

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5782602号  
(P5782602)

(45) 発行日 平成27年9月24日 (2015. 9. 24)

(24) 登録日 平成27年7月31日 (2015. 7. 31)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 C 233/38 (2006. 01)

C O 7 C 233/38 C S P

C O 7 C 235/60 (2006. 01)

C O 7 C 235/60 Z N A

C O 7 C 235/10 (2006. 01)

C O 7 C 235/10

A 6 1 K 9/14 (2006. 01)

A 6 1 K 9/14

A 6 1 K 31/713 (2006. 01)

A 6 1 K 31/713

請求項の数 15 (全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-500998 (P2012-500998)  
 (86) (22) 出願日 平成22年3月19日 (2010. 3. 19)  
 (65) 公表番号 特表2012-521358 (P2012-521358A)  
 (43) 公表日 平成24年9月13日 (2012. 9. 13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/028000  
 (87) 国際公開番号 W02010/108108  
 (87) 国際公開日 平成22年9月23日 (2010. 9. 23)  
 審査請求日 平成25年3月19日 (2013. 3. 19)  
 (31) 優先権主張番号 61/161, 828  
 (32) 優先日 平成21年3月20日 (2009. 3. 20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 515153255  
 シーエルエスエヌ ラボラトリーズ、イン  
 コーポレイテッド  
 アメリカ合衆国、デラウェア、ニュー キ  
 ャッスル、ウィルミントン、センターヴィ  
 ル ロード 2711、スウィート 40  
 O、コーポレイション サービスカンパ  
 ニー 気付  
 (74) 代理人 110000855  
 特許業務法人浅村特許事務所  
 (72) 発明者 スロボドキン、グレゴリー  
 アメリカ合衆国、アラバマ、ハンツビル、  
 グランドビュー ブールバード 1090  
 、ナンバー 927

最終頁に続く

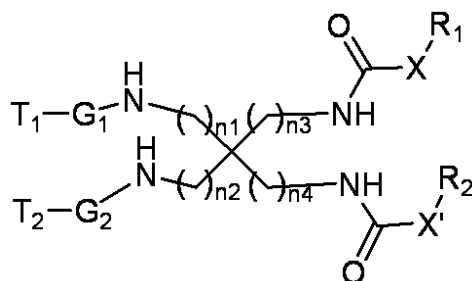
(54) 【発明の名称】 ポリアミン誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式

【化 1】



の化合物であって、式中、

n 1、n 2、n 3 及び n 4 は独立して 1、2、3 又は 4 であり、

X 及び X' は独立して結合、酸素、又は窒素であり、

R 1 及び R 2 は独立して、1 ~ 4 の二重結合又は三重結合を含有してもよいし又は含有しなくてもよい C 8 ~ C 2 5 炭化水素基であり、

T 1 及び T 2 は独立して、水素又はタ - ゲティングリガンドであり、

G 1 及び G 2 は独立して、結合又はポリマー部分であり、

ここでターゲティングリガンドが薬学上活性のある小分子、エンドソーム溶解剤、融合性ペプチド、細胞膜透過剤、電荷遮蔽剤、核酸、又は細胞受容体リガンドである、化合物。

【請求項 2】

$n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  がすべて 1 であり、 $X$  及び  $X'$  が双方共結合である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

$G_1$  が結合であり、

$G_2$  がポリマー部分であり、

並びに  $T_1$  及び  $T_2$  の少なくとも一方はターゲティングリガンドであり、 $T_1$  及び  $T_2$  の他方が水素である請求項 1 に記載の化合物。

10

【請求項 4】

$G_2$  が、ポリオキシアルキレン、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリビニルアルコール、デキストラン、ポリ(L-グルタミン酸)、スチレン無水マレイン酸、ポリ-N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、又はポリジビニルエテル無水マレイン酸である請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 5】

$-C(O)X-R_1$  及び  $-C(O)X'-R_2$  の双方がオレオイル基を表す請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 6】

20

ポリマー部分が、ポリオキシアルキレンである請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれかの化合物と、

(a) リボゾーム RNA ; RNA 又は DNA のアンチセンスポリヌクレオチド ; アプタマー ; リボザイム ; siRNA ; shRNA ; miRNA ; 及び治療上有用なタンパク質をコードするゲノム DNA、cDNA 若しくは mRNA のポリヌクレオチド ;

(b) アプタマー ; 又は

(c) タンパク質、ペプチド、コレステロール、ホルモン、小分子医薬化合物、ビタミン及び補因子

から成る群から選択される分子とを含む製剤。

30

【請求項 8】

哺乳類対象への siRNA 又はプラスミド DNA の生体内での送達における利用のための、請求項 7 に記載の製剤。

【請求項 9】

哺乳類対象の疾患を治療するための、請求項 7 に記載の製剤。

【請求項 10】

調節されない細胞増殖に特徴付けられる疾患を治療するための、請求項 7 に記載の製剤。

【請求項 11】

肺組織内の疾患を治療するための、請求項 7 に記載の製剤。

40

【請求項 12】

前記疾患が癌である請求項 11 に記載の製剤。

【請求項 13】

細胞に接触させることにより、細胞における遺伝子の発現を調節するための、請求項 7 に記載の製剤。

【請求項 14】

N, N' - ジオレオイルテトラキス(アミノメチル)メタンである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 15】

前記化合物が N, N' - ジオレオイルテトラキス(アミノメチル)メタンである、請求

50

項 7 に記載の製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、対称性ポリアミン誘導体及びそのような化合物を含む製剤に関するものであり、さらに具体的には、部分的にアシル化され、任意で補助基を持つポリアミン誘導体に関する。そのような化合物は、細胞に s i R N A を導入すること、標的配列のサイレンシング発現、s i R N A の生体内送達、並びに疾患及び / 又は障害の治療に有用である。

【背景技術】

【0002】

本発明の化合物、組成物及び方法は、生物学的に活性のある分子を細胞、組織及び臓器に効率的に移行させることに基づく治療応用、研究応用及び診断応用に有用である。以下に続く本発明の理解のためにのみ議論が提供される。

【0003】

たとえば、抗菌剤や化学療法剤のような種々の治療用化合物の細胞性の送達は、普通、2つの限界によって妥協させられる。第1に、多数の治療剤の選択性は低いことが多く、その結果、正常組織に高い毒性を生じる。第2に、多数の化合物の生細胞への輸送は細胞の複雑な膜系によって高度に限定されている。特定のトランスポータは、栄養物又は調節性分子の選択的な侵入を可能にする一方で、たとえば、核酸及びタンパク質のようなほとんどの外因性分子を排除する。脂質キャリア、生分解性ポリマー及び種々の共役系を始めとする種々の戦略を用いて化合物の細胞への輸送を改善することができる。

【0004】

外来の核酸の細胞への輸送を改善するために最もよく検討されているアプローチには、ウイルスベクター - 又はカチオン性脂質及び関連するサイトフェクチンの使用が含まれる。ウイルスベクター - を用いてある種の細胞に遺伝子を効率的に移入することができるが、それらは一般に化学的に合成された分子を細胞に導入するには使用することができない。別のアプローチは、カチオン性脂質を組み入れている送達製剤を使用することであり、それは、一方の端を介した核酸及び他方の端を介した脂質又は膜系と相互作用する。プラスミドと同様に合成核酸は、サイトフェクチンを用いて送達することができるが、そのような化合物の有用性は、細胞種の特異性、形質移入の間の低血清の要件、及び毒性によって限定されることが多い。

【0005】

生物学的に活性のある分子を送達する別のアプローチには、抱合体の使用が含まれる。抱合体は、たとえば、受容体が介在するエンドサイトーシスを介して特定細胞に選択的に輸送される特定の分子の能力に基づいて選択されることが多い。細胞膜を横切って能動的に輸送される分子に当該化合物を連結することによって、その化合物の細胞への又は特定の細胞小器官への効果的な輸送を実現することができる。或いは、能動輸送の機構なしで細胞膜を貫通することができる分子、たとえば、種々の親油性分子を用いて当該化合物を送達することができる。抱合体として利用することができる分子の例には、ペプチド、ホルモン、脂肪酸、ビタミン、フラボノイド、糖、リポーター分子、リポーター酵素、キレーター、ポルフィリン、干渉物質、及び能動輸送又は受動輸送のいずれかによって細胞膜を貫通することが可能であるそのほかの分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0006】

特定の細胞種、たとえば、癌細胞又は特定の組織及び臓器に特異的な細胞への化合物の送達は、特定の細胞種に会合する受容体を利用して達成することができる。高親和性の葉酸受容体を含む特定の受容体は特定の癌性細胞において過剰発現している。たとえば、高親和性の葉酸受容体は、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、鼻咽腔癌を含む種々の腫瘍組織で過剰発現する腫瘍マーカーであるが、正常組織では非常に限定された程度に発現する。細胞膜を横切って外因性の化合物を輸送するのに葉酸を基にした抱合体を使用することは、疾患の治療及び診断に標的化送達アプローチを提供することができ、治療用化合

10

20

30

40

50

物の必要とされる用量を低減することができる。さらに、葉酸生体抱合体を含む生体抱合体の使用を介して、治療上の生体利用効率、薬物動態及び薬物動力学的パラメータを調節することができる。生物学的に活性のあるプテロイルオリゴ-L-グルタミン酸の合成が報告されている。特定のオリゴヌクレオチド-葉酸の抱合体の固相合成の方法が記載されていると共に、特定の抱合基によってオリゴヌクレオチドが修飾される。特定のオリゴヌクレオチドを含む外因性分子の膜貫通輸送を向上させることへのビオチンと葉酸の抱合体の使用が報告されている。抱合体の核酸成分に連結されたホスホルアミダイト部分を持つ特定の核酸葉酸抱合体を含む特定の葉酸抱合体、及びこれらの葉酸抱合体の合成方法が記載されている。特定の種類の葉酸-ヌクレオシド抱合体の合成に有用な中間体、  
- [ 2  
- (トリメチルシリル)エトキシカルボニル ] 葉酸の合成が報告されている。

10

#### 【 0 0 0 7 】

特定の種類の細胞、たとえば、肝細胞に会合する受容体を利用することによって、そのほかの細胞種への化合物の送達を達成することができる。たとえば、受容体が介在するエンドサイトーシスを利用した薬剤送達系を用いて薬剤取り込みの向上と共に薬剤のターゲティングを達成している。アジアロ糖タンパク質受容体 (ASGPr) は、肝細胞に独特であり、たとえば、アジアロオロソムコイド (ASOR) のような分枝鎖のガラクトース末端の糖タンパク質に結合する。そのような糖タンパク質又は合成の糖抱合体の受容体への結合は、オリゴ糖鎖の分枝の程度に強く左右される親和性と共に生じ、たとえば、3分枝アンテナ構造は、2分枝アンテナ鎖又は1分枝アンテナ鎖よりも高い親和性で結合する (ガラクトースに比べて受容体への高い親和性を有する、糖質部分としてのN-アセチル  
- D - ガラクトサミンの使用を介したこの高い特異性の例)。この「クラスタリング効果」は、マンノシル末端の糖タンパク質又は糖抱合体の結合及び取り込みについても記載されている。細胞膜を横切って外因性の化合物を輸送するのにガラクトース及びガラクトサミンに基づいた抱合体を使用することは、HBV及びHCVの感染又は肝細胞癌のような肝臓疾患の治療に標的化した送達アプローチを提供することができる。生体抱合体の使用は、治療に必要とされる治療用化合物の必要とされる用量の低減も提供することができる。さらに、生体抱合体の使用を介して、治療上の生体利用効率、薬物動態及び薬物動力学的パラメータを調節することができる。

20

#### 【 0 0 0 8 】

幾つかの研究グループによって多数のペプチドに基づいた細胞性のトランスポータが開発されている。これらのペプチドは高い効率にて、試験管内で及び生体内で細胞膜を横断することが可能である。そのような融合性ペプチドの例には、ショウジョウバエの転写因子であるANTENNAPEDIAのホメオドメインの16アミノ酸断片; NLSドメインの存在下又は非存在下でのカポジ線維芽細胞増殖因子のシグナル配列の疎水性領域を現す17量体; *Caiman crocodylus* のIg(5)軽鎖の17量体シグナルペプチド配列; HIVのエンベロ-プ糖タンパク質gp4114の17アミノ酸融合配列; HIV-1 Tat 49-57断片; トランスポタンA-神経ペプチドガラニンのN末端断片及び膜と相互作用するスズメバチ毒ペプチドマストパンから成る隣接27量体; 及びインフルエンザウイルス凝集素エンベロ-プの糖タンパク質に由来する24量体が挙げられる。これらのペプチドは、脂質なしでの細胞培養形質移入に、アンチセンスオリゴ  
デオキシリボヌクレオチド-ペプチド抱合体の一部として上手く利用される。多数の場合で、そのような抱合体は、脂質送達を用いて形質移入された親オリゴヌクレオチドよりも良好な細胞培養の有効性を示した。加えて、ファジディスプレイ法は、生体内で幾つかの臓器ターゲティング及び腫瘍ターゲティングのペプチドを特定している。腫瘍ターゲティングのペプチドのドキシソルピシンへの抱合は、毒性特性を有意に改善することが示され、マウスの生体内癌モデル、MDA-MB-435乳癌におけるドキシソルピシンの高い有効性を示した。

30

40

#### 【 0 0 0 9 】

生物学的に活性のある分子の細胞内送達への別のアプローチには、カチオン性ポリマーの使用が含まれる (たとえば、細胞膜を横切る種々の分子の輸送を高めるための高分子量

50

リジンポリマーの使用が記載されている)。薬剤又は高分子が、その少なくとも50%がグアニジン側鎖又はアミジン側鎖を含有する6~25のサブユニットから成る輸送ポリマーに共有結合される薬剤及び高分子を輸送するための特定の方法及び組成物が開示されている。輸送ポリマーは好ましくは、D-アルギニン及びL-アルギニンのすべてD型、すべてL型又は混合物で構成されるポリアルギニンペプチドである。皮膚、消化管、肺上皮及び脳血管関門を含む上皮組織を横切る薬剤及びそのほかの剤の送達のための特定のポリリジンとポリアルギニンの化合物も記載されている。薬剤の眼内送達のための特定のポリアルギニン化合物及び特定のポリリジンとポリアルギニンの化合物も開示されている。架橋されたカチオン性のポリマー成分と特定の脂質に基づいた製剤を含む特定のシクロデキストランポリマー組成物が開示されている。

10

#### 【0010】

生物学的に活性のある分子の細胞内送達への別のアプローチには、リボソーム又はそのほかの粒子形成組成物の使用が含まれる。1965年のリボソームの最初の記載以来、薬学上活性のある化合物の送達のための脂質に基づいたキャリア系を開発する領域では持続する関心と尽力が存在し続けた。リボソームは、生体分子を分解から保護する一方で細胞の取り込みを改善するので魅力的な薬剤キャリアである。ポリアニオン(たとえば、DNA)を送達するリボソーム製剤の最も一般に使用される部類の1つは、カチオン性脂質を含有するものである。カチオン性脂質のみを用いて又はそのほかの脂質と、たとえば、ホスファチジルエタノールアミンのような両親媒性物質を含めて高分子と共に脂質凝集体を形成することができる。脂質製剤の組成物及びその調製方法の双方が、得られるアニオン性高分子/カチオン性脂質の凝集体の構造と大きさに影響を有することは当該技術で周知である。これらの因子を調節して試験管内及び生体内で特定の細胞種へのポリアニオンの送達を最適化することができる。生物学的に活性のある分子の細胞性の送達にカチオン性脂質を使用することは幾つかの利点を有する。カチオン性脂質を用いたアニオン性化合物の被包は、静電相互作用のために原則的に定量的である。加えて、カチオン性脂質は、細胞膜輸送を開始する負に荷電した細胞膜と相互作用すると考えられている。

20

#### 【0011】

実験によって、プラスミドDNAは、二重層脂質小胞の中に被包された単一プラスミドから成る小さな粒子に被包することができることが示された。これらの粒子は通常、融合性の脂質ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、低レベルのカチオン性脂質を含有し、ポリ(エチレングリコール)(PEG)のコ-ティングの存在によって水性媒体中で安定化することができる。これらの粒子は、静脈内(i.v.)注射に続いて長い血液循環寿命を示すので全身性の適用を有し、そのような領域での高い血管透過性のために種々の組織及び臓器又は腫瘍で優先的に蓄積することができ、エンドソーム膜の崩壊によるエンドサイトーシスのリソソーム経路を免れるように設計することができる。これらの粒子は、実験的応用及び治療応用のために、種々の細胞種に生物学的に活性のある分子を送達するのに有用であり得る。たとえば、短鎖干渉RNA(siRNA)、アンチセンス、リボザイム、デコイ、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、2-5Aオリゴヌクレオチド、及びアプタマーのような核酸技法の試験管内及び生体内での効果的な使用は、細胞膜を横切るこれら化合物の効率的な送達から恩恵を受けてもよい。siRNAと、特定の両親媒性化合物と、特定のポリカチオンから成る特定の組成物が開示されている。特定の脂質に基づいた製剤、特定の脂質を被包した干渉RNA製剤、及びポリヌクレオチドの細胞性送達のための特定のポリカチオン性組成物が記載されている。短鎖干渉核酸分子(siRNA)及びsiRNA分子の送達のための種々の技法及びそのほかのポリヌクレオチドも記載されている。

30

40

#### 【0012】

加えて、カチオン性脂質粒子を含む最近の研究は、核酸(又はそのほかのポリアニオン性化合物)とカチオン性脂質を含む2つの構造的に異なった複合体の形成を明らかにした。一方の構造は、カチオン性脂質の二重層に挟まれた核酸の単層を持つ多重積層を含む(「積層構造」)。第2の構造は、二次元の六角形柱状相構造を含み(「逆六角形構造」)

50

、その中で核酸分子は、六角形構造の形成においてカチオン性脂質によって濃縮される。著者らはまた、逆六角形構造の方が、積層構造よりも哺乳類細胞に効率的に形質移入することを実証した。さらに、光学顕微鏡による検討によって、積層構造を含む複合体は小胞に融合することなくアニオン性小胞に安定して結合するが、逆六角形構造を含む複合体は、不安定であり、アニオン性小胞に迅速に融合し、融合の際、核酸を放出することが示された。

【 0 0 1 3 】

積層相から逆六角形相の複合体への構造的変換は、逆六角形構造の適合で助力する好適な手助け脂質を組み入れることによって、又はたとえば、ヘキサノールのような補助界面活性剤を使用することによって達成される。しかしながら、これらの変換条件のいずれもが生体系での送達に好適ではない。さらに、逆六角形複合体がさらに大きな形質移入効率を示す一方で、積層複合体に比べて、それは非常に乏しい血清安定性しか有さない。従って、血清安定性である送達剤を設計する二 - ズが依然として存在する。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 4 】

本発明は、生物学的に活性のある分子の全身性送達及び局所性送達の効率を改善する化合物、組成物及び方法を提供する。とりわけ、本発明は、血液循環で安定であり、生物学的に活性のある分子の送達の効率を高める適切な生理的条件下（たとえば、pH）で構造的変化を受ける送達剤を作製し、使用するための化合物、組成物及び方法を提供する。

20

【課題を解決するための手段】

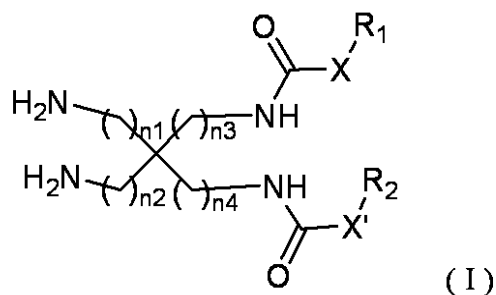
【 0 0 1 5 】

広い態様では、本発明は、以下に示される式 I ~ V I の化合物を包含する。

【 0 0 1 6 】

従って、本発明の態様の 1 つは、式 I

【化 1】



30

の化合物を提供する。

【 0 0 1 7 】

式中、

n 1、n 2、n 3 及び n 4 は独立して 1、2、3 又は 4 であり、

40

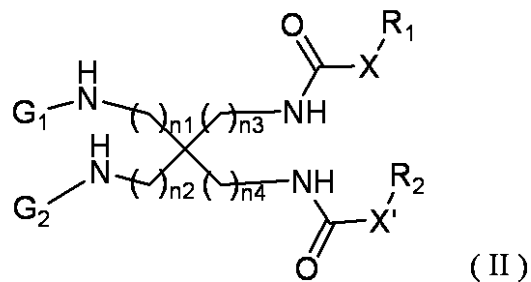
X 及び X' は独立して結合、酸素、又は窒素であり、

R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> は独立して、任意で 1 ~ 4 の二重結合又は三重結合を含有する C<sub>8</sub> ~ C<sub>25</sub> 炭化水素基である。

【 0 0 1 8 】

本発明の第 2 の態様は、式 I I

## 【化 2】



10

の化合物を提供する。

## 【0019】

式中、

$n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  は独立して 1、2、3 又は 4 であり、

$X$  及び  $X'$  は独立して結合、酸素、又は窒素であり、

$R_1$  及び  $R_2$  は独立して、任意で 1 ~ 4 の二重結合又は三重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基であり、

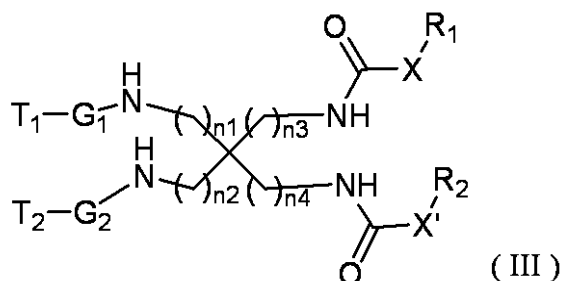
$G_1$  及び  $G_2$  は独立して、水素又はポリマー部分である。

## 【0020】

20

本発明の第 3 の態様は、式 (III)

## 【化 3】



30

の化合物を提供する。

## 【0021】

式中、

$n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  は独立して 1、2、3 又は 4 であり、

$X$  及び  $X'$  は独立して結合、酸素、又は窒素であり、

$R_1$  及び  $R_2$  は独立して、任意で 1 ~ 4 の二重結合又は三重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基であり、

$T_1$  及び  $T_2$  は独立して、水素又はタ - ゲティングリガンドであり、

40

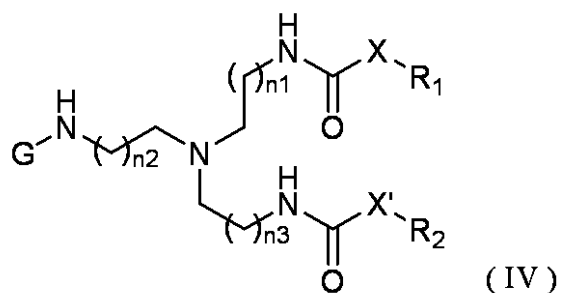
$G_1$  及び  $G_2$  は独立して、結合又はポリマー部分であり、

$T_1$  及び  $T_2$  の少なくとも一方はタ - ゲティングリガンドである。

## 【0022】

本発明の第 4 の態様は、式 (IV)

## 【化 4】



10

の化合物を提供する。

## 【 0 0 2 3 】

式中、

$n_1$ 、 $n_2$ 、及び  $n_3$  は独立して 1、2、3 又は 4 であり、

X 及び X' は独立して結合、酸素、又は窒素であり、

$R_1$  及び  $R_2$  は独立して、任意で 1 ~ 4 の二重結合又は三重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基であり、

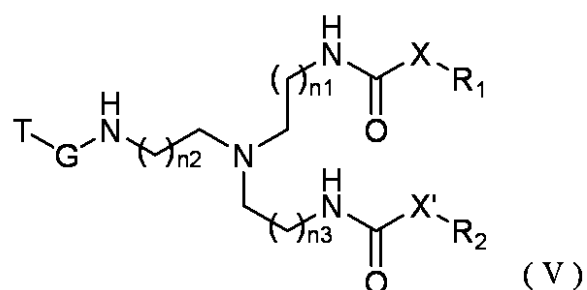
G は水素又はポリマー部分である。

## 【 0 0 2 4 】

本発明の第 5 の態様は、式 (V)

20

## 【化 5】



30

の化合物を提供する。

## 【 0 0 2 5 】

式中、

$n_1$ 、 $n_2$ 、及び  $n_3$  は独立して 1、2、3 又は 4 であり、

X 及び X' は独立して結合、酸素、又は窒素であり、

$R_1$  及び  $R_2$  は独立して、任意で 1 ~ 4 の二重結合又は三重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基であり、

T はタ - ゲティングリガンドであり、

G は結合又はポリマー部分である。

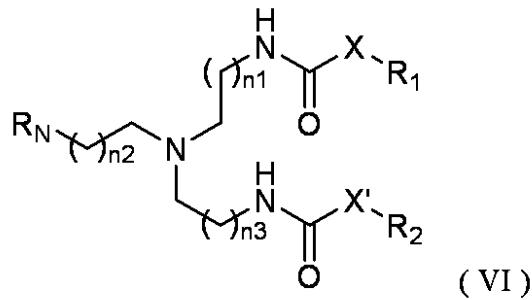
40

## 【 0 0 2 6 】

本発明の別の態様は、式 (VI)



## 【化 6】



10

の化合物を提供する。

## 【0027】

式中、

$n_1$ 、 $n_2$ 、及び  $n_3$  は独立して 1、2、3 又は 4 であり、

$X$  及び  $X'$  は独立して結合、酸素、又は窒素であり、

$R_1$  及び  $R_2$  は独立して、任意で 1 ~ 4 の二重結合又は三重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基であり、

$R_N$  は、 $NHR_4$ 、 $NR_4R_5$  又は  $N^+R_4R_5R_6$  を表し、その際、 $R_4$ 、 $R_5$  及び  $R_6$  は  $C_1 \sim C_6$  アルキル基を表す。

20

## 【0028】

本発明はまた、式 I ~ V I の化合物を作製するのに有用である合成中間体も提供する。

## 【0029】

本発明の態様の 1 つは、式 I ~ V I の化合物を含む製剤を提供する。本発明の製剤は、式 I ~ V I の化合物によって形成されるリポプレックス又はリポソームを含有する。

## 【0030】

本発明の態様の 1 つは、式 I ~ V I の化合物と、生物学的に活性のある分子であり得る別の分子を含む製剤を提供する。生物学的に活性のある分子は、(a) リポソーム RNA ; RNA 若しくは DNA のアンチセンスポリヌクレオチド ; siRNA ; shRNA ; 及び治療上有用なタンパク質をコードするゲノム DNA、cDNA 若しくは mRNA のポリヌクレオチドから成る群から選択されてもよく、又は (b) タンパク質、ペプチド、コレステロール、ホルモン、たとえば、抗菌剤、化学療法剤、ビタミン及び補因子のような小分子であってもよい。

30

## 【0031】

関連する態様では、本発明は、式 I ~ V I の化合物とアプタマーを含む製剤を提供する。これらの製剤では、アプタマーは化合物に共有結合しない。従って、化合物がタ-ゲティングリガンド T を含有する場合、得られる製剤は、共有結合したタ-ゲティングリガンドと共有結合しないアプタマーを含んでもよい。これらの製剤では、アプタマー及びタ-ゲティングリガンドは同一であってもよく、異なってもよい。

## 【0032】

本発明の別の態様は、式 I ~ V I の化合物によって形成される粒子と、生物学的に活性のある分子であり得る別の分子を含む製剤を提供する。この態様では、本発明は、たとえば、1 以上の siRNA 分子を被包するのに有用である安定な粒子を提供する。

40

## 【0033】

本発明の態様の 1 つは、本発明の製剤に細胞を接触させることを含む、siRNA を細胞に導入する方法を提供する。

## 【0034】

本発明の態様の 1 つは、標的配列の発現を調節する方法を提供するが、前記方法は、治療上有効な量の本発明の製剤を哺乳類対象に投与することを含む。

## 【0035】

50

本発明の別の態様は、生体内で *siRNA* を送達する方法を提供するが、前記方法は、治療上有効な量の本発明の製剤を哺乳類対象に投与することを含む。

【0036】

本発明の別の態様は、生体内でプラスミド *DNA* を送達する方法を提供するが、前記方法は、治療上有効な量の本発明の製剤を哺乳類対象に投与することを含む。

【0037】

本発明のさらに別の態様は、哺乳類対象における疾患を治療する又は予防する方法を提供するが、前記方法は、治療上有効な量の本発明の製剤を哺乳類対象に投与することを含む。

【0038】

驚くべきことに、本発明の化合物、たとえば、ジオレオイルモノアミンを用いて作製される製剤及び送達系は、双方共、転写物に特異的なノックダウンに有効であり、相対的に非毒性であることが発見された。

【0039】

驚くべきことに、本発明の製剤及び送達系の使用は、肝臓のようなほかの組織に比べて、肺組織による薬剤の優先的な取り込みを生じ、肺における優先的な転写物ノックダウンももたらすことも発見された。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】マウスの扁平上皮癌 *VII* (*SCCVII*) 細胞を用いた試験管内の形質移入の後の細胞培養培地における *VEGF* のタンパク質発現レベルを示すグラフである。ジオレオイルモノアミンにより製剤化された *siRNA* によって細胞に形質移入した。

【図2】マウスの扁平上皮癌 *VII* (*SCCVII*) 細胞を用いた試験管内の形質移入の後の細胞培養培地における *VEGF* のタンパク質発現レベルを示すグラフである。ジオレオイルモノアミン又はメチル-ジオレオイルモノアミンにより製剤化された *siRNA* によって細胞に形質移入した。

【図3】ジオレオイルモノアミンによって製剤化された *siRNA* の単回 *iv* 注射の後、マウスの肺及び肝臓における *siRNA* 特異的な転写物ノックダウン (カベオリン - 1) を示すグラフである。

【図4A】ジオレオイルモノアミンによって製剤化された *VEGF-siRNA* の *IT* 注射後の *SCCVII* 腫瘍における *mVEGF* 転写物のレベルを示すグラフ (図4A) であり、製剤化された *VEGF-siRNA* の腫瘍内投与後のマウスにおける腫瘍増殖の阻害を示すグラフ (図4B) である。

【図4B】ジオレオイルモノアミンによって製剤化された *VEGF-siRNA* の *IT* 注射後の *SCCVII* 腫瘍における *mVEGF* 転写物のレベルを示すグラフ (図4A) であり、製剤化された *VEGF-siRNA* の腫瘍内投与後のマウスにおける腫瘍増殖の阻害を示すグラフ (図4B) である。

【図5A】マウスの扁平上皮癌 *VII* (*SCCVII*) 細胞を用いた試験管内の形質移入の後の細胞培養培地におけるカベオリン - 1 (*Cav-1*) の相対的な転写物レベルを示すグラフである。 *siRNA* とジオレオイルモノアミン / *mPEG* - ジオレオイルモノアミンの複合体 (図5A) 又はジオレオイルモノアミン / *mPEG* - ジオレオイルモノアミンにより被包された *siRNA* (図5B) によって細胞に形質移入した。

【図5B】マウスの扁平上皮癌 *VII* (*SCCVII*) 細胞を用いた試験管内の形質移入の後の細胞培養培地におけるカベオリン - 1 (*Cav-1*) の相対的な転写物レベルを示すグラフである。 *siRNA* とジオレオイルモノアミン / *mPEG* - ジオレオイルモノアミンの複合体 (図5A) 又はジオレオイルモノアミン / *mPEG* - ジオレオイルモノアミンにより被包された *siRNA* (図5B) によって細胞に形質移入した。

【図6】ジオレオイルモノアミン / *mPEG* - ジオレオイルモノアミンにより複合体化された *siRNA* の単回 *iv* 注射の後、マウスの肺における用量依存性 ( $10 \mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}$ ) の *siRNA* 特異的な転写物ノックダウンを示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図 7】HepG2 細胞を用いて試験管内の形質移入の後、細胞培養培地における  $\alpha$ -アクトチンのタンパク質発現レベルを示すグラフである。ジオレオイルモノアミンノラクトビオニル-ジオレオイルモノアミンにより製剤化された siRNA によって細胞に形質移入した。

【図 8】EDTA の存在下及び非存在下におけるジオレオイルモノアミンで複合体化された Cav-1/siRNA のアルギン酸ゲルからの制御放出を示すグラフである。

【図 9】ジオレオイルモノアミンと mPEG-ジオレオイルモノアミン、又は DOTAP:DOPE (1:1)、又は BPEI によって複合体化された siRNA の単回 iv 注射の後、マウスの肺及び肝臓における siRNA 特異的な転写物ノックダウン (Cav-1) を示すグラフである。

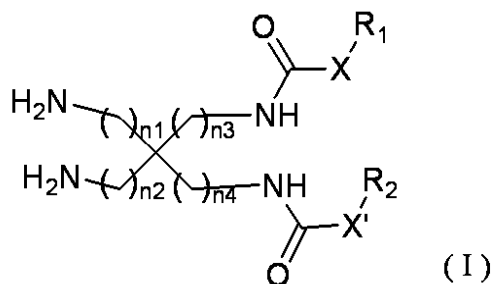
【図 10】ジオレオイルクロスアミンノ前立腺特異的膜抗原 (PSMA) ターゲティングアプタマーによって被包された siRNA の形質移入活性を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0041】

本発明の態様の 1 つは、式 I

【化 7】



の化合物及び薬学上許容可能なその塩を提供する。

【0042】

式中、

$n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  は独立して 1、2、3 又は 4 であり、

X 及び X' は独立して結合、酸素、又は窒素であり、

$R_1$  及び  $R_2$  は独立して、任意で 1 ~ 4 の二重結合又は三重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である。

【0043】

一実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  がすべて 1 であり、X 及び X' が結合である式 I の化合物を提供する。

【0044】

一実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  の少なくとも一方が、1 ~ 4 の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 I の化合物を提供する。

【0045】

別の実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  の双方が、1 ~ 4 の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 I の化合物を提供する。

【0046】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、1 又は 2 の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 I の化合物を提供する。

【0047】

一実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、二重結合を 1 つ含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 I の化合物を提供する。

【0048】

一実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、1 又は 2 の二重結合を含有する

$C_{14} \sim C_{20}$  炭化水素基である式 I の化合物を提供する。

【0049】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、二重結合を 1 つ含有する  $C_{14} \sim C_{20}$  炭化水素基である式 I の化合物を提供する。

【0050】

一実施形態では、本発明は、 $-C(O)X-R_1$  及び  $-C(O)X'-R_2$  の双方がオレオイル基を表す式 I の化合物を提供する。

【0051】

別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  が同一であり、1 又は 2 であり、 $X$  及び  $X'$  が結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  の少なくとも一方が、1 ~ 4 の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 I の化合物を提供する。

10

【0052】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  が同一であり、1 又は 2 であり、 $X$  及び  $X'$  が結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が同一であり、1 ~ 4 の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基を表す式 I の化合物を提供する。

【0053】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  が同一であり、1 又は 2 であり、 $X$  及び  $X'$  が結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が同一であり、1 ~ 2、好ましくは 1 の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基を表す式 I の化合物を提供する。

