｃｅｒａｔｏｔｏｘｉｎ）、Ｓ．クラバ（Ｓ．ｃｌａｖａ）ペプチド、メクラウナギ腸抗菌ペプチド（ＨＦＩＡＰ）、マガイニン（ｍａｇａｉｎｉｎｅ）、ブレビニン－２、デルマセプチン、メリチン、プレウロシジン、Ｈ２Ａペプチド、ツメガエル（Ｘｅｎｏｐｕｓ）ペプチド、エスクレンチニス－１（ｅｓｃｕｌｅｎｔｉｎｉｓ－１）、及びカエリン。好ましくは、多くの要因が、ヘリックス安定性の完全性を維持するとみななされるだろう。例えば、最大数のヘリックス安定化残基（例えば、ｌｅｕ、ａｌａ、又はｌｙｓ）が使用され、最小数のヘリックス不安定化残基（例えば、プロリン、又は環状モノマー単位）が使用されるだろう。キャッピング残基が考慮されるだろう（例えば、Ｇｌｙは、例示的なＮ－キャッピング残基であり、及び／又はＣ末端アミド化は、追加的なＨ－結合を提供してヘリックスを安定させるために使用することができる）。ｉ±３又はｉ±４の位置で隔てられている反対の電荷を有する残基間の塩橋形成は、安定性を提供することができる。例えば、リジン、アルギニン、ホモアルギニン、オルニチン、又はヒスチジンなどの陽イオン性残基は、陰イオン性残基であるグルタメート又はアスパルテートと塩橋を形成することができる。
【０２５１】
ペプチド及びペプチド模倣リガンドには、天然ペプチド又は修飾ペプチド、例えば、Ｄ又はＬペプチド；α、β、又はγペプチド；Ｎ－メチルペプチド；アザペプチド；１つ以上の尿素、チオ尿素、カルバメート、又はスルホニル尿素結合で置換されている１つ以上のアミド結合、つまりペプチド結合を有するペプチド；又は環状ペプチドを有するリガンドが含まれる。
【０２５２】
標的指向性リガンドは、特定の受容体を標的可能なあらゆるリガンドであり得る。その例は、葉酸エステル、ＧａｌＮＡｃ、ガラクトース、マンノース、マンノース－６Ｐ、ＧａｌＮＡｃクラスター、マンノースクラスター、ガラクトースクラスターなどの糖クラスター、又はアパタマー（ａｐａｔａｍｅｒ）である。クラスターは、複数の糖単位の組合せである。標的指向性リガンドには、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、ＰＳＭＡ、エンドセリン、ＧＣＰＩＩ、ソマトスタチン、ＬＤＬ及びＨＤＬリガンドも含まれる。また、リガンドは、核酸、例えばアプタマーに基づいていてもよい。アプタマーは、未修飾であってもよく、又は本明細書に開示されている修飾の任意の組合せを有していてもよい。
エンドソーム放出剤には、イミダゾール、ポリ又はオリゴイミダゾール、ＰＥＩ、ペプチド、膜融合性ペプチド、ポリカボキシレート（ｐｏｌｙｃａｂｏｘｙｌａｔｅ）、ポリアカチオン（ｐｏｌｙａｃａｔｉｏｎ）、マスクオリゴ又はポリカチオン又はアニオン、アセタール、ポリアセタール、ケタール／ポリケチアール（ｐｏｌｙｋｅｔｙａｌ）、オルトエステル、マスク又は非マスクカチオン又はアニオン電荷を有するポリマー、マスク又は非マスクカチオン又はアニオン電荷を有するデンドリマーが含まれる。
【０２５３】
ＰＫモジュレーターとは、薬物動態学的モジュレーターを表す。ＰＫモジュレーターには、脂肪親和物、胆汁酸、ステロイド、リン脂質類似体、ペプチド、タンパク質結合剤、ＰＥＧ、ビタミンなどが含まれる。例示的なＰＫモジュレーターには、これらに限定されないが、コレステロール、脂肪酸、コール酸、リトコール酸、ジアルキルグリセリド、ジアシルグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、ナプロキセン、イブプロフェン、ビタミンＥ、ビオチンなどが含まれる。多数のホスホロチオアート結合を含むオリゴヌクレオチ

ドも、血清タンパク質に結合することが知られており、したがって、骨格に複数のホスホロチオアート結合を含む短鎖オリゴヌクレオチド、例えば約５塩基、１０塩基、１５塩基、又は２０塩基のオリゴヌクレオチドも、リガンドとして（例えば、ＰＫ調節リガンドとして）本発明に適用可能である。

【０２５４】

加えて、血清成分（例えば、血清タンパク質）に結合するアプタマーも、ＰＫ調節リガンドとして本発明に適用可能である。

【０２５５】

本発明に適用可能な他のリガンドは、以下の文献に記載されている：２００４年８月１０日に出願された同時係属の米国特許出願第１０／９１６，１８５号；２００４年９月２１日に出願された米国特許出願第１０／９４６，８７３号；２００７年８月３日に出願された米国特許出願第１０／８３３，９３４号；２００５年４月２７日に出願された米国特許出願第１１／１１５，９８９号、及び２００７年１１月２１日に出願された米国特許出願第１１／９４４，２２７号、これらは、あらゆる目的のために参照によりこれらの全体が組み込まれる。

【０２５６】

複数のリガンドが存在する場合、リガンドは、全て同じ特性を有していてもよく、全てが異なる特性を有していてもよく、又は幾つかが異なる特性を有し、その一方で他のリガンドは同じ特性を有していてもよい。例えば、リガンドは、標的指向特性を有していてもよく、エンドソーム的活性を有していてもよく、又はＰＫ調節特性を有していてもよい。

【０２５７】

好ましい実施形態では、リガンドは全て異なる特性を有する。リガンドは、種々の場所で、例えば３’－末端、５’－末端、及び／又は内部位置で、オリゴヌクレオチドに結合させることができる。好ましい実施形態では、リガンドは、介在性テザーを介してオリゴヌクレオチドに結合している。成長しつつある鎖にモノマーが組み込まれる場合、リガンド又はテザーリガンドは、前記モノマーに存在してもよい。幾つかの実施形態では、リガンドは、「前駆体」モノマーが、成長しつつある鎖に組み込まれた後で、前記「前駆体」モノマーに結合されることにより組み込まれてもよい。例えば末端がアミノであるテザー（つまり、リガンドが結合されていない）、例えばＴＡＰ－（CH_2）$_n$$NH_2$を有するモノマーを、成長しつつあるセンス又はアンチセンス鎖に組み込むことができる。その後の作業で、つまり前駆体モノマーが鎖に組み込まれた後で、リガンドの求電子基を前駆体モノマーのテザーの末端求核基と結合させることにより、その後求電子基、例えばペンタフルオロフェニルエステル又はアルデヒド基を有するリガンドを前駆体モノマーに結合させることができる。

【０２５８】

二本鎖オリゴヌクレオチドの場合、リガンドは、一方又は両方の鎖に結合させることができる。幾つかの実施形態では、二本鎖ｉＲＮＡ作用剤は、センス鎖に結合されたリガンドを含有する。他の実施形態では、二本鎖ｉＲＮＡ作用剤は、アンチセンス鎖に結合されたリガンドを含有する。

【０２５９】

幾つかの実施形態では、リガンドは、核酸分子の核酸塩基、糖部分、又はヌクレオシド間結合に結合させることができる。プリン核酸塩基又はその誘導体に対する結合は、環内及び環外原子を含む任意の位置に生じてもよい。幾つかの実施形態では、プリン核酸塩基の２－、６－、７－、又は８位が、結合部分に結合している。また、ピリミジン核酸塩基又はその誘導体に対する結合は、任意の位置で生じてもよい。幾つかの実施形態では、ピリミジン核酸塩基の２－、５－、及び６位を、結合部分と置換することができる。ヌクレオシドの糖部分に対する結合は、任意の炭素原子で生じてもよい。結合部分に結合させることができる糖部分の炭素原子の例には、２’、３’、及び５’炭素原子が含まれる。脱塩基残基などの１’位も、結合部分に結合させることができる。ヌクレオシド間結合も、

結合部分を保持することができる。リン含有結合（例えば、ホスホジエステル、ホスホロチオアート、ホスホロジチオタート（ｐｈｏｓｐｈｏｒｏｄｉｔｈｉｏｔａｔｅ）、及びホスホロアミデートなど）の場合、結合部分は、リン原子に直接結合させることができるか、又はリン原子に結合しているＯ、Ｎ、又はＳ原子に結合させることができる。アミン又はアミド含有ヌクレオシド間結合（例えば、ＰＮＡ）の場合、結合部分は、アミン又はアミドの窒素原子に、又は隣接する炭素原子に結合させることができる。

【０２６０】

オリゴマー化合物の結合体を調製するための多数の方法が存在する。一般的に、オリゴマー化合物は、オリゴマー化合物の反応基（例えば、ＯＨ、ＳＨ、アミン、カルボキシル、及びアルデヒドなど）を、結合部分の反応基と接触させることにより、結合部分に結合される。幾つかの実施形態では、１つの反応基は求電子性であり、他方は求核性である。

【０２６１】

例えば、求電子基は、カルボニル含有官能性であってもよく、求核基は、アミン又はチオールであってもよい。核酸と、結合基を有する及び結合基を有しない関連オリゴマー化合物とを結合させるための方法は、例えば、Ｍａｎｏｈａｒａｎ ｉｎ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ, Ｃｒｏｏｋｅ ａｎｄ ＬｅＢｌｅｕ, ｅｄｓ., ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ, Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ, Ｆｌａ., １９９３, Ｃｈａｐｔｅｒ １７などの文献に詳細に記載されており、これは、参照により本明細書にその全体が組み込まれる。

【０２６２】

オリゴヌクレオチド結合体の調製を教示する代表的な米国特許には、これらに限定されないが、以下のものが含まれる：米国特許第４，８２８，９７９号；同第４，９４８，８８２号；同第５，２１８，１０５号；同第５，５２５，４６５号；同第５，５４１，３１３号；同第５，５４５，７３０号；同第５，５５２，５３８号；同第５，５７８，７１７，５，５８０，７３１号；同第５，５８０，７３１号；同第５，５９１，５８４号；同第５，１０９，１２４号；同第５，１１８，８０２号；同第５，１３８，０４５号；同第５，４１４，０７７号；同第５，４８６，６０３号；同第５，５１２，４３９号；同第５，５７８，７１８号；同第５，６０８，０４６号；同第４，５８７，０４４号；同第４，６０５，７３５号；同第４，６６７，０２５号；同第４，７６２，７７９号；同第４，７８９，７３７号；同第４，８２４，９４１号；同第４，８３５，２６３号；同第４，８７６，３３５号；同第４，９０４，５８２号；同第４，９５８，０１３号；同第５，０８２，８３０号；同第５，１１２，９６３号；同第５，２１４，１３６号；同第５，０８２，８３０号；同第５，１１２，９６３号；同第５，１４９，７８２号；同第５，２１４，１３６号；同第５，２４５，０２２号；同第５，２５４，４６９号；同第５，２５８，５０６号；同第５，２６２，５３６号；同第５，２７２，２５０号；同第５，２９２，８７３号；同第５，３１７，０９８号；同第５，３７１，２４１、同第５，３９１，７２３号；同第５，４１６，２０３号、同第５，４５１，４６３号；同第５，５１０，４７５号；同第５，５１２，６６７号；同第５，５１４，７８５号；同第５，５６５，５５２号；同第５，５６７，８１０号；同第５，５７４，１４２号；同第５，５８５，４８１号；同第５，５８７，３７１号；同第５，５９５，７２６号；同第５，５９７，６９６号；同第５，５９９，９２３号；同第５，５９９，９２８号；同第５，６７２，６６２号；同第５，６８８，９４１号；同第５，７１４，１６６号；同第６，１５３，７３７号；同第６，１７２，２０８号；同第６，３００，３１９号；同第６，３３５，４３４号；同第６，３３５，４３７号；同第６，３９５，４３７号；同第６，４４４，８０６号；同第６，４８６，３０８号；同第６，５２５，０３１号；同第６，５２８，６３１号；同第６，５５９，２７９号；これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０２６３】

核酸－脂質粒子の特徴

ある実施形態では、本発明は、核酸が脂質層内に封入されている脂質封入核酸粒子を生成するための方法及び組成物に関する。ｓｉＲＮＡオリゴヌクレオチドを組込むそのよう

な核酸－脂質粒子は、以下を含む様々な生物物理学的パラメーターを使用して特徴付けられる：（１）薬物対脂質比；（２）封入化効率；及び（３）粒径。高い薬物対脂質比、高い封入化効率、良好なヌクレアーゼ耐性及び血清安定性、並びに制御可能な粒径、一般的に２００ｎｍ未満の直径が望ましい。加えて、ヌクレアーゼ耐性を付与するための核酸修飾は、多くの場合、限定的な耐性を提供するに過ぎないものの、治療薬の費用に追加されるため、核酸ポリマーの性質は重要である。別様の記載がない限り、これらの基準は、本明細書では以下のように計算される。

【０２６４】

核酸対脂質比は、同じ容積中の脂質量で除算された明確な調製物容積中の核酸の量である。これは、１モル当たりのモル数、又は１重量当たりの重量、又は１モルあたりの重量に基づいていてもよい。最終的な投与準備済製剤の場合、核酸：脂質比は、透析、クロマトグラフィー、及び／又は酵素（例えば、ヌクレアーゼ）消化を使用して、外部核酸をできるだけ多く除去した後で計算される。

【０２６５】

封入化効率とは、最終的投与適格製剤の薬物対脂質比で除算された、開始混合物の薬物対脂質比を指す。これは相対的効率の尺度である。絶対的効率の尺度の場合、最終的には投与適格製剤となる開始混合物に添加された核酸の総量を計算することもできる。製剤プロセス中に失われた脂質量を計算することもできる。効率は、製剤の廃棄物及び費用の尺度である。

【０２６６】

サイズとは、形成された粒子のサイズ（直径）を示す。サイズ分布は、Ｎｉｃｏｍｐ社製３７０型サブマイクロメートル粒径測定器で準弾性光散乱（ＱＥＬＳ）を使用して決定することができる。新生物及び炎症部位などの血管新生化組織（漏出）組織に分布させるためには、２００ｎｍ未満の粒子が好ましい。

【０２６７】

医薬組成物

本発明の脂質粒子は、特に治療薬と結合している場合、例えば、投与経路及び標準的薬務に従って選択される、生理食塩水又はリン酸緩衝液などの薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、又は担体をさらに含む医薬組成物として製剤化することができる。

【０２６８】

特定の実施形態では、本発明の脂質－核酸粒子を含む医薬組成物は、標準的技術により調製され、薬学的に許容される担体をさらに含む。一般的に、通常の生理食塩水が、薬学的に許容される担体として使用されるだろう。他の好適な担体には、アルブミン、リポタンパク質、グロブリンなどの、安定性の増強のための糖タンパク質を含む、例えば、水、緩衝化水、０．９％生理食塩水、及び０．３％グリシンなどが含まれる。生理食塩水又は他の塩含有担体を含む組成物では、担体は、好ましくは脂質粒子形成後に添加される。したがって、脂質－核酸組成物が形成された後、組成物は、通常の生理食塩水などの薬学的に許容される担体で希釈することができる。

【０２６９】

その結果生じる医薬品は、従来の周知の滅菌技術により滅菌することができる。その後、水溶液を使用用に包装するか又は無菌条件下でろ過して凍結乾燥することができ、凍結乾燥された調製物は、投与前に無菌水溶液と混合される。組成物は、ｐＨ調整剤及び緩衝剤並びに浸透圧調整剤など、例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムなどの、生理学的条件を近似するために必要とされる薬学的に許容される補助物質を含有していてもよい。加えて、脂質懸濁液は、保管時にフリーラジカル及び脂質過酸化損傷から脂質を保護する脂質保護剤を含んでいてもよい。α－トコフェロール、及びフェリオキサミンなどの水溶性鉄特異的キレート剤などの親油性フリーラジカル失活剤が好適である。

【０２７０】

医薬製剤中の脂質粒子又は脂質－核酸粒子の濃度は、幅広く異なっていてもよく、つま

り、約０．０１％未満、通常は約０．０５～５％又は少なくとも約０．０５～５％から１０～３０重量％までであり、選択される特定の投与方法に従って、主として液量、粘性などにより選択されるだろう。例えば、濃度を増加させて、治療に伴う液体負荷を低下させることができる。これは、アテローム性動脈硬化に関連するうっ血性心不全又は重症高血圧有する患者に特に望ましい場合がある。あるいは、刺激性脂質で構成された複合体を低濃度に希釈して、投与部位の炎症を軽減することができる。１つの群の実施形態では、核酸には標識が結合されており、診断（相補的核酸の存在を示すことによる）に使用されるだろう。この場合、投与される複合体の量は、使用される特定の標識、診断する疾患状態、及び臨床医の判断に依存することになるが、一般的に、体重１キログラム当たり約０．０１～約５０ｍｇ、好ましくは体重１キログラム当たり約０．１～約５ｍｇだろう。

【０２７１】

上述のように、本発明の脂質－治療薬（例えば、核酸）粒子は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）修飾リン脂質、ＰＥＧ－セラミド、又はガングリオシドG_{M1}修飾脂質、又は凝集を防止若しくは制限するのに有効な他の脂質を含んでいてもよい。そのような成分の付加は、単に複合体凝集を防止するだけではない。むしろ、それは、循環寿命を増加させ、標的組織への脂質－核酸組成物の送達を増加させるための手段を提供することもできる。

【０２７２】

本発明は、キットの形態の脂質－治療薬組成物も提供する。キットは、典型的には、キットの種々の構成要素を収納するために区画化された容器で構成されるだろう。キットは、本発明の粒子又は医薬組成物を、好ましくは脱水又は濃縮形態で、それらの再水和又は希釈及び投与に関する説明書と共に含有するだろう。ある実施形態では、粒子は活性薬剤を含むが、他の実施形態では、粒子は活性薬剤を含まない。

【０２７３】

製造方法

本発明の方法及び組成物には、下記で又は添付の実施例に記載されている特定の陽イオン性脂質、合成、調製、及び特徴付けが使用される。加えて、本発明は、治療薬、例えば核酸に結合された脂質粒子を含む脂質粒子を調製する方法を提供する。本明細書に記載されている方法では、脂質の混合物を、核酸の緩衝水溶液と混合して、脂質粒子に封入された核酸を含有する中間混合物を生成し、封入された核酸は、約３重量％～約２５重量％、好ましくは５～１５重量％の核酸／脂質比で存在する。中間混合物は、随意にサイズ化されて、脂質部分が、好ましくは３０～１５０ｎｍ、より好ましくは約４０～９０ｎｍの直径を有する単層膜小胞である脂質－封入核酸粒子を取得することができる。その後、ｐＨを上昇させて、脂質－核酸粒子の表面電荷の少なくとも一部を中和し、したがって少なくとも部分的に表面中和された脂質－封入核酸組成物を提供する。

【０２７４】

上述のように、これらの陽イオン性脂質の幾つかは、アミノ基のｐＫａ未満のｐＨで荷電され、アミノ基のｐＫａを超えたｐＨでは実質的に中性であるアミノ脂質である。これらの陽イオン性脂質は、滴定可能な陽イオン性脂質と名付けられており、二段階プロセスを使用して本発明の製剤に使用することができる。最初に、脂質小胞は、核酸の存在下で滴定可能な陽イオン性脂質及び他の小胞成分を用いて、より低いｐＨで形成することができる。このようにして、小胞は、核酸を封入及び捕捉するだろう。次に、新しく形成された小胞の表面電荷は、滴定可能な陽イオン性脂質が示すｐＫａを超えるレベルに、つまり生理学的なｐＨ以上に、培地のｐＨを増加させることにより中和することができる。このプロセスの特に有利な態様には、あらゆる表面吸着核酸の容易な除去、及びその結果生じる中性表面を有する核酸送達媒体が両方とも含まれる。中性表面を有するリポソーム又は脂質粒子は、循環からの急速なクリアランスを回避し、陽イオン性リポソーム製剤に伴う特定の毒性を回避することが予測される。核酸－脂質粒子の製剤における、そのような滴定可能な陽イオン性脂質のこれらの使用に関するさらなる詳細は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第６，２８７，５９１号及び米国特許第６，８５８，２２５号に提

供されている。
【０２７５】
このようにして形成された小胞は、高含有量の核酸を有する均一小胞サイズの製剤を供給することがさらに注目される。加えて、小胞は、約３０～約１５０ｎｍ、より好ましくは約３０～約９０ｎｍの範囲のサイズを有する。
【０２７６】
任意の特定の理論により束縛されることを意図していないが、高効率の核酸封入化は、低ｐＨでの静電的相互作用の結果であると考えられる。酸性ｐＨ（例えば、ｐＨ４．０）では、小胞表面は、荷電されており、静電的相互作用により核酸の一部に結合する。外部酸性緩衝液が、より中性の緩衝液（例えば、ｐＨ７．５）と交換されると、脂質粒子又はリポソームの表面は中和され、あらゆる外部核酸の除去が可能になる。製剤プロセスに関するより詳細な情報は、種々の出版物に提供されている（例えば、米国特許第６，２８７，５９１号及び米国特許第６，８５８，２２５号）。
【０２７７】
上記を考慮して、本発明は、脂質／核酸製剤を調製する方法を提供する。本明細書に記載されている方法では、脂質の混合物を、核酸の緩衝水溶液と混合して、脂質粒子に封入された核酸を含有する中間混合物を生成し、例えば、封入された核酸は、約１０重量％～約２０重量％の核酸／脂質比で存在する。中間混合物は、随意にサイズ化されて、脂質部分が、好ましくは３０～１５０ｎｍ、より好ましくは約４０～９０ｎｍの直径を有する単層膜小胞である脂質－封入核酸粒子を取得することができる。その後、ｐＨを上昇させて、脂質－核酸粒子の表面電荷の少なくとも一部を中和し、したがって少なくとも部分的に表面中和された脂質－封入核酸組成物を提供する。
【０２７８】
ある実施形態では、脂質の混合物は、少なくとも２つの脂質成分：脂質がそのｐＫａ未満のｐＨで陽イオン性であり、そのｐＫａを超えるｐＨで中性であるようなｐＫａを有する脂質の中から選択される本発明の第１の脂質成分、及び脂質－核酸粒子形成中の粒子凝集を防止する脂質の中から選択される第２の脂質成分を含む。特定の実施形態では、アミノ脂質は、本発明の新規な陽イオン性脂質である。
【０２７９】
本発明の核酸－脂質粒子を調製する際、脂質混合物は、典型的には有機溶媒中の脂質溶液である。その後、この脂質の混合物は、水性緩衝液で水和してリポソームを形成させる前に、乾燥して薄膜を形成させるか又は凍結乾燥して粉末を形成させることができる。あるいは、好ましい方法では、脂質混合物は、エタノールなどの水混和性アルコール中に可溶化することができ、このエタノール性溶液を水性緩衝液に添加することにより、自発的なリポソーム形成がもたらされる。ほとんどの実施形態では、アルコールは、市販されている形態で使用される。例えば、エタノールは、無水エタノール（１００％）又は９５％エタノールとして使用することができ、残りは水である。この方法は、米国特許第５，９７６，５６７号でより詳細に記載されている。
【０２８０】
１つの例示的な実施形態では、脂質の混合物は、アルコール溶媒中の陽イオン性脂質、中性脂質（陽イオン性脂質以外）、ステロール（例えば、コレステロール）、及びＰＥＧ修飾脂質（例えば、ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）の混合物である。好ましい実施形態では、脂質混合物は、アルコール、より好ましくはエタノール中の陽イオン性脂質、中性脂質、コレステロール、及びＰＥＧ修飾脂質から本質的になる。さらなる好ましい実施形態では、第１の溶液は、上記脂質混合物からなり、モル比は、約２０～７０％陽イオン性脂質：５～４５％中性脂質：２０～５５％コレステロール：０．５～１５％ＰＥＧ修飾脂質である。またさらなる好ましい実施形態では、第１の溶液は、表１から選択される脂質、ＤＳＰＣ、Ｃｈｏｌ、及びＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡから本質的になり、モル比は、より好ましくは約２０～６０％陽イオン性脂質：５～２５％ＤＳＰＣ：２５～５５％Ｃｈｏｌ：０．５～１５％ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡである。特定の実施

形態では、脂質モル比は、およそ４０／１０／４０／１０（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）、３５／１５／４０／１０（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）、又は５２／１３／３０／５（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）である。別の群の実施形態では、これらの組成物中の中性脂質は、ＰＯＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＯＰＥ、又はＳＭと置換される。

【０２８１】

本発明によると、脂質混合物は、核酸を含有している場合がある緩衝水溶液と混合される。緩衝水溶液は、典型的には、緩衝液が脂質混合物中のプロトン化可能な脂質のｐＫａ未満のｐＨを有する溶液である。好適な緩衝剤の例には、クエン酸塩、リン酸塩、酢酸塩、及びＭＥＳが含まれる。特に好ましい緩衝液は、クエン酸緩衝液である。好ましい緩衝液では、核酸が封入される化学に応じて、陰イオンが１～１０００ｍＭの範囲にあり、緩衝液濃度の最適化は、高負荷レベルの達成に重要である場合がある（例えば、米国特許第６，２８７，５９１号及び米国特許第６，８５８，２２５号を参照）。あるいは、塩化物又は硫酸塩などでｐＨ５～６に酸性化された純水が、有用である場合がある。この場合、粒子を透析してエタノールを除去するか、ｐＨを増加させるか、又は通常の生理食塩水などの薬学的に許容される担体と混合した際に、粒子膜内外の浸透ポテンシャルの均衡を保つことになる５％グルコース又は別の非イオン性溶質を添加することが好適である場合がある。緩衝液中の核酸の量は異なっていてもよいが、典型的には、約０．０１ｍｇ／ｍＬ～約２００ｍｇ／ｍＬ、より好ましくは約０．５ｍｇ／ｍＬ～約５０ｍｇ／ｍＬだろう。

【０２８２】

脂質の混合物及び治療用核酸の緩衝水溶液を混合して、中間混合物を提供する。中間混合物は、典型的には封入化核酸を有する脂質粒子の混合物である。加えて、中間混合物は、脂質粒子表面での負荷電核酸と正荷電脂質とのイオン引力により脂質粒子（リポソーム又は脂質小胞）の表面に結合される幾らかの核酸を含有している場合もある（アミノ脂質又はプロトン化可能な第１の脂質成分を構成する他の脂質は、脂質のプロトン化可能な基のｐＫａ未満のｐＨを有する緩衝液中で正に荷電される）。１つの群の好ましい実施形態では、脂質の混合物は、脂質のアルコール溶液であり、溶液の各々の容積は、混合に際して、その結果生じるアルコール含有量が、約２０容積％～約４５容積％になるように調節される。混合物を混合する方法は、多様なプロセスのいずれかを含むことができ、生成される製剤の規模に依存することが多い。例えば、全容積が約１０～２０ｍＬ以下である場合、溶液は、試験管内で混合され、ボルテックスミキサーを使用して一緒に撹拌することができる。大規模プロセスは、好適な生産規模のガラス器具中で実施することができる。

【０２８３】

随意に、脂質混合物及び治療薬（核酸）の緩衝水溶液を混合することにより生成される脂質－封入化治療薬（例えば、核酸）複合体は、所望のサイズ範囲及び比較的狭い脂質粒径分布を達成するためにサイズ化することができる。好ましくは、本明細書で提供される組成物は、約７０～約２００ｎｍ、より好ましくは約９０～約１３０ｎｍの平均直径にサイズ化することができるだろう。リポソームを所望のサイズにサイズ化するのには、幾つかの技術が使用可能である。１つのサイズ化法は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第４，７３７，３２３号に記載されている。バス超音波処理又はプローブ超音波処理のいずれかによりリポソーム懸濁液を超音波処理することにより、約０．０５マイクロメートル未満のサイズの小さな単層膜小胞（ＳＵＶ）にまで斬新的にサイズを低減する。均質化は、大きなリポソームをより小さなものへと断片化するために煎断エネルギーに依存する別の方法である。典型的な均質化手順では、多重層膜小胞は、典型的には約０．１～０．５マイクロメートルの選択されたリポソームサイズが観察されるまで、標準的エマルジョンホモジナイザーをを再循環させる。両方法では、粒経分布は、従来のレーザー光線粒径決定法により監視することができる。本明細書のある方法の場合、均一小胞サイズを得るために押出法が使用される。

【０２８４】

小細孔のポリカーボネート膜又は非対称性セラミック膜を通してリポソーム組成物を押出することにより、比較的明確な粒径分布がもたらされる。典型的には、懸濁液は、所望のリポソーム複合体粒径分布が達成されるまで、１回又は複数回膜を通して循環される。リポソームを、連続的により小さな細孔膜を通して押出して、リポソームサイズの段階的低減を達成することができる。幾つかの場合、形成される脂質－核酸組成物は、いかなるサイズ化をすることなく使用することができる。

【０２８５】

特定の実施形態では、本発明の方法は、脂質－核酸組成物の脂質部分の表面電荷の少なくとも幾らかを中和するステップをさらに含む。少なくとも部分的に表面電荷を中和することにより、未封入化核酸は、脂質粒子表面から遊離し、従来技術を使用して組成物から除去することができる。好ましくは、未封入の表面吸着核酸は、その結果生じる組成物から緩衝液交換により除去される。例えば、クエン酸緩衝液（約ｐＨ４．０、組成物の形成に使用される）をＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水（ｐＨが約７．５のＨＢＳ）溶液に置換することにより、リポソーム表面の中和及び核酸の表面からの放出がもたらされる。その後、放出された核酸は、標準的方法を使用してクロマトグラフィーで除去することができ、その後使用される脂質のｐＫａを超えるｐＨを有する緩衝液へと切替えることができる。

【０２８６】

随意に、脂質小胞（つまり、脂質粒子）を、水性緩衝液中での水和により形成し、核酸の添加前に上述の方法のいずれかを使用してサイズ化することができる。上述のように、水性緩衝液は、アミノ脂質のｐＫａ未満のｐＨであるべきである。その後、これらのサイズ化され事前に形成された小胞に、核酸溶液を添加することができる。そのような「事前に形成された」小胞への核酸封入を可能にするために、混合物は、エタノールなどのアルコールを含有しているべきである。エタノールの場合、約２０％（重量／重量）～約４５％（重量／重量）の濃度で存在するべきである。加えて、事前に形成された小胞及び核酸の混合物を、水性緩衝液－エタノール混合物中で、脂質小胞の組成及び核酸の性質に応じて約２５℃～約５０℃の温度に加温することが必要な場合がある。当業者であれば、脂質小胞中に所望レベルの核酸を達成するための封入化プロセスの最適化には、エタノール濃度及び温度などの変数を操作することが必要であることは明白であろう。核酸封入化に好適な条件の例は、実施例において提供されている。核酸が事前に形成された小胞内に封入されれば、外部ｐＨを上昇させて、表面電荷を少なくとも部分的に中和することができる。その後、未封入の表面吸着核酸を、上述のように除去することができる。

【０２８７】

使用方法

本発明の脂質粒子は、インビトロ又はインビボで、治療薬を細胞に送達するために使用することができる。特定の実施形態では、治療薬は、本発明の核酸－脂質粒子を使用して、細胞に送達される核酸である。本発明の脂質粒子及び関連医薬組成物を使用する種々の方法に関する以下の記載は、核酸－脂質粒子に関する記載により例示されているが、これらの方法及び組成物は、そのような治療から利益を得る可能性のある任意の疾患又は障害を治療するための任意の治療薬の送達に容易に適合させることができることが理解される。

【０２８８】

ある実施形態では、本発明は、核酸を細胞に導入するための方法を提供する。細胞に導入するための好ましい核酸は、ｓｉＲＮＡ、免疫刺激オリゴヌクレオチド、プラスミド、アンチセンス、及びリボザイムである。これらの方法は、細胞内送達が生じるのに十分な期間、本発明の粒子又は組成物を細胞と接触させることにより実施することができる。

