

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-36330

(P2017-36330A)

(43) 公開日 平成29年2月16日(2017.2.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07C 219/08</b> (2006.01)	C07C 219/08 CSP	4C076
<b>A61K 47/18</b> (2006.01)	A61K 47/18	4H006
<b>A61K 9/127</b> (2006.01)	A61K 9/127	
<b>C07C 213/06</b> (2006.01)	C07C 213/06	

審査請求 有 請求項の数 20 O L (全 142 頁)

(21) 出願番号	特願2016-219673 (P2016-219673)	(71) 出願人	513146871
(22) 出願日	平成28年11月10日 (2016.11.10)		テクミラ ファーマシューティカルズ コーポレーション
(62) 分割の表示	特願2015-157142 (P2015-157142) の分割		Tekmira Pharmaceuticals Corporation
原出願日	平成19年10月3日 (2007.10.3)		カナダ国 V5J 5J8 プリティッシュコロンビア州 バーナビー グレンリヨン パークウェイ 100-8900
(31) 優先権主張番号	60/828,022	(74) 代理人	100105957
(32) 優先日	平成18年10月3日 (2006.10.3)		弁理士 恩田 誠
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100068755
(31) 優先権主張番号	60/870,457		弁理士 恩田 博宣
(32) 優先日	平成18年12月18日 (2006.12.18)	(74) 代理人	100142907
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 本田 淳

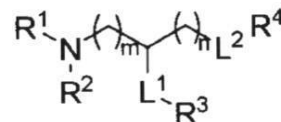
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 製剤用化合物

(57) 【要約】

【課題】 新規な製剤用化合物を提供する。

【解決手段】 式(X)の化合物。



式(X)

(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>はH、所定のアルキル又はアルケニルであり、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は所定のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、L<sup>1</sup>及びL<sup>2</sup>は所定の連結基であり、mは1~6であり、nは0~6である)

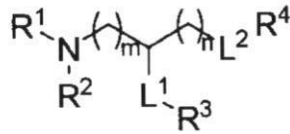
【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式(X)の化合物であって、

## 【化 1】



式(X)

10

式中、

$R^1$  及び  $R^2$  は、各々独立して、H、任意に 1 ~ 4 の  $R^5$  で置換されていてもよい  $C_1$  -  $C_6$  アルキル、任意に 1 ~ 4 の  $R^5$  で置換されていてもよい  $C_2$  -  $C_6$  アルケニル、又は  $C(NR^6)(NR^6)_2$  であり、

$R^3$  及び  $R^4$  は、各々独立して、アルキル、アルケニル、アルキニルであり、その各々は任意にフルオロ、クロロ、プロモ、又はヨードで置換されていてもよく、

$L^1$  及び  $L^2$  は、各々独立して -  $NR^6C(O)$  -、-  $C(O)NR^6$  -、-  $OC(O)$  -、-  $C(O)O$  -、-  $S-S$  -、-  $N(R^6)C(O)N(R^6)$  -、-  $OC(O)N(R^6)$  -、-  $N(R^6)C(O)$  -、-  $O-N=C$  -、OR、-  $OC(O)NH-N=C$  -、又は -  $NHC(O)NH-N=C$  - であり、

20

$L^1-R^3$  は  $L^2-R^4$  と共に、アセタール、ケタール、又はオルトエステルを形成することができ、 $R^3$  及び  $R^4$  は前記で定義した通りであり、H 又はフェニルであってもよく、

$R^5$  はフルオロ、クロロ、プロモ、ヨード、-  $OR^7$ 、-  $N(R^8)(R^9)$ 、-  $CN$ 、 $SR^{10}$ 、 $S(O)R^{10}$ 、又は  $S(O)_2R^{10}$  であり、

$R^6$  は H 又は  $C_1$  -  $C_6$  アルキルであり、

$R^7$  は H 又は  $C_1$  -  $C_6$  アルキルであり、

各  $R^8$  及び  $R^9$  は、独立して、H 又は  $C_1$  -  $C_6$  アルキルであり、

$R^{10}$  は H 又は  $C_1$  -  $C_6$  アルキルであり、

30

m は 1、2、3、4、5、又は 6 であり、

n は 0、1、2、3、4、5、又は 6 である

化合物及びその医薬上許容される塩。

## 【請求項 2】

$R^1$  は H、メチル、エチル、イソプロピル、又は 2 - ヒドロキシエチルであり、 $R^2$  はメチル、エチル、プロピル、又はイソプロピルである、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 3】

m 及び n の双方は 1 である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 4】

$L^1$  及び  $L^2$  は -  $OC(O)$  - 又は、-  $C(O)O$  - である、請求項 1 に記載の化合物。

40

## 【請求項 5】

$L^1$  及び  $L^2$  は -  $N(R^6)C(O)N(R^6)$  - である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 6】

$L^1$  及び  $L^2$  は -  $OC(O)N(R^6)$  - 又は  $N(R^6)C(O)$  - である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 7】

$L^1$  は -  $NR^6C(O)$  - であり、 $L^2$  は -  $S-S$  - である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 8】

$L^1$  は -  $OC(O)$  - であり、 $L^2$  は -  $S-S$  - である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 9】

50

$L^1$  は  $-OC(O)N(R^6)$  又は  $-N(R^6)C(O)O-$  であり、 $L^2$  は  $-S-S-$  である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 10】

$L^1$  は  $-N(R^6)C(O)N(R^6)-$  であり、 $L^2$  は  $-S-S-$  である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 11】

$L^1 - R^3$  は  $L^2 - R^4$  と共に、アセタール、ケタール又はオルトエステルを形成している、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 12】

$R^3$  及び  $R^4$  の双方は  $C_6 - C_{28}$  アルキルである、請求項 1 に記載の化合物。

10

【請求項 13】

各  $L^1$  及び  $L^2$  は独立して  $-S-S-$ 、 $-OC(O)N(R^6)-$  又は  $-N(R^6)C(O)O-$  である、請求項 12 に記載の化合物。

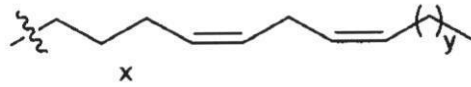
【請求項 14】

各  $R^3$  及び  $R^4$  は独立して  $C_6 - C_{30}$  アルケニルである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 15】

$R^3$  及び  $R^4$  の少なくとも 1 つは以下の式 (II) によって示され、

【化 2】



20

式(II)

式中、

$x$  は 1 ~ 8 の整数であり、

$y$  は 1 ~ 10 の整数である、

請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 16】

$R^1$  及び  $R^2$  の少なくとも 1 つは以下の式 (III) によって示され、

30

【化 3】



式(III)

式中、

$x$  は 1 ~ 8 の整数であり、

$y$  は 1 ~ 10 の整数である、

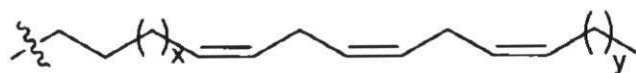
40

請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 17】

$R^1$  及び  $R^2$  の少なくとも 1 つは以下の式 (IV) によって示され、

【化 4】



式(IV)

50

式中、

x は 1 ~ 8 の整数であり、

y は 1 ~ 10 の整数である、

請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 18】

R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> の少なくとも 1 つは以下の式 (V) によって示され、

【化 5】



式(V)

10

式中、

x は 1 ~ 8 の整数であり、

y は 1 ~ 10 の整数である、

請求項 1 に記載の化合物。

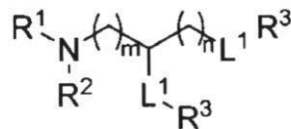
【請求項 19】

請求項 1 に記載の化合物又はその医薬上許容される塩を含有する製剤。

【請求項 20】

式 (X) の化合物を製造する方法であって、

【化 6】



式(X)

20

式中、

R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は、各々独立して、任意に 1 ~ 4 の R<sup>5</sup> で置換されていてもよい C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり、

R<sup>3</sup> はアルキル、アルケニル、アルキニルであり、

L<sup>1</sup> は -OC(O)- であり、

R<sup>5</sup> は -OR<sup>7</sup>、-N(R<sup>8</sup>)(R<sup>9</sup>)、-CN、SR<sup>10</sup>、S(O)R<sup>10</sup>、S(O)<sub>2</sub>R<sup>10</sup> であり、

R<sup>6</sup> は H、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり、

R<sup>7</sup> は H、又は C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり、

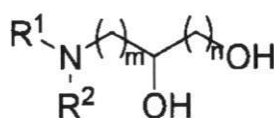
各 R<sup>8</sup> 及び R<sup>9</sup> は独立して、H 又は C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり、

R<sup>10</sup> は H 又は C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり、

m 及び n は、各々、独立して、1、2、3、4、5、又は 6 であり、

前記方法は、カップリング剤の存在下で式 (VI) :

【化 7】



式(VI)

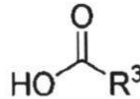
30

40

の化合物を式 (VII) :

50

## 【化 8】



式(VII)

の化合物と反応させることにより、前記式 ( X ) の化合物を提供することを含む、方法。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、核酸ベースの治療法を投与するのに有用な組成物及び方法、例えば、リポソーム及びリポプレックスのような会合複合体に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

核酸ベースの療法を用いる機会はかなりの有望性を有しており、現在の伝統的な医学では取り組むことができない医学的問題に対する解決を提供する。増大する数の病気関連遺伝子の位置及び配列は同定されつつあり、種々の病気についての核酸ベースの療法の臨床試験が今日進行中である。

20

## 【0003】

核酸を細胞に導入する一つの方法は、直接的にマイクロインジェクションを用いる機械的なものである。しかしながら、この方法は、一般には、患者への全身投与では効果的でない。

## 【0004】

核酸療法の全身送達は、核酸を標的細胞に分配し、次いで、標的細胞の膜を横切って、無傷、かつ治療的方法で機能することができる形態で核酸を移動させることを必要とする。

## 【0005】

ウィルスベクタは、いくつかの場合において、核酸ベースの治療法を投与するために、臨床において成功裏に用いられてきた。しかしながら、ウィルスベクタは細胞膜を横切って核酸を輸送する固有の能力を有するが、それらは危険をもたらしかねない。一つのそのような危険は患者染色体へのウィルスゲノム配列のランダムな組込みを含み、潜在的に、ゲノムを損傷し、かつ恐らくは、悪性形質転換を誘導する。もう一つの危険性は、ウィルスベクタが野生型ウィルスでの突然変異又は遺伝子交換いずれかを通じて病原性遺伝子型に復帰し得ることである。

30

## 【0006】

脂質ベースのベクタもまた、核酸療法で用いられており、二つの方法のうち一つで調製されてきた。一つの方法において、核酸は、カチオン性脂質及び中性脂質の混合物から作成された予め形成されたりポソーム又はリポプレックスに導入される。かくして形成された複合体は規定されておらず、かつ複雑な構造を有し、トランスフェクション効率は血清の存在によって著しく低下する。第二の方法は、中性脂質の存在なくしてモノ - 又はポリ - カチオン性脂質とのDNA複合体の形成を含む。これらの複合体はエタノールの存在下で調製され、水中で安定ではない。加えて、これらの複合体は血清によって悪影響を受ける(非特許文献1)。

40

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0007】

【非特許文献1】Behr, Acc. Chem. Res. 26: 274 - 78 (1993)

50

)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、ポリアミン化合物又は本明細書中に記載された脂質部位を含む新規な製剤を特徴とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

いくつかの実施形態において、本発明は1つ以上の化合物を含む製剤を特徴とし、各々、式(I)：

【0010】

【化1】



式(I)

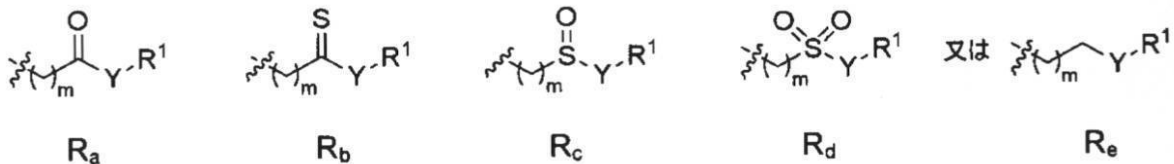
【0011】

[式中、

各  $X^a$  及び  $X^b$  は、各出現について、独立して  $C_1 - 6$  アルキレンであり、  
 $n$  は 0、1、2、3、4 又は 5 であり、各  $R$  は独立して H、

【0012】

【化2】



【0013】

であり、

式中、製剤中の式(I)の化合物の分子の少なくとも約50%におけるR部位の少なくとも  $n + 2$  (例えば、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は実質的に全て)はHではなく、

$m$  は、1、2、3 又は 4 であり、 $Y$  は O、 $NR^2$ 、又は S であり、

$R^1$  はアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、その各々は、所望により1以上の置換基で置換されていてもよく、

$R^2$  はH、アルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、その各々は所望により置換されており、その各々は、所望により1以上の置換基で置換されていてもよく、

但し、もし  $n = 0$  であれば、R部位の少なくとも  $n + 3$  はHではない]

によって規定される構造、又はその医薬上許容される塩を有する。

【0014】

いくつかの実施形態において、RがHではない場合、Rは $R_a$ であり、例えば、RがHではない場合、Rは各出現について $R_a$ である。

いくつかの実施形態において、RがHでない場合、Rは $R_b$ であり、例えば、RがHではない場合、Rは各出現について $R_b$ である。

【0015】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、RがHではない場合、RはR<sub>c</sub>であり、例えば、RがHではない場合、Rは各出現についてR<sub>c</sub>である。

いくつかの実施形態において、RがHでない場合、RはR<sub>d</sub>であり、例えば、RがHでない場合、Rは各出現についてR<sub>d</sub>である。

【0016】

いくつかの実施形態において、RがHでない場合、RはR<sub>e</sub>であり、例えば、RがHでない場合、Rは各出現についてR<sub>e</sub>である。

いくつかの実施形態において、式(I)のR部位のn+2はHでない。いくつかの実施形態において、式(I)のR部位のn+3はHではない。いくつかの実施形態において、式(I)のR部位のn+4はHではない。

10

【0017】

いくつかの実施形態において、式(I)のR部位のn+1はHではない。

いくつかの実施形態においてn>0であり、式(I)のNRの少なくとも1つのRはHである。

【0018】

いくつかの実施形態において、式(I)のNR<sub>2</sub>の少なくとも1つのRはHである。

いくつかの実施形態において、分子の少なくとも80%は単一の構造異性体である。例えば、式(I)のR部位のn+2はHではなく、あるいは式(I)のR部位のn+3はHではなく、あるいは式(I)のR部位のn+4はHではない。

【0019】

20

いくつかの実施形態において、nは2又は0である。

いくつかの実施形態において、X<sup>a</sup>及びX<sup>b</sup>はC<sub>2</sub>アルキレンである。

いくつかの実施形態において、nは0であって、X<sup>b</sup>はエチレン又はプロピレンである。

【0020】

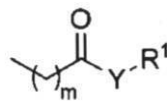
いくつかの実施形態において、n>1であって、X<sup>a</sup>は少なくとも1つの出現に伴って変化する。

いくつかの実施形態において、RがHでない場合、Rは、

【0021】

【化3】

30



【0022】

である。例えば、YはO又はNR<sup>2</sup>であり得る。いくつかの実施形態においてmは2である。いくつかの実施形態において、YはO又はNR<sup>2</sup>であって、mは2である。いくつかの実施形態においてmは1である。いくつかの実施形態において、mは1であって、YはO又はNR<sup>2</sup>である。

【0023】

40

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの出現についてR<sup>1</sup>はアルキルであり、例えば、各出現についてR<sup>1</sup>はアルキルである。

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの出現について、例えば、各出現について、R<sup>1</sup>はアルキルであって、R<sup>2</sup>はHである。

【0024】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの出現について、例えば、各出現についてR<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>はアルキルである。

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの出現についてR<sup>1</sup>はアルケニルである。

【0025】

50

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの出現について  $R^1$  はアルケニルである。

いくつかの実施形態において、 $R$  が  $H$  でない場合、少なくとも1つの出現について、例えば、各出現について  $R$  は  $R_a$  であって、 $Y$  は  $O$  又は  $NH$  である。いくつかの実施形態において、 $Y$  は  $O$  である。いくつかの実施形態において、 $Y$  は  $NH$  である。いくつかの実施形態において、 $R^1$  はアルキル、例えば、 $C_{10-30}$  アルキル又は  $C_{12}$  アルキルである。いくつかの実施形態において、 $n$  は2である。いくつかの実施形態において、各出現について  $X^a$  は  $C_2$  アルキレンであって、 $X^b$  は  $C_2$  アルキレンである。いくつかの実施形態において、 $m$  は2である。

【0026】

いくつかの実施形態において、 $n$  は2であって、 $R$  は、 $R$  が  $H$  でない場合、少なくとも1つの出現について、例えば、各出現について  $R_a$  である。いくつかの実施形態において、 $R^1$  はアルキル、例えば、 $C_{10-18}$  アルキル、又は  $C_{12}$  アルキルである。いくつかの実施形態において、 $Y$  は  $O$  であるか、 $Y$  は  $NH$  である。いくつかの実施形態において、各出現について  $X^a$  は  $C_2$  アルキレンであって、 $X^b$  は  $C_2$  アルキレンである。いくつかの実施形態において、 $m$  は2である。

【0027】

いくつかの実施形態において、 $NR$  の少なくとも1つの  $R$  は  $H$  であって、 $H$  でない場合、少なくとも1つの出現について、例えば、各出現について  $R_a$  であって、 $Y$  は  $O$  又は  $NH$  である。いくつかの実施形態において、 $Y$  は  $O$  であるか、あるいは  $Y$  は  $NH$  である。いくつかの実施形態において、 $R^1$  はアルキル、例えば、 $C_{10-18}$  アルキル又は  $C_{12}$  アルキルである。いくつかの実施形態において、 $n$  は2である。いくつかの実施形態において、各出現について  $X^a$  は  $C_2$  アルキレンであって、 $X^b$  は  $C_2$  アルキレンである。いくつかの実施形態において、 $m$  は2である。

【0028】

いくつかの実施形態において、 $n$  は2であって、 $NR$  の少なくとも1つの  $R$  は  $H$  であり、 $R$  が  $H$  でない場合、 $R$  は、少なくとも1つの出現について、例えば、各出現について  $R_a$  であって、 $Y$  は  $O$  又は  $NH$  である。いくつかの実施形態において、 $R^1$  はアルキル、例えば、 $C_{10-18}$  アルキル又は  $C_{12}$  アルキルである。いくつかの実施形態において、 $Y$  は  $O$  であるか、あるいは  $Y$  は  $NH$  である。いくつかの実施形態において、各出現について  $X^a$  は  $C_2$  アルキレンであって、 $X^b$  は  $C_2$  アルキレンである。いくつかの実施形態において、 $m$  は2である。

【0029】

いくつかの実施形態において、 $NR_2$  の少なくとも1つの  $R$  は  $H$  であって、 $R$  は少なくとも1つの出現について、例えば、各出現について  $R_a$  であり、また、 $Y$  は  $O$  又は  $NH$  である。いくつかの実施形態において、 $Y$  は  $O$  であるか、あるいは  $Y$  は  $NH$  である。いくつかの実施形態において、 $R^1$  はアルキル、例えば、 $C_{10-30}$  アルキル、 $C_{10-18}$  アルキル又は  $C_{12}$  アルキルである。いくつかの実施形態において、 $n$  は2である。いくつかの実施形態において、各出現について  $X^a$  は  $C_2$  アルキレンであって、 $X^b$  は  $C_2$  アルキレンである。いくつかの実施形態において  $m$  は2である。

【0030】

いくつかの実施形態において、 $n$  は2であって、 $NR_2$  の少なくとも1つは  $H$  であって、 $R$  は、少なくとも1つの出現について、例えば、各出現について  $R_a$  であり、また、 $Y$  は  $O$  又は  $NH$  である。いくつかの実施形態において、 $R^1$  はアルキル、例えば、 $C_{10-18}$  アルキル又は  $C_{18}$  アルキルである。いくつかの実施形態において、 $Y$  は  $O$  であるか、あるいは  $Y$  は  $NH$  である。いくつかの実施形態において、各出現について  $X^a$  が  $C_2$  アルキレンであって、 $X^b$  は  $C_2$  アルキレンである。いくつかの実施形態において、 $m$  は2である。

【0031】

いくつかの実施形態において、製剤は以下の式の1つ又は混合物を含み、以下の式にお

10

20

30

40

50

いて特定されない限り R は H ではない。

【0032】

【化4】



【0033】

いくつかの実施形態において、製剤は実質的に以下の式の1つ又は混合物よりなる。

10

【0034】

【化5】

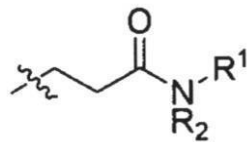


【0035】

いくつかの実施形態において、各 R は

【0036】

【化6】

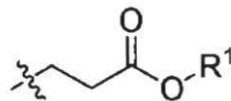


【0037】

である。いくつかの実施形態において、各 R は

【0038】

【化7】



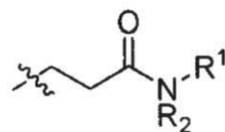
【0039】

である。いくつかの実施形態において、R<sup>1</sup> は C<sub>10</sub> - C<sub>18</sub> アルキル (例えば、C<sub>12</sub> アルキル)、又は C<sub>1</sub> - C<sub>30</sub> アルケニルである。

いくつかの実施形態において、R は

【0040】

【化8】



【0041】

である。いくつかの実施形態において、R<sup>1</sup> は C<sub>10</sub> - C<sub>18</sub> アルキル、例えば、C<sub>12</sub> アルキルである。いくつかの実施形態において、R<sup>1</sup> は C<sub>12</sub> アルキルであって、R<sup>2</sup> は H である。

【0042】

50

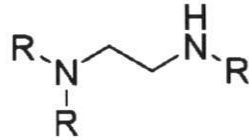
いくつかの実施形態において、 $n$ は0であって、 $X$ はプロピレンである。いくつかの実施形態において、1つの $R$ はHである。いくつかの実施形態において、 $R$ はHでない場合、 $R$ は、少なくとも1つの出現について、例えば、各出現について $R_a$ である。いくつかの実施形態において、 $R^1$ はアルキル、例えば、 $C_{10-30}$ アルキル又は $C_{12}$ アルキルである。いくつかの実施形態において、 $Y$ はHであるか、あるいは $Y$ はNHである。いくつかの実施形態において、 $m$ は2である。

【0043】

いくつかの実施形態において、式(I)は

【0044】

【化9】



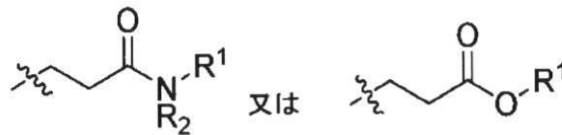
10

【0045】

である。いくつかの実施形態において、 $R$ は

【0046】

【化10】



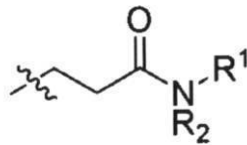
20

【0047】

である。いくつかの実施形態において、 $R^1$ は $C_{10-18}$ アルキル、又は $C_{10-30}$ アルケニルである。いくつかの実施形態において、 $R$ は

【0048】

【化11】



30

【0049】

である。いくつかの実施形態において、 $R^1$ は $C_{10-18}$ アルキル、又は $C_{10-30}$ アルケニルであって、 $R^2$ はHである。

いくつかの実施形態において、

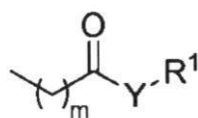
$n$ は2であり、

各出現について $X^a$ は $C_2$ アルキレンであって、 $X^b$ は $C_2$ アルキレンであり、及び各 $R$ は、少なくとも1つの出現について、例えば、各出現について、H又は

40

【0050】

【化12】



$R_a$

【0051】

50

であり、

mは2であり、

YはNH又はOであり、

R<sup>1</sup>はC<sub>1-2</sub>アルキルである。いくつかの実施形態において、式(I)の化合物の分子の少なくとも80%は単一の構造異性体である。いくつかの実施形態において、YはNHであり、例えば、式(I)の化合物の分子の少なくとも80%は単一の構造異性体である。いくつかの実施形態において、Rは5回の出現についてR<sup>a</sup>である。いくつかの実施形態において、式(I)の化合物の分子の少なくとも80%において、Rは5回の出現についてR<sup>a</sup>である。いくつかの実施形態において、YはNHである。

【0052】

いくつかの実施形態において、式(I)の化合物はその無機又は有機塩、例えば、その塩酸塩のようなそのヒドロライド塩である。いくつかの実施形態において、塩酸塩は1当量のHClからn+2当量のHClの範囲内にある。いくつかの実施形態において、式(I)の化合物は有機酸の塩、例えば、酢酸塩であり、例えば、酢酸塩は1当量の酢酸塩からn+2当量の酢酸塩又はギ酸塩であり、例えば、ギ酸塩は1当量の酢酸塩からn+2当量のギ酸塩の範囲内にある。

【0053】

いくつかの実施形態において、式(I)の化合物は水和物の形態である。

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの出現について、例えば、各出現についてR<sup>1</sup>がアルケニル部位を含み、例えば、R<sup>1</sup>がシス二重結合を含む。

【0054】

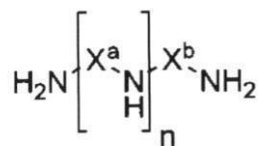
一つの態様において、本発明は式(I)の化合物、及び核酸(例えば、siRNA又はdsRNAのようなRNA、あるいはDNA)を含む製剤を特徴とする。いくつかの実施形態において、製剤はまた、融合型脂質、又はPEG脂質のようなさらなる脂質を含む。

【0055】

いくつかの実施形態において、製剤は11重量%未満の

【0056】

【化13】



式(III)

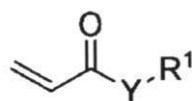
【0057】

[式中、X及びnは前記式(I)で定義した通りである]を含む。

いくつかの実施形態において、製剤は90重量%未満の

【0058】

【化14】



式(IV)

【0059】

[式中、Y及びR<sup>1</sup>は前記式(I)で定義した通りである]を含む。

いくつかの実施形態において、製剤は複数の式(I)の化合物を含む。

10

20

30

40

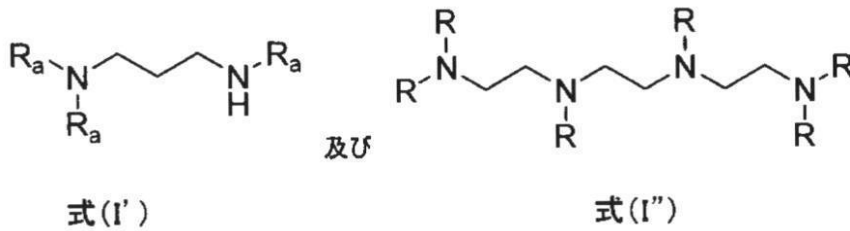
50

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態において、製剤は以下の式：

【 0 0 6 1 】

【 化 1 5 】



10

【 0 0 6 2 】

[ 式 ( I '' ) において、 R 部位の 5 つは R<sup>a</sup> である ]

の混合物を含む。いくつかの実施形態において、式 ( I ' ) 及び ( I '' ) は約 1 : 2 ~ 約 2 : 1 の比率で存在する。

【 0 0 6 3 】

一実施形態において、本発明が式 ( I I ) :

【 0 0 6 4 】

【 化 1 6 】



20

【 0 0 6 5 】

[ 式中、

各出現について各 X<sup>a</sup> 及び X<sup>b</sup> は、独立して、C<sub>1</sub> - 6 アルキレンであり、

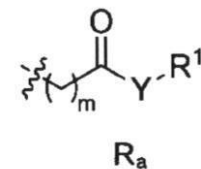
n は 0、1、2、3、4 又は 5 であり、及び

各 R は独立して H 又は

30

【 0 0 6 6 】

【 化 1 7 】



【 0 0 6 7 】

であり、

m は 2 であり、

Y は O、NR<sup>2</sup> 又は S であり、R<sup>1</sup> はアルキル又はアルケニルであり、R<sup>2</sup> は H 又は C アルキル又はアルケニルである ]

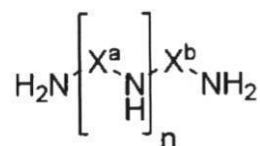
の化合物の製造方法の特徴とし、

該製造方法は、促進剤の存在下で、式 ( I I I ) :

40

【 0 0 6 8 】

【化18】



式(III)

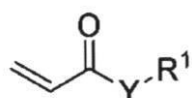
【0069】

を、式(IV)：

10

【0070】

【化19】



式(IV)

【0071】

の化合物と反応させる段階を含む。

一つの態様において、本発明は、式(II)

20

【0072】

【化20】



式(II)

【0073】

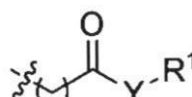
30

[式中

各 $X^a$ 及び $X^b$ は、各出現について、独立して $C_{1-6}$ アルキレンであり、 $n$ は0、1、2、3、4又は5であり、及び各 $R$ は、独立して、 $H$ 又は

【0074】

【化21】

 $R_a$ 

40

【0075】

であり、

 $m$ は2であり、 $Y$ は $O$ 、 $NR^2$ 、又は $S$ であり、 $R^1$ はアルキル又はアルケニルであり、 $R^2$ は $H$ 又は $C$ アルキル又はアルケニルである]

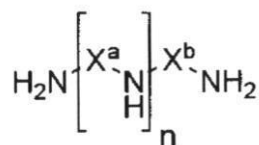
の化合物の製造方法の特徴とし、

該方法は、クエンチャの存在下で、式(III)

50

【 0 0 7 6 】

【 化 2 2 】



式(III)

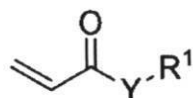
【 0 0 7 7 】

10

の化合物を、式(IV)：

【 0 0 7 8 】

【 化 2 3 】



式(IV)

【 0 0 7 9 】

20

の化合物と反応させる段階を含む。

一つの態様において、本発明は、式(II)：

【 0 0 8 0 】

【 化 2 4 】



式(II)

30

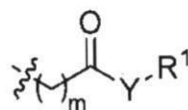
【 0 0 8 1 】

[ 式中、

各  $\text{X}^{\text{a}}$  及び  $\text{X}^{\text{b}}$  は、各出現について、独立して  $\text{C}_{1-6}$  アルキレンであり、 $n$  は 0、1、2、3、4 又は 5 であり、及び各  $\text{R}$  は、独立して、 $\text{H}$  又は

【 0 0 8 2 】

【 化 2 5 】



40

【 0 0 8 3 】

であり、

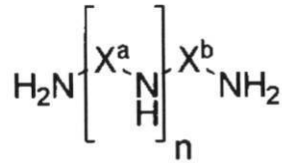
 $m$  は 2 であり、 $\text{Y}$  は  $\text{O}$ 、 $\text{NR}_2$ 、又は  $\text{S}$  であり、 $\text{R}^1$  はアルキル又はアルケニルであり、 $\text{R}^2$  は  $\text{H}$  又はアルキル又はアルケニルである ]

の化合物の製造方法を特徴とし、該方法は式(III)：

【 0 0 8 4 】

50

【化 2 6】



式(III)

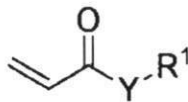
【0085】

の化合物を、式(IV)：

10

【0086】

【化 2 7】



式(IV)

【0087】

の化合物と反応させることを含み、反応混合物は約 3.8 ~ 約 6.5 モル当量の式(IV)の化合物と共に約 0.8 ~ 約 1.2 モル当量の式(III)の化合物を含む。

20

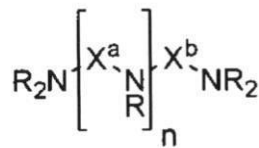
いくつかの実施形態において、反応混合物は約 5.5 ~ 約 6.5 モル当量の式(IV)の化合物と共に約 0.8 ~ 約 1.2 モル当量の式(III)の化合物を含む。いくつかの実施形態において、反応混合物は約 6 モル当量の式(IV)の化合物と共に、約 1 モル当量の式(III)の化合物を含む。いくつかの実施形態において、反応混合物約 5 モル当量の式(IV)の化合物と共に約 1 モル当量の式(III)の化合物を含む。

【0088】

一つの態様において、本発明は式(III)：

【0089】

【化 2 8】



式(II)

30

【0090】

[式中、

各 X<sup>a</sup> 及び X<sup>b</sup> は、各出現について独立して、C<sub>1</sub> - 6 アルキレンであり、

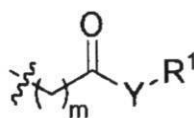
n は 0、1、2、3、4 又は 5 であり、かつ

各 R は独立して、H 又は

40

【0091】

【化 2 9】

R<sub>a</sub>

【0092】

50

であり、

mは2であり、

YはO、NR<sup>2</sup>、又はSであり、

R<sup>1</sup>はアルキル又はアルケニルであり、

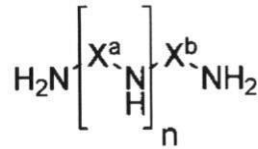
R<sup>2</sup>はH又はアルキル又はアルケニルである]

化合物の製造方法の特徴とし、

該方法は、ホウ酸及び水の存在下で、式(III)：

【0093】

【化30】



式(III)

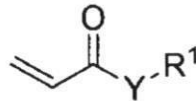
10

【0094】

の化合物を、式(IV)：

【0095】

【化31】



式(IV)

20

【0096】

の化合物と反応させる2工程プロセスを含み、

反応混合物を含む第一の工程プロセスは約3.8~約4.2モル当量の式(IV)の化合物と共に約0.8~約1.2モル当量の式(III)の化合物を含み、第二の工程は約0.8~1.2モル当量の式(IV)の化合物を加える段階を含む。

30

【0097】

一つの態様において、本発明は式(II)：

【0098】

【化32】



式(II)

40

【0099】

[式中、

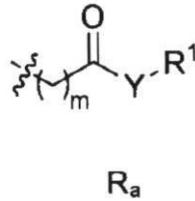
各X<sup>a</sup>及びX<sup>b</sup>は、各出現について独立して、C<sub>1-6</sub>アルキレンであり、

nは0、1、2、3、4又は5であり、及び

各Rは、独立して、H又は

【0100】

【化 3 3】



【 0 1 0 1 】

であり、

m は 2 であり

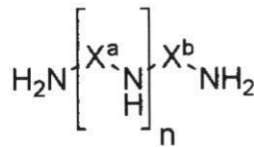
Y は O, NR<sup>2</sup>, 又は S であり、R<sup>1</sup> はアルキル又はアルケニルでありR<sup>2</sup> は H 又はアルキル又はアルケニルである ]

の化合物の製造方法の特徴とし、

該方法は、式 ( I I I ) :

【 0 1 0 2 】

【化 3 4】

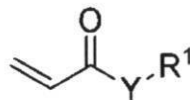


【 0 1 0 3 】

の化合物を、式 ( I V ) :

【 0 1 0 4 】

【化 3 5】



【 0 1 0 5 】

の化合物と反応させ、次いで、

反応混合物から式 ( I I ) の少なくとも 1 つの構造異性体を分離して、式 ( I I ) の構造異性体を含む実質的に精製された製剤を得る段階を含む。

【 0 1 0 6 】

いくつかの実施形態において、式 ( I I ) の構造異性体は、クロマトグラフィ分離を用いて反応混合物から分離される。いくつかの実施形態において、クロマトグラフィ分離は異性体の分離のためにフラッシュシリカゲルを用いるものである。いくつかの実施形態において、クロマトグラフィ分離は、シリカゲルを用いる異性体の重力分離である。いくつかの実施形態において、クロマトグラフィ分離は、異性体の分離のために移動床クロマトグラフィを用いるものである。いくつかの実施形態において、クロマトグラフィ分離は異性体の分離のために液体クロマトグラフィ ( L C ) を用いる。いくつかの実施形態において、クロマトグラフィ分離は異性体の分離のための順相 H P L C である。いくつかの実施形態において、クロマトグラフィ分離は、異性体の分離のための逆相 H P L C である。

【 0 1 0 7 】

いくつかの実施形態において、実質的に精製された製剤は少なくとも約 8 0 % の式 ( I I ) の構造異性体、例えば、少なくとも約 9 0 % の式 ( I I ) の構造異性体、少なくとも

10

20

30

40

50

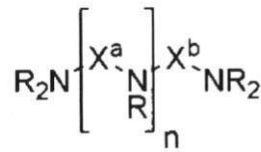
約 95% の式 (II) の構造異性体を含む。

【0108】

別の態様において、本発明は、式 (V) :

【0109】

【化36】



式(V)

10

【0110】

[ 式中、

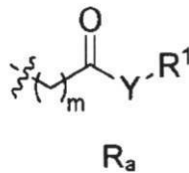
各  $X^a$  及び  $X^b$  は各出現について、独立して  $C_1 - 6$  アルキレンであり、

$n$  は 0、1、2、3、4 又は 5 であり、及び

各  $R$  は、独立して、H 又は

【0111】

【化37】



20

【0112】

であり、

$m$  は 1 であり、

$Y$  は O、 $NR^2$ 、又は S であり、

$R^1$  はアルキル又はアルケニルであり、

$R^2$  は H 又はアルキル又はアルケニルである ]

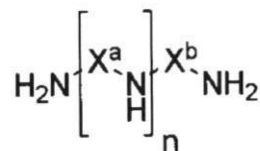
30

の化合物、又はその医薬上許容される塩の製造方法の特徴とし、

該方法は、式 (III) :

【0113】

【化38】



式(III)

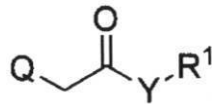
40

【0114】

の化合物を、式 (VI) :

【0115】

【化 3 9】



Q = Cl 又は Br 又は I

式(VI)

【0 1 1 6】

の化合物と反応させて、式(V)の化合物、又はその医薬上許容される塩を得る段階を含む。

10

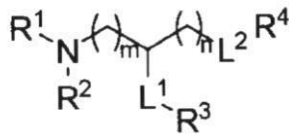
いくつかの実施形態において、その医薬上許容される塩は式(V)の化合物の塩酸塩である。

【0 1 1 7】

一つの態様において、本発明は、式(X)：

【0 1 1 8】

【化 4 0】



式(X)

20

【0 1 1 9】

[ 式中、

R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は、各々独立して、H、所望により 1 ~ 4 の R<sup>5</sup> で置換されていてもよい C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル、所望により 1 ~ 4 の R<sup>5</sup> で置換されていてもよい C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> アルケニル、又は C(NR<sup>6</sup>)(NR<sup>6</sup>)<sub>2</sub> で置換させていてもよく、

R<sup>3</sup> 及び R<sup>4</sup> は、各々独立して、アルキル、アルケニル、アルキニルであり、その各々は所望によりフルオロ、クロロ、プロモ、又はヨードで置換されていてもよく、

L<sup>1</sup> 及び L<sup>2</sup> は、各々独立して -NR<sup>6</sup>C(O)-、-C(O)NR<sup>6</sup>-、-OC(O)-、-C(O)O-、-S-S-、-N(R<sup>6</sup>)C(O)N(R<sup>6</sup>)-、-OC(O)N(R<sup>6</sup>)-、-N(R<sup>6</sup>)C(O)-、-O-N=C-、OR、-OC(O)NH-N=C-、又は -NHC(O)NH-N=C- であり、

30

L<sup>1</sup> - R<sup>3</sup> は L<sup>2</sup> - R<sup>4</sup> と共に、アセタール、ケタール、又はオルトエステルを形成することができ、R<sup>3</sup> 及び R<sup>4</sup> は前記で定義した通りであり、H 又はフェニルであってもよく、

R<sup>5</sup> はフルオロ、クロロ、プロモ、ヨード、-OR<sup>7</sup>、-N(R<sup>8</sup>)(R<sup>9</sup>)、-CN、SR<sup>10</sup>、S(O)R<sup>10</sup>、S(O)<sub>2</sub>R<sup>10</sup> であり、

R<sup>6</sup> は H、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり、

R<sup>7</sup> は H 又は C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり、

40

各 R<sup>8</sup> 及び R<sup>9</sup> は、独立して、H 又は C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり、

R<sup>10</sup> は H 又は C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり、

m は 1、2、3、4、5、又は 6 であり、

n は 0、1、2、3、4、5、又は 6 である ]

の化合物及びその医薬上許容される塩であることを特徴とする。

【0 1 2 0】

いくつかの実施形態において、該化合物はその無機塩、例えば、その塩酸塩のようなそのヒドロハライド塩である。いくつかの実施形態において、該化合物はその有機塩である。

【0 1 2 1】

50

いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  は、各々、独立して、 $C_1 - C_3$  アルキルである。

いくつかの実施形態において、 $R^1$  はメチルである。

【0122】

いくつかの実施形態において、 $R^2$  はメチルである。

いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  は共にメチルである。

いくつかの実施形態において、 $R^1$  は H、メチル、エチル、イソプロピル、又は 2 - ヒドロキシエチルである。

【0123】

いくつかの実施形態において、 $R^2$  は H である。

10

いくつかの実施形態において、 $R^2$  はメチル、エチル、プロピル、又はイソプロピルである。

【0124】

いくつかの実施形態において、 $R^1$  は H、メチル、エチル、イソプロピル、又は 2 - ヒドロキシエチルであって、 $R^2$  は H、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピルである。

【0125】

いくつかの実施形態において、 $m$  は 1 である。

いくつかの実施形態において、 $n$  は 1 である。

いくつかの実施形態において、 $m$  及び  $n$  の双方は 1 である。

20

【0126】

いくつかの実施形態において、 $L^1$  は  $-NR^6C(O)-$ 、又は  $-C(O)NR^6-$  である。

いくつかの実施形態において、 $L^1$  は  $-OC(O)-$  又は、 $-C(O)O-$  である。

【0127】

いくつかの実施形態において、 $L^1$  は  $S-S-$  である。

いくつかの実施形態において、 $L^1$  は  $-N(R^6)C(O)N(R^6)-$  である。

いくつかの実施形態において、 $L^1$  は  $-OC(O)N(R^6)-$  又は  $N(R)C(O)-$  である。

【0128】

30

いくつかの実施形態において、 $L^1$  は  $-O-N=C-$  である。

いくつかの実施形態において、 $L^1$  は  $-OC(O)NH-N=C-$  又は  $-NHC(O)NH-N=C-$  である。

【0129】

いくつかの実施形態において、 $L^2$  は  $-NR^6C(O)-$ 、又は  $-C(O)NR^6-$  である。

いくつかの実施形態において、 $L^2$  は  $-OC(O)-$  又は  $-C(O)O-$  である。

【0130】

いくつかの実施形態において、 $L^2$  は  $S-S-$  である。

いくつかの実施形態において、 $L^2$  は  $-N(R^6)C(O)N(R^6)-$  である。

40

いくつかの実施形態において、 $L^2$  は  $-OC(N)R-N(R^6)C(O)O-$  である。

【0131】

いくつかの実施形態において、 $L^2$  は  $-O-N=C-$  である。

いくつかの実施形態において、 $L^2$  は  $-OC(O)NH-N=C-$  又は  $-NHC(O)NH-N=C-$  である。

いくつかの実施形態において、 $L^1$  及び  $L^2$  の双方は  $-NR^6C(O)-C(O)NR^6-$  である。

【0132】

いくつかの実施形態において、 $L^1$  及び  $L^2$  の双方は  $-OC(O)$  又は  $C(O)O-$  で

50

ある。

いくつかの実施形態において、 $L^1$  及び  $L^2$  の双方は  $S-S-$  である。

【0133】

いくつかの実施形態において、 $L^1$  及び  $L^2$  の双方は  $-N(R^6)C(O)C(R^6)$  である。

いくつかの実施形態において、 $L^2$  の双方は  $-OC(O)N(R^6)-$  又は  $-N(R^6)C(O)O-$  である。

【0134】

いくつかの実施形態において、 $L^1$  は  $-NR^6C(O)$  であって、 $L^2$  は  $S-S-$  である。

10

いくつかの実施形態において、 $L^1$  は  $-OC(O)$  であって、 $L^2$  は  $-S-S-$  である。

【0135】

いくつかの実施形態において、 $L^1$  は  $-OC(O)N(R^6)$  又は  $-N(R^6)C(O)O-$  であって、 $L^2$  は  $S-S-$  である。

いくつかの実施形態において、 $L^1$  は  $N(R^6)C(O)N(R^6)-$  であって、 $L^2$  は  $-S-S-$  である。

【0136】

いくつかの実施形態において、 $L^1-R^3$  は  $L^2-R^4$  と共に、アセタール、ケタール又はオルトエステルを形成する。

20

いくつかの実施形態において、各  $R^3$  及び  $R^4$  は独立して、アルキルである。

【0137】

いくつかの実施形態において、 $R^3$  及び  $R^4$  の双方は  $C_6-C_{28}$  アルキルである。

いくつかの実施形態において、各  $L^1$  及び  $L^2$  は独立して  $-S-S-$ 、 $-OC(O)N(R^6)-$  又は  $-N(R^6)C(O)O-$  である。

【0138】

いくつかの実施形態において、 $R^3$  はアルキルである。

いくつかの実施形態において、 $R^4$  はアルキルである。

いくつかの実施形態において、 $R^3$  はアルケニルである。

【0139】

30

いくつかの実施形態において、 $R^4$  はアルケニルである。

いくつかの実施形態において、各  $R^3$  及び  $R^4$  は、独立して、アルケニルであり、例えば、各  $R^3$  及び  $R^4$  は、独立して、 $C_6-C_{30}$  アルケニルであるか、各  $R^3$  及び  $R^4$  は同一のアルケニル部位である。

【0140】

いくつかの実施形態において、各  $R^3$  及び  $R^4$  は、2つの二重結合部位を含む。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも1つはZ立体配置を有する。いくつかの実施形態において、二重結合の双方はZ立体配置を有する。

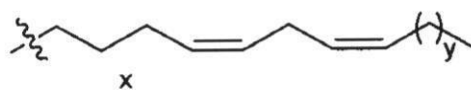
【0141】

いくつかの実施形態において、 $R^3$  及び  $R^4$  の少なくとも1つは以下の式 (II) :

40

【0142】

【化41】



式(II)

【0143】

[式中、

$x$  は 1 ~ 8 の整数であり、

50

y は 1 ~ 10 の整数である ]  
 によって示される。いくつかの実施形態において、 $R^3$  及び  $R^4$  の双方は式 (II) のものである。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも 1 つは E 立体配置を有し、例えば、二重結合の双方は E 立体配置を有する。いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  の少なくとも 1 つは以下の式 (III) :

【 0 1 4 4 】  
 【 化 4 2 】



式(III)

10

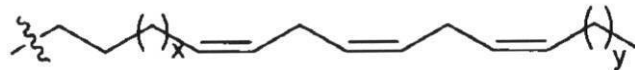
【 0 1 4 5 】  
 [ 式中、x は 1 ~ 8 の整数であり、  
 y は 1 ~ 10 の整数である ]  
 によって示される。

【 0 1 4 6 】

いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  は 3 つの二重結合部位を含む。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも 1 つは Z 立体配置を有する。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも 2 つは Z 立体配置を有する。いくつかの実施形態において、二重結合は 3 つとも全て Z 立体配置を有する。いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  の少なくとも 2 つは以下の式 (IV) :

20

【 0 1 4 7 】  
 【 化 4 3 】



式(IV)

30

【 0 1 4 8 】  
 [ 式中、x は 1 ~ 8 の整数であり、  
 y は 1 ~ 10 の整数である ]  
 によって示される。いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  の双方は式 (IV) によって示される。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも 1 つは E 立体配置を有する。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも 2 つは E 立体配置を有する。いくつかの実施形態において、二重結合は 3 つとも全て E 立体配置を有する。いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  の少なくとも 1 つは以下の式 (V) :

【 0 1 4 9 】  
 【 化 4 4 】



式(V)

40

【 0 1 5 0 】  
 [ 式中、x は 1 ~ 8 の整数であり、  
 y は 1 ~ 10 の整数であり得る ]  
 によって示される。いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  の双方は式 (V) によって示される。

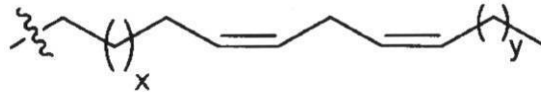
【 0 1 5 1 】

50

いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  は、各々、 $C_1 - C_6$  アルキル（例えばメチル）であり、 $L^1$  及び  $L^2$  は、各々、 $-OC(O)-$  であり、 $R^3$  及び  $R^4$  はアルケニルである。いくつかの実施形態において、 $R^3$  及び  $R^4$  は同一である。いくつかの実施形態において、 $R^3$  及び  $R^4$  は、共に2つの二重結合を含む（例えばシス結合を有する）。いくつかの実施形態において、 $R^3$  及び  $R^4$  は以下の式（II）：

【0152】

【化45】



式(II)

10

【0153】

[式中、 $x$  は1～8の整数、例えば5であり、 $y$  は1～10の整数、例えば、4である]

によって示される。

【0154】

一つの態様において、本発明は式（X）の化合物を含む製剤を特徴とする。

一つの態様において、本発明は式（X）の化合物及び核酸（例えば siRNA 又は dsRNA のような RNA、又は DNA）を含む製剤であることを特徴とする。いくつかの実施形態において、製剤はまた、融合性脂質、又は PEG 脂質のようなさらなる脂質を含む。

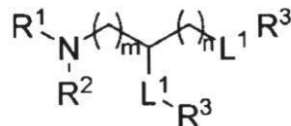
20

【0155】

一つの態様において、本発明は、

【0156】

【化46】



式(X)

30

【0157】

[式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は各々、独立して、所望により1～4の  $R^5$  で置換されていてもよく、 $R^3$  はアルキル、アルケニル、アルキニルであり、 $L^1$  は  $-OC(O)-$  であり、

$R^5$  は  $-OR^7$ 、 $-N(R^8)(R^9)$ 、 $-CN$ 、 $SR^{10}$ 、 $S(O)R^{10}$ 、 $S(O)_2R^{10}$  であり、

 $R^6$  は H、 $C_1 - C_6$  アルキルであり、 $R^7$  は H、又は  $C_1 - C_6$  アルキルであり、各  $R^8$  及び  $R^9$  は独立して、H 又は  $C_1 - C_6$  アルキルであり、 $R^{10}$  は H 又は  $C_1 - C_6$  アルキルであり、 $m$  及び  $n$  は、各々、独立して、1、2、3、4、5、又は6である]

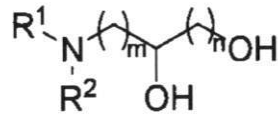
の化合物の製造方法を特徴とし、

該方法は、カップリング剤の存在下で式（VI）：

40

【0158】

【化 4 7】



式(VI)

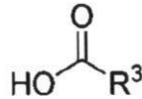
【 0 1 5 9】

の化合物を、

【 0 1 6 0】

【化 4 8】

10



式(VII)

【 0 1 6 1】

の化合物と反応させて、それにより、(式 X) の化合物を提供する段階を含む。

いくつかの実施形態において、該カップリング剤は EDCI のようなカルボジイミドである。

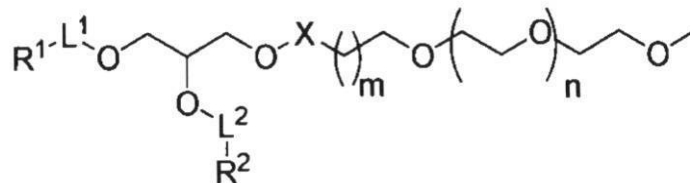
20

【 0 1 6 2】

一つの態様において、本発明は以下の式 (XV) :

【 0 1 6 3】

【化 4 9】



式(XV)

30

【 0 1 6 4】

[ 式中、各 L<sup>1</sup> 及び L<sup>2</sup> は、独立して、化学結合又は C(O) であり、各 R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は、独立して、アルキル、アルケニル又はアルキニルであり、

その各々は、所望により 1 以上の置換基で置換されていてもよく、

X は -C(O)NH-、C(S)NH、-C(O)C<sub>1-3</sub>アルキルC(O)NH-、又は -C(O)C<sub>1-3</sub>アルキルC(O)O- であり、

m は 0 ~ 11 の整数であり、

及び、n は 1 ~ 500 の整数である。 ]

の化合物を特徴とする。

40

【 0 1 6 5】

いくつかの実施形態において、L<sup>1</sup> 及び L<sup>2</sup> は共に化学結合である。いくつかの実施形態において、L<sup>1</sup> 及び L<sup>2</sup> は共に C(O) である。いくつかの実施形態において、各 R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は、独立して、アルキル、例えば、C<sub>6</sub>-C<sub>28</sub>アルキル、例えば、C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>アルキル、例えば、C<sub>13</sub>アルキル、C<sub>14</sub>アルキル、C<sub>15</sub>アルキル、又は C<sub>16</sub>アルキルである。いくつかの実施形態において、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は共にアルキル、例えば、同一の長さをもつ直鎖アルキル、例えば、C<sub>6</sub>-C<sub>28</sub>アルキル、例えば、C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>アルキル、例えば、C<sub>13</sub>アルキル、C<sub>14</sub>アルキル、C<sub>15</sub>アルキル、又は C<sub>16</sub>アルキルである。いくつかの好ましい実施形態において、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は共に C<sub>14</sub>アルキルである。

50

## 【 0 1 6 6 】

いくつかの実施形態において、式 X V はラセミ混合物を表す。

いくつかの実施形態において、式 X V の化合物は、例えば、少なくとも約 6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % の R 異性体の鏡像体過剰率を有する。いくつかの実施形態において、式 X V は鏡像異性的に純粋な「R」異性体を表す。

## 【 0 1 6 7 】

いくつかの実施形態において、式 X V の化合物は、例えば、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % の S 異性体の鏡像体過剰率を有する。いくつかの実施形態において、式 X V は鏡像異性的に純粋な「S」異性体を表す。

10

## 【 0 1 6 8 】

いくつかの実施形態において、各  $R^1$  及び  $R^2$  は、独立して、アルケニルであり、例えば、各  $R^1$  及び  $R^2$  は独立して、 $C_6 - C_{30}$  アルケニルであり、あるいは、各  $R^1$  及び  $R^2$  は同一のアルケニル部位である。いくつかの実施形態において、各  $R^1$  及び  $R^2$  は 1 つの二重結合、例えば、E 又は Z 立体配置の二重結合を含む。

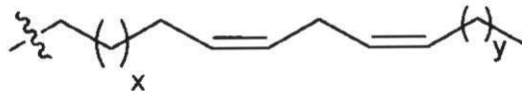
## 【 0 1 6 9 】

いくつかの実施形態において、各  $R^1$  及び  $R^2$  は、2 つの二重結合部位を含む。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも 1 つは Z 立体配置を有する。いくつかの実施形態において、二重結合の双方は Z 立体配置を有する。いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  の少なくとも 1 つは以下の式 ( I I ) :

20

## 【 0 1 7 0 】

## 【 化 5 0 】



式(II)

## 【 0 1 7 1 】

[ 式中、x は 1 ~ 8 の整数であり、

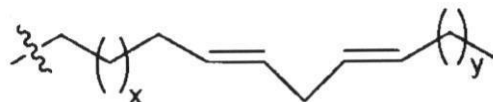
30

y は 1 ~ 1 0 の整数である ]

によって示される。いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  の双方は式 ( I I ) のものである。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも 1 つは E 立体配置を有し、例えば、両方の二重結合が E 立体配置を有する。いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  の少なくとも 1 つは以下の式 ( I I I ) :

## 【 0 1 7 2 】

## 【 化 5 1 】



式(III)

40

## 【 0 1 7 3 】

[ 式中、

x は 1 ~ 8 の正数であり、

y は 1 ~ 1 0 の整数である ]

によって示される。

## 【 0 1 7 4 】

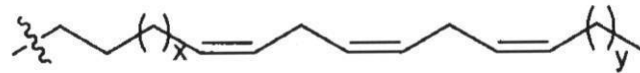
いくつかの実施形態において、各  $R^1$  及び  $R^2$  は 3 つの二重結合部位を含む。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも 1 つは Z 立体配置を有する。いくつかの実施

50

形態において、二重結合の少なくとも2つはZ立体配置を有する。いくつかの実施形態において、二重結合は3つとも全てZ立体配置を有する。いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  の少なくとも1つは以下の式 (IV) :

【0175】

【化52】



式(IV)

10

【0176】

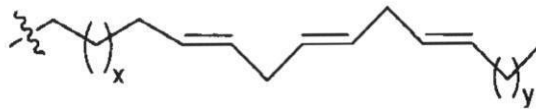
[ 式中、 $x$  は 1 ~ 8 の整数であり、

$y$  は 1 ~ 10 の整数である。 ]

によって示される。いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  の双方は式 (IV) によって示される通りである。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも1つはE立体配置を有する。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも2つは、E立体配置を有する。いくつかの実施形態において、二重結合は3つとも全てE立体配置を有する。いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  の少なくとも1つは以下の式 (IV) :

【0177】

【化53】



式(V)

20

【0178】

[ 式中、 $x$  は 1 ~ 8 の整数であり、

$y$  は 1 ~ 10 の整数である ]

によって示される。いくつかの実施形態において、 $R^3$  及び  $R^4$  の双方は式 (V) によって示される。

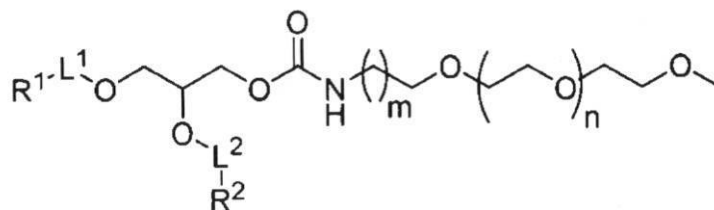
30

【0179】

いくつかの実施形態において、 $X$  は  $-C(O)NH-$  であり、以下の式 (XV')

【0180】

【化54】



式(XV')

40

【0181】

の化合物を提供する。いくつかの実施形態において、各  $R^1$  及び  $R^2$  は、独立して、アルキル、例えば、 $C_6 - C_{28}$  アルキル、例えば、 $C_{10} - C_{18}$  アルキル、例えば、 $C_3$  アルキル、 $C_{14}$  アルキル、 $C_{15}$  アルキル、又は  $C_{16}$  アルキルである。いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  は共にアルキル、例えば、同一の長さを有する直鎖アルキル、例えば、 $C_6 - C_{28}$  アルキル、例えば、 $C_{10} - C_{18}$  アルキル、例えば、 $C_3$  アルキル、 $C_{14}$  アルキル、 $C_{15}$  アルキル、又は  $C_{16}$  アルキルである。いくつかの好ましい実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  は共に  $C_{14}$  アルキルである。

50

## 【 0 1 8 2 】

いくつかの実施形態において、Xは - C ( O ) C <sub>1 - 3</sub> アルキル C ( O ) O - である。

いくつかの実施形態において、mは1～10の整数、例えば、2～4の整数、又は整数2である。

## 【 0 1 8 3 】

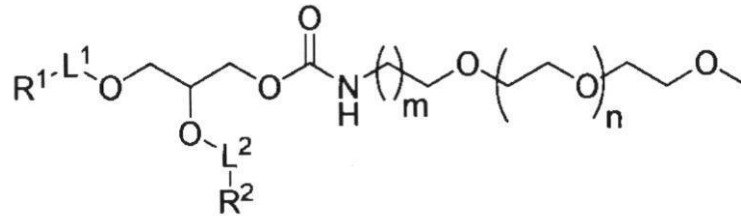
いくつかの実施形態において、nは1～500の整数、例えば、40～400、100～350、40～50、又は42～47の整数である。

いくつかの実施形態において、化合物は式 ( X V ' ) :

## 【 0 1 8 4 】

## 【 化 5 5 】

10



式(XV')

## 【 0 1 8 5 】

[ 式中、L<sup>1</sup> 及び L<sup>2</sup> の双方は化学結合である ]

20

の化合物である。いくつかの実施形態において、各 R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は、独立して、アルキル、例えば、C<sub>6</sub> - C<sub>28</sub> アルキル、例えば、C<sub>10</sub> - C<sub>18</sub> アルキル、例えば、C<sub>14</sub> アルキル、C<sub>15</sub> アルキル、又は C<sub>16</sub> アルキルである。いくつかの実施形態において、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> の双方はアルキル、例えば、同一長さを有する直鎖アルキル、例えば、C<sub>6</sub> - C<sub>28</sub> アルキル、例えば、C<sub>10</sub> - C<sub>18</sub> アルキル、例えば、C<sub>14</sub> アルキル、C<sub>15</sub> アルキル、又は C<sub>16</sub> アルキルである。いくつかの好ましい実施形態において、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> の双方は C<sub>14</sub> アルキルである。いくつかの実施形態において、mは1～10の整数、例えば、2～4の整数、又は整数2である。いくつかの実施形態において、nは1～500の整数、例えば、40～400、又は40～50の整数である。