【0054】

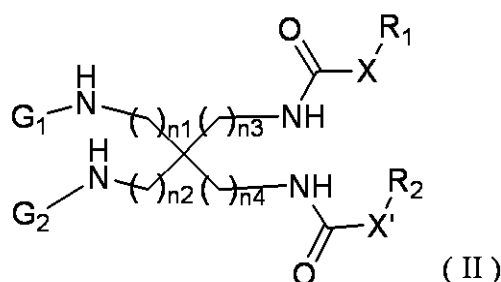
20

さらに別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  が 1 であり、 $X$  及び  $X'$  が結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が同一であり、1 ~ 2、好ましくは 1 の二重結合を含有する  $C_{14} \sim C_{20}$  炭化水素基を表す式 I の化合物を提供する。

【0055】

本発明の別の態様は、式 I I

【化 8】



30

の化合物を提供する。

【0056】

式中、

$n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  は独立して 1、2、3 又は 4 であり、

$X$  及び  $X'$  は独立して結合、酸素、又は窒素であり、

40

$R_1$  及び  $R_2$  は独立して、任意で 1 ~ 4 の二重結合又は三重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基であり、

$G_1$  及び  $G_2$  は独立して、水素又はポリマー部分である。

【0057】

一実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  がすべて 1 であり、 $X$  及び  $X'$  が双方共結合である式 I I の化合物を提供する。

【0058】

一実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  の少なくとも一方が、1 ~ 4 の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 I I の化合物を提供する。

【0059】

50

別の実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  の双方が、1 ~ 4 の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 I I の化合物を提供する。

【0060】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、1 又は 2 の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 I I の化合物を提供する。

【0061】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、二重結合を 1 つ含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 I I の化合物を提供する。

【0062】

一実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、1 又は 2 の二重結合を含有する  $C_{14} \sim C_{20}$  炭化水素基である式 I I の化合物を提供する。

10

【0063】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、二重結合を 1 つ含有する  $C_{14} \sim C_{20}$  炭化水素基である式 I I の化合物を提供する。

【0064】

一実施形態では、本発明は、 $-C(O)X-R_1$  及び  $-C(O)X'-R_2$  の双方がオレオイル基を表す式 I I の化合物を提供する。

【0065】

一実施形態では、本発明は、 $G_1$  及び  $G_2$  の一方がポリマー部分であり、他方が水素である式 I I の化合物を提供する。

20

【0066】

一実施形態では、本発明は、 $G_1$  及び  $G_2$  の一方が、ポリオキシアルキレン、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリビニルアルコール、デキストラン、ポリ(L-グルタミン酸)、スチレン無水マレイン酸、ポリ-N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、又はポリジビニルエテル無水マレイン酸である式 I I の化合物を提供する。

【0067】

別の実施形態では、本発明は、ポリマーがポリマー単位間の少なくとも 1 つのリンカー基を含む式 I I の化合物を提供する。

【0068】

30

さらに別の実施形態では、本発明は、ポリマー部分がポリオキシアルキレンである式 I I の化合物を提供する。

【0069】

さらに別の実施形態では、本発明は、ポリマーの分子量が約 200 ~ 10,000 Da である式 I I の化合物を提供する。好ましいポリマーは約 1,000 ~ 5,000 Da に及ぶ分子量を有する。

【0070】

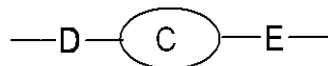
一実施形態では、本発明は、ポリマー部分が、 $-C(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-O-C(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-S-S-$ 、 $-NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3-$ 、 $-アルキレン-O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-$ 、 $-アルキレン-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-NR^3-アルキレン-$ 、 $-O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)-アルキレン-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-アルキレン-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレン$

40

50

オキシ -、 $-OC(O)NR^3$  - アルキレンオキシ、 $-NR^3$  - アルキレンオキシ -、 $-O$  - アルキレンオキシ -、 $-NR^3C(O)$  - アルキレンオキシ -、 $-C(O)NR^3$  - アルキレンオキシ - 及び  $-アルキレンオキシ - NR^3C(O)O$  - アルキレンオキシ - から選択される少なくとも 1 つのリンカーを含む式 I I の化合物を提供するが、式中、 $R^3$  は水素、又は任意で置換されるアルキル、及び

【化 9】



10

である。

【0071】

式中



は、

アリール、置換アリール、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環及び置換複素環から成る群から選択され、D 及び E は、独立して、結合、 $-O-$ 、 $CO$ 、 $-NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3-$ 、 $-アルキレン-O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-$ 、 $アルキレン-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-NR^3-アルキレン-$ 、 $-O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-OC(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-O-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3C(O)-アルキレンオキシ-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-アルキレンオキシ-NR^3C(O)O-アルキレンオキシ-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3-アルキレン-$ 、 $アルキレン-O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-アルキレン-$  及び  $-C(O)NR^3-アルキレン-$  から成る群から選択され、 $R^3$  は上記で定義されたとおりである。

20

30

【0072】

一実施形態では、本発明は、ポリマーがポリオキシエチレンであり、オキシアルキレン基が独立して、その反復単位に 2 ~ 5 の炭素原子を有する直鎖又は分枝鎖のポリオキシアルキレン基である式 I I の化合物を提供する。

40

【0073】

一実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンが、ポリオキシエチレン、直鎖若しくは分枝鎖のポリオキシプロピレン、又は直鎖若しくは分枝鎖のポリオキシブチレンである式 I I の化合物を提供する。

【0074】

一実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンがポリオキシエチレンである式 I I の化合物を提供する。

【0075】

別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  がすべて同一であり、1 又は 2 であり、X 及び X' が双方共結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  の少なくとも一方が、1 ~ 4 の

50

二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 I I の化合物を提供する。

【0076】

別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  がすべて同一であり、1 又は 2 であり、X 及び X' が双方共結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が同一であり、1 ~ 4 の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基を表す式 I I の化合物を提供する。

【0077】

別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  がすべて同一であり、1 であり、X 及び X' が双方共結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が同一であり、1 ~ 4 の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基を表す式 I I の化合物を提供する。

【0078】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  がすべて同一であり、1 であり、X 及び X' が双方共結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が同一であり、1 ~ 4 の二重結合を含有する  $C_{14} \sim C_{20}$  炭化水素基を表す式 I I の化合物を提供する。

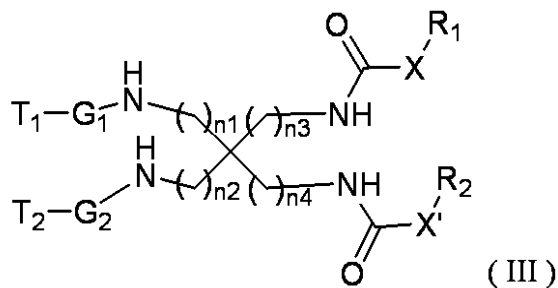
【0079】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  がすべて同一であり、1 であり、X 及び X' が双方共結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が同一であり、1 又は 2 の二重結合を含有する  $C_{14} \sim C_{20}$  炭化水素基を表す式 I I の化合物を提供する。

【0080】

本発明の別の態様は、式 I I I

【化10】



の化合物を提供する。

【0081】

式中、

$n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  は独立して 1、2、3 又は 4 であり、

X 及び X' は独立して結合、酸素、又は窒素であり、

$R_1$  及び  $R_2$  は独立して、任意で 1 ~ 4 の二重結合又は三重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基であり、

$T_1$  及び  $T_2$  は独立して、水素又はタ - ゲティングリガンドであり、

$G_1$  及び  $G_2$  は独立して、結合又はポリマー部分であり、

$T_1$  及び  $T_2$  の少なくとも一方はタ - ゲティングリガンドである。

【0082】

一実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  がすべて 1 であり、X 及び X' が双方共結合である式 I I I の化合物を提供する。

【0083】

一実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  の少なくとも一方が、1 ~ 4 の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 I I I の化合物を提供する。

【0084】

一実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  の双方が、1 ~ 4 の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 I I I の化合物を提供する。

【0085】

別の実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、1又は2の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 I I I の化合物を提供する。

【0086】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、二重結合を1つ含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 I I I の化合物を提供する。

【0087】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、1又は2の二重結合を含有する  $C_{14} \sim C_{20}$  炭化水素基である式 I I I の化合物を提供する。

【0088】

一実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、二重結合を1つ含有する  $C_{14} \sim C_{20}$  炭化水素基である式 I I I の化合物を提供する。

10

【0089】

一実施形態では、本発明は、 $-C(O)X-R_1$  及び  $-C(O)X'-R_2$  の双方がオレオイル基を表す式 I I I の化合物を提供する。

【0090】

一実施形態では、本発明は、 $G_1$  及び  $G_2$  の一方がポリマー部分であり、他方が水素である式 I I I の化合物を提供する。

【0091】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $G_1$  及び  $G_2$  の一方が、ポリオキシアルキレン、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリビニルアルコール、デキストラン、ポリ(L-グルタミン酸)、スチレン無水マレイン酸、ポリ-N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、又はポリジビニルエテル無水マレイン酸である式 I I I の化合物を提供する。

20

【0092】

別の実施形態では、本発明は、ポリマーがポリマー単位間の少なくとも1つのリンカー基を含む式 I I I の化合物を提供する。

【0093】

さらに別の実施形態では、本発明は、ポリマー部分がポリオキシアルキレンである式 I I I の化合物を提供する。

【0094】

一実施形態では、本発明は、ポリマーの分子量が約200~10,000Daである式 I I I の化合物を提供する。好ましいポリマーは約1,000~5,000Daに及ぶ分子量を有する。

30

【0095】

一実施形態では、本発明は、ポリマー部分が、 $-C(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-O-C(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-S-S-$ 、 $-NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3-$ 、 $-アルキレン-O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-$ 、 $-アルキレン-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-NR^3-アルキレン-$ 、 $-O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)-アルキレン-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-アルキレン-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-OC(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-O-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3C(O)-アルキレンオキシ-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレンオキシ-$  及び  $-アルキレンオキシ-NR^3C(O)O-アルキレンオキシ-$  か

40

50



ら選択される少なくとも1つのリンカーを含む式 I I の化合物を提供するが、式中、 $R^3$  は上記で定義されたとおり、及び

【化 1 1】



である。

【0096】

式中



10

は、

アリール、置換アリール、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環及び置換複素環から成る群から選択され、D 及び E は、独立して、結合、 $-O-$ 、 $CO$ 、 $-NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3-$ 、 $-アルキレン-O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-$ 、 $アルキレン-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-NR^3-アルキレン-$ 、 $-O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-OC(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-O-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3C(O)-アルキレンオキシ-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-アルキレンオキシ-NR^3C(O)O-アルキレンオキシ-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3-アルキレン-$ 、 $アルキレン-O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-アルキレン-$  及び  $-C(O)NR^3-アルキレン-$  から成る群から選択され、 $R^3$  は上記で定義されたとおりである。

20

30

【0097】

一実施形態では、本発明は、ポリマーがポリオキシエチレンであり、オキシアルキレン基が独立して、その反復単位に2～5の炭素原子を有する直鎖又は分枝鎖のポリオキシアルキレン基である式 I I I の化合物を提供する。

【0098】

別の実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンが、ポリオキシエチレン、直鎖若しくは分枝鎖のポリオキシプロピレン、又は直鎖若しくは分枝鎖のポリオキシブチレンである式 I I I の化合物を提供する。

40

【0099】

一実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンがポリオキシエチレンであり、ターゲティングリガンドが薬学上活性のある小分子、エンドソーム溶解剤、融合性ペプチド、細胞膜透過剤、電荷遮蔽剤、核酸、又は細胞受容体リガンドである式 I I I の化合物を提供する。

【0100】

一実施形態では、本発明は、ターゲティングリガンドが、増殖抑制活性を有するが薬学上活性のある小分子である式 I I I の化合物を提供する。

【0101】

50

一実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンがポリオキシエチレンであり、ターゲティングリガンドが増殖抑制活性を有するが薬学上活性のある小分子である式ⅠⅠⅠの化合物を提供する。

【0102】

一実施形態では、本発明は、ターゲティングリガンドが葉酸基である式ⅠⅠⅠの化合物を提供する。

【0103】

一実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンがポリオキシエチレンであり、ターゲティングリガンドが葉酸基である式ⅠⅠⅠの化合物を提供する。

【0104】

一実施形態では、本発明は、ターゲティングリガンドが融合性ペプチドである式ⅠⅠⅠの化合物を提供する。

【0105】

一実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンがポリオキシエチレンであり、ターゲティングリガンドが融合性ペプチドである式ⅠⅠⅠの化合物を提供する。

【0106】

一実施形態では、本発明は、ターゲティングリガンドが、ビオチン、ガラクトース、アセチルサリチル酸、ナプロキセン、及び細胞受容体リガンドから成る群から選択される式ⅠⅠⅠの化合物を提供する。

【0107】

一実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンがポリオキシエチレンであり、ターゲティングリガンドが、ビオチン、ガラクトース、アセチルサリチル酸、ナプロキセン、及び細胞受容体リガンドから成る群から選択される式ⅠⅠⅠの化合物を提供する。

【0108】

別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  が同一であり、1又は2であり、 $X$  及び  $X'$  の双方が結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  の少なくとも一方が、1～4の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式ⅠⅠⅠの化合物を提供する。

【0109】

別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  が同一であり、1又は2であり、 $X$  及び  $X'$  の双方が結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が同一であり、1～4の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基を表す式ⅠⅠⅠの化合物を提供する。

【0110】

別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  が1であり、 $X$  及び  $X'$  の双方が結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が同一であり、1～4の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基を表す式ⅠⅠⅠの化合物を提供する。

【0111】

別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  が1であり、 $X$  及び  $X'$  の双方が結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が同一であり、1又は2の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基を表す式ⅠⅠⅠの化合物を提供する。

【0112】

別の実施形態では、本発明は、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  が1であり、 $X$  及び  $X'$  が結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が同一であり、二重結合を1つ含有する  $C_{14} \sim C_{20}$  炭化水素基を表す式ⅠⅠⅠの化合物を提供する。

【0113】

本発明の態様の1つは、式ⅠⅤ

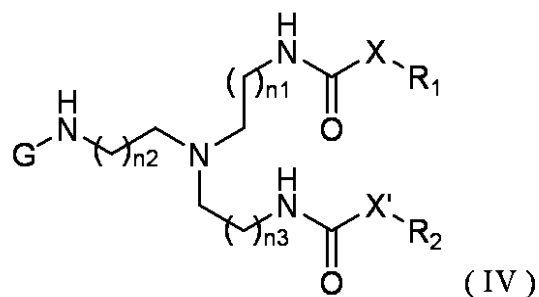
10

20

30

40

## 【化 1 2】



10

の化合物及び薬学上許容可能なその塩を提供し、式中、  
 $n_1$ 、 $n_2$ 、及び $n_3$ は独立して1、2、3又は4であり、  
 $X$ 及び $X'$ は独立して結合、酸素、又は窒素であり、  
 $R_1$ 及び $R_2$ は独立して、任意で1～4の二重結合又は三重結合を含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基であり、  
 $G$ は水素又はポリマー部分である。

## 【0114】

一実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$ 及び $n_4$ がすべて1であり、 $X$ 及び $X'$ が結合である式IVの化合物を提供する。

20

## 【0115】

一実施形態では、本発明は、 $R_1$ 及び $R_2$ の少なくとも一方が、1～4の二重結合を含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基である式IVの化合物を提供する。

## 【0116】

別の実施形態では、本発明は、 $R_1$ 及び $R_2$ の双方が、1～4の二重結合を含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基である式IVの化合物を提供する。

## 【0117】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $R_1$ 及び $R_2$ が独立して、1又は2の二重結合を含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基である式IVの化合物を提供する。

## 【0118】

別の実施形態では、本発明は、 $R_1$ 及び $R_2$ が独立して、二重結合を1つ含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基である式IVの化合物を提供する。

30

## 【0119】

一実施形態では、本発明は、 $R_1$ 及び $R_2$ が独立して、1又は2の二重結合を含有する $C_{14} \sim C_{20}$ 炭化水素基である式IVの化合物を提供する。

## 【0120】

別の実施形態では、本発明は、 $R_1$ 及び $R_2$ が独立して、二重結合を1つ含有する $C_{14} \sim C_{20}$ 炭化水素基である式IVの化合物を提供する。

## 【0121】

一実施形態では、本発明は、 $-C(O)X-R_1$ 及び $-C(O)X'-R_2$ の双方がオレオイル基を表す式IVの化合物を提供する。

40

## 【0122】

一実施形態では、本発明は、 $X$ が酸素である式IVの化合物を提供する。

## 【0123】

一実施形態では、本発明は、 $X$ が窒素である式IVの化合物を提供する。

## 【0124】

一実施形態では、本発明は、 $G$ が、ポリオキシアルキレン、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリビニルアルコール、デキストラン、ポリ(L-グルタミン酸)、スチレン無水マレイン酸、ポリ-N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、又はポリジビニルエテル無水マレイン酸である式IVの化

50

合物を提供する。

【0125】

別の実施形態では、本発明は、ポリマーがポリマー単位間の少なくとも1つのリンカー基を含む式IVの化合物を提供する。

【0126】

さらに別の実施形態では、本発明は、ポリマー部分がポリオキシアルキレンである式IVの化合物を提供する。

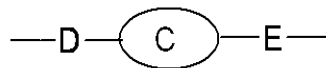
【0127】

さらに別の実施形態では、ポリマーの分子量が約200～10,000Daである式IVの化合物を提供する。好ましいポリマーは約1,000～5,000Daに及ぶ分子量を有する。

【0128】

一実施形態では、本発明は、ポリマー部分が、 $-C(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-O-C(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-S-S-$ 、 $-NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3-$ 、 $-アルキレン-O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-$ 、 $-アルキレン-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-NR^3-アルキレン-$ 、 $-O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)-アルキレン-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-アルキレン-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-OC(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-O-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3C(O)-アルキレンオキシ-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 及び $-アルキレンオキシ-NR^3C(O)O-アルキレンオキシ-$ から選択される少なくとも1つのリンカーを含む式IVの化合物を提供するが、式中、 $R^3$ は上記で定義されたとおり、及び

【化13】



である。

【0129】

式中



は、

アリール、置換アリール、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環及び置換複素環から成る群から選択され、D及びEは、独立して、結合、 $-O-$ 、 $CO$ 、 $-NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3-$ 、 $-アルキレン-O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-$ 、 $アルキレン-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C$

(O)NR<sup>3</sup> - アルキレン - 、 - OC(O)NR<sup>3</sup> - アルキレン - 、 - NR<sup>3</sup> - アルキレン - 、 - O - アルキレン - 、 - NR<sup>3</sup>C(O) - アルキレン - 、 - NR<sup>3</sup>C(O)O - アルキレンオキシ - 、 - NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup> - アルキレンオキシ - 、 - OC(O)NR<sup>3</sup> - アルキレンオキシ - 、 - NR<sup>3</sup> - アルキレンオキシ - 、 - O - アルキレンオキシ - 、 - NR<sup>3</sup>C(O) - アルキレンオキシ - 、 - C(O)NR<sup>3</sup> - アルキレンオキシ - 、 - アルキレンオキシ - NR<sup>3</sup>C(O)O - アルキレンオキシ - 、 - C(O)NR<sup>3</sup> - アルキレン - 、 - アルキレン - NR<sup>3</sup>C(O)O - アルキレン - 、 - アルキレン - NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup> - アルキレン - 、 - アルキレン - OC(O)NR<sup>3</sup> - アルキレン - 、 - アルキレン - NR<sup>3</sup> - アルキレン - 、 アルキレン - O - アルキレン - 、 - アルキレン - NR<sup>3</sup>C(O) - アルキレン - 及び - C(O)NR<sup>3</sup> - アルキレン - から成る群から選択され、R<sup>3</sup>は上記で定義されたとおりである。

10

#### 【0130】

一実施形態では、本発明は、ポリマーがポリオキシエチレンであり、オキシアルキレン基が独立して、その反復単位に2～5の炭素原子を有する直鎖又は分枝鎖のポリオキシアルキレン基である式IVの化合物を提供する。

#### 【0131】

別の実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンが、ポリオキシエチレン、直鎖若しくは分枝鎖のポリオキシプロピレン、又は直鎖若しくは分枝鎖のポリオキシブチレンである式IVの化合物を提供する。

#### 【0132】

さらに別の実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンがポリオキシエチレンである式IVの化合物を提供する。

20

#### 【0133】

別の実施形態では、本発明は、n<sub>1</sub>、n<sub>2</sub>、及びn<sub>3</sub>が同一であり、1又は2であり、X及びX'が結合であり、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>の少なくとも一方が、1～4の二重結合を含有するC<sub>8</sub>～C<sub>25</sub>炭化水素基である式IVの化合物を提供する。

#### 【0134】

別の実施形態では、本発明は、n<sub>1</sub>、n<sub>2</sub>、及びn<sub>3</sub>が同一であり、1又は2であり、X及びX'が結合であり、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>の双方が、1～4の二重結合を含有するC<sub>8</sub>～C<sub>25</sub>炭化水素基である式IVの化合物を提供する。

30

#### 【0135】

別の実施形態では、本発明は、n<sub>1</sub>、n<sub>2</sub>、及びn<sub>3</sub>が同一であり、1又は2であり、X及びX'が結合であり、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>が同一であり、1～4の二重結合を含有するC<sub>8</sub>～C<sub>25</sub>炭化水素基を表す式IVの化合物を提供する。

#### 【0136】

さらに別の実施形態では、本発明は、n<sub>1</sub>、n<sub>2</sub>、及びn<sub>3</sub>が同一であり、1又は2であり、X及びX'が結合であり、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>が同一であり、1又は2の二重結合を含有するC<sub>8</sub>～C<sub>25</sub>炭化水素基を表す式IVの化合物を提供する。

#### 【0137】

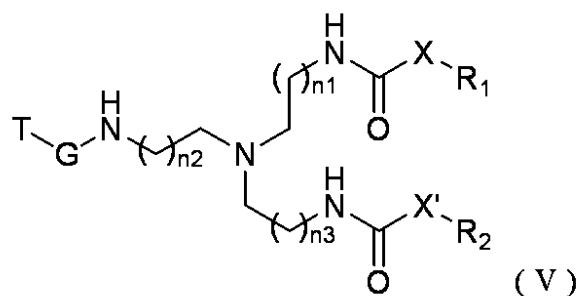
さらに別の実施形態では、本発明は、n<sub>1</sub>、n<sub>2</sub>、及びn<sub>3</sub>が1であり、X及びX'が結合であり、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>が同一であり、二重結合を1つ含有するC<sub>14</sub>～C<sub>20</sub>炭化水素基を表す式IVの化合物を提供する。

40

#### 【0138】

本発明の別の態様は、式V

## 【化 1 4】



10

の化合物を提供する。

## 【0139】

式中、

$n_1$ 、 $n_2$ 、及び $n_3$ は独立して1、2、3又は4であり、

X及びX'は独立して結合、酸素、又は窒素であり、

$R_1$ 及び $R_2$ は独立して、任意で1～4の二重結合又は三重結合を含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基であり、

Tはタ-ゲティングリガンドであり、

Gは結合又はポリマー部分である。

20

## 【0140】

一実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、及び $n_3$ がすべて1であり、X及びX'の双方が結合である式Vの化合物を提供する。

## 【0141】

一実施形態では、本発明は、 $R_1$ 及び $R_2$ の少なくとも一方が、1～4の二重結合を含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基である式Vの化合物を提供する。

## 【0142】

別の実施形態では、本発明は、 $R_1$ 及び $R_2$ の双方が、1～4の二重結合を含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基である式Vの化合物を提供する。

## 【0143】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $R_1$ 及び $R_2$ が独立して、1又は2の二重結合を含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基である式Vの化合物を提供する。

30

## 【0144】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $R_1$ 及び $R_2$ が独立して、二重結合を1つ含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基である式Vの化合物を提供する。

## 【0145】

一実施形態では、本発明は、 $R_1$ 及び $R_2$ が独立して、1又は2の二重結合を含有する $C_{14} \sim C_{20}$ 炭化水素基である式Vの化合物を提供する。

## 【0146】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $R_1$ 及び $R_2$ が独立して、二重結合を1つ含有する $C_{14} \sim C_{20}$ 炭化水素基である式Vの化合物を提供する。

40

## 【0147】

一実施形態では、本発明は、 $-C(O)X-R_1$ 及び $-C(O)X'-R_2$ の双方がオレオイル基を表す式Vの化合物を提供する。

## 【0148】

別の実施形態では、本発明は、Gがポリマー部分である式Vの化合物を提供する。

## 【0149】

さらに別の実施形態では、本発明は、Gが、ポリオキシアルキレン、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリビニルアルコール、デキストラン、ポリ(L-グルタミン酸)、スチレン無水マレイン酸、ポリ-N-(2-ヒド

50

ロキシプロピル)メタクリルアミド、又はポリジビニルエテル無水マレイン酸である式Vの化合物を提供する。

【0150】

さらに別の実施形態では、本発明は、ポリマーがポリマー単位間の少なくとも1つのリンカー基を含む式Vの化合物を提供する。

【0151】

一実施形態では、本発明は、本発明は、ポリマー部分がポリオキシアルキレンである式Vの化合物を提供する。

【0152】

別の実施形態では、ポリマーの分子量が約200~10,000Daである式IVの化合物を提供する。ポリマーの好ましい分子量は約1,000~5,000Daである。

【0153】

一実施形態では、本発明は、ポリマー部分が、 $-C(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-O-C(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-S-S-$ 、 $-NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3-$ 、 $-アルキレン-O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-$ 、 $-アルキレン-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-NR^3-アルキレン-$ 、 $-O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)-アルキレン-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-アルキレン-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-OC(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-O-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3C(O)-アルキレンオキシ-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 及び $-アルキレンオキシ-NR^3C(O)O-アルキレンオキシ-$ から選択される少なくとも1つのリンカーを含む式Vの化合物を提供するが、式中、 $R^3$ は上記で定義されたとおり、及び

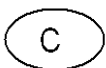
【化15】



である。

【0154】

式中



は、

アリール、置換アリール、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環及び置換複素環から成る群から選択され、D及びEは、独立して、結合、 $-O-$ 、 $CO$ 、 $-NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3-$ 、 $-アルキレン-O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-$ 、 $アルキレン-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C$

(O)NR<sup>3</sup> - アルキレン - 、 - OC(O)NR<sup>3</sup> - アルキレン - 、 - NR<sup>3</sup> - アルキレン - 、 - O - アルキレン - 、 - NR<sup>3</sup>C(O) - アルキレン - 、 - NR<sup>3</sup>C(O)O - アルキレンオキシ - 、 - NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup> - アルキレンオキシ - 、 - OC(O)NR<sup>3</sup> - アルキレンオキシ - 、 - NR<sup>3</sup> - アルキレンオキシ - 、 - O - アルキレンオキシ - 、 - NR<sup>3</sup>C(O) - アルキレンオキシ - 、 - C(O)NR<sup>3</sup> - アルキレンオキシ - 、 - アルキレンオキシ - NR<sup>3</sup>C(O)O - アルキレンオキシ - 、 - C(O)NR<sup>3</sup> - アルキレン - 、 - アルキレン - NR<sup>3</sup>C(O)O - アルキレン - 、 - アルキレン - NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup> - アルキレン - 、 - アルキレン - OC(O)NR<sup>3</sup> - アルキレン - 、 - アルキレン - NR<sup>3</sup> - アルキレン - 、 アルキレン - O - アルキレン - 、 - アルキレン - NR<sup>3</sup>C(O) - アルキレン - 及び - C(O)NR<sup>3</sup> - アルキレン - から成る群から選択され、R<sup>3</sup>は上記で定義されたとおりである。

10

## 【0155】

別の実施形態では、本発明は、ポリマーがポリオキシエチレンであり、オキシアルキレン基が独立して、その反復単位に2～5の炭素原子を有する直鎖又は分枝鎖のポリオキシアルキレン基である式Vの化合物を提供する。

## 【0156】

さらに別の実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンが、ポリオキシエチレン、直鎖若しくは分枝鎖のポリオキシプロピレン、又は直鎖若しくは分枝鎖のポリオキシブチレンである式Vの化合物を提供する。

## 【0157】

20

一実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンがポリオキシエチレンであり、ターゲティングリガンドが薬学上活性のある小分子、エンドソーム溶解剤、融合性ペプチド、細胞膜透過剤、電荷遮蔽剤、又は核酸である式Vの化合物を提供する。

## 【0158】

一実施形態では、本発明は、ターゲティングリガンドが、増殖抑制活性を有するが薬学上活性のある小分子である式Vの化合物を提供する。

## 【0159】

一実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンがポリオキシエチレンであり、ターゲティングリガンドが増殖抑制活性を有するが薬学上活性のある小分子である式Vの化合物を提供する。

30

## 【0160】

さらに別の実施形態では、本発明は、ターゲティングリガンドが葉酸基である式Vの化合物を提供する。

## 【0161】

さらに別の実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンがポリオキシエチレンであり、ターゲティングリガンドが葉酸基である式Vの化合物を提供する。

## 【0162】

一実施形態では、本発明は、ターゲティングリガンドが融合性ペプチドである式Vの化合物を提供する。

## 【0163】

40

一実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンがポリオキシエチレンであり、ターゲティングリガンドが融合性ペプチドである式Vの化合物を提供する。

## 【0164】

一実施形態では、本発明は、ターゲティングリガンドが、ビオチン、ガラクトース、アセチルサリチル酸、及びナプロキセンから成る群から選択される式Vの化合物を提供する。

## 【0165】

一実施形態では、本発明は、ポリオキシアルキレンがポリオキシエチレンであり、ターゲティングリガンドが、ビオチン、ガラクトース、アセチルサリチル酸、及びナプロキセンから成る群から選択される式Vの化合物を提供する。

50



## 【0166】

別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、及び $n_3$ が同一であり、1又は2であり、 $X$ 及び $X'$ が結合であり、 $R_1$ 及び $R_2$ の少なくとも一方が、1～4の二重結合を含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基である式Vの化合物を提供する。

## 【0167】

別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、及び $n_3$ が同一であり、1又は2であり、 $X$ 及び $X'$ が結合であり、 $R_1$ 及び $R_2$ の双方が、1～4の二重結合を含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基である式Vの化合物を提供する。

## 【0168】

別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、及び $n_3$ が同一であり、1又は2であり、 $X$ 及び $X'$ が結合であり、 $R_1$ 及び $R_2$ が同一であり、1～4の二重結合を含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基を表す式Vの化合物を提供する。

10

## 【0169】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、及び $n_3$ が同一であり、1又は2であり、 $X$ 及び $X'$ が結合であり、 $R_1$ 及び $R_2$ が同一であり、1又は2の二重結合を含有する $C_{14} \sim C_{20}$ 炭化水素基を表す式Vの化合物を提供する。

## 【0170】

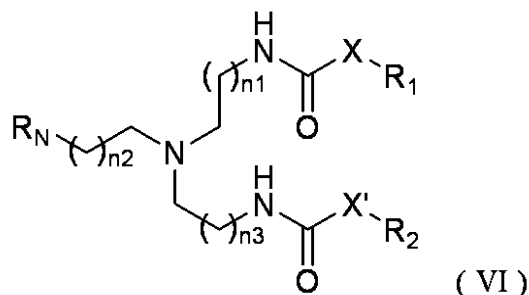
さらに別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、及び $n_3$ が1であり、 $X$ 及び $X'$ が結合であり、 $R_1$ 及び $R_2$ が同一であり、二重結合を1つ含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基を表す式Vの化合物を提供する。

20

## 【0171】

本発明の別の態様は、式VI

## 【化16】



30

の化合物を提供する。

## 【0172】

式中、

$n_1$ 、 $n_2$ 、及び $n_3$ は独立して1、2、3又は4であり、

$X$ 及び $X'$ は独立して結合、酸素、又は窒素であり、

$R_1$ 及び $R_2$ は独立して、任意で1～4の二重結合又は三重結合を含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基であり、

40

$R_N$ は、 $NHR_4$ 、 $NR_4R_5$ 又は $N^+R_4R_5R_6$ を表し、その際、 $R_4$ 、 $R_5$ 及び $R_6$ は独立して $C_1 \sim C_6$ アルキル基を表す。

## 【0173】

一実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、及び $n_3$ がすべて1であり、 $X$ 及び $X'$ の双方が結合である式VIの化合物を提供する。

## 【0174】

一実施形態では、本発明は、 $R_1$ 及び $R_2$ の少なくとも一方が、1～4の二重結合を含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基である式VIの化合物を提供する。

## 【0175】

別の実施形態では、本発明は、 $R_1$ 及び $R_2$ の双方が、1～4の二重結合を含有する $C$

50

$C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 V I の化合物を提供する。

【0176】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、1又は2の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 V I の化合物を提供する。

【0177】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、二重結合を1つ含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 V I の化合物を提供する。

【0178】

一実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、1又は2の二重結合を含有する  $C_{14} \sim C_{20}$  炭化水素基である式 V I の化合物を提供する

10

【0179】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $R_1$  及び  $R_2$  が独立して、二重結合を1つ含有する  $C_{14} \sim C_{20}$  炭化水素基である式 V I の化合物を提供する。

【0180】

一実施形態では、本発明は、 $-C(O)X-R_1$  及び  $-C(O)X'-R_2$  の双方がオレオイル基を表す式 V I の化合物を提供する。

【0181】

別の実施形態では、本発明は、 $R_N$  が  $NHR_4$  を表し、 $R_4$  が  $C_1 \sim C_2$  アルキル基を表す式 V I の化合物を提供する。

【0182】

20

別の実施形態では、本発明は、 $R_N$  が  $NR_4R_5$  を表し、 $R_4$  及び  $R_5$  が独立して  $C_1 \sim C_2$  アルキル基を表す式 V I の化合物を提供する。

【0183】

別の実施形態では、本発明は、 $R_N$  が  $N^+R_4R_5R_6$  を表し、 $R_4R_5$  及び  $R_6$  が独立して  $C_1 \sim C_2$  アルキル基を表す式 V I の化合物を提供する。

【0184】

別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、及び  $n_3$  が同一であり、1又は2であり、 $X$  及び  $X'$  が結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  の少なくとも一方が、1～4の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 V I の化合物を提供する。

【0185】

30

別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  が同一であり、1又は2であり、 $X$  及び  $X'$  が結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  の双方が、1～4の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基である式 V I の化合物を提供する。

【0186】

別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、及び  $n_3$  が同一であり、1又は2であり、 $X$  及び  $X'$  が結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が同一であり、1～4の二重結合を含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基を表す式 V I の化合物を提供する。

【0187】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、及び  $n_3$  が同一であり、1又は2であり、 $X$  及び  $X'$  が結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が同一であり、1又は2の二重結合を含有する  $C_{14} \sim C_{20}$  炭化水素基を表す式 V I の化合物を提供する。

40

【0188】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、及び  $n_3$  が1であり、 $X$  及び  $X'$  が結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が同一であり、二重結合を1つ含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基を表す式 V I の化合物を提供する。

【0189】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、及び  $n_3$  が1であり、 $X$  及び  $X'$  が結合であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が同一であり、二重結合を1つ含有する  $C_8 \sim C_{25}$  炭化水素基を表し、 $R_N$  が  $N^+R_4R_5R_6$  を表し、 $R_4R_5$  及び  $R_6$  が独立して  $C_1 \sim C_6$  アルキル基を表す式 V I の化合物を提供する。

