

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-2082

(P2017-2082A)

(43) 公開日 平成29年1月5日(2017.1.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/44 (2017.01)	A 6 1 K 47/44	4 C 0 7 6
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	4 C 0 8 4
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 7/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/02	4 H 0 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
審査請求 有 請求項の数 9 O L (全 142 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-191166 (P2016-191166)	(71) 出願人	506336728
(22) 出願日	平成28年9月29日 (2016. 9. 29)		アルニラム ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2014-211560 (P2014-211560) の分割		ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.
原出願日	平成20年12月4日 (2008. 12. 4)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0
(31) 優先権主張番号	60/992, 309	(74) 代理人	100073184
(32) 優先日	平成19年12月4日 (2007. 12. 4)		弁理士 柳田 征史
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100090468
(31) 優先権主張番号	61/127, 751		弁理士 佐久間 剛
(32) 優先日	平成20年5月14日 (2008. 5. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/091, 093		
(32) 優先日	平成20年8月22日 (2008. 8. 22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 標的化脂質

(57) 【要約】

【課題】核酸のインビボ送達に有利な標的化脂質およびこれらの脂質を含む脂質粒子、ならびにインビボでの治療的使用に好適な核酸-脂質粒子組成物を提供する。

【解決手段】構造 L^{100} -リンカー- L^{100} (式中、 L^{100} は、脂質、親油性物質、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、 L^{101} は、リガンドまたは $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_pO(CH_2)_qCH_2$ -リガンドであり、p は、1~1000 であり、かつ q は、1~20 である。) の標的化脂質を提供する。さらに、本発明は、治療剤を細胞に送達するための組成物および方法を提供する。特に、これらは、核酸を効率的に封入し、封入された核酸をインビボで細胞に効率的に送達する新規の脂質および核酸-脂質粒子を含む。

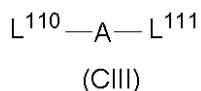
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式 (C I I I) に示す構造を有する標的化脂質：

【化 1】

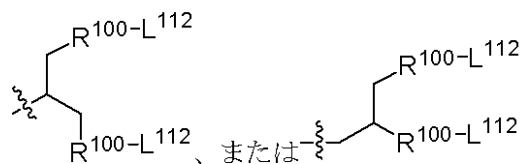


式中、

L^{110} は、

10

【化 2】

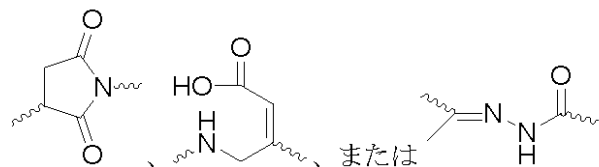


であり；

R^{110} は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、CO、NH、O、S、S-S、 $-C(CH_3)_2-S-S-$ 、 $-CH(CH_3)-S-S-$ 、C(O)、OC(O)、C(O)O、NHC(O)、C(O)NH、NHCH₂、CH₂、CH₂NH、CH₂O、CH=N-O、ヘテロアリール、ヘテロ環、

20

【化 3】

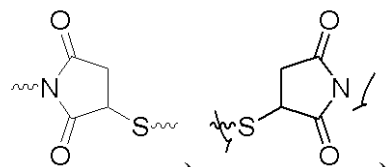


であり；

30

A は、O、NH、NCH₃、S、CH₂、S-S、 $-C(CH_3)_2-S-S-$ 、 $-CH(CH_3)-S-S-$ 、 $-O-N=C-$ 、 $-C(O)-N(H)-N=C-$ 、 $-C=N-O-$ 、 $-C=N-N(H)-C(O)-$ 、 $-C(O)N(Me)-N=C-$ 、 $-C=N-N(Me)-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-O-$ 、 $-O-C(O)-NH-$ 、 $-NH-C(O)-O-$ 、 $-NH-C(O)-NH-$ 、 $-N(Me)-C(O)-N(Me)-$ 、 $-N(H)-C(O)-N(Me)-$ 、 $-N(Me)-C(O)-N(H)-$ 、 $-C(O)-O-$ 、 $-C(O)-N(H)-$ 、 $-C(O)-N(Me)-$ 、 $-O-C(O)-$ 、 $-NH-C(O)-$ 、 $-N(Me)-C(O)-$ 、 $-C=N-$ 、 $-N=C-$ 、

【化 4】

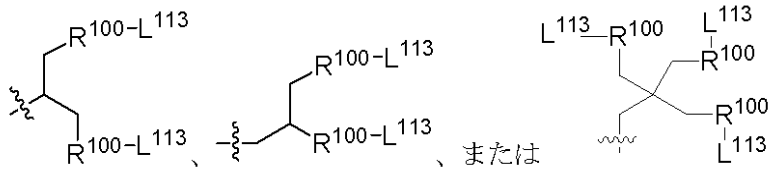


40

ヘテロ環、またはヘテロアリールであり；

L^{111} は、 L^{113} 、 L^{114} 、

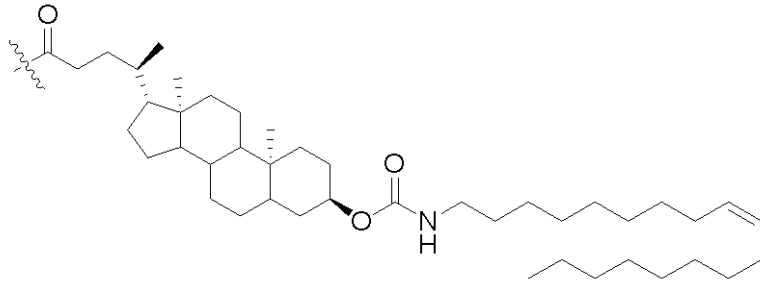
【化 5】



であり；

L^{112} は、それぞれ存在ごとに独立して、コレステロール、

【化 6】

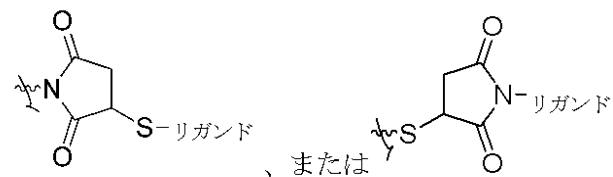


C_5-C_{31} アルキル、 C_5-C_{31} アルケニル、または C_5-C_{31} アルキニルであり、これらは各々、随意的に、1つ以上の置換基で置換されており；

L^{113} は、それぞれ存在ごとに独立して、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_pO(CH_2)_qCH_2-L^{114}$ であり；

L^{114} は、それぞれ存在ごとに独立して、リガンド、 $-C(O)-$ リガンド、 $-O-C(O)-$ リガンド、 $-N(H)-$ リガンド、 $-O-C(O)-N(H)-$ リガンド、 $-O-C(O)-O-$ リガンド、 $-NH-C(O)-N(H)-$ リガンド、 $-NH-C(O)-O-$ リガンド、 $-S-S-$ リガンド、 $-O-N=C-$ リガンド、 $-NH-N=C-$ リガンド、 $-C=N-O-$ リガンド、 $-C=N-N(H)-$ リガンド、ヘテロ環ーリガンド、ヘテロアリールーリガンド、

【化 7】



であり；ここで、リガンドは葉酸または糖質であり、

p は、1～1000であり；かつ

q は、1～20である。

【請求項 2】

(i) 請求項 1 記載の標的化脂質；(ii) カチオン性脂質；(iii) DSPC、POPC、DOPE、および SM から選択される中性脂質；(iv) コレステロール；ならびに (v) PEG-DMG または PEG-DMA を含み、

これらの構成要素が、標的化脂質約 0.5～50%：カチオン性脂質 20～60%：中性脂質 5～25%：コレステロール 25～55%：PEG-DMG または PEG-DMA 0.5～15% というモル比である薬学的組成物。

【請求項 3】

治療剤をさらに含む、請求項 2 記載の薬学的組成物。

【請求項 4】

10

20

30

40

50

前記治療剤がオリゴヌクレオチドである、請求項 3 記載の薬学的組成物。

【請求項 5】

前記オリゴヌクレオチドが一本鎖である、請求項 4 記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

前記オリゴヌクレオチドが二本鎖である、請求項 4 記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

前記オリゴヌクレオチドが iRNA 剤である、請求項 4 記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

前記オリゴヌクレオチドが分解に耐えるように修飾される、請求項 4 記載の薬学的組成物。

10

【請求項 9】

前記オリゴヌクレオチドが、コンジュゲートされたりガンドを含む、請求項 4 記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、米国仮特許出願第 60/992,309 号（2007 年 12 月 4 日出願）；米国仮特許出願第 61/013,597 号（2007 年 12 月 13 日出願）；米国仮特許出願第 61/127,751 号（2008 年 5 月 14 日出願）；米国仮特許出願第 61/091,093 号（2008 年 8 月 22 日出願）；および米国仮特許出願第 61/097,261 号（2008 年 9 月 16 日出願）に対する優先権の利益を主張する。これらの先行出願の全ての内容は、その全体が参照により本明細書に援用される。

20

【政府援助に関する記載】

【0002】

本明細書に記載される研究は、少なくとも一部は、国立アレルギー感染症研究所／国立衛生研究所／保健社会福祉省（NIAID/NIH/DHHS）から与えられた契約番号 HHSN266200600012C、ならびに国防総省および防衛威嚇緩和機関（DOD/DTRA）から与えられた契約番号 HDTRA-1-07-C-0082 の下での米国政府資金を用いてなされたものである。したがって、政府は本発明における一定の権利を有し得る。

30

【技術分野】

【0003】

本発明は、脂質粒子を用いた治療剤送達分野に関する。特に、本発明は、核酸のインビボ送達に有利な標的化脂質およびこれらの脂質を含む脂質粒子、ならびにインビボでの治療的使用に好適な核酸-脂質粒子組成物を提供する。さらに、本発明は、これらの組成物を作製する方法、および例えば、さまざまな疾患状態の治療のために、これらの組成物を用いて核酸を細胞に導入する方法を提供する。

【背景技術】

【0004】

オリゴヌクレオチド化合物は、医学において重要な治療用途を有する。特定の疾患の原因となる遺伝子をサイレンシングするためにオリゴヌクレオチドを用いることができる。遺伝子サイレンシングは、翻訳を阻害することによってタンパク質の生成を妨げる。重要なことに、遺伝子サイレンシング剤は、疾患と関連するタンパク質の機能を阻害する従来型の小有機化合物に取って代わるものとして有望視されている。siRNA、アンチセンス RNA、およびマイクロ RNA は、遺伝子サイレンシングによってタンパク質の生成を妨げるオリゴヌクレオチドである。

40

【0005】

RNA 干渉、すなわち「RNAi」は、線虫に導入されたときに、二本鎖 RNA（dsRNA）が遺伝子発現を阻止することができるという観察を説明するために、Fire および同僚らが最初に作り出した用語である（非特許文献 1）。短い dsRNA は、脊椎動

50

物を含む、多くの生物において遺伝子特異的な転写後サイレンシングを導くものであり、遺伝子機能を研究するための新しいツールを提供している。RNAiは、サイレンシングトリガーに相同なメッセンジャーRNAを壊す配列特異的な多成分ヌクレアーゼである、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)によって仲介される。RISCは、二本鎖RNAトリガーに由来する短いRNA(約22ヌクレオチド)を含有することが知られているが、この活性のタンパク質成分はまだ分かっていない。

【0006】

siRNA化合物は、種々の診断目的および治療目的に有望な薬剤である。siRNA化合物は、遺伝子の機能を同定するために用いることができる。さらに、siRNA化合物は、疾患を引き起こす遺伝子をサイレンシングすることによって作用する新しいタイプの医薬品として大きな可能性を提供する。中枢神経系疾患、炎症性疾患、代謝障害、腫瘍、感染性疾患、および眼疾患を含む多くの疾患を治療するための干渉RNA治療剤を開発する研究が現在進行中である。

【0007】

siRNAは、潜在的な抗ウイルス治療薬として極めて有効であることが示されており、最近多くの例が公表されている。ウイルスゲノム中の標的に対して向けられるsiRNA分子は、インフルエンザ(非特許文献2~4)、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)(非特許文献5)、B型肝炎ウイルス(HBV)(非特許文献6)、C型肝炎ウイルス(非特許文献7~8)、およびSARSコロナウイルス(非特許文献9)の動物モデルにおいて、ウイルス力価を数桁、飛躍的に低下させる。

【0008】

アンチセンス法とは、mRNAまたはDNAのような細胞内核酸の正常な必須機能(例えば、タンパク質合成)が妨げられるような、比較的短いオリゴヌクレオチドのmRNAまたはDNAへの相補的なハイブリダイゼーションのことである。ハイブリダイゼーションは、ワトソン-クリック塩基対を介したRNAまたは一本鎖DNAに対するオリゴヌクレオチドの配列特異的な水素結合である。このような塩基対を互いに相補的であると言う。

【0009】

Cohen(非特許文献10)によって論じられている、標的配列の発現レベルを変化させる天然に存在する事象には、2つの種類があると考えられる。第一の、ハイブリダイゼーション停止は、オリゴヌクレオチド阻害剤が、標的核酸に結合し、その結果、単なる立体障害によって、必須タンパク質(ほとんどの場合、リボソーム)の核酸への結合が妨げられる終結事象を説明するものである。

【0010】

アンチセンスオリゴヌクレオチドが標的配列の発現レベルを変化させるもう1つの手段は、標的mRNAへのハイブリダイゼーションと、それに続く細胞内RNAアーゼHによる標的RNAの酵素的切断によるものである。2'-デオキシリボフラノシルオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体が標的RNAとハイブリダイズし、この二重鎖がRNAアーゼH酵素を活性化して、RNA鎖を切断し、それによって、このRNAの正常な機能を破壊する。ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、この種のアンチセンス終結事象によって作用するアンチセンス薬剤の最も著明な例である。

【0011】

これらのおよび他の核酸をベースにした治療を使用する機会は大いに有望であり、現在の伝統的な医学では対処できない医学的問題の解決策を提供する。増々多くの疾患関連遺伝子の場所と配列が同定されつつあり、種々の疾患についての核酸をベースにした治療法の臨床試験が、現在進行中である。

【0012】

オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド類似体の治療薬としての適用の進歩にも関わらず、改善された薬理学的特性を有するオリゴヌクレオチドが必要とされている。核酸およびオリゴヌクレオチドの膜貫通送達の改善に向けた努力において、タンパク質担体

10

20

30

40

50

、抗体担体、リポソーム性送達系、エレクトロポレーション、直接注射、細胞融合、ウイルスベクター、およびリン酸カルシウムを介する形質転換が利用されている。しかしながら、これらの技術の多くは、膜貫通輸送が可能な細胞の種類と、このような輸送を達成するのに必要な条件とによって限定される。

【0013】

効果の改善を試みようとして、研究者らは、化学修飾された治療的核酸または未修飾の治療的核酸を送達するために、脂質をベースにした担体系も利用している。非特許文献11において、著者らは、アニオン性（従来型）のリポソーム、pH感受性リポソーム、免疫リポソーム、融合性リポソーム、およびカチオン性脂質／アンチセンス凝集体の使用に言及している。同様に、siRNAは、カチオン性リポソーム中で全身投与されており、これらの核酸－脂質粒子がヒト以外の霊長類を含む哺乳類における標的タンパク質の下方調節を改善することが報告されている（非特許文献12）。

10

【0014】

こうした進歩にもかかわらず、一般的な治療的使用に好適な改善された脂質－治療的核酸組成物が当技術分野で依然として必要とされている。これらの組成物は、高効率で核酸を封入し、高い薬物：脂質比を有し、封入された核酸を血清中の分解とクリアランスから保護し、全身送達に好適であり、封入された核酸の細胞内送達を提供することが好ましいであろう。さらに、これらの脂質－核酸粒子は、核酸の有効用量での患者治療が重大な毒性および／または患者へのリスクを伴わないように、良好な忍容性があり、かつ十分な治療指数を提供すべきである。本発明は、このような組成物、これらの組成物を作製する方法、および疾患の治療の目的を含めて、これらの組成物を用いて核酸を細胞に導入する方法を提供する。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Fireら（1998）Nature 391, 806－811

【非特許文献2】2～Gerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: 8676－8681（2004）

【非特許文献3】Tompkinsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: 8682－8686（2004）

30

【非特許文献4】Thomasら, Expert Opin. Biol. Ther. 5: 495－505（2005）

【非特許文献5】Bitkoら, Nat. Med. 11: 50－55（2005）

【非特許文献6】Morrisseyら, Nat. Biotechnol. 23: 1002－1007（2005）

【非特許文献7】Kapadia, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 2014－2018（2003）

【非特許文献8】Wilsonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 2783－2788（2003）

【非特許文献9】Liら, Nat. Med. 11: 944－951（2005）

40

【非特許文献10】Oligonucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Inc., 1989, Boca Raton, Fla.

【非特許文献11】Zelphati, OおよびSzoka, F. C., J. Contr. Rel. 41: 99－119（1996）

【非特許文献12】Zimmermannら, Nature 441: 111－114（2006）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

50

本発明は、核酸のインビボ送達に有利な標的化脂質およびこれらの脂質を含む脂質粒子、ならびにインビボでの治療的使用に好適な核酸-脂質粒子組成物を提供する。

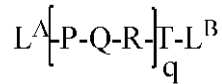
【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明は、下記式（I）に示す構造を有する標的化脂質を提供する：

【0018】

【化1】



式（I）

10

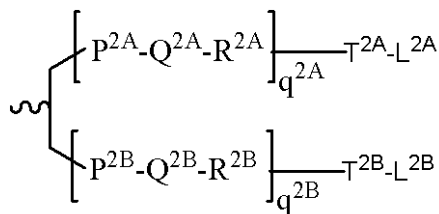
【0019】

式中、

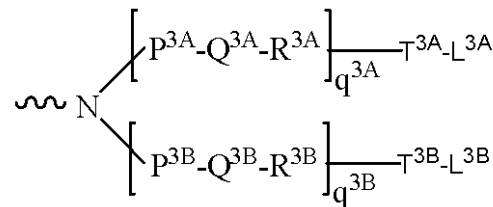
L^A は、糖質、グルコース、マンノース、ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、フコース、グルコサミン、ラクトース、マルトース、葉酸、ペプチドから選択されるリガンドであるか、または下記式 I I ~ V：

【0020】

【化2】

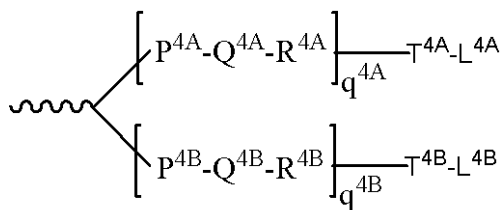


式（I I）

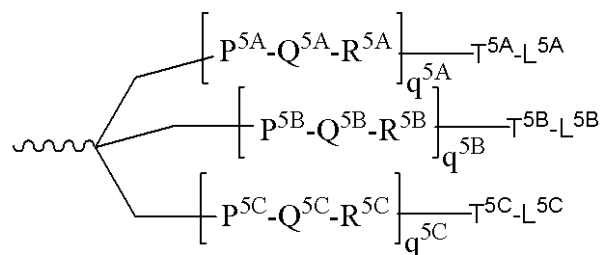


式（I I I）

20



式（I V）



式（V）

30

【0021】

に示す構造を有し；

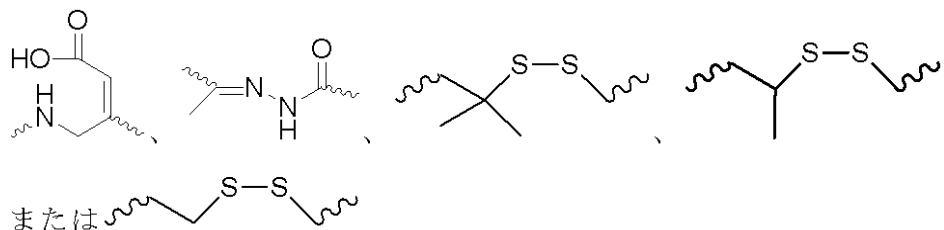
q 、 q^{2A} 、 q^{2B} 、 q^{3A} 、 q^{3B} 、 q^{4A} 、 q^{4B} 、 q^{5A} 、 q^{5B} 、および q^{5C} は、それぞれ存在ごとに独立して、0~20であり；

P 、 P^{2A} 、 P^{2B} 、 P^{3A} 、 P^{3B} 、 P^{4A} 、 P^{4B} 、 P^{5A} 、 P^{5B} 、 P^{5C} 、 T 、 T^{2A} 、 T^{2B} 、 T^{3A} 、 T^{3B} 、 T^{4A} 、 T^{4B} 、 T^{5A} 、 T^{5B} 、および T^{5C} は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、 NR' 、 O 、 S 、 $C(O)$ 、 $OC(O)$ 、 $C(O)O$ 、 $NHC(O)$ 、 $C(O)NH$ 、 $NHCH_2$ 、 CH_2 、 CH_2NH もしくは CH_2O 、 $NHCH(R^a)C(O)$ 、 $-C(O)-CH(R^a)-NH-$ 、 CO 、 $CH=N-O$ 、 CH_2S 、尿素、ヘテロ環、ヘテロアリアル、

【0022】

40

【化 3】



【0023】

10

であり；

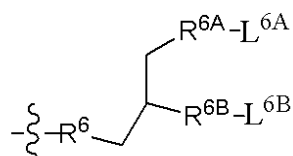
Q、Q^{2A}、Q^{2B}、Q^{3A}、Q^{3B}、Q^{4A}、Q^{4B}、Q^{5A}、Q^{5B}、およびQ^{5C}は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-C(R')(R'')(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_mC(R')(R'')(CH_2)_pCH_2CH_2-$ 、または $-(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH-$ であり；

L^Bは、親油性物質、ステロイド（例えば、ウバオール、ヘシゲニン、ジオスゲニン）、テルペン（例えば、トリテルペン、例えば、サルササボゲニン、フリーデリン、エピフリーデラノール誘導体化リトコール酸）、ビタミン（例えば、葉酸、ビタミンA、ビオチン、ピリドキサル）、セラミドからなる群から選択されるリガンドであるか、または下記式（VI）：

20

【0024】

【化 4】



式(VI)

【0025】

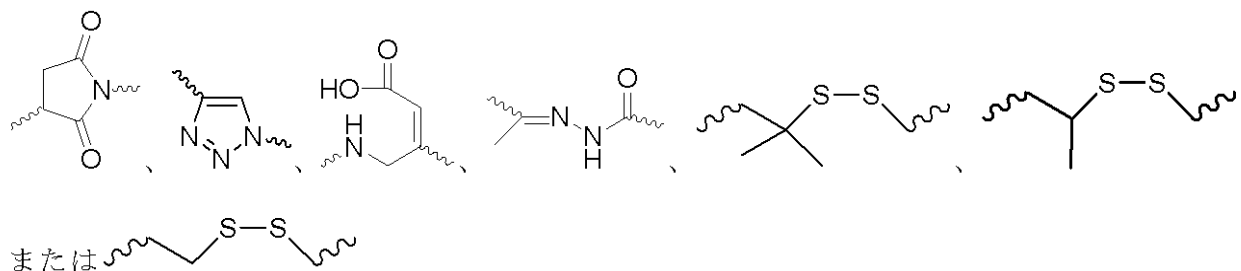
30

の構造を有し；

R、R²、R^{2A}、R^{2B}、R^{3A}、R^{3B}、R^{4A}、R^{4B}、R^{5A}、R^{5B}、R^{5C}、R⁶、R^{6A}、およびR^{6B}は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、CO、NH、NR'、O、S、C(O)、OC(O)、C(O)O、NHC(O)、C(O)NH、NHCH₂、CH₂、CH₂NHもしくはCH₂O、NHCH(R^a)C(O)、 $-C(O)-CH(R^a)-NH-$ 、CO、CH=N-O、

【0026】

【化 5】



40

【0027】

であり；

L^{2A}、L^{2B}、L^{3A}、L^{3B}、L^{4A}、L^{4B}、L^{5A}、L^{5B}、およびL^{5C}は、それぞれ存在ごとに独立して、糖質、グルコース、マンノース、ガラクトース、N-ア

50

セチルーガラクトサミン、フコース、グルコサミン、ラクトース、マルトース、葉酸、またはペプチドであり；

R' および R'' は、それぞれ独立して、 H 、 CH_3 、 OH 、 SH 、 NH_2 、 NR^{10} 、 R^{20} 、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであるか；あるいは、 R' および R'' は、それぞれ独立にハロゲンであり；

R^a は、 H または アミノ酸側鎖であり；

R^{10} および R^{20} は、それぞれ独立して、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり；

L^{6A} および L^{6B} は、それぞれ独立して、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、これらは各々、随意的に1つ以上の置換基で置換されており；

m は、それぞれ存在ごとに独立して、0～50であり；

n は、それぞれ存在ごとに独立して、1～20であり；かつ

p は、それぞれ存在ごとに独立して、0～50である。

【0028】

q 、 q^{2A} 、 q^{2B} 、 q^{3A} 、 q^{3B} 、 q^{4A} 、 q^{4B} 、 q^{5A} 、 q^{5B} 、および q^{5C} のいずれかが1よりも大きいとき、繰り返し単位は、互いに同じであることも、または異なることもあり、例えば、 q が3であるとき、単位 $-[P-Q-R]_q-$ は、 $-[P-Q-R]-[P-Q-R]-[P-Q-R]-$ に拡大され、この $-[P-Q-R]-$ 単位の全てが、同じであることも、互いに全く異なることも、またはこれらの混合であることもある。

【0029】

本発明はさらに、脂質粒子および薬学的組成物を調製する方法、ならびにこれらの脂質粒子および薬学的組成物を調製する際に有用なキットを含む。本方法は、薬剤、例えば、選択された標的遺伝子（例えば、肝臓で発現する遺伝子）を標的とするオリゴヌクレオチドをベースにしたコンストラクトと標的化脂質とを含む組成物を提供する工程；および組成物を被検対象（例えば、動物）に投与する工程；それによって、標的遺伝子の発現を評価することにより、薬剤と標的化脂質を評価する工程を含む。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】 標的化リガンドを用いた標的送達の概略図。

【図2】 コンジュゲートされた治療剤とともに標的化リガンドを用いる標的送達の概略図。

【図3】 テザーで隔てられた1つ以上の標的化部分 R を用いるポリマー薬物送達系の模式図。 X と Y は、スキャフォールド／テザーとテザー／リガンド間の化学的結合を示す。 R' および／または R'' は、標的化基、融合基、エンドソーム放出基、疎水性／親水性バランス（例えば、さまざまな長さの飽和アルキルもしくは不飽和アルキル）、またはさまざまな長さの PEG 、または PEG のような循環促進剤、 PK 調節因子のいずれかである。

【図4】 テザーと結合 Z （生体切断可能であるかまたは安定である）を介してポリマー骨格にコンジュゲートされた治療剤コンジュゲートを用いるポリマー薬物送達系の概略図。

【図5】 標的化部分を有する pH 感受性脂質。

【図6】 カチオン性脂質－葉酸コンジュゲート。

【図7】 脂質－葉酸コンジュゲート。

【図8A】 標的送達のための葉酸コンジュゲート脂質、 PEG －脂質、および送達系。

【図8B】 標的送達のための葉酸コンジュゲート脂質、 PEG －脂質、および送達系。

【図9】 葉酸コンジュゲートの合成。

【図10】 本発明の PEG －脂質の模式図。

【図11】 本発明の PEG －脂質の模式図。

【図12】 本発明の PEG －脂質の模式図。

【図13】 本発明の PEG －脂質の模式図。

【図 1 4】本発明の P E G－脂質の模式図。
 【図 1 5】本発明の P E G－脂質の模式図。
 【図 1 6】本発明の P E G－脂質の模式図。
 【図 1 7】本発明の P E G－脂質の模式図。
 【図 1 8】本発明の P E G－脂質の模式図。
 【図 1 9】本発明の P E G－脂質の模式図。

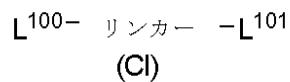
【発明を実施するための形態】

【0031】

一態様では、本発明は、下記式 (C I) に示す構造を有する標的化脂質モノマーを提供する。

【0032】

【化 6】



【0033】

式中、

L^{100} は、それぞれ存在ごとに独立して、脂質、親油性物質、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、これらは各々、随意的に、1つ以上の置換基で置換されており；

L^{101} は、それぞれ存在ごとに独立して、リガンドまたは $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p\text{O}(\text{CH}_2)_q\text{CH}_2-$ リガンドであり；

p は、1～1000であり；かつ

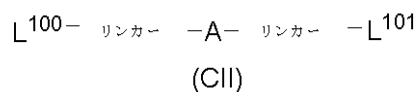
q は、1～20である。

【0034】

一実施形態では、標的化脂質モノマーは、下記式 (C I I) に示す構造を有する。

【0035】

【化 7】



【0036】

式中、

A は、O、NH、NCH₃、S、CH₂、S-S、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{N}=\text{C}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{H})-\text{N}=\text{C}-$ 、 $-\text{C}=\text{N}-\text{O}-$ 、 $-\text{C}=\text{N}-\text{N}(\text{H})-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{Me})-\text{N}=\text{C}-$ 、 $-\text{C}=\text{N}-\text{N}(\text{Me})-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-\text{N}(\text{Me})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{Me})-$ 、 $-\text{N}(\text{H})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{Me})-$ 、 $-\text{N}(\text{Me})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{Me})-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{Me})-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}=\text{N}-$ 、 $-\text{N}=\text{C}-$ 、

【0037】

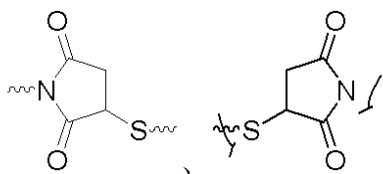
10

20

30

40

【化 8】



【0038】

ヘテロ環、またはヘテロアリールであり；

L^{100} は、それぞれ存在ごとに独立して、脂質、親油性物質、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、これらは各々、随意的に、1つ以上の置換基で置換されており；

L^{101} は、それぞれ存在ごとに独立して、リガンドまたは $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_pO(CH_2)_qCH_2-$ リガンドであり；

p は、1～1000であり；かつ

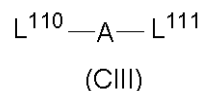
q は、1～20である。

【0039】

一実施形態では、標的化脂質モノマーは、下記式 (CIII) に示す構造を有する。

【0040】

【化 9】



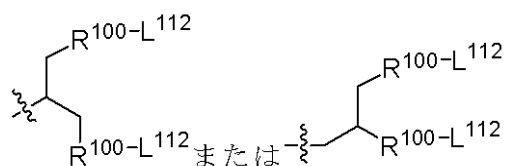
【0041】

式中、

L^{100} は、 L^{112} 、

【0042】

【化 10】



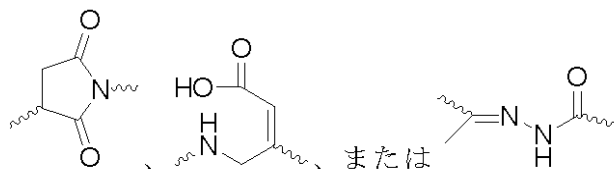
【0043】

であり；

R^{100} は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、CO、NH、O、S、S-S、 $-C(CH_3)_2-S-S-$ 、 $-CH(CH_3)-S-S-$ 、C(O)、OC(O)、C(O)O、NHC(O)、C(O)NH、NHCH₂、CH₂、CH₂NH、CH₂O、CH=N-O、ヘテロアリール、ヘテロ環、

【0044】

【化 11】



10

20

30

40

50

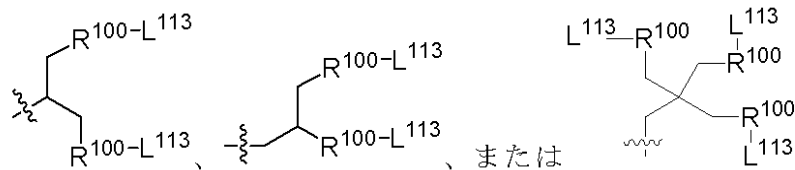
【0045】

であり；

 L^{111} は、 L^{113} 、 L^{114} 、

【0046】

【化12】



10

【0047】

であり；

L^{112} は、それぞれ存在ごとに独立して、脂質、親油性物質、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、これらは各々、随意的に、1つ以上の置換基で置換されており；

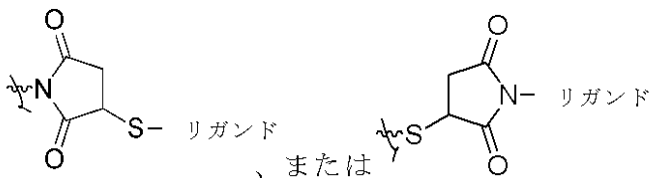
L^{113} は、それぞれ存在ごとに独立して、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_pO(CH_2)_qCH_2-L^{114}$ であり；

L^{114} は、それぞれ存在ごとに独立して、リガンド、 $-C(O)-$ リガンド、 $-O-C(O)-$ リガンド、 $-N(H)-$ リガンド、 $-O-C(O)-N(H)-$ リガンド、 $-O-C(O)-O-$ リガンド、 $-NH-C(O)-N(H)-$ リガンド、 $-NH-C(O)-O-$ リガンド、 $-S-S-$ リガンド、 $-O-N=C-$ リガンド、 $-NH-N=C-$ リガンド、 $-C=N-O-$ リガンド、 $-C=N-N(H)-$ リガンド、ヘテロ環リガンド、ヘテロアリーールリガンド、

20

【0048】

【化13】



30

【0049】

であり；

 p は、1～1000であり；かつ q は、1～20である。

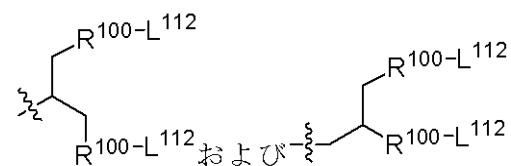
【0050】

一実施形態では、 L^{110} は、

【0051】

【化14】

40



【0052】

からなる群から選択される。

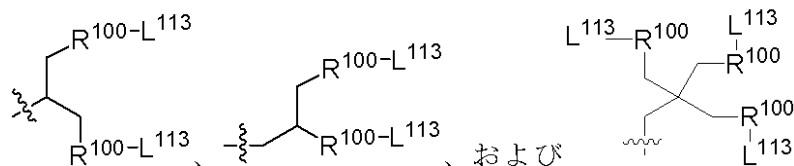
【0053】

一実施形態では、 L^{111} は、

50

【0054】

【化15】



【0055】

からなる群から選択される。

10

【0056】

一実施形態では、 L^{112} は、アルキル、例えば、 C_5-C_{31} アルキル、例えば、 $C_{10}-C_{18}$ アルキル、例えば、 C_{14} アルキル、 C_{15} アルキル、 C_{16} アルキル、 C_{17} アルキル、 C_{18} アルキルである。

【0057】

一実施形態では、 L^{112} は、アルケニル、例えば、 C_5-C_{31} アルケニル、例えば、 $C_{10}-C_{18}$ アルケニル、例えば、 C_{14} アルケニル、 C_{15} アルケニル、 C_{16} アルケニル、 C_{17} アルケニル、 C_{18} アルケニルである。一実施形態では、 L^{112} は、少なくとも1つの二重結合を含む。

【0058】

一実施形態では、 L^{112} は、アルキニル、例えば、 C_5-C_{31} アルキニル、例えば、 $C_{10}-C_{18}$ アルキニル、例えば、 C_{14} アルキニル、 C_{15} アルキニル、 C_{16} アルキニル、 C_{17} アルキニル、 C_{18} アルキニルである。一実施形態では、 L^{112} は、少なくとも1つの三重結合を含む。一実施形態では、 L^{112} は、少なくとも1つの二重結合と少なくとも1つの三重結合とを含む。

20

【0059】

一実施形態では、 L^{112} は、少なくとも1つの二重結合、例えば、E配置またはZ配置の二重結合を含む。

【0060】

一実施形態では、 L^{112} は、2つの二重結合を含む。一実施形態では、少なくとも1つの二重結合がZ配置を有する。一実施形態では、両方の二重結合がZ配置を有する。一実施形態では、少なくとも1つの二重結合がE配置を有する。一実施形態では、両方の二重結合がE配置を有する。

30

【0061】

一実施形態では、 L^{112} は、3つの二重結合を含む。一実施形態では、少なくとも1つの二重結合がZ配置を有する。一実施形態では、2つの二重結合がZ配置を有する。一実施形態では、3つ全ての二重結合がZ配置を有する。一実施形態では、少なくとも1つの二重結合がE配置を有する。一実施形態では、2つの二重結合がE配置を有する。一実施形態では、3つ全ての二重結合がE配置を有する。

【0062】

一実施形態では、 L^{112} は、コレステロールである。

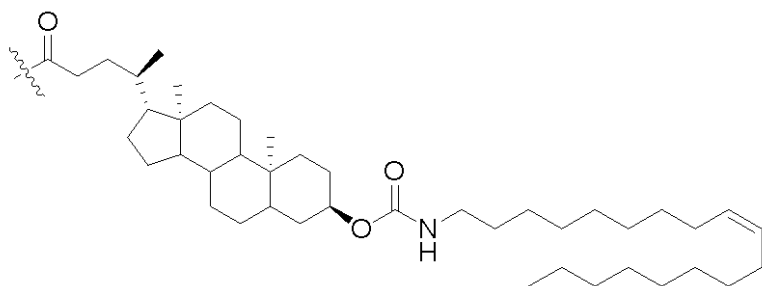
40

【0063】

一実施形態では、 L^{112} は、

【0064】

【化 1 6】



10

【0 0 6 5】

である。

【0 0 6 6】

一実施形態では、 L^{114} は、標的化リガンド、例えば、葉酸、糖質である。

【0 0 6 7】

一実施形態では、 L^{114} は、式 (I I) ~ (V) に示す構造を有する。

【0 0 6 8】

一実施形態では、 L^{114} は、図 8 に示す群から選択される。

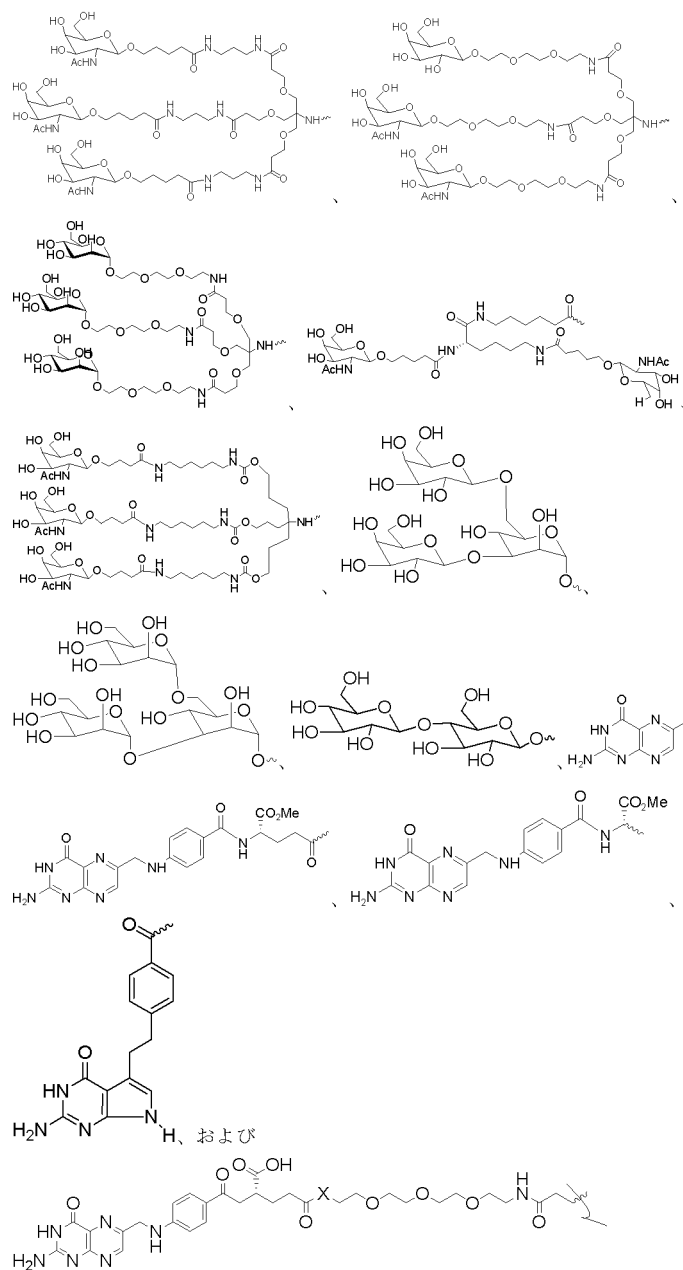
【0 0 6 9】

一実施形態では、 L^{114} は、

20

【0 0 7 0】

【化 1 7】



10

20

30

40

【0071】

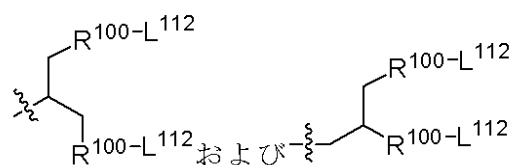
からなる群から選択される。

【0072】

一実施形態では、 L^{110} が、

【0073】

【化 1 8】



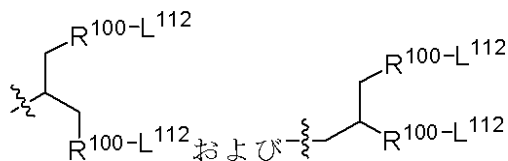
【0074】

からなる群から選択されるとき、 L^{110} はラセミ混合物である。

【0075】

50

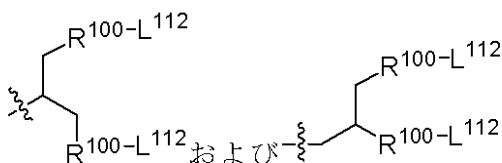
一実施形態では、 L^{110} が、
 【0076】
 【化19】



10

【0077】
 からなる群から選択される時、 L^{110} は、R異性体のエナンチオマー過剰（例えば、少なくとも約65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%）である。一実施形態では、 L^{110} は、エナンチオマー的に純粋な「R」異性体である。

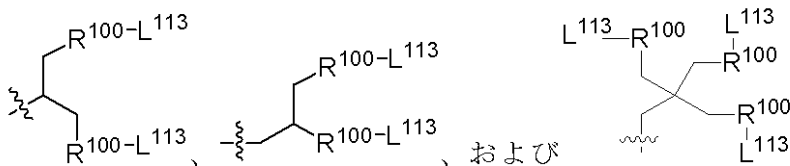
【0078】
 一実施形態では、 L^{110} が、
 【0079】
 【化20】



20

【0080】
 からなる群から選択される時、 L^{110} は、S異性体のエナンチオマー過剰（例えば、少なくとも約65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%）である。一実施形態では、 L^{110} は、エナンチオマー的に純粋な「S」異性体である。

【0081】
 一実施形態では、 L^{111} が、
 【0082】
 【化21】



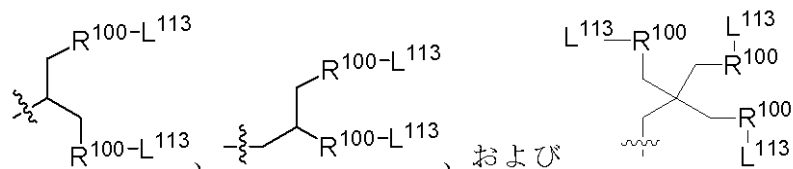
30

【0083】
 からなる群から選択される時、 L^{111} はラセミ混合物である。

40

【0084】
 一実施形態では、 L^{111} が、
 【0085】

【化 2 2】



【0086】

からなる群から選択されるとき、 L^{111} は、R 異性体のエナンチオマー過剰（例えば、少なくとも約 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または 99%）である。一実施形態では、 L^{111} は、エナンチオマー的に純粋な「R」異性体である。

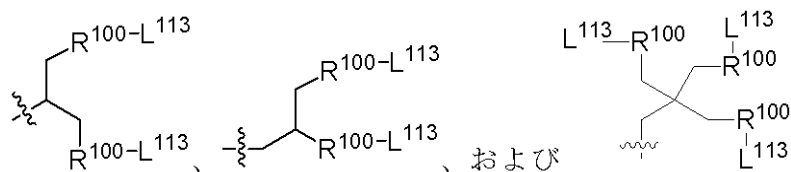
10

【0087】

一実施形態では、 L^{111} が、

【0088】

【化 2 3】



20

【0089】

からなる群から選択されるとき、 L^{111} は、S 異性体のエナンチオマー過剰（例えば、少なくとも約 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または 99%）である。一実施形態では、 L^{111} は、エナンチオマー的に純粋な「S」異性体である。

【0090】

一態様では、本発明は、下記式（CIV）で示す構造を有する脂質モノマーである

【0091】

【化 2 4】



(CIV)

30

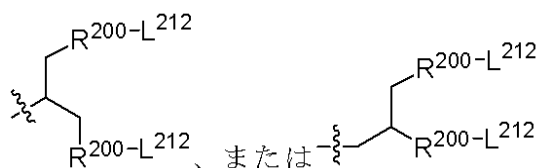
【0092】

式中、

L^{210} は、 L^{211} 、

【0093】

【化 2 5】



40

【0094】

であり；

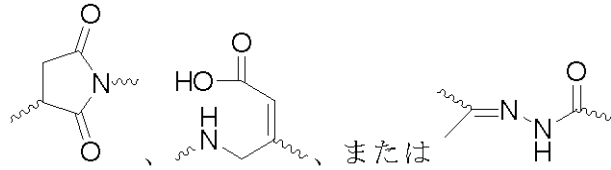
R^{200} は、それぞれ存在しないか、CO、NH、O、S、S-S、 $-C(CH_3)_2$

50

—S—S—、—CH(CH₃)—S—S—、C(O)、OC(O)、C(O)O、NHC(O)、C(O)NH、NHCH₂、CH₂、CH₂NH、CH₂O、CH=N—O、ヘテロアリアル、ヘテロ環、

【0095】

【化26】



10

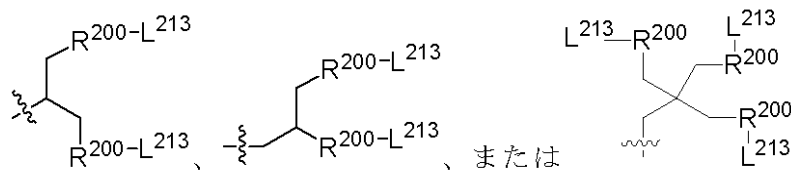
【0096】

であり；

L²¹¹は、L²¹³、

【0097】

【化27】



20

【0098】

であり；

L²¹²は、それぞれ存在ごとに独立して、脂質、親油性物質、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、これらは各々、随意的に、1つ以上の置換基で置換されており；

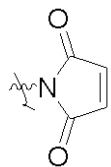
L²¹³は、それぞれ存在ごとに独立して、—CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_pO(CH₂)_qCH₂—L²¹⁴であり；

L²¹⁴は、それぞれ存在ごとに独立して、H、—OH、—OCH₃、—NH₂、N(H)CH₃、N(CH₃)₂、—SH、—SCH₃、—N₃、—COOH、—C(O)NH₂、—C(O)NHNH₂、—CH=CH₂、—C≡CH、または

30

【0099】

【化28】



40

【0100】

であり；

pは、1～1000であり；かつ

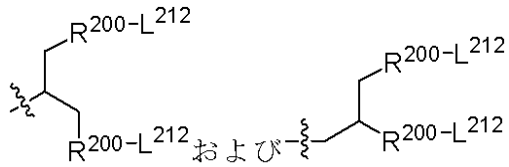
qは、1～20である。

【0101】

一実施形態では、L²¹⁰は、

【0102】

【化 2 9】



【0103】

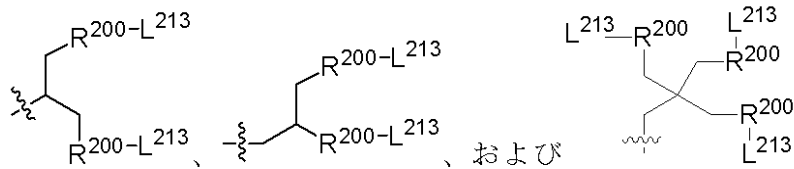
からなる群から選択される。

【0104】

一実施形態では、 L^{211} は、

【0105】

【化 3 0】



【0106】

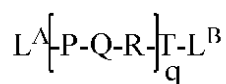
からなる群から選択される。

【0107】

一態様では、本発明は、下記式 (I) に示す構造を有する標的化脂質を提供する：

【0108】

【化 3 1】



式 (I)

【0109】

式中、

L^A は、糖質、グルコース、マンノース、ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、フコース、グルコサミン、ラクトース、マルトース、葉酸、ペプチドから選択されるリガンドであるか、または下記式 I I ~ V :

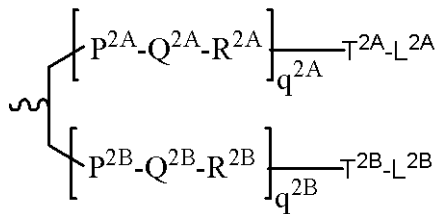
【0110】

10

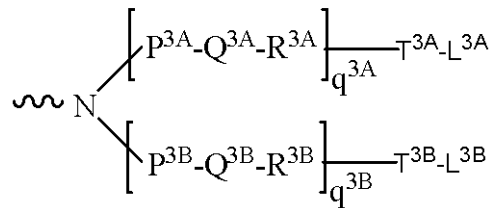
20

30

【化 3 2】

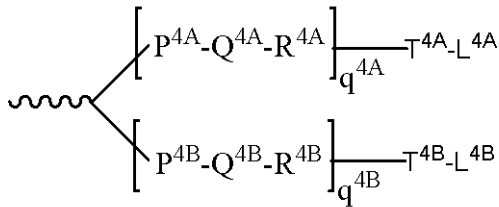


式(I I)



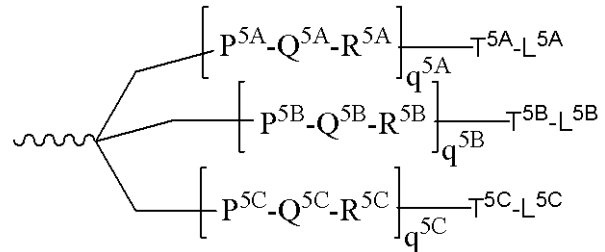
式(I I I)

10



式(I V)

、または



式(V)

20

【0 1 1 1】

に示す構造を有し；

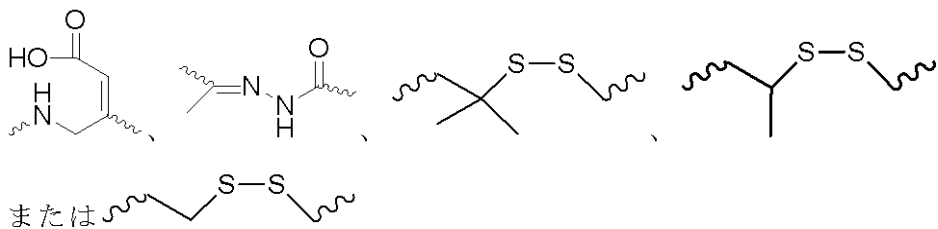
q 、 q^{2A} 、 q^{2B} 、 q^{3A} 、 q^{3B} 、 q^{4A} 、 q^{4B} 、 q^{5A} 、 q^{5B} 、および q^{5C} は、それぞれ存在ごとに独立して、0～20であり；

P 、 P^{2A} 、 P^{2B} 、 P^{3A} 、 P^{3B} 、 P^{4A} 、 P^{4B} 、 P^{5A} 、 P^{5B} 、 P^{5C} 、 T 、 T^{2A} 、 T^{2B} 、 T^{3A} 、 T^{3B} 、 T^{4A} 、 T^{4B} 、 T^{4A} 、 T^{5B} 、および T^{5C} は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、 NR' 、 O 、 S 、 $C(O)$ 、 $OC(O)$ 、 $C(O)O$ 、 $NHC(O)$ 、 $C(O)NH$ 、 $NHCH_2$ 、 CH_2 、 CH_2NH もしくは CH_2O 、 $NHCH(R^a)C(O)$ 、 $-C(O)-CH(R^a)-NH-$ 、 CO 、 $CH=N-O$ 、 CH_2S 、尿素、ヘテロ環、ヘテロアリール、

30

【0 1 1 2】

【化 3 3】



【0 1 1 3】

であり；

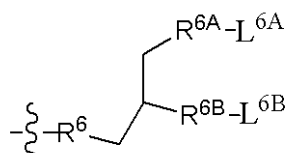
Q 、 Q^{2A} 、 Q^{2B} 、 Q^{3A} 、 Q^{3B} 、 Q^{4A} 、 Q^{4B} 、 Q^{5A} 、 Q^{5B} 、および Q^{5C} は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-C(R')(R'')(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_mC(R')(R'')-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2-$ 、または $-(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH-$ であり；

L^B は、親油性物質、ステロイド（例えば、ウバオール、ヘシゲニン、ジオスゲニン）、テルペン（例えば、トリテルペン、例えば、サルササボゲニン、フリーデリン、エピフリーデラノール誘導体化リトコール酸）、ビタミン（例えば、葉酸、ビタミンA、ビオチン、ピリドキサル）、セラミドからなる群から選択されるリガンドであるか、または下記式(V I)：

50

【0114】

【化34】



式(V1)

10

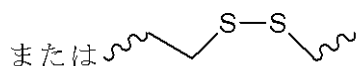
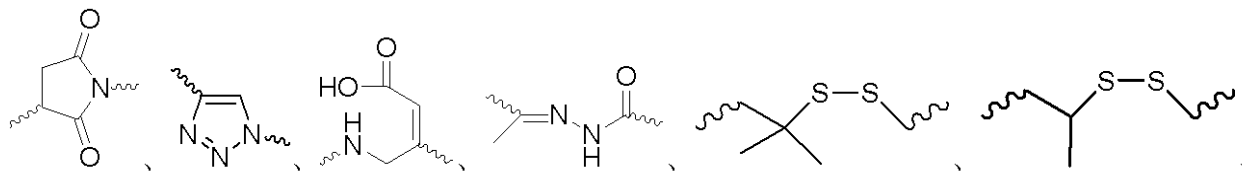
【0115】

の構造を有し；

R、R²、R^{2A}、R^{2B}、R^{3A}、R^{3B}、R^{4A}、R^{4B}、R^{5A}、R^{5B}、R^{5C}、R⁶、R^{6A}、およびR^{6B}は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、CO、NH、NR'、O、S、C(O)、OC(O)、C(O)O、NHC(O)、C(O)NH、NHCH₂、CH₂、CH₂NHもしくはCH₂O、NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、CO、CH=N-O、

【0116】

【化35】



20

【0117】

であり；

L^{2A}、L^{2B}、L^{3A}、L^{3B}、L^{4A}、L^{4B}、L^{5A}、L^{5B}、およびL^{5C}は、それぞれ存在ごとに独立して、糖質、グルコース、マンノース、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、フコース、グルコサミン、ラクトース、マルトース、葉酸、またはペプチドであり；

30

R'およびR''は、それぞれ独立して、H、CH₃、OH、SH、NH₂、NR¹⁰、R²⁰、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり；

R^aは、Hまたはアミノ酸側鎖であり；

R¹⁰およびR²⁰は、それぞれ独立して、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり；

L^{6A}およびL^{6B}は、それぞれ独立して、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、これらは各々、随意的に1つ以上の置換基で置換されており；

40

mは、それぞれ存在ごとに独立して、0～50であり；

nは、それぞれ存在ごとに独立して、1～20であり；かつ

pは、それぞれ存在ごとに独立して、0～50である。

【0118】

q、q^{2A}、q^{2B}、q^{3A}、q^{3B}、q^{4A}、q^{4B}、q^{5A}、q^{5B}、およびq^{5C}のいずれかが1よりも大きいとき、反復単位は、互いに同じであることも、または異なることもあり、例えば、qが3であるとき、単位-[P-Q-R]_q-は、-[P-Q-R]-[P-Q-R]-[P-Q-R]-に拡大され、この-[P-Q-R]-単位の全てが、同じであることも、互いに全く異なることも、またはこれらの混合であることもある。

50

【0119】

親油性部分は、例えば、脂質、コレステロール、オレイル残基、リノレオイル基、ラウロイル残基、ドコシニル残基、ステアロイル残基、レチニル残基、コレステリル残基、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1, 3-ビス-O (ヘキサデシル) グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1, 3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O 3- (オレオイル) リトコール酸、O 3- (オレオイル) コレン酸、ジメトキシトリチル、フェノキサジン、または胆汁酸からなる群から選択することができる。好ましい親油性部分はコレステロールである。

【0120】

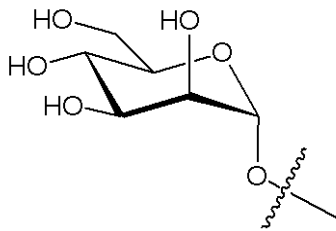
一実施形態では、 L^A は、マンノース、ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミンであるか、または式Vに示す構造を有する。好ましい実施形態では、 L^A は、マンノースである。一実施形態では、 L^A は、式Vに示す構造を有する。

【0121】

一実施形態では、 L^A は、

【0122】

【化36】



【0123】

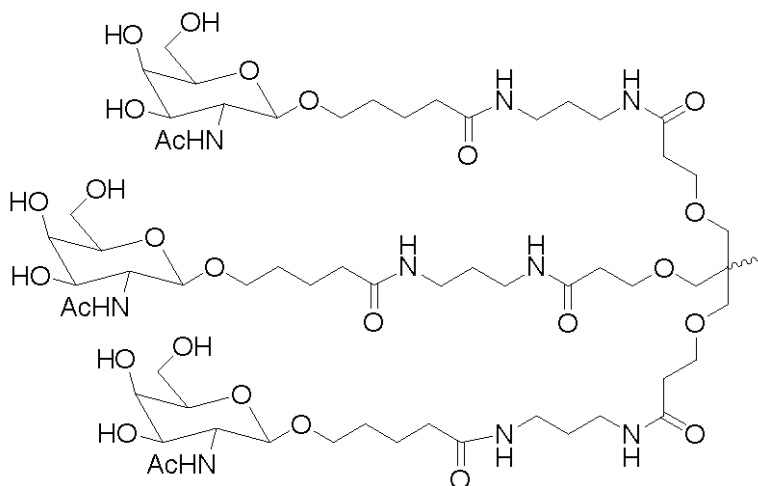
である。

【0124】

一実施形態では、 L^A は、

【0125】

【化37】



【0126】

である。

【0127】

一実施形態では、 L^{2A} と L^{2B} は両方とも同じである。

【0128】

一実施形態では、 $L^2 A$ と $L^2 B$ は両方とも異なっている。

【0129】

一実施形態では、 $L^3 A$ と $L^3 B$ は両方とも同じである。

【0130】

一実施形態では、 $L^3 A$ と $L^3 B$ は両方とも異なっている。

【0131】

一実施形態では、 $L^4 A$ と $L^4 B$ は両方とも同じである。

【0132】

一実施形態では、 $L^4 A$ と $L^4 B$ は両方とも異なっている。

【0133】

一実施形態では、 $L^5 A$ と $L^5 B$ と $L^5 C$ は全て同じである。

【0134】

一実施形態では、 $L^5 A$ と $L^5 B$ と $L^5 C$ のうちの2つが同じである。

【0135】

一実施形態では、 $L^5 A$ と $L^5 B$ が同じで、 $L^5 C$ が異なっている。

【0136】

一実施形態では、 $L^5 A$ と $L^5 C$ が同じで、 $L^5 B$ が異なっている。

【0137】

一実施形態では、 $L^5 B$ と $L^5 C$ が同じで、 $L^5 A$ が異なっている。

【0138】

一実施形態では、 $L^6 A$ と $L^6 B$ は両方とも同じである。

【0139】

一実施形態では、 $L^6 A$ と $L^6 B$ は両方とも異なっている。

【0140】

一実施形態では、 $R^6 A$ と $R^6 B$ は各々、O、C(O)、NH、またはNR'である。

【0141】

一実施形態では、 $L^6 A$ と $L^6 B$ は各々、独立して、アルキル、例えば、 $C_6 - C_{28}$ アルキル、例えば、 $C_{10} - C_{18}$ アルキル、例えば、 C_{14} アルキルである。一実施形態では、 $L^6 A$ と $L^6 B$ は両方とも、アルキル、例えば、同じ長さを有する直鎖アルキル、例えば、 $C_6 - C_{28}$ アルキル、例えば、 $C_{10} - C_{18}$ アルキル、例えば、 C_{14} アルキルまたは C_{16} アルキルである。一実施形態では、 $L^6 A$ と $L^6 B$ は両方とも C_{14} アルキルである。

