

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-515693

(P2013-515693A)

(43) 公表日 平成25年5月9日(2013.5.9)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 47/28 (2006.01)	A 61 K 47/28	4 C 076
C07J 9/00 (2006.01)	C 07 J 9/00	4 C 084
C07J 43/00 (2006.01)	C 07 J 43/00	4 C 086
A61K 47/34 (2006.01)	A 61 K 47/34	4 C 091
A61K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00	4 J 005

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 211 頁) 最終頁に続く

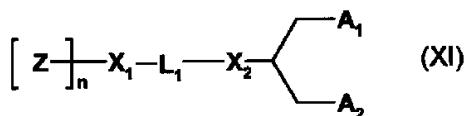
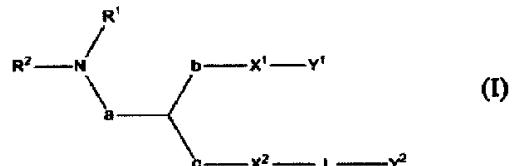
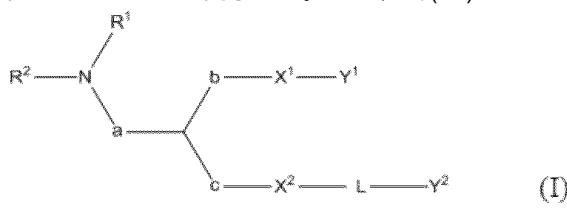
(21) 出願番号	特願2012-545302 (P2012-545302)	(71) 出願人	504389991 ノバルティス アーゲー
(86) (22) 出願日	平成22年12月21日 (2010.12.21)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 35
(85) 翻訳文提出日	平成24年8月21日 (2012.8.21)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 葉
(86) 國際出願番号	PCT/EP2010/070412	(74) 代理人	100101454 弁理士 山田 卓二
(87) 國際公開番号	W02011/076807	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(87) 國際公開日	平成23年6月30日 (2011.6.30)	(74) 代理人	100067035 弁理士 岩崎 光隆
(31) 優先権主張番号	61/284,787	(74) 代理人	100156144 弁理士 落合 康
(32) 優先日	平成21年12月23日 (2009.12.23)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

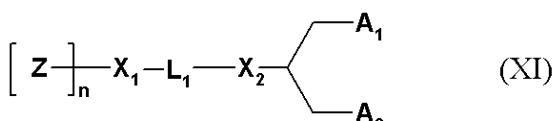
(54) 【発明の名称】脂質、脂質組成物およびそれらの使用方法

## (57) 【要約】

治療有効量の生物活性薬物を、肝臓、腫瘍および/または他の細胞または組織に送達するための製剤および最適化プロトコールを開示する。また、式(I)：



のカチオン性脂質化合物の組成物および使用を提供する。また、本発明は、式(XI)：



のステルス脂質の組成物および使用に関する。また、当該化合物、組成物および製剤の製造方法、ならびに、生

## 【特許請求の範囲】

### 【請求項1】

少なくとも 1 種のカチオン性脂質、少なくとも 1 種のヘルパー脂質および少なくとも 1 種のステルス脂質を含む生物活性薬物を送達するための組成物であって、生物活性薬物が  
a) 組成物が約 6.2 以上の  $pK_a$  を有するカチオン性脂質を有するとき、肝臓または肝臓細胞：

b) 組成物が約 6.2 以下の  $pK_a$  を有するカチオン性脂質を有するとき、腫瘍または腫瘍細胞；

c) 組成物が約5.1～約7.4のpKaを有するカチオン性脂質を有するとき、肝臓または肝臓細胞；および

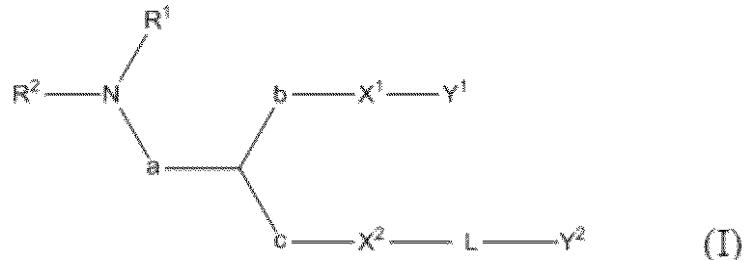
d) 組成物が約5.0～約6.7のpKaを有するカチオン性脂質を有するとき、腫瘍または腫瘍細胞；

から選択される組織または細胞に送達するためのものである、組成物。

## 【請求項2】

式(Ⅰ)：

【化 1】



「式中、

R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub> ヘテロシクロアルキル、C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub> ヘテロシクロアルケニル、C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub> ヘテロシクロアルキニルまたは C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> ヘテロアリール基を形成し；

aは、存在しないか、または、所望により置換されたC<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>アルキレンであり。

bは、存在しないか、または、所望により置換されたC<sub>1</sub>~4アルキレンであり；

cは、存在しないか、または、所望により置換されたC<sub>1</sub>-4アルキレンであり。

$x^1$  は、〇または S であり；

$\chi^2$  は、O または S であり；

$\text{Y}^1$  は、所望により置換された  $\text{C}_{10-30}$  アルケニル、 $\text{C}_{10-30}$  アルキニル、 $\text{C}_{10-30}$  ヘテロアルケニルまたは  $\text{C}_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；

Lは、存在しないか、または  $(L^a)_d$  -  $(L^b)_e$  -  $(L^c)_f$  -

{ここで、 $L^a$ は、所望により置換された $C_{1-15}$ アルキレン、 $C_{1-15}$ アルケニレン、 $C_{1-15}$ アルキニレン、 $C_{1-15}$ ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$ ヘテロアルケニレンまたは $C_{1-15}$ ヘテロアルキニレンであり；

$L^b$  は、所望により置換された  $C_{6-14}$  アリーレンまたは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；

$L^c$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$d$  は、0 または 1 であり；

$e$  は、0 または 1 であり；

$f$  は、0 または 1 である。}

であり；

$\text{Y}^2$  は、所望により置換されたステロイドである。]

の化合物またはその塩または薬学的に許容される誘導体。

### 【請求項3】

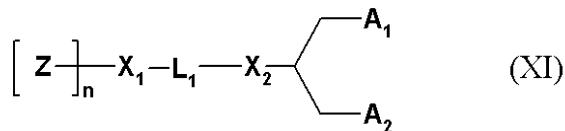
1個以上の置換基が、

- (a) a が、所望により置換された C<sub>1</sub> - C<sub>2</sub> アルキレンおよび所望により置換された C<sub>1</sub> アルキレンから選択され；
  - (b) b が、所望により置換された C<sub>0</sub> - C<sub>2</sub> アルキレンおよび所望により置換された C<sub>1</sub> アルキレンから選択され；
  - (c) c が、存在しないか、または、所望により置換された C<sub>1</sub> アルキレンであるか；かつ／または
  - (d) a、b および c が非置換である；
  - (e) R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> が、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された C<sub>3</sub> - C<sub>2</sub> 基へテロシクロアルキル、C<sub>3</sub> - C<sub>2</sub> 基へテロシクロアルケニルまたは C<sub>3</sub> - C<sub>2</sub> 基へテロシクロアルキニル基を形成し；
  - (f) R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> が、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された環状 C<sub>5</sub> - C<sub>6</sub> 基および所望により置換された環状 C<sub>5</sub> - C<sub>6</sub> 基から選択される基を形成し；
  - (g) R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> が、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された環状 C<sub>5</sub> 基、C<sub>6</sub> 基または C<sub>7</sub> 基を形成し；および
  - (h) R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> が、それらが結合している窒素原子と一体となって、頭部 H<sup>1</sup> ~ H<sup>5</sup> の少なくとも 1 個から選択されるものである；
  - (i) X<sup>1</sup> が O であり；
  - (j) X<sup>2</sup> が O であり；
  - (k) X<sup>1</sup> および X<sup>2</sup> が両方とも O であり；
  - (l) L が少なくとも 1 個のヘテロ原子を含み；
  - (m) L が少なくとも 1 個の O 原子を含み；
  - (n) L<sup>c</sup> が式 L<sup>c-i</sup> ~ L<sup>c-xxxxxiii</sup> の 1 つから選択され；
  - (o) d が 0 であり； e が 0 であり； f が 1 である；
  - (p) Y<sup>1</sup> が C<sub>1</sub> - C<sub>2</sub> 基であり；
  - (q) Y<sup>1</sup> が少なくとも 1 個のアルケニル基を有し；
  - (r) Y<sup>1</sup> が少なくとも 1 個の cis 不飽和アルケニル基を有し；
  - (s) Y<sup>1</sup> が Y<sup>1-i</sup> ~ Y<sup>1-vii</sup> から選択されるものあり；
  - (t) Y<sup>2</sup> が所望により置換されたステロイド上で酸素原子を介して L に結合しており；
  - (u) Y<sup>2</sup> がステロイドの環 A の 3 位でヒドロキシ基の水素原子が除かれたステロールであり；
  - (v) Y<sup>2</sup> が(u)のステロールであり、該ステロールが、アンナステロール；アベナステロール；シトステロール；ブラシカステロール；カルシフェロール；カンブエステロール；カリノステロール；チャイナステロール；コレスタノール；コレステロール；コプロスタノール；シクロアルテノール；デヒドロコレステロール；デスマステロール；ジヒドロカルシフェロール；ジヒドロコレステロール；ジヒドロエルゴステロール；ジノステロール；エピコレステロール；エルゴステロール；フコステロール；ヘキサヒドロルミステロール；ヘキサオール；ヒドロキシコレステロール；ラノステロール；ルミステロール；パルケオール；ポリフェラステロール；サリンゴステロール；シトスタノール；シトステロール；スチグマスタノール；スチグマステロール；ウェインベルステロール；チモステロール；ステロール胆汁酸(コレル酸；ケノデオキシコレル酸；グリココレル酸；タウロコレル酸；デオキシコレル酸およびリトコレル酸から選択される 1 つ以上を含む)；および／またはその塩もしくは薬学的に許容される誘導体からなる群から選択され；
  - (w) Y<sup>2</sup> がコレステロールである；
- の 1 つ以上から選択されるものである、請求項 2 に記載された化合物。

【請求項 4】

式(XI)：

## 【化2】



[式中、

Zは、PEG、ならびに、ポリ(オキサゾリン)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(グリセロール)、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ[N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド]およびポリ(アミノ酸)をベースとするポリマー(ここで、ポリマーは直鎖であっても分枝鎖であってもよく、また、所望により置換されていてもよい。)から選択される親水性頭部であり；

ここで、Zは、n個のサブユニットが重合したものであり；

nは、10ユニットと200ユニットの間のZの平均重合度であり、ここで、nは、異なるポリマータイプについて最適化されており；

L<sub>1</sub>は、エーテル(例えば-O-)、エステル(例えば-C(O)O-)、スクシネート(例えば-O(O)C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)O-)、カルバメート(例えば-O-C(O)-NR'-)、カーボネート(例えば-O-C(O)O-)、ケトン(例えば-C-C(O)-C-)；カルボニル(例えば-C(O)-)；ウレア(例えば-NR-C(O)NR'-)、アミン(例えば-NR'-)、アミド(例えば-C(O)NR'-)、イミン(例えば-C(NR')-)、チオエーテル(例えば-S-)、キサントゲン酸エステル(例えば-O-C(S)S-)およびホスホジエステル(例えば-O-P(O)<sub>2</sub>O-) (これらは何れも、0個、1個またはそれ以上のZ基によって置換されていてもよい。)を0個、1個、2個またはそれ以上含む、所望により置換されたC<sub>1-10</sub>アルキレンまたはC<sub>1-10</sub>ヘテロアルキレンリンカーであり；

ここで、R'は、-H、-NH-、-O-、-S-、ホスフェートまたは所望により置換されたC<sub>1-10</sub>アルキレンから独立して選択され；

X<sub>1</sub>およびX<sub>2</sub>は、炭素原子、または、-NH-、-O-、-S-もしくはホスフェートから選択されるヘテロ原子から独立して選択され；

A<sub>1</sub>およびA<sub>2</sub>は、C<sub>6-30</sub>アルキル、C<sub>6-30</sub>アルケニルおよびC<sub>6-30</sub>アルキニルから独立して選択され、ここで、A<sub>1</sub>およびA<sub>2</sub>は、同一であっても異なっていてもよい。]

あるいは、A<sub>1</sub>およびA<sub>2</sub>は、それらが結合している炭素原子と一体となって、所望により置換されたステロイドを形成する。]

のステルス脂質またはその塩または薬学的に許容される誘導体。

## 【請求項5】

請求項1に記載の組成物に使用するための、請求項2～4の何れか1つ以上の組成物。

## 【請求項6】

生物活性薬物が肝臓または肝臓細胞に送達するためのものであり、カチオン性脂質が、少なくとも

- (a) 約5.1～約7.4；
- (b) 約5.3～約7.3；
- (c) 約5.9～約7.0；
- (d) 約6.2～約6.8；および
- (e) 約6.1以上

から選択されるpKaを有する、請求項1または5に記載の組成物。

## 【請求項7】

生物活性薬物が腫瘍または腫瘍細胞に送達するためのものであり、カチオン性脂質が、少なくとも

- (a) 約5.0～約6.7；
- (b) 約5.2～約6.3；
- (c) 約5.4～約6.2；

10

20

30

40

50

(d) 約 5.8 ~ 約 6.1 ; および

(e) 約 6.1 以下

から選択される  $pK_a$  を有する、請求項 1 または 5 に記載の組成物。

**【請求項 8】**

少なくとも 1 種の中性脂質をさらに含む、請求項 1 または請求項 5 ~ 7 の何れか 1 項に記載の組成物。 10

**【請求項 9】**

組成物が、ステルス脂質、製剤方法、N / P 比、粒子サイズ、および、カチオン性脂質、所望により存在する中性脂質、ヘルパー脂質、ステルス脂質および所望のアルキルレゾルシノールをベースとする脂質のモル比の少なくとも 1 つの選択によって最適化される、請求項 1 または請求項 5 ~ 8 の何れか 1 項に記載の組成物。

**【請求項 10】**

カチオン性脂質が、E0001 ~ E0171 および E0175 ~ E0180 から選択される、請求項 1 または請求項 5 ~ 9 の何れか 1 項に記載の組成物。

**【請求項 11】**

ステルス脂質が、S001 ~ S009 および S012 ~ S026 から選択される、請求項 1 または請求項 5 ~ 10 の何れか 1 項に記載の組成物。 20

**【請求項 12】**

組成物が、標的となる細胞のタイプまたは臓器に最適化したカチオン性脂質の  $pK_a$  、用いられるカチオン性脂質、用いられるステルス脂質、ヘルパー脂質、用いられる中性脂質、中性脂質が存在するか否か、選択されたヘルパー脂質、所望により存在する中性脂質、ステルス脂質およびカチオン性脂質の比率、N / P 比、粒子サイズ、投与レジメ、投与量、製剤化方法などの個別の選択を含むがこれらに限定されない少なくとも 1 つのパラメーターを最適化したものである、請求項 1 または請求項 5 ~ 11 の何れか 1 項に記載された組成物。

**【請求項 13】**

生物活性薬物をさらに含む、請求項 1 または請求項 5 ~ 12 の何れか 1 項に記載の組成物。 20

**【請求項 14】**

疾患または障害の治療的処置に有効な量で、生物活性薬物を含む、請求項 13 に記載の組成物。 30

**【請求項 15】**

生物活性薬物が、抗体、コレステロール、ホルモン、抗ウイルス剤、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核タンパク質、化学療法剤、低分子量薬物、ビタミン、補因子、ヌクレオシド、ヌクレオシド誘導体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素的核酸、アンチセンス核酸、三本鎖形成オリゴヌクレオチド、2,5-A アンチセンスキメラ、アロザイム、アブタマー、デコイ RNA 分子およびそのアナログ、および、低分子核酸、例えば RNA 干渉剤 (RNAi) 、低分子干渉核酸 (siRNA) 、低分子干渉 RNA (small RNA) 、二本鎖 RNA (dsRNA) 、ミクロ RNA (miRNA) 、および低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) からなる群から選択される、請求項 13 または 14 に記載の組成物。 40

**【請求項 16】**

生物活性薬物が、ヌクレオシドまたはヌクレオシド誘導体、RNAi 、 siRNA 、 RNAi 阻害剤、 miRNA 、 siRNA および shRNA の 1 つ以上から選択される、請求項 15 に記載の組成物。

**【請求項 17】**

さらに薬学的に許容される担体を含む、請求項 1 ~ 16 の何れか 1 項に記載された化合物、製剤および / または組成物。

**【請求項 18】**

請求項 1 ~ 16 の何れか 1 項に記載の化合物、製剤および組成物、ならびに使用説明書を含むキット。 50

**【請求項 19】**

疾患または状態を処置する方法であって、治療有効量の請求項1または請求項5～17の何れか1項に記載された組成物を、必要とする患者に投与する工程を含む方法。

**【請求項 20】**

疾患または状態が、癌、肝臓疾患、または、RNAi構築物による処置に応答する疾患である、請求項19に記載の方法。

**【請求項 21】**

処置を必要とする対象において疾患または状態を処置する方法であって、請求項1または請求項5～17の何れか1項に記載された組成物を1つ以上含む製剤中の治療有効量の生物活性薬物を投与する工程を含む方法。

10

**【請求項 22】**

疾患または状態が、腫瘍、肝臓疾患、または、RNAi構築物による処置に応答する疾患である、請求項21に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****本発明の分野**

本発明は、カチオン性脂質化合物、ステルス脂質(stealth lipid)化合物、および、当該化合物を含む組成物に関する。本発明はまた、当該化合物および組成物の製造方法、および、例えば細胞および組織に生物活性薬物を送達するための、当該化合物および組成物の方法およびその方法における当該化合物および組成物の使用に関する。本発明は、特に肝臓および腫瘍を含む特定の細胞型に、生物活性薬物を送達するための脂質製剤に使用するためのカチオン性脂質において、最適化されたpKa範囲、および製剤を最適化する方法を記載している。

20

**【背景技術】****【0002】****本発明の背景**

生物活性薬物(治療関連化合物を含む)の対象への送達は、しばしば、化合物が標的細胞または組織に到達するのが困難であることによって妨げられる。特に、多くの生物活性薬物の生存細胞への輸送は、細胞の複雑な膜系によってかなり制限される。これらの制限のために、成果を得るために望ましい濃度よりもはるかに高い濃度の生物活性薬物の使用を要し、これは毒作用および副作用のリスクを増大させる。この問題の1つの解決方法は、細胞への選択性的侵入が可能な特異的担体分子を利用することである。脂質担体、生物分解性ポリマーおよび種々のコンジュゲート系を、細胞への生物活性薬物の送達を改善するために用いることが可能である。

30

**【0003】**

細胞に送達するのが特に難しい生物活性薬物の1つのクラスは、生物治療薬(ヌクレオシド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、核酸およびこれらの誘導体を含む)である。一般的に、核酸は、細胞または血漿中で、限られた時間のみ安定である。RNA干渉、RNAi治療、RNA薬、アンチセンス治療および遺伝子治療の発展により、とりわけ、細胞に活性な核酸薬物を導入する有効な手段の必要性が増大している。これらの理由のために、核酸をベースとする薬物を安定化して細胞に送達することができる組成物は、特に興味深い。

40

**【0004】**

細胞への外来性核酸の輸送を改善する最も研究された方法は、ウイルスベクターまたはカチオン性脂質の使用を含む。ウイルスベクターは、幾つかの細胞型に遺伝子を有効に輸送するために使用することができるが、それらは、一般的に、化学的に合成された分子を細胞に導入するために使用することはできない。

**【0005】**

他の方法は、一部分で生物活性薬物と相互作用し、他の部分で膜系と相互作用するカチ

50

オン性脂質を組み込んだ送達組成物を使用することである（レビューについては、Felgner, 1990, Advanced Drug Delivery Reviews, 5, 162-187 および Felgner, 1993, J. Liposome Res., 3, 3-16を参照のこと）。このような組成物は、リポソームを含むと報告されている。

#### 【0006】

リポソームが1965年にBanghamによって最初に記載されて以来 (J. Mol. Biol. 13, 238 252)、生物活性薬物を送達する脂質ベース担体系を開発することに、関心が持たれて努力され続けている。正に帶電したリポソームの使用によって培養細胞に機能的核酸を導入するプロセスは、Philip Felgner et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 7417 (1987) に最初に記載されている。このプロセスは、その後に、K. L. Brigham et al., Am. J. Med. Sci., 298, 278 281 (1989) によってin vivoで証明された。10

#### 【0007】

リポソームは、生物分子を分解から保護しながらその細胞取り込みを改善するために、魅力的な担体である。リポソームの種々のクラスの中で、カチオン性脂質を含むリポソームは、一般的に、ポリアニオン(例えば核酸)を送達するために使用される。このようなリポソームは、カチオン性脂質のみを使用して、所望により他の脂質および両親媒性物質、例えばホスファチジルエタノールアミンを含んで、形成される。当技術分野では、脂質製剤の組成およびその製造方法の双方が、得られた凝集物の構造およびサイズに影響を及ぼすことが周知である。20

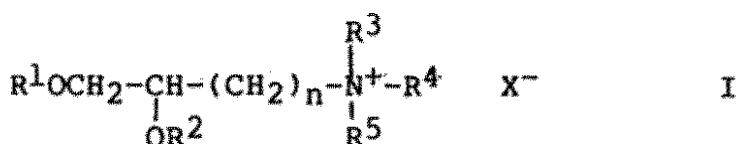
#### 【0008】

生物活性薬物の細胞送達におけるカチオン性脂質の使用は、幾つかの利点を有する。カチオン性脂質を用いたアニオニン性化合物の被包は、静電相互作用により、本質的に定量的である。さらに、カチオン性脂質は、負に帶電した細胞膜と相互作用して、細胞膜輸送が開始されると考えられる (Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; Xu et al., 1996, Biochemistry 35, 5616)。20

#### 【0009】

正に帶電したリポソームを用いる培養細胞への機能的核酸の導入についてのFelgnerの初期の研究に続いて、一般式 I :

#### 【化1】



をベースとするカチオン性脂質化合物が、欧州特許第0 187 702号の特許明細書に開示されている。30

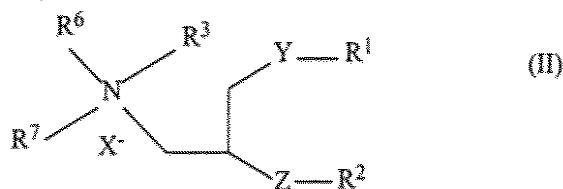
#### 【0010】

これらのカチオン性脂質化合物は、一般的に、窒素を含む“頭部”に結合している2個のアルキル鎖またはアルケニル鎖からなる。また、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>のうち2つまたは3つが、一体となって、キヌクリジノ、ピペリジノ、ピロリジノまたはモルホリノであるものが開示されている。40

#### 【0011】

欧州特許第0 187 702号以降、多くの別の研究者たちが、カチオン性脂質化合物を開示している。関連する特許明細書は、国際公開第00/030444号であり、これは、合成カチオン性脂質およびリポソームを記載している。この明細書は、多様な異なる頭部を有するカチオン性脂質化合物を開示しており、その幾つかの例は、1個より多い頭部を特徴としている。すなわち、これに開示された化合物のうち、式(I)の化合物である。

## 【化2】

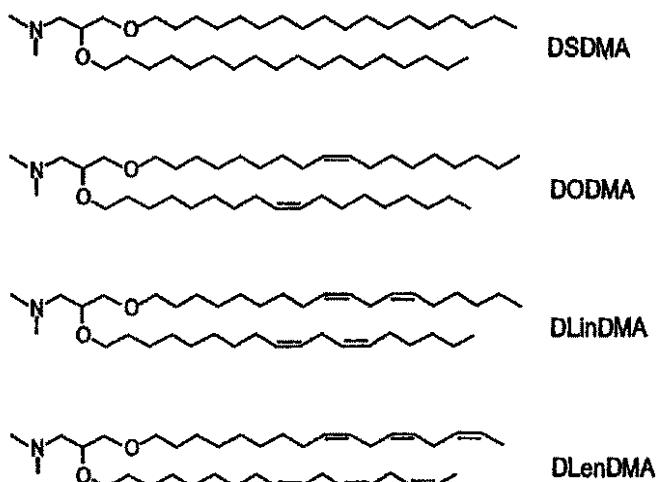


## 【0012】

国際公開第2005/121348号は、脂質をベースとする製剤を開示している。当該明細書に開示された核酸脂質粒子は、干渉RNA分子、1個所より多い不飽和部位を有する約10～20個の炭素原子のアルキル側鎖を有するカチオン性脂質、非カチオン性脂質、および、粒子の凝集を阻害する脂質コンジュゲート、例えばポリエチレングリコール(PEG)脂質コンジュゲートまたはポリアミド(ATTA)コンジュゲートを含む。この特許明細書に開示された具体的なカチオン性脂質化合物は、DSDMA、DODMA、DLinDMA、DLenDMAを含む。

10

## 【化3】



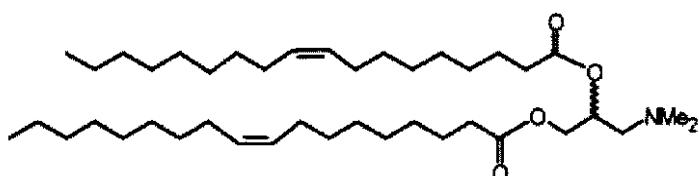
20

## 【0013】

Cullis and Bailey, Biochemistry 1994, 33, 12573-12580は、アミノ脂質、例えば下記のアミノ脂質を含むリポソームを報告している。

30

## 【化4】



40

## 【0014】

新規カチオン性脂質化合物に関する他の最近の文献は、薬物送達および診断に有用であると報告されている、広範なアミノ酸脂質化合物を記載している国際公開第2008/137758号である。

## 【0015】

米国特許第2006/0240554号および関連出願である米国特許第2008/0020058号および米国特許第2009/0048197号はまた、カチオン性脂質に関するものである。これらの脂質は、細胞および/または組織に、低分子量核酸、例えば低分子干渉核酸(siRNA)を含む生物活性薬物を送達することができるところが報告されている。

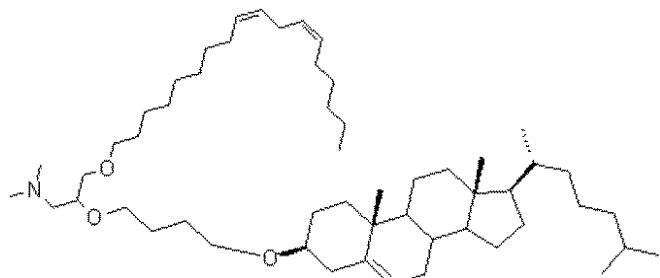
## 【0016】

米国特許第2006/0240554号、米国特許第2008/0020058号および米国特許第2009/0048197

50

号は、細胞に siRNA を送達するための、コレステロールおよび PEG - DAG と組み合わせたカチオン性脂質 CLinDMA の使用を記載している。CLinDMA の構造を下に示す。この分子の“頭部”には、-N(Me)<sub>2</sub> 基がある。CLinDMA はまた、本明細書で E0173 と記載される。

【化 5】

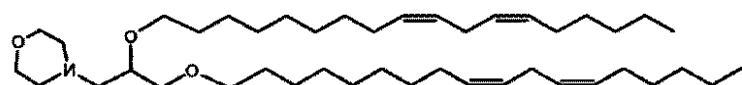


10

[ 0 0 1 7 ]

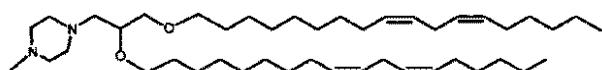
国際公開第2009/086558号は、下記の化合物を開示している。

【化 6】



20

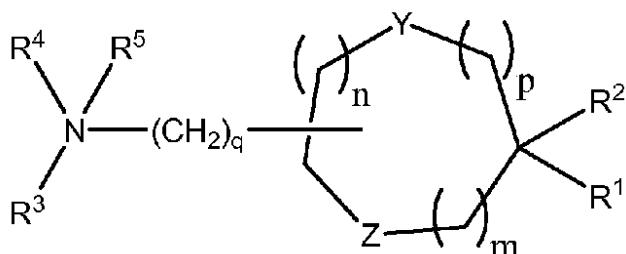
七



[ 0 0 1 8 ]

それはまた、下記の一般式：

【化7】



(式中、 $R^3$  および  $R^4$  は、一体となって、所望により置換された 4 ~ 6 個の炭素原子および窒素および酸素から選択される 1 個または 2 個のヘテロ原子を含むヘテロ環式環を形成してもよい。)

を有するアミノ脂質を開示している。

[ 0 0 1 9 ]

細胞への生物活性薬物の全身および局所送達を助けるさらなるカチオン性脂質が必要とされている。また、当技術分野で既知のカチオン性脂質と比較して、細胞への生物活性薬物の全身および局所送達を改善したカチオン性脂質が必要とされている。さらに、特定の臓器および腫瘍、特に肝臓外部の腫瘍への生物活性薬物の全身および局所送達を改善するために最適化された物理学的性質を有する脂質剤が必要とされている。

## 【発明の概要】

【0020】

## 【】 本発明の概要

本発明は、新規カチオン性脂質およびステルス脂質、それらを含む製剤、およびそれらの使用方法を提供する。また、特に RNAi 構築物を含む薬物を治療有効量でそれを必要

50

とする対象に送達するために当該脂質を使用する製剤を提供する。特定の範囲内の  $pK_a$  を有するカチオン性脂質を含む特定の製剤が、対象の肝臓および/または体細胞組織中の腫瘍へ治療有効量の薬物を投与するために提供される。原則として(例外がある)、腫瘍への送達に最も有効な製剤(下により詳細に記載)は、約 6.1 以下の  $pK_a$  を有するカチオン性脂質を含み、特定の範囲は、腫瘍のタイプに依存して、約 5.0 ~ 約 6.7 を含み、特に約 5.2 ~ 約 6.3、または約 5.4 ~ 約 6.2、または約 5.8 ~ 約 6.1 を含む。一方、肝臓への送達に最も有効な製剤(下記により詳細に記載)は、約 6.1 以上の  $pK_a$  を有するカチオン性脂質を含み、特定の範囲は、約 5.1 ~ 約 7.4 を含み、約 5.3 ~ 約 7.3 を含み、特に約 5.9 ~ 約 7.0 を含み、一つの態様において約 6.2 ~ 約 6.8 である。

## 【0021】

10

製剤は、さらに、当業者によって、例えば標的となる細胞のタイプまたは臓器に最適化したカチオン性脂質の  $pK_a$ 、用いられるカチオン性脂質、用いられるステルス脂質、ヘルパー脂質、用いられる中性脂質(中性脂質が存在するか否かを含む)、選択されたヘルパー脂質、所望により存在する中性脂質、ステルス脂質およびカチオン性脂質の比率、N/P 比、粒子サイズ、投与レジメ、投与量、製剤方法などの個々の選択を含むが、これらに限定されない、製剤の他の局面を調節することによって最適化され得る。

## 【0022】

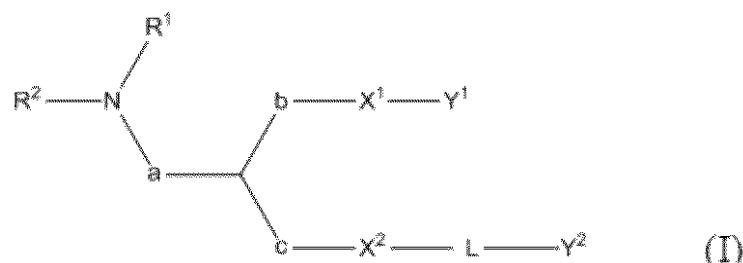
20

本発明は、カチオン性脂質(本明細書中で“化合物”とも言う)および当該脂質を含む組成物を提供する。本発明はまた、当該化合物および組成物の製造方法、当該化合物および組成物により生物活性薬物(治療薬を含む)を細胞に送達(*in vivo*送達を含む)するための方法およびその方法における当該化合物および組成物の使用、および、*in vivo*で特定の細胞型および組織に送達するために当該製剤を最適化する方法を提供する。本発明はまたステルス脂質を提供する。

## 【0023】

一つの態様において、本発明は、式(I):

## 【化8】



[式中、

$R^1$  および  $R^2$  は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された  $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキニルまたは  $C_{5-20}$  ヘテロアリール基を形成し;

a は、存在しないか、または、所望により置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり;

b は、存在しないか、または、所望により置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり;

c は、存在しないか、または、所望により置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり;

$X^1$  は、O または S であり;

$X^2$  は、O または S であり;

$Y^1$  は、所望により置換された  $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルまたは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり;

L は、存在しないか、または  $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f-$

{ここで、 $L^a$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり;

$L^b$  は、所望により置換された  $C_{6-14}$  アリーレンまたは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり;

40

50

$L^c$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

d は、0 または 1 であり；

e は、0 または 1 であり；

f は、0 または 1 である。}

であり；

$Y^2$  は、所望により置換されたステロイドである。]

の化合物またはその薬学的に許容される誘導体を提供する。

#### 【0024】

本発明はまた、式(I)の化合物を含む医薬組成物を提供する。これらの組成物は、所望により他の脂質成分と組み合わせた生物活性薬物を含み得る。

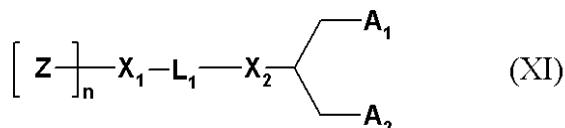
#### 【0025】

本発明はまた、式(XI)の化合物を含む医薬組成物を提供する。これらの組成物は、所望により他の脂質成分と組み合わせた生物活性薬物を含み得る。

#### 【0026】

一つの態様において、本発明は、式(XI)：

#### 【化9】



[式中、

$Z$  は、PEG、ならびに、ポリ(オキサゾリン)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(グリセロール)、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ[N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド]およびポリ(アミノ酸)をベースとするポリマー(ここで、ポリマーは直鎖であっても分枝であってもよく、また、所望により置換されていてよい。)から選択される親水性頭部であり；

ここで、 $Z$  は、 $n$  個のサブユニットが重合したものであり；

$n$  は、10 ユニットと 200 ユニットの間の  $Z$  の平均重合度であり、ここで、 $n$  は、異なるポリマータイプについて最適化されており；

$L_1$  は、エーテル(例えば -O-)、エステル(例えば -C(O)O-)、スクシネート(例えば -O(O)C-C<sub>H</sub><sub>2</sub>-C<sub>H</sub><sub>2</sub>-C(O)O-)、カルバメート(例えば -OC(O)-NR'-)、カーボネート(例えば -OC(O)O-)、ケトン(例えば -C-C(O)-C-)；カルボニル(例えば -C(O)-)；ウレア(例えば -NR-C(O)NR'-)、アミン(例えば -NR'-)、アミド(例えば -C(O)NR'-)、イミン(例えば -C(NR')-)、チオエーテル(例えば -S-)、キサントゲン酸エステル(xanthate)(例えば -OC(S)S-)およびホスホジエステル(例えば -OP(O)<sub>2</sub>O-) (これらは何れも、0 個、1 個またはそれ以上の  $Z$  基によって置換されていてよい。)を 0 個、1 個、2 個またはそれ以上含む、所望により置換された  $C_{1-10}$  アルキレンまたは  $C_{1-10}$  ヘテロアルキレンリンカーであり；

ここで、 $R'$  は、-H、-NH-、-NH<sub>2</sub>、-O-、-S-、ホスフェートまたは所望により置換された  $C_{1-10}$  アルキレンから独立して選択され；

$X_1$  および  $X_2$  は、炭素原子、または、-NH-、-O-、-S- もしくはホスフェートから選択されるヘテロ原子から独立して選択され；

$A_1$  および  $A_2$  は、 $C_{6-30}$  アルキル、 $C_{6-30}$  アルケニルおよび  $C_{6-30}$  アルキニルから独立して選択され、ここで、 $A_1$  および  $A_2$  は、同一であっても異なっていてよいか、

あるいは、 $A_1$  および  $A_2$  は、それらが結合している炭素原子と一体となって、所望により置換されたステロイドを形成する。]

の化合物またはその塩または薬学的に許容される誘導体を提供する。

【0027】

本発明の脂質を含む組成物は、例えば、患者において、特に遺伝子発現の調節に応答する障害または疾患を含む障害または疾患を処置するために治療用化合物(例えば1種以上の生物活性薬物)を送達するのに、あるいは、標的細胞または組織に治療薬を投与するのに有用である。本発明の化合物および組成物は、それ自体、患者において疾患および状態を処置するために用いられ得る。特に、本化合物は、抗体、低分子量組成物、タンパク質治療薬および核酸組成物、例えばRNAiのためのsiRNAを含む生物活性薬物を、細胞または組織に送達するための、リポソームおよび/または脂質ナノ粒子製剤組成物に利用され得る。

10

【0028】

本発明の方法において、生物活性薬物は、記載されたカチオン性脂質を利用して細胞に送達され、その過程において、上皮組織および内皮組織、例えば皮膚、粘膜、血管組織、胃腸の組織、血液脳関門組織、眼の組織、肺組織、肝臓組織、心臓組織、腎臓組織、腫瘍組織などを通り抜けることができる。本化合物および組成物は、生物活性薬物の局所送達および全身送達の双方に用いることができる。

【発明を実施するための形態】

【0029】

本発明の詳細な説明

これまで、大部分の体細胞組織への治療有効量のRNAi組成物の送達に問題があるために、RNAi分野の治療可能性は満たされていない。RNAi治療薬は、眼、皮膚、肺および肝臓の組織を対象とする場合は、ある程度有効である。他の全ての体細胞組織を処置するために、および転移性癌を含む癌に、治療有効量のRNAiを送達するための組成物および方法に対する必要性が残存している。

20

【0030】

本明細書に記載する発見は、腫瘍へ送達するための製剤では、カチオン性脂質の最適pKa範囲が、肝臓へ送達するためのものより低いことが見出されたことである。原則として(例外がある)、腫瘍に送達するのに最も有効な脂質を有する製剤(下により詳細に記載)は、腫瘍のタイプに依存して、特に約5.8～約6.1を含む約5.0～約6.7のpKaを有するカチオン性脂質を含む。一方、肝臓へ送達するのに最も有効な脂質を有する製剤(下により詳細に記載)は、特に約5.9～約7.0を含む約5.1～約7.4のpKaを有するカチオン性脂質を含む。一つの態様において、約6.1以下のpKaを有するカチオン性脂質は、腫瘍または腫瘍細胞に生物活性薬物を送達する製剤に、より有効である。一方、約6.1以上のpKaを有するカチオン性脂質は、肝臓または肝細胞に生物活性薬物を送達する製剤に、より有効である。

30

【0031】

本発明では、新規カチオン性脂質、ステルス脂質およびそれらを含む製剤、ならびに使用方法が提供される。特定のpKa範囲の典型的なカチオン性脂質であって、in vivoで対象に投与されたときに、それを含む製剤が腫瘍に治療有効量のRNAi組成物を送達し得るカチオン性脂質が記載されている。他のpKa範囲のカチオン性脂質で作られる他の製剤であって、in vivoで対象に投与されたときに、それを含む製剤が治療有効量のRNAi組成物を送達し得るカチオン性脂質が記載されている。

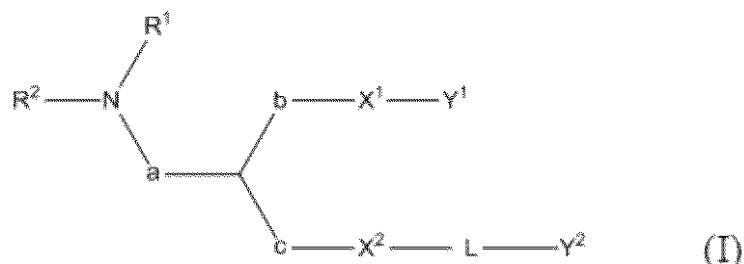
40

【0032】

本発明のカチオン性脂質

一つの態様において、本発明は、式(I)：

## 【化10】



[式中、

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換されたC<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルケニル、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルキニルまたはC<sub>5-20</sub>ヘテロアリール基を形成し；

aは、存在しないか、または、所望により置換されたC<sub>1-4</sub>アルキレンであり；

bは、存在しないか、または、所望により置換されたC<sub>1-4</sub>アルキレンであり；

cは、存在しないか、または、所望により置換されたC<sub>1-4</sub>アルキレンであり；

X<sup>1</sup>は、OまたはSであり；

X<sup>2</sup>は、OまたはSであり；

Y<sup>1</sup>は、所望により置換されたC<sub>10-30</sub>アルケニル、C<sub>10-30</sub>アルキニル、C<sub>10-30</sub>ヘテロアルケニルまたはC<sub>10-30</sub>ヘテロアルキニルであり；

Lは、存在しないか、または-(L<sup>a</sup>)<sub>d</sub>-(L<sup>b</sup>)<sub>e</sub>-(L<sup>c</sup>)<sub>f</sub>-

{ここで、L<sup>a</sup>は、所望により置換されたC<sub>1-15</sub>アルキレン、C<sub>1-15</sub>アルケニレン、C<sub>1-15</sub>アルキニレン、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルキレン、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルケニレンまたはC<sub>1-15</sub>ヘテロアルキニレンであり；

L<sup>b</sup>は、所望により置換されたC<sub>6-14</sub>アリーレンまたはC<sub>5-13</sub>ヘテロアリーレンであり；

L<sup>c</sup>は、所望により置換されたC<sub>1-15</sub>アルキレン、C<sub>1-15</sub>アルケニレン、C<sub>1-15</sub>アルキニレン、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルキレン、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルケニレンまたはC<sub>1-15</sub>ヘテロアルキニレンであり；

dは、0または1であり；

eは、0または1であり；

fは、0または1である。}

であり；

Y<sup>2</sup>は、所望により置換されたステロイドである。]

の化合物またはその薬学的に許容される誘導体を提供する

## 【0033】

式Iの一つの態様において、aは、所望により置換されたC<sub>1-2</sub>アルキレンである。

式Iの一つの態様において、aは、所望により置換されたC<sub>1</sub>アルキレンである。式Iの

一つの態様において、bは、所望により置換されたC<sub>0-2</sub>アルキレンである。式Iの

一つの態様において、bは、所望により置換されたC<sub>1</sub>アルキレンである。式Iの一つの態

様において、cは、存在しないか、または所望により置換されたC<sub>1</sub>アルキレンである。

式Iの一つの態様において、a、bおよびcは非置換である。式Iの一つの態様において、cは存在しない。

## 【0034】

式Iの一つの態様において、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが結合している窒素原子と一体とな

って、所望により置換されたC<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルケニルまたはC<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルキニル基を形成する。式Iの一つの態

様において、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが結合している窒素原子と一体となつて、所望により置換されたC<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルキル基を形成する。式Iの一つの態

様において、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが結合している窒素原子と一体となつて、所望により置換されたC<sub>5-16</sub>基を形成する。式Iの一つの態様において、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それら

10

20

30

40

50

が結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された C<sub>5-12</sub> 基を形成する。

**【0035】**

式 I の一つの態様において、 R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された C<sub>5</sub> 基、 C<sub>6</sub> 基または C<sub>7</sub> 基を形成する。式 I の一つの態様において、 R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された C<sub>5</sub> 基または C<sub>6</sub> 基を形成する。

**【0036】**

式 I の一つの態様において、 R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それらが結合している窒素原子と一体となって、 H<sup>1</sup> ~ H<sup>5</sup> から選択されるものである。

10

**【0037】**

式 I の一つの態様において、 X<sup>1</sup> は O である。式 I の一つの態様において、 X<sup>2</sup> は O である。

**【0038】**

式 I の一つの態様において、 L は、少なくとも 1 個のヘテロ原子を含む。式 I の一つの態様において、 L は、少なくとも 1 個の O 原子を含む。式 I の一つの態様において、 L は、少なくとも 2 個のヘテロ原子を含む。式 I の一つの態様において、 L は、少なくとも 2 個の O 原子の置換を含む。式 I の一つの態様において、 L<sup>c</sup> は、所望により置換された C<sub>1-15</sub> アルキレンまたは C<sub>1-15</sub> ヘテロアルキレンである。式 I の一つの態様において、 L<sup>c</sup> は、 L<sup>c-i</sup> ~ L<sup>c-xxxxiii</sup> の何れか 1 個以上から選択される。

20

**【0039】**

式 I の一つの態様において、 L<sup>c</sup> は、所望により置換された C<sub>1-15</sub> ヘテロアルキレンである。式 I の一つの態様において、 L<sup>c</sup> は、所望により置換された C<sub>1-11</sub> 基である。式 I の一つの態様において、 L<sup>c</sup> は、所望により置換された C<sub>1-9</sub> 基である。式 I の一つの態様において、 L<sup>c</sup> は、所望により置換された C<sub>3-8</sub> 基である。式 I の一つの態様において、 L<sup>c</sup> は、所望により置換された C<sub>4-7</sub> 基である。式 I の一つの態様において、 L<sup>c</sup> は、所望により置換された C<sub>5</sub> 、 C<sub>6</sub> または C<sub>7</sub> 基である。

**【0040】**

式 I の一つの態様において、 d は 0 であり； e は 0 であり、 f は 1 である。

30

**【0041】**

式 I の一つの態様において、 Y<sup>1</sup> は C<sub>12-28</sub> 基である。式 I の一つの態様において、 Y<sup>1</sup> は C<sub>14-26</sub> 基である。式 I の一つの態様において、 Y<sup>1</sup> は C<sub>16-24</sub> 基である。式 I の一つの態様において、 Y<sup>1</sup> は C<sub>16-22</sub> 基である。式 I の一つの態様において、 Y<sup>1</sup> は少なくとも 1 個のアルケニル基を有する。式 I の一つの態様において、 Y<sup>1</sup> は、 1 個、 2 個または 3 個のアルケニル基を有する。式 I の一つの態様において、 Y<sup>1</sup> は、 3 位で 1 個のアルケニル基を有する。式 I の一つの態様において、 Y<sup>1</sup> は、 6 位で 1 個のアルケニル基を有する。式 I の一つの態様において、 Y<sup>1</sup> は、 9 位で 1 個のアルケニル基を有する。

**【0042】**

式 I の一つの態様において、 Y<sup>1</sup> は、少なくとも 1 個の cis 不飽和アルケニル基を有する。式 I の一つの態様において、 Y<sup>1</sup> は、少なくとも 2 個の cis 不飽和アルケニル基を有する。式 I の一つの態様において、 Y<sup>1</sup> は、少なくとも 3 個の cis 不飽和アルケニル基を有する。式 I の一つの態様において、 Y<sup>1</sup> は、 Y<sup>1-i</sup> ~ Y<sup>1-vii</sup> から選択される。

40

**【0043】**

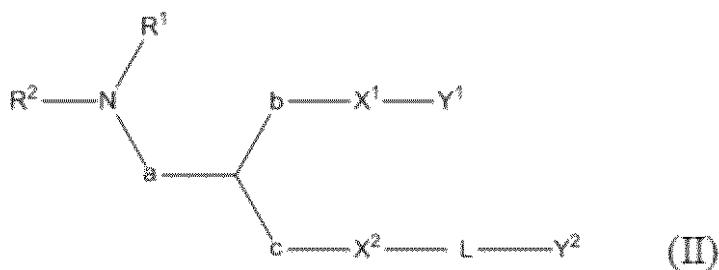
式 I の一つの態様において、 Y<sup>2</sup> は、酸素原子を介して、所望により置換されたステロイド上で、 L に結合している。式 I の一つの態様において、 Y<sup>2</sup> は、酸素原子を介して、ステロイドの環 A の 3 位で、 L に結合している。式 I の一つの態様において、 Y<sup>2</sup> は、ステロイドの環 A の 3 位でヒドロキシ基の水素原子が除かれたステロールである。式 I の一つの態様において、ステロールは、コレステロールである。

**【0044】**

50

本発明の第2の態様は、式(II)：

【化11】



10

[式中、

$R^1$  および  $R^2$  は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された  $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキニルまたは  $C_{5-20}$  ヘテロアリール基を形成し；

$a$  は、存在しないか、または、所望により置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり；

$b$  は、存在しないか、または、所望により置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり；

$c$  は、存在しないか、または、所望により置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり；

$X^1$  は、O または S であり；

$X^2$  は、O または S であり；

$Y^1$  は、所望により置換された  $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルまたは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；

$L$  は、 $- (L^a)_d - (L^b)_e - (L^c)_f -$

{ここで、 $L^a$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$L^b$  は、所望により置換された  $C_{6-14}$  アリーレンまたは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；

$L^c$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$d$  は、0 または 1 であり；

$e$  は、0 または 1 であり；

$f$  は、0 または 1 である。

ただし、 $L$  は、1 個以上のヘテロ原子を含む。}

であり；

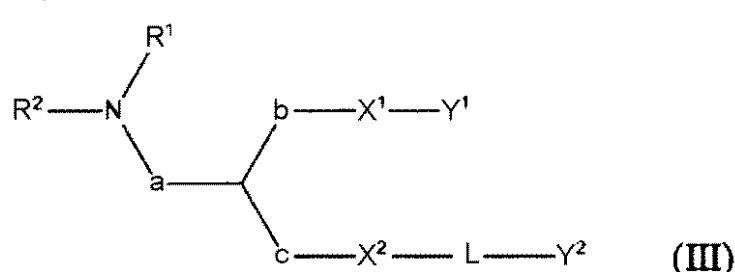
$Y^2$  は、所望により置換されたステロイドである。]

の化合物またはその薬学的に許容される誘導体によって表される。

【0045】

本発明の第3の態様は、式(III)：

【化12】



[式中、

$R^1$  および  $R^2$  は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換され

50

た  $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキニルまたは  $C_{5-20}$  ヘテロアリール基を形成し；

a は、メチレンであり；

b は、メチレンであり；

c は、存在せず；

$X^1$  は、O または S であり；

$X^2$  は、O または S であり；

$Y^1$  は、所望により置換された  $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルまたは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；

L は、 $-(L^a)_d - (L^b)_e - (L^c)_f -$

10

{ここで、 $L^a$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$L^b$  は、所望により置換された  $C_{6-14}$  アリーレンまたは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；

$L^c$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

d は、0 または 1 であり；

e は、0 または 1 であり；

f は、0 または 1 である。}

20

であり；

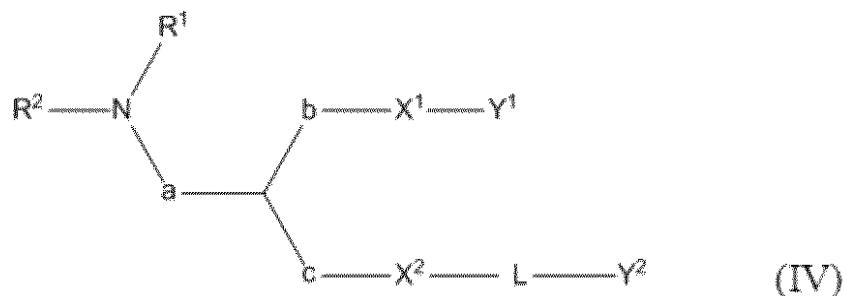
$Y^2$  は、所望により置換されたステロイドである。]

の化合物またはその薬学的に許容される誘導体によって表される。

#### 【0046】

本発明の第 4 の態様は、式(IV)：

#### 【化13】



[式中、

$R^1$  および  $R^2$  は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された  $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキニルまたは  $C_{5-20}$  ヘテロアリール基を形成し；

a は、メチレンであり；

b は、メチレンであり；

c は、存在せず；

$X^1$  は、O または S であり；

$X^2$  は、O または S であり；

$Y^1$  は、所望により置換された  $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルまたは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；

L は、 $-(L^a)_d - (L^b)_e - (L^c)_f -$

40

{ここで、 $L^a$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

50

$L^b$  は、所望により置換された  $C_{6-14}$  アリーレンまたは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；

$L^c$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

d は、0 または 1 であり；

e は、0 または 1 であり；

f は、0 または 1 である。

ただし、 $L$  は、1 個以上のヘテロ原子を含む。}

であり；

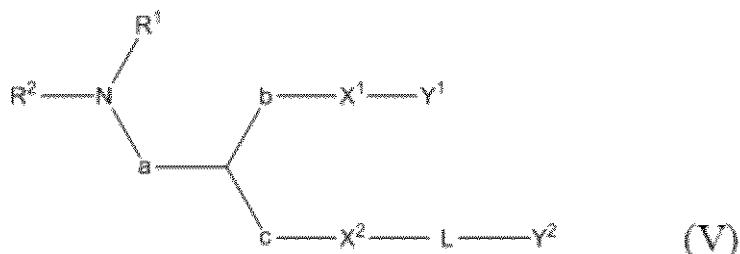
$Y^2$  は、所望により置換されたステロイドである。

の化合物またはその薬学的に許容される誘導体によって表される。

#### 【0047】

本発明の第 5 の態様は、式(V)：

#### 【化14】



[式中、

$R^1$  および  $R^2$  は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された  $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキニルまたは  $C_{5-20}$  ヘテロアリール基を形成し；

a は、メチレンであり；

b は、メチレンであり；

c は、存在せず；

$X^1$  は、O であり；

$X^2$  は、O であり；

$Y^1$  は、所望により置換された  $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルまたは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；

$L$  は、 $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f-$

{ここで、 $L^a$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$L^b$  は、所望により置換された  $C_{6-14}$  アリーレンまたは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；

$L^c$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

d は、0 または 1 であり；

e は、0 または 1 であり；

f は、0 または 1 である。

ただし、 $L$  は、1 個以上のヘテロ原子を含む。}

であり；

$Y^2$  は、所望により置換されたステロイドである。]

の化合物またはその薬学的に許容される誘導体によって表される。

10

20

30

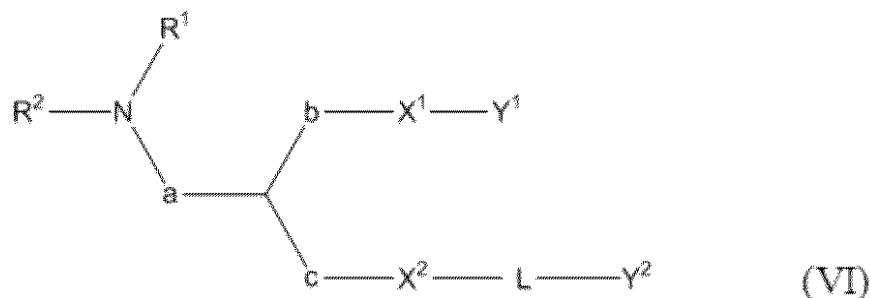
40

50

## 【0048】

本発明の第6の態様は、式(VI)：

## 【化15】



[式中、

$R^1$  および  $R^2$  は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された  $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキニルまたは  $C_{5-20}$  ヘテロアリール基を形成し；

a は、メチレンであり；

b は、メチレンであり；

c は、存在せず；

$X^1$  は、O であり；

$X^2$  は、O であり；

$Y^1$  は、所望により置換された  $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルまたは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；

L は、-L<sup>c</sup>-

{ここで、 $L^c$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンである。} 20  
であり；

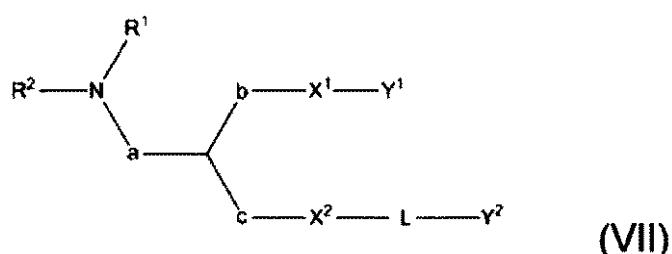
$Y^2$  は、所望により置換されたステロイドである。]

の化合物またはその薬学的に許容される誘導体によって表される。

## 【0049】

本発明の第7の態様は、式(VII)：

## 【化16】



[式中、

$R^1$  および  $R^2$  は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された  $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキニルまたは  $C_{5-20}$  ヘテロアリール基を形成し；

a は、メチレンであり；

b は、メチレンであり；

c は、存在せず；

$X^1$  は、O であり；

$X^2$  は、O であり；

$Y^1$  は、所望により置換された  $C_{16-22}$  アルケニル基であり；

L は、-L<sup>c</sup>-

{ここで、 $L^c$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンである。} 40

の化合物またはその薬学的に許容される誘導体によって表される。

ロアルケニレンまたはC<sub>1</sub> - C<sub>5</sub>ヘテロアルキニレンである。}

であり；

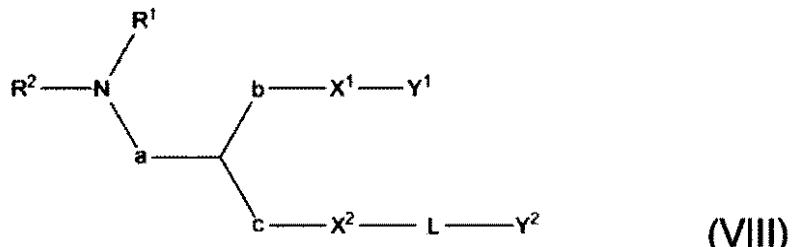
Y<sup>2</sup>は、所望により置換されたステロイドである。]

の化合物またはその薬学的に許容される誘導体によって表される。

【0050】

本発明の第8の態様は、式(VIII)：

【化17】



[式中、

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換されたC<sub>3</sub> - C<sub>20</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>3</sub> - C<sub>20</sub>ヘテロシクロアルケニル、C<sub>3</sub> - C<sub>20</sub>ヘテロシクロアルキニルまたはC<sub>5</sub> - C<sub>20</sub>ヘテロアリール基を形成し；

aは、メチレンであり；

bは、メチレンであり；

cは、存在せず；

X<sup>1</sup>は、Oであり；

X<sup>2</sup>は、Oであり；

Y<sup>1</sup>は、所望により置換されたC<sub>16</sub> - C<sub>22</sub>アルケニル基であり；

Lは、-L<sup>c</sup>-

{ここで、L<sup>c</sup>は、所望により置換されたC<sub>1</sub> - C<sub>5</sub>ヘテロアルキレン、C<sub>1</sub> - C<sub>5</sub>ヘテロアルケニレンまたはC<sub>1</sub> - C<sub>5</sub>ヘテロアルキニレンである。}

であり；

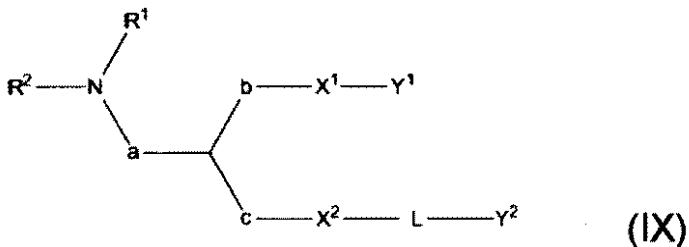
Y<sup>2</sup>は、ステロイドの環Aの3位のヒドロキシ基を介して結合しているコレステロールであり、当該ヒドロキシ基の水素原子は存在しない。]

の化合物またはその薬学的に許容される誘導体によって表される。

【0051】

本発明の第9の態様は、pKaが約5.1～約7.4である式(IX)：

【化18】



[式中、

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換されたC<sub>3</sub> - C<sub>20</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>3</sub> - C<sub>20</sub>ヘテロシクロアルケニル、C<sub>3</sub> - C<sub>20</sub>ヘテロシクロアルキニルまたはC<sub>5</sub> - C<sub>20</sub>ヘテロアリール基を形成し；

aは、メチレンであり；

bは、メチレンであり；

cは、存在せず；

X<sup>1</sup>は、OまたはSであり；

X<sup>2</sup>は、OまたはSであり；

40

50

$Y^1$  は、所望により置換された  $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルまたは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；

$L$  は、 $- (L^a)_d - (L^b)_e - (L^c)_f -$

{ここで、 $L^a$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$L^b$  は、所望により置換された  $C_{6-14}$  アリーレンまたは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；

$L^c$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$d$  は、0 または 1 であり；

$e$  は、0 または 1 であり；

$f$  は、0 または 1 である。

ただし、 $L$  は、1 個以上のヘテロ原子を含む。}

であり；

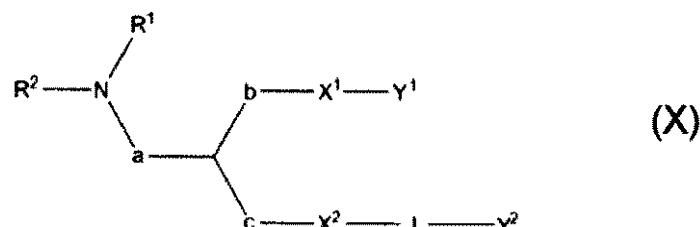
$Y^2$  は、所望により置換されたステロイドである。]

の化合物またはその薬学的に許容される誘導体によって表される。

### 【0052】

本発明の第 10 の態様は、 $pK_a$  が約 5.0 ~ 約 6.7 である式(X)：

### 【化19】



[式中、

$R^1$  および  $R^2$  は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された  $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキニルまたは  $C_{5-20}$  ヘテロアリール基を形成し；

$a$  は、メチレンであり；

$b$  は、メチレンであり；

$c$  は、存在せず；

$X^1$  は、O または S であり；

$X^2$  は、O または S であり；

$Y^1$  は、所望により置換された  $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルまたは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；

$L$  は、 $- (L^a)_d - (L^b)_e - (L^c)_f -$

{ここで、 $L^a$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$L^b$  は、所望により置換された  $C_{6-14}$  アリーレンまたは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；

$L^c$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$d$  は、0 または 1 であり；

$e$  は、0 または 1 であり；

10

20

30

40

50

$f$  は、0 または 1 である。

ただし、 $L$  は、1 個以上のヘテロ原子を含む。}

であり；

$Y^2$  は、所望により置換されたステロイドである。]

の化合物またはその薬学的に許容される誘導体によって表される。

### 【0053】

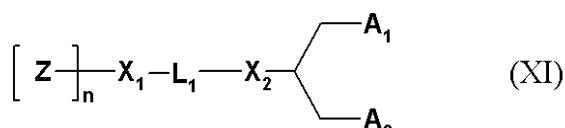
#### ステルス脂質

本発明は、脂質部分に連結している親水性頭部を含む“ステルス脂質”を含む。ステルス脂質のさらなる特徴を以下に示す。

### 【0054】

一つの態様において、式(XI)：

### 【化20】



[式中、

$Z$  は、PEG、ならびに、ポリ(オキサゾリン)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(グリセロール)、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ[N-(2-ヒドロキシプロビル)メタクリルアミド]およびポリ(アミノ酸)をベースとするポリマー(ここで、ポリマーは直鎖であっても分枝鎖であってもよく、また、所望により置換されていてもよい。)から選択される親水性頭部であり；

ここで、 $Z$  は、 $n$  個のサブユニットが重合したものであり；

$n$  は、10 ユニットと 200 ユニットの間の  $Z$  の平均重合度であり、ここで、 $n$  は、異なるポリマータイプについて最適化されており；

$L_1$  は、エーテル(例えば -O-)、エステル(例えば -C(O)O-)、スクシネート(例えば -O(O)C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)O-)、カルバメート(例えば -OC(O)-NR'-)、カーボネート(例えば -OC(O)O-)、ケトン(例えば -C-C(O)-C-)、カルボニル(例えば -C(O)-)、ウレア(例えば -NRC(O)NR'-)、アミン(例えば -NR'-)、アミド(例えば -C(O)NR'-)、イミン(例えば -C(NR')-)、チオエーテル(例えば -S-)、キサントゲン酸エステル(例えば -OC(S)S-)およびホスホジエステル(例えば -OP(O)<sub>2</sub>O-) (これらは何れも、0 個、1 個またはそれ以上の  $Z$  基で置換されていてもよい。)を 0 個、1 個、2 個またはそれ以上含む、所望により置換された C<sub>1-10</sub> アルキレンまたは C<sub>1-10</sub> ヘテロアルキレンリンカーであり；

ここで、 $R'$  は、-H、-NH-、-NH<sub>2</sub>、-O-、-S-、ホスフェートまたは所望により置換された C<sub>1-10</sub> アルキレンから独立して選択され；

$X_1$  および  $X_2$  は、炭素原子、または、-NH-、-O-、-S- もしくはホスフェートから選択されるヘテロ原子から独立して選択され；

$A_1$  および  $A_2$  は、C<sub>6-30</sub> アルキル、C<sub>6-30</sub> アルケニルおよび C<sub>6-30</sub> アルキニルから独立して選択され、ここで、 $A_1$  および  $A_2$  は、同一であっても異なっていてもよいか、

あるいは、 $A_1$  および  $A_2$  は、それらが結合している炭素原子と一体となって、所望により置換されたステロイドを形成する。]

のステルス脂質またはその塩または薬学的に許容される誘導体を提供する。

### 【0055】

一つの態様において、本発明は、式(XII)：

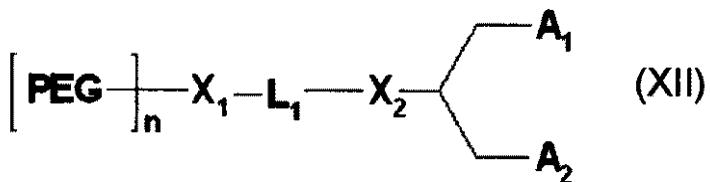
10

20

30

40

## 【化21】



[式中、

PEGは、ポリ(エチレングリコール)サブユニットであり、ここで、PEGは、直鎖であっても分枝鎖であってもよく；

$n$ は、10ユニットと200ユニットの間のPEGの平均重合度であり、好ましくは約23ユニット、約45ユニットまたは約68ユニットであり；

$L_1$ は、エーテル、エステル、スクシネート、カルバメート、カーボネート、ケトン、カルボニル、ウレア、アミン、アミド、イミン、チオエーテル、キサントゲン酸エステルおよびホスホジエステル(これらは何れも、0個、1個またはそれ以上のPEG基によって置換されていてもよい。)を1個、2個またはそれ以上含む、所望により置換された $C_{1-10}$ アルキレンまたは $C_{1-10}$ ヘテロアルキレンリンカーであり；

$X_1$ および $X_2$ は、炭素または酸素から独立して選択され；

$A_1$ および $A_2$ は、 $C_{6-30}$ アルキル、 $C_{6-30}$ アルケニルおよび $C_{6-30}$ アルキニルから独立して選択され、ここで、 $A_1$ および $A_2$ 同一であっても異なっていてもよい。

あるいは、 $A_1$ および $A_2$ は、それらが結合している炭素原子と一体となって、所望により置換されたステロイドを形成する。]

のステルス脂質またはその塩または薬学的に許容される誘導体を提供する。

## 【0056】

式(XI)および(XII)のステルス脂質は、例えば式(I)のカチオン性脂質と共に製剤化されるとき、以前の同等のステルス脂質と比較して、in vivo有効性が増大した脂質ナノ粒子を提供する。従って、本発明は、有効性と毒性を改善する可能性を有するステルス脂質を提供する。本発明において、これらのステルス脂質を含む組成物、および、細胞に生物活性薬物を送達するためのこれらのステルス脂質の使用が提供される。

## 【0057】

表8に示す通り、同じ方法で製剤化され、ステルス脂質が異なる以外は同一の組成物である2種の例示的脂質ナノ粒子は、肝臓に送達される。先行技術のステルス脂質S010を含み、第VII因子("FVII")に特異的なsiRNA構築物を送達する脂質ナノ粒子は、肝臓へ投与されたとき、in vivoで、72.2%阻害であることを証明した。一方、ステルス脂質S006を含む脂質ナノ粒子は、比較すると、in vivoで、83.8%の第VII因子阻害であることを証明した。

## 【0058】

in vivoで、皮下腫瘍に送達するための表9に示した他の例において、PEG/ステルス脂質を除いて同一の組成物を有する6種のナノ粒子を、ポロ様キナーゼ1("PLK1")に特異的なsiRNAの有効な送達について比較する。先行技術のステルス脂質S011を含む脂質ナノ粒子は、腫瘍組織において、in vivoで、46%のPLK1阻害であることを証明した。一方、ステルス脂質S004、S007、S009、S008およびS005を含む脂質ナノ粒子は、腫瘍組織において、in vivoで、それぞれ56%、65%、64%、60%および52%のPLK1阻害であることを証明した。

## 【0059】

ステルス脂質S001~S009およびS012~S026は、個々におよび一群として、生物活性薬物、この場合、1種以上のsiRNAの送達に使用するための製剤および治療用組成物に用いられるとき、改善された性質を示す。

## 【0060】

10

20

30

40

50

本発明において、新規ステルス脂質が提供される。本発明の一つの態様において、ステルス脂質はS001である。一つの態様において、ステルス脂質はS002である。一つの態様において、ステルス脂質はS003である。一つの態様において、ステルス脂質はS004である。一つの態様において、ステルス脂質はS005である。一つの態様において、ステルス脂質はS006である。一つの態様において、ステルス脂質はS007である。一つの態様において、ステルス脂質はS008である。一つの態様において、ステルス脂質はS009である。一つの態様において、ステルス脂質はS012である。一つの態様において、ステルス脂質はS013である。一つの態様において、ステルス脂質はS014である。一つの態様において、ステルス脂質はS015である。一つの態様において、ステルス脂質はS016である。一つの態様において、ステルス脂質はS017である。一つの態様において、ステルス脂質はS018である。一つの態様において、ステルス脂質はS019である。一つの態様において、ステルス脂質はS020である。一つの態様において、ステルス脂質はS021である。一つの態様において、ステルス脂質はS022である。一つの態様において、ステルス脂質はS023である。一つの態様において、ステルス脂質はS024である。一つの態様において、ステルス脂質はS025である。一つの態様において、ステルス脂質はS026である。

