

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(10) 国際公開番号

WO 2013/089151 A1

(43) 国際公開日

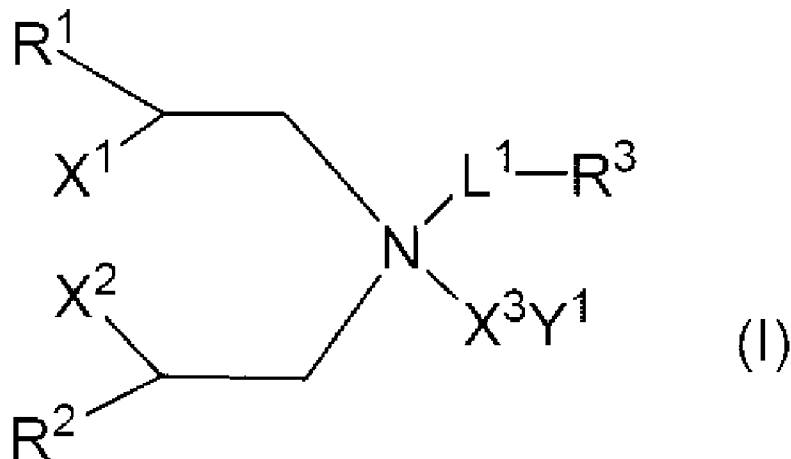
2013 年 6 月 20 日 (20.06.2013)

W O P O I P C T

- (51) 国際特許分類 :
A61K 47/18 (2006.01) A61K3 腫 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) C07C 211/21 (2006.01)
- (21) 国際出願番号 : PCT/JP20 12/082245
- (22) 国際出願日 : 2012 年 12 月 12 日 (12.12.2012)
- (25) 国際出願の言語 : 日本語
- (26) 国際公開の言語 : 日本語
- (30) 優先権データ :
61/569,400 2011 年 12 月 12 日 (12.12.2011) U S
61/670,854 2012 年 7 月 12 日 (12.07.2012) U S
- (71) 出願人 : 協和発酵キリン株式会社 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者 : 窪山 剛之 (KUBOYAMA, Takeshi); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 江良 公宏 (ERA, Tomohiro); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 直井 智幸 (NAOI, Tomoyuki); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, ML, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, ML, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類 :
- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: LIPID NANOPARTICLES FOR DRUG DELIVERY SYSTEM CONTAINING CATIONIC LIPIDS

(54) 発明の名称 : カチオン性脂質を含有するドラッグデリバリーシステムのための脂質ナノ粒子



(57) Abstract: The present invention provides lipid nanoparticles etc. containing cationic lipids for delivering drugs containing cationic lipids that make it easy to introduce nucleic acids into cells etc., for example. The cationic lipids are represented by formula (I) (in the formula: R^1 and R^2 are the same or different alkenyls etc.; X^3 does not exist, or is an alkyl etc.; X^1 and X^2 are hydrogen atoms, or together form a single bond or an alkylene; Y^1 does not exist, or is an anion; L^1 is a single bond etc.; and R^3 is an alkyl etc.).

(57) 要約 : 本発明は、例えば、核酸を細胞内等に導入することを容易にするカチオン性脂質を含有する薬物送達のための、式 (I) (式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なってアルケニル等であり、 X^3 は存在しないか、アルキル等であり、 X^1 および X^2 は水素原子であるか、または一緒になって単結合もしくはアルキレンを形成し、 Y^1 は存在しないか、陰イオンであり、 L^1 は単結合等であり、 R^3 はアルキル等である) で表されるカチオン性脂質を含有する脂質ナノ粒子等を提供する。

151 A1
2013/

明 細 書

発 明 の 名 称 :

カチオン性脂質を含有するドラッグデリバリーシステムのための脂質ナノ粒子

技 術 分 野

[0001] 本発明は、例えば、核酸を細胞内等に導入することを容易にするカチオン性脂質を含有する薬物送達 (ドラッグデリバリーシステム) のための脂質ナノ粒子等に関する。

背景技術

[0002] カチオン性脂質とは、一つまたは複数の炭化水素基を含む脂質親和性領域と、少なくとも一つのプラスに帯電した極性ヘッドグループを含む親水性領域を有する両親媒性分子である。カチオン性脂質と核酸等の巨大分子が、総荷電としてプラスに帯電する複合体を形成することにより、核酸等の巨大分子が細胞の原形質膜を通過して細胞質に入りやすくなるため、カチオン性脂質は有用である。インビトロおよびインビボにおいて行うことのできるこのプロセスは、トランスフェクションとして知られている。

典型的には、カチオン性脂質は、単独で用いられるかまたはリン脂質などの中性脂質と組み合わせられる。カチオン性脂質と中性脂質とを組み合わせることは、整列した脂質二重層を含む小胞を容易に形成できることから有用であることが知られている。カチオン性脂質が単独でまたは中性脂質と組み合わせられて形成する小胞、またはリボソームは、表面に多数のプラス荷電を有し、この荷電により、ポリヌクレオチドまたはマイナスに帯電したたんぱく質などの他のアニオン分子と複合体を形成できる。ポリヌクレオチド/カチオン性脂質/中性脂質複合体の表面上の残りめ総カチオン荷電により、細胞膜表面の主にマイナスの電荷と強い相互反応を起こすことが可能である。

多くの異なる種類のカチオン性脂質が、トランスフェクションに使用するために合成されており、現在市販されている。このようなカチオン性脂質に

は、例えば、Lipofectin、Lipofectin ACE、Lipofect AMINE、Transfectam、DOTAP 等がある。

特許文献1中で開示される、N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)等は、初期に開発されたカチオン性脂質のひとつである。DOTMA等は、分子にカチオン部位を与える、第四級窒素有するプロパナミニウム基、および分子のプロピルバックボーンにエーテル結合する一対の高級炭化水素により特徴付けられる。第四級窒素は、メチル基などの比較的短鎖のアルキル鎖で三置換されている。構造上類似のカチオン性脂質、N-(2, 3-ジ-(9-(Z)-オクタデセノイルオキシ))-プロパ-1-イル-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTAP)は、エーテル結合したアルキル基ではなく、アシル基を含む。

特許文献2および3中で開示される、例えば、N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシプロピル)]-N, N, N-ジメチル-N-ヒドロキシエチル臭化アンモニウム(DORIE)、2, 3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スベルミンカルボキシアミド)エチル]-N, N, N-ジメチル-1-プロパナミニウムトリフルオロ酢酸(DOSPA)等は、分子にカチオン部位を与える、第四級窒素有するプロパナミニウム基、および分子のプロピルバックボーンにエーテル結合する一対の高級炭化水素により特徴付けられ、さらに第四級窒素は、メチル基などの比較的短鎖のアルキル鎖とヒドロキシアルキルで三置換されていることにより特徴付けられる。

特許文献4中には、例えば、1, 2-ジリノレイルオキシ-N, N, N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)等が開示されている。DLinDMA等は、より柔軟なカチオン性脂質を開発すること、それによりリポソーム等の膜流動性を高めることを目的に、構造上類似のカチオン性脂質であるDOTAPおよびDOTMAの高級アルキル基を、不飽和部位を少なくとも2カ所含む高級アルキル基としたことにより特徴付けられる。また、特許文献5中には、例えば、2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1, 3]-ジオキソラン(DLin-K-DMA)等が開示されている。

特許文献6中には、例えば、(3R, 4R)-3, 4-ビス((Z)-ヘキサデカ-9-エニルオキシ)-1-メチルピロリジン(化合物14)、N-メチル-N, N-ビス(2-(Z)-オクタデ

カ-6- エニルオキシ)エチル)アミン (化合物36) 等が開示されている。

一方、特許文献7中には、N-メチル-N,N-ジオレイルアミン等の単純アルキルアミン型 (の塩) のカチオン性脂質が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1 :特開昭61-161246号公報 (米国特許5049386号明細書)

特許文献2 :国際公開第91/16024号

特許文献3 :国際公開第97/019675号

特許文献4 :国際公開第2005/121348号

特許文献5 :国際公開第2009/086558号

特許文献6 :国際公開第2011/136368号

特許文献7 :国際公開第1998/051278号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

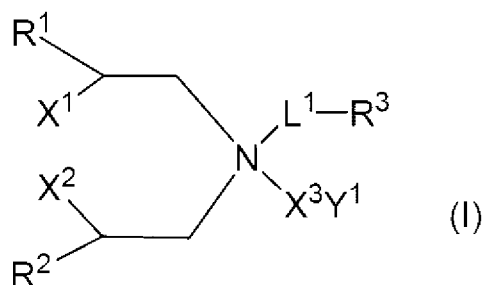
[0004] 本発明の目的は、例えば、核酸を、細胞内等に導入することを容易にするカチオン性脂質を含有する薬物送達 (ドラッグデリバリーシステム) のための脂質ナノ粒子等を提供することである。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明は以下の(1)~(24)に関する。

(1) 式(I)

[0006] [化1]



(式中、R¹およびR²は、同一または異なって炭素数10~24の直鎖状または分枝

状のアルキル、アルケニルまたはアルキニルであり、

x^1 および x^2 は、水素原子であるか、または一緒になって単結合もしくはアルキレンを形成し、

x^3 は存在しないか、炭素数1~6のアルキルまたは炭素数3~6のアルケニルであり、

x^3 が存在しない場合には、

Y^1 も存在せず、 i は単結合であり、 R^8 は水素原子、炭素数1~6のアルキル、炭素数3~6のアルケニル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1~6のアルキルもしくは炭素数3~6のアルケニルであるか、あるいは

Y^1 も存在せず、 i は-CO-または-CO-O-であり、 R^8 はピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イル、モルホリン-3-イルまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1~6のアルキルもしくは炭素数3~6のアルケニルであり、該置換基の少なくとも1つは、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ピロリジニル、ピペリジニルまたはモルホリニルであり、

x^3 が炭素数1~6のアルキルまたは炭素数3~6のアルケニルの場合には、

Y^1 は製薬上許容し得る陰イオンであり、 i は単結合であり、 R^8 は炭素数1~6のアルキル、炭素数3~6のアルケニル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ

、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数 1~ 6 のアルキルもしくは炭素数 3~6 のアルケニルである)で表されるカチオン性脂質を含有する薬物送達のための脂質ナノ粒子。

(2) R^1 および R^2 が、ドデシル、テトラデシル、(Z)-ドデカ-7-エニル、(Z)-テトラデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-4-エニル、(Z)-ヘキサデカ-7-エニル、(E)-ヘキサデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニル、(7Z, 10Z, 13Z)-ヘキサデカ-7, 10, 13-トリエニル、(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルである前記 (1) 記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

(3) R^1 および R^2 が、テトラデシル、ヘキサデシル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル、(9Z, 12Z, 15Z)-オクタデカ-9, 12, 15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニルまたは(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニルである前記 (1) 記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

(4) i が単結合であり、 R^3 が水素原子、メチル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1~ 3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数 1~ 6 のアルキルもしくは炭素数 3~6 のアルケニルである前記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

(5) i が-CO-または-CO-O-であり、 R^3 がピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1~ 3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素

数 1~ 6のアルキルもしくは炭素数3~6 のアルケニルであり、該置換基の少なくとも1つは、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルである前記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

(6) X^1 および X^2 が、一緒になって単結合またはアルキレンを形成する前記 (1) ~ (5) のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

(7) X^1 および X^2 が、一緒になって単結合またはアルキレンを形成し、 R^3 が水素原子、メチルまたは同一もしくは異なって1~ 3つのアミノ、ヒドロキシもしくはカルバモイルで置換された炭素数1~ 6のアルキルもしくは炭素数3~6 のアルケニルである前記 (1) ~ (5) のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

(8) X^1 および X^2 が、水素原子であり、 R^3 が水素原子、メチルまたは同一もしくは異なって1~ 3つのアミノ、ヒドロキシもしくはカルバモイルで置換された炭素数1~ 6のアルキルもしくは炭素数3~6 のアルケニルである前記 (1) ~ (5) のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

(9) X^3 が存在しない前記 (1) ~ (8) のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

(10) 薬物として核酸を含有する前記 (1) ~ (9) のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

(11) カチオン性脂質が、該核酸と複合体を形成しているか、または中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと該核酸との複合体を形成している、前記 (10) 記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

(12) カチオン性脂質が、該核酸と複合体を形成しているか、または中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと該核酸との複合体を形成しており、該複合体および該複合体を封入する脂質膜から構成された前記 (10) 記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

(13) 核酸がRNA干渉(RNAi)を利用した標的遺伝子の発現抑制作用を有する核酸である前記 (10) ~ (12) のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子

。

(14) 標的遺伝子が、腫瘍または炎症に関連する遺伝子である前記₍₁₃₎記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

(15) 前記₍₁₀₎～(14)のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子を用いて該核酸を細胞内に導入する方法。

(16) 細胞が、ほ乳類の腫瘍または炎症部位にある細胞である前記₍₁₅₎記載の方法。

(17) 細胞が、ほ乳類の肝臓、肺、腎臓または脾臓にある細胞である前記₍₁₅₎または₍₁₆₎記載の方法。

(18) 細胞内に導入する方法が、静脈内投与によって細胞内に導入する方法である前記₍₁₆₎または₍₁₇₎記載の方法。

(19) 前記₍₁₎～(14)のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子を哺乳動物に投与する癌または炎症疾患の治療方法。

(20) 投与する方法が、静脈内投与である前記₍₁₉₎記載の方法。

(21) 前記₍₁₎～(14)のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子を含む、疾患の治療に用いるための医薬。

(22) 静脈内投与用である前記₍₂₁₎記載の医薬。

(23) 前記₍₁₎～(14)のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子を含む、癌または炎症疾患の治療に用いるための癌または炎症疾患の治療剤。

(24) 静脈内投与用である前記₍₂₃₎記載の癌または炎症疾患の治療剤。

発明の効果

[0007] 例えば核酸を含有する本発明の薬物送達 (ドラッグデリバリーシステム) のための脂質ナノ粒子を、ほ乳類等に投与することにより、該核酸を、例えば細胞内等に容易に導入することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1] 実施例1～4で得られた製剤 (化合物1～4を用いた製剤) ならびに比較例1および2で得られた製剤 (化合物A-1 およびA-2 を用いた製剤) を、ヒト肝がん由

来細胞株 He_pG2細胞内に導入後の、標的遺伝子のmRNAの発現率を示す。縦軸は陰性対照を1とした場合の標的遺伝子のmRNAの発現率を示し、横軸は核酸濃度 (nM)、使用したカチオン性脂質の化合物番号を示す。

[図2] 実施例1~4と同様に得た製剤および実施例5で得られた製剤 (化合物1~5を用いた製剤)、ならびに比較例1および2と同様に得た製剤 (化合物A-1およびA-2を用いた製剤)を、それぞれマウスにCKAP5 siRNA 3または0.3 mg/kg 相当量を投与48時間後の血中コレステロールの値を示す。縦軸は生理食塩水投与群を100とした場合の血中コレステロール値の相対値を示す。各データの左棒および右棒は、CKAP5 siRNA 3および0.3 mg/kg 相当量を投与した場合をそれぞれ示す。

[図3] MI A PaCa-2 ゼノグラフマウスに実施例6および9で得られた製剤を、それぞれCKAP5 siRNA 10 mg/kg 相当量を投与後48時間後の腫瘍中CKAP5 mRNA量を示す。縦軸は生理食塩水処置群を1としたCKAP5 mRNA量の相対値を示す。

[図4] MI A PaCa-2 ゼノグラフマウスに実施例6~8で得られた製剤を、それぞれCKAP5 siRNA 10 mg/kg 相当量を投与後48時間後の腫瘍中CKAP5 mRNA量を示す。縦軸は生理食塩水処置群を1としたCKAP5 mRNA量の相対値を示す。◇は生理食塩水投与群、●は実施例9で得られた製剤の投与群を表わしている。

[図5] MI A PaCa-2 ゼノグラフマウスに実施例9で得られた製剤を、0日目および7日目に、CKAP5 siRNA 10 mg/kg 相当量を投与した際の腫瘍体積の推移を示す。縦軸は0日目を1とした腫瘍体積の相対値を示す。横軸は実験開始後の経過日数を示す。

[図6] MI A PaCa-2 ゼノグラフマウスに実施例10および11で得られた製剤を、それぞれEg5 siRNA 10 mg/kg 相当量を投与後48時間後の腫瘍中Eg5 mRNA量を示す。縦軸は生理食塩水処置群を1としたEg5 mRNA量の相対値を示す。

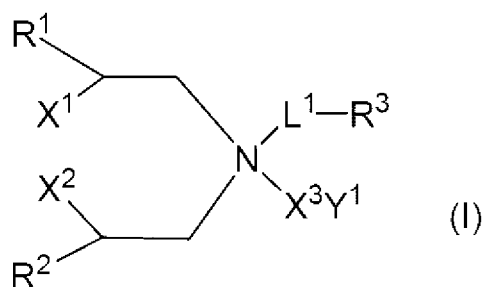
[図7] MI A PaCa-2 ゼノグラフマウスに実施例11で得られた製剤を、0日目に、Eg5 siRNA 10 mg/kg 相当量を投与した際の腫瘍体積の推移を示す。縦軸は0日目を1とした腫瘍体積の相対値を示す。横軸は実験開始後の経過日数を示す。◇は生理食塩水投与群、●は実施例11で得られた製剤の投与群を表わして

いる。

発明を実施するための形態

[0009] 本発明の脂質ナノ粒子が含有する、カチオン性脂質は、式(I)

[00 10] [化2]



(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なって炭素数10~24の直鎖状または分枝状のアルキル、アルケニルまたはアルキニルであり、

X^1 および X^2 は、水素原子であるか、または一緒になって単結合もしくはアルキレンを形成し、

X^3 は存在しないか、炭素数1~6のアルキルまたは炭素数3~6のアルケニルであり、

X^3 が存在しない場合には、

Y^1 も存在せず、 Y^1 は単結合であり、 R^3 は水素原子、炭素数1~6のアルキル、炭素数3~6のアルケニル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1~6のアルキルもしくは炭素数3~6のアルケニルであるか、あるいは

Y^1 も存在せず、 Y^1 は-CO-または-CO-O-であり、 R^3 はピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イル、モルホリン-3-イルまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイ

ル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数 1~6 のアルキルもしくは炭素数 3~6 のアルケニルであり、該置換基の少なくとも1つは、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ピロリジニル、ピペリジルまたはモルホリニルであり、

X^3 が炭素数 1~6 のアルキルまたは炭素数 3~6 のアルケニルの場合には、

Y^1 は製薬上許容し得る陰イオンであり、いは単結合であり、 R^3 は炭素数 1~6 のアルキル、炭素数 3~6 のアルケニル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数 1~6 のアルキルもしくは炭素数 3~6 のアルケニルである)で表される。

以下、式 (I) で表される化合物を化合物 (I) ということもある。他の式番号の化合物についても同様である。

[001 1] 式 (I) の各基の定義において、炭素数 10~24 の直鎖状または分枝状のアルキルとしては、例えばデシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、6, 10-ジメチルウンデカ-2-イル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、6, 10, 14-トリメチルペンタデカン-2-イル、ノナデシル、イコシル、ヘニコシル、ドコシル、トリコシル、テトラコシル等があげられる。

[001 2] 炭素数 10~24 の直鎖状または分枝状のアルケニルとしては、1~3つの2重結合を含む炭素数 10~24 の直鎖状または分枝状のアルケニルであればよく、例えば (Z)-ドデカ-7-エニル、(Z)-テトラデカ-7-エニル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-4-エニル、(Z)-ヘキサデカ-7-エニル、(E)-ヘキサデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニル、(7Z, 10Z, 13Z)-ヘキサデカ-7, 10, 13-トリエニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(9Z, 12Z)-オクタ

デカ-9, 12- ジエニル、(Z)- オクタデカ- 11- エニル、(9Z, 12Z, 15Z)- オクタデカ-9, 12, 15- トリエニル、(Z)- イコサ- 11- エニル、(11Z, 14Z)- イコサ- 11, 14- ジエニル等があげられ、好ましくは(Z)- トデカ-7- エニル、(Z)- テトラデカ-7- エニル、(Z)- ヘキサデカ-4- エニル、(Z)- ヘキサデカ-7- エニル、(E)- ヘキサデカ-7- エニル、(Z)- ヘキサデカ-9- エニル、(7Z, 10Z)- ヘキサデカ-7, 10- ジエニル、(7Z, 10Z, 13Z)- ヘキサデカ-7, 10, 13- トリエニル、(Z)- オクタデカ-9- エニル、(9Z, 12Z)- オクタデカ-9, 12- ジエニル、(11Z, 14Z)- イコサ- 11, 14- ジエニル等があげられ、より好ましくは(7Z, 10Z)- ヘキサデカ-7, 10- ジエニル、(9Z, 12Z)- オクタデカ-9, 12- ジエニル等があげられる。

[00 13] 炭素数10~24 の直鎖状または分枝状のアルキニルとしては、1~ 3つの3重結合を含む炭素数10~24 の直鎖状または分枝状のアルキニルであればよく、例えばデカ-9- イニル、トデカ-4- イニル、トデカ- 11- イニル、テトラデカ-5- イニル、テトラデカ-6- イニル、ヘキサデカ-7- イニル、ヘキサデカ-3, 5- ジイニル、ヘキサデカ-5, 7- ジイニル、オクタデカ-9- イニル等があげられる。

[00 14] なお、式(1)において、R¹およびR²は、同一の炭素数10~24 の直鎖状または分枝状のアルキル、アルケニルまたはアルキニルであることがより好ましい。また、R¹およびR²がいずれの場合も、炭素数10~24 の直鎖状または分枝状のアルキルまたはアルケニルがより好ましく、炭素数10~24 の直鎖状のアルケニルがさらに好ましい。