## 【 0 1 8 6 】

30

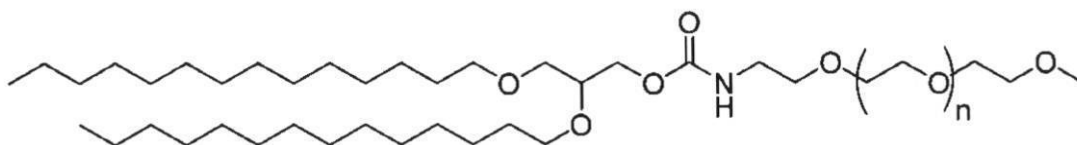
いくつかの実施形態において、化合物は式 ( X V ' ) の化合物であり、L<sup>1</sup> 及び L<sup>2</sup> は共に化学結合であり、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は共にアルキル (例えば、C<sub>6</sub> - C<sub>28</sub> アルキル、例えば、C<sub>10</sub> - C<sub>18</sub> アルキル、好ましくは C<sub>14</sub> アルキル) であり、nは約40～400の整数である。

## 【 0 1 8 7 】

いくつかの実施形態において、化合物は以下の式 ( X V I ) :

## 【 0 1 8 8 】

## 【 化 5 6 】



式(XVI)

40

## 【 0 1 8 9 】

[ 式中、反復する P E G 部位は、42 及び 47 の間の n 値を持つ 2000 の平均分子量を有する ]

を有する。

## 【 0 1 9 0 】

いくつかの実施形態において、式 X V の化合物は、例えば、少なくとも約 65%、70

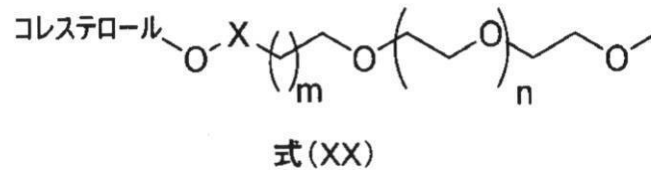
50

%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、又は99%のR異性体の鏡像体過剰率を有する。いくつかの実施形態において、式XVIの化合物は好ましい絶対立体配置「R」を持つ立体異性体である、

一つの態様において、本発明はコレステロール部位にコンジュゲートしたPEG脂質を特徴とする。例えば、以下の式(XX)の化合物：

【0191】

【化57】



10

【0192】

Xは-C(O)NH-、C(S)NH、-C(O)C<sub>1-3</sub>アルキルC(O)NH-、又は-C(O)C<sub>1-3</sub>アルキルC(O)O-であり、

mは0~11の整数であり、

nは1~500の整数である。

【0193】

いくつかの実施形態において、式(XX)中のコレステロールに結合したOはコレステロール部位の部分である。

20

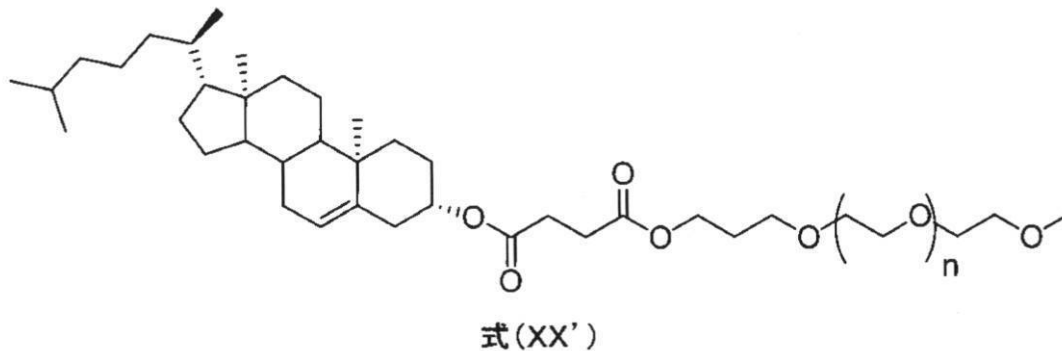
いくつかの好ましい実施形態において、Xは-C(O)NH-、又は-C(O)C<sub>1-3</sub>アルキルC(O)O-である。

【0194】

いくつかの実施形態において、式(XX)の化合物は以下の式(XX')：

【0195】

【化58】



30

【0196】

に示される通りである。

一つの態様において、本発明は、標的とする部位、例えば糖残基に結合したPEG脂質を特徴とする。例えば、式(XV)又は(XX)の化合物は、OMe末端で、標的部位によって修飾される。いくつかの実施形態において、標的部位はリンカーを介してPEG部位に結合される。例示的な標的化PEG脂質は以下の式(XXI)及び(XXII)によって示される。

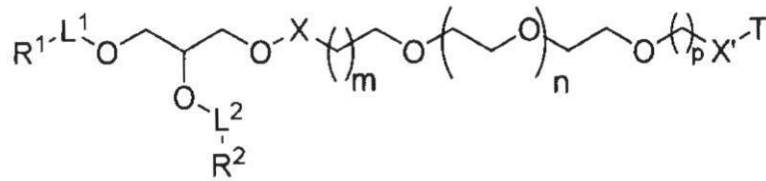
40

【0197】

一実施形態において、脂質は式(XXI)：

【0198】

【化59】



式(XXI)

【0199】

[式中、

各  $L^1$  及び  $L^2$  は、独立して、化学結合又は  $C(O)$  であり、各  $R^1$  及び  $R^2$  は、独立して、アルキル、アルケニル又はアルキニルであり、その各々は、所望により1以上の置換基で置換されていてもよく、各  $X$  及び  $X'$  は、独立して、 $-C(O)NH-$ ； $-NHC(O)-$ ； $C(S)NH$ ； $C(S)NH$ 、 $-C(O)C_{1-3}$ アルキル $C(O)NH-$ ； $NHC(O)C_{1-3}$ アルキル $C(O)-$ ； $-C(O)C_{1-3}$ アルキル $C(O)O-$ ； $NHC(O)C_{1-3}$ アルキル $-$ ；又は $C_{1-3}$ アルキル $C(O)NH-$ であり、 $m$ は0～11の整数であり、 $n$ は1～500の整数であり、 $p$ は1～6、例えば、3の整数であり、 $T$ はグリコシル部位（例えば、糖残基）のような標的部位である]

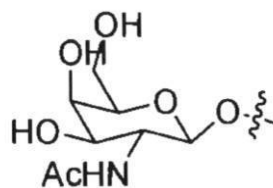
の化合物である。

【0200】

例示的な標的部位は

【0201】

【化60】



【0202】

を含む。

いくつかの実施形態において、 $L^1$  及び  $L^2$  は共に化学結合である。いくつかの実施形態において、 $L^1$  及び  $L^2$  は共に  $C(O)$  である。

【0203】

いくつかの実施形態において、各  $R^1$  及び  $R^2$  は、独立して、アルキル、例えば、 $C_6 - C_{28}$ アルキル、例えば、 $C_{10} - C_{18}$ アルキル、例えば、 $C_{14}$ アルキル、 $C_{15}$ アルキル、又は $C_{16}$ アルキルである。いくつかの実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  の双方はアルキル、例えば、同一長さの直鎖アルキル、例えば、 $C_6 - C_{28}$ アルキル、例えば、 $C_{10} - C_{18}$ アルキル、例えば、 $C_{14}$ アルキル、 $C_{15}$ アルキル、又は $C_{16}$ アルキルである。いくつかの好ましい実施形態において、 $R^1$  及び  $R^2$  の双方は $C_{14}$ アルキルである。

【0204】

いくつかの実施形態において、式(XXI)はラセミ混合物を表す。

いくつかの実施形態において、式(XXI)の化合物は、例えば、少なくとも約65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、又は99%のR異性体の鏡像体過剰率を有する。いくつかの実施形態において、式(XXI)は鏡像異性的に純粋な「R」異性体を表す。

10

20

30

40

50

## 【0205】

いくつかの実施形態において、式(XXI)化合物は、例えば、少なくとも約65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、又は99%のS異性体の鏡像体過剰率を有する。いくつかの実施形態において、式(XXI)は鏡像異性的に純粋な「S」異性体を表す。

## 【0206】

いくつかの実施形態において、各 $R^1$ 及び $R^2$ は、独立して、アルケニルであり、例えば、各 $R^1$ 及び $R^2$ は、独立して、 $C_6 - C_{30}$ アルケニルであり、あるいは各 $R^1$ 及び $R^2$ は同一のアルケニル部位である。いくつかの実施形態において、各 $R^1$ 及び $R^2$ は、1つの二重結合、例えば、E又はZ立体配置の1つの二重結合を含む。

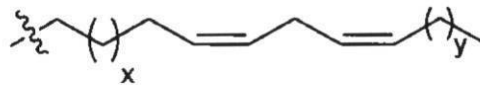
10

## 【0207】

いくつかの実施形態において、各 $R^1$ 及び $R^2$ は2つの二重結合部位を含む。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも1つはZ立体配置を有する。いくつかの実施形態において、二重結合の双方はZ立体配置を有する。いくつかの実施形態において、 $R^1$ 及び $R^2$ の少なくとも1つは以下の式(II)：

## 【0208】

## 【化61】



式(II)

20

## 【0209】

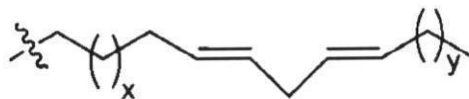
[式中、 $x$ は1~8の整数であり、

$y$ は1~10の整数である]

によって示される。いくつかの実施形態において、 $R^1$ 及び $R^2$ の双方は式(II)のものである。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも1つはE立体配置を有し、例えば、二重結合の双方はE立体配置を有する。いくつかの実施形態において、 $R^1$ 及び $R^2$ の少なくとも1つは以下の式(III)：

## 【0210】

## 【化62】



式(III)

30

## 【0211】

[式中 $x$ は1~8の整数であり、

$y$ は1~10の整数である]

によって示される。

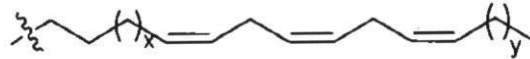
40

## 【0212】

いくつかの実施形態において、各 $R^1$ 及び $R^2$ は3つの二重結合部位を含む。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも1つはZ立体配置を有する。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも2つはZ立体配置を有する。いくつかの実施形態において、二重結合は3つとも全てZ立体配置を有する。いくつかの実施形態において、 $R^1$ 及び $R^2$ の少なくとも1つは以下の式(IV)：

## 【0213】

【化63】



式(IV)

【0214】

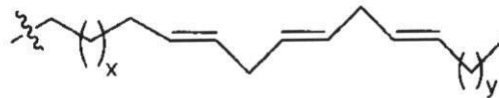
[式中、xは1～8の整数であり、  
yは1～10の整数である]

によって示される。いくつかの実施形態において、 $R^1$ 及び $R^2$ の双方は式(IV)によって示される通りである。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも1つはE立体配置を有する。いくつかの実施形態において、二重結合の少なくとも2つはE立体配置を有する。いくつかの実施形態において、二重結合は3つとも全てE立体配置を有する。いくつかの実施形態において、 $R^1$ 及び $R^2$ の少なくとも1つは以下の式(IV)：

10

【0215】

【化64】



式(V)

20

【0216】

[式中、xは1～8の整数であり、  
yは1～10の整数である]

によって示される。いくつかの実施形態において、 $R^3$ 及び $R^4$ の双方は式(V)によって示される。

【0217】

いくつかの実施形態において、pは3である。

いくつかの実施形態において、Lは $\text{NHC}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ アルキル(例えば、 $\text{NHC}(\text{O})\text{C}_3$ アルキル)である。

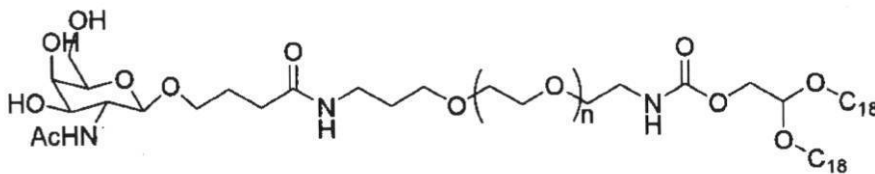
30

【0218】

いくつかの実施形態において、式(XXI)の化合物は以下の(XXI')：

【0219】

【化65】



式(XXI')

40

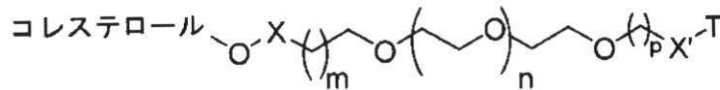
【0220】

の化合物である。

一実施形態において、脂質は式(XXII)：

【0221】

【化66】



式 (XXII)

【0222】

[ 式中、各 X 及び X' は、独立して、-C(O)NH-、-NHCO-、C(S)NH、C(S)NH、-C(O)C<sub>1-3</sub>アルキルC(O)NH-；NHCO-C<sub>1-3</sub>アルキルC(O)-；-C(O)C<sub>1-3</sub>アルキルC(O)O-；NHCO-C<sub>1-3</sub>アルキル-；又はC<sub>1-3</sub>アルキルC(O)NH-であり、

m は 0 ~ 11 の整数であって、

n は 1 ~ 500 の整数であり、

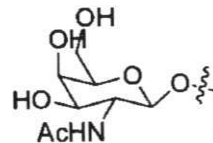
p は 1 ~ 6 の整数、例えば、3 であり、

T はグリコシル部位（例えば、糖残基）のような標的部位である ]

の化合物である。例示的な標的部位は

【0223】

【化67】



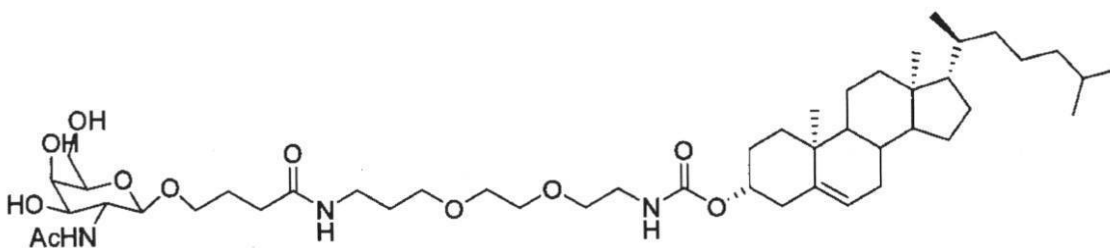
【0224】

を含む。

いくつかの好ましい実施形態において、式 (XXII) の化合物は以下に示される (XXII') の化合物である：

【0225】

【化68】



式 (XXII')

【0226】

一つの態様において、本発明は、本明細書中に記載された化合物（例えば、式 (I) の化合物又は式 (X) の化合物）、及び RNA、一本鎖又は二本鎖 RNA（例えば、siRNA 又は dsRNA 又は DNA）のような核酸を含む会合複合体を特徴とする。いくつかの実施形態において、会合複合体はリボプレックス又はリボソームである。いくつかの実施形態において、会合複合体は標的部位、融合脂質、式 (XV)、(XV') 又は (XVI) を有する PEG 脂質のような本明細書中に記載された PEG 脂質のような PEG 脂質、又はその構造成分のような 1 つ以上のさらなる成分を含む。いくつかの実施形態において、PEG 脂質は本明細書中に記載された標的化 PEG 脂質、例えば、式 (XXI)、(XXI')、(XXII)、又は (XXII') の化合物である。

【0227】

一つの態様において、本発明は、本明細書中に記載された化合物（例えば、式 (I) 又は式 (X) の化合物のような本明細書中に記載された脂質）を含む脂質製剤を緩衝液の存

10

20

30

40

50

在下で治療剤と接触させる段階を含むリポソームの形成方法を特徴とし、該緩衝液は：

分子式 I の実質的に全てのアミンがプロトン化されるのに十分な強度であり、

100 及び 300 mM の間にあり、

20 mM の同一緩衝液よりも有意に多いプロトン化を提供する濃度で存在する。

【0228】

一つの態様において、本発明は、本明細書中に記載された方法によって形成されたりポソームを特徴とする。

一つの態様において、本発明は、少なくとも約 90% エタノールを含む混合物中で、本明細書中に記載された脂質製剤（例えば、式 (I) の化合物又は式 (X) の化合物を含む脂質製剤）を治療剤と接触させ、次いで、脂質製剤を治療剤と迅速に混合して、約 200  $\mu$ M 未満の直径を有する粒子を提供する段階を含むリポソームを形成する方法を特徴とする。いくつかの実施形態において、粒子は約 50  $\mu$ M 未満の直径を有する。

10

【0229】

一つの態様において、本発明は、緩衝液の存在下で、本明細書中に記載された脂質製剤（例えば、式 (I) の化合物又は式 (X) の化合物を含む脂質製剤）を治療剤と接触させる段階を含むリポソームを形成する方法を特徴とし、該緩衝液は約 100 ~ 約 300 mM の濃度を有する。

【0230】

一つの態様において、本発明は、本明細書中に記載された製剤（例えば、式 (I) の化合物、又は式 (X) の化合物を含む脂質製剤）及び核酸を含むリポソームを特徴とする。いくつかの実施形態において、製剤はまた、PEG 化脂質、例えば、式 (XV)、(XV') 又は (XVI) を有する PEG 脂質のような本明細書中に記載された PEG 脂質を含む。いくつかの実施形態において、PEG 脂質は本明細書中に記載された標的化 PEG 脂質、例えば、式 (XXI)、(XXI')、(XXII)、又は (XXII') の化合物である。いくつかの実施形態において、製剤はまた、コレステロールのような構造部位を含む。いくつかの実施形態において、会合複合体の製剤は式 (I)、(XV) の化合物、及びコレステロールを含む。いくつかの実施形態において、該核酸は siRNA であり、例えば、該核酸は分解に耐えるように修飾されている siRNA であり、該核酸は多糖骨格の修飾によって修飾されている siRNA であり、又は該 siRNA は ApoB 遺伝子を標的とする。

20

30

【0231】

いくつかの実施形態において、該リポソームは、さらに、構造部位、及び本明細書中に記載された PEG 脂質のような PEG 化脂質を含み、製剤（例えば、式 (I) の化合物又は式 (X) の化合物を含む脂質製剤）、コレステロールのような構造部位、PEG 化脂質、及び核酸の重量比率は 8 ~ 22 : 4 ~ 10 : 4 ~ 12 : 0.4 ~ 2.2 である。いくつかの実施形態において、構造部位はコレステロールである。いくつかの実施形態において、前記比率は 10 ~ 20 : 0.5 ~ 8.0 : 5 ~ 10 : 0.5 ~ 2.0、例えば、15 : 0.8 : 7 : 1 である。いくつかの実施形態において、平均リポソーム直径は 10 nm 及び 750 nm の間にあり、例えば、平均リポソーム直径は 30 ~ 200 nm の間にあり、平均リポソーム直径は 50 ~ 100 nm の間にある。いくつかの実施形態において、製剤は未反応脂質の 15 重量% 未満である。いくつかの実施形態において、製剤（例えば、式 (I) の化合物又は式 (X) の化合物を含む脂質製剤）、コレステロールのような構造部位、及び PEG 脂質の比率は約 42 / 48 / 10（モル比率）である。いくつかの実施形態において、核酸（例えば、siRNA）に対する総脂質は約 7.5 重量% である。

40

【0232】

いくつかの実施形態において、本明細書中に記載された会合複合体における全賦形剤の核酸に対する重量比率は、約 15 : 1 未満、例えば、約 10 : 1、7.5 : 1 又は約 5 : 1 である。

【0233】

一つの態様において、本発明は、複数の脂質部位及び治療剤を含む会合複合体を形成す

50

る方法の特徴とし、該方法はエタノール中の複数の脂質部位及び水性 NaOAc 緩衝液を混合して、粒子を提供し、次いで、治療剤を該粒子に加え、それにより、会合複合体を形成する段階を含む。

【0234】

いくつかの実施形態において、脂質部位は 100% エタノールの溶液中で提供される。

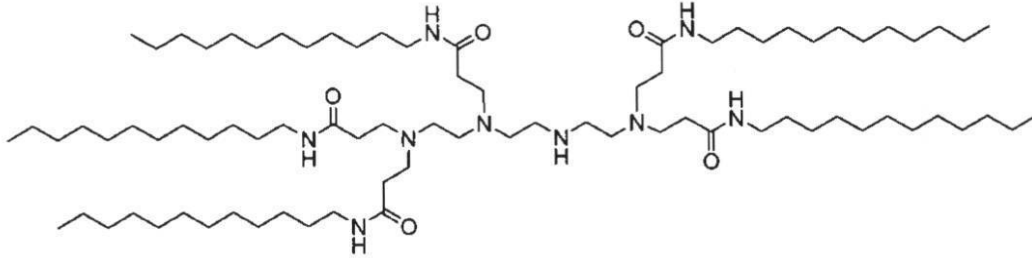
いくつかの実施形態において、複数の脂質部位はカチオン性脂質を含む。

いくつかの実施形態において、カチオン性脂質は本明細書中に記載された脂質であり、例えば、カチオン性脂質は以下の脂質のいずれか一方、又はその混合物である。

【0235】

【化69】

10



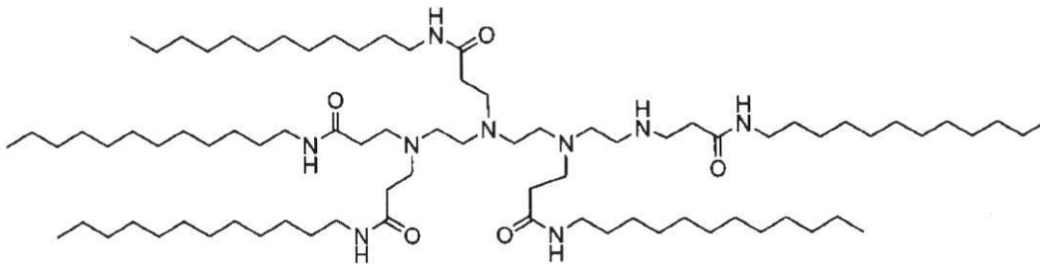
【0236】

又は

20

【0237】

【化70】



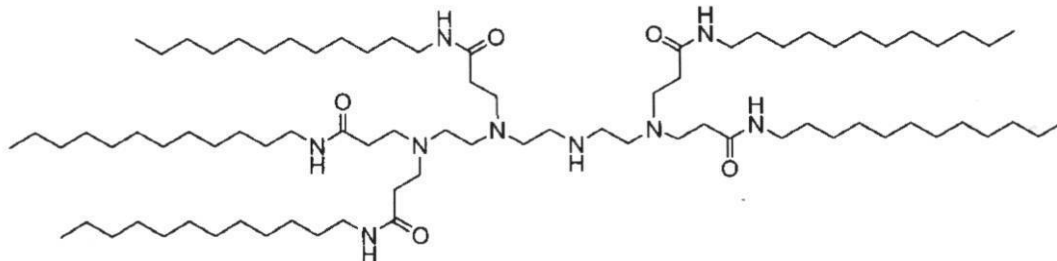
30

【0238】

いくつかの好ましい実施形態において、カチオン性脂質は

【0239】

【化71】



40

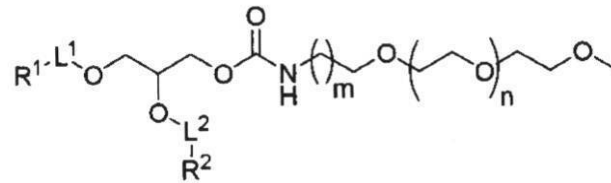
【0240】

である。

いくつかの実施形態において、複数の脂質部位は PEG 脂質を含み、例えば、PEG 脂質は以下の構造：

【0241】

## 【化 7 2】



## 【 0 2 4 2 】

[ 式中、各  $L^1$  及び  $L^2$  は、独立して、化学結合又は  $C(O)$  であり、

各  $R^1$  及び  $R^2$  は、独立して、アルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、その各々は、所望により 1 つ以上の置換基で置換されていてもよく、

$X$  は  $-C(O)NH-$ 、 $C(S)NH$ 、 $-C(O)C_{1-3}$  アルキル  $C(O)NH-$ 、又は  $-C(O)C_{1-3}$  アルキル  $C(O)O-$  であり、

$m$  は 0 ~ 11 の整数であり、

$n$  は 1 ~ 500 の整数である ]

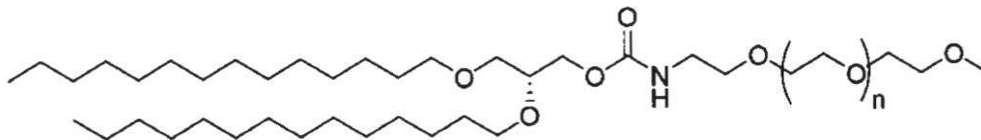
を有する。

## 【 0 2 4 3 】

いくつかの好ましい実施形態において、PEG 脂質は、反復する PEG 部位が、例えば、42 及び 47 の間の  $n$  値を持つ 2000 の平均分子量を有する式 (XVI) の PEG 脂質、又は以下に示される脂質：

## 【 0 2 4 4 】

## 【化 7 3】



## 【 0 2 4 5 】

である。

いくつかの実施形態において、複数の脂質部位は構造脂質を含み、例えば、構造脂質はコレステロールである。

## 【 0 2 4 6 】

いくつかの実施形態において、PEG 脂質は本明細書中に記載された標的化 PEG 脂質、例えば、式 (XXI)、(XXI')、(SSII) 又は (XXII') の化合物である。

## 【 0 2 4 7 】

いくつかの実施形態において、該方法は、さらに、例えば、治療剤の添加に先立って、脂質含有粒子を押し出す段階を含む。

いくつかの実施形態において、治療剤は核酸、例えば、分解に耐えるように修飾されている siRNA、多糖骨格の修飾によって修飾されている siRNA、又は親油性部位にコンジュゲートした siRNA のような siRNA である。いくつかの実施形態において、siRNA は ApoB 遺伝子を標的とする。

## 【 0 2 4 8 】

いくつかの実施形態において、会合複合体はカチオン性脂質、構造脂質、PEG 脂質及び核酸を含む。いくつかの実施形態において、カチオン性脂質、構造脂質、PEG 脂質及び核酸のモル比率は 36 ~ 48 : 42 ~ 54 : 6 ~ 14、例えば、38 ~ 46 : 44 ~ 52 : 8 ~ 12 又は約 42 : 48 : 10 である。いくつかの実施形態において、核酸に対する総賦形剤の重量比率は約 15 : 1 未満、例えば、約 10 : 1、7.5 : 1 又は約 5 : 1 である。いくつかの好ましい実施形態において、カチオン性脂質は以下の構造：

## 【 0 2 4 9 】

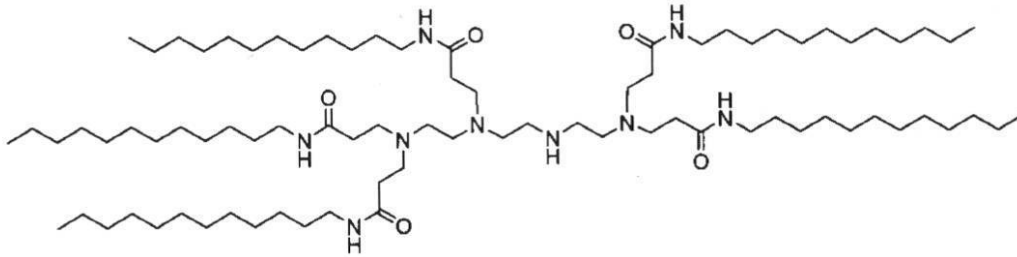
10

20

30

40

【化74】



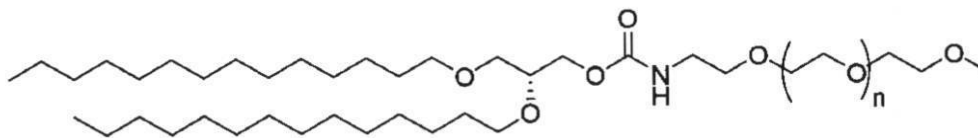
【0250】

10

を有し、PEG脂質は式(XVI)のPEG脂質であり、反復するPEG部位は、例えば、42及び47の間のnの値を持つ2000の平均分子量を有し、あるいは以下の構造：

【0251】

【化75】



【0252】

20

を有し、かつ構造脂質はコレステロールであり、例えば、カチオン性脂質、構造脂質、PEG脂質のモル比率は38~46:44~52:8~12、例えば、約42:48:10である。いくつかの好ましい実施形態において、核酸に対する総賦形剤の重量比率は約15:1未満、例えば、約10:1、約7.5:1、又は約5:1である。

【0253】

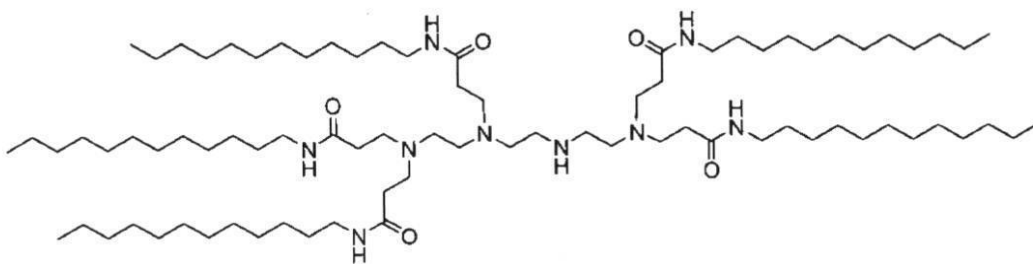
別の態様において、本発明は、本明細書中に記載された方法から作製された会合複合体を特徴とする。

別の態様において、本発明は、カチオン性脂質、構造脂質、PEG脂質、及び核酸を含む会合複合体を特徴とし、カチオン性脂質は以下の脂質のいずれか一方又はその混合物であり：

【0254】

30

【化76】



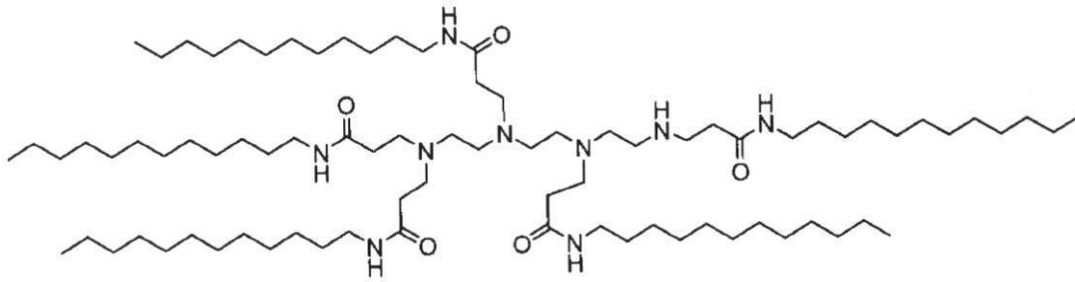
【0255】

40

又は

【0256】

【化 77】



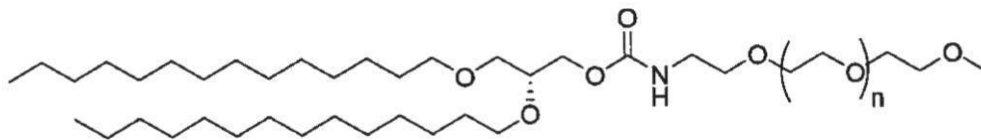
【0257】

10

PEG脂質は式(XVI)のPEG脂質であり、反復するPEG部位は、例えば、42及び47の間のnの値を持つ2000の平均分子量を有し、あるいは以下の構造：

【0258】

【化 78】



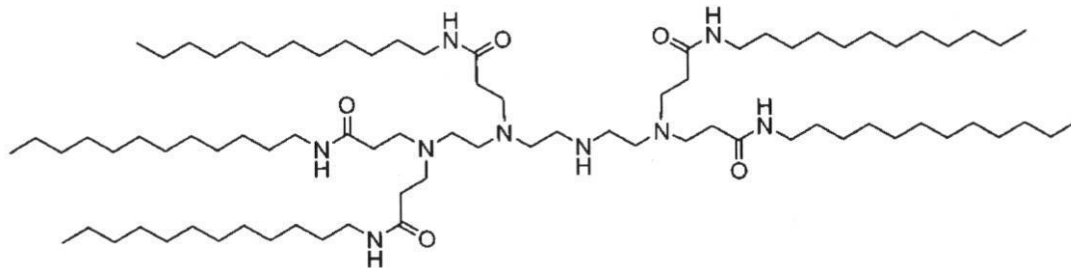
【0259】

20

を有し、及び構造脂質はコレステロールである。いくつかの好ましい実施形態において、核酸はsiRNAである。いくつかの好ましい実施形態において、カチオン性脂質は以下の式：

【0260】

【化 79】



30

【0261】

を有する。いくつかの好ましい実施形態において、カチオン性脂質製剤、構造脂質（例えば、コレステロール）、PEG脂質及び核酸のモル比率は36～48：42～54：6～14、例えば、38～46：44～52：8～12又は約42：48：10である。いくつかの好ましい実施形態において、核酸に対する総賦形剤の重量比率は約15：1未満、例えば、約10：1、約7.5：1、又は約5：1である。

【0262】

40

いくつかの実施形態において、本明細書中に記載された会合複合体は約25000nm未満、例えば、約20～200nm、約60又は約50nmの平均直径又は粒子サイズを有する。

【0263】

いくつかの実施形態において、本明細書中に記載された会合複合体にて投与される核酸は少なくとも約4時間、例えば、少なくとも約6時間、少なくとも約8時間、少なくとも約12時間、少なくとも約24時間、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約4日、少なくとも約1週間、少なくとも約2週間、又は少なくとも約3週間の血清中半減期（例えば、イン・ピトロで）を示す。

【0264】

50

一つの態様において、本発明は、本明細書中に記載された製剤を含む医薬上許容される組成物を特徴とする。

一つの態様において、本発明は、本明細書中に記載されたりボソームを含む医薬上許容される組成物を特徴とする。

【0265】

一つの態様において、本発明は、治療量の医薬上許容される組成物、例えば、本明細書中に記載されたりボソームのような会合複合体を哺乳動物に投与する段階を含む哺乳動物治療する方法を特徴とする。

【0266】

定義

用語「ハロ」又は「ハロゲン」とは、フッ素、塩素、臭素又はヨウ素のいずれかの基をいう。

【0267】

用語「アルキル」とは、指定された数の炭素原子を含有し、直鎖又は分岐鎖であり得る炭化水素鎖をいう。例えば、 $C_1 - C_{36}$ アルキルは、該基がその中に1～136個（包括的）の炭素原子を有し得ることを示す。用語「ハロアルキル」とは、1つ以上の水素原子がハロによって置き換えられたアルキルをいい、全ての水素がハロによって置き換えられたアルキル部位（例えば、ペルフルオロアルキル）を含む。用語「アリールアルキル」又は「アラルキル」とは、アルキル水素原子がアリール基によって置き換えられたアルキル部位をいう。アラルキルは、1つ以上の水素原子がアリール基によって置き換えられている基を含む。「アリールアルキル」又は「アラルキル」の例は、ベンジル、2-フェニルエチル、3-フェニルプロピル、9-フルオレニル、ベンズヒドリル、及びトリチル基を含む。

【0268】

用語「アルキレン」とは、二価アルキル、例えば、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、及び $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ をいう。

【0269】

用語「アルケニル」とは、2～36個の炭素原子を含有し、かつ1つ以上の二重結合を有する直鎖又は分岐鎖炭化水素鎖をいう。アルケニル基の例は、限定されるものではないが、アリル、プロベニル、2-ブテニル、3-ヘキセニル及び3-オクテニル基を含む。二重結合炭素の1つは、所望によりアルケニル置換基の結合点であってもよい。用語「アルキニル」とは、2～36個の炭素原子を含有し、1つ以上の三重結合を有することを特徴とする直鎖又は分岐鎖炭化水素鎖をいう。アルキニル基の例は、限定されるものではないが、エチニル、プロパルギル、及び3-ヘキシニルを含む。三重結合炭素の1つは、所望によりアルケニル置換基の結合点であってもよい。

【0270】

用語「置換基」はその基のいずれかの原子において、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクロアルケニル、シクロアルケニル、アリール、又はヘテロアリール基上に「置換された」基をいう。いずれの原子も置換することができる。適切な置換基は、限定されるものではないが、アルキル（例えば、 $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$ 、 $C_4$ 、 $C_5$ 、 $C_6$ 、 $C_7$ 、 $C_8$ 、 $C_9$ 、 $C_{10}$ 、 $C_{11}$ 、 $C_{12}$ 直鎖又は分岐鎖アルキル）、シクロアルキル、ハロアルキル（例えば、 $CF_3$ のようなペルフルオロアルキル）、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、ヘテロアラルキル、ヘテロシクリル、アルケニル、アルキニル、シクロアルケニル、ヘテロシクロアルケニル、アルコキシ、ハルアルコキシ、（例えば、 $OCF_3$ のようなペルフルオロアルコキシ）、ハロ、ヒドロキシ、カルボキシ、カルボキシレート、シアノ、ニトロ、アミノ、アルキルアミノ、 $SO_3H$ 、硫酸、リン酸、メチレンジオキシ（酸素が同一の炭素（ジェミナル置換）原子に結合している $-O-CH_2-O-$ ）、エチレンジオキシ、オキソ、チオキソ（例えば、 $C=S$ ）、イミノ（アルキル、アリール、アラルキル）、 $S(O)_n$ アルキル（ $n$ は0～2で

10

20

30

40

50

ある)、 $S(O)_n$ アリアル( $n$ は0~2である)、 $S(O)_n$ ヘテロアリアル( $n$ は0~2である)、 $S(O)_n$ ヘテロシクリル( $n$ は0~2である)、アミン(モノ-、ジ-、アルキル、シクロアルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル、アリアル、ヘテロアリアル、及びその組合せ)、エステル(アルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル、アリアル、ヘテロアリアル)、アミド(モノ-、ジ-、アルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル、アリアル、ヘテロアリアル、及びその組合せ)、スルホンアミド(モノ-、ジ-、アルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル、及びその組合せ)を含む。一つの態様において、基上の置換基は、独立して、前記置換基のいずれかの1つの単一の、又はいずれかのサブセットである。別の態様において、置換基は、それ自体、前記置換基のいずれか1つで置換されていてもよい。

10

## 【0271】

本明細書中で用いる用語「構造異性体」とは、同一の分子式を有するが、異なる構造式を有する、プロピルアルコール及びイソプロピルアルコールのような、任意の2つ以上の化合物をいう。

## 【0272】

本明細書中で用いる用語「幾何異性体」又は「立体異性体」とは、同一数及びタイプの原子、及び化学結合(すなわち、原子の間の結合性は同一である)を含有するが、原子の異なる空間的配置を有する2つ以上の化合物、例えば、二重結合のシス及びトランス異性体、鏡像異性体及びジアステレオマーをいう。

20

## 【0273】

便宜的に、明細書、実施例、及び添付の請求の範囲で用いるある種の用語及び表現の意味を以下に示す。本明細書の他の部分における用語の使用と本節に示す定義との間に明らかな矛盾があれば、本節における定義が優先されるべきである。

## 【0274】

「G」、「C」、「A」及び「U」は、各々、一般に、グアニン、シトシン、アデニン、及びウラシルを塩基として含有するヌクレオチドを表す。しかしながら、用語「リボヌクレオチド」又は「ヌクレオチド」とは、以下にさらに詳細に記載するような修飾されたヌクレオチド、又は代替置換部位をも意味することができると理解されよう。当業者は、グアニン、シトシン、アデニン及びウラシルを他の部位によって置換することができ、しかもそのような置換部位を有するオリゴヌクレオチドとの塩基対合特性は殆ど変化しないことを認識するであろう。例えば、限定されるものではないが、その塩基としてイノシンを含むヌクレオチドは、アデニン、シトシン又はウラシルを含有するヌクレオチドと塩基対合できる。よって、ウラシル、グアニン、又はアデニンを含有するヌクレオチドは、例えば、イノシンを含有するヌクレオチドによって本発明のヌクレオチド配列において置換することができる。そのような置換部位を含む配列が本発明の実施形態である。

30

## 【0275】

本明細書中で用いるように、「標的配列」とは、一次転写産物のRNAプロセッシングの産物であるmRNAを含めた、対応する遺伝子の転写の間に形成されたmRNA分子のヌクレオチド配列の連続的部分をいう。標的領域は、RNAi剤の一部に相補的である標的遺伝子におけるセグメントである。

40

## 【0276】

本明細書中で用いるように、用語「配列を含むストランド」とは、標準的なヌクレオチド命名法を用いて記載された配列によって記載されるヌクレオチドの鎖を含むオリゴヌクレオチドをいう。

## 【0277】

別段の指示のない限り、本明細書中で用い用語「相補的」は、第2のヌクレオチド配列に関連して第1のヌクレオチド配列を説明するのに用いられる場合、当業者によって理解されるように、一定の条件下で、第1のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドが、第2のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドとハイブリダイズし、二重鎖構造を形成する能力をいう。そのような条件は、

50

例えば、400 mM NaCl、40 mM PIPES pH 6.4、1 mM EDTA、50 又は70 で12～16時間、続いて洗浄を含むという厳密な条件とすることができる。生物内部に発生し得る生理的条件のような他の条件を適用することができる。当業者であれば、ハイブリダイズされたヌクレオチドの最終的適用に関連して2つの配列の相補性のテストに最も適切な諸条件を設定することができよう。

#### 【0278】

これは、第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドに対する第1及び第2のヌクレオチド配列の全長にわたる塩基対合を含む。そのような配列は、本明細書中において相互に「十分に相補的」ということができる。しかしながら、第1の配列を本明細書中において第2の配列に関連して「実質的に相補的」という場合、2つの配列は十分に相補的であり得、あるいはそれらは、それらの最終的適用に最も関連する条件下でハイブリダイズすることができる能力を保有しつつ、ハイブリダイゼーションに際して1つ以上の、但し一般的には4つ、3つ又は2つ以下のミスマッチした塩基対を形成し得る。しかし、2つのオリゴヌクレオチドを、ハイブリダイゼーションに際して1つ以上の一本鎖突出部を形成するように設計する場合、そのような突出部は、相補性の決定に関してミスマッチとしてみなされるべきではない。例えば、長さが21ヌクレオチドの一方のオリゴヌクレオチド、及び長さが23ヌクレオチドの他方のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド薬において、長い方のオリゴヌクレオチドは短い方のオリゴヌクレオチドに対して完全に相補的である21ヌクレオチドの配列を含むとき、本発明の目的においては「完全に相補的である」ということができる。

10

20

#### 【0279】

「相補的」配列は、本明細書中で用いるように、ハイブリダイズするそれらの能力に関して前記要件が満たされる限り、非ワトソン-クリック塩基対及び/又は非天然及び修飾ヌクレオチドから形成された塩基対を含み、あるいは完全にそれらから形成することができる。

#### 【0280】

用語「相補的」、「完全に相補的」及び「実質的に相補的」は、本明細書中においては、それらの使用の関係から理解されるように、オリゴヌクレオチド剤のセンスストランド及びアンチセンスストランドの間の、あるいはオリゴヌクレオチド剤のアンチセンスストランドと標的配列との間の塩基マッチングに関して用いることができる。

30

#### 【0281】

本明細書中で用いるように、メッセンジャーRNA (mRNA)「の少なくとも一部に対して実質的に相補的である」ポリヌクレオチドとは、対象とするmRNAの連続部分に対して実質的に相補的なポリヌクレオチドをいう。例えば、もし配列がApoBをコードするmRNAの非中断部分に対して実質的に相補的であれば、ポリヌクレオチドはApoB mRNAの少なくとも一部に対して相補的である。

#### 【0282】

本明細書中で用いるように、「オリゴヌクレオチド剤」とは、その標的に対してアンチセンスであるリボ核酸 (RNA) 又はデオキシリボ核酸 (DNA) 又は双方又はその修飾された一本鎖オリゴマー又はポリマーをいう。この用語は、天然に生じる核酸塩基、糖及び共有結合ヌクレオシド間 (骨格) 結合、ならびに同様に機能する天然に生じない部分を有するオリゴヌクレオチドよりなるオリゴヌクレオチドを含む。そのような修飾された又は置換されたオリゴヌクレオチドは、しばしば、例えば、増強された細胞取り込み、核酸標的に対する向上した親和性、及びヌクレアーゼの存在下における増大した安定性のような望ましい特性のため天然形態よりも好ましい。

40

#### 【0283】

オリゴヌクレオチド剤は、核酸標的 (NAT) オリゴヌクレオチド剤及び蛋白質標的 (PT) オリゴヌクレオチド剤の両方を含む。NAT及びPTオリゴヌクレオチド剤とは、リボ核酸 (RNA) 又はデオキシリボ核酸 (DNA) 又は双方又はその修飾された一本鎖

50

オリゴマー又はポリマーをいう。この用語は、天然に生じるヌクレオベース、糖、及び共有結合ヌクレオシド間（骨格）結合、ならびに同様に機能する天然に生じない部分を有するオリゴヌクレオチドよりなるオリゴヌクレオチドを含む。そのような修飾された又は置換されたオリゴヌクレオチドは、しばしば、例えば、増強された細胞取り込み、核酸標的に対する向上した親和性、及び/又はヌクレアーゼの存在下における増加した安定性のような望ましい特性のため天然形態よりも好ましい。特異的RNA又はDNA標的に結合するように設計されたNATは、標的核酸の少なくとも10、20又は30以上の塩基に対して実質的相補性、例えば、少なくとも70、80、90、又は100%相補性を有し、アンチセンスRNA、マイクロRNA、アンタゴミール（antagomir）、及び発現を調節することができる他の非二重鎖構造を含む。他のNATオリゴヌクレオチド剤は、外部ガイド配列（EGS）オリゴヌクレオチド（オリゴザイム）、DNAザイム、及びリボザイムを含む。NATオリゴヌクレオチド剤はいずれかの核酸、例えば、miRNA、premiRNA、pre-mRNA、mRNA、又はDNAを標的とすることができる。これらのNATオリゴヌクレオチド剤は、それらの標的に対するワトソン-クリック相補性を介して結合してもしなくてもよい。PTオリゴヌクレオチド剤は、好ましくは、三次元相互作用によって蛋白質標的に結合し、蛋白質活性を変調する。それらはデコイRNA、アプタマー等を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0284】

理論に束縛されることは望まないが、オリゴヌクレオチド剤は、切断依存性又は切断非依存性メカニズムを含めた、多数のメカニズムのうちの一つ以上によって作用することができる。切断ベースのメカニズムはRNAse H依存性であり得、及び/又はRISC複合体機能を含むことができる。切断非依存性メカニズムは、miRNAによって媒介されるような占有基づく翻訳阻止、又はアプタマーが行うような、蛋白質へのオリゴヌクレオチド剤の結合を含む。オリゴヌクレオチド剤を用いて、pre-mRNAにおけるスプライス部位の選択を変更することによって遺伝子の発現を変化させることもできる。スプライシングの阻害の結果、不適切にプロセッシングされたメッセージの分解をもたらすこともでき、それにより、遺伝子発現を下方制御する。

#### 【0285】

本明細書中で用いるように、用語「二本鎖RNA」又は「dsRNA」とは、前記定義のような、2つの逆平行かつ実質的に相補的な核酸ストランドを含む二重鎖構造を有するリボ核酸分子の複合体をいう。二重鎖構造を形成する2つのストランドは、1つのより長いRNA分子の異なる部分であってもよく、あるいはそれらは別々のRNA分子であってもよい。別のRNA分子の場合、そのようなdsRNAは、しばしば、文献においてはsiRNA（「短鎖干渉性RNA」）という。2つのストランドが1つのより長い分子の一部であって、従って、1つのストランドの3'末端及び二重鎖構造を形成するそれぞれの他方のストランドの5'末端の間のヌクレオチドの中断されない鎖によって連結される場合、連結RNA鎖は「ヘアピンループ」、「ショートヘアピンRNA」又は「shRNA」という。2つのストランドは、1つのストランドの3'末端、及び二重鎖構造を形成するそれぞれの他方のストランドの5'末端の間のヌクレオチドの中断されていない鎖以外の手段によって共有結合される場合、連結構造は「リンカー」という。RNAストランドは同一又は異なる数のヌクレオチドを有することができる。最大数の塩基対は、dsRNAの最も短いストランドから二重鎖中に存在するいずれかの突出部を差し引いたものにおけるヌクレオチドの数である。二重鎖構造に加えて、dsRNAは1つ以上のヌクレオチド突出部を含むことができる。加えて、本明細書中で用いるように、「dsRNA」は、多数のヌクレオチドにおける実質的修飾を含めた、及び本明細書中に開示された、あるいは当該分野で知られた全てのタイプの修飾を含めた、リボヌクレオチドに対する化学的修飾を含むことができる。あらゆるそのような修飾は、siRNAタイプの分子で用いるように、本明細書及び請求の範囲の目的では「dsRNA」に含まれる。

#### 【0286】

本明細書中で用いるように、「ヌクレオチド突出部」とは、dsRNAの一方のストラ

ンドの3'末端が他方のストランドの5'末端を超えて延び、又はその逆である場合、dsRNAの二重鎖構造から突出する1つ又は複数の非対合ヌクレオチドをいう。「平滑」又は「平滑末端」は、dsRNAのその末端において非対合ヌクレオチドがない、すなわち、ヌクレオチド突出部がないことを意味する。「平滑末端」dsRNAは、その全長にわたって二本鎖であるdsRNAであり、すなわち、分子のいずれかの末端においてヌクレオチド突出部はない。明瞭性のために、siRNAの3'末端又は5'末端にコンジュゲートした化学的キャップ又は非ヌクレオチド化学的部位は、siRNAが突出部を有するか又は平滑末端であるかを決定するためには考慮されない。

【0287】

用語「アンチセンスストランド」とは、標的配列に実質的に相補的な領域を含むdsRNAのストランドをいう。本明細書中で用いるように、用語「相補性の領域」とは、本明細書中で定義するように、配列、例えば、標的配列に実質的に相補的なアンチセンスストランド上の領域をいう。相補性の領域が標的配列に対して十分に相補的でない場合、ミスマッチは末端領域において最も許容され、仮に存在する場合、一般的には、例えば5'及び/又は3'末端の6、5、4、3又は2ヌクレオチド内の、末端領域又は複数末端領域にある。

10

【0288】

用語「センスストランド」は、本明細書中で用いるように、アンチセンスストランドの領域に対して実質的に相補的である領域を含むdsRNAのストランドをいう。

用語「サイレンスとする」及び「の発現を阻害する」とは、それらが標的遺伝子に関する限り、本明細書中においては、遺伝子が転写され、かつ遺伝子の発現が阻害されるように処理された第1の細胞又は細胞群から単離され得る遺伝子から転写されるmRNA量が、第1の細胞又は細胞群と実質的に同一の、但し同様には処理されていない第2の細胞又は細胞群（対照細胞）と比較すると、低下することによって明らかになるような、少なくとも部分的な遺伝子発現の抑制をいう。抑制の程度は、通常、

20

【0289】

【数1】

$$\frac{(\text{対照細胞におけるmRNA}) - (\text{処理細胞におけるmRNA})}{(\text{対照細胞におけるmRNA})} \cdot 100\%$$

30

【0290】

の各項で表される。

別法として、阻害の程度は、遺伝子転写に機能的に関連するパラメータの低下、例えば、細胞によって分泌される遺伝子によってコード化される蛋白質の量、又はある種の表現型、例えば、アポトーシスを呈する細胞の数の項で与えることができる。原理的には、遺伝子サイレンシングは、構成的に、又はゲノムエンジニアリングによって、及びいずれかの適切なアッセイによって、標的を発現するいずれかの細胞において決定することができる。しかしながら、所定のdsRNAがどの程度遺伝子の発現を阻害するか測定するために参照が必要な場合、それは本発明の範囲に含まれるところであり、下記の実施例に示されるアッセイはそのような参照を提供する。

40

【0291】

例えば、ある場合には、遺伝子の発現は、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドの投与によって、少なくとも約20%、25%、35%、又は50%だけ抑制される。いくつかの実施形態において、遺伝子は、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドの投与によって、少なくとも約60%、70%、又は80%だけ抑制される。いくつかの実施形態において、遺伝子は、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドの投与によって少なくとも約85%、90%、又は95%だけ抑制される。

【0292】

本明細書中で用いるように、用語「治療する」、「治療」等とは、特定の遺伝子を下方制御により調節することができる病理学的プロセスからの救済、又は緩和をいう。本発明

50

との関係では、それが（遺伝子を下方制御により調節することができる病理学的プロセス以外の）以下に本明細書中で引用する他の条件のいずれかに関する限り、そのような疾患に関連する少なくとも1つの症状を軽減し、又は緩和し、あるいはそのような疾患の進行を遅らせ、又は逆進させることを意味する。

【0293】

本明細書中で用いるように、表現「治療上有効量」及び「予防上有効量」とは、遺伝子を下方制御により調節することができる病理学的プロセスの、あるいは遺伝子を下方制御により調節することができる病理学的プロセスの明白な症状の治療、予防、又は管理における治療的利点を提供する量をいう。治療的に効果的な具体的な量は通常の治療実施者によって容易に決定することができ、例えば、遺伝子を下方制御により調節することができる病理学的プロセスの患者の病歴及び年齢、遺伝子発現を下方制御により調節することができる病理学的プロセスの段階、及び遺伝子発現を下方制御により調節することができる他の抗病理学的プロセスの投与のような当該分野で公知の因子によって変化し得る。患者を治療する関係での有効量は治療的利点を生じさせるのに十分である。用語「治療的利点」とは本明細書中で用いるように、患者の細胞増殖性疾患の医学的処置に関係して、患者の健康を促進し、又は高めるものをいう。この非限定的例の列挙は、ある期間の患者の生命の延長、病性新生物発生の低下又は遅延、腫瘍成長の低下、転移の遅延、癌細胞、腫瘍細胞、又はいずれかの他の過剰増殖細胞の増殖速度の低下、何らかの処理細胞あるいは処理細胞の影響を受けたいずれかの細胞におけるアポトーシスの誘導、及び/又は患者の状態に依存し得る患者への疼痛の減少を含む。

10

20

【0294】

本明細書中で用いるように、「医薬組成物」は、薬理学上有効量のオリゴヌクレオチド剤及び医薬上許容される担体を含む。本明細書中で用いるように、「薬理学上有効量」、「治療上有効量」又は単に「有効量」とは、意図した薬理的、治療的、予防的結果を生じさせるのに有効なRNAの量をいう。例えば、所定の臨床的処置が、病気又は障害に関連する測定可能なパラメータの少なくとも25%の低下がある場合に有効であると考えられるとき、その病気又は障害の治療のための薬物の治療上有効量は、そのパラメータの少なくとも25%低下を行うのに必要な量である。

【0295】

用語「医薬上許容される担体」とは、治療剤の投与用の担体をいう。そのような担体は限定されるものではないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール及びその組合せを含み、後により詳細に記載する。該用語は具体的には細胞培地を除く。

30

【0296】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細は、添付の図面、及び以下の記載において説明される。本発明の他の特徴、目的、及び利点は明細書及び図面、及び請求の範囲から明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0297】

【図1】種々のND98組成物の効果を比較する棒グラフを示す。

40

【図2】種々のND98組成物の効果を比較する棒グラフを示す。

【図3】ND98の6-テイルド異性体の効果を示す棒グラフを示す。

【図4】2つの異なる手順を用いて調製された会合複合体の効果を比較する棒グラフを示す。

【図5】種々の鎖長を有するものを含む種々のPEG脂質部位を示す。

【図6】会合複合体の効果を比較する棒グラフを示す。

【図7】siRNAに対する脂質の比率の低下に伴う種々の複合体の許容性を比較する棒グラフを示す。

【図8】核酸を負荷する会合複合体の製造方法のフローチャートである

【図9】2つの標的FVII及びApobでのsiRNAの効果を示す棒グラフである。

50

【図 1 0】核酸を負荷した会合複合体を作製するためのプロセスのフローチャートである。

【図 1 1】サイレンシングアッセイにおける核酸の効果に対する会合複合体の粒子サイズの効果を示す棒グラフである。

【図 1 2】a 及び b は、調製されていない、及び調製された形態における核酸治療剤の血清中半減期を比較する棒グラフである。

【図 1 3】様々な鎖長を持つ P E G 脂質を有する会合複合体の効果を比較する棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0298】

10

R N A のような核酸ベースの治療剤を投与するのに有用な脂質製剤及び送達システムを本明細書に記載する。

カチオン性脂質化合物及び脂質製剤

ポリアミン脂質製剤

出願人は、ある種のポリアミン脂質部位が s i R N A のような核酸の投与のための望ましい特性を提供することを発見した。いくつかの実施形態において、脂質部位は、例えば、第 V I I 分子標的化 s i R N A と複合体化され、マウスのような動物に投与される。次いで、分泌された血清中第 V I I 因子のレベルを定量し（投与後 2 4 時間）、ここで第 V I I 因子サイレンシングの程度はイン・ビボ s i R N A 送達の程度を示す。従って、s i R N A のような核酸の向上したイン・ビボ送達を提供する脂質が好ましい。特に出願人は、本明細書中に記載する置換を有するポリアミンが、生物学的利用性、生物分解性、及び許容性のような s i R N A を送達するための望ましい特性を有し得ることを発見した。

20

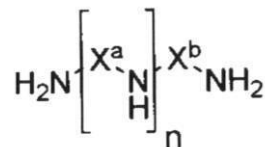
【0299】

一実施形態において、脂質製剤は、それに結合したアクリルアミド置換基又は、アクリレート置換基のような複数の置換基を有するポリアミン部位を含む。例えば、脂質部位は以下に示されるポリアミン部位：

【0300】

【化 8 0】

30



【0301】

を含むことができ、1つ以上の水素原子は、例えば、いくつかの実施形態においてはさらに置換された長鎖アルキル、アルケニル、又はアルキニル部位を含む置換基で置換されている。X<sup>a</sup> 及び X<sup>b</sup> は共にアルキレン部位である。いくつかの実施形態において、X<sup>a</sup> 及び X<sup>b</sup> は同一の鎖長を有し、例えば、X<sup>a</sup> 及び X<sup>b</sup> は共にエチレン部位である。他の実施形態は、X<sup>a</sup> 及び X<sup>b</sup> は異なる鎖長のものである。いくつかの実施形態において、ポリアミンが複数の X<sup>a</sup> 部位を含む場合、X<sup>a</sup> は 1 以上の出現に伴って変化し得る。例えば、ポリアミンがスペルミンである場合、1つの出現における X<sup>a</sup> はプロピレンであり、もう 1つの出現における X<sup>a</sup> はブチレンであって、X<sup>b</sup> はプロピレンである。

40

【0302】

出願人は、いくつかの例において、ポリアミン上の比較的高い置換度を有することが望ましいことを発見した。例えば、いくつかの実施形態において、出願人は、製剤中のポリアミンの少なくとも 80%（例えば、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は実質的に全て）が置換基で置換された、少なくとも n + 2 の水素を有するポリアミン製剤が、例えば、s i R N A のような核酸の投与で用いるための望ましい特性を提供するこ

50

とを見出した。

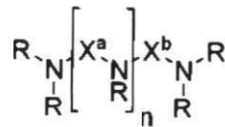
【0303】

いくつかの場合において、ポリアミンの窒素上の置換基に存在する1つ以上のヘテロ原子を有することが望ましい(好ましい)。

いくつかの実施形態において、製剤は式(I)：

【0304】

【化81】



10

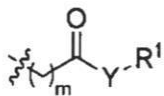
式(I)

【0305】

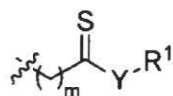
[各 $X^a$ 及び $X^b$ は、各出現について、独立して $C_{1-6}$ アルキレンであり、 $n$ は0、1、2、3、4、又は5であり、各 $R$ は独立してH、