【0142】

一実施形態では、式VIは、ラセミ混合物を表す。

【0143】

一実施形態では、式VIの化合物は、R異性体のエナンチオマー過剰（例えば、少なくとも約65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%）である。一実施形態では、式VIは、エナンチオマー的に純粋な「R」異性体を表す。

【0144】

一実施形態では、式VIの化合物は、S異性体のエナンチオマー過剰（例えば、少なくとも約65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%）である。一実施形態では、式VIは、エナンチオマー的に純粋な「S」異性体を表す。

【0145】

一実施形態では、 $L^6 A$ と $L^6 B$ は各々、独立して、アルケニルであり、例えば、 $L^6 A$ と $L^6 B$ は各々、独立して、 $C_6 - C_{30}$ アルケニルであるか、または $L^6 A$ と $L^6 B$ は各々、同じアルケニル部分である。一実施形態では、 $L^6 A$ と $L^6 B$ は各々、1つの二重結合、例えば、E配置またはZ配置の二重結合を含む。

【0146】

10

20

30

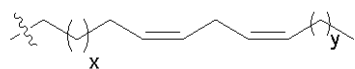
40

50

一実施形態では、 L^{6A} と L^{6B} は各々、2つの二重結合部分を含む。一実施形態では、これらの二重結合のうちの少なくとも1つがZ配置を有する。一実施形態では、これらの二重結合が両方ともZ配置を有する。一実施形態では、 L^{6A} と L^{6B} のうちの少なくとも1つは、下記式(VII)で示される。

【0147】

【化38】



式(VII)

10

【0148】

式中、

xは1～8の整数であり；かつ

yは1～10の整数である。

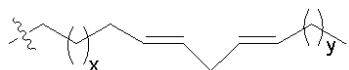
【0149】

一実施形態では、 L^{6A} と L^{6B} は両方とも、式(VII)のものである。一実施形態では、これらの二重結合のうちの少なくとも1つがE配置を有し、例えば、これらの二重結合が両方ともE配置を有する。一実施形態では、 L^{6A} と L^{6B} のうちの少なくとも1つは、下記式(VIII)で示される。

20

【0150】

【化39】



式(VIII)

【0151】

式中、

xは1～8の整数であり；かつ

yは1～10の整数である。

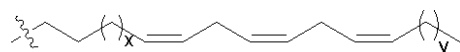
【0152】

一実施形態では、 L^{6A} と L^{6B} は各々、3つの二重結合部分を含む。一実施形態では、これらの二重結合のうちの少なくとも1つがZ配置を有する。一実施形態では、これらの二重結合のうちの少なくとも2つがZ配置を有する。一実施形態では、これらの二重結合が全て、Z配置を有する。一実施形態では、 L^{6A} と L^{6B} のうちの少なくとも1つは、下記式(IX)で示される。

30

【0153】

【化40】



式(IX)

40

【0154】

式中、

xは1～8の整数であり；かつ

50

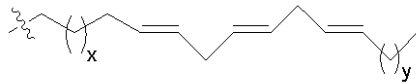
y は 1 ～ 10 の整数である。

【0155】

一実施形態では、 L^{6A} と L^{6B} は両方とも、式 (IX) で示されるものである。一実施形態では、これらの二重結合のうちの少なくとも 1 つは E 配置を有する。一実施形態では、これらの二重結合のうちの少なくとも 2 つは E 配置を有する。一実施形態では、これらの二重結合は全て E 配置を有する。一実施形態では L^{6A} と L^{6B} のうちの少なくとも 1 つは、下記式 (X) で示される。

【0156】

【化 4 1】



式 (X)

10

【0157】

式中、

x は 1 ～ 8 の整数であり；かつ

y は 1 ～ 10 の整数である。

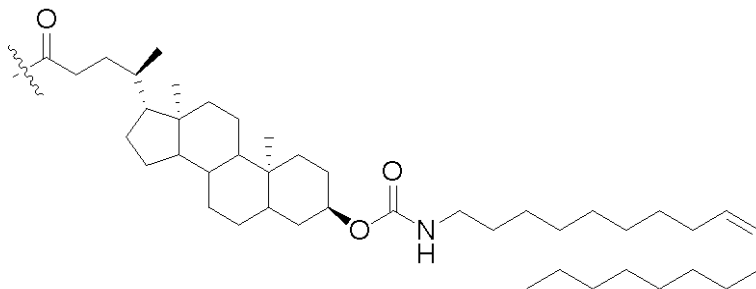
20

【0158】

一実施形態では、 L^B は、

【0159】

【化 4 2】



30

【0160】

である。

【0161】

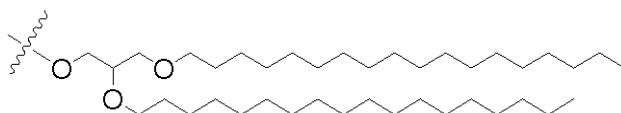
一実施形態では、 L^B は、ジアシルグリセロール、ジステアシルグリセロール、ジパルミトイルグリセロール、ジミリスチルグリセロール、ジオレオイルグリセロール、または他のジアシル／ステリル疎水性基からなる群から選択される。

【0162】

一実施形態では、 L^B は、

【0163】

【化 4 3】



【0164】

である。

40

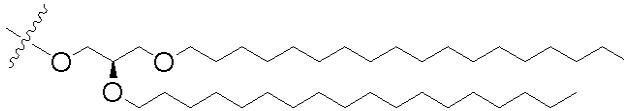
50

【0165】

好ましい一実施形態では、 L^B は、

【0166】

【化44】



【0167】

10

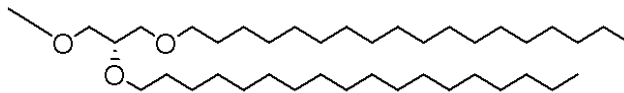
である。

【0168】

別の好ましい実施形態では、 L^B は、

【0169】

【化45】



20

【0170】

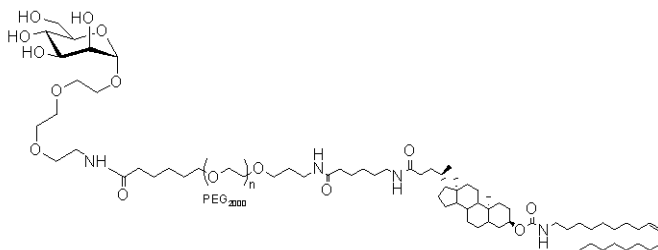
である。

【0171】

好ましい一実施形態では、式 I は、構造

【0172】

【化46】



30

【0173】

を有する。

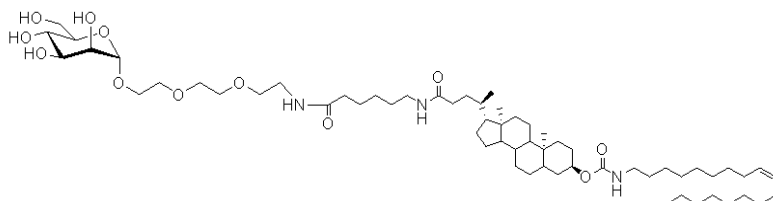
【0174】

別の好ましい実施形態では、式 I は、構造

【0175】

【化47】

40



【0176】

を有する。

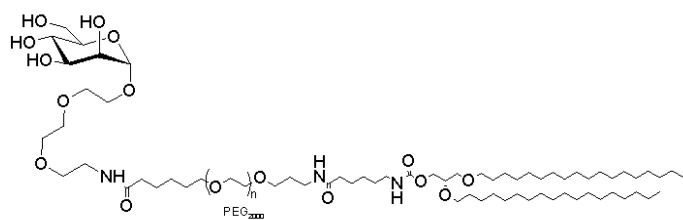
【0177】

50

好ましい一実施形態では、式 I は、構造

【0178】

【化48】



10

【0179】

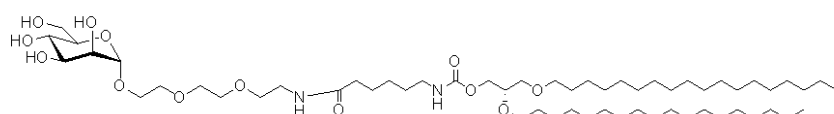
を有する。

【0180】

別の好ましい実施形態では、式 I は、構造

【0181】

【化49】



20

【0182】

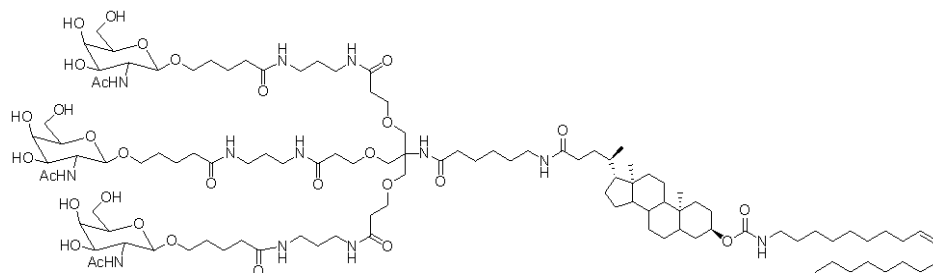
を有する。

【0183】

好ましい一実施形態では、式 I は、構造

【0184】

【化50】



30

【0185】

を有する。

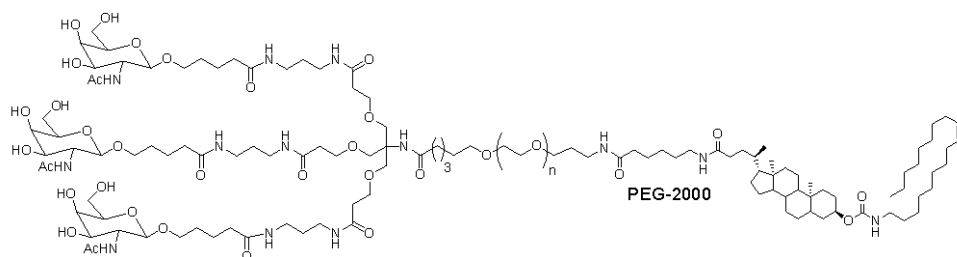
【0186】

別の好ましい実施形態では、式 I は、構造

【0187】

40

【化 5 1】



10

【0188】

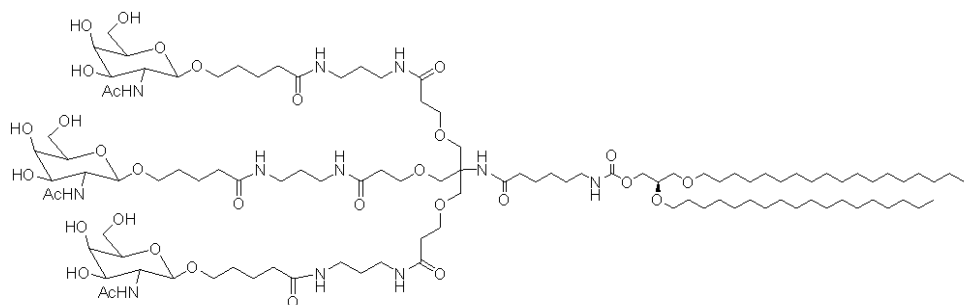
を有する。

【0189】

好ましい一実施形態では、式 I は、構造

【0190】

【化 5 2】



20

【0191】

を有する。

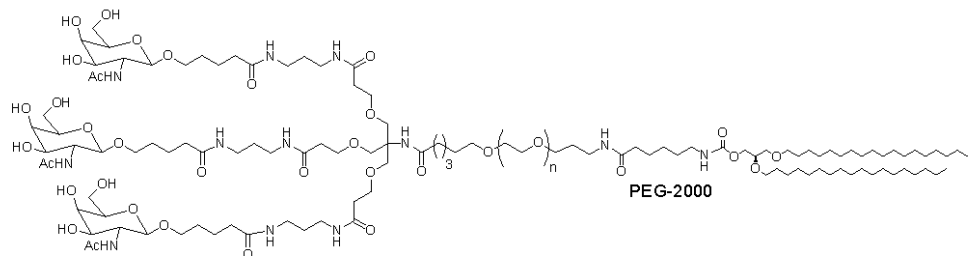
【0192】

別の好ましい実施形態では、式 I は、構造

【0193】

30

【化 5 3】



40

【0194】

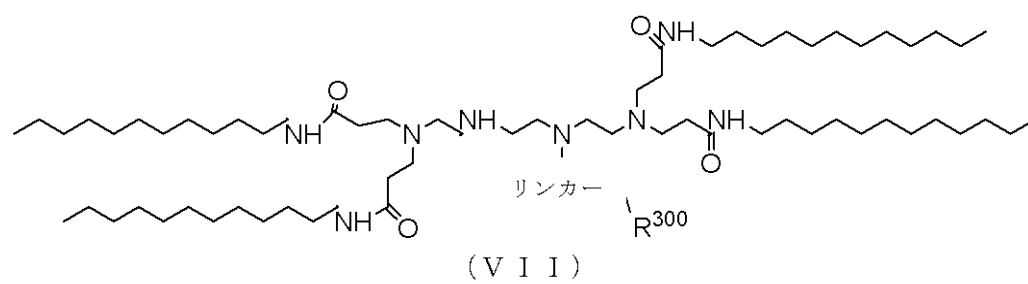
を有する。

【0195】

一態様では、本発明は、下記式 (V I I) で示す構造を有する標的化脂質モノマーを特色とする。

【0196】

【化 5 4】



10

【0197】

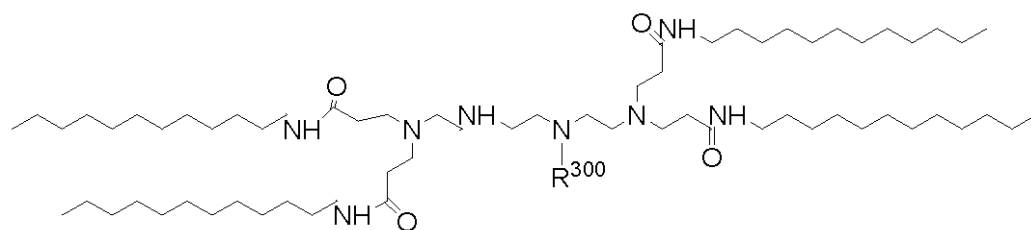
式中、 R^{300} はリガンドである。

【0198】

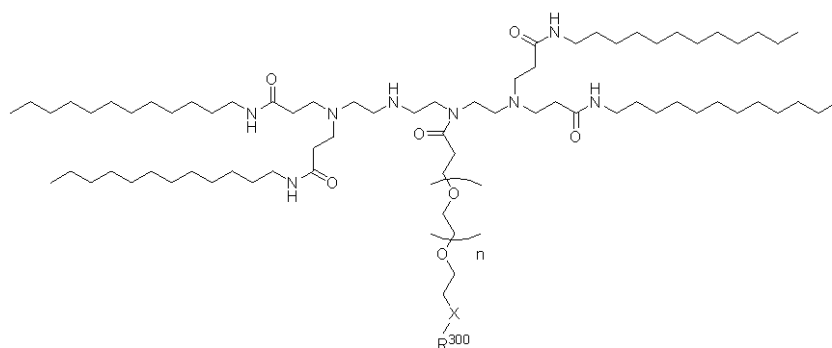
一態様では、本発明は、下記式 (VII) ~ (XV) の標的化脂質を特色とする。

【0199】

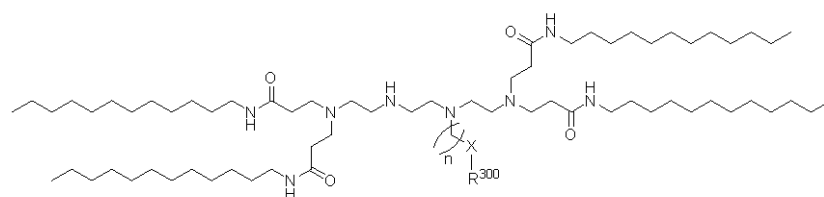
【化 5 5 - 1】



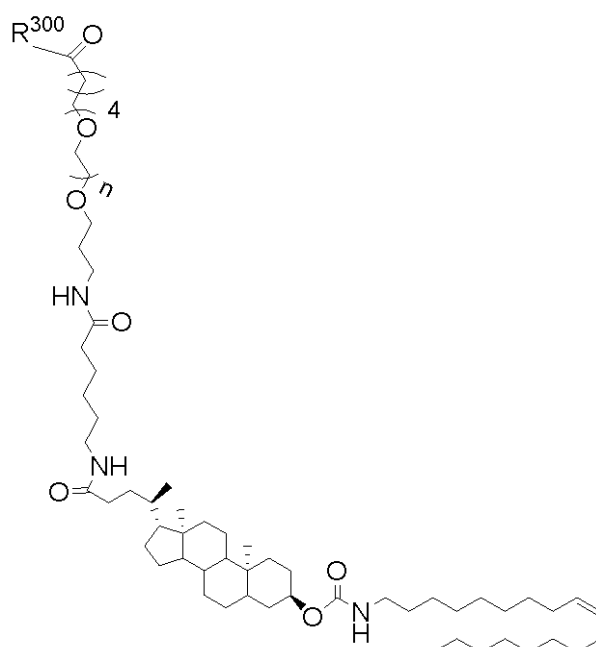
(VIII)



(IX)



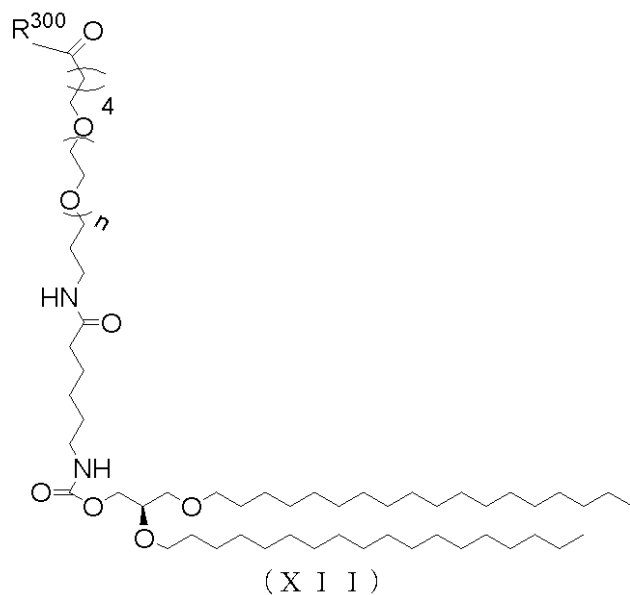
(X)



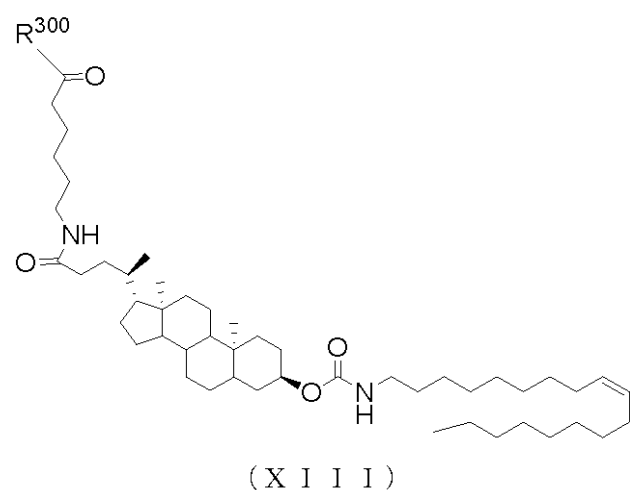
(XI)

【0200】

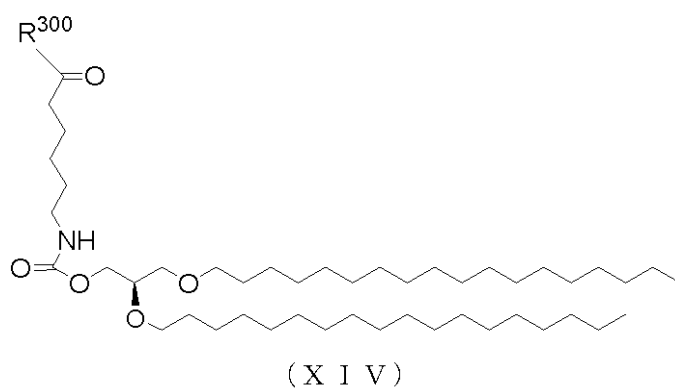
【化 5 5 - 2】



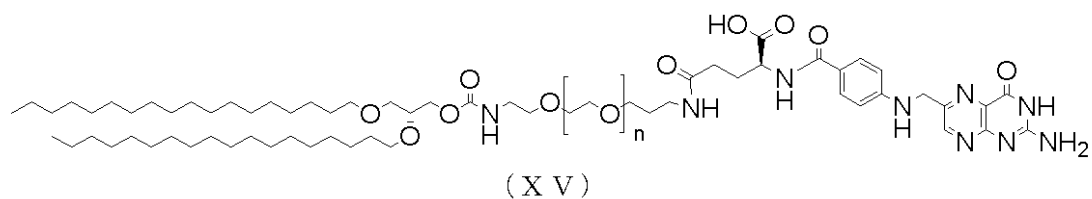
10



20



40



【 0 2 0 1】

式中、 R^{300} はリガンドであり； n は 0 ～ 20 であり；かつ

x は、エーテル結合、チオエーテル結合、カルバメート結合、ウレタン結合、生体切断

50

可能なリンカー（例えば、ジスルフィド、エステル、アミド）、pH感受性リンカー（例えば、ヒドラゾン、オキシム、アセタール／ケタール、オルトエステル、CDM（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007, 104 (32), 12982-12987）参照）ペプチダーゼ感受性ペプチド、ホスフェート、アジドおよびアルキン由来のトリアゾール結合、ならびに／またはこれらの組合せである。

【0202】

一実施形態では、Rは、式（I I）～（V）に示す構造を有する。

【0203】

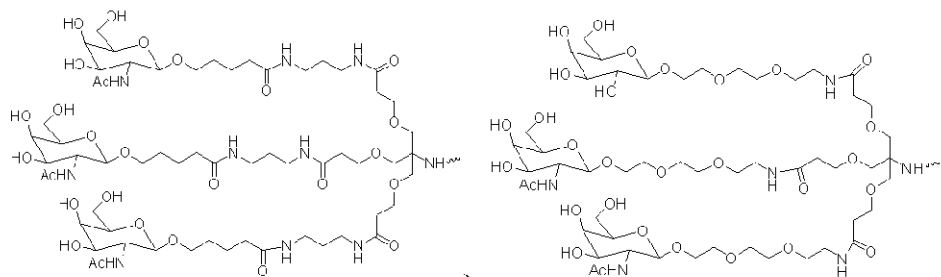
一実施形態では、Rは、図8に示す群から選択される。

【0204】

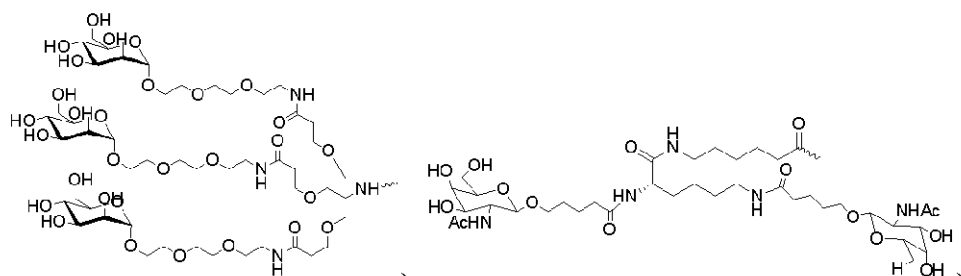
一実施形態では、Rは、

【0205】

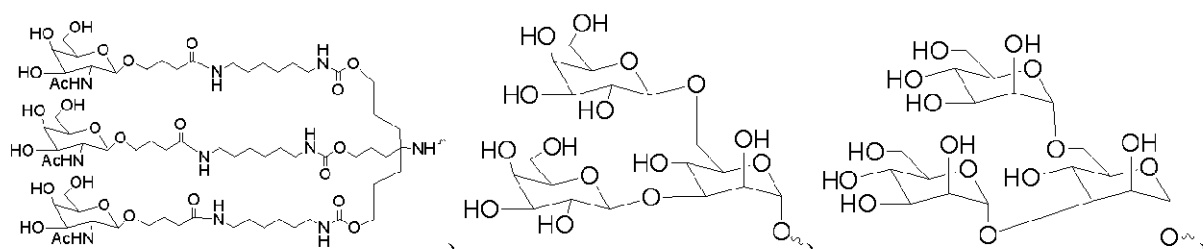
【化 5 6】



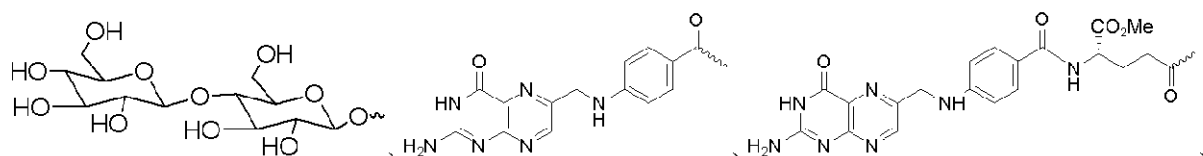
10



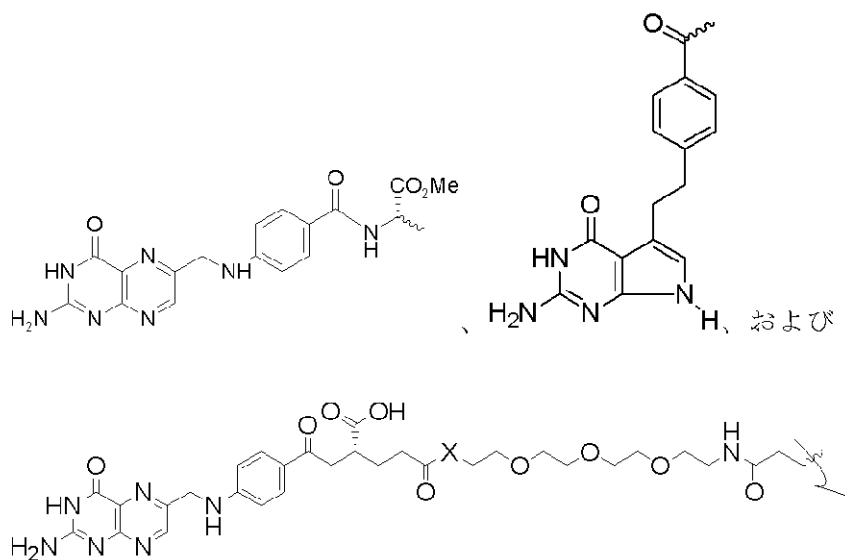
20



30



40



【 0 2 0 6 】

50

式中、x は、エーテル結合、チオエーテル結合、カルバメート結合、ウレタン結合、生体切断可能なリンカー（例えば、ジスルフィド、エステル、アミド）、pH感受性リンカー（例えば、ヒドラゾン、オキシム、アセタール／ケタール、オルトエステル、CDM（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007, 104 (32), 12982-12987）参照）、ペプチダーゼ感受性ペプチド、ホスフェート、アジドおよびアルキン由来のトリアゾール結合、ならびに／またはこれらの組合せである。）からなる群から選択される。

【0207】

いくつかの実施形態では、本発明は、表1の化合物を提供する。

【0208】

【表 1】

いくつかの好ましい実施形態

1		薬酸： 安定な疎水性アルキルテ ザー
2		薬酸： 安定な親水性テザー
3		プテロイン酸： 安定な疎水性アルキルテ ザー
4		プテロイン酸： 安定な親水性テザー
5		薬酸： ジスルフィド結合
6		薬酸： gem-ジメチルジスルフィド 結合
7		薬酸： 安定な疎水性アルキルテ ザー
8		薬酸： 安定な親水性テザー
9		プテロイン酸： 安定な疎水性アルキルテ ザー
10		プテロイン酸： 安定な親水性テザー
11		薬酸： ジスルフィド結合
12		薬酸： gem-ジメチルジスルフィド 結合

nは0～20であり；xはエーテル結合、チオエーテル結合、カルバメート結合、ウレタン結合、生体切断可能なリンカー（例えば、ジスルフィド、エステル、アミド）、pH感受性リンカー（例えば、ヒドラゾン、オキシム、アセタール／ケタール、オルトエステル、CDM(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007, 104(32), 12982-12987) 参照）、ペプチダーゼ感受性ペプチド、ホスフェート、アジドおよびアルキン由来のトリアゾール結合、ならびに／またはこれらの組合せである。

【0209】

一態様では、本発明は、標的化リガンドとコンジュゲートした薬物送達系を提供する。

【0210】

薬物送達系（本明細書では「薬物送達スキャフォールド」とも呼ばれる）は、ポリマー性のスキャフォールドをベースにすることができる。ポリマー性の送達系は、エンドソーム放出剤を含むかまたはこれを含まない、水溶性、生体適合性、生物分解性、pH感受性、カチオン性、アニオン性、中性、親水性、疎水性で、線状または分岐状のポリマー、デンドリマーを含む。ポリマーは、ポリアニオン性もしくはポリカチオン性のポリマーのpH感受性マスキング、ペプチド、多糖、単糖、ポリグリシドールも含む。ポリマーと標的

10

20

30

40

50

化部分の間のテザーおよび結合は、本明細書に記載される脂質ーリガンドコンジュゲートのテザーおよび結合と同一または同様である。

【0211】

一実施形態では、薬物送達系は、この送達系のPK特性を調節することができる部分とコンジュゲートまたは会合している。

【0212】

一実施形態では、薬物送達系は、エンドソーム放出剤とコンジュゲートまたは会合している。

【0213】

一実施形態では、薬物送達系は、エンドソーム放出剤およびこの送達系のPK特性を調節することができる部分とコンジュゲートまたは会合している。

10

【0214】

一実施形態では、薬物送達系を標的化部分に結合するテザー／リンカーは、エンドソーム放出剤とコンジュゲートまたは会合している。

【0215】

エンドソーム放出剤としては、イミダゾール、ポリイミダゾールもしくはオリゴイミダゾール、PEI、ペプチド、融合性ペプチド、ポリカルボキシレート、ポリカチオン、マスキングされたオリゴカチオンもしくはマスキングされたポリカチオン、もしくはマスキングされたオリゴアニオンもしくはマスキングされたポリアニオン、アセタール、ポリアセタール、ケタール／ポリケタール、および／またはオルトエステルが挙げられる。

20

【0216】

一態様では、薬物送達系は、リポソーム製剤、サーファクタント製剤、ミセル製剤、膜性製剤、ナノ粒子、エマルジョン、ナノエマルジョンおよびマイクロエマルジョン、イントラリピッド、大豆をベースにした製剤、大豆脂肪油、脂肪油をベースにしたもの、魚油（オメガー3）、抗体、リポイド（lipidoid）、ならびに乾燥粉末製剤に基づく。

【0217】

好ましい実施形態では、リポソームは、カチオン性、アニオン性、または中性である。

【0218】

好ましい実施形態では、サーファクタントは、カチオン性、アニオン性、または中性である。

30

【0219】

腎臓は、近位尿細管細胞に集中した高親和性の葉酸結合タンパク質（FBP）を含有する（Int. Rev. Cytol. 180, 237-284, 1998）。それゆえに、核酸治療剤（例えば、siRNAまたはアンタゴmir）を、本発明の標的送達アプローチを用いた核酸治療薬の標的送達によって、腎臓に標的することができる。

【0220】

本発明における薬物は、核酸治療薬またはiRNA剤（例えば、siRNA、アンタゴmir、マイクロRNA、アンチセンス、アプタマー、プラスミド、デコイRNA、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、アンチセンスマイクロRNA、スプライス調節オリゴヌクレオチド、RNA活性化オリゴヌクレオチドなど）である。薬物は、送達系とコンジュゲートしているかまたは送達系とともに製剤化されているかのどちらかである。いくつかの実施形態では、薬物は、標的化部分を送達系に結合させるテザー／リンカーとコンジュゲートしている。

40

【0221】

さらなる態様では、本発明は、標的遺伝子の発現を調節する方法を提供し、この方法は、本明細書に記載される薬物送達系とともに製剤化されているかまたは本明細書に記載される薬物送達系とコンジュゲートしている、本明細書で定義される薬物を投与する工程を含む。

【0222】

50

一態様では、本発明は、本明細書に記載される薬物送達系とともに製剤化されているかまたは本明細書に記載される薬物送達系とコンジュゲートしている核酸および薬学的に許容される担体を有する薬学的組成物を特色とする。

【0223】

さらなる関連実施形態では、本発明は、1つ以上の上記の本発明の脂質を含む脂質粒子を含む。ある実施形態では、粒子は、本明細書に記載される標的化脂質、カチオン性脂質、中性脂質、および粒子の凝集を低下させることができる脂質をさらに含む。特定の一実施形態では、脂質粒子は、標的化脂質約0.5～50%：カチオン性脂質20～60%：中性脂質5～25%：コレステロール25～55%：PEG-DMGまたはPEG-DMA 0.5～15%というモル比の(i)標的化脂質、(ii)アミノ脂質、(iii) 10

【0224】

葉酸

本明細書で使用される場合、「葉酸」という用語は、葉酸、ならびにプテロイン酸誘導体およびプテロイン酸類似体を含む、葉酸誘導体を指すことを意味する。本発明で使用するのに好適な葉酸の類似体および誘導体としては、葉酸拮抗薬、ジヒドロ葉酸、テトラヒドロ葉酸、テトラヒドロプテリン、フォリン酸、プテロポリグルタミン酸、1-デアザ(deza)葉酸、3-デアザ葉酸、5-デアザ葉酸、8-デアザ葉酸、10-デアザ葉酸、1, 5-デアザ葉酸、5, 10-ジデアザ葉酸、8, 10-ジデアザ葉酸、および5, 8-ジデアザ葉酸、葉酸拮抗薬、ならびにプテロイン酸誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。さらなる葉酸類似体は、公開されている米国公開US第2004/0, 242, 582号(2004年12月2日公開)に記載されている。

【0225】

脂質／親油性物質

「脂質」および「親油性物質」という用語は、任意の脂溶性分子(例えば、脂肪、油、ワックス、テルペン、ステロール、脂溶性ビタミン(例えば、A、D、E、およびK)、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、脂肪酸、ホパノイド、およびリン脂質)を指す。例示的な親油性分子としては、コレステロール、プロゲステロン、テストステロン、エストラジオール、ノルエチンドフロン(norethindrone)、コルチゾン、コール酸、O3-(オレオイル)リトコール酸、コレン酸、O3-(オレオイル)コレン酸、ケノデオキシコール酸、グリココール酸、タウロコール酸、デオキシコール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1, 3-ビス-O(ヘキサデシル)グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1, 3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、ジメトキシトリチル、フェノキサジン、多環芳香族炭化水素(例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン)、ラウリン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アルキドン酸(archidonic acid)、ロイコトリエンA、ミルセン、ゲラニオール、カルボン、菊酸、ネペタラクトン、メントフラン、 α -ピネン、カンファー、ファルネソール、フムレン、ナギオン(nagione)、カリオフィレン、アビエチン酸、ラノステロール、およびスクワレン、カンベステロール、シトステロール、スティグマステロール、エルゴステロール、ブラッシンステロール(brassinsterol)、ジステアリル-リトコールアミド、ボルネオール、メントール、ヘプタデシル基、ジアルキルグリセリド、ジアシルグリセリド、ならびに胆汁酸が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、遊離酸(例えば、遊離脂肪酸、例えば、パルミチン酸)などの親油性部分を説明する用語は、ラジカルを表す用語(例えば、パルミトイル)と互換的に使用される。

【0226】

糖質

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、「糖質」とは、少なくとも6個の炭素原子を有する1つ以上の単糖単位（線状、分岐状、もしくは環状であり得る）から構成され、各々の炭素原子に酸素原子、窒素原子、もしくは硫黄原子が結合しているそれ自体が糖質である化合物か、または各々が少なくとも6個の炭素原子を有する1つ以上の単糖単位（線状、分岐状、もしくは環状であり得る）から構成され、各々の炭素原子に酸素原子、窒素原子、もしくは硫黄原子が結合している糖質部分をその一部として有する化合物のいずれかを指す。代表的な糖質には、糖類（単糖、二糖、三糖、および約4～9個の単糖単位を含有するオリゴ糖）、ならびに多糖類（例えば、デンプン、グリコーゲン、セルロース、および多糖ゴム）が含まれる。具体的な単糖には、 C_5 以上（好ましくは $C_5 \sim C_8$ ）の糖；二糖および三糖には、2つまたは3つの単糖単位（好ましくは $C_5 \sim C_8$ ）を有する糖が含まれる。

10

【0227】

「単糖」という用語は、アロース、アルトース、アラビノース、クラジノース、エリトロース、エリスルロース、フルクトース、D-フシトール、L-フシトール、フコサミン、フコース、フクロース、ガラクトサミン、D-ガラクトサミニトール、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、グルコサミニトール、グルコース、グルコース-6-リン酸、グロース、グリセルアルデヒド、L-グリセロール-D-マンノース-ヘプトース、グリセロール、グリセロン、グロース、イドース、リキソース、マンノサミン、マンノース、マンノース-6-リン酸、プシコース、キノボース、キノボサミン、ラムニトール、ラムノサミン、ラムノース、リボース、リブロー
 ース、セドヘブツロース、ソルボース、タガトース、タロース、酒石酸、トレオース、キシロース、およびキシルロースの基を含む。単糖は、D体またはL体であることができる。単糖はさらに、デオキシ糖（アルコールヒドロキシ基を水素に置換したもの）、アミノ糖（アルコールヒドロキシ基をアミノ基に置換したもの）、チオ糖（アルコールヒドロキシ基をチオールに置換したもの、または $C=O$ を $C=S$ に置換したもの、または環状形態の環酸素を硫黄に置換したもの）、セレノ糖、テルロ糖、アザ糖（環炭素を窒素に置換したもの）、イミノ糖（環酸素を窒素に置換したもの）、ホスファノ糖（環酸素をリンに置換したもの）、ホスファ糖（環炭素をリンに置換したもの）、C-置換単糖（非末端炭素原子の水素を炭素で置換したもの）、不飽和単糖、アルジトール（カルボニル基を CHO 基で置換したもの）、アルドン酸（アルデヒド基をカルボキシ基に置換したもの）、ケ
 トアルドン酸、ウロン酸、アルダル酸などであってもよい。アミノ糖としては、アミノ単糖、好ましくは、ガラクトサミン、グルコサミン、マンノサミン、フコサミン、キノボサミン、ノイラミン酸、ムラミン酸、ラクトースジアミン、アコサミン、バシロサミン、ダウノサミン、デソサミン、フォロサミン、ガロサミン、カノサミン、カンソサミン（*kansosamine*）、ミカミノース、ミコサミン、ペロサミン、プノイモサミン、プルプロサミン（*purpurosamine*）、ロドサミンが挙げられる。単糖などは、さらに置換することができるということが理解される。

20

30

【0228】

「二糖」、「三糖」、および「多糖」という用語は、アベクオース、アクラボース、アミセトース、アミロベクチン、アミロース、アビオース、アルカノース、アスカリロース、アスコルビン酸、ボイビノース、セロビオース、セロトリオース、セルロース、カコトリオース、カルコース、キチン、コリトース、シクロデキストリン、シマロース、デキストリン、2-デオキシリボース、2-デオキシグルコース、ジギノース、ジギタロース、ジギトキソース、エバロース、エベミトロース（*evemitrose*）、フルクトオリゴ糖、ガルトオリゴ糖（*galto-oligosaccharide*）、ゲンチアノース、ゲンチオビオース、グルカン、グリコーゲン、グリコーゲン、ハマメロース、ヘパリン、イヌリン、イソレボグルコセノン、イソマルトース、イソマルトリオース、イソパノース、コジビオース、ラクトース、ラクトサミン、ラクトースジアミン、ラミナラビオース、レボグルコサン、レボグルコセノン、 β -マルトース、マルトリオース、マンナン-オリゴ糖、マンニノトリオース、メレチトース、メリビオース、ムラミン酸、ミカロー

40

50

ス、ミシノース、ノイラミン酸、ニゲロース、ノジリミシン、ノビオース、オレアンドロース、パノース、パラトース、プランテオース、プリメベロース、ラフィノース、ロジノース、ルチノース、サルメントース、セドヘブツロース、セドヘブツロサン、ソラトリオース、ソホロース、スタキオース、ストレプトース、スクロース、 α 、 α -トレハロース、トラハロサミン、ツラノース、チベロース、キシロビオース、ウンベリフェロースなどの基を含む。さらに、「二糖」、「三糖」、および「多糖」などは、さらに置換することができるということが理解される。二糖には、アミノ糖およびその誘導体、特に、C-4'位で誘導体化されたミカミノースまたはC-6'位で誘導体化された4デオキシ-3-アミノグルコースも含まれる。

【0229】

リガンド

多種多様な実体を、本発明によるコンジュゲーションのためのリガンドとして使用することができる。好ましい部分は、介在テザーを介して直接的にかまたは間接的にかのいずれかで、好ましくは共有結合的に連結されるリガンドである。

【0230】

好ましい実施形態では、リガンドは、それが組み込まれる分子の分布、標的化、または寿命を改変する。好ましい実施形態では、リガンドは、例えば、このようなリガンドがない種と比較して、選択された標的（例えば、分子、細胞、もしくは細胞型、区画（例えば、細胞区画もしくは器官区画）、組織、器官、または身体領域）に対する親和性を増強する。選択された標的に対する親和性を増強するリガンドは、標的化リガンドとも呼ばれる。

【0231】

いくつかのリガンドは、エンドソーム溶解特性を有することができる。エンドソーム溶解リガンドは、エンドソームの溶解および／または本発明の組成物、もしくはその成分のエンドソームから細胞の細胞質への輸送を促進する。エンドソーム溶解リガンドは、pH依存的な膜活性および融合性を示すポリアニオン性のペプチドまたはペプチド模倣体であり得る。ある実施形態では、エンドソーム溶解リガンドは、エンドソームpHで活性のある立体構造をとる。「活性のある」立体構造とは、エンドソーム溶解リガンドが、エンドソームの溶解および／または本発明の組成物、もしくはその成分のエンドソームから細胞の細胞質への輸送を促進する立体構造のことである。例示的なエンドソーム溶解リガンドには、GALAペプチド（Subbaraoら、Biochemistry, 1987, 26:2964-2972）、EALAペプチド（Vogelら、J. Am. Chem. Soc., 1996, 118:1581-1586）、およびこれらの誘導体（Turkら、Biochem. Biophys. Acta, 2002, 1559:56-68）が含まれる。ある実施形態では、エンドソーム溶解成分は、pHの変化に応答して電荷またはプロトン化が変化することになる化学基（例えば、アミノ酸）を含有してもよい。エンドソーム溶解成分は、線状であってもまたは分岐状であってもよい。ペプチドをベースにしたエンドソーム溶解リガンドの例示的な一次配列を表2に示す。

【0232】

10

20

30

改善することもある。

【0234】

一般的に、リガンドは、例えば、取込みを増強するための、治療的修飾物質；例えば、分布をモニターするための、診断的化合物またはレポーター基；架橋剤；およびスクレーパー耐性を付与する部分を含むことができる。一般例として、脂質、ステロイド、ビタミン、糖、タンパク質、ペプチド、ポリアミン、およびペプチド模倣物が挙げられる。

【0235】

リガンドとしては、天然に存在する物質、例えば、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、低密度リポタンパク質（LDL）、高密度リポタンパク質（HDL）、もしくはグロブリン）；糖質（例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン、もしくはヒアルロン酸）；または脂質を挙げることができる。リガンドは、組換え分子または合成分子、例えば、合成ポリマー（例えば、合成ポリアミノ酸）、オリゴヌクレオチド（例えば、アプタマー）であってもよい。ポリアミノ酸の例としては、ポリリジン（PLL）、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-無水マレイン酸コポリマー、ポリ（L-ラクチド-コグリコライド）コポリマー、ジビニルエーテル無水マレイン酸コポリマー、N-（2-ヒドロキシプロピル）メトアクリルアミドコポリマー（HMPA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリウレタン、ポリ（2-エチルアクリル酸）、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、またはポリホスファジンであるポリアミノ酸が挙げられる。ポリアミンの例としては、ポリエチレンイミン、ポリリジン（PLL）、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、シュードペプチド-ポリアミン、ペプチド模倣体ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの四級塩、またはアルファヘリックスペプチドが挙げられる。

【0236】

リガンドとしては、標的化基、例えば、細胞標的化剤または組織標的化剤（例えば、レクチン、糖タンパク質、脂質、またはタンパク質（例えば、腎臓細胞などの特定の細胞型に結合する抗体））を挙げることができる。標的化基は、チロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントプロテインA、ムチン糖質、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン、多価マンノース、多価フコース、グリコシル化されたポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタメート、ポリアスパルテート、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸、ビタミンB12、ビオチン、RSGペプチド、RSGペプチド模倣体、またはアプタマーであることができる。表3に、標的化リガンドとその関連受容体のいくつかの例を示す。

【0237】

10

20

30

【表 3】

表 3. 標的化リガンドとその関連受容体

肝臓細胞	リガンド	受容体
1)実質細胞(PC)(肝細胞)	ガラクトース	ASGP-R (アシオリ糖タンパク質受容体)
	Gal NAc (n-アセチル-ガラクトサミン)	ASPG-R Gal NAc 受容体
	ラクトース	
	アシアコフェツイン	ASPG-r
2)類洞内皮細胞(SEC)	ヒアルロン酸	ヒアルロン酸受容体
	プロコラーゲン	プロコラーゲン受容体
	負電荷の分子	スカベンジャー受容体
	マンノース	マンノース受容体
	N-アセチルグルコサミン	スカベンジャー受容体
	免疫グロブリン	Fc 受容体
	LPS	CD14 受容体
	インスリン	受容体を介するトランスサイトシス
	トランスフェリン	受容体を介するトランスサイトシス
	アルブミン	非特異的
	糖-アルブミンコンジュゲート	
	マンノース-6-リン酸	マンノース-6-リン酸受容体
3)クッパー細胞(KC)	マンノース	マンノース受容体
	フコース	フコース受容体
	アルブミン	非特異的
	マンノース-アルブミンコンジュゲート	

【0238】

リガンドの他の例としては、色素、インターカレート剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、プソラレン、マイトマイシンC）、ポルフィリン（TPPC4、テキサフィリン、サフフィリン）、多環芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ（例えば、EDTA）、親油性分子（例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パ

ルミチン酸、ミリスチン酸、O3-（オレオイル）リトコール酸、O3-（オレオイル）コレン酸、ジメトキシトリチル、もしくはフェノキサジン）、およびペプチドコンジュゲート（例えば、アンテナペディアペプチド、Tatペプチド）、アルキル化剤、ホスフェート、アミノ、メルカプト、PEG（例えば、PEG-40K）、MPEG、[MPEG]₂、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射性標識マーカー、酵素、ハプテン（例えば、ビオチン）、輸送／吸収促進物質（例えば、アスピリン、ビタミンE、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾールコンジュゲート、テトラアザマクロ環のEu3+錯体）、ジニトロフェニル、HRP、またはAPが挙げられる。

【0239】

リガンドは、タンパク質（例えば、糖タンパク質）、またはペプチド（例えば、共リガンドに対する特異的な親和性を有する分子）、または抗体（例えば、癌細胞、内皮細胞、もしくは骨細胞などの特定の細胞型に結合する抗体）であることができる。リガンドには、ホルモンおよびホルモン受容体も含まれ得る。リガンドには、脂質、レクチン、糖質、ビタミン、コファクター、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン、多価マンノース、多価フコース、またはアプタマーなどの非ペプチド種も含まれ得る。リガンドは、例えば、リボ多糖、p38 MAPキナーゼのアクチベーター、またはNF-κBのアクチベーターであることができる。

【0240】

リガンドは、例えば、細胞の細胞骨格を破壊することによって（例えば、細胞の微小管、微小フィラメント、および／または中間径フィラメントを破壊することによって）、コンジュゲートの細胞内への取込みを増大させる物質、例えば、薬物であることができる。薬物は、例えば、タキソン（taxon）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャブラキノリド（japlakinolide）、ラトランクリンA、ファロイジン、スウィンホリドA、インダノシン、またはミオセルビンであることができる。

【0241】

リガンドは、例えば、炎症性応答を活性化することによって、コンジュゲートの細胞内への取込みを増大させることができる。このような効果を有すると考えられる例示的なリガンドとしては、腫瘍壊死因子α（TNFα）、インターロイキン-1β、またはγインターフェロンが挙げられる。

【0242】

一態様では、リガンドは、脂質または脂質をベースにした分子である。このような脂質または脂質をベースにした分子は、血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）に結合することが好ましい。HSA結合リガンドは、コンジュゲートが標的組織（例えば、身体の腎臓以外の標的組織）に分布するのを可能にする。例えば、標的組織は、肝臓の実質細胞を含む肝臓であることができる。HSAに結合することができる他の分子もリガンドとして使用することができる。例えば、ネプロキシンまたはアスピリンを使用することができる。脂質または脂質をベースにしたリガンドは、（a）コンジュゲートの分解に対する抵抗性を増大させ、（b）標的細胞または細胞膜への標的化または輸送を増大させることができ、かつ／または（c）血清タンパク質、例えば、HSAへの結合を調節するために使用することができる。

【0243】

脂質をベースにしたリガンドは、標的組織に対するコンジュゲートの結合を調節（例えば、制御）するために使用することができる。例えば、HSAにより強く結合する脂質または脂質をベースにしたリガンドは、腎臓に標的される可能性が低く、したがって、身体から排出される可能性が低い。HSAにあまり強く結合しない脂質または脂質をベースにしたリガンドは、コンジュゲートを腎臓に標的するために使用することができる。

【0244】

好ましい実施形態では、脂質をベースにしたリガンドはHSAに結合する。コンジュゲ

10

20

30

40

50

ートが好ましくは腎臓以外の組織に分布するような十分な親和性で、脂質をベースにしたリガンドがHSAに結合することが好ましい。しかしながら、この親和性はHSAリガンドの結合を取り消すことができないほど強力ではないことが好ましい。

【0245】

別の好ましい実施形態では、脂質をベースにしたリガンドは、コンジュゲートが好ましくは腎臓に分布するように、HSAに弱く結合するかまたは全く結合しない。腎細胞を標的とする他の部分を、脂質をベースにしたリガンドの代わりにまたは脂質をベースにしたリガンドに加えて、使用することもできる。

【0246】

別の態様では、リガンドは、標的細胞（例えば、増殖細胞）によって取り込まれる部分（例えば、ビタミン）である。これらは、例えば、悪性型または非悪性型（例えば、癌細胞）の望ましくない細胞増殖を特徴とする障害を治療するために特に有用である。例示的なビタミンには、ビタミンA、EおよびKが含まれる。他の例示的なビタミンには、ビタミンB（例えば、葉酸、B12、リボフラビン、ビオチン、ピリドキサル）、または癌細胞によって取り込まれる他のビタミンもしくは栄養素が含まれる。HAS、低密度リポタンパク質（LDL）、および高密度リポタンパク質（HDL）も含まれる。

【0247】

別の態様では、リガンドは、細胞透過剤、好ましくはヘリックス細胞透過剤である。この薬剤は両親媒性であることが好ましい。例示的な薬剤は、tatまたはアンテナペディアなどのペプチドである。この薬剤がペプチドの場合、修飾可能であり、ペプチジル模倣体、反転異性体（invertomer）、非ペプチド結合または偽ペプチド結合が含まれ、D-アミノ酸を使用することもできる。ヘリックス剤は、好ましくは親油性相と疎油性相とを有するアルファヘリックス剤であることが好ましい。

【0248】

リガンドは、ペプチドまたはペプチド模倣体であることができる。ペプチド模倣体（本明細書ではオリゴペプチド模倣体とも呼ばれる）は、天然ペプチドと同様の明確な3次元構造に折り畳むことができる分子である。ペプチド部分またはペプチド模倣体部分の長さは、約5～50アミノ酸、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50アミノ酸であることができる（例えば、表4参照）。

【0249】

10

20

30

【表 4】

表4. 例示的な細胞透過ペプチド

細胞透過ペプチド	アミノ酸配列	参考文献
ペネトラチン	RQIKIWFQNRRMKWKK	Derossi ら, J. Biol. Chem. 269:10444, 1994
Tat 断片 (48-60)	GRKKRRQRRRPPQC	Vives ら, J. Biol. Chem., 272:16010, 1997
シグナル配列に基づくペプチド	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPK KKRKV	Chaloin ら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 243:601, 1998
PVEC	LLIILRRRIRKQAHAAHSK	Elmqvist ら, Exp. Cell Res., 269:237, 2001
トランスポータン	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAK KIL	Pooga ら, FASEB J., 12:67, 1998
両親媒性モデルペプチド	KLALKLALKALKAAALKLA	Oehlke ら, Mol. Ther., 2:339, 2000
Arg ₉	RRRRRRRRR	Mitchell ら, J. Pept. Res., 56:318, 2000
細菌細胞壁透過	KFFKFFKFFK	
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIK DFLRNLVPRTE	
セクロピン P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIA IQGGPR	
α-ディフェンシン	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRL WAFCC	
b-ディフェンシン	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQ GTCYRGKAKCCK	
バクテネシン	RKCRIVVIRVCR	
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRI PPGFPPRFPPRFPGKR-NH ₂	
インドリシジン	ILPWKWPWWPWRR-NH ₂	

【0250】

ペプチドまたはペプチド模倣体は、例えば、細胞透過ペプチド、カチオン性ペプチド、両親媒性ペプチド、または（例えば、主に Ty r、Tr p、もしくは Phe からなる）疎水性ペプチドであることができる。ペプチド部分は、デンドリマーペプチド、拘束されたペプチド、または架橋されたペプチドであることができる。別の代替において、ペプチド部分は、疎水性の膜転位配列（MTS）を含むことができる。例示的な疎水性MTS含有ペプチドは、アミノ酸配列 A A V A L L P A V L L A L L A P を有する R F G F である。R F G F 類似体（例えば、アミノ酸配列 A A L L P V L L A A P）を含有する疎水性MTSも標的化部分であることができる。ペプチド部分は、細胞膜を横断して、ペプチド、オリゴヌクレオチド、およびタンパク質を含む大きな極性分子を運ぶことができる、「送達」ペプチドであることができる。例えば、H I V Tat タンパク質（G R K K R R Q R R R P P Q）およびショウジョウバエのアンテナペディアタンパク質（R Q I K I W F Q N R R M K W K K）に由来する配列は、送達ペプチドとして機能することができている。ペプチドまたはペプチド模倣体は、ファージディスプレイライブラリー、または1ピーズ1化合物（O B O C）コンビナトリアルライブラリーから同定されたペプチドなどの、DNAのランダムな配列によってコードされることができる（L a m ら, N a t u r e, 354:82-84, 1991）。組み込まれたモノマー単位を介してi R N A 剤に連結されたペプチドまたはペプチド模倣体は、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸（R G D）ペプチド、またはR G D模倣物などの細胞標的化ペプチドであることができる

好ましい。ペプチド部分の長さは、約5アミノ酸～約40アミノ酸の範囲であることができる。ペプチド部分は、例えば、安定性または直接的な立体構造特性を増大させるための、構造的修飾を有することができる。下記の任意の構造的修飾を利用することができる。

【0251】

RGDペプチド部分は、内皮腫瘍細胞または乳癌腫瘍細胞などの腫瘍細胞を標的とするために使用することができる (Zitzmannら, Cancer Res., 62: 5139-43, 2002)。RGDペプチドは、肺、腎臓、脾臓、または肝臓を含む、種々の他の組織の腫瘍へのiRNA剤の標的化を促進することができる (Aokiら, Cancer Gene Therapy 8: 783-787, 2001)。RGDペプチドは、iRNA剤の腎臓への標的化を促進することが好ましい。RGDペプチドは、線状または環状であることができ、かつ修飾する (例えば、特定の組織への標的化を促進するためにグリコシル化またはメチル化する) ことができる。例えば、グリコシル化されたRGDペプチドは、 $\alpha_v\beta_3$ を発現する腫瘍細胞にiRNAを送達することができる (Haubnerら, Jour. Nuc. Med., 42: 326-336, 2001)。

【0252】

増殖細胞に濃縮されているマーカーを標的とするペプチドを使用することができる。例えば、RGDを含有するペプチドおよびペプチド模倣体は、癌細胞、特に、 $I_{\nu}J_3$ インテグリンを提示する細胞を標的とすることができる。このように、RGDペプチド、RGDを含有する環状ペプチド、D-アミノ酸を含むRGDペプチド、および合成RGD模倣体を使用することができる。RGDに加えて、 $I_{\nu}-J_3$ インテグリンリガンドを標的とする他の部分を使用することができる。一般に、このようなリガンドは、増殖細胞および血管新生を制御するために使用することができる。PECAM-1、VEGF、または他の癌遺伝子 (例えば、本明細書に記載される癌遺伝子) を標的とするリガンドであるこの種のリガンドの好ましいコンジュゲート。

【0253】

「細胞透過ペプチド」は、細胞、例えば、微生物細胞 (例えば、細菌細胞または真菌細胞)、または哺乳類細胞 (例えば、ヒト細胞) を透過することができる。微生物細胞透過性ペプチドは、例えば、 α -ヘリックス線状ペプチド (例えば、LL-37もしくはセロピンP1)、ジスルフィド結合含有ペプチド (例えば、 α -ディフェンシン、 β -ディフェンシン、もしくはバクテネシン)、またはわずか1種または2種のアミノ酸を主に含有するペプチド (例えば、PR-39もしくはインドリシジン) であることができる。細胞透過ペプチドは、核局在化シグナル (NLS) を含むこともできる。例えば、細胞透過ペプチドは、HIV-1 gp41の融合ペプチドドメインとSV40ラージT抗原のNLSとに由来するMPGなどの、2つの部分からなる両親媒性ペプチドであることができる (Simeoniら, Nuc. Acids Res. 31: 2717-2724, 2003)。

【0254】

一実施形態では、標的化ペプチドは、両親媒性 α -ヘリックスペプチドであることができる。例示的な両親媒性 α -ヘリックスペプチドとしては、セクロピン、ライコトキシン、パラダキシン、ブフォリン、CPF、ボンビニン様ペプチド (BLP)、カテリシディン、セラトトキシン、エボヤ (Sclava) のペプチド、メクラウナギ腸管の抗菌性ペプチド (HFIA P)、マガイニン、プレビニン-2、ダーマセプチン、メリチン、プレウロシディン、 H_2A ペプチド、アフリカツメガエルのペプチド、エスカレンチン-1、およびカエリンが挙げられるが、これらに限定されない。ヘリックスの安定性を完全に維持するために、多くの要因を考慮することが好ましいであろう。例えば、ヘリックス安定化残基を最大数利用し (例えばleu、ala、またはlys)、ヘリックス不安定化残基を最小数利用する (例えばプロリン、または環状モノマー単位)。キャッピング残基も考慮される (例えば、Glyは、例示的なN-キャッピング残基であり、かつ/またはヘリックスを安定化するための余分なH結合を与えるために、C末端アミド化を用いることができる)。i±3位、またはi±4位離れた、正反対の電荷を有する残基間の塩架橋