[00 15] アルキレンとしては、例えばメチレン、エチレン、プロピレン等があげられる。

[00 16] 炭素数1~ 6のアルキルとしては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、イソブチル、sec- ブチル、tert- ブチル、シクロブチル、シクロプロピルメチル、ペンチル、イソペンチル、sec- ペンチル、ネオペンチル、tert- ペンチル、シクロペンチル、ヘキシル、シクロヘキシル等があげられ、好ましくはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec- ブチル、tert- ブチル、ペンチル、イソペンチル、sec- ペンチル、tert- ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル等があげられ、

さらに好ましくはメチル、エチル、プロピル等があげられる。

[001 7] 炭素数3~6 のアルケニルとしては、例えばアリル、1-プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル等があげられ、好ましくはアリル等があげられる。

[001 8] 置換された炭素数1~ 6のアルキルにおけるアルキル部分および置換された炭素数3~6 のアルケニルにおけるアルケニル部分としては、それぞれ前記炭素数1~ 6のアルキルおよび炭素数3~6 のアルケニルと同義である。

[001 9] 化合物 (I) において、製薬上許容し得る陰イオンとしては、例えば塩化物イオン、臭化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオン、リン酸イオンなどの無機イオン、酢酸イオン、シュウ酸イオン、マレイン酸イオン、フマル酸イオン、クエン酸イオン、安息香酸イオン、メタンスルホン酸イオンなどの有機酸イオン等があげられる。

[0020] 化合物 (I) において、ピロリジン-2- イル、ピロリジン-3- イル、ピペリジン-2- イル、ピペリジン-3- イル、ピペリジン-4- イル、モルホリン-2- イルおよびモルホリン-3- イルは、それぞれ、環中の窒素原子上に結合した水素原子が、メチルまたはエチルに変換されたものを包含する。

[0021] モノアルキルアミノおよびジアルキルアミノとしては、それぞれ1および同一または異なって2つの、炭素数1~ 6のアルキル (前記と同義) または、アミノ、メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジェチルアミノ、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1~ 6のアルキル (前記と同義) で置換されたアミノであればよく、例えばメチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、ブチルアミノ、ペンチルアミノ、ヘキシルアミノ、ジメチルアミノ、ジェチルアミノ、エチルメチルアミノ、メチルプロピルアミノ、ブチルメチルアミノ、メチルペンチルアミノ、ヘキシルメチルアミノ、アミノエチルアミノ、アミノプロピルアミノ、(アミノエチル)メチルアミノ、ビス(アミノエチル)アミノ等があげられ、好ましくはメチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジェチルアミノ、アミノプロピルアミノ、ビス(アミノエチル)アミノ等があげられる。

化合物 (I) において、アミノ、モノアルキルアミノおよびジアルキルアミノは、それぞれ、窒素原子上の孤立電子対に、水素イオンが配位して、アンモニオ、モノアルキルアンモニオおよびジアルキルアンモニオを形成していてもよく、アミノ、モノアルキルアミノおよびジアルキルアミノは、それぞれアンモニオ、モノアルキルアンモニオおよびジアルキルアンモニオを包含する。

[0022] トリアルキルアンモニオとしては、同一または異なって3つの、炭素数1~6のアルキル(前記と同義)または、アミノ、メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジェチルアミノ、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1~6のアルキル(前記と同義)で置換されたアンモニオであればよく、例えばトリメチルアンモニオ、エチルジメチルアンモニオ、ジェチルメチルアンモニオ、トリエチルアンモニオ、トリプロピルアンモニオ、トリブチルアンモニオ、トリペンチルアンモニオ、トリヘキシルアンモニオ、トリス(アミノエチル)アンモニオ、(アミノエチル)ジメチルアンモニオ、ビス(アミノエチル)メチルアンモニオ等があげられ、好ましくはトリメチルアンモニオ、トリエチルアンモニオ、トリス(アミノエチル)アンモニオ、(アミノエチル)ジメチルアンモニオ、ビス(アミノエチル)メチルアンモニオ等があげられる。

化合物 (I) において、アミノ、モノアルキルアミノおよびジアルキルアミノの窒素原子上の孤立電子対に、水素イオンが配位したアンモニオ、モノアルキルアンモニオおよびジアルキルアンモニオ、ならびにトリアルキルアンモニオは、製薬上許容し得る陰イオン(前記と同義)と塩を形成していてもよい。

[0023] アルコキシとしては、炭素数1~6のアルキル(前記と同義)または、アミノ、メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジェチルアミノ、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1~6のアルキル(前記と同義)で置換されたヒドロキシであればよく、例えばメトキシ、エトキシ、プロピルオキシ、ブチルオキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ

、アミノエトキシ、メチルアミノエトキシ等があげられ、好ましくはメトキシ、エトキシ、アミノエトキシ、メチルアミノエトキシ等があげられる。

[0024] モノアルキルカルバモイルおよびジアルキルカルバモイルとしては、それぞれ1つおよび同一または異なって2つの、炭素数1~6のアルキル(前記と同義)または、アミノ、メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジェチルアミノ、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1~6のアルキル(前記と同義)で置換されたカルバモイルであればよく、例えばメチルカルバモイル、エチルカルバモイル、プロピルカルバモイル、ブチルカルバモイル、ペンチルカルバモイル、ヘキシルカルバモイル、ジメチルカルバモイル、ジェチルカルバモイル、エチルメチルカルバモイル、メチルプロピルカルバモイル、ブチルメチルカルバモイル、メチルペンチルカルバモイル、ヘキシルメチルカルバモイル、アミノエチルカルバモイル、アミノプロピルカルバモイル、(アミノエチル)メチルカルバモイル、ビス(アミノエチル)カルバモイル等があげられ、好ましくはメチルカルバモイル、エチルカルバモイル、ジメチルカルバモイル等があげられる。

[0025] また、 X^1 および X^2 は、水素原子であることがより好ましい。この場合には、 R^1 および R^2 は、同一または異なってドデシル、テトラデシル、(Z)-ドデカ-7-エニル、(Z)-テトラデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-4-エニル、(Z)-ヘキサデカ-7-エニル、(E)-ヘキサデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニル、(7Z, 10Z, 13Z)-ヘキサデカ-7, 10, 13-トリエニル、(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることが好ましく、同一または異なって(Z)-テトラデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-7-エニル、(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることがより好ましく、同一に(Z)-テトラデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-7-エニル、(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることが最も好ましい。

なお、 X^1 および X^2 が、水素原子である場合には、 R^3 が水素原子、メチル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは

は異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1~6のアルキルもしくは炭素数3~6のアルケニルがより好ましく、水素原子、メチルまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、ヒドロキシもしくはカルバモイルで置換された炭素数1~6のアルキルもしくは炭素数3~6のアルケニルがさらに好ましく、水素原子、メチル等が最も好ましい。

[0026] また、 X^1 および X^2 が、一緒になって単結合またはアルキレンを形成する場合には、 R^1 および R^2 は、同一または異なってテトラデシル、ヘキサデシル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル、(9Z, 12Z, 15Z)-オクタデカ-9, 12, 15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニルまたは(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニルであることが好ましく、(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることがより好ましく、同一に(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることが最も好ましい。

また、 X^1 および X^2 が、一緒になって単結合またはアルキレンを形成する場合には、 R^3 が水素原子、メチル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルしくはモルホリニルで置換された炭素数1~6のアルキルもしくは炭素数3~6のアルケニルがより好ましく、水素原子、メチルまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、ヒドロキシもしくはカルバモイルで置換された炭素数1~6のアルキルもしくは炭素数3~6のアルケニルがさらに好ましく、水素原子、メチル等が最も好ましい。

また、 X^1 および g が、一緒になって単結合を形成する場合に、 ig -CO-または-CO-0-、好ましくは-CO-であることも、本発明のより好ましい形態の1つである。この場合には、 R^3 がアミノメチル、1,2-ジアミノエチル、2-アミノエチル、1,3-ジアミノプロピル、1,4-ジアミノブチル、1,5-ジアミノペンチル、3-アミノプロピル、4-アミノブチル、5-アミノペンチル等がさらに好ましく、1,2-ジアミノエチル、1,3-ジアミノプロピル、1,4-ジアミノブチル、1,5-ジアミノペンチルであることが最も好ましく、 R^1 および R^2 は、同一もしくは異なってテトラデシル、ヘキサデシル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル、(9Z, 12Z, 15Z)-オクタデカ-9, 12, 15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニルまたは(11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニルであることが好ましく、(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることがより好ましく、同一に(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルであることが最も好ましい。

また、 X^1 および X^2 が、一緒になって単結合を形成する場合に、 X^3 が炭素数1~6のアルキルまたは炭素数3~6のアルケニル、好ましくはメチルであることも、本発明のより好ましい形態の1つである。

[0027] また、 ig は単結合であることがより好ましい。

また、 ig が単結合の場合には、 R^3 は水素原子、メチル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1~6のアルキルもしくは炭素数3~6のアルケニルであることがより好ましく、水素原子、メチル、ヒドロキシメチル、2-ヒドロキシエチル、2,3-ジヒドロキシプロピル、2-ヒドロキシプロピル、3-ヒドロキシプロピル、2-ヒドロキシ-3-メトキシプロピル、アミノメチル、2-アミノエ

チル、3- アミノプロピル、4- アミノブチル、5- アミノペンチル、2- (N, N- ジメチルアミノ)エチル、3- (N, N- ジメチルアミノ)プロピル、2- カルバモイルエチル、2- ジメチルカルバモイルエチル、1- メチルピペリジン-4- イル等がさらに好ましく、水素原子、メチル等が最も好ましい。

[0028] また、 R^8 が-CO-または-CO-O-の場合には、 R^8 はピロリジン-3- イル、ピペリジン-3- イル、ピペリジン-4- イルまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1~6のアルキルもしくは炭素数3~6のアルケニルであり、該置換基の少なくとも1つは、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルであることがより好ましく、 R^8 はアミノメチル、1,2-ジアミノエチル、2-アミノエチル、1,3-ジアミノプロピル、3-アミノプロピル、1,4-ジアミノブチル、4-アミノブチル、1,5-ジアミノペンチル、5-アミノペンチル、(N, N-ジメチルアミノ)メチル、2-(N, N-ジメチルアミノ)エチル、3-(N, N-ジメチルアミノ)プロピル、1-ヒドロキシ-2-アミノエチル、1-アミノ-2-ヒドロキシエチル等がさらに好ましく、1,2-ジアミノエチル、2-アミノエチル、1,3-ジアミノプロピル、3-アミノプロピル、1,4-ジアミノブチル、4-アミノブチル、1,5-ジアミノペンチル、5-アミノペンチル等が最も好ましい。

[0029] また、 X^3 は存在しないか、メチルであることがより好ましく、 X^3 は存在しないことがさらに好ましい。 X^3 が、メチルである場合には、 R^8 はメチルであることがより好ましい。

なお、 X^3 が存在せず、 Y^1 も存在せず、 I^1 が単結合で、 R^8 が水素原子であることも、本発明のより好ましい形態の1つである。この場合には、 R^1 および R^2 は、同一または異なってドデシル、テトラデシル、 (ℓ) -ドデカ-7-エニル、 (ℓ) -テトラデカ-7-エニル、 (ℓ) -ヘキサデカ-4-エニル、 (ℓ) -ヘキサデカ-7-エニル、 (ℓ) -ヘキサデカ-7-エニル、 (ℓ) -ヘキサデカ-9-エニル、 $(7Z, 10Z)$ -ヘキサデ

カ-7, 10- ジエニル、(7Z, 10Z, 13Z) - ヘキサデカ-7, 10, 13- トリエニル、(Z) - オクタデカ-9- エニルまたは (9Z, 12Z) - オクタデカ-9, 12- ジエニルであることが好ましく、同一または異なって (Z) - テトラデカ-7- エニルまたは (7Z, 10Z) - ヘキサデカ-7, 10- ジエニルであることがより好ましく、同一に (Z) - テトラデカ-7- エニルであることが最も好ましいうちの1つであり、また (Z) - ヘキサデカ-7- エニルであることが最も好ましいうちの1つであり、また (7Z, 10Z) - ヘキサデカ-7, 10- ジエニルであることも最も好ましいうちの1つである。

また、 X^3 が存在せず、 Y^1 も存在せず、 i が単結合で、 R^3 がメチルであることも、本発明のより好ましい形態の1つである。この場合には、 R^1 および R^2 は、同一または異なって ドデシル、テトラデシル、(Z) - ドデカ-7- エニル、(Z) - テトラデカ-7- エニル、(Z) - ヘキサデカ-4- エニル、(Z) - ヘキサデカ-7- エニル、(E) - ヘキサデカ-7- エニル、(Z) - ヘキサデカ-9- エニル、(7Z, 10Z) - ヘキサデカ-7, 10- ジエニル、(7Z, 10Z, 13Z) - ヘキサデカ-7, 10, 13- トリエニル、(Z) - オクタデカ-9- エニルまたは (9Z, 12Z) - オクタデカ-9, 12- ジエニルであることが好ましく、同一または異なって (Z) - テトラデカ-7- エニル、(7Z, 10Z) - ヘキサデカ-7, 10- ジエニルまたは (9Z, 12Z) - オクタデカ-9, 12- ジエニルであることがより好ましく、同一に (Z) - テトラデカ-7- エニルであることが最も好ましいうちの1つであり、また (7Z, 10Z) - ヘキサデカ-7, 10- ジエニルであることも最も好ましいうちの1つであり、また (9Z, 12Z) - オクタデカ-9, 12- ジエニルであることも最も好ましいうちの1つである。

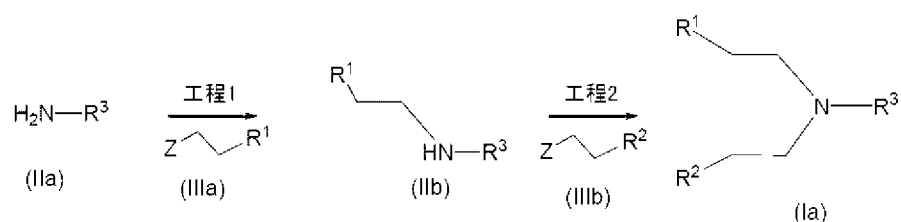
[0030] 次に化合物 (I) の製造法について説明する。なお、以下に示す製造法において、定義した基が該製造法の条件下で変化するかまたは該製造法を実施するのに不適切な場合、有機合成化学で常用される保護基の導入および除去方法 (例えば、グリーン (T. W. Greene) 著、"プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス (Protective Groups in Organic Synthesis)"、(米国)、第3版、ジョン・ワイリーアンドソンズ・インク (John Wiley & Sons Inc.)、1999年等に記載の方法 等を用いることにより、目的化合物を製造することができる。また、必要に応じて置換基導入などの反応工程の順序を変える

こともできる。

[0031] 製造法 1

化合物 (I) のうち、 X^1 および Y^1 が、水素原子であり、いは単結合であり、 g および Y^1 は存在しない、化合物 (Ia) は以下の方法によつて製造することができる。

[0032] [化3]



(式中、 Z 、 R^1 および R^2 はそれぞれ前記と同義であり、 Z は、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、トリフルオロメタンスルホニルオキシ、メタンスルホニルオキシ、ベンゼンスルホニルオキシ、 p -トルエンスルホニルオキシ等の脱離基を表す)

[0033] 工程 1および2

化合物 (Ib) は、化合物 (IIa) と化合物 (IIIa) を、無溶媒でまたは溶媒中、必要により好ましくは1~10当量の塩基の存在下、室温と200℃の間の温度で、5分間~100時間処理することにより製造することができる。さらに、化合物 (Ia) は、化合物 (Ib) と化合物 (IIIb) を、無溶媒でまたは溶媒中、必要により好ましくは1~10当量の塩基の存在下、室温と200℃の間の温度で、5分間~100時間処理し、単離することにより製造することができる。

溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、ジオキサン、 N,N -ジメチルホルムアミド、 N,N -ジメチルアセトアミド、 N -メチルピロリドン、ピリジン、水等があげられ、これらは単独でまたは混合して用いられる。

塩基としては、例えば炭酸カリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム

、ナトリウムメトキシド、カリウム tert-ブトキシド、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン、ピリジン、1,8-ジアザビスクロ[5.4.0]-7-ウンデセン (DBU)等があげられる。

化合物 (IIa) は、市販品または公知の方法 (例えば、実験化学講座 14 有機化合物の合成 II」、第5版、丸善、2005 年、P. 351) もしくはそれに準じた方法で得ることができる。

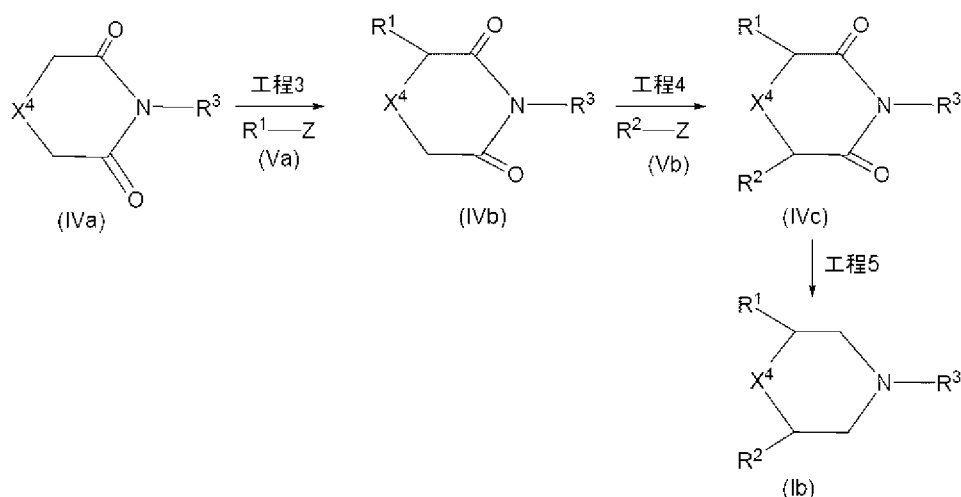
化合物 (II la) および化合物 (nib) は、市販品または公知の方法 (例えば、「実験化学講座 13 有機化合物の合成 I」、第5版、丸善、2005 年、p. 374) もしくはそれに準じた方法で得ることができる。

R¹とR²が同一の場合の化合物 (Ia) は、工程 1において、2当量以上の化合物 (I la) を用いることで得ることができる。

[0034] 製造法 2

化合物 (I) のうち、X¹およびX²が、一緒になって単結合もしくはアルキレンを形成し、いは単結合であり、X³およびY¹は存在しない、化合物 (Ib) は以下の方法によって製造することができる。

[0035] [化 4]



(式中、R¹、R²、R³およびZは、それぞれ前記と同義であり、X⁴は単結合もしくはアルキレンを表す)

[0036] 工程 3および 4

化合物 (IVb) は、化合物 (IVa) と化合物 (Va) を溶媒中、1~ 10当量の塩基の存

在下、 -100°C と 100°C の間の温度で、5分間～100時間処理することにより製造することができる。さらに、化合物(IVc)は、化合物(IVb)と化合物(Vb)を、無溶媒でまたは溶媒中、必要により好ましくは1～10当量の塩基の存在下、 -100°C と 100°C の間の温度で、5分間～100時間処理し、単離することにより製造することができる。

溶媒としては、製造法1と同じものがあげられる。

塩基としては、例えば水素化ナトリウム、水素化カリウム、カリウム *tert*-ブトキシド、ナトリウム *tert*-ブトキシド、リチウムジイソプロピルアミド(LDA)、リチウムヘキサメチルジシラジド(LHMDS)などがあげられる。

化合物(IVa)は、市販品または公知の方法(例えば、実験化学講座16有機化合物の合成IV」、第5版、丸善、2005年、p. 146)もしくはそれに準じた方法で得ることができる。

化合物(Va)および化合物(Vb)は、市販品または公知の方法(例えば、実験化学講座13有機化合物の合成I」、第5版、丸善、2005年、p. 374)もしくはそれに準じた方法で得ることができる。

R^1 と R^2 が同一の場合の化合物(IVc)は、工程3において、2当量以上の化合物(Va)を用いることで得ることができる。

[0037] 工程5

化合物(Ib)は、化合物(IVc)を溶媒中、1当量～大過剰量の還元剤および必要により好ましくは0.1～10当量の金属化合物の存在下、 -100°C と 100°C の間の温度で、5分間～100時間処理することにより製造することができる。

還元剤としては、例えば水素化リチウムアルミニウム、水素化ホウ素ナトリウム、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、シアン化水素化ホウ素ナトリウム等があげられる。