【０２８９】

本発明の組成物は、ほとんど全ての細胞タイプに吸着することができる。吸着すると、核酸－脂質粒子は、細胞の部分によりエンドシトーシスされるか、又は脂質を細胞膜と交換するか、又は細胞と融合するかのいずれかであり得る。複合体の核酸部分の移行又は取り込みは、これらの経路のいずれか１つを介して生じる場合がある。本発明の範囲に関す

る限定を意図してないが、エンドサイトーシスにより細胞に取り込まれる粒子の場合、粒子は、その後エンドソーム膜と相互作用し、恐らくは非二分子膜相の形成によりエンドソーム膜の不安定化をもたらし、細胞質への封入化核酸の導入をもたらすと考えられる。同様に、粒子が細胞原形質膜と直接融合する場合、融合が生じる際に、リポソーム膜が細胞膜に統合され、リポソームの内容物は細胞内液と混合する。細胞と脂質－核酸組成物との接触は、インビトロで実施される場合、生物学的に適合する培地中で生じるだろう。組成物の濃度は、特定の用途に応じて幅広く異なっていてもよいが、一般的に約１μモル～約１０ミリモルである。ある実施形態では、脂質－核酸組成物による細胞の処置は、一般的に、生理学的な温度（約３７℃）で、約１～２４時間の間、好ましくは約２～８時間実施されるだろう。インビトロ用途の場合、核酸の送達は、培養で増殖される任意の細胞に対してであってもよく、細胞は、植物由来又は動物由来でもよく、脊椎動物又は無脊髄動物由来でもよく、あらゆる組織又はタイプでもよい。好ましい実施形態では、細胞は、動物細胞であり、より好ましくは哺乳動物細胞であり、最も好ましくはヒト細胞であろう。

【０２９０】

１つの群の実施形態では、脂質－核酸粒子懸濁液は、約10^3～約10^5細胞／ｍＬ、より好ましくは約2×10^4細胞／ｍＬの細胞密度を有する、６０～８０％コンフルエントのプレーティングされた細胞に添加される。細胞に添加される懸濁液の濃度は、好ましくは約０．０１～２０μｇ／ｍＬ、より好ましくは約１μｇ／ｍＬである。

【０２９１】

別の実施形態では、本発明の脂質粒子は、細胞又は細胞系（例えば、腫瘍細胞系）に核酸を送達するために使用することができる。そのような細胞系の非限定的な例には、以下のものが含まれる：ＨＥＬＡ（ＡＴＣＣ Ｃａｔ Ｎ：ＣＣＬ－２）、ＫＢ（ＡＴＣＣ Ｃａｔ Ｎ：ＣＣＬ－１７）、ＨＥＰ３Ｂ（ＡＴＣＣ Ｃａｔ Ｎ：ＨＢ－８０６４）、ＳＫＯＶ－３（ＡＴＣＣ Ｃａｔ Ｎ：ＨＴＢ－７７）、ＨＣＴ－１１６（ＡＴＣＣ Ｃａｔ Ｎ：ＣＣＬ－２４７）、ＨＴ－２９（ＡＴＣＣ Ｃａｔ Ｎ：ＨＴＢ－３８）、ＰＣ－３（ＡＴＣＣ Ｃａｔ Ｎ：ＣＲＬ－１４３５）、Ａ５４９（ＡＴＣＣ Ｃａｔ Ｎ：ＣＣＬ－１８５）、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１（ＡＴＣＣ Ｃａｔ Ｎ：ＨＴＢ－２６）。

【０２９２】

典型的な用途には、ｓｉＲＮＡの細胞内送達を提供するための周知の手順を使用して、特定の細胞標的をノックダウン又はサイレンシングさせることが含まれる。あるいは、用途には、治療上有用なポリペプチドをコードするＤＮＡ又はｍＲＮＡ配列の送達が含まれる。このようにして、欠損遺伝子産物を供給することによる遺伝病又は遺伝子産物を供給しないことによる遺伝病（つまり、デュシェンヌ型ジストロフィーについては、Ｋｕｎｋｅｌ，ｅｔａｌ．，Ｂｒｉｔ．Ｍｅｄ．Ｂｕｌｌ．４５（３）：６３０－６４３（１９８９）を参照、及び嚢胞性線維症については、Ｇｏｏｄｆｅｌｌｏｗ，Ｎａｔｕｒｅ ３４１：１０２－１０３（１９８９）を参照）の治療が提供される。本発明の組成物の他の使用には、細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することが含まれる（Ｂｅｎｎｅｔｔ，ｅｔａｌ．，Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍ．４１：１０２３－１０３３（１９９２）を参照）。

【０２９３】

あるいは、本発明の組成物は、当業者に公知の方法を使用して、インビボで核酸を細胞に送達するために使用することもできる。ＤＮＡ又はｍＲＮＡ配列の送達に関しては、ＤＯＴＭＡ－ＤＯＰＥ複合体を使用した、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）－クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）発現プラスミドの静脈内送達が、参照により本明細書に組み込まれるＺｈｕ，ｅｔａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６１：２０９－２１１（１９９３）に記載されている。参照により本明細書に組み込まれるＨｙｄｅ，ｅｔａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３６２：２５０－２５６（１９９３）には、リポソームを使用した、マウスの肺気道上皮及び肺胞への嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス調節因子（ＣＦＴＲ）遺伝子送達が記載されている。参照により本明細書に組み込まれるＢｒｉｇｈａｍ，ｅｔａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｓｃｉ．２９８：２

７８－２８１　（１９８９）には、細胞内酵素であるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）をコードする機能性原核生物遺伝子によるマウス肺のインビボ形質移入が記載されている。したがって、本発明の組成物は、感染症の治療に使用することができる。

【０２９４】

インビボ投与の場合、医薬組成物は、好ましくは非経口的に、つまり関節内、静脈内、腹腔内、皮下、又は筋肉内に投与される。特定の実施形態では、医薬組成物は、ボーラス注射により静脈内に又は腹腔内に投与される。一例としては、参照により本明細書に組み込まれるＳｔａｄｌｅｒらの米国特許第５，２８６，６３４号を参照されたい。細胞内核酸送達は、Ｓｔｒａｕｂｒｉｎｇｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ．１０１：５１２－５２７（１９８３）；Ｍａｎｎｉｎｏ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ６：６８２－６９０（１９８８）；Ｎｉｃｏｌａｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒ．Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔ．６：２３９－２７１（１９８９）、及びＢｅｈｒ，Ａｃｃ．Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．２６：２７４－２７８（１９９３）でも考察されている。脂質に基づく治療薬を投与するさらに他の方法は、例えば、Ｒａｈｍａｎら、米国特許第３，９９３，７５４号；Ｓｅａｒｓ、米国特許第４，１４５，４１０号；Ｐａｐａｈａｄｊｏｐｏｕｌｏｓら、米国特許第４，２３５，８７１号；Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ、米国特許第４，２２４，１７９号；Ｌｅｎｋら、米国特許第４，５２２，８０３号；及びＦｏｕｎｔａｉｎｓら、米国特許第４，５８８，５７８号に記載されている。

【０２９５】

他の方法では、医薬品は、製剤を組織に直接適用することにより標的組織と接触させてもよい。適用は、局所的、「開放」、又は「閉鎖」術式でなされてもよい。「局所的」とは、皮膚、口腔咽頭、及び外耳道などの環境に曝されている組織に、医薬品を直接的に適用することを意味する。「開放」術式は、患者の皮膚を切開し、医薬品を適用する下層組織を直接視覚化することを含む術式である。これには、一般的に、肺に接近する開胸術、腹部臓器に接近する腹式開腹術、又は標的組織への他の直接的な外科的接近などの外科手術により達成される。「閉鎖」術式は、内部標的組織は直接視覚化されないが、皮膚の小さな創傷を通して器具を挿入することにより接近する侵襲的術式である。例えば、製剤は、針洗浄により腹膜に投与することができる。同様に、医薬品は、腰椎穿刺され、その後脊髄麻酔又は脊髄のメトラザミド（ｍｅｔｒａｚａｍｉｄｅ）画像診断のために一般的に実施される患者の適切な体位取り中に、点滴により髄膜又は脊髄に投与することができる。あるいは、製剤は、内視鏡検査デバイスを通して投与することができる。

【０２９６】

脂質－核酸組成物は、肺に吸入されるエアロゾルで（Ｂｒｉｇｈａｍ，ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｓｃｉ．２９８（４）：２７８－２８１（１９８９）を参照）、又は疾患部位への直接注射により（Ｃｕｌｖｅｒ，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ，ＭａｒｙＡｎｎ Ｌｉｅｂｅｒｔ，Ｉｎｃ．，Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ．ｐｐ．７０－７１（１９９４））投与することもできる。

【０２９７】

本発明の方法は、様々な宿主で実施することができる。好ましい宿主には、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、及びヒツジなどの哺乳動物種が含まれる。

【０２９８】

本発明の脂質－治療薬粒子の用量は、脂質対する治療薬の比率、及び患者の年齢、体重、状態に基づく投薬医師の見解に依存するだろう。

【０２９９】

１つの実施形態では、本発明は、標的ポリヌクレオチド又はポリペプチドの発現を調節する方法を提供する。これらの方法は、一般的に、標的ポリヌクレオチド又はポリペプチドの発現を調節可能な核酸に結合している本発明の脂質粒子と細胞を接触させることを含

む。本明細書で使用されるとき、「調節する」という用語は、標的ポリヌクレオチド又はポリペプチドの発現を変更することを指す。異なる実施形態では、調節は、増加又は増強を意味していてもよく、又は減少若しくは低減を意味していてもよい。標的ポリヌクレオチド又はポリペプチドの発現レベルを測定する方法は、当該技術分野において公知及び使用可能であり、それらには、例えば逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）及び免疫組織化学的技術を使用する方法が含まれる。特定の実施形態では、標的ポリヌクレオチド又はポリペプチドの発現レベルは、適切な対照値と比較して、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、又は５０％を超えて増加又は低減される。

【０３００】

例えば、ポリペプチド発現の増加が望ましい場合、核酸は、所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターであってもよい。他方で、ポリヌクレオチド又はポリペプチド発現の低減が望ましい場合、核酸は、例えば、標的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズし、それにより標的ポリヌクレオチド又はポリペプチドの発現を妨害するポリヌクレオチド配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ、又はマイクロＲＮＡであってもよい。あるいは、核酸は、そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ、又はマイクロＲＮＡを発現するプラスミドであってもよい。

【０３０１】

１つの特定の実施形態では、本発明は、細胞によるポリペプチドの発現を調節する方法であって、表１から選択される脂質、ＤＳＰＣ、Ｃｈｏｌ、及びＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡからなる又は本質的にからなる、例えば、モル比が約２０～６０％陽イオン性脂質：５～２５％ＤＳＰＣ：２５～５５％Ｃｈｏｌ：０．５～１５％ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡである脂質粒子を、細胞に提供することを含み、脂質粒子が、ポリペプチドの発現を調節可能な核酸と結合している方法を提供する。特定の実施形態では、脂質モル比は、およそ４０／１０／４０／１０（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）、３５／１５／４０／１０（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）、又は５２／１３／３０／５（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）である。別の群の実施形態では、これらの組成物中の中性脂質は、ＰＯＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＯＰＥ、又はＳＭと置換される。

【０３０２】

特定の実施形態では、治療薬は、ｓｉＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、及びｓｉＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現可能なプラスミドから選択され、ｓｉＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、又はアンチセンスＲＮＡは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと特異的に結合し、そのためポリペプチドの発現が低減されるポリヌクレオチド又はその相補体を含む。

【０３０３】

他の実施形態では、核酸は、ポリペプチド又はその機能的変異体若しくは断片をコードするプラスミドであり、そのためポリペプチド又はその機能的変異体若しくは断片の発現が増加される。

【０３０４】

関連実施形態では、本発明は、対象体でポリペプチドが過剰発現されることを特徴とする疾患又は障害を治療する方法であって、対象体に、本発明の医薬組成物を提供することを含み、治療薬が、ｓｉＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、及びｓｉＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現可能なプラスミドから選択され、ｓｉＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、又はアンチセンスＲＮＡが、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと特異的に結合するポリヌクレオチド又はその相補体を含む方法を含む。

【０３０５】

１つの実施形態では、医薬組成物は、表１から選択される脂質、ＤＳＰＣ、Ｃｈｏｌ、

及びＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡからなるか又は本質的にからなる、例えば、モル比が約２０～６０％陽イオン性脂質：５～２５％ＤＳＰＣ：２５～５５％Ｃｈｏｌ：０．５～１５％ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡである脂質粒子を含み、脂質粒子は、治療用核酸と結合している。特定の実施形態では、脂質モル比は、およそ４０／１０／４０／１０（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）、３５／１５／４０／１０（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）、又は５２／１３／３０／５（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）である。別の群の実施形態では、これらの組成物中の中性脂質は、ＰＯＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＯＰＥ、又はＳＭと置換される。

【０３０６】

別の関連実施形態では、本発明は、対象体でポリペプチドが過小発現されることを特徴とする疾患又は障害を治療する方法であって、対象体に、本発明の医薬組成物を提供することを含み、治療薬が、ポリペプチド又はその機能的変異体若しくは断片をコードするプラスミドである方法を含む。

【０３０７】

１つの実施形態では、医薬組成物は、表１から選択される脂質、ＤＳＰＣ、Ｃｈｏｌ、及びＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡからなるか又は本質的にからなる、例えば、モル比が約２０～６０％陽イオン性脂質：５～２５％ＤＳＰＣ：２５～５５％Ｃｈｏｌ：０．５～１５％ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡである脂質粒子を含み、脂質粒子は、治療用核酸と結合している。特定の実施形態では、脂質モル比は、およそ４０／１０／４０／１０（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）、３５／１５／４０／１０（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）、又は５２／１３／３０／５（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）である。別の群の実施形態では、これらの組成物中の中性脂質は、ＰＯＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＯＰＥ、又はＳＭと置換される。

【０３０８】

本発明は、対象体において免疫応答を誘導する方法であって、対象体に、本発明の医薬組成物を提供することを含み、治療薬が免疫賦活化オリゴヌクレオチドである方法をさらに提供する。ある実施形態では、免疫応答は、体液性又は粘膜性免疫応答である。１つの実施形態では、医薬組成物は、表１から選択される脂質、ＤＳＰＣ、Ｃｈｏｌ、及びＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡからなるか又は本質的にからなる、例えば、モル比が約２０～６０％陽イオン性脂質：５～２５％ＤＳＰＣ：２５～５５％Ｃｈｏｌ：０．５～１５％ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡである脂質粒子を含み、脂質粒子は、治療用核酸と結合している。特定の実施形態では、脂質モル比は、およそ４０／１０／４０／１０（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）、３５／１５／４０／１０（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）、又は５２／１３／３０／５（モル％　陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／Ｃｈｏｌ／ＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ＤＭＡ）である。別の群の実施形態では、これらの組成物中の中性脂質は、ＰＯＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＯＰＥ、又はＳＭと置換される。

【０３０９】

さらなる実施形態では、医薬組成物は、ワクチン又は抗原と組み合わせて対象体に提供される。したがって、本発明はそれ自体が、免疫賦活化オリゴヌクレオチドを含み、免疫応答が望まれる抗原に結合もされている本発明の脂質粒子を含むワクチンを提供する。特定の実施形態では、抗原は、腫瘍抗原であるか、又は感染体、例えばウイルス、細菌、又は寄生虫などに関連している。

【０３１０】

様々な腫瘍抗原、感染体抗原、及び他の疾患に関連する抗原は、当該技術分野で周知であり、これらの例は、本明細書に引用されている文献に記載されている。本発明で使用す

るのに好適な抗原の例には、これらに限定されないが、ポリペプチド抗原及びＤＮＡ抗原が含まれる。抗原の具体的な例は、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、天然痘、ポリオ、炭疽菌、インフルエンザ、チフス、破傷風、麻疹、ロタウイルス、ジフテリア、百日咳、結核、及び風疹抗原である。好ましい実施形態では、抗原は、Ｂ型肝炎の組換え抗原である。他の態様では、抗原は、Ａ型肝炎の組換え抗原である。別の態様では、抗原は、腫瘍抗原である。そのような腫瘍関連抗原の例は、ＭＵＣ－１、ＥＢＶ抗原、及びバーキットリンパ腫関連抗原である。さらなる態様では、抗原は、チロシナーゼ関連タンパク質腫瘍抗原組換え抗原である。当業者であれば、本発明で使用するのに好適な他の抗原を知っているだろう。

【０３１１】

本主題発明で使用するのに好適な腫瘍関連抗原には、単一の腫瘍タイプを示す場合があり、幾つかのタイプの腫瘍に共有されている場合があり、及び／又は正常細胞と比較して腫瘍細胞で排他的に発現又は過剰表現される場合がある突然変異分子及び非突然変異分子が両方とも含まれる。タンパク質及び糖タンパク質に加えて、炭水化物、ガングリオシド、糖脂質、及びムチンの発現の腫瘍特異的パターンも記載されている。本主題癌ワクチンに使用するための例示的な腫瘍関連抗原には、腫瘍細胞に特有な突然変異又は再編成を有する癌遺伝子、癌抑制遺伝子、及び他の遺伝子のタンパク質産物、再活性化胚遺伝子産物、腫瘍胎児性抗原、組織特異的（しかし、腫瘍特異的ではない）分化抗原、成長因子受容体、細胞表面炭水化物残基、外来性ウイルスタンパク質、及び多数の他の自己タンパク質が含まれる。

【０３１２】

腫瘍関連抗原の具体的な実施形態には、以下のものが含まれる：例えば、Ｒａｓ　ｐ２１癌原遺伝子、腫瘍抑制因子ｐ５３、及びＢＣＲ－ａｂｌ癌遺伝子、並びにＣＤＫ４、ＭＵＭ１、カスパーゼ８、及びベータカテニンのタンパク質産物などの突然変異抗原；ガレクチン４、ガレクチン９、炭酸脱水酵素、アルドラーゼＡ、ＰＲＡＭＥ、Ｈｅｒ２／ｎｅｕ、ＥｒｂＢ－２、及びＫＳＡなどの過剰発現抗原、アルファフェトプロテイン（ＡＦＰ）、ヒト絨毛膜性生殖腺刺激ホルモン（ｈＣＧ）などの腫瘍胎児性抗原；Ｍａｒｔ　１／Ｍｅｌａｎ　Ａ、ｇｐ１００、ｇｐ７５、チロシナーゼ、ＴＲＰ１、及びＴＲＰ２などの癌胎児抗原（ＣＥＡ）及びメラノサイト分化抗原などの自己抗原；ＰＳＡ、ＰＡＰ、ＰＳＭＡ、ＰＳＭ－Ｐ１、及びＰＳＭ－Ｐ２などの前立腺関連抗原；ＭＡＧＥ１、ＭＡＧＥ３、ＭＡＧＥ４、ＧＡＧＥ１、ＧＡＧＥ２、ＢＡＧＥ、ＲＡＧＥ、及びＮＹ－ＥＳＯ１、ＳＳＸ２、及びＳＣＰ１などの他の癌精巣抗原などの再活性化胚遺伝子産物；Ｍｕｃ－１及びＭｕｃ－２などのムチン；ＧＭ２、ＧＤ２、及びＧＤ３などのガングリオシド、Ｌｅｗｉｓ（ｙ）及びｇｌｏｂｏ－Ｈなどの中性糖脂質及び糖タンパク質；並びにＴｎ、Ｔｈｏｍｐｓｏｎ－Ｆｒｅｉｄｅｎｒｅｉｃｈ抗原（ＴＦ）、及びｓＴｎなどの糖タンパク質。また、本明細書に腫瘍関連抗原として含まれるのは、全細胞及び腫瘍細胞溶解産物、並びにその免疫原性部分、並びにＢ細胞リンパ腫に対して使用するための、Ｂリンパ球の単クローン増殖で発現される免疫グロブリンイディオタイプである。

【０３１３】

病原体には、これらに限定されないが、哺乳動物、より具体的にはヒトに感染する感染因子、例えばウイルスが含まれる。感染性ウイルスの例に、これらに限定されないが、以下のものが含まれる：レトロウイルス科（例えば、ＨＩＶ－１などのヒト免疫不全ウイルス（ＨＴＬＶ－ＩＩＩ、ＬＡＶ、又はＨＴＬＶ－ＩＩＩ／ＬＡＶ、又はＨＩＶ－ＩＩＩとも呼ばれる；及びＨＩＶ－ＬＰなどの他の分離株）；ピコルナウイルス科（例えば、ポリオウイルス、Ａ型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；カルシウイルス科（例えば、胃腸炎を引き起こす菌株）；トガウイルス科（例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；フラウイルス科（Ｆｌａｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、デング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；コロノウイルス科（Ｃｏｒｏｎｏｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、コロナウイルス）；ラブドウイルス科（Ｒｈａｂｄｏｖｉｒａｄａｅ）（例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；コロナウイルス科（例えば、コロナウイルス）；ラブドウイルス科（例えば、水疱

性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；フィロウイルス科（例えば、エボラウイルス）；パラミクソウイルス科（例えば、パラインフルエンザウイルス、おたふくかぜウイルス、はしかウイルス、ＲＳウイルス）；オルトミクソウイルス科（例えば、インフルエンザウイルス）；ブンガウイルス科（Ｂｕｎｇａｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、ハンタウイルス、ブンガウイルス、フレボウイルス、及びナイロウイルス）；アレナウイルス科（出血熱ウイルス）；レオウイルス科（例えば、レオウイルス、オルビウイルス、及びロタウイルス）；ビルナウイルス科；ヘパドナウイルス科（Ｂ型肝炎ウイルス）；パルボウイルス科（パルボウイルス）；パポバウイルス科（パピローマウイルス、ポリオーマウイルス）；アデノウイルス科（ほとんどのアデノウイルス）；ヘルペスウイルス科単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）１及び２、帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ヘルペスウイルス；ポックスウイルス科（痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス）；及びイリドウイルス科（例えば、アフリカブタコレラウイルス）；及び分類不能なウイルス（例えば、海綿状脳症の原因菌、デルタ肝炎（Ｂ型肝炎ウイルスの欠損付随体であると考えられる）の原因菌、非Ａ型、非Ｂ型肝炎の原因菌（クラスＩ＝内部的に伝染；クラス２＝非経口的に伝染（つまり、Ｃ型肝炎））；ノーウォーク及び関連ウイルス、並びにアストロウイルス）。

【０３１４】

また、グラム陰性菌及びグラム陽性菌は、脊椎動物の抗原として役立つ。そのようなグラム陽性菌には、これらに限定されないが、パスツレラ（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ）種、ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｉ）種、及びストレプトコッカス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）種が含まれる。グラム陰性細菌には、これらに限定されないが、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）種、及びサルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）種が含まれる。感染性細菌の具体的な例には、これらに限定されないが、以下のものが含まれる：ヘリコバクター・ピロリ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒｐｙｌｏｒｉｓ）、ボレリア・ブルグドルフェリ（Ｂｏｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）、レジュネラ・ニューモフィラ菌（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌｉａ）、ミコバクテリア（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉａ）種（例えば、結核菌（Ｍ. ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、Ｍ. アビウム（Ｍ. ａｖｉｕｍ）、Ｍ. イントラセルラーレ（Ｍ. ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒｅ）、Ｍ. カンサイ（Ｍ. ｋａｎｓａｉｉ）、Ｍ. ゴルドナエ（Ｍ. ｇｏｒｄｏｎａｅ））、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）、淋菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）、ナイセリア・メニンギティディス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、リステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）、化膿連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）（Ａ群ストレプトコッカス属）、ストレプトコッカス・アガラクティエ（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅ）（Ｂ群ストレプトコッカス属）、ストレプトコッカス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）（ビリダンス（ｖｉｒｉｄａｎｓ）群）、糞便連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓｆａｅｃａｌｉｓ）、ストレプトコッカス・ボビス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｂｏｖｉｓ）、ストレプトコッカス属（嫌気性種）、肺炎連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、病原性カンピロバクター（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）種）、エンテロコッカス種（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）、ヘモフィルス・インフルエンザ（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｕｅｎｚａｅ）、バチルス・アントラシス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｎｔｒａｃｉｓ）、コリネバクテリウム・ジフテリエ（ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａｅ）、コリネバクテリウム種、ブタ丹毒菌（Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ ｒｈｕｓｉｏｐａｔｈｉａｅ）、クロストリジウム・パーフリンガース（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｒｓ）、破傷風菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｔｅｔａｎｉ）、エンテロバクター・エロゲネス（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ａｅｒｏｇｅｎｅｓ）、肺炎桿菌（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、パスツレラ・マルトシダ（Ｐａｓｔｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ）、バクテロイデス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ）種、フソバクテリウム

・ヌクレアタム（Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｎｕｃｌｅａｔｕｍ）、ストレプトバシラス－モリニフオルミス（Ｓｔｒｅｐｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｉｓ）、トレポネーマ・パリジウム（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐａｌｌｉｄｉｕｍ）、フランベジアトレポネーマ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐｅｒｔｅｎｕｅ）、レプトスピラ（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ）、リケッチア（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ）、及びアクチノミセス・イスラエリ（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓ ｉｓｒａｅｌｌｉ）。

【０３１５】

病原体のさらなる例には、これらに限定されないが、哺乳動物、より具体的にはヒトに感染する感染性真菌が含まれる。感染性真菌の例には、これらに限定されないが、以下のものが含まれる：クリプトコックス・ネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）、ヒストプラスマ・カプスラーツム（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｓｕｌａｔｕｍ）、コクシジオイデス・イミチス（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｉｍｍｉｔｉｓ）、ブラストミセス・デルマティティディス（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ ｄｅｒｍａｔｉｔｉｄｉｓ）、クラミジア・トラコマーティス（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）。感染性寄生虫の例には、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ）、及び三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）などのマラリア原虫が含まれる。他の感染性生物（つまり、原生生物）には、トキソプラズマ・ゴンディ（Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ ｇｏｎｄｉｉ）が含まれる。

１つの実施形態では、本発明の製剤は、これらに限定されないが、以下のものを含む標的遺伝子をサイレンシング又は調節するために使用することができる：ＦＶＩＩ、Ｅｇ５、ＰＣＳＫ９、ＴＰＸ２、ａｐｏＢ、ＳＡＡ、ＴＴＲ、ＲＳＶ、ＰＤＧＦベータ遺伝子、Ｅｒｂ－Ｂ遺伝子、Ｓｒｃ遺伝子、ＣＲＫ遺伝子、ＧＲＢ２遺伝子、ＲＡＳ遺伝子、ＭＥＫＫ遺伝子、ＪＮＫ遺伝子、ＲＡＦ遺伝子、Ｅｒｋ１／２遺伝子、ＰＣＮＡ（ｐ２１）遺伝子、ＭＹＢ遺伝子、ＪＵＮ遺伝子、ＦＯＳ遺伝子、ＢＣＬ－２遺伝子、サイクリンＤ遺伝子、ＶＥＧＦ遺伝子、ＥＧＦＲ遺伝子、サイクリンＡ遺伝子、サイクリンＥ遺伝子、ＷＮＴ－１遺伝子、ベーターカテニン遺伝子、ｃ－Ｍｅｔ遺伝子、ＰＫＣ遺伝子、ＮＦＫＢ遺伝子、ＳＴＡＴ３遺伝子、サバイビン遺伝子、Ｈｅｒ２／Ｎｅｕ遺伝子、ＳＯＲＴ１遺伝子、ＸＢＰ１遺伝子、トポイソメラーゼＩ遺伝子、トポイソメラーゼＩＩアルファ遺伝子、ｐ７３遺伝子、ｐ２１（ＷＡＦ１／ＣＩＰ１）遺伝子、ｐ２７（ＫＩＰ１）遺伝子、ＰＰＭ１Ｄ遺伝子、ＲＡＳ遺伝子、カベオリンＩ遺伝子、ＭＩＢ　Ｉ遺伝子、ＭＴＡＩ遺伝子、Ｍ６８遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、ｐ５３腫瘍抑制遺伝子、ｐ５３ファミリーメンバーＤＮ－ｐ６３、ｐＲｂ腫瘍抑制遺伝子、ＡＰＣ１腫瘍抑制遺伝子、ＢＲＣＡ１腫瘍抑制遺伝子、ＰＴＥＮ腫瘍抑制遺伝子、ｍＬＬ融合遺伝子、ＢＣＲ／ＡＢＬ融合遺伝子、ＴＥＬ／ＡＭＬ１融合遺伝子、ＥＷ／ＦＬＩ１融合遺伝子、ＴＬＳ／ＦＵＳ１融合遺伝子、ＰＡＸ３／ＦＫＨＲ融合遺伝子、ＡＭＬ１／ＥＴＯ融合遺伝子、アルファｖ－インテグリン遺伝子、Ｆｌｔ－１受容体遺伝子、チューブリン遺伝子、ヒトパピローマウイルス遺伝子、ヒトパピローマウイルス複製に必要な遺伝子、ヒト免疫不全ウイルス遺伝子、ヒト免疫不全ウイルス複製に必要な遺伝子、Ａ型肝炎ウイルス遺伝子、Ａ型肝炎ウイルス複製に必要な遺伝子、Ｂ型肝炎ウイルス遺伝子、Ｂ型肝炎ウイルス複製に必要な遺伝子、Ｃ型肝炎ウイルス遺伝子、Ｃ型肝炎ウイルス複製に必要な遺伝子、Ｄ型肝炎ウイルス遺伝子、Ｄ型肝炎ウイルス複製に必要な遺伝子、Ｅ型肝炎ウイルス遺伝子、Ｅ型肝炎ウイルス複製に必要な遺伝子、Ｆ型肝炎ウイルス遺伝子、Ｆ型肝炎ウイルス複製に必要な遺伝子、Ｇ型肝炎ウイルス遺伝子、Ｇ型肝炎ウイルス複製に必要な遺伝子、Ｈ型肝炎ウイルス遺伝子、Ｈ型肝炎ウイルス複製に必要な遺伝子、ＲＳウイルス遺伝子、ＲＳウイルス複製に必要な遺伝子、単純ヘルペスウイルス遺伝子、単純ヘルペスウイルス複製に必要な遺伝子、ヘルペスサイトメガロウイルス遺伝子、ヘルペスサイトメガロウイルス複製に必要な遺伝子、ヘルペスエプスタインバーウイルス遺伝子、ヘルペスエプスタインバーウイルス複製に必要な遺