【0306】

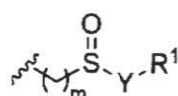
【化82】



$R_a$



$R_b$

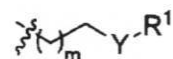


$R_c$



$R_d$

又は



$R_e$

20

【0307】

であり、製剤中の式(I)の化合物の分子の少なくとも約80%におけるR部位の少なくとも $n+2$ はHではなく、 $m$ は1、2、3又は4であり、 $Y$ はO、 $NR^2$ 、又はSであり、 $R^1$ はアルキル、アルケニル又はアルキニルである、その各々は所望により置換されており、かつ $R^2$ はH、アルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、その各々は所望により置換されており、但し、 $n=0$ の場合、R部位の少なくとも $n+3$ はHではない]の化合物又はその医薬上許容される塩を含む。

30

【0308】

上述したように、製剤は対称ならびに非対称ポリアミン誘導体を含む分子を含む。従って、 $X^a$ は各出現について独立しており、及び $X^b$ は $X^a$ から独立している。例えば、 $n$ が2である場合は、 $X^a$ は各出現について同一であり得、あるいは各出現について異なり得、あるいはいくつかの出現について同一であり得、かつ1以上の他の出現について異なり得る。 $X^b$ は、各ポリアミン誘導体における $X^a$ の出現の数にかかわらず、 $X^a$ から独立している。各出現についての、かつ $X^b$ から独立した $X^a$ はメチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、又はヘキシレンであり得る。例示的なポリアミン誘導体は $N^1$ 、 $N^1$ '-(エタン-1,2-ジイル)ジエタン-1,2-ジアミン、エタン-1,2-ジアミン、プロパン-1,3-ジアミン、スペルミン、スペルミジン、ブトレシン、及び $N^1$ -(2-アミノエチル)-プロパン-1,3-ジアミンをから誘導されたポリアミンを含む。好ましいポリアミン誘導体はプロパン-1,3-ジアミン及び $N^1$ 、 $N^1$ '-(エタン-1,2-ジイル)ジエタン-1,2-ジアミンを含む。

40

【0309】

式(I)のポリアミンはHではない少なくとも $n+2$ のR部位で置換されている。一般に、各非水素R部位は、リンカーを介してポリアミン誘導の窒素に結合され、所望により1以上の置換基で置換されたアルキル、アルケニル、又はアルキニル部位を含む。適切なリンカーはアミド、エステル、チオエステル、スルホン、スルホキシド、エーテル、アミン、及びチオエテルを含む。多くの場合において、リンカー部位はアルキレン部位(例えば、メチレン、エチレン、プロピレン、又はブチレン)を介してポリアミンの窒素に結合

50

している。例えば、アミド又はエステルリンカーはメチレン又はエチレン部位を通じてポリアミンの窒素に結合している。

【0310】

好ましいアミン置換基の例を以下に示す：

【0311】

【化83】



10

【0312】

アミンがエチレン基を介してリンカー R<sup>1</sup> 部分に結合している場合には、1,4-共轭ゲートド前駆体アクリレート又はアクリルアミドをポリアミンと反応させて、置換されたポリアミンを提供することができる。アミンがメチレン基を介してリンカー R<sup>1</sup> 部分に結合する場合、アルファ-クロロ部位のようなアルファ-ハロ置換基を含めたアミド又はエステルをポリアミンと反応させ、置換されたポリアミンを提供することができる。好ましい実施形態において、R<sup>2</sup> は H である。

【0313】

H でない R 部位は全て、前記で提供した R<sup>1</sup> 部位を必要とする。一般に、R<sup>1</sup> 部位は C<sub>6</sub>-C<sub>32</sub> アルキル、C<sub>6</sub>-C<sub>32</sub> アルケニル又は C<sub>6</sub>-C<sub>32</sub> アルキニルのような長鎖部位である。

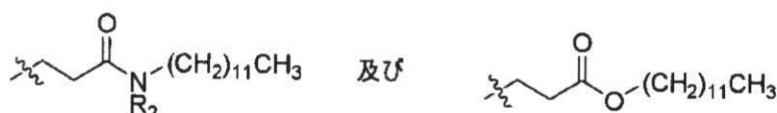
20

【0314】

いくつかの好ましい実施形態において、R<sup>1</sup> はアルキル部位である。例えば、R<sup>1</sup> は C<sub>12</sub> アルキルのような C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> アルキルである。特に好ましい R 部位の例を以下に示す。

【0315】

【化84】



30

【0316】

式 (I) の化合物を含む製剤は式 (I) の複数の化合物の混合物であり得る。例えば、製剤は、ポリアミン部位上の様々な置換度を有する式 (I) の化合物の混合物を含むことができる。しかしながら、本明細書中に記載された製剤は、製剤中の式 (I) の化合物の分子の少なくとも約 80% (例えば、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は実質的に全て) における R 部位の少なくとも n+2 が H ではないように選択される。

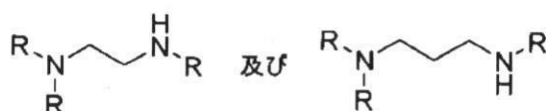
【0317】

いくつかの実施形態において、製剤は2つのアミノ基を有するポリアミン部位を含み、混合物中の式 (I) の分子の少なくとも 80% (例えば、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は実質的に全て) は、H ではない3つの R 部位で置換されている。式 (I) の例示的な化合物を以下に示す。

40

【0318】

【化85】



50

【0319】

いくつかの好ましい実施形態において、Rは

【0320】

【化86】



【0321】

である。

10

いくつかの好ましい実施形態において、R<sup>1</sup>はC<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>アルキル、又はC<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>アルケニルである。

【0322】

いくつかの実施形態において、製剤は3又は4つ（例えば、4つ）のアミノ基を有するポリアミン部位を含み、式(I)の分子の少なくとも約80%（例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は実質的に全て）におけるR部位の少なくともn+2はHではない。4つのアミノ部位を有する式(I)の例示的な化合物を以下に示す。

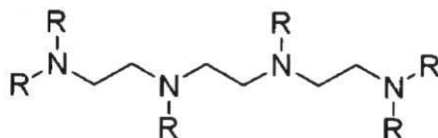
【0323】

全ての（すなわち、n+4）R部位がHではないポリアミン部位の例は以下のものである。

20

【0324】

【化87】



【0325】

いくつかの好ましい実施形態において、Rは

30

【0326】

【化88】



【0327】

である。

40

いくつかの好ましい実施形態において、R<sup>1</sup>はC<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>アルキル（例えば、C<sub>12</sub>アルキル）、又はC<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>アルケニルである。

【0328】

5つの（すなわち、n+3）R部位がHではないポリアミン部位の例を以下に示す。

【0329】

【化89】



【0330】

いくつかの好ましい実施形態において、Rは

50

【0331】

【化90】



【0332】

である。

いくつかの好ましい実施形態において、R<sup>1</sup>はC<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>アルキル（例えば、C<sub>12</sub>アルキル）又はC<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>アルケニルである。

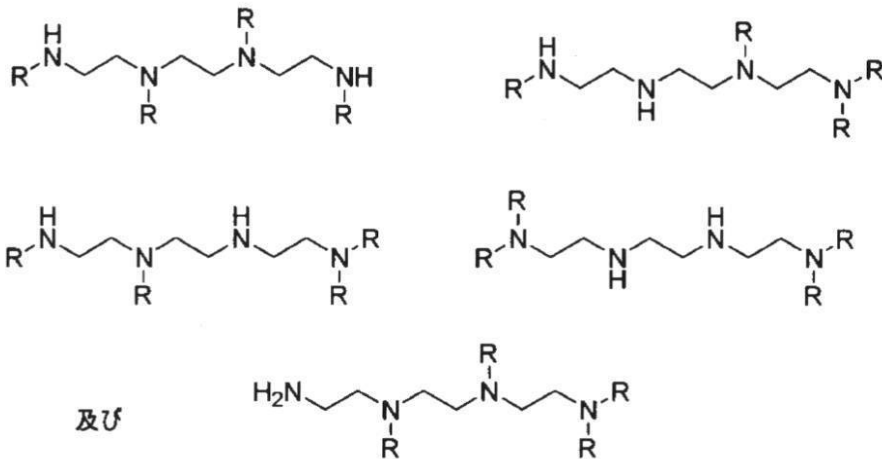
10

【0333】

4つの（すなわちn+2）R部位がHではないポリアミン部位の例を以下に示す。

【0334】

【化91】



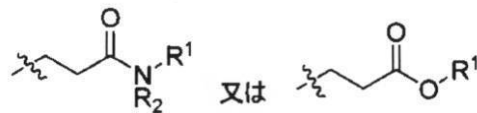
20

【0335】

いくつかの好ましい実施形態において、Rは

【0336】

【化92】



【0337】

である。

いくつかの好ましい実施形態において、R<sup>1</sup>はC<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>アルキル（例えば、C<sub>12</sub>アルキル）、C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>アルケニルである。

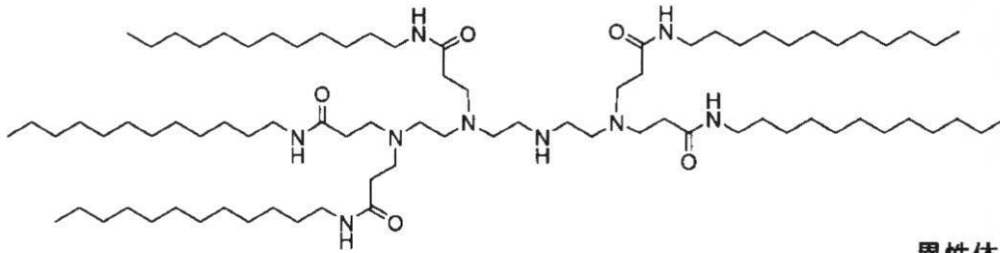
【0338】

いくつかの好ましい実施形態において、ポリアミンは以下の異性体（1）又は（2）の化合物、好ましくは異性体（1）の化合物である。

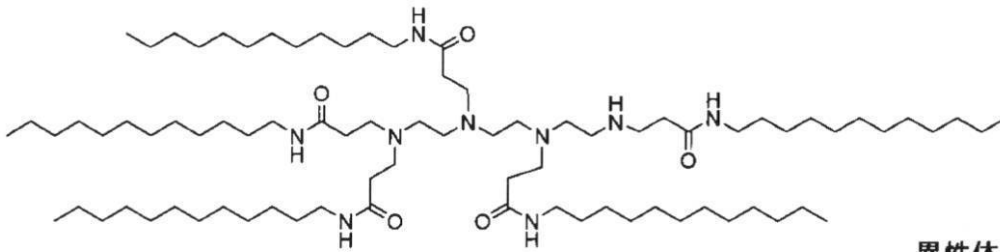
40

【0339】

## 【化 9 3】



異性体 (1)



異性体 (2)

10

## 【0340】

いくつかの実施形態において、式 (I) の化合物を含む製剤は式 (I) を有する分子の混合物を含む。例えば、混合物は、H ではない異なる程度の R 置換基のような、同一のポリアミンコアを有するが、異なる R 置換基を有する分子を含む。

20

## 【0341】

いくつかの実施形態において、単一のポリアミンコアを有する式 (I) の化合物を含み、ポリアミンコアの各 R は R 又は

## 【0342】

## 【化 9 4】



30

## 【0343】

のような単一部位である。製剤は、従って、式 (I) を有する分子の混合物を含み、該混合物は H である様々な数の R 部位を有する式 (I) のいずれかのポリアミン化合物及び / 又は H ではない単一の所定の数の R 部位を有する式 (I) のポリアミン化合物よりなり、式 (I) の化合物は、先に示された構造異性体のようなポリアミンの構造異性体である。

## 【0344】

いくつかの好ましい実施形態において、製剤は、分子の少なくとも 80% (例えば、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は実質的に全て) が単一の構造異性体であるような、式 (I) の分子を含む。

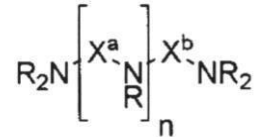
40

## 【0345】

いくつかの実施形態において、製剤は 2 つ以上の式 (I) の化合物の混合物を含む。いくつかの実施形態において、製剤は同一化学式の構造異性体の混合物である。いくつかの実施形態において、製剤は式 (I) の化合物の混合物であり、該化合物は R 置換基の化学的性質が変化する。例えば、製剤は以下の化合物、

## 【0346】

【化95】



式(I)

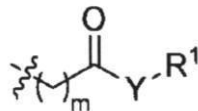
【0347】

[式中、nは0であり、各Rは独立してH又は

10

【0348】

【化96】



【0349】

である]

及び：

【0350】

20

【化97】



式(I)

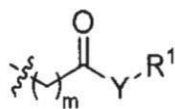
【0351】

[式中、nは2であり、各Rは独立してH又は

30

【0352】

【化98】



【0353】

である]

の混合物を含むことができる。

いくつかの実施形態において、式(I)の化合物は医薬上許容される塩のような塩の形態である。塩は、例えば、1つのアニオンと、本明細書中に記載された化合物上の正に荷電した置換基(例えば、アミノ基)との間に形成され得る。適切なアニオンは、フッ素、塩素、プロマイド臭素、ヨウ素、硫酸、重硫酸、硝酸、リン酸、クエン酸、メタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、酢酸、フマル酸、オレイン酸、吉草酸、マレイン酸、シュウ酸、イソニコチン酸、乳酸、サリチル酸、酒石酸、タンニン酸、パントテン酸、重酒石酸、アスコルビン酸、コハク酸、ゲンチシネート、グルコン酸、グルカロン酸、サッカレート、ギ酸、安息香酸、グルタミン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸及びパモ酸を含む。いくつかの好ましい実施形態において、式(I)の化合物は塩酸塩のようなヒドロライド塩である。

40

【0354】

式(I)の化合物は、水和物(例えば、(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>)及び溶媒和物の形態で存在させ

50

ることもでき、これは本開示に含まれる。

#### 生分解性カチオン脂質

本出願人らは1つ以上の生分解性部位を含むある種のカチオン性部位脂質を核酸治療剤（例えば、dsRNA）の送達用のリポソームのような会合複合体中の成分として用いることができることを発見した。例えば、本明細書中に開示されるのは、例えば、エステラーゼ、アミダーゼ、又はジスルフィド切断酵素のような酵素を介してイン・ビボにて切断に従うカチオン性脂質が本明細書中に開示される。いくつかの例において、脂質は、例えば、アセタール又はケタールのような酸不安定性部位の加水分解によって化学的に切断される。いくつかの実施形態において、脂質は、イン・ビトロ加水分解され、次いで、エステラーゼ、アミダーゼ又はジスルフィド切断酵素の1以上により、酵素切断を受ける部位を含む。これは、エンドソームのような細胞の小胞区画で起こり得る。もう1つの酸感受性切断結合はエンドソームの酸性環境で切断されるチオプロピオネート結合である（Jeongら *Bioconjugate Chem.* 2003, 4, 1426）。

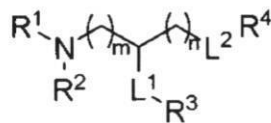
10

【0355】

いくつかの実施形態において、本発明は式(X)：

【0356】

【化99】



20

式(X)

【0357】

[式中、

R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は、各々独立してH、所望により1～4のR<sup>5</sup>で置換されたC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、所望により1～4のR<sup>5</sup>で置換されたC<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルケニルである、

R<sup>3</sup> 及び R<sup>4</sup> は、各々独立してアルキル、アルケニル、アルキニルであり、その各々は所望によりフルオロ、クロロ、プロモ、又はヨードで置換されており、

L<sup>1</sup> 及び L<sup>2</sup> は、各々独立して -NR<sup>6</sup>C(O)-、-C(O)NR<sup>6</sup>-、-OC(O)-、C(O)O-、-S-S-、-N(R<sup>6</sup>)C(O)N(R<sup>6</sup>)-、-OC(O)N(R<sup>6</sup>)-、N(R<sup>6</sup>)C(O)O-、-O-N=O-、又は-OC(O)NHであり、あるいは

30

L<sup>1</sup>-R<sup>3</sup> は L<sup>2</sup>-R<sup>4</sup> と共にアセタール又はケタールを形成することができ、

R<sup>5</sup> はフルオロ、クロロ、プロモ、ヨード、OR<sup>7</sup>、-N(R<sup>8</sup>)(R<sup>9</sup>)、-CN、SR<sup>10</sup>、S(O)R<sup>10</sup>、S(O)<sub>2</sub>R<sup>10</sup>であり、

R<sup>6</sup> はC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキルであり、

R<sup>7</sup> はH又はC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキルであり、

各R<sup>8</sup> 及び R<sup>9</sup> は独立して、H又はC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキルであり、

R<sup>10</sup> はH又はC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキルであり、

40

mは1、2、3、4、5、又は6であり、

nは0、1、2、3、4、5、又は6であるその医薬上許容される塩]

の化合物、又はその医薬上許容される塩を特徴とする。

【0358】

いくつかの実施形態において、R<sup>1</sup> はH、メチル、エチル、プロピル又はイソプロピルのような低級アルキル、又は2-ヒドロキシエチルのような置換されたアルキルである。

いくつかの実施形態において、R<sup>2</sup> はH、あるいはメチル、エチル、プロピル又はイソプロピルのような低級アルキルである。

【0359】

いくつかの実施形態において、R<sup>1</sup> 又は R<sup>2</sup> は式(X)の窒素と共にクアナジン部位を

50

形成する。

L<sup>1</sup> - R<sup>3</sup> 及び L<sup>2</sup> - R<sup>4</sup> 又はその組合せは、イン・ピボで切断される少なくとも1つの部位を提供する。いくつかの実施形態において、L<sup>1</sup> - R<sup>3</sup> 及び L<sup>2</sup> - R<sup>4</sup> の双方は生分解性である。例えば、L<sup>1</sup> - R<sup>3</sup> 及び L<sup>2</sup> - R<sup>4</sup> の双方は、独立して、(例えば、エステラーゼ、アミダーゼ、又はジスルフィド切断酵素による) 酵素分解を受ける。いくつかの実施形態において、L<sup>1</sup> 及び L<sup>2</sup> の双方はエステル、アミド又はジスルフィドのような同一の化学的単位である。他の例において、L<sup>1</sup> 及び L<sup>2</sup> は異なり、例えば、L<sup>1</sup> 又は L<sup>2</sup> はエステルであり、L<sup>1</sup> 又は L<sup>2</sup> の他方はジスルフィドである。

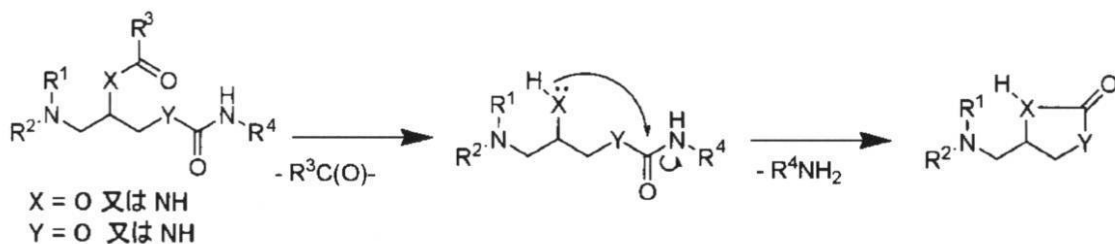
【0360】

いくつかの実施形態において、L<sup>1</sup> - R<sup>3</sup> は L<sup>2</sup> - R<sup>4</sup> と共にアセタール又はケタール部位を形成し、これは、イン・ピボにて加水分解される。

いくつかの実施形態において、L<sup>1</sup> - R<sup>3</sup> 又は L<sup>2</sup> - R<sup>4</sup> の1つは酵素切断に従う。例えば、L<sup>1</sup> - R<sup>3</sup> 又は L<sup>2</sup> - R<sup>4</sup> の一方はイン・ピボにて切断され、遊離ヒドロキシル部位又は遊離アミンを脂質上に供し、これは残りの L<sup>1</sup> - R<sup>3</sup> 又は L<sup>2</sup> - R<sup>4</sup> 部位と化学的に反応するのに利用できるようになる。例示的な実施形態を以下に示す：

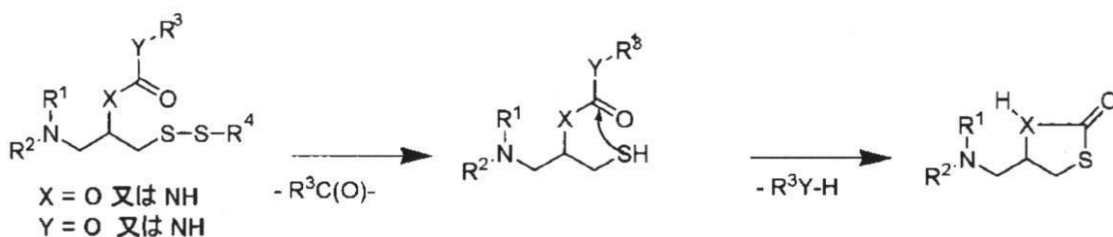
【0361】

【化100】



10

20



30

【0362】

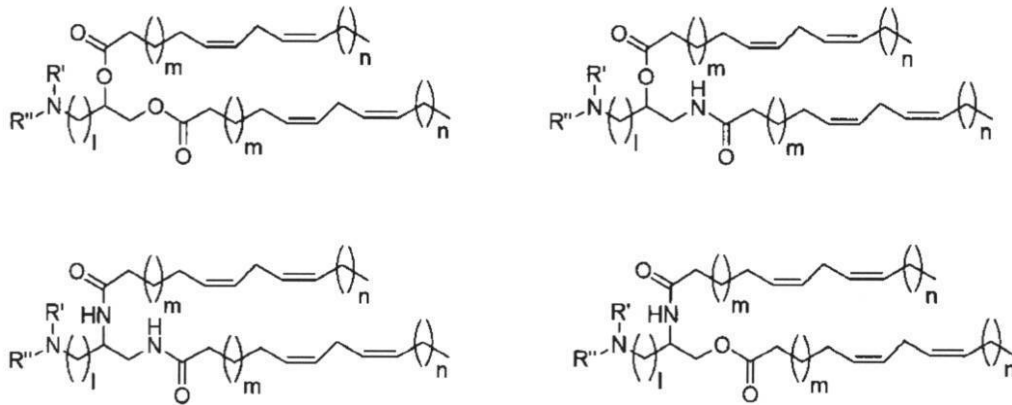
いくつかの好ましい実施形態において、カルバミン酸又は尿素部位は、アミド、エステル、又はジスルフィド部位との組合せに含まれる。例えば、脂質はエステル部位を含み、これは、切断(例えば、酵素切断)に際して、カルバミン酸又は尿素部位と化学的に反応するのに利用できるようになる。L<sup>1</sup> 及び L<sup>2</sup> のいくつかの好ましい組合せは、2つのアミド、2つのエステル、アミド及びエステル、2つのジスルフィド、アミド及びジスルフィド、エステル及びジスルフィド、カルバミン酸及びジスルフィド、尿素及びジスルフィドを含む。例示的な化合物を以下に示す：

40

Z 立体配置を持つアミド及びエステル結合(2つの二重結合)

【0363】

## 【化 1 0 1】



10

$R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{H}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{Me}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{Et}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{プロピル}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{イソプロピル}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$

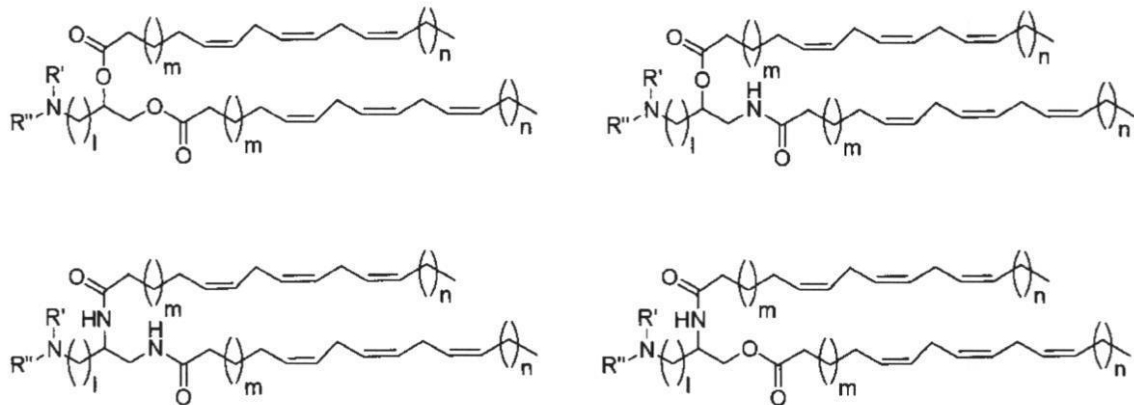
## 【 0 3 6 4】

Z 立体配置を持つアミドエステル結合 ( 3 つの二重結合 )

20

## 【 0 3 6 5】

## 【化 1 0 2】



30

$R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{H}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{Me}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{Et}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{プロピル}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{イソプロピル}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$

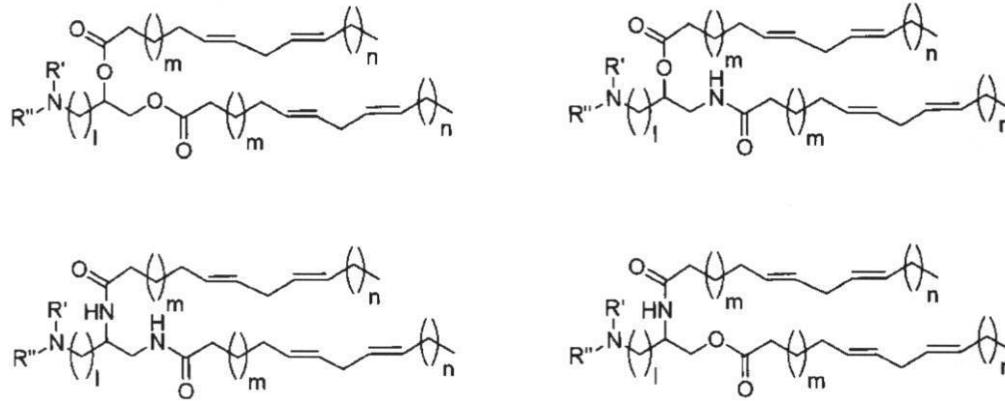
## 【 0 3 6 6】

E 立体配置を持つアミド及びエステル結合 ( 2 つの二重結合 )

40

## 【 0 3 6 7】

## 【化 1 0 3】



10

$R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は  $2\text{-ヒドロキシエチル}$  及び  $R'' = \text{H}; l = 1$  から  $6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は  $2\text{-ヒドロキシエチル}$  及び  $R'' = \text{Me}; l = 1$  から  $6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は  $2\text{-ヒドロキシエチル}$  及び  $R'' = \text{Et}; l = 1$  から  $6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は  $2\text{-ヒドロキシエチル}$  及び  $R'' = \text{プロピル}; l = 1$  から  $6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は  $2\text{-ヒドロキシエチル}$  及び  $R'' = \text{イソプロピル}; l = 1$  から  $6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$

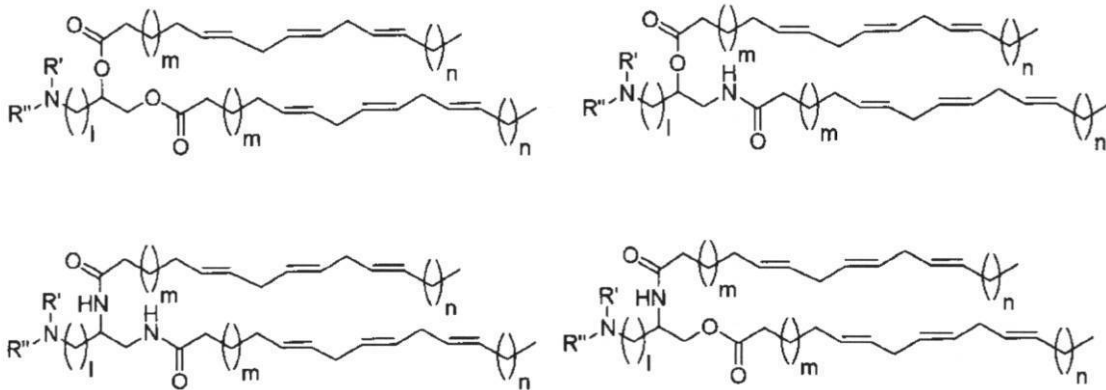
## 【 0 3 6 8】

E 立体配置を持つアミド及びエステル結合 ( 3 つの二重結合 )

20

## 【 0 3 6 9】

## 【化 1 0 4】



30

$R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は  $2\text{-ヒドロキシエチル}$  及び  $R'' = \text{H}; l = 1$  から  $6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は  $2\text{-ヒドロキシエチル}$  及び  $R'' = \text{Me}; l = 1$  から  $6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は  $2\text{-ヒドロキシエチル}$  及び  $R'' = \text{Et}; l = 1$  から  $6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は  $2\text{-ヒドロキシエチル}$  及び  $R'' = \text{プロピル}; l = 1$  から  $6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は  $2\text{-ヒドロキシエチル}$  及び  $R'' = \text{イソプロピル}; l = 1$  から  $6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$

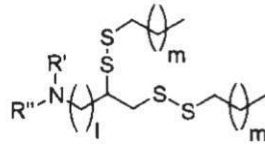
## 【 0 3 7 0】

ジスルフィド結合

40

## 【 0 3 7 1】

## 【化 1 0 5】



- $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{H}; l = 1$  から 6,  $m = 6-28$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{Me}; l = 1$  から 6,  $m = 6-28$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{Et}; l = 1$  から 6,  $m = 6-28$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{プロピル}; l = 1$  から 6,  $m = 6-28$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{イソプロピル}; l = 1$  から 6,  $m = 6-28$

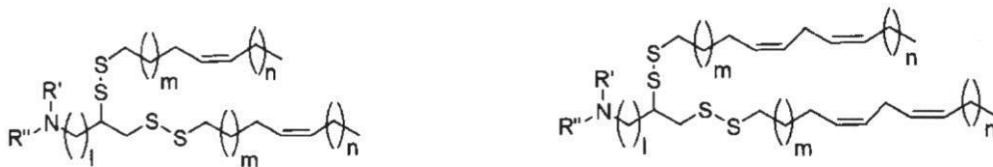
10

## 【 0 3 7 2】

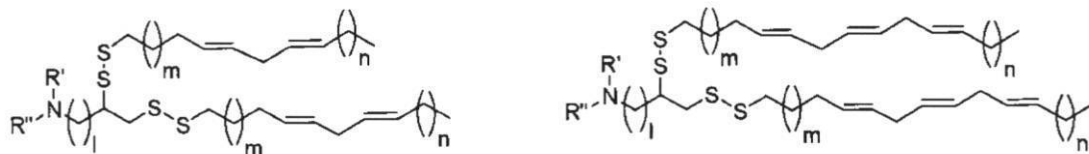
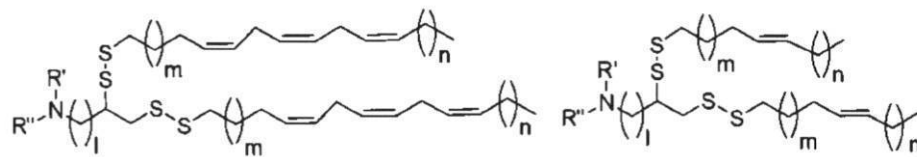
不飽和アルキル鎖、E及びZ立体配置を持つジスルフィド結合

## 【 0 3 7 3】

## 【化 1 0 6】



20



30

- $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{H}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{Me}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{Et}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{プロピル}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{イソプロピル}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$

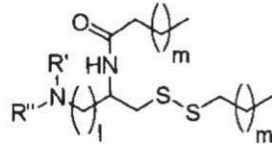
## 【 0 3 7 4】

飽和及び不飽和アルキル鎖を持つアミド及びジスルフィド結合

40

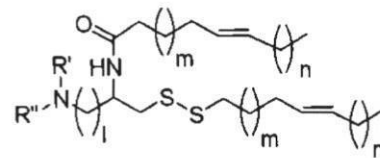
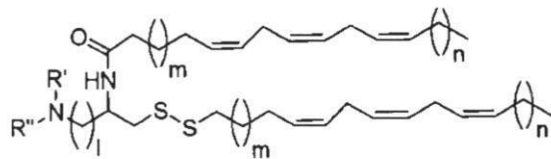
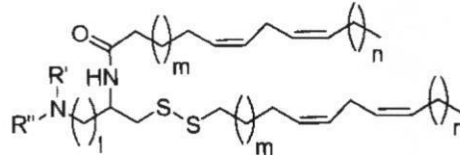
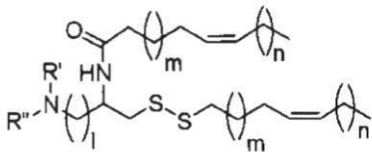
## 【 0 3 7 5】

【化 1 0 7】

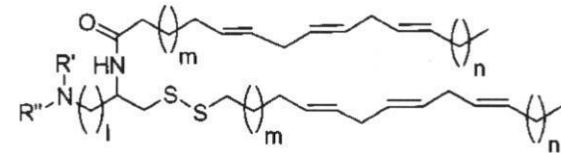
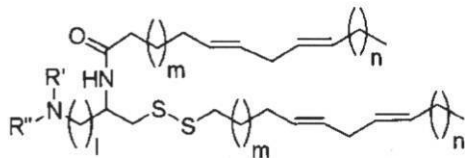


$R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{H}; l = 1$  から 6,  $m = 6-28$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{Me}; l = 1$  から 6,  $m = 6-28$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{Et}; l = 1$  から 6,  $m = 6-28$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{プロピル}; l = 1$  から 6,  $m = 6-28$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{イソプロピル}; l = 1$  から 6,  $m = 6-28$

10



20



$R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{H}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{Me}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{Et}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{プロピル}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル}$  又は 2-ヒドロキシエチル 及び  $R'' = \text{イソプロピル}; l = 1$  から 6,  $m = 1-8, n = 1-10$

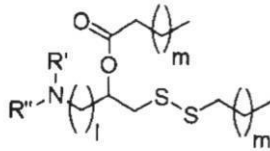
30

【 0 3 7 6】

飽和及び不飽和アルキル鎖を持つエステル及びジスルフィド結合

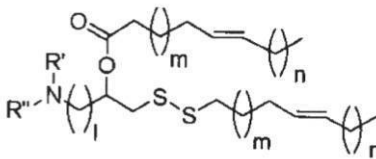
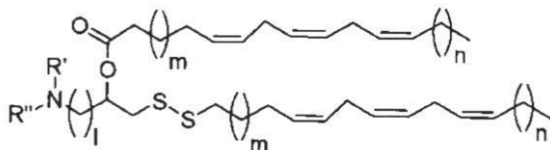
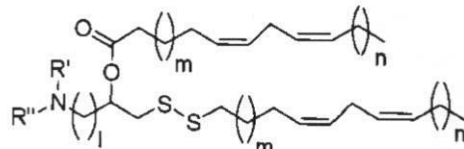
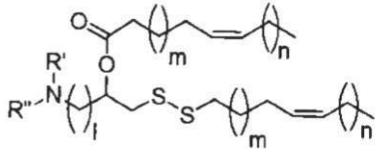
【 0 3 7 7】

【化 1 0 8】

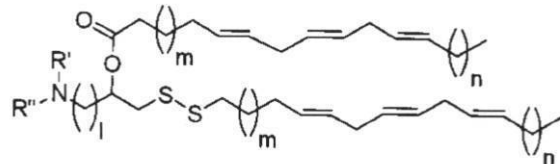
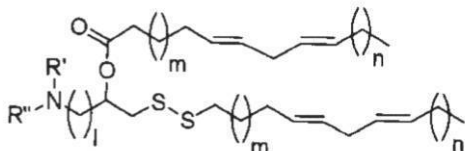


R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = H; l = 1 から 6, m = 6-28  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = Me; l = 1 から 6, m = 6-28  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = Et; l = 1 から 6, m = 6-28  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = プロピル; l = 1 から 6, m = 6-28  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = イソプロピル; l = 1 から 6, m = 6-28

10



20



R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = H; l = 1 から 6, m = 1-8, n = 1-10  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = Me; l = 1 から 6, m = 1-8, n = 1-10  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = Et; l = 1 から 6, m = 1-8, n = 1-10  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = プロピル; l = 1 から 6, m = 1-8, n = 1-10  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = イソプロピル; l = 1 から 6, m = 1-8, n = 1-10

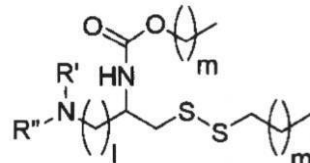
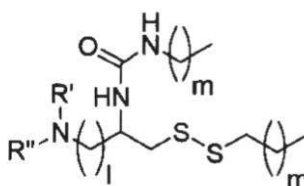
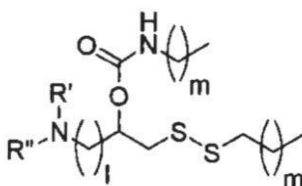
30

【 0 3 7 8】

アルキル鎖を持つカルバミン酸又は尿素及びジスルフィド結合

【 0 3 7 9】

【化 1 0 9】



40

R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = H; l = 1 から 6, m = 6-28  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = Me; l = 1 から 6, m = 6-28  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = Et; l = 1 から 6, m = 6-28  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = プロピル; l = 1 から 6, m = 6-28  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = イソプロピル; l = 1 から 6, m = 6-28

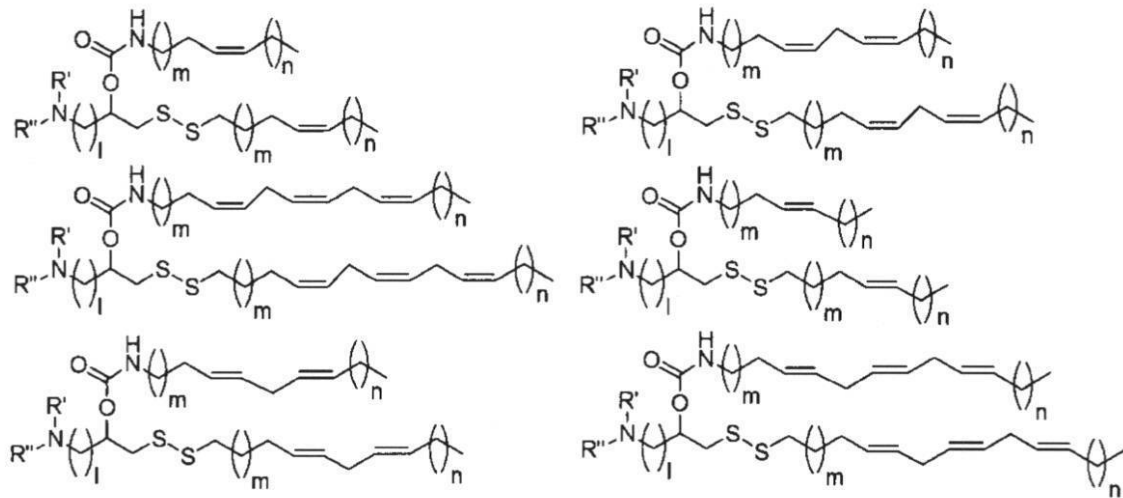
【 0 3 8 0】

50

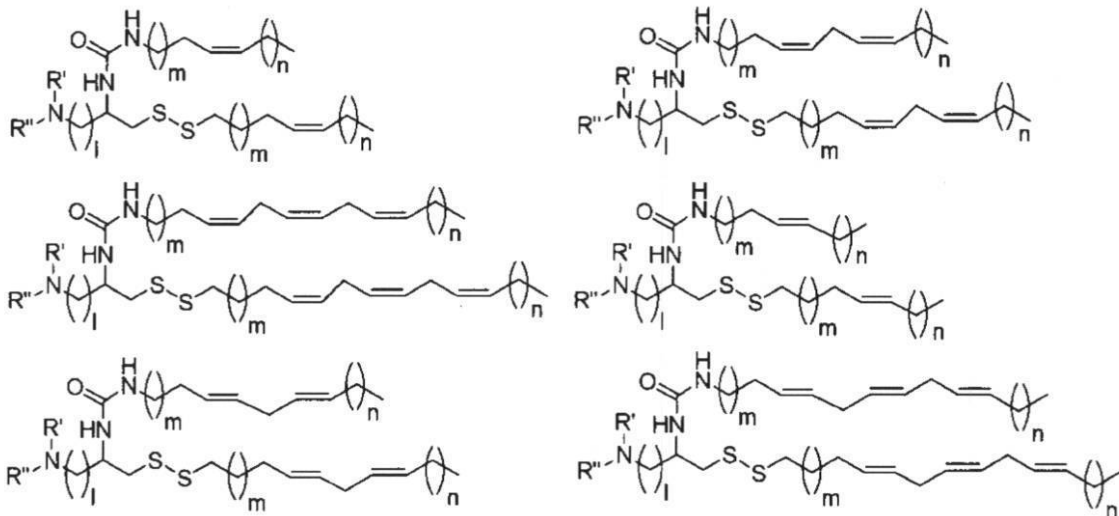
不飽和アルキル鎖を持つカルバミン酸又は尿素及びジスルフィド結合

【0381】

【化110】



10



20

30

R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = H; l = 1 から 6, m = 6-28  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = Me; l = 1 から 6, m = 6-28  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = Et; l = 1 から 6, m = 6-28  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = プロピル; l = 1 から 6, m = 6-28  
 R' = H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び R'' = イソプロピル; l = 1 から 6, m = 6-28

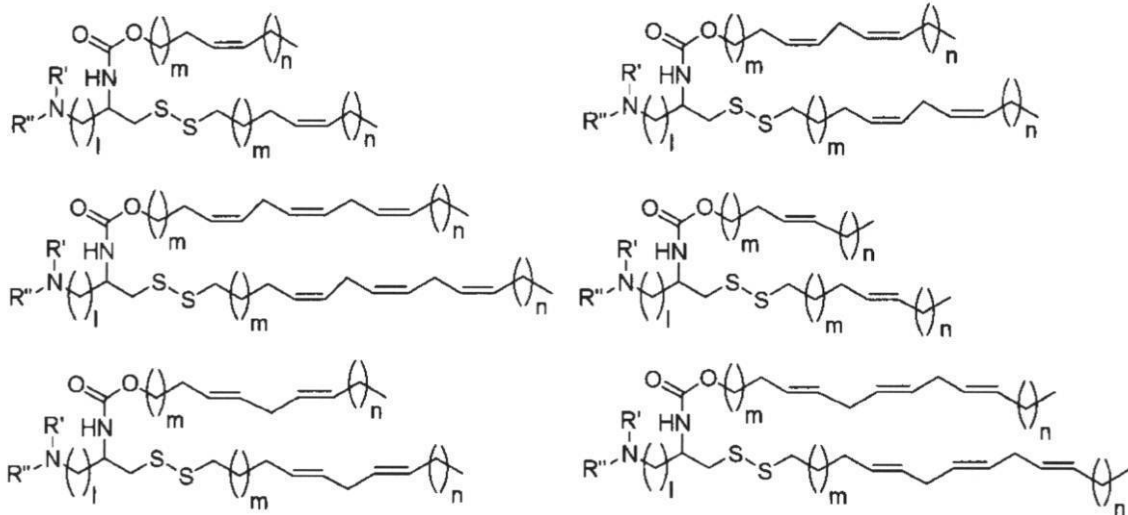
【0382】

不飽和アルキル鎖を持つカルバミン酸又は尿素及びジスルフィド結合

【0383】

40

## 【化 1 1 1】



- $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び } R'' = \text{H; } l = 1 \text{ から } 6, m = 6-28$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び } R'' = \text{Me; } l = 1 \text{ から } 6, m = 6-28$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び } R'' = \text{Et; } l = 1 \text{ から } 6, m = 6-28$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び } R'' = \text{プロピル; } l = 1 \text{ から } 6, m = 6-28$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び } R'' = \text{イソプロピル; } l = 1 \text{ から } 6, m = 6-28$

10

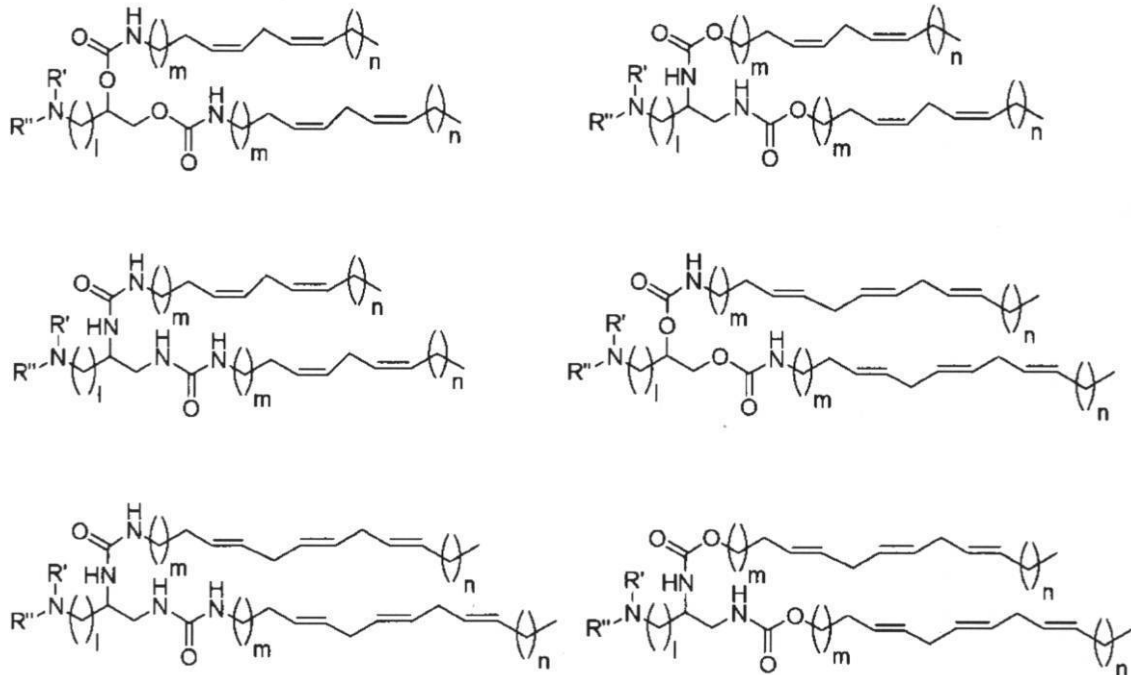
20

## 【 0 3 8 4】

不飽和アルキル鎖を持つカルバミン酸又は尿素結合

## 【 0 3 8 5】

## 【化 1 1 2】



- $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び } R'' = \text{H; } l = 1 \text{ から } 6, m = 1-10, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び } R'' = \text{Me; } l = 1 \text{ から } 6, m = 1-10, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び } R'' = \text{Et; } l = 1 \text{ から } 6, m = 1-10, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び } R'' = \text{プロピル; } l = 1 \text{ から } 6, m = 1-10, n = 1-10$   
 $R' = \text{H, Me, Et, プロピル, イソプロピル 又は 2-ヒドロキシエチル 及び } R'' = \text{イソプロピル; } l = 1 \text{ から } 6, m = 1-10, n = 1-10$

30

40

## 【 0 3 8 6】

いくつかの実施形態において、脂質は酸性切断を受けることができるオキシム、又はヒ

50

ドラゾンを含む。

$R^3$  及び  $R^4$  は、一般に、アルキル、アルケニル、又はアルキニルのような長鎖疎水性部位である。いくつかの実施形態において、 $R^3$  及び  $R^4$  は八口部位で置換され、例えば、ペルフルオロアルキル又はペルフルオロアルケニル部位を提供する。 $R^3$  及び / 又は  $R^4$  の各々は相互に独立している。いくつかの実施形態において、 $R^3$  及び  $R^4$  の双方は同一である。いくつかの実施形態において、 $R^3$  及び  $R^4$  は異なる。

【0387】

いくつかの実施形態において、 $R^3$  及び  $R^4$  はアルキルである。例えば、 $R^3$  及び  $R^4$  の一方又は双方は  $C_6 \sim C_{30}$  アルキル、例えば、 $C_{10} \sim C_{26}$  アルキル、 $C_{12} \sim C_{20}$  アルキル、又は  $C_{12}$  アルキルである。

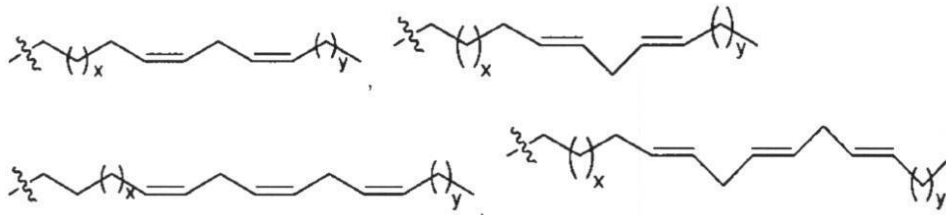
10

【0388】

いくつかの実施形態において、 $R^3$  及び / 又は  $R^4$  はアルケニルである。いくつかの好ましい実施形態において、 $R^3$  及び / 又は  $R^4$  は2又は3の二重結合を含む。例えば、 $R^3$  及び  $R^4$  は2つの二重結合を含み、あるいは  $R^3$  及び / 又は  $R^4$  は3つの二重結合を含む。二重結合は各々独立して、Z又はE立体配置を有する。例示的なアルケニル部位を以下に示す：

【0389】

【化113】



20

【0390】

[式中、 $x$  は1～8の整数であり、かつ  $y$  は1～10の整数である]

いくつかの好ましい実施形態において、 $R^3$  及び / 又は  $R^4$  は、例えば、Z立体配置を有する2つの二重結合のような、2つの二重結合を有する  $C_6 \sim C_{30}$  アルケニル、例えば、 $C_{10} \sim C_{26}$  アルケニル、及び  $C_{12} \sim C_{26}$  アルケニル、又は  $C_{17}$  アルケニルである。 $R^3$  及び / 又は  $R^4$  は同一であるか、又は異なってもよい。いくつかの好ましい実施形態において、 $R^3$  及び  $R^4$  は同一である。

30

【0391】

いくつかの実施形態において、 $R^3$  及び / 又は  $R^4$  はアルキニルである。例えば、 $C_6 \sim C_{30}$  アルキニル、例えば、 $C_{10} \sim C_{26}$  アルキニル、 $C_{12} \sim C_{20}$  アルキニル。 $R^3$  及び / 又は  $R^4$  は1～3つの三重結合、例えば、1、2又は3つの三重結合を有することができる。

【0392】

いくつかの実施形態において、式(X)の化合物は医薬上許容される塩のような塩の形態である。塩は、例えば、アニオンと本明細書中に記載された化合物上の正に荷電した置換基(例えば、アミノ)との間で形成することができる。適切なアニオンは、フッ素、塩素、プロマイド臭素、ヨウ素、硫酸、重硫酸、硝酸、リン酸、クエン酸、メタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、酢酸、フマル酸、オレイン酸、吉草酸、マレイン酸、シュウ酸、イソニコチン酸、乳酸、サリチル酸、酒石酸、タンニン酸、パントテン酸、重酒石酸、アスコルビン酸、コハク酸、ゲンチシネート、グルコン酸、グルカロン酸、サッカレート、ギ酸、安息香酸、グルタミン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸及びパモ酸を含む。いくつかの好ましい実施形態において、式(X)の化合物は塩酸塩のようなヒドロライド塩である。

40

【0393】

式(X)の化合物は水和物(例えば、 $(H_2O)_n$ )及び溶媒和物の形態で存在させる

50

こともでき、これは本開示に含まれる。

#### PEG脂質化合物

出願人らは、ある種のPEG含有脂質部位が、一本鎖、又は二本鎖、核酸、例えば、siRNAのような核酸剤の投与のための望ましい特性を提供することを見出した。例えば、本明細書中に記載された脂質のようなPEG含有脂質が、siRNAのような核酸部位と共に会合複合体に調製され、患者に投与される場合、脂質は核酸部位の向上した送達を提供する。この向上した送達は、例えば、FVIIのサイレンシングのような遺伝子サイレンシングアッセイにおける評価によって決定することができる。特に出願人らは、式(XV)のPEG脂質が、改善された生物学的利用性、生分解性、及び許容性を含めた、siRNAの送達のための望ましい特性を有することを見出した。

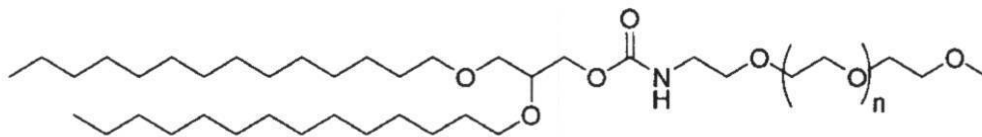
10

#### 【0394】

いくつかの実施形態において、PEGは、リンカー部位を介して、長鎖アルキル部位のような2つの疎水性部位を含む構造に結合している。例示的なPEG脂質、例えば、式(XV)、(XV')、及び(XVI)によって含まれるものが提供される。いくつかの好ましい実施形態において、PEG脂質は以下の構造：

#### 【0395】

#### 【化114】



20

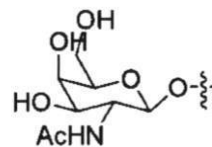
#### 【0396】

を有し、キラル中心の好ましい立体化学は「R」であり、反復するPEG部位は約2000ダルトンの合計平均分子量を有する。

いくつかの実施形態において、本明細書中に記載されたPEG脂質は標的部位、例えば、

#### 【0397】

#### 【化115】



30

#### 【0398】

のようなグリコシル部位にコンジュゲートしている。いくつかの実施形態において、標的部位はリンカー、例えば、本明細書中に記載されたリンカーを通じて、PEG脂質に結合している。例示的な標的化PEG脂質化合物は、本明細書中に記載された式(XXI)、(XXI')、(XXII)、及び(XXII')の化合物である。そのような脂質を作製する方法は、例えば、実施例42及び43に記載されている。

40

#### 【0399】

カチオン性脂質化合物及びカチオン性脂質含有製剤を作製する方法

本明細書中に記載された化合物は商業的供給源(例えば、アシネックス(A sinex)社、ロシア、モスクワ;バイオネット(Bionet)社、イギリス、カーメルフォード;ケムディヴ(ChemDiv)社、カリフォルニア州サンディエゴ;コムジェネックス(Comgenex)社、ハンガリー、ブダペスト;エナミン(Enamine)社、ウクライナ、キエフ;IFラブ(IF Lab)社、ウクライナraine;インターバイオスクリーン(Interbioscreen)社、ロシア、モスクワ;メイブリッジ(Maybridge)社、イギリス、ティンタジェル;スペックス(Specs)社、オランダthe netherlands;ティムテック(Timtec)社、デラウェア州ニューヨ

50

ーク；ヴィタス - Mラブ ( V i t a s - M L a b ) 社、ロシア、モスクワ) から入手することができるか、あるいは、商業的に入手可能な出発材料及び試薬を用いて、以下に示される従来法によって合成することができる。

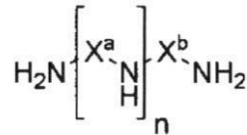
【 0 4 0 0 】

ポリアミン脂質の作製方法

いくつかの実施形態において、式 ( I ) の化合物は、以下に示される式 ( I I I ) :

【 0 4 0 1 】

【 化 1 1 6 】



10

式(III)

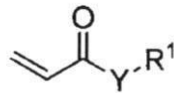
【 0 4 0 2 】

[ 式中、 $\text{X}^{\text{a}}$ 、 $\text{X}^{\text{b}}$ 、及び  $n$  は前記定義の通りである ]

のポリアミンを式 ( I V ) :

【 0 4 0 3 】

【 化 1 1 7 】



20

式(IV)

【 0 4 0 4 】

[ 式中、 $\text{Y}$  及び  $\text{R}^1$  は前記定義の通りである ]

の 1, 4 共役系と反応させて式 ( I ) の化合物を得ることによって作製することができる。

【 0 4 0 5 】

いくつかの実施形態において、式 ( I I I ) 及び ( I V ) の化合物を共に純物として ( すなわち、無溶媒 ) 反応させる。例えば、式 ( I I I ) 及び ( I V ) の化合物を高温 ( 少なくとも約 60 、少なくとも約 65 、少なくとも約 70 、少なくとも約 75 、少なくとも約 80 、少なくとも約 85 、少なくとも約 90 ) において、好ましくは約 90 にて純物として共に反応させる。

30

【 0 4 0 6 】

いくつかの実施形態において、式 ( I I I ) 及び ( I V ) の化合物を溶媒 ( 例えば、アセトニトリル又は DMF のような極性非プロトン性溶媒 ) と共に反応させる。例えば、式 ( I I I ) 及び ( I V ) の化合物を約 50 ~ 約 120 の高温にて溶媒中で共に反応させる。

【 0 4 0 7 】

いくつかの実施形態において、式 ( I I I ) 及び ( I V ) の化合物をラジカルクエンチャ又はスカベンジャー ( 例えば、ヒドロキノン ) の存在下で共に反応させる。ラジカルクエンチャを含む反応条件は、純物、又は、例えばアセトニトリル又は DMF のような極性非プロトン性溶媒中であり得る。反応は高温にて行うことができる ( 例えば、90 のような高温にて純物で、あるいは約 50 ~ 約 120 のような高温にて溶媒と共に ) 。用語「ラジカルクエンチャ」又は「ラジカルスカベンジャー」とは本明細書中で用いるように、反応混合物中でフリーラジカルを吸収することができる化学的部位をいう。ラジカルクエンチャ/スカベンジャーの例はヒドロキノン、アスコルビン酸、クレゾール、チアミン、3, 5 - G - t e r t - ブチル 4 - ヒドロキシトルエン、t e r t - ブチル 4 - ヒドロキシアニソール及びチオール含有部位を含む。

40

50

## 【0408】

いくつかの実施形態において、式(III)及び(IV)の化合物は、反応促進剤(例えば、水、又は酢酸、ホウ酸、クエン酸、安息香酸、トシル酸、ペンタフルオロフェノール、ピクリン酸、芳香族酸、炭酸水素塩、重硫酸塩、一及び二-水素リン酸塩のような塩、フェノール、ペルハロフェノール、ニトロフェノール、スルホン酸、PTTS等のようなミカエル付加促進剤)、好ましくは、飽和ホウ酸水溶液のようなホウ酸の存在下で共に反応させる。反応促進剤を含めた反応条件は純物、又は溶媒、例えば、アセトニトリル又はDMFのような極性非プロトン性溶媒中であり得る。反応は高温で行われ得る。(例えば、90のような高温にて純物、又は約50~約120のような高温において溶媒と共に)。本明細書中で用いるように、用語「反応促進剤」とは、反応混合物中で用いた場合に、反応速度を加速し/高める化学的部位をいう。

10

## 【0409】

式(IV)に対する式(III)の化合物の比率を変化させ、式(III)のポリアミン上の置換の変動をもたらすことができる。一般に、非水素部位で置換された少なくとも約50%の水素部位を有するポリアミンが好ましい。従って、式(III)/式(IV)の化合物の比率は、遊離アミンの比較的高程度の置換を有する生成物を提供するように選択される(例えば、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約99%、又は実質的に全て)。いくつかの好ましい実施形態において、nは式(III)のポリアミンにおいては0であって、式(IV)の化合物に対する式(III)の化合物の比率は約1:3~約1:5、好ましくは、約1:4である。いくつかの好ましい実施形態において、nは式(III)のポリアミンにおいては2であって、式(IV)の化合物に対する式(III)の化合物の比率は約1:3~約1:6、好ましくは約1:5である。

20

## 【0410】

いくつかの実施形態において、式(III)及び式(IV)の化合物を2工程プロセスで反応させた。例えば、最初の工程プロセスは、式(IV)の化合物の約3.8~約4.2モル当量と共に、式(III)の化合物の約0.8~約1.2モル当量を有する反応混合物を含み、第二の工程プロセスは、式(IV)の化合物の約0.8~約1.2モル当量の反応混合物への付加を含む。

30

## 【0411】

反応の完了に際して、式(I)を有する1つ以上の生成物を反応混合物から単離することができる。例えば、式(I)の化合物は単一の生成物(例えば、単一の構造異性体)として、又は生成物の混合物(例えば、複数の構造異性体及び/又は複数の式(I)の化合物)として単離することができる。いくつかの実施形態において、フラッシュクロマトグラフィ、重力クロマトグラフィ(例えば、シリカゲルを用いる異性体の重力分離)、カラムクロマトグラフィ(例えば、順相HPLC又はRPHPLC)、又は移動床クロマトグラフィのようなクロマトグラフィを用い、1つ以上の反応生成物を単離及び/又は精製することができる。いくつかの実施形態において、反応生成物は、単一の構造異性体のような単一化合物の少なくとも約80%を含有する製剤を提供するように精製される(例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約99%)。