金属化合物としては、例えば塩化コバルト、塩化鉄、塩化アルミニウム等があげられる。

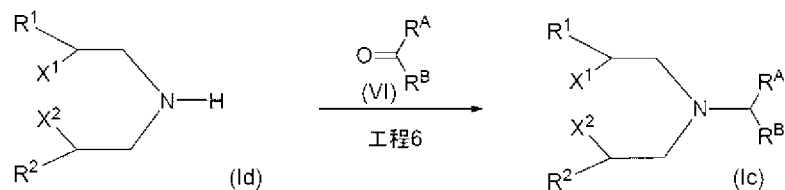
[0038] 製造法3

化合物(I)のうち、いは単結合であり、 R^3 は $-\text{CHRAR}^{\text{B}}$ (R^{A} および R^{B} は、同一また

は異なって水素原子、炭素数 1~ 5 のアルキル、炭素数 2~5 のアルケニル、ピロリジン-2- イル、ピロリジン-3- イル、ピペリジン-2- イル、ピペリジン-3- イル、ピペリジン-4- イル、モルホリン-2- イル、モルホリン-3- イルまたは同一もしくは異なって 1~ 3 つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数 1~ 5 のアルキルもしくは炭素数 2~5 のアルケニルであるか、または隣接する炭素原子と一緒になってピロリジン-3- イル、ピペリジン-3- イルもしくはピペリジン-4- イルを形成し、 R_A および R_B がともに水素原子である場合を除き、 R_A および R_B のアルキル、置換されたアルキルのアルキル部分、アルケニルおよび置換されたアルケニルのアルケニル部分の炭素数の総和は 1~ 5 であり、 R_A および R_B のいずれかが、ピロリジン-2- イル、ピロリジン-3- イル、ピペリジン-2- イル、ピペリジン-3- イル、ピペリジン-4- イル、モルホリン-2- イルまたはモルホリン-3- イルである場合には、該 R_A および R_B のもう一方は水素原子、炭素数 1~ 5 のアルキル、炭素数 2~5 のアルケニル、ピロリジン-2- イル、ピロリジン-3- イル、ピペリジン-2- イル、ピペリジン-3- イル、ピペリジン-4- イル、モルホリン-2- イル、モルホリン-3- イルまたは同一もしくは異なって 1 つもしくは 2 つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数 1~ 5 のアルキルもしくは炭素数 3~5 のアルケニルであり、 R_A および R_B が、置換されたアルキルまたはアルケニルである場合には、該置換基の総数は 2 または 3 である) であり、 X^3 および Y^1 が存在しない、化合物 (Ic) は以下の方法によって製造することができる。

[0039]

[化5]



(式中、 R^1 、 R^2 、 R^{A} 、 R^{B} 、 X^1 および X^2 は、それぞれ前記と同義である)

[0040] 工程6

化合物 (Ic) は、化合物 (Ia) および化合物 (Ib) のうちの R^3 が水素原子である化合物 (Id) を好ましくは1~10当量の化合物 (VI) と、溶媒中、好ましくは1当量〜大過剰量の還元剤および必要により好ましくは1~10当量の酸の存在下、 -20°C と 150°C の間の温度で、5分間〜72時間反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、ジオキサン、*N,N*-ジメチルホルムアミド、*N,N*-ジメチルアセトアミド、*N*-メチルピロリドン、水等があげられ、これらは単独でまたは混合して用いられる。

還元剤としては、例えばトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、シアン化水素化ホウ素ナトリウム等があげられる。

酸としては、例えば塩酸、酢酸等があげられる。

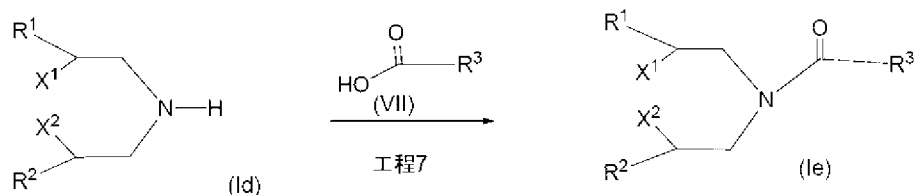
[0041] 化合物 (VI) は、市販品または公知の方法(例えば、実験化学講座15 有機化合物の合成III」、第5版、丸善、2005年、p. 1、実験化学講座15 有機化合物の合成III」、第5版、丸善、2005年、p. 153) もしくはそれに準じて得ることができる。

[0042] 製造法4

化合物 (I) のうち、 R^3 が $-\text{CO}-$ で、 X^3 および Y^1 が存在しない、化合物 (Ie) は以下の方法によって製造することができる。

[0043]

[化 6]



(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 X^1 および X^2 は、それぞれ前記と同義である)

[0044] 工程 7

化合物 (Ie) は、化合物 (Id) と化合物 (VII) とを溶媒中で、 -20°C と 150°C の間の温度で、1当量〜大過剰量の縮合剤で5分間から100時間処理することにより製造することができる。このとき、必要により好ましくは0.01〜10当量の添加剤の存在下、および/または必要により好ましくは1当量〜大過剰量の塩基を加え、反応を促進させることもできる。

溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、ジオキサン、*N,N*-ジメチルホルムアミド、*N,N*-ジメチルアセトアミド、*N*-メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド、水等があげられ、これらは単独でまたは混合して用いられる。

縮合剤としては、例えば1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩、カルボニルジイミダゾール、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルホロホスファート、(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート、0-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-*N,N,N',N'*-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート、0-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-*N,N,N',N'*-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート、ヨウ化2-クロロ-1-メチルピリジニウム等があげられる。

添加剤としては、例えば1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、4-ジメチルア

ミノピリジン等があげられる。

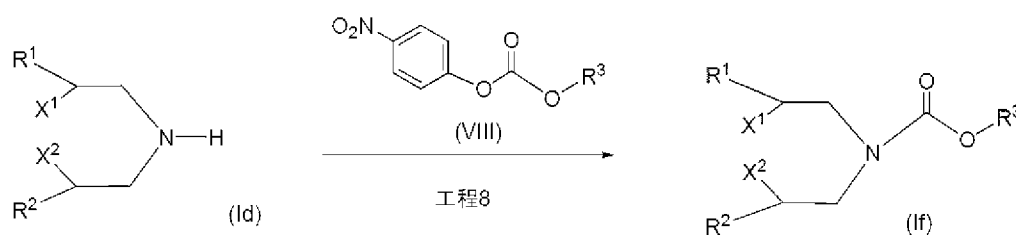
塩基としては、例えば酢酸カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸カリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、ナトリウムメトキシド、カリウム tert-ブトキシド、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン、ピリジン、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン等があげられる。

[0045] 化合物 (VII) は、市販品または公知の方法 (例えば、実験化学講座 16 有機化合物の合成 IV」、第5版、丸善、2005年、p. 1) もしくはそれに準じて得ることができる。

[0046] 製造法5

化合物 (I) のうち、 R^1 が -CO-O- で、 X^3 および Y^1 が存在しない、化合物 (If) は以下の方法によつて製造することができる。

[0047] [化7]



(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 X^1 および X^2 は、それぞれ前記と同義である)

[0048] 工程8

化合物 (If) は、化合物 (Id) を、化合物 (VIII) と、無溶媒でまたは溶媒中、必要により好ましくは1~10当量の添加剤の存在下、および/または必要により好ましくは1~10当量の塩基の存在下、-20℃と150℃の間の温度で、5分間~72時間反応させることにより製造することができる。

溶媒および添加剤としては、製造法4と同じものがあげられる。

塩基としては、例えばトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン、ピリジン、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン等があげられる。

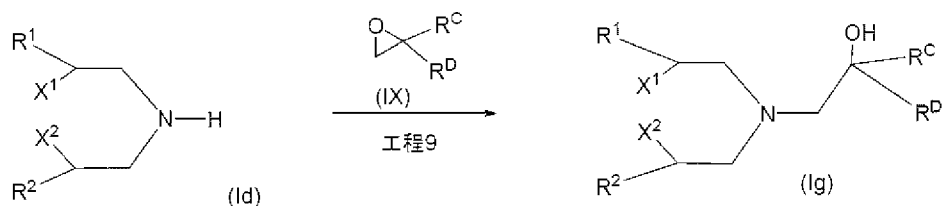
[0049] 化合物 (VIII) は、市販品または公知の方法 (例えば、"ジャーナル 'オブ' アメリカン・ケミカル・ソサイエティー (J. Am. Chem. Soc.)", (米国)、1981年、第103巻、p.4194-4199) もしくはそれに準じた方法で得ることができる。

[0050] 製造法 6

化合物 (I) のうち、いは単結合であり、 R^3 は $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})-\text{RCRD}$ (RC および RD は、同一または異なって水素原子、炭素数 1~4 のアルキル、炭素数 2~4 のアルケニル、ピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イル、モルホリン-3-イルまたは同一もしくは異なって1つもしくは2つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数 1~4 のアルキルもしくは炭素数 2~4 のアルケニルであり、 R_C および RD がともに水素原子である場合を除き、 R_C および RD のアルキル、置換されたアルキルのアルキル部分、アルケニルおよび置換されたアルケニルのアルケニル部分の炭素数の総和は 1~4 であり、 R_C および RD のいずれかがピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イルまたはモルホリン-3-イルである場合には、該 R_C および RD のもう一方は、水素原子、炭素数 1~4 のアルキル、炭素数 2~4 のアルケニル、ピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イル、モルホリン-3-イルまたは1つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数 1~4 のアルキルもしくは炭素数 2~4 のアルケニルであり、 R_G および RD が、置換されたアルキルまたはアルケニルである場合には、該置換基の総数は 2 である) であり、 X^3 および Y^1 が存在しない、化合物 (Ig) は以下の方法によつ

て製造することができる。

[0051] [化8]



(式中、 R^1 、 R^2 、 R^C 、 R^D 、 X^1 および X^2 は、それぞれ前記と同義である)

[0052] 工程9

化合物 (Ig) は、化合物 (Id) と化合物 (IX) を溶媒中または無溶媒で、0℃ と230℃ の間の温度で、5分間から100時間処理することにより製造することができる。

溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、1-プロパノール、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、ジオキサン、 N,N -ジメチルホルムアミド、 N,N -ジメチルアセトアミド、 N -メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド等があげられ、これらは単独でまたは混合して用いられる。

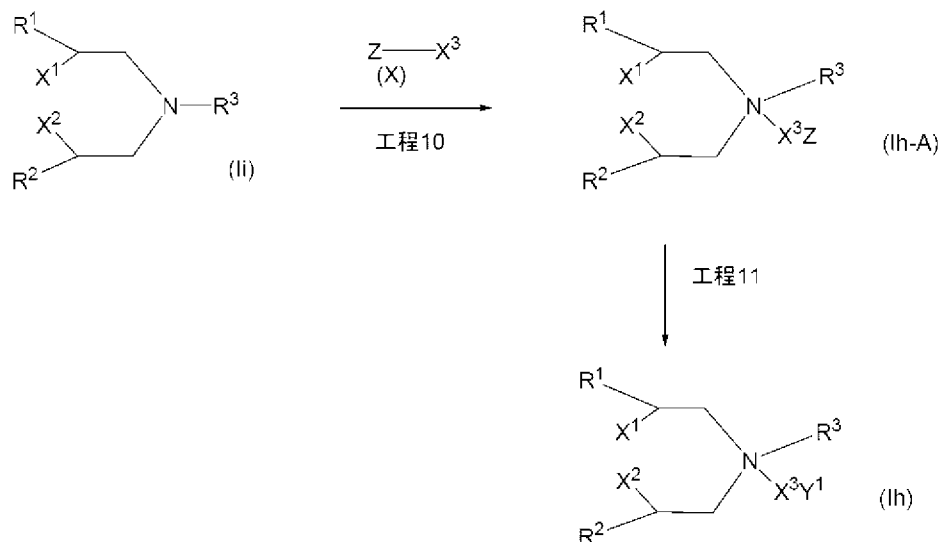
[0053] 化合物 (IX) は、市販品または公知の方法(例えば、実験化学講座17 有機化合物の合成V」、第5版、丸善、2005年、p. 186) もしくはそれに準じて得ることができる。

[0054] 製造法7

化合物 (I) のうち、 i が単結合であり、 X^3 が炭素数1~6のアルキルまたは炭素数3~6のアルケニルであり、 γ_1 が製薬上許容し得る陰イオンである化合物 (Ih) は以下の方法によって製造することができる。

[0055]

[化9]



(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 Y^1 および Z は、それぞれ前記と同義である)

[0056] 工程 10 および 11

化合物 (Ii) は、化合物 (Ia) または化合物 (Ib) である。

化合物 (Ih-A) は、化合物 (Ii) と化合物 (X) を溶媒中または無溶媒で、 0°C と 230°C の間の温度で、5分間から100時間処理することにより製造することができる。化合物 (Ih) は、化合物 (Ih-A) をY型の陰イオン交換樹脂で処理することにより製造することができる。

溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、ジオキサン、*N,N*-ジメチルホルムアミド、*N,N*-ジメチルアセトアミド、*N*-メチルピロリドン、ピリジン等があげられ、これらは単独でまたは混合して用いられる。

[0057] 化合物 (X) は、市販品または公知の方法(例えば、実験化学講座13 有機化合物の合成I」、第5版、丸善、2005年、p.374)もしくはそれに準じて得ることができる。

また、 Z と Y^1 が同一の場合には、工程11を省略することにより (Ih) を製造することができる。

[0058] 化合物 (I) における R^1 、 R^2 または R^3 に含まれる官能基の変換は、公知の方法 (

例えば、R. C. ラロック (Larock) 著、"コンプリヘンシブ・オーガニック・トランスフォーメーションズ (Comprehensive Organic Transformations)"、(米国)、第2版、ベック・ベルラグスゲセルシャフト・エンベハー (Vch Verlagsgesellschaft MbH)、1999年等に記載の方法)でまたはそれらに準じて行うこともできる。

上記各製造法における中間体および目的化合物は、有機合成化学で常用される分離精製法、例えば、ろ過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、再結晶、各種クロマトグラフィー等に付して分離精製することができる。また、中間体においては特に精製することなく次の反応に供することも可能である。

[0059] 化合物 (I) において、構造中の窒素原子上の孤立電子対に水素イオンが配位してもよく、該窒素原子は、製薬上許容し得る陰イオン (前記と同義) と塩を形成していてもよく、化合物 (I) には、該窒素原子上の孤立電子対に水素イオンが配位した化合物も包含する。なお、本発明において、 X^3 が存在しない場合とは、水素イオンが配位している場合も包含する。

化合物 (I) の中には、幾何異性体、光学異性体等の立体異性体、互変異性体等が存在し得るものもあるが、化合物 (I) は、これらを含め、全ての可能な異性体およびそれらの混合物を包含する。

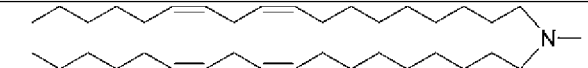
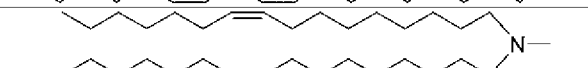
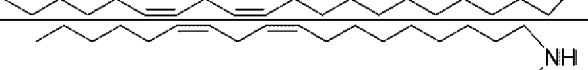
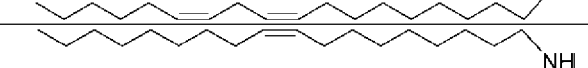
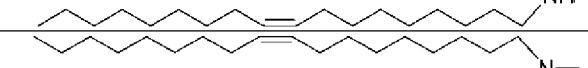
化合物 (I) 中の各原子の一部またはすべては、それぞれ対応する同位体原子で置き換わっていてもよく、化合物 (I) は、これら同位体原子で置き換わった化合物も包含する。例えば、化合物 (I) 中の水素原子の一部またはすべては、原子量2の水素原子 (重水素原子) であってもよい。

化合物 (I) 中の各原子の一部またはすべてが、それぞれ対応する同位体原子で置き換わった化合物は、市販のビルディングブロックを用いて、上記各製造法と同様な方法で製造することができる。また、化合物 (I) 中の水素原子の一部またはすべてが重水素原子で置き換わった化合物は、例えば、1) 過酸化重水素を用い、塩基性条件下にカルボン酸などを重水素化する方法 (米国特許第3849458号明細書参照)、2) イリジウム錯体を触媒として用い、重水を重水素源として用いてアルコール、カルボン酸などを重水素化する方法 ("ジャー

ナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティ (J. Am. Chem. Soc.)"、(米国)、2002年、124巻、10号、p. 2092 参照)、3)パラジウムカーボンを触媒として用い、重水素源として重水素ガスのみを用いて脂肪酸を重水素化する方法("リピッズ (LIPIDS)"、(米国)、1974年、9巻、11号、p. 913参照)、4)白金、パラジウム、ロジウム、ルテニウム、イリジウムなどの金属を触媒として用い、重水または重水および重水素ガスを重水素源として用いて、アクリル酸、アクリル酸メチル、メタクリル酸、メタクリル酸メチルなどを重水素化する方法(特公平5-1 9536号公報、特開昭61-277648号公報および特開昭61-275241号公報参照)、5)パラジウム、ニッケル、銅または亜クロム酸銅などの触媒を用い、重水を重水素源として用いて、アクリル酸、メタクリル酸メチルなどを重水素化する方法(特開昭63-1 98638号公報参照)などを用いて合成することもできる。

[0060] 化合物 (I) の具体例を表1に示す。ただし、化合物 (I) はこれらに限定されるものではない。

[0061] [表1]

化合物番号	構造式
1	
2	
3	
4	
5	
6	

[0062] また、本発明で用いられる核酸としては、ヌクレオチドおよび/または該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子が重合した分子であれば、いかなる分子であってもよく、例えばリボヌクレオチドの重合体であるRNA、デオキシリボヌクレオチドの重合体であるDNA、RNAとDNAとからなるキメラ核酸、およびこれらの核酸の少なくとも一つのヌクレオチドが、該ヌクレオチドと同等の

機能を有する分子で置換されたヌクレオチド重合体があげられる。また、ヌクレオチドおよび/または該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子が重合した分子を少なくとも一つ含む誘導体も、本発明の核酸に含まれる。さらにペプチド核酸 (PNA) ("アカントス・オブ・ケミカル・リサーチ (Acに Chem. Res.)", (米国)、1999年、32巻、p. 624)、オキシペプチド核酸 (OPNA) ("ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティ (J. Am. Chem. Soc.)", (米国)、2001年、123巻、p. 4653)、ペプチドリボ核酸 (PRNA) ("ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティ (J. Am. Chem. Soc.)", (米国)、2000年、122巻、p. 6900) 等もあげられる。なお、本発明において、RNA中のウリジンUと、DNAにおいてはチミンTとは、それぞれ読み替えることができる。

[0063] ヌクレオチドと同等の機能を有する分子としては、例えばヌクレオチド誘導体等があげられる。

ヌクレオチド誘導体としては、ヌクレオチドに修飾を施した分子であればいかなる分子であってもよいが、例えばRNAまたはDNAと比較して、ヌクレアーゼ耐性を向上させるかもしくはその他の分解因子から安定化させるため、相補鎖核酸とのアフィニティーをあげるため、細胞透過性をあげるため、または可視化させるために、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドに修飾を施した分子等が好適に用いられる。

ヌクレオチド誘導体としては、例えば糖部修飾ヌクレオチド、リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチド、塩基修飾ヌクレオチド等があげられる。

糖部修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドの糖の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよいが、2'-修飾ヌクレオチドが好ましく用いられる。

[0064] 糖部修飾ヌクレオチドの修飾基としては、例えば、2'-シアノ、2'-アルキル、2'-置換アルキル、2'-アルケニル、2'-置換アルケニル、2'-ハロゲン、2'-O-シアノ、2'-O-アルキル、2'-O-置換アルキル、2'-O-アルケニル、2'-O-置換アルケニル、2'-S-アルキル、2'-S-置換アルキル、2'-S-

- アルケニル、2' -S- 置換 アルケニル、2' - アミノ、2' -NH- アルキル、2' -NH- 置換 アルキル、2' -NH- アルケニル、2' -NH- 置換 アルケニル、2' -SO- アルキル、2' -SO- 置換 アルキル、2' -カルボキシ、2' -CO- アルキル、2' -CO- 置換 アルキル、2' -Se- アルキル、2' -Se- 置換 アルキル、2' -SiH₂- アルキル、2' -SiH₂- 置換 アルキル、2' -ONO₂、2' -NO₂、2' -N₃、2' -アミノ酸残基 (アミノ酸のカルボン酸から水酸基が除去されたもの)、2' -O- アミノ酸残基 (前記アミノ酸残基と同義)等があげられる。また、2' 位の修飾基が4' 位の炭素原子に架橋した構造を有する架橋構造型人工核酸 (Bridged Nucleic Acid) (BNA)、より具体的には、2' 位の酸素原子と4' 位の炭素原子がメチレンを介して架橋したロックト人工核酸 (Locked Nucleic Acid) (LNA)、およびエチレン架橋構造型人工核酸 (Ethylene bridged nucleic acid) (ENA) ("ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research)", (英国)、2004 年、32 巻、p. e175) 等も本発明における2' 位において修飾基で置換されたリボースに含まれる。

糖部修飾ヌクレオチドの修飾基として、2' -シアノ、2' -ハロゲン、2' -O-シアノ、2' -アルキル、2' -置換アルキル、2' -O- アルキル、2' -O- 置換アルキル、2' -O- アルケニル、2' -O- 置換アルケニル、2' -Se- アルキル、2' -Se- 置換アルキルが好ましく、2' -シアノ、2' -フルオロ、2' -クロロ、2' -プロモ、2' -トリフルオロメチル、2' -O- メチル、2' -O- エチル、2' -O- イソプロピル、2' -O- トリフルオロメチル、2' -O-[2- (メトキシ)エチル]、2' -O-[3- アミノプロピル]、2' -O-[2-(N, N-ジメチル)アミノオキシ]エチル、2' -O-[3-(N, N-ジメチルアミノ)プロピル]、2' -O-[2-[2-(N, N-ジメチルアミノ)エトキシ]エチル]、2' -O-[2- (メチルアミノ)-2- オキソエチル]、2' -Se- メチル等がより好ましく、2' -O- メチル、2' -O- エチル、2' -フルオロ等がさらに好ましく、2' -O- メチル、2' -O- エチルがもっとも好ましい。

また、糖部修飾ヌクレオチドの修飾基は、その大きさから好ましい範囲を定義することもでき、フルオロの大きさから-O- プロピルの大きさに相当するものが好ましく、-O- メチルの大きさから-O- エチルの大きさに相当する大きさ

