

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6762094号
(P6762094)

(45) 発行日 令和2年9月30日 (2020.9.30)

(24) 登録日 令和2年9月10日 (2020.9.10)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 C 323/12	(2006.01)	C O 7 C 323/12	C S P
A 6 1 K 31/713	(2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 38/00	
A 6 1 K 47/20	(2006.01)	A 6 1 K 47/20	
A 6 1 K 47/50	(2017.01)	A 6 1 K 47/50	

請求項の数 26 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-560349 (P2015-560349)
 (86) (22) 出願日 平成26年2月28日 (2014.2.28)
 (65) 公表番号 特表2016-510729 (P2016-510729A)
 (43) 公表日 平成28年4月11日 (2016.4.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/019411
 (87) 国際公開番号 W02014/134445
 (87) 国際公開日 平成26年9月4日 (2014.9.4)
 審査請求日 平成29年2月27日 (2017.2.27)
 審判番号 不服2018-14194 (P2018-14194/J1)
 審判請求日 平成30年10月25日 (2018.10.25)
 (31) 優先権主張番号 61/770,657
 (32) 優先日 平成25年2月28日 (2013.2.28)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 302051223
 タフツ ユニバーシティー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 メ
 ドフォード バロウ ホール (番地なし
)
 (73) 特許権者 515236226
 シュウ, ショウビン
 アメリカ合衆国, O 2 1 4 4 マサチュー
 セッツ州, ソマーヴィル, キャメロン ア
 ヴェニュー 1 1
 (73) 特許権者 515236237
 ワン, ミン
 アメリカ合衆国, O 2 1 4 3 マサチュー
 セッツ州, ソマーヴィル, ウィロビー ス
 トリート 2 1

最終頁に続く

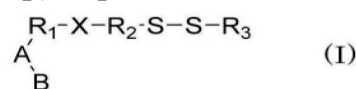
(54) 【発明の名称】 薬剤のデリバリーのためのジスルフィド化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

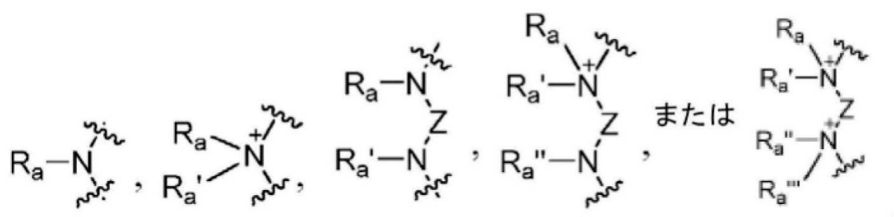
下記式 (I) :

【化 1】



ただし、親水性頭部 (hydrophilic head) である、Aは、下記：

【化 2】

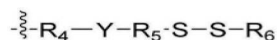


であり、この際、 R_a は、非置換の C_1-C_{20} の 1 価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の C_1-C_{20} の 1 価のヘテロアルキル基、非置換の 1 価のアリール基、または非置換の 1 価のヘテロアリール基であり； R_a' 、 R_a'' 、及び R_a''' は、それぞれ独立し

て、H、非置換の C_1-C_{20} の1価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の C_1-C_{20} の1価のヘテロアルキル基、非置換の1価のアリール基、または非置換の1価のヘテロアリール基であり；さらにZは非置換の C_1-C_{20} の2価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の C_1-C_{20} の2価のヘテロアルキレン基、非置換の2価のアリーレン基、または非置換の2価のヘテロアリーレン基であり；

Bは、下記：

【化3】



であり、この際、 R_4 、 R_5 、 R_6 、およびYは、下記定義であり；

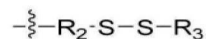
R_1 および R_4 は、それぞれ独立して、非置換の C_1-C_{10} の2価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の C_1-C_{10} の2価のヘテロアルキレン基、非置換の2価のアリーレン基、または非置換の2価のヘテロアリーレン基であり；

R_2 および R_5 は、それぞれ独立して、非置換の C_1-C_{20} の2価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の C_1-C_{20} の2価のヘテロアルキレン基、非置換の2価のアリーレン基、または非置換の2価のヘテロアリーレン基であり；

R_3 および R_6 は、それぞれ、非置換の C_1-C_{20} の1価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の C_1-C_{20} の1価のヘテロアルキル基、非置換の1価のアリール基、または非置換の1価のヘテロアリール基であり；

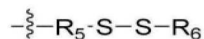
下記：

【化4】



および下記：

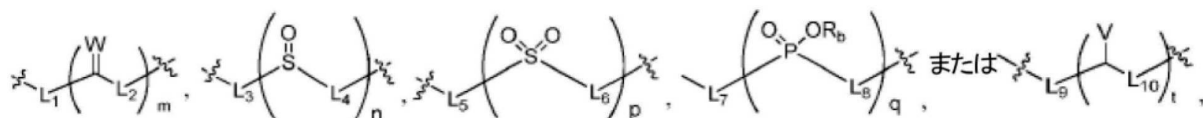
【化5】



は、それぞれ、8～24炭素原子を有し；さらに

XおよびYは、それぞれ独立して、下記：

【化6】



であり、この際、m、n、p、q、およびtは、それぞれ独立して、1～6であり；Wは、O、S、または NR_c であり； L_1 、 L_3 、 L_5 、 L_7 、および L_9 は、それぞれ独立して、単結合、O、S、または NR_d であり； L_2 、 L_4 、 L_6 、 L_8 、および L_{10} は、それぞれ独立して、単結合、O、S、または NR_e であり；さらにVは、 OR_f 、 SR_g 、または NR_hR_i であり、 R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_e 、 R_f 、 R_g 、 R_h 、および R_i は、それぞれ独立して、H、OH、非置換の C_1-C_{10} の非環状の一O-脂肪族炭化水素基、非置換の C_1-C_{10} の1価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の C_1-C_{10} の1価のヘテロアルキル基、非置換の1価のアリール基、または非置換の1価のヘテロアリール基である、

を有する化合物。

【請求項2】

Aは、下記：

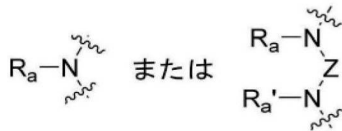
10

20

30

40

【化 7】



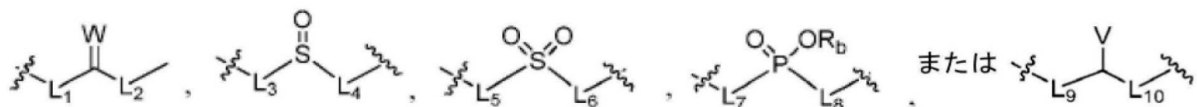
であり、この際、 R_a は、非置換の C_1-C_{10} の 1 価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の C_1-C_{10} の 1 価のヘテロアルキル基、非置換の 1 価のアリール基、または非置換の 1 価のヘテロアリール基であり； R_a' は、H、非置換の C_1-C_{10} の 1 価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の C_1-C_{10} の 1 価のヘテロアルキル基、非置換の 1 価のアリール基、または非置換の 1 価のヘテロアリール基であり；さらに Z は、非置換の C_1-C_{10} の 2 価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の C_1-C_{10} の 2 価のヘテロアルキレン基、非置換の 2 価のアリーレン基、または非置換の 2 価のヘテロアリーレン基である、請求項 1 に記載の化合物。

10

【請求項 3】

R_1 は、非置換の C_1-C_6 の 2 価の非環状の脂肪族炭化水素基、または非置換の C_1-C_6 の 2 価のヘテロアルキレン基であり； R_2 および R_3 の全炭素数は、12～20であり；さらに、 X は、下記：

【化 8】



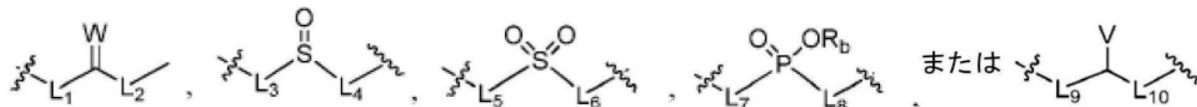
20

である、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

R_1 および R_4 は、それぞれ、非置換の C_1-C_6 の 2 価の非環状の脂肪族炭化水素基、または非置換の C_1-C_6 の 2 価のヘテロアルキレン基であり； R_2 および R_3 の全炭素数は、12～20であり； R_5 および R_6 の全炭素数は、12～20であり； X および Y は、それぞれ独立して、下記：

【化 10】



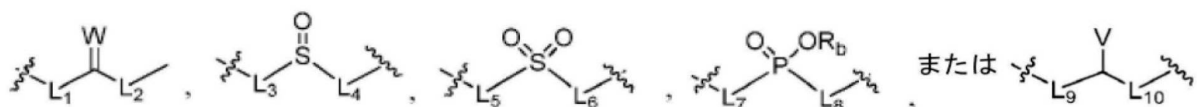
30

である、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 5】

R_1 は、非置換の C_1-C_6 の 2 価の非環状の脂肪族炭化水素基、または非置換の C_1-C_6 の 2 価のヘテロアルキレン基であり； R_2 および R_3 の全炭素数は、12～20であり；さらに X は、下記：

【化 11】



40

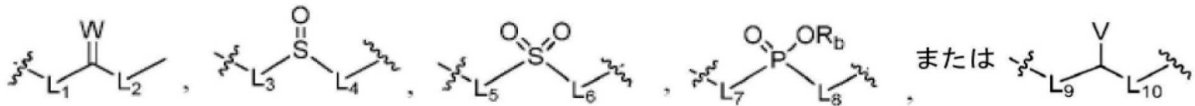
である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 6】

R_1 および R_4 は、それぞれ、非置換の C_1-C_6 の 2 価の非環状の脂肪族炭化水素基、または非置換の C_1-C_6 の 2 価のヘテロアルキレン基であり； R_2 および R_3 の全炭素数は、12～20であり； R_5 および R_6 の全炭素数は、12～20であり；さらに X および Y は、それぞれ独立して、下記：

50

【化 1 3】



である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 7】

R₁ は、非置換の C₁ - C₄ の 2 価の非環状の脂肪族炭化水素基、または非置換の C₁ - C₄ の 2 価のヘテロアルキレン基であり；さらに R₂ および R₃ の全炭素数は、14 ~ 18 である、請求項 1 に記載の化合物。

10

【請求項 8】

X は、下記：

【化 1 4】

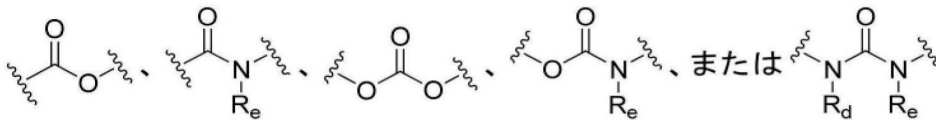


である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 9】

X は、下記：

【化 1 5】



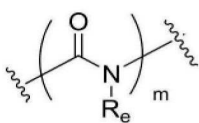
20

である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 10】

X は、下記：

【化 1 6】



30

であり、この際、m は、2 ~ 6 である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 11】

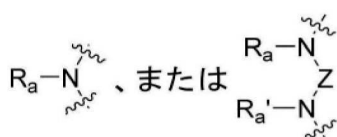
製薬上許容できる担体および請求項 1 に記載の化合物から形成されるナノコンプレックス (nanocomplex) および薬剤 (pharmaceutical agent) を含み、前記ナノコンプレックスは、50 nm ~ 1000 nm の粒径を有し；前記化合物は、非共有相互作用 (non-covalent interaction)、共有結合、または双方を介して前記薬剤に結合し；さらに前記薬剤は、800 ダルトン未満の分子量を有する有機化合物、タンパク質、ペプチド、核酸、またはこれらの組み合わせである、薬剤組成物。