40

## 【0412】

いくつかの実施形態において、遊離アミン生成物をHClのような酸で処理して、生成物のアミン塩(例えば、塩酸塩)が得られる。いくつかの実施形態において、塩生成物は、例えば、対応する遊離アミン生成物に対し、取扱い及び/又は貯蔵について改善された特性を提供する。いくつかの実施形態において、塩生成物は、対応する遊離アミンに対し、N-オキソド又はN-カルボネート形成のような分解生成物の形成を妨げ、又は形成速度を低下させることができる。いくつかの実施形態において、塩生成物は、対応する遊離

50

アミンに対して、治療製剤として用いるための改善された特性を有することができる。

【0413】

いくつかの実施形態において、反応混合物をさらに処理して、例えば、1つ以上の生成物を精製し、又は未反応出発物質のような不純物を除去する。いくつかの実施形態において、反応混合物を、未反応アクリルアミドを捕捉することができる固定化（例えば、ポリマー結合）チオール部位と反応させる。いくつかの実施形態において、単離された生成物を処理して、さらに、不純物を除去することができ、例えば、単離された生成物を固定化されたチオール部位で処理し、未反応アクリルアミド化合物を捕捉することができる。

【0414】

いくつかの実施形態において、反応生成物を固定化された（例えば、ポリマー結合）イソチオシアネートと反応させることができる。例えば、第三級アミンを含めた反応生成物を固定化されたイソチオシアネートで処理して、生成物から第一級及び/又は第二級アミンを除去することができる。

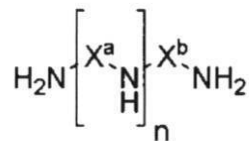
10

【0415】

いくつかの実施形態において、式(I)の化合物は、以下に示される式(III)：

【0416】

【化118】



20

式(III)

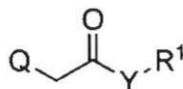
【0417】

[式中、 $X^a$ 、 $X^b$ 、及び $n$ は前記定義の通りである]

のポリアミンを、式(VI)：

【0418】

【化119】



30

式(IV)

【0419】

[式中、 $Q$ はCl、Br、又はIであって、 $Y$ 及び $R^1$ は前記定義の通りである]

と反応させることによって作製することができる。

いくつかの実施形態において、式(III)及び式(VI)の化合物は純物として共に反応させる。いくつかの実施形態において、式(III)及び式(VI)の化合物は、1つ以上の溶媒、例えば、アセトニトリル又はDMFのような極性非プロトン性溶媒の存在下で共に反応させる。いくつかの実施形態において、反応体式(III)及び式(VI)は、高温（例えば、少なくとも約50、少なくとも約60、少なくとも約70、少なくとも約80、少なくとも約90、少なくとも約100）において共に反応させる。

40

【0420】

いくつかの実施形態において、反応混合物は塩基、例えば、 $K_2CO_3$ のような炭酸塩も含む。

いくつかの実施形態において、反応混合物は触媒も含む。

【0421】

50

いくつかの実施形態において、式(VI)の化合物は、アミン部位を、酸無水物又は酸ハロゲン化物(例えば、酸塩化物)のような活性化された酸と反応させて、式(VI)の化合物を得ることによって調製される。

#### 【0422】

式(VI)に対する式(III)の化合物の比率は変化させることができ、式(III)のポリアミン上の置換の変動を提供する。一般に、非水素部位で置換された水素部位の少なくとも約50%を有するポリアミンが好ましい。従って、式(III)/式(VI)の化合物の比率は、遊離アミンの比較的高い程度の置換を有する生成物を提供するように選択される(例えば、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約99%、又は実質的に全て)。いくつかの好ましい実施形態において、nは式(II)のポリアミンにおいては0であって、式(VI)の化合物に対する式(III)の化合物の比率は約1:3~約1:5、好ましくは約1:4である。いくつかの好ましい実施形態において、nは式(III)のポリアミンにおいては2であって、式(VI)の化合物に対する式(III)の化合物の比率は約1:3~約1:6、好ましくは約1:5である。

10

#### 【0423】

いくつかの実施形態において、式(III)及び式(VI)の化合物は2工程プロセスで反応させる。例えば、第一の工程プロセスは、式(VI)の化合物の約3.8~約4.2モル当量と共に、式(III)の化合物の約0.8~約1.2モル当量を有する反応混合物を含み、第二の工程プロセスは式(VI)の化合物の約0.8~約1.2モル当量の反応混合物への付加を含む。

20

#### 【0424】

いくつかの実施形態において、式(III)のポリアミンを式(IV)又は(VI)の化合物と反応させるに先立って保護基を用い、式(III)の1以上のアミン部位を選択的に保護し、それにより、最終生成物の合成における改善された選択性を提供する。例えば、式(IV)又は(VI)の化合物との反応に先立って、式(III)のポリアミンの1つ以上の第一級アミンを保護することができ、第二級アミンと反応する式(IV)又は(VI)の化合物についての選択性を提供する。選択的に除去することができる直交保護基の使用等、他の保護基方策を使用して、第一級アミンに対する選択性を提供することができる。

30

#### 【0425】

反応の完了に際して、式(I)を有する1以上の生成物を反応混合物から単離することができる。例えば、式(I)の化合物は単一の生成物(例えば、単一の構造異性体)として、又は生成物の混合物(例えば、複数の構造異性体及び/又は複数の式(I)の化合物)として単離することができる。いくつかの実施形態において、1つ以上の反応生成物は、フラッシュクロマトグラフィ、重力クロマトグラフィ(例えば、シリカゲルを用いる異性体の重力分離)、カラムクロマトグラフィ(例えば、順相HPLC又はRPHPLC)、又は移動床クロマトグラフィのようなクロマトグラフィを用いて単離し、及び/又は精製することができる。いくつかの実施形態において、反応生成物は、単一の構造異性体のような単一化合物の少なくとも約80%を含有する製剤を提供するように精製される(例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約99%)。

40

#### 【0426】

いくつかの実施形態において、遊離アミン生成物を、HClのような酸で処理して、生成物のアミン塩を得る(例えば、塩酸塩)。いくつかの実施形態において、塩生成物は、対応する遊離アミン生成物に対して、例えば、取扱い及び/又は貯蔵のための改善された特性を提供する。いくつかの実施形態において、塩生成物は、対応する遊離アミンに対する、N-オキシド又はN-カルボネート形成のような分解生成物の形成を妨げ、又は形成

50

の速度を低下させることができる。いくつかの実施形態において、塩生成物は、対応する遊離アミンに対して、治療製剤として用いるための改善された特性を有することができる。

【0427】

いくつかの実施形態において、ポリアミンカチオン性脂質は、位置選択的合成手法を用いて作製することができる。位置選択的合成手法は、対象とする特異的アルキル化誘導体の合成に導くポリアミン骨格の窒素上に部位特異的アルキル化を成すための便宜な方法を提供する。一般に、式(I)の化合物は、最初に、第1位のアミン又は末端アミンとの選択的な反応によりそれらの反応をブロックし、又は更なる反応を抑制する試薬と反応することで、標的化合物の合成過程における適切な段階において、これらのブロックを選択的に除去することができる。式(I)の化合物の末端アミンをブロックした後、適切なモル比率の試薬及び反応条件を用いることによって、第二位アミンの1つ以上を直交アミン保護基で選択的にブロックすることができる。選択的アルキル化、それに続くブロックされたアミンの選択的脱保護、さらに再生されたアミンのアルキル化及び記載された反応の系列の適切な反復は、対象とする特異的化合物を提供する。例えば、トリエチレンテトラミン(1)の末端アミンは、適切な反応条件下で第一級アミン特異的保護基(例えば、トリフルオロアセトアミド)によって選択的にブロックされ、引き続いて、塩基(例えば、ジイソプロピルエチルアミン)の存在下で過剰の直交アミン保護試薬[例えば、(Boc)<sub>2</sub>O]と反応させて、全ての内部アミン(例えば、Boc)をブロックする。末端保護基の選択的除去及び、引き続いての、例えば、アクリルアミドでの末端アミンのアルキル化は、化合物1の十分に末端アミンアルキル化された誘導体を提供する。内部アミンの保護の脱ブロック、及び、引き続いての、計算された量のアクリルアミドでのアルキル化は、例えば、部分的にアルキル化された生成物7を生じる。化合物7を作製するためのもう1つの手法は、末端部が保護された化合物1を算出された量の直交アミン保護試薬[例えば、(Boc)<sub>2</sub>O]と反応させて、式1の部分的に保護された誘導体を得ることである。部分的に及び選択的に保護された1つの末端アミン保護基の除去及び、引き続いてのアクリルアミドでの全ての未保護アミンのアルキル化は、対象とする化合物7を生じさせる。

10

20

【0428】

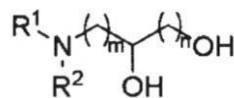
生物切断部位を有する脂質の製造方法

いくつかの実施形態において、式(X)の化合物は、式：

30

【0429】

【化120】



式(XI)

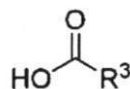
【0430】

の化合物を、式(XII)の化合物：

40

【0431】

【化121】



式(XII)

【0432】

[式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、及びR<sup>3</sup>は前記定義の通りである]

の化合物と反応させることによって製造することができる。

いくつかの実施形態において、式(XI)及び(XII)の化合物は、カルボジイミド

50

(例えば、EDC1のような水溶性カルボジイミド)のようなカップリング剤の存在下で反応させる。

【0433】

他の化学反応及び出発材料を使用して、2つの連結基 $L^1$ 及び $L^2$ を有する式(X)の化合物を提供することができる。例えば、式(XI)のヒドロキシル部位をアミン部位で置き換えて、アミド又は尿素連結基に対する前駆体を提供することができる。

【0434】

反応の完了に際して、式(X)を有する1つ以上の生成物を反応混合物から単離することができる。例えば、式(X)の化合物は単一の生成物(例えば、単一の構造異性体)として、又は生成物の混合物(例えば、複数の構造異性体及び/又は複数の式(X)の化合物)として単離することができる。いくつかの実施形態において、1つ以上の反応生成物は、フラッシュクロマトグラフィ、重クロマトグラフィ(例えば、シリカゲルを用いる異性体の重力分離)、カラムクロマトグラフィ(例えば、順相HPLC又はRPHPLC)、又は移動床クロマトグラフィのようなクロマトグラフィを用いて単離及び/又は精製することができる。いくつかの実施形態において、反応生成物は、単一の構造異性体のような単一化合物の少なくとも約80%を含有する製剤を提供するように精製される(例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約99%)。

10

【0435】

いくつかの実施形態において、遊離アミン生成物をHClのような酸で処理して、生成物のアミン塩(例えば、塩酸塩)を得る。いくつかの実施形態において、塩生成物は、対応する遊離アミン生成物に対して、例えば、取扱い及び/又は貯蔵のための改善された特性を提供する。いくつかの実施形態において、塩生成物は、対応する遊離アミンに対して、N-オキシド又はN-カルボネート形成のような分解生成物の形成を妨げ、又は形成速度を低下させることができる。いくつかの実施形態において、塩生成物は、対応する遊離アミンに対する、治療的機能で用いられる改善された特性を有し得る。

20

【0436】

PEG脂質の製造方法

PEG脂質化合物は、例えば、適切な条件下で、グリセリド部位(例えば、ジミリスチルグリセリド、ジパルミチルグリセリド、又はジステアリルグリセリド)を活性化部位と反応させて、活性化された中間体を得られ、これを引き続いてアミン又はヒドロキシル基のような反応性部位を有するPEG成分と反応させて、PEG脂質を得ることによって製造することができる。例えば、ダルキルグリセリド(例えば、ジミリスチルグリセリド)を、まず、塩基(例えば、トリエチルアミン)の存在下でN,N'-ジスクシンイミジルカルボネートと反応させ、ピリジンのような塩基の存在下で形成された中間体とPEG-アミン(例えば、mPEG2000-NH<sub>2</sub>)との引き続いての反応により、対象とするPEG脂質が得られる。これらの条件下で、PEG成分をカルバミン酸結合を介して脂質部位に付着させる。もう1つの例において、PEG脂質は、例えば、グリセリド部位(例えば、ジミリスチルグリセリド、ジパルミチルグリセリド、ジステアリルグリセリド、ジミリストイルグリセリド、ジパルミトイルグリセリド又はジステアロイルグリセリド)をコハク酸無水物と反応させ、生じたカルボキシルを引き続いて活性化し、続いて、PEG成分を有する活性化された中間体とアミン又はヒドロキシル基とを反応させて、例えば、PEG脂質を得ることによって製造することができる。一つの例において、DMAPのような塩基の存在下でジミリスチルグリセリドをコハク酸無水物と反応させて、ヘミコハク酸を得る。かくして得られたヘミコハク酸の遊離カルボキシル部位を、HBTU及びジイソプロピルエチルアミンのような標準カルボキシル活性化剤を用いて活性化し、活性化されたカルボキシルとmPEH2000-NH<sub>2</sub>との引き続いての反応により、例えば、PEG脂質を得る。この手法において、PEG成分はコハク酸ブリッジを介して脂質成分と連結される。

30

40

【0437】

50

### 会合複合体

本明細書中に記載された脂質化合物及び脂質製剤は、会合複合体、例えば、リボソーム又はリポブックスにおける成分として用いることができる。そのような会合複合体を用いて、RNAのような核酸ベースの治療法、例えば、dsRNAのような一本鎖又は二本鎖RNAを投与することができる。

#### 【0438】

本明細書中に開示された会合複合体は、核酸を標的とし、かつそれに結合することによって、遺伝子発現を修飾することができるオリゴヌクレオチド剤をパッケージするのに有用であり得る。オリゴヌクレオチド剤は一本鎖又は二本鎖とすることができ、例えば、dsRNA、pre-mRNA、mRNA、マイクロRNA (miRNA)、mi-RNA前駆体 (pre-miRNA) プラスミド又はDNAを、蛋白質に含むことができる。本発明における特徴とされているオリゴヌクレオチド剤は、例えば、dsRNA、マイクロRNA、アンチセンスRNA、アンタゴミール、デコイRNA、DNA、プラスミド及びアプタマーであり得る。

10

#### 【0439】

会合複合体は複数の成分を含むことができる。いくつかの実施形態において、リボソームのような会合複合体は、(オリゴヌクレオチド剤、例えば、dsRNAのような)核酸治療剤のような有効成分、本明細書中に記載された脂質のようなカチオン性脂質を含むことができる。いくつかの実施形態において、会合複合体は複数の治療剤、例えば、1つ以上の遺伝子、又は同一遺伝子の異なる領域を標的とする2つ又は3つの一本鎖又は二本鎖核酸部位を含むことができる。また、本明細書中に記載されたPEG脂質のようなPEG脂質、又はコレステロールのような構成成分を含めた、他の成分を会合複合体に含めることもできる。いくつかの実施形態において、会合複合体は融合脂質又は成分及び/又は標的分子を含む。いくつかの好ましい実施形態において、会合複合体は、dsRNAのようなオリゴヌクレオチド剤、式(I)又は式(X)の化合物のような本明細書中に記載された脂質、本明細書中に記載されたPEG脂質のようなPEG脂質(式(XV)のPEG脂質)、及びコレステロールのような構成成分を含むリボソームである。

20

#### 【0440】

##### 一本鎖リボ核酸

オリゴヌクレオチド剤はマイクロRNA (miRNA) を含む。マイクロRNAは、転写の阻害によって、又は標的化mRNAの分解等を通して、細胞中で特異的遺伝子の転写後サイレンシングを引き起こすことができる小さな非コーディングRNA分子である。miRNAは完全に相補的であり得るか、あるいは標的核酸との非相補性の領域を有することができる、その結果、非相補性の領域において「バルジ」をもたらす。非相補性の領域(バルジ)には、十分な相補性、好ましくは、二重鎖形成を可能とする完全な相補性の領域は、近接してそれを挟むことができる。好ましくは、相補性の領域は少なくとも8~10ヌクレオチド長(例えば、8、9、又は10ヌクレオチド長)である。miRNAは、マイクロRNAが標的核酸に対して完全に相補性ではない場合のように、転写を抑制することによって、あるいはmiRNAが完全な相補性をもってその標的に結合する場合にのみ起こると信じられている標的RNA分解を引き起こすことによって、遺伝子発現を阻害することができる。本発明は、それらの標的に結合した場合にバルジを形成できる、又はできないmiRNAの二本鎖前駆体を含むことができる。

30

40

#### 【0441】

好ましい実施形態において、本発明において特徴とするオリゴヌクレオチド剤は、内因性miRNA又はpre-miRNAを標的とすることができる。本発明において特徴とするオリゴヌクレオチド剤は、天然に生じるヌクレオベース、糖、及びヌクレオチド間(骨格)共有結合、ならびに同様に機能する天然に生じない部分を有するオリゴヌクレオチドを含むことができる。そのような修飾された、又は置換されたオリゴヌクレオチドは、例えば、増強された細胞取り込み、内因性miRNA標的に対する高められた親和性、及び/又はヌクレアーゼの存在下での高められた安定性のような望ましい特性のため、しばしば

50

、天然の形態よりも好ましい。特異的内因性miRNAに結合するように設計されたオリゴヌクレオチド剤は、標的miRNAの少なくとも10、20、又は25又はそれ以上の塩基に対して、実質的相補性、例えば、少なくとも70、80、90、又は100%相補性を有する。

#### 【0442】

miRNA又はプレmiRNAは長さが18~100ヌクレオチドであり得、より好ましくは、長さが18~80ヌクレオチドあり得る。成熟miRNAは19~30ヌクレオチド、好ましくは、21~25ヌクレオチド、特に21、22、23、24、又は25ヌクレオチドの長さを有することができる。マイクロRNA前駆体は70~100ヌクレオチドの長さを有することができ、かつヘアピン立体構造を有することができる。マイクロRNAは、長いプレmiRNAを機能的miRNAへプロセッシングするダイサー(Dicer)及びドロシャー(Drosha)と呼ばれる酵素によってプレmiRNAからイン・ピボで生じさせることができる。本発明において特徴とするマイクロRNA又は前駆体miRNAは、細胞ベースの系によってイン・ピボで合成することができるか、あるいは化学的に合成することができる。マイクロRNAは、所望の特徴を付与する修飾を含むように合成することができる。例えば、修飾は、エンドサイトーシス依存性又は非依存性メカニズム等によって、安定性、特定の組織又は細胞型に標的化される標的核酸とのハイブリダイゼーション熱力学、あるいは細胞浸透性を改善することができる。修飾は配列特異性を増加させることもでき、結果的に、オフサイト標的化を減少させることができる。合成及び化学的修飾の方法は以下により詳細に記載する。

10

20

#### 【0443】

センスストランド配列(例えば、cDNA分子のセンスストランドの配列)を仮定すれば、miRNAは、ワトソン及びクリック塩基対合の法則に従って設計することができる。miRNAは、RNA、例えば、miRNA、プレmiRNA、プレmRNA又はmRNAの一部に対して相補的であり得る。例えば、miRNAは、mRNA又はプレmRNAのコーディング領域又は非コーディング領域、例えば、5'UTRのような、プレmRNA又はmRNAの翻訳開始部位を囲う領域に対して相補的であり得る。miRNAオリゴヌクレオチドは、例えば、長さが約12~30ヌクレオチド、好ましくは、長さが約15~28ヌクレオチド(例えば、長さが16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25ヌクレオチド)であり得る。

30

#### 【0444】

特に、本発明で特徴とするmiRNA又はプレmiRNAは、標的核酸に対して非相補性を有する内部(すなわち、非末端)領域におけるヌクレオチド上に化学修飾を有することができる。例えば、修飾されたヌクレオチドは、バルジを形成するmiRNAの領域に取り込むことができる。修飾は、例えば、リンカーによってmiRNAに結合されたりリガンドを含むことができる(例えば、以下のダイアグラムOT-I~OT-IV参照)。修飾は、例えば、治療miRNAの薬物動態又は安定性を改善することができ、あるいはmiRNAの標的核酸へのハイブリダイゼーション特性(例えば、ハイブリダイゼーション熱力学)を改善することができる。いくつかの実施形態において、miRNAのバルジ領域に取り込まれるか、又は連結された修飾又はリガンドの向きは、バルジ領域中の空間を占めるような向きとされるのが好ましい。例えば、修飾は、核酸ストランド上の修飾された塩基又は糖、あるいは挿入剤として機能するリガンドを含むことができる。これらは、好ましくは、バルジ中に置かれる。挿入剤は、芳香族、例えば、多環芳香族又は複素環芳香族化合物であり得る。多環挿入剤はスタッキング能力を有することができ、2、3、又は4の融合された環を持つ系を含むことができる。以下に記載する一般的な塩基をmiRNAに取り込ませることができる。いくつかの実施形態において、miRNAのバルジ領域に取り込まれ、又は連結された修飾又はリガンドの配向は、バルジ領域中の空間を占めるように配向されることが好ましい。この配向は、改善されたハイブリダイゼーション特性、あるいはmiRNAの他の望ましい特性を促進する。

40

#### 【0445】

50

一実施形態において、miRNA又はプレmiRNAはアミノグリコシドリガンドを含むことができ、それにより、miRNAの改善されたハイブリダイゼーション特性、又は改善された配列特異性をもたらす。例示的なアミノグリコシドはグリコシル化ポリリシン、ガラクトシル化ポリリシン、ネオマイシンB、トブラマイシン、カナマイシンA、及びネオ-N-アクリジン、ネオ-S-アクリジン、ネオ-C-アクリジン、トブラ-N-アクリジン、及びカナA-N-アクリジンのようなアミノグリコシドのアクリジンコンジュゲートを含む。アクリジンアナログの使用は、配列特異性を向上させることができる。例えば、ネオマイシンBは、DNAと比較してRNAに対する高い親和性を有するが、配列特異性は低い。アクリジンアナログ、ネオ-S-アクリジンは、HIV Rev-応答エレメント(RRE)に対する増大した親和性を有する。いくつかの実施形態において、アミノグリコシドリガンドのグアニジンアナログ(グアニジノグリコシド)は、オリゴヌクレオチド剤に連結される。グアニジノグリコシドにおいて、アミノ酸上のアミン基はグアニジン基の代わりに交換される。グアニジンアナログの結合は、オリゴヌクレオチド剤の細胞浸透性を高めることができる。

#### 【0446】

一実施形態において、リガンドは、標的核酸の切断によって標的遺伝子阻害に寄与する切断基を含むことができる。好ましくは、切断基は、そこで切断基が標的RNAにアクセスし、RNAを切断できるバルジ領域に位置するようにmiRNAに連結される。切断基は、例えば、プレオマイシン(例えば、プレオマイシン-A<sub>5</sub>、プレオマイシン-A<sub>2</sub>、又はプレオマイシン-B<sub>2</sub>)、ピレン、フェナントロリン(例えば、O-フェナントロリン)、ポリアミン、トリペプチド(例えば、lys-tyr-lysトリペプチド)、又は金属イオンキレート化基であり得る。金属イオンキレート化基は、例えば、Lu(III)又はEu(III)大環複合体、Zn(II)<sub>2</sub>, 9-ジメチルフェナントロリン誘導体、Cu(II)テルピリジン、又はアクリジンを含むことができ、これらは、Lu(III)のような遊離金属イオンによるバルジの部位における標的RNAの選択的切断を促進することができる。いくつかの実施形態において、ペプチドリガンドをmiRNA又はプレmiRNAに連結させて、例えば、バルジ領域における標的RNAの切断を促進することができる。例えば、1, 8-ジメチル-1, 3, 6, 8, 10, 13-ヘキサアザシクロテトラデカン(シクラム)を(例えば、アミノ酸誘導体によって)ペプチドにコンジュゲートして、標的RNA切断を促進することができる。本発明において特徴とする方法及び組成物は、切断又は非切断依存性メカニズムによって標的遺伝子発現を阻害するmiRNAを含む。

#### 【0447】

miRNA又はプレmiRNAは、二重鎖を形成するのに十分な相補性の領域(例えば、7、8、9、10、又は11ヌクレオチド長である領域)によって両側から挟まれた非相補性の領域(例えば、3、4、5又は6ヌクレオチド長の領域)を含むように設計し、合成することができる。

#### 【0448】

ヌクレアーゼ耐性及び/又は標的に対する結合親和性の向上のために、miRNA配列は2'-O-メチル、2'-フッ素、2'-O-メトキシエチル、2'-O-アミノプロピル、2'-アミノ、及び/又はホスホロチオエート結合を包含することができる。固定化された核酸(LNA)、2-チオピリミジン(例えば、2-チオ-U)、2-アミノ-A、G-クランプ修飾、及びエチレン核酸(ENA)、例えば、2'-4'-エチレン-架橋化核酸の包含も、標的に対する結合親和性を増加させることができる。オリゴヌクレオチド骨格へのフラノン糖の包含もまた、エンドヌクレアーゼ的切断を減少させることができる。miRNA又はプレmiRNAは、3'カチオン基を包含することによって、あるいは3'末端におけるヌクレオチドを3'-3'結合で逆転させることによって、さらに修飾することができる。もう1つの代替法において、3'末端はアミノアルキル基、例えば、3'C5-アミノアルキルdTでブロックすることができる。他の3'コンジュゲートは、3'-5'エキソヌクレアーゼ的切断を阻害することができる。理論に束縛さ

10

20

30

40

50

れることは望まないが、ナプロキセン又はイブプロフェンのような3'コンジュゲートは、ヌクレアーゼがオリゴヌクレオチドの3'末端に結合するのを立体的にブロックすることによってエキソヌクレアーゼ的切断を阻害することができる。小さなアルキル鎖、アリアル基、又は複素環コンジュゲート又は修飾された糖(D-リボース、デオキシリボース、グルコース等)さえ、3'-5'-エキソヌクレアーゼをブロックすることができる。

#### 【0449】

5'末端は、アミノアルキル基、例えば、5'-O-アルキルアミノ置換基でブロックすることができる。他の5'コンジュゲートは5'-3'エキソヌクレアーゼ的切断を阻害することができる。理論に束縛されることは望まないが、ナプロキセン又はイブプロフェンのような5'コンジュゲートは、エキソヌクレアーゼがオリゴヌクレオチドの5'末端に結合するのを立体的にブロックすることによってエキソヌクレオティック切断を阻害することができる。小さなアルキル鎖、アリアル基、又は複素環コンジュゲート又は修飾された糖(D-リボース、デオキシリボース、グルコース等)さえ、3'-5'-エキソヌクレアーゼをブロックすることができる。

10

#### 【0450】

一実施形態において、miRNA又はpremiRNAは、標的化、例えば、本明細書中に記載された標的化修飾を改善する修飾を含む。miRNA分子を特定の細胞型に対して標的化する修飾の例は、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、マンノースのような炭水化物糖、葉酸のようなビタミン、RGD及びRGDミミックのような他のリガンド、及びナプロキセン、イブプロフェン又は他の公知の蛋白質-結合分子を含めた小分子を含む。

20

#### 【0451】

miRNA又はpremiRNAは、当該分野で公知の手法を用いる化学合成及び/又は酵素連結反応を用いて構築することができる。例えば、miRNA又はpremiRNAは、天然に生じるヌクレオチド、あるいは分子の生物学的安定性を増加させるように、又はmiRNA又はpremiRNA及び標的核酸の間で形成された二重鎖の物理的安定性を増加させるように設計された種々に修飾されたヌクレオチドを用いて化学的に使用することができ、例えば、ホスホロチオエート誘導体及びアクリジン置換ヌクレオチドを合成することができる。他の適切な核酸修飾は本明細書中に記載されている。別法として、miRNA又はpremiRNA核酸は、核酸がアンチセンスの向きにサブクローンされた発現ベクタを用いて生物学的に生産することができる(すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、対象とする標的核酸に対するアンチセンスの向きのものである)。

30

#### 【0452】

##### アンチセンス-タイプのオリゴヌクレオチド剤

本発明において特徴とする一本鎖オリゴヌクレオチドはアンチセンス核酸を含む。「アンチセンス」核酸は、遺伝子発現産物をコードする「センス」核酸に相補的なヌクレオチド配列、例えば、二本鎖cDNA分子のコーディングストランドに相補的な、あるいは、premiRNA、mRNA、miRNA、又はpremiRNA等のRNA配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。従って、アンチセンス核酸はセンス核酸標的と共に水素結合を形成することができる。

40

#### 【0453】

コーディングストランド配列(例えば、cDNA分子のセンスストランドの配列)を仮定すれば、アンチセンス核酸はワトソン及びクリック塩基対合の法則に従って設計することができる。アンチセンス核酸分子は、RNA、例えば、premiRNA又はmRNAのコーディング又は非コーディング領域の部分に対して相補的であり得る。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、premiRNA又はmRNAの翻訳開始部位、例えば、5'UTRを囲う領域に対して相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さが約10~25ヌクレオチド(例えば、長さが11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、又は24ヌクレオチド)であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、miRNA又はpremiRNAに対しても相補的で

50

あり得る。

【0454】

アンチセンス核酸は、当該分野で公知の手法による化学合成及び/又は酵素連結反応を用いて構築することができる。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に生じるヌクレオチド、又は、分子の生物学的安定性を増加させ、あるいはアンチセンス及び標的核酸の間で形成された二重鎖の物理的安定性を向上させるように設計された種々の修飾ヌクレオチドを用いて化学的に合成することができ、例えば、ホスホロチオエート誘導体及びアクリジン置換ヌクレオチドを用いることができる。他の適切な核酸修飾は本明細書中に記載されている。別法として、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス向きにサブクローンされている発現ベクタを用いて生物学的に生産することができる（すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、対象とする標的核酸に対してアンチセンス向きのものである）。

10

【0455】

アンチセンス剤はリボヌクレオチドのみ、デオキシリボヌクレオチドのみ（例えば、オリゴデオキシヌクレオチド）、又はデオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドの双方を含むことができる。例えば、リボヌクレオチドのみからなるアンチセンス剤は相補的RNAにハイブリダイズさせることができ、翻訳機構の標的RNA転写体への到達を妨げることができる。それにより、蛋白質合成を妨げることができる。デオキシリボヌクレオチドのみ、又はデオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含むアンチセンス分子、例えば、アンチセンス剤の5'及び3'末端においてRNA配列によって両側から挟まれたDNA配列は相補的RNAにハイブリダイズすることができ、RNA標的は、引き続いて、酵素、例えば、RNase Hによって切断することができる。標的RNAの分解は翻訳を妨げる。フランキングRNA配列は2'-O-メチル化ヌクレオチド、及びホスホロチオエート結合を含むことができ、内部DNA配列はホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。内部DNA配列は、好ましくは、RNase H活性による標的化が望まれる場合、少なくとも5ヌクレオチド長である。

20

【0456】

増大したヌクレアーゼ耐性については、アンチセンス剤は、3'末端におけるヌクレオチドを3'-3'結合で逆転させることによってさらに修飾することができる。もう一つの別法において3'末端はアミノアルキル基でブロックすることができる。

30

【0457】

一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的化、例えば、本明細書中に記載された標的化修飾を改善する修飾を含む。

デコイタイプのオリゴヌクレオチド剤

本発明において特徴とするオリゴヌクレオチド剤はデコイ核酸、例えば、デコイRNAであり得る。デコイ核酸は天然核酸に似ているが、天然核酸の活性を阻害し、又は中断するように修飾されている。例えば、デコイRNAはリガンドについての天然結合ドメインを模倣することができる。デコイRNAは、従って、特異的リガンドの結合に対して天然結合標的と競合する。天然結合標的は内因性核酸、例えば、pre-miRNA、miRNA、pre-mRNA、mRNA又はDNAであり得る。例えば、HIVトランス-活性化応答(TAR)RNAの過剰発現は「デコイ」として作用することができ、HIV tat蛋白質に効果的に結合し、それにより、HIV RNAにコードされたTAR配列に結合するのを阻害可能であることが既に示されている。

40

【0458】

一実施形態において、デコイRNAは、標的化、例えば、本明細書中に記載された標的化修飾を改善する修飾を含む。

miRNA及びアンチセンスRNAについての上述の化学的修飾、及び、本明細書中に他に記載された化学的修飾もまた、デコイ核酸における利用に適している。

【0459】

アプタマータイプのオリゴヌクレオチド剤

50

本発明中において特徴とするオリゴヌクレオチド剤はアプタマーであり得る。アプタマーは有機小分子又は蛋白質、例えば、転写又は翻訳因子のような非核酸リガンドに結合し、引き続いて、活性を変化させる（例えば、阻害する）。アプタマーは、非核酸リガンド上の標的結合部位の認識を示す特異的構造に折りたたまれる。アプタマーは、本明細書中に記載された修飾のいずれかを含有することができる。

#### 【0460】

一実施形態において、アプタマーは、標的化、例えば、本明細書中に記載された標的化修飾を改善する修飾を含む。

miRNA及びアンチセンスRNAについて上述した化学的修飾、及び本明細書中に  
10

#### 【0461】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細は、添付の図面及び以下の記載において説明されている。本発明の他の特徴及び利点は該記載及び図面から、及び特許請求の範囲から明らかであろう。本出願は全ての引用された文献、特許、及び特許出願について、参照によりその全体を援用する。

#### 【0462】

一つの態様において、本発明はアンタゴミールを特徴とする。アンタゴミールは、マイクロRNAを標的とする一本鎖、二本鎖、部分的二本鎖、及びヘアピン構造の化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドである。

#### 【0463】

アンタゴミールは、内因性miRNAに対して実質的に相補的な少なくとも12個以上の連続オリゴヌクレオチド、より具体的には、miRNA又はプレmiRNAヌクレオチド配列の標的配列に対して実質的に相補的な12個以上の連続ヌクレオチドを含む薬剤からなり、あるいはそれを含む。好ましくは、本発明の特徴であるアンタゴミールは、約12~25ヌクレオチド、好ましくは、約15~23ヌクレオチドのmiRNA標的配列にハイブリダイズするのに十分相補的なヌクレオチド配列を含む。より好ましくは、標的配列は、表1に示される配列とは、1つ、2つ、又は3つ以下のヌクレオチドのみ異なり、一実施形態において、アンタゴミールは表2a~2eに示される薬剤である。一実施形態において、アンタゴミールは非ヌクレオチド部位、例えば、コレステロール部位を含む。非ヌクレオチド部位は、例えば、オリゴヌクレオチド剤の3'又は5'末端に結合させることができる。好ましい実施形態において、コレステロール部位はオリゴヌクレオチド剤の3'末端に結合されている。  
20  
30

#### 【0464】

アンタゴミールは、修飾、例えば、ヌクレオチド修飾の取込み等により、ヌクレオチド分解に対して安定化される。別の実施形態において、アンタゴミールは、ヌクレオチド配列の5'又は3'末端における少なくとも第1、第2又は第3のヌクレオチド間結合においてホスホロチオエートを含む。さらに別の実施形態において、アンタゴミールは2'-修飾ヌクレオチド、例えば、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、又は2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)を含む。特に好ましい実施形態において、アンタゴミールは少なくとも1つの2'-O-メチル-修飾ヌクレオチドを含み、いくつかの実施形態において、アンタゴミールのヌクレオチドの全ては2'-O-メチル修飾を含む。  
40

#### 【0465】

miRNAのヌクレオチド配列に対して実質的に相補的であるアンタゴミールは細胞又はヒトに送達されて、異常な又は望ましくないmiRNA活性の場合のように、内因性miRNAの活性を阻害し、又は低下させることができ、あるいは内因性miRNAにハイブリダイズする標的mRNAの不十分な活性は病気又は障害に関連する。一実施形態にお  
50

いて、本発明において特徴とするアンタゴミールは、アルドラーゼA mRNA、N - m y c下流調節遺伝子(N d r g 3) mRNA、G T P a s e活性タンパク質 - 1 ( I q g a p 1 ) mRNAを含有するI Qモチーフ、H M G - C o A - レダクターゼ(H m g c r ) mRNA、及びクエン酸シンターゼmRNA及びその他を含む多数のRNAにハイブリダイズする、m i R - 1 2 2 (表1参照)に対して実質的に相補的であるヌクレオチド配列を有する。好ましい実施形態において、m i R - 1 2 2に実質的に相補的なアンタゴミールは、アンタゴミール - 1 2 2である(表2 a ~ 2 e)。アルドラーゼA欠乏は、溶血性貧血、先天性多発性関節拘縮症、下垂体転位、横紋筋融解、高カリウム血症を含めた種々の障害と関連付けられることが判明した。アルドラーゼA欠乏症の患者は、成長及び発達遅延、顔面正中発育不全、肝腫、ならびに筋障害症候群を含む症状も発症する。かくして、これらの傷害又は症状のいずれかを有するヒト、又は有していると診断されたヒトは、m i R - 1 2 2にハイブリダイズするアンタゴミールでの治療を受ける候補である。

10

#### 【0466】

##### 二本鎖リボ核酸(dsRNA)

一実施形態において、本発明は、細胞又は哺乳動物における遺伝子の発現を阻害するための、リボソームのような会合複合体に封入された二本鎖リボ核酸(dsRNA)分子を提供し、dsRNAは、遺伝子の発現で形成されたmRNAの少なくとも一部に対して相補的である相補性の領域を含むアンチセンスストランドを含み、かつ、相補性の該領域は長さが30ヌクレオチド未満、一般には、長さが19~24ヌクレオチドであり、かつ、該dsRNAは、該遺伝子を発現する細胞との接触に際して、該遺伝子の発現を少なくとも40%だけ阻害する。dsRNAは、ハイブリダイズして二重鎖構造を形成するのに十分相補的である2つのRNAストランドを含む。dsRNAの一方のストランド(アンチセンスストランド)は、遺伝子の発現の間に形成されたmRNAの配列に由来する標的配列に対して実質的に相補的、一般には、十分相補的である相補性の領域を含み、他方のストランド(センスストランド)は、適切な条件下で合わせられた場合に2つのストランドはハイブリダイズし、二重鎖構造を形成するように、アンチセンスストランドに対して相補的である領域を含む。一般に、二重鎖構造は、長さが、15及び30の間、より一般的には18及び25の間、さらに一般的には19及び24の間、最も一般的には19及び21の間の塩基対である。同様に、標的配列に対する相補性の領域は、長さが、15及び30の間、より一般的には18及び25の間、さらに一般的には19及び24の間、最も一般的には19及び21の間にある。本発明のdsRNAは、さらに、1つ以上の一本鎖ヌクレオチド突出部を含むことができる。dsRNAは、例えば、バイオサーチ(Biosearch)社、アプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems)社から商業的に入手可能な、自動DNAシンセサイザの使用によって、さらに以下で議論するように当該分野で公知の標準的方法によって合成することができる。

20

30

#### 【0467】

本明細書中で記載された会合複合体における封入に適したdsRNAは、18及び25の間の塩基対(例えば、21塩基対)の二重鎖構造を含むことができる。いくつかの実施形態において、dsRNAは、少なくとも21ヌクレオチド長である少なくとも1つのストランドを含む。他の実施形態において、dsRNAは、少なくとも15、16、17、18、19、20又はそれ以上の連続ヌクレオチドである少なくとも1つのストランドを含む。

40

#### 【0468】

本明細書中に記載された会合複合体における封入に適したdsRNAは、標的配列に対して1以上のミスマッチを含有することができる。好ましい実施形態において、dsRNAは、3以下のミスマッチを含有する。dsRNAのアンチセンスストランドが標的配列に対するミスマッチを含有する場合、ミスマッチの領域は相補性の領域の中央に位置しないのが好ましい。dsRNAのアンチセンスストランドが標的配列に対してミスマッチを含有する場合、ミスマッチはいずれかの末端から5ヌクレオチドに制限され、例えば、相補性の領域の5'又は3'いずれかの末端から5、4、3、2、又は1ヌクレオチドであ

50

るのが好ましい。

【0469】

一実施形態において、dsRNAの少なくとも1つの末端は、1から4、一般には1又は2ヌクレオチドの一本鎖ヌクレオチド突出部を有する。一般には、一本鎖突出部はアンチセンスストランドの3'末端に、あるいは別法として、センスストランドの3'末端に位置する。dsRNAは、一般にはアンチセンスストランドの5'末端に位置する平滑末端を有することもできる。そのようなdsRNAは改善された安定性及び阻害活性を有し、かくして、低用量、すなわち、1日当たり受容者の体重kg当たり5mg未満での投与を可能とする。一般には、dsRNAのアンチセンスストランドは、3'末端においてヌクレオチド突出部を有し、5'-末端は平滑である。別の実施形態において、突出部における1つ以上のヌクレオチドはヌクレシチドチオホスフェートで置き換えられる。

10

【0470】

さらに別の実施形態において、リボソームのような会合複合体に封入されたdsRNAは、安定性を高めるように化学的に修飾される。このような核酸は、本明細書に引用して援用する、「Current protocols in nucleic acid chemistry」, Beaucage, S. L.ら(編)、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ(John Wiley & Sons)社、アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ニューヨークに記載されているような、当該分野でよく確立された方法によって合成し、かつ/又は修飾することができる。化学的修飾は、限定されるものではないが、2'修飾、オリゴヌクレオチドの糖又は塩基の他の部位における修飾、非天然塩基のオリゴヌクレオチド鎖への導入、リガンド又は化学的部位への共有結合、及びヌクレオチド間リン酸結合の、チオリン酸のような代替結合による置換を含むことができる。1つ以上のそのような修飾を使用することができる。

20

【0471】

2つの別々のdsRNAストランドの化学的連結は、種々のよく知られた技術のいずれかによって、例えば、共有結合、イオン結合又は水素結合を導入することによって、疎水性相互作用、ファンデルワールス、又はスタッキング相互作用によって、金属-イオン配位によって、あるいはプリンアナログの使用を介して達成することができる。そのような化学的に連結されたdsRNAは、本明細書中に記載された会合複合体における封入に適している。一般には、dsRNAを修飾するのに用いることができる化学基は、限定されるものではないが、メチレンブルー、二官能性基、一般には、ビス-(2-クロロエチル)アミン、4-アセチル-N'-(p-グリオキシベンゾイル)シスタミン、4-チオウラシル、及びプソラレンを含む。一実施形態において、リンカーはヘキサ-エチレングリコールリンカーである。この場合、dsRNAは、固相合成によって生産され、ヘキサ-エチレングリコールリンカーは標準的方法に従って取り込まれる(例えば、Williams, D. J., 及びK. B. Hall, Biochem. (1996) 35: 14665-14670)。特別な実施形態において、アンチセンスストランドの5'-末端、及びセンスストランドの3'末端は、ヘキサ-エチレングリコールリンカーを介して化学的に連結される。別の実施形態において、dsRNAの少なくとも1つのヌクレオチドはホスホチオエート又はホスホジチオエート基を含む。dsRNAの末端における化学結合は、一般には、三重螺旋結合によって形成される。

30

40

【0472】

さらに別の実施形態において、2つの単一ストランドの一方又は双方におけるヌクレオチドは、例えば、限定されるものではないが、ある種のヌクレアーゼのような細胞酵素の分解活性を抑制又は阻害するように調節することができる。核酸に対する細胞酵素の分解活性を阻害するための技術は当該分野で知られており、限定されるものではないが、2'-アミノ修飾、2'-アミノ糖修飾、2'-F糖修飾、2'-F修飾、2'-アルキル糖修飾、2'-O-メトキシエチルのような2'-O-アルコキシアルキル修飾、非荷電及び荷電骨格修飾、モルホリノ修飾、2'-O-メチル修飾、及びホスホルアミデートを含む(例えば、Wagner, Nat. Med. (1995) 1: 1116-8)。従って

50

、dsRNA上のヌクレオチドの少なくとも1つの2'-ヒドロキシル基は、化学基によって、一般には、2'-F又は2'-O-メチル基によって置き換えられる。また、少なくとも1つのヌクレオチドを、固定化されたヌクレオチドを形成するように修飾することができる。そのような固定化されたヌクレオチドは、リボースの4'-炭素でリボースの2'-酸素を連結するメチレンブリッジを含有する。固定化されたヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチドはKoshkin, A. A., ら, Tetrahedron (1998), 54: 3607-3630及びObika, S. ら, Tetrahedron Lett. (1998), 39: 5401-5404)に記載されている。固定化されたヌクレオチドのオリゴヌクレオチドへの導入は、相補的配列に対する親和性を改善し、融解温度を数度だけ上昇させる(Braasch, D. A. 及びD. R. Corey, Chem. Biol. (2001), 8: 1-7)。

10

【0473】

dsRNAへのリガンドのコンジュゲーションは、その細胞吸収、ならびに特定組織に対する標的化、あるいは肝臓細胞のような特定タイプの細胞による取り込みを高めることができる。ある例においては、疎水性リガンドをdsRNAにコンジュゲートさせて、細胞膜の直接的浸透、及び/又は肝臓細胞を横切った取り込みを促進する。別法として、dsRNAにコンジュゲートされたリガンドは、受容体-媒介エンドサイトーシスに対する基質である。これらの手法は、アンチセンスオリゴヌクレオチドならびにdsRNA剤の細胞浸透を促進するのに用いられてきた。例えば、コレステロールは種々のアンチセンスオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされており、その結果、それらの非コンジュゲ

テッドアナログと比較して、実質的により活性な化合物が得られている。M. Manoharan Antisense & Nucleic Acid Drug Development 2002, 12, 103を参照されたい。オリゴヌクレオチドにコンジュゲートされている他の親油性化合物は、1-ピレン酪酸、1,3-ビス-O-(ヘキサデシル)グリセロール、及びメントールを含む。受容体-媒介エンドサイトーシスに対するリガンドの1つの例は葉酸である。葉酸は、葉酸-受容体-媒介エンドサイトーシスによって細胞に進入する。葉酸を有するdsRNA化合物は、葉酸-受容体媒介エンドサイトーシスを介して細胞に効果的に輸送され得る。Li及び共同研究者は、オリゴヌクレオチドの3'末端への葉酸の結合の結果、オリゴヌクレオチドの細胞取り込みの8倍の増加がもたらされたことを報告している。Li, S.; Deshmukh, H. M.; Huang, L. Pharm. Res. 1998, 15, 1540。これまでオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされてきた他のリガンドは、ポリエチレングリコール、炭水化物クラスタ、架橋剤、ポルフィリンコンジュゲート、送達ペプチド、及びコレステロールのような脂質を含む。siRNAについての他の化学的修飾はManoharan, M., RNA interference and chemically modified small interfering RNAs, Current Opinion in Chemical Biology (2004), 8(6), 570-579記載されている。

20

30

【0474】

ある場合には、カチオン性リガンドのオリゴヌクレオチドへのコンジュゲーションの結果、ヌクレアーゼに対する改善された耐制がもたらされる。カチオン性リガンドの代表的な例は、プロピルアンモニウム及びジメチルプロピルアンモニウムである。興味深いことには、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、カチオン性リガンドがオリゴヌクレオチドを通じて分散された場合、mRNAに対するそれらの高い結合親和性を保持すると報告された。M. Manoharan Antisense & Nucleic Acid Drug Development 2002, 12, 103及びその参考文献を参照されたい。

40

【0475】

本発明のリガンド-コンジュゲートddRNAは、dsRNAへの連結分子の結合に由来するもののような、ペンダント反応官能性を担うdsRNAの使用によって合成す

50

ることができる。この反応性オリゴヌクレオチドは、商業的に入手可能なリガンド、種々の保護基のいずれかを担うように合成されたリガンド、あるいはそれに結合された連結部位を有するリガンドと直接的に反応することができる。本発明の方法は、いくつかの好ましい実施形態においては、リガンドと適切にコンジュゲートされており、さらに、個体支持体材料に結合することができるヌクレオシドモノマーの使用によって、リガンド-コンジュゲートed dsRNAの合成を容易とする。所望により、固体支持体材料に結合していてもよいそのようなリガンド-ヌクレオシドコンジュゲートは、選択された血清結合リガンドと、ヌクレオシド又はオリゴヌクレオチドの5'位置に置かれた連結部位との反応を介して、本発明の方法のいくつかの好ましい実施形態に従って調製される。ある場合においては、dsRNAの3'末端に結合したアラルキルリガンドを担うdsRNAは、まず、長鎖アミノアルキル基を介して制御された細孔ガラス支持体にモノマー形成ブロックを共有結合させることによって調製される。次いで、標準的な固相合成技術を介して、ヌクレオチドを、固体支持体に結合したモノマー形成-ブロックに結合させる。モノマー構築ブロックはヌクレオシド、あるいは固相合成に適合する他の有機化合物であってよい。

10

20

30

40

50

#### 【0476】

本発明のコンジュゲートに用いるdsRNAは、固相合成のよく知られた技術を介して便宜にかつ定常的に作成することができる。そのような合成のための機器は、例えば、アプライドバイオシステムズ社(カリフォルニア州、フォスター・シティ)を含むいくつかの販売業者によって販売されている。当該分野で公知のそのような合成のためのいずれの他の手段も、加えて、又は別法として使用することができる。また、ホスホロチオエート及びアルキル化誘導体のような他のオリゴヌクレオチドを調製するための同様な技術を用いることも知られている。

#### 【0477】

特定の修飾されたオリゴヌクレオチドの合成に関する技術は以下の米国特許に見出すことができる：ポリアミンコンジュゲートedオリゴヌクレオチドについては米国特許第5,138,045号及び第5,218,105号、キラルリン結合を有するオリゴヌクレオチドの調製のためのモノマーについては米国特許第5,212,295号、修飾された骨格を有するオリゴヌクレオチドについては米国特許第5,378,825号及び第5,541,307号、骨格-修飾オリゴヌクレオチド及び還元カップリングを介する調製については米国特許第5,386,023号、3-デアザプリン環系に基づく修飾されたヌクレオベース、及びその合成方法については米国特許第5,457,191号、N-2置換プリンに基づく修飾されたヌクレオベースについては米国特許第5,459,255号、キラルリン結合を有するオリゴヌクレオチドを調製するための方法については米国特許第5,521,302号、ペプチド核酸については米国特許第5,539,082号、-ラクタム骨格を有するオリゴヌクレオチドについては米国特許第5,554,746号、オリゴヌクレオチドの合成のための方法及び材料については米国特許第5,571,902号、当該基を、ヌクレオシドの種々の位置のいずれかに結合された他の部位に対するリンカーとして用いることができる、アルキルチオ基を有するヌクレオシドについては米国特許第5,578,718号、高キラル純度のホスホロチオエート結合を有するオリゴヌクレオチドについては米国特許第5,587,361号及び第5,599,797号、2,6-ジアミノプリン化合物を含む2'-O-アルキルグアノシン及び関連化合物の調製プロセスについては米国特許第5,506,351号、N-2置換プリンを有するオリゴヌクレオチドについては米国特許第5,587,469号、3-デアザプリンを有するオリゴヌクレオチドについては米国特許第5,587,470号、共に、コンジュゲートed 4'-デスメチルヌクレオシドアナログについては米国特許第5,223,168号及び米国特許第5,608,046号、骨格-修飾オリゴヌクレオチドアナログについては米国特許第5,602,240号及び第5,610,289号、特に、2'-フルオロ-オリゴヌクレオチドを合成する方法については米国特許第6,262,241号及び第5,459,255号。

## 【0478】

本発明の配列特異的連結ヌクレオチドを担うリガンド-コンジュゲートed sRNA及びリガンド分子において、オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドは、標準ヌクレオチド又はヌクレオチド又は前駆体、あるいは既に連結部位を担うヌクレオチド又はヌクレオチドコンジュゲート前駆体、既にリガンド分子を担持しているリガンド-ヌクレオチド又はヌクレオチド-コンジュゲート前駆体、又は形成ブロックを担持する非ヌクレオチドリガンドを利用して適切なDNAシンセサイズで組み立てることができる。

## 【0479】

連結部位を既に担持しているヌクレオチド-コンジュゲート前駆体を用いる場合、配列-特異的連結ヌクレオチドの合成は典型的には完了されており、次いで、リガンド分子を連結部位と反応させて、リガンド-コンジュゲートオリゴヌクレオチドを形成する。ステロイド、ビタミン、脂質及びレポーター分子のような種々の分子を担うオリゴヌクレオチドコンジュゲートは従前に説明されている(Manocharanら, PCT出願WO93/07883号参照)。好ましい実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチド又は連結されたヌクレオチドは、商業的に入手可能であって、オリゴヌクレオチド合成でルーチン的に用いられる標準ホスホルアミデート及び非標準ホスホルアミデートに加えて、リガンド-ヌクレオチドコンジュゲートに由来するホスホルアミデートを用いて自動シンセサイズによって合成される。

## 【0480】

本明細書中で記載された会合複合体において封入されたdsRNAは、1以上の修飾されたヌクレオチド、例えば、ヌクレオチド中の2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-O-プロピル、2'-O-アリル、2'-O-アミノアルキル、又は2'-デオキシ-2'-フルオロ基を含むことができる。そのような修飾は高められたハイブリダイゼーション特性をオリゴヌクレオチドに付与する。さらにホスホロチオエート骨格を含有するオリゴヌクレオチドは高められたヌクレアーゼ安定性を有する。従って、官能化され、連結されたヌクレオチドはホスホロチオエート骨格、あるいは2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-O-プロピル、2'-O-アミノアルキル、2'-O-アリル又は2'-デオキシ-2'-フルオロ基のいずれか又は双方を含むように拡大することができる。当該分野で公知のオリゴヌクレオチド修飾のいくつかをまとめたリストは、例えば、PCT国際公開WO200370918号に見出される。

## 【0481】

いくつかの実施形態において、5'-末端にアミノ基を保有する官能化ヌクレオチド配列はDNAシンセサイズを用いて調製され、次いで、選択されたりガンドの活性エステル誘導体と反応させる。活性エステル誘導体は当業者によく知られている。代表的な活性エステルは、N-ヒドロスクシンイミドエステル、テトラフルオロフェノール性エステル、ペンタフルオロフェノール性エステル及びペンタクロロフェノール性エステルを含む。アミノ基及び活性エステルの反応は、選択されたりガンドが連結基を通じて5'-位置に結合したオリゴヌクレオチドを生じる。5'-末端におけるアミノ基は、5'-アミノ-モディファイヤC6試薬を利用して調製することができる。一実施形態において、リガンド分子は、リガンド-ヌクレオチドホスホルアミデートの使用によって5'-位置におけるオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることができ、リガンドはリンカーを介して5'-ヒドロキシ基に直接的に又は間接的に連結される。そのようなリガンド-ヌクレオチドホスホルアミデートは、典型的には、自動合成手法の最後に用いて、5'-末端にリガンドを担うリガンド-コンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供する。

## 【0482】

修飾されたヌクレオチド間結合又は骨格の例は、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-アルキレンホスホン酸及びキラルホスホン酸を含めたメチル及び他のアルキルホスホン酸、ホスフィン酸、3'-アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデートを含めたホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チ

10

20

30

40

50

オノアルキルホスホン酸、チオノアルキルホスホトリエステル、及び正常な 3' - 5' 結合を有するボラノリン酸、これらの 2' - 5' - の連結アナログ、及びヌクレオシド単位の隣接対が 3' - 5' ~ 5' - 3' 又は 2' - 5' ~ 5' - 2' 連結した逆転した極性を有するものを含む。種々の塩、混合塩及び遊離酸形態も含まれる。

#### 【0483】

上述したリン - 原子 - 含有結合の調製に関連する代表的な米国特許は、限定されるものではないが、その各々を本明細書に引用して援用する、米国特許第 3, 687, 808 号、第 4, 469, 863 号、第 4, 476, 301 号、第 5, 023, 243 号、第 5, 177, 196 号、第 5, 188, 897 号、第 5, 264, 423 号、第 5, 276, 019 号、第 5, 278, 302 号、第 5, 286, 717 号、第 5, 321, 131 号、第 5, 399, 676 号、第 5, 405, 939 号、第 5, 453, 496 号、第 5, 455, 233 号、第 5, 466, 677 号、第 5, 476, 925 号、第 5, 519, 126 号、第 5, 536, 821 号、第 5, 541, 306 号、第 5, 550, 111 号、第 5, 563, 253 号、第 5, 571, 799 号、第 5, 587, 361 号、第 5, 625, 050 号、及び第 5, 697, 248 号を含む。

10

#### 【0484】

リン原子を含まない修飾されたヌクレオシド間結合又は骨格（すなわち、オリゴヌクレオシド）の例は、短鎖アルキル又はシクロアルキル糖間結合、混合ヘテロ原子及びアルキル又はシクロアルキル糖間結合、又は 1 つ以上の短鎖ヘテロ原子又は複素環糖間結合によって形成される骨格を有する。これらは（部分的にはヌクレオシドの糖部分から形成された）モルホリノ結合、シロキサノ骨格、スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格、ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、アルケン含有骨格、スルファメート骨格、メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格、スルホネート及びスルホンアミド骨格、アミド骨格、及び混合 N、O、S 及び CH<sub>2</sub> 成分部分を有する他のものを有するものを含む。

20

#### 【0485】

前記したオリゴヌクレオシドの調製に関連する代表的な米国特許は限定されるものではないが、その各々を本明細書に引用して援用する、米国特許第 5, 034, 506 号、第 5, 166, 315 号、第 5, 185, 444 号、第 5, 214, 134 号、第 5, 216, 141 号、第 5, 235, 033 号、第 5, 264, 562 号、第 5, 264, 564 号、第 5, 405, 938 号、第 5, 434, 257 号、第 5, 466, 677 号、第 5, 470, 967 号、第 5, 489, 677 号、第 5, 541, 307 号、第 5, 561, 225 号、第 5, 596, 086 号、第 5, 602, 240 号、第 5, 610, 289 号、第 5, 602, 240 号、第 5, 608, 046 号、第 5, 610, 289 号、第 5, 618, 704 号、第 5, 623, 070 号、第 5, 663, 312 号、第 5, 633, 360 号、第 5, 677, 437 号、及び第 5, 677, 439 号を含む。

30

#### 【0486】

ある場合においては、リボソームのような会合複合体に含まれるオリゴヌクレオチドは、非リガンド基によって修飾することができる。多数の非リガンド分子が、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布又は細胞取り込みを増強させるためにオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされており、そのようなコンジュゲーションを行うための手法は科学文献で入手可能である。そのような非リガンド部位は、コレステロール (Lettinger ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553)、コール酸 (Manoharan ら, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4: 1053)、チオエステル、例えば、ヘキシル - S - トリチルチオール (Manoharan ら, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660: 306; Manoharan ら, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3: 2765)、チオコレステロール (Oberhauser ら, Nucl. Acids Res., 1992, 20: 533)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオール又はウンデシル残基 (Saison-Behmoaras ら, EMBO J., 1991, 10: 111; Ka

40

50

banov $\bar{a}$ , FEBS Lett., 1990, 259:327; Svinarchuk $\bar{a}$ , Biochimic, 1993, 75:49)、リン脂質、例えば、ジ - ヘキサデシル - rac - グリセロール又は 1, 2 - ジ - O - ヘキサデシル - rac - グリセロ - 3 - H - ホスホン酸トリエチルアンモニウム (Manoharan $\bar{a}$ , Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651; Shear $\bar{a}$ , Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777)、ポリアミン又はポリエチレングリコール鎖 (Manoharan $\bar{a}$ , Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969)、又はアダマンタン酢酸 (Manoharan $\bar{a}$ , Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651)、パルミチル部位 (Mishra $\bar{a}$ , Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229)、又はオクタデシルアミン又はヘキシルアミノ - カルボニル - オキシコレステロール部位 (Crooke $\bar{a}$ , J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923)のような脂質部位を含む。そのようなオリゴヌクレオチドコンジュゲートの調製を教示する代表的な米国特許は前記で列記した。典型的なコンジュゲーションは、配列の1つ以上の位置においてアミノリンカーを担うオリゴヌクレオチドの合成を含む。次いで、アミノ基を、適切なカップリング又は活性化試薬を用いてコンジュゲートされている分子と反応させる。コンジュゲーション反応は、依然として固体支持体に結合しているオリゴヌクレオチド、あるいは液相におけるオリゴヌクレオチドの引き続いての切断のいずれかで行うことができる。HPLCによるオリゴヌクレオチドコンジュゲートの精製により、典型的には、純粋なコンジュゲートが得られる。