のものがより好ましい。

[0065] 糖部修飾ヌクレオチドの修飾基におけるアルキルは、化合物 (I) における炭素数 1~6 のアルキルと同義である。

糖部修飾ヌクレオチドの修飾基におけるアルケニルは、化合物 (I) における炭素数 3~6 のアルケニルと同義である。

糖部修飾ヌクレオチドの修飾基におけるハロゲンとしては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子があげられる。

アミノ酸残基におけるアミノ酸としては、例えば脂肪族アミノ酸 (具体的には、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン等)、ヒドロキシアミノ酸 (具体的には、セリン、トレオニン等)、酸性アミノ酸 (具体的には、アスパラギン酸、グルタミン酸等)、酸性アミノ酸アミド (具体的には、アスパラギン、グルタミン等)、塩基性アミノ酸 (具体的には、リジン、ヒドロキシリジン、アルギニン、オルニチン等)、含硫アミノ酸 (具体的には、システイン、シスチン、メチオニン等)、イミノ酸 (具体的には、プロリン、4-ヒドロキシプロリン等) 等があげられる。

糖部修飾ヌクレオチドの修飾基における置換アルキルおよび置換アルケニルの置換基としては、例えば、ハロゲン (前記と同義)、ヒドロキシ、スルファニル、アミノ、オキソ、-O-アルキル (該-O-アルキルのアルキル部分は前記アルキルと同義)、-S-アルキル (該-S-アルキルのアルキル部分は前記アルキルと同義)、-NH-アルキル (該-NH-アルキルのアルキル部分は前記アルキルと同義)、ジアルキルアミノオキシ (該ジアルキルアミノオキシの2つのアルキルは同一または異なって前記アルキルと同義)、ジアルキルアミノ (該ジアルキルアミノの2つのアルキルは同一または異なって前記アルキルと同義)、ジアルキルアミノアルキレンオキシ (該ジアルキルアミノアルキレンオキシの2つのアルキルは同一または異なって前記アルキルと同義であり、アルキレン部分は前記アルキルから水素原子が1つ除かれたものを意味する) 等があげられ、置換数は好ましくは1~3である。

[0066] リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドのリン酸

ジエステル結合の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、リン酸ジエステル結合がホスホロチオエー ト結合に置換されたヌクレオチ ド、リン酸ジエステル結合がホスホロジチオエー ト結合に置換されたヌクレオチ ド、リン酸ジエステル結合がアルキルホスホネー ト結合に置換されたヌクレオチ ド、リン酸ジエステル結合がホスホロアミデ - ト結合に置換されたヌクレオチ ド等があげられる。

塩基修飾ヌクレオチ ドとしては、ヌクレオチ ドの塩基の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、塩基内の酸素原子が硫黄原子で置換されたもの、水素原子が炭素数1~6のアルキル基で置換されたもの、メチル基が水素原子もしくは炭素数2~6のアルキル基で置換されたもの、アミノ基が炭素数1~6のアルキル基、炭素数1~6のアルカノイル基等の保護基で保護されたものがあげられる。

さらに、ヌクレオチ ド誘導体として、ヌクレオチ ドまたは糖部、リン酸ジエステル結合もしくは塩基の少なくとも一つが修飾されたヌクレオチ ド誘導体に脂質、リン脂質、フエナジン、フォレー ト、フエナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、色素など、別の化学物質を付加したものもあげられ、具体的には、5' - ポリアミン付加ヌクレオチ ド誘導体、コレステロール付加ヌクレオチ ド誘導体、ステロイド付加ヌクレオチ ド誘導体、胆汁酸付加ヌクレオチ ド誘導体、ビタミン付加ヌクレオチ ド誘導体、Cy5 付加ヌクレオチ ド誘導体、Cy3 付加ヌクレオチ ド誘導体、6-FAM 付加ヌクレオチ ド誘導体、およびビオチン付加ヌクレオチ ド誘導体等があげられる。

また、ヌクレオチ ド誘導体は、核酸内の他のヌクレオチ ドまたはヌクレオチ ド誘導体とアルキレン構造、ペプチ ド構造、ヌクレオチ ド構造、エーテル構造、エステル構造、およびこれらの少なくとも一つを組み合わせた構造等の架橋構造を形成してもよい。

[0067] 本発明で用いられる核酸としては、好ましくは標的遺伝子の発現を抑制する核酸があげられ、より好ましくはRNA干渉(RNAi)を利用した標的遺伝子の発現抑制作用を有する核酸があげられる。

[0068] 本発明で用いられる標的遺伝子としては、mRNAを産生して発現する遺伝子であれば特に限定されないが、例えば、腫瘍または炎症に関連する遺伝子が好ましく、例えば血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor、以下VEGFと略す)、血管内皮増殖因子受容体(vascular endothelial growth factor receptor、以下VEGFRと略す)、線維芽細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子受容体、血小板由来増殖因子、血小板由来増殖因子受容体、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、クルツペル様因子(Kruppel-like factor、以下KLFと略す)、Ets転写因子、核因子、低酸素誘導因子、細胞周期関連因子、染色体複製関連因子、染色体修復関連因子、微小管関連因子、増殖シグナル経路関連因子、増殖関連転写因子、アポトーシス関連因子等のタンパク質をコードする遺伝子等があげられ、具体的にはVEGF遺伝子、VEGFR遺伝子、線維芽細胞増殖因子遺伝子、線維芽細胞増殖因子受容体遺伝子、血小板由来増殖因子遺伝子、血小板由来増殖因子受容体遺伝子、肝細胞増殖因子遺伝子、肝細胞増殖因子受容体遺伝子、KLF遺伝子、Ets転写因子遺伝子、核因子遺伝子、低酸素誘導因子遺伝子、細胞周期関連因子遺伝子、染色体複製関連因子遺伝子、染色体修復関連因子遺伝子、微小管関連因子遺伝子(例えば、CKAP5遺伝子等)、増殖シグナル経路関連因子遺伝子(例えば、KRAS遺伝子等)、増殖関連転写因子遺伝子、アポトーシス関連因子(例えば、BCL-2遺伝子等)等が挙げられる。

[0069] また、本発明で用いられる標的遺伝子としては、例えば、肝臓、肺、腎臓または脾臓において発現する遺伝子が好ましく、例えば前記の腫瘍または炎症に関連する遺伝子、B型肝炎ウィルスゲノム、C型肝炎ウィルスゲノム、アポリポタンパク質(APO)、ヒドロキシメチルグルタリル(HMG)CoA還元酵素、ケキシニン9型セリンプロテアーゼ(PCSK9)、第12因子、グルカゴン受容体、グルココルチコイド受容体、ロイコトリエン受容体、トロンボキサンA2受容体

、ヒスタミンH1受容体、炭酸脱水酵素、アンギオテンシン変換酵素、レニン、p53、チロシンホスファターゼ(PTP)、ナトリウム依存性グルコース輸送担体、腫瘍壊死因子、インターロイキン等のタンパク質をコードする遺伝子等があげられる。

[0070] 標的遺伝子の発現を抑制する核酸としては、例えば蛋白質等をコードする遺伝子(標的遺伝子)のmRNAの一部の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含み、かつ標的遺伝子の発現を抑制する核酸であれば、例えばsiRNA(short interference 核酸)、miRNA(micro RNA)等の二本鎖核酸、shRNA(short hairpin RNA)、アンチセンス核酸、リボザイム等の一本鎖核酸等、いずれの核酸を用いてもよいが、二本鎖核酸が好ましい。

標的遺伝子のmRNAの一部の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む核酸をアンチセンス鎖核酸といい、アンチセンス鎖核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む核酸をセンス鎖核酸ともいう。センス鎖核酸は、標的遺伝子の一部の塩基配列からなる核酸そのもの等、アンチセンス鎖核酸と対合して二重鎖形成部ができる核酸をいう。

二本鎖核酸とは、二本の鎖が対合し二重鎖形成部を有する核酸をいう。二重鎖形成部とは、二本鎖核酸を構成するヌクレオチドまたはその誘導体が塩基対を構成して二重鎖を形成している部分をいう。二重鎖形成部を構成する塩基対は、通常15~27塩基対であり、15~25塩基対が好ましく、15~23塩基対がより好ましく、15~21塩基対がさらに好ましく、15~19塩基対が特に好ましい。

[0071] 二重鎖形成部のアンチセンス鎖核酸としては、標的遺伝子のmRNAの一部配列からなる核酸、または該核酸において1~3塩基、好ましくは1~2塩基、より好ましくは1塩基が置換、欠失もしくは付加され、かつ標的蛋白質の発現抑制活性を有する核酸が好適に用いられる。二本鎖核酸を構成する一本鎖の核酸長は、通常15~30塩基からなるが、15~29塩基が好ましく、15~27塩基がより好ましく、15~25塩基がさらに好ましく、17~23塩基が特に好ましく、19~21塩基が最も好ましい。

二本鎖核酸を構成するアンチセンス鎖、センス鎖のいずれか一方、または両方の核酸は、二重鎖形成部に続く3'側または5'側に二重鎖を形成しない追加の核酸を有してもよい。この二重鎖を形成しない部分を突出部(オーバーハング)ともいう。

突出部を有する二本鎖核酸としては、少なくとも一方の鎖の3'末端または5'末端に1~4塩基、通常は1~3塩基からなる突出部を有するものが用いられるが、2塩基からなる突出部を有するものが好ましく用いられ、dTdTまたはuuからなる突出部を有するものがより好ましく用いられる。突出部は、アンチセンス鎖のみ、センス鎖のみ、およびアンチセンス鎖とセンス鎖の両方に有することができるが、アンチセンス鎖とセンス鎖の両方に突出部を有する二本鎖核酸が好ましく用いられる。

また、二重鎖形成部に続いて標的遺伝子のmRNAと一部または全てが一致する配列、または、二重鎖形成部に続いて標的遺伝子のmRNAの相補鎖の塩基配列と一致する配列を用いてもよい。さらに、標的遺伝子の発現を抑制する核酸としては、例えばDicer等のリボヌクレアーゼの作用により前記の二本鎖核酸を生成する核酸分子(国際公開第2005/089287号)や、3'末端や5'末端の突出部を有していない二本鎖核酸などを用いることもできる。

[0072] また、前記の二本鎖核酸がsiRNAである場合、アンチセンス鎖は、5'末端側から3'末端側に向って少なくとも1~17番目の塩基の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する17塩基の配列と相補的な塩基の配列であり、好ましくは、該アンチセンス鎖は、5'末端側から3'末端側に向って1~19番目の塩基の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する19塩基の配列と相補的な塩基の配列であるか、1~21番目の塩基の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する21塩基の配列と相補的な塩基の配列であるか、1~25番目の塩基の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する25塩基の配列と相補的な塩基の配列である。

[0073] さらに、本発明で用いられる核酸がsiRNAである場合、好ましくは該核酸中の糖の10~70%、より好ましくは15~60%、さらに好ましくは20~50%が、2'位において修飾基で置換されたリボースである。本発明におけるリボースの2

1' 位において修飾基で置換されたとは、2' 位の水酸基が修飾基に置換されているものを意味し、リボースの2' 位の水酸基と立体配置が同じであっても異なっているもよいが、好ましくはリボースの2' 位の水酸基と立体配置が同じである。2' 位において修飾基で置換されたリボースは、糖部修飾ヌクレオチドにおける2' -修飾ヌクレオチドに包含され、2' 位において修飾基で置換されたリボースの修飾基は、2' -修飾ヌクレオチドの修飾基と同義である。

[0074] 本発明で用いられる核酸には、核酸の構造中のリン酸部、エステル部等に含まれる酸素原子等が、例えば硫黄原子等の他の原子に置換された誘導体を包含する。

[0075] また、アンチセンス鎖およびセンス鎖の5' 末端の塩基に結合する糖は、それぞれ5' 位の水酸基が、リン酸基もしくは前記の修飾基、または生体内の核酸分解酵素等でリン酸基もしくは前記の修飾基に変換される基によって修飾されていてもよい。

また、アンチセンス鎖およびセンス鎖の3' 末端の塩基に結合する糖は、それぞれ3' 位の水酸基が、リン酸基もしくは前記の修飾基、または生体内の核酸分解酵素等でリン酸基もしくは前記の修飾基に変換される基によって修飾されていてもよい。

[0076] 一本鎖の核酸としては、標的遺伝子の連続する15~27 塩基、好ましくは15~25 塩基、より好ましくは15~23 塩基、さらに好ましくは15~21 塩基、特に好ましくは15~19 塩基からなる配列の相補配列からなる核酸、または該核酸において1~3 塩基、好ましくは1~2 塩基、より好ましくは1 塩基が置換、欠失もしくは付加され、かつ標的蛋白質の発現抑制活性を有する核酸であればいずれでもよい。該一本鎖の核酸長は、15~30 塩基以下、好ましくは15~29 塩基、より好ましくは15~27 塩基、さらに好ましくは15~25 塩基、特に好ましくは15~23 塩基の一本鎖核酸が好適に用いられる。

一本鎖核酸として、上記の二本鎖核酸を構成するアンチセンス鎖およびセンス鎖を、スペーサー配列 (スペーサーオリゴヌクレオチド) を介して連結したものをを用いてもよい。スペーサーオリゴヌクレオチドとしては6~12 塩基の

一本鎖核酸分子が好ましく、その5'末端側の配列は2個のUであるのが好ましい。スペーサーオリゴヌクレオチドの例として、UUCAAGAGAの配列からなる核酸があげられる。スペーサーオリゴヌクレオチドによってつながれるアンチセンス鎖およびセンス鎖の順番はどちらが5'側になってもよい。該一本鎖核酸としては、ステムループ構造によって二重鎖形成部を有するshRNA等の一本鎖核酸であることが好ましい。shRNA等の一本鎖核酸は、通常50~70塩基長である。

リボヌクレアーゼ等の作用により、上記の一本鎖核酸または二本鎖核酸を生成するように設計した、70塩基長以下、好ましくは50塩基長以下、さらに好ましくは30塩基長以下の核酸を用いてもよい。

[0077] なお、本発明で用いられる核酸は、既知のRNAまたはDNA合成法、およびRNAまたはDNA修飾法を用いて製造すればよい。

[0078] 本発明の脂質ナノ粒子としては、化合物 (I) を含有する脂質ナノ粒子であり、例えば化合物 (I) と核酸等との複合体、または化合物 (I) に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと核酸等との複合体を含有する脂質ナノ粒子、該複合体および該複合体を封入する脂質膜から構成された脂質ナノ粒子等があげられる。該脂質膜は、脂質一重膜(脂質1分子膜)でも脂質二重膜(脂質2分子膜)であってもよい。なお、該脂質膜に、化合物 (I)、中性脂質および/または高分子を含有していてもよい。また、該複合体および/または該脂質膜に、化合物 (I) 以外のカチオン性脂質を含有していてもよい。

また、本発明の脂質ナノ粒子としては、例えば化合物 (I) 以外のカチオン性脂質と核酸等との複合体、または化合物 (I) 以外のカチオン性脂質に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと核酸等との複合体ならびに該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物 (I) を含有する脂質ナノ粒子等もあげられる。この場合の脂質膜も、脂質一重膜(脂質1分子膜)でも脂質二重膜(脂質2分子膜)であってもよい。また、該脂質膜に、化合物 (I) 以外のカチオン性脂質、中性脂質および/または高分子を含有していてもよい。

[0079] 本発明の脂質ナノ粒子において、化合物 (I) と核酸等との複合体を含有する

脂質ナノ粒子、または化合物 (I) もしくは化合物 (I) 以外のカチオン性脂質と核酸等との複合体および該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に (I) を含有する脂質ナノ粒子がより好ましく、化合物 (I) と核酸等との複合体を含有する脂質ナノ粒子、または化合物 (I) と核酸等との複合体および該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物 (I) を含有する脂質ナノ粒子がさらに好ましく、化合物 (I) と核酸等との複合体および該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物 (I) を含有する脂質ナノ粒子が最も好ましい。なお、いずれの場合も該脂質膜に、中性脂質および/または高分子を含有していてもよい。また、該複合体および/または該脂質膜に、化合物 (I) 以外のカチオン性脂質を含有していてもよい。

[0080] 複合体の形態としては、いずれの場合も核酸等と脂質一重層からなる膜(逆ミセル)との複合体、核酸等とリポソームとの複合体、核酸等とミセルとの複合体等があげられ、好ましくは核酸等と脂質一重層からなる膜との複合体または核酸等とリポソームとの複合体があげられる。

複合体および該複合体を封入する脂質二重膜から構成された脂質ナノ粒子としては、該複合体および該複合体を封入する脂質二重膜から構成されたリポソーム等があげられる。

なお、本発明の脂質ナノ粒子は、薬物として例えば核酸等を含有することができ、核酸と化学的に近似した化合物も含有することもできる。

いずれの場合も、本発明の脂質ナノ粒子には、一種または複数種の化合物 (I) を使用してよく、また化合物 (I) と化合物 (I) 以外のカチオン性脂質とを混合したものを使用してもよい。

化合物 (I) 以外のカチオン性脂質としては、例えば、特開昭61-161246号公報(米国特許5049386号明細書)中で開示される、DOTMA、DOTAP等、国際公開第91/16024号および国際公開第97/01 9675号中で開示される、DORIE、DOSPA等、国際公開第2005/1 21348号中で開示される、DLinDMA等、国際公開第2009/08 6558号中で開示される、DLin-K-DMA等、国際公開第2011/136368号中で開示される、(3R,4R)-3, 4-ビス((Z)-ヘキサデカ-9-エニルオキシ)-1-メチルピロリ

ジン、N-メチル-N,N-ビス(2-(Z)-オクタデカ-6-エニルオキシ)エチル)アミン等があげられ、好ましくはD0TMA、D0TAP、D0RIE、D0SPA、DLinDMA、DLin-KDMA等の2つの非置換アルキル基を有する3級アミン部位または3つの非置換アルキル基を有する4級アンモニウム部位を有するカチオン性脂質であることがあげられ、より好ましくは、該3級アミン部位を有するカチオン性脂質があげられる。該3級アミン部位および該4級アンモニウム部位の非置換アルキル基はメチル基であることがより好ましい。

本発明の脂質ナノ粒子に化合物(I)を複数種使用する場合、化合物(I)と化合物(I)以外のカチオン性脂質とを混合して使用する場合あるいは本発明の脂質ナノ粒子を化合物(I)以外のカチオン性脂質と核酸等との複合体、または化合物(I)以外のカチオン性脂質に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと核酸等との複合体ならびに該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物(I)を含有する脂質ナノ粒子とする場合には、化合物(I)は、 X^3 が存在せず、 Y^1 も存在せず、いは単結合であり、かつ R^3 は炭素数1~6のアルキルであることがより好ましい。

[0081] 本発明における脂質ナノ粒子は、公知の製造方法またはそれに準じて製造することができ、いかなる製造方法で製造されたものであってよい。例えば、脂質ナノ粒子の1つであるリボソームの製造には、公知のリボソームの調製方法が適用できる。公知のリボソームの調製方法としては、例えばバンガム(Bangham)らのリボソーム調製法("ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.)"、1965年、13巻、p. 238-252 参照)、エタノール注入法("ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー(J. Cell Biol.)"、1975年、66巻、p. 621-634 参照)、フレンチプレス法("エフイービーエス・レターズ(FEBS Lett.)"、1979年、99巻、P. 210-214 参照)、凍結融解法("アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス(Arch. Biochem. Biophys.)"、1981年、212巻、p. 186-194 参照)、逆相蒸発法("プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ(Proc. Nat. L. Acad. Sci. USA)"、1978年、75巻、p. 4194-41

98参照)またはpH勾配法(例えば特許第2572554号公報、特許第2659136号公報等参照)等があげられる。リボソームの製造の際にリボソームを分散させる溶液としては、例えば水、酸、アルカリ、種々の緩衝液、生理的食塩液またはアミノ酸輸液等を用いることができる。また、リボソームの製造の際には、例えばクエン酸、アスコルビン酸、システインまたはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)等の抗酸化剤、例えばグリセリン、ブドウ糖または塩化ナトリウム等の等張化剤等の添加も可能である。また、脂質等を例えばエタノール等の有機溶媒に溶解し、溶媒を留去した後、生理食塩水等を添加、振とう攪拌し、リボソームを形成させることによってもリボソームを製造することができる。

[0082] また、本発明の脂質ナノ粒子は、例えば、化合物(I)または化合物(I)と化合物(I)以外のカチオン性脂質との混合物をクロロホルムに予め溶解し、次いで核酸等の水溶液とメタノールを加えて混合してカチオン性脂質/核酸等の複合体を形成させ、さらにクロロホルム層を取り出し、これにポリエチレングリコール化リン脂質と中性の脂質と水を加えて油中水型(W/O)エマルジョンを形成し、逆相蒸発法で処理して製造する方法(特表2002-508765号公報参照)や、核酸等を、酸性の電解質水溶液に溶解し、脂質(エタノール中)を加え、エタノール濃度を20v/v%まで下げて前記核酸の内包脂質ナノ粒子を調製し、サイジングろ過し、透析によって、過剰のエタノールを除去した後、試料をさらにpHを上げて透析して脂質ナノ粒子表面に付着した核酸を除去して製造する方法(特表2002-501511号公報および"バイオキミカ・エト'バイオフィジカ・アクタ(Biochimica et Biophysica Acta)", 2001年、1510巻、p.152-166参照)等によって製造することができる。

本発明の脂質ナノ粒子のうち、化合物(I)と核酸等との複合体、または化合物(I)に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと核酸等との複合体、および該複合体を封入した脂質二重膜から構成されたリボソームは、例えば、国際公開第02/28367号および国際公開第2006/080118号等に記載の製造方法に従って製造することができる。