の形成によって、安定化をもたらすこともできる。例えば、リジン、アルギニン、ホモアルギニン、オルニチン、またはヒスチジンなどのカチオン性残基は、アニオン性残基である、グルタミン酸またはアスパラギン酸と、塩架橋を形成することができる。

【0255】

ペプチドリガンドおよびペプチド模倣体リガンドには、天然ペプチドもしくは修飾ペプチド、例えば、DペプチドもしくはLペプチド； α ペプチド、 β ペプチド、もしくは γ ペプチド；N-メチルペプチド；アザペプチド；1つ以上の尿素結合、チオ尿素結合、カルバメート結合、もしくはスルホニル尿素結合で置換された1つ以上のアミド（すなわち、ペプチド）結合を有するペプチド；または環状ペプチドを有するリガンドが含まれる。

【0256】

標的化リガンドは、特異的な受容体を標的とすることができる任意のリガンドであることができる。例としては、葉酸、GalNAc、ガラクトース、マンノース、マンノース-6P、糖のクラスター（例えば、GalNAcクラスター、マンノースクラスター、ガラクトースクラスター）、またはアプタマーがある。クラスターは、2つ以上の糖単位の組合せである。標的化リガンドには、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、PSMA、エンドセリン、GPCRII、ソマトスタチン、LDLリガンド、およびHDLリガンドも含まれる。リガンドは、核酸をベースにしたもの、例えば、アプタマーであることもできる。アプタマーは、未修飾であることができ、または本明細書で開示される修飾の任意の組合せを有することができる。

【0257】

エンドソーム放出剤には、イミダゾール、ポリイミダゾールもしくはオリゴイミダゾール、PEI、ペプチド、融合性ペプチド、ポリカルボキシレート、ポリカチオン、マスキングされたオリゴカチオンもしくはマスキングされたポリカチオン、またはマスキングされたオリゴアニオンもしくはマスキングされたポリアニオン、アセタール、ポリアセタール、ケタール／ポリケタール、オルトエステル、マスキングされているかもしくはマスキングされていないカチオン性電荷もしくはアニオン性電荷を有するポリマー、マスキングされているかもしくはマスキングされていないカチオン性電荷もしくはアニオン性電荷を有するデンドリマーが含まれる。

【0258】

PK調節物質とは、薬物動態調節物質を意味する。PK調節物質には、親油性物質、胆汁酸、ステロイド、リン脂質類似体、ペプチド、タンパク質結合剤、PEG、ビタミンなどが含まれる。例示的なPK調節物質としては、コレステロール、脂肪酸、コール酸、リトコール酸、ジアルキルグリセリド、ジアシルグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、ナプロキセン、イブプロフェン、ビタミンE、ビオチンなどが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかのホスホロチオエート結合を含むオリゴヌクレオチドも、血清タンパク質に結合することが知られており、このため、骨格に複数のホスホロチオエート結合を含む短いオリゴヌクレオチド（例えば、約5塩基、10塩基、15塩基、または20塩基のオリゴヌクレオチド）も、リガンド（例えば、PK調節リガンド）として本発明に適している。

【0259】

さらに、血清成分（例えば、血清タンパク質）に結合するアプタマーも、PK調節リガンドとして本発明に適している。

【0260】

本発明に適している他のリガンドは、同時係属出願である米国特許出願第10/916,185号（2004年8月10日出願）；同第10/946,873号（2004年9月21日出願）；同第10/833,934号（2007年8月3日出願）；同第11/115,989号（2005年4月27日出願）および；同第11/944,227号（2007年11月21日出願）の各明細書に記載されており、これらは、全ての目的のために、その全体が参照により組み入れられる。

【0261】

2つ以上のリガンドが存在する場合、リガンドは、全てが同じ特性を有することも、全てが異なる特性を有することも、またはあるリガンドが同じ特性を有すると同時に、他のリガンドが異なる特性を有することもある。例えば、リガンドは、標的化特性を有することも、エンドソーム溶解活性を有することも、またはPK調節特性を有することもある。好ましい実施形態では、リガンドが全て、異なる特性を有する。

【0262】

リンカー／テザー

「リンカー」および「テザー」という用語は、化合物の2つの部分を接続する有機部分である。リンカーは、典型的には、直接的な結合、または原子、例えば、酸素もしくは窒素、単位、例えば、 NR^1 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ 、 SO 、 SO_2 、 SO_2NH 、または原子鎖、例えば、置換アルキルもしくは非置換アルキル、置換アルケニルもしくは非置換アルケニル、置換アルキニルもしくは非置換アルキニル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリールアルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキニルヘテロアリールアルケニル、アルキニルヘテロアリールアルキニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキニル、アルケニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキニルヘテロシクリルアルキニル、アルキルアリール、アルケニルアリール、アルキニルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルヘテロアリール、アルキニルヘテロアリールを含み、この場合、1つ以上のメチレンは、 O 、 S 、 $\text{S}(\text{O})$ 、 SO_2 、 $\text{N}(\text{R}^1)_2$ 、 $\text{C}(\text{O})$ 、切断可能な結合基、置換アリールまたは非置換アリール、置換ヘテロアリールまたは非置換ヘテロアリール、置換複素環または非置換複素環によって中断または終結され得る（式中、 R^1 は、水素、アシル、脂肪族、または置換脂肪族である）。

【0263】

一実施形態では、リンカー／テザー（下線）には、 $\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{NH—}$ ； $\text{—C}(\text{O})\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{NH—}$ ； $\text{—NR}'''\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{NH—}$ ； $\text{—C}(\text{O})\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{—C}(\text{O})\text{—}$ ； $\text{—C}(\text{O})\text{—O—}$ ； $\text{—C}(\text{O})\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{—NH—C}(\text{O})\text{—}$ ； $\text{—C}(\text{O})\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{—}$ ； $\text{—C}(\text{O})\text{—NH—}$ ； $\text{—C}(\text{O})\text{—}$ ； $\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{—C}(\text{O})\text{—}$ ； $\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{—C}(\text{O})\text{O—}$ ； $\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{—}$ ； $\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{—NH—C}(\text{O})\text{—}$ ； $\text{—C}(\text{O})\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{—NH—C}(\text{O})\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{R}''')\text{NH—}$ ； $\text{—C}(\text{O})\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{—NH—C}(\text{O})\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{R}')(\text{R}'')\text{—SS—}(\text{CH}_2)_n\text{—NH—C}(\text{O})\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{R}''')\text{NH—}$ ； $\text{—C}(\text{O})\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{—NH—C}(\text{O})\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{—SS—}(\text{CH}_2)_n\text{—CH}(\text{R}''')\text{—NH—C}(\text{O})\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{R}''')\text{NH—}$ ； $\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{—NH—C}(\text{O})\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{R}')(\text{R}'')\text{—SS—}(\text{CH}_2)_n\text{—}$ が含まれる（式中、各 n は、独立して、1～20（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20）であり、 R' および R'' は、それぞれ独立して、 H 、 CH_3 、 OH 、 SH 、 NH_2 、 NH （アルキル= Me 、 Et 、 Pr 、 IsoPr 、 Bu 、 Bn ）または N （ジアルキル= Me_2 、 Et_2 、 Bn_2 ）であり； R''' は、 H 、 COOH

、 CONH_2 、 CONHMe 、 CONMe_2 、 $\text{CONH}(\text{CH}_2)_j\text{NH}_2$ 、 $\text{CONH}(\text{CH}_2)_j\text{OH}$ 、 $\text{CONH}(\text{CH}_2)_j\text{COOH}$ 、 $\text{CONH}(\text{CH}_2)_j\text{SH}$ 、 $\text{CONH}(\text{CH}_2)_j\text{CONH}_2$ 、 $\text{CONH}(\text{CH}_2)_j\text{CONHMe}$ 、 $\text{CONH}(\text{CH}_2)_j\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_k\text{H}$ 、 $\text{CONH}(\text{CH}_2)_j\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_k\text{NH}_2$ 、 $\text{CONH}(\text{CH}_2)_j\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_k\text{CH}_3$ 、 $\text{CONH}(\text{CH}_2)_j\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_k\text{COOH}$ 、または $\text{CONH}(\text{CH}_2)_j\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_k\text{SH}$ であり；かつ R' は、 C_1-C_6 アルキルであり、 j および k は、それぞれ独立して、 $0\sim 20$ である）。好ましくは、 n は、 2 、 5 、 6 、または 11 である。他の実施形態では、窒素は、末端オキシアミノ基（例えば、 $-\text{ONH}_2$ ）、またはヒドラジノ基（ $-\text{NHNH}_2$ ）の一部を形成し得る。リンカー／テザーは、随意的に、例えば、ヒドロキシ、アルコキシ、パーハロアルキルで置換されていてもよく、かつ／または随意的に、 1 つ以上の追加のヘテロ原子、例えば、 N 、 O 、もしくは S が挿入されていてもよい。

【0264】

ある実施形態では、リンカーは、分岐状リンカーである。分岐状リンカーの分岐点は、少なくとも三価であり得るが、四価、五価、もしくは六価の原子、またはこのような複数の原子価を示す基であってもよい。ある実施形態では、分岐点は、 $-\text{C}$ 、 $-\text{CH}$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_2-)(\text{CH}_2-)\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{H})(\text{CH}_2-)\text{CH}_2-$ 、 $-\text{N}$ 、 $-\text{N}(\text{Q})$ 、 $-\text{C}$ 、 $-\text{O}-\text{C}$ 、 $-\text{S}-\text{C}$ 、 $-\text{SS}-\text{C}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{Q})-\text{C}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{Q})-\text{C}$ 、 $-\text{N}(\text{Q})\text{C}(\text{O})-\text{C}$ 、または $-\text{N}(\text{Q})\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{C}$ である（式中、 Q はそれぞれ存在ごとに独立して、 H または随意的に置換アルキルである）。他の実施形態では、分岐点は、グリセロールまたはグリセロール誘導体である。

【0265】

脂質粒子

本発明は、上記の 1 つ以上の標的化脂質を含む脂質粒子も提供する。脂質粒子には、リポソームが含まれるが、これに限定されない。本明細書で使用される場合、リポソームとは、水性内部を包む脂質含有膜を有する構造体のことである。リポソームは、 1 つ以上の脂質膜を有し得る。本発明は、一層のリポソーム（単層と呼ぶ）と重層化されたリポソーム（多層と呼ぶ）の両方を企図する。核酸と複合体を形成した場合、脂質粒子は、例えば、*Felgner, Scientific American*に記載されているような、 DNA 層の間に挟まったカチオン性脂質二重層から構成される、リポプレックス（lipoplex）となり得る。

【0266】

本発明の脂質粒子は、 1 つ以上の追加の脂質および／または他の成分（例えば、コレステロール）をさらに含んでもよい。他の脂質は、種々の目的のために、例えば、脂質の酸化を防ぐために、またはリガンドをリポソーム表面に付着させるために、本発明のリポソーム組成物に含めてもよい。本発明のリポソームの中に、両親媒性脂質、中性脂質、カチオン性脂質、およびアニオン性脂質を含む、多くの脂質のうちのどれが存在してもよい。このような脂質は、単独でまたは組み合わせて使用することができる。存在し得る追加の脂質成分の具体的な例は、以下に記載されている。

【0267】

本発明の脂質粒子中に存在し得る追加の成分には、ポリアミドオリゴマー（例えば、米国特許第 $6,320,017$ 号明細書参照）、ペプチド、タンパク質、界面活性剤、脂質誘導体、例えば、ホスファチジルエタノールアミンに共役した PEG およびセラミドにコンジュゲートした PEG （米国特許第 $5,885,613$ 号明細書参照）などの、二重層安定化成分が含まれる。

【0268】

特定の実施形態では、脂質粒子には、アミノ脂質またはカチオン性脂質、中性脂質、ステロール、および生成中の脂質粒子の凝集を低下させるために選択される脂質のうち 1 つ以上が含まれる。生成中の脂質粒子の凝集の低下は、生成中の電荷誘導による凝集を防ぐ

、粒子の立体安定化によって生じ得る。

【0269】

生成中に粒子が凝集するのを低下させる脂質の例としては、ポリエチレングリコール（PEG）修飾脂質、モノシアロガングリオシドGm1、およびポリアミドオリゴマー（「PAO」）（例えば、米国特許第6,320,017号明細書に記載されているもの）が挙げられる。PEG、Gm1、またはATTAのような、生成中に凝集するのを防ぐ、荷電していない親水性の立体障害部分を有する他の化合物を、本発明の方法および組成物などで使用するために、脂質に共役させることもできる。ATTA-脂質は、例えば、米国特許第6,320,017号明細書に記載されており、PEG-脂質コンジュゲートは、例えば、米国特許第5,820,873号、同第5,534,499号、および同第5,885,613号の各明細書に記載されている。典型的には、凝集を低下させるために選択される脂質成分の濃度は、（脂質のモルパーセントで）約1～15%である。

10

【0270】

本発明で有用なPEG修飾脂質（または脂質-ポリオキシエチレンコンジュゲート）の特定の例は、PEG部分を脂質小胞の表面に固定するための種々の「アンカリング」脂質部分を有することがある。好適なPEG修飾脂質の例としては、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミンおよびPEG修飾ホスファチジン酸、参照により本明細書に組み入れられる同時係属の米国特許出願第08/486,214号明細書に記載されているPEG-セラミドコンジュゲート（例えば、PEG-CerC14またはPEG-CerC20）、PEG修飾ジアルキルアミン、ならびにPEG修飾1,2-ジアシルオキシプロパン-3-アミンが挙げられる。特に好ましいのは、PEG修飾ジアシルグリセロールおよびPEG修飾ジアルキルグリセロールである。

20

【0271】

PEGまたはATTAなどの立体的に大きい部分を脂質アンカーにコンジュゲートする実施形態では、脂質アンカーの選択は、コンジュゲートが脂質粒子とどのように会合することになるかということによって決まる。mePEG（mw2000）-ジアステアロイルホスファチジルエタノールアミン（PEG-DSPe）は、この粒子が循環から排除されるまで、おそらく数日間、リポソームと会合したままであるということがよく知られている。PEG-CerC20などの他のコンジュゲートは、同様の滞留能を有する。しかしながら、PEG-CerC14は、血清に曝されると、速やかに製剤から放出され、いくつかのアッセイでは、 $T_{1/2}$ が60分未満である。米国特許出願第08/486,214号明細書で例説されているように、少なくとも3つの特性、すなわち、アシル鎖の長さ、アシル鎖の飽和状態、および立体障害頭部基の大きさが、放出速度に影響を与える。これらの特色について好適なバリエーションがある化合物が、本発明に有用であり得る。いくつかの治療用途については、PEG修飾脂質が、インビボで核酸-脂質粒子から速やかに失われることが好ましい場合があり、したがって、PEG修飾脂質が比較的短い脂質アンカーを有することになる。他の治療用途では、核酸-脂質粒子がより長い血漿循環寿命を示すことが好ましい場合があり、したがって、PEG修飾脂質が比較的長い脂質アンカーを有することになる。

30

【0272】

他の例示的なPEG-脂質には、例えば、国際公開第05/026372号に記載されているようなジアルキルオキシプロピルに共役したPEG（PEG-DAA）、例えば、米国特許公開第20030077829号および同第2005008689号に記載されているようなジアシルグリセロールに共役したPEG（PEG-DAG）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）に共役したPEG（PEG-PE）、もしくはセラミドにコンジュゲートしたPEG、またはこれらの組合せが含まれるが、これらに限定されるわけではない（米国特許第5,885,613号参照）。

40

【0273】

凝集防止化合物が適切に機能するために、脂質コンジュゲーションが必ずしも必要というわけではないということに留意すべきである。溶液中の遊離のPEGまたは遊離のAT

50

TAが、凝集を防ぐのに十分であることがある。生成後に粒子が安定である場合は、対象に投与する前に、PEGまたはATAを透析で取り除くことができる。

【0274】

脂質粒子中に存在する場合、中性脂質は、生理的pHで非荷電または中性のいずれかの両性イオン形態で存在する多くの脂質種のうちのどれであってもよい。このような脂質には、例えば、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、セファリン、およびセレブロシドが含まれる。本明細書に記載される粒子中で使用される中性脂質の選択は、一般に、例えば、リポソームの大きさおよび血流中でのリポソームの安定性を考慮することで判断される。中性脂質成分は、2つのアシル基（すなわち、ジアシルホスファチジルコリンおよびジアシルホスファチジルエタノールアミン）を有する脂質であることが好ましい。さまざまな鎖長および飽和度の種々のアシル鎖基を有する脂質は、入手可能であるか、または周知の技術で単離もしくは合成され得る。一群の実施形態では、炭素鎖長がC₁₀～C₂₀の飽和脂肪酸を含有する脂質が好ましい。別の群の実施形態では、炭素鎖長がC₁₀～C₂₀の単不飽和脂肪酸または二不飽和脂肪酸を有する脂質が使用される。さらに、飽和脂肪酸鎖と不飽和脂肪酸鎖の混合物を有する脂質を使用することができる。本発明で使用される中性脂質は、DOPE、DSPC、POPC、または任意の関連ホスファチジルコリンであることが好ましい。本発明で使用される中性脂質は、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、または他の頭部基（例えば、セリンおよびイノシトール）を有するリン脂質から構成されていてもよい。

【0275】

存在する場合、脂質混合物のステロール成分は、リポソーム、脂質小胞、または脂質粒子の調製の分野で従来から使用されているステロールのうちのどれであってもよい。好ましいステロールは、コレステロールである。

【0276】

本発明の脂質粒子中で使用するのに好適なカチオン性脂質としては、N，N-ジオレイル-N，N-ジメチルアンモニウムクロリド（「DODAC」）；N-（2，3-ジオレイルオキシ）プロピル-N，N，N-トリメチルアンモニウムクロリド（「DOTMA」）；N，N-ジステアシル-N，N-ジメチルアンモニウムブロミド（「DDAB」）；N-（2，3-ジオレイルオキシ）プロピル-N，N，N-トリメチルアンモニウムクロリド（「DOTAP」）；1，2-ジオレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩（「DOTAP・Cl」）；3β-（N-（N'，N'-ジメチルアミノエタン）-カルバモイル）コレステロール（「DC-Chol」）、N-（1-（2，3-ジオレイルオキシ）プロピル）-N-2-（スペルミンカルボキシアミド）エチル-N，N-ジメチルアンモニウムトリフルオロ酢酸（「DOSPA」）、ジオクタデシルアミドグリシルカルボキシスペルミン（「DOGS」）、1，2-ジレオイル-sn-3-ホスホエタノールアミン（「DOPE」）、1，2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン（「DODAP」）、N，N-ジメチル-2，3-ジオレイルオキシ）プロピルアミン（「DODMA」）、およびN-（1，2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル）-N，N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（「DMRIE」）が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、例えば、LIPOFECTIN（DOTMAとDOPEとを含む、GIBCO/BRLから入手可能）、ならびにLIPOFECTAMINE（DOSPAおよびDOPEを含む、GIBCO/BRLから入手可能）などの、カチオン性脂質の多くの市販調製品を使用することができる。特定の実施形態では、カチオン性脂質はアミノ脂質である。

【0277】

本発明に適した他のカチオン性脂質は、国際出願第PCT/US2007/080331号（2007年10月3日出願）に開示されている。

【0278】

本発明の脂質粒子中で使用するのに好適なアニオン性脂質としては、ホスファチジルグ

リセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、N-ドデカノイルホスファチジルエタノールアミン、N-スクシニルホスファチジルエタノールアミン、N-グルタリルホスファチジルエタノールアミン、リシルホスファチジルグリセロール、および中性脂質に結合した他のアニオン性修飾基が挙げられるが、これらに限定されない。

【0279】

多くの実施形態では、両親媒性脂質が本発明の脂質粒子中に含まれる。「両親媒性脂質」とは、脂質材料の疎水性部分が疎水性相の方向に向いている一方で、親水性部分が水性相の方向に向いている、任意の好適な材料を指す。このような化合物としては、リン脂質、アミノ脂質、およびスフィンゴ脂質が挙げられるが、これらに限定されない。代表的なリン脂質としては、スフィンゴミエリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンノシトール、ホスファチジン酸、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン、リソホスファチジルコリン、リソホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、またはジリノレオイルホスファチジルコリンが挙げられる。スフィンゴ脂質、グリコスフィンゴ脂質ファミリー、ジアシルグリセロール、および β -アシルオキシ酸などの、リンを欠く他の化合物も使用することができる。さらに、このような両親媒性脂質は、トリグリセリドおよびステロールなどの、他の脂質と容易に混合することができる。

【0280】

プログラム可能な融合脂質も、本発明の脂質粒子中に含めるのに好適である。このような脂質粒子は、細胞膜と融合する傾向がほとんどなく、所与のシグナル事象が生じるまで積載物を送達する。これによって、脂質粒子は、生物に注射された後でより均一に分布すること、または細胞と融合し始める前に疾患部位に分布することが可能となる。シグナル事象は、例えば、pH、温度、イオン環境、または時間の変化であり得る。時間の変化の場合、融合遅延成分または融合「遮蔽 (c l o a k i n g)」成分 (例えば、A T T A-脂質コンジュゲートまたはP E G-脂質コンジュゲート) は、単に時間をかけて脂質粒子膜から放出することができる。脂質粒子は、体内で好適に分布する時まで、融合性であるのに十分な遮蔽剤を失っている。他のシグナル事象に関しては、炎症部位での温度上昇などの、疾患部位または標的細胞と関連するシグナルを選択することが望ましい。

【0281】

例示的な一実施形態では、脂質粒子は、本発明の標的化脂質、カチオン性脂質、中性脂質 (アミノ脂質以外)、ステロール (例えば、コレステロール)、およびP E G修飾脂質 (例えば、P E G-D M G、P E G-C-D O M G、またはP E G-D M A) の混合物を含む。ある実施形態では、脂質混合物は、本発明の標的化脂質、カチオン性脂質、中性脂質、コレステロール、およびP E G修飾脂質からなるか、または本発明の標的化脂質、カチオン性脂質、中性脂質、コレステロール、およびP E G修飾脂質から本質的になる。さらに好ましい実施形態では、脂質粒子は、標的化脂質約20~50%：カチオン性脂質20~70%：中性脂質5~45%：コレステロール20~55%：P E G修飾脂質0.5~15%というモル比の上記の脂質混合物からなるかまたは標的化脂質約20~50%：カチオン性脂質20~70%：中性脂質5~45%：コレステロール20~55%：P E G修飾脂質0.5~15%というモル比の上記の脂質混合物から本質的になる。

【0282】

好ましい実施形態では、脂質粒子の全ての成分は光学的に純粋である。

【0283】

治療剤-脂質粒子の組成物および製剤

本発明は、本発明の脂質粒子および活性剤を含み、活性剤が脂質粒子と会合している組成物を含む。特定の実施形態では、活性剤は治療剤である。特定の実施形態では、活性剤は、脂質粒子の水性内部に封入されている。他の実施形態では、活性剤は、脂質粒子の1つ以上の脂質層の内側に存在する。他の実施形態では、活性剤は、脂質粒子の外側または

内側の脂質表面に結合している。

【0284】

本明細書で使用される「完全に封入された」とは、粒子中の核酸が、遊離のDNAを著しく分解する血清またはヌクレアーゼアッセイに曝された後にそれほど分解されないことを意味する。完全に封入された系では、通常は遊離の核酸の100%を分解する処置において、粒子核酸の25%未満が分解されることが好ましく、粒子核酸の10%未満が分解されることがより好ましく、粒子核酸の5%未満が分解されることが最も好ましい。あるいは、完全に封入されていることを、Oligreen（登録商標）アッセイで決定してもよい。Oligreen（登録商標）は、溶液中のオリゴヌクレオチドおよび一本鎖DNAを定量するための超高感度の蛍光核酸染色剤である（Invitrogen Corporation, Carlsbad社製（米国カリフォルニア州所在）から入手可能）。完全に封入されていることにより、粒子が血清安定性であること、すなわち、インビボ投与の後、粒子が速やかにその構成部分へと分解することはないことも示唆される。

10

【0285】

本明細書で使用される活性剤には、細胞、組織、器官、または対象に対して所望の効果を発揮することができる任意の分子または化合物が含まれる。このような効果は、例えば、生物学的なもの、生理学的なもの、または美容上のものであってもよい。活性剤は、例えば、核酸、ペプチドおよびポリペプチド（例えば、抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体断片；ヒト化抗体、組換え抗体、組換えヒト抗体、および霊長類化（商標）抗体）、サイトカイン、増殖因子、アポトーシス因子、分化誘導因子、細胞表面受容体およびそのリガンド；ホルモンを含む）；ならびに小分子（有機小分子または有機小化合物を含む）を含む、任意の種類の分子または化合物であってもよい。

20

【0286】

一実施形態では、活性剤は、治療的活性剤、またはその塩もしくは誘導体である。治療剤誘導体は、それ自体に治療的活性があってもよく、または治療剤誘導体は、さらに修飾されることによって活性を持つようになるプロドラッグであってもよい。したがって、一実施形態では、治療剤誘導体は、未修飾の薬剤と比較した場合に治療的活性の一部または全てを保持するが、別の実施形態では、治療剤誘導体は治療的活性を欠く。

【0287】

さまざまな実施形態では、治療剤には、任意の治療的に有効な薬剤または薬物、例えば、抗炎症化合物、抗鬱薬、興奮剤、鎮痛剤、抗生物質、避妊薬、解熱剤、血管拡張剤、抗血管新生薬、細胞血管剤（cytovascular agent）、シグナル伝達阻害剤、心血管薬（例えば、抗不整脈剤）、血管収縮薬、ホルモン、およびステロイドが含まれる。

30

【0288】

ある実施形態では、治療剤は腫瘍学薬物であり、これは、抗腫瘍薬、抗癌薬、腫瘍薬、抗新生物剤などと呼ばれることもある。本発明に従って使用し得る腫瘍学薬物としては、アドリアマイシン、アルケラン、アロプリノール、アルトレタミン、アミフォスチン、アナストロゾール、araC、亜ヒ酸、アザチオプリン、ベキサロテン、b i CNU、ブレオマイシン、静脈用ブスルファン、経口用ブスルファン、カペシダビン（ゼローダ）、カルボプラチン、カルムスチン、CCNU、セレコキシブ、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリビン、シクロスポリンA、シタラビン、シトシンアラビノシド、ダウノルビシン、シトキサン、ダウノルビシン、デキサメサゾン、デクスラゾキサン、ドセタキセル、ドキソルビシン、ドキソルビシン、DTIC、エピルビシン、エストラムスチン、リン酸エトポシド、エトポシドおよびVP-16、エキセメスタン、FK506、フルダラビン、フルオロウラシル、5-FU、ジェムシタビン（ジェムザール）、ゲムツズマブーオゾガマイシン、酢酸ゴセレリン、ヒドロレア、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、メシル酸イマチニブ、インターフェロン、イリノテカン（カンプトスター、CPT-111）、レトロゾール、ロイコボリン、ロイスタチン、ロイプロリド、レバミゾール、リトレチノイン（litretinoin）、メゲストロール、メルファラン、L-

40

50

PAM、メスナ、メトトレキサート、メトキサレン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ナイトロジェンマスタード、パクリタキセル、パミドロネート、ペガデマーゼ、ペントスタチン、ポルフィマーナトリウム、プレドニソン、リツキサン、ストレプトゾシン、STI-571、タモキシフェン、タキソテール、テモゾールアミド、テニポシド、VM-26、トポテカン（ハイカムチン）、トレミフェン、トレチノイン、ATRA、ベルパン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、VP16、ならびにビノレルビンが挙げられるが、これらに限定されない。本発明に従って使用し得る腫瘍学薬物の他の例は、エリプチシンおよびエリプチシン類似体またはエリプチシン誘導体、エポチロン、細胞内キナーゼ阻害剤、ならびにカンプトテシンである。

【0289】

核酸－脂質粒子

ある実施形態では、本発明の脂質粒子は、核酸と会合し、核酸－脂質粒子を生じる。特定の実施形態では、核酸は、脂質粒子中に完全に封入されている。本明細書で使用される場合、「核酸」という用語は、任意のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含むことを意味する。最大50ヌクレオチドまでを含有する断片を、一般に、オリゴヌクレオチドと呼び、より長い断片をポリヌクレオチドと呼ぶ。特定の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドの長さは20～50ヌクレオチドである。

【0290】

本発明との関連において、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、天然に存在する塩基、糖、および糖間（骨格）結合からなるヌクレオチドモノマーもしくはヌクレオシドモノマーのポリマーまたはオリゴマーを指す。「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語には、同様に機能する天然には存在しないモノマー、またはその部分を含むポリマーまたはオリゴマーも含まれる。例えば、増強された細胞への取込みおよびヌクレアーゼの存在下での増大した安定性などの特性のために、このような修飾オリゴヌクレオチドまたは置換オリゴヌクレオチドが天然の形態よりも好ましいことが多い。

【0291】

オリゴヌクレオチドは、デオキシリボオリゴヌクレオチドまたはリボオリゴヌクレオチドとして分類される。デオキシリボオリゴヌクレオチドは、デオキシリボースと呼ばれる5炭素糖からなり、デオキシリボースは、この糖の5'炭素と3'炭素でホスフェートに共有結合して交互の未分岐ポリマーを形成する。リボオリゴヌクレオチドは、5炭素糖がリボースである類似の繰り返し構造からなる。

【0292】

本発明による脂質－核酸粒子中に存在する核酸には、任意の形態の公知の核酸が含まれる。本明細書で使用される核酸は、一本鎖DNAもしくは一本鎖RNA、または二本鎖DNAもしくは二本鎖RNA、またはDNA－RNAハイブリッドであることができる。二本鎖DNAの例としては、構造遺伝子、制御領域と終結領域とを含む遺伝子、および自己複製系（例えば、ウイルスDNAまたはプラスミドDNA）が挙げられる。二本鎖RNAの例としては、siRNAおよび他のRNA干渉試薬が挙げられる。一本鎖核酸としては、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、マイクロRNA、アンタゴm

【0293】

本発明の核酸は、通常は核酸の特定の形態によって、さまざまな長さであってもよい。例えば、特定の実施形態では、プラスミドまたは遺伝子の長さは、約1,000～100,000ヌクレオチドであってもよい。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドの長さは、約10～100ヌクレオチドの範囲であってもよい。さまざまな関連する実施形態では、オリゴヌクレオチドの長さは、一本鎖、二本鎖、および三本鎖ともに、約10～約50ヌクレオチド、約20～約50ヌクレオチド、約15～約30ヌクレオチド、約20～約30ヌクレオチドの範囲であってもよい。

【0294】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド（またはその鎖）は、標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするかまたは標的ポリヌクレオチドに相補的である。

「特異的にハイブリダイズ可能な」または「相補的な」は、DNA標的またはRNA標的とオリゴヌクレオチドの間で安定かつ特異的な結合が生じるような十分な程度の相補性を示すために使用される用語である。特異的にハイブリダイズ可能であるために、オリゴヌクレオチドがその標的核酸配列に100%相補的である必要はないということが理解される。標的に対するオリゴヌクレオチドの結合が、標的分子の正常な機能を妨害して、標的分子からの効用または発現を失わせており、かつ特異的結合が所望される条件下で、すなわち、インビボアッセイもしくは治療的処置の場合には、生理的条件下で、またはインビトロアッセイの場合には、そのアッセイが行なわれる条件下で、非標的配列に対するオリゴヌクレオチドの非特異的結合を回避するために十分な程度の相補性があるとき、オリゴヌクレオチドは特異的にハイブリダイズ可能である。したがって、他の実施形態では、このオリゴヌクレオチドは、それが標的とするかまたはそれが特異的にハイブリダイズする遺伝子配列またはmRNA配列と比較して、1つ、2つ、または3つの塩基置換を含む。

【0295】

RNA干渉核酸

特定の実施形態では、本発明の核酸-脂質粒子は、RNA干渉（RNAi）分子と会合している。目的とする遺伝子またはポリヌクレオチドの発現を妨害するために、RNAi分子を用いるRNA干渉法を使用してもよい。これらのRNAi分子はiRNA剤とも呼ばれ、以下に説明する。

【0296】

iRNA剤は、標的遺伝子と十分に相同な領域を含み、かつヌクレオチドに関して、iRNA剤またはその断片が標的遺伝子の下方調節を仲介することができるほどの十分な長さであるべきである。（説明しやすくするために、本明細書では、ヌクレオチドまたはリボヌクレオチドという用語を、RNA剤の1つ以上のモノマーサブユニットに関して使用する場合がある。本明細書での「リボヌクレオチド」または「ヌクレオチド」という用語の用法は、修飾RNAまたはヌクレオチド代用物の場合、修飾ヌクレオチド、または1つ以上の位置での代用物置換部分も示すことができるということが理解されよう。）したがって、iRNA剤は、標的RNAに対して少なくとも部分的に、および一実施形態では、完全に、相補的な領域であるか、またはこのような領域を含む。iRNA剤と標的の間に完全な相補性がある必要はないが、対応性は、iRNA剤、またはその切断産物が、例えば、標的RNA（例えば、mRNA）のRNAi切断によって、配列特異的なサイレンシングを導くことが可能となる程度に十分でなければならない。相補性、すなわち、標的鎖との相同性の程度は、アンチセンス鎖において最も重要である。多くの場合、特にアンチセンス鎖における完全な相補性が所望されるものの、一実施形態は、特にアンチセンス鎖において、（標的RNAに対して）1つ以上の、または例えば、6つ、5つ、4つ、3つ、2つ、もしくはそれより少ないミスマッチを含むことができる。特にアンチセンス鎖におけるミスマッチは、末端領域で最も許容され、かつ、存在する場合は、末端領域（単数または複数）において、例えば、5'末端および／または3'末端から6、5、4、または3ヌクレオチド以内であり得る。センス鎖に要求されるのは、分子の全体的な二本鎖の性質を維持するためにアンチセンス鎖と十分に相補的であることのみである。

【0297】

本明細書の他の箇所で議論されるように、およびその全体が参照により組み入れられる文献において、iRNA剤は、多くの場合、修飾されているか、またはヌクレオシド代用物を含む。iRNA剤の一本鎖領域は、多くの場合、修飾されているか、またはヌクレオシド代用物を含み、例えば、不對領域またはヘアピン構造の領域（例えば、2つの相補的な領域を繋ぐ領域）は、修飾またはヌクレオシド代用物を有することができる。例えば、エキソヌクレアーゼに対して、iRNA剤の1つ以上の3'末端または5'末端を安定化する修飾またはアンチセンスiRNA剤がRISCに入るように有利に働く修飾も想定される。修飾は、C3（またはC6、C7、C12）アミノリンカー、チオールリンカー、

カルボキシリリンカー、非ヌクレオチドスパーサー（C 3、C 6、C 7、C 1 2、無塩基、トリエチレングリコール、ヘキサエチレングリコール）、特別なビオチン試薬またはフルオレセイン試薬（これらは、ホスホロアミダイトとして生じ、RNA 合成の間に複数のカップリングが行なえるように、DMT 保護ヒドロキシル基を別に有する）を含むことができる。

【0298】

i RNA 剤としては次のようなものが挙げられる：インターフェロン応答を誘発するのに十分な長さの分子（これらは、Dicer (Bernsteinら, 2001. Nature, 409: 363-366) によって切断され、RISC (RNA 誘導サイレンシング複合体) 内に入ることができる)；およびインターフェロン応答を誘発しない程度に十分に短い分子（これらの分子も Dicer によって切断され、かつ／または RISC 内に入ることができる）、例えば、RISC 内に入ることができる大きさの分子（例えば、Dicer 切断産物に類似した分子）。インターフェロン応答を誘発しない程度に十分に短い分子を、本明細書では、「si RNA 剤またはより短い i RNA 剤」と呼ぶ。本明細書で使用される「si RNA 剤またはより短い i RNA 剤」とは、例えば、ヒト細胞内で有害なインターフェロン応答を誘導しないぐらい十分に短い、例えば、60、50、40、または30ヌクレオチド未満の二重鎖領域を有する RNA 剤（例えば、二本鎖 RNA 剤または一本鎖剤）を指す。si RNA 剤、またはその切断産物は、例えば、標的 RNA に対して RNA i を誘導することによって、標的遺伝子を下方調節することができ、この場合、標的は内在性の標的 RNA または病原体の標的 RNA を含み得る。

10

20

【0299】

si RNA 剤の各鎖の長さは、30、25、24、23、22、21、または20ヌクレオチド以下であることができる。鎖の長さは、少なくとも19であってもよい。例えば、各鎖の長さは、21～25ヌクレオチドであることができる。si RNA 剤は、17、18、19、20、21、22、23、24、または25ヌクレオチド対の二重鎖領域、および1つ以上の突出、または1つもしくは2つの、2～3ヌクレオチドの3'突出を有してもよい。

【0300】

標的 RNA に対する相同性および標的遺伝子を下方調節する能力に加え、i RNA 剤は、以下の特性のうちの1つ以上を有してもよい。

30

【0301】

一本鎖 i RNA 剤は、RISC 複合体に入り、RISC を介した標的 mRNA の切断に関与することができるぐらい十分に長くてもよい。一本鎖 i RNA 剤の長さは、少なくとも14ヌクレオチド、および他の実施形態では、少なくとも15、20、25、29、35、40、または50ヌクレオチドである。ある実施形態では、一本鎖 i RNA 剤の長さは、200、100、または60ヌクレオチド未満である。

【0302】

ヘアピン i RNA 剤は、17、18、19、29、20、21、22、23、24、もしくは25ヌクレオチド対に等しいか、または少なくとも17、18、19、29、20、21、22、23、24、もしくは25ヌクレオチド対の二重鎖領域を有する。二重鎖領域の長さは、200、100、または50以下である。ある実施形態では、二重鎖領域の範囲の長さは、15～30、17～23、19～23、および19～21ヌクレオチド対である。ヘアピンは、一実施形態では、3' に、また、ある実施形態では、ヘアピンのアンチセンス側に、一本鎖突出または末端不對領域を有してもよい。一実施形態では、突出の長さは、2～3ヌクレオチドである。

40

【0303】

本明細書で使用される「二本鎖 (ds) i RNA 剤」とは、鎖間ハイブリダイゼーションによって二重鎖構造の領域が形成され得る、2つ以上の、場合によっては2つの、鎖を含む i RNA 剤である。

【0304】

50

二本鎖 iRNA 剤のアンチセンス鎖の長さは、14、15、16、17、18、19、25、29、40、もしくは60ヌクレオチドに等しくてもよく、または少なくとも14、15、16、17、18、19、25、29、40、もしくは60ヌクレオチドであってもよい。二本鎖 iRNA 剤のアンチセンス鎖の長さは、200、100、または50ヌクレオチド以下であってもよい。範囲の長さは、17～25、19～23、および19～21ヌクレオチドであってもよい。

【0305】

二本鎖 iRNA 剤のセンス鎖の長さは、14、15、16、17、18、19、25、29、40、もしくは60ヌクレオチドに等しくてもよく、または少なくとも14、15、16、17、18、19、25、29、40、もしくは60ヌクレオチドであってもよい。二本鎖 iRNA 剤のセンス鎖の長さは、200、100、または50ヌクレオチド以下であってもよい。範囲の長さは、17～25、19～23、および19～21ヌクレオチドであってもよい。

【0306】

二本鎖 iRNA 剤の二本鎖部分の長さは、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、29、40、もしくは60ヌクレオチド対に等しくてもよく、または少なくとも14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、29、40、もしくは60ヌクレオチド対であってもよい。二本鎖 iRNA 剤の二本鎖部分の長さは、200、100、または50ヌクレオチド対以下であってもよい。範囲の長さは、15～30、17～23、19～23、および19～21ヌクレオチド対であってもよい。

【0307】

多くの実施形態では、ds iRNA 剤は、内在性分子によって（例えば、Dicer によって）切断されて、より小さい ds iRNA 剤（例えば、siRNA 剤）を産生することができるくらいに十分大きい。

【0308】

二本鎖 iRNA 剤のアンチセンス鎖とセンス鎖の一方または両方を修飾することが望ましい場合がある。センス鎖とアンチセンス鎖は、同じ修飾または同じ部類の修飾を有することもあれば、異なる修飾を有することもあり、例えば、場合によっては、センス鎖のみを修飾することが望ましい場合がある。例えば、センス鎖を不活性化するために、センス鎖のみを修飾することが望ましい場合があり、例えば、センス鎖を不活性化して、活性のある siRNA/タンパク質または RISC の形成を妨げるために、センス鎖を修飾することができる。これは、センス鎖の 5'-リン酸化を妨げる修飾によって（例えば、5'-O-メチルリボヌクレオチドを用いる修飾によって）遂行することができる（Nykanen ら（2001）ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. Cell 107, 309-321 参照）。例えば、単に 5'-OH を O-Me ではなく H によって置換することなどの、リン酸化を妨げる他の修飾も使用することもできる。あるいは、大きな嵩高い基を 5'-ホスフェートに付加して、ホスホジエステル結合に変えてもよいが、ホスホジエステラーゼがこのような結合を切断して、機能的な siRNA の 5'-末端を放出し得るので、これはあまり望ましくない可能性がある。アンチセンス鎖修飾には、5'-リン酸化、および本明細書で議論される任意の他の 5' 修飾、特に、一本鎖 iRNA 分子に関する節において上で議論された 5' 修飾が含まれる。

【0309】

ds iRNA 剤が、分子の一方または両方の末端で一本鎖領域または不對領域を含むように、センス鎖とアンチセンス鎖を選択し得る。したがって、ds iRNA 剤は、突出、例えば、1つもしくは2つの 5' 突出もしくは 3' 突出、または 2～3ヌクレオチドの 3' 突出を含有するように対形成した、センス鎖とアンチセンス鎖を含有し得る。多くの実施形態は、3' 突出を有する。ある siRNA 剤は、一本鎖突出を有し、一実施形態

では、各末端に1ヌクレオチドまたは2ヌクレオチドまたは3ヌクレオチドの長さの3'突出を有する。突出は、一方の鎖が他方の鎖よりも長いこと、または同じ長さの2つの鎖がジグザグ状になっていることの結果として生じ得る。5'末端はリン酸化されていてもよい。

【0310】

一実施形態では、二重鎖領域の長さは、例えば、上で考察されたsiRNA剤の範囲において、15~30ヌクレオチド長、または18、19、20、21、22、および23ヌクレオチド長である。siRNA剤は、天然のDicerによって長いdsiRNAからプロセッシングされた産物と長さおよび構造が類似していることがあり得る。siRNA剤の2つの鎖が結合（例えば、共有結合）している実施形態も含まれる。ヘアピン、または所要の二本鎖領域、および3'突出を与える他の一本鎖構造も本発明の範囲内にある。

10

【0311】

dsiRNA剤およびsiRNA剤を含む、本明細書に記載される単離されたiRNA剤は、標的RNA、例えば、mRNA（例えば、タンパク質をコードする遺伝子の転写物）のサイレンシングを仲介することができる。便宜上、このようなmRNAを、本明細書では、サイレンシングされるmRNAとも呼ぶ。このような遺伝子を標的遺伝子とも呼ぶ。一般に、サイレンシングされるRNAは、内在性遺伝子または病原体遺伝子である。さらに、mRNA以外のRNA（例えば、tRNA）、およびウイルスRNAを標的とすることもできる。

20

【0312】

本明細書で使用される場合、「RNAiを仲介する」という語句は、配列特異的な様式で、標的RNAをサイレンシングする能力を指す。理論に束縛されることを望まないが、サイレンシングでは、RNAiの機構またはプロセスおよびガイドRNA（例えば、21~23ヌクレオチドのsiRNA剤）が使用されると考えられている。

【0313】

本明細書で使用される場合、「特異的にハイブリダイズ可能な」または「相補的な」は、本発明の化合物と標的RNA分子の間で安定かつ特異的な結合が生じるような十分な程度の相補性を示すために使用される用語である。特異的結合には、特異的結合が所望される条件下で、すなわち、インビボアッセイもしくは治療的処置の場合には、生理的条件下で、またはインビトロアッセイの場合には、そのアッセイが行なわれる条件下で、非標的配列に対するオリゴマー化合物の非特異的結合を回避するために十分な程度の相補性が必要とされる。非標的配列は、典型的には、少なくとも5ヌクレオチド異なっている。

30

【0314】

一実施形態では、iRNA剤は、iRNA剤が標的mRNAによってコードされるタンパク質の産生をサイレンシングするように、標的RNA、例えば、標的mRNAに「十分に相補的」である。別の実施形態では、iRNA剤は、標的RNAに「厳密に相補的」であり、例えば、標的RNAとiRNA剤は、例えば、厳密に相補的な領域でワトソン・クリック塩基対のみからできたハイブリッドを形成するようにアニールする。「十分に相補的な」標的RNAは、標的RNAに厳密に相補的な（例えば、少なくとも10ヌクレオチドの）内部領域を含むことができる。さらに、一実施形態では、iRNA剤は、単一ヌクレオチドの相違を特異的に区別することができる。この場合、iRNA剤は、厳密な相補性が、単一ヌクレオチドの違いがある（例えば、7ヌクレオチド以内の）領域に見られる場合のみにRNAiを仲介する。

40

【0315】

本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」という用語は、例えば、100、200、300、または400ヌクレオチド未満の長さの核酸分子（RNAまたはDNA）を指す。

【0316】

本明細書で考察されるRNA剤は、未修飾のRNA、ならびに、例えば、効力を改善す

50

るために修飾されたRNA、およびヌクレオシド代用物のポリマーを含む。未修飾のRNAとは、核酸の成分、すなわち、糖、塩基、およびリン酸の部分が、天然に存在する、例えば、ヒトの体内に天然に存在するのと同じかまたは本質的に同じである分子を指す。当技術分野では、稀であるかまたは通常とは異なるが、天然に存在するRNAを修飾RNAと呼ぶことが多く、例えば、Limbachら（1994）Summary: the modified nucleosides of RNA, Nucleic Acids Res. 22: 2183-2196を参照されたい。（典型的には転写後修飾の結果であることが明白なので）修飾RNAと呼ばれることが多い、このような稀であるかまたは通常とは異なるRNAは、本明細書で使用される「未修飾のRNA」という用語の範囲内にある。修飾RNAは、1つ以上の核酸の成分、すなわち、糖、塩基、およびリン酸の部分が、天然に存在するものと異なる、例えば、ヒトの体内に存在するものと異なる分子を指す。これらは修飾「RNA」と呼ばれるが、当然、修飾されているのでRNAではない分子を含むことになる。ヌクレオシド代用物とは、リボリン酸骨格が非リボリン酸構築物で置換されている分子のことであり、この非リボリン酸構築物は、ハイブリダイゼーションが、リボリン酸骨格の場合に見られるのと実質的に同様（例えば、リボリン酸骨格の非荷電模倣物）であるように、塩基が正しい空間的関係性で提示されることを可能にする。

10

【0317】

マイクロRNA

マイクロRNA (miRNA) は、植物および動物のゲノム中のDNAから転写されるが、タンパク質に翻訳されない、高度に保存されたクラスの小さいRNA分子である。プロセッシングされたmiRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) に組み込まれるようになる一本鎖の約17~25ヌクレオチド (nt) のRNA分子であり、発生、細胞増殖、アポトーシス、および分化の重要な調節因子として同定されている。プロセッシングされたmiRNAは、特異的mRNAの3' -非翻訳領域に結合することによって遺伝子発現の調節に役割を果たすと考えられている。RISCは、翻訳の阻害、転写物の切断、またはその両方によって遺伝子発現の下方調節を仲介する。RISCは、広範な真核生物の核内での転写サイレンシングにも関与している。

20

【0318】

これまでに同定されたmiRNAの数は多く、ますます増えているが、その実例となる例を、例えば、「miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature」 Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. NAR, 2006, 34, Database Issue, D140-D144; 「The microRNA Registry」 Griffiths-Jones S. NAR, 2004, 32, Database Issue, D109-D111に見出すことができ、また、<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>に見出すこともできる。

30

【0319】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

一実施形態では、核酸は、標的ポリヌクレオチドに向けられるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。「アンチセンスオリゴヌクレオチド」または単に「アンチセンス」という用語は、標的とされるポリヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドを含むことを意味する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、選択された配列に相補的な一本鎖のDNAまたはRNAである。アンチセンスRNAの場合は、それらが相補的RNA鎖に結合することによって相補的RNA鎖の翻訳を妨げる。アンチセンスDNAは、特異的で、相補的な（コードまたは非コード）RNAを標的とするために使用することができる。結合が生じた場合、このDNA/RNAハイブリッドは、RNAアーゼHという酵素によって分解されることができる。特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約10~約50ヌクレオチド、より好ましくは約15~約30ヌクレオチドを含有する。この

40

50

用語は、所望の標的遺伝子に厳密に相補的でない可能性のあるアンチセンスオリゴヌクレオチドも包含する。したがって、本発明は、アンチセンスを用いて標的の特異的でない活性が見られる場合、または標的配列との1つ以上のミスマッチを含有するアンチセンス配列が特定の用途に最も好ましい場合に、利用することができる。

【0320】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、効果的で、かつ標的とされるタンパク質合成の阻害剤であることが示されており、したがって、標的遺伝子によるタンパク質合成を特異的に阻害するために使用することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドがタンパク質合成を阻害する効力は十分に証明されている。例えば、ポリガラクタウロナーゼ (polygalacturonase) とムスカリン2型アセチルコリン受容体の合成は、これらのそれぞれのmRNA配列に向けられるアンチセンスオリゴヌクレオチドによって阻害される (米国特許第5,739,119号および米国特許第5,759,829号)。さらに、アンチセンス阻害の例は、核タンパク質サイクリン、多剤耐性遺伝子 (MDG1)、ICAM-1、E-セレクトリン、STK-1、線条体GABA_A受容体、およびヒトEGFについて示されている (Jaskulskiら, Science. 1988 Jun 10; 240 (4858): 1544-6; VasanthakumarおよびAhmed, Cancer Commun. 1989; 1 (4): 225-32; Perisら, Brain Res Mol Brain Res. 1998 Jun 15; 57 (2): 310-20; 米国特許第5,801,154号; 米国特許第5,789,573号; 米国特許第5,718,709号、および米国特許第5,610,288号)。さらに、種々の異常な細胞増殖 (例えば、癌) を阻害し、これらを治療するのに使用し得るアンチセンス構築物も記載されている (米国特許第5,747,470号; 米国特許第5,591,317、および米国特許第5,783,683号)。

【0321】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを産生する方法は当技術分野で公知であり、任意のポリヌクレオチド配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを産生するように容易に適合させることができる。所与の標的配列に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド配列の選択は、選択された標的配列の解析ならびに二次構造、T_m、結合エネルギー、および相対的な安定性の決定に基づく。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、宿主細胞における標的mRNAへの特異的結合を低下させるかまたは邪魔することになるダイマー、ヘアピン、または他の二次構造を形成する能力が相対的にないことに基づいて選択されてもよい。極めて好ましいmRNAの標的領域には、AUG翻訳開始コドン上またはその付近にある領域、およびmRNAの5'領域に実質的に相補的な配列が含まれる。これらの二次構造解析および標的部位選択の検討は、例えば、OLIGOプライマー解析ソフトウェア (Molecular Biology Insights) のバージョン4および/またはBLASTN 2.0.5アルゴリズムソフトウェア (Altschulら, Nucleic Acids Res. 1997, 25 (17): 3389-402) を用いて行なうことができる。

【0322】

リボザイム

本発明の別の実施形態によれば、核酸-脂質粒子は、リボザイムと会合している。リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を持つ特異的触媒ドメインを有するRNA-タンパク質複合体である (KimおよびCech, Proc Natl Acad Sci US A. 1987 Dec; 84 (24): 8788-92; ForsterおよびSymons, Cell. 1987 Apr 24; 49 (2): 211-20)。例えば、多くのリボザイムは、高い特異性で、リン酸エステル転移反応を加速させ、多くの場合、オリゴヌクレオチド基質中のいくつかのリン酸エステルのうちの1つだけを切断する (Cechら, Cell. 1981 Dec; 27 (3 Pt 2): 487-96; MichelおよびWesthof, J Mol Biol. 1990 Dec 5; 216 (3): 585-610; Reinhold-HurekおよびShub, Nature. 19

10

20

30

40

50

92 May 14; 357 (6374): 173-6)。この特異性は、化学反応の前に、基質が特異的な塩基対形成相互作用を介してリボザイムの内部ガイド配列（「IGS」）に結合する必要があることによるものである。

【0323】

少なくとも6つの基本的な種類の天然に存在する酵素的RNAが現在知られている。各々が、生理的条件下でトランス形のRNAホスホジエステル結合の加水分解を触媒することができる（したがって、他のRNA分子を切断することができる）。一般に、酵素的核酸は、まず標的RNAに結合することによって作用する。このような結合は、標的RNAを切断するように作用する分子の酵素的部分のごく近傍にある酵素的核酸の標的結合部分を介して起こる。したがって、酵素的核酸は、まず標的RNAを認識し、次に、相補的な塩基対形成を介して標的RNAに結合し、ひとたび正しい部位に結合すると、標的RNAを切断するように酵素的に作用する。このような標的RNAの戦略的切断によって、コードされたタンパク質を合成する標的RNAの能力が破壊されることになる。酵素的核酸がそのRNA標的に結合し、それを切断した後、酵素的核酸はそのRNAから放出されて、別の標的を探し求めて、新たな標的への結合とその切断を繰り返すことができる。

【0324】

酵素的核酸分子は、例えば、ハンマーヘッド型、ヘアピン、 δ 肝炎ウイルス、グループIイントロン、またはRNアーゼP RNA（RNAガイド配列と関連している）、またはNeurospora VS RNAモチーフとなって形成され得る。ハンマーヘッド型モチーフの具体的な例は、Rossiら Nucleic Acids Res., Sep 11; 20 (17): 4559-65によって記載されている。ヘアピンモチーフの例は、Hampelら（欧州特許出願公開EP第0360257号）、HampelおよびTritz, Biochemistry 1989 Jun 13; 28 (12): 4929-33; Hampelら, Nucleic Acids Res. 1990 Jan 25; 18 (2): 299-304、および米国特許第5,631,359号によって記載されている。 δ 肝炎ウイルスモチーフの例は、PerrottaおよびBeen, Biochemistry. 1992 Dec 1; 31 (47): 11843-52によって記載されており、RNアーゼPモチーフの例は、Guerrier-Takadara, Cell. 1983 Dec; 35 (3 Pt 2): 849-57によって記載されており; Neurospora VS RNAリボザイムモチーフの例は、Collins (SavilleおよびCollins, Cell. 1990 May 18; 61 (4): 685-96; SavilleおよびCollins, Proc Natl Acad Sci USA. 1991 Oct 1; 88 (19): 8826-30; CollinsおよびOlive, Biochemistry. 1993 Mar 23; 32 (11): 2795-9)によって記載されており; グループIイントロンの例は、米国特許第4,987,071号に記載されている。本発明に従って使用される酵素的核酸の重要な特徴は、これらが標的遺伝子DNAまたはRNA領域の1つ以上に相補的な特異的基質結合部位を有していること、およびこれらが、分子に対してRNA切断活性を付与するその基質結合部位の中またはその周囲のヌクレオチド配列を有していることである。したがって、リボザイム構築物が、本明細書に記載される特異的モチーフに限定される必要はない。

【0325】

任意のポリヌクレオチド配列に標的されるリボザイムを産生する方法は当技術分野で公知である。リボザイムを、国際公開第93/23569号および国際公開第94/02595号の各パンフレット（各々、具体的に、参照により本明細書に援用される）に記載されているように設計し、そこに記載されているように合成して、インビトロおよびインビボで試験し得る。

【0326】

リボザイム活性は、リボザイム結合アームの長さを変えることまたは血清リボヌクレアーゼによるそれらの分解を防ぐ修飾を有するリボザイム（例えば、国際公開第92/07

10

20

30

40

50

065号；同第93／15187号；同第91／03162号の各パンフレット；欧州特許出願公開第92110298.4号；米国特許第5,334,711号の各明細書；および国際公開第94／13688号パンフレットを参照されたく、これらには、酵素的RNA分子の糖部分に施すことができるさまざまな化学修飾が記載されている）、細胞内でのそれらの効力を増強する修飾を有するリボザイム、ならびにRNA合成時間を短縮し、化学反応の必要性を減らすためにステムII塩基が除去されたりリボザイムを化学合成することによって最適化することができる。

【0327】

免疫刺激性オリゴヌクレオチド

本発明の脂質粒子と会合する核酸は、免疫刺激性であってもよく、これには、対象（哺乳類の患者であっても、または他の患者であってもよい）に投与されたときに、免疫応答を誘導することができる免疫刺激性オリゴヌクレオチド（ISS；一本鎖または二本鎖）が含まれる。ISSには、例えば、ヘアピン二次構造を生じさせる特定のパ lindロム（Yamamoto Sら（1992）J. Immunol. 148:4072-4076参照）、またはCpGモチーフ、および他の公知のISS特徴（例えば、多重Gドメイン、国際公開第96／11266号パンフレット参照）が含まれる。

【0328】

免疫応答は、先天性免疫応答または適応免疫応答であり得る。免疫系は、より先天性の免疫系と、脊椎動物の後天性の適応免疫系に分けられ、後者は、液性の細胞成分にさらに分けられる。特定の実施形態では、免疫応答は、粘膜によるものであってもよい。

【0329】

特定の実施形態では、免疫刺激性核酸は、脂質粒子と組み合わせて投与された場合にのみ免疫刺激性であり、その「遊離形態」で投与された場合には、免疫刺激性ではない。本発明によれば、このようなオリゴヌクレオチドが免疫刺激性であると考えられる。

【0330】

免疫刺激性核酸は、免疫応答を誘発するために標的ポリヌクレオチドに特異的に結合し、標的ポリヌクレオチドの発現を低下させる必要がない場合には、配列非特異的であると考えられる。したがって、特定の免疫刺激性核酸は、天然に存在する遺伝子またはmRNAの領域に対応する配列を含み得るが、依然として配列非特異的な免疫刺激性核酸と考えられ得る。

【0331】

アンタゴmir

アンタゴmirは、RNAアーゼからの保護および薬理学的特性（例えば、組織および細胞への取込みの増強）のためのさまざまな修飾を有するRNA様オリゴヌクレオチドである。アンタゴmirは、例えば、糖の完全な2'-メチル化、ホスホロチオエート骨格、および例えば、3'-末端のコレステロール部分によって、普通のRNAとは異なる。アンタゴmirは、内在性miRNAを効率的にサイレンシングし、それによってmiRNA誘導性の遺伝子サイレンシングを妨害するために使用し得る。アンタゴmir介在性のmiRNAサイレンシングの例は、Krutzfeldtら、Nature, 2005, 438:685-689（これは、その全体が参照により本明細書に明示的に組み入れられる）に記載されているmiR-122のサイレンシングである。

【0332】

デコイオリゴヌクレオチド

転写因子は、周囲のゲノムDNAがない場合でも、それらの比較的短い結合配列を認識することができるので、特定の転写因子のコンセンサス結合配列を持つ短いオリゴヌクレオチドを、生きた細胞での遺伝子発現を操作するための道具として使用することができる。この戦略では、このような「デコイオリゴヌクレオチド」が細胞内に送達され、その後、標的因子によって認識および結合されることが必要になる。デコイによって転写因子のDNA結合部位が占められると、転写因子が後に標的遺伝子のプロモーター領域に結合することができなくなる。デコイは、転写因子によって活性化される遺伝子の発現を阻害す

10

20

30

40

50

るために、または転写因子の結合によって抑制される遺伝子を上方調節するために、治療剤として使用することができる。デコイオリゴヌクレオチドの利用例は、Mannら、J. Clin. Invest., 2000, 106:1071-1075に見出すことができ、これは、その全体が参照により本明細書に明示的に組み入れられる。