伝子、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス遺伝子、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス複製に必要な遺伝子、ＪＣウイルス遺伝子、ＪＣウイルス複製に必要なヒト遺伝子、ミクソウイルス遺伝子、ミクソウイルス遺伝子複製に必要な遺伝子、ライノウイルス遺伝子、ライノウイルス複製に必要な遺伝子、コロナウイルス遺伝子、コロナウイルス複製に必要な遺伝子、西ナイルウイルス遺伝子、西ナイルウイルス複製に必要な遺伝子、セントルイス脳炎遺伝子、セントルイス脳炎複製に必要な遺伝子、ダニ媒介性脳炎ウイルス遺伝子、ダニ媒介性脳炎ウイルス複製に必要な遺伝子、マリーバレー脳炎ウイルス遺伝子、マリーバレー脳炎ウイルス複製に必要な遺伝子、デング熱ウイルス遺伝子、デング熱ウイルス遺伝子複製に必要な遺伝子、シミアンウイルス４０遺伝子、シミアンウイルス４０複製に必要な遺伝子、ヒトＴ細胞リンパ球向性ウイルス遺伝子、ヒトＴ細胞リンパ球向性ウイルス複製に必要な遺伝子、モロニーマウス白血病ウイルス遺伝子、モロニーマウス白血病ウイルス複製に必要な遺伝子、脳心筋炎ウイルス遺伝子、脳心筋炎ウイルス複製に必要な遺伝子、はしかウイルス遺伝子、はしかウイルス複製に必要な遺伝子、水痘帯状疱疹（Ｖｅｒｉｃｅｌｌａ　ｚｏｓｔｅｒ）ウイルス遺伝子、水痘帯状疱疹ウイルス複製に必要な遺伝子、アデノウイルス遺伝子、アデノウイルス複製に必要な遺伝子、黄熱病ウイルス遺伝子、黄熱病ウイルス複製に必要な遺伝子、ポリオウイルス遺伝子、ポリオウイルス複製に必要な遺伝子、ポックスウイルス遺伝子、ポックスウイルス複製に必要な遺伝子、プラスモジウム遺伝子、プラスモジウム遺伝子複製に必要な遺伝子、ミコバクテリア・ウルセランス遺伝子、ミコバクテリア・ウルセランス複製に必要な遺伝子、結核菌遺伝子、結核菌遺伝子に必要な遺伝子、癩菌遺伝子、癩菌複製に必要な遺伝子、黄色ブドウ球菌遺伝子、黄色ブドウ球菌複製に必要な遺伝子、肺炎連鎖球菌遺伝子、肺炎連鎖球菌複製に必要な遺伝子、化膿連鎖球菌遺伝子、化膿連鎖球菌複製に必要な遺伝子、クラミジア・ニューモニエ遺伝子、クラミジア・ニューモニエ複製に必要な遺伝子、肺炎ミコプラズマ遺伝子、肺炎ミコプラズマ複製に必要な遺伝子、インテグリン遺伝子、セレクチン遺伝子、補体系遺伝子、ケモカイン遺伝子、ケモカイン受容体遺伝子、ＧＣＳＦ遺伝子、Ｇｒｏ１遺伝子、Ｇｒｏ２遺伝子、Ｇｒｏ３遺伝子、ＰＦ４遺伝子、ＭＩＧ遺伝子、前血小板塩基性タンパク質遺伝子、ＭＩＰ－１Ｉ遺伝子、ＭＩＰ－１Ｊ遺伝子、ＲＡＮＴＥＳ遺伝子、ＭＣＰ－１遺伝子、ＭＣＰ－２遺伝子、ＭＣＰ－３遺伝子、ＣＭＢＫＲ１遺伝子、ＣＭＢＫＲ２遺伝子、ＣＭＢＫＲ３遺伝子、ＣＭＢＫＲ５ｖ、ＡＩＦ－１遺伝子、Ｉ－３０９遺伝子、イオンチャネルの構成要素の遺伝子、神経伝達物質受容体の遺伝子、神経伝達物質リガンドの遺伝子、アミロイドファミリー遺伝子、プレセニリン遺伝子、ＨＤ遺伝子、ＤＲＰＬＡ遺伝子、ＳＣＡ１遺伝子、ＳＣＡ２遺伝子、ＭＪＤ１遺伝子、ＣＡＣＮＬ１Ａ４遺伝子、ＳＣＡ７遺伝子、ＳＣＡ８遺伝子、ＬＯＨ細胞に見出される対立遺伝子、又は多形型遺伝子のうちの１つの対立遺伝子。

【０３１６】

定義

「アルキル」は、１～２４個の炭素原子を含有する直鎖又は分岐の非環式又は環式飽和脂肪族炭化水素を意味する。代表的な飽和直鎖アルキルには、メチル、エチル、ｎ－プロピル、ｎ－ブチル、ｎ－ペンチル、及びｎ－ヘキシルなどが含まれ；飽和分岐アルキルには、イソプロピル、ｓｅｃ－ブチル、イソブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、及びイソペンチルなどが含まれる。代表的な飽和環式アルキルには、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、及びシクロヘキシルなどが含まれ；不飽和環式アルキルには、シクロペンテニル及びシクロヘキセニルなどが含まれる。

【０３１７】

「アルケニル」は、隣接した炭素原子間に少なくとも１つの二重結合を含有する、上記に定義されているようなアルキルを意味する。アルケニルには、ｃｉｓ及びＴｒａｎｓ異性体の両方が含まれる。代表的な直鎖及び分岐アルケニルには、エチレニル、プロピレニル、１－ブテニル、２－ブテニル、イソブチレニル、１－ペンテニル、２－ペンテニル、３－メチル－１－ブテニル、２－メチル－２－ブテニル、及び２，３－ジメチル－２－ブテニルなどが含まれる。

【０３１８】
「アルキニル」は、隣接した炭素間に少なくとも１つの三重結合をさらに含有する、上記に定義されているような任意のアルキル又はアルケニルを意味する。代表的な直鎖及び分岐アルキニルには、アセチレニル、プロピニル、１－ブチニル、２－ブチニル、１－ペンチニル、２－ペンチニル、及び３－メチル－１ブチニルなどが含まれる。
【０３１９】
「アシル」という用語は、水素、アルキル、部分的に飽和した又は完全に飽和したシクロアルキル、部分的に飽和した又は完全に飽和したヘテロ環、アリール、及びヘテロアリールで置換されたカルボニル基を指す。例えば、アシルには、（Ｃ１～Ｃ２０）アルカノイル（例えば、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、バレリル、カプロイル、ｔ－ブチルアセチルなど）、（Ｃ３～Ｃ２０）シクロアルキルカルボニル（例えば、シクロプロピルカルボニル、シクロブチルカルボニル、シクロペンチルカルボニル、シクロヘキシルカルボニルなど）、ヘテロ環式カルボニル（例えば、ピロリジニルカルボニル、ピロリド－２－オン－５－カルボニル、ピペリジニルカルボニル、ピペラジニルカルボニル、テトラヒドロフラニルカルボニルなど）、アロイル（例えば、ベンゾイル）、及びヘテロアロイル（例えば、チオフェニル－２－カルボニル、チオフェニル－３－カルボニル、フラニル－２－カルボニル、フラニル－３－カルボニル、１Ｈ－ピロイル－２－カルボニル、１Ｈ－ピロイル－３－カルボニル、ベンゾ［ｂ］チオフェニル－２－カルボニルなど）などの基が含まれる。
【０３２０】
「アリール」という用語は、芳香族単環式、二環式、又は三環式炭化水素環系を指し、そこでは任意の環原子が置換されていてもよい。アリール部分の例には、これらに限定されないが、フェニル、ナフチル、アントラセニル、及びピレニルが含まれる。
【０３２１】
「ヘテロ環」は、飽和、不飽和、又は芳香族のいずれかであり、窒素、酸素、及び硫黄から独立して選択される１個又は２個のヘテロ原子を含有する７～１０員の単環式、又は７～１０員の二環式、ヘテロ環式環を意味し、そこでは、窒素及び硫黄ヘテロ原子は、随意に酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は、随意に四級化されており、上記ヘテロ環のいずれかがベンゼン環に融合されている二環式環を含む。ヘテロ環は、任意のヘテロ原子又は炭素原子を介して結合されていてもよい。ヘテロ環には、下記で定義されているヘテロアリールが含まれる。ヘテロ環には、モルフォリニル、ピロリジノニル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピペリジニル（ｐｉｐｅｒｉｚｙｎｙｌ）、ヒダントイニル、バレロラクトンバレロラクタミル、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピリジニル、テトラヒドロプリミジニル（ｔｅｔｒａｈｙｄｒｏｐｒｉｍｉｄｉｎｙｌ）、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロチオフェニル、及びテトラヒドロチオピラニルなどが含まれる。
【０３２２】
「ヘテロアリール」という用語は、単環式の場合は１～３個のヘテロ原子、二環式の場合は１～６個のヘテロ原子、三環式の場合は１～９個のヘテロ原子を有する芳香族５～８員単環式、８～１２員二環式、又は１１～１４員三環式環系を指し、前記ヘテロ原子は、Ｏ、Ｎ、又はＳから選択され（例えば、炭素原子、及び単環式、二環式、又は三環式の場合、それぞれ１～３、１～６、又は１～９個のＮ，Ｏ、又はＳのヘテロ原子）を指し、そこでは任意の環原子が置換されていてもよい。本明細書に記載されているヘテロアリール基は、共通の炭素間結合を共有する融合環を含有することもできる。「アルキルヘテロシル（ａｌｋｙｌｈｅｔｅｒｏｃｙｌｅ）」という用語は、環原子の少なくとも１つが、アルキル、アルケニル、又はアルキニルと置換されているヘテロアリールを指す。
【０３２３】
「置換された」という用語は、所与の構造の１つ以上の水素ラジカルが、以下のものを含むがそれらに限定されない指定された置換基のラジカルと置換されることを指す：ハロ

、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール基、ヘテロシクリル、チオール、アルキルチオ、オキソ、チオキシ、アリールチオ、アルキルチオアルキル、アリールチオアルキル、アルキルスルホニル、アルキルスルホニルアルキル、アリールスルホニルアルキル、アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ（ａｒａｌｋｏｘｙ）、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、アリールアミノカルボニル、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、ハロアルキル、アミノ、トリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、アルキルアミノ、アリールアミノ、アルキルアミノアルキル、アリールアミノアルキル、アミノアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシアルキル、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、アミノカルボニルアルキル、アシル、アラルコキシカルボニル（ａｒａｌｋｏｘｙｃａｒｂｏｎｙｌ）、カルボン酸、スルホン酸、スルホニル、ホスホン酸、アリール、ヘテロアリール、ヘテロ環式、及び脂肪族。置換基はさらに置換されてもよいことが理解される。例示的な置換基には、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、及び環式アミノ化合物が含まれる。

【０３２４】

「ハロゲン」は、フルオロ、クロロ、ブロモ、及びヨードを意味する。

【０３２５】

「アルキルアミン」及び「ジアルキルアミン」という用語は、それぞれ－ＮＨ（アルキル）及び－Ｎ（アルキル）$_2$ラジカルを指す。

【０３２６】

「アルキルホスフェート」という用語は、－Ｏ－Ｐ（Ｑ’）（Ｑ’’）－Ｏ－Ｒを指し、式中Ｑ’及びＱ’’は、各々独立してＯ、Ｓ、Ｎ（Ｒ）$_2$、随意に置換されたアルキル又はアルコキシであり、Ｒは、随意に置換されたアルキル、ω－アミノアルキル、又はω－（置換）アミノアルキルである。

【０３２７】

「アルキルホスホロチオアート」という用語は、Ｑ’又はＱ’’の少なくとも１つがＳであるアルキルホスフェートを指す。

【０３２８】

「アルキルホスホネート」という用語は、Ｑ’又はＱ’’の少なくとも１つがアルキルであるアルキルホスフェートを指す。

【０３２９】

「ヒドロキシアルキル」という用語は、－Ｏ－アルキルラジカルを意味する。

【０３３０】

「アルキルヘテロ環」という用語は、少なくとも１つのメチレンがヘテロ環と取替されているアルキルを指す。

【０３３１】

「ω－アミノアルキル」という用語は、－アルキルＮＨ$_2$ラジカルを指す。及び「ω－（置換）アミノアルキル」という用語は、Ｈ又はＮの少なくとも１つがアルキルと置換されているω－アミノアルキルを指す。

【０３３２】

「ω－ホスホアルキル」という用語は、－アルキル－Ｏ－Ｐ（Ｑ’）（Ｑ’’）－Ｏ－Ｒを指し、式中Ｑ’及びＱ’’は、各々独立してＯ又はＳであり、Ｒは随意に置換されたアルキルである。

【０３３３】

「ω－チオホスホアルキル」という用語は、Ｑ’又はＱ’’の少なくとも１つがＳであるω－ホスホアルキルを指す。

【０３３４】

幾つかの実施形態では、本発明の方法は、保護基の使用を必要とする場合がある。保護基法は、当業者に周知である（例えば、Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｇｒｅｅｎ，Ｔ．Ｗ．ｅｔ．ａｌ．，Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ Ｃｉｔｙ，１９９９を

参照）。手短に言えば、本発明の状況内の保護基は、官能基の望ましくない反応性を低減又は除去する任意の基である。保護基は、官能基に付加されて、特定の反応中にその反応性を遮蔽し、その後取り除かれて元の官能基に戻すことができる。幾つかの実施形態では、「アルコール保護基」が使用される。「アルコール保護基」は、アルコール官能基の望ましくない反応性を低減又は除去する任意の基である。保護基は、当該技術分野で周知の技術を使用して、付加及び除去することができる。

【０３３５】

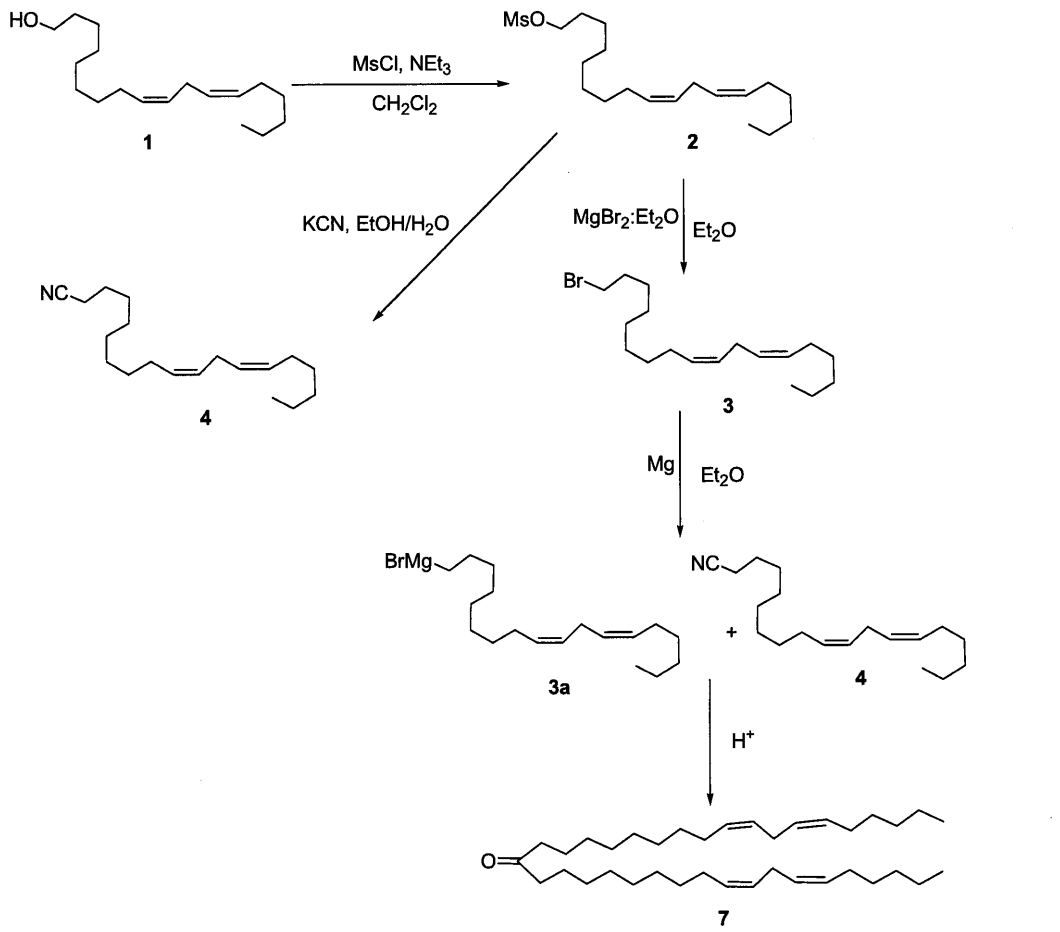
本発明の化合物は、実施例でより詳細に記載されている方法を含む公知の有機合成技術により調製することができる。

【０３３６】

実施例　実施例１　メタンスルホン酸オクタデカ－９，１２－ジエニルエステル２の合成

スキーム１

【化１０】



ジクロロメタン（１００ｍＬ）中のアルコール１（２６．６ｇ、１００ミリモル）溶液に、トリエチルアミン（１３．１３ｇ、１３０ミリモル）を添加し、この溶液を氷浴で冷却した。この冷却溶液に、ジクロロメタン（６０ｍＬ）中の塩化メシル（１２．６ｇ、１１０ミリモル）溶液を滴加し、添加の完了後、反応混合物を周囲温度に加温し、オーバーナイトで撹拌した。反応混合物のＴＬＣは、反応の完了を示した。反応混合物をジクロロメタン（２００ｍＬ）で希釈し、水（２００ｍＬ）、飽和$NaHCO_3$（２００ｍＬ）、ブライン（１００ｍＬ）で洗浄し、乾燥した（$NaSO_4$）。有機層を濃縮して粗生成物を得、それを、ヘキサン中０～１０％Et_2Oを使用したカラムクロマトグラフィー（シリカゲル）で精製した。純粋な生成物画分を混合及び濃縮し、無色油状物として純粋な生

成物２を得た（３０．６ｇ、８９％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$、４００ＭＨｚ）δ＝５．４２～５．２１（ｍ、４Ｈ）、４．２０（ｔ、２Ｈ）、３．０６（ｓ、３Ｈ）、２．７９（ｔ、２Ｈ）、２．１９～２．００（ｍ、４Ｈ）、１．９０～１．７０（ｍ、２Ｈ）、１．０６～１．１８（ｍ、１８Ｈ）、０．８８（ｔ、３Ｈ）。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$）δ＝１３０．７６、１３０．５４、１２８．６、１２８．４、７０．６７、３７．９、３２．０５、３０．１２、２９．８７、２９．８５、２９．６８、２９．６５、２９．５３、２７．７２、２７．７１、２６．１５、２５．９４、２３．０９、１４．６０。ＭＳ：Ｃ$_{19}$Ｈ$_{36}$Ｏ$_{3}$Ｓの分子量計算値：計算値３４４．５３、実測値３４３．５２（Ｍ－Ｈ$^{-}$）。

【０３３７】

１８－ブロモオクタデカ－６，９－ジエン３の合成

メシレート２（１３．４４ｇ、３９ミリモル）を無水エーテル（５００ｍＬ）に溶解し、それに、ＭｇＢｒ．Ｅｔ$_{2}$Ｏ錯体（３０．７ｇ、１１８ミリモル）をアルゴン下で添加し、混合物を２６時間アルゴン下で還流し、その後ＴＬＣは反応の完了を示した。反応混合物をエーテル（２００ｍＬ）で希釈し、氷水（２００ｍＬ）をこの混合物に添加し、層を分離した。有機層を１％Ｋ$_{2}$ＣＯ$_{3}$水溶液（１００ｍＬ）、ブライン（１００ｍＬ）で洗浄し、乾燥した（無水Ｎａ$_{2}$ＳＯ$_{4}$）。有機層を濃縮して粗生成物を得、それを、ヘキサン中０～１％Ｅｔ$_{2}$Ｏを使用したカラムクロマトグラフィー（シリカゲル）により精製し、無色油状物としてブロモ３（１２．６ｇ、９４％）を単離した。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$、４００ＭＨｚ）δ＝５．４１～５．２９（ｍ、４Ｈ）、４．２０（ｄ、２Ｈ）、３．４０（ｔ、Ｊ＝７Ｈｚ、２Ｈ）、２．７７（ｔ、Ｊ＝６．６Ｈｚ、２Ｈ）、２．０９～２．０２（ｍ、４Ｈ）、１．８８～１．００（ｍ、２Ｈ）、１．４６～１．２７（ｍ、１８Ｈ）、０．８８（ｔ、Ｊ＝３．９Ｈｚ、３Ｈ）。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$）δ＝１３０．４１、１３０．２５、１２８．２６、１２８．１２、３４．１７、３３．０５、３１．７５、２９．８２、２９．５７、２９．５４、２９．３９、２８．９５、２８．３８、２７．４２、２７．４０、２５．８４、２２．７９、１４．２８。

【０３３８】

１８－シアノオクタデカ－６，９－ジエン４の合成

エタノール（９０ｍＬ）中のメシレート（３．４４ｇ、１０ミリモル）溶液に、水（１０ｍＬ）中のＫＣＮ（１．３２ｇ、２０ミリモル）溶液を添加し、混合物を３０分間還流し、その後反応混合物のＴＬＣは反応の完了を示し、その後エーテル（２００ｍＬ）を反応混合物に添加し、その後で水を添加した。反応混合物をエーテルで抽出し、混合した有機層を水（１００ｍＬ）、ブライン（２００ｍＬ）で洗浄し、乾燥した。有機層を濃縮することにより粗生成物がもたらされ、それをカラムクロマトグラフィー（ヘキサン中０～１０％Ｅｔ$_{2}$Ｏ）で精製した。純粋な生成物４を、無色油状物として単離した（２ｇ、７４％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$、４００ＭＨｚ）δ＝５．３３～５．２２（ｍ、４Ｈ）、２．７０（ｔ、２Ｈ）、２．２７～２．２３（ｍ、２Ｈ）、２．００～１．９５（ｍ、４Ｈ）、１．６１～１．５４（ｍ、２Ｈ）、１．３９～１．２０（ｍ、１８Ｈ）、０．８２（ｔ、３Ｈ）。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$）δ＝１３０．２０、１２９．９６、１２８．０８、１２７．８７、１１９．７８、７０．７６、６６．０２、３２．５２、２９．８２、２９．５７、２９．３３、２９．２４、２９．１９、２９．１２、２８．７３、２８．６５、２７．２０、２７．１６、２５．６２、２５．３７、２２．５６、１７．１０、１４．０６。ＭＳ：Ｃ$_{19}$Ｈ$_{33}$Ｎの分子量計算値：計算値２７５．４７、実測値２７６．６（Ｍ－Ｈ$^{-}$）。

【０３３９】

ヘプタトリアコンター６，９，２８，３１－テトラエン－１９－オン７の合成

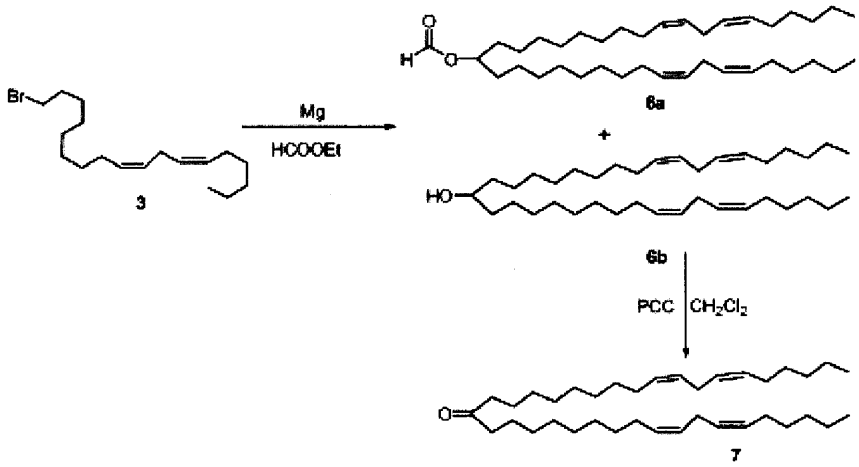
火炎乾燥した５００ｍＬ　２ＮＲＢフラスコに、新しく活性化したＭｇ削屑（０．１４４ｇ、６ミリモル）を添加し、磁気撹拌子及び還流冷却器をフラスコに取り付けた。この装置をアルゴンで脱気及び通気し、１０ｍＬの無水エーテルを注射器でフラスコに添加した。ブロミド３（１．６５ｇ、５ミリモル）を無水エーテル（１０ｍＬ）に溶解し、注射

器でフラスコに滴加した。発熱反応が認められ（グリニャール試薬形成を確認／加速するために、２ｍｇのヨウ素を添加し、即時脱色が観察され、グリニャール試薬の形成が確認された）、エーテルの還流を開始した。添加の完了後、反応混合物を３５℃で１時間維持し、その後氷浴で冷却した。シアン化物４（１．３８ｇ、５ミリモル）を無水エーテル（２０ｍＬ）に溶解し、撹拌しながら反応物に滴加した。発熱反応が観察され、反応混合物を周囲温度でオーバーナイトで撹拌した。１０ｍＬのアセトン、その後氷冷水（６０ｍＬ）を滴加することにより、反応を停止させた。溶液が均質になり層が分離されるまで、反応混合物をH_2SO_4水溶液（１０容積％、２００ｍＬ）で処理した。水相をエーテル（２×１００ｍＬ）で抽出した。混合したエーテル層を乾燥（Na_2SO_4）及び濃縮して粗生成物を得、それをカラム（シリカゲル、ヘキサン中０～１０％エーテル）クロマトグラフィーで精製した。純粋な生成物画分を蒸発させて、純粋なケトン７を無色油状物（２ｇ、７４％）として得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_3$、４００ＭＨｚ）δ＝５．３３～５．２１（ｍ、８Ｈ）、２．６９（ｔ、４Ｈ）、２．３０（ｔ、４Ｈ）、２．０５～１．９５（ｍ、８Ｈ）、１．５５～１．４５（ｍ、２Ｈ）、１．３５～１．１５（ｍ、１８Ｈ）、０．８２（ｔ、３Ｈ）。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_3$）δ＝２１１．９０、１３０．６３、１３０．５４、１２８．４７、１２８．４１、４３．２７、３３．０４、３２．０１、３０．９３、２９．８９、２９．８６、２９．７５、２９．７４、２７．６９、２６．１１、２４．３５、２３．０６、１４．０５。ＭＳ：$C_{37}H_{66}O$の分子量計算値：計算値５２６．９２、実測値５２８．０２（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

【０３４０】

実施例２：ケトン７の別途合成

【化１１】



化合物６ｂの合成

火炎乾燥した５００ｍＬ　ＲＢフラスコに、新しく活性化したＭｇ削屑（２．４ｇ、１００ミリモル）を添加し、磁気撹拌子、添加用漏斗、及び還流冷却器をフラスコに取り付けた。この装置をアルゴンで脱気及び通気し、１０ｍＬの無水エーテルを注射器でフラスコに添加した。ブロミド３（２６．５ｇ、８０．４７ミリモル）を無水エーテル（５０ｍＬ）に溶解し、添加用漏斗に加えた。約５ｍＬのこのエーテル溶液を、勢い良く撹拌しながらＭｇ削屑に添加した。発熱反応が認められ（グリニャール試薬形成を確認／加速するために、５ｍｇのヨウ素を添加し、即時脱色が観察され、グリニャール試薬の形成が確認された）、エーテルの還流を開始した。水中でフラスコを冷却することによる穏やかな還流下で反応を維持しながら、ブロミド溶液の残りを滴加した。添加の完了後、反応混合物を３５℃で１時間維持し、その後氷浴で冷却した。ギ酸エチル（２．６８ｇ、３６．２ミリモル）を無水エーテル（４０ｍＬ）に溶解し、添加用漏斗に移し、撹拌しながら反応混合物に滴加した。発熱反応が観察され、反応混合物の還流を開始した。反応の開始後、エ

ーテル性蟻酸溶液の残りを流動として迅速に添加し、反応混合物を周囲温度でさらに１時間撹拌した。１０ｍＬのアセトン、その後氷冷水（６０ｍＬ）を滴加することにより、反応を停止させた。溶液が均質になり層が分離されるまで、反応混合物をH_2SO_4水溶液（１０容積％、３００ｍＬ）で処理した。水相をエーテル（２×１００ｍＬ）で抽出した。混合したエーテル層を乾燥（Na_2SO_4）及び濃縮して粗生成物を得、それをカラム（シリカゲル、ヘキサン中０～１０％エーテル）クロマトグラフィーで精製した。わずかにより極性でない画分を濃縮して蟻酸エステル６ａ（１．９ｇ）を得、純粋な生成物画分を蒸発させて、純粋な生成物６ｂを無色油状物として得た（１４．６ｇ、７８％）。

【０３４１】

化合物７の合成

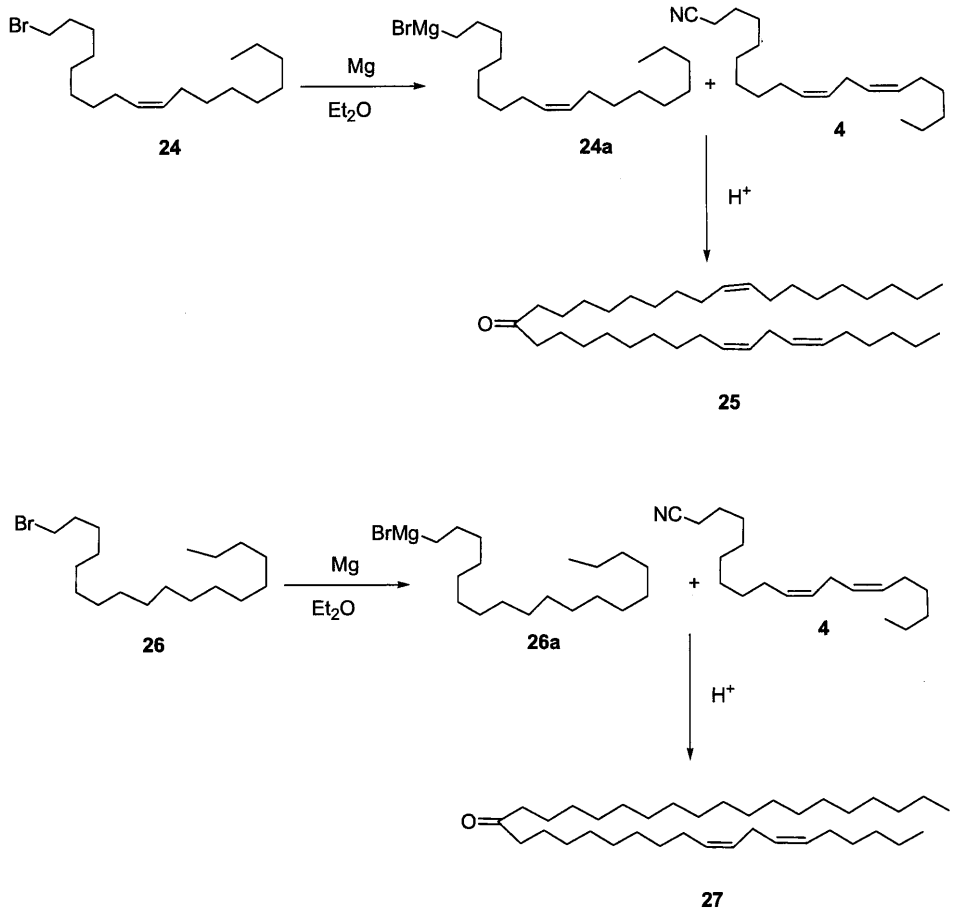
CH_2Cl_2（６０ｍＬ）中のアルコール６ｂ（３ｇ、５．６８ミリモル）溶液に、新しく活性化した４Ａモレキュラーシーブ（５０ｇ）を添加し、この溶液に粉末ＰＣＣ（４．９ｇ、２２．７ミリモル）を、２０分間にわたって数回に分けて添加し、混合物をさらに１時間撹拌し（注：長期にわたる反応時間はより低い収率に結びつくため、良好な収率を得るためには反応を注意深く監視することが必要である）、その後反応混合物のＴＬＣを１０分毎に実施した（ヘキサン中５％エーテル）。反応の完了後、反応混合物をシリカゲルのパッドでろ過し、残渣をCH_2Cl_2（４００ｍＬ）で洗浄した。ろ過液を濃縮し、このようにして得た粗生成物を、カラムクロマトグラフィー（シリカゲル、ヘキサン中１％Et_2O）でさらに精製して、純粋な生成物７（２．９ｇ、９７％）を無色油状物として単離した。^1H ＮＭＲ（$CDCl_3$、４００ＭＨｚ）δ＝５．３３～５．２１（ｍ、８Ｈ）、２．６９（ｔ、４Ｈ）、２．３０（ｔ、４Ｈ）、２．０５～１．９５（ｍ、８Ｈ）、１．５５～１．４５（ｍ、２Ｈ）、１．３５～１．１５（ｍ、１８Ｈ）、０．８２（ｔ、３Ｈ）。^{13}C ＮＭＲ（$CDCl_3$）δ＝２１１．９０、１３０．６３、１３０．５４、１２８．４７、１２８．４１、４３．２７、３３．０４、３２．０１、３０．９３、２９．８９、２９．８６、２９．７５、２９．７４、２７．６９、２６．１１、２４．３５、２３．０６、１４．０５。ＭＳ：$C_{37}H_{66}O$の分子量計算値：計算値５２６．９２、実測値５２８．０２（$M+H^+$）。

【０３４２】

実施例３：非対称ケトン２５及び２７の合成

スキーム３

【化１２】



ヘプタトリアコンター６，９，２８－トリエン－１９－オン２５の合成

乾燥した５０ｍＬ　２ＮＲＢフラスコに、新しく活性化したＭｇ削屑（１３２ｍｇ、０．００５４ミリモル）を添加し、磁気撹拌子及び還流冷却器をフラスコに取り付けた。この装置を窒素で脱気及び通気し、１０ｍＬの無水エーテルを注射器でフラスコに添加した。ブロミド２４（１．８ｇ、０．００５４ミリモル）を無水エーテル（１０ｍＬ）に溶解し、注射器でフラスコに滴加した。発熱反応が認められ（反応はジブロモエタンで開始された）、エーテルの還流を開始した。添加の完了後、反応混合物を３５℃で１時間維持し、その後氷浴で１０～１５℃に冷却した。シアン化物４（０．５ｇ、０．００１８ミリモル）を乾燥ＴＨＦ（５ｍＬ）に溶解し、撹拌しながら反応物に滴加した。発熱反応が観察され、反応混合物を１２時間還流し（７０℃で）、塩化アンモニウム溶液で反応を停止させた。その後、溶液が均質になり層が分離されるまで、溶液を２５％ＨＣｌ溶液で処理した。水相をエーテル（２×１００ｍＬ）で抽出した。混合したエーテル層を乾燥及び濃縮して粗生成物を得、それをカラムクロマトグラフィーで精製した。純粋な生成物画分を蒸発させて、純粋なケトン２５を無色油状物として得た。

収量：０．２３０ｇ（２４％）。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ３、４００ＭＨｚ）：δ＝５．３７～５．３０（ｍ、６Ｈ）、２．７７～２．７４（ｔ、２Ｈ）、２．３８～２．３４（ｔ、４Ｈ）、２．０５～１．９５（ｍ、８Ｈ）、１．５６～１．５２（ｍ、４Ｈ）、１．３５～１．２５（ｍ、脂肪族プロトン）、０．８９～０．８５（ｔ、６Ｈ）。ＩＲ（ｃｍ－１）：２９２４、２８５４、１７１７、１４６５、１０４９、７２１。

【０３４３】

ヘプタトリアコンター６，９－ジエン－１９－オン２７の合成

火炎乾燥した５００ｍＬ　２ＮＲＢフラスコに、新しく活性化したＭｇ削屑（０．１４４ｇ、６ミリモル）を添加し、磁気撹拌子及び還流冷却器をフラスコに取り付ける。この

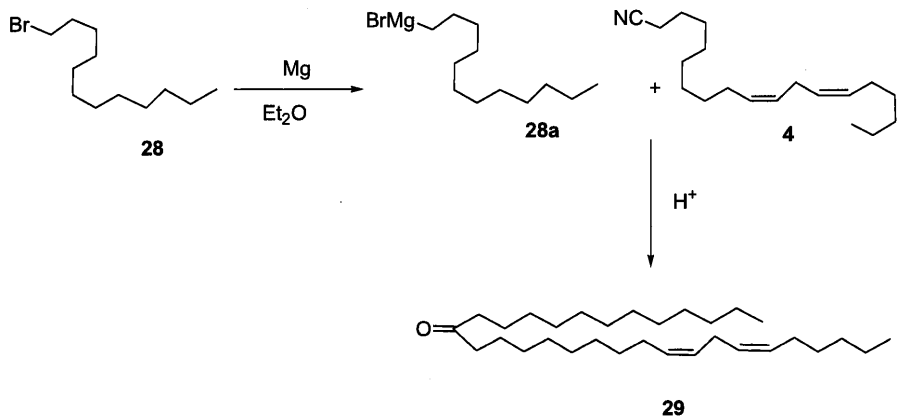
装置をアルゴンで脱気及び通気し、１０ｍＬの無水エーテルを注射器でフラスコに添加する。市販のブロミド２６（２．６５ｇ、５ミリモル）を無水エーテル（１０ｍＬ）に溶解し、注射器でフラスコに滴加する。添加の完了後、反応混合物を３５℃で１時間維持し、その後氷浴で冷却する。シアン化物４（１．３８ｇ、５ミリモル）を無水エーテル（２０ｍＬ）に溶解し、撹拌しながら反応物に滴加する。発熱反応が観察され、反応混合物を周囲温度でオーバーナイトで撹拌する。１０ｍＬのアセトン、その後氷冷水（６０ｍＬ）を滴加することにより、反応を停止させる。溶液が均質になり層が分離されるまで、反応混合物をH_2SO_4水溶液（１０容積％、２００ｍＬ）で処理する。水相をエーテル（２×１００ｍＬ）で抽出する。混合したエーテル層を乾燥（Na_2SO_4）及び濃縮して粗生成物を得、それをカラムクロマトグラフィーで精製して、純粋なケトン２７を無色油状物として得る。１Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ３、４００ＭＨｚ）：δ＝５．４２～５．３０（ｍ、４Ｈ）、２．７９～２．７８（ｔ、２Ｈ）、２．４０～２．３７（ｔ、４Ｈ）、２．０８～２．０３（ｍ、４Ｈ）、１．５８～１．５４（ｍ、４Ｈ）、１．３６～１．２６（ｂｒ　ｍ、脂肪族プロトン）、０．９１～０．８７（ｔ、６Ｈ）。ＩＲ（ｃｍ－１）：２９２４、２８５４、１７１６、１４６５、１３７５、７２１。

【０３４４】

実施例４：C_{12}鎖を有する非対称ケトンの合成

スキーム４

【化１３】



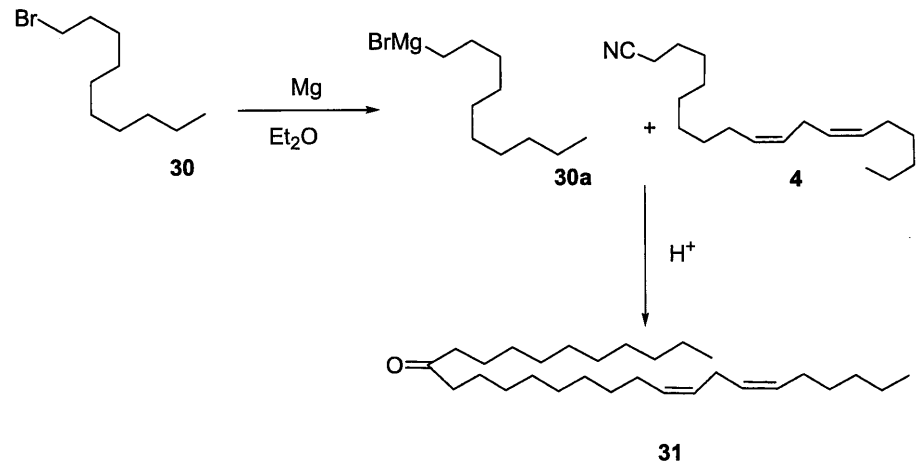
乾燥した５０ｍＬ　２ＮＲＢフラスコに、新しく活性化したＭｇ削屑（１７５ｍｇ、０．００７２ミリモル）を添加し、磁気撹拌子及び還流冷却器をフラスコに取り付けた。この装置を窒素で脱気及び通気し、１０ｍＬの無水エーテルを注射器でフラスコに添加した。ブロミド２８（１．５ｇ、０．００６ミリモル）を無水エーテル（７ｍＬ）に溶解し、注射器でフラスコに滴加した。発熱反応が認められ（反応はジブロモエタンで開始された）、エーテルの還流を開始した。添加の完了後、反応混合物を３５℃で１時間維持し、その後氷浴で１０～１５℃に冷却した。シアン化物４（１ｇ、０．００３６ミリモル）を無水エーテル（７ｍＬ）に溶解し、撹拌しながら反応物に滴加した。発熱反応が観察され、反応混合物を１２時間還流し、塩化アンモニウム溶液で反応を停止させた。その後、溶液が均質になり層が分離されるまで、溶液を２５％ＨＣｌ溶液で処理した。水相をエーテルで抽出した。混合したエーテル層を乾燥及び濃縮して粗生成物を得、それをカラムクロマトグラフィーで精製した。純粋な生成物画分を蒸発させて、純粋なケトン２９を無色油状物として得た。収量：０．６５ｇ（２６％）。^{1}Ｈ～ＮＭＲ（δｐｐｍ）：５．３８８～５．３０２（ｍ、４Ｈ）、２．７７～２．７４（ｔ、２Ｈ）、２．３８～２．３４（ｔ、４Ｈ）、２．０４～２．０１（ｍ、４Ｈ）、１．３４～１．１８（ｍ、３６Ｈ）、０．８９～０．８５（ｍ、６Ｈ）。ＩＲ（cm^{-1}）：３００９、２９２０、２８５１、１７１１（Ｃ＝Ｏ）、１４６６、１３７６、１２６１。

【０３４５】

実施例５：Ｃ$_{10}$鎖を有する非対称ケトン３１の合成

スキーム５

【化１４】



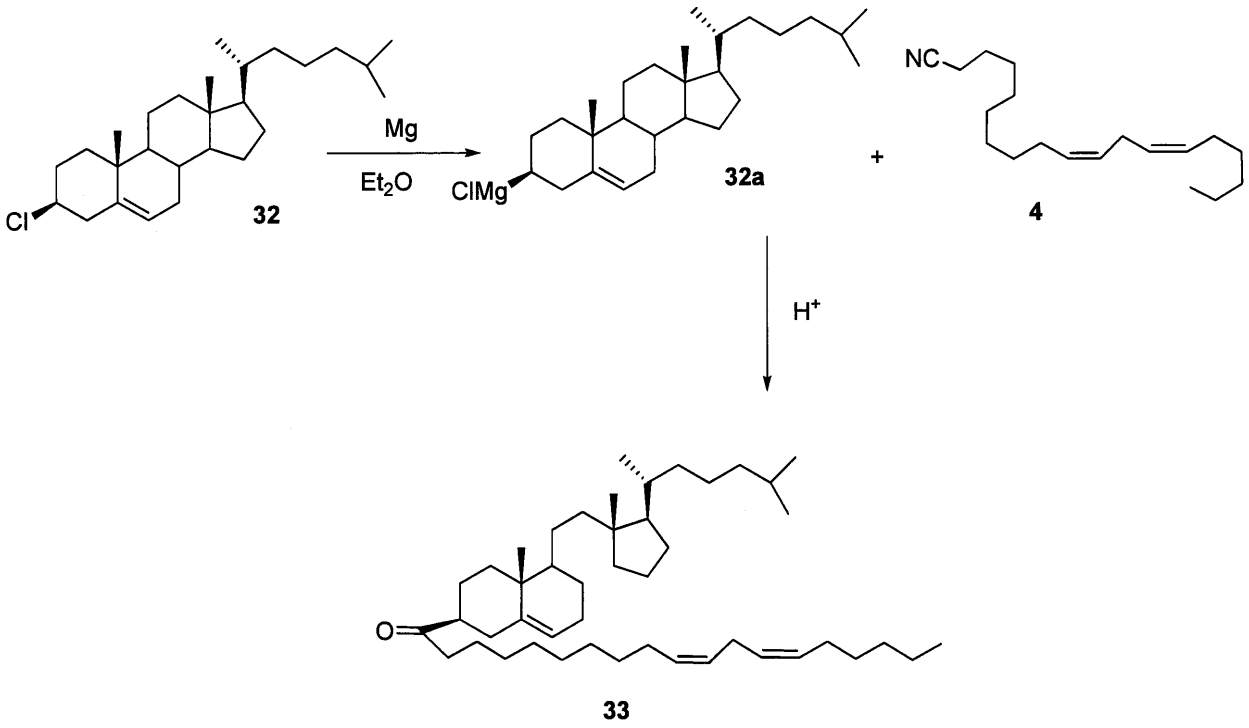
乾燥した５０ｍＬ　２ＮＲＢフラスコに、新しく活性化したＭｇ削屑（２６６ｍｇ、０．０１０９ミリモル）を添加し、磁気撹拌子及び還流冷却器をフラスコに取り付けた。この装置を窒素で脱気及び通気し、１０ｍＬの無水エーテルを注射器でフラスコに添加した。ブロミド（２．４３ｇ、０．０１０９ミリモル）を無水エーテル（７ｍＬ）に溶解し、注射器でフラスコに滴加した。発熱反応が認められ（反応はジブロモエタンで開始された）、エーテルの還流を開始した。添加の完了後、反応混合物を３５℃で１時間維持し、その後氷浴で１０～１５℃に冷却した。シアン化物（１ｇ、０．００３６ミリモル）を無水エーテル（７ｍＬ）に溶解し、撹拌しながら反応物に滴加した。発熱反応が観察され、反応混合物を周囲温度で２時間撹拌した。ＴＨＦ（４ｍＬ）を反応混合物に添加し、シアノ誘導体が完全に消費されるまで、それを４時間４５～５０℃に加温した。３ｍＬのアセトン、その後氷冷水を滴加することにより、反応を停止させた。その後、溶液が均質になり層が分離されるまで、２５％ＨＣｌ溶液で反応混合物を処理した。水相をエーテルで抽出した。混合したエーテル層を乾燥及び濃縮して粗生成物を得、それをカラムクロマトグラフィーで精製した。純粋な生成物画分を蒸発させて、純粋なケトンを無色油状物として得た。収量：０．９３ｇ（６１％）。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（δｐｐｍ）：５．３７～５．３０２（ｍ、４Ｈ）、２．７７～２．７４（ｔ、２Ｈ）、２．３８～２．３４（ｔ、４Ｈ）、２．０５～２．００（ｍ、４Ｈ）、１．５５～１．５２（ｍ、２Ｈ）、１．３５～１．２４（ｍ、３４Ｈ）、０．８９～０．８４（ｍ６Ｈ）。ＩＲ（ｃｍ$^{-1}$）：３００９、２９２５、２８５４、１７１７（Ｃ＝Ｏ）、１４６５、１３７６。

【０３４６】

実施例６：コレステロールを有する非対称ケトン３３の合成

スキーム６

【化１５】



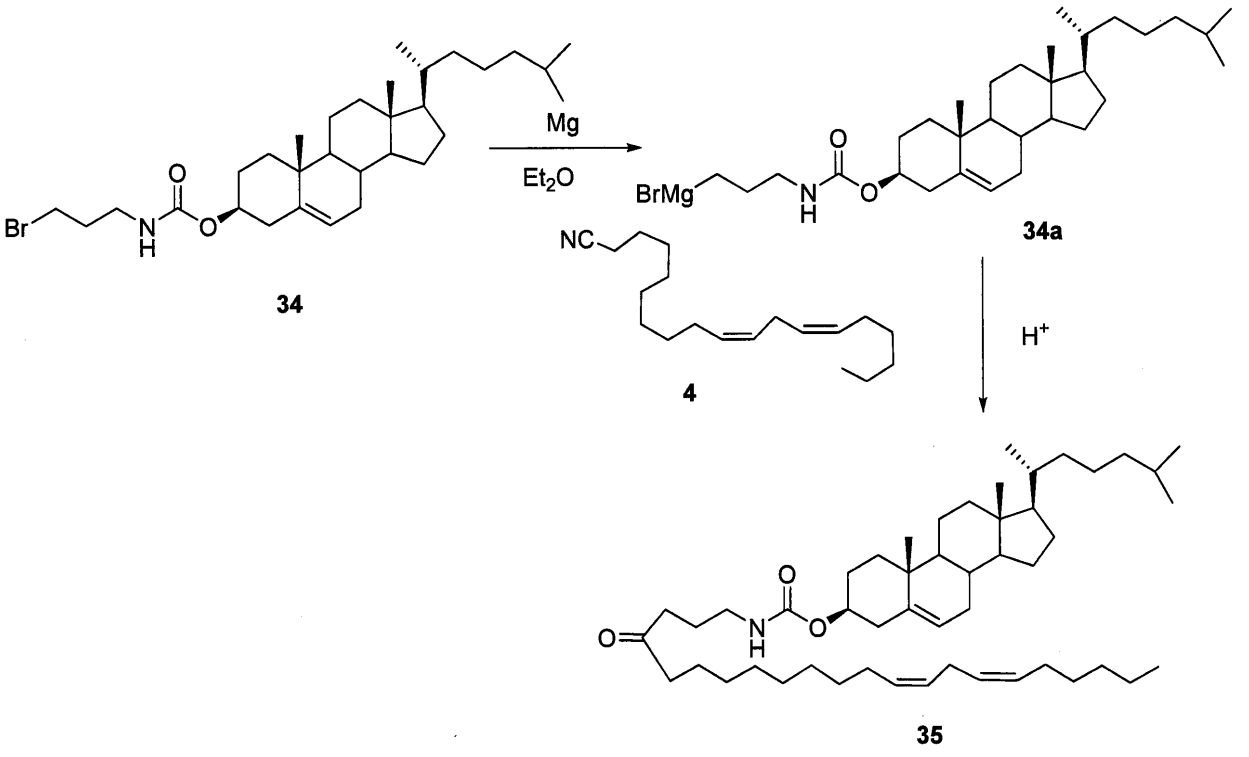
ケトン３１の合成に使用された手順と同様の手順を使用して、塩化コレステリルを対応する塩化マグネシウムに変換し、その後シアン化リノレイルに添加することにより、ケトン３３を得た。

【０３４７】

実施例７：コレステロールを有する非対称ケトン３５の合成

スキーム７

【化１６】



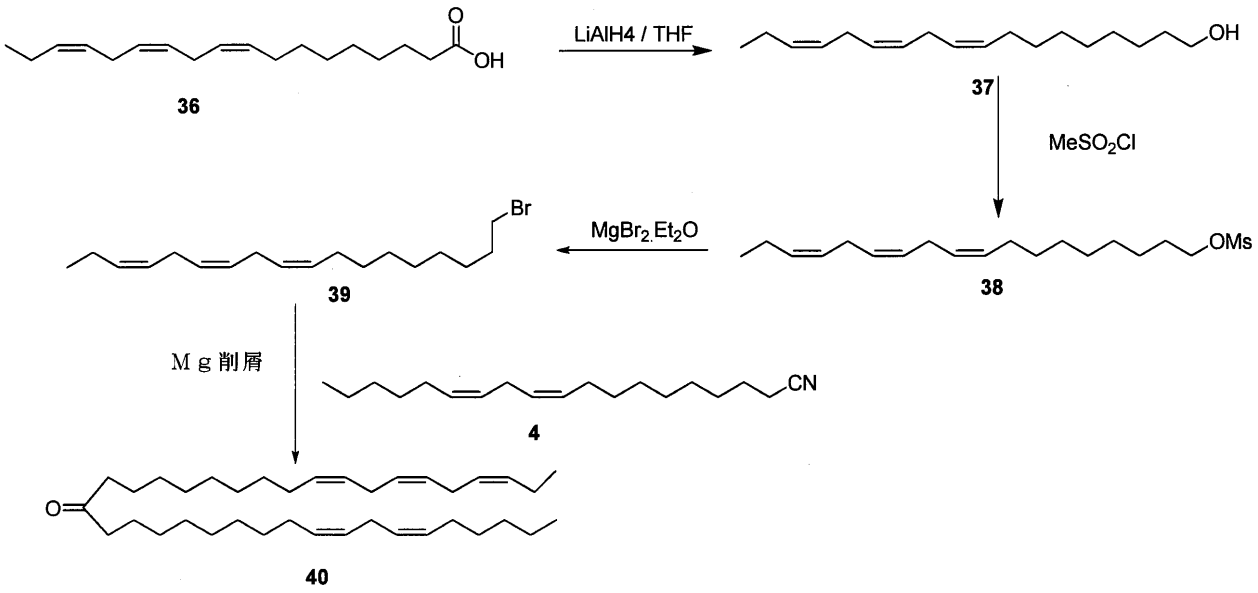
クロロギ酸コレステロールを３－ブロモプロピルアミンで処理することによりブロミド３４を得、それを、対応するグリニャール試薬３４ａに変換し、それをシアン化リノレイルで処理することにより、対応する非対称ケトン３５を良好な収率で得た。

【０３４８】

実施例８：非対称ケトン４０の合成

スキーム８

【化１７】



【０３４９】

化合物３７の合成

$LiAlH_4$（１．０２ｇ、０．０２６９モル）を含有する５００ｍＬ　二つ口ＲＢＦに、無水ＴＨＦ（２０ｍＬ）を窒素雰囲気下、室温で添加した。懸濁液を室温で１時間撹拌し、その後０℃に冷却した。この混合物に、無水ＴＨＦ（５０ｍＬ）中の化合物１（５ｇ、０．０１７９８モル）溶液を、内部温度を０℃に維持しながらゆっくりと添加した。添加の完了後、反応混合物を周囲温度に加温し、１時間撹拌した。反応の進行は、ＴＬＣで監視した。反応が完了したら、混合物を０℃に冷却し、飽和Na_2SO_4水溶液で反応を停止させた。反応混合物を３０分間撹拌し、形成された固形物をセライト床でろ過し、酢酸エチル（１００ｍＬ）で洗浄した。ろ過液及び洗浄液を混合しロータリーエバポレータで蒸発させて、化合物３７を無色液体として得、それをいかなる精製もせずにそのまま次の段階で使用した。収量：（４．５ｇ、９５％）。^1H　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、$CDCl_3$）δ＝５．３９～５．２８（ｍ、６Ｈ）、３．６４～３．６１（ｔ、２Ｈ）、２．８１～２．７８（ｔ、４Ｈ）、２．１０～２．０１（ｍ、４Ｈ）、１．５９～１．５１（ｍ、２Ｈ）、１．２９～１．２２（ｍ、脂肪族プロトン）、０．９８～０．９４（ｔ、３Ｈ）。

【０３５０】

化合物３８の合成

化合物３７（１４ｇ、０．０５３０モル）を、５００ｍＬ　二つ口ＲＢＦ中のＤＣＭ（３００ｍＬ）に溶解し、０℃に冷却した。この溶液に、トリエチルアミン（２９．５ｍＬ、０．２１２１モル）を不活性雰囲気下でゆっくりと添加した。その後、反応混合物を、１０～１５分間撹拌し、それに、塩化メシル（６．１７のｍＬ、０．０７９５モル）をゆっくりと添加した。添加の完了後、反応混合物の周囲温度に加温させ、２０時間撹拌した。反応は、ＴＬＣで監視した。完了したら、反応混合物を水（２００ｍＬ）で希釈し、数分間撹拌し、有機層を分離した。有機相をブライン（１×７０ｍＬ）でさらに洗浄し、Ｎ

a_2SO_4で乾燥し、溶媒をロータリーエバポレータで除去して、粗化合物３８を褐色油状物として得、それを次の反応にそのまま使用した。収量：（１７ｇ、９３％）。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、$CDCl_3$）δ＝５．３９～５．３１（ｍ、６Ｈ）、４．２２～４．１９（ｔ、２Ｈ）、２．９９（ｓ、３Ｈ）、２．８１～２．７８（ｍ、４Ｈ）、２．０８～２．０１（ｍ、４Ｈ）、１．７５．１．６９（ｍ、２Ｈ）、１．３９～１．２９（ｍ、脂肪族プロトン）、０．９８～０．９４（ｔ、３Ｈ）。

【０３５１】

化合物３９の合成

メシレート３８（１０ｇ、０．２９２３モル）を、１０００ｍＬ　二つ口ＲＢＦ及び$MgBr_2$中の無水エーテル（３００ｍＬ）に溶解した。Et_2O錯体（２２．６３ｇ、０．０８７７モル）を、窒素雰囲気下でそれに添加した。その後、その結果生じた混合物を加熱して２６時間還流した。反応の完了後（ＴＬＣによる）、反応混合物をエーテル（３００ｍＬ）及び氷水（２００ｍＬ）で希釈し、エーテル層を分離した。その後、有機層を１％K_2CO_3水溶液（１００ｍＬ）で、その後ブライン（８０ｍＬ）で洗浄した。その後、有機相を無水Na_2SO_4で乾燥し、溶媒を減圧下で蒸発させて粗物質を得、それを、溶出系としてヘキサン中０～１％酢酸エチルを使用したシリカゲル（６０～１２０メッシュ）でクロマトグラフィー分離し、所望の化合物３９を油状物として得た。収量：（７ｇ、７３％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、$CDCl_3$）δ＝５．３９～５．３１（ｍ、６Ｈ）、３．４１～３．３７（ｔ、２Ｈ）、２．８１～２．７８（ｍ、４Ｈ）、２．０８～２．０２（ｍ、４Ｈ）、１．８６～１．８０（ｍ、２Ｈ）、１．４２～１．２９（ｍ、脂肪族プロトン）、０．９８～０．９４（ｔ、３Ｈ）。

【０３５２】

非対称ケトン４０の合成

火炎乾燥した５００ｍＬ　二つ口ＲＢＦに磁気撹拌子及び還流冷却器を取り付け、新しく活性化したＭｇ削屑（０．８８ｇ、０．０３６３６モル）を添加した。この装置をアルゴンで脱気し、通気し、それにエーテル（１５０ｍＬ）を添加した。５０ｍＬエーテル中のブロモ化合物４（１１．８９ｇ、０．０３６３６モル）を、始めに数滴添加して反応を開始させた（注：グリニャール試薬の形成を加速するために、触媒量の１，２－ジブロモエタンも添加した）。開始時に、ブロモ化合物の残りの溶液を、還流しているエーテル溶液にゆっくりと添加した。添加の完了後、反応混合物を１．５時間４０℃で還流した。その後、それを１０℃に冷却し、３０ｍＬ乾燥エーテル中のシアン化リノレイル４（５ｇ、０．０１８１８モル）を滴加し、その後その結果生じた混合物を加熱して４０℃で２０時間還流した。反応の進行は、ＴＬＣで監視した。シアノ誘導体４０が完全に消費された後（ＴＬＣによる）、混合物を室温に冷却し、３０ｍＬのアセトン、その後氷水（５０ｍＬ）で反応を停止させた。この溶液を、１０％ＨＣｌ溶液でさらに酸性化し、エーテル層を分離させた。水相をジエチルエーテル（２×１００ｍＬ）でさらに抽出した。無水Na_2SO_4で乾燥した後で溶媒を除去することにより粗ケトンを得、それを、溶出系としてヘキサン中０～５％エーテルを使用したシリカゲルカラムクロマトグラフィー（１００～２００メッシュ）で精製し、淡黄色油状物として表題化合物４０を得た。収量：（４．８ｇ、５０．５％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、$CDCl_3$）δ＝５．３８～５．２８（ｍ、１０Ｈ）、２．８０～２．７４（ｍ、６Ｈ）、２．３８～２．３４（ｔ、４Ｈ）、２．０８～２．００（ｍ、８Ｈ）、１．５５～１．５２（ｍ、４Ｈ）、１．３５～１．２６（ｍ、脂肪族プロトン）、０．９８～０．９４（ｔ、３Ｈ）、０．８９～０．８５（ｔ、３Ｈ）。ＨＰＬＣ－９８．０４％。

【０３５３】

実施例９：オリゴヌクレオチド合成：

オリゴヌクレオチドは全て、ＡＫＴＡｏｌｉｇｏｐｉｌｏｔ合成機で合成した。細孔が制御されている市販のガラス固体支持体（ｄＴ－ＣＰＧ、５００Å、Ｐｒｉｍｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ社製）、及び以下の標準的保護基を有するＲＮＡホスホラミダイトを使用してオリゴヌクレオチドを合成した：５’－Ｏ－ジメトキシトリチルＮ６－ベンゾイル－２

’－ｔ－ブチルジメチルシリル－アデノシン－３’－Ｏ－Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピル－２－シアノエチルホスホラミダイト、５’－Ｏ－ジメトキシトリチル－Ｎ４－アセチル－２’－ｔ－ブチルジメチルシリル－シチジン－３’－Ｏ－Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピル－２－シアノエチルホスホラミダイト、５’－Ｏ－ジメトキシトリチル－Ｎ２－－イソブトリル（ｉｓｏｂｕｔｒｙｌ）－２’－ｔ－ブチルジメチルシリル－グアノシン－３’－Ｏ－Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピル－２－シアノエチルホスホラミダイト、及び５’－Ｏ－ジメトキシトリチル－２’－ｔ－ブチルジメチルシリル－ウリジン－３’－Ｏ－Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピル－２－シアノエチルホスホラミダイト（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）。２’－Ｆホスホラミダイト、５’－Ｏ－ジメトキシトリチル－Ｎ４－アセチル－２’－フルロ－シチジン－３’－Ｏ－Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピル－２－シアノエチル－ホスホラミダイト、及び５’－Ｏ－ジメトキシトリチル－２’－フルロ－ウリジン－３’－Ｏ－Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピル－２－シアノエチル－ホスホラミダイトは、（Ｐｒｏｍｅｇａ社）から購入した。ホスホラミダイトは全て、１０％ＴＨＦ／ＡＮＣ（容積／容積）中０．２Ｍ濃度で使用されたグアノシンを除いて、アセトニトリル（CH_3CN）中０．２Ｍ濃度で使用した。１６分間の結合／再利用時間を使用した。活性化剤は、５－エチルチオテトラゾール（０．７５Ｍ、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ社製）であり、ＰＯ酸化の場合、ヨウ素／水／ピリジンを使用し、２，６－ルチジン／ＡＣＮ（１：１　容積／容積）中でのＰＳ酸化ＰＡＤＳ（２％）を使用した。

【０３５４】

３’－リガンド結合鎖を、対応するリガンドを含有する固体支持体を使用して合成した。例えば、配列へのコレステロール単位の導入は、ヒドロキシプロリノール－コレステロールホスホラミダイトから実施した。コレステロールを、６－アミノヘキサノアート結合によりｔｒａｎｓ－４－ヒドロキシプロリノールに結合させて、ヒドロキシプロリノール－コレステロール部分を得た。５’－末端Ｃｙ－３及びＣｙ－５．５（蛍光体）標識ｓｉＲＮＡを、Ｂｉｏｓｅａｒｃｈ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社から購入した対応するＱｕａｓａｒ－５７０（Ｃｙ－３）ホスホラミダイトから合成した。５’－末端又は内部位置へのリガンドの結合は、適切に保護されたリガンド－ホスホラミダイト基本単位を使用して、５－（エチルチオ）－１Ｈ－テトラゾール活性化剤の存在下で、無水CH_3CN中の０．１Ｍホスホラミダイト溶液を、固体に結合しているオリゴヌクレオチドに、１５分間の長期にわたって結合させることにより達成する。ヌクレオチド間亜リン酸エステルのリン酸エステルへの酸化は、報告されている（１）標準的なヨウ素－水を使用するか、又はｔｅｒｔ－ブチルヒドロペルオキシド／アセトニトリル／水（１０：８７：３）を用いて１０分間の酸化待機時間で、結合されたオリゴヌクレオチドを処理することにより実施した。ホスホロチオアートは、ＤＤＴＴ（ＡＭ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ社から購入）、ＰＡＤＳ、又はＢｅａｕｃａｇｅ試薬などの硫黄転移試薬を使用することにより、亜リン酸エステルをホスホロチオアートに酸化することによって導入した。コレステロールホスホラミダイトは、施設内で合成し、ジクロロメタン中０．１Ｍの濃度で使用した。コレステロールホスホラミダイトの結合時間は１６分間だった。

【０３５５】

合成の完了後、支持体を１００ｍＬのガラスボトル（ＶＷＲ社製）に移し換えた。８０ｍＬのエタノール性アンモニア混合物［アンモニア：エタノール（３：１）］を５５℃で６．５時間用いて、オリゴヌクレオチドを支持体から切断し、同時に塩基及びホスフェート基を脱保護した。ボトルを氷上で短時間冷却し、その後エタノール性アンモニア混合物を新しい２５０ｍＬボトルにろ過した。ＣＰＧを、２×４０ｍＬ量のエタノール／水（１：１　容積／容積）で洗浄した。その後、混合物の容積を、ｒｏｔｏ－ｖａｐで約３０ｍＬに減少させた。その後混合物を、ｄｙｉｎｃｅで凍結させ、減圧下でｓｐｅｅｄ　ｖａｃを用いて乾燥した。

【０３５６】

乾燥残渣を、２６ｍＬのトリエチルアミン、トリエチルアミントリヒドロフルオリド（

ＴＥＡ．３ＨＦ）、又はピリジン－ＨＦ、及びＤＭＳＯ（３：４：６）中に再懸濁し、９０分間６０℃に加熱して、２’位のｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリル（ＴＢＤＭＳ）基を取り除いた。その後、５０ｍＬの２０ｍＭ酢酸ナトリウムで反応を停止させ、ｐＨを６．５に調整し、精製するまで冷凍庫で保管した。