[0083] また、本発明の脂質ナノ粒子のうち、化合物 (I) と核酸等との複合体、または化合物 (I) に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと核酸等との複合体ならびに該複合体を封入した脂質膜から構成され、脂質膜に化合物 (I) および/または化合物 (I) 以外のカチオン性脂質を含有する脂質ナノ粒子、化合物 (I) 以外のカチオン性脂質と核酸等との複合体、または化合物 (I) 以外のカチオン性脂質に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと核酸等との複合体ならびに該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物 (I) または化合物 (I) および化合物 (I) 以外のカチオン性脂質を含有する脂質ナノ粒子等は、国際公開第02/28367号および国際公開第2006/080118号等に記載の製造方法に従って、それぞれの複合体を製造し、水または0~20%エタノール水溶液中に、該複合体を溶解させずに分散させ(A液)、別途、それぞれの脂質膜成分を、エタノール水溶液中に溶解させ(B液)、等量のA液とB液を混合し、さらに適宜に水を加えることで得ることができる。なお、A液およびB液中のカチオン性脂質は、一種または複数種の化合物 (I) または化合物 (I) 以外のカチオン性脂質を使用してよく、また化合物 (I) と化合物 (I) 以外のカチオン性脂質を組み合わせる混合して使用してもよい。

[0084] なお、本発明において、化合物 (I) と核酸等との複合体、または化合物 (I) に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと核酸等との複合体ならびに該複合体を封入した脂質膜から構成され、脂質膜に化合物 (I) および/または化合物 (I) 以外のカチオン性脂質を含有する脂質ナノ粒子、化合物 (I) 以外のカチオン性脂質と核酸等との複合体、または化合物 (I) 以外のカチオン性脂質に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと核酸等との複合体ならびに該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物 (I) または化合物 (I) および化合物 (I) 以外のカチオン性脂質を含有する脂質ナノ粒子等の製造中および製造後に、複合体中の核酸等と脂質膜中のカチオン性脂質との静電相互作用や、複合体中のカチオン性脂質と脂質膜中のカチオン性脂質との融合によって、複合体および膜の構造が変位したものも、それぞれ化合物 (I) と核酸等との複合体、または化合物 (I) に中性脂質および/もしくは

高分子を組み合わせたものと核酸等との複合体ならびに該複合体を封入した脂質膜から構成され、脂質膜に化合物 (I) および/ または化合物 (I) 以外のカチオン性脂質を含有する脂質ナノ粒子、化合物 (I) 以外のカチオン性脂質と核酸等との複合体、または化合物 (I) 以外のカチオン性脂質に中性脂質および/ もしくは高分子を組み合わせたものと核酸等との複合体ならびに該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物 (I) または化合物 (I) および化合物 (I) 以外のカチオン性脂質を含有する脂質ナノ粒子等に包含される。

[0085] 本発明の脂質ナノ粒子において、複合体中の化合物 (I) の分子の総数は、核酸のリン原子の数に対して0.5~8 倍であるのが好ましく、1.5~5 倍であるのがより好ましく、2~3 倍であるのがさらに好ましい。また、該複合体中の化合物 (I) および化合物 (I) 以外のカチオン性脂質の分子の総数は、該核酸のリン原子の数に対して0.5~8 倍であるのが好ましく、1.5~5 倍であるのがより好ましく、2~3 倍であるのがさらに好ましい。

本発明の脂質ナノ粒子において、複合体および該複合体を封入する脂質膜から構成された脂質ナノ粒子中の化合物 (I) の分子の総数は、該核酸のリン原子の数に対して1~ 15倍であるのが好ましく、2.5~ 10倍であるのがより好ましく、3.5~8 倍であるのがさらに好ましい。また、該脂質ナノ粒子中の化合物 (I) および化合物 (I) 以外のカチオン性脂質の分子の総数は、該核酸のリン原子の数に対して1~ 15倍であるのが好ましく、2.5~ 10倍であるのがより好ましく、3.5~8 倍であるのがさらに好ましい。

[0086] 国際公開第02/28367 号および国際公開第2006/0801 18号等に記載の製造方法に従って、核酸(前記と同義)、好ましくは二本鎖核酸と任意のカチオン性脂質、好ましくは化合物 (I) および/ または本発明における化合物 (I) 以外のカチオン性脂質を含有するリポソームとの複合体を製造し、水または0~20% エタノール水溶液中に、該複合体を溶解させずに分散させ(A液)、別途、任意のカチオン性脂質、好ましくは化合物 (I) および/ または本発明における化合物 (I) 以外のカチオン性脂質を、エタノール水溶液中に溶解させ(B液)、等量または体積比1:1のA液とB液を混合すること、または、さらに適宜に水を加えること

で、該核酸と該カチオン性脂質を含有する脂質ナノ粒子を得ることができる。該脂質ナノ粒子は、好ましくはカチオン性脂質と核酸との複合体および該複合体を封入する脂質膜を含有する脂質ナノ粒子であり、より好ましくは該核酸と該カチオン性脂質を含有する脂質一重層からなる膜(逆ミセル)との複合体および該複合体を封入する脂質膜を含有する脂質ナノ粒子である。これらの場合の脂質膜は、脂質一重膜(脂質1分子膜)でも脂質二重膜(脂質2分子膜)であってもよい。

また、本開示の該核酸と該リポソームとの複合体中のリポソームは、予め大きさを、平均粒子径 10nm~400nm、より好ましくは30nm~110nm、さらに好ましくは40nm~80nm に調節したリポソームが好ましい。また、該複合体および/または脂質膜に、中性脂質および/または高分子を含有していてもよい。また、A液は、リポソームと該核酸との複合体を形成させることができれば、エタノール濃度は、20~40% であってもよい。

また、等量のA液とB液を混合する代わりに、A液とB液を混合後に複合体が溶解せず、かつB液中のカチオン性脂質が溶解しないエタノール濃度、好ましくは複合体が溶解せず、B液中のカチオン性脂質が溶解せず、かつエタノール濃度が30~60% のエタノール水溶液になるような比でA液とB液を混合することに代えてもよく、あるいはA液とB液を混合後に複合体が溶解しないようなエタノール濃度になるような比でA液とB液を混合し、さらに水を加えることで、B液中のカチオン性脂質が溶解しなくなるエタノール濃度にすることにしてもよい。

本開示の該A液中での核酸とリポソームとの複合体は、A液とB液を混合し、さらに適宜に水を加えた後には、カチオン性脂質を含有する脂質一重層からなる膜(逆ミセル)と核酸との複合体に形態が変化している。本開示の製造方法で得られる該核酸と該カチオン性脂質を含有する脂質ナノ粒子は、好ましくはカチオン性脂質と核酸との複合体および該複合体を封入する脂質膜を含有する脂質ナノ粒子であり、より好ましくは、カチオン性脂質を含有する脂質一重層からなる膜(逆ミセル)と核酸との複合体および該複合体を封入する

脂質膜を含有し、該脂質膜にカチオン性脂質を含有する脂質ナノ粒子であり、その製造性(収率および/または均一性)は優れている。

該A液中での核酸とリポソームとの複合体において、複合体中のカチオン性脂質の分子の総数は、核酸のリン原子の数に対して0.5~8倍であるのが好ましく、1.5~5倍であるのがより好ましく、2~3倍であるのがさらに好ましい。

A液とB液を混合後の該核酸と該カチオン性脂質を含有する脂質一重層からなる膜(逆ミセル)との複合体および該複合体を封入する脂質膜を含有する脂質ナノ粒子においては、該複合体および該複合体を封入する脂質膜中のカチオン性脂質の分子の総数は、該核酸のリン原子の数に対して1~15倍であるのが好ましく、2.5~10倍であるのがより好ましく、3.5~8倍であるのがさらに好ましい。

[0087] 中性脂質としては、単純脂質、複合脂質または誘導脂質のいかなるものであってもよく、例えばリン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴイドまたはステロール等があげられるがこれらに限定されない。

本発明の脂質ナノ粒子において中性脂質を含有する場合には、中性脂質の分子の総数は、化合物(I)および化合物(I)以外のカチオン性脂質の分子の総数に対して0.1~1.8倍であるのが好ましく、0.3~1.2倍であるのがより好ましく、0.4~0.9倍であるのがさらに好ましい。本発明の脂質ナノ粒子は、中性脂質を、複合体に含有してもよく、複合体を封入する脂質膜に含有してもよく、少なくとも複合体を封入する脂質膜に含有していることがより好ましく、複合体および該複合体を封入する脂質膜のどちらにも含有していることがさらに好ましい。

[0088] 中性脂質におけるリン脂質としては、例えばホスファチジルコリン(具体的には大豆ホスファチジルコリン、卵黄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)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ノリレミトイルオレオイルホスファチジルコリン(P0PC)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン(D0PC)

等)、ホスファチジルエタノールアミン(具体的にはジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(PSPE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(PPPE)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(POPE)、ジミリス Toil ホスホエタノールアミン(PMPE)、16-0-モノメチルPE、16-0-ジメチルPE、18-1-トランスPE、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(POPE)、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(SOPE)等)、ダリセロリン脂質(具体的にはホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール(POPG)、リゾホスファチジルコリン等)、スフィンゴリン脂質(具体的にはスフィンゴミエリン、セラミドホスホエタノールアミン、セラミドホスホダリセロール、セラミドホスホグリセロリン酸等)、グリセロホスホノ脂質、スフィンゴホスホノ脂質、天然レシチン(具体的には卵黄レシチン、大豆レシチン等)または水素添加リン脂質(具体的には水素添加大豆ホスファチジルコリン等)等の天然または合成のリン脂質があげられる。

[0089] 中性脂質におけるグリセロ糖脂質としては、例えばスルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリドまたはグリコシルジグリセリド等があげられる。

[0090] 中性脂質におけるスフィンゴ糖脂質としては、例えばガラクトシルセレブロシド、ラク トシルセレブロシドまたはガンダリオシド等があげられる。

[0091] 中性脂質におけるスフィンゴイドとしては、例えばスフィンガン、イコサスフィンガン、スフィンゴシンまたはそれらの誘導体等があげられる。誘導体としては、例えばスフィンガン、イコサスフィンガンまたはスフィンゴシン等の $-NH_2$ を $-NHC(O)(CH_2)_xCH_3$ (式中、 x は0~18の整数であり、中でも6、12または18が好ましい)に変換したもの等があげられる。

[0092] 中性脂質におけるステロールとしては、例えばコレステロール、ジヒドロコレステロール、ラノステロール、 β -シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、プラシカステロール、エルゴカステロール、フコステ

ロールまたは 3β -[N-(N', N'-ジメチルアミノエチル)カルバモイル]コレステロール (DC-Chol) 等があげられる。

[0093] 高分子としては、例えばタンパク質、アルブミン、デキストラン、ポリフェクト (polyfect)、キトサン、デキストラン硫酸、例えばポリ-L-リジン、ポリエチレンジアミン、ポリアスパラギン酸、スチレンマレイン酸共重合体、イソプロピルアクリルアミドアクリルピロリドン共重合体、ポリエチレングリコール修飾 dendrimer、ポリ乳酸、ポリ乳酸ポリグリコール酸またはポリエチレングリコール化ポリ乳酸等の高分子またはそれらの塩の1以上からなるミセルがあげられる。

[0094] ここで、高分子における塩は、例えば金属塩、アンモニウム塩、酸付加塩、有機アミン付加塩、アミノ酸付加塩等を包含する。金属塩としては、例えばリチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩または亜鉛塩等があげられる。アンモニウム塩としては、例えばアンモニウムまたはテトラメチルアンモニウム等の塩があげられる。酸付加塩としては、例えば塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩またはリン酸塩等の無機酸塩、および酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩またはクエン酸塩等の有機酸塩があげられる。有機アミン付加塩としては、例えばモルホリンまたはピペリジン等の付加塩があげられる。アミノ酸付加塩としては、例えばグリシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸またはリジン等の付加塩があげられる。

[0095] また、本発明における脂質ナノ粒子はいずれにしても、例えば糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体、または界面活性剤等を含有することが好ましい。該糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤は、複合体に含有されてもよく、複合体を封入する脂質膜に含有していてもよく、複合体および該複合体を封入する脂質膜のどちらにも含有していることがより好ましい。

本発明の脂質ナノ粒子が、糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選

ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体を含有する場合には、糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体および脂肪酸誘導体の分子の総数は、化合物 (I) および化合物 (I) 以外のカチオン性脂質の分子の総数に対して0.05~0.3倍であるのが好ましく、0.07~0.25倍であるのがより好ましく、0.1~0.2倍であるのがさらに好ましい。

[0096] 糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体、または界面活性剤としては、好ましくは、糖脂質、または水溶性高分子の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体があげられ、より好ましくは、水溶性高分子の脂質誘導体または脂肪酸誘導体があげられる。糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体、または界面活性剤は、分子の一部が脂質ナノ粒子の他の構成成分と例えば疎水性親和力、静電的相互作用等で結合する性質をもち、他の部分が脂質ナノ粒子の製造時の溶媒と例えば親水性親和力、静電的相互作用等で結合する性質をもつ、2面性をもつ物質であるのが好ましい。

[0097] 糖、ペプチドまたは核酸の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えばショ糖、ソルビトール、乳糖等の糖、例えばカゼイン由来ペプチド、卵白由来ペプチド、大豆由来ペプチド、ダルタチオン等のペプチド、または例えばDNA、RNA、プラスミド、siRNA、ODN等の核酸と、前記脂質ナノ粒子の定義の中であげた中性脂質もしくは化合物 (I) または例えばステアリン酸、ノルメチン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸等の脂肪酸とが結合してなるもの等があげられる。

[0098] また、糖の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えば前記脂質ナノ粒子の定義の中であげたグリセロ糖脂質またはスフィンゴ糖脂質等も含まれる。

[0099] 水溶性高分子の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えばポリエチレングリコール、ポリグリセリン、ポリエチレニミン、ポリビニルアルコ

ール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、オリゴ糖、デキストリン、水溶性セルロース、デキストラン、コンドロイチン硫酸、ポリグリセリン、キトサン、ポリビニルピロリドン、ポリアスパラギン酸アミド、ポリ-L-リジン、マンナン、プルラン、オリゴグリセロール等またはそれらの誘導体と、前記脂質ナノ粒子の定義の中であげた中性脂質もしくは化合物 (1)、または例えばステアリン酸、ノルミチン酸、ミリスチン酸またはラウリン酸等の脂肪酸とが結合してなるもの、それらの塩等があげられ、より好ましくは、ポリエチレングリコール誘導体、ポリグリセリン誘導体等の脂質誘導体または脂肪酸誘導体等があげられ、さらに好ましくは、ポリエチレングリコール誘導体の脂質誘導体または脂肪酸誘導体およびそれらの塩があげられる。

[01 00] ポリエチレングリコール誘導体の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えばポリエチレングリコール化脂質 (具体的にはポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン (より具体的には 1, 2-ジステアロイル-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)-2000] (PEG-DSPE)、1, 2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N[メトキシ (ポリエチレングリコール)-2000] (PEG-DMPE) 等)、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60、クレモフォアイーエル (CREMOPHOR E 等)、ポリエチレングリコールソルビタン脂肪酸エステル類 (具体的にはモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン等) またはポリエチレングリコール脂肪酸エステル類等があげられ、より好ましくは、ポリエチレングリコール化脂質があげられる。

[01 01] ポリグリセリン誘導体の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えばポリグリセリン化脂質 (具体的にはポリグリセリン-ホスファチジルエタノールアミン等) またはポリグリセリン脂肪酸エステル類等があげられ、より好ましくは、ポリグリセリン化脂質があげられる。

[01 02] 界面活性剤としては、例えばモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (具体的にはポリソルベート 80 等)、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール (具体的にはプルロニック F68 等)、ソルビタン脂肪酸エステル

(具体的にはソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノオレート等)、ポリオキシエチレン誘導体(具体的にはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、ポリオキシエチレン라우リルアルコール等)、グリセリン脂肪酸エステルまたはポリエチレングリコールアルキルエーテル等があげられ、好ましくは、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、グリセリン脂肪酸エステルまたはポリエチレングリコールアルキルエーテル等があげられる。

[0103] また、本発明における脂質ナノ粒子には、例えば高分子、ポリオキシエチレン誘導体等による表面改質も任意に行うことができる(ラジック(D. D. Lasick)、マーティン(F. Martin)編、"ステルス・リポソームズ(Stealth Liposomes)"、(米国)、シーアールシー・プレス・インク(CRC Press Inc)、1995年、p. 93-102参照)。表面改質に使用し得る高分子としては、例えばデキストラン、プルラン、マンナン、アミロペクチンまたはヒドロキシエチルデンプン等があげられる。ポリオキシエチレン誘導体としては、例えばポリソルベート80、プルロニックF68、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、ポリオキシエチレン라우リルアルコールまたはPEG-DSPE等があげられる。該表面改質によって、本発明の脂質ナノ粒子、脂質ナノ粒子中の複合体および脂質膜に糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体、または界面活性剤を含有させることができる。

また、標的化リガンドを、本発明の脂質ナノ粒子の脂質成分の極性ヘッド残基に共有結合することにより本発明の脂質ナノ粒子の表面に直接結合させることも任意に行うことができる(国際公開第2006/116107号参照)。

[0104] 本発明における脂質ナノ粒子の平均粒子径は、所望により自由に選択できるが、下記する平均粒子径とするのが好ましい。平均粒子径を調節する方法としては、例えばエクストルージョン法、大きな多重膜リポソーム(MLV)等を機械的に粉碎(具体的にはマントンゴウリン、マイクロフルイダイザー等を使用)する方法(ミュラー(R. H. Muller)、ベニタ(S. Benita)、ボーム(B. Bohm)編著、"エマルジョン・アンド・ナノサスペンションズ・フォー・ザ・フォーミュレーション・オブ・ポアリー・ソラブル・ドラッグズ(Emulsion and Nanos

uspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs)"、(ドイツ)、サイエンティフィック・パブリッシャーズ・シュトゥットガルト(Scientific Publishers Stuttgart), 1998年、p. 267-294 参照)等があげられる。

[01 05] 本発明における脂質ナノ粒子の大きさは、平均粒子径が約10nm~1000nmであるのが好ましく、約30nm~300nmであるのがより好ましく、約50nm~200nmであるのがさらに好ましい。

[01 06] 本発明の脂質ナノ粒子を、ほ乳類の細胞に投与することで、本発明の脂質ナノ粒子中の核酸等を細胞内に導入することができる。

[01 07] インビボで本発明の脂質ナノ粒子を、ほ乳類の細胞に投与する方法は、インビボにおいて行うことのできる公知のトランスフェクションの手順に従って行えばよい。例えば、本発明の脂質ナノ粒子を、人を含む哺乳動物に静脈内投与することで、例えば癌または炎症の生じた臓器または部位へ送達され、送達臓器または部位の細胞内に本発明の脂質ナノ粒子中の核酸等を導入することができる。癌または炎症の生じた臓器または部位としては、特に限定されないが、例えば胃、大腸、肝臓、肺、脾臓、膵臓、腎臓、膀胱、皮膚、血管、眼球等があげられる。また、本発明の脂質ナノ粒子を、人を含む哺乳動物に静脈内投与することで、例えば血管、肝臓、肺、脾臓および/または腎臓へ送達され、送達臓器または部位の細胞内に本発明の脂質ナノ粒子中の核酸等を導入することができる。肝臓、肺、脾臓および/または腎臓の細胞は、正常細胞、癌もしくは炎症に関連した細胞またはその他の疾患に関連した細胞のいずれでもよい。

本発明の脂質ナノ粒子中の核酸等が、RNA干渉(RNAi)を利用した標的遺伝子の発現抑制作用を有する核酸であれば、インビボでほ乳類の細胞内に、遺伝子の発現を抑制するRNA等を導入することができ、遺伝子等の発現の抑制ができる。投与対象は、人であることが好ましい。

また、本発明の脂質ナノ粒子における標的遺伝子が、例えば腫瘍または炎症に関連する遺伝子であれば、本発明の脂質ナノ粒子を、癌または炎症疾患の治療剤または予防剤、好ましくは固形癌または血管もしくは血管近傍の炎

症の治療剤または予防剤として使用することができる。具体的には、本発明の脂質ナノ粒子における標的遺伝子が、血管新生に関連する遺伝子等であれば、血管平滑筋の増殖や血管新生等を抑制できるので、本発明の脂質ナノ粒子を、例えば血管平滑筋の増殖や血管新生を伴う癌または炎症疾患の治療剤または予防剤として使用することができる。化合物 (I) を、複数種を組み合わせ使用する場合または化合物 (I) 以外のカチオン性脂質と組み合わせ使用する場合には、個々のカチオン性脂質を単独で使用する場合と比べて減量できるので、カチオン性脂質が原因の好ましくない事象の発生率や程度を減らすことができる。

即ち、本発明は、上記説明した本発明の脂質ナノ粒子を哺乳動物に投与する癌または炎症疾患の治療方法も提供する。投与対象は、人であることが好ましく、癌または炎症疾患に罹患している人がより好ましい。

また、本発明の脂質ナノ粒子は、癌または炎症疾患の治療剤または予防剤に関するインビボの薬効評価モデルにおいて、標的遺伝子を抑制することの有効性を検証するためのツールとして使用することもできる。

[01 08] 本発明の脂質ナノ粒子は、例えば血液成分等の生体成分 (例えば血液、消化管等) 中での前記核酸等の安定化、副作用の低減または標的遺伝子の発現部位を含む組織または臓器への薬剤集積性の増大等を目的とする製剤としても使用できる。

[01 09] 本発明の脂質ナノ粒子を、医薬品の癌または炎症疾患等の治療剤または予防剤として使用する場合、投与経路としては、治療に際し最も効果的な投与経路を使用するのが望ましく、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内または静脈内等の非経口投与または経口投与をあげることができ、好ましくは静脈内投与または筋肉内投与をあげることができ、より好ましくは静脈内投与があげられる。

投与量は、投与対象の病状や年齢、投与経路などによって異なるが、例えば核酸に換算した1日投与量が約0.1 μ g~ 1000mgとなるように投与すればよい。

[01 10] 静脈内投与または筋肉内投与に適当な製剤としては、例えば注射剤があげられ、上述の方法により調製した脂質ナノ粒子の分散液をそのまま例えば注射剤等の形態として用いることも可能であるが、該分散液から例えば濾過、遠心分離等によつて溶媒を除去して使用することも、該分散液を凍結乾燥して使用する、および/または例えばマンニトール、ラクトース、トレハロース、マルトースもしくはダリシン等の賦形剤を加えた分散液を凍結乾燥して使用することもできる。

注射剤の場合、前記の脂質ナノ粒子の分散液または前記の溶媒を除去または凍結乾燥した脂質ナノ粒子に、例えば水、酸、アルカリ、種々の緩衝液、生理的食塩液またはアミノ酸輸液等を混合して注射剤を調製することが好ましい。また、例えばクエン酸、アスコルビン酸、システインもしくはEDTA等の抗酸化剤またはダリセリン、ブドウ糖もしくは塩化ナトリウム等の等張化剤等を添加して注射剤を調製することも可能である。また、例えばダリセリン等の凍結保存剤を加えて凍結保存することもできる。

[01 11] 次に、実施例および試験例により、本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例および試験例に限定されるものではない。

なお、参考例に示されたプロトン核磁気共鳴スペクトル (^1H NMR) は、270MHz、300MHzまたは400MHzで測定されたものであり、化合物および測定条件によつては交換性プロトンが明瞭には観測されないことがある。なお、シグナルの多重度の表記としては通常用いられるものを用いているが、brとは見かけ上幅広いシグナルであることを表す。

[01 12] 参考例 1

メチルジ ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル)アミン (化合物 1)

メチルアミン (アルドリッチ (Aldrich) 社製、約2 mol/Lテトラヒドロフラン溶液、10.5 mL、21.0 mmol) に (9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルメタン
スルホナート (ニューチェック・プレップ (Nu-Chek Prep, Inc) 社製、1.03 g、
3.00 mmol) を加え、マイクロ波反応装置を用いて150℃で90分間加熱撹拌した。
反応液を酢酸エチルで希釈し、2 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、ついで飽

和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過し、減圧下濃縮することによってメチル ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル)アミンの粗生成物を得た。

得られた粗生成物に (9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル メタンスルホナート (Nu-Chek Prep, Inc 社製, 0.93 g, 2.70 mmol) および 50%水酸化ナトリウム水溶液 (0.960 g, 12.0 mmol) を加え、油浴上 135℃ で 60 分間加熱撹拌した。室温まで冷却後、反応液を酢酸エチルで希釈し、水、ついで飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 100/0 ~ 97/3) で精製することにより化合物 1 (1.07 g, 67.2 %) を得た。

ESI-MS m/z : 529 ($M + H$)⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.89 (t, $J = 6.7$ Hz, 6H), 1.29 (br s, 32H), 1.40-1.51 (m, 4H), 1.97-2.06 (m, 8H), 2.20 (s, 3H), 2.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 2.77 (t, $J = 5.8$ Hz, 4H), 5.28-5.43 (m, 8H) .

[01 13] 参考例 2

メチルジ ((Z)-ヘキサデカ-9-エニル)アミン (化合物 2)

参考例 1 と同様の方法で、メチルアミン (ALdrich 社製、約 2 mol/L テトラヒドロフラン溶液、10.0 mL、20.0 mmol) および (Z)-ヘキサデカ-9-エニル メタンスルホナート (Nu-Chek Prep, Inc 社製, 1.21 g, 3.80 mmol) を用い、化合物 2 (0.491 g, 51.6 %) を得た。

ESI-MS m/z : 477 ($M + H$)⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.88 (t, $J = 6.7$ Hz, 6H), 1.29 (br s, 36H), 1.46-1.57 (m, 4H), 1.97-2.05 (m, 8H), 2.33 (s, 3H), 2.45 (t, $J = 7.9$ Hz, 4H), 5.29-5.41 (m, 4H) .

[01 14] 参考例 3

メチルジ ((11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニル)アミン (化合物 3)

参考例 1 と同様の方法で、メチルアミン (ALdrich 社製、約 2 mol/L テトラヒドロフラン溶液、16.0 mL、32.0 mmol) および (11Z, 14Z)-イコサ-11, 14-ジエニル メタンスルホナート (Nu-Chek Prep, Inc 社製, 2.98 g, 8.00 mmol) を用

し、化合物 3(1.27 g, 54.4%)を得た。

ESI-MS m/z : 585 ($M + H$)+; ^1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 0.89 (t, $J = 6.7$ Hz, 6H), 1.27 (br s, 40H), 1.39-1.51 (m, 4H), 2.01-2.09 (m, 8H), 2.20 (s, 3H), 2.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 2.79 (d, $J = 6.3$ Hz, 4H), 5.28-5.43 (m, 8H) .

[01 15] 参考例 4

ジ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル)アミン (化合物 4)

参考例 1と同様の方法で、アンモニア (東京化成工業社製、約 2 mol/L メタノール溶液、18.0 mL、36.0 mmol) および (9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルメタンスルホナート (Nu-Chek Prep, Inc 社製、2.79 g, 8.10 mmol) を用い、化合物 4(0.838 g, 36.2%)を得た。

ESI-MS m/z : 515 ($M + H$)+; ^1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H), 1.30 (br s, 33H), 1.41-1.54 (m, 4H), 2.01-2.09 (m, 8H), 2.59 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H), 2.77 (t, $J = 5.6$ Hz, 4H), 5.28-5.43 (m, 8H) .

[01 16] 参考例 5

ジ((Z)-オクタデカ-9-エニル)アミン (化合物 5)

参考例 1と同様の方法で、アンモニア (東京化成工業社製、約 2 mol/L メタノール溶液、12.0 mL、24.0 mmol) および (Z)-オクタデカ-9-エニルメタンスルホナート (Nu-Chek Prep, Inc 社製、1.87 g, 5.40 mmol) を用い、化合物 5(0.562 g, 36.2%)を得た。

ESI-MS m/z : 519 ($M + H$)+; ^1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 0.88 (t, $J = 6.7$ Hz, 6H), 1.29 (br s, 45H), 1.41-1.52 (m, 4H), 1.97-2.05 (m, 8H), 2.58 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H), 5.28-5.40 (m, 4H) .

[01 17] 参考例 6

メチルジ((Z)-オクタデカ-9-エニル)アミン (化合物 6)

参考例 1と同様の方法で、メチルアミン (ALdrich社製、約 2 mol/L テトラヒドロフラン溶液、11.2 mL、22.4 mmol) および (Z)-オクタデカ-9-エニルメタンスルホナート (Nu-Chek Prep, Inc 社製、2.11 g, 6.09 mmol) を用い、化合物

6(1.20 g, 70.2%)を得た。

ESI-MS m/z : 533 ($M + H$)⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.88 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H), 1.27 (br s, 44H), 1.39-1.50 (m, 4H), 1.97-2.06 (m, 8H), 2.20 (s, 3H), 2.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 5.28-5.40 (m, 4H) .

実施例 1

[0118] 参考例 1 で得られた化合物 1 を用いて、以下のように製剤を製造した。用いた核酸は、センス鎖 [5' -GmUCAmUCACACmUGAAmUACCAAmU-3' (m が付された塩基に結合する糖は、2' -O- メチルで置換されている リボースである)] と、アンチセンス鎖 [5' -AUUGGUAUUCAGUGUGAUGACAC-3' (5' 末端をリン酸化してある)] の塩基配列からなる、アポリポプロテイン B (Apolipoprotein-B、以下 apo-b と表す) 遺伝子の発現を抑制する APO-B siRNA であり、センス鎖およびアンチセンス鎖それぞれをニッポンイージーティー社、ジーンデザイン社、インビトロジェン社または北海道システムサイエンス社から入手し、アニーリングさせることにより調製した (以下 apo-b siRNA という)。

化合物 1/ 1, 2- ジミリス トイル -sn- グリセロ-3- ホスホエタノール アミン- N-(メトキシ (ポリエチレングリコール)-2000) ナトリウム塩 (PEG-DMPE Na、N-(カルボニルメトキシポリエチレングリコール 2000)-1, 2- ジミリス トイル -sn- グリセロ-3- ホスホエタノール アミン=ナトリウム塩、日油社製)/ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC、1, 2- ジステアロイル -sn- グリセロ-3- ホスホコリン、日油社製)/コレステロール (アヴァンチ・ポーラーリピッド (Avanti Polar Lipids) 社製)=8.947/1.059/5.708/13.697 mmol/L となるように、各試料を秤量し 90 vol% エタノールに溶解させ、脂質膜の構成成分の溶液を調製した。一方、apo-b siRNA/ 蒸留水 (24 mg/ml) を Tris-EDTA 緩衝液 (200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA、インビトロジェン (Invitrogen) 製)、および 20 mM クエン酸緩衝液 (pH5.0) で希釈し、1.5 mg/mL の apo-b siRNA 水溶液 (2 mM Tris-EDTA 緩衝液、20 mM クエン酸緩衝液、pH5.0) を調製した。

得られた脂質溶液を 37℃ に加温した後、100 μ L を製剤調製用の容器に移し、得られた apo-b siRNA 水溶液 100 μ L を攪拌下に加えた。得られた脂質核酸

混合懸濁液 200 μL に、20 mM クエン酸緩衝液 (300 mM NaCl 含有, pH6.0) 200 μL を攪拌下に加え、さらにダルベッコリン酸バッファー (DPBS、インビトロジェン (Invitrogen) 製) 662 μL を滴下して siRNA 濃度を 10 μM とし、製剤 1 (化合物 1 および核酸を含有する脂質ナノ粒子) を得た。

粒子径測定装置 (Zetasizer Nano ZS、マルバーン (Malvern) 社製) で製剤中の脂質ナノ粒子の平均粒子径を測定した結果、該製剤中の脂質ナノ粒子の平均粒子径は 155.9 nm であった。

実施例 2

[0119] 化合物 1 を、化合物 2 にした以外、実施例 1 と同様にして製剤を得た。該製剤中の脂質ナノ粒子の平均粒子径は 122.7 nm であった。

実施例 3

[0120] 化合物 1 を、化合物 3 にした以外、実施例 1 と同様にして製剤を得た。該製剤中の脂質ナノ粒子の平均粒子径は 129.8 nm であった。

実施例 4

[0121] 化合物 1 を、化合物 4 にした以外、実施例 1 と同様にして製剤を得た。該製剤中の脂質ナノ粒子の平均粒子径は 139.5 nm であった。

実施例 5

[0122] 化合物 1 を、化合物 5 にした以外、実施例 1 と同様にして製剤を得た。

得られた製剤はアミコンウルトラ (Milestone 社製) を用いて濃縮し、さらに DPBS に置換し、0.2 μm のフィルター (東洋濾紙社製) を用いてクリーンベンチ内でろ過した。さらに得られた製剤の siRNA 濃度を測定し、siRNA 濃度で 1.0 mg/mL となるように DPBS を用いて希釈した。該製剤中の脂質ナノ粒子の平均粒子径は 178.6 nm であった。

[0123] 比較例 1

化合物 1 を、DOTAP (化合物 A-1、Avanti Polar Lipids 製) にした以外、実施例 1 と同様にして製剤を得た。該製剤中の脂質ナノ粒子の平均粒子径は 104.0 nm であった。

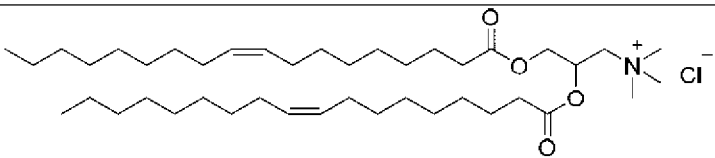
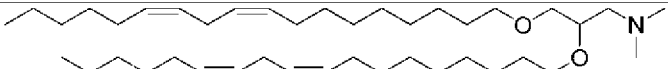
[0 124] 比較例 2

化合物 1 を、DLinDMA (化合物 A-2) にした以外、実施例 1 と同様にして製剤を得た。なお、化合物 A-2 は国際公開第 2005/ 12 1348 号記載の方法に従い合成した。

該製剤中の脂質ナノ粒子の平均粒子径は 131.6 nm であつた。

[0 125] 比較例で用いた化合物 A-1 および A-2 の構造式を表 2 に示す。

[0 126] [表 2]

化合物番号	構造式
A-1	
A-2	

[0 127] 試験例 1

実施例 1~4 で得られた各製剤 (化合物 1~4 および核酸を含有する脂質ナノ粒子) ならびに比較例 1 および 2 で得られた各製剤を、それぞれ以下の方法により、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 細胞 (HB-8065) に導入した。

核酸の最終濃度が 3-100nM または 1-30nM となるように、オプティメム (Opti-MEM、ギブコ (GIBCO) 社、31985) で希釈した各製剤を、96 ウェルの培養プレートに、20 μ L ずつ分注した後、1.25% ウシ胎仔血清 (FBS、SAFC バイオサイエンス (SAFC Biosciences) 社、12203C) を含む最小必須培地 (MEM) に懸濁させた HepG2 細胞を、細胞数 6250/80 μ L/ウェルとなるように播種し、37℃、5%CO₂ 条件下で培養することで、各製剤を HepG2 細胞内に導入した。また陰性対照の群として何も処理しない細胞を播種した。

各製剤を導入した細胞を 37℃ の 5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養し、氷冷したリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS、GIBCO 社、14190) で洗浄し、CellLytic[®] - Ct Kit (アプライドバイオサイエンス (ABI) 社、AM1728) を用いて、製品に添付された説明書に記載された方法に従い、全 RNA の回収と、得られた全 RNA を鋳型とする逆転写反応による cDNA の作製とを行った。

得られたcDNAを鋳型とし、ユニバーサルプロープライブラリ(Universal Probe Library、ロシュ アプライドサイエンス (Roche Applied Science) 社、0468363300 1)をプローブとして、ABI7900HT Fast (ABI 社製)を用い、添付された使用説明書に記載された方法に従ってPCR反応させることにより、apo-b 遺伝子および構成的発現遺伝子であるダリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase^α 以下gapdh と表す)遺伝子をPCR反応させてmRNA増幅量をそれぞれ測定し、gapdh のmRNA増幅量を内部対照として、apo-b のmRNAの準定量値を算出した。また、陰性対照の群における、apo-b のmRNA量およびgapdh のmRNA増幅量を同様にそれぞれ測定し、gapdh のmRNA増幅量を内部対照として、apo-b のmRNAの準定量値を算出した。

算出されたapo-b のmRNAの準定量値を、陰性対照におけるapo-b のmRNAの準定量値を1として求めたapo-b のmRNAの発現率の結果を、図1に示す。なお、縦軸は陰性対照を1とした場合の標的遺伝子のmRNAの発現率を表し、横軸は核酸濃度 (nM)、使用したカチオン性脂質の化合物番号および実施例番号を示す。

[0128] 図1から明らかなように、実施例1~4で得られた製剤 (apo-b遺伝子の発現を抑制するAPO-B siRNAと、化合物1~4のそれぞれとを含有する脂質ナノ粒子)を、ヒト肝がん由来細胞株HepG2細胞内に導入後の、apo-b 遺伝子のmRNAの発現率は、比較例2で得られた各製剤と比較して、抑制が弱い。

[0129] 試験例2

実施例1~4と同様に得た各製剤、実施例5で得られた製剤 (化合物1~5および核酸を含有する脂質ナノ粒子)ならびに比較例1および2と同様に得た各製剤を、それぞれ以下の方法によりインビボ薬効評価試験を実施した。なお、各製剤は、アミコンウルトラ (Merieux社製)を用いて濃縮し、DPBSで溶媒を置換後、製剤を回収した。得られた製剤のsiRNA濃度を定量し、試験に合わせて希釈して用いた。

マウスを馴化飼育後、siRNA濃度で3または0.3 mg/kg となるようにマウスに静脈内投与した。投与から48時間後に採血し、採取した血液は小型冷却遠心機 (05PR-22:日立社製)を用いて3000 rpm, 20 min., 4℃で遠心分離した。得ら

れた血清中のコレステロール値を、Cholesterol Assay Kit (Cayman Chemical 社製、Cat# : 10007640) を用いて、製品の説明書に記載された方法に従い、標準液および血清サンプル中の蛍光度をARVO (530 nm/595 nm) もしくはEnVision (531 nm/595 nm) で測定した。得られた蛍光度から検量線を作成し、血清中のコレステロール濃度を算出した。

算出された血清中のコレステロール濃度の結果を、図2に示す。なお、縦軸は生理食塩水投与群を100とした場合の血中コレステロール値の相対値を示し、横軸は使用したカチオン性脂質の化合物番号を示す。

[0130] 図2から明らかなように、実施例1~5で得られた製剤 (apo-b遺伝子の発現を抑制するAPO-B siRNAと、化合物1~5のそれぞれとを含有する脂質ナノ粒子) は、インビボでの薬効評価試験であるコレステロール濃度の測定結果において、比較例1および2で得られる各製剤と比較して、抑制が強い。本発明の脂質ナノ粒子は、インビトロで評価試験 (試験例1) では、トランスフェクションの作用が低いにもかかわらず、インビボで薬効評価試験した結果、予想外に作用が強く、インビボの薬物送達のための脂質ナノ粒子として有用であるという、当業者が予想しない効果を有することが明らかとなった。

よって、本発明の脂質ナノ粒子は、核酸を細胞内等に導入することができ、化合物(1)は、インビボで細胞内に薬物送達することを容易にするカチオン性脂質であることが明らかとなった。

実施例 6

[0131] 参考例1で得られた化合物1を用いて、以下のように製剤を製造した。用いた核酸は、センス鎖 [5' -mGmGAAGCUGGCGAUUAUGCAGAUUmUmA-3' (mが付された塩基に結合する糖は、2' -O- メチルで置換されているリボースである)] と、アンチセンス鎖 [5' -UAAAUCUGCAUAAUCGCCAGCUUCC-3' (5', 末端をリン酸化してある)] の塩基配列からなる、CKAP5 遺伝子の発現を抑制するCKAP5 siRNAであり、ニッポンイージーティー社、ジーンデザイン社、インビトロジェン社または北海道システムサイエンス社より、アニール済みの凍結乾燥siRNAを入手し、蒸留水で溶解させることによって24 mg/mL に調製した (以下CKAP5 siRNA溶

液 という)。

化合物 1/ 1, 2- ジミリス トイル -sn- グリセ ロ- 3- ホスホエタノール アミン- N- (メ トキシ (ポ リエチ レングリコール)2000) ナ トリウム塩 (PEG-DMPE Na、 N- (カル ボニル メ トキシポ リエチ レングリコール 2000) - 1, 2- ジミリス トイル -sn- グリセ ロ- 3- ホスホエタノール アミン=ナ トリウム塩、 日油社製)=57. 26/5. 521 mmo L/L となるように塩 酸 およびエタノールを含有する水溶液に懸濁させ、 vortex 攪拌 ミキサーで攪拌および加温を繰り返して均一な懸濁液を得た。この懸濁液を室温下で 0.2 μ m のポリカーボネートメンブランフィルターおよび 0.05 μ m のポリカーボネートメンブランフィルターに通し、リード粒子の分散液を得た。Dynamic Light scattering (DLS) で得られたリード粒子の平均粒子径を測定し、30 nm から 100 nm の範囲内であることを確認した。得られたリード粒子の分散液に、CKAP5s siRNA 溶液を、3:1 の割合で混合し、さらに 3 倍量の蒸留水を加えて混合することでカチオン性脂質/核酸複合体粒子の分散液を調製した。

一方、化合物 1/ 1, 2- ジステアロイル -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)2000) ナ トリウム塩 (PEG-DSPE Na、 N- (カル ボニル メ トキシポ リエチ レングリコール 2000) - 1, 2- ジステアロイル -sn- グリセ ロ- 3- ホスホエタノール アミン=ナ トリウム塩、 日油社製)/ ジステアロイル ホスファチジル コリン (DSPC、 1, 2- ジステアロイル -sn- グリセ ロ- 3- ホスホコリン、 日油社製)/ コレステロール (日油社製)=8. 947/2. 943/5. 707/ 11. 83 mmo L/L となるように、各試料を秤量し 90 vol% エタノールに溶解させ、脂質膜構成成分の溶液を調製した。

得られた脂質膜構成成分の溶液を加温した後、得られたカチオン性脂質/核酸複合体粒子の分散液を、1:1 の割合で混合し、さらに数倍量の蒸留水を混合し、粗製剤を得た。

得られた粗製剤はアミコンウルトラ (M は i pore 社製) を用いて濃縮し、さらに生理食塩水 (生食) に置換し、0.2 μ m のフィルター (東洋濾紙社製) を用いてクリーンベンチ内でろ過した。さらに得られた製剤の siRNA 濃度を測定し、si