#### 【0487】

上述した修飾は、本明細書中に記載されたオリゴヌクレオチド剤と共に用いるのに適している。

#### 融合脂質

用語「融合性」とは、脂質又は他の薬物の送達システムの、細胞の膜と融合する能力をいう。膜は原形質膜、又は細胞小器官、例えば、エンドソーム、核等を囲む膜のいずれかであり得る。適切な融合性脂質の例は、限定されるものではないが、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、DODAC、DODMA、DODAP、又はDLindMAを含む。いくつかの実施形態において、会合複合体は、例えば、エンドソーム放出のための脂質にコンジュゲートしたイミダゾール部位のような小分子を含む。

#### 【0488】

#### PEG又はPEG脂質

カチオン性及び融合性脂質に加えて、会合複合体は、ATTA脂質又はPEG脂質のような二層安定化成分 (BSC) を含む。例示的な脂質は以下の通りである：例えば、WO05/026372号に記載されたジアルキルオキシプロピルにカップリングされたPEG (PEG-DAA)、例えば、米国特許公開番号第20030077829号及び第2005008689号に記載されたジアシルグリセロールにカップリングされたPEG (PEG-DAG)、ホスファチジルエタノールアミン (PE) にカップリングされたPEG (PEG-PE)、又はセラミドにコンジュゲートされたPEG又はそれらの混合物 (例えば、米国特許第5, 885, 613号参照)。好ましい実施形態において、会合は本明細書中に記載されたPEG脂質、例えば、式 (XV)、式 (XV') 又は式 (XVI) のPEG脂質を含む。一つの好ましい実施形態において、BSCはSPLPの凝集を阻害するコンジュゲート脂質である。適切なコンジュゲート基質は、限定されるものではないが、PEG脂質コンジュゲート、ATTA-脂質コンジュゲート、カチオン性 - ポリマー - 脂質コンジュゲート (CPL) 又はその混合物を含む。一つの好ましい実施形態において、SPLPはPEG脂質コンジュゲート、あるいはCPLを伴うATTA-脂質コンジュゲートのいずれかを含む。

#### 【0489】

PEGはポリエチレングリコール、2つの末端ヒドロキシル基を持つエチレンPEG反復単位の直線状水溶性ポリマーである。PEGはそれらの分子量によって分類され；例え

ば、PEG 2000は約2,000ダルトンの平均分子量を有し、PEG 5000は約5,000ダルトンの平均分子量を有する。PEGはシグマケミカル(Sigma Chemical)社及び他の会社から商業的に入手可能であり、例えば、以下の：モノメトキシポリエチレングリコール(MePEG-OH)、モノメトキシポリエチレングリコール-スクシネート(MePEG-S)、モノメトキシポリエチレングリコール-スクシンイミジルスクシネート(MePEG-S-NHS)、モノメトキシポリエチレングリコール-アミン(MePEG-NH<sub>2</sub>)、モノメトキシポリエチレングリコール-トレシレート(MePEG-TRES)、及びモノメトキシポリエチレングリコール-イミダゾリル-カルボニル(MePEG-IM)を含む。加えて、モノメトキシポリエチレングリコール-酢酸(MePEG-CH<sub>2</sub>COOH)は、例えば、PEG-DAAコンジュゲートを含めたPEG脂質コンジュゲートを調製するのに特に有用である。

10

#### 【0490】

好ましい実施形態において、PEGは約550ダルトン~約10,000ダルトン、より好ましくは約750ダルトン~約5,000ダルトン、より好ましくは約1,000ダルトン~約5,000ダルトン、より好ましくは約1,500ダルトン~約3,000ダルトン、さらに好ましくは約2,000ダルトン、又は約750ダルトンの平均分子量を有する。PEGは、所望により、アルキル、アルコキシ、アシル又はアリアル基によって置換することができる。PEGは脂質に直接的にコンジュゲートすることができるか、あるいはリンカー部位を介して脂質に連結させてもよい。PEGを脂質にカップリングさせるのに適したいずれのリンカー部位も用いることができ、例えば、非エステル含有リンカー部位及びエステル含有リンカー部位を含む。好ましい実施形態において、リンカー部位は非エステル含有リンカー部位である。本明細書中で用いるように、用語「非エステル含有リンカー部位」とは、カルボン酸エステル結合(-OC(O)-)を含有しないリンカー部位をいう。適切な非エステル含有リンカーは、限定されるものではないが、アミド(-C(O)NH-)、アミノ(-NR-)、カルボニル(-C(O)-)、カルバミン酸(-NHC(O)O-)、尿素(-NHC(O)NH-)、ジスルフィド(-S-S-)、エーテル(-O-)、スクシニル(-(O)CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-)、スクシンイミジル(-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-NH-)、エーテル、ジスルフィド等、ならびに(カルバミン酸リンカー部位及びアミドリナー部位の双方を含有するリンカーのような)それらの組合せを含む。好ましい実施形態において、カルバミン酸リンカーを用いて、PEGを脂質にカップリングさせる。

20

30

#### 【0491】

他の実施形態において、エステル含有リンカーを用いて、PEGを脂質にカップリングさせる。適切なエステル含有リンカー部位は、例えば、カルボネート(-OC(O)O-)、スクシノイル、ホスフェートエステル(-O-(O)POH-O-)、スルホネートエステル、及びそれらの組合せを含む。

#### 【0492】

##### 標的化剤

いくつかの実施形態において、会合複合体は標的化剤を含む。例えば、標的化剤を会合複合体(例えば、リボソーム)の表面に包含させ、会合複合体が体内の標的とされた領域に向かうのを促進することができる。標的化剤の例はガラクトース、マンノース、及び葉酸である。標的化剤の他の例は、小分子受容体、ペプチド及び抗体を含む。いくつかの実施形態において、標的化剤はオリゴヌクレオチド剤のような治療部位にコンジュゲートされている。いくつかの実施形態において、標的部位を直接的に会合複合体の脂質成分に結合させる。いくつかの実施形態において、標的部位は、好ましくは平均分子量2000amuを持つPEGを介して脂質成分に直接的に結合させる。いくつかの実施形態において、標的化剤は、例えば、会合複合体の表面にはコンジュゲートされていない。

40

#### 【0493】

##### 構造成分

いくつかの実施形態において、会合複合体は、複合体(例えば、リボソーム)の構造を

50

改善する1つ以上の成分を含む。いくつかの実施形態において、dsRNAのような治療剤をコレステロールのような親油性化合物に結合（例えば、コンジュゲート）させることができ、それにより、dsRNAに対する親油性アンカーを提供する。いくつかの実施形態において、コレステロールのような親油性部位へのdsRNAのコンジュゲーションは、会合複合体のカプセル化効率を改善することができる。

**【0494】**

## 会合複合体の特性

リポソームのような会合複合体は、一般には、約25nm～約500nmの範囲の水力学直径を持つ粒子である。いくつかの好ましい実施形態において、会合複合体は、500nm未満、例えば、約25～約400nm、例えば、約25nm～約300nm、好ましくは約120nm以下である。

10

**【0495】**

いくつかの実施形態において、RNAに対する会合複合体内の総賦形剤の重量比は約20：1未満、例えば、約15：1である。いくつかの好ましい実施形態において、重量比率は10：1未満、例えば、約7.5：1である。

**【0496】**

いくつかの実施形態において、会合複合体は、会合複合体がエンドソーム条件（例えば、複合体の破壊を促進する条件）下でプロトン化されるが、生理学的条件下ではプロトン化されないようなpKaを有する。

20

**【0497】**

いくつかの実施形態において、会合複合体は、dsRNAのようなオリゴヌクレオチドの改善されたイン・ビボ送達を提供する。オリゴヌクレオチドのイン・ビボ送達は、遺伝子サイレンシングアッセイ、例えば、第VII因子のサイレンシングを測定するアッセイを用いて測定することができる。

**【0498】**

## イン・ビボ第VII因子サイレンシング実験

C57BL/6マウスは、生理食塩水又は種々の脂質製剤の尾静脈注射を受けた。脂質調製siRNAは、10µL/g動物体重の注射容量にて種々の用量で投与される。投与から24時間後に、血清試料を眼窩後部出血によって収集する。血清第VII因子濃度は、発色診断キット（Coaset Factor VII Assay Kit、ダイアファーマ（DiaPharma）社）を用い、製造業者のプロトコルに従って決定する。

30

**【0499】**

## 会合複合体の製造方法

いくつかの実施形態において、会合複合体は溶媒及び緩衝液の存在下で、オリゴヌクレオチドのような治療剤を脂質と接触させることによって作製される。いくつかの実施形態において、複数の脂質、例えば、1つ以上のカチオン性脂質（例えば、ポリアミン含有脂質、又は本明細書中に記載された生物切断性部位を含む脂質）、PEG脂質、標的脂質又は融合性脂質を溶媒に包含させる。

40

**【0500】**

いくつかの実施形態において、緩衝液は、本明細書中に記載された基質、例えば、式（I）又は式（X）の脂質のようなアミン含有脂質の実質的に全てのアミンをプロトン化するのに十分な強度のものである。

**【0501】**

いくつかの実施形態において、緩衝液は酢酸ナトリウム（pH約5）のような酢酸塩緩衝液である。いくつかの実施形態において、溶液中の緩衝液は約100mM～約300mMの濃度である。

**【0502】**

いくつかの実施形態において、溶媒はエタノールである。例えば、いくつかの実施形態において、混合物は少なくとも約90%エタノール、又は100%エタノールを含む。

50

いくつかの実施形態において、該方法は混合物を押し出して、約500nm未満の水力学直径を持つサイズ（例えば、約25nm～約300nmのサイズ、例えば、いくつかの好ましい実施形態においては、粒子サイズは約40～120nmの範囲内にある）の粒子を有する会合複合体を提供する段階を含む。いくつかの実施形態において、該方法は混合物押し出しを含まない。

【0503】

一実施形態において、リポソームは、コレステロール、PEG、エタノール、及び25mM酢酸塩緩衝液を含む溶液中に混合された本明細書中に記載の脂質の溶液を提供し、pH約5の混合物を提供することによって調製される。混合物は穏やかにボルテックスされ、この混合物にスクロースが添加される。次いで、スクロースが溶解するまで、混合物を再度ボルテックスする。この混合物に酢酸塩緩衝液中siRNAの溶液を加え、約20分間軽くボルテックスする。次いで、混合物を40℃にて少なくとも1つのフィルタ（例えば、2つの200nmフィルタ）を通して押し出し（例えば、少なくとも約10回、例えば、11回以上）、pH7.4のPBSに対して室温にて約90分間透析する。

10

【0504】

一実施形態において、リポソームは、リポソーム混合物を押し出すことなく調製される。本明細書中に記載された脂質をコレステロール、PEG、及びsiRNAと、100%エタノール、水、及び約100mM～約300mM（pH約5）の濃度を有する酢酸塩緩衝液中で混和する。混和したものを、90%エタノール中で迅速に混合する。完了に際して、混合物を約100mM～約300mM（約5のpH）の濃度を有する酢酸塩緩衝液に対して透析して（又は限外濾過で処理して）、エタノールを除去し、次いで、PBSに対して透析して（又は限外濾過で処理して）、緩衝液条件を変化させる。

20

【0505】

会合複合体は、一本鎖又は二本鎖核酸のような治療剤の不在下で形成することができ、次いで、形成に際して、1つ以上の治療上活性な一本鎖又は二本鎖核酸部位で処理して、負荷会合複合体、すなわち、治療的に活性な核酸が負荷される会合複合体を提供する。核酸は、会合複体内に捕捉されるか、会合複体の表面に吸収されるか、又はその両方である。例えば、前記リポソームのような会合複合体を形成する方法を用いて、核酸、例えば、siRNAのような一本鎖又は二本鎖RNAのような治療剤を含まない会合複合体を形成することができる。会合複合体の形成に際して、次いで、複合体をsiRNAのような治療剤で処理して、負荷された会合複合体を提供することができる。

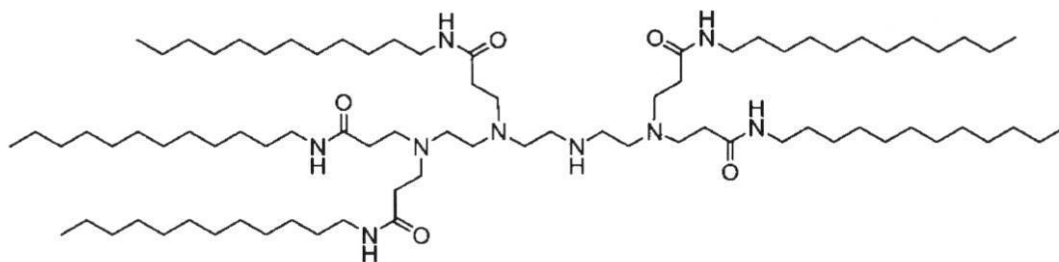
30

【0506】

一実施形態において、式(I)において記載された脂質のようなカチオン性脂質、好ましくは以下の式：

【0507】

【化122】



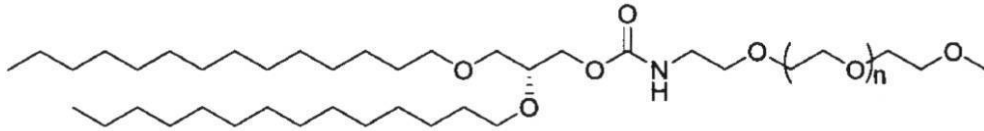
40

【0508】

のカチオン性脂質、コレステロール、及びPEG脂質、例えば、以下のPEG脂質：

【0509】

## 【化 1 2 3】



## 【0510】

のような本明細書中に記載されたPEG脂質を含む混合物がエタノール（例えば、100%エタノール）中に提供され、水性NaOAcのような水性緩衝液と組合せて、負荷されていない会合複合体を得る。次いで、会合複合体を所望により押し出しし、会合複合体のより均一なサイズ分布を提供する。次いで、会合複合体をエタノール（例えば、35%エタノール）中のsiRNAのような治療剤で処理し、それにより、負荷された会合複合体を得る。いくつかの実施形態において、次いで、会合複合体を、透析のようなエタノールを除去するプロセスで処理する。

## 【0511】

## 会合複合体の評価

前記方法のいずれかによって調製された会合複合体を同様の方法で評価する。会合複合体は、まず、目視検査によって評価される。一般に、好ましい会合複合体は凝集体又は沈澱を含まない白みがかった半透明溶液である。脂質-ナノ粒子の粒子サイズ及び粒子サイズ分布は、Malvern Zetasizer Nano ZS（マルバーン（Malvern）社、アメリカ合衆国）を用いる動的光散乱によって測定される。好ましい粒子はサイズが20~300nm、より好ましくは40~100nmである。いくつかの好ましい実施形態において、粒子サイズの分布は単峰型である。調製中の総siRNA濃度、ならびに捕捉された画分は、染料排除アッセイを用いて推定される。調製されたsiRNAの試料を、製剤破壊界面活性剤、5% Triton-X100の存在下又は不在下にてRNA-結合染料Ribogreen（モレキュラープローブズ（Molecular Probes）社）と共にインキュベートする。製剤の全siRNAは、標準曲線に対して界面活性剤を含有する試料からのシグナルによって決定される。捕捉された分率は、全siRNA含有量から（海面活性剤の不在下においてシグナルによって測定された）「遊離」siRNA含有量を差し引くことによって測定される。捕捉されたsiRNAの割合は、典型的には>85%である。

## 【0512】

## 会合複合体及びそれを含む組成物を用いる方法

## オリゴヌクレオチド剤を含む医薬組成物

会合複合体中で構築されたオリゴヌクレオチド剤は、例えば、一本鎖又は二本鎖立体配置にて、細胞又はヒトに投与することができる。二本鎖立体配置であるオリゴヌクレオチド剤は、実質的に相補的なオリゴヌクレオチドストランドに結合される。二本鎖立体配置におけるオリゴヌクレオチド剤の送達は、増大したヌクレアーゼに対する耐性のようなある種の利点をオリゴヌクレオチド剤に付与することができる。

## 【0513】

一実施形態において、本発明は、本明細書中に記載されたりボソームのような会合複合体に封入されたオリゴヌクレオチド剤、及び医薬上許容される担体を含む医薬組成物を提供する。封入されたオリゴヌクレオチド剤を含む医薬組成物は、遺伝子発現の下方制御により調節することができる病理学的プロセスのような、標的遺伝子の発現又は活性に関連する病気又は障害を治療するのに有用である。そのような医薬組成物は、送達の様式に基づいて調製される。1つの例は、非経口送達を介する、肝臓のような特定の器官/組織への送達のために調製される組成物である。

## 【0514】

本発明の特徴である医薬組成物は、標的遺伝子の発現を阻害するのに十分な用量で投与される。

10

20

30

40

50

一般に、適切な用量の封入されたオリゴヌクレオチド剤は、送達されるオリゴヌクレオチド剤が1日当たり受容者の体重キログラム当たり0.01~5.0ミリグラムの範囲であり、一般に、1日当たり体重キログラム当たり1マイクログラム~1mgの範囲内にある。医薬組成物は毎日一回投与でき、あるいはオリゴヌクレオチド剤は、1日を通して適切な間隔の2、3回又はそれ以上の部分用量(sub-dose)で、あるいは連続注入、あるいは制御された放出製剤を通じての送達を用いて投与することができる。その場合、各部分用量に含有されたオリゴヌクレオチド剤は、合計日用量を達成するために、対応して少なくしなければならない。用量単位は、例えば、封入されたオリゴヌクレオチド剤の持続放出を数日間に渡って提供する慣用的な持続放出製剤を用いて、数日間に渡り送達するために調合することもできる。持続放出製剤は当該分野でよく知られている。

10

## 【0515】

当業者であれば、限定されるものではないが、病気又は障害の重症度、従前の治療、患者の一般的健康及び/又は年齢、及び存在する他の病気を含むある種の因子が、患者を効果的に治療するのに必要な用量及びタイミングに影響し得ることを認識するであろう。さらに、治療上有効量の組成物での患者の治療は、1回の治療、又は一連の治療を含むことができる。会合複合体に封入された個々のオリゴヌクレオチド剤についての有効用量及びイン・ビボ半減期の推定は、慣用的な方法を用いて、あるいは本明細書中の他の箇所に記載された、適切な動物モデルを用いるイン・ビボテストに基づいて行うことができる。

## 【0516】

いくつかのマウス遺伝学における進歩は、種々のヒト病気研究のための多数のマウスモデルを作製している。そのようなモデルは、親油性組成物に封入されたオリゴヌクレオチド剤のイン・ビボテストで、ならびに治療上有効用量を決定するのに用いられる。

20

## 【0517】

任意の方法を用いて、リポソームのような会合複合体に封入されたオリゴヌクレオチド剤を哺乳動物に投与することもできる。例えば、投与は直接的、経口、又は非経口(例えば、皮下、心室内、筋肉内又は腹腔内注射、又は静脈内点滴)とすることができる。投与は(注射によって)迅速なものとするか、あるいは(例えば、ゆっくりとした注入、あるいは遅延放出製剤の投与により)一定期間に渡って行うことができる。

## 【0518】

会合複合体に封入されたオリゴヌクレオチド剤は、滅菌及び非滅菌水性溶液、アルコールのような通常の溶媒中の非水性溶液、又は油性の液体又は固体中の溶液のような組成物に調製することができる。そのような溶液は、緩衝液、希釈剤、及び他の適切な添加剤を含有することもできる。非経口、髄腔内又は心室内投与では、オリゴヌクレオチド剤は、滅菌水性溶液のような組成物に調製ことができ、それはさらに緩衝液、希釈剤、及び他の適切な添加剤(例えば、浸透促進剤、担体化合物、及び他の医薬上許容される担体)を含有することができる。

30

## 【0519】

会合複合体に封入されたオリゴヌクレオチド剤は、医薬上許容される担体又は希釈剤に調製することができる。(本明細書中においては、「賦形剤」とも称される)「医薬上許容される担体」は医薬上許容される溶媒、懸濁剤、又はいずれかの他の薬理的に不活性なビヒクルである。医薬上許容される担体は液体又は固体とすることができ、所望の体積、濃度及び他の付随する輸送及び化学的特性を提供するように意図された投与の計画様式で選択することができる。典型的な医薬上許容される担体は、その例として、限定されるものではないが：水、生理食塩水、結合剤(例えば、ポリビニルピロリドン又はヒドロキシプロピルメチルセルロース)、充填剤(例えば、ラクトース及び他の糖、ゼラチン、又は硫酸カルシウム)、潤滑剤(例えば、澱粉、ポリエチレングリコール、又は酢酸ナトリウム)、分解剤(例えば、澱粉又はナトリウム澱粉グリコレート)、及び湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)を含む。

40

## (実施例1)

化合物3、4及び4、5の合成及び精製：ミカエル付加条件下でのトリエチレンテトラ

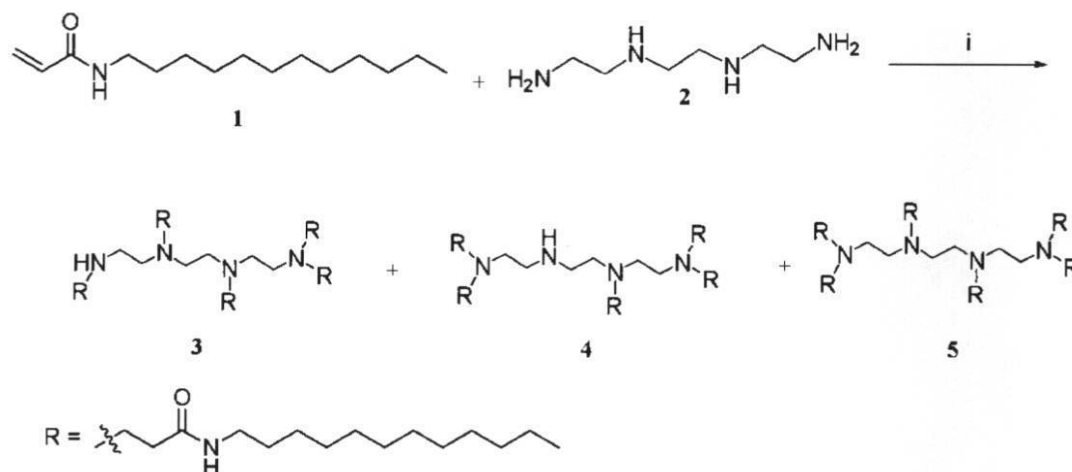
50

ミンのアルキル化 - 方法 1 (スキーム 1)

【0520】

【化124】

スキーム1<sup>a</sup>



<sup>a</sup>(i) 90°C、純物、5日間

10

20

【0521】

350 mLの圧力びん中に、N - ドデシルアクリルアミド 1 (84 g, 0.35 モル) [Slee, Deborah H.; Romano, Suzanne J.; Yu, Jinghua; Nguyen, True N.; John, Judy K.; Raheja, Neil K.; Axe, Frank U.; Jones, Todd K.; Ripka, William C. Journal of Medicinal Chemistry (2001), 44 (13), 2094 - 2107] を取り、容器を穏やかに加熱することによって固体をアルゴン下で融解させた。この融解物にトリエチレンテトラミン 2 (10.2 g, 0.07 モル) を加え、混合物を 90 にて 5 日間加熱した。アクリルアミド 1 へのトリエチレンテトラミン 2 のミカエル付加により、純物反応条件下で、少量の低アルキル化生成物と共に、2つの5アルキル化生成物、及び1つの6アルキル化生成物を得た。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH : NEt<sub>3</sub> (90 : 5 : 5) を溶離剤として用いる TLC によって、反応混合物を分析した。TLC は出発アクリルアミド 1 のほとんど完全な消費を示した。反応混合物をジクロロメタン (40 mL) に溶解し、シリカゲルプレバックカラム上に装填して、混合物を溶離剤 H<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH : NEt<sub>3</sub> (48 : 1 : 1 から 8 : 1 : 1) を用いて分離した。完全な分離を達成するために、同一条件を用いる多重カラムを行い、以下の純粋な生成物を得た。必要な 5 付加生成物 3 及び 4 が、6 付加生成物 5 と共に単離された。反応混合物においては、低級付加生成物のいくらかもまた、粗製反応混合物の TLC 及び LC - MS で検出された。

30

【0522】

N - ドデシル - 3 - ( ( 2 - ドデシルカルバモイル - エチル ) - { 2 - [ ( 2 - ドデシルカルバモイル - エチル ) - 2 - { ( 2 - ドデシルカルバモイル - エチル ) - [ 2 - ( 2 - ドデシルカルバモイル - エチルアミノ ) - エチル ] アミノ } - エチルアミノ ) プロピオンアミド。2つの5 - アルキル化誘導体の1つである化合物 3 (異性体 I) は淡黄色発泡体 (12 g, 13%) として単離された。MS m/z 672 (M + 2H / 2), 448 (M + 3H / 3)。<sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub> δ 0.87 (t, J = 6.5 Hz, 15H), 1.20 ~ 1.39 (m, 92H), 1.46 ~ 1.57 (m, 12H), 2.20 ~ 2.50 (m, 16H), 2.60 ~ 2.78 (m, 10H), 3.10 ~ 3.25 (m, 12H), 6.98 (bs, 3H), 7.41 (bs, 1H), 7.63 (bs, 1H), 8.85 (bs, 1H)。<sup>13</sup>C NMR CDCl<sub>3</sub> δ 14.33, 2

40

50

2.90, 27.37, 29.59, 29.67, 29.88, 29.89, 29.92, 32.13, 39.74, 172.77。

【0523】

(3 - [ (2 - { 2 - [ { 2 - ビス - (2 - ドデシルカルバモイル - エチル) - アミノ ] - エチル } - (2 - ドデシルカルバモイル - エチル) - アミノ ] - エチルアミノ } - エチル) - (2 - ドデシルカルバモイル - エチル) - アミノ ] - N - ドデシル - プロピオンアミド)。第二の5 - アルキル化誘導体である化合物4 (異性体II) は白色粉末 (13.7 g, 14%) として単離された。MS  $m/z$  672 ( $M + 2H / 2$ ), 448 ( $M + 3H / 3$ )。 $^1H$  NMR  $CDCl_3$   $\delta$  0.87 (t,  $J = 6.5$  Hz, 15H), 1.20 ~ 1.39 (m, 92H), 1.44 ~ 1.54 (m, 12H), 2.30 ~ 2.45 (m, 8H), 2.46 ~ 2.54 (m, 8H) 2.55 ~ 2.85 (m, 10H), 3.15 ~ 3.30 (m, 12H), 6.98 (bs, 1H), 8.85 (bs, 1H)。 $^{13}C$  NMR  $CDCl_3$   $\delta$  14.33, 22.89, 27.28, 27.38, 29.59, 29.69, 29.88, 29.89, 29.92, 32.13, 39.65, 39.74, 50.84, 172.63, 172.75, 172.81。

10

【0524】

これと共に、2 : 3 (3 : 4) の比率の化合物3及び4の純粋な混合物 (11.6 g, 12%) も単離された。

3 - [ { 2 - [ { 2 - [ ビス - (2 - ドデシルカルバモイル - エチル) - アミノ ] - エチル } - (2 - ドデシルカルバモイル - エチル) - アミノ ] - エチル } - (2 - ドデシルカルバモイル - エチル) - アミノ ] - N - ドデシル - プロピオンアミド。6アルキル化生成物5がクリーム色粉末 (16.3 g, 17%) として単離された。MS  $m/z$  792 ( $M + 2H / 2$ ), 528 ( $M + 3H / 3$ )。 $^1H$  NMR  $DMSO - d_6$   $\delta$  0.87 (t,  $J = 7$  Hz, 18H), 1.15 ~ 1.40 (m, 112H), 1.45 ~ 1.53 (m, 12H), 2.20 ~ 2.35 (m, 8H) 2.37 ~ 2.50 (m, 12H), 2.64 ~ 2.78 (m, 12H), 3.10 ~ 3.25 (m, 12H), 7.26, (bs, 2H)。 $^{13}C$  NMR  $CDCl_3$   $\delta$  14.32, 22.89, 27.34, 27.38, 29.59, 29.69, 29.90, 29.92, 32.13, 39.77, 50.85, 172.80。

20

30

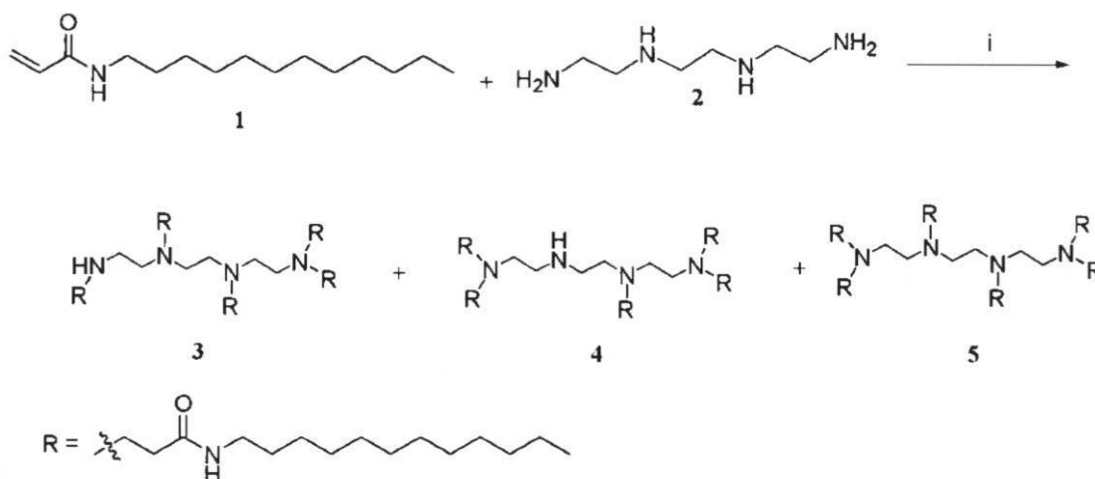
(実施例2)

化合物3、4及び4の合成及び精製：ミカエル付加条件下でのトリエチレンテトラミンのアルキル化 - 方法2 (スキーム2)

別の実験において、高温での出発アクリルアミド1の重合を妨げるために、ラジカルクエンチャベンゾキノン反応混合物に加えた。

【0525】

## 【化 1 2 5】

スキーム2<sup>a</sup>

10

<sup>a</sup>(i) 90°C、触媒量(15 mg)のベンゾキノン、5日間

## 【0 5 2 6】

この方法において、ラジカルクエンチャベンゾキノンに反応混合物に加えた以外は、方法1(実施例1)のそれと同様な反応を行った。150 mLの圧力びん中で、N-ドデシルアクリルアミド1(24 g, 100ミリモル)を取り、これに、15 mgのベンゾキノンに加え、容器を穏やかに加熱することによって固体アクリルアミドをアルゴン下で融解させた。この融解物にトリエチレンテトラミン2(2.9 g, 20ミリモル)を加え、混合物を90°Cにて5日間加熱した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NEt<sub>3</sub>(90:5:5)を溶離剤として用いるTLCによって、反応混合物を分析した。TLCは出発アクリルアミド1のほとんど完全な消費を示した。反応混合物をジクロロメタン(40 mL)に溶解させ、所望の生成物3、4及び5を実施例1に記載したように単離した。この場合、6付加生成物の量のわずかな増加が観察された。

20

## 【0 5 2 7】

化合物3:5付加生成物、異性体Iは単黄色の発泡体(3.4 g, 13%)として単離された。この化合物についての分析及びスペクトルデータは方法1によって得られた3のそれと同一であった。

30

## 【0 5 2 8】

化合物4:5付加生成物、異性体IIは白色粉末(3.9 g, 14%)として単離された。この化合物についての分析及びスペクトルデータは方法1によって得られた4のそれと同一であった。異性体3及び4の純粋な混合物(1.9 g, 7%)も単離された。

## 【0 5 2 9】

化合物5:6付加生成物はクリーム色粉末(6.9 g, 26%)として単離された。この化合物についての分析及びスペクトルデータは方法1によって得られた5のそれと同一であった。

40

## (実施例3)

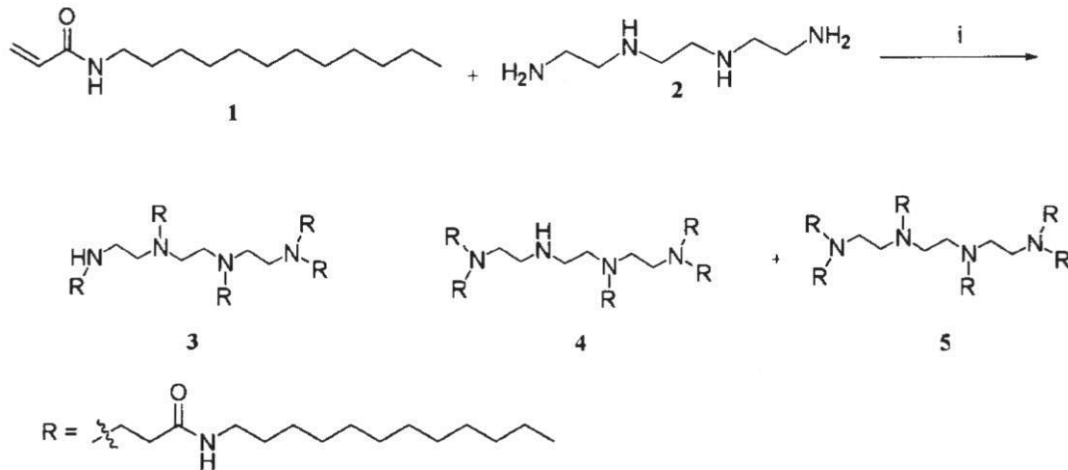
化合物3、4及び4の合成及び精製:ミカエル付加条件下でのトリエチレンテトラミンのアルキル化-方法3(スキーム3)

この方法においては、ハウ酸(Chaudhuri, Mihir K.; Hussain, Sahid; Kantam, M. Lakshmi; Neelima, B. Tetrahedron Letters(2005), 46(48), 8329-8331.)のような促進剤の存在下でミカエル付加を行って、反応速度を高めた。

## 【0 5 3 0】

## 【化 1 2 6】

## スキーム3\*



\* (i) 90°C、ホウ酸水溶液、2日間

## 【 0 5 3 1 】

この方法においては、ミカエル付加促進剤、飽和ホウ酸水溶液を反応混合物に加えた以外は方法 1 (実施例 1) と同様な反応を行った。150 mL 圧力びん中で、容器を穏やかに加熱することによって N - ドデシル - アクリルアミド 1 (24 g, 100 ミリモル) をアルゴン下で融解させ、これに 3 mL のホウ酸水溶液を加えた。この融解物にトリエチレンテトラミン 2 (2.9 g, 20 ミリモル) を加え、混合物を 90 にて 2 日間加熱した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH : NEt<sub>3</sub> (90 : 5 : 5) を溶離剤として用いる TLC によって、反応混合物を分析した。TLC は、出発アクリルアミド 1 のほとんど完全な消費を示した。反応混合物をジクロロメタン (100 mL) に溶解させ、溶液を固体炭酸水素ナトリウムと共に攪拌し、有機層を濾過し、ロータリーエバポレータ中で濃縮した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH : NEt<sub>3</sub> (48 : 1 : 1 から 8 : 1 : 1) を用いるカラムクロマトグラフィ (シリカゲル) によって、この粗製生成物を精製した。完全な分離を達成するために、同一条件を用いて多重カラムを行い、以下の純粋な生成物を得た。この反応条件下では、化合物 4 (異性体 II) 及び 6 付加生成物 5 の収率の増加が達成された。

## 【 0 5 3 2 】

化合物 3 : 5 付加生成物 3、異性体 I は淡黄色発泡体 (3.1 g, 11%) として単離された。この化合物についての分析及びスペクトルデータは方法 1 によって得られた 3 のそれと同一であった。

## 【 0 5 3 3 】

化合物 4 : 5 付加生成物 4、異性体 II は白色粉末 (5.7 g, 20%) として単離されたこの化合物についての分析及びスペクトルデータは方法 1 によって得られた 4 のそれと同一であった。異性体 3 及び 4 の純粋な混合物 (2.1 g, 7%) も単離された。

## 【 0 5 3 4 】

化合物 5 : 6 付加生成物 5 はクリーム色粉末 (7.6 g, 28%) として単離された。この化合物についての分析及びスペクトルデータは方法 1 によって得られた 5 のそれと同一であった。

## (実施例 4)

化合物 3 及び 4 の合成及び精製 : ミカエル付加条件下でのトリエチレンテトラミンのアルキル化 - 方法 4 (スキーム 4)

別の実験において、6 付加生成物 5 の形成を最小化するために、溶媒の使用を試みた。

## 【 0 5 3 5 】

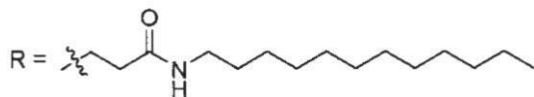
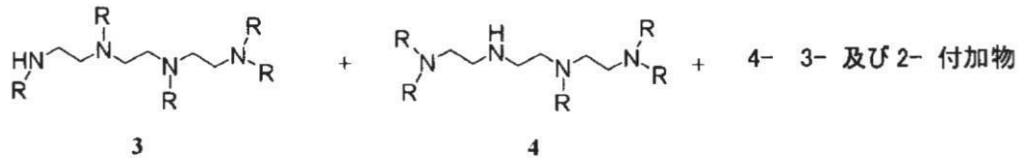
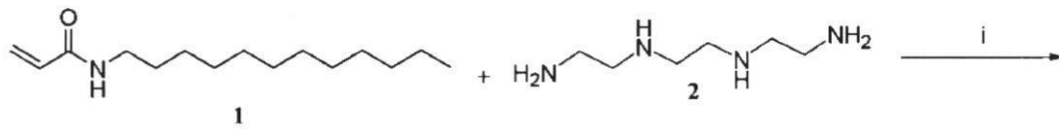
10

20

30

40

## 【化 1 2 7】

スキーム4<sup>a</sup>

<sup>a</sup>(i) 90°C、アセトニトリル又は DMF、5日間

## 【 0 5 3 6】

この方法においては、攪拌しつつ 90 の溶媒の存在下で反応を行った以外は、方法 1 (実施例 1) 及び方法 2 (実施例 2) と同様な反応を行った。150 mL の圧力びん中で、N-ドデシル-アクリルアミド 1 (10 g, 41.8 ミリモル) を 20 mL のアセトニトリル又は DMF いずれかに溶解させた。この溶液にトリエチレンテトラミン 2 (1 g, 6.8 ミリモル) を加え、混合物を、90 にて 5 日間加熱した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH : NEt<sub>3</sub> (90 : 5 : 5) を溶離剤として用いる TLC によって、反応混合物を分析した。TLC は、少量の所要の 5 付加生成物の形成を示した。この反応における主要生成物は、非常に極性の強い低級付加生成物及び 4 付加生成物の混合物であった。

(実施例 5)

反応混合物からの未反応アクリルアミドの分離及び / 又は単離された生成物 3、4 及び 5

反応混合物から未反応アクリルアミド 1 を除去するために、反応混合物を酢酸エチル又は DMF で希釈し、ポリスチレン又はポリマー結合チオール (又はメルカプタン) と共に攪拌して、全てのアクリルアミドを捕捉した。固定化されたチオールを溶液に加え、室温にて穏やかに振盪し、固体を濾別した。固定化されたチオールのアクリルアミドへのミカエル付加により、全ての未反応アクリルアミドが捕捉される。各所望の異性体の単離後の汚染物としての痕跡量のアクリルアミドも、同一条件下で完全に除去された。単離された生成物 3 (又は 4 又は 5) を DMF 又は酢酸エチルに溶解させ、固定化されたアクリルアミドクエンチャ、フィルタと共に穏やかに振盪し、真空中での濾液の蒸発によりアクリルアミド汚染のない純粋な化合物 3 (又は 4 又は 5) を得る。

(実施例 6)

化合物 5 からの第一級及び第二級アミン汚染物の分離

痕跡量の第一級及び第二級アミン汚染物を除去するための化合物 5 のカラムクロマトグラフィ分離の後に、化合物を酢酸エチル又は DMF に溶解させ、固体結合又は固定化イソチオシアネートと共に室温で一晩攪拌した。固体を濾別し、濾液の蒸発により、主要な又は二次的なアミン汚染物のいずれも含まない純粋な化合物 5 を得る。

(実施例 7)

化合物 3 及び 4 からの第一級アミンの汚染物の分離

反応の完了後に、反応混合物を室温にてジクロロメタン中のトリエチルアミンの存在下でテトラクロロフタル酸無水物によって処理し、溶媒を蒸発させ、残渣を酢酸エチルと共に攪拌し、固体を濾過し、濾液を濃縮して、第一級アミンの汚染物を含まない生成物を得た。

10

20

30

40

50

【0537】

【表1】

表1

## 生成物3及び4の合成方法

方法	温度	促進剤	溶媒	ラジカル クエンチャ	備考	
1	90°C	なし	純物	なし	総単離収率39%の3及び4の形成。6付加生成物5は17%単離された。反応は完了までに6日間要した。	10
2	90°C	なし	純物	ベンゾキノン	ベンゾキノンはアクリルアミド1の重合を抑制するために用いられた。3及び4の総単離収率は34%であった。但し、5も26%単離された。反応時間は方法1と同じ。	20
3	90°C	ホウ酸	純物	なし	反応速度が促進された。反応は2日間で完了した。3及び4の総収率は38%であった。さらに5も28%単離された。	
4	80-120°C	なし	DMF	なし	反応は非常に緩慢。低級付加生成物のみが形成された。	30

【0538】

(実施例8)

生成物3、4及び5の塩酸塩の調製方法

取扱いの容易性を改善し、前記リストの化合物の安定性を増加させるために、それらに対応する塩酸塩6、7及び8に変換した。

【0539】

化合物3の塩酸塩(6)：アミン3(9.4g)を100mLの熱無水1,4-ジオキササンに溶解させ、ジオキササン中の4M HClの100mLを加え、混合物を室温にて一晩攪拌した。窒素を反応混合物に1時間通気して、過剰のHClを除去し、残存する溶液を~10mLまで濃縮した。これにEtOAc：ヘキサン(1：1)の不均一混合物100mLを加え、沈殿した生成物を濾過し、酢酸エチル(50mL)、ヘキサン(100mL)で洗浄し、得られた粉末を真空下で乾燥させて、純粋な生成物6(9.99g, 96%)をクリーム色粉末として得た。<sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub> δ 0.83 (t, J = 6.5 Hz, 15H), 1.20~1.39 (m, 92H), 2.64~2.70 (m, 8H), 2.90~3.10 (m, 16H), 3.25~3.45 (m, 12H), 3.46~3.64 (m, 4H), 5.20~6.0 (bs, 2H), 8.05~8.15 (m, 5H), 10. (bs, 3H)。<sup>13</sup>C NMR CDCl<sub>3</sub> δ 13.83, 22.04, 26.48, 28.69, 28.79, 28.90, 29.04, 31.26, 38.71, 168.38, 168.53。元素分析：C<sub>81</sub>H<sub>163</sub>N<sub>9</sub>O<sub>5</sub>·4H

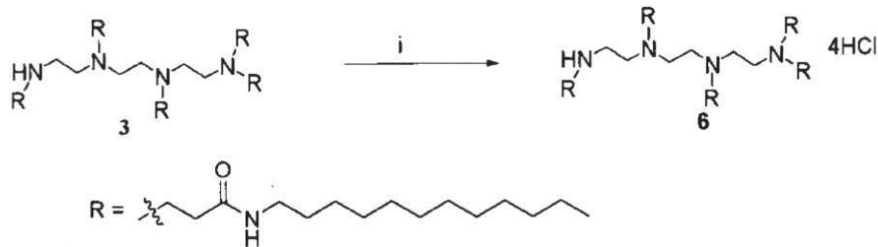
50

C 1 . 3 H<sub>2</sub> Oとして、計算値：C, 63.05; H, 11.30; N, 8.17; Cl, 9.19 実測値：C, 63.13; H, 11.06; N, 8.21; Cl, 9.21

【0540】

【化128】

スキーム5<sup>a</sup>



10

<sup>a</sup>(i) 1,4-ジオキサン中 4M HCl、室温、12 時間

【0541】

化合物 7

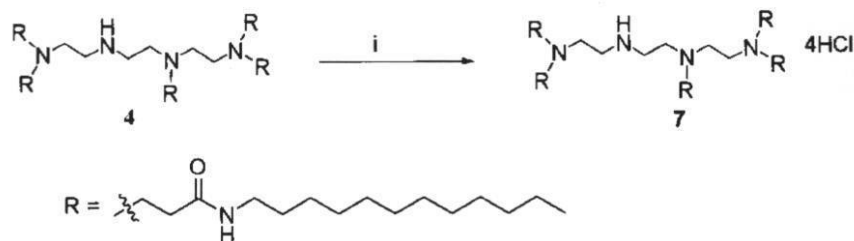
3 について前記で用いたのと同様な手法を用いて、アミン 4 (13.7 g, 10.2 ミリモル) を対応する HCl 塩 7 に変換して、6 を得た。テトラヒドロクロライド塩 7 は白色粉末 (14.6 g, 96%) として単離された。<sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub> d 0.82 (t, J = 6.5 Hz, 15 H), 1.20 ~ 1.41 (m, 92 H), 2.52 ~ 2.72 (m, 8 H), 2.90 ~ 3.10 (m, 16 H), 3.25 ~ 3.45 (m, 12 H), 3.46 ~ 3.64 (m, 4 H), 5.20 ~ 6.0 (bs, 2 H), 8.05 ~ 8.15 (m, 5 H), 10. (bs, 3 H)。<sup>13</sup>C NMR CDCl<sub>3</sub> d 8.42, 13.84, 22.04, 26.48, 28.69, 28.79, 29.00, 31.26, 45.44, 168.53, 168.60。元素分析：C<sub>41</sub>H<sub>163</sub>N<sub>9</sub>O<sub>5</sub> · 4HCl · 2H<sub>2</sub>Oとして、計算値：C, 63.79; H, 11.30; N, 8.17; Cl, 9.34 実測値：C, 63.78; H, 11.04; N, 8.40; Cl, 9.73。

20

【0542】

【化129】

スキーム6<sup>a</sup>



<sup>a</sup>(i) 1,4-ジオキサン中 4M HCl、室温、12 時間

40

【0543】

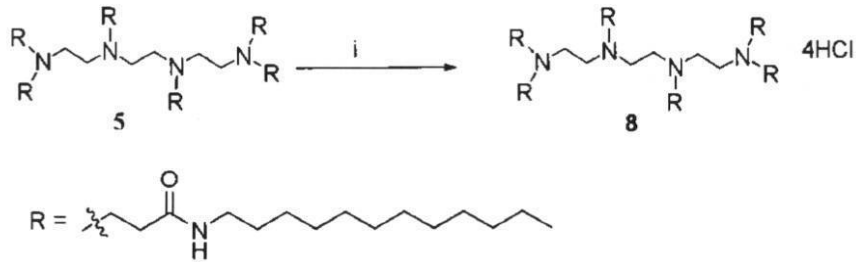
化合物 8

塩 6 について前記したのと同様な手法を用いて、アミン 5 (13.7 g, 1.2 ミリモル) を対応する HCl 8 に変換した。テトラヒドロクロライド塩 8 は白色粉末 (1.3 g, 96%) として単離された。<sup>1</sup>H NMR DMSO-d<sub>6</sub> d 0.87 (t, J = 7 Hz, 18 H), 1.13 ~ 1.30, (m, 112 H), 1.35 ~ 1.53 (m, 12 H), 2.10 ~ 2.25 (m, 12 H), 2.30 ~ 2.40 (m, 12 H), 2.60 ~ 2.76 (m, 12 H), 3.10 ~ 3.25 (m, 12 H), 7.26 (bs, 4 H), 7.64 (bs, 2 H), 10.1 (bs, 4 H)。

50

【0544】

【化130】

スキーム7<sup>a</sup>

10

<sup>a</sup>(i) 1,4-ジオキサン中 4M HCl、室温、12 時間

【0545】

(実施例 9)

化合物 3 及び 4 の直接的合成のためのトリエチレンテトラミン上のアミノ基の選択的保護

工程 1 : 化合物 10 の調製 : アセトニトリル ( 500 mL ) 中のトリエチレンテトラミン 2 ( 20.55 g , 140.52 ミリモル , シグマアルドリッチ ( Sigma - Aldrich ) 社から購入 ) を攪拌しながら氷浴で冷却した。トリフルオロ酢酸エチル ( 35.20 mL , 295.09 ミリモル ) を攪拌溶液に加え、20 時間攪拌した。溶媒及び揮発物を減圧下で除去し、高真空下で乾燥させ、9 を白色固体 ( 44.4 g , 94 % ) として得た。かくして得られた生成物をさらに精製することなく次の反応で用いることができた ( Wender P. A. Organic Letter , 2005 7 , 4815 ) 。

20

【0546】

粗製化合物 9 ( 23.70 , 70 ミリモル ) をアセトニトリル ( 400 mL ) に溶解させ、氷浴上で攪拌した。N - ( ベンジルオキシカルボニルオキシ ) スクシネート ( Z - O Su , 43.73 g , 175 ミリモル , Novabiochem から購入 ) 及びトリエチルアミン ( 23.40 mL , 210 ミリモル ) を反応混合物に加え、一晚攪拌した。溶媒を除去し、残渣をジクロロメタン ( DCM ) に抽出し、順次、水 ( 2 回 ) 及び食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を真空中で除去し、そのように得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ ( グラジエント溶出、30 % ~ 70 % EtOAc / ヘキサン ) によって精製して、化合物 10 を白色固体 ( 38.2 g , 89 % ) として得た。<sup>1</sup>H NMR ( DMSO - d<sub>6</sub> , 400 MHz ) δ = 9.60 ~ 9.50 ( m , 2 H ) 7.40 ~ 7.20 ( m , 10 H ) , 5.02 ( s , 4 H ) , 3.40 ~ 3.20 ( m , 12 H ) 。 MS : C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>HF<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> として、計算値 : 606.19 , 実測値 : 607.2 ( M<sup>+</sup> ) 。

30

【0547】

工程 2 : 化合物 11 の調製 : 化合物 10 ( 12.60 g , 20.78 ミリモル ) を室温にてメタノール ( MeOH , 150 mL ) に懸濁させ、エタノール ( 40 mL ) 中のメチルアミンの 8 M 溶液を攪拌しながら懸濁液に加えた。全ての固体を溶液とし、室温で 1 時間攪拌した後、混合物を 50 °C まで温め、8 時間攪拌した。反応を TLC によってモニターした。全ての溶媒を減圧下で除去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ ( グラジエント溶出、10 % MeOH / DCM ~ 10 : 10 : 80 , MeOH : TEA : DCM ) によって精製して、生成物 11 ( 7.80 g , 91 % ) を淡黄色ガム状液体として得た。<sup>1</sup>H NMR ( DMSO - d<sub>6</sub> , 400 MHz ) δ = 7.80 ~ 7.40 ( m , 10 H ) , 5.02 ~ 4.94 ( m , 4 H ) , 3.45 ~ 3.05 ( m , 8 H ) , 2.70 ~ 2.55 ( m , 4 H ) , 2.20 ( bs , 4 H ) 。 MS : C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> とし

40

50

て、計算値：414.23，実測値：415.20 (M<sup>+</sup>)。

【0548】

工程3：化合物13の調製：化合物12は、1.1モル当量のトリフルオロ酢酸エチル (8.80 mL, 77.10ミリモル)と反応させることによって、化合物9の合成について工程1に記載したように、トリエチレンテトラミン100 (10.25 g, 70.09ミリモル)から調製した。そのように得られた組成物12を無水DCM (400 mL)に溶解させ、0℃まで冷却した。(Boc)<sub>2</sub>O (53.53ミリモル, 245.31ミリモル)及びトリエチルアミン (48 mL, 350ミリモル)を加え、反応混合物を一晩攪拌した。反応の進行をTCLによってモニターした。溶媒を真空中で除去し、残渣をDCMに抽出し、水、食塩水で洗浄し、乾燥させた。DCMを除去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (グラジエント溶出50% EtOAc / ヘキサン ~ EtOAc) によって精製して、所望の生成物13 (34.20 g, 92%)を白色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ = 9.51 ~ 9.38 (m, 1H), 6.82 (bs, 1H) 3.30 ~ 3.00 (m, 12H), 1.58 ~ 1.30 (s, 27H)。MS: C<sub>23</sub>H<sub>41</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>として、計算値：542.29，実測値：543.4 (M<sup>+</sup>)。

10

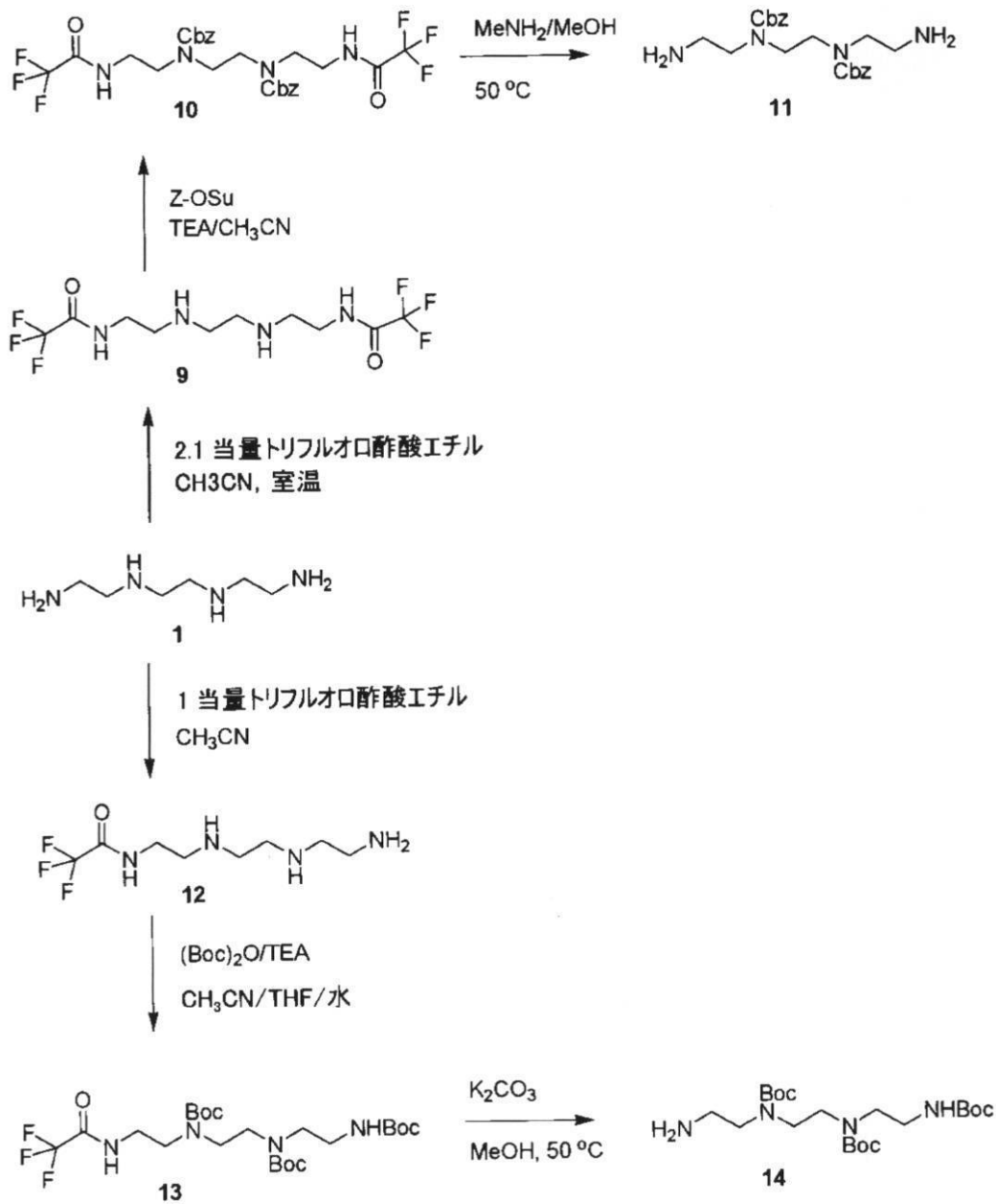
【0549】

工程4：14の調製：MeOH (200 mL)中の化合物13 (25 g, 47.32ミリモル)の溶液を水 (1 mL)の存在下でK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 g)と共に50℃にて一晩攪拌した。反応の進行をTLCによってモニターした。固体K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を濾別し、MeOHで洗浄し、合わせた洗浄液及び溶媒を真空中で除去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィによって精製して、所望の生成物14 (10.2 g, 50%)を白色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ = 6.83 (bs, 1H) 2.95 ~ 3.30 (m, 12H), 2.62 ~ 2.50 (m, 2H), 1.25 ~ 1.45 (m, 27H)。MS: C<sub>21</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>として、計算値：446.31，実測値：447.4 (M<sup>+</sup>)。

20

【0550】

## 【化 1 3 1】

スキーム8<sup>a</sup>

10

20

30

## \* トリエチレンテトラミン窒素の選択的保護

## 【0551】

工程5：化合物15の調製：化合物9（23.0g，68.02ミリモル）をアセトニトリル/ジクロロメタン（1：1，300mL）の混合物に溶解させ、0℃まで冷却した。Z-OSu（17.00g，69ミリモル）を溶液に加え、10分間攪拌した。トリエチルアミン（23.40mL，210ミリモル）を引き続いて反応混合物に加え、一晩攪拌した。溶媒及びトリエチルアミンを真空中で除去し、残渣をDCMに抽出し、水（2回）、食塩水で洗浄し、乾燥させた。溶媒を除去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ（まず、20～60% EtOAc / ヘキサン、次いで、5% MeOH / DCMで溶出）によって精製して、所望の生成物15（13.3g）を副産物10（8.5g）と共に白色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR（DMSO-d<sub>6</sub>，400MHz）δ= 9.60（bs，1H），9.30（bs，1H），7.40～7.28（m，5H），5.01（s，2H），3.40～3.10（m，8H），2.70～2.50（m，4H）。M

40

50

S : C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>F<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>として、計算値：472.15，実測値：447.473.1 (M<sup>+</sup>)。

【0552】

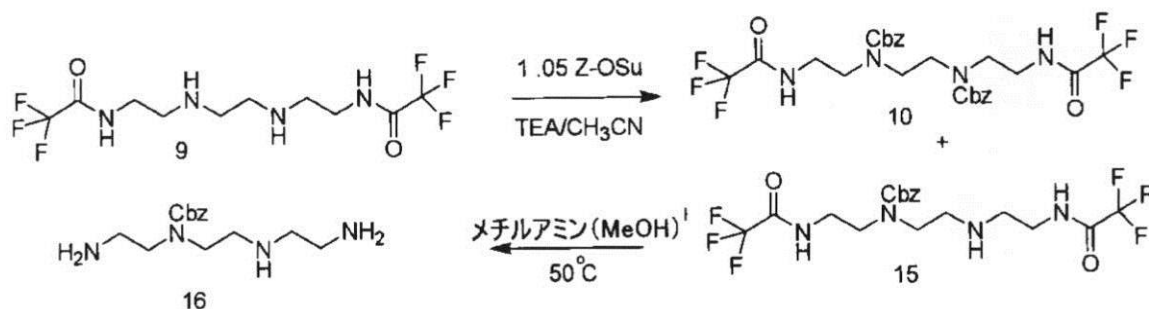
工程6：化合物16の調製：工程2に記載したようなメチルアミン(50ml, EtOH中の8M溶液)での化合物15(13.4g, 28.38ミリモル)の処理により、無色液体化合物16(6.10g, 79%)を得た。そのように得られた生成物はさらに精製することなく次の反応で用いた。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz) δ = 7.45~7.20(m, 6H), 5.07(s, 2H), 3.45~2.90(m, 8H), 2.60~2.30(m, 4H)。MS : C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>として、計算値：280.19，実測値：281.2 (M<sup>+</sup>)。

10

【0553】

【化132】

### スキーム9\*



20

### \*トリエチレンテトラミンの1つの第2窒素の選択的ブロック

【0554】

(実施例10)