40

【請求項 12】

A は、下記：

【化 1 7】



50

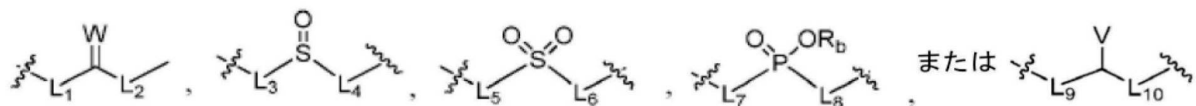
であり、この際、 R_a は、非置換の $C_1 - C_{10}$ の 1 価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の $C_1 - C_{10}$ の 1 価のヘテロアルキル基、非置換の 1 価のアリール基、または非置換の 1 価のヘテロアリール基であり； R_a' は、非置換の $C_1 - C_{10}$ の 1 価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の $C_1 - C_{10}$ の 1 価のヘテロアルキル基、非置換の 1 価のアリール基、または非置換の 1 価のヘテロアリール基であり；さらに Z は、非置換の $C_1 - C_{10}$ の 2 価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の $C_1 - C_{10}$ の 2 価のヘテロアルキレン基、非置換の 2 価のアリーレン基、または非置換の 2 価のヘテロアリーレン基である、請求項 11 に記載の薬剤組成物。

【請求項 13】

10

R_1 は、非置換の $C_1 - C_6$ の 2 価の非環状の脂肪族炭化水素基、または非置換の $C_1 - C_6$ の 2 価のヘテロアルキレン基であり； R_2 および R_3 の全炭素数は、12～20 であり；さらに X は、下記：

【化 18】



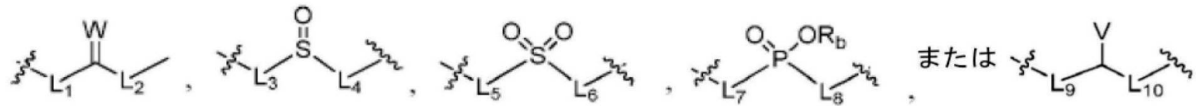
である、請求項 12 に記載の薬剤組成物。

【請求項 14】

20

R_1 および R_4 は、それぞれ、非置換の $C_1 - C_6$ の 2 価の非環状の脂肪族炭化水素基、または非置換の $C_1 - C_6$ の 2 価のヘテロアルキレン基であり； R_2 および R_3 の全炭素数は、12～20 であり； R_5 および R_6 の全炭素数は、12～20 であり；さらに X および Y は、それぞれ独立して、下記：

【化 20】



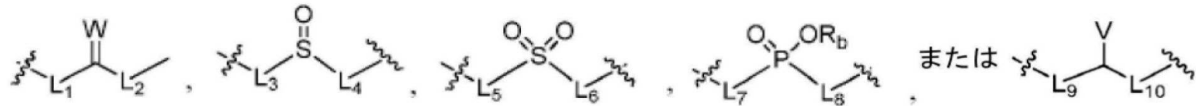
である、請求項 12 に記載の薬剤組成物。

30

【請求項 15】

R_1 は、非置換の $C_1 - C_6$ の 2 価の非環状の脂肪族炭化水素基、または非置換の $C_1 - C_6$ の 2 価のヘテロアルキレン基であり； R_2 および R_3 の全炭素数は、12～20 であり；さらに X は、下記：

【化 21】



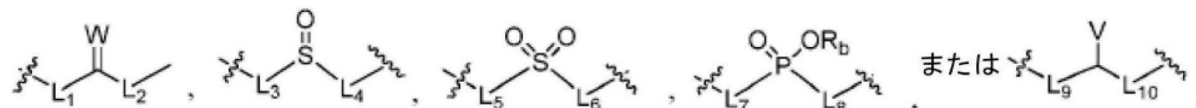
である、請求項 11 に記載の薬剤組成物。

40

【請求項 16】

R_1 および R_4 は、それぞれ、非置換の $C_1 - C_6$ の 2 価の非環状の脂肪族炭化水素基、または非置換の $C_1 - C_6$ の 2 価のヘテロアルキレン基であり； R_2 および R_3 の全炭素数は、12～20 であり； R_5 および R_6 の全炭素数は、12～20 であり；さらに X および Y は、それぞれ独立して、下記：

【化 23】



50

である、請求項 1 1 に記載の薬剤組成物。

【請求項 1 7】

R_1 は、非置換の $C_1 - C_4$ の 2 価の非環状の脂肪族炭化水素基、または非置換の $C_1 - C_4$ の 2 価のヘテロアルキレン基であり； R_2 および R_3 の全炭素数は、14～18 である、請求項 1 1 に記載の薬剤組成物。

【請求項 1 8】

X は、下記：

【化 2 4】



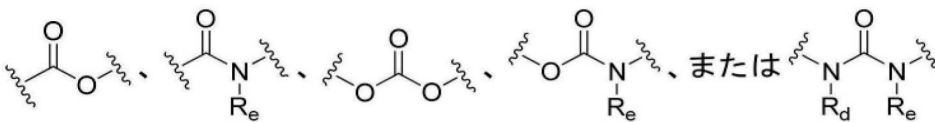
10

である、請求項 1 1 に記載の薬剤組成物。

【請求項 1 9】

X は、下記：

【化 2 5】



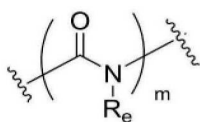
20

である、請求項 1 1 に記載の薬剤組成物。

【請求項 2 0】

X は、下記：

【化 2 6】



であり、この際、 m は、2～6 である、請求項 1 1 に記載の薬剤組成物。

30

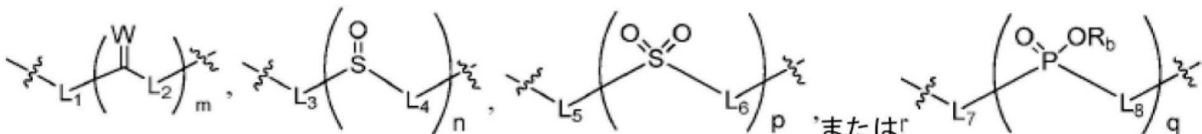
【請求項 2 1】

ナノコンプレックス (nanocomplex) を含む薬剤組成物であって、前記ナノコンプレックスはタンパク質および請求項 1 に記載の化合物から形成され、前記ナノコンプレックスは、50 nm～1000 nm の粒径を有し；前記タンパク質は、非共有相互作用 (non-covalent interaction)、共有結合、または双方を介して前記化合物に結合する、薬剤組成物。

【請求項 2 2】

X および Y は、それぞれ独立して、下記：

【化 3 4】



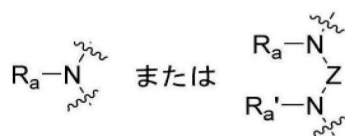
40

である、請求項 2 1 に記載の薬剤組成物。

【請求項 2 3】

A が、下記：

【化 3 5】



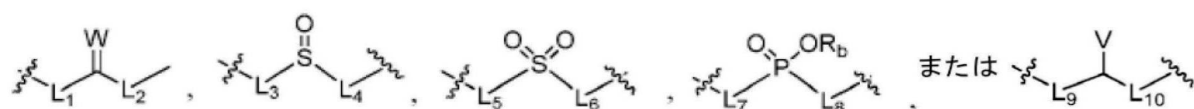
であり、この際、 R_a は、非置換の $C_1 - C_{10}$ の 1 価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の $C_1 - C_{10}$ の 1 価のヘテロアルキル基、非置換の 1 価のアリール基、または非置換の 1 価のヘテロアリール基であり； $R_{a'}$ は、非置換の $C_1 - C_{10}$ の 1 価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の $C_1 - C_{10}$ の 1 価のヘテロアルキル基、非置換の 1 価のアリール基、または非置換の 1 価のヘテロアリール基であり；さらに Z は、非置換の $C_1 - C_{10}$ の 2 価の非環状の脂肪族炭化水素基、非置換の $C_1 - C_{10}$ の 2 価のヘテロアルキレン基、非置換の 2 価のアリーレン基、または非置換の 2 価のヘテロアリーレン基である、請求項 2 2 に記載の薬剤組成物。

10

【請求項 2 4】

R_1 は、非置換の $C_1 - C_6$ の 2 価の非環状の脂肪族炭化水素基、または非置換の $C_1 - C_6$ の 2 価のヘテロアルキレン基であり； R_2 および R_3 の全炭素数は、12～20 であり；さらに X は、下記：

【化 3 6】



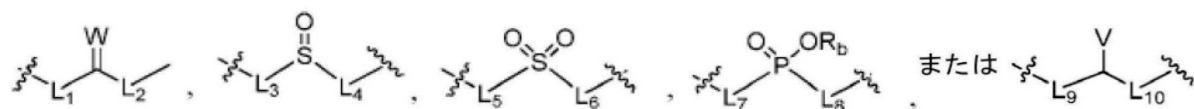
20

である、請求項 2 3 に記載の薬剤組成物。

【請求項 2 5】

R_1 および R_4 は、それぞれ、非置換の $C_1 - C_6$ の 2 価の非環状の脂肪族炭化水素基、または非置換の $C_1 - C_6$ の 2 価のヘテロアルキレン基であり； R_2 および R_3 の全炭素数は、12～20 であり； R_5 および R_6 の全炭素数は、12～20 であり；さらに X および Y は、それぞれ独立して、下記：

【化 3 8】



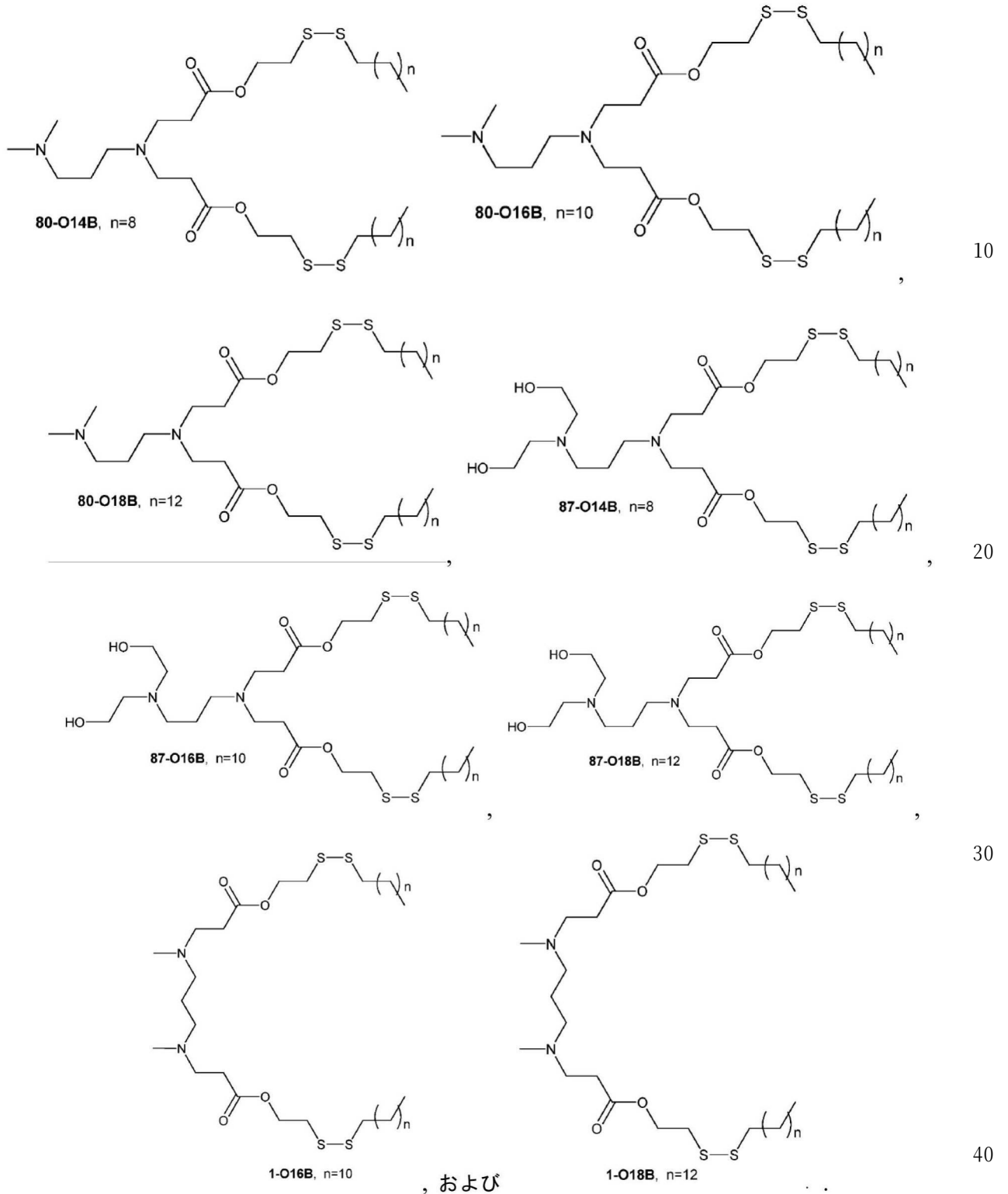
30

である、請求項 2 3 に記載の薬剤組成物。

【請求項 2 6】

下記からなる群から選択される、化合物。

【化 3 9】



【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の参照

本願は、2013年2月28日付で提出された、米国仮出願第61/770,657号の優先権を主張し、当該出願の内容は参考で本明細書中に引用される。

【背景技術】

【0002】

背景

10

20

30

40

50

治療効果を得るために、薬剤を標的部位にデリバリーする必要がある。酵素による分解を受けやすいまたは細胞膜を通過して細胞内の標的に到達できない薬剤をデリバリーすることはチャレンジである。