50

## 【0190】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $n_1$ 、 $n_2$ 、及び $n_3$ が1であり、 $X$ 及び $X'$ が結合であり、 $R_1$ 及び $R_2$ が同一であり、二重結合を1つ含有する $C_8 \sim C_{25}$ 炭化水素基を表し、 $R_N$ が $N^+R_4R_5R_6$ を表し、 $R_4$ 、 $R_5$ 及び $R_6$ が独立して $C_1 \sim C_2$ アルキル基を表す式V Iの化合物を提供する。

## 【0191】

$X$ 及び $X'$ の双方が結合を表す式I ~ V Iの化合物の別の実施形態では、好適な $C(O)XR_1$ 及び $C(O)X'R_2$ の部分には、10 ~ 22の炭素原子、好ましくは12 ~ 20の炭素原子、さらに好ましくは14 ~ 18の炭素原子を有する飽和、一飽和及び多飽和の脂肪酸に由来する基が挙げられる。代表的な $C(O)XR_1$ 及び $C(O)X'R_2$ の部分には、たとえば、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、エルカ酸、ドコサヘキサエン酸、イソステアリン酸、エライジン酸、ペトロセリン酸、エレオステアリン酸、又はラウロレイン酸に由来するようなものが挙げられる。

10

## 【0192】

$X$ 及び $X'$ の双方が窒素又は酸素を表す式I ~ V Iの化合物の別の実施形態では、好適な $R_1$ 及び $R_2$ の部分には、10 ~ 22の炭素原子、好ましくは12 ~ 20の炭素原子、さらに好ましくは14 ~ 18の炭素原子を有する飽和、一飽和及び多飽和の脂肪酸に由来する基が挙げられる。代表的な $R_1$ 及び $R_2$ の部分には、たとえば、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、エルカ酸、ドコサヘキサエン酸、イソステアリン酸、エライジン酸、ペトロセリン酸、エレオステアリン酸、又はラウロレイン酸に由来するようなものが挙げられる。

20

## 【0193】

本発明の態様の1つは、式I ~ V Iのいずれかの化合物を含む製剤を提供する。

## 【0194】

本発明の態様の1つは、式I ~ V Iの化合物と、生物学的に活性のある分子であり得る別の分子を含む製剤を提供するが、該分子は、リボソームRNA；RNA若しくはDNAのアンチセンスポリヌクレオチド；siRNA；shRNA；及び治療上有用なタンパク質をコードするゲノムDNA、cDNA若しくはmRNAのポリヌクレオチドから成る群から選択される。

30

## 【0195】

本発明の別の態様は、式I ~ V Iのいずれかの化合物と生物学的に活性のある分子によって形成される粒子を含む製剤を提供する。

## 【0196】

本発明の別の態様は、式I ~ V Iのいずれかの化合物と生物学的に活性のある分子を含む製剤を提供し、生物学的に活性のある分子と化合物はリボプレックスを形成する。

## 【0197】

本発明の別の態様は、式I ~ V Iのいずれかの化合物と生物学的に活性のある分子を含む製剤を提供し、生物学的に活性のある分子は少なくとも部分的に、化合物によって形成されるリボソームの中にある。

40

## 【0198】

本発明の別の態様は、式I ~ V Iのいずれかの化合物と生物学的に活性のある分子を含む製剤を提供し、生物学的に活性のある分子はリボソームの中に被包される。

## 【0199】

一実施形態では、本発明は、粒子が約500nm未満の直径中央値を有する製剤を提供する。

## 【0200】

本発明の態様の1つは、本発明の製剤を細胞に接触させることを含む、siRNAを細胞に導入する方法を提供し、製剤は、式I ~ V Iのいずれかの化合物とsiRNAを含む。

50

## 【0201】

本発明の別の態様は、本発明の製剤を細胞に接触させることを含む、合成 s h R N A を細胞に導入する方法を提供し、製剤は、式 I ~ V I のいずれかの化合物と s h R N A を含む。

## 【0202】

本発明のさらに別の態様は、本発明の製剤を細胞に接触させることを含む、m i R N A を細胞に導入する方法を提供し、製剤は、式 I ~ V I のいずれかの化合物と m i R N A を含む。

## 【0203】

本発明の別の態様は、本発明の製剤を細胞に接触させることを含む、アンチセンス核酸を細胞に導入する方法を提供し、製剤は、式 I ~ V I のいずれかの化合物とアンチセンス核酸を含む。

10

## 【0204】

本発明の態様の1つは、標的配列の発現を調節する方法を提供し、前記方法は、式 I ~ V I のいずれかの化合物と生物学的に活性のある分子を含む、治療上有効な量の製剤を哺乳類対象に投与することを含む。

## 【0205】

本発明の別の態様は、s i R N A を生体内で送達する方法を提供し、前記方法は、治療上有効な量の本発明の製剤を哺乳類対象に投与することを含む。

## 【0206】

20

本発明の別の態様は、哺乳類対象における疾患を治療する又は予防する方法を提供し、前記方法は、式 I ~ V I のいずれかの化合物と生物学的に活性のある分子を含む、治療上有効な量の製剤を前記対象に投与することを含む。

## 【0207】

本発明の別の態様は、遺伝子の発現を阻害することが可能である生物学的に活性のある分子と式 I ~ V I のいずれかの化合物を含む製剤に細胞を接触させることを含む、遺伝子の発現を阻害する方法を提供する。一実施形態では、細胞は哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞である。さらに、これらの方法は、生体内又は試験管内で実施されてもよい。一実施形態では、生物学的に活性のある分子は、s i R N A、s h R N A、m i R N A、アンチセンス核酸、リボゾーム R N A、R N A 若しくは D N A のアンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、及び治療上有用なタンパク質をコードするゲノム D N A、c D N A 又は m R N A のポリヌクレオチドから成る群から選択される。そのような製剤はまた、コレステロール、ホルモン、抗ウイルス剤、ペプチド、化学療法剤、小分子、ビタミン、補因子、又は抗体のようなタンパク質も含んでもよい。

30

## 【0208】

本発明の別の態様では、遺伝子発現の阻害に関与するもの以外に治療で使用するために、遺伝子発現を阻害しない生物学的に活性のある分子、たとえば、種々の小分子の医薬化合物を本発明の化合物と共に製剤に含有することができる。

## 【0209】

別の実施形態では、本発明は、( i ) 式 I ~ V I のいずれかの1以上の化合物と ( i i ) 1以上の生物学的に活性のある分子の製剤を含有する埋め込み可能な又は注入可能な用具を提供する。これらの用具では、製剤は、用具の中に捕捉される又は被包され、製剤に加えて用具は、生分解性及び/又は生体適合性の薬剤放出物質を含む。用具は、対象、好ましくは哺乳類、さらに好ましくはヒト対象の体内に注入する又は埋め込むのに好適な大きさ及び形状である。

40

## 【0210】

上記で言及したように、本発明の特定の化合物は、ポリマー部分、G、G<sub>1</sub>又はG<sub>2</sub>を含む。これらのポリマー基は、約200Da~約10,000Daに及ぶ分子量を有する。

## 【0211】

50

ポリマー部分は、好ましくはポリオキシアルキレンであり、又は2以上のポリオキシアルキレンの基若しくは単位を含む。ポリオキシアルキレン基は、酸化アルキレンモノマーを重合し、所望の大きさと重量のポリマー部分を提供することによって形成される。ポリマー部分が2以上のポリオキシアルキレン基を含む場合、個々のポリオキシアルキレン基はリンカー基によって互いに連結される。好適なリンカーの例は、 $-C(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-O-C(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-S-S-$ 、 $-NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3-$ 、 $-アルキレン-O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-$ 、 $-アルキレン-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-NR^3-アルキレン-$ 、 $-O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)-アルキレン-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-アルキレン-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-OC(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-O-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3C(O)-アルキレンオキシ-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレンオキシ-$  及び  $-アルキレンオキシ-NR^3C(O)O-アルキレンオキシ-$  であり、式中、 $R^3$  は水素、又は任意で置換されるアルキル、及び

【化17】



である。

【0212】

式中



は、

アリール、置換アリール、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環及び置換複素環から成る群から選択され、D及びEは、独立して、結合、 $-O-$ 、 $CO$ 、 $-NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-$ 、 $-アルキレン-NR^3-$ 、 $-アルキレン-O-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-$ 、 $-アルキレン-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-NR^3-アルキレン-$ 、 $-O-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)-アルキレン-$ 、 $-NR^3C(O)O-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-OC(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-O-アルキレンオキシ-$ 、 $-NR^3C(O)-アルキレンオキシ-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレンオキシ-$ 、 $-アルキレンオキシ-NR^3C(O)O-アルキレンオキシ-$ 、 $-C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-OC(O)NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-O-アルキレン-$ 、 $-アルキレン-NR^3C(O)-ア$

ルキレン - 及び - C ( O ) N R <sup>3</sup> - アルキレン - から成る群から選択され、R <sup>3</sup> は上記で定義されたとおりである。

【 0 2 1 3 】

好ましいリンカー基は、- C ( O ) - 、 - O - 、 - N R <sup>3</sup> - 、 - N R <sup>3</sup> C ( O ) O - 、 - O C ( O ) N R <sup>3</sup> - 、 - N R <sup>3</sup> C ( O ) - 及び - C ( O ) N R <sup>3</sup> - であり、R <sup>3</sup> は上記で定義されたとおりである。

【 0 2 1 4 】

たとえば、アミド基によって連結された独立した単位から G、G<sub>1</sub> 又は G<sub>2</sub> が形成される場合、単位はさらに短い鎖のポリマーから選択されてもよく、又は広い範囲の大きさと分子量を有する単位であってもよい。上記で言及したように、ポリマー G、G<sub>1</sub> 及び G<sub>2</sub> は約 200 ~ 10,000 Da の分子量を有してもよく；これらのポリマーのいずれかが幾つかのさらに短い独立した大きさの単位から形成されてもよい。単位は、独立して約 50 (すなわち、ポリエチレングリコールの 1 反復単位)、200、又は 500 Da、約 3000、4000 又は 5000 Da に及ぶ分子量を有してもよい。

【 0 2 1 5 】

従って、化合物が、約 3000 Da の分子量を有するポリマー部分 G、G<sub>1</sub> 又は G<sub>2</sub> を含む場合、ポリマーは、たとえば、

(a) 約 3000 Da の分子量を有するポリオキシエチレン基であってもよく；

(b) 3つのアミドリリンカー ( - C ( O ) N H - ) によって互いに共有結合した4つのポリオキシエチレンから成ってもよく、各ポリオキシエチレン基はポリマー部分が約 3000 Da の分子量を有するように約 750 Da の分子量を有する；又は

(c) 4つのアミドリリンカー ( - C ( O ) N H - ) によって互いに共有結合した5つのポリオキシエチレンから成ってもよく、5つのポリオキシエチレン基は、それぞれ、約 500、1000、250、1000、及び 250 Da の分子量を有する。

【 0 2 1 6 】

これらのポリマー部分は例としてのみ含められ；当業者は、本発明の化合物で好適に用いることができるほかのポリマー部分を認識するであろう。

【 0 2 1 7 】

本発明のポリマー部分を作製するのに有用な試薬の非限定例には以下が挙げられる。

【表 1】

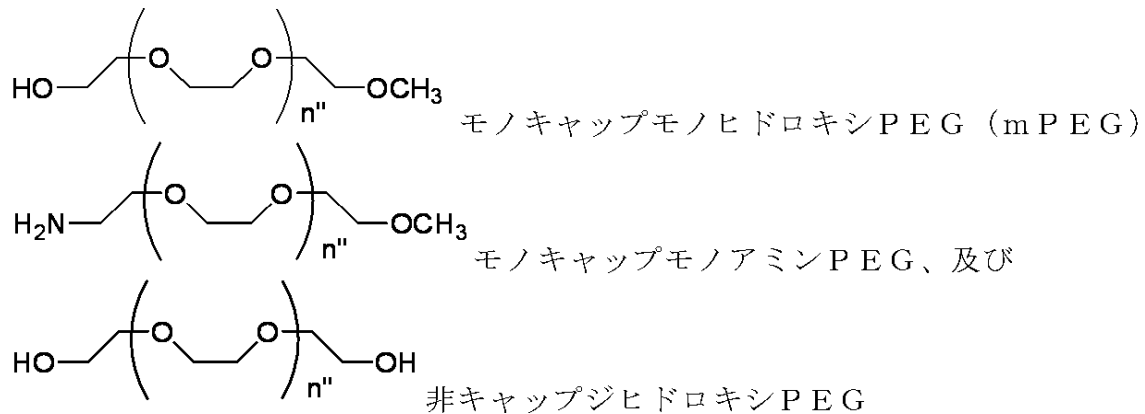
HO (アルキレン-O) <sub>pp</sub> R <sup>bb</sup>	モノキャップモノヒドロキシPEG (mPEG)
H <sub>2</sub> N (アルキレン-O) <sub>pp</sub> R <sup>bb</sup>	モノキャップモノアミノPEG
HO (アルキレン-O) <sub>pp</sub> R-OH	非キャップジヒドロキシPEG
H <sub>2</sub> N (アルキレン-O) <sub>pp</sub> R-OH	非キャップモノアミノPEG

式中、pp 及びアルキレンは本明細書で定義されたとおりであり、R<sup>bb</sup> は好ましくは、アルキル及び置換アルキルから成る群から選択される。

【 0 2 1 8 】

そのような試薬の具体例には、以下が挙げられる：

## 【化 18】



10

## 【0219】

一部の実施形態では、粒子は、第1のリザーバに水溶液を、第2のリザーバに有機液溶液（すなわち、本発明の化合物の水溶液）を提供し、リポソームの被包、たとえば、干渉RNAを実質的に即時に生成するように水溶液と有機液溶液を混合することによって作製される。一部の実施形態では、粒子は、界面活性剤系の方式又は有機溶媒系の方式のいずれかで疎水性の中間体複合体を形成し、その後、界面活性剤又は有機溶媒を取り除くことによって作製される。好ましい実施形態は、電荷中和型である。

20

## 【0220】

一実施形態では、干渉RNAはプラスミドから転写され、プラスミドは、界面活性剤溶液におけるカチオン性脂質と組み合わせて被覆された核酸-脂質の複合体を提供する。次いで複合体は、非カチオン性脂質と接触して、界面活性剤と、核酸-脂質複合体と非カチオン性脂質の溶液を提供し、その後界面活性剤が取り除かれて血清安定性の核酸-脂質粒子の溶液を提供し、その際、干渉RNA鑄型を含むプラスミドは脂質二重層に被包される。こうして形成された粒子は約50～500nmの大きさを有する。

## 【0221】

別の実施形態では、安定な脂質粒子は、有機溶媒にてカチオン性脂質と非カチオン性脂質の混合物を調製し；たとえば、干渉RNAを含む核酸の水溶液をカチオン性脂質と非カチオン性脂質の混合物に接触させて透明な単一相を提供し；有機溶媒を取り除いて核酸-脂質の粒子の懸濁液を提供することによって形成され、その際、核酸は脂質二重層に被包され、粒子は血清中で安定であり、約50～500nmの大きさを有する。

30

## 【0222】

本発明の粒子と複合体、たとえば、所望の大きさ及び/又は電荷を有するsiRNAとの式I～VIのいずれかの化合物の複合体は、上記で調製した混合物を好適なフィルターに通すことによって得ることができる。以下の実施例32及び33を参照のこと。

## 【0223】

本発明の脂質粒子は、siRNA配列を含む核酸の治療用送達に有用である。特に、標的核酸配列の翻訳を下方調節する又はサイレンシングすることによる哺乳類における疾患を治療する試験管内及び生体内の方法を提供することが本発明の目的である。これらの方法では、siRNA分子が核酸-脂質の粒子に製剤化され、粒子は、そのような治療を必要とする患者（たとえば、標的核酸配列を含む遺伝子の発現又は過剰発現に関連する疾患又は障害と診断された患者）に投与される。或いは、細胞が患者から取り出され、試験管内でsiRNAが送達され、細胞が患者に再注入される。一実施形態では、本発明は、カチオン性脂質と、非カチオン性脂質と、凝集を阻害する抱合された脂質と、siRNAを含む核酸-脂質の粒子に細胞を接触させることによってsiRNA分子を細胞に導入する方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、カチオン性脂質と、凝集を阻害する抱合された脂質と、siRNAを含む核酸-脂質の粒子に細胞を接触させることによってsiRNA分子を細胞に導入する方法を提供する。さらに別の実施形態では、本発明は、カチ

40

50

オン性脂質と s i R N A を含む核酸 - 脂質の粒子に細胞を接触させることによって s i R N A 分子を細胞に導入する方法を提供する。

【 0 2 2 4 】

脂質粒子をたとえば、静脈内に又は腹腔内に投与してもよい。一実施形態では、注射後約 1、6、12、24、36、48、60、72、84 又は 96 時間の血漿に、核酸 - 脂質の粒子の総投与量の少なくとも約 10 % が存在する。ほかの実施形態では、注射後約 1、6、12、24、36、48、60、72、84 又は 96 時間の血漿に、核酸 - 脂質の粒子の総注射量の 20 %、30 %、40 % を超える、及び 60 %、70 % 又は 80 % ほどが存在する。一実施形態では、標的組織（すなわち、肺、肝臓、腫瘍、血管内皮、又は炎症部位）の細胞における s i R N A の存在は、投与後 24、48、72 及び 96 時間に検出可能である。一実施形態では、標的配列の発現の下方調節は、投与後 24、48、72 及び 96 時間に検出可能である。一実施形態では、標的配列の発現の下方調節は、腫瘍細胞又は炎症部位の細胞又は病気の組織で優先的に生じる。一実施形態では、投与部位から離れた細胞における s i R N A の存在は、核酸 - 脂質の粒子の静脈内注射後、少なくとも 4 日で検出可能である。別の実施形態では、標的組織（すなわち、肺、肝臓、腫瘍、血管内皮、又は炎症部位）の細胞における s i R N A の存在は、核酸 - 脂質の粒子の注射後、少なくとも 4 日で検出可能である。

10

【 0 2 2 5 】

粒子は、血液循環にて安定であり、血管外部位及び標的細胞集団にアクセスする薬物動態挙動に必要とされる大きさなので、静脈内の核酸の移行に使用するのに好適である。本発明はまた、脂質粒子を含む薬学上許容可能な組成物も提供する。

20

【 0 2 2 6 】

粒子は、血液循環にて安定であり、血管外部位及び標的細胞集団にアクセスする薬物動態挙動に必要とされる大きさなので、静脈内の核酸の移行に使用するのに好適である。

【 0 2 2 7 】

本明細書で記載される安定な核酸 - 脂質の粒子は通常、核酸（たとえば、s i R N A 配列又は s i R N A 配列をコードする D N A 配列）と、カチオン性脂質と、非カチオン性脂質と、たとえば、脂質粒子の凝集を抑制する抱合脂質のような二重層の安定化成分を含む。本発明の脂質粒子は、約 500 n m 未満の平均直径を有し、実質的に非毒性である。さらに、本発明の脂質粒子に被包される核酸は水溶液においてヌクレアーゼによる分解に耐性である。

30

【 0 2 2 8 】

核酸 - 脂質の粒子の核酸成分は通常、たとえば、1 以上の単離された小型干渉 R N A（s i R N A）二本鎖、さらに長い二本鎖 R N A（d s R N A）又は D N A プラスミドにおける転写カセットから転写される s i R N A 又は d s R N A として含む幾つかの形態にて提供され得る干渉 R N A（すなわち、s i R N A）を含む。

【 0 2 2 9 】

R N A 集団を用いて長い前駆体 R N A を提供することができ、又は選択された標的配列に実質的な又は完全な同一性を有する長い前駆体 R N A を用いて s i R N A を作製することができる。当業者に周知の方法に従って、R N A を細胞又は組織から単離し、合成し、及び / 又はクローニングすることができる。R N A は、混合集団（細胞又は組織から得られる、c D N A から転写される、差し引きされる、選択される、など）であることができ、又は単一の標的配列を提示することができる。R N A は、天然に存在することができ、たとえば、細胞試料から単離することができ、たとえば、T 7 又は S P 6 ポリメラーゼ及び P C R 産物又はクローニングされた c D N A を用いて試験管内で合成することができ、又は化学的に合成することができる。

40

【 0 2 3 0 】

合成 R N A のために長鎖 d s R N A を形成するには、試験管内で相補体を転写し、ハイブリッド形成して d s R N A を形成する。天然に存在する R N A 集団を使用するのであれば、R N A 集団に相当する c D N A を転写することによって、又は R N A ポリメラーゼを

50



用いて、RNA相補体も提供される（たとえば、大腸菌のRNA分解酵素III又はダイサーによる消化のためにdsRNAを形成すること）。次いで前駆体RNAをハイブリッド形成させて消化のための二本鎖RNAを形成する。dsRNAを核酸-脂質の粒子で直接被包することができ、又は被包に先立って試験管内で消化することができる。

#### 【0231】

或いは、1以上のsiRNA鋳型をコードする1以上のDNAプラスミドを核酸-脂質の粒子に被包する。siRNAは、たとえば、小型核RNAU6又はヒトRNA分解酵素PRNAH1のための天然に存在する転写単位に基づいて、RNAポリメラーゼIII転写単位を有するプラスミドにおいてDNA鋳型からヘアピンループを持つ二本鎖に自動的に折り畳む配列として転写され得る（Brummelkamp, et al., Science 296:550 (2002); D 10  
onze, et al., Nucleic Acids Res. 30:e46 (2002); Paddison, et al., Genes Dev. 16: 948 (2002); Yu, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 99:6047 (2002); Lee, et al., Nat. Biotech. 20:500 (2002); Miyagishi, et al., Nat. Biotech. 20:497 (2002); Paul, et al., Nat. Biotech. 20:505 (2002); and Sui, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 99:5 515 (2002)）。通常、転写単位又は転写カセットは、所望のsiRNA配列と、2～3の  
20  
ウリジン残基及びポリチミジン（T5）配列（ポリアデニル化シグナル）で構成される停止配列の転写のための鋳型に操作可能に連結された、たとえば、H1-RNA又はU6プロモータのようなRNA転写物プロモータ配列を含有する（Brummelkamp, Science, 上記）。選択されたプロモータは、保存的な又は誘導可能な転写を提供する。RNA干渉分子のDNA指向転写のための組成物及び方法は、参照によって本明細書に組み入れられる米  
30  
国特許第6,573,099号に詳細に記載されている。好ましくは、合成された又は転写されたsiRNAは、約1～4のヌクレオチド、好ましくは約2～3のヌクレオチドの3'オーバーハングと5'リン酸末端を有する（Elbashir, et al., Genes Dev. 15:188 (2001); Nykanen, et al., Cell 107:309 (2001)）。転写単位は、それから干渉RNAが転写されるプラスミド又はDNAベクターに組み入れられる。治療目的での遺伝物質の生体内送達に好適なプラスミドは、参照によって本明細書に組み入れられる米国特許第5,962,428号及び同第5,910,488号に詳細に記載されている。選択されたプラスミドは、標的細胞の一時的な又は安定な送達を提供する。所望の遺伝子配列を発現するように設計されたプラスミドは、siRNAの転写のための転写単位カセットを含有するように修飾され得ることは当業者に明らかであろう。

#### 【0232】

RNAを単離する、RNAを合成する、核酸をハイブリッド形成させる、cDNAライブラリを作製してスクリーニングする、及びPCRを行う方法は、PCR法（米国特許第4,683,195号及び同第4,683,202号; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds, 1990)を参照）のように、当該技術で周知である（たとえば、Gubler & Hoffman, Gene 25:263-269 (1983); Sambrook et al., supra; Ausubel et al., 上記を参照）。発現ライブラリも当業者に周知である。本発明における使用の一般的方法を開示している追加の基礎的テキストには、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed. 1989); Kriegler, Gene Transfer and Ex 40  
pression: A Laboratory Manual (1990); 及び Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、1994)）が挙げられる。

#### 【0233】

一般に、核酸-脂質の粒子を送達して当該遺伝子産物の転写（すなわち、発現）を下方調節する又はサイレンシングすることが望ましい。遺伝子産物の好適な部類には、ウイルス感染及び生存に関連する遺伝子、代謝性の疾患及び障害（たとえば、肝臓が標的である疾患、及び肝臓の疾患及び障害）に関連する遺伝子、腫瘍形成及び細胞の形質転換に関連する遺伝子、血管形成遺伝子、たとえば、炎症及び自己免疫応答に関連するもののような免疫調節遺伝子、リガンド受容体遺伝子、及び神経変性障害に関連する遺伝子が挙げられ 50

るが、これらに限定されない。

#### 【0234】

ウイルス感染及び生存に関連する遺伝子には、細胞において結合する、侵入する及び複製するためにウイルスによって発現されるものが挙げられる。特に関心があるのは慢性のウイルス性疾患に関連するウイルス配列である。特に関心があるウイルス配列には、肝炎ウイルスの配列 (Hamasaki, et al., FEBS Lett. 543:51 (2003); Yokota, et al., EMBO Rep. 4:602 (2003); Schlomai, et al., Hepatology 37:764 (2003); Wilson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100:2783 (2003); Kapadia, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100:2014 (2003); and FIELDS VIROLOGY (Knipe et al. eds. 2001))、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) (Banerjee, et al., Mol. Ther. 8:62 (2003); Song, et al., J. Virol. 77:7174 (2003); Stephenson JAMA 289:1494 (2003); Qin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100:183 (2003))、ヘルペスウイルス (Jia, et al., J. Virol. 77:3301 (2003)) 及びヒトのパピローマウイルス (HPV) (Hall, et al., J. Virol. 77:6066 (2003); Jiang, et al., Oncogene 21:6041 (2002)) が挙げられる。サイレンシングされ得る、例となる肝炎ウイルスの核酸配列には、転写及び翻訳に関与する核酸配列 (たとえば、En1、En2、X、P)、構造タンパク質をコードする核酸配列 (たとえば、Cタンパク質及びC関連タンパク質を含むコアタンパク質; S、M、Lタンパク質又はその断片を含むカプシド及びエンペロープタンパク質) (FIELDS VIROLOGY, 2001, 上記参照) が挙げられるが、これらに限定されない。サイレンシングされ得る、例となるC型肝炎ウイルスの核酸配列には、セリンプロテアーゼ (たとえば、NS3/NS4)、ヘリカーゼ (たとえば、NS3)、ポリメラーゼ (たとえば、NS5B)、及びエンペロープタンパク質 (たとえば、E1、E2及びp7) が挙げられるが、これらに限定されない。A型肝炎ウイルスの核酸配列は、たとえば、GenBank受入番号NC\_001489で言及され、B型肝炎ウイルスの核酸配列は、たとえば、GenBank受入番号NC\_003977で言及され、C型肝炎ウイルスの核酸配列は、たとえば、GenBank受入番号NC\_004102で言及され、D型肝炎ウイルスの核酸配列は、たとえば、GenBank受入番号NC\_001653で言及され、E型肝炎ウイルスの核酸配列は、たとえば、GenBank受入番号NC\_001434で言及され、G型肝炎ウイルスの核酸配列は、たとえば、GenBank受入番号NC\_001710で言及されている。ウイルス感染及び生存に関連する遺伝子をコードする配列のサイレンシングを、従来の剤と併用して好都合に使用してウイルスの状態を治療することができる。

#### 【0235】

代謝性の疾患及び障害 (たとえば、肝臓が標的である疾患、及び肝臓の疾患及び障害) に関連する遺伝子には、たとえば、脂質異常症 (たとえば、肝臓X受容体 (たとえば、LXR 及びLXR、GenBank受入番号NM\_007121)、ファルネソイドX受容体 (FXR) (GenBank受入番号NM\_005123)、ステロール調節要素結合タンパク質 (SREBP)、Site-1プロテアーゼ (SIP)、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素A還元酵素 (HMG-補酵素A還元酵素)、アポリポタンパク質 (ApoB)、及びアポリポタンパク質 (ApoE、及び糖尿病 (たとえば、グルコース-6-リン酸) において発現される遺伝子が挙げられる (たとえば、Forman et al., Cell 81:687 (1995); Seol et al., Mol. Endocrinol. 9:72 (1995), Zavacki et al., PNAS USA 94:7909 (1997); Sakai, et al., Cell 85:1037-1046 (1996); Duncan, et al., J. Biol. Chem. 272:12778-12785 (1997); Willy, et al., Genes Dev. 9(9):1033-45 (1995); Lehmann, et al., J. Biol. Chem. 272(6):3137-3140 (1997); Janowski, et al., Nature 383:728-731 (1996); Peet, et al., Cell 93:693-704 (1998)を参照)。当業者は、代謝性の疾患及び障害 (たとえば、肝臓が標的である疾患、及び肝臓の疾患及び障害) に関連する遺伝子には、肝臓自体で発現される遺伝子と共にそのほかの臓器及び組織で発現される遺伝子が含まれることを十分に理解するであろう。代謝性の疾患及び障害に関連する遺伝子をコードする配列のサイレンシングを、従来の剤の投与と併用して好都合に使用して疾患又は障害を治療することができる。

## 【 0 2 3 6 】

腫瘍形成及び細胞の形質転換に関連する遺伝子配列の例には、M L L 融合遺伝子、B C R - A B L のような転座配列 (Wilda, et al., Oncogene, 21:5716 (2002); Scherr, et al., Blood 101: 1566)、T E L - A M L 1、E W S - F L I 1、T L S - F U S、P A X 3 - F K H R、B C L - 2、A M L 1 - E T O 及び A M L 1 - M T G 8 (Heidenreich, et al., Blood 101:3157 (2003))、多剤耐性遺伝子のような過剰発現配列 (Nieth, et al., FEBS Lett. 545:144 (2003); Wu, et al., Cancer Res. 63:1515 (2003))、サイクリン (Li, et al., Cancer Res. 63:3593 (2003); Zou, et al., Genes Dev. 16:2923 (2002))、 $\alpha$ -カテニン (Verma, et al., Clin Cancer Res. 9:1291 (2003))、テロメラーゼ遺伝子 (Kosciulek, et al., Mol Cancer Ther. 2:209 (2003))、c - M Y C、N - M Y C、B C L - 2、E R B B 1 及び E R B B 2 (Nagy, et al. Exp. Cell Res. 285:39 (2003))、並びに R A S のような変異配列 (Tuschl and Borkhardt, Mol. Interventions, 2:158 (2002)にて概説) が挙げられる。D N A 修復酵素をコードする配列のサイレンシングによって、化学療法剤の投与との併用での使用が見つかる (Collis, et al., Cancer Res. 63:1550 (2003))。腫瘍の移動に関連するタンパク質をコードする遺伝子も、当該標的配列であり、たとえば、インテグリン、セレクチン及びメタロプロテイナーゼである。前述の例は、排他的ではない。腫瘍形成又は細胞の形質転換、腫瘍増殖又は腫瘍の移動を助長する又は促進する遺伝子配列の全部又は一部が鋳型配列として含まれ得る。

10

## 【 0 2 3 7 】

血管形成遺伝子は、新しい血管の形成を促進することができる。特に関心があるのは、血管内皮増殖因子 (V E G F) である (Reich, et al., Mol. Vis. 9:210 (2003))。

20

## 【 0 2 3 8 】

免疫調節遺伝子は、1以上の免疫応答を調節する遺伝子である。免疫調節遺伝子の例には、増殖因子のようなサイトカイン (たとえば、T G F -  $\beta$ 、T G F -  $\beta$ 、E G F、F G F、I G F、N G F、P D G F、C G F、G M - C S F、S C F など)、インターロイキン (たとえば、I L - 2、I L - 4、I L - 12 (Hill, et al., J. Immunol. 171:691 (2003))、I L - 15、I L - 18、I L - 20 など)、インターフェロン (たとえば、I F N -  $\alpha$ 、I F N -  $\beta$ 、I F N -  $\gamma$  など) 及び T N F が挙げられる。F a s 及び F a s リガンドも関心のある免疫調節剤標的配列である (Song, et al., Nat. Med. 9:347 (2003))。造血系及びリンパ系の細胞における二次シグナル伝達分子をコードする遺伝子も本発明に含まれ、たとえば、B r u t o n のチロシンキナーゼのような T e c ファミリーキナーゼである (Heinonen, et al., FEBS Lett. 527:274 (2002))。

30

## 【 0 2 3 9 】

本発明の細胞の受容体リガンドは、タンパク質分子又はステロイド分子である。細胞の受容体リガンドには、細胞表面の受容体 (たとえば、インスリン受容体、E P O 受容体、G - タンパク質共役受容体、チロシンキナーゼ活性を持つ受容体、サイトカイン受容体、増殖因子受容体など) に結合して受容体が関与する生理的経路を調節する (たとえば、阻害する、活性化するなど) (たとえば、グルコースレベルの調節、血球の発生、有糸分裂誘発など) ことができるリガンドが挙げられる。細胞表面受容体のリガンドの例には、サイトカイン、増殖因子、インターロイキン、インターフェロン、エリスロポイエチン (E P O)、インスリン、グルカゴン、G - タンパク質共役受容体リガンドなどが挙げられる。トリヌクレオチド反復 (たとえば、C A G 反復) の拡大をコードする鋳型によって、球脊髄性筋萎縮症及びハンチントン病のようなトリヌクレオチド反復の拡大が原因で起きる神経変性障害におけるサイレンシング病理配列での使用が見つかる (Caplen, et al., Hum. Mol. Genet. 11:175 (2002))。細胞受容体のリガンドには、細胞表面の受容体ではなく細胞内の受容体 (たとえば、核におけるステロイド受容体、小胞体に局在する細胞質のイノシトールリン酸受容体) に結合するリガンドも含まれる。細胞内受容体のリガンドの例には、親油性ホルモン様ステロイドホルモン、イノシトール三リン酸、及びイントラクリンペプチドホルモンが挙げられる。

40

定義

50

## 【0240】

本明細書で使用されるとき、用語「アルキル」は、1～10の炭素原子を含有するアルキル基を含む。アルキル基は直鎖であっても分枝鎖であってもよい。「アルキル」の例には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソ-、sec-及びtert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ヘキシル、3-メチルヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、3-エチルブチルなどが挙げられる。好ましいアルキル基は、 $C_1 \sim C_6$ アルキルである。本発明のアルキル基は、本明細書で提供されるような種々の基によって任意で置換されてもよい。従って、置換に利用できる任意の炭素原子は、種々の置換基、たとえば、ハロゲン、OH、 $NO_2$ 、CN、 $NH_2$ 、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ アルコキシ、 $NH(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})$ 、 $N(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})$ 、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $(C_3 \sim C_{10} \text{シクロアルキル})$ アルキル、 $(C_3 \sim C_{10} \text{シクロアルキル})$ アルコキシ、 $C_2 \sim C_9$ ヘテロシクロアルキル、 $C_1 \sim C_8$ アルケニル、 $C_1 \sim C_8$ アルキニル、ハロ( $C_1 \sim C_8$ )アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_8$ )アルコキシ、オキソ、アミノ( $C_1 \sim C_8$ )アルキル、モノ及びジ( $C_1 \sim C_8$ アルキル)アミノ( $C_1 \sim C_8$ )アルキル、 $C_1 \sim C_8$ アシル、 $C_1 \sim C_8$ アシルオキシ、 $C_1 \sim C_8$ スルホニル、 $C_1 \sim C_8$ チオ、 $C_1 \sim C_8$ スルホンアミド及び $C_1 \sim C_8$ アミノスルホニルにさらに結合してもよい。