RNA濃度で1.0 mg/mL となるように生食を用いて希釈した。該製剤中の脂質ナノ粒子の平均粒子径は86.0 nmであった。

実施例 7

[0132] 化合物1を、化合物2にした以外、実施例6と同様にして製剤を得た。該製剤中の脂質ナノ粒子の平均粒子径は77.1 nmであった。

実施例 8

[0133] 化合物1を、化合物6にした以外、実施例6と同様にして製剤を得た。該製剤中の脂質ナノ粒子の平均粒子径は81.5 nmであった。

実施例 9

[0134] 参考例1で得られた化合物1を用いて、以下のように製剤を製造した。

実施例6と同様にしてCKAP5 siRNAならびにリード粒子から、カチオン性脂質/核酸複合体粒子の分散液を調製した。

一方、化合物1/trans-1-メチル-3,4-ビス(((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエノイルオキシ)メチル)ピロリジン(国際公開第2011/136368号に記載の製造方法と同様の方法で得た)/1,2-ジステアロイル-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)-2000)ナトリウム塩(PEG-DSPE Na、N-(カルボニルメトキシポリエチレングリコール2000)-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン=ナトリウム塩、日油社製)/ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC、1,2-ジステアロイル-sn-ダリセロ-3-ホスホコリン、日油社製)/コレステロール(日油社製)=2.982/5.965/2.943/5.707/11.83 mmol/L となるように、各試料を秤量し90 vol%エタノールに溶解させ、脂質膜構成成分の溶液を調製した。

得られた脂質膜構成成分の溶液を加温した後、得られたカチオン性脂質/核酸複合体粒子の分散液を、1:1の割合で混合し、さらに数倍量の蒸留水を混合し、粗製剤を得た。

得られた粗製剤はアミコンウルトラ(Mはipore社製)を用いて濃縮し、さらに生理食塩水(生食)に置換し、0.2 μmのフィルター(東洋濾紙社製)を用いてクリーンベンチ内でろ過した。さらに得られた製剤のsiRNA濃度を測定し、si

RNA濃度で1.0 mg/mLとなるように生食を用いて希釈した。該製剤中の脂質ナノ粒子の平均粒子径は93.9 nmであった。

[0135] 試験例3

実施例6~9で得られた各製剤(化合物(I)および核酸を含有する脂質ナノ粒子)を、それぞれ以下の方法によりインビボ mRNAノックダウン評価試験を実施した。

ヒト膵臓癌由来細胞株であるMIA PaCa-2はJCRB細胞バンクより受領し、10%非働化ウシ胎仔血清(GIBCO社製)及び1vol%ペニシリン-ストربتマイシン(ナカライテスク社製、26253-84)を含む高グルコース含有DMEM(GIBCO社製、11995-073)で37℃、5%CO₂条件下で培養した。MIA PaCa-2を1X 10⁸ cells / mLの濃度となるようにPBSに懸濁し、この細胞懸濁液100 μLをSCIDマウス(日本クレアより入荷)の背部皮下に移植した(1X 10⁷ cells / 0.1 mL PBS / head)。移植6日後、腫瘍体積を指標に一群3匹として群分けを行い、実施例6および7で得られた製剤を10 mg/kg(10 mL/kg)でマウスに静脈内投与した。陰性対照として生理食塩水を使用し、10 mL/kgで投与した。投与前及び投与48時間後にマウスの体重を測定した。体重測定後にマウスを安楽死させ、皮下腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍は直ちに液体窒素で凍結し、使用するまで-80℃に保存した。

得られた腫瘍サンプルについて、サンプルの入った2 mL丸底tubeに1 mLのTRIzol reagent (インビトロジェン(Invitrogen)製、15596-018)及び5mmのジルコニアビーズを添加し、Tissue Lyser II (キアゲン(QIAGEN)製)にて1/25 freq, 1.5 min x 2回の条件で破碎した。破碎後遠心(10000 rpm, 10 min)し上清を回収、200 μLのクロロホルムを添加し激しく攪拌後再び遠心(15000 rpm, 15 min)した。得られた上清200 μLから自動核酸抽出機MagNA PURE 96 (ロシュ(Roche)製)にて、Cellular RNA Large Volume Kit (ロシュ(Roche)製、5467535)を用いてRNAを抽出した。抽出したRNA濃度を微量吸光光度計Dropse96 (トリニアン(Trinean)製)にて測定、200-1000 ng相当のRNAをTranscript (ロシュ(Roche)製、4897030)を用いて逆転写を行った。反応液組成、反

応条件は添付文書に従った。得られたcDNAサンプルをdH₂Oで10倍希釈し、qPCRの錶型として用いた。qPCR反応にはTaqMan Gene Expression Master Mix (アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems) 製, 4369542), TaqMan Gene Expression Assays (アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems) 製, 4331182)を用いた。PCR反応の条件はTaqMan Gene Expression添付の使用説明書に従った。検体のmRNA量は、生理食塩水投与群における、CKAP5のmRNA量を1としたときの相対的な割合として算出した。

図3に、実施例6および9で得られた各製剤について、それぞれsiRNA 10 mg/kg投与後48時間後の腫瘍中CKAP5 mRNA量を示す。縦軸は生理食塩水処置群を1としたCKAP5 mRNA量の相対値を示す。

図4に、実施例6~8で得られた各製剤について、それぞれsiRNA 10 mg/kg投与後48時間後の腫瘍中CKAP5 mRNA量を示す。縦軸は生理食塩水処置群を1としたCKAP5 mRNA量の相対値を示す。

[0136] 試験例4

実施例9で得られた製剤(化合物1および核酸を含有する脂質ナノ粒子)を、それぞれ以下の方法により腫瘍増殖抑制能評価試験を実施した。

試験例3と同様にして、膵臓癌由来細胞株であるMIA PaCa-2をSCIDマウスに移植したゼノグラフトモデルを用いて実施した。腫瘍体積を指標に一群6匹となるように群分けを実施(Day0)し、Day0及びDay7に実施例9で得られた製剤を10 mg/kg (10mL/kg)で静脈内投与した。生理食塩水は10 mL/kgとして同様に投与した。各個体の腫瘍径を、Day0からDay14まで測定し、以下の式を用いて腫瘍体積、体積比を算出した。

(数1)

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \text{長径 (mm)} \times \text{短径 (mm)} \times \text{短径 (mm)} \times 0.5$$

(数2)

$$\text{体積比 (V/V}_0\text{)} = \text{各時点の腫瘍体積 (mm}^3\text{)} \div \text{Day0の腫瘍体積 (mm}^3\text{)}$$

図5に、0日目および7日目に10 mg/kg (10mL/kg)投与した際の腫瘍体積の推移を示す。縦軸は0日目を1とした腫瘍体積の相対値を示す。横軸は実験開始

後の経過日数を示す。

[01 37] 図3~5 から明らかなように、実施例6~9 で得られた製剤 (CKAP5遺伝子の発現を抑制するCKAP5 siRNAと、化合物 (I) を含有する脂質ナノ粒子) を、インビボで薬効評価試験した結果は、極めて強くCKAP5遺伝子の発現を抑制し、抗腫瘍作用が強い。本発明の脂質ナノ粒子は、試験例1では、インビトロでの評価試験 (試験例1) では、トランスフェクションの作用が低いにもかかわらず、インビボで薬効評価試験 (試験例3および4) した結果、予想外に作用が強く、インビボの薬物送達 (ドラッグデリバリーシステム) のための脂質ナノ粒子として有用であるという、当業者が予想しない効果を有することが明らかとなった。特に、腫瘍にインビボの薬物送達 (ドラッグデリバリーシステム) のための脂質ナノ粒子として有用であるという、より予想できない効果を有することが明らかとなった。

よって、本発明の脂質ナノ粒子は、核酸を細胞内等に導入することができ、化合物 (I) は、インビボで細胞内に薬物送達することを容易にするカチオン性脂質であることが明らかとなった。また、本発明の脂質ナノ粒子は、核酸を特に、腫瘍の細胞内等に導入することができ、化合物 (I) は、インビボで腫瘍の細胞内に薬物送達することを容易にするカチオン性脂質であることが明らかとなった。

実施例 10

[01 38] 参考例1で得られた化合物1を用いて、以下のように製剤を製造した。用いた核酸は、市販のEg5遺伝子の発現を抑制するEg5 siRNA (インビトロジェン社製、カタログ番号 HSS1 05842) であり、センス鎖に5' -CCCAUCAACACUGGUAAGAACUGAA-3' の塩基配列を含み、アンチセンス鎖に5' -UUCAGUUCUUACCAGUGUUGAUGGG-3' の塩基配列を含む。インビトロジェン社より、アニール済みの凍結乾燥siRNAを入手し、蒸留水で溶解させることによって24 mg/mLに調製した (以下Eg5 siRNA溶液という)。

化合物1/ 1, 2-ジミリス トイル-sn- グリセロ-3- ホスホエタノールアミン-N-(メトキシ (ポリエチレングリコール)2000) ナトリウム塩 (PEG-DMPE Na、N (カ

ルポニルメトキシポリエチレングリコール2000)-1,2-ジミリス Toil -sn- グリセロ-3-ホスホエタノールアミン=ナトリウム塩、日油社製)=57.26/5.521 mmol/L となるように塩酸およびエタノールを含有する水溶液に懸濁させ、vortex 攪拌ミキサーで攪拌および加温を繰り返して均一な懸濁液を得た。この懸濁液を室温下で0.2 μm のポリカーボネートメンブランフィルターおよび0.05 μm のポリカーボネートメンブランフィルターに通し、リード粒子の分散液を得た。Dynamic Light scattering (DLS) で得られたリード粒子の平均粒子径を測定し、30 nmから100 nmの範囲内であることを確認した。得られたリード粒子の分散液に、Eg5 siRNA溶液を、3:1の割合で混合し、さらに3倍量の蒸留水を加えて混合することでカチオン性脂質/核酸複合体粒子の分散液を調製した。

一方、化合物1/1,2-ジステアロイル-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)₂₀₀₀)ナトリウム塩(PEG-DSPE Na、N-(カルボニルメトキシポリエチレングリコール2000)-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン=ナトリウム塩、日油社製)/ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、日油社製)/コレステロール(日油社製)=8.947/2.943/5.707/11.83 mmol/L となるように、各試料を秤量し90 vol%エタノールに溶解させ、脂質膜構成成分の溶液を調製した。

得られた脂質膜構成成分の溶液を加温した後、得られたカチオン性脂質/核酸複合体粒子の分散液を、1:1の割合で混合し、さらに数倍量の蒸留水を混合し、粗製剤を得た。

得られた粗製剤はアミコンウルトラ(Mはipore社製)を用いて濃縮し、さらに生理食塩水(生食)に置換し、0.2 μm のフィルター(東洋濾紙社製)を用いてクリーンベンチ内でろ過した。さらに得られた製剤のsiRNA濃度を測定し、siRNA濃度で1.0 mg/mL となるように生食を用いて希釈した。該製剤中の脂質ナノ粒子の平均粒子径は80.3 nmであった。

実施例 11

[0139] 参考例1で得られた化合物1を用いて、以下のように製剤を製造した。

実施例10と同様にしてEg5 siRNAならびにリード粒子から、カチオン性脂質/核酸複合体粒子の分散液を調製した。

一方、化合物1/trans-1-メチル-3,4-ビス(((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエノイルオキシ)メチル)ピロリジン(国際公開第2011/136368号に記載の製造方法と同様の方法で得た)/1,2-ジステアロイル-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)-2000)ナトリウム塩(PEG-DSPE Na、N-(カルボニルメトキシポリエチレングリコール2000)-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン=ナトリウム塩、日油社製)/ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC、1,2-ジステアロイル-sn-ダリセロ-3-ホスホコリン、日油社製)/コレステロール(日油社製)=2.982/5.965/2.943/5.707/11.83 mmol/Lとなるように、各試料を秤量し90 vol%エタノールに溶解させ、脂質膜構成成分の溶液を調製した。

得られた脂質膜構成成分の溶液を加温した後、得られたカチオン性脂質/核酸複合体粒子の分散液を、1:1の割合で混合し、さらに数倍量の蒸留水を混合し、粗製剤を得た。

得られた粗製剤はアミコンウルトラ(Millipore社製)を用いて濃縮し、さらに生理食塩水(生食)に置換し、0.2 μmのフィルター(東洋濾紙社製)を用いてクリーンベンチ内でろ過した。さらに得られた製剤のsiRNA濃度を測定し、siRNA濃度で1.0 mg/mLとなるように生食を用いて希釈した。該製剤中の脂質ナノ粒子の平均粒子径は80.5 nmであった。

[0140] 試験例5

実施例10および11で得られた各製剤(化合物1および核酸を含有する脂質ナノ粒子)を、それぞれ以下の方法によりインビボ mRNA ノックダウン評価試験を実施した。

試験例3と同様にして、膵臓癌由来細胞株であるMIA PaCa-2をSCIDマウスに移植したゼノグラフモデルを用いて実施した。移植6日後、腫瘍体積を指標に一群3匹として群分けを行い、実施例10および11で得られた製剤を10 mg/kg

(10mL/kg) でマウスに静脈内投与した。陰性対照として生理食塩水を使用し、10mL/kg で投与した。投与前及び投与48時間後にマウスの体重を測定した。体重測定後にマウスを安楽死させ、皮下腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍は直ちに液体窒素で凍結し、使用するまで-80℃に保存した。

得られた腫瘍サンプルについて、サンプルの入った2 mL丸底tubeに1 mLのTRIzol reagent (インビトロジェン (Invitrogen) 製, 15596-018) 及び5mmのジルコニアビーズを添加し、Tissue Lyser II (キアゲン (QIAGEN) 製) にて1/25 freq, 1.5 min x 2回の条件で破碎した。破碎後遠心 (10000 rpm, 10 min) し上清を回収、200 μ Lのクロロホルムを添加し激しく攪拌後再び遠心 (15000 rpm, 15 min) した。得られた上清200 μ Lから自動核酸抽出機 MagNA PURE 96 (ロシュ (Roche) 製) にて、Cellular RNA Large Volume Kit (ロシュ (Roche) 製, 5467535) を用いてRNAを抽出した。抽出したRNA濃度を微量吸光光度計 Dropse nse96 (トリニアン (Trinean) 製) にて測定、200- 1000 ng相当のRNAをTransc riptor (ロシュ (Roche) 製, 4897030) を用いて逆転写を行った。反応液組成、反応条件は添付文書に従った。得られたcDNAサンプルをdH2Oで10倍希釈し、qPCRの錶型として用いた。qPCR反応にはTaqMan Gene Expression Master Mix (アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems) 製, 4369542) , TaqMan Gene Expression Assays (アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems) 製, 4331182) を用いた。PCR反応の条件はTaqMan Gene Expression添付の使用説明書に従った。検体のmRNA量は、生理食塩水投与群における、Eg5 のmRNA量を1としたときの相対的な割合として算出した。

図6に、実施例10および11で得られた各製剤について、それぞれsiRNA 10 mg/kg 投与後48時間後の腫瘍中Eg5 mRNA量を示す。縦軸は生理食塩水処置群を1としたEg5 mRNA量の相対値を示す。

[0141] 試験例6

実施例11で得られた製剤で得られた製剤 (化合物1および核酸を含有する脂質ナノ粒子) を、それぞれ以下の方法により腫瘍増殖抑制能評価試験を実施した。

試験例3と同様に、膵臓癌由来細胞株であるMIA PaCa-2をSCIDマウスに移植したゼノグラフモデルを用いて実施した。腫瘍体積を指標に一群5匹となるように群分けを実施 (Day0) し、実施例11で得られた製剤を10 mg/kg(10 mL/kg)で静脈内投与した。生理食塩水は10 mL/kgとして同様に投与した。各個体の腫瘍径を、Day0からDay5まで測定し、試験例4と同様に腫瘍体積、体積比を算出した。

図7に、0日目に10 mg/kg(10 mL/kg)投与した際の腫瘍体積の推移を示す。縦軸は0日目を1とした腫瘍体積の相対値を示す。横軸は実験開始後の経過日数を示す。

[0142] 図6および7から明らかなように、実施例10および11で得られた製剤 (Eg5遺伝子の発現を抑制するEg5 siRNAと、化合物1を含有する脂質ナノ粒子)を、インビボで薬効評価試験した結果は、極めて強くEg5遺伝子の発現を抑制し、抗腫瘍作用が強い。本発明の脂質ナノ粒子は、試験例1では、インビトロでの評価試験 (試験例1)では、トランスフェクションの作用が低いにもかかわらず、インビボで薬効評価試験 (試験例5および6)した結果、予想外に作用が強く、インビボの薬物送達 (ドラッグデリバリーシステム)のための脂質ナノ粒子として有用であるという、当業者が予想しない効果を有することが明らかとなった。特に、腫瘍にインビボの薬物送達 (ドラッグデリバリーシステム)のための脂質ナノ粒子として有用であるという、より予想できない効果を有することが明らかとなった。

よって、本発明の脂質ナノ粒子は、核酸を細胞内等に導入することができ、化合物(1)は、インビボで細胞内に薬物送達することを容易にするカチオン性脂質であることが明らかとなった。また、本発明の脂質ナノ粒子は、核酸を特に、腫瘍の細胞内等に導入することができ、化合物(1)は、インビボで腫瘍の細胞内に薬物送達することを容易にするカチオン性脂質であることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0143] 本発明の脂質ナノ粒子を、ほ乳類等に投与することにより、例えば核酸を

、細胞内等に容易に導入することができる。

配列表 フリーテキスト

[0144] 配列番号 1-s iRNA センス鎖

配列番号 2-s iRNA アンチセンス鎖

配列番号 2-5' - リン酸化アデノシン (5' -phosphorylated Adenosine)

配列番号 3-s iRNA センス鎖

配列番号 4-s iRNA アンチセンス鎖

配列番号 4-5' - リン酸化アデノシン (5' -phosphorylated Adenosine)

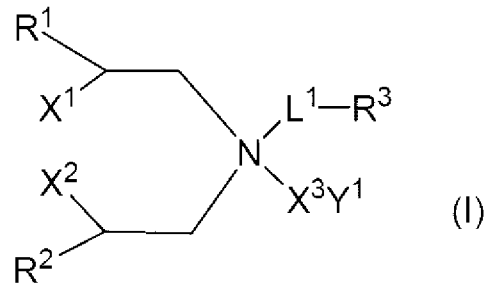
配列番号 5-s iRNA センス鎖

配列番号 6-s iRNA アンチセンス鎖

請求の範囲

[請求項 1] 式 (I)

[化 10]



(式中、R¹およびR²は、同一または異なって炭素数10~24の直鎖状または分枝状のアルキル、アルケニルまたはアルキニルであり、

X¹およびX²は、水素原子であるか、または一緒になって単結合もしくはアルキレンを形成し、

X³は存在しないか、炭素数1~6のアルキルまたは炭素数3~6のアルケニルであり、

X³が存在しない場合には、

Y¹も存在せず、いは単結合であり、R³は水素原子、炭素数1~6のアルキル、炭素数3~6のアルケニル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1~6のアルキルもしくは炭素数3~6のアルケニルであるか、あるいは

Y¹も存在せず、いは-CO-または-CO-O-であり、R³はピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イル、モルホリン-3-イルまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、

カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数 1~ 6 のアルキルもしくは炭素数 3~6 のアルケニルであり、該置換基の少なくとも 1 つは、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ピロリジニル、ピペリジニルまたはモルホリニルであり、

X^3 が炭素数 1~ 6 のアルキルまたは炭素数 3~6 のアルケニルの場合には、

Y^1 は製薬上許容し得る陰イオンであり、 i は単結合であり、 R^3 は炭素数 1~ 6 のアルキル、炭素数 3~6 のアルケニル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なつて 1~ 3 つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数 1~ 6 のアルキルもしくは炭素数 3~6 のアルケニルである)で表されるカチオン性脂質を含有する薬物送達のための脂質ナノ粒子。

[請求項 2] R^1 および R^2 が、ドデシル、テトラデシル、(Z)-ドデカ-7-エニル、(Z)-テトラデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-4-エニル、(Z)-ヘキサデカ-7-エニル、(E)-ヘキサデカ-7-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(7Z, 10Z)-ヘキサデカ-7, 10-ジエニル、(7Z, 10Z, 13Z)-ヘキサデカ-7, 10, 13-トリエニル、(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニルである請求項 1記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

[請求項 3] R^1 および R^2 が、テトラデシル、ヘキサデシル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル、(9Z, 12Z, 15Z)-オクタデ

カ-9, 12, 15- トリエニル、(Z)- イコサ- 11- エニルまたは (¹1Z, 14Z)- イコサ- 11, 14- ジエニルである請求項1記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

[請求項4] いが単結合であり、R⁸が水素原子、メチル、ピロリジン-3- イル、ピペリジン-3- イル、ピペリジン-4- イルまたは同一もしくは異なって1~ 3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、 トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1~ 6のアルキルもしくは炭素数3~ 6のアルケニルである請求項1~ 3のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

[請求項5] いが-CO- または-CO-O- であり、R⁸がピロリジン-3- イル、ピペリジン-3- イル、ピペリジン-4- イルまたは同一もしくは異なって1~ 3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、 トリアルキルアンモニオ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1~ 6のアルキルもしくは炭素数3~ 6のアルケニルであり、該置換基の少なくとも1つは、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、 トリアルキルアンモニオ、ピロリジニル、ピペリジニルもしくはモルホリニルである請求項1~ 3のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

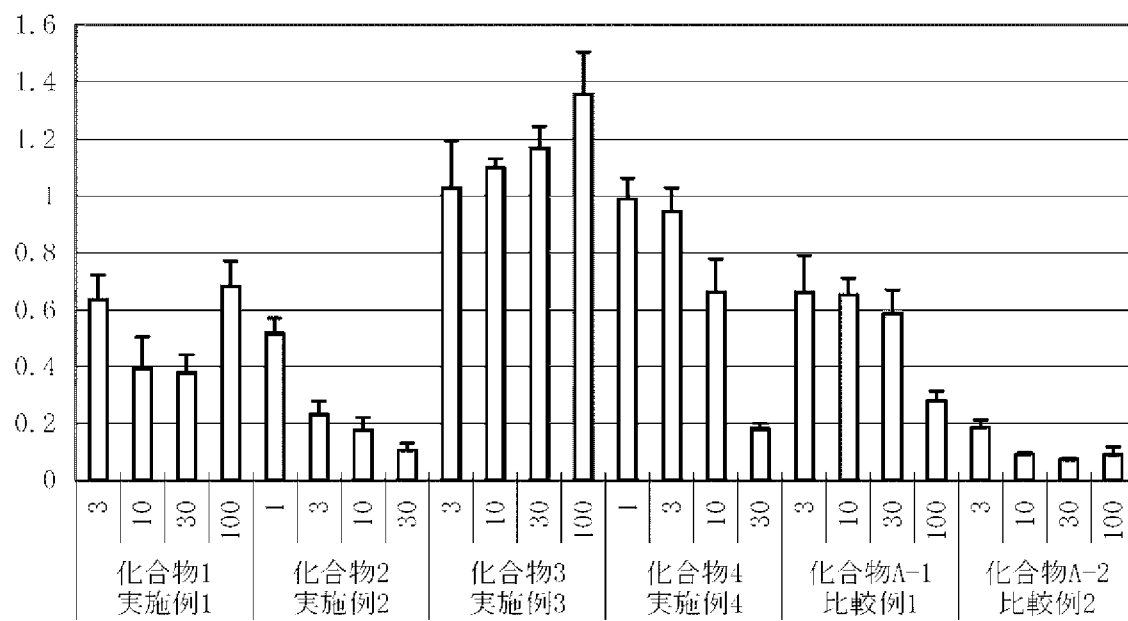
[請求項6] X¹およびY¹が、一緒になって単結合またはアルキレンを形成する請求項1~ 5のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

[請求項7] X¹およびY¹が、一緒になって単結合またはアルキレンを形成し、R⁸が水素原子、メチルまたは同一もしくは異なって1~ 3つのアミノ、ヒドロキシもしくはカルバモイルで置換された炭素数1~ 6のアルキルもしくは炭素数3~ 6のアルケニルである請求項1~ 5のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。

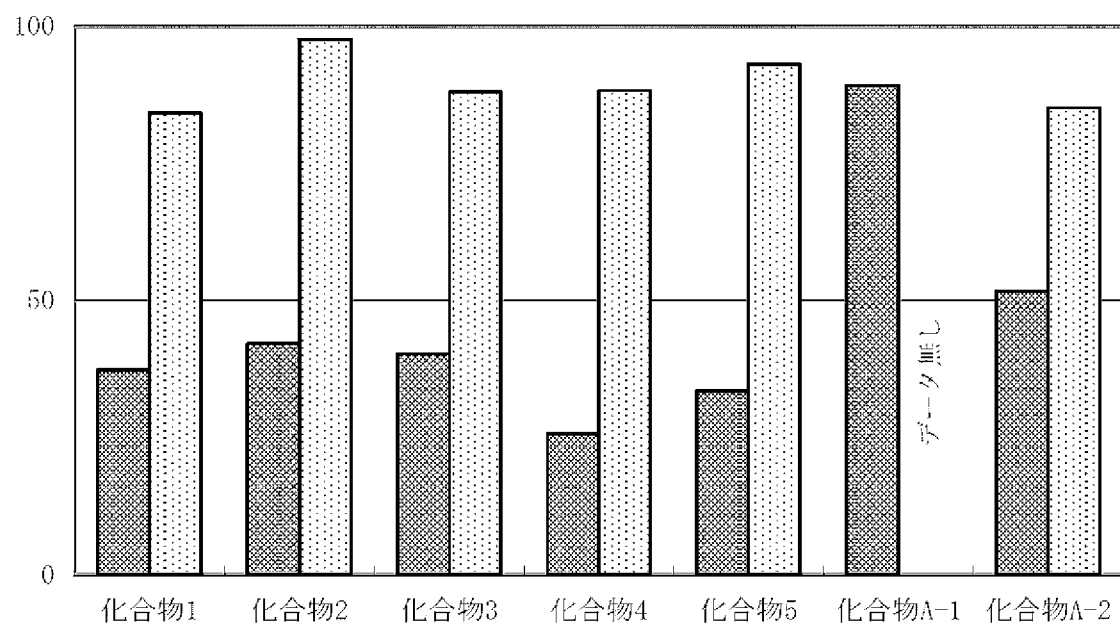
- [請求項8] X^1 および X^2 が、水素原子であり、 R^3 が水素原子、メチルまたは同一もしくは異なって1~3つのアミノ、ヒドロキシもしくはカルバモイルで置換された炭素数1~6のアルキルもしくは炭素数3~6のアルケニルである請求項1~5のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。
- [請求項9] X^3 が存在しない請求項1~8のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。
- [請求項10] 薬物として核酸を含有する請求項1~9のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。
- [請求項11] カチオン性脂質が、該核酸と複合体を形成しているか、または中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと該核酸との複合体を形成している、請求項10記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。
- [請求項12] カチオン性脂質が、該核酸と複合体を形成しているか、または中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと該核酸との複合体を形成しており、該複合体および該複合体を封入する脂質膜から構成された請求項10記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。
- [請求項13] 核酸がRNA干渉 (RNAi) を利用した標的遺伝子の発現抑制作用を有する核酸である請求項10~12のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。
- [請求項14] 標的遺伝子が、腫瘍または炎症に関連する遺伝子である請求項13記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子。
- [請求項15] 請求項10~14のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子を用いて該核酸を細胞内に導入する方法。
- [請求項16] 細胞が、ほ乳類の腫瘍または炎症部位にある細胞である請求項15記載の方法。
- [請求項17] 細胞が、ほ乳類の肝臓、肺、腎臓または脾臓にある細胞である請求項15または16記載の方法。
- [請求項18] 細胞内に導入する方法が、静脈内投与によって細胞内に導入する方法である請求項16または17記載の方法。

- [請求項 19] 請求項 1~ 14 のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子を哺乳動物に投与する癌または炎症疾患の治療方法。
- [請求項 20] 投与する方法が、静脈内投与である請求項 19記載の方法。
- [請求項 21] 請求項 1~ 14 のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子を含む、疾患の治療に用いるための医薬。
- [請求項 22] 静脈内投与用である請求項 21記載の医薬。
- [請求項 23] 請求項 1~ 14 のいずれかに記載の薬物送達のための脂質ナノ粒子を含む、癌または炎症疾患の治療に用いるための癌または炎症疾患の治療剤。
- [請求項 24] 静脈内投与用である請求項 23記載の癌または炎症疾患の治療剤。

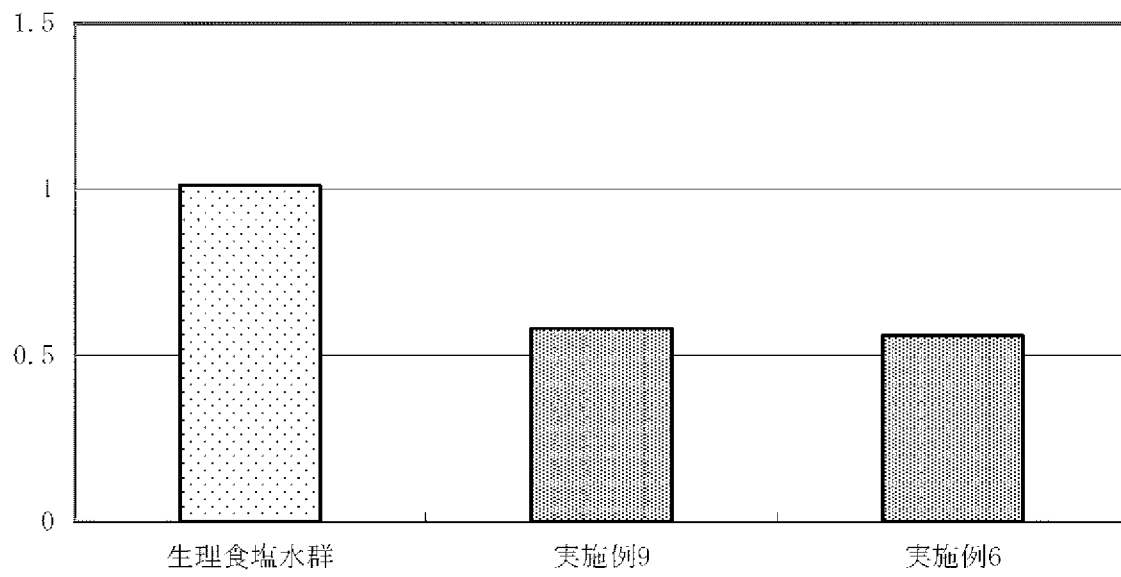
[図1]



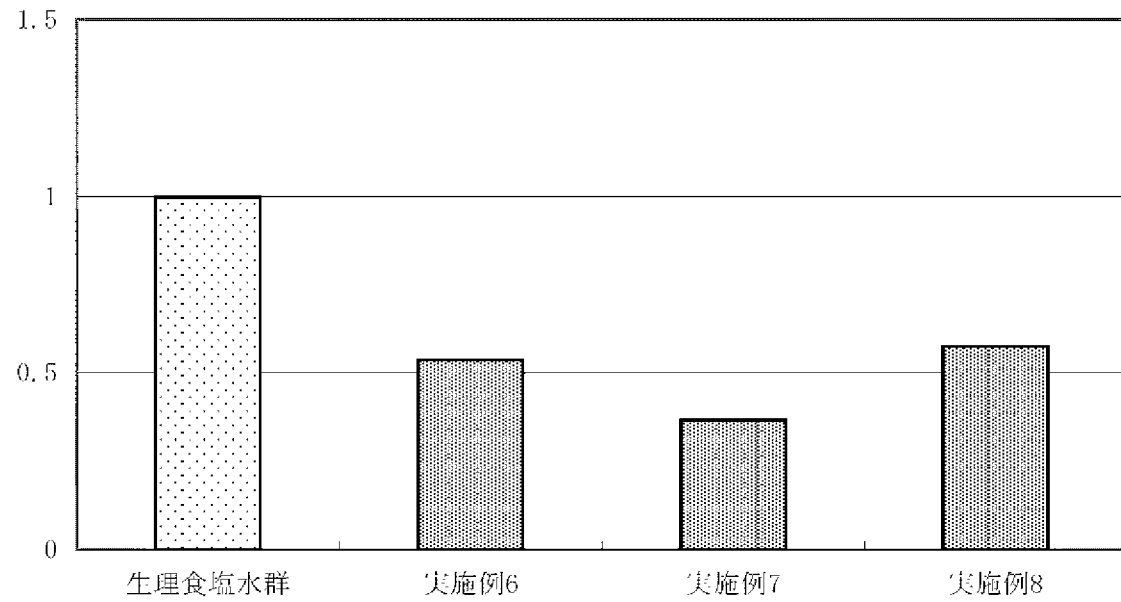
[図2]



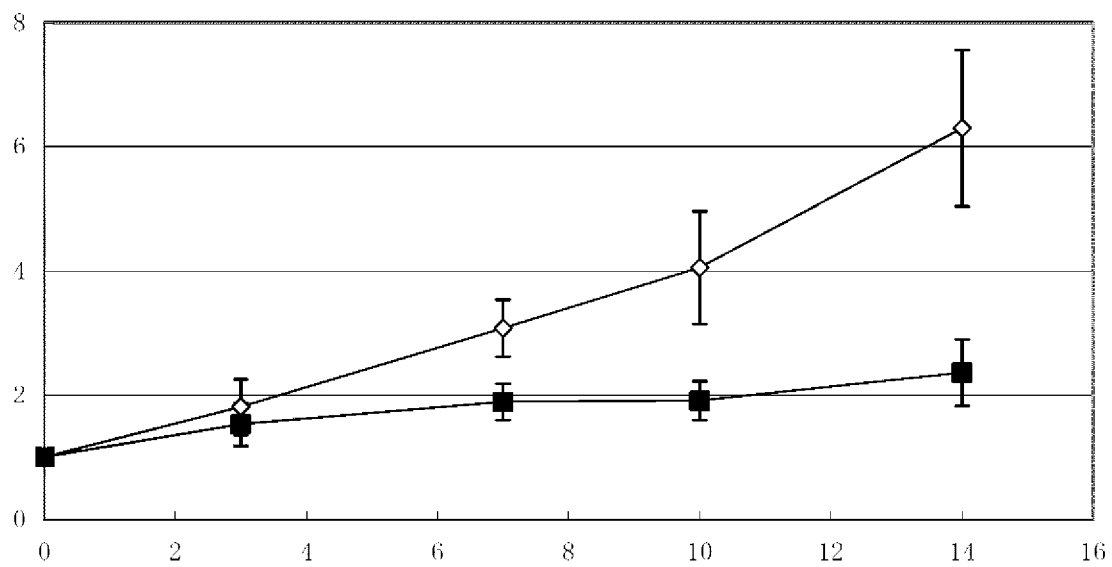
[図3]



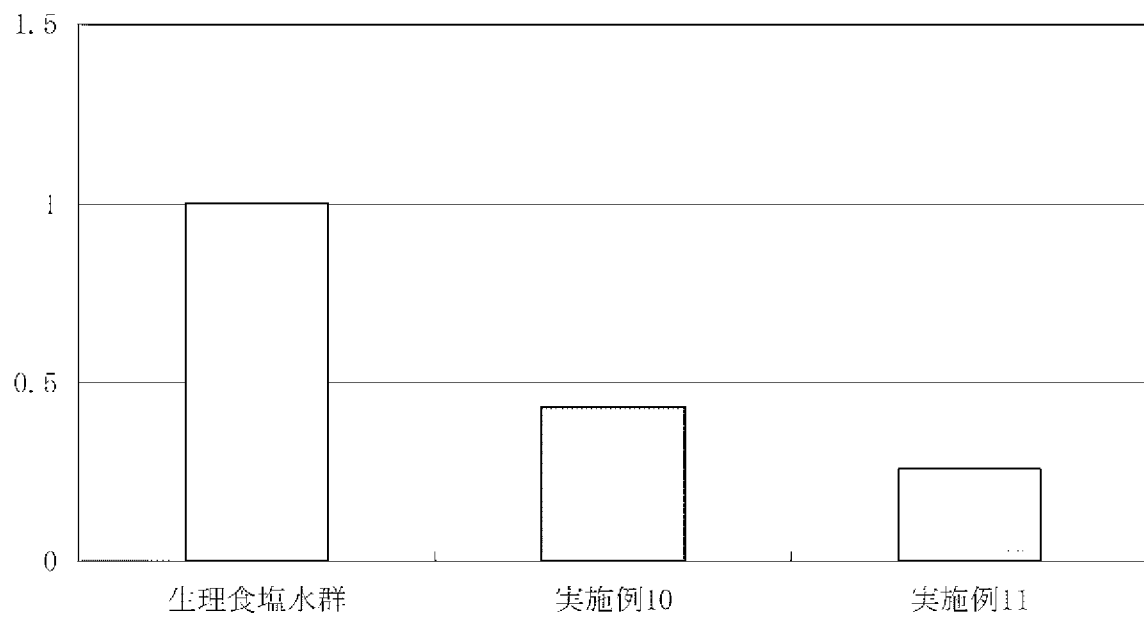
[図4]



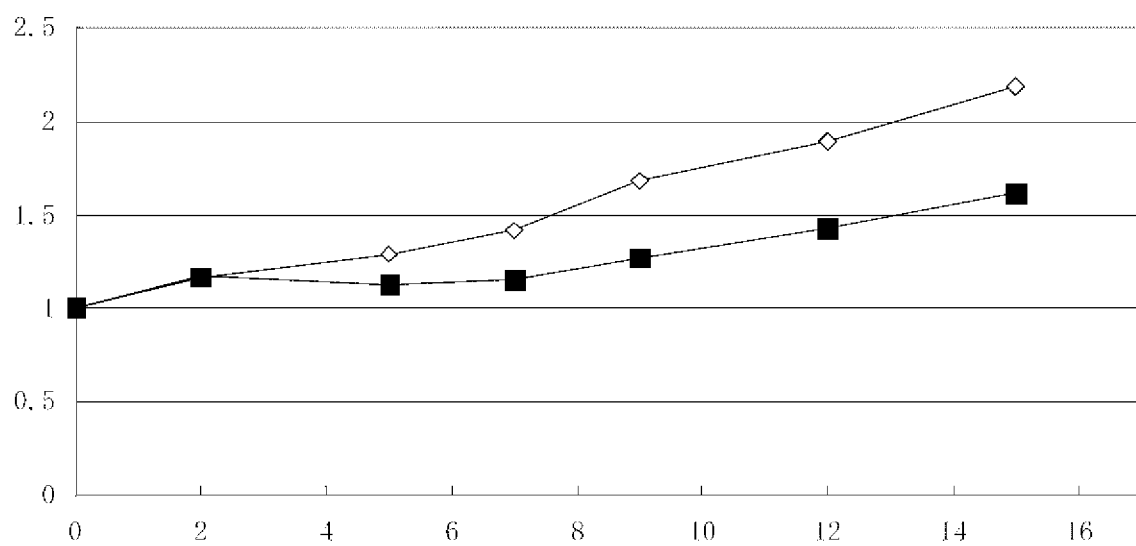
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP2 012 / 082245

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

ボウ47 / ヌ8 (2006.01) i, A 61K 9/1 27 (2006.01) i, A 61K38/0 0 (2006.01) i, C07C211/21 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61 K 47 / 18 , A 61K9 / 127 , A 61K 38 / 00 , C 07 C 211 / 21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1 996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

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

CA/REGI STRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2000 / 030444 A1 (VANDERBILT UNIVERS I T Y) , 02 June 2000 (02.06.2000) , claims ; page 3, line 23 to page 63, line 4 & US 2003 / 0049310 A1 & US 6656498 B1 & US 2006 / 0057194 A1	1-5, 8-14 , 21-24 6, 1
X A	J P 10-509418 A (Inex Pharmaceutical s Co r p .) , 14 Septembe r 1998 (14.09.1998) , claims ; page 9, line 17 to page 16, line 3 ; example s & J P 3887015 B & US 5753613 A & US 5785992 A & EP 783296 A & EP 1179340 A2 & WO 1996 / 010390 A1	1-4, 8-14 , 21-24 6, 7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 March, 2013 (01.03.13)

Date of mailing of the international search report

12 March, 2013 (12.03.13)

Name and mailing address of the ISA/

Japan e Patent Offi c e

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP2 012 / 082245

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2008-505131 A (Statens Serum Institut), 21 February 2008 (21.02.2008), claims ; paragraph s [0052] to [0072] ; example s & JP 4987704 B & US 2006/0008519 A1 & US 2010/0226975 A1 & EP 1765289 A & WO 2006/002642 A2	1-4, 8-14, 21-24 6, 7
X A	JP 10-152461 A (F. Hoffmann- La Roche AG.), 09 June 1998 (09.06.1998), claims ; paragraph s [0005] to [0038], [0068] to [0070], [0079] to [0106] ; example s ; fig . 1 to 2 & US 6034137 A & EP 846680 A1	1-3, 5 8-14, 21-2 6 7

、
ね

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP2 012 / 082245

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15 - 20
 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 Claims 15 - 20 pertain to "method for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy" and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and [PCT Rule 39.1(iv)].
2. ☐ Claims Nos.:
 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K47/18 (2006. 01) i, A61K9/127 (2006. 01) i, A61K38/00 (2006. 01) i, C07C21 1/21 (2006. 01) i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K47/18, A61K9/127, A61K38/00, C07C21 1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 -
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 -
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2

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

CA/REGISTRY (STN)

年

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	ffO 2000/030444 AI (VANDERBILT UNIVERSITY) 2000. 06. 02, Claims, 第 3 頁第 23 行-第 63 頁第 4 行 & US 2003/00493 10 AI & US 6656498 BI & US 2006/0057 194 AI	1—5, 8—14, 21-24 6, 7
X A	JP 10- 509418 A (イネックス ファーマシューティカルズ コーポレイション) 1998. 09. 14, 【特許請求の範囲】 第 9 頁第 17 行-第 16 頁第 3 行, 実施例 & JP 3887015 B & US 5753613 A & US 5785992 A & EP 783296 A & EP 1179340 A2 & wo 1996/010390 AI	1-4, 8-14, 21-24 6, 7

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

* 引用文献のカテゴリー

IA 「特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの」

IE 「国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの」

IL 「優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)」

IO 「口頭による開示、使用、展示等に言及する文献」

IP 「国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

IT 「国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの」

IX 「特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの」

IY 「特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの」

IX 「同一パテントファミリー文献」

国際調査を完了した日

0 1 . 0 3 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 3 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

石井 裕美子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

3 4 0 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	JP 2008- 50513 1 A (ス タ テ ン ス セ ー ノ レ ム イ ン ス テ イ ト ウ ー ト) 2008. 02. 21, 【特許請求の範囲】 , 【052】 - [0072] , 実施例 & JP 4987704 B & US 2006/00085 19 AI & US 2010/0226975 AI & EP 1765289 A & W O 2006/002642 A2	1-4, 8-14, 21-24 6, 7
X A	JP 10-152461 A (エ フ ・ ホ フ マ ン ー ラ ロ シ ュ ア ー ゲ ー) 1998. 06. 09, 【特許請求の範囲】 , 【005】 - [0038] , 【0068】 - [0070] , [0079] - 【0106】 , 実施例 , 図 1】 - 図 2】 & US 6034137 A & EP 846680 AI	1-3, 5, 8-14, 21- 24 6, 7

第 II 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (P C T 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 1 5 — 2 0 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 1 5 — 2 0 は [手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法] に関するものであって、
PCT17 条 (2) (a) (i) 及び [PCT 規則 39.1 (iv)] の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6.4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 III 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。