【0333】

核酸修飾

以下の考察の大部分は、一本鎖分子について言及するものである。本発明の多くの実施形態では、二本鎖iRNA剤（例えば、部分的二本鎖iRNA剤）が想定されている。したがって、以下に記載される一本鎖構造からできた二本鎖構造（例えば、2つの別々の分子が接触して二本鎖領域を形成している場合、または分子内対形成によって二本鎖領域が形成されている場合（例えば、ヘアピン構造））は、本発明の範囲内にある。長さについては、本明細書の他の箇所に記載されている。

10

【0334】

核酸はサブユニットのポリマーであるので、以下に記載される修飾の多く（例えば、塩基、またはリン酸部分、またはリン酸部分の非結合Oの修飾）は、核酸内で繰り返される位置で生じる。修飾が核酸中のこれらの位置全てで生じる場合もあるが、多くの場合、そうではない。例として、修飾は、3'末端位置または5'末端位置でのみで生じ得、末端領域で、例えば、末端ヌクレオチド上の位置でまたは鎖の最後の2、3、4、5、もしくは10ヌクレオチドでのみ生じ得る。修飾は、二本鎖領域、一本鎖領域、またはその両方で生じ得る。修飾は、RNAの二本鎖領域でのみ生じ得るか、またはRNAの一本鎖領域でのみ生じ得る。例えば、非結合O位置でのホスホロチオエート修飾は、一方もしくは両方の末端で生じ得るか、末端領域で、例えば、末端ヌクレオチド上の位置でもしくは鎖の最後の2、3、4、5、もしくは10ヌクレオチドでのみ生じ得るか、または二本鎖領域と一本鎖領域において、特に末端で生じ得る。5'末端（単数または複数）をリン酸化することができる。

20

【0335】

一実施形態では、例えば、安定性を高めるために、突出に特定の塩基を含めるか、または一本鎖突出（例えば、5'突出もしくは3'突出、もしくはその両方）に修飾ヌクレオチドもしくはヌクレオチド代用物を含めることが可能である。例えば、突出にプリンヌクレオチドを含めることが望ましいことがある。一実施形態では、3'突出または5'突出中の塩基の全てまたはいくつかを、例えば、本明細書に記載される修飾を用いて、修飾する。修飾には、例えば、リボース糖の2'OH基での修飾の使用、例えば、リボヌクレオチドの代わりとしてのデオキシリボヌクレオチド（例えば、デオキシチミジン）の使用、およびリン酸基での修飾（例えば、ホスホロチオエート修飾）が含まれることができる。突出が標的配列と相同である必要はない。

30

【0336】

未修飾のオリゴリボヌクレオチドは、いくつかの用途では最適とは言えない場合があり、例えば、未修飾のオリゴリボヌクレオチドが、例えば、細胞ヌクレアーゼによる分解を受けやすい可能性がある。ヌクレアーゼは、核酸のホスホジエステル結合を加水分解することができる。しかしながら、上記RNA成分の1つ以上に対する化学修飾は、改善された特性を付与することができ、例えば、ヌクレアーゼに対してオリゴリボヌクレオチドをより安定にすることができる。

40

【0337】

具体的な修飾を以下に詳細に考察する。

【0338】

リン酸基

リン酸基は、負に荷電した種である。電荷は、2つの非結合酸素原子に均等に分布している。しかしながら、リン酸基は、酸素原子の1つを異なる置換基で置換することによって修飾することができる。RNAリン酸骨格に対するこの修飾の1つの結果は、ヌクレアーゼ分解に対するオリゴリボヌクレオチドの耐性の増大であり得る。したがって、理論に

50

束縛されることを望まないが、一実施形態では、非荷電リンカーかまたは非対称の電荷分布を有する荷電リンカーのいずれかを生じさせる改変を導入することが望ましい可能性がある。

【0339】

修飾リン酸基の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルホスホネートまたはアリールホスホネート、およびホスホトリエステルが挙げられる。ホスホロジチオエートは、両方の非結合酸素が硫黄に置換されている。ホスホロジチオエートにおけるリン中心はアキラルであり、アキラルはオリゴリボヌクレオチドのジASTEレオマーの形成を妨害する。ジASTEレオマー形成により、個々のジASTEレオマーがヌクレアーゼに対するさまざまな耐性を示す調製物を生じさせることが可能である。さらに、キラルリン酸基を含有するRNAのハイブリダイゼーション親和性は、対応する未修飾のRNA種と比べてより低い可能性がある。したがって、ホスホジエステル結合の酸素は、S、Se、B、C、H、N、またはOR（Rはアルキルもしくはアリールである）のいずれか1つに置換することができる。

10

【0340】

リン酸リンカーは、結合酸素を、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、および炭素（架橋メチレンホスホネート）で置換することによって修飾することもできる。

20

【0341】

糖基

修飾RNAは、リボ核酸の糖基の全てまたはいくつかの修飾を含むことができる。例えば、2'ヒドロキシル基(OH)は、多数の異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基で修飾または置換することができる。理論によって束縛されるものではないが、ヒドロキシルが、2'アルコキシドイオンを形成するように脱プロトン化されることがもはやできないので、安定性の増強が予測される。2'アルコキシドは、リンカーのリン原子への分子内求核攻撃による分解を触媒することができる。再び、理論によって束縛されることを望まないが、2'位でのアルコキシド形成が可能でない改変を導入することが、ある実施形態に対して望ましい可能性がある。

30

【0342】

「オキシ」-2'ヒドロキシル基修飾の例としては、アルコキシまたはアリールオキシ(OR、例えば、R=H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖)；ポリエチレングリコール(PEG)、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ ；2'ヒドロキシルが、例えば、メチレン架橋によって同じリボース糖の4'炭素に接続されている「ロックされた」核酸(LNA)；O-AMINE(AMINE=NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)およびアミノアルコキシ、 $O(CH_2)_nAMINE$ (例えば、AMINE=NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)が挙げられる。メトキシエチル基(MOE)(PEG誘導体である、 $OCH_2CH_2OCH_3$)のみを含有するオリゴヌクレオチドが堅固なホスホロチオエート修飾で修飾されたものに匹敵するヌクレアーゼ安定性を示すことは注目すべきことである。

40

【0343】

「デオキシ」修飾としては、水素(すなわち、デオキシリボース糖、これは、部分的にdsのRNAの突出部に特に関連する)；ハロ(例えば、フルオロ)；アミノ(例えば、NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸)；NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-AMINE(AMINE=NH₂；アルキルアミ

50

ノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ)、 NH C (O) R (R =アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖)、シアノ;メルカプト;アルキル-チオールアルキル;チオアルコキシ;ならびにアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニル、およびアルキニル(これらは随意的に、例えば、アミノ官能基で置換されていてもよい)が挙げられる。ある実施形態の他の置換基としては、2'-メトキシエチル、2'- OCH_3 、2'- O -アリル、2'- C -アリル、および2'-フルオロが挙げられる。

【0344】

糖基は、リボース中の対応する炭素の立体化学的配置とは反対の立体化学的配置を有する1つ以上の炭素を含有することもできる。したがって、修飾RNAは、例えば、糖としてアラビノースを含有するヌクレオチドを含むことができる。

10

【0345】

修飾RNAは、 $\text{C}-1'$ にヌクレオ塩基を欠く「無塩基」糖を含むこともできる。これらの無塩基糖は、1つ以上の構成成分の糖原子におけるさらなる修飾を含有することもできる。

【0346】

ヌクレアーゼ耐性を最大化するために、2'修飾を、1つ以上のリン酸リンカー修飾(例えば、ホスホロチオエート)と組み合わせて使用することができる。いわゆる「キメラ」オリゴヌクレオチドは、2つ以上の異なる修飾を含有するオリゴヌクレオチドである。

20

【0347】

リン酸基の置換

リン酸基は、リン以外のものを含有する接続部に置換することができる。理論によって束縛されることを望まないが、荷電したホスホジエステル基はヌクレアーゼ分解における反応中心なので、これを中性の構造模倣物で置換することは、ヌクレアーゼ安定性の増強を付与するはずであると考えられている。再び、理論によって束縛されることを望まないが、ある態様では、荷電したリン酸基が中性部分に置換される改変を導入することが望ましい可能性がある。

リン酸基を置換することができる部分の例としては、シロキサン、カルボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、およびメチレンオキシメチルイミノが挙げられる。ある実施形態では、置換には、メチレンカルボニルアミノ基およびメチレンメチルイミノ基が含まれてもよい。

30

【0348】

リン酸骨格の置換

リン酸リンカーおよびリボース糖が、ヌクレアーゼ耐性のヌクレオシドまたはヌクレオチドの代用物に置換されているオリゴヌクレオチド模倣スキャフォールドを構築することもできる。理論によって束縛されることを望まないが、繰り返し荷電した骨格が存在しなければ、ポリアニオンを認識するタンパク質(例えば、ヌクレアーゼ)への結合が減少すると考えられている。再び、理論によって束縛されることを望まないが、ある態様では、塩基が中性の代用骨格によって連結される改変を導入することが望ましい可能性がある。

40

【0349】

例としては、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、およびペプチド核酸(PNA)というヌクレオシド代用物が挙げられる。ある実施形態では、PNA代用物を使用してもよい。

【0350】

末端修飾

オリゴヌクレオチドの3'末端および5'末端を修飾することができる。このような修飾は、分子の3'末端、5'末端、または両方の末端においてなされ得る。これらの修飾

50

は、末端のリン酸全体または末端リン酸基の1つ以上の原子の修飾または置換を含むことができる。例えば、オリゴヌクレオチドの3'末端および5'末端を、他の機能的分子実体、例えば、標識部分、例えば、フルオロフォア（例えば、ピレン、TAMRA、フルオレセイン、Cy3色素もしくはCy5色素）または保護基（例えば、硫黄、ケイ素、ホウ素、もしくはエステルをベースにしたもの）にコンジュゲートすることができる。機能的分子実体は、リン酸基および／またはスパーサーを介して糖に付着させることが可能である。スパーサーの末端原子は、リン酸基の結合原子または糖のC-3'もしくはC-5'のO基、N基、S基、もしくはC基に接続するかまたはこれらに置き換わることができる。あるいは、スパーサーは、ヌクレオチド代用物（例えば、PNA）の末端原子に接続するかまたはこれに置き換わることができる。これらのスパーサーまたはリンカーとしては、例えば、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_nN-$ 、 $-(CH_2)_nO-$ 、 $-(CH_2)_nS-$ 、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$ （例えば、 $n=3$ または6）、無塩基糖、アミド、カルボキシ、アミン、オキシアミン、オキシイミン、チオエーテル、ジスルフィド、チオ尿素、スルホンアミド、もしくはモルホリノ、またはビオチン試薬およびフルオレセイン試薬を挙げることができる。「スパーサー／リン酸－機能的分子実体－スパーサーリン酸」という配列が、iRNA剤の2つの鎖の間に介在するとき、この配列は、ヘアピン型RNA剤中のヘアピンRNAループの代わりになることが可能である。3'末端は-OH基とすることができる。理論に束縛されることを望まないが、特定の部分のコンジュゲーションは、輸送特性、ハイブリダイゼーション特性、および特異性特性を改善することができると考えられている。再び、理論に束縛されることを望まないが、ヌクレアーゼ耐性を改善する末端の改変を導入することが望ましい可能性がある。末端修飾の他の例としては、色素、インターカレート剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、プソラレン、マイトマイシンC）、ポルフィリン（TPPC4、テキサフィリン、サッフイリン）、多環芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ（例えば、EDTA）、親油性担体（例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-（オレオイル）リトコール酸、O3-（オレオイル）コレン酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン）、およびペプチドコンジュゲート（例えば、アンテナペディアペプチド、Tatペプチド）、アルキル化剤、ホスフェート、アミノ、メルカプト、PEG（例えば、PEG-40K）、MPEG、 $[MPEG]_2$ 、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射性標識マーカー、酵素、ハプテン（例えば、ビオチン）、輸送／吸収促進物質（例えば、アスピリン、ビタミンE、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾールコンジュゲート、テトラアザマクロ環のEu3+錯体）が挙げられる。

【0351】

末端修飾は、本明細書の他の箇所で考察されるような理由を含む多くの理由のために、活性を調節するために、または分解に対する耐性を調節するために加えることができる。活性を調節するために有用な末端修飾には、リン酸またはリン酸類似体による5'末端の修飾が含まれる。例えば、ある実施形態では、iRNA剤、とりわけアンチセンス鎖は、5'リン酸化されているか、または5'プライム末端にホスホリル類似体を含む。5'リン酸修飾には、RISCを介した遺伝子サイレンシングと適合可能なものが含まれる。好適な修飾には、5'モノホスフェート（ $(HO)_2(O)P-O-5'$ ）；5'ジホスフェート（ $(HO)_2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$ ）；5'トリホスフェート（ $(HO)_2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$ ）；5'-グアノシンキャップ（7-メチル化または非メチル化）（ $7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$ ）；5'-アデノシンキャップ（Appp）、および任意の修飾または非修飾ヌクレオチドキャップ構

造 (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5') ; 5'モノチオホスフェート (ホスホロチオエート ; (HO)₂(S)P-O-5') ; 5'モノジチオホスフェート (ホスホロジチオエート ; (HO)(HS)(S)P-O-5')、5'-ホスホロチオレート ((HO)₂(O)P-S-5') ; 酸素／硫黄置換モノホスフェート、ジホスフェート、およびトリホスフェートの任意のさらなる組合せ (例えば、5'-α-チオトリホスフェート、5'-γ-チオトリホスフェートなど)、5'-ホスホロアミデート ((HO)₂(O)P-NH-5'、(HO)(NH₂)(O)P-O-5')、5'-アルキルホスホネート (R=アルキル=メチル、エチル、イソプロピル、プロピルなど、例えば、RP(OH)(O)-O-5'、(OH)₂(O)P-5'-CH₂)、5'-アルキルエーテルホスホネート (R=アルキルエーテル=メトキシメチル (MeOCH₂-)、エトキシメチルなど、例えば、RP(OH)(O)-O-5') が含まれる。

10

【0352】

末端修飾は、分布をモニターするためにも有用であり得るが、このような場合、付加される基には、フルオロフォア (例えば、フルオレセイン) または A l e x a 色素 (例えば、A l e x a 488) が含まれ得る。末端修飾は、取込みを増強するためにも有用であり得るが、このために有用な修飾にはコレステロールが含まれる。末端修飾は、RNA 剤を別の部分に架橋するためにも有用であり得るが、このための有用な修飾にはマイトマイシン C が含まれる。

20

【0353】

塩基

アデニン、グアニン、シトシン、およびウラシルは RNA に見られる最も一般的な塩基である。これらの塩基は、改善された特性を有する RNA を提供するために修飾または置換することができる。例えば、ヌクレアーゼ耐性オリゴヌクレオチドは、これらの塩基を用いて、または合成もしくは天然のヌクレオ塩基 (例えば、イノシン、チミン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌブラリン (nubularine)、イソグアニシン (isoguanisine)、またはツベルシジン) および上記の修飾のいずれか 1 つを用いて調製することができる。あるいは、上記の塩基および「汎用的な塩基」のいずれかの置換類似体または修飾類似体を利用することができる。例としては、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの 6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの 2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、5-ハロウラシルおよび 5-ハロシトシン、5-プロピニルウラシルおよび 5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、および 6-アゾチミン、5-ウラシル (シュードウラシル)、4-チオウラシル、5-ハロウラシル、5-(2-アミノプロピル)ウラシル、5-アミノアリルウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル、および他の 8-置換アデニンならびに 8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル、および他の 8-置換グアニン、5-トリフルオロメチルおよび他の 5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニン、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、および N-2 置換プリン、N-6 置換プリン、および O-6 置換プリン (2-アミノプロピルアデニンを含む)、5-プロピニルウラシルおよび 5-プロピニルシトシン、ジヒドロウラシル、3-デアザ-5-アザシトシン、2-アミノプリン、5-アルキルウラシル、7-アルキルグアニン、5-アルキルシトシン、7-デアザアデニン、N6、N6-ジメチルアデニン、2, 6-ジアミノプリン、5-アミノ-アリル-ウラシル、N3-メチルウラシル、置換 1, 2, 4-トリアゾール、2-ピリジノン、5-ニトロインドール、3-ニトロピロール、5-メトキシウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸、5-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウラシル、5-メチルアミノメチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウラシル、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N⁴-アセチルシトシン、2-チオシトシン、N6-メチルアデニン、N6-イソペンチルアデニン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、N-メチルグア

30

40

50

ニン、またはO-アルキル化塩基が挙げられる。さらなるプリンおよびピリミジンとしては、米国特許第3,687,808号に開示されているもの、「Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering」, 858-859頁, Kroschwitz J. I. 編, John Wiley & Sons, 1990に開示されているもの、およびEnglischら, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613によって開示されているものが挙げられる。

【0354】

一般に、塩基の変化は、安定性を促進するためには使用されないが、他の理由のために有用である可能性があり、例えば、いくつかのもの（例えば、2,6-ジアミノプリンおよび2アミノプリン）は蛍光性である。修飾塩基は、標的特異性を低下させることがあり得る。このことは、iRNA剤の設計において考慮されてもよい。

10

【0355】

参考文献

本明細書で列挙した刊行物、特許、および公開特許出願は全て、参照により本明細書に組み入れられる。

【0356】

一般的な参考文献

本発明に従って使用されるオリゴリボヌクレオチドおよびオリゴリボヌクレオシドは、固相合成によるものであってもよく、例えば、「Oligonucleotides synthesis, a practical approach」, M. J. Gait 編, IRL Press, 1984; 「Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach」エフ エックスタイン (F. Eckstein) 編, IRL Press, 1991 (とりわけ、第1章「Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis」、第2章「Oligoribonucleotide synthesis」、第3章「2'-O-Methyloligonucleotide-s: synthesis and applications」、第4章「Phosphorothioate oligonucleotides」、第5章「Synthesis of oligonucleotide phosphorodithioates」、第6章「Synthesis of oligo-2'-deoxyribonucleoside methylphosphonates」、および第7章「Oligodeoxynucleotides containing modified bases」) を参照されたい。他の特に有用な合成手順、試薬、ブロッキング基、および反応条件は、Martin, P., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Beaucage, S. L. および Iyer, R. P., Tetrahedron, 1992, 48, 2223-2311、ならびに Beaucage, S. L. および Iyer, R. P., Tetrahedron, 1993, 49, 6123-6194、またはこれらの文献中で参照されている参考文献に記載されている。国際公開第00/44895号、国際公開第01/75164号、または国際公開第02/44321号の各パンフレットに記載の修飾を本明細書で使用する
ことができる。

20

30

40

【0357】

リン酸基の参考文献

ホスフィン酸オリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,508,270号明細書に記載されている。アルキルホスホン酸オリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第4,469,863号明細書に記載されている。ホスホルアミダイトオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,256,775号明細書または米国特許第5,366,878号明細書に記載されている。ホスホトリエステルオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,023,243号明細書に記載されている。ボラノリン酸オリゴリボヌク

50

レオチドの調製は、米国特許第5, 130, 302号明細書および米国特許第5, 177, 198号に記載されている。3'-デオキシ-3'-アミノホスホリアミデートリボオリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5, 476, 925号に記載されている。3'-デオキシ-3'-メチレンホスホン酸オリゴリボヌクレオチドは、An, H, J. Org. Chem. 2001, 66, 2789-2801に記載されている。硫黄架橋ヌクレオチドの調製は、Sproatら, Nucleosides Nucleotides 1988, 7, 651、およびCrosstickら, Tetrahedron Lett. 1989, 30, 4693に記載されている。

【0358】

糖基の参考文献

2'修飾に対する修飾は、Verma, S. ら, Annu. Rev. Biochem. 1998, 67, 99~134および同文献中の全ての参考文献に見出すことができる。リボースに対する特異的修飾は、以下の参考文献に見出すことができる：2'-フルオロ（Kawasakiら, J. Med. Chem., 1993, 36, 831~841, 2'-MOE（Martin, P. Helv. Chim. Acta 1996, 79, 1930~1938）、「LNA」（Wengel, J. Acc. Chem. Res. 1999, 32, 301~310）。

【0359】

リン酸基の置換に関する参考文献

メチレンメチルイミノ結合オリゴリボヌクレオシド（本明細書では、MMI結合オリゴリボヌクレオシドとしても識別される）、メチレンジメチルヒドラゾ結合オリゴリボヌクレオシド（本明細書では、MDH結合オリゴリボヌクレオシドとしても識別される）、およびメチレンカルボニルアミノ結合オリゴヌクレオシド（本明細書では、アミド-3結合オリゴリボヌクレオシドとしても識別される）、およびメチレンアミノカルボニル結合オリゴヌクレオシド（本明細書では、アミド-4結合オリゴリボヌクレオシドとしても識別される）、ならびに例えば、MMIとPO結合またはPS結合を交互に有する混合骨格化合物は、米国特許第5, 378, 825号、同第5, 386, 023号、同第5, 489, 677号の各明細書、ならびに公開された国際出願第PCT/US92/04294号および第PCT/US92/04305号（それぞれ、国際公開第92/20822号および国際公開第92/20823号として公開されている）の各パンフレットに記載されているように調製することができる。ホルムアセタールおよびチオホルムアセタール結合オリゴリボヌクレオシドは、米国特許第5, 264, 562号明細書および同第5, 264, 564号明細書に記載されているように調製することができる。エチレンオキシド結合オリゴリボヌクレオシドは、米国特許第5, 223, 618号明細書に記載されているように調製することができる。シロキサン置換は、Cormier, J. F. ら, Nucleic Acids Res. 1988, 16, 4583に記載されている。カルボネート置換は、Tittensor, J. R., J. Chem. Soc. C1971, 1933に記載されている。カルボキシメチル置換は、Edge, M. D., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 1972, 1991に記載されている。カルバメート置換は、Stirchak, E. P., Nucleic Acids Res. 1989, 17, 6129に記載されている。

【0360】

リン酸-リボース骨格の置換に関する参考文献

シクロブチル糖代用物の化合物は、米国特許第5, 359, 044号明細書に記載されているように調製することができる。ピロリジン糖代用物は、米国特許第5, 519, 134号明細書に記載されているように調製することができる。モルホリノ糖代用物は、米国特許第5, 142, 047号および同第5, 235, 033号の各明細書、ならびに他の関連する特許の開示に記載されているように調製することができる。ペプチド核酸（PNA）はそれ自体公知であり、「Peptide Nucleic Acids（PNA）：Synthesis, Properties and Potential App

10

20

30

40

50

lications」, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23で参照されているさまざまな手順のいずれかに従って調製することができる。これらは、米国特許第5, 539, 083号明細書に従って調製してもよい。

【0361】

末端修飾の参考文献

末端修飾は、Manoharan, Mら, Antisense and Nucleic Acid Drug Development 12, 103-128 (2002) および同文献中の参考文献に記載されている。

【0362】

塩基の参考文献

N-2置換プリンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5, 459, 255号明細書に記載されているように調製することができる。3-デアザプリンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5, 457, 191号明細書に記載されているように調製することができる。5, 6-置換ピリミジンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5, 614, 617号明細書に記載されているように調製することができる。5-プロピニルピリミジンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5, 484, 908号明細書に記載されているように調製することができる。さらなる参考文献は、塩基修飾についての上記の節に開示することができる。

【0363】

本発明による脂質-核酸粒子で使用される核酸には、公知の任意の形態の核酸が含まれる。したがって、核酸は、ヌクレアーゼ耐性および血清安定性を増強するために過去に使用されているタイプの修飾核酸であってもよい。しかしながら、驚くべきことに、天然核酸ポリマーのホスホジエステル結合が修飾されていない核酸から脂質-核酸粒子を製剤化する本発明の方法を用いて、許容可能な治療製品を調製することもでき、未修飾のホスホジエステル核酸（すなわち、全ての結合がホスホジエステル結合である核酸）の使用は、本発明の好ましい実施形態である。

【0364】

キメラオリゴヌクレオチド

所与の化合物の全ての位置が均一に修飾される必要はなく、それどころか、2つ以上の前記の修飾が、単一の化合物に、またはオリゴヌクレオチド中の単一のヌクレオシドにさえ組み込まれていてもよい。本発明の特定の好ましいオリゴヌクレオチドはキメラオリゴヌクレオチドである。本発明の文脈における「キメラオリゴヌクレオチド」または「キメラ」とは、各々少なくとも1ヌクレオチドから構成された、2つ以上の化学的に異なる領域を含有するオリゴヌクレオチドのことである。これらのオリゴヌクレオチドは、典型的には、1つ以上の有益な特性（例えば、増大したヌクレアーゼ耐性、増大した細胞への取込み、RNA標的に対する増大した結合親和性など）を付与する少なくとも1つの修飾ヌクレオチドの領域とRNA-アーゼH切断の基質となる領域とを含有する。

【0365】

一実施形態では、キメラオリゴヌクレオチドは、標的結合親和性を増大させるように修飾された少なくとも1つの領域を含む。標的に対するオリゴヌクレオチドの親和性は、オリゴヌクレオチド/標的対のT_mを測定することによってごく普通に決定される。T_mとは、オリゴヌクレオチドと標的が解離する温度のことであり、解離は分光光度法によって検出される。T_mが高ければ高いほど、標的に対するオリゴヌクレオチドの親和性は大きい。一実施形態では、標的mRNAへの結合親和性を増大させるように修飾されたオリゴヌクレオチドの領域は、糖の2'位で修飾された少なくとも1つのヌクレオチド、最も好ましくは2'-O-アルキル修飾ヌクレオチド、2'-O-アルキル-2'-O-アルキル修飾ヌクレオチド、または2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを含む。このような修飾は、オリゴヌクレオチドにごく普通に組み込まれており、これらのオリゴヌクレオチドは、所与の標的に対して2'-デオキシオリゴヌクレオチドよりもT_mが高い（すなわち、標的結合親

10

20

30

40

50

和性が高い)ことが示されている。このような増大した親和性の効果は、オリゴヌクレオチドによる標的遺伝子発現の阻害を大いに増強することである。

【0366】

別の実施形態では、キメラオリゴヌクレオチドは、RNアーゼHの基質として働く領域を含む。当然、オリゴヌクレオチドは、本明細書で記載されているさまざまな修飾の任意の組合せを含み得ることが理解される。

【0367】

本発明のオリゴヌクレオチドの別の修飾は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞への取込みを増強する1つ以上の部分またはコンジュゲートをオリゴヌクレオチドに化学的に結合することを伴う。このようなコンジュゲートおよびそれを調製する方法は当技術分野で公知である。

10

【0368】

当業者は、治療的効力などのインビボでの効用について、妥当な経験則では、チオエート型の配列が遊離形態で作用するならば、同じ配列の、任意の化学的性質の封入された粒子にも効果があることを理解するであろう。封入された粒子はまた、より広範なインビボ効用を有し、別の方法ではアンチセンス治療に応答することが知られていない条件およびモデルにおいて効力を示す可能性がある。当業者は、本発明を適用すれば、今度はアンチセンス治療に応答する古いモデルを発見し得ることが分かっている。さらに、当業者は、本発明を利用することによって、廃棄されたアンチセンス配列または化学反応を再検討し、効果を発見する可能性がある。

20

【0369】

本発明に従って使用されるオリゴヌクレオチドは、周知の固相合成の技術によって好都合にかつごく普通に作成し得る。このような合成のために機器は、Applied Biosystemsをはじめとするいくつかのベンダーによって販売されている。このような合成のための任意の他の手段も利用してよく、オリゴヌクレオチドの実際の合成は、ルーチンワークをする人の能力の範囲内に十分にある。ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体などの他のオリゴヌクレオチドを調製するために同様の技術を使用することも周知である。

【0370】

核酸-脂質粒子の特徴

ある実施形態では、本発明は、核酸が脂質層の中に封入されている脂質封入核酸粒子を産生するための方法および組成物に関する。siRNAオリゴヌクレオチドを取り込んでいる、このような核酸-脂質粒子は、(1)薬物対脂質比；(2)封入効率；および(3)粒子サイズを含む種々の生物物理学的パラメータを用いて特徴付けられる。高い薬物対脂質比、高い封入効率、良好なヌクレアーゼ耐性および血清安定性、ならびに制御可能な粒子サイズ(通常、直径200nm未満)が望ましい。さらに、核酸ポリマーの性質が重要であるが、それは、ヌクレアーゼ耐性を付与する目的で核酸を修飾すると、治療薬の費用が上乗せされるものの、限られた耐性しかもたらさない場合が多いからである。別途明記しない限り、これらの基準は、本明細書では以下のように算出される。

30

【0371】

核酸対脂質比は、規定容量の調製物中の核酸の量を、同じ容量中の脂質の量で割ったものである。これは、モル対モルとしてであっても、または重量対重量としてであっても、または重量対モルとしてであってもよい。最終的な投与可能製剤については、透析、クロマトグラフィー、および/または酵素(例えば、ヌクレアーゼ)消化を利用して、できるだけ多くの外部核酸を除去した後に、核酸：脂質比を算出する。

40

【0372】

封入効率とは、出発混合物の薬物対脂質比を、最終的な投与可能製剤の薬物対脂質比で割ったものを指す。これは、相対効率の尺度である。絶対効率の尺度については、投与可能製剤となる出発混合物に添加される核酸の総量を算出することもできる。また、製剤化プロセスで失われる脂質の量を算出してもよい。効率は、製剤化の損失高と経費の尺度で

50

ある。

【0373】

サイズは、生成される粒子のサイズ（直径）を意味する。サイズ分布は、N i c o m p M o d e l 370サブミクロン粒子サイズ測定器で準弾性光散乱（Q E L S）を用いて決定し得る。新生物および炎症部位などの、血管新生した（漏れやすい）組織への分布のために、200nm未満の粒子が好ましい。

【0374】

薬学的組成物

本発明の脂質粒子は、特に治療剤と会合している場合に、薬学的組成物として製剤化されてもよく、例えば、これは、投与の経路および標準的な薬学的慣行に従って選択される、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、または担体（例えば、生理的食塩水もしくはリン酸緩衝液）をさらに含む。

【0375】

特定の実施形態では、本発明の脂質-核酸粒子を含む薬学的組成物は、標準的な技術に従って調製され、これは、薬学的に許容される担体をさらに含む。一般に、生理食塩水が薬学的に許容される担体として利用される。他の好適な担体としては、例えば、安定性を増強するために糖タンパク質（例えば、アルブミン、リボタンパク質、グロブリンなど）を含む、水、緩衝水、0.9%食塩水、0.3%グリシンなどが挙げられる。食塩水または他の塩含有担体を含む組成物において、担体が、以下の脂質粒子製剤に添加されることが好ましい。したがって、脂質-核酸組成物を生成した後、これらの組成物を薬学的に許容される担体（例えば、生理食塩水）中に希釈することができる。

【0376】

得られた薬学的調製物を従来の周知の滅菌技術によって滅菌してもよい。その後、水性溶液を、無菌条件下で、使用のために包装するかまたは濾過し、凍結乾燥させ、凍結乾燥させた調製物を、投与の前に滅菌水性溶液と組み合わせる。組成物は、生理的条件に近づけるために必要とされる薬学的に許容される補助物質、例えば、pH調節剤およびpH緩衝剤、張性調節剤など（例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムなど）を含有してもよい。さらに、脂質懸濁液は、保存時のフリーラジカルおよび脂質過酸化による傷害に対して脂質を保護する脂質保護剤を含んでもよい。親油性のフリーラジカルクエンチャー（例えば、 α -トコフェロール）および水溶性の鉄特異的キレート剤（例えば、フェリオキサミン）が好適である。

【0377】

薬学的製剤中の脂質粒子または脂質-核酸粒子の濃度は、さまざまに（すなわち、約0.01重量%未満、通常は、約0.05~5重量%または少なくとも約0.05~5重量%から10~30重量%までにも）異なる可能性があり、主に、選択される特定の投与様式に従う液量、粘性などによって選択される。例えば、治療に伴う流体負荷を下げるために、この濃度を増大させてもよい。これは、アテローム性動脈硬化症に関連する鬱血性心不全または重症高血圧を有する患者で特に望ましい可能性がある。あるいは、投与部位での炎症を緩和するために、刺激性の脂質から構成された複合体を希釈して、濃度を下げてもよい。一群の実施形態では、核酸は、標識が付着しており、（相補的核酸の存在を示すことによって）診断に使用される。この例では、投与される複合体の量は、使用される特定の標識、診断されている疾患状態、および臨床医の判断によって決定されるが、一般に、約0.01~約50mg/kg体重、好ましくは約0.1~約5mg/kg体重である。

【0378】

上記のように、本発明の脂質-治療剤（例えば、核酸）粒子は、ポリエチレングリコール（PEG）-修飾リン脂質、PEG-セラミド、もしくはガングリオシド G_{M1} -修飾脂質、または凝集を防ぐかまたは制限するのに有効な他の脂質を含んでもよい。このような成分の添加は、単に複合体凝集を防ぐだけではない。それどころか、これは、循環寿命を増大させ、標的組織への脂質-核酸組成物の送達を増大させる手段も提供する可能性が

ある。

【0379】

本発明は、キット形態の脂質—治療剤組成物も提供する。キットは、典型的には、キットのさまざまな要素を入れるために区画化された容器から構成されている。キットは、好ましくは脱水または濃縮された形態の、本発明の粒子または薬学的組成物を、それらを再水和または希釈および投与するための指示書とともに含有する。ある実施形態では、粒子は活性剤を含むが、他の実施形態では、含まない。

【0380】

製造方法

本発明の方法および組成物は、特定の標的化脂質、付随する実施例に記載されるその合成、調製、および特性解析を利用する。さらに、本発明は、治療剤（例えば、核酸）と会合した脂質粒子を含む、脂質粒子を調製する方法を提供する。本明細書に記載される方法では、脂質の混合物を核酸の緩衝水性溶液と組み合わせて、脂質粒子中に封入された核酸を含有する中間混合物を生成させるが、脂質粒子中では、この封入された核酸が、約1重量%～約30重量%、好ましくは3～25重量%、一層より好ましくは5～15重量%の核酸／脂質比で存在する。随意的に、脂質部分が、好ましくは直径20～200nm、より好ましくは30～150nm、一層より好ましくは約40～90nmの単層小胞となる脂質封入核酸粒子が得られる大きさに中間混合物を作り得る。その後、pHを上昇させて、脂質—核酸粒子上の表面電荷の少なくとも一部を中和し、それによって、少なくとも部分的に表面が中和された脂質封入核酸組成物を提供する。

【0381】

上記のように、カチオン性脂質のうちのいくつかは、アミノ基の pK_a よりも低いpHで荷電し、アミノ基の pK_a よりも高いpHにおいては実質的に中性であるアミノ脂質である。これらのカチオン性脂質は、滴定可能なカチオン性脂質と呼ばれ、2段階のプロセスを用いる本発明の製剤化で使うことができる。まず、脂質小胞を、核酸の存在下で滴定可能なカチオン性脂質と他の小胞成分を用いてより低いpHで形成させることができる。このようにして、小胞は、核酸を封入し、閉じ込める。次に、媒質のpHを、存在する滴定可能なカチオン性脂質の pK_a よりも高いレベルにまで、すなわち、生理的pH以上にまで増大させることによって、新たに形成された小胞の表面電荷を中和することができる。このプロセスの特に有利な態様は、表面吸着した全ての核酸と結果として得られる中性の表面を有する核酸送達小胞の両方を容易に除去することを含む。中性の表面を有するリポソームまたは脂質粒は、循環からの速やかな排除を回避し、かつカチオン性リポソームの調製物と関連する特定の毒性を回避すると考えられる。核酸—脂質粒子の製剤化におけるこのような滴定可能なカチオン性脂質のこれらの使用に関するさらなる詳細は、米国特許第6,287,591号および米国特許第6,858,225号の各明細書に提供されており、これらは参照により本明細書に組み入れられる。

【0382】

このように形成される小胞は、核酸の含有量が高い、均一な小胞サイズの製剤を提供することにさらに留意されたい。さらに、小胞のサイズの範囲は、約20～約200nm、好ましくは30～約150nm、より好ましくは約30～約90nmである。

【0383】

任意の特定の理論に束縛されることを意図するものではないが、核酸封入の非常に高い効率性は、低いpHでの静電相互作用の結果であると考えられている。酸性pH（例えば、pH4.0）では、小胞表面は荷電し、静電相互作用を通じて核酸の一部と結合する。外部の酸性緩衝液をより中性の緩衝液（例えば、pH7.5）と交換すると、脂質粒子またはリポソームの表面は中和され、任意の外部の核酸を除去することができる。製剤化プロセスに関するより詳細な情報は、さまざまな刊行物（例えば、米国特許第6,287,591号および米国特許第6,858,225号の各明細書）に提供されている。

【0384】

上記のことを考慮して、本発明は、脂質／核酸製剤を調製する方法を提供する。本明細

書に記載される方法では、脂質の混合物を核酸の緩衝水性溶液と組み合わせて、脂質粒子に封入された核酸を含有する中間混合物を生成させるが、この脂質粒子中では、例えば、この封入された核酸が、約10重量%～約20重量%の核酸／脂質比で存在する。随意的に、脂質部分が、好ましくは直径30～150nm、より好ましくは約40～90nmの単層小胞となる脂質封入核酸粒子を得る大きさに中間混合物を作り得る。その後、pHを上昇させて、脂質－核酸粒子上の表面電荷の少なくとも一部を中和し、それによって、少なくとも部分的に表面が中和された脂質封入核酸組成物を提供する。

【0385】

本発明の核酸－脂質粒子の調製において、脂質の混合物は、典型的には、脂質の有機溶媒溶液である。その後、この脂質の混合物を、乾燥させて薄膜を形成させるか、または凍結乾燥して粉末を形成させた後に、水性緩衝液で水和してリボソームを形成させることができる。あるいは、好ましい方法において、脂質混合物を、エタノールなどの水混和性のアルコール中で溶解させ、このエタノール溶液を水性緩衝液に添加して、自発的にリボソームを形成させることができる。大部分の実施形態では、アルコールは、市販の形態で使用される。例えば、エタノールは、完全エタノール（100%）として、または95%エタノール（その残りは水）として使用することができる。この方法は、米国特許第5,976,567号明細書により詳細に記載されている。

【0386】

例示的な一実施形態では、脂質の混合物は、アルコール溶媒中の、標的化脂質、カチオン性脂質、中性脂質（カチオン性脂質以外）、ステロール（例えば、コレステロール）、およびPEG修飾脂質（例えば、PEG-DMG、PEG-C-DOMG、またはPEG-DMA）の混合物である。好ましい実施形態では、脂質の混合物は、アルコール、より好ましくはエタノール中の、標的化脂質、カチオン性アミノ脂質、中性脂質、コレステロール、およびPEG修飾脂質から本質的になる。さらに好ましい実施形態では、第1の溶液は、標的化脂質約0.5～50%：カチオン性脂質20～70%：中性脂質5～45%：コレステロール20～55%：PEG修飾脂質0.5～15%というモル比の上記の脂質混合物からなる。

【0387】

本発明に従って、脂質混合物を、核酸を含有し得る緩衝水性溶液と組み合わせる。緩衝水性溶液は、典型的には、緩衝剤のpHが脂質混合物中のプロトン化可能な脂質の pK_a よりも低い溶液である。好適な緩衝剤の例としては、クエン酸塩、リン酸塩、酢酸塩、およびMESが挙げられる。特に好ましい緩衝剤は、クエン酸緩衝剤である。好ましい緩衝剤は、封入されている核酸の化学的性質によって、アニオンの範囲が1～1000mMであり、高い充填レベルを達成するために、緩衝剤濃度の最適化が重要である場合がある（例えば、米国特許第6,287,591号および米国特許第6,858,225号の各明細書参照）。あるいは、塩化物、硫酸塩などでpH5～6まで酸性化した純水が有用である場合がある。この場合、5%グルコース、または粒子を透析してエタノールを除去し、pHを上昇させたときに、もしくは薬学的に許容される担体（例えば、生理食塩水）と混合したときに、粒子膜を隔てた浸透ポテンシャルの平衡を保つ別の非イオン性溶質を添加することが好適である可能性がある。緩衝液中の核酸の量は、さまざまに異なり得るが、典型的には、約0.01mg/mL～約200mg/mL、より好ましくは約0.5mg/mL～約50mg/mLである。

【0388】

脂質の混合物と治療的核酸の緩衝水性溶液を組み合わせ、中間混合物を提供する。中間混合物は、典型的には、封入された核酸を有する脂質粒子の混合物である。さらに、中間混合物は、負に荷電した核酸と、脂質粒子上の正に荷電した脂質（アミノ脂質またはプロトン化可能な第1の脂質成分を構成する他の脂質は、脂質上のプロトン化可能な基の pK_a よりも低いpHの緩衝液中で正に荷電する）のイオン引力が原因で脂質粒子（リボソームまたは脂質小胞）の表面に付着する核酸の一部も含有し得る。一群の好ましい実施形態では、脂質の混合物は、脂質のアルコール溶液であり、各々の溶液の容量は、組み合わ

10

20

30

40

50

せたときに、結果として得られるアルコール含有量が、約20容量%～約45容量%となるように調整される。混合物を組み合わせる方法は、多くの場合、生産される製剤の規模によって、任意の種々のプロセスを含むことができる。例えば、総容量が約10～20mL以下であるとき、溶液は、試験管の中で組み合わせ、ボウルテックスミキサーを用いて攪拌一体化することができる。大規模なプロセスは、好適な生産規模のガラス製品の中で実行することができる。

【0389】

随意的に、脂質混合物と治療剤（核酸）の緩衝水性溶液とを組み合わせることによって産生される脂質封入治療剤（例えば、核酸）の複合体を、所望のサイズ範囲および比較的狭い脂質粒子サイズの分布を達成する大きさに作ることができる。好ましくは、本明細書で提供される組成物を、約70～約200nmの、より好ましくは約90～約130nmの平均直径に合わせて作る。リボソームを所望のサイズに合わせて作るために、いくつかの技術が利用可能である。1つのサイジング法は、米国特許第4,737,323号に記載されており、これは参照により本明細書に組み入れられる。浴式またはプローブ式のいずれかの超音波処理によるリボソーム懸濁液の超音波処理は、サイズが約0.05ミクロン未満の小さい単層小胞（SUV）にまで、次第にサイズを小さくする。ホモジナイゼーションは、剪断エネルギーに頼って大きいリボソームをより小さいリボソームに断片化する別の方法である。典型的なホモジナイゼーション手順では、選択されたリボソームサイズ（典型的には、約0.1～0.5ミクロン）が観察されるまで、標準的なエマルジョンホモジナイザーを通して多層小胞を繰り返し循環させる。両方の方法において、粒子サイズ分布は、従来のレーザービームによる粒子サイズ決定によってモニターすることができる。本明細書中のある方法については、押し出し成形を用いて、均一な小胞サイズを得る。

10

20

【0390】

小孔性ポリカーボネート膜または非対称性セラミック膜を通してリボソーム組成物を押し出すことにより、比較的良く画定されたサイズ分布が得られる。典型的には、所望のリボソーム複合体サイズ分布が得られるまで、一回または複数回、膜を通して懸濁液を循環させる。リボソームを、孔が連続的に小さくなる膜を通して押し出して、リボソームのサイズが徐々に小さくなるのを達成してもよい。いくつかの例において、形成される脂質－核酸組成物は、サイジングを行なうことなく使用することができる。

30

【0391】

特定の実施形態では、本発明の方法は、脂質－核酸組成物の脂質部分上の表面電荷の少なくともいくらかを中和する工程をさらに含む。表面電荷を少なくとも部分的に中和することによって、封入されていない核酸を脂質粒子表面から剥がし、従来技術を用いて組成物から除去することができる。封入されていない、表面吸着した核酸を、緩衝液の交換によって、得られる組成物から除去することが好ましい。例えば、クエン酸緩衝液（pH約4.0、組成物を生成するのに使用される）をHEPES緩衝食塩水（HBS、pH約7.5）と置換することによって、リボソーム表面の中和と表面からの核酸の放出がもたらされる。その後、放出された核酸を、標準的な方法を用いてクロマトグラフィーで除去し、その後、使用される脂質のpKaよりも高いpHの緩衝液に切り換えることができる。

40

【0392】

随意的に、脂質小胞（すなわち、脂質粒子）を、水性緩衝液中での水和によって形成させ、核酸を添加する前に、上記の方法のいずれかを用いてサイジングすることができる。上記のように、水性緩衝液は、アミノ脂質のpKaよりも低いpHであるべきである。その後、核酸の溶液を、これらのサイジングされた、あらかじめ形成された小胞に添加することができる。このような「あらかじめ形成された」小胞への核酸の封入を可能にするために、混合物は、エタノールなどのアルコールを含有すべきである。エタノールの場合、約20%（w/w）～約45%（w/w）の濃度で存在するべきである。さらに、あらかじめ形成された小胞と核酸の混合物を、水性緩衝液－エタノール混合物中で、脂質小胞の組成と核酸の性質に応じて約25℃～約50℃の温度まで温める必要がある場合がある。

50

脂質小胞中の所望の核酸レベルを達成するために封入プロセスを最適化するには、エタノール濃度および温度などの変数を操作する必要があるということが当業者には明白であろう。核酸封入に好適な条件の例は、実施例に提供されている。ひとたび核酸があらかじめ形成された小胞に封入されれば、外部のpHを増大させて、表面電荷を少なくとも部分的に中和することができる。その後、封入されていない、表面吸着した核酸を上記のように除去することができる。

【0393】

使用方法

本発明の脂質粒子を、インビトロまたはインビボで、治療剤を細胞に送達するために使用し得る。特定の実施形態では、治療剤は、本発明の核酸-脂質粒子を用いて細胞に送達される核酸である。本発明の脂質粒子および関連する薬学的組成物のさまざまな使用方法に関する以下の説明は、核酸-脂質粒子に関する説明によって例示されるが、これらの方法および組成物が、そのような治療から恩恵を受ける任意の疾患または障害を治療するための任意の治療剤を送達するために容易に適用され得ることが理解される。

【0394】

ある実施形態では、本発明は、核酸を細胞に導入するための方法を提供する。細胞への導入に好ましい核酸は、siRNA、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、プラスミド、アンチセンス、およびリボザイムである。これらの方法は、本発明の粒子または組成物を、細胞内送達が起こるのに十分な時間、細胞と接触させることによって実行し得る。

【0395】

本発明の組成物は、ほとんど全ての細胞型に吸着させることができる。ひとたび吸着すれば、核酸-脂質粒子は、細胞の一部によってエンドサイトーシスされるか、細胞膜と脂質を交換するか、または細胞と融合することができる。複合体の核酸部分の移入または取込みは、これらの経路のいずれか1つを介して起こり得る。本発明の範囲に関して限定されることを意図するものではないが、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた粒子の場合、粒子はその後、エンドソーム膜と相互作用し、おそらくは二重層でない相を形成することによってエンドソーム膜を不安定化し、封入された核酸を細胞質に導入すると考えられている。同様に、粒子と細胞形質膜との直接的な融合の場合、融合が起こると、リボソーム膜は、細胞膜に組み込まれ、リボソームの内容物が細胞内液と組み合わせる。インビトロで実行される場合、細胞と脂質-核酸組成物の接触は、生物学的に適合する媒質中で起こる。組成物の濃度は、特定の用途によってさまざまに異なり得るが、一般に、約 $1\mu\text{mol}$ ～約 10mmol である。ある実施形態では、脂質-核酸組成物による細胞の治療は、一般に、生理的温度（約 37°C ）で、約1～24時間、好ましくは約2～8時間実行される。インビトロでの適用については、核酸の送達は、植物起源のものであれ、または動物起源のものであれ、脊椎動物であれ、または無脊椎動物であれ、いかなる組織またはタイプのものであれ、培養で増殖した任意の細胞に対して行なわれるものであり得る。好ましい実施形態では、細胞は、動物細胞、より好ましくは哺乳類細胞、および最も好ましくはヒト細胞である。

【0396】

一群の実施形態では、脂質-核酸粒子懸濁液を、60～80%コンフルエントでプレーティングされた、細胞密度が約 10^3 ～約 10^5 細胞/mL、より好ましくは約 2×10^4 細胞/mLの細胞に添加する。細胞に添加される懸濁液の濃度は、好ましくは約0.01～20 $\mu\text{g/mL}$ 、より好ましくは約1 $\mu\text{g/mL}$ である。

【0397】

典型的な適用には、特異的な細胞標的をノックダウンまたはサイレンシングするsiRNAの細胞内送達をもたらす周知の手順の使用が含まれる。あるいは、適用には、治療的に有用なポリペプチドをコードするDNA配列またはmRNA配列の送達が含まれる。このように、欠損または欠如した遺伝子産物を供給することによって、遺伝的疾患に対する（すなわち、デュシェンヌ型ジストロフィー、Kunkelら, Brit. Med. Bull. 45(3): 630-643 (1989) 参照、および嚢胞性線維症、Goodf

10

20

30

40

50

ellow, Nature 341:102-103 (1989) 参照) に対する治療を提供する。本発明の組成物の他の用途には、細胞におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入が含まれる (Bennettら, Mol. Pharm. 41:1023-1033 (1992) 参照)。

【0398】

あるいは、本発明の組成物を、当業者に公知の方法を用いて、インビボで細胞に核酸を送達するために使用することもできる。DNA配列またはmRNA配列を送達するための本発明の適用に関して、Zhuら, Science 261:209-211 (1993) (これは、参照により本明細書に組み入れられる) には、DOTMA-DOPC錯体を用いたサイトメガロウイルス (CMV) -クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 発現プラスミドの静脈内送達に記載されている。Hydeら, Nature 362:250-256 (1993) (これは、参照により本明細書に組み入れられる) には、リポソームを用いた、マウスの気道上皮へのおよび肺の肺胞への嚢包性線維症コンダクタンス制御因子 (CFTF) 遺伝子の送達に記載されている。Brighamら, Am. J. Med. Sci. 298:278-281 (1989) (これは、参照により本明細書に組み入れられる) には、細胞内酵素であるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) をコードする機能性の原核生物遺伝子によるマウスの肺のインビボトランスフェクションに記載されている。このように、本発明の組成物を感染性疾患の治療で使用する事ができる。

【0399】

インビボ投与については、薬学的組成物を、非経口的に、すなわち、関節内、静脈内、腹腔内、皮下、または筋肉内に投与することが好ましい。特定の実施形態では、薬学的組成物を、ボーラス注射によって、静脈内または腹腔内に投与する。一例として、Stadlerら, 米国特許第5,286,634号明細書明細書を参照されたく、これは参照により本明細書に組み入れられる。細胞内核酸送達は、Straubingerら, Methods in Enzymology, Academic Press, New York. 101:512-527 (1983); Manninoら, Biotechniques 6:682-690 (1988); Nicolauら, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6:239-271 (1989)、およびBehr, Acc. Chem. Res. 26:274-278 (1993) でも考察されている。脂質をベースにした治療薬を投与するさらに他の方法は、例えば、Rahmanら, 米国特許第3,993,754号; Sears, 米国特許第4,145,410号; Papahadjopoulosら, 米国特許第4,235,871号; Schneider, 米国特許第4,224,179号; Lenkら, 米国特許第4,522,803号; およびFountainら, 米国特許第4,588,578号の各明細書に記載されている。

【0400】

他の方法において、薬学的調製物を組織に直接適用することにより、この調製物を標的組織と接触させてもよい。適用は、局所的処置、「開かれた」処置、または「閉じた」処置によって行ない得る。「局所的」は、環境に露出している組織 (例えば、皮膚、中咽頭、外耳道など) に薬学的調製物を直接適用することを意味する。「開かれた」処置とは、患者の皮膚を切開し、薬学的調製物が適用される下層組織を直接可視化することを含む処置のことである。これは、一般に、肺にアクセスするための開胸手術、腹部内臓にアクセスするための腹式開腹術、または標的組織への他の直接的な外科的アプローチなどの外科的処置によって遂行される。「閉じた」処置とは、内部の標的組織を直接可視化するのではなく、皮膚の小さい傷を通した挿入器具で内部の標的組織にアクセスする侵襲的な処置のことである。例えば、調製物を針洗浄で腹膜に投与してもよい。同様に、薬学的調製物を、脊髄麻酔またはメトラズアミド (metrazamide) による脊髄の画像化のために一般に行われるように、腰椎穿刺と、それに続く患者の適当な位置決めの間に、注入によって髄膜または脊髄に投与してもよい。あるいは、調製物を内視鏡装置で投与しても

よい。

【0401】

脂質－核酸組成物を、肺に吸入されるエアロゾル（Brighamら，Am. J. Sci. 298（4）：278－281（1989）参照）で、または疾患部位での直接的な注射によって（Culver, Human Gene Therapy, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, New York. pp. 70－71（1994））投与することもできる。

【0402】

本発明の方法は、種々の宿主で実施され得る。好ましい宿主には、ヒト、ヒト以外の霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジなどの哺乳類種が含まれる。

10

【0403】

本発明の脂質－治療剤粒子の投薬量は、治療剤対脂質の比率、ならびに患者の年齢、体重、および状態に基づいた投与医師の意見によって決まることになる。

【0404】

一実施形態では、本発明は、標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリペプチドの発現を調節する方法を提供する。これらの方法は、一般に、標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリペプチドの発現を調節することができる核酸と会合している本発明の脂質粒子と細胞を接触させる工程を含む。本明細書で使用される場合、「調節すること」という用語は、標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリペプチドの発現を変化させることを指す。異なる実施形態では、調節することは、増大させることもしくは増強することを行うことができ、または減少させることもしくは低下させることを行うことができる。標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリペプチドの発現レベルを測定する方法は当技術分野で公知かつ利用可能であり、例えば、逆転写－ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）および免疫組織化学技術を利用する方法を含む。特定の実施形態では、標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリペプチドの発現レベルは、適当な対照値と比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、または50%より大きく増大または低下する。

20

【0405】

例えば、ポリペプチドの発現の増大が所望される場合、核酸は、所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターであってもよい。他方、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現の低下が所望される場合、核酸は、例えば、標的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズし、それによって標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリペプチドの発現を妨害するポリヌクレオチド配列を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、またはマイクロRNAであってもよい。あるいは、核酸は、そのようなオリゴヌクレオチド、siRNA、またはマイクロRNAなどを発現するプラスミドであってもよい。

30

【0406】

特定の実施形態では、治療剤は、siRNA、マイクロRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンタゴミル、およびsiRNA、マイクロRNA、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択され、ここで、これらのsiRNA、マイクロRNA、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ポリペプチドの発現を低下させるように、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的に結合するポリヌクレオチドまたはその相補体を含む。

40

【0407】

他の実施形態では、核酸は、ポリペプチドまたはその機能性変異体もしくは断片の発現が増大するように、これらのポリペプチドまたはその機能性変異体もしくは断片をコードするプラスミドである。

【0408】

関連する実施形態では、本発明は、対象におけるポリペプチドの過剰発現を特徴とする疾患または障害を治療する方法であって、その治療剤が、siRNA、マイクロRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンタゴミル、およびsiRNA、マイクロRNA

50

、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択され、これらの s i R N A、マイクロ R N A、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的に結合するポリヌクレオチドまたはその相補体を含む、本発明の薬学的組成物を対象に提供する工程を含む方法を提供する。

【0409】

別の関連する実施形態では、本発明は、対象におけるポリペプチドの過小発現を特徴とする疾患または障害を治療する方法であって、その治療剤が、このポリペプチドまたはその機能性変異体もしくは断片をコードするプラスミドである、本発明の薬学的組成物を対象に提供する工程を含む方法を提供する。

【0410】

さらなる実施形態では、薬学的組成物を、ワクチンまたは抗原と組み合わせて対象に投与する。したがって、本発明それ自体が、免疫刺激性オリゴヌクレオチドを含み、免疫応答が望ましい抗原と関連してもいる、本発明の脂質粒子を含むワクチンを提供する。特定の実施形態では、抗原は、腫瘍抗原であるか、または例えば、ウイルス、細菌、もしくは寄生虫などの感染性因子と関連する。

【0411】

種々の腫瘍抗原、感染性因子抗原、および他の疾患と関連する抗原が当技術分野で周知であり、これらの例が本明細書で引用される参考文献に記載されている。本発明で使用するのに好適な抗原の例としては、ポリペプチド抗原または D N A 抗原が挙げられるが、これらに限定されない。抗原の具体的な例は、A 型肝炎、B 型肝炎、天然痘、ポリオ、炭疽、インフルエンザ、発疹チフス、破傷風、麻疹、ロタウイルス、ジフテリア、百日咳、結核、および風疹の抗原である。好ましい実施形態では、抗原は、B 型肝炎の組換え抗原である。他の態様では、抗原は、A 型肝炎の組換え抗原である。別の態様では、抗原は、腫瘍抗原である。このような腫瘍関連抗原の例は、M U C - 1、E B V 抗原、およびパーキンソン病腫瘍と関連する抗原である。さらなる態様では、抗原は、チロシナーゼ関連タンパク質腫瘍抗原の組換え抗原である。当業者は、本発明で使用するのに好適な他の抗原を理解しているであろう。

【0412】

本発明で使用するために好適な腫瘍関連抗原には、突然変異分子と非突然変異分子の両方が含まれ、これらの分子は、単一の腫瘍型を示してもよく、いくつかの腫瘍型で共有されてもよく、かつ／または正常細胞と比較して腫瘍細胞でもっぱら発現もしくは過剰発現していてもよい。タンパク質および糖タンパク質に加えて、糖質、ガングリオシド、糖脂質、およびムチンの腫瘍特異的な発現パターンも記載されている。本癌ワクチンで 사용되는例示的な腫瘍関連抗原には、オンコジーン、腫瘍抑制因子遺伝子、および腫瘍細胞に特有の突然変異もしくは再配列を有する他の遺伝子のタンパク質産物、再活性化された胚性遺伝子産物、腫瘍胎児性抗原、組織特異的（だが、腫瘍特異的ではない）分化抗原、増殖因子受容体、細胞表面糖質残基、外来ウイルスタンパク質、ならびに多くの他の自己タンパク質が含まれる。

【0413】

腫瘍関連抗原の具体的な実施形態には、例えば、突然変異抗原（例えば、R a s p 2 1 プロトオンコジーン、腫瘍抑制因子 p 5 3、および B C R - a b l オンコジーンのタンパク質産物、ならびに C D K 4、M U M 1、カスパーゼ 8、および β カテニン）；過剰発現抗原（例えば、ガレクチン 4、ガレクチン 9、炭酸脱水素酵素、アルドラーゼ A、P R A M E、H e r 2 / n e u、E r b B - 2、および K S A、腫瘍胎児性抗原（例えば、 α フェトタンパク質（A F P）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（h C G））；自己抗原（例えば、癌胎児性抗原（C E A）およびメラノサイト分化抗原（例えば、M a r t 1 / M e l a n A、g p 1 0 0、g p 7 5、チロシナーゼ、T R P 1、および T R P 2））；前立腺関連抗原（例えば、P S A、P A P、P S M A、P S M - P 1、および P S M - P 2）；再活性化胚性遺伝子産物（例えば、M A G E 1、M A G E 3、M A G E 4、G A G E 1、G A G E 2、B A G E、R A G E、および他の癌精巢抗原（例えば、N Y - E S O 1、

10

20

30

40

50

S S X 2、および S C P 1)) ; ムチン (例えば、M u c - 1 および M u c - 2) ; ガングリオシド (例えば、G M 2、G D 2、および G D 3)、中性糖脂質、ならびに糖タンパク質 (例えば、ルイス (y) および グロボ - H)) ; ならびに糖タンパク質 (例えば、T n、トンプソン - フリーデンライヒ (T h o m p s o n - F r e i d e n r e i c h) 抗原 (T F)、および s T n) が含まれる。全細胞および腫瘍細胞ライセート、ならびに B 細胞リンパ腫に対して使用される B リンパ球のモノクローナル増殖物上に発現した免疫グロブリンイディオタイプ、およびその免疫原性部分も、本明細書に記載される腫瘍関連抗原として含まれる。