10

## 【0241】

用語「アルキレン」は、好ましくは1～5、さらに好ましくは1～3の炭素原子を有し、直鎖又は分枝鎖のいずれかである二価の飽和脂肪族ヒドロカルビル基を指す。この用語は、たとえば、メチレン( $-CH_2-$ )、エチレン( $-CH_2CH_2-$ )、n-プロピレン( $-CH_2CH_2CH_2-$ )、イソプロピレン( $-CH_2CH(CH_3)-$ )などによって例示される。

20

## 【0242】

用語「アルキレンオキシ」は、酸素に結合した二価の飽和脂肪族ヒドロカルビル基を指し、脂肪族ヒドロカルビル基は好ましくは1～5、さらに好ましくは1～3の炭素原子を有し、直鎖又は分枝鎖のいずれかである。

## 【0243】

用語「アリール」は、少なくとも1つの芳香族環を含有する芳香族炭化水素環系を指す。芳香族環はそのほかの芳香族炭化水素環又は非芳香族炭化水素環に任意で縮合されてもよく、さもなければ、連結されてもよい。アリール基の例には、たとえば、フェニル、ナフチル、アントラセニル、1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン、インデニル、2,3-ジヒドロインデニル及びビフェニルが挙げられる。アリール基の好ましい例には、フェニル、ナフチル、1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン、及び2,3-ジヒドロインデニルが挙げられる。さらに好ましいアリール基は、フェニル及びナフチルである。本発明のアリール基は本明細書で提供されるような種々の基によって任意で置換されてもよい。従って、アリール環系の中に存在し、置換に利用できる任意の炭素原子は、種々の環置換基、たとえば、ハロゲン、OH、 $NO_2$ 、CN、 $NH_2$ 、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ アルコキシ、 $NH(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})$ 、 $N(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})$ 、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $(C_3 \sim C_{10} \text{シクロアルキル})$ アルキル、 $(C_3 \sim C_{10} \text{シクロアルキル})$ アルコキシ、 $C_2 \sim C_9$ ヘテロシクロアルキル、 $C_1 \sim C_8$ アルケニル、 $C_1 \sim C_8$ アルキニル、ハロ( $C_1 \sim C_8$ )アルキル、ハロ( $C_1 \sim C_8$ )アルコキシ、オキソ、アミノ( $C_1 \sim C_8$ )アルキル、モノ及びジ( $C_1 \sim C_8$ アルキル)アミノ( $C_1 \sim C_8$ )アルキル、 $C_1 \sim C_8$ アシル、 $C_1 \sim C_8$ アシルオキシ、 $C_1 \sim C_8$ スルホニル、 $C_1 \sim C_8$ チオ、 $C_1 \sim C_8$ スルホンアミド及び $C_1 \sim C_8$ アミノスルホニルにさらに結合してもよい。

30

40

## 【0244】

用語「シクロアルキル」は、 $C_3 \sim C_8$ 環状炭化水素を指す。シクロアルキルの例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル及びシクロオクチルが挙げられる。さらに好ましいのは $C_3 \sim C_6$ シクロアルキル基である

50

。本発明のシクロアルキル基は、本明細書で提供されるような種々の基によって任意で置換されてもよい。従って、シクロアルキル環系の中に存在し、置換に利用できる任意の炭素原子は、種々の環置換基、たとえば、ハロゲン、OH、NO<sub>2</sub>、CN、NH<sub>2</sub>、C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル、C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルコキシ、NH(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル)、N(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル)(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル)、C<sub>3</sub>～C<sub>10</sub>シクロアルキル、(C<sub>3</sub>～C<sub>10</sub>シクロアルキル)アルキル、(C<sub>3</sub>～C<sub>10</sub>シクロアルキル)アルコキシ、C<sub>2</sub>～C<sub>9</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルケニル、C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキニル、ハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>)アルキル、ハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>)アルコキシ、オキソ、アミノ(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>)アルキル、モノ及びジ(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル)アミノ(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>)アルキルにさらに結合してもよい。

#### 【0245】

用語「ヘテロシクロアルキル」は、窒素、酸素及びイオウから選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含有する環又は環系を指し、その際、前記ヘテロ原子は、非芳香族環にあり、環系は非芳香族環の環員(の1つ)によって親基に連結される。ヘテロシクロアルキル環は任意で、ほかのヘテロシクロアルキル環及び/又は非芳香族環及び/又はフェニル環に縮合される。従って、本発明に好適なヘテロシクロアルキル基は少なくとも3つの環員を有し、20までの環員を有してもよい。好ましいヘテロシクロアルキル基は3～10の環員を有する。特定のさらに好ましいヘテロシクロアルキル基は8～10の環員を有する。そのほかのさらに好ましいヘテロシクロアルキル基は5又は6の環員を有する。ヘテロシクロアルキル基の例には、たとえば、1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリニル、1,2-ジヒドロキノリニル、1,2,3,4-テトラヒドロキノリニル、ベンゾ[1,4]オキサジニル、2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]オキサジニル、インドリニル、ベンゾ[1,3]ジオキサリル、2H-クロメニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピペリジニル、ピペラジニル、テトラヒドロフラニル、ピロリジニル、ピリジノニル、アゼチジニル、及びピラゾリジニルが挙げられる。好ましいヘテロシクロアルキル基には、ピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリジニル、ピリジノニル、ジヒドロピロリジニル、アゼチジニル、アジリジニル、1,2,3,4-テトラヒドロキノリニル、2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]オキサジニル、インドリニル、ベンゾ[1,3]ジオキサリル及びピロリジノニルが挙げられる。さらに好ましいヘテロシクロアルキル基は、ピロリジニル、ピペリジニル、アゼチジニル、アジリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、1,2,3,4-テトラヒドロキノリニル、2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]オキサジニル、インドリニル、及びベンゾ[1,3]ジオキサリルである。本発明のヘテロシクロアルキル基は、本明細書で提供されるような種々の基によって任意で置換されてもよい。従って、ヘテロシクロアルキル環の中に存在し、置換に利用できる任意の炭素原子は、種々の環置換基、たとえば、たとえば、ハロゲン、OH、NO<sub>2</sub>、CN、NH<sub>2</sub>、C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル、C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルコキシ、NH(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル)、N(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル)(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル)、C<sub>3</sub>～C<sub>10</sub>シクロアルキル、(C<sub>3</sub>～C<sub>10</sub>シクロアルキル)アルキル、(C<sub>3</sub>～C<sub>10</sub>シクロアルキル)アルコキシ、C<sub>2</sub>～C<sub>9</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルケニル、C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキニル、ハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>)アルキル、ハロ(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>)アルコキシ、オキソ、アミノ(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>)アルキル、モノ及びジ(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル)アミノ(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>)アルキルにさらに結合してもよい。

#### 【0246】

用語「ヘテロアリール」は、窒素、酸素及びイオウから選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含有する芳香族環系を指し、環系は芳香族環の環員(の1つ)によって親基に連結される。ヘテロアリール環は、1以上のヘテロアリール環、芳香族又は非芳香族の炭化水素環又はヘテロシクロアルキル環に縮合されてもよい。従って、本発明に好適なヘテロアリール基は、少なくとも5つの環員を有し、20までの環員を有してもよい。ヘテロアリールの例には、たとえば、ピリジン、フラン、チエニル、5,6,7,8-テトラヒドロイソキノリニル、及びピリミジニルが挙げられる。好ましいヘテロアリール基には、チエニル、ベンゾチエニル、ピリジル、キノリニル、ピラゾリル、ピリミジル、イミダゾ

10

20

30

40

50

リル、ベンズイミダゾリル、フラニル、ベンゾフラニル、ジベンゾフラニル、チアゾリル、ベンゾチアゾリル、イソキサゾリル、オキサジアゾリル、イソチアゾリル、ベンズイソチアゾリル、トリアゾリル、ピロリル、インドリル、5, 6 - ジヒドロキナゾリニル、4, 5, 6, 7 - テトラヒドロインドリル、4, 5 - ジヒドロ - 2H - インダゾリル、5, 6 - ジヒドロキノリニル、ピラゾリル及びベンゾピラゾリルが挙げられる。さらに好ましいヘテロアリアル基は、ベンゾチアゾリル、ピリジル、ピラゾリル及びキノリニルである。本発明のヘテロアリアル基は、本明細書で提供されるような種々の基によって任意で置換されてもよい。従って、ヘテロアリアル環系の中に存在し、置換に利用できる任意の炭素原子は、種々の環置換基、たとえば、たとえば、ハロゲン、OH、NO<sub>2</sub>、CN、NH<sub>2</sub>、C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル、C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub> アルコキシ、NH(C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)、N(C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)(C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)、C<sub>3</sub> ~ C<sub>10</sub> シクロアルキル、(C<sub>3</sub> ~ C<sub>10</sub> シクロアルキル) アルキル、(C<sub>3</sub> ~ C<sub>10</sub> シクロアルキル) アルコキシ、C<sub>2</sub> ~ C<sub>9</sub> ヘテロシクロアルキル、C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub> アルケニル、C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキニル、ハロ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub>) アルキル、ハロ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub>) アルコキシ、オキソ、アミノ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub>) アルキル、モノ及びジ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル) アミノ(C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub>) アルキルにさらに結合してもよい。

10

#### 【0247】

本明細書で使用されるとき、「増殖抑制活性」によって、たとえば、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)、急性リンパ性白血病(ALL)及び慢性リンパ性白血病(CLL)のような白血病、カポジ肉腫のようなAIDS関連の癌；乳癌；骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、巨細胞腫瘍、アダマンチノーマ及び脊索腫のような骨癌；髄膜腫、膠芽細胞腫、低レベル星状細胞腫、乏突起膠細胞腫、下垂体腫瘍、シュワン細胞症及び転移性脳腫瘍のような脳腫瘍；外套細胞リンパ腫のような種々のリンパ腫を含む頭頸部の癌、非ホジキンリンパ腫、腺腫、扁平上皮癌、咽頭癌、胆嚢及び胆管の癌、網膜芽腫のような網膜の癌、食道の癌、胃癌、多発性骨髄腫、卵巣癌、至急癌、甲状腺癌、精巣癌、子宮内膜癌、黒色腫、結腸直腸癌、肺癌、膀胱癌、前立腺癌、肺癌(非小細胞肺癌を含む)、膵臓癌、肉腫、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、頭頸部の癌、皮膚癌、鼻咽腔癌、脂肪肉腫、上皮癌、腎細胞癌、胆嚢腺癌、耳下腺腺癌、子宮内膜肉腫、多剤耐性癌；並びに、たとえば、腫瘍血管形成に関連する血管新生、黄斑変性症(たとえば、湿性/乾性AMD)、角膜血管新生、糖尿病性網膜症、血管新生緑内障、近視性変性のような増殖性の疾患及び障害、並びに、たとえば、再狭窄及び多発性嚢胞腎疾患のようなそのほかの増殖性の疾患及び障害、並びにそのほかの癌、又は、細胞若しくは組織における遺伝子発現に係る疾患の調節のみに応答し得る、又はほかの治療法との併用で応答し得る増殖性の疾患、症状、形質、遺伝子型若しくは表現型を含む、当該技術で既知であるような調節されない細胞の増殖又は複製を特徴とする疾患、症状、形質、遺伝子型又は表現型に対する生物活性を意味する。

20

30

#### 【0248】

用語「アプタマー」は、別の分子に結合する核酸を意味する。この結合相互作用は、ワトソン/クリックの塩基対形成(たとえば、AはU又はTと結合し、GはCと結合する)によって例示される標準の核酸/核酸の水素結合の形成を包含しないが、そのほかの非共有結合(又は一部では共有結合)のすべてを包含する。非共有結合の非限定例には、水素結合形成、静電相互作用、ファン・デル・ワールス力及び疎水性相互作用が挙げられる。アプタマーは、これらの種類の相互作用のいずれか若しくはすべてによって、又は場合によっては共有結合によって別の分子に結合してもよい。別の分子へのアプタマーの共有結合は、アプタマー又は標的分子が化学的に反応性の部分又は光反応性の部分を含有する場合に生じ得る。用語「アプタマー」は、意図された標的物質との複合体を形成することが可能である核酸を指す。「標的特異的」は、アプタマーが、混入する物質に結合するよりもはるかに高い親和性で標的検体に結合することを意味する。

40

#### 【0249】

用語「生物学的に活性のある分子」は、本明細書で使用されるとき、系において生物学

50

的応答を誘発できる又は修飾できる化合物又は分子を指す。生物学的に活性のある分子の非限定例には、抗体（たとえば、モノクローナル、キメラ、ヒト化など）、コレステロール、ホルモン、抗ウイルス剤、ペプチド、タンパク質、化学療法剤、小分子、ビタミン、補因子、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素核酸（たとえば、リボザイムなど）、アンチセンス核酸、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、2, 5 - Aキメラ、dsRNA（たとえば、siRNA、shRNA、など）、アロザイム、アプタマー、デコイ、リボゾームRNA、RNA又はDNA又はRNAとDNAの組み合わせのアンチセンスポリヌクレオチド、miRNA、shRNA、及び治療上有益なタンパク質及びその類似体をコードするゲノムDNA、cDNA又はmRNAのポリヌクレオチドが挙げられる。本発明の生物学的に活性のある分子には、生物学的に活性のある分子の薬物動力学及び/又は薬物動態を調節することが可能な分子、たとえば、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール及びそのほかのポリエーテルのような脂質及びポリマーも含まれる。特定の実施形態では、用語、生物学的に活性のある分子は、本明細書における用語「分子」又は「当該分子」と相互交換可能に使用される。

10

#### 【0250】

本明細書で使用されるとき、「カチオン性脂質」によって、たとえば、式I～VIのいずれかを有する化合物のような、ほぼ生理的pHで正味の正の電荷を有する親油性の化合物を意味する。

#### 【0251】

本明細書で使用されるとき、「中性脂質」によって、ほぼ生理的pHで正味の電荷を持たない本明細書で定義されるようなカチオン性脂質以外の親油性化合物を意味する。ほぼ生理的pHで正味の電荷を持たない好適な化合物には、両性イオンが挙げられる。

20

#### 【0252】

本明細書で使用されるとき、「細胞」は、普通の生物学的な意味で使用され、多細胞生物全体を指すものではなく、たとえば、ヒトを指すものではない。細胞は、生物、たとえば、鳥類、植物、及び、たとえば、ヒト、ウシ、ヒツジ、類人猿、サル、ブタ、イヌ及びネコのような哺乳類に存在し得る。細胞は、原核細胞（たとえば、細菌細胞）又は真核細胞（たとえば、哺乳類又は植物の細胞）であり得る。細胞は、体細胞又は生殖細胞の起源であることができ、全能性又は多能性であることができ、分裂性又は非分裂性であることができる。細胞はまた、配偶子又は胚、幹細胞、又は完全に分化した細胞に由来することができ、又はそれを含むことができる。

30

#### 【0253】

本明細書で使用されるとき、用語「二本鎖RNA」又は「dsRNA」は、短鎖干渉RNA（siRNA）を含むRNA干渉が可能である二本鎖RNA分子を指す。

#### 【0254】

「遺伝子」によって、RNAをコードする核酸、たとえば、ポリペプチドをコードする構造遺伝子を含むが、これらに限定されない核酸配列を意味する。遺伝子又は標的遺伝子はまた、機能性RNA（fRNA）、又は小型一時的RNA（stRNA）、微小RNA（miRNA）、小型核RNA（snRNA）、短鎖干渉RNA（siRNA）、小型核RNA（snRNA）、リボゾームRNA（rRNA）、転移RNA（tRNA）及びそれらの前駆体RNAのような非コーディングRNAをコードすることができる。

40

#### 【0255】

「阻害する」又は「阻害」によって、1以上のタンパク質若しくはタンパク質サブユニットをコードする遺伝子の発現、RNA分子若しくは同等のRNA分子のレベル、又は1以上のタンパク質若しくはタンパク質サブユニットの活性が、本発明の核酸分子及び分子の非存在下で認められるものより低く低減されることを意味する。一実施形態では、siRNAによる阻害は、不活性分子又は減衰分子の存在下で認められるレベルよりも下である。別の実施形態では、siRNAによる阻害は、たとえば、スクランブル配列又はミスマッチを伴ったsiRNAの存在下で認められるレベルよりも下である。別の実施形態では、本発明の核酸分子による遺伝子発現の阻害は、核酸分子の存在下で、その非存在下よ

50

りも大きい。一実施形態では、遺伝子発現の阻害は、転写後サイレンシング、たとえば、標的核酸分子（たとえば、RNA）のRNAiが介在する切断又は翻訳の阻害に関連する。一実施形態では、阻害は、転写前サイレンシングに関連する。

【0256】

用語「リンカー」及び「リンカー基」は、1以上の分子を互いに接続する多価の、好ましくは二価の部分を目指す。例は、ポリマー部分Gの一部と一緒に接続する又はターゲティングリガンドTをポリマー部分Gに接続する部分である。リンカーは生分解性又は生体安定性であることができる。生分解性リンカーは、特定の組織又は細胞型への送達のような特定の目的で安定性を調節できるように設計される。好適なリンカー基の例には、以下の基：-C(O)-、-O-、-O-C(O)O-、-C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-、  
-S-S-、-NR<sup>3</sup>-、-NR<sup>3</sup>C(O)O-、-OC(O)NR<sup>3</sup>-、-NR<sup>3</sup>C(O)-、-C(O)NR<sup>3</sup>-、-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-、-アルキレン-NR<sup>3</sup>C(O)O-、-アルキレン-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-、-アルキレン-OC(O)NR<sup>3</sup>-、  
-アルキレン-NR<sup>3</sup>-、-アルキレン-O-、-アルキレン-NR<sup>3</sup>C(O)-、-アルキレン-C(O)NR<sup>3</sup>-、-NR<sup>3</sup>C(O)O-アルキレン-、-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-アルキレン-、-OC(O)NR<sup>3</sup>-アルキレン-、-NR<sup>3</sup>-アルキレン-、-O-アルキレン-、-NR<sup>3</sup>C(O)-アルキレン-、-C(O)NR<sup>3</sup>-アルキレン-、  
-アルキレン-NR<sup>3</sup>C(O)O-アルキレン-、-アルキレン-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-アルキレン-、-アルキレン-OC(O)NR<sup>3</sup>-アルキレン-、-アルキレン-NR<sup>3</sup>-アルキレン-、-アルキレン-O-アルキレン-、-アルキレン-NR<sup>3</sup>C(O)-アルキレン-、-C(O)NR<sup>3</sup>-アルキレン-、-NR<sup>3</sup>C(O)O-アルキレンオキシ-、  
-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-アルキレンオキシ-、-OC(O)NR<sup>3</sup>-アルキレンオキシ-、-NR<sup>3</sup>-アルキレンオキシ-、-O-アルキレンオキシ-、-NR<sup>3</sup>C(O)-アルキレンオキシ-、-C(O)NR<sup>3</sup>-アルキレンオキシ-及び-アルキレンオキシ-NR<sup>3</sup>C(O)O-アルキレンオキシ-が挙げられ、式中、R<sup>3</sup>は水素、又は任意で置換されるアルキル、及び

【化19】



である。

【0257】

式中



は、

アリール、置換アリール、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環及び置換複素環から成る群から選択され、D及びEは、独立して、結合、-O-、CO、-NR<sup>3</sup>-、-NR<sup>3</sup>C(O)O-、-OC(O)NR<sup>3</sup>-、-NR<sup>3</sup>C(O)-、-C(O)NR<sup>3</sup>-、-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-、-アルキレン-NR<sup>3</sup>C(O)O-、-アルキレン-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-、-アルキレン-OC(O)NR<sup>3</sup>-、-アルキレン-NR<sup>3</sup>-、-アルキレン-O-、-アルキレン-NR<sup>3</sup>C(O)-、アルキレン-C(O)NR<sup>3</sup>-、-NR<sup>3</sup>C(O)O-アルキレン-、-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-アルキレン-、-OC(O)NR<sup>3</sup>-アルキレン-、-NR<sup>3</sup>-アルキレン-、-O-アルキレン-、-NR<sup>3</sup>C(O)-アルキレン、-NR<sup>3</sup>C(O)O-アルキレンオキシ-、-NR<sup>3</sup>C(O)NR<sup>3</sup>-アルキレンオキシ-、-OC(O)NR<sup>3</sup>-アルキレンオキシ-、-NR<sup>3</sup>-アルキレンオキシ-、-O-アルキレンオキシ-、-NR



$^3\text{C}(\text{O})$  - アルキレンオキシ - 、 -  $\text{C}(\text{O})\text{NR}^3$  - アルキレンオキシ - 、 - アルキレンオキシ -  $\text{NR}^3\text{C}(\text{O})\text{O}$  - アルキレンオキシ - 、 -  $\text{C}(\text{O})\text{NR}^3$  - アルキレン - 、 - アルキレン -  $\text{NR}^3\text{C}(\text{O})\text{O}$  - アルキレン - 、 - アルキレン -  $\text{NR}^3\text{C}(\text{O})\text{NR}^3$  - アルキレン - 、 - アルキレン -  $\text{OC}(\text{O})\text{NR}^3$  - アルキレン - 、 - アルキレン -  $\text{NR}^3$  - アルキレン - 、 アルキレン -  $\text{O}$  - アルキレン - 、 - アルキレン -  $\text{NR}^3\text{C}(\text{O})$  - アルキレン - 及び -  $\text{C}(\text{O})\text{NR}^3$  - アルキレン - から成る群から選択され、 $\text{R}^3$  は上記で定義されたとおりである。

#### 【0258】

用語「ターゲティングリガンド」は、たとえば、受容体のような別の化合物に直接又は間接的に相互作用することが可能である、たとえば、薬剤、ペプチド、ホルモン又は神経伝達物質のような化合物又は分子を指す。リガンドと相互作用する受容体は、細胞の表面に存在することができ、又は或いは細胞間受容体であることができる。リガンドの受容体との相互作用は、生化学的応答を生じることができ、又は単に物理的相互作用若しくは会合であることができる。リガンドの非限定例には、薬学上活性のある小分子、エンドソーム溶解剤、融合性ペプチド、細胞膜貫通剤、電荷遮蔽剤、及び核酸が挙げられる。リガンドのそのほかの非限定例には、ガラクトース、ガラクトサミン及びN - アセチルガラクトサミンのような糖及び炭水化物；エストロゲン、テストステロン、プロゲステロン、グルココルチゾン、アドレナリン、インスリン、グルカゴン、コルチゾール、ビタミンD、甲状腺ホルモン、レチノイン酸及び成長ホルモンのようなホルモン；VEGF、EGF、NGF及びPDGFのような増殖因子；コレステロール；胆汁酸；GABA、グルタミン酸塩、アセチルコリンのような神経伝達物質；NOGO；イノシトール三リン酸；ジアシルグリセロール；エピネフリン；ノルエピネフリン；ペプチド；葉酸塩、ピリドキシン及びビオチンのようなビタミン類、アセチルサリチル酸及びナプロキセンのような薬剤、抗体、並びに生体内又は試験管内で受容体と相互作用することができるそのほかの分子が挙げられる。リンカー分子、たとえば、アミド、カルボニル、エステル、ペプチド、ジスルフィド、シラン、ヌクレオシド、脱塩基ヌクレオシド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、炭水化物、脂質、ポリ炭化水素、リン酸エステル、ホスホルアミデート、トリホスフェート、アルキルホスフェート、又は光解離性のリンカーを用いてリガンドを本発明の化合物に連結することができる。一実施形態では、リンカーは生分解性リンカーである。切断に好適な条件には、pH、UV照射、酵素活性、温度、加水分解、排除、及び置換反応、及び結合の熱動態特性が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0259】

本明細書で使用されるとき、用語「脂質」は、親油性化合物を指す。脂質化合物の非限定例には、直鎖、分枝鎖、飽和及び不飽和の脂肪酸を含む脂肪酸及びその誘導体、カロテノイド、テルペン、胆汁酸、及びコレステロール及びその誘導体又は類似体を含むステロイドが挙げられる。

#### 【0260】

用語「脂質粒子」又は「脂質粒子組成物」は、独立して、又はカチオン性脂質、中性脂質、及び/又はポリエチレングリコール/ジアシルグリセロール抱合体（すなわち、ポリエチレングリコール/ジアシルグリセロール（PEG/DAG）、PEG/コレステロール又はPEG/DMB）との併用で、1以上の生物学的に活性のある分子を含む組成物を指す。製剤化された分子組成物はさらにコレステロール又はコレステロール誘導体を含むことができる。本発明のカチオン性脂質は、式I ~ VIのいずれかを有する化合物、塩化N, N - ジオレオイルN, N - ジメチルアンモニウム（DODAC）、臭化N, N - ジステアрил - N, N - ジメチルアンモニウム（DDAB）、塩化N - (1 - (2, 3 - ジオレオイルオキシ)プロピル)N, N, N - トリメチルアンモニウム（DOTAP）、塩化N - (1 - (2, 3 - ジオレオイルオキシ)プロピル)N, N, N - トリメチルアンモニウム（DOTMA）、N, N - ジメチル - 2, 3 - ジオレオイルオキシ)プロピルアミン（DODMA）、1, 2 - ジオレオイルオキシ - 3 - ジメチルアンモニウム - プロパン（DODAP）、1, 2 - ジオレオイルカルバミル - 3 - ジメチルアンモニウム - プロパン

(DOCDAP)、1,2-ジリネオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DLINDAP)、3-ジメチルアミノ-2-(コレスト-5-エン-3-ベータ-オキシブタン-4-オキシ)-1-(シス、シス-9,12-オクタデカジエンオキシ)プロパン(CLINDMA)、2-[5'- (コレスト-5-エン-3-ベータ-オキシ)-3'-オキサペントキシ)-3-ジメチル-1-(シス、シス-9',12'-オクタデカジエンオキシ)プロパン(CPLINDMA)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレオイルオキシベンジルアミン(DMOBA)及び/又はこれらの混合物を含むことができる。中性脂肪は、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、卵ホスファチジルコリン(EPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、コレステロール及び/又はこれらの混合物を含むことができる。PEG抱合体は、PEG-ジラウリルグリセロール(C12)、PEG-ジミリスチルグリセロール(C14)、PEG-ジパルミトイルグリセロール(C16)、PEG-ジステリルグリセロール(C18)、PEG-ジラウリルグリカミド(C12)、PEG-ジミリスチルグリカミド(C14)、PEG-ジパルミトイルグリカミド(C16)、PEG-ジステリルグリカミド(C18)、PEG-コレステロール又はPEG-DMBを含むことができる。カチオン性脂質成分は、製剤に存在する総脂質の約2%~約60%、約5%~約45%、約5%~約15%、又は約40%~約50%を構成することができる。中性脂質成分は、製剤に存在する総脂質の約5%~約90%、又は約20%~約85%を構成することができる。PEG-DAG抱合体(たとえば、ポリエチレングリコール/ジアシルグリセロール(PEG/DAG)、PEG/コレステロール又はPEG/DMB)は、製剤に存在する総脂質の約1%~約20%、又は約4%~約15%を構成することができる。コレステロール成分は、製剤に存在する総脂質の約10%~約60%、又は約20%~約45%を構成することができる。一実施形態では、本発明の製剤化された分子組成物は、製剤に存在する総脂質の約7.5%を構成するカチオン性脂質成分と、製剤に存在する総脂質の約82.5%を構成する中性脂質と、製剤に存在する総脂質の約10%を構成するPEG抱合体を含む。一実施形態では、本発明の製剤化された分子組成物は、生物学的に活性のある分子と、DODMAと、DSPCと、PEG/DAG抱合体を含む。一実施形態では、PEG/DAG抱合体は、PEG-ジラウリルグリセロール(C12)、PEG-ジミリスチルグリセロール(C14)、PEG-ジパルミトイルグリセロール(C16)、又はPEG-ジステリルグリセロール(C18)である。別の実施形態では、製剤化された分子組成物はまた、コレステロール又はコレステロール誘導体も含む。

#### 【0261】

「ナノ粒子」によって、その大きさがナノメートルで測定される顕微鏡的粒子を意味する。本発明のナノ粒子は通常、直径が約1~約999nmに及び、被包された又は内包された生物学的に活性のある分子を含むことができる。

#### 【0262】

「PEG」によって、ポリエチレングリコール又はそのほかのポリアルキレンエーテル又は同等のポリマーを意味する。

#### 【0263】

本明細書で使用されるとき、用語「短鎖干渉核酸」、「siRNA」、「短鎖干渉RNA」、「siRNA」、及び「短鎖干渉核酸分子」は、配列特異的にRNA干渉「RNAi」又は遺伝子サイレンシングが介在することによって遺伝子の発現又はウイルスの複製を阻害する又は下方調節することが可能である核酸分子を指す。たとえば、siRNAは、自己相補的なセンス及びアンチセンスの領域を含む二本鎖の核酸分子であることができ、アンチセンス領域は、標的核酸分子又はその一部のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列又はその一部に相当するヌクレオチド配列を有する。siRNAは2つの別々のオリゴヌクレオチドから組み立てることができる。一方の鎖はセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖であり、その際、アンチセンス鎖とセンス鎖は自己相補的である(すなわち、各鎖は、他方の鎖のヌクレオチド配列に

相補的である鎖を含み；たとえば、アンチセンス鎖とセンス鎖が、二重鎖構造又は二本鎖構造を形成する場合、たとえば、二本鎖領域は、約15～約30、たとえば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28又は30の塩基対であり；アンチセンス領域は、標的核酸分子又はその一部のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列又はその一部に相当するヌクレオチド配列を含む（たとえば、*siRNA*分子の約15～約25以上のヌクレオチドが標的核酸又はその一部に相補的である）。或いは、*siRNA*は、単一のオリゴヌクレオチドから組み立てられ、*siRNA*の自己相補的なセンス及びアンチセンスの領域は核酸に基づいた又は核酸に基づかないリンカーによって連結される。*siNA*は、自己相補的なセンス及びアンチセンスの領域を有する、二本鎖、非対称二本鎖、ヘアピン、又は非対称のヘアピン二次構造を持つポリヌクレオチドであることができ、アンチセンス領域は、標的核酸分子又はその一部のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列又はその一部に相当するヌクレオチド配列を有する。*siNA*は、2以上のループ構造と、自己相補的なセンス及びアンチセンスの領域を含む幹を有する環状の単鎖ポリヌクレオチドであることができ、アンチセンス領域は、標的核酸分子又はその一部のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列又はその一部に相当するヌクレオチド配列を有し、環状ポリヌクレオチドは生体内又は試験管内のいずれかで処理されて*RNAi*に介在することが可能である活性のある*siNA*分子を生成することができる。*siNA*もまた、標的核酸分子又はその一部のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を有する単鎖ポリヌクレオチドを含むことができ（たとえば、そのような*siNA*分子は、標的核酸配列又はその一部に相当するヌクレオチド配列の*siNA*分子の中での存在を必要としない）、単鎖ポリヌクレオチドはさらに、たとえば、5'-リン酸（たとえば、Martinez et al., 2002, Cell., 110, 563-574 and Schwarz et al., 2002, Molecular Cell, 10, 537-568を参照）又は5', 3'-二リン酸のような末端リン酸基を含むことができる。特定の実施形態では、本発明の*siNA*分子は、別々のセンス及びアンチセンスの配列又は領域を含み、センス及びアンチセンスの領域は、当該技術で既知のように、ヌクレオチド又は非ヌクレオチドのリンカーによって共有結合し、又は代わりに、イオン相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用及び/又はスタッキング相互作用によって非共有結合する。特定の実施形態では、本発明の*siNA*分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。別の実施形態では、本発明の*siNA*分子は、標的遺伝子の発現の阻害を引き起こす方式で標的遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用する。本明細書で使用されるとき、*siNA*分子は、*RNA*のみを含有する分子に限定される必要はないが、さらに、化学的に修飾されたヌクレオチド及び非ヌクレオチドをさらに包含する。特定の実施形態では、本発明の短鎖干渉核酸分子は、2'-ヒドロキシ（2'-OH）含有のヌクレオチドを欠く。出願者は、特定の実施形態で、*RNAi*に介在するのに2'-ヒドロキシ基を有するヌクレオチドの存在を必要としない短鎖干渉核酸を記載し、本発明の短鎖干渉核酸分子は、リボヌクレオチド（たとえば、2'-OH基を有するヌクレオチド）を任意で含まない。しかしながら、*RNAi*を支援するのに*siNA*分子の中でリボヌクレオチドの存在を必要としないそのような*siNA*分子は、2'-OH基を持つ1以上のヌクレオチドを含有する、連結されたリンカー（単数）又はリンカー（複数）又はそのほかの連結された又は関連する基、部分又は鎖を有する。任意で、*siNA*分子は、ヌクレオチドの位置の約5、10、20、30、40、又は50%でリボヌクレオチドを含むことができる。本発明の修飾された短鎖干渉核酸分子はまた、短鎖干渉修飾オリゴヌクレオチドと呼ぶこともできる。本明細書で使用されるとき、用語、*siNA*は、配列特異的な*RNAi*に介在することが可能である核酸分子を記載するのに使用されるそのほかの用語、たとえば、短鎖干渉*RNA*（*siRNA*）、二本鎖*RNA*（*dsRNA*）、微小*RNA*（*miRNA*）、短鎖ヘアピン*RNA*（*shRNA*）、短鎖干渉オリゴヌクレオチド、短鎖干渉核酸、短鎖干渉修飾オリゴヌクレオチド、化学修飾*siRNA*、転写後遺伝子サイレンシング*RNA*（*ptgsRNA*）、及びそのほかに同等であることを

10

20

30

40

50

意味する。本発明の s i N A 分子の非限定例は、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、2005年9月23日に出願された U S S N 1 1 / 2 3 4 , 7 3 0 に示されている。そのような s i N A 分子は、遺伝子発現の阻害に介在する当該技術で既知のそのほかの核酸技法、たとえば、リボザイム、アンチセンス、三本鎖形成、アプタマー、2 , 5 - A キメラ又はデコイオリゴヌクレオチドからは識別可能である。

#### 【0264】

本明細書で使用されるとき、「標的」によって、標的遺伝子によってコードされる任意の標的タンパク質、ペプチド、又はポリペプチドを意味する。用語「標的」はまた、たとえば、標的 R N A によってコードされる標的活性を有する標的タンパク質、ペプチド又はポリペプチドをコードする核酸配列も指す。用語「標的」はまた、そのほかの標的をコードする配列、たとえば、そのほかの標的アイソフォーム、変異標的遺伝子、標的遺伝子のスプライシング変異体、及び標的遺伝子の多型も含むことにする。