10

20

30

40

50

#### 【0061】

##### 生物活性薬物を送達するための製剤

一般的に、先行技術では、ステルス脂質のみを変更することによって組織依存的有効性を制御していたところ、我々は、驚くべきことに、カチオン性脂質を変えることによって特定の組織に関する有効性を制御することができることを見出した。下に記す通り、生物活性薬物を送達するための脂質製剤を、製剤に含まれるカチオン性脂質のみを変更することによって、他より優先的に1つの細胞型または臓器を標的化するよう調節することができるを見出した。例えば、 $pK_a$ が約6.1以上であるカチオン性脂質は、肝臓を標的とする製剤において、 $pK_a$ が約6.1以下であるカチオン性脂質を含む製剤と比べて、かなり有効である。 $pK_a$ が約6.1以下であるカチオン性脂質を含む製剤は、比較すると、*in vivo*で腫瘍を標的とする製剤において、より有効である。原則として(例外がある)、腫瘍に送達するのに最も有効な脂質を有する製剤(下記により詳細に記載)は、腫瘍のタイプに依存して、特に、約5.2～約6.3または約5.4～約6.2または約5.8～約6.1を含む、約5.0～約6.7の $pK_a$ を有するカチオン性脂質を含む。一方、肝臓に送達するのに最も有効な脂質を有する製剤(下記により詳細に記載)は、約5.3～約7.3を含み、約5.9～約7.0を含み、一つの態様において、約6.2～約6.8を含む、約5.1～約7.4の $pK_a$ を有するカチオン性脂質を含む。

#### 【0062】

一つの態様において、当業者は、望ましい $pK_a$ 範囲を有するカチオン性脂質、ステルス脂質、ヘルパー脂質、所望のアルキルレゾルシノールをベースとする脂質および所望により存在する中性脂質を、例えリポソーム製剤、リポナノ粒子(LNP)製剤などを含む*in vivo*で特定の細胞および組織に送達するための製剤に組み込むことによって、さらなる最適化が可能である。一つの態様において、これらの種々のタイプの脂質のモル比を調節することによって、さらなる最適化が行われる。一つの態様において、望ましい粒子サイズ、N/P比、製剤化方法、および/または投与レジメ(例え時間経過に対する投与回数、実際の投与量(mg/kg)、投与のタイミング、他の治療薬との組み合わせなど)の1つ以上を調節することによって、さらなる最適化が行われる。上記態様に関する当業者に既知の種々の最適化方法は、本発明の一部とみなす。

#### 【0063】

一つの態様において、治療有効量の生物活性薬物を送達するための製剤が、カチオン性脂質、ヘルパー脂質およびステルス脂質をそれぞれ少なくとも1種含むとき、本発明のカチオン性脂質が提供される。一つの態様において、当該製剤は、さらに、少なくとも1種の中性脂質を含む。一つの態様において、製剤は、腫瘍へ送達するための生物活性薬物を送達するのに最適化される。一つの態様において、製剤は、肝臓に送達するための生物活性薬物を送達するために最適化される。一つの態様において、製剤は、特定のタイプの生

物活性薬物を送達するために最適化される。生物活性薬物のタイプの例は、例えば、抗体、コレステロール、ホルモン、抗ウイルス剤、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核タンパク質、化学療法剤、低分子量薬物、ビタミン、補因子、ヌクレオシド、ヌクレオシド誘導体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素的核酸(enzymatic nucleic acid)、アンチセンス核酸、三本鎖形成オリゴヌクレオチド、2,5-Aアンチセンスキメラ、アロザイム、アプタマー、リボザイム、デコイRNA分子およびそのアナログ、および、低分子核酸、例えば低分子干渉核酸(siRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、ミクロRNA(miRNA)および低分子ヘアピン型RNA(shRNA)を含むが、これらに限定されない。このような生物活性薬物は、所望により、その治療上の価値を増大させるために、1つ以上のさらなる化学的および生物学的薬物で最適化されてもよく、例えば安定性、半減期、効果および/または免疫原性などの生物学的性質を調節する修飾を行ってもよい。

10

## 【0064】

腫瘍に治療薬を送達するために、好ましい製剤は、このような投与を必要とする対象において、治療標的の活性を有效地に調節するのに十分な量の生物活性薬物を送達するものから選択される。

## 【0065】

生物活性薬物がRNAi構築物であるとき、有効量のRNAi、siRNA、siNAまたはshRNAは、少なくとも20%以上、50%以上、60%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上または100%までの、標的細胞中で発現される標的mRNAのノックダウン(KD)を提供する量である。一般的に、有効な処置に必要とされる治療上関連するKDの範囲の選択は、標的化経路、細胞型または組織、および/または処置される疾患または障害によって変化し得る。

20

## 【0066】

本明細書において、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が、それらが結合している窒素原子と一体となって、環状の“頭部”を形成している、上に記載されたタイプのカチオン性脂質は、脂質製剤に使用するのに有効なカチオン性脂質であることを報告する。さらに、本明細書において、環状の頭部の存在が、脂質製剤の挙動を予測されないほど変えること、特にそれが他の置換基の影響を変えることを報告する。

30

## 【0067】

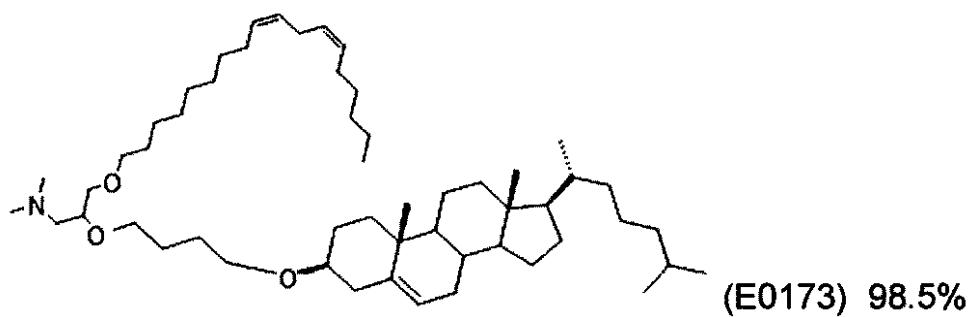
本発明のカチオン性脂質化合物の頭部(すなわちR<sup>1</sup>-N-R<sup>2</sup>)は、1個の第3級アミン基を含む。この特徴は、化合物の挙動を、例えば、それらが、例えば第4級(カチオン性)アミン基を有するときと異なるようにする。なぜならば、窒素の四級化がその原子に固定化された電荷を据え、そのpH応答性を除き、化合物の極めて異なった挙動を生じさせるからである。

## 【0068】

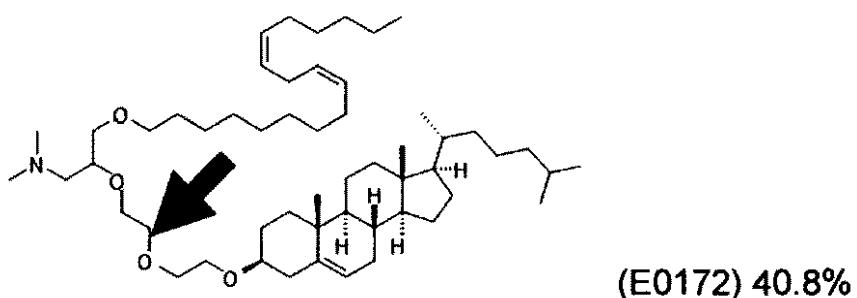
一つの具体例において、本発明の化合物E0027およびE0014中の環状頭部の存在は、全体として、頭部のみが異なる脂質E0173およびE0172と比較して、製剤において有効な送達剤として作用するカチオン性脂質の能力を変化させる。例えば、下により詳細に記載する通り、-N(Me)<sub>2</sub>頭部を有する特定のカチオン性脂質(E0173, CLinDMA)を含む製剤は、第VII因子に特異的なRNAi構築物を送達する製剤に用いられるとき、in vivoで、第VII因子を98.5%阻害することが証明される。L-アルキレン置換基をL-ヘテロアルキレン置換基と置き換えることによって修飾した場合(下に矢印で印を付けた)、化合物(E0172)の活性は減少し、in vivoで第VII因子を40.8%阻害することが見出される。

40

【化 2 2】



10

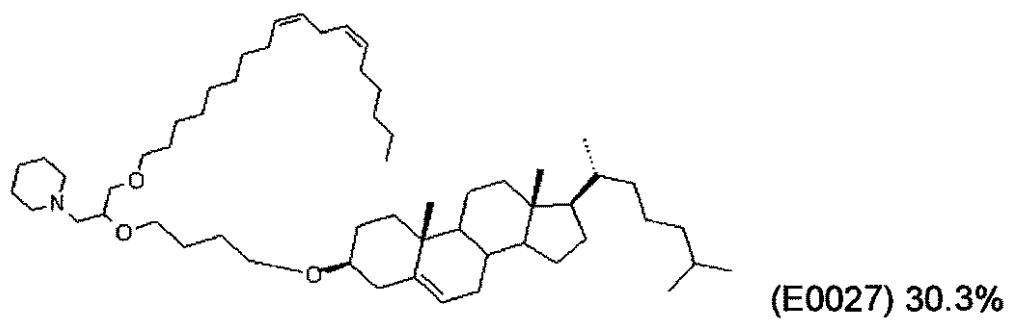


20

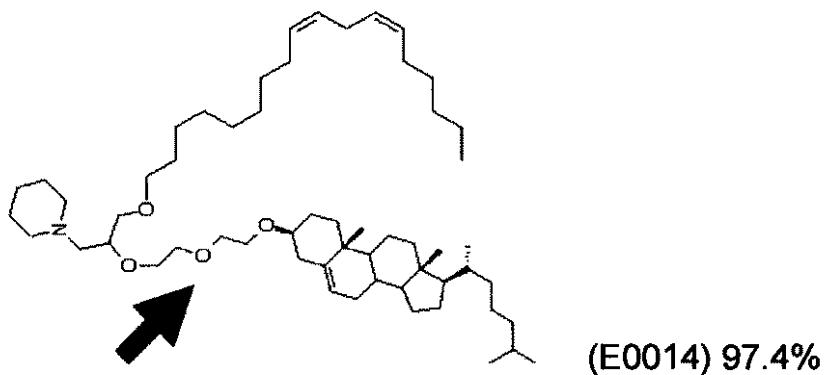
【0 0 6 9】

対照的に、本発明者らは、環状の頭部が存在するとき、L-アルキレンのL-ヘテロアルキレン置換基への変更は逆の作用があり、化合物の有効性が増大することを見出した。  
例：

【化 2 3】



30



40

【0 0 7 0】

従って、本発明の一つの態様は、Lが1個以上のヘテロ原子を含むこれらの化合物を含む。上で述べた通り、CLiNDMA頭部を有する化合物から出発した当業者は、2個以上のヘテロ原子を含むL基が、最終化合物の有効性を減少させることしか発見しなかった

50

であろうから、当業者は、C L i n D M A の開示から出発してもこのような化合物に至らず、そのため、このような基を含む化合物は提供されなかつたであろう。

【0071】

如何なる理論にも束縛されるつもりはないが、一つの可能性として、本発明の脂質製剤の有効性は、 $pK_a$ に関連する。例えば、L中のヘテロ原子の数を変更することで、または、頭部の性質を変更することで、構造を変えることによって、カチオン性脂質の $pK_a$ を調節することができる。

【0072】

一つの例において、例えば、肝臓において、第VII因子をそれぞれ98.5%、40.8%、30.3%および97.4%阻害する上記製剤(カチオン性脂質E0172、E0171、E0027およびE0014を含む)を用いる表8におけるin vivoでのs i R N A 試験について、その $pK_a$ 値は、それぞれ6.7、8.5、5.7および6.4であることが見出される。

10

【0073】

肝臓への薬物の送達に関して、本発明の一つの態様において、原則として(例外がある)、このような製剤に使用するのに最も有効なカチオン性脂質は、約5.1～約7.4の $pK_a$ を有すると考えられる。一つの態様において、肝臓送達のための本発明の製剤のために、約5.3～約7.3の $pK_a$ を有するカチオン性脂質を提供する。一つの態様において、肝臓送達のための本発明の製剤のために、約5.9～約7.0の $pK_a$ を有するカチオン性脂質を提供する。一つの態様において、肝臓に生物活性薬物を送達する製剤に使用するためには、好ましい脂質は、約6.2～約6.8の $pK_a$ 範囲を有する。

20

【0074】

本発明の驚くべき発見は、腫瘍組織が、有効性について、異なる最適 $pK_a$ 範囲を有することである。従って、上の段落の $pK_a$ 範囲は、脂質が生物活性薬物を肝臓細胞に送達することが意図されている限り、適用される。

【0075】

腫瘍への生物活性薬物の送達に関して、原則として(例外がある)、このような製剤に使用するのに最も有効な本発明のカチオン性脂質は約5.0～約6.7の $pK_a$ を有し、従って、それが、一つの態様において腫瘍に送達するのに好ましい脂質である。

【0076】

一つの一般的な態様において、生物活性薬物を1つ以上の腫瘍に送達するのに使用するための本発明の製剤において、約5.0～約6.7の $pK_a$ を有するカチオン性脂質を提供する。一つの態様において、生物活性薬物を1つ以上の腫瘍に送達するのに使用するための本発明の製剤において、約5.2～約6.3の $pK_a$ を有するカチオン性脂質を提供する。一つの態様において、生物活性薬物を1つ以上の腫瘍に送達するのに使用するための本発明の製剤において、約5.4～約6.2の $pK_a$ を有するカチオン性脂質を提供する。一つの態様において、生物活性薬物を1つ以上の腫瘍に送達するのに使用する本発明の製剤において、約5.8～約6.1の $pK_a$ を有するカチオン性脂質を提供する。

30

【0077】

一つの態様において、本製剤に用いられるカチオン性脂質は、生物活性薬物を特定の腫瘍または細胞型に送達するのに最適化された $pK_a$ を有する。腫瘍タイプは、原発性腫瘍であっても転移性腫瘍であってもよい。

40

【0078】

一つの具体的な態様において、H e p 3 B 様腫瘍への送達に最適化された製剤は、約5.0～約6.7の $pK_a$ を有するカチオン性脂質を含む。一つの具体的な態様において、H e p 3 B 様腫瘍への送達に最適化された製剤は、約5.3～約6.3の $pK_a$ を有するカチオン性脂質を含む。一つの具体的な態様において、H e p 3 B 様腫瘍への送達に最適化された製剤は、約5.4～約5.9の $pK_a$ を有するカチオン性脂質を含む。一つの具体的な態様において、H e p 3 B 様腫瘍への送達に最適化された製剤は、約5.8～約5.9の $pK_a$ を有するカチオン性脂質を含む。

【0079】

50

一つの具体的な態様において、HepG2様腫瘍への送達に最適化された製剤は、約5.2～約6.2のpKaを有するカチオン性脂質を含む。一つの具体的な態様において、Hep3B様腫瘍への送達に最適化された製剤は、約5.3～約6.2のpKaを有するカチオン性脂質を含む。一つの具体的な態様において、Hep3B様腫瘍への送達に最適化された製剤は、約5.6～約6.1のpKaを有するカチオン性脂質を含む。一つの具体的な態様において、HepG2様腫瘍への送達に最適化された製剤は、約6.1のpKaを有するカチオン性脂質を含む。

#### 【0080】

一つの具体的な態様において、786-0様腎腫瘍またはその転移腫瘍への送達に最適化された製剤は、約6.1のpKaを有するカチオン性脂質を含む。

10

#### 【0081】

他の組織、適応、腫瘍タイプまたは投与経路が、好ましい脂質pKa範囲を有するとの仮説を立てることは当然である。また、リポソームまたはLNP製剤について、種々の組織、適応、腫瘍タイプまたは投与経路が、好ましいカチオン性脂質pKa範囲、N/P比、粒子サイズ、用いられるカチオン性脂質、用いられるステルス脂質、用いられるヘルパー脂質、所望により選択された中性脂質の使用、各脂質成分の相対的モル比、製剤方法、送達されるべき生物活性薬物、および、投与量を含む投与レジメを有することの仮説を立てることも当然である。これらの局面をそれぞれ最適化することは、それぞれ独立にまたは連係した方法で、下に記載されており、このような最適化の多くの具体的な局面は、過度の実験を必要とせず、当業者の能力の範囲内であると考えられる。

20

#### 【0082】

製剤は、当業者によって、例えば、標的となる細胞のタイプまたは臓器に最適化されたカチオン性脂質のpKa；用いられるカチオン性脂質；用いられるステルス脂質；用いられるヘルパー脂質；中性脂質が存在するか否か；存在するならば、用いられる中性脂質の選択；選択されたヘルパー脂質、所望により存在する中性脂質、ステルス脂質およびカチオン性脂質のモル比；N/P比；粒子サイズ；投与レジメ；投与量；製剤方法などの個別の選択を含むがこれらに限定されない、製剤の他の局面を調節することによって、最適化され得る。

30

#### 【0083】

##### 式(I)～(X)の化合物の態様

##### a、bおよびc

一つの態様において、aは、所望により置換されたC<sub>1</sub>～C<sub>2</sub>アルキレンである。一つの態様において、aは、所望により置換されたC<sub>1</sub>アルキレンである。

#### 【0084】

一つの態様において、bは、所望により置換されたC<sub>0</sub>～C<sub>2</sub>アルキレンである。一つの態様において、bは、所望により置換されたC<sub>1</sub>アルキレンである。

#### 【0085】

一つの態様において、cは、存在しないか、または、所望により置換されたC<sub>1</sub>アルキレンである。一つの態様において、cは、存在しない。

40

#### 【0086】

一つの態様において、a、bおよびcが、存在するならば、置換されていない。

#### 【0087】

##### カチオン性脂質の頭部

一つの態様において、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換されたC<sub>3</sub>～C<sub>20</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>3</sub>～C<sub>20</sub>ヘテロシクロアルケニル、C<sub>3</sub>～C<sub>20</sub>ヘテロシクロアルキニル基、C<sub>5</sub>～C<sub>6</sub>ヘテロアリールまたはC<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>ヘテロアリール基を形成する。一つの態様において、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換されたC<sub>3</sub>～C<sub>20</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>3</sub>～C<sub>20</sub>ヘテロシクロアルケニルまたはC<sub>3</sub>～C<sub>20</sub>ヘテロシクロアルキニル基を形成する。一つの態様において、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが結合している窒素原子と一体となって

50

、所望により置換された C<sub>3</sub> - C<sub>2</sub> 基へテロシクロアルキル基を形成する。

**【0088】**

一つの態様において、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された環状 C<sub>5</sub> - C<sub>6</sub> 基を形成する。一つの態様において、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された環状 C<sub>5</sub> - C<sub>12</sub> 基を形成する。一つの態様において、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された環状 C<sub>5</sub> 基、環状 C<sub>6</sub> 基または環状 C<sub>7</sub> 基を形成する。一つの態様において、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された環状 C<sub>5</sub> 基または環状 C<sub>6</sub> 基を形成する。

**【0089】**

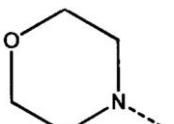
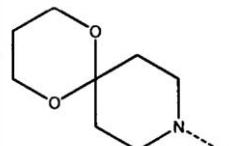
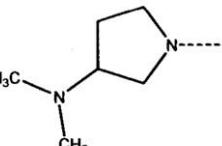
本発明の一つの態様において、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それらが結合している窒素原子と一体となって、少なくとも 1 個の酸素原子を含む環状基を形成する。

**【0090】**

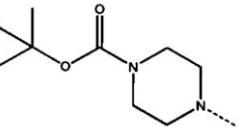
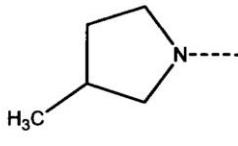
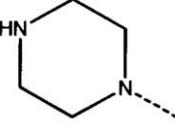
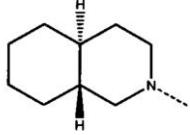
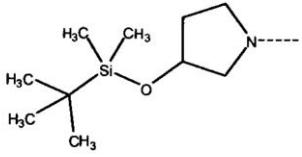
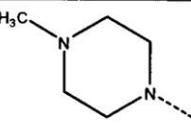
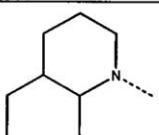
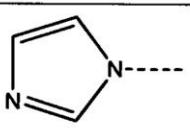
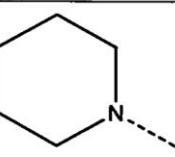
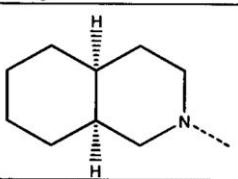
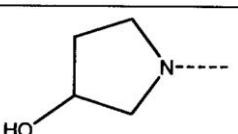
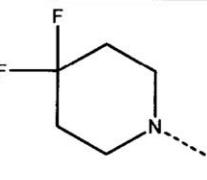
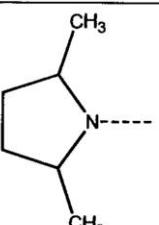
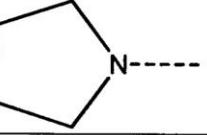
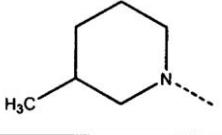
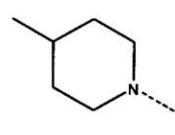
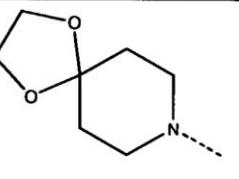
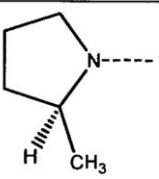
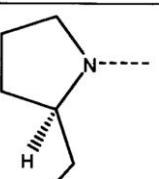
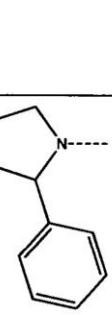
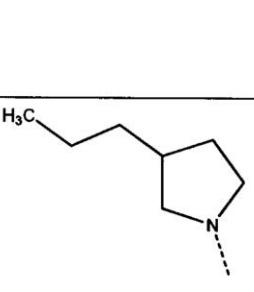
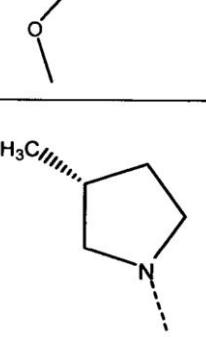
一つの態様において、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それらが結合している窒素原子と一体となって、表 1 に示した頭部 H<sup>1</sup> ~ H<sup>5</sup> と少なくとも 1 つから選択されるものである。

表 1 : H<sup>1</sup> ~ H<sup>5</sup> と名付けられた部分

**【表 1】**

	構造		構造		構造
H <sup>1</sup>		H <sup>19</sup>		H <sup>37</sup>	

【表2】

$H^2$		$H^{20}$		$H^{38}$	
$H^3$		$H^{21}$		$H^{39}$	
$H^4$		$H^{22}$		$H^{40}$	
$H^5$		$H^{23}$		$H^{41}$	
$H^6$		$H^{24}$		$H^{42}$	
$H^7$		$H^{25}$		$H^{43}$	
$H^8$		$H^{26}$		$H^{44}$	
$H^9$		$H^{27}$		$H^{45}$	

【0 0 9 1】

【表3】

$H^{10}$		$H^{28}$		$H^{46}$	
$H^{11}$		$H^{29}$		$H^{47}$	
$H^{12}$		$H^{30}$		$H^{48}$	
$H^{13}$		$H^{31}$		$H^{49}$	
$H^{14}$		$H^{32}$		$H^{50}$	
$H^{15}$		$H^{33}$		$H^{51}$	
$H^{16}$		$H^{34}$		$H^{52}$	

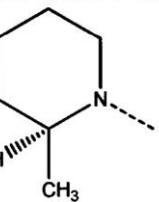
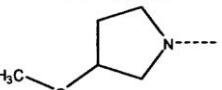
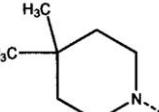
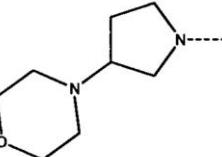
10

20

30

40

【表4】

$H^{17}$		$H^{35}$			
$H^{18}$		$H^{36}$			

10

## 【0092】

カチオン性脂質のpKa

一つの態様において、望ましい範囲のpKa範囲を有するカチオン性脂質は、特に生物活性薬物を送達する製剤の場合を含む本発明において好ましい。

## 【0093】

上に記載した通り、および下に示す通り、約5.1～約7.4のpKaを有するカチオン性脂質は、一般的に、肝臓を標的とする製剤に用いられるとき有効である。一つの態様において、カチオン性脂質のpKaは、肝臓への送達について、約5.1～約7.4である。一つの態様において、肝臓を特異的に標的とするための製剤に使用するための、約5.3～約7.3のpKaを有するカチオン性脂質である。従って、一つの態様において、カチオン性脂質のpKaは、肝臓への送達について、約5.3～約7.3である。一つの態様において、カチオン性脂質のpKaは、肝臓への送達について、約5.9～約7.0である。一つの態様において、カチオン性脂質のpKaは、肝臓への送達について、約6.2～約6.8である。

20

## 【0094】

上に記載した通り、および下に実験に基づいて説明する通り、約5.0～約6.7のpKaを有するカチオン性脂質は、腫瘍に生物活性薬物を送達するための製剤に用いられるとき、特に有効である。従って、一つの態様において、カチオン性脂質のpKaは、腫瘍への送達について、約5.0～約6.7である。一つの態様において、カチオン性脂質のpKaは、腫瘍への送達について、約5.2～約6.3である。一つの態様において、カチオン性脂質のpKaは、腫瘍への送達について、約5.4～約6.2である。一つの態様において、カチオン性脂質のpKaは、腫瘍への送達について、約5.8～約6.1である。一般的な態様において、カチオン性脂質のpKaは、腫瘍または腫瘍細胞への生物活性薬物の送達について、約6.1以下である。

30

## 【0095】

生物活性薬物を送達する製剤に使用するためのカチオン性脂質のpKaは、さらに、腫瘍のタイプに依存して、最適化できる。例えば、表9、10および11に示す通り、PLK1 mRNAに特異的なRNAi構築物は、LNP製剤中のカチオン性脂質のpKaと関連する方法で、マウスの脇腹に注射されたHep3B、HepG2および786-0腎腫瘍に異なって送達される。さらなる分析により、in vivoでHep3B腫瘍においてPLK1をノックダウンするのに最適なpKa範囲がHepG2および786-0腫瘍に対する最適なpKa範囲と異なることは明らかであるが、両方の範囲とも、上の段落に記載した5.0～6.7の一般的な範囲内であり、そして全ての範囲は、一般的に、肝臓への送達に最適なものより低いpKaを有するカチオン性脂質を含む。

40

## 【0096】

従って、一つの態様において、in vivoでのHep3B様腫瘍への生物活性薬物の送達について、本発明のカチオン性脂質は、約5.0～約6.7のpKa範囲を有する。一つの態様において、カチオン性脂質のpKaは、Hep3B様腫瘍への送達について、約5.

50

3～約6.3である。一つの態様において、カチオン性脂質のpKaは、Hep3B様腫瘍について、約5.4～約5.9である。一つの態様において、カチオン性脂質のpKaは、Hep3B様腫瘍への送達について、約5.8～約5.9である。

#### 【0097】

さらに、一つの態様において、in vivoでHepG2様腫瘍への生物活性薬物の送達について、本発明のカチオン性脂質は、約5.2～約6.2のpKa範囲を有する。一つの態様において、カチオン性脂質のpKaは、HepG2様腫瘍への送達について、約5.3～約6.2である。一つの態様において、カチオン性脂質のpKaは、HepG2様腫瘍への送達について、約5.6～約6.1である。一つの態様において、カチオン性脂質のpKaは、HepG2様腫瘍または786-0腎腫瘍様腫瘍への送達について、約6.1である。

10

#### 【0098】

X<sup>1</sup>およびX<sup>2</sup>

一つの態様において、X<sup>1</sup>は〇である。他の態様において、X<sup>2</sup>は〇である。一つの態様において、X<sup>1</sup>およびX<sup>2</sup>の両方が〇である。

#### 【0099】

リンカー

一つの態様において、Lは少なくとも1個のヘテロ原子を含む。これは、X<sup>2</sup>およびY<sup>2</sup>の間を直接連結する鎖が、少なくとも1個のヘテロ原子を有することを意味する。言い換えれば、L上の置換基中の何れのヘテロ原子も、これらの目的については、考慮されない。一つの態様において、Lは少なくとも1個のO原子を含む。

20

#### 【0100】

一つの態様において、Lは少なくとも2個のヘテロ原子を含む。一つの態様において、Lは少なくとも2個のO原子を含む。

#### 【0101】

一つの態様において、L<sup>c</sup>は、所望により置換されたC<sub>1-15</sub>アルキレンまたはC<sub>1-15</sub>ヘテロアルキレンである。一つの態様において、L<sup>c</sup>は、所望により置換されたC<sub>1-15</sub>アルキレンまたはC<sub>1-15</sub>ヘテロアルキレンであり、dおよびeは、両方ともゼロ(0)である。

30

#### 【0102】

一つの態様において、L<sup>c</sup>は、式L<sup>c-i</sup>～L<sup>c-xxxxxiii</sup>の1つから選択される。一つの態様において、L<sup>c</sup>は、式L<sup>c-i</sup>～L<sup>c-xxxxxiii</sup>の1つから選択され、dおよびeは、両方ともゼロ(0)である。

#### 【0103】

## 【表5】

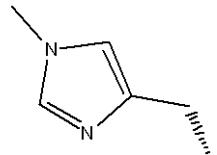
L <sup>c-i</sup>	$-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2-$	
L <sup>c-ii</sup>	$-(\text{CH}_2)_4-$	
L <sup>c-iii</sup>	$-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$	
L <sup>c-iv</sup>	$-\text{CO}-$	
L <sup>c-v</sup>	$-\text{COCH}_2\text{OCH}_2\text{CO}-$	
L <sup>c-vi</sup>	$-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}-$	
L <sup>c-vii</sup>	$-(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_3-$	
L <sup>c-viii</sup>	$-(\text{CH}_2)_2-$	10
L <sup>c-ix</sup>	$-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2-$	
L <sup>c-x</sup>	$-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2-$	
L <sup>c-xi</sup>		
L <sup>c-xii</sup>		20
L <sup>c-xiii</sup>		
L <sup>c-xiv</sup>		
L <sup>c-xv</sup>	$-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}(\text{CH}_3)-$	30
L <sup>c-xvi</sup>	$-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$	
L <sup>c-xvii</sup>	$-(\text{CH}_2)_2\text{OC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$	
L <sup>c-xviii</sup>	$-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCO}-$	
L <sup>c-xix</sup>	$-(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-$	
L <sup>c-xx</sup>	$-(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{C}(=\text{O})-$	
L <sup>c-xxi</sup>	$-(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})-$	
L <sup>c-xxii</sup>	$-(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})-$	

## 【0104】

## 【表 6】

L<sup>c-xxiii</sup>

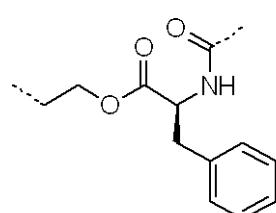
$-(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}(\text{側鎖 1})\text{NH}\text{C}(=\text{O})-$   
(ここで、側鎖 1 は、基：



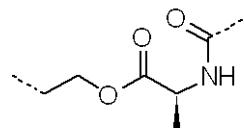
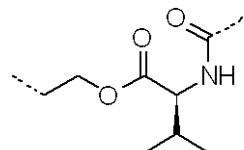
を表し、点線は、分子の残りの部分への結合を表す。)

L<sup>c-xxiv</sup> $-(\text{CH}_2)_2\text{OC}(=\text{O})-$ 

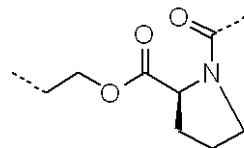
10

L<sup>c-xxv</sup> $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2-$ L<sup>c-xxvi</sup> $-(\text{CH}_2)_2\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2-$ L<sup>c-xxvii</sup> $-(\text{CH}_2)_2\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NH}\text{C}(=\text{O})-$ L<sup>c-xxviii</sup> $-(\text{CH}_2)_2\text{OC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{NH}\text{C}(=\text{O})-$ L<sup>c-xxix</sup>

20

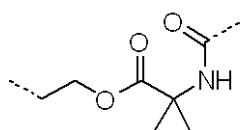
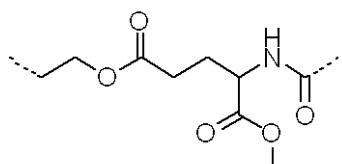
L<sup>c-xxx</sup>L<sup>c-xxxi</sup>

30

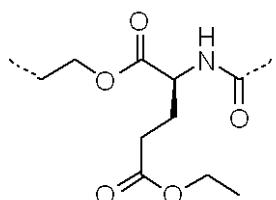
L<sup>c-xxxii</sup>

## 【0105】

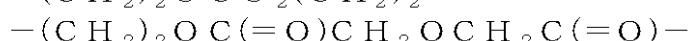
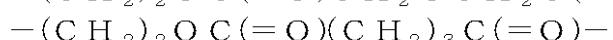
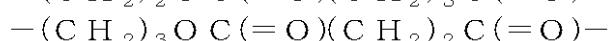
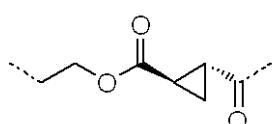
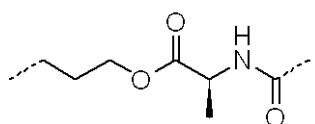
## 【表7】

 $L^c$ -xxxiii $L^c$ -xxxiv

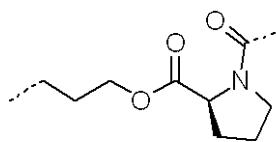
10

 $L^c$ -xxxxv $L^c$ -xxxxvi

20

 $L^c$ -xxxxvii $L^c$ -xxxxviii $L^c$ -xxxxix $L^c$ -xxxxx $L^c$ -xxxxxi

30

 $L^c$ -xxxxxii $L^c$ -xxxxxiii

40

## 【0106】

$L^c$ が少なくとも1個のヘテロ原子を含む基が好ましいため、 $L^c$ は、好ましくは、 $L^c$ -i、 $L^c$ -iv～ $L^c$ -viiおよび $L^c$ -ix～ $L^c$ -xxxxxiから選択される。

## 【0107】

一つの態様において、 $L^c$ は所望により置換された $C_{1-15}$ ヘテロアルキレンである。

一つの態様において、 $L^c$ は、所望により置換された $C_{1-11}$ 基である。一つの態様において、 $L^c$ は、所望により置換された $C_{1-9}$ 基である。一つの態様において、 $L^c$ は、所望により置換された $C_{3-8}$ 基である。一つの態様において、 $L^c$ は、所望により

50

置換された C<sub>4</sub> - C<sub>7</sub> 基である。一つの態様において、L<sup>c</sup> は、所望により置換された C<sub>5</sub>、C<sub>6</sub> または C<sub>7</sub> 基である。

**【0108】**

一つの態様において、d は 0 であり；e は 0 であり；f は 1 である。一つの態様において、d は 0 であり；e は 0 であり；f は 1 であり；L<sup>c</sup> は、上に示した鎖長の範囲内のヘテロアルケンである。

**【0109】**

**カチオン性脂質における Y<sup>1</sup>**

一つの態様において、Y<sup>1</sup> は C<sub>12</sub> - C<sub>28</sub> 基である。一つの態様において、Y<sup>1</sup> は所望により置換された C<sub>14</sub> - C<sub>26</sub> 基である。一つの態様において、Y<sup>1</sup> は所望により置換された C<sub>16</sub> - C<sub>24</sub> 基である。一つの態様において、Y<sup>1</sup> は所望により置換された C<sub>16</sub> - C<sub>22</sub> 基である。一つの態様において、所望により置換された Y<sup>1</sup> 鎖は、18、19、20 または 21 原子長である。

10

**【0110】**

上に示した炭素数の範囲内で、Y<sup>1</sup> は、好ましくは、アルケニルまたはヘテロアルケニルである。

**【0111】**

一つの態様において、Y<sup>1</sup> は、少なくとも 1 個のアルケニル基を有する。一つの態様において、Y<sup>1</sup> は、1 個、2 個または 3 個のアルケニル基である。

20

**【0112】**

一つの態様において、Y<sup>1</sup> は、3 位でアルケニル基を有する。他の態様において、Y<sup>1</sup> は、6 位でアルケニル基を有する。他の態様において、Y<sup>1</sup> は、9 位でアルケニル基を有する。一つの態様において、Y<sup>1</sup> は、3 位、6 位および 9 位のうち 2 箇所または 3 箇所でアルケニル基を有する。一つの態様において、Y<sup>1</sup> は、6 位および 9 位で不飽和である。他の態様において、Y<sup>1</sup> は、3 位、6 位および 9 位で不飽和である。一つの態様において、Y<sup>1</sup> は、9 位で不飽和である。

**【0113】**

一つの態様において、Y<sup>1</sup> は、少なくとも 1 個の cis 不飽和アルケニル基を有する。一つの態様において、Y<sup>1</sup> は、少なくとも 2 個の cis 不飽和アルケニル基を有する。一つの態様において、Y<sup>1</sup> は、少なくとも 3 個の cis 不飽和アルケニル基を有する。少なくとも 1 個の cis 不飽和アルケニル基は、3 位、6 位および 9 位の 1 箇所、2 箇所または 3 箇所であってもよい。脂質の鎖中の不飽和は、MacLachlan et al., Journal of Controlled Release 107 (2005) 276-287において議論されている。

30

**【0114】**

一つの態様において、Y<sup>1</sup> は、表 2 に示された Y<sup>1-i</sup> ~ Y<sup>1-vii</sup> から選択される。

表 2 : Y<sup>1-i</sup> ~ Y<sup>1-vii</sup> と名付けられた Y<sup>1</sup> に関する部分

【表8】

名前	構造	名前	構造
Y <sup>1-i</sup>		Y <sup>1-ii</sup>	
名前	構造	名前	構造
Y <sup>1-iii</sup>		Y <sup>1-iv</sup>	
名前	構造	名前	構造
Y <sup>1-v</sup>		Y <sup>1-vi</sup>	
名前	構造		
Y <sup>1-vii</sup>			

【0115】

Y<sup>2</sup>

一つの態様において、Y<sup>2</sup>は、所望により置換されたステロイド上の酸素原子を介してLに結合している。一つの態様において、Y<sup>2</sup>は、ステロイドの環Aの3位で、酸素原子を介してLに結合している。一つの態様において、Y<sup>2</sup>は、ステロイドの環Aの3位のヒドロキシ基の水素原子が除かれたステロールである(Lへの結合は、当該ヒドロキシ基の酸素原子を介したものである)。

【0116】

一つの態様において、当該ステロールは、アンナステロール(annasterol)；アベナステロール；-シトステロール；プラシカステロール；カルシフェロール；カンプエステロール；カリノステロール(chalinosterol)；チャイナステロール(chinasterol)；コレステノール；コレステロール；コプロスタノール；シクロアルテノール；デヒドロコレステロール；デスマステロール；ジヒドロカルシフェロール；ジヒドロコレステロール；ジヒドロエルゴステロール；ジノステロール；エピコレステロール；エルゴステロール；フコステロール；ヘキサヒドロミステロール；ヘキサオール；ヒドロキシコレステロール；ラノステロール；ルミステロール；パルケオール；ポリフェラステロール；サリンゴステロール；シトスタノール；シトステロール；スチグマスタノール；スチグマステロール；ウェインベルステロール；チモステロール(zymosterol)；ステロール胆汁酸(例えばコレール

10

20

30

40

50

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；およびリトコール酸)；および／またはそれらの薬学的に関連する塩または薬学的に許容される誘導体からなる群から選択されるものである。

一つの態様において、ステロールは、コレステロールである。

#### 【0117】

##### 生物活性薬物の送達に使用するための具体的な脂質

新規の本発明のカチオン性脂質およびステルス脂質が、例えば生物活性薬物を含む治療上許容される薬物の送達に用いられ得る。カチオン性脂質、ステルス脂質および他のタイプの脂質を含む製剤が、本明細書に記載されている。本明細書に開示された脂質は、新規であり、有用であると考えられるが、下に示す例示的で非拘束的開示において、さらに詳細に示す通り、治療使用のために、特定の特性が他より好ましい。一つの態様において、リポソーム、脂質ナノ粒子または他のこののような脂質製剤は、さらに、生物学的に有効な薬物を含む。一つの態様において、リポソーム、脂質ナノ粒子または他のこののような脂質製剤は、空である。

10

#### 【0118】

一つの態様において、製剤に使用するための個別の脂質成分は、キットで提供される。一つの態様において、キットは、脂質製剤を作製するための説明書を含む。キットは、予め作られた製剤を含んでも、投与前に混合を必要とする個別の成分または一部の成分を含んでもよい。キットは、さらに、コントロール、緩衝液、容器および送達成分など(これらに限定されない)の追加の成分を提供してもよいし、本明細書に記載された本発明の脂質および成分に限定されてもよい。

20

#### 【0119】

一つの態様において、キットは、カチオン性脂質、ステルス脂質、ヘルパー脂質および／または所望により存在する中性脂質の1つ以上を含むが、これらに限定されない、少なくとも1種のリポソームまたはリポソーム成分を含む。一つの態様において、キットは、さらに、生物活性薬物を含む。一つの態様において、キットは、さらに、コントロール脂質、またはコントロール薬物、コントロールリポソーム製剤、着色剤、緩衝剤、使用説明書などを1つ以上含む。他の態様において、リポソーム製剤は、予め混合されている。キットの1つ以上の化学成分は、脱水和された形態であっても水和物の形態であってもよい。本明細書に記載された種々の化合物および組成物を凍結乾燥で脱水するための、当技術分野で既知の種々の方法の何れもが使用され得る。

30

#### 【0120】

本発明の一つの局面において、下に例示された具体的な化合物の何れか1つまたはその薬学的に許容される誘導体が提供される。

#### 【0121】

一つの態様において、本化合物は、肝臓に生物活性薬物を送達するためのものであり、本化合物は、E0024、E0014、E0052、E0118、E0175、E0177またはE0083の1種以上から選択される。一つの態様において、肝臓に生物活性薬物を送達する組成物は、E0024、E0014、E0052、E0118またはE0083から選択される1種以上の化合物を含む。一つの態様において、肝臓に生物活性薬物を送達する組成物は、化合物E0024を含む。一つの態様において、肝臓に生物活性薬物を送達する組成物は、化合物E0014を含む。一つの態様において、肝臓に生物活性薬物を送達する組成物は、化合物E0052を含む。一つの態様において、肝臓に生物活性薬物を送達する組成物は、化合物E0118を含む。一つの態様において、肝臓に生物活性薬物を送達する組成物は、化合物E0083を含む。

40

#### 【0122】

一つの態様において、本化合物は、腫瘍に生物活性薬物を送達するためのものであり、本化合物は、E0011、E0008、E0025、E0026、E0076、E0077、E0085またはE0088の1種以上から選択される。一つの態様において、腫瘍に生物活性薬物を送達する組成物は、E0011、E0008、E0025、E0026、E0076、E0077、E0085またはE0088から選択される1種以上の化合物を含む。一つの態様において、腫瘍に生物活性薬物を送達する組成物は、化合物E0011

50

1を含む。一つの態様において、腫瘍に生物活性薬物を送達する組成物は、化合物E0008を含む。一つの態様において、腫瘍に生物活性薬物を送達する組成物は、化合物E0025を含む。一つの態様において、腫瘍に生物活性薬物を送達する組成物は、化合物E0026を含む。一つの態様において、腫瘍に生物活性薬物を送達する組成物は、化合物E0076を含む。一つの態様において、腫瘍に生物活性薬物を送達する組成物は、化合物E0077を含む。一つの態様において、腫瘍に生物活性薬物を送達する組成物は、化合物E0085を含む。一つの態様において、腫瘍に生物活性薬物を送達する組成物は、化合物E0088を含む。

### 【0123】

本明細書に記載された脂質を1種以上含むリポソーム、脂質ナノ粒子および他のこのような脂質製剤は、*in vitro*または*in vivo*の何れかで、細胞または組織に核酸組成物を送達するのに有用である。治療関連核酸組成物は、疾患または障害に関連する1つ以上の遺伝子に特異的であるRNAi剤であって、細胞または組織中の内在性配列をRNAi剤で標的化することが、治療効果または予防効果をもたらすRNAi剤を含む。

10

### 【0124】

非拘束的原則として、標的阻害の治療有効量の特にRNAi剤を含む生物活性薬物の送達によって、標的が肝臓内で発現されたとき、少なくとも70%の標的阻害を起こす。一つの態様において、肝臓にRNAiを送達する製剤に提供されるとき、本発明のカチオン性脂質は、少なくとも70%標的阻害を提供する。肝臓用に製剤化されるとき、少なくとも70%KDを提供するカチオン性脂質は、E0007、E0008、E0011、E0014、E0015、E0016、E0017、E0018、E0019、E0022、E0024、E0025、E0026、E0032、E0034、E0040、E0042、E0043、E0045、E0048、E0049、E0051、E0052、E0053、E0054、E0055およびE0118を含むが、これらに限定されない。一つの態様において、肝臓にRNAiを送達する製剤に添加したとき、本発明のカチオン性脂質は、少なくとも80%標的阻害を提供する。肝臓用に製剤化されるとき、少なくとも80%KDを提供するカチオン性脂質は、E0008、E0011、E0014、E0016、E0017、E0018、E0019、E0022、E0024、E0025、E0026、E0032、E0034、E0040、E0042、E0043、E0045、E0048、E0051、E0052、E0053、E0054、E0055およびE0118を含むが、これらに限定されない。一つの態様において、肝臓にRNAiを送達する製剤に添加したとき、本発明のカチオン性脂質は、少なくとも90%標的阻害を提供する。肝臓用に製剤化されるとき、少なくとも90%KDを提供するカチオン性脂質は、E0011、E0014、E0017、E0018、E0024、E0025、E0026、E0040、E0043、E0045、E0052、E0053、E0054、E0055およびE0118を含むが、これらに限定されない。一つの態様において、肝臓にRNAiを送達する製剤に添加したとき、本発明のカチオン性脂質は、少なくとも95%標的阻害を提供する。肝臓用に製剤化されるとき、少なくとも95%KDを提供するカチオン性脂質は、E0014、E0017、E0018、E0024、E0026、E0040、E0043、E0052、E0054、E0055およびE0118を含むが、これらに限定されない。一つの態様において、肝臓にRNAiを送達する製剤に添加したとき、本発明のカチオン性脂質は、少なくとも98%標的阻害を提供する。肝臓用に製剤化されるとき、少なくとも98%KDを提供するカチオン性脂質は、E0014、E0017、E0018、E0024、E0052、E0054およびE0118を含むが、これらに限定されない。

20

30

### 【0125】

非拘束的原則として、標的阻害の治療有効量の特にRNAi剤を含む生物活性薬物の送達によって、標的が腫瘍であるとき、少なくとも50%の標的阻害を起こす。一つの態様において、腫瘍または腫瘍細胞にRNAiを送達する製剤に添加したとき、本発明のカチオン性脂質は、少なくとも50%標的阻害を提供する。腫瘍または腫瘍細胞用に製剤化されるとき、少なくとも50%KDを提供するカチオン性脂質は、E0008、E0011、E0025、E0026、E0075、E0076、E0077、E0085、E0088、E0095、E0104、E0178およびE0179を含むが、これらに限定されない。一つの態様において、腫瘍または腫瘍細胞にRNAiを送達する製剤に添加したとき、本発明のカチオン性脂質は、少なくとも60%標的阻害を提供する。腫瘍または腫瘍細胞用に製剤化されるとき、少なくとも60%KDを提供するカチオン性脂質は、E0008、E0011、E0025、E0026、E0075、E0076、E0077、E0085およびE0088を含むが、これらに限定されない。一つの態様において、腫瘍または腫瘍細胞にRNAi

40

50

を送達する製剤に添加したとき、本発明のカチオン性脂質は、少なくとも 70 % 標的阻害を提供する。腫瘍または腫瘍送達用に製剤化されるとき、少なくとも 70 % KD を提供するカチオン性脂質は、E0011、E0025、E0026、E0075、E0076、E0077 および E0088 を含むが、これらに限定されない。一つの態様において、腫瘍または腫瘍細胞に RNAi を送達する製剤に添加したとき、本発明のカチオン性脂質は、少なくとも 80 % 標的阻害を提供する。腫瘍または腫瘍細胞用に製剤化されるとき、少なくとも 80 % KD を提供するカチオン性脂質は、E0008、E0025 および E0076 を含むが、これらに限定されない。

#### 【 0 1 2 6 】

具体的な態様において、標的阻害の治療有効量の特に RNAi 剤を含む生物活性薬物の送達によって、標的が HepG2 様腫瘍または 786-0 様腫瘍であるとき、少なくとも 30 % の標的阻害を起こす。一つの具体的な態様において、本発明のカチオン性脂質は、HepG2 様腫瘍または 786-0 様腫瘍に RNAi を送達する製剤に添加したとき、少なくとも 30 % 標的阻害を提供し、E0056、E0076、E0085、E0104、E0175、E0176 および E0177 を含む。一つの具体的な態様において、HepG2 様腫瘍または 786-0 様腫瘍に RNAi を送達する製剤に添加したとき、本発明のカチオン性脂質は、少なくとも 30 % 標的阻害を提供し、E0085、E0175 および E0177 を含む。

10

#### 【 0 1 2 7 】

##### 肝臓に送達するための具体的なカチオン性脂質

一つの態様において、好ましいカチオン性脂質は、E0014 である。一つの態様において、好ましいカチオン性脂質は、E0017 である。一つの態様において、好ましいカチオン性脂質は、E0018 である。一つの態様において、好ましいカチオン性脂質は、E0024 である。一つの態様において、好ましいカチオン性脂質は、E0052 である。一つの態様において、好ましいカチオン性脂質は、E0054 である。一つの態様において、好ましいカチオン性脂質は、E0118 である。

20

#### 【 0 1 2 8 】

一つの態様において、肝臓に生物活性薬物を送達するのに好ましい製剤は、約 5.1 ~ 約 7.4 の pKa を有するカチオン性脂質を含む。一つの態様において、肝臓に生物活性薬物を送達するのに好ましい製剤は、約 5.3 ~ 約 7.3 の pKa を有するカチオン性脂質を含む。一つの態様において、肝臓に生物活性薬物を送達するのに好ましい製剤は、約 5.9 ~ 約 7.0 の pKa を有するカチオン性脂質を含む。一つの態様において、肝臓に生物活性薬物を送達するのに好ましい製剤は、約 6.2 ~ 約 6.8 の pKa を有するカチオン性脂質を含む。一つの態様において、肝臓に生物活性薬物を送達するのに好ましい製剤は、約 6.1 以上の pKa を有するカチオン性脂質を含む。

30

#### 【 0 1 2 9 】

##### 腫瘍に送達するための具体的なカチオン性脂質

一つの態様において、好ましいカチオン性脂質は、E0008 である。一つの態様において、好ましいカチオン性脂質は、E0025 である。一つの態様において、好ましいカチオン性脂質は、E0076 である。一つの態様において、好ましいカチオン性脂質は、E0085 である。一つの態様において、好ましいカチオン性脂質は、E0175 である。一つの態様において、好ましいカチオン性脂質は、E0177 である。

40

#### 【 0 1 3 0 】

一つの態様において、in vivo で腫瘍に生物活性薬物を送達するのに好ましい製剤は、約 5.0 ~ 約 6.7 の pKa を有するカチオン性脂質を含む。一つの態様において、in vivo で腫瘍に生物活性薬物を送達するのに好ましい製剤は、約 5.2 ~ 約 6.3 の pKa を有するカチオン性脂質を含む。一つの態様において、in vivo で腫瘍に生物活性薬物を送達するのに好ましい製剤は、約 5.4 ~ 約 6.2 の pKa を有するカチオン性脂質を含む。一つの態様において、in vivo で腫瘍に生物活性薬物を送達するのに好ましい製剤は、約 5.8 ~ 約 6.1 の pKa を有するカチオン性脂質を含む。一つの態様において、腫瘍または腫瘍細胞に生物活性薬物を送達するのに好ましい製剤は、約 6.1 以下の pKa を有するカチオン性脂質を含む。

50

## 【0131】

医薬組成物および製剤

本発明は、少なくとも1種の本発明のカチオン性脂質化合物を含む医薬組成物を提供する。本発明は、少なくとも1種の本発明のステルス脂質を含む医薬組成物を提供する。一つの態様において、少なくとも1種の他の脂質成分が存在する。このような組成物はまた、所望により1種以上の他の脂質成分と組み合わせた生物活性薬物を含んでもよい。一つの態様において、1種以上の成分、組成物および/または薬物が、キット中に提供される。1種以上の生物活性薬物と組み合わせて本発明の脂質を含む組成物は、一つの態様において、例えば、細胞または組織に、治療有効量の1種以上の生物活性薬物を送達するのに使用するための製剤として提供される。一つの態様において、細胞または組織は、処置または予防を必要とする対象における細胞または組織である。一つの態様において、対象は、治療有効量の生物活性薬物を必要とする患者である。本明細書で用いられるとき、対象は、ヒトおよび非ヒト動物の双方を含む。

## 【0132】

他の脂質成分は、カチオン性脂質、(所望の)中性脂質、ヘルパー脂質、ステルス脂質およびアルキルレゾルシノールをベースとする脂質からなる群から1種以上選択されるものであり得る。一つの態様において、本発明は、(a) カチオン性脂質、例えば式I～Xの何れか1つの化合物、および/または本発明のE0001～E0171およびE0175～E0180；(b) 所望により存在する中性脂質、例えばDSPC；(c) ヘルパー脂質、例えばコレステロールを含むもの；(d) ステルス脂質、例えば式XIまたはXIIの何れか1つ、または、S001～S009およびS012～S026の何れか1つ以上、または、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレンギリコール)2000](カタログ番号 880150P, Avanti Polar Lipids)を含む組成物を提供する。一つの態様において、脂質成分は、リポソーム製剤、例えばナノ粒子などの中に存在する。一つの態様において、リポソーム製剤は、さらに、生物活性薬物を含む。一つの態様において、リポソーム製剤は、さらに、治療有効量の生物活性薬物を含む。

## 【0133】

他の脂質成分は、例えば、塩化N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウム(DODAC)、臭化N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウム(DDAB)、塩化N-(1-(2,3-ジオレオイルオキシ)-プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウム(DOTAP)、塩化N-(1-(2,3-ジオレイロイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウム(DOTMA)、N,N-ジメチル-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピルアミン(DODMA)、1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP)、1,2-ジオレオイルカルバミル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DOCDAp)、1,2-ジリネオイル(Dilineoyl)-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DLINDAP)、ジラウリル(C<sub>12</sub>:0)-トリメチル-アンモニウム-プロパン(DLTAP)、ジオレオイルオキシ-N-[2-スペルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウム トリフルオロ酢酸塩(DOSPA)、ジオクタデシルアミドグリシル-スペルミン(DOGS)、DC-Chol、臭化1,2-ジミリストイルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウム(DMRIE)、3-ジメチルアミノ-2-(コレスタ-5-エン-3-オキシブタン-4-オキシ)-1-(cis,cis-9,12-オクタデカジエンオキシ)プロパン(CLindMA)、2-[5'-(コレスタ-5-エン-3[ ]-オキシ)-3'-オキサペントキシ]-3-ジメチル-1-(cis,cis-9',12'-オクタデカジエンオキシ)-プロパン(CplindMA)、および、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン(DMOBA)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン(DOcarbDAP)からなる既知のカチオン性脂質の群から選択されるものであってもよい。一つの態様において、他の脂質成分は、DOTAPまたはDLTAPである。

## 【0134】

10

20

30

40

50

一つの態様において、カチオン性脂質は、式Iの脂質から選択される。一つの態様において、カチオン性脂質は、式IIの脂質から選択される。一つの態様において、カチオン性脂質は、式IIIの脂質から選択される。一つの態様において、カチオン性脂質は、式IVの脂質から選択される。一つの態様において、カチオン性脂質は、式Vの脂質から選択される。一つの態様において、カチオン性脂質は、式VIの脂質から選択される。一つの態様において、カチオン性脂質は、式VIIの脂質から選択される。一つの態様において、カチオン性脂質は、式VIIIの脂質から選択される。一つの態様において、カチオン性脂質は、式IXの脂質から選択される。一つの態様において、カチオン性脂質は、式Xの脂質から選択される。一つの態様において、カチオン性脂質は、E0001からE0171(E0001～E0171)、および、E0175からE0180(E0175～E0180)のリストから選択される。

10

### 【0135】

他の脂質成分は、例えば、中性脂質であってもよい。中性脂質は、一つの態様において、多様な中性の非荷電または双性イオン性脂質の何れかから1つ以上選択されてもよい。本発明において、中性リン脂質の例は、5-ヘプタデシルベンゼン-1,3-ジオール(レゾルシノール)、コレステロール ヘミスクシネット(CHEMS)、ジパルミトイロホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ホスホコリン(DOPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、ホスファチジルコリン(PLPC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、例えばホスファチジルコリン(EPC)、ジラウリロイルホスファチジルコリン(DLPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、1-ミリストイル-2-パルミトイロホスファチジルコリン(MPPC)、1-パルミトイロ-2-ミリストイルホスファチジルコリン(PMPC)、1,2-ジアラキドイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DBPC)、1-パルミトイロ-2-ステアロイルホスファチジルコリン(PSPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DAPC)、1,2-ジエイコセノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DEPC)、パルミトイロオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、リゾホスファチジルコリン、ジリノ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エタノールアミン(DSPE)、ジミリストイル ホスファチジルエタノールアミン(DMPE)、ジパルミトイロ ホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、パルミトイロオレオイル ホスファチジルエタノールアミン(POPE)、リゾホスファチジルエタノールアミン、またはこれらの組み合わせを含む。一つの態様において、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)およびジミリストイル ホスファチジル エタノールアミン(DMPE)からなる群から選択される。

20

30

30

### 【0136】

他の脂質成分は、例えばアニオン性脂質、例えば安定な複合体を作ることができるアニオン性脂質であってもよい。アニオン性脂質の例は、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ル酸、N-ドデカのイル 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およびリジルホスファチジルグリセロールである。

40

### 【0137】

適当な中性およびアニオン性脂質はまた、米国特許第2009/0048197号の段落[0119]に記載されたものを含む。

40

### 【0138】

投与される組成物中の脂質総量は、一つの態様において、約5～約30mg脂質/mg生物活性薬物(例えばsiRNA)、他の態様において約5～約25mg脂質/mg生物活性薬物(例えばsiRNA)、他の態様において約7～約25mg脂質/mg生物活性薬物(例えばsiRNA)であり、一つの態様において約7～約15mg脂質/mg生物活性薬物(例えばsiRNA)である。

50

### 【0139】

脂質組成物、例えばリポソームおよびリポナノ粒子に生物活性薬物を負荷する種々の方法は、当技術分野で利用可能であり、受動的および能動的負荷方法を含む。その何れもが、本発明の範囲内であるとみなされる。用いられる正確な方法は、例えば負荷される生物活性薬物、負荷後に用いる保存方法、得られた粒子の大きさ、および意図される投与レジメを含むが、これらに限定されない多くの要素に基づいて選択され得る。方法は、例えばリポソームを形成または再構成する際に薬物と脂質を機械的に混合し、有機溶媒中で全成分を溶解し、それらを乾燥フィルムに濃縮し、pHまたはイオン濃度勾配を作り活性な薬物をリポソーム内部に入れ、膜電位差を作り、イオノフォア介在負荷することを含む。少なくとも下記の実施例68、69および77、PCT公開公報第95/08986号、米国特許第5,837,282号、米国特許第5,837,282号および米国特許第7,811,602号を参照のこと。

10

#### 【0140】

投与される生物活性薬物の投与量は、生物活性薬物の個性および標的患者(例えば動物種)などの幾つかの要素に依存する。生物活性薬物の濃度は、siRNAが動物に投与されるとき、それに従って調節されるが、1回投与量当たり0.1mg/ml～10mg/mlが典型的である。

#### 【0141】

siRNAの総量を、幾つかの方法によって測定することができる。HPLC法は、アニオン交換、逆相(RP)またはサイズ排除(SEC)を含む。また、蛍光法を用いてもよい。これらの全ての方法において、総siRNA含量を測定する前に、ナノ粒子からsiRNAを遊離するために、ナノ粒子を溶解しておかなければならない。

20

#### 【0142】

一つの態様において、本組成物は、組成物中に存在する脂質総量に対して約10%～約80%、約20%～約70%または約30%～約60%となるカチオン性脂質成分を含む。これらのパーセンテージは最終脂質粒子中の脂質成分の総モルに対するモル%である。

#### 【0143】

一つの態様において、本組成物は、組成物中に存在する脂質総量に対して約0%～約50%、約0%～約30%または約10%～約20%となる中性脂質成分を含む。一つの態様において、組成物の中性脂質成分は、オプションである。一つの態様において、本組成物は、中性脂質成分を有しない。これらのパーセンテージは最終脂質粒子中の脂質成分の総モルに対するモル%である。

30

#### 【0144】

一つの態様において、本組成物は、組成物中に存在する脂質総量に対して約5%～約80%、約20%～約70%または約30%～約50%となるヘルパー脂質成分を含む。これらのパーセンテージは最終脂質粒子中の脂質成分の総モルに対するモル%である。

#### 【0145】

一つの態様において、本組成物は、組成物中に存在する脂質総量に対して約0%～約10%、約1%～約6%、または約2%～約5%となるステルス脂質成分を含む。これらのパーセンテージは最終脂質粒子中の脂質成分の総モルに対するモル%である。

#### 【0146】

一つの態様において、本組成物は、製剤中に存在する脂質総量に対して約30～約60%となるカチオン性脂質成分、製剤中に存在する脂質総量に対して約0～約30%となる中性脂質成分、製剤中に存在する脂質総量に対して約18～約46%となるヘルパー脂質、および、製剤中に存在する脂質総量に対して約2～約4%となるステルス脂質を含む。これらのパーセンテージは最終脂質粒子中の脂質成分の総モルに対するモル%である。

40

#### 【0147】

本発明のリポソーム組成物は、非経腸、静脈内、全身、局所、経口、腫瘍内、筋肉内、皮下、腹腔内、吸入またはこのような送達方法の何れかを含む、幾つかの方法の何れかで投与される。一つの態様において、本組成物は、非経腸で、すなわち、関節内、静脈内、腹腔内、皮下または筋肉内に投与される。具体的な態様において、リポソーム組成物は、静脈内注入によって、または、ボラス注射によって腹腔内に投与される。

50

**【 0 1 4 8 】**

本発明のリポソーム組成物は、対象に送達するのに適当な医薬組成物として製剤化され得る。本発明の医薬組成物は、しばしば、さらに、1種以上の緩衝剤(例えば中性緩衝食塩水またはリン酸緩衝食塩水)、炭水化物(例えばグルコース、マンノース、ショ糖、デキストロースまたはデキストラン)、マンニトール、タンパク質、ポリペプチドまたはアミノ酸、例えばグリシン、抗酸化剤、静菌剤、キレート剤、例えばEDTAまたはグルタチオン、アジュバント(例えば水酸化アルミニウム)、製剤をレシピエントの血液に対して等張性、低張性または弱高張性とする溶質、懸濁剤、濃厚化剤、および/または保存料を含む。あるいは、本発明の組成物は、凍結乾燥物として製剤化され得る。

**【 0 1 4 9 】**

本発明に使用するのに適当な製剤は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17.sup.th Ed. (1985)で見出される。しばしば、静脈内組成物は、許容される担体、例えば水性担体に懸濁したリポソームの溶液を含む。

**【 0 1 5 0 】****生物活性薬物を送達する方法および関連する使用**

本発明のカチオン性脂質およびステルス脂質は、生物活性薬物を送達するのに用いられる製剤に有用である。本発明の新規脂質を含む製剤は、ミクロ粒子を含む粒子形成送達剤、ナノ粒子、および、細胞に種々の分子を送達するのに有用な導入剤を含むが、これらに限定されない種々の形態であってもよい。具体的な製剤は、生物活性薬物、例えば、抗体(例えばモノクローナル、キメラ、ヒト化、ナノボディおよびそのフラグメントなど)、コレステロール、ホルモン、ペプチド、タンパク質、化学療法剤および他のタイプの抗腫瘍薬、低分子量薬物、ビタミン、補因子、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素的核酸、アンチセンス核酸、三本鎖形成オリゴヌクレオチド、アンチセンスDNAまたはRNA組成物、キメラDNA:RNA組成物、アロザイム、アブタマー、リボザイム、デコイおよびそのアナログ、プラスミドおよび他のタイプの発現ベクター、および小分子核酸、RNAi剤、低分子干渉核酸(siRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、ミクロRNA(miRNA)および低分子ヘアピン型RNA(shRNA)分子を、関連する細胞および/または組織、例えば細胞培養物、対象または生物体に、移入または送達するのに有効である。生物活性薬物の上記リストは、例示のみであり、これらに限定されることを意図しない。このような化合物は、精製されても部分的に精製されてもよく、天然由来であっても合成されたものであってもよく、化学的に修飾されていてもよい。

**【 0 1 5 1 】**

このような生物活性薬物を含む製剤は、例えば、細胞、対象または生物体において、疾患、状態または体質を予防、阻害または処置する組成物を提供するのに有用である。疾患、状態または体質は、癌、炎症性疾患、移植片および/または組織拒絶反応を含む増殖性疾患、自己免疫性疾患または状態、加齢性疾患、神経疾患または神経変性疾患、呼吸器疾患、心血管疾患、眼疾患、代謝疾患、皮膚疾患、聴覚疾患、肝臓疾患、腎臓疾患などを含むが、これらに限定されない。

**【 0 1 5 2 】**

1回投与当たりに投与される活性薬物の量は、最小治療量より多いが、中毒量に満たない量である。1回投与当たりの実際の量は、幾つかの要素、例えば患者の病歴、他の治療の使用、提供される生物活性薬物および疾患の性質に依存して、医師によって決定され得る。投与される生物活性薬物の量は、処置に対する患者の応答および何らかの処置関連副作用の存在または重症度に依存して、処置時に調節され得る。適切な規制当局によって承認された典型的な投与量および化合物処置は、当業者に知られており、利用可能である。例えばPhysician's Desk Reference, 64th ed., Physician's Desk Reference Inc. (2010), Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa. (1985)、および、Remington The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., Li

10

20

30

40

50

ppincott Williams & Williams Publishers (2005)を参照のこと。

【0153】

一つの態様において、生物活性薬物の1回投与量が、それを必要とする患者に投与される。一つの態様において、多回投与量が投与されるとき、同時に、別個に、または交互に、多回投与量が投与されてもよい。一つの態様において、多回投与量では、同じ製剤が投与される。一つの態様において、多回投与量では、製剤が異なる。種々の態様において、投与は、1日1回で投与されても1日、2日、3日、4日以上の連続した日の間で1回で投与されてもよい。一つの態様において、用量は、週1回投与される。一つの態様において、用量は、1週間おきに投与される。一つの態様において、患者は、処置に対する患者の応答に依存して、少なくとも2クール、場合によりそれ以上の処置レジメを受ける。一剤レジメにおいて、処置の全クールは、観察された応答および毒性に基づいて、患者および医師によって決定される。上記の投与レジメは例示と考えられるべきである。他の投与レジメは、本発明の範囲内とみなされ、これは望ましい治療効果に依存する。

10

【0154】

一つの態様において、本発明は、細胞に生物活性薬物を送達する方法であって、生物活性薬物および本発明の化合物を含む組成物を、細胞に投与することを含む方法を提供する。  
。

20

【0155】

細胞は、*in vitro*であっても*in vivo*であってもよい。

【0156】

本発明は、治療に使用するための、式(I)の化合物を提供する。本発明はまた、さらに式II～Xで識別された式Iの化合物のサブセットを提供する。式I～Xの化合物は、一般的に、本明細書で、カチオン性脂質と呼ばれる。

30

【0157】

本発明はさらに、治療に使用するための、式(XI)の化合物を提供する。本発明はまた、さらに、式(XII)で区別された式(XI)の化合物のサブセットを提供する。式(XI)および(XI)  
Iの化合物は、一般的に、本明細書で、ステルス脂質と呼ばれる。

【0158】

本発明は、さらに、疾患または状態を処置する方法であって、疾患または状態を処置する生物活性薬物と組み合わせた、少なくとも1種の式(I)の化合物を含む医薬組成物を治療有効量で患者に投与する工程を含む方法を提供する。本発明はまた、疾患または状態の処置に使用するための、少なくとも1種の式(XI)の化合物を含み組成物を提供する。

30

【0159】

本発明はまた、疾患または状態を処置する医薬の製造における、式(I)の化合物の症を提供する。一つの態様において、医薬は、疾患または状態を処置する生物活性薬物を含む。本発明はまた、式(I)または式(XI)の化合物を含む、疾患または状態を処置する医薬の製造における、疾患または状態を処置する生物活性薬物の使用を提供する。

【0160】

本発明はまた、疾患または状態を処置する方法であって、少なくとも1つの本発明の組成物を含む製剤において、治療有効量の生物活性薬物を、患者に投与する工程を含む方法を提供する。一つの態様において、疾患または状態は、肝臓疾患、腫瘍または疾患である。一つの態様において、疾患または状態は、s i R N A 剤を投与することによって処置可能である。

40

【0161】

本発明はまた、患者における疾患または状態の処置に使用するための、本発明の組成物を提供する。一つの態様において、疾患または状態は、肝臓疾患、腫瘍またはm R N A によってコードされたタンパク質が介在する疾患である。

【0162】

本発明はまた、式(I)および/または式XIの化合物を含む製品を提供する。一つの態様において、本発明は、さらに、治療において同時、別個または連続使用するための、組み

50

合わせ製剤として、生物活性薬物を含む

【0163】

投与および製剤

全般

薬学的使用において、本発明の化合物および組成物は、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、気道(エアゾール)、経口、鼻腔内、直腸、腔、頬側、鼻咽頭、消化器または舌下投与を含む、経腸または非経腸経路によって、医薬の少なくとも一部として投与され得る。投与は、全身であっても局所であってもよい。局所投与は、例えば、カテーテル挿入、インプラント埋め込み、浸透圧ポンプ、直接注射、皮膚/経皮適用、ステント挿入、耳/眼用滴剤、または門脈投与を含んでもよい。式(I)および/または式(XI)の化合物は、提案された適応症の処置に最も適切な投与形および投与経路を選択するために、溶解度および溶液安定性(pHに対する)、浸透性などの生物薬学的性質について評価されるべきである。

【0164】

本発明の化合物および組成物は、一般的に、しかし必須ではなく、1種以上の薬学的に許容される添加物と組み合わせた製剤として投与される。用語“添加物”は、本発明の化合物以外の何らかの成分、他の脂質成分および生物活性薬物を含む。添加物は、製剤に、機能的(例えば薬物放出速度制御)および/または非機能的(例えば加工助剤または希釈剤)の特性を与える。添加物の選択は、大体において、特定の投与方法、溶解性および安定性に対する添加物の効果、および投与形の性質などの要素に依存する。

【0165】

典型的な薬学的に許容される添加物は、

- ・希釈剤、例えば乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール、ソルビトール、セルロースおよび/またはグリシン；
  - ・滑沢剤、例えばシリカ、タルク、ステアリン酸とそのマグネシウム塩もしくはカルシウム塩および/またはポリエチレングリコール；
  - ・結合剤、例えばケイ酸アルミニウムマグネシウム、澱粉ペースト、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよび/またはポリビニルピロリドン；
  - ・崩壊剤、例えば澱粉、寒天、アルギン酸もしくはそのナトリウム塩、または、発泡性混合物；および/または
  - / 吸收剤、着色料、風味剤および/または甘味料；
- を含む。

【0166】

添加物は、所望により緩衝剤(例えばPBS緩衝液)および/または糖を含む水溶液の担体であってもよい。

【0167】

薬学的に許容される添加物の徹底的な議論は、Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 2000, 20th edition (ISBN: 0683306472)で利用できる。

【0168】

経口投与

本発明の化合物および組成物は、経口で投与されてもよい。経口投与は、化合物が消化器に入る嚥下、および/または、化合物が口から直接血流に入る頬側、舌または舌下の投与を含んでもよい。

【0169】

非経腸投与

本発明の化合物および組成物を、非経腸で投与することができる。本発明の化合物および組成物は、血流、皮下組織、筋肉または内臓に直接投与されてもよい。投与に適当な方法は、静脈内、動脈内、髄腔内、脳室内、尿道内、胸骨内、頭蓋内、筋肉内、滑液内および皮下を含む。投与に適当なデバイスは、針(マイクロニードル)のある注射器、針のない注射器および点滴を含む。

10

20

30

40

50

## 【0170】

非経腸製剤は、典型的に、水性または油性溶液である。溶液が水性であるとき、添加物、例えば糖類(ブドウ糖、マンニトール、ソルビトールなどを含むが、これらに限定されない)、塩類、炭水化物および緩衝剤(好ましくはpH 3~9)であるが、幾つかの適用において、滅菌処理された非水性溶液として、または適当なピークリ、例えば滅菌処理されたパイロジエンを含まない水(WFI)と併せて用いられる乾燥された形態として、より適切に製剤化され得る。

## 【0171】

非経腸製剤は、分解可能なポリマー、例えばポリエステル(すなわちポリ乳酸、ポリラクチド、ポリラクチド-コ-グリコリド、ポリカプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸)、ポリオルトエステル類およびポリ無水物から誘導されるインプラントであってもよい。これらの製剤は、外科的切開により、皮下組織、筋肉組織または特定の臓器に直接投与されてもよい。

10

## 【0172】

凍結乾燥などによる、滅菌条件下での非経腸製剤の製造は、例えば、当業者に周知の標準的な薬学的方法を用いて、容易に達成され得る。

## 【0173】

非経腸溶液の製造に用いられる化合物および組成物の溶解度は、適切な製剤方法の使用によって、例えば共溶媒の混合および/または溶解促進剤、例えば界面活性剤、ミセル構造およびシクロデキストリンの使用によって増大させてもよい。

20

## 【0174】

吸入および鼻腔内投与

本発明の化合物および組成物を、鼻腔内に、典型的には、乾燥粉末の形態(単独で、または、例えば乳糖との乾燥混合物における混合物として、または例えばリン脂質、例えばホスファチジルコリンと混合された混合成分粒子としての何れか)で、乾燥粉末吸入器、加圧容器、ポンプ、スプレー、アトマイザー(好ましくは微小ミストを作るための電気水力学を用いたアトマイザー)またはネプライザーからのエアゾールスプレーとして、適当な噴射剤、例えば1,1,1,2-テトラフルオロエタンまたは1,1,1,2,3,3,3-ヘptaフルオロプロパンを使用してまたは使用せずに、吸入によって、あるいは、鼻腔用滴剤として、投与することができる。鼻腔内の使用について、粉末は、生体接着剤、例えばキトサンまたはシクロデキストリンを含んでもよい。

30

## 【0175】

加圧容器、ポンプ、スプレー、アトマイザーまたはネプライザーは、例えばエタノール、水性エタノール、または本発明の化合物を分散、溶解または遅延放出するための適当な代替剤、溶媒としての噴射剤、および所望の界面活性剤、例えばトリオレイン酸ソルビタン、オレイン酸またはオリゴ乳酸を含む、本発明の化合物の溶液または懸濁液を含む。

## 【0176】

乾燥粉末または懸濁液製剤を使用する前に、本化合物または組成物を、吸入による送達に適当な大きさ(典型的には5ミクロン未満)まで微細化する。これは、何らかの適切な粉碎法、例えばスパイラルジェット・ミル、流動床ジェットミル、ナノ粒子を形成するための超臨界流体加工、高圧均質化またはスプレー乾燥などによって達成され得る。

40

## 【0177】

噴射吸入器(inhaler)または吸気吸入器(insufflator)に使用するためのカプセル剤(例えばゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースから作られている)、ブリストーおよびカートリッジは、本発明の化合物または組成物、適当な粉末基剤、例えば乳糖または澱粉および性能修飾剤、例えば1-ロイシン、マンニトールまたはステアリン酸マグネシウムの粉末混合物を含んで製剤化され得る。乳糖は、無水物であっても一水和物の形態であってもよく、好ましくは後者である。他の適当な添加物は、デキストラン、ブドウ糖、麦芽糖、ソルビトール、キシリトール、果糖、ショ糖およびトレハロースを含む。

## 【0178】

50

吸入 / 鼻腔内投与用製剤は、例えば P G L A を用いて、即時および / または修飾放出製剤で製剤化され得る。修飾放出製剤は、遅延、持続性、パルス、制御、標的化およびプログラム放出を含む。

【 0 1 7 9 】

経皮投与

経皮適用に適当な製剤は、担体と共に、治療有効量の本発明の化合物または組成物を含む。好都合な担体は、宿主の皮膚を通過するのを助けるための吸収可能な薬理学的に許容される溶媒を含む。典型的には、経皮デバイスは、裏打ち材、所望により担体と共に化合物を含むリザーバー、所望により延長した時間に亘って制御されたおよび予め定められた速度で化合物を宿主の皮膚に送達するための速度制御障壁、および、皮膚にデバイスを固定化するための手段を含むバンテージの形態である。

10

【 0 1 8 0 】

本発明が標的とする細胞および臓器

本発明の化合物、組成物、方法および使用は、患者において、下記の 1 つ以上に生物活性薬物を送達するために用いられ得る :

肝臓または肝臓細胞(例えば肝細胞) ;

腎臓または腎臓細胞 ;

腫瘍または腫瘍細胞 ;

C N S または C N S 細胞(中枢神経系、例えば脳および / または脊髄) ;

P N S または P N S 細胞(末梢神経系) ;

20

肺または肺細胞 ;

脈管構造または血管細胞 ;

皮膚または皮膚細胞(例えば真皮細胞および / または滲胞細胞) ;

眼または眼の細胞(例えば斑、中心窩、角膜、網膜) ; および

耳または耳の細胞(例えば内耳、中耳および / または外耳の細胞)。

【 0 1 8 1 】

一つの態様において、本発明の化合物、組成物、方法および使用は、肝臓細胞(例えば肝細胞)に生物活性薬物を送達するためのものである。一つの態様において、本発明の化合物、組成物、方法および使用は、腫瘍または腫瘍細胞(例えば原発性腫瘍または転移性癌細胞)に生物活性薬物を送達するためのものである。

30

【 0 1 8 2 】

肝臓または肝臓細胞に生物活性薬物を送達するために、一つの態様において、本発明の化合物または組成物を、当技術分野で一般的に知られている通りに、例えば送達を助けるために、非経腸投与(例えば静脈内、筋肉内、皮下投与)、または局所投与(例えば直接注射、門脈注射、カテーテル挿入、ステント挿入)によって、患者の肝臓または肝臓細胞と接触させる。

【 0 1 8 3 】

腎臓または腎臓細胞に生物活性薬物を送達するために、一つの態様において、本発明の化合物または組成物を、当技術分野で一般的に知られている通りに、例えば送達を助けるために、非経腸投与(例えば静脈内、筋肉内、皮下投与)、または局所投与(例えば直接注射、カテーテル挿入、ステント挿入)によって、患者の腎臓または腎臓細胞と接触させる。

40

【 0 1 8 4 】

腫瘍または腫瘍細胞に生物活性薬物を送達するために、一つの態様において、本発明の化合物または組成物を、当技術分野で一般的に知られている通りに、例えば送達を助けるために、非経腸投与(例えば静脈内、筋肉内、皮下投与)、または局所投与(例えば直接注射、カテーテル挿入、ステント挿入)によって、患者の腫瘍または腫瘍細胞と接触させる。

【 0 1 8 5 】

C N S または C N S 細胞(例えば脳細胞および / または脊髄細胞)に、生物活性薬物を送

50

達するために、一つの態様において、本発明の化合物または組成物を、当技術分野で一般的に知られている通りに、例えば送達を助けるために、非経腸投与(例えば静脈内、筋肉内、皮下投与)、または局所投与(例えば直接注射、カテーテル挿入、ステント挿入、浸透圧ポンプ投与(例えば髄腔内(*intrathecal*)または脳室内))によって、患者のCNSまたはCNS細胞(例えば脳細胞および/または脊髄細胞)と接触させる。

#### 【0186】

PNSまたはPNS細胞に生物活性薬物を送達するために、一つの態様において、本発明の化合物または組成物を、当技術分野で一般的に知られている通りに、例えば送達を助けるために、非経腸投与(例えば静脈内、筋肉内、皮下投与)、または局所投与(例えば直接注射)によって、患者のPNSまたはPNS細胞と接触させる。 10

#### 【0187】

肺または肺細胞に生物活性薬物を送達するために、一つの態様において、本発明の化合物または組成物を、当技術分野で一般的に知られている通りに、例えば送達を助けるために、非経腸投与(例えば静脈内、筋肉内、皮下投与)、または局所投与(例えば肺組織および細胞への直接的肺投与)によって、患者の肺または肺細胞と接触させる。

#### 【0188】

血管または血管細胞に、生物活性薬物を送達するために、一つの態様において、本発明の化合物または組成物を、当技術分野で一般的に知られている通りに、例えば送達を助けるために、非経腸投与(例えば静脈内、筋肉内、皮下投与)、または局所投与(例えばクランプ、カテーテル挿入、ステント挿入)によって、患者の血管または血管細胞と接触させる。 20

#### 【0189】

皮膚または皮膚細胞(例えば真皮細胞および/または濾胞細胞)に、生物活性薬物を送達するために、一つの態様において、本発明の化合物または組成物を、当技術分野で一般的に知られている通りに、例えば送達を助けるために、非経腸投与(例えば静脈内、筋肉内、皮下投与)、または局所投与(例えば直接皮膚に塗布する、イオン導入)によって、患者の皮膚または皮膚細胞(例えば真皮細胞および/または濾胞細胞)と接触させる。

#### 【0190】

眼または眼の細胞(例えば班、中心窩、角膜、網膜)に、生物活性薬物を送達するために、一つの態様において、本発明の化合物または組成物を、当技術分野で一般的に知られている通りに、例えば送達を助けるために、非経腸投与(例えば静脈内、筋肉内、皮下投与)、または局所投与(例えば直接注射、眼内注射、イオン導入、点眼剤の使用、インプラント)によって、患者の眼または眼の細胞(例えば班、中心窩、角膜、網膜)と接触させる。 30

#### 【0191】

耳または耳の細胞(例えば内耳、中耳および/または外耳の細胞)に、生物活性薬物を送達するために、一つの態様において、本発明の化合物または組成物を、当技術分野で一般的に知られている通りに、例えば送達を助けるために、非経腸投与(例えば静脈内、筋肉内、皮下投与)、または局所投与(例えば直接注射)によって、患者の耳または耳の細胞(例えば内耳、中耳および/または外耳の細胞)と接触させる。

#### 【0192】

#### 疾患または状態の処置

本発明によって処置され得る疾患または状態は、患者の遺伝子、遺伝子発現、タンパク質、タンパク質活性、細胞経路などの調節に関連するものを含む。本発明によって処置される疾患または状態は、増殖性疾患(例えば腫瘍)；炎症性疾患；移植片および/または組織拒絶反応(同種移植片拒絶反応)；自己免疫疾患；感染性疾患；加齢関連疾患；神経疾患または神経変性疾患(例えばハンチントン病)；代謝疾患；心血管疾患；呼吸器疾患；眼疾患；皮膚疾患；聴覚疾患(例えば聴覚消失、難聴)；肝臓疾患(例えば肝炎、HCV、HBV、糖尿病、肝硬変、肝細胞癌)および腎臓(kidney/renal)疾患(例えば多発性嚢胞腎疾患)からなる群から選択される、1つ以上であり得る。一つの具体的な態様において、本発明は、増殖性疾患、例えば腫瘍または腫瘍細胞を処置する。一つの具体的な態様において 40

、本発明は、肝臓疾患、例えば肝炎、HCV、HBV、糖尿病、肝硬変、特定の肝細胞癌を処置する。

#### 【0193】

当業者は、本発明の化合物と組み合わせて治療有効量の薬物を送達する生物活性薬物を選択することが可能である。薬物がRNAi治療剤であるとき、望ましい治療効果は、対象の疾患または状態に関係する標的遺伝子の発現を調節することである。一つの態様において、遺伝子発現の減少およびその結果として応答するタンパク質 / RNAのレベルの減少は、ある程度、疾患または状態の症状を緩和する。

#### 【0194】

##### 有効性

本化合物、組成物、方法および使用は、疾患または状態を軽減、阻止または寛解するのに適切な状態に投与条件を含み得る。一つの態様において、処置しない患者と比較して、患者において、標的遺伝子の発現レベルを減少させる、治療有効量のRNAi剤を、それを必要とする患者に投与する。

10

#### 【0195】

一つの態様において、対象の疾患または状態に関係する標的の発現を、処置しない患者に対して、約10%、より好ましくは約20%、より好ましくは約30%、より好ましくは約40%、より好ましくは約50%、より好ましくは約60%、より好ましくは約70%、より好ましくは約80%、より好ましくは約90%、より好ましくは約95%、より好ましくは約98%、および最も好ましくは約100%まで減少させる。

20

#### 【0196】

##### 定義

本明細書全体で用いられるとき、“a”および“an”などの記載は、記載の文法上の対象物の1つ以上(少なくとも1つ)を言う。

30

#### 【0197】

##### 式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)、(VII)、(VIII)、(IX)、(X)、(XI)および(XII)の化合物およびその誘導体

本明細書で用いられるとき、用語“本発明の(脂質)化合物”、“式(I)の(脂質)化合物”、“(脂質)化合物”、“カチオン性脂質”など(すなわち本発明のカチオン性脂質についての全ての記載)および/または“ステルス脂質”は、その薬学的に許容される誘導体および多型、異性体および同位体標識体を含む。さらに、当該用語は、カチオン性脂質についての式(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)、(VII)、(VIII)、(IX)および(X)の化合物；およびステルス脂質についての式(XI)および(XII)の化合物；および本明細書に開示されたその態様を含む。

30

#### 【0198】

##### 薬学的に許容される誘導体

用語“薬学的に許容される誘導体”は、式(I)の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物または水和物を何れも含む。一つの態様において、薬学的に許容される誘導体は、式(I)の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物または水和物である。

40

#### 【0199】

##### 薬学的に許容される塩

用語“薬学的に許容される塩”は、無機酸または有機酸および無機塩基または有機塩基を含む、薬学的に許容される非毒性の酸または塩基から製造される塩を含む。薬学的に許容される塩のレビューについては、Stahl and Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use (Wiley VCH, Weinheim, Germany, 2002)を参照のこと。

40

#### 【0200】

##### 溶媒和物および水和物

本発明の化合物は、溶媒和されていない形態で存在しても溶媒和された形態で存在してもよい。用語“溶媒和物”は、本発明の化合物および1種以上の薬学的に許容される溶媒

50

分子、例えば水またはC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコール、例えばエタノールを含む分子複合体を含む。用語“水和物”は、溶媒が水である“溶媒和物”を意味する。

### 【0201】

#### 異性体の形態

本発明の化合物は、c i s型およびt r a n s型、E型およびZ型、R型、S型およびメソ型、ケト型およびエノール型を含むが、これらに限定されない、1種以上の幾何異性体、光学異性体、エナンチオマー、ジアステレオマーおよび互変異性体の形態で存在してもよい。全てのこのような異性体の形態が本発明の範囲内に含まれる。異性体の形態は、異性体として純粋なまたは富化された形態で存在しても、異性体混合物(例えばラセミ体またはジアステレオマー混合物)で存在してもよい。

10

### 【0202】

従って、本発明は、例えば、

- ・式(I)の化合物の立体異性体混合物；
- ・式(I)の化合物のジアステレオマーとして富化されたまたはジアステレオマーとして純粋な異性体；または
- ・式(I)の化合物のエナンチオマーとして富化されたまたはエナンチオマーとして純粋な異性体；

を少なくとも提供する。

### 【0203】

適切な異性体は、既知の方法(例えばクロマトグラフィー法および再結晶)を適用するまたは適合させることによって、混合物から分離され得る。適切な異性体は、既知の方法(例えば不斉合成)を適用するまたは適合させることによって製造され得る。

20

### 【0204】

#### 同位体標識

本発明は、1個以上の原子が、同じ原子番号を有するが天然に通常見出される原子質量または質量数と異なる原子質量または質量数を有する原子に置き換えられている、薬学的に許容される同位体標識された式(I)の化合物を含む。

### 【0205】

本発明の化合物に包含するのに適當な同位体の例は、水素の同位体、例えば<sup>2</sup>Hおよび<sup>3</sup>H、炭素の同位体、例えば<sup>1</sup><sup>1</sup>C、<sup>1</sup><sup>3</sup>Cおよび<sup>1</sup><sup>4</sup>C、塩素の同位体、例えば<sup>3</sup><sup>6</sup>C、<sup>1</sup>、フッ素の同位体、例えば<sup>1</sup><sup>8</sup>F、ヨウ素の同位体、例えば<sup>1</sup><sup>2</sup><sup>3</sup>Iおよび<sup>1</sup><sup>2</sup><sup>5</sup>I、窒素の同位体、例えば<sup>1</sup><sup>3</sup>Nおよび<sup>1</sup><sup>5</sup>N、酸素の同位体、例えば<sup>1</sup><sup>5</sup>O、<sup>1</sup><sup>7</sup>Oおよび<sup>1</sup><sup>8</sup>O、リンの同位体、例えば<sup>3</sup><sup>2</sup>P、および硫黄の同位体、例えば<sup>3</sup><sup>5</sup>Sを含む。或る同位体標識された式(I)の化合物、例えば放射性同位体を組み込んだものは、薬物および/または基質組織分布研究に有用である。放射性同位体、<sup>3</sup>Hおよび<sup>1</sup><sup>4</sup>Cは、特に、組み込みが容易で迅速な検出方法がある点で、この目的に特に有用である。

30

### 【0206】

陽電子放出同位体、例えば<sup>1</sup><sup>1</sup>C、<sup>1</sup><sup>8</sup>F、<sup>1</sup><sup>5</sup>Oおよび<sup>1</sup><sup>3</sup>Nとの置換は、陽電子放出断層撮影法(PET)に有用であり得る。

40

### 【0207】

同位体標識された式(I)の化合物は、一般的に、当業者に既知の方法によって製造され得るか、または、先に用いられた標識されていない反応剤の代わりに適切な同位体標識された反応剤を用いて本明細書で記載された工程と類似の工程によって製造され得る。

### 【0208】

#### 治療の定義

本明細書で用いられるとき、“処置”は、寛解、治療および予防の処置を含む。本明細書で用いられるとき、“患者”は、処置を必要とする動物、好ましくは哺乳類、好ましくはヒトを意味する。

### 【0209】

“生物活性薬物”は、好ましくは治療用化合物、すなわち疾患または状態を処置または

50

予防するのに有用な化合物である。

【0210】

生物活性薬物は、例えば、抗体、コレステロール、ホルモン、抗ウイルス剤、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核タンパク質、化学療法剤、低分子量薬物、ビタミン、補因子、ヌクレオシド、ヌクレオシド誘導体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素的核酸、アンチセンス核酸、三本鎖形成オリゴヌクレオチド、2-5Aアンチセンスキメラ、アロザイム、アブタマー、リボザイム、デコイRNA分子およびそのアナログ、および、低分子核酸、例えば低分子干渉核酸(siRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、ミクロRNA(miRNA)および低分子ヘアピン型RNA(shRNA)を含むRNA阻害剤(RNAi)を含むが、これらに限定されない。一つの態様において、生物活性薬物は、好ましくは、ヌクレオシドまたはヌクレオシド誘導体、例えば核酸、オリゴヌクレオチド、ポリ核酸(例えばsiRNA、miRNA、RNAi、アンチセンス、アブタマー、リボザイム、デコイ、リボザイム、2-5A、三本鎖形成オリゴヌクレオチド)、好ましくはsiRNA、miRNA、siRNA阻害剤またはmiRNA阻害剤である。

10

【0211】

一つの態様において、生物活性薬物はsiRNA(低分子干渉核酸)分子である。一つの態様において、siRNAはsiDNAである。一つの態様において、siRNAはsiRNAである。一つの態様において、siRNAはmiRNAである。

20

【0212】

一つの態様において、生物活性薬物は、以降便宜上“siRNA”分子と呼ぶ、標的遺伝子の発現を下方制御する低分子核酸であり、ここで、例えば標的遺伝子は、標的をコードする配列を含むか、あるいは、標的遺伝子は、標的遺伝子発現に関与する標的をコードしない配列または調節エレメントを含む。

20

【0213】

siRNAは、単鎖、二本鎖または多重鎖であり得る。一つの態様において、それは二本鎖である。

【0214】

一つの態様において、siRNAは、非修飾ヌクレオチドおよび/または非ヌクレオチドを含む。一つの態様において、siRNAは、少なくとも1種または1種以上の修飾ヌクレオチドおよび/または非ヌクレオチドを含む。一つの態様において、修飾ヌクレオチドは、修飾された塩基部分を含む。一つの態様において、修飾ヌクレオチドは、修飾された糖部分を含む。一つの態様において、修飾ヌクレオチドは、修飾された骨格部分を含む。一つの態様において、siRNAは、1つ以上の修飾された塩基部分、修飾された糖部分および/または修飾された骨格部分を含む。

30

【0215】

一つの態様において、siRNA分子は、約15～約40塩基対(例えば約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、23、33、34、35、36、37、38、39または40塩基対)を含み、副態様において約15～約30塩基対(例えば約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30塩基対)、副態様において約15～約28塩基対、副態様において約17～約25塩基対、副態様において約18～約23塩基対、さらなる副態様において約19～約22塩基対を含む。一つの態様において、siRNAは、約17塩基対を含む。一つの態様において、siRNAは約18塩基対を含む。一つの態様において、siRNAは、約19塩基対を含む。一つの態様において、siRNAは約20塩基対を含む。一つの態様において、siRNAは約21塩基対を含む。

40

【0216】

一つの態様において、siRNA分子の2本鎖はそれぞれ独立して、約15～約40ヌクレオチド(例えば約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、2

50

5、26、27、28、29、30、31、23、33、34、35、36、37、38、39または40ヌクレオチド)、副様において、約15～約30ヌクレオチド(例えば約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌクレオチド)、副様において、約15～約28ヌクレオチド、副様において、約17～約25ヌクレオチド、副様において、約18～約23ヌクレオチド、さらなる副様において、約19～約22ヌクレオチドを含む。一つの様において、それぞれの鎖は約17ヌクレオチド長である。一つの様において、それぞれの鎖は、約18ヌクレオチド長である。一つの様において、それぞれの鎖は、約19ヌクレオチド長である。一つの様において、それぞれの鎖は約20ヌクレオチド長である。一つの様において、それぞれの鎖は約21ヌクレオチド長である。

10

## 【0217】

一つの様において、s i N A分子は、標的R N Aの切断を、R I S C複合体、すなわちR N A干渉(R N A i)を介して行う。

## 【0218】

一つの様において、s i N A分子は、第1鎖および第2鎖を含み、s i N A分子の第1鎖は、R N A干渉により標的R N Aの直接的に切断するための、標的R N Aに十分な相補性を有するヌクレオチド配列を含み、s i N A分子の第2鎖は、第1鎖に相補的であるヌクレオチド配列を含む。

## 【0219】

一つの様において、低分子干渉核酸(s i N A)分子は、化学的に合成された二本鎖分子である。

20

## 【0220】

一つの様において、s i N Aは、標的遺伝子または標的遺伝子ファミリー(ここで、当該遺伝子または遺伝子ファミリー配列は、配列相同性を有する。)の発現を阻害する。このような相同的な配列は、当技術分野で知られている通りに、例えば配列アラインメントを用いて識別され得る。このようなs i N A分子は、相同的な配列を標的化するように、例えば完全に相補的な配列を用いて、またはさらなる標的配列を提供し得る非標準的塩基対、例えばミスマッチおよび/またはゆらぎ塩基対を組み込むことによって設計され得る。

## 【0221】

一つの様において、二本鎖s i N A分子は、リボヌクレオチドを全く含まない。他の様において、二本鎖s i N A分子が1個以上のリボヌクレオチドを含む。

30

## 【0222】

一つの様において、標的遺伝子の発現を下方制御するs i N A分子は、アンチセンス領域(ここで、アンチセンス領域は、標的遺伝子またはその一部のヌクレオチド配列およびセンス領域に対して相補的な配列であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的遺伝子またはその一部のヌクレオチド配列と実質的に同一であるヌクレオチド配列を含む。)を含む。一つの様において、アンチセンス領域およびセンス領域は、独立して、約15～約30ヌクレオチド(例えば約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌクレオチド)を含む。一つの様において、アンチセンス領域は、標的遺伝子またはその一部をコードするR N Aのヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、アンチセンス領域に相補的であるヌクレオチド配列を含む。

40

## 【0223】

一つの様において、s i N A分子は、平滑末端化した末端を1つ含む。一つの様において、s i N A分子は、平滑末端化した末端を2つ含み、すなわちオーバーハングした対になっていないヌクレオチドが全くない対称な末端を含む。

## 【0224】

一つの様において、s i N A分子の各フラグメントの全てのヌクレオチドは、s i N A分子のもう一方の鎖上の相補的なヌクレオチドと塩基対となっている。

## 【0225】

50

一つの態様において、s i N A 分子は、下記の1つ以上の特徴を含む：ミスマッチ、バルジ、ループおよびゆらぎ塩基対。これらはそれぞれ、R N A 干渉を媒介するs i N A 分子の活性を調節し得る。

#### 【0226】

一つの態様において、センス領域は、リンクー分子、例えばポリヌクレオチドリンクーまたは非ヌクレオチドリンクーを介してアンチセンス領域に連結している。

#### 【0227】

一つの態様において、s i N A 分子は、1個以上の修飾されたピリミジンおよび／またはプリンヌクレオチドを有する。一つの態様において、センス領域におけるピリミジンヌクレオチドは、2' - O - メチルピリミジンヌクレオチドまたは2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり、センス領域に存在するプリンヌクレオチドは、2' - デオキシプリンヌクレオチドである。他の態様において、センス領域におけるピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり、センス領域に存在するプリンヌクレオチドは、2' - O - メチルプリンヌクレオチドである。他の態様において、センス領域におけるピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり、センス領域に存在するプリンヌクレオチドは、2' - デオキシプリンヌクレオチドである。一つの態様において、アンチセンス領域におけるピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり、アンチセンス領域に存在するプリンヌクレオチドは、2' - O - メチルまたは2' - デオキシプリンヌクレオチドである。10

#### 【0228】

一つの態様において、センス鎖は、非相補的な領域を有する。所望により、非相補的な領域に存在するヌクレオチドは、全て2' - デオキシヌクレオチドである。

#### 【0229】

一つの態様において、センス領域を含むポリヌクレオチドは、鎖の5'末端、3'末端または5'末端および3'末端の両方の末端キャップ部分を含む。一つの態様において、アンチセンス鎖を含むポリヌクレオチドは、鎖の5'末端および3'末端または5'末端および3'末端の両方の末端キャップ部分を含む。一つの態様において、末端キャップ部分は、逆転デオキシ脱塩基部分またはグリセリル部分である。末端キャップ部分の他の例は、当技術分野で既知であり、例えば国際公開第2005/021749号および国際公開第2007/128477号により知られている。20

#### 【0230】

一つの態様において、s i N A は、ポリヌクレオチド骨格中のホスファイト、ホスホジエステル、ホスホロチオエートおよび／またはホスホジチオエート結合を有する。一つの態様において、s i N A は、少なくとも1個のホスホロチオエート結合を有する。一つの態様において、s i N A は、少なくとも1個のホスホジチオエート結合を有する。

#### 【0231】

一つの態様において、ヌクレオチド修飾は、s i N A 中の、リボヌクレアーゼによる切断に感受性である特異的に選択された位置、例えばピリミジンヌクレオチドを有する位置に存在する。30

#### 【0232】

一つの態様において、s i N A 分子の各鎖の2個の3'末端 - ヌクレオチドはそれぞれ、2' - デオキシピリミジンヌクレオチド、例えば2' - デオキシチミジンである。

#### 【0233】

本発明の化合物および投与される生物活性薬物(例えば治療用化合物)の量は、疾患または状態の処置に用いられる治療上有効な量、および、疾患または状態の予防に用いられる予防上有効な量であるべきである

#### 【0234】

用語“治療上有効な量”は、標的となる疾患または状態を処置または寛解するのに必要な本発明の化合物および生物活性薬物(例えば治療用化合物)の量を言う。用語“予防上有40

10

20

30

40

50

効な量”は、標的となる疾患または状態を予防するのに必要な本発明の化合物および生物活性薬物(例えば治療用化合物)の量を言う。正確な投与量は、一般的に、投与時の患者の状態に依存する。投与量を決定する際に考慮されるべき要素は、患者の疾病状態の重症度、患者の全身の健康、年齢、体重、性別、食事、投与時間、投与頻度、投与経路、生物活性薬物(例えば治療用化合物)の個性、反応感受性および患者の治療に対する耐容性または応答を含む。正確な量を、通常の実験方法によって決定することができるが、最終的には臨床医の判断に委ねられ得る。一般的に、有効投与量は、0.01mg/kg/日(患者の体重に対する薬物の重量)~1000mg/kg/日、例えば1mg/kg/日~100mg/kg/日である。組成物は、患者に、個々に投与されても、他の薬物(agent)、薬剤(drug)またはホルモンと組み合わせて投与されてもよい。

10

## 【0235】

処置方法または関連する使用の何れかにおいて、本発明の化合物または組成物は、種々の時間間隔での投与、例えば1日1回の処置過程、2日毎に1回の処置過程、3日毎に1回の処置過程、4日毎に1回の処置過程、5日毎に1回の処置過程、6日毎に1回の処置過程、1月1回の処置過程などの処置過程として患者に投与され得る。一つの態様において、処置過程は、1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週または10週毎に1回である。一つの態様において、処置過程は、約1週~約52週以上(例えば不定)である。一つの態様において、処置過程は、約1月~約48月以上(例えば不定)である。

20

## 【0236】

一つの態様において、処置過程は、固定化された間隔で、例えば1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週以上毎に1回(例えば1×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×以上)の初期処置過程、続いて、追加の固定化された間隔で、例えば4週、6週、8週、10週、15週、20週、25週、30週、35週、40週以上毎に1回(例えば1×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×以上)の維持処置過程を含む。

20

## 【0237】

“増殖性疾患”とは、本明細書で用いられるとき、当技術分野で知られている制御されない細胞増殖または複製によって特徴付けられる何れかの疾患、状態、体質、遺伝子型または表現型を意味する。一つの態様において、増殖性疾患は癌である。一つの態様において、増殖性疾患は腫瘍である。一つの態様において、増殖性疾患は、液体腫瘍、例えば白血病、例えば急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性リンパ性白血病(ALL)、多発性骨髓腫および慢性リンパ性白血病；および固形腫瘍、例えば AIDS 関連癌、例えばカポジ肉腫；乳癌；骨の癌；脳の癌；頭頸部癌、非ホジキンリンパ腫、腺癌、扁平上皮細胞癌、喉頭癌、胆囊癌および胆管癌、網膜の癌、食道癌、胃腸の癌、卵巣癌、子宮癌、甲状腺癌、精巣癌、子宮内膜の癌、黒色腫、結腸直腸癌、肺癌、膀胱癌、前立腺癌、肺癌(非小細胞肺癌を含む)、肺膿瘍、肉腫、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、頭頸部癌、皮膚癌、鼻咽頭癌、脂肪肉腫、上皮癌、腎細胞癌、胆囊腺癌、子宮内膜肉腫、多剤耐性癌を含むが、これらに限定されない。一つの態様において、増殖性疾患は、腫瘍血管新生に関連した血管新生、黄斑変性(例えば滲出型(wet)/萎縮型(dry)加齢関連黄斑変性)、角膜血管新生、糖尿病網膜症、血管新生緑内障、近視性変性を含むが、これらに限定されない。一つの態様において、増殖性疾患は、再狭窄および多発性囊胞腎疾患を含む。

30

## 【0238】

“炎症性疾患”とは、本明細書で用いられるとき、当技術分野で知られている炎症過程またはアレルギー過程によって特徴付けられる何れかの疾患、状態、体質、遺伝子型または表現型を意味する。炎症性疾患は、例えば、炎症(例えば急性および/または慢性炎症)、呼吸器疾患、アテローム性動脈硬化症、乾癬、皮膚炎、再狭窄、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、敗血症ショック、関節リウマチ、炎症性腸疾患、炎症性骨盤疾患、疼痛、眼の炎症性疾患、セリアック病、結核、珪肺症および他の塵肺を含むが、これらに限定されない。

40

## 【0239】

50

“自己免疫疾患”とは、本明細書で用いられるとき、当技術分野で知られている自己免疫によって特徴付けられる何れかの疾患、状態、体質、遺伝子型または表現型を意味する。自己免疫疾患は、例えば、多発性硬化症、真性糖尿病、狼瘡、強皮症、線維筋痛症、移植拒絶反応(例えば同種移植片拒絶反応の予防)、悪性貧血、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、重症筋無力症、エリテマトーデスおよびグレーブス病を含むが、これらに限定されない。

#### 【0240】

“感染性疾患”とは、感染病原体、例えばウイルス、細菌、真菌、ブリオンまたは寄生虫と関連する何れかの疾患、障害または状態を意味する。

#### 【0241】

“神経疾患”とは、中枢または末梢神経系を冒す何らかの疾患、障害または状態を意味する。神経学的疾患は、例えば、アルツハイマー病、動脈瘤、脳傷害、手根管症候群、脳動脈瘤、慢性疼痛、クロイツフェルト・ヤコブ病、癲癇、ハンチントン病を含む末梢神経系または中枢神経系の何れかの疾患または障害、および他の神経疾患、障害および症候群を含むが、これらに限定されない。

#### 【0242】

“呼吸器疾患”とは、呼吸管を冒す何らかの疾患または障害を意味する。呼吸器疾患は、例えば喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、アレルギー性鼻炎、副鼻腔炎、アレルギー、呼吸妨害、呼吸窮迫症候群、囊胞性線維症、肺高血圧または血管収縮および肺気腫を含むが、これらに限定されない。

#### 【0243】

“心血管疾患”とは、心臓および脈管構造を冒す疾患または状態を意味する。心血管疾患は、例えば冠動脈心疾患(CHD)、脳血管疾患(CVD)、大動脈弁狭窄症、末梢血管疾患、心筋梗塞(心臓発作)、不整脈および鬱血性心不全を含むが、これらに限定されない。

#### 【0244】

“眼疾患”とは、本明細書で用いられるとき、眼および関連する構造の何らかの疾患、状態、体質、遺伝子型または表現型を意味する。眼疾患は、例えば囊胞様黄斑浮腫、糖尿病網膜症、網膜格子状変性、網膜静脈閉塞症、網膜動脈閉塞症、黄斑変性(例えば加齢関連黄斑変性、例えば滲出型AMDまたは萎縮型AMD)、トキソプラスマ症、網膜色素変性、結膜断裂、角膜断裂、緑内障などを含むが、これらに限定されない。

#### 【0245】

“代謝疾患”とは、代謝経路を冒す何らかの疾患または状態を意味する。代謝疾患は、遺伝した酵素異常による先天性の異常な代謝プロセスか、または内分泌性臓器の疾患または代謝に重要な臓器、例えば肝臓の機能不全による後天性の異常な代謝プロセスに起因し得る。一つの態様において、代謝疾患は、肥満、インスリン抵抗性および糖尿病(例えばI型および/またはII型糖尿病)を含む。

#### 【0246】

“皮膚疾患”とは、皮膚、真皮または髪の毛もしくは濾胞などの何らかの下部構造の何らかの疾患または状態を意味する。皮膚疾患、障害、状態および体質は、乾癬、異所性皮膚炎、皮膚癌、例えば黒色腫および基底細胞癌、頭髪喪失、脱毛および色素沈着の変化を含み得る。

#### 【0247】

“聴覚疾患”とは、耳、例えば内耳、中耳、外耳および聴覚神経、その何れかの下部構造を含む、聴覚系の何らかの疾患または状態を意味する。聴覚疾患、障害、状態および体質は、聴覚消失、難聴、耳鳴、眩暈および平衡障害および運動障害を含み得る。

#### 【0248】

一つの態様において、疾患または状態は、肝臓疾患、腫瘍、第VII因子が介在する疾患、および/またはPLK1が介在する疾患である。第VII因子が介在する疾患は、異常血液凝固および腫瘍を含み、従って、このような疾患は、血栓症(例えば静脈血栓塞栓症、肺塞栓症および卒中)を含む。

10

20

30

40

50

## 【0249】

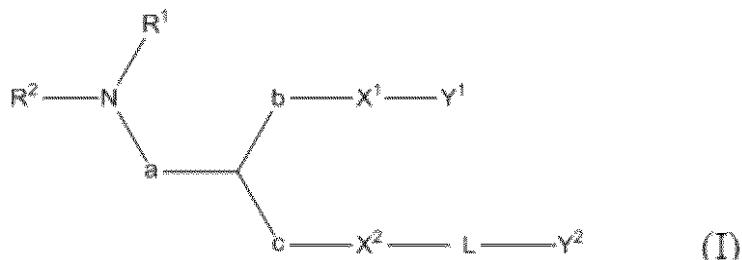
生化学的用語および定義

用語“脂質”は、脂肪酸エステルを含むが、これに限定されず、そして、水に不溶性であるが多くの有機溶媒に可溶性であることによって特徴付けられる有機化合物のグループを言う。脂質は、少なくとも3つのクラス(1)脂および油、ならびに蜡を含む“単純脂質”；(2)リン脂質および糖脂質を含む“脂質化合物”；および(3)“誘導化脂質”例えばステロイド、に分割され得る。

## 【0250】

用語“カチオン性脂質”は、本明細書で用いられるとき、正電荷を有する何れかの親油性化合物、例えば式(I)：

## 【化24】



[式中、定義は、本明細書の他の箇所で示されている。]

を有する化合物を意味する。カチオン性脂質の他の例は、“組成物”の表題で上に示されている。

## 【0251】

ヘルパー脂質

用語“ヘルパー脂質”は、本明細書で用いられるとき、トランスフェクション(例えば生物活性薬物を含むナノ粒子のトランスフェクション)を或る程度増強する脂質を意味する。ヘルパー脂質がトランスフェクションを増強するメカニズムは、例えば、粒子の安定性向上させること、および/または膜融合性を向上させることを含み得る。ヘルパー脂質は、ステロイド類およびアルキルレゾルシノール類を含む。ヘルパー脂質の例は、コレステロール、5-ヘプタデシルレゾルシノールおよびコレステロール ヘミスクシネットである。

## 【0252】

ステルス脂質

用語“ステルス脂質”は、本明細書で用いられるとき、ナノ粒子がin vivoで(例えば血中で)存在することができる時間の長さを延長する脂質を意味する。一つの態様において、ステルス脂質は、脂質部分に連結した親水性ポリマー頭部を含む。一つの態様においてリポソーム製剤中のステルス脂質は、ナノ粒子表面を保護し、それによって血液細胞によるオプソニン化および单核食細胞系のマクロファージによる取り込みを減少させる。本発明で使用するのに適当なステルス脂質の構造は、例えば式XIおよび式XIIで示された化合物を含むが、これらに限定されない。他の意図されるステルス脂質および当該脂質の生化学についての情報は、Romberg et al., Pharmaceutical Research, Vol. 25, No. 1, 2008, p.55-71 および Hoekstra et al., Biochimica et Biophysica Acta 1660 (2004) 41-52で見出され得る。

## 【0253】

一つの態様において、ステルス脂質は、PEG(時々ポリ(エチレンオキシド)と呼ぶ)、および、ポリ(オキサゾリン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(グリセロール)、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリアミノ酸およびポリ[N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド]をベースとするポリマーから選択される基を含む。一つの態様において、ヘルパー脂質は、Rombergらに記載された通りに“脱ぎ捨てられる”ことができる。本発明の具体的なステルス脂質は、例えば式XIおよび式XIIで示されるものであり、これらは当業者によってさらに置き換えられ得る。さらなる適当なPEG脂質は、例えば国際公開第20

06/007712号に開示されている。

【0254】

具体的な適当なステルス脂質は、約C<sub>4</sub>～約C<sub>40</sub>飽和または不飽和炭素原子を含むアルキル鎖を有するジアルキルグリセロールまたはジアルキルグリカミド(glycamide)基を含む、ポリエチレングリコール ジアシルグリセロールまたはポリエチレングリコール ジアシルグリカミド(PEG-DAG)コンジュゲートを含む。ジアルキルグリセロールまたはジアルキルグリカミド基は、さらに、1個以上の置換されたアルキル基を含んでもよい。本明細書に記載された何れかの態様において、PEGコンジュゲートは、PEG-ジラウリルグリセロール、PEG-ジミリスチルグリセロール(カタログ番号 GM 020 (NOF))、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステアリルグリセロール、PEG-ジラウリルグリカミド、PEG-ジミリスチルグリカミド、PEG-ジパルミトイルグリカミド、およびPEG-ジステアリル(disteryl)グリカミド、PEG-コレステロール(1-[8'-(コレスター-5-エン-3-オキシ)カルボキサミド-3',6'-ジオキサオクタニル]-カルバモイル-メチルポリ(エチレングリコール)、PEG-DMB(3,4-ジテトラデオキシベンジル-メチルポリ(エチレングリコール)エーテル)、S001、S002、S003、S004、S005、S006、S007、S008、S009、S010、S011、S012、S013、S014、S015、S016、S017、S018、S019、S020、S021、S022、S023、S024、S025、S026、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)2000] (カタログ番号 880150P (Avanti Polar Lipids))から選択され得る。S010およびS011は、それぞれ、ラベルIVaおよびIVcの下に国際公開第WO 2009/086558号に開示されている。10 20

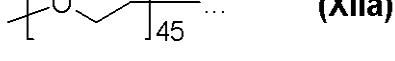
【0255】

ことわりのない限り、用語“PEG”は、本明細書で用いられるとき、何れかのポリエチレングリコールまたは他のポリアルキレンエーテル・ポリマーを意味する。一つの態様において、PEGは、所望により置換された直鎖または分枝鎖のエチレングリコールまたはエチレンオキシドのポリマーである。一つの態様において、PEGは、非置換である。一つの態様において、PEGは、例えば1個以上のアルキル、アルコキシ、アシルまたはアリール基によって置換されている。一つの態様において、用語は、PEGコポリマー、例えばPEG-ポリウレタンまたはPEG-ポリプロピレンを含む(例えばJ. Milton Harris, Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications (1992)を参照のこと。);他の態様において、用語は、PEGコポリマーを含まない。一つの態様において、PEGは、約130～約50,000、副態様において約150～約30,000、副態様において約150～約20,000、副態様において約150～約15,000、副態様において約150～約10,000、副態様において約150～約600、副態様において約150～約5000、副態様において約150～約4000、副態様において約150～約3000、副態様において約300～約3000、副態様において約1000～約3000、副態様において約1500～約2500の分子量を有する。30

【0256】

或る態様において、PEGは、“PEG 2000”とも呼ばれる“PEG 2K”であり、これは、約2000ダルトンの平均分子量を有する。PEG 2Kは、式(XIIa):40

【化25】



によって本明細書で表されるものであり、ここで、平均重合度を意味するnは45であり、約45サブユニットを含む。しかし、当技術分野で既知の他のPEGの態様は、平均重合度が約23サブユニット(n=23)および/または68サブユニット(n=68)を含むものを用い得る。

【0257】

RNA干渉およびRNAsi製剤についての定義

“脂質ナノ粒子”とは、分子間力によって互いに物理的に結合している複数の(すなわち1種より多い)脂質分子を含む粒子を意味する。脂質ナノ粒子は、例えばミクロスフィア(単層および多層の小胞を含むもの、例えばリポソーム)、エマルジョン中で分散された相、ミセルまたは懸濁液中の内部相であってもよい。

【0258】

脂質ナノ粒子は、約1～約2,500nm、約1～約1,500nm、約1～約1,000nm、副様において約50～約600nm、副様において、約50～約400nm、副様において約50～約250nm、副様において約50～約150nmのサイズを有する。断りのない限り、本明細書で記載された全てのサイズは、Malvern Zetasizerで動力学的光散乱によって測定される完全に形成されたナノ粒子の平均サイズ(直径)である。ナノ粒子サンプルは、計数速度が約200～400kctsとなるようリン酸緩衝食塩水(PBS)で希釈される。データは、光強度測定の重量平均として表される。

10

【0259】

一つの態様において、生物活性薬物は、脂質ナノ粒子(例えば小胞)と結合しており、好ましくはそれに封入されている。

【0260】

一つの態様において、脂質ナノ粒子は、生物活性薬物、本発明の化合物、中性脂質、ヘルパー脂質およびステルス脂質を含む。

【0261】

一つの態様において、リポソーム粒子は、血清中で安定である。

20

【0262】

用語“低分子干渉核酸”(s i N A)は、本明細書で用いられるとき、配列特異的な方法で、R N A干渉(R N A i)の媒介または遺伝子発現抑制によって、遺伝子発現またはウイルス複製を阻害または下方制御することができる何れかの核酸分子を言う。それは、低分子干渉R N A(s i R N A)、ミクロR N A(m i R N A)、低分子干渉オリゴヌクレオチド、および、化学修飾された低分子干渉核酸分子を含む。s i R N Aは、動物および植物において、R N A干渉、配列特異的転写後遺伝子発現抑制のプロセスを担う。s i R N Aは、発現抑制される遺伝子標的に相同なまたは特異的な、より長い二本鎖R N A(d s R N A)から、リボヌクレアーゼIII切断によって作られる。

30

【0263】

“R N A干渉”(R N A i)とは、一般的に当技術分野で知られている通り、細胞中で、遺伝子発現を阻害するまたは下方制御する生物学的プロセスを意味する。例えば、Zamore and Haley, 2005, Science, 309, 1519 1524; Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494 498; および Kreutzer et al., 国際公開第00/44895号; Fire, 国際公開第99/32619号; Mello and Fire, 国際公開第01/29058号などを参照のこと。

【0264】

本明細書で用いられるとき、R N A iは、配列特異的R N A干渉を記載するために用いられる他の用語、例えば転写後遺伝子発現抑制、翻訳阻害、転写阻害またはエピジェネティクスと等価である。例えば、本発明の脂質を含む製剤は、転写後レベルおよび/または翻訳前レベルの両方で後成的に遺伝子発現抑制するs i N A分子と組み合わせて使用することができる。非限定的な例において、s i N A分子による遺伝子発現調節は、R I S Cを介したR N A(コーディングまたは非コーディングR N Aの何れか)のs i N A介在切断、あるいは、当技術分野で知られている転写阻害の結果生じ得る。他の態様において、s i N Aによる遺伝子発現の調節は、例えばJanowski et al., 2005, Nature Chemical Biology, 1, 216-222で報告されているような、転写阻害の結果生じ得る。

40

【0265】

“R N A i阻害剤”とは、細胞または患者におけるR N A干渉機能または活性を下方制御する(例えば減少させるまたは阻害する)ことができる何らかの分子を意味する。R N A i阻害剤は、R I S Cなどのタンパク質成分、またはm i R N Aまたはs i R N Aなどの

50

核酸成分を含むRNAi経路の何れかの化合物と相互作用するか、またはこれらの機能を妨害することによって、RNAi(例えば標的ポリヌクレオチドのRNAi介在切断、翻訳阻害または転写阻害、または転写抑制)を下方制御、減少または阻害することができる。RNAi阻害剤は、siRNA分子、アンチセンス分子、アプタマーまたはRISCと相互作用するか、またはその機能を妨害する低分子、miRNAまたはsiRNA、または細胞もしくは患者におけるRNAi経路の他の何れかの成分であってもよい。RNAi(例えば標的ポリヌクレオチドのRNAi介在切断、翻訳阻害または転写抑制)を阻害することによって、標的遺伝子の発現を調節(例えば上方制御または下方制御)するために、RNAi阻害剤を用いることができる。一つの態様において、RNA阻害剤は、翻訳阻害による遺伝子発現の内因性下方制御または阻害、翻訳阻害、転写抑制、または、ポリヌクレオチド(例えばmRNA)のRISC介在切断を妨害する(例えば減少させるまたは妨げる)ことによって、遺伝子発現を上方制御するために用いられる。遺伝子発現の内因性抑制、発現抑制または阻害を妨害することによって、本発明のRNAi阻害剤は、従って、機能の喪失に起因する疾患または状態を処置するために、遺伝子発現を上方制御するために用いられ得る。用語“RNAi阻害剤”は、本明細書の種々の態様において、用語“siRNA”と同じ意味で用いられる。

#### 【0266】

用語“酵素的核酸”は、本明細書で用いられるとき、基質結合領域において特定の遺伝子標的に相補性を有し、かつ、標的RNAを特異的に切断する作用をする酵素活性を有し、それによって標的RNA分子を不活性化する核酸分子を言う。相補性領域は、酵素的核酸分子が標的RNAに十分にハイブリダイゼーションして切断をすることを可能とする。100%の相補性が好ましいが、50~75%程の相補性もまた、本発明に有用であり得る(例えばWerner and Uhlenbeck, 1995, Nucleic Acids Research, 23, 2092-2096; Hammann et al., 1999, Antisense and Nucleic Acid Drug Dev., 9, 25-31を参照のこと。)。核酸は、塩基部分、糖部分およびリン酸部分で修飾され得る。用語酵素的核酸は、例えばリボザイム、触媒的RNA、酵素的RNA、触媒的DNA、アプタザイム(aptazyme)またはアプタマー結合リボザイム、制御可能リボザイム、触媒的オリゴヌクレオチド、ヌクレオザイム(nucleozyme)、DNAザイム、RNA酵素、エンドリボヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、ミニザイム(minizyme)、リードザイム(leadzyme)、オリゴザイム(oligozyme)またはDNA酵素などのフレーズと同じ意味で用いられる。これらの用語は全て、酵素活性を有する核酸分子を記載している。酵素的核酸分子の重要な特徴は、標的核酸領域の1つ以上と相補性である基質特異的結合部位を有すること、および、それが核酸切断および/または分子へのライゲーション活性を与える基質結合部位中にまたはその周辺にヌクレオチド配列を有することである(例えばCech et al., 米国特許出願第4,987,071号; Cech et al., 1988, 260 JAMA 3030を参照のこと)。本発明のリボザイムおよび酵素的核酸分子は、例えば、当技術分野で記載された通りに、または本明細書の他の場所で記載された通りに、化学修飾されていてもよい。

#### 【0267】

用語“アンチセンス核酸”は、本明細書で用いられるとき、RNA-RNAまたはRNA-DNAまたはRNA-PNA(タンパク質核酸; Egholm et al., 1993 Nature 365, 566)相互作用によって標的RNAに結合し、標的RNAの活性を変化させる非酵素的核酸分子を言う(レビューについては、Stein and Cheng, 1993 Science 261, 1004 およびWolf et al., 米国特許第5,849,902号を参照のこと。)。アンチセンスDNAは、化学的に合成されるか、または、一本鎖DNA発現ベクターまたはその等価物の使用によって発現され得る。本発明のアンチセンス分子は、例えば当技術分野に記載された通りに、化学修飾され得る。

#### 【0268】

用語“RNAアーゼH活性化領域”は、本明細書で用いられるとき、RNAに結合して、細胞のRNAアーゼH酵素によって認識される非共有結合性複合体を形成することができる核酸分子の領域(一般的に4~25ヌクレオチド長と同じまたはそれより長いもの、

10

20

30

40

50

好ましくは 5' ~ 1' ヌクレオチド長)を言う(例えば Arrow et al., 米国特許第5,849,902号; Arrow et al., 米国特許第5,989,912号を参照のこと。)。RNA アーゼ H 酵素は、核酸分子 - 標的 RNA 複合体に結合し、標的 RNA 配列を切断する。

#### 【0269】

用語“2', 5' - A アンチセンスキメラ”は、本明細書で用いられるとき、5' - リン酸化 2', 5' - 結合アデニレート残基を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを言う。これらのキメラは、配列特異的な方法で、標的 RNA に結合し、細胞の 2', 5' - A 依存性リボヌクレアーゼを活性化し、次に標的 RNA を切断する(Torrence et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1300; Silverman et al., 2000, Methods Enzymol., 313, 522-533; Player and Torrence, 1998, Pharmacol. Ther., 78, 55-113)。2', 5' - A アンチセンスキメラ分子は、例えば、当技術分野で記載された通りに化学的に修飾され得る。10

#### 【0270】

用語“三本鎖形成オリゴヌクレオチド”は、本明細書で用いられるとき、配列特異的な方法で二本鎖 DNA に結合して三本鎖を形成することができるオリゴヌクレオチドを言う。このような三本鎖構造の形成が、標的となった遺伝子の転写を阻害することが示されている(Duval Valentin et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 504; Fox, 2000, Curr. Med. Chem., 7, 17-37; Praseuth et. al., 2000, Biochim. Biophys. Acta, 1489, 181-206)。本発明の三本鎖形成オリゴヌクレオチド分子は、例えば、当技術分野で記載された通りに化学的に修飾され得る。

#### 【0271】

用語“デコイ RNA”は、本明細書で用いられるとき、予め定められたリガンドに優先的に結合するよう設計された RNA 分子またはアプタマーを言う。このような結合は、標的分子の阻害または活性化をもたらし得る。デコイ RNA またはアプタマーは、特異的なリガンドの結合について、天然由来の結合標的と競合し得る。同様に、デコイ RNA は、受容体に結合してエフェクター分子の結合をブロックするか、または、受容体の対象に結合して受容体との相互作用を妨げるよう設計され得る。本発明のデコイ分子は、例えば、当技術分野で記載された通りに化学的に修飾され得る。20

#### 【0272】

用語“一本鎖 DNA”(ssDNA)は、本明細書で用いられるとき、直線状一本鎖を含む天然由来または合成デオキシリボ核酸分子を言う。例えば ssDNA は、センスまたはアンチセンス遺伝子配列または EST (Expressed Sequence Tag) であり得る。30

#### 【0273】

用語“アロザイム”は、本明細書で用いられるとき、例えば米国特許第5,834,186号、第5,741,679号、第5,589,332号、第5,871,914号および PCT 国際公開第00/24931号、第0/26226号、第98/27104号および第99/29842号を含む、アロステリック酵素的核酸分子を言う。

#### 【0274】

“アプタマー”とは、本明細書で用いられるとき、標的分子に特異的に結合するポリヌクレオチド組成物であって、ポリヌクレオチドが細胞中の標的分子によって通常認識される配列と異なる配列を有するポリヌクレオチド組成物を意味する。あるいは、アプタマーは、天然では核酸に結合しない標的分子に結合する核酸分子であり得る。標的分子は、対象の何れの分子であってもよい。本発明のアプタマー分子は、当技術分野で記載された通りに化学修飾され得る。40

#### 【0275】

“調節”とは、遺伝子発現、または RNA 分子レベル、または 1 個以上のタンパク質またはタンパク質サブユニットをコードする等価の RNA 分子の発現、あるいは、1 個以上のタンパク質またはタンパク質サブユニットの活性を、上方制御するか、または下方制御する、あるいは、モジュレーターなしで観察されるよりも発現、レベルまたは活性が高いまたは低くなるように、存在しなくなることを意味する。例えば、一つの態様において、用語“調節”は、“阻害”を意味する。一つの態様において、経路の調節は、本発明の用50

語では、例えば、標的mRNAによって標的化されるかもしくはコードされているタンパク質、酵素または基質を含むか、またはこれらによって制御される、治療上意味のある構成要素および／または生物学的経路のエンドポイントを上方制御することまたは下方制御することを表す。

#### 【0276】

“阻害”、“下方制御”または“減少”とは、1個以上のタンパク質またはタンパク質サブユニットをコードする遺伝子またはRNA分子レベルまたは等価RNA分子の発現、あるいは、1個以上のタンパク質またはタンパク質サブユニットの活性が、通常環境で、例えば核酸分子(例えばsiRNA)の非存在下で観察されるよりも下まで減少することを意味する。一つの態様において、siRNA分子による阻害、下方制御または減少は、不活性化されたまたは減弱した分子の存在下で観察されるレベルより低い。一つの態様において、siRNA分子による阻害、下方制御または減少は、例えばスクランブル配列またはミスマッチを有するsiRNA分子の存在下で観察されるレベルより低い。一つの態様において、核酸分子による阻害、下方制御または遺伝子発現の減少は、核酸分子の非存在下よりも核酸分子の存在下で大きい。一つの態様において、遺伝子発現の阻害、下方制御または減少は、転写後発現抑制、例えば標的核酸分子(例えばRNA)のRNAi介在切断、または、翻訳阻害に関係している。一つの態様において、遺伝子発現の阻害、下方制御または減少は、転写前発現抑制に関係する。

10

#### 【0277】

“上方制御する”または“促進する”とは、遺伝子の発現、またはRNA分子レベル、または1個以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットをコードする等価のRNA分子、または1個以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットの活性が、天然の環境で、例えば核酸分子(例えばsiRNA)の非存在下で観察されるよりも増加することを意味する。一つの態様において、siRNA分子による遺伝子発現の上方制御または促進は、不活性または減衰した分子の存在下で観察されるレベルより高い。一つの態様において、siRNA分子による遺伝子発現の上方制御または促進は、例えばスクランブル配列またはミスマッチを有するsiRNA分子の存在下で観察されるレベルより高い。一つの態様において、核酸分子による上方制御または促進は、核酸分子の非存在下よりも核酸分子の存在下で大きい。一つの態様において、遺伝子発現の上方制御または促進は、RNA介在遺伝子発現抑制、例えば対象の遺伝子の発現を下方制御し、阻害し、または発現抑制するコーディングまたは非コーディングRNA標的のRNAi介在切断または発現抑制に関係している。

20

30

#### 【0278】

“遺伝子”または“標的遺伝子”とは、RNA、例えばポリペプチドをコードする構造遺伝子を含む(これらに限定されない)、核酸配列をコードする核酸を意味する。遺伝子または標的遺伝子はまた、機能的RNA(FRNA)または非コーディングRNA(ncRNA)、例えば小分子RNA(s t RNA)、ミクロRNA(miRNA)、核内低分子RNA(snRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、核小体低分子RNA(snRNA)、リボソーム(rRNA)、トランスファーRNA(tRNA)およびその前駆体RNAをコードし得る。このような非コーディングRNAは、機能的または制御細胞プロセスに関係するFRNAまたはncRNAの活性を調節するsiRNA介在RNA干渉の標的核酸分子となる。そのために、疾患を引き起こす異常なFRNAまたはncRNA活性をsiRNA分子によって調節することができる。

40

#### 【0279】

“標的”とは、本明細書で用いられるとき、標的遺伝子をコードする何らかの標的タンパク質、ペプチドまたはポリペプチドを意味する。用語“標的”はまた、標的活性を有する何らかの標的タンパク質、ペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸配列、例えば標的RNAをコードするものを言う。用語“標的”はまた、他の標的をコードする配列、例えば他の標的アイソフォーム、変異体標的遺伝子、標的遺伝子のスプライスバリエント、および遺伝子多型を含むことを意味する。“標的核酸”とは、その発現または活性が調

50

節されるべきものである何れかの核酸配列を意味する。標的核酸はDNAであってもRNAであってもよい。

#### 【0280】

“非標準塩基対”とは、何れかの非ワトソン・クリック塩基対、例えばミスマッチおよび/または、ゆらぎ塩基を意味する。

#### 【0281】

“センス領域”とは、siNA分子のアンチセンス領域と相補性を有するsiNA分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、siNA分子のセンス領域は、標的核酸配列と相同性を有する核酸配列を含み得る。一つの態様において、siNA分子のセンス領域は、センス鎖またはパッセンジャー鎖と呼ぶ。

10

#### 【0282】

“アンチセンス領域”とは、標的核酸配列に相補性を有するsiNA分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、siNA分子のアンチセンス領域は、所望によりsiNA分子のセンス領域に相補性を有する核酸配列を含んでもよい。一つの態様において、siNA分子のアンチセンス領域は、アンチセンス鎖またはガイド鎖と呼ばれる。

20

#### 【0283】

“標的核酸”または“標的ポリヌクレオチド”は、発現または活性が調節されるべき何れかの核酸配列を意味する。標的核酸は、DNAであってもRNAであってもよい。一つの態様において、本発明の標的核酸は、標的RNAである。一つの態様において、本発明の標的核酸は、標的DNAである。

30

#### 【0284】

“相補性”とは、伝統的なワトソン・クリック・タイプまたは他の非伝統的なタイプ、例えばフーグスティーン塩基対形成の何れかによって、核酸が他の核酸配列と水素結合を形成し得ることを意味する。一つの態様において、本発明の二本鎖核酸分子、例えばsiNA分子(ここで、各鎖は15ヌクレオチド長と40ヌクレオチド長の間である。)は、二本鎖核酸分子の2本鎖の間で、約10%と約100%の間(例えば約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%または100%)の相補性を含む。相補性パーセントは、第2核酸配列と水素結合を形成する(例えばワトソン・クリックの塩基対形成)ことによってペアとなり得る、核酸分子中の隣接する残基のパーセンテージを示す。

30

#### 【0285】

### 化学用語および定義

本明細書を説明する目的において、下記の定義を適用し、適切な場合はいつでも、単数形で用いられた用語は、複数を含み、またその逆も同様である。

#### 【0286】

### ハロ

本明細書で用いられるとき、用語“ハロゲン”または“ハロ”は、フルオロ、クロロ、ブロモおよびヨードを言う。用語“ハロゲン”(または“ハロ”)は、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素を含む。

40

#### 【0287】

本明細書で用いられるとき、用語“ハロアルキル”は、1個以上の本明細書で定義されたハロ基によって置換されている、本明細書で定義されたアルキルを言う。ハロアルキルは、モノハロアルキル、ジハロアルキル、または、パーハロアルキルを含むポリハロアルキルであり得る。モノハロアルキルは、アルキル基内に1個のヨード、ブロモ、クロロまたはフルオロを有し得る。ジハロアルキルおよびポリハロアルキル基は、アルキル内に2個以上の同一のハロ原子または異なるハロ基の組み合わせを有し得る。典型的には、ポリハロアルキルは、12個まで、または10個または8個または6個または4個または3個または2個のハロ基を含む。ハロアルキルの非限定的な例は、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、クロロメチル、ジクロロメチル、トリクロロメチル、ペンタフルオロエチル、ヘptaフルオロプロピル、ジフルオロクロロメチル、ジクロロフル

50

オロメチル、ジフルオロエチル、ジフルオロプロピル、ジクロロエチルおよびジクロロプロピルを含む。パーサロアルキルは、全ての水素原子がハロ原子で置き換えられているアルキルを言う。

#### 【0288】

##### アルキル、アルキレン、アルケニル、アルキニル、シクロアルキルなど

用語“アルキル”、“アルキレン”、“アルケニル”および“アルキニル”は、直鎖および分枝鎖の非環式形を言うために本明細書で用いられる。その環状アナログは、シクロアルキル、シクロアルケニルなどと呼ばれる。

#### 【0289】

用語“アルキル”は、一価の直鎖または分枝鎖の飽和非環状ヒドロカルビル基を含む。  
本明細書で用いられるとき、用語“アルキル”は、50個までの炭素原子を有する完全に飽和の分枝または非分枝炭化水素部分を言う。ことわりのない限り、アルキルは、1～50個の炭素原子、1～40個の炭素原子、1～30個の炭素原子、1～20個の炭素原子、1～16個の炭素原子、1～10個の炭素原子、1～7個の炭素原子または1～4個の炭素原子を有する炭化水素部分を言う。アルキルの代表例は、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、n-ヘキシリル、3-メチルヘキシリル、2,2-ジメチルペンチル、2,3-ジメチルペンチル、n-ヘプチル、n-オクチル、n-ノニル、n-デシルなどを含むが、これらに限定されない。一つの態様において、アルキルは、C<sub>1</sub>～C<sub>10</sub>アルキルであり、他の態様においてC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルであり、他の態様においてC<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>アルキル、例えばメチル、エチル、n-プロピル、i-プロピルまたはt-ブチル基である。

10

20

30

40

#### 【0290】

用語“シクロアルキル”は、一価の飽和環状ヒドロカルビル基を含む。一つの態様において、シクロアルキルはC<sub>3</sub>～C<sub>10</sub>シクロアルキルであり、他の態様においてC<sub>3</sub>～C<sub>6</sub>シクロアルキルであり、例えばシクロペンチルおよびシクロヘキシリルである。

#### 【0291】

用語“アルコキシ”は、アルキル-O-(ここで、アルキルは、上で定義されたものである。)を意味する。アルコキシの代表例は、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、2-ブロポキシ、ブトキシ、tert-ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシリオキシ、シクロプロピルオキシ-、シクロヘキシリオキシ-などを含むが、これらに限定されない。典型的には、アルコキシ基は、約1～7個、より好ましくは約1～4個の炭素原子を有する。

#### 【0292】

用語“アルケニル”は、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を有する一価の直鎖または分枝鎖の不飽和非環状ヒドロカルビル基を含み、一つの態様において炭素-炭素三重結合を有さないものである。本明細書で用いられるとき、用語“アルキレン”は、1～50個の炭素原子を有する本明細書で定義された二価のアルキル基を言う。それは、1～50個の炭素原子を含む。断りのない限り、アルキレンは、1～50個の炭素原子、1～40個の炭素原子、1～30個の炭素原子、1～20個の炭素原子、1～16個の炭素原子、1～10個の炭素原子、1～7個の炭素原子または1～4個の炭素原子を有する部分を言う。アルキレンの代表例は、メチレン、エチレン、n-プロピレン、イソプロピレン、n-ブチレン、sec-ブチレン、イソブチレン、tert-ブチレン、n-ペンチレン、イソペンチレン、ネオペンチレン、n-ヘキシリレン、3-メチルヘキシリレン、2,2-ジメチルペンチレン、2,3-ジメチルペンチレン、n-ヘプチレン、n-オクチレン、n-ノニレン、n-デシレンなどを含むが、これらに限定されない。一つの態様において、アルケニルは、C<sub>2</sub>～C<sub>10</sub>アルケニルであり、他の態様においてC<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>アルケニルであり、他の態様において、C<sub>2</sub>～C<sub>4</sub>アルケニルである。

#### 【0293】

用語“シクロアルケニル”は、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を有する一価の部分的に不飽和な環状ヒドロカルビル基を含む。一つの態様において、シクロアルケニルは

50

、 $C_{3\text{--}10}$ シクロアルケニルであり、他の態様において、 $C_{5\text{--}10}$ シクロアルケニル、例えばシクロヘキセニルである。

#### 【0294】

用語“アルキニル”は、少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を有する、一価の直鎖または分枝の不飽和非環状ヒドロカルビル基を含み、一つの態様において炭素-炭素二重結合を有さないものである。一つの態様において、アルキニルは、 $C_{2\text{--}10}$ アルキニルであり、他の態様において $C_{2\text{--}6}$ アルキニルであり、他の態様において $C_{2\text{--}4}$ アルキニルである。

#### 【0295】

用語“シクロアルキニル”は、少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を有する一価の部分的に不飽和の環状ヒドロカルビル基を含む。一つの態様において、シクロアルキニルは、 $C_{6\text{--}10}$ シクロアルキニルであり、他の態様において $C_{8\text{--}10}$ シクロアルキニルである。

10

#### 【0296】

用語“アルキレン”は、二価の直鎖または分枝鎖の飽和非環状ヒドロカルビル基を含む。一つの態様において、アルキレンは、 $C_{1\text{--}10}$ アルキレンであり、他の態様において $C_{1\text{--}6}$ アルキレンであり、他の態様において $C_{1\text{--}4}$ アルキレン、例えばメチレン、エチレン、n-プロピレン、i-プロピレンまたはt-ブチレン基である。

#### 【0297】

用語“アルケニレン”は、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を有する二価の直鎖または分枝鎖の不飽和非環状ヒドロカルビル基を含み、一つの態様において炭素-炭素三重結合を有さないものである。一つの態様において、アルケニレンは、 $C_{2\text{--}10}$ アルケニレンであり、他の態様において $C_{2\text{--}6}$ アルケニレンであり、他の態様において $C_{2\text{--}4}$ アルケニレンである。

20

#### 【0298】

用語“アルキニレン”は、少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を有する、二価の直鎖または分枝鎖の不飽和非環状ヒドロカルビル基を含む。一つの態様においてアルキニレンは、 $C_{2\text{--}10}$ アルキニレンであり、他の態様において $C_{2\text{--}6}$ アルキニレンであり、他の態様において $C_{2\text{--}4}$ アルキニレンである。

30

#### 【0299】

#### ヘテロアルキルなど

本明細書で用いられるとき、用語“ヘテロ原子”は、窒素(N)、酸素(O)、リン(P)または硫黄(S)原子を言い、特に窒素または酸素である。

#### 【0300】

用語“ヘテロアルキル”は、6個までの炭素原子、一つの態様において5個までの炭素原子、他の態様において4個までの炭素原子、他の態様において3個までの炭素原子、他の態様において2個までの炭素原子、他の態様において1個の炭素原子が、それぞれ独立して、O、S(O)<sub>q</sub>、N、P(O)<sub>r</sub>またはSi(好ましくはO、S(O)<sub>q</sub>またはN)によって置き換えられており、ただし、少なくとも1個のアルキル炭素原子が残っているアルキル基を含む。ヘテロアルキル基は、Cで結合していてもヘテロで結合していてもよく、すなわち、それは、炭素原子を介して、またはO、S(O)<sub>q</sub>、N、P(O)<sub>r</sub>もしくはSを介して、分子の残りに連結していてもよい。なお、S(O)<sub>q</sub>およびP(O)<sub>r</sub>は、下に定義する。

40

#### 【0301】

用語“ヘテロシクロアルキル”は、6個までの炭素原子、一つの態様において5個までの炭素原子、他の態様において4個までの炭素原子、他の態様において3個までの炭素原子、他の態様において2個までの炭素原子、他の態様において1個の炭素原子が、それぞれ独立して、O、S(O)<sub>q</sub>またはNによって置き換えられており、ただし少なくとも1個のシクロアルキル炭素原子が残っているシクロアルキル基を含む。ヘテロシクロアルキル基の例は、オキシラニル、チアラニル(thiaranyl)、アジリジニル、オキセタニル、チア

50

タニル(thiatanyl)、アゼチジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフェニル、ピロリジニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ピペリジニル、1,4-ジオキサニル、1,4-オキサチアニル(oxathianyl)、モルホリニル、1,4-ジチアニル、ピペラジニル、1,4-アザチアニル、オキセパニル、チエパニル(thiepanyl)、アゼパニル、1,4-ジオキセパニル、1,4-オキサチエパニル(oxathiepanyl)、1,4-オキサアゼパニル、1,4-ジチエパニル(dithiepanyl)、1,4-チエアゼパニル(thiazepanyl)および1,4-ジアゼパニルを含む。ヘテロシクロアルキル基は、Cで結合していてもNで結合してもよく、すなわち、それは、炭素原子または窒素原子を介して、分子の残りに連結していてもよい。

## 【0302】

10

用語“ヘテロアルケニル”は、3個までの炭素原子、一つの態様において2個までの炭素原子、他の態様において1個の炭素原子が、それぞれ独立して、O、S(O)<sub>q</sub>またはNによって置き換えられており、ただし少なくとも1個のアルケニル炭素-炭素二重結合が残っているアルケニル基を含む。ヘテロアルケニル基は、Cで結合していてもヘテロで結合してもよく、すなわち、それは、炭素原子またはO、S(O)<sub>q</sub>またはNを介して、分子の残りに連結していてもよい。

## 【0303】

20

用語“ヘテロシクロアルケニル”は、3個までの炭素原子、一つの態様において2個までの炭素原子、他の態様において1個の炭素原子が、それぞれ独立して、O、S(O)<sub>q</sub>またはNによって置き換えられており、ただし、少なくとも1個のシクロアルケニル炭素-炭素二重結合が残っているシクロアルケニル基を含む。ヘテロシクロアルケニルの例は、3,4-ジヒドロ-2H-ピラニル、5,6-ジヒドロ-2H-ピラニル、2H-ピラニル、1,2,3,4-テトラヒドロピリジニルおよび1,2,5,6-テトラヒドロピリジニルを含む。ヘテロシクロアルケニル基は、Cで結合していてもNで結合してもよく、すなわち、それは、炭素原子または窒素原子を介して分子の残りに連結していてもよい。一つの態様において、本発明のヘテロシクロアルケニル基は、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>シクロアルケニル基を含む。一つの態様において、本発明のヘテロシクロアルケニル基は、C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>シクロアルケニル基を含む。

## 【0304】

30

用語“ヘテロアルキニル”は、3個までの炭素原子、一つの態様において2個までの炭素原子、他の態様において1個の炭素原子が、それぞれ独立して、O、S(O)<sub>q</sub>またはNによって置き換えられており、ただし、少なくとも1個のアルキニル炭素-炭素三重結合が残っているアルキニル基を含む。ヘテロアルキニル基は、Cで結合していてもヘテロで結合してもよく、すなわち、それは、炭素原子、またはO、S(O)<sub>q</sub>もしくはNを介して、分子の残りに連結していてもよい。

## 【0305】

40

用語“ヘテロシクロアルキニル”は、3個までの炭素原子、一つの態様において2個までの炭素原子、他の態様において1個の炭素原子が、それぞれ独立して、O、S(O)<sub>q</sub>またはNによって置き換えられており、ただし、少なくとも1個のシクロアルキニル炭素-炭素三重結合が残っているシクロアルキニル基を含む。ヘテロシクロアルケニル基は、Cで結合していてもNで結合してもよく、すなわち、それは、炭素原子もしくは窒素原子を介して分子の残りに連結していてもよい。ヘテロシクロアルキニル基の例は、アザシクロオクタ-4-イニルを含む。一つの態様において、本発明は、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>ヘテロシクロアルキニル基を含む。一つの態様において、本発明は、C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>ヘテロシクロアルキニル基を含む。

## 【0306】

50

用語“ヘテロアルキレン”は、3個までの炭素原子、一つの態様において2個までの炭素原子、他の態様において1個の炭素原子が、それぞれ独立して、O、S(O)<sub>q</sub>またはNによって置き換えられており、ただし、少なくとも1個のアルキレン炭素-炭素結合が残っているアルキレン基を含む。

## 【0307】

用語“ヘテロアルケニレン”は、3個までの炭素原子、一つの態様において2個までの炭素原子、他の態様において1個の炭素原子が、それぞれ独立して、O、S(O)<sub>q</sub>またはNによって置き換えられており、ただし、少なくとも1個のアルケニレン炭素-炭素二重結合が残っているアルケニレン基を含む。

## 【0308】

用語“ヘテロアルキニレン”は、3個までの炭素原子、一つの態様において2個までの炭素原子、他の態様において1個の炭素原子が、それぞれ独立して、O、S(O)<sub>q</sub>またはNによって置き換えられており、ただし、少なくとも1個のアルキニレン炭素-炭素三重結合が残っているアルキニレン基を含む。

10

## 【0309】

アリール

用語“アリール”は、一価の芳香族環状ヒドロカルビル基を含み、例えばフェニルまたはナフチル(例えば1-ナフチルまたは2-ナフチル)である。一般的に、アリール基は、単環式芳香環基であっても、多環式縮合芳香環基であってもよい。好ましいアリールは、C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>アリールである。本明細書で用いられるとき、用語“アリール”は、環部分に6~20個の炭素原子を有する芳香族炭化水素基を言う。典型的には、アリールは、6~20個の炭素原子を有する単環式、二環式または三環式アリールであり、1個以上の非芳香族炭化水素環が縮合した1個以上の芳香環を含む。非限定的な例は、フェニル、ナフチルまたはテトラヒドロナフチルを含む。

20

## 【0310】

アリール基の他の例は、アセアントリレン、アセナフチレン、アセフェナントリレン、アントラセン、アズレン、クリセン、コロネン、フルオランテン、フルオレン、a s - インダセン、s - インダセン、インデン、ナフタレン、オバレン、ペリレン、フェナレン、フェナントレン、ピセン、ブレイアデン、ピレン、ピラントレンおよびルビセンの一価の誘導体である。

## 【0311】

用語“アリールアルキル”は、アリール基で置換されたアルキルを意味し、例えばベンジルである。

30

## 【0312】

用語“アリーレン”は、二価の芳香族環状ヒドロカルビル基を含み、例えばフェニレンである。一般的に、アリーレン基は、単環式芳香環基であっても、多環式縮合芳香環基であってもよい。好ましいアリーレンは、C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>アリーレンである。アリーレン基の他の例は、アセアントリレン、アセナフチレン、アセフェナントリレン、アントラセン、アズレン、クリセン、コロネン、フルオランテン、フルオレン、a s - インダセン、s - インダセン、インデン、ナフタレン、オバレン、ペリレン、フェナレン、フェナントレン、ピセン、ブレイアデン、ピレン、ピラントレンおよびルビセンの二価の誘導体である。

40

## 【0313】

ヘテロアリール

用語“ヘテロアリール”は、O、S、NおよびNR<sup>N</sup>(ここで、R<sup>N</sup>は下に定義される(一つの態様において、Hまたはアルキル(例えばC<sub>1</sub>-<sub>6</sub>アルキル)である。)から独立して選択される1個以上のヘテロ原子を含む、一価のヘテロ芳香族環状ヒドロカルビル基を含む。本明細書で用いられるとき、用語“ヘテロアリール”は、N、OまたはSから選択される1~8個のヘテロ原子を有する5~14員単環式または二環式または三環式芳香環系を言う。典型的に、ヘテロアリールは、5~10員の環系(例えば5~7員単環式または8~10員二環式)または5~7員環系である。典型的なヘテロアリール基は、2-または3-チエニル、2-または3-フリル、2-または3-ピロリル、2-、4-または5-イミダゾリル、3-、4-または5-ピラゾリル、2-、4-または5-チアゾリル、3-、4-または5-イソチアゾリル、2-、4-または5-オキサゾリル、3-、4-または5-イソオキサゾリル、3-または5-1,2,4-トリアゾリル、4-または5-

50

- 1 , 2 , 3 - トリアゾリル、テトラゾリル、2 - 、3 - または4 - ピリジル、3 - または4 - ピリダジニル、3 - 、4 - または5 - ピラジニル、2 - ピラジニル、および2 - 、4 - または5 - ピリミジニルを含む。

#### 【0314】

用語“ヘテロアリール”はまた、ヘテロ芳香環が、1個以上のアリール環、脂環式環またはヘテロシクリル環と縮合しており、結合点がヘテロ芳香環上にある基を言う。非限定的な例は、H<sup>1~5</sup>およびH<sup>2~9</sup>として、本明細書で示された頭部を含む。

#### 【0315】

一般的に、ヘテロアリール基は、単環式ヘテロ芳香環基であっても多環式(例えば二環式)縮合ヘテロ芳香環基であってもよい。一つの態様において、ヘテロアリール基は、5~13環員(例えば5~10員)を含み、かつ、O、S、NおよびNR<sup>N</sup>から独立して選択される1個、2個、3個または4個の環ヘテロ原子を含む。一つの態様において、ヘテロアリール基は、5員、6員、9員または10員であってもよく、例えば5員単環式環、6員単環式環、9員縮合二環式環または10員縮合二環式環である。

10

#### 【0316】

単環式ヘテロ芳香族基は、5~6環員を含み、かつO、S、NまたはNR<sup>N</sup>から選択される1個、2個、3個または4個のヘテロ原子を含むヘテロ芳香族基を含む。

#### 【0317】

一つの態様において、5員単環式ヘテロアリール基は、-NR<sup>N</sup>-基、-O-原子または-S-原子である1個の環員、および、所望により=N-原子である1~3個の環員(例えば1個または2個の環員)(ここで、5個の環員の残りは炭素原子である。)を含む。

20

#### 【0318】

5員単環式ヘテロアリール基の例は、ピロリル、フラニル、チオフェニル、ピラゾリル、イミダゾリル、イソオキサゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、チアゾリル、1,2,3-トリアゾリル、1,2,4-トリアゾリル、1,2,3-オキサジアゾリル、1,2,4-オキサジアゾリル、1,2,5-オキサジアゾリル、1,3,4-オキサジアゾリル、1,3,4-チアジアゾリル、ピリジル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピラジニル、1,3,5-トリアジニル、1,2,4-トリアジニル、1,2,3-トリアジニルおよびテトラゾリルである。

30

#### 【0319】

6員単環式ヘテロアリール基の例は、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニルおよびピラジニルである。

#### 【0320】

一つの態様において、6員単環式ヘテロアリール基は、=N-原子である1個または2個の環員(ここで、6個の環員の残りは炭素原子である。)を含む。

#### 【0321】

二環式ヘテロ芳香族基は、9~13個の環員を含み、かつ、O、S、NまたはNR<sup>N</sup>から選択される1個、2個、3個、4個またはそれ以上のヘテロ原子を含む縮合ヘテロ芳香環基を含む。

40

#### 【0322】

一つの態様において、9員二環式ヘテロアリール基は、-NR<sup>N</sup>-基、-O-原子または-S-原子である1個の環員、および、所望により=N-原子である1~3個の環員(例えば1個または2個の環員)(ここで、9個の環員の残りは炭素原子である。)を含む。

#### 【0323】

9員縮合二環式ヘテロアリール環基の例は、ベンゾフラニル、ベンゾチオフェニル、インドリル、ベンゾイミダゾリル、インダゾリル、ベンゾトリアゾリル、ピロ口[2,3-b]ピリジニル、ピロ口[2,3-c]ピリジニル、ピロ口[3,2-c]ピリジニル、ピロ口[3,2-b]ピリジニル、イミダゾ[4,5-b]ピリジニル、イミダゾ[4,5-c]ピリジニル、ピラゾロ[4,3-d]ピリジニル、ピラゾロ[4,3-c]ピリジニル、ピラゾロ[3,4-c]ピリジニル、ピラゾロ[3,4-b]ピリジニル、イソインドリル、インダゾリル、ブリ

50

ニル、インドリジニル、イミダゾ[1,2-a]ピリジニル、イミダゾ[1,5-a]ピリジニル、ピラゾロ[1,2-a]ピリジニル、ピロロ[1,2-b]ピリダジニルおよびイミダゾ[1,2-c]ピリミジニルである。

#### 【0324】

用語“ヘテロアリールアルキル”は、ヘテロアリール基で置換されたアルキルを意味する。

#### 【0325】

用語“ヘテロアリーレン”は、O、S、NおよびNR<sup>N</sup>(ここで、R<sup>N</sup>は下で定義される(一つの態様において、Hまたはアルキル(例えばC<sub>1-6</sub>アルキル)である。))から独立して選択される1個以上のヘテロ原子を含む二価のヘテロ芳香族環状ヒドロカルビル基を含む。一般的に、ヘテロアリーレン基は、単環ヘテロ芳香環基であっても多環式(例えば二環式)縮合ヘテロ芳香環基であってもよい。一つの態様において、ヘテロアリーレン基は、5~13個の環員(好ましくは5~10個の環員)を含み、かつ、O、S、NおよびNR<sup>N</sup>から独立して選択される1個、2個、3個または4個の環ヘテロ原子を含む。一つの態様において、ヘテロアリーレン基は、5員、6員、9員または10員であってもよく、例えば5員単環式環、6員単環式環、9員縮合二環式環または10員縮合二環式環である。用語“ヘテロアリーレン”は、上で述べたヘテロアリール基それぞれの二価の誘導体を含む。

#### 【0326】

用語“アリール”、“芳香族”、“ヘテロアリール”および“ヘテロ芳香族”はまた、部分的に還元された基を含む。従って、例えば“ヘテロアリール”は、環の1つが飽和環まで還元された縮合種(例えば1,2,3,4-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル)を含む。

#### 【0327】

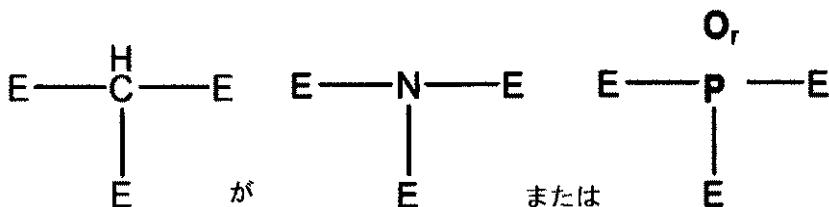
##### 全般

ことわりのない限り、基の組み合わせが、1個の部分(例えばアリールアルキル)として本明細書で記載されたとき、最後に記載された基が、分子の残りにその部分が結合している原子を含む。

#### 【0328】

アルキル基または他の基の炭素原子がO、S(O)<sub>q</sub>、NまたはP(O)<sub>r</sub>によって置き換えられると記載されるとき、これは、以下を意図している：

#### 【化26】



(ここで、Eは、Hではない。)によって置き換えられ；

-CH=は、-N=または-P(O)<sub>r</sub>=によって置き換えられるか；

C-Hは、NまたはP(O)<sub>r</sub>によって置き換えられるか；または

-CH<sub>2</sub>-は、-O-、-S(O)<sub>q</sub>-、-NR<sup>N</sup>-または-P(O)<sub>r</sub>R<sup>N</sup>-(ここで、R<sup>N</sup>はHまたは所望により置換されたC<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>ヘテロアルキル、C<sub>3-6</sub>シクロアルキル、C<sub>3-6</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>2-6</sub>アルケニル、C<sub>2-6</sub>ヘテロアルケニル、C<sub>3-6</sub>シクロアルケニル、C<sub>3-6</sub>ヘテロシクロアルケニル、フェニルまたは5個もしくは6個の環員を含むヘテロアリールである。)によって置き換えられる。R<sup>N</sup>は、このましくは、H、C<sub>1-6</sub>アルキルまたはC<sub>3-6</sub>シクロアルキルである。qは、独立して、0、1または2である。一つの態様において、qは0である。

rは、独立して、0または1である。一つの態様において、rは0である。

#### 【0329】

10

20

30

40

50

炭素原子が Si によって置き換えられると記載されるとき、これは、それ以外の結合は同じままであるが、炭素原子をケイ素原子に交換することを意図している。従って、例えば - CH<sub>2</sub> - は、 - SiH<sub>2</sub> - によって置き換えられ； - CH = は、 - SiH = によって置き換えられ； C - H は、 Si - H によって置き換えられる。

### 【0330】

明確化のために、上記のヘテロ原子含有基(例えばヘテロアルキルなど)に関して、炭素原子の数が示されるとき、例えば C<sub>3</sub> ~ 6 ヘテロアルキルと示すとき、3 ~ 6 個の鎖炭素原子が、O、S(O)<sub>q</sub> またはN によって置き換えられている C<sub>3</sub> ~ 6 アルキルをベースとする基を意図している。従って、C<sub>3</sub> ~ 6 ヘテロアルキル基は、例えば 3 ~ 6 個未満の鎖炭素原子を含む。他の例として、ピリジル基は、たとえ 5 個の炭素原子を含むのであっても C<sub>6</sub> ヘテロアリール基と分類される。  
10

### 【0331】

下で示された特定の官能基または化学的部分について述べるとき、意図された化学的部分は、次の通りである：

エーテル(例えば - O - )；エステル(例えば - C(O)O - )；スクシネット(例えば - O(O)C - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - C(O)O - ))；カルバメート(例えば - OC(O) - NR' - )；カーボネート(例えば - OC(O)O - )；ケトン(例えば - C - C(O) - C - )；カルボニル(例えば - C(O) - )；ウレア(例えば - NR C(O)NR' - )；アミン(例えば - NR' - )；アミド(例えば - C(O)NR' - )；イミン(例えば - C(NR') - )；チオエーテル(例えば - S - )；キサントゲン酸エステル(例えば - OC(S)S - )；ホスホジエステル(例えば - OP(O)<sub>2</sub>O - )  
20

{ここで、R' は、H、-NH-、-O-、-S-、ホスフェートまたは所望により置換された C<sub>1</sub> ~ 10 アルキレンから独立して選択されていてもよい。}。

### 【0332】

#### pKa

明示的にことわりのない限り、本明細書で記載された全ての pKa は、水中で、標準温度および標準圧力で測定される。また、ことわりのない限り、全ての pKa についての記載は、下記の方法を用いて測定された pKa についての記載である。

### 【0333】

脂質を秤量し、エタノールに溶解することによって、エタノール中 2 mM の脂質溶液を調製する。エタノール：メタノール 9 : 1 中 0.3 mM の蛍光プローブ TNS 溶液を、最初にメタノール中 3 mM の TNS の溶液を作り、次いでエタノールで 0.3 mM まで希釈することによって調製する。  
30

### 【0334】

リン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウムおよび塩化ナトリウムを含む水性緩衝液を、それぞれ、濃度 20 mM、25 mM、20 mM および 150 mM で調製する。緩衝液を 8 部に分け、pH を、12 N HCl または 6 N NaOH の何れかで、4.44 ~ 4.52、5.27、6.15 ~ 6.21、6.57、7.10 ~ 7.20、7.72 ~ 7.80、8.27 ~ 8.33 および 10.47 ~ 11.12 に調節する。400 μl の 2 mM 脂質溶液および 800 μl の 0.3 mM TNS 溶液を混合する。  
40

### 【0335】

Tecan Genesis RSP150 ハイスループット液体ハンドラーおよび Gemini ソフトウェアを用いて、7.5 μl のプローブ / 脂質ミックスを、1 ml 96 ウェルプレート(model NUNC 260252, Nalge Nunc International)中の、242.5 μl の緩衝液に加える。これを 8 つ全ての緩衝液について行う。

### 【0336】

1 ml 96 ウェルプレート中で混合した後、100 μl の各プローブ / 脂質 / 緩衝液混合物を、250 μl の黒色透明底 96 ウェルプレート(model COSTAR 3904, Corning)に移す。

### 【0337】

10

20

30

40

50

SpectraMax M5 分光光度計で、ソフトウェア SoftMax pro 5.2および以下のパラメーターを用いて、蛍光測定を行う：

リードモード：蛍光、トップリード

波長：励起 322 nm、放出 431 nm、オートカットオフ 420 nm

感度：測定回数 6、PMT：オート

自動混合：前：オフ

自動較正：オン

アッセイプレートタイプ：96 ウェル Standard clrbtm

測定したウェル：プレート全体を測定

静置時間：オフ

カラム波長優先度；カラム優先

輸送スピード：通常

自動測定：オフ

#### 【0338】

測定後、96 ウェルプレートでの空のウェルのバックグラウンド蛍光値を、各プローブ / 脂質 / 緩衝液混合物から引く。蛍光強度の値を、最も低い pH で正規化する。正規化された蛍光強度 対 pH チャートを、Microsoft Excel ソフトウェアでプロットする。8 個の点を滑らかな線で繋ぐ。

#### 【0339】

正規化された蛍光強度が 0.5 に等しい線上の点を見つける。0.5 に等しい正規化された蛍光強度に対応する pH を見つけ、それを脂質の pKa と考える。

本方法を用いて測定された pKa は、約 0.2 pKa 単位まで正確である。

#### 【0340】

##### 存在しない基

式(I)中の基 a、b または c が、“存在しない”とき、意味するところは、その変わりに単結合が存在することであり、すなわち、基 a、b または c の両側の 2 つの基が、互いに直接結合している。

#### 【0341】

##### 置換

本明細書で用いられるとき、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキルまたはヘテロシクリル基の何れかに適用される用語“所望により置換されている”は、特にことわりのないかぎり、非置換であるか、あるいは、1 個以上、典型的には 1 個、2 個、3 個、4 個または 5 個の適当な非水素置換基によって置換されている基を言い、当該置換基はそれれ、下記の群から独立して選択されるものである：

- (a) アルキル；
- (b) ヒドロキシ(または保護されたヒドロキシ)；
- (c) ハロ；
- (d) オキソ、すなわち = O、または、アルキルイミノ、すなわち = N - アルキル；
- (e) アミノ、アルキルアミノまたはジアルキルアミノ；
- (f) アルコキシ；
- (g) シクロアルキル；
- (h) カルボキシル；

(i) ヘテロシクロオキシ(ここで、ヘテロシクロオキシは、酸素架橋により結合しているヘテロ環基を表す。)；

(j) アルキル - O - C(O) - ；

(k) メルカプト；

(l) ニトロ；

(m) シアノ；

(n) スルファモイルまたはスルホニアミド；

(o) アリール；

10

20

30

40

50

- (p) アルキル - C(O) - O - ;
- (q) アリール - C(O) - O - ;
- (r) アリール - S - ;
- (s) アリールオキシ；
- (t) アルキル - S - ;
- (u) ホルミル、すなわち H C(O) - ;
- (v) カルバモイル；
- (w) アリール - アルキル - ; および
- (x) アルキル、シクロアルキル、アルコキシ、ヒドロキシ、アミノ、アルキル - C(O) - NH - 、アルキルアミノ、ジアルキルアミノまたはハロゲンで置換されたアリール。

10

**【0342】**

本明細書で用いられるとき、アルキルまたはアルキル含有基の何れかに適用される用語“所望により置換された”は、非置換であるか、あるいは、1個以上、典型的には1個、2個または3個の適当な非水素置換基によって置換されている基を言い、当該置換基はそれぞれ、ハロ、ヒドロキシ(または保護されたヒドロキシ)またはアルコキシ基からなる群から独立して選択されるものである。

**【0343】**

本発明の化合物の基(例えばアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、アルケニル、シクロアルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、ヘテロアルキル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロシクロアルケニル、ヘテロアルキニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレン、アリール、アリールアルキル、アリールヘテロアルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキルまたはヘテロアリールヘテロアルキル基など)は、置換されていても非置換であってもよく、一つの態様において、非置換である。典型的には、置換は、1個の水素原子を1個の置換基で置き換えること、または=Oによる置換の場合は2個の水素原子を置き換えることを含む。

20

**【0344】**

置換されているとき、一般的には、各基で1~5個の置換基が存在し、一つの態様において1~3個の置換基が存在し、一つの態様において1個または2個の置換基が存在し、一つの態様において1個の置換基が存在する。一つの態様は、同じ原子上に1個以上の置換基を含み、例えばアセタール基である。

30

**【0345】**

一つの態様において、置換基は、独立して、Sub<sup>1</sup>またはSub<sup>2</sup>(一つの態様においてSub<sup>2</sup>)であり、

Sub<sup>1</sup>は、独立して、ハロゲン、トリハロメチル、トリハロエチル、-NO<sub>2</sub>、-CN、-N<sup>+</sup>(R<sup>s</sup>)<sub>2</sub>O<sup>-</sup>、-CO<sub>2</sub>H、-CO<sub>2</sub>R<sup>s</sup>、-SO<sub>3</sub>H、-SOR<sup>s</sup>、-SO<sub>2</sub>R<sup>s</sup>、-SO<sub>3</sub>R<sup>s</sup>、-OC(=O)OR<sup>s</sup>、-C(=O)H、-C(=O)R<sup>s</sup>、-OC(=O)R<sup>s</sup>、-NR<sup>s</sup><sub>2</sub>、-C(=O)NH<sub>2</sub>、-C(=O)NR<sup>s</sup><sub>2</sub>、-N(R<sup>s</sup>)C(=O)OR<sup>s</sup>、-N(R<sup>s</sup>)C(=O)NR<sup>s</sup><sub>2</sub>、-OC(=O)NR<sup>s</sup><sub>2</sub>、-N(R<sup>s</sup>)C(=O)R<sup>s</sup>、-C(=S)NR<sup>s</sup><sub>2</sub>、-NR<sup>s</sup>C(=S)R<sup>s</sup>、-SO<sub>2</sub>NR<sup>s</sup><sub>2</sub>、-NR<sup>s</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>s</sup>、-N(R<sup>s</sup>)C(=S)NR<sup>s</sup><sub>2</sub>、-N(R<sup>s</sup>)SO<sub>2</sub>NR<sup>s</sup><sub>2</sub>、-R<sup>s</sup>または-Z<sup>s</sup>R<sup>s</sup>

40

(ここで、Z<sup>s</sup>は、独立して、O、SまたはNR<sup>s</sup>であり；

R<sup>s</sup>は、独立して、H、またはC<sub>1~6</sub>アルキル、C<sub>1~6</sub>ヘテロアルキル、-(Alk<sup>a</sup>)<sub>f</sub>-C<sub>3~6</sub>シクロアルキル、-(Alk<sup>a</sup>)<sub>f</sub>-C<sub>3~6</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>2~6</sub>アルケニル、C<sub>2~6</sub>ヘテロアルケニル、-(Alk<sup>a</sup>)<sub>f</sub>-C<sub>3~6</sub>シクロアルケニル、-(Alk<sup>a</sup>)<sub>f</sub>-C<sub>3~6</sub>ヘテロシクロアルケニル、C<sub>2~6</sub>アルキニル、C<sub>2~6</sub>ヘテロアルキニル、-(Alk<sup>a</sup>)<sub>f</sub>-C<sub>6~14</sub>アリール、-(Alk<sup>a</sup>)<sub>f</sub>-C<sub>6~14</sub>アリールまたは-(Alk<sup>a</sup>)<sub>f</sub>-ヘテロアリール(ここで、ヘテロアリールは5~13環員を含む。)

(ここで、fは、0または1であり；

50

A<sub>1</sub>k<sup>a</sup>は、C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキレンまたはC<sub>1</sub>~<sub>6</sub>ヘテロアルキレンであり；R<sup>s</sup>は、それ自身、所望により1~3個の置換基Sub<sup>2</sup>によって置換されており(一つの態様において非置換である。)である。)

であり；

Sub<sup>2</sup>は、独立してハロゲン、トリハロメチル、トリハロエチル、-NO<sub>2</sub>、-CN、-N<sup>+</sup>(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)<sub>2</sub>O<sup>-</sup>、-CO<sub>2</sub>H、-CO<sub>2</sub>C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-SO<sub>3</sub>H、-SOC<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-SO<sub>2</sub>C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-SO<sub>3</sub>C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-OC(=O)OC<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-C(=O)H、-C(=O)C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-OC(=O)C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、=O、-N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-C(=O)NH<sub>2</sub>、-C(=O)N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)C(=O)O(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)、-N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)C(=O)N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-OC(=O)N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)、10  
-N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)C(=O)C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-C(=S)N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)C(=S)C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-SO<sub>2</sub>N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)SO<sub>2</sub>C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)C(=S)N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)SO<sub>2</sub>N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>ヘテロアルキル、-C<sub>3</sub>~<sub>6</sub>シクロアルキル、-C<sub>3</sub>~<sub>6</sub>ヘテロシクロアルキル、-C<sub>2</sub>~<sub>6</sub>アルケニル、-C<sub>2</sub>~<sub>6</sub>シクロアルケニル、-C<sub>3</sub>~<sub>6</sub>ヘテロシクロアルケニル、-C<sub>2</sub>~<sub>6</sub>アルキニル、-C<sub>2</sub>~<sub>6</sub>ヘテロアルキニル、-C<sub>6</sub>~<sub>1</sub>アリール、-C<sub>5</sub>~<sub>1</sub>アリール<sub>3</sub>ヘテロアリール、-Z<sup>t</sup>-C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-Z<sup>t</sup>-C<sub>3</sub>~<sub>6</sub>シクロアルキル、-Z<sup>t</sup>-C<sub>2</sub>~<sub>6</sub>アルケニル、-Z<sup>t</sup>-C<sub>3</sub>~<sub>6</sub>シクロアルケニルまたは-Z<sup>t</sup>-C<sub>2</sub>~<sub>6</sub>アルキニル<sub>20</sub>  
(ここで、Z<sup>t</sup>は、独立して、O、S、NHまたはN(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)である。)

である。

#### 【0346】

Sub<sup>1</sup>中のR<sup>s</sup>が所望により1~3個の置換基Sub<sup>2</sup>によって置換されている場合、Sub<sup>2</sup>は非置換である。しかし、一つの態様において、R<sup>s</sup>は非置換である。

#### 【0347】

一つの態様において、R<sup>s</sup>は、HまたはC<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキルであり、所望により1~3個の置換基Sub<sup>2</sup>によって置換されている。

#### 【0348】

一つの態様において、Sub<sup>2</sup>は、独立して、ハロゲン、トリハロメチル、トリハロエチル、-NO<sub>2</sub>、-CN、-N<sup>+</sup>(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)<sub>2</sub>O<sup>-</sup>、-CO<sub>2</sub>H、-SO<sub>3</sub>H、-SOC<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-SO<sub>2</sub>C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-SO<sub>3</sub>C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-C(=O)H、-C(=O)C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、=O、-N(C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-C(=O)NH<sub>2</sub>、-C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-C<sub>3</sub>~<sub>6</sub>シクロアルキル、-C<sub>3</sub>~<sub>6</sub>ヘテロシクロアルキル、-Z<sup>t</sup>-C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキルまたは-Z<sup>t</sup>-C<sub>3</sub>~<sub>6</sub>シクロアルキルである。<sub>30</sub>

#### 【0349】

一つの態様において、置換される基が非環式(例えばアルキル、ヘテロアルキル、アルケニルなど)であるとき、Sub<sup>1</sup>は-R<sup>s</sup>ではなく、Sub<sup>2</sup>は-C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル、-C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>ヘテロアルキル、-C<sub>2</sub>~<sub>6</sub>アルケニル、-C<sub>2</sub>~<sub>6</sub>ヘテロアルケニル、-C<sub>2</sub>~<sub>6</sub>アルキニルまたは-C<sub>2</sub>~<sub>6</sub>ヘテロアルキニルではない。<sub>40</sub>

#### 【0350】

Sub<sup>2</sup>以外の基が、置換され得る箇所を少なくとも2箇所有するとき、基は、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレンまたはヘテロアルキニレン鎖(一つの態様において1~6個の原子、一つの態様において3~6個の原子、一つの態様において3個または4個の原子を含む)の両端で置換されて、環状部分を形成してもよい。鎖は、所望により1~3個の置換基Sub<sup>2</sup>によって置換されている。一つの態様において、鎖は置換されていない。従って、用語所望により置換された“シクロアルキル”、“シクロアルケニル”、“シクロアルキニル”、“ヘテロシクロアルキル”、“ヘテロシクロアルケニル”、“ヘテロシクロアルキニル”および

“ヘテロアリール”は、縮合しているものを含む。例えば、“所望により置換されたシクロアルキル”は、2個のシクロアルキル環が縮合している種を含み、“所望により置換されたヘテロアリール”は、1個のヘテロシクロアルキル環が芳香環に縮合している種(例えば5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル)を含む。

#### 【0351】

$\text{Sub}^2$ 以外の基が2回置換され得る基を有するとき、当該原子は、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレンまたはヘテロアルキニレン鎖(一つの態様において2~8個の原子、一つの態様において3~6個の原子、一つの態様において4個または5個の原子を含む)の両端によって置換されて、環状部分を形成してもよい。鎖は、所望により1~3個の置換基 $\text{Sub}^2$ によって置換されている。一つの態様において、鎖は、置換されていない。従って、用語所望により置換された“シクロアルキル”、“シクロアルケニル”、“シクロアルキニル”、“ヘテロシクロアルキル”、“ヘテロシクロアルケニル”、“ヘテロシクロアルキニル”、“アリール”および“ヘテロアリール”は、スピロ種を含む。

10

#### 【0352】

説明のために、基がヘテロ原子を有するとき、置換基は、ヘテロ原子に結合していてもよい。従って、例えば“所望により置換されたヘテロアルキル”は、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{Sub}^1)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{Sub}^1)-\text{NH}-\text{CH}_2-$ および $-\text{CH}(\text{Sub}^1)-\text{N}(\text{Sub}^1)-\text{CH}_2-$ などを含む。

20

#### 【0353】

##### 修飾語

リストが修飾語に先行されるとき、修飾語は、リスト中の各アイテムに適用されると解されるべきことを意図している。例えばフレーズ“所望により置換された $\text{C}_{3-20}$ ヘテロシクロアルキル、 $\text{C}_{3-20}$ ヘテロシクロアルケニル、 $\text{C}_{3-20}$ ヘテロシクロアルキニルまたは $\text{C}_{5-20}$ ヘテロアリール基”は、リスト中の4個のアイテム、すなわち $\text{C}_{3-20}$ ヘテロシクロアルキル基、 $\text{C}_{3-20}$ ヘテロシクロアルケニル基、 $\text{C}_{3-20}$ ヘテロシクロアルキニル基および $\text{C}_{6-20}$ ヘテロアリール基がそれぞれ、所望により置換されていてもよいことを意味する。

#### 【0354】

ある基が、最初の修飾語によって特徴付けられ、その後同じ基が二次的な修飾語によって特徴付けられるとき、これが意味するものは、この基が両方の修飾語によって同時に特徴付けられることである。例えば、ある基が“ $\text{C}_{3-20}$ ヘテロシクロアルキニル”(最初の修飾語)と記載され、同じ基がその後に“ $\text{C}_{5-16}$ ”(二次的修飾語)基と記載されるとき、これが意味するものは、 $\text{C}_{5-16}$ ヘテロシクロアルキニル基である。

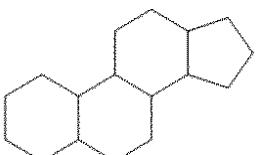
30

#### 【0355】

##### ステロイド

本明細書で用いられるとき、用語“ステロイド”は、下記の構造：

#### 【化27】



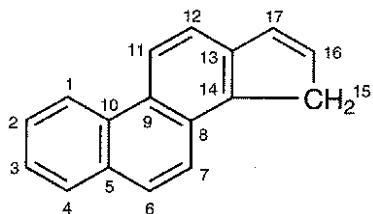
40

(この構造は、本明細書で、“ステロイド骨格”とも言う。)を含む何らかの基を言う。

#### 【0356】

単に説明のために、ステロイド骨格を完全に飽和として上に記載した。しかし、用語ステロイドはまた、ステロイド骨格中に不飽和存在がする例を含むことを意図している。例えば用語ステロイドは、完全に不飽和(マンキュード)基本骨格、すなわち15H-シクロペンタ[a]フェナントレン：

## 【化28】



を含む基を含む。

用語ステロイドはまた、部分的に不飽和なステロイド骨格を含む基を含む。

## 【0357】

用語ステロイドはまた、ステロイド骨格の“セコ”誘導体、すなわち環が開裂している基；それぞれ環の縮小および拡張を含むステロイド骨格の“ノル”および“ホモ”誘導体を含む(*Systemic Nomenclature of Organic Chemistry*, by D. Hellwinkel, published by Springer, 2001, ISBN: 3 540 41138 0, “セコ”については203頁、“ノル”および“ホモ”については204頁を参照のこと。)。しかし、一つの態様において、このような“セコ”誘導体は、用語“ステロイド”に包含されない。他の態様において、このような“ノル”誘導体は、用語“ステロイド”に包含されない。他の態様において、“ホモ”誘導体は、用語“ステロイド”に本願されない。従って、一つの態様において、このようなセコ、ノルおよびホモ誘導体は、用語“ステロイド”に包含されない。

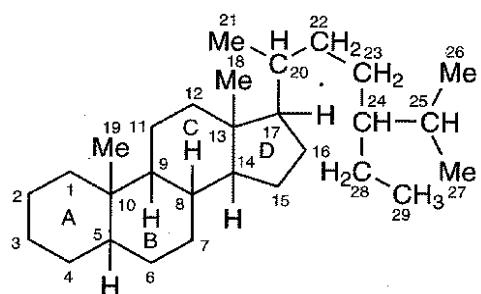
## 【0358】

用語ステロイドはまた、ステロイド骨格と名付けられた構造中の1個以上の炭素原子がヘテロ原子によって置き換えられている例を含む。このような態様において6個までの炭素原子、一つの態様において5個までの炭素原子、他の態様において4個までの炭素原子、他の態様において3個までの炭素原子、他の態様において2個までの炭素原子、他の態様において1個の炭素原子はそれぞれ、O、S(O)<sub>q</sub>、N、P(O)<sub>r</sub>またはSi(好ましくはO、S(O)<sub>q</sub>またはN)によって置き換えられている。しかし、一つの態様において、用語“ステロイド”は、“ステロイド基本骨格”はヘテロ原子を含まない種を含む。

## 【0359】

ステロイド環系は、下に示す慣例に従って番号付けされる。

## 【化29】



## 【0360】

用語ステロイドは、ステロール、ステロイドホルモン、胆汁酸および胆汁酸の塩を包含する。ステロールは、環Aの3位にヒドロキシル基を有する何れかのステロイドである。

## 【0361】

不饱和

標準的な使用に従って、3位は、鎖の(メチル)末端から3番目の結合を言い；6位は、鎖の(メチル)末端から6番目の結合を言い；9位は、鎖の(メチル)末端から9番目の結合を言う。

## 【0362】

PDI

頭字語PDIは、多分散性指数を表す。ことわりのない限り、本明細書で記載された全てのPDIは、Malvern Zetasizerの動的光散乱によって測定された、完全に形成された

10

20

30

40

50

ナノ粒子のPDIである。計数速度が約200～400kctsであるように、ナノ粒子サンプルをリン酸緩衝食塩水(PBS)で希釈する。

### 【0363】

#### 一般的な定義

用語“含む(comprising)”は、“含む(including)”および“からなる(consisting)”を包含し、例えばXを“含む”組成物は、排他的にXからなるのであっても、さらなる何かを含んで、例えばX+Yであってもよい。

### 【0364】

用語“実質的”は、“完全に”を除外せず、例えばYが“実質的に無い”組成物は、Yを完全に含まないものであってもよい。必要ならば、用語“実質的に”は、本発明の定義から省略してもよい。

### 【0365】

数値xに関する用語“約”は、例えば $x \pm 10\%$ を意味する。一つの態様において、開示された全ての数値について、用語“約”は存在しない。

### 【0366】

誤解を避けるために、化合物、組成物、方法または使用の内容で明示的に開示された全ての特徴はまた、化合物、組成物、方法および使用の内容について潜在的に開示されている。例えば、或る化合物が特徴“A”を有することが本明細書で明示的に開示されているならば、本明細書では、特徴“A”を有する発明の化合物を含む発明による処置方法を潜在的に開示している。

### 【0367】

さらに、本発明の種々の態様が本明細書に記載されている。各態様で特定された特徴は、他の特定された特徴と組み合わせて、さらなる態様を提供し得ると認められる。

### 【0368】

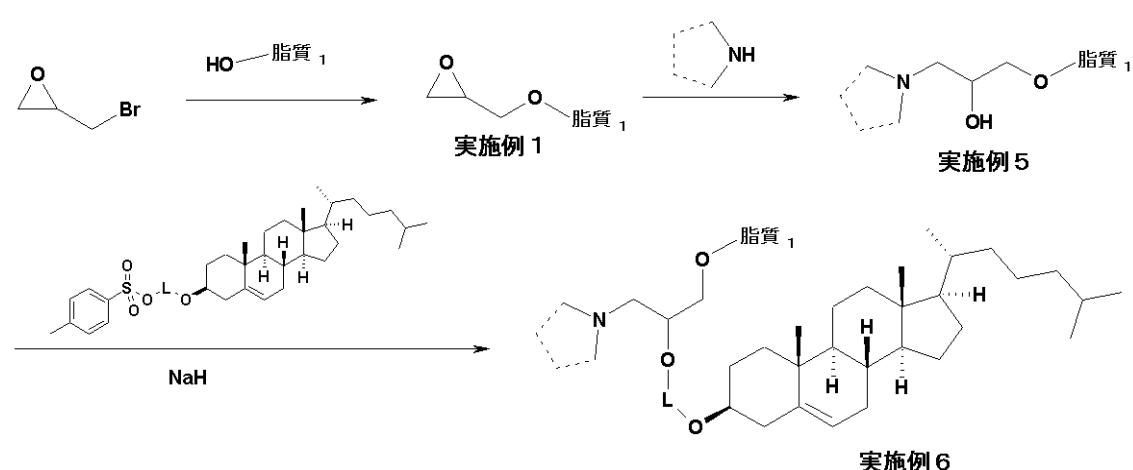
#### 本発明のカチオン性脂質の化学合成

経路Aは、本発明の化合物を合成するのに用いられ得る一般的な方法を示す。経路CDTは、コレステロールジグリコールトシレート反応剤をどのように製造するかを説明している。

### 【0369】

#### 経路A

##### 【化30】



### 【0370】

#### 経路CDT

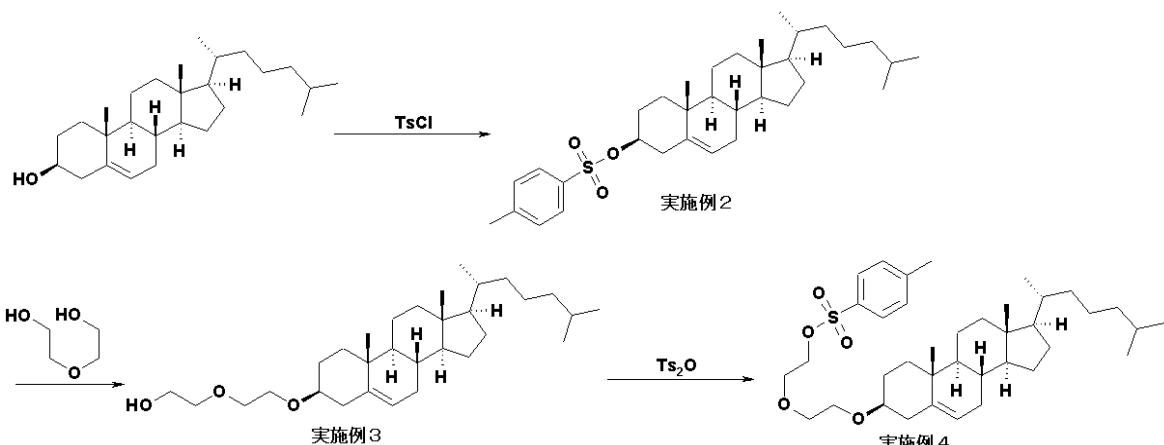
10

20

30

40

## 【化31】



10

20

20

30

40

50

## 【実施例】

## 【0371】

エポキシド(実施例1)

リノレイルアルコール(48.7 g, 183 mmol)を丸底フラスコに加え、THF(400 ml)に溶解する。得られた溶液を氷浴を用いて冷却し、水素化ナトリウム(13.16 g, 329 mmol)を加える。得られたスラリーを室温で1時間攪拌する。エピプロモヒドリンを一度に加え、室温で反応を続ける。4時間攪拌した後、さらなる水素化ナトリウム(13.16 g, 329 mmol)を加える。室温でさらに1時間攪拌攪拌した後、エピプロモヒドリンのさらなるアリコート(32.5 g, 238 mmol)を加える。反応物を50℃で一夜加熱する。反応物を室温まで冷却し、水で反応停止させた。EtOAcを加え、得られた有機層を厚め、塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させる。揮発成分をロータリーエバボレーターによって除去し、得られた残渣をシリカのクロマトグラフィーによって、EtOAc/ヘプタンで精製し、望ましいエポキシドを得る。

## 【0372】

コレステロール トシレート(実施例2)

コレステロール(50 g, 129 mmol)をDCM(55 ml)およびピリジン(150 ml)に溶解する。得られた溶液を0℃まで冷却し、塩化トシリルを固体として一度に加える。反応物をゆっくりと室温まで一夜温める。反応物をロータリーエバボレーターによって濃縮し、MeOH(500 ml)を加え、白色の固体を得る。30分間攪拌を続け、沈殿物を濾過によって集め、MeOHで洗浄し、真空下で乾燥させ、望ましいトシレートを得る。

## 【0373】

コレステロール ジグリコール(実施例3)

コレステロール トシレート(73 g, 128 mmol)を1,4-ジオキサン(750 ml)に溶解する。ジエチレングリコール(294 ml, 3077 mmol)を加え、反応物を穏やかに還流する。得られた溶液を室温まで冷却し、ロータリーエバボレーターによって濃縮する。得られたゲル状物質をDCMに溶かし、水で攪拌する。得られた有機層を集め、水層をDCMで1回抽出する。有機層を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、ロータリーエバボレーターによって濃縮する。粗生成物を、シリカ上で、EtOAc/ヘプタンで精製し、望ましいコレステロール ジグリコールを得る。

## 【0374】

コレステロール ジグリコール トシレート(実施例4)

コレステロール ジグリコール(51.5 g, 103 mmol)を、DCM(160 ml)およびピリジン(60 ml)中で攪拌する。無水トシリル酸(38.7 g, 119 mmol)を加え、得られた溶液を室温で一夜攪拌する。反応物をロータリーエバボレーターによって濃縮し、得られた残渣を、シリカ上で、EtOAc/ヘプタンで精製し、望ましい生成物を得る。

## 【0375】

3-ペリジニル-1,2-プロパンジオール 1-リノレイルエーテル(実施例5)

実施例 1 のエポキシド(1.0 g, 3.1 mmol)をEtOH(17 ml)に溶解する。ピペリジン(0.45 ml, 4.65 mmol)を加え、混合物を、マイクロ波反応器中、140°で5分間加熱する。室温まで冷却した後、混合物をロータリーエバポレーターによって濃縮し、シリカ上で、MeOH / DCMで精製し、望ましいアミノアルコールを得る。

### 【0376】

#### 最終化合物 1(実施例 6)

実施例 5 のアミノアルコール(0.447 mg, 1.09 mmol)をトルエン(15 ml)中で攪拌し、NaH(0.102 g, 4.24 mmol)を一度に加える。得られた混合物を室温で30分間攪拌し、実施例 4 のトシレートを一度に加える。反応物を一夜還流する。室温("r.t.")まで冷却した後、反応物を飽和水性重炭酸ナトリウムを添加することによって反応停止させる。得られた混合物を5分間攪拌し、ロータリーエバポレーターによって濃縮する。得られた残渣を、直接、シリカ上で、MeOH / DCMで精製し、粗生成物を得る。これを、シリカ上で、EtOAc / ヘプタンで精製し、望ましい化合物を得る。

### 【0377】

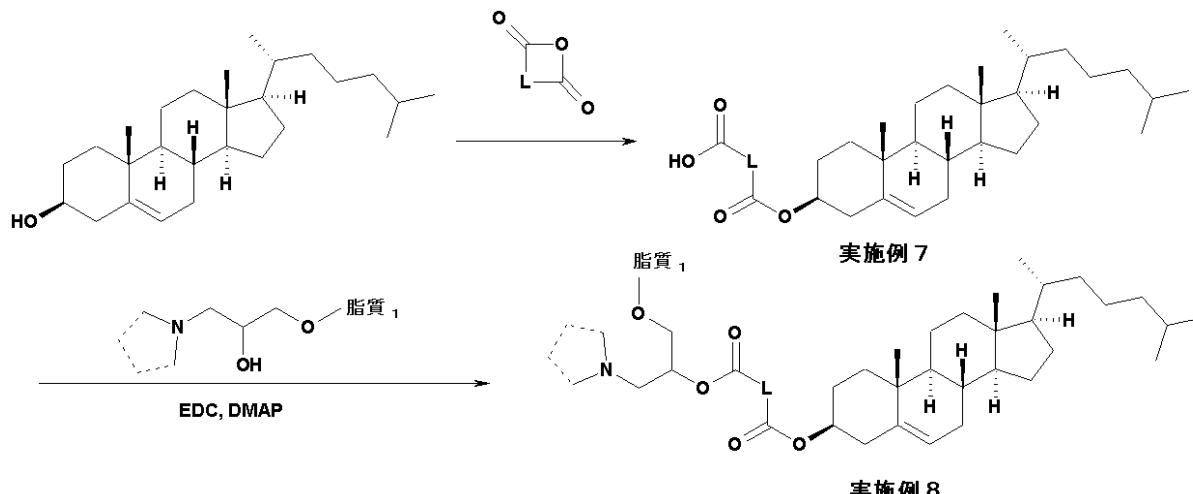
下記の化合物(その構造を下に示す)は、経路Aの方法によって製造され得る：

E0011 ; E0002 ; E0003 ; E0013 ; E0015 ; E0006 ; E0008 ; E0001 ; E0022 ; E0026 ; E0030 ; E0037 ; E0038 ; E0039 ; E0042 ; E0050 ; E0055 ; E0061 ; E0062 ; E0063 ; E0064 ; E0065 ; E0066 ; E0068 ; E0069 ; E0070 ; E0071 ; E0072 ; E0073 ; E0074 ; E0075 ; E0076 ; E0077 ; E0078 ; E0079 ; E0080 ; E0081 ; E0082 ; E0083 ; E0084 ; E0085 ; E0086 ; E0087 ; E0088 ; E0089 ; E0090 ; E0091 ; E0092 ; E0093 ; E0094 ; E0095 ; E0096 ; E0107 ; E0109 ; E0023 ; E0024 ; E0025 ; E0031 ; E0033 ; E0034 ; E0043 ; E0046 ; E0059 ; E0067 ; E0014 ; E0119 ; E0016 ; E0004 ; E0005 ; E0017 ; E0018 ; E0019 ; E0120 ; E0007 ; E0020 ; E0010 ; E0021 ; E0027 ; E0028 ; E0029 ; E0032 ; E0035 ; E0009 ; E0040 ; E0041 ; E0044 ; E0048 ; E0049 ; E0052 ; E0053 ; E0057 ; E0119 ; E0120 ; E0121 ; E0124 ; E0126 ; E0127 ; E0147 ; E0149 ; E0158 ; E0051 ; E0067 ; E0112 ; E0113 ; E0114 ; E0118 ; E0159 ; E0170 ; およびE0171。

### 【0378】

経路Bはまた、本発明の化合物を合成するのに用いられ得る一般的な方法を表す。

### 【化32】



### 【0379】

#### 実施例 7

コレステロール(3.33 g, 8.62 mmol)、無水ジグリコール酸(1 g, 8.62 mmol)、DMAP(0.263 g, 2.154 mmol)、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(35 ml)およびスターーラーバーを丸底フラスコに加える。反応物を室温で3日間攪拌する。

### 【0380】

反応混合物を濃縮し、残渣を、SF40 80Gカラムを用いるIntelliFlash 280 (AnaLogix)のフラッシュクロマトグラフィーによって精製する：0~2 CV, 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 2~10 CV, 100:0 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:(MeOH 10% AcOH)~90:1

10

20

30

40

50

0 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : (MeOH 10% AcOH)の直線的濃度勾配；10~25CV,  
 90 : 10 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : (MeOH 10% AcOH)~85 : 15 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> :  
 (MeOH 10% AcOH)の直線的濃度勾配。生成物をコレステロールと共に溶出する。  
 生成物含有フラクションを合わせて、白色のスラリーになるまで真空で濃縮し、ヘプタンで希釈し(コレステロールはヘプタンに可溶である)、氷浴中で冷却する。白色の固体を濾過して取り、ヘプタンで洗浄し、真空下に置き、1.50g(35%)の純粋な生成物を得る。

## 【0381】

実施例8

実施例5のアミノアルコール(105.3mg, 0.258mmol)、DMAP(22mg, 0.180mmol)および実施例7のカルボン酸(135.6mg, 0.270mmol)を、小さいバイアルに秤量する。ジクロロメタン(2.5ml)を加え、次にEDC塩酸塩(67.1mg, 0.350mmol)を加える。反応混合物を室温で一夜攪拌する。粗製の反応混合物をF15 24Gカラムを用いるIntelliFlash 280 (AnaLogix)のフラッシュクロマトグラフィーによって精製する：0~3CV, 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ; 3~25CV, 100:0 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH ~95:5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOHの直線的濃度勾配。生成物は未だ不純である。残渣を、再度SF15 24Gカラムを用いるIntelliFlash 280 (AnaLogix)のフラッシュクロマトグラフィーによって精製する：0~3CV, 100% ヘプタン；3~30CV, 100:0 ヘプタン：酢酸エチル~65:35 ヘプタン：酢酸エチルの直線的濃度勾配。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、真空で濃縮し、38mg(13%)の純粋な生成物を透明な液体として得る。

## 【0382】

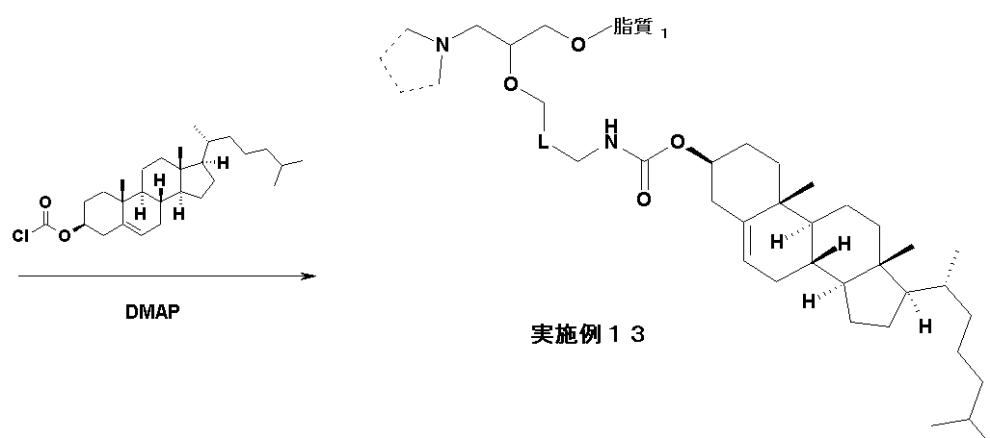
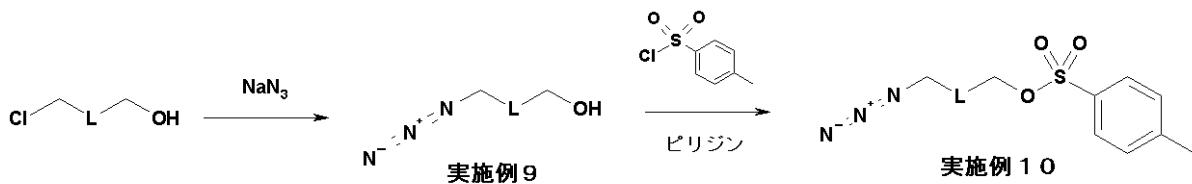
下記の化合物(その構造を下に示す)は、経路Bの方法によって製造され得る：E0036およびE0047。

## 【0383】

経路Cはまた、本発明の化合物を合成するのに用いられ得る一般的な方法を表す。

経路C

【化 3 3】



【 0 3 8 4 】

実施例 9

2-(2-クロロエトキシエタノール)(5.01g, 40.2mmol)を丸底フラスコに秤量し、DMF(100ml)に溶解する。溶液を攪拌し、NaN<sub>3</sub>(2.89g, 44.5mmol)を加え、温度を80まで上げる。溶液は濁った。反応物を一夜攪拌する。翌朝、反応物を熱源から取り、300mlの水で希釈する。この溶液を酢酸エチルで洗浄し、生成物を抽出する(4×100ml)。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮して液体を得る。<sup>1</sup>H-NMRによると、この液体は、44重量%のDMFを含んでいた。生成物(5.19g(98%))を、さらに精製することなく次の工程を行う。

【 0 3 8 5 】

実施例 1 0

実施例9のアジドアルコール(5.25g, 22.42mmol)およびピリジン(3ml, 37.1mmol)を、丸底フラスコ中で、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(45ml)に溶解し、氷浴中で攪拌する。冷えたら、塩化トシリ(4.70g, 24.66mmol)を一度に加える。反応物を冷蔵庫中に一夜置く。翌日、反応物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(50ml)で希釈し、1M HCl(2×40ml)で抽出し、ピリジンを除去する。有機相を塩水(40ml)で1回洗浄し、濃縮する。残渣を、SFC40-115Gカラムを用いるIntelliFlash 280 (AnaLogix)のフラッシュクロマトグラフィーによって精製する：0～20CV, 100:0 ヘプタン：酢酸エチル～50:50 ヘプタン：酢酸エチルの直線的濃度勾配。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、真空中で濃縮し、概算で純度90%、0.61g(10%)の生成物を得る。

【 0 3 8 6 】

実施例 1 1

実施例5のアミノアルコールおよび実施例10のトシレートを用いる以外、実施例6の

通りに製造する。

**【0387】**

実施例12

実施例11のアルキルアジド(334mg, 0.641mmol)を、小さいバイアル中で、T  
H F(4ml)および水(0.400ml)に溶解する。この溶液に、T H F中のトリメチルホス  
フィンの溶液(2.5ml, 2.500mmolのトリメチルホスフィン)を加え、反応物を一夜攪  
拌する。T L Cによると、翌朝までに反応が完了した。溶媒を蒸発させ、残渣を10mlの  
M e O Hに溶解する。溶液を、M e O Hで予め平衡化したS C X(10g)カラムに負荷し  
、50mlのM e O Hで洗浄し、4×10mlのM e O H中7M N H<sub>3</sub>で溶出する。2番目  
、3番目および4番目のフラクションに生成物が溶出する；これらのフラクションをブー  
ルし、濃縮する。T L Cによると(および臭いによると)、トリメチルホスフィンが未だ存  
在しているため、残渣を50mlのE t O A cに溶かし、3×15mlのN a H C O<sub>3</sub>で僅かに  
塩基性にした水で洗浄する。有機相をN a<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>で乾燥させ、濃縮して無色の液体を得  
る：232mg(73%)。

10

**【0388】**

実施例13

実施例12のアミン(232mg, 0.469mmol)を、丸底フラスコ中で、C H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub>(  
5ml)に溶解する。この溶液に、コレステロール クロロホルメート(316mg, 0.703  
mmol)およびD M A P(86mg, 0.703mmol)を加える。溶液を室温で一夜攪拌する。粗  
製の反応混合物を、直接、SF15 24Gカラムを用いるIntelliFlash 280 (AnaLogix)のフ  
ラッショクロマトグラフィーによって精製する：0～5 C V, 100% C H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub>；5  
～15 C V, 100:0 C H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub>:M e O H～95:5 C H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub>:M e O Hの直線的濃度勾配；15～30, 95:5 C H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub>:M e O H。生成物を含むフラ  
クションをT L Cによって同定し、合わせて、濃縮し、薄黄色の油状物を得る：339mg  
(80%)。

20

**【0389】**

下記の化合物(その構造を下に示す)は、経路Cの方法によって製造され得る：E0054；E  
0097；E0099；E0103；E0148；E0169；E0175；およびE0176。

20

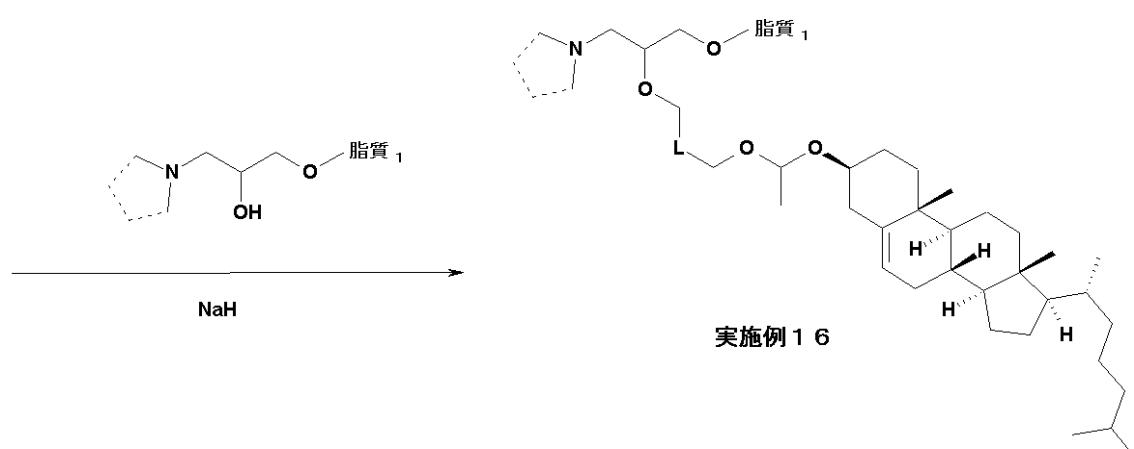
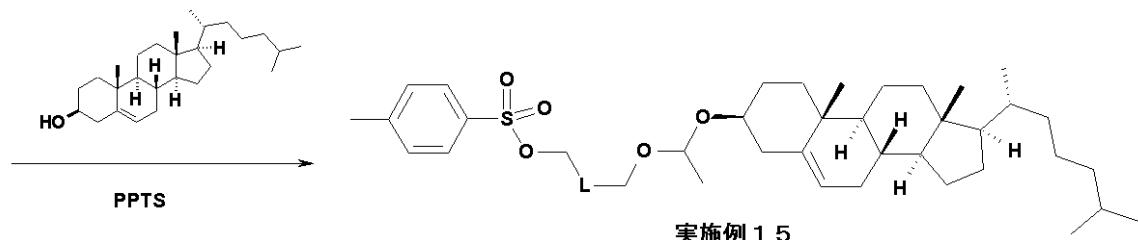
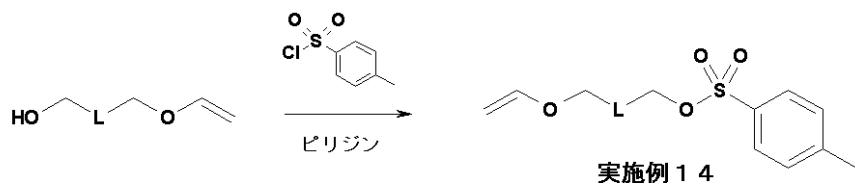
**【0390】**

経路Dはまた、本発明の化合物を合成するのに用いられ得る一般的な方法を表す。

30

経路D

## 【化34】



## 【0391】

実施例 14

$\text{C}_\text{H}_2\text{Cl}_2$  中のジエチレングリコール ビニルエーテル(3.96 g, 30 mmol)の溶液に、0℃で、ピリジン(4.85 ml)を、次に塩化トシリ(6.86 g, 36 mmol)を加える。0℃で10分後、反応物を室温まで温め、一夜攪拌する。反応物を、 $\text{NaHCO}_3$ 飽和水溶液と酢酸エチルの層間で抽出する。有機抽出物を合わせて、乾燥させ、濃縮する。残渣を30% 酢酸エチル/70% ヘプタンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製する：5.45 g(63%)。

## 【0392】

実施例 15

$\text{C}_\text{H}_2\text{Cl}_2$  中の実施例 14 のビニルエーテル(1.0 g, 3.49 mmol)の溶液に、室温で、コレステロール(0.675 g, 1.746 mmol)を、次に PPTS(0.878 g, 3.49 mmol)を加える。反応物を室温で5時間攪拌する。TLCによると、生成物は、コレステロールの非常に近くに溶出し、僅かにUV活性である。反応物を、 $\text{NaHCO}_3$ 飽和水溶液と酢酸エチルの層間で抽出する。有機抽出物を合わせて、乾燥させ、濃縮する。粗製の残渣を、30% 酢酸エチル/70% ヘプタンで、フラッシュクロマトグラフィーによって精製する：700 mg(60%)。

## 【0393】

実施例 16

実施例 5 のアミノアルコールおよび実施例 15 のトシレートを用いる以外、実施例 6 の通りに製造する。

## 【0394】

下記の化合物(その構造を下に示す)は、経路 D の方法によって製造され得る：E0058。

10

20

30

40

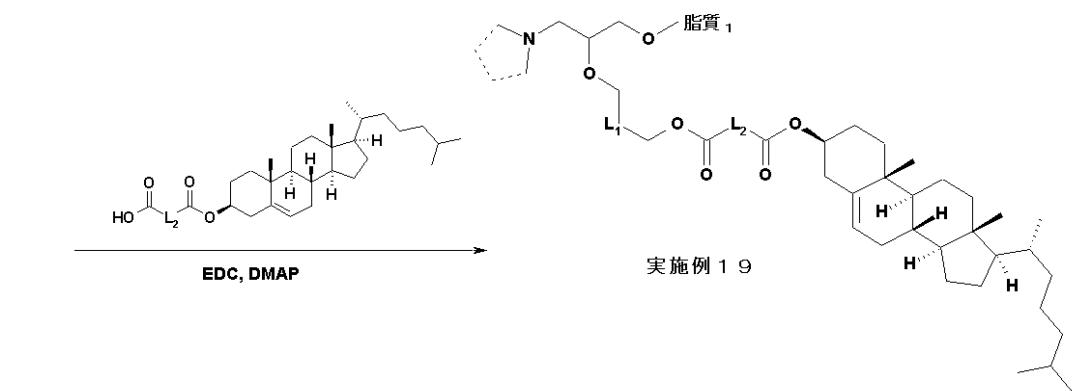
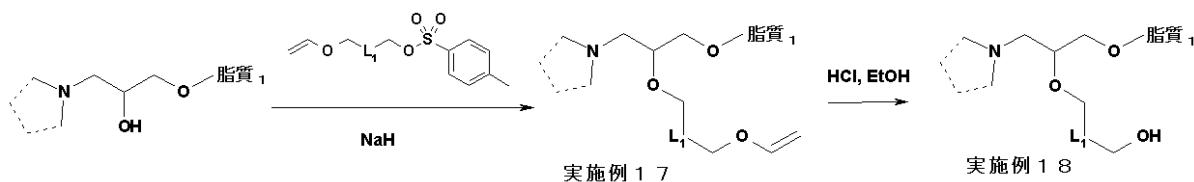
50

[ 0 3 9 5 ]

経路 E はまた、本発明の化合物を合成するのに用いられる一般的な方法を表す。

經路 E

【化 3 5】



10

20

[ 0 3 9 6 ]

寒施例 1 7

実施例 5 のアミノアルコールおよび実施例 14 のトシレートを用いる以外、実施例 6 の通りに製造する。

[ 0 3 9 7 ]

寒施例 1 8

水性 H C 1 の 1 N 溶液(0.38 ml, 0.38 mmol)を、4 mlの1:1 エタノール/T H F 中の実施例 17 のビニルエーテル(100 mg, 0.19 mmol)の溶液に、室温で滴下する。1時間後、反応物を、NaHCO<sub>3</sub> 飽和水溶液と酢酸エチルの層間で抽出する。有機抽出物を合わせて、乾燥させ、濃縮して、油状物を得る。これをさらに精製することなく次の工程に用いる；85 mg(90%)。

30

【 0 3 9 8 】

寒施例 1 9

実施例18のアミノアルコールおよびカルボン酸としてコレステロールヘミスクシネートを用いる以外、実施例8の通りに製造する。

[ 0 3 9 9 ]

下記の化合物(その構造を下に示す)は、経路 E の方法によって製造され得る : E0060 ; E0104 ; E0129 ; E0130 ; E0143 ; E0150 ; E0151 ; E0152 ; E0161 ; E0162 ; E0163 ; E0164 ; E0165 ; E0177 ; E0178 ; およびE0179.

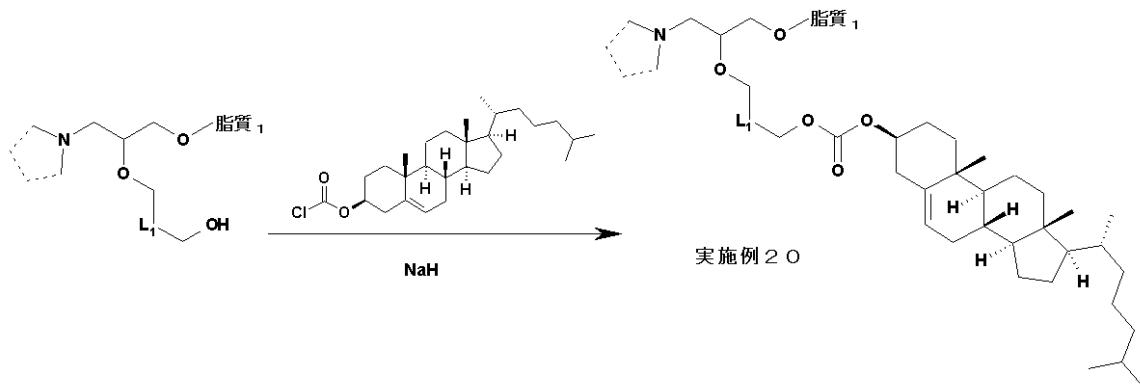
40

[ 0 4 0 0 ]

経路 E はまた、本発明の化合物を合成するのに用いられる一般的な方法を表す。

經路 F

## 【化36】



10

## 【0401】

実施例20

トルエン(12ml)中の実施例18のアミノアルコール(600mg, 1.21mmol)の溶液に、室温で、60% NaH(97mg, 2.42mmol)を加える(反応物は黄色となった)。10分後、コレステロール クロロホルメート(815mg, 1.815mmol)を加える。反応物を80まで加熱し(反応物は橙色となった)、一夜攪拌する。反応混合物を冷却し、塩水と酢酸エチルの層間で抽出する。有機抽出物を合わせて、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥させ、油状物となるまで濃縮する。粗製の油状物を、5% MeOH / 95%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ で、フラッシュクロマトグラフィーによって精製する: 720mg(66%)。

20

## 【0402】

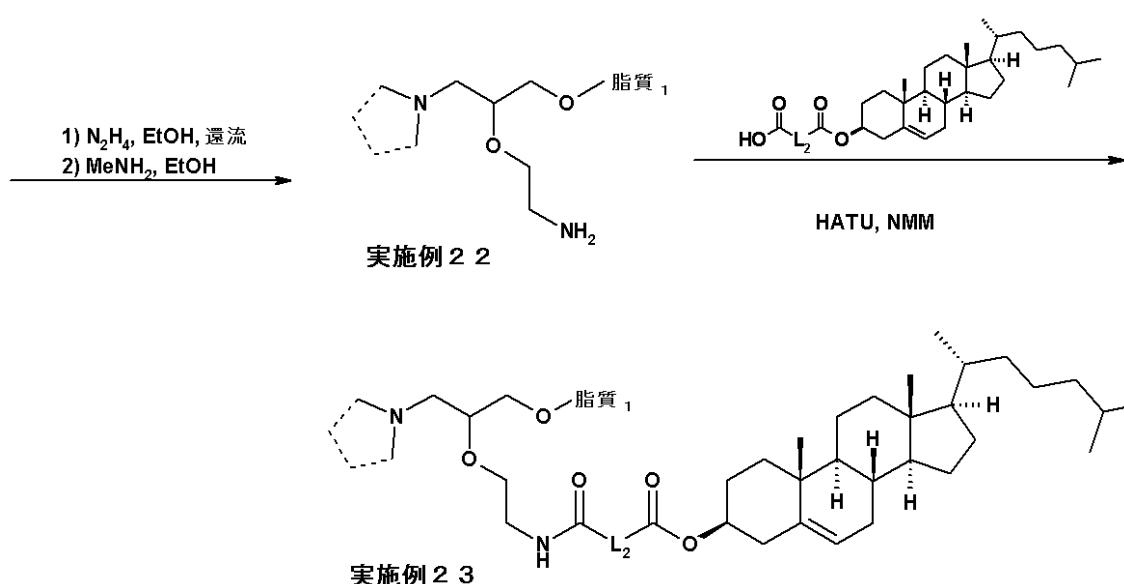
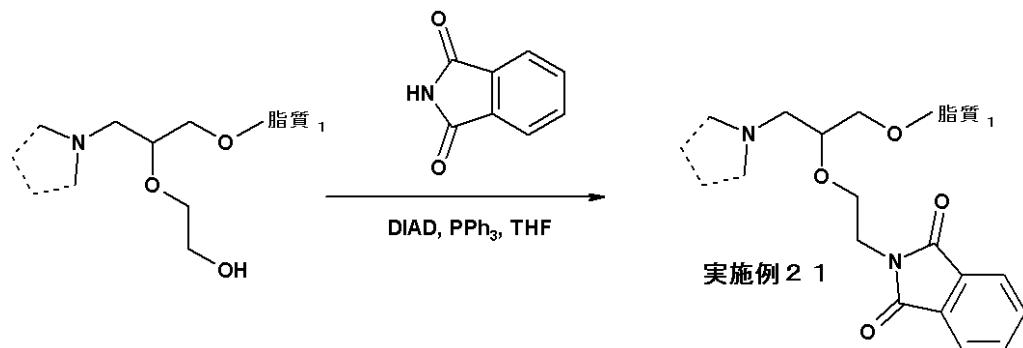
下記の化合物(その構造を下に示す)は、経路Fの方法によって製造され得る:E0056; E0122; E0123; E0138; およびE0139。

## 【0403】

経路Gはまた、本発明の化合物を合成するのに用いられ得る一般的な方法を表す。

経路G

## 【化37】



## 【0404】

実施例2-1

T H F (10ml)中の実施例5のアミノアルコールの溶液(12.4mmol)およびT H F (10ml)中のD I A Dの溶液(3ml)を、T H F (50ml)中のP Ph<sub>3</sub>(2.5g)およびフタルイミド(2.5g)の溶液に同時に加える。得られた混合物を室温で一夜攪拌する。反応物を乾固するまで濃縮し、次の工程に直接用いる。

30

## 【0405】

実施例2-2

実施例2-1の物質をエタノール(25ml)中で攪拌し、T H F 中のメチルアミンの溶液を加える。反応物を室温で16時間攪拌し、乾固するまで濃縮する。粗製の物質をシリカのクロマトグラフィーによって精製する。

30

## 【0406】

実施例2-3

実施例2-2のアミン(0.22mmol)を、コレステロール ヘミスクシネート(0.25mmol)、H A T U (0.26mmol)と共に、D M F (5ml)中で攪拌する。N - メチルモルホリン(0.55mmol)を加え、反応物を室温で一夜攪拌する。得られた溶液を真空下で濃縮し、E t O A c で希釈する。得られた有機層を、水で、次いで塩水で洗浄し、濃縮して黄色の液体を得る。得られた残渣を中性アルミナで精製し、薄黄色の液体を得る。

40

## 【0407】

下記の化合物は、経路Gの方法によって製造され得る：E0098；E0100；E0101；E0105；E0106；およびE0108。

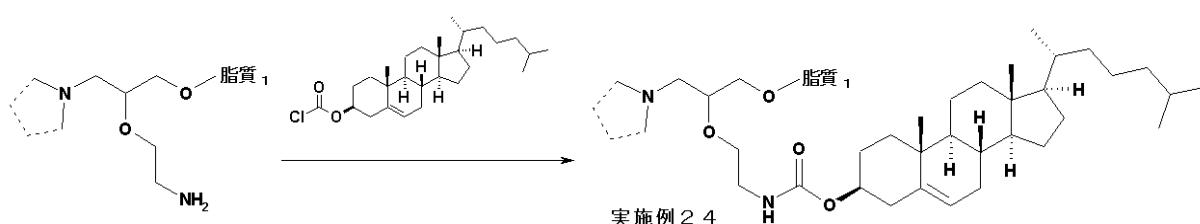
## 【0408】

経路Hはまた、本発明の化合物を合成するのに用いられ得る一般的な方法を表す。

50

経路 H

## 【化38】



## 【0409】

## 実施例 24

10

D C M (10 ml) 中の実施例 22 のアミン (3.55 mmol) の溶液に、D I E A (5.7 mmol) およびコレステロール クロロホルムート (6.0 mmol) を加える。得られた反応物を室温で一夜攪拌する。反応物を E t O A c (50 ml) で希釈し、水で、次いで塩水で洗浄する。得られた有機層を濃縮して残渣を得て、シリカのクロマトグラフィーによって精製し、薄黄色の液体を得る。

## 【0410】

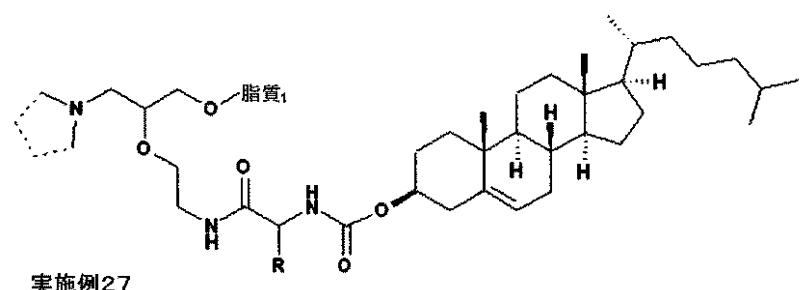
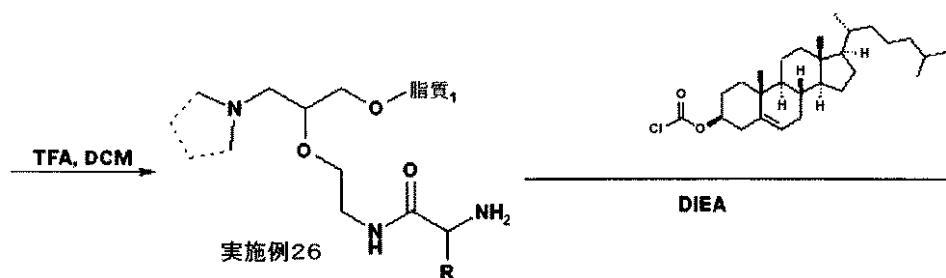
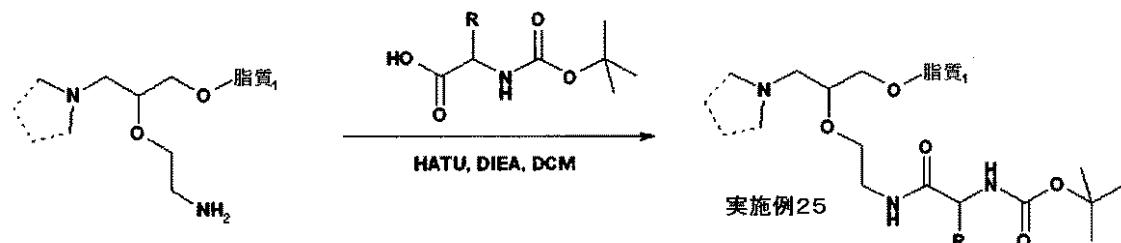
E0102は、経路 H の方法を用いて製造され得る。

## 【0411】

経路 I はまた、本発明の化合物を合成するのに用いられ得る一般的な方法を表す。

経路 I

## 【化39】



## 【0412】

## 実施例 25

30

D C M (25 ml) 中の実施例 22 のアミン (0.33 mmol) の溶液に、B O C - グリシン (0.36 mmol)、H A T U (0.36 mmol) および D I E A (0.66 mmol) を加える。得られた混合物を室温で一夜攪拌する。得られた反応混合物を飽和水性 N H<sub>4</sub> C l で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮し、粗製の固体を得る。これをさらに精製することなく用いる

40

50

。

## 【0413】

実施例26

前述の工程で得られた物質を DCM(15ml) 中で攪拌し、TFA(5ml) を加える。得られた溶液を室温で一夜攪拌する。得られた混合物を乾固するまで濃縮し、1.5N HCl(20ml) を加える。溶液を EtOAc で洗浄し、固体の NaHCO<sub>3</sub> で pH を > 7 まで減少させる。得られた混合物を DCM で抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮して粗製の固体を得る。これをさらに精製することなく用いる。

## 【0414】

実施例27

前述の工程で得られた物質を DCM(20ml) 中で攪拌し、DIPEA(0.53mmol) を加える。この溶液に、コレステロール クロロホルメート(0.53mmol) を加え、反応物を室温で一夜攪拌する。反応物を EtOAc(50ml) で希釈し、得られた溶液を、1.5N HCl、10% 水性 NaHCO<sub>3</sub> で、そして塩水で洗浄する。得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮して固体を得る。

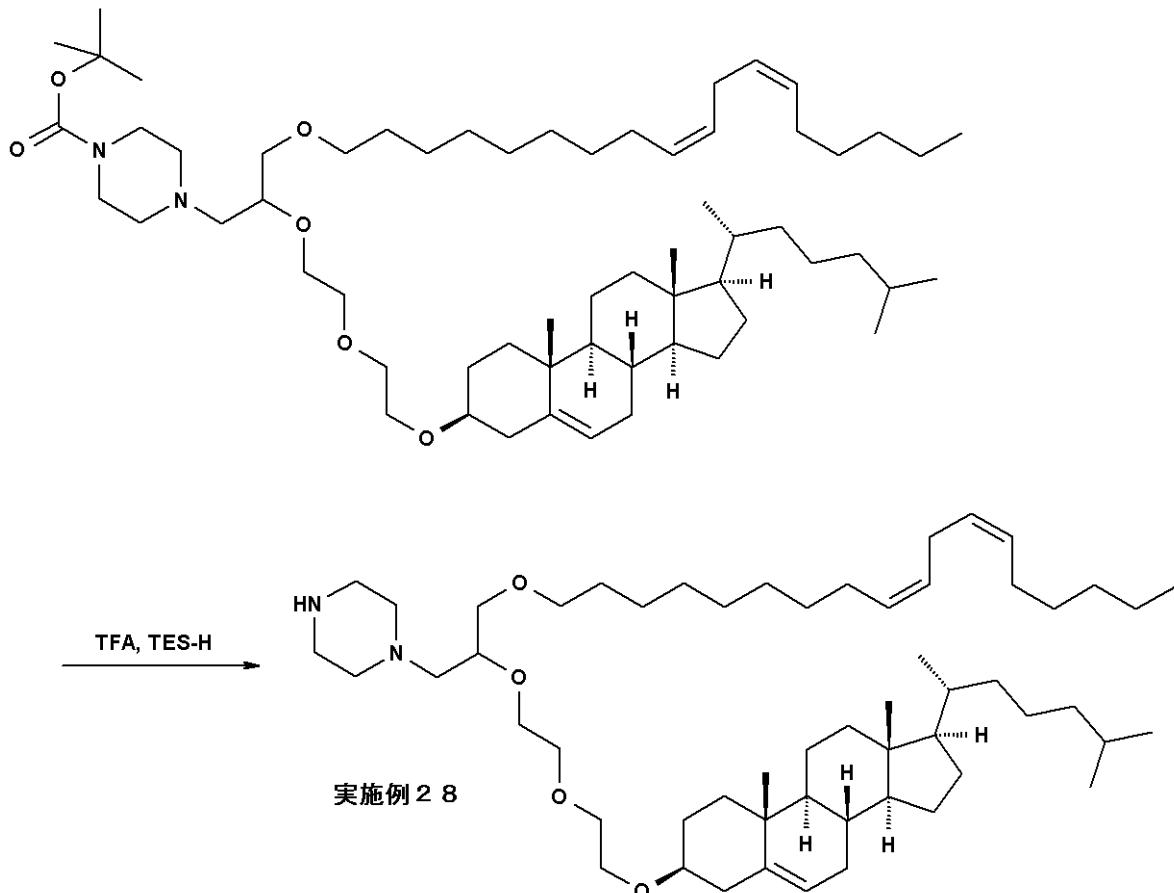
## 【0415】

E0110およびE0111は、経路Iの方法を用いて製造され得る。

## 【0416】

実施例28～32はまた、本発明の化合物を合成するのに用いられ得る経路を表す。

## 【化40】



## 【0417】

実施例28

経路Aの方法を用いて製造したBOC保護カチオン性脂質(150mg)を、トリエチルシラン(0.5ml)と共に攪拌し、TFA(10ml)を一度に加える。2時間後、反応物を乾固するまで濃縮する。得られた残渣を、シリカ上で、DCM中0～15% MeOHで精製し、濃縮してガラス状油状物を得る。

10

20

30

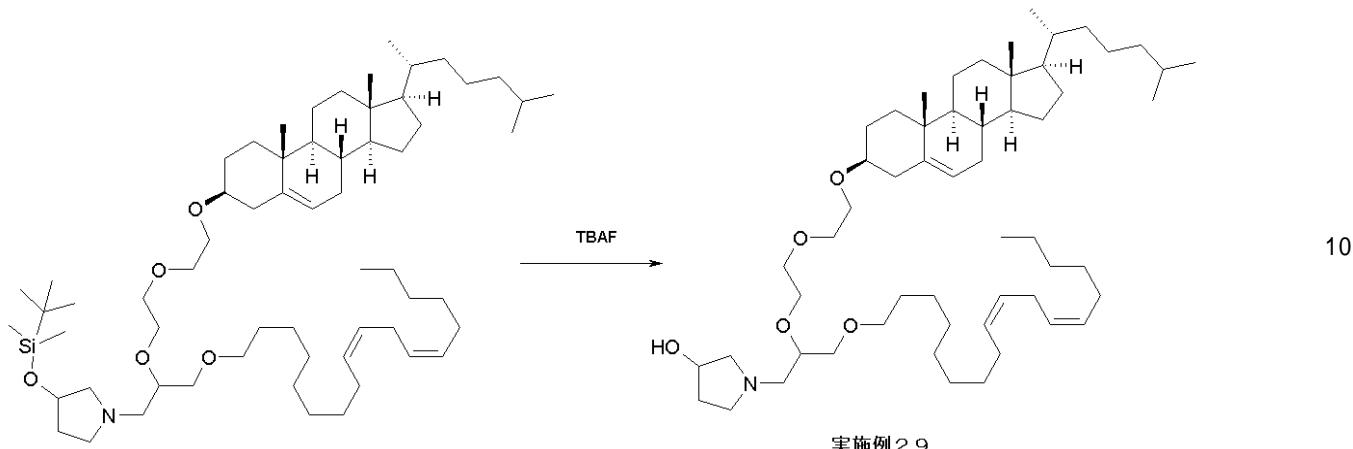
40

50

E0012は、この方法を用いて合成され得る。

【 0 4 1 8 】

【化 4 1】



[ 0 4 1 9 ]

实施例 2 9

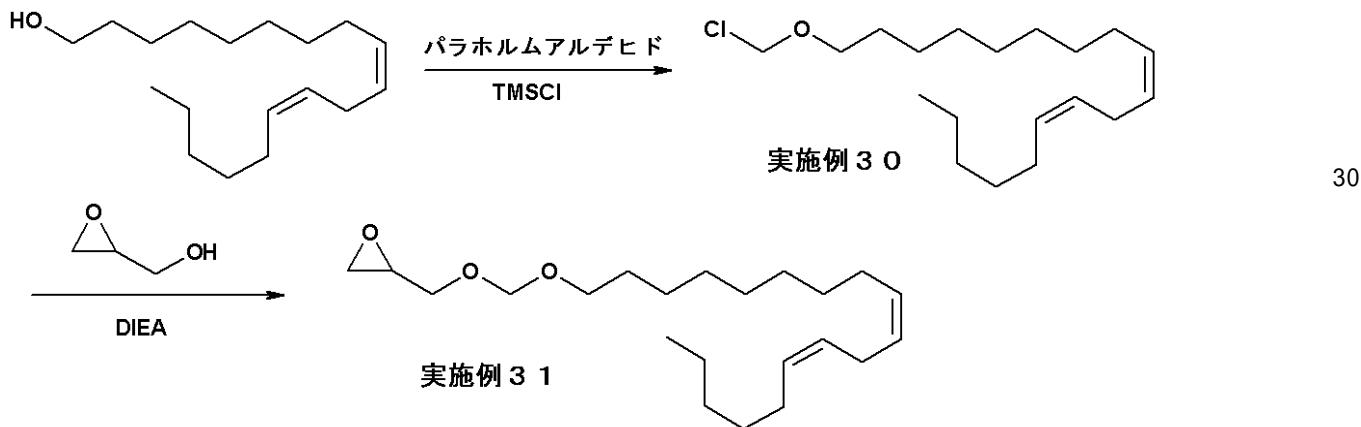
経路 A の方法を用いて製造した T B D M S 保護カチオン性脂質(135 mg, 0.138 mmol)を T H F (2 ml) 中で攪拌し、T B A F 溶液(0.28 ml, T H F 中 1.0 M, 0.28 mmol)を加える。反応物を室温で一夜攪拌する。反応物を、直接、シリカ上で、D C M 中 0 ~ 20% MeOH で精製し、透明な油状物を得る。

E0045は、この方法を用いて合成され得る。

[ 0 4 2 0 ]

実施例 3-0 ~ 3-1 はまた、本発明の化合物を合成するのに用いられる経路を表す。

【化 4 2】



【 0 4 2 1 】

実施例 3 0

T M S C 1 (9.4 ml) 中のパラホルムアルデヒド(536 mg)の懸濁液に、攪拌しながら、15分かけて、リノレイルアルコール(5.0 g)を滴下する。反応物が透明になったら、それを減圧下で濃縮し、すぐに次の工程に用いる。

【 0 4 2 2 】

実施例 3 1

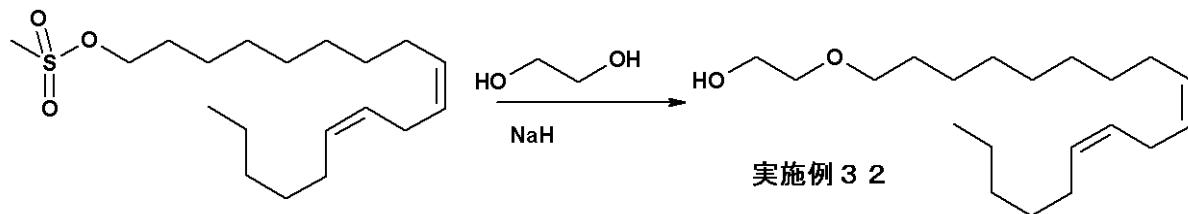
T H F ( 5 0 m l ) 中のグリシドール ( 1 . 5 m l ) の溶液に、攪拌しながら、実施例 3 0 の化合物 ( 5 . 8 g ) 、 D I E A ( 9 . 5 m l ) 、ヨウ化 テトラブチルアンモニウム ( 6 . 8 g ) を加える。反応物を室温で 5 時間攪拌する。固体を濾過によって除き、ジエチルエーテルで洗浄する。濾液を集め、水で、そして塩水で洗浄する。得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮し、粗製の油状物を得る。粗製の物質を、予め 3 % トリエチルアミン含有移動相で処理したシリカのクロマトグラフィーによって精製する。物質をヘプタ

ン中の E t O A c を用いて溶出し、1.65 g の純粹な生成物を透明な液体として得る。

〔 0 4 2 3 〕

E0115、E0116、E0117およびE0160を合成するための出発物質を、実施例30および実施例31の工程を用いて合成し得る。

【化 4 3】



10

[ 0 4 2 4 ]

実施例 3 2

エチレングリコール(0.30g)を、THF(20ml)中で攪拌し、60wt%水素化ナトリウム(0.19g)を加える。得られた混合物を20分間攪拌する。リノレイルメシレート(1.64g)を加え、反応物を50℃で2時間加熱し、一夜還流する。反応物を室温まで冷却し、さらに24時間攪拌する。反応物に飽和水性塩化アンモニウムを加え、得られた混合物をDCMで抽出する。得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮し、粗製の油状物を得る。粗製の物質を、シリカで、ヘプタン中EtOAcを用いて精製し、640mgの望ましい生成物を得る。

20

[ 0 4 2 5 ]

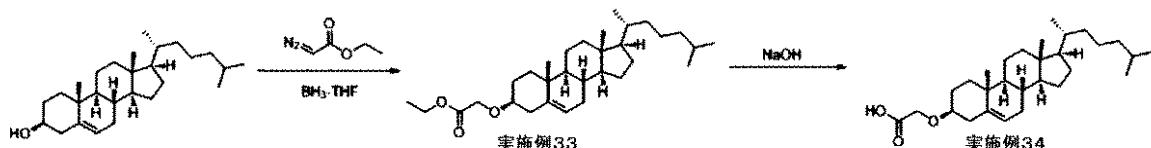
実施例30～32の方法は、リノレイル鎖および分子のコアの間にスペーサーを有する脂質(例えばE0055)の合成に用いられ得る。

[ 0 4 2 6 ]

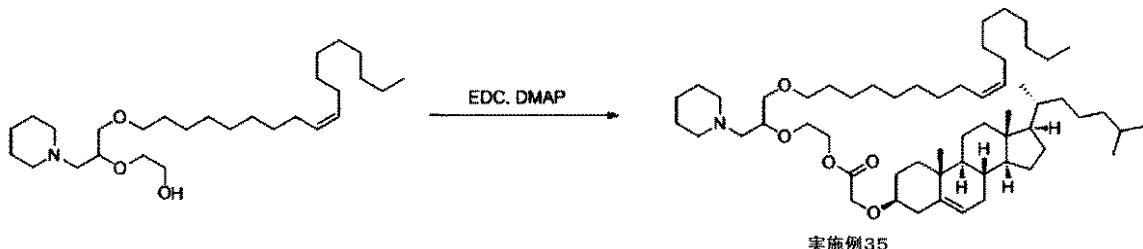
経路Jはまた、本発明の化合物を合成するのに用いられ得る一般的な方法を表す。

経路 J

【化 4 4】



30



10

[ 0 4 3 7 1 ]

塞施例 3 3

D C M ( 3 0 m l ) 中のコレステロール ( 1 0 g , 2 6 mmol ) およびボラン - T H F ( 5 滴 ) の溶液に、エチルジアゾアセテート ( 3 . 5 m l , 5 2 mmol ) を加える。5 分間攪拌した後、反応混合物を濃縮し、シリカのクロマトグラフィーによって、ヘキサン / E t O A c で精製し、9 g の望ましい生成物を得る。

【0428】

塞施例 3-4

E t O H (110 ml) 中の実施例 33 の化合物 (9 g, 19 mmol) の溶液に、N a O H (3 g, 76 mmol) を加える。得られた混合物を 70 °C で 3 時間加熱する。反応物を室温まで

50

冷却し、濃縮する。残渣を水に溶かし、2N HClで酸性にして、DCM(2×)で抽出する。得られた有機層を合わせ、濃縮し、8gの望ましい生成物を得る。

#### 【0429】

##### 実施例35

EDC(1.8g, 9.8mmol)およびDMAP(80mg, 0.66mmol)を、DCM(5ml)中の実施例34の化合物(2.2g, 4.9mmol)の溶液に加える。反応物を10分間攪拌し、アルコール(1.5g)を加え、反応物を室温で一夜攪拌する。反応物をDCMで希釈し、水で洗浄する。得られた有機層を濃縮して残渣を得る。これを、シリカ上で、クロロホルム/MeOHで精製し、望ましい生成物を油状物として得る。

#### 【0430】

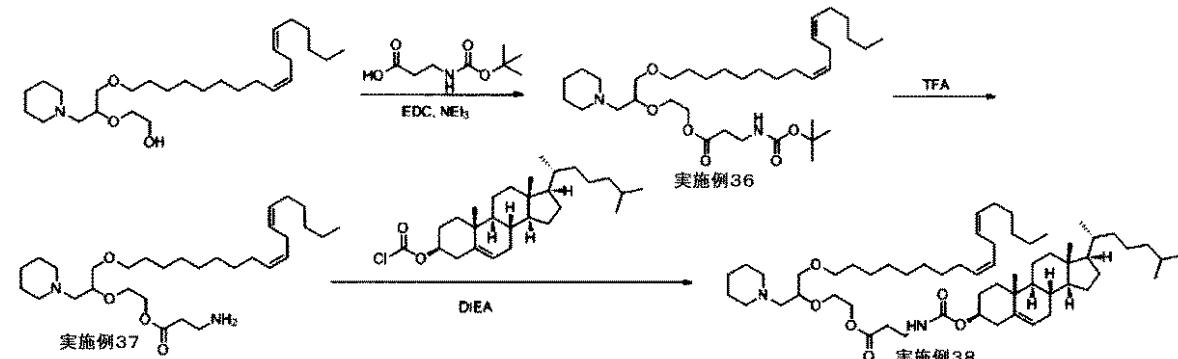
下記の化合物は、経路Jの方法によって製造され得る：E0125；E0128；E0131；E0140；およびE0144。

#### 【0431】

経路Kはまた、本発明の化合物を合成するのに用いられ得る一般的な方法を表す。

#### 経路K

##### 【化45】



#### 【0432】

##### 実施例36

DCM(6ml)中のN-Boc-L-アラニン(1.25g, 6.61mmol)の溶液に、EDC(2.5g, 13mmol)、HOBT(0.3g, 2mmol)およびTEA(2ml, 13mmol)を加える。得られた混合物を30分間攪拌する。DCM(4ml)中のアミノアルコール(2g)の溶液を加え、反応物を10時間攪拌する。反応物をDCMで希釈し、飽和重炭酸ナトリウムで、そして塩水で洗浄する。得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮して油状物を得る。これを、シリカ上で、MeOH/DCMで精製する。生成物を濃縮して2.65gの油状物を得る。

#### 【0433】

##### 実施例37

実施例36の化合物(2.6g)を、DCM(10ml)中で攪拌し、TFA(10ml)を加える。3時間後、反応物を乾固するまで濃縮し、それを直接次の工程に用いる。

#### 【0434】

##### 実施例38

DCM(20ml)中の実施例37の化合物(2g)の溶液に、DIPEA(2.7ml, 15.7mmol)およびDMAP(80mg, 0.6mmol)を、続いてコレステロールクロロホルメート(2.1g, 4.7mmol)を加える。反応物を室温で3時間攪拌する。反応物をDCMで希釈し、水で洗浄する。得られた有機層を濃縮し、シリカ上で、MeOH/クロロホルムで精製し、2.1gの望ましい生成物を得る。

#### 【0435】

下記の化合物は、経路Kの方法によって製造され得る：E0133；E0134；E0135；E0136；E0137；E0141；E0132；E0142；E0145；E0166；およびE0168。

#### 【0436】

10

20

30

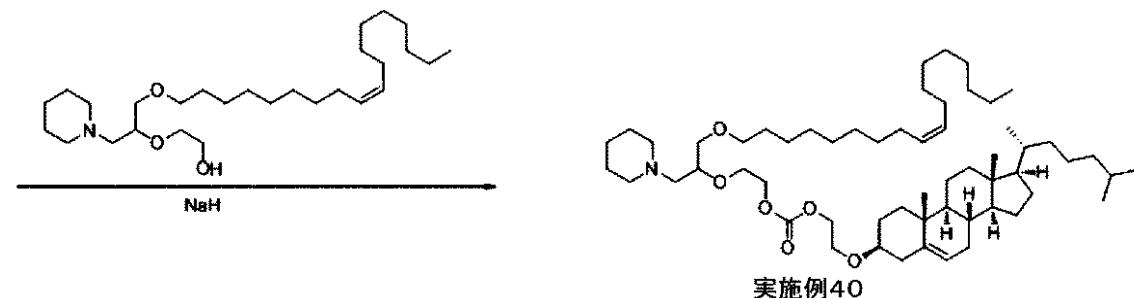
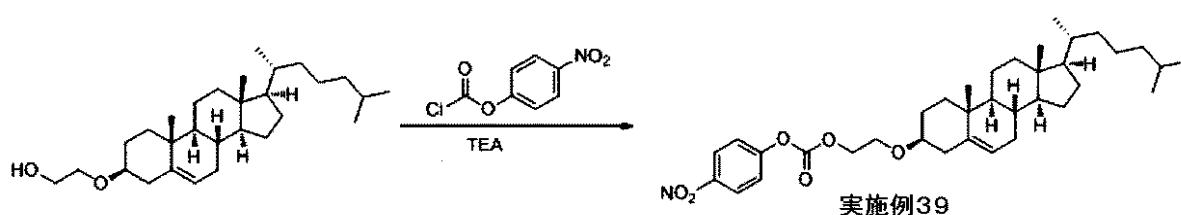
40

50

経路 L はまた、本発明の化合物を合成するのに用いられ得る一般的な方法を表す。

### 経路 L

#### 【化 4 6】



#### 【0 4 3 7】

##### 実施例 3 9

D C M (1 0 ml) 中のアルコール (2 . 5 g , 5 . 8 mmol) の溶液に、p - ニトロクロロホルムートおよび T E A を加える。反応物を室温で一夜攪拌する。反応物を D C M で希釈し、水で洗浄する。得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮して油状物を得る。これを、シリカ上で、E t O A c / ヘキサンで精製し、望ましい生成物を得る。

#### 【0 4 3 8】

##### 実施例 4 0

アルコール (1 . 3 g , 2 . 9 mmol) を、M e P h (1 0 ml) 中で攪拌する。N a H (0 . 4 6 g , 1 1 . 4 mmol) を加え、反応物を室温で 3 0 分間攪拌する。実施例 3 9 の化合物 (1 . 7 g , 1 . 2 mmol) を加え、反応物を室温で 1 6 時間攪拌する。反応物を冰浴中で冷却する、水で反応停止させる。得られた混合物を E t O A c で抽出する。有機層を合わせて、塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮して粗製の油状物を得る。この物質を、シリカ上で、E t O A c / ヘキサンで精製し、1 g の望ましい生成物を得る。

#### 【0 4 3 9】

E0146は、経路 L の方法を用いて合成され得る。

#### 【0 4 4 0】

##### 実施例 4 1 、 4 2 および 4 3

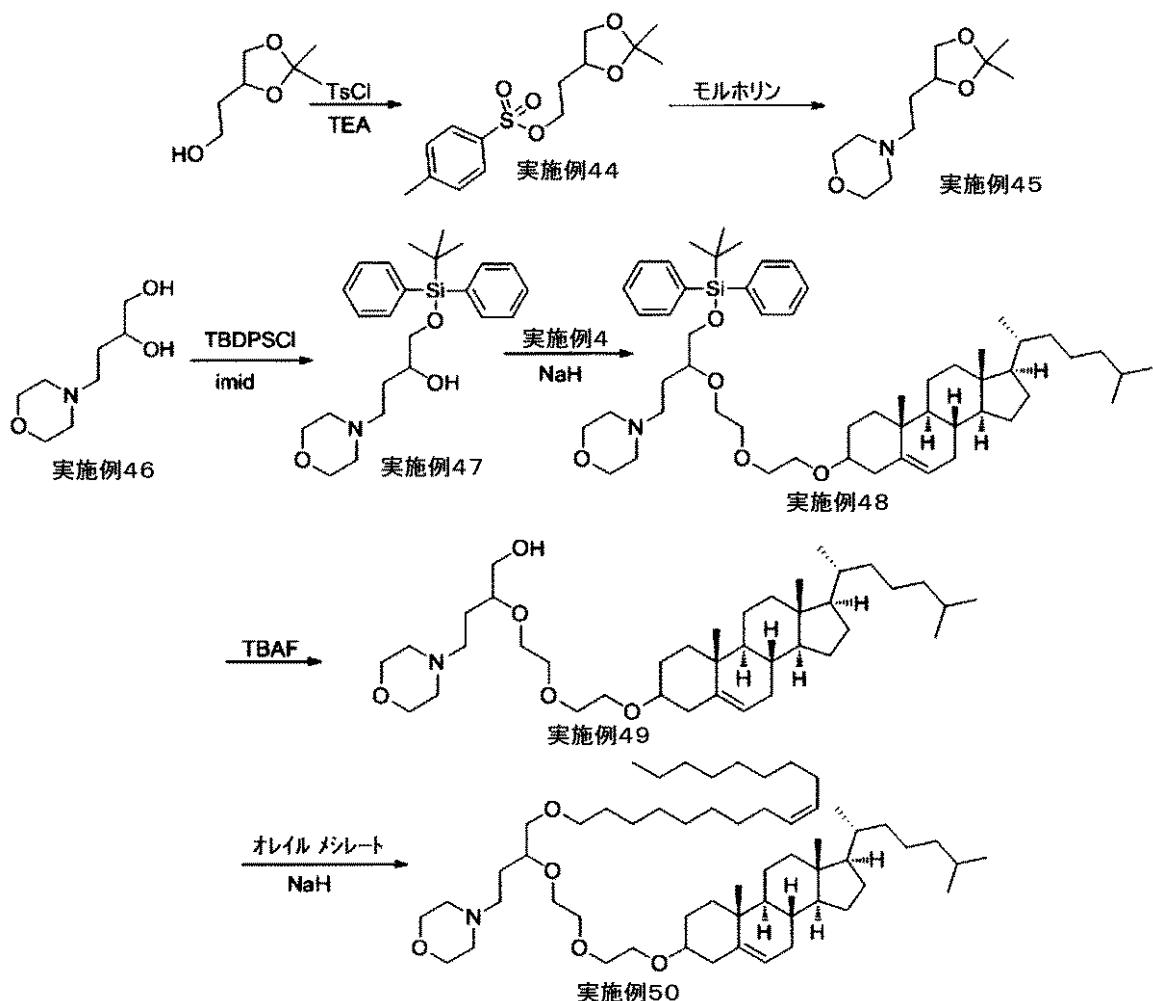
(記載なし)

#### 【0 4 4 1】

経路 X はまた、本発明の化合物を合成するのに用いられ得る一般的な方法を表す。

### 経路 X

## 【化47】



## 【0442】

実施例44

ジクロロメタン(2.5ml)中の2-(2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-イル)エタノール(800mg, 5.47mmol)、トリエチルアミン(0.915ml, 6.57mmol)およびN,N-ジメチルアミノピリジン(134mg, 1.10mmol)の溶液に、室温で、塩化トシリル(1.10g, 5.75mmol)を加える。反応物を室温で3時間攪拌する。反応物を飽和水性NaHCO<sub>3</sub>で希釈し、酢酸エチルで抽出する。有機相を乾燥させ、濃縮し、粗生成物を、シリカのフラッシュクロマトグラフィーによって、酢酸エチル/ヘプタンの濃度勾配で精製する：1.24g, 75%。

## 【0443】

実施例45

実施例44のトシレート(1.03g, 3.43mmol)およびモルホリン(2.97ml, 34.3mmol)をフラスコ中で合わせる。フラスコを密封し、60°で一夜加熱する。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、飽和水性NaHCO<sub>3</sub>で洗浄する。有機相を乾燥させ、濃縮し、粗生成物を、シリカのフラッシュクロマトグラフィーによって、ジクロロメタン/メタノールの濃度勾配で精製する：670mg, 91%。

## 【0444】

実施例46

実施例45のアミン(530mg, 2.46mmol)を、ジオキサン(1.5ml)に0°で溶解する。冷却した溶液に、濃塩酸(水性, 7.39mmol)を加える。反応物を室温で一夜攪拌する。過剰量の固体のK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を加えて酸を中和する。固体を濾過によって除き、アセトンで洗浄する。濾液を濃縮し、粗生成物を、シリカのフラッシュクロマトグラフィーによって、ジクロロメタン/メタノールの濃度勾配で精製する：320mg, 74%。

30

40

50

## 【0445】

実施例47

実施例46の前述の工程で得られたジオール(320mg, 1.8mmol)を、DCM(12ml)中で、イミダゾール(249mg, 3.65mmol)と共に攪拌する。この溶液に、TBDPS*C*1(0.475ml, 1.8mmol)を加える。得られた混合物を室温で一夜攪拌する。反応物をDCMで希釈し、飽和重炭酸ナトリウムで洗浄(ished)する。得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、油状物になるまで濃縮し、シリカ上で、DCM/MeOHで精製し、650mgの望ましい生成物を得る。

## 【0446】

実施例48

トルエン(15ml)中の前述の工程で得られた物質(640mg, 1.5mmol)に、水素化ナトリウム(124mg, 油中60wt%, 3.1mmol)を加える。20分後、コレステロール反応材(1.17g, 1.86mmol)を加え、反応物を一夜還流する。室温まで冷却した後、反応物を塩水で反応停止させ、酢酸エチルで抽出する。得られた有機層を乾燥させ、濃縮し、シリカ上で、EtOAc/ヘプタンで精製し、560mgの望ましい生成物を得る。

## 【0447】

実施例49

THF(6ml)中の前述の工程で得られた物質(660mg, 0.76mmol)に、THF中1MのTBAF溶液(1.5ml, 1.5mmol)を加える。反応物を2時間攪拌し、EtOAcで希釈する。得られた有機層を塩水で洗浄(ished)し、乾燥させ、濃縮して粗生成物を得る。これを、シリカで、MeOH/DCMで精製する。

## 【0448】

実施例50

実施例49のアミノアルコール(280mg, 0.443mmol)をトルエン(4ml)に室温で溶解し、60%NaH(44mg, 1.1mmol)を加える。20分後、オレイルトシレート(実施例10に記載された方法と類似の方法でオレイルアルコールから製造される)(187mg, 0.443mmol)を加える。反応物を3時間還流する。反応物を室温まで冷却し、酢酸エチルで希釈し、塩水で洗浄(ished)する。有機相を乾燥させ、濃縮し、粗生成物を、シリカのフラッショクロマトグラフィーによって、酢酸エチル/ヘプタンの濃度勾配で精製する：183mg, 47%。

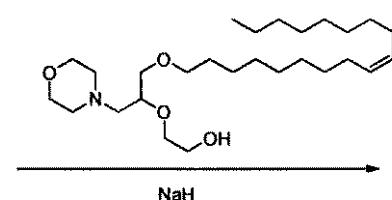
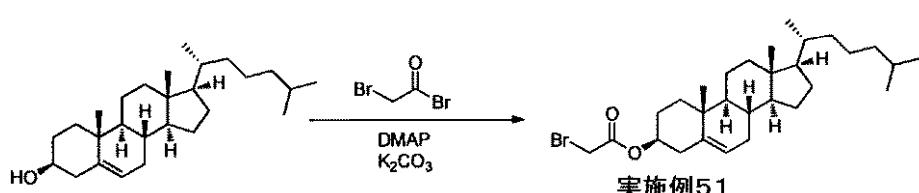
## 【0449】

E0180は、経路Xの方法によって製造され得る。

## 【0450】

経路Yはまた、本発明の化合物を合成するのに用いられ得る一般的な方法を表す。

## 経路Y

【化48】

実施例52

10

20

30

40

50

**【0451】****実施例51**

D C M(20ml)中のコレステロール(700mg, 1.8mmol)の溶液に、炭酸カリウム(750g, 5.4mmol)およびD M A P(22mg, 0.18mmol)を加え、臭化プロモアセチル(0.19ml, 2.2mmol)を滴下する。氷浴中で90分間攪拌した後、反応物を濾過し、濃縮し、シリカ上で、D C M /ヘプタンで精製し、850mgの望ましい生成物を得る。

**【0452】****実施例52**

M e P h(20ml)中のアミノアルコール(1.08g, 2.37mmol)の溶液に、N a H(190mg, 油中60wt%, 4.74mmol)を加える。混合物を10分間還流し、プロモアセチルコレステロール(1.20g, 2.37mmol)を加える。反応物を還流しながら2時間攪拌し、室温まで冷却する。反応物に水およびE t O A cおよび塩水を加える。得られた有機層を集め、乾燥させ、濃縮して粗製の物質を得る。カラムをD C M中1%酢酸で平衡化した後に、これを、シリカ上で、E t O A c /ヘプタンで精製する。精製後、生成物含有フラクションを合わせて、飽和水性重炭酸ナトリウムで洗浄した後、濃縮し、700mgの望ましい生成物を得る。

**【0453】**

E0167は、経路Yの方法を用いて製造され得る。

**【0454】****実施例53****ステルス脂質の構造および合成**

ステルス脂質S001～S026の構造を表3に示す。下記の実施例54～67は、ステルス脂質の合成を説明している。

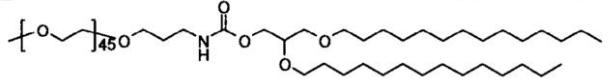
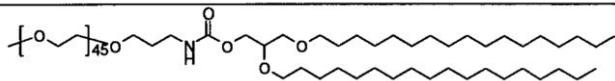
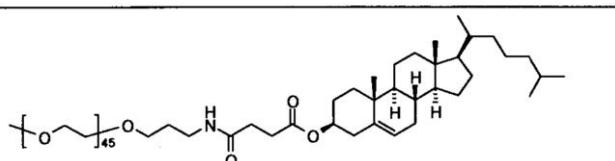
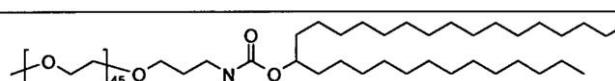
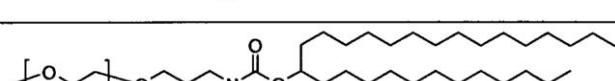
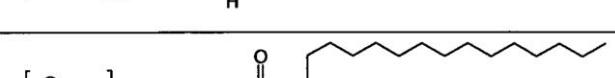
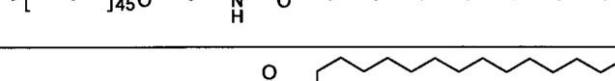
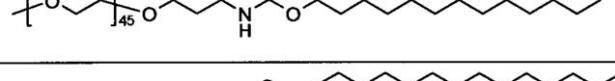
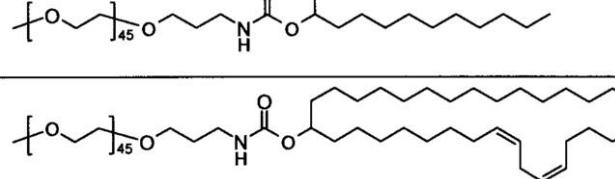
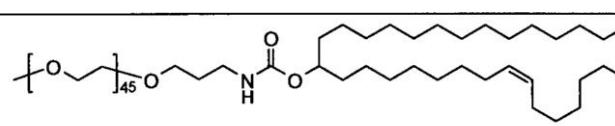
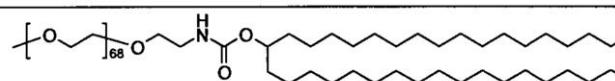
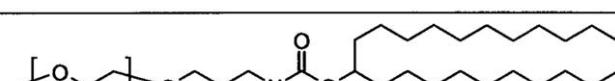
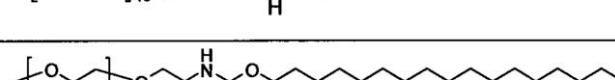
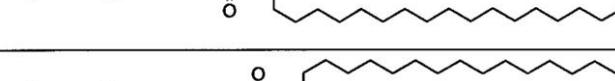
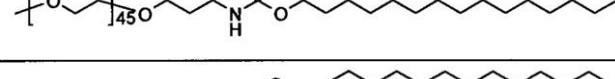
**【0455】****表3：ステルス脂質の構造**

【表9】

ステルス 脂質	脂質
S001	
S002	
S003	
S004	
S005	
S006	
S007	
S008	
S009	

【0 4 5 6】

【表10】

S010	
S011	
S012	
S013	
S014	
S015	
S016	
S017	
S018	
S019	
S020	
S021	
S022	
S023	
S024	

## 【表11】

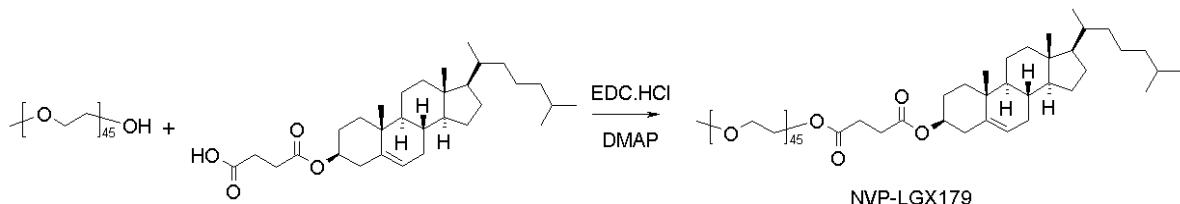
S025	
S026	

## 【0457】

10

実施例54:S001

## 【化49】



## 【0458】

20

コレステロール ヘミスクシネート(608 mg, 1.25 mmol)およびN-(3-ジメチルアミノプロビル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩(240 mg, 1.25 mmol, EDC·HCl)を、無水ジクロロメタン(4 ml)に溶解し、N,N-ジメチルアミノピリジン(305 mg, 2.50 mmol)およびポリ(エチレングリコール)メチルエーテル(500 mg, 0.250 mmol,  $M_n = \text{約} 2,000 \text{ g/mol}$ , Sigma Aldrich)を加える。反応混合物を室温で攪拌する。72時間後、全反応混合物を10 gのBond Elut SCXカラム(Varian; 予め 50 : 50 ジクロロメタン : メタノールで平衡化)に負荷し、50 : 50 ジクロロメタン : メタノールで溶出する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮する。さらに、粗生成物を、シリカのフラッシュクロマトグラフィーによって、ジクロロメタン / メタノール濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮して白色の固体を得る：304 mg, 48.6%。

30

## 【0459】

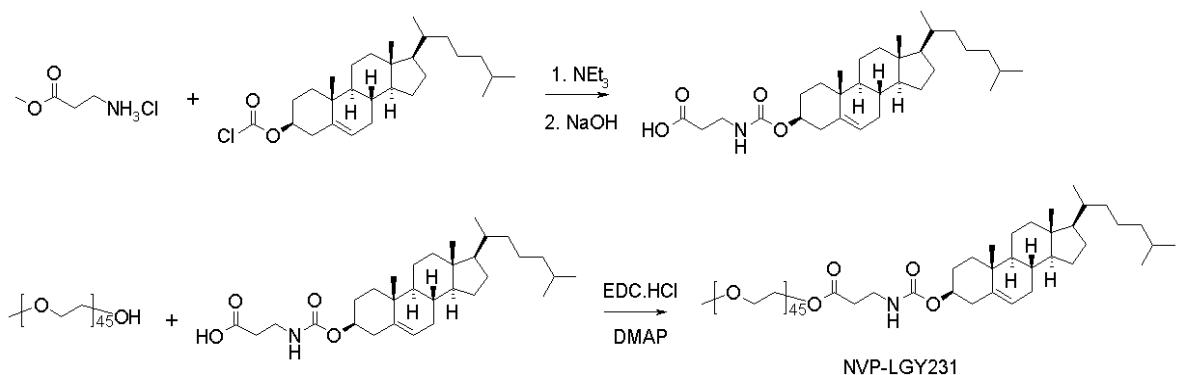
テトラヒドロフランでのサイズ排除クロマトグラフィーによって、単一の狭いピークが示される。<sup>1</sup>H-NMRスペクトルで観察されたピークおよび積分値は、予測された生成物と一致している。

## 【0460】

40

実施例55:S002

## 【化50】



## 【0461】

50

工程1

- アラニン塩酸塩(1.00 g, 7.16 mmol)、コレステロール クロロホルムート(3

50

.06 g, 6.81 mmol)およびトリエチルアミン(2.0 ml, 14 mmol)を無水クロロホルム(25 ml)に溶解する。溶液を室温で一夜攪拌する。翌朝、溶媒を蒸発させ、残渣を酢酸エチル(100 ml)に溶解し、1M HClで、塩水で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させる。生成物を濃縮して白色の固体を得る。これをさらに精製することなく次の工程に用いる：3.31 g, 90.0%。

#### 【0462】

##### 工程2

前述の工程で得られた生成物(メチルエステル)(298 mg, 0.578 mmol)をテトラヒドロフラン(2 ml)に溶解し、1M NaOH(2.0 ml, 2.0 mmol)を加え、二相の溶液を得る。溶液を室温で攪拌すると、エマルジョンが形成する。2時間後、反応混合物を10 mlの水で希釈し、1M HClで酸性にする。生成物を酢酸エチル(100 ml)で抽出する。有機相を塩水で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、濃縮して白色の固体を得る。<sup>1</sup>H-NMRにより、少量のメチルエステル出発物質(約5 mol%)の存在が示されたが、さらに精製することなく次の工程に用いるのに十分な程純粋であると考えられる：252 mg, 83.0%。

#### 【0463】

##### 工程3

N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩(96 mg, 0.50 mmol)、前述の工程で得られた生成物(カルボン酸)(252 mg, 0.477 mmol)、N,N-ジメチルアミノピリジン(122 mg, 1.00 mmol)およびポリ(エチレングリコール)メチルエーテル(200 mg, 0.100 mmol, M<sub>n</sub> = 約2,000 g/mol, Sigma Aldrich)を無水ジクロロメタン(5.0 ml)に溶解し、室温で攪拌する。24時間後、反応混合物を、10 gのBond Elut SCXカラム(Varian；予め50:50 ジクロロメタン:メタノールで平衡化)に負荷し、50:50 ジクロロメタン:メタノールで溶出する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮する。粗生成物を、さらに、シリカのフラッシュクロマトグラフィーによって、ジクロロメタン/メタノール濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮し、白色の固体を得る：151 mg, 60.3%。

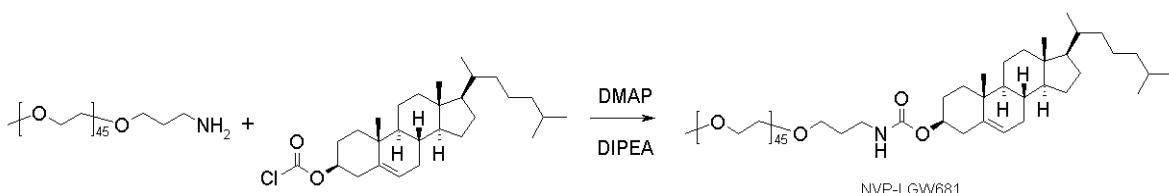
#### 【0464】

テトラヒドロフランでのサイズ排除クロマトグラフィーによって、単一の狭いピークが示される。<sup>1</sup>H-NMRスペクトルで観察されたピークおよび積分値は、予測された生成物と一致している。

#### 【0465】

##### 実施例56 : S003

#### 【化51】



#### 【0466】

PEG-NH<sub>2</sub>(500 mg, 0.250 mmol, M<sub>n</sub> = 約2000 g/mol, "Sunbright M EPA 20H", NOF Corp.)、コレステロール クロロホルメート(449 mg, 1.00 mmol)、N,N-ジメチルアミノピリジン(122 mg, 1.00 mmol)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(148 mg, 1.15 mmol)を、5 mlの1:1 トルエン:ジクロロメタンに溶解し、室温で攪拌する。72時間後、N,N-ジメチルエチレンジアミン(0.2 ml)を加えて、過剰のコレステロール クロロホルメートを消失させる。30分攪拌した後、反応混合物を、10 gのBond Elut SCXカラム(Varian；予め50:50 ジクロロメタン:メタノールで平衡化)に負荷し、50:50 ジクロロメタン:メタノールで溶出する。生

10

20

30

40

50

成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮する。粗生成物を、さらにシリカのフラッシュクロマトグラフィーによって、ジクロロメタン/メタノールの濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮し、白色の固体を得る：376mg, 57.8%。

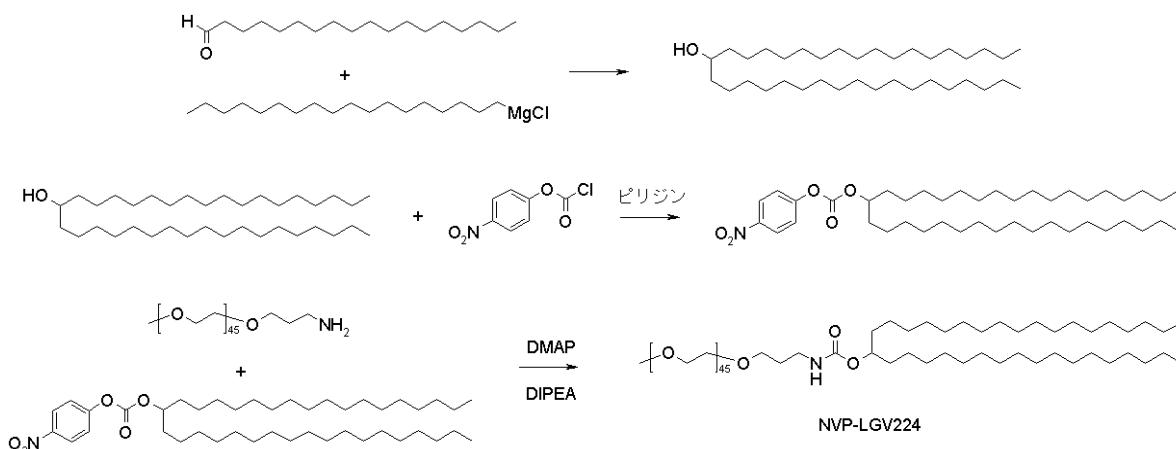
#### 【0467】

テトラヒドロフランでのサイズ排除クロマトグラフィーによって、単一の狭いピークが示される。<sup>1</sup>H-NMRスペクトルで観察されたピークおよび積分値は、予測された生成物と一致している。

#### 【0468】

##### 実施例57：S004

##### 【化52】



#### 【0469】

##### 工程1

ヒートガンで乾燥した丸底フラスコに、窒素下で、オクタデシルアルデヒド(500mg, 1.86mmol)およびテトラヒドロフラン(10ml)を加える。テトラヒドロフラン中0.5Mの塩化オクタデシルマグネシウムの溶液(7.5ml, 3.8mmol)をシリンドリを介して加え、反応物を40まで温める。添加が完了したら、反応物を1時間攪拌する。反応物を熱源から除き、1mlの酢酸で反応停止させる。室温に至った後、溶液をジクロロメタンで希釈し、水で、0.1M NaOHで、1M HClで、そして塩水で洗浄する。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過する。粗製の物質を熱ヘプタンから2回結晶化し、白色の粉末として得る：195mg, 20.0%。

#### 【0470】

##### 工程2

前述の工程で得られた生成物(アルコール)(194mg, 0.371mmol)を、ジクロロメタン(4ml)に40で溶解し、ピリジン(100μl, 1.24mmol)および4-ニトロフェニルクロロホルメート(93mg, 0.46mmol)を加える。反応物を40で一夜攪拌し、室温まで冷却する。粗生成物を、シリカのフラッシュクロマトグラフィーによって、ヘプタン/ジクロロメタンの濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮し、白色の固体を得る：219mg, 86.0%。

#### 【0471】

##### 工程3

前述の工程で得られた生成物(4-ニトロフェニルカーボネート)を、トルエン(5ml)に室温で溶解する。PEG-NH<sub>2</sub>(800mg, 0.400mmol, M<sub>n</sub> = 約2000g/mol, "Sunbright MEPA 20H", NOF Corp.)、N,N-ジメチルアミノピリジン(50mg, 0.409mmol)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(200μl, 1.145mmol)を加え、溶液を室温で攪拌する。72時間後、反応物を、10gのBond Elut SCXカラム(Variant; 予め50:50ジクロロメタン:メタノールで平衡化)に負荷し、50:50ジクロロメタン:メタノールで溶出する。生成物含有フラクションを、TLCによって同定

し、合わせて、濃縮する。粗生成物を、さらに、シリカのフラッシュクロマトグラフィーによって、ジクロロメタン / メタノールの濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションを、TLC によって同定し、合わせて、濃縮する。4 - ニトロフェノール不純物を除去するため、生成物をジクロロメタン(10ml)に溶解し、Silicycle(2.0g, カタログ番号R52030B)を加える。溶液を室温で1時間激しく攪拌し、濾過し、樹脂を除き、濃縮して薄黄色の固体を得る：806mg, 97.0%。

#### 【0472】

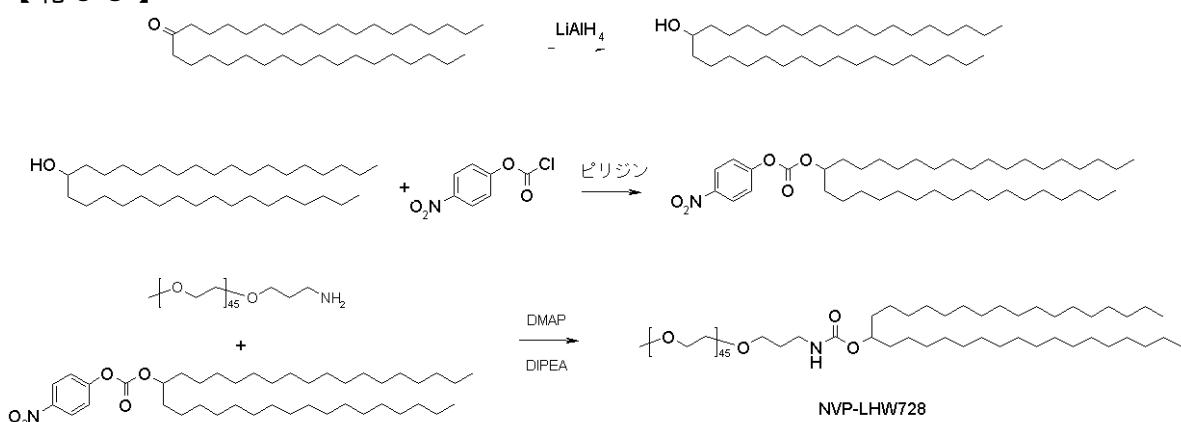
N,N -ジメチルホルムアミドでのサイズ排除クロマトグラフィーによって、単一の狭いピークが示される。<sup>1</sup>H-NMRスペクトルで観察されたピークおよび積分値は、予測された生成物と一致している。

10

#### 【0473】

#### 実施例 58 : S005

#### 【化53】



20

#### 【0474】

#### 工程 1

丸底フラスコ中で、ペントトリアコンタン - 18 - オン(750mg, 1.48mmol)を、穏やかに攪拌しながら、テトラヒドロフラン(40ml)に溶解する。ケトン含有溶液を室温まで冷却した後、ジエチルエーテル中4Mの水素化リチウムアルミニウム溶液(0.74ml, 2.96mmol)を滴下する。反応物を室温で30分間攪拌する。固体の硫酸ナトリウム水和物を加え、スラリーを20分間攪拌し、過剰の水素化リチウムアルミニウムで反応停止させる。固体を濾過して除き、濾液をヘプタンで希釈し、1M HClで洗浄する。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮し、白色の固体を得る。粗生成物は、さらに精製することなく次の工程に用いるのに十分な程純粋である：650mg, 86.0%。

30

#### 【0475】

#### 工程 2

ジクロロメタン(10ml)中の前述の工程で得られた生成物(アルコール)(200mg, 0.393mmol)の溶液およびピリジン(78mg, 0.98mmol)に、室温で、4 - ニトロフェニルクロロホルメート(99mg, 0.49mmol)を加える。反応混合物を35℃で4時間加熱する。反応混合物をヘプタンで希釈し、1M HClで、そして飽和重炭酸ナトリウムで抽出する。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮し、シリカのフラッシュクロマトグラフィーによって、ヘプタン : 酢酸エチルの濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮し、白色の固体を得る：200mg, 76%。

40

#### 【0476】

#### 工程 3

前述の工程で得られた生成物(4 - ニトロフェニル カーボネート)(260mg, 0.386mmol)を、トルエン(4ml)に溶解し、続いてPEG2k(620mg, 0.310mmol, M<sub>n</sub> = 約2000g/mol, "Sunbright MEPA 20H", NOF Corp.)、N,N -ジメチルアミノピリジン(40mg, 0.33mmol)およびN,N -ジイソプロピルエチルアミン(200μl, 1.15mmol)を加える。溶液を室温で一夜攪拌する。反応混合物を10gのBond Elut SC

50

Xカラム(Varian; 予め 50 : 50 ジクロロメタン : メタノールで平衡化)に負荷し、50 : 50 ジクロロメタン : メタノールで溶出する。生成物含有フラクションを TLC によって同定し、合わせて、濃縮する。さらに、粗生成物を、シリカのフラッシュクロマトグラフィーによって、ジクロロメタン / メタノールの濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションを TLC によって同定し、合わせて、濃縮する。4 - ニトロフェノール不純物を除去するために、粗生成物を 1 : 1 ジクロロメタン : メタノールに溶解し、10 g の Bond Elut NH<sub>2</sub>カラム(Varian; 予め 50 : 50 ジクロロメタン : メタノールで平衡化)に通して溶出する。生成物含有フラクションを TLC によって同定し、合わせて、濃縮し、薄黄色の固体を得る: 631 mg, 78.0 %。

## 【0477】

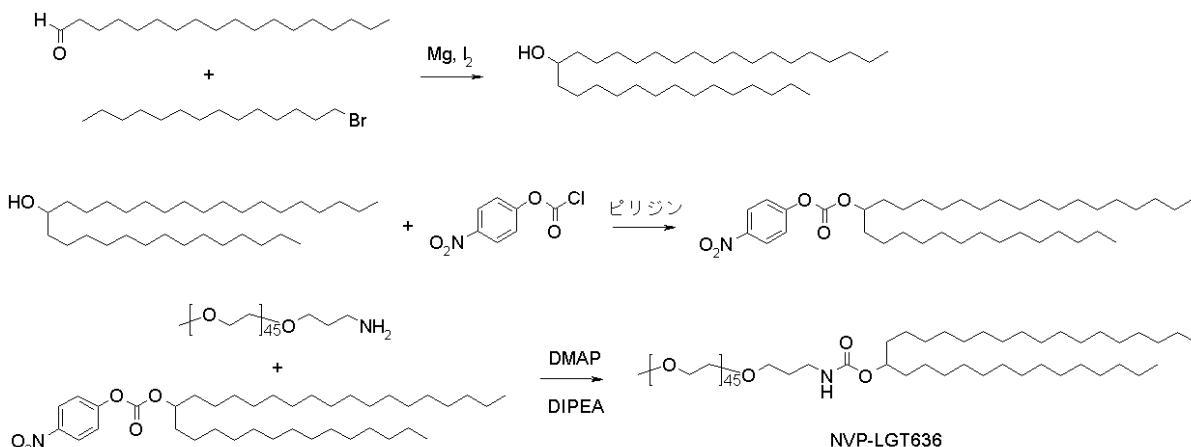
10

N,N -ジメチルホルムアミドでのサイズ排除クロマトグラフィーによって、単一の狭いピークが示される。<sup>1</sup>H-NMRスペクトルで観察されたピークおよび積分値は、予測された生成物と一致している。

## 【0478】

実施例 59: S007

## 【化54】



20

## 【0479】

30

工程 1

丸底フラスコに、マグネシウム金属(0.201 g, 8.27 mmol)および触媒量のヨウ素、続いてテトラヒドロフラン(30 ml)および1 - プロモテトラデカン(2.17 g, 7.82 mmol)を加える。混合物を2時間還流し、室温まで冷却する。テトラヒドロフラン(5 ml)中のオクタデシルアルデヒド(0.600 g, 2.24 mmol)の溶液を加え、反応混合物を室温で30分間攪拌する。反応物を酢酸エチルで希釈し、1 M HClで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮する。粗生成物を、さらに、シリカのフラッシュクロマトグラフィーによって、ヘプタン / 酢酸エチルの濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションを TLC によって同定し、合わせて、濃縮する: 310 mg, 29.7 %。

## 【0480】

40

工程 2

前述の工程で得られた生成物(アルコール)(310 mg, 0.664 mmol)をジクロロメタン(15 ml)で溶解する。ピリジン(0.134 ml, 1.66 mmol)を、続いて4 - ニトロフェニルクロロホルメート(167 mg, 0.830 mmol)を加える。反応物を室温で一夜攪拌する。反応物を酢酸エチルで希釈し、NaHCO<sub>3</sub>の飽和水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮する。粗生成物を、さらに、シリカのフラッシュクロマトグラフィーによって、ヘプタン / 酢酸エチルの濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションを TLC によって同定し、合わせて、濃縮する: 315 mg, 75.0 %。

## 【0481】

工程 3

トルエン(10 ml)中の前述の工程で得られた生成物(4 - ニトロフェニル カーボネット

50

(315 mg, 0.498 mmol)の溶液に、室温で、N,N-ジメチルアミノピリジン(48.7 mg, 0.399 mmol)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.174 ml, 0.997 mmol)を、続いてPEG-NH<sub>2</sub>(798 mg, 0.399 mmol, M<sub>n</sub>=約2000 g/mol, "Sunbright MEPA 20H", NOF Corp.)を加える。黄色の溶液を室温で一夜攪拌する。反応混合物を10 gのBond Elut SCXカラム(Varian; 予め50:50ジクロロメタン:メタノールで平衡化)に負荷し、50:50ジクロロメタン:メタノールで溶出する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮する。粗生成物を、さらにシリカのフラッショクロマトグラフィーによって、ジクロロメタン/メタノールの濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮する: 540 mg, 54.3%。

10

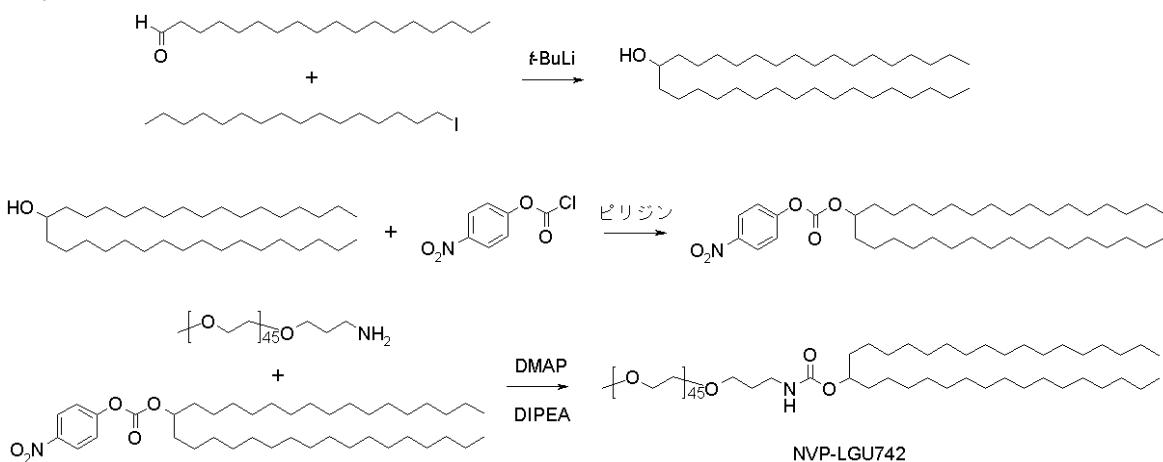
## 【0482】

<sup>1</sup>H-NMRスペクトルで観察されたピークおよび積分値は、予測された生成物と一致している。

## 【0483】

実施例60:S008

## 【化55】



20

## 【0484】

工程1

乾燥した丸底フラスコに、窒素下で、1-ヨードヘキサデカン(0.705 g, 2.00 mmol)およびジエチルエーテル(15 ml)を加える。溶液を-78まで冷却し(溶液は白色のスラリーとなる)、ヘプタン中1.7 Mのt-ブチルリチウムの溶液(2.59 ml, 4.40 mmol)を滴下する。20分間攪拌した後、反応混合物を室温まで温め、さらに2時間攪拌する。反応混合物に、ジエチルエーテル(3 ml)中のオクタデシルアルデヒド(0.268 g, 1.00 mmol)の溶液を滴下する(発熱)。反応物を氷冷した1 M HClで反応停止させ、ジクロロメタンで抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮する。粗生成物を、さらにシリカのフラッショクロマトグラフィーによって、ヘプタン/ジクロロメタンの濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮する: 150 mg, 30.3%。

30

## 【0485】

工程2

前述の工程で得られた生成物(アルコール)(200 mg, 0.404 mmol)を、ジクロロメタン(6 ml)に溶解する。ピリジン(0.082 ml, 1.01 mmol)を、次に4-ニトロフェニルクロロホルメート(102 mg, 0.505 mmol)を加える。反応物を室温で一夜攪拌する。反応物を、酢酸エチルで希釈し、NaHCO<sub>3</sub>の飽和水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮する。粗生成物を、さらにシリカのフラッショクロマトグラフィーによって、ヘプタン/酢酸エチルの濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮する: 220 mg, 82.0%。

40

## 【0486】

50

工程 3

トルエン(6ml)中の前述の工程で得られた生成物(4-ニトロフェニル カーボネート)(230mg, 0.348mmol)の溶液に、室温で、N,N-ジメチルアミノピリジン(42.6mg, 0.348mmol)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.152ml, 0.871mol)を、次にPEG-NH<sub>2</sub>(697mg, 0.348mmol, M<sub>n</sub>=約2000g/mol, "Sunbright MEPA 20H", NOF Corp.)を加える。黄色の溶液を室温で一夜攪拌する。反応混合物を10gのBond Elut SCXカラム(Varian; 予め50:50 ジクロロメタン:メタノールで平衡化)に負荷し、50:50 ジクロロメタン:メタノールで溶出する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮する。粗生成物を、さらに、シリカのフラッシュクロマトグラフィーによって、ジクロロメタン/メタノールの濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮する: 600mg, 68.3%。

10

## 【0487】

<sup>1</sup>H-NMRスペクトルで観察されたピークおよび積分値は、予測された生成物と一致している。

## 【0488】

S009は、S008について記載された方法と類似の方法で製造され得る。

## 【0489】

実施例 6 1 : S010およびS011

S010およびS011は、例えばPCT出願国際公開第2009/086558号にそれぞれ化合物IVaおよびIVcについて示された通りに製造され得る。これらの化合物は、国際公開第2009/086558号の実施例19に示された通りに合成され得る。

20

## 【0490】

実施例 6 2 : S012

S012は、S001について記載された方法と類似の方法で、ポリ(エチレングリコール)メチルエーテルの代わりにPEG-NH<sub>2</sub>("Sunbright MEPA 20H", NOF Corp.)を用いて製造され得る。

## 【0491】

実施例 6 3 : S006およびS013~S024

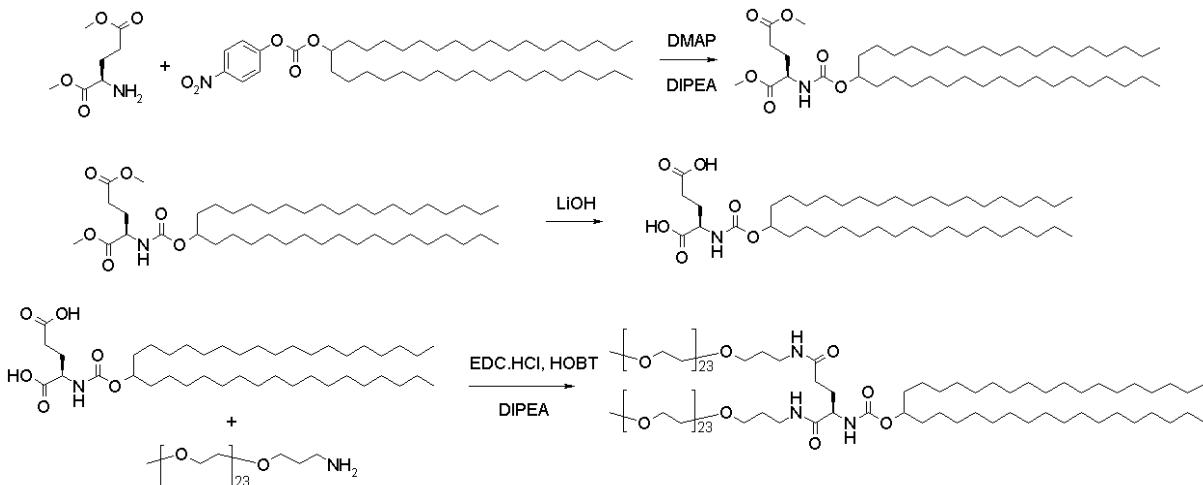
S006、S013、S014、S015、S016、S017、S018、S019、S020、S021、S022、S023およびS024は、S004について記載された方法と類似の方法で製造され得る。

30

## 【0492】

実施例 6 4 : S025

## 【化56】



40

## 【0493】

工程 1

本明細書に記載された化合物S004の合成の工程2の生成物(4-ニトロフェニル カーボ

50

ネート)(285mg, 0.414mmol)を、N,N-ジメチルホルムアミド(5ml)に懸濁し、次にD-グルタミン酸ジメチルエステル(145mg, 0.828mmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.145ml, 0.828mmol)およびN,N-ジメチルアミノピリジン(101mg, 0.828mmol)を加える。溶液を60で一夜加熱する。反応混合物を10gのBond Elut SCXカラム(Varian; 予め50:50ジクロロメタン:メタノールで平衡化)に負荷し、50:50ジクロロメタン:メタノールで溶出する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮する。粗生成物を、さらに、シリカのフラッシュクロマトグラフィーによって、酢酸エチル/ヘプタンの濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮し、白色の固体を得る: 131mg, 44%。

10

## 【0494】

工程2

前述の工程で得られた生成物(ジメチルエステル)(0.160g, 0.221mmol)をテトラヒドロフラン(5ml)に溶解し、水(5ml)中のLiOH(52.9mg, 2.21mmol)の溶液を加える。反応物を室温で72時間攪拌する。溶液をクロロホルムで希釈し、1N HCl(水性)で、そして塩水で洗浄する。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過する。濾液を濃縮し、白色の固体を得る: 130mg, 85%。

20

## 【0495】

工程3

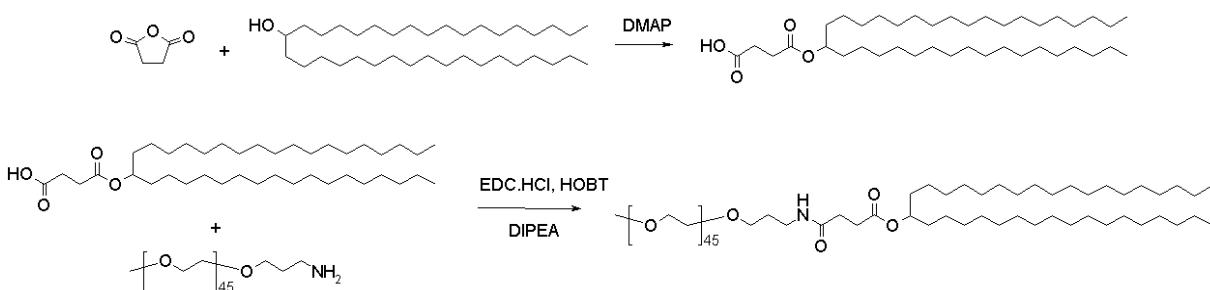
前述の工程で得られた生成物(二酸)(130mg, 0.187mmol)をジクロロメタン(9ml)およびヘプタン(1.5ml)に室温で懸濁する。N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩(107mg, 0.560mmol)を懸濁液に加え、次にヒドロキシベンゾトリニアゾール(86mg, 0.56mmol)を加える。30分後、PEG-NH<sub>2</sub>(411mg, 0.411mmol, Mn=約1000g/mol, "mPEG-amine, 1k", Creative PEGWorks)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(65μl, 0.374mmol)を加える。反応物を室温で一夜攪拌する。反応混合物を10gのBond Elut SCXカラム(Varian; 予め50:50ジクロロメタン:メタノールで平衡化)に負荷し、50:50ジクロロメタン:メタノールで溶出する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮する。粗生成物を、さらに、シリカのフラッシュクロマトグラフィーによって、ジクロロメタン/メタノールの濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮し、白色の固体を得る: 376mg, 57.8%。

30

## 【0496】

実施例65:S026

## 【化57】



40

## 【0497】

工程1

本明細書で記載された化合物S004の合成の工程1の生成物(アルコール)(200mg, 0.382mmol)、無水コハク酸(38mg, 0.38mmol)およびN,N-ジメチルアミノピリジン(12mg, 0.096mmol)をフラスコに秤量し、クロロホルム(3.5ml)に懸濁する。反応混合物を70で一夜攪拌する。反応混合物を、1gのBond Elut SCXカラム(Varian; 予めジクロロメタンで平衡化)に負荷し、ジクロロメタンで溶出する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮する。粗生成物を、さらに、シリカの

50

ラッショクロマトグラフィーによって、酢酸エチル / ヘプタンの濃度勾配で精製する。生成物含有フラクションを T L C によって同定し、合わせて、濃縮し、白色の固体を得る： 134 mg, 56%。

## 【0498】

工程 2

前述の工程で得られた生成物(カルボン酸)(75 mg, 0.12 mmol)、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩(35 mg, 0.18 mmol)およびヒドロキシベンゾトリアゾール(28 mg, 0.18 mmol)を無水クロロホルム(1 ml)に溶解し、室温で0.5時間攪拌する。次いでPEG-NH<sub>2</sub>(265 mg, 0.132 mmol, Mn = 約2000 g/mol, "Sunbright MEPA 20H", NOF Corp.)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(32 μl, 0.18 mmol)を加え、溶液を室温で一夜攪拌する。反応混合物を2 g のBond Elut SCXカラム(Varian; 予め 50 : 50 ジクロロメタン : メタノールで平衡化)に負荷し、ジクロロメタンで溶出する。生成物含有フラクションをTLCによって同定し、合わせて、濃縮し、白色の固体を得る： 240 mg, 76%。

## 【0499】

これらのステルス脂質の特性決定データは、下記の表4および5の通りである。

表4：ステルス脂質S001～S026の<sup>1</sup>H-NMR

## 【表12】

S001	0.68 (s, 3H), 0.78-1.63 (m, 33H), 1.76-1.91 (m, 3H), 1.91-2.07 (m, 2H), 2.32 (d, 2H), 2.56-2.70 (m, 4H), 3.39 (s, 3H), 3.43-3.89 (m, 210H), 4.25 (t, 2H), 4.64 (m, 1H), 5.33-5.41 (m, 1H)
S002	0.67 (s, 3H), 0.77-1.66 (m, 33H), 1.72-2.10 (m, 7H), 2.17-2.44 (m, 2H), 2.57 (t, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.41-3.94 (m, 196H), 4.26 (t, 2H), 4.38-4.61 (m, 1H), 5.19-5.30 (m, 1H), 5.34-5.43 (m, 1H)
S003	0.68 (s, 3H), 0.78-1.67 (m, 33H), 1.68-1.92 (m, 5), 1.92-2.07 (m, 2H), 2.15-2.46 (m, 2H), 3.22-3.34 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.41-3.90 (m, 200H), 4.40-4.57 (m, 1H), 5.14 (br, 1H), 5.33-5.43 (m, 1H)
S004	0.88 (t, 6H), 1.25 (m, 62H), 1.48 (m, 4H), 1.77 (m, 2H), 3.18-3.34 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.42-3.88 (m, 205H), 4.71 (m, 1H), 5.06 (m, 1H)
S005	0.89 (t, 6H), 1.26 (m, 60H), 1.48 (m, 4H), 1.78 (m, 2H), 3.17-3.33 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 3.42-3.88 (m, 203H), 4.71 (m, 1H), 5.07 (m, 1H)
S006	0.88 (t, 6H), 1.25 (m, 46H), 1.48 (m, 4H), 1.77 (m, 2H), 3.14-3.34 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.41-3.91 (m, 209H), 4.71 (m, 1H), 5.06 (m, 1H)
S007	0.87 (m, 6H), 1.25 (m, 54H), 1.48 (m, 4H), 1.76 (m, 2H), 3.15-3.32 (m, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.41-3.89 (m, 206H), 4.70 (m, 1H), 5.06 (m, 1H)
S008	0.84 (t, 6H), 1.21 (m, 58H), 1.43 (m, 4H), 1.74 (m, 2H), 2.99-3.29 (m, 2H), 3.34 (s, 3H), 3.37-4.08 (m, 187H), 4.66 (m, 1H), 5.08 (m, 1H)
S009	0.88 (t, 6H), 1.25 (m, 54H), 1.47 (m, 4H), 1.77 (m, 2H), 3.16-3.34 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.41-3.87 (m, 207H), 4.70 (m, 1H), 5.06 (m, 1H)

## 【0500】

10

20

30

40

【表13】

S010	0.88 (t, 6H), 1.25 (m, 44H), 1.55 (m, 4H), 1.78 (m, 2H), 3.15-3.33 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.40-3.95 (m, 207H), 3.97-4.30 (m, 2H), 4.96-5.27 (br m, 1H)	10
S011	0.89 (t, 6H), 1.26 (m, 60H), 1.56 (m, 4H), 1.78 (m, 2H), 3.20-3.34 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 3.40-3.89 (m, 219H), 4.02-4.26 (m, 2H), 5.09-5.23 (m, 1H)	
S013	0.89 (t, 6H), 1.26 (m, 54H), 1.48 (m, 4H), 1.77 (m, 2H), 3.16-3.34 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.41-3.87 (m, 187H), 4.71 (m, 1H), 5.05 (m, 1H)	
S014	0.89 (t, 6H), 1.26 (m, 54H), 1.49 (m, 4H), 1.78 (m, 2H), 3.16-3.34 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 3.41-3.87 (m, 210H), 4.72 (m, 1H), 5.05 (m, 1H)	
S015	0.89 (t, 6H), 1.26 (m, 50H), 1.48 (m, 4H), 1.78 (m, 2H), 3.16-3.34 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 3.41-3.87 (m, 209H), 4.71 (m, 1H), 5.06 (m, 1H)	
S016	0.88 (t, 6H), 1.26 (m, 50H), 1.47 (m, 4H), 1.77 (m, 2H), 3.16-3.34 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.41-3.87 (m, 202H), 4.71 (m, 1H), 5.06 (m, 1H)	20
S017	0.89 (t, 6H), 1.26 (m, 46H), 1.49 (m, 4H), 1.78 (m, 2H), 3.16-3.34 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 3.41-3.87 (m, 203H), 4.71 (m, 1H), 5.06 (m, 1H)	
S018	0.88 (t, 6H), 1.25 (m, 48H), 1.48 (m, 4H), 1.77 (m, 2H), 2.05 (m, 4H), 2.77 (m, 2H), 3.16-3.34 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 3.41-3.87 (m, 180H), 4.71 (m, 1H), 5.05 (m, 1H), 5.25-5.50 (m, 4H)	
S019	0.88 (t, 6H), 1.26 (m, 54H), 1.48 (m, 4H), 1.77 (m, 2H), 2.01 (m, 4H), 3.16-3.34 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.41-3.87 (m, 200H), 4.71 (m, 1H), 5.05 (m, 1H), 5.31-5.49 (m, 2H)	
S020	0.88 (t, 6H), 1.26 (m, 62H), 1.49 (m, 4H), 3.38 (s, 3H), 3.4-3.9 (m, 299H), 4.72 (m, 1H), 5.11 (m, 1H)	
S021	0.89 (t, 6H), 1.26 (m, 36H), 1.48 (m, 4H), 1.78 (m, 2H), 3.20-3.35 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 3.41-3.87 (m, 196H), 4.71 (m, 1H), 5.07 (m, 1H)	30
S022	0.89 (t, 6H), 1.26 (m, 62H), 1.49 (m, 4H), 3.36 (s, 3H), 3.41-3.87 (m, 161H), 4.72 (m, 1H), 5.14 (m, 1H)	
S023	0.88 (t, 6H), 1.26 (m, 64H), 1.47 (m, 4H), 1.77 (m, 2H), 3.20-3.35 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 3.42-3.88 (m, 194H), 4.71 (m, 1H), 5.06 (m, 1H)	
S024	0.88 (t, 6H), 1.25 (m, 48H), 1.47 (m, 4H), 1.77 (m, 2H), 3.20-3.35 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 3.42-3.88 (m, 194H), 4.70 (m, 1H), 5.08 (m, 1H)	
S025	0.87 (t, 6H), 1.24 (m, 62H), 1.47 (m, 4H), 2.01 (m, 2H), 2.2-2.4 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 3.41-3.87 (m, 229H), 4.13 (m, 1H), 4.65 (m, 1H), 5.78 (m, 1H), 6.65 (m, 1H), 7.07 (m, 1H)	40
S026	0.87 (t, 6H), 1.25 (m, 62H), 1.49 (m, 4H), 1.76 (m, 2H), 2.44 (t, J = 8 Hz, 2H), 2.63 (t, J = 8 Hz, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.41-3.87 (m, 213H), 4.84 (m, 1H), 6.32 (m, 1H)	

【0501】

表5：ステルス脂質S001～S026の他の特性決定

【表14】

	SEC	MALDI	TLC	TLC条件	TLC溶媒
S001	单一ピーク(THF)	~2550			
S002	单一ピーク(THF)	~2550			
S003	单一ピーク(THF)	~2600			
S004	单一ピーク(DMF)				
S005	单一ピーク(DMF)				
S006	单一ピーク(DMF)				
S007			0.39	1:9	MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
S008			1.39	1:9	MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
S010	单一ピーク(THF)	~2800			
S011	单一ピーク(DMF)				
S013	单一ピーク(THF)	~2650			
S014	单一ピーク(THF)	~2750			
S015	单一ピーク(THF)	~2750			
S016	单一ピーク(THF)	~2700			
S017	单一ピーク(THF)	~2650			
S018	单一ピーク(THF)	~2750			
S019	单一ピーク(THF)	~2750			
S020	单一ピーク(THF)	~3600			
S021	单一ピーク(DMF)	~2700			
S022	单一ピーク(DMF)	2364.1 (厳密)			
S023		~2900			
S024		~2700			
S025	单一ピーク(THF)	~3000			
S026	单一ピーク(THF)	~3050			

10

20

30

## 【0502】

実施例66結果の表の概要

合成された化合物を下記の表に表す。誤解を避けるために、幾つかの置換基は、それらが重複しているように表しているが、化合物の真の構造は、それでもなお完全に明確である。例えば、

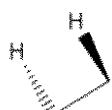
## 【化58】



40

は、化学的に不可能な3員の水素含有環を表すのではなく、代わりに、下記：

## 【化59】



を表す。

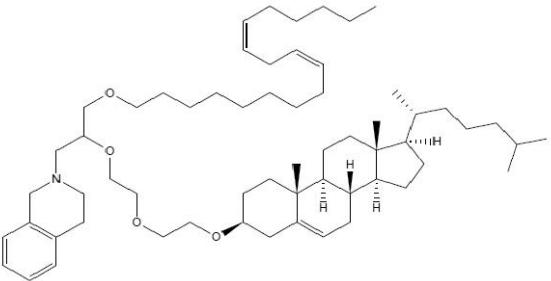
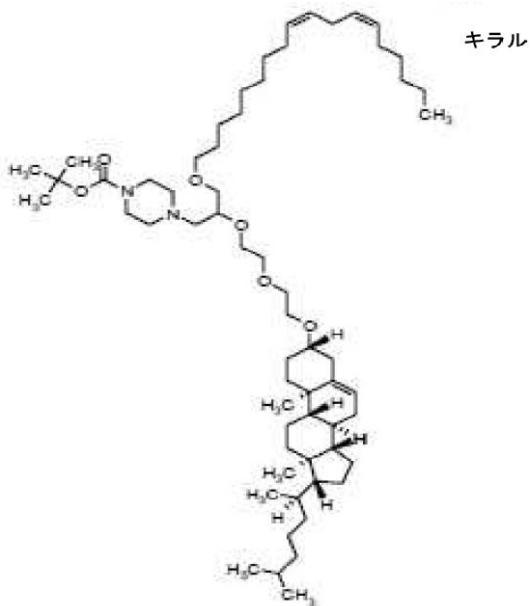
## 【0503】

表6は、本発明のカチオン性脂質の構造を提供する。

50

表 6 : カチオン性脂質の特性決定および構造

【表 15】

脂質	構造	$R^1-N-R^2$	$Y^1$	$L$
E0001		$H^{15}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$
E0002		$H^2$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$

10

20

30

【表16】

E0003	<p>キラル</p>	$H^1$	$Y^{1-ii}$	$L^{c-i}$	10
E0004	<p>キラル</p>	$H^{10}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	20 30

【0504】

【表17】

E0005	<p><chem>C[C@H]1[C@@H](C[C@H]2[C@H]3[C@H]4[C@H]2[C@H]1OCCOC[C@H]3OCCOC[C@H]4OCCOC[C@H]5[C@H]6[C@H]7[C@H]5[C@H]8[C@H]6[C@H]9[C@H]8[C@H]10[C@H]7[C@H]11[C@H]10[C@H]12[C@H]9[C@H]11[C@H]13[C@H]12CCCCCCC13</chem></p>	$H^{11}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	10
E0006	<p><chem>C[C@H]1[C@@H](C[C@H]2[C@H]3[C@H]4[C@H]2[C@H]1OCCOC[C@H]3OCCOC[C@H]4OCCOC[C@H]5[C@H]6[C@H]7[C@H]5[C@H]8[C@H]6[C@H]9[C@H]8[C@H]10[C@H]7[C@H]11[C@H]10[C@H]12[C@H]9[C@H]11[C@H]13[C@H]12CCCCCCC13</chem></p>	$H^{13}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	20

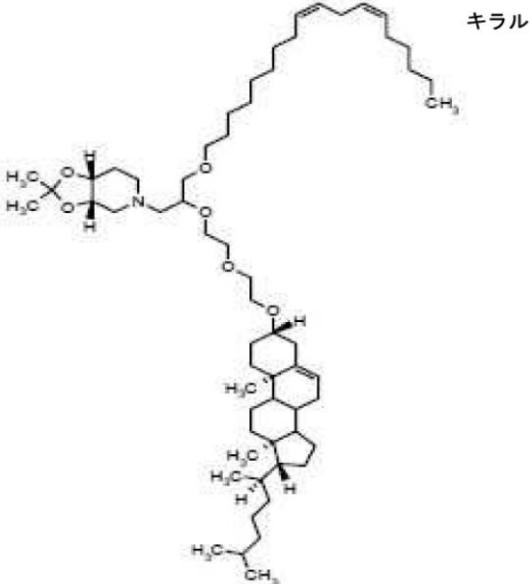
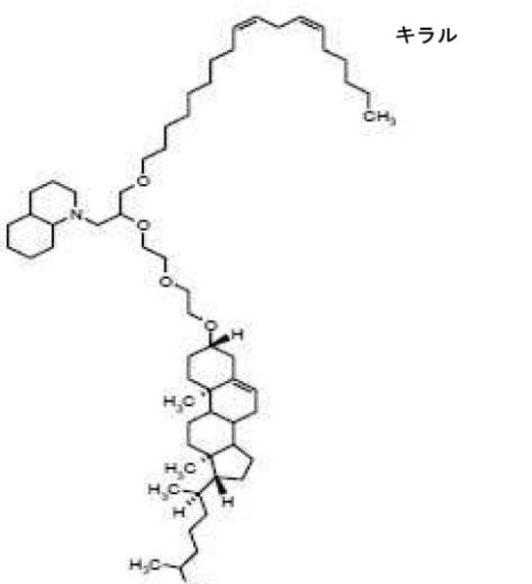
30

【表18】

E0007	<p style="text-align: right;">10</p>	$H^{19}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$
E0008	<p style="text-align: right;">20</p> <p style="text-align: right;">30</p>	$H^{43}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$

【0505】

【表19】

E0009	 <p>キラル</p>	$H^{34}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	10
E0010	 <p>キラル</p>	$H^{22}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	20 30

【表20】

E0011		H <sup>1</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-i</sup>	10
E0012		H <sup>3</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-i</sup>	20

【0 5 0 6】

【表 2 1】

E0013	<p>キラル</p>	$H^4$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	10
E0014	<p>キラル</p>	$H^5$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	20

30

【表22】

E0015	<p>キラル</p>	$H^7$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	10
E0016	<p>キラル</p>	$H^8$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	20

【0507】

【表 2 3】

E0017	<p><math>H^{14}</math></p> <p><math>Y^{1-i}</math></p> <p><math>L^{c-i}</math></p>	10
E0018	<p><math>H^{16}</math></p> <p><math>Y^{1-i}</math></p> <p><math>L^{c-i}</math></p>	<p>20</p> <p>30</p>

【表 2 4】

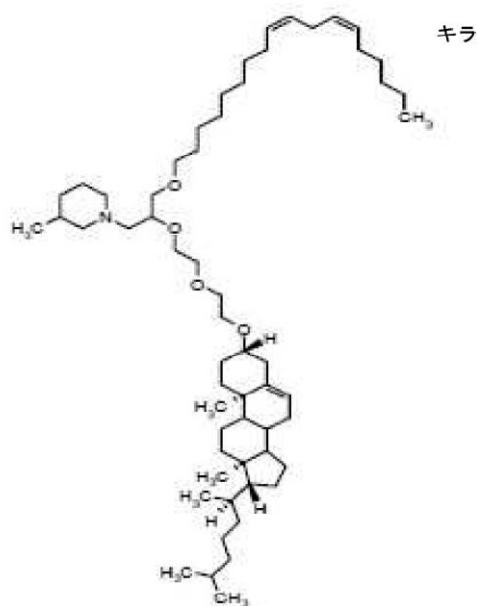
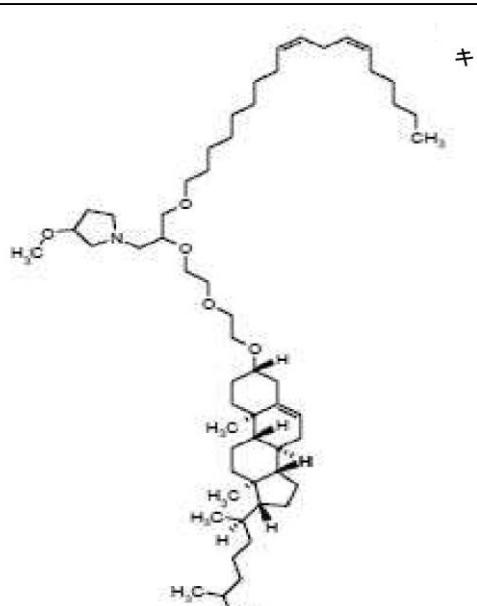
E0019	<p>キラル</p>	$H^{17}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$
E0020	<p>キラル</p>	$H^{21}$	$Y^{l-i}$	$L^{c-i}$

【 0 5 0 8 】

【表 25】

E0021	<p>キラル</p>	$H^{23}$	$Y^{l-i}$	$L^{c-i}$	10
E0022	<p>キラル</p>	$H^{24}$	$Y^{l-i}$	$L^{c-i}$	20 30

【表26】

E0023		$H^{25}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	10
E0024		$H^{35}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	20 30

【0509】

【表27】

E0025		$H^{27}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	10
E0026		$H^{28}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	20

【表28】

E0027	<p style="text-align: center;">キラル</p>	$H^5$	$Y^{1-i}$	$L^{c-ii}$
E0028	<p style="text-align: center;">キラル</p>	$H^1$	$Y^{1-i}$	$L^{c-ii}$

【0 5 1 0】

10

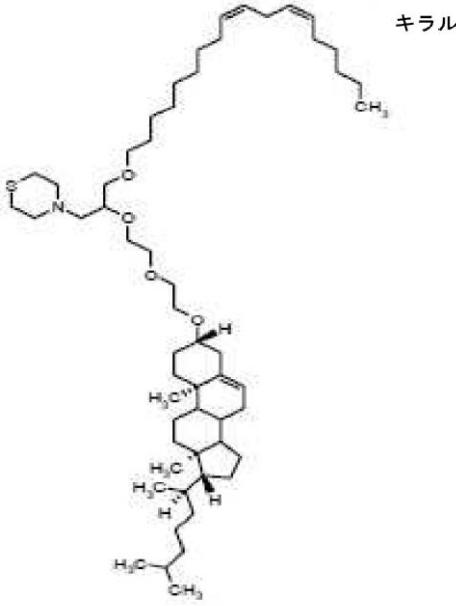
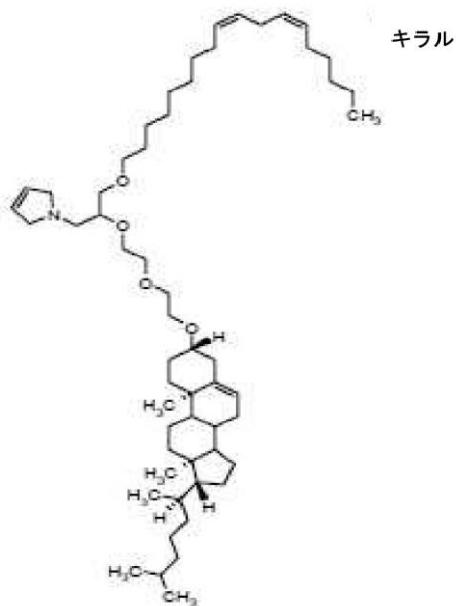
20

30

【表 2 9】

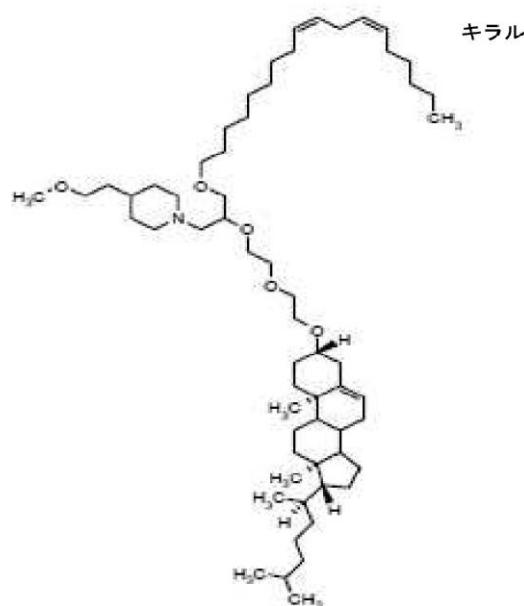
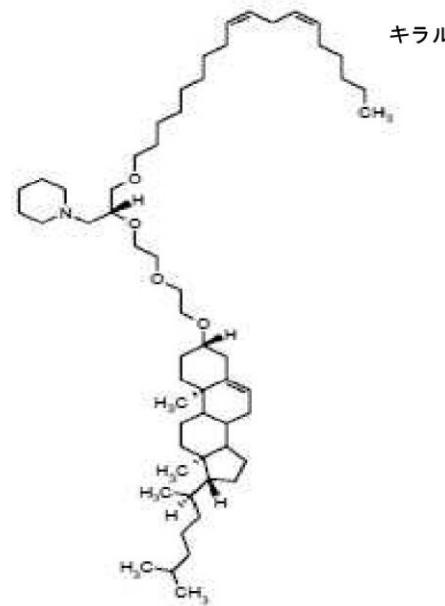
E0029	<p>キラル</p>	$H^{29}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	10
E0030	<p>キラル</p>	$H^{30}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	20 30

【表30】

E0031		$H^{31}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	10
E0032		$H^{20}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	20 30

【0511】

【表 3 1】

E0033		$H^{33}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	10
E0034		$H^5$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	20 30

【表32】

E0035		$H^{35}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-ii}$
E0036		$H^5$	$Y^{1-i}$	$L^{c-iii}$

【0 5 1 2】

10

20

30

【表 3 3】

E0037	<p><chem>C[C@H]1[C@@H]2[C@H]3[C@H]4[C@H]2[C@H]1C[C@H]3[C@H]5[C@H]6[C@H]4[C@H]5[C@H]7[C@H]6[C@H]8[C@H]7[C@H]9[C@H]8[C@H]10[C@H]9[C@H]11[C@H]10[C@H]12[C@H]11[C@H]13[C@H]12[C@H]14[C@H]13[C@H]15[C@H]14[C@H]16[C@H]15[C@H]17[C@H]16[C@H]18[C@H]17[C@H]19[C@H]18[C@H]20[C@H]19[C@H]21[C@H]1[C@H]2[C@H]3[C@H]4[C@H]5[C@H]6[C@H]7[C@H]8[C@H]9[C@H]10[C@H]11[C@H]12[C@H]13[C@H]14[C@H]15[C@H]16[C@H]17[C@H]18[C@H]19[C@H]20[C@H]21</chem></p>	$H^{44}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	10
E0038	<p><chem>C[C@H]1[C@@H]2[C@H]3[C@H]4[C@H]2[C@H]1C[C@H]3[C@H]5[C@H]6[C@H]4[C@H]5[C@H]7[C@H]6[C@H]8[C@H]7[C@H]9[C@H]8[C@H]10[C@H]9[C@H]11[C@H]10[C@H]12[C@H]11[C@H]13[C@H]12[C@H]14[C@H]13[C@H]15[C@H]14[C@H]16[C@H]15[C@H]17[C@H]16[C@H]18[C@H]17[C@H]19[C@H]18[C@H]20[C@H]19[C@H]21[C@H]1[C@H]2[C@H]3[C@H]4[C@H]5[C@H]6[C@H]7[C@H]8[C@H]9[C@H]10[C@H]11[C@H]12[C@H]13[C@H]14[C@H]15[C@H]16[C@H]17[C@H]18[C@H]19[C@H]20[C@H]21</chem></p>	$H^{36}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	20 30

【表34】

E0039		$H^{37}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	10
E0040	異性体 E0053 および E0052 の混合物	$H^{12/26}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	20
E0041		$H^{32}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	30

【0 5 1 3】

【表 3 5】

E0042		H <sup>39</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-i</sup>	10
E0043		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-i</sup>	20
E0044		H <sup>48</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-i</sup>	30

【表36】

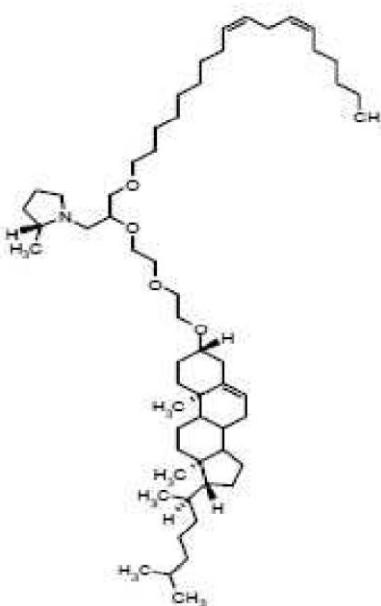
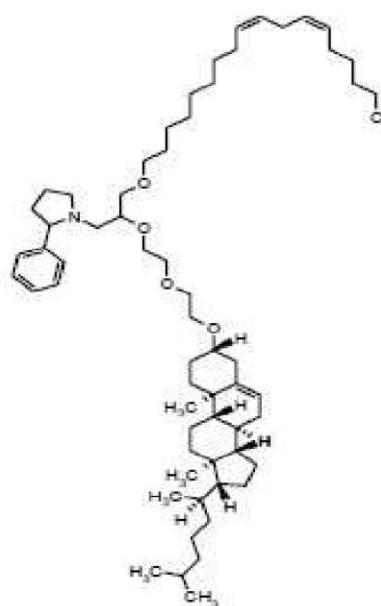
E0045		H <sup>41</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-i</sup>	10
E0046		H <sup>42</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-i</sup>	20

【0514】

【表 3 7】

E0047		$H^5$	$Y^{1-i}$	$L^{c-v}$	10
E0048		$H^{26}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	20 30

【表38】

E0049		H <sup>12</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-i</sup>	10
E0050		H <sup>9</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-i</sup>	20 30

【0 5 1 5】

【表39】

E0051	<p>キラル</p>	$H^{40}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$
E0052	<p>キラル</p>	$H^{12}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$

【表40】

E0053		H <sup>26</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-i</sup>	10
E0054		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-vi</sup>	20 30

【0516】

【表41】

E0055		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iii</sup>	L <sup>c-i</sup>	10
E0056		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xviii</sup>	20
E0057		H <sup>47</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-i</sup>	30

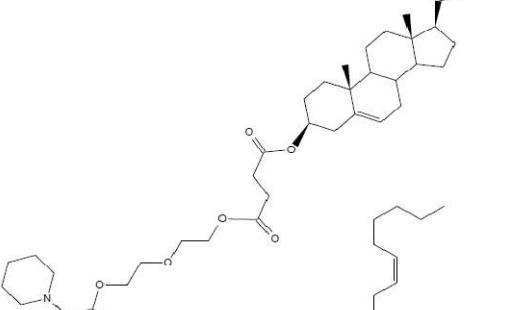
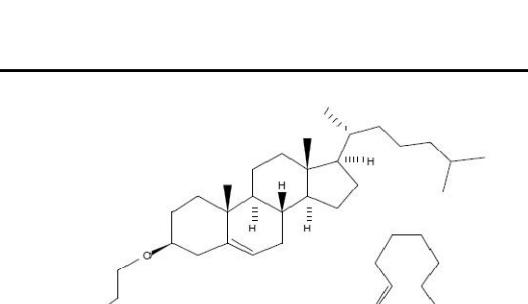
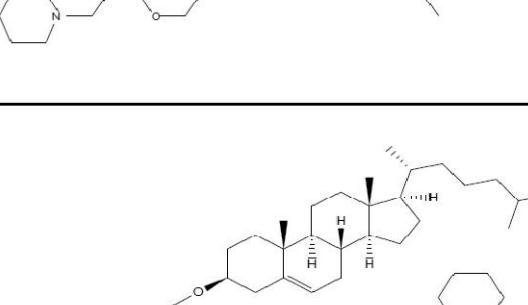
40

【表42】

E0058		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xv</sup>	10
E0059		H <sup>45</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-i</sup>	20

【0 5 1 7】

【表 4 3】

E0060		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xvi</sup>
E0061		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-viii</sup>
E0062		H <sup>35</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-viii</sup>

【表44】

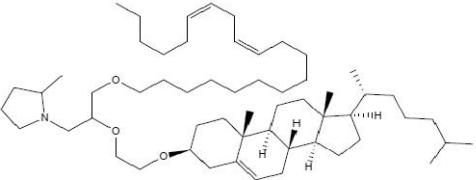
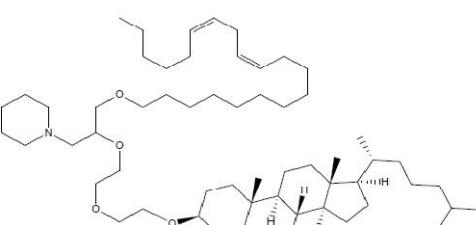
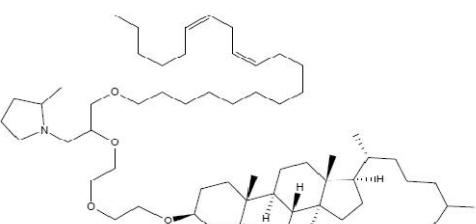
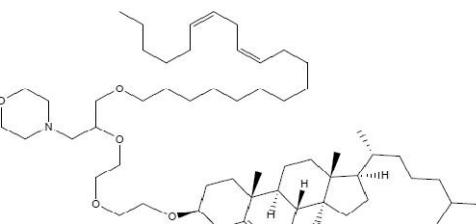
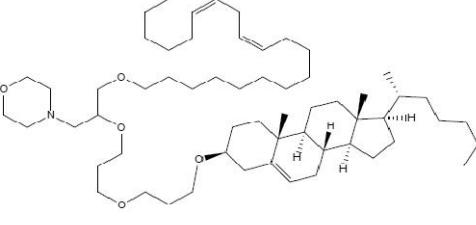
E0063	<p>キラル</p>	$H^5$	$Y^{1-iv}$	$L^{c-i}$	10
E0064	<p>キラル</p>	$H^{35}$	$Y^{1-iv}$	$L^{c-i}$	20
E0065	<p>キラル</p>	$H^{12/26}$	$Y^{l-iv}$	$L^{c-i}$	30

【0 5 1 8】

【表 4 5】

E0066		H <sup>12/26</sup>	Y <sup>I-iv</sup>	L <sup>c-viii</sup>	10
E0067		H <sup>46</sup>	Y <sup>I-i</sup>	L <sup>c-i</sup>	20
E0068		H <sup>1</sup>	Y <sup>1-v</sup>	L <sup>c-viii</sup>	30
E0069		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-v</sup>	L <sup>c-viii</sup>	40

【表46】

E0070		H <sup>12/26</sup>	Y <sup>1-v</sup>	L <sup>c-viii</sup>
E0071		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-v</sup>	L <sup>c-i</sup>
E0072		H <sup>12/26</sup>	Y <sup>1-v</sup>	L <sup>c-i</sup>
E0073		H <sup>1</sup>	Y <sup>1-v</sup>	L <sup>c-i</sup>
E0074		H <sup>1</sup>	Y <sup>1-v</sup>	L <sup>c-vii</sup>

【0519】

【表47】

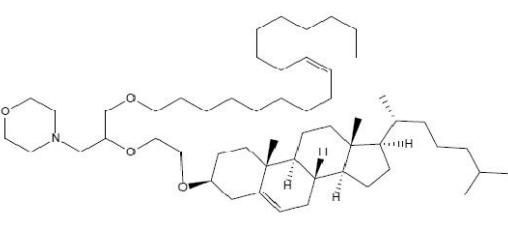
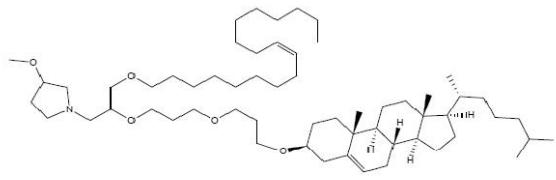
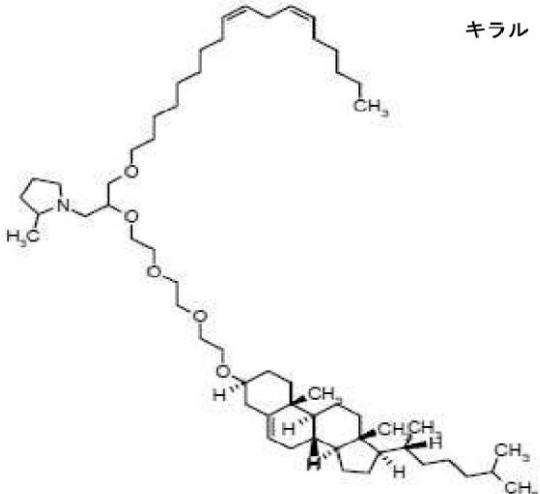
E0075	<p>キラル</p>	$H^{12/26}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-vii}$	10
E0076	<p>キラル</p>	$H^5$	$Y^{1-i}$	$L^{c-viii}$	20 30

【表48】

E0077		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-vii</sup>	10
E0078		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-vii</sup>	20
E0079		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-ix</sup>	30

【0520】

【表 4 9】

E0080		H <sup>1</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-viii</sup>
E0081		H <sup>35</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-vii</sup>
E0082		H <sup>12/26</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-x</sup>

10

20

30

【表 5 0】

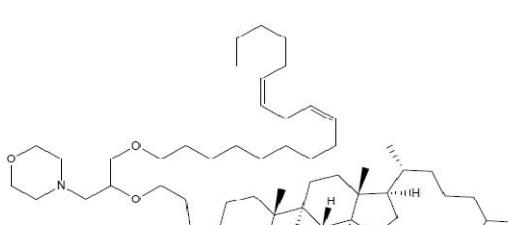
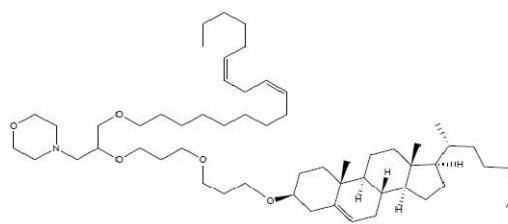
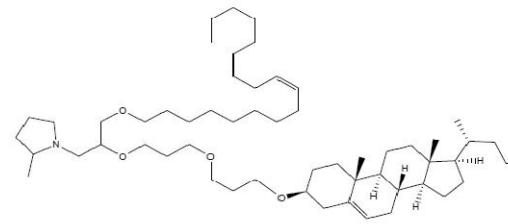
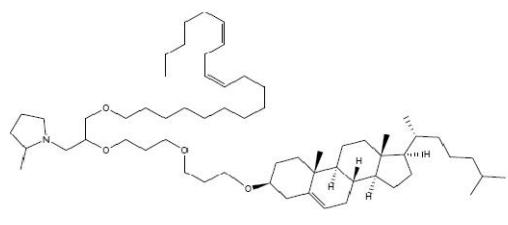
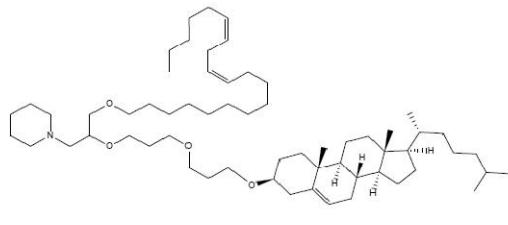
E0083	<p>キラル</p>	$H^{12/26}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-i}$	10
E0084		$H^{12/26}$	$Y^{1-i}$	$L^{c-ix}$	20
E0085		$H^1$	$Y^{1-iv}$	$L^{c-i}$	30
E0086		$H^1$	$Y^{1-iv}$	$L^{c-vii}$	40

【0 5 2 1】

【表 5 1】

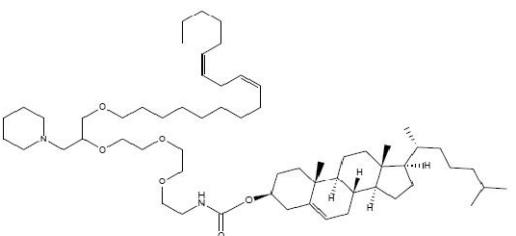
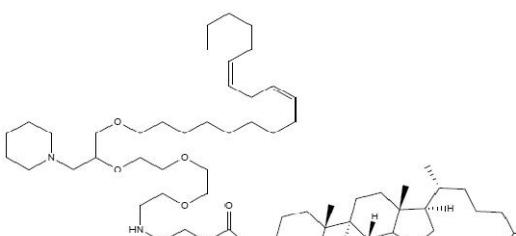
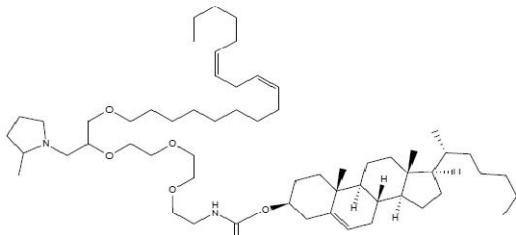
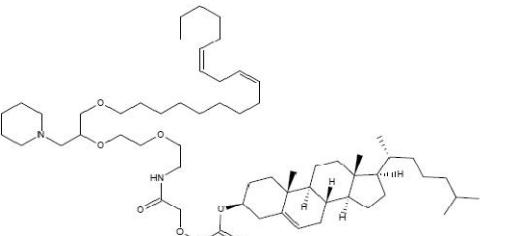
E0087		H <sup>35</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-viii</sup>	
E0088		H <sup>35</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-vii</sup>	10
E0089		H <sup>35</sup>	Y <sup>1-v</sup>	L <sup>c-viii</sup>	20
E0090		H <sup>35</sup>	Y <sup>1-v</sup>	L <sup>c-i</sup>	30
E0091		H <sup>35</sup>	Y <sup>1-v</sup>	L <sup>c-vii</sup>	40

【表 5 2】

E0092		H <sup>1</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-viii</sup>	10
E0093		H <sup>1</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-vii</sup>	20
E0094		H <sup>12/26</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-vii</sup>	30
E0095		H <sup>12/26</sup>	Y <sup>1-v</sup>	L <sup>c-vii</sup>	40
E0096		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-v</sup>	L <sup>c-vii</sup>	

【0 5 2 2】

【表 5 3】

E0097		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xiv</sup>	10
E0098		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xi</sup>	
E0099		H <sup>12/26</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xiv</sup>	20
E0100		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xii</sup>	30

【表 5 4】

E0101		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xiii</sup>
E0102		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xxi</sup>
E0103		H <sup>12/26</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-vi</sup>
E0104		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xvii</sup>
E0105		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xix</sup>

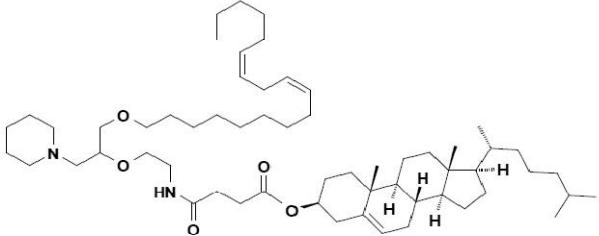
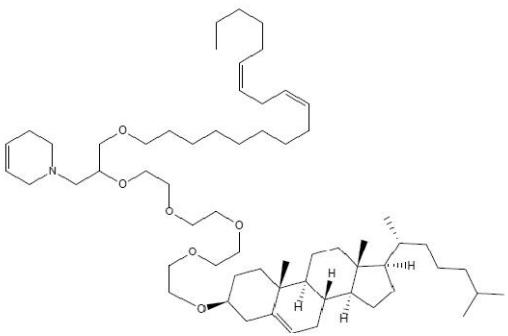
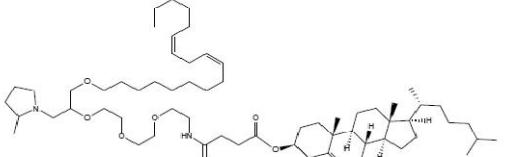
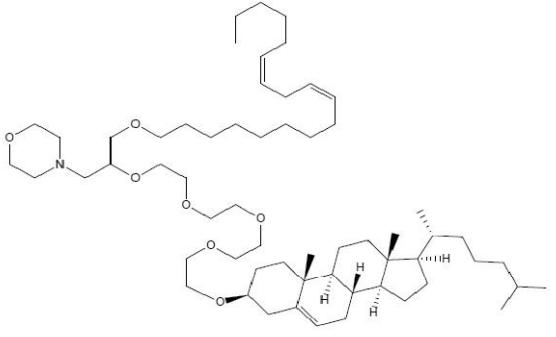
【0 5 2 3】

10

20

30

【表 5 5】

E0106		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xx</sup>
E0107		H <sup>16</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-ix</sup>
E0108		H <sup>12/26</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xi</sup>
E0109		H <sup>1</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-ix</sup>

10

20

30

40

【表 5 6】

E0110		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xxii</sup>
E0111		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xxiii</sup>
E0112		H <sup>7</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-x</sup>
E0113		H <sup>7</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-ix</sup>

【0 5 2 4】

【表 5 7】

E0114		H <sup>1</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-x</sup>
E0115		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-vi</sup>	c-i
E0116		H <sup>35</sup>	Y <sup>1-vi</sup>	c-i
E0117		H <sup>12/26</sup>	Y <sup>1-vi</sup>	c-i
E0118	異性体 E0053 および E0052 の他の混合物	H <sup>12/26</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-i</sup>
E0119		H <sup>25</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-i</sup>

10

20

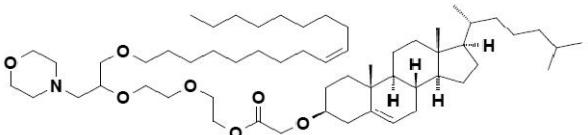
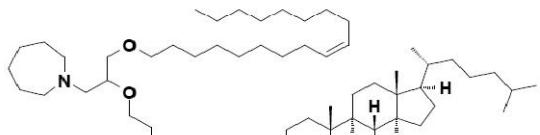
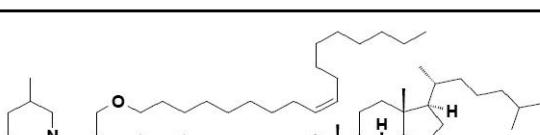
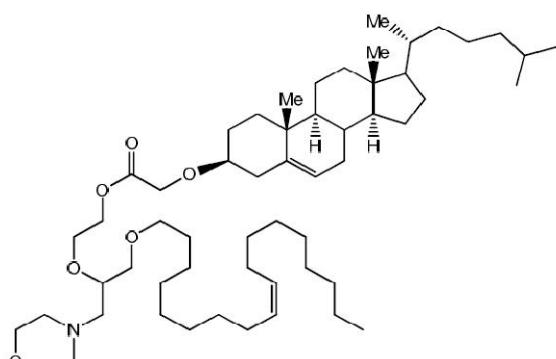
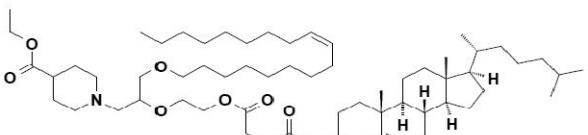
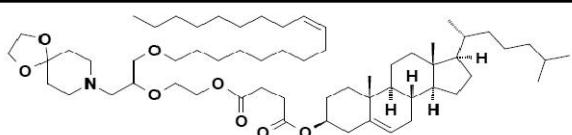
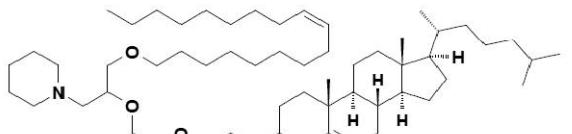
30

40

【表 5 8】

E0120		H <sup>21</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-i</sup>	
E0121		H <sup>14</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-i</sup>	10
E0122		H <sup>1</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xviii</sup>	20
E0123		H <sup>1</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxiv</sup>	
E0124		H <sup>21</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-vii</sup>	30
【 0 5 2 5 】					

【表 5 9】

E0125		H <sup>1</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxv</sup>
E0126		H <sup>14</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-vii</sup>
E0127		H <sup>25</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-vii</sup>
E0128		H <sup>1</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxvi</sup>
E0129		H <sup>49</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xvii</sup>
E0130		H <sup>8</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xvii</sup>
E0131		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxvi</sup>

10

20

30

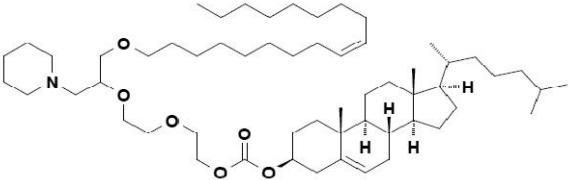
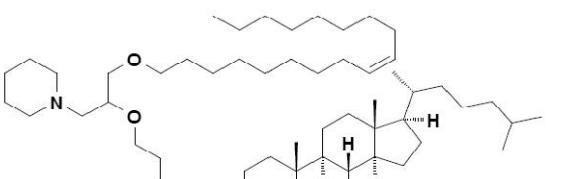
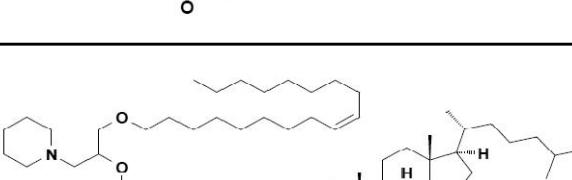
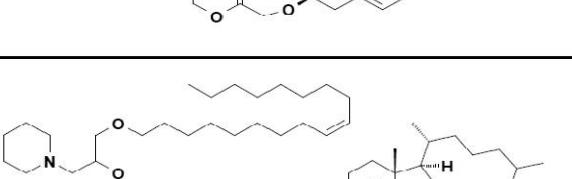
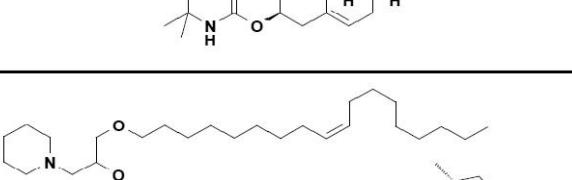
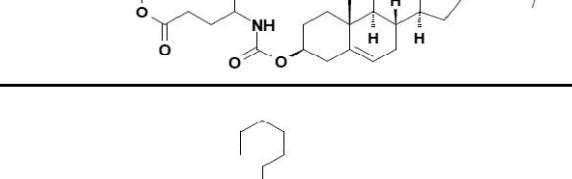
40

【表60】

E0132		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxvii</sup>
E0133		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xxviii</sup>
E0134		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-i</sup>	L <sup>c-xxix</sup>
E0135		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxx</sup>
E0136		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxxi</sup>
E0137		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxxii</sup>

【0526】

【表 6 1】

E0138		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xviii</sup>
E0139		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxiv</sup>
E0140		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxv</sup>
E0141		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxxiii</sup>
E0142		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxxiv</sup>
E0143		H <sup>50</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xvii</sup>

10

20

30

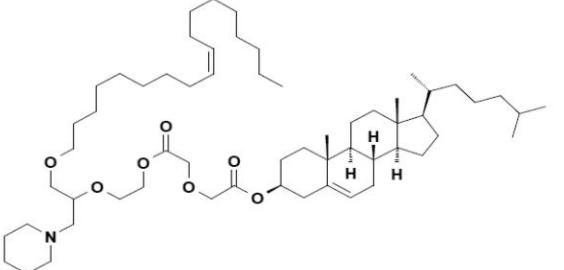
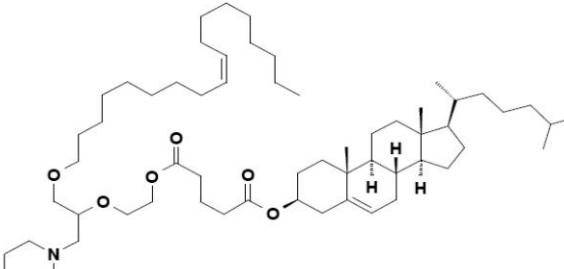
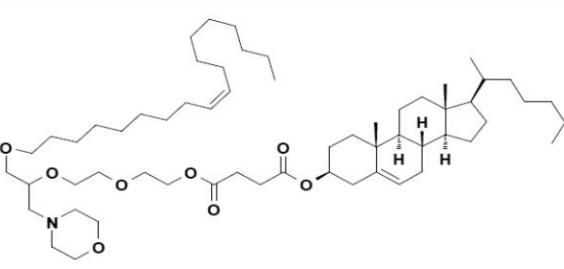
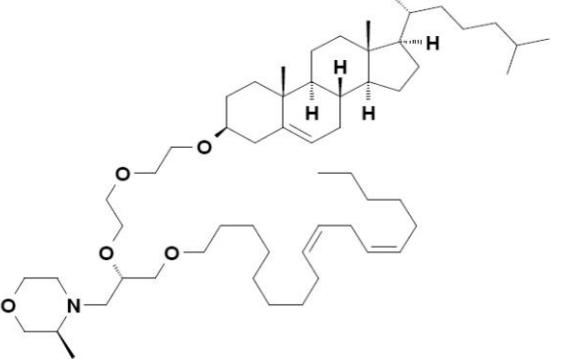
40

【表 6 2】

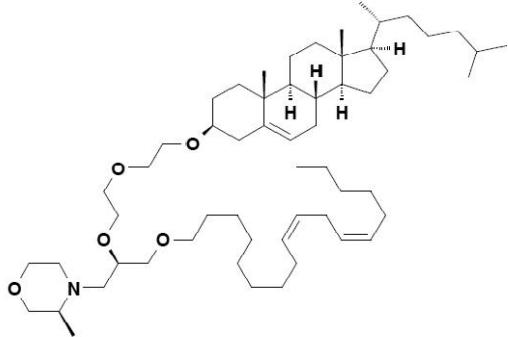
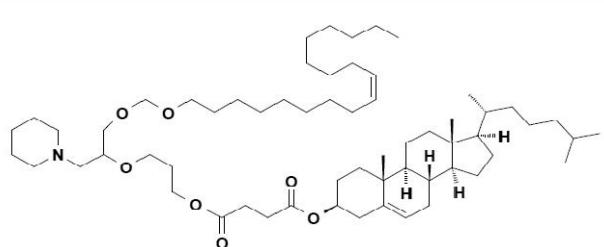
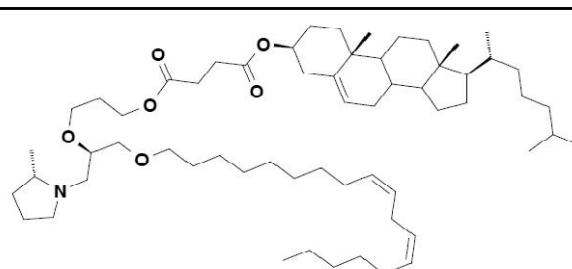
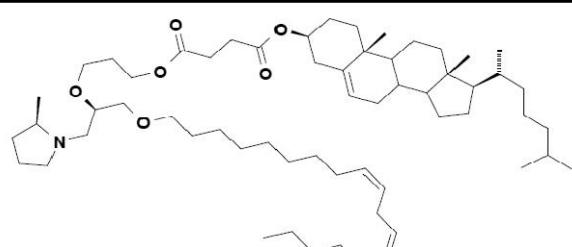
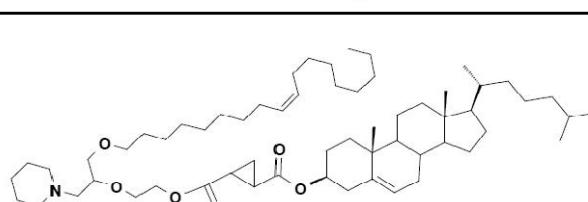
E0144		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxv</sup>
E0145		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxxv</sup>
E0146		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxxvi</sup>
E0147		H <sup>27</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-i</sup>
E0148		H <sup>25</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-vi</sup>
E0149		H <sup>51</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-i</sup>

【0 5 2 7】

【表 6 3】

E0150		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxxvii</sup>
E0151		H <sup>5</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xxxviii</sup>
E0152		H <sup>1</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xvi</sup>
E0158		H <sup>52</sup>	Y <sup>l-i</sup>	L <sup>c-i</sup>

【表 6 4】

E0159		H <sup>52</sup>	Y <sup>l-i</sup>	L <sup>c-i</sup>
E0160		H <sup>5</sup>	Y <sup>l-vii</sup>	L <sup>c-xxxix</sup>
E0161		H <sup>26</sup>	Y <sup>l-i</sup>	L <sup>c-xxxix</sup>
E0162		H <sup>12</sup>	Y <sup>l-i</sup>	L <sup>c-xxxix</sup>
E0163		H <sup>5</sup>	Y <sup>l-iv</sup>	L <sup>c-xxxx</sup>

【 0 5 2 8 】

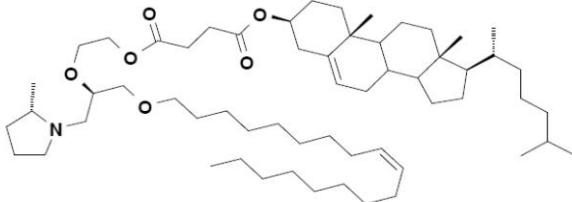
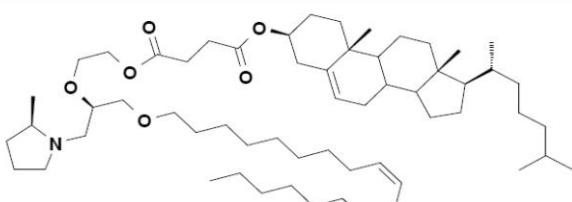
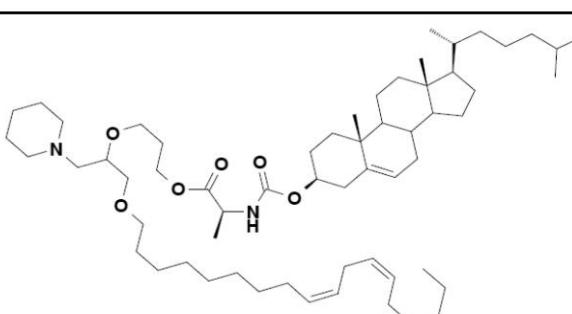
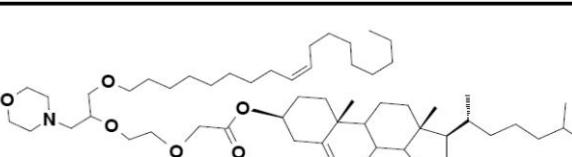
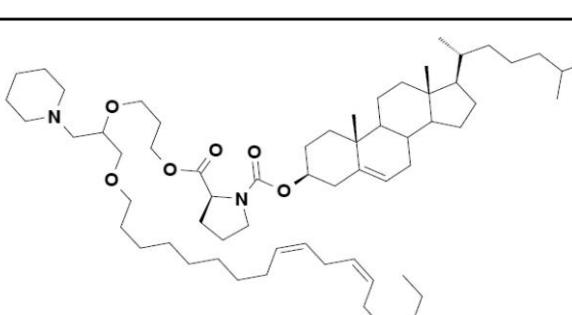
10

20

30

40

【表 6 5】

E0164		H <sup>26</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xvii</sup>
E0165		H <sup>12</sup>	Y <sup>1-iv</sup>	L <sup>c-xvii</sup>
E0166		H <sup>5</sup>	Y <sup>l-i</sup>	L <sup>c-xxxxi</sup>
E0167		H <sup>1</sup>	Y <sup>l-iv</sup>	L <sup>c-xxxxii</sup>
E0168		H <sup>5</sup>	Y <sup>l-i</sup>	L <sup>c-xxxxiii</sup>

10

20

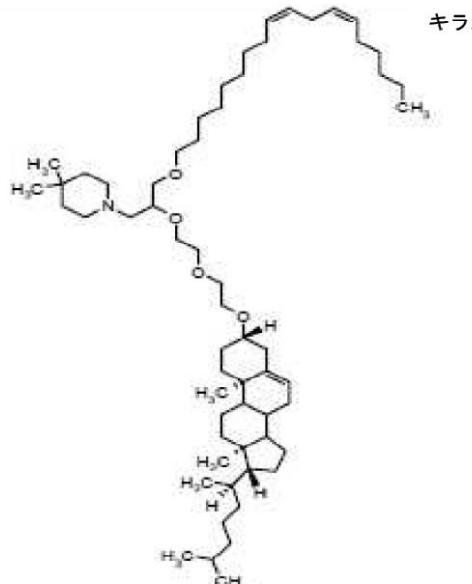
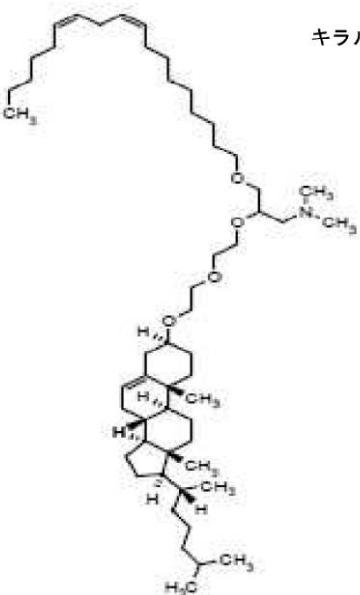
30

【表66】

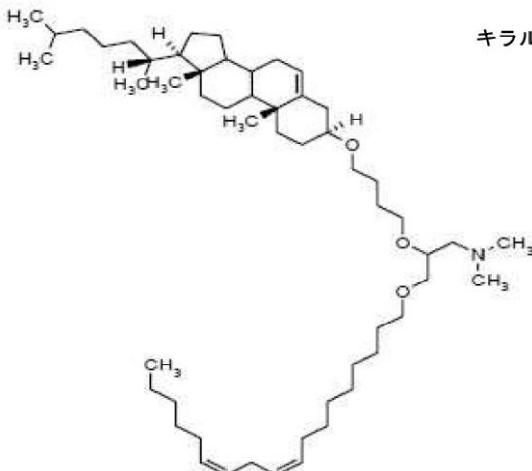
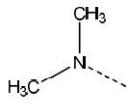
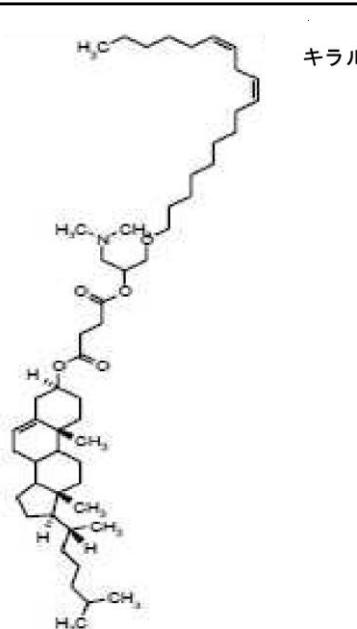
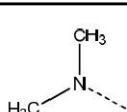
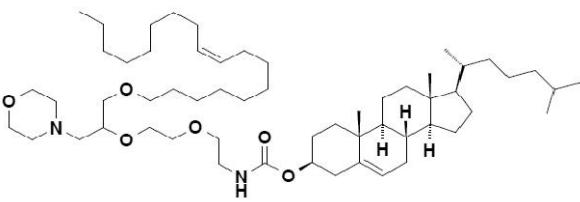
E0169		H <sup>27</sup>	Y <sup>i-iv</sup>	L <sup>c-vi</sup>	10
E0170		H <sup>6</sup>	Y <sup>i-i</sup>	L <sup>c-i</sup>	20

【0529】

【表 6 7】

E0171	 <p>キラル</p>	$H^{18}$	$Y^{l-i}$	$L^{c-i}$	10
E0172 (比較例)	 <p>キラル</p>	$CH_3$	$Y^{l-i}$	$L^{c-i}$	20

【表 6 8】

E0173 (比較例)	 <p>キラル</p>		$Y^{l-i}$	$L^{c-ii}$
E0174 (比較例)	 <p>キラル</p>		$Y^{l-i}$	$L^{c-iii}$
E0175		$H^1$	$Y^{l-iv}$	$L^{c-vi}$

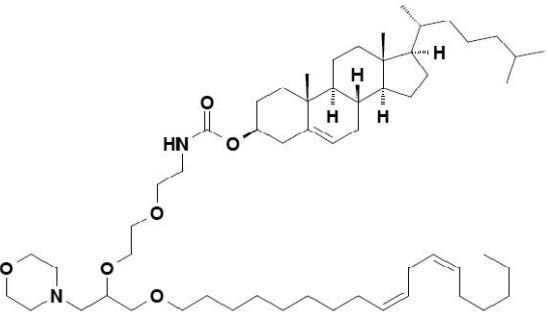
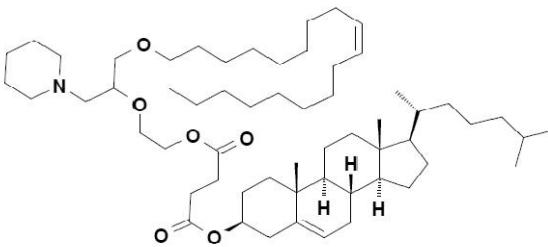
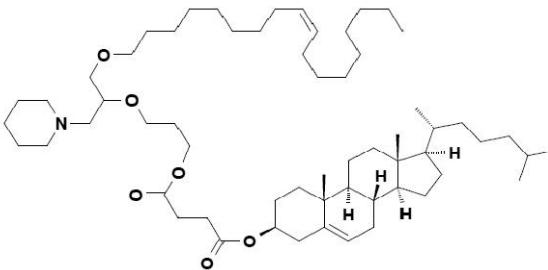
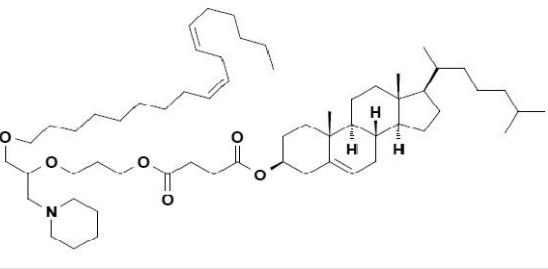
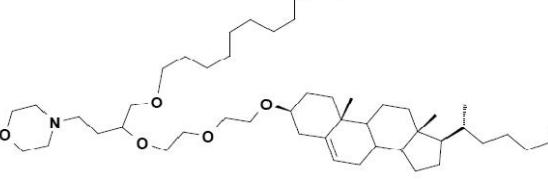
【0 5 3 0】

10

20

30

【表 6 9】

E0176		H <sup>1</sup>	Y <sup>i-i</sup>	L <sup>c-vi</sup>
E0177		H <sup>5</sup>	Y <sup>i-iv</sup>	L <sup>c-xvii</sup>
E0178		H <sup>5</sup>	Y <sup>i-iv</sup>	L <sup>c-xxxix</sup>
E0179		H <sup>5</sup>	Y <sup>i-i</sup>	L <sup>c-xxxiv</sup>
E0180		H <sup>1</sup>	Y <sup>i-iv</sup>	L <sup>c-i</sup>

## 【0531】

E0180を除く上記化合物はそれぞれについて、Y<sup>2</sup>は、酸素原子を介して、ステロイドの環Aの3位でLに結合しているコレステロールであり(当該ヒドロキシ基の水素原子は存在しない)；X<sup>1</sup>およびX<sup>2</sup>がOであり；a = メチレン；b = メチレン、およびcは存在せず；一方、E0180についてはa = エチレンである。

## 【0532】

下記の特性決定データに加えて、<sup>1</sup>H-NMRにより、合成を行った全ての脂質について純度および何れかのオレフィン異性体化を評価する。具体的には、通常0.68ppm付近でのコレステロール誘導体の一重項についての積算値を、5.2～5.5ppm範囲のオレフィン誘

導体のシグナルと比較する。望ましい cis 非共役オレフィンについてのオレフィン積算値およびコレステロールのオレフィン水素を異性体化生成物に対応する 5.5 ppm より大きい何れかの新しいシグナルと比較する。全ての場合において、<sup>1</sup>H-NMR の積算されたシグナルを比較することによって測定した異性体化の程度は、10% 未満である。

## 【0533】

実施例 67

種々の脂質の NMR 特性決定を下に示す。

## 【0534】

## E0008

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5.25-5.48 (m, 5H), 3.69-3.86 (m, 2H), 3.55-3.69 (m, 7H), 3.34-3.55 (m, 4H), 3.07-3.25 (m, 1H), 2.70-3.01 (m, 4H), 2.30-2.53 (m, 3H), 2.15-2.30 (m, 1H), 1.78-2.14 (m, 11H), 1.42-1.66 (m, 12H), 0.97-1.42 (m, 34H), 0.81-0.97 (m, 16H), 0.68 (s, 3H) ppm. 10

## 【0535】

## E0006

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5.25-5.47 (m, 5H), 3.56-3.85 (m, 11H), 3.48-3.56 (m, 1H), 3.36-3.48 (m, 3H), 3.11-3.27 (m, 1H), 2.66-2.83 (m, 4H), 2.41-2.49 (m, 2H), 2.30-2.41 (m, 1H), 2.15-2.28 (m, 1H), 1.72-2.12 (m, 11H), 0.96-1.70 (m, 60H), 0.68 (s, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 140.9, 130.2, 130.1, 128.0, 127.9, 121.6, 79.5, 72.0, 71.7, 71.6, 70.9, 69.4, 67.3, 60.2, 60.1, 59.7, 56.8, 56.1, 50.2, 42.3, 39.8, 39.5, 39.0, 37.2, 36.8, 36.2, 35.8, 31.9, 31.9, 31.5, 29.7, 29.5, 29.5, 29.3, 29.3, 29.0, 28.3, 28.2, 28.0, 27.2, 27.2, 26.2, 25.6, 24.3, 23.8, 22.8, 22.7, 22.6, 22.6, 21.0, 19.4, 18.7, 14.1, 11.8 ppm. 20

## 【0536】

## E0003

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5.22-5.46 (m, 7H), 3.66-3.93 (m, 5H), 3.54-3.66 (m, 6H), 3.35-3.54 (m, 4H), 3.07-3.23 (m, 1H), 2.73-2.89 (m, 4H), 2.39-2.73 (m, 4H), 2.28-2.39 (m, 1H), 2.28-2.39 (m, 1H), 1.70-2.12 (m, 10H), 1.20-1.65 (m, 24H), 0.94-1.19 (m, 13H), 0.77-0.94 (m, 14H), 0.66 (s, 3H) ppm. 30

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 140.9, 130.4, 130.0, 128.3, 128.1, 127.8, 127.6, 121.6, 79.5, 71.6, 70.8, 70.7, 69.2, 67.3, 60.1, 56.7, 56.1, 54.2, 50.1, 42.3, 39.7, 39.5, 39.0, 37.2, 36.8, 36.2, 35.8, 31.9, 31.8, 31.5, 29.5, 29.4, 29.3, 28.3, 28.2, 28.0, 27.2, 27.2, 25.8, 25.6, 24.3, 23.8, 22.8, 22.6, 22.5, 21.0, 19.4, 18.7, 14.1, 11.8 ppm.

## 【0537】

## E0002

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5.26-5.44 (m, 5H), 3.68-3.84 (m, 3H), 5.54-3.68 (m, 7H), 3.32-3.54 (m, 6H), 3.09-3.24 (m, 1H), 2.68-2.80 (m, 2H), 2.27-2.58 (m, 3H), 2.12-2.27 (m, 1H), 1.69-2.12 (m, 9H), 1.41-1.69 (m, 20H), 1.19-1.40 (m, 20H), 0.95-1.19 (m, 11H), 0.78-0.95 (m, 12 H), 0.66 (s, 3H) ppm. 40

## 【0538】

## E0001

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.10-7.24 (m, 3H), 6.96-7.10 (m, 1H), 5.21-5.48 (m, 5H), 3.73-3.90 (m, 3H), 3.37-3.72 (m, 11H), 3.10-3.25 (m, 1H), 2.72-2.86 (m, 2H), 2.28-2.42 (m, 1H), 2.14-2.28 (m, 1H), 1.92-2.14 (m, 6H), 1.78-1.92 (m, 4H), 1.22-1.78 (m, 34 H), 0.95-1.22 (m, 13H), 0.84-0.95 (m, 13H), 0.68 (s, 3H) ppm.

## 【0539】

## E0004

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5.24-5.44 (m, 5H), 3.66-3.83 (m, 2H), 3.54-3.65 (m, 7H) 50

H), 3.34-3.51 (m, 4H), 3.11-3.23 (m, 1H), 2.94-3.10 (m, 2H), 2.56-2.87 (m, 6.5H), 2.41-2.50 (d, J=5.02 Hz, 2H), 2.29-2.40 (m, 2.5H), 1.96-2.26 (m, 8H), 1.62-1.96 (m, 8H), 1.62-1.96 (m, 11H), 1.40-1.61 (m, 11H), 1.22-1.40 (m, 20H), 0.81-1.21 (m, 26H), 0.66 (s, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) 142.5, 140.9, 139.7, 130.1, 130.1, 128.7, 127.9, 127.9, 125.8, 121.5, 79.4, 77.2, 71.8, 71.6, 70.8, 70.8, 69.3, 67.3, 63.1, 59.3, 56.7, 56.1, 53.6, 53.3, 50.1, 49.9, 42.2, 39.7, 39.4, 39.0, 37.2, 36.8, 36.1, 35.7, 31.9, 31.8, 31.5, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 28.3, 28.2, 27.9, 27.2, 27.1, 27.0, 26.9, 26.1, 25.6, 24.8, 24.2, 23.8, 22.8, 22.5, 21.3, 21.0, 19.3, 18.6, 14.0, 11.8 ppm.

10

## 【 0 5 4 0 】

E0005

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5.28-5.44 (m, 3H), 3.69-3.82 (m, 2H), 3.57-3.67 (m, 7H), 3.48-3.64 (m, 1H), 3.39-3.48 (m, 3H), 3.33 (s, 3H), 3.12-3.24 (m, 2H), 2.70-2.86 (m, 4H), 2.42-2.47 (d, J=6.02 Hz, 2H), 2.33-2.42 (m, 3H), 1.97-2.10 (m, 5H), 1.76-1.97 (m, 7H), 1.42-1.64 (m, 12H), 1.23-1.42 (m, 20H), 0.97-1.23 (m, 12H), 0.81-0.97 (m, 13H), 0.68 (s, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 140.9, 130.2, 130.1, 127.9, 127.9, 121.5, 79.5, 77.5, 72.5, 72.1, 70.9, 70.8, 69.3, 67.3, 63.1, 59.3, 56.7, 56.1, 55.5, 52.0, 51.7, 50.1, 42.3, 39.8, 39.5, 39.0, 37.2, 36.8, 36.2, 35.8, 31.9, 31.9, 31.5, 31.0, 29.7, 29.5, 29.5, 29.3, 29.3, 28.3, 28.2, 28.0, 27.2, 27.2, 26.1, 25.6, 24.3, 23.8, 22.8, 22.6, 21.0, 19.4, 18.7, 14.1, 11.8 ppm.

20

## 【 0 5 4 1 】

E0007

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5.26-5.44 (m, 5H), 3.84-3.94 (t, J = 5.56 Hz, 4H), 3.68-3.87 (m, 2H), 3.56-3.67 (m, 7H), 3.47-3.54 (m, 1H), 3.38-3.47 (m, 3H), 3.11-3.23 (m, 1H), 2.73-2.82 (t, J=6.44 Hz, 2H), 2.42-2.57 (m, 5H), 2.32-2.41 (m, 1H), 2.11-2.27 (m, 2H), 1.97-2.10 (m, 6H), 1.76-1.96 (m, 7H), 1.66-1.75 (m, 2H), 1.41-1.62 (m, 9H), 1.22-1.41 (m, 20H), 0.81-1.22 (m, 25H), 0.67 (s, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 141.0, 130.1, 130.1, 127.9, 127.9, 121.5, 96.2, 79.5, 77.6, 72.2, 71.6, 70.9, 70.8, 69.4, 67.3, 63.1, 59.3, 59.1, 56.8, 56.1, 50.5, 50.2, 42.3, 39.8, 39.5, 39.1, 37.2, 36.8, 36.2, 35.7, 32.8, 31.9, 31.9, 31.5, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 28.3, 28.2, 28.0, 27.2, 27.2, 26.1, 25.6, 25.6, 24.3, 23.8, 22.8, 22.5, 21.0, 19.3, 18.7, 14.0, 11.8 ppm.

30

## 【 0 5 4 2 】

E0009

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5.27-5.44 (m, 5H), 4.07-4.22 (m, 2H), 3.67-3.83 (m, 2H), 3.55-3.67 (m, 6H), 3.37-3.52 (m, 4H), 3.12-3.25 (m, 1H), 2.81-2.90 (m, 1H), 2.73-2.81 (t, J=6.53Hz, 2H), 2.42-2.64 (m, 3H), 2.15-2.41 (m, 4H), 1.76-2.11 (m, 11H), 1.64-1.72 (m, 4H), 1.42-1.63 (m, 12H), 1.21-1.41 (m, 22H), 0.81-1.22 (m, 26H), 0.68 (s, 3H) ppm.

40

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 140.9, 130.2, 130.1, 127.9, 127.9, 121.5, 79.5, 77.2, 72.7, 72.0, 71.6, 71.5, 70.8, 69.4, 67.3, 61.9, 59.5, 56.7, 56.5, 56.1, 50.1, 49.3, 49.3, 42.3, 39.7, 39.5, 39.0, 37.2, 36.8, 36.2, 35.8, 31.9, 31.9, 31.5, 29.7, 29.5, 29.5, 29.3, 29.3, 28.4, 28.3, 28.2, 28.0, 27.4, 27.4, 27.2, 27.2, 26.5, 26.1, 25.6, 24.3, 23.8, 22.8, 22.6, 22.6, 21.0, 19.4, 18.7, 14.1, 11.8 ppm.

40

## 【 0 5 4 3 】

E0170

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5.26-5.45 (m, 5H), 3.68-3.82 (m, 2H), 3.56-3.68 (m, 7H), 3.38-3.53 m, 4H), 3.11-3.24 (m, 1H), 2.73-2.82 (t, J=6.53 Hz, 2H), 2.56-2.69

50

(m, 4H), 2.50-2.56 (m, 2H), 2.32-2.41 (m, 1H), 2.09-2.27 (m, 2H), 1.77-2.09 (m, 13H), 1.42-1.63 (m, 9H), 1.21-1.42 (m, 20H), 0.83-1.21 (m, 25H), 0.68 (s, 3H) ppm。

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 140.9, 130.2, 130.1, 128.0, 127.9, 124.4, 122.0, 121.5, 119.6, 79.5, 77.6, 77.2, 71.8, 71.6, 70.9, 70.8, 69.4, 67.3, 58.7, 56.7, 56.1, 50.7, 50.1, 42.3, 39.7, 39.5, 39.0, 37.2, 36.8, 36.1, 35.8, 34.0, 31.9, 31.8, 31.5, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 28.3, 28.2, 28.0, 27.2, 27.2, 26.1, 25.6, 24.3, 23.8, 22.8, 22.6, 21.0, 19.3, 18.7, 14.1, 11.8 ppm。

## 【0544】

E0171

10

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5.27-5.46 (m, 5H), 3.58-3.82 (m, 9H), 3.38-3.54 (m, 4H), 3.13-3.26 (m, 1H), 2.74-2.82 (m, 2H), 2.31-2.50 (m, 6H), 2.16-2.2 (m, 1H), 1.70-2.10 (m, 12H), 1.24-1.65 (m, 33H), 0.97-1.23 (m, 13H), 0.82-0.97 (m, 19H), 0.68 (s, 3H) ppm。

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 141.0, 130.2, 130.1, 127.9, 127.9, 121.5, 79.5, 77.2, 73.2, 72.5, 72.3, 71.6, 70.9, 70.8, 69.3, 67.3, 66.0, 61.9, 60.9, 60.2, 56.7, 56.1, 50.7, 50.1, 42.3, 39.8, 39.5, 39.0, 38.7, 37.2, 36.8, 36.2, 35.8, 31.9, 31.5, 31.5, 29.7, 29.5, 29.5, 29.3, 29.3, 28.3, 28.2, 28.0, 27.2, 27.2, 26.1, 25.6, 24.3, 23.8, 22.8, 22.6, 21.0, 19.4, 18.7, 14.1, 11.8 ppm。

## 【0545】

E0010

20

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5.26-5.45 (m, 5H), 3.53-3.84 (m, 9H), 3.37-3.53 (m, 4H), 3.13-3.24 (m, 1H), 2.91-3.00 (m, 1H), 2.74-2.86 (m, 2H), 2.28-2.43 (m, 2H), 2.10-2.28 (m, 2H), 1.42-2.10 (m, 32H), 0.82-1.41 (m, 50H), 0.68 (s, 3H) ppm。

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 141.0, 130.2, 130.1, 127.9, 127.9, 121.5, 79.5, 77.2, 71.9, 71.6, 70.9, 70.8, 69.1, 67.3, 66.7, 56.8, 56.1, 55.5, 54.6, 54.0, 50.1, 42.3, 42.1, 42.0, 39.8, 39.5, 39.0, 37.2, 36.8, 36.2, 35.8, 33.2, 32.6, 31.9, 31.5, 30.7, 29.7, 29.5, 29.5, 29.3, 29.3, 28.3, 28.2, 28.0, 27.2, 27.2, 26.2, 26.1, 25.8, 25.6, 24.3, 23.8, 22.8, 22.6, 21.0, 19.4, 18.7, 14.1, 11.8 ppm。

## 【0546】

30

本化合物の他の特性決定データを、下記の表に示す。

表7：カチオン性脂質の特性決定データ

## 【表70】

脂質	MW (予測値)	MW (観測値) (M + H)	TLC Rf	TLC 比	TLC 溶媒	HPLC RT (分)	HPLC % 純度	方法
E0001			0.77	4:6	EtOAc:ヘプタン			

【表71】

E0002			0.67	1:0	EtOAc:ヘプタン			
E0003			0.45	1:0	EtOAc:ヘプタン			
E0004			0.23	1:9	MeOH:DCM			
E0005			0.52	1:9	MeOH:DCM			
E0006			0.64	1:0	EtOAc:ヘプタン			
E0007			0.80	1:9	MeOH:DCM			
E0008	877.8	879.3						
E0009	935.8	937.3						
E0010	917.8	919.3	0.59	1:9	MeOH:DCM			
E0011	865.8	867.2	0.51	1:19	MeOH:DCM			
E0012	864.8	865.9	0.10	1:9	MeOH:DCM			
E0013	878.8	880.0	0.40	1:9	MeOH:DCM			
E0014	863.8	864.5				19.3	98.9	*1
E0015	849.8	850.9	0.62	1:9	MeOH:DCM			
E0016	921.8	923.0	0.49	1:9	MeOH:DCM			
E0017	877.8	879.0	0.51	1:9	MeOH:DCM			
E0018	861.8	863.3	0.54	1:9	MeOH:DCM			
E0019	877.8	879.0	0.54	1:9	MeOH:DCM			
E0020	917.8	919.3	0.15	2:1	ヘプタン:EtOAc			
E0021	917.8	919.3	0.46	1:9	MeOH:DCM			
E0022	889.8	891.3	0.54	1:9	MeOH:DCM			
E0023	878.4	879.2	0.44	1:10	MeOH:EtOAc			
E0024	879.8	880.7	0.62	1:9	MeOH:DCM	15.3	99.4	*1
E0025	892.5	893.2	0.31	1:10	MeOH:EtOAc			
E0026	877.8	879.3	0.51	1:9	MeOH:DCM			
E0027	847.8	849.3	0.48	1:9	MeOH:DCM			
E0028	849.8	851.0	0.75	1:9	MeOH:DCM			
E0029	897.8	899.2	0.78	1:9	MeOH:DCM			
E0030	953.8	955.3	0.65	1:9	MeOH:DCM			
E0031	882.5	882.7	0.31	1:3	EtOAc:ヘプタン			
E0032	847.7	849.2	0.43	1:9	MeOH:DCM			
E0033	922.5	923.2	0.53	1:10	MeOH:DCM			
E0034	864.4	865.1	0.30	1:10	MeOH:EtOAc			
E0035	863.8	865.2	0.64	1:9	MeOH:DCM			
E0036	876.4	877.0	0.54	1:10	MeOH:DCM			
E0037	893.8	895.2	0.55	1:9	MeOH:DCM			
E0038	934.8	936.3	0.41	1:9	MeOH:DCM			
E0039	892.8	894.2	0.37	1:9	MeOH:DCM			
E0040	863.8	865.2	0.50	1:9	MeOH:DCM			
E0041	1004.8	1006.3	0.79	1:9	MeOH:DCM			
E0042	979.8	981.1	0.59	1:9	MeOH:DCM			
E0043	864.4	865.2	0.40	1:9	MeOH:DCM			
E0044	892.8	894.1	0.22	1:9	MeOH:DCM			
E0045	865.8	867.1	0.37	1:9	MeOH:DCM			
E0046	878.4	879.1	0.42	1:9	MeOH:DCM			
E0047	892.4	893.0	0.60	1:10	MeOH:DCM			
E0048	863.8	865.2	0.45	1:9	MeOH:DCM			
E0049	863.8	865.1	0.45	1:9	MeOH:DCM			
E0050	925.8	927.0	0.33, 0.40 <sup>a</sup>	1:19	MeOH:DCM			
E0051	847.4	847.9	0.39	1:3:6	MeOH:EtOAc:ヘプタン			
E0052	863.8	865.1	0.47	1:9	MeOH:DCM			
E0053	863.8	865.1	0.34	1:9	MeOH:DCM			

【0547】

10

20

30

40

【表72】

E0054	907.4	908.0	0.38	1:10	MeOH:DCM			
E0055	907.8	909.0	0.35	1:9	MeOH:DCM			
E0056	908.4	909.1	0.37	1:19	MeOH:DCM			
E0057	878.4	880.0	0.37	1:10	MeOH:DCM			
E0058	908.5	909.0	0.37	1:19	MeOH:DCM			
E0059	864.4	864.9	0.37	1:19	MeOH:DCM			
E0060	964.5	965.0	0.56	4:96	MeOH:DCM	15.3	99.7	*1
E0061	821.8	822.8				5.3	97.3	*2
E0062	837.8	838.6				5.8	99.8	*2
E0063	865.8	866.7				14.2	97.4	*1
E0064	881.8	882.6				6.8	99.7	*3
E0065	865.7	866.7				15.2	97.8	*1
E0066	821.8	822.9				15.2	98.9	*1
E0067	864.4	866.0	0.37	1:19	MeOH:DCM			
E0068	849.8	850.5				15.7	99.5	*1
E0069	847.8	848.5				15.9	100.0	*1
E0070	847.8	848.5				15.9	99.7	*1
E0071	891.8	892.5				15.7	97.8	*1
E0072	891.8	892.5				15.7	99.6	*1
E0073	891.8	892.5				15.7	97.8	*1
E0074	921.8	922.7				20.7	92.2	*1
E0075	891.8	892.5				20.2	99.9	*1
E0076	819.7	820.5				14.9	99.7	*1
E0077	891.8	892.5				15.5	99.7	*1
E0078	893.8	894.7				20.4	97.7	*1
E0079	951.8	952.4				20.1	99.4	*1
E0080	823.7	824.7				15.2	99.8	*1
E0081	909.8	911.5				20.4	97.6	*1
E0082	907.7	909.3				15.5	99.9	*1
E0083	863.8	864.5				15.5	99.8	*1
E0084	951.8	953.5				15.3	97.4	*1
E0085	867.8	868.4				15.2	99.6	*1
E0086	895.8	897.5				15.7	99.3	*1
E0087	835.7	836.5				15.2	99.4	*1
E0088	907.8	908.7				18.0	99.7	*1
E0089	863.8	864.5				15.6	98.2	*1
E0090	907.8	908.7				15.3	99.5	*1
E0091	935.8	936.7				15.7	99.3	*1
E0092	821.7	822.5				17.5	99.8	*1
E0093	893.8	894.7				17.9	99.8	*1
E0094	893.8	894.7				18.0	99.9	*1
E0095	919.8	920.5				21.1	99.8	*1
E0096	919.8	920.5				20.6	96.8	*1
E0097	950.8	951.7				15.4	95.4	*1
E0098	1006.8	1008.6				15.1	97.8	*1
E0099	950.8	951.5				14.7	98.8	*1
E0100	978.8	980.8				14.8	97.7	*1
E0101	962.8	963.6				14.7	98.3	*1
E0102	862.7	863.7				15.1	99.5	*1
E0103	906.8	907.8				14.8	97.6	*1
E0104	919.8	920.5				15.3	99.8	*1
E0105	934.8	935.5				15.0	98.6	*1
E0106	918.8	919.7				15.3	98.5	*1
E0107	949.8	950.8				14.9	99.9	*1

【0548】

10

20

30

40

【表73】

E0108	1006.8	1008.5				15.0	97.9	*1
E0109	953.8	954.7				15.1	99.8	*1
E0110	919.8	920.7				15.0	98.7	*1
E0111	1013.8	1015.6				16.9	95.8	*4
E0112	893.8	894.8				15.2	99.8	*1
E0113	937.8	938.5				15.2	99.6	*1
E0114	909.8	910.5				14.5	99.0	*1
E0115	893.8	894.7				15.4	98.9	*1
E0116	909.8	910.6				15.5	99.2	*1
E0117	893.7	894.5				15.5	99.4	*1
E0118	863.8	865.2	0.47	1:9	MeOH:DCM			
E0119	880.5	880.6	0.84	85:5	クロロホルム: MeOH			
E0120	920.5	920.7	0.85	9:1	クロロホルム: MeOH			
E0121	880.5	880.1	0.83	95:5	クロロホルム: MeOH			
E0122	912.4	912.6	0.66	95:5	DCM:MeOH			
E0123	867.9	868.0	0.36	95:5	DCM:MeOH			
E0124	947.8	948.5	0.84	9:1	クロロホルム: MeOH			
E0125	925.8	926.3	0.60	95:5	DCM:MeOH			
E0126	907.8	908.5	0.83	95:5	DCM:MeOH			
E0127	907.8	908.1	0.83	85:15	クロロホルム: MeOH			
E0128	881.8	882.5	0.61	95:5	DCM:MeOH			
E0129	993.8	994.4	0.29	95:5	DCM:MeOH			
E0130	979.8	980.1	0.60	9:1	クロロホルム: MeOH	17.0	99.5	*5
E0131	879.8	880.3	0.43	9:1	クロロホルム: MeOH			
E0132	922.8	923.0	0.43	9:1	クロロホルム: MeOH			
E0133	934.8	935.5	0.44	9:1	クロロホルム: MeOH			
E0134	1010.8	1012.2	0.40	95:5	DCM:MeOH			
E0135	936.7	937.4	0.45	9:1	クロロホルム: MeOH	16.0	98.4	*6
E0136	964.8	965.5	0.46	9:1	DCM:MeOH	16.3	98.8	*6
E0137	962.8	963.8	0.43	9:1	クロロホルム: MeOH	16.8	97.3	*6
E0138	909.8	910.4	0.43	95:5	DCM:MeOH	16.7	99.2	*6
E0139	865.7	866.4	0.43	95:5	DCM:MeOH	11.8	99.1	*7
E0140	923.8	924.5	0.42	95:5	DCM:MeOH	16.2	96.2	*6
E0141	950.8	951.0	0.38	95:5	DCM:MeOH	10.8	99.5	*7
E0142	1008.8	1009.7	0.38	95:5	DCM:MeOH			
E0143	979.8	980.9	0.46	95:5	DCM:MeOH	10.9	95.5	*7
E0144	923.8	925.0	0.47	95:5	DCM:MeOH	10.9	96.1	*7
E0145	1008.8	1010.2	0.38	95:5	DCM:MeOH	10.5	92.1	*7
E0146	909.8	910.8	0.18	50:50	EtOAc:ヘキサン			
E0147	893.8	895.0	0.68	9:1	DCM:MeOH			
E0148	922.8	923.7	0.50	9:1	DCM:MeOH			
E0149	907.8	908.9	0.47	9:1	DCM:MeOH			
E0150	937.8	939.0	0.61	9:1	DCM:MeOH			
E0151	935.8	937.0	0.65	9:1	DCM:MeOH			
E0152	967.8	968.3	0.43	95:5	DCM:MeOH			
E0158	879.8	881.1	0.47	8:2	EtOAc:ヘプタン			
E0159	879.8	881.0	0.41	8:2	EtOAc:ヘプタン			
E0160	965.8	967.0				6.9	100.0	*8
E0161	933.8	935.0	0.43	9:1	DCM:MeOH			
E0162	933.8	935.0	0.60	9:1	DCM:MeOH			
E0163	933.8	934.9				4.2	100.0	*8
E0164	921.8	923.0	0.41	9:1	DCM:MeOH			
E0165	921.8	923.0	0.48	9:1	DCM:MeOH			
E0166	948.8	949.5	0.58	9:1	DCM:MeOH			

【0549】

10

20

30

40

【表74】

E0167	881.7	882.9				4.3	100.0	*8
E0168	974.8	975.4	0.58	9:1	DCM:MeOH			
E0169	936.8	938.0	0.46	9:1	DCM:MeOH			
E0170								
E0171								
E0175	910.8	911.5	0.50	9:1	DCM:MeOH			
E0176	908.8	909.5	0.28	95:5	DCM:MeOH			
E0177	921.8	922.9	0.48	9:1	DCM:MeOH			
E0178	935.8	937.0	0.54	9:1	DCM:MeOH			
E0179	933.8	935.1	0.35	95:5	DCM:MeOH			
E0180	881.8	882.9	0.49	95:5	DCM:MeOH			

10

<sup>a</sup> E0050は2種のジアステレオマー成分がシリカで異なるR<sub>f</sub>値を有するジアステレオマー混合物である。

## 【0550】

用いられた方法は、下記に示した通りである。

\*1 - Zorbax 300SB C3 150×4.6, 1mL/分, 水: MeCN w / 0.1% TFA, 40~100%を15分, 100%を5分, ELSD検出。

\*2 - Zorbax RX SIL 250×4.6, 0.7mL/分, ヘキサン: EtOH 4:6, ELSD検出。

\*3 - Zorbax NH2 250×4.6, 1mL/分, ヘキサン: IPA, 30~60%を10分, 60%を5分, ELSD検出器。

20

\*4 - Xbridge C8, 150×4.6 mm, 1mL/分, 水: MeCN w / 0.1% TFA, 30~100%を15分, 100%を5分, ELSD検出。

\*5 - Zorbax Eclipse XDB-C18 250×4.6, 1mL/分, 水: MeCN w / 0.1% TFA, 50%を5分間維持, 50~100%を5分, 次いで100%を12分間維持, ELSD検出器。

\*6 - Zorbax Eclipse XDB-C18 250×4.6, 1mL/分, 水: MeOH w / 0.1% TFA, 50%を5分, 次いで50~100%を5分, 次いで100%を5分間維持, ELSD検出器。

\*7 - Zorbax Eclipse XDB-C18 250×4.6, 1mL/分, 水: MeOH w / 0.1% TFA, 50~70%を2分, 70~100%を3分, 次いで100%を5分間維持, ELSD検出器。

30

\*8 - Acquity BEH Shield RP 18 50×2.1, 0.5mL/分, 65, 水: IPA w / 0.0125% TFA, 30~50%を1.5分, 50~75%を10.5分, 75~90%を0.6分, 次いで90%を0.4分間維持, CAD検出器。

30

## 【0551】

実施例68組成物の製造

本発明の化合物を脂質ナノ粒子の形態で投与することが好ましい。それ故に、本発明の組成物が、本発明の化合物および所望により1種以上の他の脂質成分を含む脂質ナノ粒子を含むのが好ましい。

40

## 【0552】

サイズ縮小を達成するためおよび/または粒子サイズの均一性を高めるために、当業者は種々の組合せで実施する下に記載する工程を使用し得る。加えて、当業者は音波処理、濾過またはリポソーム製剤で使用される他のサイジング技術を用い得る。

## 【0553】

本発明の組成物を製造する方法は、典型的に生物活性薬物を含む水溶液を含む第一リザーバーを提供し、脂質の有機溶液を含む第二リザーバーを提供し、そしてその水溶液と有機脂質溶液を混合することを含む。第一リザーバーは、所望により第二リザーバーと流体連結している。混合工程の後に所望によりインキュベーション工程、濾過工程、および希釈および/または濃縮工程が続いてよい。

50

**【 0 5 5 4 】**

一つの態様において、生物活性薬物および / または脂質は適當な緩衝液中にある。一つの態様において、生物活性薬物は、水性緩衝液、例えばクエン酸緩衝液中にある。一つの態様において、脂質は有機アルコール、例えばエタノール中にある。

**【 0 5 5 5 】**

一つの態様において、インキュベーション工程は、混合工程からの溶液を、容器中、約 0 ~ 約 100 時間(好ましくは約 0 ~ 約 24 時間)、おおよそ *r t* および所望により光から保護して静置させることを含む。

**【 0 5 5 6 】**

一つの態様において、希釈工程がインキュベーション工程の後にある。希釈工程は、例えば、ポンピング装置(例えば蠕動ポンプ)を使用した水性緩衝液(例えばクエン酸緩衝液)での希釈を含む。10

**【 0 5 5 7 】**

一つの態様において、濾過工程は限外濾過である。一つの態様において、限外濾過は、希釈した溶液の濃縮と、その後の、例えば、適當なポンピングシステム(例えばポンピング装置、例えば蠕動ポンプまたはその同等物)を適當な限外濾過膜(例えば G E 中空纖維カートリッジまたは同等物)と共に使用する、ダイアフィルトレーションを含む。

**【 0 5 5 8 】**

この工程は脂質ナノ粒子の形成をもたらさなければならない。一つの態様において、脂質ナノ粒子は生物活性薬物を含む。20

**【 0 5 5 9 】**

一つの態様において、混合工程は透明単相を提供する。

**【 0 5 6 0 】**

一つの態様において、混合工程後、有機溶媒を除去して、生物活性薬物が脂質により、例えば脂質二重層中に封入されている粒子の懸濁液を提供する。

**【 0 5 6 1 】**

有機溶媒の選択は、典型的に溶媒極性および溶媒を粒子形成の後の段階で容易に除去できることの考慮を含む。

**【 0 5 6 2 】**

可溶化剤としても使用する有機溶媒は、好ましくは、生物活性薬物と脂質の透明な一相混合物を提供するのに十分な量である。30

**【 0 5 6 3 】**

有機溶媒は、クロロホルム、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、シクロヘキサン、シクロペンタン、ベンゼン、トルエン、メタノール、および他の脂肪族アルコール類(例えば C<sub>1</sub> - C<sub>8</sub>)、例えばエタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、*t* *e r t* - ブタノール、イソブタノール、ペンタノールおよびヘキサノールサノールの 1 種以上(例えば 2 種)から選択してよい。

**【 0 5 6 4 】**

混合工程は任意の数の方法により、例えば、機械的手段、例えばボルテックスミキサーにより行うことができる。40

**【 0 5 6 5 】**

有機溶媒の除去に使用する方法は典型的にダイアフィルトレーションまたは減圧下の蒸発または混合物への不活性ガス(例えば窒素またはアルゴン)流の吹き付けを含む。

**【 0 5 6 6 】**

他の態様において、本方法は、さらに、本組成物を使用した細胞の形質転換を行うのに有用な非脂質ポリカチオン類を含む。適當な非脂質ポリカチオン類の例は、臭化ヘキサジメトリン(商品名POLYBRENE(登録商標)でAldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis., USAから販売)またはヘキサジメトリンの他の塩類を含むが、これらに限定されない。他の適當なポリカチオン類は、例えば、ポリ-L-オルニチン、ポリ-L-アルギニン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ポリアリルアミンおよびポリエチレンイミンの塩類を含む50

。

## 【0567】

ある態様において、脂質ナノ粒子の形成は、単相系(例えばBlighおよびDyer単相または水性溶媒と有機溶媒の類似混合物)または適当に混合している二相系のいずれかで実施できる。

## 【0568】

脂質ナノ粒子は、単相系または二相系で形成してよい。単相系では、カチオン性脂質および生物活性薬物を、それぞれ一定量の単相混合物に溶解させる。2溶液の混合により一混合物を提供し、その中で複合体が形成される。二相系では、カチオン性脂質が生物活性薬物(これは水相に存在する)と結合し、それを有機相に“引き込む”。

10

## 【0569】

一つの態様において、脂質ナノ粒子を:(a)生物活性薬物と非カチオン性脂質および洗剤を含む溶液を接触させて化合物-脂質混合物を形成させ;(b)カチオン性脂質と化合物-脂質混合物を接触させて生物活性薬物の負電荷の部分を中和し、生物活性薬物と脂質の電荷が中和された混合物を形成し;そして(c)洗剤を電荷が中和された混合物から除去することを含む方法により製造する。

## 【0570】

態様の一つの群において、中性脂質および洗剤の溶液は水溶液である。生物活性薬物と中性脂質および洗剤の溶液の接触は、典型的に生物活性薬物の第一溶液と脂質および洗剤の第二溶液の混合により達成する。好ましくは、生物活性薬物溶液もまた洗剤溶液である。本方法に使用する中性脂質の量は、典型的に使用するカチオン性脂質の量に基づき決定し、典型的に使用するカチオン性脂質の約0.2~5倍量、好ましくは使用するカチオン性脂質の約0.5~約2倍量である。

20

## 【0571】

こうして形成された生物活性薬物-脂質混合物をカチオン性脂質と接触させて、存在する目的分子(または他のポリアニオニ性物質)に関連する負電荷の部分を中和する。使用するカチオン性脂質の量は、典型的に生物活性薬物の負電荷の少なくとも50%を中和するのに十分な量である。好ましくは、負電荷は少なくとも70%中和され、より好ましくは少なくとも90%中和される。

30

## 【0572】

洗剤の除去に使用する方法は、典型的に透析を含む。有機溶媒が存在するとき、除去は、典型的にダイアフィルトレーションまたは減圧下の蒸発によりまたは混合物への不活性ガス(例えば窒素またはアルゴン)流の吹き付けにより達成される。

## 【0573】

本明細書に本発明の組成物を製造するための装置を開示する。本装置は、典型的に生物活性薬物を含む水溶液を保持するための第一リザーバーおよび有機脂質溶液を保持するための第二リザーバーを含む。本装置はまた、水溶液と有機脂質溶液を混合領域または混合チャンバーに実質的に等しい流速でポンプ輸送するために構成されたポンプ機構を典型的に含む。一つの態様において、混合領域または混合チャンバーはTカップリングまたはその同等物を含み、それは水性流体および有機流体流をTコネクターへのインプットとして合わせ、得られた合わせた水溶液と有機溶液をTコネクターから回収リザーバーまたはその同等物へと排出させることを可能にする。

40

## 【0574】

実施例69組成物の製造方法の例

等容積のアルコールに溶解した脂質と、クエン酸緩衝液に溶解したs i R N Aを衝突噴流法により混合して、脂質ナノ粒子(LNP)を形成させる。脂質溶液は、本発明のカチオン性脂質化合物または同等な脂質、ヘルパー脂質(コレステロール)、任意成分としての中性脂質(DSPC)およびPEG(PEG)脂質を、アルコール中12mg/mLを目標として8~16mg/mLの濃度で含む。本発明の製剤中の各脂質成分の相対的モル比は表8~11に

50

記載する。LNP製剤が4種の脂質成分を含むとき、モル比は、それらが記載されている順番で、表の最初の4列に記載されている脂質のタイプに対応する。LNP製剤が3種の脂質成分を含むとき、中性脂質がない。

#### 【0575】

カチオン性脂質に対する脂質の比率は40～60モル百分率を目標として20～70モル百分率の範囲であり、ヘルパー脂質のモル百分率は30～50を目標として20～70の範囲であり、中性脂質のモル百分率は0～30の範囲であり、PEG脂質のモル百分率は2～5を目標として1～6の範囲である。siRNA溶液の濃度はクエン酸ナトリウム：塩化ナトリウム緩衝液pH4中、0.8～0.9mg/mLを目標として0.7～1.0mg/mLの範囲である。LNPは、等容積のエタノール中の脂質溶液と、クエン酸緩衝液に溶解したsiRNAを、0.25～2.0mmの範囲の内径のチューブ中、総流速10～120mL/minを通る衝突噴流法により混合することにより形成させる。混合したLNP溶液を、希釈工程前にrtで0～48時間静置する。次いで、溶液を濃縮し、30～100KDのMWカットオフを有する膜を使用する限外濾過法により適当な緩衝液に対してダイアフィルトレーション(diafiltered)する。最終産物を滅菌濾過し、4℃で貯蔵する。10

#### 【0576】

##### 実施例70：マウスモデルにおけるin vivoでのトランスフェクション

メスのCD-1マウスを、Charles River Labsから購入し、標準的実験食および水を自由に摂取させて飼育する。投与時、動物の体重は約25グラムである。製剤化したsiRNAを、1回投与として、個々の動物の体重に従いmg siRNA/kgベースで計算した種々の投与量で、側面尾静脈から静脈内投与する(10ml/kg注射量)。20

#### 【0577】

製剤化したsiRNAは、下の実施例に記載するとおり、標的mRNA配列に特異的な二本鎖siRNA配列から成り、カチオン性脂質、ステルス脂質および中性脂質を含む脂質ヌクレオチド粒子(LNP)の形である。肝臓のターゲティングに使用するsiRNA構築物は、第VII因子に特異的である。腫瘍のターゲティングに使用するsiRNA構築物は、Judge et al., See, J Clin Invest. 2009 Mar; 119(3):661-73; doi: 10.1172/JC137515により公開されているPLK1-424に特異的である。

#### 1. FVII siRNA二本鎖配列

5' UUu AAU UGA AAC cAA GAc Auu 3' (配列番号1)30

5' uGu cuu GGu uuc AAu uAA Auu 3' (配列番号2)

#### 2. PLK1 424 siRNA二本鎖配列

5' UAU UUA AgG AGG GUG AuC Uuu 3' (配列番号3)

5' AGA Uca cCC Ucc uuA AAU auu 3' (配列番号4)

#### 【0578】

これらの配列中、次の略語を使用する：

A = アデノシン

U = ウリジン

G = グアノシン

C = シトシン

a = 2'-O-メチル-アデノシン

u = 2'-O-メチル-ウリジン

g = 2'-O-メチル-グアノシン

c = 2'-O-メチル-シトシン

#### 【0579】

##### 実施例71：第VII因子活性アッセイ

製剤化した第VII因子siRNAを、1回投与として、個々の動物体重に従いmg siRNA/kgベースで計算した種々の投与量で、側面尾静脈から静脈内投与する(10ml/kg注射量)。注射約48時間後、マウスをCO<sub>2</sub>吸入により麻酔し、大静脈を介して放血させる。血漿第VII因子活性分析のために、0.105M クエン酸ナトリウム抗凝血因子を40

10

20

30

40

50

含むチューブに血液を集める。数例で、フォローアップmRNA定量のために肝臓の小片 (~50mg)を回収し、液体窒素で急速冷凍する。

【0580】

注射したマウスから集めた血漿を、Hyphen BiomedicalのBiophen FVIIキット(カタログ番号221304)を使用して、第VII因子活性について分析する。アッセイ標準曲線を、媒体対照動物由来の貯蔵血漿の一定量を使用して調製する。全サンプルを標準曲線の直線範囲に入るように希釈し、相対的第VII因子活性を記録する。

【0581】

数例で、総肝臓RNAを、製造者のプロトコールに従いQiagen's RNeasy単離キット(カタログ番号74106)を使用して調製する。第VII因子mRNAを定量的PCRで分析し、GAPDHに対して標準化する。Applied Biosystems第VII因子遺伝子発現アッセイMm00487333\_m1およびマウスGAPDH内因性対照(カタログ番号4352339E)をmRNA検出に使用する。

【0582】

第VII因子アッセイの結果を下記の表8に示す。

表8：第VII因子アッセイ - *in vivo*での肝臓の結果

【表75】

脂質	中性 脂質 <sup>1</sup>	ヘルペス 脂質	ステルス 脂質 <sup>2,3</sup>	脂質比 (モル比) <sup>4</sup>	N/P 比	最終 サイズ (nm)	PDI	pKa	用量 (mg/ kg)	FVII 阻害 %
E0001	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	71	0.101	4.84	3	27.6
E0001		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	77	0.16	4.84	3	20.1
E0002	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	109	0.221		3	10.4
E0002	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	109	0.221		1	-0.3
E0003	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	106	0.224		3	2.9
E0004		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	186	0.201	7.48	3	41
E0004	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	142	0.113	7.48	3	23.4
E0005		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	146	0.07		1.5	59.9
E0005	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	168	0.069		3	12.2
E0006		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	95	0.142	4.88	3	21.2
E0006	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	146	0.04	4.88	3	15.7
E0007		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	138	0.148	5.84	3	76.8
E0007	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	92	0.178	5.84	3	72.2
E0008	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	85	0.168	5.81	3	73
E0008		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	84	0.214	5.81	3	84.5
E0009		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	82	0.16	4.89	3	6.9
E0009	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	83	0.2	4.89	3	38.4
E0010		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	80	0.201	5.85	3	65.1
E0010	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	90	0.184	5.85	3	46.8
E0011	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	111	0.221	5.32	3	86.5
E0011		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	108	0.23	5.32	3	92.3
E0012	DSPC	CHOL	AVANTI	30/30/36/4	2.3	220	0.105		3	9.3
E0014		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	101.5	0.182	6.4	1	68.5
E0014		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	148	0.05	6.4	3	97.4
E0014	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	104	0.151	6.4	3	98.6
E0014	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	104	0.151	6.4	1	72.1
E0014	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	95	0.148	6.4	3	95.8
E0014		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	94.6	0.092	6.4	3	94
E0014		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	94.6	0.092	6.4	1	37.6
E0014		CHOL	GM-020	60/0/34/6	3	85.8	0.106	6.4	3	96.6
E0014		CHOL	GM-020	60/0/34/6	3	85.8	0.106	6.4	1	25
E0014		CHOL	GM-020	60/0/38/2	3	141	0.122	6.4	3	96.2
E0014		CHOL	GM-020	60/0/38/2	3	141	0.122	6.4	1	71.5
E0015		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	130	0.05	7.39	3	77.1
E0015	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	164	0.06	7.39	3	30.7
E0016		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	178	0.206	5.85	3	59.9
E0016	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	97	0.175	5.85	3	88.8
E0017		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	97	0.19	6.46	3	96.5
E0017	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	106	0.17	6.46	3	98.3
E0017	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	106	0.17	6.46	1	53.8
E0018	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	119	0.095	5.9	3	91.8
E0018		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	103	0.113	5.9	3	98
E0018		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	140	0.13	5.9	1	40.5
E0019	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	143	0.065	6.75	3	76.7
E0019		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	90.5	0.164	6.75	3	85.2
E0019		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	180	0.19	6.75	1	33.7

【0583】

10

20

30

40

【表76】

E0020		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	81	0.084	6.08	3	51.4
E0020	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	83	0.138	6.08	3	62.4
E0021		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	72	0.184	5.13	3	52.8
E0021	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	85	0.22	5.13	3	24.5
E0022		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	84	0.192		3	87.8
E0022	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	93	0.143		3	49.4
E0023		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	99	0.122	5.85	3	68
E0023	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	95	0.221	5.85	3	59.1
E0024		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	149	0.092	6.62	3	99.5
E0024	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	100	0.148	6.62	3	99.9
E0024	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	100	0.148	6.62	1	85.3
E0024		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	125	0.08	6.62	1	95.7
E0024		CHOL	S010	60/0/37/3	3	96.09	0.137	6.62	1	72.2
E0024		CHOL	S006	60/0/37/3	3	98.53	0.12	6.62	1	83.8
E0025		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	73	0.12	5.45	3	94.2
E0025	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	97	0.22	5.45	3	63
E0026		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	87	0.23	5.85	3	95.1
E0027		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	65	0.15	5.71	3	30.3
E0027	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	146	0.311	5.71	3	36.3
E0028		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	68	0.125	4.8	3	38.7
E0028	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	129	0.216	4.8	3	12.5
E0029		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	113	0.08	4.95	3	-19.1
E0029	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	137	0.04	4.95	3	12.4
E0030		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	155	0.08	5.38	3	12.4
E0031		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	65	0.11	4.8	3	27.1
E0031	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	108	0.23	4.8	3	36.7
E0032		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	63	0.21	6.8	3	85.5
E0032	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	87	0.18	6.8	3	64.5
E0033		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	105	0.05		3	15.3
E0033	DSPC	CHOL	AVANTI	25/28/18/4	1.9	161	0.16		3	-36.4
E0034		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	99	0.16		3	88.1
E0034	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	99	0.16		3	81.3
E0035		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	79	0.21	5.93	3	66.8
E0035	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	103	0.2	5.93	3	22
E0036		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	76	0.24	5.74	3	-23.1
E0036	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	122	0.12	5.74	3	-47
E0037		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	117	0.1		3	66.2
E0037	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	96	0.24		3	69.3
E0038		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	115	0.08		3	-6.2
E0038	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	116	0.25		3	-2.4
E0039		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	94	0.06	5.88	3	-5.4
E0039	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	113	0.15	5.88	3	-6.7
E0040		CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	87	0.21	6.13	3	91.8
E0040	DSPC	CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	103	0.15	6.13	3	97.8
E0040		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	101	0.17	6.13	1	49.2
E0041		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	93	0.21	4.8	3	17.6
E0041	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	95	0.37	4.8	3	-7.4
E0042		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	73	0.19	6.7	3	84.5
E0042	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	83	0.11	6.7	3	49.1
E0043		CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	110	0.24	6.33	3	95.7
E0043		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	76	0.15	6.33	3	-11.7
E0045		CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	100	0.18	4.73	3	10.4
E0045		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	103	0.25	4.73	3	90.7

【0584】

10

30

40

【表77】

E0046		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	194	0.116	5.75	3	12.7
E0047		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	112	0.061	5.55	3	-3.4
E0048		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	225	0.115	6.56	3	88.5
E0049		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	237	0.09	6.85	3	78.8
E0050	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	100	0.21	4.9	3	-7.2
E0050		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	103	0.097	4.9	3	-10.4
E0051		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	142.9	0.057	5.73	3	77.5
E0051	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	157.7	0.131	5.73	3	17
E0052	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	100.4	0.185	6.95	3	98.1
E0052	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	100.4	0.185	6.95	1	69.8
E0053	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	103.3	0.221	6.95	3	90.1
E0053	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	103.3	0.221	6.95	1	-9.4
E0054	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	103	0.2	6.58	3	97.8
E0054		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	96	0.13	6.58	3	98.9
E0054	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	103	0.2	6.58	1	57.5
E0054		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	96	0.13	6.58	1	63
E0055	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	113	0.24	6.78	3	96.4
E0055		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	380	0.22	6.78	3	69.8
E0055	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	113	0.24	6.78	1	28.2
E0055		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	380	0.22	6.78	1	14.8
E0060		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	90.25	0.171	6.43	1	0.0
E0061		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	139.4	0.073	6.28	1	52.6
E0062		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	145.1	0.125	6.45	1	64.8
E0063		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	155.5	0.09	6.48	1	33.3
E0064		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	169.2	0.144	6.83	1	37.2
E0065		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	153.01	0.148	6.8	1	41.1
E0066		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	140.7	0.071	6.5	1	44.2
E0068		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	174.0	0.041	4.82	1	28.6
E0069		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	113.4	0.199	6.07	1	29
E0070		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	150.9	0.045	6.40	1	50.3
E0071		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	188.2	0.151	6.47	1	30.8
E0073		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	130.1	0.118	5.66	1	37.4
E0075		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	108.3	0.098	5.79	1	31.5
E0076		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	89.47	0.143	5.85	1	29.3
E0077		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	109.8	0.127	5.79	1	26.8
E0078		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	122.6	0.098	5.72	1	51.9
E0079		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	106.2	0.052	6.79	1	33.5
E0082		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	105.1	0.303	6.81	1	49.7
E0083		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	113.4	0.199	6.79	1	55.6
E0084		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	112.1	0.1	7.27	1	60.7
E0087		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	119.2	0.148	6.38	1	69
E0088		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	110.7	0.080	5.79	1	50.8
E0094		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	115.5	0.076	5.91	1	36.3
E0095		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	125.1	0.091	5.84	1	13
E0096		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	128.8	0.162	5.77	1	14.4
E0115		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	162.5	0.098	6.41	1	68.8
E0118	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	88	0.21	6.88	3	98.1
E0118		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	93	0.23	6.88	3	99.2
E0118		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	98	0.22	6.88	1	76.1
E0170		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	170	0.05		3	14.3
E0170	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	133	0.095		3	9.3
E0171		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	90	0.18	5.85	3	54.1
E0172		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	129	0.184	8.5	3	40.8

【0585】

10

20

30

40

## 【表78】

E0172	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	170	0.181	8.5	3	21
E0173		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	76	0.16	6.73	3	98.5
E0173	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	98	0.17	6.73	3	90.9
E0173		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	76	0.16	6.73	1	87.4
E0174	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3.43	117	0.23	5.15	3	63.2
E0174		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3.43	90	0.21	5.15	3	3.5

<sup>1</sup> ブランクのセルは、中性脂質が存在しないことを示す。

<sup>2</sup> AVANTIは、AVANTI 880150Pを表す。

<sup>3</sup> GM-020は、GM 020 NOFを表す。

10

<sup>4</sup> モル比を表す際の脂質タイプの順番は、表の最初の4列の順番に対応している。モル比に3種の脂質しか挙げられていないときは、中性脂質が存在しない。

## 【0586】

実施例72：Hep3B腫瘍試験

Hep3B腫瘍を、100μl PBS中 $7 \times 10^6$ 細胞を左脇腹にsc注射することによりメスヌードマウスに確立させる。腫瘍の平均サイズが $100\text{mm}^3$ に到達した播種10～14日後に、マウスを処置群に無作為化する。siRNA製剤化LNP製剤を、個々の動物体重に従いmg siRNA/kgベースで計算した種々の投与量で、側面尾静脈から静脈内投与する(10ml/kg注射量)。マウスを種々の時点でCO<sub>2</sub>吸入により麻酔し、腫瘍をmRNA定量用に採取する。広範なpKa(5.3～6.6)を有する脂質をLNP製剤に使用する。腫瘍をデジタルカリパスを使用して2方向(幅×長さ)で測定して、腫瘍増殖を評価する。腫瘍体積を式[a × b × b / 2](式中、aは最大直径であり、bは最小直径である)を使用して計算する。

20

## 【0587】

実施例73：HepG2肝臓腫瘍試験

HepG2腫瘍を、100μl PBS中 $5 \times 10^6$ 細胞を左脇腹にsc注射することによりメスヌードマウスに確立させる。腫瘍の平均サイズが $150\text{mm}^3$ に到達した播種10～14日後に、マウスを処置群に無作為化する。siRNA製剤化LNP製剤を、個々の動物体重に従いmg siRNA/kgベースで計算した3×3mg/kg投与量で、側面尾静脈から静脈内投与する(10ml/kg注射量)。マウスを種々の時点でCO<sub>2</sub>吸入により麻酔し、腫瘍をmRNA定量のために最後の投与から24時間後に採取する。広範なpKa(5.3～6.6)を有する脂質をLNP製剤に使用する。腫瘍をデジタルカリパスを使用して2方向(幅×長さ)で測定して、腫瘍増殖を評価する。腫瘍体積を式[a × b × b / 2](式中、aは最大直径であり、bは最小直径である)を使用して計算する。

30

## 【0588】

実施例74：786-0腎臓腫瘍試験

786-0腫瘍を200μl PBS中 $10 \times 10^6$ 細胞のsc注射により、先に記載のとおり確立する。移植4週間後、200～250mm<sup>3</sup>の範囲の腫瘍サイズのマウスを処置群に無作為化する。次に、siRNA製剤化LNPを、5または10mg/kg投与量のいずれかで静脈内投与する。1回投与48時間後、腫瘍をmRNA定量のために採取する。

40

## 【0589】

実施例75：腫瘍組織におけるPLK-1およびGAPDH mRNA KDの測定

約30～50mgの腫瘍組織を、Qiagenホモゲナイザー中で組織溶解緩衝液にモホゲナイズし、遠心により溶解物を浄化させる。総RNAを、製造者のプロトコールに従いRNasey単離キット(カタログ番号74106)を使用して単離する。PLK-1 mRNAを定量的PCRにより分析し、ヒトGAPDHに対して標準化する。Applied BiosystemsヒトPLK-1遺伝子発現アッセイHs00983229\_m1およびヒトGAPDH内因性対照(カタログ番号4326317E)をmRNA検出に使用する。

## 【0590】

実施例72、73、74および75の腫瘍におけるPLK1 mRNAレベルのノック

50

ダウン(“K D”)の結果を次の表に示し、阻害パーセント(PLK1阻害%)として計算する。Hep3B肝臓腫瘍のターゲティングの結果を表9に示す。HepG2肝臓腫瘍のターゲティングの結果を表10に示す。786-0腎臓腫瘍のターゲティングの結果を表11に示す。全表におけるpKaは、カチオン性脂質のpKaを言う。複数回投与が示されているとき(例えば、3×5)、最初の数字は投与回数を示し、二番目の数字は投与量あたりの用量をmg siRNA(生物活性薬物)/kgマウスで示す。一般に複数投与量は24時間間隔で投与し、mRNA定量用の組織を最後の投与24時間後に採取する。

表9: in vivoでのHep3B腫瘍アッセイ結果

【表79】

脂質番号	ヘルパー脂質	中性脂質 <sup>1</sup>	ステルス脂質	脂質比(モル比) <sup>2</sup>	N/P(比)	最終サイズ(nm)	pKa	#用量x(mg/kg)	PLK1阻害%
E0008	Chol		S011	60/38/2	4	93.11	5.81	1x5	85
E0008	Chol		S004	60/38/2	4	123.1	5.81	1x1	38
E0011	Chol	DSPC	S011	40/48/10/2	4	83.45	5.32	1x10	56
E0011	Chol		S019	60/38/2	4	110	5.32	1x1	36
E0011	Chol		S020	60/38/2	4	74.42	5.32	1x1	32
E0011	Chol		S011	60/38/2	4	84.58	5.32	1x10	67
E0011	Chol		S011	60/38/2	4	84.58	5.32	3x10	71
E0011	Chol		S011	60/38/2	4	84.58	5.32	3x5	68
E0011	Chol	DSPC	S004	40/48/10/2	4	85.09	5.32	1x10	65
E0011	Chol	DSPC	S012	40/48/10/2	4	91.46	5.32	1x10	18
E0011	Chol	DSPC	S002	40/48/10/2	4	89.73	5.32	1x10	37
E0011	Chol	DSPC	S003	40/48/10/2	4	100.5	5.32	1x10	42
E0011	Chol	DSPC	S011	40/53/5/2	4	100	5.32	1x10	60
E0011	Chol	DSPC	S011	40/43/15/2	4	94.21	5.32	1x10	44
E0011	Chol	DSPC	S011	40/38/20/2	4	95.4	5.32	1x10	38
E0011	Chol		S011	60/38/2	4	83.01	5.32	1x5	69
E0011	Chol		S011	60/38/2	4	83.02	5.32	1x2	46

【0591】

10

20

30

【表 8 0】

E0011	Chol		S004	60/38/2	4	95.47	5.32	1x10	70
E0011	Chol		S004	60/38/2	4	95.47	5.32	3x5	67
E0011	Chol		S004	60/38/2	4	96.31	5.32	1x2	56
E0011	Chol		S004	60/38/2	4	96.31	5.32	1x5	66
E0011	Chol		S007	60/38/2	4	94.2	5.32	1x2	65
E0011	Chol		S009	60/38/2	4	98.41	5.32	1x2	64
E0011	Chol		S008	60/38/2	4	101.5	5.32	1x2	60
E0011	Chol		S005	60/38/2	4	95.26	5.32	1x2	52
E0011	Chol		S011	55/43/2	4	84.58	5.32	1x2	59
E0011	Chol		S011	55/43/2	4	84.58	5.32	1x5	66
E0011	Chol		S011	50/48/2	4	84.76	5.32	1x2	58
E0011	Chol		S011	50/48/2	4	84.76	5.32	1x5	67
E0014	Chol	DSPC	S011	40/48/10/2	4	82.21	6.4	1x10	22
E0061	Chol		S004	60/38/2	4	90.09	6.28	1x1	23
E0024	Chol	DSPC	S011	40/48/10/2	3	88.46	6.62	1x10	15
E0024	Chol		S004	60/38/0/2	3	120.6	6.62	4x5	23
E0025	Chol		S011	60/38/2	4	95.73	5.45	1x5	84
E0025	Chol	DSPC	S011	40/48/10/2	4	85.63	5.45	1x5	77
E0025	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	118.8	5.45	1x1	27
E0026	Chol		S011	60/38/2	4	105.8	5.85	1x5	75
E0051	Chol	DSPC	S011	40/48/10/2	4	85.77	5.73	1x10	17
E0095	Chol		S004	50/48/2	4	96.09	5.84	1x1	58
E0095	Chol		S004	50/48/2	4	96.09	5.84	1x0.1	23
E0095	Chol		S004	50/48/2	4	96.09	5.84	1x1	56
E0075	Chol		S011	60/38/2	4	124.5	5.79	1x5	75
E0076	Chol		S011	60/38/2	4	89.89	5.85	1x5	85
E0076	Chol		S004	50/48/2	4	86.03	5.85	1x1	54
E0076	Chol		S004	50/48/2	4	86.03	5.85	1x1	42
E0076	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	80.98	5.85	1x1	19
E0076	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	80.98	5.85	1x0.1	0
E0077	Chol		S011	60/38/2	4	120.8	5.79	1x5	77
E0085	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	76.8	5.32	1x1	22
E0085	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	87.74	5.32	1x1	30
E0085	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	87.74	5.32	1x1	34
E0085	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	87.74	5.32	1x0.1	53
E0085	Chol		S004	50/48/0/2	4	96.42	5.32	1x1	42
E0085	Chol	DSPC	S004	50/38/10/2	4	88.33	5.32	1x1	20
E0085	Chol	DSPC	S011	40/48/10/2	4	81.83	5.32	1x10	55
E0085	Chol		S004	60/38/2	4	90.06	5.32	1x2	62
E0085	Chol		S004	60/38/2	4	90.06	5.32	1x5	69
E0088	Chol		S011	60/38/2	4	146.2	5.79	1x5	71
E0093	Chol	DSPC	S011	40/48/10/2	4	82.42	4.85	1x10	2
E0104	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	87.59	6.1	1x1	48
E0104	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	87.59	6.1	1x0.1	34
E0104	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	92.19	6.1	1x1	34
E0104	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	92.19	6.1	1x0.1	22

【0 5 9 2】

10

20

30

40

【表81】

E0104	Chol		S004	60/38/2	4	106.2	6.1	1x1	47
E0104	Chol		S004	50/48/2	3	96.19	6.1	1x1	48
E0104	Chol		S020	50/48/2	4	75.56	6.1	1x1	45
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	90.77	6.1	1x0.1	29
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	90.77	6.1	1x1	55
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	95.05	6.1	1x1	50
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	95.05	6.1	1x0.1	15
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	95.05	6.1	1x1	50
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	95.05	6.1	1x1	40
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	90.87	6.1	1x1	56
E0102	Chol		S004	60/38/2	4	94.69	6.31	1x1	37
E0102	Chol		S004	60/38/2	4	94.69	6.31	1x1	47
E0045	Chol		S004	60/38/2	4	103.2	4.73	1x1	36
E0119	Chol		S004	50/48/2	4	99.37	5.82	1x1	40
E0120	Chol		S004	50/48/2	4	87	5.48	1x1	28
E0125	Chol		S004	50/48/2	4	94.13	5.53	1x1	36
E0125	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	92.84	5.53	1x1	20
E0125	Chol	DSPC	S004	50/38/10/2	4	101.5	5.53	1x1	34
E0128	Chol		S004	50/48/2	4	83.47	5.01	1x1	23
E0151	Chol		S004	50/48/2	4	103.8	6.06	1x1	25
E0151	Chol		S004	50/48/2	4	103.8	6.06	1x0.1	7
E0152	Chol		S004	50/48/2	4	121.3	5.38	1x1	18
E0160	Chol		S004	50/48/2	4	100.8	6.05	1x1	38
E0161	Chol		S004	50/48/2	4	101.4	6.3	1x1	45
E0167	Chol		S004	50/48/2	4	86.57	5.21	1x1	23
E0175	Chol		S004	60/38/2	4	78.74	5.67	1x1	42
E0175	Chol		S020	60/38/2	4	69.33	5.67	1x1	44
E0175	Chol		S004	50/48/2	4	67.98	5.67	1x1	41
E0175	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	3.8	93.51	5.67	1x1	46
E0175	Chol	レゾルシノール <sup>3</sup>	S004	50/43/5/2	3.8	104.2	5.67	1x1	34
E0176	Chol		S004	60/38/2	4	99.14	5.56	1x1	36
E0177	Chol		S004	50/48/2	4	91.91	6.1	1x1	41
E0177	Chol		S004	50/48/2	4	91.91	6.1	1x1	30
E0177	Chol		S004	50/48/2	4	91.91	6.1	1x0.1	9
E0177	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	95.92	6.1	1x1	45
E0177	Chol	DOPC	S004	50/43/5/2	4	89.78	6.1	1x1	0
E0177	Chol	DSPC	S004	50/38/10/2	4	88.15	6.1	1x1	36
E0178	Chol		S004	50/48/2	4	88.39	5.92	1x1	35
E0178	Chol		S004	50/48/2	4	88.39	5.92	1x0.1	0
E0178	Chol		S004	50/48/2	4	88.39	5.92	1x1	56
E0178	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	94.67	5.92	1x1	58
E0178	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	94.67	5.92	1x1	32
E0179	Chol		S004	50/48/2	4	114.6	5.95	1x1	53
E0180	Chol		S004	50/48/2	4	77.35		1x1	16

<sup>1</sup> ブランクのセルは、中性脂質が存在しないことを示す。<sup>2</sup> モル比を表す際の脂質タイプの順番は、表の最初の4列の順番に対応している。モル比に3種の脂質しか挙げられていないときは、中性脂質が存在しない。<sup>3</sup> “レゾルシノール”は、5-ヘプタデシルベンゼン-1,3-ジオールを表す。

## 【0593】

【表82】

脂質番号	ヘルパー脂質	中性脂質 <sup>1</sup>	ステルス脂質	脂質モル比 <sup>2</sup>	N/P比	最終サイズ	pKa	#用量X(mg/kg)	PLK1%阻害
E0011	Chol		S018	60/38/2	4	113.2	5.32	3x3	16
E0011	Chol		S019	60/38/2	4	110	5.32	3x3	13
E0011	Chol		S020	60/38/2	4	74.42	5.32	3x3	29
E0056	Chol		S004	50/48/2	4	77	6.33	3x3	0
E0076	Chol		S004	50/48/2	4	86.03	5.85	3x3	35
E0085	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	76.8	5.32	3x3	40
E0056	Chol		S004	50/48/2	4	96.09	5.84	3x3	16
E0056	Chol		S004	50/48/2	4	96.09	5.84	3x3	30
E0096	Chol		S004	50/48/2	4	94.91	5.77	3x3	17
E0104	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	87.59	6.1	3x3	32
E0104	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	92.19	6.1	3x3	36
E0104	Chol	DOPC	S004	50/43/5/2	4	125.1	6.1	3x3	19
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	95.05	6.1	3x3	34
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	90.87	6.1	3x3	30
E0119	Chol		S004	50/48/2	4	99.37	5.82	3x3	22
E0175	Chol		S004	60/38/2	4	78.74	5.67	3x3	49
E0175	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	3.8	93.51	5.67	3x3	30
E0176	Chol		S004	60/38/2	4	99.14	5.56	3x3	37
E0177	Chol		S004	50/48/2	4	91.91	6.1	3x3	30
E0177	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	95.92	6.1	3x3	44
E0177	Chol	DOPC	S004	50/43/5/2	4	89.78	6.1	3x3	24
E0178	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	94.67	5.92	3x3	0
E0161	Chol		S004	50/48/2	4	101.4	6.3	3x3	0
E0162	Chol		S004	50/48/2	4	114.4	6.07	3x3	0
E0180	Chol		S004	50/48/2	4	77.35		3x3	0

<sup>1</sup> ブランクのセルは、中性脂質が存在しないことを示す。

30

<sup>2</sup> モル比を表す際の脂質タイプの順番は、表の最初の4列の順番に対応している。モル比に3種の脂質しか挙げられていないときは、中性脂質が存在しない。

## 【0594】

表11：786-0腎臓腫瘍アッセイ結果

【表83】

脂質番号	ヘルパー脂質	中性脂質 <sup>1</sup>	ステルス脂質	脂質比 <sup>2</sup>	N/P比	最終サイズ	pKa	#用量X(mg/kg)	PLK1%阻害
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	95.05	6.1	1x5	55
E0104	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	87.59	6.1	1x10	50
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	95.05	6.1	1x10	50

<sup>1</sup> ブランクのセルは、中性脂質が存在しないことを示す。

40

<sup>2</sup> モル比を表す際の脂質タイプの順番は、表の最初の4列の順番に対応している。モル比に3種の脂質しか挙げられていないときは、中性脂質が存在しない。

## 【0595】

上記の表において、N / P比は次のものに等しい：(最初に製剤化したカチオン性脂質のモル数) / (最初に製剤化した siRNA のモル数 \* siRNAあたりの総アニオン電荷数)。

## 【0596】

実施例76：脂質製剤の最適化

50

例えば、上の表に示すとおりのカチオン性脂質およびステルス脂質を使用する製剤のさらなる最適化は当業者の知識の範囲内で考慮され、過度の実験なしに行い得る。例えば、製剤を、例えば、標的とする細胞または臓器のタイプに対して最適化したカチオン性脂質のpKa、使用するカチオン性脂質、使用するステルス脂質、ヘルパー脂質、使用する中性脂質、中性脂質が存在するか否か、選択したヘルパー脂質、任意成分としての中性脂質、ステルス脂質およびカチオン性脂質の比率、N/P比、粒子サイズ、投与レジメン、投与する用量、製剤法など個々の選択を含むが、これらに限定されない少なくとも一つのパラメーターについて最適化し得る。

#### 【0597】

一つの態様において、より最適な中性脂質を選択するとき、当業者はDOPCよりもDSPCを選択する。ある態様において、例えば、表9のE0177および表10のE0104において、これらの2種の中性脂質の選択によってのみ異なる組成物は、DSPCを使用したときと比べてDOPCを使用したとき低いKDまたは0でさえあるKDを示し、他の全ての面が等しいと考えられる。ある組成物において、中性脂質を完全に省くと、例えば、表9のE0085の少なくとも1種の製剤について、中性脂質が存在するときと比較してPLK1の高い阻害パーセントをもたらすか、または製剤中のDSPCを徐々に減少させるE0011において、ノックダウンパーセントを徐々に上昇させる。

#### 【0598】

投与量(mg/kg)および投与レジメン、例えば、投与回数および該投与のタイミングもまた最適化できる。例えば、表9に示す一つの実験において、E0178を含む製剤の0.1mg/kgの投与は零(0)%KDの結果であったが、1.0mg/kg投与は35%KDを提供する。高用量が対象により耐容性でないとき、完全処置レジメンを、数日間にわたり提供される複数の小用量の投与量として投与してよく、そのようなものは、表9では、E0011およびS004を含む製剤での $1 \times 10\text{ mg/kg siRNA}$ 対 $3 \times 5\text{ mg/kg siRNA}$ がそれぞれ70%KDおよび67%KDをもたらす。

#### 【0599】

### 実施例77：核酸レプリコン送達用リポソーム

それぞれ約10,000ヌクレオチド長の種々の核酸レプリコンを、下に記載するとおりリポソームで送達する。核酸を、本質的にJeffs et al. (2005) *Pharmaceutical Research* 22 (3):362-372およびMaurer et al. (2001) *Biophysical Journal*, 80: 2310-2326の方法により製造したリポソームに封入する。

#### 【0600】

参照リポソームは10%DSPC(双性イオン性、すなわち、中性脂質)、40%DlinDMA(カチオン性脂質)、48%コレステロール(ヘルパー脂質)および2%PEG接合DMG(ステルス脂質)から成る。DlinDMA脂質(1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン)を、Heyes et al. (2005) *J Controlled Release* 107:276-87の方法を使用して合成する。DSPC(1,2-ジアステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)をGenzymeから購入する。コレステロールをSigma-Aldrichから得る。PEG接合DMG(1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレンギリコール)、アンモニウム塩)、DOTAP(1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン、塩化物塩)およびDC cholesterol(3-[N-(N',N'ジメチル-アミノエタン)-カルバモイル]コレステロール塩酸塩)はAvanti Polar Lipidsから入手可能である。

#### 【0601】

簡単に言うと、脂質をエタノール(2ml)に溶解し、レプリコンを緩衝液(2ml、100mM クエン酸ナトリウム、pH 6)に溶解し、これらを2mlの緩衝液と混合して、1時間平衡化させる。混合物を6ml緩衝液で希釈して、濾過する。得られた生成物はリポソームを、~95%封入効率で含む。

#### 【0602】

封入された核酸のパーセンテージおよび核酸濃度は市販のキットで決定する。色素添加

10

20

30

40

50

前にリポソームを  $1 \times$  T E 緩衝液(キット含有)で 10 倍または 100 倍に希釈する。それとは別に、色素添加前にリポソームを 0.5% Triton X 含有  $1 \times$  T E 緩衝液で 10 倍または 100 倍に希釈する(リポソームを破壊し、それ故に、総核酸をアッセイするため)。その後等量の色素を各溶液に添加し、色素添加後の約  $180 \mu\text{L}$  の各溶液を、96 ウェル培養プレートにデュプリケートで充填する。蛍光(励起 485 nm、発光 528 nm)をマイクロプレートリーダーで読む。

#### 【 0 6 0 3 】

核酸の *in vivo* 発現を評価するために、レポーター酵素(S E A P; 分泌型アルカリホスファターゼ)をレブリコン中にコード化する。発現レベルを、 $1 \times$  Phospha-Light 希釈緩衝液で 1 : 4 希釈した血清で、化学ルミネセンスアルカリホスフェート基質を使用して測定する。8 ~ 10 週齢 BALB/c マウス(5 匹 / 群)に、0 日目に脚あたり  $50 \mu\text{l}$  で 0.1  $\mu\text{g}$  または 1  $\mu\text{g}$  核酸投与量で筋肉内注射する。同じベクターをまたリポソーム無しで(PBS 中)、1  $\mu\text{g}$  で投与する。

10

#### 【 0 6 0 4 】

封入により、S E A P レベルが 1  $\mu\text{g}$  投与量で約 1 / 2 ログ上昇し、6 日目に、0.1  $\mu\text{g}$  封入投与量からの発現は 1  $\mu\text{g}$  日封入投与量で見られるレベルと一致する。それ故に、核酸をリポソームに製剤化したとき、裸の核酸対照と比較して、10 倍低用量でさえ増加させる。

20

#### 【 0 6 0 5 】

さらに S E A P 実験は *in vivo* での明らかな用量反応を示し、ここで、発現は 1 ng ほどの少ない核酸の送達後でさえ見られる。封入したおよび裸のレブリコンからの発現を比較した実験は、0.01  $\mu\text{g}$  封入核酸が 1  $\mu\text{g}$  の裸の核酸と同等であることを示す。0.5  $\mu\text{g}$  投与量の核酸で、封入物質は 6 日目に 12 倍高い発現をもたらすことができる; 0.1  $\mu\text{g}$  投与量レベルで 6 日目に 24 倍高い発現をもたらすことができる。

30

#### 【 0 6 0 6 】

参照脂質(D l i n D M A)を使用する代わりに、本発明のカチオン性脂質を使用する。参照リポソームを、カチオン性脂質として D l i n D M A を使用して形成させる(上記参照)。D l i n D M A を、下に記載し、表に示す一連の種々のカチオン性脂質と置き換える。2% P E G 2 0 0 0 - D M G と(01)40% のカチオン性脂質、10% D S P C 、および 48% コレステロール、または(02)60% のカチオン性脂質および 38% コレステロールのいずれかを用いて、各リポソームの 2 種のタイプを形成させる。それ故に、(01)と(02)のリポソームの比較は、中性双性イオン性脂質の効果を示す。

#### 【 0 6 0 7 】

これらのリポソームを、上に記載する S E A P レポーターを用いて試験する。次の表 1-2 はリポソームのサイズ(Z 平均および多分散指数)、各リポソームにおける核酸封入%を、注射後 1 日および 6 日目に検出した S E A P 活性と共に示す。S E A P 活性は、D l i n D M A、コレステロールおよび P E G - D M G から製造された“D l i n D M A (02)”リポソームに対する。

表 1-2 : 核酸レブリコンのリポソーム送達

【表84】

E no.	Zav (pdI)	% 封入	SEAP 1日目	SEAP 6日目
DlinDMA (01)	154.6 (0.131)	95.5	80.9	71.1
DlinDMA (02)	162.0 (0.134)	85.3	100	100
比較例 (01)	133.9 (0.185)	96.5	57	45.7
比較例 (02)	134.6 (0.082)	97.6	54.2	4.3
E0014 (01)	158.3 (0.212)	62.0	65.7	44.9
E0014 (02)	164.2 (0.145)	86	62.2	39.7
E0024 (01)	131.0 (0.145)	74.0	91	154.8
E0024 (02)	134.6 (0.117)	81.5	90.4	142.6
E0026 (01)	164.0 (0.162)	76.0	76.9	329.8
E0026 (02)	177.8 (0.117)	72.8	67.1	227.9
E0084 (01)	116.0 (0.180)	79.8	25.5	12.4
E0084 (02)	136.3 (0.164)	74.9	24.8	23.1
E0065 (01)	140.6 (0.184)	77	26.5	163.3
E0065 (02)	138.6 (0.122)	87	29.7	74.8
E0078 (01)	176.7 (0.185)	50	76.5	187
E0078 (02)	199.5 (0.191)	46.3	82.4	329.8
E0069 (01)	165.3 (0.169)	72.2	65.1	453.9

【表85】

E0069 (02)	179.5 (0.157)	65	68.5	658.2
E0108 (01)	129.7 (0.184)	78.4	113.4	47.8
E0108 (02)	147.6 (0.131)	80.9	78.2	10.4
E0115 (01)	129.2 (0.186)	71	113.6	242.2
E0115 (02)	139 (0198)	75.2	71.8	187.2
E0099 (01)	135.7 (0.161)	78.8	65	10
E0099 (02)	158.3 (0.287)	69.4	78.8	8.2

【0608】

本発明にさらなる局面

本発明は、少なくとも1種のカチオン性脂質、少なくとも1種のヘルパー脂質および少なくとも1種のステルス脂質を含む、生物活性薬物を送達する組成物であって、生物活性薬物が、

10

20

30

40

50

(a) 組成物が約 6.2 以上の  $pK_a$  を有するカチオン性脂質を有するとき、肝臓または肝臓細胞；および

(b) 組成物が約 6.2 以下の  $pK_a$  を有するカチオン性脂質を有するとき、腫瘍または腫瘍細胞；

から選択される組織または細胞に送達するためのものである、組成物を含む。

#### 【0609】

本発明は、少なくとも 1 種のカチオン性脂質、少なくとも 1 種のヘルパー脂質および少なくとも 1 種のステルス脂質を含む、生物活性薬物を送達する組成物であって、生物活性薬物が、

(a) 組成物が約 5.1 ~ 約 7.4 の  $pK_a$  を有するカチオン性脂質を有するとき、肝臓または肝臓細胞；および

(b) 組成物が約 5.0 ~ 約 6.7 の  $pK_a$  を有するカチオン性脂質を有するとき、腫瘍または腫瘍細胞；

から選択される組織または細胞に送達するためのものである、組成物を含む。

#### 【0610】

本発明は、さらに所望により存在する中性脂質を含む、段落 [0608] または [0609] の組成物を含む。

#### 【0611】

本発明は、生物活性薬物が疾患または障害の治療的処置に有効な量である、段落 [0608]、[0609] または [0610] の何れか 1 つの組成物を含む。

#### 【0612】

本発明は、生物活性薬物が肝臓または肝臓細胞に送達するためのものであり、カチオン性脂質 1 が少なくとも約 5.1 ~ 約 7.4 の  $pK_a$  を有する、段落 [0611] の組成物を含む。

#### 【0613】

本発明は、生物活性薬物が腫瘍または腫瘍細胞に送達するためのものであり、段落 1 の化合物が約 5.0 ~ 約 6.7 の  $pK_a$  を有する、段落 [0611] の組成物を含む。

#### 【0614】

本発明は、カチオン性脂質が約 5.2 ~ 約 6.3 の  $pK_a$  を有する、段落 [0613] の組成物を含む。

#### 【0615】

本発明は、カチオン性脂質が約 5.4 ~ 約 6.2 の  $pK_a$  を有する、段落 [0613] の組成物を含む。

#### 【0616】

本発明は、カチオン性脂質が約 5.8 ~ 約 6.1 の  $pK_a$  を有する、段落 [0613] の組成物を含む。

#### 【0617】

本発明は、ステルス脂質、製剤化方法、N / P 比、粒子サイズ、ならびに、カチオン性脂質、所望により存在する中性脂質、ヘルパー脂質、ステルス脂質および所望のアルキルレゾルシノールをベースとする脂質のモル比の少なくとも 1 つの選択によって最適化した、段落 [0613] ~ 段落 [0616] の何れか 1 つ以上の組成物を含む。

#### 【0618】

本発明は、生物活性薬物が肝臓または肝臓細胞に送達するためのものであり、組成物が約 5.1 ~ 約 7.4 の  $pK_a$  を有するカチオン性脂質を少なくとも 1 種含む製剤を含む、段落 [0611] の組成物を含む。

#### 【0619】

本発明は、カチオン性脂質が約 5.3 ~ 約 7.3 の  $pK_a$  を有する、段落 [0618] の組成物を含む。

#### 【0620】

本発明は、カチオン性脂質が約 5.9 ~ 約 7.0 の  $pK_a$  を有する、段落 [0618] の組

10

20

30

40

50

成物を含む。

【 0 6 2 1 】

本発明は、カチオン性脂質が約6.2～約6.8のpKaを有する、段落[0618]の組成物を含む。

( 0 6 2 2 )

本発明は、ステルス脂質、製剤化方法、N / P 比、粒子サイズ、ならびに、カチオン性脂質、所望により存在する中性脂質、ヘルパー脂質、ステルス脂質および所望のアルキルレゾルシノールをベースとする脂質のモル比の少なくとも 1 つの選択によって最適化した、段落[0618]～段落[0621]の何れか 1 つ以上の組成物を含む。

( 0 6 2 3 )

本発明は、カチオン性脂質の  $pK_a$  が約 5.4 ~ 約 5.9 である、Hep3B 様腫瘍に送達するための段落 [0617] の組成物を含む。

【 0 6 2 4 】

本発明は、カチオン性脂質の  $pK_a$  が約 5.6 ~ 約 6.1 である、HepG2 様腫瘍および 786-0 様腫瘍に送達するための段落 [0617] の組成物を含む。

〔 0 6 2 5 〕

本発明は、疾患または状態を処置する方法であって、段落[0608]～[0624]の何れか1つの組成物を、治療有効量でそれを必要とする患者に投与する工程を含む方法を含む。

【 0 6 2 6 】

本発明は、疾患または障害が、腫瘍、肝臓疾患、またはRNAi構築物による処置に応答する疾患である。段落[0625]の方法を含む。

【 0 6 2 7 】

本発明は、疾患または状態が腫瘍であり、組成物中のカチオン性脂質が約5.0～約6.7のpKaを有する、段落[0625]の方法を含む。

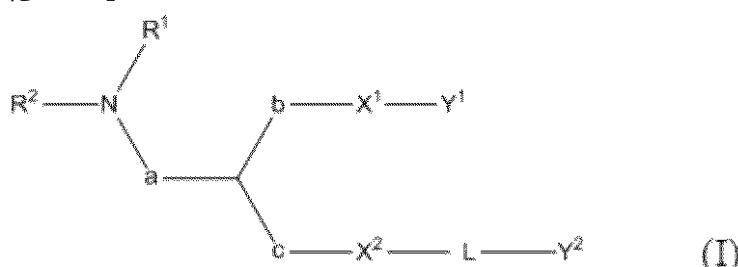
[ 0 6 3 8 ]

本発明は、疾患または状態が肝臓のものであり、組成物中のカチオン性脂質が約5.1～約7.4のpKaを有する。段落[0625]の方法を含む。

[ 0 6 2 9 ]

本発明は、式(1)・

【化 6 0】



「式中、

R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された C<sub>3-20</sub> ヘテロシクロアルキル、C<sub>3-20</sub> ヘテロシクロアルケニル、C<sub>3-20</sub> ヘテロシクロアルキニルまたは C<sub>5-20</sub> ヘテロアリール基を形成し；

は、存在しないか、または、所望により置換されたことである。

bは、存在しないか、または、所望により置換されたこと、アルキレンである。

これは、存在しないか、または、所望により賣換されたこと、アルキレンである。

\*<sup>1</sup> は、のまなはSであり。

×<sup>2</sup>は〇またはSである。

$\gamma^1$  は、所望により置換された  $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ハテロアルケニルまたは  $C_{10-30}$  ハテロアルキニルである：

は、存在しないか、または、 $(\perp^a)$ 、 $(\perp^b)$ 、 $(\perp^c)$ 。

{ここで、 $L^a$ は、所望により置換された $C_{1-15}$ アルキレン、 $C_{1-15}$ アルケニレン、 $C_{1-15}$ アルキニレン、 $C_{1-15}$ ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$ ヘテロアルケニレンまたは $C_{1-15}$ ヘテロアルキニレンであり；

$L^b$ は、所望により置換された $C_{6-14}$ アリーレンまたは $C_{5-13}$ ヘテロアリーレンであり；

$L^c$ は、所望により置換された $C_{1-15}$ アルキレン、 $C_{1-15}$ アルケニレン、 $C_{1-15}$ アルキニレン、 $C_{1-15}$ ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$ ヘテロアルケニレンまたは $C_{1-15}$ ヘテロアルキニレンであり；

$d$ は、0または1であり；

$e$ は、0または1であり；

$f$ は、0または1である。}

であり；

$Y^2$ は、所望により置換されたステロイドである。]

の化合物またはその塩または薬学的に許容される誘導体を含む。

#### 【0630】

本発明は、 $a$ が、所望により置換された $C_{1-2}$ アルキレンおよび所望により置換された $C_1$ アルキレンから選択される、段落[0629]の化合物を含む。

#### 【0631】

本発明は、 $b$ が、所望により置換された $C_{0-2}$ アルキレンおよび所望により置換された $C_1$ アルキレンから選択される、段落[0629]または[0630]の化合物を含む。

#### 【0632】

本発明は、 $c$ が、存在しないか、または所望により置換された $C_1$ アルキレンである、段落[0629]～[0631]の何れか1つの化合物を含む。

#### 【0633】

本発明は、 $a$ 、 $b$ および $c$ が非置換である、段落[0629]～[0632]の何れか1つの化合物を含む。

#### 【0634】

本発明は、 $R^1$ および $R^2$ が、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された $C_{3-20}$ ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$ ヘテロシクロアルケニルまたは $C_{3-20}$ ヘテロシクロアルキニル基を形成する、段落[0629]～[0633]の何れか1つの化合物を含む。

#### 【0635】

本発明は、 $R^1$ および $R^2$ が、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された環状 $C_{5-16}$ 基および所望により置換された環状 $C_{5-12}$ 基から選択される基を形成する、段落[0629]～[0634]の何れか1つの化合物を含む。

#### 【0636】

本発明は、 $R^1$ および $R^2$ が、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された環状 $C_5$ 基、 $C_6$ 基または $C_7$ 基を形成する、段落[0635]の化合物を含む。

#### 【0637】

本発明は、 $R^1$ および $R^2$ が、それらが結合している窒素原子と一体となって、頭部 $H^1-H^{5-2}$ の少なくとも1つから選択される基である、段落[0629]～[0636]の何れか1つの化合物を含む。

#### 【0638】

本発明は、 $X^1$ がOである、段落[0629]～[0637]の何れか1つの化合物を含む。

#### 【0639】

本発明は、 $X^2$ がOである、段落[0629]～[0638]の何れか1つの化合物を含む。

#### 【0640】

10

20

30

40

50

本発明は、Lが少なくとも1個のヘテロ原子を含む、段落[0629]～[0639]の何れか1つの化合物を含む。

## 【0641】

本発明は、Lが少なくとも1個のO原子を含む、段落[0640]の化合物を含む。

## 【0642】

本発明は、L<sup>c</sup>が式L<sup>c-i</sup>～L<sup>c-xxxxxiii</sup>の1つから選択されるものである、段落[0629]～[0641]の何れか1つの化合物を含む。

## 【表86】

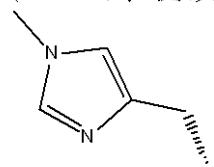
L <sup>c-i</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	10
L <sup>c-ii</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	
L <sup>c-iii</sup>	-CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO-	
L <sup>c-iv</sup>	-CO-	
L <sup>c-v</sup>	-COCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CO-	
L <sup>c-vi</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO-	
L <sup>c-vii</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -	
L <sup>c-viii</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	
L <sup>c-ix</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	
L <sup>c-x</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	
L <sup>c-xi</sup>		20
L <sup>c-xii</sup>		
L <sup>c-xiii</sup>		30
L <sup>c-xiv</sup>		
L <sup>c-xv</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH(CH <sub>3</sub> )-	
L <sup>c-xvi</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO-	
L <sup>c-xvii</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO-	
L <sup>c-xviii</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O CO-	
L <sup>c-xix</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHC(=O)CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(=O)-	40
L <sup>c-xx</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHC(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C(=O)-	
L <sup>c-xxi</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHC(=O)-	
L <sup>c-xxii</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHC(=O)CH <sub>2</sub> NHC(=O)-	

## 【0643】

## 【表 8 7】

L<sup>c-xxiii</sup>—(C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N H C(=O)C H(側鎖 1)N H C(=O)—

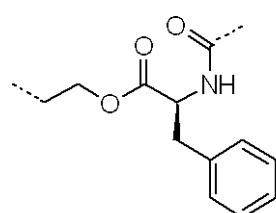
(ここで、側鎖 1 は、基：



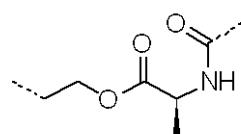
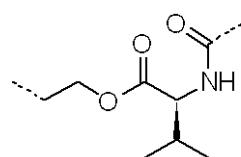
を表し、点線は、分子の残りの部分への結合を表す。)

L<sup>c-xxiv</sup>—(C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O C(=O)—

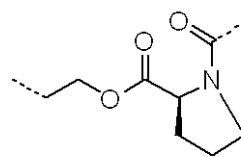
10

L<sup>c-xxv</sup>—(C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O C(=O)C H<sub>2</sub>—L<sup>c-xxvi</sup>—(C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O C(=O)C H<sub>2</sub>—L<sup>c-xxvii</sup>—(C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O C(=O)C H<sub>2</sub> N H C(=O)—L<sup>c-xxviii</sup>—(C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O C(=O)(C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N H C(=O)—L<sup>c-xxix</sup>

20

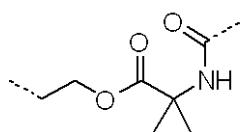
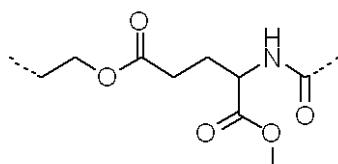
L<sup>c-xxx</sup>L<sup>c-xxxi</sup>

30

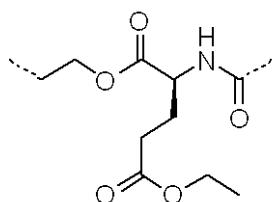
L<sup>c-xxxii</sup>

## 【0 6 4 4】

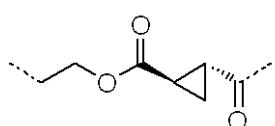
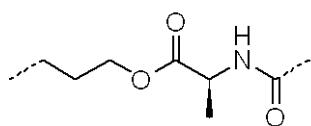
## 【表 8 8】

L<sup>c-xxxiii</sup>L<sup>c-xxxiv</sup>

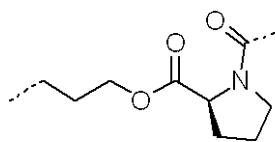
10

L<sup>c-xxxxv</sup>L<sup>c-xxxxvi</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCON(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-

20

L<sup>c-xxxxvii</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH(=O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>C(=O)-L<sup>c-xxxxviii</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O)-L<sup>c-xxxxix</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OCH(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(=O)-L<sup>c-xxxxx</sup>L<sup>c-xxxxxi</sup>

30

L<sup>c-xxxxxii</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>C(=O)-L<sup>c-xxxxxiii</sup>

40

## 【0 6 4 5】

本発明は、dが0であり；eが0であり；fが1である、段落[0 6 2 9]～[0 6 4 4]の何れか1つの化合物を含む。

## 【0 6 4 6】

本発明は、Y<sup>1</sup>がC<sub>1-2</sub>～<sub>2-8</sub>基である、段落[0 6 2 9]～[0 6 4 5]の何れか1つの化合物を含む。

## 【0 6 4 7】

本発明は、Y<sup>1</sup>が少なくとも1個のアルケニル基を有する、段落[0 6 2 9]～[0 6 4 6]の何れか1つの化合物を含む。

50

## 【0648】

本発明は、Y<sup>1</sup>が少なくとも1個のc i s不飽和アルケニル基を有する、段落[0647]の化合物を含む。

## 【0649】

本発明は、Y<sup>1</sup>が、Y<sup>1-i</sup>～Y<sup>1-vi</sup>から選択されるものである、段落[0629]～[0645]の何れか1つの化合物を含む。

## 【0650】

本発明は、Y<sup>2</sup>が所望により置換されたステロイド上の酸素原子を介してLに結合している、段落[0629]～[0649]の何れか1つの化合物を含む。

## 【0651】

本発明は、Y<sup>2</sup>が、ステロイドの環Aの3位のヒドロキシ基の水素原子が除かれたステロールである、段落[0650]の化合物を含む。

## 【0652】

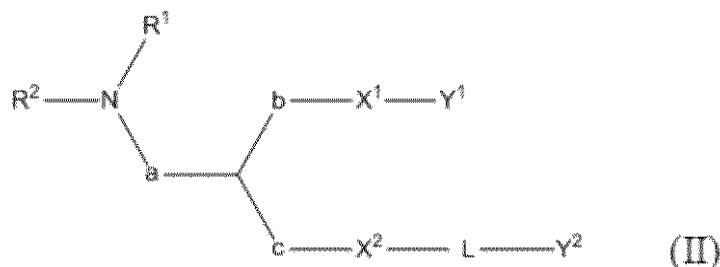
本発明は、ステロールが、アンナステロール；アベナステロール；betaシトステロール；ブラシカステロール；カルシフェロール；カンプエステロール；カリノステロール；チャイナステロール；コレスタノール；コレステロール；コプロスタノール；シクロアルテノール；デヒドロコレステロール；デスマステロール；ジヒドロカルシフェロール；ジヒドロコレステロール；ジヒドロエルゴステロール；ジノステロール；エピコレステロール；エルゴステロール；フコステロール；ヘキサヒドロミステロール；ヘキサオール；ヒドロキシコレステロール；ラノステロール；ルミステロール；パルケオール；ポリフェラステロール；サリンゴステロール；シトスタノール；シトステロール；スチグマスターノール；スチグマステロール；ウェインペルステロール；チモステロール；ステロール胆汁酸(コレル酸；ケノデオキシコレル酸；グリココレル酸；タウロコレル酸；デオキシコレル酸およびリトコレル酸から選択される1つ以上を含む)；および/またはその塩または薬学的に許容される誘導体からなる群から選択されるものである、段落[0650]の化合物を含む。

本発明は、ステロールが、コレステロールである、段落[0652]の化合物を含む。

## 【0653】

本発明は、式(II)：

## 【化61】



[式中、

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換されたC<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルケニル、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルキニルまたはC<sub>5-20</sub>ヘテロアリール基を形成し；

aは、存在しないか、または、所望により置換されたC<sub>1-4</sub>アルキレンであり；

bは、存在しないか、または、所望により置換されたC<sub>1-4</sub>アルキレンであり；

cは、存在しないか、または、所望により置換されたC<sub>1-4</sub>アルキレンであり；

X<sup>1</sup>は、OまたはSであり；

X<sup>2</sup>は、OまたはSであり；

Y<sup>1</sup>は、所望により置換されたC<sub>10-30</sub>アルケニル、C<sub>10-30</sub>アルキニル、C<sub>10-30</sub>ヘテロアルケニルまたはC<sub>10-30</sub>ヘテロアルキニルであり；

Lは、-(L<sup>a</sup>)<sub>d</sub>-(L<sup>b</sup>)<sub>e</sub>-(L<sup>c</sup>)<sub>f</sub>-

10

20

30

40

50

{ここで、 $L^a$ は、所望により置換された $C_{1-15}$ アルキレン、 $C_{1-15}$ アルケニレン、 $C_{1-15}$ アルキニレン、 $C_{1-15}$ ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$ ヘテロアルケニレンまたは $C_{1-15}$ ヘテロアルキニレンであり；

$L^b$ は、所望により置換された $C_{6-14}$ アリーレンまたは $C_{5-13}$ ヘテロアリーレンであり；

$L^c$ は、所望により置換された $C_{1-15}$ アルキレン、 $C_{1-15}$ アルケニレン、 $C_{1-15}$ アルキニレン、 $C_{1-15}$ ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$ ヘテロアルケニレンまたは $C_{1-15}$ ヘテロアルキニレンであり；

dは、0または1であり；

eは、0または1であり；

fは、0または1である。

ただし、 $L$ は、1個以上のヘテロ原子を含む。}

であり；

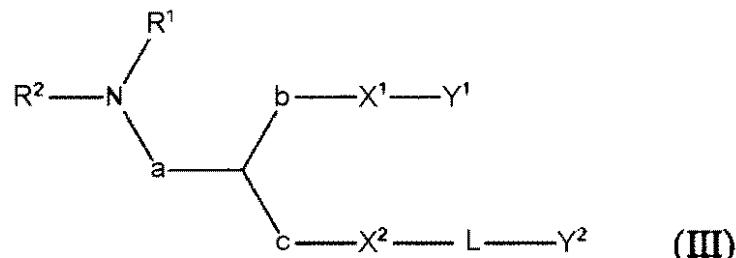
$Y^2$ は、所望により置換されたステロイドである。]

の化合物またはその塩または薬学的に許容される誘導体を含む、段落[0629]の化合物を含む。

#### 【0654】

本発明は、式(III)：

#### 【化62】



[式中、

$R^1$ および $R^2$ は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された $C_{3-20}$ ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$ ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$ ヘテロシクロアルキニルまたは $C_{5-20}$ ヘテロアリール基を形成し；

aは、メチレンであり；

bは、メチレンであり；

cは、存在せず；

$X^1$ は、OまたはSであり；

$X^2$ は、OまたはSであり；

$Y^1$ は、所望により置換された $C_{10-30}$ アルケニル、 $C_{10-30}$ アルキニル、 $C_{10-30}$ ヘテロアルケニルまたは $C_{10-30}$ ヘテロアルキニルであり；

$L$ は、 $-(L^a)_d - (L^b)_e - (L^c)_f$ -

{ここで、 $L^a$ は、所望により置換された $C_{1-15}$ アルキレン、 $C_{1-15}$ アルケニレン、 $C_{1-15}$ アルキニレン、 $C_{1-15}$ ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$ ヘテロアルケニレンまたは $C_{1-15}$ ヘテロアルキニレンであり；

$L^b$ は、所望により置換された $C_{6-14}$ アリーレンまたは $C_{5-13}$ ヘテロアリーレンであり；

$L^c$ は、所望により置換された $C_{1-15}$ アルキレン、 $C_{1-15}$ アルケニレン、 $C_{1-15}$ アルキニレン、 $C_{1-15}$ ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$ ヘテロアルケニレンまたは $C_{1-15}$ ヘテロアルキニレンであり；

dは、0または1であり；

eは、0または1であり；

fは、0または1である。}

10

20

30

40

50

であり；

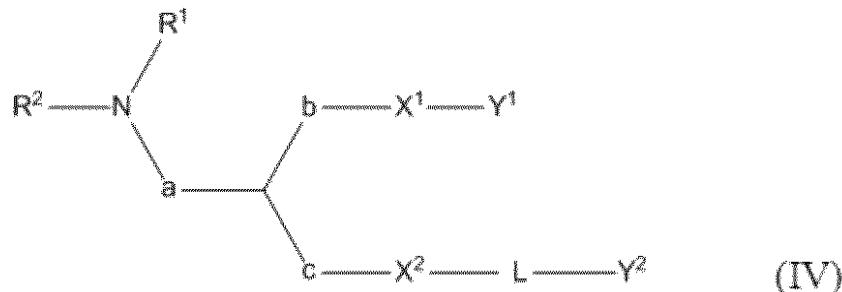
$Y^2$  は、所望により置換されたステロイドである。】

の化合物またはその塩または薬学的に許容される誘導体を含む、段落[0629]の化合物を含む。

【0655】

本発明は、式(IV)：

【化63】



[式中、

$R^1$  および  $R^2$  は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された  $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキニルまたは  $C_{5-20}$  ヘテロアリール基を形成し；

$a$  は、メチレンであり；

$b$  は、メチレンであり；

$c$  は、存在せず；

$X^1$  は、O または S であり；

$X^2$  は、O または S であり；

$Y^1$  は、所望により置換された  $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルまたは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；

$L$  は、 $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f-$

{ここで、 $L^a$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$L^b$  は、所望により置換された  $C_{6-14}$  アリーレンまたは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；

$L^c$  は、所望により置換された  $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$d$  は、0 または 1 であり；

$e$  は、0 または 1 であり；

$f$  は、0 または 1 である。

ただし、 $L$  は、1 個以上のヘテロ原子を含む。}

であり；

$Y^2$  は、所望により置換されたステロイドである。

の化合物またはその塩または薬学的に許容される誘導体を含む、段落[0629]の化合物を含む。

【0656】

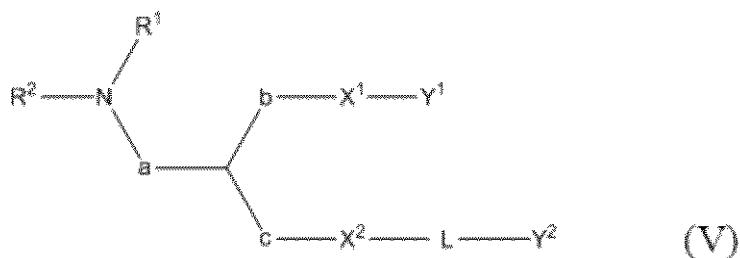
本発明は、式(V)：

20

30

40

## 【化64】



[式中、

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換されたC<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルケニル、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルキニルまたはC<sub>5-20</sub>ヘテロアリール基を形成し；

aは、メチレンであり；

bは、メチレンであり；

cは、存在せず；

X<sup>1</sup>は、Oであり；

X<sup>2</sup>は、Oであり；

Y<sup>1</sup>は、所望により置換されたC<sub>10-30</sub>アルケニル、C<sub>10-30</sub>アルキニル、C<sub>10-30</sub>ヘテロアルケニルまたはC<sub>10-30</sub>ヘテロアルキニルであり；

Lは、-(L<sup>a</sup>)<sub>d</sub>-(L<sup>b</sup>)<sub>e</sub>-(L<sup>c</sup>)<sub>f</sub>-

{ここで、L<sup>a</sup>は、所望により置換されたC<sub>1-15</sub>アルキレン、C<sub>1-15</sub>アルケニレン、C<sub>1-15</sub>アルキニレン、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルキレン、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルケニレンまたはC<sub>1-15</sub>ヘテロアルキニレンであり；

L<sup>b</sup>は、所望により置換されたC<sub>6-14</sub>アリーレンまたはC<sub>5-13</sub>ヘテロアリーレンであり；

L<sup>c</sup>は、所望により置換されたC<sub>1-15</sub>アルキレン、C<sub>1-15</sub>アルケニレン、C<sub>1-15</sub>アルキニレン、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルキレン、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルケニレンまたはC<sub>1-15</sub>ヘテロアルキニレンであり；

dは、0または1であり；

eは、0または1であり；

fは、0または1である。

ただし、Lは、1個以上のヘテロ原子を含む。}

であり；

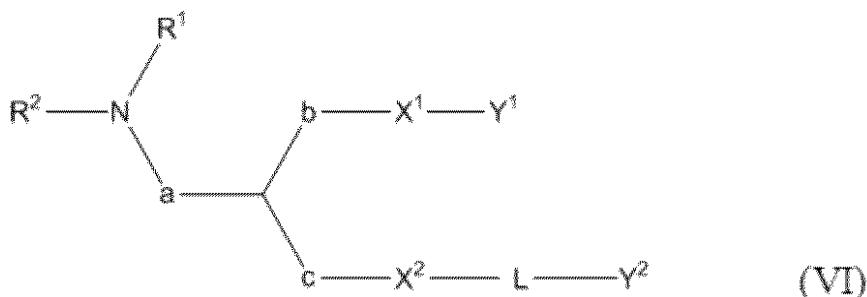
Y<sup>2</sup>は、所望により置換されたステロイドである。]

の化合物またはその塩または薬学的に許容される誘導体を含む、段落[0629]の化合物を含む。

## 【0657】

本発明は、式(VI)：

## 【化65】



[式中、

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換され

10

20

30

40

50

た  $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキニルまたは  $C_{5-20}$  ヘテロアリール基を形成し；

a は、メチレンであり；

b は、メチレンであり；

c は、存在せず；

$X^1$  は、O であり；

$X^2$  は、O であり；

$Y^1$  は、所望により置換された  $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルまたは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；

L は、-L<sup>c</sup>-

10

{ここで、L<sup>c</sup> は、所望により置換された  $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンである。}

であり；

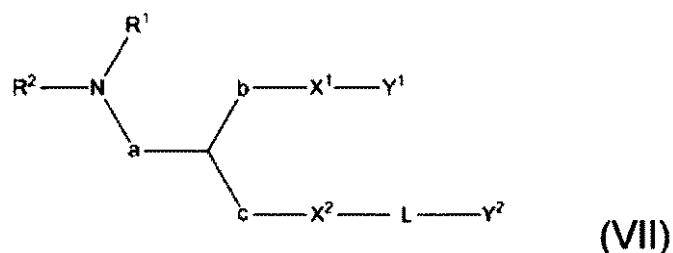
$Y^2$  は、所望により置換されたステロイドである。]

の化合物またはその塩または薬学的に許容される誘導体を含む、段落[0629]の化合物を含む。

#### 【0658】

本発明は、式(VII)：

#### 【化66】



20

[式中、

$R^1$  および  $R^2$  は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換された  $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$  ヘテロシクロアルキニルまたは  $C_{5-20}$  ヘテロアリール基を形成し；

30

a は、メチレンであり；

b は、メチレンであり；

c は、存在せず；

$X^1$  は、O であり；

$X^2$  は、O であり；

$Y^1$  は、所望により置換された  $C_{16-22}$  アルケニル基であり；

L は、-L<sup>c</sup>-

{ここで、L<sup>c</sup> は、所望により置換された  $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンまたは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンである。}

であり；

$Y^2$  は、所望により置換されたステロイドである。]

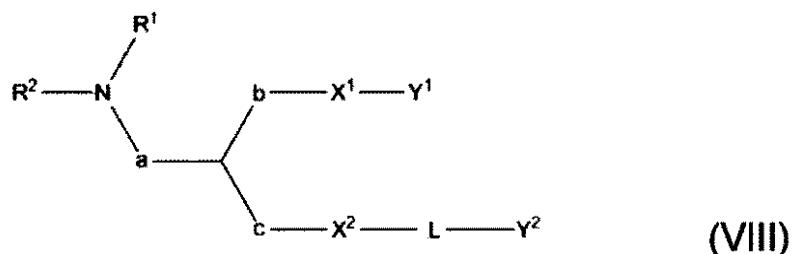
の化合物またはその塩または薬学的に許容される誘導体を含む、段落[0629]の化合物を含む。

#### 【0659】

本発明は、式(VIII)：

40

## 【化67】



[式中、

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換されたC<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルケニル、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルキニルまたはC<sub>5-20</sub>ヘテロアリール基を形成し；

aは、メチレンであり；

bは、メチレンであり；

cは、存在せず；

X<sup>1</sup>は、Oであり；

X<sup>2</sup>は、Oであり；

Y<sup>1</sup>は、所望により置換されたC<sub>16-22</sub>アルケニル基であり；

Lは、-L<sup>c</sup>-

{ここで、L<sup>c</sup>は、所望により置換されたC<sub>1-15</sub>ヘテロアルキレン、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルケニレンまたはC<sub>1-15</sub>ヘテロアルキニレンである。}

であり；

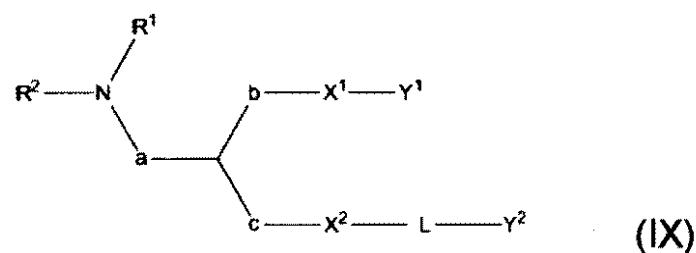
Y<sup>2</sup>は、ステロイドの環Aの3位のヒドロキシ基を介して結合しているコレステロールであり、当該ヒドロキシ基の水素原子は存在しない。]

の化合物またはその塩または薬学的に許容される誘導体を含む、段落[0629]の化合物を含む。

## 【0660】

本発明は、pKaが約5.1～約7.4である式(IX)：

## 【化68】



[式中、

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換されたC<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルケニル、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクロアルキニルまたはC<sub>5-20</sub>ヘテロアリール基を形成し；

aは、メチレンであり；

bは、メチレンであり；

cは、存在せず；

X<sup>1</sup>は、OまたはSであり；

X<sup>2</sup>は、OまたはSであり；

Y<sup>1</sup>は、所望により置換されたC<sub>10-30</sub>アルケニル、C<sub>10-30</sub>アルキニル、C<sub>10-30</sub>ヘテロアルケニルまたはC<sub>10-30</sub>ヘテロアルキニルであり；

Lは、-(L<sup>a</sup>)<sub>d</sub>-(L<sup>b</sup>)<sub>e</sub>-(L<sup>c</sup>)<sub>f</sub>-

{ここで、L<sup>a</sup>は、所望により置換されたC<sub>1-15</sub>アルキレン、C<sub>1-15</sub>アルケニレン、C<sub>1-15</sub>アルキニレン、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルキレン、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルケニ

10

20

30

40

50

レンまたはC<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>ヘテロアルキニレンであり；

L<sup>b</sup>は、所望により置換されたC<sub>6</sub>-C<sub>4</sub>アリーレンまたはC<sub>5</sub>-C<sub>3</sub>ヘテロアリーレンであり；

L<sup>c</sup>は、所望により置換されたC<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルキレン、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルケニレン、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルキニレン、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>ヘテロアルキレン、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>ヘテロアルケニレンまたはC<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>ヘテロアルキニレンであり；

dは、0または1であり；

eは、0または1であり；

fは、0または1である。

ただし、Lは、1個以上のヘテロ原子を含む。}

10

であり；

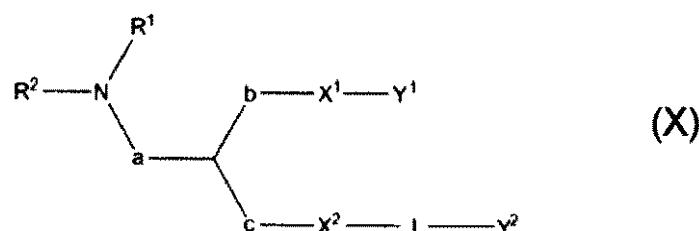
Y<sup>2</sup>は、所望により置換されたステロイドである。]

の化合物またはその塩または薬学的に許容される誘導体を含む、段落[0629]の化合物を含む。

#### 【0661】

本発明は、pK<sub>a</sub>が約5.0～約6.7である式(X)：

#### 【化69】



20

[式中、

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それらが結合している窒素原子と一体となって、所望により置換されたC<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>ヘテロシクロアルケニル、C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>ヘテロシクロアルキニルまたはC<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>ヘテロアリール基を形成し；

aは、メチレンであり；

bは、メチレンであり；

cは、存在せず；

X<sup>1</sup>は、OまたはSであり；

X<sup>2</sup>は、OまたはSであり；

Y<sup>1</sup>は、所望により置換されたC<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>アルケニル、C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>アルキニル、C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>ヘテロアルケニルまたはC<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>ヘテロアルキニルであり；

Lは、-(L<sup>a</sup>)<sub>d</sub>-(L<sup>b</sup>)<sub>e</sub>-(L<sup>c</sup>)<sub>f</sub>-

{ここで、L<sup>a</sup>は、所望により置換されたC<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルキレン、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルケニレン、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルキニレン、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>ヘテロアルキレン、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>ヘテロアルケニレンまたはC<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>ヘテロアルキニレンであり；

L<sup>b</sup>は、所望により置換されたC<sub>6</sub>-C<sub>4</sub>アリーレンまたはC<sub>5</sub>-C<sub>3</sub>ヘテロアリーレンであり；

L<sup>c</sup>は、所望により置換されたC<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルキレン、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルケニレン、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルキニレン、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>ヘテロアルキレン、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>ヘテロアルケニレンまたはC<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>ヘテロアルキニレンであり；

dは、0または1であり；

eは、0または1であり；

fは、0または1である。

ただし、Lは、1個以上のヘテロ原子を含む。}

であり；

Y<sup>2</sup>は、所望により置換されたステロイドである。]

50

40

30

の化合物またはその塩または薬学的に許容される誘導体を含む、段落[0629]の化合物を含む。

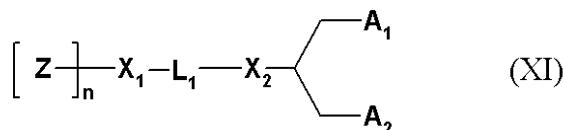
【0662】

本発明は、E0001～E0171およびE0175～E0180の何れか1つ以上から選択される、段落[0629]～[0661]の式I～Xの何れか1つの化合物を含む。

【0663】

本発明は、式(XI)：

【化70】



10

[式中、

Zは、PEG、ならびに、ポリ(オキサゾリン)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(グリセロール)、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ[N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド]およびポリ(アミノ酸)をベースとするポリマー(ここで、ポリマーは直鎖であっても分子であってもよく、また、所望により置換されていてよい。)から選択される親水性頭部であり；

ここで、Zは、n個のサブユニットが重合したものであり；

nは、10ユニットと200ユニットの間のZの平均重合度であり、ここで、nは、異なるポリマータイプについて最適化されており；

L<sub>1</sub>は、エーテル(例えば-O-)、エステル(例えば-C(O)O-)、スクシネット(例えば-O(O)C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)O-)、カルバメート(例えば-O-C(O)-NR'-)、カーボネート(例えば-O-C(O)O-)、ケトン(例えば-C-C(O)-C-)、カルボニル(例えば-C(O)-)、ウレア(例えば-NR-C(O)NR'-)、アミン(例えば-NR'-)、アミド(例えば-C(O)NR'-)、イミン(例えば-C(NR')-)、チオエーテル(例えば-S-)、キサントゲン酸エステル(例えば-O-C(S)S-)およびホスホジエステル(例えば-O-P(O)<sub>2</sub>O-) (これらは何れも、0個、1個またはそれ以上のZ基で置換されていてよい。)を0個、1個、2個またはそれ以上含む、所望により置換されたC<sub>1-10</sub>アルキレンまたはC<sub>1-10</sub>ヘテロアルキレンリンカーであり；

ここで、R'は、-H、-NH-、-O-、-S-、ホスフェートまたは所望により置換されたC<sub>1-10</sub>アルキレンから独立して選択され；

X<sub>1</sub>およびX<sub>2</sub>は、炭素原子、または、-NH-、-O-、-S-もしくはホスフェートから選択されるヘテロ原子から独立して選択され；

A<sub>1</sub>およびA<sub>2</sub>は、C<sub>6-30</sub>アルキル、C<sub>6-30</sub>アルケニルおよびC<sub>6-30</sub>アルキニルから独立して選択され、ここで、A<sub>1</sub>およびA<sub>2</sub>は、同一であっても異なっていてよい。]

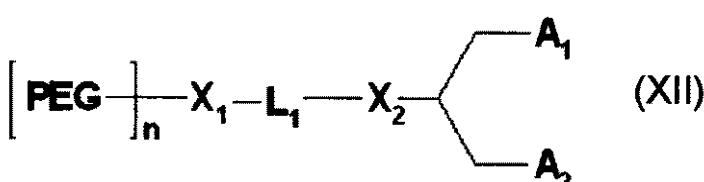
あるいは、A<sub>1</sub>およびA<sub>2</sub>は、それらが結合している炭素原子と一体となって、所望により置換されたステロイドを形成する。]

のステルス脂質またはその塩または薬学的に許容される誘導体を含む。

【0664】

本発明は、式(XII)：

【化71】



30

20

40

50

[式中、

P E G は、ポリ(エチレングリコール)サブユニットであり、ここで、P E G は、直鎖であっても分枝鎖であってもよく；

n は、10 ユニットと 200 ユニットの間の P E G の平均重合度であり、好ましくは約 23 ユニット、約 45 ユニットまたは約 68 ユニットであり；

L<sub>1</sub> は、エーテル、エステル、スクシネート、カルバメート、カーボネート、ケトン、カルボニル、ウレア、アミン、アミド、イミン、チオエーテル、キサントゲン酸エステルおよびホスホジエステル(これらは何れも、0 個、1 個またはそれ以上の P E G 基によって置換されていてもよい。)を 1 個、2 個またはそれ以上含む、所望により置換された C<sub>1</sub> -<sub>10</sub> ヘテロアルキレンリンカーであり；

X<sub>1</sub> および X<sub>2</sub> は、炭素または酸素から独立して選択され；

A<sub>1</sub> および A<sub>2</sub> は、C<sub>6</sub>-<sub>30</sub> アルキル、C<sub>6</sub>-<sub>30</sub> アルケニルおよび C<sub>6</sub>-<sub>30</sub> アルキニルから独立して選択され、ここで、A<sub>1</sub> および A<sub>2</sub> は、同一であっても異なっていてもよい。

あるいは、A<sub>1</sub> および A<sub>2</sub> は、それらが結合している炭素原子と一緒にとなって、所望により置換されたステロイドを形成する。]

のステルス脂質またはその塩または薬学的に許容される誘導体を含む、段落[0663]のステルス脂質を含む。

#### 【0665】

本発明は、S001～S009およびS012～S026の何れか 1 つ以上から選択される、段落[0663]および[0664]の何れか 1 つの化合物を含む。

#### 【0666】

本発明は、肝臓または肝臓細胞に生物活性薬物を送達するための、pK<sub>a</sub> が約 5.1～約 7.4 である段落[0629]～[0662]の何れか 1 つの化合物を含む。

#### 【0667】

本発明は、肝臓または肝臓細胞に生物活性薬物を送達する製剤に使用するための、pK<sub>a</sub> が約 6.2 以上である段落[0629]～[0662]の何れか 1 つの化合物を含む。

#### 【0668】

本発明は、肝臓または肝臓細胞に生物活性薬物を送達する製剤に使用するための、pK<sub>a</sub> が約 5.9～約 7.0 である段落[0667]の化合物を含む。

#### 【0669】

本発明は、腫瘍または腫瘍細胞に生物活性薬物を送達する製剤に使用するための、pK<sub>a</sub> が約 5.0～約 6.7 である、段落[0629]～[0662]の何れか 1 つの化合物を含む。

#### 【0670】

本発明は、腫瘍または腫瘍細胞に生物活性薬物を送達する製剤に使用するための、pK<sub>a</sub> が約 5.4～約 6.2 である段落[0629]～[0662]の何れか 1 つの化合物を含む。

#### 【0671】

本発明は、腫瘍または腫瘍細胞に生物活性薬物を送達する製剤に使用するための、pK<sub>a</sub> が約 6.2 以下である段落[0629]～[0662]の何れか 1 つの化合物を含む。

#### 【0672】

本発明は、治療のために生物活性薬物を送達する製剤に使用するための、段落[0629]～[0671]の何れか 1 つの化合物を含む。

#### 【0673】

本発明は、治療のために生物活性薬物を送達する製剤に使用するための、段落[0629]～[0672]の何れか 1 つの化合物の 1 つ以上を含む組成物を含む。

#### 【0674】

本発明は、段落[0629]～[0672]の何れか 1 つの化合物に加えて、少なくとも 1 種の脂質成分をさらに含む、段落[0673]の組成物を含む。

#### 【0675】

本発明は、カチオン性脂質、所望により存在する中性脂質、ヘルパー脂質、ステルス脂

10

20

30

40

50

質および所望のアルキルレゾルシノールをベースとする脂質からなる群から選択される、1種以上の脂質成分を含む脂質製剤を含む、段落[0608]～[0624]および段落[0674]の何れか1つの組成物を含む。

【0676】

本発明は、ステルス脂質が式XIまたは式XIIのステルス脂質から選択されるものである、段落[0675]の組成物を含む。

【0677】

本発明は、標的となる細胞のタイプまたは臓器に最適化したカチオン性脂質のpKa、用いられるカチオン性脂質、用いられるステルス脂質、ヘルパー脂質、用いられる中性脂質、中性脂質が存在するか否か、選択されたヘルパー脂質、所望により存在する中性脂質、ステルス脂質およびカチオン性脂質の比率、N/P比、粒子サイズ、投与レジメ、投与量、製剤化方法の個別の選択を含むがこれらに限定されない少なくとも1つのパラメーターを最適化した段落[0675]の組成物を含む。10

【0678】

本発明は、生物活性薬物をさらに含む、段落[0608]～[0624]および段落[0673]～[0677]の何れか1つの組成物を含む。

【0679】

本発明は、生物活性薬物が、抗体、コレステロール、ホルモン、抗ウイルス剤、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核タンパク質、化学療法剤、低分子量薬物、ビタミン、補因子、ヌクレオシド、ヌクレオシド誘導体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素的核酸、アンチセンス核酸、三本鎖形成オリゴヌクレオチド、2,5-Aアンチセンスキメラ、アロザイム、アプタマー、デコイRNA分子およびそのアナログ、および、低分子核酸、例えばRNA干渉剤(RNAi)、低分子干渉核酸(siRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、ミクロRNA(miRNA)および低分子ヘアピン型RNA(shRNA)からなる群から選択される、段落[0678]の組成物を含む。20

【0680】

本発明は、生物活性薬物がヌクレオシドまたはヌクレオシド誘導体である、段落[0679]の組成物を含む。

【0681】

本発明は、生物活性薬物が、RNAi、siRNA、RNAi阻害剤、miRNA、siRNAおよびshRNAから選択される、段落[0680]の組成物を含む。30

【0682】

本発明は、カチオン性脂質が、E0007、E0008、E0011、E0014、E0015、E0016、E0017、E0018、E0019、E0022、E0024、E0025、E0026、E0032、E0034、E0040、E0042、E0043、E0045、E0048、E0049、E0051、E0052、E0053、E0054、E0055およびE0118のカチオン性脂質の1つ以上から選択される段落[0675]の組成物を含む。

【0683】

本発明は、カチオン性脂質が、E0008、E0011、E0025、E0026、E0075、E0076、E0077、E0085、E0088、E0095、E0104、E0178およびE0179のカチオン性脂質から選択される、段落[0675]の組成物を含む。40

【0684】

本発明は、E0008、E0011、E0025、E0026、E0075、E0076、E0077、E0085、E0088、E0095、E0104、E0178およびE0179から選択される少なくとも1種のカチオン性脂質を含む、段落[0675]の組成物を含む。

【0685】

本発明は、E0011、E0025、E0026、E0075、E0076、E0077およびE0088から選択される少なくとも1種のカチオン性脂質を含む、段落[0675]の組成物を含む。

【0686】

本発明は、ステルス脂質が、S001、S002、S003、S004、S005、S006、S007、S008、S009、S010、S011、S012、S013、S014、S015、S016、S017、S018、S019、S020、S021、S022、50

S023、S024、S025およびS026のステルス脂質から選択される、段落[0675]の組成物を含む。

【0687】

本発明は、何れか1つ以上の上記化合物、薬学的に許容される担体をさらに含む製剤および/または組成物を含む。

【0688】

本発明は、何れか1つ以上の上記化合物、製剤および組成物、ならびに使用説明書を含むキットを含む。

【0689】

本発明は、処置を必要とする対象において、疾患または状態を処置する方法であって、段落[0608]～[0624]および段落[0673]～[0686]の何れか1つ以上の組成物を含む製剤中の、治療有効量の生物活性薬物を投与する工程を含む方法を含む。 10

【0690】

本発明は、細胞または組織に生物活性薬物を送達する方法であって、段落[0608]～[0624]および段落[0673]～[0686]の何れか1つの組成物を、細胞または組織に投与することを含む方法を含む。

【0691】

本発明は、疾患または状態が、腫瘍、肝臓疾患、または、RNAi構築物による処置に応答する疾患である、段落[0690]の方法を含む。

【0692】

本発明は、疾患または状態が腫瘍であり、組成物中のカチオン性脂質が約5.0～約6.7のpKaを有する、段落[0690]の方法を含む。 20

【0693】

本発明は、疾患または状態が腫瘍であり、組成物中のカチオン性脂質が、約6.2以下のpKaを有する、段落[0690]の方法を含む。

【0694】

本発明は、疾患または状態が腫瘍であり、組成物中のカチオン性脂質が約5.0～約6.7のpKaを有する、段落[0690]の方法を含む。

【0695】

本発明は、疾患または状態が肝臓であり、組成物中のカチオン性脂質が約5.1～約7.4のpKaを有する、段落[0690]の方法を含む。 30

【0696】

本発明は、生物活性薬物が、抗体、コレステロール、ホルモン、抗ウイルス剤、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核タンパク質、化学療法剤、低分子量薬物、ビタミン、補因子、ヌクレオシド、ヌクレオシド誘導体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素的核酸、アンチセンス核酸、三本鎖形成オリゴヌクレオチド、2,5-Aアンチセンスキメラ、アロザイム、アプタマー、デコイRNA分子およびそのアナログ、および小分子核酸、例えばRNA干渉剤(RNAi)、低分子干渉核酸(siRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、ミクロRNA(miRNA)および低分子ヘアピン型RNA(shRNA)からなる群から選択される、段落[0689]～[0695]の方法を含む。 40

【0697】

本発明は、生物活性薬物がヌクレオシドまたはヌクレオシド誘導体である、段落[0696]の方法を含む。

【0698】

本発明は、生物活性薬物が、RNAi、siRNA、RNAi阻害剤、miRNA、siRNAおよびshRNAから選択される、段落[00794]の方法を含む。

【0699】

別途定義しないかぎり、本明細書で用いられた技術用語および科学用語は、本発明が属する分野をよく知っている専門家によって通常理解されるものと同一の意味を有する。 50

**【0700】**

ことわりのない限り、詳細に具体的に記載されていない全ての他の方法、工程、技術および操作は、当業者に既知の方法で行われ得るか、行ったものである。例えば、標準的なハンドブックおよび一般的な背景技術およびさらにそこで引用された文献に、記載されている。

**【0701】**

本発明の特許請求の範囲は、非限定的であり、以下に添付する。

**【0702】**

特定の態様および主張が本明細書で詳細に開示されているが、これは、例として、説明の目的のためにのみ開示されており、添付された請求項の範囲または何れかの対応するさらなる適応の請求項の対象範囲に関して限定することを意図しない。特に、本発明者らは、請求項によって定義された本発明の精神および範囲から逸脱しない限り、種々の置換、変更および修飾を行い得ることを企図する。出発物質の、対象の生物学的物質またはリポソーム会合方法の選択は、本明細書に記載された態様の知識を有する当業者には、きまりきった事項であると考えられる。他の局面、利点および修飾が、下記の請求項の範囲内であると考えられる。後に出願する対応出願における請求項の範囲の訂正は、種々の国の特許法による限定によるものであり、請求項の対象を放棄すると解釈されるべきではない。

10

**【0703】**

[配列表]

**【表89】**

20

配列番号	配列(5'→3')	タイプ
1	UUu AAU UGA AAC cAA GAc Auu	Artificial
2	uGu cuu GGu uuc AAu uAA Auu	Artificial
3	UAU UUA AgG AGG GUG AuC Uuu	Artificial
4	AGA Uca cCC Ucc uuA AAU auu	Artificial

**【手続補正書】**

【提出日】平成24年9月19日(2012.9.19)

**【手続補正1】**

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2013515693000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2010/070412

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

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

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

2, 3(completely); 1, 5-22(partially)

## Remark on Protest

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2010/070412
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>
INV. A61P35/00 A61P1/16 A61P43/00 A61K9/127 A61K9/14
A61K31/7088 A61K47/18 A61K47/28 A61K47/30

**ADD.**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
A61K A61P C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/086558 A1 (TEKMIRA PHARMACEUTICALS CORP [CA]; UNIV BRITISH COLUMBIA [CA]; ALNYLAM) 9 July 2009 (2009-07-09) example 19 page 29, lines 12-27 D-Lin-MPZ; page 17 D-Lin-MA; page 15 page 147 - page 148; tables 5-6 claims 11, 14-20, 25 ----- -/-	1,6-9, 12-22
Y		1-3,5-22

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  3 May 2011	Date of mailing of the international search report  12/09/2011
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer
--	--------------------

Lemarchand, Aude
------------------

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2010/070412
---

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/020058 A1 (CHEN TONGQIAN [US] ET AL) 24 January 2008 (2008-01-24) page 10, paragraph 69 - page 11, paragraph 75 COIM structure; page 105 L149; page 102; table IV -----	1-3,5-22
X	WO 2008/103276 A2 (MERCK & CO INC [US]; JADHAV VASANT [US]; VARGESE CHANDRA [US]; SHAW L) 28 August 2008 (2008-08-28) COIM structure; page 275 Coleyl-2MeIm; CLin-Im; CLin-2MeI; pages 276-277 L149; page 278 L237-L240; page 280 -----	1-3,5-9, 12-22
X	DATABASE CA [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; 29 August 2008 (2008-08-29), JADHAV, VASANT ET AL: "Preparation and formulation of cholestryl-containing cationic lipid nanoparticle used for delivering various biol. active mols. to cells", XP002633767, retrieved from STN Database accession no. 2008:1042536 abstract -----	1-3, 5-10, 12-22
X	DATABASE REGISTRY [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; 19 September 2008 (2008-09-19), "1050504-57-8", XP002633768, retrieved from STN accession no. 1050504-57-8 Database accession no. 1050504-57-8 the whole document -----	10
X	WO 2008/147438 A2 (SIRNA THERAPEUTICS INC; CHEN TONGQIAN [US]; VARGESE CHANDRA [US]; VAG) 4 December 2008 (2008-12-04) COIM structure; page 280 L149; page 276 -----	1-3,5-9, 12-22
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2010/070412
---

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2011/022460 A1 (MERCK SHARP & DOHME [US]; CAMERON MARK [US]; DAVIS JENNIFER R [US]; GE) 24 February 2011 (2011-02-24) page 22; compound 10a page 15; compound 10 claims 1-4 page 1, line 35 - page 2, line 2; compound A -----	1-3,5-22
X,P	SEMPLE S C ET AL: "Rational design of cationic lipids for siRNA delivery", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 28, no. 2, February 2010 (2010-02), pages 172-176+METHOD, XP002633693, NATURE PUBLISHING GROUP USA ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT.1602 page 174, last paragraph - page 175, paragraph first; table 1 -----	1-3,5-20
Y	SEMPLE<A> S C ET AL: "Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, vol. 1510, no. 1-2, 9 February 2001 (2001-02-09), pages 152-166, XP004248775, ISSN: 0005-2736, DOI: DOI:10.1016/S0005-2736(00)00343-6 page 158, left-hand column, last paragraph - page 159, right-hand column, paragraph first -----	1-3,5-22
T	ZHANG JINGTAO ET AL: "Ionization behavior of amino lipids for siRNA delivery: determination of ionization constants, SAR, and the impact of lipid pKa on cationic lipid-biomembrane interactions.", LANGMUIR : THE ACS JOURNAL OF SURFACES AND COLLOIDS, vol. 27, no. 5, 1 March 2011 (2011-03-01), pages 1907-1914, XP07918344, ISSN: 1520-5827 page 1909 - right-hand column, last paragraph page 1910 - paragraph first; table 1 -----	1-3,5-22
4		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2010/070412

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2009086558	A1	09-07-2009		CA 2709875 A1 EP 2224912 A1 JP 2011509258 A US 2011117125 A1		09-07-2009 08-09-2010 24-03-2011 19-05-2011
US 2008020058	A1	24-01-2008		US 2009048197 A1 US 2010105933 A1		19-02-2009 29-04-2010
WO 2008103276	A2	28-08-2008		AU 2008219165 A1 CA 2689042 A1 EP 2131848 A2 JP 2010519203 A US 2010015218 A1		28-08-2008 28-08-2008 16-12-2009 03-06-2010 21-01-2010
WO 2008147438	A2	04-12-2008		AU 2007354321 A1 CA 2667473 A1 EP 2104740 A2 JP 2010507680 A US 2010048888 A1		04-12-2008 04-12-2008 30-09-2009 11-03-2010 25-02-2010
WO 2011022460	A1	24-02-2011		NONE		

International Application No. PCT/EP2010/070412

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

**1. claims: 2, 3(completely); 1, 5-22(partially)**

a composition comprising a cationic lipid, one helper lipid and one stealth lipid for delivery of a biologically active agent, wherein the biologically active agent is for delivery to a tissue or cell selected from: a) a liver or liver cells, wherein the composition has a cationic lipid with a pKa of from about 6.2 or above; b) a tumor or tumor cell, wherein the composition has a cationic lipid with a pKa of from about 6.2 or below; c) a liver or liver cells, wherein the composition has a cationic lipid with a pKa of from about 5.1 to about 7.4; and d) a tumor or tumor cell, wherein the composition has a cationic lipid with a pKa of from about 5.0 to about 6.7, wherein the cationic lipid is a compound of formula (I) as defined in claim 2;  
a compound of formula (I) as defined in claim 2.

---

**2. claims: 4(completely); 1, 5-22(partially)**

a "stealth lipid" of formula (XI) as defined in claim 4 and a composition comprising said stealth lipid, a cationic lipid, one helper lipid for use in the delivery of a biologically active agent, wherein the biologically active agent is for delivery to a tissue or cell selected from: a) a liver or liver cells, wherein the composition has a cationic lipid with a pKa of from about 6.2 or above; b) a tumor or tumor cell, wherein the composition has a cationic lipid with a pKa of from about 6.2 or below; c) a liver or liver cells, wherein the composition has a cationic lipid with a pKa of from about 5.1 to about 7.4; and d) a tumor or tumor cell, wherein the composition has a cationic lipid with a pKa of from about 5.0 to about 6.7.

---

**3. claims: 1, 6-9, 12-22(all partially)**

1. A composition comprising at least one cationic lipid, at least one helper lipid and at least one stealth lipid for delivery of a biologically active agent, wherein the biologically active agent is for delivery to a tissue or cell selected from:  
a) a liver or liver cells, wherein the composition has a cationic lipid with a pKa of from about 6.2 or above;  
b) a tumor or tumor cell, wherein the composition has a cationic lipid with a pKa of from about 6.2 or below;  
c) a liver or liver cells, wherein the composition has a cationic lipid with a pKa of from about 5.1 to about 7.4; and  
d) a tumor or tumor cell, wherein the composition has a cationic lipid with a pKa of from about 5.0 to about 6.7

International Application No. PCT/ EP2010/ 070412

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

wherein 1) the cationic agent is not a compound of formula (I) as defined in claim 2 and 2) the stealth lipid is not a compound of formula (XI) as defined in claim 4

---

## 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 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
C 0 8 G 65/333 (2006.01)	C 0 8 G 65/333	

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

(72)発明者 ジェレミー・バリーザ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 25  
0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 キース・ボウマン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 25  
0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 アンドリュー・ゲール

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 35  
0 番、ノバルティス・バクシーンズ・アンド・ダイアグノスティックス・インコーポレイテッド

(72)発明者 タンジナ・ファザール

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 25  
0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 キャメロン・リー

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 25  
0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 チャンドラ・バルギース

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 25  
0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ローラ・ウエスト

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 25  
0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ジャオ・ジュンピン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 25  
0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4C076 AA95 CC29 DD70 EE23 EE51 FF34 FF68

4C084 AA17 MA05 NA13 ZA751 ZB261

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA03 MA05 NA13 ZA75 ZB26  
4C091 AA01 BB06 CC01 DD01 EE05 FF01 GG01 HH01 JJ03 KK01  
LL01 MM03 NN01 PA02 PA05 PB05 QQ01  
4J005 AA04 BD02 BD05

【要約の続き】

物活性薬物を細胞および／または組織に送達するための当該化合物、組成物および製剤の方法および使用を提供する

。