【0414】

病原体には、哺乳類 (より特には、ヒト) に感染する感染性因子、例えば、ウイルスが含まれるが、これに限定されない。感染性ウイルスの例としては、レトロウイルス科 (例えば、ヒト免疫不全ウイルス、例えば、H I V - 1 (H T L V - I I I、L A V もしくは H T L V - I I I / L A V、または H I V - I I I と呼ばれる) ; および他の分離株、例えば、H I V - L P ; ピコルナウイルス科 (例えば、ポリオウイルス、A 型肝炎ウイルス ; エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス) ; カリシウイルス科 (例えば、胃腸炎を引き起こす株) ; トガウイルス科 (例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス) ; フラビウイルス科 (例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス) ; コロナウイルス科 (例えば、コロナウイルス) ; ラブドウイルス科 (例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス) ; フィロウイルス科 (例えば、エボラウイルス) ; パラミクソウイルス科 (例えば、パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス) ; オルトミクソウイルス科 (例えば、インフルエンザウイルス) ; ブンガウイルス科 (例えば、ハンターウイルス、ブンガウイルス、フレボウイルス、およびナイロウイルス) ; アレナウイルス科 (出血熱ウイルス) ; レオウイルス科 (例えば、レオウイルス、オルビウイルス、およびロタウイルス) ; ビルナウイルス科 ; ヘパドナウイルス科 (B 型肝炎ウイルス) ; パルボウイルス科 (パルボウイルス) ; パピローマウイルス科 (パピローマウイルス、ポリオーマウイルス) ; アデノウイルス科 (大部分のアデノウイルス) ; ヘルペスウイルス科、単純ヘルペスウイルス (H S V) 1 および H S V - 2、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス (C M V)、ヘルペスウイルス ; ポッククウイルス科 (痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス) ; ならびにイリドウイルス科 (例えば、アフリカ豚熱ウイルス) ; ならびに未分類ウイルス (例えば、海綿状脳症の病原因子、デルタ肝炎の因子 (B 型肝炎ウイルスの欠損付随体と考えられている)、非 A 非 B 型肝炎 (クラス 1 = 内部で伝染する ; クラス 2 = 非経口で伝染する (すなわち、C 型肝炎) ; ノーウォークウイルスおよび関連ウイルス、ならびにアストロウイルス) が挙げられる。

【0415】

グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌も脊椎動物における抗原としての役割を果たす。このようなグラム陽性細菌には、パストレラ (*Pasteurella*) 種、ブドウ球菌 (*Staphylococci*) 種、および連鎖球菌 (*Streptococcus*) 種が含まれるが、これらに限定されない。グラム陰性細菌には、大腸菌 (*Escherichia coli*)、シュードモナス (*Pseudomonas*) 種、およびサルモネラ (*Salmonella*) 種が含まれるが、これらに限定されない。感染性細菌の具体的な例には、ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*)、ライム病ボレリア菌 (*Borrelia burgdorferi*)、レジオネラ・ニューモフィリア (*Legionella pneumophila*)、マイコバクテリウム (*Mycobacteria*) 種 (例えば、M. ツベルクローシス (*M. tuberculosis*)、M. アビウム (*M. avium*)、M. イントラセルラーレ (*M. intracellulare*)、M. カンサイ (*M. kansasii*)、M. ゴルドナエ (*M. goodii*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)

togenes)、化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*) (A群連鎖球菌)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ(*Streptococcus agalactiae*) (B群連鎖球菌)、連鎖球菌(ビリダンス(*viridans*)群)、大便連鎖球菌(*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ボビス(*Streptococcus bovis*)、連鎖球菌(嫌気性種)、肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、病原性カンピロバクター(*Campylobacter*)種、腸球菌(*Enterococcus*)種、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)、炭疽菌(*Bacillus anthracis*)、ジフテリア菌(*corynebacterium diphtheriae*)、コリネバクテリウム(*corynebacterium*)種、ブタ丹毒菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、クロストリジウム・ペルFRINGELス(*Clostridium perfringers*)、破傷風菌(*Clostridium tetani*)、エンテロバクター・エロゲネス(*Enterobacter aerogenes*)、肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)、パスツレラ・ムルトシダ(*Pasturella multocida*)、バクテロイデス(*Bacteroides*)種、フソバクテリウム・ヌクレアタム(*Fusobacterium nucleatum*)、ストレプトバシラス・モニリフォルミス(*Streptobacillus moniliformis*)、トレポネマ・パリジウム(*Treponema pallidum*)、トレポネマ・パルテヌエ(*Treponema pertenuae*)、レプトスピラ(*Leptospira*)、リケッチア(*Rickettsia*)、およびアクチノミセス・イスラエリ(*Actinomyces israelii*)が含まれるが、これらに限定されない。

【0416】

病原体のさらなる例には、哺乳類(より特には、ヒト)に感染する感染性真菌が含まれるが、これに限定されない。感染性真菌の例には、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ(*Cryptococcus neoformans*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム(*Histoplasma capsulatum*)、コクシジオイデス・イミティス(*Coccidioides immitis*)、ブラストミセス・デルマチチジス(*Blastomyces dermatitidis*)、クラミジア・トラコマチス(*Chlamydia trachomatis*)、カンジダ・アルビカンズ(*Candida albicans*)が含まれるが、これらに限定されない。感染性寄生虫の例としては、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)、四日熱マラリア原虫(*Plasmodium malariae*)、卵形マラリア(*Plasmodium ovale*)、および三日熱マラリア原虫(*Plasmodium vivax*)などの変形体が挙げられる。他の感染性生物(すなわち、原生生物)には、トキソプラズマ原虫(*Toxoplasma gondii*)が含まれる。

【0417】

一態様では、本発明は、細胞における標的遺伝子の発現を調節する方法であって、該細胞に本発明の組成物を提供する工程を含む方法を提供する。一実施形態では、標的遺伝子は、第VII因子、Eg5、PCSK9、TPX2、apoB、SAA、TTR、RSV、PDGFβ遺伝子、ErbB遺伝子、Src遺伝子、CRK遺伝子、GRB2遺伝子、RAS遺伝子、MEKK遺伝子、JNK遺伝子、RAF遺伝子、Erk1/2遺伝子、PCNA(p21)遺伝子、MYB遺伝子、JUN遺伝子、FOS遺伝子、BCL-2遺伝子、サイクリンD遺伝子、VEGF遺伝子、EGFR遺伝子、サイクリンA遺伝子、サイクリンE遺伝子、WNT-1遺伝子、β-カテニン遺伝子、c-MET遺伝子、PKC遺伝子、NFKB遺伝子、STAT3遺伝子、サバイビン遺伝子、Her2/Neu遺伝子、トポイソメラーゼI遺伝子、トポイソメラーゼIIα遺伝子、p73遺伝子の突然変異、p21(WAF1/CIP1)遺伝子の突然変異、p27(KIP1)遺伝子の突然変異、PPM1D遺伝子の突然変異、RAS遺伝子の突然変異、カベオリンI遺伝子の突然変異、MIB-1遺伝子の突然変異、MTA1遺伝子の突然変異、M68遺伝子の突然

変異、腫瘍抑制因子遺伝子の突然変異、および p 5 3 腫瘍抑制因子遺伝子の突然変異からなる群から選択される。

【0418】

定義

便宜のため、本明細書、実施例、および付随する特許請求の範囲で使用される特定の用語および語の意味が、以下に提供される。本明細書の他の部分におけるある用語の用法と本節で示されるその定義との間に明白な矛盾がある場合には、本節の定義が優先されるものとする。

【0419】

「G」、「C」、「A」および「U」は各々、通常、塩基としてグアニン、シトシン、アデニン、およびウラシルをそれぞれ含有するヌクレオチドを表す。しかしながら、「リボヌクレオチド」または「ヌクレオチド」という用語は、以下にさらに詳述するような修飾ヌクレオチド、または代用置換部分も指すことができるということが理解されよう。当業者にはよく知られていることであるが、グアニン、シトシン、アデニン、およびウラシルを他の部分に置換し、このような置換部分を有するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの塩基対形成特性を実質的に変化させないでおくことが可能である。例えば、限定するものではないが、塩基としてイノシンを含むヌクレオチドは、アデニン、シトシン、またはウラシルを含有するヌクレオチドと塩基対形成し得る。したがって、ウラシル、グアニン、またはアデニンを含有するヌクレオチドは、本発明のヌクレオチド配列中で、例えばイノシンを含有するヌクレオチドに置換し得る。このような置換部分を含む配列は本発明の実施形態である。

【0420】

本明細書で使用される「第VII因子」は、第VII因子のmRNA、タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドを意味する。「第VII因子」という用語は、当技術分野で、A1132620、Cf7、凝固因子VII前駆体、凝固因子VII、FVII、血清プロトロンビン転化促進因子、FVII凝固タンパク質、およびエプタコグアルファとしても知られている。

【0421】

本明細書で使用される場合、「標的配列」とは、一次転写産物のRNAプロセッシングの産物であるmRNAを含む、遺伝子の転写の間に形成されるmRNA分子のヌクレオチド配列の連続した部分を指す。

【0422】

本明細書で使用される場合、「配列を含む鎖」という用語は、標準的なヌクレオチド命名法を用いて参照される配列によって説明される、ヌクレオチドの鎖を含むオリゴヌクレオチドを指す。

【0423】

本明細書で使用される場合、および別途示されない限り、ヌクレオチド対との関連で使用される場合の「相補的」という用語は、古典的なワトソン-クリック対、すなわち、GC、AT、またはAUを意味する。この用語は、一方または両方のヌクレオチドが、例えば、リボース修飾またはリン酸骨格修飾によって、本明細書に記載されるように修飾されている古典的なワトソン-クリック対形成にまでも及ぶ。この用語は、イノシンまたは塩基対形成特性を実質的には変化させない他の実体との対形成も含むことができる。

【0424】

本明細書で使用される場合、および別途示されない限り、第2のヌクレオチド配列との関連で第1のヌクレオチド配列を説明するのに使用される場合の「相補的」という用語は、当業者に理解されるように、第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドとハイブリダイズし、特定の条件下で二重鎖構造を形成する能力を指す。相補性は、生理的条件下での、すなわち、生物内で直面し得る生理的に関連のある条件下でのハイブリダイゼーションを可能にする完全な相補性、実質的な相補性、および十分な相補性

を含むことができる。完全な相補性とは、個々の対について上で定義されるような、第1の配列と第2の配列の対の全てにおける相補性を指す。ある配列が、本明細書中の第2の配列に対して「実質的に相補的」である場合、この2つの配列は、完全に相補的であり得るか、またはこれらの配列は、ハイブリダイズしたときに、1つ以上の、しかし通常は、多くて4つ、3つ、もしくは2つのミスマッチの塩基対を形成しながらも、その最終的な適用に最も関連がある条件下でハイブリダイズする能力を保持し得る。実質的な相補性は、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションとしても定義することができ、この場合、ストリンジェントな条件は、以下を含み得る：400 mM NaCl、40 mM PIPES pH 6.4、1 mM EDTA、50℃または70℃、12～16時間の後、洗浄。当業者は、ハイブリダイズしたヌクレオチドの最終的な適用に従う2つの配列の相補性の試験に最も適当な条件の組を決定することができるであろう。

10

【0425】

しかしながら、2つのオリゴヌクレオチドが、ハイブリダイズしたときに、1つ以上の一本鎖突出を形成するように設計される場合、そのような突出は、相補性の決定に関してミスマッチとはみなされないものとする。例えば、一方の21ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドと、もう一方の23ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含むdsRNAであって、より長いオリゴヌクレオチドが、より短いオリゴヌクレオチドに完全に相補的な21ヌクレオチドの配列を含むdsRNAは、本発明の目的のために、やはり「完全に相補的」と呼ばれ得る。

【0426】

本明細書で使用される「相補的」配列はまた、ハイブリダイズするそれらの能力に関する上記の要件が満たされる限り、非ワトソンクリック塩基対ならびに／または非天然ヌクレオチドおよび修飾ヌクレオチドから形成された塩基対を含んでもよく、またはこれらの塩基対から完全に形成されてもよい。

20

【0427】

生理的条件下での、例えば、生物内で直面し得る生理的に関連のある条件下でのハイブリダイゼーションを可能にする「相補的」、「完全に相補的」、「実質的に相補的」、および十分な相補性という用語は、これらを使用する文脈から理解されるように、dsRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖の間の、またはdsRNAのアンチセンス鎖と標的配列の間の塩基ミスマッチに関して本明細書で使用され得る。

30

【0428】

本明細書で使用される場合、メッセンジャーRNA (mRNA) 「の少なくとも一部に相補的な、例えば、実質的に相補的な」ポリヌクレオチドとは、対象となる（例えば、第VII因子をコードする）mRNAの連続した部分に相補的な、例えば、実質的に相補的なポリヌクレオチドを指す。例えば、ポリヌクレオチドは、その配列が第VII因子をコードするmRNAの中断されていない部分に実質的に相補的である場合、第VII因子のmRNAの少なくとも一部に相補的である。

【0429】

本明細書で使用される「二本鎖RNA」または「dsRNA」という用語は、逆平行で、かつ上で定義されたような、実質的に相補的な2つの核酸鎖を含む二重鎖構造を有するリボ核酸分子、またはリボ核酸分子の複合体を指す。二重鎖構造を形成する2つの鎖は、1つのより大きいRNA分子の異なる部分であってもよく、またはその2つの鎖は、別々のRNA分子であってもよい。2つの分子が1つのより大きい分子の部分であり、したがって、二重鎖構造を形成する一方の鎖の3'-末端とそれぞれのもう一方の鎖の5'-末端の間の中断されないヌクレオチド鎖によって接続されている場合、接続RNA鎖は「ヘアピンループ」と呼ばれる。2つの鎖が、二重鎖構造を形成する一方の鎖の3'-末端とそれぞれのもう一方の鎖の5'-末端の間の中断されないヌクレオチド鎖以外の手段で共有結合的に接続されている場合、接続構造は、「リンカー」と呼ばれる。RNA鎖は、同数または異なる数のヌクレオチドを有し得る。塩基対の最大数は、dsRNAのうち最短の鎖のヌクレオチドの数である。二重鎖構造に加えて、dsRNAは、1つ以上のヌクレ

40

50

オチド突出を含み得る。本明細書で使用される dsRNA は、「小さい阻害性 RNA」、「siRNA」、「siRNA 剤」、「iRNA 剤」、または「RNAi 剤」とも呼ばれる。

【0430】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド突出」とは、dsRNA の一方の鎖の 3' 末端がもう一方の鎖の 5' 末端を越えて伸びるか、またはその逆である場合に、dsRNA の二重鎖構造から突出する不對ヌクレオチド（単数または複数）を指す。「平滑」または「平滑末端」とは dsRNA のその末端に不對ヌクレオチドがないこと、すなわち、ヌクレオチド突出がないことを意味する。「平滑末端の」dsRNA とは、その全長にわたって二本鎖である、すなわち、分子のどちらの末端にもヌクレオチド突出がない dsRNA のことである。

10

【0431】

「アンチセンス鎖」という用語は、標的配列に実質的に相補的な領域を含む dsRNA の鎖を指す。本明細書で使用される場合、「相補領域」という用語は、本明細書で定義されるように、配列（例えば、標的配列）に実質的に相補的な、アンチセンス鎖上の領域を指す。相補領域が標的配列に完全に相補的ではない場合、ミスマッチは末端領域において最も許容され、かつ、存在する場合は、通常、末端領域（単数または複数）に、例えば、5' 末端および／または 3' 末端から 6、5、4、3、または 2 ヌクレオチド以内にある。

【0432】

本明細書で使用される「センス鎖」という用語は、アンチセンス鎖のある領域に実質的に相補的な領域を含む dsRNA の鎖を指す。

20

【0433】

「同一性」という用語は、2 つ以上のポリヌクレオチド配列を比較することによって決定される、このような配列間の関係性のことである。同一性はまた、一連のポリヌクレオチド配列間の一致によって決定される、このような配列間の配列関連性の程度を意味する。2 つのポリヌクレオチド配列間の同一性を測定するための多くの方法が存在するが、この用語は当業者に周知である（例えば、Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); および Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. および Devereux, J., 編, M. Stockton Press, New York (1991) 参照）。本明細書で使用される「実質的に同一」とは、dsRNA のセンス鎖と標的遺伝子の対応する部分との間に非常に高い相同性（好ましくは 100% の配列同一性）があることを意味する。しかしながら、90% 超、または 95% の配列同一性を有する dsRNA を本発明で使用してもよく、したがって、遺伝子突然変異、系統多形、または進化的分岐のために見込まれ得る配列の変異も許容することができる。100% 同一性が好ましいが、dsRNA は、RNA と標的遺伝子の間に単一または複数の塩基対のランダムなミスマッチを含有してもよい。

30

【0434】

当業者には理解されるように、「細胞に導入する」とは、dsRNA に関する場合、細胞内への取込みまたは吸収を促進することを意味する。dsRNA の吸収または取込みは、人の手を借りない拡散プロセスまたは細胞の能動的プロセスを通じてなされ得るし、または補助的な薬剤もしくは装置によってなされ得る。この用語の意味は、インビトロの細胞に限定されるものではない。dsRNA は、生きた生物の一部である「細胞に導入される」場合もある。このような例では、細胞への導入は、生物への送達を含むことになる。例えば、インビボ送達については、dsRNA を組織部位に注入することができるし、または全身投与することができる。インビトロでの細胞への導入には、エレクトロポレーションおよびリポフェクションなどの当技術分野で公知の方法が含まれる。

40

【0435】

「サイレンシングする」および「発現を阻害する」という用語は、これらの用語が第 V

50

I I 因子遺伝子を指すものである限り、本明細書では、第 V I I 因子遺伝子の発現の少なくとも一部の抑制を指し、この抑制は、第 V I I 因子遺伝子が転写される第 1 の細胞または細胞群であって、第 V I I 因子遺伝子の発現が阻害されるように処理された細胞または細胞群から単離し得る、第 V I I 因子遺伝子から転写された m R N A の量が、第 2 の細胞または細胞群であって、第 1 の細胞または細胞群と実質的に同一であるが、第 1 の細胞または細胞群のように処理されていない細胞または細胞群（対照細胞）と比較して、減少していることによって明らかにされるようなものである。阻害の程度は通常；

（対照細胞の m R N A）－（処理細胞の m R N A）× 1 0 0 / （対照細胞の m R N A）
で表される。

【0436】

あるいは、阻害の程度は、第 V I I 因子遺伝子の転写に関数関係があるパラメータ、例えば、細胞によって分泌される、第 V I I 因子遺伝子にコードされたタンパク質の量、またはある表現型（例えば、アポトーシス）を示す細胞の数、の減少という観点から与えられる場合もある。原則として、第 V I I 因子遺伝子のサイレンシングは、構成的にかまたはゲノム工学によるかのいずれかで、標的を発現している任意の細胞において、任意の適当なアッセイによって測定し得る。しかしながら、所与の s i R N A が第 V I I 因子遺伝子の発現を一定の度合いで阻害するかどうか、したがって、この s i R N A が本発明に包含されるかどうかを決定するために参照が必要な場合、以下の実施例に提供されるアッセイが、そのような参照としての役割を果たすものとする。

【0437】

例えば、ある例では、第 V I I 因子遺伝子の発現は、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドの投与によって少なくとも約 2 0 %、2 5 %、3 5 %、4 0 %、または 5 0 % 抑制される。好ましい実施形態では、第 V I I 因子遺伝子は、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドの投与によって少なくとも約 6 0 %、7 0 %、または 8 0 % 抑制される。より好ましい実施形態では、第 V I I 因子遺伝子は、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドの投与によって少なくとも約 8 5 %、9 0 %、または 9 5 % 抑制される。

【0438】

「治療する」、「治療」などの用語は、疾患または障害の緩和または軽減を指す。本発明との関連において、以下に本明細書で引用される他の状態（例えば、血栓疾患以外の第 V I I 因子が仲介する状態）のいずれかに関する限り、「治療する」、「治療」などの用語は、そのような状態に伴う少なくとも 1 つの症状を緩和もしくは軽減すること、またはそのような状態の進行を遅延もしくは逆行させることを意味する。

【0439】

「治療的に有意義な」組成物は、適切な用量で投与されたときに、疾患もしくは障害、または疾患もしくは障害の症状を緩和または軽減することができる。

【0440】

本明細書で使用される場合、「第 V I I 因子が仲介する状態または疾患」という用語ならびに関連用語および関連語句は、不適切な（例えば、正常よりも大きい）第 V I I 因子の活性を特徴とする状態または障害を指す。不適切な第 V I I 因子の機能的活性は、通常は第 V I I 因子を発現しない細胞での第 V I I 因子の発現、または（例えば、ウイルス性出血熱の症状、もしくは血栓を引き起こす）第 V I I 因子発現の増大の結果として生じ得る。第 V I I 因子が仲介する状態または疾患は、不適切な第 V I I 因子の機能的活性によって完全にまたは部分的に仲介され得る。しかしながら、第 V I I 因子が仲介する状態または疾患は、第 V I I 因子の調節によって、根本的な状態または障害にいくらかの影響を及ぼせるものである（例えば、第 V I I 因子の阻害剤によって、少なくとも一部の患者では健康がいくらか改善される）。

【0441】

「出血熱」には、ウイルス感染によって引き起こされる病気の組合せが含まれる。典型的には、発熱と消化管症状に続いて、毛細血管の出血が起こる。

【0442】

「凝固障害」とは、対象の血液凝固機構の任意の欠陥のことである。

【0443】

本明細書で使用される場合、「血栓障害」とは、好ましくは望まない第ⅤⅠⅠ因子発現に起因する任意の障害のことであり、望ましくない血液凝固を特徴とする任意の障害を含む。

【0444】

本明細書で使用される場合、「治療的有効量」および「予防的有効量」という語句は、ウイルス性出血熱、またはそのような障害の明らかな症状（例えば、出血、発熱、衰弱、筋肉痛、頭痛、炎症、もしくは循環性ショック）の治療、予防、もしくは管理において治療効果を提供する量を指す。治療的に有効な具体的な量は、普通の医師により容易に決定可能であり、当技術分野で公知の要因、例えば、血栓障害のタイプ、患者の病歴および年齢、疾患の段階、ならびに他の薬剤の投与などによって変わり得る。

【0445】

本明細書で使用される場合、「薬学的組成物」には、薬理学的有効量の dsRNA と薬学的に許容される担体とが含まれる。本明細書で使用される場合、「薬理学的有効量」、「治療的有効量」、または単に「有効量」とは、意図される薬理学的結果、治療的結果、または予防的結果をもたらすのに有効な RNA の量を指す。例えば、疾患または障害に関連する測定可能なパラメータが少なくとも 25% 低下したときに、所与の臨床治療が有効であると考えられる場合、その疾患または障害を治療するための薬物の治療的有効量は、そのパラメータの少なくとも 25% 低下をもたらすのに必要な量である。

【0446】

「薬学的に許容される担体」という用語は、治療剤を投与するための担体を指す。このような担体には、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびこれらの組合せが含まれるが、これらに限定されない。この用語は、細胞培養培地を特に除外する。経口投与される薬物について、薬学的に許容される担体には、薬学的に許容される賦形剤、例えば、不活性希釈剤、崩壊剤、結合剤、潤滑剤、甘味料、香料、着色剤、および防腐剤が含まれるが、これらに限定されない。好適な不活性希釈剤には、炭酸ナトリウムおよび炭酸カルシウム、リン酸ナトリウムおよびリン酸カルシウム、ならびにラクトースが含まれ、一方、トウモロコシデンプンおよびアルギン酸は、好適な崩壊剤である。結合剤には、デンプンおよびゼラチンが含まれ得、一方、潤滑剤は、存在する場合には、一般に、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、またはタルクである。所望の場合には、消化管内での吸収を遅らせるために、錠剤をモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルなどの材料でコーティングし得る。

【0447】

本明細書で使用される場合、「形質転換細胞」とは、dsRNA 分子を発現することが可能なベクターが導入された細胞のことである。

【0448】

「アルキル」は、1～24 個の炭素原子を含有する、直鎖状または分岐状の、非環状または環状の、飽和脂肪族炭化水素を意味する。代表的な飽和直鎖アルキルには、メチル、エチル、n-プロピル、n-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシルなどが含まれ、一方、飽和分枝アルキルには、イソプロピル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、イソペンチルなどが含まれる。代表的な飽和環状アルキルには、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどが含まれ、一方、不飽和環状アルキルには、シクロペンテニルおよびシクロヘキセニルなどが含まれる。

【0449】

「アルケニル」は、隣接する炭素原子間に少なくとも 1 つの二重結合を含有する、上で定義されるような、アルキルを意味する。アルケニルには、シス異性体とトランス異性体の両方が含まれる。代表的な直鎖アルケニルおよび分岐アルケニルには、エチレニル、プロピレニル、1-ブテニル、2-ブテニル、イソブチレニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-メチル-1-ブテニル、2-メチル-2-ブテニル、2, 3-ジメチル-2

ーブテニルなどが含まれる。

【0450】

「アルキニル」は、隣接する炭素原子間に少なくとも1つの三重結合をさらに含有する、上で定義されるような、任意のアルキルまたはアルケニルを意味する。代表的な直鎖アルキニルおよび分枝アルキニルには、アセチレニル、プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、3-メチル-1-ブチニルなどが含まれる。

【0451】

「アシル」は、結合位置の炭素が、以下で定義されるような、オキシ基で置換されている任意のアルキル、アルケニル、またはアルキニルを意味する。例えば、 $-C(=O)$ アルキル、 $-C(=O)$ アルケニル、および $-C(=O)$ アルキニルは、アシル基である。

【0452】

「ヘテロ環」は、飽和、不飽和、もしくは芳香族のいずれかで、窒素、酸素、および硫黄から独立に選択される1個または2個のヘテロ原子を含有する、5～7員の単環式ヘテロ環、または7～10員の二環式ヘテロ環を意味し、ここで、窒素および硫黄のヘテロ原子は、随意的に酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は、随意的に四級化されていてもよく、任意の上記のヘテロ環がベンゼン環に融合されている二環式環を含む。ヘテロ環は、任意のヘテロ原子または炭素原子を介して結合され得る。ヘテロ環には、以下で定義されるヘテロアリアルが含まれる。ヘテロ環には、モルフォニリニル、ピロリジノニル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピペリジニル (piperizyny l)、ヒダントイニル、バレロールアクタミル (valerolactamyl)、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピリジニル、テトラヒドロプリミジニル、テトラヒドロチオフエニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロチオフエニル、テトラヒドロチオピラニルなどが含まれる。

【0453】

「ヘテロアリアル」は、炭素原子、水素原子、ならびに窒素、酸素、および、硫黄から独立に選択される1個以上のヘテロ原子（好ましくは1～3個のヘテロ原子）を含む単環式または多環式の芳香族環を意味する。当業者には周知であるように、ヘテロアリアル環は、全て炭素の対応物よりも芳香族性が少ない。したがって、本発明の目的のために、ヘテロアリアル基は、ある程度の芳香族性を有することのみが必要である。例示的なヘテロアリアル基には、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、(1, 2, 3,)-トリアゾリルおよび(1, 2, 4)-トリアゾリル、ピラジニル、ピリミジニル、テトラゾリルが含まれるが、これらに限定されない。

【0454】

「随意的に置換されたアルキル」、「随意的に置換されたアルケニル」、「随意的に置換されたアルキニル」、「随意的に置換されたアシル」、および「随意的に置換されたヘテロ環」という用語は、置換されるときに、少なくとも1つの水素原子が置換基と置換されることを意味する。オキシ置換基 ($=O$) の場合、2つの水素原子が置換される。この点に関して、置換基には、オキシ、ハロゲン、ヘテロ環、 $-CN$ 、 $-OR^x$ 、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^xC(=O)R^y$ 、 $-NR^xSO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ 、および $-SO_nNR^xR^y$ (式中、 n は0、1、または2であり、 R^x および R^y は同じか、または異なり、かつ独立に水素、アルキル、もしくはヘテロ環であり、該アルキル置換基とヘテロ環置換基は各々、1つ以上のオキシ、ハロゲン、 $-OH$ 、 $-CN$ 、アルキル、 $-OR^x$ 、ヘテロ環、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^xC(=O)R^y$ 、 $-NR^xSO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ 、および $-SO_nNR^xR^y$ でさらに置換されていてもよい) が含まれる。

【0455】

「ハロゲン」は、フルオロ、クロロ、ブロモ、およびヨードを意味する。

【0456】

一実施形態では、本発明の方法は、保護基の使用を必要とする場合がある。保護基に関する方法論は、当業者によく知られている（例えば、Protective Groups in Organic Synthesis, Green, T. W. ら, Wiley-Interscience, New York City, 1999 参照）。簡潔に述べると、本発明との関連における保護基とは、官能基の望まない反応性を低下させるかまたは排除する任意の基のことである。特定の反応中の反応性をマスキングするために、保護基を官能基に付加し、その後、もとの官能基を露出させるために除去することができる。一実施形態では、「アルコール保護基」が使用される。「アルコール保護基」とは、アルコール官能基の望まない反応性を減少させるかまたは排除する任意の基のことである。保護基は、当技術分野で周知の技術を用いて付加および除去することができる。

10

【0457】

本発明の化合物は、実施例にさらに詳細に記載される方法を含む、公知の有機合成技術によって調製することができる。

【実施例】

【0458】

以下の実施例は、特許請求された本発明を例証するために提供されるのであって、それを限定するために提供されるのではない。

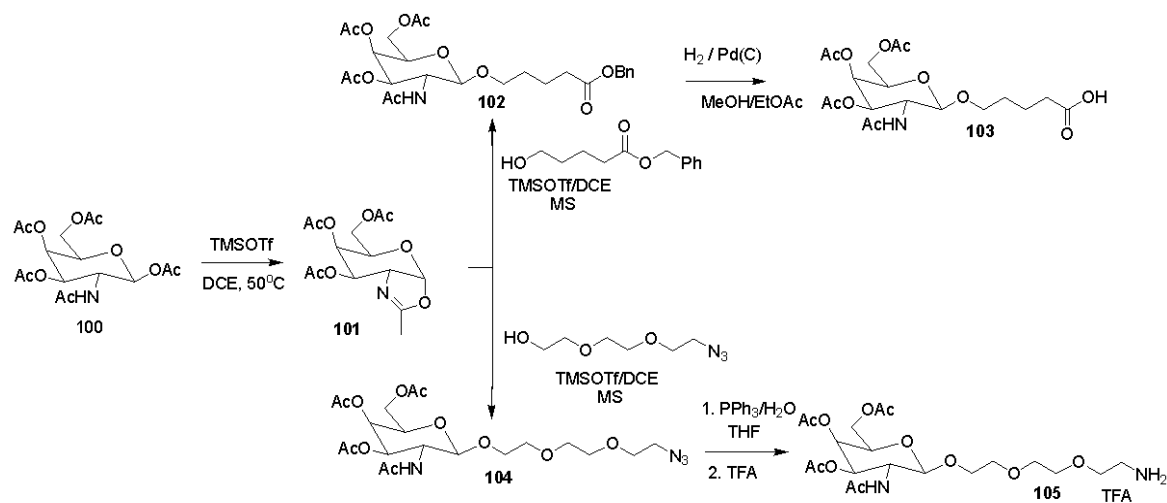
【0459】

実施例 1. コンジュゲーション用の糖質ビルディングブロックの合成

20

【0460】

【化 57】



30

【0461】

101 の調製：

ガラクトサミンペンタアセテート 100 (52.00 g、133.63 mmol) を、周囲温度でジクロロエタン (300 mL) 中に入れた。そこに、TMSOTf (44.55 g、200.44 mmol) を添加し、混合物を 50°C で 90 分間、水浴で攪拌し、加熱を停止し、混合物を室温で一晩攪拌した。これを、氷冷重炭酸ナトリウム溶液中に注ぎ入れ、ジクロロメタンで抽出し、水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を除去し、残渣を高真空下で一晩乾燥させて、化合物を暗色の粘性物質 (44.50 g、定量的) として得た。これを、さらに精製することなく、次の反応に使用した。¹H NMR と MALDI で生成物の生成を確認した。MS: C₁₄H₁₉NO₈ の計算値 329.11; 実測値 352.1 (M+Na)。

40

【0462】

102 の調製：

50

化合物101 (43.70 g、133.56 mmol) とそのベンジルエステル (41.71 g、200.34 mmol) をジクロロメタン (300 mL) に溶解させ、そこに分子ふるい (50 g) を添加し、30 分間攪拌した。そこに TMSOTf (14.50 g、66.78 mmol) を添加し、混合物を室温で一晩攪拌した。これを、氷冷重炭酸ナトリウム溶液中に注ぎ入れ、ジクロロメタンで抽出し、水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー (勾配溶出: 20%–100% の酢酸エチル/ヘキサン) で精製して、所要の化合物を淡褐色の粘着性の液体 (60.50 g、86%) として得た。 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ MS: $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{NO}_{11}$ の計算値 537.22; 実測値 560.21 (M+Na)。

【0463】

10

103 の調製:

化合物102 (60.00 g、111.68 mmol) を、メタノール/酢酸エチルの混合物に溶解させ、アルゴンで脱気した。Pd/C (6.00 g、10 重量% Degussa、ウェットタイプ) を添加し、バルーン圧下で一晩水素化した。小型のセライトパッドに通して濾過し、メタノールで洗浄し、高真空下で一晩乾燥して、生成物 (48.85 g、98%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ MS: $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_{11}$ の計算値 447.17; 実測値 469.9 (M+Na)。

【0464】

104 の調製:

20

化合物101 (42.30 g、128.43 mmol) とそのアジドエタノール (26 g、192.45 mmol) をジクロロエタン (300 mL) に溶解させ、そこに分子ふるい (50 g) を添加し、30 分間攪拌した。そこに TMSOTf (14.29 g、64.21 mmol) を添加し、混合物を室温で一晩攪拌した。これを、氷冷重炭酸ナトリウム溶液中に注ぎ入れ、ジクロロメタンで抽出し、水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー (勾配溶出: 20%–100% の酢酸エチル/ヘキサン、次いで 5%–10% のメタノール/酢酸エチル) で精製して、所要の化合物を淡褐色の粘着性の液体 (59.23 g、91.00%) として得た。 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ MS: $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{11}$ の計算値 504.21; 実測値 527.1 (M+Na)。

【0465】

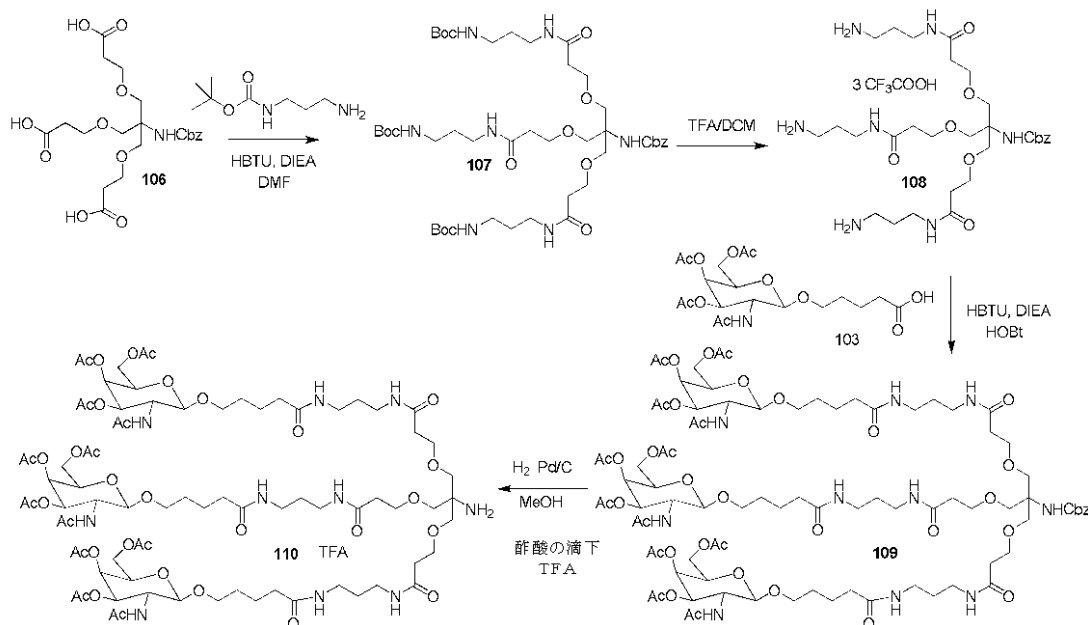
30

105 の調製:

化合物104 (9.33 g、18.50 mmol) を THF (100 mL) に溶解させ、そこに PPh₃ (5.97 g、22.2 mmol) を添加し、混合物を 48 時間攪拌した。出発材料が完全に消失したことを TLC で確認した。水 (1 mL、55 mmol) を添加し、さらに 24 時間攪拌した。TFA (2.85 mL、23.12 mmol) とトルエン (40 mL) を添加し、溶媒を減圧下で除去した。残渣をトルエンと 2 回共蒸発させ (2 × 40 mL)、高真空下で乾燥させた。これを同日中に次の反応に使用した。MS: $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{11}$ の計算値 478.22; 実測値 500.8 (M+Na)。

【0466】

【化 5 8】



10

【0 4 6 7】

20

107の調製：

化合物106 (JOC 2002) (6.94 g、14.73 mmol) とモノboc
 プロピルアミン (10.26 g、58.89 mmol) をDMF (100 mL) に溶解
 させ、そこにHBTU (17.26 g、45.50 mmol) とDIEA (15.36 mL
 、88.14 mmol) を添加し、一晩攪拌した。反応混合物を氷水混合物中に入れ、ジ
 クロロメタンで抽出し、重炭酸ナトリウム溶液、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上
 で乾燥させた。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー (酢酸エチル、次いで2% - 10
 %のMeOH / DCM) で精製して、生成物を白色の綿毛状の固体 (10.49 g、76
 %) として得た。MS : C₄₅H₇₇N₇O₁₄ の計算値939.55 ; 実測値940.
 53 (M+H)。

30

【0 4 6 8】

108の調製：

化合物107 (2.40 g、2.56 mmol) をジクロロメタン (10 mL) に溶解
 させ、そこにTFA / DCM (1 : 4、10 mL) の混合物を添加し、30分間攪拌した
 。反応を質量スペクトルでモニターした。100 mLのトルエンを添加し、溶媒を減圧下
 で除去した。残渣をトルエンと2回共蒸発させ (2 × 100 mL) 、高真空下で乾燥させ
 て、化合物をそのTFA塩 (白色の粘着性物質、2.47 g、99%) として得た。これ
 を、さらに精製することなく、次の反応に使用した。MS : C₃₀H₅₃N₇O₈ の計算
 値639.40 ; 実測値640.45 (M+H)。

【0 4 6 9】

40

109の調製：

GalNAc酸103 (4.00 g、8.99 mmol) をDMF (50 mL) に溶解
 させ、そこにHBTU (3.75 g、9.88 mmol) 、HOBT (1.34 g、9.
 88 mmol) 、およびDIEA (5 mL、3.2当量) を添加し、3~4分間攪拌した
 。そこに108 (2.47 g、2.50 mmol) のDMF溶液を添加し、反応混合物を
 一晩攪拌した。TLCで確認し、溶媒を減圧下で除去した。残渣をジクロロメタンに溶解
 させ、重炭酸ナトリウム溶液 (50 mL) 、水 (100 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウム
 上で乾燥させた。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー (酢酸エチル、次いで勾配溶
 出5% - 15%のMeOH / DCM) で精製して、生成物109を白色の固体 (4.20
 g、87%) として得た。MS : C₈₇H₁₃₄N₁₀O₃₈ の計算値1926.89 ;

50

実測値 1949.5 (M+N a)。

【0470】

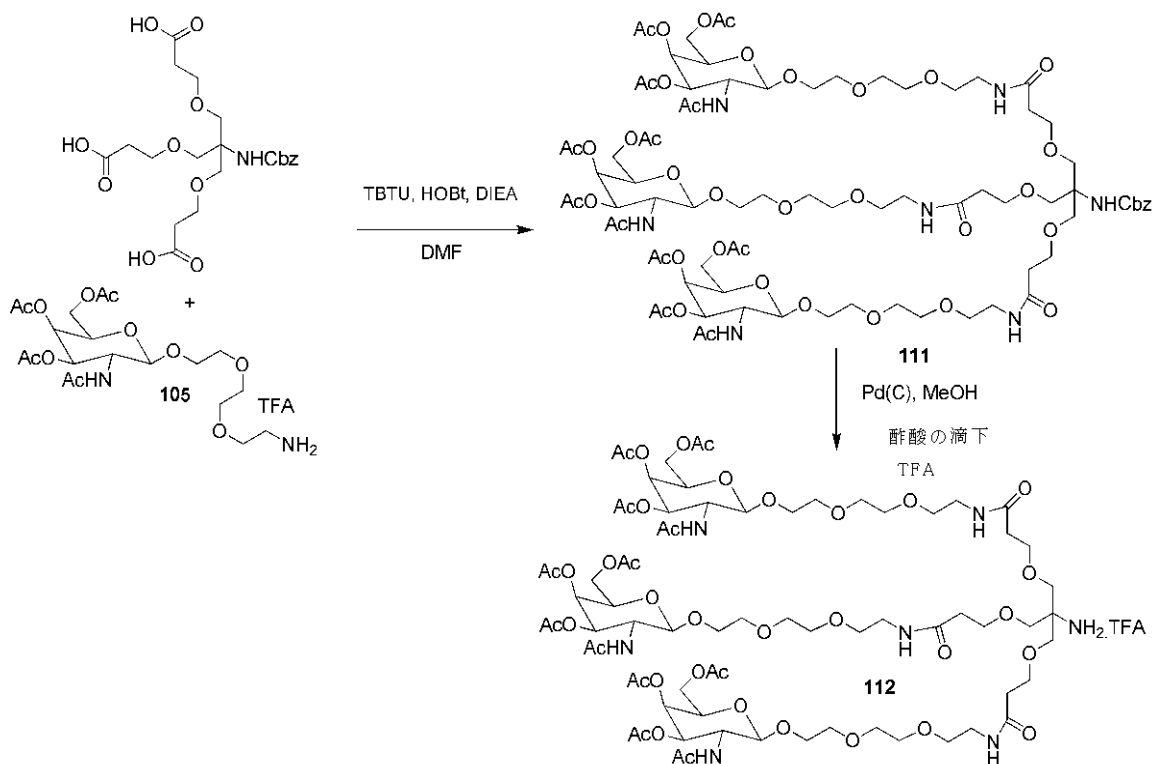
110の調製：

GalNAc誘導体109 (7.50 g、4.18 mmol) を、アルゴンで脱気したメタノール (50 mL) 中に入れた。Pd/C (0.800 g、10重量% Degussaタイプ、ウェット) と数滴の酢酸を添加し、混合物をバルーン圧下で一晩水素化した。反応混合物を小型のセライトパッドに通して濾過し、メタノールで洗浄した。TFA (0.465 mL、5.22 mmol) を添加し、溶媒を減圧下で除去した。残渣をトルエンと共に蒸発させ (2回)、高真空下で一晩乾燥させて、化合物をTFA塩 (淡黄色の固体、7.30 g、99%) として得た。MS: $C_{79}H_{128}N_{10}O_{36}$ の計算値 1792.85; 実測値 1815.9 (M+N a)。

10

【0471】

【化59】



20

30

【0472】

111の調製：

トリカルボン酸106 (2.17 g、4.625 mmol) とアミン (18.50 mmol、先の反応からの粗製物) をDMF (100 mL) に溶解させた。そこにTBTU (5.34 g、16.63 mmol)、HOBT (2.24 g、16.59 mmol)、およびDIEA (5.64 mL、32.36 mmol) を添加し、反応混合物を24時間攪拌した。24時間攪拌した後、追加量のDIEA (4 mL) を添加し、攪拌を続けた。48時間後、溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタンに溶解させ、1 Mリン酸溶液、重炭酸ナトリウム溶液、水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー (酢酸エチル、次いで3%–15%のMeOH/DCM) で精製して、所要の化合物111を白色の固体 (5.80 g、68%) として得た。MS: $C_{81}H_{125}N_7O_{41}$ の計算値 1851.79; 実測値 1874.20 (M+N a)。

40

【0473】

112の調製：

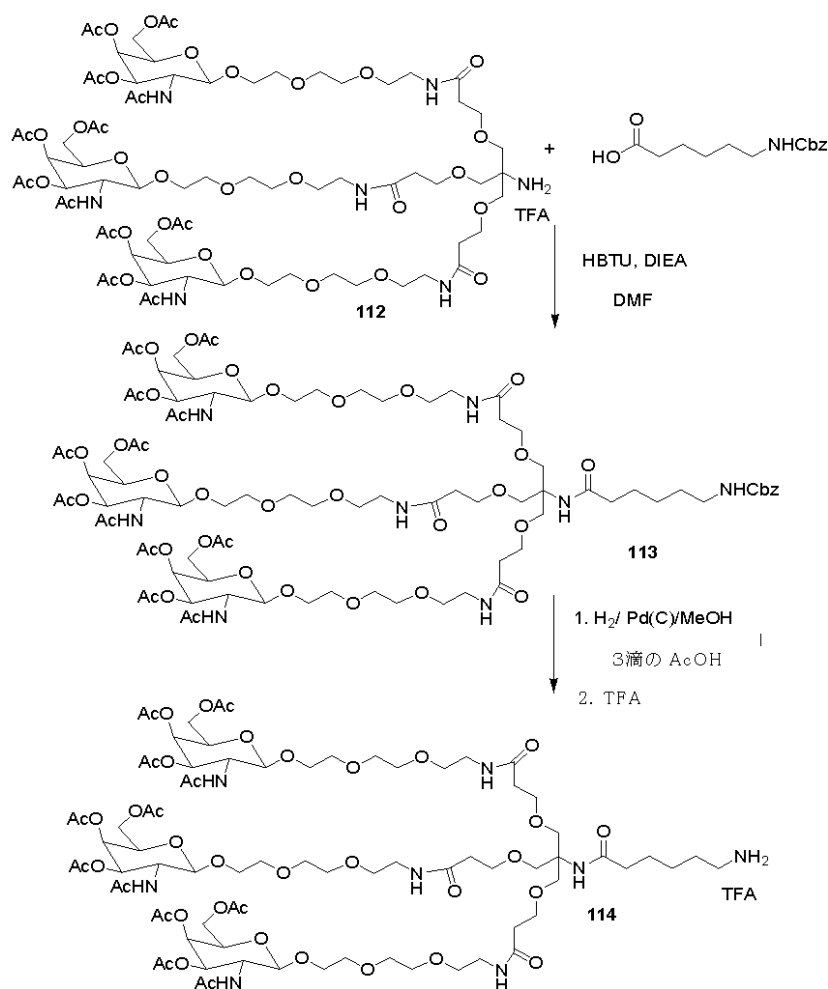
GalNAc誘導体111 (5.75 g、3.09 mmol) を、アルゴンで脱気した

50

メタノール（100 mL）中に入れた。Pd/C（0.600 g、10重量% Degussa、含水型）と数滴の酢酸を添加し、混合物をバルーン圧下で36時間水素化した。反応混合物を小型のセライトパッドに通して濾過し、メタノールで洗浄した。TFA（0.354 mL、1.25当量）とトルエン（30 mL）を添加し、溶媒を減圧下で除去した。残渣をトルエンと共蒸発させ（2回）、高真空下で一晩乾燥させて、化合物をTFA塩（5.70 g、粗製物）として得た。MS：C₈₁H₁₂₅N₇O₄₁の計算値1717.75；実測値1740.5（M+Na）。

【0474】

【化60】



【0475】

113の調製：

ε-アミノカプロン酸（2.19 g、8.25 mmol）をDMF（50 mL）に溶解させた。そこにHBTU（3.13 g、8.25 mmol）とDIEA（7.19 mL、5.00当量）を添加し、混合物を数分間攪拌した。GalNAcアミン112（10.10 g、5.52 mmol）を50 mLのDMFに溶解させ、前記混合物に添加し、48時間攪拌した。TLCとMALDIで生成物の生成について確認した。溶媒を除去し、残渣をDCMに溶解させ、NaHCO₃溶液と水で洗浄した。硫酸ナトリウム上で乾燥させ、溶媒を減圧下で除去した。残渣をクロマトグラフィー（酢酸エチルによる溶出、次いで5%–15%のMeOH/DCMの勾配溶出）で精製して、所要の化合物113をオフホワイトの固体（6.20 g、57%）として得た。MS：C₈₇H₁₃₆N₈O₄₂の計算値1964.88；実測値1987.75（M+Na）。

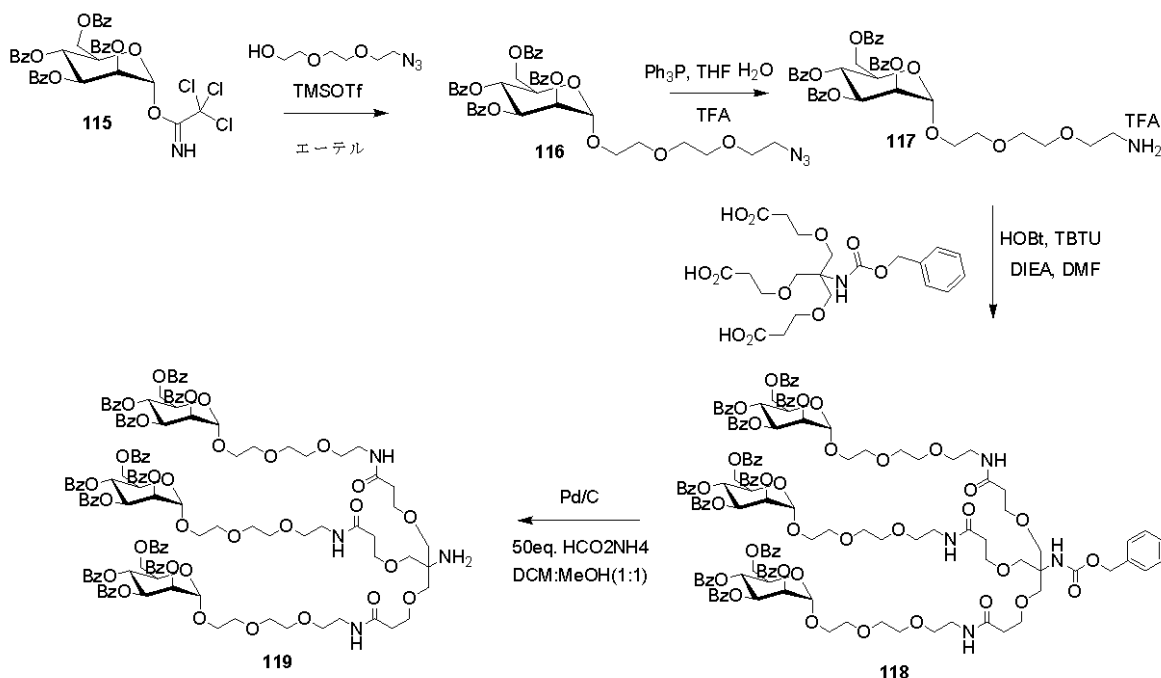
【0476】

114の調製:

化合物113 (6.10 g、3.10 mmol) をメタノール (50 mL) に溶解させ、そこに1 mLの酢酸を添加した。反応混合物を脱気し、そこにPd/C (0.700 g、10重量% Degussa、含水型) を添加し、バルーン圧下で36時間水素化した。反応混合物を小型のセライトパッドに通して濾過し、MeOHで洗浄した。そこに1.25当量のTFAとトルエン (50 mL) を添加し、溶媒を減圧下で除去した。残渣をトルエンと2回共蒸発させ、高真空下で一晩乾燥させて、所要の化合物をオフホワイトの固体 (6.10 g、定量的) として得た。この化合物を、さらに精製することなく、そのまま次の反応に使用した。MS: $C_{79}H_{130}N_8O_{40}$ の計算値1830.84; 実測値1853.81 (M+Na)。

【0477】

【化61】



【0478】

116の調製:

マンノーストリクロロアセトイミデート115 (15.00 g、20.24 mmol) とアジドアルコール (4.25 g、1.2当量) をトルエンに溶解させ、2回共沸騰させた。残渣を高真空下で一晩乾燥させた。そこに無水ジエチルエーテル (30 mL) と分子ふるい (10 g) を添加した。反応混合物を氷水浴で冷却した。そこにTMSOTf (0.5 mL、0.1当量) を添加し、混合物を10分間攪拌した。反応をTLCでモニターし、TEAでクエンチした。分子ふるいを濾過し、溶媒を減圧下で除去した。残渣をクロマトグラフィー (20%–50%のEtOAc/ヘキサン) で精製して、化合物を無色の液体 (8.36 g、55%) として得た。MS: $C_{40}H_{39}N_3O_{12}$ の計算値753.25; 実測値776.23 (M+Na)。

【0479】

117の調製:

化合物116 (8.30 g、11.01 mmol) を無水THF (70 mL) に溶解させ、そこにPPh₃ (3.46 g、1.2当量) を添加し、混合物を周囲温度で2日間攪拌した。そこに水 (1 mL) を添加し、混合物をさらに24時間攪拌した。反応をTLCでモニターした。そこにトリフルロ酢酸 (1.06 mL、1.25当量) とトルエン (50 mL) を添加した。溶媒を減圧下で除去し、残渣をトルエンと2回共蒸発させ、高真空下で乾燥させた。これを、さらに精製することなく、そのまま次の反応に使用した。MS: $C_{40}H_{41}NO_{12}$ の計算値727.26; 実測値750.23 (M+Na)。

【0480】

118の調製：

トリカルボン酸（11.05 g、23.45 mmol）とアミン（68.19 g、94 mmol、先の反応からの粗製物）をDMF（200 mL）に溶解させた。そこにTBTU（27.09 g、84 mmol）、HOBT（11.34 g、84 mmol）、およびDIEA（28 mL、160 mmol）を添加し、反応混合物を24時間攪拌した。24時間攪拌した後、追加量のDIEA（28 mL）を添加し、攪拌を続けた。48時間後、溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタンに溶解させ、1 Mリン酸溶液、重炭酸ナトリウム溶液、および水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー（酢酸エチル、次いで3%–15%のMeOH/DCM）で精製して、所要の化合物118を白色の固体（41.95 g、67%）として得た。MS：C₁₄H₁₄N₄O₄の計算値2598.93；実測値2621.89（M+Na）。

10

【0481】

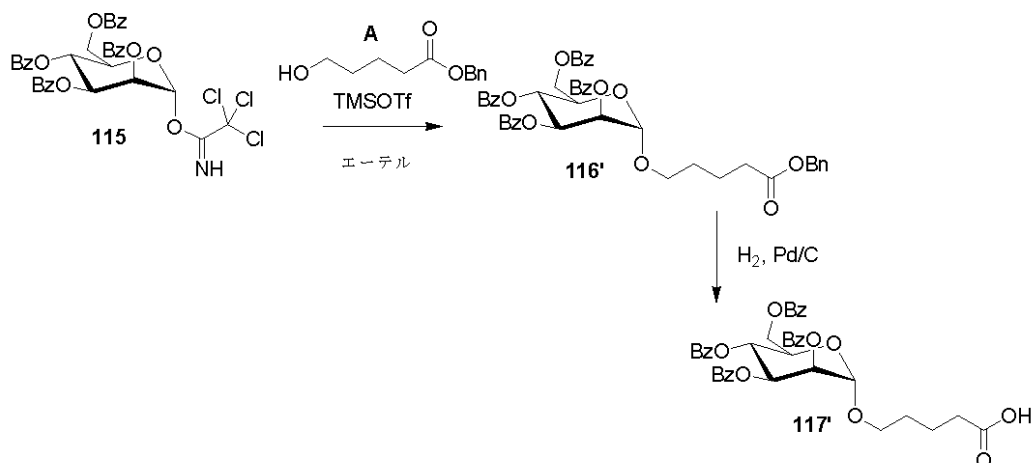
119の調製：

化合物133（3.05 g、1.176 mmol）をDCM/MeOHの混合物に溶解させた。そこに50当量のギ酸アンモニウム、次いで5% Pd/C（1.5 g、50重量%）を添加し、周囲温度で8時間攪拌した。これを小型のセライトパッドに通して濾過し、MeOH/DCMで洗浄し、溶媒を除去し、残渣を高真空下で一晩乾燥させて、化合物を白色の固体（2.65 g、92%）として得た。MS：C₁₃H₁₄N₄O₄の計算値2464.89；実測値2487.92（M+Na）。

20

【0482】

【化62】



30

【0483】

116'の調製：

マンノーストリクロロアセトイミデート115（15.23 g、20.55 mmol）とA（4.36 g、1.02当量）をトルエンに溶解させ、2回共沸騰させた。残渣を高真空下で一晩乾燥させた。そこに無水ジエチルエーテル（30 mL）と分子ふるい（10 g）を添加した。反応混合物を氷水浴で冷却した。そこにTMSOTf（0.5 mL、0.1当量）を添加し、混合物を10分間攪拌した。反応をTLCでモニターし、TEAでクエンチした。分子ふるいを濾過し、溶媒を減圧下で除去した。残渣をクロマトグラフィー（ヘキサン、15%–25%のEtOAc/ヘキサン）で精製して、化合物を無色の液体（14.52 g、90%）として得た。MS：C₄₆H₄₂O₁₂の計算値786.27；実測値809.25（M+Na）。

40

【0484】

117'の調製：

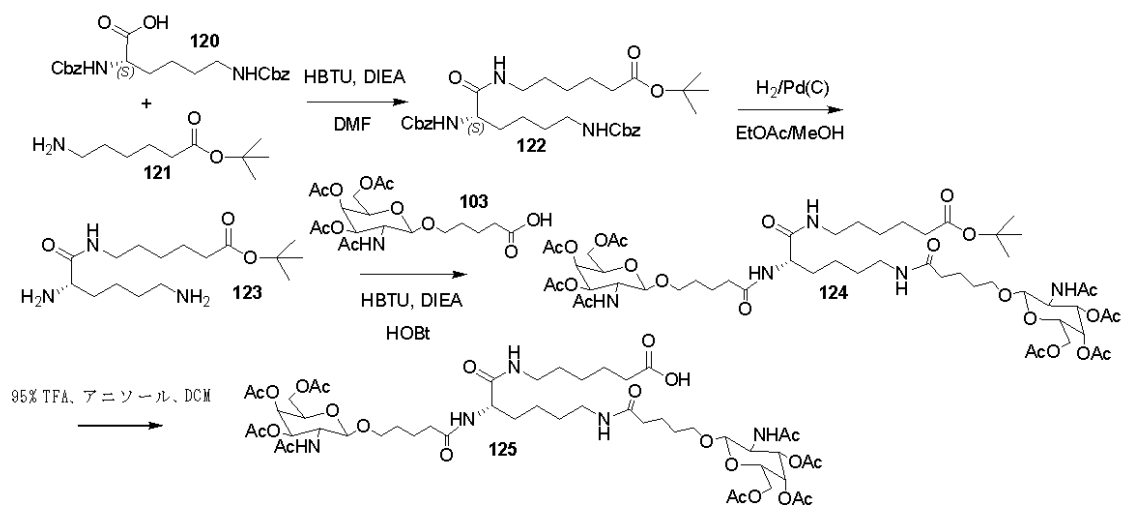
マンノースベンジルエステル（14.30 g、18.17 mmol）を酢酸エチル（100 mL）に溶解させ、そこに2滴の酢酸を添加した。脱気し、Pd/C（1.50 g、

50

10重量% Degussa、含水型)を添加し、バルーン圧下で24時間水素化した。反応をTLCとMALDIでモニターした。これを小型のセライトパッドに通して濾過し、酢酸エチルで洗浄した。溶媒を除去し、残渣を高真空下で乾燥させて、化合物を無色のオイル(11.20g、90%)として得た。MS: $C_{39}H_{36}O_{12}$ の計算値696.22; 実測値719.18 (M+N a)。