【0003】

公知のデリバリー方法としては、標的特異的ベヒクルの使用がある。Place et al., Molecular Therapy-Nucleic Acids, 1, e15 (2012)を参照。デリバリーベヒクルの例としては、リポソーム、ポリマー、及び無機ナノ粒子がある。Gonzales-Toro et al., Journal of American Chemical Society, 134, 6964-67 (2012)を参照。しかしながら、これらのベヒクルは、しばしば、毒性があるまたは不十分である。Sun et al., Bioconjugate Chemistry, 23, 135-40 (2012); and Akinc et al., Molecular Therapy, 17, 872-79 (2009)を参照。

10

【0004】

標的部位に薬剤をデリバリーするための有効でかつ安全なベヒクルを開発する必要がある。

【発明の概要】

【0005】

要約

本発明は、特定の脂質様化合物が薬剤のデリバリーに使用される有効でかつ安全なベヒクルであるという発見に基づくものである。

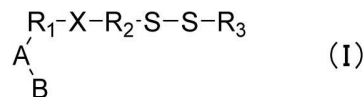
【0006】

20

一態様では、本発明は、式 (I) :

【0007】

【化1】



【0008】

を有する脂質様化合物を特徴とする。

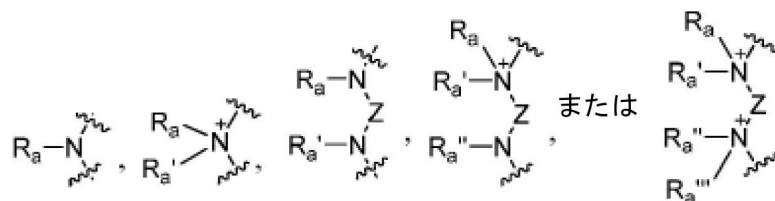
【0009】

この式において、親水性頭部であり、必要であれば正に荷電してもよい、Aは、下記：

30

【0010】

【化2】



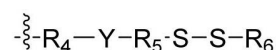
【0011】

であり、この際、 R_a 、 $R_{a'}$ 、 $R_{a''}$ 、および $R_{a''}'$ は、それぞれ独立して、 H 、 C_1-C_{20} の1価の脂肪族基、 C_1-C_{20} の1価のヘテロ脂肪族基、1価のアリール基、または1価のヘテロアリール基であり、および Z は、 C_1-C_{20} の2価の脂肪族基、 C_1-C_{20} の2価のヘテロ脂肪族基、2価のアリール基、または2価のヘテロアリール基であり； B は、 C_1-C_{24} の1価の脂肪族基、 C_1-C_{24} の1価のヘテロ脂肪族基、1価のアリール基、1価のヘテロアリール基、または下記：

40

【0012】

【化3】



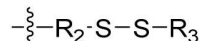
【0013】

50

であり； R_1 および R_4 は、それぞれ独立して、単結合(bond)、 $C_1 - C_{10}$ の2価の脂肪族基、 $C_1 - C_{10}$ の2価のヘテロ脂肪族基、2価のアリール基、または2価のヘテロアリール基であり； R_2 および R_5 は、それぞれ独立して、単結合(bond)、 $C_1 - C_{20}$ の2価の脂肪族基、 $C_1 - C_{20}$ の2価のヘテロ脂肪族基、2価のアリール基、または2価のヘテロアリール基であり； R_3 および R_6 は、それぞれ独立して、 $C_1 - C_{20}$ の1価の脂肪族基、 $C_1 - C_{20}$ の1価のヘテロ脂肪族基、1価のアリール基、または1価のヘテロアリール基であり；疎水性尾部である、下記：

【0014】

【化4】



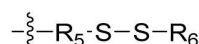
10

【0015】

およびやはり疎水性尾部である、下記：

【0016】

【化5】

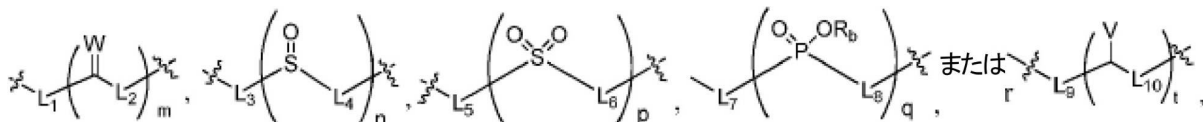


【0017】

は、8～24炭素原子を有し；ならびにリンカーである、X、およびやはりリンカーである、Yは、下記：

【0018】

【化6】



20

【0019】

であり、この際、m、n、p、q、およびtは、それぞれ独立して、1～6であり；Wは、O、S、または NR_c であり； R_1 、 R_2 、 R_4 、または R_5 に直接結合する、 L_1 、 L_3 、 L_5 、 L_7 、および L_9 は、それぞれ独立して、単結合(bond)、O、S、または NR_d であり； L_2 、 L_4 、 L_6 、 L_8 、および L_{10} は、それぞれ独立して、単結合(bond)、O、S、または NR_e であり；Vは、 OR_f 、 SR_g 、または NR_hR_i であり；ならびに R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_e 、 R_f 、 R_g 、 R_h 、および R_i は、それぞれ独立して、H、OH、 $C_1 - C_{10}$ のオキシ脂肪族基、 $C_1 - C_{10}$ の1価の脂肪族基、 $C_1 - C_{10}$ の1価のヘテロ脂肪族基、1価のアリール基、または1価のヘテロアリール基である。

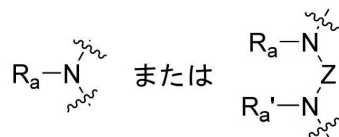
30

【0020】

上記脂質様化合物のサブセットとしては、Aが下記：

【0021】

【化7】



40

【0022】

であり、 R_a および R_a' が、それぞれ独立して、 $C_1 - C_{10}$ の1価の脂肪族基、 $C_1 - C_{10}$ の1価のヘテロ脂肪族基、1価のアリール基、または1価のヘテロアリール基であり；ならびにZが、 $C_1 - C_{10}$ の2価の脂肪族基、 $C_1 - C_{10}$ の2価のヘテロ脂肪族基、2価のアリール基、または2価のヘテロアリール基であるものがある。

【0023】

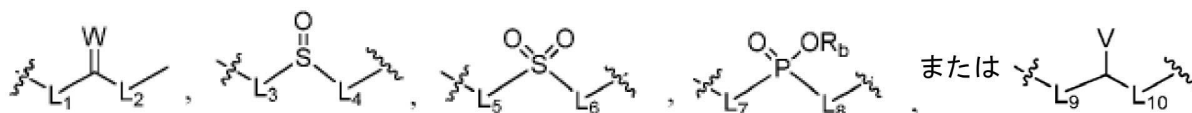
本発明の脂質様化合物によっては、 R_1 および R_4 が、それぞれ独立して、 $C_1 - C_6$ (例えば、 $C_1 - C_4$) の2価の脂肪族基または $C_1 - C_6$ (例えば、 $C_1 - C_4$) の2価のヘテロ脂肪族基であり、 R_2 および R_3 の全炭素数が12～20 (例えば、14～1

50

8) であり、 R_5 および R_6 の全炭素数がまた 12 ~ 20 (例えば、14 ~ 18) であり、ならびに X および Y が、それぞれ独立して、下記：

【0024】

【化8】



【0025】

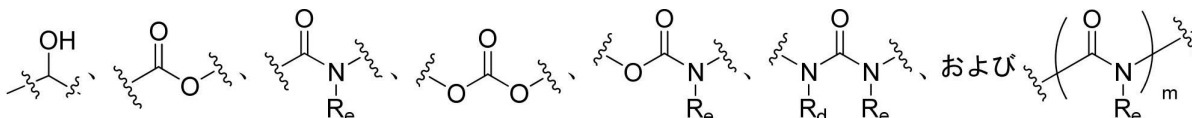
であることを特徴とする。

【0026】

X および Y の特定の例としては、下記：

【0027】

【化9】



【0028】

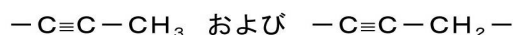
があり、この際、m は 2 ~ 6 である。

【0029】

本明細書において、「脂肪族」ということばは、飽和または不飽和の、直鎖または分岐鎖の、非環状、環状、または多環の炭化水素部分を意味する。例としては、以下に制限されないが、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、アルキニレン、シクロアルキル、シクロアルキレン、シクロアルケニル、シクロアルケニレン、シクロアルキニル、及びシクロアルキニレン部分が挙げられる。「アルキル」または「アルキレン」ということばは、メチル、メチレン、エチル、エチレン、プロピル、プロピレン、ブチル、ブチレン、ペンチル、ペンチレン、ヘキシル、ヘキシレン、ヘプチル、ヘプチレン、オクチル、オクチレン、ノニル、ノニレン、デシル、デシレン、ウンデシル、ウンデシレン、ドデシル、ドデシレン、トリデシル、トリデシレン、テトラデシル、テトラデシレン、ペンタデシル、ペンタデシレン、ヘキサデシル、ヘキサデシレン、ヘプタデシル、ヘプタデシレン、オクタデシル、オクタデシレン、ノナデシル、ノナデシレン、イコシル、イコシレン、トリアコンチル(triacontyl)、及びトリアコンチレン(triacotylene)などの、飽和の、直鎖または分岐鎖の炭化水素部分を意味する。「アルケニル」または「アルケニレン」ということばは、 $-CH=CH-CH_3$ 及び $-CH=CH-CH_2-$ などの、少なくとも 1 つの 2 重結合を含む直鎖または分岐鎖の炭化水素部分を意味する。「アルキニル」または「アルキニレン」ということばは、下記：

【0030】

【化10】



【0031】

などの、少なくとも 1 つの 3 重結合を含む直鎖または分岐鎖の炭化水素部分を意味する。

「シクロアルキル」または「シクロアルキレン」ということばは、シクロヘキシル及びシクロヘキシレンなどの、飽和の環状の炭化水素部分を意味する。「シクロアルケニル」または「シクロアルケニレン」ということばは、シクロヘキセニル、シクロヘキセニレンなどの、少なくとも 1 つの 2 重結合を含む非芳香族の環状の炭化水素部分を意味する。「シクロアルキニル」または「シクロアルキニレン」ということばは、シクロオクチニル及びシクロオクチニレンなどの、少なくとも 1 つの 3 重結合を含む非芳香族の環状の炭化水素部分を意味する。

【0032】

「ヘテロ脂肪族(heteroaliphatic)」ということばは、N、O、P、B、S、Si、Sb、Al、Sn、As、Se、及びGeから選択される少なくとも 1 つのヘテロ原子を有

10

20

30

40

50

する脂肪族部分を意味する。

【0033】

本明細書における「オキシ脂肪族」ということばは、 $-O-$ 脂肪族を意味する。オキシ脂肪族の例としては、メトキシ、エトキシ、 n -プロポキシ、イソプロポキシ、 n -ブトキシ、 i so-ブトキシ、 sec -ブトキシ、及び $tert$ -ブトキシが挙げられる。