5-アルキル化単一異性体4の合成 - 方法1

工程1：11とN-ドデシルアクリルアミドとの反応：ジアミン11(1.00g, 2.41ミリモル)及びN-ドデシルアクリルアミド(3.47g, 14.50ミリモル)を共に圧力チューブに取り、90にて5日間加熱した。反応をTLCによってモニターした。反応終了後、混合物をジクロロメタンに溶解させ、フラッシュクロマトグラフィによって精製して、生成物17、18及び19を得た。

30

【0555】

工程2：化合物20の調製：化合物19(2.00g, 1.46ミリモル)を酢酸エチル及びメタノール(1:2, 15ml)の混合物に溶解させ、それに2当量の酢酸を加える。触媒としてパラジウム/炭素(0.200g, 10重量%)を用いて混合物を圧力(345kPa(50psi))下で水素化して、所望の生成物20を得る。

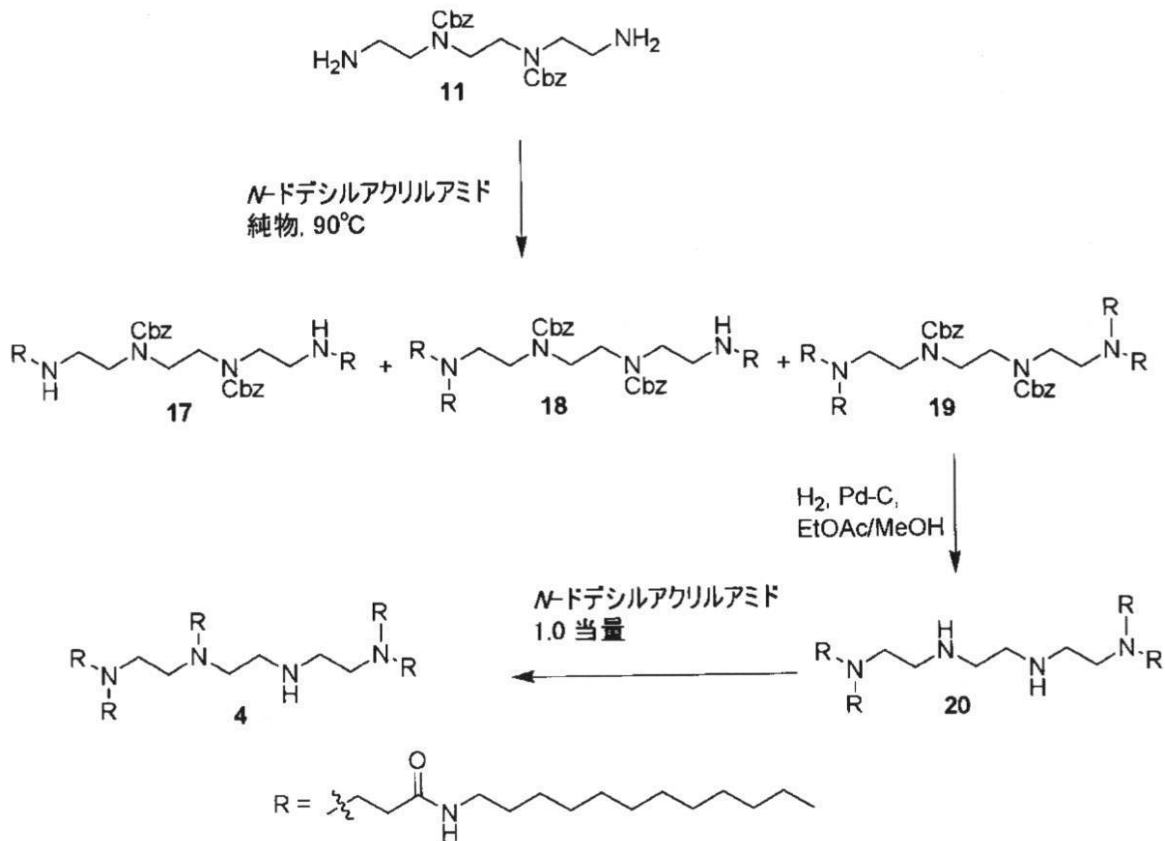
【0556】

工程3：単一の異性体4の調製：化合物20(1.50g, 1.36ミリモル)及びアクリルアミド1(0.325ミリモル, 1.36ミリモル)をトルエン(4ml)に溶解させ、90にて加熱して、化合物4を形成する。反応の進行はTLCによってモニターする。反応の完了後、混合物を室温まで冷却し、DCMに溶解させ、フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィにて精製して、所望の生成物4を得る。

40

【0557】

【化 1 3 3】  
スキーム10



10

20

## 【0558】

(実施例11)

5-アルキル化単一異性体4の合成-方法2

工程1: 化合物21の調製: 化合物16 (1.0g, 3.56ミリモル) 及び*N*-ドデシルアクリルアミド (6.00g, 7当量) を共に圧力チューブに取り、加熱して、化合物21を得る。反応の進行はTLCによってモニターする。反応の完了後、混合物をDCMに溶解させ、フラッシュシリカゲルクロマトグラフィによって精製して、所望の化合物21を得る。

30

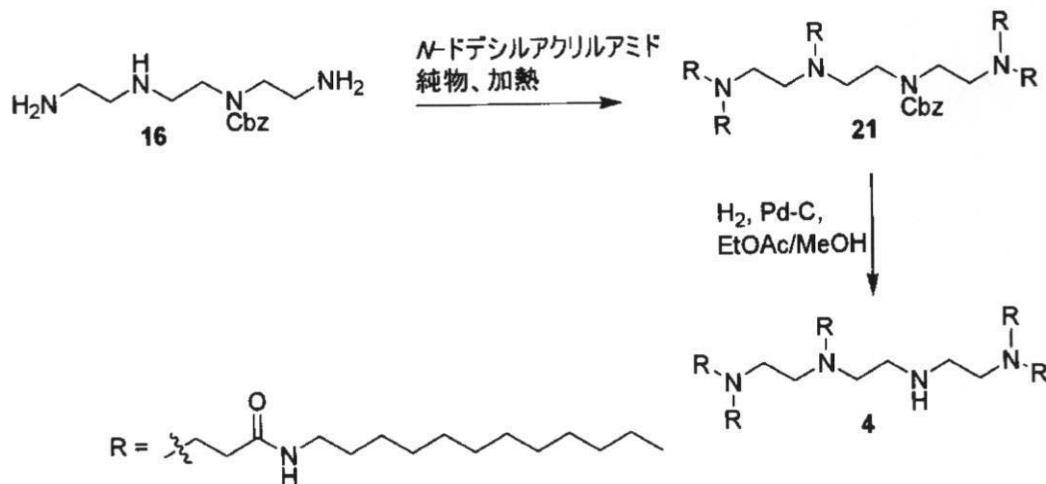
## 【0559】

工程2: 21からの化合物4の調製: 化合物21 (2.00g, 1.35ミリモル) を酢酸エチル及びメタノール (1:2, 15ml) の混合物に溶解させ、それに、2当量の酢酸を加える。混合物を圧力 (345kPa (50psi)) 下でパラジウム-炭素 (0.200g, 10重量%) 上で水素化して、所望の単一の異性体4を得る。

## 【0560】

## 【化 1 3 4】

## スキーム11



10

## 【0561】

## (実施例12)

## 5-アルキル化単一異性体3の合成 - 方法1

工程1：化合物22の調製：化合物14 (5.06 g, 11.30ミリモル) 及びN-ドデシルアクリルアミド (2.94 g, 12.43ミリモル) をトルエン中に取り、90にて5日間加熱した。TLCをチェックし、生成物の形成を示した。反応混合物をカラムシリカゲルプレパックカラム上に直接装填し、フラッシュクロマトグラフィ (5% MeOH / DCM) によって精製して、化合物22 (4.82 g, 62%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ = 8.17 (bs, 1H), 6.60 (bs, 1H), 3.30 ~ 2.95 (m, 12H), 2.70 (t, J = 5.80 Hz, 2H), 2.60 (t, J = 6.00 Hz, 2H), 2.18 (t, J = 6.40 Hz, 2H), 1.35 (m, 29H), 1.26 ~ 1.15 (m, 18H), 0.83 (t, J = 6.00 Hz, 3H)。MS: C<sub>36</sub>H<sub>71</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>として、計算値: 685.54, 実測値: 686.5 (M<sup>+</sup>)。

20

30

## 【0562】

工程2：化合物23の調製：化合物22 (4.75 g, 6.92ミリモル) をジクロロメタン (100 mL) に溶解させ、0 まで冷却した。Z-OSu (2.59 g, 1.5当量) を溶液に加え、10分間攪拌した。反応混合物を引き続いてトリエチルアミン (2.82 mL, 20.76ミリモル) と共に一晩攪拌した。溶媒及びトリエチルアミンを真空中で除去し、残渣をジクロロメタンに抽出し、順次、水 (2回) 及び食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去した後、残渣をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィ (5 ~ 10% MeOH / DCM) によって精製して、所望の生成物23 (5.33 g, 94%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 7.49 ~ 7.25 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 3.60 ~ 3.02 (m, 14H), 2.45 ~ 2.45 (m, 4H), 1.50 ~ 1.35 (m, 27H), 1.24 ~ 1.20 (m, 18H), 0.87 (t, J = 6.00 Hz, 3H)。MS: C<sub>44</sub>H<sub>77</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>として、計算値: 819.57, 実測値: 820.7 (M<sup>+</sup>)。

40

## 【0563】

工程3：化合物24の調製：ジオキサン (50 mL) 中の4M HClをジオキサン (100 mL) 中の化合物23 (5.30 g, 6.50ミリモル) の溶液に加えた。次いで、反応混合物を一晩攪拌した。反応の進行の間に、生成物が沈殿した。溶媒及びHClを真空下で除去し、白色固体を得た。残渣を、過剰のトリエチルアミンを含有するMeOH中に取り、懸濁液を1時間攪拌して、均一な溶液を得た。溶媒を真空中で除去し、残渣をEtOAcと共に粉砕し、トリエチルアミン塩酸塩を濾別した。合わせた濾液を真空下で

50

蒸発させて、ガム状の液体 24 (3.30 g, 98%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) d = 7.37 ~ 7.28 (m, 5H), 5.05 (s, 2H), 3.60 ~ 3.20 (m, 4H), 3.10 ~ 2.70 (m, 10H), 2.40 ~ 2.20 (m, 4H), 1.40 ~ 1.30 (m, 2H), 1.25 ~ 1.17 (m, 18H), 0.81 (t, J = 6.00 Hz, 3H)。MS: C<sub>29</sub>H<sub>53</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> として、計算値: 519.41, 実測値: 520.4 (M<sup>+</sup>)。

## 【0564】

工程 4: 化合物 25 の調製: 化合物 24 (1.00 g, 1.925 ミリモル) 及び N-ドデシルアクリルアミド (3.70 g, 8 当量) を共に圧力チューブに取り、高温にて加熱して、所望の化合物 25 を得る。生成物の形成は TLC によってモニターされ、引き続き、フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィによって精製して、純粋な化合物 25 を得る。

10

## 【0565】

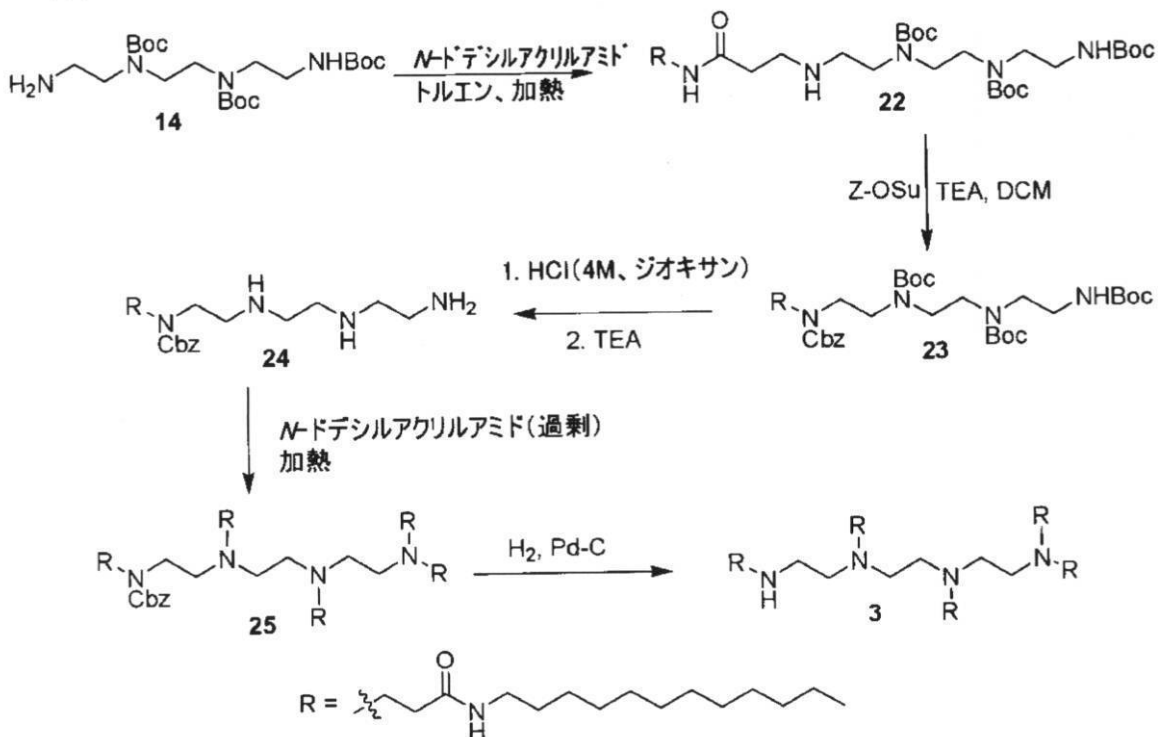
工程 5: 化合物 3 の調製: 化合物 25 (2.00 g, 1.35 ミリモル) を酢酸エチル及びメタノール (1:2, 15 ml) の混合物に溶解させ、それに、2 当量の酢酸を加える。混合物を圧力 (345 kPa (50 psi)) 下でパラジウム-炭素 (0.200 g, 10 重量%) 上で水素化して、所望の生成物 3 を得る。

## 【0566】

## 【化 135】

## スキーム 12

20



30

40

## 【0567】

## (実施例 13)

## 5-アルキル化単一異性体 3 の合成 - 方法 2

工程 1: 化合物 26 の調製: 臭化ベンジル (1.25 ml, 1.5 当量) を、DMC (100 mL) 中の化合物 22 (4.80 g, 7.00 ミリモル) 及び K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9.67 g, 10 当量) の懸濁液に加え、混合物を一晩攪拌した。反応の進行は TLC によってモニターした。固体を濾別し、MeOH 及び酢酸エチルで洗浄した。合わせた濾液を減圧下で濃縮し、そのようにして得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (50 ~ 100% EtOAc / ヘキサン) によって精製して、所望の化合物 26 (3.30 g, 61%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) d = 7.77 (bs,

50

2 H), 7.28 ~ 7.23 (m, 5 H), 6.85 ~ 6.70 (m, 1 H), 3.59 (s, 2 H), 3.20 ~ 2.20 (m, 18 H), 1.35 (s, 27 H) 1.30 ~ 1.23 (m, 2 H), 1.20 ~ 1.15 (m, 18 H), 6.81 (t, J = 6.00 Hz, 3 H)。MS: C<sub>43</sub>H<sub>77</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>として、計算値: 775.58, 実測値: 776.5 (M<sup>+</sup>)。

【0568】

工程2: 化合物27の調製: ジオキサン(50 ml)中の化合物26(3.30 g, 4.25ミリモル)をジオキサン中の4M HCl(50 ml)と共に一晩攪拌した。白色沈澱の形成が反応の間に見られた。溶媒及び酸を真空下で除去し、そのようにして得られた白色残渣を過剰のトリエチルアミンを含有するメタノールに再度溶解させた。次いで、均一な溶液を減圧下で蒸発させて、白色残渣を得た。残渣をEtOAcと共に粉碎し、トリエチルアミン塩酸塩を濾別した。濾液を減圧下で蒸発させて、所望の化合物27(2.36 g, 99%)をガム状液体として得た。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) d = 8.05 (t, J = 5.5 Hz, 1 H), 7.40 ~ 7.20 (m, 5 H), 3.58 (s, 2 H), 3.10 ~ 2.30 (m, 18 H), 1.40 ~ 1.30 (m, 2 H), 1.25 ~ 1.15 (m, 18 H), 0.82 (t, J = 6.00 Hz, 3 H)。MS: C<sub>28</sub>H<sub>53</sub>N<sub>5</sub>Oとして、計算値: 475.43, 実測値: 498.4 (M + Na)。

10

【0569】

工程3: 化合物28の調製: 純物の化合物27(1.00 g, 2.10ミリモル)及びN-ドデシルアクリルアミド(4.0 g, 8当量)を圧力チューブ中で混合し、高温まで加熱して、化合物28を形成させた。28の形成をTLC及びLC-MSによってモニターする。反応の完了の後、生成物をクロマトグラフィ精製によって単離して、純粋な化合物28を得る。

20

【0570】

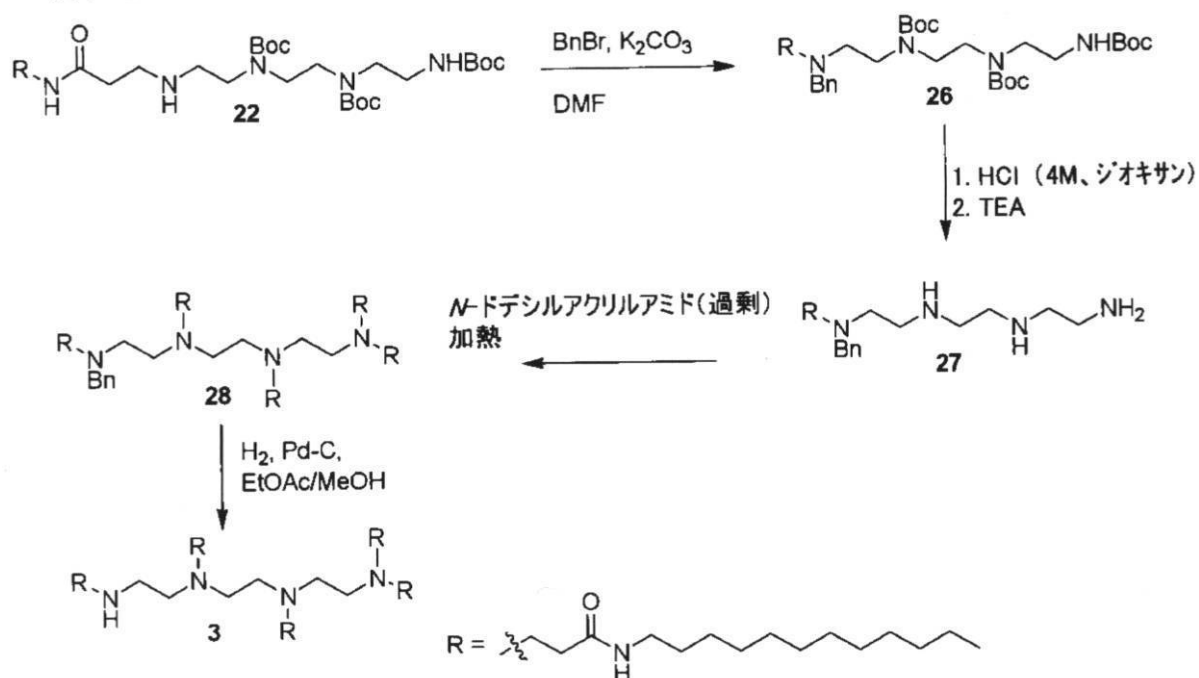
工程4: 化合物28からの化合物3の調製: 化合物28(2.00 g, 1.40ミリモル)を酢酸エチル及びメタノール(1:2, 15 ml)の混合物に溶解させ、それに、6当量の酢酸を加える。混合物を圧力(345 kPa(50 psi))下でパラジウム-炭素(0.200 g, 10重量%)上で水素化して、化合物3を得る。

30

【0571】

【化136】

スキーム13



40

50

## 【0572】

(実施例14)

異性体3の収束合成 - 方法1

工程1：化合物30、31及び32の調製：エチレンジアミン29（0.978ml，14.63ミリモル）、N-ドデシルアクリルアミド（7.00g，29.26ミリモル）及びホウ酸（100mg）を5mLの水中に取り、90にて4日間加熱した。アクリルアミドの完全な消失はTLC分析によって確認した。反応混合物をDCMに溶解させ、水及び炭酸水素塩で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。DCMを除去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ（2：2：96～10：10：80% MeOH/TEA/DCM）によって精製して、化合物30（1.86g）を得た。<sup>1</sup>H NMR（CDCl<sub>3</sub>，400MHz）d=7.05（bs，2H），3.21（q，J=6.30Hz，4H），2.87（t，J=6.00Hz，4H），2.73（s，4H），2.34（t，J=6.00Hz，4H），1.57（bs，2H），1.49～1.45（m，4H），1.28～1.19（m，40H），0.87（t，J=6.8Hz，6H）。MS：C<sub>32</sub>H<sub>66</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>として、計算値：538.52，実測値：539.50（M+）。31（3.50g）<sup>1</sup>H NMR（DMSO-d<sub>6</sub>，400MHz）d=8.20（bs，1H），3.20～2.15（m，22H），1.36～1.30（m，6H），1.25～1.15（m，30H），0.81（t，J=6.00Hz，9H）。MS：C<sub>47</sub>H<sub>95</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>として、計算値：777.74，実測値：778.7（M+）及び32（1.75g）<sup>1</sup>H NMR（DMSO-d<sub>6</sub>，400MHz）d=3.23～2.15（m，28H），1.35～1.45（m，8H），1.26～1.15（m，40H），0.82（t，J=6.00Hz，12H）。MS：C<sub>62</sub>H<sub>124</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>として、計算値：1016.97，実測値：1018.0（M+）。

10

20

## 【0573】

工程2：化合物33の調製：化合物31（1.55g，2ミリモル）及びK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>（2.76g，20ミリモル）をDMF中に取り。それに、クロロアセトアルデヒドジメチルアセタール（0.453ml，4.00ミリモル）を加え、24時間攪拌する。反応をTLCによってモニターし、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を濾過し、MeOHで洗浄する。溶媒を減圧下で除去し、残渣をクロマトグラフィ精製に付して、化合物33を得る。

## 【0574】

工程3：化合物34の調製：化合物33（2.00g，2.31ミリモル）をMeOH及びDCMの混合物中に取り、それに、PTSA（2.0当量）を加え、反応混合物を一晩攪拌する。溶液を炭酸水素ナトリウム溶液で中和し、DCMで抽出し、乾燥させる。化合物をクロマトグラフィ分離によって精製して、所望の生成物34を得る。

30

## 【0575】

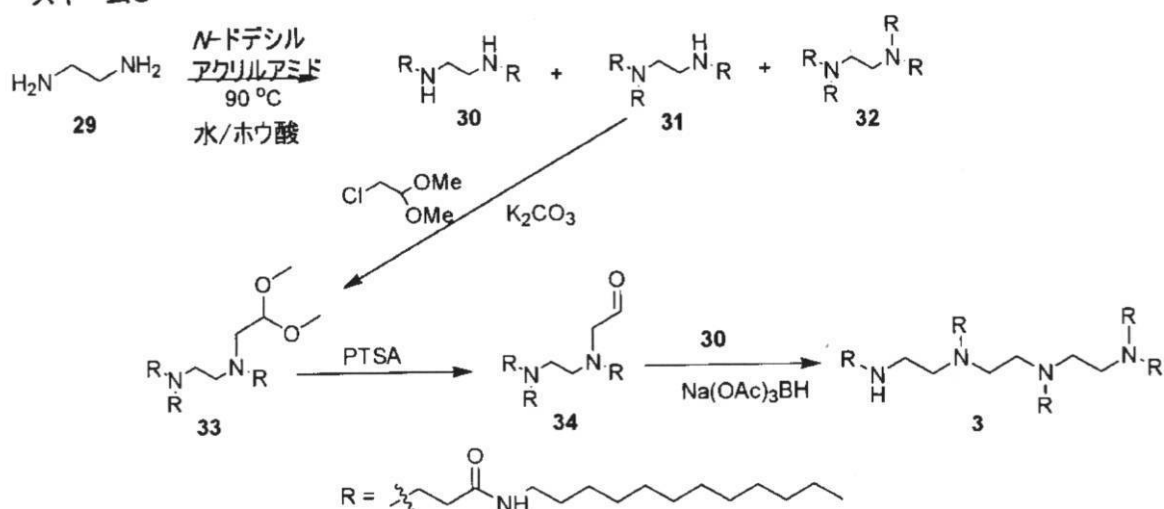
工程4：34からの単一異性体3の調製：化合物34（2.00g，2.43ミリモル）及び30（1.31g，2.43ミリモル）をDCM中に取り、それに、活性化された分子篩を加え、3時間攪拌する。反応をTLCによってモニターする。反応終了後、溶媒を除去する。残渣をTHFに溶解させ、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム（5当量）及び酢酸を加え、一晩攪拌する。溶媒を除去し、DCMで抽出し、残渣のクロマトグラフィ分離により純粋な異性体3を得る。

40

## 【0576】

【化137】

## スキーム8



10

【0577】

(実施例15)

異性体3の収束合成 - 方法2

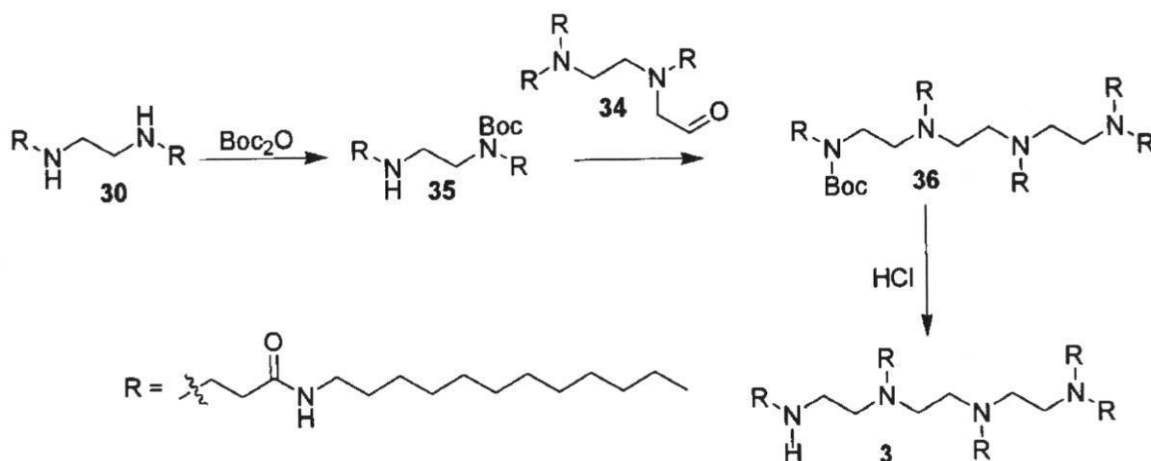
所望の単一異性体3は、窒素の1つの選択的保護によって化合物35を得ることにより化合物30から調製される。引き続き、化合物35を還元条件下でアルデヒド34と反応させて、化合物36を得る。36の酸処理により化合物3を得る。

20

【0578】

【化138】

## スキーム15



30

【0579】

(実施例16)

異性体3の収束合成 - 方法3

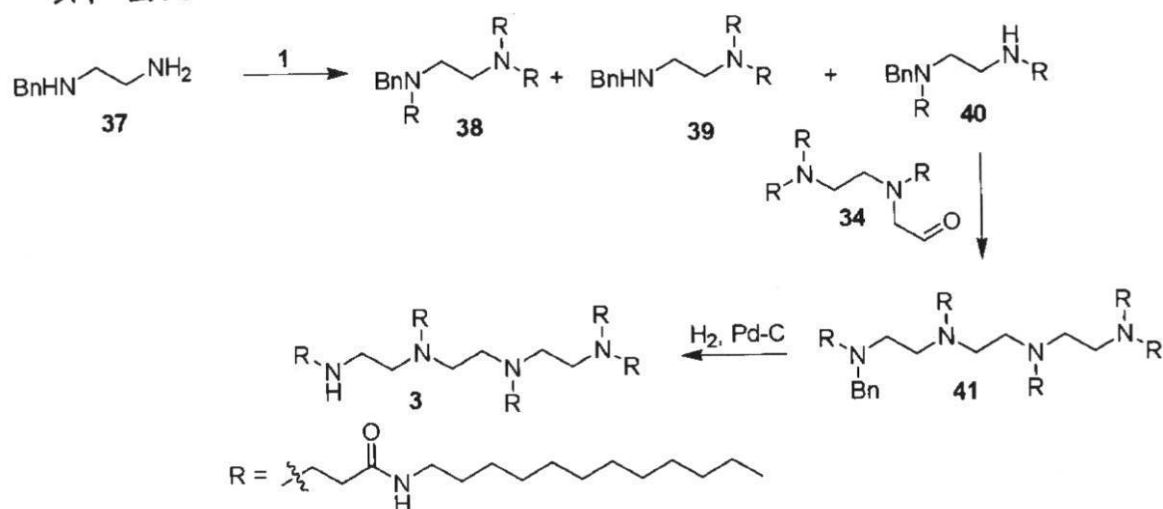
所望の単一の異性体3はモノベンジルエチレンジアミン37からも調製される。37を1でアルキル化することにより、化合物38、39及び40の混合物が得られる。化合物40還元条件下でアルデヒド34と反応させて、化合物41が得られる。41の水素化分解により、所望の化合物3が得られる。

40

【0580】

【化 1 3 9】

## スキーム16



10

【0581】

(実施例17)

異性体4の収束合成 - 方法1

工程1：化合物43の調製：150 mLの圧力びん中で、容器を穏やかに加熱することによって、N-ドデシル-アクリルアミド1 (16.4 g, 68.8ミリモル)をアルゴン下で融解させ、これに、3 mLのホウ酸水溶液を加えた。この融解物に、Boc保護エチレンジアミン42 (5 g, 31.2ミリモル)を加え、混合物を90℃にて一晩加熱した。反応混合物を、溶離剤としてCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH : NEt<sub>3</sub> (90 : 5 : 5)を用いるTLCによって分析した。TLCは、出発アクリルアミド1のほとんど完全な消費を示した。反応混合物をジクロロメタン(100 mL)に溶解させ、溶液を固体炭酸水素ナトリウムと共に攪拌し、有機相を濾過し、ロータリーエバポレータ中で濃縮した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH : NEt<sub>3</sub> (48 : 1 : 1から8 : 1 : 1)を用いるカラムクロマトグラフィ(シリカゲル)によって、この粗製生成物を精製した。この反応における主な生成物は二重付加生成物43である。少量の1-付加物も観察された。

20

30

【0582】

工程2：化合物44の調製：化合物43 (2.00 g, 3.13ミリモル)をジオキサン(50 mL)中に取り、それに、HCl (20 mL, ジオキサン中の4 M溶液)を加え、一晩攪拌する。溶媒を除去して、化合物44を得る。

【0583】

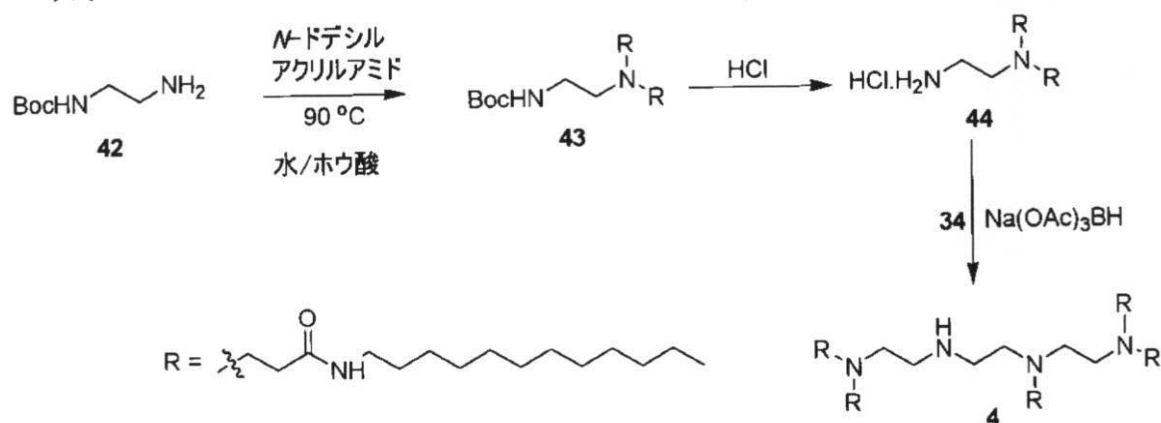
工程3：34及び44からの単一異性体4の調製：化合物34 (2.00 g, 2.43ミリモル)及び44 (1.31 g, 2.43ミリモル)をDCM中に取り、それに、活性化された分子篩を加え、3時間攪拌する。反応をTLCによってモニターする。反応終了後、溶媒を除去する。残渣をTHFに溶解させ、トリアセトキシホウ水素化ナトリウム(5当量)及び酢酸を加え、一晩攪拌する。溶媒を除去し、DCMで抽出し、残渣のクロマトグラフィ分離により純粋な異性体4が得られる。

40

【0584】

【化140】

## スキーム17



10

【0585】

(実施例18)

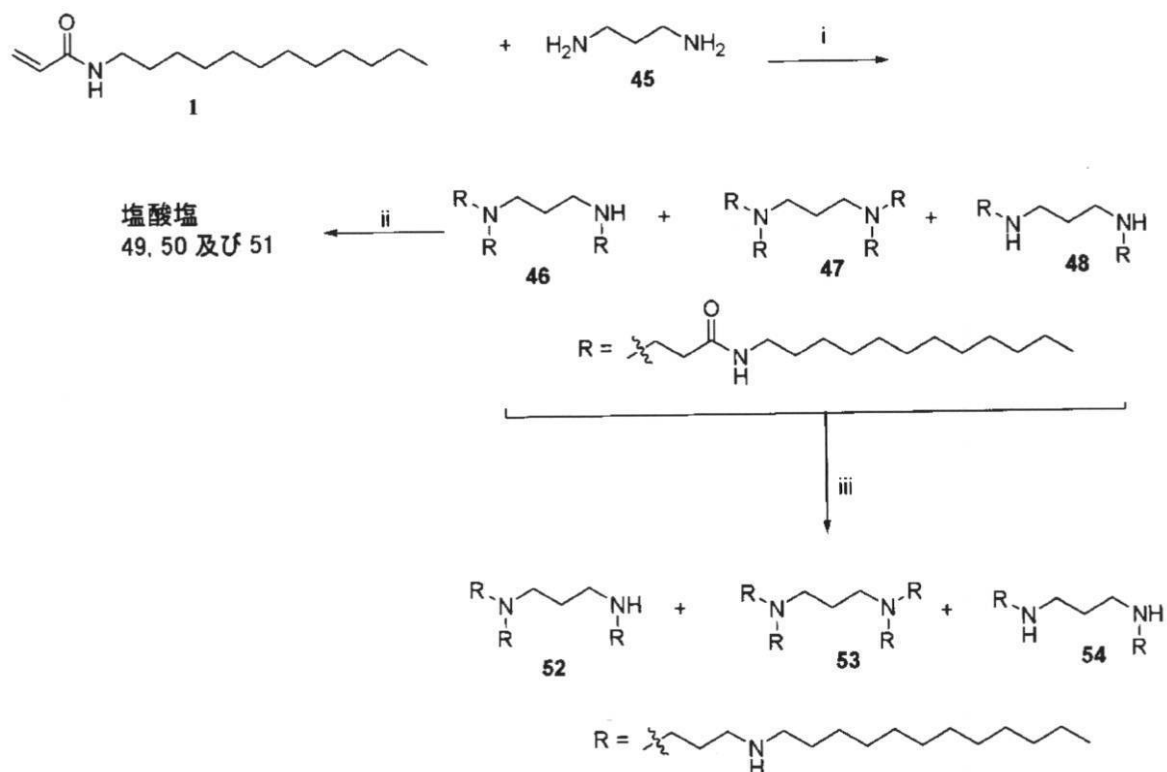
N-ドデシルアクリルアミドの1,3-ジアミノプロパンへの付加、及びアミドのアミンへの引き続いての還元

カチオン性液体中の電荷の数の効果を調べるために、アクリルアミド1の1,3-ジアミノプロパン45でのミカエル付加物を調べた。

20

【0586】

【化141】

スキーム18<sup>a</sup>

30

40

<sup>a</sup>(i) 90°C、ホウ酸水溶液、16時間;(ii) 1,4-ジオキサノン中 4M HCl、12時間及び (iii) BH<sub>3</sub>

【0587】

工程1: 46、47及び48の合成: 150 mL 圧力びん中で容器を穏やかに加熱することによって、N-ドデシル-アクリルアミド1 (15.4 g, 64ミリモル) をアル

50

ゴン下で融解させ、これに、3 mLのホウ酸水溶液を加えた。この融解物に、1, 3-ジアミノプロパン44 (1.58 g, 21ミリモル)を加え、混合物を90 にて一晩加熱した。溶離剤としてCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NEt<sub>3</sub> (90:5:5)を用いるTLCによって、反応混合物を分析した。TLCは、出発アクリルアミド1のほとんど完全な消費を示した。反応混合物をジクロロメタン(100 mL)に溶解させ、溶液を固体炭酸水素ナトリウムと共に攪拌し、有機層を濾過し、ロータリーエバポレータで濃縮した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NEt<sub>3</sub> (48:1:1~8:1:1)を用いるカラムクロマトグラフィ(シリカゲル)によって、この粗製生成物を精製した。この反応における主な生成物は三重付加生成物46である。少量の4-付加物47及び2-付加物48も単離された。

10

## 【0588】

N-ドデシル-3-{(2-ドデシルカルバモイル-エチル)-[3-(2-ドデシルカルバモイル-メチルアミノ)プロピル]アミノ}-プロピオンアミド46。3付加生成物46が白色固体(5.7 g, 35%)として単離された。MS m/z 793 (MH<sup>+</sup>)<sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub> d 0.87 (t, J=6.6 Hz, 9H), 1.20~1.30 (m, 60H), 1.42~1.66 (m, 6H), 2.33 (t, J=6 Hz, 4H), 2.38~2.46 (m, 4H), 2.60~2.70 (m, 4H), 2.84 (t, 2H), 3.15~3.28 (m, 6H), 6.65 (bs, 1H), 6.99 (bs, 3H)。

20

## 【0589】

4-[{3-[ビス-(2-ドデシルカルバモイル-エチル)-アミノ]-プロピル}-(2-ドデシルカルバモイル-エチル)アミノ]-N-ドデシル-ブチルアミド47。4付加生成物47も少量単離された。

## 【0590】

N-ドデシル-3-[-(2-ドデシルカルバモイル-エチルアミノ)-プロピルアミノ]-プロピオンアミド48。ジアクト48はクリーム色粉末(1.6 g, 10%)として単離された。MS m/z 553 (MH<sup>+</sup>)<sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub> d 0.89 (t, J=6.6 Hz, 6H), 1.10~1.20 (m, 40H), 1.42~1.66 (m, 6H), 2.20 (t, J=6 Hz, 4H), 2.55 (t, 4H), 2.60 (t, 4H), 3.00 (m, 4H), 8.00 (bs, 2H)。

30

## 【0591】

工程2:アミン4, 35及び36のそれらの対応する塩酸塩49、50及び51への変換

実施例8に記載されたのと同様な手法を用い、アミン46(5.5 g)を対応するHCl 49に変換し、二塩酸塩49が白色粉末(5.73 g, 92%)として単離された。<sup>1</sup>H NMR DMSO-d<sub>6</sub> d 0.88 (t, J=7 Hz, 9H), 1.17~1.30 (m, 66H), 1.35~1.45 (m, 6H), 2.10~2.25 (m, 2H), 2.55~2.70 (m, 6H), 2.95~3.15 (m, 10H), 3.20~3.35 (m, 6H), 8.16 (t, 1H), 8.24 (t, 1H), 9.15 (bs, 1H), 10.65 (bs, 1H)。

40

## 【0592】

実施例8に記載されたのと同様な手順において、アミン47を4M HClで処理して、二塩酸塩50を得る。

実施例8に記載されたのと同様な手順において、アミン48を4M HClで処理して、二塩酸塩51を得る。

## 【0593】

工程3:アミド46、47及び48のアミン52、53及び54への還元:アミン46を過剰のジボランと共にTHF中で一晩還流し、4M HClでの引き続いての処理により、ポリアミン52の塩酸塩を得る。

## 【0594】

50

アミン 47 及び 48 の同様な処理により、それらの各塩酸塩としての対応する還元された生成物 53 及び 54 を得る。

(実施例 19)

ポリアミド 3、4 及び 5 の対応するポリアミン dendrimer への還元

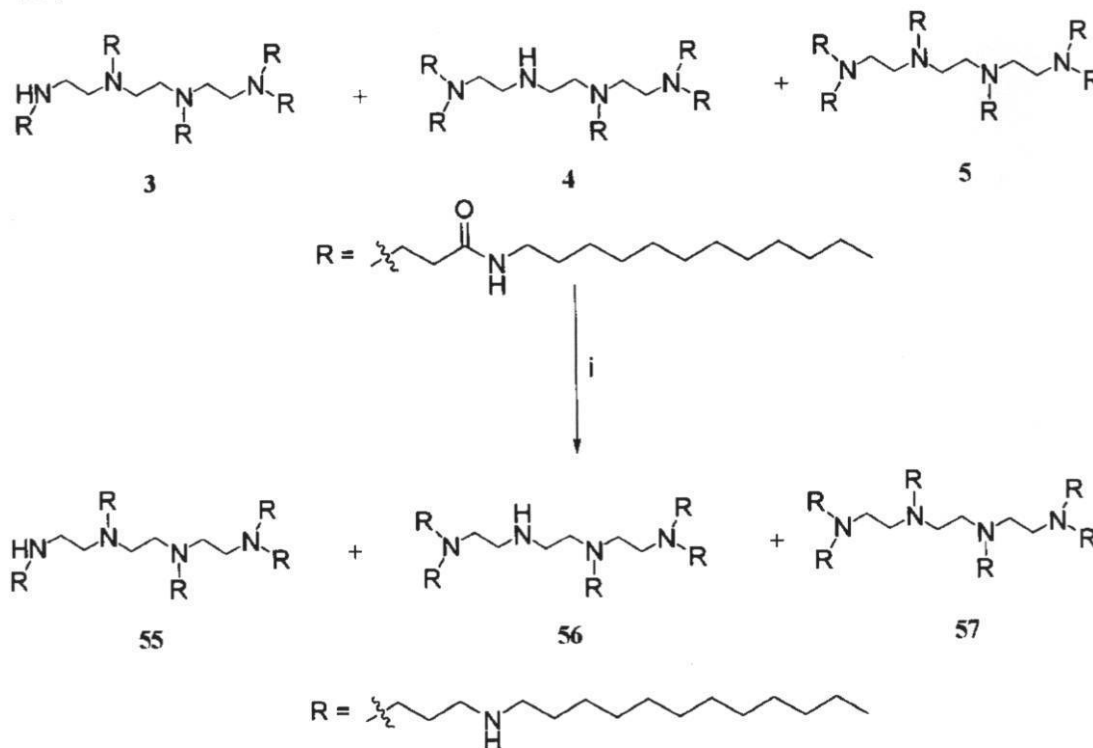
化合物 3 を大過剰の THF 中のジボランと共に還流して、対応する還元された生成物 55 を得る。反応の完了後、反応混合物を仕上げ処理に先立って 4 M HCl で処理し、生成物をその塩酸塩として単離する。56 及び 57 の塩酸塩もまた、各々、対応する手順 4 及び 5 から得られる。

【0595】

【化142】

10

スキーム 19<sup>a</sup>



20

30

<sup>a</sup>(i)  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ 、還流

【0596】

(実施例 20)

ポリアミノアルキル脂質 - アミドのアミンへの還元

32 からのポリアミン 60 の調製：化合物 32 (1.02 g, 1 ミリモル) を THF (20 ml) 中に取り、それに、 $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$  (60 ml, THF 中 1 M) を加え、2 日間還流する。反応を TLC によってモニターする。THF の除去により、白色残渣が得られ、これを 1 M HCl で処理し、DCM に抽出する。粗製生成物クロマトグラフィ分離により、純粋な化合物 60 が得られる。

40

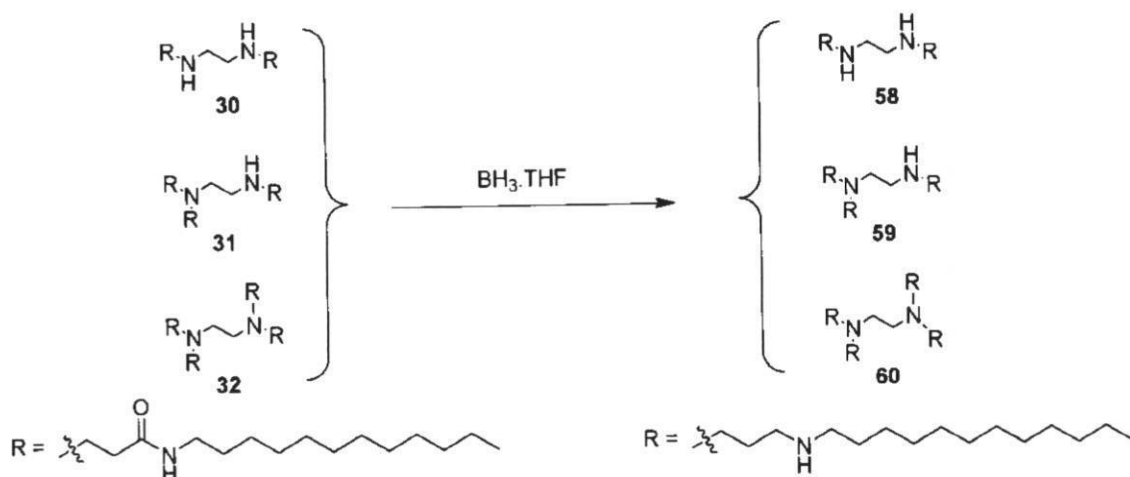
【0597】

30 及び 31 からのポリアミン 58 及び 59 の調製：調製 60 について記載されたのと同様な条件下でのアミド 30 及び 31 の還元により、それぞれ 58 及び 59 が得られる。

【0598】

## 【化 1 4 3】

## スキーム20



10

## 【 0 5 9 9】

(実施例 2 1)

ポリアミド - ポリアミノアルキルの合成 - アルキルハライドを用いるアミンのアルキル化

20

工程 1 : 化合物 6 2 の調製 : D C M ( 2 0 0 m L ) 中の塩化クロロアセチル ( 1 0 . 3 1 m L , 1 2 9 . 3 7 ミリモル ) の溶液を氷浴で冷却し、これに、T E A ( 3 6 . 7 0 m l , 2 6 9 . 5 ミリモル ) を含有するジクロロメタン中のドデシルアミン ( 6 1 , 2 0 . 0 0 g , 1 0 7 . 8 1 ミリモル ) の溶液を 1 時間にわたって滴下した。反応混合物はこの時点までに茶色がかった黒色に変色し、0 にてさらに 1 時間攪拌を継続した。反応混合物を焼結漏斗を通して濾過し、E t O A c で洗浄し、クロロホルムで希釈し、順次、水、炭酸水素ナトリウム溶液、1 M H C l 及び食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィ ( 5 ~ 5 0 % E t O A c / ヘキサン ) によって残渣を精製して、化合物 6 2 ( 2 6 . 0 0 g , 9 2 % ) を茶色固体として得た。 $^1\text{H NMR}$  ( C D C l <sub>3</sub> , 4 0 0 M H z ) d = 6 . 5 9 ( b s , 1 H ) , 4 . 0 3 ( s , 2 H ) , 3 . 2 5 ( q , J = 6 . 0 0 H z , 2 H ) , 1 . 5 4 ~ 1 . 4 9 ( m , 2 H ) , 1 . 4 5 ~ 1 . 1 5 ( m , 1 8 H ) , 0 . 8 6 ( t , J = 6 . 0 0 H z , 3 H ) 。 M S : C <sub>1 4</sub> H <sub>2 8</sub> C l N O とし、計算値 : 2 6 1 . 1 9 , 実測値 : 2 6 2 . 2 0 ( M <sup>+</sup> ) 。

30

## 【 0 6 0 0】

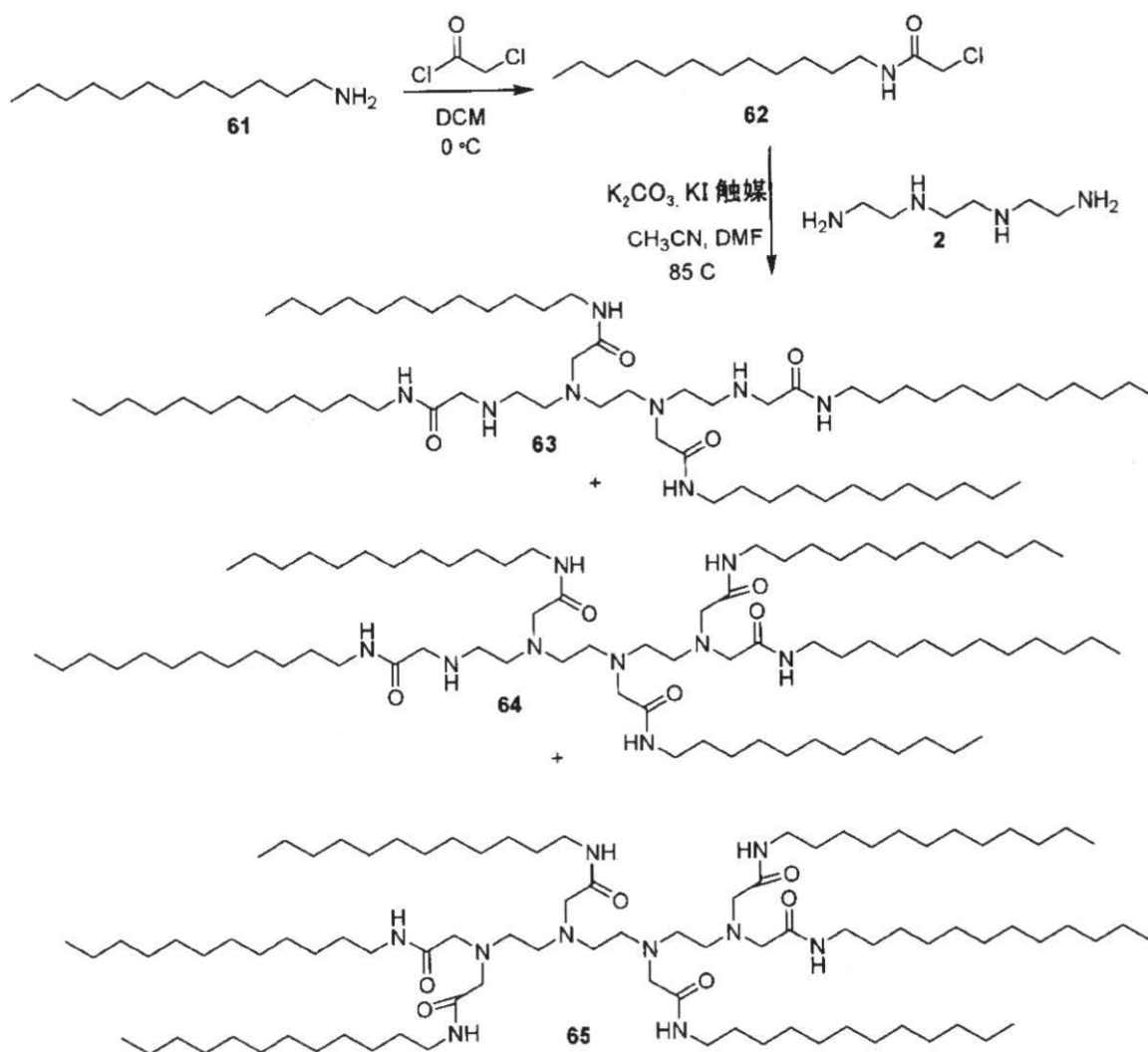
工程 2 : 6 3、6 4 及び 6 5 の調製 : トリエチレンテトラミン 2 ( 1 . 0 0 g , 6 . 8 3 ミリモル ) 及びクロロアセトアミド 6 2 ( 1 0 . 0 0 g , 5 . 5 当量 ) を共に C H <sub>3</sub> C N / D M F ( 1 : 3 ) の混合物中に取り、そこに K <sub>2</sub> C O <sub>3</sub> ( 9 . 4 3 g , 1 0 等量 ) 及び K I ( 5 0 m g ) を加え、8 5 で 3 日間加熱する。反応混合物を濾過して固体を除去し、D C M で洗浄し、溶媒を真空中で除去し、粗製残渣のクロマトグラフィ分離により純粋な化合物 6 3、6 4 及び 6 5 を得る。

40

## 【 0 6 0 1】

## 【化 1 4 4】

## スキーム21



10

20

30

## 【0602】

## (実施例22)

ポリアミド - ポリアミノアルキルの合成 - 分岐アミノアルキルと共にアルキルハライドを用いるアミンのアルキル化

工程1: 67の調製: 塩化クロロアセチル(4.05 mL, 51ミリモル)をDCM(100 mL)中に取り、0℃まで冷却した。これに、N,N-ジドデシルアミン(66, 15.00 g, 42.41ミリモル)及びTEA(14.43 mL, 2.5当量)のジクロロメタン溶液を1時間にわたって滴下した。反応混合物はこの時点までに茶色がかった黒色に変色し、滴下の後に、反応混合物を室温にて24時間攪拌した。反応混合物を焼結漏斗を通して濾過し、EtOAcで洗浄し、クロロホルムで希釈し、順次、水、炭酸水素ナトリウム溶液、1M HCl及び食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を真空中で除去し、カラムクロマトグラフィ(5~50% EtOAc/ヘキサン)によって残渣を精製して、必要な生成物67(12.5 g, 69%)を茶色がかった液体として得た。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 4.04 (s, 2H), 3.30 (m, 4H), 1.50~1.45 (m, 2H), 1.40~1.20 (m, 18H), 0.87 (t, J = 6.00 Hz, 3H)。MS: C<sub>26</sub>H<sub>52</sub>ClNOとして、計算値: 430.15, 実測値: 431.2 (M<sup>+</sup>)。

40

## 【0603】

工程2: 68、69及び70の調製: トリエチレンテトラミン2(0.500 g, 6. 50

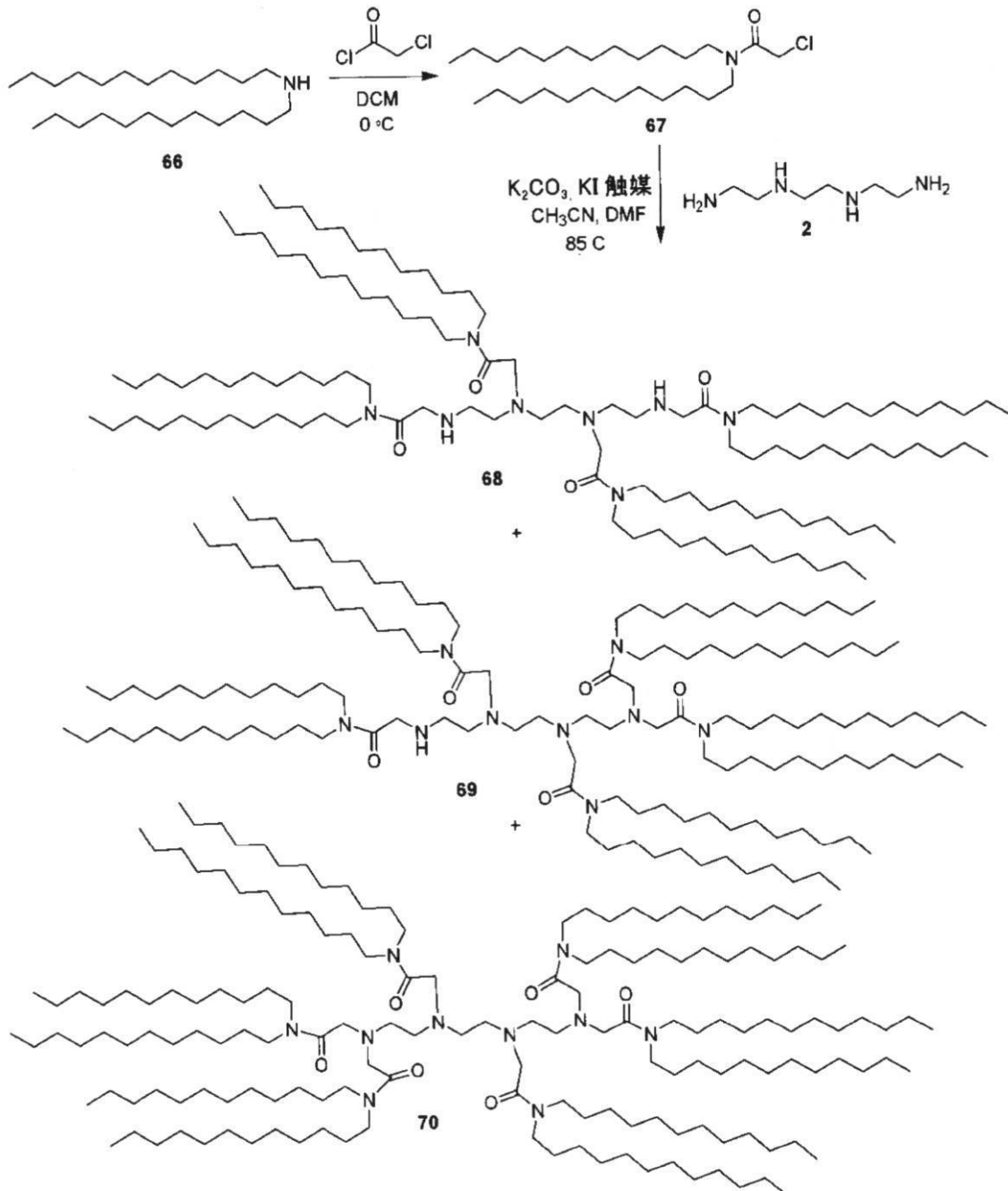
50

83ミリモル)及びクロロアセトアミド67(8.10g, 5.5当量)を共に $\text{CH}_3\text{CN}/\text{DMF}$ (1:3)の混合物中に取り、そこに $\text{K}_2\text{CO}_3$ (4.72g, 10当量)及び $\text{KI}$ (30mg)を加え、85で3日間加熱した。反応混合物を濾過して、不溶性固体を除去し、 $\text{DCM}$ で洗浄し、溶媒を除去し、残渣のクロマトグラフィ分離により、68、69及び70を得た。

【0604】

【化145】

スキーム22



【0605】

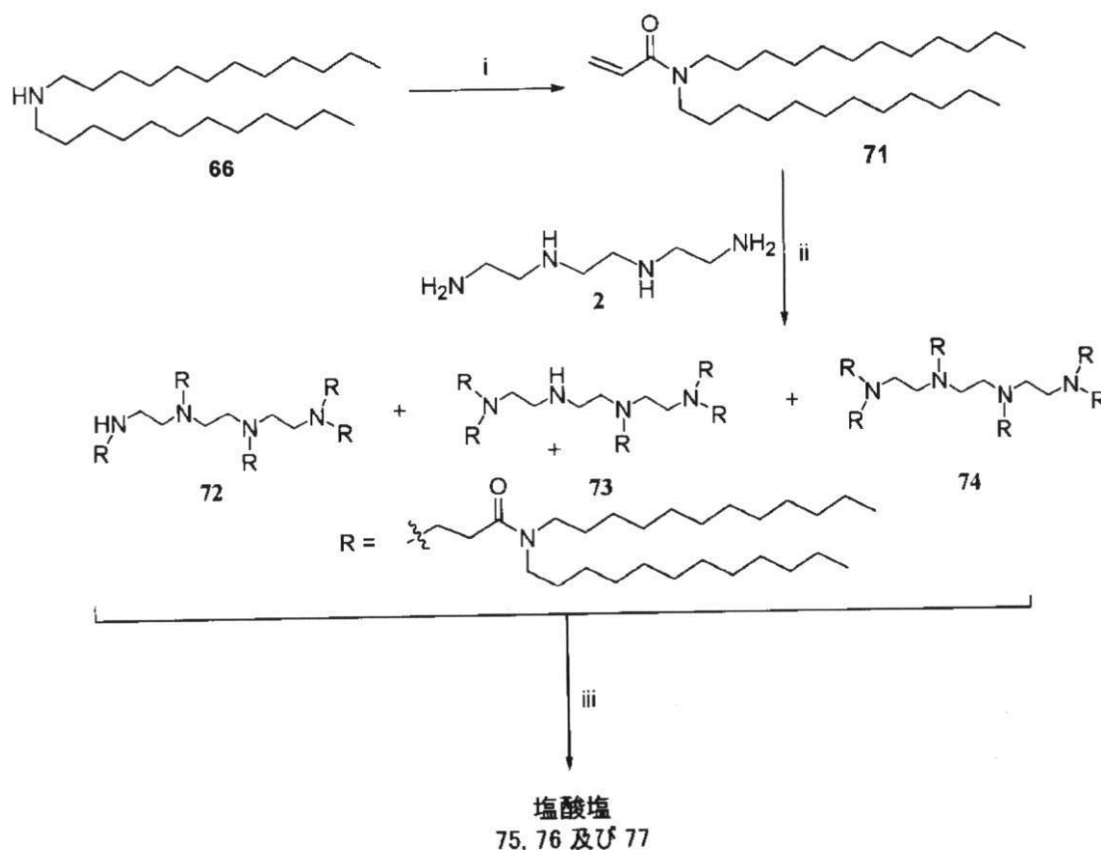
(実施例23)

N,N-ジアルキルアクリルアミドのポリアミンへの付加

疎水性の鎖をカチオン性脂質により多く付加する効果を検討するために、ジドデシルアミンをアクリルアミドに対する前駆体として用いた。

【0606】

【化146】

スキーム23<sup>a</sup>

<sup>a</sup>(i) 塩化アクリロイル、 $-10-0^{\circ}\text{C}$ 、DIPEA、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、4 時間、(ii)  $90^{\circ}\text{C}$ 、純物、5 日間及び

(iii) HCl/ジオキサン

【0607】

工程 1：N，N - ジドデシルアクリルアミド 71 の合成

- 10 の無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (700 mL) 中のジドデシルアミン 66 (25 g, 70 . 7 ミリモル) 及びジイソプロピルエチルアミン (18 g, 141 ミリモル) の溶液に、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL) 中の塩化アクリロイル (7 . 68 g, 85 ミリモル) の溶液を 20 分間にわたって滴下した。滴下完了後、反応混合物を 0 にて 4 時間攪拌し、その後、反応混合物の TLC は反応の完了を示した。反応混合物を飽和  $\text{NaHCO}_3$  溶液 (200 mL)、水 (200 mL)、食塩水 (100 mL) で洗浄し、 $\text{NaSO}_4$  で乾燥させた。有機層の濃縮により生成物 71 (28 . 4 g, 100%) が得られ、これを次の工程で用いた。<sup>1</sup>H NMR  $\text{CDCl}_3$  d 0 . 94 (t,  $J = 6 . 5 \text{ Hz}$ , 6 H), 1 . 05 ~ 1 . 69 (m, 40 H), 3 . 15 ~ 3 . 60 (dt, 4 H), 5 . 64 (d, 1 H), 6 . 36 (d, 1 H), 6 . 63 (m, 1 H)。

【0608】

工程 2：トリエチレンテトラミン 2 及び 71 の反応

アクリルアミド 71 をアミン 2 で処理し、通常の仕上げ処理及びカラム精製の後、ミカエル付加生成物 72、73 及び 74 を単離する。

【0609】

工程 3：塩酸塩 75、76 及び 77 の合成：得られた各単一化合物をジオキサン中に取り、ジオキサン中の 4 M HCl を溶液に加え、実施例 8 に記載されたように攪拌して、対応する塩酸塩を得る。

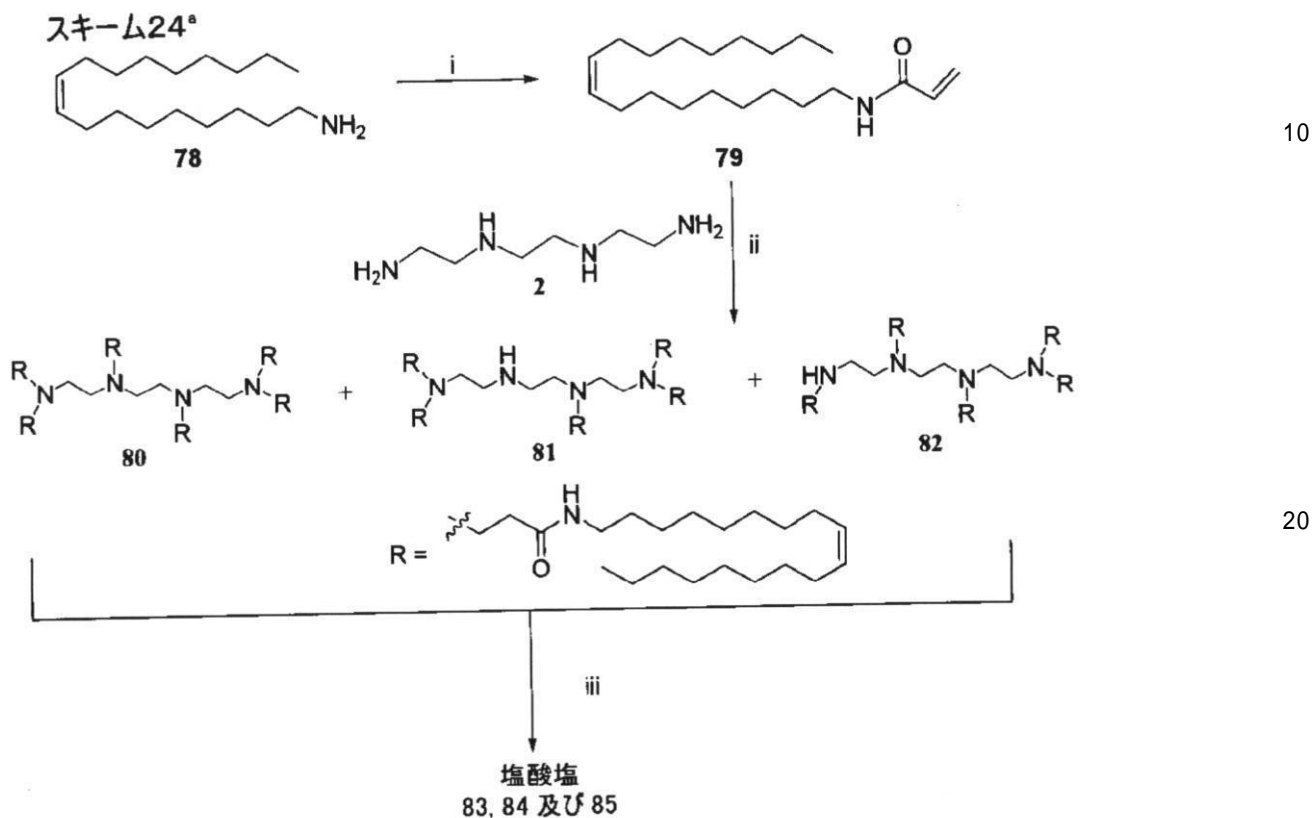
(実施例 24)

ミカエル付加条件下でのモノ不飽和 N - アルキルアクリルアミドを用いるポリアミンのアルキル化

アルキル鎖中の二重結合の効果を検討するために、オレイルアミンをアクリルアミド 79 に対する前駆体として用いた。

【0610】

【化147】



<sup>a</sup>(i) 塩化アクリロイル、 $-10-0^{\circ}\text{C}$ 、DIPEA、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、4 時間、(ii)  $90^{\circ}\text{C}$ 、純物、5 日間

及び (iii) HCl/ジオキサン

30

【0611】

工程 1：化合物 79 の合成：-10 の無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 mL) 中のオレイルアミン 78 (26.75 g, 100 ミリモル) 及びトリエチルアミン (20 g, 200 ミリモル) の溶液に、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL) 中の塩化アクリロイル (9.9 g, 110 ミリモル) の溶液を 20 分間にわたって滴下した。滴下の完了後、反応混合物を 0 で 4 時間攪拌し、その後、反応混合物の TLC は反応の完了を示した。反応混合物を飽和  $\text{NaHCO}_3$  溶液 (200 mL)、水 (200 mL)、食塩水 (100 mL) で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させた。有機層の濃縮により生成物 79 (32 g, 100%) が得られ、これを次の工程で用いた。<sup>1</sup>H NMR  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  0.91 (t,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 1.05 ~ 1.35 (m, 24H), 1.42 (t, 2H), 1.96 (m, 4H), 5.31 (t, 1H), 5.33 ~ 5.36 (m, 1H), 5.54 (dd, 1H), 6.02 (dd, 1H), 6.18 (dd, 1H), 8.03 (bs, 1H)。

40

【0612】

工程 2：化合物 79 とトリエチレンテトラミンとの反応

アクリルアミド 79 をトリエチレンテトラミン 2 で処理し、通常の仕上げ処理及びカラム精製の後、ミカエル付加生成物は純粋な化合物 80、81 及び 82 を与える。

【0613】

50

工程 3 : 塩酸塩 83、84 及び 85 の合成 : 得られた各単一化合物 (80, 81 及び 82) をジオキサン中に取り、ジオキサン中の 4 M HCl を溶液に加え、実施例 8 に記載したように攪拌して、対応する塩酸塩を得る。

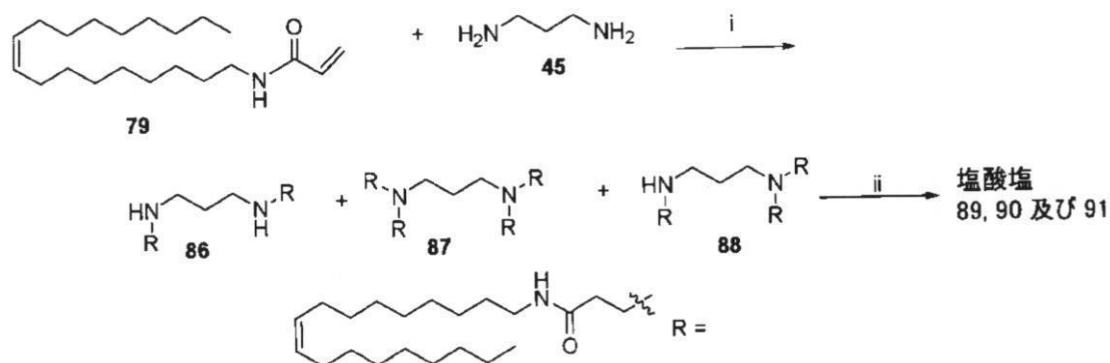
(実施例 25)

ミカエル付加条件下でのモノ不飽和 N - アルキルアクリルアミドを用いるジアミンのアルケニル化

【0614】

【化148】

スキーム 25<sup>a</sup>



10

20

<sup>a</sup>(i) 90°C、ホウ酸水溶液、16 時間及び (ii) HCl/ジオキサン

【0615】

実施例 24 と同様な手順において、アクリルアミド 79 をジアミン 45 で処理し、通常の仕上げ処理及びカラム精製の後、ミカエル付加生成物 86、87 及び 88 が単離される。そのようにして得られた遊離アミンのジオキサン中の HCl での処理により、各々、対応する塩酸塩 89、90 及び 91 が得られる。

(実施例 26)

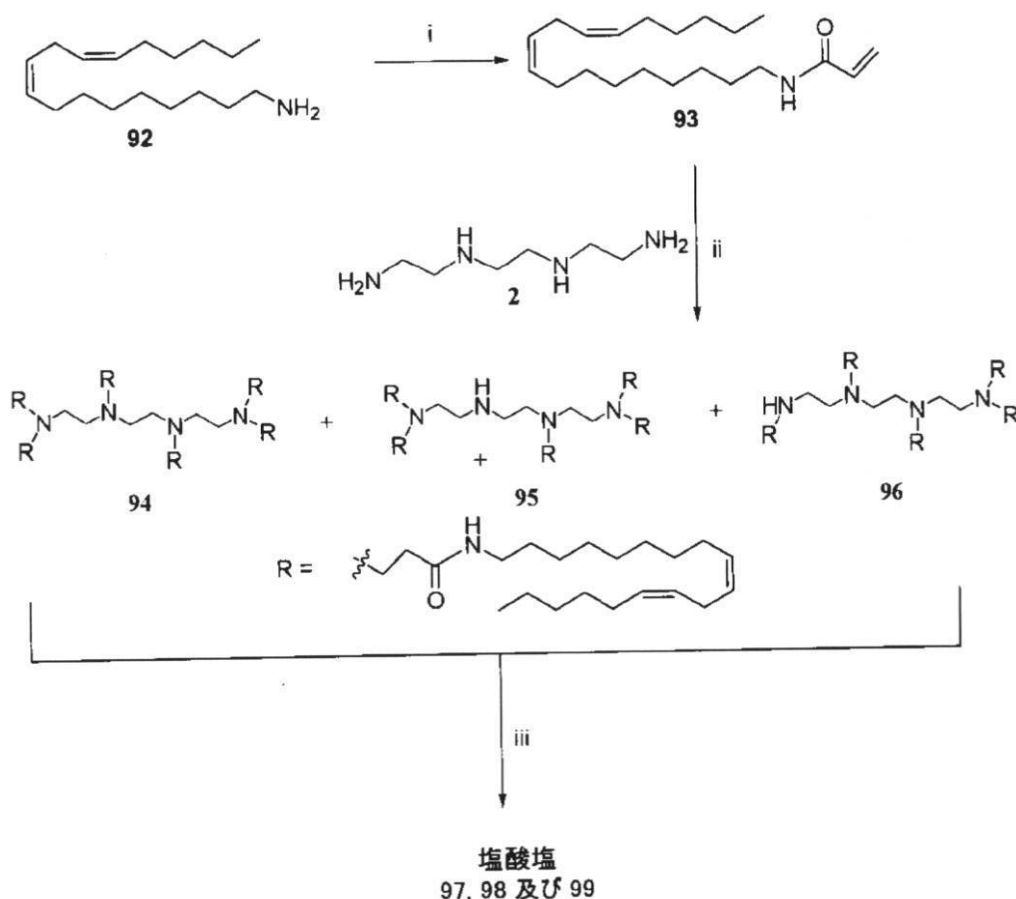
ミカエル付加条件下でのポリ不飽和 N - アルキルアクリルアミドを用いるポリアミンのアルケニル化

30

アルキル鎖におけるポリ不飽和の効果を検討するために、リノレイルアミン 92 をアクリルアミド 93 に対する前駆体として用いた。

【0616】

【化 1 4 9】

スキーム26<sup>a</sup>

<sup>a</sup>(i) 塩化アクリロイル、 $-10-0^{\circ}\text{C}$ 、DIPEA、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、4 時間、(ii)  $90^{\circ}\text{C}$ 、純物、5 日間

及び (iii) HCl/ジオキサン

【0 6 1 7】

工程 1：化合物 93：リノリルアミン 92 を、実施例 2 4、工程 1 のそれと同様な手順により塩化アクリロイルで処理し、対応するアクリルアミド 93 が単離される。

工程 2：化合物 93 とトリエチレンテトラミンとの反応

実施例 3 に記載されたように、アクリルアミド 93 をホウ酸の存在下でトリエチレンテトラミン 2 によって処理し、通常の仕上げ処理及びカラム精製の後に、ミカエル付加生成物が純粋な化合物 94、95 及び 96 を得る。

【0 6 1 8】

工程 3：塩酸塩 97、98 及び 99 の合成：得られた各単一化合物 (94、95 又は 96) をジオキサン中に取り、ジオキサン中の 4 M HCl を溶液に加え、実施例 8 に記載されたように攪拌して、対応する塩酸塩を得る。

(実施例 2 7)

ミカエル付加条件下でのポリ不飽和 N - アルキルアクリルアミドを用いるジアミンのアルケニル化

【0 6 1 9】

10

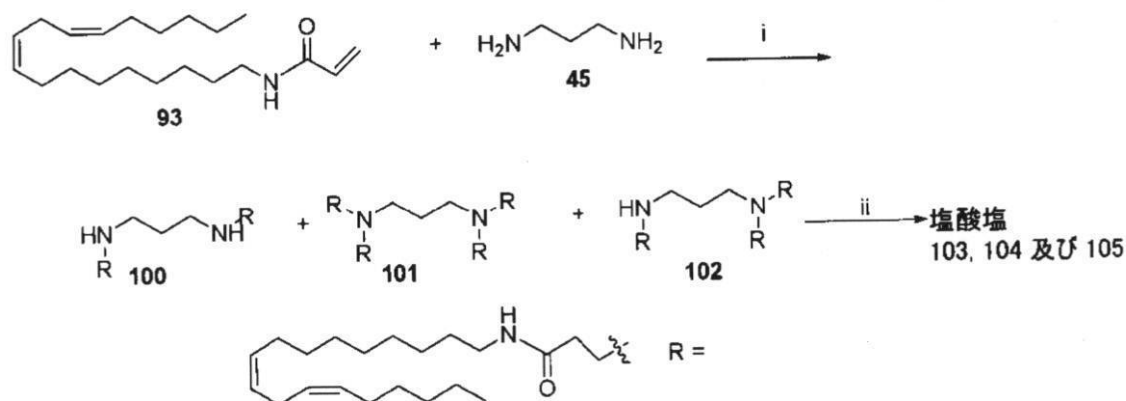
20

30

40

【化150】

## スキーム27\*



\*(i) 90°C、ホウ酸水溶液、16時間及び (ii) HCl/ジオキサン

【0620】

実施例3と同様な手順において、ホウ酸の存在下でアクリルアミド93をジアミン45で処理し、通常の仕上げ処理及びカラム精製の後、ミカエル付加生成物100、101及び102を単離する。そのようにして得られた遊離アミンのジオキサン中のHClの処理により、各々、対応する塩酸塩103、104及び105を得る。

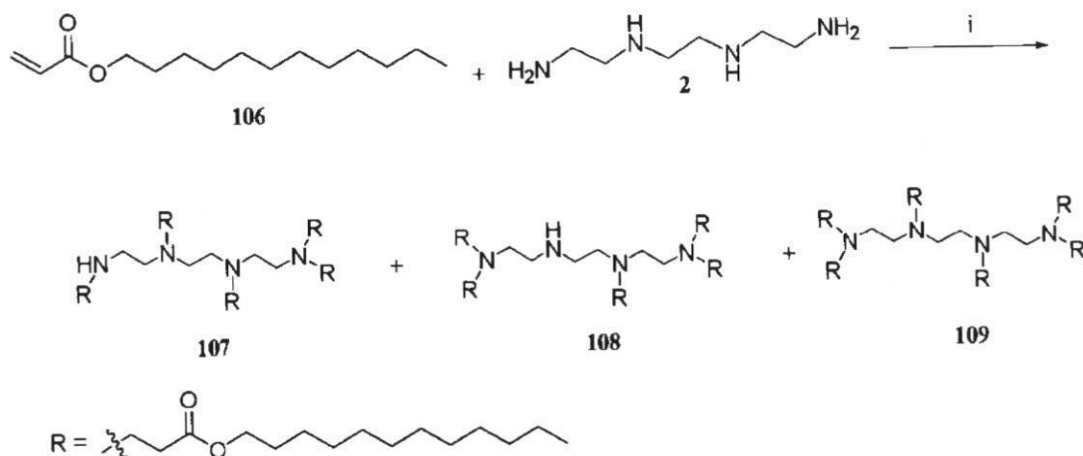
(実施例28)

ミカエル付加条件下でのアルキルアクリレートを用いるポリアミンのアルケニル化

【0621】

【化151】

## スキーム28\*



\*(i) メタノール-水、40°C又はメタノール、水、ホウ酸、室温

【0622】

メタノール1:n-ドデシルアクリレート(106)を40のメタノール-水中のトリエチレントラミン2と共に攪拌して、化合物107、108及び109を得る。生成物をクロマトグラフィ反応によって単離する。

【0623】

方法2: 40のメタノール-水中のホウ酸の存在下で、n-ドデシルアクリレート(106)をトリエチレントラミン2と共に攪拌して、化合物107、108及び109を得る。生成物をクロマトグラフィ分離によって単離する。

(実施例29)

10

20

30

40

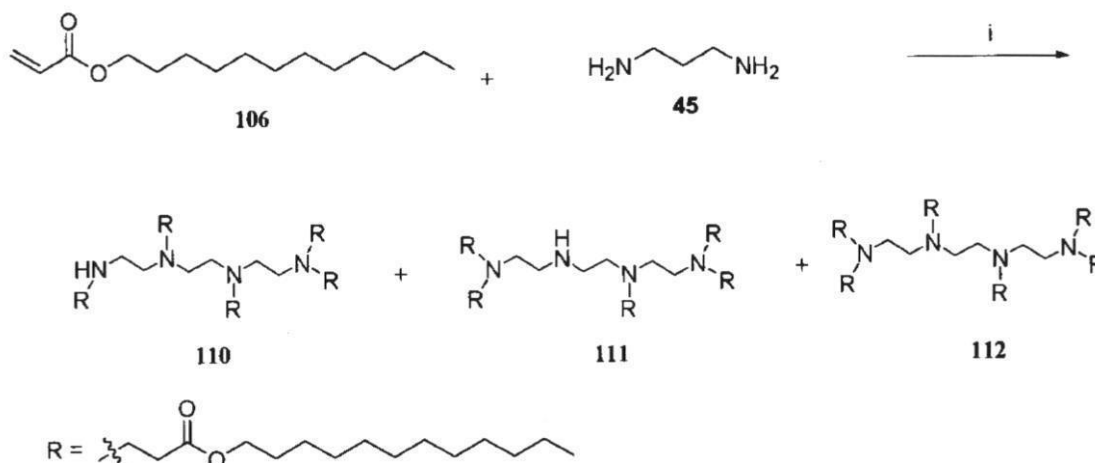
50

ミカエル付加条件下におけるアルキルアクリレートを用いるジアミンのアルケニル化

【0624】

【化152】

スキーム29<sup>a</sup>



10

<sup>a</sup>(i) メタノール-水、40°C又はメタノール、水、ホウ酸、室温

【0625】

20

方法1：40 におけるメタノール-水中のトリエチレンテトラミン2と共にn-ドデシルアクリレート(106)を攪拌して、化合物110、111及び112を得る。生成物はクロマトグラフィ分離によって単離される。

【0626】

方法2：40 におけるメタノール-水中のホウ酸の存在下でトリエチレンテトラミン2と共にn-ドデシルアクリレート(106)を攪拌して、化合物110、111及び112を得る。生成物はクロマトグラフィ分離によって単離される。

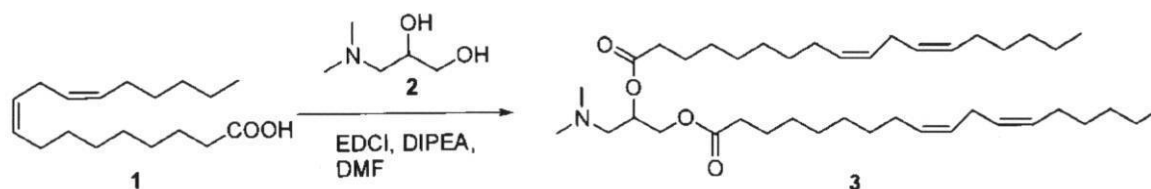
(実施例30)

オクタデカ-9,12-ジエン酸3-ジメチルアミノ-2-オクタデカ-9,12-ジエノイルオキシ-プロピルエステル3の合成

30

【0627】

【化153】



【0628】

40

無水DMF(60mL)中のリノール酸(25g,89.1ミリモル)の溶液に、ジイソプロピルエチルアミン(17mL,100ミリモル)を攪拌しつつ室温に加え、続いて、3-(ジメチルアミノ)-1,2-プロパンジオール(4.8g,40.5ミリモル)及びEDCI(17.25g,89.9ミリモル)を加え、混合物を室温にて一晩攪拌した。反応混合物のTLC(溶離剤としてのヘキサン中の20%EtOAc)は反応の完了を示した。反応混合物を氷水に注ぎ、酢酸エチル(2×100mL)で抽出した。合わせた有機層を水(100mL)、飽和NaHCO<sub>3</sub>(100mL)で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させた。有機層の濃縮により粗製生成物が得られ、これをカラムクロマトグラフィ(シリカゲル、溶離剤:ヘキサン中の20%EtOAc)によって精製した。純粋な生成物を含む画分をプールし、濃縮した。純粋なエステルが透明な液体(5.7g,22%)として単離された。MS m/z 645(M+H)<sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub> d

50

0.88 (t, J = 6.3 Hz, 6H), 1.20 ~ 1.39 (m, 28H), 1.61 (t, J = 4.9 Hz, 12H), 2.03 ~ 2.08 (m, 8H), 2.26 ~ 2.38 (m, 10H), 2.44 ~ 2.56 (m, 2H), 2.76 (t, J = 6.3 Hz, 4H), 4.09 (dd, J = 6.1 Hz & 11.9 Hz, 1H), 4.36 (dd, J = 3.3 & 11.9 Hz, 1H), 5.29 ~ 5.34 (m, 1H), 5.34 ~ 5.41 (m, 8H)。<sup>13</sup>C NMR CDCl<sub>3</sub> d 14.30, 22.79, 25.08, 25.10, 25.83, 27.40, 29.26, 29.30, 29.34, 29.42, 29.55, 29.83, 31.73, 34.32, 34.58, 46.01, 59.37, 64.02, 128.08, 128.24, 130.21, 130.42, 173.39, 173.65。

10

(実施例 31)

押出しを用いるリポソームを製造するための例示的な手順

100%エタノール中のND98 (120 mg/ml)、コレステロール (25 mg/ml)、及びC16-PEG-Cer-2000 (100 mg/ml)のストック溶液を調製する。-20 で貯蔵する。製剤を調製するに先立って37 の水浴中で温める (30分までが有用である。コレステロールが完全に溶解するにはもうしばらく時間がかかる)。

【0629】

2 x 2 ml 調製

15 ml のファルコンチューブに以下のものを加える：

20

- 1) 125 μl の脂質
- 2) 200 μl のコレステロール
- 3) 70 μl のPEG
- 4) 5 μl の100%エタノール
- 5) 600 μl の25 mM 酢酸ナトリウム pH 5
- 6) ボルテックス上で穏やかに混合する (設定 5)
- 7) 20 mg のスクロースを加える。

【0630】

8) スクロースが溶解するまで再度ボルテックスする。

9) 1 ml の新たに調製された (新しいファルコンチューブ中)、25 mM 酢酸ナトリウム中の siRNA の 1 mg/ml 溶液を加える (= 100 μl の 10 mg/ml siRNA + 900 μl の 25 mM 酢酸ナトリウム)

30

10) 20 分間軽くボルテックスする (設定 1、ファルコンチューブホルダアダプタを使用)

11) 15 分後 (5 分残り)、押出器を洗浄する。

【0631】

12) 40 にて2つの200 nmのフィルタを通して11回押し出す。

13) 3,500 MWCO Pierceカセットにおいて、室温にて90分間、PBS、pH 7.4 に対して透析する。

40

(実施例 32)

押出しを用いることなくリポソームを製造するための例示的な手順

100%エタノール中のND98 (120 mg/ml)、コレステロール (25 mg/ml)、及びC16-PEG-Cer-2000 (100 mg/ml)のストック溶液を調製する。-20 で貯蔵する。製剤を調製するに先立って37 の水浴中で温める (30分までが有用である。コレステロールが完全に溶解するにはもうしばらく時間がかかる)。

【0632】

15 ml のファルコンチューブに以下のものを加える：

- 1) 125 μl の脂質
- 2) 200 μl のコレステロール

50

- 3) 70  $\mu$ l の PEG
- 4) 495  $\mu$ l の 100% エタノール
- 5) 100  $\mu$ l の水
- 6) 100 ~ 300 mM 酢酸ナトリウム、~ pH 5 中の 1 mM の 1 mg/ml siRNA を調製する。

## 【0633】

- 7) 脂質を酢酸緩衝液中の siRNA と共に 90% エタノール中で迅速に混合する。
- 8) 100 ~ 300 mM 酢酸ナトリウム、pH ~ 5 に対して透析して(又は限外濾過を用いて) エタノールを除去する。

## 【0634】

- 9) PBS に対して透析して(又は限外濾過を用いて)、緩衝液条件を変更する。
- (実施例 33)

リポソーム試料中の RNA の定量のための例示的なプロトコル

以下の手順を用いて、(1) 捕捉された siRNA の割合及び(2) リポソーム中の siRNA の総量を定量することができる。

## 【0635】

材料:

Ribogreen (モレキュラープローブズ社)

2% Triton X-100

TE 緩衝液

プロトコル(96-ウェルプレート様式):

1. siRNA 濃度が ~ 2  $\mu$ g/ml (0.4 ~ 4  $\mu$ g/ml) となるように TE 緩衝液中にテストすべき試料を希釈する。試料の希釈を記録する。
2. 50  $\mu$ L の各試料を 2 ウェルにアレイする(例えば、試料はマイクロプレートの二列にアレイされる)。
3. 50  $\mu$ L の TE 緩衝液を 2 つの試料(例えば、最上列試料)の各々の 1 つに加える。この試料を用いて「遊離」siRNA を決定する。
4. 50  $\mu$ L の 2% Triton X-100 を 2 つの試料(例えば、最下列試料)残りに加える。この試料を用いて、「総」siRNA を決定する。
5. 定量すべき siRNA の既知量を用いることによって、標準 siRNA 希釈物を調製する。4  $\mu$ g/ml の 50  $\mu$ L から出発し、2 倍ずつ希釈を行う。50  $\mu$ l の 2% Triton X-100 を希釈の標準試料の各々に加える。
6. 室温にて 15 分間インキュベートする。
7. 100  $\mu$ L の希釈された Ribogreen を試料の全てに加える。希釈された Ribogreen は、1:100 希釈で用いる。
8. FITC 設定を用いて蛍光光度計(Victor 2)にてプレートリードを行う。

計算:

ウェル中の最終容量は 200  $\mu$ L である。

## 【0636】

Ribogreen の最終希釈は 1:200 である。

Triton X-100 は 0.5% である。

標準の希釈は 1  $\mu$ g/ml から出発する。

## 【0637】

標準曲線をプロットし、直線フィットを行う。

捕捉% =  $100 \times (1 - \text{「遊離」シグナル} / \text{「合計」シグナル})$  を測定する。

「siRNA」を測定する: まず、標準曲線を用いて「合計」シグナルを濃度に変換し、次いで、希釈倍数を掛ける。

(実施例 34)

リポソームに調製された脂質部位の比較

脂質組成物の有効性は、siRNA 部位を標的に送達する脂質の相対的能力を決定する

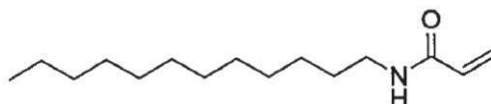
ことによってテストすることができる。例えば、標的のサイレンシングは、*siRNA* が細胞に送達されることを示す。出願人は、以下の脂質部位の各々を含むリポソーム複合体を、第VII因子 (FVII) をサイレンスするのに用いられる *siRNA* と比較した。

【0638】

最初に、精製されていない反応混合物を用いた。異なる ND : 98 モノマー比率 : ND : 98 = 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1, 5 : 1, 及び 6 : 1 にて生成物を合成することによって、異なる ND 98 反応混合物を作成した。ND 98 は、以下に示される構造の ND :

【0639】

【化154】



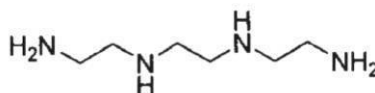
10

【0640】

を、以下に示される構造のアミン 98 :

【0641】

【化155】



20

【0642】

と、前記に示される比率 (すなわち、ND : 98 = 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1, 5 : 1, 及び 6 : 1) で反応させることによって生成される。

リポソームは ND 98 : コレステロール : FED 2000 - Cer C16 : *siRNA* = 15 : 0.8 : 7 : 1 (重量比率) で調製された。ND : 98 = 1 : 1 及び 2 : 1 で調製されたリポソームは、調製中に沈澱し、それ以上の評価は行われなかった。

【0643】

以下の表は、種々のモノマー比率 (すなわち、数字は 98 に対する ND の比率を示す) を用い、リポソームの平均粒子サイズ及びパーセント捕捉を提供する。

30

【0644】

【表2】

表 2 :

	Z-平均粒子サイズ (nm)	%捕捉
ND98 3	56	>95
ND98 4	56	>95
ND98 5	81	93
ND98 6	72	74

40

【0645】

図 1 は、2 mg / kg *siRNA* の実験的投与を用いる種々のモノマー比率についての FVII サイレncing アッセイの結果を提供する。結果は、ND 98 5 テイル部位及び / 又は ND 98 6 テイル部位が活性な種であることを示唆する。というのは、これらは ND 98 6 : 1 調製で最も豊富な種類だからである。説明されたように、5 テイル部位は、出発アミン 98 上の水素の 5 つが出発アクリルアミド部位 ND と反応している

50

化合物を示す。6テイル部位は、出発アミン98上の水素の6つがアクリルアミド部位NDと反応している化合物を示す。従って、「テイル」の数は、出発アミン上の反応した水素の数を示す。

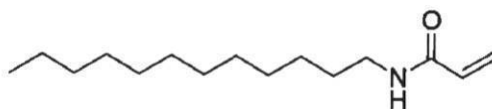
(実施例35)

好ましい脂質異性体の決定

出願人らは、ND98脂質生成物を精製した。ND98脂質部位は、以下に示される構造のND：

【0646】

【化156】



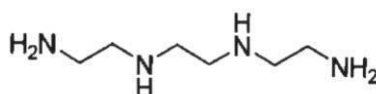
10

【0647】

と、以下に示される構造のアミン98：

【0648】

【化157】



20

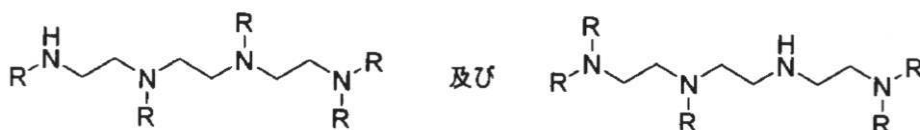
【0649】

との反応によってもたらされる脂質部位である。

出願人らは、ND98の4-テイル混合異性体(すなわち、アミン水素の4つは前記NDアクリルアミドと反応している)、5-テイルND98の単一の構造異性体(すなわち、アミン水素の4つは前記NDアクリルアミドと反応している)をテストした。2つの5テイル異性体の例を以下に示す。

【0650】

【化158】



30

【0651】

生成されたND98生成物のリポソームを、以下の比率：ND98：コレステロール：PEG2000-CerC16：siRNA = 15：5：7：1(重量比率)にて以下の成分で調製した。

【0652】

以下の表3は、種々のモノマー比率(すなわち、数字は98に対するNDの比率を示す)を用いるリポソームの平均粒子サイズ及びパーセント捕捉を提供する。

【0653】

40

【表 3】

表 3 :

	Z-平均粒子サイズ (nm)	%捕捉
ND98 1	88	>95
ND98 2	104	86
ND98 3	115	86
ND98 4	92	>95

10

## 【0654】

表 3 及び図 2 について、ND98 1 = 5 - テイルド (異性体 I)、ND98 2 = 5 - テイルド (異性体 I + II) ; ND98 3 = 5 - テイルド (異性体 III) 及び ND98 4 = 5 - テイルド。

## 【0655】

リポソームは 2.5 mg / kg の用量にて siRNA と共に投与し、FVII のサイレンシングについて評価した。図 2 は 4 テイルド異性体混合物、単一の 5 テイルド異性体 (すなわち、異性体 I 及び II) 及び 5 テイルド異性体の混合物 (すなわち、異性体 I 及び II の結果) を提供する。

20

(実施例 36)

好ましい ND98 異性体の決定

6 テイルド 98 の生成された異性体を調製し、精製した。ND98 構造は、前記実施例 34 及び 35 で記載されたものに対応する。6 テイルドは、アミン 98 の水素の全てが ND 出発物質と反応していることを示す。この脂質出発物質に関しては、リポソームは以下の比率 : ND98 : コレステロール : PEG2000 - CerC16 : siRNA = 15 : 5 : 7 : 1 (重量比率) で調製した。図 3 は、FVII を効果的にサイレントした、siRNA の送達における ND98 6 テイルド異性体の有効性を示している。

30

(実施例 37)

種々の ND98 脂質出発物質を用いるリポソーム粒子サイズ

(前記実施例 34 及び 35 に示された) ND98 構造を有する複数の脂質出発物質をリポソームに調製した。リポソームの粒子サイズを評価し、その結果を以下の表 4 に示す。

## 【0656】

【表 4】

製剤	粒径 (nm)
ND98 3 (例1)	56
ND98 4 (例1)	56
ND98 5 (例1)	81
ND98 6 (例1)	72
ND98 1 (例2)	88
ND98 2 (例2)	104
ND98 3 (例2)	115
ND98 4 (例2)	92
6-テイルド ND98 (例3)	127

10

## 【0657】

20

(実施例38)

遊離リポソーム製剤の押出し

ND98脂質を用い、リポソーム複合体を調製した。製剤は以下の比率：ND98：コレステロール：PEG2000-CerC16：siRNA = 15：5：7：1（重量比率）を含む。リポソームは、一般には、前記実施例32に記載されたように、押出しすることなく調製した。2つの試料、すなわち、100mM酢酸中での最初の透析工程において、100mM酢酸ナトリウム中に調製された100mM siRNAを有する第1の試料、及び、300mM酢酸中での最初の透析工程において、300mM酢酸ナトリウム中に調製された300mM siRNAを有する第2の試料を調製した。

## 【0658】

30

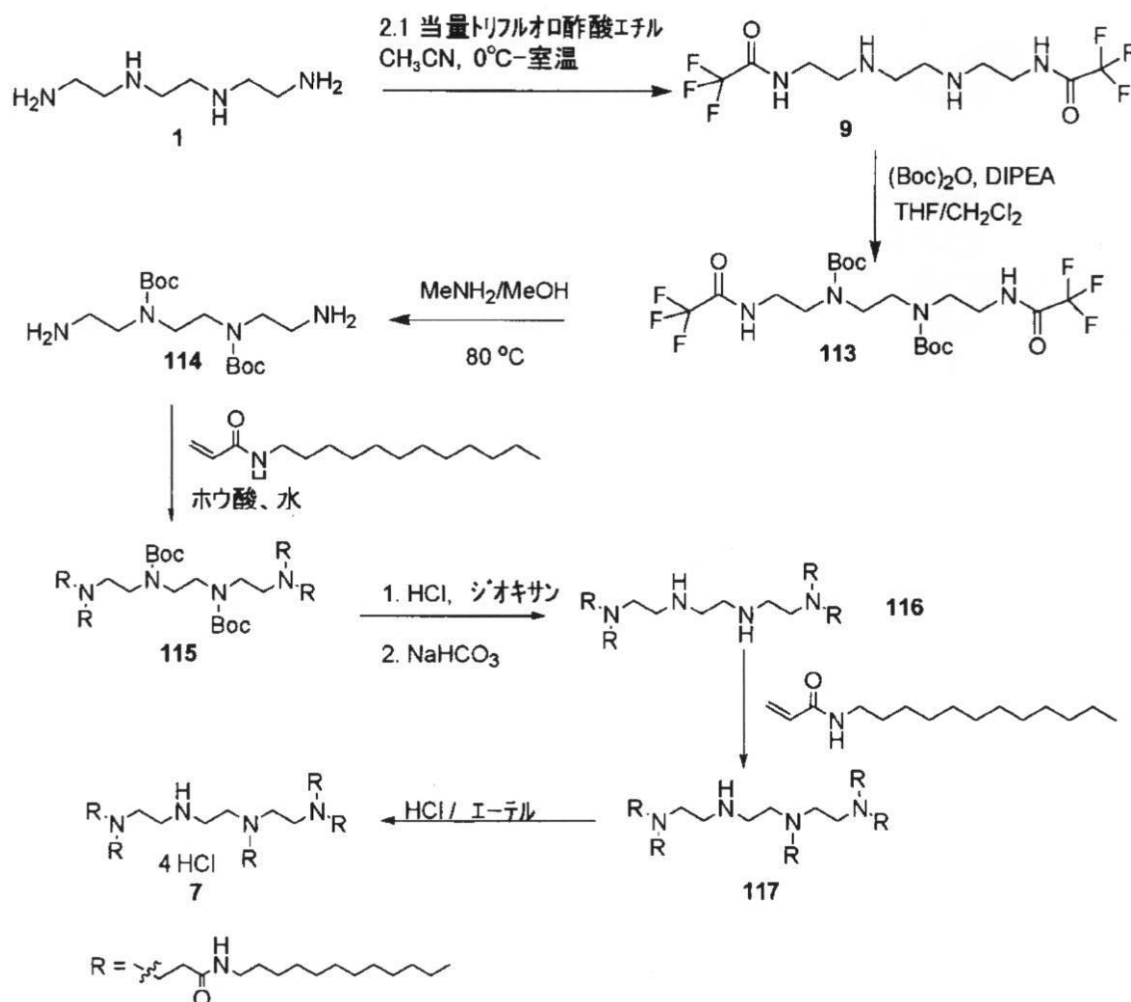
図4は、FVIIサイレンシングアッセイの結果を示し、これは、種々のプロセスを用いて作製された製剤の比較活性を示している。

(実施例39)

カチオン性脂質7の位置選択的合成 - 方策1

## 【0659】

【化159】

スキーム31<sup>a</sup>

10

20

30

<sup>a</sup>カチオン性脂質7の位置選択的合成—手順1

【0660】

工程1：化合物9の調製：無水アセトニトリル（500 mL）中のトリエチレンテトラミン1（48.83 g, 0.334 mol, Sigma-Aldrichから購入）を一定攪拌下で氷浴冷却した。トリ酢酸エチル（79.6 mL, 0.668 mol）を溶液に加え、添加の後に、反応混合物を室温まで温め、20時間攪拌した。溶媒及び揮発物を減圧下で除去し、残渣を最小量の温かいジクロロメタン（100 mL）に溶解させ、それに、冷たいヘキサンを攪拌しつつ加えた。沈殿した生成物を氷中で冷却し、濾過して、白色固体（112.2 g, 99%）を得た。

40

【0661】

工程2：（2- {tert-ブトキシカルボニル- [2- (2, 2, 2-トリフルオロ-アセチルアミノ)エチル]-アミノ} - 2- (2, 2, 2-トリフルオロ-アセチルアミノ)エチル)カルバミン酸tert-ブチルエステル113の合成

トリフルオロアセトアミド9（112.2 g, 0.332 mol）をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/THF（600 mL / 100 mL）に溶解させ、それに、ジイソプロピルエチルアミン（129.25 g, 1 mol）を加え、氷浴で攪拌した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>（100 mL）中の二炭酸ジ-tert-ブチル（145 g, 0.664 mol, シグマアルドリッチ社から購入）を反応混合物に滴下し、一晚攪拌した。溶媒を除去し、残渣をNaHCO<sub>3</sub>の飽和溶液（400 mL）と共に攪拌し、濾過し、ヘキサン（100 mL）で洗浄し、45 にて

50

真空中で一晩乾燥させて、純粋なジ b o c 化合物を白色固体 ( 1 6 7 g , 9 4 % ) とし  
得た。  $^1\text{H NMR}$  for 1 1 3 ( DMSO -  $d_6$  , 4 0 0 \text{ MHz } )  $d = 9 . 6 0 \sim$   
9 . 4 0 ( m , 2 \text{ H } ) , 3 . 3 5 \sim 3 . 1 5 ( m , 1 2 \text{ H } ) , 1 . 3 6 ( s , 1 8 \text{ H } ) \text{ M}  
S : C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> とし、計算値 : 4 3 8 . 1 7 , 実測値 : 4 3 9 . 2 0 (  $\text{M}^+$  )  
MS : C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> とし、計算値 : 5 3 8 . 2 2 , 実測値 : 5 3 9 . 2 0 (  $\text{M}^+$  ) 。

【 0 6 6 2 】

工程 3 : ( 2 - アミノ - エチル ) - { 2 - [ ( 2 - アミノ - エチル ) - tert - ブト  
キシカルボニル - アミノ ] - エチル } カルバミン酸 tert - ブチルエステルの合成

アセトアミド 1 1 3 ( 1 6 7 g , 0 . 3 1 \text{ mol } ) をステンレス鋼圧力リアクタ中に取り、それに、エタノール ( 2 0 0 \text{ mL } ) 中のメチルアミンの溶液 ( 3 3 \text{ 重量 } \% ) を加えた。混合物を 9 0 まで温め、2 4 時間攪拌した。反応をマススペクトルによってモニターした。全ての溶媒を減圧下で除去し、残渣を 8 0 の高真空に付して、生成物 1 1 4 ( 1 0 3 g , 9 6 \% ) をガム状液体として得、この化合物はさらに精製することなく次の反応で用いることができた。  $^1\text{H NMR}$  ( CDCl <sub>3</sub> , 4 0 0 \text{ MHz } )  $d = 3 . 2 0 \sim 3 . 0 0$  ( m , 4 \text{ H } ) , 2 . 6 2 \sim 2 . 3 8 ( m , 8 \text{ H } ) , 1 . 3 2 ( s , 9 \text{ H } ) , \text{MS} : \text{C}  
1 1 H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> とし、計算値 : 2 4 6 . 2 1 , 実測値 2 4 6 . 2 0 (  $\text{M}^+$  ) 。

【 0 6 6 3 】

工程 4 : ミカエル付加生成物 1 1 5 の合成

ジアミン 1 1 4 ( 1 0 3 g , 0 . 2 9 7 \text{ ミリモル } ) 、 N - ドデシルアクリルアミド ( 3 6 5 g , 1 . 4 8 7 \text{ mol } ) 、 及び水 ( 3 0 \text{ mL } ) 中のホウ酸の飽和溶液を共に圧力リアクタ中に取り、9 0 にて 4 日間加熱した。反応を TLC 及びマススペクトルによってモニターした。反応混合物をジクロロメタン ( DCM ) に抽出し、順次、NaHCO<sub>3</sub> 溶液及び食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を真空中で除去し、そのようにして得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ ( グラジエント溶出 - 酢酸エチル ) 、次いで、3 ~ 1 0 \% \text{ MeOH / DCM } ) によって精製して、1 1 5 を淡黄色固体 ( 2 2 8 g , 5 9 \% ) とし得た。MS : C <sub>76</sub> H <sub>150</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub> とし、計算値 : 1 3 0 3 . 1 6 , 実測値 : 1 3 0 4 . 2 0 (  $\text{M}^+$  ) 。

【 0 6 6 4 】

工程 5 : ジアミン 1 5 6 の調製

ジオキサン ( 5 0 0 \text{ mL } ) 中の 4 \text{ M HCl} をメタノール ( 1 0 0 \text{ mL } ) 中の diboc 化合物 1 1 5 ( 2 2 8 g , 0 . 1 7 5 \text{ mol } ) の溶液に加え、混合物を室温で 2 日間攪拌した。残渣をマススペクトルによってモニターした。出発 diboc 化合物の完全な消失後、沈殿した塩酸塩を濾過し、THF ( 1 0 0 \text{ mL } ) で洗浄し、乾燥させて、純粋な塩を白色粉末 ( 1 7 8 g , 9 3 \% ) とし得た。前記塩を飽和 NaHCO<sub>3</sub> ( 1 \text{ L } ) で処理し、ジクロロメタン ( 3 x 6 0 0 \text{ mL } ) で抽出した。混和した有機抽出物を乾燥させ、濃縮して、白色固体 ( 1 6 4 g , 8 5 \% ) とし得た。MS : C <sub>66</sub> H <sub>134</sub> N <sub>8</sub> O <sub>4</sub> とし、計算値 : 1 1 0 3 . 0 5 , 実測値 : 1 1 0 4 . 1 0 (  $\text{M}^+$  ) 。

【 0 6 6 5 】

工程 6 : 1 1 7 の合成 : 化合物 1 1 6 ( 1 6 4 g , 1 4 9 \text{ ミリモル } ) 、 N - ドデシルアクリルアミド ( 3 5 . 6 g , 1 4 9 \text{ ミリモル } ) 及び水 ( 3 0 \text{ mL } ) 中のホウ酸の飽和溶液を共に圧力リアクタ中に取り、9 0 にて 3 日間加熱した。反応の進行は、TLC 及びマススペクトルによってモニターした。反応混合物をジクロロメタン ( DCM ) に抽出し、順次、NaHCO<sub>3</sub> 溶液及び食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を真空中で除去し、そのようにして得られた残渣をシリカゲル ( 2 \text{ Kg } ) カラムクロマトグラフィ ( グラジエント溶出 - 0 : 5 : 9 5 ~ 1 0 : 1 0 : 8 0 \% \text{ TEA / MeOH / DCM } ) によって精製して、1 1 7 を淡黄色固体 ( 8 3 . 8 g , 4 2 \% ) とし得た。MS : C <sub>76</sub> H <sub>150</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub> とし、計算値 : 1 3 0 3 . 1 6 , 実測値 1 3 0 4 . 2 0 (  $\text{M}^+$  ) 。物質を真正試料 TLC ( 定量的 ) 、 HPLC 及びマススペクトルと比較した。MS : C <sub>81</sub> H <sub>163</sub> N <sub>9</sub> O <sub>5</sub> とし、計算値 : 1 3 4 2 . 2 8 , 実測値 : 1 3 4 3 . 3 0 (

10

20

30

40

50

M<sup>+</sup> )。

【0666】

工程7：塩酸塩7の合成

アミン117 (54 g, 40ミリモル) をエタノール (100 mL) に溶解させ、それに、エーテル中の200 mLの2 M HClを加え、混合物を室温で一晩攪拌した。窒素を反応混合物に通気し、排気口をドライライト (dryrite) に通し、KOHの10%溶液まで通過させた。30分後に、反応混合物を乾燥状態まで濃縮し、残渣を500 mLの無水エタノールに再度溶解させ、混合物をロータリーエボレータ中で濃縮した。このプロセスを再度反復し、そのようにして得られた残渣を43の真空オープン中で一晩乾燥させた。純粋な生成物をクリーム色粉末 (59.9 g, 99%) として単離した。

10

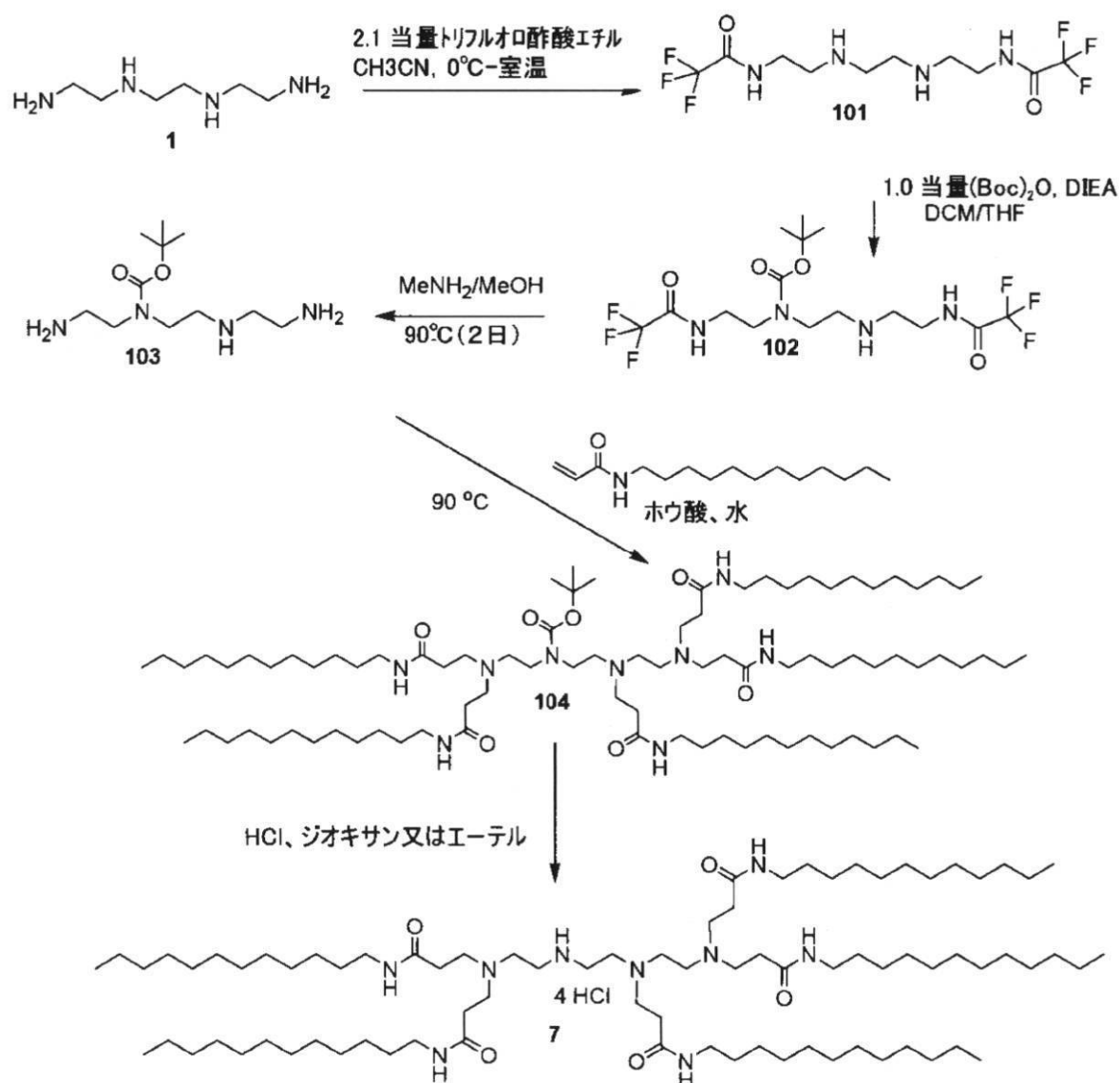
(実施例40)

カチオン性脂質7の位置選択的合成 - 方策2

方法1

【0667】

【化160】



20

30

40

【0668】

工程1：オーバーヘッドスターを備えた4首5 Lフラスコ中のアセトニトリル (2 L) 中のトリエチレントトラミン1 (200 g, 1.37 mol, Sigma Aldrichから購入) を攪拌しながら氷浴で冷却した。トリフルオロ酢酸エチル (388.5 g, 2.74 mol) を攪拌溶液に加え、20時間攪拌した。溶媒及び揮発物を減圧下で除

50

去し、残渣をDCM/ヘキサンの混合物と共に粉碎し、濾過して、100gを白色固体(429g, 93%)として得た。そのようにして得られた生成物はさらに精製することなく次の反応で用いることができた。MS:  $C_{10}H_{16}F_6N_4O_2$ として、計算値: 338.12, 実測値: 339.0 ( $M^+$ )。

**【0669】**

工程2: 粗製化合物101(427g, 1.26mol)を溶媒の混合物(3L, THF/DCM(1:2))に溶解させ、氷-水浴で攪拌した。二炭酸ジ-tert-ブチル( $Boc)_2O$ , 270g, 1.26mol, Sigma Aldrichから購入)及びDIEA(500mL, 2.86mol)を反応混合物に加え、一晚攪拌した。溶媒を除去し、残渣をジクロロメタン(DCM, 1000mL)に抽出し、NaHCO<sub>3</sub>溶液(500mL)、水(500mL×2)及び食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を真空中で除去し、そのようにして得られた残渣をDCM/ヘキサン(2:1)と共に粉碎し、濾過した。溶媒を除去し、残渣を高真空下で乾燥させて、化合物112をガム状液体(523g)として得た。

10

**【0670】**

化合物102の一部をシリカゲルクロマトグラフィ(グラジエント溶出、酢酸エチル、続いて3~10%MeOH/DCM)によって精製して、化合物102をガム状液体(102.00g)として得た。102についての<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz)d=9.60~9.10(m, 3H), 3.35~3.25(m, 4H), 3.25~3.20(2, 2H), 3.20~3.10(m, 2H), 2.68~2.58(m, 4H), 1.35(s, 9H)。MS:  $C_{15}H_{24}F_6N_4O_4$ として、計算値: 438.17, 実測値: 439.20 ( $M^+$ )。

20

**【0671】**

工程3: 精製された化合物102(102.0g, 233.40ミリモル)を圧力リアクタ中にて、室温でエタノール/メチルアミン(400mL, EtOH中の33重量%メチルアミン溶液)に溶解させた。混合物を90℃まで温め、2日間攪拌した。反応をマススペクトルによってモニターした。減圧下で全ての溶媒を除去し、残渣を80℃の高真空に付して生成物103(58.00g, 99%)をガム状液体として得、この化合物はさらに精製することなく次の反応で用いることができた。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)d=3.20~3.00(m, 4H), 2.62~2.38(m, 8H), 1.32(s, 9H)。MS:  $C_{11}H_{26}N_4O_2$ として、計算値: 246.21, 実測値: 247.20 ( $M^+$ )。

30

**【0672】**

工程4: トリアミン103(56.00g, 227.64ミリモル)、N-ドデシルアクリルアミド(327.00g, 1365ミリモル)、及び水(50mL)中のホウ酸の飽和溶液を共に圧力リアクタ中に取り、90℃で6日間加熱した。反応をTLC及びマススペクトルによってモニターした。反応混合物をジクロロメタン(DCM)に抽出し、順次、NaHCO<sub>3</sub>溶液(400mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を真空中で除去し、そのようにして得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ(グラジエント溶出-酢酸エチル、次いで、3~10%MeOH/DCM)によって精製して104を淡黄色固体(186g, 57%)として得た。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)d=7.20(bs, 1H), 7.05(bs, 1H), 6.85(bs, 1H), 6.74(bs, 1H), 3.25~3.03(m, 12H), 2.80~2.60(m, 8H), 2.55~2.21(m, 12H), 1.52~1.45(m, 10H), 1.42(s, 9H), 1.34~1.20(m, 100H), 0.87(t, J=6.5Hz, 15H)。MS:  $C_{86}H_{171}N_9O_7$ として、計算値: 1442.33, 実測値: 1443.30 ( $M^+$ )。

40

**【0673】**

工程5: ジオキサン(400mL)中の4M HClを、ジオキサン(300mL)中の化合物105(184.00, 127.23ミリモル)の溶液に加えた。次いで、反応

50

混合物を一晩攪拌した。反応をマススペクトルによってモニターした。窒素を溶液に通すことによって、過剰のHClを除去した。真空下で溶媒を除去し、残渣をエタノール(500 mL × 3)で3回共蒸発させて、淡黄色ガム状固体7(186.00 g, 98%)を四塩酸塩として得た。該物質を真正試料のTLC(定量)、HPLC及びマススペクトルと比較した。MS: C<sub>81</sub>H<sub>163</sub>N<sub>9</sub>O<sub>5</sub>として、計算値: 1342.28, 実測値: 1343.30(M<sup>+</sup>)。

**【0674】**

## 方法2

化合物102を方法1: 工程1及び2に記載したように調製した。メタノール1の工程2から得られた粗製生成物をさらに精製することなく次の反応を用いた。

10

**【0675】**

工程1: 化合物102(103.45 g, 238.90ミリモル, 工程2, 方法1からの粗製化合物)を、圧力リアクタ中で室温にてエタノール/メチルアミン(400 mL, EtOH中の33 wt%メチルアミン溶液)に溶解させた。混合物を90℃まで温め、2日間攪拌した。反応をマススペクトルによってモニターした。全ての溶媒を減圧下で除去し、残渣を水浴での80℃の高真空に付して、生成物103(63.50 g)を淡黄色ガム状液体として得、この化合物は精製することなく次の反応で用いることができた。

**【0676】**

工程4: トリアミン103(63.50 g, 238ミリモル)、N-ドデシルアクリルアミド(320.00 g, 1338ミリモル)、及び水(50 mL)中のホウ酸の飽和溶液を共に圧力リアクタ中に取り、工程4、方法1に記載されたように90℃で6日間加熱した。反応をTLC及びマススペクトルによってモニターした。反応混合物をジクロロメタン(DCM)に抽出し、順次NaHCO<sub>3</sub>溶液(400 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を真空中で除去し、そのようにして得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ(グラジエント溶出-酢酸エチル、次いで、3~10% MeOH/DCM)によって精製して、104を淡黄色固体(65.2 g, 20%)として得た。

20

**【0677】**

工程5: エーテル(800 mL)中の2M HClを化合物105(65.00 g, 45ミリモル)に加えた。次いで、反応混合物を一晩攪拌した。反応をマススペクトルによってモニターした。窒素を溶液に通すことによって、過剰なHClを除去した。溶媒を真空下で除去し、残渣をエタノール(500 mL × 3)で3回共蒸発させて、淡黄色ガム状固体7(66 g, 98%)を四塩酸塩として得た。該物質を真正試料のTLC(定量)、HPLC及びマススペクトルと比較した。MS: C<sub>81</sub>H<sub>163</sub>N<sub>9</sub>O<sub>5</sub>として、計算値: 1342.28, 実測値: 1343.30(M<sup>+</sup>)。

30

**【0678】**

## 方法3

化合物102は方法1: 工程1及び2に記載されたように調製した。方法1の工程2から得られた粗製生成物をさらに精製することなく次の反応で用いた。

**【0679】**

工程3: 化合物102(105.20 g, 240ミリモル, 方法Iからの粗製化合物)を、圧力リアクタ中で室温にてエタノール/メチルアミン(400 mL, EtOH中の33重量%メチルアミン溶液)に溶解させた。混合物を90℃まで温め、2日間攪拌した。反応をマススペクトルによってモニターした。全ての溶媒を減圧下で除去し、残渣を水浴上で80℃の高真空に付して、生成物103(64.70 g)を淡黄色ガム状液体として得、この化合物はさらに精製することなく次の反応で用いることができた。

40

**【0680】**

工程4: トリアミン103(64.70 g, 240ミリモル)、N-ドデシルアクリルアミド(370.00 g, 1569ミリモル)、及び水(50 mL)中のホウ酸の飽和溶液を、共に圧力リアクタ中に取り、90℃にて6日間加熱した。反応をTLC及びマス

50

ペクトルによってモニターした。反応混合物をジクロロメタン (DCM) に抽出し、順次  $\text{NaHCO}_3$  溶液 (400 mL) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を真空中で除去し、そのようにして得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (グラジエント溶出 - 酢酸エチル、次いで、3 ~ 10% MeOH / DCM) によって精製して、104 を淡黄色固体 (192 g) として得た。

【0681】

工程5：所望の化合物7は実施例40の工程5、方法1に記載されたように化合物104から塩酸塩として得られた。四塩酸塩としての化合物7：194 g (98%)。該物質を真正な試料の TLC (定量)、HPLC 及びマススペクトルと比較した。MS： $\text{C}_{81}\text{H}_{163}\text{N}_9\text{O}_5$  として、計算値：1342.28, 実測値：1343.30 ( $\text{M}^+$ )。 (実施例41)

異なるPEG脂質部位を有する種々の会合複合体に調製された siRNA の活性の比較。脂質組成物の有効性は siRNA 部位を標的に送達する脂質の相対的能力を決定することによってテストすることができる。例えば、標的のサイレンシングは、siRNA が細胞に送達されることを示す。出願人は、図5に示された13個の異なるPEG脂質部位の1つを含む会合複合体を、第VII因子 (FVII) をサイレントとするのに用いられる siRNA と比較した。

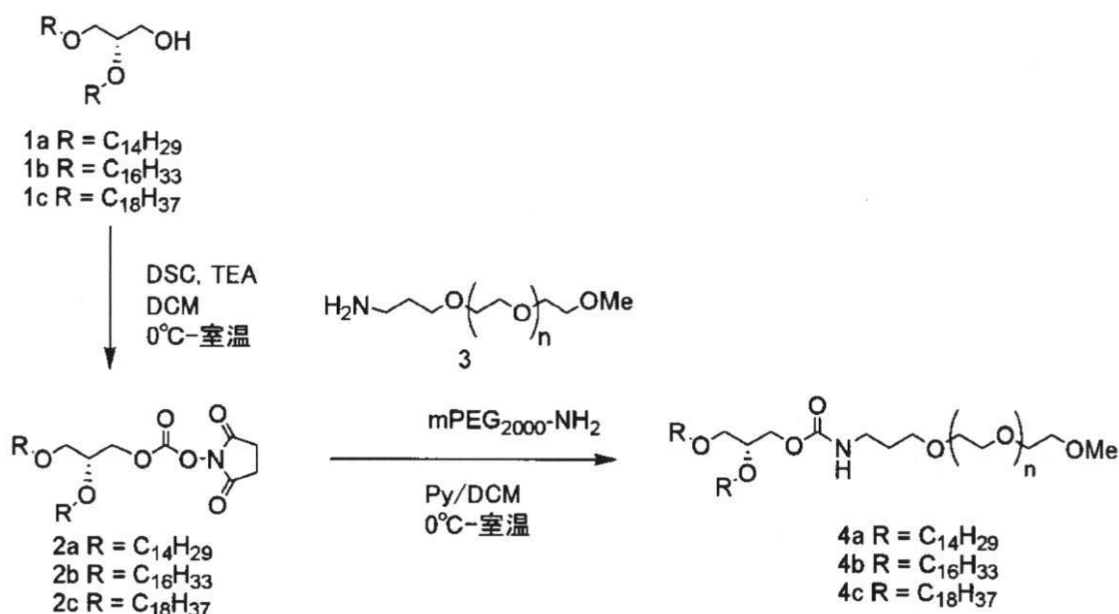
【0682】

PEG脂質1~13は以下の手順を用いて合成した。

【0683】

【化161】

スキーム1\*



\*スキーム1：mPEG2000-1,2-ジ-O-アルキル-sn3-カルバモイルグリセリド

【0684】

化合物5の調製：1,2-ジ-O-テトラデシル-sn-グリセリド (30 g, 61.80ミリモル) 及びN,N'-スクシンイミジルカルボネート (DSC, 23.76 g, 1.5当量) をジクロロメタン (DCM, 500 mL) 中に取り、氷水混合物上で攪拌した。トリエチルアミン (25.30 mL, 3当量) を攪拌溶液に加え、引き続いて反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応の進行はTLCによってモニターした。反応混合物をDCM (400 mL) で希釈し、有機層を水 (2 x 500 mL)、 $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (500 mL) で洗浄し、続いて、標準的な仕上げ処理を行った。得られた残渣を高真空下で室温にて一晩乾燥させた。乾燥させた後、そのようにして得られた粗製カルボネー

ト3をジクロロメタン(500 mL)に溶解させ、氷浴上で攪拌した。攪拌溶液に、mPEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub>(4,103.00 g, 47.20ミリモル, NOF社、日本から購入)及び無水ピリジン(80 mL, 過剰)をアルゴン下で加えた。次いで、反応混合物を室温で一晩攪拌した。溶媒及び揮発物を真空下で除去し、残渣をDCM(200 mL)に溶解させ、酢酸エチル中でパッキングされたシリカゲルのカラムに充填した。カラムをまず酢酸エチルで、引き続いて、ジクロロメタン中の5~10%メタノールのグラジエントで溶出させて、所望のPEG脂質5を白色固体(105.30 g, 83%)として得た。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) d=5.20~5.12(m, 2H), 4.18~4.01(m, 1H), 3.80~3.70(m, 2H), 3.70~3.20(m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, PEG-CH<sub>2</sub>), 2.10~2.01(m, 2H), 1.70~1.60(m, 2H), 1.56~1.45(m, 4H), 1.31~1.15(m, 48H), 0.84(t, J=6.5 Hz, 6H)。判明したMS範囲: 2660~2836。

#### 【0685】

4bの調製: 1,2-ジ-*O*-ヘキサデシル-sn-グリセリド1b(1.00 g, 1.848ミリモル)及びDSC(0.710 g, 1.5当量)を共にジクロロメタン(20 mL)中に取り、氷水混合物中で0℃まで冷却した。トリエチルアミン(1.00 mL, 3当量)をそれに加え、一晩攪拌した。反応に続いてTLCを行いDCMで希釈し、水(2回)、NaHCO<sub>3</sub>溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下で溶媒を除去し、残渣2bを一晩高真空下に置いた。この化合物はさらに精製することなく、直接次の反応に用いた。MPEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub>3(1.50 g, 0.687ミリモル, NOF社、日本から購入)、及び先の工程2bからの化合物(0.702 g, 1.5当量)をアルゴン下でジクロロメタン(20 mL)に溶解させた。反応を0℃まで冷却した。ピリジン(1 mL, 過剰)をそれに加え、一晩攪拌した。反応をTLCによってモニターした。溶媒及び揮発物を真空下で除去し、残渣をクロマトグラフィ(最初に酢酸エチル、次いで、グラジエント溶出として5~10% MeOH/DCM)によって精製して、所要の化合物4bを白色固体(1.46 g, 76%)として得た。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) d=5.17(t, J=5.5 Hz, 1H), 4.13(dd, J=4.00 Hz, 11.00 Hz, 1H), 4.05(dd, J=5.00 Hz, 11.00 Hz, 1H), 3.82~3.75(m, 2H), 3.70~3.20(m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, PEG-CH<sub>2</sub>), 2.05~1.90(m, 2H), 1.80~1.70(m, 2H), 1.61~1.45(m, 6H), 1.35~1.17(m, 56H), 0.85(t, J=6.5 Hz, 6H)。判明したMSの範囲: 2716~2892。

#### 【0686】

4cの調製: 1,2-ジ-*O*-オクタデシル-sn-グリセリド1c(4.00 g, 6.70ミリモル)及びDSC(2.58 g, 1.5当量)を共にジクロロメタン(60 mL)中に取り、氷水混合物中で0℃まで冷却した。トリエチルアミン(2.75 mL, 3当量)をそれに加え、一晩攪拌した。反応に続いてTLCを行いDCMで希釈し、水(2回)、NaHCO<sub>3</sub>溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧下で除去し、残渣を一晩高真空下に置いた。この化合物をさらに精製し、次の反応で直接的に用いた。MPEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub>3(1.50 g, 0.687ミリモル, NOF社、日本から購入)、及び先の工程2cからの化合物(0.760 g, 1.5当量)をアルゴン下でジクロロメタン(20 mL)に溶解させた。反応を0℃まで冷却した。ピリジン(1 mL, 過剰)をそれに加え、一晩攪拌した。反応をTLCによってモニターした。溶媒及び揮発物を減圧下で除去し、残渣をクロマトグラフィ(最初酢酸エチル、次いで、グラジエント溶出として5~10% MeOH/DCM)によって精製して、所要の化合物4cを白色固体(0.92 g, 48%)として得た。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) d=5.22~5.15(m, 1H), 4.16(dd, J=4.00 Hz, 11.00 Hz, 1H), 4.06(dd, J=5.00 Hz, 11.00 Hz, 1H), 3.81~3.75(m, 2H), 3.70~3.20(m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, PEG-

10

20

30

40

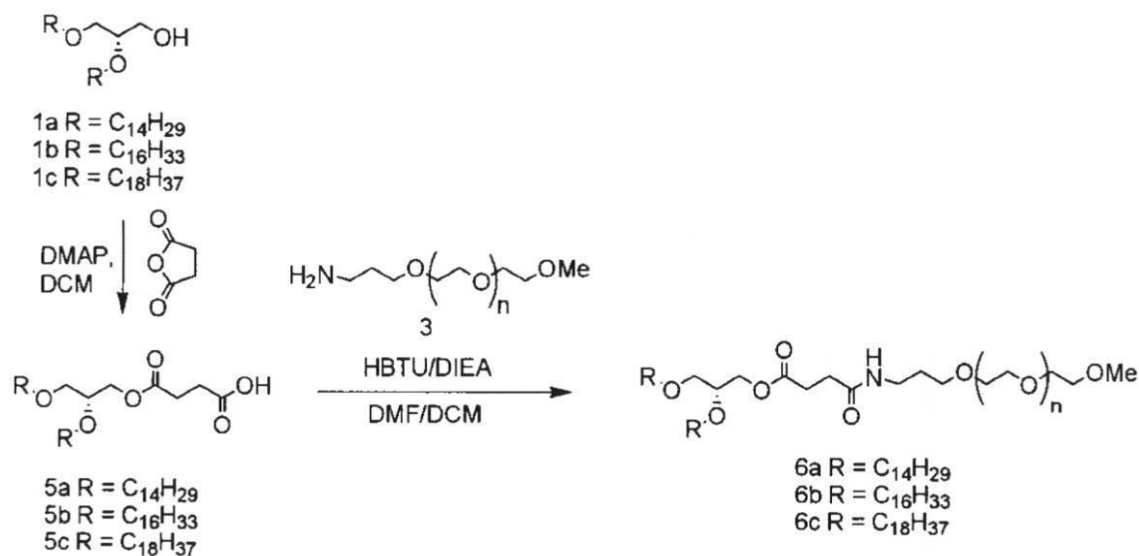
50

CH<sub>2</sub>), 1.80 ~ 1.70 (m, 2H), 1.60 ~ 1.48 (m, 4H), 1.31 ~ 1.15 (m, 64H), 0.85 (t, J = 6.5 Hz, 6H)。判明したMS範囲: 2774 ~ 2948。

【0687】

【化162】

### スキーム2<sup>a</sup>



10

20

### <sup>a</sup>スキーム2: mPEG2000-1,2-ジ-O-アルキル-sn3-スクシニルグリセリド

【0688】

化合物6aの調製: 1,2-ジ-O-テトラデシル-sn-グリセリド1a (1.00 g, 2.06ミリモル)、コハク酸無水物 (0.416 g, 2当量) 及びDMAP (0.628 g, 2.5当量) を共にジクロロメタン (20 mL) 中に取り、一晩攪拌した。反応に続いてTLCを行い、DCMで希釈し、冷却した希薄クエン酸、水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧下で除去し、残渣を一晩高真空下に置いた。この化合物をさらに精製し、次の反応で直接的に用いた。MPEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> 3 (1.50 g, 0.687ミリモル, NOF社、日本から購入)、先の工程5aからの化合物 (0.66 g, 1.12当量) 及びHBTU (0.430 g, 1.13ミリモル) をアルゴン下でジクロロメタン/DMF (2:1, 20 mL) の混合物に溶解させた。DIEA (0.358 mL, 3当量) をそれに加え、一晩攪拌した。反応混合物を大きなフラスコに移し、減圧下で溶媒及び揮発物を除去した。残渣を高真空下で一晩乾燥させ、クロマトグラフィ (最初は酢酸エチル、次いでグラジエント溶出としての5~10% MeOH/DCM) によって精製して、所要の化合物6aを白色固体 (0.822 g, 43%) として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 6.34 ~ 6.30 (m, 2H), 4.16 (dd, J = 4.00 Hz, 11.00 Hz, 1H), 4.08 (dd, J = 5.00 Hz, 11.00 Hz, 1H), 3.82 ~ 3.78 (m, 2H), 3.70 ~ 3.30 (m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, PEG-CH<sub>2</sub>), 2.64 (t, J = 7.00 Hz, 2H), 2.43 (t, J = 6.80 Hz, 2H), 1.76 ~ 1.72 (m, 2H), 1.56 ~ 1.48 (m, 4H), 1.34 ~ 1.16 (m, 48H), 0.85 (t, J = 6.5 Hz, 6H)。判明したMSの範囲2644 ~ 2804。

30

40

【0689】

化合物6bの調製: 1,2-ジ-O-ヘキサデシル-sn-グリセリド1b (1.00 g, 1.848ミリモル)、コハク酸無水物 (0.0369 g, 2当量) 及びDMAP (0.563 g, 2.5当量) を共にジクロロメタン (20 mL) 中に取り、一晩攪拌した。反応に続いてTLCを行い、DCMで希釈し、冷却希クエン酸、水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧下で除去し、残渣を一晩高真空下に置いた。この化合物は

50

さらに精製して、次の反応で直接的に用いた。MPEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> 3 (1.50 g, 0.687ミリモル, NOF社、日本から購入)、先の工程5bからの化合物(0.66 g, 1.03ミリモル)及びHBTU(0.400 g, 1.05ミリモル)をアルゴン下でジクロロメタン/DMF(2:1, 20 mL)の混合物に溶解させた。DIEA(0.358 mL, 3当量)をそれに加え、一晚攪拌した。反応混合物を大きなフラスコに移し、減圧下で溶媒及び揮発物を除去した。残渣を高真空下で一晚乾燥させ、クロマトグラフィ(最初に酢酸エチル、次いで、グラジエント溶出としての5~10% MeOH/DCM)によって精製して、所要の化合物6bを白色固体(0.300 g, 16%)として得た。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) d=6.33~6.28(m, 1H), 4.18(dd, J=4.00 Hz, 11.00 Hz, 1H), 4.08(dd, J=5.00 Hz, 11.00 Hz, 1H), 3.82~3.76(m, 2H), 3.70~3.30(m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, PEG-CH<sub>2</sub>), 2.65(t, J=7.08 Hz, 2H), 2.44(t, J=6.83 Hz, 2H), 1.76~1.68(m, 2H), 1.57~1.48(m, 4H), 1.32~1.17(m, 56H), 0.86(t, J=6.6 Hz, 6H)。判明したMS: 2640~2822。

10

## 【0690】

化合物6cの調製: 1,2-ジ-O-オクタデシル-sn-グリセリド1c(5.00 g, 8.37ミリモル)、コハク酸無水物(1.70 g, 2当量)及びDMAP(2.55 g, 2.5当量)を共にジクロロメタン(50 mL)中に取り、一晚攪拌した。反応に続いてTLCを行い、DCMで希釈し、冷希クエン酸、水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧下で除去し、残渣を一晚高真空下に置いた。この化合物はさらに精製して、次の工程で直接的に用いた。MPEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> 3(1.50 g, 0.687ミリモル, NOF社、日本から購入)、先の工程5cからの化合物(0.718 g, 1.03ミリモル)及びHBTU(0.410 g, 1.08ミリモル)をアルゴン下でジクロロメタン/DMF(2:1, 20 mL)の混合物に溶解させた。DIEA(0.350 mL, 3当量)をそれに加え、一晚攪拌した。反応混合物を大きなフラスコに移し、減圧下で溶媒及び揮発物を除去した。残渣を一晚高真空下で乾燥させ、クロマトグラフィ(最初に酢酸エチル、次いで、グラジエント溶出としての5~10% MeOH/DCM)によって精製して、所要の化合物6cを白色固体(1.1 g, 56%)として得た。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) d=6.38~6.33(m, 1H), 4.19(dd, J=4.00 Hz, 11.00 Hz, 1H), 4.07(dd, J=5.00 Hz, 11.00 Hz, 1H), 3.81~3.74(m, 2H), 3.70~3.20(m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, PEG-CH<sub>2</sub>), 2.63(t, J=7.03 Hz, 2H), 2.43(t, J=6.87 Hz, 2H), 1.76~1.68(m, 2H), 1.57~1.48(m, 4H), 1.32~1.17(m, 64H), 0.86(t, J=6.60 Hz, 6H)。判明したMS範囲: 2680~2922。

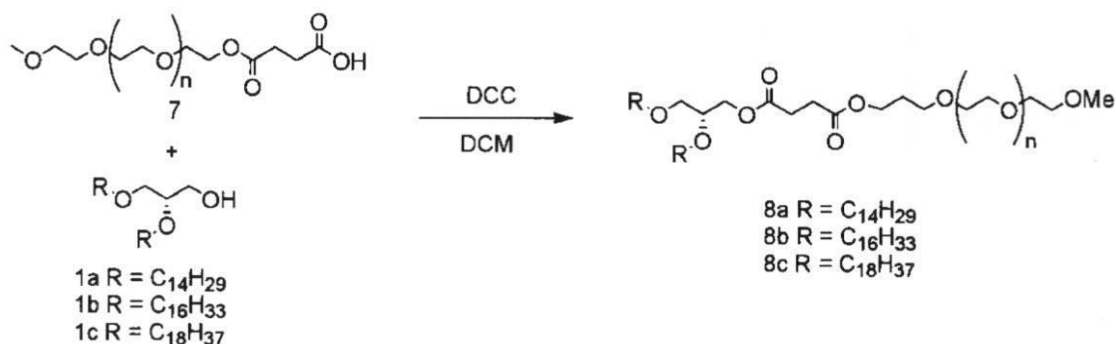
20

30

## 【0691】

【化163】

## スキーム3\*



10

\*スキーム3: mPEG2000-1,2-ジ-O-アルキル-sn3-スクシニルグリセリド

【0692】

化合物8aの調製: 1,2-ジ-O-テトラデシル-sn-グリセリド1a(0.300g, 0.618ミリモル)、MPEG-スクシネート7(1.00g, 0.476ミリモル, NOF社、日本から購入)、DCC(0.127g, 1.3当量)及びDMA P(0.058g, 0.476ミリモル)をアルゴン下でジクロロメタン(20mL)中に取

反応はTLCによってモニターした。反応混合物を一晩の攪拌の後に0℃まで冷却し、沈殿した固体を濾別した。揮発物及び溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣をクロマトグラフィ(最初、EtOAc、続いて5~10%DCM/MeOHグラジエント溶出)によって精製して、化合物8aを白色固体(0.590g, 48%)として得た。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) d= 4.25~4.18(m, 2H), 4.08(dd, J=5.60Hz, 11.50Hz, 1H), 3.80~3.73(m, 2H), 3.70~3.30(m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, PEG-CH<sub>2</sub>), 1.56~1.47(m, 4H), 1.30~1.15(m, 48H), 0.85(t, J=6.60Hz, 6H)。判明したMSの範囲: 2440~2708。

20

化合物8bの調製: 1,2-ジ-O-ヘキサデシル-sn-グリセリド1b(0.334g, 0.618ミリモル)、MPEGスクシネート7(1.00g, 0.476ミリモル, NOF社、日本から購入)、DCC(0.127g, 1.3当量)及びDMA P(0.058g, 0.476ミリモル)をアルゴン下でジクロロメタン(20mL)中に取り、一晩攪拌した。反応はTLCによってモニターした。反応混合物を一晩攪拌した後に0℃まで冷却し、沈殿した固体を濾過した。揮発物及び溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣をクロマトグラフィ(最初はEtOAcで溶出、続いて、5~10%DCM/MeOHグラジエント溶出)によって精製して、化合物8bを白色固体(0.930g, 74%)として得た。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) d= 4.25~4.17(m, 2H), 4.09(dd, J=5.50Hz, 11.50Hz, 1H), 3.81~3.73(m, 2H), 3.70~3.30(m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, PEG-CH<sub>2</sub>), 1.58~1.47(m, 4H), 1.30~1.17(m, 56H), 0.86(t, J=6.60Hz, 6H)。判明したMS範囲: 2453~2760。

30

40

【0693】

化合物8cの調製: 1,2-ジ-O-オクタデシル-sn-グリセリド1c(0.369g, 0.618ミリモル)、MPEG-スクシネート7(1.00g, 0.476ミリモル, NOF社、日本から購入)、DCC(0.127g, 1.3当量)及びDMA P(0.058g, 0.476ミリモル)をアルゴン下でジクロロメタン(20mL)中に取り、一晩攪拌した。反応をTLCによってモニターした。反応混合物を一晩攪拌した後、0℃まで冷却し、沈殿した固体を濾過した。揮発物及び溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣をクロマトグラフィ(最初、EtOAcで溶出、続いて、5~10%DCM/MeO

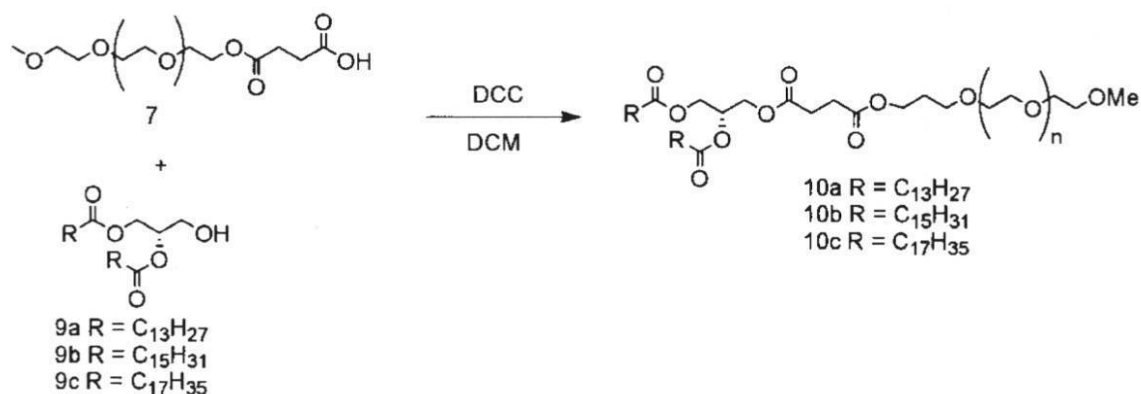
50

H グラジエント溶出) によって精製して、化合物 8 c を白色固体 (0.960 g, 75%) として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) d = 4.27 ~ 4.20 (m, 2H), 4.10 (dd, J = 5.80 Hz, 11.50 Hz, 1H), 3.83 ~ 3.74 (m, 2H), 3.70 ~ 3.35 (m, - - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - -, PEG - CH<sub>2</sub>), 1.54 ~ 1.46 (m, 4H), 1.30 ~ 1.17 (m, 64H), 0.86 (t, J = 6.60 Hz, 6H)。判明した MS 範囲: 2508 ~ 2816。

【0694】

【化164】

#### スキーム4\*



10

20

#### \*スキーム4: mPEG2000-1,2-ジ-O-アルキル-sn3-スクシニルグリセリド

【0695】

化合物 10 a の調製: 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロール 9 a (0.317 g, 0.618 ミリモル)、MPEG - スクシネート 7 (1.00 g, 0.476 ミリモル NOF 社、日本から購入)、DCC (0.127 g, 1.3 当量)、DMAP (0.058 g, 0.476 ミリモル) をアルゴン下でジクロロメタン (20 mL) 中に取り、一晩攪拌した。反応は TLC によってモニターした。反応混合物を一晩の攪拌の後に 0 °C まで冷却し、沈殿した固体を濾過した。揮発物及び溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣をクロマトグラフィ (最初は、EtOAc 溶出、続いて、5 ~ 10% DCM / MeOH グラジエント溶出) によって精製して、化合物 10 a を白色固体 (0.960 g, 78%) として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) d = 5.26 ~ 5.20 (m, 1H), 4.30 ~ 4.08 (m, 6H), 3.81 ~ 3.73 (m, 2H), 3.70 ~ 3.40 (m, - - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - -, PEG - CH<sub>2</sub>), 2.65 ~ 2.60 (m, 4H), 2.35 ~ 2.28 (m, 4H), 1.63 ~ 1.52 (m, 4H), 1.30 ~ 1.15 (m, 44H), 0.86 (t, J = 6.60 Hz, 6H)。判明した MS の範囲: 2468 ~ 2732。

30

【0696】

化合物 10 b の調製: 1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロール 9 b (0.352 g, 0.618 ミリモル)、MPEG - スクシネート 7 (1.00 g, 0.476 ミリモル, NOF 社、日本から購入)、DCC (0.127 g, 1.3 当量) 及び DMAP (0.058 g, 0.476 ミリモル) をアルゴン下でジクロロメタン (20 mL) 中に取り、一晩攪拌した。反応は TLC によってモニターした。反応混合物を一晩攪拌した後に、0 °C まで冷却し、沈殿した固体を濾別した。揮発物及び溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣をクロマトグラフィ (最初は、EtOAc で溶出、続いて 5 ~ 10% DCM / MeOH グラジエント溶出) によって精製して、化合物 10 b を白色固体 (1.02 g, 81%) として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) d = 5.26 ~ 5.19 (m, 1H), 4.30 ~ 4.05 (m, 6H), 3.80 ~ 3.40 (m, - - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - -, PEG - CH<sub>2</sub>), 2.65 ~ 2.60 (m, 4H), 2.33 ~ 2.2

40

50

4 (m, 4H), 1.63 ~ 1.50 (m, 4H), 1.30 ~ 1.15 (m, 52H), 0.85 (t, J = 6.60 Hz, 6H)。判明したMS範囲：2524 ~ 2792。

【0697】

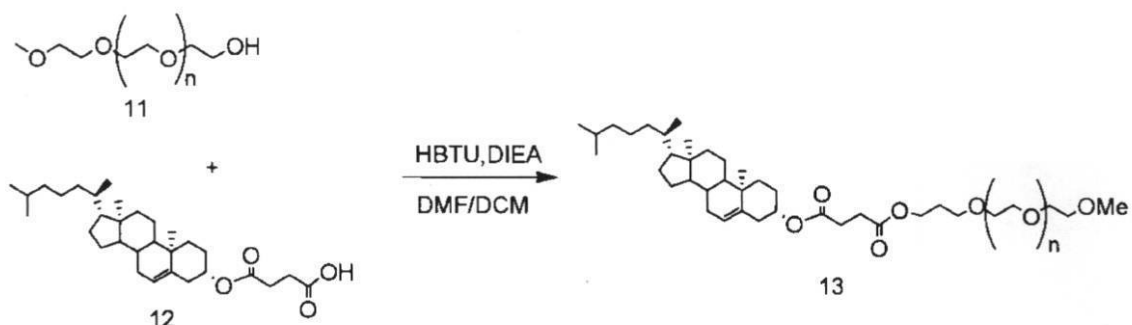
化合物10cの調製：1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール9c (0.387g, 0.618ミリモル)、MPEG-スクシネート7 (1.00g, 0.476ミリモル)、NOF社、日本から購入)、DCC (0.127g, 1.3当量)及びDMAP (0.058g, 0.476ミリモル)をアルゴン下でジクロロメタン(20mL)中に取り、一晚攪拌した。反応はTLCによってモニターした。反応混合物を一晚攪拌した後、0まで冷却し、沈殿した固体を濾別した。揮発物及び溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣をクロマトグラフィ(最初、EtOAcで溶出、続いてDCM/MeOHグラジエント溶出)によって精製して、化合物10cを白色固体(1.04g, 80%)として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) d = 5.26 ~ 5.19 (m, 1H), 4.30 ~ 4.05 (m, 6H), 3.80 ~ 3.40 (m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-PEG-CH<sub>2</sub>), 2.66 ~ 2.59 (m, 4H), 2.31 ~ 2.26 (m, 4H), 1.63 ~ 1.52 (m, 4H), 1.30 ~ 1.15 (m, 52H), 0.85 (t, J = 6.60 Hz, 6H)。判明したMS範囲：2540 ~ 2844。

10

【0698】

【化165】

### スキーム5\*



20

### \*スキーム5: コレステリル-mPEG2000

30

【0699】

化合物13の調製：MPEG<sub>2000</sub>-OH 11 (6.00g, 3ミリモル, Sigma-Aldrichから購入)、コレステロールヘミスクシネート12 (1.50g, 3.08ミリモル)及びHBTU (1.23g, 3.23ミリモル)をアルゴン下でジクロロメタン/DMF (2:1, 100mL)の混合物に溶解させた。DIEA (1.60mL, 3当量)をそれに加え、一晚攪拌した。溶媒及び揮発物を減圧下で除去した。残渣を一晚高真空下で乾燥させ、クロマトグラフィ(最初は酢酸エチル、次いで、グラジエント溶出としての5~10% MeOH/DCM)によって精製して、所要の化合物13を白色固体(5.05g, 68%)として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) d = 5.35 ~ 5.25 (m, 1H), 4.60 ~ 4.50 (m, 1H), 4.22 ~ 4.18 (m, 2H), 3.80 ~ 3.76 (m, 2H), 3.72 ~ 3.40 (m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-PEG-CH<sub>2</sub>), 2.64 ~ 2.56 (m, 4H), 2.31 ~ 2.20 (m, 3H), 2.01 ~ 0.8 (m, 44H)。判明したMS範囲：2390 ~ 2654。

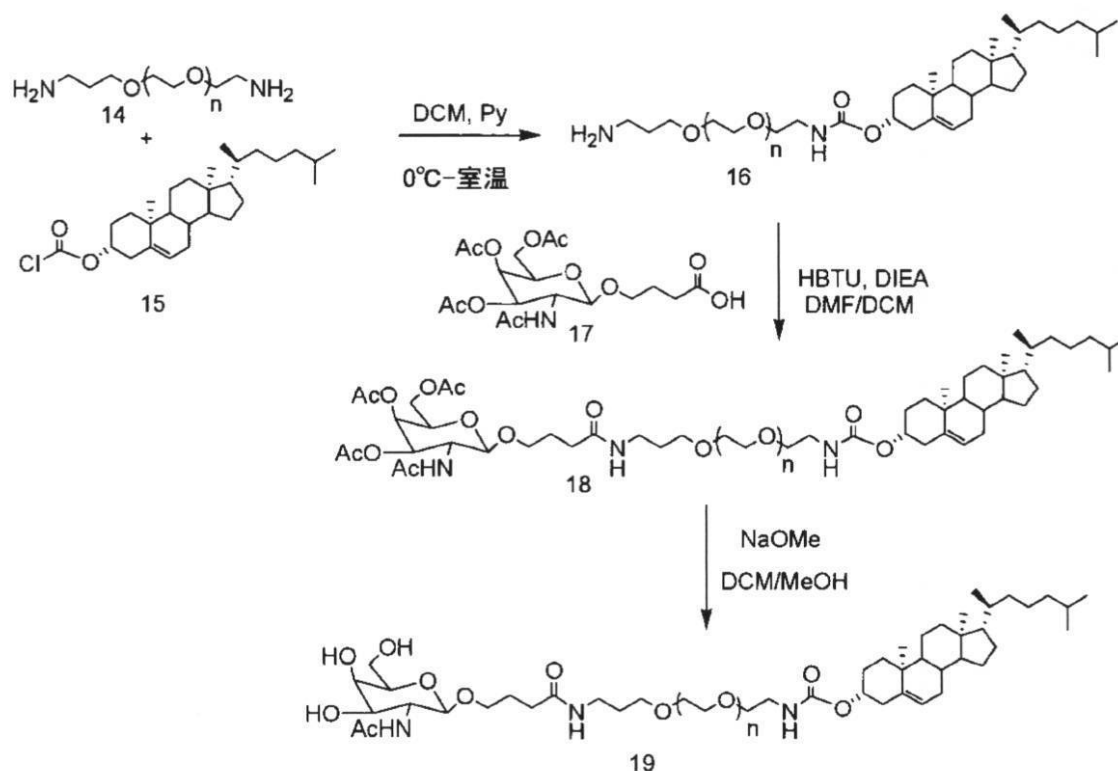
40

(実施例42)

標的化PEG脂質

【0700】

## 【化 1 6 6】



10

20

## 【0701】

19の調製:

工程1: 化合物14 (2.00g, 1.01ミリモル) 及びクロロギ酸コレステロール15 (0.453g, 1.01ミリモル) を共にジクロロメタン (20mL) 中に取った。混合物を氷水浴中で冷却した。トリエチルアミン (0.448mL) を加え、反応混合物を一晩攪拌した。反応をTLCによってモニターした。溶媒を除去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィ (酢酸エチル、次いで5~10% MeOH / DCM) によって精製して、所望の化合物16 (1.10g, 45.40%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) d = 5.35 (m, 1H), 5.15 (m, 1H), 3.40~3.85 (m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3.10~3.25 (m, 10H), 0.80~2.38 (m, 44H, コレステロール)。判明したMS範囲: 2220~2490。

30

## 【0702】

工程2: 化合物16 (1.00g, 0.417ミリモル) (0.235g, 0.542ミリモル) 及びHBTU (0.190g, 0.5ミリモル) をDCM / DMF (20mL, 2:1) の混合物中に取った。それにDIEAを加え、一晩攪拌した。反応はTLCによってモニターし、溶媒を減圧下で除去し、残渣をクロマトグラフィ (5~10% MeOH / DCM) によって精製して、所望の化合物18 (1.02g, 87%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz) d = 7.52 (d, J = 8.06Hz, 1H), 7.33 (d, J = 7.02Hz, 1H), 7.25 (d, J = 7.32Hz, 1H), 5.27 (m, 1H), 5.18 (d, J = 3.2Hz, 1H), 4.92 (dd, J = 3.17, 11.23Hz, 1H), 4.43 (m, 1H), 3.60~4.02 (m, 5H), 3.20~3.55 (m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 2.90~3.10 (m, 10H), 2.05 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.84 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 0.80~2.38 (m, 44H, コレステロール)。判明したMSの範囲: 2680~2990。

40

## 【0703】

工程3: 化合物18 (1.02g, 0.362ミリモル) をMeOH / DCM (10mL)

50

の混合物に溶解させ、それにメタノール（過剰）中のNaOMeの0.5M溶液を加え、一晚攪拌した。反応の進行はTLCによってモニターした。混合物をAcOH中和した。溶媒を真空下で除去し、残渣をクロマトグラフィ（5～10% MeOH/DCM）によって精製して、化合物19（280mg, 30%）を得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) δ = 5.38 (m, 1H), 4.02～4.06 (m, 7H), 3.30～3.80 (m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3.20～3.29 (m, 8H), 2.08 (s, 3H), 0.80～2.38. (m, 44H, コレステロール)。判明したMSの範囲：2600～2900。

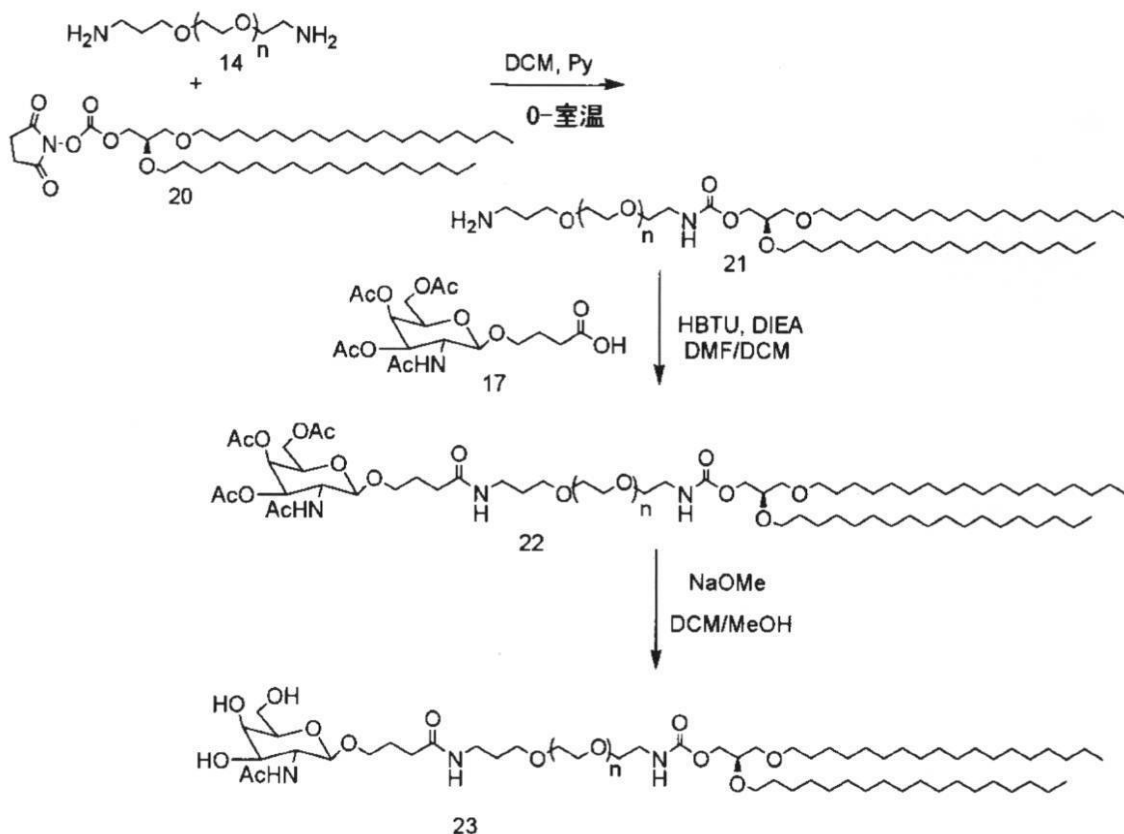
(実施例43)

標的化PEG脂質

10

【0704】

【化167】



20

30

【0705】

23の調製：

工程1：化合物14（2.00g, 1.01ミリモル）及び化合物20（0.453g, 1.01ミリモル）を共にジクロロメタン（20mL）中にとった。混合物を氷水浴中で冷却した。ピリジン（1 mL, 過剰）を加え、反応混合物を一晚攪拌した。反応はTLCによってモニターした。溶媒を除去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィ（酢酸エチル、続いて、5～10% MeOH/DCM）によって精製して、所望の化合物21（400mg, 15%）を得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) δ = 5.20 (m, 1H), 4.05～4.20 (m, 2H), 3.20～3.80 (m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.70～1.82 (m, 4H), 1.50～1.61 (m, 2H), 1.18～1.38 (m, 60H), 0.87 (t, J = 6.30 Hz, 6H)。判明したMS範囲：2400～2750。

40

【0706】

工程2：化合物21（0.415g, 0.159ミリモル）、17（0.100g, 1.3当量）及びHBTU（0.90g, 1.15当量）をDCM/DMF（20mL, 2:1）の混合物中にとった。それに、DIEA（0.2mL）を加え、一晚攪拌した。反

50

応はTLCによってモニターし、溶媒を減圧下で除去し、残渣をクロマトグラフィ(3~10% MeOH/DCM)によって精製して、所望の化合物22(0.450g, 94%)を得た。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) d=6.21(d, J=8.70Hz, 1H), 5.33(d, J=2.70Hz, 1H), 5.15~5.20(m, 2H), 4.55(d, J=8.15Hz, 1H), 4.01~4.20(m, 4H), 3.20~3.90(m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 2.14(s, 3H), 2.03(s, 3H), 1.99(s, 3H), 1.93(s, 3H), 1.70~1.82(m, 4H), 1.50~1.61(m, 4H), 1.17~1.38(m, 60H), 0.86(t, J=6.32Hz, 6H)。判明したMS範囲: 2800~3200。

#### 【0707】

工程3: 化合物22(0.450g, 0.359ミリモル)をMeOH/DCM(5mL)の混合物に溶解させ、それにメタノール(過剰)中のNaOMeの0.5M溶液を加え、一晚攪拌した。反応の進行をTLCによってモニターし、混合物をAcOHで中和した。溶媒を真空中で除去し、残渣をクロマトグラフィ(5~10% MeOH/DCM)によって精製して、化合物23(365mg, 85%)を得た。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) d=5.18(m, 1H), 4.05~4.20(m, 4H), 3.20~3.90(m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 2.05(s, 3H), 1.71~1.80(m, 4H), 1.50~1.61(m, 4H), 1.17~1.38(m, 60H), 0.87(t, J=6.32Hz, 6H)。判明したMS範囲: 2760~3000。

#### 【0708】

図6に示されたように、患者に投与された場合、製剤は種々の経路のFVIIのサイレンシングをもたらした。例えば、製剤3は、製剤5、6及び12と同様に比較的高いレベルのFVIIのサイレンシングをもたらした。

(実施例44)

マウスに投与した製剤LNPO1の許容性

組成物ND98: コレステロール: PEG-C14 = 42:48:10(モル比)を含む空のリポソームを実施例45に記載したように調製した。次いで、異なる量のsiRNAを予め形成された押し出し空リポソームに加えて30:1、20:1、15:1、10:1、及び5:1(重量:重量)の初期総賦形剤: siRNA比率を有する製剤を得た。5:1の総賦形剤: siRNA比率の製剤の調製の結果、製剤中に過剰のsiRNAがもたらされ、脂質負荷能力を飽和させる。次いで、5容量のPBSに対して100,000MWC膜を用いる接線流濾過によって過剰のsiRNAを除去した。次いで、得られた製剤を10mg/kg容量の尾静脈注射を介してC57BL-6マウスに投与した。製剤の許容性は、製剤の投与から24時間及び48時間後に動物の体重増加を測定することによって評価し、その結果を図7に示す。

(実施例45)

最初に未負荷複合体を形成し、次に未負荷複合体をsiRNAで処理することによる会合複合体の形成、及び2つの治療剤を含む会合複合体の投与

2つの異なる核酸部位を有する会合複合体を以下の通りに調製した。エタノール中のND98、コレステロール、及びPEG-C14のストック溶液を、各々、NS98、コレステロール、及びPEG-C14について以下の濃度: 133mg/mL、25mg/mL、及び100mg/mLで調製した。次いで、脂質ストックを混合して、42:48:10のND98:コレステロール:PEG-C14モル比率を得た。次いで、この混合物を水性緩衝液に加え、その結果、35%エタノール、100mM酢酸ナトリウム、pH5中の脂質ナノ粒子が自然に形成された。次いで、押出器(Lipex, Northern Lipids)を用いて未負荷脂質ナノ粒子を0.08µm膜(Whatman, Nucleopore)を2回通して、サイズが20~100nmの単峰型の小胞を得た。次いで、35%エタノール中の適量のsiRNAを、総賦形剤: siRNA比率7.5:1(重量:重量)で、予めサイズ調整された未負荷小胞に加えた。次いで、得られた混合物

10

20

30

40

50

を37℃にて30分間インキュベートして、siRNAの脂質ナノ粒子への負荷を可能とした。インキュベーションの後に、透析、又はPBSに対するクロスフロー濾過のいずれかによってエタノール除去及び緩衝液交換を行った。次いで、最終製剤を0.2µmフィルタを通して滅菌濾過した。賦形剤及び治療剤の添加の順序を示すフローチャートを図8に示す。

#### 【0709】

ApoB及び第VII因子を標的とするsiRNAの1:1混合物を実施例44に記載のように調製した。これとは別に、同じApoB及び第VII因子標的siRNAを実施例31に記載のようにそれぞれ調製した。次いで、3つの製剤を、10µL/g動物体重の注射容量にて種々の用量で投与した。投与から48時間後に、血清試料を眼窩後出血によって収集し、動物を屠殺し、肝臓を採取した。血清中第VII因子濃度は製造業者のプロトコルに従い、発色診断キット(Coaset Factor VII Assay Kit、ダイアファーマ社)を用いて測定した。ApoB及び第VII因子の肝臓中mRNAレベルは分岐-DNA(bDNA)アッセイ(Quantigene, Panomics)を用いて決定し、その結果を図9に示す。2つの治療剤の間に阻害の兆候は観察されなかった。むしろ、治療剤の双方は投与した場合に有効性を示した。

10

(実施例46)

予め形成された小胞を用いる会合複合体の製造方法

脂質ストック調製物

脂質性ND98-4HCL(分子量1487)、コレステロール、及びPEG-C14のストック溶液を、ND98、コレステロール、及びPEG-C14を、各々133mg/mL、25mg/mL、及び100mg/mLの濃度でエタノール中に調製した。ストック溶液を50℃まで温めて、脂質の溶液化を助けた促進した。

20

#### 【0710】

空小胞調製物

次いで、脂質ストックを以下に列記する容量に従って混合し、ND98:コレステロール:PEG-C14が42:48:10のモル比を得た。また、以下の表に列記された容量に従って水性混合物も調製した。

#### 【0711】

【表5】

30

脂質混合物容量 (mL)			
ND98	コレステロール	PEG	合計
56.250	90.000	31.500	177.750
水性混合物 (mL)			
水	3M NaOAc	エタノール	合計
378.000	27.000	40.327	445.327

40

#### 【0712】

次いで、エタノール性脂質混合物を、磁気攪拌プレート上で迅速に攪拌しつつ、水性混合物に加えた。混合に際して、脂質性小胞が自然に形成された。次いで、得られた小胞を0.08µm(Whatman, Nucleopore)を通して押出しして(2回)、空の小胞をサイズ調整した。全ての操作は室温で行った。

#### 【0713】

50

空の小胞への siRNA の負荷

脱塩した二重鎖 siRNA を 10 mg / mL の濃度で pH 5 の 50 mM 酢酸ナトリウムに溶解させることによって、siRNA ストック溶液を調製した。適切な容量のこの siRNA ストックを適切な容量のエタノールと混合して、35% (体積) エタノールで希釈された siRNA 溶液を得た (以下の表参照)。

【0714】

【表6】

siRNA 希釈

siRNA ストック (mg/mL)	siRNA (50 nM NaOAc)	エタノール	合計
10	180.000	96.923	276.923

10

【0715】

磁気攪拌プレート上で迅速に攪拌しつつ、277 mL の希釈した siRNA 溶液を 623 mL の空の小胞混合物に加えた。次いで、得られた混合物を 37℃ にて 30 分間インキュベートして、siRNA の負荷を可能とした。

20

【0716】

限外濾過及び最終 0.2 μm 濾過

インキュベーションの後、900 mL 負荷ナノ粒子混合物を 1.8 L の PBS に希釈して、2.7 L の希釈された混合物を得た。次いで、この希釈された混合物を ~1 L まで濃縮し、堆積された 2 つの 100,000 MWCO カートリッジを利用するザルトリウス (Sartorius) TFF システムを用い、10 容量の PBS に対するクロスフロー濾過によって透析濾過した。カートリッジには逆圧を適用せず、ポンプスピードは 300 rpm に設定した。緩衝液交換の後、得られた溶液をほぼ 2 mg / mL siRNA まで濃縮した。

30

【0717】

最終濾過は、0.2 μm フィルタカプセル (ワットマン (Whatman) 社製、Polycap 36 AS) に溶液を通すことによって最終濾過を行った。

このプロセスを示すフローチャートを図 10 に示す。

(実施例 47)

効率に対する粒子サイズの比較

実施例 46 に一般的に記載された手順を用い、会合複合体を形成した。しかしながら、複合体はサイズに基づいて評価されたので、異なる押出膜を用いて、直径 150 nm、85 nm、60 nm、及び 50 nm を有する粒子を作製した。複合体中に負荷された siRNA は第 VII 因子を標的とした。

40

【0718】

粒子は第 VII 因子サイレンシングアッセイにおいて評価し、50 nm 粒子は 150 nm、85 nm、及び 60 nm 粒子に対して最も効果的であることを示した。アッセイの結果を図 11 に示す。

(実施例 48)

会合複合体に調製されていない核酸剤と調製された核酸剤との半減期の比較

会合複合体に調製された siRNA の半減期はヒト血清中で 37℃ でイン・ビトロにて評価した。会合複合体は実施例 46 におけるように調製した。比較の目的で、調製されていない siRNA もヒト血清においてやはりイン・ビトロで評価した。HPLC によって決定された全長産物のパーセントは、調製された及び調製されていない siRNA の双方について評価した。図 12 に示されるように、調製された siRNA はヒト血清においてイ

50

ン・ピトロで半減期を有意に改善した。

(実施例 4 9)

様々な鎖長の P E G 脂質を有する会合の効果の比較

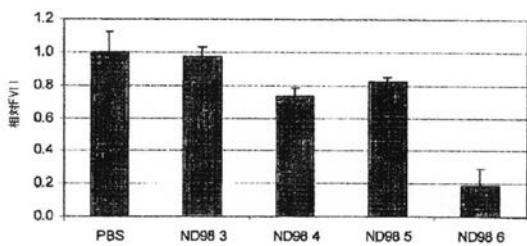
様々な長さの P E G 脂質のアルキル鎖を有する会合複合体を、実施例 4 6 のように調製した。1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、及び 1 6 のアルキル鎖の長さを評価し、第 V I I 因子サイレンシングアッセイにおける効果につき比較した。図 1 3 に示されるように、1 3、1 4 及び 1 5 の鎖長は、該アッセイで測定されたように最大のサイレンシングを示した。

【 0 7 1 9 】

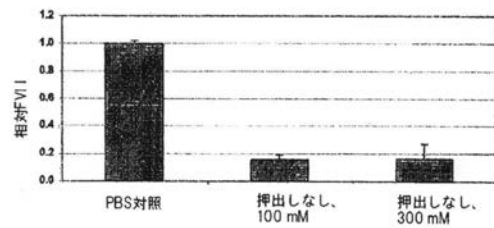
本発明の多数の実施形態を記載した。しかしながら、本発明の主旨及び範囲を逸脱することなく、種々の変形例をなすことができることが理解されよう。従って、他の実施形態は請求の範囲の範囲内に含まれる。

10

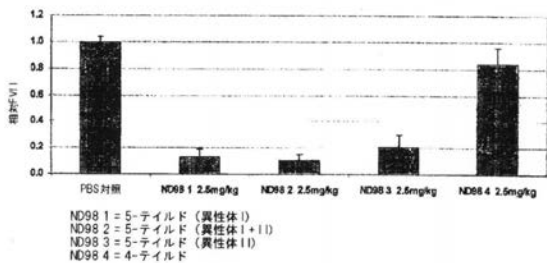
【 図 1 】



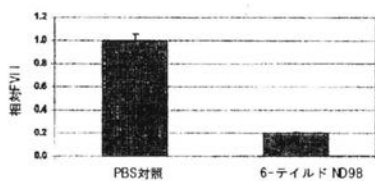
【 図 4 】



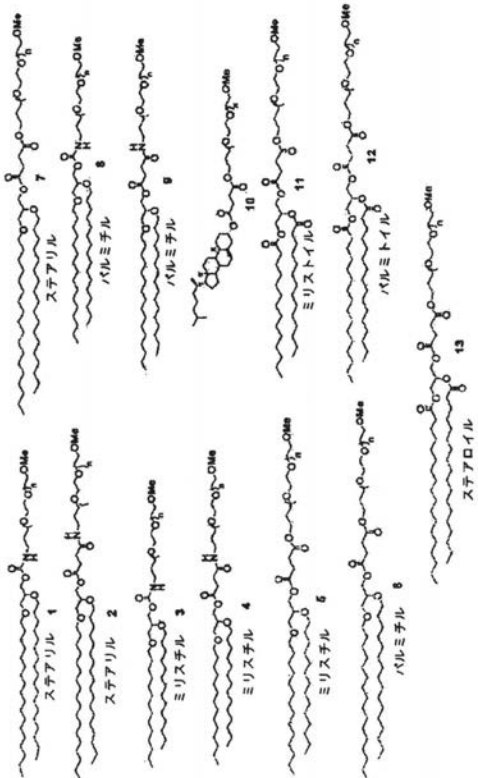
【 図 2 】



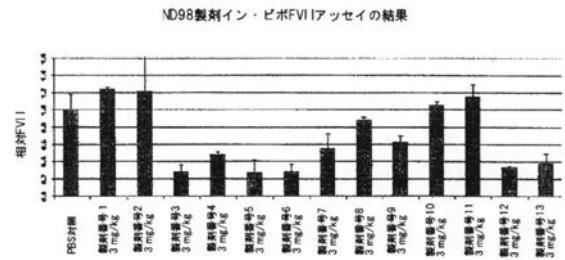
【 図 3 】



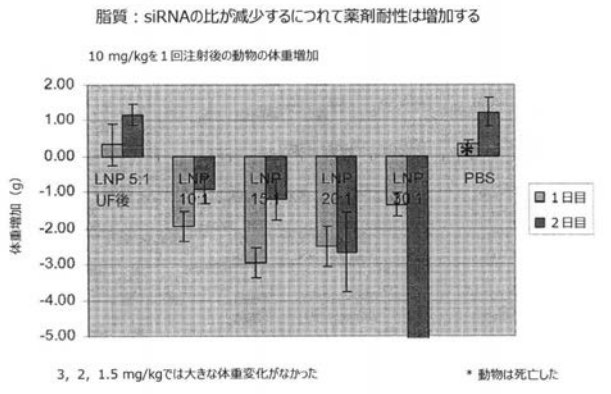
【 図 5 】



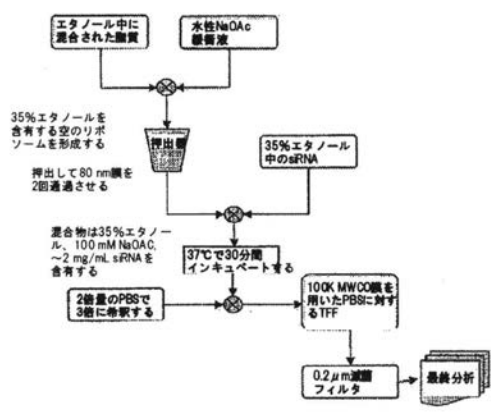
【 図 6 】



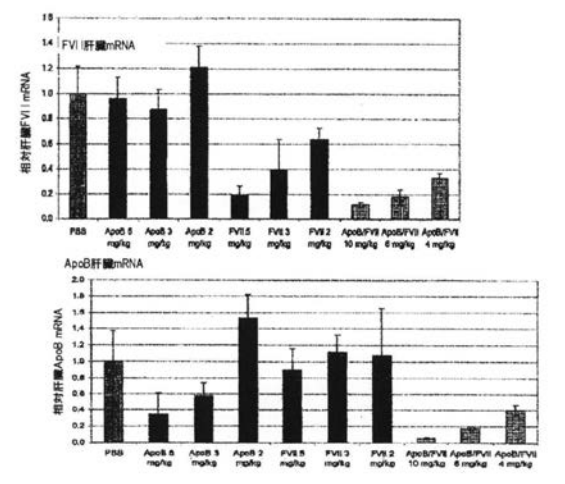
【 図 7 】



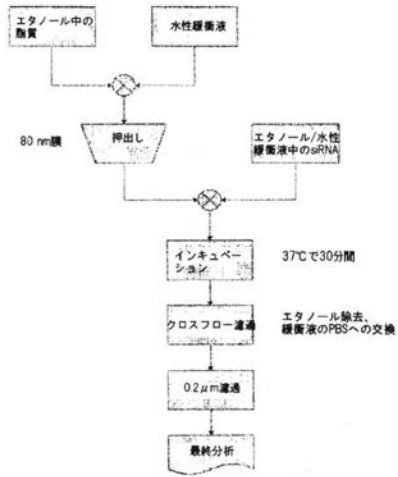
【 図 8 】



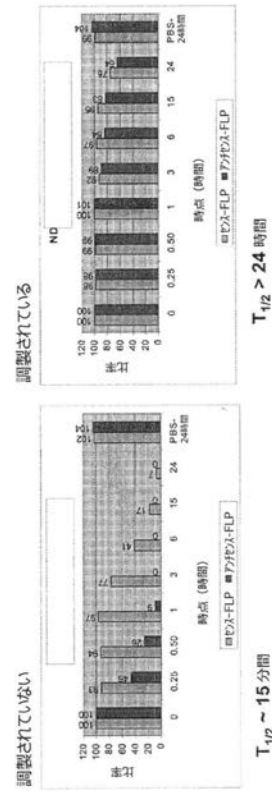
【 図 9 】



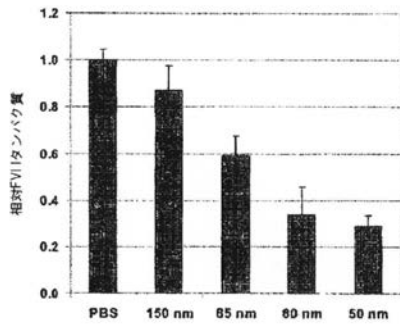
【 図 1 0 】



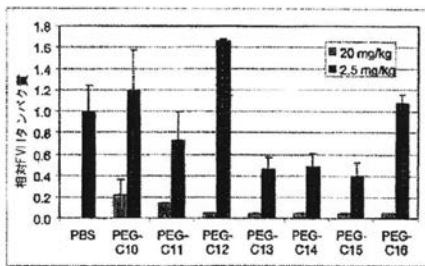
【 図 1 2 】



【 図 1 1 】



【 図 1 3 】



## フロントページの続き

- (72)発明者 マノハラン、ムシア  
アメリカ合衆国 02493 マサチューセッツ州 ウェストン ローリング レーン 19
- (72)発明者 ラジェーブ、カランソータイル ジー .  
アメリカ合衆国 01778 マサチューセッツ州 ウェイランド ディーン ロード 25
- (72)発明者 アキンク、アキン  
アメリカ合衆国 02494 マサチューセッツ州 ニーダム シーダー ストリート 286
- (72)発明者 ジャヤプラカシュ、ケイ . ナラヤナネア  
アメリカ合衆国 02169 マサチューセッツ州 クインシー ハンコック ストリート 12  
05 アpartment ナンバー 603
- (72)発明者 ジャイラマン、ムスサミー  
アメリカ合衆国 01844 マサチューセッツ州 メシュエン メリマック ストリート 18
- (72)発明者 マイヤー、マーティン エイ .  
アメリカ合衆国 02478 マサチューセッツ州 ベルモント スチュワート テラス 1
- Fターム(参考) 4C076 AA19 AA95 BB11 DD52M FF11 FF31 FF68 FF70  
4H006 AA01 AA02 AB20 AC48 BT12 BU32