#### 医薬組成物

#### 【0265】

本発明の化合物は、従来の非毒性の薬学上許容可能なキャリア、アジュバント及びビヒクルを含有する投与単位製剤にて、経口で、局所に、非経口で、吸入又は噴霧によって、又は直腸に投与されてもよい。本明細書で使用されるとき、用語、非経口には、経皮、皮下、血管内（たとえば、静脈内）、筋肉内、又はクモ膜下の注射又は注入の技法などが含まれる。さらに、本発明の化合物と薬学上許容可能なキャリアを含む医薬製剤が提供される。本発明の1以上の化合物が、1以上の非毒性の薬学上許容可能なキャリア及び/又は希釈剤及び/又はアジュバント、及び所望であれば、そのほかの有効成分と共に存在してもよい。本発明の化合物を含有する医薬組成物は、たとえば、錠剤、トローチ、甘味錠剤、水性懸濁液又は油性懸濁液、分散可能な粉剤又は顆粒剤、エマルション、硬質又は軟質のカプセル、又はシロップ又はエリキシルとして経口使用の好適な形態であってもよい。

#### 【0266】

経口使用を意図される組成物は、医薬組成物製造の技術で既知の方法に従って調製されてもよく、そのような組成物は、薬学上洗練され、口に合う製剤を提供するために甘味剤、風味剤、着色剤及び保存剤から成る群から選択される1以上の剤を含有してもよい。錠剤は、錠剤の製造に好適である薬学上許容可能な賦形剤と混合して有効成分を含有する。それらの賦形剤は、たとえば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム又はリン酸ナトリウムのような不活性希釈剤；たとえば、コーンスターチ、又はアルギン酸のような造粒剤及び崩壊剤；たとえば、デンプン、ゼラチン又はアカシアのような結合剤；及びたとえば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸又はタルクのような潤滑剤であってもよい。錠剤は、非被覆であってもよく、又は既知の技法で被覆されてもよい。場合によっては、既知の技法によってそのようなコーティングを調製して消化管における崩壊及び吸収を遅らせ、それによってさらに長い期間持続する作用を提供してもよい。たとえば、モノステアリン酸グリセリル又はジステアリン酸グリセリルのような遅延用物質を採用してもよい。

#### 【0267】

経口使用のための製剤は、硬質ゼラチンカプセルとしても提示されてもよく、その際、有効成分は、たとえば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム又はカオリンのような不活性固体希釈剤と混合してもよく、又は軟質ゼラチンカプセルとして提示されてもよく、その際、有効成分は、水、又はたとえば、ピーナッツ油、流動パラフィン又はオリーブ油と混合される。

#### 【0268】

経口使用のための製剤はまた、甘味錠剤として提示されてもよい。

#### 【0269】

水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に好適な賦形剤との混合で有効物質を含有する。そのような賦形剤は、たとえば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピル - メチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリド

ン、ゴムトラガカント及びアラビアゴムのような懸濁剤であり；分散剤又は湿潤剤は、天然に存在するホスファチド、たとえば、レシチン、又は脂肪酸による酸化アルキレンの縮合生成物、たとえば、ステアリン酸ポリオキシエチレン、又は長鎖脂肪族アルコールによる酸化エチレンの縮合生成物、たとえば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、又は脂肪酸に由来する部分エステルとモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビトールのようなヘキシトールによる酸化エチレンの縮合生成物、又は脂肪酸に由来する部分エステルと無水ヘキシトールによる酸化エチレンの縮合生成物、たとえば、モノオレイン酸ポリエチレンソルビタンであってもよい。水性懸濁液は、1以上の保存剤、たとえば、p - ヒドロキシ安息香酸エチル又はn - プロピル、1以上の着色剤、1以上の風味剤、及び1以上の甘味剤、たとえば、スクロース又はサッカリンも含有してもよい。

10

#### 【0270】

油性懸濁液は、植物油、たとえば、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油、ココナッツ油、又は流動パラフィンのような鉱物油に有効成分を懸濁することによって製剤化されてもよい。油性懸濁液は、たとえば、蜜蝋、硬質パラフィン又はセチルアルコールのような増粘剤を含有してもよい。甘味剤及び風味剤を加えて口に合う経口製剤を提供してもよい。これらの組成物は、たとえば、アスコルビン酸のような抗酸化剤の添加によって保存されてもよい。

#### 【0271】

水の添加による水性懸濁液の調製に好適な分散可能な粉剤及び顆粒剤は、分散剤又は湿潤剤、懸濁剤及び1以上の保存剤との混合で有効成分を提供する。好適な分散剤又は湿潤剤、又は懸濁剤は、すでに上述されたものによって例示される。追加の賦形剤、たとえば、甘味剤、風味剤及び着色剤も存在してもよい。

20

#### 【0272】

本発明の医薬組成物はまた、水中油エマルションの形態であってもよい。油相は、植物油又は鉱物油又はこれらの混合物であってもよい。好適な乳化剤は、天然に存在するゴム、たとえば、アラビアゴム又はゴムトラガカント、天然に存在するホスファチド、たとえば、大豆、レシチン、及び脂肪酸に由来するエステル又は部分エステル、及びヘキシトール、無水物、たとえば、モノオレイン酸ソルビタン、及び酸化エチレンによる前記部分エステルの縮合生成物、たとえば、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンであってもよい。エマルションは甘味剤及び風味剤も含有してもよい。

30

#### 【0273】

シロップ及びエリキシルは、甘味剤、たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、グルコース又はスクロースと共に製剤化されてもよい。そのような製剤はまた緩和薬、保存剤及び風味剤及び着色剤を含有してもよい。医薬組成物は、無菌の注射用の水性懸濁液又は油質の懸濁液の形態であってもよい。この懸濁液は、上記で言及された好適な分散剤又は湿潤剤及び懸濁剤を用いて当該技術に従って製剤化されてもよい。無菌の注射用製剤はまた、非毒性の非経口で許容可能な希釈剤又は溶媒における無菌の注射用の溶液又は懸濁液、たとえば、1, 3 - ブタンジオールの溶液であってもよい。採用されてもよい許容可能なビヒクル及び溶液には、水、リンガー溶液及び等張の塩化ナトリウム溶液がある。加えて、無菌の不揮発性油は溶媒又は懸濁媒体として好都合に採用される。この目的で、合成のモノ又はジ - グリセリドを含むどのような銘柄の不揮発性油が採用されてもよい。加えて、オレイン酸のような脂肪酸は、注射用製剤で使用される。

40

#### 【0274】

本発明の化合物は、たとえば、薬物の直腸投与のための座薬の形態で投与されてもよい。これらの組成物は、常温では固体であるが、直腸温では液体であるので直腸で溶解して薬剤を放出する好適な非刺激性の賦形剤と薬剤を混合することによって調製することができる。そのような物質には、カカオバター及びポリエチレングリコールが挙げられる。

#### 【0275】

本発明の化合物は無菌の媒体中で非経口にて投与されてもよい。薬剤は、使用されるビヒクル及び濃度によってビヒクルに懸濁することができ、又は溶解することができる。有

50

利なことに、局所麻酔剤、保存剤及び緩衝剤のようなアジュバントをビヒクルに溶解することができる。

【0276】

眼又は、たとえば、口及び皮膚のようなそのほかの外側組織の障害については、たとえば、総量で0.075～30%w/w、好ましくは0.2～20%w/w及び最も好ましくは0.4～15%w/wにて有効成分を含有する局所ジェル、スプレー、軟膏又はクリーム又は座薬として製剤を好ましく適用することができる。軟膏に製剤化される場合、パラフィン基剤又は水混和性の軟膏基剤と共に有効成分を用いてもよい。

【0277】

或いは、有効成分は、水中油のクリーム基剤にてクリームに製剤化されてもよい。所望であれば、クリーム基剤の水性相は、たとえば、少なくとも30%の、たとえば、プロピレングリコール、ブタン-1,3-ジオール、マンニトール、ソルビトール、グリセロール、ポリエチレングリコール及びそれらの混合物のような多価のアルコールを含んでもよい。局所製剤は望ましくは、皮膚又はそのほかの冒された領域を介した有効成分の吸収又は貫通を高める化合物を含んでもよい。そのような皮膚貫通増強剤には、ジメチルスルホキシド及び関連する類似体が挙げられる。本発明の化合物はまた、経皮用具によって投与されてもよい。好ましくは、リザーバ及び多孔性膜のタイプ又は固体マトリクス変異体のいずれかの貼付剤を用いて局所投与が達成される。いずれかの場合において、膜を介してリザーバ又は微小カプセルから、受入者の皮膚又は粘膜に接触する活性剤透過粘着剤に活性剤が連続的に送達される。活性剤が皮膚を介して吸収されるのであれば、制御された又は所定の流量の活性剤が受入者に投与される。微小カプセルの場合、被包剤が膜として機能してもよい。経皮貼付剤には、たとえば、アクリル系エマルジョン及びポリエステル貼付剤のような粘着剤系を伴った好適な溶媒系にて化合物が含まれてもよい。本発明のエマルジョンの油性相は、既知の方法で既知の成分から構成されてもよい。相が単に乳化剤を含んでもよい一方で、相は、少なくとも1つの乳化剤の脂肪又は油又は脂肪と油の双方との混合物を含んでもよい。好ましくは、親水性の乳化剤が、安定剤として作用する親油性の乳化剤と一緒に含まれる。油と脂肪の双方を含むことも好ましい。一緒に、安定剤の存在下又は非存在下の乳化剤がいわゆる乳化ワックスを構成し、ワックスは油及び脂肪と一緒に、クリーム製剤の油性分散相を形成するいわゆる乳化軟膏基剤を構成する。本発明の製剤での使用に好適な乳化剤及び乳化安定剤には、とりわけ、Tween 60、Span 80、セトステアリルアルコール、ミリスチルアルコール、モノステアリン酸グリセリル、及びラウリル硫酸ナトリウムが挙げられる。医薬エマルジョン製剤で使用されそうなほとんどの油における活性化合物の溶解性が非常に低いので、製剤に好適な油又は脂肪の選択は、所望の化粧品特性を達成することに基づく。従って、クリームは好ましくは、チューブ又はそのほかの容器からの漏出を回避する好適な一貫性を持つベタベタしない、着色性ではない、洗い落としのできる製品であるべきである。直鎖の又は分枝鎖のモノ-又はジ-塩基アルキルエステル、たとえば、ジ-イソアジペート、ステアリン酸イソセチル、ココナッツ脂肪酸のプロピレングリコールエステル、ミリスチン酸イソプロピル、オレイン酸デシル、パルミチン酸イソプロピル、ステアリン酸ブチル、パルミチン酸2-エチルヘキシル、又は分枝鎖エステルの混合物を使用してもよい。これらは、必要とされる特性によって、単独で使用してもよいし、組み合わせて使用してもよい。或いは、たとえば、白色軟質パラフィン及び/又は流動パラフィン又はそのほかの鉱物油のような低融点脂質を使用することができる。

【0278】

眼への局所投与に好適な製剤には、有効成分に好適なキャリア、特に水性溶媒に有効成分が溶解される又は懸濁される点眼剤も挙げられる。そのような製剤には、0.5～20%、有利には0.5～10%、及び特に約1.5%w/wの濃度で抗炎症性の有効成分が好ましく存在する。治療目的で、本発明の活性化合物は、投与の指示された経路に適当な1以上のアジュバントと通常組み合わせられる。経口で投与されるのであれば、化合物は、ラクトース、スクロース、デンプン粉、アルカン酸のセルロースエステル、セルロース

10

20

30

40

50

アルキルエステル、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、酸化マグネシウム、リン酸及び硫酸のナトリウム塩及びカルシウム塩、ゼラチン、アカシアゴム、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、及び／又はポリビニルアルコールと共に混合され、次いで好都合な投与のために錠剤化又はカプセル化されてもよい。そのようなカプセル又は錠剤は、ヒドロキシプロピルメチルセルロースにおける活性化合物の分散物で提供されてもよいように、制御放出製剤を含有してもよい。非経口投与のための製剤は、水性の又は非水性の等張で無菌の注射用の溶液又は懸濁液の形態であってもよい。これらの溶液又は懸濁液は、経口投与用の製剤での使用で言及された１以上のキャリア又は希釈剤を有する無菌の粉体又は顆粒から調製されてもよい。化合物は、水、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、エタノール、コーン油、綿実油、ピーナッツ油、ゴマ油、ベンジルアルコール、塩化ナトリウム及び／又は種々の緩衝液に溶解されてもよい。そのほかのアジュバント及び投与方式は、医薬技術で周知であり、広く知られている。

10

#### 【 0 2 7 9 】

体重のキログラム当たり、１日当たり約 0 . 1 m g ~ 約 1 4 0 m g の常態の投与量レベルが上記で指示された状態の治療に有用である（１日当たり患者当たり約 0 . 5 m g ~ 約 7 m g ）。キャリア物質と組み合わせて単回投与形態を生じる有効成分の量は、治療される宿主及び特定の投与方式によって変化する。投与単位形態は一般に約 1 m g ~ 約 5 0 0 m g の間の有効成分を含有する。１日の用量を１日当たり 1 ~ 4 回の投与で投与することができる。皮膚症状の場合、本発明の化合物の局所用製剤を１日 2 ~ 4 回塗布された領域に塗布することが好ましくてもよい。

20

#### 【 0 2 8 0 】

しかしながら、特定の患者に対する特定の用量レベルは、採用される特定の化合物、年齢、体重、全身状態、性別、食事、投与時間、投与経路及び排泄率、薬剤の併用、及び治療を受ける特定の疾患の重症度を含む種々の因子によって左右されることが理解されるであろう。

一般的な手順

#### 【 0 2 8 1 】

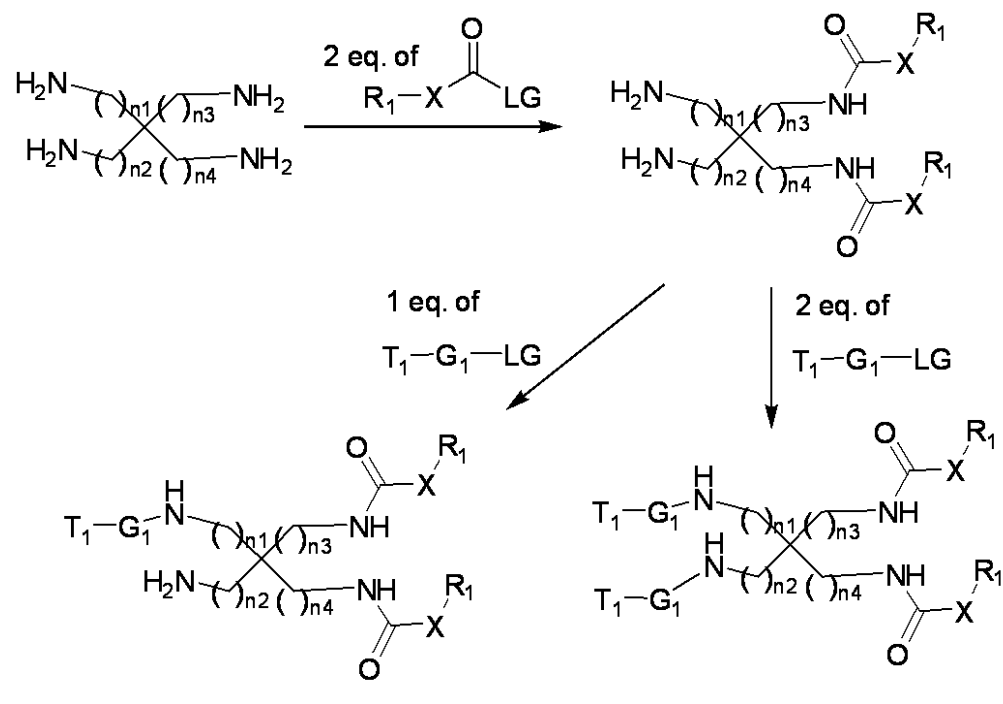
本発明の化合物の調製のための代表的な合成手順を以下のスキームにて以下で概略する。当業者は、出発物質及び反応条件が変化してもよく、反応の順序が変わってもよく、追加の工程を採用して所望の化合物を生成してもよいことを認識するであろう。場合によっては、上記形質転換の一部を達成するのに特定の反応性官能性の保護が必要であってもよい。一般に、そのような保護基の必要性は、そのような基を結合し、取り外すのに必要とされる条件と共に、有機合成の当業者には明らかであろう。

30

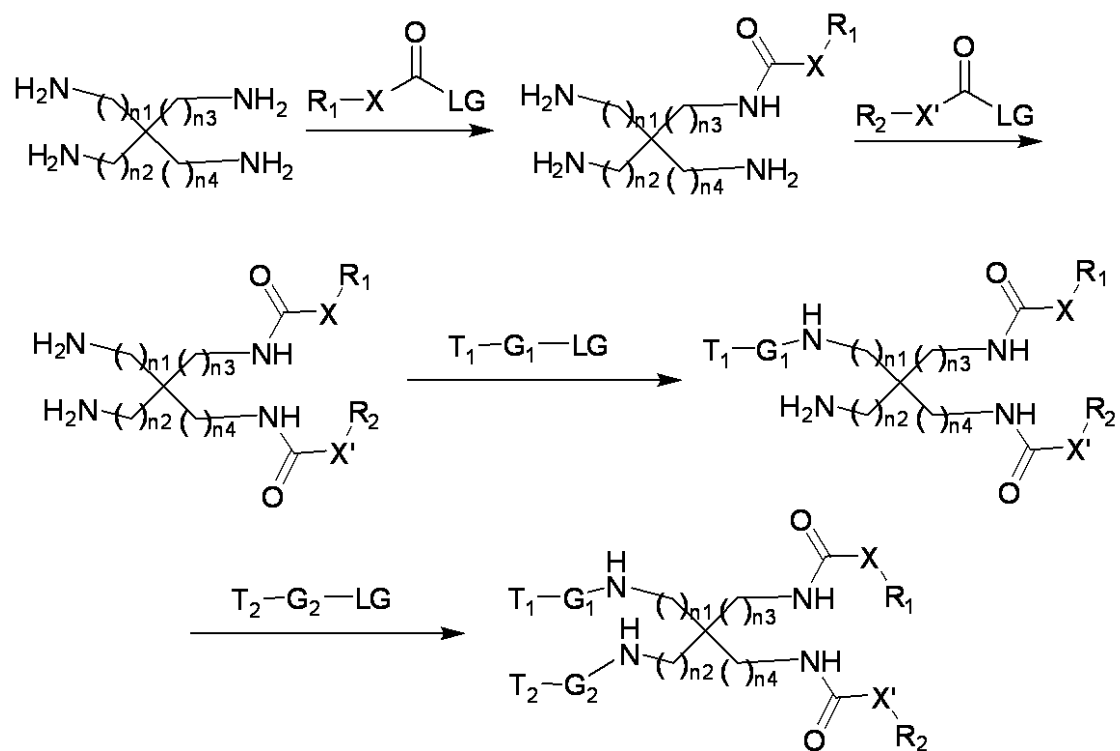
#### 【 0 2 8 2 】

特に指示されない限り、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $X$ 、 $X'$ 、 $G$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ 、 $T$ 、 $T_1$ 、 $T_2$ 、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$  及び  $n_4$  は、式 I ~ V I と関連して上記で言及された定義を持つ。 $LG$  は、ハロゲン、トルエンスルホニル、メタンスルホニル、トリフルオロメタンスルホニル、2, 2, 2 - トリフルオロエトキシ、 $N$  - ヒドロキシスクシンイミジルなどを含むが、これらに限定されない脱離基を表す。

スキーム 1

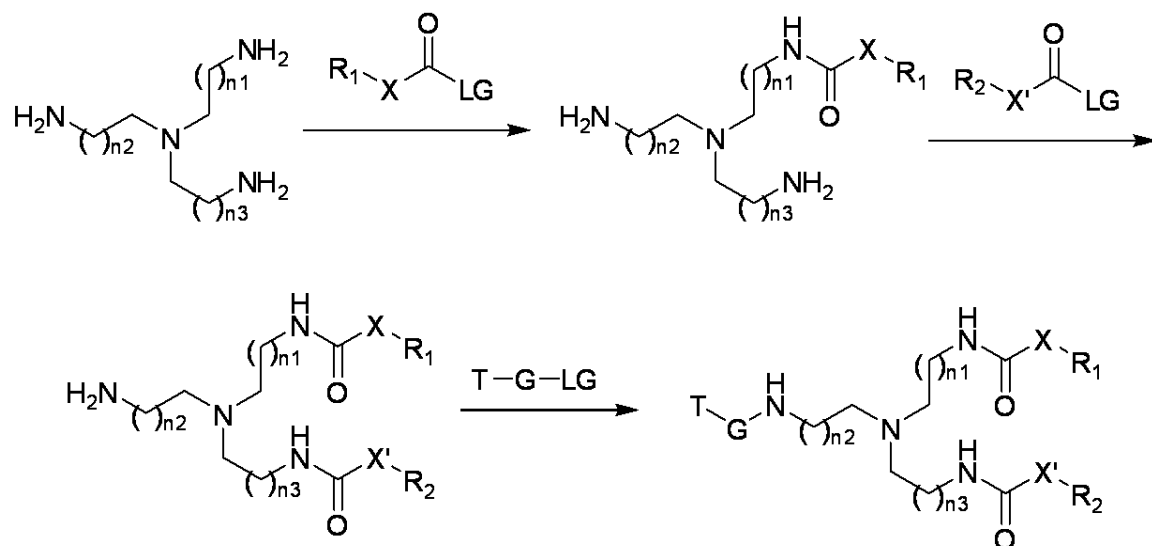


スキーム 2

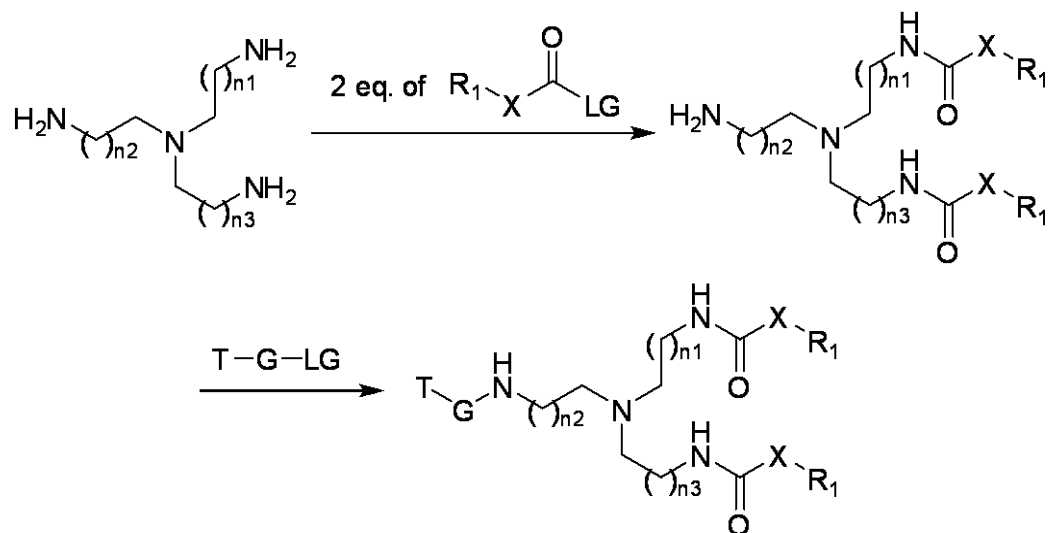




スキーム 3



スキーム 4



【 0 2 8 3 】

## 实施例

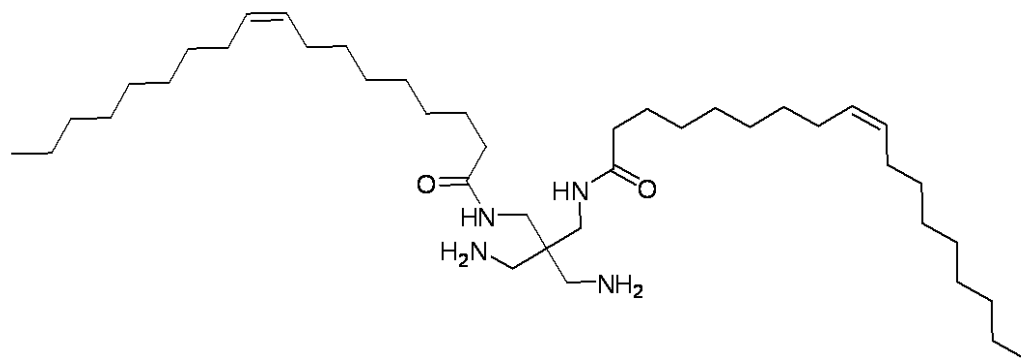
本発明の化合物の調製を以下の実施例によってさらに説明するが、それは、そこで記載される特定の手順及び化合物に、範囲又は精神において本発明を限定するとは解釈されるべきではない。本発明の化合物を合成する代表的な方法を以下に提示する。所望の標的化合物に必要とされる置換基の性質が合成の好ましい方法を決定することが理解される。

【 0 2 8 4 】

## 实施例 1

N, N' - ジオレオイルテトラキス (アミノメチル) メタン (「ジオレオイルクロスアミン」) の合成

## 【化 20】



10

ジオレオイルクロスアミン (1)

既知の手順 (Adil, K. et al., Solid State Sciences, 6 (2004), 1229-1235) によってテトラキス (アミノメチル) メタンを調製する。50 mL のフラスコに還流コンデンサと磁気攪拌器を装備する。四塩化テトラキス (アミノメチル) メタン (800 mg、2.88 ミリモル) とメタノール (10 mL) と NaOMe / MeOH 溶液 (5.457 M を 2.10 g、11.50 ミリモル) をフラスコに充填する。混合物を攪拌し、4 時間還流し、次いで冷却する。無機塩からメタノール溶液を静かに捨て、塩を無水エタノールに再懸濁する。懸濁液を遠心し、合わせた有機物を真空中で濃縮する。残留物を塩化メチレン (15 mL) に溶解し、残りの無機塩からシリンジ (0.45 ミクロンのフィルター) を用いて濾過する。濾液の濃縮によって白色の半固形物質として定量的収率にて遊離のテトラキス (アミノメチル) メタンを得る (残りのアルコールは NMR によって概算する)。NMR (D<sub>2</sub>O) 2.9 (s, CH<sub>2</sub>)。

20

## 【0285】

得られたテトラキス (アミノメチル) メタン (420 mg、純度 90%、2.86 ミリモル) を無水エタノール (15 mL) に溶解し、トリフルオロ酢酸 (400 mg、3.50 ミリモル) を加え、その後、2, 2, 2 - トリフルオロエチルオレート (2.08 g、5.72 ミリモル) [下記参照、実施例 3] を加える。均質な混合物を室温にて 72 時間反応させ、真空中で濃縮する。残留物を MeOH / 水 (10%) / トリフルオロ酢酸 (0.1%) (40 mL) に溶解し、トリフルオロ酢酸で pH を約 pH 2 に調整する。MeOH / 水 (10%) / トリフルオロ酢酸 (0.1%) を溶離液として用いて C-8 改変シリカでのクロマトグラフィによって残留物を精製する。ビストリフルオロ酢酸塩 (0.9 g) として N, N' - ジオレオイルテトラキス (アミノメチル) メタン (「ジオレオイルクロスアミン」) を単離する。MS (TFA 塩) 661 [M + 1]; NMR (CDCl<sub>3</sub>) 8.5 (br, 6H), 8.05 (br, 2H), 5.37 (m, 4H), 3.07 及び 2.95 (解像力弱く、各 4H); 2.15 (t, 4H), 2.01 (m, 8H), 1.35 (m, 48H), 0.9 (t, 6H)。

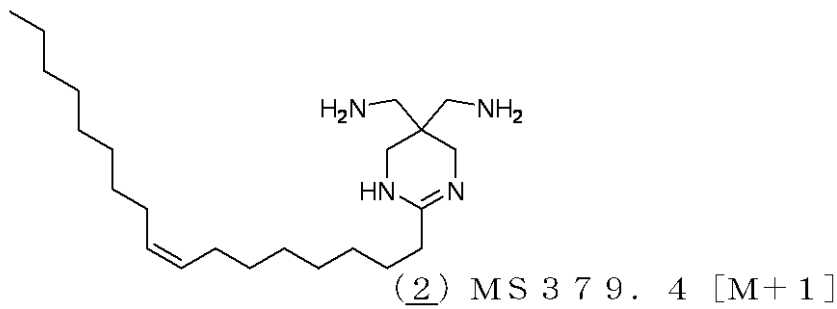
30

## 【0286】

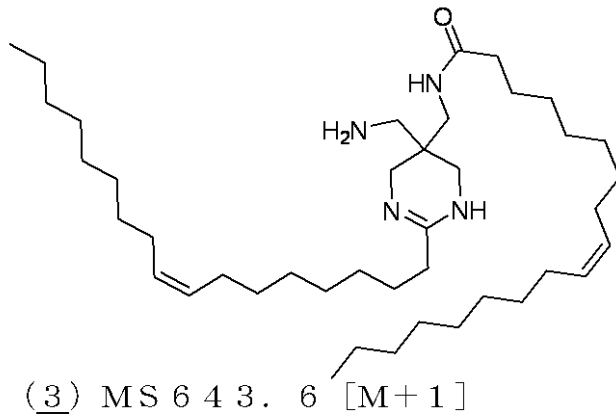
反応を高い pH (たとえば、トリフルオロ酢酸の非存在下、又は NaOMe の存在下) のもとで行うと、副産物量の 2、3、及び 4 が生成されるが、それらは容易に取り除くことができる (たとえば、クロマトグラフィ)。

40

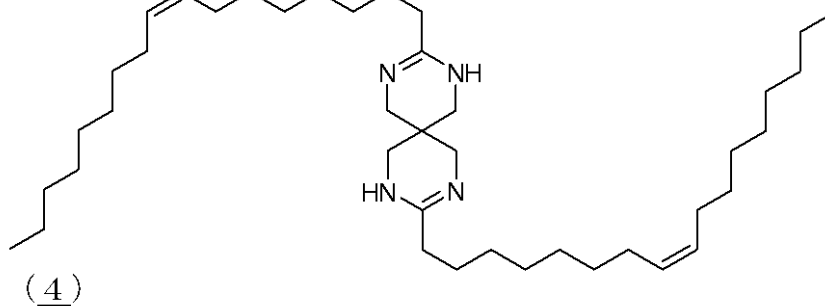
## 【化 2 1】



10



20



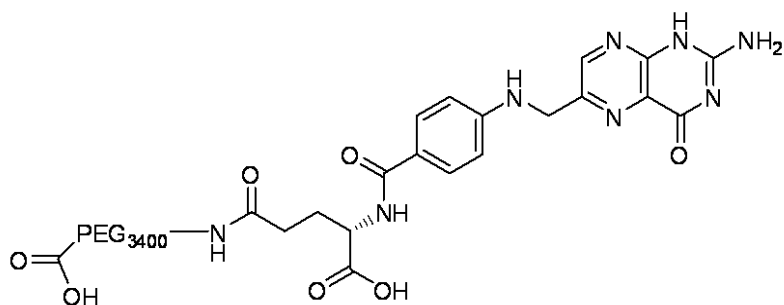
30

## 【 0 2 8 7】

## 実施例 2

## 2.1. 葉酸 - PEG 3400 - COOH

## 【化 2 2】



40

170 mg の  $H_2N$ -PEG3400-COOH (Laysan により製造された) を DMSO (2 mL) と無水クロロホルム (2 mL) に溶解する。ヒューニツヒの塩基 (15  $\mu$ L) を加え、その後葉酸 - NHS エステル (60 mg、既知の手順、Lee, R. J.; Low, P. S.; "Methods in Molecular Medicine", 25, 69-76, April 2000 によって調製された) を加えた。さらなる 80 mg の葉酸 - NHS を DMSO の溶液 (2.5 mL) として加える。攪拌した混合物を室温で 24 時間保持し、真空でクロロホルムを取り除き、残

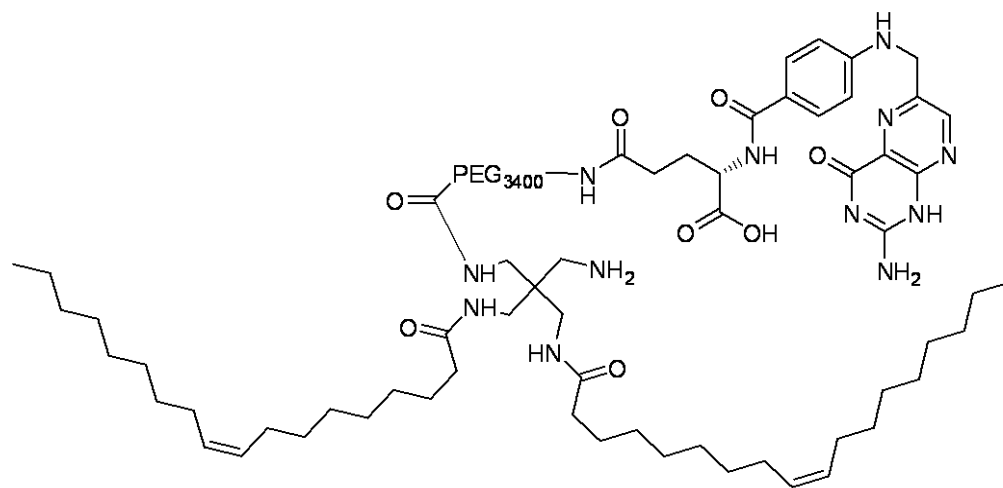
50

留物を脱イオン水（60 mL）で希釈する。3500 Dカットオフ膜を用いて、数滴の TFA で pH 2 ~ 3 にした脱イオン水に対して、得られた均質な黄色の溶液を透析する。透析槽を 6 回交換した後、黄色の溶液を回収し、真空で濃縮して葉酸 - PEG 3400 - COOH を得る。

【0288】

2.2. 「葉酸 - PEG - ジオレオイルクロスアミン」(5) を得るための葉酸 - PEG 3400 - COOH とのカップリング

【化23】



葉酸 - PEG - ジオレオイルクロスアミン (5)

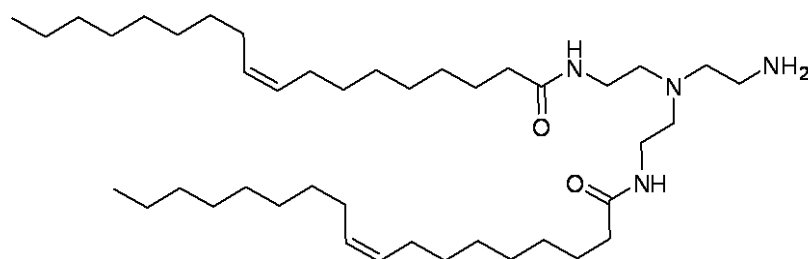
150 mg の葉酸 - PEG 3400 - COOH を無水 DMSO (2 mL) に溶解し、NHS (9 mg) を加え、次いで DCC (16 mg) を加える。混合物を暗所にて 20 時間反応させ、葉酸 - PEG 3400 - COONHS を得る。この溶液に、無水 DMSO (2 mL) 中 30 mg の N, N' - ジオレオイルテトラキス (アミノメチル) メタンを加える。反応混合物を 24 時間反応させた後、脱イオン水 (60 mL) でそれを希釈する。3500 D のカットオフバッグを用いて脱イオン水に対して、得られた均質の黄色の溶液を透析することによって、未反応の葉酸 - PEG 3400 - COOH との約 50 % の混合物として葉酸ペグ化 N, N' - ジオレオイルテトラキス (アミノメチル) メタン (「葉酸 - PEG - ジオレオイルクロスアミン」) を得る。