【0034】

本明細書における「アリール」ということばは、 C_6 単環、 C_{10} 2環、 C_{14} 3環、 C_{20} 4環、または C_{24} 5環の芳香環系を意味する。アリール基の例としては、フェニル、フェニレン、ナフチル、ナフチレン、アントラセニル、アントラセニレン、ピレニル、及びピレニレンが挙げられる。本明細書における「ヘテロアリール」ということばは、10
1以上のヘテロ原子（O、N、S、またはSeなど）を有する芳香族の5～8員の単環系、8～12員の2環系、11～14員の3環系、及び15～20員の4環系を意味する。ヘテロアリール基の例としては、フリル、フリレン、フルオレニル、フルオレニレン、ピロピル、ピロリレン、チエニル、チエニレン、オキサゾリル、オキサゾリレン、イミダゾリル、イミダゾリレン、ベンズイミダゾリル、ベンズイミダゾリレン、チアゾリル、チアゾリレン、ピリジル、ピリジリレン、ピリミジニル、ピリミジニレン、キナゾリニル、キナゾリニレン、キノリニル、キノリニレン、イソキノリニル、イソキノリニレン、インドリル、及びインドリレンが挙げられる。

【0035】

特記しない限り、本明細書に記載される脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシ脂肪族、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、アルキニレン、シクロアルキル、シクロアルキレン、シクロアルケニル、シクロアルケニレン、シクロアルキニル、シクロアルキニレン、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルキレン、ヘテロシクロアルケニル、ヘテロシクロアルケニレン、アリール、及びヘテロアリールは、置換部分及び非置換部分双方を包含する。シクロアルキル、シクロアルキレン、シクロアルケニル、シクロアルケニレン、シクロアルキニル、シクロアルキニレン、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルキレン、ヘテロシクロアルケニル、ヘテロシクロアルケニレン、アリール、及びヘテロアリールに存在しうる置換基としては、以下に制限されないが、 C_1-C_{10} アルキル、 C_2-C_{10} アルケニル、 C_2-C_{10} アルキニル、 C_3-C_{20} シクロアルキル、 C_3-C_{20} シクロアルケニル、 C_3-C_{20} ヘテロシクロアルキル、 C_3-C_{20} ヘテロシクロアルケニル、 C_1-C_{10} アルコキシ、アリール、アリールオキシ、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ、アミノ、 C_1-C_{10} アルキルアミノ、 C_2-C_{20} ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、 C_1-C_{10} アルキルスルホンアミノ、アリールスルホンアミノ、 C_1-C_{10} アルキルイミノ、アリールイミノ、 C_1-C_{10} アルキルスルホンイミノ、アリールスルホンイミノ、ヒドロキシル、ハロゲン(halo)、チオ(thio)、 C_1-C_{10} アルキルチオ(thio)、アリールチオ、 C_1-C_{10} アルキルスルホニル、アリールスルホニル、アシルアミノ、アミノアシル、アミノチオアシル、アミド、アミジノ、グアニジン、ウレイド(ureido)、チオウレイド(thioureido)、シアノ、ニトロ、ニトロソ、アジド、アシル、チオアシル、アシルオキシ、カルボキシル、及びカルボン酸エステルが挙げられる。一方、脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシ脂肪族、アルキル、アルキレン、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、及びアルキニレンに存在しうる置換基としては、 C_1-C_{10} アルキルを除く上記すべての置換基がある。シクロアルキル、シクロアルキレン、シクロアルケニル、シクロアルケニレン、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルキレン、ヘテロシクロアルケニル、ヘテロシクロアルケニレン、アリール、及びヘテロアリールはまた、相互に融合していてもよい。

【0036】

上記脂質様化合物としては、化合物自体、さらには該当する場合にはこれらの塩及び溶媒和物がある。例えば、塩は、アニオンおよび脂質様化合物の正に荷電した基（例えば、アミノ）の間に形成されてもよい。適当なアニオンとしては、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩、トリフルオロ酢酸塩、

10

20

30

40

50

酢酸塩、リンゴ酸塩、トシレート(tosylate)、酒石酸塩、フマル酸塩、グルタミン酸塩、グルクロン酸塩、乳酸塩、グルタル酸塩、及びマレイン酸塩が挙げられる。同様に、塩は、カチオンおよび脂質様化合物の負に荷電した基（例えば、カルボキシレート）の間に形成されてもよい。適当なカチオンとしては、ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン、及びテトラメチルアンモニウムイオン等のアンモニウムカチオンが挙げられる。脂質様化合物はまた、4級窒素原子を含む上記塩を包含する。溶媒和物は、脂質様化合物および製薬上許容できる溶媒の間に形成されるコンプレックス(complex)を意味する。製薬上許容できる溶媒の例としては、水、エタノール、イソプロパノール、酢酸エチル、酢酸、及びエタノールアミンが挙げられる。

【0037】

10

本発明の他の態様は、製薬上許容できる担体および上記脂質化合物の一つから形成されるナノコンプレックス(nanocomplex)および薬剤(pharmaceutical agent)を含む薬剤組成物に関する。本組成物において、ナノコンプレックスは、50~500nm（例えば、50~300nmおよび50~180nm）の粒径を有し；上記薬剤は、小分子、タンパク質、ペプチド、核酸、サッカリドまたはこれらの組み合わせであり；さらに上記化合物は、非共有相互作用(non-covalent interaction)、共有結合、または双方を介して上記薬剤に結合する。

【0038】

薬剤組成物における担体は、組成物の活性成分と適合し（好ましくは、活性成分を安定化でき）、処置される患者に有害でないという意味で「許容できる」ものでなければならない。1以上の可溶化剤を、活性のあるグリコシド化合物のデリバリーのための製薬賦形剤として使用してもよい。他の担体の例としては、コロイド酸化ケイ素、ステアリン酸マグネシウム、セルロース、ラウリル硫酸ナトリウム、およびD & C Yellow #10が挙げられる。

20

【0039】

「薬剤」ということばは、病気の医療診断、治療(cure)、処置(treatment)、または予防への使用を対象とした化学物質を意味する。

【0040】

「小分子」ということばは、オリゴペプチド、オリゴ糖、及びオリゴヌクレオチドなどの、800ダルトン未満（例えば、500ダルトン未満）の分子量を有する有機化合物を意味する。

30

【0041】

「ペプチド」または「タンパク質」ということばは、天然のまたは非天然のアミノ酸がアミド結合で一緒に連結した、800ダルトン以上の分子量を有するポリマーを意味する。これらのポリマーは双方とも、化学的に修飾されてもよい。「核酸」ということばは、800ダルトン以上の分子量を有する、ヌクレオチドがホスホジエステル結合によって一緒に連結したポリマーを意味する。これらのポリマーは双方とも、化学的に修飾されてもよい。タンパク質修飾の例としては、PEG化(PEGylation)及び本明細書に包含されるリジン残基のアミン基のカルボキシル化がある。より詳細には、タンパク質またはペプチドのカルボキシル化は、cis-アコニット酸無水物を用いることによってなされうる。Lee et al., Angewandte Chemie International Edition, 48, 5309-12 (2009); Lee et al., Angewandte Chemie International Edition, 49, 2552-55 (2010); およびMaier et al., Journal of the American Chemical Society, 134, 10169-73 (2012)を参照。

40

【0042】

「非共有相互作用(non-covalent interaction)」ということばは、非共有結合を意味し、イオン相互作用、水素結合、ファンデルワールス相互作用、及び疎水性相互作用を包含する。

【0043】

さらに、タンパク質および生還元性化合物(bioreducible compound)から形成されるナノコンプレックス(nanocomplex)を含む薬剤組成物が本発明の概念に含まれる。当該薬剤

50

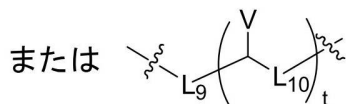
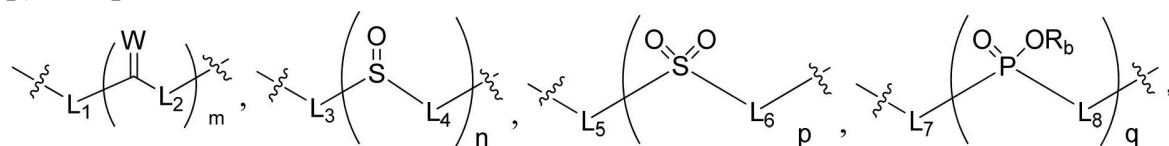
組成物において、上記ナノコンプレックスは、50～500nmの粒径を有し；上記生還元性化合物は、ジスルフィド疎水性部分(disulfide hydrophobic moiety)、親水性部分、ならびに上記ジスルフィド疎水性部分および上記親水性部分を結合するリンカーを含み；さらに上記タンパク質は、非共有相互作用(non-covalent interaction)、共有結合、または双方を介して上記生還元性化合物に結合する。

【0044】

特定の実施形態では、ジスルフィド疎水性部分は、1以上の-S-S-基および8～24炭素原子を含むヘテロ脂肪族基であり；上記親水性部分は、1以上の親水性基および1～20炭素原子を含む脂肪族またはヘテロ脂肪族基であり、上記親水性基は、それぞれ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアミノ、テトラアルキルアンモニウム、ヒドロキシアミノ、ヒドロキシル、カルボキシル、カルボキシレート(carboxylate)、カルバメート(carbamate)、カルバマイド(carbamide)、カーボネート(carbonate)、ホスフェート(phosphate)、ホスファイト(phosphite)、スルフェート(sulfate)、スルファイト(sulfite)、またはチオスルフェート(thiosulfate)であり；さらに上記リンカーは、O、S、Si、C₁～C₆のアルキレン、下記：

【0045】

【化11】



【0046】

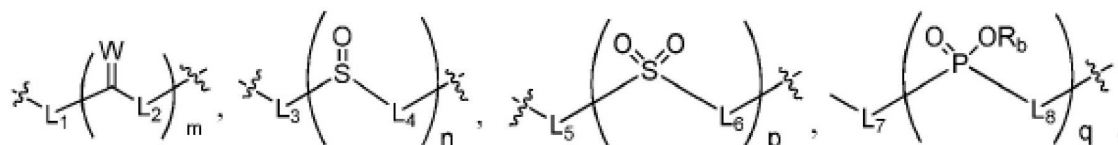
であり、この際、上記変数は、上記と同様の定義である。

【0047】

XおよびYの特定の例としては、O、S、Si、C₁～C₆のアルキレン、下記：

【0048】

【化12】



【0049】

がある。

【0050】

本発明の1以上の実施形態の詳細を以下の説明に記載する。本発明の他の特徴、目的、および利点は、下記説明からおよび特許請求の範囲から明らかであろう。

【0051】

詳細な説明

本発明の脂質様化合物は、上記式(I)に示されるように、それぞれ、(i)親水性頭部、A；(ii)疎水性尾部、R₂-S-S-R₃；および(iii)リンカー、Xを含む。必要であれば、これらの化合物は、第2の疎水性尾部、R₅-S-S-R₆および第2のリンカー、Yを含む。

【0052】

親水性頭部は、1以上の親水性官能基、例えば、ヒドロキシル、カルボニル、カルボキ

10

20

30

40

50

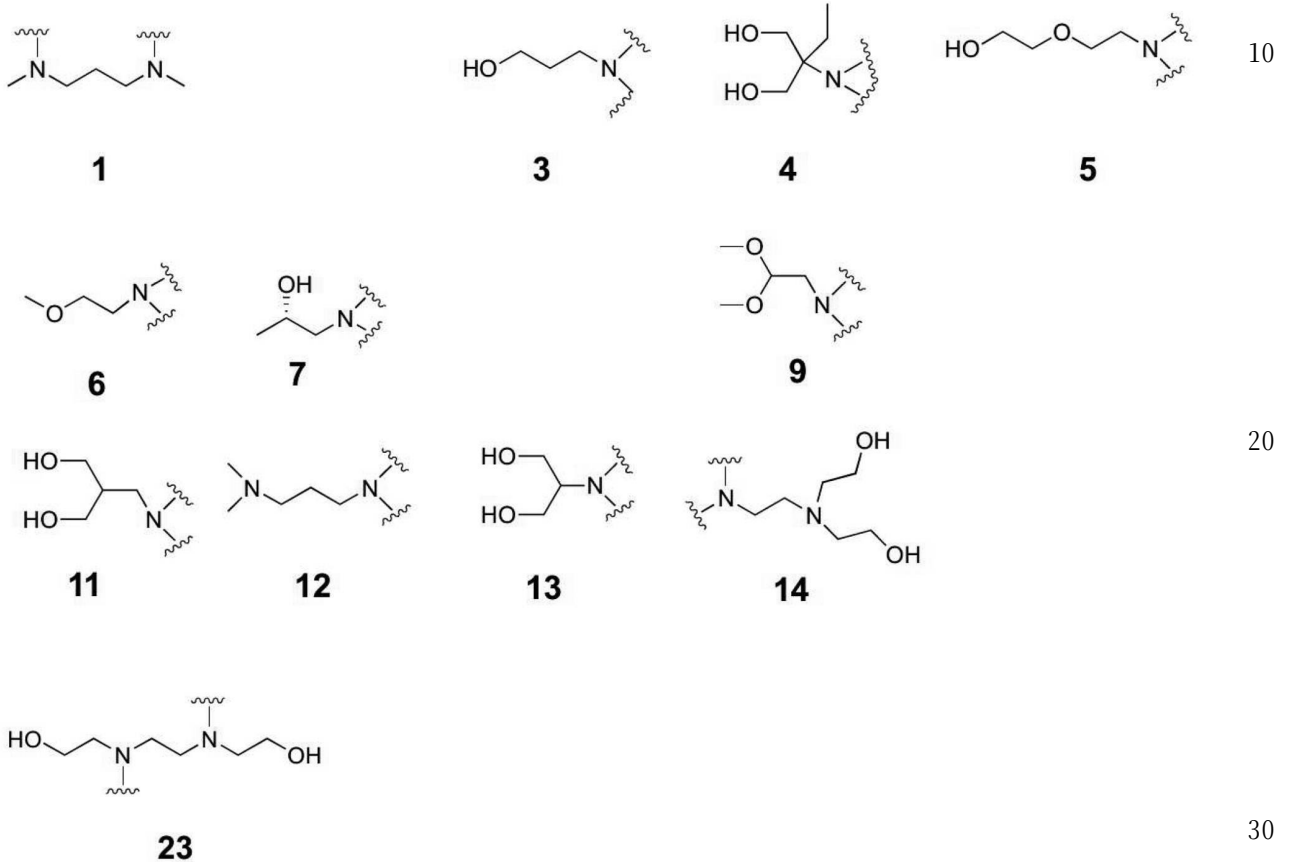
シル、アミノ、スルフィド、ホスフェート、アミド、エステル、エーテル、カルバメート(carbamate)、カーボネート(carbonate)、カルバマイド(carbamide)、およびホスホジエステルを含む。これらの基は、水素結合を形成でき、必要であれば、正にまたは負に帯電する。

【0053】

親水性頭部の例としては、下記がある。

【0054】

【化13】



【0055】

他の例としては、Akinc et al., Nature Biotechnology, 26, 561-69 (2008)およびMahon et al., 米国特許出願公開第2011/0293703号に記載されるものがある。

【0056】

疎水性尾部は、ジスルフィド結合及び8～24炭素原子を含む飽和または不飽和の、直鎖または分岐鎖の、非環状または環状の、芳香族または非芳香族の炭化水素部分である。炭素原子の1以上が、N、O、P、B、S、Si、Sb、Al、Sn、As、Se、及びGe等の、ヘテロ原子に置換されてもよい。尾部は、必要であれば、要約の項に記載される1以上の基で置換されてもよい。このジスルフィド結合を有する脂質様化合物は生還元性(bioreducible)でありうる。

【0057】

例としては、下記がある。

【0058】

80-O14B, n=8

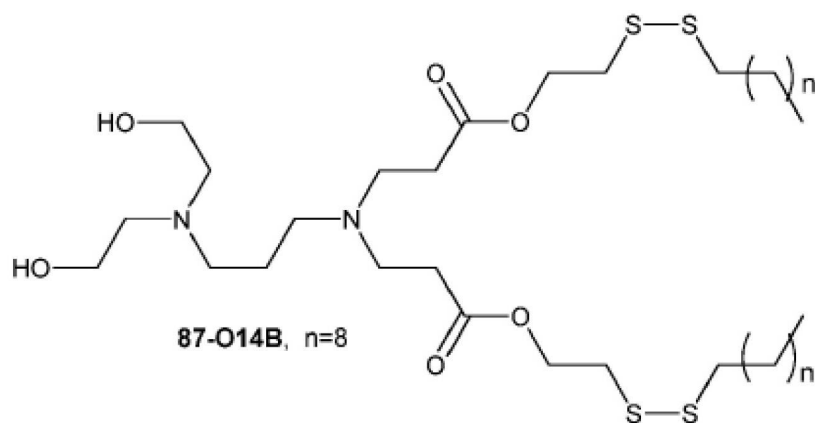
N(C)CCCN(C)CC(=O)OCCSCC()CN(C)CCCCN(CCC(=O)OCCSCCSCC(C)C)CC(=O)OCCSCCSCC(C)C

80-O18B, n=12

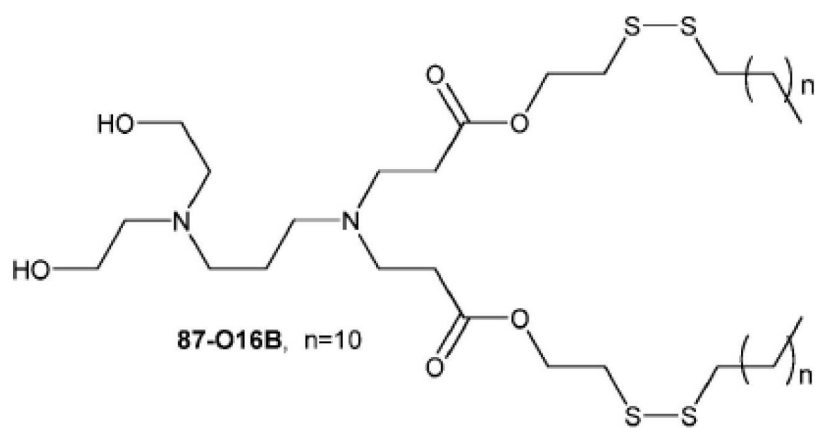
30

【 0 0 6 3 】

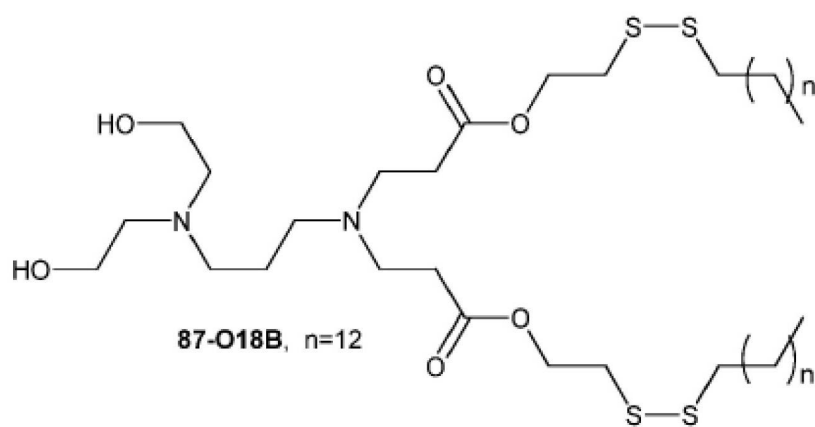
【化 1 7】



10



20



30

【 0 0 6 4 】

10

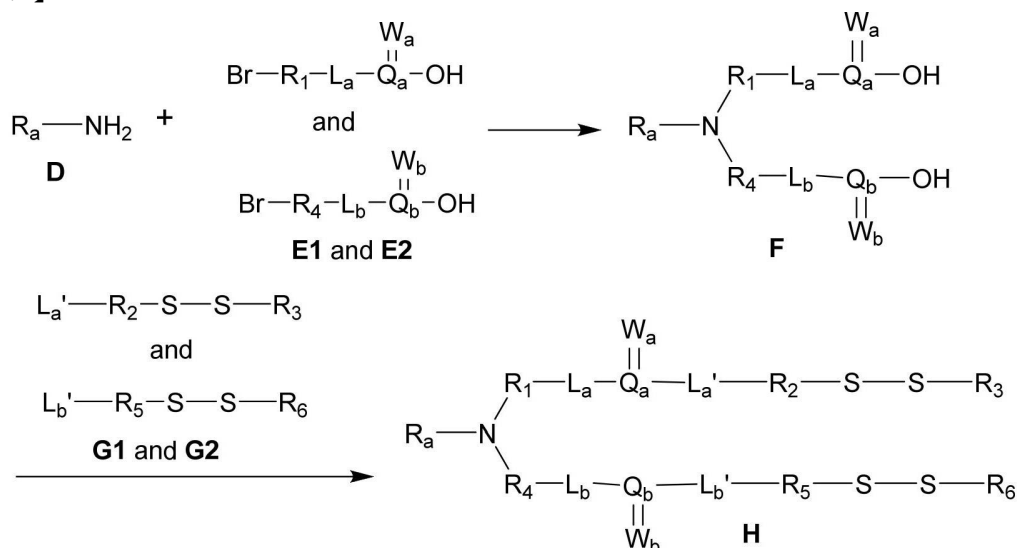


本発明の脂質様化合物は、当該分野において既知の方法によって調製できる。Wang et al., ACS Synthetic Biology, 1, 403-07 (2012); Manoharan, et al., 国際特許出願公開 WO 2008/042973 号; および Zugates et al., 米国特許第 8,071,082 号を参照。

以下に示される経路により、これらの脂質様化合物の合成を例示する。

【 0 0 6 7 】

【化 19】



10

【0068】

L_a 、 L_a' 、 L_b 、及び L_b' は、それぞれ、 $L_1 \sim L_{10}$ の1つであってもよい； W_a 及び W_b は、それぞれ独立して、 W または V である；さらに、 R_a および $R_1 \sim R_6$ 、ならびに $L_1 \sim L_{10}$ 、 W 、及び V は、上記と同様の定義である。

20

【0069】

上記具体的な合成経路において、アミン化合物、即ち、化合物Dは、臭化物、E1及びE2と反応して、化合物Fを形成し、その後、この化合物FをG1およびG2双方とカップリングして、最終産物、即ち、化合物Hを得る。この化合物（上記に示す）中の2重結合の一方または双方を1つまたは2つの1重結合に還元して、本発明の異なる脂質様化合物を得てもよい。

【0070】

本発明の他の脂質様化合物は、上記合成経路や当該分野において知られている他の経路を介して他の適当な出発材料を用いて調製されてもよい。上記方法は、脂質様化合物を最終的に合成するために適当な保護基を付加するまたは除去する別の工程を含んでもよい。加えて、様々な合成工程を別の配列(sequence)または順番(order)で行って、所望の材料を得てもよい。適用できる脂質様化合物を合成するのに使用できる合成化学変換及び保護基法(synthetic chemistry transformations and protecting group methodologies)（保護および脱保護）は、当該分野において知られており、例えば、R. Larock, Comprehensive Organic Transformations (2ndEd., VCH Publishers 1999); P. G. M. Wuts and T. W. Greene, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis (4thEd., John Wiley and Sons 2007); L. Fieser and M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis (John Wiley and Sons 1994); and L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis (2nd ed., John Wiley and Sons 2009)およびこれに続く版がある。

30

40

【0071】

特定の脂質様化合物は、非芳香族2重結合及び1以上の不斉中心を有していてもよい。ゆえに、当該化合物は、ラセミ化合物及びラセミ混合物、単一の鏡像異性体、個々のジアステレオマー、ジアステレオマー混合物、ならびにシスーまたはトランスー異性体として存在してもよい。すべてのこのような異性体が包含される。

【0072】

上述したように、これらの脂質様化合物は、薬剤のデリバリーに有用である。これらの化合物は、インビトロアッセイによって薬剤をデリバリーする際の有効性について予めスクリーニングされた後、動物実験及び臨床試験によって確かめられることができる。また、他の方法は当業者には明らかであろう。