【0485】

【化63】



10

20

【0486】

122の調製:

化合物120(26.55g、64.06mmol)と121(10.00g、53.43mmol)をDMF(150mL)に溶解させた。そこにHBTU(24.12g、64mmol)とDIEA(46mL、5当量)を添加し、反応混合物を一晩攪拌した。TLCで確認し、混合物を氷冷水に添加し、エーテルと酢酸エチルの混合物で抽出し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を除去し、粗生成物をクロマトグラフィー(20%–50%の酢酸エチル/ヘキサン)で精製して、所要の生成物をオフホワイトの固体(23.20g、74%)として得た。MS: $C_{32}H_{45}N_3O_7$ のMW計算値: 583.72、実測値584.73 (M+H)。

30

【0487】

123の調製:

化合物122(3.30g、5.65mmol)を酢酸エチル/MeOHの混合物に溶解させ、Pd/C(500mg)を触媒として用いて、バルーン圧下で一晩水素化した。小型のセライトパッドに通して濾過し、溶媒を除去し、生成物を、さらに精製することなく、次の反応に使用した。MS: $C_{16}H_{33}N_3O_3$ のMW計算値: 315.25、実測値316.26 (M+H)。

【0488】

124の調製:

化合物123(5.65mmol)とGalNAc酸103(5.81g、12.99mmol)をDMF(80mL)に溶解させた。そこにHBTU(4.97g、13.10mmol)とDIEA(7.00mL、3当量)を添加し、反応混合物を一晩攪拌した。溶媒を除去し、残渣をDCMに溶解させ、水とブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を除去し、粗生成物をクロマトグラフィー(EtOAc、次いで3%–10%のMeOH/DCM)で精製して、所要の生成物をオフホワイトの固体(5.25g、79%)として得た。MS: $C_{54}H_{87}N_5O_{23}$ のMW計算値: 1173.58、実測値1196.60 (M+N a)。

40

【0489】

125の調製:

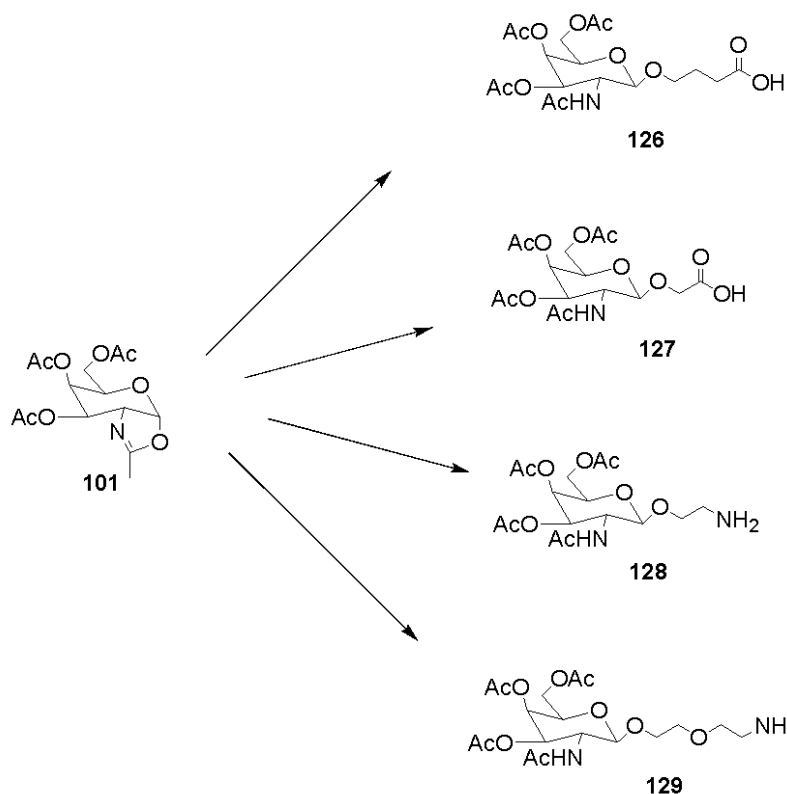
50

二分岐のGalNAc誘導体124(5.15g、4.40mmol)を15mLの無水DCMに溶解させ、そこに3mLのアニソールと30mLのTFAを添加し、この反応混合物を周囲温度で2時間攪拌した。TLCで確認し、反応混合物にトルエンを添加し、溶媒を減圧下で除去した。トルエンと2回共蒸発させ、残渣をDCMに溶解させ、水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させた。粗生成物を濾過カラム(10%のMeOH/DCM)で精製して、所要の生成物を薄茶色の固体(4.40g、91%)として得た。MS: $C_{50}H_{79}N_5O_{23}$ のMW計算値: 1117.52、実測値1140.62(M+N a)。

【0490】

【化64】

10



20

30

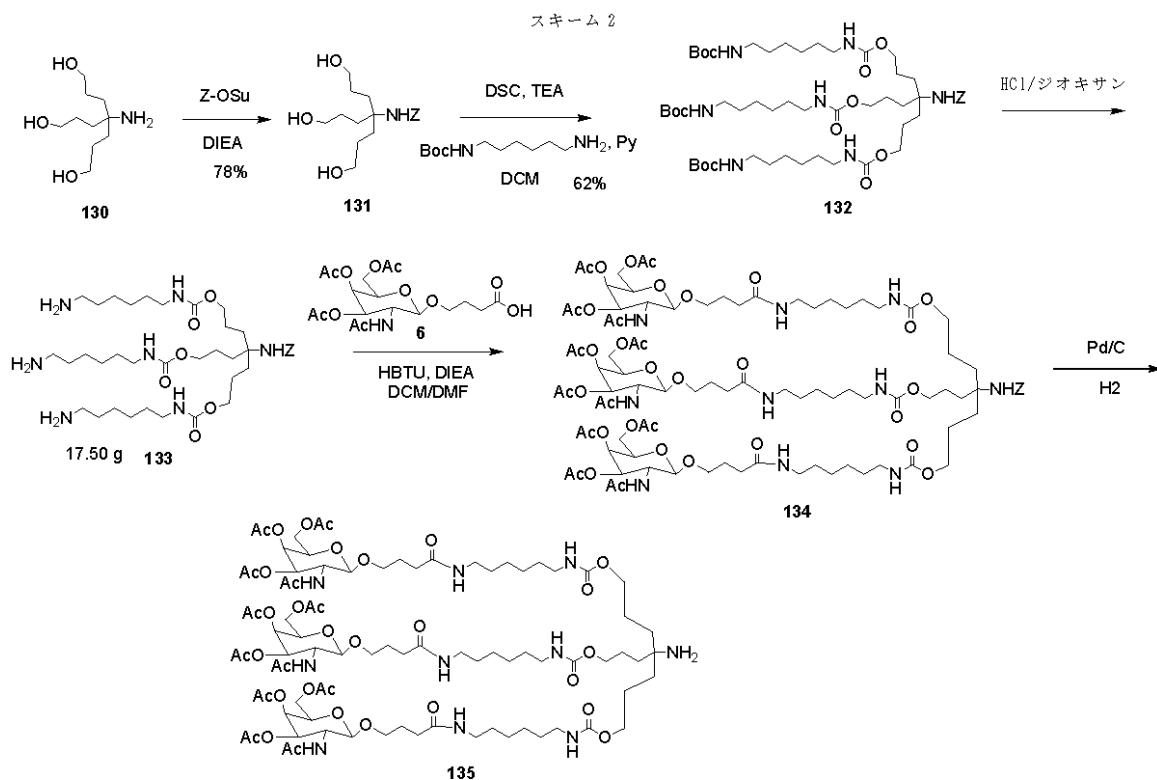
【0491】

ビルディングブロック126と127は、103の合成手順と同様の手順を用いて合成する。ビルディングブロック128と129は、105の合成手順と同様の手順を用いて合成する。

【0492】

40

【化 6 5】



10

20

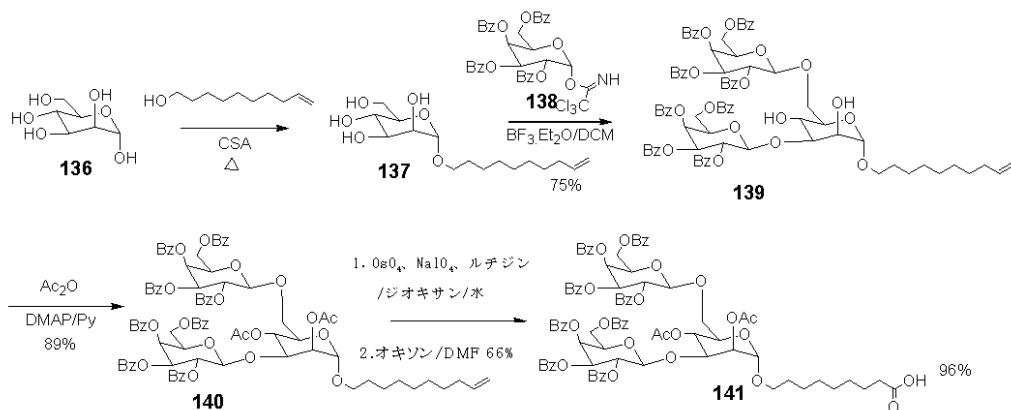
【 0 4 9 3 】

1 3 5 の 調 製 :

ビルディングブロック 1 3 5 は、1 1 0 の合成手順と同様の手順を用いて合成する。

【 0 4 9 4 】

【化 6 6】



30

40

【 0 4 9 5 】

1 3 7 の 調 製 :

マンノース (10.00 g、55.53 mmol) とデシノール (100 g、溶媒) と CSA (500 mg) を 110 °C で、油浴で一晩攪拌した。デシノールの色は一晩で濃い茶色になった。デシノールの大部分を減圧下で完全蒸留した。残渣を DCM に溶解させ、TEA で中和した。この溶液を水で抽出し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を除去し、残渣を小型のシリカゲルパッドによる濾過 (初めに酢酸エチル、次に 10% - 15% の MeOH / DCM) で精製して、生成物 (7.52 g、42%) を得た。¹H NMR (CDCl₃、400 MHz) δ 4.00 MHz (7.52 g、42%) . オール) とデ

50

シノール（100 g、溶媒）とCSA（500 mg）を110℃で、油浴で撹拌した。

【0496】

139の調製：

化合物137（0.172 g、0.541 mmol）をアルゴン下で無水DCM（10 mL）に溶解させた。そこにMSを添加し、反応物を氷浴で冷却した。BF₃・Et₂O（10 μ（102 g、0.541 mmol）をアルゴン下で無水DCM（10 mL）に溶解させた。MSを添加し、5 mLのDCM中の138（1.00 g、1.35 mmol）を15分かけて滴下して添加した。反応をTLCでモニターし、アクセプターがなくなった時点で、反応物をTEAでクエンチし、DCMで希釈し、MSを濾過で除去し、乾燥させた。残渣をクロマトグラフィー（勾配溶出10%—40%のEtOAc／ヘキサン）で精製して、化合物を白色の綿毛状の固体（0.550 g、69%）として得た。5 mLのDCM中の¹H NMR（CDCl₃、400 MHz）δ 4.00 MHz）3.5 mmol）を15分かけて滴下して添加した。反応をTLCでモニターし、アクセプターがなくなった時点で、反応物をTEAでクエンチし、DCMで希釈し、濾過し、5 mLのDCM中の¹³C NMR（CDCl₃、100 MHz）δ 100 MHz）3.5 mmol）を15分かけて滴下して添加した。反応をTLCでモニターし、アクセプターがなくなった時点で、反応物をTEAと2Hでクエンチした）、1.30—0.92（m, 12 H, 63, 128.61, 128.54, 128.47, 128.44, 114.37, 102.74, 102.68, 98.81, 85.27, 72.43, 71.96, 71.37, 71.31, 71.01, 70.30, 70.26, 70.05, 68.31, 68.23, 67.41, 66.11, 62.63, 62.08, 33.96, 29.65, 29.58, 29.53, 29.58, 29.08, 26.20。MS。C₈₄H₈₂O₂₄について計算された分子量、計算値1474.52、実測値1497.60（M+Na）。

【0497】

140の調製：

化合物139（0.104 g、0.07 mmol）をDCM／Py（10 mL、1：1）とAc₂O（0.5 mL、過剰）とDMAP（0.050 g）の混合物に溶解させ、反応物を一晩撹拌した。反応物をMeOHでクエンチし、溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー（勾配溶出10%—30%のEtOAc／ヘキサン）で精製して、化合物を白色の綿毛状の固体（0.108 g、99%）として得た。¹H NMR（CDCl₃、400 MHz）δ 4.00 MHz）過剰）とDMAP（0.050 g）、そして反応物を一晩撹拌した。反応物をMeOHでクエンチし、溶媒を除去した。0.7（m, 13 H）、3.90—3.80（m, 1 H）、3.69—3.61（m, 1 H）、3.36—3.28（m, 1 H）、2.98—2.81（m, 1 H）、2.08（s, 3 H）、2.10—2.01（m, 4 H）、1.35（s, 3 H）、1.42—1.20（m, 12 H）。¹³C NMR（CDCl₃、100 MHz）δ 100 MHz）過剰）とDMAP（0.050 g）、そして反応物を一晩撹拌した。反応物。7.82, 10.43 Hz, 1 H）、5.65—5.47（m, 2 H）、5.10—4.07（m, 13 H）、3.90—3.80（m, 1 H）、3.69—3.61（m, 1 H）、3.36—3.28（m, 1 H）、2.98—2.81（m, 1 H）、2.08（s, 3 H）、2.10—2.01（m, 4 H）、128.47, 128.40, 114.35, 102.32, 99.58, 96.64, 74.51, 72.11, 71.91, 71.46, 71.21, 69.78, 69.72, 69.51, 69.28, 68.19, 68.03, 67.82, 67.12, 61.97, 61.83, 33.94, 29.63, 29.61, 29.55, 29.49, 29.27, 29.20, 29.05, 26.11, 21.06, 20.02。MS：C₈₈H₈₆O₂₆について計算された分子量、計算値1558.54、実測値1581.8（M+Na）。

【0498】

141の調製：

化合物141（1.36 g、0.873 mmol）をジオキサン：水（40 mL、3：

1) の混合物に溶解させた。反応混合物に、ルチジン (0.203 mL、2 当量)、次いで OsO_4 溶液 (1 mL、0.05 M の t -ブタノール溶液) を添加した。過ヨウ素酸ナトリウム (0.774 g、4 当量) を添加し、室温で 4 時間攪拌した。反応を TLC でモニターし、出発材料が消費された時点で、混合物を水で希釈し、DCM (3 回) で抽出し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を全て除去し、残渣を次の反応に直接使用した。上記の反応からの残渣を DMF (20 mL) に溶解させ、そこにオキソン (0.590 g、1.05 当量) を添加し、周囲温度で 3 時間攪拌した。出発材料が消費された時点で、2 mL の 1 M HCl を添加し、酢酸エチルで希釈した。水、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー (勾配抽出 0%–40% の EtOAc/ヘキサン) で精製して、化合物を白色の固体 (1.08 g 79%) として得た。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$ 、400 MHz) δ 4.00 (m, 2H), 3.90–3.85 (m, 7H), 3.80–3.75 (m, 4H), 3.60–3.55 (m, 1H), 2.96–2.87 (m, 1H), 2.80–2.75 (m, 2H), 2.60 (s, 3H), 2.50–2.45 (m, 1H), 2.40–2.35 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.20–2.15 (m, 12H)。 ^{13}C NMR (CDCl_3 、100 MHz) δ 100.0, 133.49, 130.18, 130.08, 128.85, 129.61, 129.52, 129.44, 129.20, 129.13, 128.91, 128.89, 128.81, 128.78, 128.71, 128.51, 128.45, 102.34, 99.67, 96.65, 74.60, 72.17, 71.94, 71.49, 71.21, 69.82, 69.79, 69.59, 69.37, 68.22, 68.11, 67.81, 67.20, 64.55, 61.99, 61.85, 60.59, 44.06, 33.96, 30.79, 29.39, 29.31, 29.24, 29.20, 29.17, 29.08, 26.08, 24.85, 24.79, 22.20, 21.24, 21.11, 20.07。MS: $\text{C}_{87}\text{H}_{84}\text{O}_{28}$ について計算された分子量、計算値 1576.51、実測値 1599.50 (M+N a)。

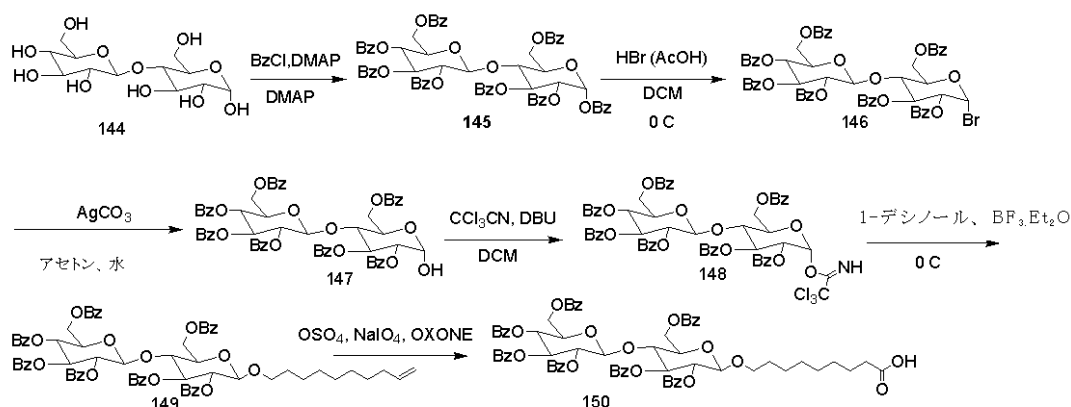
10

20

30

【0499】

10



20

148の調製：

化合物 148 は、報告されている手順に従って合成した (Martin, C. ; Karen, P. ; Laurence, V. Chem. Pharm. Bull. 2004, 52, 965-971.)。

30

149の調製：

1-デシノール (0.300 g、1.92 mmol) とトリクロロアセトイミデート 148 (2.33 g、1.2 当量) をアルゴン下で無水 DCM (10 mL) に溶解させた。そこに MS を添加し、反応物を氷浴で冷却した。BF₃・Et₂O (30 μ (30 g、1.2 当量) をアルゴン下で無水 DCM (10 mL) に溶解させた。そこに MS を添加し、反応物を氷浴で冷却した。BF 130.08, 128.85, 129.61, 129.52, 129.44, 129.20, 129.13, 128.91, 128.89, 128.81, 128.78, 128.71, 128.51, 128.45, 102.34, 99.60 % の EtOAc / ヘキサン)、化合物を白色の綿毛状の固体 (2.01 g、86 %) として得た。¹H NMR (CDCl₃、400 MHz) δ 4.00 (m, 4 H), 1.00–1.60 (m, 11 H)。¹³C NMR (CDCl₃、100 MHz) δ 100.00 (m, 4 H), 1.00–1.60 (m, 11 H)。8.91, 128.81, 130.12, 130.05, 129.98, 129.95, 129.92,

40

50

129.88, 129.80, 129.77, 129.73, 129.68, 129.62, 129.55, 129.50, 129.47, 129.41, 129.40, 129.29, 129.14, 129.11, 129.03, 128.96, 128.87, 128.84, 128.83, 128.78, 128.76, 128.63, 128.56, 128.54, 128.48, 128.37, 128.26, 114.33, 114.26, 100.92, 100.84, 97.04, 96.52, 75.36, 75.17, 74.84, 73.37, 72.95, 72.90, 72.81, 72.57, 72.507, 71.94, 71.58, 71.05, 70.37, 70.27, 70.19, 70.06, 69.86, 69.24, 69.19, 69.02, 63.71, 63.56, 63.20, 62.93, 62.69, 33.96, 33.91, 32.93, 29.60, 29.53, 29.50, 29.46, 29.42, 29.33, 29.30, 29.22, 29.14, 29.06, 29.00。MS. $C_{71}H_{68}O_{18}$ について計算された分子量、計算値1208.44、実測値1231.4 (M+Na)。

10

【0502】

150の調製：

化合物149 (7.26 g、6 mmol) をジオキサン：水の混合物 (100 mL、3：1) に溶解させた。反応混合物に、ルチジン (0.7 mL、2 当量)、次いで OsO_4 溶液 (5 mL、0.05 M の t-ブタノール溶液) を添加した。過ヨウ素酸ナトリウム (5.11 g、4 当量) を添加し、室温で4時間攪拌した。反応をTLCでモニターし、出発材料が消費された時点で、混合物を水で希釈し、DCMで抽出し (3回)、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を全て除去し、残渣を次の反応に直接使用した。上記の反応からの残渣をDMF (60 mL) に溶解させ、そこにオキソン (3.86 g、1.05 当量)、そして周囲温度で3時間攪拌した。出発材料が消費された時点で、10 mL の1M HCl を添加し、酢酸エチルで希釈した。水、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー (勾配溶出20%–40%のEtOAc/ヘキサン) で精製して、化合物150を白色の固体 (5.50 g、75%) として得た。 ^1H NMR (DMSO- d_6 、400 MHz) δ 4.00 (m, 5H, 5.50 g、75%)。ヨード酸塩 (5.11 g、4 当量) を添加し、室温で4時間攪拌した。 $Re^{13}C$ NMR (DMSO- d_6 、100 MHz) δ 100 (m, 5.50 g、75%)。ヨード酸塩 (5.11 g、4 当量) を添加し、室温で4時間攪拌した。反応をTLCでモニターし、出発材料が消費された時点で、混合物を希釈した。99, 164.88, 164.75, 164.70, 164.60, 164.54, 164.50, 133.80, 133.71, 133.58, 133.42, 133.29, 133.15, 129.88, 129.42, 129.36, 129.29, 129.23, 129.20, 129.12, 129.07, 129.05, 129.03, 128.91, 128.88, 128.72, 128.59, 128.48, 128.38, 99.96, 99.29, 99.22, 95.96, 95.64, 95.22, 93.10, 75.61, 74.86, 74.57, 74.37, 74.15, 73.59, 73.14, 72.58, 71.46, 71.15, 70.48, 70.31, 70.09, 69.97, 69.00, 68.87, 68.22, 67.81, 63.65, 62.49, 60.73, 59.76, 43.01, 33.68, 33.62, 32.54, 28.84, 28.82, 28.61, 28.55, 28.47, 28.40, 25.47, 25.21, 24.52, 24.43, 20.45。MS. $C_{70}H_{66}O_{20}$ について計算された分子量、計算値1226.41、実測値1249.4 (M+Na)。

20

30

40

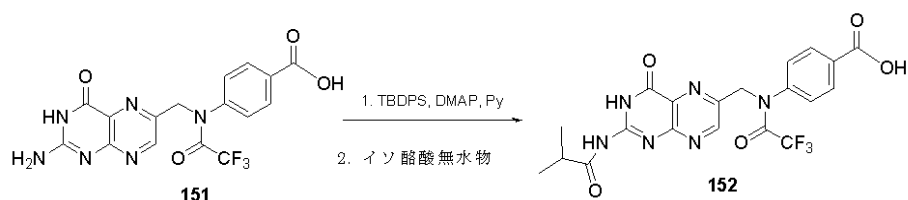
【0503】

実施例2. コンジュゲーション用のプテロイン酸の前駆体

適切に置換されたプテロイン酸前駆体110を以下のように調製した。

【0504】

【化 6 8】



10

【0505】

4-[(2-イソブチリルアミノ-4-オキソ-3,4-ジヒドロプテリジン-6-イルメチル)-(2,2,2-トリフルオロアセチル)-アミノ]ベンゼン酸152の合成

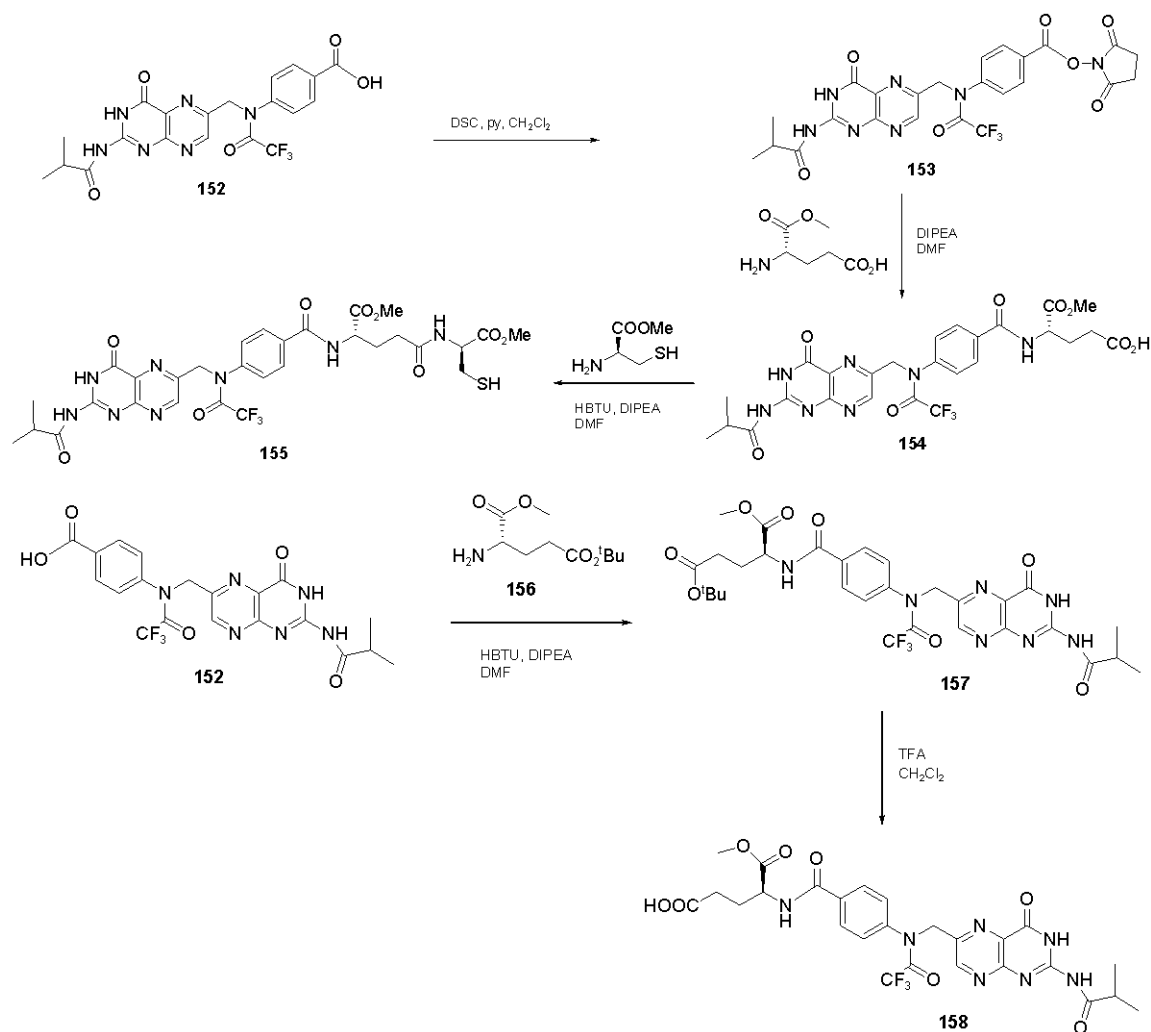
プテロイン酸(25g、61.2mmol)とDMAP(11.25g、92mmol)の無水ピリジン(400mL)懸濁液に、TBDPSの塩化物(42g、153mmol)を添加した。反応混合物を室温で30時間攪拌した後、イソ酪酸無水物(14.6g、92mmol)を添加し、混合物を少し温めた。さらに60mLのピリジンも添加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物が均一になった後、ピリジンと他の揮発性物質をロータリーエバポレーター中で濃縮した。残渣をEtOAc(1L)と酢酸(100mL)と水(500mL)とともに24時間攪拌した。こうして得られたスラリーを濾過し、残渣を水(500mL)、EtOAc(1L)で洗浄し、乾燥させて、純粋な生成物を白色の固体(26.1g、89%)として得た。¹H NMR(DMSO-d₆、400MHz) δ=8.87(s, 1H), 7.95(d, J=8.6Hz, 2H), 7.67(d, J=8.6Hz, 2H), 5.21(s, 2H), 2.79-2.74(m, 1H), 1.12(d, J=6.83Hz, 6H)、¹³C NMR(DMSO-d₆) δ=180.72, 166.49, 159.25, 149.87, 147.68, 142.69, 136.34, 134.45, 130.54, 129.16, 128.86, 127.49, 34.96, 33.09, 26.52, 18.88, 18.74。¹⁹F NMR(DMSO-d₆) d-64.32。MS。C₂₀H₁₇F₃N₆O₅について計算された分子量、計算値478.12、実測値479.12(MH⁺)。

20

30

【0506】

【化 6 9】



10

20

30

【0507】

RNA合成に適した、適切に置換された、より用途の広い葉酸の前駆体を合成するために、以下の戦略を用いた。この方法では、保護葉酸152を、 γ -tert-ブチル、グルタミン酸の α -Meエステル、156で処理して、エステル157を得た。これをTFA/CH₂Cl₂で処理して、前駆体158を得た。

【0508】

2-〔4-〔(2-イソブチリルアミノ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-プテリジン-6-イルメチル)-(2,2,2-トリフルオロアセチル)-アミノ〕-ペンタンジオン酸5-tert-ブチルエステル1-メチルエステル157の合成

代表的な手順において、プテロイン酸前駆体152(2.4g、5mmol)を無水DMF(20mL)に溶解させ、HBTU(1.9g、1当量)、次いでDIPEA(1mL、5当量)を添加し、20分間攪拌した。反応混合物に、アミン塩酸塩156(1.2g、1当量)をDMF溶液(6mL)として添加した。反応をTLCでモニターした(8% MeOH/DCM、PMA染色)。反応混合物のTLCは反応の完了を示した。激しく攪拌しながら、反応混合物をゆっくりと氷の中に入れた。沈殿生成物を濾過して、生成物157を白色の固体(収量=2.85g、86%)として得た。¹H NMR(DMSO-d₆、400MHz) δ =12.33(s, 1H), 11.94(s, 1H), 8.88(s, 1H), 8.82(d, J=7.3Hz, 1H), 7.90(d, J=8.6Hz, 2H), 7.68(d, J=8.4Hz, 2H), 5.22(s, 2H), 4.46-4.40(m, 1H), 3.62(s, 3H), 2.86-2.73(m, 1H), 2

40

50

. 32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H) 2.05–1.90 (m, 2H), 1.35 (m, 9H), 1.12 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6) $\delta = 180.75, 172.13, 171.45, 165.64, 159.10, 154.80, 149.97, 149.79, 147.72, 141.75, 134.15, 130.53, 128.70, 128.49, 117.50, 114.64, 79.79, 51.96, 51.91, 34.96, 31.22, 27.68, 25.71, 18.72$ 。MS: $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_8$ について計算された分子量、計算値 677.63、実測値 676.72 ($\text{M}-\text{H}^-$)。

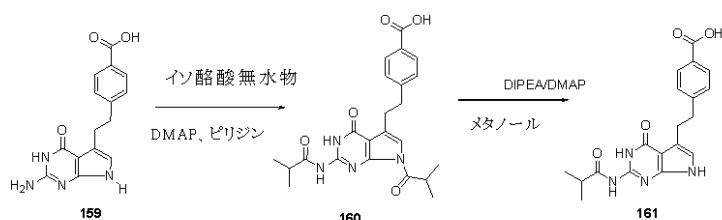
【0509】

2-〔4-〔(2-イソブチルアミノ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-プテリジン-6-イルメチル)-(2,2,2-トリフルオロアセチル)-アミノ〕-ペンタンジオン酸1-メチルエステル158の合成

エステル157 (2g、2.9mmol) をジクロロメタン中の20mLの50% TFAに溶解させ、この溶液を室温で30分間攪拌した後、TLCは出発エステルが完全に消失したことを示した。反応混合物を濃縮し、残渣を CH_2Cl_2 :ヘキサン(2:3)から結晶化し、結晶化した生成物を濾過除去し、乾燥させて、純粋な生成物158 (1.76g、96%) をオフホワイトの粉末として得た。 ^1H NMR (DMSO- d_6 、400MHz) $\delta = 12.32$ (bs, 1H), 11.94 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.84 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.69 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.45–4.41 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 2.78–2.75 (m, 1H), 2.35 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H) 2.07–1.92 (m, 2H), 1.12 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6) $\delta = 180.77, 173.70, 172.19, 165.70, 159.21, 155.54, 149.93, 149.84, 147.75, 141.78, 134.18, 130.53, 128.71, 128.49, 117.51, 114.64, 53.98, 52.06, 51.93, 34.97, 30.11, 25.68, 18.73$ 。MS: $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_8$ について計算された分子量、621.18、実測値 620.18 ($\text{M}-\text{H}^-$)。

【0510】

【化70】



【0511】

160の合成

化合物159 (0.2g、0.000671mol) の無水ピリジン (5mL) 懸濁液に、DMAP (0.13g、0.0010mol)、次いでイソ酪酸無水物 (0.6mL、0.0040mol) を室温で添加した。その後、得られた混合物を4時間還流させた。反応の完了後 (TLCによる)、混合物を氷 HCl /ヘキサン中に入れ、よく攪拌した。得られた固体を濾過し、ヘキサンで洗浄し、さらなる反応に直接使用した。収量 (0.1g、34%)。 ^1H NMR (DMSO、400MHz) : $\delta = 12.08$ (s, 1H), 11.48 (s, 1H), 7.85 (d, 2H), 7.35 (d, 2H), 7.22 (s, 1H), 4.33 (m, 1H), 2.98 (m, 2H), 2.96 (m, 2H), 2.81 (m, 1H), 1.19 (d, 6H), 1.14 (d, 6H)。 ^{13}C NMR (DMSO) : $\delta = 179.85, 175.21, 167.00, 156.64, 147.81$

, 147.34, 146.73, 129.08, 128.32, 128.14, 121.27, 116.00, 106.07, 35.02, 34.51, 33.37, 26.90, 18.72, 18.64。MS (MH)⁺: 439.40。

【0512】

197の合成

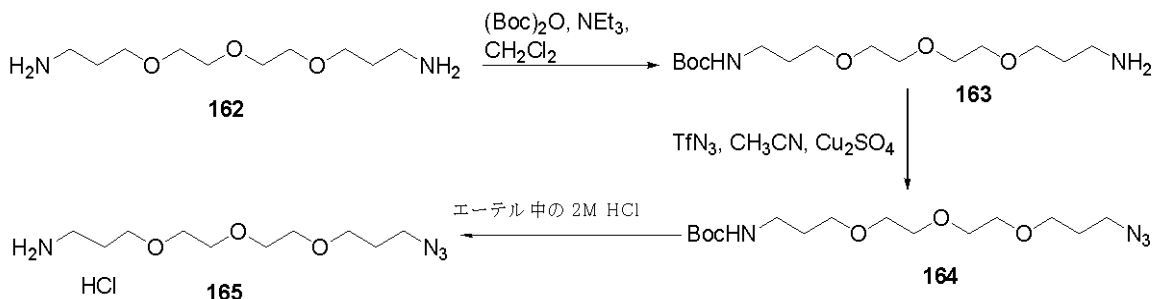
160 (0.4 g、0.00091 mol) の MeOH 攪拌溶液 5 ml に、DIPEA (0.036 mL、0.00278 mol) を室温で添加した。(注: DIPEA の添加後、反応混合物は透明になる。) 10 分後、混合物に DMAP (触媒) を添加した。反応の完了を TLC (& LCMS) でモニターした。その後、MeOH を濃縮し、残渣を水 (5 mL) で希釈した。希 HCl で酸性化した後、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、Na₂SO₄ 上で乾燥させ、濃縮した。粗混合物は十分に純粋であったので、さらなる反応に直接使用した。収量: 260 mg (54%)。¹H NMR (DMSO、400 MHz), δ = 12.77 (bs, 1H), 11.68 (s, 1H), 11.34 (s, 2H), 7.84 (d, 2H), 7.32 (d, 2H), 6.64 (s, 1H), 3.01 (m, 2H), 2.94 (m, 2H), 2.74 (m, 1H), 1.09 (d, 6H)。MS (MH)⁺: 369.10。

【0513】

葉酸コンジュゲートを含むアジド官能基を合成するために、以下の戦略を使用した。アジドアミンテザー 165 は、以下に示すような市販のジアミン 162 から合成した。

【0514】

【化71】



【0515】

アミン 163 の合成

ジアミン (22 g、0.1 mol) のジクロロメタン (300 mL) 溶液に、トリエチルアミン (15 mL) を添加し、混合物を氷浴で冷却した。この冷溶液に、(Boc)₂O の CH₂Cl₂ (100 mL) 溶液を滴下して添加し、混合物を一晩攪拌した。反応混合物を飽和 NaHCO₃ (200 mL)、水 (300 mL)、ブライン (300 mL) で洗浄し、乾燥させた (Na₂SO₄)。この有機層を濃縮した後、カラム精製することによって、純粋なモノ Boc アミン 202 が 55% の収率で得られた。MS: C₁₅H₃₂N₂O₅ の MW 計算値: 320.42; 実測値 321.41 (MH⁺)。

【0516】

アジド 164 の合成

トリフル酸アジド原液を、Tetrahedron Letters 47 (2006) 2382-2385 に報告されている通りに調製した。アミン (0.96 g、3 mmol)、重炭酸ナトリウム (0.85 mg、10 mmol)、および硫酸銅 (II) 五水和物 (22 mg、0.1 mmol) を水 (3 mL) に溶解させた。トリフル酸アジド原液 (5 mL) を添加した後、メタノール (20 mL) を添加すると、均一系が得られた。この青色の混合物を 30 分間攪拌した後、TLC と MS によって、出発アミンが完全に消失したことが示された。反応混合物をロータリーエバポレーター中で濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出液: ジクロロメタン-メタノール) で精製して、純粋なアジド 164 (1 g、96%) をオイルとして得た。MS: C₁₅H₃₀N₄O₅ の MW 計

算値：346.42；実測値347.41 (MH⁺)。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ = 4.68 (bs, 1H), 3.40–3.30 (m, 12H), 3.16 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.00–2.95 (m, 2H), 1.68–1.54 (m, 4H), 1.04 (s, 9H)。

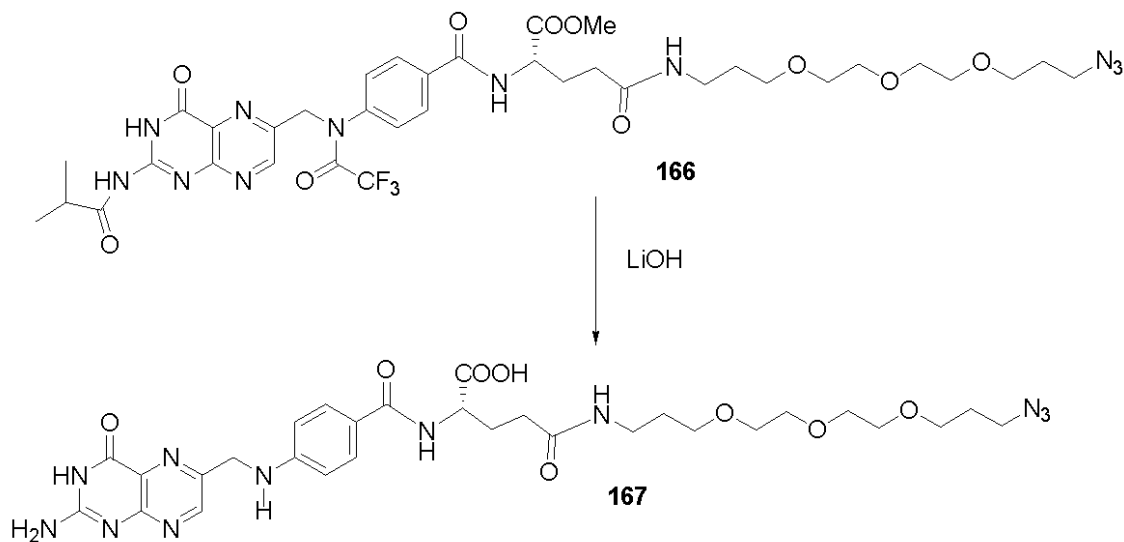
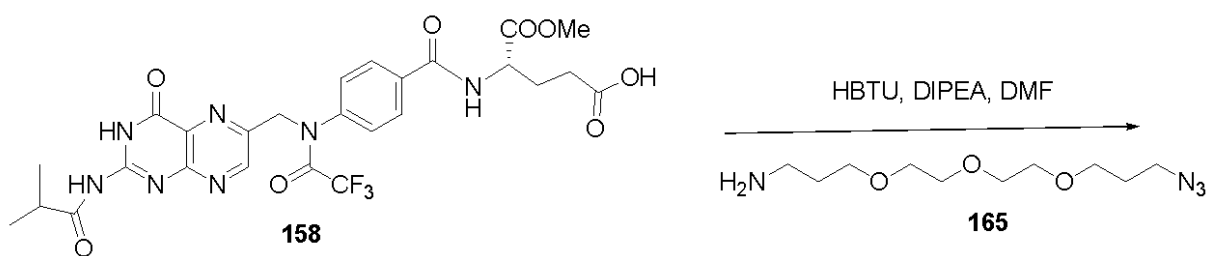
【0517】

165の合成

アジド203 (1 g、2.88 mmol) をエタノール (10 mL) に溶解させ、これにHClの2 Mエーテル溶液を添加し、混合物を室温で一晩攪拌した。MSで出発材料がないことが示された。反応混合物を濃縮し、こうして得られたオイルを、さらに精製することなく、そのまま次の反応に使用した。MS：C₁₀H₂₃ClN₄O₃のMW計算値：246.17；実測値247.17 (MH⁺)。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ = 8.96 (bs, 1H), 7.92 (bs, 2H), 3.52–3.40 (m, 12H), 3.37 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.85–2.77 (m, 2H), 1.81–1.70 (m, 4H)。

【0518】

【化72】



【0519】

アミン165 (0.6 g) と酸158 (1.2 g) との共役によって、共役アジド166 (1.68 g、93%) が淡黄色の泡状物質として得られた。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ = 12.34 (s, 1H), 11.95 (s, 1H), 8.89 (s, 2H), 7.92 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.81 (m, 1H), 7.70 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.40–4.34 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.50–3.31 (m, 15H), 3.09–3.00 (m, 2H), 2.80–2.72 (m, 1H), 2.20 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.10–1.89 (m, 2H), 1.76–1.54 (m, 4H), 1.12 (

d, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 6H)。MS. $\text{C}_{36}\text{H}_{46}\text{F}_3\text{N}_{11}\text{O}_{10}$ について計算された分子量、計算値 849.81、実測値 850.2 (MH^+)。

【0520】

167の合成：

アジド166 (1 g) を THF (20 mL) に溶解させ、そこに水酸化リチウム (2 mL の水中に 100 mg) の水溶液を添加し、この溶液を室温で4時間攪拌した後、MSでSMが完全に消失したことが示された。反応混合物を、酢酸を用いて pH 5 まで酸性化し、RMを酢酸エチル (100 mL) で希釈した。沈殿生成物を濾過除去し、水と酢酸エチルで洗浄し、真空下、40℃で一晩乾燥させて、純粋なアジド167 (0.455 g、55%) をオレンジ色の固体として得た。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$ 、400 MHz) 10

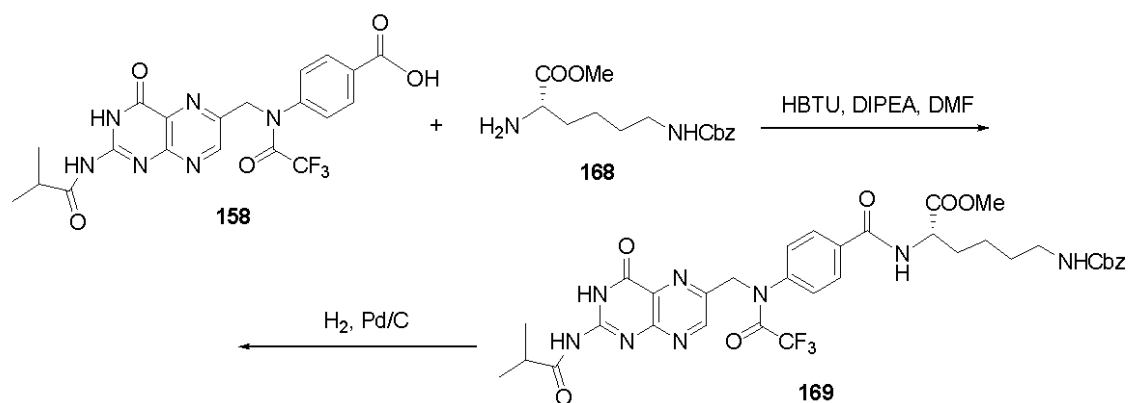
$\delta = 8.59$ (s, 1H), 7.85 (bs, 1H), 7.72 (bs, 1H), 7.56 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H), 6.88 (bs, 1H), 6.65 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H), 4.45 (s, 2H), 4.00–4.02 (m, 1H), 3.50–3.33 (m, 14H), 3.04–3.00 (m, 2H), 2.07–1.83 (m, 4H), 1.76–1.54 (m, 4H)。MS. $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_{11}\text{O}_8$ について計算された分子量、計算値 669.69、実測値 668.2 ($\text{M}-\text{H}^-$)。

【0521】

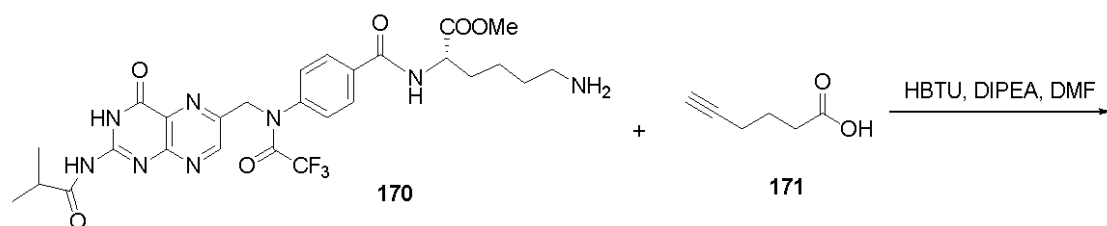
別の実施形態では、葉酸を含有するアルキンを以下のように合成する。この場合には、保護プテロイン酸158を保護リジン168と共役させて、共役生成物169を得た。これは、Cbz脱保護されるとアミン170を生じた。このアミン170を酸171と共役させることによって、共役生成物172を得た。これを精製し、脱保護した後、以下に記載される生成物173が得られた。 20

【0522】

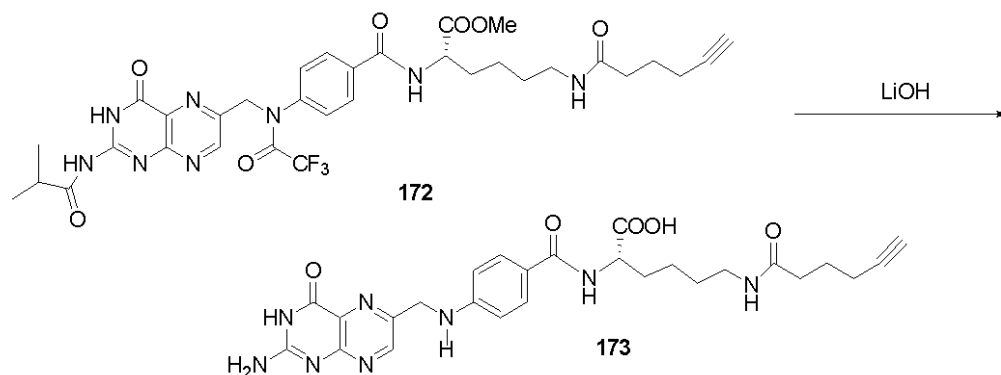
【化 7 3】



10



20



30

【0 5 2 3】

169の合成：

166の合成に使用したのと同様の手順を用いて、酸158をリジン誘導体168と共役させることによって、共役生成物169を白色の固体として95%の収率で得た。

【0 5 2 4】

170の合成：

化合物169をPd/Cで水素化することによって、脱保護アミン170を黄色の固体として得た。

【0 5 2 5】

172の合成：

166の合成に使用したのと同様の手順を用いて、アミン170を酸171と共役させることによって、共役生成物172を高い収率で得た。

【0 5 2 6】

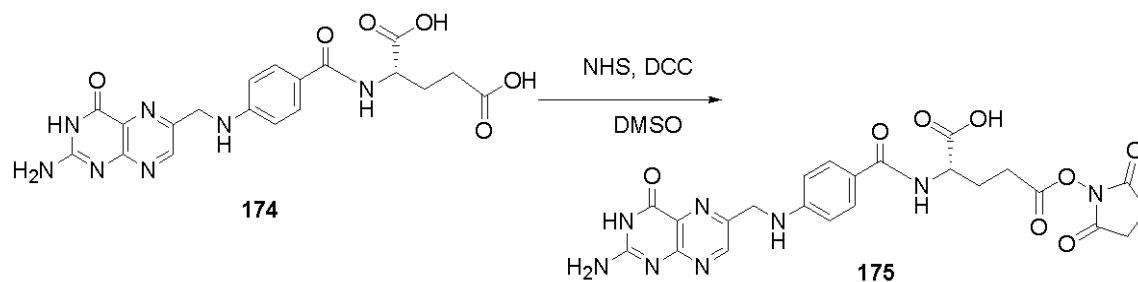
173の合成：

167の合成について記載されたものと同様の手順を用いて、保護基の脱保護を達成し、完全に脱保護されたアルキン173を単離した。

【0 5 2 7】

40

【化 7 4】



10

【0528】

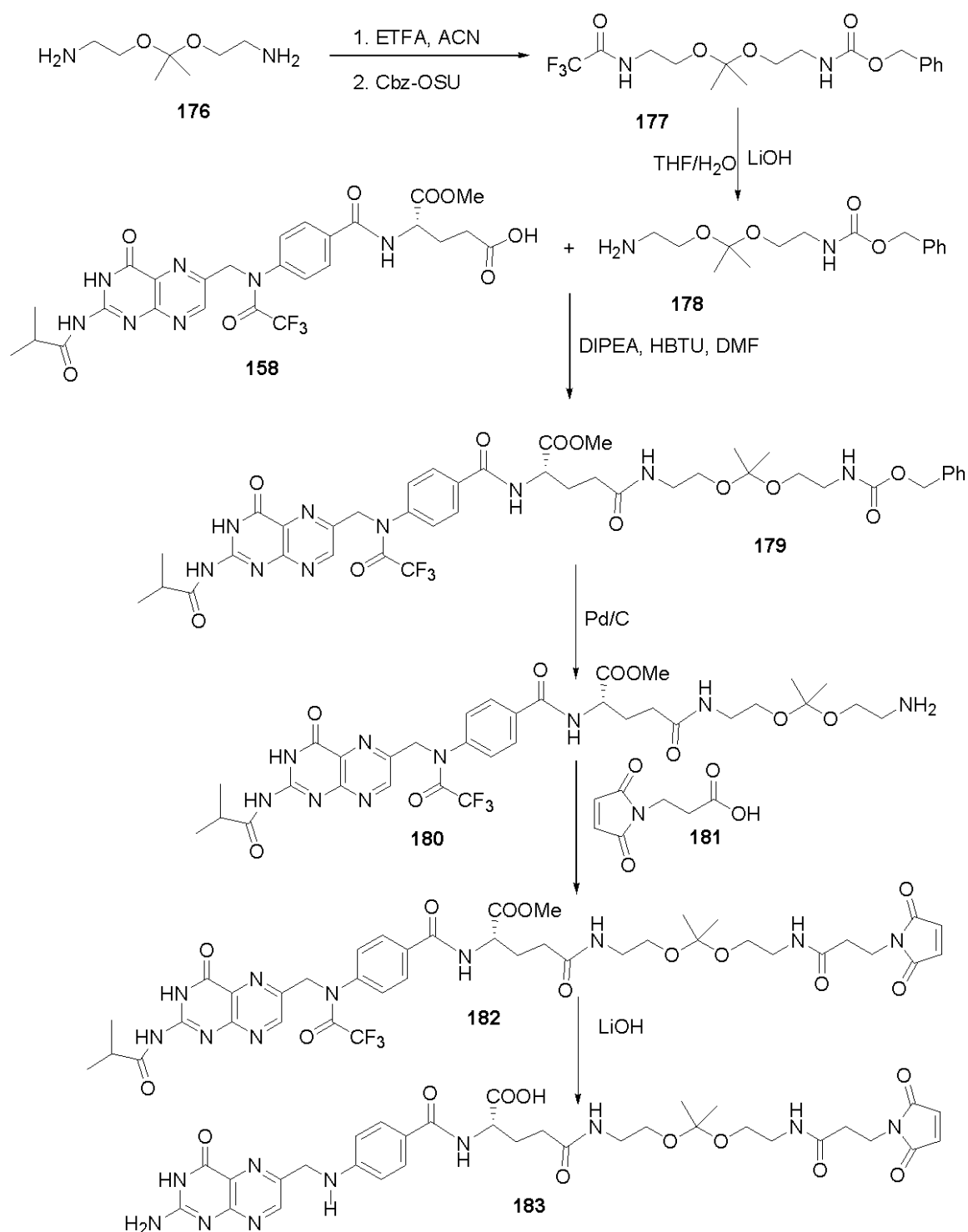
175の調製

葉酸174をDCC、次いでN-ヒドロキシスクシニミドで処理することによって、活性化エステル175を80%の収率で得た。典型的な手順において、葉酸（5g、11.33mmol）を無水DMSO（100mL）に溶解させ、この溶液にトリエチアミン（2.5mL）、DCC（4.7g、22.6mmol）、およびN-ヒドロキシスクシニミド（2.6g、22.6mmol）を添加し、この溶液を室温暗所で18時間攪拌した。反応混合物を濾過し、濾過液にEtOAc（1L）を添加し、沈殿生成物を濾過し、酢酸エチル（500mL）、エーテル（200mL）で洗浄し、真空下で乾燥させて、生成物を黄色の粉末として単離した。HPLCにより、生成物の純度が83%であることが

20

【0529】

【化 7 5】



【0530】

183の調製

報告されている手順 (Paramonov, S. E. ; Bachelder, E. M. ; Beaudette, T. T. ; Standley, S. M. ; Lee, C. C. ; Dashe, J. ; Frechet, Jean M. J. Fully Acid-Degradable Biocompatible Polyacetal Microparticles for Drug Delivery. Bioconjugate Che

mistry (2008), 19(4), 911-919)を用いて、ケタール176を合成した。このケタールの一時的な保護を、2ステップのワンポット法で、初めにこのジアミンを1当量のエチルトリフルオロ酢酸で処理し、次いで1当量のCbz-OSuで処理することによって行ない、カラム精製後に、ジ保護された誘導体177を80%の収率で得た。保護アミン177を水性LiOHで処理することによって、アミン178を定量的な収率で得た。このアミン178(0.5g)を、保護葉酸158(1g)と共役させることによって、共役生成物179(1.1g)を得、これを水素化することによって、アミン180を定量的な収率で得た。マレイミドプロピオン酸181を用いてアミン180の共役を行なうと、共役生成物182が良好な収率で生じた。THF中の氷冷した水性LiOHを用いて、182の全ての保護基の最終的な脱保護を行ない、前駆体183をオレンジ色の固体として得た。

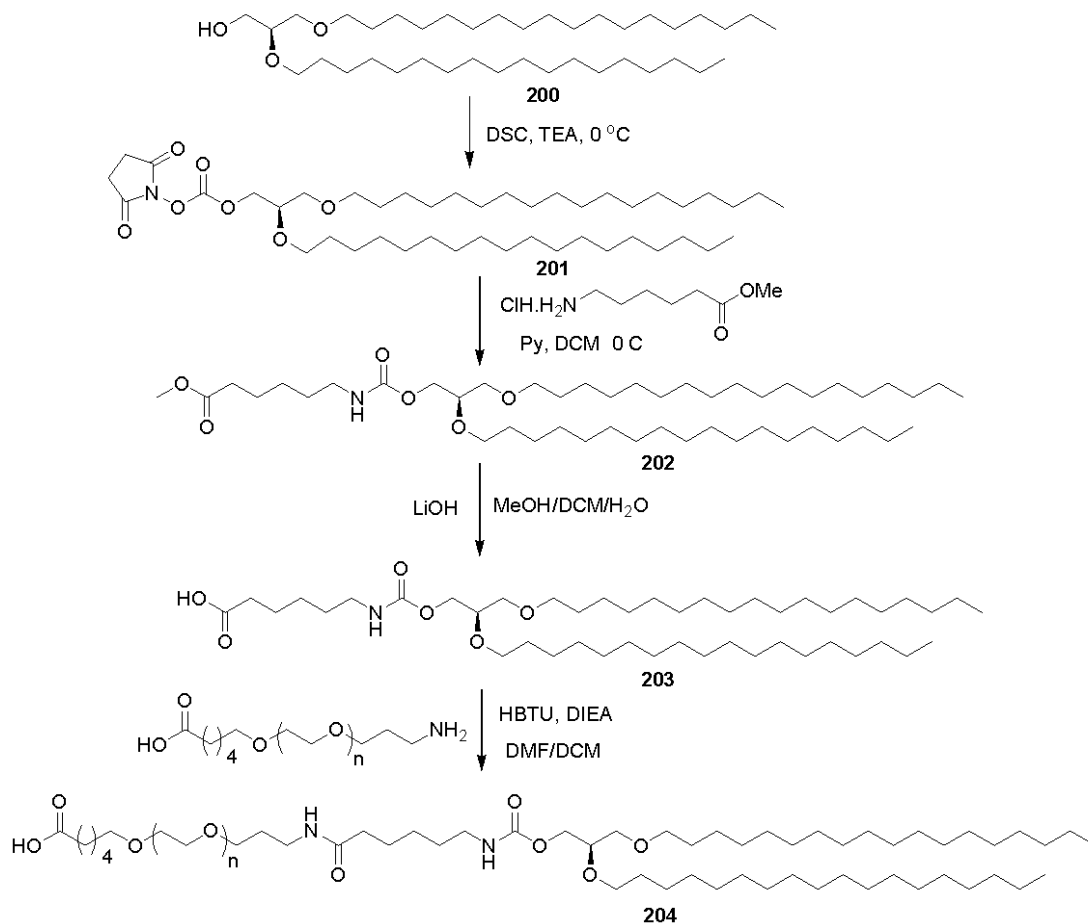
10

【0531】

実施例3. 脂質コンジュゲートの合成

【0532】

【化76】



20

30

40

【0533】

201の調製:

1, 2-ジオクタデシルsnグリセロール(8.50g、14.23mmol)とDSC(5.47g、1.5当量)をDCM(100mL)に溶解させ、氷水浴で冷却した。トリエチルアミン(6.00mL、44mmol)を添加し、混合物を一晩攪拌した。混合物を分液漏斗に移し、DCMで希釈し、重炭酸溶液と水で洗浄した。DCM層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を除去し、残渣を高真空下で一晩乾燥させた。これを、さらに精製することなく、次の反応で使用した(収量、11.50g)。

【0534】

50

202の調製：

化合物201 (4.00 g、5.42 mmol) と6-アミノヘキサン酸塩化物 (1.477 g、1.5当量) をDCMに溶解させ、氷浴で冷却した。混合物にピリジン (5 mL) を添加し、一晩攪拌した。溶媒を除去し、残渣を高真空下で乾燥させた。残渣をジクロロメタンで抽出し、重炭酸と水で洗浄した。粗生成物をクロマトグラフィー (EtOAc/ヘキサンの勾配溶出) で精製して、所要の生成物202 (収量-3.80 g、91%) を得た。MS: $C_{47}H_{93}NO_6$ の計算値767.70; 実測値768.68 (M+H)。