【0289】

実施例 3

N, N' - ジオレオイルトリス (アミノエチル) アミン (「ジオレオイルモノアミン」) (6) の合成

【化24】



「ジオレオイルモノアミン」(6)

塩化オレオイル (75 g、250 ミリモル) を、2, 2, 2 - トリフルオロエタノール (60 g、600 ミリモル) と共に還流にて 16 時間加熱した。HCl の放出が止まった

後、真空で過剰のトリフルオロエタノールを除く。残留物の真空蒸留によって、無色の液体として 87.6 g のオレイン酸 2, 2, 2 - トリフルオロエチル、沸点 150 / 0.3 を得る。

【0290】

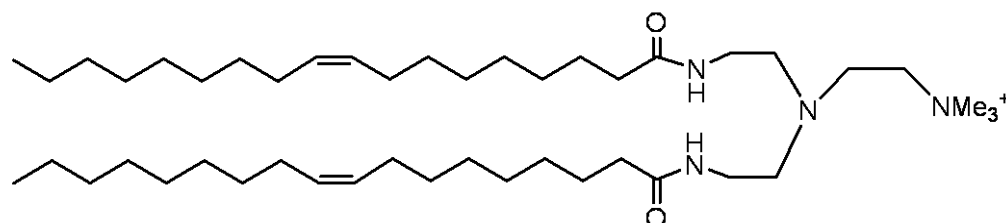
トリス(2 - アミノエチル)アミン(1.45 g、10ミリモル)を 20 mL のエタノールに溶解する。この溶液にオレイン酸 2, 2, 2 - トリフルオロエチル(5.6 g)を加え、反応混合物を 24 時間還流する。真空で混合物を濃縮し、トリフルオロ酢酸(TFA)によって pH 2 ~ 3 に酸性化する。C8 シリカにおけるこの溶液の逆相クロマトグラフィ(溶離液: 89.9% アセトニトリル / 10% 水 / 0.1% TFA)によってそのトリフルオロ酢酸塩として 1.8 g の N, N' - ジオレオイルトリス(アミノエチル)アミン(「ジオレオイルモノアミン」)を得る。MS(TFA 塩) 675 [M + 1]; NMR(CDCl<sub>3</sub>) 7.4 (br, 2H), 5.37 (m, 4H), 3.55, 3.37 及び 3.05 (解像度弱く、すべて 12H), 2.15 (t, 4H), 2.01 (m, 8H), 1.35 (m, 48H), 0.9 (t, 6H)。

【0291】

実施例 3 A

メチル - ジオレオイルモノアミン(6.1)の調製

【化25】



メチル - ジオレオイルモノアミン(6.1)

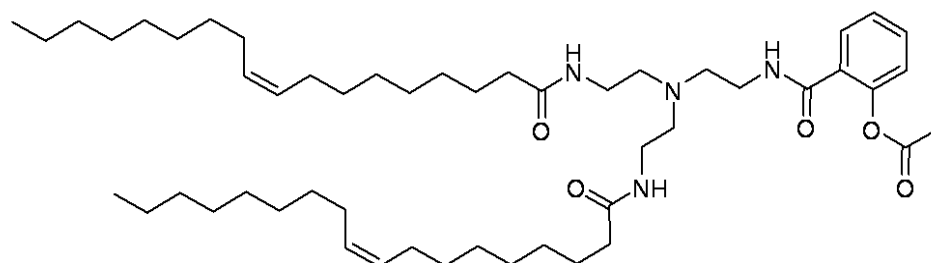
過剰のヨードメタンによる N, N' - ジオレオイルトリス(アミノエチル)アミン(「ジオレオイルモノアミン」)のメチル化によって表題の化合物を調製する。

【0292】

実施例 4

N, N' - ジオレオイル N'' - アセチルサリチロイルトリス(アミノエチル)アミン(7)の合成

【化26】



(7)

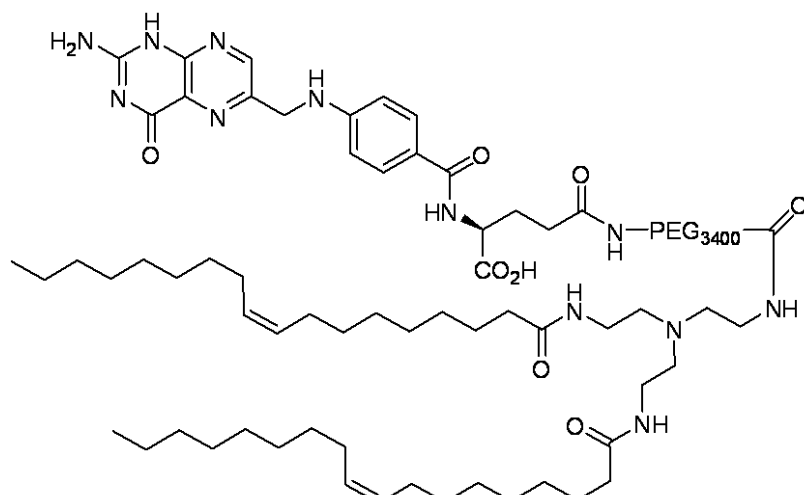
トリフルオロ酢酸 N, N' - ジオレオイルトリス(アミノエチル)アミン(80 mg、100 マイクロモル)を 5 mL のクロロホルムに溶解し、3 mL の 10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液で処理する。有機相を分離し、乾燥させ、真空にて濃縮して遊離の塩基として N, N' - ジオレオイルトリス(アミノエチル)アミンを得る。この物質を 3 mL の無水クロロホルムに溶解し、溶液を塩化アセチルサリチロイル(20 mg、100 マイクロモル)で処理することによって表題の化合物を得る。

## 【 0 2 9 3 】

## 実施例 5

「葉酸 - P E G - ジオレオイルモノアミン」( 8 )を得るための葉酸 - P E G 3 4 0 0 - C O O Hとのカップリング

## 【化 2 7】



葉酸 - P E G - ジオレオイルモノアミン ( 8 )

実施例 2 に記載されたように、葉酸 - P E G 3 4 0 0 - C O O H とジオレオイルモノアミンから葉酸 - ジオレオイルモノアミンが原則的に得られる。

## 【 0 2 9 4 】

## 実施例 6

s i R N A とのジオレオイルクロスアミンの複合体；ナノ粒子の形成

使用する s i R N A は、内因性の血管内皮増殖因子 ( V E G F ) の転写物及びタンパク質のレベルでのノックダウンを生じること意図したヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質はジオレオイルクロスアミンである。s i R N A ( 3 m g / m L ) とジオレオイルクロスアミン ( 5 m g / m L ) の溶液を注射用水にて別々に調製し、その後、s i R N A については 0 . 3 m g / m L に、ジオレオイルクロスアミンについては 1 . 5 m g / m L に 5 % デキストロースで希釈する。マイクロピペットを用いて s i R N A のデキストロース溶液をジオレオイルクロスアミンのデキストロース溶液に加え、5 : 1 ( 正 : 負 ) の電荷比とする。製剤を室温にて 1 5 分間インキュベートして複合体を形成させる。

## 【 0 2 9 5 】

## 実施例 7

D N A とのジオレオイルクロスアミンの複合体；ナノ粒子の形成

使用する核酸は、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミド D N A である。使用するカチオン性脂質はジオレオイルクロスアミンである。プラスミド D N A ( 3 m g / m L ) とジオレオイルクロスアミン ( 5 m g / m L ) の溶液を注射用水にて別々に調製し、その後、プラスミド D N A については 0 . 3 m g / m L に、ジオレオイルクロスアミンについては 1 . 5 m g / m L に 5 % デキストロースで希釈する。マイクロピペットを用いてプラスミド D N A のデキストロース溶液をジオレオイルクロスアミンのデキストロース溶液に加え、5 : 1 ( 正 : 負 ) の電荷比とする。製剤を室温にて 1 5 分間インキュベートして複合体を形成させる。

## 【 0 2 9 6 】

## 実施例 8

s i R N A との葉酸 - P E G - ジオレオイルクロスアミンの複合体

使用する s i R N A は、内因性の血管内皮増殖因子 ( V E G F ) の転写物及びタンパク

質のレベルでのノックダウンを生じることを意図したヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質は、様々なモル比（１：１）、（２：１）、（４：１）又は（１０：１）にて、葉酸リガンドに抱合させた又は葉酸化ジオレオイルクロスアミンと同時製剤化したジオレオイルクロスアミンである。補助製剤化剤をジオレオイルクロスアミンのクロロホルム溶液に加え、実施例 9 に記載されるようにリボソームの調製を行う。s i R N A（３ m g / m L）と葉酸 - P E G - ジオレオイルクロスアミン（５ m g / m L）の溶液を注射用水にて別々に調製し、その後、s i R N A については 0 . 3 m g / m L に、葉酸 - P E G - ジオレオイルクロスアミンについては 1 . 9 m g / m L に 5 % デキストロースで希釈する。マイクロピペットを用いて s i R N A のデキストロース溶液を葉酸 - P E G - ジオレオイルクロスアミンのデキストロース溶液に加え、５：１（正：負）の電荷比とする。製剤を室温にて 1 5 分間インキュベートして複合体を形成させる。

10

【 0 2 9 7 】

## 実施例 9

s i R N A とのジオレオイルモノアミンの複合体；ナノ粒子の形成

使用する s i R N A は、内因性の血管内皮増殖因子（V E G F）の転写物及びタンパク質のレベルでのノックダウンを生じることを意図したヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質はジオレオイルモノアミンである。s i R N A（３ m g / m L）とジオレオイルモノアミン（５ m g / m L）の溶液を注射用水にて別々に調製し、その後、s i R N A については 0 . 3 m g / m L に、ジオレオイルモノアミンについては 1 . 5 m g / m L に 5 % デキストロースで希釈する。マイクロピペットを用いて s i R N A のデキストロース溶液をジオレオイルモノアミンのデキストロース溶液に加え、５：１（正：負）の電荷比とする。製剤を室温にて 1 5 分間インキュベートして複合体を形成させる。

20

【 0 2 9 8 】

## 実施例 1 0

D N A とのジオレオイルモノアミンの複合体；ナノ粒子の形成

使用する核酸は、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミド D N A であり、使用するカチオン性脂質はジオレオイルモノアミンである。プラスミド D N A（３ m g / m L）とジオレオイルモノアミン（５ m g / m L）の溶液を注射用水にて別々に調製し、その後、プラスミド D N A については 0 . 3 m g / m L に、ジオレオイルモノアミンについては 1 . 5 m g / m L に 5 % デキストロースで希釈する。マイクロピペットを用いてプラスミド D N A のデキストロース溶液をジオレオイルモノアミンのデキストロース溶液に加え、５：１（正：負）の電荷比とする。製剤を室温にて 1 5 分間インキュベートして複合体を形成させる。

30

【 0 2 9 9 】

## 実施例 1 1

ジオレオイルクロスアミンによって被包した s i R N A の調製

この実施例は、ジオレオイルクロスアミンを用いた s i R N A のリボソームへの被包を説明する。使用する s i R N A は、内因性の血管内皮増殖因子（V E G F）の転写物及びタンパク質のレベルでのノックダウンを生じることを意図したヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質はジオレオイルクロスアミンである。被包リボソームを調製するには、脂質をクロロホルムに溶解し、混合して脂質の均質な混合物を確保する。回転蒸発によって有機溶媒を除き、丸底フラスコの側面上で脂質の薄膜を得る。丸底フラスコを一晩真空ポンプに入れることによってクロロホルムをさらに蒸発させる。得られた脂質膜を先ず 1 0 0 % エタノールに溶解し、次いで 5 0 % にする。水に溶解した s i R N A をリボソーム / エタノールの溶液に加える。回転蒸発方式によってリボソーム / s i R N A の混合物からエタノールを蒸発させる。等量の 1 0 % デキストロースを被包 s i R N A 粒子に加えることによって、得られたナノ粒子を 5 % デキストロースに懸濁する。

40

【 0 3 0 0 】

## 実施例 1 2

葉酸 - P E G - ジオレオイルクロスアミンによって被包した s i R N A の調製

50

この実施例は、葉酸 - PEG - ジオレオイルクロスアミンを用いた siRNA のリボソームへの被包を説明する。使用する siRNA は、内因性の血管内皮増殖因子 (VEGF) の転写物及びタンパク質のレベルでのノックダウンを生じることが意図したヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質は葉酸 - PEG - ジオレオイルクロスアミンである。被包リボソームを調製するには、脂質をクロロホルムに溶解し、混合して脂質の均質な混合物を確保する。回転蒸発によって有機溶媒を除き、丸底フラスコの側面上で脂質の薄膜を得る。丸底フラスコを一晩真空ポンプに入れることによってクロロホルムをさらに蒸発させる。得られた脂質膜を先ず 100% エタノールに溶解し、次いで 50% にする。水に溶解した siRNA をリボソーム / エタノールの溶液に加える。回転蒸発方式によってリボソーム / siRNA の混合物からエタノールを蒸発させる。等量の 10% デキストロースを被包 siRNA 粒子に加えることによって、得られたナノ粒子を 5% デキストロースに懸濁する。

#### 【0301】

##### 実施例 13

補助製剤化剤を伴ったジオレオイルモノアミンによる siRNA 形質移入複合体の調製

使用する siRNA は、内因性の血管内皮増殖因子 (VEGF) の転写物及びタンパク質のレベルでのノックダウンを生じることが意図したヌクレオチドの二本鎖配列である。ジオレオイルモノアミンは、(4:1) のモル比でほかの脂質と共に製剤化する。使用する脂質は、1, 2 - ジオレオイル sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DOPE)、1, 2 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 550]、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 - N - ラクトシル、及びコレステロールである。補助製剤化剤をクロロホルム中のジオレオイルモノアミンに加える。実施例 9 に以前記載したようにリボソームを調製する。siRNA (3 mg/mL) とジオレオイルモノアミン (5 mg/mL) の溶液を注射用水にて別々に調製し、その後、0.3 mg/mL の siRNA と、1.9 mg/mL のジオレオイルモノアミンに 5% デキストロースで希釈する。マイクロピペットを用いて siRNA のデキストロース溶液をジオレオイルモノアミンのデキストロース溶液に加え、5:1 (正:負) の電荷比とする。製剤を室温にて 15 分間インキュベートして複合体を形成させる。

#### 【0302】

##### 実施例 14

ジオレオイルモノアミンによる DNA 形質移入複合体の調製

使用する核酸は、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミド DNA であり、ジオレオイルモノアミンが脂質である。プラスミド DNA (3 mg/mL) とジオレオイルモノアミン (5 mg/mL) の溶液を注射用水にて別々に調製し、その後、プラスミド DNA については 0.3 mg/mL に、ジオレオイルモノアミンについては 1.9 mg/mL に 5% デキストロースで希釈する。マイクロピペットを用いてプラスミド DNA のデキストロース溶液をジオレオイルモノアミンのデキストロース溶液に加え、5:1 (正:負) の電荷比とする。製剤を室温にて 15 分間インキュベートして複合体を形成させる。

#### 【0303】

##### 実施例 15

補助製剤化剤を伴ったジオレオイルモノアミンによる DNA 形質移入複合体の調製

使用する核酸は、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミド DNA であり、使用するカチオン性脂質はジオレオイルモノアミンである。この実施例で使用されるカチオン性脂質は、(4:1) のモル比でほかの脂質と製剤化されたジオレオイルモノアミンである。使用する脂質は、1, 2 - ジオレオイル sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DOPE)、1, 2 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 550]、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 - N - ラクトシル、及びコレステロールである。補助製剤化剤をクロロホルム中のジオレオイルモノアミンに加える。実施例 9 に以前記載し



たようにリボソームを調製する。DNA ( 3 m g / m L ) とジオレオイルモノアミン補助製剤化剤 ( 5 m g / m L ) の溶液を注射用水にて別々に調製し、その後、0 . 3 m g / m L の DNA と、1 . 9 m g / m L のジオレオイルモノアミンに5 % デキストロースで希釈する。マイクロピペットを用いてDNA のデキストロース溶液をジオレオイルモノアミンのデキストロース溶液に加え、5 : 1 ( 正 : 負 ) の電荷比とする。製剤を室温にて15 分間インキュベートして複合体を形成させる。

#### 【 0 3 0 4 】

##### 実施例 1 6

葉酸 - P E G - ジオレオイルモノアミンによって同時製剤化されたジオレオイルモノアミンによる s i R N A 形質移入複合体の調製

使用する s i R N A は、内因性の血管内皮増殖因子 ( V E G F ) の転写物及びタンパク質のレベルでのノックダウンを生じることを意図したヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質は、様々なモル比 ( 1 : 1 )、( 2 : 1 )、( 4 : 1 ) 又は ( 1 0 : 1 ) にて、葉酸 - P E G - ジオレオイルモノアミンと同時に製剤化したジオレオイルモノアミンである。補助製剤化剤をジオレオイルモノアミンのクロロホルム溶液に加える。実施例 9 に以前記載されたようにリボソームの調製を行う。s i R N A ( 3 m g / m L ) とジオレオイルモノアミン / 葉酸 - P E G - ジオレオイルモノアミン ( 5 m g / m L ) の溶液を注射用水にて別々に調製し、その後、0 . 3 m g / m L の s i R N A と、1 . 9 m g / m L のジオレオイルモノアミンに5 % デキストロースで希釈する。マイクロピペットを用いて s i R N A のデキストロース溶液をジオレオイルモノアミンのデキストロース溶液に加え、5 : 1 ( 正 : 負 ) の電荷比とする。製剤を室温にて15 分間インキュベートして複合体を形成させる。

#### 【 0 3 0 5 】

##### 実施例 1 7

ジオレオイルモノアミンのリボソームによって被包した s i R N A の調製

使用する s i R N A は、内因性の血管内皮増殖因子 ( V E G F ) の転写物及びタンパク質のレベルでのノックダウンを生じることを意図したヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質は、ジオレオイルモノアミンである。被包リボソームを調製するには、脂質をクロロホルムに溶解し、混合して脂質の均質な混合物を確保する。回転蒸発によって有機溶媒を除き、丸底フラスコの側面上で脂質の薄膜を得る。丸底フラスコを一晩真空ポンプに入れることによってクロロホルムをさらに蒸発させる。得られた脂質膜を先ず100 % エタノールに溶解し、次いで50 % にする。水に溶解した s i R N A をリボソーム / エタノールの溶液に加える。回転蒸発方式によってリボソーム / s i R N A の混合物からエタノールを蒸発させる。等量の10 % デキストロースを被包 s i R N A 粒子に加えることによって、得られたナノ粒子を5 % デキストロースに懸濁する。

#### 【 0 3 0 6 】

##### 実施例 1 8

葉酸 - P E G - ジオレオイルモノアミンのリボソームによって被包した s i R N A の調製

使用する s i R N A は、内因性の血管内皮増殖因子 ( V E G F ) の転写物及びタンパク質のレベルでのノックダウンを生じることを意図したヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質は、葉酸 - P E G - ジオレオイルモノアミンである。被包リボソームを調製するには、脂質をクロロホルムに溶解し、混合して脂質の均質な混合物を確保する。回転蒸発によって有機溶媒を除き、丸底フラスコの側面上で脂質の薄膜を得る。丸底フラスコを一晩真空ポンプに入れることによってクロロホルムをさらに蒸発させる。得られた脂質膜を先ず100 % エタノールに溶解し、次いで50 % にする。水に溶解した s i R N A をリボソーム / エタノールの溶液に加える。回転蒸発方式によってリボソーム / s i R N A の混合物からエタノールを蒸発させる。等量の10 % デキストロースを被包 s i R N A 粒子に加えることによって、得られたナノ粒子を5 % デキストロースに懸濁する。

#### 【 0 3 0 7 】

## 実施例 19

s i R N A と ジオレオイルクロスアミンの複合体の形質移入活性

s i R N A と ジオレオイルクロスアミンの複合体の形質移入活性を以下のように試験管内で測定する。m V E G F 又はルシフェラーゼの s i R N A 構築物を含む形質移入複合体を実施例 9 に記載された方法によって調製する。S C C V I I 細胞 ( $0.5 \times 10^5$  個の細胞/ウェル; マウス扁平上皮癌) を 10% ウシ胎児血清 (F B S) にて 24 穴組織培養プレートに播く。総容積 250  $\mu$  L のダルベッコ改変イーグル最小必須培地 (D M E M) にて F B S の非存在下又は存在下において 0.5  $\mu$  g の s i R N A と共に各ウェルを 6 時間インキュベートする。その培地に F B S を欠く細胞についてインキュベート時間が終了すると、20% の F B S を補完した 250  $\mu$  L の D M E M を形質移入した細胞に加え、さらに 40 時間インキュベートする。その形質移入培地に F B S を伴った細胞には、10% の F B S を補完した 250  $\mu$  L の D M E M を形質移入した細胞に加え、さらに 40 時間インキュベートする。インキュベート時間の終了時、細胞培養培地 (タンパク質) 又は細胞溶解物 (転写物) において m V E G F のタンパク質及び転写物のノックダウンを評価する。m V E G F のタンパク質レベルの測定については、m V E G F の E L I S A アッセイによって細胞培養培地を直接分析する。m V E G F の転写物の解析については、トリス試薬を用いて細胞を溶解し、次いで q R T - P C R 検出キットを用いて m V E G F 転写物のレベルを定量する。

10

【0308】

## 実施例 20

20

ジオレオイルクロスアミンによって被包された s i R N A の形質移入活性

この実施例は、ジオレオイルモノアミン、ジオレオイルクロスアミン、又は両方のカチオン剤の混合物を用いた s i R N A のリボソーム被包を説明する。使用する s i R N A は、内因性の血管内皮増殖因子 (V E G F) の転写物及びタンパク質のレベルでのノックダウンを生じることを意図したヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質は、ジオレオイルモノアミン (実施例 3)、ジオレオイルクロスアミン (実施例 1)、又は両方の混合物である。被包リボソームを調製するには、脂質をクロロホルムに溶解し、混合して脂質の均質な混合物を確保する。回転蒸発によって有機溶媒を除き、丸底フラスコの側面上で脂質の薄膜を得る。丸底フラスコを一晩真空ポンプに入れることによってクロロホルムをさらに蒸発させる。得られた脂質膜をまず 100% エタノールに溶解し、次いで 50% にする。水に溶解した s i R N A をリボソーム/エタノールの溶液に加える。回転蒸発方式によってリボソーム/s i R N A の混合物からエタノールを蒸発させる。等量の 10% デキストロースを被包 s i R N A 粒子に加えることによって、得られたナノ粒子を 5% デキストロースに懸濁する。S C C V I I 細胞 ( $0.5 \times 10^5$  個の細胞/ウェル) を 10% F B S にて 24 穴組織培養プレートに播く。総容積 250  $\mu$  L D M E M にて F B S の非存在下又は存在下において 0.5  $\mu$  g の複合体化 s i R N A と共に各ウェルを 6 時間インキュベートする。その培地に F B S を欠く細胞についてインキュベート時間が終了すると、20% の F B S を補完した 250  $\mu$  L の D M E M を形質移入した細胞に加え、さらに 40 時間インキュベートする。その形質移入培地に F B S を伴った細胞には、10% の F B S を補完した 250  $\mu$  L の D M E M を形質移入した細胞に加え、さらに 40 時間インキュベートする。インキュベート時間の終了時、細胞培養培地 (タンパク質) 又は細胞溶解物 (転写物) において m V E G F のタンパク質及び転写物のノックダウンを評価する。m V E G F のタンパク質レベルの測定については、m V E G F の E L I S A アッセイによって細胞培養培地を直接分析する。m V E G F の転写物の解析については、トリス試薬を用いて細胞を溶解し、次いで q R T - P C R 検出キットを用いて m V E G F 転写物のレベルを定量する。

30

40

【0309】

## 実施例 21

葉酸 - P E G - ジオレオイルクロスアミンによって被包された s i R N A の形質移入活性

この実施例は、葉酸 - P E G - ジオレオイルモノアミン、葉酸 - P E G - ジオレオイル

50

クロスアミン、又は両方のカチオン剤の混合物を用いた *siRNA* のリポソーム被包を説明する。使用する *siRNA* は、内因性の血管内皮増殖因子 (VEGF) の転写物及びタンパク質のレベルでのノックダウンを生じることを意図したヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質は、葉酸 - PEG - ジオレオイルモノアミン (実施例 5)、葉酸 - PEG - ジオレオイルクロスアミン (実施例 2)、又は両方の混合物である。被包リポソームを調製するには、脂質をクロロホルムに溶解し、混合して脂質の均質な混合物を確保する。回転蒸発によって有機溶媒を除き、丸底フラスコの側面上で脂質の薄膜を得る。丸底フラスコを一晩真空ポンプに入れることによってクロロホルムをさらに蒸発させる。得られた脂質膜を先ず 100% エタノールに溶解し、次いで 50% にする。水に溶解した *siRNA* をリポソーム / エタノールの溶液に加える。回転蒸発方式によってリポソーム / *siRNA* の混合物からエタノールを蒸発させる。等量の 10% デキストロースを被包 *siRNA* 粒子に加えることによって、得られたナノ粒子を 5% デキストロースに懸濁する。SCCVII 細胞 ( $0.5 \times 10^5$  個の細胞 / ウェル) を 10% FBS にて 24 穴組織培養プレートに播く。総容積 250  $\mu$ L DMEM にて FBS の非存在下又は存在下において 0.5  $\mu$ g の複合体化 *siRNA* と共に各ウェルを 6 時間インキュベートする。その培地に FBS を欠く細胞についてインキュベート時間が終了すると、20% の FBS を補完した 250  $\mu$ L の DMEM を形質移入した細胞に加え、さらに 40 時間インキュベートする。その形質移入培地に FBS を伴った細胞には、10% の FBS を補完した 250  $\mu$ L の DMEM を形質移入した細胞に加え、さらに 40 時間インキュベートする。インキュベート時間の終了時、細胞培養培地 (タンパク質) 又は細胞溶解物 (転写物) において mVEGF のタンパク質及び転写物のノックダウンを評価する。mVEGF のタンパク質レベルの測定については、mVEGF の ELISA アッセイによって細胞培養培地を直接分析する。mVEGF の転写物の解析については、トリス試薬を用いて細胞を溶解し、次いで qRT-PCR 検出キットを用いて mVEGF 転写物のレベルを定量する。

### 【0310】

#### 実施例 22

ジオレオイルモノアミン複合体化 *siRNA* の腔内投与に続く子宮 VEGF タンパク質のノックダウン

*siRNA* 投与の 2 日前に、プロゲステロン (ゴマ油に溶解した 0.5 mg) を皮下投与で 2 日間、メス ICR マウス (17 ~ 22 グラム) に与えて動物における発情周期を正常化した。次いで VEGF 転写物を標的とする製剤化 *siRNA* 又は非標的型の対照 *siRNA* をマウスに腔内投与する。*siRNA* は、5 : 1 の N : P 電荷比にてジオレオイルモノアミンと複合体化する。最終容量 30  $\mu$ L にて総量 9  $\mu$ g の *siRNA* (0.3 mg / mL) を投与する。投与後 48 時間で動物を安楽死させ、腔 / 頸部と子宮 (子宮角を含む) を回収し、ほかの組織から切り離し、液体  $N_2$  に保存する。プロゲステロン処理に一致する肉眼所見を持った動物の組織のみを解析に使用する。溶解緩衝液で組織をホモジネートし、ELISA によって VEGF タンパク質の判定を行う。

### 【0311】

#### 実施例 23

クロスアミン *siRNA* の投与後の、腹腔に播種された悪性腫瘍を持つ動物における腹水と腹腔内腫瘍結節での増殖因子のタンパク質及び転写物のノックダウン

疾患の進行に関係している VEGF のレベルを低下させる尽力において、播種された卵巣癌を持つ動物に *siRNA* とジオレオイルクロスアミンを含有する製剤を投与する。播種性卵巣癌を誘導するために、 $2.5 \times 10^6$  個の ID8 (マウス卵巣癌) 細胞を IP でメス C57BL / 6 マウスに埋め込む。腫瘍の埋め込み後所定の日に、5 : 1 の N : P の比でジオレオイルクロスアミンと共に製剤化された *siVEGF* を 200  $\mu$ g マウスに注射する。処理後 24 時間で開始して、動物を安楽死させ、腹腔から腫瘍と腹水を回収し、VEGF のタンパク質と転写物のレベルについて解析する。腹水転写物の解析については、試料を先ず、赤血球溶解プロトコールに供し、RNA 単離の前に有核細胞について濃縮する。

## 【0312】

## 実施例24

葉酸 - PEG - ジオレオイルクロスアミンを用いた腫瘍標的化 s i R N A

S C C V I I 腫瘍の担癌マウスに葉酸 - PEG - ジオレオイルクロスアミンによって製剤化した V E G F の s i R N A を静脈内で又は腹腔内で送達する。投与後、特定の時間に腫瘍を回収し、転写物及び標的転写物のタンパク質レベルを判定する。

## 【0313】

## 実施例25

ペプチド改変のジオレオイルクロスアミンを用いた s i R N A の全身性の取り込みの向上

保存された A r g - G l y - A s p モチーフを有するペプチドの付加によって標的インテグリン受容体に機能的に改変をもたらしたジオレオイルクロスアミンによって s i R N A を製剤化する。担癌マウスに複合体を静脈内で又は腹腔内で送達する。投与後、特定の時間に、種々の組織を回収し、標的とされた転写物 / タンパク質の転写物及びタンパク質の定量を行う。

## 【0314】

## 実施例26

ジオレオイルモノアミン送達剤によって複合体化された s i R N A の試験管内形質移入に続くタンパク質のノックダウン

s i R N A とジオレオイルモノアミン送達剤との共役複合体の形質移入活性を試験管内で測定する。実施例9に以前記載された方法によって、s i m V E G F の s i R N A の構築物を含有する形質移入複合体を調製する。S C C V I I 細胞 ( $0.5 \times 10^5$  個の細胞 / ウェル) を 10 % F B S にて 24 穴組織培養プレートに播く。総容積 250  $\mu$  L D M E M にて 0.5  $\mu$  g の複合体化 s i R N A と共に各ウェルを 6 時間インキュベートする。インキュベート時間が終了すると、20 % の F B S を補完した 250  $\mu$  L の D M E M を形質移入した細胞に加え、さらに 40 時間インキュベートする。インキュベート時間の終了時、上清の m V E G F のタンパク質の定量を行う。結果は、V E G F タンパク質の有意な (約 95 %) ノックダウンを示す (図1)。

## 【0315】

## 実施例27

ジオレオイルモノアミンとメチル - ジオレオイルモノアミンの送達剤によって複合体化された s i R N A の試験管内形質移入に続くタンパク質のノックダウン

ジオレオイルモノアミン (実施例3) とメチル - ジオレオイルモノアミン (実施例3A) の送達剤との s i R N A の複合体の形質移入活性を試験管内で測定する。実施例9に以前記載された方法によって、s i m V E G F の s i R N A の構築物を含有する形質移入複合体を調製する。S C C V I I 細胞 ( $0.5 \times 10^5$  個の細胞 / ウェル) を 10 % F B S にて 24 穴組織培養プレートに播く。総容積 250  $\mu$  L D M E M にて 0.5  $\mu$  g の複合体化 s i R N A と共に各ウェルを 6 時間インキュベートする。インキュベート時間が終了すると、20 % の F B S を補完した 250  $\mu$  L の D M E M を形質移入した細胞に加え、さらに 40 時間インキュベートする。インキュベート時間の終了時、上清の m V E G F のタンパク質の定量を上述のように行う。結果は、V E G F タンパク質の有意な (約 95 %) ノックダウンを示す (図2)。

## 【0316】

## 実施例28

葉酸 - PEG - ジオレオイルモノアミンによって複合体化された s i R N A の試験管内形質移入に続くタンパク質及び転写物のノックダウン

s i R N A と葉酸 - PEG - ジオレオイルモノアミンの共役複合体の形質移入活性を試験管内で測定する。以前記載された方法によって、s i m V E G F の s i R N A の構築物を含有する形質移入複合体を調製する。S C C V I I 細胞 ( $0.5 \times 10^5$  個の細胞 / ウェル) を 10 % F B S にて 24 穴組織培養プレートに播く。総容積 250  $\mu$  L D M E M にて種々の濃度での葉酸基質の非存在下又は存在下で、0.5  $\mu$  g の複合体化 s i R N A と

10

20

30

40

50

共に各ウェルを6時間インキュベートする。インキュベート時間が終了すると、20%のFBSを補充した250 $\mu$ LのDMEMを形質移入した細胞に加え、さらに40時間インキュベートする。インキュベート時間の終了時、mVEGFタンパク質及びmVEGF転写物をそれぞれ、細胞培養培地及び細胞溶解物から測定する。mVEGFのタンパク質レベルの測定については、mVEGFのELISAアッセイによって細胞培養培地を直接測定する。mVEGFの転写物の解析については、トリス試薬を用いて細胞を溶解し、次いでqRT-PCR検出キットを用いてmVEGF転写物のレベルを定量する。非サイレンシング対照のsiRNAで形質移入した細胞に比べて生じるVEGFタンパク質及び転写物のノックダウンの比率を計算する。

【0317】

10

#### 実施例29

ジオレオイルモノアミン送達剤によって複合体化されたsiRNAの投与に続く肺及び肝臓におけるカベオリン-1転写物のノックダウン

カベオリン-1(Cav-1)転写物を標的とする製剤化siRNA又は非標的性のsiRNA対照をメスICRマウス(17~22グラム)に静脈内注射する。siRNAは、10:1の比でジオレオイルモノアミン送達剤と複合体化させる。合計100 $\mu$ gのsiRNAを最終容量200 $\mu$ L(0.5mg/mL)で注射する。注射後48時間で動物を安楽死させ、qRT-PCRを用いたCav-1転写物の解析のために肺及び肝臓を回収する。内部対照としての $\alpha$ -アクチンに対して転写物レベルを標準化する。結果(図3)は、肺(76%ノックダウン)及び肝臓(62%ノックダウン)の双方で標的特異的なCav-1転写物レベルで有意な低下を示す。各群についてn=5。

20

【0318】

#### 実施例30

マウスにおける皮下腫瘍に注射されたジオレオイルモノアミン製剤化siRNAに続く腫瘍阻害を生じるVEGF転写物のノックダウン

この実施例では、 $5 \times 10^5$ 個の扁平上皮癌細胞を注射することによりC3Hマウスの後脇腹に腫瘍を埋め込んだ。腫瘍は、それが約40mm<sup>3</sup>に達するまで増殖することができた。次いで、5:1のN:P比にてジオレオイルモノアミンによって製剤化された市販のVEGFを標的とするsiRNA又は同様に製剤化された非サイレンシング対照のsiRNAを腫瘍に注入した。siRNAの最終濃度は0.3mg/mLだった。合計30 $\mu$ Lの製剤化されたsiRNA溶液を腫瘍に注入し、注入は3~4日ごとに合計6回繰り返した。2回目の製剤化siRNAの注入後48時間に転写物の解析のために一部の動物から腫瘍を回収した。この試験の結果(図4)は、VEGFのsiRNAの投与が非サイレンシング対照群に比べてVEGFの転写で32%の低下を生じたことを示している。最後の腫瘍注入の1週間後では、非サイレンシングsiRNAに比べてVEGFのsiRNA群における腫瘍容積で31%の低下があり、無処理の対照動物に比べて57%の低下があった。VEGFのsiRNA処理はさらに、非サイレンシング対照(sinON)群又は無処理群に比べて動物の生存率中央値で13%の改善を生じた。