50

【0073】

いずれかの理論に拘束されないが、本脂質様化合物は、コンプレックス、例えば、ナノコンプレックスや微粒子を形成することによって薬剤のデリバリーを促進する。このような脂質様化合物の親水性頭部は、正にまたは負に帯電して、反対の電荷を有する薬剤の部分に結合し、その疎水性部分が薬剤の疎水性部分に結合する。いずれかの結合は、共有結合または非共有結合であってもよい。

【0074】

上記コンプレックスは、Wang et al., ACS Synthetic Biology, 1, 403-07 (2012)等の文献に記載の方法を用いて調製できる。通常、コンプレックスは、脂質様化合物及び薬剤を、酢酸ナトリウム緩衝液またはリン酸緩衝生理食塩水（「PBS」）等の緩衝液中でインキュベートすることによって得られる。

10

【0075】

さらに、本発明は、有効量の上記コンプレックス（例えば、ナノコンプレックス）を必要とする患者に投与する方法を包含する。「有効量」とは、処置される患者に治療効果を与えるのに必要なコンプレックスの量を意味する。有効量は、当業者には認識されるように、処置される病気のタイプ、投与経路、賦形剤の使用、及び他の治療のための処置との併用の可能性によって、異なるであろう。

【0076】

本発明の方法を実施するために、上記コンプレックスを含む組成物を、非経口で、経口で、経鼻的に、直腸内に、局所的に、または口腔に投与できる。本明細書中で使用される「非経口」ということばは、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、滑液嚢内、胸骨内、髄腔内、病巣内、または頭蓋内注射、さらには適当な輸注技術を意味する。

20

【0077】

滅菌注射用組成物は、1, 3-ブタンジオールにおける溶液等の、非毒性の非経口で許容できる希釈剤または溶剤における溶液または懸濁液であってもよい。使用できる許容できるベヒクルや溶剤の中には、マンニトール、水、リンガー溶液、及び等張塩化ナトリウム溶液がある。加えて、固定油が、溶剤または懸濁媒体として従来使用される（例えば、合成モノまたはジグリセリド）。オレイン酸及びそのグリセリド誘導體等の、脂肪酸が、注射剤の調製に使用でき、特にポリオキシエチレン化された型の、オリーブ油またはヒマシ油等の、天然の製薬上許容できる油もまた同様にして使用できる。また、これらの油溶液または懸濁液は、長鎖アルコール希釈剤若しくは分散剤、カルボキシメチルセルロース、または同様の分散剤を含んでもよい。ツィーン（Tween）若しくはスパン（Span）等の他の一般的に使用される界面活性剤または製薬上許容できる固体、液体、または他の投与形態の製造に一般的に使用される他の同様の乳化剤若しくはバイオアベイラビリティ促進剤もまた、配合目的で使用されうる。

30

【0078】

経口投与用の組成物は、カプセル、錠剤、エマルジョンならびに水性懸濁液、分散液および溶液などの経口投与が許容できる投与形態であってもよい。錠剤の場合には、一般的に使用される担体としては、ラクトース及びコーンスターチがある。ステアリン酸マグネシウム等の滑剤もまた一般的に添加される。カプセル形態での経口投与では、使用できる希釈剤としては、ラクトースや乾燥コーンスターチがある。水性懸濁液またはエマルジョンを経口投与する場合には、活性成分を乳化剤または懸濁化剤と組み合わせて油相中に懸濁または溶解することができる。必要であれば、特定の甘味剤、風味剤、または着色剤を添加してもよい。

40

【0079】

鼻エアロゾルまたは吸入用組成物を、製剤処方分野で既知の技術に従って調製してもよい。例えば、このような組成物を、ベンジルアルコールまたは他の適当な防腐剤、バイオアベイラビリティを促進するための吸収促進剤、フッ化炭素、および／または当該分野において既知の他の可溶化剤若しくは分散剤を用いて、生理食塩水における溶液として調製してもよい。

50

【0080】

また、コンプレックスを含む組成物を、直腸投与用の坐剤の形態で投与してもよい。

【実施例】

【0081】

下記特定の実施例は、単に詳細に説明するものであり、何であれ、残りの開示部分を制限するものではないと、解されるべきである。さらなる努力なしで、当業者は、本明細書の記載に基づいて、十分本発明を利用できると、考えられる。本明細書に挙げられるすべての公報は、全体を参考で本明細書中に引用される。

【0082】

実施例1：脂質様化合物の合成

10

8種の脂質様化合物を下記方法に従って調製した。

【0083】

5 mL のテフロン（登録商標）コーティングされたガラス製スクリュートップバイアル(Telfon-lined glass screw-top vial)に、ジスルフィド結合を有するアクリレート、アミンに1：2.4（アミン：アクリレート）のモル比で添加した。この混合物を90℃で2日間攪拌した。冷却後、このようにして形成された脂質様化合物を、特記しない限り、精製せずに使用した、必要であれば、これをシリカゲルによるクロマトグラフィーを用いて精製し、プロトン核磁気共鳴によって特性を明らかにした。

【0084】

上記方法に従って、化合物80-O14Bを、下記に示される構造を有する、N,N'-ジメチルプロパン-1,3-ジアミン(N,N'-dimehtylpropane-1,3-diamine)及び2-(デシルジスルファニル)エチルアクリレート(2-(decyl disulfanyl)ethyl acrylate)を用いて調製した。

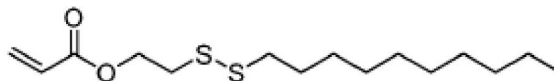
20

【0085】

【化20】



N,N'-ジメチルプロパン-1,3-ジアミン



2-(デシルジスルファニル)エチルアクリレート

【0086】

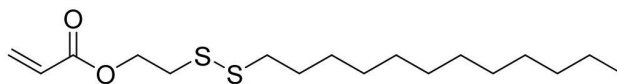
30

実施例2：脂質様化合物80-O16Bの合成

化合物80-O16Bを、2-(ドデシルジスルファニル)エチルアクリレート(2-(dodecyl disulfanyl)ethyl acrylate)（構造を下記に示す）を2-(デシルジスルファニル)エチルアクリレートの代わりに使用する以外は、実施例1に記載の全く同じ方法に従って、調製した。

【0087】

【化21】



2-(ドデシルジスルファニル)エチルアクリレート

40

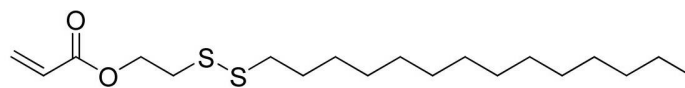
【0088】

実施例3：脂質様化合物80-O18Bの合成

化合物80-O18Bを、2-(テトラデシルジスルファニル)エチルアクリレート(2-(tetradecyl disulfanyl)ethyl acrylate)（構造を下記に示す）を2-(デシルジスルファニル)エチルアクリレートの代わりに使用する以外は、実施例1に記載の全く同じ方法に従って、調製した。

【0089】

【化 2 2】



2-(テトラデシルジスルファニル)エチルアクリレート

【0090】

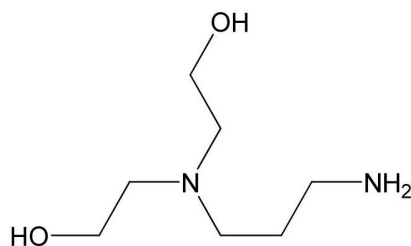
実施例 4：脂質様化合物 87-O14B の合成

化合物 87-O14B を、2, 2'-(3-アミノプロピルアザンジイル)ジエタノール(2,2'-(3-aminopropylazanediyl)diethanol) (構造を下記に示す) を N, N'-ジメチルプロパン-1, 3-ジアミンの代わりに使用する以外は、実施例 1 に記載の全く同じ方法に従って、調製した。

10

【0091】

【化 2 3】



2, 2'-(3-アミノプロピルアザンジイル)ジエタノール

20

【0092】

実施例 5：脂質様化合物 87-O16B の合成

化合物 87-O16B を、2, 2'-(3-アミノプロピルアザンジイル)ジエタノール(2,2'-(3-aminopropylazanediyl)diethanol) を N, N'-ジメチルプロパン-1, 3-ジアミンの代わりに使用する以外は、実施例 2 に記載の全く同じ方法に従って、調製した。

【0093】

実施例 6：脂質様化合物 87-O18B の合成

化合物 87-O18B を、2, 2'-(3-アミノプロピルアザンジイル)ジエタノール(2,2'-(3-aminopropylazanediyl)diethanol) を N, N'-ジメチルプロパン-1, 3-ジアミンの代わりに使用する以外は、実施例 3 に記載の全く同じ方法に従って、調製した。

30

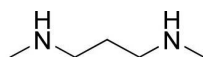
【0094】

実施例 7：脂質様化合物 1-O16B の合成

化合物 1-O16B を、N¹, N³-ジメチルプロパン-1, 3-ジアミン(N¹,N³-dimethylpropane-1,3-diamine) (構造を下記に示す) を N, N'-ジメチルプロパン-1, 3-ジアミンの代わりに使用する以外は、実施例 2 に記載の全く同じ方法に従って、調製した。

【0095】

【化 2 4】

N¹, N³-ジメチルプロパン-1, 3-ジアミン

40

【0096】

実施例 8：脂質様化合物 1-O18B の合成

化合物 1-O18B を、2-(テトラデシルジスルファニル)エチルアクリレート(2-(tetradecyldisulfanyl)ethyl acrylate) を 2-(ドデシルジスルファニル)エチルアクリレートの代わりに使用する以外は、実施例 7 に記載の全く同じ方法に従って、調製した。

【0097】

50

実施例 9～45：ナノコンプレックス組成物の調製

実施例 1～8 のいずれかで調製された脂質様化合物を、1 mg/mL の濃度で酢酸ナトリウム溶液 (25 mM、pH = 5.5) 中に溶解した。必要であれば、コレステロール及び 1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) (「DOP E」) をも含ませた。タンパク質または siRNA を得られた混合物に仕込んで、室温で 15 分間インキュベートした。脂質様化合物溶液及びタンパク質または siRNA の重量比は、6 : 1、20 : 1、または 40 : 1 である。このようにして調製されたナノコンプレックス組成物、即ち、下記組成物 9～30 について、下記実施例 47 でインビトロアッセイを行った。

【0098】

化合物 9～30 を、すべて生還元性 (bio reducible) である、本発明のジスルフィド脂質様化合物 80-O14B、80-O16B、80-O18B、87-O14B、87-O16B、及び 87-O18B を用いて、上記方法に従って調製した。これらの組成物及び他の組成物の成分およびこれらの量 (μg) については下記表参照し、それぞれは脂質様化合物、コレステロール、DOP E、及びタンパク質 (例えば、サポリン) または siRNA を含む。ただし、下記表には、本発明の組成物 31～45 および下記比較組成物の成分およびこれらの重量もまた含まれている。比較組成物 9'～30' は、非生還元性脂質様化合物 80-O14、80-O16、80-O18、87-O14、87-O16、及び 87-O18 を使用した以外は、同様にして調製した。これらの非生還元性化合物の調製は下記に記載する。

【0099】

10

20

【表 1 - 1】

	組成(重量比)
組成物 9	80-O14B (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.8 μ g)
比較組成物 9'	80-O14 (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.8 μ g)
組成物 10	80-O16B (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.8 μ g)
比較組成物 10'	80-O16 (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.8 μ g)
組成物 11	80-O18B (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.8 μ g)
比較組成物 11'	80-O18 (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.8 μ g)
組成物 12	87-O16B (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.8 μ g)
比較組成物 12'	87-O16 (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.8 μ g)
組成物 13	80-O14B (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)
比較組成物 13'	80-O14 (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)
組成物 14	80-O16B (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)
比較組成物 14'	80-O16 (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)
組成物 15	80-O18B (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)
比較組成物 15'	80-O18 (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)
組成物 16	87-O16B (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)
比較組成物 16'	87-O16 (16 μ g)、コレステロール (8 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)
組成物 17	80-O14B (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)
比較組成物 17'	80-O14 (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)
組成物 18	80-O16B (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)
比較組成物 18'	80-O16 (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)
組成物 19	80-O18B (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)
比較組成物 19'	80-O18 (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)

【0 1 0 0】

10

20

30

40

【表 1 - 2】

組成物 20	87-O16B (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)
比較組成物 20'	87-O16 (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.4 μ g)
組成物 21	80-O14B (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.2 μ g)
比較組成物 21'	80-O14 (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.2 μ g)
組成物 22	80-O16B (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.2 μ g)
比較組成物 22'	80-O16 (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.2 μ g)
組成物 23	80-O18B (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.2 μ g)
比較組成物 23'	80-O18 (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.2 μ g)
組成物 24	87-O16B (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.2 μ g)
比較組成物 24'	87-O16 (8 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (0.2 μ g)
組成物 25	80-O14B (7.2 μ g)及び siRNA (1.2 μ g)
比較組成物 25'	80-O14 (7.2 μ g)及び siRNA (1.2 μ g)
組成物 26	87-O14B (7.2 μ g)及び siRNA (1.2 μ g)
比較組成物 26'	87-O14 (7.2 μ g)及び siRNA (1.2 μ g)
組成物 27	80-O16B (7.2 μ g)及び siRNA (1.2 μ g)
比較組成物 27'	80-O16 (7.2 μ g)及び siRNA (1.2 μ g)
組成物 28	87-O16B (7.2 μ g)及び siRNA (1.2 μ g)
比較組成物 28'	87-O16 (7.2 μ g)及び siRNA (1.2 μ g)
組成物 29	80-O18B (7.2 μ g)及び siRNA (1.2 μ g)
比較組成物 29'	80-O18 (7.2 μ g)及び siRNA (1.2 μ g)
組成物 30	87-O18B (7.2 μ g)及び siRNA (1.2 μ g)
比較組成物 30'	87-O18 (7.2 μ g)及び siRNA (1.2 μ g)
組成物 31	1-O16B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (1.07 μ g)
組成物 32	1-O18B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (1.07 μ g)
比較組成物 33a'	80-O14 (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、及び DOPE (1 μ g)
比較組成物 33b'	80-O14 (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (2 μ g)
比較組成物 33c'	80-O14B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、及び DOPE (1 μ g)
組成物 33	80-O14B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (2 μ g)

【0101】

【表 1 - 3】

比較組成物 34a'	80-O16 (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、及び DOPE (1 μ g)
比較組成物 34b''	80-O16 (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (2 μ g)
比較組成物 34c'	80-O16B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、及び DOPE (1 μ g)
組成物 34	80-O16B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (2 μ g)
比較組成物 35a'	80-O18 (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、及び DOPE (1 μ g)
比較組成物 35b'	80-O18 (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (2 μ g)
比較組成物 35c'	80-O18B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、及び DOPE (1 μ g)
組成物 35	80-O18B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (2 μ g)
比較組成物 36'	80-O14B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及び 0%PEG
組成物 36	80-O14B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、サホリン (2 μ g)、及び 0%PEG
比較組成物 37'	80-O14B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及び 25%PEG
組成物 37	80-O14B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、サホリン (2 μ g)、及び 25%PEG
比較組成物 38'	80-O14B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、及び 40%PEG
組成物 38	80-O14B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、サホリン (2 μ g)、及び 40%PEG

【0 1 0 2】

10

20

30

40

【表 1 - 4】

比較組成物 39'	80-O14B (16 μ g) 及びコレステロール (4 μ g)
組成物 39	80-O14B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、及びサホリン (2 μ g)
比較組成物 40'	80-O14B (16 μ g) 及び DOPE (1 μ g)
組成物 40	80-O14B (16 μ g)、DOPE (1 μ g)、及びサホリン (2 μ g)
比較組成物 41'	80-O14B (16 μ g)
組成物 41	80-O14B (16 μ g) 及びサホリン (2 μ g)
組成物 42	80-O16B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、PEG (1 μ g)、及び siRNA (2 μ g)
組成物 43	80-O16B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、PEG (4 μ g)、及び siRNA (2 μ g)
組成物 44	87-O18B (16 μ g)、コレステロール (4 μ g)、DOPE (1 μ g)、PEG (1 μ g)、及び siRNA (2 μ g)
組成物 45	80-O16B (16 μ g)、PEG (4 μ g)、及び siRNA (2 μ g)

【0103】

組成物 31 及び 32 は、下記薄膜水和法(thin film hydration method)を用いて調製した。化合物 1-O16B または 1-O18B、コレステロール、および DOPE を、クロロホルム中で 16 : 4 : 1 の重量比で混合した後、真空中で蒸発することによって、薄膜が残った。PBS 中でこの薄膜を再水和することによって、1 mg/mL 濃度の 1-O16B または 1-O18B の溶液を得た。サポリンを添加した (1-O16B または 1-O18B 溶液 : サポリン = 15 : 1 (重量比))。この混合物を室温で 15 分間インキュベートした後、mPEG2000-セラミド C16 / DSPE-PEG2000-ビオチン (mPEG2000-ceramide C16/DSPE-PEG2000-Biotin) (Avanti Polar Lipids から購入、重量 /

10

20

30

40

50

重量＝８：１、PEG １０重量％の１－Ｏ１６Ｂ、この成分は上記表中に示されていない）を添加した。この混合物を１５分間再インキュベートすることによって、ナノコンプレックス組成物である、組成物３１または３２を得た。化合物１－Ｏ１６Ｂまたは１－Ｏ１８Ｂ、コレステロール、DOP E、およびサポリンの重量比については、上記表参照。このようにして調製されたこれらの２種の組成物について、下記実施例４７に記載のインビボアッセイを行った。

【０１０４】

mPEG2000-セラミドC16/DSP E-PEG2000-ビオチンの代わりに、mPEG2000-セラミド(mPEG2000-ceramide)を、ならびに、それぞれ、脂質様化合物８０－Ｏ１４Ｂ、８０－Ｏ１６Ｂ、及び８０－Ｏ１８Ｂを使用する以外は、上記方法に従って、組成物３３～３５を調製した。同様にして、比較組成物３３ａ’－３３ｃ’、３４ａ’－３４ｃ’、及び３５ａ’－３５ｃ’を、サポリンを添加せずに８０－Ｏ１４、８０－Ｏ１６、または８０－Ｏ１８を用いて調製した。これらの組成物について、実施例４７に記載のインビトロアッセイを試験した。

10

【０１０５】

DSP E-PEG2000を含ませなかった以外は、組成物３３を調製するのに使用した方法に従って、組成物３６を調製した。また、比較組成物３６’は、サポリンを添加しない以外は同様にして調製した。これらの２種の組成物、ならびに下記の９種の組成物３７～４５及び５種の比較組成物３７’～４１’について、実施例４７に記載のインビトロ及びインビボアッセイを行った。

20

【０１０６】

DSP E-PEG2000を、PEGが２５重量％の脂質様化合物であるような量で添加する以外は、組成物３３を調製するのに使用した方法に従って、組成物３７を調製した。また、比較組成物３７’を、サポリンを添加しない以外は同様にして調製した。

【０１０７】

DSP E-PEG2000を、PEGが４０重量％の脂質様化合物であるような量で添加する以外は、組成物３３を調製するのに使用した方法に従って、組成物３８を調製した。また、比較組成物３８’を、サポリンを添加しない以外は同様にして調製した。

【０１０８】

組成物３９を下記方法に従って調製した。化合物８０－１４Ｂ及びコレステロールを、クロロホルム中で１６：４の重量比で混合した後、真空下で蒸発することによって、薄膜が残った。PBS中でこの薄膜を再水和することによって、１mg/mL濃度の８０－１４Ｂの溶液を得た。サポリンを添加した（８０－１４Ｂ：サポリン＝８：１（重量比））。この混合物を室温で１５分間インキュベートした後、DSP E-PEG2000を添加した（PEG １０重量％の８０－１４Ｂ）。この混合物を１５分間再インキュベートすることによって、組成物３９を得た。また、組成物３９’を、サポリンを添加しない以外は同様にして調製した。

30

【０１０９】

コレステロールの代わりに、DOP E（８０－１４Ｂ：DOP E＝１６：１、w/w）を添加した以外は、上記組成物３９を調製するのに使用した方法に従って、組成物４０を調製した。また、比較組成物４０’を、サポリンを添加しない以外は同様にして調製した。

40

【０１１０】

コレステロールを添加しなかった以外は、上記組成物３９を調製するのに使用した方法に従って、組成物４１を調製した。また、比較組成物４１’を、サポリンを添加しない以外は同様にして調製した。

【０１１１】

組成物４２を下記方法に従って調製した。化合物８０－１６Ｂ、コレステロール、及びDOP Eを、クロロホルム中で１６：４：１の重量比で混合した後、真空下で蒸発することによって、薄膜が残った。PBS中でこの薄膜を再水和することによって、１mg/m

50

L濃度の80-16Bの溶液を得た。siRNAを添加した(80-16B:siRNA=8:1(重量比))。この混合物を室温で15分間インキュベートした後、DSP-PEG2000を添加した(80-16B:PEG=16:1、w/w)。この混合物を15分間再インキュベートすることによって、組成物42を得た。

【0112】

80-16B及びPEGの割合を16:1ではなく4:1にした以外は、直前に記載の方法に従って、組成物43を調製した。

【0113】

80-16Bの代わりに、87-18Bを使用した以外は、組成物42を調製するのに使用した方法に従って、組成物44を調製した。

10

【0114】

コレステロール及びDSP-PEG2000を含ませなかった以外は、組成物43を調製するのに使用した方法に従って、組成物45を調製した。

【0115】

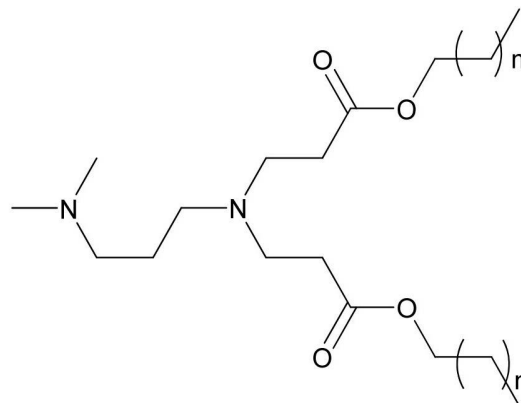
比較化合物および比較組成物の調製

比較化合物80-O14、80-O16、80-O18、87-O14、87-O16、および87-O18を、テトラデシルアクリレート(tetradecyl acrylate)、ヘキサデシルアクリレート(hexadecyl acrylate)、またはオクタデシルアクリレート(octadecyl acrylate)をジスルファニルアクリレートの代わりに使用した以外は、それぞれ、実施例1~6に記載の全く同じ方法を用いて、調製した。これらの6種の比較化合物の構造を下記

20

【0116】

【化25】



30

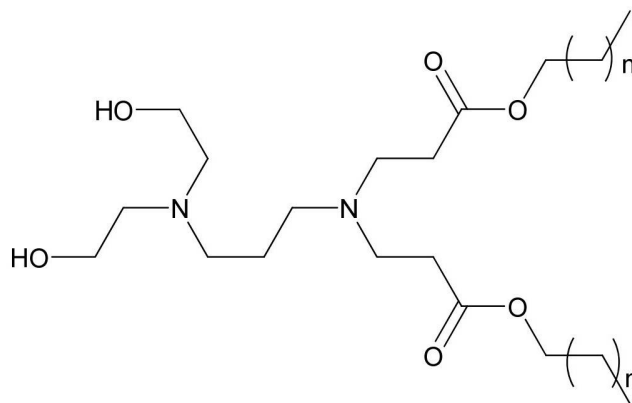
比較化合物80-O14、 $n=12$

比較化合物80-O16、 $n=14$

比較化合物80-O18、 $n=16$

【0117】

【化 2 6】

比較化合物87-O14、 $n=12$ 比較化合物87-O16、 $n=14$ 比較化合物87-O18、 $n=16$

【0118】

これら6種の比較化合物を用いて、上記方法の一つに従って、組成物9'-30'、33a'~33c'、34a'~34c'、35a'~35c'、及び36'~41'を調製し、下記実施例47に記載の方法に従って試験した。上記表は、これらの組成物に含まれる成分及びこれらの量を示す。

【0119】

実施例46：粒径の測定

動的光散乱(DLS)アッセイを行って、組成物33及び36~41ならびにまた比較組成物33b'及び36'~41'のそれぞれに含まれるナノコンプレックスの粒径を測定した。

【0120】

1mg/mL ナノコンプレックス組成物 約20μLを、本測定用にリン酸緩衝液(pH=7.2)で1.2mLに希釈した。

【0121】

16種の試験組成物のそれぞれにおいて、粒径は150~400nmであった。ただし、粒径は、組成物に含まれる成分及びこれらの量を変更することによって調整してもよい。

【0122】

実施例47：脂質様化合物のデリバリー効率の評価

実施例1~6で調製された脂質様化合物について、細胞系MDA-MB-231及びMCF-7へのタンパク質、即ち、サポリン(Saponaria officinalis由来、pI=9.5)のデリバリー、ならびに細胞系GFP-MDA-MB-231へのsiRNA、即ち、siPLK-1のデリバリーを評価した。

【0123】

細胞培養

3種の細胞系を、5%CO₂の存在下で37℃で10%ウシ胎児血清(「FBS」)及び1%ペニシリン/ストレプトマイシンを追加したダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(「DMEM」)で培養した。下記タンパク質トランスフェクションアッセイでは、細胞を、トランスフェクションする1日前に、1ウェル当たり10,000細胞の密度で96ウェルプレートに播種した。

【0124】

MDA-MB-231におけるインビトロでのタンパク質のトランスフェクション

タンパク質のデリバリー効率を評価するために、実施例9~24で調製した脂質様化合物/タンパク質コンプレックス及び比較組成物9'~24'をMDA-MB-231癌細胞に添加し、37℃で24時間インキュベートした。サポリン濃度は、PBSにおいて0

10

20

30

40

50

． 1 μg / 250 μL であった。脂質様化合物またはサポリンを含まない等容のPBSをコントロールとして使用した。24インキュベートした後、アマーラブルーアッセイ(Amar Blue assay)によって細胞の生存率を測定した。全てのトランスフェクション研究を4連で行った。

【0125】

予想できなかったことに、ジスルフィド脂質様化合物80-O14B、80-O16B、80-O18B、及び87-O16Bは、これらの非ジスルフィドのカウンターパート、即ち、80-O14、80-O16、80-O18、及び87-O16に比べて、4研究条件全てにおいて非常により高いサポリンデリバリー効率を示した。より詳細には、組成物13 (80-O14Bを含む)、組成物14 (80-O16Bを含む)、組成物15 (80-O18Bを含む)、及び組成物16 (87-O16Bを含む)で処理した細胞は、それぞれ、32%、9%、12%、及び39%の細胞生存率を示した。これに対して、比較組成物13' (80-O14を含む)、比較組成物14' (80-O16を含む)、比較組成物15' (80-O18を含む)、及び比較組成物16' (87-O16を含む)で処理した細胞は、それぞれ、80%、57%、51%、及び72%の細胞生存率を示した。

10

【0126】

MC F-7におけるインビトロでのタンパク質のトランスフェクション

組成物33~41、ならびに比較組成物33a'、33b'、33c'、34a'、34b'、34c'、35a'、35b'、35c'、および36'~41'について、MC F-7細胞へのサポリンのデリバリーに関するインビトロ研究を行った。より詳細には、各配合物を、0.025~3 μg / 50 μL の濃度になるようにPBSで希釈した後、これを1配合物当たり4試験で96ウェルプレートで調製した細胞にデリバリーした。様々な濃度のサポリンを試験した。PBSをブランクとした。

20

【0127】

細胞の生存率をMTTアッセイによって測定した。MTT試薬である3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)をDMEM中に0.5 mg/mL になるように希釈して、アッセイ溶液を得た。デリバリー実験用に使用した96ウェルプレートから培地を吸引した。次に、各ウェルを150 μL のMTTアッセイ溶液で満たし、37℃で4時間インキュベートした。590 nm の吸光度を読んだ。サポリンを以下のようにしてFITC (フルオレセインイソチオシアネート)で標識した。サポリン(1 mg/mL ; 200 μL)を100 μL DMSOに溶解した6 mg FITCと混合し、遮光した(protected from light)後、数時間遠心した。このようにして標識されたタンパク質を、サイズ排除カラム(size exclusion column)によりFITC染料と分離した。FITC-標識サポリン画分を得、吸光度を測定するために0.67 mg/mL 濃度にまで希釈した。IC₅₀値を、細胞の生存率が50%にまで減少した脂質化合物の濃度として算出した。

30

【0128】

予想できなかったことに、組成物33 (80-O14Bを含む)、組成物34 (80-O16Bを含む)、及び組成物35 (80-O18Bを含む)は、それぞれ、0.75 μg / 10000細胞、0.6 μg / 10000細胞、及び0.8 μg / 10000細胞のIC₅₀を示した。これに対して、比較組成物33b' (80-O14を含む)、比較組成物34b' (80-O16を含む)、及び比較組成物35b' (80-O18を含む)は、1 μg / 10000細胞濃度で細胞毒性を示さなかった。

40

【0129】

インビトロでのsiRNAデリバリー

siRNAデリバリー効率を評価するために、実施例25~30で調製した脂質様化合物/siRNAコンプレックスおよび比較組成物25'~30'を、GFP-MDA-MB-231癌細胞に添加し、37℃で24時間インキュベートした。製造社の指示に従っ

50

て調製したOPTI-MEMにおけるsiRNA及びリポフェクタミン2000(Lipofectamine 2000) (「LPF 2000」、Invitrogenから購入した市販のカチオン性脂質)のコンプレックスを含む、コントロール組成物を使用した。GFPを発現する細胞の割合(%)を、フローサイトメトリー(BD FACS caliber)によって評価した。全ての組成物は4連で試験した。

【0130】

予想できなかったことに、ジスルフィド脂質様化合物80-O16B、80-O18B、87-O14B、及び87-O16Bの一つを含む組成物は、それぞれ、40%以下にまでGFP発現を阻害した。これに対して、これらの非ジスルフィドのカウンターパートである80-O16、80-O18、87-O14、及び87-O16は、75%以上でGFP発現を阻害した。

10

【0131】

インビボでの癌の処置

組成物31(即ち、1-O16B及びサポリンを含む)及び組成物32(即ち、1-O18B及びサポリンを含む)について、下記方法に従ってインビボでの腫瘍成長阻害を試験した。より詳細には、4T1-12B乳房腫瘍を有するBALB/cマウスを、 10^7 細胞/mLの濃度で10% FBSを添加したDMEMにおける4T1-12B細胞懸濁液から発生させた。細胞懸濁液のアリコート(100 μ L)を、4~6週齢のメスのBALB/cマウスの乳房脂肪体に注射した。このマウスを、注射から7日後にランダムに4群(処置群でn=7、コントロール群でn=5)に分けた。これらのマウスに、3日毎に尾静脈を介して注射した。処置群では、各マウスに、5.5 mg/kgの1-O16Bまたは1-O18B及び330 μ g/kgのサポリンを注射した。腫瘍容積を3日毎に測定した。

20

【0132】

また、1-O16B及び1-O18Bを含まないPBS、およびサポリンを、コントロールとして注射した。また、比較研究を、1-O16B及び1-O18Bを含まないPBSにおけるサポリンを用いて行った。

【0133】

予想できなかったことに、16日目に、組成物31または32で処置したマウスは、腫瘍サイズが100 mm³未満であり、これはPBSで処置したマウスのサイズ(即ち、200 mm³)およびサポリンで処置したマウスのサイズ(即ち、120 mm³超)よりかなり小さく;さらに、22日目では、組成物32で処置したマウスは、腫瘍サイズが100 mm³未満であり、これはPBSまたはサポリンで処置したマウスのサイズ(即ち、250 mm³超)よりかなり小さかった。

30

【0134】

インビボでのsiRNAのデリバリー

インビボでのsiRNAのデリバリー効率を評価するために、組成物42~45を用いて、下記デリバリーアッセイを行った。上記方法に従って、グリセルアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)(GAPDH)を標的とするsiRNAを用いて、これらの組成物を配合した。

40

【0135】

試験動物であるマウスを4群(5匹/群)に分けて、静脈内尾静脈注射により組成物42、43、44、または45を投与した。コントロール群のマウスには、PBSを投与した。組織特異的抑制効率および蓄積を、肝臓、肺、及び腎臓組織で試験した。

【0136】

予想できなかったことに、組成物42及び43は肺組織での、組成物44は肝臓組織での、および組成物45は腎臓組織での、遺伝子発現を抑制した。より詳細には、組成物42及び43で処置したマウスの肺組織では、GAPDH mRNAがコントロール群のレベルの37%及び56%で発現した;組成物44で処置したマウスの肝臓組織では、55%のGAPDH mRNAが発現した;さらに、組成物45で処置したマウスの腎臓組織

50

では、25%のGAPDH mRNAが発現した。

【0137】

他の実施形態

本明細書に開示されるすべての特徴は、いずれの組み合わせで組み合わせられてもよい。本明細書に開示される各特徴は、同じ、等価の、または同様の目的に適う別の特徴に置換されてもよい。ゆえに、特記しない限り、開示される各特徴は、一連の等価のまたは同様の特徴の一例であるのみである。

【0138】

上記説明から、当業者は、本発明の必須の特徴を容易に確認でき、本発明の概念および範囲から逸脱することなく、様々な用途および条件に適合するように本発明を様々な変更及び修飾することが可能である。したがって、他の実施形態もまた下記特許請求の範囲に含まれる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 48/00 (2006.01) A 6 1 K 48/00

(74)代理人 110000671
八田国際特許業務法人

(72)発明者 シュウ, ショウビン
アメリカ合衆国, 0 2 1 4 4 マサチューセッツ州, ソマーヴィル, キャメロン アヴェニュー
1 1

(72)発明者 ワン, ミン
アメリカ合衆国, 0 2 1 4 3 マサチューセッツ州, ソマーヴィル, ウィロビー ストリート 2
1

合議体

審判長 佐々木 秀次

審判官 富永 保

審判官 天野 宏樹

(56)参考文献 特表2002-501762 (JP, A)
特表2005-529959 (JP, A)
特開2010-24203 (JP, A)
米国特許第3914301 (US, A)
特開昭55-133343 (JP, A)
米国特許第3954746 (US, A)
特開平6-220480 (JP, A)
米国特許第3853775 (US, A)
国際公開第2012/146762 (WO, A1)
特開平5-279322 (JP, A)
特表2008-510795 (JP, A)
特表平8-507770 (JP, A)
米国特許出願公開第2004/0097720 (US, A1)
Biochem. J. , (2001), Vol. 356, pp. 747-756
J. Med. Chem. , (2000), Vol. 43, No. 23, pp. 4377-4387
Org. Biomol. Chem. , (2011), Vol. 9, pp. 820-833
高分子論文集, (2000), Vol. 57, No. 10, pp. 652-658
Macromolecules, (1996), Vol. 29, pp. 3681-3685
J. CHEM. SOC. , CHEM. COMMUN. , (1992), No. 7, pp. 547-549
INHIBITORS FOR SULFUR CORROSION OF COPPER AND SILVER, SYMPOSIUM ON ADDITIVES IN THE PETROLEUM INDUSTRY PRESENTED BEFORE THE DIVISION OF PETROLEUM CHEMISTRY AMERICAN CHEMICAL SOCIETY DETROIT MEETING, (1965), D-137-D-144
ChemBioChem, (2010), Vol. 11, pp. 511-515
Angew. Chem. Int. Ed. , (2003), Vol. 42, pp. 1839-1841
Bioconjug Chem. , (2012), Vol. 23, No. 1, pp. 135-140, NIH Public Access Author Manuscript, pp. 1

− 1 3

J. CHEM. SOC. , CHEM. COMMUN. , (1 9 9 0) , p p. 2 2 5 − 2 2 6

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07C323/12

A61K38/00-38/58

A61K48/00

REGISTRY (STN) , CA (STN)