【0535】

203の調製：

化合物202 (4.50 g、5.86 mmol) をTHF/MeOH/水 (2:2:1) の混合物に溶解させ、氷浴で冷却した。LiOH (1.23 g、5当量) を添加し、混合物を一晩攪拌した。TLCで確認し、混合物をAcOHで中和した。溶媒を除去し、残渣をジクロロメタンで抽出し、水で洗浄した。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィーで精製して、所要の化合物を白色の固体として得た (収量、4.32 g、97%)。MS: $C_{46}H_{91}NO_6$ の計算値753.68; 実測値752.70 (M-H)。

【0536】

204の調製：

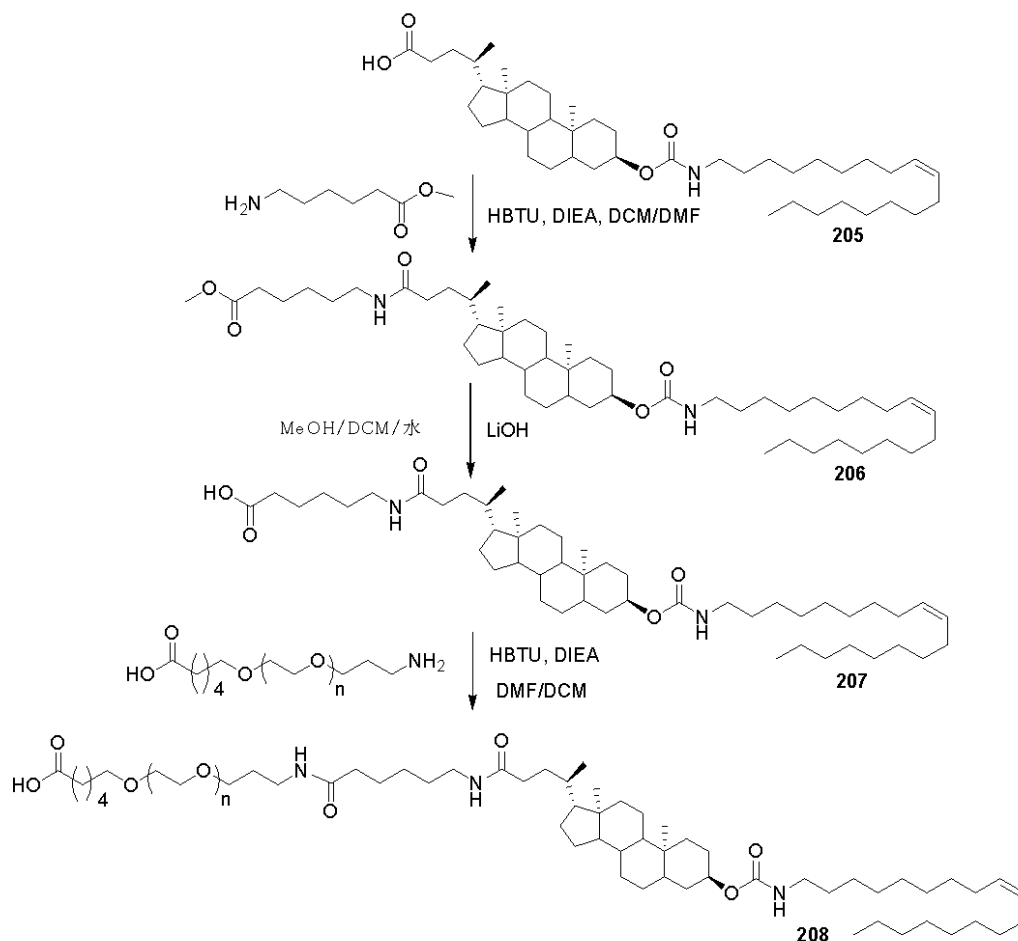
化合物203 (0.832 g、1.10 mmol) とHBTU (0.461 g、1.21 mmol) をDCM/DMFの混合物に溶解させ、そこにDIEA (0.573 mL) を添加し、混合物を5分間攪拌した。PEGアミノ酸 (2.00 g、0.921 mmol) を添加し、混合物を一晩攪拌した。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー (酢酸エチル、次に5%-10%のMeOH/DCM) で精製し、所要の生成物を得た (2.58 g、95%)。MSで計算された平均分子量2700-2900、実測値2720-2960。

【0537】

10

20

【化 7 7】



10

20

【0538】

206の調製:

30

化合物205 (2.11 g、3.15 mmol) とメチルアミノヘキサン酸塩 (0.688 g、1.2 当量) をDMF/DCM (50 mL) の混合物に溶解させた。そこにHBTU (1.31 g、1.05 当量) とDIEA (2 mL、過剰) を添加した。混合物を周囲温度で一晩攪拌した。混合物を氷と水の混合物中に注ぎ入れ、エーテルで抽出した。エーテル層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィーで精製して、所要の生成物206を得た (収量-2.27 g、90%)。

【0539】

207の調製:

40

化合物206 (2.25 g、2.925 mmol) をTHF/MeOH/水 (50 mL、2:2:1) の混合物に溶解させ、氷浴で冷却した。LiOH (0.614 g、5 当量) を添加し、混合物を一晩攪拌した。TLCで確認し、混合物をAcOHで中和した。溶媒を除去し、残渣をジクロロメタンで抽出し、水で洗浄した。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィーで精製して、所要の化合物を白色の固体として得た (収量、2.12 g、96%)。MS: $\text{C}_{49}\text{H}_{86}\text{N}_2\text{O}_5$ の計算値782.65; 実測値781.70 (M-H)。

【0540】

208の調製:

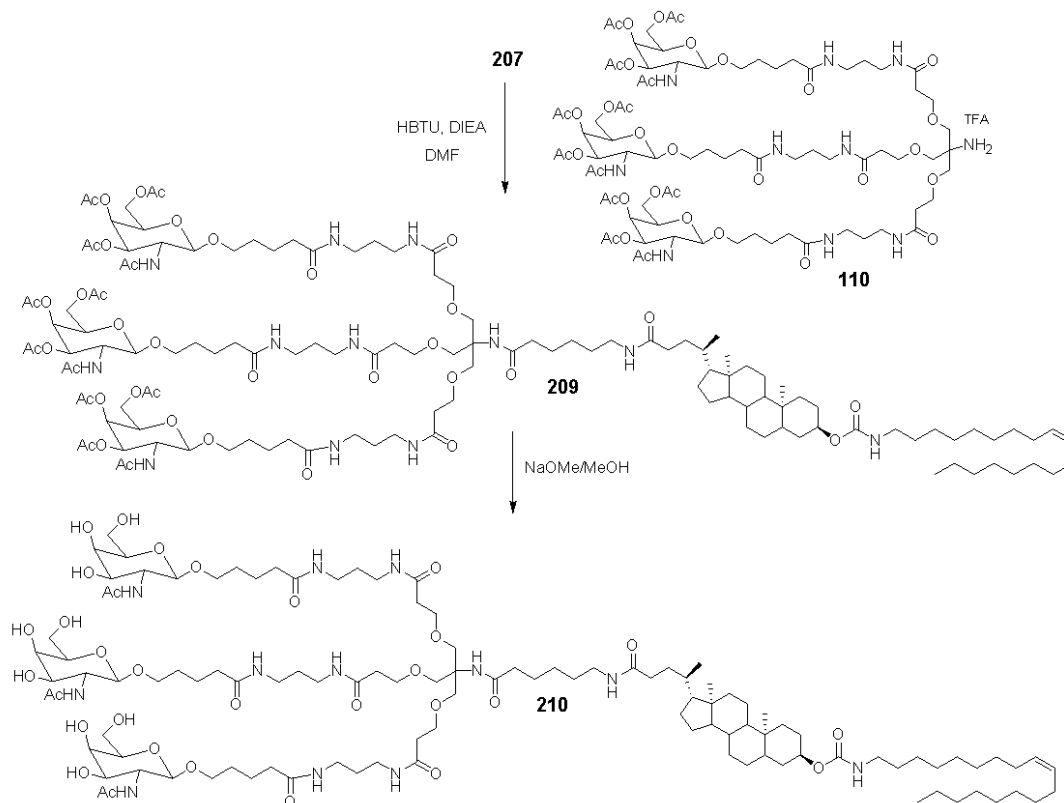
50

化合物207 (0.865 g、1.10 mmol) とHBTU (0.461 g、1.21 mmol) をDCM/DMFの混合物に溶解させ、そこにDIEA (0.573 mL) を添加し、混合物を5分間攪拌した。PEGアミノ酸 (2.00 g、0.921 mmol)

）を添加し、混合物を一晩攪拌した。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー（酢酸エチル、次に5%－12%のMeOH／DCM）で精製して、所要の生成物を得た（1.60g、59%）。MSで計算された平均分子量2750－2950；実測値2730－2970。

【0541】

【化78】



【0542】

209の調製：

化合物207（0.994g、1.269mmol）とHBTU（0.505g、1.05当量）をDCM／DMFの混合物に溶解させ、そこにDIEA（0.660mL）を添加し、混合物を5分間攪拌した。GalNAcアミン（2.00g、1.057mmol）の溶液を添加し、混合物を一晩攪拌した。TLCで確認し、溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー（DCM、酢酸エチル、次に5%－20%のMeOH／DCM）で精製して、所要の生成物を得た（1.83g、68%）。MS：C₁₂₈H₂₁₂N₁₂O₄₀の計算値2557.49；実測値2579.94（M+Na）。

【0543】

210の調製：

化合物209（0.506g、0.1978mmol）をMeOH／DCM（10mL、2：1）の混合物に溶解させ、そこにNaOMe（4mL、0.5MのMeOH溶液）を添加し、混合物を一晩攪拌した。反応をTLCでモニターした。酢酸を用いて、pHを5～6に合わせた。溶媒を除去し、残渣をMeOHに溶解させ、カチオン交換樹脂に通した。溶媒を除去し、残渣をEtOHに溶解させ、0.2μmフィルターに通して濾過した。残渣を高真空下、40℃で2日間乾燥させて、所要の化合物を粘性の液体として得た（0.407g、92%）。MS：C₁₁₀H₁₉₄N₁₂O₃₁の計算値2179.40；実測値2202.32（M+Na）。

【0544】

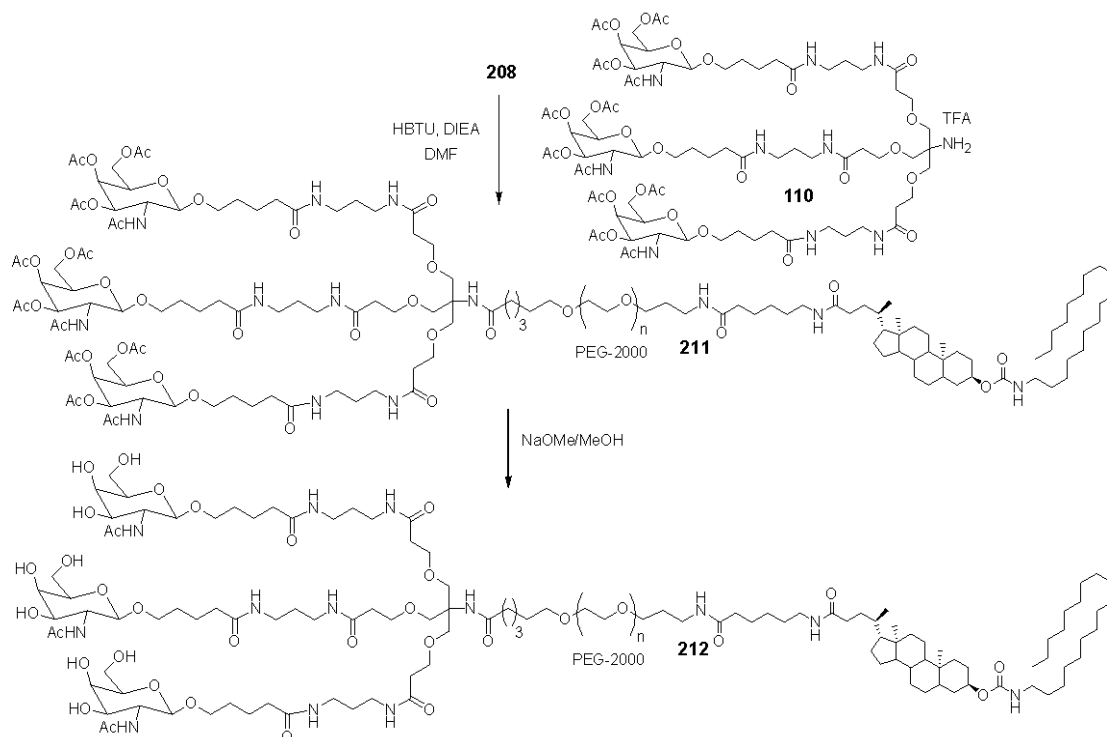
10

20

30

40

【化 7 9】



10

20

【0545】

211の調製：

化合物208（1.51g、0.514mmol）とHBTU（0.195g、0.514当量）をDCM/DMFの混合物に溶解させ、そこにDIEA（0.268mL）を添加し、混合物を5分間攪拌した。GalNAcアミン（0.971g、0.514mmol）の溶液を添加し、混合物を一晩攪拌した。TLCで確認し、溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー（DCM、酢酸エチル、次に5%–20%のMeOH/DCM）で精製して、所要の生成物を得た（1.92g、78%）。MSで計算された平均分子量4600–4900；実測値4600–4900。

30

【0546】

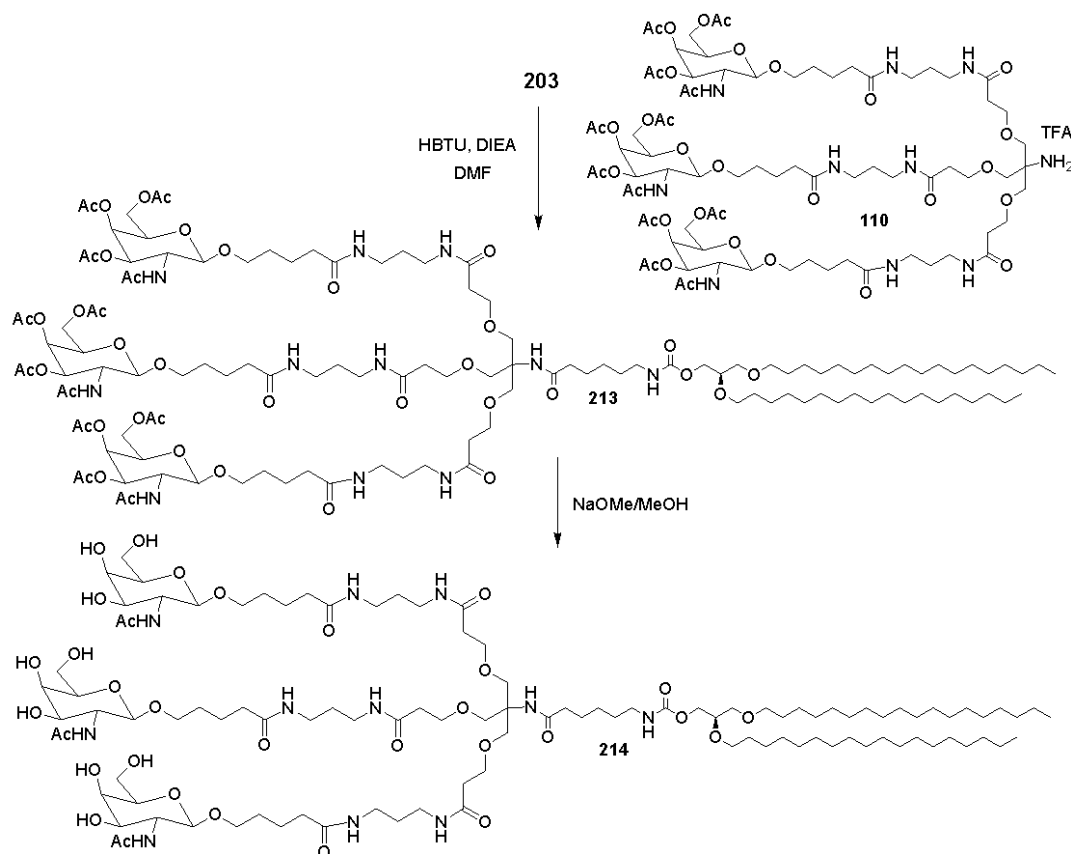
210の調製：

化合物209（0.503g、0.106mmol）をMeOH/DCM（10mL、2：1）の混合物に溶解させ、そこにNaOMe（2mL、0.5MのMeOH溶液）を添加し、混合物を一晩攪拌した。反応をTLCでモニターした。酢酸を用いて、pHを5～6に合わせた。溶媒を除去し、残渣をMeOHに溶解させ、カチオン交換樹脂に通した。溶媒を除去し、残渣をEtOHに溶解させ、0.2μmフィルターに通して濾過した。残渣を高真空下、40℃で2日間乾燥させて、所要の化合物を白色の固体として得た（0.420g、92%）。MSで計算された平均分子量4200–4500；実測値4200–4500。

40

【0547】

【化 8 0】



10

20

【0548】

213の調製：

化合物203 (0.956 g、1.268 mmol) と HBTU (0.505 g、1.33 mmol) を DCM/DMF の混合物に溶解させ、そこに DIEA (0.661 mL) を添加し、混合物を5分間攪拌した。GalNAcアミン (2.00 g、1.057 mmol) の溶液を添加し、混合物を一晩攪拌した。TLCで確認し、溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー (DCM、酢酸エチル、次に5%–20%のMeOH/DCM) で精製して、所要の生成物を得た (1.78 g、67%)。MS: $C_{125}H_{217}N_{11}O_{41}$ の計算値 2528.52; 実測値 2551.48 (M+Na)。

30

【0549】

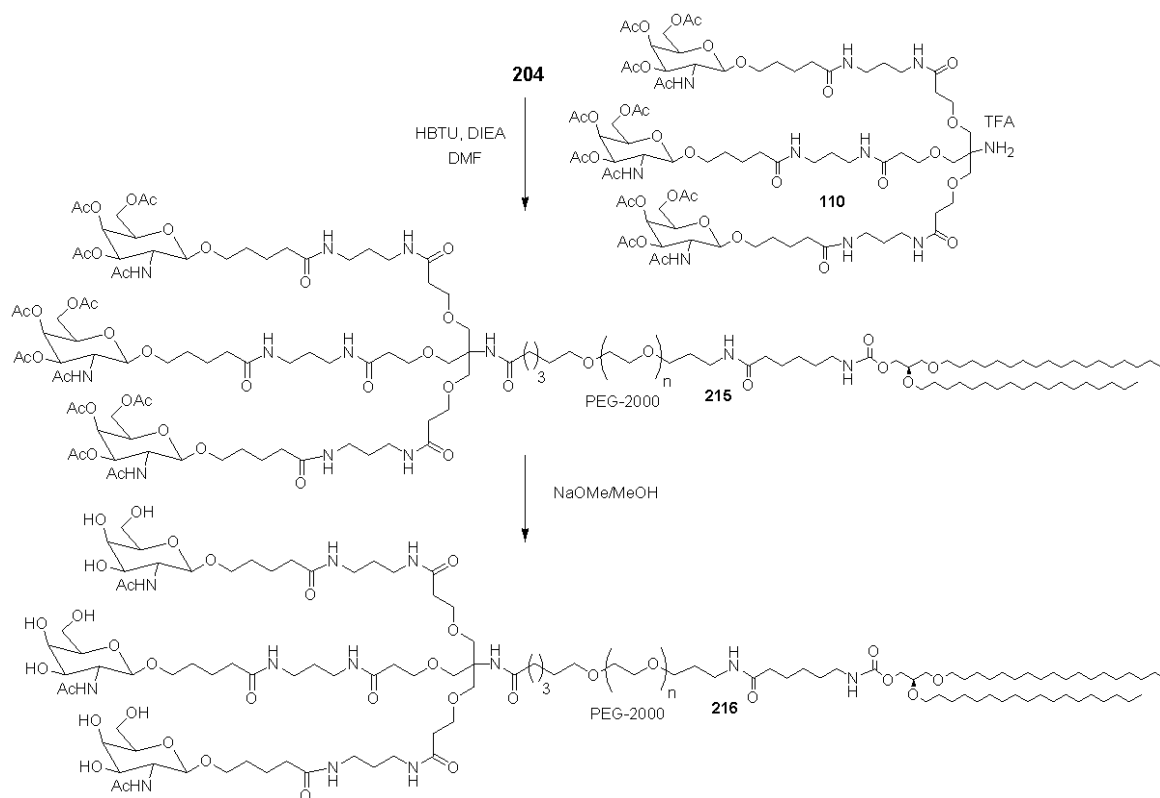
214の調製：

化合物213 (0.518 g、0.205 mmol) を MeOH/DCM (10 mL、2:1) の混合物に溶解させ、そこに NaOMe (4 mL、0.5 M の MeOH 溶液) を添加し、混合物を一晩攪拌した。反応を TLC でモニターした。酢酸を用いて、pH を 5~6 に合わせた。溶媒を除去し、残渣を MeOH に溶解させ、カチオン交換樹脂に通した。溶媒を除去し、残渣を EtOH に溶解させ、0.2 μm フィルターに通して濾過した。残渣を高真空下、40℃で2日間乾燥させて、所要の化合物を白色の固体として得た (0.360 g、86%)。MS: $C_{107}H_{199}N_{11}O_{32}$ の計算値 2150.43; 実測値 2173.31 (M+Na)。

40

【0550】

【化 8 1】



10

20

【0551】

215の調製：

化合物204（2.58g、0.880mmol）とHBTU（0.333g、0.880mmol）をDCM/DMFの混合物に溶解させ、そこにDIEA（0.463mL）を添加し、混合物を5分間攪拌した。GalNAcアミン（1.679g、0.514mmol）の溶液を添加し、混合物を一晩攪拌した。TLCで確認し、溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー（DCM、酢酸エチル、次に5%–20%のMeOH/DCM）で精製して、所要の生成物を得た（2.30g、55%）。MSで計算された平均分子量4500–4800；実測値4500–4800。

30

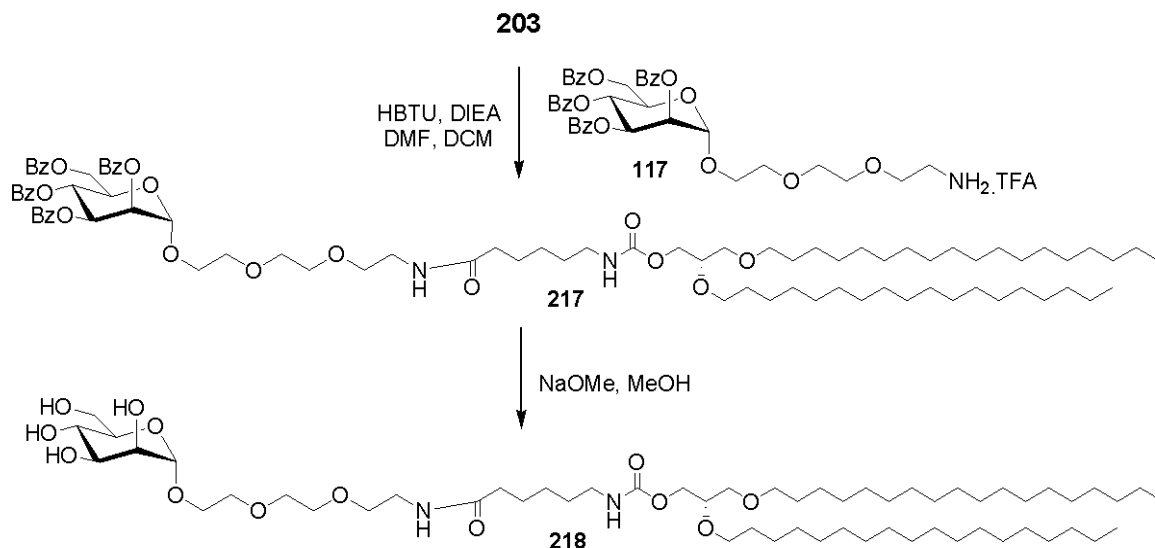
216の調製：

化合物215（0.545g、0.115mmol）をMeOH/DCM（10mL、2：1）の混合物に溶解させ、そこにNaOMe（2mL、0.5MのMeOH溶液）を添加し、混合物を一晩攪拌した。反応をTLCでモニターした。酢酸を用いて、pHを5～6に合わせた。溶媒を除去し、残渣をMeOHに溶解させ、カチオン交換樹脂に通した。溶媒を除去し、残渣をEtOHに溶解させ、0.2μmフィルターに通して濾過した。残渣を高真空下、40℃で2日間乾燥させて、所要の化合物を白色の固体として得た（0.339g、68%）。MSで計算された平均分子量4200–4500；実測値4200–4500。

40

【0552】

【化 8 2】



10

【0553】

217の調製：

20

化合物203（1.099 g、1.45 mmol）とHBTU（0.550 g、1.45 mmol）をDCM/DMFの混合物に溶解させ、そこにDIEA（1.26 mL）を添加し、混合物を5分間攪拌した。マンノースアミン（1.47 g、1.2当量）の溶液を添加し、混合物を一晩攪拌した。TLCで確認し、溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー（50%–80%の酢酸エチル/ヘキサン、次に酢酸エチル）で精製して、所要の生成物を得た（1.90 g、89%）。MS：C₈₆H₁₃₀N₂O₁₇の計算値1462.94；実測値1463.95（M+H）。

【0554】

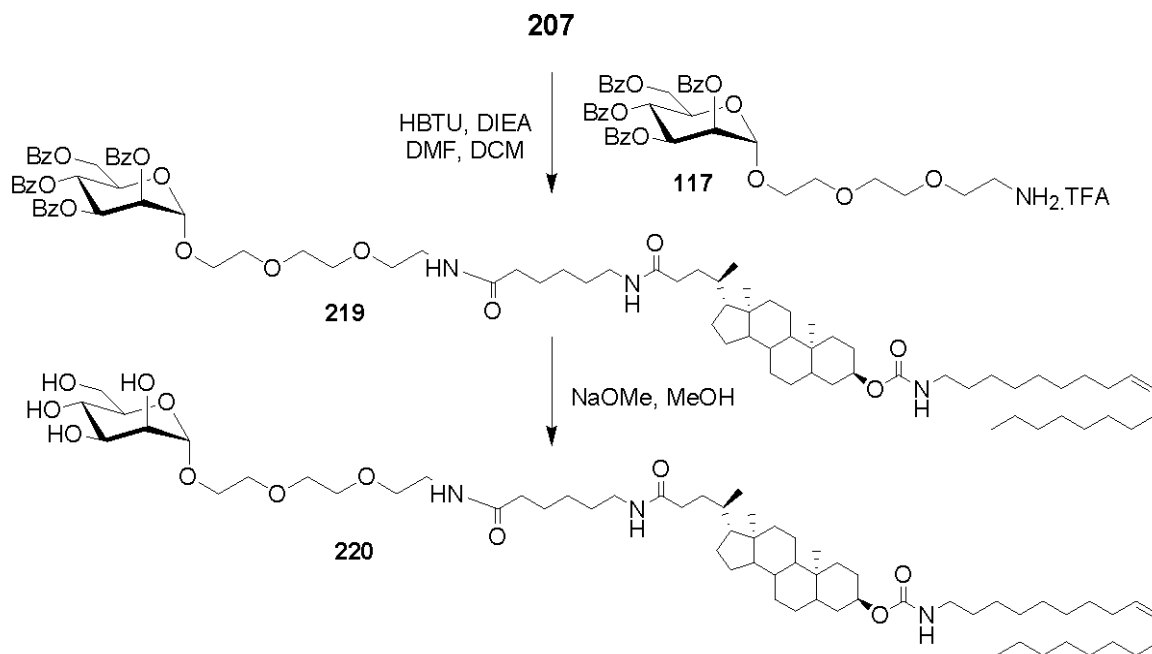
218の調製：

30

化合物217（1.87 g、1.27 mmol）をMeOH/DCM（10 mL、2：1）の混合物に溶解させ、そこにNaOMe（12 mL、0.5 MのMeOH溶液）を添加し、混合物を一晩攪拌した。反応をTLCでモニターした。5 mLのNaOMe溶液を再び添加し、さらに24時間攪拌を続けた。溶媒を除去し、残渣をMeOH/DCMに溶解させ、カチオン交換樹脂に通した。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー（5%–10%のMeOH/DCM）で精製した。残渣を高真空下、40℃で2日間乾燥させて、所要の化合物を白色の固体として得た（0.567 g、42%）。MS：C₅₈H₁₁₄N₂O₁₃の計算値1046.83；実測値1069.80（M+Na）。

【0555】

【化 8 3】



10

20

【0556】

219の調製：

化合物207（1.039g、1.32mmol）とHBTU（0.510g、1.339mmol）をDCM／DMFの混合物に溶解させ、そこにDIEA（1.15mL）を添加し、混合物を5分間攪拌した。マンノースアミン（1.338g、1.2当量）の溶液を添加し、混合物を一晩攪拌した。TLCで確認し、溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー（50％－80％の酢酸エチル／ヘキサン、次に酢酸エチル、次に5％のMeOH／DCM）で精製して、所要の生成物を得た（1.63g、83％）。MS：C₈₉H₁₂₅N₃O₁₆の計算値1491.91；実測値1515.01（M+Na）。

【0557】

220の調製：

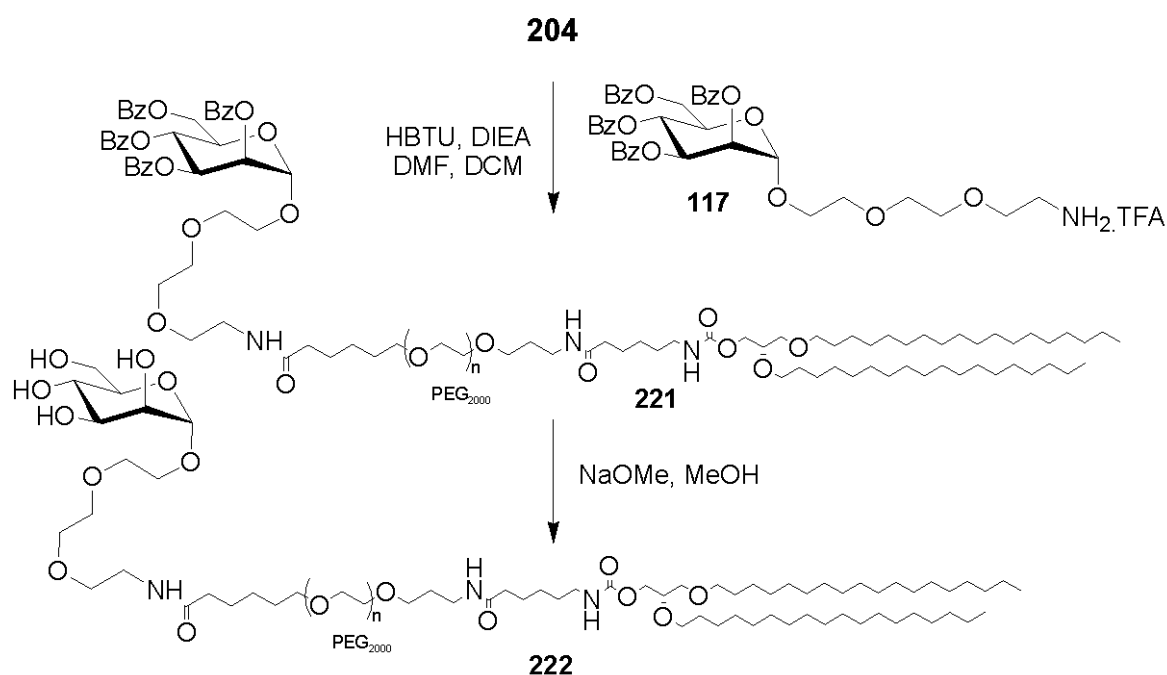
化合物219（1.55g、1.038mmol）をMeOH／DCM（10mL、2：1）の混合物に溶解させ、そこにNaOMe（10mL、0.5MのMeOH溶液）を添加し、混合物を一晩攪拌した。反応をTLCでモニターした。5mLのNaOMe溶液を再び添加し、さらに24時間攪拌を続けた。溶媒を除去し、残渣をMeOH／DCMに溶解させ、カチオン交換樹脂に通した。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー（まず50％のEtOAc／ヘキサン、EtOAc、次に5％－10％のMeOH／DCMで溶出）で精製した。残渣を高真空下、40℃で2日間乾燥させて、所要の化合物を白色の固体として得た（0.616g、55％）。MS：C₆₁H₁₀₉N₃O₁₂の計算値1075.80；実測値1098.81（M+Na）。

30

40

【0558】

【化 8 4】



10

20

【0559】

221の調製：

化合物204（1.17g、0.402mmol）とHBTU（0.168g、0.442mmol）をDCM/DMFの混合物に溶解させ、そこにDIEA（0.420mL）を添加し、混合物を5分間攪拌した。マンノースアミン（0.406g、0.482mmol）の溶液を添加し、混合物を一晩攪拌した。TLCで確認し、溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー（酢酸エチル、次に3%–10%のMeOH/DCM）で精製して、所要の生成物を得た（1.10g、75%）。MSで計算された平均分子量3400–3800；実測値3400–3800。

30

【0560】

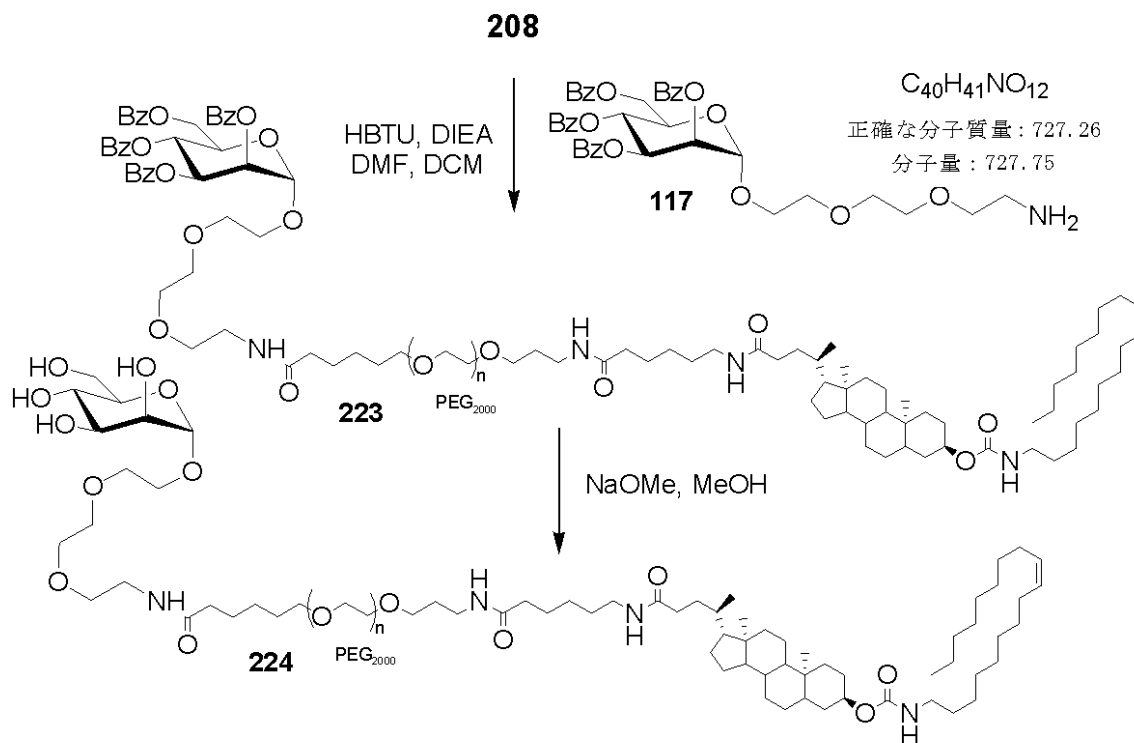
222の調製：

化合物221（0.952g、0.263mmol）をMeOH/DCM（10mL、2：1）の混合物に溶解させ、そこにNaOMe（3mL、0.5MのMeOH溶液）を添加し、混合物を一晩攪拌した。反応をTLCでモニターした。2mLのNaOMe溶液を再び添加し、さらに24時間攪拌を続けた。溶媒を除去し、残渣をMeOH/DCMに溶解させ、カチオン交換樹脂に通した。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー（まずEtOAc、次いで5%–20%のMeOH/DCMで溶出）で精製した。残渣を高真空下、40℃で2日間乾燥させて、所要の化合物を白色の固体として得た（0.50g、59%）。MSで計算された平均分子量3100–3400；実測値3100–3400。

40

【0561】

【化 8 5】



10

20

【0562】

223の調製:

化合物208 (1.14 g、0.388 mmol) と HBTU (0.162 g、0.426 mmol) を DCM/DMF の混合物に溶解させ、そこに DIEA (0.405 mL) を添加し、混合物を5分間攪拌した。マンノースアミン (0.392 g、0.466 mmol) の溶液を添加し、混合物を一晩攪拌した。TLCで確認し、溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー (酢酸エチル、次に3%–10%のMeOH/DCM) で精製して、所要の生成物を得た (1.30 g、92%)。MSで計算された平均分子量 3400–3800; 実測値 3400–3800。

30

【0563】

224の調製:

化合物223 (1.303 g、0.357 mmol) を MeOH/DCM (10 mL、2:1) の混合物に溶解させ、そこに NaOMe (3.5 mL、0.5 M の MeOH 溶液) を添加し、混合物を一晩攪拌した。反応を TLC でモニターした。2 mL の NaOMe 溶液を再び添加し、さらに24時間攪拌を続けた。溶媒を除去し、残渣を MeOH/DCM に溶解させ、カチオン交換樹脂に通した。溶媒を除去し、残渣をクロマトグラフィー (まず EtOAc、次いで5%–20%のMeOH/DCMで溶出) で精製した。残渣を高真空下、40℃で2日間乾燥させて、所要の化合物を白色の固体として得た (0.456 g、40%)。MSで計算された平均分子量 3100–3400; 実測値 3100–3400。

40

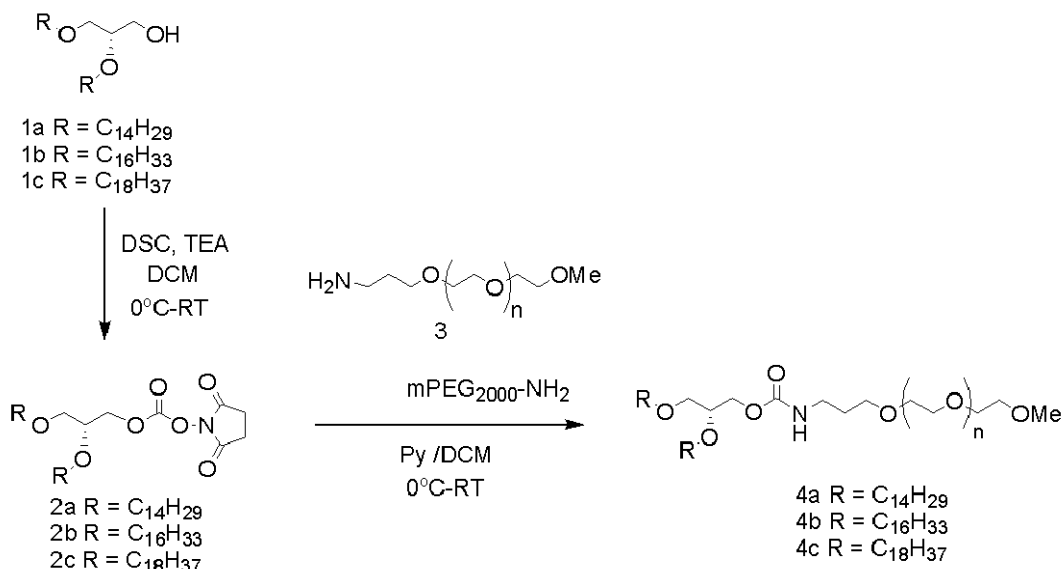
【0564】

実施例4: mPEG2000-1, 2-ジ-*O*-アルキル-sn3-カルボモイルグリセリド (PEG-DMG) の合成

PEG-脂質、例えば、mPEG2000-1, 2-ジ-*O*-アルキル-sn3-カルボモイルグリセリド (PEG-DMG) を以下の手順を用いて合成した。

【0565】

【化 8 6】



10

^a スキーム 1 : mPEG2000-1, 2-ジ-O-アルキル-sn-3-カルボモイルグリセリド

【0566】

化合物 228a の調製 :

20

1, 2-Di-O-テトラデシル-sn-グリセリド 225a (30 g、61.80 mmol) と N, N'-スクシニミジルカルボネート (DSC、23.76 g、1.5 当量) をジクロロメタン (DCM、500 mL) の中に入れ、氷水混合物上で攪拌した。攪拌溶液にトリエチルアミン (25.30 mL、3 当量) を添加し、その後、反応混合物を周囲温度で一晩攪拌した。反応の進行を TLC でモニターした。反応混合物を DCM (400 mL) で希釈し、有機層を水 (2 × 500 mL)、NaHCO₃ 水溶液 (500 mL) で洗浄した後、標準的な後処理を行なった。得られた残渣を、高真空下、周囲温度で一晩乾燥させた。乾燥後、こうして得られた粗カルボネート 226a をジクロロメタン (500 mL) に溶解させ、氷浴上で攪拌した。この攪拌溶液に、mPEG₂₀₀₀-NH₂ (227、103.00 g、47.20 mmol、NOF Corporation, Japan から購入) と無水ピリジン (80 mL、過剰) をアルゴン下で添加した。一実施形態では、メトキシ-(PEG)-x-アミンは、x = 45 ~ 49、好ましくは 47 ~ 49、およびより好ましくは 49 である。その後、反応混合物を周囲温度で一晩攪拌した。溶媒と揮発性物質を真空下で除去し、残渣を DCM (200 mL) に溶解させ、酢酸エチル中に詰められたシリカゲルのカラムに充填した。このカラムをまず酢酸エチルで溶出し、その後、ジクロロメタン中の 5% - 10% のメタノール勾配で溶出して、所望の PEG-脂質 228a を白色の固体として得た (105.30 g、83%)。¹H NMR (CDCl₃、400 MHz) δ = 5.20 - 5.12 (m, 1H), 4.18 - 4.01 (m, 2H), 3.80 - 3.70 (m, 2H), 3.70 - 3.20 (m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 2.10 - 2.01 (m, 2H), 1.70 - 1.60 (m, 2H), 1.56 - 1.45 (m, 4H), 1.31 - 1.15 (m, 48H), 0.84 (t, J = 6.5 Hz, 6H)。MS 範囲; 実測値: 2660 - 2836。

30

40

【0567】

228b の調製 :

1, 2-ジ-O-ヘキサデシル-sn-グリセリド 225b (1.00 g、1.848 mmol) と DSC (0.710 g、1.5 当量) をジクロロメタン (20 mL) 中に入れて、氷水混合物中で 0°C まで冷却した。そこにトリエチルアミン (1.00 mL、3 当量) を添加し、一晩攪拌した。反応物を TLC にかき、DCM で希釈し、水 (2 回)、NaHCO₃ 溶液で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を減圧下で除去し、残渣 226b を高真空下で一晩除去した。この化合物を、さらに精製することなく、次の

50

反応に直接使用した。MPEG₂₀₀₀-NH₂ 227 (1.50 g、0.687 mmol、NOF Corporation, Japanから購入)と前の工程からの化合物226b (0.702 g、1.5当量)をアルゴン下でジクロロメタン(20 mL)に溶解させた。反応物を0℃に冷却した。そこにピリジン(1 mL、過剰)を添加し、一晚撹拌した。反応をTLCでモニターした。溶媒と揮発性物質を真空下で除去し、残渣をクロマトグラフィー(溶出勾配として、まず酢酸エチル、次に5%–10%のMeOH/DCM)で精製して、所要の化合物228bを白色の固体として得た(1.46 g、76%)。¹H NMR(CDCl₃、400 MHz) δ = 5.17 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 4.13 (dd, J = 4.00 Hz, 11.00 Hz, 1H), 4.05 (dd, J = 5.00 Hz, 11.00 Hz, 1H), 3.82–3.75 (m, 2H), 3.70–3.20 (m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 2.05–1.90 (m, 2H), 1.80–1.70 (m, 2H), 1.61–1.45 (m, 6H), 1.35–1.17 (m, 56H), 0.85 (t, J = 6.5 Hz, 6H)。MS範囲; 実測値: 2716–2892。

10

【0568】

228cの調製:

1, 2-ジオ-オクタデシル-sn-グリセリド225c (4.00 g、6.70 mmol)とDSC (2.58 g、1.5当量)をジクロロメタン(60 mL)中に一緒に取り、氷水混合物中で0℃まで冷却した。そこにトリエチルアミン(2.75 mL、3当量)を添加し、一晚撹拌した。反応物をTLCにかけ、DCMで希釈し、水(2回)、NaHCO₃溶液で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を減圧下で除去し、残渣を高真空下で一晩除去した。この化合物を、さらに精製することなく、次の反応に直接使用した。MPEG₂₀₀₀-NH₂ 227 (1.50 g、0.687 mmol、NOF Corporation, Japanから購入)と前の工程からの化合物226c (0.760 g、1.5当量)をアルゴン下でジクロロメタン(20 mL)に溶解させた。反応物を0℃に冷却した。そこにピリジン(1 mL、過剰)を添加し、一晚撹拌した。反応をTLCでモニターした。溶媒と揮発性物質を真空下で除去し、残渣をクロマトグラフィー(溶出勾配として、まず酢酸エチル、次に5%–10%のMeOH/DCM)で精製して、所要の化合物228cを白色の固体として得た(0.92 g、48%)。¹H NMR(CDCl₃、400 MHz) δ = 5.22–5.15 (m, 1H), 4.16 (dd, J = 4.00 Hz, 11.00 Hz, 1H), 4.06 (dd, J = 5.00 Hz, 11.00 Hz, 1H), 3.81–3.75 (m, 2H), 3.70–3.20 (m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 1.80–1.70 (m, 2H), 1.60–1.48 (m, 4H), 1.31–1.15 (m, 64H), 0.85 (t, J = 6.5 Hz, 6H)。MS範囲; 実測値: 2774–2948。

20

30

【0569】

実施例5. 第VII因子(FVII)のインビトロアッセイ

トランスフェクションのための細胞播種

siRNAをトランスフェクションする1日前に、細胞を、抗生物質を含まない培地中、15,000細胞/ウェルの密度で(150,000細胞/mL培地、100 μL/ウェル)、96ウェルプレートに播く。

40

【0570】

FVII安定細胞株のための標準的なトランスフェクション条件

- ・96ウェルプレート設定でのトランスフェクション用に、0.5 μL/ウェルの濃度のリポフェクトアミン2000を使用する。
- ・FVII標的化siRNAまたは対照siRNAをOptiMEM中で6 nMの濃度に希釈する。
- ・siRNAとトランスフェクション試薬(リポフェクトアミン2000)を混合し、室温で20分間インキュベートすることによって複合体を形成させる。
- ・20分後、(合計60 μLの容量のうち)50 μLの複合体を、その前日に播かれた細

50

胞を含有する単一のウェル（ウェルには既に100 μ Lの増殖培地が含まれている）に添加し、穏やかに上下にピペティングすることによって、試料を混合する。この時点で、ウェルには、150 μ Lの総容量、1 nMのsiRNA、0.5 μ LのLF2000試薬が含まれる。

- ・プレートを37℃インキュベーターに戻す。
- ・24時間後、培地を除去し、新鮮培地と置き換える（100 μ L／ウェル）。
- ・培地交換してから24時間後、FVII活性のアッセイのために培地の上清を回収する。
- ・上清中の第VII因子タンパク質のレベルを、製造元のプロトコルに従って、発色アッセイ（Coaset Factor VII, DiaPharma Group社製（米国オハイオ州所在）またはBiophen FVII, Anicara Corporation社製（米国オハイオ州所在））を用いて試料中で測定する。

10

【0571】

実施例6：FVIIとapoBのインビボアッセイ

C57BL／6マウス（Charles River Labs社製（米国マサチューセッツ州所在））とSprague-Dawleyラット（Charles River Labs社製（米国マサチューセッツ州所在））に、尾静脈注射によって、0.01 mL／gの容量で、食塩水または所望の製剤中のsiRNAのいずれかを投与する。投与後のさまざまな時点で、イソフルオラン吸入によって動物に麻酔をかけ、後眼窩採血によって血清分離管の中に血液を採取する。第VII因子タンパク質の血清レベルを、製造元の

プロトコルに従って、発色アッセイ（Coaset Factor VII, DiaPharma Group社製（米国オハイオ州所在）またはBiophen FVII, Anicara Corporation社製（米国オハイオ州所在））を用いて試料中で測定する。食塩水処理した動物から採取した血液を用いて、標準曲線を作成する。投与後のさまざまな時点で肝臓mRNAレベルを評価する実験では、動物を屠殺し、肝臓を摘出し、液体窒素で瞬間凍結する。凍結した肝臓組織をすり潰して粉末にする。組織ライセートを調製し、FVIIとapoBの肝臓mRNAレベルを、分岐DNAアッセイ（Quant iGene Assay, Panomics社製（米国カリフォルニア州所在））を用いて測定する。

20

【0572】

実施例7：齧歯類の肝遺伝子サイレンシングモデルでの標的化脂質を介する送達

潜在的な肝標的の数が多いことと、この臓器がよく灌流する性質（これは、外因性siRNAをより送達しやすくする可能性がある）であることの両方の理由から、肝臓は、治療的介入にとっての魅力的な臓器である。肝実質を含む、肝細胞でのsiRNAが仲介する高レベルの遺伝子サイレンシングを促進する標的化脂質／siRNA複合体を同定するために、肝臓に対するインビボスクリーニングが使用される。血液凝固因子である第VII因子は、肝臓への機能的siRNA送達をアッセイするのに理想的な標的遺伝子である。これは肝細胞で特異的に産生される。したがって、遺伝子サイレンシングは、網内系の細胞（例えば、クッパー細胞）のみへの送達ではなく、実質への送達の成功を意味する。さらに、第VII因子は、血清中で容易に測定可能な分泌タンパク質であるので、動物を屠殺する必要性をなくす。最後に、半減期が短い（2～5時間）ため、mRNAレベルでのサイレンシングは、最小限のタイムラグでタンパク質レベルでのサイレンシングとなって現れる。

30

40

【0573】

Alnylamで実施される動物研究で使用される手順は全て、動物実験倫理委員会（IACUC）によって承認されており、適用される地域、州、および連邦の規制に準拠している。マウスに、siRNAのさまざまな脂質製剤を、2.5 mg／kgの用量で、1日に2回、静脈内注射で投与する。2回目の投与の24時間後に、第VII因子のタンパク質レベルを定量する。あるいは、ラットに、1.25、2.5、5、および10 mg／kgで、カチオン性脂質／siRNAを注射する。動物を、さまざまな時点で採血し、投

50

与の48時間後に屠殺する。肝臓の第VII因子のmRNAレベル、血清第VII因子のタンパク質レベル、およびプロトロンビン時間を評価する。

【0574】

実施例8：齧歯類の肝遺伝子サイレンシングモデルでのリボソームを介する送達の特異性

Alnylamで実施される動物研究で使用される手順は全て、動物実験倫理委員会（IACUC）によって承認されており、適用される地域、州、および連邦の規制に準拠している。遺伝子サイレンシングの特異性を確認するために、第VII因子と別の肝細胞発現遺伝子であるアポリポタンパク質B（apoB）の両方について、肝臓mRNAレベルを測定する。動物を、siFVIIのみ、またはsiapoBのみを含有する製剤で処理し、両方の遺伝子から転写されるmRNAのレベルを測定する。さらに、2つのsiRNAの混合物のカチオン性脂質製剤の投与を、ミスマッチのある第VII因子siRNAの効果と同様に、評価する。これらのデータによって、観察された遺伝子サイレンシングが、肝臓のmRNAレベルに対する脂質/siRNAの特異的な効果の直接的な結果であることと、これらの効果が複数の肝細胞発現遺伝子に適用可能であることが示される。

【0575】

実施例9：インビボでの齧歯類第VII因子とapoBのサイレンシング実験

Alnylamで実施される動物研究で使用される手順は全て、動物実験倫理委員会（IACUC）によって承認されており、適用される地域、州、および連邦の規制に準拠している。C57BL/6マウス（Charles River Labs社製（米国マサチューセッツ州所在））とSprague-Dawleyラット（Charles River Labs社製（米国マサチューセッツ州所在））に、尾静脈注射によって、0.01mL/gの容量で、食塩水または所望の製剤中のsiRNAのいずれかを投与する。投与後のさまざまな時点で、イソフルオラン吸入によって動物に麻酔をかけ、後眼窩採血によって血清分離管の中に血液を採取する。第VII因子タンパク質の血清レベルを、製造元のプロトコルに従って、発色アッセイ（Coaset Factor VII, DiaPharma Group社製（米国オハイオ州所在））またはBiophen FVII, Anicara Corporation社製（米国オハイオ州所在））を用いて試料中で測定する。食塩水処理した動物から採取した血液を用いて、標準曲線を作成する。投与後のさまざまな時点で肝臓mRNAレベルを評価する実験では、動物を屠殺し、肝臓を摘出し、液体窒素で瞬間凍結する。凍結した肝臓組織をすり潰して粉末にする。組織ライセートを調製し、FVIIとapoBの肝臓mRNAレベルを、分岐DNAアッセイ（Quantigene Assay, Panomics社製（米国カリフォルニア州所在））を用いて測定する。

【0576】

実施例10：インビボでのマウスRSVのサイレンシング実験

Alnylamで実施される動物研究で使用される手順は全て、動物実験倫理委員会（IACUC）によって承認されており、適用される地域、州、および連邦の規制に準拠している。2, 2, 2-トリブロモエタノール（Avertin社製）の腹腔内（i.p.）投与によって、BALB/cマウス（Harlan Sprague-Dawley Laboratories社製（米国インディアナ州インディアナポリス所在））に麻酔をかけ、総容量50μLの脂質/siRNA製剤を鼻腔内（i.n.）注入する。siRNA注入の4時間後、マウスに麻酔をかけ、 10^6 PFUのRSV/A2またはRSV/B1を鼻腔内に感染させる。感染後4日目に肺を摘出する前に、右尾動脈を切断して、麻酔をかけたマウスから血を抜く。肺組織を、氷上でリン酸緩衝食塩水（PBS, Invitrogen社製）中に採取し、ウイルス力価を測定する。肺のRSV力価は、免疫染色プラークアッセイで測定する。手持ち式のTissumiserホモジナイザー（Fisher Scientific社製（米国ペンシルベニア州ピッツバーグ所在））を用いて、肺をホモジナイズする。肺のホモジネートを氷上に5～10分間置き、破片を沈殿させる。清澄化された肺のライセートを、無血清D-MEM中で10倍に希釈し、D-M

EMを含む24ウェルプレート中で培養された95%コンフルエントのVero E6細胞に添加し、37℃で1時間インキュベートし、次いで2%のメチルセルロースを重層する。感染後5日目に、培地を除去し、細胞をアセトン：メタノール（60：40）で固定し、免疫染色する。プラークをカウントし、PBSまたはsiRNAミスマッチ対照と比べたlog(10) pfu/g肺を測定する。

【0577】

実施例11：腹腔マクロファージでのサイレンシング

Alnylamで実施される動物研究で使用される手順は全て、動物実験倫理委員会（IACUC）によって承認されており、適用される地域、州、および連邦の規制に準拠している。10mg/kgの脂質/siRNAをi.p注射する3日前に、C57Bl/6 Jマウス（Jackson Labs社製）に、4%のBrewersチオグリコレート培地（Difco社製）1mLを腹腔内注射する（1グループにつき4匹のマウス）。4日後に腹腔洗浄液を回収し、適切なフルオロフォアコンジュゲート抗体（BD Biosciences社製）で染色する。フローサイトメトリー用の試料をLSRIIFローサイトメーター（BD Bioscience社製）で解析し、FlowJoソフトウェア（TreeStar社製）を用いて、CD11b^{high}Gr1^{low}のマクロファージ集団を同定し、対象となる表面タンパク質の発現を定量する。

【0578】

実施例12：インビボでのmiRNAサイレンシング実験

Alnylamで実施される動物研究で使用される手順は全て、動物実験倫理委員会（IACUC）によって承認されており、適用される地域、州、および連邦の規制に準拠している。C57BL/6NCRJマウス（Charles River社製（独国スールツフェルト所在））に、3日間連続で、尾静脈注射によって、5mg/kg（0.5mg/mL）で、アンタゴmirまたは抗mirの脂質製剤を投与する。4日目に肝臓を摘出し、対象となるmiRNAの発現レベルを測定する。肝臓組織を、プロテイナーゼKを含む細胞/組織の溶解緩衝液（Epicentre社製（米国ウィスコンシン州マディソン所在））に溶解させ、超音波処理にかける。TE飽和フェノール（Roth社製（独国カールスルーエ所在））でトータルRNAを抽出し、その後、エタノールを用いて沈殿させる。対象となるマウスmiRNAに相補的な合成DNAプローブ、および対照としてのマウスU6 RNAの5'末端を、ポリヌクレオチドキナーゼ（New England Biolabs社製）とγ-32P ATP（GE Healthcare社製）を用いて標識する。

【0579】

トータルの肝臓RNAを、miRNA特異的プローブとU6プローブに溶液中で同時にハイブリダイズさせる。このハイブリダイゼーション条件は、U6 RNAと成熟miRNAの検出を可能にするが、プレー-miRNAの検出は可能にしない。S1ヌクレアーゼで処理した後、試料を変性10%アクリルアミドゲルに充填する。ゲルをホスホイメージャースクリーンに露出させ、Typhoon 9200機器（GE Healthcare社製）で解析する。miRNA対U6の相対シグナル強度を各試料について計算する。

【0580】

実施例13：一本鎖オリゴリボヌクレオチド(アンタゴmir)のインビボでのカチオン性脂質を介する送達

siRNA以外の核酸薬物の送達におけるカチオン性脂質材料の有用性を調べるために、本発明者らは、miRNAを標的とする一本鎖2'-O-Meオリゴリボヌクレオチド（アンタゴmirまたは抗mir）の送達を促進するカチオン性脂質の潜在能力を検討する。抗mirのインビボ送達によって、特異的な標的miRNAサイレンシングが生じ、結果として標的miRNAによって調節される遺伝子の特異的な上方調節が生じる。カチオン性脂質で製剤化された抗mir122を、上記のように、3日間連続で、5mg/kgの用量でマウスに投与する。

【0581】

m i R - 1 2 2 によって調節される遺伝子の発現は、分岐DNAアッセイを用いて解析する。簡潔に述べると、30～50mgの凍結肝臓組織を、1mLの組織／細胞溶解緩衝液（E P I C E N T R E 社製（米国ウィスコンシン州所在））中で超音波処理によって溶解させる。標的遺伝子のシグナル強度に応じて、10～40μLのライセートを分岐DNAアッセイに使用する。Q u a n t i G e n e P r o b e D e s i g n e r ソフトウェアを用いて、プローブセットを設計する。Q u a n t i G e n e D e t e c t i o n A s s a y の 奨 め に 従 っ て、標的遺伝子発現をアッセイし、同じ肝臓組織ライセートからの対応するG A P D H ハウスキーパーの発現に対して正規化する。

【0582】

実施例14：毒性の評価

A l n y l a m で 実施される動物研究で使用される手順は全て、動物実験倫理委員会（I A C U C）によって承認されており、適用される地域、州、および連邦の規制に準拠している。ラットに、10mg/kg/週の用量で、製剤化されたs i R N A の 静脈内ボラス注射を週に1度、4回投与する。標的サイレンシングに関連する毒性の可能性を全て排除するために、既知のどのm R N A にもハイブリダイズしないはずの対照s i R N A を使用する。全ての臓器の外見と重量を測定する。

【0583】

実施例15：ヒト以外の霊長類での標的化脂質を介する遺伝子サイレンシング

3つ目の動物種での、カチオン性脂質で製剤化されたs i R N A の 効果を測定するために、ヒト以外の霊長類での研究を実施する。カニクイザルを用いる手順は全て、適用される地域、州、および連邦の規制に準拠するプロトコルを用いて、公認の開発業務機関によって実施されるものであり、動物実験倫理委員会（I A C U C）によって承認されている。カニクイザル（1グループにつきn = 6）に、5mL/kgのリン酸緩衝食塩水、2.5mg/kgの製剤化された対照s i R N A （1.25mL/kg）、2.5mg/kg（1.25mL/kg）の製剤化されたs i A p o B、または6.25mg/kg（3.125mL/kg）の製剤化されたs i A p o B の いずれかを、ボラスの静脈内注射として、上腕静脈を通して投与する。a p o B - 1 0 0 タンパク質の測定のために、投与前、ならびに投与の0.5、1、2、3、4、6、8、11、14、17、20、23、26、および30日後に、血清を採取する。その後の実験で、カニクイザル（1グループにつきn = 3）に、2.5mg/kgの製剤化された対照s i R N A、または2.5もしくは6.25mg/kgの製剤化されたs i A p o B の いずれかを、ボラスの静脈内注射として、伏在静脈を通して投与する。a p o B - 1 0 0 タンパク質の測定のために、投与前、ならびに投与の12、24および48時間後に血清を採取する。A p o B - 1 0 0 タンパク質レベルは、E L I S A アッセイを用いて測定する。臨床化学物質を、投与前、ならびに投与の24および48時間後に解析する。血液学的パラメータと凝固パラメータを、投与前、および投与の48時間後に解析する。48時間で動物を屠殺する。肝臓のA p o b m R N A レベルを、分岐DNAアッセイ（Q u a n t i G e n e A s s a y, P a n o m i c s 社製（米国カリフォルニア州所在））を用いて、試料中で測定する。

【0584】

上記のさまざまな実施形態を組み合わせて、さらなる実施形態を提供することができる。本明細書で参照されるおよび／または出願データシートに列挙される米国特許、米国特許出願公報、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、および非特許刊行物は全て、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。必要があれば、さまざまな特許、出願、および刊行物の概念を利用するように実施形態の態様を修正して、またさなる実施形態を提供することができる。

【0585】

上記の説明に照らして、これらのおよび他の変更を実施形態に対して行ない得る。一般に、以下の特許請求の範囲において、使用される用語は、本特許請求の範囲を、本明細書および本特許請求の範囲に開示される特定の実施形態に限定するものとみなされるべきではなく、このような特許請求の範囲に対して権利が与えられる全ての範囲の等価物に加え

10

20

30

40

50

て、全ての可能な実施形態を含むものとみなされるべきである。したがって、本特許請求の範囲は、本開示によって限定されない。

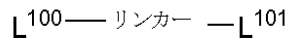
【0586】

他の実施態様

1. 下記式 (CI) に示す構造を有する標的化脂質：

【0587】

【化87】



(CI)

10

【0588】

式中、

L^{100} は、それぞれ存在ごとに独立して、脂質、親油性物質、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、これらは各々、随意的に、1つ以上の置換基で置換されており；

L^{101} は、それぞれ存在ごとに独立して、リガンドまたは $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_pO(CH_2)_qCH_2-$ リガンドであり；

p は、1～1000であり；かつ

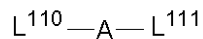
q は、1～20である。

2. 下記式 (CIII) に示す構造を有する標的化脂質：

20

【0589】

【化88】



(CIII)

【0590】

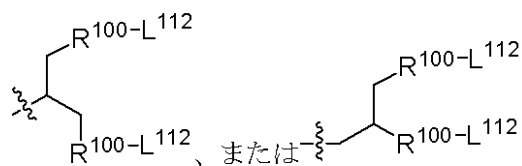
式中、

L^{110} は、 L^{111} 、

【0591】

30

【化89】



【0592】

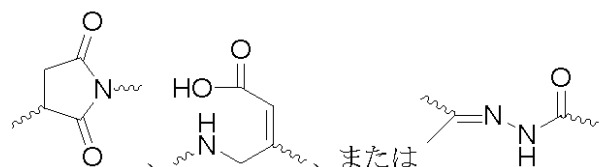
であり；

R^{100} は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、CO、NH、O、S、S-S、 $-C(CH_3)_2-S-S-$ 、 $-CH(CH_3)-S-S-$ 、C(O)、OC(O)、C(O)O、NHC(O)、C(O)NH、NHCH₂、CH₂、CH₂NH、CH₂O、CH=N-O、ヘテロアリール、ヘテロ環、

40

【0593】

【化 9 0】



【0 5 9 4】

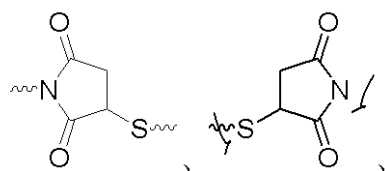
であり；

Aは、O、NH、NCH₃、S、CH₂、S-S、-C(CH₃)₂-S-S-、-C(H)(CH₃)-S-S-、-O-N=C-、-C(O)-N(H)-N=C-、-C=N-O-、-C=N-N(H)-C(O)-、-C(O)N(Me)-N=C-、-C=N-N(Me)-C(O)-、-O-C(O)-O-、-O-C(O)-NH-、-NH-C(O)-O-、-NH-C(O)-NH-、-N(Me)-C(O)-N(Me)-、-N(H)-C(O)-N(Me)-、-N(Me)-C(O)-N(H)-、-C(O)-O-、-C(O)-N(H)-、-C(O)-N(Me)-、-O-C(O)-、-NH-C(O)-、-N(Me)-C(O)-、-C=N-、-N=C-、

10

【0 5 9 5】

【化 9 1】



20

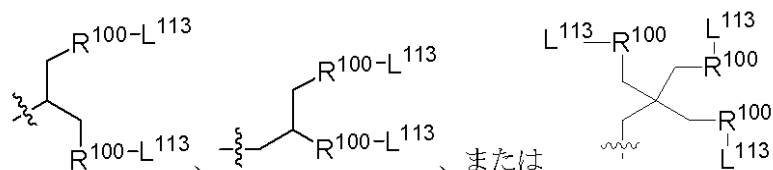
【0 5 9 6】

ヘテロ環、またはヘテロアリールであり；

L^{1 1 1}は、L^{1 1 3}、L^{1 1 4}、

【0 5 9 7】

【化 9 2】



30

【0 5 9 8】

であり；

L^{1 1 2}は、それぞれ存在ごとに独立して、脂質、親油性物質、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、これらは各々、随意的に、1つ以上の置換基で置換されており；

40

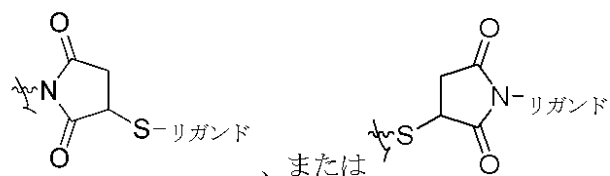
L^{1 1 3}は、それぞれ存在ごとに独立して、-CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_pO(CH₂)_qCH₂-L^{1 1 4}であり；

L^{1 1 4}は、それぞれ存在ごとに独立して、リガンド、-C(O)-リガンド、-O-C(O)-リガンド、-N(H)-リガンド、-O-C(O)-N(H)-リガンド、-O-C(O)-O-リガンド、-NH-C(O)-N(H)-リガンド、-NH-C(O)-O-リガンド、-S-S-リガンド、-O-N=C-リガンド、-NH-N=C-リガンド、-C=N-O-リガンド、-C=N-N(H)-リガンド、ヘテロ環-リガンド、ヘテロアリール-リガンド、

【0 5 9 9】

50

【化 9 3】



【0600】

であり；

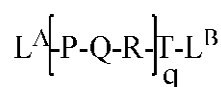
p は、1～1000であり；かつ

q は、1～20である。

3. 下記式 (C I) に示す構造を有する標的化脂質：

【0601】

【化 9 4】



式 (I)

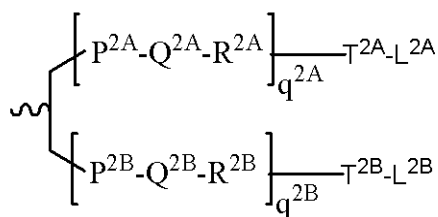
【0602】

式中、

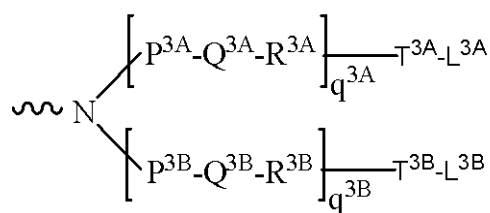
L^A は、糖質、グルコース、マンノース、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、フコース、グルコサミン、ラクトース、マルトース、葉酸、ペプチドから選択されるリガンドであるか、または下記式 I I ～ V：

【0603】

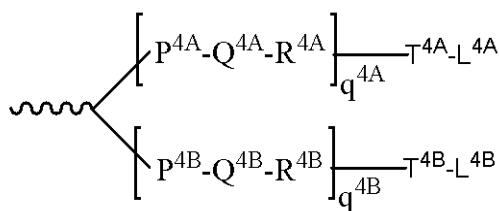
【化 9 5】



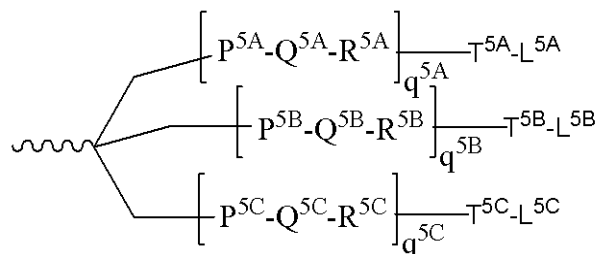
式 (I I)



式 (I I I)



式 (I V)



式 (V)

【0604】

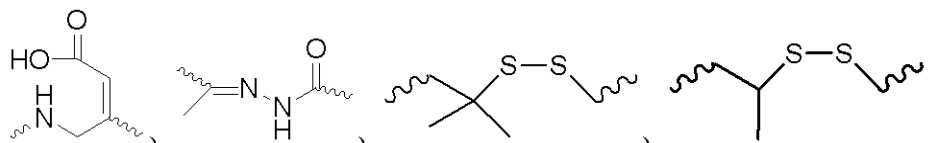
に示す構造を有し：

q、 q^{2A} 、 q^{2B} 、 q^{3A} 、 q^{3B} 、 q^{4A} 、 q^{4B} 、 q^{5A} 、 q^{5B} 、および q^5 ^{C} は、それぞれ存在ごとに独立して、0～20であり；P、 P^{2A} 、 P^{2B} 、 P^{3A} 、 P^{3B} 、 P^{4A} 、 P^{4B} 、 P^{5A} 、 P^{5B} 、 P^{5C} 、T

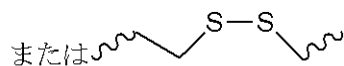
、 T^2A 、 T^2B 、 T^3A 、 T^3B 、 T^4A 、 T^4B 、 T^4A 、 T^5B 、および T^5C は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、 NR' 、 O 、 S 、 $C(O)$ 、 $OC(O)$ 、 $C(O)O$ 、 $NHC(O)$ 、 $C(O)NH$ 、 $NHCH_2$ 、 CH_2 、 CH_2NH もしくは CH_2O 、 $NHCH(R^a)C(O)$ 、 $-C(O)-CH(R^a)-NH-$ 、 CO 、 $CH=N-O$ 、 CH_2S 、尿素、ヘテロ環、ヘテロアリール、

【0605】

【化96】



10



【0606】

であり；

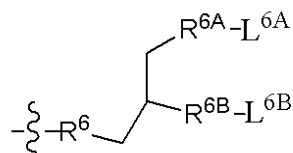
Q 、 Q^2A 、 Q^2B 、 Q^3A 、 Q^3B 、 Q^4A 、 Q^4B 、 Q^5A 、 Q^5B 、および Q^5C は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-C(R')(R'')(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_mC(R')(R'')-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2-$ 、または $-(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH-$ であり；

20

L^B は、親油性物質、ステロイド、テルペン、ビタミン、セラミドからなる群から選択されるか、または下記式(VI)：

【0607】

【化97】



30

式(VI)

【0608】

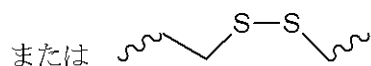
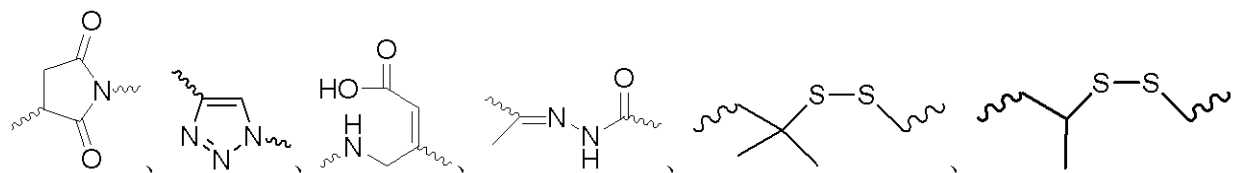
の構造を有し；

R 、 R^2 、 R^2A 、 R^2B 、 R^3A 、 R^3B 、 R^4A 、 R^4B 、 R^5A 、 R^5B 、 R^5C 、 R^6 、 R^6A 、および R^6B は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、 CO 、 NH 、 NR' 、 O 、 S 、 $C(O)$ 、 $OC(O)$ 、 $C(O)O$ 、 $NHC(O)$ 、 $C(O)NH$ 、 $NHCH_2$ 、 CH_2 、 CH_2NH もしくは CH_2O 、 $NHCH(R^a)C(O)$ 、 $-C(O)-CH(R^a)-NH-$ 、 CO 、 $CH=N-O$ 、

40

【0609】

【化98】



50

【0610】

であり；

L^{2A} 、 L^{2B} 、 L^{3A} 、 L^{3B} 、 L^{4A} 、 L^{4B} 、 L^{5A} 、 L^{5B} 、および L^{5C} は、それぞれ存在ごとに独立して、糖質、糖質類似体、グルコース、マンノース、ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、フコース、グルコサミン、ラクトース、マルトース、葉酸、またはペプチドであり；

R' および R'' は、それぞれ独立して、H、 CH_3 、OH、SH、 NH_2 、 NR^{10} 、 R^{20} 、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり；

R^a は、Hまたはアミノ酸側鎖であり；

R^{10} および R^{20} は、それぞれ独立して、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり； 10

L^{6A} および L^{6B} は、それぞれ独立して、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、その各々は、随意的に1つ以上の置換基で置換されており；

mは、それぞれ存在ごとに独立して、0～50であり；

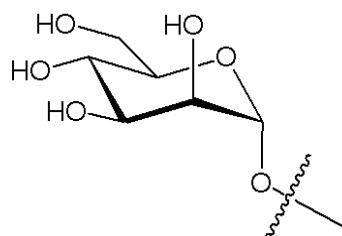
nは、それぞれ存在ごとに独立して、1～20であり；かつ

pは、それぞれ存在ごとに独立して、0～50である。

4. L^A が、

【0611】

【化99】



20

【0612】

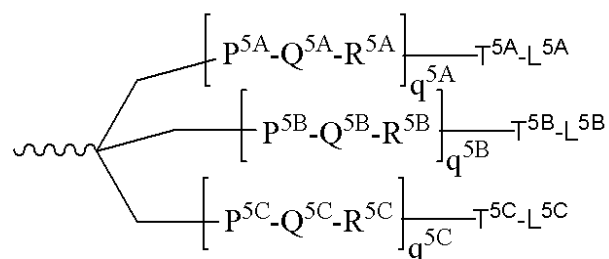
である、実施態様3に記載の標的化脂質。

5. L^A が、

30

【0613】

【化100】



式(V)

40

【0614】

式中、

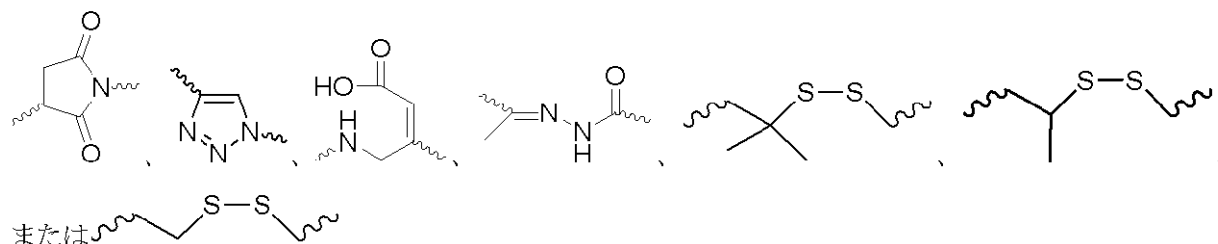
q^{5A} 、 q^{5B} 、および q^{5C} は、それぞれ存在ごとに独立して、0～20であり；

P^{5A} 、 P^{5B} 、 P^{5C} 、 T^{5A} 、 T^{5B} 、および T^{5C} は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、CO、NH、 NR' 、O、S、C(O)、OC(O)、C(O)O、NHC(O)、C(O)NH、NHCH₂、CH₂、CH₂NHもしくはCH₂O、NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、CO、CH=N-O、

【0615】

50

【化 1 0 1】



【0 6 1 6】

10

であり；

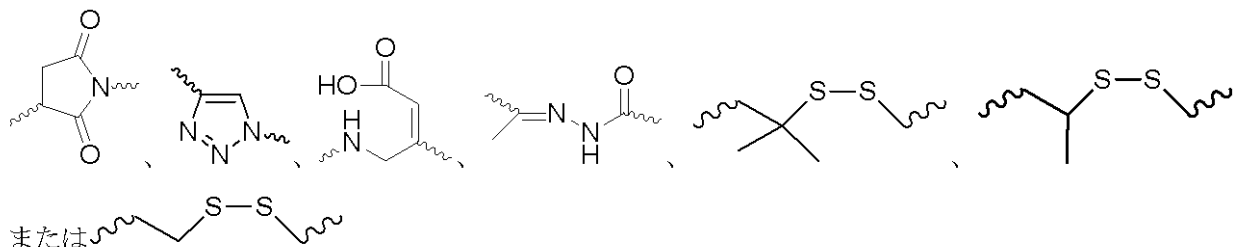
Q^{5A} 、 Q^{5B} 、および Q^{5C} は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-C(R')(R'')(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_mC(R')(R'')-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2-$ 、または $-(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH-$ であり；

R^{5A} 、 R^{5B} 、および R^{5C} は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、 CO 、 NH 、 NR' 、 O 、 S 、 $C(O)$ 、 $OC(O)$ 、 $C(O)O$ 、 $NHC(O)$ 、 $C(O)NH$ 、 $NHCH_2$ 、 CH_2 、 CH_2NH もしくは CH_2O 、 $NHCH(R^a)C(O)$ 、 $-C(O)-CH(R^a)-NH-$ 、 CO 、 $CH=N-O$ 、

【0 6 1 7】

20

【化 1 0 2】



【0 6 1 8】

30

であり；

L^{5A} 、 L^{5B} 、および L^{5C} は、それぞれ存在ごとに独立して、糖質、グルコース、マンノース、ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、フコース、グルコサミン、ラクトース、マルトース、葉酸、またはペプチドであり；

R' は、独立して、 H 、 CH_3 、 OH 、 SH 、 NH_2 、 NH (アルキル)、または NH (ジアルキル) であり；

R^a は、 H または アミノ酸側鎖 であり；

n は、それぞれ存在ごとに独立して、 $0 \sim 20$ であり；かつ

m は、それぞれ存在ごとに独立して、 $0 \sim 50$ である）

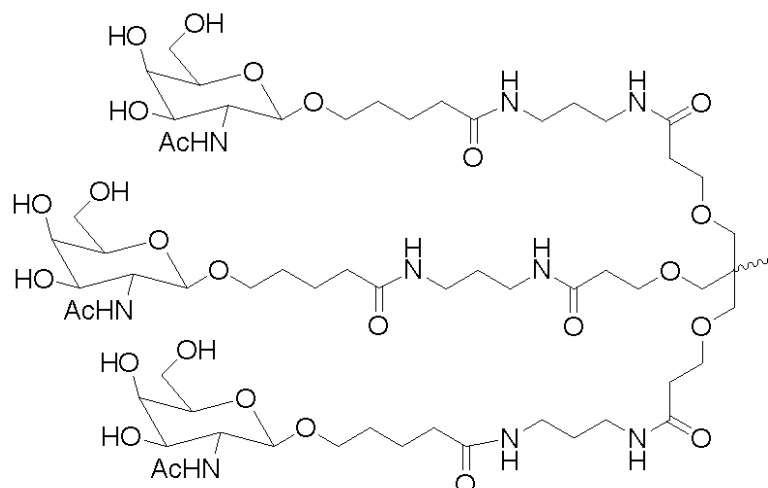
である、実施態様 3 に記載の標的化脂質。

6. L^A が、

40

【0 6 1 9】

【化 1 0 3】



10

【 0 6 2 0】

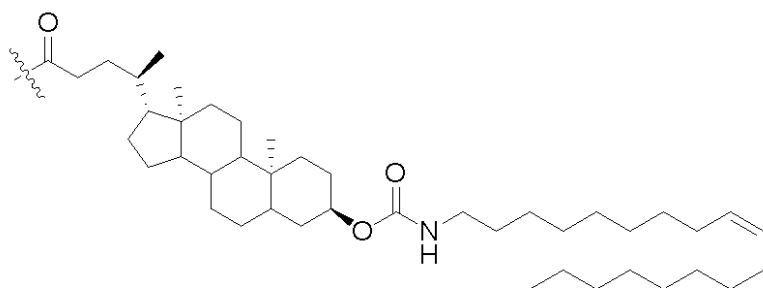
である、実施態様 5 に記載の標的化脂質。

7. L^B が、

【 0 6 2 1】

【化 1 0 4】

20



30

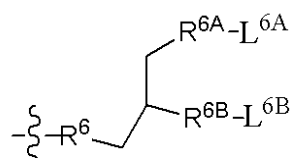
【 0 6 2 2】

である、実施態様 3 に記載の標的化脂質。

8. L^B が、

【 0 6 2 3】

【化 1 0 5】



式(IV)

40

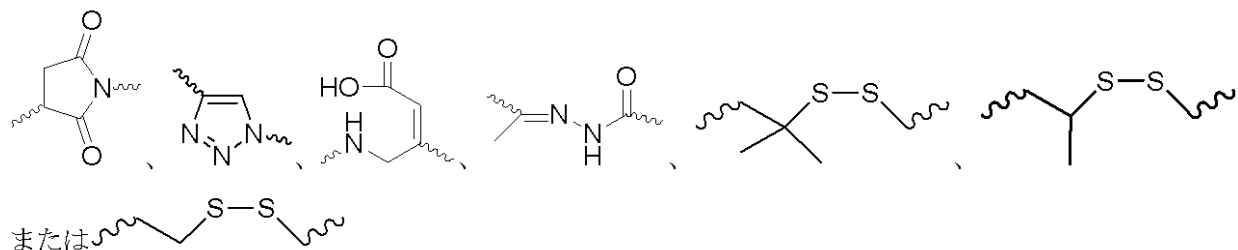
【 0 6 2 4】

式中、

R^6 、 R^{6A} 、および R^{6B} は、それぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、CO、NH、NR'、O、S、C(O)、OC(O)、C(O)O、NHC(O)、C(O)NH、NHCH₂、CH₂、CH₂NHもしくはCH₂O、NHCH(R^a)C(O)、—C(O)—CH(R^a)—NH—、CO、CH=N—O、

【 0 6 2 5】

【化 1 0 6】



【 0 6 2 6】

10

であり；

R' は、それぞれ存在ごとに独立して、H、CH₃、OH、SH、NH₂、NH（アルキル＝Me、Et、Pr、イソPr、Bu、Bn）、またはN（ジアルキル＝Me₂、Et₂、Bn₂）であり；

R^a は、Hまたはアミノ酸側鎖であり；

L^{6A}とL^{6B}は、それぞれ独立して、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、その各々は、随意的に1つ以上の置換基で置換されている、実施態様3に記載の標的化脂質。

9. R⁶が、O、S、またはNHから選択される、実施態様8に記載の標的化脂質。

10. R^{6A}およびR^{6B}が、O、S、またはNHから選択される、実施態様8に記載の標的化脂質。

20

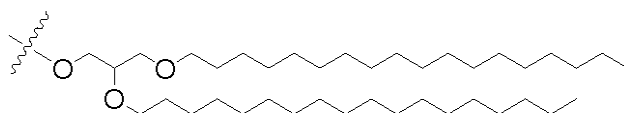
11. R、R^{6A}、およびR^{6B}がOである、実施態様8に記載の標的化脂質。

12. L^{6A}およびL^{6B}がアルキルである、実施態様8に記載の標的化脂質。

13. L^Bが、

【 0 6 2 7】

【化 1 0 7】



30

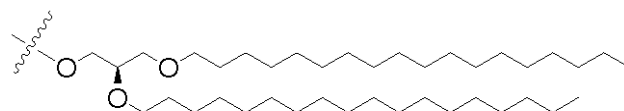
【 0 6 2 8】

である、実施態様8に記載の標的化脂質。

14. L^Bが、

【 0 6 2 9】

【化 1 0 8】



40

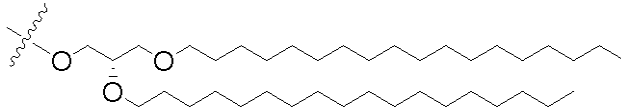
【 0 6 3 0】

である、実施態様8に記載の標的化脂質。

15. L^Bが、

【 0 6 3 1】

【化 1 0 9】



【0 6 3 2】

である、実施態様 8 に記載の標的化脂質。

16. (i) 実施態様 1 または 2 に記載の標的化脂質；(ii) カチオン性脂質；(iii) DSPC、POPC、DOPE、および SM から選択される中性脂質；(iv) コレステロール；ならびに (v) PEG-DMG または PEG-DMA を含み、

これらの構成要素が、標的化脂質約 0.5～50%：カチオン性脂質 20～60%：中性脂質 5～25%：コレステロール 25～55%：PEG-DMG または PEG-DMA 0.5～15% というモル比である薬学的組成物。

17. 治療剤をさらに含む、実施態様 16 に記載の薬学的組成物。

18. 前記治療剤がオリゴヌクレオチドである、実施態様 17 に記載の薬学的組成物。

19. 前記オリゴヌクレオチドが一本鎖である、実施態様 18 に記載の薬学的組成物。

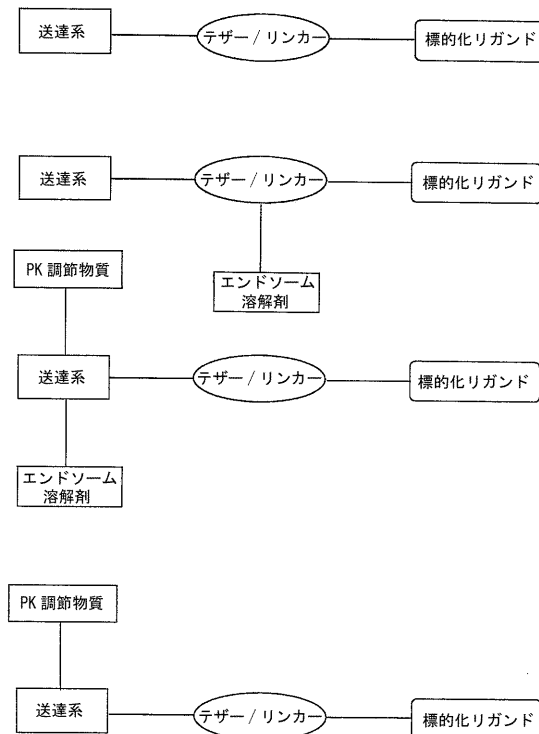
20. 前記オリゴヌクレオチドが二本鎖である、実施態様 18 に記載の薬学的組成物。

21. 前記オリゴヌクレオチドが iRNA 剤である、実施態様 18 に記載の薬学的組成物。

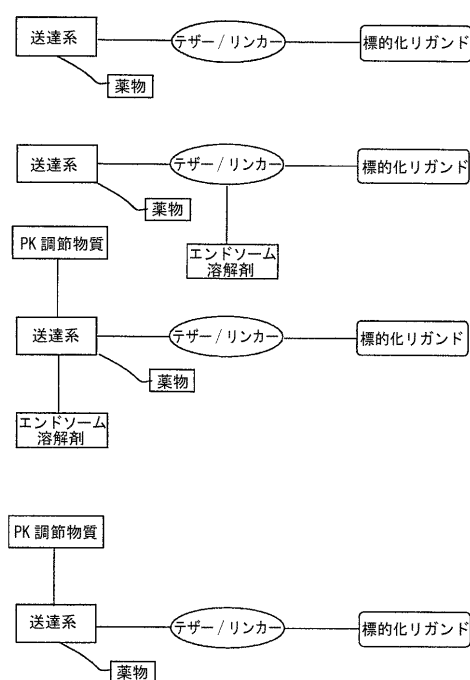
22. 前記オリゴヌクレオチドが分解に耐えるように修飾される、実施態様 18 に記載の薬学的組成物。

23. 前記オリゴヌクレオチドが、コンジュゲートされたりガンドを含む、実施態様 18 に記載の薬学的組成物。

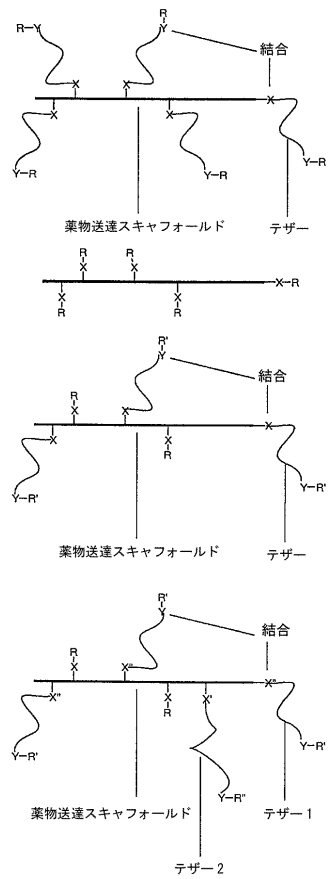
【図 1】



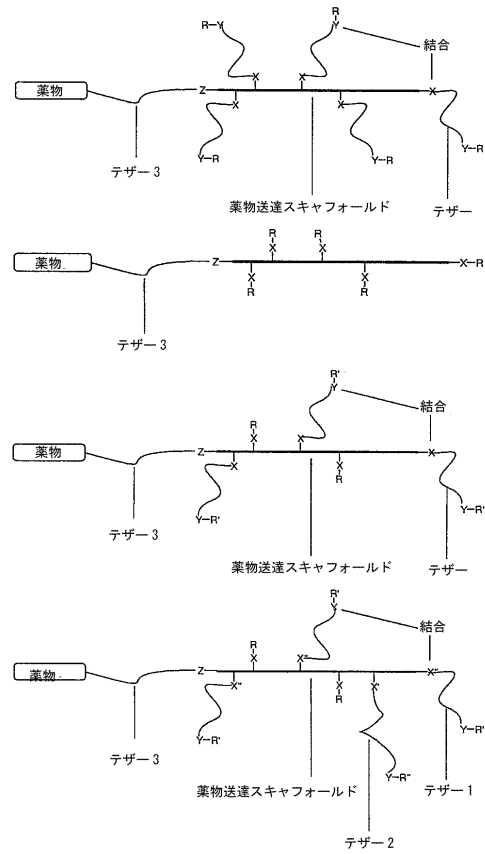
【図 2】



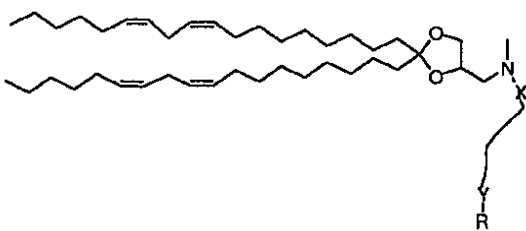
【図 3】



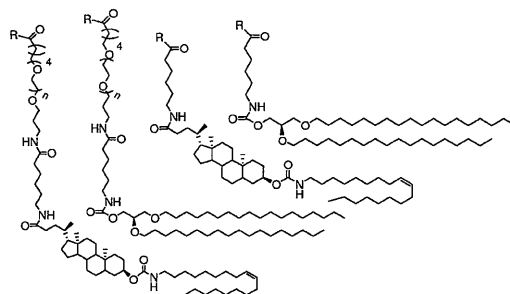
【図 4】



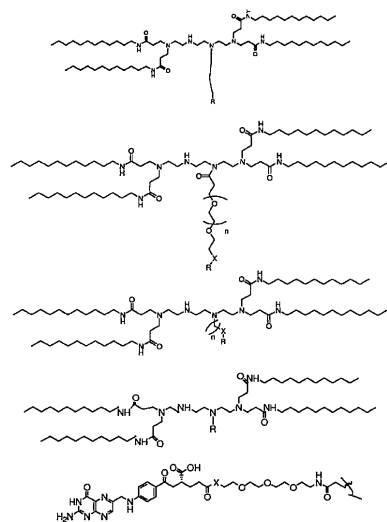
【図 5】



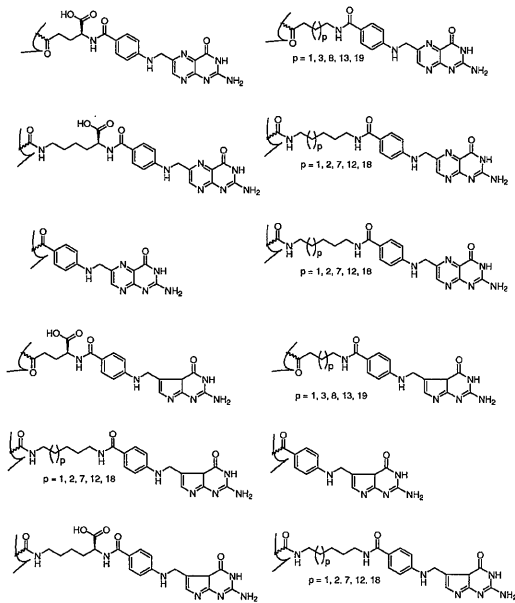
【図 7】



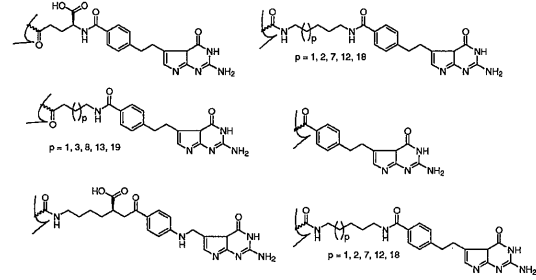
【図 6】



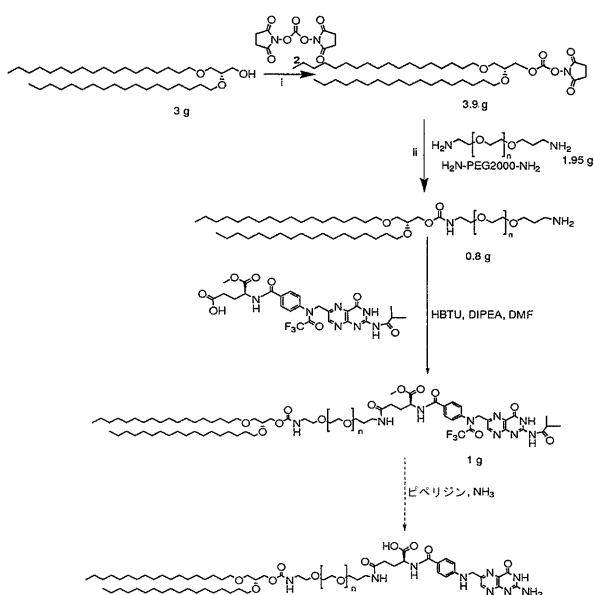
【図 8 A】



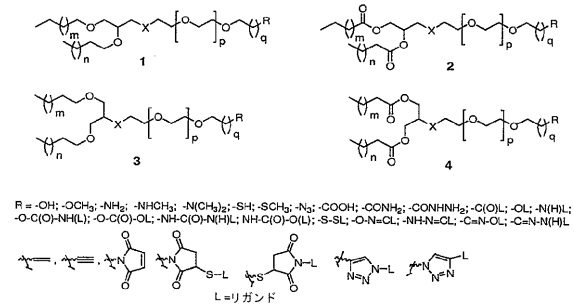
【図 8 B】



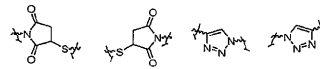
【図 9】



【図 10】

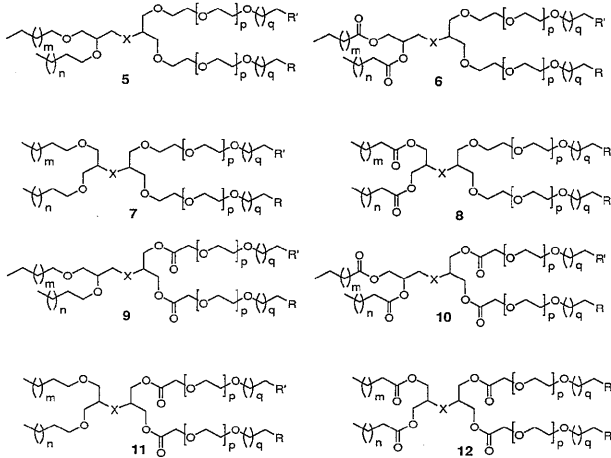


X = O; NH; NCH₃; S; CH₂; S-S; -O-N=C-; -C(O)-N(H)-N=C-; -C=N-O-; -C=N-N(H)-C(O)-; -C(O)-N(Me)-N=C-; -C=N-N(Me)-C(O)-; -O-C(O)-O-; -O-C(O)-NH-; -NH-C(O)-O-; -NH-C(O)-NH-; -N(Me)-C(O)-N(Me)-; -N(H)-C(O)-N(Me)-; -N(Me)-C(O)-N(H)-; -C(O)-O-; -C(O)-N(H)-; -C(O)-N(Me)-; -O-C(O)-; -NH-C(O)-; -N(Me)-C(O)-; -C=N-; -N=C-;

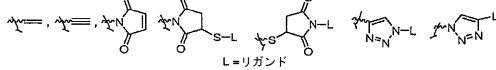


R 配置もしくは S 配置のグリセロール骨格または両方のラセミ混合物。m=5 ~ 29; n=6 ~ 28; p=1 ~ 1000, および q=1 ~ 20。

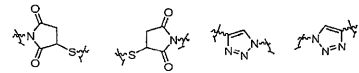
【図 1 1】



R, R' = -OH; -OCH₃; -NH₂; -NHCH₃; -N(CH₃)₂; -SH; -SCH₃; -N₃; -COOH; -CONH₂; -CONHNH₂; -C(O)L; -OL; -N(H)L; -O-C(O)-NH(L); -O-C(O)-OL; -NH-C(O)-N(H)L; -NH-C(O)-OL; -S-SL; -O-N=CL; -NH-N=CL; -C=N-OL; -C=N-N(H)L

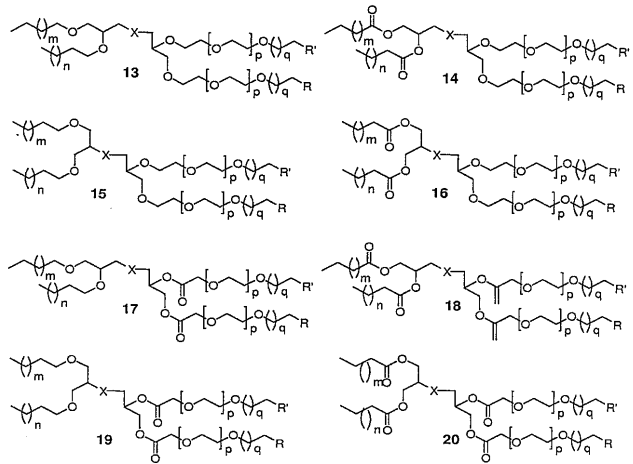


X = O; NH; NCH₃; S; CH₂; S-S; -O-N=C-; -C(O)-N(H)-N=C-; -C=N-O-; -C=N-N(H)-C(O)-; -C(O)-N(Me)-N=C-; -C=N-N(Me)-C(O)-; -O-C(O)-O-; -O-C(O)-NH-; -NH-C(O)-O-; -NH-C(O)-NH-; -N(Me)-C(O)-N(Me)-; -N(H)-C(O)-N(Me)-; -N(Me)-C(O)-N(H)-; -C(O)-O-; -C(O)-N(H)-; -C(O)-N(Me)-; -O-C(O)-; -NH-C(O)-; -N(Me)-C(O)-; -C=N-; -N=C-;

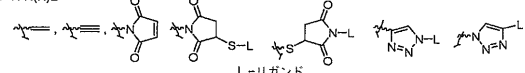


R 配置もしくは S 配置のグリセロール骨格または両方のラセミ混合物。m=5~29; n=6~28; p=1~1000、および q=1~20。

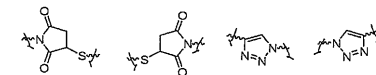
【図 1 2】



R, R' = -OH; -OCH₃; -NH₂; -NHCH₃; -N(CH₃)₂; -SH; -SCH₃; -N₃; -COOH; -CONH₂; -CONHNH₂; -C(O)L; -OL; -N(H)L; -O-C(O)-NH(L); -O-C(O)-OL; -NH-C(O)-N(H)L; -NH-C(O)-OL; -S-SL; -O-N=CL; -NH-N=CL; -C=N-OL; -C=N-N(H)L

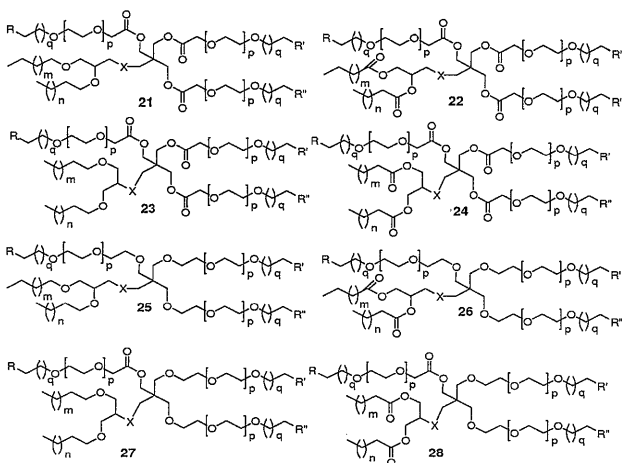


X = O; NH; NCH₃; S; CH₂; S-S; -O-N=C-; -C(O)-N(H)-N=C-; -C=N-O-; -C=N-N(H)-C(O)-; -C(O)-N(Me)-N=C-; -C=N-N(Me)-C(O)-; -O-C(O)-O-; -O-C(O)-NH-; -NH-C(O)-O-; -NH-C(O)-NH-; -N(Me)-C(O)-N(Me)-; -N(H)-C(O)-N(Me)-; -N(Me)-C(O)-N(H)-; -C(O)-O-; -C(O)-N(H)-; -C(O)-N(Me)-; -O-C(O)-; -NH-C(O)-; -N(Me)-C(O)-; -C=N-; -N=C-;

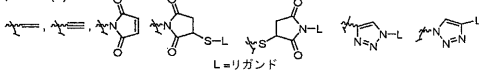


R 配置もしくは S 配置のグリセロール骨格または両方のラセミ混合物。m=5~29; n=6~28; p=1~1000、および q=1~20。

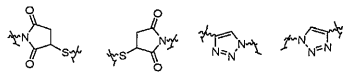
【図 1 3】



R, R', R'' = -OH; -OCH₃; -NH₂; -NHCH₃; -N(CH₃)₂; -SH; -SCH₃; -N₃; -COOH; -CONH₂; -CONHNH₂; -C(O)L; -OL; -N(H)L; -O-C(O)-NH(L); -O-C(O)-OL; -NH-C(O)-N(H)L; -NH-C(O)-OL; -S-SL; -O-N=CL; -NH-N=CL; -C=N-OL; -C=N-N(H)L

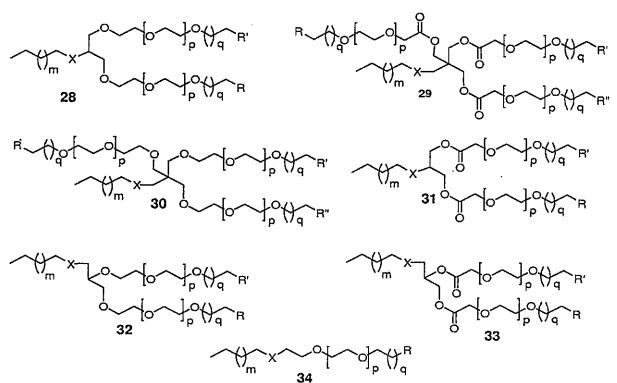


X = O; NH; NCH₃; S; CH₂; S-S; -O-N=C-; -C(O)-N(H)-N=C-; -C=N-O-; -C=N-N(H)-C(O)-; -C(O)-N(Me)-N=C-; -C=N-N(Me)-C(O)-; -O-C(O)-O-; -O-C(O)-NH-; -NH-C(O)-O-; -NH-C(O)-NH-; -N(Me)-C(O)-N(Me)-; -N(H)-C(O)-N(Me)-; -N(Me)-C(O)-N(H)-; -C(O)-O-; -C(O)-N(H)-; -C(O)-N(Me)-; -O-C(O)-; -NH-C(O)-; -N(Me)-C(O)-; -C=N-; -N=C-;

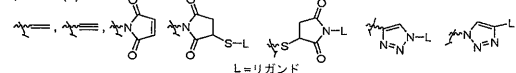


R 配置もしくは S 配置のグリセロール骨格または両方のラセミ混合物。m=5~29; n=6~28; p=1~1000、および q=1~20。

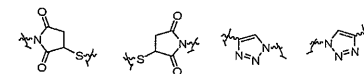
【図 1 4】



R, R', R'' = -OH; -OCH₃; -NH₂; -NHCH₃; -N(CH₃)₂; -SH; -SCH₃; -N₃; -COOH; -CONH₂; -CONHNH₂; -C(O)L; -OL; -N(H)L; -O-C(O)-NH(L); -O-C(O)-OL; -NH-C(O)-N(H)L; -NH-C(O)-OL; -S-SL; -O-N=CL; -NH-N=CL; -C=N-OL; -C=N-N(H)L

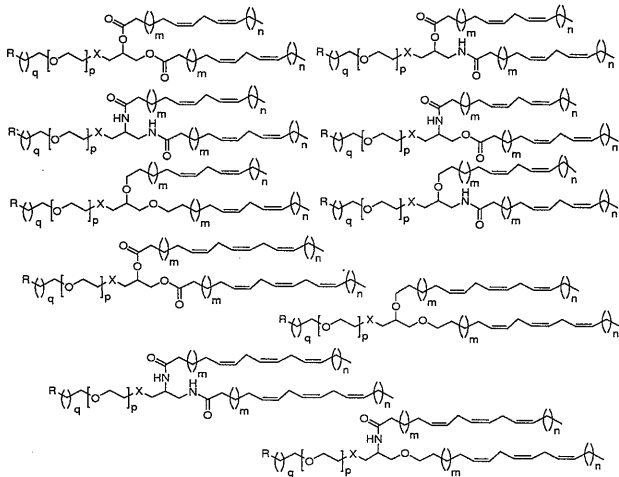


X = O; NH; NCH₃; S; CH₂; S-S; -O-N=C-; -C(O)-N(H)-N=C-; -C=N-O-; -C=N-N(H)-C(O)-; -C(O)-N(Me)-N=C-; -C=N-N(Me)-C(O)-; -O-C(O)-O-; -O-C(O)-NH-; -NH-C(O)-O-; -NH-C(O)-NH-; -N(Me)-C(O)-N(Me)-; -N(H)-C(O)-N(Me)-; -N(Me)-C(O)-N(H)-; -C(O)-O-; -C(O)-N(H)-; -C(O)-N(Me)-; -O-C(O)-; -NH-C(O)-; -N(Me)-C(O)-; -C=N-; -N=C-;

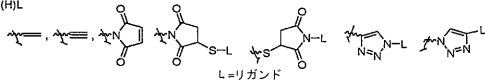


R 配置もしくは S 配置のグリセロール骨格または両方のラセミ混合物。m=5~29; n=6~28; p=1~1000、および q=1~20。

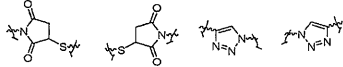
【図 15】



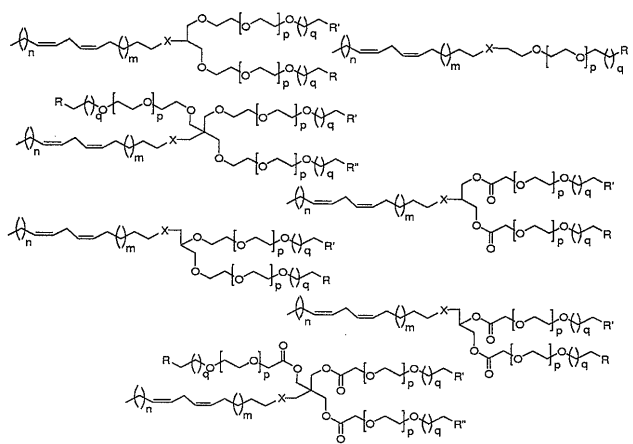
R = -OH; -OCH₃; -NH₂; -NHCH₃; -N(CH₃)₂; -SH; -SCH₃; -N₃; -COOH; -CONH₂; -CONHNH₂; -C(O)L; -OL; -N(H)L; -O-C(O)-NH(L); -O-C(O)-OL; -NH-C(O)-N(H)L; -NH-C(O)-O(L); -S-L; -O-N=CL; -NH-N=CL; -C=N-OL; -C=N-N(H)L



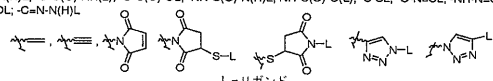
X = O; NH; NCH₃; S; CH₂; S-S; -O-N=C-; -C(O)-N(H)-N=C-; -C=N-O-; -C=N-N(H)-C(O)-; -C(O)₂N(Me)-N=C-; -C=N-N(Me)-C(O)-; -O-C(O)-O-; -O-C(O)-NH-; -NH-C(O)-O-; -NH-C(O)-NH-; -N(Me)-C(O)-N(Me)-; -N(H)-C(O)-N(Me)-; -N(Me)-C(O)-N(H)-; -C(O)-O-; -C(O)-N(H)-; -C(O)-N(Me)-; -O-C(O)-; -NH-C(O)-; -N(Me)-C(O)-; -C=N-; -N=C-



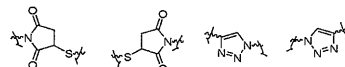
【図 16】



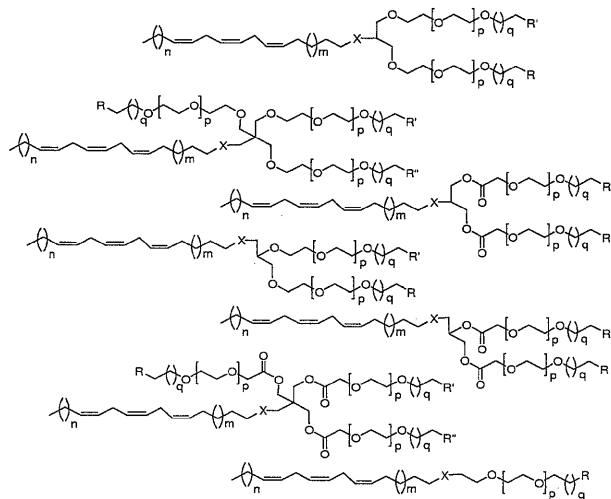
R, R', R'' = -OH; -OCH₃; -NH₂; -NHCH₃; -N(CH₃)₂; -SH; -SCH₃; -N₃; -COOH; -CONH₂; -CONHNH₂; -C(O)L; -OL; -N(H)L; -O-C(O)-NH(L); -O-C(O)-OL; -NH-C(O)-N(H)L; -NH-C(O)-O(L); -S-L; -O-N=CL; -NH-N=CL; -C=N-OL; -C=N-N(H)L



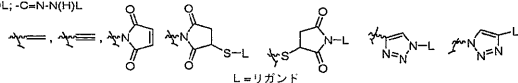
X = O; NH; NCH₃; S; CH₂; S-S; -O-N=C-; -C(O)-N(H)-N=C-; -C=N-O-; -C=N-N(H)-C(O)-; -C(O)₂N(Me)-N=C-; -C=N-N(Me)-C(O)-; -O-C(O)-O-; -O-C(O)-NH-; -NH-C(O)-O-; -NH-C(O)-NH-; -N(Me)-C(O)-N(Me)-; -N(H)-C(O)-N(Me)-; -N(Me)-C(O)-N(H)-; -C(O)-O-; -C(O)-N(H)-; -C(O)-N(Me)-; -O-C(O)-; -NH-C(O)-; -N(Me)-C(O)-; -C=N-; -N=C-



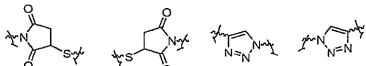
【図 17】



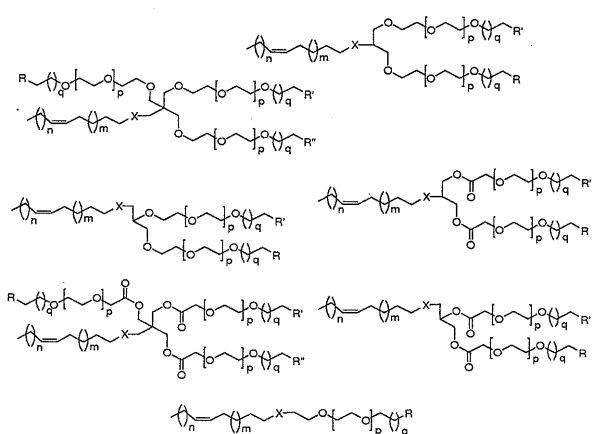
R, R', R'' = -OH; -OCH₃; -NH₂; -NHCH₃; -N(CH₃)₂; -SH; -SCH₃; -N₃; -COOH; -CONH₂; -CONHNH₂; -C(O)L; -OL; -N(H)L; -O-C(O)-NH(L); -O-C(O)-OL; -NH-C(O)-N(H)L; -NH-C(O)-O(L); -S-L; -O-N=CL; -NH-N=CL; -C=N-OL; -C=N-N(H)L



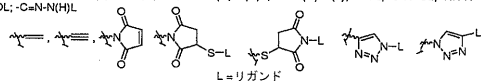
X = O; NH; NCH₃; S; CH₂; S-S; -O-N=C-; -C(O)-N(H)-N=C-; -C=N-O-; -C=N-N(H)-C(O)-; -C(O)₂N(Me)-N=C-; -C=N-N(Me)-C(O)-; -O-C(O)-O-; -O-C(O)-NH-; -NH-C(O)-O-; -NH-C(O)-NH-; -N(Me)-C(O)-N(Me)-; -N(H)-C(O)-N(Me)-; -N(Me)-C(O)-N(H)-; -C(O)-O-; -C(O)-N(H)-; -C(O)-N(Me)-; -O-C(O)-; -NH-C(O)-; -N(Me)-C(O)-; -C=N-; -N=C-



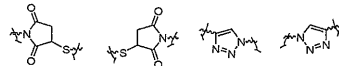
【図 18】



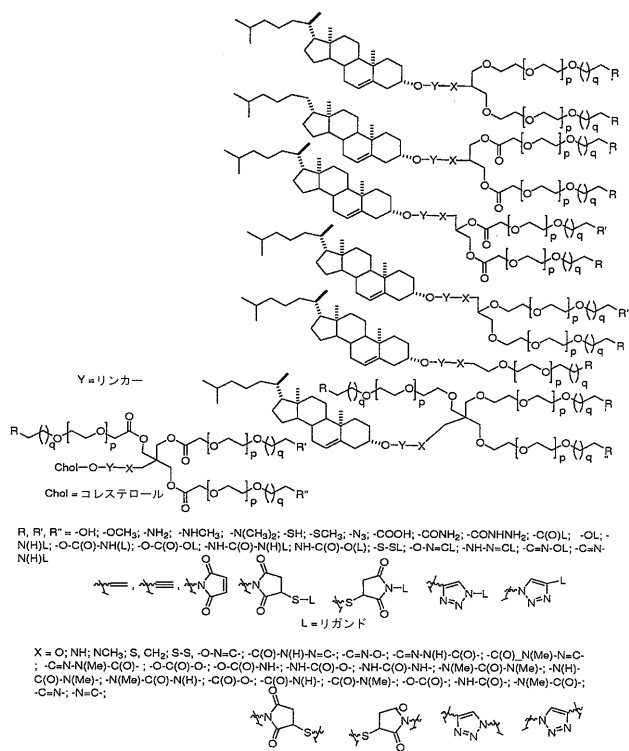
R, R', R'' = -OH; -OCH₃; -NH₂; -NHCH₃; -N(CH₃)₂; -SH; -SCH₃; -N₃; -COOH; -CONH₂; -CONHNH₂; -C(O)L; -OL; -N(H)L; -O-C(O)-NH(L); -O-C(O)-OL; -NH-C(O)-N(H)L; -NH-C(O)-O(L); -S-L; -O-N=CL; -NH-N=CL; -C=N-OL; -C=N-N(H)L



X = O; NH; NCH₃; S; CH₂; S-S; -O-N=C-; -C(O)-N(H)-N=C-; -C=N-O-; -C=N-N(H)-C(O)-; -C(O)₂N(Me)-N=C-; -C=N-N(Me)-C(O)-; -O-C(O)-O-; -O-C(O)-NH-; -NH-C(O)-O-; -NH-C(O)-NH-; -N(Me)-C(O)-N(Me)-; -N(H)-C(O)-N(Me)-; -N(Me)-C(O)-N(H)-; -C(O)-O-; -C(O)-N(H)-; -C(O)-N(Me)-; -O-C(O)-; -NH-C(O)-; -N(Me)-C(O)-; -C=N-; -N=C-



【図 19】



【配列表】

2017002082000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K	31/7105 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28	
A 6 1 K	47/34 (2017.01)	A 6 1 K	47/34	
A 6 1 K	47/50 (2017.01)	A 6 1 K	47/48	
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/22	
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/26	
C 0 7 K	5/00 (2006.01)	C 0 7 K	5/00	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/00	G

- (31)優先権主張番号 61/097,261
 (32)優先日 平成20年9月16日(2008.9.16)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/013,597
 (32)優先日 平成19年12月13日(2007.12.13)
 (33)優先権主張国 米国(US)

- (72)発明者 ムシアー マノハラン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0
 アルニラム ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド
 (72)発明者 カランソッタシル ジー ラジーヴ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0
 アルニラム ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド
 (72)発明者 ジャヤプラカシュ ケイ ナラヤナンナイル
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0
 アルニラム ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド
 (72)発明者 ムシュサミ ジャヤラマン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0
 アルニラム ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4C076 AA95 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 CC01 CC04 CC14 CC35
 DD60 DD69 DD70 EE23 EE51 EE59
 4C084 AA17 AA27 MA05 MA56 MA66 NA05 NA13 ZA071 ZA081 ZA541
 ZA941 ZB111 ZB331
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA56 MA66 NA05 NA13 ZA07
 ZA08 ZA54 ZA94 ZB11 ZB33
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA17 BA18 CA40 EA20 EA27 FA10