30

【0319】

#### 実施例31

40

濾過により濃縮された、ジオレオイルモノアミンとのsiRNA形質移入複合体の調製

使用するsiRNAは、内因性の血管内皮増殖因子(VEGF)の転写物及びタンパク質のレベルでのノックダウンを生じることを意図したヌクレオチドの二本鎖配列である。カチオン性脂質のリポソームは実施例9で以前記載されたように調製する。siRNA(20mg/mL)とジオレオイルモノアミン(6.4mg/mL)の溶液を注射用水にて別々に調製する。25 $\mu$ LのsiRNAを500 $\mu$ Lのジオレオイルモノアミン溶液と混合する。その後、5%デキストロースで複合体を0.03mg/mLのsiRNAに希釈する。希釈した複合体を25~50kDaの遠心フィルターユニットに移し、数分間遠心して残余分で所望のsiRNA濃度に達する。

【0320】

50

## 実施例 3 2

濾過により濃縮された、ジオレオイルクロスアミンとの s i R N A 形質移入複合体の調製

使用する s i R N A は、内因性の血管内皮増殖因子 ( V E G F ) の転写物及びタンパク質のレベルでのノックダウンを生じることを意図したヌクレオチドの二本鎖配列である。カチオン性脂質のリポソームは実施例 9 で以前記載されたように調製する。s i R N A ( 2 0 m g / m L ) とジオレオイルクロスアミン ( 5 m g / m L ) の溶液を注射用水にて別々に調製する。5  $\mu$  L の s i R N A を 5 0 0  $\mu$  L のジオレオイルクロスアミン溶液と混合する。その後、5 % デキストロースで複合体を 0 . 0 3 m g / m L の s i R N A に希釈する。希釈した複合体を 2 5 ~ 5 0 k D a の遠心フィルターユニットに移し、数分間遠心して残余分で所望の s i R N A 濃度に達する。

【 0 3 2 1 】

## 実施例 3 3

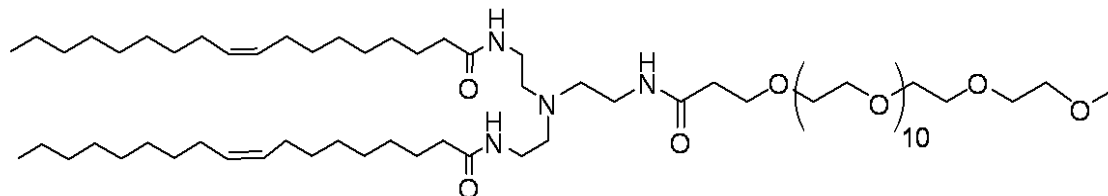
ナノ粒子の粒度及びゼータ電位の測定

実施例 6 及び 9 のように、ジオレオイルクロスアミン / s i R N A 及びジオレオイルモノアミン / s i R N A を製剤化し、5 0 m M の N a C l で適当な濃度に希釈する。次いで試料をポリスチレン製のキュベットに加え、9 0 プラス / B I - M A S 粒子サイザーを用いて粒度及びゼータ電位について測定する。観察された粒度は 8 0 ~ 4 0 0 n m の間であり、観察されたゼータ電位は + 1 0 ~ + 4 0 m V の間である。

【 0 3 2 2 】

## 実施例 3 4

ジ - [ 2 - ( オレオイルアミノ ) エチル ] [ 2 - [ ( メトキシドデカエチレングリコールカルボニルアミノ ) エチル ] アミン「m P E G - ジオレオイルモノアミン」( 9 ) の調製【化 2 8 】



m P E G - ジオレオイルモノアミン ( 9 )

メトキシ ( ドデカエチレングリコール ) ( M W 5 5 0 、ポリ分散、約 1 2 のエチレングリコール単位を含有する、7 2 0 m g 、 1 . 3 0 ミリモル ) を 8 m L の無水トルエンに溶解する。これに、ホスゲンのトルエン溶液 ( 2 M 溶液を 4 m L 、 8 ミリモル ) を加える。反応混合物を室温にて 3 時間攪拌し、次いで室温にて真空中で濃縮して、8 1 0 m g ( 1 . 3 1 ミリモル ) の粗精製のクロロギ酸メトキシ ( ドデカエチレングリコール ) を得る。

【 0 3 2 3 】

上記クロロギ酸メトキシ ( ドデカエチレングリコール ) ( 8 1 0 m g 、 1 . 3 1 ミリモル ) を 6 . 3 1 3 g の塩化メチレンに溶解する。炭酸カリウムによる処理によってジオレオイルモノアミンを遊離の塩基に変換し、塩化メチレンで抽出する。有機相を乾燥させ、無水油性物質 ( 7 0 0 m g 、 1 . 0 4 ミリモル ) を生じ、それを 6 m L の無水塩化メチレンに再溶解する。攪拌しながら、ジオレオイルモノアミン遊離塩基溶液に、5 . 6 6 g のクロロギ酸メトキシ ( ドデカエチレングリコール ) ( m P E G クロロギ酸の 1 . 0 4 ミリモル ) を加える。混合物を室温で 3 時間攪拌し、次いで濃縮し、シリカゲル ( 塩化メチレンにおける 3 ~ 1 5 % のメタノールの勾配溶出 ) を用いたクロマトグラフィで精製する。精製によって P E G - ジオレオイルモノアミン ( 8 3 0 m g 、 0 . 6 6 4 ミリモル ) を得る。

【 0 3 2 4 】

## 実施例 3 5

10

20

30

40

50

### 蛍光タガントを持つモノアミンの調製

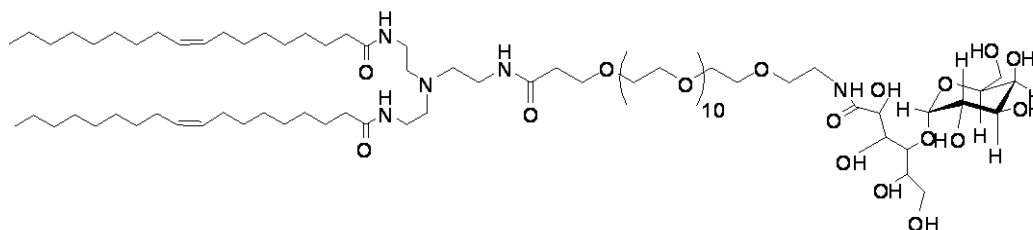
塩化スルホローダミンBアシル (Fluka、115 mg、0.2ミリモル) を4 mLの無水クロロホルムに溶解する。5 mLの無水クロロホルム中のジオレオイルモノアミン遊離塩基 [140 mg、約0.2ミリモル、そのTFA塩のクロロホルム溶液を炭酸カリウムで処理することによって上記のように調製された] のよく攪拌された溶液に、この溶液を加える。混合物を室温にて3時間攪拌し、次いで濃縮し、2000ミクロンの厚層シリカゲル分取プレートを用いた [その後、塩化メチレンにおける3~15%のメタノールで溶出] クロマトグラフィで精製する。精製によって [ローダミンBスルホニル] ジオレオイルモノアミン (120 mg、0.1ミリモル) が得られる。

#### 実施例 36

##### 【0325】

- ラクトビオニルアミド - - プロピオン酸ウンデカエチレングリコール - ジ - [2 - (オレオイルアミノ) エチル] (2 - アミノエチル) アミン、 「ラクトビオニル - ジオレオイルモノアミン」 (10) の合成

##### 【化29】



ラクトビオニル-ジオレオイルモノアミン (10)

Fmocアミノ - - プロピオン酸 - ウンデカエチレングリコールリンカー (Fmoc - PEG<sub>11</sub> - COOH) (100 mg、0.119ミリモル) と p - ニトロフェノール (18 mg、0.129ミリモル) を1 mLの塩化メチレンに溶解する。DCC (27 mg、0.131ミリモル) を1 mLの塩化メチレンに溶解し、攪拌しているPEG/p - ニトロフェノール溶液に加える。室温にて反応を3時間進め、その後、0.45 μmのシリンジフィルターを用いてDCUを取り除く。炭酸カリウム処理によってジオレオイルモノアミンを遊離の塩基に変換し、塩化メチレンで抽出する。有機相を乾燥させて75 mg (0.111ミリモル) の乾燥物質を得、それを0.5 mLの塩化メチレンに再溶解する。この溶液をp - ニトロフェノール活性化 - Fmocアミノ - - プロピオン酸 - ウンデカエチレングリコール酸溶液に加える。室温にて反応を18時間進める。粗精製物質を乾燥させ、1.8 mLのジメチルホルムアミドに再溶解し、それに200 μLのピペリジンを加える。Fmoc切断を15分間進め、その後、高真空下でジメチルホルムアミドとピペリジンを取り除く。メタノール中80%の塩化メチレン、その後75%の塩化メチレンを含有するシリカゲルカラムでの分離によって - アミノ - - プロピオン酸 - ウンデカエチレングリコール - ジ - [2 - (オレオイルアミノ) エチル] (2 - アミノエチル) アミンを単離する。適当な分画を乾燥させ、75 mg (0.59ミリモル) の茶色の油性物質を得る。

##### 【0326】

一滴のトリフルオロ酢酸を含有するメタノール中で50 にて脱水することによって先ず、ラクトビオン酸を相当するラクトンに変換する。15 μLのジイソプロピルエチルアミンを含有する1.5 mLのメタノールに - アミノ - - プロピオン酸 - ウンデカエチレングリコール - ジ - [2 - (オレオイルアミノ) エチル] (2 - アミノエチル) アミン (50 mg、0.039ミリモル) を溶解する。この攪拌している溶液に、無水ラクトビオノラクトン (15 mg、0.044ミリモル) を加える。フラスコを密封し、反応物を60 にて20時間攪拌する。シリンジ濾過によって少量の沈殿物を取り除き、高真空下で - ラクトビオニルアミノ - - プロピオン酸 - ウンデカエチレングリコール - ジ - [

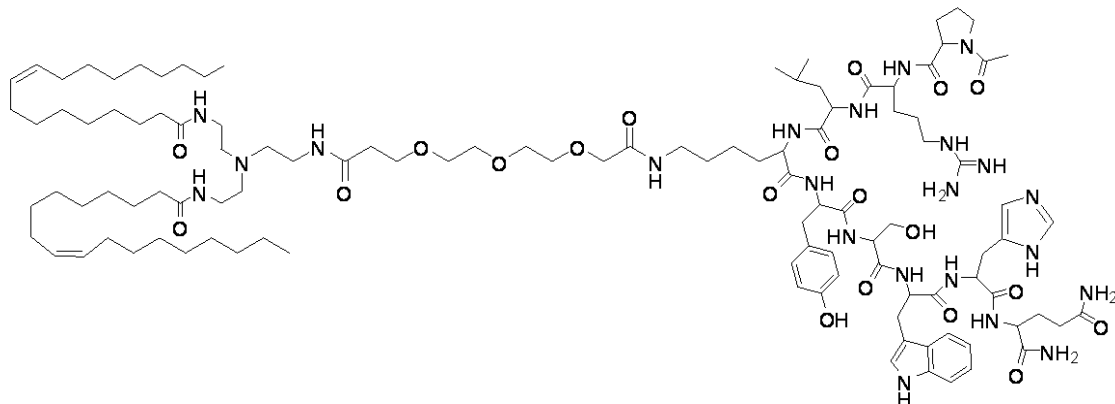
2 - (オレオイルアミノ)エチル] (2 - アミノエチル)アミンを乾燥させて 57 mg (0.035ミリモル)の純粋な物質を得る。

【0327】

#### 実施例 37

ジ - [2 - (オレオイルアミノ)エチル] [2 - [ - プロピオン - LHRH - オクタエチレングリコールアミノ)エチル]アミン、 「LHRH - ジオレオイルモノアミン」 (11) の合成

【化30】



LHRH-ジオレオイルモノアミン (11)

オクタエチレングリコールジプロピオン酸 (347 mg、0.675ミリモル) を 8 mL の無水塩化メチレンに溶解する。これに、p - ニトロフェノール (210 mg、1.5ミリモル) を加え、次いでジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (313 mg、1.52ミリモル) を加える。翌日、反応混合物を沈殿したジシクロヘキシルウレアから濾別し、濾液を濃縮し、シリカにおけるクロマトグラフィ (先ずエーテルによる溶出で未反応の p - ニトロフェノールを除き、次いで 4 % メタノール / 塩化メチレン) によって溶出する) によって表題の化合物を精製する。

【0328】

上記のオクタエチレングリコールジプロピオン酸 - ジ - p - ニトロフェノールエステル (510 mg、0.68ミリモル) を 6 mL の無水塩化メチレンに溶解する。炭酸カリウム処理によってジ - [2 - (オレオイルアミノ)エチル] (2 - アミノエチル)アミンを遊離の塩基に変換し、塩化メチレンで抽出する。有機相を乾燥させて乾燥した油性物質 (390 mg、0.58ミリモル) を得、それを 3 mL の塩化メチレンに再溶解する。混合物を一晩攪拌し、次いで前述のジ - p - ニトロフェノールエステルと同様の手順を用いてクロマトグラフィで精製する。未反応のジ - [2 - (オレオイルアミノ)エチル] (2 - アミノエチル)アミンを分画した後、ジ - [2 - (オレオイルアミノ)エチル] [2 - ( - プロピオン酸オクタエチレングリコールプロピオニルアミノ)エチル]アミン p - ニトロフェノレート (268 mg、0.207ミリモル) を回収する。

【0329】

市販の LHRH ペプチド (配列: Ac - QHWSYKLRP - Am、TFA 塩を 98 mg、0.078ミリモル) を 2 mL の無水ジメチルホルムアミドに溶解し、高真空下で溶液を蒸発させてペプチドを乾燥させる。残留物を 1 mL の無水ジメチルホルムアミドに溶解し; 上記ジ - [2 - (オレオイルアミノ)エチル] [2 - ( - プロピオン酸オクタエチレングリコールプロピオニルアミノ)エチル]アミン p - ニトロフェノレート (135 mg、0.104ミリモル) の 1 mL ジメチルホルムアミド溶液を加え、その後、トリエチルアミン (0.028 mL、0.201ミリモル) を加える。攪拌した反応混合物を室温にて 17 時間保持し、次いで真空で濃縮する。C8 カラムとアセトニトリル / 水の勾配溶出 (15 分間かけて 30 % アセトニトリル / 水 (0.1 % TFA) から 90 %) を用い



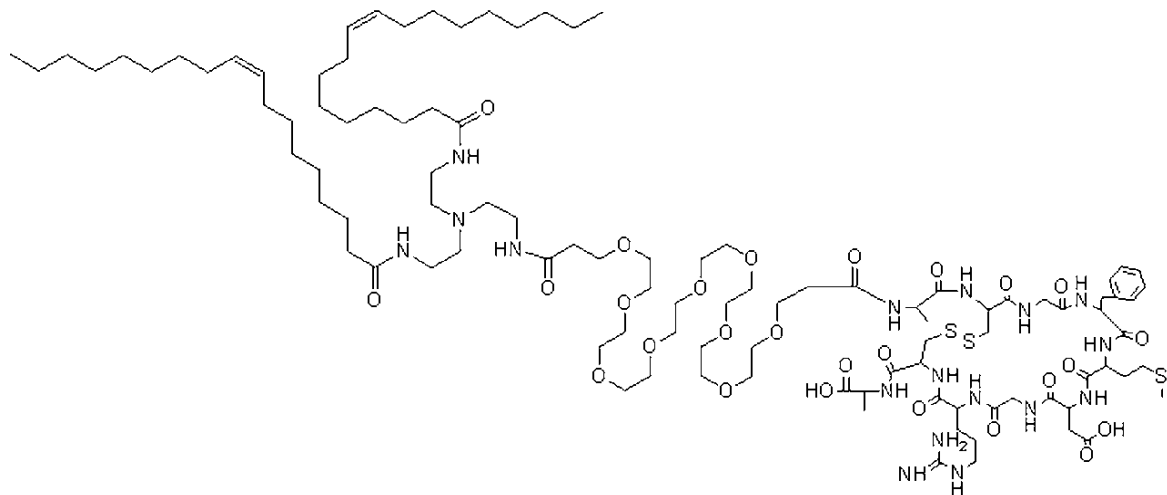
た逆相分取用クロマトグラフィによって標的物質の精製を達成し、97 mg のジ - [ 2 - (オレオイルアミノ)エチル] [ 2 - ( - プロピオン酸 - L H R H オクタエチレングリコールプロピオンアミノ)エチル]アミンを得る。

【0330】

実施例 38

ジ - [ 2 - (オレオイルアミノ)エチル] [ 2 - ( - プロピオン酸 - R G D - オクタエチレングリコールプロピオンアミノ)エチル]アミン、「R G D - ジオレオイルモノアミン」(12)の合成

【化31】



R G D - ジオレオイルモノアミン (12)

オクタエチレングリコールジプロピオン酸 (347 mg、0.675ミリモル) を 8 mL の無水塩化メチレンに溶解する。これに、p - ニトロフェノール (210 mg、1.5ミリモル) を加え、次いでジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (313 mg、1.52ミリモル) を加える。翌日、反応混合物を沈殿したジシクロヘキシルウレアから濾別し、濾液を濃縮し、シリカにおけるクロマトグラフィ (先ずエーテルによる溶出で未反応の p - ニトロフェノールを除き、次いで 4 % メタノール / 塩化メチレン) によって溶出

【0331】

上記オクタエチレングリコールジプロピオン酸ジ - p - ニトロフェノールエステル (510 mg、0.68ミリモル) を 6 mL の無水塩化メチレンに溶解する。炭酸カリウム処理によってジオレオイルモノアミンを遊離の塩基に変換し、塩化メチレンで抽出する。有機相を乾燥させて乾燥した油性物質 (390 mg、0.58ミリモル) を得、それを 3 mL の塩化メチレンに再溶解する。混合物を一晩攪拌し、次いで上述のジ - p - ニトロフェノールエステルと同様の手順を用いたクロマトグラフィで精製する。未反応のジオレオイルモノアミンを分画した後、ジ - [ 2 - (オレオイルアミノ)エチル] [ 2 - ( - プロピオン酸オクタエチレングリコールプロピオンアミノ)エチル]アミン p - ニトロフェノレート (268 mg、0.207ミリモル) を回収する。

【0332】

市販の R G D ペプチド (配列: A \* C R G D M F G \* C A (2 - 9ジスルフィド結合)、T F A 塩で 117 mg、0.100ミリモル) を 3 mL の無水ジメチルホルムアミドに溶解し、高真空中で溶液を蒸発させてペプチドを乾燥させる。残留物を 3 mL の無水メタノールに溶解し; 上記ジ - [ 2 - (オレオイルアミノ)エチル] [ 2 - ( - プロピオン酸オクタエチレングリコールプロピオンアミノ)エチル]アミン p - ニトロフェノレート (135 mg、0.104ミリモル) の 3 mL 塩化メチレン溶液を加え、その後、ヒューニッヒの塩基 (0.065 mL、0.370ミリモル) を加える。反応混合物を室温で

7 2 時間攪拌し、次いで真空で濃縮する。C 8 カラムとアセトニトリル / 水の勾配溶出を用いた逆相分取用クロマトグラフィによって標的物質の精製を達成し、4 3 m g ( 0 . 0 2 0 ミリモル ) のジ - [ 2 - ( オレオイルアミノ ) エチル ] [ 2 - (     - プロピオニル - R G D - オクタエチレングリコールプロピオニルアミノ ) エチル ] アミンを得る。

【 0 3 3 3 】

#### 実施例 3 9

ジオレオイルモノアミンと m P E G - ジオレオイルモノアミンによって複合体化された s i R N A の調製

使用する s i R N A は、内因性の血管内皮増殖因子 ( V E G F ) の転写物及びタンパク質のレベルでのノックダウンを生じることを意図したヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質は、ジオレオイルモノアミン ( 実施例 3 ) と m P E G - ジオレオイルモノアミン ( 実施例 3 4 ) の混合物である。リポソームを調製するには、脂質をクロロホルムに溶解し、混合して脂質の均質な混合物を確保する。回転蒸発によって有機溶媒を除き、丸底フラスコの壁上で脂質の薄膜を得る。丸底フラスコを一晩真空ポンプに入れることによってクロロホルムをさらに蒸発させる。得られた脂質膜を所望の濃度にて蒸留水で再水和し、数分間激しく攪拌する。溶液を超音波処理槽に 1 時間入れ、次いで 2 0 0 n m のシリンジフィルターを介して濾過し、最終的なリポソーム溶液を得る。水に溶解した s i R N A をリポソーム溶液に加える。

【 0 3 3 4 】

#### 実施例 4 0

ジオレオイルモノアミンと m P E G - ジオレオイルモノアミンによって被包された s i R N A の調製

この実施例は、m P E G - ジオレオイルモノアミンを用いた s i R N A のリポソーム被包を説明する。使用する s i R N A は、内因性の標的転写物及びタンパク質のレベルのノックダウンを生じるように意図されたヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質は、ジオレオイルモノアミン ( 実施例 3 ) と m P E G - ジオレオイルモノアミン ( 実施例 3 4 ) の混合物である。被包リポソームを調製するには、脂質をクロロホルムに溶解し、混合して脂質の均質な混合物を確保する。回転蒸発によって有機溶媒を除き、丸底フラスコの壁上で脂質の薄膜を得る。丸底フラスコを一晩真空ポンプに入れることによってクロロホルムをさらに蒸発させる。得られた脂質膜をまず 1 0 0 % エタノールに溶解し、次いで 5 0 % にする。水に溶解した s i R N A をリポソーム / エタノールの溶液に加える。回転蒸発方式によってリポソーム / s i R N A の混合物からエタノールを蒸発させる。等量の 1 0 % デキストロースを被包 s i R N A 粒子に加えることによって、得られたナノ粒子を 5 % デキストロースに懸濁する。

【 0 3 3 5 】

#### 実施例 4 1

s i R N A とジオレオイルモノアミン / m P E G - ジオレオイルモノアミンの複合体の形質移入活性

s i R N A とジオレオイルモノアミン / m P E G - ジオレオイルモノアミンの複合体の形質移入活性を試験管内で以下のように測定する。使用する s i R N A は、内因性カベオリン - 1 ( C a v - 1 ) の転写物レベルのノックダウンを生じるように意図されたヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質は、ジオレオイルモノアミン ( 実施例 3 ) と m P E G - ジオレオイルモノアミン ( 実施例 3 4 ) の混合物である。リポソームを調製するには、脂質をクロロホルムに溶解し、混合して脂質の均質な混合物を確保する。回転蒸発によって有機溶媒を除き、丸底フラスコの壁上で脂質の薄膜を得る。丸底フラスコを一晩真空ポンプに入れることによってクロロホルムをさらに蒸発させる。得られた脂質膜を所望の濃度にて蒸留水で再水和し、数分間激しく攪拌する。溶液を超音波処理槽に 1 時間入れ、次いで 2 0 0 n m のシリンジフィルターを介して濾過し、最終的なリポソーム溶液を得る。水に溶解した s i R N A をリポソーム溶液に加える。等量の 1 0 % デキストロースを被包 s i R N A 粒子に加えることによって、得られたナノ粒子を 5 % デキス

トローに懸濁する。SCCVII細胞 ( $0.5 \times 10^5$  個の細胞/ウェル) を 10% FBS にて 24 穴組織培養プレートに播く。総容積 250  $\mu$ L DMEM にて FBS の非存在下又は存在下において 0.5  $\mu$ g の複合体化 siRNA と共に各ウェルを 6 時間インキュベートする。その培地に FBS を欠く細胞についてインキュベーション時間が終了すると、20% の FBS を補完した 250  $\mu$ L の DMEM を形質移入した細胞に加え、さらに 40 時間インキュベートする。その形質移入培地に FBS を伴った細胞には、10% の FBS を補完した 250  $\mu$ L の DMEM を形質移入した細胞に加え、さらに 40 時間インキュベートする。インキュベーション時間の終了時、Cav-1 転写物のノックダウンを細胞溶解物で測定する。Cav-1 転写物の解析を行うには、トリス試薬を用いて細胞を溶解し、qRT-PCR 検出キットを用いて Cav-1 転写物のレベルについて定量する。非サイレンシング対照に比べて、Cav-1 の転写物は 90% まで阻害される。

10

#### 【0336】

##### 実施例 42

ジオレオイルモノアミン/mPEG-ジオレオイルモノアミンによって被包された siRNA の形質移入活性

ジオレオイルモノアミン/mPEG-ジオレオイルモノアミンによって被包された siRNA の形質移入活性を試験管内で以下のように測定する。使用する siRNA は、内因性カベオリン-1 (Cav-1) の転写物レベルのノックダウンを生じるように意図されたヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質は、ジオレオイルモノアミン (実施例 3) と mPEG-ジオレオイルモノアミン (実施例 34) の混合物である。被包リポソームを調製するには、脂質をクロロホルムに溶解し、混合して脂質の均質な混合物を確保する。回転蒸発によって有機溶媒を除き、丸底フラスコの壁上で脂質の薄膜を得る。丸底フラスコを一晩真空ポンプに入れることによってクロロホルムをさらに蒸発させる。得られた脂質膜をまず 100% エタノールに溶解し、次いで 50% にする。水に溶解した siRNA をリポソーム/エタノールの溶液に加える。回転蒸発方式によってリポソーム/siRNA の混合物からエタノールを蒸発させる。等量の 10% デキストロースを被包 siRNA 粒子に加えることによって、得られたナノ粒子を 5% デキストロースに懸濁する。SCCVII細胞 ( $0.5 \times 10^5$  個の細胞/ウェル) を 10% FBS にて 24 穴組織培養プレートに播く。総容積 250  $\mu$ L DMEM にて FBS の非存在下又は存在下において 0.5  $\mu$ g の複合体化 siRNA と共に各ウェルを 6 時間インキュベートする。その培地に FBS を欠く細胞についてインキュベーション時間が終了すると、20% の FBS を補完した 250  $\mu$ L の DMEM を形質移入した細胞に加え、さらに 40 時間インキュベートする。その形質移入培地に FBS を伴った細胞には、10% の FBS を補完した 250  $\mu$ L の DMEM を形質移入した細胞に加え、さらに 40 時間インキュベートする。インキュベーション時間の終了時、Cav-1 転写物のノックダウンを細胞溶解物で測定する。Cav-1 転写物の解析については、トリス試薬を用いて細胞を溶解し、次いで qRT-PCR 検出キットを用いて Cav-1 転写物のレベルについて定量する。非サイレンシング対照に比べて、Cav-1 の転写物は 45% まで阻害される (図 5B を参照)。

20

30

#### 【0337】

##### 実施例 43

ジオレオイルモノアミンと mPEG-ジオレオイルモノアミンによって複合体化された siRNA の投与に続く肺におけるカベオリン-1 転写物のノックダウン

カベオリン-1 (Cav-1) 転写物を標的とする以前製剤化された siRNA をメス ICR マウス (17~22 グラム) に静脈内 (IV) 注射する。siRNA 複合体は、100、60、40、20 又は 10  $\mu$ g の siRNA と共にジオレオイルモノアミンと mPEG-ジオレオイルモノアミンの 10:0 混合物を含有する (N:P 比、20:1) (実施例 9 を参照)。注射後 48 時間で動物を安楽死させ、qRT-PCR を用いた標的 Cav-1 転写物の解析及び siRNA の定量のために肺を回収する。Cav-1 転写物のレベル (内部対照としての  $\alpha$ -アクチンに対して転写物レベルを標準化される) は、未処理の対照動物と比べた発現比率として表される。結果は、100  $\mu$ g の siRNA を投与さ

40

50

れた動物での  $> 60\%$  から  $10\mu\text{g}$  の  $\text{siRNA}$  を投与された動物での約  $13\%$  までに及ぶ動物の肺における  $\text{Cav-1}$  転写物レベルの用量依存性の低下を示す。注射した  $\text{siRNA}$  の定量は、肺に分布する  $\text{siRNA}$  の絶対量において用量依存性の増加を示す (図6)。最低用量にて、注射された  $\text{siRNA}$  の約  $5\%$  が肺に分布する。最高用量では、注射された  $\text{siRNA}$  の約  $50\%$  が肺に分布する。動物の数 (「 $n$ 」) は各群 6 匹である。

#### 【0338】

##### 実施例 44

ジオレオイルモノアミン/ラクトビオニル-ジオレオイルモノアミンによって被包された  $\text{siRNA}$  の形質移入活性

オレオイルモノアミン/ラクトビオニル-ジオレオイルモノアミンによって被包された  $\text{siRNA}$  の形質移入活性を試験管内で以下のように測定する。使用する  $\text{siRNA}$  は、

- アクチンの転写物レベルのノックダウンを生じるように意図されたヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質は、ジオレオイルモノアミン (実施例 3) とラクトビオニル-ジオレオイルモノアミン (実施例 35) の混合物である。被包リボソームを調製するには、脂質をクロロホルムに溶解し、混合して脂質の均質な混合物を確保する。回転蒸発によって有機溶媒を除き、丸底フラスコの壁上で脂質の薄膜を得る。丸底フラスコを一晩真空ポンプに入れることによってクロロホルムをさらに蒸発させる。得られた脂質膜を先ず  $100\%$  エタノールに溶解し、次いで  $50\%$  にする。水に溶解した  $\text{siRNA}$  をリボソーム/エタノールの溶液に加える。回転蒸発方式によってリボソーム/ $\text{siRNA}$  の混合物からエタノールを蒸発させる。等量の  $10\%$  デキストロースを被包  $\text{siRNA}$  粒子に加えることによって、得られたナノ粒子を  $5\%$  デキストロースに懸濁する。Hepa16細胞 ( $0.5 \times 10^5$  個の細胞/ウェル) を  $10\%$  FBS にて 24 穴組織培養プレートに播く。総容積  $250\mu\text{L}$  DMEM にて FBS の非存在下又は存在下において  $0.5\mu\text{g}$  の複合体化  $\text{siRNA}$  と共に各ウェルを 6 時間インキュベートする。その培地に FBS を欠く細胞についてインキュベーション時間が終了すると、 $20\%$  の FBS を補完した  $250\mu\text{L}$  の DMEM を形質移入した細胞に加え、さらに 40 時間インキュベートする。その形質移入培地に FBS を伴った細胞には、 $10\%$  の FBS を補完した  $250\mu\text{L}$  の DMEM を形質移入した細胞に加え、さらに 40 時間インキュベートする。インキュベーション時間の終了時、- アクチン転写物のノックダウンを細胞溶解物で測定する。- アクチン転写物の解析については、トリス試薬を用いて細胞を溶解し、次いで qRT-PCR 検出キットを用いて - アクチン転写物のレベルについて定量する。非サイレンシング対照に比べて、- アクチンの転写物は  $90\%$  まで阻害されるが、LBA リガンドを欠く同一の粒子を含有する試料は、非サイレンシング対照に比べて  $57\%$  の阻害しか示さなかった (図7)。

#### 【0339】

##### 実施例 45

ジオレオイルモノアミンによって複合体化された  $\text{siRNA}$  の架橋ゲルからの制御された放出

#### 【0340】

実施例 39 で記載されたように、 $50\mu\text{g}$  の  $\text{Cav-1}$  の  $\text{siRNA}$  と  $1.4\mu\text{g}$  のジオレオイルモノアミンを  $50\mu\text{L}$  の容積に含有させて、ジオレオイルモノアミンによって複合体化された  $\text{siRNA}$  を製剤化する。アルギン酸ナトリウム (A 型) を水に溶解して  $2\%$  溶液を得る。アルギン酸溶液 ( $100\mu\text{L}$ ) を 96 穴プレートの単一のウェルに加え、次いで  $50\mu\text{L}$  のジオレオイルモノアミン/ $\text{Cav-1}$  の  $\text{siRNA}$  の溶液を加える。十分に混合した後、 $50\mu\text{L}$  の  $0.68\text{M}$  の  $\text{CaCl}_2$  を前の混合物に加え、ゲルを架橋する。次いで、 $100\mu\text{L}$  の水又は  $0.1\text{M}$  の EDTA ( $\text{Ca}^{2+}$  イオンを錯体化することによってゲルを壊すのに役立つ) を加えて水溶液中でのゲルの完全な浸漬を保証する。記載された時点で、上清を取り出し ( $200\mu\text{L}$ )、新しい  $200\mu\text{L}$  の水又は  $0.1\text{M}$  の EDTA に置き換える。84 時間後、qRT-PCR を用いて、回収した試料すべてを  $\text{Cav-1}$  の  $\text{siRNA}$  について解析する。時間をかけて放出された量を判定するために

、各時点で回収された s i R N A の量を合計する。E D T A の添加を有する試料では、負荷されたジオレオイルモノアミン複合体化 s i R N A の 1 0 0 % が 8 4 時間後放出される。E D T A を含有しない試料では、8 4 時間までに放出される負荷された合計 s i R N A の < 2 0 % で有意に遅い放出動態が認められた ( 図 8 ) 。

#### 【 0 3 4 1 】

##### 実施例 4 6

ほかの市販のカチオン性脂質とカチオン性ポリマー系で複合体化した s i R N A と比べたジオレオイルモノアミンと m P E G - ジオレオイルモノアミンで複合体化した s i R N A の投与に続く肺におけるカベオリン - 1 転写物のノックダウン

カベオリン - 1 ( C a v - 1 ) 転写物を標的とする以前製剤化された s i R N A をメス I C R マウス ( 1 7 ~ 2 2 グラム ) に静脈内 ( I V ) 注射する。s i R N A 複合体は、4 0  $\mu$  g の s i R N A と共にジオレオイルモノアミンと m P E G - ジオレオイルモノアミンの 1 0 : 0 混合物を含有する ( N : P 比、2 0 : 1 ) ( 実施例 9 を参照 ) 。さらに、2 0 : 1 の N : P 比での D O T A P : D O P E ( 1 : 1 ) 又は 2 5 k D a の分枝鎖 P E I ( 1 0 : 1 ) のいずれかと共に s i R N A を製剤化する。D O T A P : D O P E と共に製剤化した合計 4 0  $\mu$  g の s i R N A ) ( 2 0 0  $\mu$  L にて ) をマウスに I V 注射する、又は分枝鎖 P E I と共に製剤化した合計 2 0  $\mu$  g の s i R N A ) ( 1 0 0  $\mu$  L にて ) を I V 注射する。この製剤に関連する既知の毒性を試み、緩和するために、低い用量で分枝鎖 P E I を用いる。注射の 4 8 時間後に動物を安楽死させ、q R T - P C R を用いた標的 C a v - 1 転写物の解析及び s i R N A の定量のために肺及び肝臓を回収する。C a v - 1 転写物のレベル ( 内部対照としての  $\alpha$  - アクチンに対して転写物レベルを標準化される ) は、未処理の対照動物と比べた発現比率として表される。動物の数 ( 「 n 」 ) は各群 5 匹である。結果は、肺における C a v - 1 発現にて有意な転写物のノックダウン ( 約 6 0 % ) 及び肝臓における約 3 3 % の転写物ノックダウンを示す。D O T A P : D O P E で製剤化した s i R N A について有意な転写物ノックダウンは言及されない。分枝鎖 P E I で製剤化した s i R N A については、組織を回収する前に製剤に関連する毒性のために動物が死亡したので、解析できなかった ; ジオレオイルモノアミンと m P E G - ジオレオイルモノアミンで製剤化した s i R N A 及び D O T A P : D O P E で製剤化した s i R N A は、毒性がほとんどなく投与された。

