(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 8 月 4 日(04.08.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/121942 A1

(51) 国際特許分類:
C07D 295/088 (2006.01) *A61K 47/22* (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *C07D 311/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/052690

(22) 国際出願日: 2016 年 1 月 29 日(29.01.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2015-016786 2015 年 1 月 30 日(30.01.2015) JP

(71) 出願人: 日油株式会社 (NOF CORPORATION) [JP/JP]; 〒1506019 東京都渋谷区恵比寿四丁目２０番３号 Tokyo (JP). 国立大学法人北海道大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 Hokkaido (JP).

(72) 発明者: 中井 悠太(NAKAI, Yuta); 〒2100865 神奈川県川崎市川崎区千鳥町３－３ 日油株式会社内 Kanagawa (JP). 丹下 耕太(TANGE, Kota); 〒2100865 神奈川県川崎市川崎区千鳥町３－３ 日油株式会社内 Kanagawa (JP). 秋田 英万(AKITA, Hidetaka); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 原島 秀吉(HARASHIMA, Hideyoshi); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 冨樫 亮平(TOGASHI, Ryohei); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 三浦 尚也(MIURA, Naoya); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 前田 澪(MAETA, Mio); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目１番１号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

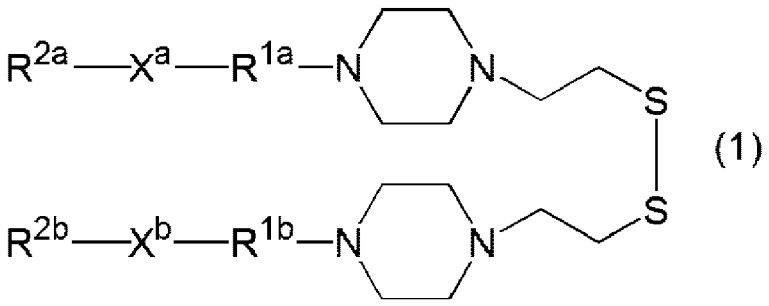
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,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

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[続葉有]

(54) **Title**: CATIONIC LIPID

(54) 発明の名称 : カチオン性脂質



(1)

(57) **Abstract**: The purpose of the present invention is to provide a cationic lipid that can be used as a nucleic acid delivery carrier, a lipid membrane structure in which the cationic lipid is used, a nucleic-acid-introducing agent in which the cationic lipid is used, and a method for achieving nucleic acid introduction using the nucleic-acid-introducing agent containing the cationic lipid. The lipid membrane structure containing the cationic lipid represented by formula (1) (in the formula, each of the symbols is as defined in the specification) has exceptional stability in the blood and tumor accumulation properties. The nucleic-acid-introducing agent in which this cationic lipid is used makes it possible to achieve high nucleic acid delivery efficiency of a nucleic acid to be delivered into the cytoplasm.

(57) 要約: 本発明は、核酸送達キャリアとして用いることができるカチオン性脂質、カチオン性脂質を用いた脂質膜構造体、およびカチオン性脂質を用いた核酸導入剤、並びにカチオン性脂質を含む核酸導入剤を用いて核酸導入を達成する方法を提供することを目的とする。式（１）（式中、各記号の定義は明細書に記載の通りである）で示されるカチオン性脂質を含む脂質膜構造体は、血中安定性や腫瘍集積性に優れている。当該カチオン性脂質を用いた核酸導入剤は、送達核酸の細胞質内への高い核酸送達効率を達成することができる。

WO 2016/121942 A1

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： カチオン性脂質

技術分野

[0001] 本発明は核酸送達効率を改善したカチオン性脂質、これを含む脂質膜構造体、及びこれらの用途に関する。

背景技術

[0002] 核酸治療は、核酸（ＲＮＡ）を細胞質内へ送達して病原蛋白質の発現を抑制する治療法であり、遺伝子治療は、核酸（ＤＮＡ）を細胞核内へ送達して治療に有用な蛋白質の発現を促進させる治療法である。これらの治療法では、核酸を細胞内へ送達することが重要となる。しかしながら、核酸単独では血中の酵素により速やかに分解されるため、細胞内への送達が困難である。そのためこれらの治療薬を実用化するには、核酸を細胞内へ送達するためのキャリアが求められている。

[0003] 外来物質を細胞内へ送達するというキャリアの性質上、少ない使用量で大きな効果を発揮することが必要である。即ち、核酸送達キャリアには、細胞質内に取り込まれた単位キャリア当たりの核酸の送達量を高めること、つまりは細胞質内への核酸送達効率を高めることが要求される。

[0004] レトロウイルスおよびアデノウイルスに代表されるウイルスベクターは、核酸送達効率の高いキャリアである。その一方で、ゲノムへのウイルスベクターの挿入により引き起こされる腫瘍の形成や標的細胞以外への非特異的な影響を及ぼすといった問題点がある。これらのことから、非ウイルスキャリアの開発が進められている。その中でもカチオン性脂質を用いた核酸送達キャリア（脂質膜構造体）は、最も一般的に用いられている非ウイルスキャリアである。

[0005] カチオン性脂質を用いた核酸送達キャリアで、核酸送達効率を高めるには、体内動態（例えば、血中での安定性や腫瘍等の標的細胞への集積性など）を改善することが求められている。さらに、細胞質内への核酸の送達効率を

高めるためには、上述の体内動態の他に、細胞内動態（例えば、細胞への取り込みや、エンドソームからの脱出、細胞質内でのキャリアからの核酸の放出など）を改善することも必要となる（非特許文献１）。

[0006] カチオン性脂質は、大別して疎水性部と親水性部から構成されている。その構成としては、疎水性部には脂肪酸基やステロール基などの疎水性基、親水性部にはアミノ基などのカチオン性基が用いられている。カチオン性脂質の組成としては、親水性基１つに対して、疎水性基が２つ含まれる構造（以下、「二鎖型カチオン性脂質」と称する）が多く知られている。

[0007] 上述のように、カチオン性脂質を用いた核酸送達キャリアでは、体内動態および細胞内動態を改善する必要がある。核酸や細胞膜がアニオン性を示すことから、これらと静電的に相互作用を示すカチオン性脂質のカチオン性基が、これらの課題を解決するための重要な役割を担うことが判明している。そのため、カチオン性脂質ではカチオン性基、つまり、アミノ基を中心に開発が進められている。

[0008] 細胞内動態の改善には、四級アミンを有するカチオン性脂質を用いる方法が知られている。例えば、四級アミンを有する公知の二鎖型カチオン性脂質１，２－Ｄｉｏｌｅｏｙｌ－３－ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｍｏｎｉｕｍ ｐｒｏｐａｎｅ（以下、「ＤＯＴＡＰ」と称する）では、ＤＯＴＡＰのアミノ基がアニオン性を示す核酸と静電的な相互作用により、正に帯電した脂質膜構造体を形成することができる。この正に帯電した脂質膜構造体が、アニオン性を示す細胞膜と相互作用することにより、細胞への取り込みを高めることができる。しかしながら、四級アミンを有するＤＯＴＡＰでは核酸との静電的な相互作用が強すぎるため、核酸がキャリアから放出され難いといった問題点を有している（非特許文献２）。

[0009] 一方で、三級アミンについても種々検討が行われている。三級アミンを有する公知の二鎖型カチオン性脂質としては、１，２－Ｄｉｏｌｅｏｙｌ－３－ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｉｎｏ ｐｒｏｐａｎｅ（以下、「ＤＯＤＡＰ」と称する）が挙げられる。ＤＯＤＡＰは、核酸との静電的な相互作用により脂

質膜構造体を形成することができ、標的細胞へ核酸を送達し得るキャリアとなることが述べられている（非特許文献２）。

[0010] 非特許文献３では、体内動態について述べられている。この文献では、二鎖型カチオン性脂質のｐＫａを中性付近に調整している。このカチオン性脂質を用いた脂質膜構造体は、静脈内注射後に長い間血中で安定であること、腫瘍部位に集積することが示されている。

[0011] 非特許文献４では細胞内動態について述べられている。この文献では、二鎖型カチオン性脂質について、アミノ基周辺の構造を変更することで、脂質膜構造体としてのｐＫａを細胞内でのエンドソーム脱出に有利な値に調整できることが述べられている。これにより、エンドソーム脱出が促進され、核酸送達効率が向上することが明らかとされている。

[0012] また、疎水性基とアミノ基数が異なる三級アミノ基を有するカチオン性脂質についても開発が行われている。例えば、特許文献１及び３では、疎水性基１つと親水性基１つからなる化合物同士を、生分解性を示すジスルフィド結合で繋いだ構造を有するカチオン性脂質について述べられている。この文献では、当該カチオン性脂質が血中安定性や腫瘍標的性などの体内動態を改善できることが示されている。また、当該カチオン性脂質は公知のカチオン性脂質であるＤＯＴＡＰやＤＯＤＡＰと比較して、高い核酸送達効率を示すことから、核酸の細胞質内への送達効率の向上などの細胞内動態を改善できることが明らかとなっている。

[0013] しかしながら、こうした当該分野での技術進捗にも関らず、カチオン性脂質を用いた脂質膜構造体により達成される細胞質内への核酸送達効率は、十分に満足されるものではない。

[0014] 特許文献２で述べられているように細胞内への送達能を向上させるためには、アミノ基を多く含有することが有用である。しかしながら、アミノ基を多く含有することは、細胞内におけるキャリアからの核酸の放出が抑制されることにつながるため、核酸送達効率の改善は期待できない。

先行技術文献

特許文献

[0015] 特許文献1：国際公開第２０１３／０７３４８０号

特許文献2：特開２０１１－１２１９６６号公報

特許文献3：ＵＳ２０１４０３３５１５７

非特許文献

[0016] 非特許文献1：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ １３（４）：７８６－７９４，２００６

非特許文献2：Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ２９（２４－２５）：３４７７－９６，２００８

非特許文献3：Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ １０７：２７６－２８７，２００５

非特許文献4：Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２８：１７２－１７６，２０１０

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0017] 本発明の目的は、核酸送達キャリアとして用いることができるカチオン性脂質、カチオン性脂質を用いた脂質膜構造体、およびカチオン性脂質を用いた核酸導入剤を提供することである。

また、カチオン性脂質を含む核酸導入剤を用いて核酸導入を達成する方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0018] 細胞質内への核酸送達効率の向上には、アミノ基の数を増加させ、細胞内への送達能を向上させつつ、核酸を細胞質内で効率良く放出することを達成する必要がある。

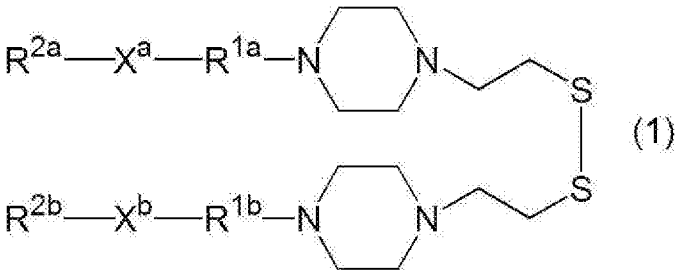
[0019] 本発明者らはこの技術的な問題点に着目して鋭意研究した結果、疎水性基とピペラジンを三級アミンとした親水性基からなる化合物同士をジスルフィド結合で繋いだ構造を有するカチオン性脂質（疎水性基が２つに対して、親

水性基４つを有する構造、以下、本発明のカチオン性脂質とも称する）が、高い核酸送達効率を有することを見出して本発明を完成するに至った。

[0020] 即ち、本発明は、以下の内容を包含する。

［１］式（１）

[0021] [化1]



(1)

[0022] 式（１）中、Ｒ^{1a}及びＲ^{1b}は独立して、炭素数８以下のアルキレン基又はオキシジアルキレン基であり、

Ｘ^{a}及びＸ^{b}は独立して、エステル結合、アミド結合、カーバメート結合、又はエーテル結合を表し、

Ｒ^{2a}及びＲ^{2b}は独立して、ステロール残基、脂溶性ビタミン残基、又は炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基を表す）で示されるカチオン性脂質。

［２］Ｒ^{1a}及びＲ^{1b}が独立して、アルキレン基である［１］記載のカチオン性脂質。

［３］Ｘ^{a}及びＸ^{b}がエステル結合である、［１］又は［２］に記載のカチオン性脂質。

［４］Ｒ^{2a}及びＲ^{2b}が独立して、脂溶性ビタミン残基、又は炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基である［１］～［３］のいずれかに記載のカチオン性脂質。

［５］Ｒ^{2a}及びＲ^{2b}が独立して、脂溶性ビタミン残基である［１］～［４］のいずれかに記載のカチオン性脂質。

［６］Ｒ^{2a}及びＲ^{2b}が独立して、炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基である［１］～［４］のいずれかに記載のカチオン性脂質。

［７］［１］～［６］のいずれかに記載のカチオン性脂質を膜の構成脂質と

して含む脂質膜構造体。

［８］［１］～［６］のいずれかに記載のカチオン性脂質、又は［７］記載の脂質膜構造体を含む核酸導入剤。

［９］［１］～［６］のいずれかに記載のカチオン性脂質、又は［７］記載の脂質膜構造体に抗炎症剤を封入した核酸導入剤。

［１０］生体外において、核酸を内封した［８］又は［９］記載の核酸導入剤と細胞とを接触させることを含む、当該核酸を当該細胞内へ送達する方法。

［１１］核酸を封入した［８］又は［９］記載の核酸導入剤を、標的細胞へ送達されるように、生体へ投与することを含む、当該核酸を当該細胞内へ導入する方法。

発明の効果

[0023] 本発明は、カチオン性脂質に関するものである。当該カチオン性脂質は、脂質膜構造体を形成することができ、また当該カチオン性脂質を含む核酸導入剤とすることができる。当該カチオン性脂質を含む脂質膜構造体は、ｐＫａを中性付近とすることができるため、血中安定性や腫瘍集積性を有している。また、細胞内の還元的環境において本発明のカチオン性脂質に含まれるジスルフィド結合が切断され、内包物（核酸）の放出が促進される。そのため、本発明のカチオン性脂質を用いた核酸導入剤は、送達核酸の細胞質内への高い核酸送達効率を達成することができる。

[0024] また本発明のカチオン性脂質、又は脂質膜構造体を用いて核酸導入を行うと、血清成分による核酸の分解が抑制されるため、血清存在下での核酸導入や生体内での核酸導入に有利である。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]各種カチオン性脂質（Ｍｙｒ－Ｃ３Ｍ、ＴＳ－Ｃ３Ｍ、ＴＳ－ＰＺ４Ｃ２）から調製される各種ＭＥＮＤ（多機能性エンベロープ型ナノ構造体）の遺伝子発現活性を示した図である。

[図2]Ｄｅｘ－Ｐａｌの内封量を調整したＴＳ－ＰＺ４Ｃ２から調製されるＭ

ＥＮＤの遺伝子発現活性の経時的変化を示す図である。

[図3]ｐＤＮＡ、又はｐＤＮＡを封入した市販のトランスフェクション試薬から調製される遺伝子導入剤、及びｐＤＮＡを封入したＴＳ－ＰＺ４Ｃ２から調製されるＭＥＮＤの静脈投与後の肝臓における遺伝子発現活性を示した図である。

[図4]ｐＤＮＡを封入した、ＴＳ－Ｃ３Ｍから調製されるＭＥＮＤ、又はＴＳ－ＰＺ４Ｃ２から調製されるＭＥＮＤの静脈投与後の肝臓における遺伝子発現活性を示した図である。

[図5]上段は、脂溶性蛍光色素を搭載した、各種カチオン性脂質（Ｍｙｒ－Ｃ３Ｍ、ＴＳ－ＰＺ４Ｃ２、Ｌ－ＰＺ４Ｃ２、Ｏ－ＰＺ４Ｃ２）から調製される各種ＭＥＮＤの静脈投与後の各臓器及び腫瘍への集積性を示した写真である。中段は、投与後２４時間後の肝臓への集積量を示した図である。下段は、投与後２４時間後の腫瘍への集積量を示した図である。

[図6]ｐＤＮＡを封入した各種カチオン性脂質（Ｍｙｒ－Ｃ３Ｍ、Ｌ－ＰＺ４Ｃ２、Ｏ－ＰＺ４Ｃ２）から調製される各種ＭＥＮＤの静脈投与後４８時間後の腫瘍における遺伝子発現活性を示した図である。

[図7]遺伝子を封入した、Ｌ－ＰＺ４Ｃ２から調製されるＭＥＮＤの静脈投与後の抗腫瘍効果を示した図である。

発明を実施するための形態

[0026] 以下、本発明の実施形態を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0027] 本発明は、式（１）で表される化合物（以下、本発明の化合物、あるいは本発明のカチオン性脂質とも称する）を提供するものである。

[0028] R^{1a}及びR^{1b}は独立して、炭素数８以下のアルキレン基又はオキシジアルキレン基を表し、好ましくは炭素数８以下のアルキレン基である。

[0029] 炭素数８以下のアルキレン基は、直鎖状であっても、分岐を有していても良いが、好ましくは直鎖状である。当該アルキレン基に含まれる炭素数は、好ましくは６以下であり、最も好ましくは４以下である。炭素数８以下のア

ルキレン基としては、具体的にはメチレン基、エチレン基、プロピレン基、イソプロピレン基、テトラメチレン基、イソブチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基、ヘプタメチレン基、オクタメチレン基等を挙げることができ、好ましくはメチレン基、エチレン基、プロピレン基、テトラメチレン基であり、最も好ましくはエチレン基である。

[0030] 炭素数８以下のオキシジアルキレン基とは、エーテル結合を介したアルキレン基（アルキレン－Ｏ－アルキレン）を示し、２つ存在するアルキレン基の炭素数の合計が８以下のものである。ここで、２つ存在するアルキレンは同一でも異なっていてもよいが、好ましくは同一である。炭素数８以下のオキシジアルキレン基としては、具体的にはオキシジメチレン基、オキシジエチレン基、オキシジプロピレン基、オキシジブチレン基等を挙げることができる。好ましくは、オキシジメチレン基、オキシジエチレン基、オキシジプロピレン基であり、最も好ましくはオキシジエチレン基である。

[0031] R^{1a}はR^{1b}と同一であっても異なっていても良いが、好ましくは、R^{1a}はR^{1b}と同一の基である。

[0032] X^a及びX^bは独立して、エステル結合、アミド結合、カーバメート結合、エーテル結合であり、好ましくはエステル結合、アミド結合であり、最も好ましくはエステル結合である。X^a及びX^bの結合の向きは制限されないが、X^aおよびX^bがエステル結合の場合、好ましくは、R^{2a}－ＣＯ－Ｏ－R^{1a}－およびR^{2b}－ＣＯ－Ｏ－R^{1b}－構造を呈する。

[0033] X^aはX^bと同一であっても異なっていても良いが、好ましくは、X^aはX^bと同一の基である。

[0034] R^{2a}及びR^{2b}は独立して、ステロール残基、脂溶性ビタミン残基又は炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基を表し、好ましくは脂溶性ビタミン残基又は炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基である。最も好ましくは脂肪族炭化水素基である。また、臓器（特に肝臓）特異性という観点からはR^{2a}及びR^{2b}が脂溶性ビタミン残基であることもまた好ましい。

[0035] 「ステロール残基」としては、X^a又はX^bとの結合に関与する反応性官能

基（例、水酸基）を除いたステロール、又はステロール誘導体に由来する残基が挙げられるが、好ましくはステロール誘導体に由来する残基である。ステロール誘導体とは、例えば、ステロールの水酸基をジカルボン酸の一方のカルボン酸と反応させたステロールヘミエステル（この場合、もう一方のカルボン酸が反応性官能基となる）が挙げられる。ステロールには、例えばコレステロール、コレスタノール、スチグマステロール、β－シトステロール、ラノステロール、及びエルゴステロール等が挙げられるが、好ましくはコレステロール、又はコレスタノールである。ジカルボン酸としては、例えば、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、又はアジピン酸等が挙げられるが、好ましくはコハク酸、又はグルタル酸である。ステロール誘導体の具体例としては、コレステロールヘミコハク酸エステル、コレステロールヘミグルタル酸エステル等が挙げられる。

[0036] 「脂溶性ビタミン残基」としては、X^a又はX^bとの結合に関与する反応性官能基（例、水酸基）を除いた脂溶性ビタミン、又は脂溶性ビタミン誘導体に由来する残基が挙げられるが、好ましくは脂溶性ビタミン誘導体に由来する残基である。脂溶性ビタミン誘導体とは、反応性官能基が水酸基である脂溶性ビタミンの水酸基をジカルボン酸の一方のカルボン酸と反応させた脂溶性ビタミンヘミエステル（この場合、もう一方のカルボン酸が反応性官能基となる）が挙げられる。脂溶性ビタミンとしては、例えばレチノイン酸、レチノール、レチナール、エルゴステロール、７－デヒドロコレステロール、カルシフェロール、コルカルシフェロール、ジヒドロエルゴカルシフェロール、ジヒドロタキステロール、トコフェロール、又はトコトリエノール等を挙げることができるが、好ましくは、レチノイン酸、又はトコフェロールであり、最も好ましくは、トコフェロールである。ジカルボン酸としては、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、及びアジピン酸等が挙げられるが、好ましくはコハク酸、及びグルタル酸である。脂溶性ビタミン誘導体の具体例としては、トコフェロールヘミコハク酸エステル、トコフェロールヘミグルタル酸エステル等が挙げられる。

[0037] 炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基は、直鎖であっても、分岐を有していても良いが、好ましくは直鎖である。当該脂肪族炭化水素基は、飽和であっても不飽和であっても良い。不飽和炭化水素基の場合、当該脂肪族炭化水素基に含まれる不飽和結合の数は１～６個、好ましくは１～３個、最も好ましくは１～２個である。不飽和結合には炭素－炭素二重結合及び三重結合が含まれるが、好ましくは二重結合である。当該脂肪族炭化水素基に含まれる炭素数は、直鎖の場合、好ましくは１３～２１であり、最も好ましくは１３～１７である。炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基としては、例えば、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、イコシル基、ヘンイコシル基、ドコシル基、トリコシル基、トリデセニル基、テトラデセニル基、ペンタデセニル基、ヘキサデセニル基、ヘプタデセニル基、オクタデセニル基、ノナデセニル基、イコセニル基、ヘンイコセニル基、ドコセニル基、トリコセニル基、トリデカジエニル基、テトラデカジエニル基、ペンタデカジエニル基、ヘキサデカジエニル基、ヘプタデカジエニル基、オクタデカジエニル基、ノナデカジエニル基、イコサジエニル基、ヘンイコサジエニル基、ドコサジエニル基、オクタデカトリエニル基、イコサトリエニル基、イコサテトラエニル基、イコサペンタエニル基、ドコサヘキサエニル基、メチルドデシル基、メチルトリデシル基、メチルテトラデシル基、メチルペンタデシル基、メチルヘプタデシル基、メチルオクタデシル基、メチルノナデシル基、メチルイコシル基、メチルヘンイコシル基、メチルドコシル基、エチルウンデシル基、エチルドデシル基、エチルトリデシル基、エチルテトラデシル基、エチルペンタデシル基、エチルヘプタデシル基、エチルオクタデシル基、エチルノナデシル基、エチルイコシル基、エチルヘンイコシル基、ヘキシルヘプチル基、ヘキシルノニル基、ヘプチルオクチル基、ヘプチルデシル基、オクチルノニル基、オクチルウンデシル基、ノニルデシル基、デシルウンデシル基、ウンデシルドデシル基、ヘキサメチルウンデシル基等を挙げることができる。直鎖のものとしては好ましくは、トリデシル基、ペンタデシル基、ヘプタ

デシル基、ノナデシル基、ヘンイコシル基、ヘプタデセニル基、ヘプタデカジエニル基であり、特に好ましくは、トリデシル基、ヘプタデシル基、ヘプタデセニル基、ヘプタデカジエニル基である。分岐のものとしては好ましくは、メチルペンタデシル基、ヘキシルノニル基、ヘプチルデシル基、オクチルウンデシル基、ヘキサメチルウンデシル基であり、特に好ましくは、メチルペンタデシル基、ヘキシルノニル基、ヘプチルデシル基である。

[0038] 一態様において、炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基は脂肪酸、脂肪族アルコール、又は脂肪族アミンに由来するものが用いられる。R^{2a}が脂肪酸由来の場合、X^aはエステル結合、又はアミド結合であり、脂肪族由来のカルボニル炭素は、X^aに含まれる。R^{2b}が脂肪酸由来の場合、X^bはエステル結合、又はアミド結合であり、脂肪族由来のカルボニル炭素は、X^bに含まれる。脂肪族炭化水素基の具体例としては、脂肪酸としてリノール酸を用いた場合ではヘプタデカジエニル基となり、脂肪酸としてオレイン酸を用いた場合ではヘプタデセニル基となる。

[0039] R^{2a}はR^{2b}と同一であっても異なっていても良いが、好ましくは、R^{2a}はR^{2b}と同一の基である。

[0040] 一態様において、R^{1a}はR^{1b}と同一であり、X^aはX^bと同一であり、R^{2a}はR^{2b}と同一である。

[0041] 一態様において、

R^{1a}およびR^{1b}は独立して、炭素数８以下（炭素数１～８）のアルキレン基を表し、

X^aおよびX^bはエステル結合を表し、

R^{2a}およびR^{2b}は独立して、脂溶性ビタミン残基（例、トコフェロールヘミコハク酸エステル由来の基）を表す。

一態様において、

R^{1a}およびR^{1b}は独立して、炭素数８以下（炭素数１～８）のアルキレン基を表し、

X^aおよびX^bはエステル結合を表し、

R^{2a}およびR^{2b}は独立して、炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基（例、ヘプタデカジエニル基、ヘプタデセニル基）を表す。

[0042] 一態様において、

R^{1a}およびR^{1b}は、炭素数８以下（炭素数１～８）のアルキレン基を表し、

X^aおよびX^bは、エステル結合を表し、

R^{2a}およびR^{2b}は、脂溶性ビタミン残基（例、トコフェロールヘミコハク酸エステル由来の基）を表し、

R^{1a}はR^{1b}と同一であり、

R^{2a}はR^{2b}と同一である。

一態様において、

R^{1a}およびR^{1b}は、炭素数８以下（炭素数１～８）のアルキレン基を表し、

X^aおよびX^bは、エステル結合を表し、

R^{2a}およびR^{2b}は、炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基（例、ヘプタデカジエニル基、ヘプタデセニル基）を表し、

R^{1a}はR^{1b}と同一であり、

R^{2a}はR^{2b}と同一である。

[0043] 一態様において、

R^{1a}およびR^{1b}は、エチレン基を表し、

X^aおよびX^bは、－ＣＯ－Ｏ－を表し、

R^{2a}およびR^{2b}は独立して、脂溶性ビタミン残基（例、トコフェロールヘミコハク酸エステル由来の基）を表す。

一態様において、

R^{1a}およびR^{1b}は、エチレン基を表し、

X^aおよびX^bは、－ＣＯ－Ｏ－を表し、

R^{2a}およびR^{2b}は独立して、炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基（例、ヘプタデカジエニル基、ヘプタデセニル基）を表す。

[0044] 一態様において、

R^{1a}およびR^{1b}は、エチレン基を表し、

X^aおよびX^bは、－ＣＯ－Ｏ－を表し、

R^{2a}およびR^{2b}は、脂溶性ビタミン残基（例、トコフェロールヘミコハク酸エステル由来の基）を表し、

R^{2a}はR^{2b}と同一である。

一態様において、

R^{1a}およびR^{1b}は、エチレン基を表し、

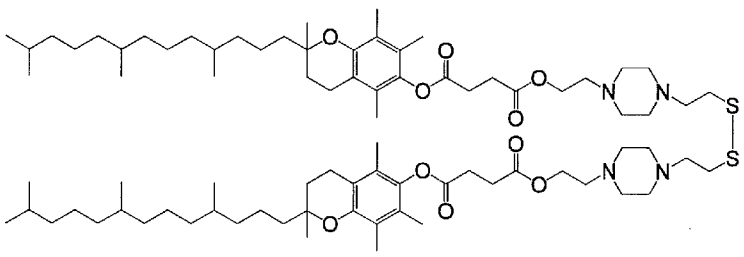
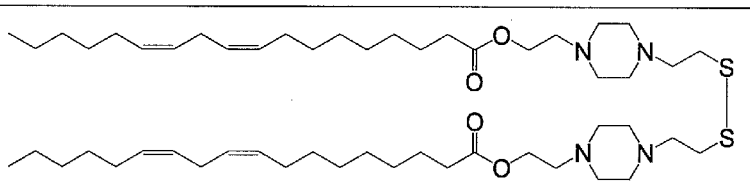
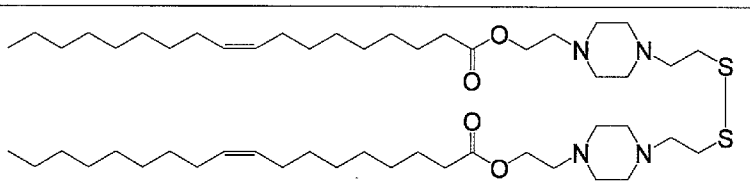
X^aおよびX^bは、－ＣＯ－Ｏ－を表し、

R^{2a}およびR^{2b}は、炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基（例、ヘプタデカジエニル基、ヘプタデセニル基）を表し、

R^{2a}はR^{2b}と同一である。

[0045] 本発明のカチオン性脂質の具体例としては、以下のＴＳ－ＰＺ４Ｃ２、Ｌ－ＰＺ４Ｃ２、Ｏ－ＰＺ４Ｃ２を挙げることができる。

[0046] [表1]

カチオン性脂質の名称	構造
TS-PZ4C2	
L-PZ4C2	
O-PZ4C2	

[0047] 次に本発明の化合物の製造方法について説明する。

[0048] 本発明の化合物は、－Ｓ－Ｓ－（ジスルフィド）結合を有している。その

ため、製造方法としては、$R^{2a}-X^{a}-R^{1a}-$を有するＳＨ（チオール）化合物、及び$R^{2b}-X^{b}-R^{1b}-$を有するＳＨ（チオール）化合物を製造後、これらを酸化（カップリング）することで－Ｓ－Ｓ－結合を含む本発明の化合物を得る方法、－Ｓ－Ｓ－結合を含む化合物から出発し、必要な部分を順次合成していき、最終的に本発明の化合物を得る方法等が挙げられる。好ましくは、後者の方法である。

[0049] 後者の方法の具体例を以下に挙げるが、製造方法はこれらに限定されない。

[0050] 出発化合物としては、－Ｓ－Ｓ－結合を含む両末端カルボン酸、両末端アミン、両末端イソシアネート、両末端アルコール、メタンスルホニル基などの脱離基を有する両末端アルコール、ｐ－ニトロフェニルカーボネート基などの脱離基を有する両末端カーボネートなどが挙げられる。

[0051] 例えば、R^{1a}及びR^{1b}がエチレン基であり、X^{a}およびX^{b}が同一でＸ（エステル結合、アミド結合、カーバメート結合、又はエーテル結合）であり、R^{2a}およびR^{2b}が同一でR^{2}（ステロール残基、脂溶性ビタミン残基、又は炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基）である化合物を製造する場合、－Ｓ－Ｓ－結合を含む化合物（Ｉ）中の両末端官能基を、４位にエチレン基を介して官能基を有するピペラジン誘導体（以下、「化合物（ＩＩ）」と称する）の１位の二級アミノ基と反応させた後、誘導体（ＩＩ）中の官能基と$R^{2}-X$を含む化合物（ＩＩＩ）中の官能基を反応させることにより、－Ｓ－Ｓ－結合、２つのピペラジン骨格、R^{1a}及びR^{1b}、X^{1a}及びX^{1b}、並びにR^{2a}及びR^{2b}を含む本発明の化合物を得ることができる。

[0052] 化合物（Ｉ）と化合物（ＩＩ）の反応には、触媒として、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、水酸化カリウムなどの塩基触媒を使用しても良く、無触媒で行っても良い。好ましくは、炭酸カリウム又は炭酸ナトリウムが触媒として用いられる。

[0053] 触媒量としては、化合物（Ｉ）に対して０．１～１００ｍｏｌ当量であり、好ましくは、０．１～２０ｍｏｌ当量であり、より好ましくは０．１～５

ｍｏｌ当量である。化合物（ＩＩ）の仕込み量は、化合物（Ｉ）に対して、１～５０ｍｏｌ当量であり、好ましくは１～１０ｍｏｌ当量である。

[0054] 化合物（Ｉ）と化合物（ＩＩ）の反応に使用する溶媒としては、反応を阻害しない溶媒や水溶液であればよく、特に制限なく使用することができる。例えば酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム、アセトニトリル、トルエンなどが挙げられる。これらの中では、トルエン、クロロホルム、アセトニトリルが好ましい。

[0055] 反応温度は、－２０～１５０℃、好ましくは０～８０℃であり、より好ましくは、２０～５０℃である。反応時間は１～４８時間、好ましくは２～２４時間である。

[0056] 化合物（Ｉ）と化合物（ＩＩ）の反応生成物（以下、反応生成物（Ｉ）と称する）と、化合物（ＩＩＩ）を反応させる場合には、化合物（Ｉ）と化合物（ＩＩ）の反応に使用した触媒のように、炭酸カリウムや炭酸ナトリウム、水酸化カリウムなどのアルカリ触媒を使用しても良く、ｐ－トルエンスルホン酸やメタンスルホン酸などの酸触媒、または無触媒で行ってもよい。

[0057] また、ジシクロヘキシルカルボジイミド（以下、「ＤＣＣ」と称する）、ジイソプロピルカルボジイミド（以下、「ＤＩＣ」と称する）、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（以下、「ＥＤＣ」と称する）などの縮合剤を使用して、反応生成物（Ｉ）と、化合物（ＩＩＩ）を直接反応させてもよく、または、化合物（ＩＩＩ）を縮合剤を使用して、無水物などに変換した後、反応生成物（Ｉ）と反応させてもよい。

[0058] 化合物（ＩＩＩ）の仕込み量は、反応生成物（Ｉ）に対して、1～５０ｍｏｌ当量であり、好ましくは１～１０ｍｏｌ当量である。

[0059] 反応生成物（Ｉ）と化合物（ＩＩＩ）との反応に使用される触媒は、反応させる官能基同士によって、適宜選択してよい。

[0060] 触媒量は、反応生成物（Ｉ）に対して０．０５～１００ｍｏｌ当量であり、好ましくは、０．１～２０ｍｏｌ当量であり、より好ましくは０．２～５ｍｏｌ当量である。

[0061] 反応生成物（ＩＩ）と化合物（ＩＩＩ）の反応に使用する溶媒としては、反応を阻害しない溶媒や水溶液であればよく、特に制限なく使用することができる。例えば酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム、アセトニトリル、トルエンなどが挙げられる。これらの中ではクロロホルム、トルエンが好ましい。

[0062] 反応温度は、０～１５０℃、好ましくは０～８０℃であり、より好ましくは、２０～５０℃である。反応時間は１～４８時間、好ましくは２～２４時間である。

[0063] 上記反応によって得られた反応物は、抽出精製、再結晶、吸着精製、再沈殿、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどの一般的な精製法によって、適宜精製することができる。

[0064] 具体例として、－Ｓ－Ｓ－結合を有し、両末端にメシレート基（ＭｓＯ－）などの脱離基を有する化合物を出発原料とし、１－ピペラジンエタノールを結合させた後、脂溶性ビタミンまたは脂肪酸を結合させた実施例を後述する（実施例１～３）。当業者であれば、適宜原料を選択し、本明細書の実施例の方法に準じて反応を行うことにより、所望の本発明の化合物を製造することができる。

[0065] 次に本発明の脂質膜構造体について説明する。本発明の脂質膜構造体は、本発明の化合物、即ち、上記一般式（１）で表わされる化合物を膜の構成物質として含有するものである。ここで、本発明における「脂質膜構造体」とは、両親媒性脂質の親水基が界面の水相側に向かって配列した膜構造を有する粒子を意味する。「両親媒性脂質」とは、親水性を示す親水性基、および疎水性を示す疎水性基の両方を有する脂質のことを意味する。両親媒性脂質としては、例えば、カチオン性脂質やリン脂質等を挙げることができる。

[0066] 本発明の脂質膜構造体の形態は特に限定されないが、例えば、水系溶媒に本発明のカチオン性脂質が分散した形態として、リポソーム（例えば一枚膜リポソーム、多重層リポソームなど）、Ｏ／Ｗ型エマルション、Ｗ／Ｏ型エマルション、球状ミセル、ひも状ミセル、または不特定の層状構造物などを

挙げることができる。本発明の脂質膜構造体は、好ましくはリポソームである。

[0067] 本発明の脂質膜構造体は、本発明のカチオン性脂質に加え、それ以外のその他の構成成分をさらに含有してもよい。当該その他の構成成分としては、例えば、脂質（リン脂質（ホルファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホルファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン等）、糖脂質、ペプチド脂質、コレステロール、本発明のカチオン性脂質以外のカチオン性脂質、ＰＥＧ脂質等）、界面活性剤（例えば、３－［（３－コールアミドプロピル）ジメチルアンモニオ］プロパンスルホネート、コール酸ナトリウム塩、オクチルグリコシド、Ｎ－Ｄ－グルコ－Ｎ－メチルアルカンアミド類等）、ポリエチレングリコール、タンパク質などが挙げられる。本発明の脂質膜構造体における当該その他の構成成分の含有量は、通常５～１００ｍｏｌ％であり、好ましくは１０～９０ｍｏｌ％であり、より好ましくは、３０～７０ｍｏｌ％である。

[0068] 本発明の脂質膜構造体に含まれる本発明のカチオン性脂質の含有量は特に限定されないが、通常は、脂質膜構造体を後述の核酸導入剤として用いた場合に、核酸を導入するために十分な量の本発明のカチオン性脂質が含まれる。例えば、総脂質の５～１００ｍｏｌ％、好ましくは１０～９０ｍｏｌ％、より好ましくは３０～７０ｍｏｌ％である。

[0069] 本発明の脂質膜構造体は、本発明のカチオン性脂質及びその他の構成成分（脂質等）を適当な溶媒または分散媒、例えば、水性溶媒やアルコール性溶媒中に分散させ、必要に応じて組織化を誘導する操作を行うことにより調製することができる。

[0070] 「組織化を誘導する操作」としては、例えば、エタノール希釈法、単純水和法、超音波処理、加熱、ボルテックス、エーテル注入法、フレンチ・プレス法、コール酸法、Ca^{2+}融合法、凍結－融解法、逆相蒸発法等の自体公知の方法が挙げられるが、これらに限定されない。

[0071] 本発明のカチオン性脂質を含む脂質膜構造体に核酸を内封させ、これを細胞へ接触させることにより、生体内及び／又は生体外において該核酸を該細胞内へ導入することができる。従って、本発明は、上記本発明のカチオン性脂質又は脂質膜構造体を含む、核酸導入剤を提供するものである。

[0072] 本発明の核酸導入剤は、任意の核酸を細胞内へ導入することができる。核酸の種類としては、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＲＮＡのキメラ核酸、ＤＮＡ／ＲＮＡのハイブリッド等を挙げることができるがこれらに限定されない。また、核酸は１～３本鎖のいずれも用いることができるが、好ましくは１本鎖又は２本鎖である。核酸は、プリン又はピリミジン塩基のＮ－グリコシドであるその他のタイプのヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のオリゴマー（例えば、市販のペプチド核酸（ＰＮＡ）等）、又は特殊な結合を有するその他のオリゴマー（但し、該オリゴマーはＤＮＡやＲＮＡ中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置を持つヌクレオチドを含有する）などであってもよい。さらに該核酸は、例えば、公知の修飾の付加された核酸、当該分野で知られた標識のある核酸、キャップの付いた核酸、メチル化された核酸、１個以上の天然ヌクレオチドを類縁物で置換した核酸、分子内ヌクレオチド修飾された核酸、非荷電結合（例えば、メチルスルホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カーバメート等）を持つ核酸、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）を持つ核酸、例えば蛋白質（例えば、ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ－Ｌ－リジン等）や糖（例えば、モノサッカライド等）等の側鎖基を有している核酸、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレン等）を持つ核酸、キレート化合物（例えば、金属、放射活性を持つ金属、ホウ素、酸化性の金属等）を含有する核酸、アルキル化剤を含有する核酸、修飾された結合を持つ核酸（例えば、αアノマー型の核酸等）等であってもよい。

[0073] 本発明において使用できるＤＮＡの種類は特に制限されず、使用の目的に

応じて適宜選択することができる。例えば、プラスミドＤＮＡ、ｃＤＮＡ、アンチセンスＤＮＡ、染色体ＤＮＡ、ＰＡＣ、ＢＡＣ等が挙げられ、好ましくはプラスミドＤＮＡ、ｃＤＮＡ、アンチセンスＤＮＡであり、より好ましくはプラスミドＤＮＡである。プラスミドＤＮＡ等の環状ＤＮＡは適宜制限酵素等により消化され、線形ＤＮＡとして用いることもできる。

[0074] 本発明において使用できるＲＮＡの種類は特に制限されず、使用の目的に応じて適宜選択することができる。例えば、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、一本鎖ＲＮＡゲノム、二本鎖ＲＮＡゲノム、ＲＮＡレプリコン、トランスファーＲＮＡ、リボゾーマルＲＮＡ等が挙げられ、好ましくは、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、ＲＮＡレプリコンである。

[0075] 本発明において用いられる核酸は、当業者が通常用いる方法により精製されていることが好ましい。

[0076] 一態様において、本発明に用いられる核酸は、ＣｐＧ配列の頻度が低く抑制されており、好ましくはＣｐＧ配列を含まない。ＣｐＧ配列の頻度が低い核酸を用いることにより、細胞内へ導入された核酸が長い期間細胞内へとどまり、その生理的効果が長い期間持続する。例えば、本発明において用いられる核酸としてＣｐＧ配列を含まないプラスミドＤＮＡ（発現ベクター）を用いた場合、目的とする遺伝子をより長い期間持続的に発現させることが可能である。本明細書において、ＣｐＧ配列とは、５’から３’へ向かって、シトシンの次にグアニンが現れるタイプの２塩基配列である。例えば、本発明において用いられる核酸におけるＣｐＧ配列の頻度は、５０塩基につき１個以下、好ましくは１００塩基につき１個以下、より好ましくは１０００塩基につき１個以下、最も好ましくはＣｐＧ配列を含まない。

[0077] また、ＣｐＧ配列は、自然免疫反応を惹起するため、ＣｐＧ配列の頻度が低く抑制された核酸（好ましくは、ＣｐＧ配列を含まない核酸）を本発明において用いることにより、自然免疫反応に起因する、炎症等の副作用の発生

を回避することができる。特に、本発明の化合物又は脂質膜構造体自体、刺激性が低く、生体内へ投与された時に炎症性サイトカインの産生を殆ど誘導しないため、本発明の脂質膜構造体と、ＣｐＧ配列の頻度が低く抑制された核酸（好ましくは、ＣｐＧ配列を含まない核酸）とを組み合わせて用いることにより、自然免疫反応に起因する炎症等の副作用の発生リスクを最小限に抑制することができる。

[0078] 本発明の核酸導入剤は、抗炎症剤と併用してもよく、また、脂質膜構造体に抗炎症剤を内封させてもよい。抗炎症剤との併用は、核酸導入に伴う副作用の発生リスクを最小限に抑制することができるのに加え、後述の実施例からも明らかなように、遺伝子発現効率をいっそう高めることができるので、好ましい態様である。抗炎症剤としては、非ステロイド系抗炎症剤（例えば、イブプロフェン、ケトプロフェン、ナプロキセン、インドメタシン、アスピリン、ジクロフェナク、ピロキシカム、アセトアミノフェン、セレコキシブ、ロフェコキシブなど）、ステロイド系抗炎症剤（例えば、ヒドロコルチゾン、プレドニゾロン、デキサメタゾン、ベタメタゾンなど）が挙げられ、好ましくはステロイド系抗炎症剤である。これらの炎症剤は、投与形態に応じて誘導体化したものを用いてもよい。例えばデキサメタゾンは脂肪酸エステル化されていることが好ましく、特にデキサメタゾンパルミチン酸エステルとして用いることが好ましい。脂質膜構造体への抗炎症剤の内封は、後述の、核酸を脂質膜構造体へ内封させる方法と同様にして行うことができる。

[0079] 核酸を内封した本発明の核酸導入剤は、例えば疾患の予防および／又は治療を目的として、生体内（ｉｎ ｖｉｖｏ）投与することができる。従って、本発明において用いられる核酸は、ある所定の疾患に対して予防および／又は治療活性を有するもの（予防・治療用核酸）が好ましい。そのような核酸としては、例えば、いわゆる遺伝子治療に用いられる核酸などが挙げられる。

[0080] 本発明の核酸導入剤を用いて、核酸を細胞内へ導入するためには、本発明の脂質膜構造体を形成する際に、目的とする核酸を共存させることにより、

該核酸を内封した本発明の脂質膜構造体を形成させる。例えば、エタノール希釈法によりリポソームを形成する場合、核酸の水溶液と、本発明の脂質膜構造体の構成成分（脂質等）のエタノール溶液とをボルテックス等で激しく混合した後で、混合物を適切な緩衝液で希釈する。単純水和法によりリポソームを形成する場合、本発明の脂質膜構造体の構成成分（脂質等）を適切な有機溶媒に溶解し、該溶液をガラス容器に入れ、減圧乾燥することにより溶媒を留去し、脂質薄膜を得る。ここへ、核酸の水溶液を加え、水和させた後に、ソニケーターで超音波処理する。本発明はこのような核酸を内封した上記脂質膜構造体をも提供するものである。

[0081] 核酸を内封したリポソームの一形態として、核酸とポリカチオン（例、プロタミン）との間の静電的複合体をリポソームによって封入することで調製される多機能性エンベロープ型ナノ構造体（ＭＥＮＤ；ｍｕｌｔｉｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｅｎｖｅｌｏｐｅ－ｔｙｐｅ ｎａｎｏ ｄｅｖｉｃｅ、以下「ＭＥＮＤ」と称する）が挙げられる(Ｋｏｇｕｒｅ Ｋ ｅｔ ａｌ., Ｍｕｌｔｉｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｅｎｖｅｌｏｐｅ－ｔｙｐｅ ｎａｎｏ ｄｅｖｉｃｅ（ＭＥＮＤ）ａｓ ａ ｎｏｎ－ｖｉｒａｌ ｇｅｎｅ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｓｙｓｔｅｍ. Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｒｅｖ. ２００８)。この構造体（ＭＥＮＤ）は、核酸等を特定の細胞内に選択的に送達するためのドラッグデリバリーシステムとして用いることができ、例えば、樹状細胞への抗原遺伝子導入によるＤＮＡワクチンや腫瘍の遺伝子治療などに有用である。

[0082] 核酸を内封した本発明の脂質膜構造体の粒子径は、好ましくは１０ｎｍ～３００ｎｍであり、より好ましくは１００ｎｍ～２００ｎｍである。粒子径の測定は、Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｎａｎｏ （Ｍａｌｖｅｒｎ社）を用いて行うことができる。脂質膜構造体の粒子径は、脂質膜構造体の調製方法により、適宜調整することができる。

[0083] 核酸を内封した本発明の脂質膜構造体の表面電位（ゼータ電位）は、好ましくは－１５～＋１０ｍＶ、さらに好ましくは－１５～＋５ｍＶである。従前の遺伝子導入においては、表面電位がプラスに荷電された粒子が主に用い

られてきた。これは、負電荷を有する細胞表面のヘパリン硫酸との静電的相互作用を促進し、細胞への取り込みを促進するための方法としては有用であるが、正の表面電荷は、細胞内において送達核酸との相互作用によるキャリアからの核酸の放出の抑制や、ｍＲＮＡと送達核酸との相互作用によるタンパク質の合成が抑制される可能性がある。表面電荷を上記の範囲内に調整することにより、この問題を解決し得る。表面電荷の測定は、Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｎａｎｏを用いて行うことができる。脂質膜構造体の表面電荷は、本発明のカチオン性脂質を含む脂質膜構造体の構成成分の組成により、調整することができる。

[0084] 核酸を内封した本発明の脂質膜構造体と細胞とを接触させることで、内封された核酸を細胞内へ導入することができる。当該「細胞」の種類は、特に限定されず、原核生物及び真核生物の細胞を用いることができるが、好ましくは真核生物である。真核生物の種類も、特に限定されず、例えば、ヒトを含む哺乳類（例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、ウシ等）、鳥類（例えば、ニワトリ、ダチョウ等）、両生類（例えば、カエル等）、魚類（例えば、ゼブラフィッシュ、メダカ等）等の脊椎動物、昆虫（蚕、蛾、ショウジョウバエ等）等の無脊椎動物、植物、微生物（例えば、酵母等）等が挙げられる。より好ましくは、本発明で対象とされる細胞は、動物もしくは植物細胞、さらに好ましくは哺乳動物細胞である。当該細胞は、癌細胞を含む培養細胞株であっても、個体や組織より単離された細胞、あるいは組織もしくは組織片の細胞であってもよい。また、細胞は接着細胞であっても、非接着細胞であってもよい。

[0085] 生体外（ｉｎ ｖｉｔｒｏ）において核酸を内封した本発明の脂質膜構造体と細胞とを接触させる工程を以下において具体的に説明する。

[0086] 細胞は当該脂質膜構造体との接触の数日前に適当な培地に懸濁し、適切な条件で培養する。脂質膜構造体との接触時において、細胞は増殖期にあってもよいし、そうでなくてもよい。

[0087] 当該接触時の培養液は、血清含有培地であっても血清不含培地であっても

よいが、培地中の血清濃度は３０重量％以下が好ましく、２０重量％以下であることがより好ましい。培地中に過剰な血清等の蛋白質が含まれていると、当該脂質膜構造体と細胞との接触が阻害される可能性がある。

[0088] 当該接触時の細胞密度は、特には限定されず、細胞の種類等を考慮して適宜設定することが可能であるが、通常１×１０^{4}～１×１０^{7}細胞／ｍＬの範囲である。

[0089] このように調製された細胞に、例えば、上述の核酸が内封された本発明の脂質膜構造体の懸濁液を添加する。該懸濁液の添加量は、特に限定されず、細胞数等を考慮して適宜設定することが可能である。細胞へ接触させる際の脂質膜構造体の濃度は、目的とする核酸の細胞内への導入が達成可能な限り特には限定されないが、脂質濃度として、通常１～１０ｎｍｏｌ／ｍＬ、好ましくは１０～５０ｎｍｏｌ／ｍＬであり、核酸の濃度として、通常０．０１～１００μｇ／ｍＬ、好ましくは０．１～１０μｇ／ｍＬである。

[0090] 上述の懸濁液を細胞に添加した後、該細胞を培養する。培養時の温度、湿度、CO_2濃度等は、細胞の種類を考慮して適宜設定する。細胞が哺乳動物由来の細胞である場合は、通常、温度は約３７℃、湿度は約９５％、CO_2濃度は約５％である。また、培養時間も用いる細胞の種類等の条件を考慮して適宜設定できるが、通常０．１～２４時間の範囲であり、好ましくは０．２～４時間の範囲であり、より好ましくは０．５～２時間の範囲である。上記培養時間が短すぎると、核酸が十分細胞内へ導入されず、培養時間が長すぎると、細胞が弱ることがある。

[0091] 上述の培養により、核酸が細胞内へ導入されるが、好ましくは培地を新鮮な培地と交換するか、又は培地に新鮮な培地を添加して更に培養を続ける。細胞が哺乳動物由来の細胞である場合は、新鮮な培地は、血清又は栄養因子を含むことが好ましい。

[0092] また、上述の通り、本発明の脂質膜構造体を用いることで、生体外（ｉｎ ｖｉｔｒｏ）のみならず、生体内（ｉｎ ｖｉｖｏ）においても核酸を細胞内へ導入することが可能である。即ち、核酸を内封した本発明の脂質膜構造体