【０３５７】

オリゴヌクレオチドは、精製する前に高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）で分析し、緩衝液及びカラムの選択は、配列及び／又は結合されたリガンドの性質に依存する。

【０３５８】

リガンド結合オリゴヌクレオチドは、調製用逆相ＨＰＬＣで精製した。未結合オリゴヌクレオチドは、施設内で充填したＴＳＫゲルカラムの陰イオン交換ＨＰＬＣで精製した。緩衝液は、１０％CH_3CN中の２０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ８．５）（緩衝液Ａ）、及び１０％CH_3CN、１Ｍ　ＮａＢｒ中の２０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ８．５）（緩衝液Ｂ）だった。全長オリゴヌクレオチドを含有する画分を貯溜し、脱塩し、凍結乾燥した。およそ０．１５ＯＤの脱塩オリゴヌクレオチドを水で希釈して１５０μｌにし、その後ＣＧＥ及びＬＣ／ＭＳ解析用の特殊バイアルにピペットで移した。化合物は、最終的にＬＣ－ＥＳＭＳ及びＣＧＥで分析した。

【０３５９】

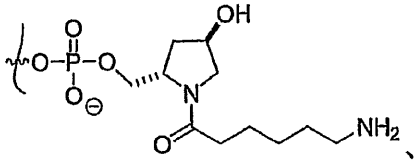
ｓｉＲＮＡの調製の場合、等モル量のセンス及びアンチセンス鎖を、１×ＰＢＳ中で５分間９５℃に加熱し、ゆっくりと室温に冷却した。二本鎖の完全性は、ＨＰＬＣ分析により確認した。

【表６】

表７．Ｌｕｃ及びＦＶＩＩ標的用のｓｉＲＮＡ二本鎖。

二本鎖	センス／アンチセンス	配列５’－３’	配列番号	標的
	１０００／２４３４	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdTU*CG AAG fUAC UCA G CG fUAA GdT*dT		Ｌｕｃ
	２４３３／１００１	C*UfU ACG CUG AGfU ACU U CG AdT*dTUCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT		Ｌｕｃ
	２４３３／２４３４	C*UfU ACG CUG AGfU ACU U CG AdT*dTU*CG AAG fUAC U CA GCG fUAA GdT*dT		Ｌｕｃ
	１０００／１００１	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdTUCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT		Ｌｕｃ
ＡＤ－１５９６		GGAUCAUCUCAAGUCUUACdTdTG UAAGACUUGAGAUGAUCCdTdT		ＦＶＩＩ
ＡＤ－１６６１		GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCf UfUAfCdTsdTGfUAAGAfCfUfU GAGAfUGAfUfCfCdT*dT		ＦＶＩＩ

注：Ｌ８は、下記式であり、

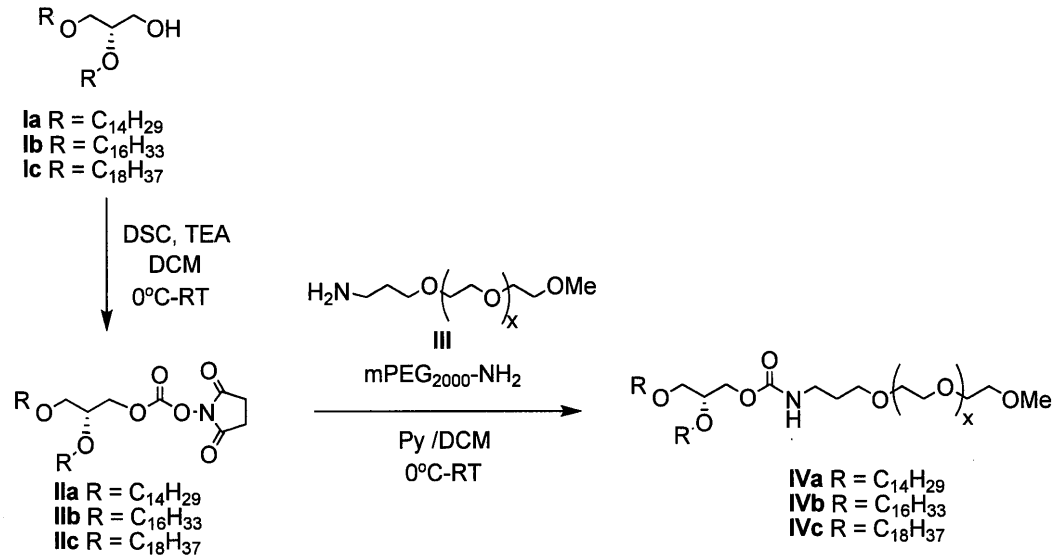


、

小文字は２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドであり、＊はホスホロチオアート骨格結合であり、ｆＮは２’－フルオロヌクレオチドであり、ｄＮは２’－デオキシヌクレオチドである。

【０３６０】
実施例１０：ｓｉＲＮＡの血清安定性アッセイ
初期の配列に基づく安定性選択の中程度スループットアッセイを、「完全染色」法により実施した。アッセイを実施するために、ｓｉＲＮＡ二本鎖を、９０％ヒト血清中３７℃でインキュベートした。反応混合物の試料を、種々の時点（０分、１５、３０、６０、１２０、及び２４０分）で反応停止させ、電気泳動分析にかけた（図１）。経時的なＲＮＡ切断により、血清ヌクレアーゼ分解に対するｓｉＲＮＡ二本鎖の感受性に関する情報がもたらされた。
【０３６１】
放射性同位体標識ｄｓＲＮＡ及び血清の安定性アッセイを使用して、ｓｉＲＮＡ切断事象をさらに特徴付けた。最初に、ｓｉＲＮＡ二本鎖のセンス又はアンチセンス鎖のいずれかを、^{32}Ｐで５’末端標識した。標識ｓｉＲＮＡ二本鎖を、９０％ヒト血清と共に３７℃でインキュベートし、溶液の試料を、少しずつ時間をおいた時点で取り出して反応停止させた。試料を電気泳動により分析した。
【０３６２】
実施例１１：陽イオン性脂質由来のリポソームを使用したＦＶＩＩのインビボ評価
インビボげっ歯動物第ＶＩＩ因子及びＡｐｏＢサイレンシング実験。
Ｃ５７ＢＬ／６マウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｓ社製、マサチューセッツ州）及びＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｓ社製、マサチューセッツ州）は、０．０１ｍＬ／ｇの容積の生理食塩水又は所望の製剤中のｓｉＲＮＡのいずれかを、尾部静脈注射により受容した。投与後の種々の時点で、イソフルオラン吸入により動物に麻酔をかけ、後眼窩出血により血液を血清分離管に収集した。試料中の第ＶＩＩ因子タンパク質の血清レベルを、製造業者プロトコールに従って発色性アッセイ（Ｃｏａｓｅｔ第ＶＩＩ因子、ＤｉａＰｈａｒｍａ　Ｇｒｏｕｐ社製、オハイオ州、又はＢｉｏｐｈｅｎ　ＦＶＩＩ、Ａｎｉａｒａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ社製、オハイオ州）を使用して決定した。生理食塩水処置された動物から収集した血清を使用して、標準曲線を生成した。肝臓ｍＲＮＡレベルを評価した実験では、投与後の種々の時点で、動物を犠牲にして肝臓を回収し、液体窒素で瞬間凍結した。凍結肝臓組織を粉砕して粉末にした。組織溶解生成物を調製し、第ＶＩＩ因子及びａｐｏＢの肝臓ｍＲＮＡレベルを、分岐ＤＮＡアッセイを使用して決定した（ＱｕａｎｔｉＧｅｎｅ　Ａｓｓａｙ、Ｐａｎｏｍｉｃｓ社製、カリフォルニア州）。
【０３６３】
実施例１２：１，２－ジ－Ｏ－アルキル－ｓｎ３－カルボモイルグリセリド（Ｃａｒｂｏｍｏｙｌｇｌｙｃｅｒｉｄｅ）（ＰＥＧ－ＤＭＧ）の調製

【化１８】



ＩＶａの調製

１，２－ジ－Ｏ－テトラデシル－ｓｎ－グリセリドＩａ（３０ｇ、６１．８０ミリモル）及びＮ，Ｎ’－スクシンイミジルカルボアント（ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌｃａｒｂｏａｎｔｅ）（ＤＳＣ、２３．７６ｇ、１．５当量）をジクロロメタン（ＤＣＭ、５００ｍＬ）中で一緒にし、氷水混合物上で撹拌した。トリエチルアミン（ＴＥＡ、２５．３０ｍＬ、３当量）を撹拌溶液に添加し、その後反応混合物を周囲温度でオーバーナイトで撹拌させた。反応の進行は、ＴＬＣで監視した。反応混合物をＤＣＭ（４００ｍＬ）で希釈し、有機層を、水（２×５００ｍＬ）、$NaHCO_3$水溶液（５００ｍＬ）で洗浄し、その後標準的処理をした。得られた残渣を、高真空下、周囲温度でオーバーナイトで乾燥した。このようにして得られた粗カルボネートＩＩａを乾燥した後、ジクロロメタン（５００ｍＬ）に溶解し、氷浴上で撹拌した。この撹拌溶液に、$mPEG_{2000}-NH_2$（ＩＩＩ、１０３．００ｇ、４７．２０ミリモル、ＮＯＦ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ社、日本から購入）及び無水ピリジン（Ｐｙ、８０ｍＬ、過剰量）を、アルゴン下で添加した。その後、反応混合物を周囲温度でオーバーナイトで撹拌させた。溶媒及び揮発物を減圧下で除去し、残渣をＤＣＭ（２００ｍＬ）に溶解し、酢酸エチルで充填したシリカゲルカラムに負荷した。カラムを、まず酢酸エチルで、その後ジクロロメタン中５～１０％メタノール勾配で溶出して、所望のＰＥＧ－脂質ＩＶａを白色固形物（１０５．３０ｇ、８３％）として得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（$CDCl_3$、４００ＭＨｚ）δ＝５．２０～５．１２（ｍ、１Ｈ）、４．１８～４．０１（ｍ、２Ｈ）、３．８０～３．７０（ｍ、２Ｈ）、３．７０～３．２０（ｍ、$-O-CH_2-CH_2-O-$、$PEG-CH_2$）、２．１０～２．０１（ｍ、２Ｈ）、１．７０～１．６０（ｍ、２Ｈ）、１．５６～１．４５（ｍ、４Ｈ）、１．３１～１．１５（ｍ、４８Ｈ）、０．８４（ｔ、Ｊ＝６．５Ｈｚ、６Ｈ）。ＭＳ実測値範囲：２６６０～２８３６。

【０３６４】

ＩＶｂの調製

１，２－ジ－Ｏ－ヘキサデシル－ｓｎ－グリセリドＩｂ（１．００ｇ、１．８４８ミリモル）及びＤＳＣ（０．７１０ｇ、１．５当量）を、ジクロロメタン（２０ｍＬ）中で一緒にし、氷水混合物で０℃に冷却した。トリエチルアミン（１．００ｍＬ、３当量）を添加し、反応物をオーバーナイトで撹拌した。反応をＴＬＣで追跡し、ＤＣＭで希釈し、水（２回）、$NaHCO_3$溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で除去し、その結果生じたＩＩｂの残渣を高真空下でオーバーナイトで維持した。この化合物を、さらなる精製をせずに次の反応に直接使用した。$mPEG_{2000}-NH_2$ ＩＩＩ（

１．５０ｇ、０．６８７ミリモル、ＮＯＦ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ社、日本から購入）及びＩＩｂ（０．７０２ｇ、１．５当量）を、アルゴン下でジクロロメタン（２０ｍＬ）に溶解した。反応物を０℃に冷却した。ピリジン（１ｍＬ、過剰量）を添加し、反応物をオーバーナイトで撹拌した。反応は、ＴＬＣで監視した。溶媒及び揮発物を減圧下で除去し、残渣を、クロマトグラフィー（最初は酢酸エチル、その後勾配溶出として５～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）で精製して、所望の化合物ＩＶｂを白色固形物（１．４６ｇ、７６％）として得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$、４００ＭＨｚ）δ＝５．１７（ｔ、Ｊ＝５．５Ｈｚ、１Ｈ）、４．１３（ｄｄ、Ｊ＝４．００Ｈｚ、１１．００Ｈｚ、１Ｈ）、４．０５（ｄｄ、Ｊ＝５．００Ｈｚ、１１．００Ｈｚ、１Ｈ）、３．８２～３．７５（ｍ、２Ｈ）、３．７０～３．２０（ｍ、－Ｏ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－、ＰＥＧ－ＣＨ$_{2}$）、２．０５～１．９０（ｍ、２Ｈ）、１．８０～１．７０（ｍ、２Ｈ）、１．６１～１．４５（ｍ、６Ｈ）、１．３５～１．１７（ｍ、５６Ｈ）、０．８５（ｔ、Ｊ＝６．５Ｈｚ、６Ｈ）。ＭＳ実測値範囲：２７１６～２８９２。

【０３６５】

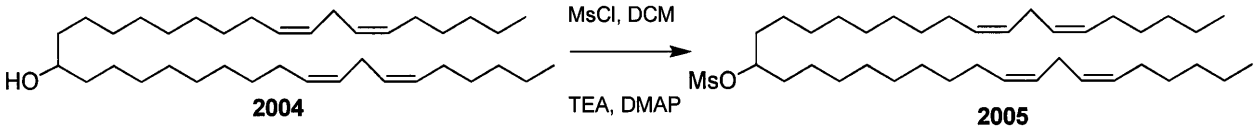
ＩＶｃの調製

１，２－ジ－Ｏ－オクタデシル－ｓｎ－グリセリドＩｃ（４．００ｇ、６．７０ミリモル）及びＤＳＣ（２．５８ｇ、１．５当量）を、ジクロロメタン（２０ｍＬ）中で一緒にし、氷水混合物で０℃に冷却した。トリエチルアミン（２．７５ｍＬ、３当量）を添加し、反応物をオーバーナイトで撹拌した。反応をＴＬＣで追跡し、ＤＣＭで希釈し、水（２回）、ＮａＨＣＯ$_{3}$溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で除去し、残渣を高真空下でオーバーナイトで維持した。この化合物を、さらなる精製をせずに次の反応に直接使用した。ＭＰＥＧ$_{2000}$－ＮＨ$_{2}$　ＩＩＩ（１．５０ｇ、０．６８７ミリモル、ＮＯＦ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ社、日本から購入）及びＩＩｃ（０．７６０ｇ、１．５当量）を、アルゴン下でジクロロメタン（２０ｍＬ）に溶解した。反応物を０℃に冷却した。ピリジン（１ｍＬ、過剰量）を添加し、反応物をオーバーナイトで撹拌した。反応は、ＴＬＣで監視した。溶媒及び揮発物を減圧下で除去し、残渣を、クロマトグラフィー（酢酸エチル、その後勾配溶出として５～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）で精製して、所望の化合物ＩＶｃを白色固形物（０．９２ｇ、４８％）として得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$、４００ＭＨｚ）δ＝５．２２～５．１５（ｍ、１Ｈ）、４．１６（ｄｄ、Ｊ＝４．００Ｈｚ、１１．００Ｈｚ、１Ｈ）、４．０６（ｄｄ、Ｊ＝５．００Ｈｚ、１１．００Ｈｚ、１Ｈ）、３．８１～３．７５（ｍ、２Ｈ）、３．７０～３．２０（ｍ、－Ｏ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－、ＰＥＧ－ＣＨ$_{2}$）、１．８０～１．７０（ｍ、２Ｈ）、１．６０～１．４８（ｍ、４Ｈ）、１．３１～１．１５（ｍ、６４Ｈ）、０．８５（ｔ、Ｊ＝６．５Ｈｚ、６Ｈ）。ＭＳ実測値範囲：２７７４～２９４８。

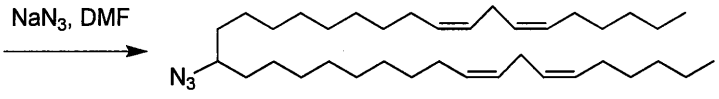
【０３６６】

実施例１３：

【化１９】



2004　　2005



2006

２００５の合成：Ａｒ雰囲気下のＤＣＭ（４００ｍＬ）中２００４（５０ｇ、９５ミリモル）溶液に、ＴＥＡ（５３ｍＬ、３７８ミリモル）及びＤＭＡＰ（１．２ｇ、９．５ミリモル）を添加し、Ａｒ雰囲気下、室温で撹拌した。反応物を－５℃に冷却し、ＤＣＭ（１００ｍＬ）中の塩化メシル（１５ｍＬ、１９０ミリモル）溶液を－５℃未満の温度でゆっくりと添加し、添加後、室温に加温させた。３０分後（ＴＬＣ）、反応物を氷冷水（２０ｍＬ）で反応停止させた。有機層を分離し、１Ｎ　ＨＣｌ（３０ｍＬ）、水、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で蒸発させて純粋な生成物（５５ｇ、９５．５％）を黄色液体として得た。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ０．８９（ｔ、６Ｈ、Ｊ＝６．８）、１．２～１．５（ｍ、３６Ｈ）、１．６７（ｍ、４Ｈ）、２．０５（ｑ、８Ｈ、Ｊ１＝６．８、Ｊ２＝６．８）、２．７７（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６．４）、２．９９（ｓ、３Ｈ）、４．７１（ｍ、１Ｈ）、及び５．３６（ｍ、８Ｈ）。

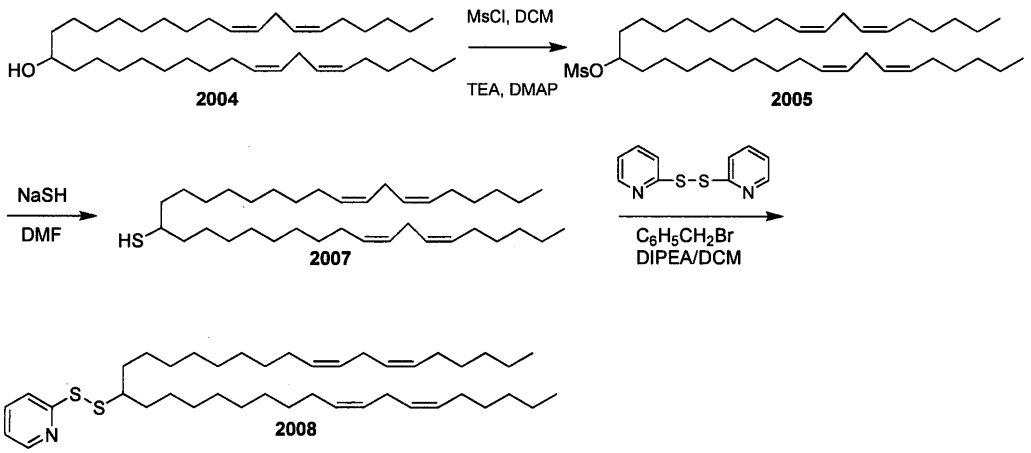
【０３６７】

合成２００６：アルゴン雰囲気下のＤＭＦ（５００ｍＬ）中２００５（５０ｇ、８２ミリモル）溶液に、ＮａＮ$_3$（２７ｇ、４１０ミリモル）を添加し、７０℃に加熱し、その温度を４時間維持した（ＴＬＣ）。混合物を水で希釈し、酢酸エチル（３×２５０ｍＬ）で抽出した。有機層を、水、ブラインで洗浄し、Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥し、減圧下で蒸発させて粗生成物を得、それを、溶出液としてヘキサン／酢酸エチルを使用したシリカゲルクロマトグラフィーで精製した。生成物をヘキサン中２％エーテルで溶出して、２００６（３６ｇ、８６％）を淡黄色液体として得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ３）：δ０．９０（ｔ、８Ｈ）、１．３０（ｍ、３６Ｈ）、１．４９（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６．４Ｈｚ）、２．０４（ｑ、８Ｈ、Ｊ１＝７．６、Ｊ２＝１４Ｈｚ）、２．７７（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６．４Ｈｚ）、３．２２（ｍ、１Ｈ）、５．３４（ｍ、８Ｈ）。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ１４．１、２２．５、２５．６、２６．１、２７．２、２９．２、２９．３、２９．４５、２９．６５、３１．５、３４．１、６３．１、１２７．９、及び１３０．１。ＩＲ（ＫＢｒ）：２０９８。

【０３６８】

実施例１４：

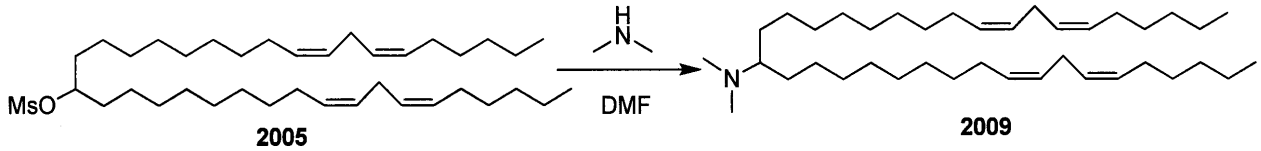
【化２０】



２００７の合成：ジメチルホルムアミド（５００ｍＬ）中の２００５（７６ｇ、１２５ミリモル）溶液に、水硫化ナトリウム水和物（３５ｇ、６２５ミリモル）を室温で添加した。反応混合物を２時間７０℃に加熱した（ＴＬＣ）。その後、それを室温に冷却し、水（７Ｖ）で希釈し、エーテル（３×５Ｖ）で抽出した。混合したエーテル層を、水（２×３Ｖ）、ブライン溶液（２×３Ｖ）で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で蒸発させて粗生成物を得、それを、溶出液としてヘキサンを使用したシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、生成物２００７（４３．６ｇ、６４％）を得た。ＭＳ：Ｃ$_{37}$Ｈ$_{68}$Ｓの分子量計算値５４４．５０、実測値：５４５．５１（Ｍ＋Ｈ）。

【０３６９】
２００８の合成：ジクロロメタン（４００ｍＬ）中のアルドリチオール（２０．２ｇ、９２ミリモル）溶液に、臭化ベンジル（１１ｍＬ、９２ミリモル）を０℃で添加した。０℃で１５分間撹拌した後、それを室温に加温し、１５分間撹拌した。反応混合物を０℃に冷却しなおし、ジクロロメタン（１００ｍＬ）中の２００７（５０ｇ、９２ミリモル）溶液、その後ジイソプロピルエチルアミン（１６ｍＬ、９２ミリモル）を添加した。添加後、それを加熱して２時間還流した（ＴＬＣ）。その後、それを、ジクロロメタン（１０Ｖ）で希釈し、水（２×１０Ｖ）、ブライン溶液（２×１０Ｖ）で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で蒸発させて粗生成物を得、それを、３％エーテル／ヘキサンを使用したシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、純粋な生成物を淡黄色液体として得た。（３５ｇ、５８％）^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ０．８９（ｔ、６Ｈ、Ｊ１＝６．４Ｈｚ、Ｊ２＝７．２Ｈｚ）、１．２５～１．４２（ｍ、３８Ｈ）、１．５６～１．６３（ｍ、２Ｈ）、２．０５（ｑ、８Ｈ、Ｊ１＝６．４Ｈｚ、Ｊ２＝１４Ｈｚ）、２．７８（ｔ、５Ｈ、Ｊ１＝６．４Ｈｚ、Ｊ２＝６Ｈｚ）、５．３０～５．４２（ｍ、８Ｈ）、７．０６（ｔ、１Ｈ、Ｊ１＝５．２Ｈｚ、Ｊ２＝６．８Ｈｚ）、７．６２（ｔ、１Ｈ、Ｊ１＝７．６Ｈｚ、Ｊ２＝７．６Ｈｚ）、７．７６（ｄ、１Ｈ、Ｊ＝８Ｈｚ）、８．４２（ｄ、１Ｈ、Ｊ＝４．４Ｈｚ）。^{13}Ｃ ＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ２２．６、２５．６、２６．７、２７．２、２９．２、２９．３、２９．５、２９．６、３１．５、３３．７４、５２．９、１１９．９、１２０．４、１２７．９、１２８、１３０．１、１３０．２、１３６．７、１４９．３、１６１．５。ＭＳ：Ｃ$_{42}$Ｈ$_{71}$ＮＳ$_{2}$の分子量計算値６５３．５０、実測値：６５４．４９（Ｍ＋Ｈ）。

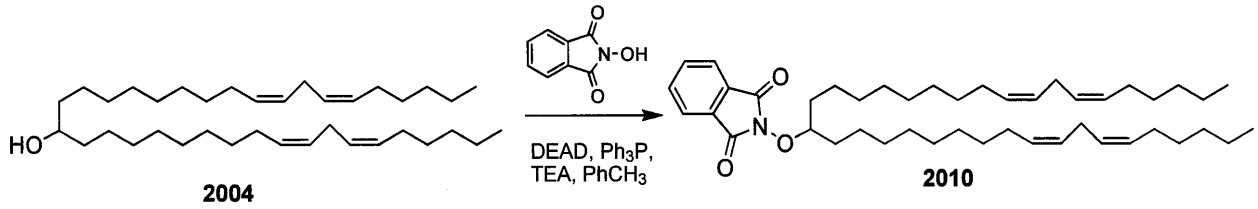
【０３７０】
実施例１５：
【化２１】



２００９（ＡＬＮＹ－１３８）の合成：ＤＭＦ及びジメチルアミン中の２００５（５ｇ、８ミリモル）溶液－４０％水溶液を封管にいれた。反応混合物を２０時間９０℃に加熱した（ＴＬＣ）。その後、それを室温に冷却し、水に注ぎ、酢酸エチル（３×５０ｍＬ）で抽出した。有機層を水及びブラインで洗浄し、Ｎａ$_{2}$ＳＯ$_{4}$で乾燥し、蒸発させて、純粋な生成物を薄褐色液体（２．００ｇ、４５％）として得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ０．８９（ｔ、６Ｈ、ｊ＝６．８）、１．２～１．４（ｍ、４０Ｈ）、２．０５（ｑ、８Ｈ、Ｊ$_{1}$＝６．８Ｈｚ、Ｊ$_{2}$＝６．８Ｈｚ）、２．２（ｓ、６Ｈ）、２．７７（ｔ、４Ｈ、ｊ＝６．４Ｈｚ）、５．３５（ｍ、８Ｈ）。^{13}Ｃ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ１４．１、２２．５、２２．６、２７．１、２７．２、２９．３、２９．５、２９．５７、２９．６３、２９．６７、３０．０、３１．５、３２．５、４０．５、６４．０、１２７．９、及び１３０．１ ＭＳ：Ｃ$_{39}$Ｈ$_{73}$Ｎの分子量計算値５５５．５７、実測値：５５６．５５（Ｍ＋Ｈ）。

【０３７１】
実施例１６：

【化２２】

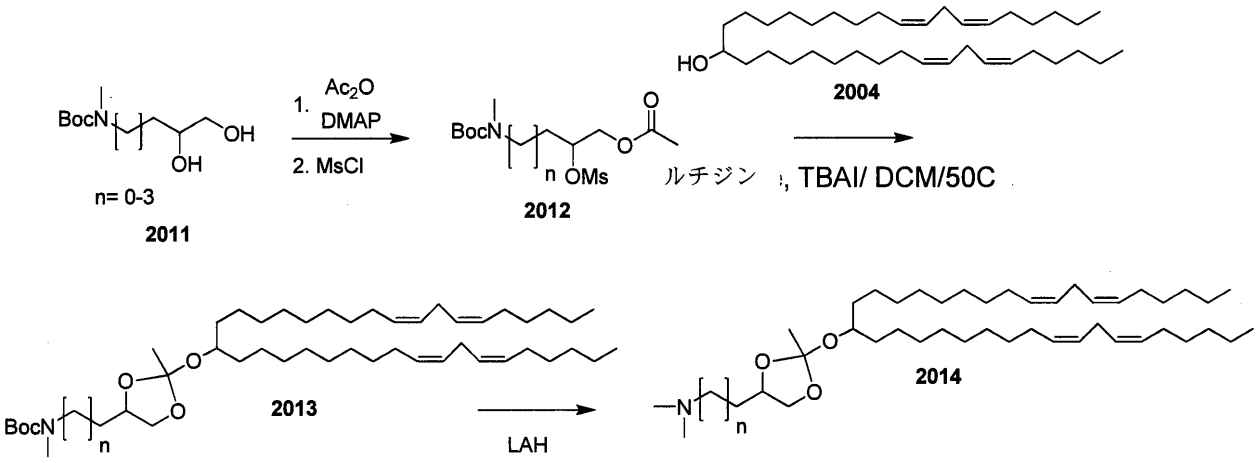


２０１０の合成：トルエン中の２００４（３０ｇ、５６．８ミリモル）溶液に、Ｎ－ヒドロキシフタルイミド（１３．９ｇ、８５ミリモル）及びＴＰＰ（２２．３０ｇ、８５ミリモル）を、アルゴン下で添加した。反応物を－５℃に冷却し、これに、ＴＥＡ（１１．８４ｍＬ）、その後ＤＥＡＤ（１３．１４ｍＬ）を添加した。反応物を室温で１２時間撹拌させた（ＴＬＣ）。その後、それをセライトパッドでろ過した。ろ過液を減圧下で蒸発させて粗生成物を得、それをシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、純粋な生成物を得、それを３％ジエチルエーテル及びヘキサンで溶出して、生成物２０１０（２２．９０ｇ、６０．５０％）を淡黄色液体として得た。 ^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$、）：δ０．９０（６Ｈ、ｔ、Ｊ＝７．２Ｈｚ）、１．２～１．４（３４Ｈ、ｍ）、１．６６～１．７０（４Ｈ、ｍ）、２．０３～２．０８（８Ｈ、ｍ）、２．７８（４Ｈ、ｔ、Ｊ＝１２．８Ｈｚ）、４．２２（１Ｈ、ｍ）、５．２９～５．４３（８Ｈ、ｍ）、７．７４～７．７６（２Ｈ、ｍ）、７．８３～７．８５（２Ｈ、ｍ）。^{13}Ｃ ＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$、）：δ１４．３、２２．５、２４．９、２５．６、２７．２、２７．２０、２９．３、２９．３、２９．５、２９．５、２９．６、２９．７、３１．５、３２．４、８８．３、１２３．３、１２７．９、１２９．０、１３０．１、１３４．３、１６４．３。ＭＳ：Ｃ$_{45}$Ｈ$_{71}$ＮＯ$_{3}$の分子量計算値６７３．５４、実測値６７４．５５（Ｍ＋Ｈ）。

【０３７２】

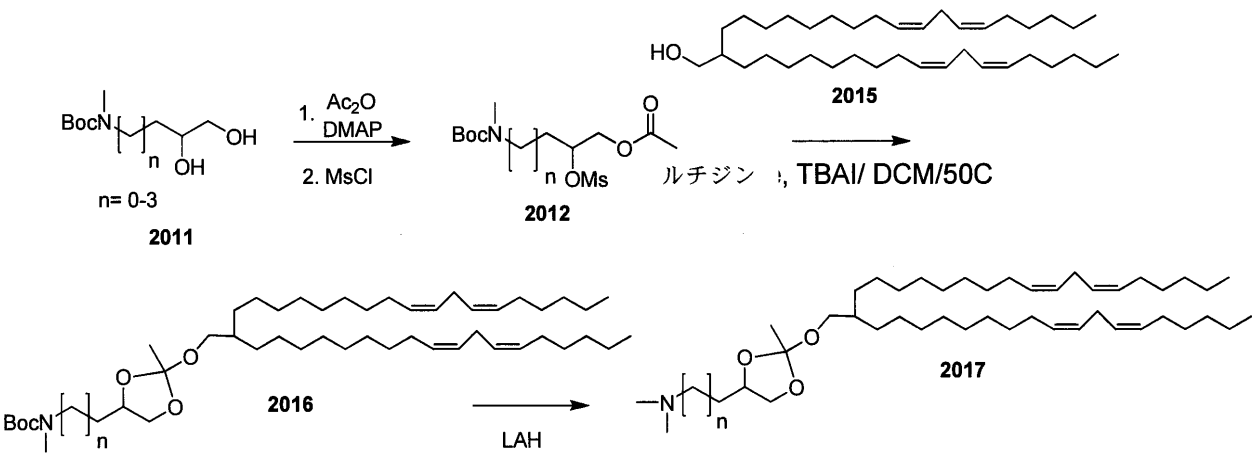
実施例１７：

【化２３】



実施例１８：

【化２４】

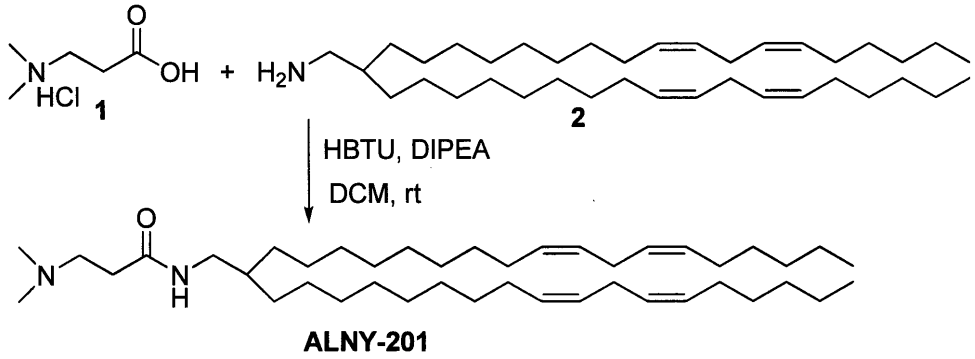


【０３７３】

実施例１９：３－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（（１１Ｚ，１４Ｚ）－２－（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエニル）イコサ－１１，１４－ジエニル）プロパンアミド（ＡＬＮＹ－２０１）の合成

スキーム１

【化２５】

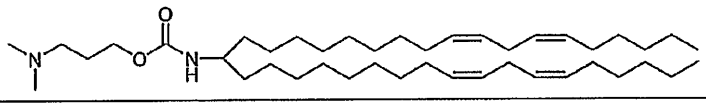
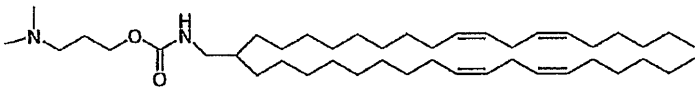
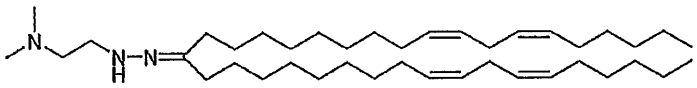
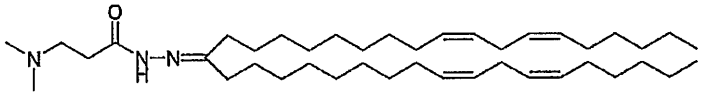
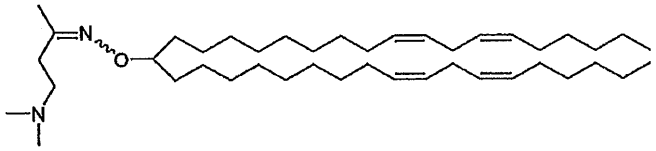
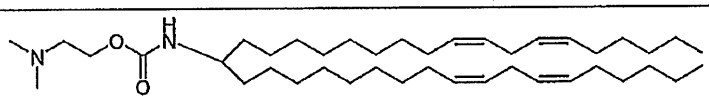


ＤＣＭ中のＮ，Ｎ－ジメチルアミノプロピオン酸塩酸塩（１、０．１９８ｇ、１．３ミリモル、１．０当量）撹拌懸濁液に、ＨＢＴＵ（０．５９ｇ、１．５６ミリモル、１．２当量）及びＤＩＰＥＡ（０．７１ｍＬ、３．９ミリモル、３．０当量）を室温で添加した。１０分間撹拌した後、ＤＣＭ中のアミン（２、０．７ｇ．１．３ミリモル、１．０当量）溶液を室温で滴加し、反応が完了するまで撹拌を継続した。反応混合物をＤＣＭで希釈し、飽和$NaHCO_3$溶液、その後ブラインで洗浄し、有機層を分離し、$MgSO_4$で乾燥し、濃縮し、ＤＣＭ：ＭｅＯＨ（５％）を勾配として使用したシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して、７０％の収率で純粋な油状化合物３を得た。^1H ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、$CDCl_3$）δ７．１８（ｂｒｓ、１Ｈ）、５．４７～５．１９（ｍ、８Ｈ）、３．１８～３．０７（ｍ、４Ｈ）、２．７６（ｔ、Ｊ＝６．５、４Ｈ）、２．７０（ｓ、６Ｈ）、２．６０（ｔ、Ｊ＝６．０、２Ｈ）、２．０４（ｑ、Ｊ＝６．８、９Ｈ）、１．４８（ｂｒｓ、１Ｈ）、１．４０～１．１４（ｍ、４３Ｈ）、０．８８（ｔ、Ｊ＝６．８、６Ｈ）。Ｃ４３Ｈ８０Ｎ２Ｏの質量計算値：６４０．６、実測値：６４１．５。

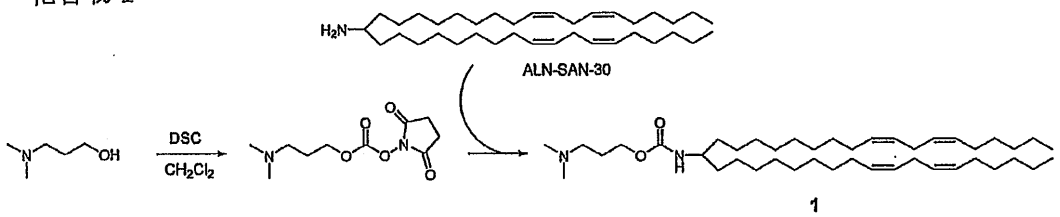
【０３７４】

新規ジリノレイル誘導体の合成

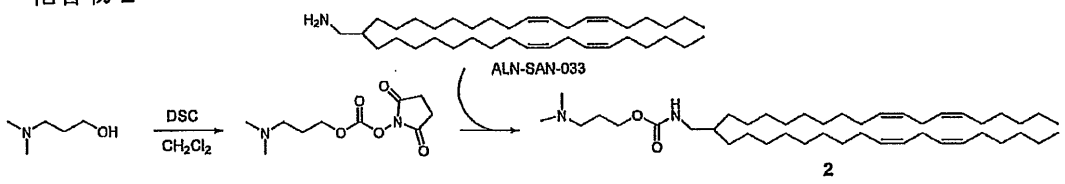
【表７Ａ】

番号	化合物	名称
1		ALNY-192
2		ALNY-200
3		ALNY-175
4		ALNY-187
5		ALNY-149
6		ALNY-202

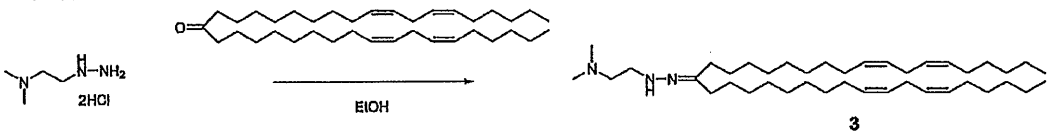
化合物１



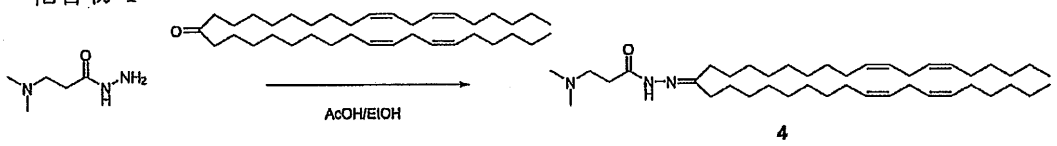
化合物２



化合物３

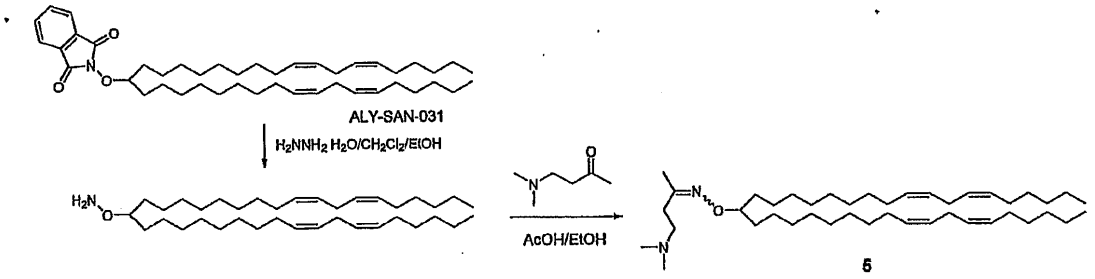


化合物４

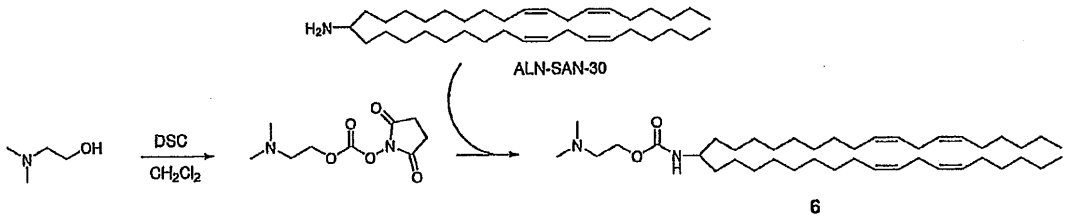


【表７Ｂ】

化合物５



化合物６



【０３７５】

実験の詳細

化合物１（ＡＬＮＹ－１９２）

CH_2Cl_2（２００ｍＬ）中のＮ，Ｎ’－ジサクシニミジルカルボネート（５．５０ｇ、２１．５ミリモル）溶液に、３－ジメチルアミノ－１－プロパノール（２．４３ｇ、２３．６ミリモル）を滴加した。その結果生じた混合物を、室温でオーバーナイトで撹拌した。５０ｍＬの溶液を取り出し、Et_3N（０．８２２ｍＬ、５．９０ミリモル）及びＡＬＮ－ＳＡＮ－３０（２．０８ｇ、３．９３ミリモル）を添加し、反応混合物を室温でオーバーナイトで撹拌した。反応混合物をCH_2Cl_2で希釈し、飽和$NaHCO_3$水溶液で洗浄した。有機層を無水$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（CH_2Cl_2中０～５％ＭｅＯＨ）で精製して、化合物１を得た（１．６６ｇ、２．５３ミリモル、６４％、CH_2Cl_2中５％ＭｅＯＨでR_f＝０．２２）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（$CDCl_3$、４００ＭＨｚ）δ５．３０～５．４１（ｍ、８Ｈ）、４．３７（ｄ、Ｊ＝８．０Ｈｚ、１Ｈ）、４．０９（ｔ、Ｊ＝６．０Ｈｚ、２Ｈ）、３．５７（ｂｒｓ、１Ｈ）、２．７８（ｔ、Ｊ＝６．０Ｈｚ、４Ｈ）、２．３３（ｔ、Ｊ＝８．０Ｈｚ、２Ｈ）、２．２３（ｓ、６Ｈ）、２．０２～２．０６（ｍ、８Ｈ）、１．７６～１．８０（ｍ、２Ｈ）、１．２７～１．４５（ｍ、４０Ｈ）、０．８９（ｔ、Ｊ＝８．０Ｈｚ、６Ｈ）。^{13}Ｃ ＮＭＲ（$CDCl_3$、１００ＭＨｚ）δ１５６．５、１３０．４、１３０．３、１２８．２、１２８．１、６３．２、５６．６、５１．４、４５．７、３５．７、３１．７、２９．９、２９．８、２９．７、２９．６、２９．５、２７．７、２７．５、２７．４、２６．０、２５．８、２２．８、１４．３。$C_{43}H_{81}N_2O_2$の分子量$(M+H)^+$ 計算値６５７．６３、実測値６５７．５。

【０３７６】

化合物２（ＡＬＮＹ－２００）

CH_2Cl_2（２００ｍＬ）中のＮ，Ｎ’－ジサクシニミジルカルボネート（５．５０ｇ、２１．５ミリモル）溶液に、３－ジメチルアミノ－１－プロパノール（２．４３ｇ、２３．６ミリモル）を滴加した。その結果生じた混合物を、室温でオーバーナイトで撹拌した。５０ｍＬの溶液を取り出し、Et_3N（０．６９７ｍＬ、５．００ミリモル）及びＡＬＮ－ＳＡＮ－０３３（１．７１ｇ、３．１５ミリモル）を添加し、反応混合物を室温でオーバーナイトで撹拌した。反応混合物をCH_2Cl_2で希釈し、飽和$NaHCO_3$水溶液で洗浄した。有機層を無水$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗生成物をシリ

カゲルカラムクロマトグラフィー（CH_2Cl_2中０～５％ＭｅＯＨ）で精製して、化合物２を得た（１．１４ｇ、１．７０ミリモル、５４％、CH_2Cl_2中５％ＭｅＯＨでR_f＝０．１３）。$C_{44}H_{83}N_2O_2$の分子量（Ｍ＋Ｈ）$^+$　計算値：６７１．６５、実測値：６７１．５。

【０３７７】

化合物３（ＡＬＮＹ－１７５）

ＥｔＯＨ（５０ｍＬ）を含有するフラスコに、ジメチルアミノエチルヒドラジン二塩酸塩（１．００ｇ、５．７０ミリモル）及びＡＬＮＹ－ＳＡＮ－００３（２．００ｇ、３．８０ミリモル）を添加した。混合物を１６時間６０℃に加熱した。Et_3N（０．５ｍＬ）の添加後、反応混合物を蒸発させた。残渣をEt_2O及び飽和$NaHCO_3$水溶液で抽出し、有機層を無水$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（CH_2Cl_2：ＭｅＯＨ：NH_3水溶液＝９５：５：０．５、R_f＝０．２９）で精製して、化合物３を得た（１．７８ｇ、２．９１ミリモル、７６％）。$C_{41}H_{78}N_3$の分子量（Ｍ＋Ｈ）$^+$　計算値：６１２．６２、実測値：６１２．５。

【０３７８】

化合物４（ＡＬＮＹ－１８７）

ＥｔＯＨ（１０ｍＬ）中の３－ジメチルアミノ－プロピオン酸ヒドラジド（Ｒｙａｎ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製、５００ｍｇ、３．８９ミリモル）及びＥｔＯＨ（２０ｍＬ）中のジリノレイルケトン（１．７４ｇ、３．３１ミリモル）を一緒に混合した。この溶液に、酢酸（０．０３８ｍＬ、０．６６２ミリモル）を添加し、反応混合物を６５℃で５時間加熱した。Et_3N（０．５ｍＬ）の添加後、反応混合物を蒸発させた。残渣をCH_2Cl_2及び飽和$NaHCO_3$水溶液で抽出し、有機層を無水$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（CH_2Cl_2：ＭｅＯＨ：NH_3水溶液＝９５：５：０．５、R_f＝０．３０）で精製して、化合物４を得た（１．４０ｇ、２．１９ミリモル、６６％）。$C_{42}H_{78}N_3O$の分子量（Ｍ＋Ｈ）$^+$　計算値６４０．６１、実測値６４０．５。

【０３７９】

化合物５（ＡＬＮＹ－１４９）

ＡＬＹ－ＳＡＮ－０３１（２．３６ｇ、３．５０ミリモル）を、CH_2Cl_2（３６ｍＬ）及びＥｔＯＨ（４ｍＬ）中のヒドラジン一水和物（０．４２４ｍＬ、５．６０ミリモル）で２時間処理した。その結果生じた白色析出物をろ過した後、ろ過液を濃縮した。残渣をEt_2O及び飽和$NaHCO_3$水溶液で抽出し、有機層を$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗生成物を、さらなる精製をせずに次のステップで使用した。R_f：０．４４（ヘキサン中１０％ＥｔＯＡＣ）。$C_{37}H_{70}NO$の分子量（Ｍ＋Ｈ）$^+$　計算値５４４．５５、実測値５４４．２。

【０３８０】

アミノオキシ化合物を、ＥｔＯＨ（３０ｍＬ）に溶解し、４－（ジメチルアミノ）ブタン－２－オン（Ｍａｔｒｉｘ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製、５００ｍｇ、４．３４ミリモル）及び酢酸（０．０４０ｍＬ、０．７０ミリモル）を、その溶液に添加した。反応混合物を室温で１４時間撹拌した。Et_3N（０．５ｍＬ）の添加後、反応混合物を蒸発させた。残渣をEt_2O及び飽和$NaHCO_3$水溶液で抽出し、有機層を$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗生成物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：ＥｔＯＡｃ＝１：１）で精製して、化合物５をＥ／Ｚ異性体の混合物として得た（１．９０ｇ、２．９６ミリモル、８５％、２ステップ、ヘキサン：ＥｔＯＡｃ＝１：１で展開してR_f＝０．３９及び０．２１）。$C_{43}H_{81}N_2O$の分子量（Ｍ＋Ｈ）$^+$　計算値６４１．６３、実測値６４１．５。

【０３８１】

化合物６（ＡＬＮＹ－２０２）

CH_2Cl_2（２００ｍＬ）中のＮ，Ｎ’－ジサクシニミジルカルボネート（５．５０

ｇ、２１．５ミリモル）溶液に、３－ジメチルアミノ－１－プロパノール（２．３７ｍＬ、２３．６ミリモル）を滴加した。その結果生じた混合物を、室温でオーバーナイトで撹拌した。５０ｍＬの溶液を取り出し、Et_3N（０．８２２ｍＬ、５．９０ミリモル）及びＡＬＮ－ＳＡＮ－３０（２．０７ｇ、３．９３ミリモル）を添加し、反応混合物を室温でオーバーナイトで撹拌した。反応混合物をCH_2Cl_2で希釈し、飽和$NaHCO_3$水溶液で洗浄した。有機層を無水$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗生成物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（CH_2Cl_2中０～５％ＭｅＯＨ）で精製して、化合物６を得た。$C_{42}H_{79}N_2O_2$の分子量$(M+H)^+$　計算値６４３．６１、実測値６４３．５。

【０３８２】

本発明の化合物は、それらの全体が本明細書に組み込まれる以下の論文に記載されている手順によりさらに合成することができる：

１．Ｓｃｈｌｕｅｔｅｒ，　Ｕｒｓ；　Ｌｕ，　Ｊｕｎ；　Ｆｒａｓｅｒ－Ｒｅｉｄ，　Ｂｅｒｔ．　Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　Ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ　Ｔｏ　Ｈｅａｖｉｌｙ　Ｌｉｐｉｄａｔｅｄ　Ｐｈｏｓｐｈｏｇｌｙｃｅｒｏｉｎｏｓｉｔｉｄｅｓ．　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　（２００３），　５（３），　２５５－２５７２

２．Ｋｉｎｇ，　Ｊ．　Ｆ．；　Ａｌｌｂｕｔｔ，　Ａ．　Ｄ．　Ｃａｎ．　Ｊ．　Ｃｈｅｍ．　１９７０，　４８，　１７５４－１７６９３

３．Ｍａｃｈ，　Ｍａｔｅｕｓｚ；　Ｓｃｈｌｕｅｔｅｒ，　Ｕｒｓ；　Ｍａｔｈｅｗ，　Ｆｅｌｉｘ；　Ｆｒａｓｅｒ－Ｒｅｉｄ，　Ｂｅｒｔ；　Ｈａｚｅｎ，　Ｋｅｖｉｎ　Ｃ．　Ｃｏｍｐａｒｉｎｇ　ｎ－ｐｅｎｔｅｎｙｌ　ｏｒｔｈｏｅｓｔｅｒｓ　ａｎｄ　ｎ－ｐｅｎｔｅｎｙｌ　ｇｌｙｃｏｓｉｄｅｓ　ａｓ　ａｌｔｅｒｎａｔｉｖｅ　ｇｌｙｃｏｓｙｌ　ｄｏｎｏｒｓ．　Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　（２００２），　５８（３６），　７３４５－７３５４

【０３８３】

実施例２０：インビボげっ歯動物第ＶＩＩ因子サイレンシングモデルを使用した、種々の陽イオン性脂質を含有する脂質粒子製剤の効力の決定。

第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）は、凝血カスケードにおいて顕著なタンパク質であり、肝臓（肝細胞）で合成され、血漿へと分泌される。血漿中のＦＶＩＩレベルは、単純なプレートに基づく比色アッセイにより決定することができる。そのため、ＦＶＩＩは、肝細胞由来タンパク質のｓｉｒｎａ媒介性下方制御を決定するための便利なモデルであり、並びに核酸脂質粒子及びｓｉＲＮＡの血漿中濃度及び組織分布を監視するための便利なモデルである。

【表８】

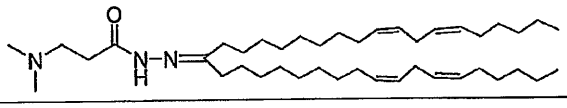
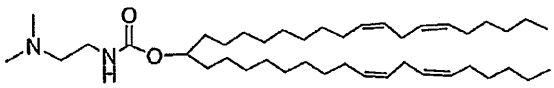
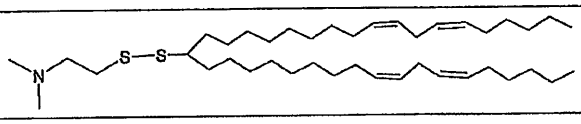
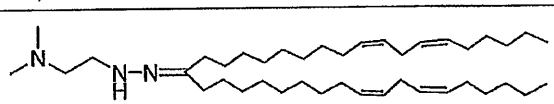
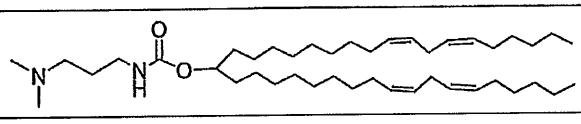
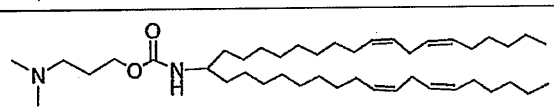
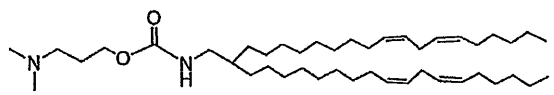
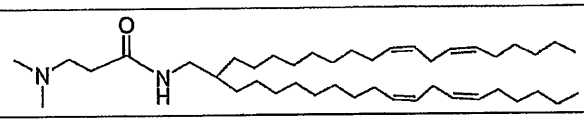
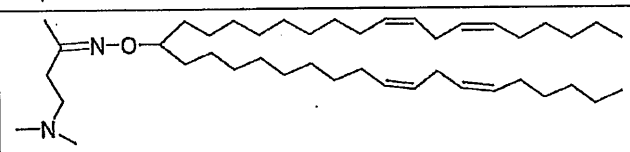
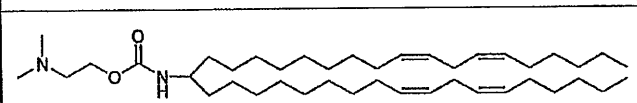
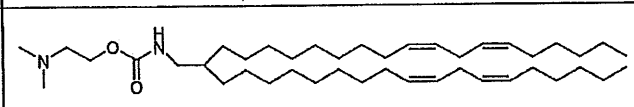
二本鎖	配列５’－３’	配列番号	標的
AD-1661	GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUAfCdTsdT		FVII
	GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdTsdT		

小文字は２’ＯＭｅ修飾であり、Ｎｆは２’Ｆ修飾核酸塩基であり、ｄＴはデオキシチミジンであり、ｓはホスホチオアートである。

【０３８４】

以下の陽イオン性脂質を試験した：

【表９】

化合物	化合物構造	分子データ
A		分子量：$_{7}N_3O$ Mol Wt: 640.08
B		分子量：$_{}N_2O_2$ Mol Wt: 643.08
C		分子量：$_{7}NS_2$ Mol Wt: 648.19
D		分子量：$_{77}N_3$ Mol Wt: 612.07
E		分子量：$_{}N_2O_2$ Mol Wt: 657.11
F		$C_{43}H_{80}N_2O_2$ 分子量：657.11
G		$C_{44}H_{82}N_2O_2$ 分子量：671.134
H		$C_{43}H_{80}N_2O$ 分子量：641.108
I		$C_{43}H_{80}N_2O$ 分子量：641.11
J		$C_{42}H_{78}N_2O_2$ 分子量：643.081
K		$C_{43}H_{80}N_2O_2$ 分子量：657.107

【０３８５】

上記に示されている陽イオン性脂質を使用して、米国特許仮出願第６１／２２８，３７３号に記載されているようなインライン混合法を使用して、ＡＤ－１６６１二本鎖を含有するリポソームを製剤化した。脂質粒子を、以下のモル比を使用して製剤化した：５０％陽イオン性脂質／１０％ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）／３８．５％コレステロール／１．５％　ＰＥＧ－ＤＭＧ（平均ＰＥＧ分子量が２０００の（１－（モノメトキシ－ポリエチレングリコール）－２，３－ジミリストイルグリセロール）。

【０３８６】

Ｃ５７ＢＬ／６マウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｓ社製、マサチューセッツ州）は、生理食塩水又は製剤化したｓｉＲＮＡのいずれかを、尾部静脈注射により受容した。投与後の種々の時点で、血清試料を後眼窩出血により収集した。試料中の第ＶＩＩ

因子タンパク質の血清レベルを、発色アッセイ（Ｂｉｏｐｈｅｎ　ＦＶＩＩ、Ａｎｉａｒａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ社製、オハイオ州）を使用して決定した。第ＶＩＩ因子の肝臓ｍＲＮＡレベルを決定するために、動物を犠牲にして肝臓を回収し、液体窒素で瞬間凍結した。組織溶解生成物を凍結組織から調製し、第ＶＩＩ因子の肝臓ｍＲＮＡレベルを、分岐ＤＮＡアッセイを使用して定量化した（ＱｕａｎｔｉＧｅｎｅ　Ａｓｓａｙ、Ｐａｎｏｍｉｃｓ社製、カリフォルニア州）。

【０３８７】

ＦＶＩＩ　ｓｉＲＮＡ処置動物のＦＶＩＩ活性を、Ｃ５７ＢＬ／６マウスに静脈内（ボーラス）注射した４８時間後に評価した。ＦＶＩＩを、血清又は組織中のタンパク質レベルを決定するための市販キットを使用し、製造業者の説明書に従って、マイクロプレート規模で測定した。ＦＶＩＩの低減を未処理対照マウスに対して決定し、結果を残留ＦＶＩＩ％として表した。２用量レベル（０．０５及び０．００５ｍｇ／ｋｇのＦＶＩＩ　ｓｉＲＮＡ）を、各新規リポソーム組成物のスクリーニングに使用した。図３は、様々な陽イオン性脂質を含有する０．０５又は０．００５ｍｇ／ｋｇの脂質粒子を投与した動物中の相対的ＦＶＩＩタンパク質レベルを例示するグラフを示す。

【０３８８】

実施例２１　事前に形成された小胞を使用したｓｉＲＮＡ製剤

陽イオン性脂質を含有する粒子を、事前形成小胞法を使用して製作した。陽イオン性脂質、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ脂質を、それぞれ４０／１０／４０／１０のモル比でエタノールに可溶化した。脂質混合物を緩衝水溶液（５０ｍＭクエン酸、ｐＨ４）に添加して、それぞれ３０％（容積／容積）及び６．１ｍｇ／ｍＬの最終エタノール及び脂質濃度に混合し、押出前に室温で２分間平衡化させた。水和脂質を、Ｎｉｃｏｍｐ分析により決定して７０～９０ｎｍの小胞直径が得られるまで、Ｌｉｐｅｘ　Ｅｘｔｒｕｄｅｒ（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ　Ｌｉｐｉｄｓ社製、バンクーバー、ブリティッシュコロンビア州）を使用して、２２℃で、２つの積層型８０ｎｍ細孔サイズフィルター（Ｎｕｃｌｅｐｏｒｅ社製）を通して押し出した。これには、一般的に１～３回の通過が必要だった。小さな小胞を形成しなかった幾つかの陽イオン性脂質混合物の場合、より低いｐＨ緩衝液（５０ｍＭクエン酸、ｐＨ３）で脂質混合物を水和して、ＤＳＰＣ頭部基のホスフェート基をプロトン化することが、安定した７０～９０ｎｍ小胞の形成に役立った。

【０３８９】

ＦＶＩＩ　ｓｉＲＮＡ（３０％エタノールを含有する５０ｍＭクエン酸、ｐＨ４水溶液に可溶化）を、予め３５℃に平衡化された小胞に、約５ｍＬ／分の速度で混合しながら添加した。０．０６（重量／重量）の最終標的ｓｉＲＮＡ／脂質比が達成された後、ＦＶＩＩ　ｓｉＲＮＡの小胞再構成及び封入化を可能にするために、混合物を３５℃でさらに３０分間インキュベートした。その後、エタノールを除去し、外部緩衝液を、透析又は接線流ダイアフィルトレーションのいずれかにより、ＰＢＳ（１５５ｍＭ　ＮａＣｌ、３ｍＭ　Ｎａ２ＨＰＯ４、１ｍＭ　ＫＨ２ＰＯ４、ｐＨ７．５）に置換した。最終封入化ｓｉＲＮＡ対脂質比は、サイズ排除スピンカラム又はイオン交換スピンカラムを使用して、未封入ｓｉＲＮＡを除去した後に決定した。

【０３９０】

実施例２２：新規な脂質製剤の効力のインビボ決定

試験製剤は、治療群当たり３匹のマウスを用いて、０．１、０．３、１．０、及び５．０ｍｇ／ｋｇで、雌の７～９週齢、１５～２５ｇの雌Ｃ５７Ｂｌ／６マウスのＦＶＩＩノックダウンについて初期評価した。研究には全て、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ、対照群）又はベンチマーク製剤のいずれかを受容する動物が含まれていた。製剤を、試験の直前にＰＢＳで適切な濃度に希釈した。マウスを計量し、適切な投与容積を計算した（１０μｌ／ｇ体重）。試験及びベンチマーク製剤並びにＰＢＳ（対照動物用）を、側尾静脈に静脈内投与した。２４時間後、ケタミン／キシラジンを腹膜腔内注射して動物に麻酔をかけ、５００～７００μｌの血液を、心穿刺により血清分離チューブ（ＢＤ　Ｍｉｃｒｏｔａｉｎｅｒ）に収集した。血液を１５℃で１０分間２，０００×ｇで遠心分離し、血清を

収集し、分析するまで－７０℃で保管した。血清試料を３７℃で３０分間解凍し、ＰＢＳで希釈し、９６穴アッセイプレートに等分した。第ＶＩＩ因子レベルは、製造業者の説明書に従った発色アッセイ（Ｂｉｏｐｈｅｎ　ＦＶＩＩキット、Ｈｙｐｈｅｎ　ＢｉｏＭｅｄ社製）、及び４０５ｎｍ波長フィルターを装備したマイクロプレートリーダーで測定した吸光度を使用して評価した。血漿ＦＶＩＩレベルを定量し、対照動物の血清貯留試料から生成した検量線を使用して、ＥＤ５０（対照動物と比較して血漿ＦＶＩＩレベルの５０％低減をもたらす用量）を計算した。高レベルのＦＶＩＩノックダウン（ＥＤ５０＜＜０．１ｍｇ／ｋｇ）を示す目的の製剤を、より低い用量範囲の独立した研究で再試験して効力を確認し、ＥＤ５０を確立した。

【０３９１】

図４は、この方法を使用して試験された例示的な化合物のＥＣ５０を示す表を提供する。

【０３９２】

実施例２２Ａ：製剤化脂質のｐＫａの決定

様々なイオン化可能な陽イオン性脂質のｐＫａは、水中では非蛍光性であるが、膜に結合すると検知可能に蛍光性となる蛍光プローブである２－（ｐ－トルイジノ）－６－ナフタレンスルホン酸（ＴＮＳ）を使用して、本質的に（Ｅａｓｔｍａｎ　ｅｔ　ａｌ　１９９２　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３１：４２６２-４２６８）に記載されているように決定した。陽イオン性脂質／ＤＳＰＣ／ＣＨ／ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ（４０：１０：４０：１０モル比）で構成される小胞を、２～１１の範囲の種々のｐＨの緩衝液（１３０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　CH_3COONH_4、１０ｍＭ　ＭＥ、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ）で０．１ｍＭに希釈した。等量のＴＮＳ水溶液（最終１μＭ）を希釈小胞に添加し、３０秒間の平衡化期間後、ＴＮＳ含有溶液の蛍光を、それぞれ３２１ｎｍ及び４４５ｎｍの励起及び発光波長で測定した。陽イオン性脂質含有小胞のｐＫａは、測定された蛍光を溶液のｐＨに対してプロットし、市販グラフプログラムＩｇｏｒＰｒｏを使用して、データをシグモイド曲線にフィッティングすることにより決定した。

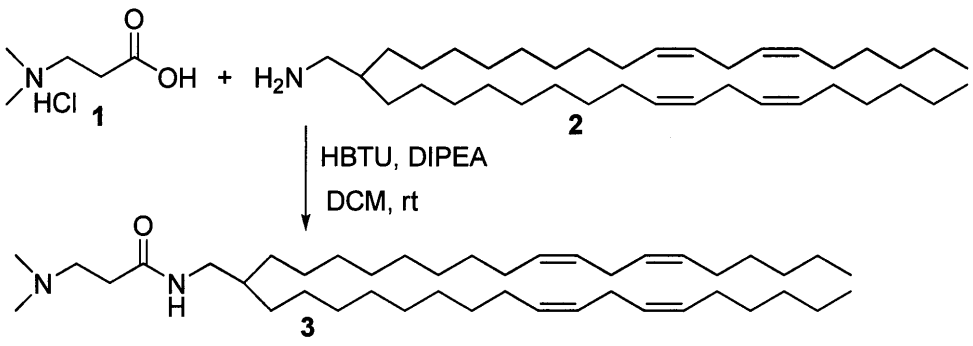
【０３９３】

図４は、この方法を使用して試験された例示的な化合物のＥＣ５０を示す表を提供する。

【０３９４】

実施例２３：アミド結合脂質の合成

【化２６】



ＤＣＭ中のＮ，Ｎ－ジメチルアミノプロピオン酸塩酸塩（１、０．１９８ｇ、１．３ミリモル、１．０当量）撹拌懸濁液に、ＨＢＴＵ（０．５９ｇ、１．５６ミリモル、１．２当量）及びＤＩＰＥＡ（０．７１ｍＬ、３．９ミリモル、３．０当量）を室温で添加した。１０分間撹拌した後、ＤＣＭ中のアミン（２、０．７ｇ．１．３ミリモル、１．０当量）溶液を室温で滴加し、反応が完了するまで撹拌を継続した。反応混合物をＤＣＭで希釈し、飽和$NaHCO_3$溶液、その後ブラインで洗浄し、有機層を分離し、$MgSO_4$で乾燥し、濃縮し、ＤＣＭ：ＭｅＯＨ（５％）を勾配として使用したシリカゲルカラムクロマ

トグラフィーで精製して、純粋な油状化合物３（ＡＬＮＹ－２０１）を７０％の収率で得た。

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）δ７．１８（ｂｒｓ、１Ｈ）、５．４７～５．１９（ｍ、８Ｈ）、３．１８～３．０７（ｍ、４Ｈ）、２．７６（ｔ、Ｊ＝６．５、４Ｈ）、２．７０（ｓ、６Ｈ）、２．６０（ｔ、Ｊ＝６．０、２Ｈ）、２．０４（ｑ、Ｊ＝６．８、９Ｈ）、１．４８（ｂｒｓ、１Ｈ）、１．４０～１．１４（ｍ、４３Ｈ）、０．８８（ｔ、Ｊ＝６．８、６Ｈ）。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１０１ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）δ１７２．２６、１３０．４１、１３０．３６、１２８．１７、１２８．１５、７７．５４、７７．２２、７６．９０、５５．７０、４３．８５、４３．０２、３７．９０、３１．９９、３１．７４、３０．２５、２９．９２、２９．８６、２９．８１、２９．５７、２７．４７、２７．４２、２６．８４、２５．８５、２２．７９、１４．２９。Ｃ４３Ｈ８０Ｎ２Ｏの計算質量値：６４０．６、実測値６４１．５。

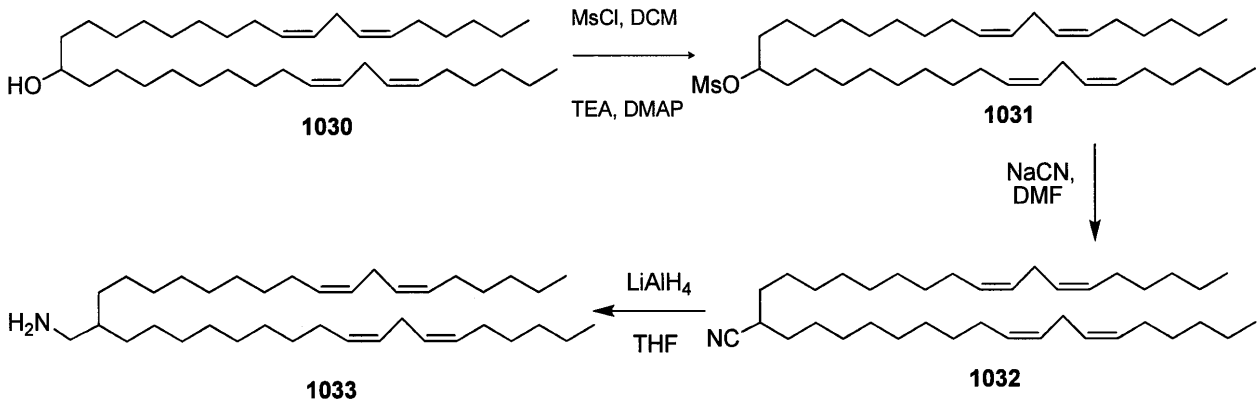
【０３９５】

実施例２４：カルバメート及び尿素結合脂質の合成

化合物１０３３

スキーム１

【化２７】



【表１０】

段階－１：

段階番号	化学薬品／試薬＆溶媒	分子量	モル	等量	量
1	アルコール１０３０	528	0.095	1	50 g
2	DCM				500 ml
3	トリエチルアミン（ＴＥＡ）	101.2	0.378	4	53 ml
4	DMAP	122.17	0.0095	0.1	1.2 g
5	塩化メシル	114.55	0.19	2	15 ml

【０３９６】

Ａｒ雰囲気下のＤＣＭ（４００ｍＬ）中アルコール１０３０溶液に、ＴＥＡ及びＤＭＡＰを添加し、Ａｒ雰囲気下、室温で撹拌した。反応物を－５℃に冷却し、ＤＣＭ（１００ｍＬ）中の塩化メシル溶液を－５℃未満の温度でゆっくりと添加し、添加後、室温に加温させた。３０分後（ＴＬＣ）、反応物を氷冷水（２０ｍＬ）で反応停止させた。有機層を分離し、１Ｎ　ＨＣｌ（３０ｍＬ）、水、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で蒸発させて純粋な生成物１０３１（５５ｇ、収率９５．５％）を黄色液体として得た。ＨＰＬＣ：９９．８％；^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ０．８９（ｔ、６Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ）、１．２～１．５（ｍ、３６Ｈ）、１．６７（ｍ、４Ｈ）、２．０５（ｑ、８Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ）、２．７７（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６．４Ｈｚ）、２

．９９（ｓ、３Ｈ）、４．７１（ｍ、１Ｈ）、及び５．３６（ｍ、８Ｈ）。^{13}ＣＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ１４．０、２２．５、２４．９、２５．６、２７．２、２９．２、２９．３、２９．４、２９．５、２９．６、３１．５、３４．４、３８．６、４５．９、８４．３、１２７．９、１２８．０、１３０．０、１３０．１。

【表１１】

段階－２：

段階番号	化学薬品／試薬＆溶媒	分子量	モル	等量	量
1	メシレート１０３１	606	0.0165	1	10g
2	ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）				100 ml
3	シアン化ナトリウム	49	0.0330	2	1.617g

【０３９７】

Ａｒ雰囲気下のＤＭＦ中シアン化ナトリウム溶液に、ＤＭＦ中の段階－１生成物をゆっくりと添加し、その後２４時間５５℃に加熱した（ＨＰＬＣ）。その後、それを室温に冷却し、水で希釈し、酢酸エチル（数回）で抽出した。混合した有機層を、水、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で蒸発させて粗生成物を得、それを、溶出液として１％エーテル／ヘキサンを使用したシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、純粋な生成物１０３２（５．８ｇ、収率：６２％）を淡黄色液体として得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ０．８７（ｔ、６Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ）、１．２５（ｍ、３８Ｈ）、１．５２（ｍ、４Ｈ）、２．０３（ｑ、８Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ）、２．４７（ｍ、１Ｈ）、２．７６（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６．４Ｈｚ）、５．３２（ｍ、８Ｈ）。

【表１２】

段階－３：

段階番号	化学薬品／試薬＆溶媒	分子量	モル	等量	量
1	ニトリル１０３２	538	0.0097	1	5.2g
2	水素化アルミニウムリチウム	38	0.0387	4	1.5g
3	テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）				52 ml

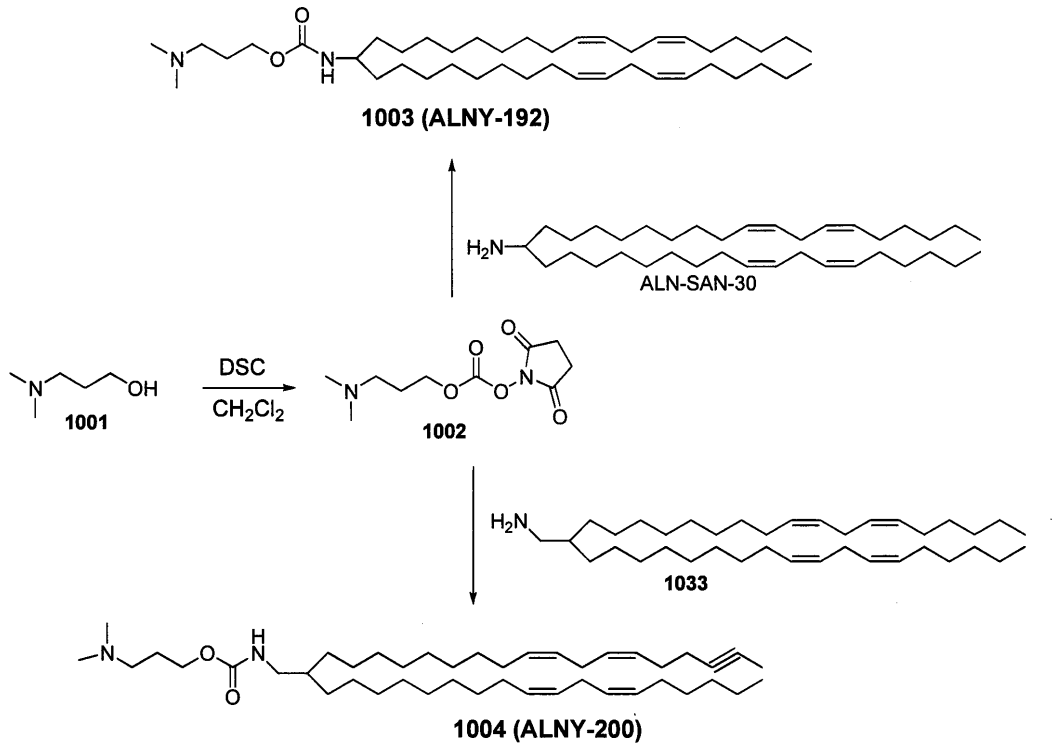
【０３９８】

Ａｒ雰囲気下の乾燥ＴＨＦ中水素化アルミニウムリチウム懸濁液に、ＴＨＦ中の段階－２生成物を０℃で滴加した。その後、それを室温（ＲＴ）に加温させ、ＲＴで２０時間撹拌した（ＴＬＣ）。それを０℃に冷却し、硫酸ナトリウムの飽和溶液で反応停止させた。反応停止させた物質を、セライト床でろ過し、酢酸エチルで洗浄した。混合したろ過液を減圧下で蒸発させて粗生成物を得、それを、ヘキサン中１０％酢酸エチルを使用したシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、純粋な生成物１０３３（３．７ｇ、収率：７１％）を薄褐色液体として得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ０．８７（ｔ、６Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ）、１．２７（ｍ、４８Ｈ）、２．０３（ｑ、８Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ）、２．６０（ｄ、２Ｈ、Ｊ＝４．０Ｈｚ）、２．７６（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６．４Ｈｚ）、５．３１（ｍ、８Ｈ）。^{13}ＣＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ１４．１、２２．６、２５．６、２６．８、２７．１、２７．２、２９．３、２９．５、２９．６、３０．１、３１．５、４０．９、４５．２、１２８．０、１３０．１。ＬＣ－ＭＳ：５４３（Ｍ＋）。

【０３９９】

スキーム２

【化２８】



化合物１００３（ＡＬＮＹ－１９２）

CH_2Cl_2（２００ｍＬ）中のＮ，Ｎ’－ジサクシニミジルカルボネート（５．５０ｇ、２１．５ミリモル）溶液に、３－ジメチルアミノ－１－プロパノール（１００１、２．４３ｇ、２３．６ミリモル）を滴加した。その結果生じた混合物を、室温でオーバーナイトで撹拌した。５０ｍＬの溶液を取り出し、Et_3N（０．８２２ｍＬ、５．９０ミリモル）及びＡＬＮ－ＳＡＮ－３０（２．０８ｇ、３．９３ミリモル）を添加し、反応混合物を室温でオーバーナイトで撹拌した。反応混合物をCH_2Cl_2で希釈し、飽和$NaHCO_3$水溶液で洗浄した。有機層を無水$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（CH_2Cl_2中０～５％ＭｅＯＨ）で精製して、化合物１００３を得た（１．６６ｇ、２．５３ミリモル、６４％、CH_2Cl_2中５％ＭｅＯＨでR_f＝０．２２）。^1H ＮＭＲ（$CDCl_3$、４００ＭＨｚ）δ５．３０～５．４１（ｍ、８Ｈ）、４．３７（ｄ、Ｊ＝８．０Ｈｚ、１Ｈ）、４．０９（ｔ、Ｊ＝６．０Ｈｚ、２Ｈ）、３．５７（ｂｒｓ、１Ｈ）、２．７８（ｔ、Ｊ＝６．０Ｈｚ、４Ｈ）、２．３３（ｔ、Ｊ＝８．０Ｈｚ、２Ｈ）、２．２３（ｓ、６Ｈ）、２．０２～２．０６（ｍ、８Ｈ）、１．７６～１．８０（ｍ、２Ｈ）、１．２７～１．４５（ｍ、４０Ｈ）、０．８９（ｔ、Ｊ＝８．０Ｈｚ、６Ｈ）。^{13}C ＮＭＲ（$CDCl_3$、１００ＭＨｚ）δ１５６．５、１３０．４、１３０．３、１２８．２、１２８．１、６３．２、５６．６、５１．４、４５．７、３５．７、３１．７、２９．９、２９．８、２９．７、２９．６、２９．５、２７．７、２７．５、２７．４、２６．０、２５．８、２２．８、１４．３。$C_{43}H_{81}N_2O_2$の分子量$(M+H)^+$ 計算値６５７．６３、実測値６５７．５。

【０４００】

化合物１００４（ＡＬＮＹ－２００）

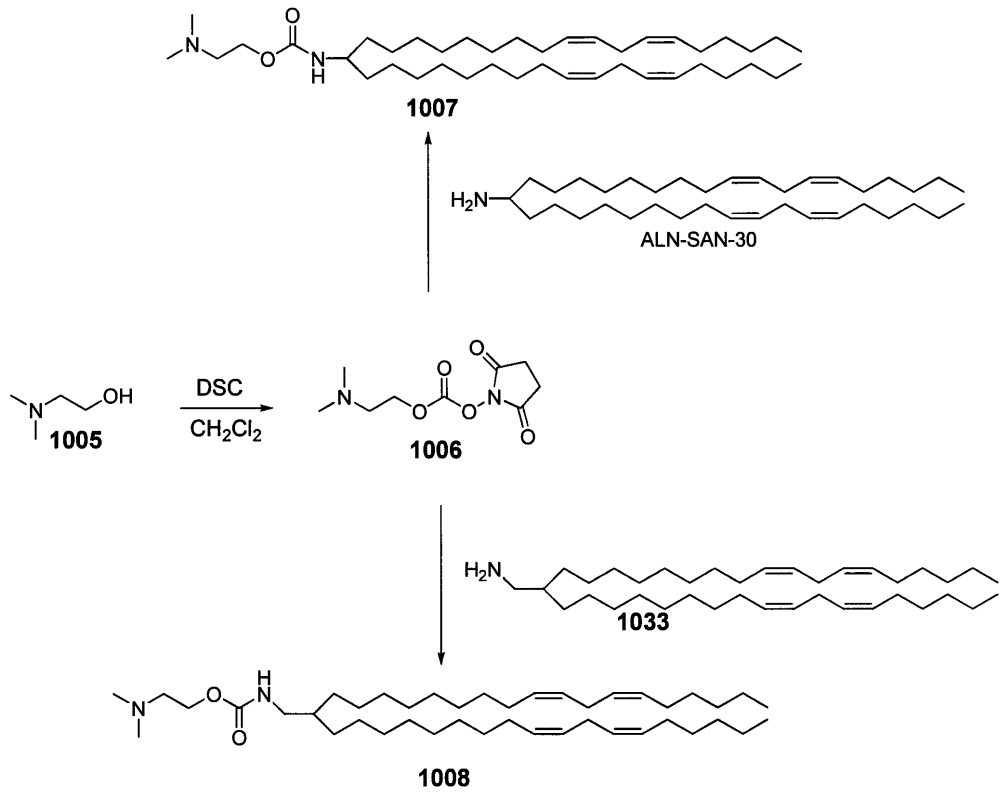
CH_2Cl_2（２００ｍＬ）中のＮ，Ｎ’－ジサクシニミジルカルボネート（５．５０ｇ、２１．５ミリモル）溶液に、３－ジメチルアミノ－１－プロパノール（１００１、２．４３ｇ、２３．６ミリモル）を滴加した。その結果生じた混合物を、室温でオーバーナイトで撹拌した。５０ｍＬの溶液を取り出し、Et_3N（０．６９７ｍＬ、５．００ミリ

モル）及びアミン１０３３（１．７１ｇ、３．１５ミリモル）を添加し、反応混合物を室温でオーバーナイトで撹拌した。反応混合物をCH_2Cl_2で希釈し、飽和$NaHCO_3$水溶液で洗浄した。有機層を無水$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（CH_2Cl_2中０～５％ＭｅＯＨ）で精製して、化合物１００４を得た（１．１４ｇ、１．７０ミリモル、５４％、CH_2Cl_2中５％ＭｅＯＨでR_f＝０．１３）。$C_{44}H_{83}N_2O_2$の分子量$(M+H)^+$　計算値６７１．６５、実測値６７１．５。

【０４０１】

スキーム３

【化２９】



化合物１００７

CH_2Cl_2（２００ｍＬ）中のＮ，Ｎ’－ジサクシニミジルカルボネート（５．５０ｇ、２１．５ミリモル）溶液に、２－ジメチルアミノエタノール（１００５、２．３７ｍＬ、２３．６ミリモル）を滴加した。その結果生じた混合物を、室温でオーバーナイトで撹拌した。５０ｍＬの溶液を取り出し、Et_3N（０．８２２ｍＬ、５．９０ミリモル）及びＡＬＮ－ＳＡＮ－３０（２．０７ｇ、３．９２ミリモル）を添加し、反応混合物を室温でオーバーナイトで撹拌した。反応混合物をCH_2Cl_2で希釈し、飽和$NaHCO_3$水溶液で洗浄した。有機層を無水$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（CH_2Cl_2中０～５％ＭｅＯＨ）で精製して、化合物１００７を得た（１．７８ｇ、２．７７ミリモル、７１％、２ステップ、CH_2Cl_2中５％ＭｅＯＨで展開してR_f＝０．２６）。$C_{42}H_{79}N_2O_2$の分子量$(M+H)^+$　計算値６４３．６１、実測値６４３．５。

【０４０２】

化合物１００８

CH_2Cl_2（２００ｍＬ）中のＮ，Ｎ’－ジサクシニミジルカルボネート（５．５０ｇ、２１．５ミリモル）溶液に、２－ジメチルアミノエタノール（１００５、２．３７ｍＬ、２３．６ミリモル）を滴加した。その結果生じた混合物を、室温でオーバーナイトで

撹拌した。５０ｍＬの溶液を取り出し、Et_3N（０．６９７ｍＬ、５．００ミリモル）及び１０３３（４４０ｍｇ、０．８１２ミリモル）を添加し、反応混合物を室温でオーバーナイトで撹拌した。反応混合物をCH_2Cl_2で希釈し、飽和$NaHCO_3$水溶液で洗浄した。有機層を無水$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（CH_2Cl_2中０～５％ＭｅＯＨ）で精製して、化合物８を得た（３３２ｍｇ、０．５０５ミリモル、６２％、CH_2Cl_2中５％ＭｅＯＨでR_f＝０．３０）。$C_{43}H_{81}N_2O_2$の分子量（Ｍ＋Ｈ）$^+$　計算値６５７．６３、実測値６５７．５。

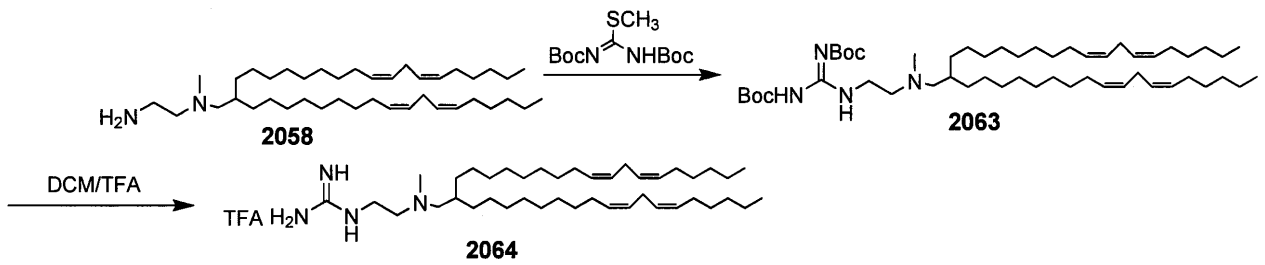
【０４０３】

実施例２５：グアニジウム結合脂質の合成

グアニジウム類似体

２０６４の合成

【化３０】



２０６３の合成：ＤＭＦ／酢酸エチル混合物中の２０５８（６．７ｇ、０．０１１２モル）溶液に、ビス－Ｂｏｃ－Ｓ－メチルイソチオ尿素（３．４ｇ、０．０１１８モル）及びトリエチルアミン（３．５ｍＬ、０．２４６モル）を０℃で添加した。均質な溶液に、$HgCl_2$（３．３ｇ、０．０１２３モル）を０℃で添加し、１時間室温で撹拌した。ＴＬＣは、出発物質が存在しないことを示した。その後、反応物を酢酸エチル（１００ｍＬ）で希釈した。セライトのパッドでろ過し、酢酸エチルで洗浄した。ろ過液を水洗浄（２×１５０ｍＬ）及びブライン洗浄（２００ｍＬ）した。濁った有機層を、セライト／２３０～４００メッシュシリカゲル／セライトのパッドで再度ろ過した。ろ過液を減圧で蒸発させて粗生成物を得、それを、溶出液としてＤＣＭ／ヘキサンを使用した中性アルミナのクロマトグラフィーで精製した。生成物をヘキサン中４０％ＤＣＭで溶出し、黄色液体を得た（収量５．２ｇ、５５％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、$CDCl_3$）：０．８９（ｔ、６Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ）、１．２７～１．４６（ｍ、４３Ｈ）、１．４９（ｓ、９Ｈ）、１．５０（ｓ、９Ｈ）、２．０２（ｑ、８Ｈ、J_1＝６．８Ｈｚ、J_2＝６．８Ｈｚ）、２．１２（ｄ、２Ｈ、Ｊ＝７．２Ｈｚ）、２．１６（ｓ、３Ｈ）、２．４６（ｔ、２Ｈ、Ｊ＝５．６Ｈｚ）、２．７７（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６Ｈｚ）、３．４７（ｍ、２Ｈ）、５．３０（ｍ、８Ｈ）、８．６７（ｓ、１Ｈ）、１１．４８（９ｓ、１Ｈ）。

【０４０４】

２０６４（ＡＬＮＹ－１３９）の合成：０℃の１０ｍＬ　ＤＣＭ中２０６３（５．２ｇ、０．００６２モル）溶液に、６０ｍＬ　ＤＣＭ中の１０ｍＬ　ＴＦＡをゆっくりと添加した。添加後、反応物を室温で３時間撹拌した。ＴＬＣは、出発物質が存在しないことを示した。過剰ＴＦＡを減圧下で除去し、必要な生成物を褐色粘性液体として得た（５．３ｇ、７８％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、$CDCl_3$）：０．８９（ｔ、６Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ）、１．２７～１．４６（ｍ、４４Ｈ）、１．７８（ｓ、１Ｈ）、２．０２（ｑ、８Ｈ、J_1＝６．４Ｈｚ、J_2＝６．８Ｈｚ）、２．７７（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６．４Ｈｚ）、２．８６（ｓ、３Ｈ）、２．９２～３．０１（ｍ、２Ｈ）、３．２７～３．３９（ｍ、２Ｈ）、３．７６～３．９（ｍ、２Ｈ）、５．３０（ｍ、８Ｈ）、７．１２（ｍ、２Ｈ）、８．４１（ｍ、１Ｈ）、１０．０２（ｍ、３Ｈ）。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１００ＭＨｚ、$CDCl_3$）：１４．０、２２．５、２５．６、２５．８、２６．０、２７．１７、２

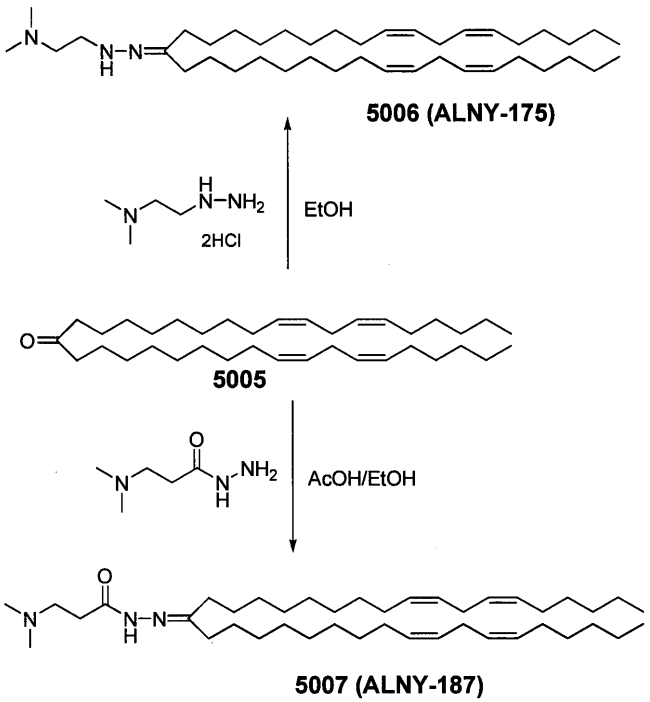
７．１９、２７．６、２９．３、２９．３３、２９．５、２９．６、３１．０、３１．５、３３．９、３６．３、４１．０、５４．１、５５．２、６２．０、６２．１９、１１１．４、１１４．３、１１７．１、１１９．９、１２７．９、１２７．９５、１３０．１、１３０．２、１５２．１、１５５．０、１５７．４、１６１．２、１６１．６、１６１．９６、１６２．３。ＭＳ：１０９３（テトラＴＦＡ塩）。

【０４０５】

実施例２６：オキシム－及びヒドラゾン結合脂質の合成：

スキーム１

【化３１】



実験の詳細

化合物５００６（ＡＬＮＹ－１７５）：ＥｔＯＨ（５０ｍＬ）を含有するフラスコに、ジメチルアミノエチルヒドラジン二塩酸塩（１．００ｇ、５．７０ミリモル）及びケトン５００５（２．００ｇ、３．８０ミリモル）を添加した。混合物を６０℃で１６時間加熱した。Et_3N（０．５ｍＬ）の添加後、反応混合物を蒸発させた。残渣をEt_2O及び飽和$NaHCO_3$水溶液で抽出し、有機層を$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（CH_2Cl_2：ＭｅＯＨ：NH_3水溶液＝９５：５：０．５、R_f＝０．２９）で精製して、化合物３を得た（１．７８ｇ、２．９１ミリモル、７６％）。$C_{41}H_{78}N_3$の分子量（Ｍ＋Ｈ）$^+$　計算値６１２．６２、実測値６１２．５。

【０４０６】

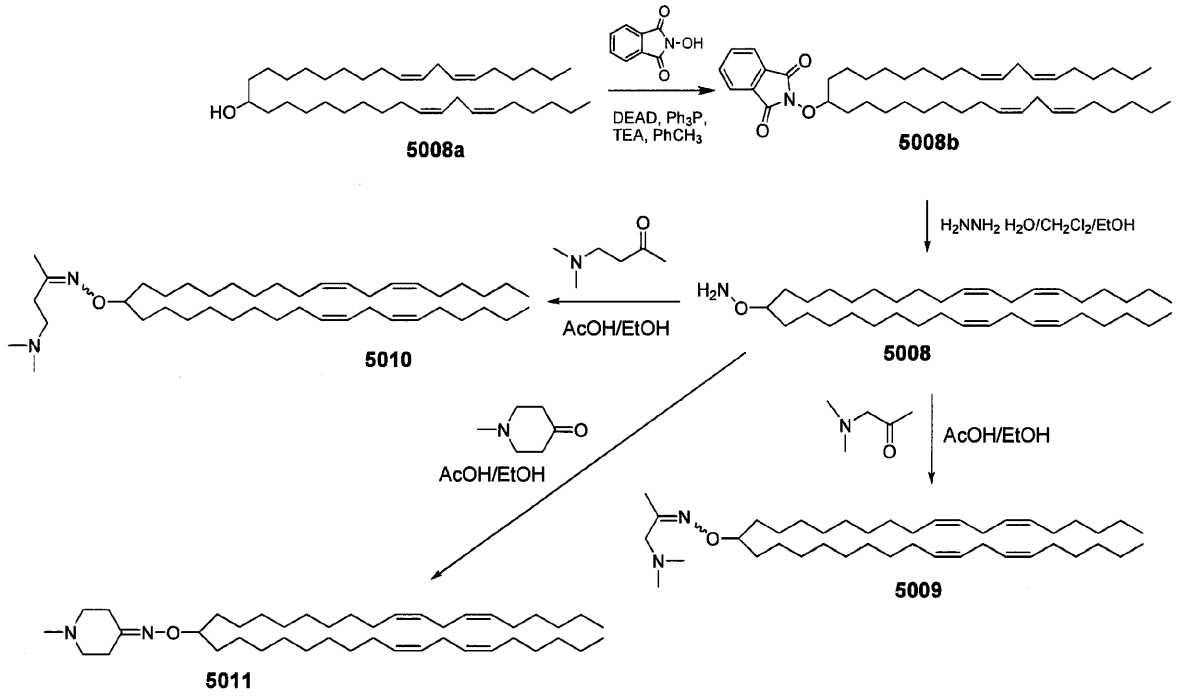
化合物５００７（ＡＬＮＹ－１８７）：ＥｔＯＨ（１０ｍＬ）中の３－ジメチルアミノ－プロピオン酸ヒドラジド（Ｒｙａｎ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製、５００ｍｇ、３．８９ミリモル）及びＥｔＯＨ（２０ｍＬ）中のジリノレイルケトン５００５（１．７４ｇ、３．３１ミリモル）を、一緒に混合した。この溶液に、酢酸（０．０３８ｍＬ、０．６６２ミリモル）を添加し、反応混合物を６５℃で５時間加熱した。Et_3N（０．５ｍＬ）の添加後、反応混合物を蒸発させた。残渣をCH_2Cl_2及び飽和$NaHCO_3$水溶液で抽出し、有機層を$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（CH_2Cl_2：ＭｅＯＨ：NH_3水溶液＝９５：５：０．５、R_f＝０．３０）で精製して、化合物５００７を得た（１．４０ｇ、２．１９ミリモル、６６％）。$C_{42}H_{78}N_3O$の分子量（Ｍ＋Ｈ）$^+$　計算値６４０．６１、実測値６４０．５