#### 【 0 3 4 2 】

##### 実施例 4 7

ジオレオイルクロスアミン / P S M A ターゲティングアプタマーによって被包された s i R N A の形質移入活性

ジオレオイルクロスアミン / P S M A ターゲティングアプタマーによって被包された s i R N A の形質移入活性を試験管内で以下のように測定する。使用する s i R N A は、C a v - 1 の転写物レベルのノックダウンを生じるように意図されたヌクレオチドの二本鎖配列である。使用するカチオン性脂質は、ジオレオイルクロスアミン ( 実施例 1 ) である。RNA アプタマーは前立腺特異的膜抗原を標的とし、3 ' 末端に s s R N A ウリジンテイルを含む ( P S M A アプタマーの配列 : 5 ' - G G G A G G A C G A U G C G G A U C A G C C A U G U U U A C G U C A C U C C U A A U - 3 ' ) 。非結合性の変異アプタマーを陰性対照として含める ( 変異 P S M A アプタマーの配列 : 5 ' - G G G A G G A C G A U G C G G A U C A G C C A U C C U U A C G U C A C U C C U A A U - 3 ' ) 。被包したリボソームは実施例 4 5 で記載されたように調製する。RNA アプタマーを被包リボソームに加え、室温で 3 0 分間インキュベートすることによって標的化されたりボソームを調製する。L N C a p 細胞 ( 2 . 5  $\times$  1 0 <sup>5</sup> 個の細胞 / ウェル ) を 1 0 % F B S にて 2 4 穴組織培養プレートに播く。総容積 5 0 0  $\mu$  L の R P M I 1 6 4 0 にて F B S の非存在下において 0 . 1  $\mu$  g の標的化リボソーム又は非標的化対照リボソームと共に各ウェルを 5 時間インキュベートする。インキュベーション時間が終了すると、1 0 % の F B S を補完した 5 0 0  $\mu$  L の R P M I 1 6 4 0 で培地を置き換え、さらに 4 0 時間インキュベートする。イ

ンキュベート時間の終了時、C a v - 1 転写物のノックダウンを細胞溶解物で測定する。転写物の解析については、細胞を溶解し、Q i a g e n の R N E a s y キット ( Q i a g e n の製品番号 : 7 4 1 0 6 ) を用いて全 R N A を精製する。q R T - P C R 検出キットを用いて C a v - 1 と G A P D H ( 内部対照 ) の転写物レベルを定量する。非サイレンシング対照に比べて、C a v - 1 転写物レベルは、P S M A ターゲティングリボソームで処理された細胞では 7 0 % 枯渇する。これは、非ターゲティング変異 P S M A アプタマーで処理した細胞とは対照的であり、それは、非サイレンシング対照と比べて C a v - 1 転写物の枯渇を示さない。前立腺特異的膜抗原を欠く細胞 ( チャイニーズハムスターの卵巣細胞 ) の処理は、ターゲティングアプタマーの同一性とは無関係に、非サイレンシング対照と比べて C a v - 1 枯渇の類似したレベル ( 約 3 5 % ) を示す ( 図 1 0 ) 。

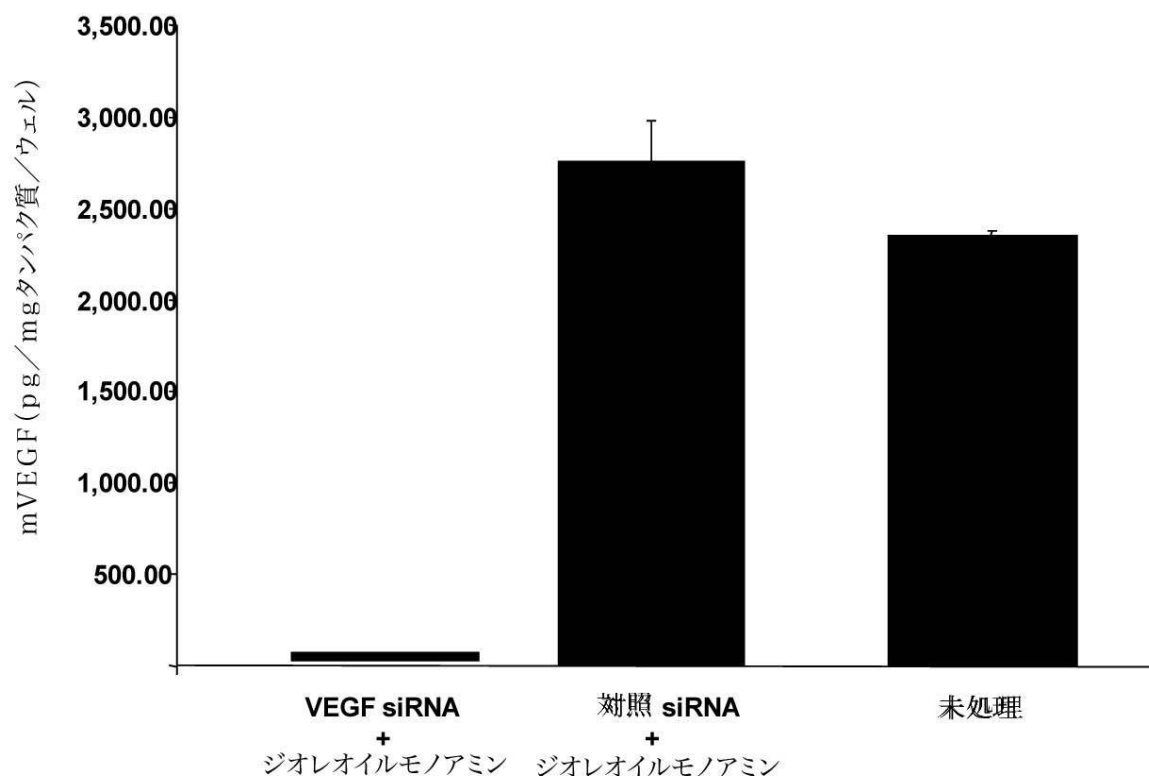
10

#### 【 0 3 4 3 】

本発明及びそれを作製する及び使用する方法及び工程を、当業者が同様に作製し、使用できるように完全な、明瞭な、簡明な及び正確な用語で記載している。前述は本発明の好ましい実施形態を記載し、特許請求の範囲で言及されるような本発明の精神又は範囲を逸脱することなく、そこで改変が為されてもよいことが理解されるべきである。本発明とみなされる主題を特に指摘し、はっきりと主張するために、以下の特許請求の範囲が、本明細書を結論付ける。

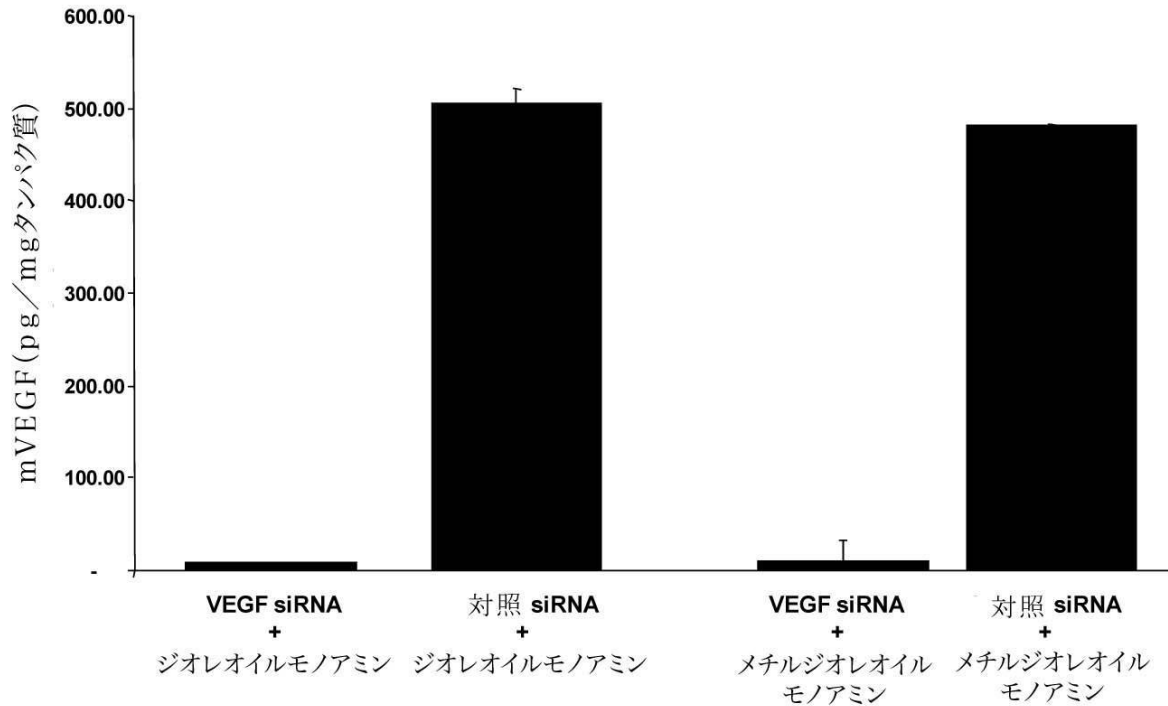
#### 【 図 1 】

ジオレオイルモノアミンによって製剤化された VEGF - s i R N A による  
SCCVII 細胞における VEGF 遺伝子のノックダウン



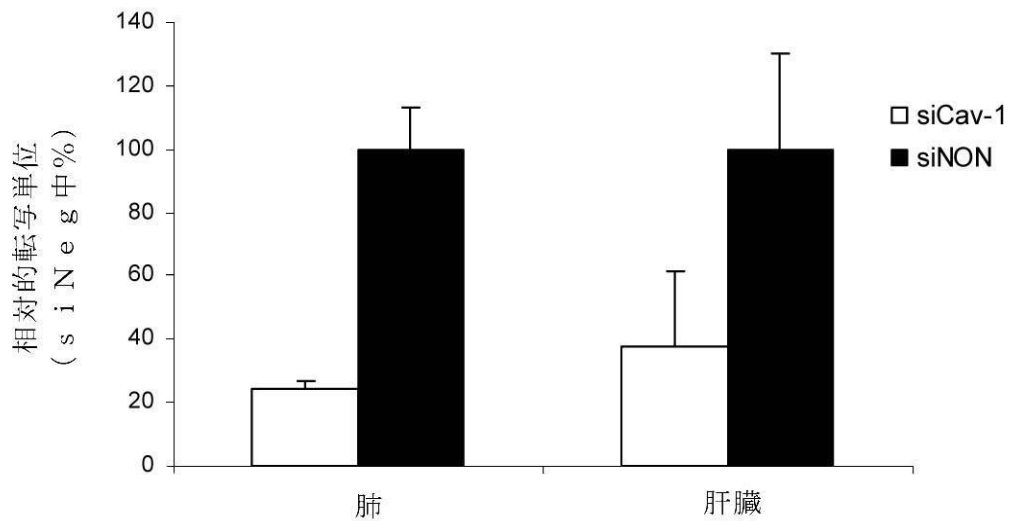
【図 2】

ジオレオイルモノアミン又はメチル-ジオレオイルモノアミンによって製剤化された VEGF-siRNA による SCCVII 細胞における VEGF 遺伝子のノックダウン



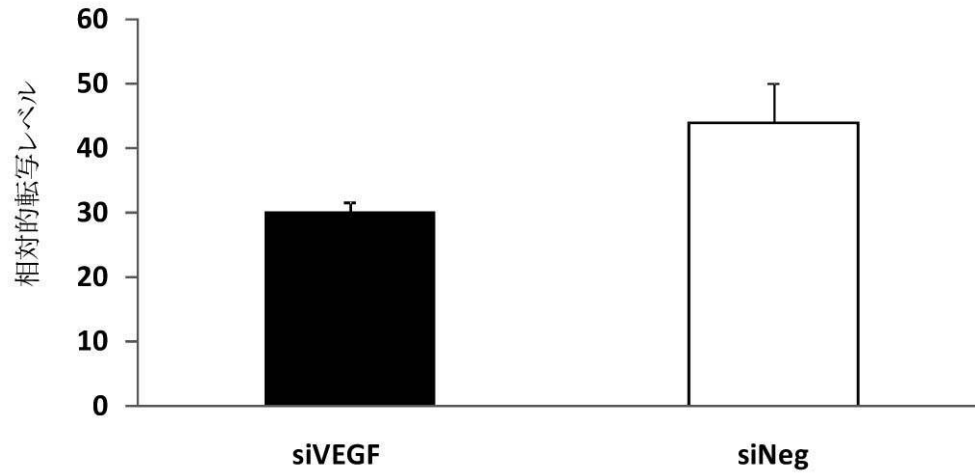
【図 3】

肺と肝臓におけるカベオリン-1 転写物のレベル



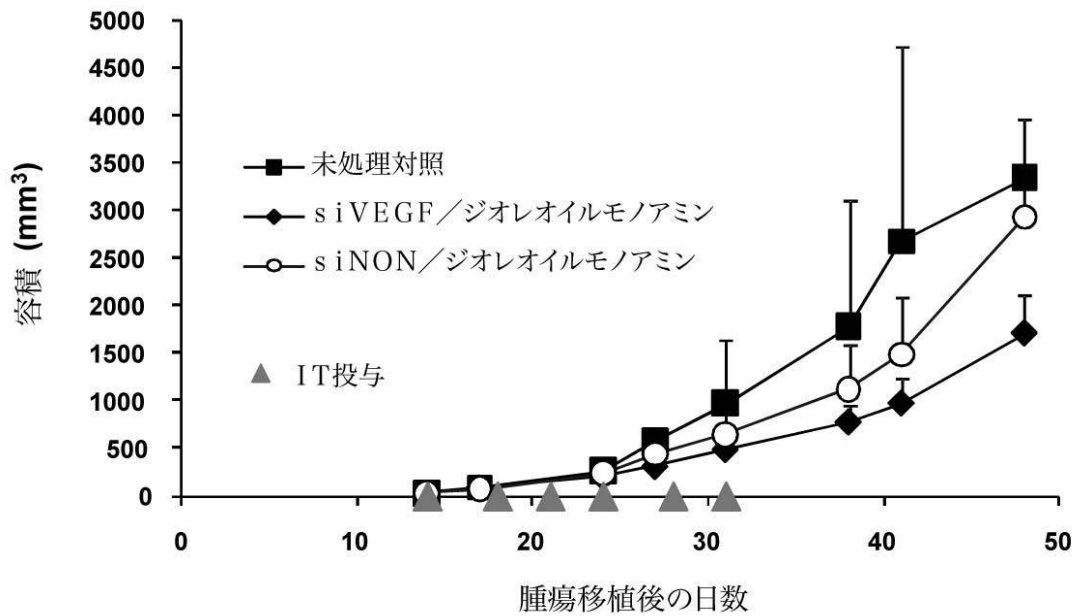
【図4A】

ジオレオイルモノアミンで製剤化したsiRNAの2回のIT注射に続く  
SCCVII腫瘍におけるmVEGFの発現レベル



【図4B】

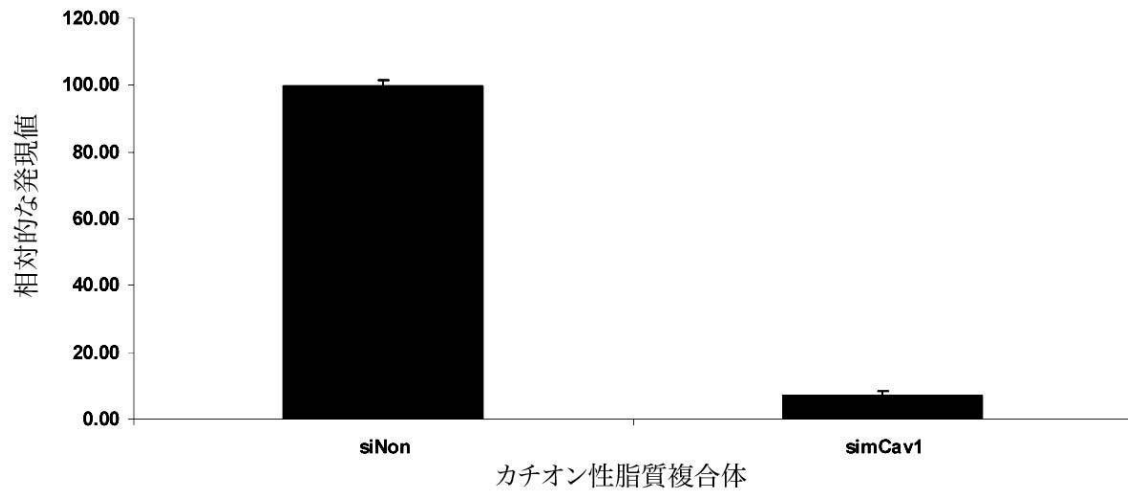
製剤化されたVEGF-siRNAの反復腫瘍内投与の後の  
SCCVII腫瘍の容積





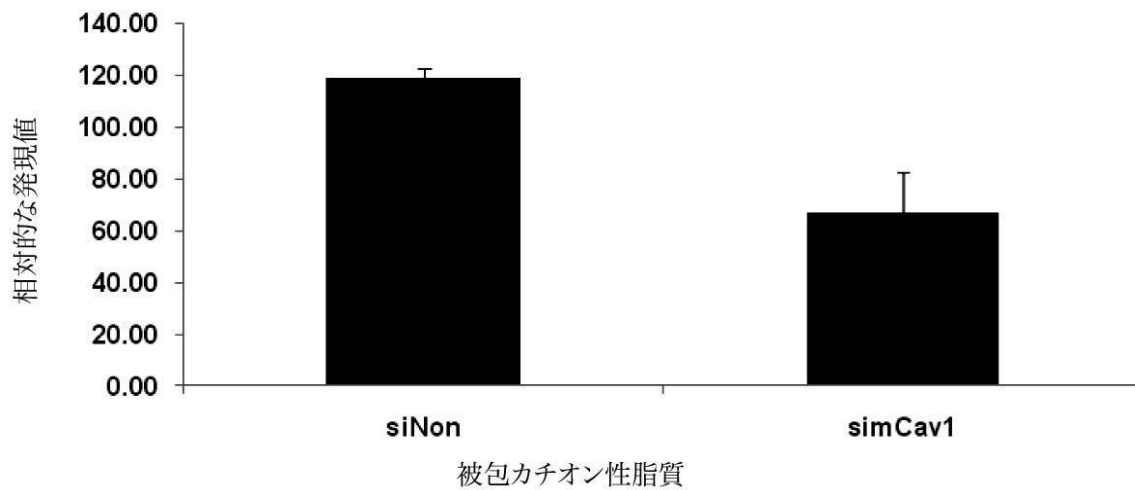
【図 5 A】

製剤化したCAV-1-siRNAによる形質移入後の  
SCCVII細胞におけるCAV-1転写物のレベル



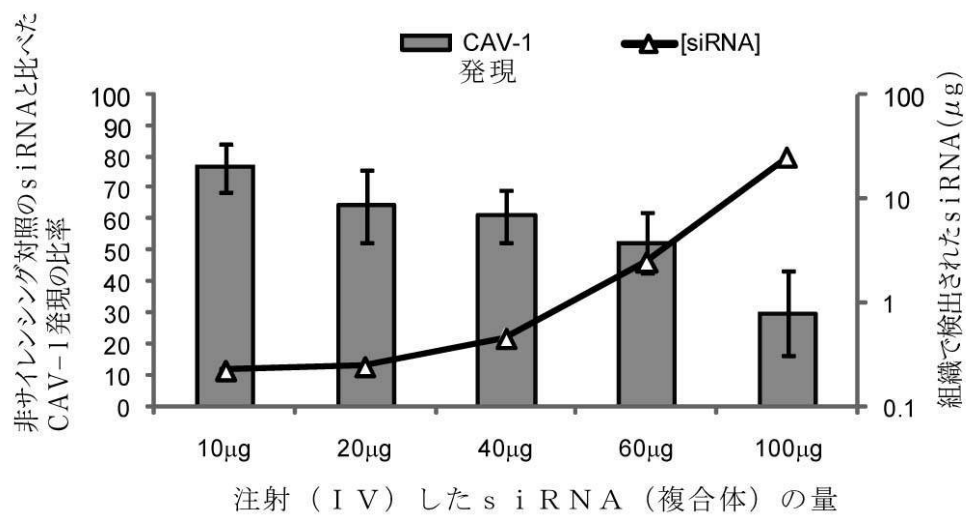
【図 5 B】

被包CAV-1-siRNAによる形質移入後の  
SCCVII細胞におけるCAV-1転写物のレベル



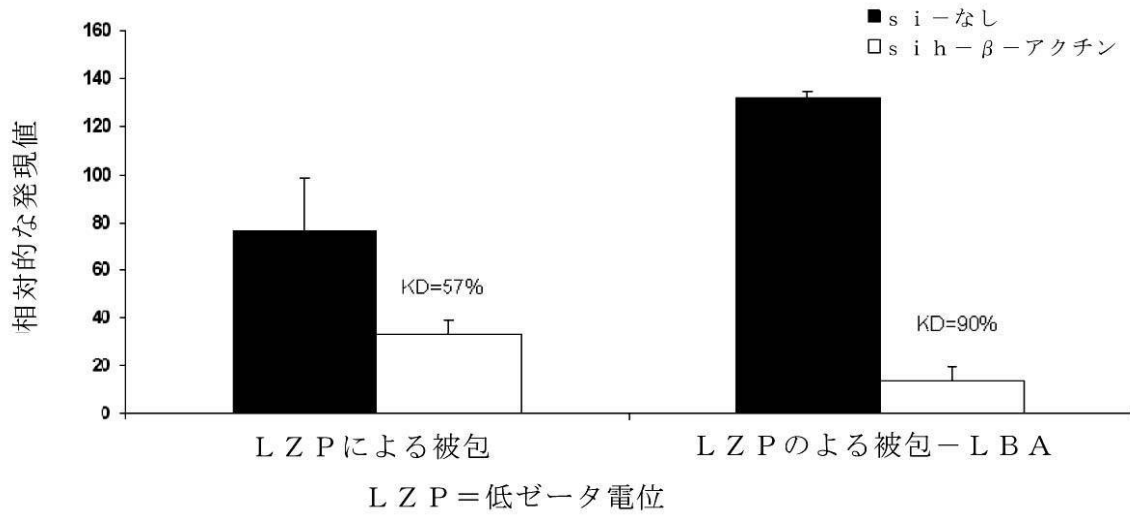
【図 6】

用量依存性のCAV-1ノックダウン及びsiRNAの分布



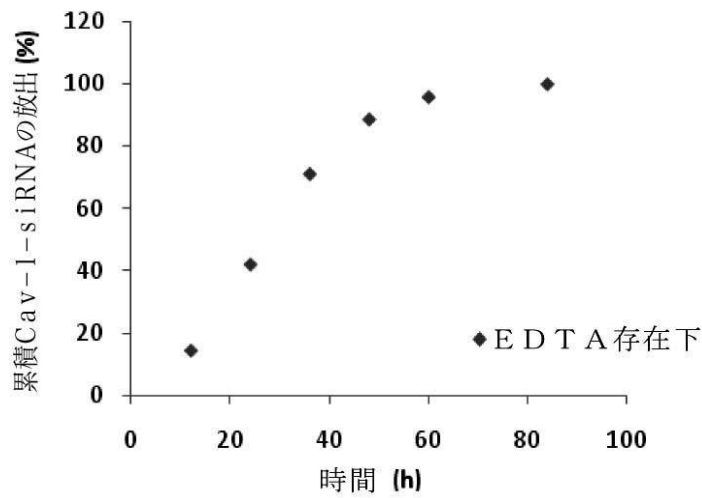
【図7】

L Z Pによる被包を伴ったL B Aターゲティング  
部分を用いたノックダウン活性の増大

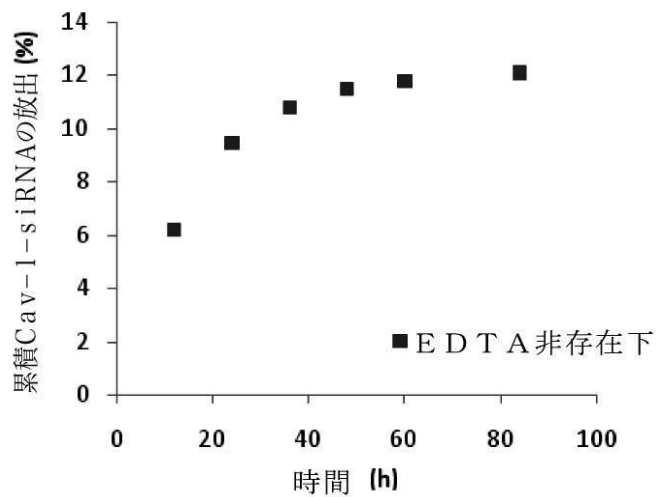


【図8】

C a v - 1 - s i R N Aの制御された放出

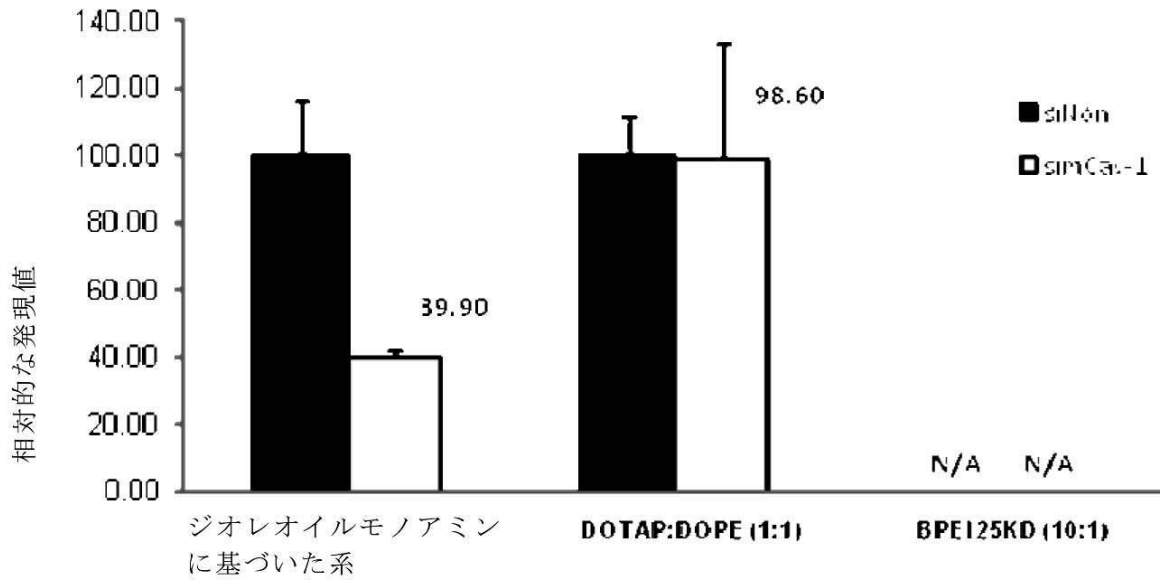


C a v - 1 - s i R N Aの制御された放出

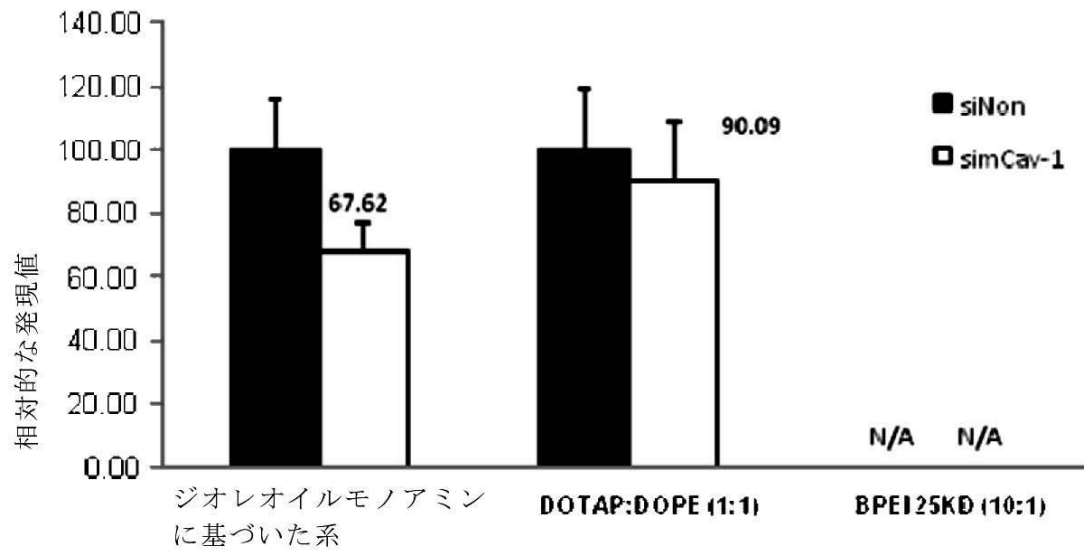


【図 9】

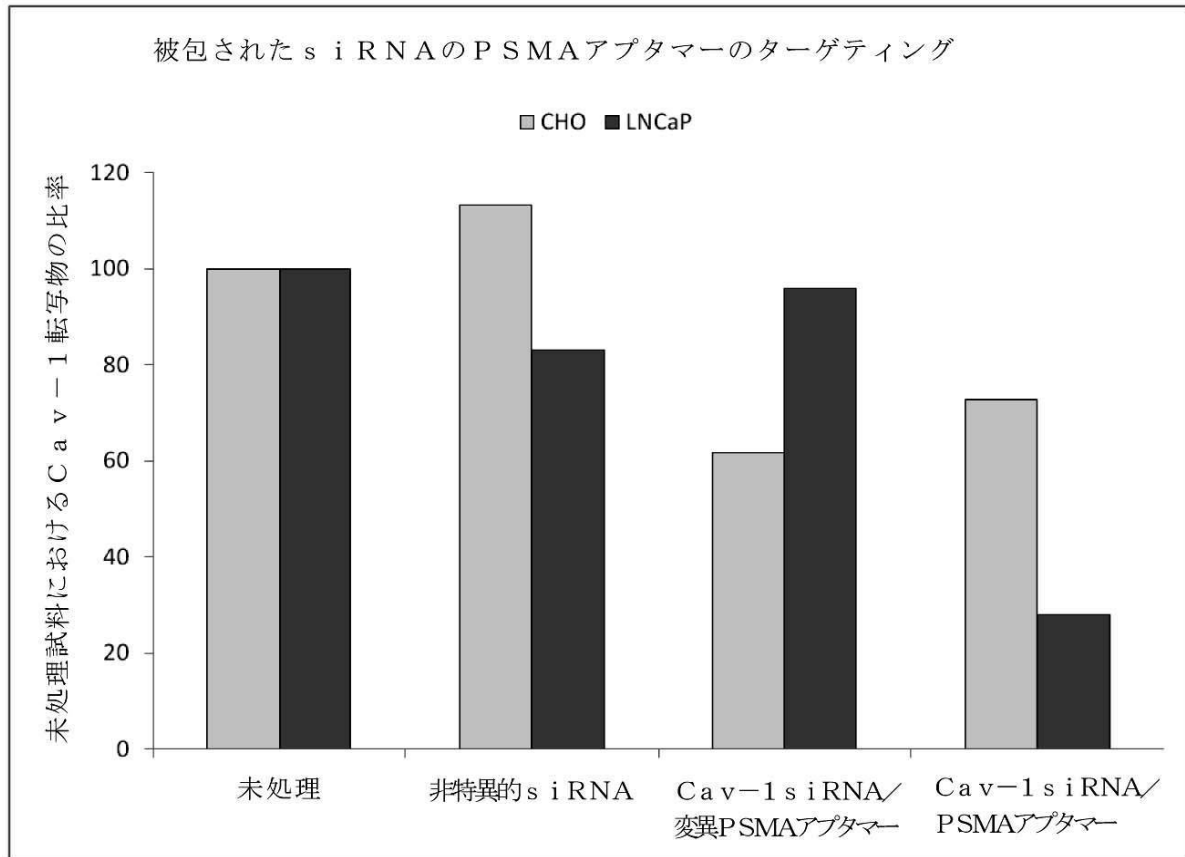
種々の s i R N A 製剤の I T 注射後の肺における m C a v - 1 の発現  
レベル



種々の s i R N A 製剤の I T 注射後の肝臓における m C a v - 1 の発現  
レベル



【図 10】



【配列表】

0005782602000001.app

## 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
A 6 1 K 9/127 (2006.01)		A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 47/18 (2006.01)		A 6 1 K 47/18
A 6 1 K 31/525 (2006.01)		A 6 1 K 31/525
A 6 1 K 47/48 (2006.01)		A 6 1 K 47/48
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00
C 0 8 G 65/333 (2006.01)		C 0 8 G 65/333

- (72)発明者 コンゴ、リチャード  
アメリカ合衆国、アラバマ、ハンツビル、ウェスチース ロー 2 0 7
- (72)発明者 マター、マジエド  
アメリカ合衆国、アラバマ、マディソン、トッテンハム ウェイ 1 1 9
- (72)発明者 フェウエル、ジェイソン  
アメリカ合衆国、アラバマ、マディソン、インランド ベイ ドライブ 1 1 1
- (72)発明者 アンワー、クルシェード  
アメリカ合衆国、アラバマ、マディソン、トウィード ドライブ 1 0 9
- (72)発明者 スパークス、ブライアン、ジェフリー  
アメリカ合衆国、アラバマ、ハンツビル、セ リー ドライブ 1 2 1

審査官 井上 明子

- (56)参考文献 国際公開第2008/096012(WO, A1)  
特表2001-505191(JP, A)  
米国特許出願公開第2005/0095280(US, A1)  
特表平10-502679(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- C 0 7 C 2 3 3 / 3 8  
A 6 1 K 9 / 1 2 7  
A 6 1 K 9 / 1 4  
A 6 1 K 3 1 / 5 2 5  
A 6 1 K 3 1 / 7 1 3  
A 6 1 K 4 7 / 1 8  
A 6 1 K 4 7 / 4 8  
A 6 1 K 4 8 / 0 0  
A 6 1 P 3 5 / 0 0  
C 0 7 C 2 3 5 / 1 0  
C 0 7 C 2 3 5 / 6 0  
C 0 8 G 6 5 / 3 3 3  
C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )