

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年12月13日(13.12.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/225873 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/7105 (2006.01) A61K 47/14 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/022286

(22) 国際出願日: 2018年6月11日(11.06.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
62/517,407 2017年6月9日(09.06.2017) US

(71) 出願人: 協和発酵キリン株式会社 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 上原 啓嗣 (UEHARA, Keiji); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 畑中 剣太郎 (HATANAKA, Kentaro); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 岩井 宏徒 (IWAI, Hiroto); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 直井 智幸 (NAOI, Tomoyuki); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). デスティト ジュゼッペ (DESTITO, Giuseppe); 92037 カリフォルニア州ラ ホヤ、アテナ サークル、9420 California (US). ニュージェント レイチェル ソロフ (NUGENT, Rachel

Soloff); 92037 カリフォルニア州ラ ホヤ、アテナ サークル、9420 California (US).

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外 (INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木6-10-1 六本木ヒルズ森タワー23階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: NUCLEIC-ACID-CONTAINING NANOPARTICLES

(54) 発明の名称: 核酸含有ナノ粒子

(57) Abstract: The present invention pertains to nanoparticles containing: a lipid (lipid I) that includes a lipid- or water-soluble unit and has a ligand capable of binding to Siglec (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin), and a nucleic acid; or a polymer (polymer I) that includes a water-soluble unit and a cationic unit and has a ligand capable of binding to Siglec (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin), and a nucleic acid. These nanoparticles are nucleic acid-containing nanoparticles that can be delivered to immune system cells.

(57) 要約: シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なリガンドを有する、脂質または水溶性ユニットを含む脂質 (脂質I)、および核酸を含む、あるいは、シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なリガンドを有する、水溶性ユニットおよびカチオン性ユニットを含む高分子 (高分子I)、ならびに核酸を含む、ナノ粒子に関する。本発明のナノ粒子は、免疫系細胞に送達可能な核酸含有ナノ粒子である。

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト
（規則5.2(a)）

明 細 書

発明の名称：核酸含有ナノ粒子

技術分野

[0001] 本発明は、核酸含有ナノ粒子、核酸を細胞内に導入する方法、並びに、当該核酸含有ナノ粒子を用いる、医薬、及び疾患の治療または予防方法に関する。

背景技術

[0002] プラスミドDNA(pDNA)、アンチセンス、デコイ核酸、リボザイム、siRNA、miRNA、antimiRNA、mRNA等の核酸医薬は、細胞内のあらゆる遺伝子の発現を促進したり、抑制したりすることによって、遺伝子を制御できる汎用性の高さから、今まで治療困難とされてきたさまざまな疾患への臨床応用が期待されている。

また、核酸医薬は、細胞内における標的選択性と活性の高さから抗体、低分子医薬に次ぐ、次世代医薬として期待されている。

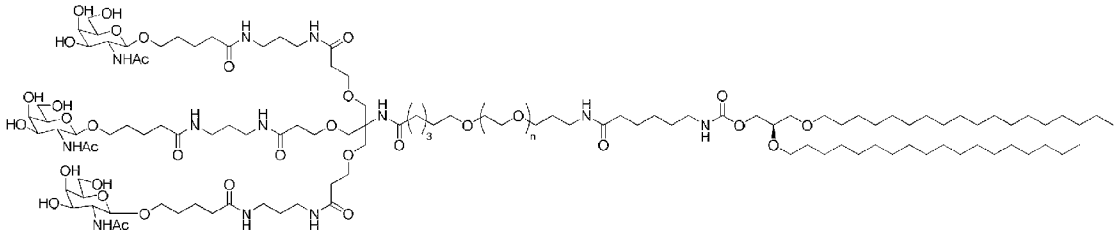
しかしながら、核酸医薬は、標的組織への送達が困難であることが問題点として挙げられる。

[0003] インビボにおける効果的な核酸医薬の送達法の1つとして、標的化合物を有する脂質/核酸あるいは高分子/核酸ナノ粒子を用いる方法が報告されている。標的化合物としては、細胞外に発現する受容体に結合可能なリガンドが挙げられる。

[0004] 非特許文献1および特許文献1では、肝細胞に極めて高発現しているアシアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)に結合可能なN-アセチル-D-ガラクトサミン(GalNAc)リガンドと2本鎖脂質を含む脂質/核酸ナノ粒子による肝臓へのターゲティングが報告されている。

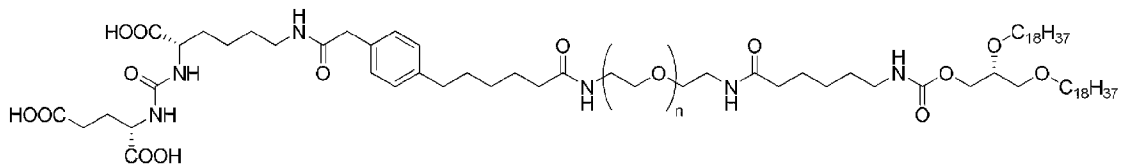
[0005]

[化1]



[0006] 非特許文献2および特許文献2では、前立腺癌患者に特異的に高発現する前立腺膜特異的抗原（PSMA）に対して結合可能なペプチドリガンドと2本鎖脂質を含む脂質/核酸ナノ粒子による癌へのターゲティングが報告されている。

[0007] [化2]



[0008] また、非特許文献3には、トランスフェリンを有するポリマー/核酸ナノ粒子による癌細胞に対するターゲティングが報告されている。

[0009] 非特許文献1～3および特許文献1～2に報告されているように、核酸含有ナノ粒子への標的化合物の付与は、標的組織への移行性および薬理効果向上が期待できる。しかしながら、これらの標的臓器、細胞としては肝臓あるいは癌が大多数を占めておりその適用範囲は限定されている。したがって、肝臓以外の標的臓器および細胞に効果を示す核酸医薬の開発が強く望まれている。

[0010] シグレック（Siglec; sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin）は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するシアル酸含有糖鎖を認識する受容体であり、免疫系細胞表面に発現する（非特許文献4）。

[0011] シグレックを利用した送達技術として、非特許文献5、6には、シグレック受容体の一つであるシグレック-2に対して、結合可能な抗体を利用した複合体の利用が報告されている。

[0012] また、特許文献3には、シグレックに対して結合可能な糖鎖リガンドが開示されている。さらにまた、特許文献4には、シグレックに対して結合可能な糖鎖リガンドを利用したナノ粒子による低分子薬剤または抗原等の送達技術が報告されている。

[0013] しかしながら、シグレックに対して結合可能な糖鎖リガンドを利用した核酸含有ナノ粒子による報告例は無い。

先行技術文献

特許文献

[0014] 特許文献1：国際公開第2010/054405号

特許文献2：国際公開第2012/016188号

特許文献3：国際公開第2007/056525号

特許文献4：国際公開第2012/018377号

非特許文献

[0015] 非特許文献1：モレキュラーセラピー (Molecular Therapy), 2010年, 第18巻, p1357-1364

非特許文献2：モレキュラーセラピーヌクレックアシッド (Molecular Therapy Nucleic Acid), 2016年, 第5巻, p348

非特許文献3：ネイチャー (Nature), 2010年, 第464巻, p1067-1070

非特許文献4：ネイチャーレビューズイミュノロジー (Nature Reviews Immunology), 2007年, 第7巻, p255-266

非特許文献5：ブリティッシュジャーナルオブヘマトロジー (British Journal of Haematology), 2014年, 第167巻, p487-499

非特許文献6：ルーケミア (Leukemia), 2010年, 第24巻, p1566-1573

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0016] 本発明の目的は、免疫系細胞に送達可能な核酸含有ナノ粒子等を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明は、以下に関する。

[1]

シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なリガンドを有する、脂質または水溶性ユニットを含む脂質(脂質I)、および核酸を含む、あるいは、

シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なリガンドを有する、水溶性ユニットおよびカチオン性ユニットを含む高分子(高分子I)、ならびに核酸を含む、

ナノ粒子。

[2]

シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なリガンドを有する、脂質または水溶性ユニットを含む脂質(脂質I)、核酸、およびカチオン性脂質(脂質II)を含む、あるいは、

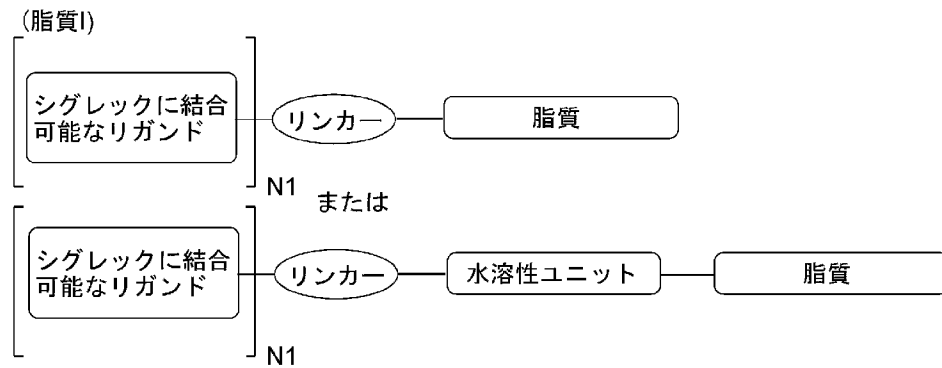
シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なリガンドを有する、水溶性ユニットおよびカチオン性ユニットを含む高分子(高分子I)、核酸、ならびに、水溶性ユニットおよびカチオン性ユニットを含む高分子(高分子II)を含む、

ナノ粒子。

[3]

脂質Iが、シグレックに結合可能なリガンドと、脂質あるいは水溶性ユニットとがリンカーを介して連結した構造：

[化3]

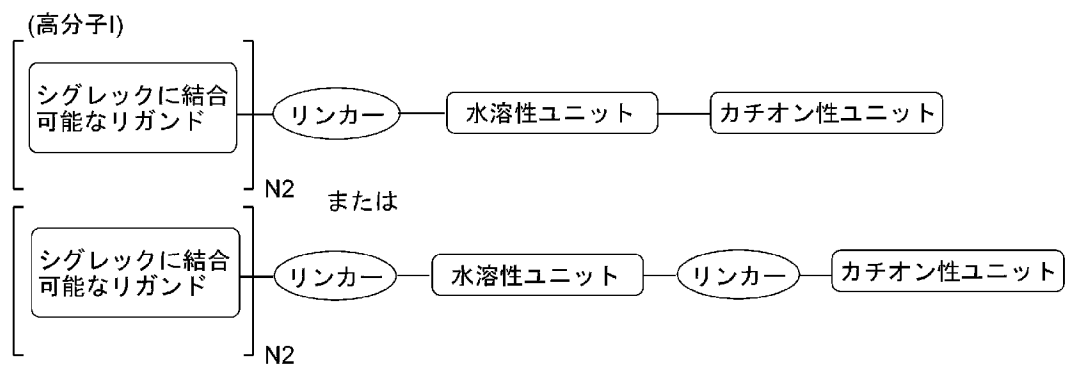


(N1は、1以上の整数である。)

で表され、

高分子Iが、シグレックに結合可能なリガンドと、水溶性ユニットとが、あるいはシグレックに結合可能なリガンドと、水溶性ユニットと、カチオン性ユニットとがリンカーを介して連結した構造：

[化4]



(N2は、1以上の整数である。)

で表される、[1] または [2] に記載のナノ粒子。

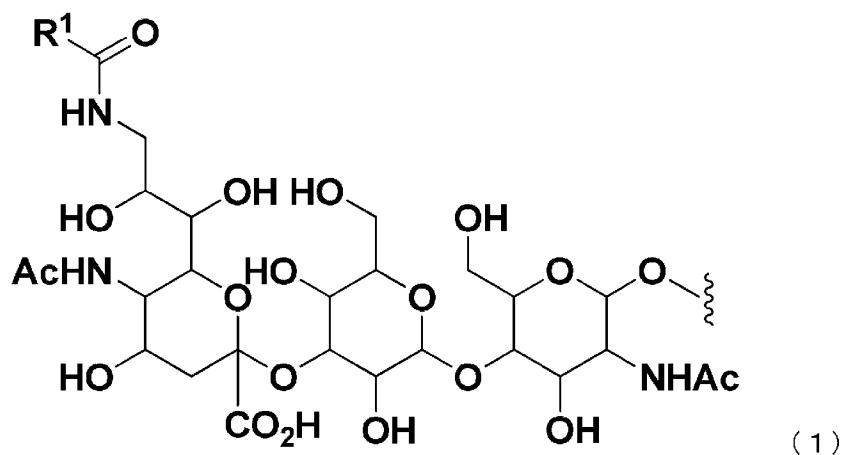
[4]

前記リガンドが、糖鎖リガンドである、[1] ~ [3] のいずれかに記載のナノ粒子。

[5]

糖鎖リガンドが、以下の式(1)で表される基である、[4] に記載のナノ粒子。

[化5]

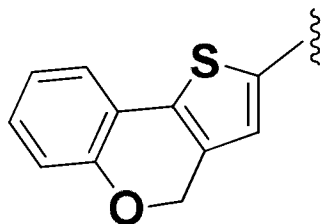


(式(1)中、Acはアセチル基を表し、R¹は、C6-C12アリール基、C4-C12ヘテロアリール基、または、C6-C12アリール基もしくはC4-C12ヘテロアリール基で置換されたC1-C6アルキル基を表す。)

[6]

式(1)におけるR¹が、以下の構造で表される基である、[5]に記載のナノ粒子。

[化6]



[7]

水溶性ユニットが、ポリエチレングリコール、ポリグリセリン、ポリエチレンイミン、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、オリゴ糖、デキストリン、水溶性セルロース、デキストラン、コンドロイチン硫酸、ポリグリセリン、キトサン、ポリビニルピロリドン、ポリアスパラギン酸アミド、ポリ-L-リジン、マンナン、プルラン、オリゴグリセロール、およびそれらの誘導体からなる群より選択される1種以上を有するユニットである、[1]～[6]のいずれかに記載のナノ粒子。

[8]

カチオン性ユニットが、リジン、アルギニン、ヒスチジンからなる群より選択される一種以上を含むアミノ酸ポリマーユニット、ポリエチレンジイミンユニット、又は、ポリアミノアクリレートユニットである、[1] ~ [7] のいずれかに記載のナノ粒子。

[9]

ナノ粒子が、さらに中性脂質を含む、[1] ~ [8] のいずれかに記載のナノ粒子。

[1 0]

核酸がsiRNAまたはmRNAである、[1] ~ [9] のいずれかに記載のナノ粒子。

[1 1]

siRNAが、コレステロール、トコフェロールまたは脂肪酸とリンカーを介して共有結合している、[1 0] に記載のナノ粒子。

[1 2]

Siglec-1(CD169)陽性細胞へ送達するために使用される、[1] ~ [1 1] のいずれかに記載のナノ粒子。

[1 3]

Siglec-1 (CD169) 陽性細胞が、マクロファージ、樹状細胞または単球である、[1 2] に記載のナノ粒子。

[1 4]

[1] ~ [1 1] のいずれかに記載のナノ粒子を用いる、核酸を細胞内に導入する方法。

[1 5]

細胞が、Siglec-1(CD169)陽性細胞である、[1 4] に記載の方法。

[1 6]

Siglec-1 (CD169) 陽性細胞が、マクロファージ、樹状細胞または単球である、[1 5] に記載の方法。

[1 7]

[1] ～ [1 3] のいずれかに記載のナノ粒子を含む、医薬。

[1 8]

静脈内投与用または皮下投与用である、[1 7] に記載の医薬。

[1 9]

[1 7] または [1 8] に記載の医薬を、それを必要とする患者に投与することを含む、疾患の治療または予防方法。

[2 0]

シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なりガンドを有する、脂質または水溶性ユニットを含む脂質(脂質I)、および核酸を含む、[1] に記載のナノ粒子。

[2 1]

シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なりガンドを有する、脂質または水溶性ユニットを含む脂質(脂質I)、核酸、およびカチオン性脂質(脂質II)を含む、[2] に記載のナノ粒子

発明の効果

[0018] 本発明により、医薬として有用で、免疫系細胞に送達可能な核酸含有ナノ粒子等を提供することができる。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明を実施する形態について詳細に説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明を限定するものではない。

[0020] [ナノ粒子]

本発明のナノ粒子は、シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なりガンドを有する、脂質または水溶性ユニットを含む脂質(脂質I)、および核酸を含む、あるいは、

シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なりガンドを有する、水溶性ユニットおよびカチオン性ユニットを含む高分子(高分子I)、ならびに核酸を含む。本発明のナノ粒子は、核酸含有ナノ

粒子である。

本発明のナノ粒子の平均粒子径は、好ましくは1.00～2000 nmであり、より好ましくは10.0～500 nmであり、さらに好ましくは20.0～300 nmであり、最も好ましくは20.0～200 nmである。

シグレックは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する受容体であり、免疫系細胞表面に存在する。本発明のナノ粒子は、単球、マクロファージ、または樹状細胞をターゲット細胞とすることができる。

[0021] 本発明のナノ粒子は、そのモデルとして、核酸を含む中心部を、脂質が外層を形成して包む構造（すなわち、粒子内部に核酸が存在し、粒子外部（外層）を脂質が構成する構造）が考えられる。このとき、脂質Iおよび高分子Iはナノ粒子の外層に存在し、シグレックに結合可能なリガンドは、粒子の外側方向の向きで存在し、粒子の表面がリガンドによって修飾されるような形態であると考えられる。これによって、リガンドが、シグレックに相互作用することができる。

このとき、粒子の表面のリガンドによる修飾率(%)は、粒子を構成する脂質あるいは高分子の合計モル濃度に対する、脂質Iあるいは高分子Iのモル濃度（すなわち、脂質Iのモル数／粒子を構成する脂質の合計モル数、または、高分子Iのモル数／粒子を構成する高分子の合計モル数）を指標とすることができる。上記修飾率は、脂質Iを含む核酸含有ナノ粒子である場合、ナノ粒子が標的細胞に到達し、核酸を細胞内に移行するために、好ましくは0.2%以上であり、より好ましくは0.4%以上であり、さらに好ましくは1.0%以上であり、よりさらに好ましくは1.4%以上である。上記修飾率の最大値は、特に限定されないが、50%以下が好ましく、より好ましくは30%以下であり、さらに好ましくは10%以下であり、さらにより好ましくは5%以下である。

上記修飾率は、高分子Iを含む核酸含有ナノ粒子である場合、ナノ粒子が標的細胞に到達し、核酸を細胞内に移行するために、好ましくは0.2%以上であり、より好ましくは0.4%以上であり、さらに好ましくは1.0%以上であり、よりさらに好ましくは1.4%以上である。上記修飾率の最大値は、100%以下であ

ればよい。高分子Iを含む核酸含有ナノ粒子における修飾率は、好ましくは30～100%であり、より好ましくは50～100%以下であり、さらにより好ましくは70～100%である。

[0022] 本発明のナノ粒子は、シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なリガンドを有する、脂質または水溶性ユニットを含む脂質(脂質I)、および核酸を含む、ナノ粒子であることが好ましく、シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なリガンドを有する、脂質または水溶性ユニットを含む脂質(脂質I)、核酸、およびカチオン性脂質(脂質II)を含む、ナノ粒子であることがより好ましい。

[0023] (脂質Iおよび高分子I)

脂質Iは、シグレックに結合可能なリガンドを有する脂質、または、シグレックに結合可能なリガンドを有する水溶性ユニットを含む脂質である。本発明における脂質および水溶性ユニットを含む脂質は、天然型の脂質であってもよく、天然型の構造が一部改変された非天然型の脂質、すなわち、脂質アナログであってもよい。

高分子Iは、シグレックに結合可能なリガンドを有する、水溶性ユニットおよびカチオン性ユニットを含む高分子である。

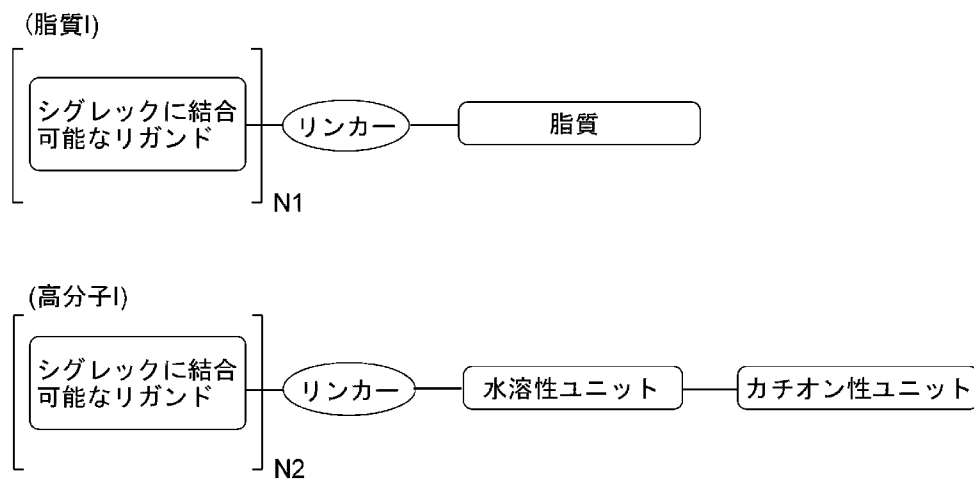
上記シグレックに結合可能なリガンドを有する脂質は、シグレックに結合可能なリガンドと、脂質ユニットとが結合した複合体ともいうこともできる。上記シグレックに結合可能なリガンドを有する、水溶性ユニットを含む脂質は、シグレックに結合可能なリガンドと、水溶性ユニット、脂質ユニットとが結合した複合体ともいうこともできる。上記シグレックに結合可能なリガンドを有する、水溶性ユニットおよびカチオン性ユニットを含む高分子は、シグレックに結合可能なリガンドと、水溶性ユニット、カチオン性ユニットとが結合した複合体ともいうこともできる。

脂質Iは、シグレックに結合可能なリガンドと、脂質あるいは水溶性ユニットとがリンカーを介して連結した構造を有することが好ましい。また、高分子Iは、シグレックに結合可能なリガンドと水溶性ユニットとがリンカー

を介して連結した構造を有することが好ましい。リンカーによって、シグレックに結合可能なリガンドと、脂質あるいはカチオン性ユニットとを連結することもできる。

[0024] シグレックに結合可能なリガンドと、脂質あるいは水溶性ユニットとがリンカーを介して連結した構造を有する構造は、具体的には、以下の構造式で表すことができる。なお、構造式中のシグレックに結合可能なリガンドは、1以上がリンカーに結合していてもよい。

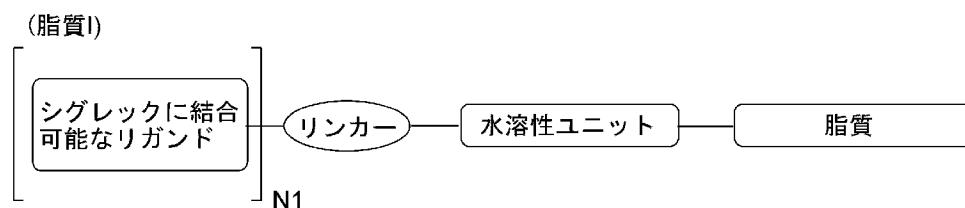
[0025] [化7]



(構造式中のN1、N2は、1以上の整数である。)

[0026] 脂質Iは、シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なリガンドを有する、水溶性ユニットを含む脂質であってもよく、すなわち、シグレックに結合可能なリガンドと、水溶性ユニットとがリンカーを介して連結した、以下の構造式で表すこともできる。

[0027] [化8]

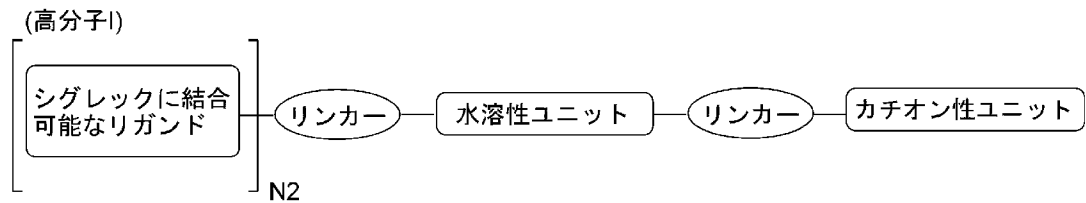


(構造式中のN1は、1以上の整数である。)

[0028] また、高分子Iは、水溶性ユニットとカチオン性ユニットとが、リンカーを

介して結合していてもよく、すなわち、以下の構造式で表すこともできる。

[0029] [化9]



(構造式中のN2は、1以上の整数である。)

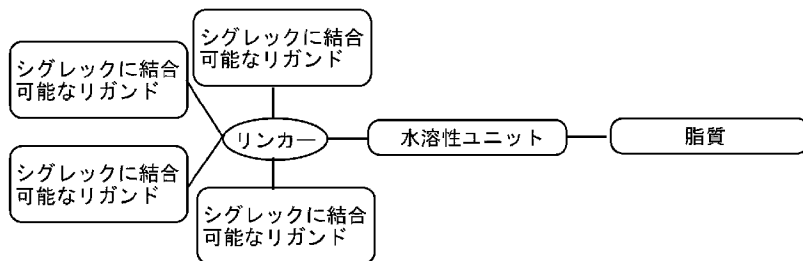
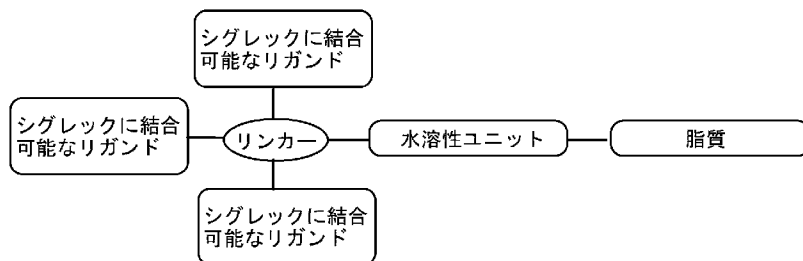
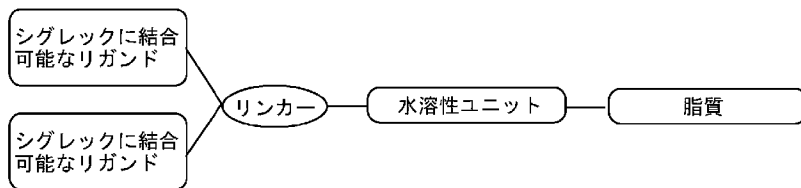
[0030] 脂質Iおよび高分子Iは、上述したようにシグレックに結合可能なリガンドを1以上有していてもよく、2つ有していてもよく、3つ有していてもよく、4つ有していてもよい。シグレックに結合可能なリガンドを2つ以上有する脂質Iおよび高分子Iは、分岐構造を含むリンカーとすることにより得ることができ、以下の構造式により表すことができる。

以下の構造における脂質Iは、脂質とリンカーとの間に水溶性ユニットを含んでいても、いなくてもよい。また、以下の構造における高分子Iは、水溶性ユニットとカチオン性ユニットとが、リンカーを介して結合していてもよい。

[0031]

[化10]

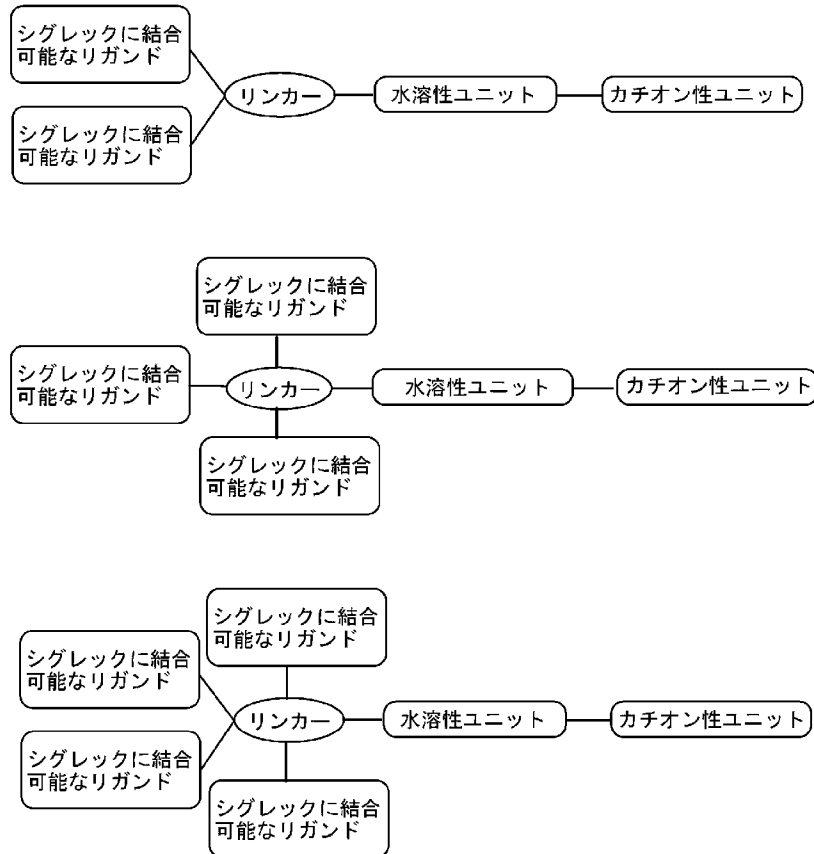
(脂質I)



[0032]

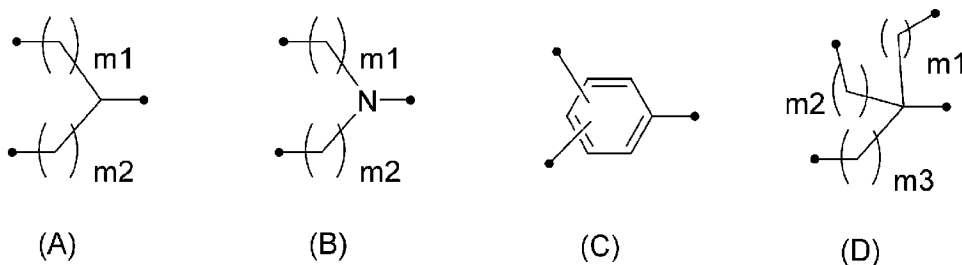
[化11]

(高分子I)



[0033] リンカーに含まれる分岐構造としては、特に限定はされないが、例えば、以下に示される構造 (A) ~ (D) が挙げられる。

[0034] [化12]

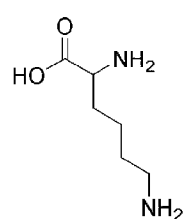


(式中、 $m_1 \sim m_3$ はそれぞれ独立して、0~3の整数を表す)

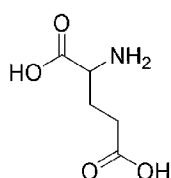
[0035] 上記 (A) ~ (D) の分岐構造は、以下の化合物により提供することができる。具体的には、分岐構造 (A) は、例えば化合物 (A-1) ~ (A-5)

等が持つ分岐構造を利用することにより提供できる。分岐構造（B）は、例えば化合物（B－１）および（B－２）等が持つ分岐構造を利用することにより提供できる。分岐構造（C）は、例えば化合物（C－１）～（C－３）等が持つ分岐構造を利用することにより提供できる。分岐構造（D）は、例えば化合物（D－１）等が持つ分岐構造を利用することにより提供できる。

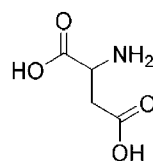
[0036] [化13]



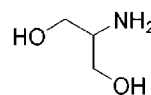
(A-1)



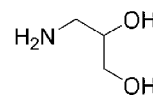
(A-2)



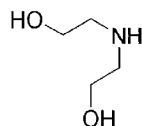
(A-3)



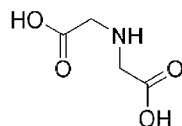
(A-4)



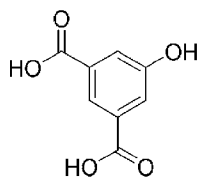
(A-5)



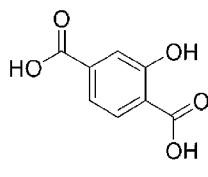
(B-1)



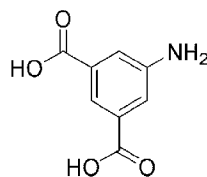
(B-2)



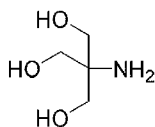
(C-1)



(C-2)



(C-3)



(D-1)

[0037] 上記分岐構造（A）～（D）を2つ以上組み合わせることによって、5つ以上に分岐した分岐構造を提供することもできる。

[0038] 水溶性ユニットは、例えば、ポリエチレングリコール、ポリグリセリン、ポリエチレンイミン、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリ

ルアミド、オリゴ糖、デキストリン、水溶性セルロース、デキストラン、コンドロイチン硫酸、ポリグリセリン、キトサン、ポリビニルピロリドン、ポリアスパラギン酸アミド、ポリ-L-リジン、マンナン、プルラン、オリゴグリセロール等またはそれらの誘導体により構成される。これらの中でも、好ましくはポリエチレングリコールである。水溶性ユニットの数平均分子量は、特に制限されないが、100～40000が好ましく、500～20000がより好ましく、500～5000がさらに好ましい。

[0039] 脂質 I における脂質としては、脂質ナノ粒子を形成することができる脂質であれば特に制限されず、中性脂質が好適である。

中性脂質としては、例えば、リン脂質、グリセロール脂質、ステロール、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質およびスフィンゴイド等を好適に挙げることができる。これらの中性脂質は、1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせ使用してもよい。

[0040] 脂質 I を構成する中性脂質におけるリン脂質としては、例えば、ホスファチジルコリン(PC)(具体的には大豆ホスファチジルコリン、卵黄ホスファチジルコリン(EPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、ジミリス Toilホスファチジルコリン(DMPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)等)、ホスファチジルエタノールアミン(具体的にはジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、ジミリス Toilホスホエタノールアミン(DMPE)、16-0-モノメチルPE、16-0-ジメチルPE、18-1-トランスPE、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(POPE)、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(SOPE)等)、グリセロリン脂質(具体的にはホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、パルミトイルオレオイ

ルホスファチジルグリセロール(POPG)、リゾホスファチジルコリン等)、スフィンゴリン脂質(具体的にはスフィンゴミエリン、セラミドホスホエタノールアミン、セラミドホスホグリセロール、セラミドホスホグリセロリン酸等)、グリセロホスホノ脂質、スフィンゴホスホノ脂質、天然レシチン(具体的には卵黄レシチン、大豆レシチン等)または水素添加リン脂質(具体的には水素添加大豆ホスファチジルコリン等)等の天然または合成のリン脂質が挙げられるがこれらに限定されない。

[0041] 脂質 I を構成する中性脂質におけるグリセロール脂質としては、例えば、ジアシルグリセロール等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0042] 脂質 I を構成する中性脂質におけるグリセロ糖脂質としては、例えば、スルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリドまたはグリコシルジグリセリド等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0043] 脂質 I を構成する中性脂質におけるスフィンゴ糖脂質としては、例えば、ガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシドまたはガングリオシド等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0044] 脂質 I を構成する中性脂質におけるスフィンゴイドとしては、例えば、スフィンガン、イコサスフィンガン、スフィンゴシンまたはそれらの誘導体等が挙げられるがこれらに限定されない。誘導体としては、例えば、スフィンガン、イコサスフィンガンおよびスフィンゴシン等の $-NH_2$ を $-NHCO(CH_2)_xCH_3$ (式中、 x は0~18の整数であり、中でも6、12または18が好ましい)に変換したものが挙げられるがこれらに限定されない。

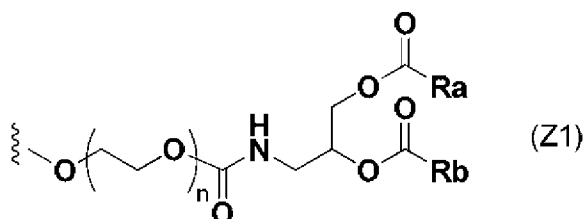
[0045] 脂質 I を構成する中性脂質におけるステロールとしては、例えば、コレステロール(Chol)、ジヒドロコレステロール、ラノステロール、 β -シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、エルゴカステロール、フコステロールまたは 3β -[N-(N',N'-ジメチルアミノエチル)カルバモイル]コレステロール(DC-Chol)等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0046] 脂質Ⅰは、脂質と水溶性ユニットとから構成される構造（以下、水溶性高分子の脂質誘導体に由来する構造とも記載する）を含むことが好ましい。上記脂質と水溶性ユニットとから構成される構造は、水溶性高分子の脂質誘導体に由来することが好ましい。

また、本発明における水溶性高分子の脂質誘導体としては、上記中性脂質のポリエチレングリコール脂質誘導体であってもよい。上記中性脂質のポリエチレングリコール脂質誘導体は、例えば、上記中性脂質に含まれるヒドロキシ基に、アミド基やエステル基を介してまたは介さずに、ポリエチレングリコール基が結合した構造や、上記中性脂質に含まれるヒドロキシ基をアミド基やカルボキシル基に置換し、置換したアミド基やカルボキシル基を介してポリエチレングリコール基が結合した構造が挙げられる。

脂質と水溶性ユニットとから構成される構造としては、具体的には、以下の式（Z1）～（Z3）で表される構造を挙げられる。

[0047] [化14]

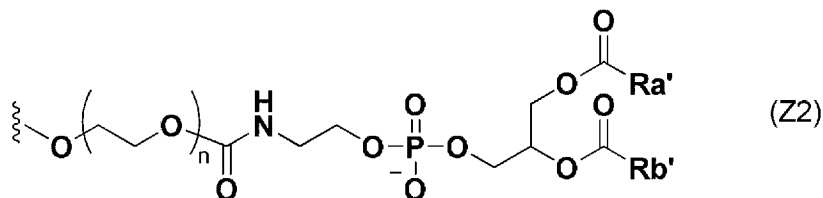


[0048] 式（Z1）中、RaおよびRbは、独立して、炭素数7～23の直鎖状または分岐状のアルキル、アルケニルもしくはアルキニルであり、好ましくはヘプタデカニル、ペンタデカニル、トリデカニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニル、(Z)-トリデカ-8-エニル、(Z)-ペンタデカ-8-エニル、(Z)-ヘプタデカ-5-エニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニル、(E)-ヘプタデカ-8-エニル、(Z)-ヘプタデカ-10-エニル、(8Z, 11Z)-ヘプタデカ-8, 11-ジエニル、(8Z, 11Z, 14Z)-ヘプタデカ-8, 11, 14-トリエニル、(Z)-ノナデカ-10-エニル、(10Z, 13Z)-ノナデカ-10, 13-ジエニル、(Z)-ヘンエイコサ-12-エニル、ノナン-10-イニル、トリデカ-5-イニル、ペンタデカ-6-イニル、ペンタデカ-4, 6-ジイニルまたはペンタデカ-8-イニルであり、nは1～300の整数であり、好ましくは5～200であり、より好ましくは

10～150である。

RaおよびRbの中でも、より好ましくは、ヘプタデカニル、ペンタデカニル、トリデカニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニルである。

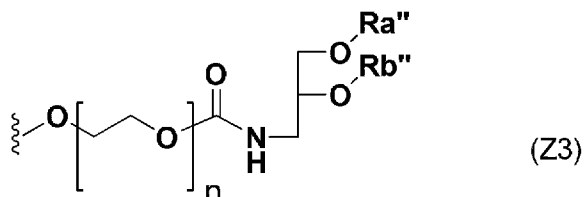
[0049] [化15]



[0050] 式 (Z2) 中、Ra' およびRb' は、独立して、炭素数7～23の直鎖状または分岐状のアルキル、アルケニルもしくはアルキニルであり、好ましくはヘプタデカニル、ペンタデカニル、トリデカニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニル、(Z)-トリデカ-8-エニル、(Z)-ペンタデカ-8-エニル、(Z)-ヘプタデカ-5-エニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニル、(E)-ヘプタデカ-8-エニル、(Z)-ヘプタデカ-10-エニル、(8Z, 11Z)-ヘプタデカ-8, 11-ジエニル、(8Z, 11Z, 14Z)-ヘプタデカ-8, 11, 14-トリエニル、(Z)-ノナデカ-10-エニル、(10Z, 13Z)-ノナデカ-10, 13-ジエニル、(Z)-ヘンエイコサ-12-エニル、ノナン-10-イニル、トリデカ-5-イニル、ペンタデカ-6-イニル、ペンタデカ-4, 6-ジイニルまたはペンタデカ-8-イニルであり、nは1～300の整数であり、好ましくは5～200であり、より好ましくは10～150である。

Ra' およびRb' の中でも、より好ましくは、ヘプタデカニル、ペンタデカニル、トリデカニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニルである。

[0051] [化16]



[0052] 式 (Z3) 中、Ra' ' およびRb' ' は、独立して、炭素数8～24の直鎖状または分岐状のアルキル、アルケニルもしくはアルキニルであり、好ましくはオクタデカニル、ヘキサデカニル、テトラデカニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル

、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル、(9Z, 12Z, 15Z)-オクタデカ-9, 12, 15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニル、(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニル、(Z)-ドコサ-13-エニル、デカ-11-イニル、テトラデカ-6-イニル、ヘキサデカ-7-イニル、ヘキサデカ-5, 7-ジイニルまたはオクタデカ-9-イニルであり、nは1~300の整数であり、好ましくは5~200であり、より好ましくは10~150である。

Ra' ' および Rb' ' の中でも、より好ましくは、オクタデカニル、ヘキサデカニル、テトラデカニル、(Z)-オクタデカ-9-エニルである。

[0053] 水溶性高分子の脂質誘導体としては、好ましくはポリエチレングリコールの脂質誘導体であり、より好ましくは、ポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン(より具体的には1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG-DSPE)、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG-DPPE)、1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG-DMPE)、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000])、およびポリエチレングリコール-ジアシルグリセロール(より具体的には、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロール, メトキシポリエチレングリコール-2000(PEG-DSG)、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール, メトキシポリエチレングリコール-2000 (PEG-DPG)、1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロール, メトキシポリエチレングリコール-2000 (PEG-DMG)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロール, メトキシポリエチレングリコール-2000 (PEG-DOG)) からなる群より選択されるポリエチレングリコール化脂質であり、さらに好ましくは、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG-DSPE) および 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロール, メトキシポリエチレングリコール-2000(PEG-

DSG)である。

[0054] 高分子Iにおけるカチオン性ユニットとしては、好ましくは、リジン、アルギニン、ヒスチジンからなる群より選択される一種以上を含むアミノ酸ポリマーユニット、ポリエチレンイミンユニット、又は、ポリアミノアクリレートユニットである。

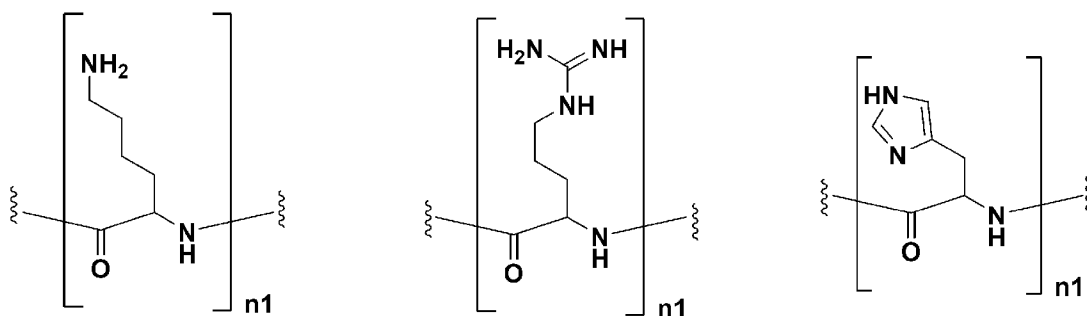
[0055] リジン、アルギニン、ヒスチジンからなる群より選択される一種以上を含むアミノ酸ポリマーユニットは、リジン、アルギニン、ヒスチジンからなる群より選択される一種以上を含むアミノ酸の重合によって得ることができる。アミノ酸ポリマーユニットが2種以上のアミノ酸によって構成される場合、ランダム共重合体であってもよく、ブロック共重合体であってもよい。

アミノ酸ポリマーユニットは、リジン、アルギニン、およびヒスチジン以外のアミノ酸を含んでいてもよい。リジン、アルギニン、およびヒスチジン以外のアミノ酸としては、特に制限されないが、好ましくはグリシンである。

アミノ酸ポリマーユニットを構成するアミノ酸において、リジン、アルギニン、ヒスチジンからなる群より選択される一種以上のアミノ酸単位が70%以上であることが好ましく、80%以上であることがより好ましく、90%以上であることがさらに好ましい。

上記アミノ酸ポリマーユニットとしては、例えば、以下の構造が挙げられる。

[0056] [化17]

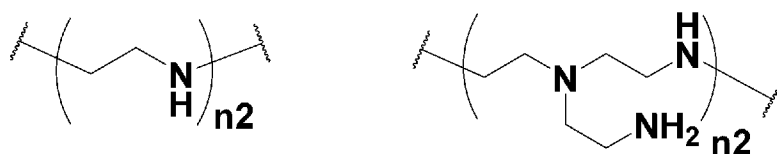


(上記構造中、 $n1$ は2以上の整数である。)

[0057] 高分子Iにおけるカチオン性ユニットは、核酸を包むように配向し、粒子を形成する。ナノ粒子に含ませる核酸は、核酸のサイズ（分子量）によって電荷量が変わり、それに応じて粒子形成のために必要なカチオン性ユニットのサイズも変化する。したがって、上記n1で表されるアミノ酸モノマーの繰り返し数は、核酸の分子量に基づき調整すればよく、特に制限されないが、1～3000の範囲であればよく、好ましくは10～2000であり、より好ましくは10～1000であり、よりさらに好ましくは10～100であり、さらにより好ましくは10～50であり、特に好ましくは10～40である。

[0058] 上記ポリエチレンイミンユニットは、エチレンイミンを重合したポリマーからなるユニットである。ポリエチレンイミンユニットは、例えば、主鎖構造を以下に示すように表すことができるが、ポリエチレンイミン主鎖が、その他のポリエチレンイミン構造と架橋形成していてもよい。

[0059] [化18]



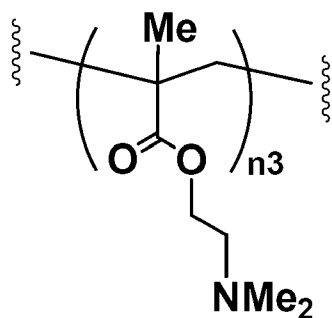
（上記主鎖構造中、n2は1以上の整数である。）

[0060] 上記n2で表されるアミノ酸モノマーの繰り返し数は、核酸の分子量に基づき調整すればよく、特に制限されないが、1～3000の範囲であればよく、好ましくは10～2000であり、より好ましくは50～1000である。

[0061] 上記ポリアミノアクリレートユニットは、例えば、メタクリル酸2-(ジメチルアミノ)エチル等のアミノ基を有するメタクリル酸を重合したポリマーからなるユニットである。ポリアミノアクリレートユニットとしては、例えば、以下に示すような構造を好適に挙げられる。

[0062]

[化19]

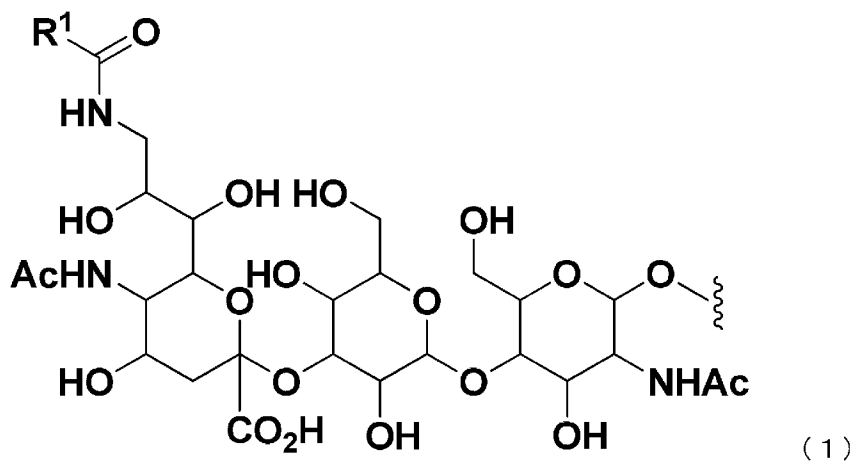


(上記構造中、 n_3 は1以上の整数である。)

[0063] 上記n3で表されるアミノ酸モノマーの繰り返し数は、核酸の分子量に基づき調整すればよく、特に制限されないが、1～3000の範囲であればよく、好ましくは10～2000であり、より好ましくは50～1000である。

[0064] 前記リガンドは、糖鎖リガンドであることが好ましい。また、糖鎖リガンドは、以下の式（１）で表される基であることが好ましい。

[0065] [化20]



(式(1)中、Acはアセチル基を表し、R¹は、C6-C12アリール基、C4-C12ヘテロアリール基、または、C6-C12アリール基もしくはC4-C12ヘテロアリール基で置換されたC1-C6アルキル基を表す。)

[0066] R¹における、C6-C12アリール基としては、フェニル基、ビフェニル基、ナフチル基等が挙げられる。

[0067] R¹における、C4-C12ヘテロアリール基としては、フラニル基、チエニル基、

チオピラニル基、イソチオクロメニル基、ピロリル基、イミダゾリル基、ピラゾリル基、ピリジル基、ピラリジニル基、ピリミジニル基、ピリダジニル基、チアゾリル基、イソチアゾリル基、ピラニル基が挙げられる。

[0068] C6-C12アリール基およびC4-C12ヘテロアリール基は、置換基によって置換されていてもよく、置換基としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル等のアルキル基；メトキシ、エトキシ、プロポキシ等のアルコキシ基；クロロ、ブromo等のハロゲン原子；ヒドロキシ基；アミノ基；フェニル基、ビフェニル基、ナフチル基等のC6-C12アリール基；フラニル基、チエニル基等のC4-C12ヘテロアリール基；ピペリジン、クロマン等の複素環基；等が挙げられる。

また、上記置換基の中で、フェニル基、ビフェニル基、ナフチル基等のC6-C12アリール基；フラニル基、チエニル基等のC4-C12ヘテロアリール基；ピペリジン、クロマン等の複素環基；は、C6-C12アリール基およびC4-C12ヘテロアリール基に、縮合して少なくとも2つの環から構成される縮合環を形成していてもよい。

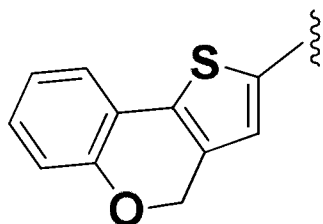
[0069] R¹における、C6-C12アリール基もしくはC4-C12ヘテロアリール基で置換されたC1-C6アルキル基における「C6-C12アリール基」および「C4-C12ヘテロアリール基」としては、上述のR¹における、C6-C12アリール基およびC4-C12ヘテロアリール基と同様の例示を挙げることができる。

R¹における、C6-C12アリール基もしくはC4-C12ヘテロアリール基で置換されたC1-C6アルキル基における「C1-C6アルキル基」としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、シクロブチル、シクロプロピルメチル、ペンチル、イソペンチル、sec-ペンチル、ネオペンチル、tert-ペンチル、シクロペンチル、ヘキシルまたはシクロヘキシル等が挙げられ、好ましくはメチル、エチル、プロピルである。

[0070] 式(1)におけるR¹は、以下の構造で表される基であることが好ましい。

[0071]

[化21]



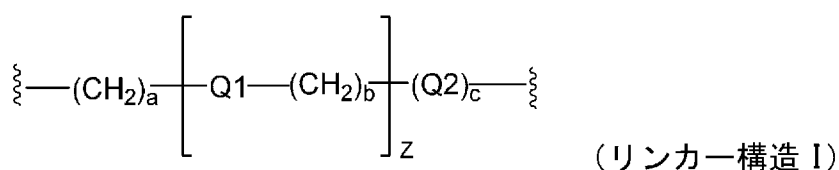
[0072] リンカーは、シグレックに結合可能なリガンドと脂質とを、あるいは、シグレックに結合可能なリガンドと水溶性ユニットとを、あるいは、水溶性ユニットとカチオン性ユニットとを連結し、リガンドのシグレックに対する親和性を低下させないものであれば、特に制限されない。

また、脂質Ⅰ及び高分子Ⅰの製造容易性の観点から、シグレックに結合可能なリガンド、水溶性ユニット、およびカチオン性ユニットのそれぞれがリンカーを介して結合していることが好ましい。したがって、リンカーを介する結合を形成するために、水溶性ユニット、シグレックに結合可能なリガンド、および、カチオン性ユニットの末端構造は、それぞれ、ヒドロキシ基、アミノ基等の官能性を有していることが好ましい。

[0073] リンカーの構造としては、アミド基（-NHC0-）、アミノ基（-NH-）、エーテル基（-0-）、チオエーテル基（-S-）、カルボニル基（-C0-）エステル基（-C0-0-）、ヘテロ環、及びヘテロ芳香環等からなる群より選択される少なくとも一つの官能基を含んでいてもよいアルキレン基が好適に挙げられる。アルキレン基の炭素数としては、特に制限されないが、好ましくは1～10である。

[0074] リンカーの構造の一つとしては、例えば以下のリンカー構造Iで表される。

[0075] [化22]



(リンカー構造I中、Q1及びQ2は、それぞれ独立して、アミド基（-NHC0-または-CONH-）、アミノ基（-NH-）、エーテル基（-0-）、チオエーテル基（-S-

)、カルボニル基(-C(=O)-)、エステル基(-C(=O)-O-または-O-C(=O)-)、ヘテロ環、及びヘテロ芳香環のいずれかであり、aおよびbは、それぞれ独立して、0～5、好ましくは1～5、より好ましくは2～3のいずれかの整数であり、cは、0または1であり、Zは1以上、好ましくは1～5、より好ましくは1～2の整数である。)

[0076] Q1及びQ2のヘテロ環としては、特に制限されないが、例えば、1以上のヘテロ原子を含んでいる4～7員環のヘテロ環、スクシンイミド等が挙げられる。

Q1及びQ2のヘテロ芳香環としては、特に制限されないが、例えば、トリアゾール、イミダゾール、テトラゾール、ピリジン、ピリミジン等が挙げられる。

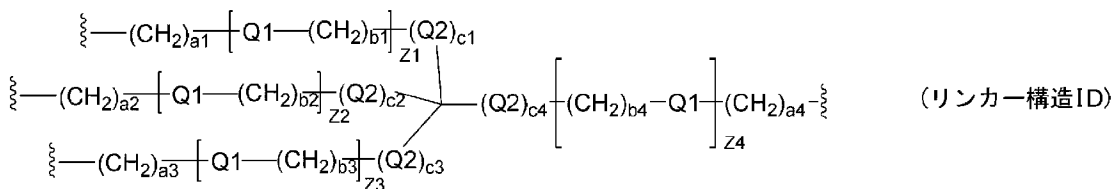
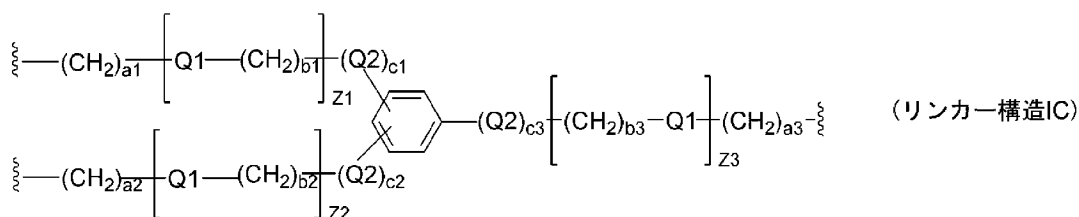
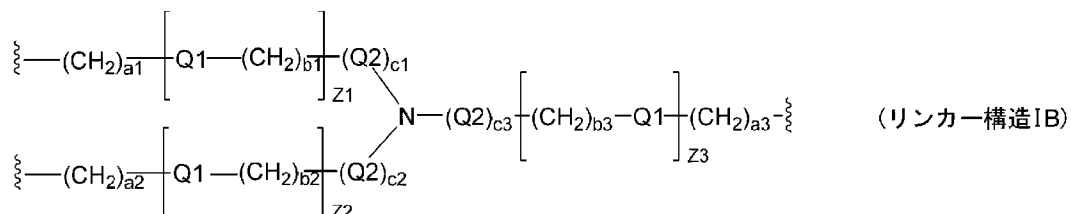
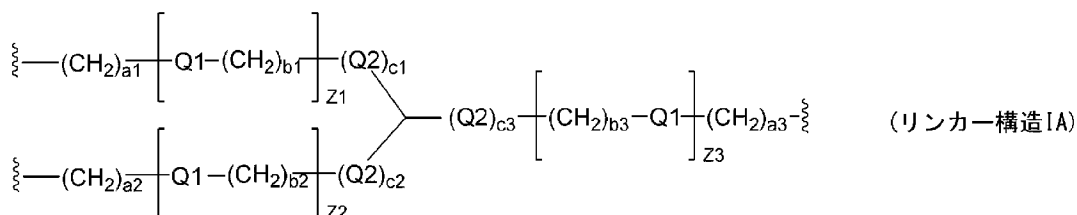
Zが2以上であるとき、複数の、Q1およびbは、それぞれ同一であっても、異なってもよい。

[0077] 上述したように、一分子の脂質Iまたは高分子I内に2つ以上のリガンドを有するようにするため、シグレックに結合可能なリガンドと水溶性ユニットとの間に存在するリンカーは、分岐点を有していてもよい。また、高分子Iにおいては、水溶性ユニットとカチオン性ユニットとの間に存在するリンカーに分岐点を有していてもよい。したがって、上述の分岐構造(A)～(D)と、リンカー構造Iとを組み合わせたものも、好適なリンカーの構造として挙げられる。

分岐構造を含むリンカーとしては、例えば、以下のリンカー構造IA～IDを挙げることができる。

[0078]

[化23]



(構造中、Q1及びQ2は、それぞれ独立して、アミド基(-NHCO-または-CONH-)、アミノ基(-NH-)、エーテル基(-O-)、チオエーテル基(-S-)、カルボニル基(-C(=O)-)、エステル基(-CO-O-または-O-CO-)、ヘテロ環、及びヘテロ芳香環のいずれかであり、a1～a4およびb1～b4は、それぞれ独立して、0～5のいずれかの整数であり、c1～c4は、それぞれ独立して、0または1であり、Z1～Z4は、それぞれ独立して1以上の整数である。)

[0079] Q1及びQ2のヘテロ環としては、特に制限されないが、例えば、1以上のヘテロ原子を含んでいる4～7員環のヘテロ環、スクシンイミド等が挙げられる。

Q1及びQ2のヘテロ芳香環としては、特に制限されないが、例えば、トリア

ゾール、イミダゾール、テトラゾール、ピリジン、ピリミジン等が挙げられる。

Z1～Z4が2以上であるとき、複数の、Q1およびb1～b4は、それぞれ同一であっても、異なってもよい。

[0080] 脂質Ⅰにおけるリンカーの構造としては、上記で記載したリンカー構造I、リンカー構造IA、およびリンカー構造IBが好ましい。

このとき、リンカー構造I中の、Q1及びQ2は、それぞれ独立して、アミド基（-NHC(=O)-または-C(=O)NH-）、アミノ基（-NH-）、ヘテロ環、及びヘテロ芳香環のいずれかであり、aおよびbは、それぞれ独立して、0～5のいずれかの整数であり、cは、0または1であり、且つ、Zは1又は2であることが好ましい。

リンカー構造IA中の、Q1及びQ2は、それぞれ独立して、アミド基（-NHC(=O)-または-C(=O)NH-）、アミノ基（-NH-）、ヘテロ環、及びヘテロ芳香環のいずれかであり、a1～a3およびb1～b3は、それぞれ独立して、0～5の整数であり、c1～c3は、独立して0または1であり、且つ、Z1～Z3は、独立して1又は2であることが好ましい。

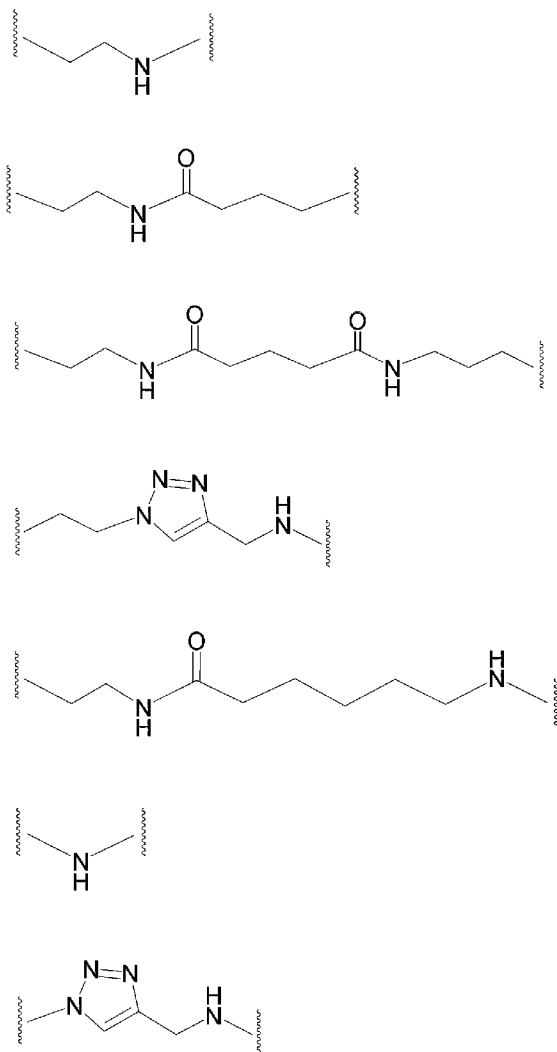
リンカー構造IB中の、Q1及びQ2は、それぞれ独立して、アミド基（-NHC(=O)-または-C(=O)NH-）、アミノ基（-NH-）、ヘテロ環、及びヘテロ芳香環のいずれかであり、a1～a3およびb1～b3は、それぞれ独立して、0～5の整数であり、c1～c3は、独立して0または1であり、且つ、Z1～Z3は、独立して1又は2であることが好ましい。

[0081] 脂質Ⅰにおけるリンカーの構造としては、具体的には、以下の構造を挙げることができる。

なお、シグレックに結合可能なリガンドが、例えば、式（1）で表される基である場合、糖鎖末端（すなわち、アノマー位のヒドロキシ基に由来する酸素）を介さずとも、糖鎖と、リンカーとが結合してもよい。

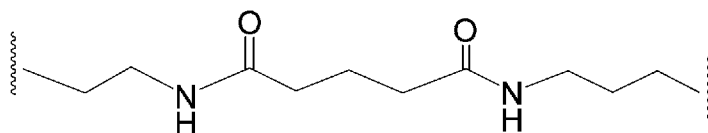
[0082]

[化24]



[0083] 脂質 I における、上記リンカーの構造の中でも好ましくは、以下の構造である。

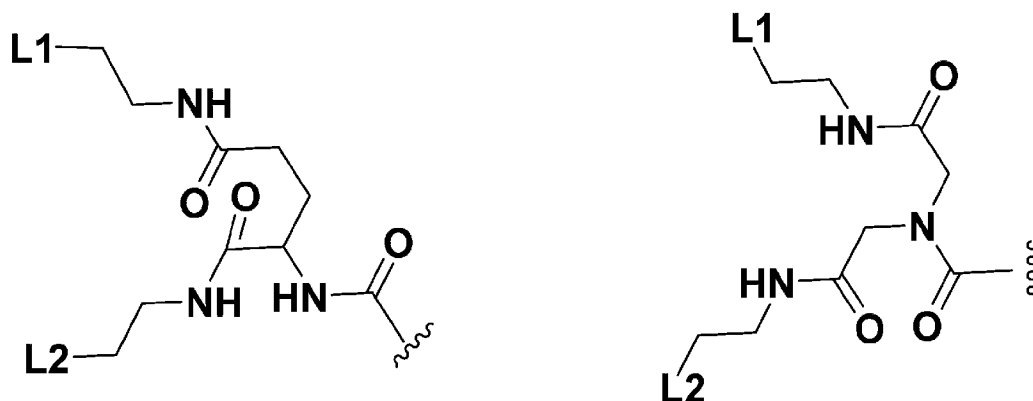
[0084] [化25]



[0085] また、脂質 I が、2つのシグレックに結合可能なリガンドを有するとき、リンカーの構造としては、例えば、以下の構造が挙げられる。

[0086]

[化26]



(構造中、L1およびL2は、同一でも異なってもよく、シグレックに結合可能なリガンドを表す。)

[0087] 高分子Iにおける、シグレックに結合可能なリガンドと水溶性ユニットとを連結するリンカーの構造としては、上述のリンカー構造I、リンカー構造IA、およびリンカー構造IBが好ましい。

このとき、リンカー構造I中の、Q1及びQ2は、それぞれ独立して、アミド基(-NHC(=O)-)、アミノ基(-NH-)、ヘテロ環、及びヘテロ芳香環のいずれかであり、aおよびbは、それぞれ独立して、0～5の整数であり、cは、0または1であり、且つ、Zは、1又は2であることが好ましい。

リンカー構造IA中の、Q1及びQ2は、それぞれ独立して、アミド基(-NHC(=O)-または-C(=O)NH-)、アミノ基(-NH-)、ヘテロ環、及びヘテロ芳香環のいずれかであり、a1～a3およびb1～b3は、それぞれ独立して、0～5の整数であり、c1～c3は、独立して0または1であり、且つ、Z1～Z3は、独立して1又は2であることが好ましい。

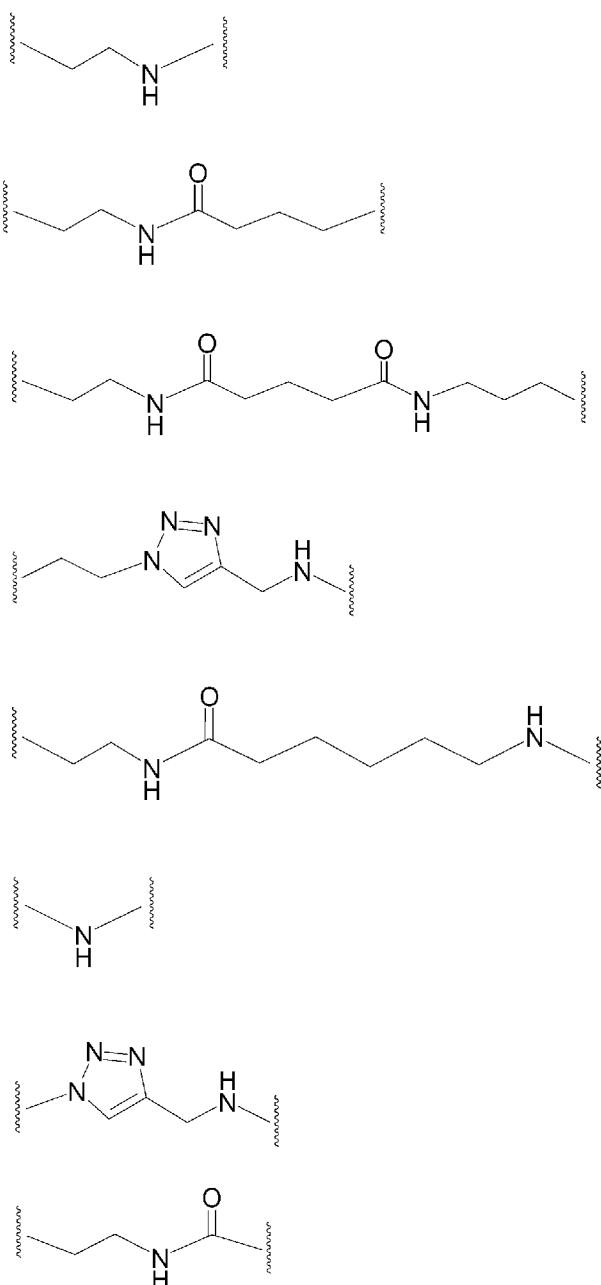
リンカー構造IB中の、Q1及びQ2は、それぞれ独立して、アミド基(-NHC(=O)-または-C(=O)NH-)、アミノ基(-NH-)、ヘテロ環、及びヘテロ芳香環のいずれかであり、a1～a3およびb1～b3は、それぞれ独立して、0～5の整数であり、c1～c3は、独立して0または1であり、且つ、Z1～Z3は、独立して1又は2であることが好ましい。

[0088] 高分子Iにおける、シグレックに結合可能なリガンドと水溶性ユニットと

を連結するリンカーの構造としては、具体的には、以下の構造を挙げることができる。

なお、シグレックに結合可能なリガンドが、例えば、式（１）で表される基である場合、糖鎖末端（すなわち、アノマー位のヒドロキシ基に由来する酸素）を介さずとも、糖鎖と、リンカーとが結合してもよい。

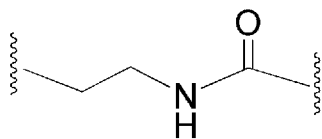
[0089] [化27]



[0090] 高分子 I における、上記リンカーの構造の中でも好ましくは、以下の構造

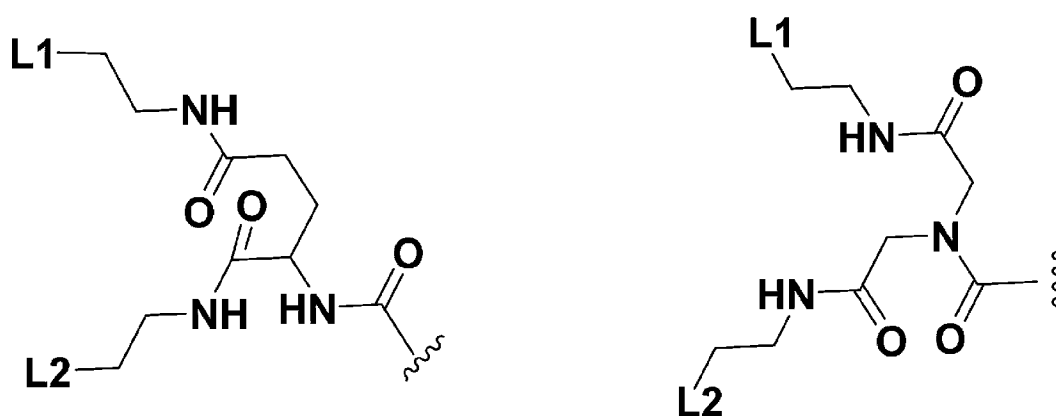
である。

[0091] [化28]



[0092] また、高分子 I が、2つのシグレックに結合可能なリガンドを有するとき、リンカーの構造としては、以下の構造が挙げられる。

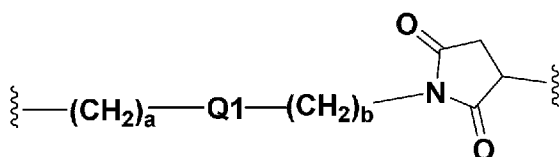
[0093] [化29]



(構造中、L1およびL2は、同一でも異なってもよく、シグレックに結合可能なリガンドを表す。)

[0094] 高分子Iにおける、水溶性ユニットと、カチオン性ユニットとを連結するために存在するリンカーは、上述のリンカー構造 I が好ましく、より好ましくは以下の構造で表される。

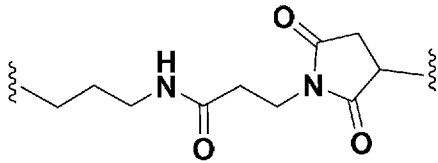
[0095] [化30]



(aおよびbは、それぞれ独立して、0～5、好ましくは1～5、より好ましくは2～3のいずれかの整数である。)

[0096] 高分子Iにおける、水溶性ユニットと、カチオン性ユニットとを連結するために存在するリンカー構造Iは、以下の構造がさらに好ましい。

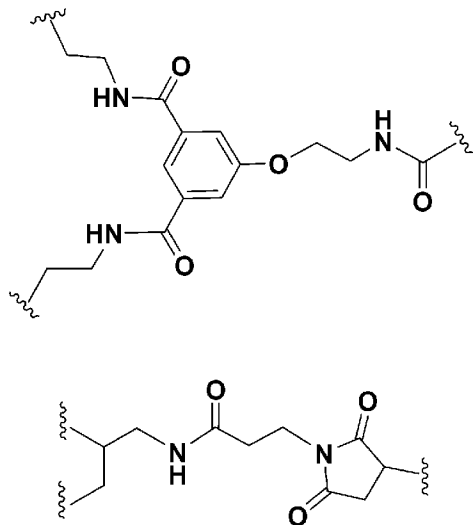
[0097] [化31]



[0098] 高分子 I が、2 以上のシグレックに結合可能なリガンドを有するとき、水溶性ユニットと、カチオン性ユニットとを連結するために存在するリンカーに分岐点を設けてもよい。

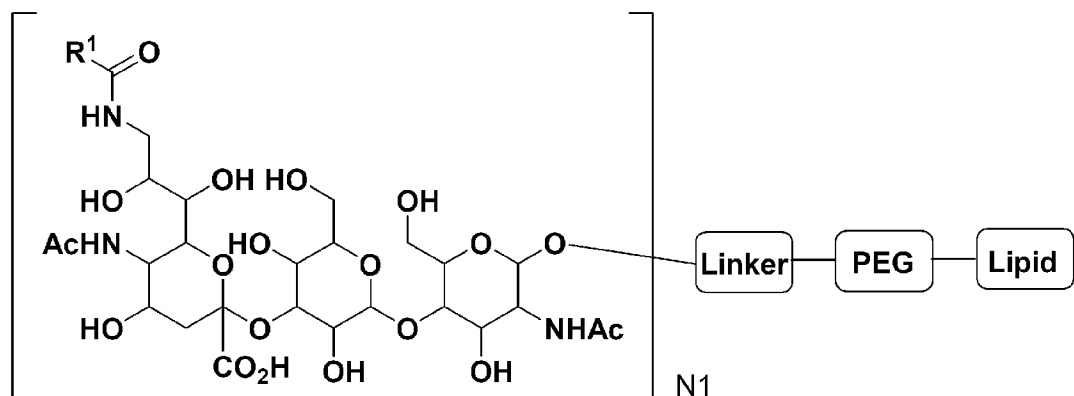
このとき、リンカーの構造としては、以下の構造が挙げられる。

[0099] [化32]



[0100] 脂質 I としては、具体的には、以下の構造が挙げられる。

[0101] [化33]



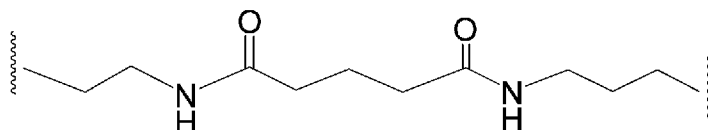
[0102] 式中、R¹は、C6-C12アリール基、C4-C12ヘテロアリール基、または、C6-C12

アリール基もしくはC4-C12ヘテロアリール基で置換されたC1-C6アルキル基を表す。Linkerは、リンカーを表し、PEGは、ポリエチレングリコールを含むユニットであり、Lipidは脂質であり、N1は1以上の整数である。Acはアセチルを表す。

式中の-PEG-Lipidの構造としては、上述した、式(Z1)～(Z3)で表されるいずれかの構造であることが好ましく、式(Z2)で表される構造であることがより好ましい。

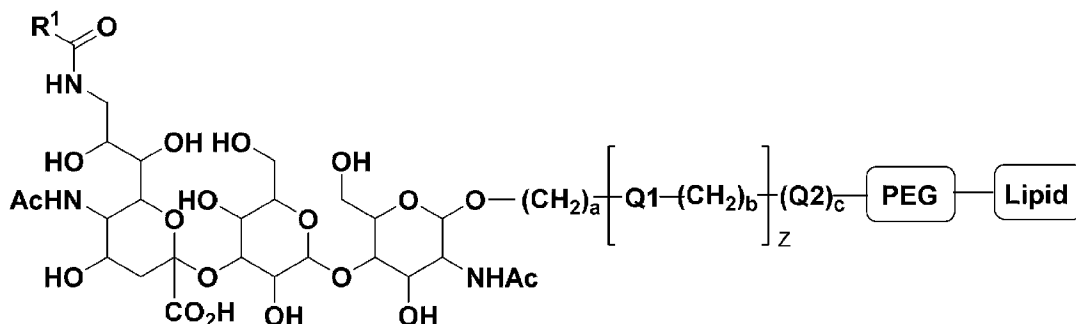
Linkerとしては、特に制限されないが、好ましくは、上述した、リンカー構造I、リンカー構造IA、およびリンカー構造IBのいずれかであり、より好ましくは、リンカー構造Iであり、さらに好ましくは、以下の構造である。

[0103] [化34]



[0104] 脂質Iとしては、具体的には、以下の構造が好ましい。

[0105] [化35]

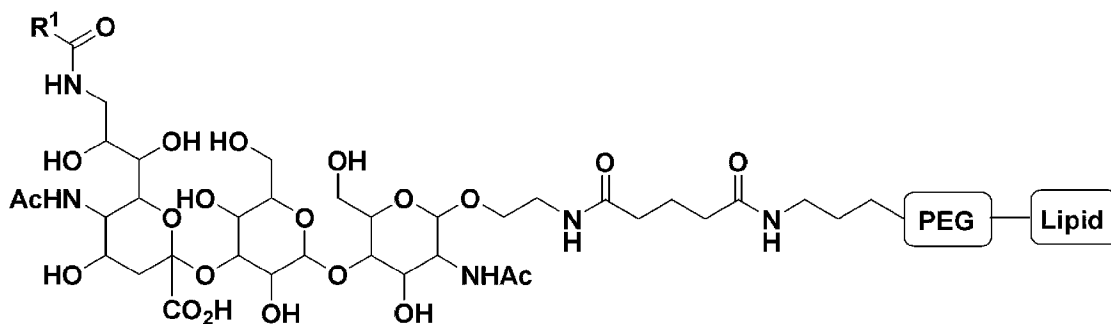


(構造中、R¹、Q1、Q2、a、b、c、Z、PEG、Lipid、およびAcは上記と同様である。)

[0106] 脂質Iとしては、具体的には、以下の構造がより好ましい。

[0107]

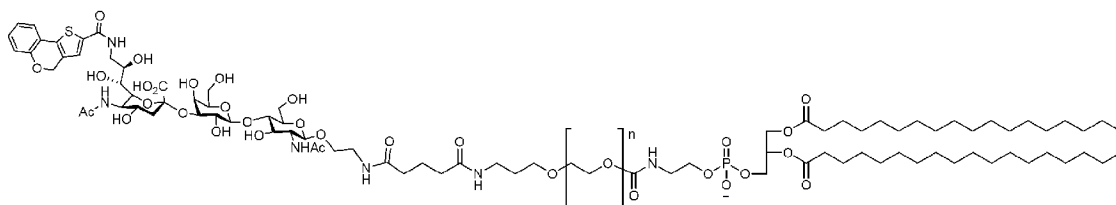
[化36]



(構造中、R¹、PEG、Lipid、およびAcは、上記と同様である。)

[0108] 脂質 I としては、以下の構造がさらに好ましい。

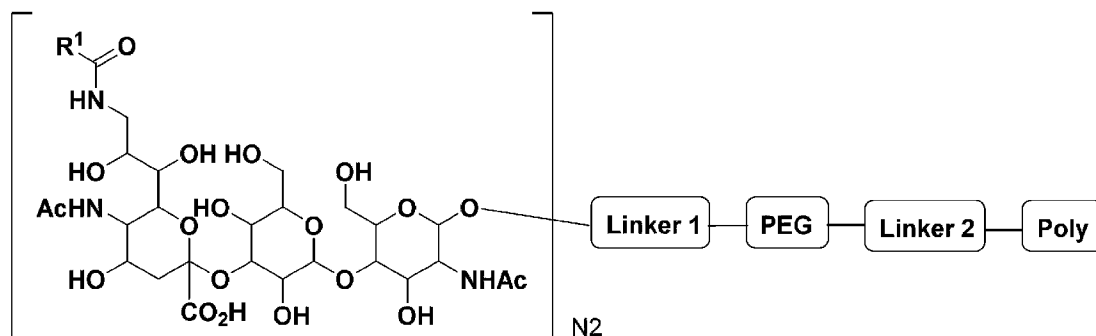
[0109] [化37]



(Acは、アセチルを表す。nは、1~300の整数である。)

[0110] 高分子 I としては、具体的には、以下の構造が挙げられる。

[0111] [化38]



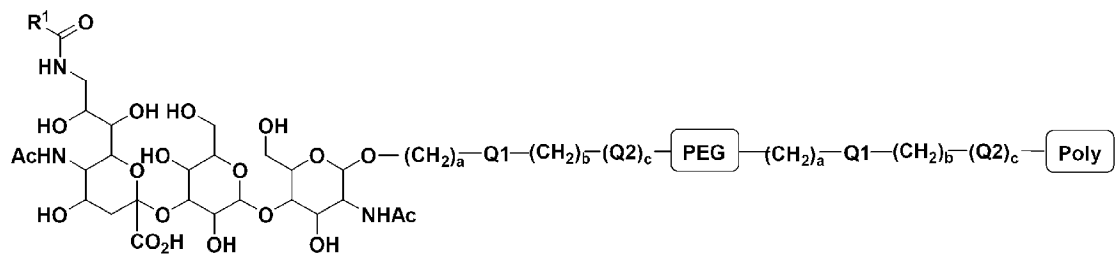
(式中、R¹は、C6-C12アリール基、C4-C12ヘテロアリール基、または、C6-C12アリール基もしくはC4-C12ヘテロアリール基で置換されたC1-C6アルキル基を表す。PEGは、ポリエチレングリコールを含むユニットであり、Polyは、リジン、アルギニン、ヒスチジンからなる群より選択される一種以上を含むアミノ酸ポリマーユニット、ポリエチレンジイミンユニット、又は、ポリアミノアクリレートユニットである。Linker 1及びLinker 2は、それぞれ独立してPol

yとPEGを連結するリンカーである。N2は1以上の整数である。Acはアセチルを表す。)

[0112] Linker 1としては、好ましくは、上述のリンカー構造I、リンカー構造IA、およびリンカー構造IBである。

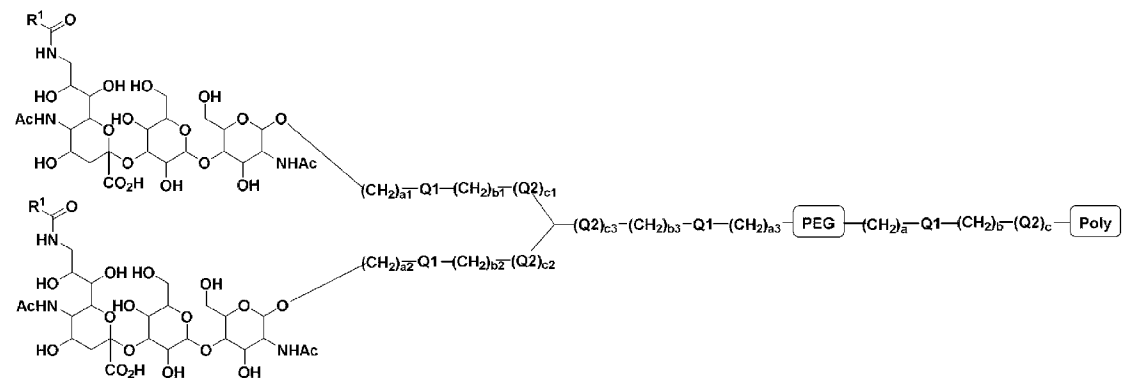
[0113] 好ましい高分子Iとしては、以下の構造を挙げることができる。

[0114] [化39]



(構造中、R¹、PEG、Poly、Q1、Q2、a、b、c、およびAcは、上記と同様である。複数の、Q1、Q2、a、b、cは、同一であっても、異なってもよい。)

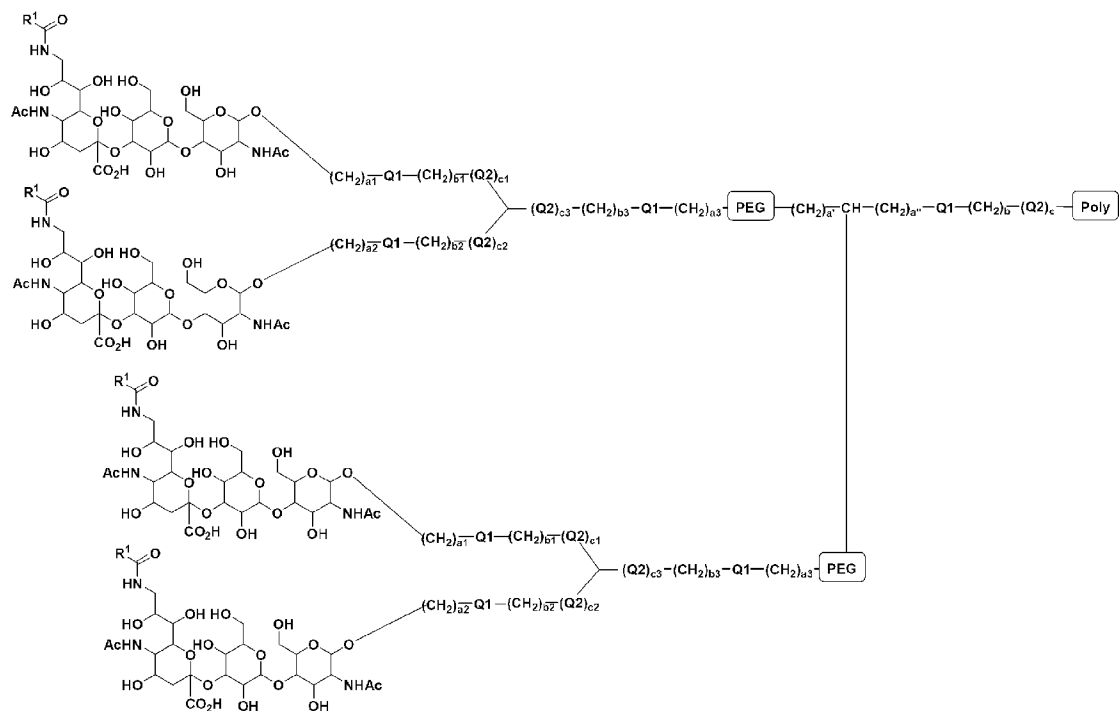
[0115] [化40]



(構造中、R¹、PEG、Poly、Q1、Q2、a、b、c、a1~a3、b1~b3、c1~c3、およびAcは、上記と同様である。複数の、R¹、Q1、Q2は、同一であっても、異なってもよい。)

[0116]

[化41]

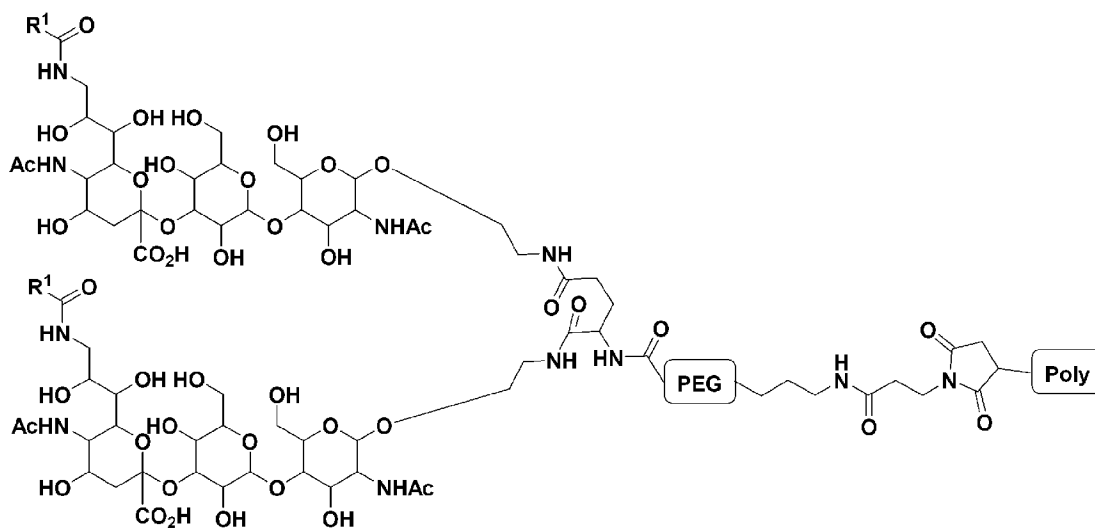
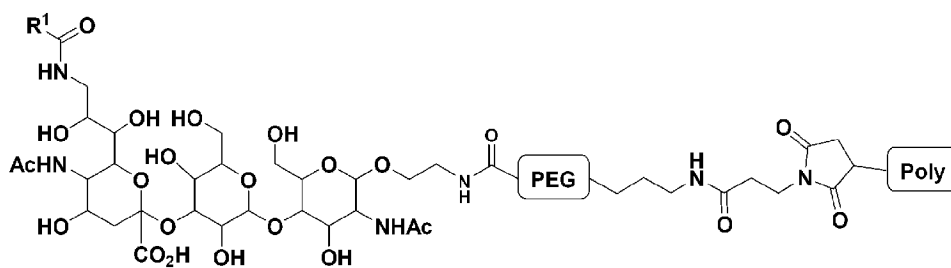


(構造中、 R^1 、PEG、Poly、Q1、Q2、b、c、 $a_1 \sim a_3$ 、 $b_1 \sim b_3$ 、 $c_1 \sim c_3$ 、およびA cは、上記と同様である。複数の、 R^1 、Q1、Q2、 $a_1 \sim a_3$ 、 $b_1 \sim b_3$ 、 $c_1 \sim c_3$ は、同一であっても、異なってもよい。 a' 及び a'' は、それぞれ独立して、0～5のいずれかの整数である。)

[0117] より好ましい高分子Iとしては、以下の構造を挙げることができる。

[0118]

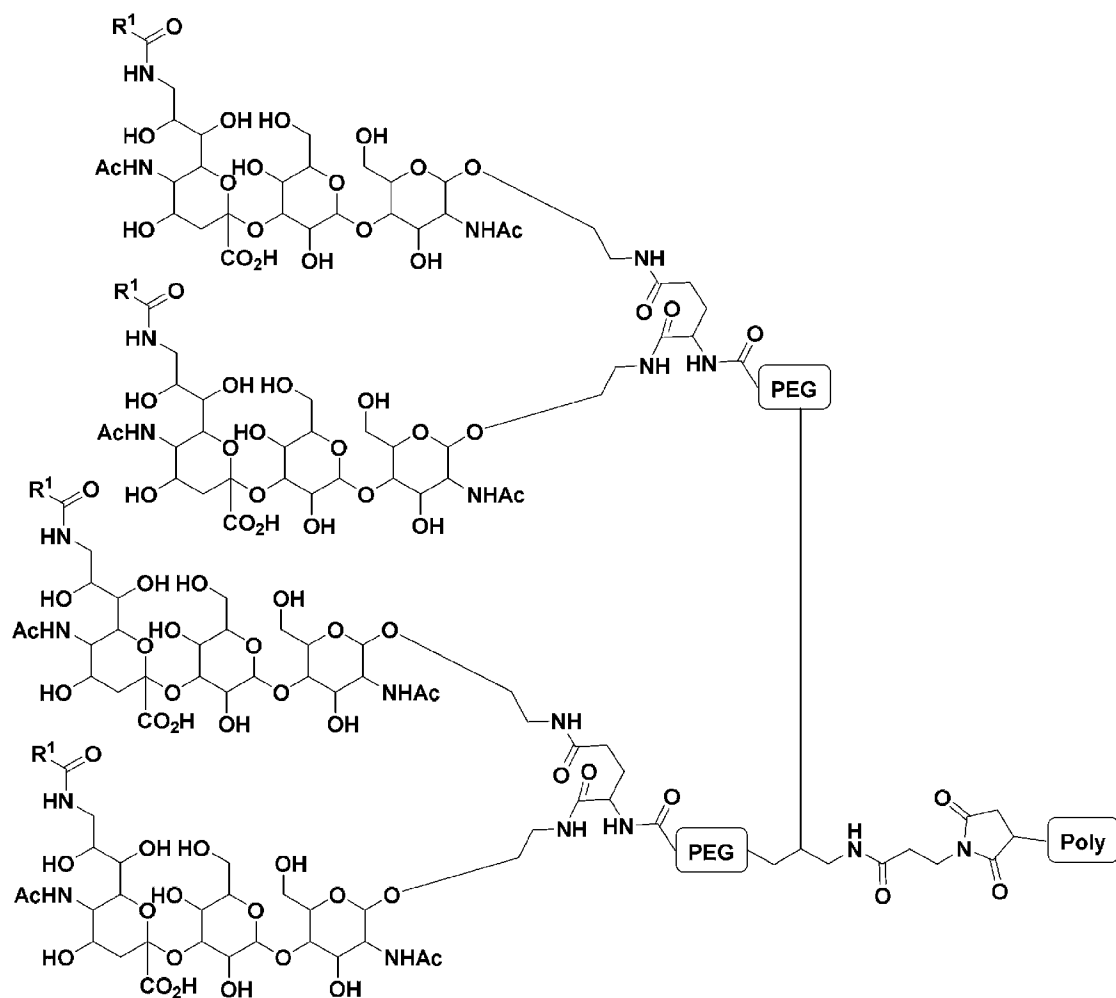
[化42]



(R¹、PEG、Poly、およびAcは、上記と同様である。)

[0119]

[化43]

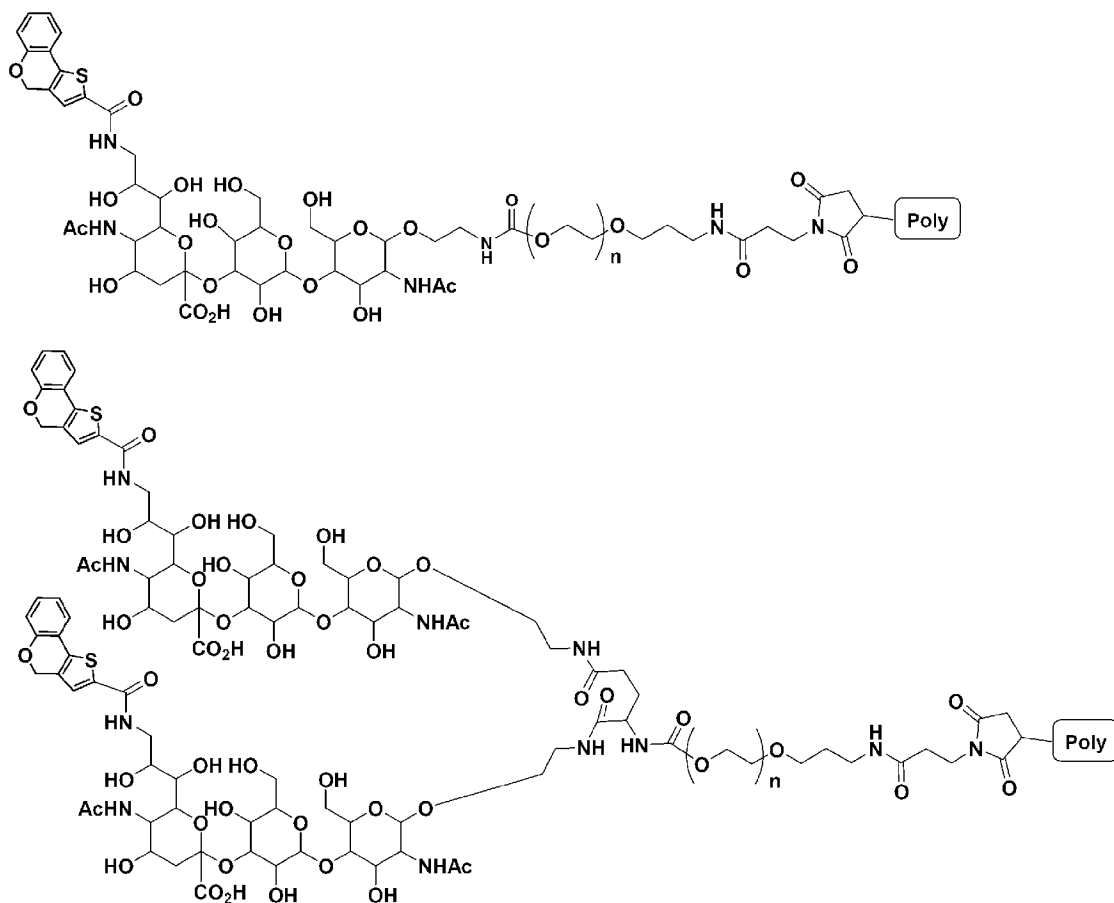


(R¹、PEG、Poly、およびAcは、上記と同様である。)

[0120] さらに好ましい高分子 I としては、以下の構造を挙げることができる。

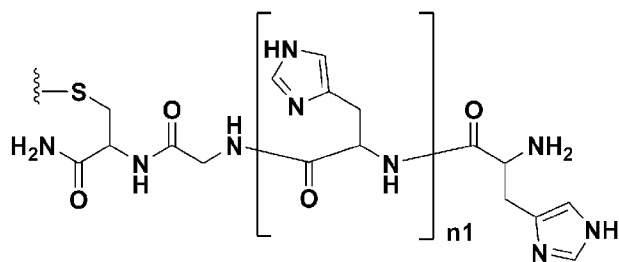
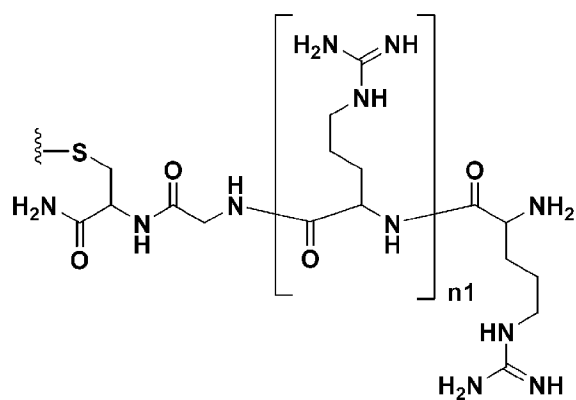
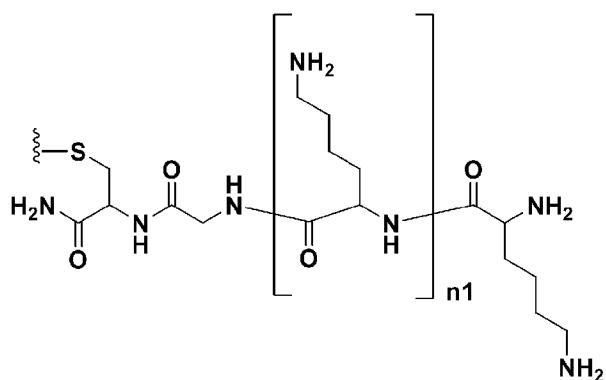
[0121]

[化44]



(構造中、Acはアセチルを表し、nは、1～300の整数であり、Polyは、以下の構造：

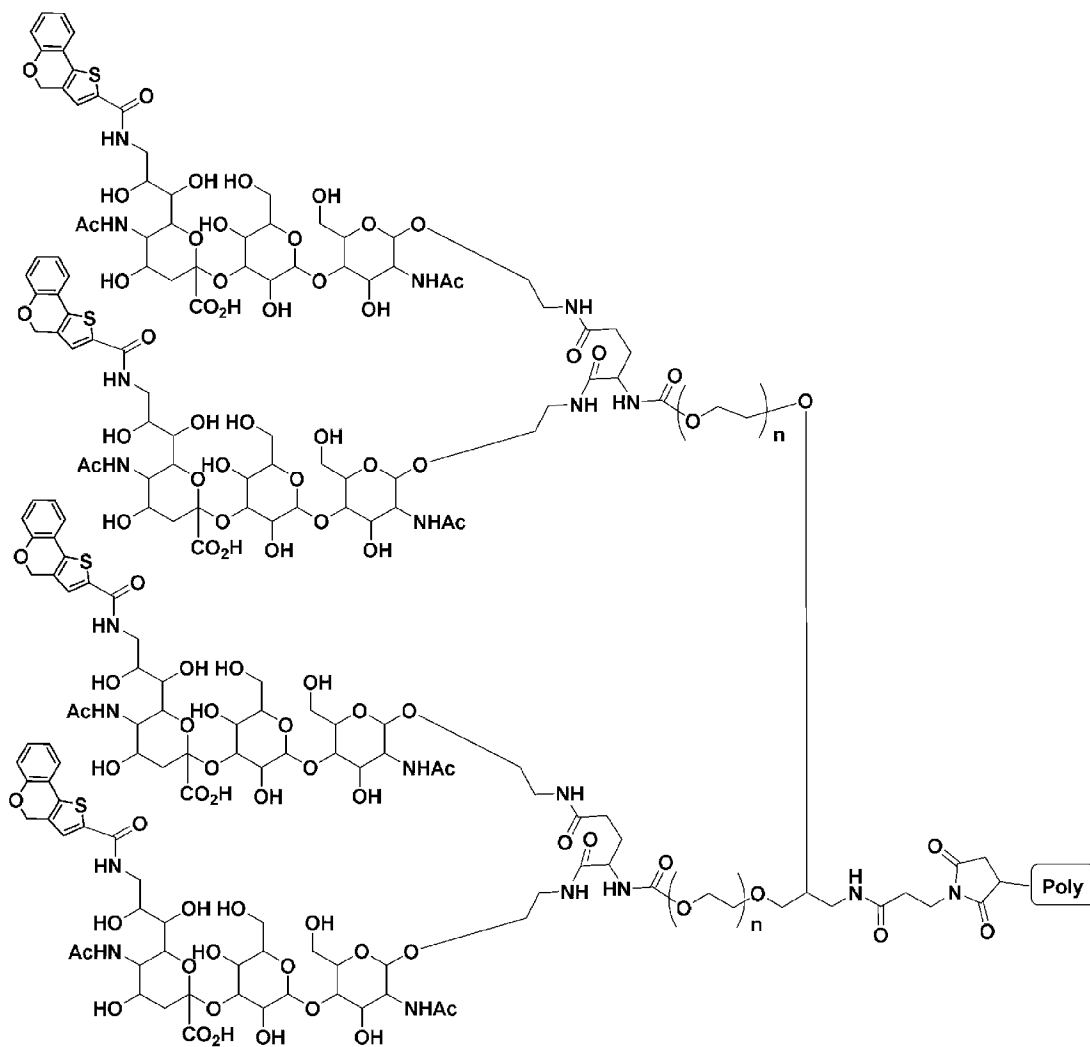
[化45]



(n_1 は、1～3000、好ましくは10～2000であり、より好ましくは10～1000であり、よりさらに好ましくは10～100であり、さらにより好ましくは10～50であり、特に好ましくは10～40である。)のいずれかで表される。)

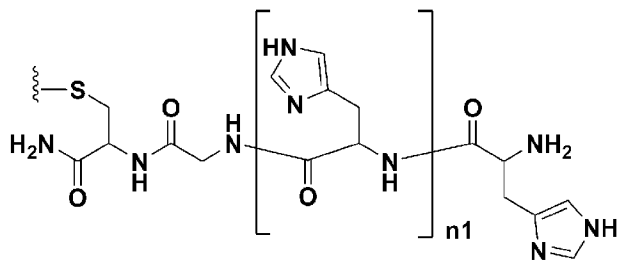
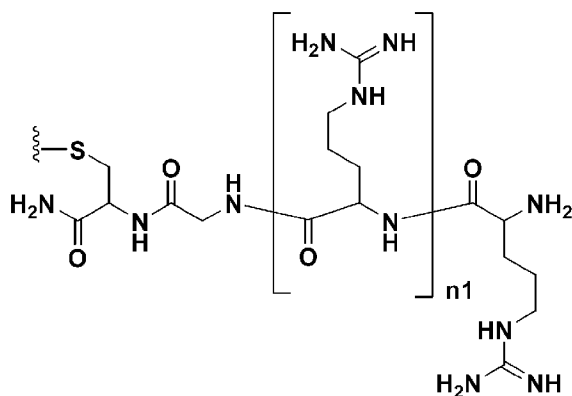
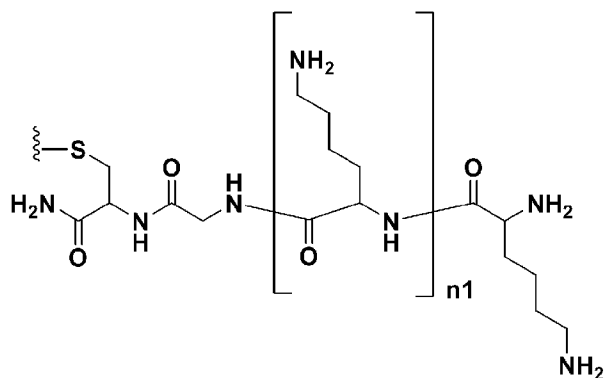
[0122]

[化46]



(構造中、Acはアセチルを表し、nは、1~300の整数であり、Polyは、以下の構造：

[化47]

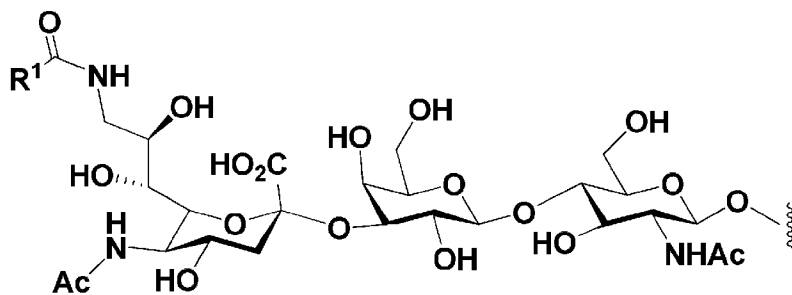


(n_1 は、1～3000、好ましくは10～2000であり、より好ましくは10～1000であり、よりさらに好ましくは10～100であり、さらにより好ましくは10～50であり、特に好ましくは10～40である。)のいずれかで表される。)

[0123] なお、脂質Iおよび高分子Iとして、それぞれ数種類の異性体が存在し得るが、脂質Iおよび高分子Iは、それぞれ、異性体のいずれか1種の単一物であっても、これらが任意の割合で含まれる混合物であってもよい。異性体としては、具体的には、光学異性体が挙げられる。

式(1)は、下記の式(1')で表される異性体であることが好ましい。

[0124] [化48]



(1')

(式(1')中、R¹は、式(1)におけるR¹と同義である。Acはアセチル基である。)

[0125] 脂質Iは、J. Am. Chem. Soc., 2012, 134, 15696を参照して、有機合成手法を用いて合成することができる。

具体的には、以下に示すスキームのとおり、脂質あるいは水溶性ユニットを含む脂質に含まれる反応性基、または、脂質あるいは水溶性ユニットを含む脂質に一般的な誘導化を行うことによって導入した反応性基と、シグレックに結合可能なリガンドに結合した反応性基を含む有機基（かかる有機基は、脂質Iにおいてはリンカーとなる）における反応性基とを、反応させることによって、脂質Iを得ることができるが、合成方法は特に制限されない。

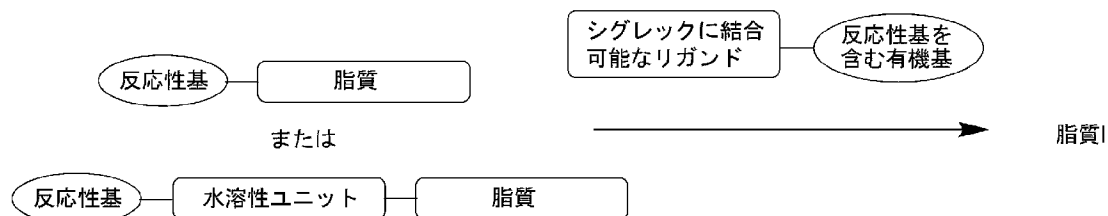
反応性基の組み合わせとしては、アミノ基とカルボキシル基との組み合わせ、ヒドロキシル基とカルボキシル基との組み合わせ等が挙げられ、好ましくはアミノ基とカルボキシル基との組み合わせであり、より好ましくは、脂質あるいは水溶性ユニットを含む脂質の反応性基がアミノ基であり、シグレックに結合可能なリガンドに結合した反応性基がカルボキシル基である組み合わせである。

反応性基であるカルボキシル基は、酸クロライドや、N-ヒドロキシスクシンイミド、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド等によって、活性化してもよく、一般的な、アミド結合形成反応や脱水縮合反応の条件を適用することができる。

反応性基を含む脂質あるいは水溶性ユニット、および、反応性基を含む有

機基を含むシグレックに結合可能なリガンドは、J. Am. Chem. Soc., 2012, 134, 15696を参照して入手することができ、市販の脂質やリガンドを、有機合成手法を用いて誘導化すればよい。

[0126] [化49]



[0127] 高分子Iもまた、有機合成手法を用いて合成することができる。

具体的には、以下に示すスキームのとおり、水溶性ユニットおよびカチオン性ユニットを含む高分子に含まれる反応性基、または、該水溶性ユニットに一般的な誘導化を行うことによって導入した反応性基と、シグレックに結合可能なリガンドに結合した反応性基を含む有機基（かかる有機基は、高分子Iにおいてはリンカーとなる）における反応性基とを、反応させることによって、高分子Iを得ることができるが、合成方法は特に制限されない。

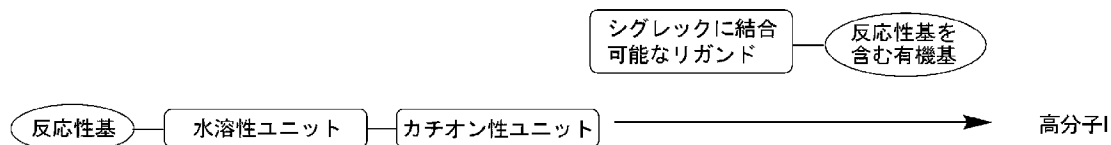
反応性基の組み合わせとしては、特に制限されず、例えば、アミノ基とカルボキシル基との組み合わせ、ヒドロキシル基とカルボキシル基との組み合わせ等が挙げられる。

反応性基であるカルボキシル基は、酸クロライドや、N-ヒドロキシスクシンイミド、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド等によって、活性化してもよく、一般的な、アミド結合形成反応や脱水縮合反応の条件を適用することができる。

反応性基を含む水溶性ユニットおよびカチオン性ユニットを含む高分子、および、反応性基を含む有機基を含むシグレックに結合可能なリガンドは、J. Am. Chem. Soc., 2012, 134, 15696を参照して入手することができ、市販の脂質やリガンドを、有機合成手法を用いて誘導化すればよい。

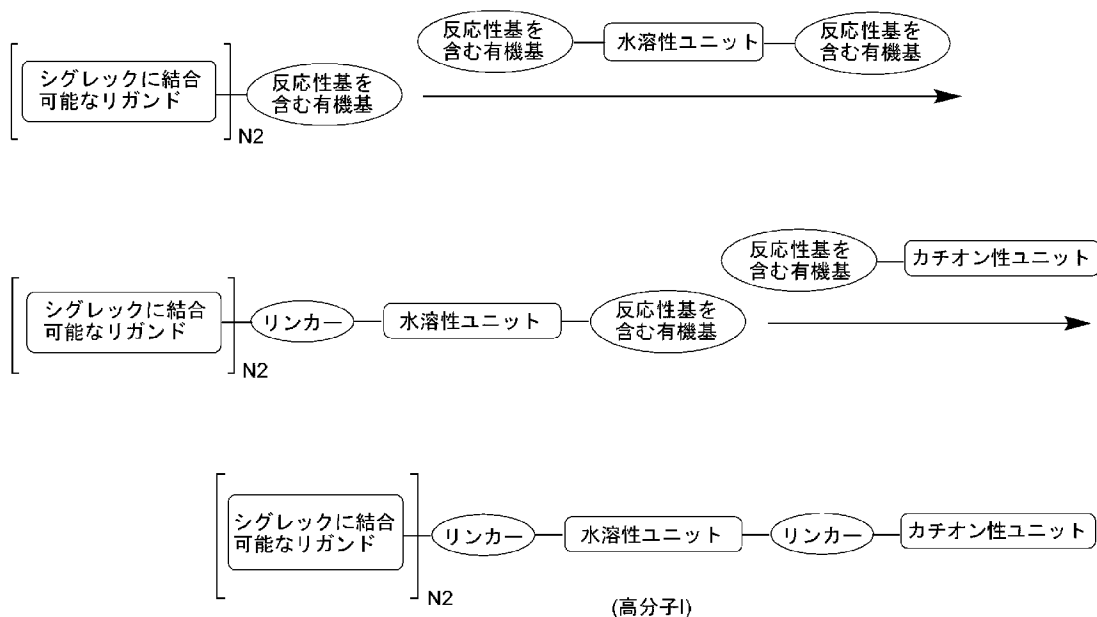
[0128]

[化50]



[0129] また、以下に示すように、シグレックに結合可能なリガンドに結合した反応性基を含む有機基と、反応性基を含む水溶性ユニットを反応させたのち、反応性基を含むカチオン性ユニットとを反応させる方法も挙げることができる。

[0130] [化51]



[0131] 反応性基を含む有機基を含むシグレックに結合可能なリガンドは、例えば、J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 6680-6681、国際公開第2007/056525号等を参照し、合成することもできる。

[0132] シグレックに結合可能なリガンドに、反応性基を含む有機基を導入することにより、シグレックに結合可能なリガンドを、脂質あるいは水溶性ユニットを含む脂質、または、水溶性ユニットおよびカチオン性ユニットを含む高分子との連結が可能となる。

シグレックに結合可能なリガンドに、反応性基を含む有機基を導入する方法としては、特に制限されず、シグレックに結合可能なリガンドと、反応性

基を含む有機基となる化合物とを、エーテル化（第4版実験化学講座20 有機化合物の合成II」、第4版、p.187、丸善(1992年)等）、アミノ化（第4版実験化学講座20 有機化合物の合成II」、第4版、p.279、丸善(1992年)等）、エステル化（第4版実験化学講座22 有機化合物の合成IV」、第4版、p.43、丸善(1992年)等）、アミド化（第4版実験化学講座22 有機化合物の合成IV」、第4版、p.137、丸善(1992年)等）等の一般的な反応を行えばよい。

[0133] シグレックに結合可能なリガンドが、糖鎖リガンドである場合、例えば、糖鎖の末端のアノマー位に、反応性基を含む有機基となる化合物を、反応させることによって（アセタール化等）、シグレックに結合可能なリガンドに反応性基を含む有機基を導入することができる。

[0134] （脂質II）

本発明のナノ粒子が脂質を含む脂質ナノ粒子である場合、脂質Iに加え、カチオン性脂質(脂質II)を含んでいてもよい。

カチオン性脂質としては、1以上の置換されていてもよい炭化水素基を含む脂質親和性領域と、少なくとも1つの1級アミノ基、2級アミノ基、3級アミノ基および／または4級アンモニウム基を含むカチオン性の親水性領域を有する両親媒性分子であれば特に限定されないが、置換されていても良い1つのアミノ基または1つの4級アンモニウム基を有する親水部および置換されていても良い独立した2つの炭化水素基を有する疎水部を有する脂質を挙げることができる。

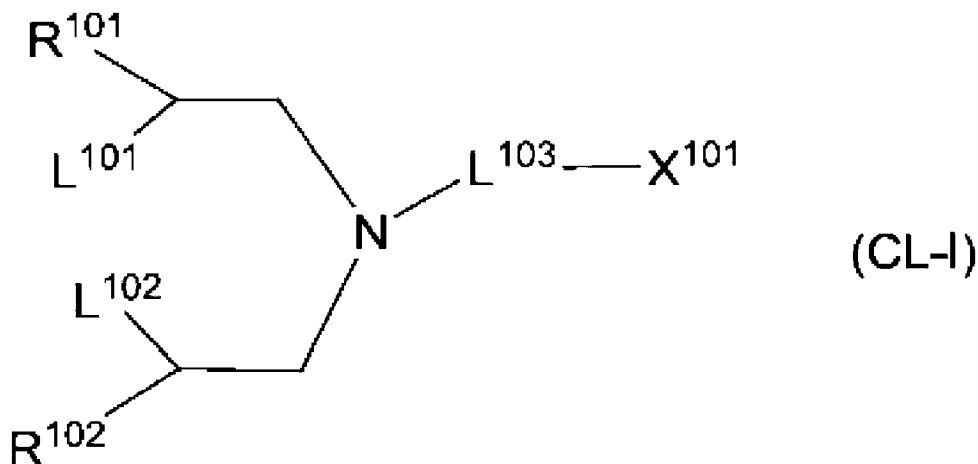
[0135] 本発明で用いられるカチオン性脂質としては、例えば、国際公開第2013/089151号、国際公開第2011/136368号、国際公開第2014/007398号、国際公開第2010/042877号または国際公開第2010/054401号に記載のカチオン性脂質等が挙げられる。

[0136] 本発明で用いられるカチオン性脂質としては、具体的には、以下の式(CL-I)～式(CL-XVI)が挙げられる。

[0137] 式(CL-I)

[0138]

[化52]



(式中、

R^{101} および R^{102} は同一または異なって直鎖状もしくは分岐状のC10-C24アルキル、C10-C24アルケニルまたはC10-C24アルキニルであり、

L^{101} および L^{102} は水素原子であるか、または一緒になって単結合もしくはC2-C8アルキレンを形成し、

L^{103} は単結合、-C0-または-C0-O-であり、

L^{103} が単結合である場合には、

X^{101} は水素原子、C1-C6アルキル、C3-C6アルケニル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、または同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換されたC1-C6アルキルもしくはC3-C6アルケニルであり、

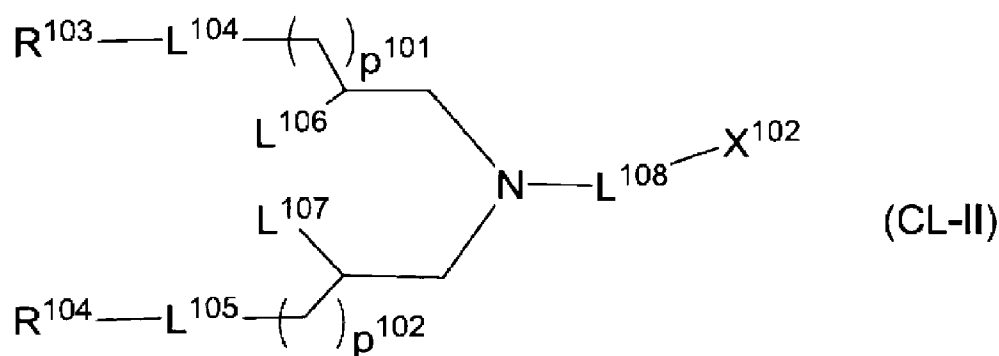
L^{103} が-C0-または-C0-O-である場合には、

X^{101} はピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イル、モルホリン-3-イル、または同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジ

ニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換されたC1-C6アルキルもしくはC3-C6アルケニルであり、該置換基の少なくとも1つは、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ピロリジニル、ピペリジルまたはモルホリニルである)

[0139] 式(CL-II)

[0140] [化53]



(式中、

R^{103} および R^{104} は同一または異なって直鎖状もしくは分岐状のC12-C24アルキル、C12-C24アルケニルまたはC12-C24アルキニルであり、

p^{101} および p^{102} は同一または異なって0~3の整数であり、

L^{106} および L^{107} は水素原子であるか、または一緒になって単結合もしくはC2-C8アルキレンを形成し、

L^{104} および L^{105} は同一または異なって-O-、-CO-O-または-O-CO-であり、

L^{108} は単結合、-CO-または-CO-O-であり、

L^{108} が単結合である場合には、

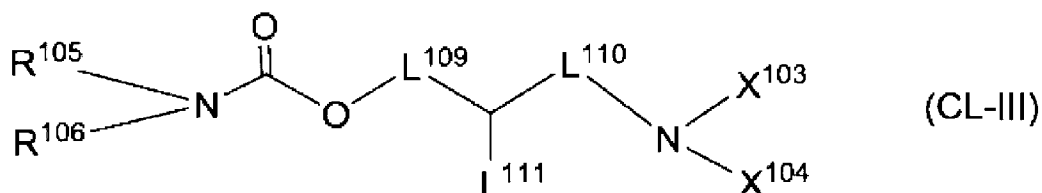
X^{102} は水素原子、C1-C6アルキル、C3-C6アルケニル、ピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、または同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換されたC1-C6アルキルもしくはC3-C6アルケニルであり、

L¹⁰⁸が-CO-または-CO-O-である場合には、

X¹⁰²はピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イル、モルホリン-3-イル、または同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換されたC1-C6アルキルもしくはC3-C6アルケニルであり、該置換基の少なくとも1つは、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ピロリジニル、ピペリジニルまたはモルホリニルである)

[0141] 式(CL-III)

[0142] [化54]



(式中、

R¹⁰⁵は直鎖状もしくは分岐状のC8-C24アルキル、C8-C24アルケニルまたはC8-C24アルキニルであり、

R¹⁰⁶は直鎖状または分岐状のC8-C24アルキル、C8-C24アルケニル、C8-C24アルキニル、C8-C24アルキルオキシエチル、C8-C24アルキルオキシプロピル、C8-C24アルケニルオキシエチル、C8-C24アルケニルオキシプロピル、C8-C24アルキニルオキシエチルまたはC8-C24アルキニルオキシプロピルであり、

X¹⁰³およびX¹⁰⁴は同一または異なってC1-C3アルキルであるか、または一緒になってC2-C8アルキレンを形成するか、またはX¹⁰³はL¹¹¹と一緒にC2-C8アルキレンを形成し、

L¹¹¹は水素原子、C1-C6アルキル、C3-C6アルケニル、アミノ、モノアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、または同一もしくは異なって1~3つのアミノ

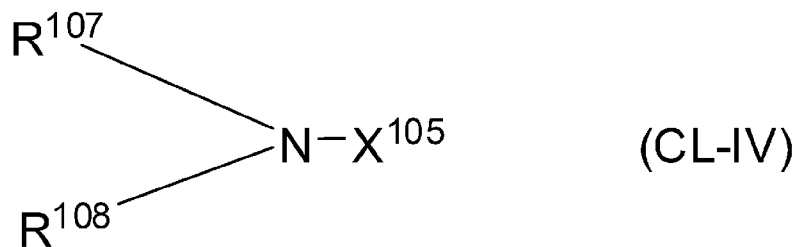
、モノアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイルもしくはジアルキルカルバモイルで置換されたC1-C6アルキルもしくはC3-C6アルケニルであるか、またはX¹⁰³と一緒にあってC2-C8アルキレンを形成し、

L¹⁰⁹はC1-C6アルキレンであり、

L¹¹⁰は単結合であるか、またはC1-C6アルキレンであり、ただし、L¹⁰⁹とL¹¹⁰の炭素数の和は7以下であり、L¹¹¹が、水素原子の場合、L¹¹⁰は単結合であり、L¹¹¹がX¹⁰³と一緒にあってC2-C6アルキレンを形成する場合、L¹¹⁰は単結合であるか、またはメチレンもしくはエチレンである)

[0143] 式(CL-IV)

[0144] [化55]



(式中、

R¹⁰⁷は直鎖状もしくは分岐状のC8-C24アルキル、C8-C24アルケニルまたはC8-C24アルキニルであり、

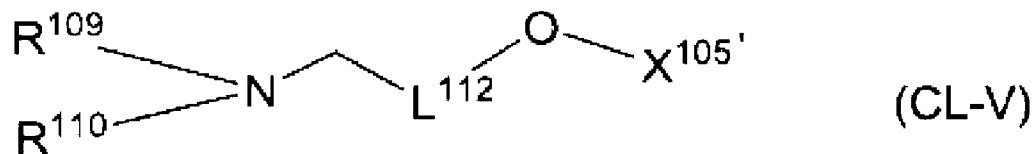
R¹⁰⁸は直鎖状もしくは分岐状のC8-C24アルキル、C8-C24アルケニル、C8-C24アルキニル、C8-C24アルキルオキシエチル、C8-C24アルキルオキシプロピル、C8-C24アルケニルオキシエチル、C8-C24アルケニルオキシプロピル、C8-C24アルキニルオキシエチル、C8-C24アルキニルオキシプロピル、C8-C24アルキルオキシエトキシエチル、C8-C24アルケニルオキシエトキシエチルまたはC8-C24アルキニルオキシエトキシエチルであり、

X¹⁰⁵は水素原子または置換されていても良いC1-C4アルキルである)

[0145] 式(CL-V)

[0146]

[化56]



(式中、

R^{109} は直鎖状もしくは分岐状のC8-C24アルキル、C8-C24アルケニルまたはC8-C24アルキニルであり、

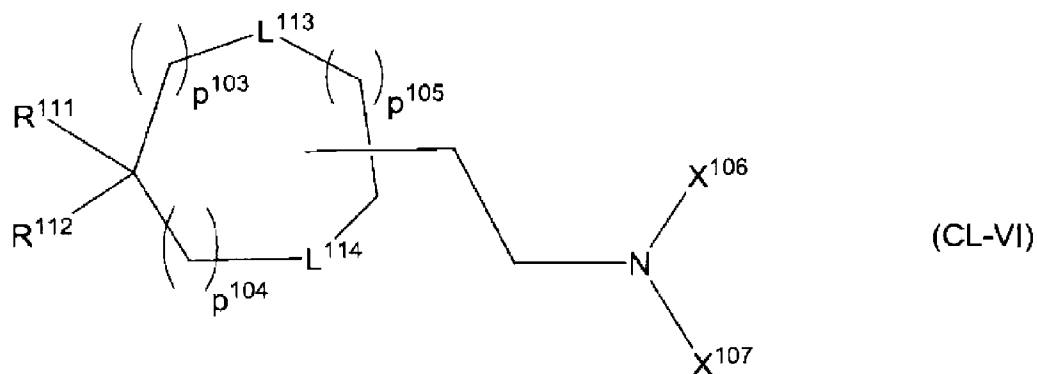
R^{110} は直鎖状もしくは分岐状のC8-C24アルキル、C8-C24アルケニル、C8-C24アルキニル、C8-C24アルキルオキシエチル、C8-C24アルキルオキシプロピル、C8-C24アルケニルオキシエチル、C8-C24アルケニルオキシプロピル、C8-C24アルキニルオキシエチルまたはC8-C24アルキニルオキシプロピルであり、

L^{112} はC1-C3アルキレンであり、

$\text{X}^{105'}$ は水素原子またはC1-C3アルキルである)

[0147] 式(CL-VI)

[0148] [化57]



(式中、

R^{111} および R^{112} は同一または異なって直鎖状もしくは分岐状の置換されていて
も良いC8-C24アルキル、C8-C24アルケニルまたはC8-C24アルキニルであり、

X^{106} および X^{107} は同一または異なってC1-C3アルキルであるか、または一緒にな
ってC2-C8アルキレンを形成し、

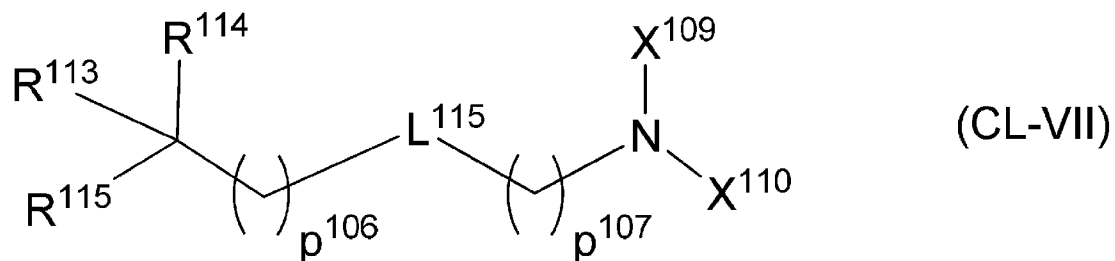
p^{103} 、 p^{104} および p^{105} は同一または異なって0または1であり、ただし p^{103} 、 p^{104} お

よび p^{105} は同時には0ではなく、

L^{113} および L^{114} は同一または異なって0、SまたはNHである)

[0149] 式(CL-VII)

[0150] [化58]



(式中、

R^{113} および R^{114} は同一または異なって直鎖もしくは分岐状の置換されていても良いC8-C24アルキル、C8-C24アルケニルまたはC8-C24アルキニルであり、

R^{115} は水素原子、ヒドロキシ、置換されていても良いC1-C4アルキル、C1-C4アルコキシまたはC1-C4アシルオキシであり、

X^{109} および X^{110} は同一または異なってC1-C3アルキルであるか、または一緒になってC2-C8アルキレンを形成し、

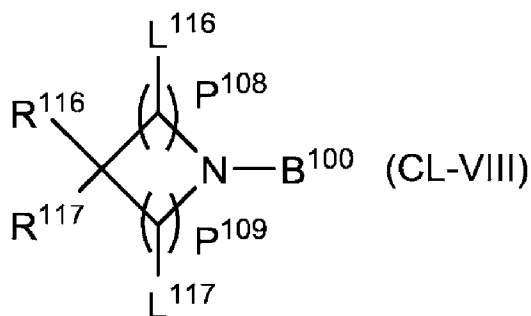
L^{115} は-CO-O-、-O-CO-、-NHCO-または-CONH-であり、

p^{106} は0~3の整数であり、

p^{107} は1~4の整数である)

[0151] 式(CL-VIII)

[0152] [化59]



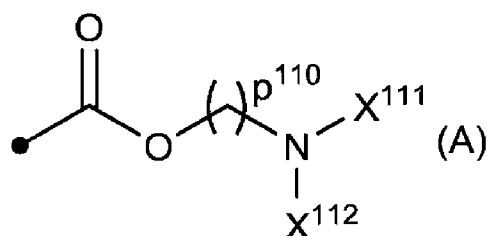
(式中、

R^{116} および R^{117} は同一または異なって直鎖状もしくは分岐状の置換されていて

も良いC8-C24アルキル、C8-C24アルケニル、C8-C24アルキニル、C7-C20アルキルオキシC1-C3アルキル、C7-C20アルケニルオキシC1-C3アルキルまたはC7-C20アルキニルオキシC1-C3アルキルであり、

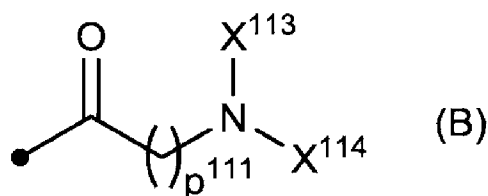
B¹⁰⁰は、水素原子、C1-C3アルキル、ヒドロキシC2-C4アルキル、C1-C3ジアルキルアミノC2-C4アルキル、式(A)

[化60]



(式中、X¹¹¹およびX¹¹²は同一または異なって水素原子もしくはC1-C3アルキルであるか、またはX¹¹¹およびX¹¹²が結合する窒素原子と一緒になってC2-C6含窒素ヘテロ環を形成してもよく、p¹¹⁰は2~6の整数である)、または式(B)

[化61]



(式中、X¹¹³およびX¹¹⁴は同一または異なって水素原子もしくはC1~C3アルキルであるか、またはX¹¹³およびX¹¹⁴が結合する窒素原子と一緒になってC2-C6含窒素ヘテロ環を形成してもよく、p¹¹¹は1~6の整数である)であり、

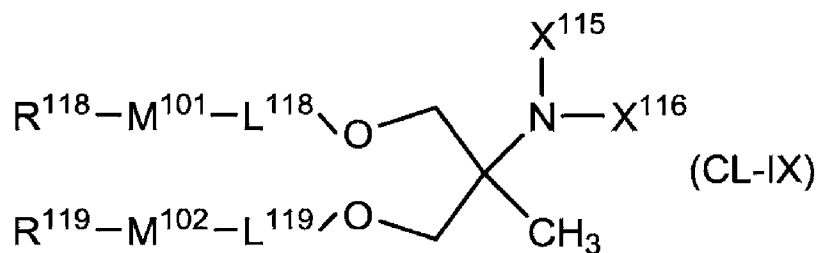
P¹⁰⁸は0~4の整数であり、P¹⁰⁹は1~4の整数であり(但し、P¹⁰⁸が0であり、P¹⁰⁹が1である場合を除く)、

L¹¹⁶は結合する炭素ごとに同一または異なって水素原子またはC1-C3アルキルであり、

L¹¹⁷は結合する炭素ごとに同一または異なって水素原子またはC1-C3アルキルである)

[0153] 式(CL-IX)

[0154] [化62]



(式中、

X¹¹⁵およびX¹¹⁶は同一または異なって水素原子またはC1-C3アルキルであり、L¹¹⁸およびL¹¹⁹は同一または異なって直鎖状もしくは分岐状の置換されていても良いC8-C24アルキレンもしくはC8-C24アルケニレンであり、

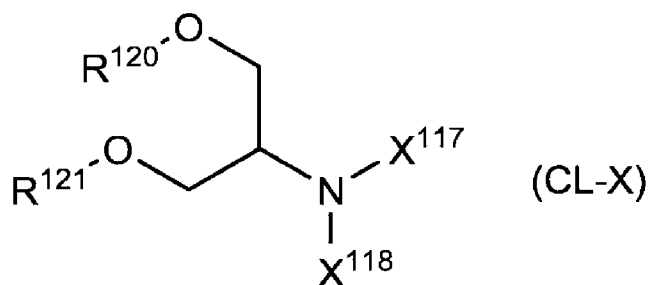
M¹⁰¹およびM¹⁰²は同一または異なって-C=C-、-OC(O)-、-C(O)O-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(S)-、-C(S)O-、-SS-、-C(R')=N-、-N=C(R')-、-C(R')=N-O-、-O=N=C(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(S)-、-C(S)N(R')-、-N(R')C(O)N(R'')-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-および-OC(O)O-からなる群から選ばれ、

R' およびR'' は、同一または異なって、水素原子またはC1-C3アルキルであり、

R¹¹⁸およびR¹¹⁹は同一または異なって直鎖状もしくは分岐状の置換されていても良いC1-C16アルキルまたはC2-C16アルケニルである)

[0155] 式(CL-X)

[0156] [化63]



(式中

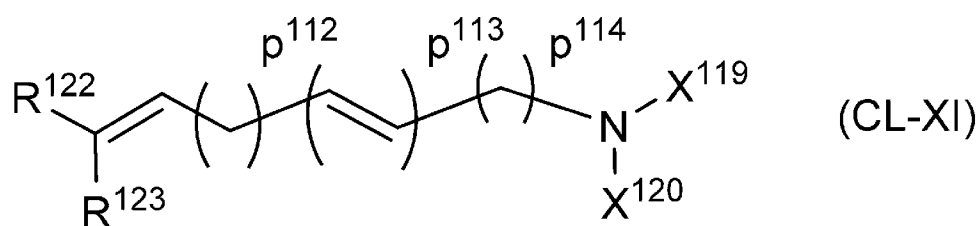
X¹¹⁷およびX¹¹⁸は同一または異なって水素原子、置換されていても良いC1-C6

アルキル、ヘテロシクリルまたはポリアミンであるか、または X^{117} および X^{118} はそれらが結合している窒素と一緒に、該窒素に加えて、N、OおよびSから選択される1または2個のさらなるヘテロ原子を含有していてもよい4~7員の単環式ヘテロ環を形成してもよく、

R^{120} および R^{121} は同一または異なって直鎖状もしくは分岐状の置換されていてもよいC4-C24アルキルまたはC4-C24アルケニルである)

[0157] 式(CL-XI)

[0158] [化64]



(式中、

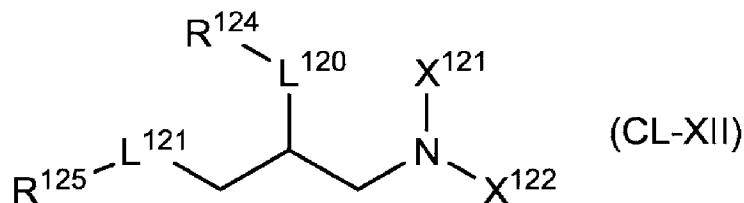
X^{119} および X^{120} は同一または異なって水素原子、直鎖状もしくは分岐状の置換されていてもよいC1-C20アルキル、C1-C20アルケニル、C1-C20アルキニルまたはC6-C20アシルであり、

R^{122} および R^{123} は同一または異なって直鎖状もしくは分岐状の置換されていてもよいC1-C30アルキル、C2-C30アルケニルまたはC2-C30アルキニルであり、

p^{112} 、 p^{113} および p^{114} は同一または異なって0であるか、任意の正の整数である)

[0159] 式(CL-XII)

[0160] [化65]



(式中、

X^{121} および X^{122} は同一または異なって水素原子、シクロアルキル、シクロアル

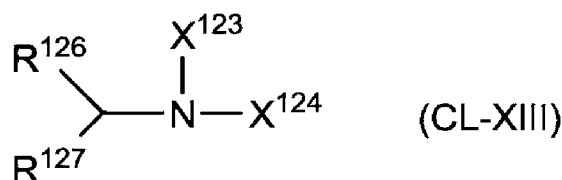
ケニルであるか、または X^{121} および X^{122} はそれらが結合する窒素原子と一緒に
なってC2-C6含窒素ヘテロ環を形成してもよく

L^{120} および L^{121} は同一または異なって-O-、-OC(O)-または-(O)CO-であり、

R^{124} および R^{125} は同一または異なって直鎖状もしくは分岐状の置換されていて
も良いC8-C24アルキルまたはC8-C24アルケニルである)、

[0161] 式(CL-XIII)

[0162] [化66]



(式中、

R^{126} および R^{127} は同一または異なって直鎖状もしくは分岐状の置換されていて
も良いC8-C24アルキル、C8-C24アルケニル、C8-C24アルキニル、C8-C24ヘテ
ロアルキル、C8-C24ヘテロアルケニルまたはC8-C24ヘテロアルキニルであり
、

X^{123} は水素原子または置換されていて良いC1-C6アルキルであり、

X^{124} はC1-C6アルキル、 $-NR^{4a}R^{4b}$ で置換される置換C1-C6アルキルまたは置換さ
れていても良いC3-C7ヘテロシクリルであり、

R^{4a} および R^{4b} は同一または異なって水素原子、 $C(=NH)NH_2$ または置換されてい
ても良いC1-C6アルキルであるか、または R^{4a} および R^{4b} は、置換されていても良
いC3-C7ヘテロシクリルを形成してもよく、

X^{123} および X^{124} はそれらが結合する窒素原子と一緒になって置換されていても
良いC3-C7ヘテロシクリルを形成してもよく、

ただし、 X^{123} および X^{124} はイミダゾリル、ベンズイミダゾリル、またはタスク
シンイミジルを形成せず、および1つだけの1級アミンが X^{123} および X^{124} のいず
れか一方の上に存在することができ、またはいかなる1級アミンも X^{123} および X^{124}
のいずれか一方の上に存在せず、 X^{123} および X^{124} は置換されたアミドではなく

R¹²⁶およびR¹²⁷が飽和C11アルキルまたは飽和C15アルキルであるとき、X¹²³は水素原子ではなく、

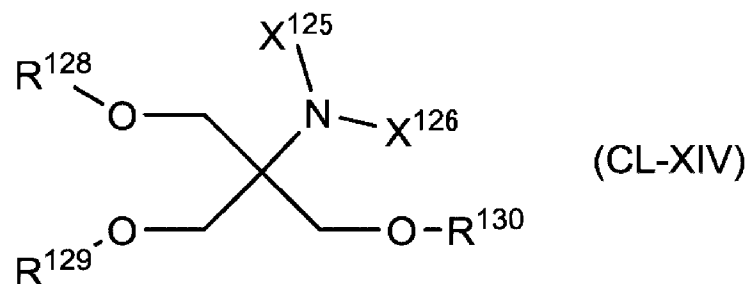
R¹²⁶およびR¹²⁷が飽和C16アルキルまたは飽和C17アルキルであるとき、R¹²⁶およびR¹²⁷はOHと置換されず、

R¹²⁶およびR¹²⁷が飽和C17アルキルであるとき、X¹²³およびX¹²⁴はOHと置換されず、

R¹²⁶およびR¹²⁷が飽和C18アルキルであるとき、X¹²⁴は置換されていても良いイミダゾリルと置換されない)

[0163] 式(CL-XIV)

[0164] [化67]



(式中、

X¹²⁵およびX¹²⁶は同一または異なって水素原子、置換されていても良いC1-C6アルキル、ヘテロシクリルまたはポリアミンであるか、またはX¹²⁵およびX¹²⁶はそれらが結合している窒素と一緒に、該窒素に加えて、N、OおよびSから選択される1または2個のさらなるヘテロ原子を含有していてもよい4~7員の単環式ヘテロ環を形成してもよく、

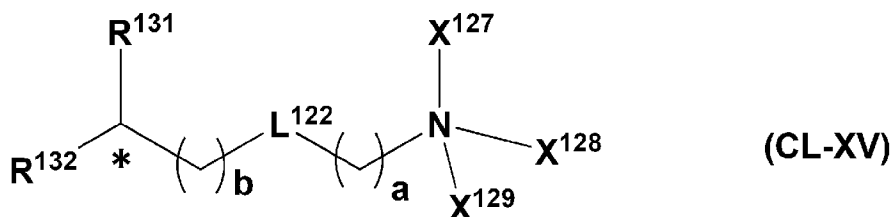
R¹³⁰は水素原子またはC1-C6アルキルであり、

R¹²⁸およびR¹²⁹は同一または異なって直鎖状もしくは分岐状の置換されていても良いC4-C24アルキルまたはC4-C24アルケニルである)

[0165] 式(CL-XV)

[0166]

[化68]



(式中、

X^{127} および X^{128} はそれぞれ独立して、C1-C6アルキル、C2-C6アルケニル、C2-C6アルキニルであるか、

X^{127} および X^{128} は、それらが結合している窒素原子と一体になって、1から2個の窒素原子を有する複素環を形成し、

L^{122} は $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(X^{130})-$ 、 $-N(X^{130})C(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(X^{130})-$ 、 $-N(X^{130})C(O)N(X^{130})-$ 、または $-N(X^{130})C(O)O-$ であり、

X^{130} の各存在は独立して、水素原子またはC1-C3アルキルであり、

a は1、2、3、4、5、または6であり、

b は0、1、2、または3であり、

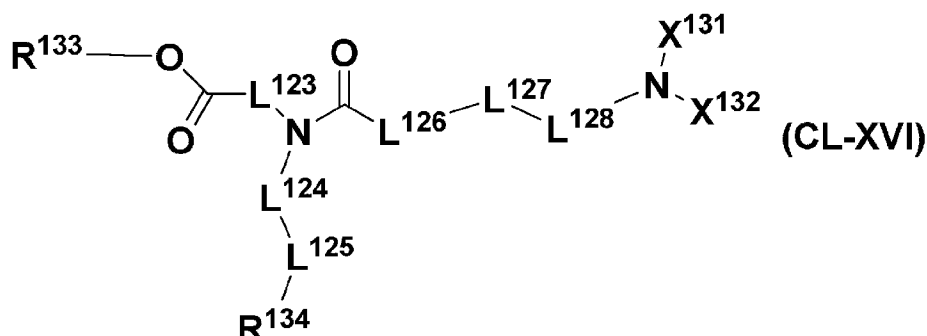
X^{129} は存在しないか、水素またはC1-C3アルキルであり、

R^{131} および R^{132} のそれぞれは独立して、1つ以上の生分解性基を有する炭素数12~24のアルキル、炭素数12~24のアルケニル、または炭素数12~24のアルコキシであり、各生分解性基は独立して、上記の炭素数12~24のアルキル基、アルケニル基、またはアルコキシ基に割り込んでいるか、炭素数12~24のアルキル基、アルケニル基、またはアルコキシ基の末端で置換されており（上記生分解性基は、割り込んでいるものは、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(X^{130})-$ 、または $-N(X^{130})C(O)-$ であり、末端のものは、 $-C(O)O-C1-C4$ アルキル、 $-OC(O)-C1-C4$ アルキル、 $-C(O)N(X^{130})-C1-C4$ アルキル、または $-N(X^{130})C(O)-C1-C4$ アルキルである）、

R^{131} および R^{132} は、上記生分解性基とアスタリスク（*）の付された第3級炭素原子との間に少なくとも4つの炭素原子を有する鎖である）

[0167] 式(CL-XVI)

[0168] [化69]



(式中、

R^{133} および R^{134} は同一または異なり、それぞれ直鎖もしくは分岐のC1-C9アルキル、C2-C11アルケニルもしくはC2-C11アルキニルであり、

L^{123} および L^{124} は同一または異なり、それぞれ直鎖のC5-C18アルキレンもしくは直鎖のC5-C18アルケニレンであるか、またはNと複素環を形成しており、

L^{125} は、単結合であるか、または-CO-O-であり、それによって-L¹²⁴-CO-OR¹³⁴が形成されており、

L^{127} はSまたはOであり、

L^{126} は単結合であるか、または直鎖状もしくは分岐状のC1-C6アルキレンであるか、またはNと複素環を形成しており、

L^{128} は直鎖状もしくは分岐状のC1-C6アルキレンであり、そして

X^{131} および X^{132} は同一または異なり、それぞれ水素または直鎖状もしくは分岐状のC1-C6アルキルである)

[0169] 式(CL-I)の各基の定義において、直鎖状または分岐状のC10-C24アルキルとしては、例えばデシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、6,10-ジメチルウンデカ-2-イル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、6,10,14-トリメチルペンタデカン-2-イル、ノナデシル、イコシル、ヘニコシル、ドコシル、トリコシル、またはテトラコシル等が挙げられ、好ましくはデシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、またはオクタデシル等

が挙げられ、より好ましくはトリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシルまたはオクタデシル等が挙げられる。

[0170] 直鎖状または分岐状のC10-C24アルケニルとしては、1～3つの2重結合を含む直鎖状または分岐状のC10-C24アルケニルであればよく、例えば、(Z)-ドデカ-7-エニル、(Z)-テトラデカ-7-エニル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-4-エニル、(Z)-ヘキサデカ-7-エニル、(E)-ヘキサデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニル、(7Z, 10Z, 13Z)-ヘキサデカ-7, 10, 13-トリエニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z, 12Z, 15Z)-オクタデカ-9, 12, 15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニル、(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニル等が挙げられ、好ましくは(Z)-ドデカ-7-エニル、(Z)-テトラデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-4-エニル、(Z)-ヘキサデカ-7-エニル、(E)-ヘキサデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニル、(7Z, 10Z, 13Z)-ヘキサデカ-7, 10, 13-トリエニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル、(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニル等が挙げられ、より好ましくは(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル等が挙げられる。

[0171] 直鎖状または分岐状のC10-C24アルキニルとしては、1～3つの3重結合を含む直鎖状または分岐状のC10-C24アルキニルであればよく、例えば、デカ-9-イニル、ドデカ-4-イニル、ドデカ-11-イニル、テトラデカ-5-イニル、テトラデカ-6-イニル、ヘキサデカ-7-イニル、ヘキサデカ-3, 5-ジイニル、ヘキサデカ-5, 7-ジイニルまたはオクタデカ-9-イニル等が挙げられ、好ましくはヘキサデカ-7-イニルまたはオクタデカ-9-イニル等が挙げられ、より好ましくはオクタデカ-9-イニル等が挙げられる。

[0172] なお、式(CL-I)において、R¹⁰¹およびR¹⁰²は、同一の直鎖状または分岐状のC10-C24アルキル、C10-C24アルケニルまたはC10-C24アルキニルであることが好ましく、同一に直鎖状または分岐状のC10-C24アルキルまたはC10-C24アルケ

ニルであることがより好ましく、同一に直鎖のC10-C24アルケニルであることがさらに好ましい。

[0173] C1-C3アルキレンとしては、例えばメチレン、エチレン、またはプロピレン等が挙げられ、好ましくはメチレンまたはエチレンが挙げられ、より好ましくはメチレンが挙げられる。

[0174] C1-C6アルキルとしては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、シクロブチル、シクロプロピルメチル、ペンチル、イソペンチル、sec-ペンチル、ネオペンチル、tert-ペンチル、シクロペンチル、ヘキシルまたはシクロヘキシル等が挙げられ、好ましくはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、sec-ペンチル、tert-ペンチル、ネオペンチルまたはヘキシル等が挙げられ、より好ましくはメチル、エチルまたはプロピル等が挙げられる。

[0175] C3-C6アルケニルとしては、例えば、アリル、1-プロペニル、ブテニル、ペンテニルまたはヘキセニル等が挙げられ、好ましくはアリル等が挙げられる。

[0176] モノアルキルアミノおよびジアルキルアミノとしては、それぞれ1つ、または同一もしくは異なる2つの、C1-C6アルキル(前記と同義)、またはアミノ、メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換されたC1-C6アルキル(前記と同義)で置換されたアミノであればよく、例えばメチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、ブチルアミノ、ペンチルアミノ、ヘキシルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、エチルメチルアミノ、メチルプロピルアミノ、ブチルメチルアミノ、メチルペンチルアミノ、ヘキシルメチルアミノ、アミノエチルアミノ、アミノプロピルアミノ、(アミノエチル)メチルアミノまたはビス(アミノエチル)アミノ等が挙げられ、好ましくはメチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、アミノプロピルアミノまたはビス(アミノエチル)アミノ等が挙げられ、より好ましくはメチルアミノまた

はジメチルアミノ等が挙げられる。

[0177] トリアルキルアンモニオとしては、同一または異なって3つの、C1-C6アルキル(前記と同義)、またはアミノ、メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換されたC1-C6アルキル(前記と同義)で置換されたアンモニオであればよく、例えばトリメチルアンモニオ、エチルジメチルアンモニオ、ジエチルメチルアンモニオ、トリエチルアンモニオ、トリプロピルアンモニオ、トリブチルアンモニオ、トリペンチルアンモニオ、トリヘキシルアンモニオ、トリス(アミノエチル)アンモニオ、(アミノエチル)ジメチルアンモニオまたはビス(アミノエチル)メチルアンモニオ等が挙げられ、好ましくはトリメチルアンモニオ、トリエチルアンモニオ、トリス(アミノエチル)アンモニオ、(アミノエチル)ジメチルアンモニオまたはビス(アミノエチル)メチルアンモニオ等が挙げられ、より好ましくはトリメチルアンモニオ等が挙げられる。

[0178] 化合物(CL-I)において、トリアルキルアンモニオは、薬学的に許容される陰イオン(前記と同義)と塩を形成していてもよい。

[0179] アルコキシとしては、C1-C6アルキル(前記と同義)または、アミノ、メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換されたC1-C6アルキル(前記と同義)で置換されたヒドロキシであればよく、例えばメトキシ、エトキシ、プロピルオキシ、ブチルオキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ、アミノエトキシまたはメチルアミノエトキシ等が挙げられ、好ましくはメトキシ、エトキシ、アミノエトキシまたはメチルアミノエトキシ等が挙げられ、より好ましくはメトキシ等が挙げられる。

[0180] モノアルキルカルバモイルおよびジアルキルカルバモイルとしては、それぞれ1つ、または同一もしくは異なる2つの、C1-C6アルキル(前記と同義)、またはアミノ、メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換されたC1-C6アルキル(前記と同義)で置換されたカルバモイルであればよく、例えば、メチルカ

ルバモイル、エチルカルバモイル、プロピルカルバモイル、ブチルカルバモイル、ペンチルカルバモイル、ヘキシルカルバモイル、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル、エチルメチルカルバモイル、メチルプロピルカルバモイル、ブチルメチルカルバモイル、メチルペンチルカルバモイル、ヘキシルメチルカルバモイル、アミノエチルカルバモイル、アミノプロピルカルバモイル、(アミノエチル)メチルカルバモイル、またはビス(アミノエチル)カルバモイル等が挙げられ、好ましくはメチルカルバモイル、エチルカルバモイルまたはジメチルカルバモイル等が挙げられ、より好ましくはメチルカルバモイル、またはジメチルカルバモイル等が挙げられる。

[0181] L¹⁰¹およびL¹⁰²は、水素原子であることがより好ましい。この場合には、R¹⁰¹およびR¹⁰²は、同一または異なって、ドデシル、テトラデシル、(Z)-ドデカ-7-エニル、(Z)-テトラデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-4-エニル、(Z)-ヘキサデカ-7-エニル、(E)-ヘキサデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニル、(7Z, 10Z, 13Z)-ヘキサデカ-7, 10, 13-トリエニル、(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることが好ましく、(Z)-テトラデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-7-エニル、(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニル、または(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることがより好ましく、同一に(Z)-テトラデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-7-エニルまたは(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることがさらに好ましい。

なお、L¹⁰¹およびL¹⁰²が、水素原子である場合には、X¹⁰¹が水素原子、メチル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、または同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換されたC1-C6アルキルもしくはC3-C6アルケニルであることがより好ましく、水素原子、メチル、または同一もしくは異なって1~3つのアミノ、ヒドロキシもしくはカルバモイルで置換されたC1-C6ア

ルキルもしくはC3-C6アルケニルであることがさらに好ましく、水素原子、またはメチル等であることがさらに好ましい。

[0182] L¹⁰¹およびL¹⁰²が、一緒になって単結合またはC1-C3アルキレンを形成する場合には、R¹⁰¹およびR¹⁰²は、同一または異なってテトラデシル、ヘキサデシル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル、(9Z, 12Z, 15Z)-オクタデカ-9, 12, 15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニル、または(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニルであることが好ましく、(Z)-オクタデカ-9-エニル、または(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることがより好ましく、同一に(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることがさらに好ましい。

[0183] L¹⁰¹およびL¹⁰²が、一緒になって単結合またはC1-C3アルキレンを形成する場合には、X¹⁰¹が水素原子、メチル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、または同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換されたC1-C6アルキルもしくはC3-C6アルケニルであることがより好ましく、水素原子、メチル、または同一もしくは異なって1~3つのアミノ、ヒドロキシもしくはカルバモイルで置換されたC1-C6アルキルもしくはC3-C6アルケニルであることがさらに好ましく、水素原子またはメチル等であることが最も好ましい。

L¹⁰¹およびL¹⁰²が、一緒になって単結合を形成する場合に、L¹⁰³が-CO-または-CO-O-、好ましくは-CO-であることも、本発明のより好ましい形態の1つである。この場合には、X¹⁰¹がアミノメチル、1,2-ジアミノエチル、2-アミノエチル、1,3-ジアミノプロピル、1,4-ジアミノブチル、1,5-ジアミノペンチル、3-アミノプロピル、4-アミノブチルまたは5-アミノペンチル等がであることが好ましく、1,2-ジアミノエチル、1,3-ジアミノプロピル、1,4-ジアミノブチ

ルまたは1,5-ジアミノペンチルであることがさらに好ましい。R¹⁰¹およびR¹⁰²は、同一または異なって、テトラデシル、ヘキサデシル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル、(9Z, 12Z, 15Z)-オクタデカ-9, 12, 15-トリエニルまたは(Z)-イコサ-11-エニルまたは(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニルであることが好ましく、(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることがより好ましく、同一に(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることがさらに好ましい。

[0184] L¹⁰³は単結合であることがより好ましい。

[0185] L¹⁰³が単結合の場合には、X¹⁰¹は水素原子、メチル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、または同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換されたC1-C6アルキルもしくはC3-C6アルケニル等であることがより好ましく、水素原子、メチル、ヒドロキシメチル、2-ヒドロキシエチル、2,3-ジヒドロキシプロピル、2-ヒドロキシプロピル、3-ヒドロキシプロピル、2-ヒドロキシ-3-メトキシプロピル、アミノメチル、2-アミノエチル、3-アミノプロピル、4-アミノブチル、5-アミノペンチル、2-(N,N-ジメチルアミノ)エチル、3-(N,N-ジメチルアミノ)プロピル、2-カルバモイルエチル、2-ジメチルカルバモイルエチル、または1-メチルピペリジン-4-イル等であることがさらに好ましく、水素原子またはメチルであることが最も好ましい。

[0186] L¹⁰³が-CO-または-CO-O-の場合には、X¹⁰¹はピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、または同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換され

たC1-C6アルキルもしくはC3-C6アルケニルであり、該置換基の少なくとも1つは、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ピロリジニル、ピペリジルまたはモルホリニル等であることがより好ましく、R³はアミノメチル、1,2-ジアミノエチル、2-アミノエチル、1,3-ジアミノプロピル、3-アミノプロピル、1,4-ジアミノブチル、4-アミノブチル、1,5-ジアミノペンチル、5-アミノペンチル、(N,N-ジメチルアミノ)メチル、2-(N,N-ジメチルアミノ)エチル、3-(N,N-ジメチルアミノ)プロピル、1-ヒドロキシ-2-アミノエチルまたは1-アミノ-2-ヒドロキシエチル等であることがさらに好ましく、1,2-ジアミノエチル、2-アミノエチル、1,3-ジアミノプロピル、3-アミノプロピル、1,4-ジアミノブチル、4-アミノブチル、1,5-ジアミノペンチルまたは5-アミノペンチル等であることが最も好ましい。

[0187] L¹⁰³が単結合で、X¹⁰¹が水素原子であることも、本発明のより好ましい形態の1つである。この場合には、R¹⁰¹およびR¹⁰²は、同一または異なって、ドデシル、テトラデシル、(Z)-ドデカ-7-エニル、(Z)-テトラデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-4-エニル、(Z)-ヘキサデカ-7-エニル、(E)-ヘキサデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニル、(7Z, 10Z, 13Z)-ヘキサデカ-7, 10, 13-トリエニル、(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることが好ましく、同一または異なって、(Z)-テトラデカ-7-エニルまたは(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニルであることがより好ましく、同一に(Z)-テトラデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-7-エニルまたは(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニルであることがさらに好ましい。

[0188] L¹⁰³が単結合で、X¹⁰¹がメチルであることも、本発明のより好ましい形態の1つである。この場合には、R¹⁰¹およびR¹⁰²は、同一または異なって、ドデシル、テトラデシル、(Z)-ドデカ-7-エニル、(Z)-テトラデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-4-エニル、(Z)-ヘキサデカ-7-エニル、(E)-ヘキサデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニル、(7Z, 10Z, 13Z)-ヘキサデカ-7, 10, 13-トリエニル、(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)

)-オクタデカ-9,12-ジエニルであることが好ましく、同一または異なって、(Z)-テトラデカ-7-エニル、(7Z,10Z)-ヘキサデカ-7,10-ジエニルまたは(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニルであることがより好ましく、同一に(Z)-テトラデカ-7-エニル、(7Z,10Z)-ヘキサデカ-7,10-ジエニルまたは(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニルであることがさらに好ましい。

[0189] 式(CL-II)の各基の定義において、直鎖状もしくは分岐状のC12-C24アルキルとしては、例えばドデシル、トリデシル、テトラデシル、2,6,10-トリメチルウンデシル、ペンタデシル、3,7,11-トリメチルドデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、6,10,14-トリメチルペンタデカン-2-イル、ノナデシル、2,6,10,14-テトラメチルペンタデシル、イコシル、3,7,11,15-テトラメチルヘキサデシル、ヘニコシル、ドコシル、トリコシルまたはテトラコシル等が挙げられ、好ましくはドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシルまたはイコシル等が挙げられ、より好ましくはドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシルまたはオクタデシル等が挙げられる。

[0190] 直鎖状もしくは分岐状のC12-C24アルケニルとしては、1~3つの2重結合を含む直鎖状もしくは分岐状のC12-C24アルケニルであればよく、例えば、(Z)-トリデカ-8-エニル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ペンタデカ-8-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-ヘプタデカ-5-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-ヘプタデカ-8-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-ヘプタデカ-10-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(8Z,11Z)-ヘプタデカ-8,11-ジエニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(8Z,11Z,14Z)-オクタデカ-8,11,14-トリエニル、(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエニル、(Z)-ノナデカ-10-エニル、(Z)-イコサ-11-エニル、(10Z,13Z)-ノナデカ-10,13-ジエニル、(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニル、2,6,10-トリメチルウンデカ-1,5,9-トリエニル、3,7,11-トリメチルドデカ-2,6,10-トリエニル、2,6,10,14-テトラメチルペンタデカ

-1-エニルまたは3, 7, 11, 15-テトラメチルヘキサデカ-2-エニル等が挙げられ、好ましくは(Z)-ペンタデカ-8-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-ヘプタデカ-5-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(8Z, 11Z)-ヘプタデカ-8, 11-ジエニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル等が挙げられ、より好ましくは(Z)-ヘプタデカ-8-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(8Z, 11Z)-ヘプタデカ-8, 11-ジエニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル等が挙げられる。

[0191] 直鎖状もしくは分岐状のC12-C24アルキニルとしては、1~3つの3重結合を含む直鎖状もしくは分岐状のC12-C24アルキニルであればよく、例えばドデカ-11-イニル、トリデカ-12-イニル、ペンタデカ-6-イニル、ヘキサデカ-7-イニル、ペンタデカ-4, 6-ジイニル、ヘキサデカ-5, 7-ジイニル、ヘプタデカ-8-イニルまたはオクタデカ-9-イニル等が挙げられ、好ましくはペンタデカ-6-イニル、ヘキサデカ-7-イニル、ペンタデカ-4, 6-ジイニル、ヘキサデカ-5, 7-ジイニル、ヘプタデカ-8-イニルまたはオクタデカ-9-イニル等が挙げられ、より好ましくはヘプタデカ-8-イニルまたはオクタデカ-9-イニル等が挙げられる。

[0192] 式(CL-II)の各基の定義におけるC1-C3アルキレン、C1-C6アルキルおよびC3-C6アルケニルは、それぞれ前記式(CL-I)におけるものと同義である。

[0193] モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、アルコキシ、モノアルキルカルバモイルおよびジアルキルカルバモイルは、それぞれ前記式(CL-I)におけるものと同義である。

[0194] R¹⁰³およびR¹⁰⁴は、同一の直鎖状もしくは分岐状のC12-C24アルキル、C12-C24アルケニルまたはC12-C24アルキニルであることが好ましく、同一の直鎖状もしくは分岐状のC12-C24アルキル、またはC12-C24アルケニルであることがより好ましい。

[0195] L¹⁰⁴およびL¹⁰⁵は、同一の-0-、-C0-0-または-0-C0-であることがより好ましい。

[0196] L¹⁰⁴およびL¹⁰⁵の少なくとも1つが-0-または-0-C0-である場合には、R¹⁰³およ

びR¹⁰⁴は、同一または異なって、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、イコシル、ドコシル、テトラコシル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル、(9Z, 12Z, 15Z)-オクタデカ-9, 12, 15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニル、(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニル、3, 7, 11-トリメチルドデカ-2, 6, 10-トリエニルまたは3, 7, 11, 15-テトラメチルヘキサデカ-2-エニルであることがより好ましく、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることがさらに好ましい。

[0197] L¹⁰⁴およびL¹⁰⁵の少なくとも1つが-C0-0-である場合には、R¹⁰³およびR¹⁰⁴はそれぞれトリデシル、ペンタデシル、ヘプタデシル、ノナデシル、ヘニコシル、トリコシル、(Z)-トリデカ-8-エニル、(Z)-ペンタデカ-8-エニル、(Z)-ヘプタデカ-5-エニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニル、(E)-ヘプタデカ-8-エニル、(Z)-ヘプタデカ-10-エニル、(8Z, 11Z)-ヘプタデカ-8, 11-ジエニル、(8Z, 11Z, 14Z)-オクタデカ-8, 11, 14-トリエニル、(Z)-ノナデカ-10-エニル、(10Z, 13Z)-ノナデカ-10, 13-ジエニル、(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニル、2, 6, 10-トリメチルウンデカ-1, 5, 9-トリエニルまたは2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカ-1-エニルであることがより好ましく、トリデシル、ペンタデシル、ヘプタデシル、(Z)-ペンタデカ-8-エニル、(Z)-ヘプタデカ-5-エニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニルまたは(8Z, 11Z)-ヘプタデカ-8, 11-ジエニルであることがさらに好ましい。

[0198] p¹⁰¹およびp¹⁰²は、同時に0または1であることがより好ましい。

[0199] L¹⁰⁶およびL¹⁰⁷は、一緒になって単結合またはC1-C3アルキレンを形成することがより好ましい。L¹⁰⁶およびL¹⁰⁷が、一緒になって単結合またはC1-C3アルキレンを形成する場合には、X¹⁰²が水素原子、メチル、ピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イ

ル、モルホリン-2-イル、モルホリン-3-イル、または同一もしくは異なって1～3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換されたC1-C6アルキルもしくはC3-C6アルケニルであることがより好ましく、水素原子、メチル、または同一もしくは異なって1～3つのアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシもしくはカルバモイルで置換されたC1-C6アルキルもしくはC3-C6アルケニルであることがさらに好ましく、水素原子、メチル、2,3-ジヒドロキシプロピル、3-ヒドロキシプロピル、アミノメチル、1,2-ジアミノエチル、2-アミノエチル、1,3-ジアミノプロピル、1,4-ジアミノブチル、1,5-ジアミノペンチル、3-アミノプロピル、4-アミノブチル、5-アミノペンチルまたは2-カルバモイルエチルであることが最も好ましい。これらの置換基のうちモノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、アルコキシ、モノアルキルカルバモイルおよびジアルキルカルバモイルにおけるアルキル部分は、前記C1-C4アルキルと同義である。ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオおよびジアルキルカルバモイルにおける2または3つのアルキルは、それぞれ同一でも異なってもよい。

[0200] L¹⁰⁶およびL¹⁰⁷が、一緒になって単結合を形成する場合に、L¹⁰⁸が-CO-または-CO-O-、好ましくは-CO-であることが好ましい。

[0201] L¹⁰⁶およびL¹⁰⁷が、一緒になって単結合を形成する場合に、p¹⁰¹およびp¹⁰²は、同一または異なって1～3であることが好ましい。

[0202] L¹⁰⁶およびL¹⁰⁷が、水素原子である場合には、X¹⁰²は水素原子、メチル、ピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イル、モルホリン-3-イルまたは同一もしくは異なって1～3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換されたC1-C6アルキルもしくはC3-C6のアルケ

ニルであることが好ましく、水素原子、メチルまたは同一もしくは異なって1～3つのアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシもしくはカルバモイルで置換されたC1-C6アルキルもしくはC3-C6アルケニルであることがより好ましく、水素原子、メチル、2,3-ジヒドロキシプロピル、3-ヒドロキシプロピル、アミノメチル、1,2-ジアミノエチル、2-アミノエチル、1,3-ジアミノプロピル、1,4-ジアミノブチル、1,5-ジアミノペンチル、3-アミノプロピル、4-アミノブチル、5-アミノペンチルまたは2-カルバモイルエチル等であることがさらに好ましい。これらの置換基のうちモノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、アルコキシ、モノアルキルカルバモイルおよびジアルキルカルバモイルにおけるアルキル部分は、前記C1-C4アルキルと同義である。ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、およびジアルキルカルバモイルにおける2または3つのアルキルは、それぞれ同一でも異なってもよい。

[0203] L¹⁰⁸は単結合であることが好ましい。なお、L¹⁰⁸が単結合の場合には、L¹⁰⁴およびL¹⁰⁵は-O-であることが好ましい。

[0204] L¹⁰⁸が単結合の場合には、X¹⁰²は水素原子、メチル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1～3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換されたC1-C6アルキルもしくはC3-C6アルケニル等であることが好ましく、水素原子、メチル、ヒドロキシメチル、2-ヒドロキシエチル、2,3-ジヒドロキシプロピル、2-ヒドロキシプロピル、3-ヒドロキシプロピル、2-ヒドロキシ-3-メトキシプロピル、アミノメチル、2-アミノエチル、3-アミノプロピル、4-アミノブチル、5-アミノペンチル、2-(N,N-ジメチルアミノ)エチル、3-(N,N-ジメチルアミノ)プロピル、2-カルバモイルエチル、2-ジメチルカルバモイルエチルまたは1-メチルピペリジン-4-イル等であることがより好ましく、水素原子、メチル、2,3-ジヒドロキシプロピル、3-ヒドロキシプロピル、2-

-アミノエチル、3-アミノプロピル、4-アミノブチル、5-アミノペンチルまたは2-カルバモイルエチル等であることがさらに好ましい。これらの置換基のうちモノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、アルコキシ、モノアルキルカルバモイルおよびジアルキルカルバモイルにおけるアルキル部分は、前記C1-C4アルキルと同義である。ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、およびジアルキルカルバモイルにおける2または3つのアルキルは、それぞれ同一でも異なってもよい。

[0205] L¹⁰⁴およびL¹⁰⁵は-O-であることがより好ましい。ただし、L¹⁰⁸が単結合で、X¹⁰²が水素原子の場合には、L¹⁰⁴およびL¹⁰⁵が同一の-CO-O-または-O-CO-であることが好ましく、-CO-O-であることがより好ましい。

[0206] L¹⁰⁸が-CO-または-CO-O-の場合には、L¹⁰⁴およびL¹⁰⁵は同一の-CO-O-または-O-CO-であることが好ましく、-CO-O-であることがより好ましい。

[0207] L¹⁰⁸が-CO-または-CO-O-の場合には、X¹⁰²はピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換されたC1-C6アルキルもしくはC3-C6アルケニルであることが好ましく、該置換基の少なくとも1つは、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルであることが好ましく、X¹⁰²はアミノメチル、1,2-ジアミノエチル、2-アミノエチル、1,3-ジアミノプロピル、3-アミノプロピル、1,4-ジアミノブチル、4-アミノブチル、1,5-ジアミノペンチル、5-アミノペンチル、(N,N-ジメチルアミノ)メチル、2-(N,N-ジメチルアミノ)エチル、3-(N,N-ジメチルアミノ)プロピルまたは1-アミノ-2-ヒドロキシエチル等であることがより好ましく、アミノメチル、1,2-ジアミノエチル、2-アミノエチル、1,3-ジアミノプロピル、3-アミノプロピル、1,4-ジアミノブチル、4-アミノブチル、1,5-ジアミノペンチルまたは5-アミノペンチル等であることがさらに好ましい。これらの置換基の

うちモノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、アルコキシ、モノアルキルカルバモイルおよびジアルキルカルバモイルにおけるアルキル部分は、前記C1-C6アルキルと同義である。ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオおよびジアルキルカルバモイルにおける2または3つのアルキルは、それぞれ同一でも異なってもよい。

[0208] L¹⁰⁴およびL¹⁰⁵は同一の-CO-O-または-O-CO-であることが好ましく、-CO-O-であることがより好ましい。

[0209] 式(CL-III)、(CL-IV)および(CL-V)の各基の定義において、直鎖状または分岐状のC8-C24アルキル、C8-C24アルケニルおよびC8-C24アルキニルは、それぞれ前記式(CL-I)～(CL-II)におけるものと同義であり、同様の基が好ましい。

[0210] 式(CL-III)、(CL-IV)および(CL-V)の各基の定義において、C8-C24アルキルオキシエチルおよびC8-C24アルキルオキシプロピルにおけるアルキル部分としては、例えば前記直鎖状または分岐状のC8-C24アルキルで例示したもの等が挙げられる。

[0211] アルキニルオキシエチルおよびアルキニルオキシプロピルにおけるアルキニル部分としては、例えば、前記直鎖状または分岐状のC8-C24アルキニルの例示したものの等が挙げられる。

[0212] R¹⁰⁵およびR¹⁰⁶は、同一または異なって直鎖状もしくは分岐状のC8-C24アルキルまたはC8-C24アルケニルであることが好ましく、同一または異なって直鎖状または分岐状のC8-C24アルケニルであることがより好ましく、同一または異なって直鎖のC8-C24アルケニルであることがさらに好ましい。また、R¹⁰⁵およびR¹⁰⁶は、同一であることがより好ましく、その場合には、直鎖状もしくは分岐状のC12-C24アルキル、C12-C24アルケニルまたはC12-C24アルキニルであることが好ましく、直鎖のC12-C24アルケニルであることがより好ましい。直鎖状または分岐状のC12-C24アルキル、C12-C24アルケニル、およびC12-C24アルキニルは、それぞれ前記式(CL-II)におけるものと同義である。

[0213] R¹⁰⁵およびR¹⁰⁶は、同一または異なって直鎖状もしくは分岐状のC8-C24アルキ

ルまたはC8-C24アルケニルであることが好ましく、同一または異なって直鎖状または分岐状のC8-C24アルケニルであることがより好ましく、同一または異なって直鎖のC8-C24アルケニルであることがさらに好ましい。また、R¹⁰⁵およびR¹⁰⁶は、同一であることがより好ましく、その場合には、直鎖状もしくは分岐状のC15-C20アルキル、C15-C20アルケニルまたはC15-C20アルキニルであることが好ましく、直鎖のC15-C20アルケニルであることがより好ましい。直鎖状または分岐状のC15-C20アルキル、C15-C20アルケニル、およびC15-C20アルキニルは、それぞれ前記式(I)～(IV)におけるものと同義であり、同様の基が好ましい。

[0214] R¹⁰⁵およびR¹⁰⁶が、異なる場合には、R¹⁰⁵が直鎖状または分岐状のC15-C20アルキル、C15-C20アルケニルまたはC15-C20アルキニルであり、R¹⁰⁶が直鎖状または分岐状のC8-C12アルキルであることが好ましい。ここで、直鎖状または分岐状のC8-C12アルキルとしては、例えばオクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、またはドデシルが挙げられ、好ましくはオクチル、デシルまたはドデシルが挙げられる。

[0215] R¹⁰⁵が直鎖のC15-C20アルケニルであり、R¹⁰⁶が直鎖のC8-C12アルキルであることがより好ましく、R¹⁰⁵が(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであり、R¹⁰⁶がオクチル、デシルまたはドデシルであることがさらに好ましい。

[0216] R¹⁰⁵およびR¹⁰⁶が、異なる場合には、R¹⁰⁵が、直鎖状または分岐状のC8-C24アルキル、C8-C24アルケニルまたはC8-C24アルキニルであり、R¹⁰⁶がC8-C24アルキルオキシエチル、C8-C24アルキルオキシプロピル、C8-C24アルケニルオキシエチル、C8-C24アルケニルオキシプロピル、C8-C24アルキニルオキシエチルまたはC8-C24アルキニルオキシプロピルであることも好ましい。この場合、R¹⁰⁵が、直鎖のC8-C24アルケニルであり、R¹⁰⁶が、C8-C24アルケニルオキシエチルであることがより好ましく、R¹⁰⁵が、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルまたは(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニルであり、R¹⁰⁶が、(Z)-オクタデカ-9-エニルオキシエチル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12

-ジエニルオキシエチルまたは(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニルオキシエチルであることがさらに好ましく、R¹⁰⁵が、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであり、R¹⁰⁶が、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルオキシエチルであることが最も好ましい。

[0217] R¹⁰⁵および／またはR¹⁰⁶が、同一または異なって直鎖状もしくは分岐状のC8-C24アルキルまたはC8-C24アルケニルである場合には、同一または異なってテトラデシル、ヘキサデシル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル、(9Z, 12Z, 15Z)-オクタデカ-9, 12, 15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニル、(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニルまたは(Z)-ドコサ-13-エニルであることが好ましく、同一または異なってヘキサデシル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル、(Z)-イコサ-11-エニルまたは(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニルであることがより好ましく、同一または異なって(Z)-オクタデカ-9-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルまたは(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニルであることがさらに好ましく、同一に(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることが最も好ましい。

[0218] R¹⁰⁷およびR¹⁰⁸は、それぞれ前記R¹⁰⁵およびR¹⁰⁶と同義であり、前記R¹⁰⁵およびR¹⁰⁶と同様の基が好ましい。ただし、R¹⁰⁷が、直鎖状または分岐状のC8-C24アルキル、C8-C24アルケニルまたはC8-C24アルキニルである場合、R¹⁰⁷およびR¹⁰⁸は、同一に(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることが好ましい。

[0219] R¹⁰⁹およびR¹¹⁰は、それぞれ前記R¹⁰⁵およびR¹⁰⁶と同義であり、前記R¹⁰⁵およびR¹⁰⁶と同様の基が好ましい。ただし、R¹⁰⁹およびR¹¹⁰は、同一に直鎖状または分岐状のC15-C20アルキル、C15-C20アルケニルまたはC15-C20アルキニルであることが好ましく、同一に(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることがより好ましい。

[0220] X¹⁰³およびX¹⁰⁴における、C1-C3アルキルとしては、例えばメチル、エチル、

プロピル、イソプロピルまたはシクロプロピルが挙げられ、好ましくはメチルまたはエチルが挙げられ、さらに好ましくはメチルが挙げられる。

[0221] X^{103} と X^{104} が一緒になって形成する、C2-C8アルキレンとしては、例えばエチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレンまたはオクチレン等が挙げられ、好ましくはブチレン、ペンチレンまたはヘキシレン等が挙げられ、より好ましくはヘキシレン等が挙げられる。

[0222] X^{103} が L^{111} と一緒に形成する、C2-C8アルキレンとしては、例えばエチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレンまたはオクチレン等が挙げられ、好ましくはプロピレン、ブチレンまたはペンチレン等が挙げられ、より好ましくはプロピレンまたはブチレン等が挙げられ、さらに好ましくはプロピレンが挙げられる。

[0223] X^{103} および X^{104} は、同一または異なってメチルもしくはエチルであるか、一緒になってブチレン、ペンチレンもしくはヘキシレンを形成するか、または X^{103} が L^{111} と一緒に形成してエチレン、プロピレンもしくはブチレンを形成することが好ましい。また X^{103} および X^{104} は、同一または異なってメチルもしくはエチルであるか、または一緒になってブチレン、ペンチレンもしくはヘキシレンを形成することが好ましく、 X^{103} が L^{111} と一緒に形成してエチレン、プロピレンもしくはブチレンを形成し、 X^{104} はメチルまたはエチルであることも好ましい。そして X^{103} および X^{104} は、同一にメチルであるか、または一緒になってヘキシレンを形成することがさらに好ましく、 X^{103} が L^{111} と一緒に形成してプロピレンまたはブチレンを形成し、 X^{104} はメチルであることもさらに好ましい。

[0224] L^{111} における、C1-C6アルキル、C3-C6アルケニル、モノアルキルアミノ、アルコキシ、モノアルキルカルバモイルおよびジアルキルカルバモイルは、それぞれ前記式(CL-I)におけるものと同義である。

[0225] L^{111} は、水素原子、C1-C6アルキル、アミノ、モノアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、またはヒドロキシもしくはアルコキシで置換されたC1-C6アルキルであるか、または X^{103} と一緒に形成してC2-C6アルキレンを形成することが好ましく

、水素原子、メチル、アミノ、メチルアミノ、ヒドロキシ、メトキシまたは同一もしくは異なって1〜3つのアミノもしくはヒドロキシで置換されたメチルであるか、または X^{103} と一緒にエチレン、プロピレンもしくはブチレンを形成することがより好ましく、水素原子、C1-C3アルキル、またはヒドロキシであるか、または X^{103} と一緒にプロピレンまたはブチレンを形成することがさらに好ましく、水素原子または X^{103} と一緒にプロピレンを形成することが最も好ましい。

[0226] L^{109} および L^{110} における、C1-C6アルキレンとしては、例えばメチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレンまたはヘキシレン等が挙げられ、好ましくはメチレンまたはエチレン等が挙げられる。

[0227] L^{109} は、メチレン、エチレンまたはプロピレン等であることが好ましく、メチレンまたはエチレン等であることがより好ましく、 L^{110} は、単結合、メチレンまたはエチレン等であることが好ましく、単結合またはメチレン等であることがより好ましい。 L^{109} と L^{110} の炭素数の和は、1〜3が好ましく、2がさらに好ましい。これらいずれの場合にも、 X^{103} および X^{104} は、同一または異なってメチルもしくはエチル等であり、 L^{111} は、水素原子、メチル、アミノ、メチルアミノ、ヒドロキシ、メトキシまたは同一もしくは異なって1〜3つのアミノもしくはヒドロキシで置換されたメチル等であるか、 X^{103} と X^{104} と一緒にペンチレン、ヘキシレンもしくはヘプチレン等を形成し、 L^{111} は、水素原子、メチル、アミノ、メチルアミノ、ヒドロキシ、メトキシまたは同一もしくは異なって1〜3つのアミノもしくはヒドロキシで置換されたメチル等であるか、または X^{103} と L^{111} と一緒にプロピレン、ブチレンもしくはペンチレン等を形成し、 X^{104} はメチルまたはエチル等であることが好ましく、 X^{103} および X^{104} はメチルであり、 L^{111} は水素原子であるか、 X^{103} と X^{104} と一緒にペンチレンまたはヘキシレンを形成し、 L^{111} は水素原子であるか、または X^{103} と L^{111} と一緒にプロピレンを形成し、 X^{104} はメチル等であることがより好ましい。

[0228] 式(CL-V)の各基の定義において、 $X^{105'}$ における、C1-C4アルキルとしては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピルまたはシクロプロピル等が

挙げられ、好ましくはメチル、エチルまたはイソプロピル等が挙げられ、より好ましくはメチルまたはエチル等が挙げられる。なお、 $X^{105'}$ としては、水素原子またはメチル等がさらに好ましく、水素原子が最も好ましい。

[0229] L^{112} における、C1-C3アルキレンとしては、例えば、メチレン、エチレンまたはプロピレン等が挙げられ、好ましくはメチレンまたはエチレン等が挙げられる。

[0230] 式(CL-VI)および式(CL-VII)の各基の定義において、直鎖状または分岐状の置換されていても良いC8-C24アルキル、C8-C24アルケニルおよびC8-C24アルキニルは、それぞれ前記式(CL-I)～(CL-V)におけるものと同義である。

[0231] 式(CL-VII)の R^{115} における、置換されていても良いC1-C4アルキルにおけるC1-C4アルキルとしては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、シクロブチル、シクロプロピルメチル等が挙げられ、好ましくはメチル、エチル等が挙げられ、より好ましくはメチルが挙げられる。

置換されていても良いC1-C4アルコキシのアルキル部分は、前記C1-C4アルキルと同義である。

置換されていても良いC1-C4アルキルにおける置換基としては、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イル、モルホリン-3-イル、ヒドロキシ、アルコキシ、アルコシカルボニル、ヒドロシカルボニル、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ニトロ、シアノ、フルオロ、クロロ、ブロモ等が挙げられる。これらの置換基のうちモノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルコキシ、アルコシカルボニル、モノアルキルカルバモイルおよびジアルキルカルバモイルにおけるアルキル部分は、前記C1-C4アルキルと同義である。ジアルキルアミノおよびジアルキルカルバモイルにおける2つのアルキルは、それぞれ同一でも異なってもよい。

[0232] 置換されていても良いC1-C4アシルオキシにおけるアシルとしては、例えば

、ホルミル、アセチル、プロパノイル、2-メチルプロパノイル、シクロプロパノイル、ブタノイル等が挙げられ、好ましくはアセチル等が挙げられる。

置換されていても良いC1-C4アシルオキシにおける置換基としては、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イル、モルホリン-3-イル、ヒドロキシ、アルコキシ、アルコキシカルボニル、ヒドロキシカルボニル、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ニトロ、シアノ、フルオロ、クロロ、ブromo等が挙げられる。これらの置換基のうちモノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルコキシ、アルコキシカルボニル、モノアルキルカルバモイルおよびジアルキルカルバモイルにおけるアルキル部分は、前記C1-C4アルキルと同義である。ジアルキルアミノおよびジアルキルカルバモイルにおける2つのアルキルは、それぞれ同一でも異なってもよい。

[0233] 式(CL-VI)において、 R^{111} および R^{112} は同一の直鎖状もしくは分岐状のC8-C24アルキル、C8-C24アルケニルまたはC8-C24アルキニルであることが好ましく、同一の直鎖状もしくは分岐状のC8-C24アルキル、またはC8-C24アルケニルであることがより好ましい。

[0234] R^{111} および R^{112} は、同一または異なってオクチル、デシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、イコシル、ドコシル、テトラコシル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル、(9Z, 12Z, 15Z)-オクタデカ-9, 12, 15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニル、(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニル、3, 7, 11-トリメチルドデカ-2, 6, 10-トリエニルまたは3, 7, 11, 15-テトラメチルヘキサデカ-2-エニル等であることが好ましく、同一または異なってドデシル、テトラデシル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル等であることがより好ましく、同一に(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オ

クタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル等であることがさらに好ましい。

[0235] X^{106} と X^{107} は、同一または異なってメチルまたはエチルであることが好ましく、同一にメチルであることがより好ましい。

[0236] X^{106} と X^{107} が一緒になって形成する、C2-C8アルキレンとしては、例えばエチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレンまたはオクチレン等が挙げられ、好ましくはブチレン、ペンチレンまたはヘキシレン等が挙げられ、より好ましくはブチレンまたはペンチレン等が挙げられる。

[0237] X^{106} および X^{107} は、同一にメチルであるか、または一緒になってブチレン、ペンチレンまたはヘキシレンを形成することが好ましい。

[0238] p^{103} および p^{104} は同時に0であることが好ましく、 p^{105} は1であることが好ましい。

[0239] L^{113} および L^{114} は同時に0であることが好ましい。

[0240] R^{113} および R^{114} は、同一の直鎖状もしくは分岐状のC8-C24アルキル、C8-C24アルケニルまたはC8-C24アルキニルであることが好ましく、同一の直鎖状もしくは分岐状のC8-C24アルキルまたはC8-C24アルケニルであることがより好ましい。

[0241] X^{109} および X^{110} におけるC1-C3アルキルおよびC2-C8アルキレンは、それぞれ前記式(CL-VI)におけるものと同義である。

[0242] R^{115} は、水素原子、ヒドロキシ、メチルまたはメトキシ等であることが好ましく、水素原子またはヒドロキシ等であることがより好ましく、水素原子であることがさらに好ましい。

[0243] L^{115} は、-O-CO-であることが好ましい。この場合、 p^{106} が0または1であり、 p^{107} が2~4の整数であることが好ましく、 p^{106} が0または1であり、 p^{107} が3であることがより好ましい。

[0244] L^{115} が、-CO-O-である場合、 p^{106} が0であり、 p^{107} が2~4の整数であることが好ましく、 p^{106} が0であり、 p^{107} が3であることがより好ましい。

[0245] 式(CL-VIII)～式(CL-XVI)の各基の定義においては、式(CL-I)～式(CL-VII)におけるものと同義であってもよい。

[0246] また、式(CL-VIII)における各基は国際公開第2016/002753号に、式(CL-X)における各基は国際公開第2009/129385号に、式(CL-XI)における各基は国際公開第2013/149140号に、式(CL-XII)における各基は国際公開第2009/129395号に、式(CL-XIII)における各基は国際公開第2013/059496号に、式(CL-XIV)における各基は国際公開第2011/149733号に、式(CL-XV)における各基は国際公開第2011/153493号に、式(CL-XVI)における各基は国際公開第2015/074085号において、それぞれ対応して記載される各基における好ましい態様であってもよい。

[0247] 式(CL-IX)における L^{118} および L^{119} は同一または異なって、好ましくは直鎖状もしくは分岐状のC8-C24アルキレンまたはC8-C24アルケニレンであり、より好ましくは直鎖状もしくは分岐状のC8-C20アルキレンまたはC8-C20アルケニレンである。

[0248] 式(CL-X)における X^{117} および X^{118} のC1-C6アルキル、ヘテロシクリルまたはポリアミンは、ハロゲン原子、 R' 、 OR' 、 SR' 、CN、 CO_2R' または $CONR'_2$ から選択される1～3個の置換基で置換されていてもよい。

[0249] 式(CL-X)における X^{117} および X^{118} がそれらが結合している窒素と一緒に、該窒素に加えて、N、OおよびSから選択される1または2個のさらなるヘテロ原子を含有していてもよい、4～7員の単環式ヘテロ環を形成する場合には、該単環式ヘテロ環はハロゲン原子、 R' 、 OR' 、 SR' 、CN、 CO_2R' または $CONR'_2$ から選択される1～3個の置換基で置換されていてもよい。

ここで、 R' は水素原子またはC1-C6アルキルであり、 R' としてのC1-C6アルキルは、ハロゲン原子またはOHで置換されていてもよい。

[0250] 式(CL-X)における R^{120} および R^{121} は同一または異なって好ましくは直鎖状もしくは分岐状のC4-C24アルキルまたはC4-C24アルケニルであり、より好ましくは直鎖状もしくは分岐状のC4-C20アルキルまたはC4-C20アルケニルである。

C4-C24アルキルまたはC4-C24アルケニルは、ハロゲン原子、R'、OR'、SR'、CN、CO₂R' またはCONR'₂から選択される1個以上の置換基で置換されていてもよい。

ここで、R' は水素原子またはC1-C6アルキルであり、R' としてのC1-C6アルキルは、ハロゲン原子またはOHで置換されていてもよい。

[0251] 式(CL-XI)におけるX¹¹⁹およびX¹²⁰直鎖状もしくは分岐状の置換されていてもよいC6-C20アシルである場合、C6-C20アシルにおけるカルボニル基以外の構造として、C5-C19アルキル、C5-C19アルケニルまたはC5-C19アルキニルであり得る。

[0252] 式(CL-XII)におけるR¹²⁴およびR¹²⁵は同一または異なって、好ましくは直鎖状もしくは分岐状のC8-C24アルキルまたはC8-C24アルケニルであり、より好ましくは直鎖状もしくは分岐状のC14-C20アルキルまたはC14-C20アルケニルである。

[0253] 式(CL-XIV)におけるX¹²⁵およびX¹²⁶のC1-C6アルキル、ヘテロシクリルまたはポリアミンは、ハロゲン原子、R'、OR'、SR'、CN、CO₂R' またはCONR'₂から選択される1~3個の置換基で置換されていてもよい。

式(CL-XIV)におけるX¹²⁵およびX¹²⁶がそれらが結合している窒素と一緒に、該窒素に加えて、N、OおよびSから選択される1または2個のさらなるヘテロ原子を含有していてもよい、4~7員の単環式ヘテロ環を形成する場合には、該単環式ヘテロ環はハロゲン原子、R'、OR'、SR'、CN、CO₂R' またはCONR'₂から選択される1~3個の置換基で置換されていてもよい。

ここで、R' は水素原子またはC1-C6アルキルであり、R' としてのC1-C6アルキルは、ハロゲン原子またはOHで置換されていてもよい。

[0254] 式(CL-XIV)におけるR¹²⁸、およびR¹²⁹は同一または異なって好ましくは直鎖状もしくは分岐状のC4-C24アルキルまたはC4-C24アルケニルであり、より好ましくは直鎖状もしくは分岐状のC4-C20アルキルまたはC4-C20アルケニルである。

C4-C24アルキルまたはC4-C24アルケニルは、ハロゲン原子、R'、OR'、SR

’、CN、CO₂R’ またはCONR’₂から選択される1個以上の置換基で置換されていてもよい。

ここで、R’ は水素原子またはC1-C6アルキルであり、R’ としてのC1-C6アルキルは、ハロゲン原子またはOHで置換されていてもよい。

式 (CL-XIV) におけるR¹³⁰は水素原子またはC1-C6アルキルである。

[0255] 本発明におけるカチオン性脂質は、好ましくは式(CL-I), (CL-II), (CL-III), (CL-IV), (CL-V), (CL-VIII), (CL-IX)で表されるカチオン性脂質である。

[0256] 本発明で用いられるカチオン性脂質の具体例を以下の表1～7に示すが、本発明のカチオン性脂質はこれらに限定されるものではない。

[0257]

[表1]

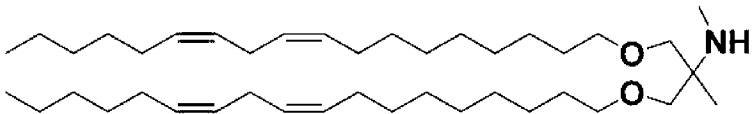
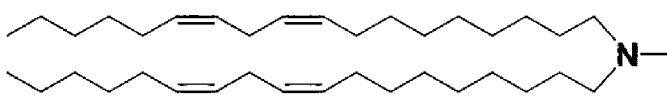
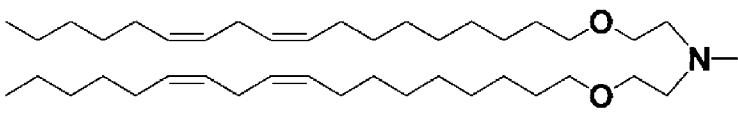
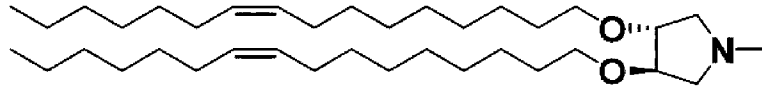
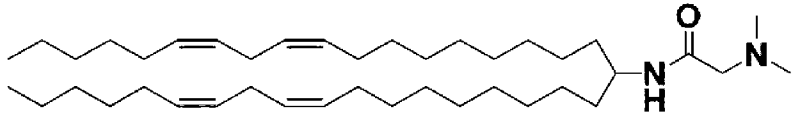
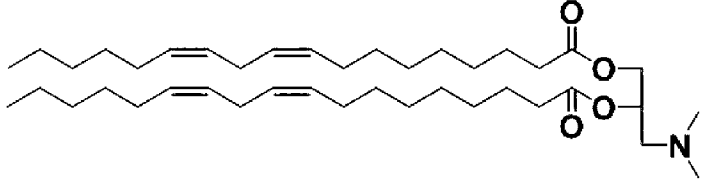
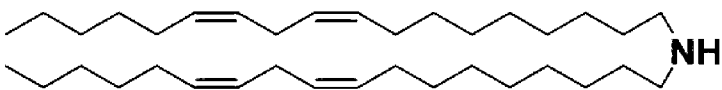
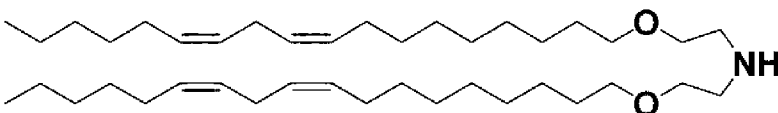
表 1

化合物番号	構造式
CL-1	
CL-2	
CL-3	
CL-4	
CL-5	
CL-6	
CL-7	
CL-8	

[0258]

[表2]

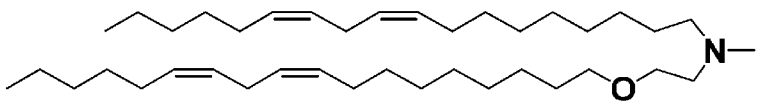
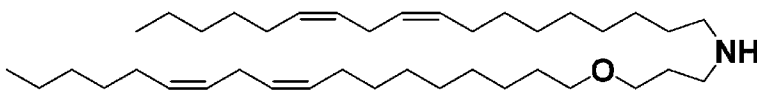
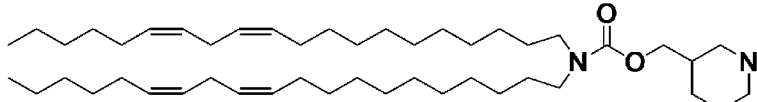
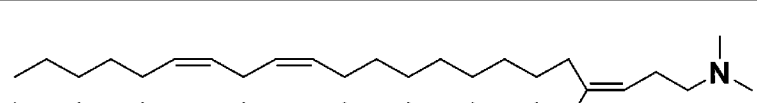
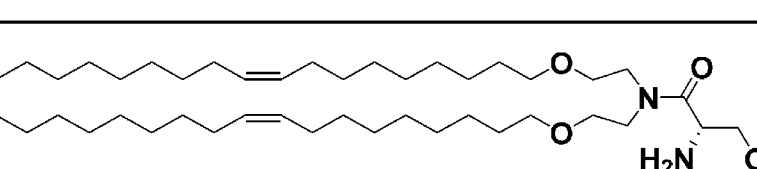
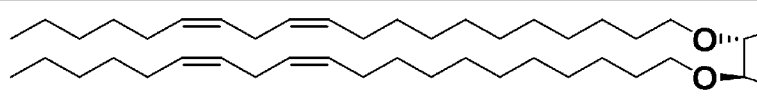
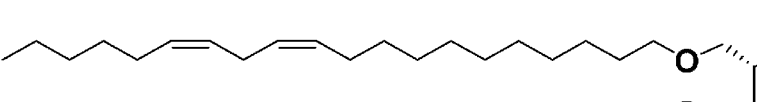
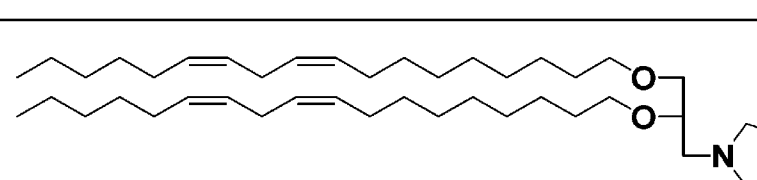
表 2

化合物番号	構造式
CL-9	
CL-10	
CL-11	
CL-12	
CL-13	
CL-14	
CL-15	
CL-16	

[0259]

[表3]

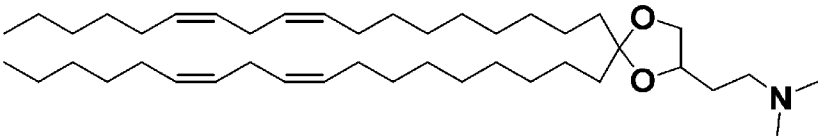
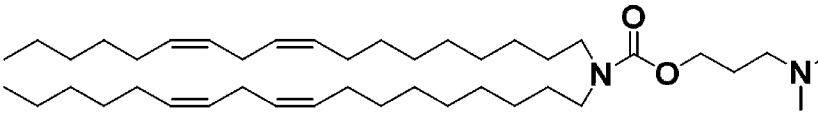
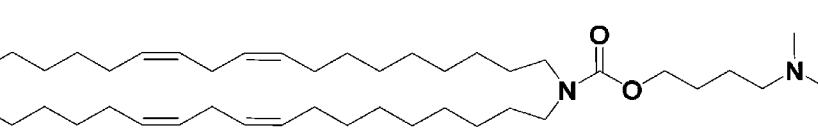
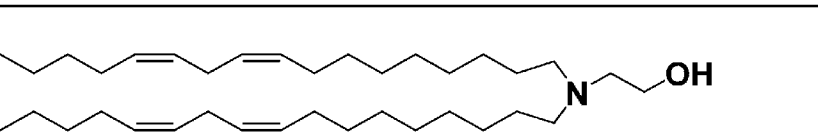
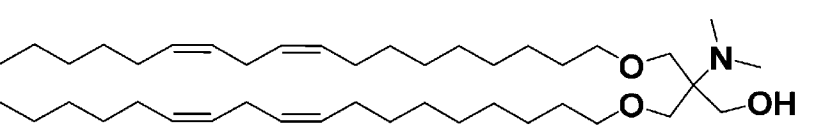
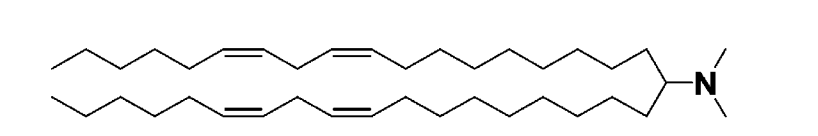
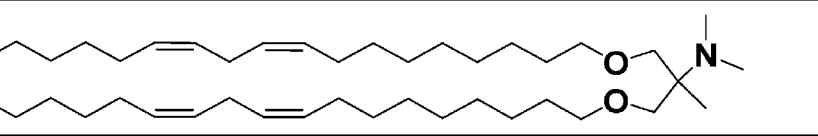
表3

化合物番号	構造式
CL-17	
CL-18	
CL-19	
CL-20	
CL-21	
CL-22	
CL-23	
CL-24	

[0260]

[表4]

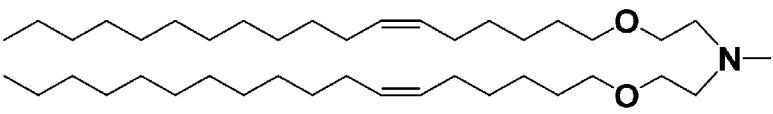
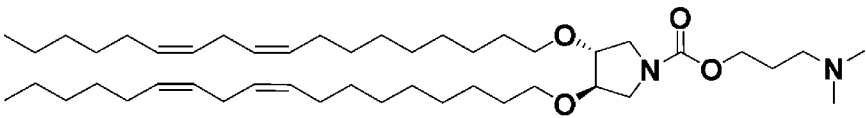
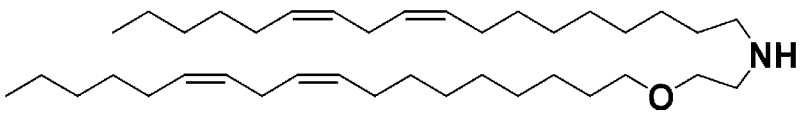
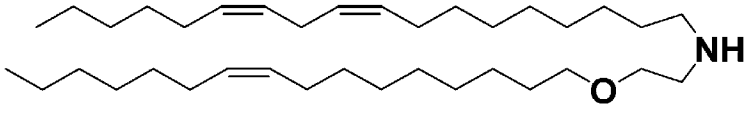
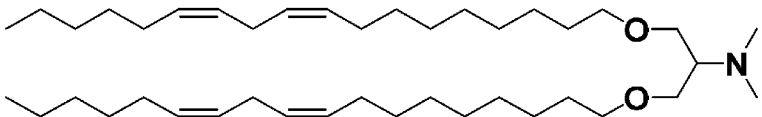
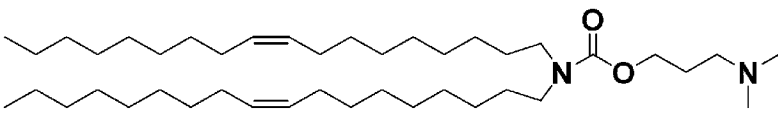
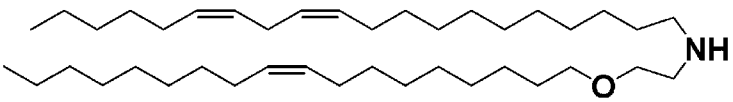
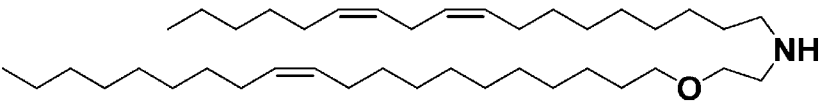
表4

化合物番号	構造式
CL-25	
CL-26	
CL-27	
CL-28	
CL-29	
CL-30	
CL-31	

[0261]

[表5]

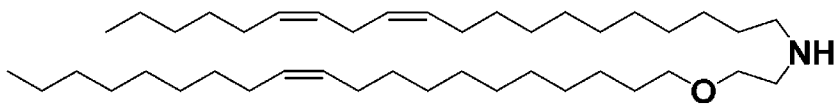
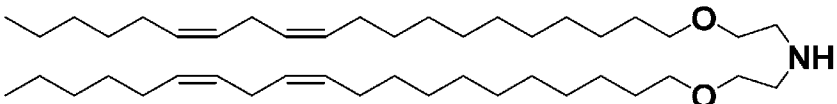
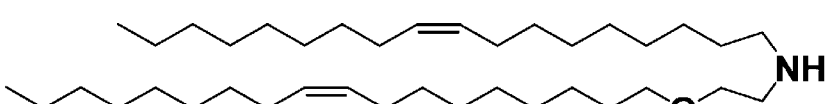
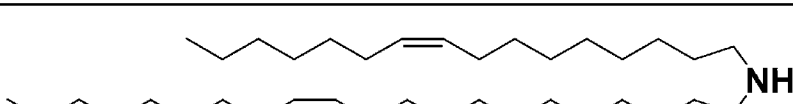
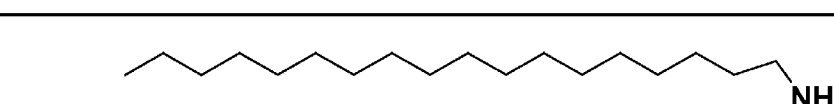
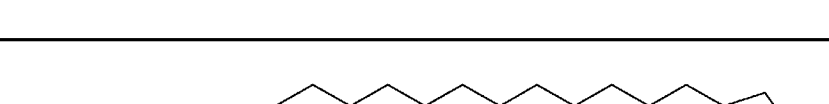
表5

化合物番号	構造式
CL-32	
CL-33	
CL-34	
CL-35	
CL-36	
CL-37	
CL-38	
CL-39	

[0262]

[表6]

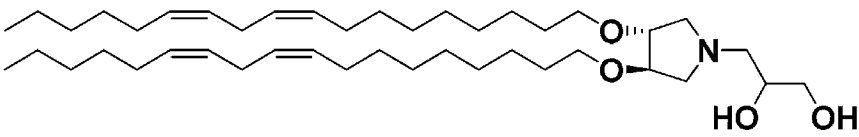
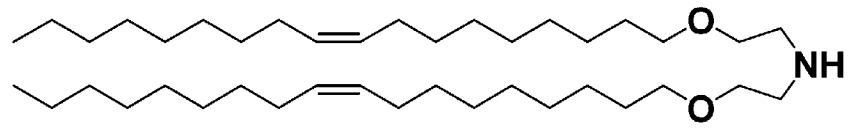
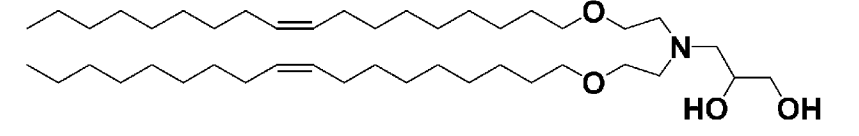
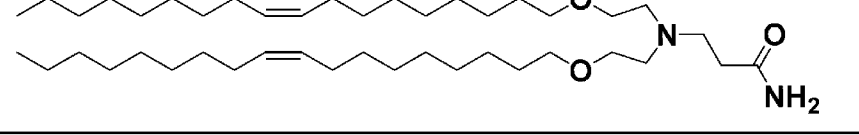
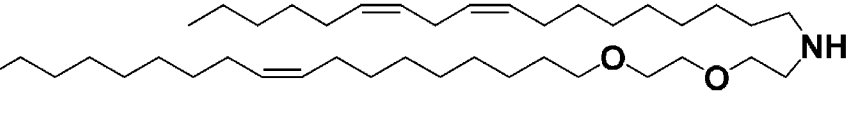
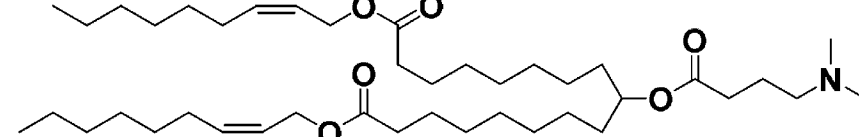
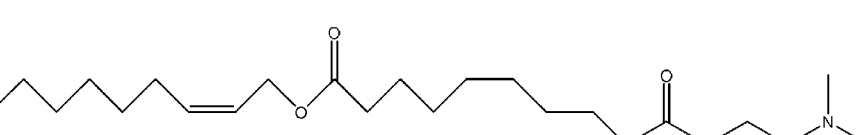
表6

化合物番号	構造式
CL-40	
CL-41	
CL-42	
CL-43	
CL-44	
CL-45	

[0263]

[表7]

表7

化合物番号	構造式
CL-46	
CL-47	
CL-48	
CL-49	
CL-50	
CL-51	
CL-52	

[0264] 次に本発明におけるカチオン性脂質の製造方法について説明する。なお、以下に示す製造法において、定義した基が該製造法の条件下で変化するかまたは該製造法を実施するのに不適切な場合、有機合成化学で常用される保護

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

[0265] また、以下に示す製造法において記載されているエーテル化（第4版実験化学講座20 有機化合物の合成II」、第4版、p. 187、丸善(1992年)等）、アミノ化（第4版実験化学講座20 有機化合物の合成II」、第4版、p. 279、丸善(1992年)等）、エステル化（第4版実験化学講座22 有機化合物の合成IV」、第4版、p. 43、丸善(1992年)等）、アミド化（第4版実験化学講座22 有機化合物の合成IV」、第4版、p. 137、丸善(1992年)等）等の一般的な単位反応は、それぞれ既存の文献に記載されている一般的な反応条件を用いても行うことができる。

[0266] 式(CL-I)で表される脂質は国際公開第2013/089151号に記載の方法、またはそれに準じた方法で得ることができる。

[0267] 式(CL-II)で表される脂質は国際公開第2011/136368号に記載の方法、またはそれに準じた方法で得ることができる。

[0268] 式(CL-III)、式(CL-IV)および式(CL-V)で表される脂質は国際公開第2014/07398号に記載の方法、またはそれに準じた方法で得ることができる。

[0269] 式(CL-VI)で表される脂質は国際公開第2010/042877号に記載の方法、またはそれに準じた方法で得ることができる。

[0270] 式(CL-VII)で表される脂質は国際公開第2010/054401号に記載の方法、またはそれに準じた方法で得ることができる。

[0271] 式(CL-VIII)で表される脂質は国際公開第2016/002753号に記載の方法、またはそれに準じた方法で得ることができる。

[0272] 式(CL-IX)で表される脂質は以下に記載の方法、またはそれに準じた方法で得ることができる。

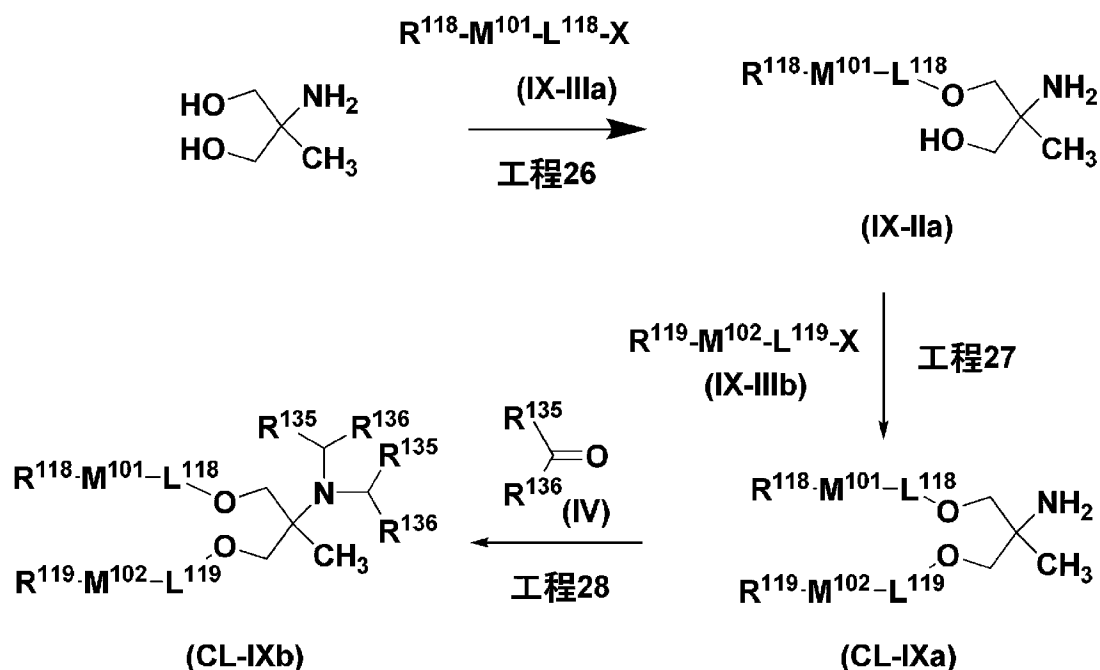
[0273] 本発明の化合物の製造法について説明する。なお、以下に示す製造法にお

いて、定義した基が該製造法の条件下で変化するかまたは該製造法を実施するのに不適切な場合、有機合成化学で常用される保護基の導入および除去方法[例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス第3版(Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、グリーン(T.W.Greene)著、John Wiley & Sons Inc. (1999年)等に記載の方法]等を用いることにより、目的化合物を製造することができる。また、必要に応じて置換基導入等の反応工程の順序を変えることもできる。

[0274] 製造法1

式(CL-IX)で表される脂質のうち、 X^{115} および X^{116} が共に水素原子である化合物(CL-IXa)、および X^{115} および X^{116} が同一である化合物(CL-IXb)は以下の方法によって製造することができる。

[0275] [化70]



(式中、 R^{118} 、 R^{119} 、 M^{101} 、 M^{102} 、 L^{118} および L^{119} はそれぞれ前記と同義であり、IX-IIaおよびIX-IIIbにおけるXは同一または異なって、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、トリフルオロメタンスルホニルオキシ、メタンスルホニルオキシ、ベンゼンスルホニルオキシ、p-トルエンスルホニルオキシ等の脱離基を表し、 R^{135} は水素原子、メチルまたはエチルであり、 R^{136} は水素原子またはメチル

であるか、または R^{135} と R^{136} は隣接する炭素と一緒になってシクロプロピル環を形成する（ただし、 R^{135} が水素原子またはエチルであるとき、 R^{136} はメチルでない））

[0276] 工程26および工程27

化合物(IX-IIa)は、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオールと化合物(IX-IIIa)を、無溶媒でまたは溶媒中、1~10当量の塩基の存在下、室温と200℃の間の温度で、5分間~100時間反応させることにより製造することができる。さらに、化合物(CL-IXa)は、化合物(IX-IIa)と化合物(IX-IIIb)を、無溶媒でまたは溶媒中、1~10当量の塩基の存在下、室温と200℃の間の温度で、5分間~100時間反応させることにより製造することができる。

[0277] 溶媒としては、例えばジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、トルエン、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、1,4-ジオキサン、ピリジン等が挙げられ、これらは単独でまたは混合して用いることができる。

[0278] 塩基としては、例えばナトリウムメトキシド、カリウム tert-ブトキシド、水素化ナトリウム、リチウムジイソプロピルアミド、ヘキサメチルジシラザンリチウム、ヘキサメチルジシラザンナトリウム、n-ブチルリチウム等が挙げられる。

[0279] 化合物(IX-IIIa)および化合物(IX-IIIb)は、市販品としてまたは公知の方法(例えば、「第5版実験化学講座13 有機化合物の合成I」、第5版、p. 374、丸善(2005年))もしくはそれに準じた方法で得ることもできる。

[0280] R^{118} - M^{101} - L^{118} および R^{119} - M^{102} - L^{119} が同一の場合の化合物(CL-IXa)は、工程26において、2当量以上の化合物(IX-IIIa)を用いることで得ることができる。

[0281] 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオールは市販品として得ることができる。

[0282] 工程28

化合物(CL-IXb)は、化合物(CL-IXa)を2~20当量の化合物(IX-IV)と、溶媒中、好ましくは1当量~大過剰量の還元剤および必要により好ましくは1~10

当量の酸の存在下、 -20°C と 150°C の間の温度で、5分間～72時間反応させることにより製造することができる。

[0283] 溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、tert-ブチルアルコール、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、1,4-ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、水等が挙げられ、これらは単独でまたは混合して用いられる。

[0284] 還元剤としては、例えばトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等が挙げられる。

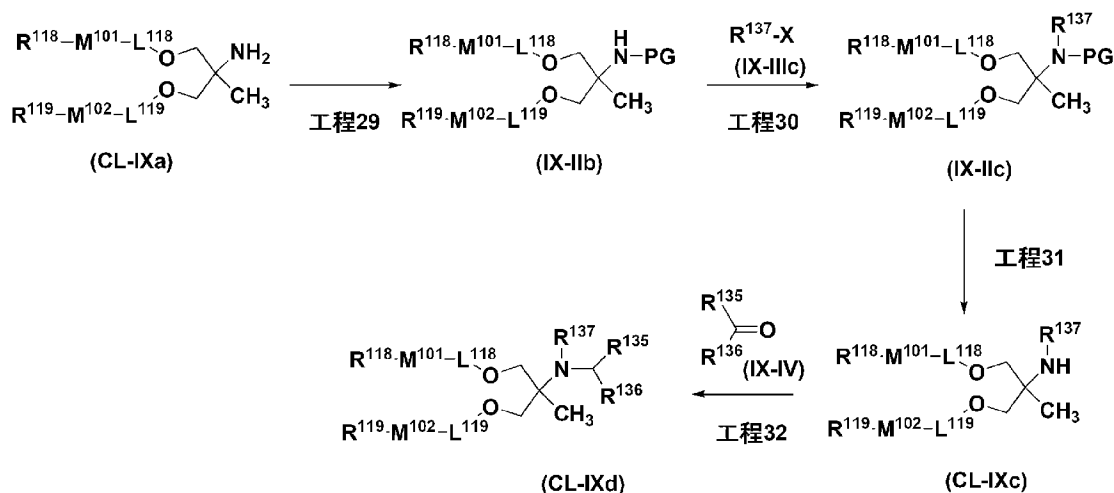
[0285] 酸としては、例えば塩酸、酢酸等が挙げられる。

[0286] 化合物(IX-IV)は、市販品として得ることができる。

[0287] 製造法2

式(CL-IX)で表される脂質のうち、 X^{115} および X^{116} が異なる化合物(CL-IXc)および(CL-IXd)は以下の方法によって製造することができる。

[0288] [化71]



(式中、 R^{118} 、 R^{119} 、 M^{101} 、 M^{102} 、 L^{118} 、 L^{119} 、 R^{135} 、 R^{136} および X はそれぞれ前記と同義であり、 R^{137} は X^{115} と同義であり、PGは保護基を表わす。)

[0289] 工程29

化合物(IX-IIb)は、化合物(CL-IXa)を有機合成化学で常用される保護基[例

例えば、プロテクティブ グループス イン オーガニック シンセシス第3版 (Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、グリーン(T.W. Greene)著、John Wiley & Sons Inc. (1999年)等に記載の保護基]で保護することで製造することができる。

[0290] 工程30

化合物(IX-IIc)は、化合物(IX-IIb)と化合物(IX-IIIc)を、無溶媒または溶媒中、1~10当量の塩基の存在下、-20℃と150℃の間の温度で、5分間~72時間反応させることにより製造することができる。

[0291] 溶媒としては、例えばジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、トルエン、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、1,4-ジオキサン、ピリジン、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド等が挙げられ、これらは単独でまたは混合して用いることができる。

[0292] 塩基としては、例えばナトリウムメトキシド、カリウム tert-ブトキシド、水素化ナトリウム、リチウムジイソプロピルアミド、ヘキサメチルジシラザンリチウム、ヘキサメチルジシラザンナトリウム、n-ブチルリチウム、炭酸カリウム、炭酸セシウム、トリエチルアミン等が挙げられる。

[0293] 化合物(IX-IIIc)は、市販品として得ることができる。

[0294] 工程31

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

[0295] 工程32

化合物(CL-IXd)は、化合物(CL-IXc)を1~10当量の化合物(IX-IV)と、溶媒中、好ましくは1当量~大過剰量の還元剤および必要により好ましくは1~10当

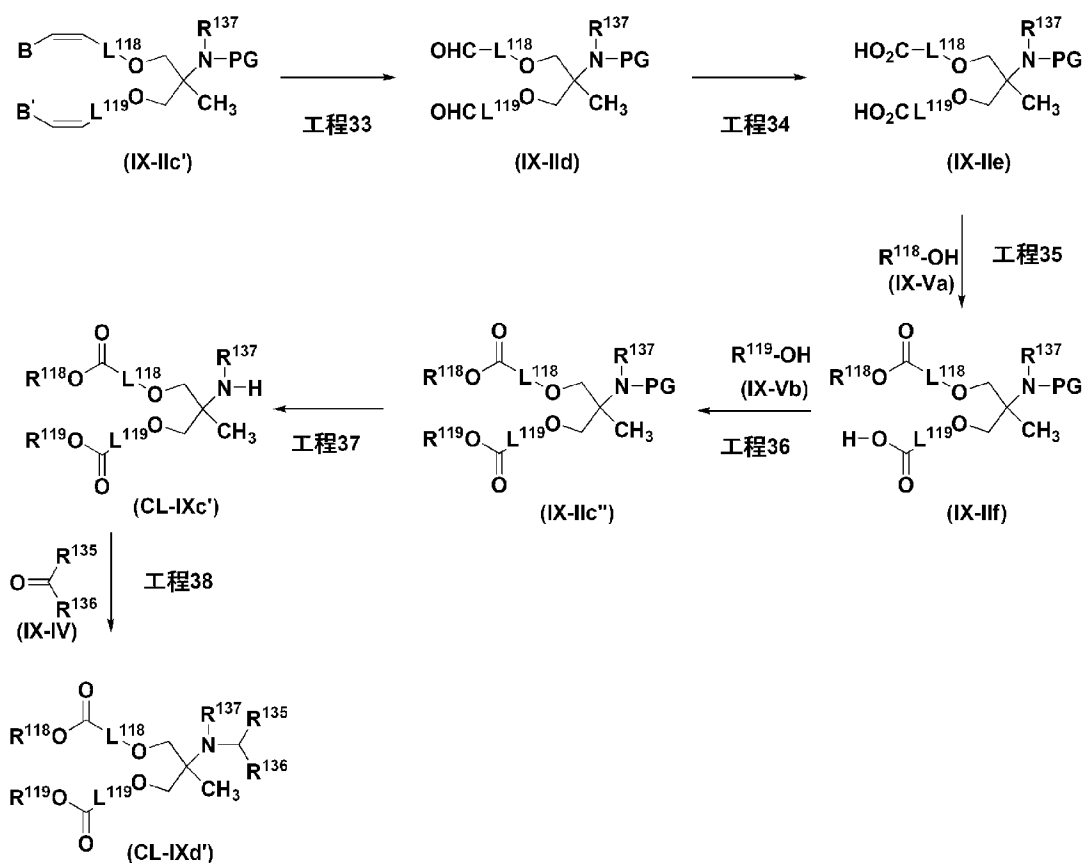
量の酸の存在下、 -20°C と 150°C の間の温度で、5分間～72時間反応させることにより製造することができる。

[0296] 溶媒、還元剤、酸としては、それぞれ工程28で例示したものが挙げられる。

[0297] 製造法3

式(CL-IX)で表される脂質のうち、 M^{101} および M^{102} がそれぞれ $-\text{OC}(O)-$ である化合物(CL-IXc')および(CL-IXd')は以下の方法によっても製造することができる。

[0298] [化72]



(式中、 R^{118} 、 R^{119} 、 M^{101} 、 M^{102} 、 L^{118} 、 L^{119} 、 R^{135} 、 R^{136} 、 R^{137} およびPGはそれぞれ前記と同義であり、 B および B' は直鎖状または分岐状の C1-C16 アルキルまたは C2-C16 アルケニルである。)

[0299] 工程33

化合物(IX-IIId)は、化合物(IX-IIc')と酸化剤を溶媒中、 -20°C と 150°C の

間の温度で、5分間～72時間反応させることにより製造することができる。

[0300] 酸化剤としては、オゾン、四酸化オスミウム/過ヨウ素酸ナトリウム、四酸化オスミウム/四酢酸鉛等が挙げられる。

[0301] 溶媒としては、工程28で例示したものが挙げられる。

[0302] 化合物(IX-IIc')は製造法2に記載の方法で製造することができる。

[0303] 工程34

化合物(IX-IIe)は、化合物(IX-IId)と酸化剤を、溶媒中-20℃と150℃の間の温度で、5分間～72時間反応させることにより製造することができる。

[0304] 酸化剤としては、ジョーンズ試薬、ニクロム酸ピリジニウム、四酸化ルテニウム、亜塩素酸ナトリウム等が挙げられる。

[0305] 溶媒としては、tert-ブチルアルコール、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトン、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、1,4-ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、水等が挙げられ、これらは単独でまたは混合して用いることができる。

[0306] 工程35および工程36

化合物(IX-IIf)は化合物(IX-IIe)と化合物(IX-Va)を、無溶媒でまたは溶媒中、1～10当量の縮合剤と1～10当量の塩基の存在下、室温と200℃の間の温度で、5分間～100時間反応させることにより製造することができる。さらに、化合物(IX-IIc'')は、化合物(IX-IIf)と化合物(IX-Vb)を、無溶媒でまたは溶媒中、1～10当量の縮合剤と1～10当量の塩基の存在下、室温と200℃の間の温度で、5分間～100時間反応させることにより製造することができる。

[0307] 溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ピリジン等が挙げられ、これらは単独でまたは混合して用いることができる。

[0308] 縮合剤としては、例えば塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド n 水和物、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩、0-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N',N',-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩等が挙げられる。

[0309] 塩基としては例えば炭酸カリウム、炭酸セシウム、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン、ピリジン等が挙げられる。

[0310] 化合物(IX-Va)および化合物(IX-Vb)は市販品として得ることができる。

[0311] R^{118} および R^{119} が同一の場合の化合物(IX-IIc')は、工程35において、2当量以上の化合物(IX-Va)を用いることで得ることができる。

[0312] 工程37

化合物(CL-IXc')は、化合物(IX-IIc')の保護基PGを適切な方法で除去することによって得られる。保護基の除去方法としては、有機合成化学で常用される保護基の除去方法[例えば、プロテクティブ グループス イン オーガニック シンセシス第3版(Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、グリーン(T.W.Greene)著、John Wiley & Sons Inc.(1999年)等に記載の除去方法]を用いることができ、これにより目的とする化合物を製造することができる。

[0313] 工程38

化合物(CL-IXd')は、化合物(CL-IXc')を1~10当量の化合物(IX-IV)と、溶媒中、好ましくは1当量~大過剰量の還元剤および必要により好ましくは1~10当量の酸の存在下、-20℃と150℃の間の温度で、5分間~72時間反応させることにより製造することができる。

[0314] 溶媒、酸としては、それぞれ工程28で例示したものが挙げられる。

[0315] なお、化合物(CL-IX)のうち、前記化合物(CL-IXa)~(CL-IXd)以外の化合物は、目的とする化合物の構造に適した原料や試薬等を採用することにより、

上記の製造法に準じて、あるいは有機合成化学で常用される一般的な製造方法を適用することによって製造することができる。

[0316] 上記各製造法における中間体および目的化合物は、有機合成化学で常用される分離精製法、例えば、ろ過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、再結晶各種クロマトグラフィー等に付して単離精製することができる。また、中間体においては特に精製することなく次の反応に供することも可能である。

[0317] X^{115} および X^{116} は同一または異なって、水素原子またはC1-C3アルキルである。

X^{115} および X^{116} は同一または異なって、好ましくは水素原子、メチル、エチル、プロピルであり、より好ましくは水素原子、メチルである。

(X^{115} , X^{116}) の組み合わせとしては、好ましくは(水素原子, 水素原子)、(水素原子, メチル)、(メチル, メチル)であり、より好ましくは(水素原子, メチル)、(メチル, メチル)である。

[0318] L^{118} および L^{119} は同一または異なって、直鎖状または分岐状のC8-C24アルキレンもしくはC8-C24アルケニレンである。

L^{118} および L^{119} は同一または異なって、アルキレンである場合、好ましくは直鎖状のC8-C24アルキレンであり、より好ましくは直鎖状のC8-C20アルキレンであり、さらに好ましくは直鎖状のC8-C12アルキレンである。

L^{118} および L^{119} は同一または異なって、好ましくはオクチレン、ノニレン、ウンデシレン、トリデシレン、ペンタデシレンであり、より好ましくはオクチレン、ノニレン、ウンデシレンである。

L^{118} および L^{119} は同一または異なって、アルケニレンである場合、好ましくは直鎖状のC8-C24アルケニレンであり、より好ましくは直鎖状のC10-C20アルケニレンであり、さらに好ましくは直鎖状のC10-C12アルケニレンである。

L^{118} および L^{119} は同一または異なって、好ましくは(Z)-ウンデカ-9-エニレン、(Z)-トリデカ-11-エニレン、(Z)-テトラデカ-9-エニレン、(Z)-ヘキサデカ-9-エニレン、(Z)-オクタデカ-9-エニレン、(Z)-オクタデカ-11-エニレン、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニレンである。

L¹¹⁸およびL¹¹⁹は同一であることが好ましい。

[0319] M¹⁰¹およびM¹⁰²は同一または異なって、-C=C-、-OC(O)-、-C(O)O-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(S)-、-C(S)O-、-SS-、-C(R')=N-、-N=C(R')-、-C(R')=N-O-、-O-N=C(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(S)-、-C(S)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R³)C(O)O-、-OC(O)N(R')-および-OC(O)O-である。

M¹⁰¹およびM¹⁰²は同一または異なって、好ましくは-C=C-、-OC(O)-、-C(O)O-、-C(O)(NR')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-OC(O)O-であり、より好ましくは-C=C-、-OC(O)-、-C(O)O-である。

M¹⁰¹およびM¹⁰²の各構造の結合については、-OC(O)-を例にして説明すると、R¹¹⁸-OC(O)-L¹¹⁸という構造であることを意味する。

M¹⁰¹およびM¹⁰²は同一であることが好ましい。

[0320] M¹⁰¹およびM¹⁰²におけるR' およびR'' は、同一または異なって、水素原子またはC1-C3アルキルである。

R' およびR'' は、好ましくは水素原子、メチル、エチル、プロピルであり、より好ましくは水素原子、メチルであり、さらに好ましくは水素原子である。

[0321] R¹¹⁸およびR¹¹⁹は同一または異なって、直鎖状または分岐状のC1-C16アルキルまたはC2-C16アルケニルである。

R¹¹⁸およびR¹¹⁹は同一または異なって、アルキルである場合、好ましくは直鎖状のC1-C16アルキルであり、より好ましくは直鎖状のC2-C9アルキルである。

R¹¹⁸およびR¹¹⁹は同一または異なって、好ましくはペンチル、オクチル、ノニル、デシル、ドデシルである。

R¹¹⁸およびR¹¹⁹は同一または異なって、アルケニルである場合、好ましくは直鎖状のC2-C16アルケニルであり、より好ましくは直鎖状のC3-C9アルケニルである。

R¹¹⁸およびR¹¹⁹は同一または異なって、好ましくは(Z)-ヘプタ-2-エン、(Z)

ーオクタ-2-エン、(Z)-ノナ-2-エン、(Z)-ノナ-3-エン、ノナ-8-エン、(Z)-ドデカ-2-エン、(Z)-トリデカ-2-エンである。

R¹¹⁸およびR¹¹⁹は同一であることが好ましい。

[0322] R¹¹⁸-M¹⁰¹-L¹¹⁸およびR¹¹⁹-M¹⁰²-L¹¹⁹は同一または異なって、R¹¹⁸およびR¹¹⁹、M¹⁰¹およびM¹⁰²、L¹¹⁸およびL¹¹⁹としては、各基について説明した構造からの組み合わせであってよい。

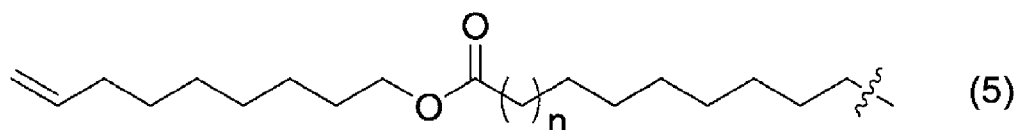
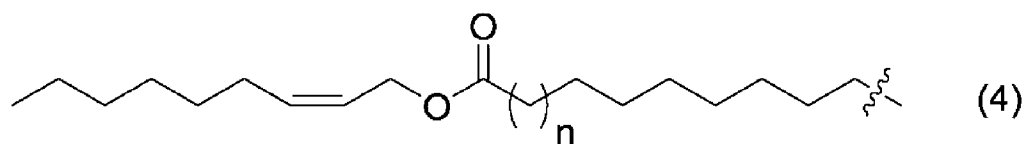
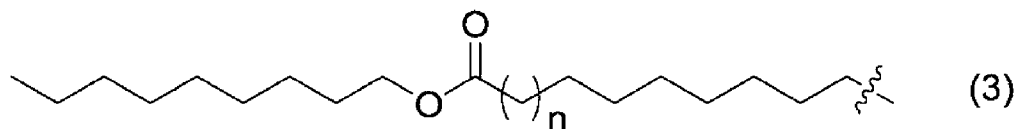
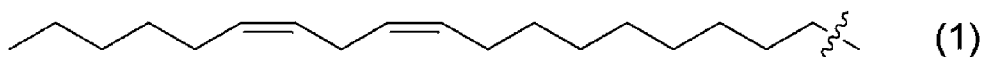
R¹¹⁸-M¹⁰¹-L¹¹⁸およびR¹¹⁹-M¹⁰²-L¹¹⁹は同一であることが好ましい。

R¹¹⁸-M¹⁰¹-L¹¹⁸およびR¹¹⁹-M¹⁰²-L¹¹⁹は同一または異なって、好ましくは(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル、(9Z, 12Z, 15Z)-オクタデカ-9, 12, 15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニル、(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニルおよび(Z)-ドコサ-13-エニルからなる群から選ばれ、より好ましくは(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルおよび(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニルからなる群から選ばれる。

R¹¹⁸-M¹⁰¹-L¹¹⁸およびR¹¹⁹-M¹⁰²-L¹¹⁹は同一または異なって、好ましくは以下の構造(1)～(5)であり、より好ましくは同一に以下の構造(1)～(5)である。

[0323]

[化73]



[式中、nは1-4の整数である]

[0324] 式(CL-X)で表される脂質は国際公開第2009/129385号に記載の方法、またはそれに準じた方法で得ることができる。

[0325] 式(CL-XI)で表される脂質は国際公開第2013/1491401号に記載の方法、またはそれに準じた方法で得ることができる。

[0326] 式(CL-XII)で表される脂質は国際公開第2009/129395号に記載の方法、またはそれに準じた方法で得ることができる。

[0327] 式(CL-XIII)で表される脂質は国際公開第2013/059496号に記載の方法、またはそれに準じた方法で得ることができる。

[0328] 式(CL-XIV)で表される脂質は国際公開第2011/149733号に記載の方法、またはそれに準じた方法で得ることができる。

[0329] 式(CL-XV)で表される脂質は国際公開第2011/153493号に記載の方法、またはそれに準じた方法で得ることができる。

[0330] 式(CL-XVI)で表される脂質は国際公開第2015/074085号に記載の方法、またはそれに準じた方法で得ることができる。

[0331] 上述したように本発明におけるナノ粒子に脂質IIが含まれる場合であっても、さらに中性脂質が含まれることが好ましい。

中性脂質としては、例えば、リン脂質、グリセロール脂質、ステロール、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、水溶性ユニットを含む脂質、およびスフィンゴイド等を好適に挙げることができる。これらの中性脂質は、1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせ使用してもよい。

[0332] 本発明の核酸含有脂質ナノ粒子において中性脂質を含有する場合には、中性脂質の分子の総数は特に限定されないが、総脂質のモル数に対して、好ましくは0.05倍モル量以上、より好ましくは0.10倍モル量以上、さらに好ましくは0.20倍モル量以上、よりさらに好ましくは0.30倍モル量以上である。また、中性脂質の分子の総数は特に限定されないが、好ましくは0.75倍モル量以下、より好ましくは0.70倍モル量以下、さらに好ましくは0.65倍モル量以下、よりさらに好ましくは0.60倍モル量以下である。

[0333] 中性脂質におけるリン脂質としては、例えば、ホスファチジルコリン(PC)(具体的には大豆ホスファチジルコリン、卵黄ホスファチジルコリン(EPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、ジミリス Toilホスファチジルコリン(DMPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)等)、ホスファチジルエタノールアミン(具体的にはジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、ジミリス Toilホスホエタノールアミン(DMPE)、16-0-モノメチルPE、16-0-ジメチルPE、18-1-トランスPE、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(POPE)、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(SOPE)等)、グリセロリン脂質(具体的にはホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、パルミトイルオレオイルホスファチ

ジグリセロール(POPG)、リゾホスファチジルコリン等)、スフィンゴリン脂質(具体的にはスフィンゴミエリン、セラミドホスホエタノールアミン、セラミドホスホグリセロール、セラミドホスホグリセロリン酸等)、グリセロホスホノ脂質、スフィンゴホスホノ脂質、天然レシチン(具体的には卵黄レシチン、大豆レシチン等)または水素添加リン脂質(具体的には水素添加大豆ホスファチジルコリン等)等の天然または合成のリン脂質が挙げられるがこれらに限定されない。

[0334] 中性脂質におけるグリセロ糖脂質としては、例えば、スルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリドまたはグリコシルジグリセリド等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0335] 中性脂質におけるスフィンゴ糖脂質としては、例えば、ガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシドまたはガングリオシド等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0336] 中性脂質におけるスフィンゴイドとしては、例えば、スフィンガン、イコサスフィンガン、スフィンゴシンまたはそれらの誘導体等が挙げられるがこれらに限定されない。誘導体としては、例えば、スフィンガン、イコサスフィンガンまたはスフィンゴシン等の $-NH_2$ を $-NHCO(CH_2)_xCH_3$ (式中、 x は0~18の整数であり、中でも6、12または18が好ましい)に変換したもの等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0337] 中性脂質におけるステロールとしては、例えば、コレステロール(Chol)、ジヒドロコレステロール、ラノステロール、 β -シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、エルゴカステロール、フコステロールまたは 3β -[N-(N', N'-ジメチルアミノエチル)カルバモイル]コレステロール(DC-Chol)等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0338] 水溶性ユニットを含む脂質とは、水溶性高分子の脂質誘導体または脂肪酸誘導体である。

水溶性高分子の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えば、ポリエ

チレングリコール、ポリグリセリン、ポリエチレンイミン、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、オリゴ糖、デキストリン、水溶性セルロース、デキストラン、コンドロイチン硫酸、ポリグリセリン、キトサン、ポリビニルピロリドン、ポリアスパラギン酸アミド、ポリ-L-リジン、マンナン、プルラン、オリゴグリセロール等またはそれらの誘導体と、前記組成物の定義の中で挙げた中性脂質または例えば、ステアリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸またはラウリン酸等の脂肪酸とが結合してなるもの、それらの塩等が挙げられ、より好ましくは、ポリエチレングリコールまたはポリグリセリン等の脂質誘導体または脂肪酸誘導体およびそれらの塩が挙げられ、さらに好ましくは、ポリエチレングリコールの脂質誘導体または脂肪酸誘導体およびそれらの塩が挙げられる。

[0339] ポリエチレングリコールの脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えば、ポリエチレングリコール化脂質[具体的にはポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミンおよびポリエチレングリコール-ジアシルグリセロール(より具体的には1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG-DSPE)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG-DPPE)、1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG-DMPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール, メトキシポリエチレングリコール-2000(PEG-DSG)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロール, メトキシポリエチレングリコール-2000 (PEG-DPG)、 1,2-ジミリスチル-sn-グリセロール, メトキシポリエチレングリコール-2000 (PEG-DMG)、1,2-オレオイル-sn-グリセロール, メトキシポリエチレングリコール-2000 (PEG-DOG)) 等)、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、クレモフォアイーエル(CREMOPHOR EL)等]、ポリエチレングリコールソルビタン脂肪酸エステル類(具体的にはモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン等)またはポリエチレングリコール脂肪酸エステル類等が挙げられ、より好ましくは、ポリエチレングリコール化脂質が挙

げられる。

[0340] ポリグリセリンの脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えば、ポリグリセリン化脂質(具体的にはポリグリセリン-ホスファチジルエタノールアミン等)またはポリグリセリン脂肪酸エステル類等が挙げられ、より好ましくは、ポリグリセリン化脂質が挙げられる。

[0341] 本発明の核酸含有ナノ粒子において、核酸含有ナノ粒子における水溶性高分子の脂質誘導体および脂肪酸誘導体の分子の総数は特に限定されないが、総脂質のモル数に対して0.005倍モル量以上であるのが好ましく、0.01~0.30倍モル量であるのがより好ましく、0.02~0.25倍モル量であるのがさらに好ましく、0.03~0.20倍モル量であるのがさらにより好ましく、0.04~0.15倍モル量であるのがさらにより好ましく、0.04~0.12倍モル量であるのが最も好ましい。

[0342] 本願発明のナノ粒子には、高分子が含まれていてもよく、例えば、タンパク質、アルブミン、デキストラン、ポリフェクト(polyfect)、キトサン、デキストラン硫酸、例えば、ポリ-L-リジン、ポリエチレンイミン、ポリアスパラギン酸、スチレンマレイン酸共重合体、イソプロピルアクリルアミド-アクリルピロリドン共重合体、ポリエチレングリコール修飾デンドリマー、ポリ乳酸、ポリ乳酸ポリグリコール酸またはポリエチレングリコール化ポリ乳酸等の高分子またはそれらの塩の1以上からなるミセル等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0343] ここで、高分子の塩は、例えば、金属塩、アンモニウム基塩、酸付加塩、有機アミン付加塩、アミノ酸付加塩等を包含する。金属塩としては、例えば、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩または亜鉛塩等が挙げられるがこれらに限定されない。アンモニウム基塩としては、例えば、アンモニウム基またはテトラメチルアンモニウム基等の塩が挙げられるがこれらに限定されない。酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩またはリン酸塩等の無機酸塩、および酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸

塩またはクエン酸塩等の有機酸塩が挙げられるがこれらに限定されない。有機アミン付加塩としては、例えば、モルホリンまたはピペリジン等の付加塩が挙げられるがこれらに限定されない。アミノ酸付加塩としては、例えば、グリシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸またはリジン等の付加塩が挙げられるがこれらに限定されない。

[0344] 本発明の核酸含有脂質ナノ粒子は、いずれも、例えば、糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体、または界面活性剤等を含有しても良い。本発明における中性脂質には、上記脂質誘導体および脂肪酸誘導体が含まれる。

[0345] 糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体、または界面活性剤としては、好ましくは、糖脂質、または水溶性高分子の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体が挙げられ、より好ましくは、水溶性高分子の脂質誘導体または脂肪酸誘導体が挙げられる。糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体、または界面活性剤は、分子の一部が組成物の他の構成成分と例えば、疎水性親和力、静電的相互作用等で結合する性質をもち、他の部分が組成物の製造時の溶媒と例えば、親水性親和力、静電的相互作用等で結合する性質をもつ、2面性をもつ物質であるのが好ましい。

[0346] 糖、ペプチドまたは核酸の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えば、ショ糖、ソルビトール、乳糖等の糖、例えば、カゼイン由来ペプチド、卵白由来ペプチド、大豆由来ペプチド、グルタチオン等のペプチド、または例えば、DNA、RNA、プラスミド、siRNA、ODN等の核酸と、前記組成物の定義の中で挙げた中性脂質または例えば、ステアリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸等の脂肪酸とが結合してなるもの等が挙げられる。

[0347] 糖の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えば、前記組成物の定義の中で挙げたグリセロ糖脂質またはスフィンゴ糖脂質等も含まれる。

[0348] 界面活性剤としては、例えば、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン(具体的にはポリソルベート80等)、ポリオキシエチレンポリオキシプロ

ピレングリコール(具体的にはプルロニックF68等)、ソルビタン脂肪酸エステル(具体的にはソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノオレエート等)、ポリオキシエチレン誘導体(具体的にはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、ポリオキシエチレンラウリルアルコール等)、グリセリン脂肪酸エステルまたはポリエチレングリコールアルキルエーテル等が挙げられ、好ましくは、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、グリセリン脂肪酸エステルまたはポリエチレングリコールアルキルエーテル等が挙げられる。

[0349] カチオン性脂質としては、上述したカチオン性脂質(脂質II)に加えて、さらに別のカチオン性脂質を使用してもよい。(以下、脂質IIと、別のカチオン性脂質を合わせて、単にカチオン性脂質ともいう。)

脂質II以外のカチオン性脂質としては、例えば、特開昭61-161246号公報(米国特許5049386号明細書)中で開示される、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)、N-(2,3-ジ-(9-(Z)-オクタデセノイルオキシ))-プロパ-1-イル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTAP)等、国際公開第91/16024号および国際公開第97/019675号中で開示される、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシプロピル)]-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチル臭化アンモニウム(DORIE)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スぺルミンカルボキシアミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパニウムトリフルオロ酢酸(DOSPA)等、国際公開第2005/121348号中で開示される、DLinDMA等、国際公開第2009/086558号中で開示される、DLin-K-DMA、国際公開第2010/042877号中で開示される、DLin-KC2-DMA、国際公開第2010/054401号中で開示される、DLin-MC3-DMA、国際公開第2011/136368号中で開示される、(3R2R)-3,4-ビス((Z)-ヘキサデカ-9-エニルオキシ)-1-メチルピロリジン、N-メチル-N,N-ビス(2-((Z)-オクタデカ-6-エニルオキシ)エチル)アミン等が挙げられ、好ましくはDOTMA、DOTAP、DORIE、DOSPA、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-K-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-KC2-DMA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリ

アコンタ-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イル 4-(ジメチルアミノ)ブタノアート (DLin-MC3-DMA)等の2つの非置換アルキル基を有する3級アミン部位または3つの非置換アルキル基を有する4級アンモニウム部位を有するカチオン性脂質が挙げられ、より好ましくは、該3級アミン部位を有するカチオン性脂質が挙げられる。該3級アミン部位および該4級アンモニウム部位の非置換アルキル基はメチル基であることがより好ましい。

[0350] 本発明の一実施形態は、シグレックに結合可能なリガンドを有する、脂質(脂質I)と、核酸を含有する脂質ナノ粒子であり、例えば、脂質Iとカチオン性脂質と核酸とから構成される脂質ナノ粒子；脂質Iとカチオン性脂質に中性脂質を組み合わせたものと核酸との複合体を含有する脂質ナノ粒子；該複合体および脂質Iを含む脂質膜を含有する脂質ナノ粒子；脂質Iを含む脂質膜を含有する脂質ナノ粒子に、該複合体を封入した脂質ナノ粒子；等が挙げられる。

上記複合体としては、核酸と脂質二重層からなる膜との複合体、核酸とリポソームとの複合体、核酸とミセルとの複合体等が挙げられ、好ましくは、核酸とミセルとの複合体または核酸とリポソームとの複合体が挙げられる。該脂質膜は、脂質一重膜(脂質1分子膜)でも脂質二重膜(脂質2分子膜)であってもよい。なお、該脂質膜に、カチオン性脂質、中性脂質を含有していてもよい。

[0351] また、上記複合体の形態としては、例えば、核酸と脂質一重(一分子)層からなる膜(逆ミセル)との複合体、核酸とリポソームとの複合体、核酸とミセルとの複合体等が挙げられ、好ましくは核酸と脂質一重層からなる膜との複合体または核酸とリポソームとの複合体が挙げられる。複合体および該複合体を封入する脂質膜を含有する脂質ナノ粒子としては、例えば該複合体および該複合体を脂質二重膜で封入するリポソーム等が挙げられる。

[0352] 本発明の脂質ナノ粒子には、カチオン性脂質を一種または複数種を混合して使用してもよい。

[0353] なお、本発明の脂質ナノ粒子は、核酸を含有することができるが、核酸と

化学的に近似した化合物（例えばペプチド核酸）も含有することもできる。

[0354] 本発明においては、総脂質とは、脂質Iおよび脂質I以外の脂質の合計である。

[0355] また、本発明の核酸含有ナノ粒子には、例えば、水溶性高分子等による表面改質も任意に行うことができる[ラジック(D.D.Lasic)、マーティン(F.Martin)編, “ステルス・リポソームズ(Stealth Liposomes)” (米国), シーアールシー・プレス・インク(CRC Press Inc), 1995年, p. 93-102参照]。表面改質に使用し得る水溶性高分子としては、例えば、ポリエチレングリコール、ポリグリセリン、ポリエチレンイミン、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、オリゴ糖、デキストリン、水溶性セルロース、デキストラン、コンドロイチン硫酸、ポリグリセリン、キトサン、ポリビニルピロリドン、ポリアスパラギン酸アミド、ポリ-L-リジン、マンナン、プルラン、オリゴグリセロール等が挙げられ、好ましくはポリエチレングリコール、ポリグリセリン、ポリエチレンイミン、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸およびポリアクリルアミド等が挙げられ、より好ましくはポリエチレングリコールおよびポリグリセリン等が挙げられるがこれらに限定されない。また、表面改質には、糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体(前記と同義)、または界面活性剤等を用いることができる。該表面改質は、本発明の核酸含有脂質ナノ粒子中に糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体、または界面活性剤を含有させる方法の1つである。

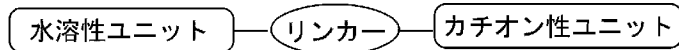
[0356] (高分子II)

高分子IIは、水溶性ユニットおよびカチオン性ユニットを含む高分子である。

また、高分子IIは、水溶性ユニットとカチオン性ユニットとが、リンカーを介して結合していてもよく、すなわち、以下の構造式で表すこともできる。

[0357] [化74]

(高分子II)



[0358] 水溶性ユニットとしては、例えば、ポリエチレングリコールユニット、ポリグリセリンユニット、ポリエチレンイミンユニット、ポリビニルアルコールユニット、ポリアクリル酸ユニット、ポリアクリルアミドユニット、オリゴ糖ユニット、デキストリンユニット、水溶性セルロースユニット、デキストランユニット、コンドロイチン硫酸ユニット、ポリグリセリンユニット、キトサンユニット、ポリビニルピロリドンユニット、ポリアスパラギン酸アミドユニット、ポリ-L-リジンユニット、マンナンユニット、プルランユニット、オリゴグリセロールユニット等またはそれらの誘導体が挙げられる。これらの中でも、好ましくはポリエチレングリコールユニットである。水溶性ユニットの数平均分子量は、特に制限されないが、100～5000が好ましく、500～3000がより好ましい。

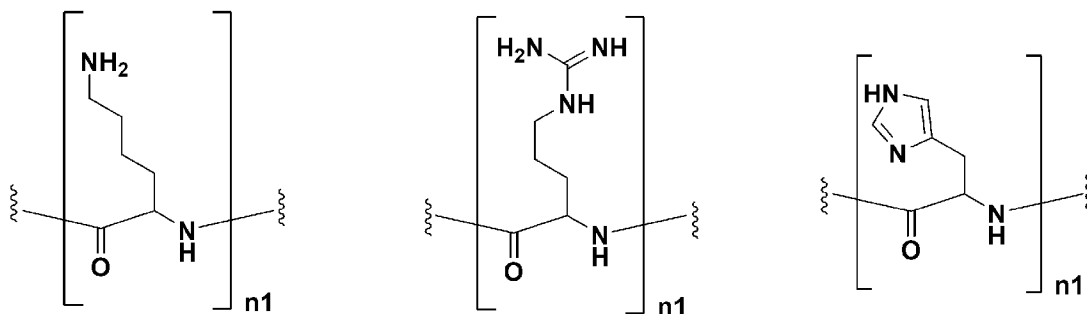
[0359] 高分子IIにおけるカチオン性ユニットとしては、好ましくは、リジン、アルギニン、ヒスチジンからなる群より選択される一種以上を含むアミノ酸ポリマーユニット、ポリエチレンイミンユニット、又は、ポリアミノアクリレートユニットである。

[0360] リジン、アルギニン、ヒスチジンからなる群より選択される一種以上を含むアミノ酸ポリマーユニットは、リジン、アルギニン、ヒスチジンからなる群より選択される一種以上を含むアミノ酸の重合によって得ることができる。アミノ酸ポリマーユニットが2種以上のアミノ酸によって構成される場合、ランダム共重合体であってもよく、ブロック共重合体であってもよい。

上記アミノ酸ポリマーユニットとしては、例えば、以下の構造が挙げられる。

[0361]

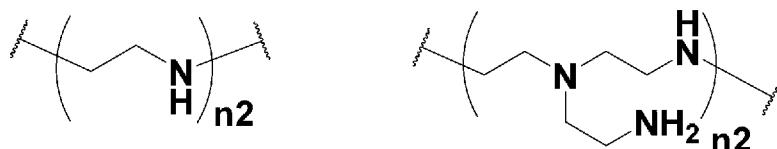
[化75]



(上記構造中、 $n1$ は2以上の整数である。 $n1$ は、好ましくは2～100であり、より好ましくは5～50である。)

[0362] 上記ポリエチレンイミンユニットは、エチレンイミンを重合したポリマーからなるユニットである。ポリエチレンイミンユニットは、例えば、主鎖構造を以下に示すように表すことができるが、ポリエチレンイミン主鎖が、その他のポリエチレンイミン構造と架橋形成していてもよい。

[0363] [化76]

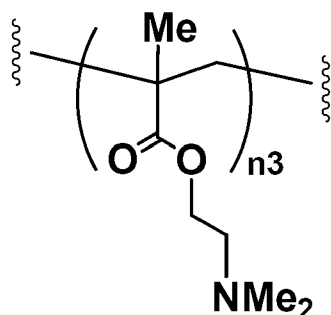


(上記主鎖構造中、 $n2$ は1以上の整数である。 $n2$ は、好ましくは2～100であり、より好ましくは5～50である。)

[0364] 上記ポリアミノアクリレートユニットは、例えば、メタクリル酸2-(ジメチルアミノ)エチル等のアミノ基を有するメタクリル酸を重合したポリマーからなるユニットである。ポリアミノアクリレートユニットとしては、例えば、以下に示すような構造を好適に挙げられる。

[0365]

[化77]



(上記構造中、 $n3$ は1以上の整数である。)

[0366] 高分子IIにおけるリンカーとしては、水溶性ユニットとカチオン性ユニットとを連結できるものであれば特に制限されないが、脂質I及び高分子Iに好適に用いられるリンカーが高分子Iにおけるリンカーにおいても好適である。

[0367] (核酸)

本発明で用いられる核酸としては、例えば、ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドと同等の機能を有する分子が重合した分子であれば、いかなる分子であってもよく、例えば、リボヌクレオチドの重合体であるリボ核酸(RNA)、デオキシリボヌクレオチドの重合体であるデオキシリボ核酸(DNA)、RNAとDNAとからなるキメラ核酸、およびこれらの核酸の少なくとも一つのヌクレオチドが該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子で置換されたヌクレオチド重合体等が挙げられる。また、ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドと同等の機能を有する分子が重合した分子の構造を少なくとも一部に含む誘導体も、本発明の核酸に含まれる。なお、本発明において、ウラシルUと、チミンTとは、それぞれ読み替えることができる。

[0368] ヌクレオチドと同等の機能を有する分子としては、例えば、ヌクレオチド誘導体等が挙げられる。

[0369] ヌクレオチド誘導体としては、例えば、ヌクレオチドに修飾を施した分子であればいかなる分子であってもよいが、例えば、RNAまたはDNAと比較して、ヌクレアーゼ耐性を向上させるかもしくはその他の分解因子から安定化さ

せるため、相補鎖核酸とのアフィニティーをあげるため、細胞透過性をあげるため、または可視化させるために、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドに修飾を施した分子等が好適に用いられる。

[0370] ヌクレオチド誘導体としては、例えば、糖部修飾ヌクレオチド、リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチド、塩基修飾ヌクレオチド等が挙げられる。

[0371] 糖部修飾ヌクレオチドとしては、例えば、ヌクレオチドの糖の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよいが、2'-修飾ヌクレオチドが好ましく用いられる。

[0372] 糖部修飾ヌクレオチドにおける修飾基としては、例えば、2'-シアノ、2'-アルキル、2'-置換アルキル、2'-アルケニル、2'-置換アルケニル、2'-ハロゲン、2'-O-シアノ、2'-O-アルキル、2'-O-置換アルキル、2'-O-アルケニル、2'-O-置換アルケニル、2'-S-アルキル、2'-S-置換アルキル、2'-S-アルケニル、2'-S-置換アルケニル、2'-アミノ、2'-NH-アルキル、2'-NH-置換アルキル、2'-NH-アルケニル、2'-NH-置換アルケニル、2'-SO-アルキル、2'-SO-置換アルキル、2'-カルボキシ、2'-CO-アルキル、2'-CO-置換アルキル、2'-Se-アルキル、2'-Se-置換アルキル、2'-SiH₂-アルキル、2'-SiH₂-置換アルキル、2'-ONO₂、2'-NO₂、2'-N₃、2'-アミノ酸残基(アミノ酸を構成するカルボキシル基からヒドロキシが除去されたもの)、2'-O-アミノ酸残基(前記アミノ酸残基と同義)等が挙げられる。

[0373] 糖部修飾ヌクレオチドとして、例えば、2'位の修飾基が4'位の炭素原子に架橋した構造を有する架橋構造型人工核酸(Bridged Nucleic Acid)(BNA)、より具体的には、2'位の酸素原子と4'位の炭素原子がメチレンを介して架橋したロックト人工核酸(Locked Nucleic Acid)(LNA)、およびエチレン架橋構造型人工核酸(Ethylene bridged nucleic acid)(ENA)[Nucleic Acid Research, 32, e175(2004)]等も挙げられ、これらは2'-修飾ヌクレオチドに含まれる。

[0374] 糖部修飾ヌクレオチドとして、ペプチド核酸(PNA)[Acc. Chem. Res., 32,

624(1999)]、オキシペプチド核酸(OPNA)[J. Am. Chem. Soc., 123, 4653(2001)]、ペプチドリボ核酸(PRNA)[J. Am. Chem. Soc., 122, 6900(2000)]等も挙げられる。

[0375] 糖部修飾ヌクレオチドにおける修飾基として、2'-シアノ、2'-ハロゲン、2'-O-シアノ、2'-アルキル、2'-置換アルキル、2'-O-アルキル、2'-O-置換アルキル、2'-O-アルケニル、2'-O-置換アルケニル、2'-Se-アルキルまたは2'-Se-置換アルキル等が好ましく、2'-シアノ、2'-フルオロ、2'-クロロ、2'-ブromo、2'-トリフルオロメチル、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-O-イソプロピル、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-[2-(メトキシ)エチル]、2'-O-(3-アミノプロピル)、2'-O-[2-(N,N-ジメチルアミノオキシ)エチル]、2'-O-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロピル]、2'-O-{2-[2-(N,N-ジメチルアミノ)エトキシ]エチル}、2'-O-[2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル]または2'-Se-メチル等がより好ましく、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-フルオロ等がさらに好ましく、2'-O-メチルまたは2'-O-エチルが最も好ましい。

[0376] 糖部修飾ヌクレオチドにおける修飾基は、その大きさから好ましい範囲を定義することもでき、フルオロの大きさから-O-ブチルの大きさに相当するものが好ましく、-O-メチルの大きさから-O-エチルの大きさに相当するものがより好ましい。

[0377] 糖部修飾ヌクレオチドにおける修飾基におけるアルキルとしては、例えば、C1-C6アルキルが挙げられ、より具体的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチルまたはヘキシル等のC1-C6アルキルが挙げられる。

[0378] 糖部修飾ヌクレオチドにおける修飾基におけるアルケニルとしては、例えば、C3-C6アルケニルが挙げられ、より具体的にはアリル、1-プロペニル、ブテニル、ペンテニルまたはヘキセニル等のC3-C6アルケニルが挙げられる。

[0379] 糖部修飾ヌクレオチドにおける修飾基におけるハロゲンとしては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子またはヨウ素原子等が挙げられる。

[0380] アミノ酸残基におけるアミノ酸としては、例えば、脂肪族アミノ酸(具体的には、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン等)、ヒドロキシアミノ酸(具体的には、セリン、トレオニン等)、酸性アミノ酸(具体的には、アスパラギン酸、グルタミン酸等)、酸性アミノ酸アミド(具体的には、アスパラギン、グルタミン等)、塩基性アミノ酸(具体的には、リジン、ヒドロキシリジン、アルギニン、オルニチン等)、含硫アミノ酸(具体的には、システイン、シスチン、メチオニン等)またはイミノ酸(具体的には、プロリン、4-ヒドロキシプロリン等)等が挙げられる。

[0381] 糖部修飾ヌクレオチドにおける修飾基における置換アルキルおよび置換アルケニルにおける置換基としては、例えば、ハロゲン(前記と同義)、ヒドロキシ、スルファニル、アミノ、オキソ、-O-アルキル(該-O-アルキルのアルキル部分は前記修飾基におけるC1-C6アルキルと同義)、-S-アルキル(該-S-アルキルのアルキル部分は前記修飾基におけるC1-C6アルキルと同義)、-NH-アルキル(該-NH-アルキルのアルキル部分は前記修飾基におけるC1-C6アルキルと同義)、ジアルキルアミノオキシ(該ジアルキルアミノオキシの2つのアルキル部分は同一または異なって前記修飾基におけるC1-C6アルキルと同義)、ジアルキルアミノ(該ジアルキルアミノの2つのアルキル部分は同一または異なって前記修飾基におけるC1-C6アルキルと同義)またはジアルキルアミノアルキルオキシ(該ジアルキルアミノアルキルオキシの2つのアルキル部分は同一または異なって前記修飾基におけるC1-C6アルキルと同義であり、アルキレン部分は前記修飾基におけるC1-C6アルキルから水素原子が1つ除かれたものを意味する)等が挙げられ、置換数は好ましくは1~3である。

[0382] リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、リン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がホスホロジチオエート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がアルキルホスホネー

ト結合に置換されたヌクレオチドまたはリン酸ジエステル結合がホスホロアミデート結合に置換されたヌクレオチド等が挙げられる。

[0383] 塩基修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドの塩基の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、塩基内の酸素原子が硫黄原子で置換されたもの、水素原子がC1-C6アルキル基で置換されたもの、メチル基が水素原子もしくはC2-C6アルキル基で置換されたもの、アミノ基がC1-C6アルキル基、C1-C6アルカノイル基等の保護基で保護されたものの等が挙げられる。

[0384] さらに、ヌクレオチド誘導体として、ヌクレオチドまたは糖部、リン酸ジエステル結合もしくは塩基の少なくとも一つが修飾されたヌクレオチド誘導体に脂質、リン脂質、フェナジン、フォレート、フェナントリジン、アントラキノ、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリンおよび色素等、別の化学物質を付加したものも挙げられ、具体的には、5'-ポリアミン付加ヌクレオチド誘導体、コレステロール付加ヌクレオチド誘導体、ステロイド付加ヌクレオチド誘導体、胆汁酸付加ヌクレオチド誘導体、ビタミン付加ヌクレオチド誘導体、緑色蛍光色素(Cy3)付加ヌクレオチド誘導体、赤色蛍光色素(Cy5)付加ヌクレオチド誘導体、フルオロセイン(6-FAM)付加ヌクレオチド誘導体、およびビオチン付加ヌクレオチド誘導体等が挙げられる。

[0385] 本発明で用いられる核酸においては、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体が、該核酸内の他のヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体とアルキレン構造、ペプチド構造、ヌクレオチド構造、エーテル構造、エステル構造およびこれらの少なくとも2つを組み合わせた構造等の架橋構造を形成してもよい。

[0386] 本発明で用いられる核酸としては、分子量が1,000 kDa以下のものが好ましく、100 kDa以下のものがより好ましく、30 kDa以下のものがさらに好ましい。また、本発明で用いられる核酸としては、好ましくは、正常な細胞にて発現している標的遺伝子を補足する核酸、および、標的遺伝子の発現を抑制す

る核酸が挙げられ、より好ましくはRNA干渉(RNAi)を利用した標的遺伝子の発現抑制作用を有する核酸が挙げられる。

[0387] 本発明で用いられる核酸としては、mRNAであってもよい。mRNAは、鋳型DNAより転写したmRNAを指し、コードするタンパク質（ペプチドを含む）は、特に制限されない。mRNAは、糖タンパク質をコードするものであってもよく、融合タンパク質をコードするものであってもよい。mRNAの塩基数は、特に制限はされない。また、mRNAは、目的とするタンパク質を合成できる相同な配列であればよく、複数個の塩基が欠失、置換、挿入または付加されたものであってもよい。

[0388] 本発明のナノ粒子中の核酸は、細胞内に導入される。かかる細胞は、ほ乳類のSiglec-1(CD169)陽性細胞であることが好ましい。核酸が細胞内に導入されることにより、その細胞内において、標的遺伝子の発現を促進または抑制することができる。Siglec-1(CD169)陽性細胞としては、例えば、マクロファージ、樹状細胞または単球等が挙げられる。

本発明における標的遺伝子としては、治療を目的とする疾患の種類等に応じて適宜選択すればよく、例えば、治療の目的である疾患の原因となる欠陥を修復や修正できる遺伝子、疾患の原因となる因子や受容体等の発現を抑制する遺伝子等が挙げられる。疾患としては、Siglec-1(CD169)陽性細胞が見られる疾患が挙げられ、マクロファージ、または樹状細胞もしくは単球がかかる疾患が挙げられる。

[0389] 核酸としては、例えば、蛋白質等をコードする遺伝子(標的遺伝子)のmRNAの一部の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含み、かつ標的遺伝子の発現を抑制する核酸であれば、例えば、siRNA(short interference RNA)、miRNA(micro RNA)等の二本鎖核酸、shRNA(short hairpin RNA)、アンチセンス核酸、リボザイム等の一本鎖核酸等、いずれの核酸を用いてもよいが、二本鎖核酸が好ましい。

[0390] 標的遺伝子のmRNAの一部の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む核酸をアンチセンス鎖核酸といい、アンチセンス鎖核酸の塩基配列に対して相補

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

[0391] 二本鎖核酸とは、二本の鎖が対合し二重鎖形成部を有する核酸をいう。二重鎖形成部とは、二本鎖核酸を構成するヌクレオチドまたはその誘導体が塩基対を構成して二重鎖を形成している部分をいう。二重鎖形成部を構成する塩基対は、通常15～27塩基対であり、15～25塩基対が好ましく、15～23塩基対がより好ましく、15～21塩基対がさらに好ましく、15～19塩基対が特に好ましい。

[0392] 二重鎖形成部のアンチセンス鎖核酸としては、例えば、標的遺伝子のmRNAの一部配列からなる核酸、または該核酸において1～3塩基、好ましくは1～2塩基、より好ましくは1塩基が置換、欠失もしくは付加され、かつ標的蛋白質の発現抑制活性を有する核酸が好適に用いられる。二本鎖核酸を構成する一本鎖の核酸は、通常15～30塩基(ヌクレオシド)の連なりからなるが、15～29塩基が好ましく、15～27塩基がより好ましく、15～25塩基がさらに好ましく、17～23塩基が特に好ましく、19～21塩基が最も好ましい。

[0393] 二本鎖核酸を構成するアンチセンス鎖、センス鎖のいずれか一方、または両方の核酸は、二重鎖形成部に続く3'側または5'側に二重鎖を形成しない追加の核酸を有してもよい。この二重鎖を形成しない部分を突出部(オーバーハング)ともいう。

[0394] 突出部を有する二本鎖核酸としては、例えば、少なくとも一方の鎖の3'末端または5'末端に1～4塩基、通常は1～3塩基からなる突出部を有するものが用いられるが、2塩基からなる突出部を有するものが好ましく用いられ、dTdTまたはUUからなる突出部を有するものがより好ましく用いられる。突出部は、アンチセンス鎖のみ、センス鎖のみ、およびアンチセンス鎖とセンス鎖の両方に有することができるが、アンチセンス鎖とセンス鎖の両方に突出部を有する二本鎖核酸が好ましく用いられる。

[0395] 二重鎖形成部に続いて標的遺伝子のmRNAの塩基配列と一部または全てがー

致する配列、または、二重鎖形成部に続いて標的遺伝子のmRNAの相補鎖の塩基配列と一部または全てが一致する配列を用いてもよい。さらに、標的遺伝子の発現を抑制する核酸としては、例えば、Dicer等のリボヌクレアーゼの作用により前記の二本鎖核酸を生成する核酸分子(国際公開第2005/089287号)や、3'末端や5'末端の突出部を有していない二本鎖核酸等を用いることもできる。

[0396] 前記の二本鎖核酸がsiRNAである場合、好ましくは、アンチセンス鎖は、5'末端側から3'末端側に向って少なくとも1〜17番目の塩基(ヌクレオシド)の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する17塩基の配列と相補的な塩基の配列であり、より好ましくは、該アンチセンス鎖は、5'末端側から3'末端側に向って1〜19番目の塩基の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する19塩基の配列と相補的な塩基の配列であるか、1〜21番目の塩基の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する21塩基の配列と相補的な塩基の配列であるか、1〜25番目の塩基の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する25塩基の配列と相補的な塩基の配列である。

[0397] さらに、本発明で用いられる核酸がsiRNAである場合、2'位において修飾基で置換されたリボースが含まれることが好ましい。本発明における2'位において修飾基で置換されたリボースとは、リボースの2'位のヒドロキシが修飾基に置換されているものを意味し、リボースの2'位のヒドロキシと立体配置が同じであっても異なってもよいが、好ましくはリボースの2'位のヒドロキシと立体配置が同じである。2'位において修飾基で置換されたリボースにおける修飾基としては、糖部修飾ヌクレオチドにおける2'-修飾ヌクレオチドにおける修飾基の定義で例示したものおよび水素原子が挙げられ、2'-シアノ、2'-ハロゲン、2'-O-シアノ、2'-アルキル、2'-置換アルキル、2'-O-アルキル、2'-O-置換アルキル、2'-O-アルケニル、2'-O-置換アルケニル、2'-Se-アルキル、2'-Se-置換アルキル等が好ましく、2'-シアノ、2'-フルオロ、2'-クロロ、2'-ブロモ、2'-トリフルオロメチル、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-O-イソプロピル、2'-O-トリフルオロメチル、

2'-O-[2-(メトキシ)エチル]、2'-O-(3-アミノプロピル)、2'-O-[2-(N,N-ジメチル)アミノオキシ]エチル、2'-O-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロピル]、2'-O-{2-[2-(N,N-ジメチルアミノ)エトキシ]エチル}、2'-O-[2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル]、2'-Se-メチル、水素原子等がより好ましく、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-フルオロ、水素原子等がさらに好ましく、2'-O-メチル、2'-O-フルオロが最も好ましい。

[0398] 本発明で用いられる核酸は、核酸の構造中のリン酸部、エステル部等に含まれる酸素原子等が、例えば、硫黄原子等の他の原子に置換された誘導体を包含する。

[0399] アンチセンス鎖およびセンス鎖の5' 末端の塩基に結合する糖は、それぞれ5' 位のヒドロキシが、リン酸基もしくは前記の修飾基、または生体内の核酸分解酵素等でリン酸基もしくは前記の修飾基に変換される基によって修飾されていてもよい。

[0400] アンチセンス鎖およびセンス鎖の3' 末端の塩基に結合する糖は、それぞれ3' 位のヒドロキシが、リン酸基もしくは前記の修飾基、または生体内の核酸分解酵素等でリン酸基もしくは前記の修飾基に変換される基によって修飾されていてもよい。

[0401] 一本鎖の核酸としては、例えば、標的遺伝子の連続する15~27塩基(ヌクレオシド)、好ましくは15~25塩基、より好ましくは15~23塩基、さらに好ましくは15~21塩基、特に好ましくは15~19塩基からなる配列の相補配列からなる核酸、または該核酸において1~3塩基、好ましくは1~2塩基、より好ましくは1塩基が置換、欠失もしくは付加され、かつ標的蛋白質の発現抑制活性を有する核酸であればいずれでもよい。該一本鎖の核酸は、10~30塩基(ヌクレオシド)の連なりからなることが好ましく、より好ましくは10~27塩基、さらに好ましくは10~25塩基、特に好ましくは10~23塩基の一本鎖核酸が好適に用いられる。

[0402] 一本鎖核酸として、上記の二本鎖核酸を構成するアンチセンス鎖およびセンス鎖を、スペーサー配列(スペーサーオリゴヌクレオチド)を介して連結し

たものを用いてもよい。スペーサーオリゴヌクレオチドとしては6～12塩基の一本鎖核酸分子が好ましく、その5'末端側の配列は2個のUであるのが好ましい。スペーサーオリゴヌクレオチドの例として、UUCAAGAGAの配列からなる核酸が挙げられる。スペーサーオリゴヌクレオチドによってつながれるアンチセンス鎖およびセンス鎖の順番はどちらが5'側になってもよい。該一本鎖核酸としては、例えば、ステムループ構造によって二重鎖形成部を有するshRNA等の一本鎖核酸であることが好ましい。shRNA等の一本鎖核酸は、通常50～70塩基長である。

[0403] リボヌクレアーゼ等の作用により、上記の一本鎖核酸または二本鎖核酸を生成するように設計した、70塩基長以下、好ましくは50塩基長以下、さらに好ましくは30塩基長以下の核酸を用いてもよい。

[0404] なお、本発明で用いられる核酸は、既知のRNAまたはDNA合成法、およびRNAまたはDNA修飾法を用いて得ることができる。

[0405] なお、本発明の核酸含有脂質ナノ粒子は、核酸だけでなく、核酸と化学的に近似した化合物（アニオン性ペプチド等のアニオン性高分子等）も含有することもできる。

[0406] [核酸含有脂質ナノ粒子の製造方法]

本発明の脂質ナノ粒子は、公知の製造方法またはそれに準じて製造することができ、いかなる製造方法で製造されたものであってよい。例えば、組成物の1つであるリポソームを含有する組成物の製造には、公知のリポソームの調製方法が適用できる。公知のリポソームの調製方法としては、例えばバンガム(Bangham)らのリポソーム調製法[“ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.)”, 1965年, 第13巻, p. 238-252参照]、エタノール注入法[“ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー(J. Cell Biol.)”, 1975年, 第66巻, p. 621-634参照]、フレンチプレス法[“エフイービーエス・レターズ(FEBS Lett.)”, 1979年, 第99巻, p. 210-214参照]、凍結融解法[“アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス(Arch. Biochem. Biophys.)”, 1981年, 第212巻, p. 186-194参照]、逆相蒸発法[“プロシーディング

グズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)”, 1978年, 第75巻, p. 4194-4198参照]またはpH勾配法(例えば特許第2572554号公報、特許第2659136号公報等参照)等が挙げられる。リポソームの製造の際にリポソームを分散させる溶液としては、例えば水、酸、アルカリ、種々の緩衝液、生理食塩水またはアミノ酸輸液等を用いることができる。また、リポソームの製造の際には、例えばクエン酸、アスコルビン酸、システインまたはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)等の抗酸化剤、例えばグリセリン、ブドウ糖または塩化ナトリウム等の等張化剤等の添加も可能である。また、脂質等を例えばエタノール等の有機溶媒に溶解し、溶媒を留去した後、生理食塩水等を添加、振とう攪拌し、リポソームを形成させることによってリポソームを製造することができる。

[0407] また、本発明の脂質ナノ粒子は、例えば、カチオン性脂質をクロロホルムに予め溶解し、次いで核酸等の水溶液とメタノールを加えて混合してカチオン性脂質/核酸等の複合体を形成させ、さらにクロロホルム層を取り出し、これに脂質Iとポリエチレングリコール化リン脂質と中性脂質と水を加えて油中水型(W/O)エマルジョンを形成し、逆相蒸発法で処理して製造する方法(特表2002-508765号公報参照)や、核酸等を、酸性の電解質水溶液に溶解し、例えば、脂質Iとカチオン性脂質、または脂質Iとカチオン性脂質と中性脂質の混合物(エタノール中)を加え、エタノール濃度を20v/v%まで下げて前記核酸等の内包脂質ナノ粒子を調製し、サイジングろ過し、透析によって、過剰のエタノールを除去した後、試料をさらにpHを上げて透析して脂質ナノ粒子表面に付着した核酸等を除去して製造する方法(特表2002-501511号公報および”バイオミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ(Biochimica et Biophysica Acta)”, 2001年、1510巻、p. 152-166参照)等によって製造することができる。

[0408] 本発明の脂質ナノ粒子のうち、脂質Iとカチオン性脂質および/もしくは中性脂質を組み合わせたものと核酸等との複合体を含有する脂質ナノ粒子またはカチオン性脂質と核酸の複合体を封入する脂質Iを含む脂質膜から構成され

た脂質ナノ粒子は、例えば、国際公開第02/28367号および国際公開第2006/080118号等に記載の製造方法に従って製造することができる。

[0409] また、本発明の脂質ナノ粒子のうち、例えば脂質Iとカチオン性脂質と核酸との複合体、または脂質Iとカチオン性脂質に中性脂質を組み合わせたものと核酸との複合体、またはカチオン性脂質と核酸の複合体を脂質Iおよび/もしくはカチオン性脂質、中性脂質を含む脂質膜で封入した脂質ナノ粒子等は、国際公開第02/28367号および国際公開第2006/080118号等に記載の製造方法に従って、それぞれの複合体を製造することができる。例えば、水または0～40%エタノール水溶液中に、カチオン性脂質と、核酸とを混合して、カチオン性脂質と核酸を含む複合体を溶解させずに分散させ(第1の脂質溶液)、別途、シグレックに結合可能なリガンドを有する、水溶性ユニットを含む脂質(脂質I)、カチオン性脂質、および中性脂質を含む脂質膜成分を、例えばエタノール水溶液中に溶解させ(第2の脂質溶液)、等量または体積比1:1～10:1の第1の脂質溶液と第2の脂質溶液を混合し、さらに適宜に水を加えることで得ることができる。なお、第1の脂質溶液および第2の脂質溶液中のカチオン性脂質としては、一種または複数種のカチオン性脂質を使用してもよい。

[0410] なお、本発明において、脂質Iとカチオン性脂質と核酸との複合体、または脂質Iとカチオン性脂質に中性脂質を組み合わせたものと核酸との複合体、またはカチオン性脂質と核酸の複合体を、脂質Iおよび/もしくはカチオン性脂質、中性脂質を含む脂質膜で封入した脂質ナノ粒子等の製造中および製造後に、複合体中の核酸と脂質膜中のカチオン性脂質との静電相互作用や、複合体中のカチオン性脂質と脂質膜中のカチオン性脂質との融合によって、複合体および膜の構造が変異したものも、本発明の脂質ナノ粒子等に包含される。

[0411] 本発明の核酸含有脂質ナノ粒子は、脂質IIを含む場合、例えば、以下の工程(a)～(c)を含む製造方法によって製造することができる。

(a)水に混和可能な有機溶媒と水との混合溶媒中で、カチオン性脂質(脂質II)と、核酸とを混合して、カチオン性脂質(脂質II)と核酸を含む第1の脂質溶液

を調製する工程、

(b)シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なりガンドを有する、脂質または水溶性ユニットを含む脂質(脂質I)、およびカチオン性脂質(脂質II)を含む第2の脂質溶液を調製する工程、および(c)第1の脂質溶液と第2の脂質溶液とを混合し、さらに水または緩衝剤水溶液を添加する工程

[0412] 本発明の核酸含有脂質ナノ粒子の製造方法としては、具体的には、以下の方法が挙げられる。

国際公開第02/28367号および国際公開第2006/080118号等に記載の製造方法に従って、核酸(前記と同義)、好ましくは二本鎖核酸とカチオン性脂質を含有するリポソームとの複合体を製造し、水または0~40%エタノール水溶液中に、該複合体を溶解させずに分散させ(第1の脂質溶液)、別途、シグレックに結合可能なりガンドを有する、水溶性ユニットを含む脂質(脂質I)、カチオン性脂質、および中性脂質を、エタノール水溶液中に溶解させ(第2の脂質溶液)、等量または体積比1:1~10:1の第1の脂質溶液と第2の脂質溶液を混合すること、または、さらに適宜に水を加えることでも、該核酸と脂質Iを含有する脂質ナノ粒子を得ることができる。脂質ナノ粒子は、好ましくは脂質Iとカチオン性脂質と核酸との複合体およびカチオン性脂質と核酸との複合体を封入する脂質Iを含む脂質膜を含有する組成物であるか、または該核酸と該カチオン性脂質を含有する脂質一重層からなる膜(逆ミセル)との複合体および該複合体を封入する脂質Iを含む脂質膜を含有する組成物である。これらの場合の脂質膜は、脂質一重膜(脂質1分子膜)でも脂質二重膜(脂質2分子膜)であってもよい。

[0413] 第1の脂質溶液または第2の脂質溶液の脂質溶液の混合においては、前者を後者に加えても良く、後者を前者に加えてもよい。また、攪拌しながら容器に同時に前者と後者を加えてもよい。さらに、インラインにおいて前者と後者を混合することもできる。この場合、インライン混合デバイスとしては、例えば、T-コネクタ等を用いることができる。

- [0414] また、本開示の該核酸と該リボソームとの複合体中のリボソームは、予め大きさを、平均粒子径10nm～400nm、より好ましくは20nm～110nm、さらに好ましくは30nm～80nmに調節したリボソームが好ましい。また、該複合体および/または脂質膜に、中性脂質および/または高分子を含有していてもよい。また、第1の脂質溶液は、リボソームと該核酸との複合体を形成させることができれば、エタノール濃度は、0～70%であってもよい。
- [0415] また、等量の第1の脂質溶液と第2の脂質溶液を混合する代わりに、第1の脂質溶液と第2の脂質溶液を混合後に複合体が溶解せず、かつ第2の脂質溶液中の脂質が溶解しないエタノール濃度となる比率で混ぜてもよい。好ましくは複合体が溶解せず、第2の脂質溶液中の脂質が溶解せず、かつエタノール濃度が10～60%のエタノール水溶液になるような比で第1の脂質溶液と第2の脂質溶液を混合することに代えてもよく、または第1の脂質溶液と第2の脂質溶液を混合後に複合体が溶解しないようなエタノール濃度になるような比で第1の脂質溶液と第2の脂質溶液を混合し、さらに水を加えることで、第2の脂質溶液中の脂質が溶解しなくなるエタノール濃度にするにしてもよい。
- [0416] 本開示の該第1の脂質溶液中での核酸とリボソームとの複合体は、第1の脂質溶液と第2の脂質溶液を混合し、さらに適宜に水を加えた後には、カチオン性脂質を含有する脂質一重層からなる膜(逆ミセル)と核酸との複合体に形態が変化していてもよい。本開示の製造方法で得られる脂質Iと該核酸と該カチオン性脂質を含有する組成物は、好ましくはカチオン性脂質と核酸との複合体および該複合体を封入する脂質膜を含有する組成物であり、または、カチオン性脂質を含有する脂質一重層からなる膜(逆ミセル)と核酸との複合体および該複合体を封入する脂質膜を含有し、該脂質膜に脂質Iとカチオン性脂質を含有する組成物であり、その製造性(収率および/または均一性)は優れている。
- [0417] 本発明の脂質ナノ粒子中の複合体または複合体を封入する脂質膜の平均粒子径は、所望により自由に選択できるが、下記する平均粒子径とするのが好ましい。平均粒子径を調節する方法としては、例えばエクストルージョン法

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

[0418] 本発明の製造方法の工程(a)における核酸は、核酸そのものを使用してもよく、あらかじめ蒸留水に溶解し、核酸水溶液としてもよい。核酸水溶液を工程(a)で使用する場合、当該水溶液における核酸濃度は、好ましくは0.1~1000mg/mLであり、より好ましくは1~500mg/mLであり、さらに好ましくは10~1000mg/mLである。

第1の溶液における核酸濃度は、核酸の種類や、分子量により適宜調整すればよいが、通常0.01~150mg/mLであり、好ましくは0.05~30mg/mLであり、より好ましくは0.3~10mg/mLである。

[0419] 第1の溶液におけるカチオン性脂質(脂質II)の濃度は、核酸の種類や、分子量や、使用量に応じて適宜調整すればよいが、通常0.01~400mmol/Lであり、好ましくは0.2~50mmol/Lであり、より好ましくは1~20mmol/Lである。

[0420] 第2の溶液における脂質Iの濃度は、ナノ粒子における脂質Iによる目的修飾率に応じて適宜調整すればよいが、通常0.00001~6mmol/Lであり、好ましくは0.02~4mmol/Lであり、より好ましくは0.05~3mmol/Lである。

第2の溶液におけるカチオン性脂質(脂質II)の濃度は、核酸の種類や、分子量や、使用量に応じて適宜調整すればよいが、通常0.01~100mmol/Lであり、好ましくは0.1~80mmol/Lであり、より好ましくは0.8~50mmol/Lである。

また、第2の溶液に、さらに脂質Iおよび脂質II以外の脂質を含む場合、かかる脂質は、1種以上でよく、好ましくは中性脂質であり、通常0.01~100mmol/Lであり、好ましくは0.1~80mmol/Lであり、より好ましくは0.8~50mmol/L

である。

[0421] 核酸および脂質を含有する有機溶媒溶液を調製する際の温度は核酸および脂質が溶解する限りにおいて特に限定されないが、10～60℃が好ましく、20～50℃がより好ましく、20～30℃がさらに好ましい。なお、30℃以上に加温する場合は、核酸および脂質の溶解度が増し、より少ない溶媒量で脂質ナノ粒子の製造を行うことができる。

[0422] 水に混和可能な有機溶媒が、アルコール、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、アセトン、アセトニトリルまたはこれらの混合物であることが好ましく、アルコールであることがより好ましい。アルコールは、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールまたはこれらの混合物であることが好ましい。

水に混和可能な有機溶媒と水との混合溶媒としては、0～50%(v/v)の水を含むメタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等のC1-C6アルコール類またはこれらの混合物が好ましく、0～50%(v/v)の水を含むエタノールまたはプロパノールがより好ましく、0～50%(v/v)の水を含むエタノールがさらに好ましい。ここで「%(v/v)」とは、溶液全体の体積に占める溶質の体積百分率を示し、以下同様である。

[0423] 核酸および脂質を含有する有機溶媒溶液における溶媒に、塩酸、酢酸、リン酸等の無機酸、またはこれらの酸の塩等を加えることもできる。この場合の溶媒のpHは、1～7とするのが好ましく、1～5とするのがより好ましく、2～4とするのがさらに好ましい。

[0424] 核酸および脂質を含有する有機溶媒溶液に、水または緩衝剤水溶液を添加する操作において、用いる水または緩衝剤水溶液の容量は特に限定されないが、核酸および脂質の有機溶媒溶液の容量に対して、0.5～100倍が好ましく、1.5～20倍がより好ましく、2.0～10倍がさらに好ましい。

[0425] この場合、水または緩衝剤水溶液を添加した後の有機溶媒濃度は特に限定されないが、得られた溶液に対して50%(v/v)以下が好ましく、40%(v/v)以下がより好ましく、30%(v/v)以下がさらに好ましく、20%(v/v)以下が最も

好ましい。また、緩衝剤水溶液としては、緩衝作用を有するものであれば特に限定されるものではないが、例えば、リン酸緩衝水溶液、クエン酸緩衝水溶液、酢酸緩衝水溶液等が挙げられる。

[0426] 上記添加操作を行う際の温度は特に限定されないが、10～60℃が好ましく、20～50℃がより好ましく、20～30℃がさらに好ましい。

[0427] 上記添加操作において、有機溶媒溶液を速やかに低下させることが重要である。具体的には、有機溶媒濃度を70% (v/v)以上から50% (v/v)以下まで、1分以内に变化させることが好ましく、0.5分以内に变化させることがより好ましく、0.1分以内に变化させることがさらに好ましく、0.05分以内に变化させるのが最も好ましい。

[0428] 本発明の核酸含有脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質（脂質II）を含まない場合、例えば、以下の工程(a')～(c')を含む製造方法によって製造することができる。

(a') 水と、核酸とシグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なリガンドを有する、脂質または水溶性ユニットを含む脂質(脂質I)を混合して、水溶液Aを調製する工程、

(b') その他の脂質の水に混和可能な有機溶媒の脂質溶液Bを調製する工程、および

(c') 上記水溶液Aと上記脂質溶液Bとを接触させる工程

[0429] 本発明の核酸含有脂質ナノ粒子において、総脂質のモル数と核酸のモル数の比率(総脂質のモル数/核酸のモル数)が50以上であるのが好ましく、100～1000であるのがより好ましく、120～800であるのがさらに好ましく、140～600であるのがよりさらに好ましく、200～500であるのが最も好ましい。

[0430] 本発明の核酸含有ナノ粒子の平均粒子径は、脂質ナノ粒子の調製後にさらに調節することもできる。平均粒子径を調節する方法としては、例えば、エクストルージョン法、大きな多重膜リポソーム(MLV)等を機械的に粉碎(具体的にはマントンゴウリン、マイクロフルイダイザー等を使用)する方法[ミュラー(R. H. Muller)、ベニタ(S. Benita)、ボーム(B. Bohm)編著, “エマルジョン

・アンド・ナノサスペンションズ・フォー・ザ・フォーミュレーション・オブ・ポアリー・ソラブル・ドラッグズ(Emulsion and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs)”, ドイツ, サイエントیفிக்க・パブリッシャーズ・スチュットガルト(Scientific Publishers Stuttgart), 1998年, p. 267-294参照]等が挙げられる。

[0431] 本発明の核酸含有ナノ粒子の大きさは、例えば、動的光散乱法で測定することができる。

[0432] [核酸含有高分子ナノ粒子の製造方法]

本発明のナノ粒子は、核酸、高分子Iおよび高分子IIを混合することによって製造することができる。すなわち、本発明の一つは、核酸含有高分子ナノ粒子の製造方法である。核酸含有高分子ナノ粒子の製造方法は、核酸、高分子Iおよび高分子IIを、混合する工程を含む。上記混合においては、任意の順番で、核酸、高分子Iおよび高分子IIを混合すればよいが、例えば、以下の方法を挙げることができる。

(方法1)

核酸溶液に、高分子Iおよび高分子IIを添加するか、高分子Iおよび高分子Iを含む溶液に核酸を添加する方法

(方法2)

核酸溶液、高分子Iを含む溶液、および高分子IIを含む溶液を、同時に混合する方法

[0433] 上記方法1において、核酸溶液に、高分子Iおよび高分子IIを添加するとき、高分子Iおよび高分子IIは、高分子Iおよび高分子IIの混合物の溶液であってもよい。

また、上記方法1において、高分子Iおよび高分子IIを含む溶液に核酸を添加するとき、核酸は、核酸溶液であることが望ましい。

上記方法1および方法2における各溶液の、溶媒としては、水、または、水に混和可能な有機溶媒と水との混合溶媒等が挙げられる。上記方法1および方法2における各溶液中の核酸、高分子Iおよび高分子IIの各濃度は、核酸

の種類や、分子量や、使用量、あるいは、ナノ粒子における高分子Iによる目的修飾率によって、適宜調整すればよい。

[0434] 水に混和可能な有機溶媒が、アルコール、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、アセトン、アセトニトリルまたはこれらの混合物であることが好ましく、アルコールであることがより好ましい。アルコールは、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールまたはこれらの混合物であることが好ましい。

水に混和可能な有機溶媒と水との混合溶媒としては、0~50%(v/v)の水を含むメタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等のC1-C6アルコール類またはこれらの混合物が好ましく、0~50%(v/v)の水を含むエタノールまたはプロパノールがより好ましく、0~50%(v/v)の水を含むエタノールがさらに好ましい。

[0435] 上記方法1において、核酸溶液に、高分子Iおよび高分子IIの混合物の溶液を添加するとき、あるいは、高分子Iおよび高分子IIを含む溶液に核酸溶液を添加するとき、前記混合物の溶液、あるいは、核酸溶液を添加するときの速度は、特に制限されない。

また、上記方法2において、核酸溶液、高分子Iを含む溶液、および高分子IIを含む溶液を、同時に添加する場合においても、各溶液を添加する速度は、特に制限されない。

[0436] 本発明の核酸含有ナノ粒子を、ほ乳類の細胞に導入することで、本発明の核酸含有ナノ粒子中の核酸を細胞内に導入することができる。

[0437] インビボにおける本発明の核酸含有ナノ粒子のほ乳類の細胞への導入は、インビボにおいて行うことのできる公知のトランスフェクションの手順に従って行えばよい。例えば、本発明の核酸含有ナノ粒子を、人を含む哺乳動物に静脈内投与することで、例えば、腫瘍または炎症の生じた臓器または部位へ送達され、送達臓器または部位の細胞内に本発明の核酸含有ナノ粒子中の核酸を導入することができる。Siglec-1が発現する細胞が存在する臓器または部位としては、特に限定されないが、例えば、肝臓、肺、リンパ、脾臓、

胃、大腸、腸管、肝臓、肺、脾臓、膵臓、腎臓、膀胱、皮膚、血管、眼球等が挙げられる。また、本発明の核酸含有ナノ粒子を、人を含む哺乳動物に静脈内投与することで、例えば、肝臓、胃、肺、腎臓、膵臓および／または脾臓へ送達され、送達臓器または部位の細胞内に本発明の核酸含有ナノ粒子中の核酸を導入することができる。

上記の臓器または部位の中でも、好ましくは、肝臓、肺、リンパ、腎臓、腸管および／または脾臓である。

[0438] 本発明の核酸含有ナノ粒子中の核酸が、RNA干渉(RNAi)を利用した標的遺伝子の発現抑制作用を有する核酸であれば、インビボでは乳類の細胞内に、標的遺伝子の発現を抑制する該核酸等を導入することができ、標的遺伝子の発現の抑制ができる。投与対象は、人であることが好ましい。

[0439] 本発明の核酸含有ナノ粒子中の標的遺伝子が、Siglec-1が陽性である細胞において発現する遺伝子であり、且つ、例えば、肝臓、肺、リンパ、腎臓、腸管および／または脾臓において発現する遺伝子であれば、本発明の核酸含有ナノ粒子を、肝臓、肺、リンパ、腎臓、腸管および／または脾臓に関連する疾患の治療剤または予防剤、好ましくは肝臓に関連する疾患の治療剤または予防剤として使用することができる。即ち、本発明は、上記説明した本発明の核酸含有ナノ粒子を哺乳動物に投与する肝臓、肺、リンパ、腎臓、腸管および／または脾臓に関連する疾患等の治療方法も提供する。投与対象は、人であることが好ましく、肝臓、肺、リンパ、腎臓、腸管および／または脾臓に関連する疾患等に罹患している人がより好ましい。

[0440] 本発明の核酸含有ナノ粒子は、Siglec-1が陽性である細胞が関与し、肝臓、肺、リンパ、腎臓、腸管および／または脾臓に関連する疾患等の治療剤または予防剤に関するインビボの薬効評価モデルにおいて、標的遺伝子を抑制することの有効性を検証するためのツールとして使用することもできる。

[0441] 本発明の核酸含有ナノ粒子は、例えば、血液成分等の生体成分(例えば、血液、消化管等)中での前記核酸の安定化、副作用の低減または標的遺伝子の発現部位を含む組織または臓器への薬剤集積性の増大等を目的とする製剤とし

ても使用できる。

[0442] 本発明の核酸含有ナノ粒子を、肝臓、肺、リンパ、腎臓、腸管および／または脾臓に関連する疾患等の治療剤または予防剤として使用する場合、投与経路としては、治療に際し最も効果的な投与経路を使用するのが望ましく、例えば、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内または静脈内等の非経口投与または経口投与を挙げることができ、好ましくは静脈内投与、皮下投与または筋肉内投与を挙げることができ、より好ましくは静脈内投与が挙げられる。

[0443] 投与量は、投与対象の病状や年齢、投与経路等によって異なるが、例えば、核酸に換算した1日投与量が約0.1 μ g～1000mgとなるように投与すればよい。

[0444] 静脈内投与または筋肉内投与に適当な製剤としては、例えば、注射剤が挙げられ、上述の方法により調製した組成物の分散液をそのまま例えば、注射剤等の形態として用いることも可能であるが、該分散液から、例えば、濾過、遠心分離等によって溶媒を除去して使用することも、例えば、該分散液を凍結乾燥して使用する、および／またはマンニトール、ラクトース、トレハロース、マルトースもしくはグリシン等の賦形剤を加えた分散液を凍結乾燥して使用することもできる。

[0445] 注射剤の場合、前記の組成物の分散液または前記の溶媒を除去または凍結乾燥した組成物に、例えば、水、酸、アルカリ、種々の緩衝液、生理食塩水またはアミノ酸輸液等を混合して注射剤を調製することが好ましい。また、例えば、クエン酸、アスコルビン酸、システインもしくはEDTA等の抗酸化剤またはグリセリン、ブドウ糖もしくは塩化ナトリウム等の等張化剤等を添加して注射剤を調製することも可能である。また、例えば、グリセリン等の凍結保存剤を加えて凍結保存することもできる。

[0446] また、本発明は、疾患の治療に使用するためのナノ粒子；疾患の治療に使用するための医薬組成物；疾患を治療するためのナノ粒子の使用；疾患の治療用医薬の製造におけるナノ粒子の使用；疾患の治療用医薬の製造に使用する

るためのナノ粒子；有効量のナノ粒子を、その必要のある対象に投与することを含む、疾患の治療または予防方法；を提供する。

実施例

[0447] 次に、実施例、参考例、比較例および試験例により、本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例、参考例、比較例および試験例に限定されるものではない。

なお、実施例および参考例に示されたプロトン核磁気共鳴スペクトル(^1H NMR)は、270MHz、300MHzまたは400MHzで測定されたものであり、化合物および測定条件によっては交換性プロトンが明瞭には観測されないことがある。なお、シグナルの多重度の表記としては通常用いられるものを用いているが、b rとは見かけ上幅広いシグナルであることを表す。

[0448] 参考例1～50に、カチオン性脂質の合成を示した。

[0449] 参考例1

N,N-ジメチル-2,3-ビス(((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イル)オキシ)プロパン-1-アミン(化合物CL-1)

CL-1は、“ジャーナル オブ コントロールド リリース (J. Control. Release.)”，2005年，第107巻，p.276-287に記載の方法で合成した。

[0450] 参考例2

N-メチル-N,N-ビス(2-((Z)-ヘキサデカ-9-エニルオキシ)エチル)アミン(化合物CL-2)

水素化ナトリウム(油性，60%，222 mg，5.55 mmol)のトルエン(2 mL)懸濁液に、N-メチルジエタノールアミン(東京化成工業社製、82.6 mg，0.693 mmol)のトルエン (2 mL)溶液を攪拌しながら添加した後、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル メタンスルホナート(530 mg，1.66 mmol)のトルエン(2 mL)溶液を滴下した。得られた混合物を加熱還流下2時間攪拌した。室温まで冷却後、反応を水で停止させた。得られた混合物に飽和食塩水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール=100/0～98/2

)で精製することにより標記の化合物 (199 mg, 0.353 mmol, 収率51%)を得た。
。

ESI-MS m/z : 565 ($M + H$)⁺;

[0451] 参考例3

trans-1-メチル-3,4-ビス(((Z)-オクタデカ-9-エン-1-イル)オキシ)メチル)
ピロリジン (化合物CL-3)

CL-3は、国際公開第2011/136368号に記載の方法で合成した。

[0452] 参考例4

trans-1-メチルピロリジン-3,4-ジイル)ビス(メチレン) (9Z, 9' Z, 12Z, 12' Z)-
ビス(オクタデカ-9,12-ジエノアート) (化合物CL-4)

CL-4は、国際公開第2011/136368号に記載の方法で合成した。

[0453] 参考例5

(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル 4-(ジ
メチルアミノ)ブタノアート (化合物CL-5)

CL-5は、国際公開第2010/054401号に記載の方法に準ずる方法で合成した。

ESI-MS m/z : 642

[0454] 参考例6

3-(ジ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イル)アミノ)プロパン-1-オール
(化合物CL-6)

CL-6は、国際公開第2014/007398号に記載の方法で合成した。

[0455] 参考例7

(9Z, 12Z)-N-(2-(((Z)-オクタデカ-9-エン-1-イル)オキシ)エチル)オクタデカ
-9,12-ジエン-1-アミン (化合物CL-7)

CL-7は、国際公開第2014/007398号に記載の方法で合成した。

[0456] 参考例8

1-メチル-3,3-ジ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イル)アゼチジン (化
合物CL-8)

CL-8は、国際公開第2016/002753号に記載の方法で合成した。

[0457] 参考例9

N, 2-ジメチル-1, 3-ビス(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)プロパン-2-アミン (化合物CL-9)

工程1

2-アミノ-2-メチルプロパン-1, 3-ジオール (東京化成工業社製, 0.300 g, 4.76 mmol)をテトラヒドロフラン (3 mL)に溶解させ、水素化ナトリウム (油性60%, 0.171 g, 7.13 mmol)を室温に加えた。発泡が収まった後、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル メタンサルホナート (Nu-Chek Prep, Inc社製, 2.458 g, 7.13 mmol)を加え、加熱環流下2時間攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール=100/0~90/10)で精製することで、2-メチル-1, 3-ビス(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ)プロパン-2-アミン (0.280 g, 収率16%)を得た。

ESI-MS m/z : 602 ($M + H$)⁺

工程2

工程1で得られる2-メチル-1, 3-ビス(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ)プロパン-2-アミン (0.500 g, 0.831 mmol)をジクロロメタン (3 mL)に溶解させ、氷冷下トリエチルアミン (和光純薬工業社製, 2.55 mL, 18.3 mmol)および2-ニトロベンゼン-1-スルホニル クロリド (Sigma-Aldrich社製, 0.368 g, 1.66 mmol)加え、室温に戻した後1時間攪拌した。反応混合物に水を加え、ヘキサンで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=99/1~85/15)で精製することで、N-(2-メチル-1, 3-ビス(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ)プロパン-2-イル)-2-ニトロベンゼンスルホンアミド (0.400 g, 収率61%)を得た。

ESI-MS m/z : 787(M + H)⁺

工程3

工程2で得られたN-(2-メチル-1,3-ビス((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ)プロパン-2-イル)-2-ニトロベンゼンスルホンアミド (0.200 g, 0.274 mmol)をテトラヒドロフラン (3 mL)に溶解させ、炭酸セシウム (和光純薬工業社製, 0.248 g, 0.726 mmol)およびヨウ化メチル (東京化成工業社製, 0.048 mL, 0.762 mmol)を加え、マイクロ波反応装置を用いて70°Cで1時間攪拌した。反応混合物に水を加え、ヘキサンで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、粗生成物としてN-メチル-N-(2-メチル-1,3-ビス(((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イル)オキシ)プロパン-2-イル)-2-ニトロベンゼンスルホンアミド (0.200 g, 収率91%)を得た。

ESI-MS m/z : 801(M + H)⁺

工程4

工程3で得られたN-メチル-N-(2-メチル-1,3-ビス((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ)プロパン-2-イル)-2-ニトロベンゼンスルホンアミド (0.200 g, 0.250 mmol)をアセトニトリル (2 mL)に溶解させ、1-ドデカンチオール (東京化成工業社製, 0.149 mL, 0.624 mmol)、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン (ナカライテスク社製, 0.0940 mL, 0.624 mmol)を加え、80°Cで1時間攪拌した。反応混合物に水を加え、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。得られた残渣をNHシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=90/10~75/25)で精製することにより、化合物CL-9 (0.070 g, 収率46%)を得た。

ESI-MS m/z : 616(M + H)⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.89 (t, J = 6.8 Hz, 6H), 1.02 (s, 3H), 1.25-1.40 (m, 32H), 1.50-1.59 (m, 4H), 2.05 (q, J = 6.8 Hz, 8H), 2.32 (s, 3H), 2.77 (t, J = 6.3 Hz, 4H), 3.26 (s, 4H), 3.40 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 5.28-5.43 (m, 8H).

[0458] 参考例10

メチルジ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル)アミン(化合物CL-10)

メチルアミン(Sigma-Aldrich社製, 約2 mol/Lテトラヒドロフラン溶液、10.5 mL、21.0 mmol)に(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル メタンスルホナート(1.03 g, 3.00 mmol)を加え、マイクロ波反応装置を用いて150°Cで90分間加熱撹拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、2 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、ついで飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過し、減圧下濃縮することでメチル((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル)アミンの粗生成物を得た。

得られた粗生成物に(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル メタンスルホナート(0.93 g, 2.70 mmol)および50%水酸化ナトリウム水溶液(0.960 g, 12.0 mmol)を加え、油浴上135°Cで60分間加熱撹拌した。室温まで冷却後、反応液を酢酸エチルで希釈し、水、ついで飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール = 100/0~97/3)で精製することにより化合物CL-10 (1.07 g, 2.03 mmol, 通し収率67 %)を得た。

ESI-MS m/z : 529 ($M + H$)⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.89 (t, $J = 6.7$ Hz, 6H), 1.29 (br s, 32H), 1.40-1.51 (m, 4H), 1.97-2.06 (m, 8H), 2.20 (s, 3H), 2.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 2.77 (t, $J = 5.8$ Hz, 4H), 5.28-5.43 (m, 8H).

[0459] 参考例11

N-メチル-2-(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)-N-(2-(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)エチル)エタン-1-アミン (化合物CL-11)

CL-11は、国際公開第2011/136368号に記載の方法で合成した。

[0460] 参考例12

(3R, 4R)-3, 4-ビス(((Z)-ヘキサデカ-9-エン-1-イル)オキシ)-1-メチルピロリジン (化合物CL-12)

CL-12は、国際公開第2011/136368号に記載の方法で合成した。

[0461] 参考例13

2-(ジメチルアミノ)-N-((6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-ヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イル)アセトアミド (化合物CL-13)

CL-13は、国際公開第2013/059496号に記載の方法で合成した。

[0462] 参考例14

3-(ジメチルアミノ)プロパン-1, 2-ジイル (9Z, 9' Z, 12Z, 12' Z)-ビス(オクタデカ-9, 12-ジエノアート) (化合物CL-14)

CL-14は、“バイオケミストリー (BioChemistry)”, 1994年, 第33巻, p. 12573-12580に記載の方法で合成した。

[0463] 参考例15

(9Z, 12Z)-ジ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)アミン (化合物CL-15)

CL-15は、国際公開第2014/007398号に記載の方法で合成した。

[0464] 参考例16

ビス(2-(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)エチル)アミン (化合物CL-16)

CL-16は、国際公開第2011/136368号に記載の方法で合成した。

[0465] 参考例17

(9Z, 12Z)-N-メチル-N-(2-(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)エチル)オクタデカ-9, 12-ジエン-1-アミン (化合物CL-17)

2-(メチルアミノ)エタノール (東京化成工業社製, 0.125 g, 1.66 mmol) をトルエン (2.5 mL)に溶解させ、水素化ナトリウム(油性, 60%, 0.333 g, 8.32 mmol)、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル メタンサルホナート (Nu-Chek Prep, Inc製, 1.32 g, 3.83 mmol)のトルエン (2.5 mL)溶液を順に加え、加熱環流下2時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却した後、エタノール、水を加え、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラ

ムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール=100/0~97/3)で精製することにより、化合物CL-17 (0.211 g, 収率22%)を得た。

ESI-MS m/z : 572(M + H)⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.89 (t, J = 6.9 Hz, 6H), 1.24-1.38 (m, 32H), 1.43-1.49 (m, 2H), 1.53-1.59 (m, 2H), 2.05 (q, J = 7.2 Hz, 8H), 2.27 (s, 3H), 2.37 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.57 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.78 (t, J = 6.8 Hz, 4H), 3.42 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.52 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 5.30-5.41 (m, 8H).

[0466] 参考例18

(9Z, 12Z)-N-(3-(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)プロピル)オクタデカ-9, 12-ジエン-1-アミン (化合物CL-18)

CL-18は、国際公開第2014/007398号に記載の方法に準ずる方法で合成した。

ESI-MS m/z : 572

[0467] 参考例19

(1-メチルピペリジン-3-イル)メチル ジ(((11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエン-1-イル)カルバマート (化合物CL-19)

CL-19は、国際公開第2014/007398号に記載の方法で合成した。

[0468] 参考例20

(13Z, 16Z)-N,N-ジメチル-4-(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)ドコサ-3, 13, 16-トリエン-1-アミン (化合物CL-20)

工程1

国際公開第2009/132131に記載の方法で合成したヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-オン (0.353 g, 0.186 mmol)のテトラヒドロフラン (0.882 mL)溶液に、アルゴン雰囲気下、無水セリウム(III)クロリド (東京化成工業社製, 0.174 g, 0.706 mmol)を加えた。その後、氷冷下にてシクロプロピルマグネシウム ブロミド(Sigma-Aldrich社製, 0.5 mmol/L, 1.06 mL, 0.529 mmol)を加え、5分攪拌した後、室温で1時間攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を無水

硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=97/3~94/6)で精製することにより、(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-19-シクロプロピルヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-オール (0.141 g, 収率70%)を得た。

ESI-MS m/z : 569

工程2

工程1で得られた(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-19-シクロプロピルヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-オール (0.141 g, 0.248 mmol)のジクロロメタン (2 mL)溶液に 室温にて臭化リチウム (Sigma-Aldrich社製, 0.108 g, 1.24 mmol)とクロロトリメチルシラン (東京化成工業社製, 0.135 g, 1.24 mmol)を加えて1時間攪拌した。その後、臭化リチウム (Sigma-Aldrich社製, 0.108 g, 1.24 mmol)とクロロトリメチルシラン (東京化成工業社製, 0.135 g, 1.24 mmol)を追加で加えて1時間攪拌した。

反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、水層をヘキサンで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=100/0~90/10で精製することにより、(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-19-(3-ブロモプロピリデン)ヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テトラエン (0.074 g, 収率47%)を得た。

ESI-MS m/z : 632

工程3

工程2で得られた(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-19-(3-ブロモプロピリデン)ヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テトラエン (0.074 g, 0.117 mmol)にジメチルアミン (Sigma-Aldrich社製, 2.0 mmol/L テトラヒドロフラン溶液, 1.5 mL, 3.0 mmol)を加え、マイクロウェーブ照射下にて90分130℃で加熱攪拌した。反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、水層をヘキサンで抽出した。有機層を飽和食塩水にて洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣をNHシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキ

サン/酢酸エチル=97/3~88/12で精製することにより、CL-20 (0.062 g, 収率 69%)を得た。

ESI-MS m/z : 596

[0469] 参考例21

(S)-2-アミノ-3-ヒドロキシ-N,N-ビス(2-(((Z)-オクタデカ-9-エン-1-イル)オキシ)エチル)プロパンアミド (化合物CL-21)

CL-21は、国際公開第2011/136368号に記載の方法で合成した。

[0470] 参考例22

(3R, 4R)-3, 4-ビス(((11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエン-1-イル)オキシ)ピロリジン (化合物CL-22)

CL-22は、国際公開第2011/136368号に記載の方法で合成した。

[0471] 参考例23

trans-3, 4-ビス((((11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエン-1-イル)オキシ)メチル)-1-メチルピロリジン (化合物CL-23)

CL-23は、国際公開第2011/136368号に記載の方法で合成した。

[0472] 参考例24

1-((S)-2, 3-ビス(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)プロピル)ピロリジン (化合物CL-24)

CL-24は、国際公開第2009/129395号に記載の方法で合成した。

[0473] 参考例25

2-(2, 2-ジ((9Z, 12Z)-オクタエカ-9, 12-ジエン-1-イル)-1, 3-ジオキソラン-4-イル)-N,N-ジメチルエタン-1-アミン (化合物CL-25)

CL-25は、国際公開第2010/042877号に記載の方法で合成した。

[0474] 参考例26

3-(ジメチルアミノ)プロピル ジ((9Z, 12Z)-オキサデカ-9, 12-ジエン-1-イル)カルバマート (化合物CL-26)

CL-26は、国際公開第2014/007398号に記載の方法で合成した。

[0475] 参考例27

4-(ジメチルアミノ)ブチル ジ((9Z, 12Z)-オキサデカ-9, 12-ジエン-1-イル)カルバマート (化合物CL-27)

CL-27は、国際公開第2014/007398号に記載の方法で合成した。

[0476] 参考例28

2-(ジ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)アミノ)エタン-1-オール (化合物CL-28)

CL-28は、国際公開第2014/007398号に記載の方法で合成した。

[0477] 参考例29

2-(ジメチルアミノ)-3-(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)-2-(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)メチル)プロパン-1-オール (化合物CL-29)

CL-29は、国際公開第2011/149733号に記載の方法で合成した。

[0478] 参考例30

(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-N, N-ジメチルヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-アミン (化合物CL-30)

CL-30は、国際公開第2010/054405号に記載の方法で合成した。

[0479] 参考例31

N, N, 2-トリメチル-1, 3-ビス(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)プロパン-2-アミン (化合物CL-31)

参考例9の工程1で得られた2-メチル-1, 3-ビス((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ)プロパン-2-アミン (0.240 g, 0.399 mmol)を1,2-ジクロロエタン (1 mL)とメタノール (1 mL)の混合溶媒に溶解させ、ホルムアルデヒド (和光純薬工業社製, 37%水溶液, 0.144 mL, 1.99 mmol)、ナトリウムトリアセトキシボロヒドリド (東京化成工業社製, 0.211 g, 0.997 mmol)を加え、室温で一晩攪拌した。反応混合物に水を加え、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムで洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣をNHシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=99/1~80/20)で精製すること

により、化合物2 (0.191 g, 収率76%)を得た。

ESI-MS m/z : 630 ($M + H$)⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.89 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H), 0.95 (s, 3H), 1.26–1.39 (m, 32H), 1.53–1.58 (m, 4H), 2.05 (q, $J = 6.9$ Hz, 8H), 2.31 (s, 6H), 2.77 (t, $J = 6.3$ Hz, 4H), 3.33–3.42 (m, 8H), 5.27–5.43 (m, 8H).

[0480] 参考例32

N-メチル-2-(((Z)-オクタデカ-6-エン-1-イル)オキシ)-N-(2-(((Z)-オクタデカ-6-エン-1-イル)オキシ)エチル)エタン-1-アミン (化合物CL-32)

CL-32は、国際公開第2011/136368号に記載の方法で合成した。

[0481] 参考例33

(3R, 4R)-3-(ジメチルアミノ)プロピル 3, 4-ビス((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルオキシ)ピロリジン-1-カルボキシラート (化合物CL-33)

工程1

水素化ナトリウム(油性, 60%, 5.80 g, 145 mmol)のトルエン(100 mL)懸濁液に、(3R, 4R)-1-ベンジルピロリジン-3, 4-ジオール(Diverchim S.A. 社製、3.50 g, 18.1 mmol)のトルエン (70 mL)溶液を攪拌しながら添加した後、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル メタンスルホナート(15.6 g, 45.3 mmol)のトルエン(30 mL)溶液を滴下した。得られた混合物を加熱還流下終夜攪拌した。室温まで冷却後、反応を飽和塩化アンモニウム基水溶液で停止した。得られた混合物に飽和食塩水を加え、酢酸エチルで2回抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(メタノール/クロロホルム=0/100~2/98)で精製することにより(3R, 4R)-1-ベンジル-3, 4-ビス((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルオキシ)ピロリジン(6.96 g, 10.1 mmol, 収率56%)を得た。

ESI-MS m/z : 691 ($M + H$)⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H), 1.26–1.38 (m, 30H), 1.52–1.62 (m, 6H), 2.05 (q, $J = 6.3$ Hz, 8H), 2.50 (dd, $J = 9.9, 4.3$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J = 5.8$ Hz, 4H), 2.85 (dd, $J = 9.6, 5.9$ Hz, 2H), 3.37–3.45 (m, 4H), 3.52–3.66 (m, 2H), 3.83 (t, $J = 4.$

6 Hz, 2H), 5.28-5.43 (m, 8H), 7.23-7.33 (m, 5H).

工程2

工程1で得られた(3R, 4R)-1-ベンジル-3, 4-ビス((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルオキシ)ピロリジン (6.96 g, 10.1 mmol)を1, 2-ジクロロエタン (100mL)に溶解させ、クロロギ酸1-クロロエチル(3.30 mL, 30.3 mmol)を加え130℃で1時間攪拌した。反応溶液にメタノール(100 mL)を加え、130℃でさらに1時間攪拌した。室温まで冷却後、減圧下濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール=100/0~92/8)で精製した。得られた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、次いで飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過し、減圧下濃縮することで(3R, 4R)-3, 4-ビス((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルオキシ)ピロリジン(5.56 g, 9.27 mmol, 収率92%)を得た。

ESI-MS m/z : 601 ($M + H$)⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H), 1.29-1.41 (m, 30H), 1.49-1.60 (m, 4H), 1.67 (br s, 3H), 2.05 (q, $J = 6.5$ Hz, 8H), 2.75-2.85 (m, 6H), 3.09 (dd, $J = 12.4, 5.1$ Hz, 2H), 3.37-3.49 (m, 4H), 3.76 (dd, $J = 5.0, 3.3$ Hz, 2H), 5.28-5.43 (m, 8H).

工程3

参考例4の工程2と同様の方法で、ジ((Z)-オクタデカ-9-エニル)アミンの代わりに工程2で得られた(3R, 4R)-3, 4-ビス((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルオキシ)ピロリジン(0.111 g, 0.185 mmol)を用いて、標記の化合物 (0.101 g, 0.139 mmol, 75%) を得た。

ESI-MS m/z : 730 ($M + H$)⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H), 1.24-1.40 (m, 32H), 1.50-1.57 (m, 4H), 1.77-1.83 (m, 2H), 2.02-2.08 (m, 8H), 2.23 (s, 6H), 2.34 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J = 6.8$ Hz, 4H), 3.38-3.56 (m, 8H), 3.83-3.86 (m, 2H), 4.11 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 5.30-5.42 (m, 8H).

[0482] 参考例34

(9Z, 12Z)-N-(2-(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)エチル)

オクタデカ-9, 12-ジエン-1-アミン(化合物CL-34)

CL-34は、国際公開第2014/007398号に記載の方法で合成した。

[0483] 参考例35

(9Z, 12Z)-N-(2-(((Z)-ヘキサデカ-9-エン-1-イル) オキシ)エチル)オクタデカ-9, 12-ジエン-1-アミン (化合物CL-35)

CL-35は、国際公開第2014/007398号に記載の方法で合成した。

[0484] 参考例36

N, N-ジメチル-1, 3-ビス(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)プロパン-2-アミン (化合物CL-36)

CL-36は、国際公開第2009/129385号に記載の方法で合成した。

[0485] 参考例37

3-(ジメチルミノ)プロピル ジ((Z)-オクタデカ-9-エニル)カルバマート(化合物CL-37)

工程1

アンモニア(東京化成工業社製、約2 mol/Lメタノール溶液、12.0 mL、24.0 mmol)に、(Z)-オクタデカ-9-エニル メタンスルホナート(1.04 g, 3.00 mmol)を加え、マイクロ波反応装置を用いて130℃で3時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えてクロロホルムで5回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過し、減圧濃縮することで(Z)-オクタデカ-9-エニルアミンの粗生成物を得た。

得られた粗生成物に(Z)-オクタデカ-9-エニル メタンスルホナート(0.832 g, 2.40 mmol)および50%水酸化ナトリウム水溶液(0.960 g、12.0 mmol)を加え、油浴上110℃で60分間攪拌した。室温まで冷却後、反応液を酢酸エチルで希釈し、水、ついで飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール=100/0~95/5)で精製することにより、ジ((Z)-オクタデカ-9-エニル)アミン (0.562 g, 1.085 mmol, 収率36%)を得た。

ESI-MS m/z : 519(M + H)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.88(t, J = 6.7 Hz, 6H), 1.2

9(br s, 45H), 1.41–1.52(m, 4H), 1.97–2.05(m, 8H), 2.58(t, $J = 7.2$ Hz, 4H), 5.28–5.40(m, 4H).

工程2

工程1で得られるジ((Z)-オクタデカ-9-エニル)アミン (0.156 g、0.301 mmol)をクロロホルム(3 mL)に溶解させ、“ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー(J. Am. Chem. Soc.)”, 1981年, 第103巻, p. 4194–4199記載の方法に準じた方法で合成した3-(ジメチルアミノ)プロピル 4-ニトロフェニル カルボナート塩酸塩 (0.138 g、0.452 mmol)およびトリエチルアミン(0.168 mL, 1.21 mmol)を加え、マイクロ波反応装置を用いて110℃で60分間攪拌した。反応液に3-(ジメチルアミノ)プロピル 4-ニトロフェニル カルボナート塩酸塩 (22.9 mg、0.0753 mmol)を加え、マイクロ波反応装置を用いて110℃で20分間攪拌した。反応液に3-(ジメチルアミノ)プロピル 4-ニトロフェニル カルボナート塩酸塩 (22.9 mg、0.0753 mmol)を加え、マイクロ波反応装置を用いて110℃で20分間攪拌した。反応液に3-(ジメチルアミノ)プロピル 4-ニトロフェニル カルボナート塩酸塩 (22.9 mg、0.0753 mmol)を加え、マイクロ波反応装置を用いて110℃で20分間攪拌した。反応液をクロロホルムで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、ついで飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。得られた残渣を少量のn-ヘキサン/酢酸エチル(1/4)に溶解してアミノ修飾シリカゲルのパッドに吸着させ、n-ヘキサン/酢酸エチル(1/4)で溶出し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール=100/0~95/5)で精製することで標記の化合物 (0.173 g, 0.267 mmol, 収率89%)を得た。

ESI-MS m/z : 648($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.88(t, $J = 6.6$ Hz, 6H), 1.28(br s, 44H), 1.45–1.55(m, 4H), 1.75–1.85(m, 2H), 1.97–2.04(m, 8H), 2.23(s, 6H), 2.34(t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.13–3.24(m, 4H), 4.10(t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 5.28–5.40(m, 4H).

(11Z, 14Z)-N-(2-(((Z)-オクタデカ-9-エン-1-イル)オキシ)エチル)イコサ-11, 14-ジエン-1-アミン (化合物CL-38)

CL-38は、国際公開第2014/007398号に記載の方法に準ずる方法で合成した。
。

ESI-MS m/z: 588

[0487] 参考例39

(9Z, 12Z)-N-(2-(((Z)-イコサ-11-エン-1-イル)オキシ)エチル)オクタデカ-9, 12-ジエン-1-アミン (化合物CL-39)

CL-39は、国際公開第2014/007398号に記載の方法に準ずる方法で合成した。
。

ESI-MS m/z: 588

[0488] 参考例40

(11Z, 14Z)-N-(2-(((Z)-イコサ-11-エン-1-イル)オキシ)エチル)イコサ-11, 14-ジエン-1-アミン (化合物CL-40)

CL-40は、国際公開第2014/007398号に記載の方法に準ずる方法で合成した。
。

ESI-MS m/z: 616

[0489] 参考例41

(Z)-N-(2-(((Z)-オクタデカ-9-エン-1-イル)オキシ)エチル)オクタデカ-9-エン-1-アミン (化合物CL-41)

CL-41は、国際公開第2014/007398号に記載の方法に準ずる方法で合成した。
。

ESI-MS m/z: 562

[0490] 参考例42

ビス(2-(((11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエン-1-イル)オキシ)エチル)アミン (化合物CL-42)

CL-42は、国際公開第2011/136368号に記載の方法に準ずる方法で合成した。
。

ESI-MS m/z : 658

[0491] 参考例43

(Z)-N-(2-(((Z)-オクタデカ-9-エン-1-イル)オキシ)エチル)ヘキサデカ-9-エン-1-アミン (化合物CL-43)

CL-43は、国際公開第2014/007398号に記載の方法に準ずる方法で合成した。
。

ESI-MS m/z : 534

[0492] 参考例44

(Z)-N-(2-(オクタデカ-9-エン-1-イルオキシ)エチル)オクタデカン-1-アミン
(化合物CL-44)

CL-44は、国際公開第2014/007398号に記載の方法に準ずる方法で合成した。
。

ESI-MS m/z : 564

[0493] 参考例45

(Z)-N-(2-(オクタデカ-9-エン-1-イルオキシ)エチル)テトラデカン-1-アミン
(化合物CL-45)

CL-45は、国際公開第2014/007398号に記載の方法に準ずる方法で合成した。
。

ESI-MS m/z : 508

[0494] 参考例46

3-((3R, 4R)-3, 4-ビス(((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)オキシ)ピロリジン-1-イル)プロパン-1, 2-ジオール (化合物CL-46)

CL-46は、国際公開第2011/136368号に記載の方法で合成した。

[0495] 参考例47

ビス(2-(((Z)-オクタデカ-9-エン-1-イル)オキシ)エチル)アミン (化合物CL-47)

CL-47は、国際公開第2011/136368号に記載の方法で合成した。

[0496] 参考例48

3-(ビス(2-(((Z)-オクタデカ-9-エン-1-イル)オキシ)エチル)アミノ)プロパン-1,2-ジオール (化合物CL-48)

CL-48は、国際公開第2011/136368号に記載の方法で合成した。

[0497] 参考例49

3-(ビス(2-(((Z)-オクタデカ-9-エン-1-イル)オキシ)エチル)アミノ)プロパンアミド (化合物CL-49)

CL-49は、国際公開第2011/136368号に記載の方法で合成した。

[0498] 参考例50

(9Z, 12Z)-N-(2-(2-(((Z)-オクタデカ-9-エン-1-イル)オキシ)エトキシ)エチル)オクタデカ-9,12-ジエン-1-アミン (化合物CL-50)

CL-50は、国際公開第2014/007398号に記載の方法に準ずる方法で合成した。

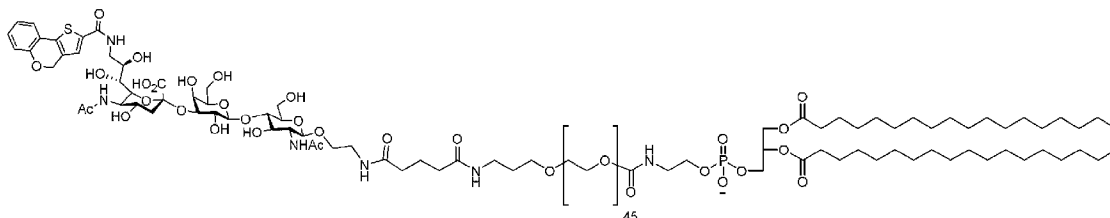
ESI-MS m/z : 604

[0499] 参考例51 (シグレックに結合可能なリガンドを有する脂質の合成)

以下の式に示されるシグレックに結合可能なリガンドを有する脂質を、J. Am. Chem. Soc., 2012, 134, 15696に記載の方法にしたがって、合成した。
以下参考例51で合成した脂質を、Siglec-1L-PEG-DSPEとも記載する。

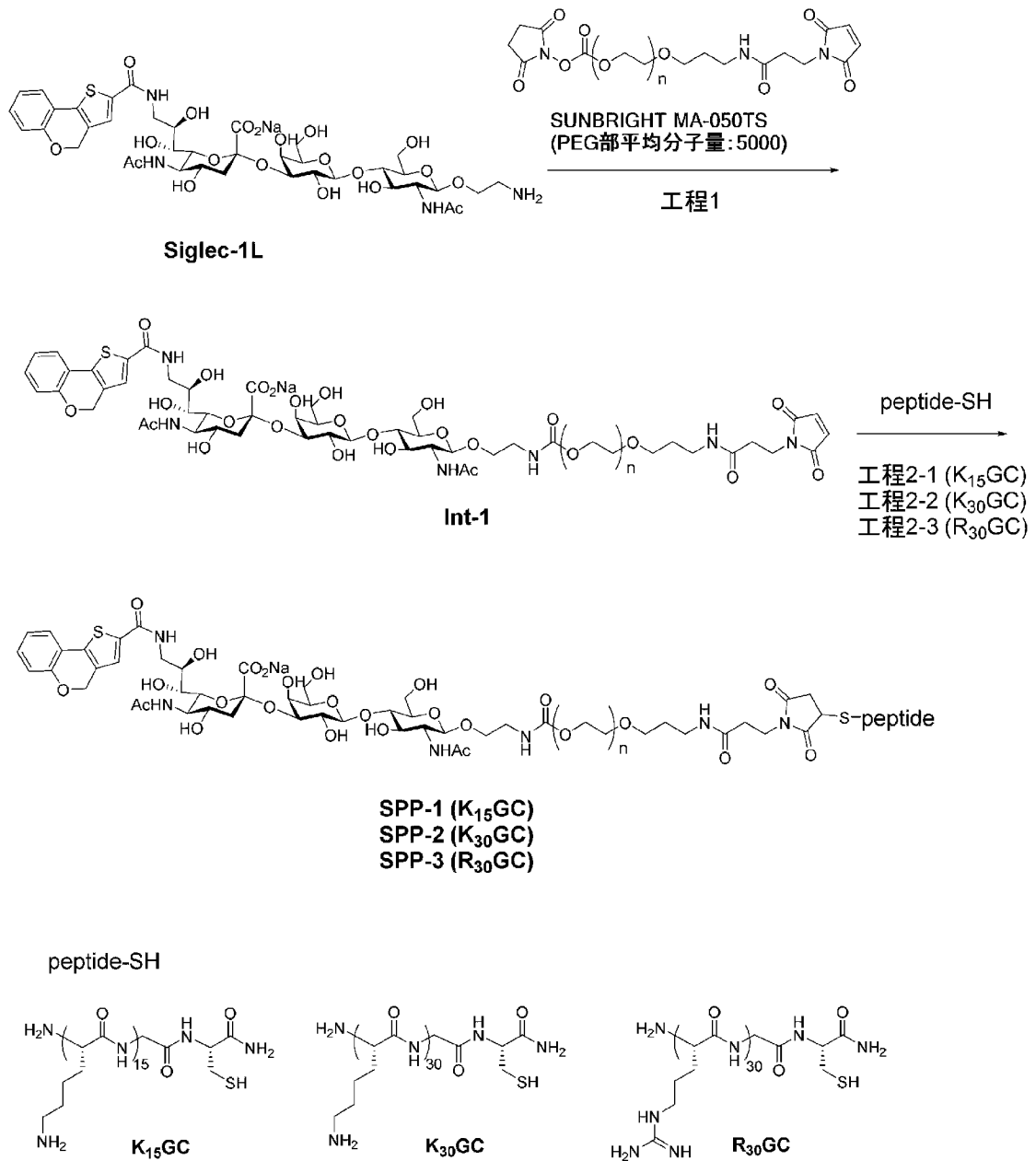
合成により得られたSiglec-1L-PEG-DSPEは、J. Am. Chem. Soc., 2012, 134, 15696に記載のスペクトルデータと一致した。

[0500] [化78]



[0501] 以下、参考例52～63に、シグレックに結合可能なリガンド (Siglec-1L) を有するカチオン性ポリマー SPP-1～12の合成を示す。下記に記載される各PEG部は単一の分子量ではなく、分子量に分布が存在するが、MSスペクトルにおいては、各PEG部の平均分子量の数値(5000 または2000)を用いて計算した。

[0502] [化79]

[0503] 参考例52 Siglec-1L-PEG5000-K₁₅GC (化合物SPP-1)の合成

工程1

J. Am. Chem. Soc., 2012, 134, 15696に記載の方法で合成した、Siglec-1 L (4.9 mg, 5.3 μ mol, 保持時間; 0.94分 (HPLC条件A), 5.16分 (HPLC条件B)) のN,N-ジメチルホルムアミド(200 μ L) 溶液に対し、SUNBRIGHT MA-050TS (日油社製, PEGユニット平均分子量5000, 19 mg, 3.5 μ mol, 保持時間; 1.4

2分(HPLC条件A), 4.46分(HPLC条件B))のN,N-ジメチルホルムアミド(200 μ L)溶液を加え1時間静置した。HPLCにて化合物Int-1(保持時間; 1.41分(HPLC条件A), 5.16分(HPLC条件B))の生成およびSUNBRIGHT MA-050TSの消失を確認後、反応溶液をそのまま次の工程に用いた。

[0504] HPLC条件A

カラム; Waters社製 ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm

カラム温度; 40 $^{\circ}$ C

溶媒A; 0.1 %ギ酸水溶液、溶媒B; アセトニトリル、流速; 0.8 mL /分

グラジエント; 溶媒A / 溶媒B = 90/10 $\rightarrow$ 10/90 (1.7分間)

[0505] HPLC条件B

カラム; Agilent社製 Porshell 120 EC-C8, 2.7 μ m, 4.6 x 50 mm

カラム温度; 40 $^{\circ}$ C

溶媒A; 0.1 %ギ酸水溶液、溶媒B; イソプロパノール、流速; 0.8 mL /分

グラジエント; 溶媒A / 溶媒B = 95/5 $\rightarrow$ 60/40 (8分間)

[0506] 工程2-1

工程1で得られた化合物Int-1溶液に対して10 Mの酢酸 - N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (2.0 μ L) を添加した後、K₁₅GCペプチド (東レ社製, 11 mg, 5.3 μ mol, 保持時間; 0.17分 (HPLC条件A))のN,N-ジメチルホルムアミド (100 μ L)溶液を加え2時間静置した。HPLCにて反応終了を確認後、反応液を水で希釈し、Vivaspin6 5K (ザルトリウス社製) により溶媒を水に置換した。Sep-Pak (登録商標) 6cc C18 Cartridge (Waters社製, 30 %アセトニトリル水溶液で溶出)にて精製し、凍結乾燥により化合物SPP-1 (17 mg, 2.0 μ mol, 2工程57 %, 保持時間; 1.12分 (HPLC条件A))を白色固体として得た。

[0507] 参考例53 Siglec-1L-PEG5000-K₃₀GC (化合物SPP-2)の合成

工程2-2

Siglec-1L (5.2 mg, 5.6 μ mol)とSUNBRIGHT MA-050TS (20 mg, 3.8 μ mol)を用いて参考例52の工程1と同様にして化合物Int-1溶液を得た。その反応溶液及びK₃₀GCペプチド (東レ社製, 15 mg, 3.8 μ mol, 保持時間; 0.15分 (HPL

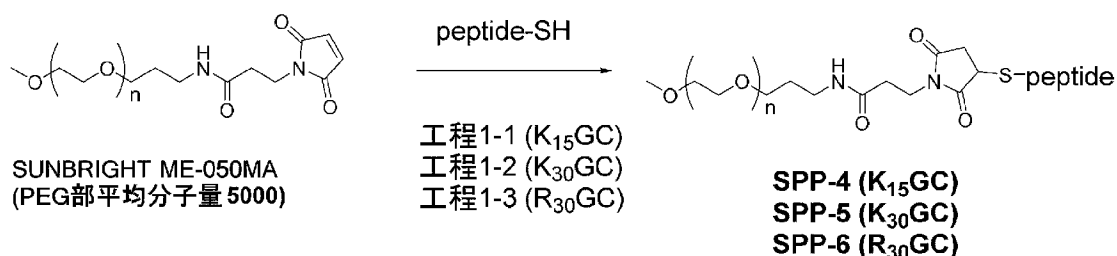
C条件A))を用いて、参考例52の工程2-1と同様にして化合物SPP-2 (25 mg, 2.5 μmol , 2工程66 %, 保持時間; 1.01分 (HPLC条件A))を白色固体として得た。

[0508] 参考例54 Siglec-1L-PEG5000- R_{30}GC (化合物SPP-3)の合成

工程2-3

Siglec-1L (5.2 mg, 5.6 μmol)とSUNBRIGHT MA-050TS (20 mg, 3.8 μmol)を用いて、参考例52の工程1と同様にして化合物Int-1溶液を得た。その反応溶液及び R_{30}GC ペプチド (東レ社製, 18 mg, 3.8 μmol , 保持時間; 0.15分 (HPLC条件A))を用いて、参考例52の工程2-1と同様にして化合物SPP-3 (28 mg, 2.5 μmol , 2工程66 %, 保持時間; 1.01分 (HPLC条件A))を白色固体として得た。

[0509] [化80]



[0510] 参考例55 PEG5000- K_{15}GC (化合物SPP-4)の合成

工程1-1

SUNBRIGHT ME-050MA (日油社製, PEGユニット平均分子量5000, 7.0 mg, 1.3 μmol , 保持時間; 4.61分 (HPLC条件B))のN,N -ジメチルホルムアミド (100 μL)溶液に対して10 Mの酢酸 - N,N -ジメチルホルムアミド溶液 (2.0 μL)を添加した後、 K_{15}GC ペプチド (4.2 mg, 2.0 μmol)のN,N -ジメチルホルムアミド (100 μL)溶液を加え2時間静置した。HPLCにて反応終了を確認後、反応液を水で希釈し、Amicon Ultra-4 3K (Waters社製)により溶媒を水に置換した。Sep-Pak (登録商標) 6cc C18 Cartridge (Waters社製, 30 %アセトニトリル水溶液で溶出)にて精製し、凍結乾燥により化合物SPP-4 (7.2 mg, 1.0 μmol , 77 %, 保持時間; 3.30分 (HPLC条件B))を白色固体として得た。

[0511] 参考例56 PEG5000-K₃₀GC (化合物SPP-5)の合成

工程1-2

SUNBRIGHT ME-050MA (6.0 mg, 1.1 μmol)とK₃₀GCペプチド (6.9 mg, 1.7 μmol)を用いて、参考例55の工程1-1と同様にして化合物SPP-5を白色固体として得た (6.0 mg, 0.65 μmol , 59 %, 保持時間; 3.04分 (HPLC条件B))。

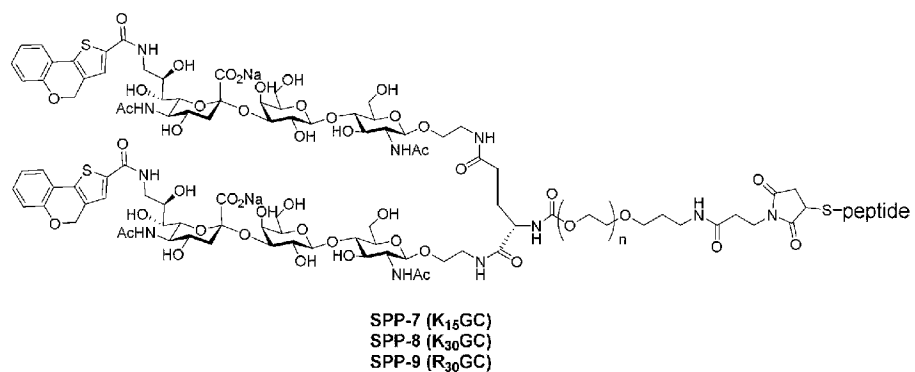
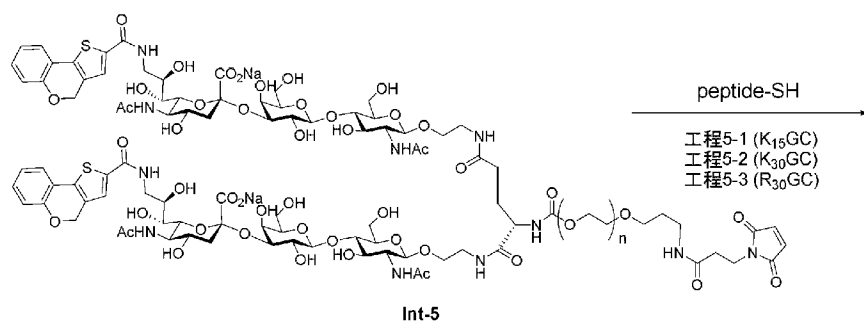
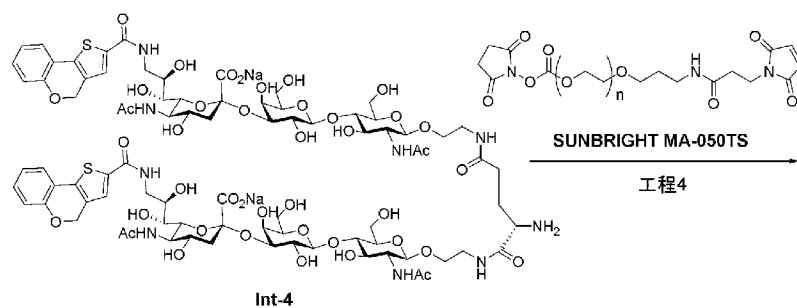
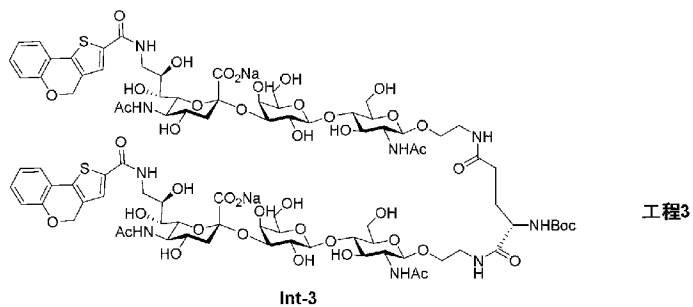
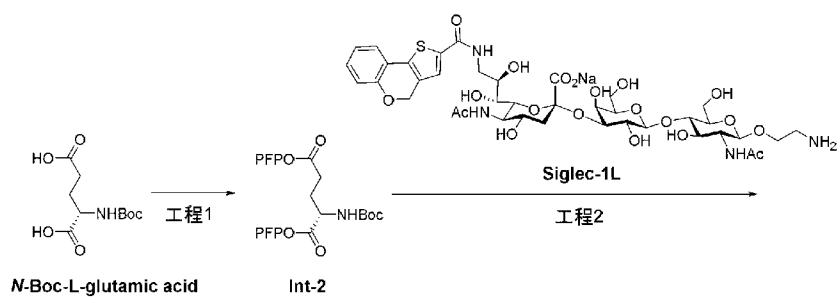
[0512] 参考例57 PEG5000-R₃₀GC (化合物SPP-6)の合成

工程1-3

SUNBRIGHT ME-050MA (5.0 mg, 1.0 μmol)とR₃₀GCペプチド (6.0 mg, 1.2 μmol)を用いて、参考例55の工程1-1と同様にして化合物SPP-6を白色固体として得た (5.8 mg, 0.57 μmol , 57 %, 保持時間; 3.09分 (HPLC条件B))

[0513]

[化81]



[0514] 参考例58 (Siglec-1L)₂-PEG5000-K₁₅GC (SPP-7)の合成

工程1

N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-グルタミン酸 (250 mg, 1.0 mmol) をジクロロメタン (5.1 mL) に懸濁させ、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (1.8 mL, 10 mmol) 及びトリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニルエステル (700 μ L, 4.0 mmol) を加え、室温で30分間攪拌した。飽和重曹水で反応を停止し、酢酸エチルで抽出を行った。得られた有機層を飽和重曹水で3回、水で1回、飽和食塩水で1回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下濃縮することにより化合物Int-2 (600 mg) を白色固体として得た。

Int-2の質量分析において、ESI-MS m/z: 480.2 (M-Boc+H)⁺のピークが見られた。

工程2

Siglec-1L (71 mg, 76 μ mol) をN,N-ジメチルホルムアミド (1.4 mL) に溶解し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (30 μ L, 170 μ mol) 及び工程1で得られた化合物Int-2 (20 mg, 35 μ mol) を加え、2時間室温で攪拌した。Siglec-1L (4.8 mg, 8.3 μ mol) を追加した後、更に30分間室温で攪拌した。反応溶液を水 (16 mL) で希釈した後、Sep-Pak (登録商標) Vac 35cc C18 Cartridge (Waters社製, 40 %アセトニトリル水溶液で溶出) により精製し、化合物Int-3 (76 mg) を白色固体として得た。

Int-3の質量分析において、ESI-MS m/z: 2071.8 (M-2Na+H)⁻のピークが見られた。

工程3

工程2で得られた化合物Int-3 (73 mg, 35 μ mol) を水 (880 μ L) に溶解し、6 M塩酸水溶液 (880 μ L) を加えて室温で30分間攪拌した。2 M水酸化ナトリウム水溶液 (2.6 mL) で中和した後、Sep-Pak (登録商標) Vac 35cc C18 Cartridge (Waters社製, 40 %アセトニトリル水溶液で溶出) により精製し、化合物Int-4 (60 mg, 30 μ mol, 86 %) を白色固体として得た。

Int-4の質量分析において、ESI-MS m/z: 1971.5 (M-2Na+H)⁻のピークが見ら

れた。

工程4

工程3で得られた化合物Int-4 (3.3 mg, 1.7 μmol , 保持時間; 1.12分 (HPLC条件A), 5.95分 (HPLC条件B))及びSUNBRIGHT MA-050TS (6.0 mg, 1.1 μmol)を用いて参考例52の工程1と同様にして化合物Int-5溶液 (保持時間; 5.54分 (HPLC条件B))を得た。

工程5-1

工程4で得られた化合物Int-5溶液及びK₁₅GCペプチド (3.5 mg, 1.7 μmol)を用いて、参考例52の工程2と同様にして化合物SPP-7 (1.2 mg, 0.13 μmol , 2工程12%, 保持時間; 1.12分 (HPLC条件A))を白色固体として得た。

[0515] 参考例59 (Siglec-1L)₂-PEG5000-K₃₀GC (SPP-8)の合成

工程5-2

参考例58の工程3で得られた化合物Int-4 (2.8 mg, 1.4 μmol)とSUNBRIGHT MA-050TS (5.0 mg, 0.93 μmol)を用いて参考例58の工程4と同様にして化合物Int-5溶液を得た。その反応溶液及びK₃₀GCペプチド (5.6 mg, 1.4 μmol)を用いて参考例58の工程5-1と同様にして化合物SPP-8 (1.8 mg, 0.16 μmol , 2工程17 %, 保持時間; 1.04分 (HPLC条件A))を白色固体として得た。

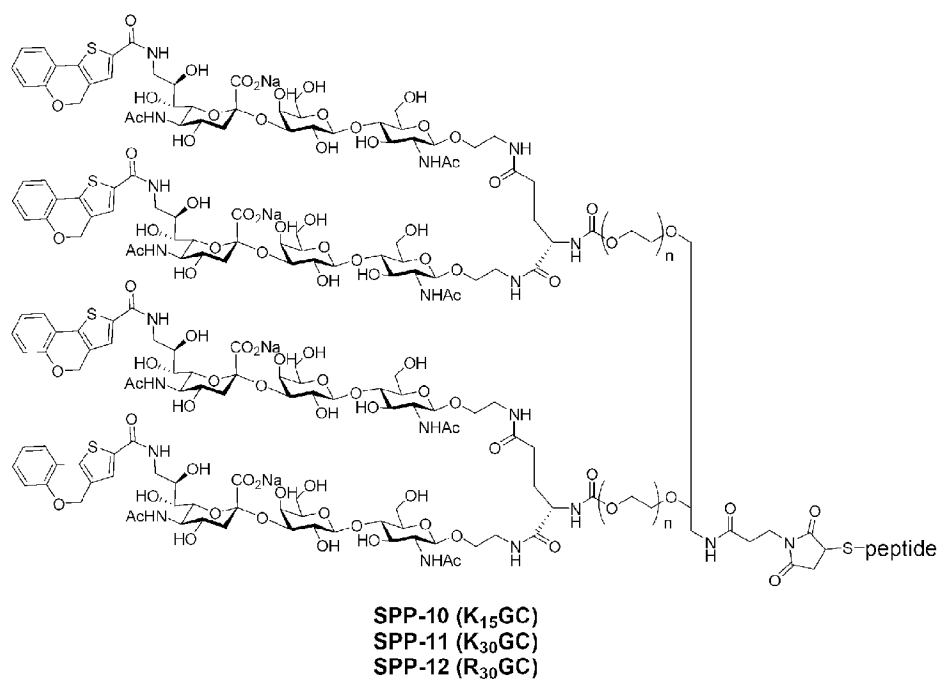
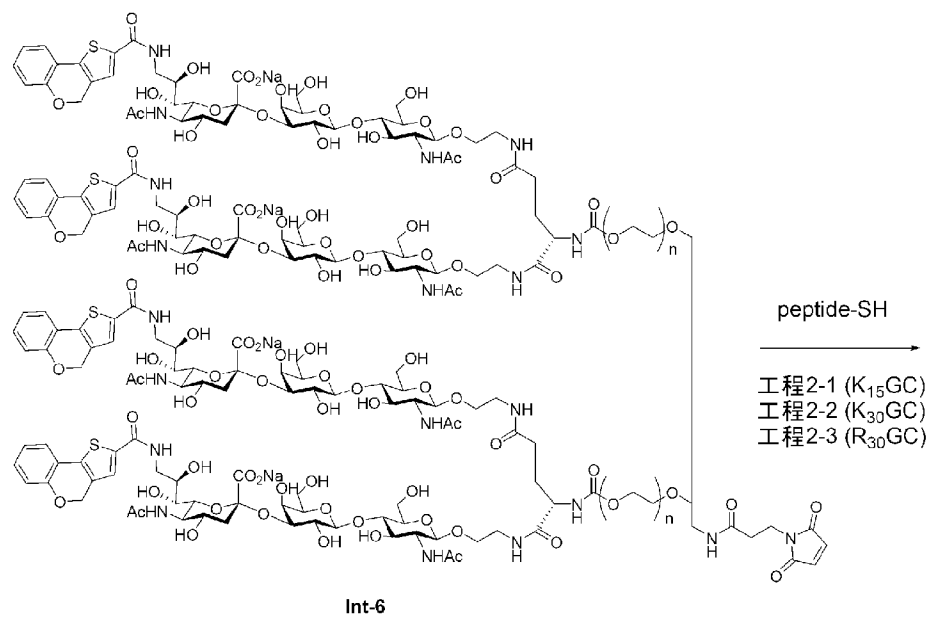
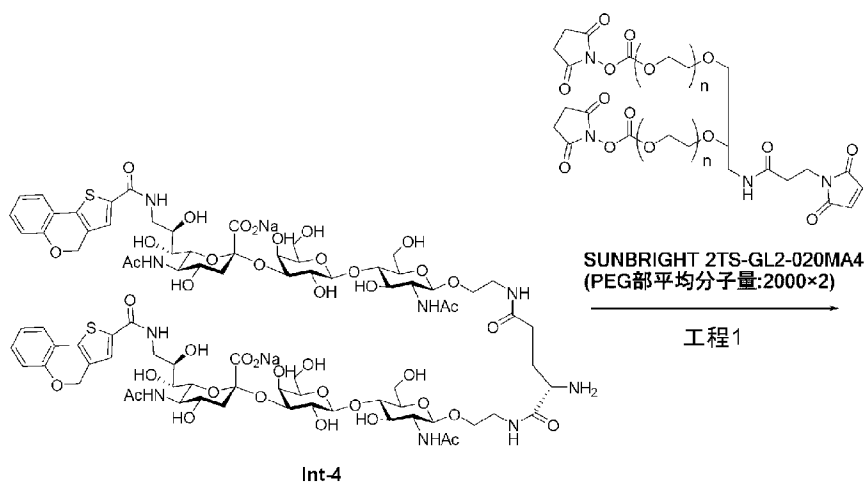
[0516] 参考例60 (Siglec-1L)₂-PEG5000-R₃₀GC (SPP-9)の合成

工程5-3

参考例58の工程3で得られた化合物Int-4 (2.5 mg, 1.3 μmol)とSUNBRIGHT MA-050TS (4.5 mg, 0.84 μmol)を用いて参考例58の工程4と同様にして化合物Int-5溶液を得た。その反応溶液及びR₃₀GCペプチド (6.1 mg, 1.3 μmol)を用いて参考例58の工程5-1と同様にして化合物SPP-9 (5.0 mg, 0.41 μmol , 2工程49 %, 保持時間; 1.02分 (HPLC条件A))を白色固体として得た。

[0517]

[化82]



[0518] 参考例61 ((Siglec-1L)₂-PEG2000)₂-K₁₅GC (SPP-10)の合成

工程1

参考例58の工程3で得られた化合物Int-4 (5.9 mg, 3.0 μmol)及びSUNBRIGHT 2TS-GL2-020MA4 (日油社製, PEG部の平均分子量2000×2, 3.0 mg, 1.2 μmol, 保持時間; 1.32分 (HPLC条件A), 4.01分 (HPLC条件B))を用いて、参考例52の工程1と同様にして化合物Int-6溶液 (保持時間; 1.42分 (HPLC条件A), 4.46分 (HPLC条件B))を得た。

[0519] 工程2-1

工程1で得られた化合物Int-6溶液及びK₁₅GCペプチド (3.8 mg, 1.8 μmol)を用いて、参考例52の工程2-1と同様にして化合物SPP-10 (7.4 mg, 0.89 μmol, 2工程74%, 保持時間; 1.03分 (HPLC条件A))を白色固体として得た。

[0520] 参考例62 ((Siglec-1L)₂-PEG2000)₂-K₃₀GC (SPP-11)の合成

工程2-2

参考例58の工程3で得られた化合物Int-4 (4.9 mg, 2.5 μmol)とSUNBRIGHT 2TS-GL2-020MA4 (2.5 mg, 1.0 μmol)を用いて参考例61の工程1と同様にして化合物Int-6溶液を得た。その反応溶液及びK₃₀GCペプチド (4.8 mg, 1.2 μmol)を用いて参考例61の工程2-1と同様にして化合物SPP-11 (1.6 mg, 0.15 μmol, 2工程15%, 保持時間; 0.93分 (HPLC条件A))を白色固体として得た。

[0521] 参考例63 ((Siglec-1L)₂-PEG2000)₂-R₃₀GC (SPP-12)の合成

工程2-3

参考例58の工程3で得られた化合物Int-4 (4.9 mg, 2.5 μmol)とSUNBRIGHT 2TS-GL2-020MA4 (2.5 mg, 1.0 μmol)を用いて参考例61の工程1と同様にして化合物Int-6溶液を得た。その反応溶液及びR₃₀GCペプチド (5.8 mg, 1.2 μmol)を用いて参考例61の工程2-1と同様にして化合物SPP-12 (6.3 mg, 0.57 μmol, 2工程57%, 保持時間; 0.92分 (HPLC条件A))を白色固体として得た。

[0522] 以下、実施例1～6、及び比較例1は、ナノ粒子におけるSiglec-1L-PEG-DSPEの含有量、すなわち、ナノ粒子のSiglec-1L-PEG-DSPEの修飾率を変更した製剤調製例である。

[0523] [実施例1]

参考例51で得られた化合物Siglec-1L-PEG-lipid、参考例8で得られた化合物CL-8、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG-DSPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、およびコレステロールを用いて、以下のように核酸含有ナノ粒子を製造した。

核酸はセンス鎖(5' -AGCAAGGACUGGUCUUUCUAUCUCU-3')と、アンチセンス鎖(5' -AGAGAUAGAAAGACCAGUCCUUGCU-3')塩基配列からなる、 β 2-ミクログロブリン遺伝子の発現を抑制するsiRNAを用いた(以下、「B2M siRNA」ともいう)。PEG-DSPE、DOPE、コレステロールは日油から入手した。

B2M siRNAは蒸留水に溶解し、24mg/mLに調製して用いた。

CL-8とPEG-DSPEとの濃度比(CL-8/PEG-DSPE Na)が、57.26(mmol/L)/5.521(mmol/L)となるように、各脂質を塩酸およびエタノールを含有する水溶液に懸濁させ、vortex攪拌ミキサーで攪拌および、加温を繰り返して均一な懸濁液を得た。この懸濁液を室温下で0.2 μ mのポリカーボネートメンブランフィルターおよび0.05 μ mのポリカーボネートメンブランフィルターに通し、リード粒子の分散液を得た。粒子径測定装置(Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments社製)で得られたリード粒子の平均粒子径を測定し、30nmから100nmの範囲内であることを確認した。得られたリード粒子の分散液に、siRNA溶液を、3:1の体積比(=リード粒子の分散液:siRNA溶液)の割合で混合し、さらに3倍量の蒸留水を加えて混合することで核酸複合体粒子の分散液を調製した。

一方、CL-8と、PEG-DSPE Naと、DOPEと、コレステロールと、Siglec-1L-PEG-DSPEとの濃度比(CL-8/PEG-DSPE Na/DOPE/コレステロール/Siglec-1L-PEG-DSPE)が、14.72(mmol/L)/1.082(mmol/L)/4.008(mmol/L)/9.619(mmol/L)/0.007(mmol/L)となるように、各脂質を秤量し90vol%エタノールに溶解させ、脂質膜構成成分の溶液を調製した。

得られた脂質膜構成成分の溶液を加温した後、かかる脂質膜構成成分の溶液と、上記核酸複合体粒子の分散液とを、体積比1:1の割合で混合し、さらに

数倍量の蒸留水を混合し、粗製剤を得た。

得られた粗製剤はアミコンウルトラ(Millipore社製)を用いて濃縮し、さらに溶媒を生理食塩水に置換し、 $0.2\mu\text{m}$ のフィルター(東洋濾紙社製)を用いてクリーンベンチ内でろ過した。さらに、得られた製剤のsiRNA濃度を測定し、siRNA濃度で $10\mu\text{M}$ となるように生理食塩水を用いて希釈することで、製剤1を得た。

[0524] [実施例2]

参考例51で得られたSiglec-1L-PEG-lipidの含量を変えた核酸含有製剤を、以下のように製造した。

製剤1の脂質膜構成成分の溶液を、CL-8と、PEG-DSPE Naと、DOPEと、コレステロールと、Siglec-1L-PEG-DSPEとの濃度比 (CL-8/PEG-DSPE Na/DOPE/コレステロール/Siglec-1L-PEG-DSPE) を $14.72\text{ (mmol/L)}/1.067\text{ (mmol/L)}/4.008\text{ (mmol/L)}/9.619\text{ (mmol/L)}/0.022\text{ (mmol/L)}$ にした以外、実施例1と同様にして製剤2を得た。

[0525] [実施例3]

参考例51で得られたSiglec-1L-PEG-lipidの含量を変えた核酸含有製剤を、以下のように製造した。

製剤1の脂質膜構成成分の溶液を、CL-8と、PEG-DSPE Naと、DOPEと、コレステロールと、Siglec-1L-PEG-DSPEとの濃度比 (CL-8/PEG-DSPE Na/DOPE/コレステロール/Siglec-1L-PEG-DSPE) を $14.72\text{ (mmol/L)}/1.024\text{ (mmol/L)}/4.008\text{ (mmol/L)}/9.619\text{ (mmol/L)}/0.065\text{ (mmol/L)}$ にした以外、実施例1と同様にして製剤3を得た。

[0526] [実施例4]

参考例51で得られたSiglec-1L-PEG-lipidの含量を変えた核酸含有製剤を、以下のように製造した。

製剤1の脂質膜構成成分の溶液を、CL-8と、PEG-DSPE Naと、DOPEと、コレステロールと、Siglec-1L-PEG-DSPEとの濃度比 (CL-8/PEG-DSPE Na/DOPE/コレステロール/Siglec-1L-PEG-DSPE) を $14.72\text{ (mmol/L)}/0.893\text{ (mmol/L)}/4.008\text{ (mmol/L)}/9.619\text{ (mmol/L)}/0.065\text{ (mmol/L)}$ にした以外、実施例1と同様にして製剤4を得た。

mmol/L)/9.619(mmol/L)/0.196(mmol/L)にした以外、実施例1と同様にして製剤4を得た。

[0527] [実施例5]

参考例51で得られたSiglec-1L-PEG-lipidの含量を変えた核酸含有製剤を、以下のように製造した。

製剤1の脂質膜構成成分の溶液を、CL-8と、PEG-DSPE Naと、DOPEと、コレステロールと、Siglec-1L-PEG-DSPEとの濃度比 (CL-8/PEG-DSPE Na/DOPE/コレステロール/Siglec-1L-PEG-DSPE) を14.72(mmol/L)/0.500(mmol/L)/4.008(mmol/L)/9.619(mmol/L)/0.589(mmol/L)にした以外、実施例1と同様にして製剤5を得た。

[0528] [実施例6]

参考例51で得られたSiglec-1L-PEG-lipidの含量を変えた核酸含有製剤を、以下のように製造した。

製剤1の脂質膜構成成分の溶液を、CL-8と、DOPEと、コレステロールと、Siglec-1L-PEG-DSPEとの濃度比 (CL-8/DOPE/コレステロール/Siglec-1L-PEG-DSPE) を14.72(mmol/L)/4.008(mmol/L)/9.619(mmol/L)/1.089(mmol/L)にした以外、実施例1と同様にして製剤6を得た。

[0529] [比較例1]

参考例51で得られたSiglec-1L-PEG-lipidを含まない核酸含有製剤を、以下のように製造した。

製剤1の脂質膜構成成分の溶液を、CL-8と、PEG-DSPE Naと、DOPEと、コレステロールとの濃度比 (CL-8/PEG-DSPE Na/DOPE/コレステロール) を14.72(mmol/L)/1.089(mmol/L)/4.008(mmol/L)/9.619(mmol/L)にした以外、実施例1と同様にして製剤7を得た。

[0530] [試験例1]

核酸含有脂質ナノ粒子の平均粒子径測定

粒子径測定装置 (Zetasizer Nano ZS, マルバーン (Malvern) 社製) で製剤中の核酸含有脂質ナノ粒子の平均粒子径およびゼータ電位を測定した (表

8)。なお表中のPDIは多分散指数(Polydispersity Index)を表す。

[0531] [表8]

製剤番号	サイズ (nm)	PDI	ゼータ 電位 (mV)
1	94.31	0.055	7.95
2	104.10	0.124	12.3
3	91.64	0.067	4.33
4	96.85	0.069	13.9
5	114.50	0.163	7.76
6	93.74	0.103	10.3
7	94.41	0.084	11.5

[0532] [試験例2]

核酸含有脂質ナノ粒子のヒト細胞株に対する標的遺伝子発現抑制作用を評価した。

実施例1～6および比較例1で得られた各核酸含有脂質ナノ粒子について、それぞれ以下の方法により、ヒト由来単球系細胞株THP-1(American Type Culture Collection由来)に対する標的遺伝子発現抑制作用を測定した。

THP-1細胞株は、10%ウシ胎児血清(FBS)を含むアールピーエムアイ1640培地(RPMI1640培地、ナカライテスク社製、30264-56)(以下10% FBS RPMI1640培地と記載)で維持継代し、500 U/mLのRecombinant Human IFN- α 2タンパク質(R&D社、11105-1)を含む10% FBS RPMI1640培地にて24時間培養することで、細胞膜上にSiglec-1を誘導した(以降、Siglec-1誘導THP-1と記載する)。

各核酸含有脂質ナノ粒子を最終濃度が30, 10, 3または1 nmol/Lとなるようにオプティメム (Opti-MEM、ギブコ(GIBCO)社、31985)で希釈し、96ウェルの浮遊細胞用培養プレート(コーニング社、3474)に20 μ Lずつ分注した後、オプティメムに懸濁させたSiglec-1誘導THP-1を細胞数12500/80 μ L/ウェルとなるように添加し、37°C、5%CO₂条件下で4時間培養することで、各核酸含有脂質ナノ粒子を細胞に導入した。また、陰性対照の群として何も処理しないSiglec-1誘導THP-1を同様に培養した。培養後の細胞を室温にて1800 rpm、3分間遠心し、培養上清を注意深く除去した後、10% FBS RPMI1640培地を添加し、37

℃、5%CO₂条件下でさらに20時間培養した。培養後の細胞を氷冷したリン酸緩衝化生理食塩水(ナカライテスク社、14249-24)で洗浄し、スーパープレップセルリシスアンドアールティーキットフォーキューピーシーアール(東洋紡社製、カタログ番号SCQ-201)を用いて、製品に添付された説明書に記載された方法に従い、全RNAの回収と、得られた全RNAを鋳型とする逆転写反応によるcDNAの作製とを行った。

得られたcDNAを鋳型とし、タックマンジーンエクスペッションアッセイズプローブ(アプライドバイオシステムズ社製)をプローブとして、クオントスタジオ12ケーフレックスリアルタイムピーシーアールシステム(ABI社製)を用い、添付された使用説明書に記載された方法に従ってPCR反応させることにより、ベータ2ミクログロブリン(Beta-2 microglobulin、以下B2Mと記載する)遺伝子および構成的発現遺伝子であるグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、以下GAPDHと記載する)遺伝子をPCR反応させてmRNA増幅量をそれぞれ測定し、GapdhのmRNA増幅量を内部対照として、B2MのmRNAの準定量値を算出した。同様に測定した陰性対照におけるB2MのmRNAの準定量値を1として、B2MのmRNAの準定量値から、B2MのmRNAの発現率を求めた。得られたB2MのmRNAの発現率を、陰性対照のB2M mRNA発現率に対する抑制率として表した結果を表9に示す。

[0533] [表9]

製剤番号	修飾率* (%)	B2M 遺伝子発現抑制率 (%)			
		1 nmol/L	3 nmol/L	10 nmol/L	30 nmol/L
1	0.018	4.03	8.39	11.12	36.21
2	0.053	-12.98	-11.23	-17.03	0.57
3	0.16	-13.17	-11.04	-7.08	5.60
4	0.48	3.35	8.919	24.81	41.91
5	1.4	49.80	68.92	79.79	84.79
6	2.6	55.45	73.83	85.07	86.96
7	0	-4.84	-6.11	2.38	9.03

[0534] Siglec-1L -PEG-DSPEのモル数を脂質ナノ粒子の総脂質モル数で除すること

で算出した。

[0535] これらの結果より、標的化素子(Siglec-1L-PEG-DSPE)を導入した製剤1-6は標的化素子を含まない製剤7と比較して遺伝子発現抑制活性の向上を示した。また、標的化素子の導入量に依存した遺伝子発現抑制活性の向上を示した。

[0536] 以下、実施例7～8および比較例2は、PEG脂質誘導体を変えた製剤調製例である。

[0537] [実施例7]

参考例51で得られた化合物Siglec-1L-PEG-lipidおよび参考例8で得られた化合物CL-8 (CL-8)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG-DMPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG-DSPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、コレステロールを用いて、以下のように核酸含有脂質ナノ粒子を製造した。

PEG-DMPEは日油から入手した。

製剤1のリード粒子製剤をCL-8/PEG-DMPE Na=57.26/5.521 mmol/Lにした以外、実施例5と同様にして製剤8を得た。

[0538] [実施例8]

参考例51で得られた化合物Siglec-1L-PEG-lipidおよび参考例8で得られた化合物CL-8 (CL-8)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG-DSG)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、コレステロールを用いて、以下のように核酸含有脂質ナノ粒子を製造した。

PEG-DSGは日油から入手した。

製剤5で使用されるPEG-DSPEをPEG-DSGにした以外、実施例5と同様にして製剤9を得た。

[0539] [比較例2]

製剤7のリード粒子製剤を、CL-8/PEG-DMPE Na=57.26/5.521 mmol/Lにした以外、比較例1と同様にして製剤10を得た。

[0540] [試験例3]

核酸含有脂質ナノ粒子の平均粒子径測定

粒子径測定装置 (Zetasizer Nano ZS, マルバーン (Malvern) 社製) で製剤中の核酸含有脂質ナノ粒子の平均粒子径およびゼータ電位を測定した (表 10)。なお表中のPDIは多分散指数(Polydispersity Index)を表す。

[0541] [表10]

製剤番号	サイズ (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)
8	120.0	0.165	15.1
9	119.50	0.073	15.6
10	92.53	0.080	16.2

[0542] [試験例4]

核酸含有脂質ナノ粒子のヒト細胞株に対する標的遺伝子発現抑制作用を評価した。

実施例7, 8および比較例2で得られた各核酸含有脂質ナノ粒子について、試験例2と同様の方法で標的遺伝子発現抑制作用を評価した。

得られたB2MのmRNAの発現率を、陰性対照のB2M mRNA発現率に対する抑制率として表した結果を表 11 に示す。

[0543] [表11]

製剤番号	B2M 遺伝子発現抑制率 (%)			
	1 nmol/L	3 nmol/L	10 nmol/L	30 nmol/L
8	58.69	78.63	90.62	93.76
9	74.70	81.08	85.95	92.77
10	ND※	ND※	34.89	51.46

※表中、NDは、Not Detectedを表す。

[0544] これらの結果より、標的化素子(Siglec-1L -PEG-DSPE)を導入した製剤8は標的化素子(Siglec-1L -PEG-DSPE)を含まない製剤10と比較して遺伝子発現抑制活性の向上を示した。また、PEG脂質誘導体を変換した製剤9は製剤8と同等

の遺伝子発現抑制活性を示した。

[0545] 以下、実施例9～13および比較例3～7に種々カチオン性脂質を用いた製剤調製例を示す。

[0546] [実施例9]

参考例51で得られた化合物Siglec-1L-PEG-lipidおよび参考例10で得られた化合物CL-10 (CL-10)、1,2-ジミリスティル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG-DMPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG-DSPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、コレステロールを用いて、以下のように核酸含有脂質ナノ粒子を製造した。

製剤8のCL-8をCL-10にした以外、実施例7と同様にして製剤11を得た。

[0547] [実施例10]

参考例51で得られた化合物Siglec-1L-PEG-lipidおよび参考例26で得られた化合物CL-26 (CL-26)、1,2-ジミリスティル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG-DMPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG-DSPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、コレステロールを用いて、以下のように核酸含有脂質ナノ粒子を製造した。

製剤8のCL-8をCL-26にした以外、実施例7と同様にして製剤12を得た。

[0548] [実施例11]

参考例51で得られた化合物Siglec-1L-PEG-lipidおよび参考例6で得られた化合物CL-6 (CL-6)、1,2-ジミリスティル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG-DMPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG-DSPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、コレステロールを用いて、以下のように核酸含

有脂質ナノ粒子を製造した。

製剤8のCL-8をCL-6にした以外、実施例7と同様にして製剤13を得た。

[0549] [実施例12]

参考例51で得られた化合物Siglec-1L-PEG-lipidおよび参考例7で得られた化合物CL-7 (CL-7)、1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG-DMPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG-DSPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、コレステロールを用いて、以下のように核酸含有脂質ナノ粒子を製造した。

製剤8のCL-8をCL-7にした以外、実施例7と同様にして製剤14を得た。

[0550] [実施例13]

参考例51で得られた化合物Siglec-1L-PEG-lipidおよび参考例9で得られた化合物CL-9 (CL-9)、1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG-DMPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG-DSPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、コレステロールを用いて、以下のように核酸含有脂質ナノ粒子を製造した。

製剤8のCL-8をCL-9にした以外、実施例7と同様にして製剤15を得た。

[0551] [比較例3]

製剤10のCL-8をCL-10にした以外、比較例2と同様にして製剤16を得た。

[0552] [比較例4]

製剤10のCL-8をCL-26にした以外、比較例2と同様にして製剤17を得た。

[0553] [比較例5]

製剤10のCL-8をCL-6にした以外、比較例2と同様にして製剤18を得た。

[0554] [比較例6]

製剤10のCL-8をCL-7にした以外、比較例2と同様にして製剤19を得た。

[0555] [比較例7]

製剤10のCL-8をCL-9にした以外、比較例2と同様にして製剤20を得た。

[0556] [試験例5]

核酸含有脂質ナノ粒子の平均粒子径測定

粒子径測定装置 (Zetasizer Nano ZS, マルバーン (Malvern) 社製) で製剤中の核酸含有脂質ナノ粒子の平均粒子径およびゼータ電位を測定した (表 12)。なお表中のPDIは多分散指数 (Polydispersity Index) を表す。

[0557] [表12]

製剤番号	サイズ (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)
11	70.31	0.125	5.49
12	104.4	0.121	18.3
13	83.93	0.148	13.6
14	92.77	0.127	14.8
15	87.53	0.129	18.6
16	69.14	0.094	5.05
17	102.1	0.147	16.8
18	82.37	0.110	12.8
19	91.41	0.107	15.3
20	83.11	0.141	12.7

[0558] [試験例6]

核酸含有脂質ナノ粒子のヒト細胞株に対する標的遺伝子発現抑制作用を評価した。

実施例9から13および比較例3から7で得られた各核酸含有脂質ナノ粒子について、試験例2と同様の方法で標的遺伝子発現抑制作用を評価した。

得られたB2MのmRNAの発現率を、陰性対照のB2M mRNA発現率に対する抑制率として表した結果を表 13 に示す。

[0559]

[表13]

製剤番号	B2M 遺伝子発現抑制率 (%)			
	1 nmol/L	3 nmol/L	10 nmol/L	30 nmol/L
11	19.52	41.71	57.09	60.76
12	47.65	75.32	84.82	87.15
13	54.19	69.09	80.83	90.91
14	56.28	71.45	81.09	85.02
15	37.93	63.50	78.47	84.65
16	10.31	-0.17	16.94	15.67
17	-8.60	4.03	58.23	49.89
18	-21.58	-6.87	33.03	44.15
19	9.31	28.59	38.83	32.90
20	-10.84	-6.12	22.18	30.70

[0560] これらの結果より、標的化素子(Siglec-1L-PEG-DSPE)を導入した製剤11～15は対応する標的化素子(Siglec-1L -PEG-DSPE)を含まない製剤16～20と比較して遺伝子発現抑制活性の向上を示した。

[0561] [試験例7]

核酸含有脂質ナノ粒子のヒト初代単球細胞に対する標的遺伝子発現抑制作用を評価した。

実施例10および比較例4で得られた各核酸含有脂質ナノ粒子について、それぞれ以下の方法により、健常人由来CD14陽性単球細胞 (Untouched Frozen NP B-CD14+ Monocytes, Allcells社製, PB011F)に対する標的遺伝子発現抑制作用を測定した。

健常人由来CD14陽性単球細胞は、10%ウシ胎児血清、1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution(ギブコ社、11140-050)、1 mM ピルビン酸ナトリウム(ギブコ社、11360-070)、50 μ M 2-メルカプトエタノール(ギブコ社製、21985-023)を含むRPMI1640培地(以下、ヒト単球基礎培地と記載)及びDNase I溶液 (DNase I Solution , StemCell Technology社製、07900)を用い、単球細胞に添付のプロトコルに従って融解した。その後、1000 U/mLのRecombinant Human IFN- α 2タンパク質を含むヒト単球基礎培地にて100000細胞/100

μL /ウェルの密度で96ウェル浮遊細胞用培養プレートに播種し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で24時間培養することで、細胞膜上にSiglec-1を誘導した(以降、Siglec-1誘導ヒト初代単球細胞と記載する)。培養24時間後の細胞を室温、 1800 rpm 、3分間遠心し、培養上清を注意深く除去した後、オプティメムを $80\text{ }\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。

続いて、各核酸含有脂質ナノ粒子を最終濃度が30, 10, 3または 1 nmol/L となるようにオプティメムで希釈し、各ウェルに $20\text{ }\mu\text{L}$ ずつ添加し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で4時間培養することで、各核酸含有脂質ナノ粒子を細胞に導入した。また、陰性対照の群として何も処理しないSiglec-1誘導ヒト初代単球を同様に培養した。培養後の細胞を室温にて 1800 rpm 、3分間遠心し、培養上清を注意深く除去した後、 $100\text{ }\mu\text{L}/\text{well}$ のヒト単球基礎培地を添加し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下でさらに20時間培養した。

培養後の細胞を氷冷したリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し、さらに $20\text{ }\mu\text{L}/\text{well}$ の 0.02% EDTA溶液(ナカライテスク社、14367-74)を添加し 37°C で数分間静置することにより、Siglec-1誘導ヒト初代単球を浮遊させた。得られたSiglec-1誘導ヒト初代単球を 0.05% アジ化ナトリウム(ナカライテスク社、13160-94)、 0.02% EDTA(アンピオン社、AM9269G)を含む 1% ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝化生理食塩水(ナカライテスク社、09968-35)(以下、フローサイトメトリー用バッファー)で2回洗浄した後、 20% のFcR Blocking Reagent human(ミルテニーバイオテク社、130-059-901)を含むフローサイトメトリー用バッファーを $100\text{ }\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、 4°C で15分間静置した。

続いて、FITC anti-human $\beta 2$ -microglobulin Antibody(Biolegend社、316304)をフローサイトメトリー用バッファーで4倍希釈し、96ウェルU底プレート(ファルコン社製、353077)に $20\text{ }\mu\text{L}/\text{well}$ で分注した後、15分静置後のSiglec-1誘導ヒト初代単球を $80\text{ }\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、 4°C で60分間静置することで、細胞膜上のB2Mタンパク質と抗体を反応させた。

続いて、抗体反応後のSiglec-1誘導ヒト初代単球をフローサイトメトリー用バッファーで3回洗浄したのち、各細胞の 488 nm の励起光に対する 530 nm の

蛍光強度をBD FACS Canto II Flow Cytometer(BD社製)を用いて測定することで、細胞膜上のB2Mタンパク質の発現量を測定した。同様に測定した陰性対照におけるB2Mタンパク質の発現量を1として、B2Mタンパク質の発現率を求めた。得られたB2Mタンパク質の発現率を、陰性対照のB2M mRNA発現率に対する抑制率として表した結果を表14に示す。

[0562] [表14]

製剤番号	B2M 発現抑制率 (%)			
	1 nmol/L	3 nmol/L	10 nmol/L	30 nmol/L
12	32.88	56.74	80.41	92.60
17	11.54	11.76	30.62	48.12

[0563] 本結果より、ヒト初代単球細胞由来のSiglec-1陽性活性化単球細胞においても、Siglec-1L-PEG-DSPEを用いた製剤12は対応するSiglec-1L-PEG-DSPE非含有の製剤17に比べて飛躍的に強い遺伝子発現抑制活性を示した。

[0564] [実施例14]

参考例51で得られた化合物Siglec-1L-PEG-lipid、参考例8で得られた化合物CL-8、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG-DSPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、およびコレステロールを用いて、以下のように核酸含有ナノ粒子を製造した。

核酸はTriLink BioTechnologies, LLC から入手した緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するCleanCap™ EGFP mRNA (5moU)を用いた(以下、「GFP mRNA」ともいう)。PEG-DSPE、DOPE、コレステロールは日油から入手した。

GFP mRNAは蒸留水に溶解し、1mg/mLに調製して用いた。

CL-8とPEG-DSPEとの濃度比(CL-8/PEG-DSPE Na)が、57.26(mmol/L)/5.521(mmol/L)となるように、各脂質を塩酸およびエタノールを含有する水溶液に懸濁させ、vortex攪拌ミキサーで攪拌および、加温を繰り返して均一な懸濁液を得た。この懸濁液を室温下で0.2μmのポリカーボネートメンブランフィルターおよび0.05μmのポリカーボネートメンブランフィルターに通し、リー

ド粒子の分散液を得た。粒子径測定装置 (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments社製) で得られたリード粒子の平均粒子径を測定し、30nmから100nmの範囲内であることを確認した。得られたリード粒子の分散液に、GFP mRNA溶液を、1:8の体積比(=リード粒子の分散液: GFP mRNA溶液)の割合で混合し、さらに0.185倍量の蒸留水を加えて混合することで核酸複合体粒子の分散液を調製した。

一方、CL-8と、PEG-DSPE Naと、DOPEと、コレステロールと、Siglec-1L-PEG-DSPEとの濃度比 (CL-8/PEG-DSPE Na/DOPE/コレステロール/Siglec-1L-PEG-DSPE) が、14.72(mmol/L)/0.500(mmol/L)/4.008(mmol/L)/9.619(mmol/L)/0.589(mmol/L)となるように、各脂質を秤量し90vol%エタノールに溶解させ、脂質膜構成成分の溶液を調製した。

得られた脂質膜構成成分の溶液を加温した後、かかる脂質膜構成成分の溶液と、上記核酸複合体粒子の分散液とを、体積比1:1の割合で混合し、さらに数倍量の蒸留水を混合し、粗製剤を得た。

得られた粗製剤はビバスピリン (GEヘルスケア社製)を用いて濃縮し、さらに溶媒を生理食塩水に置換し、0.2 μ mのフィルター(東洋濾紙社製)を用いてクリーンベンチ内でろ過した。さらに、得られた製剤のGFP mRNA濃度を測定し、GFP mRNA濃度で60 μ g/mLとなるように生理食塩水を用いて希釈することで、製剤21を得た。

[0565] [実施例15]

参考例51で得られた化合物Siglec-1L-PEG-lipid、参考例8で得られた化合物CL-8、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG-DSPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、およびコレステロールを用いて、以下のように核酸含有ナノ粒子を製造した。

核酸はTriLink BioTechnologies, LLC から入手したホタルルシフェラーゼを発現するCleanCap™ FLuc mRNA (5moU)を用いた (以下、「FLuc mRNA」ともいう)。PEG-DSPE、DOPE、コレステロールは日油から入手した。

FLuc mRNAは蒸留水に溶解し、1mg/mLに調製して用いた。

製剤21のGFP mRNAをFLuc mRNAにした以外、実施例14と同様にして製剤22を得た。

[0566] [比較例8]

参考例51で得られたSiglec-1L-PEG-lipidを含まない核酸含有製剤を、以下のように製造した。

製剤21の脂質膜構成成分の溶液を、CL-8と、PEG-DSPE Naと、DOPEと、コレステロールとの濃度比（CL-8/PEG-DSPE Na/DOPE/コレステロール）を14.72(mmol/L)/1.089(mmol/L)/4.008(mmol/L)/9.619(mmol/L)にした以外、実施例14と同様にして製剤23を得た。

[0567] [比較例9]

参考例51で得られたSiglec-1L-PEG-lipidを含まない核酸含有製剤を、以下のように製造した。

製剤22の脂質膜構成成分の溶液を、CL-8と、PEG-DSPE Naと、DOPEと、コレステロールとの濃度比（CL-8/PEG-DSPE Na/DOPE/コレステロール）を14.72(mmol/L)/1.089(mmol/L)/4.008(mmol/L)/9.619(mmol/L)にした以外、実施例15と同様にして製剤24を得た。

[0568] [試験例8]

核酸含有脂質ナノ粒子の平均粒子径測定

粒子径測定装置（Zetasizer Nano ZS, マルバーン（Malvern）社製）で製剤中の核酸含有脂質ナノ粒子の平均粒子径およびゼータ電位を測定した（表15）。なお表中のPDIは多分散指数(Polydispersity Index)を表す。

[0569] [表15]

製剤番号	サイズ (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)
21	162.4	0.142	23.0
22	157.1	0.139	22.1
23	168.2	0.132	18.8
24	158.0	0.157	25.2

[0570] [試験例9]

核酸含有脂質ナノ粒子のヒト細胞株に対する標的遺伝子発現亢進作用を評価した。

実施例14および比較例8で得られた各核酸含有脂質ナノ粒子について、それぞれ以下の方法により、ヒト由来単球系細胞株THP-1(American Type Culture Collection由来)に対する標的遺伝子発現亢進作用を測定した。

THP-1細胞株は、10%ウシ胎児血清(FBS)を含むアールピーエムアイ1640培地(RPMI1640培地、ナカライテスク社製、30264-56)(以下10% FBS RPMI1640培地と記載)で維持継代し、500 U/mLのRecombinant Human IFN- α 2タンパク質(R&D社、11105-1)を含む10% FBS RPMI1640培地にて48時間培養することで、細胞膜上にSiglec-1を誘導した(以降、Siglec-1誘導THP-1と記載する)。

各核酸含有脂質ナノ粒子を最終濃度が1, 0.3, 0.1または0.03 $\mu\text{g/mL}$ となるようにオプティメム(Opti-MEM、ギブコ(GIBCO)社、31985)で希釈し、96ウェルの浮遊細胞用培養プレート(コーニング社、3474)に20 μL ずつ分注した後、オプティメムに懸濁させたSiglec-1誘導THP-1を細胞数12500/80 μL /ウェルとなるように添加し、37°C、5%CO₂条件下で24時間培養することで、各核酸含有脂質ナノ粒子を細胞に導入した。また、陰性対照の群として何も処理しないSiglec-1誘導THP-1を同様に培養した。培養後の細胞を室温にて1800 rpm、3分間遠心し、培養上清を注意深く除去した後、細胞を0.05%アジ化ナトリウム(ナカライテスク社、13160-94)、0.02%EDTA(アンピオン社、AM9269G)を含む1%ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝化生理食塩水(ナカライテスク社、09968-35)(以下、フローサイトメトリー用バッファー)で懸濁した。得られた各細胞の488 nmの励起光に対する530 nmの蛍光強度をBD FACS Canto II Flow Cytometer(BD社製)を用いて測定することで、細胞における緑色蛍光タンパク質(GFP)タンパク質の発現量を測定した。同様に測定した陰性対照細胞における蛍光強度を1とした際の各細胞の相対蛍光強度を表16に示す。

[0571]

[表16]

製剤番号	相対蛍光強度			
	0.03 μ g/mL	0.1 μ g/mL	0.3 μ g/mL	1 μ g/mL
21	3.73	12.71	21.76	20.21
23	1.28	2.14	5.66	9.33

[0572] 本結果より、受容体Siglec-1を誘導したヒト細胞株THP-1に対して、標的化素子(Siglec-1L-PEG-DSPE)を導入した製剤21は標的化素子を含まない製剤23と比較して強い遺伝子発現亢進活性を示した。

[0573] [試験例10]

核酸含有脂質ナノ粒子のヒト初代単球細胞に対する標的遺伝子発現抑制作用を評価した。

実施例14および比較例8で得られた各核酸含有脂質ナノ粒子について、それぞれ以下の方法により、健常人由来CD14陽性単球細胞 (Untouched Frozen NP B-CD14+ Monocytes, Allcells社製, PB011F)に対する標的遺伝子発現亢進作用を測定した。

健常人由来CD14陽性単球細胞は、10%ウシ胎児血清、1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution(ギブコ社、11140-050)、1 mM ピルビン酸ナトリウム(ギブコ社、11360-070)、50 μ M 2-メルカプトエタノール(ギブコ社製、21985-023)を含むRPMI1640培地(以下、ヒト単球基礎培地と記載)、及びDNase I溶液 (DNase I Solution , StemCell Technology社製、07900)を用い、単球細胞に添付のプロトコルに従って融解した。その後、1000 U/mLのRecombinant Human IFN-alpha 2タンパク質を含むヒト単球基礎培地にて100000細胞/100 μ L/ウェルの密度で96ウェル浮遊細胞用培養プレートに播種し、37°C、5%CO₂条件下で48時間培養することで、細胞膜上にSiglec-1を誘導した(以降、Siglec-1誘導ヒト初代単球細胞と記載する)。培養48時間後の細胞を室温、1800 rpm、3分間遠心し、培養上清を注意深く除去した後、オプティメムを80 μ L/wellで添加した。

続いて、各核酸含有脂質ナノ粒子を最終濃度が1, 0.3または0.1 μ g/mLと

なるようにオプティメムで希釈し、各ウェルに20 μ Lずつ添加し、37°C、5%CO₂条件下で24時間培養することで、各核酸含有脂質ナノ粒子を細胞に導入した。また、陰性対照の群として何も処理しないSiglec-1誘導ヒト初代単球を同様に培養した。培養後の細胞を室温にて1800 rpm、3分間遠心し、培養上清を注意深く除去した後、細胞を0.05%アジ化ナトリウム(ナカライテスク社、13160-94)、0.02%EDTA(アンピオン社、AM9269G)を含む1%ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝化生理食塩水(ナカライテスク社、09968-35)(以下、フローサイトメトリー用バッファー)で懸濁した。得られた各細胞の488 nmの励起光に対する530 nmの蛍光強度をBD FACS Canto II Flow Cytometer(BD社製)を用いて測定することで、細胞における緑色蛍光タンパク質(GFP)タンパク質の発現量を測定した。同様に測定した陰性対照細胞における蛍光強度を1とした際の各細胞の相対蛍光強度を表17に示す。

[0574] [表17]

製剤番号	相対蛍光強度		
	0.1 μ g/mL	0.3 μ g/mL	1 μ g/mL
21	1.20	1.55	2.14
23	1.06	1.14	1.27

[0575] 本結果より、ヒト初代単球細胞由来のSiglec-1陽性活性化単球細胞においても、Siglec-1L-PEG-DSPEを用いた製剤21は対応するSiglec-1L-PEG-DSPE非含有の製剤23に比べて強い遺伝子発現亢進活性を示した。

[0576] [試験例11]

核酸含有脂質ナノ粒子のヒト細胞株に対する標的遺伝子発現亢進作用を評価した。

実施例15および比較例9で得られた各核酸含有脂質ナノ粒子について、それぞれ以下の方法により、ヒト由来単球系細胞株THP-1(American Type Culture Collection由来)に対する標的遺伝子発現亢進作用を測定した。

THP-1細胞株は、10%ウシ胎児血清(FBS)を含むアールピーエムアイ1640培地(RPMI1640培地、ナカライテスク社製、30264-56)(以下10% FBS RPMI1640培

地と記載)で維持継代し、2000 U/mLのRecombinant Human IFN- α 2タンパク質 (R&D社、11105-1)を含む10% FBS RPMI1640培地にて48時間培養することで、細胞膜上にSiglec-1を誘導した(以降、Siglec-1誘導THP-1と記載する)。

各核酸含有脂質ナノ粒子を最終濃度が0.3または0.1 $\mu\text{g/mL}$ となるようにオプティメム (Opti-MEM、ギブコ(GIBCO)社、31985)で希釈し、96ウェルの浮遊細胞用培養プレート(コーニング社、3474)に20 μL ずつ分注した後、オプティメムに懸濁させたSiglec-1誘導THP-1を細胞数12500/80 μL /ウェルとなるように添加し、37°C、5%CO₂条件下で24時間培養することで、各核酸含有脂質ナノ粒子を細胞に導入した。また、陰性対照の群として何も処理しないSiglec-1誘導THP-1を同様に培養した。培養後に、細胞を含む培養液にステディーグロ ルシフェラーゼアッセイシステム(プロメガ社、E2550)を製品マニュアルの通りに用い、マルチラベルリーダー 2030アルボエックス3(2030 ALVO X3、パーキンエルマー社)を用いた発光測定を行うことで、培養液中のホタルルシフェラーゼ(FLuc)タンパク質の発現量を測定した。同様に測定した陰性対照細胞における発光強度を1とした際の各細胞の相対発光強度を表18に示す。

[0577] [表18]

製剤番号	相対発光強度	
	0.1 $\mu\text{g/mL}$	0.3 $\mu\text{g/mL}$
22	2.03	2.46
24	1.35	2.09

[0578] 本結果より、受容体Siglec-1を誘導したヒト細胞株THP-1に対して、標的化素子(Siglec-1L-PEG-DSPE)を導入した製剤22は標的化素子を含まない製剤24と比較して強い遺伝子発現亢進活性を示した。

[0579] [実施例16]

カチオン性脂質を含有しないSiglec-1L-PEG-lipidを含む製剤25は以下のよう

に調製した。

参考例51で得られた化合物Siglec-1L-PEG-lipid、1,2-ジステアロイル-sn-グ

リセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG-DSPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、およびコレステロールを用いて、以下のように核酸含有ナノ粒子を製造した。

核酸はセンス鎖(5' - GCCAGACUUUGUUGGAUUUGA - 3')と、アンチセンス鎖(5' - AAmAUmCCmAAmCAmAAmGUmCUmGGmCmUmU - 3') (mは2'-OMe-RNAを示す)塩基配列を有し、アンチセンス鎖3'末端にコレステロールを修飾した、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ1遺伝子の発現を抑制するsiRNAを用いた(以下、「HPRT1 siRNA-cho」ともいう)。PEG-DSPE、DOPE、コレステロールは日油から入手した。

HPRT-1 siRNA-choは蒸留水に溶解し、24mg/mLにして保管した。

PEG-DSPEとDOPEとコレステロールの濃度比(PEG-DSPE Na/DOPE/コレステロール)が、0.4730 (mmol/L)/9.119(mmol/L)/2.977(mmol/L)となるように、各脂質をエタノールに溶解させた。一方、Siglec-1L-PEG-lipid とHPRT-1 siRNA-choの濃度比(Siglec-1L-PEG-lipid/HPRT-1 siRNA-cho)が0.06058(mmol/L)/0.001048(mmol/L)となるように蒸留水で希釈した。

脂質溶液およびSiglec-1L-PEG-lipidと核酸を含む水溶液をシリンジ(ハミルトン社製)に各々充填し、各溶液の流速が3.000mL/minおよび9.000mL/minとなるようにシリンジポンプ(YMC社製)で溶出させ、マイクロリアクタ用ミキサ(YMC社製)を通して粗製剤を得た。得られた粗製剤はビバスピリン(GEヘルスケア社製)を用いて濃縮し、さらに溶媒を生理食塩水に置換し、0.2μmのフィルター(東洋濾紙社製)を用いてクリーンベンチ内でろ過した。さらに、得られた製剤のHPRT-1 siRNA-cho濃度を測定し、HPRT-1 siRNA-cho濃度で10mMとなるように生理食塩水を用いて希釈することで、製剤25を得た。

[0580] [実施例17]

カチオン性脂質を含有しないSiglec-1L-PEG-lipidを含む製剤26は以下のように調製した。

脂質および核酸は実施例16と同様とした。

PEG-DSPEとDOPEとコレステロールの濃度比 (PEG-DSPE Na/DOPE/コレステロール) が、 $0.2365 \text{ (mmol/L)}/4.559 \text{ (mmol/L)}/1.489 \text{ (mmol/L)}$ となるように、各脂質をエタノールに溶解させた。一方、Siglec-1L-PEG-lipid とHPRT-1 siRNA-choの濃度比(Siglec-1L-PEG-lipid/HPRT-1 siRNA-cho)が $0.02983 \text{ (mmol/L)}/0.005159 \text{ (mmol/L)}$ となるように蒸留水で希釈した。

それ以外は実施例16と同様にして製剤26を得た。

[0581] [実施例18]

カチオン性脂質を含有しないSiglec-1L-PEG-lipidを含む製剤27は以下のよう
に調製した。

脂質および核酸は実施例16と同様とした。

PEG-DSPEとDOPEとコレステロールとSiglec-1L-PEG-lipidとHPRT-1 siRNA-choのモル比 (PEG-DSPE Na/DOPE/コレステロール/ Siglec-1L-PEG-lipid/ HPRT-1 siRNA-cho) が、 $0.5202 \text{ (}\mu\text{mol)}/9.914 \text{ (}\mu\text{mol)}/3.237 \text{ (}\mu\text{mol)}/0.1946 \text{ (}\mu\text{mol)}/0.03365 \text{ (}\mu\text{mol)}$ となるようにt-BuOH/蒸留水の混合溶液に溶解させ凍結乾燥した。

得られた脂質/核酸紛体に生理食塩水を核酸濃度として 1 mg/mL になるように添加し、vortex攪拌ミキサーで攪拌して懸濁液を得た。この懸濁液を室温下で $0.4 \mu\text{m}$ のポリカーボネートメンブランフィルター、 $0.2 \mu\text{m}$ のポリカーボネートメンブランフィルターおよび $0.1 \mu\text{m}$ のポリカーボネートメンブランフィルターに通し、核酸複合体粒子の分散液を調製した。

得られた核酸複合体粒子の分散液を $0.2 \mu\text{m}$ のフィルター(東洋濾紙社製)を用いてクリーンベンチ内でろ過した。さらに、得られた製剤のHPRT1 siRNA-cho濃度を測定し、HPRT1 siRNA-cho濃度で 10 mM となるように生理食塩水を用いて希釈することで、製剤27を得た。

[0582] [比較例10]

カチオン性脂質およびSiglec-1L-PEG-lipidを含まない製剤28は以下のよう
に調製した。

脂質および核酸は実施例16と同様とした。

PEG-DSPEとDOPEとコレステロールの濃度比（PEG-DSPE Na/DOPE/コレステロール）が、 $0.6676(\text{mmol/L})/9.260(\text{mmol/L})/3.023(\text{mmol/L})$ となるように、各脂質をエタノールに溶解させた。一方、HPRT-1 siRNA-choが $0.001048(\text{mmol/L})$ となるように蒸留水で希釈した。

それ以外は実施例16と同様にして製剤28を得た。

[0583] [比較例11]

カチオン性脂質およびSiglec-1L-PEG-lipidを含まない製剤29は以下のよう
に調製した。

脂質および核酸は実施例16と同様とした。

PEG-DSPEとDOPEとコレステロールの濃度比（PEG-DSPE Na/DOPE/コレステロール）が、 $0.3338(\text{mmol/L})/4.630(\text{mmol/L})/1.512(\text{mmol/L})$ となるように、各脂質をエタノールに溶解させた。一方、HPRT-1 siRNA-choが $0.005239(\text{mmol/L})$ となるように蒸留水で希釈した。

それ以外は実施例16と同様にして製剤29を得た。

[0584] [比較例12]

カチオン性脂質およびSiglec-1L-PEG-lipidを含まない製剤30は以下のよう
に調製した。

脂質および核酸は実施例18と同様とした。

PEG-DSPEとDOPEとコレステロールとHPRT-1 siRNA-choのモル比（PEG-DSPE Na/DOPE/コレステロール/ HPRT-1 siRNA-cho）が、 $0.7148(\mu\text{mol})/9.914(\mu\text{mol})/3.237(\mu\text{mol})/0.03365(\mu\text{mol})$ となるようにt-BuOH/蒸留水の混合溶液に溶解させ凍結乾燥した。

それ以外は実施例18と同様にして製剤30を得た。

[0585] [試験例12]

核酸含有脂質ナノ粒子の平均粒子径測定

粒子径測定装置（Zetasizer Nano ZS, マルバーン（Malvern）社製）で製剤中の核酸含有脂質ナノ粒子の平均粒子径およびゼータ電位を測定した（表19）。なお表中のPDIは多分散指数(Polydispersity Index)を表す。

[0586] [表19]

製剤番号	サイズ (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)
25	80.27	0.173	-15.0
26	50.01	0.227	-25.8
27	135.3	0.080	-31.8
28	70.25	0.252	-23.0
29	51.14	0.233	-16.1
30	129.6	0.128	-30.8

[0587] [試験例12]

核酸含有脂質ナノ粒子のヒト初代単球細胞に対する標的遺伝子発現抑制作用を評価した。

[0588] [実施例19]

核酸およびシグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なリガンドを有する、水溶性ユニットおよびカチオン性ユニットを含む高分子(高分子I)を含む製剤は以下のように調製した。

参考例52で得られたSiglec-1L-PEG5000-K₁₅GC (化合物SPP-1)を用いて、以下のように核酸複合体を製造した。

核酸はセンス鎖 (5' —A(F)[^]G(M)[^]G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M)U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M)[^]C(F)[^]U(M)—3') と、アンチセンス鎖 (5' —A(F)[^]G(M)[^]A(F)G(M)A(F)U(M)A(F)G(M)A(F)A(M)A(M)G(F)A(M)C(F)C(M)A(F)G(M)U(F)C(M)C(F)U(M)[^]U(F)[^]G(M)—3') ((M)は2'-OMe-RNA、(F)は2'-F-RNA、[^]はPhosphorothioatedを示す)塩基配列からなる、β2-ミクログロブリン遺伝子の発現を抑制するsiRNAを用いた(以下、「B2M siRNA-2」ともいう)。

B2M siRNA-2は蒸留水に溶解し、24mg/mLにして保管し、必要に応じて10mM HEPESで希釈した。

Siglec-1L-PEG5000-K15GC (化合物SPP-1)は10mg/mLとなるように10mM HEPESで溶解した。化合物SPP-1が持つアミノ基数(N)とsiRNAの持つリン酸基数(P)の比がN/P=1となるよう、Siglec-1L-PEG5000-K15GC (化合物SPP-1)とB2M siRNA-2を混和し、核酸濃度として最終濃度10μMとすることで製剤31した。

[0589] [実施例20]

製剤31のN/P=1の条件をN/P=2.5にした以外、実施例19と同様にして製剤32を得た。

[0590] [実施例21]

製剤31のN/P=1の条件をN/P=5にした以外、実施例19と同様にして製剤33を得た。

[0591] [実施例22]

製剤31のN/P=1の条件をN/P=10にした以外、実施例19と同様にして製剤34を得た。

[0592] [実施例23]

参考例53で得られたSiglec-1L-PEG5000-K₃₀GC（化合物SPP-2）を用いて、以下のように核酸複合体を製造した。

Siglec-1L-PEG5000-K₃₀GC（化合物SPP-2）は10mg/mLとなるように10mM HEPESで溶解した。N/P=1となるよう、Siglec-1L-PEG5000-K₃₀GC（化合物SPP-2）とB2M siRNA-2を混和し、核酸濃度として最終濃度10 μ Mとすることで製剤35した。

[0593] [実施例24]

製剤35のN/P=1の条件をN/P=2.5にした以外、実施例23と同様にして製剤36を得た。

[0594] [実施例25]

製剤35のN/P=1の条件をN/P=5にした以外、実施例23と同様にして製剤37を得た。

[0595] [実施例26]

製剤35のN/P=1の条件をN/P=10にした以外、実施例23と同様にして製剤38を得た。

[0596] [実施例27]

参考例54で得られたSiglec-1L-PEG5000-R₃₀GC（化合物SPP-3）を用いて、以下のように核酸複合体を製造した。

Siglec-1L-PEG5000-R₃₀GC (化合物SPP-3)は10mg/mLとなるように10mM HEPESで溶解した。N/P=1となるよう、Siglec-1L-PEG5000-R₃₀GC (化合物SPP-3)とB2M siRNA-2を混和し、核酸濃度として最終濃度10 μ Mとすることで製剤39した。

[0597] [実施例28]

製剤36のN/P=1の条件をN/P=2.5にした以外、実施例27と同様にして製剤40を得た。

[0598] [実施例29]

製剤36のN/P=1の条件をN/P=5にした以外、実施例27と同様にして製剤41を得た。

[0599] [実施例30]

製剤36のN/P=1の条件をN/P=10にした以外、実施例27と同様にして製剤42を得た。

[0600] [実施例31]

参考例58で得られた(Siglec-1L)₂-PEG5000-K₁₅GC (SPP-7)を用いて、以下のよう核酸複合体を製造した。

(Siglec-1L)₂-PEG5000-K₁₅GC (SPP-7)は2mg/mLとなるように注射用水で溶解した。N/P=1となるよう、Siglec-1L-PEG5000-R₃₀GC (化合物SPP-3)とB2M siRNA-2を混和し、核酸濃度として最終濃度10 μ Mとすることで製剤43した。

[0601] [実施例32]

製剤43のN/P=1の条件をN/P=5にした以外、実施例31と同様にして製剤44を得た。

[0602] [実施例33]

製剤36のN/P=1の条件をN/P=5にした以外、実施例31と同様にして製剤45を得た。

[0603] [実施例34]

製剤36のN/P=1の条件をN/P=10にした以外、実施例31と同様にして製剤46を得た。

[0604] [実施例35]

参考例59で得られた(Siglec-1L)₂-PEG5000-K₃₀GC (SPP-8)を用いて、以下のよう核酸複合体を製造した。

(Siglec-1L)₂-PEG5000-K₃₀GC (SPP-8)は2mg/mLとなるように注射用水で溶解した。N/P=1となるよう、(Siglec-1L)₂-PEG5000-K₃₀GC (SPP-8)とB2M siRNA-2を混和し、核酸濃度として最終濃度10 μ Mとすることで製剤47した。

[0605] [実施例36]

製剤47のN/P=1の条件をN/P=2.5にした以外、実施例35と同様にして製剤48を得た。

[0606] [実施例37]

製剤47のN/P=1の条件をN/P=5にした以外、実施例35と同様にして製剤49を得た。

[0607] [実施例38]

製剤47のN/P=1の条件をN/P=10にした以外、実施例35と同様にして製剤50を得た。

[0608] [実施例39]

参考例60で得られた(Siglec-1L)₂-PEG5000-R₃₀GC (SPP-9)を用いて、以下のよう核酸複合体を製造した。

(Siglec-1L)₂-PEG5000-R₃₀GC (SPP-9)は5mg/mLとなるように注射用水で溶解した。N/P=1となるよう、(Siglec-1L)₂-PEG5000-R₃₀GC (SPP-9)とB2M siRNA-2を混和し、核酸濃度として最終濃度10 μ Mとすることで製剤51した。

[0609] [実施例40]

製剤51のN/P=1の条件をN/P=2.5にした以外、実施例39と同様にして製剤52を得た。

[0610] [実施例41]

製剤51のN/P=1の条件をN/P=5にした以外、実施例39と同様にして製剤53を得た。

[0611] [実施例42]

製剤51のN/P=1の条件をN/P=10にした以外、実施例39と同様にして製剤54を得た。

[0612] [実施例43]

参考例61で得られた $((\text{Siglec-1L})_2\text{-PEG2000})_2\text{-K}_{15}\text{GC}$ (SPP-10)を用いて、以下のように核酸複合体を製造した。

$((\text{Siglec-1L})_2\text{-PEG2000})_2\text{-K}_{15}\text{GC}$ (SPP-10)は10mg/mLとなるように注射用水で溶解した。N/P=1となるよう、 $((\text{Siglec-1L})_2\text{-PEG2000})_2\text{-K}_{15}\text{GC}$ (SPP-10)とB2M siRNA-2を混和し、核酸濃度として最終濃度10 μM とすることで製剤55した。

[0613] [実施例44]

製剤55のN/P=1の条件をN/P=2.5にした以外、実施例43と同様にして製剤56を得た。

[0614] [実施例45]

製剤55のN/P=1の条件をN/P=5にした以外、実施例43と同様にして製剤57を得た。

[0615] [実施例46]

製剤55のN/P=1の条件をN/P=10にした以外、実施例43と同様にして製剤58を得た。

[0616] [実施例47]

参考例62で得られた $((\text{Siglec-1L})_2\text{-PEG2000})_2\text{-K}_{30}\text{GC}$ (SPP-11)を用いて、以下のように核酸複合体を製造した。

$((\text{Siglec-1L})_2\text{-PEG2000})_2\text{-K}_{30}\text{GC}$ (SPP-11)は2mg/mLとなるように注射用水で溶解した。N/P=1となるよう、 $((\text{Siglec-1L})_2\text{-PEG2000})_2\text{-K}_{30}\text{GC}$ (SPP-11)とB2M siRNA-2を混和し、核酸濃度として最終濃度10 μM とすることで製剤59した。

[0617] [実施例48]

製剤59のN/P=1の条件をN/P=2.5にした以外、実施例47と同様にして製剤60を得た。

[0618] [実施例49]

製剤59のN/P=1の条件をN/P=5にした以外、実施例47と同様にして製剤61を

得た。

[0619] [実施例50]

製剤59のN/P=1の条件をN/P=10にした以外、実施例47と同様にして製剤62を得た。

[0620] [実施例51]

参考例63で得られた $((\text{Siglec-1L})_2\text{-PEG2000})_2\text{-R}_{30}\text{GC}$ (SPP-12)を用いて、以下のように核酸複合体を製造した。

$((\text{Siglec-1L})_2\text{-PEG2000})_2\text{-R}_{30}\text{GC}$ (SPP-12)は10mg/mLとなるように注射用水で溶解した。N/P=1となるよう、 $((\text{Siglec-1L})_2\text{-PEG2000})_2\text{-R}_{30}\text{GC}$ (SPP-12)とB2M siRNA-2を混和し、核酸濃度として最終濃度10 μM とすることで製剤63した。

[0621] [実施例52]

製剤63のN/P=1の条件をN/P=2.5にした以外、実施例51と同様にして製剤64を得た。

[0622] [実施例53]

製剤63のN/P=1の条件をN/P=5にした以外、実施例51同様にして製剤65を得た。

[0623] [実施例54]

製剤63のN/P=1の条件をN/P=10にした以外、実施例51と同様にして製剤66を得た。

[0624] [比較例13]

参考例55で得られたPEG5000-K₁₅GC (化合物SPP-4)を用いて、以下のように核酸複合体を製造した。

PEG5000-K₁₅GC (化合物SPP-4)は10mg/mLとなるように10 mM HEPESで溶解した。N/P=1となるよう、PEG5000-K₁₅GC (化合物SPP-4)とB2M siRNA-2を混和し、核酸濃度として最終濃度10 μM とすることで製剤67した。

[0625] [比較例14]

製剤67のN/P=1の条件をN/P=2.5にした以外、比較例13と同様にして製剤68を得た。

[0626] [比較例15]

製剤67のN/P=1の条件をN/P=5にした以外、比較例13と同様にして製剤69を得た。

[0627] [比較例16]

製剤67のN/P=1の条件をN/P=10にした以外、比較例13と同様にして製剤70を得た。

[0628] [比較例17]

参考例56で得られたPEG5000-K₃₀GC（化合物SPP-5）を用いて、以下のように核酸複合体を製造した。

PEG5000-K₃₀GC（化合物SPP-5）は10mg/mLとなるように10 mM HEPESで溶解した。N/P=1となるよう、PEG5000-K₃₀GC（化合物SPP-5）とB2M siRNA-2を混和し、核酸濃度として最終濃度10 μ Mとすることで製剤71した。

[0629] [比較例18]

製剤71のN/P=1の条件をN/P=2.5にした以外、比較例17と同様にして製剤72を得た。

[0630] [比較例19]

製剤71のN/P=1の条件をN/P=5にした以外、比較例17と同様にして製剤73を得た。

[0631] [比較例20]

製剤71のN/P=1の条件をN/P=10にした以外、比較例18と同様にして製剤74を得た。

[0632] [比較例21]

参考例57で得られたPEG5000-R₃₀GC（化合物SPP-6）を用いて、以下のように核酸複合体を製造した。

PEG5000-R₃₀GC（化合物SPP-6）は10mg/mLとなるように10 mM HEPESで溶解した。N/P=1となるよう、PEG5000-R₃₀GC（化合物SPP-6）とB2M siRNA-2を混和し、核酸濃度として最終濃度10 μ Mとすることで製剤75した。

[0633] [比較例22]

製剤75のN/P=1の条件をN/P=2.5にした以外、比較例21と同様にして製剤76を得た。

[0634] [比較例23]

製剤75のN/P=1の条件をN/P=5にした以外、比較例21と同様にして製剤77を得た。

[0635] [比較例24]

製剤75のN/P=1の条件をN/P=10にした以外、比較例21と同様にして製剤78を得た。

配列表フリーテキスト

[0636] 配列番号1は、B2M siRNAセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号2は、B2M siRNAアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号3は、HPRT1 siRNA-choセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号4は、HPRT1 siRNA-choアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号5は、B2M-2 siRNAセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号6は、B2M-2 siRNAアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

請求の範囲

【請求項1】 シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なリガンドを有する、脂質または水溶性ユニットを含む脂質(脂質I)、および核酸を含む、あるいは、

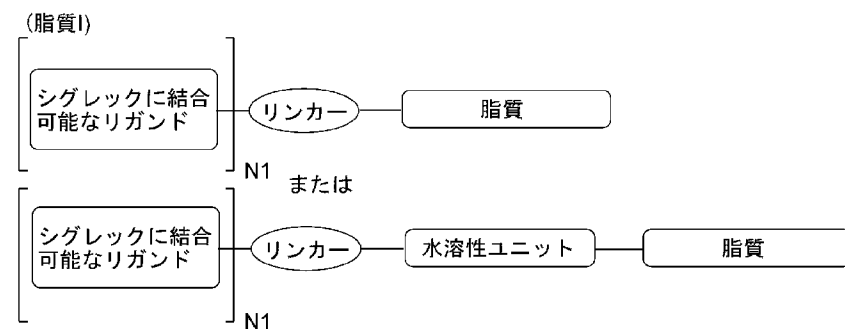
シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なリガンドを有する、水溶性ユニットおよびカチオン性ユニットを含む高分子(高分子I)、ならびに核酸を含む、
ナノ粒子。

【請求項2】 シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なリガンドを有する、脂質または水溶性ユニットを含む脂質(脂質I)、核酸、およびカチオン性脂質(脂質II)を含む、あるいは、

シグレック (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) に結合可能なリガンドを有する、水溶性ユニットおよびカチオン性ユニットを含む高分子(高分子I)、核酸、ならびに、水溶性ユニットおよびカチオン性ユニットを含む高分子(高分子II)を含む、
ナノ粒子。

【請求項3】 脂質Iが、シグレックに結合可能なリガンドと、脂質あるいは水溶性ユニットとがリンカーを介して連結した構造：

【化1】

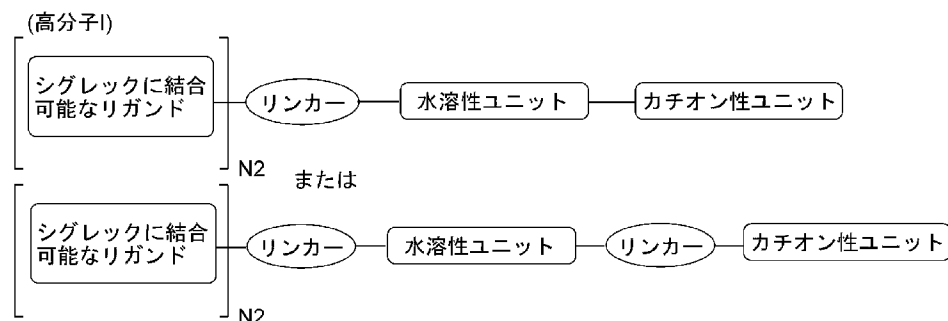


(N1は、1以上の整数である。)

で表され、

高分子Iが、シグレックに結合可能なリガンドと、水溶性ユニットとが、あるいはシグレックに結合可能なリガンドと、水溶性ユニットと、カチオン性ユニットとがリンカーを介して連結した構造：

[化2]



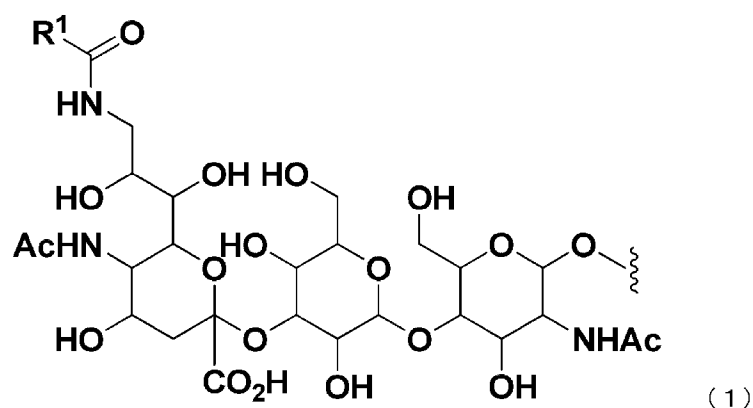
(N2は、1以上の整数である。)

で表される、請求項1または2に記載のナノ粒子。

[請求項4] 前記リガンドが、糖鎖リガンドである、請求項1～3のいずれか一項に記載のナノ粒子。

[請求項5] 糖鎖リガンドが、以下の式(1)で表される基である、請求項4に記載のナノ粒子。

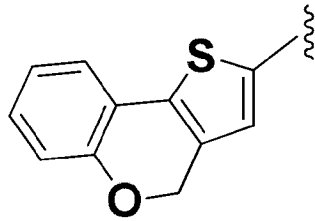
[化3]



(式(1)中、Acはアセチル基を表し、R¹は、C6-C12アリール基、C4-C12ヘテロアリール基、または、C6-C12アリール基もしくはC4-C12ヘテロアリール基で置換されたC1-C6アルキル基を表す。)

[請求項6] 式(1)におけるR¹が、以下の構造で表される基である、請求項5に記載のナノ粒子。

[化4]



- [請求項7] 水溶性ユニットが、ポリエチレングリコール、ポリグリセリン、ポリエチレンイミン、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、オリゴ糖、デキストリン、水溶性セルロース、デキストラン、コンドロイチン硫酸、ポリグリセリン、キトサン、ポリビニルピロリドン、ポリアスパラギン酸アミド、ポリ-L-リジン、マンナン、プルラン、オリゴグリセロール、およびそれらの誘導体からなる群より選択される1種以上を有するユニットである、請求項1～6のいずれか一項に記載のナノ粒子。
- [請求項8] カチオン性ユニットが、リジン、アルギニン、ヒスチジンからなる群より選択される一種以上を含むアミノ酸ポリマーユニット、ポリエチレンイミンユニット、又は、ポリアミノアクリレートユニットである、請求項1～7のいずれか一項に記載のナノ粒子。
- [請求項9] ナノ粒子が、さらに中性脂質を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載のナノ粒子。
- [請求項10] 核酸がsiRNAまたはmRNAである、請求項1～9のいずれか1項に記載のナノ粒子。
- [請求項11] siRNAが、コレステロール、トコフェロールまたは脂肪酸とリンカーを介して共有結合している、請求項10に記載のナノ粒子。
- [請求項12] Siglec-1(CD169)陽性細胞へ送達するために使用される、請求項1～11のいずれか一項に記載のナノ粒子。
- [請求項13] Siglec-1(CD169)陽性細胞が、マクロファージ、樹状細胞または単球である、請求項12に記載のナノ粒子。
- [請求項14] 請求項1～11のいずれか一項に記載のナノ粒子を用いる、核酸を

細胞内に導入する方法。

- [請求項15] 細胞が、Siglec-1(CD169)陽性細胞である、請求項 1 4 に記載の方法。
- [請求項16] Siglec-1 (CD169) 陽性細胞が、マクロファージ、樹状細胞または単球である、請求項 1 5 に記載の方法。
- [請求項17] 請求項 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載のナノ粒子を含む、医薬。
- [請求項18] 静脈内投与用また皮下投与用である、請求項 1 7 に記載の医薬。
- [請求項19] 請求項 1 7 または 1 8 に記載の医薬を、それを必要とする患者に投与することを含む、疾患の治療または予防方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/022286

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A61K31/7105(2006.01)i, A61K9/14(2006.01)i, A61K47/14(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. A61K31/7105, A61K9/14, A61K47/14, A61P43/00

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2016/153012 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) 29 September 2016, claims, paragraph [0503], example 72 & EP 3275448 A1 (claims, paragraph [0498], example 72) & CA 2980721 A & AU 2016237148 A & CN 107427531 A & KR 10-2017-0130531 A	1-19
Y	JP 2016-519120 A (BAYER HEALTHCARE LLC) 30 June 2016, claims, paragraphs [0032], [0045] & US 2016/0279252 A1 (claims, paragraphs [0036], [0049]) & WO 2014/179184 A1 & EP 2991684 A1 & TW 201519900 A & CN 105451774 A	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.	☐ See patent family annex.
--	---

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 15 August 2018 (15.08.2018)	Date of mailing of the international search report 28 August 2018 (28.08.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/022286

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PRESCHER, Horst et al., "New human CD22/siglec-2 ligands with a triazole glycoside", Chem Bio Chem, May 2017, vol. 18, pp. 1216-1225, in particular, abstract	1-19
Y	SPENCE, S. et al., "Targeting siglecs with a sialic acid-decorated nanoparticle abrogates inflammation", Sci Transl Med, vol. 7, 2015, 303ra140, in particular, abstract	1-19
Y	JP 2015-521040 A (GRADALIS, INC.) 27 July 2015, claims & US 2013/0302407 A1(claims) & WO 2013/170071 A1 & EP 2847333 A1 & KR 10-2015-0006477 A & CN 104685055 A	1-19
Y	JP 2011-500023 A (INTRADIGM CORPORATION) 06 January 2011, paragraph [0075] & US 2010/0210710 A1 (paragraph [0085]) & WO 2009/051659 A2 & EP 2209895 A1 & CA 2702039 A	1-19
Y	WO 2015/164818 A1 (STRIKE BIO, INC.) 29 October 2015, page 3, paragraph [0002] & JP 2017-518764 A (paragraph [0010]) & US 2015/0307885 A1 & EP 3134528 A1 & CN 106661576 A	1-19
A	木曾 慎, 糖鎖の構造と機能について (その 2), 日本醤油研究所雑誌, vol. 30, no. 3, 財団法人日本醤油研究所, 2004, pp. 77-84, fig. 21, non-official translation (KISO, Makoto, "Regarding structure and function of sugar chain (no. 2)", Journal of Japan Soy Sauce Research Institute - Zaidan Hojin Nihon Shoyu Kenkyusho)	1-19

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K31/7105(2006.01)i, A61K9/14(2006.01)i, A61K47/14(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K31/7105, A61K9/14, A61K47/14, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2016/153012 A1 (協和発酵キリン株式会社) 2016.09.29, 特許請求の範囲、[0503]、実施例 72 & EP 3275448 A1(Claims, [0498], Exaples72) & CA 2980721 A & AU 2016237148 A & CN 107427531 A & KR 10-2017-0130531 A	1-19
Y	JP 2016-519120 A (バイエル・ヘルスケア・エルエルシー) 2016.06.30, 特許請求の範囲、[0032], [0045] & US 2016/0279252 A1(Claims, [0036], [0049]) & WO 2014/179184 A1 & EP 2991684 A1 & TW 201519900 A & CN 105451774 A	1-19

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.08.2018

国際調査報告の発送日

28.08.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

渡部 正博

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

5801

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	PRESCHER, Horst et al., New human CD22/siglec-2 ligands with a triazole glycoside, Chem Bio Chem, 2017.05, Vol.18, p.1216-1225, 特に、Abstract	1-19
Y	SPENCE, S et al., Targeting siglecs with a sialic acid-decorated nanoparticle abrogates inflammation, Sci Transl Med, Vol.7, 2015, 303ra140, 特に、Abstract	1-19
Y	JP 2015-521040 A (グラダリス インク.) 2015.07.27, 特許請求の範囲 & US 2013/0302407 A1(Claims) & WO 2013/170071 A1 & EP 2847333 A1 & KR 10-2015-0006477 A & CN 104685055 A	1-19
Y	JP 2011-500023 A (イントラダイム コーポレーション) 2011.01.06, [0075] & US 2010/0210710 A1([0085]) & WO 2009/051659 A2 & EP 2209895 A1 & CA 2702039 A	1-19
Y	WO 2015/164818 A1 (STRIKE BIO, INC.) 2015.10.29, p.3 第2段落 & JP 2017-518764 A([0010]) & US 2015/0307885 A1 & EP 3134528 A1 & CN 106661576 A	1-19
A	木曾 眞, 糖鎖の構造と機能について (その2), 日本醤油研究所雑誌, Vol.30, No.3, 財団法人日本醤油研究所, 2004, p.77-84, 図21	1-19