。

【０４０７】

スキーム２

【化３２】



５００８ｂ：トルエン中の５００８ａ（３０ｇ、５６．８ミリモル）溶液に、Ｎ－ヒドロキシフタルイミド（１３．９ｇ、８５ミリモル）及びＴＰＰ（２２．３０ｇ、８５ミリモル）を、アルゴン下で添加した。反応物を－５℃に冷却し、これに、ＴＥＡ（１１．８４ｍＬ）、その後ＤＥＡＤ（１３．１４ｍＬ）を添加した。反応物を室温で１２時間撹拌させた（ＴＬＣ）。その後、それをセライトパッドでろ過した。ろ過液を減圧下で蒸発させて粗生成物を得、それをシリカゲルクロマトグラフィーで精製して純粋な生成物を得、それを３％ジエチルエーテル及びヘキサンで溶出して、生成物５００８ｂ（２２．９０ｇ、６０．５０％）を淡黄色液体として得た。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、$CDCl_3$）：δ０．９０（６Ｈ、ｔ、Ｊ＝７．２Ｈｚ）、１．２～１．４（３４Ｈ、ｍ）、１．６６～１．７０（４Ｈ、ｍ）、２．０３～２．０８（８Ｈ、ｍ）、２．７８（４Ｈ、ｔ、Ｊ＝１２．８Ｈｚ）、４．２２（１Ｈ、ｍ）、５．２９～５．４３（８Ｈ、ｍ）、７．７４～７．７６（２Ｈ、ｍ）、７．８３～７．８５（２Ｈ、ｍ）。^{13}ＣＮＭＲ（１００ＭＨｚ、$CDCl_3$）：δ１４．３、２２．５、２４．９、２５．６、２７．２、２７．２０、２９．３、２９．３、２９．５、２９．５、２９．６、２９．７、３１．５、３２．４、８８．３、１２３．３、１２７．９、１２９．０、１３０．１、１３４．３、１６４．３。ＭＳ：$C_{45}H_{71}NO_3$の分子量計算値６７３．５４、実測値６７４．５５（Ｍ＋Ｈ）。

【０４０８】

化合物５０１０：ＡＬＹ－ＳＡＮ－０３１（２．３６ｇ、３．５０ミリモル）を、CH_2Cl_2（３６ｍＬ）及びＥｔＯＨ（４ｍＬ）中のヒドラジン一水和物（０．４２４ｍＬ、５．６０ミリモル）で２時間処理した。その結果生じた白色析出物をろ過した後、ろ過液を濃縮した。残渣をEt_2O及び飽和$NaHCO_3$水溶液で抽出し、有機層を$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗物質５００８を、さらなる精製をせずに次のステップで使用した。R_f＝０．４４（ヘキサン中１０％ＥｔＯＡＣ）。$C_{37}H_{70}NO$の分子量（Ｍ＋Ｈ）$^+$　計算値５４４．５５、実測値５４４．２。

【０４０９】

化合物５００８をＥｔＯＨ（３０ｍＬ）に溶解し、４－（ジメチルアミノ）ブタン－２－オン（Ｍａｔｒｉｘ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製、５００ｍｇ、４．３４ミリモル）及び酢酸（０．０４０ｍＬ、０．７０ミリモル）を、その溶液に添加した。反応混合物を室温で１４時間撹拌した。Et_3N（０．５ｍＬ）の添加後、反応混合物を蒸発させた。残渣をEt_2O及び飽和$NaHCO_3$水溶液で抽出し、有機層を$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：ＥｔＯＡｃ＝１：１）で精製して、化合物５０１０をＥ／Ｚ異性体の混合物として得た（１．９０ｇ、２．９６ミリモル、８５％、２ステップ、ヘキサン：ＥｔＯＡｃ＝１：１で展開してR_f＝０．３９、０．２１）。$C_{43}H_{81}N_2O$の分子量$(M+H)^+$　計算値６４１．６３、実測値６４１．５。

【０４１０】

化合物５００９：化合物５００６（８００ｍｇ、１．４７ミリモル）をＥｔＯＨ（１５ｍＬ）に溶解し、その溶液に（ジメチルアミノ）アセトン（Ａｌｄｒｉｃｈ社製、０．２２０ｍＬ、１．９１ミリモル）及び酢酸（０．０１７ｍＬ、０．２９４ミリモル）を添加し、反応混合物を１４時間室温で撹拌した。Et_3N（０．５ｍＬ）の添加後、反応混合物を蒸発させた。残渣をEt_2O及び飽和$NaHCO_3$水溶液で抽出し、有機層を$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：ＥｔＯＡｃ＝９：１）で精製して、化合物５００９を得た（８６８ｍｇ、１．３８ミリモル、９４％、ヘキサン：ＥｔＯＡｃ＝９：１で展開してR_f＝０．２２）。$C_{42}H_{79}N_2O$の分子量$(M+H)^+$　計算値６２７．６２、実測値６２７．５。

【０４１１】

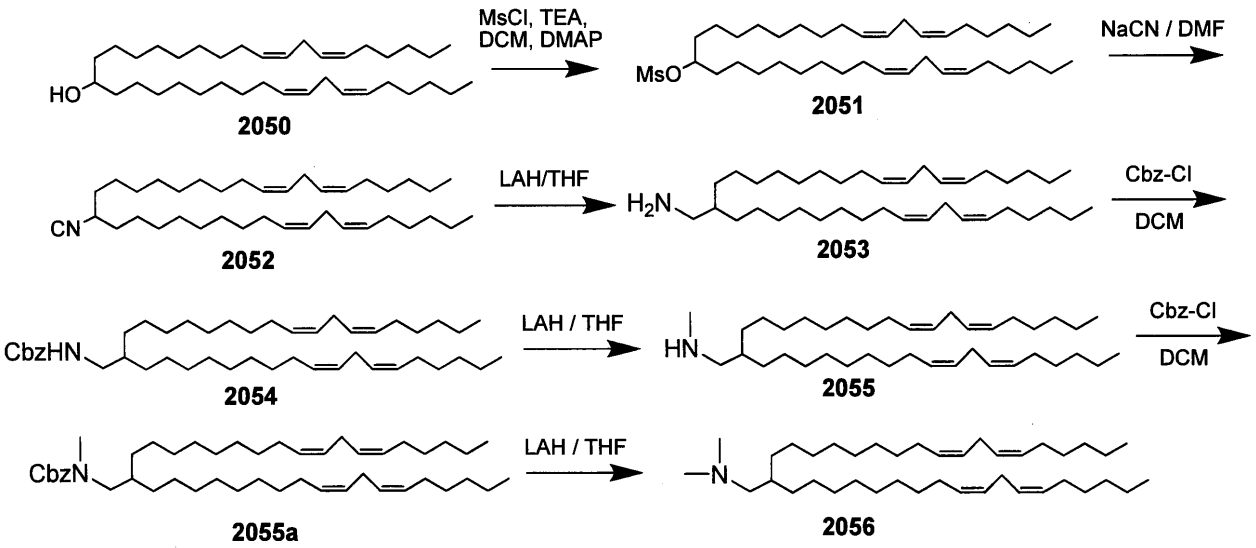
化合物５０１１：化合物５００６（１．０９ｇ、２．００ミリモル）をＥｔＯＨ（２０ｍＬ）に溶解した。その溶液に、１－メチル－４－ピペリドン（Ａｌｄｒｉｃｈ社製、０．３２０ｍＬ、２．６０ミリモル）及び酢酸（０．４０ｍＬ、０．４００ミリモル）を添加し、反応混合物を１４時間室温で撹拌した。Et_3N（０．５ｍＬ）の添加後、反応混合物を蒸発させた。残渣をEt_2O及び飽和$NaHCO_3$水溶液で抽出し、有機層を$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、濃縮した。粗物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（CH_2Cl_2：ＭｅＯＨ：NH_4OH＝９７：３：０．３）で精製して、化合物５０１１を得た（１．１１ｇ、１．７４ミリモル、８７％、CH_2Cl_2：ＭｅＯＨ：NH_4OH＝９７：３：０．３で展開してR_f＝０．２０）。$C_{43}H_{79}N_2O$の分子量$(M+H)^+$　計算値６３９．６２、実測値６３９．５。

【０４１２】

実施例２７：他の脂質の合成：

化合物２０５６（ＡＬＮＹ－１８１）の合成

【化３３】



２０５１の合成：Ａｒ雰囲気下のＤＣＭ（４００ｍＬ）中２００４（５０ｇ、９５ミリモル）溶液に、ＴＥＡ（５３ｍＬ、３７８ミリモル）及びＤＭＡＰ（１．２ｇ、９．５ミリモル）を添加し、Ａｒ雰囲気下、室温で撹拌した。反応物を－５℃に冷却し、ＤＣＭ（１００ｍＬ）中の塩化メシル（１５ｍＬ、１９０ミリモル）溶液を－５℃未満の温度でゆっくりと添加し、添加後、室温に加温させた。３０分後（ＴＬＣ）、反応物を氷冷水（２０ｍＬ）で反応停止させた。有機層を分離し、１Ｎ　ＨＣｌ（３０ｍＬ）、水、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で蒸発させて純粋な生成物（５５ｇ、９５．５％）を黄色液体として得た。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ０．８９（ｔ、６Ｈ、Ｊ＝６．８）、１．２～１．５（ｍ、３６Ｈ）、１．６７（ｍ、４Ｈ）、２．０５（ｑ、８Ｈ、Ｊ１＝６．８、Ｊ２＝６．８）、２．７７（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６．４）、２．９９（ｓ、３Ｈ）、４．７１（ｍ、１Ｈ）、及び５．３６（ｍ、８Ｈ）。

【０４１３】

２０５２の合成：ＤＭＦ中のシアン化ナトリウム（１．７０ｇ、０．０３３０モル）撹拌溶液に、ＤＭＦ（１００ｍＬ）中の化合物２０５１（１０ｇ、０．０１６５モル）をゆっくりと添加し、２４時間５５℃に加熱した（ＴＬＣ）。その後、それを室温に冷却し、水で希釈し、酢酸エチルで数回抽出した。混合した有機層を、水、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で蒸発させて粗生成物を得、それを、１％エーテル／ヘキサンを使用したシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、生成物を淡黄色液体として得た（５．８０ｇ、６２％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ０．８７（ｔ、６Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ）、１．２５（ｍ、３８Ｈ）、１．５２（ｍ、４Ｈ）、２．０３（ｑ、８Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ、Ｊ＝６．８Ｈｚ）、２．４７（ｍ、１Ｈ）、２．７６（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６．４Ｈｚ）、５．３２（ｍ、８Ｈ）。

【０４１４】

２０５３の合成：アルゴン雰囲気下、０℃のＴＨＦ（５２ｍＬ）中ＬＡＨ（１．５０ｇ、０．０３８７モル）冷却懸濁液に、ＴＨＦ中の化合物２０５２（５．２ｇ、０．００９７モル）を滴加した。添加後、それを室温に加温させ、２０時間撹拌した（ＴＬＣ）。それを、０℃に冷却し、硫酸ナトリウムの飽和溶液（１０ｍＬ）、その後酢酸エチルで反応停止させた。セライト床でろ過し、酢酸エチルで洗浄した。混合したろ過液を減圧下で蒸発させて粗生成物を得、それを、ヘキサン中１０％酢酸エチルを使用したシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、生成物を薄褐色液体として得た（３．７０ｇ、７１％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ０．８７（ｔ、６Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ）、１．２７（ｍ、４８Ｈ）、２．０３（ｑ、８Ｈ、６．８Ｈｚ、６．８Ｈｚ）、２．６０（ｄ、２Ｈ、Ｊ＝４．０Ｈｚ）、２．７６（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６．４Ｈｚ）、５．３１（ｍ、

８Ｈ）。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ１４．１、２２．６、２５．６、２６．８、２７．１、２７．２、２９．３、２９．５、２９．６、３０．１、３１．５、４０．９、４５．２、１２８．０、１３０．１。質量５４３（Ｍ＋）。

【０４１５】

２０５４の合成：アルゴン雰囲気下、０℃のＤＣＭ（４５０ｍＬ）中の化合物２０５３（４５ｇ、０．０８３モル）溶液に、２，６－ルチジン（１９．３ｍＬ、０．１６６モル）、その後クロロギ酸ベンジル（１２．１ｍＬ、０．０８４７モル）を滴加した。その後、それを２０℃に加温し、その温度で１時間撹拌した（ＴＬＣ）。その後、それを、ＤＣＭ（２００ｍＬ）で希釈し、１０％クエン酸（２×２００ｍＬ）、水、ブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で蒸発させて粗生成物を得、それを、３％エーテル／ヘキサンを使用したシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、最終生成物を薄褐色液体として得た（３６ｇ、６４％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ０．８７（ｔ、６Ｈ、Ｊ＝６Ｈｚ）、１．２８（ｍ、４４Ｈ）、２．０２（ｑ、８Ｈ、Ｊ$_1$＝６．８Ｈｚ、Ｊ$_2$＝６．８Ｈｚ）、２．７６（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６．４Ｈｚ）、３．１１（ｔ、２Ｈ、Ｊ＝５．６Ｈｚ）、４．６７（ｓ、１Ｈ）、５．１８（ｓ、２Ｈ）、５．３０（ｍ、８Ｈ）、７．３１（ｍ、４Ｈ）。

【０４１６】

２０５５の合成：アルゴン雰囲気下、０℃のＴＨＦ（３６０ｍＬ）中水素化アルミニウムリチウム（４．０５ｇ、０．１０６６モル）懸濁液に、ＴＨＦ中の化合物２０５４（３６ｇ、０．０５３３モル）を滴加した。添加後、それを室温に加温させ、１５時間撹拌した（ＴＬＣ）。反応物を０℃に冷却し、硫酸ナトリウムの飽和溶液、その後酢酸エチルで反応停止させた。それをセライト床でろ過し、酢酸エチルで洗浄した。混合したろ過液を蒸発させ、１００％メタノールを使用したシリカゲルで精製して、最終生生成物を得た（２６ｇ、８７％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ０．８７（ｔ、６Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ）、１．２７（ｍ、４２Ｈ）、２．０３（ｑ、８Ｈ、Ｊ$_1$＝６．８Ｈｚ、Ｊ$_2$＝６．８Ｈｚ）、２．４５（ｓ、３Ｈ）、２．４９（ｄ、２Ｈ、Ｊ＝６Ｈｚ）、２．７６（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６．４Ｈｚ）、５．３０（ｍ、８Ｈ）。

【０４１７】

２０５５ａの合成：化合物２０５５（４ｇ、０．００７２モル）をアルゴン雰囲気下でＤＣＭ（４０ｍＬ）に溶解し、０℃に冷却した。この溶液に、２，６－ルチジン（１．７ｍＬ、０．０１４４モル）、その後クロロギ酸ベンジル（１．０ｍＬ、０．００７４モル）を滴加した。その後、それを、２０℃に加温させ、１時間撹拌した（ＴＬＣ）。その後、それをＤＣＭ（２００ｍＬ）で希釈し、１０％クエン酸（２×２００ｍＬ）、水、及びブラインで洗浄した。混合した有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で蒸発させて粗生成物を得、それを、３％エーテル／ヘキサンを使用したシリカゲルで精製して、最終生成物を得た（３．８０ｇ、７６％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ０．８７（ｔ、６Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ）、１．２０（ｍ、４４Ｈ）、２．０２（ｑ、８Ｈ、Ｊ$_1$＝６．８Ｈｚ、Ｊ$_2$＝６．８Ｈｚ）、２．７６（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６．４Ｈｚ）、２．８９（ｄ、３Ｈ、Ｊ＝６Ｈｚ）、３．１４（ｍ、２Ｈ）、５．１２（ｓ、２Ｈ）、５．３０（ｍ、８Ｈ）、７．２６（ｍ、４Ｈ）。

【０４１８】

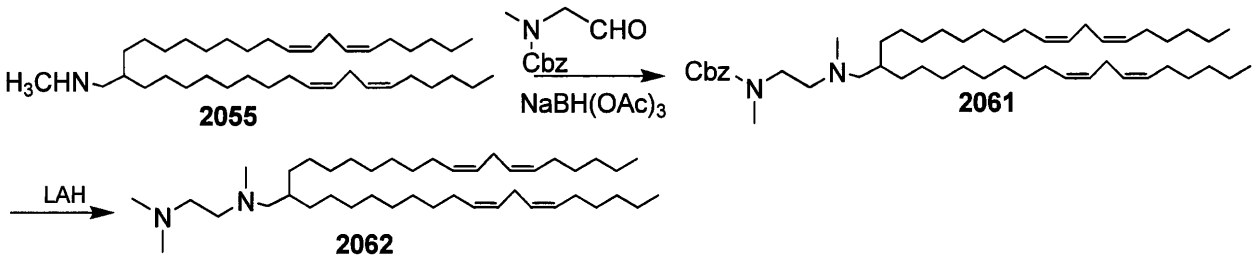
２０５６の合成：アルゴン雰囲気下、０℃のＴＨＦ中水素化アルミニウムリチウム（０．５２ｇ、０．０１３８モル）懸濁液に、ＴＨＦ（３８ｍＬ）中の化合物２０５５ａ（３．８０ｇ、０．００５５モル）を滴加した。添加後、それを室温に加温させ、１５時間撹拌した（ＴＬＣ）。反応物を０℃に冷却し、硫酸ナトリウムの飽和溶液、その後酢酸エチルで反応停止させた。全物質をセライト床でろ過し、酢酸エチルで洗浄した。混合したろ過液を減圧下で蒸発させて粗生成物を得、それを、１００％メタノールを使用したシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、最終生成物を無色液体として得た（２．２０ｇ、７０％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ０．８７（ｔ、６Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ）、１．２１（ｍ、４４Ｈ）、２．０３（ｑ、８Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ、Ｊ＝６．４

Ｈｚ）、２．１８（ｓ、６Ｈ）、２．７６（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６．４Ｈｚ）、５．３０（ｍ、８Ｈ）。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ１４．０、２２．４、２５．５、２６．５、２７．０、２７．１、２９．２、２９．４、２９．６、３０．０、３１．４、３２．１、３５．６、４５．９、６４．８、１２７．８、１３０．０。ＥＬＳＤ：９９．０％　質量：５７０．２（Ｍ＋）

【０４１９】

２０６２（ＡＬＮＹ－１４１）の合成：

【化３４】



２０６１の合成：アルゴン下、０℃の１００ｍＬ　ＤＣＭ中２０５５（５ｇ、０．００８９モル）溶液に、ＮａＢＨ（ＯＡｃ）$_3$（２．３０ｇ、０．０１０６モル）を添加し、２０分間撹拌した。７００ｍＬ　ＤＣＭ中のアルデヒド（１．７０ｇ、０．００８２モル）を、４５分間の期間にわたって反応物にゆっくりと添加した。添加した後、反応物を室温で１５～２０分間撹拌させた。ＴＬＣは、出発物質が存在しないことを示した。反応を飽和ＮａＨＣＯ$_3$（２×５００ｍＬ）及び水（５００ｍＬ）で洗浄した。水層をＤＣＭ（５００ｍＬ）で再度抽出した。混合した有機層を、ブライン（５００ｍＬ）で洗浄した。有機層をNa_2SO_4で乾燥し、ろ過し、濃縮した。得られた粗生成物を、シリカゲルクロマトグラフィー及び溶出液としてのヘキサン／ジエチルエーテルにより精製した。生成物をヘキサン中８％エーテルで溶出し、褐色液体を得た（収量６．４０ｇ、９６％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ：（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：０．８９（ｔ、６Ｈ、Ｊ＝７．２Ｈｚ）、１．２６～１．４３（ｍ、４０Ｈ）、１．８５（ｍ、１Ｈ）、２．０６（ｑ、８Ｈ、Ｊ１＝６．８Ｈｚ、Ｊ２＝６．８Ｈｚ）、２．１５（ｓ、２Ｈ）、２．２０（ｓ、３Ｈ）、２．４５（ｍ、２Ｈ）、２．７７（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６Ｈｚ）、２．９５（ｓ、３Ｈ）、３．３５（ｍ、２Ｈ）、５．１２（ｓ、２Ｈ）、５．３２（ｍ、８Ｈ）、７．３５（ｍ、５Ｈ）。

【０４２０】

２０６２の合成：アルゴン雰囲気下、０℃のＴＨＦ中水素化アルミニウムリチウム（０．７５１ｇ、０．０１９８モル）懸濁液に、ＴＨＦ中の化合物２０６１（５．７ｇ、０．００７６モル）を滴加した。添加後、それを室温に加温させ、１５時間撹拌した（ＴＬＣ）。反応物を０℃に冷却し、硫酸ナトリウム（５０ｍＬ）の飽和溶液、その後酢酸エチル（１００ｍＬ）で反応停止させた。それをセライト床でろ過し、酢酸エチルで洗浄した。混合したろ過液を減圧下で蒸発させて粗生成物を得、それを、溶出液としてＤＣＭ／酢酸エチル／クロロホルム／メタノールを使用したシリカゲルクロマトグラフィーで精製した。生成物を、メタノール中３％クロロホルムで褐色液体として溶出した（３．８０ｇ、８０％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ：（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：０．８９（ｔ、６Ｈ、Ｊ＝６．８Ｈｚ）、１．２６～１．３７（ｍ、４０Ｈ）、１．４２（ｍ、１Ｈ）、２．０６（ｑ、８Ｈ、Ｊ１＝６．８Ｈｚ、Ｊ２＝６．８Ｈｚ）、２．１５（ｄ、２Ｈ、Ｊ＝７．２Ｈｚ）、２．２０（ｓ、３Ｈ）、２．２９（ｓ、６Ｈ）、２．４５（ｓ、４Ｈ）、２．７８（ｔ、４Ｈ、Ｊ＝６．４Ｈｚ）、５．３６（ｍ、８Ｈ）。^{13}Ｃ　ＮＭＲ：（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：１４．１、２２．６、２５．６、２６．６、２７．２、２７．２２、２８．９、２９．３、２９．６、２９．７、３０．１、３１．５、３２．２、３５．８、４３．２、４５．７、５６．２、５７．２、６３．３、１２７．９、１３０．２。ＨＰＬＣ

ＥＬＳＤ：１００％　質量：６２７．５３

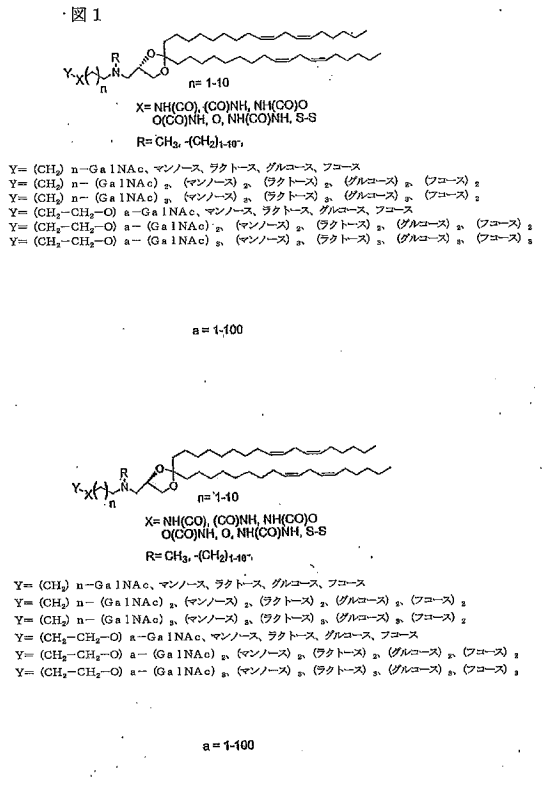
【０４２１】

上記に記載されている種々の実施形態を組み合わせて、さらなる実施形態を提供することができる。本明細書で参照されている及び／又は出願データシートに列挙されている米国特許、米国特許出願公開、外国特許、外国特許出願、及び非特許文献には、これらに限定されないが、以下のものが含まれる：［挿入リスト］、これらは参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる。実施形態の態様は、必要に応じて、またさらなる実施形態を提供するために種々の特許、出願、及び文献の概念を使用して改変することができる。

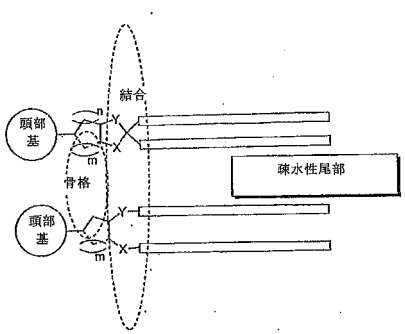
【０４２２】

実施形態に対するこれら及び他の改変を、上記の詳細な記載に照らして行うことができる。一般的に、添付の特許請求の範囲では、使用される用語は、本明細書及び特許請求の範囲で開示された特定の実施形態に、特許請求の範囲を限定するように解釈されるべきでないが、そのような特許請求の範囲に与えられる等価物の完全な範囲と共にあらゆる考え得る実施形態を含むと解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は本開示により限定されない。

【図１】



【図２】



【図３】

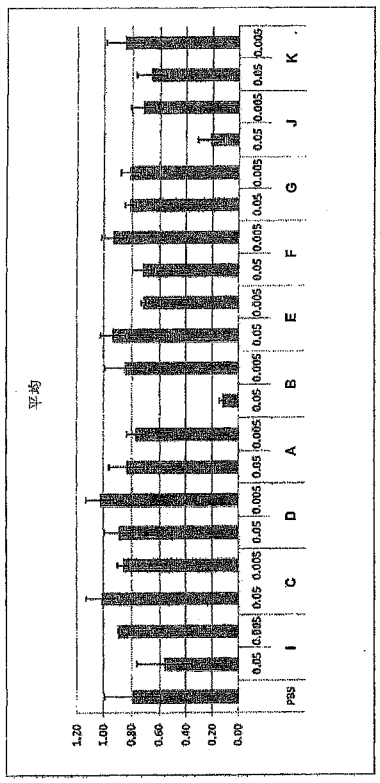
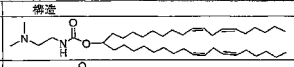
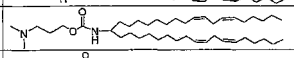
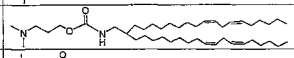
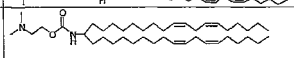
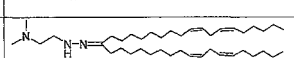
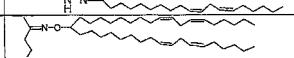
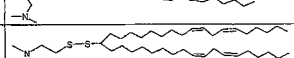
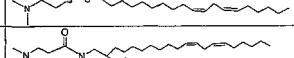
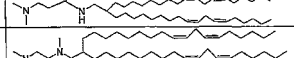
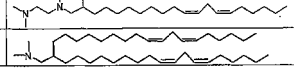


図３

【図４】

図４

化合物	構造	ED50	pKa
ALNY-190		0.47	6.49
ALNY-192		2.1	7.21
ALNY-200		>5.00	7.57
ALNY-202		0.12	6.52
ALNY-175		2.7	
ALNY-149		0.1	5.81
ALNY-160		2.00	5.18
ALNY-201		>5.0	8.02
ALNY-141		0.14	6.62
ALNY-181		0.25	

【配列表】

2020172500000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
C07C 309/04	*(2006.01)*	C07C	309/04		4C086
C07C 321/08	*(2006.01)*	C07C	321/08		4C204
C07C 211/21	*(2006.01)*	C07C	211/21		4H006
C07C 237/06	*(2006.01)*	C07C	237/06		
C07C 271/12	*(2006.01)*	C07C	271/12		
C07C 251/78	*(2006.01)*	C07C	251/78		
C07C 251/38	*(2006.01)*	C07C	251/38		
C07C 321/18	*(2006.01)*	C07C	321/18		
C07C 279/12	*(2006.01)*	C07C	279/12		
C07C 211/22	*(2006.01)*	C07C	211/22		
A61K 9/14	*(2006.01)*	A61K	9/14		
A61K 47/08	*(2006.01)*	A61K	47/08		
A61K 47/16	*(2006.01)*	A61K	47/16		
A61K 47/18	*(2006.01)*	A61K	47/18		
A61K 47/22	*(2006.01)*	A61K	47/22		
A61K 47/28	*(2006.01)*	A61K	47/28		
A61K 47/54	*(2017.01)*	A61K	47/54		
A61K 45/00	*(2006.01)*	A61K	45/00		
A61K 48/00	*(2006.01)*	A61K	48/00		
A61P 31/04	*(2006.01)*	A61P	31/04		
A61P 31/12	*(2006.01)*	A61P	31/12		
A61P 33/00	*(2006.01)*	A61P	33/00		
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P	35/00		
A61P 37/04	*(2006.01)*	A61P	37/04		
A61K 31/7088	*(2006.01)*	A61K	31/7088		
A61K 31/7105	*(2006.01)*	A61K	31/7105		
A61K 31/713	*(2006.01)*	A61K	31/713		
A61K 39/00	*(2006.01)*	A61K	39/00	G	
A61K 39/002	*(2006.01)*	A61K	39/00	H	
A61K 39/02	*(2006.01)*	A61K	39/002		
A61K 39/12	*(2006.01)*	A61K	39/02		
C07D 209/48	*(2006.01)*	A61K	39/12		
C07D 211/72	*(2006.01)*	C07D	209/48		
C07D 213/71	*(2006.01)*	C07D	211/72		
C07D 317/44	*(2006.01)*	C07D	213/71		
C12N 15/11	*(2006.01)*	C07D	317/44		
C12N 15/63	*(2006.01)*	C12N	15/11	Z	
C12N 15/117	*(2010.01)*	C12N	15/63	Z	
C12N 15/115	*(2010.01)*	C12N	15/117	Z	
C12N 15/113	*(2010.01)*	C12N	15/115	Z	
C12N 15/85	*(2006.01)*	C12N	15/113	Z	
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N	15/85	Z	
C12N 15/88	*(2006.01)*	C12N	15/113	120Z	
		C12N	15/113	110Z	
		C12N	15/113	130Z	
		C12N	15/113	140Z	
		C12N	5/10		

Ｃ１２Ｎ　15/88　　Ｚ

(31)優先権主張番号　61/234,098
(32)優先日　平成21年8月14日(2009.8.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　61/185,438
(32)優先日　平成21年6月9日(2009.6.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　61/154,350
(32)優先日　平成21年2月20日(2009.2.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　61/113,179
(32)優先日　平成20年11月10日(2008.11.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(72)発明者　ムティアー・マノハラン
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・サード・ストリート・３００・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド
(72)発明者　カラントッタティル・ジー・ラジーヴ
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・サード・ストリート・３００・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド
(72)発明者　ムトゥサミー・ジャヤラマン
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・サード・ストリート・３００・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド
(72)発明者　デヴィッド・バトラー
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・サード・ストリート・３００・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド
(72)発明者　ジャヤプラカシュ・ケー・ナラヤナンナイル
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・サード・ストリート・３００・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド
(72)発明者　マーティン・メイヤー
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・サード・ストリート・３００・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド
(72)発明者　ラックスマン・エルテプ
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・サード・ストリート・３００・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド

Ｆターム(参考)　4B065 AB01 BA01 BA05 BB10 BB18 BC12
4C055 AA01 BA02 BA47 BB16 CA01 DA01
4C076 AA95 BB11 BB13 BB16 BB21 BB27 CC06 CC07 CC31 CC34
CC35 CC41 DD40A DD48A DD49A DD52A DD59A DD60A DD70A EE59A
FF31 FF63
4C084 AA13 AA17 MA05 MA13 MA16 MA41 MA55 MA56 MA66 NA13
ZB091
4C085 AA03 BA07 BA51 BB01 BB23 CC07 CC08 CC31 EE01 EE05
GG01 GG02 GG03 GG04 GG06 GG10
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 MA07 MA08 MA10 MA41 NA13

ZB09
4C204 BB01 BB09 CB04 DB30 EB03 FB33 GB01
4H006 AA01 AA03 AB20 BU32 BV22 FE11 RA10 RA18

【外国語明細書】
2020172500000001.pdf