を対象へ投与することにより、該脂質膜構造体が標的細胞へ到達・接触し、生体内で該脂質膜構造体に内封された核酸が細胞内へ導入される。該脂質膜構造体を投与可能な対象としては、特に限定されず、例えば、哺乳類（例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、ウシ等）、鳥類（例えば、ニワトリ、ダチョウ等）、両生類（例えば、カエル等）、魚類（例えば、ゼブラフィッシュ、メダカ等）等の脊椎動物、昆虫（例えば、蚕、蛾、ショウジョウバエ等）等の無脊椎動物、植物等を挙げることができる。本発明の脂質膜構造体の投与対象としては、好ましくはヒト又は他の哺乳動物である。

[0093] 標的細胞の種類は特に限定されず、本発明の脂質膜構造体を用いることで、種々の組織（例えば、肝臓、腎臓、膵臓、肺、脾臓、心臓、血液、筋肉、骨、脳、胃、小腸、大腸、皮膚、脂肪組織等、好ましくは肝臓、腎臓、脾臓）中の細胞へ、核酸を導入することが可能である。

[0094] 本発明のカチオン性脂質及びそれを含む脂質膜構造体は、腫瘍集積性を有し、従って、腫瘍、特に悪性腫瘍の治療に有用である。このような悪性腫瘍としては、例えば、線維肉腫、扁平上皮癌、神経芽細胞腫、乳癌、胃癌、肝細胞癌、膀胱癌、甲状腺腫瘍、尿路上皮癌、グリア芽細胞腫、急性骨髄性白血病、膵管癌及び前立腺癌等を挙げることができるが、これらに限定されることはない。

[0095] また、本発明の脂質膜構造体は、核酸以外の化合物（例えば、抗癌剤など）が核酸に加えて、あるいは単独で導入されたものであってよい。核酸以外の化合物が導入された脂質膜構造体の対象（例えば、脊椎動物、無脊椎動物など）への投与方法は、標的細胞へ該脂質膜構造体が到達・接触し、該脂質膜構造体に導入された化合物を細胞内へ導入可能な方法であれば特に限定されず、導入化合物の種類、標的細胞の種類や部位等を考慮して、自体公知の投与方法（例えば、経口投与、非経口投与（例えば、静脈内投与、筋肉内投与、局所投与、経皮投与、皮下投与、腹腔内投与、スプレー等）等）を適宜選択することができる。該脂質膜構造体の投与量は、化合物の細胞内への導入を達成可能な範囲であれば、特に限定されず、投与対象の種類、投与方法

、導入化合物の種類、標的細胞の種類や部位等を考慮して適宜選択することができる。

[0096] 本発明のカチオン性脂質又は脂質膜構造体を核酸導入剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

[0097] 該核酸導入剤が研究用試薬として提供される場合、当該本発明の核酸導入剤は、本発明の脂質膜構造体をそのままで、あるいは例えば水もしくはそれ以外の生理学的に許容し得る液（例えば、水溶性溶媒（例えば、リンゴ酸緩衝液等）、有機溶媒（例えば、エタノール、メタノール、ＤＭＳＯなど）もしくは水溶性溶媒と有機溶媒との混合液等）との無菌性溶液もしくは懸濁液を用いて提供され得る。本発明の核酸導入剤は適宜、自体公知の生理学的に許容し得る添加剤（例えば、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤等）を含むことが出来る。

[0098] また、該核酸導入剤が医薬として提供される場合、当該本発明の核酸導入剤は、本発明の脂質膜構造体をそのままで用いて、あるいは医薬上許容される公知の添加剤（例えば、担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤等）とともに用い、一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって、経口剤（例えば、錠剤、カプセル剤等）あるいは非経口剤（例えば注射剤、スプレー剤等）として、好ましくは非経口剤（より好ましくは、注射剤）として製造することができる。

[0099] 本発明の核酸導入剤は、成人用に加えて、小児用の製剤とすることもできる。

[0100] 本発明の核酸導入剤はキットの態様で提供することも可能である。当該キットには、本発明のカチオン性脂質又は脂質膜構造体に加えて、核酸導入の際に使用する試薬を含むことができる。一態様において、本発明の核酸導入剤（又はキット）は、ポリカチオン（例、プロタミン）を更に含む。当該態様の本発明の核酸導入剤（又はキット）を用いることにより、容易に核酸とポリカチオン（例、プロタミン）との間の静電的複合体を、本発明の脂質膜構造体に封入し、ＭＥＮＤを構成し、核酸の細胞内導入へ供することができ

る。

実施例

[0101] 以下に本発明の実施例について更に詳細に説明するが、本発明は当該実施例に何ら限定されない。

[0102] 実施例の説明において使用している略語の意味は、それぞれ以下の通りである。

ｐＤＮＡ：プラスミドＤＮＡ

Ｃｈｏｌ：コレステロール

PEG_{2000}－ＤＭＧ：１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロール，メトキシポリエチレングリコール（ＰＥＧ ＭＷ ２０００）

PEG_{2000}－ＤＳＧ：１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロール，メトキシポリエチレングリコール（ＰＥＧ ＭＷ ２０００）

PEG_{5000}－ＤＳＧ：１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロール，メトキシポリエチレングリコール（ＰＥＧ ＭＷ ５０００）

ＤＯＰＥ：１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン

ＳＯＰＣ：１－ステアロイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン

Ｄｅｘ－Ｐａｌ：デキサメタゾンパルミチン酸エステル

ＤｉＲ：１，１’－ジオクタデシル－３，３，３’，３’－テトラメチルインドトリカルボシアニン　アイオダイド

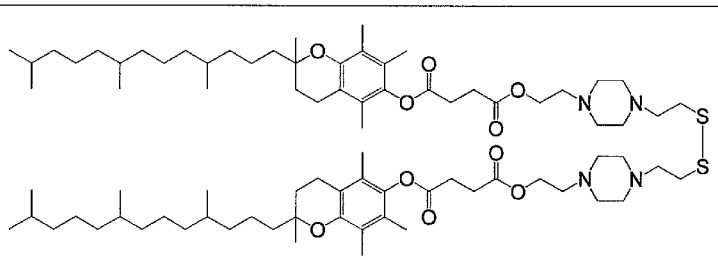
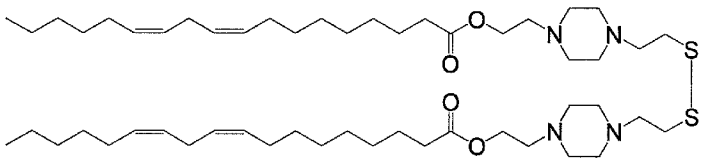
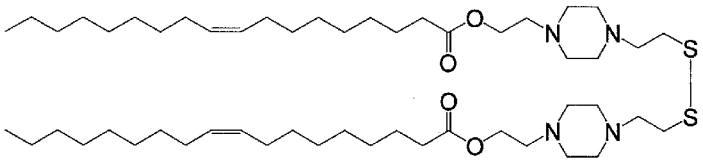
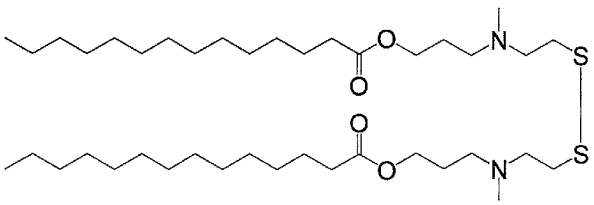
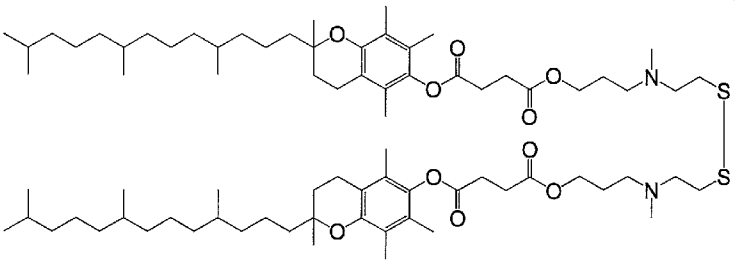
ＰＢＳ：リン酸緩衝生理食塩水

１５ＰＧＤＨ：１５－ヒドロキシプロスタグランジンデヒドロゲナーゼ

[0103] 表２に、以下の実施例及び比較例において製造したカチオン性脂質の名称と構造を示した。比較例１及び２は、それぞれ特許文献１の実施例１及び実施例５に準じて製造した。

[0104]

[表2]

	カチオン性脂質の名称	構造
実施例１	TS-PZ4C2	
実施例２	L-PZ4C2	
実施例３	O-PZ4C2	
比較例１	Myr-C3M	
比較例２	TS-C3M	

[0105] ［実施例１］ＴＳ－ＰＺ４Ｃ２の合成

＜メシル化＞

ビス（２－ヒドロキシエチル）ジスルフィド１５ｇ（東京化成工業社製）（９７ｍｍｏｌ）にアセトニトリル１４３ｍＬを加え、２０～２５℃にて溶解させた。トリエチルアミン３３．３ｇ（関東化学社製）（３２８ｍｍｏｌ）を加えた後、攪拌しながら１０℃に冷却した。温度が２０℃以下になるように塩化メタンスルホニル３４．５ｇ（関東化学社製）（３００ｍｍｏｌ）

を１時間かけて滴下した。滴下終了後、２０～２５℃で３時間反応させた。ＴＬＣ分析（展開溶媒：クロロホルム、ヨウ素発色）により、ビス（２－ヒドロキシエチル）ジスルフィドのスポットが消失していることを確認し、反応を終了した。反応溶液にエタノール２９ｍＬを加え、反応を停止させた後に、ろ過にて不溶物をろ別除去した。ろ液に１０％重曹水１５０ｇを加え、５分攪拌した後、１０分間静置した。水層を除去後、さらに４回重曹水で抽出精製を行った。得られた有機層に硫酸マグネシウム４．５ｇを加えて、脱水を行った。ろ過にて不溶物をろ別除去した後、エバポレーターを用いてろ液の溶媒を留去し、褐色固体（以下、「ｄｉ－Ｍｓ体」と称する）を２９．４ｇ得た。

[0106] ＜^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル（６００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）＞

得られた化合物ｄｉ－Ｍｓ体の^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトルの分析結果を以下に示す。

δ２．９５～３．２０ｐｐｍ（ｍ、C$\underline{H}_{3}$－SO_{2}－O－CH_{2}－C$\underline{H}_{2}$－Ｓ－、１０Ｈ）、δ４．４５～４．５０ｐｐｍ（ｔ、CH_{3}－SO_{2}－O－C$\underline{H}_{2}$－CH_{2}－Ｓ－、４Ｈ）

[0107] ＜三級アミノ化＞

ｄｉ－Ｍｓ体１．２ｇ（４ｍｍｏｌ）にアセトニトリル３１ｍＬを加え、２０～２５℃で溶解させた後、炭酸カリウム１．３ｇ（関東化学工業社製）（１０ｍｍｏｌ）を加えて、５分間攪拌した。その後、４－ピペラジンエタノール５．０ｇ（東京化成工業社製）（３９ｍｍｏｌ）を加え、２５～３５℃で１３時間反応させた。ＴＬＣ分析（展開溶剤：クロロホルム／メタノール／２８％アンモニア水＝８０／２０／２（ｖ／ｖ／ｖ）、ヨウ素発色）により、ｄｉ－Ｍｓ体のスポットが消失していることを確認し、反応を終了した。ろ過にて不溶物をろ別除去した後、エバポレーターにてろ液の溶媒を留去した。得られた褐色液体をクロロホルム２５ｍＬに溶解させた後、蒸留水２５ｍＬを加え、５分攪拌した。攪拌後、１０分静置した後、水層を除去した。その後、さらに２回蒸留水で抽出精製を行った。得られた有機層に硫酸

マグネシウム０．６ｇを加えて、脱水を行った。ろ過にて不溶物をろ別除去した後、エバポレーターを用いてろ液の溶媒を留去し、淡黄色の液体（以下、「ｄｉ－ＰＺ４Ｃ２体」と称する）を１．０ｇ得た。

[0108] ＜^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル（６００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）＞

得られた化合物ｄｉ－ＰＺ４Ｃ２体の^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトルの分析結果を以下に示す。

δ２．４０～２．６６ｐｐｍ（ｍ、ＨＯ－ＣＨ$_{2}$－Ｃ$\underline{\mathrm{H}}_{2}$－Ｎ－Ｃ$\underline{\mathrm{H}}_{2}$－Ｃ$\underline{\mathrm{H}}_{2}$－Ｎ－、２０Ｈ）、δ２．６７～２．７２ｐｐｍ（ｍ、－Ｎ－ＣＨ$_{2}$－Ｃ$\underline{\mathrm{H}}_{2}$－Ｓ－、４Ｈ）、２．７４～２．８５ｐｐｍ（ｍ、$\underline{\mathrm{H}}$Ｏ－ＣＨ$_{2}$－、－Ｎ－Ｃ$\underline{\mathrm{H}}_{2}$－ＣＨ$_{2}$－Ｓ－、６Ｈ）、３．６０～３．６５ｐｐｍ（ｔ、ＨＯ－Ｃ$\underline{\mathrm{H}}_{2}$－ＣＨ$_{2}$－、４Ｈ）

[0109] ＜アシル化＞

ｄｉ－ＰＺ４Ｃ２体３．０ｇ（８ｍｍｏｌ）とＤ－α－トコフェロールコハク酸エステル８．４ｇ（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ社製）（１６ｍｍｏｌ）をクロロホルム４５ｍＬに２０～２５℃で溶解させた。その後、４－ジメチルアミノピリジン０．４ｇ（広栄化学工業社製）（３ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ４．６ｇ（東京化成工業社製）（２４ｍｍｏｌ）を加え、３０℃で４時間反応させた。ＴＬＣ分析（展開溶剤：クロロホルム／メタノール＝９／１（ｖ／ｖ）、リン酸硫酸銅発色）により、Ｄ－α－トコフェロールコハク酸エステルのスポットが消失していることを確認し、反応を終了した。エバポレーターで反応溶媒を留去した後、ヘキサン２００ｍＬを加えた。その後、アセトニトリル１００ｍＬを加え、５分間攪拌した。１０分間静置した後、ヘキサン層を回収し、エバポレーターにて溶剤を留去し、淡黄色の液体１０．７ｇを得た。この液体９．０ｇをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製（溶離液：クロロホルム／メタノール＝９９／１～９８／２（ｖ／ｖ））し、目的物であるＴＳ－ＰＺ４Ｃ２を５．７ｇ得た。

[0110] ＜^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル（６００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）＞

得られた化合物ＴＳ－ＰＺ４Ｃ２の^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトルの分析結果を以

下に示す。

δ０．８３～０．８８ｐｐｍ（ｍ、（Ｃ$\underline{Ｈ}_3$）$_2$ＣＨ－（ＣＨ$_2$）$_3$－（Ｃ$\underline{Ｈ}_3$）ＣＨ－（ＣＨ$_2$）$_3$－（Ｃ$\underline{Ｈ}_3$）ＣＨ－、２４Ｈ）、δ１．０３～１．８２ｐｐｍ（ｍ、（ＣＨ$_3$）$_2$Ｃ$\underline{Ｈ}$－（Ｃ$\underline{Ｈ}_2$）$_3$－（ＣＨ$_3$）Ｃ$\underline{Ｈ}$－（Ｃ$\underline{Ｈ}_2$）$_3$－（ＣＨ$_3$）Ｃ$\underline{Ｈ}$－（Ｃ$\underline{Ｈ}_2$）$_3$－（Ｃ$\underline{Ｈ}_3$）Ｃ－、－Ｃ－Ｃ$\underline{Ｈ}_2$－ＣＨ$_2$－Ｃ－Ｃ－Ｏ－、５２Ｈ）、δ１．９５～２．０９ｐｐｍ（ｍ、Ａｒ－Ｃ$\underline{Ｈ}_3$、１８Ｈ）、δ２．４０～２．６０ｐｐｍ（ｍ、－Ｎ－Ｃ$\underline{Ｈ}_2$－Ｃ$\underline{Ｈ}_2$－Ｎ－、－Ｃ－ＣＨ$_2$－Ｃ$\underline{Ｈ}_2$－Ｃ－Ｃ－Ｏ－、２０Ｈ）、δ２．６１～２．６８ｐｐｍ（ｍ、－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ$\underline{Ｈ}_2$－Ｎ－、－Ｎ－ＣＨ$_2$－Ｃ$\underline{Ｈ}_2$－Ｓ－、８Ｈ）、δ２．７５～２．８４ｐｐｍ（ｍ、Ａｒ－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｃ$\underline{Ｈ}_2$－、－Ｎ－Ｃ$\underline{Ｈ}_2$－ＣＨ$_2$－Ｓ－、８Ｈ）、δ２．９１～２．９５ｐｐｍ（ｍ、Ａｒ－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－ＣＨ$_2$－Ｃ$\underline{Ｈ}_2$－、４Ｈ）、δ４．２１～４．２５ｐｐｍ（ｔ、－Ｃ（Ｏ）－Ｃ$\underline{Ｈ}_2$－ＣＨ$_2$－Ｎ－、４Ｈ）

[0111] ［実施例２］Ｌ－ＰＺ４Ｃ２の合成

＜アシル化＞

ｄｉ－ＰＺ４Ｃ２体２．５ｇ（７ｍｍｏｌ）とリノール酸３．７ｇ（日油社製）（１３ｍｍｏｌ）をクロロホルム２５ｍＬに２０～２５℃で溶解させた。その後、４－ジメチルアミノピリジン０．３ｇ（３ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ３．８ｇ（２０ｍｍｏｌ）を加え、３０℃で４時間反応させた。ＴＬＣ分析（展開溶剤：クロロホルム／メタノール＝９／１（ｖ／ｖ）、リン酸硫酸銅発色）により、リノール酸のスポットが消失していることを確認し、反応を終了した。エバポレーターで反応溶媒を留去した後、ヘキサン５７ｍＬを加えた。その後、アセトニトリル２４ｍＬを加え、５分間攪拌した。１０分間静置した後、ヘキサン層を回収し、エバポレーターにて溶剤を留去し、淡黄色の液体４．９ｇを得た。この液体４．９ｇをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製（溶離液：クロロホルム／メタノール＝９９／１～９７／３（ｖ／ｖ））し、目的物であるＬ－ＰＺ４Ｃ２を３．１ｇ得た。

[0112] ＜^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル（６００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）＞

得られた化合物Ｌ－ＰＺ４Ｃ２の^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトルの分析結果を以下に示す。

δ０．８７～０．９１ｐｐｍ（ｔ、Ｃ$\underline{H}_3$－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＣＨ$_2$－、６Ｈ）、δ１．２５～１．３８ｐｐｍ（ｍ、ＣＨ$_3$－（Ｃ$\underline{H}_2$）$_3$－ＣＨ$_2$－、－（Ｃ$\underline{H}_2$）$_4$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｃ（Ｏ）－、２８Ｈ）、δ１．５８～１．６３ｐｐｍ（ｍ、－（ＣＨ$_2$）$_4$－Ｃ$\underline{H}_2$－ＣＨ$_2$－Ｃ（Ｏ）－、４Ｈ）、δ２．００～２．０７ｐｐｍ（ｍ、－Ｃ$\underline{H}_2$－ＣＨ＝ＣＨ－ＣＨ$_2$－ＣＨ＝ＣＨ－Ｃ$\underline{H}_2$－、８Ｈ）、δ２．３０～２．３２ｐｐｍ（ｔ、－（ＣＨ$_2$）$_4$－ＣＨ$_2$－Ｃ$\underline{H}_2$－Ｃ（Ｏ）－、４Ｈ）、δ２．５０～２．７０ｐｐｍ（ｍ、－Ｎ－Ｃ$\underline{H}_2$－Ｃ$\underline{H}_2$－Ｎ－、－Ｎ－ＣＨ$_2$－Ｃ$\underline{H}_2$－Ｓ－、－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ$\underline{H}_2$－Ｎ－、２４Ｈ）、δ２．７５～２．８４ｐｐｍ（ｍ、－ＣＨ＝ＣＨ－Ｃ$\underline{H}_2$－ＣＨ＝ＣＨ－、－Ｎ－Ｃ$\underline{H}_2$－ＣＨ$_2$－Ｓ－、８Ｈ）、δ４．１８～４．２１ｐｐｍ（ｔ、－Ｏ－Ｃ$\underline{H}_2$－ＣＨ$_2$－Ｎ－、４Ｈ）、δ５．３０～５．４１ｐｐｍ（ｍ、－ＣＨ$_2$－Ｃ$\underline{H}$＝Ｃ$\underline{H}$－ＣＨ$_2$－Ｃ$\underline{H}$＝Ｃ$\underline{H}$－ＣＨ$_2$－、８Ｈ）

[0113] ［実施例３］Ｏ－ＰＺ４Ｃ２の合成

ｄｉ－ＰＺ４Ｃ２体０．８ｇ（２ｍｍｏｌ）とオレイン酸１．２ｇ（日油社製）（４ｍｍｏｌ）をクロロホルム８ｍＬに２０～２５℃で溶解させた。その後、４－ジメチルアミノピリジン０．１ｇ（１ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ１．２ｇ（６ｍｍｏｌ）を加え、３０℃で３時間反応させた。ＴＬＣ分析（展開溶剤：クロロホルム／メタノール＝９／１（ｖ／ｖ）、リン酸硫酸銅発色）により、オレイン酸のスポットが消失していることを確認し、反応を終了した。エバポレーターで反応溶媒を留去した後、ヘキサン１２ｍＬを加えた。その後、アセトニトリル５ｍＬを加え、５分間攪拌した。１０分間静置した後、ヘキサン層を回収し、エバポレーターにて溶剤を留去し、淡黄色の液体１．８ｇを得た。この液体１．７ｇをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製（溶離液：クロロホルム／メタノール＝９９／１～９７／３（ｖ／ｖ））し、目的物であるＯ－ＰＺ４Ｃ２を１．１ｇ得た。

[0114] ＜^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル（６００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）＞

得られた化合物Ｏ－ＰＺ４Ｃ２の^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトルの分析結果を以下に示す。

δ０．８６～０．９０ｐｐｍ（ｔ、Ｃ$\underline{Ｈ}_{3}$－（ＣＨ$_{2}$）$_{6}$－ＣＨ$_{2}$－、６Ｈ）、δ１．２５～１．３４ｐｐｍ（ｍ、ＣＨ$_{3}$－（Ｃ$\underline{Ｈ}_{2}$）$_{6}$－ＣＨ$_{2}$－、－ＣＨ$_{2}$－（Ｃ$\underline{Ｈ}_{2}$）$_{4}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－Ｃ（Ｏ）－、４０Ｈ）、δ１．５８～１．６４ｐｐｍ（ｍ、－ＣＨ$_{2}$－（ＣＨ$_{2}$）$_{4}$－Ｃ$\underline{Ｈ}_{2}$－ＣＨ$_{2}$－Ｃ（Ｏ）－、４Ｈ）、δ１．９９～２．０３ｐｐｍ（ｍ、－Ｃ$\underline{Ｈ}_{2}$－ＣＨ＝ＣＨ－Ｃ$\underline{Ｈ}_{2}$－、８Ｈ）、δ２．２８～２．３２ｐｐｍ（ｍ、－ＣＨ$_{2}$－（ＣＨ$_{2}$）$_{4}$－ＣＨ$_{2}$－Ｃ$\underline{Ｈ}_{2}$－Ｃ（Ｏ）－、４Ｈ）、δ２．４５～２．７０ｐｐｍ（ｍ、－Ｎ－Ｃ$\underline{Ｈ}_{2}$－Ｃ$\underline{Ｈ}_{2}$－Ｎ－、－Ｏ－ＣＨ$_{2}$－Ｃ$\underline{Ｈ}_{2}$－Ｎ－、－Ｎ－ＣＨ$_{2}$－Ｃ$\underline{Ｈ}_{2}$－Ｓ－、２４Ｈ）、δ２．８０～２．８５ｐｐｍ（ｍ、－Ｎ－Ｃ$\underline{Ｈ}_{2}$－ＣＨ$_{2}$－Ｓ－、４Ｈ）、δ４．１８～４．２１ｐｐｍ（ｔ、－Ｏ－Ｃ$\underline{Ｈ}_{2}$－ＣＨ$_{2}$－Ｎ－、４Ｈ）、δ５．１３～５．３８ｐｐｍ（ｍ、－ＣＨ$_{2}$－Ｃ$\underline{Ｈ}$＝Ｃ$\underline{Ｈ}$－ＣＨ$_{2}$－、４Ｈ）

[0115] [試験例１]

１．各種ＭＥＮＤの調製

Ｍｙｒ－Ｃ３Ｍを用いたＭＥＮＤの調製

（１）プラスミドＤＮＡ（ｐＤＮＡ）とプロタミンからなる核酸静電的複合体の形成

ベクターのコアとして、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするｐＤＮＡ溶液、プロタミン（ＣＡＬＢＩＯＣＨＥＭ社製）溶液を、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液でそれぞれ０．１５ｍｇ／ｍＬ、９６．３μｇ／ｍＬに希釈し、０．１５ｍｇ／ｍＬのｐＤＮＡ溶液１００μＬを攪拌しながら９６．３μｇ／ｍＬプロタミン１００μＬを少量ずつ滴下して、プロタミンとｐＤＮＡの静電的複合体を調製した（Ｎ／Ｐ比＝１．０）。

（２）エタノール希釈法によるＭＥＮＤの調製

脂質のエタノール溶液は、エッペンドルフチューブに５ｍＭのカチオン性脂質（Ｍｙｒ－Ｃ３Ｍ）、５ｍＭリン脂質（ＳＯＰＣ）、５ｍＭコレステロール（Ｃｈｏｌ）を総脂質３３０ｎｍｏｌになるように目的の割合で混合し

、ＰＥＧ$_{2000}$－ＤＳＧ（１ｍＭエタノール溶液）をさらに総脂質の３モル％相当量添加し、全量で２００μＬとなるようにエタノールを加えた。脂質溶液をボルテックスミキサーを用いて撹拌しながら、［試験例１］（１）で調製した核酸静電的複合体２００μＬ（１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ；ｐＨ５．３）を素早く加え、その後ｐＨ５．３に調整した１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ緩衝液１．６ｍＬを加えた。さらにｐＨ５．３に調整した１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ緩衝液２ｍＬを加えエタノール濃度が５％になるまで希釈し、Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ ４（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社）を用い、遠心条件（室温，１０００ｇ，１５ｍｉｎ）で約５０μＬまで限外濾過し濃縮した。その後、ｐＨ７．４に調整した１００ｍＭ ＨＥＰＥＳ緩衝液を用いて４ｍＬまでメスアップし、再度、室温条件で遠心（１０００ｇ，１５ｍｉｎ）を行うことで濃縮した。その後、１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ緩衝液（ｐＨ７．４）を用いて４ｍＬまでメスアップし、再度、室温条件で遠心（１０００ｇ，１５ｍｉｎ）を行うことで濃縮した。最後に、１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ緩衝液（ｐＨ７．４）で目的の脂質濃度になるようメスアップした。

[0116] ＴＳ－ＰＺ４Ｃ２またはＴＳ－Ｃ３Ｍを用いたＭＥＮＤの調製

ｐＤＮＡ溶液（１ｍｇ／ｍＬ）、１００ｍＭリンゴ酸緩衝液（ｐＨ４．０）、５Ｍ塩化ナトリウム水溶液および滅菌水を混合し、それぞれ終濃度が０．１ｍｇ／ｍＬ、２０ｍＭ、４０ｍＭとなる溶液を調製し、ＤＮＡ溶液とした。

脂質のエタノール溶液は、５ｍＬチューブに５ｍＭのカチオン性脂質（ＴＳ－ＰＺ４Ｃ２またはＴＳ－Ｃ３Ｍ）、１０ｍＭコレステロール（Ｃｈｏｌ）を総脂質６００ｎｍｏｌになるように目的の割合で混合し、ＰＥＧ$_{2000}$－ＤＭＧ（５ｍＭエタノール溶液）をさらに総脂質の３モル％相当量添加し、全量で２００μＬとなるようにエタノールを加えた。脂質溶液をボルテックスミキサーを用いて撹拌しながら、上記のＤＮＡ溶液３００μＬを素早く加え、その後２０ｍＭ リンゴ酸緩衝液（ｐＨ４．０、１００ｍＭ塩化ナトリウム含有）５００μＬを加えた後にリン酸緩衝生理食塩水を加え、エタノール

濃度が１０％になるまで希釈した。同様の作業を３度行った後に更にリン酸緩衝生理食塩水を加え、エタノール濃度が５％になるまで希釈した。その後、Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ １５（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社）を用い、遠心条件（室温，２２６７ｒｐｍ，２０ｍｉｎ）で約２００μＬまで限外濾過し濃縮した。その後、リン酸緩衝生理食塩水を用いて１５ｍＬまでメスアップし、再度、室温条件で遠心（２２６７ｒｐｍ，２０ｍｉｎ）を行うことで濃縮した。最後に、リン酸緩衝生理食塩水で目的の脂質濃度になるようメスアップした。

[0117] ２．各種ＭＥＮＤの粒子径、及び表面電位の測定

粒子径並びに表面電位は、動的光散乱法（Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｎａｎｏ；Ｍａｌｖｅｒｎ社）を用いて測定した。上記１．で調製された各種ＭＥＮＤの粒子径、表面電位を表３～５に示す。

[0118] [表3]

カチオン性脂質の名称	脂質組成	
ＴＳ－ＰＺ４Ｃ２	カチオン性脂質：Ｃｈｏｌ＝７：３	
粒子径（ｎｍ）	ＰｄＩ	ゼータ電位（ｍＶ）
１２６．８	０．０４１	－７．３８

[0119] [表4]

カチオン性脂質の名称	脂質組成	
ＴＳ－Ｃ３Ｍ	カチオン性脂質：Ｃｈｏｌ＝７：３	
粒子径（ｎｍ）	ＰｄＩ	ゼータ電位（ｍＶ）
１４１．３	０．０８	－５．４

[0120] [表5]

カチオン性脂質の名称	脂質組成	
Ｍｙｒ－Ｃ３Ｍ	カチオン性脂質：ＳＯＰＣ：Ｃｈｏｌ＝３：４：３	
粒子径（ｎｍ）	ＰｄＩ	ゼータ電位（ｍＶ）
１２８．３	０．１８８	１．８８

[0121] ３．結果

いずれのカチオン性脂質においても、生理的ｐＨでの電荷は、好ましい形

態である－１５～＋１０ｍＶであった。

[0122] ［試験例２］遺伝子発現活性－１（インビボにおける遺伝子発現活性：肝臓への遺伝子送達）

１．各種ＭＥＮＤの調製

各種ＭＥＮＤは、[試験例１]に記載の方法で調製した。

２．遺伝子発現活性評価

調製したＭＥＮＤ溶液を各々２０μｇ ＤＮＡ相当、４週齢の雄のＩＣＲマウスに尾静脈投与した。２４、４８時間後にマウスを頸椎脱臼法によって安楽死させ、肝臓を摘出し、液体窒素で凍結処理した。これをＬｙｓｉｓ緩衝液中で融解させ、ホモジネートの作製を行った。これを１３，０００ｒｐｍ，１０分，４℃で遠心し、上清を採取し、これを測定サンプルとした。サンプル溶液２０μＬをルシフェラーゼ基質５０μＬと混合し、Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｓｅｒ－ＰＳＮ（ＡＢ２２００ ＡＴＴＯ）を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。また、サンプル中のタンパク質濃度を、ＢＣＡ ｐｒｏｔｅｉｎ ａｓｓａｙ ｋｉｔを用いて定量し、遺伝子発現活性をＲＬＵ／ｍｇ ｐｒｏｔｅｉｎとして測定した。

３．結果

結果を図１に示す。値が高い程、即ちルシフェラーゼ活性が高い程、遺伝子発現活性が高いことを意味する。本発明のカチオン性脂質を用いた脂質膜構造体は、比較例１（特許文献１・実施例１）及び比較例２（特許文献１・実施例５）のカチオン性脂質を用いた脂質膜構造体に比べより高い遺伝子発現活性を示した。ＴＳ－Ｃ３ＭやＭｙｒ－Ｃ３Ｍ等の特許文献１記載のカチオン性脂質が、ＤＯＴＡＰやＤＯＤＡＰ等のカチオン性脂質と比較して、より高い核酸送達効率を示すことが知られており（特許文献１）、従って、本発明のカチオン性脂質は、ＴＳ－Ｃ３ＭやＭｙｒ－Ｃ３Ｍに加え、従来のカチオン性脂質であるＤＯＴＡＰやＤＯＤＡＰよりも優れたインビボでの遺伝子導入活性を有することがわかる。

[0123] ［試験例３］インビボにおける遺伝子発現活性、及び活性持続時間（抗炎症

剤との併用による効果）

１．ＭＥＮＤの調製

［試験例１］に記載されたＭＥＮＤの調製時に、デキサメタゾンパルミチン酸エステルのエタノール溶液を終濃度０．５ｍＭとなるように脂質溶液に加えることで、デキサメタゾンパルミチン酸エステルが内封されたＭＥＮＤの調製を行った。

２．遺伝子発現活性評価

［試験例３］１．の項で示した方法で調製したＭＥＮＤ溶液を各々２０μｇＤＮＡ相当、４週齢の雄のＩＣＲマウスに尾静脈投与した。投与１、３、７、１０日後に３ｍｇ相当のルシフェリン（ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｇｒａｄｅ，Ｐｒｏｍｅｇａ）をマウスに腹腔内投与し、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ ＩＩ(Ｃａｌｉｐｅｒ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ)を用いてイメージングを行った。取得した画像からマウス腹部における輝度の平均値をｐｈｏｔｏｎｓ／ｓｅｃ／ｃｍ^2／ｓｒとして算出し、これを肝臓における遺伝子発現活性の指標とした。

３．結果

結果を図２に示す。本発明のカチオン性脂質を用いた脂質膜構造体に抗炎症剤であるデキサメタゾンパルミチン酸エステルを内包することで、遺伝子発現活性が向上した。さらに、生体内で１０日間の遺伝子発現が達成された。

[0124] ［試験例４］遺伝子発現活性－２（インビボにおける遺伝子発現活性：市販の核酸導入剤との比較）

１．核酸導入剤の調製

ｎａｋｅｄ－ｐＤＮＡはＨＥＰＥＳ緩衝液に２．４μｇ／１５０μＬとなるように希釈した。リポフェクトアミン２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）＋ｐＤＮＡは、ＨＥＰＥＳ緩衝液に９．６μＬ／７５μＬとなるようリポフェクトアミン２０００を添加し５分間室温でインキュベートした溶液に、ＨＥＰＥＳ緩衝液に２．４μｇ／７５μＬとなるようｐＤＮＡを添加した溶液を

等量混合し、２０分間室温でインキュベートすることで作成した。ＴＳ－ＰＺ４Ｃ２_ＭＥＮＤは［試験例１］（２）のエタノール希釈法により、ＰＥＧ脂質としてＰＥＧ$_{2000}$－ＤＭＧを用いて作成した。

２．遺伝子発現活性評価

［試験例４］１．の項で示した方法で調製したｎａｋｅｄ－ｐＤＮＡ、リポフェクトアミン２０００＋ｐＤＮＡをそれぞれ２．４μｇＤＮＡ相当、またＴＳ－ＰＺ４Ｃ２_ＭＥＮＤ溶液を１．２μｇＤＮＡ相当、６週齢の雌のＢＡＬＢ／ｃマウスの頸の後ろに皮下投与した。２４時間後に、３ｍｇ相当のルシフェリン（ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｇｒａｄｅ，　Ｐｒｏｍｅｇａ）をマウスに腹腔内投与し、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａｌｌ(Ｃａｌｉｐｅｒ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ)を用いてイメージングを行った。取得した画像からマウス頸部における輝度を算出し、ｐｈｏｔｏｎｓ／ｓｅｃとして算出し、これを遺伝子発現活性の指標とした。

３．結果

結果を図３に示す。ｐＤＮＡ単体あるいは市販の核酸導入剤であるリポフェクトアミン２０００を用いた場合のいずれよりも、本発明のカチオン性脂質を用いた脂質膜構造体を核酸導入剤として用いた場合の方がより高い活性を示した。

[0125] ［試験例５］遺伝子発現活性－３

１．各種ＭＥＮＤの調製

（カチオン性脂質：ＤＯＰＥ：Ｃｈｏｌ）＝（５：２：３），（４：３：３），（３：４：３）の組成のＭＥＮＤは［試験例１］（２）のエタノール希釈法により、リン脂質としてＤＯＰＥを用い、ＰＥＧ脂質としてＰＥＧ$_{2000}$－ＤＭＧを用いて作成した。（カチオン性脂質：Ｃｈｏｌ）＝（７：３）の組成のＭＥＮＤについては、[試験例１]に記載の方法で調製した。

２．遺伝子発現活性評価

［試験例５］１．の項で示した方法で調製したＴＳ－ＰＺ４Ｃ２_ＭＥＮＤ溶液およびＴＳ－Ｃ３Ｍ_ＭＥＮＤ溶液を各々１．２μｇＤＮＡ相当、６週

齢の雌のＢＡＬＢ／ｃマウスの頸の後ろに皮下投与し、［試験例４］２．の項と同様の方法で評価を行った。

３．結果

結果を図４に示す。２つの脂質成分及び２つのアミノ基で構成される比較例２に比べて、２つの脂質成分及び４つのアミノ基を有する本願発明の方がより遺伝子導入効率が高いことがわかる。

[0126] ［試験例６］

１．各種ＭＥＮＤの調製

ＴＳ－ＰＺ４Ｃ２またはＭｙｒ－Ｃ３Ｍを用いたＭＥＮＤの調製

各種ＭＥＮＤの調製は、[試験例１]（２）のエタノール希釈法により実施し、リン脂質にはＤＯＰＣを用いた。またＰＥＧ脂質にはPEG_{5000}－ＤＳＧを用い、Ｍｙｒ－Ｃ３ＭのＭＥＮＤでは総脂質の５モル％相当、およびＴＳ－ＰＺ４Ｃ２のＭＥＮＤでは１０モル％相当を添加した。

Ｌ－ＰＺ４Ｃ２またはＯ－ＰＺ４Ｃ２を用いたＭＥＮＤの調製

ｐＤＮＡ溶液（１ｍｇ／ｍＬ）、１００ｍＭリンゴ酸緩衝液（ｐＨ４．０）、５Ｍ塩化ナトリウム水溶液および滅菌水を混合し、それぞれ終濃度が０．１ｍｇ／ｍＬ、２０ｍＭ、４０ｍＭとなる溶液を調製し、ＤＮＡ溶液とした。

脂質のエタノール溶液は、５ｍＬチューブに５ｍＭのカチオン性脂質（Ｌ－ＰＺ４Ｃ２、Ｏ－ＰＺ４Ｃ２）、１０ｍＭコレステロール（Ｃｈｏｌ）、１０ｍＭＤＯＰＣを総脂質８４０ｎｍｏｌになるように目的の割合で混合し、PEG_{5000}－ＤＳＧ（１ｍＭエタノール溶液）をさらに総脂質の５モル％相当量添加し、全量で２００μＬ（８０％エタノール溶液）となるようにエタノールおよび２０ｍＭ リンゴ酸緩衝液（ｐＨ４．０）を加えた。脂質溶液をボルテックスミキサーを用いて攪拌しながら、上記のＤＮＡ溶液２００μＬを素早く加え、その後２０ｍＭ リンゴ酸緩衝液（ｐＨ４．０）１６００μＬを加えた後にリン酸緩衝生理食塩水を加え、エタノール濃度が８％になるまで希釈した。同様の作業を３度行った後に更にリン酸緩衝生理食塩水を加

え、エタノール濃度が４％になるまで希釈した。その後、Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ １５（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社）を用い、遠心条件（室温，２２６７ｒｐｍ，３０ｍｉｎ）で約２００μＬまで限外濾過し濃縮した。その後、リン酸緩衝生理食塩水を用いて１５ｍＬまでメスアップし、再度、室温条件で遠心（２２６７ｒｐｍ，３０ｍｉｎ）を行うことで濃縮した。最後に、リン酸緩衝生理食塩水で目的の脂質濃度になるようメスアップした。

[0127] ２．各種ＭＥＮＤの粒子径、及び表面電位の測定

粒子径並びに表面電位は、動的光散乱法（Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｎａｎｏ）を用いて測定した。上記１．で調製された各種ＭＥＮＤの粒子径、表面電位を表６～９に示す。

[0128] [表6]

カチオン性脂質の名称	脂質組成	
Ｍｙｒ－Ｃ３Ｍ	カチオン性脂質：ＤＯＰＣ：Ｃｈｏｌ＝３：４：３	
粒子径（ｎｍ）	ＰｄＩ	ゼータ電位（ｍＶ）
１１３．９	０．１３４	－０．１３５

[0129] [表7]

カチオン性脂質の名称	脂質組成	
ＴＳ－ＰＺ４Ｃ２	カチオン性脂質：Ｃｈｏｌ＝７：３	
粒子径（ｎｍ）	ＰｄＩ	ゼータ電位（ｍＶ）
１０４．８	０．１２１	－０．８９７

[0130] [表8]

カチオン性脂質の名称	脂質組成	
Ｌ－ＰＺ４Ｃ２	カチオン性脂質：ＤＯＰＣ：Ｃｈｏｌ＝６：１：３	
粒子径（ｎｍ）	ＰｄＩ	ゼータ電位（ｍＶ）
１０８．７	０．０９４	０．１４４

[0131]

[表9]

カチオン性脂質の名称	脂質組成	
Ｏ－ＰＺ４Ｃ２	カチオン性脂質：ＤＯＰＣ：Ｃｈｏｌ＝６：１：３	
粒子径（ｎｍ）	ＰｄＩ	ゼータ電位（ｍＶ）
１１５．２	０．０８３	－０．２９４

[0132] ３．結果

いずれのカチオン性脂質においても、生理的ｐＨでの電荷は好ましい形態である－１５～＋１０ｍＶであった。

[0133] ［試験例７］インビボにおける臓器集積性の評価

１．各種ＭＥＮＤの調製

［試験例６］に記載されたＭＥＮＤの調製時に、ＤｉＲのエタノール溶液を終濃度３．６μＭとなるように脂質溶液に加えることで、蛍光標識されたＭＥＮＤの調製を行った。

２．各臓器への集積性の評価

６週齢の雌のＢａｌｂ／ｃマウスの皮下にマウス乳癌由来癌細胞株４Ｔ１細胞の懸濁液（１ｘ１０^{6} ｃｅｌｌｓ／ｍｏｕｓｅ）を皮下投与することで担癌マウスを作製した。癌細胞皮下移植７日後に、調製したＭＥＮＤ溶液を各々ＤｉＲ １ ｎｍｏｌ相当を尾静脈内投与した。投与２４時間後にマウスを頸椎脱臼法により安楽死させ、各臓器を摘出し、ＩＶＩＳ Ｌｕｍｉｎａｌ(Ｃａｌｉｐｅｒ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ)を用いてイメージングを行った（励起波長：７１０ｎｍ、検出：ＩＣＧフィルター）。取得した画像から各臓器及び肝臓、腫瘍における輝度を算出し、[ｐｈｏｔｏｎｓ／ｓｅｃ]／[μＷ／ｃｍ^{2}]として算出し、これを臓器集積性及び肝臓集積性、腫瘍集積性の指標とした。

３．結果

結果を図５に示す。本発明のカチオン性脂質ＴＳ－ＰＺ４Ｃ２を用いた脂質膜構造体では、比較例１（特許文献１・実施例１）のカチオン性脂質を用いた脂質膜構造体と比べて、高い肝臓への集積性を示した。また本発明のカ

チオン性脂質Ｌ－ＰＺ４Ｃ２またはＯ－ＰＺ４Ｃ２を用いた脂質膜構造体では、比較例１（特許文献１・実施例１）のカチオン性脂質を用いた脂質膜構造体と比べて、高い腫瘍への集積性を示した。

[0134] ［試験例８］インビボにおける遺伝子発現活性（腫瘍への遺伝子送達）

１．各種ＭＥＮＤの調製

各種ＭＥＮＤは、[試験例６]に記載の方法で調製した。

２．遺伝子発現活性評価

６週齢の雌のＢａｌｂ／ｃマウスの皮下にマウス乳癌由来癌細胞株４Ｔ１細胞の懸濁液（１ｘ１０^{6}　ｃｅｌｌｓ／ｍｏｕｓｅ）を皮下投与することで担癌マウスを作製した。癌細胞皮下移植７日後に、調製したＭＥＮＤ溶液を各々２５ｍｇＤＮＡ相当を尾静脈内投与した。投与４８時間後にマウスを頸椎脱臼法により安楽死させ、腫瘍を摘出し、液体窒素で凍結処理した。これをＬｙｓｉｓ緩衝液中で融解させ、ホモジネートの作製を行った。これを１３，０００ｒｐｍ，１０分，４℃で遠心し、上清を採取し、これを測定サンプルとした。サンプル溶液２０μＬをルシフェラーゼ基質５０μＬと混合し、Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｓｅｒ－ＰＳＮ（ＡＢ２２００　ＡＴＴＯ）を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。また、サンプル中のタンパク質濃度を、ＢＣＡ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔを用いて定量し、遺伝子発現活性をＲＬＵ／ｍｇ　ｐｒｏｔｅｉｎとして測定した。

３．結果

結果を図６に示す。値が高い程、即ちルシフェラーゼ活性が高い程、遺伝子発現活性が高いことを意味する。本発明のカチオン性脂質（Ｌ－ＰＺ４Ｃ２やＯ－ＰＺ４Ｃ２）を用いた脂質膜構造体は、比較例１（特許文献１・実施例１）のカチオン性脂質を用いた脂質膜構造体と比べて、より高い腫瘍への遺伝子送達発現活性を示した。Ｍｙｒ－Ｃ３Ｍは、ＤＯＴＡＰやＤＯＤＡＰ等の従来のカチオン性脂質と比較して、より高い核酸送達効率を示すことが知られている。従って、本発明のＬ－ＰＺ４Ｃ２およびＯ－ＰＺ４Ｃ２は、Ｍｙｒ－Ｃ３Ｍに加えて、従来のカチオン性脂質よりも優れた腫瘍への遺

伝導入活性を有していることが示唆される。

[0135] [試験例９]ＭＥＮＤを用いた遺伝子送達における抗腫瘍効果

１．プラスミドＤＮＡ（ｐＤＮＡ）溶液の調製

搭載ＤＮＡとしては、ルシフェラーゼ遺伝子または１５ＰＧＤＨ遺伝子をコードするｐＤＮＡを用いた。

２．ＭＥＮＤの調製

ＭＥＮＤは、[試験例６]の方法により、カチオン性脂質にＬ－ＰＺ４Ｃ２を用いて作成した。

３．抗腫瘍効果の評価

６週齢の雌のＢａｌｂ／ｃマウスの皮下にマウス乳癌由来癌細胞株４Ｔ１細胞の懸濁液（１ｘ１０^{6}　ｃｅｌｌｓ／ｍｏｕｓｅ）を皮下投与することで担癌マウスを作製した。癌細胞皮下移植７日後から３日に一度、計３回にわたり、上記２．で調製したＭＥＮＤ溶液を各々３０ｍｇＤＮＡ相当を尾静脈内投与した。腫瘍の短径および長径を経時的に測定し、体積（ｍｍ^{3}）＝短径（ｍｍ）^{2}ｘ長径（ｍｍ）ｘ０．５２として体積を算出した。

４．結果

結果を図７に示す。値が低い程、腫瘍の肥大が抑制されており、抗腫瘍効果が高いことを意味する。遺伝子を封入した本発明のカチオン性脂質を用いたＭＥＮＤは、腫瘍の肥大を有意に抑制していることが分かった。

産業上の利用可能性

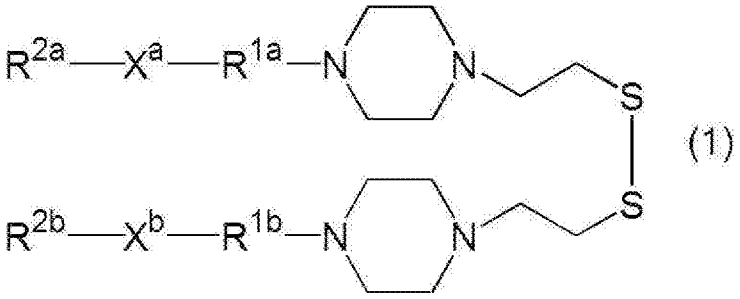
[0136] 本発明によると、高効率で核酸を細胞内へ導入することが可能であるので、遺伝子治療や生化学実験に有用である。

本出願は、日本で出願された特願２０１５－１６７８６（出願日：２０１５年１月３０日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

[請求項1] 式（１）

[化1]



（式（１）中、Ｒ^{1a}及びＲ^{1b}は独立して、炭素数８以下のアルキレン基又はオキシジアルキレン基であり、

Ｘ^{a}及びＸ^{b}は独立して、エステル結合、アミド結合、カーバメート結合、又はエーテル結合を表し、

Ｒ^{2a}及びＲ^{2b}は独立して、ステロール残基、脂溶性ビタミン残基、又は炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基を表す）で示されるカチオン性脂質。

[請求項2] Ｒ^{1a}及びＲ^{1b}が独立して、アルキレン基である請求項１記載のカチオン性脂質。

[請求項3] Ｘ^{a}及びＸ^{b}がエステル結合である、請求項１又は２に記載のカチオン性脂質。

[請求項4] Ｒ^{2a}及びＲ^{2b}が独立して、脂溶性ビタミン残基、又は炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基である請求項１～３のいずれか１項に記載のカチオン性脂質。

[請求項5] Ｒ^{2a}及びＲ^{2b}が独立して、脂溶性ビタミン残基である請求項１～４のいずれか１項に記載のカチオン性脂質。

[請求項6] Ｒ^{2a}及びＲ^{2b}が独立して、炭素数１３～２３の脂肪族炭化水素基である請求項１～４のいずれか１項に記載のカチオン性脂質。

[請求項7] 請求項１～６のいずれか１項に記載のカチオン性脂質を膜の構成脂質として含む脂質膜構造体。

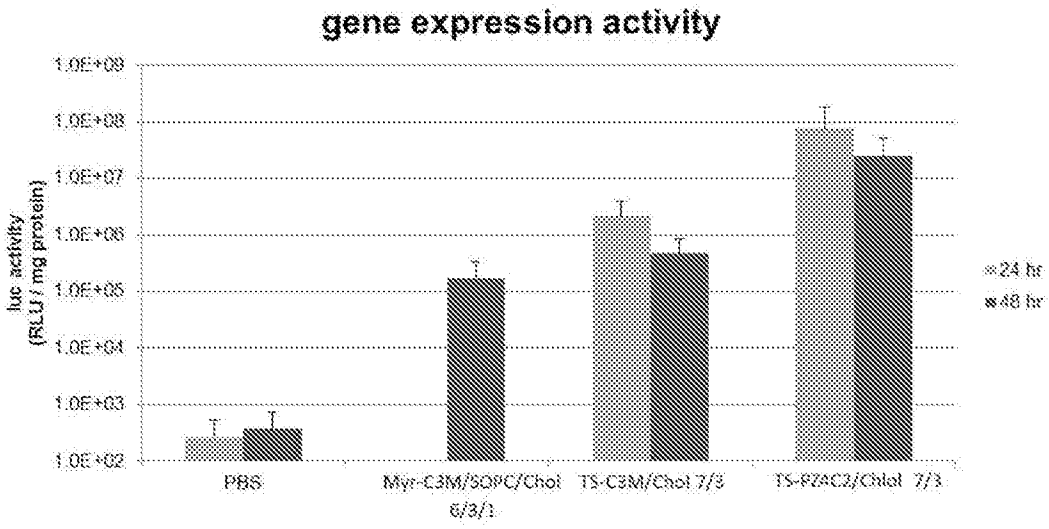
[請求項8] 請求項１～６のいずれか１項に記載のカチオン性脂質、又は請求項７記載の脂質膜構造体を含む核酸導入剤。

[請求項9] 請求項１～６のいずれか１項に記載のカチオン性脂質、又は請求項７記載の脂質膜構造体に抗炎症剤を封入した核酸導入剤。

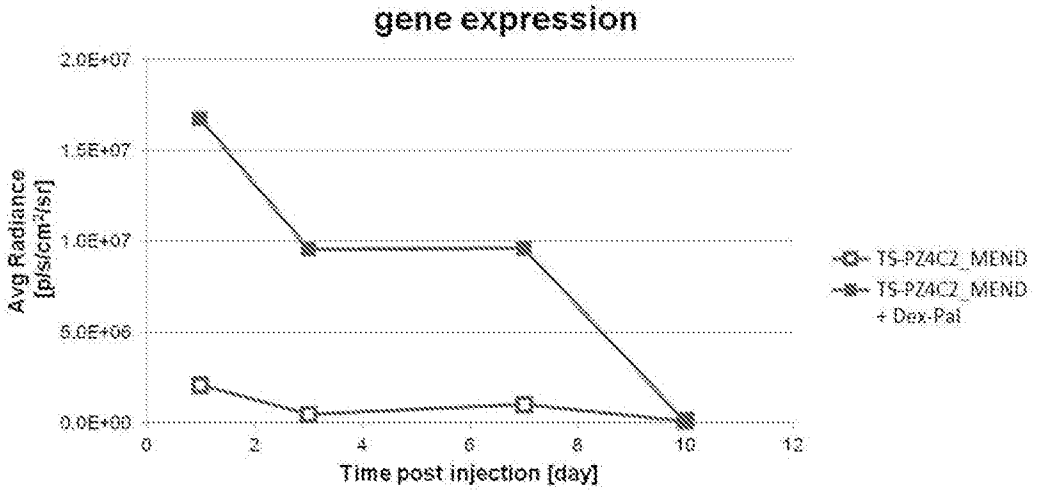
[請求項10] 生体外において、核酸を内封した請求項８又は９記載の核酸導入剤と細胞とを接触させることを含む、当該核酸を当該細胞内へ送達する方法。

[請求項11] 核酸を封入した請求項８又は９記載の核酸導入剤を、標的細胞へ送達されるように、生体へ投与することを含む、当該核酸を当該細胞内へ導入する方法。

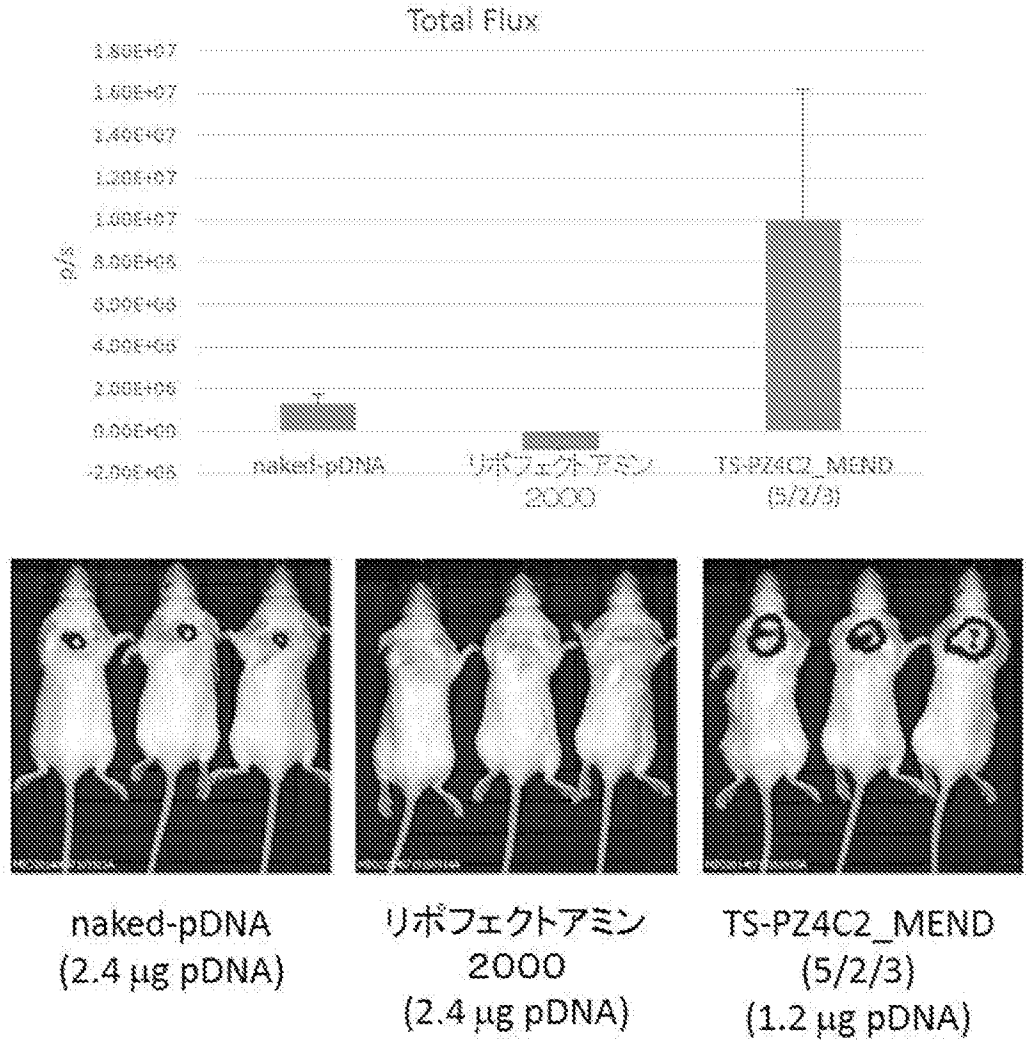
[図1]


gene expression activity
luc activity (RLU / mg protein)
1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
PBS
Myr-C3M/SOPC/Chol 6/3/1
TS-C3M/Chol 7/3
TS-PZ4C2/Chlol 7/3
24 hr
48 hr

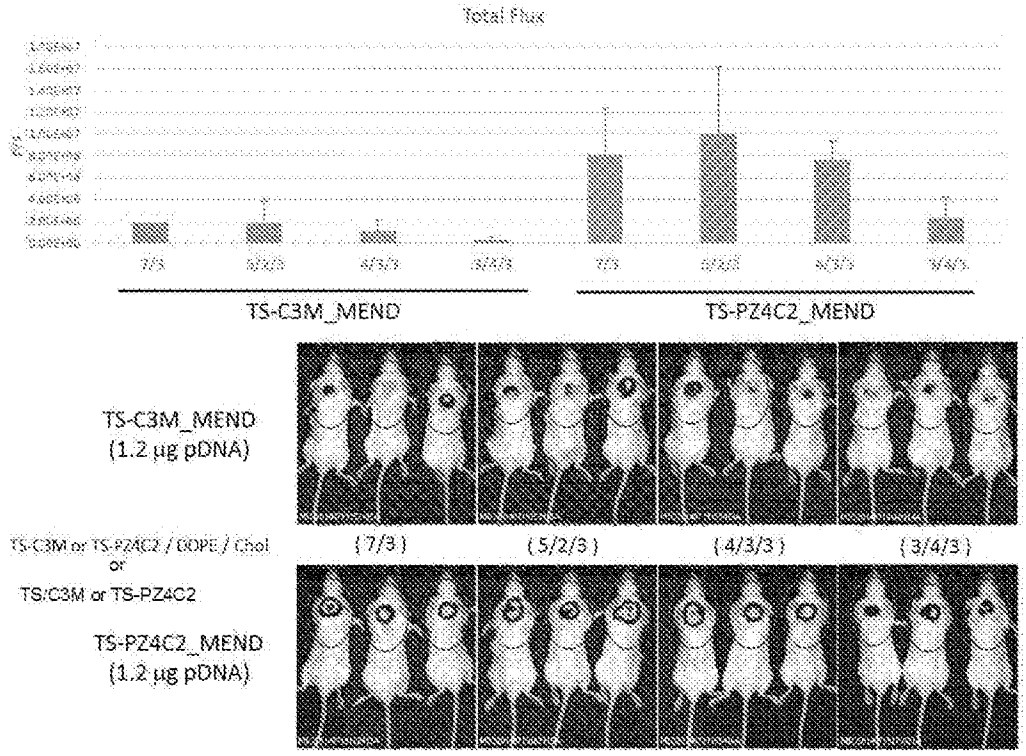
[図2]


gene expression
Avg Radiance [p/s/cm²/sr]
2.0E+07
1.5E+07
1.0E+07
5.0E+06
0.0E+00
0
2
4
6
8
10
12
Time post injection [day]
TS-PZ4C2_MEND
TS-PZ4C2_MEND + Dex-Pal

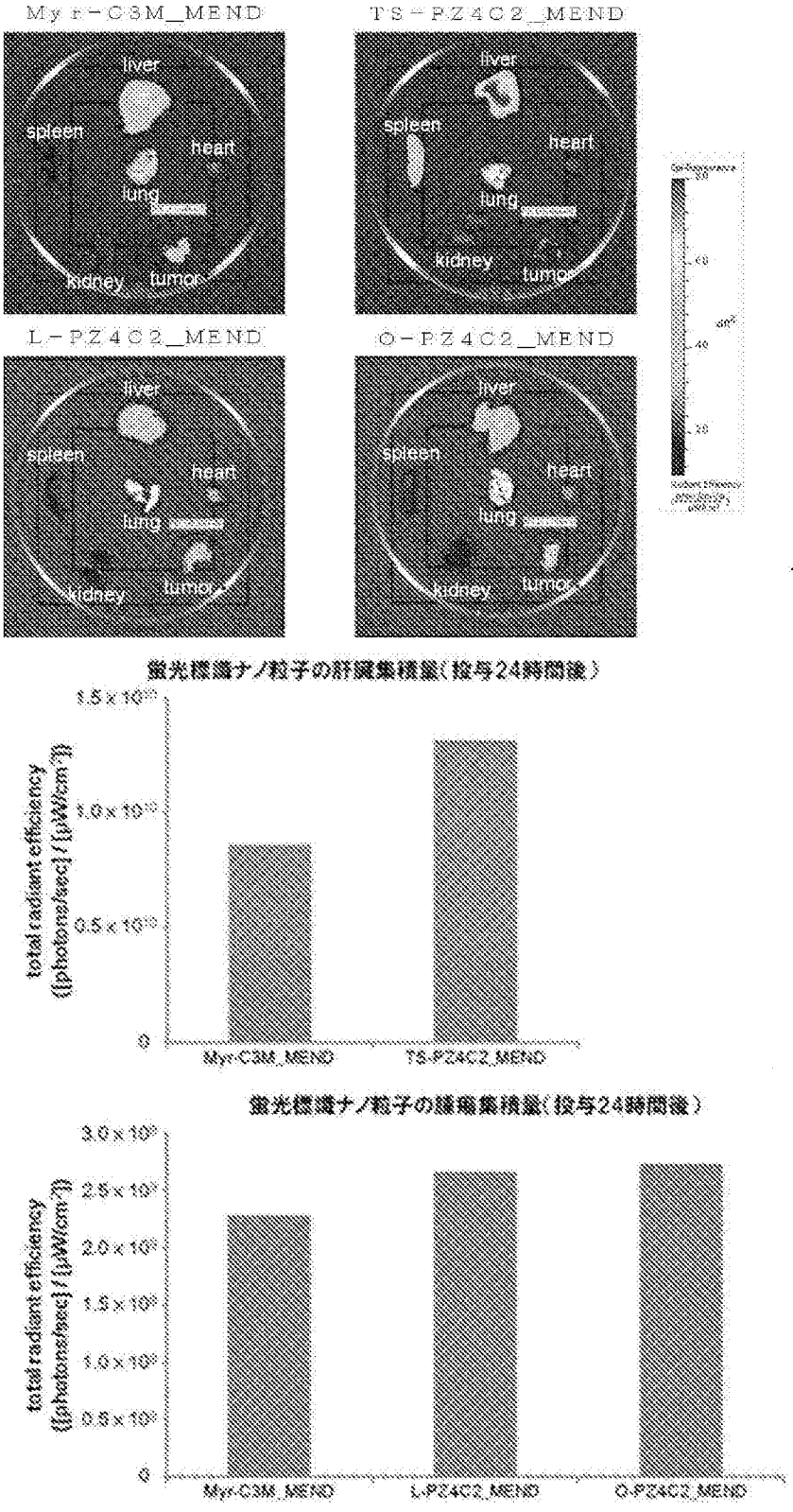
[図3]


Total Flux
naked-pDNA
リポフェクトアミン 2000
TS-PZ4C2_MEND (5/2/3)
naked-pDNA (2.4 μg pDNA)
リポフェクトアミン 2000 (2.4 μg pDNA)
TS-PZ4C2_MEND (5/2/3) (1.2 μg pDNA)

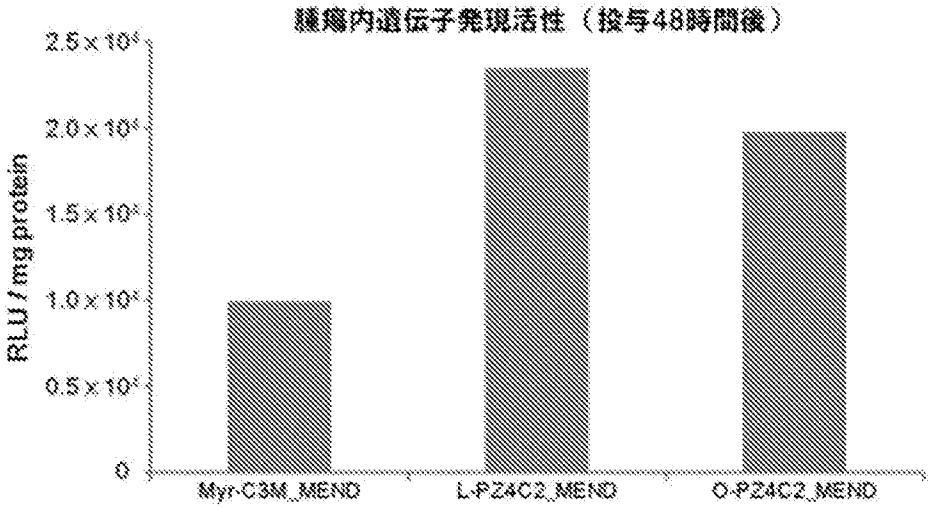
[図4]


Total Flux
TS-C3M_MEND
TS-PZ4C2_MEND
TS-C3M_MEND (1.2 μg pDNA)
TS-C3M or TS-PZ4C2 / DOPE / Chol or TS/C3M or TS-PZ4C2
(7/3)
(5/2/3)
(4/3/3)
(3/4/3)
TS-PZ4C2_MEND (1.2 μg pDNA)

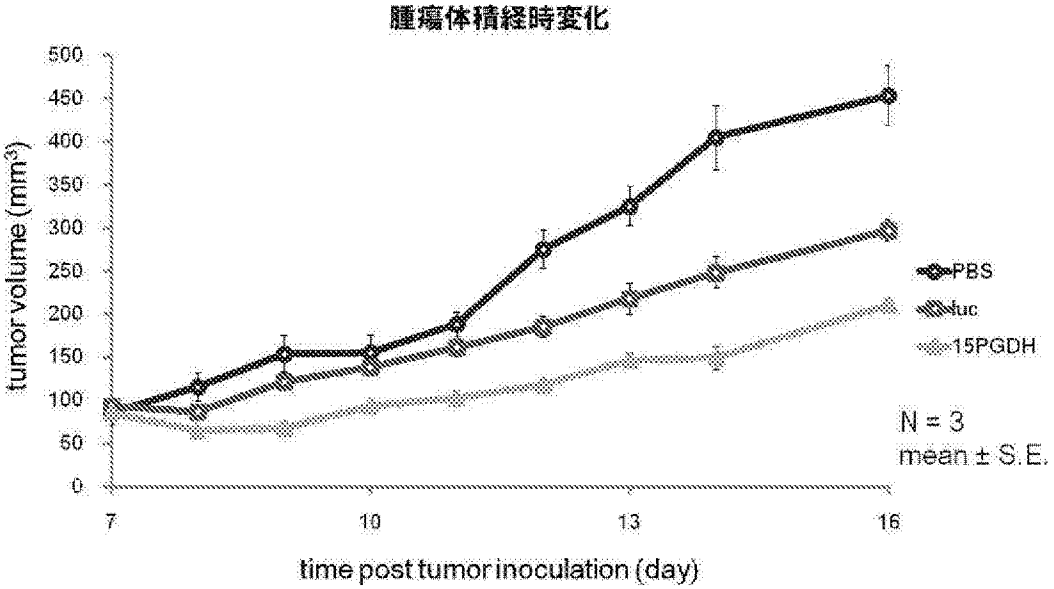
[図5]


Myr-C3M_MEND
liver
spleen
heart
lung
kidney
tumor
TS-PZ4C2_MEND
liver
spleen
heart
lung
kidney
tumor
L-PZ4C2_MEND
liver
spleen
heart
lung
kidney
tumor
O-PZ4C2_MEND
liver
spleen
heart
lung
kidney
tumor
蛍光標識ナノ粒子の肝臓集積量（投与24時間後）
total radiant efficiency ([photons/sec] / [μW/cm²])
1.5 x 10⁻⁰⁷
1.0 x 10⁻⁰⁷
0.5 x 10⁻⁰⁷
0
Myr-C3M_MEND
TS-PZ4C2_MEND
蛍光標識ナノ粒子の腫瘍集積量（投与24時間後）
total radiant efficiency ([photons/sec] / [μW/cm²])
3.0 x 10⁻⁰⁶
2.5 x 10⁻⁰⁶
2.0 x 10⁻⁰⁶
1.5 x 10⁻⁰⁶
1.0 x 10⁻⁰⁶
0.5 x 10⁻⁰⁶
0
Myr-C3M_MEND
L-PZ4C2_MEND
O-PZ4C2_MEND

[図6]


腫瘍内遺伝子発現活性（投与48時間後）
RLU / mg protein
2.5 x 10⁴
2.0 x 10⁴
1.5 x 10⁴
1.0 x 10⁴
0.5 x 10⁴
0
Myr-C3M_MEND
L-PZ4C2_MEND
O-PZ4C2_MEND

[図7]


腫瘍体積経時変化
tumor volume (mm³)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
7
10
13
16
time post tumor inoculation (day)
PBS
luc
15PGDH
N = 3
mean ± S.E.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/052690

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07D295/088(2006.01)i, *A61K9/127*(2006.01)i, *A61K31/7088*(2006.01)i, *A61K45/00*(2006.01)i, *A61K47/22*(2006.01)i, *A61K48/00*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *C07D311/00*(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D295/088, A61K9/127, A61K31/7088, A61K45/00, A61K47/22, A61K48/00, A61P43/00, C07D311/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2014/0335157 A1 (NOF Corp.), 13 November 2014 (13.11.2014), entire text & WO 2013/073480 A1 & EP 2781507 A1 & CN 103930398 A	1-11
A	WO 2013/073480 A1 (NOF Corp.), 23 May 2013 (23.05.2013), entire text & US 2014/0335157 A1 & EP 2781507 A1 & CN 103930398 A	1-11

☒ 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 application or patent 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	Date of mailing of the international search report
15 April 2016 (15.04.16)	26 April 2016 (26.04.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/052690

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-121966 A (Life Technologies Corp.), 23 June 2011 (23.06.2011), entire text & JP 2002-529439 A & JP 4854853 B & US 2005/0124069 A1 & US 2005/0164391 A1 & US 2005/0164971 A1 & US 2005/0164972 A1 & US 2005/0260597 A1 & US 7166745 B1 & US 2007/0202598 A1 & US 2007/0202600 A1 & US 2009/0143583 A1 & US 2010/0159593 A1 & US 2012/0238747 A1 & US 2015/0190522 A1 & WO 2000/027795 A1 & EP 1829856 A2 & EP 2298728 A1	1-11
A	JP 2011-509074 A (OZ Biosciences), 24 March 2011 (24.03.2011), entire text & US 2012/0015865 A1 & WO 2009/106713 A2	1-11
A	US 6153434 A (UNIVERSITY OF FLORIDA), 28 November 2000 (28.11.2000), entire text & US 6169078 B1 & WO 1999/058152 A1	1-11
A	JP 2012-509272 A (Enzon Pharmaceuticals, Inc.), 19 April 2012 (19.04.2012), entire text & US 2011/0229581 A1 & WO 2010/057155 A1 & CN 102231952 A	1-11
A	KEDIKA,B. et al, Synthesis and Gene Transfer Activities of Novel Serum Compatible Reducible Tocopherol-Based Cationic Lipids, Molecular Pharmaceutics, 2012, Vol.9, No.5, p.1146-1162, ISSN:1543-8384	1-11
A	MARKOV,O.O. et al, Novel cationic liposomes provide highly efficient delivery of DNA and RNA into dendritic cell progenitors and their immature offsets, Journal of Controlled Release, 2012, Vol.160, No.2, p.200-210, ISSN:0168-3659	1-11
A	TANG,F. et al, Use of Dithiodiglycolic Acid as a Tether for Cationic Lipids Decreases the Cytotoxicity and Increases Transgene Expression of Plasmid DNA in Vitro, Bioconjugate Chemistry, 1999, Vol.10, No.5, p.791-796, ISSN:1043-1802	1-11
A	JP 2012-526134 A (Alnylam Pharmaceuticals, Inc.), 25 October 2012 (25.10.2012), entire text & US 2010/0285112 A1 & WO 2010/129687 A1	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/052690

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-508394 A (Mirus Corp.), 31 March 2005 (31.03.2005), entire text & JP 2010-132665 A & JP 2007-501282 A & JP 2003-501440 A & JP 2009-185048 A & JP 5274461 B & US 2003/0092180 A1 & US 2007/0128169 A1 & US 2003/0125281 A1 & US 2004/0229358 A1 & US 2006/0063731 A1 & US 2005/0143332 A1 & US 2004/0242528 A1 & US 2001/0004636 A1 & US 6265387 B1 & US 2002/0137707 A1 & US 2002/0001574 A1 & US 2004/0259828 A1 & US 2005/0153451 A1 & US 2005/0192242 A1 & US 2005/0036995 A1 & US 2003/0130224 A1 & US 2004/0067907 A1 & US 2004/0106567 A1 & US 2007/0105804 A1 & US 2003/0166280 A1 & US 2002/0052335 A1 & US 7507722 B1 & US 2004/0224879 A1 & US 2004/0198687 A1 & US 2007/0036865 A1 & US 2006/0122096 A1 & US 2008/0281074 A1 & US 2001/0044412 A1 & US 2007/0219363 A1 & US 2008/0287628 A1 & US 2005/0123600 A1 & US 2008/0152661 A1 & US 2001/0024829 A1 & US 6126964 A & US 2008/0281044 A1 & US 2009/0023890 A1 & US 2004/0197318 A1 & US 2002/0164315 A1 & US 2005/0037496 A1 & US 2006/0063257 A1 & US 2002/0165184 A1 & US 2006/0024828 A1 & US 2002/0085989 A1 & US 2001/0036926 A1 & US 2007/0191281 A1 & WO 2000/050617 A1 & JP 2005-519976 A & JP 2002-512985 A & JP 2005-529931 A & JP 2010-521133 A & JP 2013-215193 A & US 2005/0037989 A1 & US 2002/0132788 A1 & US 2003/0143204 A1 & US 2005/0260270 A1 & US 2004/0019008 A1 & US 7396821 B1 & US 2003/0216347 A1 & US 2001/0008882 A1 & US 2001/0019723 A1 & US 2004/0137064 A1 & US 2001/0009904 A1 & US 2007/0244067 A1 & US 2005/0182013 A1 & US 2006/0093584 A1 & US 2007/0021364 A1 & US 2004/0019007 A1 & US 2004/0072785 A1 & US 2004/0110697 A1 & US 6867196 B1 & US 2004/0198678 A1 & US 2002/0165183 A1 & US 2005/0222075 A1 & US 2004/0058446 A1 & US 6630351 B1 & US 2003/0220264 A1 & US 2008/0281041 A1 & US 2015/0273081 A1 & US 2004/0137625 A1 & US 2008/0200661 A1 & US 2009/0048410 A1 & US 2003/0026841 A1 & US 6818626 B1 & US 6339067 B1 & US 2008/0269450 A1 & US 2008/0287630 A1 & US 2012/0230938 A1 & US 2002/0160515 A1 & US 2003/0008009 A1 & US 2005/0170505 A1 & US 2007/0071823 A1 & US 2004/0161463 A1 & US 2002/0061287 A1 & US 2006/0159764 A1 & US 2001/0044417 A1 & WO 2003/040375 A1 & WO 2003/080794 A2	1-11

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& WO 2005/017098 A2 & WO 2005/116045 A1 & WO 2004/105836 A2 & WO 2005/004879 A1 & WO 2005/009346 A2 & WO 2004/065587 A1 & WO 2001/032223 A1 & WO 1999/055379 A1 & WO 2005/006864 A1 & WO 2004/062368 A1 & WO 2005/016355 A1 & WO 2005/009476 A1 & WO 2003/048338 A2 & WO 2002/095048 A2 & WO 2004/090107 A2 & WO 2000/015285 A1 & WO 2000/075162 A1 & WO 2000/075164 A1 & WO 2001/037665 A1 & WO 2003/100081 A2 & WO 2008/022309 A2 & WO 2001/049841 A1 & WO 2000/003738 A1 & WO 1998/029541 A1 & WO 2006/081074 A2 & WO 2006/083342 A1 & EP 1458870 A1 & EP 1161547 A1 & EP 1427450 A2 & EP 1679964 A1 & EP 1626755 A1 & EP 1651239 A1 & EP 1636385 A1 & EP 1597357 A1 & EP 1246649 A1 & EP 1075283 A1 & EP 1646282 A1 & EP 1581053 A1 & EP 1660099 A1 & EP 1667728 A1 & EP 1461052 A1 & EP 1397043 A1 & EP 1610612 A1 & EP 1113836 A1 & EP 1102784 A1 & EP 1102785 A1 & EP 1233671 A1 & EP 1506218 A1 & EP 2061443 A1 & EP 1248838 A1 & EP 1098667 A1 & EP 958356 A1 & EP 1841864 A1 & KR 10-2009-0042918 A & CN 101500548 A & CN 102614528 A & KR 10-1133799 B	
A	ZHANG,Y. et al, Cationic gemini lipids with cyclen headgroups: interaction with DNA and gene delivery abilities, RSC Advances, 2014, Vol.4, No.83, p.44261-44268, ISSN:2046-2069	1-11

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０５２６９０

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07D295/088(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K47/22(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07D311/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07D295/088, A61K9/127, A61K31/7088, A61K45/00, A61K47/22, A61K48/00, A61P43/00, C07D311/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報　　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　　１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報　　１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報　　１９９４－２０１６年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	US 2014/0335157 A1 (NOF CORPORATION) 2014.11.13, 全文 & WO 2013/073480 A1 & EP 2781507 A1 & CN 103930398 A	1-11
A	WO 2013/073480 A1 (日油株式会社) 2013.05.23, 全文 & US 2014/0335157 A1 & EP 2781507 A1 & CN 103930398 A	1-11
A	JP 2011-121966 A (ライフ テクノロジーズ コーポレーション) 2011.06.23, 全文 & JP 2002-529439 A & JP 4854853 B & US 2005/0124069 A1 & US	1-11

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１５．０４．２０１６	２６．０４．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｐ　４５００
早川　裕之
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４９２

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
	2005/0164391 A1 & US 2005/0164971 A1 & US 2005/0164972 A1 & US 2005/0260597 A1 & US 7166745 B1 & US 2007/0202598 A1 & US 2007/0202600 A1 & US 2009/0143583 A1 & US 2010/0159593 A1 & US 2012/0238747 A1 & US 2015/0190522 A1 & WO 2000/027795 A1 & EP 1829856 A2 & EP 2298728 A1	
A	JP 2011-509074 A (オズ ビオスイヤーンス) 2011.03.24, 全文 & US 2012/0015865 A1 & WO 2009/106713 A2	1-11
A	US 6153434 A (UNIVERSITY OF FLORIDA) 2000.11.28, 全文 & US 6169078 B1 & WO 1999/058152 A1	1-11
A	JP 2012-509272 A (エンゾン ファーマシューティカルズ, インコーポレーテッド) 2012.04.19, 全文 & US 2011/0229581 A1 & WO 2010/057155 A1 & CN 102231952 A	1-11
A	KEDIKA,B. et al, Synthesis and Gene Transfer Activities of Novel Serum Compatible Reducible Tocopherol-Based Cationic Lipids, Molecular Pharmaceutics, 2012, Vol.9, No.5, p.1146-1162, ISSN:1543-8384	1-11
A	MARKOV,O.O. et al, Novel cationic liposomes provide highly efficient delivery of DNA and RNA into dendritic cell progenitors and their immature offsets, Journal of Controlled Release, 2012, Vol.160, No.2, p.200-210, ISSN:0168-3659	1-11
A	TANG,F. et al, Use of Dithiodiglycolic Acid as a Tether for Cationic Lipids Decreases the Cytotoxicity and Increases Transgene Expression of Plasmid DNA in Vitro, Bioconjugate Chemistry, 1999, Vol.10, No.5, p.791-796, ISSN:1043-1802	1-11
A	JP 2012-526134 A (アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド) 2012.10.25, 全文 & US 2010/0285112 A1 & WO 2010/129687 A1	1-11
A	JP 2005-508394 A (マイラス コーポレイション) 2005.03.31, 全文 & JP 2010-132665 A & JP 2005-519976 A & JP 2007-501282 A & JP 2002-512985 A & JP 2003-501440 A & JP 2005-529931 A & JP 2009-185048 A & JP 2010-521133 A & JP 5274461 B & JP 2013-215193 A & US 2003/0092180 A1 & US 2005/0037989 A1 & US 2007/0128169 A1 & US 2002/0132788 A1 & US 2003/0125281 A1 & US 2003/0143204	1-11

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
	A1 & US 2004/0229358 A1 & US 2005/0260270 A1 & US 2006/0063731 A1 & US 2004/0019008 A1 & US 2005/0143332 A1 & US 7396821 B1 & US 2004/0242528 A1 & US 2003/0216347 A1 & US 2001/0004636 A1 & US 2001/0008882 A1 & US 6265387 B1 & US 2001/0019723 A1 & US 2002/0137707 A1 & US 2004/0137064 A1 & US 2002/0001574 A1 & US 2001/0009904 A1 & US 2004/0259828 A1 & US 2007/0244067 A1 & US 2005/0153451 A1 & US 2005/0182013 A1 & US 2005/0192242 A1 & US 2006/0093584 A1 & US 2005/0036995 A1 & US 2007/0021364 A1 & US 2003/0130224 A1 & US 2004/0019007 A1 & US 2004/0067907 A1 & US 2004/0072785 A1 & US 2004/0106567 A1 & US 2004/0110697 A1 & US 2007/0105804 A1 & US 6867196 B1 & US 2003/0166280 A1 & US 2004/0198678 A1 & US 2002/0052335 A1 & US 2002/0165183 A1 & US 7507722 B1 & US 2005/0222075 A1 & US 2004/0224879 A1 & US 2004/0058446 A1 & US 2004/0198687 A1 & US 6630351 B1 & US 2007/0036865 A1 & US 2003/0220264 A1 & US 2006/0122096 A1 & US 2008/0281041 A1 & US 2008/0281074 A1 & US 2015/0273081 A1 & US 2001/0044412 A1 & US 2004/0137625 A1 & US 2007/0219363 A1 & US 2008/0200661 A1 & US 2008/0287628 A1 & US 2009/0048410 A1 & US 2005/0123600 A1 & US 2003/0026841 A1 & US 2008/0152661 A1 & US 6818626 B1 & US 2001/0024829 A1 & US 6339067 B1 & US 6126964 A & US 2008/0269450 A1 & US 2008/0281044 A1 & US 2008/0287630 A1 & US 2009/0023890 A1 & US 2012/0230938 A1 & US 2004/0197318 A1 & US 2002/0160515 A1 & US 2002/0164315 A1 & US 2003/0008009 A1 & US 2005/0037496 A1 & US 2005/0170505 A1 & US 2006/0063257 A1 & US 2007/0071823 A1 & US 2002/0165184 A1 & US 2004/0161463 A1 & US 2006/0024828 A1 & US 2002/0061287 A1 & US 2002/0085989 A1 & US 2006/0159764 A1 & US 2001/0036926 A1 & US 2001/0044417 A1 & US 2007/0191281 A1 & WO 2003/040375 A1 & WO 2000/050617 A1 & WO 2003/080794 A2 & WO 2005/017098 A2 & WO 2005/116045 A1 & WO 2004/105836 A2 & WO 2005/004879 A1 & WO 2005/009346 A2 & WO 2004/065587 A1 & WO 2001/032223 A1 & WO 1999/055379 A1 & WO 2005/006864 A1 & WO 2004/062368 A1 & WO 2005/016355 A1 & WO 2005/009476 A1 & WO 2003/048338 A2 & WO 2002/095048 A2 & WO 2004/090107 A2 & WO 2000/015285 A1 & WO 2000/075162 A1 & WO 2000/075164 A1 & WO 2001/037665 A1 & WO 2003/100081 A2 & WO 2008/022309 A2 & WO 2001/049841 A1 & WO 2000/003738 A1 & WO 1998/029541 A1 & WO 2006/081074 A2 & WO 2006/083342 A1 & EP 1458870 A1 & EP 1161547 A1 & EP 1427450 A2 & EP 1679964 A1 & EP 1626755 A1 & EP 1651239 A1 & EP 1636385 A1 & EP 1597357 A1 & EP 1246649 A1 & EP 1075283 A1 & EP 1646282 A1 & EP 1581053 A1 & EP 1660099 A1 & EP 1667728 A1 & EP 1461052 A1 & EP 1397043 A1 & EP	

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
	1610612 A1 & EP 1113836 A1 & EP 1102784 A1 & EP 1102785 A1 & EP 1233671 A1 & EP 1506218 A1 & EP 2061443 A1 & EP 1248838 A1 & EP 1098667 A1 & EP 958356 A1 & EP 1841864 A1 & KR 10-2009-0042918 A & CN 101500548 A & CN 102614528 A & KR 10-1133799 B	
A	ZHANG,Y. et al, Cationic gemini lipids with cyclen headgroups: interaction with DNA and gene delivery abilities, RSC Advances, 2014, Vol.4, No.83, p.44261-44268, ISSN:2046-2069	1-11