

(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2017-14253

(P2017-14253A)

(43) 公開日 平成29年1月19日(2017.1.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	
審査請求 有 請求項の数 28 O L (全 131 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-157739 (P2016-157739)	(71) 出願人	507328184
(22) 出願日	平成28年8月10日 (2016. 8. 10)		マリーナ バイオテック, インコーポレイ
(62) 分割の表示	特願2015-130272 (P2015-130272)		テッド
原出願日	平成19年12月19日 (2007. 12. 19)		アメリカ合衆国 ワシントン州 9802
(31) 優先権主張番号	06256450.5		1-7266, ボセル, モンテ ヴィラ
(32) 優先日	平成18年12月19日 (2006. 12. 19)	(74) 代理人	100101454
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 山田 卓二
(31) 優先権主張番号	11/642, 347	(74) 代理人	100062144
(32) 優先日	平成18年12月19日 (2006. 12. 19)		弁理士 青山 篠
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100106518
(31) 優先権主張番号	07117189.6		弁理士 松谷 道子
(32) 優先日	平成19年9月25日 (2007. 9. 25)	(74) 代理人	100138911
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 櫻井 陽子
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 トランスフェクションエンハンサー要素を含む脂質および脂質集合体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】脂質集合体の融合性を向上させ、リポソーム等の脂質集合体であって、イオン相互作用によって脂質集合体との複合体を形成するトランスフェクションエンハンサー要素 (T E T) を含む脂質集合体、又はこのようなT E Eを組み込んでいる脂質の提供。

【解決手段】一般式 (I) : 脂質部分- [疎水性部分- p H感受性親水性部分] に従う、脂質部分および1種または複数のT E Eを含む脂質 (脂質-T E E) であって、前記1種または複数のT E Eは、一般式 (I I) : 疎水性部分- p H感受性親水性部分、を有し、式中、各T E Eのp H感受性親水性部分は独立に、p k a 2 ~ 6 の弱酸、または酸性基と弱塩基との組合せを含むp K a 3 ~ 8 の双性イオン構造であるような脂質。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (I) :

脂質部分－[疎水性部分－pH感受性親水性部分] (I)

に従う、脂質部分および1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む脂質(脂質－TEE)であって、

前記1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素(TEE)は一般式(II)

疎水性部分－pH感受性親水性部分 (II)

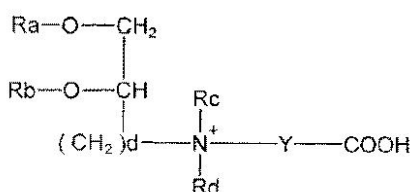
を有し、

式中、各TEEのpH感受性親水性部分は独立に、pKa 2～6の弱酸、または酸性基と弱塩基との組合せを含むpKa 3～8の双性イオン構造であり、ただし前記脂質が、次の構造(III)、(IV)、または(V)のうちの1つではないことを条件とする脂質。

PE－アミド結合－X－COOH (III)

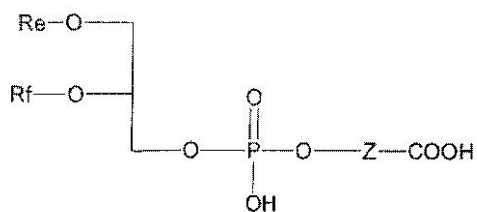
(式中、PEは、ホスファチジルエタノールアミン部分であり、Xは、3～20個の原子の鎖長を有し、場合によっては1個または複数のヘテロ原子を含む置換または非置換の飽和または不飽和炭素含有直鎖である) ;

【化 1】



(式中、Yは、2～10個のC原子の鎖長を有する飽和直鎖アルキル基であり、Ra、Rb、Rc、およびRdは独立に、0～6個の不飽和部位を有する直鎖状または分枝状の非置換または置換C1～23アルキル基、アシル基、アルキレン基、ヘテロアルキル基、環状基、またはアリール基であり、前記基は0～5個のヘテロ原子を含み、置換基は－O－(CH2)e－CH3；－S－(CH2)e－CH3；A－(CH2)e (式中、Aはハロゲン化物である)、および－N((CH2)e－CH3)2であり、置換基のアルキル基は、0～2個のヘテロ原子を含み、eは0～4であり、さらにRaおよびRbは独立に、Hとすることができ、dは1～6である) ; または

【化 2】



(式中、ReおよびRfは独立に、水素原子、または二重および三重結合を場合によっては含むC1～C24直鎖状もしくは分枝状アルキル鎖もしくはアシル鎖であり、Zは、アリール環、3～6個の炭素原子を有するシクロアルキル、ヒドロキシル、および／または1個もしくは複数のさらなるカルボン酸基で場合によっては置換されていてもよい、6～20個の炭素原子を有する脂肪族および／または脂環式炭化水素鎖である)。

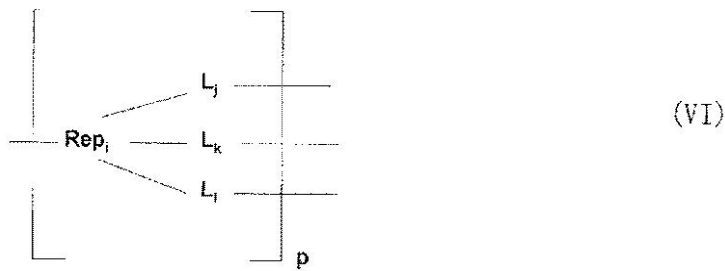
【請求項 2】

前記TEEが、疎水性部分および1種または複数のpH感受性親水性部分の特徴とする、請求項1に記載の脂質。

【請求項 3】

前記 T E E が、次の一般式のうちの 1 つを有する、請求項 1 または請求項 2 に記載の脂質。

【化 3】



10

(式中、 Rep_i 基はそれぞれ独立に、1～8 個の C 原子を有する非分枝状、分枝状、または環状の置換または非置換アルキル基、アルケニル基、アルキレン基、アルキニル基、またはアリール基であり、

前記置換基は、1 種または複数の pH 感受性親水性部分、低級アルキル、アルキレン、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アルキルチオ、およびアルキルチオアルキルから選択され、

L_j 、 L_k 、または L_l は独立に、存在しないか、あるいは

—CH₂—、—O—、—S—、—N(H)C(O)—、—C(O)O—、—OC(O)N(H)—、—C(O)—、—C(O)N(H)—、—N(H)C(O)O—、—CH=N—、—OC(O)—、—N=CH—、—S—S—、—NH—、—N(R₁₃)(R₁₄)— (ただし、R₁₃ および R₁₄ は独立に、H もしくは低級アルキルであり、または R₁₃ もしくは R₁₄ の一方は、存在しなくてもよい)、

20

【化 4】



アミノ酸、α-ヒドロキシ酸、または β-ヒドロキシ酸から選択され、

30

前記 T E E 中の C 原子の総数は、6～40 個であり、p は ≤ 40 である)；または
—ステロール (VII)

(式中、前記ステロールは、1 種または複数の親水性部分、—OH、—SH、または低級アルキル、アルキレン、アルケニル、もしくはアルキニル、アルコキシ、アルキルアルコキシ、アルキルチオ、もしくはアルキルアルキルチオで置換されていてもよい)。

【請求項 4】

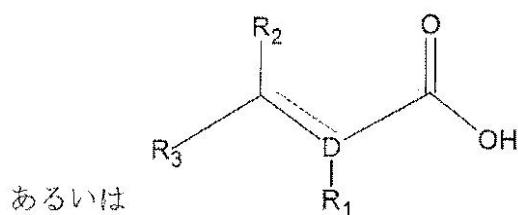
一般式 VI における前記アミノ酸が、プロリン、グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニン、またはそれらのペプチドから選択され、一般式 VI における前記 α-および β-ヒドロキシ酸が、グリコール酸、乳酸、およびヒドロキシ酪酸から選択される、請求項 3 に記載の脂質。

40

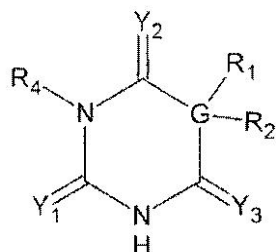
【請求項 5】

前記 pH 感受性親水性部分が弱酸であり、前記弱酸が、次の構造のうちの 1 つから選択されるカルボン酸、バルビツル酸もしくは誘導体、キサンチンもしくは誘導体、またはウラシルもしくは誘導体である、請求項 1～請求項 4 のいずれか一項に記載の脂質。

【化 5】



(VIII)



(IX)

10

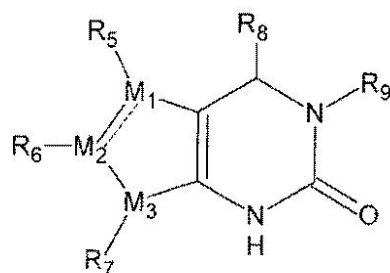
20

30

(式中、点線は、任意選択である二重結合を表し、
 R 1、R 2、R 3、および R 4 は独立に、T E E の疎水性部分、水素、0 ～ 5 個の不飽和部位を有する直鎖状、分枝状、もしくは環状の非置換もしくは置換 C 1 ～ C 1 0 アルキル、アルキレン、またはヘテロアルキル、あるいはアリール基であり、前記基は、—O—または—S—から選択される 0 ～ 5 個のヘテロ原子を含み、前記ヘテロ原子は、前記基中の第 1 の原子ではなく、前記置換基は、ヒドロキシ基、メルカプト基、オキシ基、ホルミル基、ニトロ基、シアノ基、ハロ基、またはトリハロメチル基から選択され、R 1、R 2、および R 3 は、代替としてかつ独立にアルコキシ基、アルコキシアルキル基、アルキルチオ基、アルキルチオアルキル基、ヒドロキシ基、メルカプト基、オキシ基、ホルミル基、ニトロ基、シアノ基、ハロ基、またはトリハロメチル基とすることができ、D は、C、または 0 ～ 3 個の不飽和部位を有し、かつ—O—、—S—から選択される 0 ～ 5 個のヘテロ原子を含む非置換もしくは置換環状アルキル基もしくはアリール基であり、前記置換基は、アルキル基、アルキレン基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシ基、アルコキシアルキル基、アルキルチオ基、アルキルチオアルキル基、ヒドロキシ基、メルカプト基、オキシ基、ホルミル基、シアノ基、ハロ基、またはトリハロメチル基から選択され、
 Y 1、Y 2、および Y 3 は独立に、O または S であり、
 G は、C または N とすることができ、G が N であるとき、R 1 または R 2 の一方は、存在しなくてもよく、R 1 および R 2 は R 4 と定義される) ；

あるいは

【化 6】



(X)

40

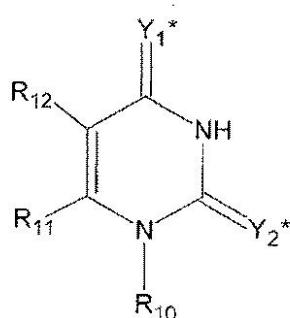
50

(式中、点線は、任意選択である二重結合を表し、
 R 5、R 6、R 7、または R 9 は、独立に T E E の疎水性部分、水素、0 ～ 5 個の不飽和部位を有する直鎖状、分枝状、もしくは環状の非置換もしくは置換 C 1 ～ C 1 0 アルキル、アルキレン、またはヘテロアルキル、あるいはアリール基とすることができ、前記基は、—O—または—S—から選択される 0 ～ 5 個のヘテロ原子を含み、前記ヘテロ原子は、

前記基中の第 1 の原子ではなく、前記置換基は、ヒドロキシ基、メルカプト基、オキシ基、ホルミル基、ニトロ基、シアノ基、ハロ基、またはトリハロメチル基から選択され、
 R 8 は O または S H であり、
 M 3 は N または C であり、
 M 2 は C または $-O-$ であり、M 2 が $-O-$ である場合、R 6 は存在せず、
 M 1 は N または C または $-O-$ であり、M 1 が $-O-$ である場合、R 5 は存在せず、
 M 1、M 2、または M 3 が C であるとき、R 5、R 6、または R 7 は、さらにアルコキシ基、アルコキシアルキル基、アルキルチオ基、アルキルチオアルキル基、ヒドロキシ基、メルカプト基、オキシ基、ホルミル基、ニトロ基、シアノ基、ハロ基、またはトリハロメチル基とすることができ、R 5、R 6、または R 7 と定義されたさらなる置換基 R 5'、
 R 6'、または R 7' は、C 原子に結合していてもよい) ;

あるいは

【化 7】



(XI)

(式中、

R 1 0 は、T E E の疎水性部分とすることができ、R 1 1 および R 1 2 は独立に、水素、ヒドロキシ基、メルカプト基、ホルミル基、ニトロ基、シアノ基、またはハロ基、またはトリハロメチル基とすることができるが、R 1 1 および R 1 2 の少なくとも一方は H 以外であり、

Y 1 * および Y 2 * は独立に、O または S である)。

【請求項 6】

前記双性イオン構造の前記弱塩基が、イミダゾール、モルホリン、ピリジン、ピペラジン、または非環状アミンの群から選択される、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 7】

前記 T E E の前記 1 種または複数の pH 感受性親水性部分がカルボン酸基である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 8】

前記疎水性部分がアルキル直鎖である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 9】

前記脂質 - T E E が次の一般式：

脂質部分 - [(L 2) - (T E E)]^r

(式中、L 2 は、存在しないか、または $-CH_2-$ 、 $-O-$ ； $-S-$ ； $-N(H)C(O)-$ ； $-C(O)N(H)-$ ； $-C(O)O-$ ； $-OC(O)N(H)-$ ； $-C(O)-$ ； $-C(O)N(H)-$ ； $-N(H)C(O)O-$ ； $-NH-$ ； $-N(R13)(R14)-$ (ただし、R 1 3 および R 1 4 は独立に、H もしくは低級アルキルであり、または R 1 3 もしくは R 1 4 の一方は、存在しなくてもよい)； $-CH=N-$ ； $-OC(O)-$ ； $-N=CH-$ ；および $-S-S-$ から選択される連結基であり；r は 1 ～ 5 の整数である)

を有する、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の脂質。

【請求項 10】

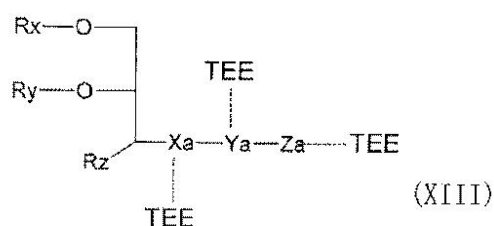
前記脂質部分が、 $-OH$ 基で置換されていてもよいリン脂質およびそのリゾ型、スフィンゴ脂質およびそのリゾ型、コレステロールのようなステロールおよびその誘導体、ジアシルグリセロール／ジアルキルグリセロール、モノアシルグリセロール／モノアルキルグリセロール、グリセリン酸のモノエステル、ジエステル、モノエーテル、もしくはジエーテル、スフィンゴシン／フィトスフィンゴシン／スフィンガニンおよびそれらのN置換誘導体、セラミド、1, 2-ジアシル-3-アミノプロパン／1, 2-ジアルキル-3-アミノプロパン、1-もしくは2-モノアシル-3-アミノプロパン／1-もしくは2-モノアルキル-3-アミノプロパン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、脂肪酸、ジカルボン酸アルキルエステル、トリカルボン酸ジアルキルエステル、または酒石酸と長鎖アルコールとのエステル、もしくは酒石酸と長鎖カルボン酸とのエステルを含む群から選択される、請求項1～9のいずれか一項に記載の脂質。

10

【請求項 11】

一般式 (X I I I) ~ (X I X) のうちの1つを有する、請求項1～10のいずれか一項に記載の脂質。

【化 8】



20

(式中、 R_x および R_y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含む $C_8 \sim C_{30}$ アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいは R_x または R_y の一方は、 H とすることができ、 R_z は、 H 、 $=O$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ であり、

X_a は、 $-OPO_3-$ ； $-OPO_2-CH_2-$ ； $-ピロホスフェート-$ ； $-OSO_3-$ ； $-OSO_2-$ ； $-O-$ ； $-NH-$ ； $-S-$ ； $-N(H)C(O)-$ ； $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ ； $-OC(O)N(H)-$ ； $-N(H)C(O)O-$ ； $-OC(O)-$ ； $-C(O)O-$ ； $-N=CH-$ ； $-CH=N-$ ； $-CH_2-$ ； $-S-S-$ ； $-N(R_{13})(R_{14})-$ (ただし、 R_{13} および R_{14} は独立に、 H もしくは低級アルキルであり、または R_{13} もしくは R_{14} の一方は、存在しなくてもよい)；または

30

【化 9】



であり、

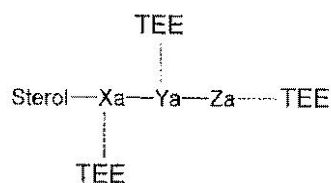
Y_a は存在しないか、または非分枝状、分枝状、もしくは環状の置換もしくは非置換アルキル、アルケニル；1～8個のC原子を有するアルキレン基もしくはアルキニル基もしくはアリール基であり、ここで前記置換基は、1種または複数の $-OH$ ； $-NH_2$ ； $-N(R_{13})(R_{14})$ (ただし、 R_{13} および R_{14} は、上記で定義される)； $-COOH$ ；糖から選択され、あるいは Y_a は糖；アミノ酸；ジ-もしくはトリペプチド； α -ヒドロキシ酸もしくは β -ヒドロキシ酸、またはジヒドロキシ酸であり、 Z_a は存在しないか、または $-O-$ ； $-S-$ ； $-N(H)C(O)-$ ； $-C(O)N(H)-$ ； $-C(O)O-$ ； $-OC(O)N(H)-$ ； $-C(O)-$ ； $-C(O)N(H)-$ ； $-N(H)C(O)O-$ ； $-NH-$ ； $-N(R_{13})(R_{14})-$ (R_{13} および R_{14} は上記のように定義する)； $-CH=N-$ ； $-OC(O)-$ ； $-N=CH-$ ； $-S-S-$ から選択される基であり、あるいは Z_a は、 $-NH_2$ ； $-(NH_3)^+$ ； $-(N(R_{13})(R_{14})(R_{15}))^+$ (ただし、 R_{13} 、 R_{14} 、および R_{15} は、上記の R_{13} および R_{14} のよ

40

50

うに定義される) ; $-C(O)OH$; $-OH$; $-C(O)H$; $-C(O)OR_{16}$ (ただし、 R_{16} は低級アルキルである) ; $-C(O)NH_2$ の群から選択され、点線は、1種または複数の TEE のあり得るグラフト位置を表す) ;

【化 10】



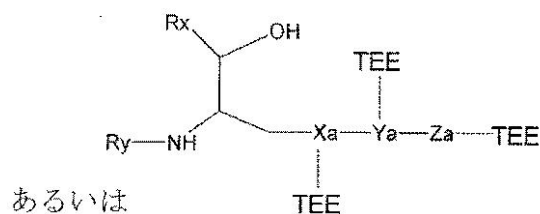
(XIV)

10

(式中、Xa はステロールの 3' 位において結合しており、上記のように定義され、Ya および Za は、上記で定義され、ステロールは、コレステロール、シトステロール、カンペステロール、デスモステロール、フコステロール、22-ケトステロール、20-ヒドロキシステロール、スチグマステロール、22-ヒドロキシコレステロール、25-ヒドロキシコレステロール、ラノステロール、7-デヒドロコレステロール、ジヒドロコレステロール、19-ヒドロキシコレステロール、5 α -コレスト-7-エン3 β -オール、7-ヒドロキシコレステロール、エピコレステロール、エルゴステロール、および/またはデヒドロエルゴステロールから選択され、好ましくは前記ステロールは、コレステロールであり、点線は、1種または複数の TEE のあり得るグラフト位置を表す) ;

20

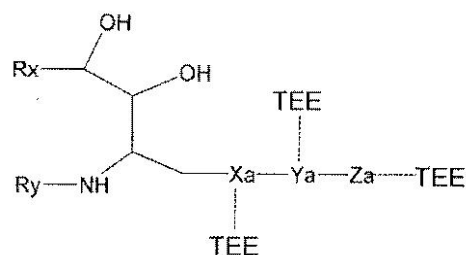
【化 11】



(XV)

あるいは

【化 12】



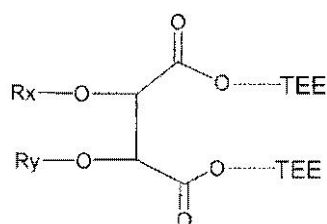
(XVI)

30

(式中、Rx、Ry、Xa、Ya、またはZaは、上記で定義され、点線は、1種または複数の TEE のあり得るグラフト位置を表す) ;

40

【化 13】



(XVII)

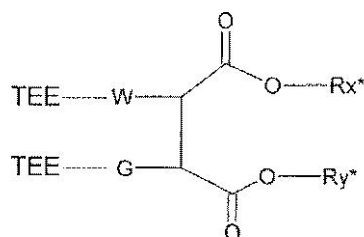
(式中、Rx および Ry は、上記で定義され、点線は、1種または複数の TEE のあり得

50

るグラフト位置を表す) ;

あるいは

【化 1 4】

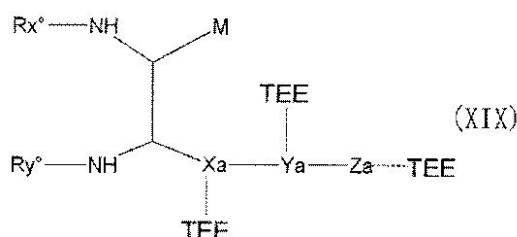


(XVIII)

10

(式中、 R_x^* および R_y^* は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC8～C30アルキル鎖であり、あるいは R_x^* または R_y^* の一方は、Hとすることができ、WおよびGは独立に、HO-、-O-、-S-、-N(H)C(O)-、-C(O)O-、-N(H)C(O)O-であり、点線は、1種または複数のTEEのあり得るグラフト位置を表す) ;

【化 1 5】



(XIX)

20

(式中、 R_x° および R_y° は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC8～C30アシル鎖であり、あるいはR1またはR2の一方は、Hとすることができ、MはHまたは-OHであり、Xa、Ya、Zaは、上記で定義され、点線は、1種または複数のTEEのあり得るグラフト位置を表す)。

30

【請求項 1 2】

前記脂質が、2種以上の親水性極性頭部基または様々な位置において置換を可能にする複雑な親水性頭部基を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む脂質。

【請求項 1 3】

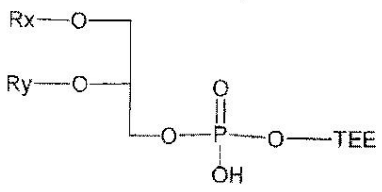
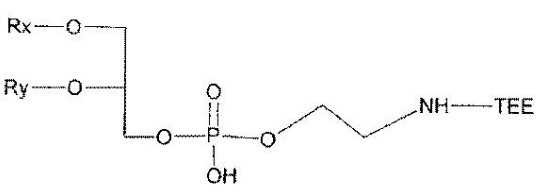
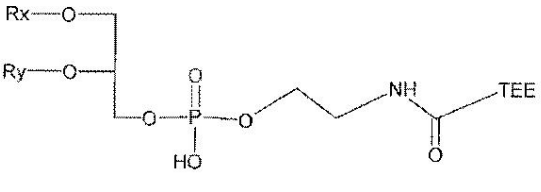
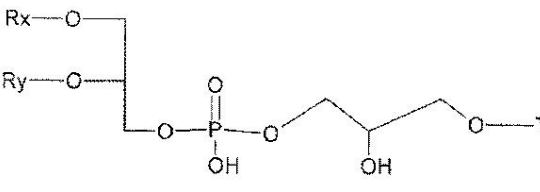
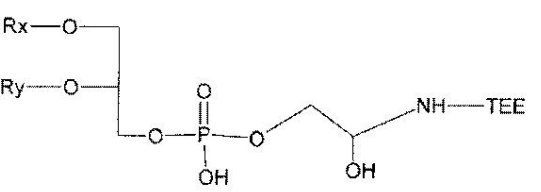
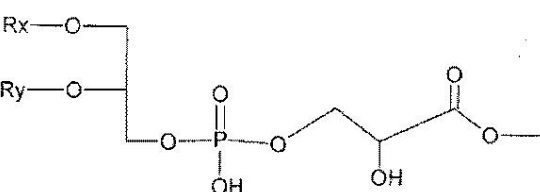
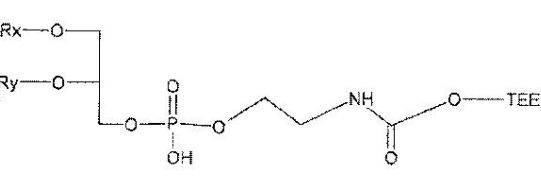
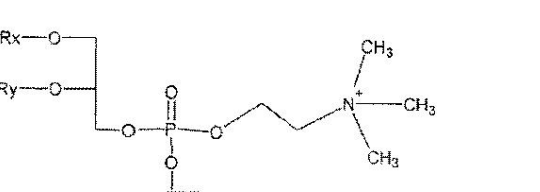
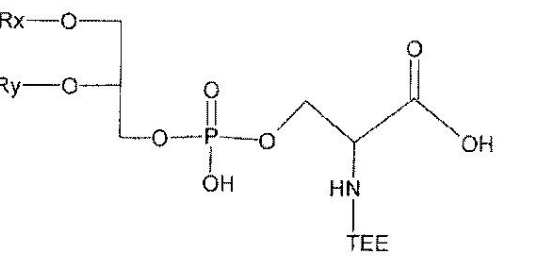
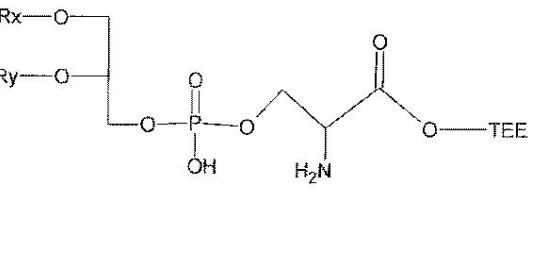
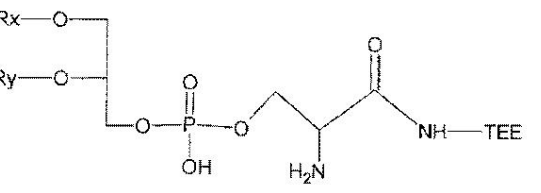
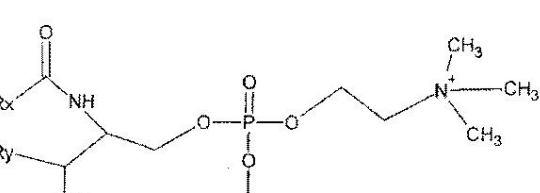
前記脂質が、酒石酸と長鎖アルコールとのエステル；マレイン酸の誘導体；脂肪酸とグルコース、スクロース、もしくはマルトースなどの糖とのエステル；ドデシル-β-グルコピラノシドまたはドデシル-β-マルトシドなどアルキルグリコシドおよびその誘導体；Br i j 3 5、Genap o l シリーズ、Thes i t などアルキル-エチレングリコール洗浄剤の誘導体、またはホスファチジルイノシトールおよびその誘導体を含む群から

40

【請求項 1 4】

前記脂質が、下記の化合物を含む群から選択される、請求項1～13のいずれか一項に記載の1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む脂質。

【表 1 - 1】

10

20

30

40

【表 1 - 2】

10

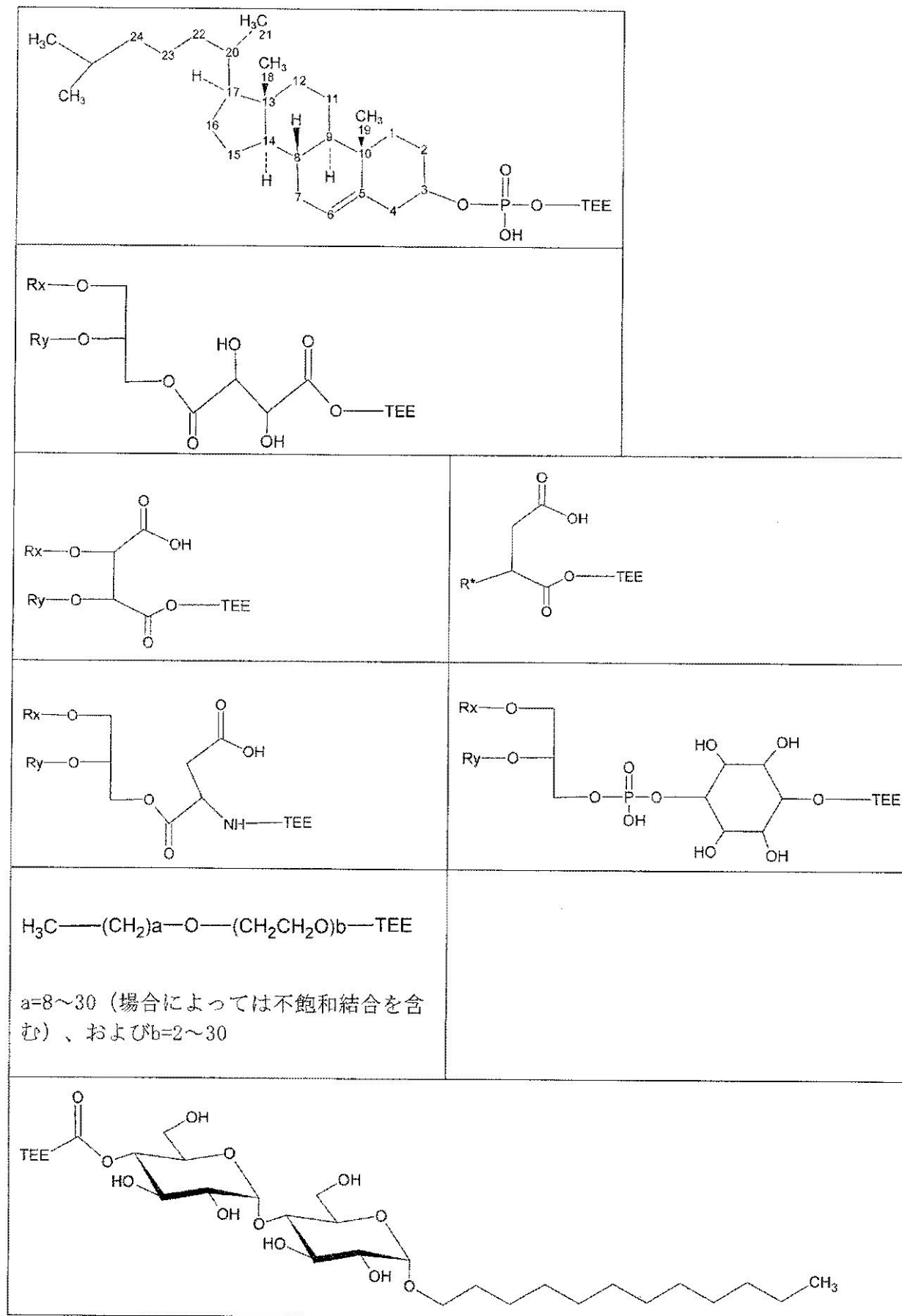
(式中、R_xおよびR_yは独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC₈～C₃₀アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいはR_xまたはR_yの一方は、Hとすることができ、R₃*およびR₄*は独立に、HまたはC₁～C₆アルキルである)。

20

【請求項 15】

前記脂質が、下記の化合物を含む群から選択される、請求項1～13のいずれか一項に記載の1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む脂質。

【化 1 6】

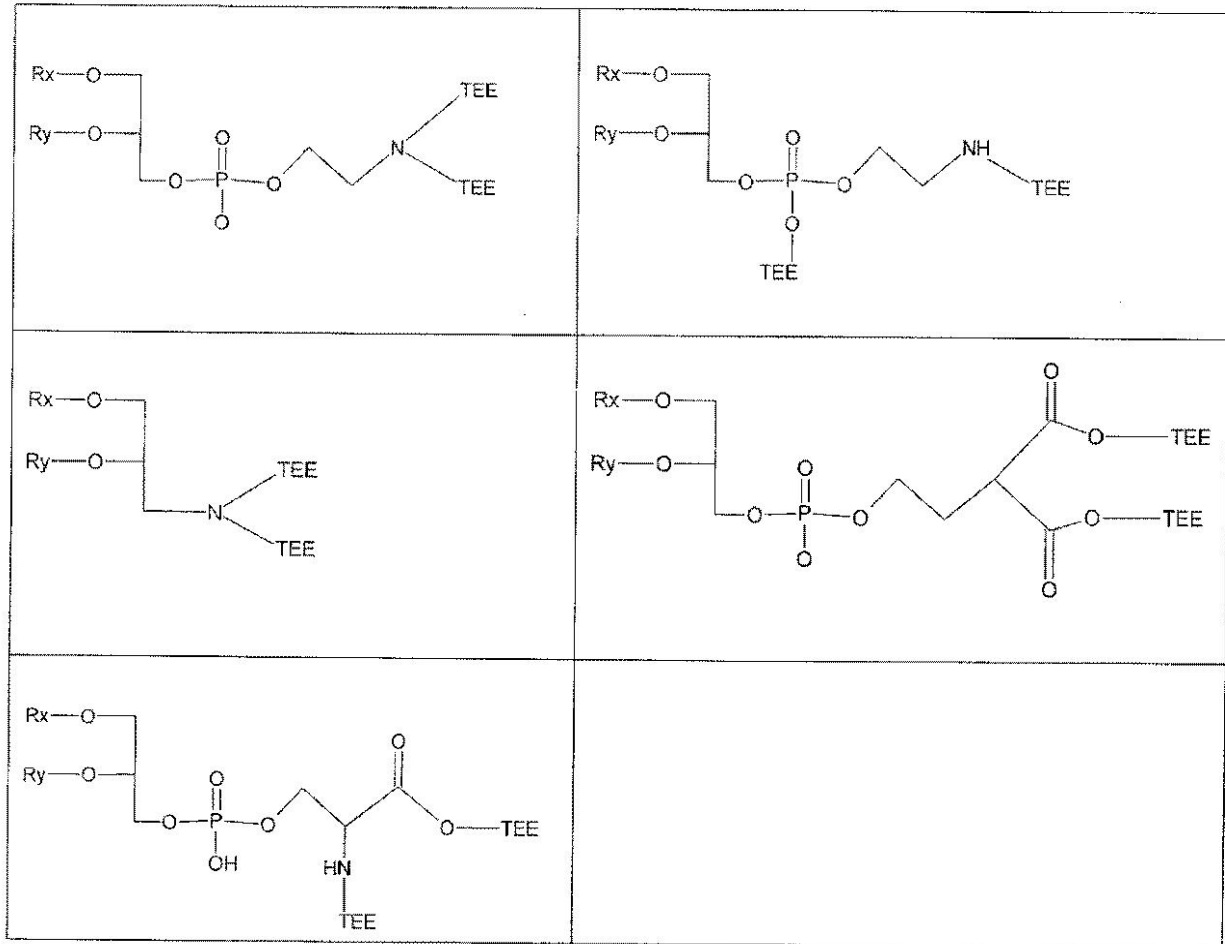


(式中、 R_x および R_y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC8～C30アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいは R_x または R_y の一方は、Hとすることができ、 R^* は、0、1、もしくは2個のエチレン性不飽和結合を含むC8～C30アルキル鎖である)。

【請求項16】

前記脂質が、下記の化合物を含む群から選択される、請求項1～13のいずれか一項に記載の1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む脂質。

【化17】

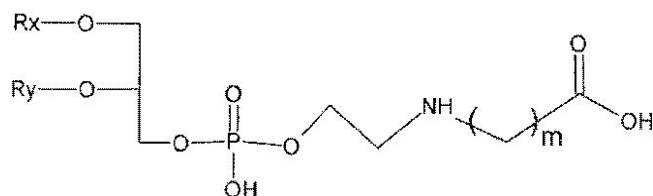


(式中、 R_x および R_y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC8～C30アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいは R_x または R_y の一方は、Hとすることができる)。

【請求項17】

前記脂質が、下記の化合物を含む群から選択される、請求項1～7のいずれか一項に記載の1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む脂質。

【化18】



(式中、 R_x および R_y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC

10

20

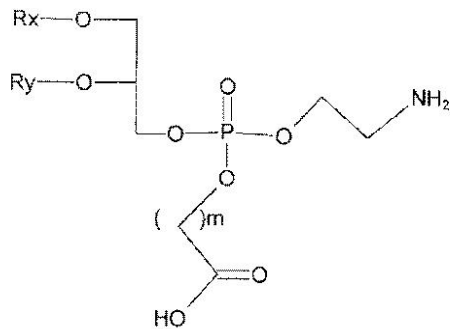
30

40

50

8～C30アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいはR_xまたはR_yの一方は、Hとすることができ、m = 6～40である)；

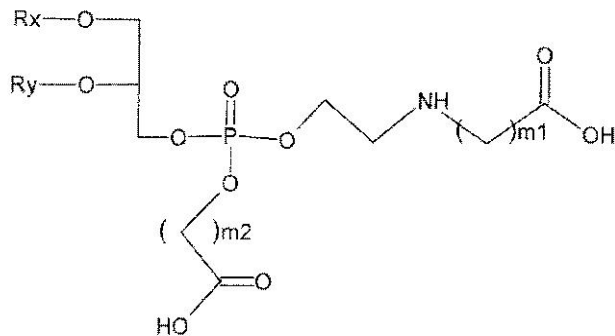
【化19】



10

(式中、R_xおよびR_yは独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC8～C30アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいはR_xまたはR_yの一方は、Hとすることができ、m = 6～40である)；

【化20】

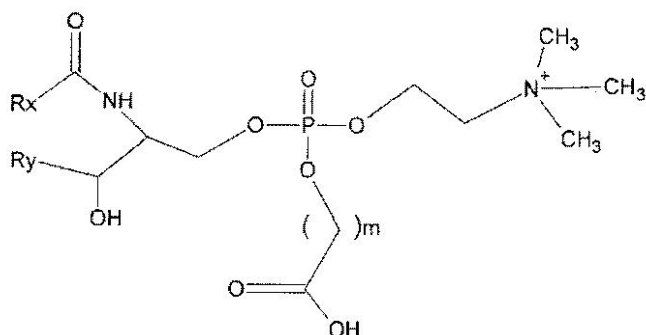


20

(式中、R_xおよびR_yは独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC8～C30アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいはR_xまたはR_yの一方は、Hとすることができ、m₁およびm₂は独立に、6～40である)；

30

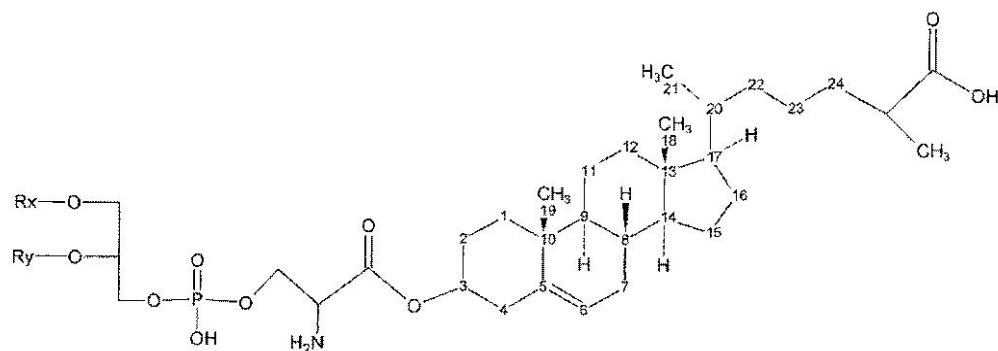
【化21】



40

(式中、R_xおよびR_yは独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC8～C30アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいはR_xまたはR_yの一方は、Hとすることができ、m = 6～40である)；

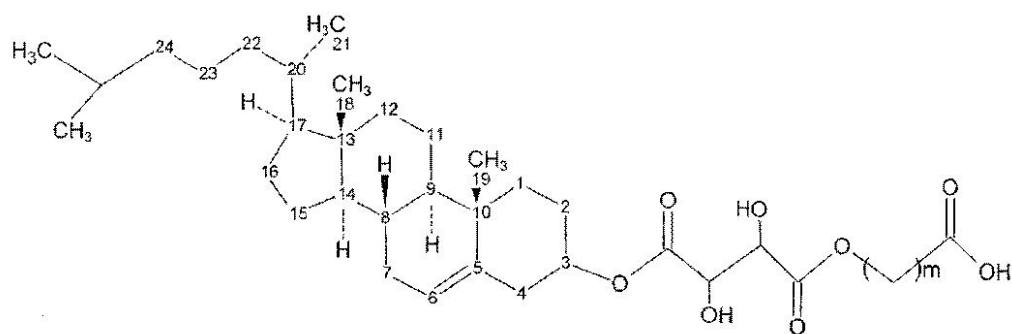
【化 2 2】



10

(式中、R x および R y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC 8～C 30アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいはR x またはR y の一方は、Hとすることができる) ；

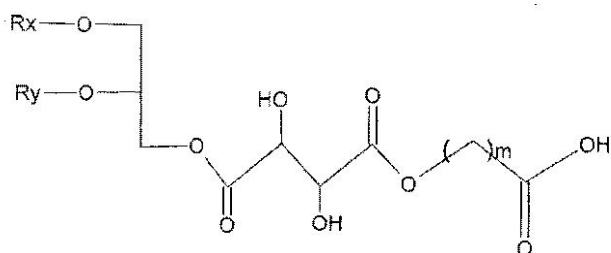
【化 2 3】



20

(式中、m = 6～40である) ；

【化 2 4】

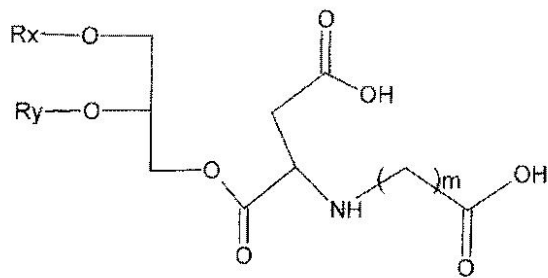


30

(式中、R x および R y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC 8～C 30アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいはR x またはR y の一方は、Hとすることができ、m = 6～40である) ；

40

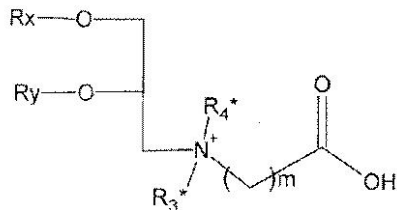
【化 2 5】



10

(式中、R x および R y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC 8～C 30アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいはR x またはR y の一方は、Hとすることができ、m = 6～40である)；

【化 2 6】



20

(式中、R x および R y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC 8～C 30アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいはR x またはR y の一方は、Hとすることができ、R 3 * および R 4 * は独立に、HまたはC 1～C 6アルキルであり、m = 11～40である)。

【請求項 1 8】

脂質集合体であって、請求項 1～17のいずれか一項に記載の1種もしくは複数の脂質、またはイオン相互作用によって前記脂質集合体との複合体を形成するトランスフェクションエンハンサー要素 (T E E) を含み、前記T E Eは、次式：

30

疎水性部分－p H感受性親水性部分 (I I)

(各T E Eの前記p H感受性親水性部分は独立に、p k a 2～6の弱酸、または酸性基と弱塩基との組合せを含むp K a 3～8の双性イオン構造である) を有する、脂質集合体。

【請求項 1 9】

前記脂質集合体が、リポソーム、ミセル、逆ミセル、立方もしくは六方脂質相、渦巻形、エマルジョン、ダブルエマルジョン、および実質的に脂質、油、もしくは両親媒性物質からなる他の多量体集合体から選択される、請求項 1 8に記載の脂質集合体。

【請求項 2 0】

前記T E Eが、ポリカチオン性要素との複合体を形成し、アニオン性脂質集合体と組み合わせられる、請求項 1 8または19に記載の脂質集合体。

40

【請求項 2 1】

前記ポリカチオン性要素が、ポリエチレンジアミン、ポリアリルアミン、スぺルミン、ジスぺルミン、トリスぺルミン、テトラスぺルミン、オリゴスぺルミン、テルミン、スぺルミジン、プトレシン、およびリシン、オルニチン、またはアルギニンからのポリマーまたはオリゴマーから選択される、請求項 2 0に記載の脂質集合体。

【請求項 2 2】

前記T E Eが、ポリアニオン性要素との複合体を形成し、カチオン性脂質集合体と組み合わせられる、請求項 1 8または19に記載の脂質集合体。

50

【請求項 23】

前記ポリアニオン性要素が、アクリル酸、メタクリル酸、グルタミン酸、またはアスパラギン酸のポリマーおよびオリゴマーから選択される、請求項 22 に記載の脂質集合体。

【請求項 24】

前記脂質集合体が、中性および／またはカチオン性および／またはアニオン性脂質をさらに含む脂質相から形成される、請求項 18～23 のいずれか一項に記載の脂質集合体。

【請求項 25】

前記脂質集合体の総電荷が、中性、カチオン性、またはアニオン性である、請求項 18～24 のいずれか一項に記載の脂質集合体。

【請求項 26】

前記中性脂質が、ホスファチジルコリン；ホスファチジルエタノールアミン；スフィンゴ脂質；セラミド；セレブロシド；ステロール系脂質、例えばコレステロール；および／またはこのような脂質の誘導体を含む群から選択される、請求項 24 または請求項 25 に記載の脂質集合体。

【請求項 27】

前記中性脂質が、DMPC、DPPC、DSPC、POPC、DOPC、DMPE、DPPPE、DSPPE、POPE、DOPE、ジフィタノイルPE、スフィンゴミエリン、セラミド、および／またはコレステロールを含む群から選択される、請求項 26 に記載の脂質集合体。

【請求項 28】

前記カチオン性脂質が、DOTAP、DMTAP、DPTAP、DC-Chol、DAC-Chol、DODAP、DOEPC、TC-Chol、DOTMA、DORIE、DDAP、CTAB、CPyC、DPIM、CHIM、MoChol、HisChol、BGSC、BGTC、DOSPER、DOSC、DOGSDO、DmC4Mo2、DmC3Mo2、C3Mo2、C3Mo3、C4Mo4、C5Mo2、C6Mo2、C8Mo2、PipC2Chol、MoC2Chol、MoC3Chol、N-メチル-PipChol、PyrroC2Chol、PyC2Chol、ImC3Chol、PipeC2Chol、およびこのような脂質の誘導体を含む群から選択される、請求項 24 または請求項 25 に記載の脂質集合体。

【請求項 29】

前記アニオン性脂質が、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、chems および別のアニオン性ステロール誘導体、セチルホスフェート、ジアシルグリセロールヘミスクシネート、およびカルジオリピン、ならびに／またはこのような脂質の誘導体を含む群から選択される、請求項 24 または請求項 25 に記載の脂質集合体。

【請求項 30】

前記脂質集合体が、DOPE、リゾ脂質、もしくは遊離脂肪酸、またはそれらの混合物を含む群から選択される融合性脂質を含む、請求項 18～29 のいずれか一項に記載の脂質集合体。

【請求項 31】

1 種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む前記 1 種または複数の脂質の量が、全脂質相の 0.1 モル%～90 モル%である、請求項 18～30 のいずれか一項に記載の脂質集合体。

【請求項 32】

前記脂質集合体が、両性特性を有する脂質相から形成される、請求項 18～31 のいずれか一項に記載の脂質集合体。

【請求項 33】

前記脂質集合体が、様々な粒径およびラメラ性のリボソームまたは両性リボソームである、請求項 18～31 のいずれか一項に記載の脂質集合体。

【請求項 34】

両性特性を有する脂質相から形成された脂質集合体であって、前記集合体は、一般式（I）：

脂質部分－〔疎水性部分－pH感受性親水性部分〕 （I）

に従う、1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む脂質（脂質－TEE）を含み、

前記トランスフェクションエンハンサー要素（TEE）は、一般式（II）：

疎水性部分－pH感受性親水性部分 （II）

（式中、前記TEEの前記pH感受性親水性部分は、pKa2～6の弱酸、または酸性基と弱塩基との組合せを含むpKa3～8の双性イオン構造である）

を有する脂質集合体。

10

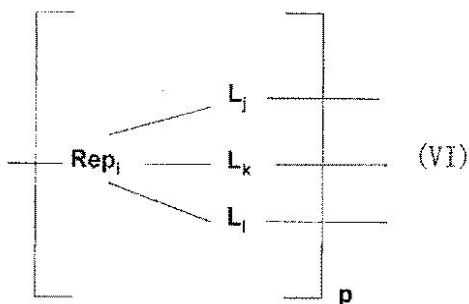
【請求項35】

前記TEEが、疎水性部分および1種または複数のpH感受性親水性要素を特徴とする、請求項34に記載の脂質集合体。

【請求項36】

TEEが、次の一般式のうちの1つを有する、請求項34または請求項35に記載の脂質集合体。

【化27】



20

（式中、Rep_i基はそれぞれ独立に、1～8個のC原子を有する非分枝状、分枝状、または環状の置換または非置換アルキル基、アルケニル基、アルキレン基、アルキニル基、またはアリール基であり、前記置換基は、1種または複数のpH感受性親水性部分、低級アルキル、アルキレン、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコシアルキル、アルキルチオ、およびアルキルチオアルキルから選択され、

30

L_j、L_k、またはL_lはそれぞれ独立に、存在しないか、あるいは

－CH₂－、－O－、－S－、－N(H)C(O)－、－C(O)O－、－OC(O)N(H)－、－C(O)－、－C(O)N(H)－、－N(H)C(O)O－、－CH＝N－、－OC(O)－、－N＝CH－、－S－S－、－NH－、－N(R13)(R14)－（ただし、R13およびR14は独立に、HもしくはC1～C6アルキルであり、またはR13もしくはR14の一方は、存在しなくてもよい）、

【化28】



40

アミノ酸、α-ヒドロキシ酸、およびβ-ヒドロキシ酸から選択され、

TEE中のC原子の総数は、6～40個であり、pは≤40である）；あるいは

ステロール （VII）

（式中、前記ステロールは、1種または複数の親水性部分、－OH、－SH、または低級アルキル、アルキレン、アルケニル、もしくはアルキニル、アルコキシ、アルキルアルコキシ、アルキルチオ、およびアルキルアルキルチオで置換されていてもよい）。

【請求項37】

50

1 種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む前記 1 種または複数の脂質の量が、全脂質相の 0.1 モル%～90 モル%である、請求項 34～36 のいずれか一項に記載の脂質集合体。

【請求項 38】

前記両性脂質相が 1 種または複数の両性脂質を含む、請求項 34～37 に記載の脂質集合体。

【請求項 39】

前記両性脂質が、Hist Chol、Hist DG、isoHist Succ DG、アシルカルノシン、HCChol、Hist-PS、および EDTA-Chol から選択される、請求項 38 に記載の脂質集合体。

10

【請求項 40】

前記両性脂質相が、(i) 安定なカチオン性脂質および帯電可能なアニオン性脂質、(ii) 帯電可能なカチオン性脂質および帯電可能なアニオン性脂質、または (iii) 安定なアニオン性脂質および帯電可能なカチオン性脂質から選択される両性脂質混合物を含む、請求項 34～37 に記載の脂質集合体。

【請求項 41】

前記脂質相が、20～90 モル%の前記両性脂質混合物、2～20 モル%のDeca-PE、w12-PE、Pal-PE、w21-PE、w12-DPTAP、w16-DPTAP、w20-DPTAP、w12-Amid-PE、およびw16-Amid-PE から選択される 1 種または複数のTEEを含む 1 種または複数の脂質、および場合によっ

20

【請求項 42】

前記両性脂質混合物が「両性 I」脂質対であり、カチオン性脂質とアニオン性脂質のモル比 (C/A 比) が 0.3～0.7 である、請求項 40 または 41 に記載の脂質集合体。

【請求項 43】

前記両性脂質混合物が「両性 II」脂質対であり、カチオン性脂質とアニオン性脂質のモル比 (C/A 比) が 0.3～3 である、請求項 40 または 41 に記載の脂質集合体。

【請求項 44】

前記両性脂質混合物が、DOTAP/Chems、DOTAP/DMG-Succ、DOTAP/DOG-Succ、DODAP/Chems、DODAP/DMG-Succ、DODAP/DOG-Succ、DDAB/Chems、DDAB/DMG-Succ、DDAB/DOG-Succ、DC-Chol/Chems、DC-Chol/DMG-Succ、DC-Chol/DOG-Succ、DAC-Chol/Chems、DAC-Chol/DMG-Succ、DAC-Chol/DOG-Succ、TC-Chol/Chems、TC-Chol/DMG-Succ、TC-Chol/DOG-Succ、MoChol/Chems、MoChol/DMG-Succ、HisChol/DOG-Succ、HisChol/Chems、HisChol/DMG-Succ、HisChol/DOG-Succ、Chim/Chems、Chim/DMG-Succ、Chim/DOG-Succ、DmC4Mo2/Chems、DmC4Mo2/DMG-Succ、およびDmC4Mo2/DOG-Succから選択される、請求項 42 または 43 に記載の脂質集合体。

30

40

【請求項 45】

前記脂質集合体が両性リポソームである、請求項 34～43 のいずれか一項に記載の脂質集合体。

【請求項 46】

前記両性リポソームが、ユニラメラ、オリゴラメラ、またはマルチラメラであり、前記両性リポソームの粒径が、50～1000 nm、好ましくは50～500 nm、より好ましくは70～250 nmで異なる、請求項 45 に記載の脂質集合体。

【請求項 47】

脂質相が、約10～20%のホスファチジルコリン、20～35%のDC-Chol、

50

40～60%のCHEMSまたはDMGSucc、および約5～15%のPal-PEまたはDeca-PEを含む、請求項40～46のいずれか一項に記載の脂質集合体。

【請求項48】

前記脂質集合体がリポソームであり、脂質相が下記から選択される組合せを含む、請求項18～47のいずれか一項に記載の脂質集合体。

【表 2 - 1】

脂質1	脂質2	脂質3	脂質4	TEE-脂質	モル%
POPC	DOPE			Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	22:68:10
POPC	DOPE			Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	17:53:30
POPC		DOTAP	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DOTAP	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	50:10:30:10
POPC	DOPE	MoChol	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	12:38:20:20:10
POPC	DOPE	MoChol	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	5:22:42:21:10
POPC	DOPE	MoChol	DOG-Succ	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	7:20:21:42:10

10

20

30

40

【表 2 - 2】

POPC	DOPE	MoChol	DMG-Succ	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	5:22:21:42:10
	DOPE	MoChol	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	50:20:20:10
POPC		DDAB	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DDAB	Chol-C3	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DDAB	Chol-C5	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DDAB	Chol-C6	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DDAB	Chol-C8	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DC-Chol	DMGSucc	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10

10

20

30

40

【表 2 - 3】

POPC		DC- Chol	Chol-C3	Pal-PEまたはDeca-PEま たはw12-PEまたはw21-PE またはw12-DPTAPまたは w16-DPTAPまたはw20- DPTAPまたはw12-Amid-PE またはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DC- Chol	Chol-C5	Pal-PEまたはDeca-PEま たはw12-PEまたはw21-PE またはw12-DPTAPまたは w16-DPTAPまたはw20- DPTAPまたはw12-Amid-PE またはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DC- Chol	Chol-C6	Pal-PEまたはDeca-PEま たはw12-PEまたはw21-PE またはw12-DPTAPまたは w16-DPTAPまたはw20- DPTAPまたはw12-Amid-PE またはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DC- Chol	Chol-C8	Pal-PEまたはDeca-PEま たはw12-PEまたはw21-PE またはw12-DPTAPまたは w16-DPTAPまたはw20- DPTAPまたはw12-Amid-PE またはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DC- Chol	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEま たはw12-PEまたはw21-PE またはw12-DPTAPまたは w16-DPTAPまたはw20- DPTAPまたはw12-Amid-PE またはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DODAP	DMGSucc	Pal-PEまたはDeca-PEま たはw12-PEまたはw21-PE またはw12-DPTAPまたは w16-DPTAPまたはw20- DPTAPまたはw12-Amid-PE またはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DODAP	Chol-C3	Pal-PEまたはDeca-PEま たはw12-PEまたはw21-PE またはw12-DPTAPまたは w16-DPTAPまたはw20- DPTAPまたはw12-Amid-PE またはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DODAP	Chol-C5	Pal-PEまたはDeca-PEま たはw12-PEまたはw21-PE またはw12-DPTAPまたは w16-DPTAPまたはw20- DPTAPまたはw12-Amid-PE またはw16-Amid-PE	15:28:47:10

10

20

30

40

【表 2 - 4】

POPC		DODAP	Chol-C6	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DODAP	Chol-C8	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DODAP	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
Lig-Ly PC		DOTAP	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
C6-Cer		DOTAP	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
SM		DC- Chol	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DOTAP	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10

【請求項 49】

前記脂質集合体が、少なくとも1種の医薬品有効成分を隔絶する、請求項18～48に記載の脂質集合体。

【請求項 50】

前記医薬品有効成分が、DNA プラスミド、ポリヌクレオチド、およびオリゴヌクレオチドから選択される核酸系薬物である、請求項 49 に記載の脂質集合体。

【請求項 51】

前記核酸が、脊椎動物細胞において 1 種または複数の RNA へと転写されることが可能であり、前記 RNA が、mRNA、shRNA、miRNA、またはリボザイムであり、前記 mRNA は 1 種または複数のタンパク質またはポリペプチドをコードする、請求項 51 に記載の脂質集合体。

【請求項 52】

前記核酸が、環状 DNA プラスミド、直鎖 DNA 構築物、または mRNA である、請求項 52 に記載の脂質集合体。

10

【請求項 53】

前記核酸がオリゴヌクレオチドである、請求項 50 に記載の脂質集合体。

【請求項 54】

前記オリゴヌクレオチドが、デコイオリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、転写に影響を及ぼす作用剤、スプライシングに影響を及ぼす作用剤、リボザイム、DNA ザイム、またはアプタマーである、請求項 53 に記載の脂質集合体。

【請求項 55】

前記オリゴヌクレオチドが、腫瘍標的に向けられている、請求項 53 または請求項 54 に記載の脂質集合体。

20

【請求項 56】

前記腫瘍標的が、CEACAM6、BCL-2、EPHA2、CTNNB1、RhoA、PLK1、XIAP、テロメラゼ、サイクリンD1、K-Ras、EG5、Ki67、アンドロゲン受容体、FoxM1、Akt1、VEGF、KSB、およびCDC25B から選択される、請求項 55 に記載の脂質集合体。

【請求項 57】

請求項 18～56 のいずれか一項に記載の脂質集合体に隔絶されている医薬品活性成分、およびそのための医薬品として許容されるビヒクルを含む医薬組成物。

【請求項 58】

ヒトまたは非ヒト動物の炎症性、免疫もしくは自己免疫障害、および／または癌の治療または予防のための医薬品の製造における請求項 57 に記載の医薬組成物の使用。

30

【請求項 59】

治療上有効量の請求項 57～58 のいずれか一項に記載の医薬組成物を投与することによってヒトまたは非ヒト動物を治療する方法であって、前記脂質集合体は活性剤を隔絶し、特定の 1 つもしくは複数の臓器、腫瘍、または感染もしくは炎症の部位を標的にする方法。

【請求項 60】

前記脂質集合体は、一般式 (I) :

脂質部分－[疎水性部分－pH 感受性親水性部分] (I)

に従う、1 種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む脂質 (脂質－TEE) を含み、

40

前記トランスフェクションエンハンサー要素 (TEE) は、一般式 (II) :

疎水性部分－pH 感受性親水性部分 (II)

(前記 TEE の前記 pH 感受性親水性部分は、pKa 2～6 の弱酸、または酸性基と弱塩基との組合せを含む pKa 3～8 の双性イオン構造である)

を有する、細胞のインビボ、インビトロ、またはエキソビボトランスフェクションのための脂質集合体の使用。

【請求項 61】

前記 TEE が、疎水性部分および 1 種または複数の pH 感受性親水性要素を特徴とする、請求項 60 に記載の脂質集合体。

50

【請求項 6 2】

前記脂質集合体は、ホスファチジルコリン、スフィンゴミレイン、セラミド、もしくはセレブロシド、またはそれらの混合物の群から選択される中性脂質と、コレステロールもしくはホスファチジルエタノールアミン、またはそれらの混合物との混合物を含む脂質相から形成され、混合物のモル比は 1 : 3 ~ 3 : 1 である、請求項 6 1 または 6 2 に記載の脂質集合体の使用。

【請求項 6 3】

前記脂質相が、D O P E またはコレステロールの群から選択される 1 種または複数の脂質と組み合わせて、D S P C、D P P C、D M P C、P O P C、または D O P C から選択されるホスファチジルコリンの混合物を含む、請求項 6 2 に記載の脂質集合体の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、新規の脂質であって、脂質部分、およびこのような脂質またはこのような脂質を組み込んでいる脂質集合体（例えば、リボソーム）と生体膜、特に細胞膜との融合性を向上させることができる 1 種または複数の構造要素を含む脂質に関する。このような構造要素は、電荷および親水性の点から pH 感受性であり、低 pH に曝露させたとき、極性—無極性変化を受ける。本発明は、イオン相互作用によりこのような構造要素と脂質との複合体を形成することによって、このような脂質の融合性を改善するためのその構造要素の使用も包含する。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

膜融合は、生体系においてよくある事象であり、そのための洗練された機序を自然が編み出してきた。例えば、細胞のウイルスによる感染は、膜融合が重要な役割を果たす一現象である。

【0 0 0 3】

したがって、ウイルスの細胞膜またはエンドソーム膜との融合を促進する能力によって、組換えウイルス遺伝子送達システムの開発がもたらされたことは意外なことではない。最も顕著なシステムは、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、または単純ヘルペスウイルスベクターを利用し、世界の遺伝子療法臨床試験の 70 % 超で使用されている。ウイルス系遺伝子送達システムは非常に効率的であるが、注入後、免疫に関連した副作用を呈する。この重大な欠点によって、これらのシステムの安全性、ひいてはヒトにおけるその適用が制限される（例えば、非特許文献 1）。

30

【0 0 0 4】

代替策は、非ウイルスベクターを使用して、遺伝子試料を細胞に送達することである。非ウイルスベクターシステムは、例えばカチオン性ポリマーおよびリボソームを含む。リボソームは、水性コアを有し、両親媒性分子から形成される人工の一枚膜、オリゴ膜、または多重膜の小胞体である。カーゴは、リボソームのコアに捕捉されていてもよく、または膜層もしくは膜表面に設置されていてもよい。今日、リボソームベクターは、非ウイルス送達システムの最も重要な群である。より具体的には、カチオン性リボソームまたは脂質が動物試験および／または臨床試験で広く使用されてきた。カチオン性システムは高負荷効率をもたらすが、特に体液と接触した後、コロイド安定性が欠けている。タンパク質および／または他の生体高分子とのイオン相互作用によって、細胞外マトリックスまたは細胞表面と、その場で凝集体形成が起こる。カチオン性脂質は、非特許文献 2、非特許文献 3、非特許文献 4 によって明らかにされたように、毒性があることがわかっている場合が多い。

40

【0 0 0 5】

両性リボソームは、pH 7.5 でアニオン電荷または中性電荷を有し、pH 4 でカチオン電荷を有する最近記載されたリボソームのクラスを表す。特許文献 1、特許文献 2、および特許文献 3（すべて Panzner, et al. に付与、参照により本明細書に組み込まれる）

50

には、両性リポソームおよびそれに適した脂質の詳細な説明が記載されている。さらに、このような両性リポソームを製造するための別のpH感受性脂質が記載されている特許文献4および特許文献5（これらもPanzner, et al.に付与、参照により本明細書に組み込まれる）が開示されている。

【0006】

両性リポソームは、カチオン性リポソームと等しく高効率に、核酸分子を封入することができる。有利に、両性リポソームは、カチオン性リポソームより、インビボ投与で耐容性がはるかに良好であり、良好な生体内分布を示す。

【0007】

ウイルス遺伝子送達ベクターに比べて、非ウイルスシステムははるかに安全である。これらは、高用量で忍容性が良好であり、免疫応答を誘発しない。したがって、これらのシステムは、反復投与することができる。それにもかかわらず、ウイルスシステムは、トランスフェクション効率の点から優れている。ウイルス表面糖タンパク質をリポソームに組み込む試みがなされてきた（非特許文献5）が、これらのハイブリッド系には、やはり免疫に関連した副作用という欠点がある。

【0008】

したがって、非ウイルスシステムの改良が依然として求められている。

【0009】

先行技術では、リガンドまたは活性成分をリポソームに移植するために、pH感受性親水性部分を使用することが知られている。例えば、Kung, et al.の特許文献6には、タンパク質などの表面結合分子を結合させるためのカップリング基を外側の2重層領域に含むリポソーム組成物が開示されている。Kung, et al.によって開示されたカップリング試薬には、ホスファチジルエタノールアミン脂質部分、20個までの原子を有する炭素含有スパーサーアーム、および末端カルボキシル基が含まれる。末端カルボキシル基は、カップリング基として使用され、疎水性部分は、脂質二重層と前記カップリング基の間に空間的分離をもたらす。

【0010】

10個までの炭素原子を有するアルキル連結基、例えばカルボキシアシル基を有するRosenthal阻害剤(RI)コア構造を有するカチオン性脂質に関するWheelerの特許文献7に、関連した手法が開示されている。追加のカルボキシアシル基を含むRI構造が、例えば細胞取り込みのためのリガンド、カチオン性脂質の極性電荷密度を増大させることができる治療分子または基でさらなる機能を付与するための中間体として開示されている。

【0011】

特許文献8には、親水性基()のない長い疎水性部分を含む脂質が記載されている。これらの構造は、pHの変化に反応しない。

【0012】

Tournier et al.の特許文献9には、水、緩衝液、および生体液体に懸濁しているリポソーム小胞体を、経時的破壊および融合に対して安定化させるためのホスファチジン酸エステルが開示されている。このようなエステルは、封入能を増大させ、捕捉された物質のキャリア液体への漏れに対して小胞体膜を安定化させるとも言われている。

【0013】

Eiblの特許文献10には、グリセロール誘導体が開示されている。

【0014】

先行技術は、リポソームおよび隔絶活性成分の細胞取り込みおよび細胞質内送達を向上させるための構造要素(II)または脂質(I)の使用および最適化について言及していない。先行技術は、疎水性部分とpH感受性親水性部分との組合せがこのような機能に重大な状態をもたらすことを教示していない。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 5 】

【特許文献 1】 WO 02/066490
【特許文献 2】 WO 02/066012
【特許文献 3】 WO-A-03/070735
【特許文献 4】 WO-A-03/070220
【特許文献 5】 WO-A-03/066489
【特許文献 6】 WO-A-86/04232
【特許文献 7】 WO-A-97/19675
【特許文献 8】 US-A-6294191
【特許文献 9】 WO-A-00/11007
【特許文献 10】 EP-A-0099068
【非特許文献】

10

【 0 0 1 6 】

【非特許文献 1】 Thomas et al., Nature Reviews, Genetics, 4, 346-358, 2003
【非特許文献 2】 Fillion, et al. in BBA, 1329(2), 345-356, 1997
【非特許文献 3】 Dass in J. Pharm. Pharmacol, 54(5), 593-601, 2002
【非特許文献 4】 Hirko, et al. in Curr. Med. Chem., 10(14), 1185-1193, 2003
【非特許文献 5】 Miller N, Vile R., FASEB J, 9, 190-199, 1995
【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【 0 0 1 7 】

したがって、本発明の一般的な目的は、活性剤を細胞、特に哺乳類細胞にインビボ、インビトロ、またはエキソビボ送達するための改良された非ウイルス担体システムを提供することである。

【 0 0 1 8 】

特に、本発明の目的は、核酸（例えば、オリゴヌクレオチドおよびプラスミド）および治療特性を有する他の活性剤、例えば「生物製剤」を細胞に送達するための改良された非ウイルス担体システムを提供することである。

【 0 0 1 9 】

本発明の別の目的は、このような活性剤の細胞への取り込みが改善された非ウイルス担体システムを提供することである。

30

【 0 0 2 0 】

本発明の別の目的は、活性剤を封入または隔絶するリポソームおよび他の脂質ベースの担体システムの細胞への取り込みを改善することである。したがって、本発明のさらに別の目的は、脂質集合体の細胞への取り込みを改善するための、例えばリポソームなどの脂質集合体に組み込むことができる化合物を提供することである。

【 0 0 2 1 】

特に、本発明の目的は、このような脂質集合体と生体膜、特に細胞膜との融合性を改善するための、脂質集合体に組み込むことができる化合物を提供することである。

【 0 0 2 2 】

本発明のさらに別の目的は、活性剤または他の成分を送達するためのキャリアとしてのリポソームを含む、細胞への取り込みが改善された医薬組成物を提供することである。

40

【 0 0 2 3 】

本発明のさらに別の目的は、ヒトまたは非ヒト動物の炎症性、免疫もしくは自己免疫障害、および／または癌を治療または予防するための改良された医薬組成物を提供することである。

【 0 0 2 4 】

本発明のさらに別の目的は、活性剤を含む医薬組成物が特定の 1 つもしくは複数の臓器、腫瘍、または感染もしくは炎症の部位を標的にする、ヒトまたは非ヒト動物を治療するための改良された組成物および方法を提供することである。

50

【課題を解決するための手段】

【0025】

したがって、本発明の一態様によれば、一般式（I）：

（I）脂質－〔疎水性部分－pH感受性親水性部分〕

に従う、脂質部分および1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素（TEE）を含む脂質であって、

前記1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素（TEE）は、一般式（II）：

（II）疎水性部分－pH感受性親水性部分

を有し、

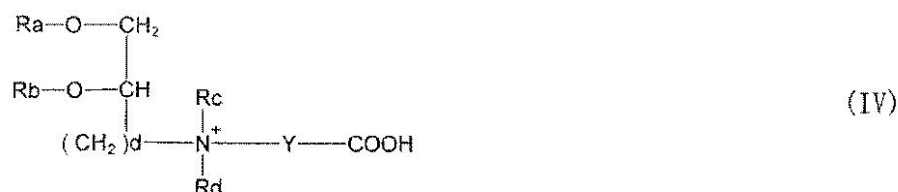
式中、各TEEのpH感受性親水性部分は独立に、pKa 2～6の弱酸、または酸性基と弱塩基との組合せを含むpKa 3～8の双性イオン構造であり、ただし前記脂質が、次の構造（III）、（IV）、または（V）のうちの1つではないことを条件とする、脂質が提供される。

PE－アミド結合－X－COOH （III）

式中、PEは、ホスファチジルエタノールアミン部分であり、Xは、3～20個の原子の鎖長を有し、場合によっては1個または複数のヘテロ原子を含む置換または非置換の飽和または不飽和炭素含有直鎖である；

【化1】

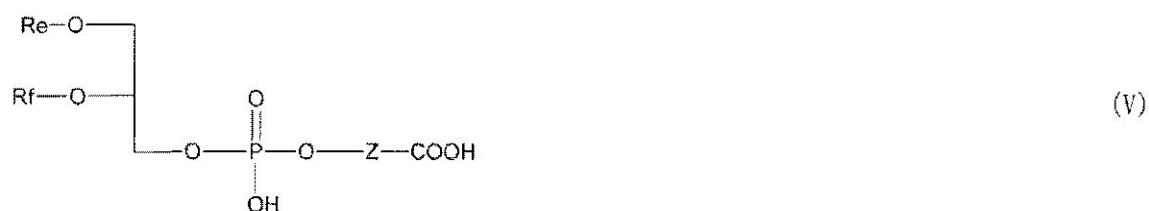
（IV）



式中、Yは、2～10個のC原子の鎖長を有する飽和直鎖アルキル基であり、Ra、Rb、Rc、およびRdは独立に、0～6個の不飽和部位を有する直鎖状または分枝状の非置換または置換C1～23アルキル基、アシル基、アルキレン基、ヘテロアルキル基、環状基、またはアリール基であり、前記基は0～5個のヘテロ原子を含み、置換基は－O－（CH₂）_e－CH₃；－S－（CH₂）_e－CH₃；A－（CH₂）_e（式中、Aはハロゲン化物である）、および－N（（CH₂）_e－CH₃）₂であり、置換基のアルキル基は、0～2個のヘテロ原子を含み、eは0～4であり、さらにRaおよびRbは独立に、Hとすることができ、dは1～6である；または

【化2】

（V）



式中、ReおよびRfは独立に、水素原子、または二重および三重結合を場合によっては含むC1～C24直鎖状もしくは分枝状アルキル鎖もしくはアシル鎖であり、Zは、アリール環、3～6個の炭素原子を有するシクロアルキル、ヒドロキシル、および／または1個もしくは複数のさらなるカルボン酸基で場合によっては置換されていてもよい、6～20個の炭素原子を有する脂肪族および／または脂環式炭化水素鎖である。

【0026】

したがって、そのまたはそれぞれのT E E部分は、脂質分子に組み込まれている。そのまたはそれぞれの脂質分子内の親水性部分の位置は異なってもよい。いくつかの態様では、親水性部分は、脂質部分とT E Eとの結合部から遠くに位置することがある。あるいは、親水性部分は、T E E内の中心に位置することがある。

【0027】

本発明は、別の態様では、脂質集合体と生体膜、特に細胞膜との融合性を改善するための脂質集合体におけるトランスフェクションエンハンサー要素(T E E)の使用であって、トランスフェクションエンハンサー要素(T E E)は、脂質分子に組み込まれていてもよく、またはイオン相互作用によって脂質集合体との複合体を形成してもよく、前記T E Eは式(I I)：

(I I) 疎水性部分－p H感受性親水性部分

(式中、T E Eのp H感受性親水性部分は、p K a 2～6の弱酸、または酸性基と弱塩基との組合せを含み、p K a 3～8である双性イオン構造である)を有する使用も包含する。

【0028】

1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素が脂質分子に組み込まれている場合、前記分子は式(I)：

(I) 脂質－[疎水性部分－p H感受性親水性部分]

を有してもよい。

【0029】

したがって、本発明の別の態様では、脂質集合体であって、本発明による1種もしくは複数の脂質、またはイオン相互作用によって前記脂質集合体との複合体を形成するトランスフェクションエンハンサー要素(T E E)を含み、前記T E Eは、次式：

疎水性部分－p H感受性親水性部分 (I I)

(各T E Eの前記p H感受性親水性部分は独立に、p k a 2～6の弱酸、または酸性基と弱塩基との組合せを含むp K a 3～8の双性イオン構造である)を有する脂質集合体が提供される。

【0030】

本発明のさらに別の態様では、両性特性を有する脂質相から形成された脂質集合体であって、前記集合体は、式(I)：

脂質部分－[疎水性部分－p H感受性親水性部分] (I)

に従う、1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む脂質(脂質－T E E)を含み、

前記トランスフェクションエンハンサー要素(T E E)は、一般式(I I)：

疎水性部分－p H感受性親水性部分 (I I)

(前記T E Eの前記p H感受性親水性部分は、p k a 2～6の弱酸、または酸性基と弱塩基との組合せを含むp K a 3～8の双性イオン構造である)を有する脂質集合体が提供される。

【0031】

前記脂質集合体は、医薬品有効成分を隔絶することができる。一実施形態において、前記医薬品成分は、DNAプラスミド、ポリヌクレオチド、およびオリゴヌクレオチドのような核酸系薬物である。

1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素(T E E)を組み込み、またはイオン相互作用によって1種または複数の個々のトランスフェクションエンハンサー要素との複合体を形成する1種または複数の脂質を含む脂質集合体、特にリボソームを効率的に使用して、インビトロ、インビボ、またはエキソビボで細胞をトランスフェクトすることが明らかになった。

【0032】

本発明は、環境の酸性化に応答する親水性－疎水性変化に基づいて医薬品有効成分の非

10

20

30

40

50

ウイルス担体システムの改良をもたらす。このような機序は、自然界でも知られている。例えば、インフルエンザウイルスは、特定の融合機序を利用する。ウイルスが受容体媒介エンドサイトーシスによって細胞内部に取り入れられた後、ウイルスエンベロープはエンドソーム膜と融合し、そのウイルスゲノムが感染細胞のサイトゾルへ放出される。この融合事象は、ウイルスエンベロープ糖タンパク質の赤血球凝集素を触媒とする。融合の引き金は、赤血球凝集素の立体構造変化を招くエンドソーム区画内の酸性pHである。同時に、HA 2鎖のN末端融合ペプチドは、アミノ酸側鎖におけるカルボキシル基のプロトン化のため、疎水性シフトを起こす。疎水性ペプチドは、標的膜に挿入することができ、不安定化、続いて融合を招く（例えば、Stegmann et al., EMBO J., 9(13), 4231-4241, 1990）。

10

【0033】

いくつかの実施形態において、本発明のTEEのpH応答性親水性部分は、pKa 3～5の弱酸を含むことがある。前記弱酸は、カルボキシル基、バルビツル酸およびその誘導体、キサンチンおよびその誘導体から選択することができる。

【0034】

他の実施形態において、前記pH応答性親水性部分は、弱または強酸性基と弱塩基との組合せ（後者のpKaは4.5～7である）を含む双性イオン構造とすることができる。好適には、前記双性イオン構造は、アニオン基、およびカチオン基としてのヘテロ環式窒素原子から形成することができる。

20

【0035】

前記親水性部分の特定のpKaを実現するためには、前記pH応答性親水性部分は、ヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、メトキシメチル基、メトキシエチル基、エトキシメチル基、エトキシエチル基、チオメチル基、チオエチル基、メチルチオメチル基、メチルチオエチル基、エチルチオメチル基、エチルチオエチル基、クロリド基、クロルメチル基、ビニル基、フェニル基、ベンジル基、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、およびtert-ブチル基、またはシクロヘキシル基を含む群から選択される構造要素で置換されていてもよい。

【0036】

いくつかの実施形態において、前記疎水性部分は、最小鎖長が6個の元素である直鎖状、分枝状、または環状鎖を含む。この実施形態の一態様では、前記疎水性部分は、7個以上、かつ40個までの元素を含み、第2の態様では、前記疎水性部分は6～20個の元素を含み、第3の態様では、前記疎水性部分は20～40個の元素を含む。

30

【0037】

前記疎水性部分の鎖の元素は、炭素原子とすることができる。一実施形態において、前記疎水性部分は飽和していてもよく、または不飽和結合を含んでいてもよい。他の実施形態において、前記疎水性部分は置換されていてもよい。

【0038】

いくつかの実施形態において、前記疎水性部分の主鎖の分枝は、かなり小さいビルディングブロックを含むことができる。好ましいビルディングブロックは、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、メトキシメチル基、エトキシメチル基、メトキシエチル基、エトキシエチル基、およびビニル基、もしくはハロゲン基、またはそれらの混合物を含む。

40

【0039】

あるいは、前記疎水性部分は、ステロールに由来してもよく、前記ステロールは、さらに置換されていてもよい。

【0040】

1個または複数のヘテロ原子または化学基をpH応答性トランスフェクションエンハンサー要素（TEE）の疎水性部分に挿入することが可能である。このようなヘテロ原子または化学基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(H)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-N(H)-$ 、 $-N(H)-C(O)-O-$ 、 $-$

50

C H = N -、- O - C (O) -、- N = C H -、および／または- S - S -、アミノ酸もしくはその誘導体、 α -ヒドロキシ酸、または β -ヒドロキシ酸から選択することができる。

【0041】

T E Eは、環境の酸性化に応答する親水性-疎水性変化を起こす。この変化は、p Hに対して応答する上述した親水性部分によって媒介される。

【0042】

本発明のいくつかの実施形態において、トランスフェクションエンハンサー要素は、 $\log D(4.0) - \log D(7.4) \geq 1$ であり、p H 7.4における $\log D$ は1～10である。

10

【0043】

本発明の大部分の態様では、前記p H応答性トランスフェクションエンハンサー要素(T E E)のp H 4における $\log D$ は、0を超える。

【0044】

言うまでもなく、前記p H応答性トランスフェクションエンハンサー要素(T E E)は、2つ以上のp H応答性親水性部分を含むことができる。

【0045】

トランスフェクションエンハンサー要素が、本発明に従って脂質部分に化学結合している場合、T E Eは、前記脂質部分の極性頭部基に結合またはグラフトすることができる。別の実施形態において、脂質は、グラフトとp H感受性トランスフェクションエンハンサー要素の間に化学リンカーを含むことができる。さらに、脂質部分の極性頭部基は、さらに置換されていてもよい。この態様のさらに別の実施形態において、前記脂質は、2種以上の親水性極性頭部基、または親水性に影響を及ぼすことなく様々な位置において置換を可能にする複雑な親水性頭部基を含むことができる。

20

【0046】

本発明の脂質集合体は、中性および／またはカチオン性および／またはアニオン性脂質をさらに含む脂質相から形成することができ、前記脂質集合体の総電荷は、中性、カチオン性、またはアニオン性とすることができる。

【0047】

本発明の一態様では、脂質集合体はリポソームであり、この態様の特定の一実施形態において、リポソームは、様々な粒径およびラメラ性を有する両性リポソームである。前記両性リポソームは、1種もしくは複数の両性脂質を含む脂質相、または(i)安定なカチオン性脂質および帯電可能なアニオン性脂質、(i i)帯電可能なカチオン性脂質および帯電可能なアニオン性脂質、もしくは(i i i)安定なアニオン性脂質および帯電可能なカチオン性脂質を含む脂質相から形成することができる。

30

【0048】

本発明に従ってイオン相互作用を利用して、前記T E Eが前記脂質集合体との複合体を形成する場合、前記T E Eを、ポリカチオン性要素に結合させ、アニオン性脂質集合体と組み合わせてもよく、またはポリアニオン性要素に結合させ、カチオン性脂質集合体と組み合わせてもよい。

40

【0049】

本発明の脂質集合体は、医薬品有効成分を隔絶することができ、特定の一実施形態において、前記医薬品成分は、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、またはDNAプラスミドのような核酸系薬物である。

【0050】

本発明の好ましい実施形態において、前記脂質は、下記の化合物(30)～(69)を含む群から選択される。

【0051】

本発明のさらに別の態様では、本発明による活性剤隔絶脂質集合体または両性リポソーム、およびそのための医薬として許容されるビヒクルを含む医薬組成物が提供される。

50

【0052】

さらに別の態様では、本発明は、本発明による医薬組成物のヒトまたは非ヒト動物の炎症性、免疫もしくは自己免疫障害、および／または癌を治療または予防するための使用を包含する。

【0053】

明確にするために、本発明の重要な用語について、次の定義および知識を使用する。

【0054】

トランスフェクション

生体膜にわたる濃度勾配の消失を具体的に記載するために広く使用される。これは、前記過程が起こる実際の機序にかかわらず、生体膜にわたる輸送、またはそれにわたる拡散、その透過もしくは浸透を含む。

10

【0055】

L o g P

平衡状態で二相系の1-オクタノールおよび水に分配された化合物の各濃度の比である。オクタノール-水分配係数 (l o g P) は、化合物の親油性または疎水性を記載するために使用される。

【0056】

L o g D

1-オクタノール中の分子のすべての (非イオン化およびイオン化) 種の平衡濃度と水相中の同じ種の平衡濃度の比である。

20

解離性混合物の分配係数 l o g D は、以下の通り定義される。

$$l o g D = l o g \left(\sum (c_i^{H^2O}) / \sum (c_i^{org}) \right), \text{ 式中}$$

$c_i^{H^2O}$ は、水中の i 番目の微細種の濃度であり、

c_i^{org} は、有機相中の i 番目の微細種の濃度である。

【0057】

L o g D は、イオン化種が分子の中性の形と同様にみなされるという点で l o g P と異なる。したがって、L o g D は、媒体の所与の p H における l o g P である。p H 7.4 における L o g D は、血漿の p H における薬物の親油性の指標を示すために引用されることが多い。

【0058】

30

L o g P 値および l o g D 値は、オクタノール／水系における分子またはそのイオン化した形の分配を測定することによって実験で確定することができる。実験値は、大量の個々の化合物について生成されており、エキスパートシステムを用いて、新規の種の l o g P 値および l o g D 値を外挿によって求めることが可能である。このような1つのエキスパートシステムは、A C D / L o g P または A C D / l o g D モジュールを備えた A C D / L a b s であり、この開示内の計算には、A C D / L a b s 7.06 が使用された。

【0059】

「核酸」または「ポリヌクレオチド」

本明細書では、任意の核酸含有分子を指し、これには、D N A または R N A が含まれるが、これらに限定されない。ポリヌクレオチドという用語は、一般に任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを指し、これは、未修飾 R N A もしくは D N A でも、修飾 R N A もしくは D N A でもよい。したがって、本明細書では、例えばポリヌクレオチドは、とりわけ一本鎖および二本鎖 D N A、一本鎖および二本鎖の領域の混合物である D N A、一本鎖および二本鎖 R N A、ならびに一本鎖および二本鎖の領域の混合物である R N A、一本鎖領域、またはさらに典型的には二本鎖領域、または一本鎖および二本鎖の領域の混合物とすることができる D N A および R N A を含む混成分子を指す。

40

【0060】

オリゴヌクレオチド

本明細書では、2個以上、しばしば4個以上、通常は11個以上のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含む分子と定義される。オリゴヌクレオチドの正確なサ

50

イズは、オリゴヌクレオチドの最終的な機能または使用を含めて、多くの要因に依存する。オリゴヌクレオチドは、例えば適切な配列のクローニングおよび制限、ならびにNarang et al., Meth. Enzymol., 68, 90-99, 1979のホスホトリエステル方法; Brown et al., Method Enzymol., 68, 109-151, 1979のホスホジエステル方法; Beaucage et al., Tetrahedron Lett., 22, 1859-1862, 1981のジエチルホスホラミダイト方法; Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc., 103, 3185-3191, 1981のトリエステル方法; または自動合成方法; およびUS 4,458,066の固体支持方法などの方法による直接化学合成を含めて、任意の適当な方法で調製することができる。

【0061】

脂質集合体

両親媒性分子を含む超分子集合体である。ある態様では、両親媒性物質は、脂質または洗浄剤と呼ばれ、別の態様では、このような物質は、生体膜を形成すること、または生体膜に挿入することが知られている。超分子集合体は、さらに無極性分子からの油を含んでもよい。したがって、本発明の超分子集合体は、様々な粒径およびラメラ性のリポソーム、ミセル、逆ミセル、立方もしくは六方脂質相、渦巻形、エマルジョン、ダブルエマルジョン、または実質的に脂質、油、もしくは両親媒性物質から構築される他の多量体集合体を含む。

【発明を実施するための形態】

【0062】

上述されたように、細胞を効率的にトランスフェクトするために、1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む1種または複数の脂質を含む脂質集合体を使用してもよいことが明らかになった。機構的には、T E EのpH感受性親水性部分は、酸性pHでプロトン化される。これは、官能基の極性の低下を招く。脂質(I)またはその一部分、例えばその全体のT E Eまたはその一部分は、トランスで提供されている脂質二重層に挿入でき、それによって融合事象を促進することが可能である。酸性化時に構造要素(I I)は、それ自身の脂質二重層に挿入し、それによって融合性および細胞トランスフェクションを改善する構造欠陥を生じることが可能である。

【0063】

薬物(例えば、核酸)の細胞の細胞質へのリポソームによる送達は、非常に多くの場合、酸性pHを有するエンドソームからの脱出に成功する必要がある。したがって、本発明の範囲内で、構造要素(I I)を含むこのような脂質は、リポソームのトランスフェクション能力を、その電荷にかかわらず付与または改善することができる。

【0064】

いくつかの説明を本発明の発見を説明するために記載することができるが、融合またはトランスフェクションの向上が実現される正確な機序の理解は、本発明を実施するためには必要でなく、本明細書に記載されていない他の機序さえ、関与する可能性がある。

【0065】

T E Eの親水性部分

本発明の一態様では、親水性部分は、pH値約4と生理的pHの7.4との間において親水性で応答する弱酸である。表1aの式(1)~(3)のカルボキシル基、バルビツル酸またはその誘導体、特にキサンチンまたはその誘導体は、このようなpH応答性親水性部分を表すが、これらに限定されない。

【0066】

10

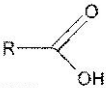
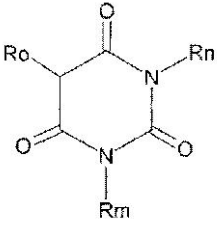
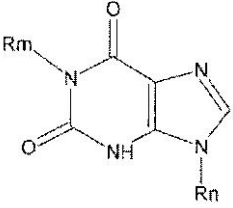
20

30

40

【表 1 - a】

表 1 a : 化合物 1 ~ 3

(1) 	(1) カルボン酸。Rは、本発明の疎水性部分を表す。
(2) 	(2) バルビツル酸誘導体。R_m、R_n、またはR_oは、本発明の疎水性部分を表すことができる。
(3) 	(3) キサンチン誘導体。R_mまたはR_nは、本発明の疎水性部分を表す。

10

20

【0067】

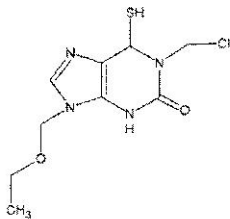
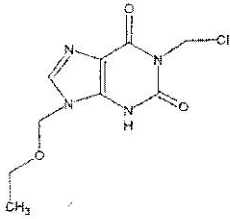
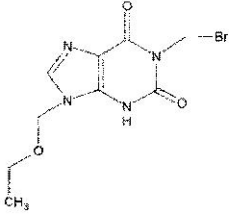
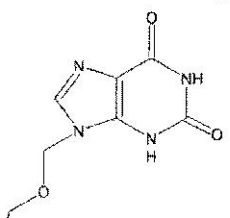
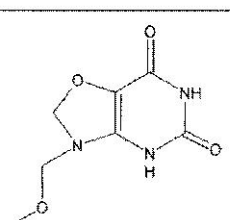
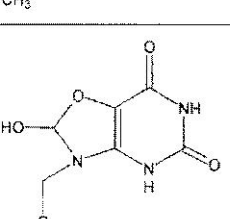
(1) ~ (3) に由来する親水性頭部基の Log D 値は、低 pH で高く、中性またはより高い pH で低い。

キサンチン、ピリミジン (ウラシル)、またはバルビツル酸の他の誘導体を、下記の表 1 b に開示し、pH 4.0 および pH 7.4 におけるそれらの log D 値に関して分析する。(100) ~ (129) の化合物のメトキシエチル部分は、上述されたように TEE の疎水性部分を表し、またはそれで置換されていてもよい。

【0068】

【表 1 - b】

表 1 b : 化合物 100 ~ 129

化学構造	化合物-#	logD (pH 4)	logD (pH 7.4)
	(100)	-0,11	-1,03
	(101)	-0,39	-2,18
	(102)	0,08	-1,71
	(103)	-0,85	-2,13
	(104)	-0,27	-0,62
	(105)	-0,18	-0,77

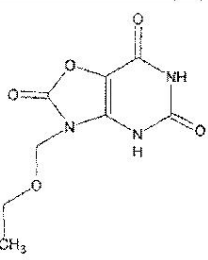
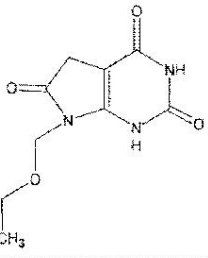
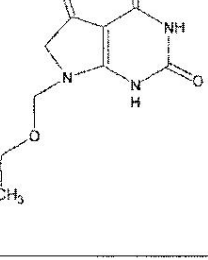
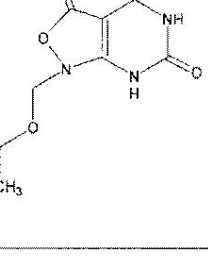
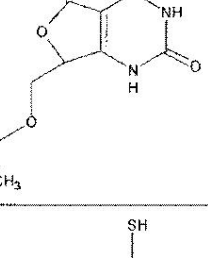
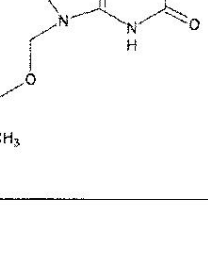
10

20

30

40

【表 1 - c】

化学構造	化合物-#	logD (pH 4)	logD (pH 7.4)
	(106)	-2,76	-3,44
	(107)	-0,1	-1,88
	(108)	-0,93	-1,27
	(109)	-2,01	-3,43
	(110)	-1,34	-2,16
	(111)	0,92	-1,31

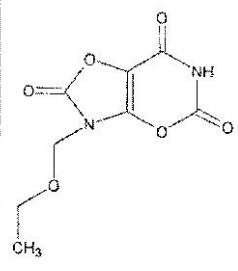
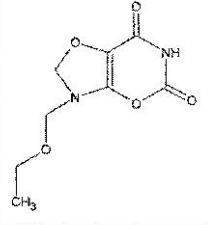
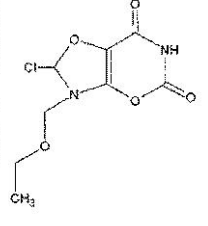
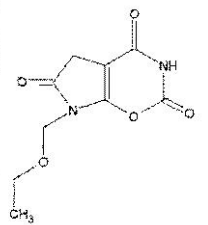
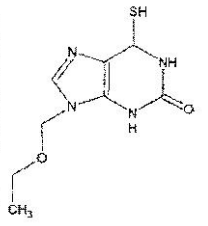
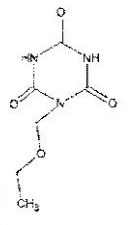
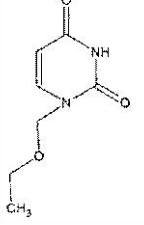
10

20

30

40

【表 1 - d】

化学構造	化合物-#	logD (pH 4)	logD (pH 7.4)
	(112)	-1, 34	-3, 15
	(113)	-0, 39	-1, 69
	(114)	0, 21	-1, 51
	(115)	0, 22	-0, 27
	(116)	-0, 33	-0, 74
	(117)	-2, 07	-3, 44
	(118)	-0, 65	-0, 68

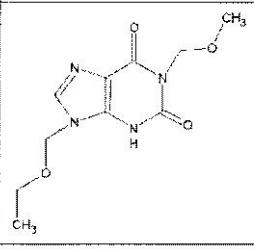
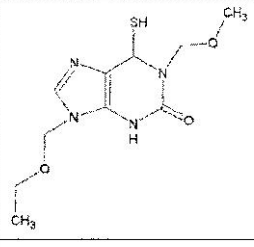
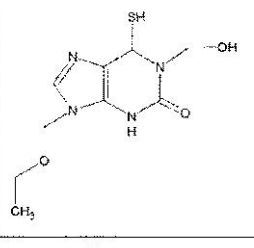
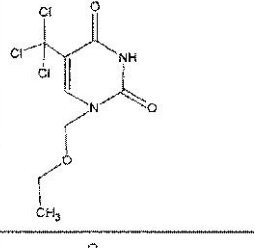
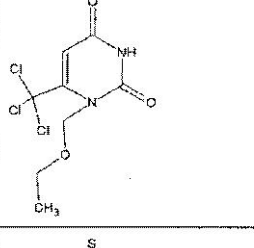
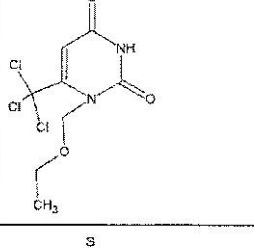
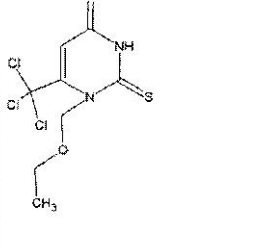
10

20

30

40

【表 1 - e】

化学構造	化合物-#	logD (pH 4)	logD (pH 7.4)
	(119)	-0,76	-2,42
	(120)	-0,31	-1,07
	(121)	-0,62	-1,38
	(122)	1,65	0,71
	(123)	1,87	0,41
	(124)	3,25	1,46
	(125)	2,81	1,15

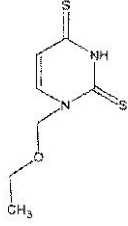
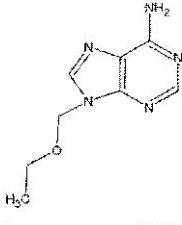
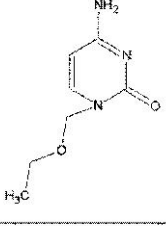
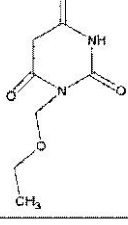
10

20

30

40

【表 1 - f】

化学構造	化合物-#	logD (pH 4)	logD (pH 7.4)
	(126)	0, 56	-1, 25
	(127)	-0, 59	-0, 23
	(128)	-1, 21	-0, 98
	(129)	-0, 48	-3, 23

10

20

【0069】

本発明の別の態様では、親水性部分は、環境のpHの変化に応答する双性イオン基を含む。双性イオン構造は、カチオン基とアニオン基が両方とも帯電しているpH値で存在する。一般化logDプロットを図1に示す。双性イオンは、帯電した親基より高いlogD値を有することが明らかである。

30

【0070】

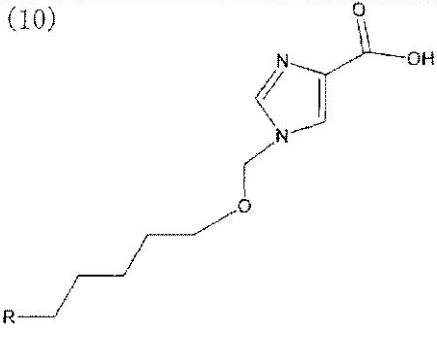
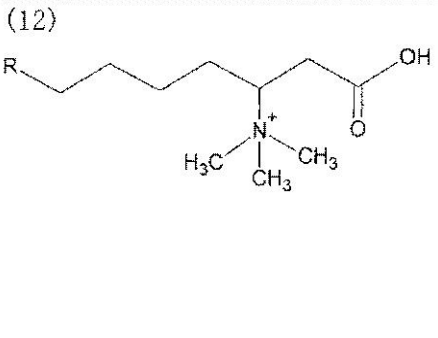
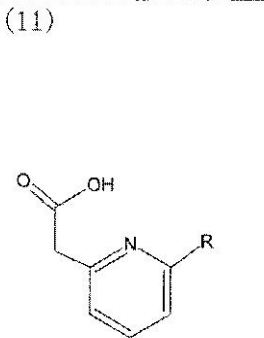
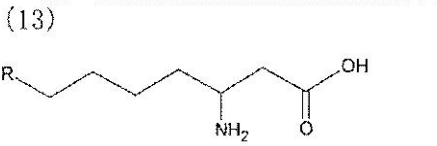
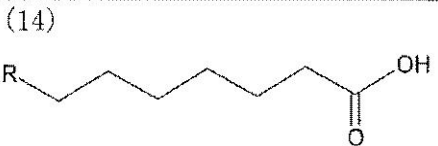
酸性化時のlogDの所望の増加は、logD曲線の右側で表わされ、カチオン電荷基のpKaに依存する。これは、アニオン基自体のpKaからむしろ独立している。一例として、アニオン基は、カルボキシ基とすることができ、カチオン基は、その基から炭素原子2～5個離れたヘテロ環の窒素原子とすることができる（例えば、化合物10または11）。ピリジルカルボン酸、イミダゾールカルボン酸、または同類のものは、このようなpH応答性親水性部分の少数の表現である。双性イオンは、pH4～pH7で存在し、それによって、本発明のpH応答性親水性の頭部基が提供される。これに反して、約9という高pKaの単純なアミノ基（例えば、化合物13）、または有効なpKaをもたないが一定の陽電荷を提供する第四級アンモニウム基（例えば、化合物12）は、双性イオンが存在するpH値の範囲を広げ、親水性の変化は、所望のpH領域（pH2～9、または上記に示すより好ましい範囲）では全く起こらない（図1および表2を参照のこと）。

40

【0071】

【表 2】

表 2 : 化合物 10 ~ 14

(10) 	(12) 	(11) 
(13) 	(14) 	

10

【0072】

親水性部分は、さらに極性基または無極性基で置換されていてもよい。本発明の一態様では、置換は、親水性部分の特定の p K a を実現するように選択される。このような p K a 値調整を実現するための規則は、当業者に周知であり、例えば構造の p K を低下させるための、バルビツル酸またはキサンチンの窒素原子におけるヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、メトキシメチル基、メトキシエチル基、エトキシメチル基、エトキシエチル基、チオメチル基、チオエチル基、メチルチオメチル基、メチルチオエチル基、エチルチオメチル基、エチルチオエチル基、クロロ基、クロロメチル基、ビニル基、フェニル基、もしくはベンジル基、またはそれらの混合物による置換を含む。式 (2) または (3) の R_m、R_n、または R_o の位置における置換は、特にこのような p K 値のシフトを実現するのに適している。

20

【0073】

言うまでもなく、p K 値は、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、および tert-ブチル基、もしくはシクロヘキシル基、またはそれらの混合物を含む置換基で、より高い値にシフトすることができる。置換キサンチンおよびそのそれぞれの p K 値に関する優れた概説は、Kulikowska et al., Biochim. Acta Pol., 51, 493-531, 2004に見出される。

30

【0074】

カルボキシル基の p K a 値も、空間的に近接した置換または化学的変更で影響を受けることが知られている。アクリル酸誘導体、安息香酸、ピリジニルカルボン酸、α-もしくはβ-ヒドロキシカルボン酸、またはα-もしくはβ-チオカルボン酸などの芳香族カルボン酸は、ハロゲン化カルボン酸と共に、親化合物より低い p K a 値を有する。一方、+I 効果をもつ置換によって、例えばシクロヘキシルカルボン酸におけるカルボキシル基の p K a がより高い値に変化する。

40

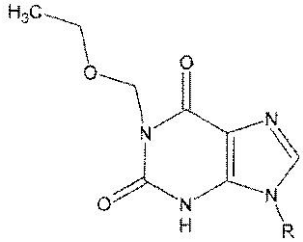
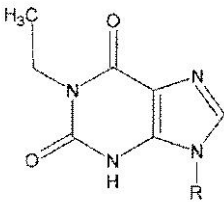
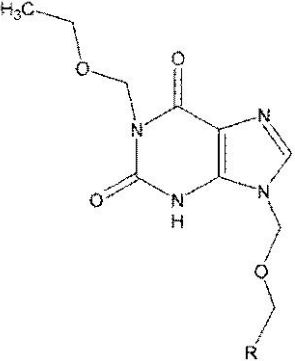
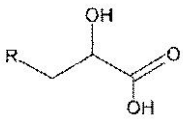
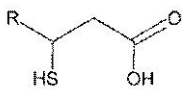
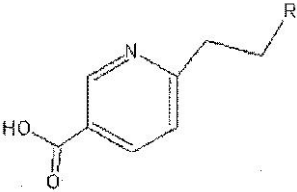
【0075】

置換親水性部分の具体例としては、表 3 の式 (4) ~ (9) (ただし、R で、T E E の疎水性部分が特定される) が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0076】

【表 3】

表 3：化合物 4～9

置換キサンチン		
(4)	(5)	(6)
		
置換カルボン酸		
(7)	(8)	(9)
		

10

20

【0077】

親水性部分の別の化学的表現は、弱酸の群から、物質の $\log D$ 、 pH 、および pK_a との関係を使用して特定することができる。酸について、これは以下の通り表すことができる。

$$\log D = \log P + \log (1 + 10^{(pH - pK_a)}) ;$$

式中、 $\log P$ は非イオン化の形の分配係数である。式は、ゼロイオン強度の条件を反映し、 $\log D$ の極めて低い値は、高 pH における酸について計算されている。イオン強度が約 0.15 M である生理的条件下で、塩形成は、このような $\log D$ の極値を限定している。

30

【0078】

図 2 は、いくつかの親水性部分について、 $\log D$ の計算値を示す。 $pH - pK_a$ に対して曲線をプロットすると、別の分析によって、 $\log D$ の同一のシフトが明らかになる（図 3 を参照のこと）。

【0079】

それらの pK_a 値に関して標準化すると、本明細書で分析されたすべての親水性部分について $\log D$ プロットが同様になる。 $\log D$ の最大差である 3.75 単位は、単一親水性部分のイオン化で実現することができる。双性イオン形成の最大振幅は、 $\log D$ の約 2.5 単位である。

【0080】

全振幅は、 pH の約 6 単位のかかなり大きいシフトを必要とする。本発明の多くの態様で考慮された ΔpH 約 3.4 (pH 7.4 ~ pH 4) の実用範囲内で、 $\log D$ の最大差は、 pK_a 約 4 では約 3 単位である。 pH が pK_a より 0 ~ 4 単位高いときはいつでも、 $\log D$ は、非常に感受性が高く反応し、最も感受性の高い反応は、 pK_a より 1 ~ 2.5 単位高い pH 値において起こる。この反応は、図 4 でも分析されている。

40

【0081】

実際的には、親水性部分の理想的 pK_a は約 4 である。 pK_a 2 ~ 6 の親水性部分（最大振幅約 1.5 単位）が好ましく、 pK_a 3 ~ 5 の親水性部分（最大振幅約 2.5 単位）がより好ましい。本発明の範囲内の他の親水性部分は、 pK_a 値が 1 ~ 7 であり得る。

【0082】

50

T E E の疎水性部分

本発明の T E E は、生体脂質膜の透過に寄与する疎水性部分を含む。このような疎水性部分の化学的表現としては、最小鎖長が 6 個の元素である直鎖状、分枝状、または環状鎖が挙げられる。本発明の多くの態様では、鎖元素は炭素原子である。本発明のいくつかの態様では、鎖元素は、2 個以上の他の鎖元素と共有結合を形成することができるヘテロ原子を含むことができる。水素原子またはハロゲン原子は、鎖に置換することができるが、鎖の元素ではない。疎水性部分は、7 個以上の元素を含むことができ、40 個までの元素を含んでもよい。本発明のいくつかの態様では、疎水性部分は、6 ~ 12 個の元素を含む。本発明の他の態様では、疎水性部分は、12 ~ 20 個の元素を含む。本発明のさらに他の態様では、疎水性部分は実に 20 ~ 40 個の元素を含む。

10

【0083】

一態様では、主鎖の分枝は、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、メトキシメチル基、エトキシメチル基、メトキシエチル基、エトキシエチル基、およびビニル基、もしくはハロゲン基、またはそれらの混合物など 1 種または複数のかなり小さいビルディングブロックを含む。

【0084】

疎水性部分は、飽和とすることができ、または不飽和結合を含むことができる。

【0085】

別の態様では、より複雑な分枝状およびまたは環状の環系は、疎水性部分の化学的表現とすることができる。このような態様の一実施形態において、疎水性部分はステロールに由来する。言うまでもなく、ステロールは、さらにメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、メトキシメチル基、エトキシメチル基、メトキシエチル基、エトキシエチル基、およびビニル基、もしくはハロゲン基、またはそれらの混合物で置換されていてもよい。本発明の別の態様では、疎水性部分は、ヒドロキシル基など 1 種または複数の親水性基で置換されているステロールを含むことができる。好ましい実施形態において、ステロールは、3、7、および 12 の位置の 1 つまたは複数においてヒドロキシル基を含む。好ましい態様では、ステロールはコレスタンであり、さらに好ましい実施形態において、コレスタンは、3、7、または 12 の位置の 1 つまたは複数においてヒドロキシル化されている。

20

【0086】

1 個または複数のヘテロ原子または化学基を疎水性部分に挿入することが可能である。本発明の一実施形態において、疎水性部分は、5 個以下のヘテロ原子または化学基を含み、別の実施形態において、2 個以下のヘテロ原子または化学基を含む。

30

【0087】

ヘテロ原子または化学基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(H)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-N(H)-$ 、 $-N(H)-C(O)-O-$ 、 $-CH=N-$ 、 $-O-C(O)-$ 、 $-N=CH-$ 、および／または $-S-S-$ を含む群から選択することができる。

【0088】

いくつかの態様では、前記ヘテロ原子および／または化学基は、アミノ酸、 α -ヒドロキシ酸、または β -ヒドロキシ酸に由来する。

40

【0089】

一実施形態において、前記アミノ酸ビルディングブロックは、プロリン、グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、もしくはメチオニン、またはそれらのペプチドの群から選択され、前記 α -および β -ヒドロキシ酸は、グリコール酸、乳酸、またはヒドロキシ酪酸を含む群から選択される。

【0090】

このような態様の別の実施形態において、2 個以上のエーテル基が存在し、エーテル結合間の間隔は、ポリ-エチレングリコールまたはポリ-プロピレングリコール中のモノマ

50

一元素を表す 2 個の炭素原子である。

【0091】

T E E の構造

T E E の構成は、その物理化学的パラメータによって支配されている。T E E は、環境の酸性化に応答して親水性－疎水性変化を起こす。この変化は、p H に対して応答する上述した親水性部分によって媒介される。このような応答は、最小振幅が $0.5 \log D$ であるべきであり、それによって $\log D$ のより高い絶対値は、より低い p H で実現される。一態様では、このような振幅は、 $1 \log D$ より大きく、これは、このような T E E の水相から膜の疎水性内部への分布が 10 倍より好ましくなることを意味する。別の態様では、このような振幅は、 1.5 より大きく、いくつかの態様では、親水性の形と疎水性の形との間の振幅は、 $2 \log D$ 単位より大きい。

本発明の一態様では、親水性部分は、生理的 p H とわずかに酸性条件のおよそ p H 4 との間の p H 値に応答する。このようなわずかに酸性条件は、エンドソームまたはリソソームのような細胞小臓器内で見られる。したがって、T E E は、細胞へのエンドサイトーシスによる取り込み後に、脂質凝集体またはリボソームのエンドソーム脱出を媒介することができる可能性がある。進行中の炎症の腫瘍組織または領域も、わずかに酸性の環境を提供し、したがって T E E は、これらの領域内に脂質凝集体またはリボソームを蓄積するのに有用であり得る。蓄積は、具体的には腫瘍もしくは間質細胞、または免疫系の細胞、または炎症性領域に存在する線維芽細胞で起こり得る。

【0092】

上述されたように、親水性のシフトの支配的 p K a は、カルボン酸、バルビツル酸、またはキサンチンなど弱酸性基の p K a とすることができる。好ましい実施形態において、本質的に弱酸によって生成 (driven) された T E E の p K は、p H 7.4 における親水性と p H 4 における疎水性の差を最大にするように最適化することができる。好ましい態様では、このような親水性部分の p K a は 2～6 である。より好ましい態様では、この p K a は 3～5 である。

【0093】

親水性のシフトが双性イオン形成によって引き起こされる場合では、支配的 p K a は、ピリジン、イミダゾール、モルホリン、またはピペラジンなどの弱塩基の p K a である。双性イオンでは、塩基の p K a は、3～8、好ましくは 4.5～7、より好ましくは 5～6.5 である。

【0094】

T E E は、1 種または複数の親水性部分を含むことがあり、親水性部分の相対および絶対位置決めは異なってもよい。場合によっては、隣接効果が生じることがある。親水性基内での効果としては、とりわけ、p K シフトおよび双性イオン形成が挙げられる。親水性基間での効果としては、それぞれの p K 値のシフトを挙げることもできる。これは、当業者に周知であり、例えば基間の間隔が 2～5 個の炭素原子であるとき、ごく接近したカルボン酸間で頻繁に観察される。

【0095】

より複雑な親水性部分のいくつかの例を下記に示す (表 4)。

【0096】

10

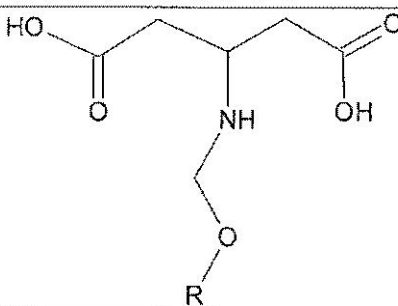
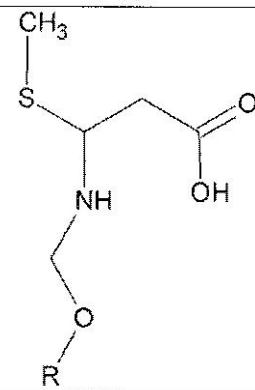
20

30

40

【表 4】

表 4：化合物 15 および 16

(15) 	(15) β-グルタミン酸誘導体。Rは、本発明の疎水性部分を表す。Rと親水性部分との間のエーテル結合は、任意選択であり、アミノ基のpKを低下させる。
(16) 	(16) 3-アミノ-3-(メチルチオ)プロパン酸誘導体 Rは、本発明の疎水性部分を表す。この場合も、Rとアミノ基との間のエーテル結合は、任意選択であるが、pKを下方にシフトさせ、同じことがチオエーテルにも当てはまる。疎水性部分は、チオエーテルにおけるメチル基を含めて、他の位置に結合していてもよい。

10

20

【0097】

2つ以上の親水性部分を含むTEEは、その中性状態とわずかに酸性状態の間で親水性の振幅がより大きい。言うまでもなく、親水性部分の混合物を単一の疎水性部分と組み合わせることができる。このような混合物は、疎水性シフトの振幅およびpH感受性のより正確な調整を可能にすることができる。しかし、いくつかの親水性部分が大きすぎると、TEEの親水性がもはや疎水性シフトで補償することができない値に増加する。

【0098】

したがって、異なるpH値間での親水性の振幅に加えて、第1のpHにおけるTEEの絶対親水性は、本発明の非常に重要な態様を表す。

30

【0099】

絶対親水性の点から、TEE自体のlogDは、中性または生理的pHの条件でのわずかに親水性と幾分疎水性との間で異なってもよい。言い換えれば、TEEは、pH7.4におけるlogDが-2~10である。

好ましい態様では、logD(7.4)は1より大きく、いくつかの態様では、logD(7.4)は3より大きい。本発明の他の態様では、TEEのlogD(7.4)は、10より小さく、いくつかの態様では、logD(7.4)は7より小さい。

【0100】

pH7.4におけるその絶対logDから独立に、pH4.0におけるTEEのlogDは、0を超える必要がある。

40

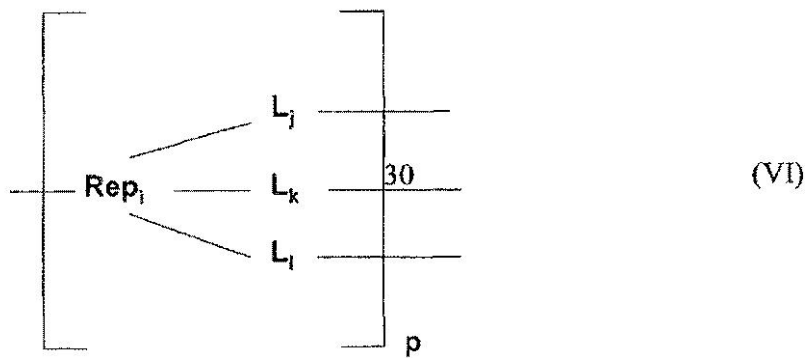
【0101】

負のlogD(7.4)のTEEは、疎水性シフトの振幅が大きいことが必要であり、このような大きい振幅は、1種または複数のカルボキシル基、キサンチン基、またはバルビツル酸基を含む親水性部分によって提供することができる。

【0102】

本発明の一実施形態において、TEEは、次の一般式のうちの1つを有する。

【化 3】



10

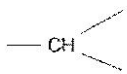
式中、 Rep_i からの Rep はいずれも独立に、1～8 個の C 原子を有する非分枝状、分枝状、または環状の置換または非置換アルキル基、アルケニル基、アルキレン基、アルキニル基、またはアリール基であり、

前記置換基は、1 種または複数の pH 感受性親水性部分、低級アルキル、アルキレン、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アルキルチオ、またはアルキルチオアルキルから選択され、「低級」は 1～6 個の原子を意味し、

L_j 、 L_k 、または L_l からの L はいずれも独立に、存在しないか、あるいは独立に $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{CH}=\text{N}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{N}=\text{CH}-$ 、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}13)(\text{R}14)-$ (ただし、 $\text{R}13$ および $\text{R}14$ は独立に、H もしくは $\text{C}1\sim\text{C}6$ アルキルであり、または $\text{R}13$ もしくは $\text{R}14$ の一方は、存在しなくてもよい)、または

20

【化 4】



または

30

【化 5】



またはアミノ酸、 α -ヒドロキシ酸、または β -ヒドロキシ酸を含む群から選択され、 T E E 中の C 原子の総数は、6～40 個であり、 p は ≤ 40 である；

あるいは

ステロール (V I I)

40

式中、前記ステロールは、1 種または複数の親水性部分、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、または低級アルキル、アルキレン、アルケニル、もしくはアルキニル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アルキルチオ、もしくはアルキルチオアルキルで置換されていてもよく、「低級」は 1～6 個の原子を意味する。

【0103】

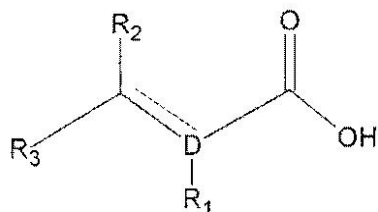
この実施形態の一態様では、一般式 V I 中のアミノ酸は、プロリン、グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、もしくはメチオニン、またはそれらのペプチドの群から選択され、一般式 V I 中の α -および β -ヒドロキシ酸は、グリコール酸、乳酸、またはヒドロキシ酪酸を含む群から選択される。

50

【0104】

好ましくは、pH感受性親水性部分は、次の一般式のうちの1つを有するpkaが1～7、好ましくは2～6、より好ましくは3～5の弱酸である。

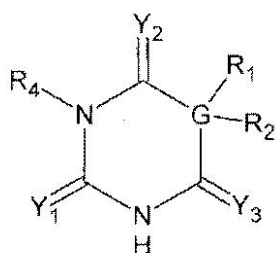
【化6】



(VIII)

または

【化7】



(IX)

式中、点線は、任意選択である二重結合を表し、

R1、R2、R3、およびR4は独立に、TEEの疎水性部分、水素、0～5個の不飽和部位を有する直鎖状、分枝状、もしくは環状の非置換もしくは置換C1～C10アルキル、アルキレン、またはヘテロアルキル、あるいはアリール基であり、前記基は、－O－または－S－から選択される0～5個のヘテロ原子を含み、前記ヘテロ原子は、前記基中の第1の原子ではなく、前記置換基は、ヒドロキシ基、メルカプト基、オキシ基、ホルミル基、ニトロ基、シアノ基、ハロ基、またはトリハロメチル基から選択され、R1、R2、およびR3は、代替としてかつ独立にアルコキシ基、アルコキシアルキル基、アルキルチオ基、アルキルチオアルキル基、ヒドロキシ基、メルカプト基、オキシ基、ホルミル基、ニトロ基、シアノ基、ハロ基、またはトリハロメチル基とすることができ、Dは、C、または0～3個の不飽和部位を有し、かつ－O－、－S－から選択される0～5個のヘテロ原子を含む非置換もしくは置換環状アルキル基もしくはアリール基であり、前記置換基は、アルキル基、アルキレン基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシ基、アルコキシアルキル基、アルキルチオ基、アルキルチオアルキル基、ヒドロキシ基、メルカプト基、オキシ基、ホルミル基、シアノ基、ハロ基、またはトリハロメチル基から選択され、Y1、Y2、およびY3は独立に、OまたはSであり、

Gは、CまたはNとすることができ、GがNであるとき、R1またはR2の一方は、存在しないことがあり、R1およびR2はR4と定義される；

あるいは

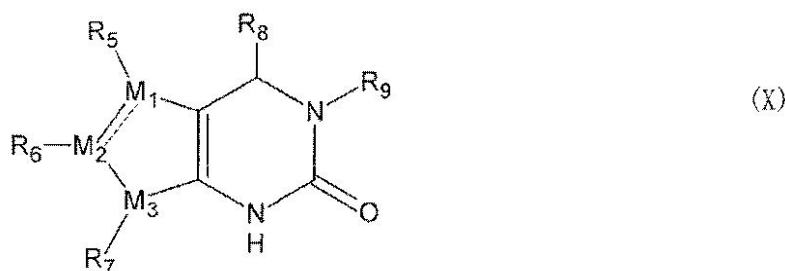
10

20

30

40

【化 8】



10

式中、点線は、任意選択である二重結合を表し、

R 5、R 6、R 7、またはR 9は、独立にT E Eの疎水性部分、水素、0～5個の不飽和部位を有する直鎖状、分枝状、もしくは環状の非置換もしくは置換C 1～C 10アルキル、アルキレン、またはヘテロアルキル、あるいはアリール基とすることができ、前記基は、
 -O-または-S-から選択される0～5個のヘテロ原子を含み、前記ヘテロ原子は、
 前記基中の第1の原子ではなく、前記置換基は、ヒドロキシ基、メルカプト基、オキシ基、
 ホルミル基、ニトロ基、シアノ基、ハロ基、またはトリハロメチル基から選択され、
 R 8はOまたはSHであり、

M 3はNまたはCであり、

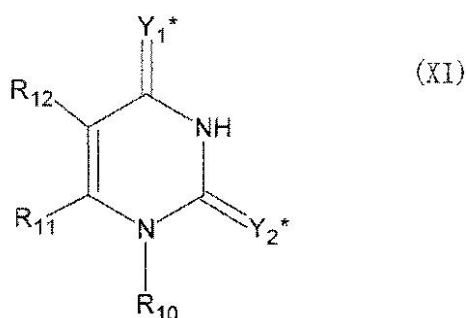
M 2はCまたは-O-であり、M 2が-O-である場合、R 6は存在せず、

M 1はNまたはCまたは-O-であり、M 1が-O-である場合、R 5は存在せず、

M 1、M 2、またはM 3がCであるとき、R 5、R 6、またはR 7は、さらにアルコキシ基、アルコキシアルキル基、アルキルチオ基、アルキルチオアルキル基、ヒドロキシ基、メルカプト基、オキシ基、ホルミル基、ニトロ基、シアノ基、ハロ基、またはトリハロメチル基とすることができ、R 5、R 6、またはR 7と定義されたさらなる置換基R 5'、R 6'、またはR 7'は、C原子に結合していてもよい；

あるいは

【化 9】



30

式中、R 10は、T E Eの疎水性部分とすることができ、R 11およびR 12は独立に、水素、ヒドロキシ基、メルカプト基、ホルミル基、ニトロ基、シアノ基、またはハロ基、またはトリハロメチル基とすることができるが、R 11およびR 12の少なくとも一方はH以外であり、

Y 1*およびY 2*は独立に、OまたはSである。

【0105】

あるいは、T E Eの前記p H感受性親水性部分は、酸性化時に双性イオンを形成し、前記双性イオンのカチオン電荷は、p k aが3～8、好ましくは4. 5～7、より好ましくは5～6. 5の弱塩基の窒素原子であることが好ましい。一態様では、前記弱塩基は、イミダゾール、モルホリン、ピリジン、またはピペラジンである。あるいは、前記弱塩基は非環状アミンである。

このような弱塩基のp k aは、窒素原子のβ位もしくはγ位のヘテロ原子によって、または空間的に近接した置換、例えば窒素原子のα位もしくはβ位での置換によって影響さ

50

れる可能性があることが当技術分野で知られている。好ましいヘテロ原子は—O—または—S—である。—I効果をもつ置換基は、このような弱塩基の pK_a を低下させることができ、アルコキシ基、アルキルチオ基、ヒドロキシ基、メルカプト基、オキシ基、ホルミル基、ニトロ基、シアノ基、ハロ基、またはトリハロメチル基が挙げられるが、これらに限定されるものではない。+I効果をもつ置換基は、このような弱塩基の pK_a を増大させることができ、例えばアルキル基が挙げられる。窒素原子の β 位または γ 位におけるヘテロ原子、および窒素原子の α 位または β 位における置換基は、T E Eの疎水性部分の一部でもよい。

【0106】

前記双性イオンのアニオン電荷は、カルボキシル基、ホスフェート基、ホファイト基、スルホ基、またはスルフィノ基から選択される酸性基である。カルボキシル基が好ましい。アニオン電荷は、双性イオンのカチオン電荷から炭素原子2～5個離れている。

【0107】

好ましいT E Eの具体例

T E Eの次の化学的表現は、さらに本発明の教示を説明するはずである。しかし、本発明の範囲は、下記に示す具体例に決して限定されない。好ましいT E Eは、次の属性を有する。

疎水性部分の鎖元素の数：8～40

$\log D(7, 4) : 1 \sim 10$

$\log D(7, 4) - \log D(4) : > 1$

弱酸の $pK_a : 2 \sim 6$

双性イオン形成のための能力をもつ弱塩基の $pK_a : 4.5 \sim 7$

【0108】

A. カルボン酸をベースにしたT E E

本発明の一態様では、T E Eは、親水性部分として1種または複数のカルボン酸基を含む。

【0109】

このような態様のいくつかの実施形態において、疎水性部分は、炭素原子の直鎖を含む。いくつかの表現では、このような鎖はアルキル直鎖である。

【0110】

下記の表5は、異なる鎖長のカルボン酸について、 $pH 4$ および $pH 7.4$ における $\log D$ を分析している。

【0111】

【表5】

表5：

炭素数	pH 4,0	pH 7,4	Δ
4	0.71	-1.83	-2.54
6	1.77	-0.75	-2.52
8	2.84	0.31	-2.53
10	3.9	1.38	-2.52
12	4.96	2.44	-2.52
14	6.02	3.5	-2.52
16	7.09	4.56	-2.53
18	8.15	5.62	-2.53
20	9.21	6.69	-2.52

【0112】

メチレン基による鎖伸長によって、 $\log D$ が約0.5単位増大することが明らかになる。6～26個のC原子を有するカルボン酸は、上記に示す選択基準に従って好ましいT E Eを表す。

【0113】

カルボン酸基の位置効果は、あまり重要ではなく、カルボン酸基は、強制ではないが、疎水性部分の末端基である。

【0114】

いくつかの態様では、疎水性部分の主鎖の1つまたは複数の位置を置換（R-）することができ、いくつかの置換の影響を、ヘキサデカン酸（パルミチン酸）誘導体について下記で分析する（表6）。

【0115】

【表6】

表6：

メチル側鎖				エチル側鎖				プロピル側鎖			
置換数	pH 4.0	pH7.4	Δ	置換数	pH 4.0	pH7.4	Δ	置換数	pH 4.0	pH 7.4	Δ
0	7.09	4.56	-2.53	0	7.09	4.56	-2.53	0	7.09	4.56	-2.53
1	7.43	4.91	-2.52	1	7.96	5.44	-2.52	1	8.5	5.98	-2.52
2	7.78	5.26	-2.52	2	8.84	6.32	-2.52	2	9.91	7.38	-2.53
3	8.13	5.6	-2.53	3	9.72	7.2	-2.52	3	11.32	8.79	-2.53

10

【0116】

R = メチルの場合、Rはそれぞれ、約0.35単位のlog D増加をもらす。R = エチルの場合、このような増加は1置換につき約0.88であり、R = プロピルの場合、増加は1置換につき約1.41である。主鎖での場合と同様に、側鎖でメチレン基を加えることによって、log Dが約0.5単位増大することが明らかになる。

【0117】

他の態様では、Rは、ヘテロ原子、特に酸素原子を含み、いくつかの置換の影響を、ヘキサデカン酸（パルミチン酸）誘導体について下記で分析する（表7）。

20

【0118】

【表7】

表7：

メトキシ側鎖				エトキシ側鎖				MOE側鎖			
置換数	pH 4.0	pH7.4	Δ	置換数	pH 4.0	pH7.4	Δ	置換数	pH 4.0	pH7.4	Δ
0	7.09	4.56	-2.53	0	7.09	4.56	-2.53	0	7.09	4.56	-2.53
1	6.03	3.35	-2.68	1	6.56	3.9	-2.66	1	6.89	4.31	-2.58
2	4.48	1.8	-2.68	2	5.54	2.67	-2.67	2	6.4	s	#VALUE!
3	2.92	0.24	-2.68	3	4.52	1.85	-2.67	3	5.91	3.32	-2.59

【0119】

R = メトキシの場合、Rはそれぞれ、約-1.4単位のlog D低下をもたらす。R = エトキシの場合、追加のメチレン基はlog Dの約0.5単位をもたらす、得られた効果は、log Dの約-0.9単位である。R = メトキシエチルの場合、1置換につき平均的影響は、log Dの約-0.4単位である。

30

【0120】

側鎖上の他の置換は、異なる影響によって鎖のlog Dをさらに変化させることができ、Rのいくつかの例を、下記の表8に示す（ヘキサデカン酸に基づく分析）。

【0121】

【表8】

表8：

R=	D (log(D))	R=	D(log(D))
ビニル	+0.4	メトキシメチル-	-1
クロロ	-0.2... -0.5	エトキシメチル-	-0.5
フルオロ	-0.9	エトキシエチル-	0
ブロモ	-0.35... +0.2	ケト-	-2.2 ... -1.7
ヒドロキシル	-1.2 ... 2.2		

40

【0122】

置換基自体は、pH応答性でなく、したがってTEEのpH応答に寄与しない。また、Rの影響はpHに無関係である。しかし、先に指摘した通り、Rは、親水性部分のpKaに影響を及ぼすことができ、それによって生理的pHとpH4...5の間でのlog(D)

50

の振幅が変化する。

【0123】

さらに他の態様では、ヘテロ原子は、疎水性部分の主鎖の一部とすることができる。他の態様では、主鎖は、不飽和結合を含んでもよい。さらに他の態様では、主鎖は、側鎖における置換と組み合わせて、ヘテロ原子を含んでもよい。このような変化は、TEEのlog Dに影響を及ぼす可能性があり、主鎖のいくつかの変形を、ヘキサデカン酸について分析した(表9)。

【0124】

【表9】

表9：

二重結合(-2H)				主鎖中のエーテル(PEG)				主鎖中のエーテル(PPG)			
置換数	pH 4.0	pH 7.4	Δ	置換数	pH 4.0	pH 7.4	Δ	置換数	pH 4.0	pH 7.4	Δ
0	7.09	4.56	-2.53	0	7.09	4.56	-2.53	0	7.09	4.56	-2.53
1	7.11	4.59	-2.52	1	5.16	2.54	-2.62	1	5.51	2.88	-2.63
2	6.58	3.99	-2.59	2	3.21	0.57	-2.64	2	3.9	1.25	-2.64
3	5.95	3.09	-2.86	3	-0.69	-3.33	-2.64	3	2.3	-0.34	-2.64

【0125】

したがって、二重結合1つは、log Dを約-0.4~-0.5単位低下させ、ポリエチレングリコールに由来する反復構造で見られる主鎖中のエーテル結合は、log Dを約2.5単位低下させ、前記効果は、追加のメチル基をポリプロピレングリコールからの反復構造中などのエーテル結合の隣に加えることによって、約1.6単位に低下する。

【0126】

主鎖上の他の置換は、異なる影響によって鎖のlog Dをさらに変化させることができ、いくつかの例を、下記の表10に示す(ヘキサデカン酸に基づく分析)。

【0127】

【表10】

表10：

元素	D (log(D))	元素	D (log(D))
-CH ₂ -	参照	-S-	-1.5
-NH- (アザ)	-6 ... -9	-S-S-	-1.1
-NH-CO- (アミド)	-7.5 ... -11		
-O-CO- (エステル)	-2, 7		

【0128】

置換基自体は、pH応答性でなく、したがってTEEのpH応答に寄与しない。また、Rの影響はpHに無関係である。しかし、先に指摘した通り、Rは、親水性部分のpKaに影響を及ぼすことができ、それによって生理的pHとpH4~5の間でのlog(D)の振幅が変化する。

【0129】

上記に示した例および分析は、特にTEEとしての構造要素を特定するために本発明を実施するための指針を与える。アイソフォームおよび位置異性体は、本発明の開示内である。本開示で先に記載された通り、置換基間の隣接効果が生じ得る。しかし、これらの効果は、当業者に周知であり、標準化学文献、データベース、またはACD/Labsなどの化学ソフトウェアの一部であるものに記載されている。

【0130】

環系

いくつかの態様では、疎水性部分は、シクロアルカン、シクロアルケン、もしくはシクロアルキンなどの環状構造、または芳香族環構造を形成することができる。

下記の表で、環状要素の少数の表現を分析し、他の要素の既知の構造寄与から、より多くの環状要素を開発することができる。言うまでもなく、環状要素を、特に上記で分析した基でさらに置換することが可能である。

【0131】

【表11】

表11:

	環状主鎖		
	cpd	pH 4, 0	pH7, 4 Δ
ステアリン酸		8, 15	5, 62 -2, 53
4-ウンデシルシクロヘキサン酸		7, 54	5, 22 -2, 32
4-ウンデシルシクロヘキセン酸		7, 12	4, 39 -2, 73
p-ウンデシル安息香酸		7, 51	4, 87 -2, 64

10

【0132】

ステロール

本発明の特定の変形では、疎水性部分の環系は、ステロール中などのより複雑な環系とすることができる。この場合も、さらなる置換は、ステロール主鎖に存在することができ、下記に示す分析は、ステロールの天然誘導体、例えばステラン主鎖の3位、7位、および12位におけるヒドロキシル基置換について、log Dのいくつかの局面を詳述している。

【0133】

20

また、TEE中のステロールの配向は異なってもよく、胆汁酸中などの26位におけるカルボキシル基の存在、またはコレステロールヘミスクシネート(CHEMS)中などの3位へのグラフトは、本発明のいくつかの例を表す(表12および13)。

【0134】

表12: TEEとして使用した胆汁酸誘導体のlog Dの分析。分析の目的で、3'ヒドロキシル基をメチル化して、有望な薬物の結合のモデルを作製したと想定した。

【0135】

【表12】

胆汁酸 (3'コレステロール)	主鎖中のOH			
	# 置換	pH 4, 0	pH7, 4	Δ
3'メトキシコレート	3	3, 18	0, 64	-2, 54
3'メトキシデオキシコレート	2	5, 23	2, 69	-2, 54
3'メトキシジデオキシコレート	1	7, 27	4, 73	-2, 54

30

【0136】

表13: TEEとして使用したCHEMS誘導体のlog Dの分析。分析の目的で、26位のカルボキシル基をメタノールでエステル化して、有望な薬物の結合のモデルを作製した。この分析では、3'位をコハク酸でエステル化し、それによってTEEの親水性部分としての非置換カルボキシル基がもたらされる。

40

【0137】

【表 1 3】

CHEMS誘導体	主鎖中のOH 置換			
(26' コレステロール)	数	pH 4, 0	pH7, 4	Δ
26' メチルコレート	3	3, 65	1, 01	-2, 64
26' メチルデオキシコレート	2	5, 69	3, 06	-2, 63
26' メチルジデオキシコレート	1	7, 73	5, 1	-2, 63

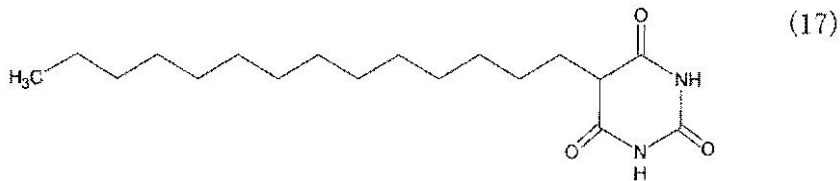
10

【0 1 3 8】

B. バルビツル酸およびキサンチンをベースにした T E E

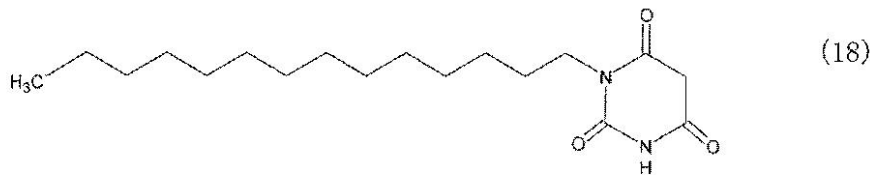
上記の考察は、言うまでもなく、構造的に異なる親水性部分を含む T E E に移すことができる。T E E の疎水性部分の構造要素の寄与は、1 種または複数の親水性部分の化学的性質にかかわらず同一でない場合、類似している。バルビツル酸またはキサンチンを含む T E E のいくつかの特定の化学的表現は、開示のこの部分を限定することなく、このような T E E の構成を示すことができる（化合物 1 7 ～ 2 3 ）。

【化 1 0】



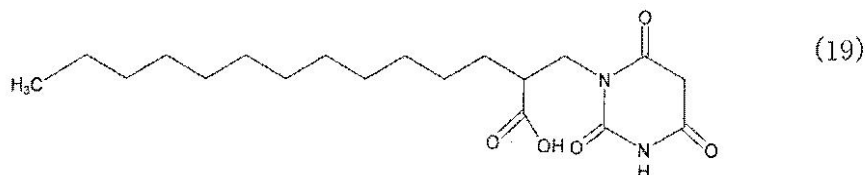
20

【化 1 1】



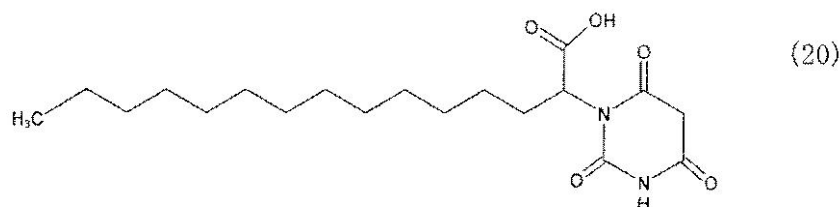
30

【化 1 2】



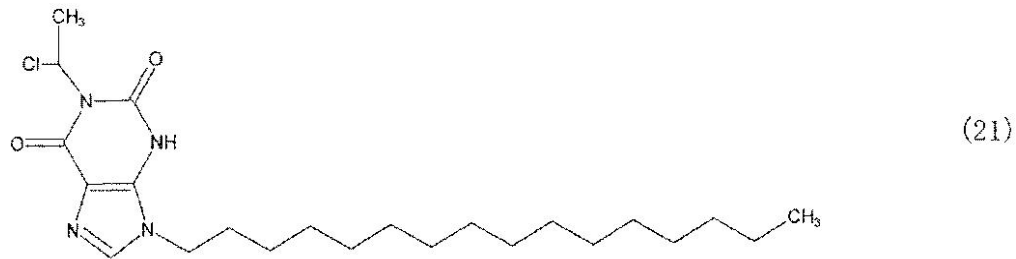
40

【化 1 3】



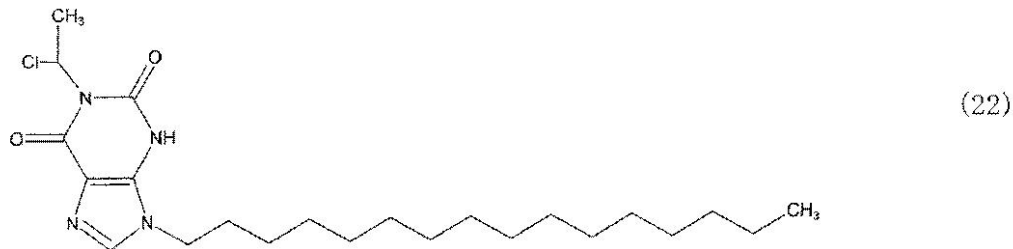
50

【化 1 4】



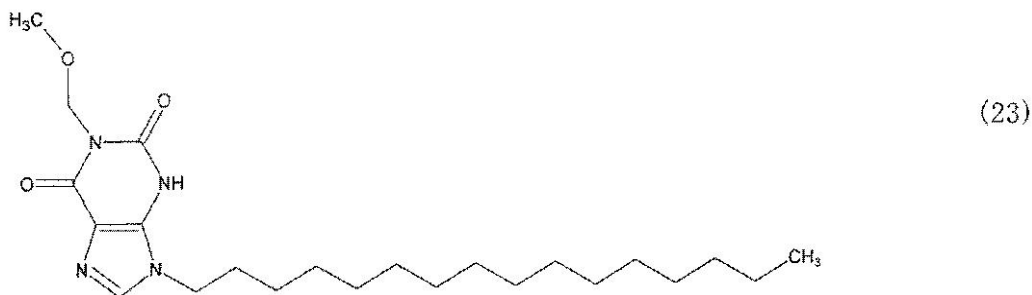
【化 1 5】

10



【化 1 6】

20



30

【0 1 3 9】

T E E 構造内の親水性部分の位置は異なってもよい。いくつかの態様では、親水性部分は、分子とT E Eとの間の結合から遠くに位置している。他の態様では、親水性部分は、T E E内の中心に位置している。

【0 1 4 0】

T E E の使用

T E E は、本発明内では脂質集合体と総称されるミセル、リポプレックス、渦巻形、エマルジョン滴など脂質、またはリポソーム、または他の超分子凝集体に組み合わせる必要がある。

【0 1 4 1】

40

T E E と脂質集合体との組合せには、いくつかの異なる手法を採用することができる。これらの手法としては、化学結合、物理的引力、または他の相互作用、例えばキレート結合が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0 1 4 2】

本発明の一態様では、T E E は、化学結合によって脂質に直接結合することができる。T E E を含む脂質を下記でさらに詳細に説明する。

本発明の別の態様では、脂質集合体を生成した後、T E E をこのような集合体にグラフトすることができる。このようなカップリングを実施するための化学結合技法および方法は、文献、例えばG. T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996に広範に報告されている。

50

本発明の別の態様では、T E Eは、例えばビオチンとビオチン結合タンパク質との分子認識、2つの相補的または部分相補的オリゴヌクレオチドの分子認識、またはシクロデキストリンとシクロデキストリンの結合ポケットに適合する分子との分子認識を使用して、DeGrip et al., Biochem. J., 330, 667-674, 1998に開示されている様々な脂質または洗浄剤、WO 06/105361に開示されているステロールまたはアダマンタン単位、WO 06/105361に開示されているステロイドまたはアダマンタン単位などの他のステロールなど脂質集合体系との複合体を形成することができる。

【0143】

別の態様では、T E Eは、イオンまたは静電的相互作用を使用して脂質集合体との複合体を形成することができる。このような態様の一実施形態において、ポリカチオン性要素をさらに含むT E Eは、アニオン性脂質集合体と組み合わせられる。別の実施形態において、ポリアニオン性要素をさらに含むT E Eは、カチオン性脂質集合体と組み合わせられる。ポリカチオン性要素としては、例えばポリエチレンジアミン、ポリアリルアミン、スぺルミン、テルミン、スぺルミジン、ジスぺルミン、トリスぺルミン、テトラスぺルミン、オリゴスぺルミン、プトレシン、またはリシン、オルニチン、もしくはアルギニンからのポリマーもしくはオリゴマーなどが挙げられるが、これらに限定されない。ポリアニオン性要素としては、例えばアクリル酸、メタクリル酸、グルタミン酸、アスパラギン酸などのポリマーまたはオリゴマーが挙げられるが、これらに限定されるものではない。脂質集合体とポリイオンを組み合わせるための技法および実験プロトコルは、WO 01/64330に開示されている。

【0144】

このような使用のためのT E E誘導体としては、化合物24～29が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

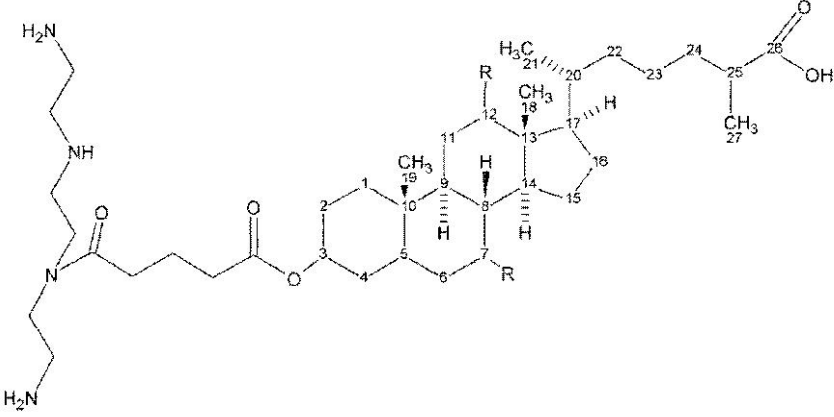
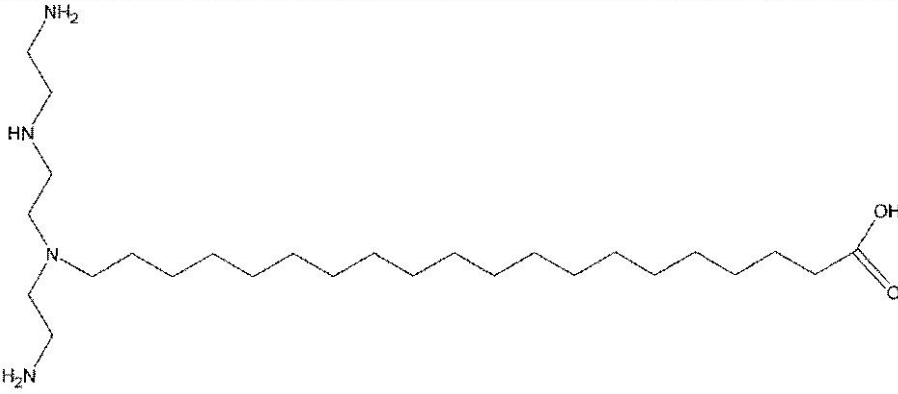
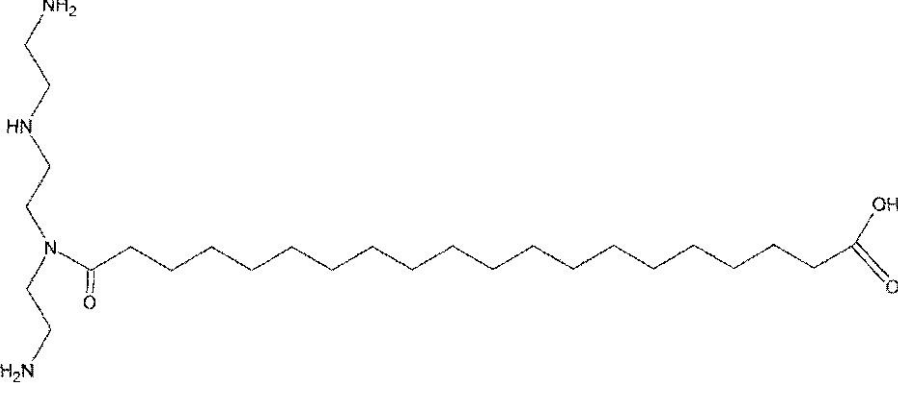
【0145】

10

20

【表 1 4 - 1】

表 1 4 : 化合物 2 4 ~ 2 9

 (24), Rは-Hまたは-OHである。	
 (25)	
 (26)	

10

20

30

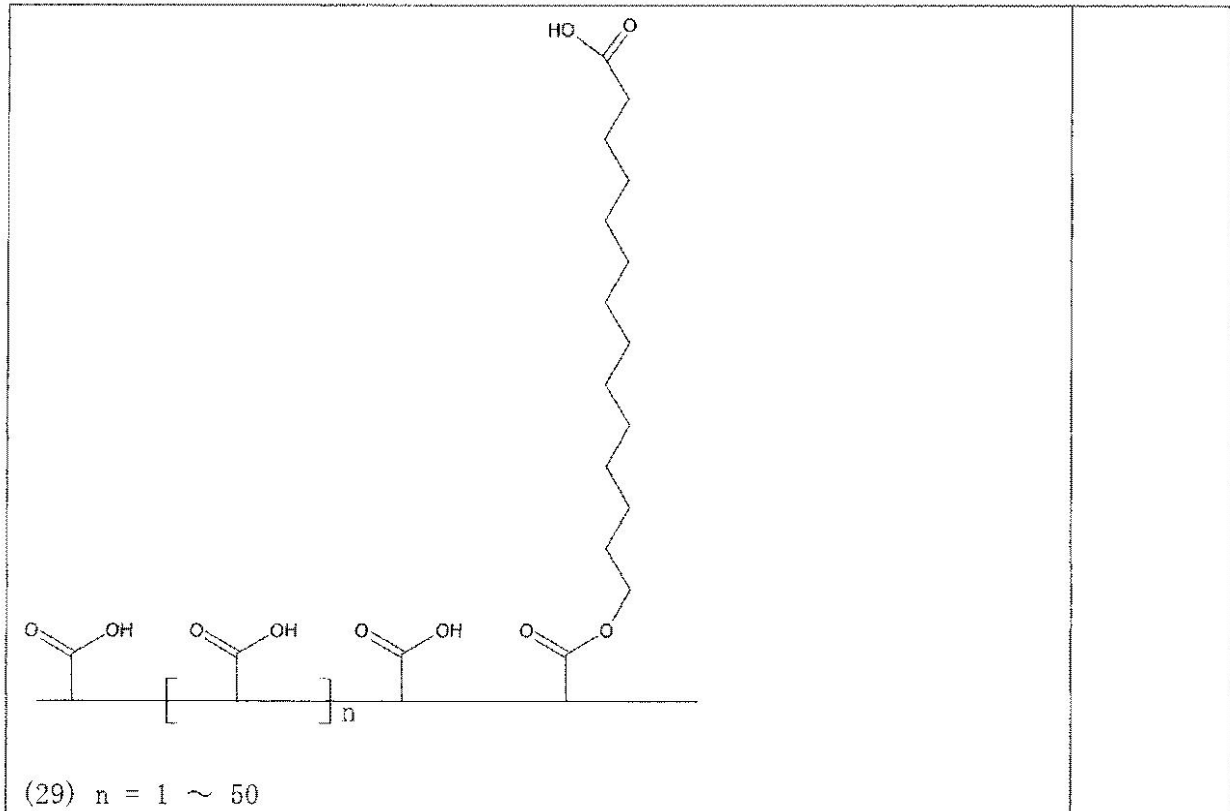
[illegible]

20

30

40

【表 1 4 - 3】



10

20

【0 1 4 6】

T E Eを含む脂質

本発明の一実施形態において、1種または複数のT E Eを含む脂質は、次の一般式を有することができる。

脂質-(L 2) r-(T E E) r (X I I)

式中、L 2は、存在しないか、または $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ ； $-\text{S}-$ ； $-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})-$ ； $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$ ； $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ； $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$ ； $-\text{C}(\text{O})-$ ； $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$ ； $-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ； $-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{N}-$ ； $-\text{OC}(\text{O})-$ ； $-\text{N}=\text{CH}-$ ； $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{N}(\text{R} 1 3)(\text{R} 1 4)-$ から選択される連結基であり、R 1 3およびR 1 4は独立に、HもしくはC 1 - C 6アルキルであり、またはR 1 3もしくはR 1 4の一方は、存在しなくてもよく、rは1～5の整数である。

30

【0 1 4 7】

T E Eを本発明に従って結合させることができる脂質は、 $-\text{OH}$ 基で置換されていてもよいリン脂質およびそのリゾ型、スフィンゴ脂質およびそのリゾ型、コレステロールのようなステロールおよびその誘導体、ジアシルグリセロール／ジアルキルグリセロール、モノアシルグリセロール／モノアルキルグリセロール、グリセリン酸のモノエステル、ジエステル、モノエーテル、もしくはジエーテル、スフィンゴシン／フィトスフィンゴシン／スフィンガニンおよびそれらのN置換誘導体、セラミド、1, 2-ジアシル-3-アミノプロパン／1, 2-ジアルキル-3-アミノプロパン、1-もしくは2-モノアシル-3-アミノプロパン／1-もしくは2-モノアルキル-3-アミノプロパン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、脂肪酸、ジカルボン酸アルキルエステル、トリカルボン酸ジアルキルエステル、または酒石酸と長鎖アルコールとのエステル、もしくは酒石酸と長鎖カルボン酸とのエステルを含む群から選択することができるが、これらに限定されない。

40

【0 1 4 8】

好ましい実施形態において、両親媒性脂質物質のアシル鎖およびアルキル鎖は独立に、8～30個の炭素原子、および0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含む。他の好ましい実施形態において、両親媒性脂質物質は、ステロール誘導体、好ましくはコレス

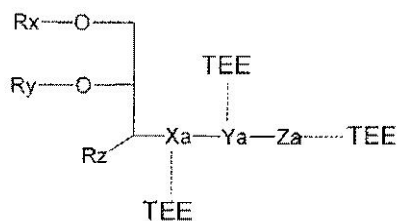
50

テロールおよびその誘導体を含む。

【0149】

本発明の一実施形態において、1種または複数のTEEを結合させることができる脂質は、次の一般式のうちの1つから選択することができる。

【化17】



(XIII)

10

式中、RxおよびRyは独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC₈～C₃₀アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいはRxまたはRyの一方は、Hとすることができ、RzはH、=O、-NH₂、-OHであり、

Xaは、-OPO₃⁻-；-OPO₂-CH₂-；-ピロホスフェート-；-OSO₃-；-OSO₂-；-O-；-NH-；-S-；-N(H)C(O)-；-C(O)-、-C(O)N(H)-；-OC(O)N(H)-；-N(H)C(O)O-；-OC(O)-；-C(O)O-；-N=CH-；-CH=N-；-CH₂-；-S-S-；-N(R13)(R14)-（ただし、R13およびR14は独立に、HもしくはC1～C6アルキルであり、またはR13もしくはR14の一方は、存在しなくてもよい）；または

20

【化18】



であり、

Yaは存在しないか、または非分枝状、分枝状、もしくは環状の置換もしくは非置換アルキル、アルケニル；1～8個のC原子を有するアルキレン基もしくはアルキニル基もしくはアリール基であり、ここで前記置換基は、1種または複数の-OH；-NH₂；-N(R13)(R14)（ただし、R13およびR14は、上記で定義される）；-COOH；糖から選択され、あるいはYaは糖；アミノ酸；ジ-もしくはトリペプチド；α-ヒドロキシ酸もしくはβ-ヒドロキシ酸、またはジヒドロキシ酸であり、

30

Zaは存在しないか、または-O-；-S-；-N(H)C(O)-；-C(O)N(H)-；-C(O)O-；-OC(O)N(H)-；-C(O)-；-C(O)N(H)-；-N(H)C(O)O-；-NH-；-N(R13)(R14)-（R13およびR14は上記のように定義する）；-CH=N-；-OC(O)-；-N=CH-；-S-S-から選択される基であり、あるいはZaは、-NH₂；-(NH₃)⁺；-(N(R13)(R14)(R15))⁺（ただし、R13、R14、およびR15は、上記のR13およびR14のように定義する）；-C(O)OH；-OH；-C(O)H；-C(O)OR16（ただし、R16はC1～C6アルキルである）；-C(O)NH₂の群から選択され、点線は、1種または複数のTEEのあり得るグラフト位置を表す；

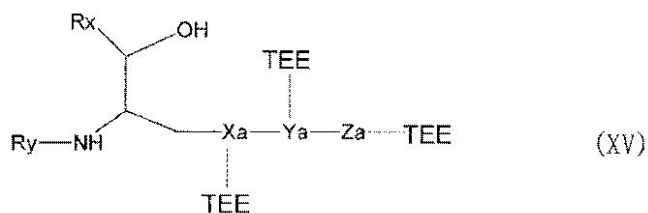
40

【化 19】



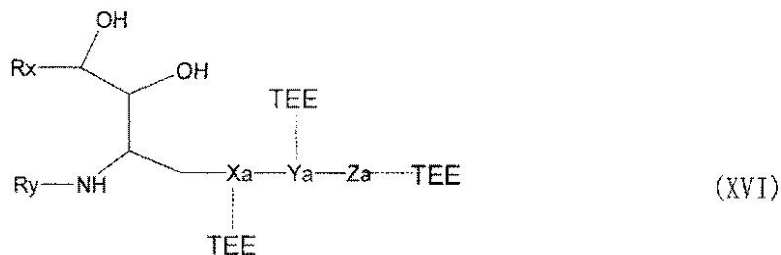
式中、X aはステロールの3'位において結合しており、上記のように定義され、Y aおよびZ aは、上記で定義され、ステロールは、コレステロール、シトステロール、カンペステロール、デスモステロール、フコステロール、22-ケトステロール、20-ヒドロキシステロール、スチグマステロール、22-ヒドロキシコレステロール、25-ヒドロキシコレステロール、ラノステロール、7-デヒドロコレステロール、ジヒドロコレステロール、19-ヒドロキシコレステロール、5 α -コレスト-7-エン3 β -オール、7-ヒドロキシコレステロール、エピコレステロール、エルゴステロール、および/またはデヒドロエルゴステロールから選択され、好ましくは前記ステロールは、コレステロールであり、点線は、1種または複数のT E Eのあり得るグラフト位置を表す；

【化 20】



または

【化 21】



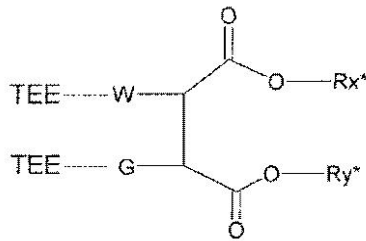
式中、R x、R y、X a、Y a、またはZ aは、上記で定義され、点線は、1種または複数のT E Eのあり得るグラフト位置を表す；

【化 22】



式中、R xおよびR yは、上記で定義され、点線は、1種または複数のT E Eのあり得るグラフト位置を表す；

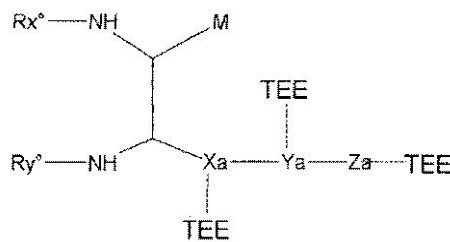
【化 2 3】



(XVIII)

式中、 Rx^* および Ry^* は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含む $C_8 \sim C_{30}$ アルキル鎖であり、あるいは Rx^* または Ry^* の一方は、Hとすることができ、WおよびGは独立に、 $HO-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-N(H)C(O)O-$ であり、点線は、1種または複数のTEEのあり得るグラフト位置を表す；

【化 2 4】



(XIX)

式中、 Rx° および Ry° は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含む $C_8 \sim C_{30}$ アシル鎖であり、あるいは Rx° または Ry° の一方は、Hとすることができ、MはHまたは $-OH$ であり、Xa、Ya、Zaは、上記で定義され、点線は、1種または複数のTEEのあり得るグラフト位置を表す。

【0150】

グラフト位置

本発明のTEEを、脂質に化学結合またはグラフトすることができる。多くの態様では、水に露出した極性脂質頭部基は、1種または複数のTEEをグラフトするのに好ましい位置である。

【0151】

グラフトとTEEとの間の化学リンカーとしては、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(H)C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(H)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-N(H)-$ 、 $-N(H)-C(O)-O-$ 、 $-CH=N-$ 、 $-O-C(O)-$ 、 $-N=CH-$ 、 $-S-S-$ 、1～6個のC原子を有し、1種もしくは複数の $-OH$ 、 $-NR_2$ 、 $-COOH$ 、もしくは糖で置換されていてもよい非分枝状、分枝状、もしくは環状アルキル、アルケニル、アルキレン、もしくはアルキニル、またはそれらの混合物； $-PO_4^-$ ； $-PO_3^-$ ； $-PO_3^-CH_2-$ ピロホスフェート； $-SO_4-$ ； $-SO_3-$ ； $-NH-$ ； $-NR-$ ；糖およびその誘導体；アミノ酸；ジ-もしくはトリペプチド、 α -ヒドロキシ酸もしくは β -ヒドロキシ酸、またはジヒドロキシ酸を含む(include and comprise)ことができるが、これらに限定されない。

【0152】

本発明の好ましい実施形態において、脂質頭部基および化学リンカー基の構造単位は、実質的極性を維持する。いくつかの態様では、この構造単位は電荷を帯びている。これは、以前の頭部基から保存された電荷、または新たに発生した電荷、例えば還元的アミノ化によって生ずるアミン基とすることができる。

【0153】

他の態様では、(I)の極性領域は、脂質の膜アンカーの外側および実際のTEEの外

側の（連続）構造単位と定義され、前記構造単位は、実質的極性を維持する。実質的極性は、水中で水素結合を形成する能力を示す。実質的極性は、 $\log D < 0$ 、いくつかの態様では $\log D < -2$ 、他の態様では $\log D < -4$ を意味する。

【0154】

本発明のいくつかの実施形態において、TEEを、帯電した極性頭部基を含む脂質にグラフトする。グラフト位置は前記帯電した極性頭部基であり、その基の電荷を少なくとも実質的程度まで維持する。脂質のこのような親水性極性頭部基の例は、リン酸（DOPAのような脂質中）、ホスホエタノール（DOPEのような脂質中）、ホスホグリセロール（POPGのような脂質中）、ホスホグリセロールアルデヒド、ホスホグリセリン酸、アミノ基（例えば、1, 2-ジアシルまたは1, 2-ジアルキル-3-アミノプロパン由来）を含むが、これらに限定されない。

10

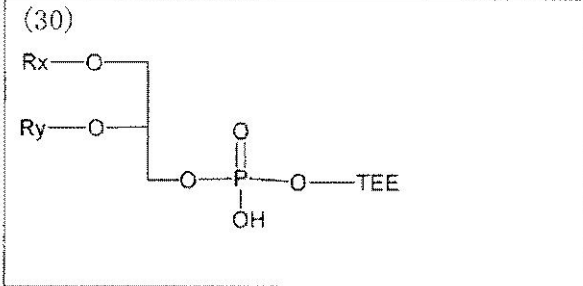
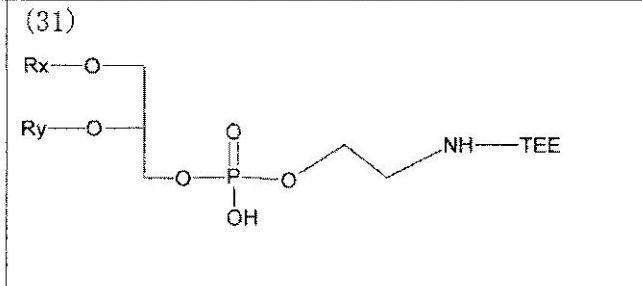
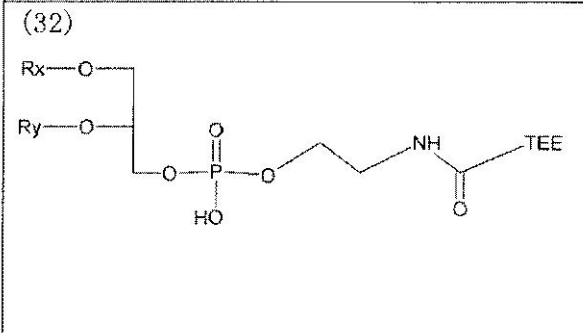
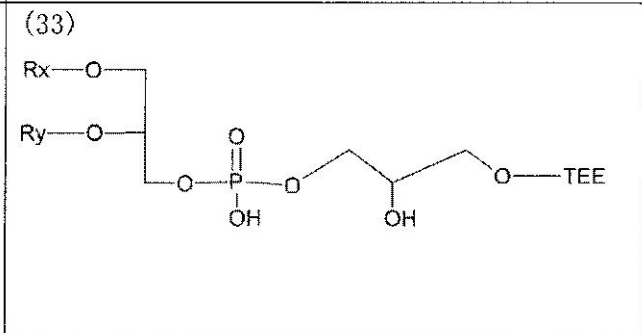
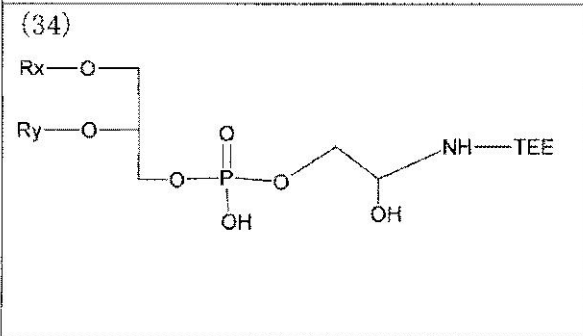
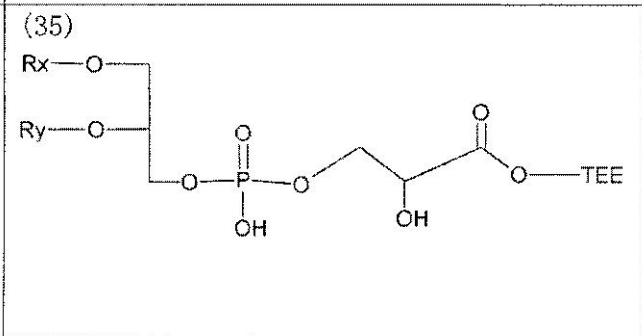
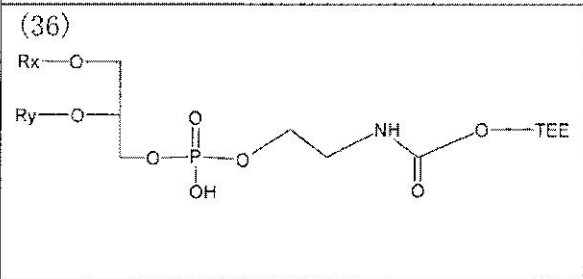
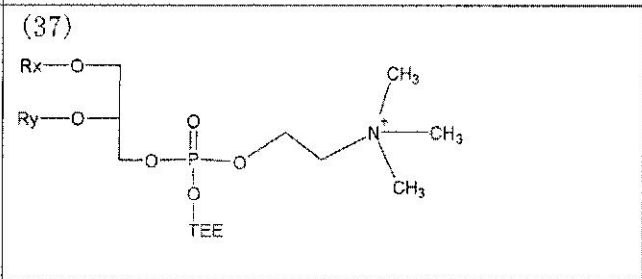
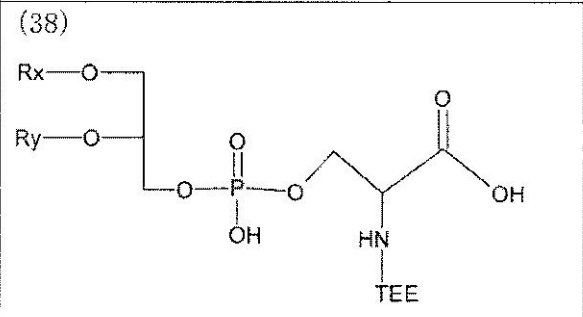
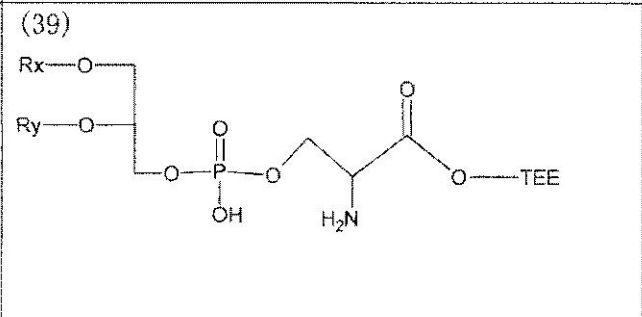
【0155】

TEEを含むこのような脂質の化学的表現としては、化合物30～43が挙げられるが、これらに限定されるものではない。 R_x および R_y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含む $C_8 \sim C_{30}$ アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいは R_x または R_y の一方は、Hとすることができ、 R_{3*} および R_{4*} は独立に、Hまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルである。

【0156】

【表 15 - 1】

表 15 : 化合物 30 ~ 43

(30) 	(31) 
(32) 	(33) 
(34) 	(35) 
(36) 	(37) 
(38) 	(39) 

10

20

30

40

【表 15 - 2】

(40)	(41)
(42)	(43)
(42a)	(43a)

10

20

【0157】

本発明の別の実施形態において、TEEを、親水性極性頭部基を含む脂質にグラフトする。グラフト位置は前記親水性基であるが、TEEと脂質との間の化学結合によって、極性頭部基が帯電しなくなる。例としては、 $-N(H)-C(O)-$ 、 $-N(H)-C(O)O-$ が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

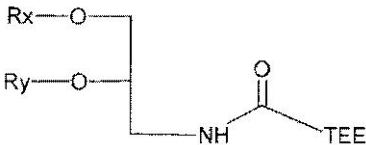
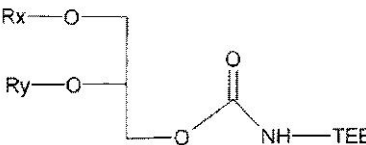
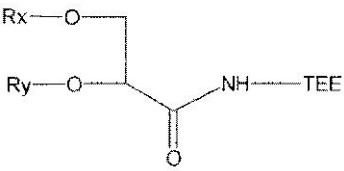
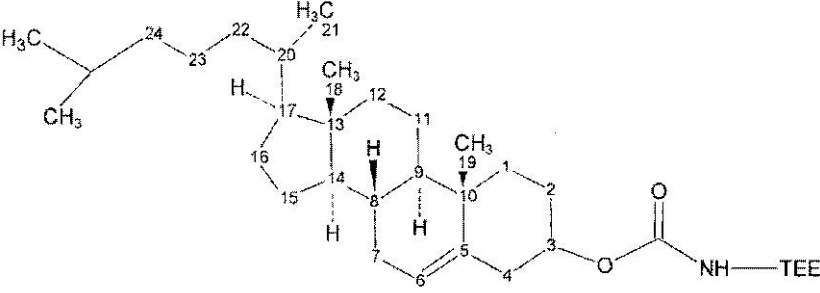
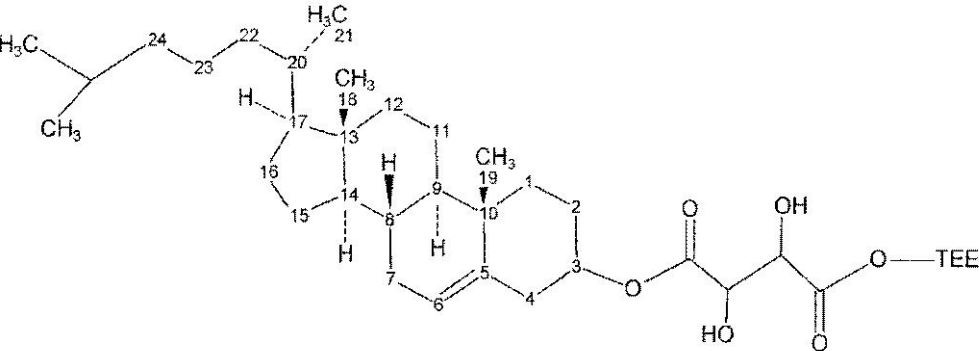
【0158】

TEEを含むこのような脂質の化学的表現としては、化合物44～47が挙げられるが、これらに限定されるものではない。 R_x および R_y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含む $C_8 \sim C_{30}$ アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいは R_x または R_y の一方は、Hとすることができる。

【0159】

【表 16】

表 16 :

(44) 	(45) 
(46) 	
(47) 	
(47a) 	

【0160】

言うまでもなく、いかなる場合でも、置換基は脂質頭部基に結合していてもよい。さらに、前述のように、連結基を、脂質頭部基と結合している TEE との間に挿入することができる。いくつかの態様では、連結基も同様に置換されている。

【0161】

好ましい実施形態において、置換基または連結基は、TEE の脂質頭部基への結合によって、頭部基の極性の低下、続いて脂質の両親媒性の喪失が起こるときに使用することができる。例えば、コレステロールと TEE としての C₁₆-ジカルボン酸とのエステル化

は、無極性エステル結合を生じ、したがって好ましくない。しかし、極性連結基、例えば酒石酸をコレステロールとTEEとしての C_{16} -ジカルボン酸との間に挿入すると、TEEが結合した後も、脂質の両親媒性構造が保存される。

【0162】

いくつかの実施形態において、脂質頭部基に結合することができる置換基は、極性であり、 $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR$ 、 $-NR_2$ 、糖およびその誘導体、アミノ酸およびその誘導体、 $-OPO_3^{2-}$ 、 $-OPO_2^{2-}$ 、 $-OSO_3^-$ ； $-OSO_2^-$ のような基、またはそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

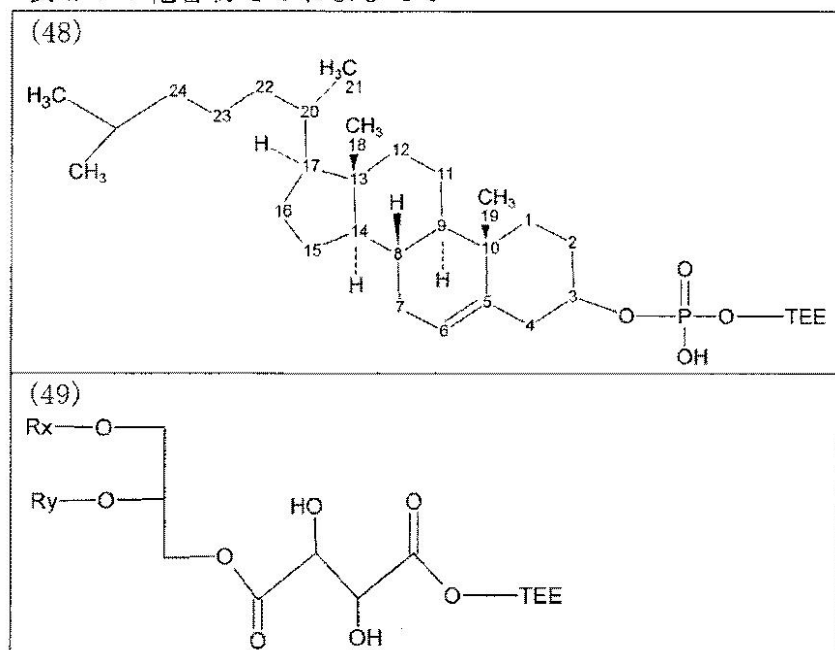
【0163】

頭部基とTEEとの間に連結基を有するこのような脂質の化学的表現としては、化合物48～49が挙げられるが、これらに限定されるものではない。 R_x および R_y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含む $C_8 \sim C_{30}$ アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいは R_x または R_y の一方は、Hとすることができる。

【0164】

【表17】

表17：化合物48および49



【0165】

この態様のさらに別の実施形態において、脂質は、2種以上の親水性極性頭部基、または親水性に影響を及ぼすことなく様々な位置において置換を可能にする複雑な親水性頭部基を含むことができる。例としては、酒石酸と長鎖アルコールとのエステル、マレイン酸の誘導体、または脂肪酸とグルコース、スクロース、もしくはマルトースなど糖とのエステルが挙げられるが、これらに限定されるものではない。さらなる例としては、ドデシル- β -D-グルコピラノシドまたはドデシル- β -D-マルトシドなどアルキルグリコシドおよびその誘導体、アルキル-エチレングリコール洗浄剤の誘導体(Brij 35、Genapolシリーズ、Thesitなど)、またはホスファチジルイノシトールおよびその誘導体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。TEEがこのような極性頭部基の異なる位置にグラフトされている異性体は、本発明の範囲内である。

【0166】

2個以上の親水性頭部基、またはTEEを含む複雑な頭部基を含むこのような脂質の化学的表現としては、化合物50～55が挙げられるが、これらに限定されるものではない。 R_x および R_y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含む $C_8 \sim C_{30}$ アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいは R_x または R_y の一方は、Hとすることができる。 R^* は、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含む $C_8 \sim C_{30}$ アル

10

20

30

40

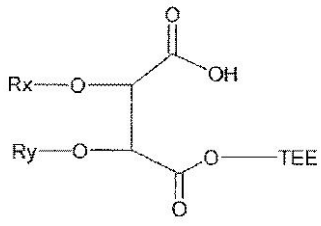
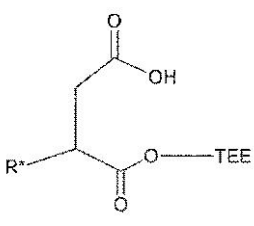
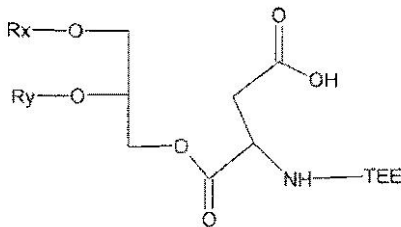
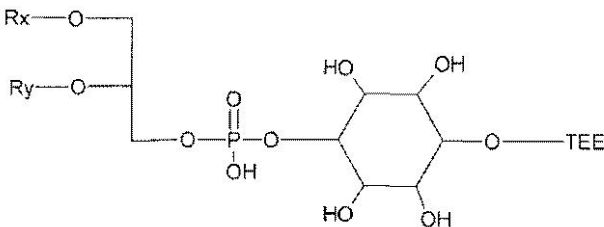
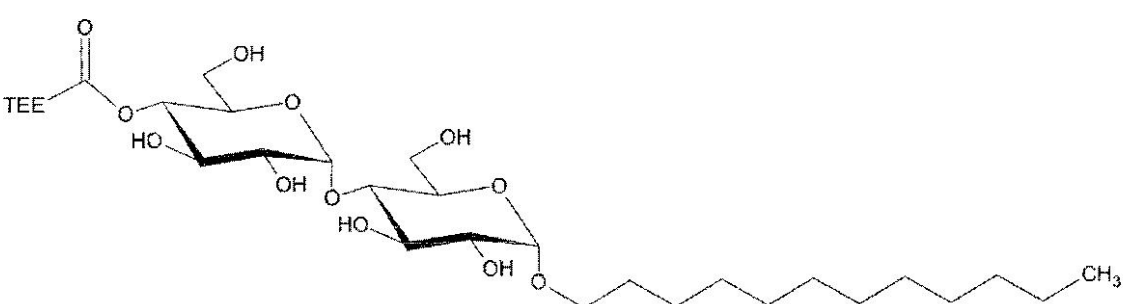
50

キル鎖である。

【0167】

【表18】

表18：化合物50～55

(50) 	(51) 
(52) 	(53) 
(54) $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_a-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-\text{TEE}$ a=8~30、場合によっては不飽和結合を含み、かつb=2~30	
(55) 	

【0168】

本発明のいくつかの変形では、2種以上のTEEを、1種の脂質に結合することができる。

【0169】

2種以上のTEEを含むこのような脂質の化学的表現としては、化合物56～60が挙げられるが、これらに限定されるものではない。RxおよびRyは独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC₈～C₃₀アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいはRxまたはRyの一方は、Hとすることができる。

【0170】

10

20

30

40

【表 19】

表 19 : 化合物 56 ~ 60

(56)	(57)
(58)	(59)
(60)	

10

20

【0171】

30

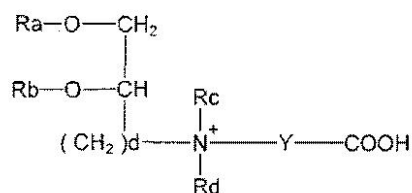
本発明のいくつかの態様では、脂質-TEE（一般式（I）に従う構造）は、次の構造（III）、（IV）、または（V）のうちの一つではない場合がある。

PE-アミド結合-X-COOH（III）

式中、Xは、3～20個の原子の鎖長を有し、様々な飽和度および／またはヘテロ原子組成物および／または置換基、ならびにCOOH-基を有する炭素含有直鎖である；

あるいは

【化25】



(IV)

40

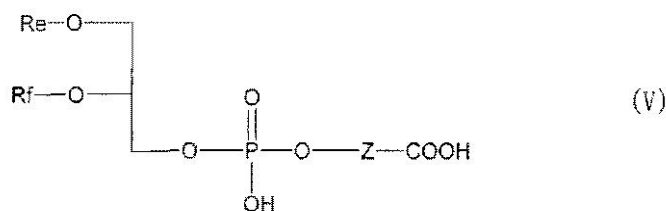
式中、Yは、2～10個のC原子の鎖長を有する直鎖状飽和アルキル鎖であり、R_a、R_b、R_c、およびR_dは独立に、0～6個の不飽和部位を有する直鎖状または分枝状の非置換または置換C₁～₂₃アルキル基、アシル基、アルキレン基、ヘテロアルキル基、環状基、およびアリール基であり、これらの基は、0～5個のヘテロ原子を含み、置換基は、-O-(CH₂)_e-CH₃；-S-(CH₂)_e-CH₃；A-(CH₂)_e（式中、Aはハロゲン化物である）、および-N((CH₂)_e-CH₃)₂であり、置換基の

50

アルキル基は、0～2個のヘテロ原子を含み、eは0～4であり、さらに R_a および R_b は独立に、Hとすることができ、dは1～6であり；

あるいは

【化26】



10

式中、 R_e および R_f は独立に、水素原子、または二重および三重結合を場合によっては含む $C_1 \sim C_{24}$ 直鎖状もしくは分枝状アルキル鎖もしくはアシル鎖であり、Zは、アリール環、3～6個の炭素原子を有するシクロアルキル、ヒドロキシル、および／またはさらなるカルボン酸官能基で場合によっては置換されているもよい、6～20個の炭素原子を有する脂肪族および／または脂環式炭化水素鎖である。

【0172】

本発明の他の態様では、化合物(I I I)、(I V)、または(V)を含む脂質集合体のインビボ、インビトロ、またはエキソビボにおける細胞トランスフェクションのための使用が好ましいことがある。

20

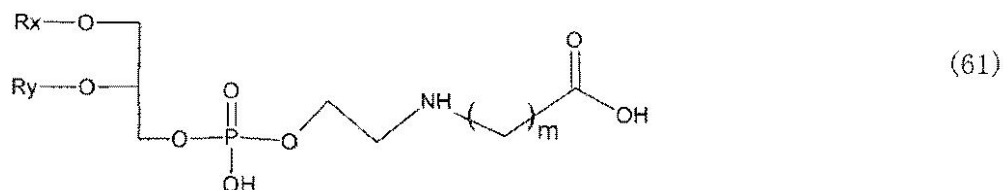
【0173】

本発明によるリン脂質の具体例としては、下記が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0174】

リン脂質およびスフィンゴ脂質：

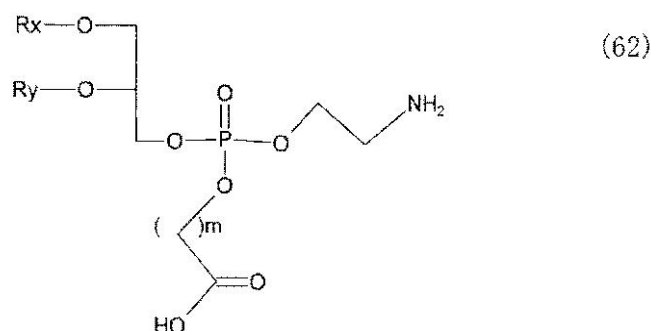
【化27】



30

式中、 R_x および R_y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含む $C_8 \sim C_{30}$ アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいは R_x または R_y の一方は、Hとすることができ、 $m = 6 \sim 40$ である。

【化28】



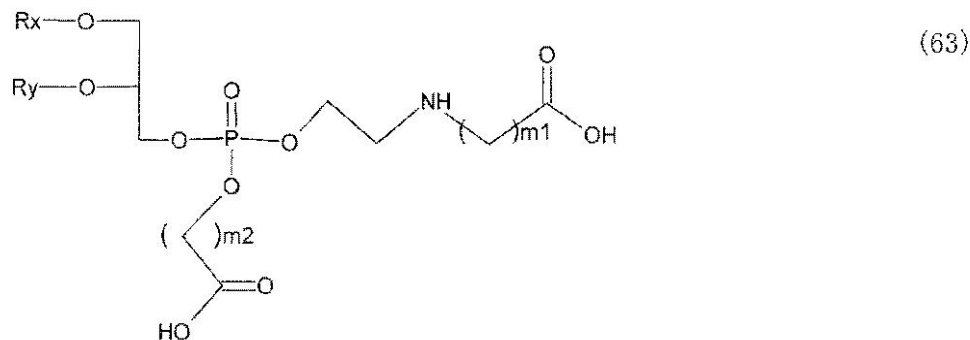
40

式中、 R_x および R_y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含む C_8

50

～C₃₀アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいはR_xまたはR_yの一方は、Hとすることができ、m = 6～40である。

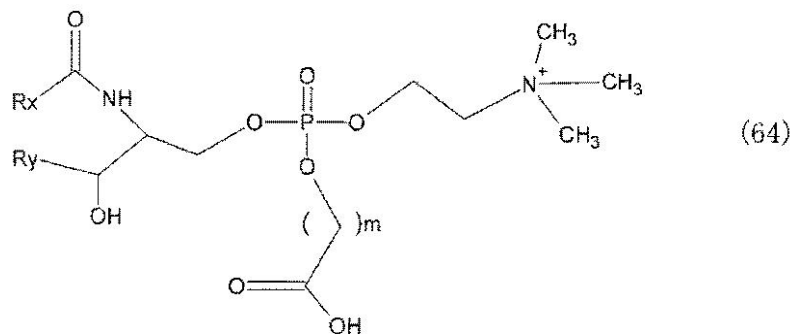
【化29】



10

式中、R₁およびR₂は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC₈～C₃₀アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいはR₁またはR₂の一方は、Hとすることができ、m₁およびm₂は独立に、6～40である。

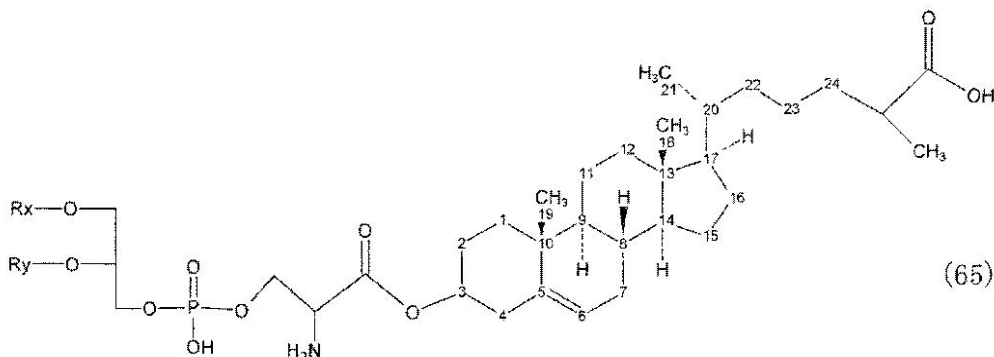
【化30】



20

式中、R_xおよびR_yは独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC₈～C₃₀アルキル鎖であり、あるいはR_xまたはR_yの一方は、Hとすることができ、m = 6～40である。

【化31】



40

式中、R_xおよびR_yは独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC₈～C₃₀アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいはR_xまたはR_yの一方は、Hとすることができる。

【0175】

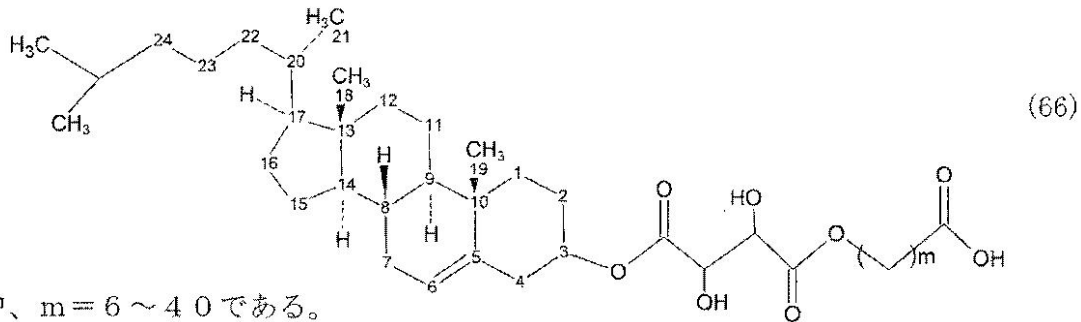
本発明によるステロール系脂質の具体例としては、下記が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0176】

50

ステロール系脂質：

【化 3 2】



式中、 $m = 6 \sim 40$ である。

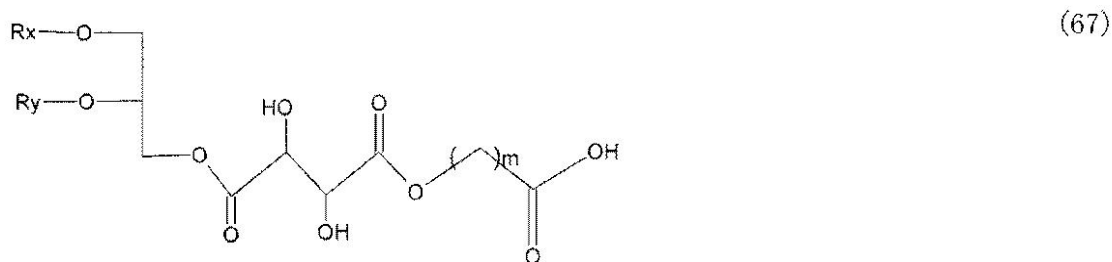
【0 1 7 7】

本発明によるジアシルグリセロール／ジアルキルグリセロール系脂質の具体例としては、下記が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0 1 7 8】

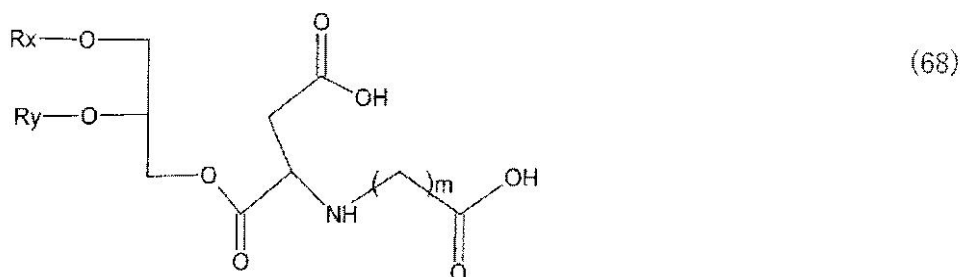
ジアシルグリセロール／ジアルキルグリセロール系脂質：

【化 3 3】



式中、 R_x および R_y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含む $C_8 \sim C_{30}$ アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいは R_x または R_y の一方は、Hとすることができ、 $m = 6 \sim 40$ である。

【化 3 4】



式中、 R_x および R_y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含む $C_8 \sim C_{30}$ アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいは R_x または R_y の一方は、Hとすることができ、 $m = 6 \sim 40$ である。

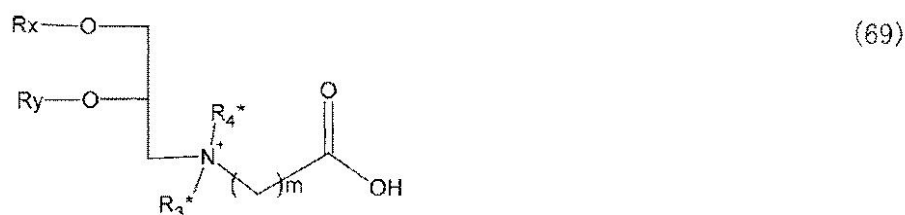
【0 1 7 9】

本発明による1，2-ジアシル-3-アミノプロパン／1，2-ジアルキル-3-アミノプロパン系脂質の具体例としては、下記が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0 1 8 0】

1，2-ジアシル-3-アミノプロパン／1，2-ジアルキル-3-アミノプロパン：

【化 3 5】



10

式中、 R_x および R_y は独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含む $C_8 \sim C_{30}$ アルキル鎖またはアシル鎖であり、あるいは R_x または R_y の一方は、Hとすることができ、 R_{3*} および R_{4*} は独立に、Hまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 $m = 1 \sim 40$ である。

【0181】

上述される1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む脂質を合成する方法には、当業者によく知られており、使用する出発材料およびカップリング成分に応じて異なってもよいカップリング反応が含まれる。典型的反応は、エステル化、アミド化、エーテル化、または還元的アミノ化である。

【0182】

20

特に好ましい分子は、プロセスに従うことによって調製することができるが、これらのカップリング反応に限定されない。

- i) ホスファチジルエタノールアミンによる ω -カルボキシーケトンの還元的アミノ化
- ii) リン脂質、例えばPC、PE、PS中のホスフェート基のエステル化
- iii) ω -ジカルボン酸と脂質の遊離ヒドロキシル基とのエステル化
- iv) ホスファチジルセリンと末端イソプロピル基内にカルボキシル基を有するコレステロール誘導体の3'-ヒドロキシル基とのエステル化
- v) 3-アミノ-1, 2-プロパンジオールジエステルのアミド化またはアルキル化
- vi) ホスファチジルグリセロールの酸化およびその後の還元的アミノ化

【0183】

30

脂質集合体

脂質集合体は、両親媒性分子を含む超分子集合体である。ある態様では、両親媒性物質は、脂質または洗浄剤と呼ばれ、別の態様では、このような物質は、生体膜を形成すること、または生体膜に挿入することが知られている。超分子集合体は、さらに無極性分子からの油を含んでもよい。したがって、本発明の超分子集合体は、様々な粒径およびラメラ性のリポソーム、ミセル、逆ミセル、立方もしくは六方脂質相、渦巻形、エマルジョン、ダブルエマルジョン、または実質的に脂質、油、もしくは両親媒性物質から構築される他の多量体集合体を含む。

【0184】

40

本発明のいくつかの実施形態において、1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む1種または複数の脂質を含む脂質集合体は、中性および／またはカチオン性および／またはアニオン性脂質をさらに含む脂質相から形成することができる。脂質集合体の総電荷は、中性、カチオン性、またはアニオン性とすることができる。

【0185】

本発明に従って脂質集合体を形成するために使用することができる脂質としては、下記の表20および21に記載する脂質が挙げられるが、これらに限定されるものではない。脂質について使用する略語はすべて、主に文献での標準的用法を指し、有用な参照として表20に含まれる。

【0186】

50

本発明の一実施形態において、脂質集合体は、天然または合成ホスファチジルコリン、

ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セラミド、セレブロシド、ステロール系脂質、例えばコレステロール、およびこのような脂質の誘導体を含む群から選択される1種または複数の中性脂質を含む。中性脂質の具体例としては、DMPC、DPPC、DSPC、POPC、DOPC、卵黄PC、ダイズPC、DMPE、DPPE、DSPE、POPE、DOPE、ジフィタノイルPE、スフィンゴミエリン、セラミド、およびコレステロールが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0187】

別の実施形態において、脂質集合体は、1種または複数のカチオン性脂質を単独で、または中性および／もしくはアニオン性脂質と組み合わせて含む。カチオン性脂質としては、DOTAP、DMTAP、DPTAP、DC-Chol、DAC-Chol、DODAP、DOEPC、TC-Chol、DOTMA、DORIE、DDAP、CTAB、CPyC、DPIM、CHIM、MoChol、HisChol、BGSC、BGTC、DOSPER、DOSC、DOGSDO、DmC4Mo2、DmC3Mo2、C3Mo2、C3Mo3、C4Mo4、C5Mo2、C6Mo2、C8Mo2、PipC2Chol、MoC2Chol、MoC3Chol、N-メチル-PipChol、PyrroC2Chol、PyC2Chol、ImC3Chol、PipeC2Chol、およびそれらの誘導体を挙げるができるが、これらに限定されるものではない。

【0188】

本発明のさらに別の実施形態において、脂質集合体は、1種または複数のアニオン性脂質を単独で、または中性および／もしくはカチオン性脂質と組み合わせて含む。アニオン性脂質としては、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、CHEMSおよび別のアニオン性ステロール誘導体、セチルホスフェート、ヘミコハク酸ジアシルグリセロール、およびカルジオリピン、ならびにそれらの誘導体を挙げるができるが、これらに限定されるものではない。具体例としては、DMPG、DPPG、DSPG、DOPG、POPG、DMPS、DPPS、DOPS、POPS、DMPA、DPPA、DOPA、POPA、CHEMS、セチルホスフェート、DMG-Succ、DPG-Succ、DSG-Succ、DOG-Succ、POG-Succ、Chol-スルフェート、Chol-ホスフェートが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0189】

一態様では、本発明で使用するための脂質集合体は、例えばDOPE、リゾ脂質、もしくは遊離脂肪酸などの融合性脂質、または前記融合性脂質と上記の中性および／もしくはカチオン性および／もしくはアニオン性脂質との混合物を含むことができる。

【0190】

驚くべきことに、脂質集合体の融合性に及ぼすTEEを含む脂質の影響は異なってもよく、実施例14に示すように、脂質集合体の形成に使用される中性脂質に依存することが明らかになった。

【0191】

本発明の一実施形態において、1種または複数のTEEを含む1種または複数の脂質を含むリポソームは、ホスファチジルコリン、スフィンゴミレイン、セラミド、もしくはセレブロシド、またはそれらの混合物の群から選択される中性脂質と、コレステロールもしくはホスファチジルエタノールアミン、またはそれらの混合物との混合物から形成され、混合物のモル比は1:3~3:1、好ましくは1:2~2:1である。この実施形態の一態様では、脂質集合体は、さらにアニオン性、カチオン性、もしくは両性脂質、またはそれらの混合物を含んでもよい。しかし、帯電した脂質の存在は、強制ではない。

この実施形態の別の態様では、ホスファチジルコリンとコレステロールの混合物、またはホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンの混合物が好ましい。DSPC、DPPC、DMPC、POPC、またはDOPCから選択されるホスファチジルコリンの1種または複数をDOPEまたはコレステロールの群から選択される1種または複数の脂質と組み合わせて含む組成物がより好ましい。

この実施形態の別の態様では、効率的に細胞をトランスフェクトするために、これらの脂質集合体を使用してもよい。

【0192】

言うまでもなく、当技術分野で知られている脂質集合体を、本発明の T E E を含む脂質と共に使用することができる。このような脂質集合体の一部は、例えば WO 05/105152 ; WO 06/069782 ; Morrissey et al., Nature Biotechnology, 23(8), 1002-1007, 2005 ; WO 05/007196 ; Wheeler et al., Gene Therapy, 6(2), 271-281, 1999 ; WO 02/34236 ; Budker et al., Nature Biotechnology, 14(6), 760-764, 1996 ; US 5,965,434 ; US 5,635,487 ; Spagnou et al., Biochemistry, 43(42), 13348-13356, 2004 ; US 6,756,054 ; WO 06/016097 および US 5,785,992 ; WO 04/035523 に開示されている。

10

【0193】

あるいは、1 種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む 1 種または複数の脂質を含む脂質集合体は、両性特性を有する脂質相から形成することができる。一態様では、前記脂質集合体は両性リボソームである。両性リボソームは、約 pH 7.5 でアニオン電荷または中性電荷を有し、pH 4 でカチオン電荷を有する最近記載されたりリボソームのクラスを表す。WO 02/066490、WO 02/066120、および WO 03/070220 には、両性リボソームおよびそれに適した脂質の詳細な説明が記載されている。

【0194】

本明細書では「両性」は、アニオン性とカチオン性の両方の帯電した基を含む物質、物質の混合物、または超分子複合体（例えば、リボソーム）を意味し、

20

(i) 帯電した基の少なくとも 1 つは、pK が 4 ~ 8 であり、

(ii) カチオン電荷は、pH 4 で優勢であり、かつ

(iii) アニオン電荷は、pH 8 で優勢であり、

pH 4 ~ pH 8 で中性の実効電荷の等電点が生じる。双性イオンは pK が上記の範囲でないので、この定義によれば、両性特性は双性イオン性と異なる。結果として、双性イオンは、様々な pH 値にわたって本質的に中性に帯電する。ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンは、双性イオン性の中性脂質である。

【0195】

本発明のいくつかの実施形態において、前記両性リボソームは、1 種または複数の両性脂質を含む脂質相から形成することができる。

30

【0196】

適当な両性脂質は、WO 02/066489 および WO 03/070735 に開示されている。好ましくは、前記両性脂質は、Hist Chol、Hist DG、isoHist Succ DG、アシルカルノシン、HCC Chol、Hist-PS、および EDTA-Chol からなる群から選択される。

【0197】

さらに別の実施形態において、脂質相は、互いに組み合わせて両性特性を有する複数の帯電した両親媒性物質を含んでもよい。

【0198】

この実施形態の一態様では、前記 1 種または複数の帯電した両親媒性物質は、pH 感受性アニオン性脂質および pH 感受性カチオン性脂質を含む。本明細書で、帯電可能なカチオンと帯電可能なアニオンのこのような組合せは、「両性 I I」脂質対と呼ばれる。好適には、前記帯電可能なカチオンは、pKa 値が約 4 ~ 約 8、好ましくは約 5.5 ~ 約 7.5 である。好適には、前記帯電可能なアニオンは、pKa 値が約 3.5 ~ 約 7、好ましくは約 4 ~ 約 6.5 である。例としては、Mo Chol / CHEMS、DPIM / CHEMS、および DPIM / DG Succ が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0199】

この実施形態の第 2 の態様では、前記 1 種または複数の帯電した両親媒性物質は、安定なカチオンおよび帯電可能なアニオンを含み、「両性 I」脂質対と呼ばれる。例としては、DDAB / CHEMS、DOTAP / CHEMS、DC-Chol / CHEMS、およ

50

びDOTAP/DMGSucc、DODAP/Chems、DODAP/DMGSuccが挙げられるが、これらに限定されるものではない。さらなる例としては、DC-Chol/Chol-C3、DC-Chol/Chol-C5、DC-Chol/Chol-C6、もしくはDC-Chol/Chol-C8、またはカチオンとしてDDAB、DODAP、もしくはDOTAPを使用する類似の組成物を挙げるができる。

【0200】

この実施形態の第3の態様では、前記1種または複数の帯電した両親媒性物質は、安定なアニオンおよび帯電可能なカチオンを含み、「両性III」脂質対と呼ばれる。例としては、MoChol/DOPGおよびMoChol/Chol-SO₄が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0201】

言うまでもなく、両親媒性ジカルボン酸、ホスファチジン酸、両親媒性ピペラジン誘導体など多重電荷をもつ両親媒性物質を使用することが可能である。このような多重帯電した両親媒性物質は、pH感受性両親媒性物質または安定なアニオンもしくはカチオンに入ることができ、あるいは混じり合った特性を有することがある。

【0202】

前記トランスフェクションエンハンサー要素を含有する脂質の量は、好ましくは脂質集合体またはリポソームの全脂質相の0.1%~90%である。一実施形態において、前記トランスフェクションエンハンサー要素を含有する脂質の量は、全脂質相の1%~50%である。別の実施形態において、前記トランスフェクションエンハンサー要素を含有する脂質の量は、脂質集合体またはリポソームの全脂質相の2%~20%である。

20

【0203】

本発明によるリポソームの具体例としては、下記が挙げられるが、これらに限定されない。

【0204】

【化36】

脂質1	脂質2	脂質3	脂質4	TEE-脂質	モル%
POPC	DOPE			Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	22:68:10
POPC	DOPE			Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	17:53:30
POPC		DOTAP	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DOTAP	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	50:10:30:10

30

40

【化 3 7】

POPC	DOPE	MoChol	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	12:38:20:20:10
POPC	DOPE	MoChol	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	5:22:42:21:10
POPC	DOPE	MoChol	DOG-Succ	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	7:20:21:42:10
POPC	DOPE	MoChol	DMG-Succ	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	5:22:21:42:10
	DOPE	MoChol	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	50:20:20:10
POPC		DDAB	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DDAB	Chol-C3	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DDAB	Chol-C5	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10

10

20

30

40

【化 3 8】

POPC		DDAB	Chol-C6	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	
POPC		DDAB	Chol-C8	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	10
POPC		DC- Chol	DMGSucc	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	
POPC		DC- Chol	Chol-C3	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	20
POPC		DC- Chol	Chol-C5	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	
POPC		DC- Chol	Chol-C6	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	30
POPC		DC- Chol	Chol-C8	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	
POPC		DC- Chol	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	40

【化 3 9】

POPC		DODAP	DMGSucc	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	
POPC		DODAP	Chol-C3	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	10
POPC		DODAP	Chol-C5	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	
POPC		DODAP	Chol-C6	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	20
POPC		DODAP	Chol-C8	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	
POPC		DODAP	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	30
Lig-Ly PC		DOTAP	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	
C6-Cer		DOTAP	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたは w12-PEまたはw21-PEまたは w12-DPTAPまたはw16-DPTAPま たはw20-DPTAPまたはw12- Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10	40

【化 4 0】

SM		DC-Chol	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10
POPC		DOTAP	Chems	Pal-PEまたはDeca-PEまたはw12-PEまたはw21-PEまたはw12-DPTAPまたはw16-DPTAPまたはw20-DPTAPまたはw12-Amid-PEまたはw16-Amid-PE	15:28:47:10

10

【0205】

本発明の一実施形態において、脂質集合体の脂質相は、約10～20モル%のホスファチジルコリン、20～35モル%のDC-Chol、40～60モル%のCHEMSまたはDMGSucc、および約5～15モル%のPal-PEまたはDeca-PEを含む。特定の実施形態では、前記集合体はリボソームである。

【0206】

本発明の一実施形態において、脂質集合体の脂質相は、20～90モル%、好ましくは40～80モル%の両性脂質混合物、2～20モル%、好ましくは5～10モル%の1種または複数のTEEを含む1種または複数の脂質、および必要に応じて、適量のホスファチジルコリン、スフィンゴ脂質、ホスファチジルエタノールアミン、またはコレステロールの1種または複数から選択される中性または双性イオン性脂質を含む。好ましくは、1種または複数のTEEを含む前記脂質は、Deca-PE、w12-PE、Pal-PE、w21-PE、w12-DPTAP、w16-DPTAP、w20-DPTAP、w12-Amid-PE、またはw16-Amid-PEの群から選択される。

20

【0207】

この実施形態の一態様では、前記両性脂質混合物は、カチオン性脂質とアニオン性脂質のモル比(C/A比)が好ましくは0.3～0.7である「両性I」脂質対である。好ましくは、前記カチオン性脂質は、DOTAP、DODAP、DDAB、DC-Chol、DAC-Chol、またはTC-Cholの1種または複数から選択され、前記アニオン性脂質は、Chems、DMG-Succ、またはDOG-Succの1種または複数から選択される。より好ましい前記「両性I」脂質対は、次の組合せのうちの1つから選択される。DOTAP/Chems、DOTAP/DMG-Succ、DOTAP/DOG-Succ、DODAP/Chems、DODAP/DMG-Succ、DODAP/DOG-Succ、DDAB/Chems、DDAB/DMG-Succ、DDAB/DOG-Succ、DC-Chol/Chems、DC-Chol/DMG-Succ、DC-Chol/DOG-Succ、DAC-Chol/Chems、DAC-Chol/DMG-Succ、DAC-Chol/DOG-Succ、TC-Chol/Chems、TC-Chol/DMG-Succ、TC-Chol/DOG-Succ。

30

【0208】

この実施形態の第2の態様では、前記両性脂質混合物は、カチオン性脂質とアニオン性脂質のモル比(C/A比)が好ましくは0.3～3である「両性II」脂質対である。好ましくは、前記カチオン性脂質は、MoChol、HisChol、Chim、DmC4Mo2の1種または複数から選択され、前記アニオン性脂質は、Chems、DMG-Succ、またはDOG-Succの1種または複数から選択される。より好ましい前記「両性II」脂質対は、次の組合せのうちの1つから選択される。MoChol/Chems、MoChol/DMG-Succ、HisChol/DOG-Succ、HisCh

40

50

o l / C h e m s 、 H i s C h o l / D M G - S u c c 、 H i s C h o l / D O G - S u c c 、 C h i m / C h e m s 、 C h i m / D M G - S u c c 、 C h i m / D O G - S u c c 、 D m C 4 M o 2 / C h e m s 、 D m C 4 M o 2 / D M G - S u c c 、 D m C 4 M o 2 / D O G - S u c c 。

【0209】

この実施形態の第3の態様では、前記脂質集合体は、好ましくは両性リポソームである。

【0210】

本発明のいくつかの実施形態において、本発明による脂質集合体は、細胞表面の標的受容体に結合する細胞標的リガンドを表面上に含んでもよい。リガンドとしては、抗体またはその断片、糖、ホルモン、ビタミン、a r g - g l y - a s p (R G D) などのペプチド、増殖因子、ビリルビン、トランスフェリン、ホレート、または他の成分を挙げることができるが、これらに限定されない。

10

【0211】

本発明のリポソームは、当業者に知られている適当な方法を使用して製造することができる。このような方法としては、規定孔径の膜に通した押出、封入対象のカーゴを含有する水相へのアルコール性脂質溶液の注入、または高圧均質化が挙げられるが、これらに限定されない。

【0212】

薬物（例えば、オリゴヌクレオチド）の溶液を、中性のpHで脂質相と接触させ、それによって、溶液の一定の割合の体積を封入させることができる。約50mM～約150mMの範囲の高濃度の脂質が、活性剤を実質的に封入するのに好ましい。

20

【0213】

両性リポソームは、核酸をその等電点以下で結合し、それによってこれらの活性剤をリポソーム膜において濃縮する顕著な利点をもたらす。このプロセスは、先端充填手順と呼ばれ、WO 02/066012により詳細に記載されている。

【0214】

本発明の一実施形態において、1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む1種または複数の脂質を含む両性リポソームは、脂質膜押出プロセスと組み合わせて前記先端充填手順を使用することによって調製することができる。簡潔に言えば、脂質を有機溶媒に溶解し、溶媒を蒸発乾固することによって、脂質膜を生成する。例えば核酸を含有するpH<6、好ましくは3～5.5の水相で、脂質膜を水和する。続いて、多重膜リポソーム懸濁液を、規定孔径の膜（例えば、ポリカーボネート）に通して押し出す。その後、懸濁液のpHを>7に上げる。

30

【0215】

本発明の別の実施形態において、1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む1種または複数の脂質を含む両性リポソームは、例えば核酸を含有する水相へのアルコール性脂質溶液の注入と組み合わせて前記先端充填手順を使用することによって調製する。このプロセスは、複数のステップを含むことができる。

40

a) 脂質混合物を水混和性溶媒、好ましくはアルコールにとかした溶液を準備するステップ、ただし前記溶液は、場合によっては酸性化してもよい。

b) 核酸薬物の水溶液を準備するステップ、ただし前記溶液は、場合によっては酸性化してもよい。

a) およびb) の溶液の少なくとも1つは、pH<6、好ましくはpH3～5.5に酸性化しなければならない。

c) 1種または複数の混合装置を場合によっては使用して、脂質混合物のアルコール性溶液を核酸の水溶液に、またはその逆に核酸の水溶液を脂質混合物のアルコール性溶液に注入することによって、あるいはa) およびb) の溶液の2つの制御流れを組み合わせることによって、規定量のa) およびb) の溶液を混合するステップ。

d) 任意選択である希釈ステップ。

50

e) pHを7より高くすることによって、またはイオン強度を高め、続いてpHを7より高くすることによって、両性リボソームと核酸との間の相互作用を解消するステップ。

f) 封入されていない薬物を除去し、かつ／またはリボソーム懸濁液を濃縮し、かつまたは水相を変え、かつ／または水混和性溶媒を除去するステップ、ただしこれらのステップはそれぞれ独立に、任意選択である。

g) 任意選択であるリボソームの無菌化濾過ステップ。

【0216】

ステップc)とd)の間、および／またはステップd)とe)の間、および／またはステップe)とf)の間、および／またはステップf)とg)の間で、リボソームの押出をプロセスの一部とすることができる。

10

ステップe)とf)の間、および／またはステップf)およびg)の間で、リボソームの1種または複数の凍結／融解サイクルをプロセスの一部とすることができる。

【0217】

ステップg)の後、リボソームの1種もしくは複数の凍結／融解サイクルおよび／または凍結乾燥をプロセスの一部とすることができる。

【0218】

好ましくは、前記アルコールは、場合によっては緩衝液または酸を使用して酸性化されたエタノール、プロパノール、またはイソプロパノールから選択することができるが、これらに限定されない。

【0219】

20

先端充填手順で使用する酸性溶液のpHを、アセテート緩衝液またはシトレート緩衝液のような既知の緩衝物質で調整することがある。あるいは、pHは、酸（例えば、HCl、酢酸、またはクエン酸）を使用して調整することがある。好ましくは、酢酸、クエン酸、またはグリシンのような医薬として許容される緩衝液を使用する。

【0220】

本発明のリボソームを作製するために使用した実際の生成方法にかかわらず、いくつかの実施形態において、封入されていない薬物は、リボソームが気密容器として形成される最初の生成ステップの後に、リボソームから除去することができる。さらに、本明細書に含まれている技術文献および参考文献には、このような方法が詳細に記載されており、適当なプロセスステップとしては、サイズ排除クロマトグラフィー、沈降、透析、限外濾過、および透析濾過を挙げることができるが、これらに限定されない。

30

【0221】

しかし、本発明の実行には、いずれの封入されていない薬物の除去も必要でなく、いくつかの実施形態において、リボソーム組成物は、遊離の薬物も封入された薬物も含むことができる。

【0222】

本発明によるリボソームは、ユニラメラ、オリゴラメラ、またはマルチラメラとすることができる。

【0223】

本発明の一態様では、リボソームの粒径は、50～1000nm、好ましくは50～500nm、より好ましくは70～250nmで異なってもよい。

40

他の態様では、リボソームの粒径は、70～150nmで異なってもよく、さらに他の態様では、リボソームの粒径は、130～250nmで異なってもよい。

【0224】

表20：脂質の略語は、主に文献での標準的用法を指し、有用な参照としてここに含まれる。

【0225】

【表 20-1】

DMPC	ジミリストイルホスファチジルコリン	
DPPC	ジパルミトイルホスファチジルコリン	
DSPC	ジステアロイルホスファチジルコリン	
POPC	パルミトイル-オレオイルホスファチジルコリン	
DOPC	ジオレオイルホスファチジルコリン	
Lig-Ly PC	1-リグノセロイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン	
C6-Cer	N-ヘキサノイル-D-エリスロースフィンゴシン	
SM	スフィンゴミエリン	10
DOPE	ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン	
DMPE	ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン	
DPPE	ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン	
ジフィタノリ-PE	ジフィタノリホスファチジルエタノールアミン	
DOPG	ジオレオイルホスファチジルグリセロール	
POPG	パルミトイル-オレオイルホスファチジルグリセロール	
DMPG	ジミリストイルホスファチジルグリセロール	
DPPG	ジパルミトイルホスファチジルグリセロール	
DMPs	ジミリストイルホスファチジルセリン	
DPPs	ジパルミトイルホスファチジルセリン	20
DOPS	ジオレオイルホスファチジルセリン	
POPS	パルミトイル-オレオイルホスファチジルセリン	
DMPA	ジミリストイルホスファチジン酸	
DPPA	ジパルミトイルホスファチジン酸	
DOPA	ジオレオイルホスファチジン酸	
POPA	パルミトイル-オレオイルホスファチジン酸	
DMPI	ジミリストイルホスファチジルイノシトール	
DPPI	ジパルミトイルホスファチジルイノシトール	
DOPI	ジオレオイルホスファチジルイノシトール	
POPI	パルミトイル-オレオイルホスファチジルイノシトール	30
Chol	コレステロール	
CHEMS	コレステロールヘミスクシネート	
Chol-C3	コレステロールヘミマロネート	
Chol-C5	コレステロールヘミグルタレート	
Chol-C6	コレステロールヘミアジペート	
Chol-C8	コレステロールヘミスベレート	
Chol-スルフェート	コレステロールスルフェート	
Chol-ホスフェート	コレステロールホスフェート	
DC-Chol	3-β-[N-(N', N'-ジメチルエタン)カルバモイル]コレステロール	40
Cet-P	セチルホスフェート	
DODAP	(1, 2)-ジオレオイルオキシプロピル)-N, N-ジメチルアンモニウムクロリド	
DOEPC	1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン	
DAC-Chol	3-β-[N-(N, N'-ジメチルエタン)カルバモイル]コレステロール	
TC-Chol	3-β-[N-(N', N', N'-トリメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール	

【表 20-2】

DOTMA	(1, 2-ジオレイルオキシプロピル) -N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド (Lipofectin (登録商標))	
DOGS	((C18) 2GlySper3+) N, N-ジオクタデシルアミド-グリシルスペルミン (Transfectam (登録商標))	
CTAB	セチルトリメチルアンモニウムブロミド	
CPyC	セチルピリジニウムクロリド	
DOTAP	(1, 2-ジオレイルオキシプロピル) -N, N, N-トリメチルアンモニウム塩	10
DMTAP	(1, 2-ジミリストイルオキシプロピル) -N, N, N-トリメチルアンモニウム塩	
DPTAP	(1, 2-ジパルミトイルオキシプロピル) -N, N, N-トリメチルアンモニウム塩	
DOTMA	(1, 2-ジオレイルオキシプロピル) -N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド	
DORIE	(1, 2-ジオレイルオキシプロピル) -3 ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド	
DDAB	ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド	20
DPIM	4-(2, 3-ビス-パルミトイルオキシプロピル) -1-メチル-1H-イミダゾール	
CHIM	ヒスタミル-コレステロールカルバメート	
MoChol	4-(2-アミノエチル) -モルホリノ-コレステロールヘミスクシネート	
DmC4Mo2	4-(2-アミノエチル) -モルホリノ-コレステロール-2, 3-ジメチルヘミスクシネート	
DmC3Mo2	4-(2-アミノエチル) -モルホリノ-コレステロール-2, 2-ジメチルヘミマロネート	
C3Mo2	4-(2-アミノエチル) -モルホリノ-コレステロールヘミマロネート	30
C3Mo3	4-(2-アミノプロピル) -モルホリノ-コレステロールヘミマロネート	
C4Mo4	4-(2-アミノブチル) -モルホリノ-コレステロールヘミスクシネート	
C5Mo2	4-(2-アミノエチル) -モルホリノ-コレステロールヘミグルタレート	
C6Mo2	4-(2-アミノエチル) -モルホリノ-コレステロールヘミアジペート	
C8Mo2	4-(2-アミノエチル) -モルホリノ-コレステロールヘミアジペート	40
PipC2Chol	4 {N-2-エチルアミノ [(3' -β-コレステリル) カルバモイル] } ピペラジン	
MoC2Chol	{N-2-エチルアミノ [(3' -β-コレステリル) カルバモイル] } モルホリン	
MoC3Chol	{N-2-プロピルアミノ [(3' -β-コレステリル) カルバモイル] } モルホリン	
N-メチル-PipChol	N-メチル {4-N-アミノ [(3' -β-コレステリル) カルバモイル] } ピペラジン	

【表 20-3】

Pyrr oC2Chol	{N-2-エチルアミノ [(3'-β-コレステリル) カルバモイル] } ピロリジン	
PipeC2Chol	{N-2-エチルアミノ [(3'-β-コレステリル) カルバモイル] } ピペリジン	
ImC3Chol	{N-2-プロピルアミノ [(3'-β-コレステリル) カルバモイル] } イミダゾール	
PyC2Chol	{N-2-エチルアミノ [(3'-β-コレステリル) カルバモイル] } ピリジン	
HisChol	ヒスタミニル-コレステロールヘミスクシネート	10
HCChol	Nα-ヒスチジニル-コレステロールカルバメート	
HistChol	Nα-ヒスチジニル-コレステロールヘミスクシネート	
AC	アシルカルノシン、ステアリル- & パルミトイルカルノシン	
HistDG	1, 2-ジパルミトイルグリセロールヘミスクシネート-N-ヒスチジニルヘミスクシネート、& ジステアロイル-、ジミリストイル、ジオレオイル、またはパルミトイル-オレオイル誘導体	
IsoHistSucc DG	1, 2-イパルミトイルグリセロール-O-ヒスチジニル-Nα-ヘミスクシネート、& ジステアロイル-、ジミリストイル、ジオレオイル、またはパルミトイル-オレオイル誘導体	20
DGSucc	1, 2-ジパルミトイルグリセロール-3-ヘミスクシネート、& ジステアロイル-、ジミリストイル-、ジオレオイル、またはパルミトイル-オレオイル誘導体	
EDTA-Chol	エチレンジアミン四酢酸のコレステロールエステル	
Hist-PS	Nα-ヒスチジニル-ホスファチジルセリン	
BGSC	ビスグアニジニウム-スペルミジン-コレステロール	
BGTC	ビスグアニジニウム-トレン-コレステロール	
DOSPER	(1, 3-ジオレオイルオキシ-2-(6-カルボキシ-スベルミル)-プロピルアミド	30
DOSC	(1, 2-ジオレオイル-3-スクシニル-s n-グリセリルコリンエステル)	
DOGSDO	(1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-スクシニル-2-ヒドロキシエチルジスルフィドオルニチン)	
DOGSuccまたはD OGS	1, 2-ジオレオイルグリセロール-3-ヘミスクシネート	
POGSuccまたはP OGS	パリムトリル-オレオイルグリセロール-オレオイル-3-ヘミスクシネート	
DMGSuccまたはD MGS	1, 2-ジミリストイルグリセロール-3-ヘミスクシネート	40
DPGSuccまたはD PGS	1, 2-ジパルミトイルグリセロール-3-ヘミスクシネート	
DOGM	ジオレオイルグリセロールヘミマロネート	
DOGG	ジオレオイルグリセロールヘミグルタレート	
DOGA	ジオレオイルグリセロールヘミアジペート	
DMGM	ジミリストイルグリセロールヘミマロネート	
DMGG	ジミリストイルグリセロールヘミグルタレート	
DMGA	ジミリストイルグリセロールヘミアジペート	

【表 20-4】

DOAS	4- { (1, 2-ジオレオイル-エチル) アミノ } -4-オキソブタン酸	
DOAM	4- { (1, 2-ジオレオイル-エチル) アミノ } -4-オキソプロパン酸	
DOAG	4- { (1, 2-ジオレオイル-エチル) アミノ } -4-オキソペンタン酸	
DOAA	4- { (1, 2-ジオレオイル-エチル) アミノ } -4-オキソヘキサン酸	10
DMA S	4- { (1, 2-ジミリストイル-エチル) アミノ } -4-オキソブタン酸	
DMAM	4- { (1, 2-ジミリストイル-エチル) アミノ } -4-オキソプロパン酸	
DMAG	4- { (1, 2-ジミリストイル-エチル) アミノ } -4-オキソペンタン酸	
DMAA	4- { (1, 2-ジミリストイル-エチル) アミノ } -4-オキソヘキサン酸	
DOS	5, 6-ジオレオイル-ヘキサン酸	20
DOM	4, 5-ジオレオイル-ペンタン酸	
DOG	6, 7-ジオレオイル-ヘプタン酸	
DOA	7, 8-ジオレオイル-オクタン酸	
DMS	5, 6-ジミリストイル-ヘキサン酸	
DMM	4, 5-ジミリストイル-ペンタン酸	
DMG	6, 7-ジミリストイル-ヘプタン酸	
DMA	7, 8-ジオレオイル-オクタン酸	
Pal-PEまたはw 16-PE	16- { 2- [2, 3-ビス-ヘキサデカノイルオキシ-プロポキシ] -ヒドロキシ-ホスホリル-オキシ } -エチルアミノ } -ヘキサデカン酸	30
Deca-PEまたはw 10-PE	10- { 2- [2, 3-ビス-ヘキサデカノイルオキシ-プロポキシ] -ヒドロキシ-ホスホリル-オキシ } -エチルアミノ } -デカン酸	
w 6-PE	6- { 2- [2, 3-ビス-ヘキサデカノイルオキシ-プロポキシ] -ヒドロキシ-ホスホリル-オキシ } -エチルアミノ } -ヘキサン酸	
w 12-PE	12- { 2- [2, 3-ビス-ヘキサデカノイルオキシ-プロポキシ] -ヒドロキシ-ホスホリル-オキシ } -エチルアミノ } -ドデカン酸	
w 21-PE	21- { 2- [2, 3-ビス-ヘキサデカノイルオキシ-プロポキシ] -ヒドロキシ-ホスホリル-オキシ } -エチルアミノ } -ヘニコサン酸	40
w 6-DPATP	ヘキサデカン酸 1- { [(5-カルボキシ-ペンチル) -ジメチル-アンモニウム] メチル-2-ヘキサデカノイルオキシ-エチルエステル	
w 12-DPTAP	ヘキサデカン酸 1- { [(11-カルボキシ-ウンデシル) -ジメチル-アンモニウム] メチル-2-ヘキサデカノイルオキシ-エチルエステル	

【表 20-5】

w16-DPTAP	ヘキサデカン酸1- { [(15-カルボキシ-ペンタデシル) -ジメチル-アンモニウム] メチル-2-ヘキサデカノイルオキシ-エチルエステル	
w20-DPTAP	ヘキサデカン酸1- { [(19-カルボキシ-ノナデシル) -ジメチル-アンモニウム] メチル-2-ヘキサデカノイルオキシ-エチルエステル	
w16-Amid-PE	ヘキサデカン酸3- { [2- (15-カルボキシ-ペンタデカノイルアミノ) -エトキシ] -ヒドロキシ-ホスホリルオキシ} -2-ヘキサデカノイルオキシ-プロピルエステル	10
w5-Amid-PE	ヘキサデカン酸3- { [2- (4-カルボキシ-ブタノイルアミノ) -エトキシ] -ヒドロキシ-ホスホリルオキシ} -2-ヘキサデカノイルオキシ-プロピルエステル	
w12-Amid-PE	ヘキサデカン酸3- { [2- (11-カルボキシ-ウンデカノイルアミノ) -エトキシ] -ヒドロキシ-ホスホリルオキシ} -2-ヘキサデカノイルオキシ-プロピルエステル	
C6-PE	ヘキサデカン酸2-ヘキサデカノイルオキシ-3- [(2-ヘキサノイルアミノ-エトキシ) -ヒドロキシ-ホスホリルオキシ] -プロピルエステル	20
C12-PE	ヘキサデカン酸2-ヘキサデカノイルオキシ-3- [(2-ドデカノイルアミノ-エトキシ) -ヒドロキシ-ホスホリルオキシ] -プロピルエステル	
C16-PE	ヘキサデカン酸2-ヘキサデカノイルオキシ-3- [(2-ヘキサデカノイルアミノ-エトキシ) -ヒドロキシ-ホスホリルオキシ] -プロピルエステル	
C20-PE	ヘキサデカン酸2-ヘキサデカノイルオキシ-3- [(2-エイコサノイルアミノ-エトキシ) -ヒドロキシ-ホスホリルオキシ] -プロピルエステル	
NBD-PE	N- (7-ニトロベンズ-2-オキサー-1, 3-ジアゾール (diazol) -4-イル) -1, 2-ジヘキサデカノイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、トリエチルアンモニウム塩	30
ローダミン-PE	Lissamine (商標) ローダミンB 1, 2-ジヘキサデカノイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン・トリエチルアンモニウム塩	

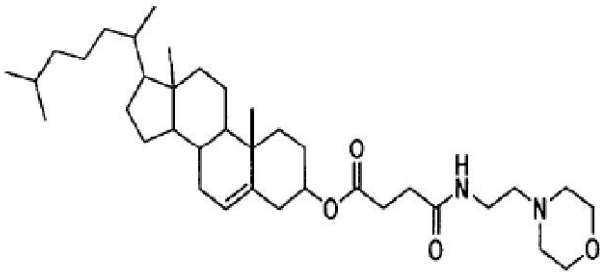
【0226】

表 21：本発明による組成物での使用に適した脂質の例（ただし、これらに限定されるものではない）。脂質の膜アンカーの例を示すが、本発明の脂質を例示するものにすぎず、それを限定するものではない。

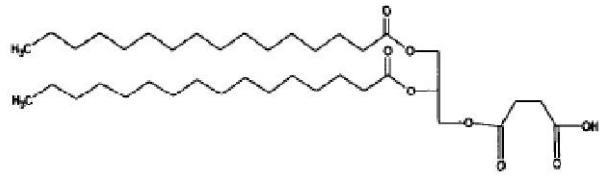
【0227】

【表 2 1】

MoChol

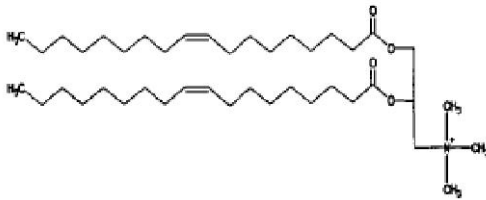


DG-Succ

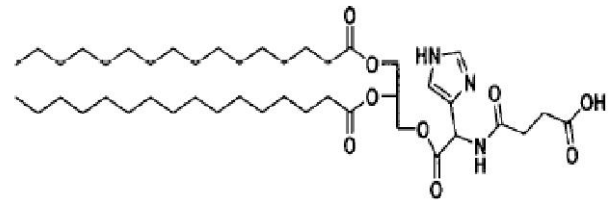


10

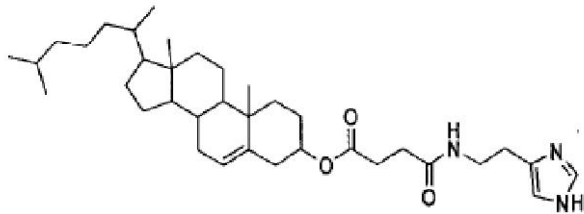
DOTAP



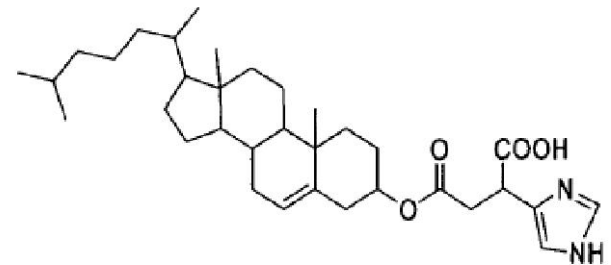
IsohistsuccDG



HisChol

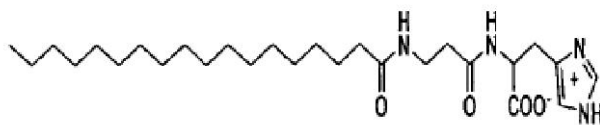


HCChol

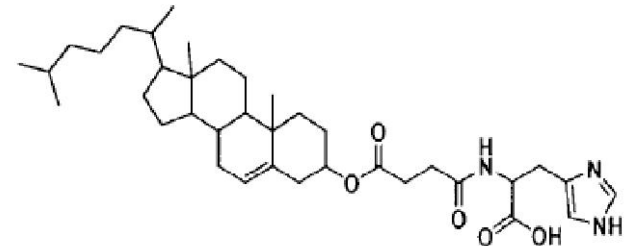


20

AC

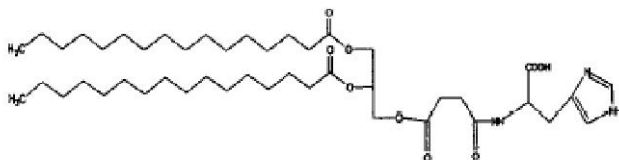


Hist-Chol



30

Hist-DG



40

【0228】

トランスフェクション

本発明によれば、インビトロ、インビボ、またはエキソビボで細胞をトランスフェクトするために、トランスフェクションエンハンサー要素を含む脂質を含む脂質集合体を使用してもよい。このような使用に限定することなく、本発明に記載する脂質集合体（例えば、リポソーム）は、例えばオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、およびDNAプラスミドなど核酸系薬物のための担体としての使用によく適している。これらの薬物は、タン

50

パク質、ポリペプチド、またはRNAのための1種または複数の特定配列をコードする核酸、ならびにタンパク質発現レベルを特異的に制御し、またはとりわけスプライシングおよび人為的切断との干渉によってタンパク質構造に影響を及ぼすことができるオリゴヌクレオチドに分類される。

【0229】

したがって、本発明のいくつかの実施形態において、核酸系治療薬は、脊椎動物細胞において1種または複数のRNAへと転写されることが可能な核酸を含んでもよく、これらのRNAは、mRNA、shRNA、miRNA、またはリボザイムとすることができ、このようなmRNAは1種または複数のタンパク質またはポリペプチドをコードする。このような核酸治療薬は、環状DNAプラスミド、WO 98/21322もしくはDE 19753182に開示されるMIDGEベクター (Minimalistic Immunogenically Defined Gene Expression) のような直鎖DNA構築物、または翻訳の準備ができているmRNA (例えば、EP 1392341) とすることができる。

【0230】

本発明の別の実施形態において、現存する細胞内核酸またはタンパク質を標的にすることができるオリゴヌクレオチドを使用してもよい。前記核酸は、前記オリゴヌクレオチドが、転写を減衰もしくは調節し、転写物のプロセッシングを改変し、またはその他の方法でタンパク質の発現に干渉するように適合されるように、特定の遺伝子をコードすることができる。「標的核酸」という用語は、特定の遺伝子をコードするDNA、およびこのようなDNAに由来するすべてのRNA (mRNA前駆体またはmRNAである) を包含する。標的核酸と、このような配列に向けられた1種または複数のオリゴヌクレオチドとの特定のハイブリッド形成によって、タンパク質発現の抑制または調節をもたらすことができる。このような特定の標的化を実現するために、オリゴヌクレオチドは、好適には標的核酸の配列に実質的に相補である一続きのヌクレオチドを含むべきである。

【0231】

上記の基準を満たすオリゴヌクレオチドは、いくつかの異なる化学的性質および立体的配置で構築される可能性がある。オリゴヌクレオチドは、DNA、RNA、ロック核酸 (LNA)、2'-O-メチルRNA (2'-Ome)、2'-O-メトキシエチルRNA (2'-MOE) (それらのホスフェートもしくはホスホチオエートの形)、またはモルホリノもしくはペプチド核酸 (PNA) を含む (ただし、これらに限定されるものではない) 天然または修飾ヌクレオシドを含んでもよい。オリゴヌクレオチドは、一本鎖でも、二本鎖でもよい。

【0232】

オリゴヌクレオチドは、8~60個の電荷を有するポリアニオン性構造である。大部分の場合、これらの構造は、ヌクレオチドを含むポリマーである。本発明は、オリゴヌクレオチドの特定の作用機序に限定されず、機序の理解は本発明を実施するのに必要ではない。

【0233】

オリゴヌクレオチドの作用機序は異なってもよく、とりわけスプライシング、転写、核一細胞質輸送、および翻訳に及ぼす効果を含む可能性がある。

【0234】

本発明の好ましい実施形態において、一本鎖オリゴヌクレオチドを使用することができ、これには、一般的にアンチセンスオリゴヌクレオチドと呼ばれるDNA系オリゴヌクレオチド、ロック核酸、2'-修飾オリゴヌクレオチドなどが挙げられるが、これらに限定されない。主鎖または塩基または糖修飾としては、ホスホチオエートDNA (PTO)、2'-O-メチルRNA (2'-Ome)、2'-フルオロRNA (2'-F)、2'-O-メトキシエチルRNA (2'-MOE)、ペプチド核酸 (PNA)、N3'-P5' ホスホアミデート (NP)、2'-フルオロアラビノ核酸 (FANA)、ロック核酸 (LNA)、モルホリンホスホアミデート (モルホリノ)、シクロヘキセン核酸 (CeNA)、トリシクロ-DNA (tcDNA) などを挙げることができるが、これらに限定されない。さら

に、混成した化学的性質は当技術分野で知られており、コポリマー、ブロックコポリマー、もしくはギャップマーとして、または他の配置で2種以上のヌクレオチド種から構築される。

【0235】

上記のオリゴヌクレオチドに加えて、相補的配列モチーフを含む二本鎖RNA分子を使用して、タンパク質発現を抑制することもできる。このようなRNA分子は、当技術分野でsiRNA分子と呼ばれる（例えば、WO 99/32619またはWO 02/055693）。他のsiRNAは、一本鎖siRNA、または1本の非連続鎖を有する二本鎖siRNAを含む。この場合も、様々な化学的性質をこのクラスのオリゴヌクレオチドに適合させた。また、DNA/RNAハイブリッド系が当技術分野で知られている。

10

【0236】

本発明の別の実施形態において、デコイオリゴヌクレオチドを使用することができる。これらの二本鎖DNA分子およびその化学修飾体は、核酸ではなく転写因子を標的にする。これは、デコイオリゴヌクレオチドが、配列特異的DNA結合タンパク質と結合し、転写に干渉する（例えば、Cho-Chung, et al. in Curr. Opin. Mol. Ther., 1999）。

【0237】

本発明の別の実施形態において、遺伝子のプロモーター領域と生理的条件下でハイブリッド形成することによって転写に影響を及ぼすことができるオリゴヌクレオチドを使用してもよい。この場合も、様々な化学的性質をこのクラスのオリゴヌクレオチドに適合させることができる。

20

【0238】

本発明のさらに別の代替形態において、DNAザイムを使用してもよい。DNAザイムは、一本鎖オリゴヌクレオチド、および酵素活性によるその化学修飾体である。「10-23」モデルと呼ばれる典型的なDNAザイムは、生理的条件下で一本鎖RNAを特定部位で切断することができる。DNAザイムの10-23モデルは、RNA上の標的配列に相補的な2個の基質認識ドメインで両側を挟まれた、15個の高度に保存されたデオキシリボヌクレオチドの触媒ドメインを有する。標的mRNAの切断は、その破壊をもたらす可能性があり、DNAザイムは複数の基質を再生利用および切断する。

【0239】

さらに本発明の別の実施形態において、リボザイムを使用することができる。リボザイムは、一本鎖オリゴリボヌクレオチド、および酵素活性によるその化学修飾体である。これらは、触媒コアを形成する保存されたステムループ構造と、および所与のRNA転写物の標的部位を取り囲む配列に逆相補であるフランキング配列の2つの成分に分けることができる。フランキング配列は、特異性を付与することができ、一般に、選択される標的部位の両側に伸びる合計で14~16 ntを構成する。

30

【0240】

本発明のさらに別の実施形態において、タンパク質を標的にするために、アプタマーを使用してもよい。アプタマーは、RNAまたはDNAなどの核酸、および特定の分子標的に密接に結合するその化学修飾体から構成された巨大分子であり、典型的には15~60 ntの長さである。ヌクレオチド鎖は、分子を複雑な三次元形状に折り畳む分子内相互作用を形成することができる。アプタマーの形状によって、酸性タンパク質、塩基性タンパク質、膜タンパク質、転写因子、および酵素が挙げられるが、これらに限定されるものではない標的分子の表面への密接な結合が可能になる。アプタマー分子の結合は、標的分子の機能に影響を及ぼすことができる。

40

【0241】

上記のオリゴヌクレオチドはすべて、1本の鎖当たりのヌクレオチド長がわずか5、好ましくは8~50の間で異なってもよい。より具体的には、オリゴヌクレオチドは、その標的配列のRNAseH媒介分解を触媒し、または翻訳を阻止し、またはスプライシングを再指示し、またはアントゴmir (antogomir) として作用する、8~50のヌクレオチド長を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドとすることができる。これらは

50

、15～30の塩基対長を有するsiRNAとすることができる。これらは、さらに15～30の塩基対長を有するデコイオリゴヌクレオチドを表すことができ、15～30のヌクレオチド長を有するゲノムDNAの転写に影響を及ぼす相補的オリゴヌクレオチドとすることができる。これらは、さらに25～50のヌクレオチド長さを有するDNAザイム、または25～50のヌクレオチド長を有するリボザイム、または15～60のヌクレオチド長を有するアプタマーを表すことができる。オリゴヌクレオチドのこのような下位クラスは、機能的に定義されることが多く、同一でも、異なってもよく、あるいは本発明の教示に実質的に影響を及ぼすことなく、それらの化学的性質または構造の一部ではあるが全部ではない特性を共有することができる。オリゴヌクレオチドと標的配列との適合は、一続きの上記のいくつかのオリゴヌクレオチド全体にわたって標的核酸上のその相補的塩基と塩基対を形成するオリゴヌクレオチドの各塩基では、完全であることが好ましい。あまり好ましくはないが、配列の対には、前記一続きの塩基対内に1個または複数のミスマッチが含まれている可能性がある。一般に、このような核酸のタイプおよび化学組成は、インビボであろうとインビトロであろうと、ビヒクルとしての本発明のリボソームの性能にほとんど影響を及ぼさず、当業者は、本発明の脂質集合体との組合せに適した他のタイプのオリゴヌクレオチドまたは核酸を見い出すことができる。

10

【0242】

本発明の一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、腫瘍標的に向けられている。好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、CEACAM6、BCL-2、EPHA2、CTNNB1、RhoA、PLK1、XIAP、テロメラーゼ、サイクリンD1、K-Ras、EG5、Ki67、アンドロゲン受容体、FoxM1、Akt1、VEGF、KSB、CDC25Bを含む群から選択される腫瘍標的に向けられている。PLK1、RhoA、EG5、FoxM1、CDC25BまたはKi67に向けられたオリゴヌクレオチドが特に好ましい。

20

【0243】

本発明の別の態様は、1種または複数のトランスフェクションエンハンサー要素を含む1種または複数の脂質を含む脂質集合体を、核酸薬物などの薬物を含めて、活性剤または材料、例えばオリゴヌクレオチドおよびプラスミドの標的送達のための担体として含む医薬組成物に関する。本発明の医薬組成物は、適当な薬理学的に許容されるビヒクル中で製剤することができる。このために、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などのビヒクルは、当業者によく知られている。

30

【0244】

いくつかの実施形態において、ヒトまたは非ヒト動物の炎症性、免疫もしくは自己免疫障害、および／または癌の治療または予防のための前記医薬組成物を使用してもよい。

【0245】

本発明のさらに別の態様は、トランスフェクションエンハンサー要素をその膜中に含む脂質を有するリボソームを活性剤または材料のための担体として含む前記医薬組成物が特定の1つもしくは複数の臓器、腫瘍、または感染もしくは炎症の部位を標的にする、ヒトまたは非ヒト動物の治療方法に関する。

【図面の簡単な説明】

40

【0246】

【図1】化合物10～14についてのlogD応答を示す図である。

【図2】TEE構造中の異なる親水性物質について、logDとpHの関係を示す図である。すべての親水性部分は、アルキル鎖の末端部に位置している。LogDは、pKaとおおよそ等しいpH値で下降し始め、このような下降は、生理的イオン強度でのイオン対形成によって制限される。

【図3】TEE構造中の異なる親水性物質について、pH-pKaをx軸として使用するlogDの標準化曲線を示す図である。すべての親水性部分は、アルキル鎖の末端部に位置している。3-クロロオクタン酸はオクタン酸と同一であり、図示していない。

【図4】logDの増分対pHの分析を示す図である。個々の親水性部分のpKaから独

50

立している共通のディスクリプタとして $pH-pK_a$ を使用して、曲線を標準化した。

【図 5】製剤 L-1、L-2、および L-3 でトランスフェクトされた HeLa 細胞の 24 時間後の蛍光顕微鏡画像を示す図である (40 倍) (倍率: 400 倍)。

【図 6】製剤 L-4、L-5、および L-6 でトランスフェクトされた HeLa 細胞の 24 時間後の蛍光顕微鏡画像を示す図である (40 倍) (倍率: 400 倍)。

【図 7】製剤 L-7 ~ L-10 でトランスフェクトされた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像を示す図である (40 倍) (倍率: 400 倍)。

【図 8】製剤 L-12 ~ L-15 でトランスフェクトされた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像を示す図である (40 倍) (倍率: 400 倍)。

【図 9】製剤 L-17 ~ L-20 でトランスフェクトされた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像を示す図である (40 倍) (倍率: 400 倍)。

【図 10】製剤 L-21 ~ L-24 でトランスフェクトされた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像を示す図である (40 倍) (倍率: 400 倍)。

【図 11】遊離カルボキシフルオレセイン (C1) またはアニオン性のリポソーム標準製剤 (DPPC: DPPG: Chol 50:10:40) (C2) でトランスフェクトされた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像を示す図である (10 倍) (倍率: 100 倍)。

【図 12】リポソーム製剤 L-25 および L-26 を静脈内注射した担腫瘍マウスの腫瘍組織の凍結切片を示す図である。

【図 13】処置群 L-46 (Plk1)、L-47 (scr)、および生理食塩水の試験期間にわたる腫瘍体積を示す図である。

【図 14】試験の終わりに動物を屠殺した後の処置群 L-46 (Plk1)、L-47 (scr)、および生理食塩水の最終腫瘍重量を示す図である。

【図 15】POPC/Chol 1:1 および通増量 (0 ~ 10%) の記載する異なる TEE-脂質からのリポソームの融合の強度を示す (7.5 ~ 2.5 の pH 範囲にわたって測定されたすべての FRET シグナルの $\Sigma FRET$ で表す) 図である。

【図 16】POPC/DOPE 1:3 および通増量 (0 ~ 10%) の記載する異なる TEE-脂質からのリポソームの融合の強度を示す (7.5 ~ 2.5 の pH 範囲にわたって測定されたすべての FRET シグナルの $\Sigma FRET$ で表す) 図である。

【図 17】製剤 L-46 または L-47 でそれぞれトランスフェクトされた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像を示す図である (10 倍) (倍率: 100 倍) (図 17A および B)。

【図 18】製剤 L-48 または L-49 でそれぞれトランスフェクトされた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像を示す図である (10 倍) (倍率: 100 倍) (図 18A および B)。

【図 19】製剤 L-50 ~ L-53 (5 ~ 40 nM Plk1-siRNA またはスクランブル siRNA) でトランスフェクトされた HeLa 細胞の細胞増殖を示す (細胞増殖 (%) で表す) 図である。

【図 20】それぞれ TEE-脂質を含まない、または 10% の異なる TEE-脂質もしくは対照脂質 (C6-PE ~ C20-PE) を含む、POPC/Chol 1:1 からのリポソームの融合の強度を示す (7.5 ~ 2.5 の pH 範囲にわたって測定されたすべての FRET シグナルの $\Sigma FRET$ で表す) 図である。TEE-脂質を含むリポソームを、TEE-脂質を含まない POPC/DOPE 1:3 からのリポソームと融合させた。

【図 21】Plk1-siRNA またはスクランブル siRNA を封入した製剤 L-54 ~ L-69 でトランスフェクトされた HeLa 細胞の相対的細胞増殖を示す図である。

【図 22】Plk1-siRNA またはスクランブル siRNA (10 ~ 40 nM siRNA) を封入した製剤 L-54 ~ L-61 でトランスフェクトされた HeLa 細胞の相対的細胞増殖を示す図である。

【実施例】

【0247】

本発明を次の実施例でさらに説明するが、これは本発明の範囲を限定するものではない。

【0248】

10

20

30

40

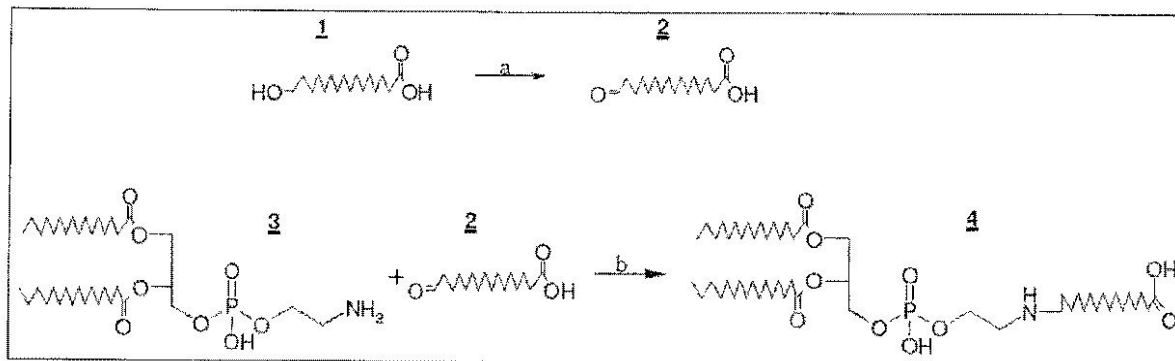
50

実施例 1

(16- {2- [2, 3-ビス-ヘキサデカノイルオキシ-プロポキシ]-ヒドロキシ-ホスホリル-オキシ}-エチルアミノ}-ヘキサデカン酸) (Pal-PEまたはw16-PE) の合成

反応スキーム：

【化 4 1】



10

【0249】

第1ステップ (a)：16-ヒドロキシ-ヘキサデカン酸の16-オキソ-ヘキサデカン酸への酸化

N₂ 雰囲気下、10 g の化合物 1 (16-ヒドロキシ-ヘキサデカン酸) (1 当量) を、1000 ml のジクロロメタン中、16 g のPCC (クロクロム酸ピリジニウム) で40℃において15分間酸化した。溶媒を除去し、残渣を酢酸エチルエステルと、その後にくシリカゲルクロマトグラフィーステップ (溶離液：酢酸エチルエステル) で分離した。

20

【0250】

第2ステップ (b)：化合物 2 のジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) による還元的アミノ化

N₂ 雰囲気下、11.8 g のDPPE (3) および16 g のシアノ水素化ほう素ナトリウム (NaCNBH₃) を800 ml のCHCl₃/CH₃OH 1:1に溶解し、65℃に加熱した。9.44 g のピリジンを混合物に添加した。4.6 g の化合物 2 (16-オキソ-ヘキサデカン酸) を400 ml のCHCl₃/CH₃OH 1:1に溶解し、最後にさらに反応混合物に滴下した。3時間後、溶媒を除去し、固体を水で2回洗浄した後、再び200 ml のCHCl₃/CH₃OH/H₂O 500:100:4に溶解した。2相を分離した後、有機相の溶媒を除去した。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィーで精製した (溶離液：CHCl₃/CH₃OH/H₂O 500:100:4)。生成物を、¹H-NMR、HPLC、および薄層クロマトグラフィーによって特徴付けた。

30

【0251】

実施例 2

化合物 (10- {2- [2, 3-ビス-ヘキサデカノイルオキシ-プロポキシ]-ヒドロキシ-ホスホリル-オキシ}-エチルアミノ}-デカン酸) (Deca-PEまたはw10-PE) の合成

この合成は、ステップ a で10-ヒドロキシデカン酸を使用する代わりに実施例 1 に従って行った。

40

【0252】

実施例 3

Cy 3 標識アンチセンスオリゴヌクレオチドを封入した両性リボソームの調製

次のリボソーム調製物を下記に示すように調製した。

【0253】

【表 2 2】

表 2 2 : 製剤 L-1 ~ L-5

製剤ID	脂質	モル%
L-1	DOPE/MoChol/Chems/Pal-PE	50:20:20:10
L-2	DOPE/MoChol/Chems/Deca-PE	50:20:20:10
L-3	DOPE/MoChol/Chems	50:20:30
L-4	POPC/DOPE/MoChol/Chems/Pal-PE	12:38:20:20:10
L-5	POPC/DOPE/MoChol/Chems/Deca-PE	12:38:20:20:10

【0 2 5 4】

10

脂質の保存溶液をクロロホルム中で混合し、最後に丸底フラスコ中、真空下で蒸発乾固した。PBS (pH 7.5) にとした Cy3 標識アンチセンスオリゴヌクレオチド溶液 1 ml (0.5 mg/ml) で脂質膜を水和した。得られた脂質濃度は 50 mM であった。懸濁液を水浴中、室温で 45 分間水和し、5 分間音波処理し、続いて -70 °C で凍結/融解サイクルを 3 回行った。融解した後、リボソーム懸濁液を、孔径 800 / 200 / 800 または 200 / 200 nm のポリカーボネート膜に 19 回通して押し出した。封入されていないオリゴヌクレオチドを沈降で除去した。

改変したプロセスで、1 つの製剤を調製した。

【0 2 5 5】

【表 2 3】

20

表 2 3 : 製剤 L-6

製剤ID	脂質	モル%
L-6	POPC/DOPE/MoChol/Chems	15:45:20:20

【0 2 5 6】

簡潔に言えば、脂質を丸底フラスコに量り入れ、クロロホルムに溶解した。次いで、ロータリーエバポレータを使用して、溶媒を蒸発させることによって、脂質膜を生成した。クロロホルム残渣を真空下で終夜除去した。10 mM NaAc、50 mM NaCl (pH 4.5) にとした Cy3 標識アンチセンスオリゴヌクレオチド溶液 1 ml (0.35 mg/ml) で脂質膜を水和している間に、多重膜小胞体が生成した。凍結融解ステップの後、多重膜リボソームを、800 / 200 / 800 nm のポリカーボネート膜に 19 回通して押し出した。押出の後、リボソーム懸濁液の pH を 1 / 10 体積の 1 M HEPES pH 8 で直ちにシフトさせた。封入されていないオリゴヌクレオチドを沈降で除去した。

30

【0 2 5 7】

脂質回収率および濃度を有機ホスフェータッセイで分析した。Malvern Zetasizer 3000 HAS を用いて、動的光散乱法で粒径を測定した。封入効率を蛍光分光法で測定した。

【0 2 5 8】

結果

40

【0 2 5 9】

【表 2 4】

表 2 4 : 製剤 L-1 ~ L-6 の粒径、PI (多分散指数)、および封入効率

製剤ID	粒径[nm] / PI	封入効率 [%]
L-1	275 / 0.183	12
L-2	251 / 0.387	18
L-3	173 / 0.068	11
L-4	244 / 0.186	20
L-5	269 / 0.396	15
L-6	227 / 0.052	69

10

【0 2 6 0】

実施例 4

カルボキシフルオレセイン (CF) を封入した両性リボソームの調製

次のリボソーム調製物を下記に示すように調製した。

【0 2 6 1】

【表 2 5】

表 2 5 : 製剤 L-7 ~ L-10、L-12 ~ L-15、および L-17 ~ L-24

20

製剤ID	脂質	モル%
L-7	DOPE/MoChol/Chems/Pal-PE	50:20:20:10
L-8	DOPE/MoChol/Chems/Pal-PE	56:20:20:4
L-9	DOPE/MoChol/Chems/Deca-PE	50:20:20:10
L-10	DOPE/MoChol/Chems/Deca-PE	56:20:20:4
L-12	POPC/DOPE/MoChol/Chems/Pal-PE	12:38:20:20:10
L-13	POPC/DOPE/MoChol/Chems/Pal-PE	15:41:20:20:4
L-14	POPC/DOPE/MoChol/Chems/Deca-PE	12:38:20:20:10
L-15	POPC/DOPE/MoChol/Chems/Deca-PE	15:41:20:20:4
L-17	POPC/DOTAP/Chems/ Pal-PE	50:10:30:10
L-18	POPC/DOTAP/Chems/ Pal-PE	56:10:30:4
L-19	POPC/DOTAP/Chems/ Deca-PE	50:10:30:10
L-20	POPC/DOTAP/Chems/ Deca-PE	56:10:30:4
L-21	POPC/DOTAP/Chems/ Pal-PE	15:28:47:10
L-22	POPC/DOTAP/Chems/ Pal-PE	21:28:47:4
L-23	POPC/DOTAP/Chems/ Deca-PE	15:28:47:10
L-24	POPC/DOTAP/Chems/ Deca-PE	21:28:47:4

30

【0 2 6 2】

40

脂質の保存溶液をクロロホルム中で混合し、最後に丸底フラスコ中、真空下で蒸発乾固した。PBS (pH 7.5) にとかした 100 mM CF で脂質膜を水和した。得られた脂質濃度は 20 mM であった。懸濁液を水浴中、室温で 45 分間水和し、5 分間音波処理し、続いて -70 °C で凍結/融解サイクルを 3 回行った。融解した後、リボソーム懸濁液を、孔径 800 / 200 / 800 nm のポリカーボネート膜に 15 回通して押し出した。封入されていない CF をゲル濾過で除去したが、一方リボソームを 3 倍に希釈した。脂質回収率および濃度を有機ホスフェータッセイで分析した。Malvern Zetasizer 3000 HAS を用いて、動的光散乱法で粒径を測定した。

【0 2 6 3】

結果

50

【0264】

【表26】

表26：製剤L-7～L10、L-12～L-15、およびL-17～L-24の粒径およびPI

製剤ID	粒径[nm] / PI
L-7	254 / 0.317
L-8	192 / 0.114
L-9	185 / 0.154
L-10	175 / 0.074
L-12	225 / 0.292
L-13	181 / 0.117
L-14	165 / 0.265
L-15	169 / 0.113
L-17	190 / 0.271
L-18	205 / 0.211
L-19	194 / 0.288
L-20	143 / 0.190
L-21	211 / 0.190
L-22	212 / 0.244
L-23	166 / 0.166
L-24	141 / 0.117

10

20

【0265】

実施例5

Cy3標識アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはカルボキシフルオレセイン（CF）を封入したリポソームによるインビトロトランスフェクション実験

HeLa細胞は、DSMZ（German Collection of Micro Organism and Cell Cultures）から入手し、DMEM中で維持した。培地は、Gibco-Invitrogenから購入し、5% CO₂中、10% FCSを37℃で補充した。細胞を2×10⁴個の細胞/mlの密度で播種し、100μlの培地中で培養した。16時間後、培地を、全量50～200ngのCy3標識オリゴヌクレオチドまたは0.5mM CF/ウェルを含むリポソーム（L1～L24）を含有するOpti-MEM I（Gibco）に置換した。細胞培養皿を、450g、37℃で1時間遠心し、続いて5% CO₂中、37℃で3時間インキュベートした。トランスフェクション混合物を上記の培地で置換し、細胞をさらに24～48時間インキュベートした。光学および蛍光顕微鏡法で、10倍または40倍の倍率の対物レンズ（Axiovert S 100, Carl Zeiss Inc.）を使用して、トランスフェクション効率および細胞分布を4時間または24時間後に決定した。

30

40

【0266】

結果

Cy3標識オリゴヌクレオチドを封入したリポソームによるHeLa細胞のトランスフェクション

図5は、製剤L-1、L-2、およびL-3でトランスフェクトされたHeLa細胞の蛍光顕微鏡画像を示す。リポソーム製剤L-3のトランスフェクション効率は、トランスフェクションエンハンサー要素を含む脂質をリポソーム膜中に含める（L-1およびL-2）ことによって改善できることがわかる。

【0267】

図6は、製剤L-4、L-5、およびL-6でトランスフェクトされたHeLa細胞

50

の蛍光顕微鏡画像を示す。リボソーム製剤 L-6 のトランスフェクション効率は、トランスフェクションエンハンサー要素を含む脂質をリボソーム膜中に含める (L-4 および L-5) ことによって改善できることがわかる。

【0268】

カルボキシフルオレセインを封入したリボソームによる HeLa 細胞のトランスフェクション

カルボキシフルオレセインは、酸性環境 (例えば、エンドソーム) 中では蛍光シグナルを示さない pH 感受性蛍光プローブである。

【0269】

図 7 は、製剤 L-7 ~ L-10 でトランスフェクトされた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像を示す。製剤はすべて、サイトゾルまたは核中で蛍光シグナルを示す。10% Pal-PE または Deca-PE をその膜中に有する製剤 (L-7 および L-9) では、蛍光シグナルが改善されている。

10

【0270】

図 8 は、製剤 L-12 ~ L-15 でトランスフェクトされた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像を示す。この場合、Pal-PE をその膜中に有する製剤 L-12 および L-13 については、カルボキシフルオレセインの蛍光シグナルがより強い。Pal-PE の量 (4% または 10%) は、蛍光シグナルに影響を及ぼさない。

【0271】

図 9 は、製剤 L-17 ~ L-20 でトランスフェクトされた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像を示す。この場合、Pal-PE または 10% Deca-PE をその膜中に有する製剤 L-17 および L-19 については、カルボキシフルオレセインの蛍光シグナルがより強い。

20

【0272】

図 10 は、製剤 L-21 ~ L-24 でトランスフェクトされた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像を示す。製剤はすべて、サイトゾルまたは核中で蛍光シグナルを示す。10% Pal-PE または Deca-PE をその膜中に有する製剤 (L-21 および L-23) では、蛍光シグナルが改善されている。

【0273】

図 11 は、遊離カルボキシフルオレセインまたはアニオン性リボソーム標準製剤 (DPPC: DPPG: Chol 50:10:40) でトランスフェクトされた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像を示す。両製剤とも、いずれの蛍光シグナルも示さない。

30

【0274】

実施例 6

腫瘍異種移植片を有するマウスにおける両性リボソームの生体内分布

C5.5 アンチセンスオリゴヌクレオチドを封入したリボソームの調製

リボソームは、アルコール注入方法で製造した。独得の処方に従って、脂質混合物を、適切なアルコール (L-25 ではエタノール、および L-26 ではイソプロパノール/1% HCl) に 8 ml の体積および適切な濃度 (L-25 では 40 mM、および L-26 では 20 mM) で溶解した。20 mM HAc、300 mM スクロースの緩衝液 (pH 4.5) にとかした適切な濃度 (L-25 では 57 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、および L-26 では 67 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の Cy5.5 標識アンチセンスオリゴヌクレオチド溶液 72 ml の体積を、丸底フラスコに移した。ポンプを備えた注入装置を使用して、両方の溶液を混合した。得られたリボソーム懸濁液を、1 M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris) HCl (pH 8) を用いて全体積の 1/10 で pH 7.5 にシフトさせ、PBS に対し透析して、封入されていない Cy5.5 標識アンチセンスオリゴヌクレオチドを除去し、続いて濃縮した。

40

【0275】

【表 27】

表 27：製剤L-25およびL-26

製剤ID	脂質	モル%	粒径[nm]/PI	封入効率 [%]
L-25	POPC/DOTAP/Chems	25:28:47	122 / 0.211	91
L-26	POPC/DOTAP/Chems/ Pal-PE	15:28:47:10	165 / 0.194	67

【0276】

空のリボソームの調製

空のリボソーム用の脂質混合物を、エタノール（L-27）またはイソプロパノール／1% HCL（L-28）に濃度50mMで溶解した。有機溶媒中の脂質と水性緩衝液（PBSまたは10mM HAc、300mM スクロース、100mM トリス、pH7.5）を混合することによって、空のリボソームを調製した。リボソーム懸濁液を、PBSに対し透析し、続いて濃縮した。

【0277】

【表 28】

表 28：製剤L-27およびL-28

製剤ID	脂質	モル%	粒径[nm]/PI
L-27	POPC/DOTAP/Chems	25:28:47	62 / 0.311
L-28	POPC/DOTAP/Chems/ Pal-PE	15:28:47:10	174 / 0.124

【0278】

Cy5.5 アンチセンスオリゴヌクレオチド充填リボソームと空のリボソームを混合して、最終脂質濃度を60mMにした。

【0279】

生体内分布試験

50μgのリボソームCy5.5 標識アンチセンスオリゴヌクレオチド（2mg/kg）を、異種移植片腫瘍（ヒト肝癌）（直径6～8mm）を有するCD1ヌードマウスの尾静脈に静脈内注射した。群のサイズは、マウス2匹／製剤とした。対照群に対し、150μlのPBSを静脈内投与した。24時間後に、マウスを屠殺し、腫瘍を回収し、凍結した。

【0280】

深冷凍結腫瘍を、部分的にOCT（Tissue-Tek）に包埋し、Cryostat Cryo-Star HM560（Microm-International, Walldorf, Germany）を用いて、-20℃で10μmの切片を作製した。切片を回収し、Super Frost（登録商標）Plus Gold slides（Menzel, Braunschweig, Germany）で乾燥し、4℃で貯蔵した。

【0281】

臓器スライス凍結切片の画像処理をLI-COR Odyssey Infrared Imaging Systems（LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Germany）で行った。

【0282】

結果

リボソーム製剤L-25およびL-26に封入したCy5.5 標識アンチセンスオリゴヌクレオチドを静脈内に適用した後、腫瘍組織における蓄積が認められた。図12は、群の両方の動物の腫瘍組織の凍結切片を示す。製剤L-25に比べて、Pal-PE製剤L-26は、腫瘍組織における蓄積が5.4倍改善されたことを示す。PBS緩衝液を投与

された動物の腫瘍組織はいずれの蛍光シグナルも示さない。

【0283】

実施例7

腫瘍異種移植片を有するマウスにおける両性リボソームによる腫瘍治療

siRNA標的Plk1または非標的スクランブル (scr) siRNAを封入したリボソームの調製

リボソームを、イソプロパノール注入方法で製造した。脂質混合物を、イソプロパノール／1% HClに238mlの体積および適切な濃度(10mM)で溶解した。10mM HAc、300mM スクロース (pH4.0) (NaOHで調整されたpH) にかした適切な濃度(36μg/ml)のPlk1またはscr siRNA溶液554mlの体積を、丸底フラスコに移した。ポンプを備えた注入装置を使用して、両方の溶液を混合した。得られたリボソーム懸濁液を、136mM Na₂HPO₄、100mM NaCl (pH9.0)の2倍の体積でpH7.5にシフトさせ、100mM Na₂HPO₄、50mM NaCl、150mM スクロース (pH7.5) に対し3回透析して封入されていないsiRNAを除去し、続けて9.6mM Na₂HPO₄、2.4mM KH₂PO₄、280mM スクロース (pH7.5) で3回透析し、最後に濃縮した。

【0284】

【表29】

表29：製剤L-46およびL-47

製剤ID	siRNA	脂質	モル%	粒径 [nm]/PI	封入効率 [%]
L-46	Plk1	POPC/DOTAP/Chems/ Pal-PE	15:28:47:10	202 / 0.58	58
L-47	scr	POPC/DOTAP/Chems/ Pal-PE	15:28:47:10	198 / 0.43	79

【0285】

インビボ試験での処置群は、以下の通り名付けた。

第1群：生理食塩水 (PBS)

第2群：L-46 Plk1、5mg/siRNA(kg)、976μmol/脂質(kg)

第3群：L-47 スクランブル、5mg/kg、616μmol/脂質(kg)

【0286】

使用したsiRNAの配列

1. Plk1 siRNA：センス 5'-agaccuaccuccggauc aa (dTdT)-3'

アンチセンス 5'-uugauccggagguagguc u (dTdT)-3'

2. Scr siRNA：センス 5'-aacuggguaagcgggcgca (dTdT)-3'

アンチセンス 5'-ugcgcccgcuuacccaguu (dTdT)-3'

【0287】

腫瘍治療

125μgのリボソーム活性Plk1またはスクランブルsiRNA (5mg/kg) を、異種移植片腫瘍 (ヒト肝癌、Hu h7) (直径5mm) を有するCD1ヌードマウスの尾静脈に1週間に2回、1日および4日に3週間静脈内注射した。群のサイズは、マウス5~7匹/製剤または対照とした。対照群に対し、200μlの生理食塩水を静脈内投与した。注射の日ごとに、腫瘍の体積を測定した。腫瘍重量は実験の終わりに確定した。最後の注射の72時間後に、マウスを屠殺し、腫瘍を回収し、凍結した。

【0288】

結果

L-46に封入したPlk1 siRNAを3週間にわたって6回静脈内に適用した後、腫瘍増殖の抑制は、生理食塩水またはscr siRNA (L-47)での処置に比べて明らかである(図13)。第2群(L-46 Plk1)の最終腫瘍重量は、それぞれ対照群1または3(生理食塩水またはL-47スクランブル)に比べて明らかに低下している(図14)。

【0289】

実施例8

T E Eを含む脂質を含むリボソームの融合性

10

脂質融合をFRET(蛍光共鳴エネルギー転移)シグナルの出現によってモニターするために、蛍光標識リボソームの対検体を調製した。0.3モル%のNBD-PEをドナーリボソームに添加し、0.3モル%のローダミン-PEをレセプターリボソームに添加した。すべての脂質をイソプロパノールに濃度20mMで溶解し、下記に示す混合物を個別に調製した。次いで、個別のアルコール性脂質検体50μlをそれぞれ、下記の緩衝液のいずれかと急速に混合した。

A) 360μlの20mM 酢酸/水酸化ナトリウム、pH4

B) 360μlの20mM 酢酸/水酸化ナトリウム、pH4、さらに15μgのsiRNAを含む。

C) 380μlの10mM 酢酸/10mM リン酸/水酸化ナトリウム、pH7.5。

20

【0290】

したがって、リボソームを、低pHまたは中性pHで、重要な活性成分のクラスを構成するオリゴヌクレオチドであるsiRNAの存在または非存在下に形成した。次いで、少量の1M Na₂HPO₄を用いて、A)またはB)中のリボソームを中和した。

【0291】

【表30】

表30:

製剤ID	15モル%	28モル%	47モル%	10モル%
L-29	POPC	DDAB	Chems	Pal-PE
L-30	POPC	DDAB	Chol-C3	Pal-PE
L-31	POPC	DDAB	Chol-C5	Pal-PE
L-32	POPC	DDAB	Chol-C6	Pal-PE
L-33	POPC	DDAB	Chol-C8	Pal-PE
L-34	POPC	DC-Chol	DMGS	Pal-PE
L-35	POPC	DC-Chol	Chol-C3	Pal-PE
L-36	POPC	DC-Chol	Chol-C5	Pal-PE
L-37	POPC	DC-Chol	Chol-C6	Pal-PE
L-38	POPC	DC-Chol	Chol-C8	Pal-PE
L-39	POPC	DC-Chol	Chems	Pal-PE
L-40	Lig-Ly PC	DOTAP	Chems	Pal-PE
L-41	C6-Cer	DOTAP	Chems	Pal-PE
L-42	SM	DC-Chol	Chems	Pal-PE
L-43	POPC	DOTAP	Chems	Pal-PE

30

40

【0292】

次いで、NBD-PEおよびローダミン-PE標識リボソームの両方を混合し、この混合検体を少量(small aliquots)ずつ、下降するpHを有する緩衝液に曝露した。これらの緩衝液は、20mM クエン酸および40mM リン酸を含んでおり、0.5pHの間隔でpH2~pH8で調整した。

50

【0293】

pH誘導性融合は、37℃で2時間起こることが可能になり、NBD／ローダミン：460／590nmおよびNBD／NBD：460／530nmの2組のフィルターを使用して、すべての検体の蛍光を測定した。膜融合のシグナルとしてのFRETを、発光（590nm）／発光（530nm）の比で表した。0.5より小さい値は、バックグラウンド蛍光を示し、より高い値はすべて、リポソーム間の融合を示す。

表31のデータから、試験製剤の大部分は融合性であったことが明らかになる。カチオン性脂質成分としてDC-Cholを含む製剤は、中間のpH値で極めて融合性であるが、中性のpHと酸性のpHとにおいて、安定なリポソームを形成することがわかった。リポソームが中性のpHで生成され、したがって測定の前に酸性のpHに曝露されなかったかどうか、またはこのようなリポソームが酸性のpHで生成され、使用する前に中性にしたかどうかはあまり重要ではなかった。また、siRNAなどのカーゴ分子の存在は、リポソームの融合挙動に影響を与えなかった。

10

【0294】

【表 3 1 - 1】

表 3 1 :

製剤ID		pH										
		2,50	3,00	3,50	4,00	4,50	5,00	5,50	6,00	6,50	7,00	8,00
L-29	+ APO B, pH 4		0,36	0,55	0,67	0,92	0,92	0,51	0,39	0,29	0,29	0,29
	空, pH 4		0,32	0,37	0,49	0,62	0,96	0,66	0,49	0,32	0,30	0,30
	空, pH 7,5	0,32	0,35	0,36	0,50	0,96	1,05	0,65	0,39	0,32	0,30	0,29
L-30	+ APO B, pH 4		0,40	0,84	0,94	0,59	0,32	0,32	0,31	0,31	0,31	0,30
	空, pH 4		0,36	0,78	1,11	0,65	0,35	0,34	0,33	0,33	0,32	0,31
	空, pH 7,5	0,38	0,47	0,69	1,06	0,69	0,44	0,35	0,33	0,32	0,32	0,31
L-31	+ APO B, pH 4		0,39	0,52	0,66	0,90	0,75	0,44	0,36	0,29	0,29	0,28
	空, pH 4		0,33	0,42	0,48	0,59	0,66	0,58	0,44	0,30	0,29	0,29
	空, pH 7,5	0,32	0,32	0,33	0,41	0,73	0,84	0,73	0,44	0,31	0,29	0,29
L-32	+ APO B, pH 4		0,40	0,51	0,58	0,74	0,60	0,59	0,41	0,29	0,28	0,28
	空, pH 4		0,32	0,35	0,39	0,43	0,59	0,60	0,45	0,31	0,29	0,29
	空, pH 7,5	0,31	0,31	0,33	0,37	0,44	0,49	0,56	0,40	0,32	0,29	0,28
L-33	+ APO B, pH 4		0,41	0,57	0,65	0,64	0,56	0,52	0,52	0,31	0,29	0,29
	空, pH 4		0,35	0,47	0,53	0,53	0,58	0,55	0,56	0,31	0,30	0,29
	空, pH 7,5	0,33	0,35	0,42	0,50	0,53	0,55	0,54	0,50	0,35	0,30	0,29
L-34	+ APO B, pH 4		0,45	0,85	1,49	1,94	0,88	0,46	0,34	0,32	0,32	0,30
	空, pH 4		0,36	0,51	0,96	1,86	0,99	0,54	0,35	0,32	0,31	0,30
	空, pH 7,5	0,48	0,64	0,86	1,28		1,33	0,62	0,40	0,36	0,33	0,31
L-35	+ APO B, pH 4		0,54	1,74		0,84	0,37	0,37	0,37	0,36	0,35	0,34
	空, pH 4		0,40	0,91		1,07	0,39	0,38	0,37	0,36	0,36	0,34
	空, pH 7,5	0,51	0,78	1,38		0,89	0,44	0,41	0,40	0,38	0,37	0,34
L-36	+ APO B, pH 4		0,50	0,86	1,28	1,84	1,92	1,48	0,51	0,34	0,33	0,32
	空, pH 4		0,38	0,55	0,95	1,34		1,40	0,61	0,36	0,35	0,34
	空, pH 7,5	0,40	0,53	0,75	1,05	1,62		1,59	0,45	0,34	0,33	0,31
L-37	+ APO B, pH 4		0,53	0,82	1,01	1,53	1,50	1,34	0,64	0,32	0,31	0,30
	空, pH 4		0,37	0,59	0,76	1,12	1,88	1,64	0,88	0,34	0,33	0,31
	空, pH 7,5	0,36	0,51	0,67	0,83	1,22	1,62	1,56	0,55	0,34	0,31	0,30
L-38	+ APO B, pH 4		0,49	0,80	1,02	1,44	1,33	1,14	0,90	0,31	0,30	0,29
	空, pH 4		0,37	0,51	0,63	0,71	1,09	1,20	1,01	0,36	0,31	0,29
	空, pH 7,5	0,38	0,50	0,74	0,79	1,06	1,18	1,33	1,06	0,37	0,30	0,29
L-39	+ APO B, pH 4		0,56	0,94	1,21	1,94	1,86	0,73	0,40	0,35	0,34	0,33
	空, pH 4		0,40	0,83	1,30	1,68	1,86	0,91	0,49	0,36	0,35	0,34
	空, pH 7,5	0,42	0,56	0,91	1,02	1,84		1,11	0,42	0,36	0,35	0,32
L-40	+ APO B, pH 4		0,54	0,83	0,89	1,14	1,13	1,00	0,55	0,33	0,32	0,31
	空, pH 4		0,39	0,47	0,58	0,71	0,98	0,82	0,61	0,35	0,32	0,31
	空, pH 7,5	0,37	0,41	0,43	0,51	0,69	0,85	0,95	0,55	0,37	0,31	0,31

10

20

30

40

【表 3 1 - 2】

製剤ID		pH										
		2,50	3,00	3,50	4,00	4,50	5,00	5,50	6,00	6,50	7,00	8,00
L-41	+ APO B, pH 4		0,53	0,89	1,38	1,31	1,16	0,80	0,39	0,32	0,32	0,31
	空, pH 4		0,35	0,55	1,46	1,36	1,24	1,19	0,47	0,32	0,32	0,31
	空, pH 7,5	0,41	0,52	0,67	1,35	1,35	1,31	1,26	0,51	0,37	0,33	0,32
L-42	+ APO B, pH 4		0,56	1,17	1,83		1,49	0,50	0,37	0,36	0,35	0,34
	空, pH 4		0,48	0,85	1,27	1,82	1,64	0,76	0,42	0,36	0,36	0,34
	空, pH 7,5	0,41	0,53	0,74	0,80	1,18	1,28	0,85	0,44	0,34	0,31	0,30
L-43	+ APO B, pH 4		0,53	0,67	0,81	1,03	0,96	0,92	0,53	0,33	0,32	0,31
	空, pH 4		0,37	0,45	0,64	0,89	0,95	0,94	0,54	0,34	0,32	0,31
	空, pH 7,5	0,37	0,41	0,51	0,57	0,87	0,98	0,97	0,59	0,36	0,32	0,31

10

【0295】

実施例 9

T E Eを含むリポソームのインビボでの使用

この試験では、s i R N A 充填両性リポソームは、標的遺伝子としてA p o Bを使用して製造した。非標的スクランブルs i R N Aを対照のために使用した。

【0296】

20

脂質混合物L-44 (P O P C : D O T A P : C H E M S : P a l - P E、15 : 28 : 47 : 10) またはL-45 (P O P C : D C - C h o l : D M G S : P a l - P E、15 : 28 : 47 : 10) を、10 mM H C l を含有するイソプロパノールに、L-44の場合は35 mMまたはL-45の場合は25 mMの濃度で溶解した。適切な体積のs i R N A 保存溶液を、10 mM H A c、300 mM スクロース / T r i s (ヒドロキシメチル) アミノメタン (T R I S) (pH 4) に希釈した。有機溶液および水溶液を3 : 7の比で混合し、リポソーム懸濁液を150 mM T r i s (pH 8) でpH > 7.5に直ちにシフトさせた。

接線流法を使用して、ポリエーテルスルホン膜 (M i l l i p o r e C o r p o r a t i o n, B i l l e r i c a, M A) を備えたP e l l i c o n (登録商標) X L カセットで、製剤を20または30倍濃縮した。100 mM トリス / H₃ P O₄、150 mM スクロース (pH 7.4) の5倍の体積を連続添加し、続いてH₃ P O₄によってpH 7.4に滴定された20 mM トリス、280 mM スクロースの緩衝液を連続添加することによって、外側の緩衝液を交換した。

30

【0297】

インビボ試験の処置スケジュールは以下の通りであった。C57 B C / 6 マウスの雄合計5匹 / 処置群に対し、それぞれの製剤をA p o Bまたはスクランブルs i R N A 投与量8 mg / k g および注入量250 μ l で0、1、および2日に静脈内注射した (静脈内投与) (下記の処置群のリストを参照のこと)。生理食塩水の注射は対照とした。最後の処置の24時間後に、マウスを屠殺し、全血を回収し、血漿を分離した。すべてのマウスの血漿をA S T およびA L T について分析した。多くの10 μ l の血漿と、血漿中のA p o B の分析用の50 mM D T T を含有するN u P a g e (登録商標) L D S サンプル緩衝液 (4倍) (I n v i t r o g e n, C a r l s b a d, C A) 40 μ l を混合した。血漿中のA p o B をウエスタンブロットによって分析した。mRNA分析では、約100 mg の肝組織を、R N A l a t e r (登録商標) 緩衝液 (S i g m a - A l d r i c h C h e m i c a l C o m p a n y, S t. L o u i s, M O) (1 ml) の10倍の体積に回収した。Q u a n t i g e n e A s s a y (P a n o m i c s, C A) を使用して、すべての肝臓検体中のmRNAを定量した。

40

【0298】

インビボ試験の処置群は、以下の通り名付けた。

50

第1群：生理食塩水（PBS）

第2群：L-44 ApoB、8mg/kg、440μmol/kg脂質（kg）

第3群：L-44 スクランプル、8mg/kg、370μmol/kg脂質（kg）

第4群：L-45 ApoB、8mg/kg、520μmol/kg脂質（kg）

第5群：L-45 スクランプル、8mg/kg、560μmol/kg脂質（kg）

動物に対し、1、2、および3日に注射し、4日に屠殺した。

【0299】

処置によって、Apo血漿タンパク質レベルは40%（L-44 ApoB）または45%（L-45 ApoB）低下した。肝臓中のmRNAは、65%（L-44 ApoB）または75%（L-45 ApoB）低下した。肝酵素ASTおよびALTは、集中処置の後でさえ変化しないことがわかり、これは、インビボで製剤の忍容性が良好であることを示した。

10

【0300】

実施例10

TEEの疎水性部分の鎖長の影響

中性または双性イオン性脂質および通増量のTEE-脂質（0モル%、2.5モル%、5モル%、または10モル%）を含む混合物から、リボソームを調製した。ここで、使用したTEEの疎水性部分の鎖長は6~20で異なった。

A. POPC/DOPE = 0.3

B. POPC/Chol = 1

20

【0301】

実験で使用したTEE-脂質

w6-PE w6-DPTAP

w10-PE

w12-PE w12-DPTAP

w16-PE w16-DPTAP

w20-DPTAP

【0302】

【表 3 2 - 1】

表 3 2 :

脂質1	脂質2	TEE-脂質	モル%
POPC	DOPE	w6-PE	33.3 : 66.6 : 0
POPC	DOPE	w6-PE	32.5 : 65 : 2.5
POPC	DOPE	w6-PE	31.7 : 63.3 : 5
POPC	DOPE	w6-PE	30 : 60 : 10
POPC	DOPE	w10-PE	33.3 : 66.6 : 0
POPC	DOPE	w10-PE	32.5 : 65 : 2.5
POPC	DOPE	w10-PE	31.7 : 63.3 : 5
POPC	DOPE	w10-PE	30 : 60 : 10
POPC	DOPE	w12-PE	33.3 : 66.6 : 0
POPC	DOPE	w12-PE	32.5 : 65 : 2.5
POPC	DOPE	w12-PE	31.7 : 63.3 : 5
POPC	DOPE	w12-PE	30 : 60 : 10
POPC	DOPE	w16-PE	33.3 : 66.6 : 0
POPC	DOPE	w16-PE	32.5 : 65 : 2.5
POPC	DOPE	w16-PE	31.7 : 63.3 : 5
POPC	DOPE	w16-PE	30 : 60 : 10
POPC	DOPE	w6-DPTAP	33.3 : 66.6 : 0
POPC	DOPE	w6-DPTAP	32.5 : 65 : 2.5
POPC	DOPE	w6-DPTAP	31.7 : 63.3 : 5

10

20

【表 3 2 - 2】

脂質1	脂質2	TEE-脂質	モル%
POPC	DOPE	w6-DPTAP	30 : 60 : 10
POPC	DOPE	w12-DPTAP	33.3 : 66.6 : 0
POPC	DOPE	w12-DPTAP	32.5 : 65 : 2.5
POPC	DOPE	w12-DPTAP	31.7 : 63.3 : 5
POPC	DOPE	w12-DPTAP	30 : 60 : 10
POPC	DOPE	w16-DPTAP	33.3 : 66.6 : 0
POPC	DOPE	w16-DPTAP	32.5 : 65 : 2.5
POPC	DOPE	w16-DPTAP	31.7 : 63.3 : 5
POPC	DOPE	w16-DPTAP	30 : 60 : 10
POPC	DOPE	w20-DPTAP	33.3 : 66.6 : 0
POPC	DOPE	w20-DPTAP	32.5 : 65 : 2.5
POPC	DOPE	w20-DPTAP	31.7 : 63.3 : 5
POPC	DOPE	w20-DPATP	30 : 60 : 10
POPC	Chol	w6-PE	50 : 50 : 0
POPC	Chol	w6-PE	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	w6-PE	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	w6-PE	45 : 45 : 10
POPC	Chol	w10-PE	50 : 50 : 0
POPC	Chol	w10-PE	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	w10-PE	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	w10-PE	45 : 45 : 10
POPC	Chol	w12-PE	50 : 50 : 0
POPC	Chol	w12-PE	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	w12-PE	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	w12-PE	45 : 45 : 10
POPC	Chol	w16-PE	50 : 50 : 0
POPC	Chol	w16-PE	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	w16-PE	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	w16-PE	45 : 45 : 10
POPC	Chol	w6-DPTAP	50 : 50 : 0
POPC	Chol	w6-DPTAP	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	w6-DPTAP	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	w6-DPTAP	45 : 45 : 10
POPC	Chol	w12-DPTAP	50 : 50 : 0
POPC	Chol	w12-DPTAP	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	w12-DPTAP	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	w12-DPTAP	45 : 45 : 10
POPC	Chol	w16-DPTAP	50 : 50 : 0
POPC	Chol	w16-DPTAP	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	w16-DPTAP	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	w16-DPTAP	45 : 45 : 10
POPC	Chol	w20-DPTAP	50 : 50 : 0
POPC	Chol	w20-DPTAP	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	w20-DPTAP	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	w20-DPATP	45 : 45 : 10

FRETに基づく脂質混合アッセイを使用して、脂質混合物の融合性を調査した。脂質融合をFRETシグナルの出現によってモニターするために、0.75モル%のNBD-PE (N-(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル)-1,2-ジヘキサデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、トリエチルアンモニウム塩) またはローダミン-PE (Lissamine (商標) ローダミンB 1,2-ジヘキサデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、トリエチルアンモニウム塩) でそれぞれ単一標識されたリポソームを調製した。

【0304】

脂質をイソプロパノールに溶解し、混合した。緩衝液(酢酸10mM、リン酸10mM、NaOH、pH7.5)をアルコール性脂質ミックスに添加し、最終脂質濃度を1.6mM、および最終イソプロパノール濃度を12.2%にすることによって、リポソームを生成した。リポソームの調製では、液体ハンドリングロボット(Perkin Elmer, Multiprobe II Ex)を使用した。NBD標識リポソームとRh標識リポソームを1:1の比で混合し、続いて上記の緩衝液で1:1で希釈した。最後に、この混合検体を少量(small aliquots)ずつ、通減する特定のpH(HAc50mM、リン酸50mM、NaOH、pH7.5; 6.5; 5.5; 4.5; 3.5; 2.5)にし、37℃で2時間インキュベートした。リポソームを、このステップで再び1:1で希釈した。

10

【0305】

NBD/ローダミン:460/590nmおよびNBD/NBD:460/530nmの2組のフィルターを使用して、検体の蛍光を測定した。膜融合のシグナルとしてのFRETを、発光(590nm)/発光(530nm)の比で表した。バックグラウンドの0.35はバックグラウンド蛍光を示し、したがってFRETシグナルから減じた。

20

【0306】

融合と単なる凝集を識別するために、懸濁液をpH7.5に中和し、FRETシグナルを再び測定した。リポソームの融合時の残留アルコール含有量3%の起こり得る干渉は、予備実験により排除した。

【0307】

融合は、pH2.5~pH7.5において測定されたFRETシグナルすべての合計であるΣFRETで表すことができる。

30

【0308】

図15および16は、通増量のTEE-脂質を含む中性または双性イオン性脂質混合物のΣFRETで表された融合を示す。結果は、TEEの疎水性部分の鎖長が長いほど、リポソームの融合が強くなることを明らかに示す。

【0309】

実施例11

カルボキシフルオレセイン(CF)を封入したリポソームによるインビトロトランスフェクション実験

リポソームの調製

次のリポソーム調製物を実施例4に示すように調製した。リポソーム懸濁液を、孔径800/800nmのポリカーボネート膜に19回通して押し出した。

40

【0310】

【表 3 3】

表 3 3 : 製剤L-46～L-49

製剤ID	脂質	モル%
L-46	POPC/DOTAP/Chems	25:28:47
L-47	POPC/DOTAP/Chems/Pal-PE	15:28:47:10
L-48	POPC/DOPE/MoChol/DMG-Succ	6:24:23:47
L-49	POPC/DOPE/MoChol/DMG-Succ/Pal-PE	5:22:21:42:10

【0 3 1 1】

10

インビトロトランスフェクション

HeLa細胞は、DSMZ (German Collection of Micro Organism and Cell Cultures) から入手し、DMEM中で維持した。培地は、Gibco-Invitrogenから購入し、5% CO₂中、10% FCSを37℃で補充した。細胞を4×10⁴個の細胞/mlの密度で播種し、100μlの培地中で培養した。16時間後、培地を、全量0.05mM CF/ウェルを含むリボソーム (L-46～L-49) を含有するOpti-MEM I (Gibco) に置換した。細胞培養皿を、5% CO₂中、37℃で4時間インキュベートした。蛍光顕微鏡法で露光時間時間を5秒にし、10/100倍対物レンズ (Axionvert S 100, Carl Zeiss Inc.) を使用して、トランスフェクション

20

【0 3 1 2】

結果

【0 3 1 3】

【表 3 4】

表 3 4 : 製剤L-46～L-49の粒径およびPI

製剤ID	粒径[nm] / PI
L-46	281 / 0.22
L-47	260 / 0.26
L-48	285 / 0.26
L-49	368 / 0.25

30

【0 3 1 4】

カルボキシフルオレセインを封入したリボソームによるHeLa細胞のトランスフェクション

40

カルボキシフルオレセインは、酸性環境 (例えば、エンドソーム) では蛍光シグナルを示さないpH感受性蛍光プローブである。

【0 3 1 5】

図17AおよびBと図18AおよびBは、製剤L-46～L-49でトランスフェクトされたHeLa細胞の蛍光顕微鏡画像を示す。10% Pal-PEをその膜中に有する製剤L-47およびL-49については、カルボキシフルオレセインの蛍光シグナルがより強い。遊離CFでは、蛍光シグナルは観察されなかった (データ図示せず)。

【0 3 1 6】

実施例 1 2

siRNA標的Plk-1または非標的スクランブル (scr) siRNAを封入したり

50

ポソームによるインビトロトランスフェクション実験 リポソームの調製

リポソームを、イソプロパノールまたはエタノール注入方法で製造した。脂質混合物を、イソプロパノール／1% HCl (L-50およびL-51) またはエタノール (L-52およびL-53) に脂質濃度 6.7 mM で溶解した。脂質溶液を、10 mM HAc、300 mM スクロース (pH 4.0) (Tris で調整した pH) にとかした適切な siRNA 溶液 (169 μg/ml) に注入し、最終アルコール濃度を 30% にした。生成したリポソーム懸濁液を、150 mM TRIS (pH 8.0) (HCl で調整した pH) の 2 倍の体積で pH 7.5 にシフトさせ、次いで 20 mM トリス、280 mM スクロース (pH 7.4) (HCl で調整した pH) に対し透析して、封入されていない siRNA およびアルコールを除去した。

10

【0317】

【表 35】

表 35 : 製剤 L-50~L-53

製剤ID	脂質	モル%	siRNA
L-50	POPC/DOTAP/Chems/Pal-PE	25:28:47:10	Plk-1
L-51	POPC/DOTAP/Chems/Pal-PE	15:28:47:10	スクランブル
L-52	POPC/DOTAP/Chems	25:28:47	Plk-1
L-53	POPC/DOTAP/Chems	25:28:47	スクランブル

20

【0318】

トランスフェクションプロトコル

HeLa 細胞は、DSMZ (German Collection of Micro Organism and Cell Cultures) から入手し、DMEM 中で維持した。培地は、Gibco-Invitrogen から購入し、5% CO₂ 中、10% FCS を 37℃ で補充した。細胞を 1.5×10^4 個の細胞/ml の密度で播種し、100 μl の培地中で培養した。16 時間後、siRNA を含むリポソームを Optimem I (Gibco-Invitrogen) に希釈し、10 μl を細胞に添加した (最終体積 110 μl、および 9.1% FCS/ウェル) (5~40 nM Plk1 またはスクランブル siRNA)。10 μl の Optimem I を、無処置細胞にも、細胞を含まないウェルにも添加した。さらに、対照として、細胞に遊離 siRNA (10~80 nM Plk-1 またはスクランブル siRNA) を添加した。細胞培養皿を、5% CO₂ 中、37℃ で 72 時間インキュベートした。細胞増殖能/生存率アッセイを使用して、トランスフェクション効率を分析した。

30

【0319】

細胞増殖能/生存率アッセイ

CellTiter-Blue Cell Viability アッセイ (Promega, US) を使用することによって、細胞増殖能/生存率を確定した。要するに、トランスフェクションの 72 時間後に、20 μl の CellTiter-Blue 試薬をウェルに添加した。37℃ で 2.5 時間インキュベートした後、100 μl の培地を黒色マイクロタイタープレート (NUNC, Denmark) のウェルに移した。蛍光プレートリーダーを使用して (励起 550 nm/発光 590 nm)、蛍光を記録した。各プレートには、次の対照を含めた。i) 細胞を含まないが培地を含むウェル (培地バックグラウンド蛍光のための対照)、および ii) 細胞を含むウェル (無処置細胞=モックのトランスフェクトされた細胞)。計算のため、実験ウェル (トランスフェクトされた細胞およびモックのトランスフェクトされた細胞) のすべての値から、培地バックグラウンドの平均蛍光値を減じた。各レプリケートトランスフェクションからの平均蛍光値を、モックのトランスフェクトされた細胞からの平均蛍光値にノーマライズし、これを 100% と設定した。

40

50

【0320】

結果

【0321】

【表36】

表36：製剤L-50～L-53の粒径およびPI

製剤ID	粒径[nm] / PI
L-50	261 / 0.36
L-51	213 / 0.32
L-52	170 / 0.32
L-53	154 / 0.26

10

【0322】

s i R N A 標的 P l k - 1 または非標的スクランブル (s c r) s i R N A を封入したリポソームによる H e l a 細胞のトランスフェクション

図19は、製剤L-50～L-53によるH e l a細胞のトランスフェクション後の細胞増殖(%)を示す。10%のT E E-脂質P a l - P Eを含み、P l k - 1 s i R N Aを封入した製剤L-50によって、細胞増殖が明らかに増殖約20%に低下することが明らかになる。細胞増殖の低下は用量依存的である。一方、T E E-脂質を含まず、P l k - 1 s i R N Aを封入した製剤L-52は、H e l a細胞の細胞増殖を細胞増殖約80%にしか低下することができない。スクランブルs i R N Aを封入した製剤L-51とL-53はどちらも、H e l a細胞の増殖にわずかにしか影響を及ぼさない。

20

【0323】

実施例13

T E Eを含む脂質を含むリポソームの融合性

中性または双性イオン性脂質(P O P C / C h o l 1 : 1)および10モル%のT E E-脂質を含む混合物から、リポソームを調製した。ここで、使用したT E Eの疎水性部分の鎖長は6～20で異なった。対照として、T E E-脂質を含まないリポソーム、およびp H感受性親水性部分としてのカルボキシル基がないアルキル鎖を有する脂質を含むリポソーム(C 6 - P E、C 1 2 - P E、C 1 6 - P E、C 2 0 - P E)を調製した。

30

【0324】

実験に使用したT E E-脂質

w6-PE	w6-DPTAP	C6-PE
w12-PE	w12-DPTAP	C12-PE
w16-PE	w16-DPTAP	C16-PE
	w20-DPTAP	C20-PE

【0325】

【表 3 7 - 1】

表 3 7 :

脂質1	脂質2	TEE-脂質または対照	モル%
POPC	Chol	w6-PE	50 : 50 : 0
POPC	Chol	w6-PE	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	w6-PE	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	w6-PE	45 : 45 : 10
POPC	Chol	w12-PE	50 : 50 : 0
POPC	Chol	w12-PE	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	w12-PE	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	w12-PE	45 : 45 : 10
POPC	Chol	w16-PE	50 : 50 : 0
POPC	Chol	w16-PE	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	w16-PE	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	w16-PE	45 : 45 : 10

【表 37-2】

脂質1	脂質2	TEE-脂質または対照	モル%
POPC	Chol	w6-DPTAP	50 : 50 : 0
POPC	Chol	w6-DPTAP	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	w6-DPTAP	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	w6-DPTAP	45 : 45 : 10
POPC	Chol	w12-DPTAP	50 : 50 : 0
POPC	Chol	w12-DPTAP	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	w12-DPTAP	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	w12-DPTAP	45 : 45 : 10
POPC	Chol	w16-DPTAP	50 : 50 : 0
POPC	Chol	w16-DPTAP	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	w16-DPTAP	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	w16-DPTAP	45 : 45 : 10
POPC	Chol	w20-DPTAP	50 : 50 : 0
POPC	Chol	w20-DPTAP	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	w20-DPTAP	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	w20-DPATP	45 : 45 : 10
POPC	Chol	C6-PE	50 : 50 : 0
POPC	Chol	C6-PE	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	C6-PE	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	C6-PE	45 : 45 : 10
POPC	Chol	C12-PE	50 : 50 : 0
POPC	Chol	C12-PE	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	C12-PE	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	C12-PE	45 : 45 : 10
POPC	Chol	C16-PE	50 : 50 : 0
POPC	Chol	C16-PE	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	C16-PE	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	C16-PE	45 : 45 : 10
POPC	Chol	C20-PE	50 : 50 : 0
POPC	Chol	C20-PE	48.8 : 48.8 : 2.5
POPC	Chol	C20-PE	47.5 : 47.5 : 5
POPC	Chol	C20-PE	45 : 45 : 10

【0326】

FRETに基づく脂質混合アッセイを使用して、脂質混合物の融合性を調査した。上述のリポソーム混合物を、0.75モル%のNBD-PE（N-（7-ニトロベンズ-2-オキサー-1,3-ジアゾール-4-イル）-1,2-ジヘキサデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、トリエチルアンモニウム塩）の存在下で調製した。さらに、0.75モル%のローダミン-PE（Lissamine（商標）ローダミンB1,2-ジヘキサデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、トリエチルアンモニウム塩）で単一標識されたTEE-脂質を含まない中性リポソーム（POPC/DOPE 1:3）を調製した。NBD-PE単一標識リポソームとローダミン-PE単一標識POPC/DOPE（1:3）リポソームを混合した。FRETシグナルの出現によって、脂質融合をモニターした。

【0327】

脂質をイソプロパノールに溶解し、混合した。緩衝液（酢酸 10 mM、リン酸 10 mM、NaOH、pH 7.5）をアルコール性脂質ミックスに添加し、最終脂質濃度を 1.6 mM、および最終イソプロパノール濃度を 12.2% にすることによって、リポソームを生成した。NBD 標識リポソームと Rh 標識リポソームを 1:1 の比で混合し、続いて上記の緩衝液で 1:1 で希釈した。最後に、この混合検体を少量（small aliquots）ずつ、逓減する特定の pH（HAc 50 mM、リン酸 50 mM、NaOH、pH 7.5 ~ 2.5）にし、37℃で 2 時間インキュベートした。リポソームを、このステップで再び 1:1 で希釈した。

【0328】

NBD/ローダミン：460/590 nm および NBD/NBD：460/530 nm の 2 組のフィルターを使用して、検体の蛍光を測定した。膜融合のシグナルとしての FRET を、発光（590 nm）/発光（530 nm）の比で表した。バックグラウンドの 0.35 はバックグラウンド蛍光を示し、したがって FRET シグナルから減じた。

10

【0329】

融合は、pH 2.5 ~ pH 7.5 において測定された FRET シグナルすべての合計である Σ FRET で表すことができる。

【0330】

図 20 は、純粋な POPC/DOPE（1:3）リポソームを用いて、それぞれ 10 モル%の TEE-脂質を含む POPC/Chol（1:1）リポソームまたは上述の対照脂質の融合能力を検出するための実験の結果を示す。カルボキシル基がないアルキル鎖を有する脂質を含むリポソーム（C6-PE ~ C20-PE）は、TEE を含む脂質を含むリポソームに比べて融合性が低いことが明らかになる。

20

【0331】

実施例 14

TEE-脂質を含むリポソームの融合性

FRET に基づく脂質混合アッセイを使用して、脂質混合物の融合性を調査した。脂質融合を FRET シグナルの出現によってモニターするために、0.75 モル%の NBD-PE（N-（7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル）-1,2-ジヘキサデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、トリエチルアンモニウム塩）またはローダミン-PE（Lissamine（商標）ローダミン B 1,2-ジヘキサデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、トリエチルアンモニウム塩）でそれぞれ単一標識されたリポソームを調製した。

30

【0332】

脂質をイソプロパノールに溶解し、混合した。緩衝液（酢酸 10 mM、リン酸 10 mM、NaOH、pH 7.5）をアルコール性脂質ミックスに添加し、最終脂質濃度を 1.46 mM、および最終イソプロパノール濃度を 13.2% にすることによって、リポソームを生成した。リポソームの調製では、液体ハンドリングロボット（Perkin Elmer, Multiprobe II Ex）を使用した。NBD 標識リポソームと Rh 標識リポソームを 1:1 の比で混合し、続いて上記の緩衝液で 1:1 で希釈した。最後に、この混合検体を少量（small aliquots）ずつ、逓減する特定の pH（HAc 50 mM、リン酸 50 mM、NaOH、pH 7.5; 6.5; 5.5; 4.5; 3.5; 2.5）にし、37℃で 2 時間インキュベートした。リポソームを、このステップで再び 1:1 で希釈した。

40

【0333】

NBD/ローダミン：460/590 nm および NBD/NBD：460/530 nm の 2 組のフィルターを使用して、検体の蛍光を測定した。膜融合のシグナルとしての FRET を、発光（590 nm）/発光（530 nm）の比で表した。バックグラウンドの 0.35 はバックグラウンド蛍光を示し、したがって FRET シグナルから減じた。

【0334】

融合は、pH 2.5 ~ pH 7.5 において測定された FRET シグナルすべての合計で

50

ある $\Sigma FRET$ で表すことができる。

【0335】

リポソームの融合性に及ぼす TEE-脂質の影響を評価するために、異なる脂質混合物および異なる TEE-脂質を用いた選別を、上述されたように行った。各両性脂質対について表 38 に示すように、48 個の異なる製剤を融合選別で試験したが、一方両性脂質対と中性脂質のモル比は 0.66 に設定した。

【0336】

【表 38】

表 38 :

両性脂質対 (C/A=0.5)	中性脂質系 (モル比)	TEE-脂質	TEE-脂質モル%
DOTAP/Chems	DOPE POPC/DOPE (0.3) POPC/Chol (1) POPC	w16-PE w16-DPTAP w20-DPTAP	0 / 2.5 / 5 / 10
DOTAP/DMG-Succ	DOPE POPC/DOPE (0.3) POPC/Chol (1) POPC	w16-PE w16-DPTAP w20-DPTAP	0 / 2.5 / 5 / 10
DC-Chol/DMG-Succ	DOPE POPC/DOPE (0.3) POPC/Chol (1) POPC	w16-PE w16-DPTAP w20-DPTAP	0 / 2.5 / 5 / 10
MoChol/Chems	DOPE POPC/DOPE (0.3) POPC/Chol (1) POPC	w16-PE w16-DPTAP w20-DPTAP	0 / 2.5 / 5 / 10
MoChol/DMG-Succ	DOPE POPC/DOPE (0.3) POPC/Chol (1) POPC	w16-PE w16-DPTAP w20-DPTAP	0 / 2.5 / 5 / 10
DmC4Mo2/DMG-Succ	DOPE POPC/DOPE (0.3) POPC/Chol (1) POPC	w16-PE w16-DPTAP w20-DPTAP	0 / 2.5 / 5 / 10

【0337】

結果

リポソーム製剤の融合性に及ぼす TEE-脂質の影響率は、各製剤の 0% TEE-脂質と 10% TEE-脂質との間の $\Sigma FRET$ の勾配を算出することによって実験データから確定することができる。表 38 中のほぼすべての製剤の融合性は、脂質混合物中の TEE-脂質によって改善することができる。

【0338】

異なる中性脂質系の勾配を比較すると、リポソーム製剤の融合性に及ぼす TEE-脂質の影響は、製剤中で使用した中性脂質に依存する可能性があることが明らかになる。表 38 に示したすべての製剤について算出した、中性脂質系の 0% TEE-脂質および 10% TEE-脂質の平均影響率および平均 $\Sigma FRET$ を表 39 にまとめる。DOPE または高量の DOPE との混合物など非常に融合性の高い六方相形成脂質を含む脂質混合物に及ぼす TEE-脂質の影響は、特定の量の安定なホスファチジルコリン、および Chol

などの六方相形成脂質を含む脂質混合物に及ぼす影響より低いことが明らかになる。中性脂質としてPOPCなど安定なホスファチジルコリンしか含まない脂質混合物は、同様にTEE-脂質によって改善することができるが、CholまたはDOPEなど特定の量の六方相形成脂質を含む混合物より低い程度でしか改善することができない。

【0339】

【表39】

表39:

中性脂質系	平均影響率	平均 Σ Fret 0%のTEE	平均 Σ Fret 10%のTEE
DOPE	13	4.66	6.24
POPC/DOPE (0.3)	13	3.10	4.32
POPC/Chol (1)	19	0.98	2.97
POPC	11	0.21	1.33

10

【0340】

実施例15

siRNA標的Plk-1または非標的スクランブル(scr) siRNAを封入したリポソームによるインビトロトランスフェクション実験
リポソームの調製

リポソームを、イソプロパノール注入方法で製造した。脂質をイソプロパノールに溶解し、混合した。NaAc 20 mM、スクロース 300 mM (pH 4.0) (HAcで調整したpH) にとかしたsiRNA溶液 (163.2または81.5 μ g/ml) をアルコール性脂質ミックスに添加し、最終アルコール濃度を30%にすることによって、リポソームを生成した。生成したリポソーム懸濁液を、136 mM Na_2HPO_4 、100 mM NaCl (pH 9) の2倍の体積でpH 7.5にシフトさせ、最終脂質濃度を1.4 mM、および最終イソプロパノール濃度を10%にした。リポソームの調製では、液体ハンドリングロボット (Perkin Elmer, Multiprobe II Ex) を使用した。

20

【0341】

【表40】

表40:

製剤ID	脂質	モル%	siRNA
L-54	POPC/Chol/DOTAP/Chems	20:20:20:40	Plk-1
L-55	POPC/Chol/DOTAP/Chems	20:20:20:40	スクランブル
L-56	POPC/Chol/DOTAP/Chems/w16-PE	19,5:19,5:19,5:39:2,5	Plk-1
L-57	POPC/Chol/DOTAP/Chems/w16-PE	19,5:19,5:19,5:39:2,5	スクランブル
L-58	POPC/Chol/DOTAP/Chems/w16-PE	19:19:19:38:5	Plk-1
L-59	POPC/Chol/DOTAP/Chems/w16-PE	19:19:19:38:5	スクランブル
L-60	POPC/Chol/DOTAP/Chems/w16-PE	18:18:18:36:10	Plk-1
L-61	POPC/Chol/DOTAP/Chems/w16-PE	18:18:18:36:10	スクランブル
L-62	POPC/Chol/MoChol/Chems	20:20:20:40	Plk-1
L-63	POPC/Chol/MoChol/Chems	20:20:20:40	スクランブル
L-64	POPC/Chol/MoChol/Chems/w16-PE	19,5:19,5:19,5:39:2,5	Plk-1
L-65	POPC/Chol/MoChol/Chems/w16-PE	19,5:19,5:19,5:39:2,5	スクランブル
L-66	POPC/Chol/MoChol/Chems/w16-PE	19:19:19:38:5	Plk-1
L-67	POPC/Chol/MoChol/Chems/w16-PE	19:19:19:38:5	スクランブル
L-68	POPC/Chol/MoChol/Chems/w16-PE	18:18:18:36:10	Plk-1
L-69	POPC/Chol/MoChol/Chems/w16-PE	18:18:18:36:10	スクランブル

30

40

50

【0342】

トランスフェクションプロトコル

HeLa細胞は、DSMZ (German Collection of Micro Organism and Cell Cultures) から入手し、DMEM中で維持した。培地は、Gibco-Invitrogenから購入し、5% CO₂ 中、10% FCSを37℃で補充した。細胞を 2×10^4 個の細胞/mlの密度で播種し、100 μ lの培地中で培養した。16時間後、siRNAを含むリボソームをPBS (Gibco-Invitrogen) に希釈し、10 μ lを細胞に添加した (最終体積110 μ l、および9.1% FCS/ウェル) (5~80 nM Plk1またはスクランブルsiRNA)。10 μ lのPBSを、無処置細胞にも、細胞を含まないウェルにも添加した。さらに、対照として、細胞に遊離siRNA (10~80 nM Plk-1またはスクランブルsiRNA) を添加した。細胞培養皿を、5% CO₂ 下、37℃で72時間インキュベートした。細胞増殖能/生存率アッセイを使用して、トランスフェクション効率を分析した。

10

【0343】

細胞増殖能/生存率アッセイ

CellTiter-Blue Cell Viabilityアッセイ (Promega, US) を使用することによって、細胞増殖能/生存率を確定した。要するに、トランスフェクションの72時間後に、20 μ lのCellTiter-Blue試薬をウェルに添加した。37℃で2.5時間インキュベートした後、100 μ lの培地を黒色マイクロタイタープレート (NUNC, Denmark) のウェルに移した。蛍光プレートリーダーを使用して (励起550 nm/発光590 nm)、蛍光を記録した。各プレートには、次の対照を含めた。i) 細胞を含まないが培地を含むウェル (培地バックグラウンド蛍光のための対照)、およびii) 細胞を含むウェル (無処置細胞=モックのトランスフェクトされた細胞)。計算のため、実験ウェル (トランスフェクトされた細胞およびモックのトランスフェクトされた細胞) のすべての値から、培地バックグラウンドの平均蛍光値を減じた。各トランスフェクションからの蛍光値を、モックのトランスフェクトされた細胞からの平均蛍光値にノーマライズし、これを100%と設定した。

20

【0344】

結果

図21は、製剤L-54~L69によるHeLa細胞のトランスフェクション後の相対的細胞増殖を示す。w16-PEを含み、Plk-1 siRNAを封入した製剤はすべて、細胞増殖を低下させる。図22は、細胞増殖の低下が用量依存的であることを示す。一方、TEE-脂質を含まず、Plk-1 siRNAを封入した製剤は、HeLa細胞の細胞増殖により低い程度でしか影響を及ぼさない。スクランブルsiRNAを封入した製剤は、HeLa細胞増殖に影響を及ぼさない。

30

【0345】

実施例16

6- {2- [2, 3-ビス-ヘキサデカノイルオキシ-プロポキシ]-ヒドロキシ-ホスホリル-オキシ]-エチルアミノ}-ヘキサン酸 (w6-PE) の合成

40

ステップa. 6-オキソヘキサン酸の合成

実施例1のステップaに記載されているように、10 gの6-ヒドロキシカプロン酸 (1当量) を32.6 gのPCC (クロクロム酸ピリジニウム) (2当量) で37℃において約20分間酸化した。

【0346】

ステップb. w6-PEの合成

第2ステップでは、1.11 gの6-オキソヘキサン酸、4.72 gのDPPE、6.0 gのシアノ水素化ほう素ナトリウム (NaCNBH₃)、および3.78 gのピリジンを使用して、実施例1のステップbに記載されている還元的アミノ化によって、w6-PEを合成した。4時間後に、溶媒を除去し、残渣を2.5リットルのクロロホルム/メタ

50

ノール／ H_2O （500：100：4）に溶解し、100mlの H_2O を添加した。2相を分液した後、有機相の溶媒を除去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：クロロホルム／メタノール／ H_2O 500：300：4）で精製した。溶媒を除去し、残渣を10mlの H_2O で洗浄した。混合物をフリットにし、粗生成物を2つの別のシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液1：クロロホルム／メタノール／ H_2O 500：300：4；溶離液2：クロロホルム／メタノール／ H_2O 500：100：4）で精製した。生成物の純度を、薄層クロマトグラフィー、 1H -NMR、およびLC-MSによって判定した。

【0347】

実施例17

12-〔2-〔2, 3-ビス-ヘキサデカノイルオキシ-プロポキシ〕-ヒドロキシ-ホスホリル-オキシ〕-エチルアミノ}-ドデカン酸（w12-PE）の合成

ステップa. 12-オキソドデカン酸の合成

実施例1のステップaに記載されているように、14gの12-ヒドロキシドデカン酸（1当量）を27.9gのPCC（クロクロム酸ピリジニウム）（2当量）で37℃において約25分間酸化した。

【0348】

ステップb. w12-PEの合成

第2ステップでは、1.2gの12-オキソドデカン酸、3.88gのDPPE、4.93gのシアノ水素化ほう素ナトリウム（ $NaCNBH_3$ ）、および3.1gのピリジンを使用して、実施例1のステップbに記載されている還元的アミノ化によって、w12-PEを合成した。5時間後に、溶媒を除去し、残渣に100mlの H_2O を添加し、次いで混合物を音波処理した。遠心ステップの後に、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：クロロホルム／メタノール／ H_2O 500：100：4）で精製した。生成物の純度を、薄層クロマトグラフィー、 1H -NMR、およびHPLCによって判定した。

【0349】

実施例18

21-〔2-〔（2, 3-ビス-ヘキサデカノイルオキシ-プロポキシ）-ヒドロキシ-ホスホリル-オキシ〕-エチルアミノ〕-ヘニコサン酸（w21-PE）の合成

ステップa. 11-ヨードウンデカン酸の合成

11-ヨードウンデカン酸を、Bergbreiter, J.Org.Chem., 40 (6), (1975)779-782に従って合成した。簡潔に言えば、 N_2 雰囲気下で、250gの11-ブロモウンデカン酸、325gのヨウ化ナトリウム、および2リットルのアセトンで24時間還流した。混合物を分割し、それぞれ4リットルの H_2O に添加した。混合物をフリットにし、粗生成物をメタノールから再結晶し、最後に融点によって特徴付けた。

【0350】

ステップb. 11-ヨードウンデカン酸エチルエステルの合成

11-ヨードウンデカン酸エチルエステルを、Bergbreiter, J.Org.Chem., 40 /6, (1975)779に従って合成した。簡潔に言えば、246.6gの11-ヨードウンデカン酸、440mlの乾燥エタノール、440mlの乾燥トルオール、および5mlの H_2SO_4 （98%）を混合した。混合物を蒸留し、それによって約400mlの共沸混合物を75℃または76℃でそれぞれ除去した。次いで、15gの K_2CO_3 を添加し、5分後に、混合物を濾過し、最後に浴温度115℃で蒸留した。得られた茶色油を、シリカゲル充填フリットに通す濾過（溶離液：酢酸エチルエステル／石油エーテル 1：7）によって精製した。最終生成物を、 1H -NMRおよび薄層クロマトグラフィーによって特徴付けた。

【0351】

ステップc. ドコス-21-エン酸エチルエステルの合成

ドコス-21-エン酸エチルエステルを、Bergbreiter et al., J. Org. Chem, 40 (6)

10

20

30

40

50

, (1975), 779-782に従って合成した。

グリニャール試薬

1. 55 gのマグネシウムを、 N_2 雰囲気下、20 mlの乾燥テトラヒドロフラン (THF) およびヨウ素結晶と混合した。次いで、11.09 gの1-クロロ-1-ウンデセンを22 mlの乾燥THFに溶解し、この溶液を30℃でマグネシウム混合物に徐々に滴下した。さらにヨウ素結晶を添加した後、混合物を45分間還流した。次いで、混合物を反応させ、25分後、再び45分間還流した。

主反応

N_2 雰囲気下、11.19 gのヨウ化銅 (I) および100 mlのTHFを混合し、-78℃に冷却した。次いで、36.73 mlのメチルリチウム (エーテル中1.6 M) を滴下した。混合物を0℃にし、次いで再び-78℃に冷却した。グリニャール試薬を滴下した後、混合物を1時間攪拌した。次いで、温度を段階的に20℃まで上げ、再び-78℃まで下げた。ステップbからの1-ヨードウンデカン酸エチルエステルを20 mlの乾燥THFに溶解し、反応混合物に滴下し、次いで約1時間攪拌させた。次いで、混合物を融解し、一夜後、300 mlの飽和 NH_4Cl 溶液および200 mlのエーテルに添加した。固体を濾過によって除去し、濾液の相を分液し、水相をエーテルで3回洗浄した。合わせた有機相を塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。次いで、有機溶媒をロータリーエバポレータで除去し、粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: 1. 石油エーテル; 2. 酢酸エチルエステル/石油エーテル 1:20) で精製し、続いてエタノールから再結晶した。最後に、生成物の純度を、薄層クロマトグラフィー、および 1H -NMRによって判定した。

【0352】

ステップd. 22-ヒドロキシドコサン酸の合成

22-ヒドロキシドコサン酸を、Mori et al., Liebigs Ann.Chem., (1991), 253-257に従って合成した。簡潔に言えば、 N_2 雰囲気下、6.6 gのドコス-21-エン酸エチルエステルおよび30 mlのTHFを混合し、0℃に冷却した。次いで、0.5当量 (9 ml) のボラン/THF錯体を滴下し、混合物を室温で2時間攪拌させた。1.2 mlの H_2O を添加した後、懸濁液再び0℃に冷却し、15 mlの3M $NaOH$ および2 mlの35% H_2O_2 を添加した。混合物を50℃で1時間攪拌した。次いで、温度を室温にし、pHを、2N HCl でpH2~3に調整した。固体をフリットにし、 H_2O で洗浄し、 $CHCl_3$ で3回共蒸留し、 $CHCl_3$ から再結晶した。さらにTHF中50℃において $NaOH$ (H_2O 中3M) で1.5日にわたって処置した後、pHを再びpH2~3に調整し、粗生成物をフリットにし、 H_2O で洗浄し、 $CHCl_3$ で2回共蒸留した。生成物を、薄層クロマトグラフィーおよび 1H -NMRによって特徴付けた。

【0353】

ステップe. 22-オキソドコサン酸の合成

実施例1のステップaに記載されているように、3.9 gの22-ヒドロキシドコサン酸 (1当量) を、4.72 gのPCC (クロロクロム酸ピリジニウム) (2当量) で還流下に約2時間酸化した。

【0354】

ステップf. w21-PEの合成

このステップでは、0.62 gの22-オキソドコサン酸、1.21 gのDPPE、1.54 gのシアノ水素化ほう素ナトリウム ($NaCNBH_3$)、および0.97 gのピリジンを使用して、実施例1のステップbに記載されている還元的アミノ化によって、w21-PEを合成した。5時間後に、溶媒を除去し、残渣に40 mlの H_2O を添加し、次いで混合物を音波処理した。固体をフリットにした後、粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: クロロホルム/メタノール/ H_2O 500:100:4) で精製した。生成物の純度を、薄層クロマトグラフィー、 1H -NMR、およびHPLCによって判定した。

【0355】

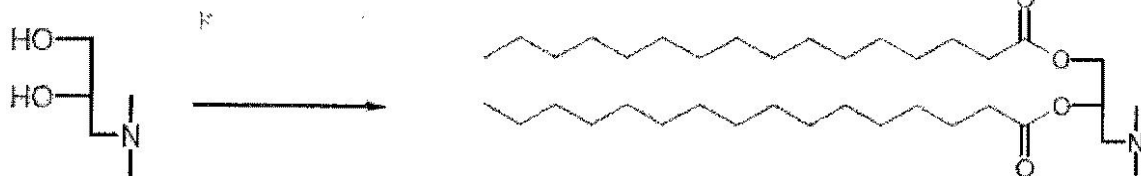
実施例 19

ヘキサデカン酸 1- { [(5-カルボキシペンチル) -ジメチルーアンモニウム] メチルー 2-ヘキサデカノイルオキシエチルエステル (w6-DPTAP) の合成

反応スキーム

【化 4 2】

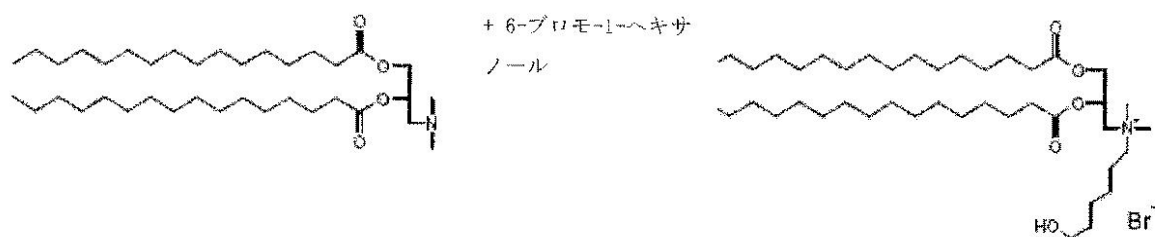
ステップ a: + ヘキサデカン酸クロリド



10

【化 4 3】

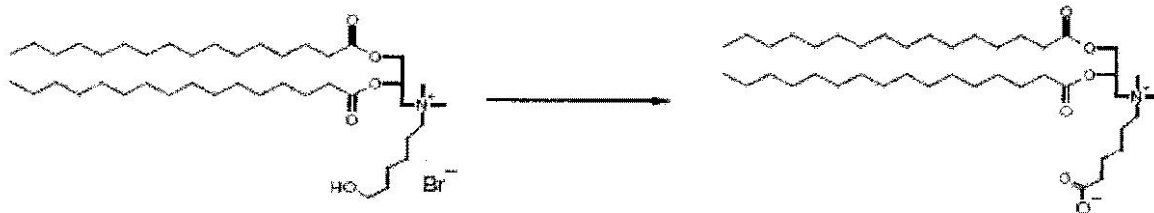
ステップ b:



20

【化 4 4】

ステップ c:



30

【0356】

ステップ a: ヘキサデカン酸 1-ジメチルアミノメチルー 2-ヘキサデカノイルオキシエチルエステルの合成

43.17 g の 3-(ジメチルアミノ)-1,2-プロパンジオールを 1000 ml のジクロロメタンに溶解した。73.3 g のトリエチルアミンおよび 0.01 g の 4-ジメチルアミノピリジンを添加した後、混合物を 0℃ に冷却した。次いで、100 ml のジクロロメタンに溶解した 199.18 g のヘキサデカン酸クロリドを滴下した。さらに 100 ml のジクロロメタンを添加した後、混合物を室温にし、終夜攪拌させた。混合物を濾過し、残渣を 300 ml のジクロロメタンで洗浄した。ロータリーエバポレータを使用して、濾液の溶媒を除去し、粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：酢酸エチルエステル／石油エーテル 1:1）で精製した。生成物を ¹H-NMR によって特徴付けた。

40

【0357】

ステップ b: (2,3-ビス-ヘキサデカノイルオキシプロピル)-(6-ヒドロキシヘキシル)-ジメチルーアンモニウムブロミドの合成

N₂ 雰囲気下、32.39 g のヘキサデカン酸 1-ジメチルアミノメチルー 2-ヘキサデカノイルオキシエチルエステル、9.84 g の 6-ブロモ-1-ヘキサノール、および 500 ml のアセトニトリルを混合し、約 1 日還流した。次いで、混合物を 5℃ に冷却し、約 7 時間後に、白色固体を濾過し、酢酸エチルエステルから再結晶した。生成物の純

50

度を、薄層クロマトグラフィーによって判定した。

【0358】

ステップc：w6-DPTAPの合成

8.31gの(2,3-ビス-ヘキサデカノイルオキシ-プロピル)-(6-ヒドロキシヘキシル)-ジメチル-アンモニウムブロミドを40mlのジクロロメタンに懸濁し、攪拌下、20mlのジクロロメタンにとかした0.035gのTEMPOを添加した。0.268gのKBrを3mlのH₂Oに溶解し、反応に添加した。0.22gのAliquat 336(商標)を添加した後、混合物を氷浴で冷却し、67mlの次亜塩素酸ナトリウム溶液に溶解した1gのNaHCO₃を滴下した。200mlのCHCl₃を添加する前に、混合物を室温で5時間攪拌した。相を分液し、有機相をNa₂SO₄で乾燥した。溶媒を除去し、粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液：クロロホルム/メタノール 4:1)で精製した。生成物を、¹H-NMRおよびLC-MSによって特徴付けた。

10

【0359】

実施例20

ヘキサデカン酸1-{[(11-カルボキシ-ウンデシル)-ジメチル-アンモニウム]メチル-2-ヘキサデカノイルオキシ-エチルエステル(w12-DPTAP)の合成
ステップa：(2,3-ビス-ヘキサデカノイルオキシ-プロピル)-(12-ヒドロキシドデシル)-ジメチル-アンモニウムブロミドの合成

実施例19のステップbに記載されているように、22.47gのヘキサデカン酸1-ジメチルアミノメチル-2-ヘキサデカノイルオキシ-エチルエステル、10gの12-ブロモ-1-ドデカノール、および500mlのアセトニトリルを使用して、合成を行った。粗生成物を酢酸エチルエステル/メタノール(9:1)から再結晶し、生成物の純度を薄層クロマトグラフィーおよび¹H-NMRによって判定した。

20

【0360】

ステップb：w-12-DPTAPの合成

実施例19のステップcに記載されているように、9.21gの(2,3-ビス-ヘキサデカノイルオキシ-プロピル)-(12-ヒドロキシドデシル)-ジメチル-アンモニウムブロミド、0.035gのTEMPO、0.268gのKBr、0.22gのAliquat(商標)、および67mlの次亜塩素酸ナトリウムに溶解した1gのNaHCO₃を使用して、w-12-DPTAPを合成した。粗生成物を2つのシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液1：クロロホルム/メタノール 4:1；溶離液2：クロロホルム/メタノール 8:1)で精製した。生成物を、¹H-NMRおよびLC-MSによって特徴付けた。

30

【0361】

実施例21

ヘキサデカン酸1-{[(15-カルボキシ-ペンタデシル)-ジメチル-アンモニウム]メチル-2-ヘキサデカノイルオキシ-エチルエステル(w16-DPTAP)の合成
ステップa：(2,3-ビス-ヘキサデカノイルオキシ-プロピル)-(16-ヒドロキシヘキサデシル)-ジメチル-アンモニウムブロミドの合成

40

実施例19のステップbに記載されているように、18.55gのヘキサデカン酸1-ジメチルアミノメチル-2-ヘキサデカノイルオキシ-エチルエステル、10gの16-ブロモ-1-ドデカノール、および500mlのアセトニトリルを使用して、合成を行った。粗生成物を酢酸エチルエステル/メタノール(10:1)から再結晶し、生成物の純度を薄層クロマトグラフィーおよび¹H-NMRによって判定した。

【0362】

ステップb：w-16-DPTAPの合成

実施例19のステップcに記載されているように、14gの(2,3-ビス-ヘキサデカノイルオキシ-プロピル)-(16-ヒドロキシヘキサデシル)-ジメチル-アンモニウムブロミド、0.05gのTEMPO、0.382gのKBr、0.3gのAliqu

50

a t (商標)、および 95.6 ml の次亜塩素酸ナトリウムに溶解した 1.43 g の NaHCO_3 を使用して、w-16-DPTAP を合成した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：クロロホルム／メタノール 8：1）で精製した。生成物を、 $^1\text{H-NMR}$ および LC-MS によって特徴付けた。

【0363】

実施例 22

ヘキサデカン酸 1- { [(19-カルボキシノナデシル) -ジメチルーアンモニウム] メチル-2-ヘキサデカノイルオキシエチルエステル (w20-DPTAP) の合成
ステップ a: イコサン-1, 20-ジオールの合成

イコサン-1, 20-ジオールを、Yoon et al., J. Org. Chem. 1973, 38(16), 2786-2792 に従って合成した。簡潔に言えば、 N_2 雰囲気下、25 g のエイコサン二酸に、100 ml の THF を添加した。次いで、474.5 ml のボラン／THF 錯体を 1.5 時間にわたって滴下した。200 ml の THF／ H_2O (1：1) を滴下する前に、混合物を終夜還流した。さらに攪拌下、250 ml の H_2O に溶解した 100 g の NaHCO_3 を添加し、2 時間後に、1000 ml の H_2O を混合物に添加し、沈殿物を濾過によって除去した。翌日およびその次の日に、白色沈殿物を濾過によって混合物から除去し、乾燥し、酢酸エチルエステルから再結晶した。生成物を、薄層クロマトグラフィーおよび $^1\text{H-NMR}$ によって特徴付けた。

【0364】

ステップ b: 20-ブロモイコサン-1-オールの合成

20-ブロモイコサン-1-オールを、Uneyama et al, Tetrahedron Letters, 1991, 32(11), 1459-1462 に従って合成した。簡潔に言えば、240 ml の石油エーテル、20.34 g のイコサン-1, 20-ジオール、および 280 ml の HBr (H_2O 中 48%) を添加する前に、400 ml の石油エーテルを加熱した。混合物を終夜還流し、室温でさらに 1 日インキュベートした。次いで、沈殿物を濾過によって除去し、300 ml のジクロロメタンに溶解した。溶液を Na_2SO_4 で乾燥し、シリカゲルに通して濾過した。溶媒を除去し、最後に粗生成物を石油エーテルから再結晶した。生成物の純度を、 $^1\text{H-NMR}$ によって判定した。

【0365】

ステップ c: (2, 3-ビス-ヘキサデカノイルオキシプロピル) - (20-ヒドロキシイコシル) -ジメチルーアンモニウムブロミドの合成

実施例 19 のステップ b に記載されているように、17.89 g のヘキサデカン酸 1-ジメチルアミノメチル-2-ヘキサデカノイルオキシエチルエステル、11.33 g の 20-ブロモイコサン-1-オール、および 500 ml のアセトニトリルを使用して、合成を行った。粗生成物をクロロホルム／メタノール (3：1) から再結晶し、生成物の純度を、薄層クロマトグラフィーおよび $^1\text{H-NMR}$ によって判定した。

【0366】

ステップ d: w-20-DPTAP の合成

実施例 19 のステップ c に記載されているように、11.45 g の (2, 3-ビス-ヘキサデカノイルオキシプロピル) - (20-ヒドロキシイコシル) -ジメチルーアンモニウムブロミド、0.039 g の TEMPO、0.294 g の KBr、0.2 g の Aliquat (商標)、および 73.7 ml の次亜塩素酸ナトリウムに溶解した 1.1 g の NaHCO_3 を使用して、w-20-DPTAP を合成した。粗生成物をシリカゲルに通して濾過し、クロロホルム／メタノール (4：1) による洗浄ステップの後、生成物を、 $^1\text{H-NMR}$ および LC-MS によって特徴付けた。

【0367】

実施例 23

ヘキサデカン酸 3- { [2- (15-カルボキシペンタデカノイルアミノ) -エトキシ] -ヒドロキシ-ホスホリルオキシ} -2-ヘキサデカノイルオキシプロピルエステル (w16-Amid-PE) の合成

10

20

30

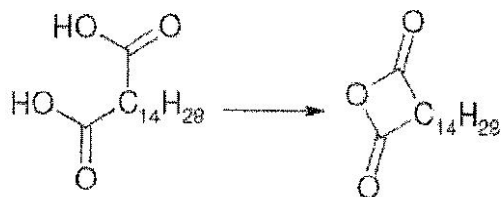
40

50

反応スキーム：

【化 4 5】

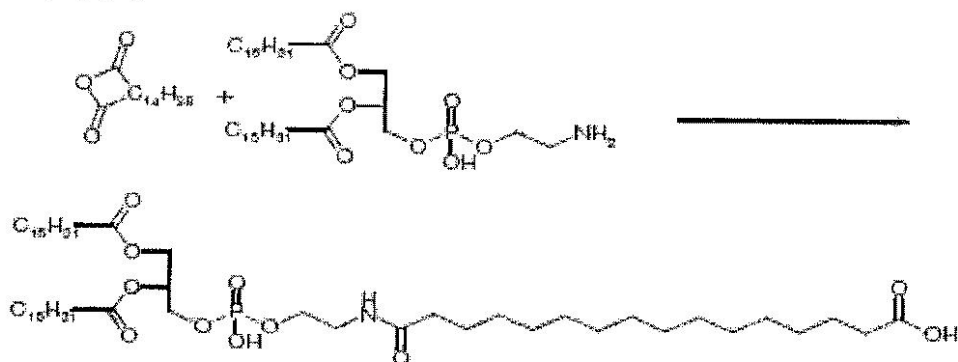
ステップa:



10

【化 4 6】

ステップb:



20

【0 3 6 8】

ステップ a：オキサシクロヘプタデカン-2，17-ジオンの合成

3 g のヘキサデカンジカルボン酸および 4.5 ml の無水酢酸を終夜還流した。次いで、溶媒を除去し、粗生成物をアセトニトリルから再結晶した。

【0 3 6 9】

ステップ b：w16-Amid-PE の合成

N₂ 雰囲気下、8 g の DPPE、160 ml のクロロホルム、3.1 g のオキサシクロヘプタデカン-2，17-ジオン、4.57 g のピリジン、および 0.1 g のジメチルアミノピリジンを混合し、70℃で終夜撹拌した。次いで、溶媒をロータリーエバポレータで除去し、超音波処理下で、残渣を 160 ml の 1N HCl に再懸濁した。翌日に、混合物をフリットにし、固体を 80 ml の 1N HCl で洗浄し、次いでクロロホルム／メタノール／H₂O（65：25：4）に溶解した。水相を除去し、有機溶媒をロータリーエバポレータで除去した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：クロロホルム／メタノール 9：1）で精製した。生成物を、¹H-NMR および LC-MS によって特徴付けた。

30

【0 3 7 0】

実施例 23

オクタン二酸モノコレステリルエステル（コレステロールヘミスベレート）の合成

ステップ a：オキソナン-2，9-ジオンの合成

N₂ 雰囲気下、50 g のスベリン酸および 100 ml の無水酢酸を 2 時間還流した。溶媒を蒸発させ、200 ml のアセトニトリルを残渣に添加し、混合物を冷凍器に終夜保持した。次いで、混合物をフリットにし、得られた残渣を 50 ml のアセトニトリルで洗浄し、乾燥した。

40

【0 3 7 1】

ステップ b：オクタン二酸モノコレステリルエステルの合成

35 g のコレステロールおよび 21.2 g のオキセパン-2，7-ジオンを丸底フラス

50

コに量り入れた。N₂雰囲気下、250 mlのトルオール、14.3 mlのピリジン、および0.22 gの4-ジメチルアミノピリジンを添加した。反応を1日還流した。次いで、溶媒を蒸発させ、残渣をジクロロメタン/酢酸エチルエステル（96：4）に溶解し、フリットによってシリカゲルで精製した（溶離液：ジクロロメタン/酢酸エチルエステル（96：4））。生成物を¹H-NMRによって特徴付けた。

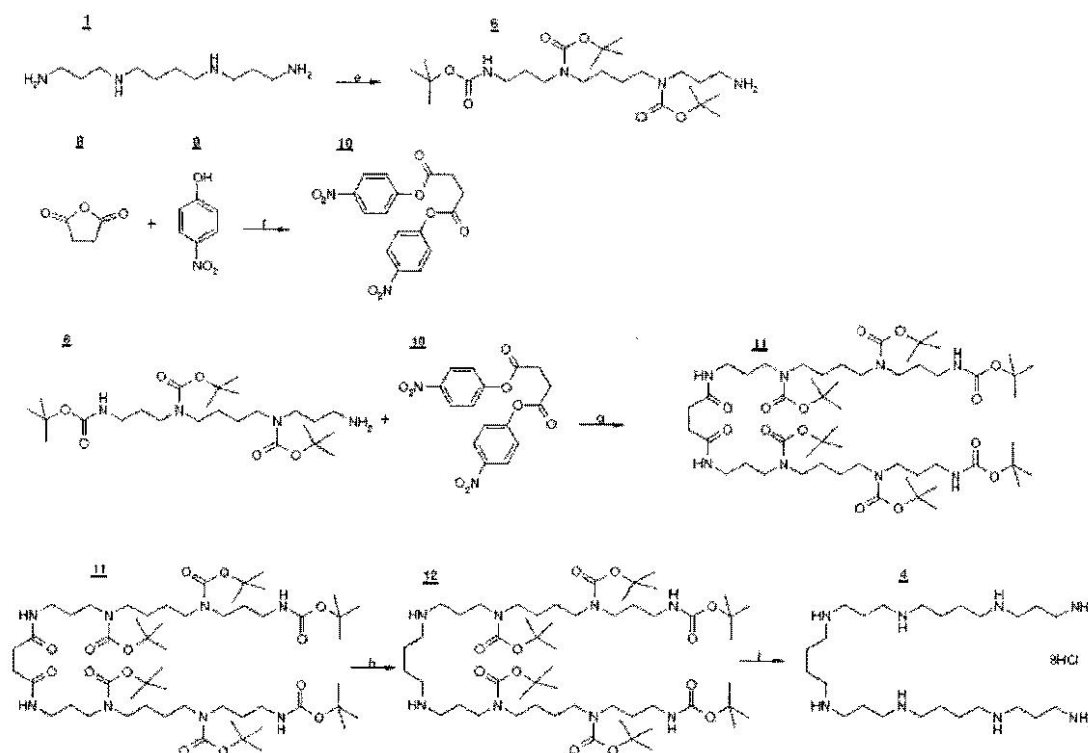
【0372】

実施例24

N-(3-アミノプロピル)-N'-[3-(4-{3-[4-(3-アミノプロピルアミノ)-ブチルアミノ]-プロピルアミノ}-ブチルアミノ)-プロピル]-ブタン-1,4-ジアミン（化合物4）の合成

反応スキーム：

【化47】



【0373】

ステップa：{4-[(3-アミノプロピル) -tert-ブトキシカルボニルアミノ] -ブチル} - (3-tert-ブトキシカルボニルアミノプロピル) -カルバミン酸tert-ブチルエステル（化合物6）の合成

Geall et al., Chem. Commun. 1998, 2035に従って、化合物を合成した。簡潔に言えば、10.12 gのスペルミンおよび150 mlのメタノールを攪拌し、-75℃に冷却した。次いで、5.95 mlのトリフルオロ酢酸エチルエステル（99%）を滴下した。温度を0℃に上げ、42.8 mlの二炭酸ジ-tert-ブチル（BOC2O）を添加し、反応を室温で終夜攪拌した。約50 mlの溶媒をロータリーエバポレーションで除去し、50 mlのH₂Oで置換し、200 mlのジエチルエーテルで3回抽出した。有機相をNa₂SO₄で乾燥し、濾過し、真空下で蒸発させた。無色油の粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液1：ジクロロメタン/メタノール/NH₄OH（25%）70：10：1；溶離液2：ジクロロメタン/メタノール/NH₄OH（25%）50：10：1）で精製した。生成物を、¹H-NMRおよびLC-MSによって特徴付けた。

【0374】

ステップb：コハク酸ビス-(4-ニトロフェニル) エステル（化合物10）の合成

丸底フラスコ中で、36.3 gのDCC (N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド)、0.2 gの4-ジメチルアミノピリジン、46.7 gのp-ニトロフェノール、および16 gの無水コハク酸、および600 mlの酢酸エチルエステルを混合し、室温で3日間攪拌した。溶媒をロータリーエバポレーションで除去し、黄色の残渣を150 mlのクロロホルムから再結晶した。白色生成物をクロロホルムで洗浄し、乾燥し、薄層クロマトグラフィーおよび¹H-NMRによって特徴付けた。

【0375】

ステップc：化合物11の合成

Graminski et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2002, 35-40に従って、化合物11を合成した。簡潔に言えば、8.8 gの化合物6を100 mlのジメチルホルムアミドに溶解した。次いで、1.95 N-メチルモルホリンおよび2.84 gの化合物10を添加し、混合物を室温で終夜攪拌させた。溶媒をロータリーエバポレーションで除去し、黄色油の粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：酢酸エチルエステル／メタノール 9：1）で精製した。溶媒を除去し、残渣を100 mlの酢酸エチルエステルおよび100 mlの石油エーテルに溶解した。混合物を150 mlのH₂Oで3回洗浄し、有機相をNa₂SO₄で乾燥した。濾過した後、溶媒をロータリーエバポレーションで除去し、生成物を薄層クロマトグラフィー、LC-MS、および¹H-NMRによって特徴付けた。

10

【0376】

ステップd：化合物12の合成

N₂雰囲気下、4.68 gの化合物11を40 mlのテトラヒドロフランに溶解し、反応混合物を氷浴で冷却した。次いで、10.8 mlのボランジメチルスルフィド錯体（テトラヒドロフラン中2M）を添加し、反応を室温で終夜攪拌させた。100 mlの石油エーテル、20 mlの酢酸エチルエステルおよび2 mlのメタノールを添加した後、溶液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（フラッシュクロマトグラフィー；溶離液：酢酸エチルエステル）にかけた。溶媒を除去し、無色油の粗生成物を別のシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：酢酸エチルエステル）で精製した。生成物を、LC-MSおよび¹H-NMRによって特徴付けた。

20

【0377】

ステップe：化合物4の合成

0.92 gの化合物12を10 mlのメタノールに溶解した。溶液を還流した後、15 mlのHCl（37%）と20 mlのHCl（2N）の混合物を滴下した。反応混合物を終夜還流した。10 mlのH₂Oを添加した後、混合物を50 mlのジクロロメタンで2回抽出した。水相の溶媒を除去し、生成物を¹H-NMRおよびLC-MSによって特徴付けた。

30

【0378】

実施例25

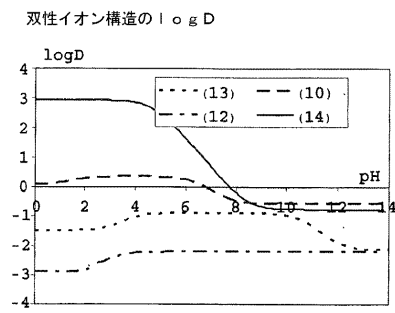
T E Eによる化合物4の誘導体化

50 mg（0.1 mmol）の化合物4の検体をω-ブロモ-α-カルボン酸でアルキル化した。簡潔に言えば、0.3 mmolもしくは0.6 mmolの6-ブロモヘキサン酸もしくは10-ブロモデカン酸、またはこれら2つの等モル混合物を2 mlの乾燥DMFに溶解し、0.1 mmolの化合物4をそれぞれの反応に添加した。混合物を50℃で終夜インキュベートし、室温に冷却し、アルキル化度を質量分析法で確定した。

40

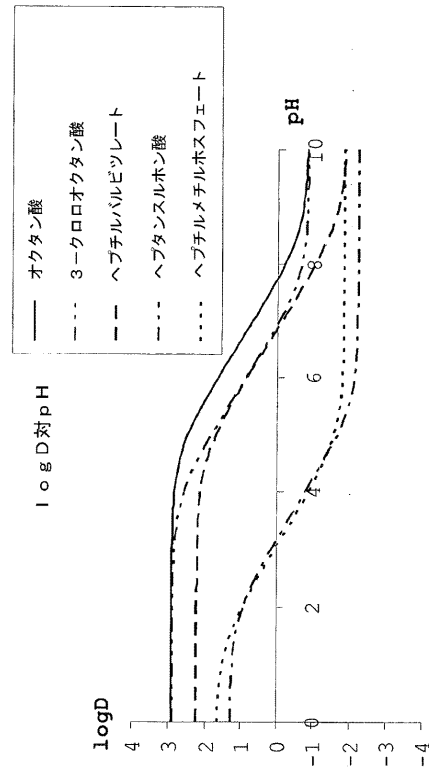
【図 1】

Figure 1:



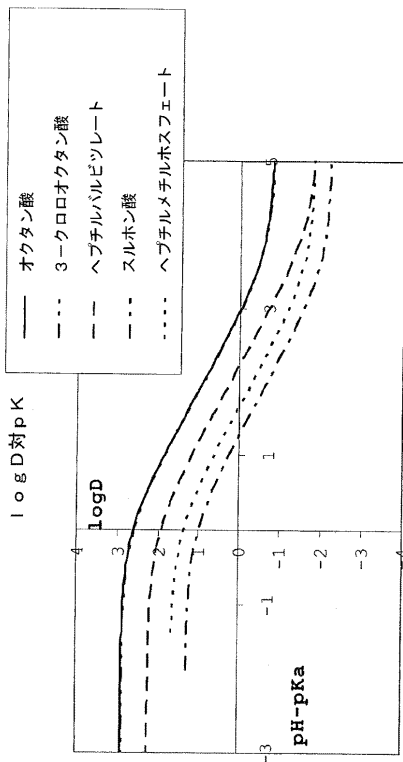
【図 2】

Figure 2:

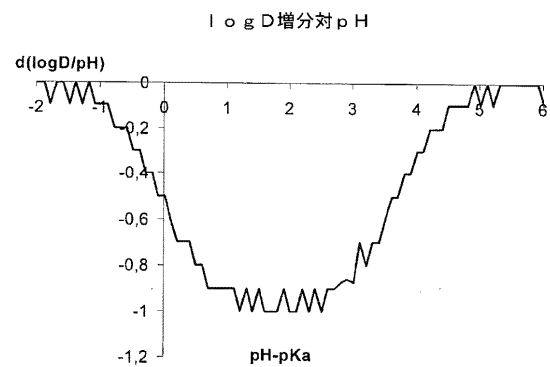


【図 3】

Figure 3:

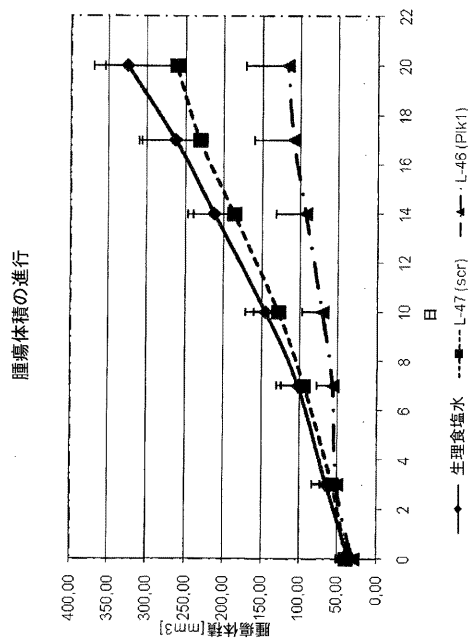


【図 4】



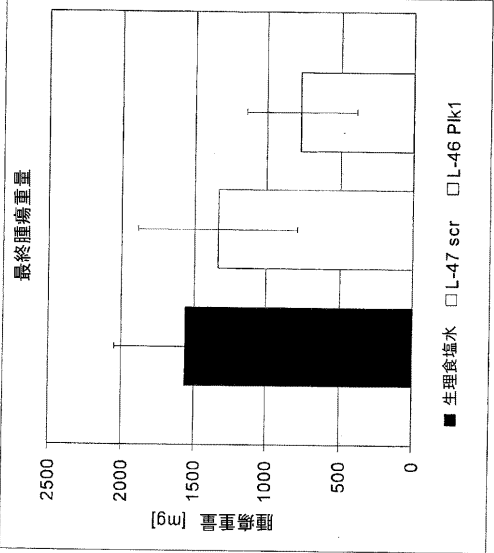
【図 13】

Figure 13:



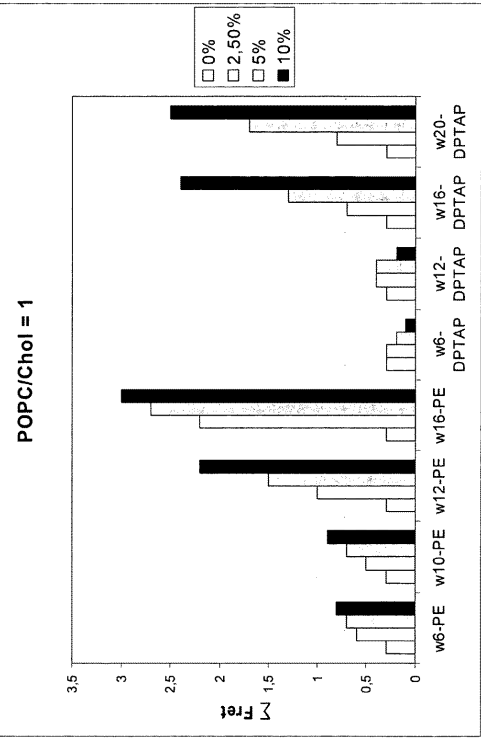
【図 14】

Figure 14:



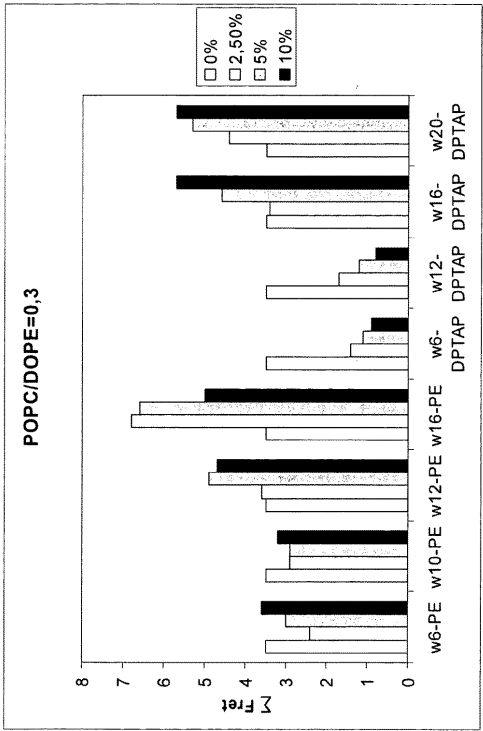
【図 15】

Figure 15:



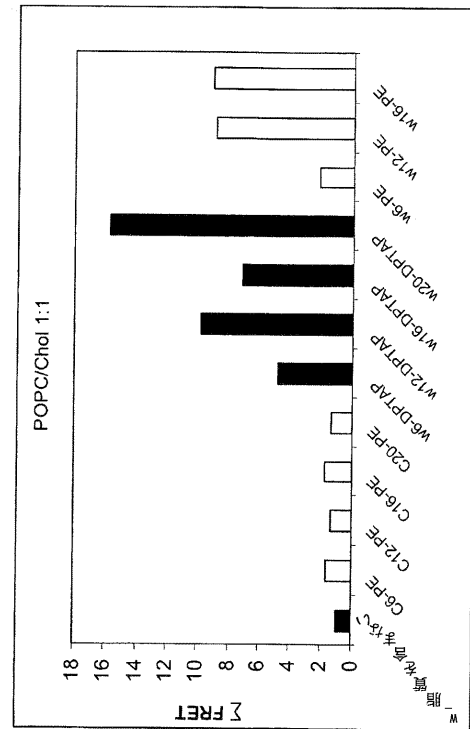
【図 16】

Figure 16:



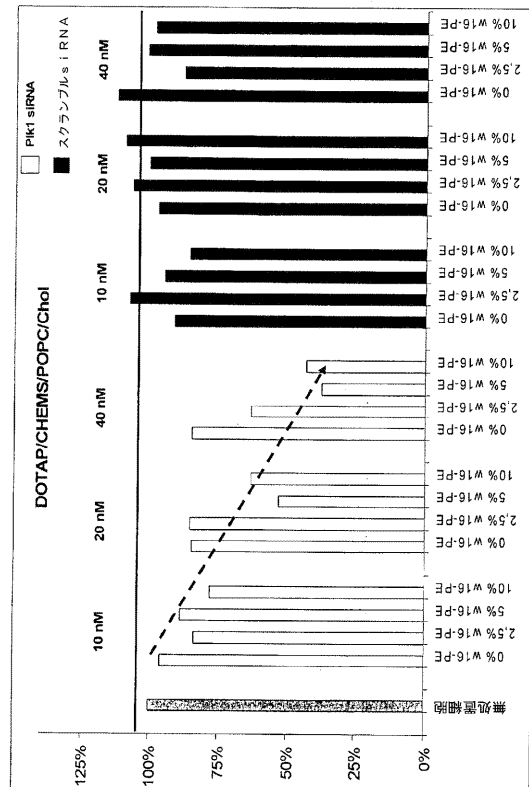
【図 20】

Figure 20:



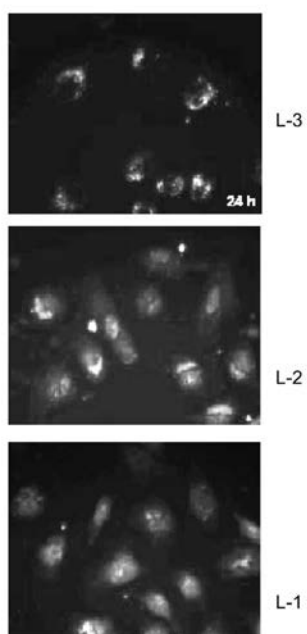
【图 2 2】

Figure 22:



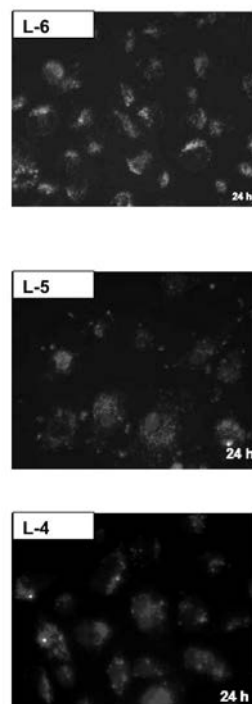
【 図 5 】

Figure 5:



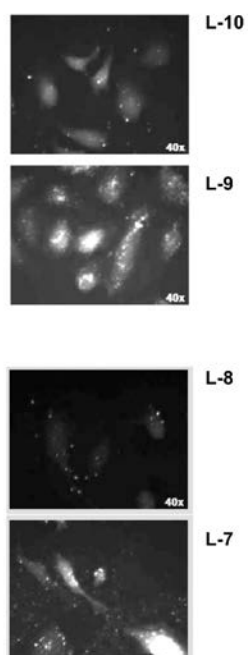
【 図 6 】

Figure 6:



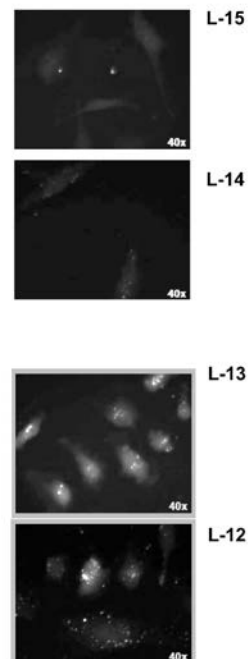
【 図 7 】

Figure 7:



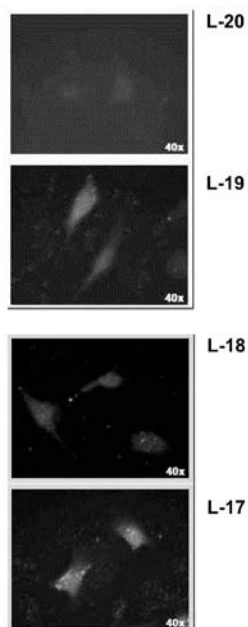
【 図 8 】

Figure 8:



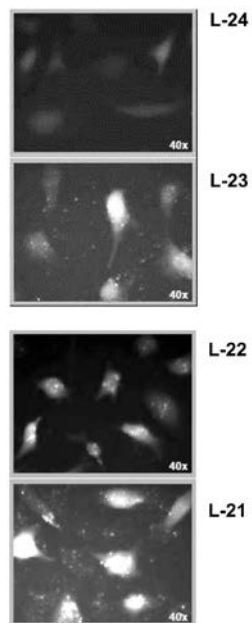
【図 9】

Figure 9:



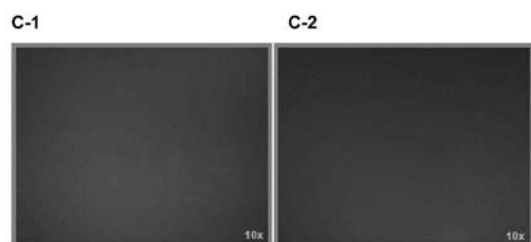
【図 10】

Figure 10:



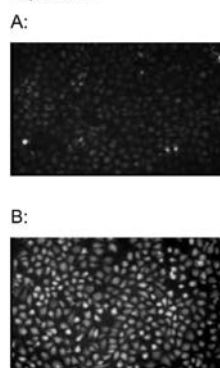
【図 11】

Figure 11:



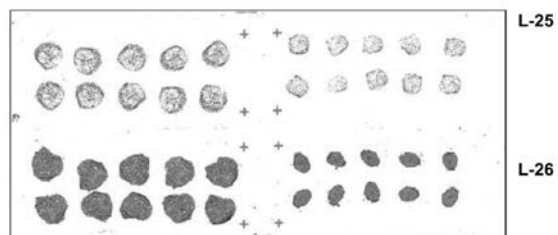
【図 17】

Figure 17:



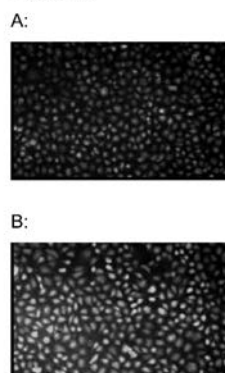
【図 12】

Figure 12:



【図 18】

Figure 18:



【手続補正書】

【提出日】平成28年8月30日(2016.8.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

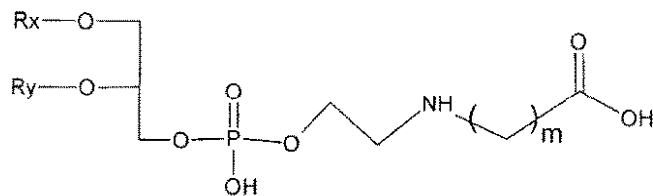
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

式：

【化1】



(式中、R_xおよびR_yは独立に、0、1、または2個のエチレン性不飽和結合を含むC₈～C₃₀アルキル鎖またはアシル鎖であり、m = 12～20である)
で示される化合物を含む製剤。

【請求項2】

前記化合物が、リポソーム、ミセル、逆ミセル、立方もしくは六方脂質相、渦巻形、エマルジョン、ダブルエマルジョン、および脂質、油および／もしくは両親媒性物質から構成される他の多量体集合体、ならびにそれらの混合物から選択される脂質集合体を形成する、請求項1に記載の製剤。

【請求項3】

前記脂質集合体が、中性および／またはカチオン性および／またはアニオン性脂質をさらに含む脂質相から形成される、請求項2に記載の製剤。

【請求項4】

前記中性脂質が、ホスファチジルコリン；ホスファチジルエタノールアミン；スフィンゴ脂質；セラミド；セレブロシド；ステロール系脂質；およびそれらの混合物から選択される、請求項3に記載の製剤。

【請求項5】

前記中性脂質が、DMPC、DPPC、DSPC、POPC、DOPC、DMPE、DPPE、DSPE、POPE、DOPE、ジフィタノイルPE、スフィンゴミエリン、セラミド、コレステロール、およびそれらの混合物を含む群から選択される、請求項4に記載の製剤。

【請求項6】

前記カチオン性脂質が、DOTAP、DMTAP、DPTAP、DC-Chol、DAC-Chol、DODAP、DOEPC、TC-Chol、DOTMA、DORIE、DDAP、CTAB、CPyC、DPIM、CHIM、MoChol、HisChol、BGSC、BGTC、DOSPER、DOSC、DOGSDO、DmC4Mo2、DmC3Mo2、C3Mo2、C3Mo3、C4Mo4、C5Mo2、C6Mo2、C8Mo2、PipC2Chol、MoC2Chol、MoC3Chol、N-メチル-PipChol、PyrroC2Chol、PyC2Chol、ImC3Chol、PipeC2Chol、およびそれらの混合物を含む群から選択される、請求項3に記載の製剤。

【請求項7】

前記アニオン性脂質が、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、CHEMS、アニオン性ステロール、セチル

ホスフェート、ジアシルグリセロールヘミスクシネート、カルジオリピン、およびそれらの混合物を含む群から選択される、請求項3に記載の製剤。

【請求項8】

R_xおよびR_yがC₁₆アシルであり、mが16であり、製剤がDOTAP、POPCおよびCHEMSをさらに含む、請求項1に記載の製剤。

【請求項9】

請求項1に記載される化合物の量が、全脂質相の0.1モル%～90モル%である、請求項2～8のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項10】

前記脂質集合体が両性リポソームである、請求項2～9のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項11】

前記脂質集合体が1種以上の両性脂質を含む脂質相から形成される、請求項10に記載の製剤。

【請求項12】

前記両性脂質が、HistChol、HistDG、isoHistSuccDG、アシルカルノシン、HCChol、Hist-PS、およびEDTA-Cholを含む群から選択される、請求項11に記載の製剤。

【請求項13】

前記脂質集合体が、(i)安定なカチオン性脂質および帯電可能なアニオン性脂質、(ii)帯電可能なカチオン性脂質および帯電可能なアニオン性脂質、または(iii)安定なアニオン性脂質および帯電可能なカチオン性脂質から選択される両性脂質混合物をさらに含む脂質相から形成される、請求項10に記載の製剤。

【請求項14】

前記脂質相が、20～90モル%の前記両性脂質混合物、および2～20モル%の請求項1に記載される化合物を含む、請求項13に記載の製剤。

【請求項15】

前記脂質相が、1以上のホスファチジルコリン、スフィンゴ脂質、ホスファチジルエタノールアミンおよびコレステロールから選択される、1種以上の中性または双性イオン性脂質をさらに含む、請求項14に記載の製剤。

【請求項16】

前記両性脂質混合物が「両性I」脂質対であり、カチオン性脂質とアニオン性脂質のモル比(C/A比)が0.3～0.7である、請求項13～15のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項17】

前記両性脂質混合物が「両性II」脂質対であり、カチオン性脂質とアニオン性脂質のモル比(C/A比)が0.3～3である、請求項13～15のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項18】

前記両性脂質混合物が、DOTAP/Chems、DOTAP/DMG-Succ、DOTAP/DOG-Succ、DODAP/Chems、DODAP/DMG-Succ、DODAP/DOG-Succ、DDAB/Chems、DDAB/DMG-Succ、DDAB/DOG-Succ、DC-Chol/Chems、DC-Chol/DMG-Succ、DC-Chol/DOG-Succ、DAC-Chol/Chems、DAC-Chol/DMG-Succ、DAC-Chol/DOG-Succ、TC-Chol/Chems、TC-Chol/DMG-Succ、TC-Chol/DOG-Succ、MoChol/Chems、MoChol/DMG-Succ、HisChol/DOG-Succ、HisChol/Chems、HisChol/DMG-Succ、HisChol/DOG-Succ、Chim/Chems、Chim/DMG-Succ、Chim/DOG-Succ、DmC4Mo2/Chems、DmC4Mo2/DMG-Succ、およびDmC4Mo2/DOG-Succから選択される、請求項16また

は 17 に記載の 製剤。

【請求項 19】

前記両性リポソームが、ユニラメラ、オリゴラメラ、またはマルチラメラであり、前記両性リポソームの粒径が、50～1000nmである、請求項 10 に記載の 製剤。

【請求項 20】

前記脂質集合体が、少なくとも 1 種の医薬品有効成分を隔絶する、請求項 2～19 のいずれか一項に記載の 製剤。

【請求項 21】

前記医薬品有効成分が、DNA プラスミド、ポリヌクレオチド、およびオリゴヌクレオチドから選択される核酸系薬物である、請求項 20 に記載の 製剤。

【請求項 22】

前記核酸系薬物が、脊椎動物細胞において 1 種 以上 の RNA へと転写されることが可能であり、前記 RNA が、mRNA、shRNA、miRNA、またはリボザイムであり、前記 mRNA は 1 種 以上 のタンパク質またはポリペプチドをコードする、請求項 21 に記載の 製剤。

【請求項 23】

前記核酸系薬物が、環状 DNA プラスミド、直鎖 DNA 構築物、mRNA、アントゴmir、miRNA または siRNA である、請求項 21 に記載の 製剤。

【請求項 24】

前記核酸系薬物がオリゴヌクレオチドである、請求項 21 に記載の 製剤。

【請求項 25】

前記オリゴヌクレオチドが、デコイオリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、転写に影響を及ぼす作用剤、スプライシングに影響を及ぼす作用剤、リボザイム、DNA ザイム、またはアプタマーである、請求項 24 に記載の 製剤。

【請求項 26】

前記オリゴヌクレオチドが、腫瘍標的に向けられている、請求項 24 に記載の 製剤。

【請求項 27】

前記腫瘍標的が、CEACAM6、BCL-2、EPHA2、CTNNB1、RhoA、PLK1、XIAP、テロメラーゼ、サイクリンD1、K-Ras、EG5、Ki67、アンドロゲン受容体、FoxM1、Akt1、VEGF、KSB、およびCDC25B から選択される、請求項 26 に記載の 製剤。

【請求項 28】

請求項 2～27 のいずれか一項に記載の 製剤、およびそのための医薬として許容されるビヒクルを含む医薬組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	47/14	(2006.01)	A 6 1 K	47/14
A 6 1 K	47/16	(2006.01)	A 6 1 K	47/16
A 6 1 K	31/711	(2006.01)	A 6 1 K	31/711
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	31/713
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00

- (72)発明者 シュテフェン・パンツナー
ドイツ連邦共和国デー 0 6 1 1 4 ハレ、ヘーアヴェークシュトラセ 7 番
- (72)発明者 ジルケ・ルッツ
ドイツ連邦共和国デー 0 6 1 1 4 ハレ、シュライヤーマッハーシュトラセ 3 3 番
- (72)発明者 エヴゲニオス・シエピ
ドイツ連邦共和国デー 0 4 1 5 5 ライプツィヒ、ゲオルク・シューマン・シュトラセ 7 8 番
- (72)発明者 クリスティアン・ラインシュ
ドイツ連邦共和国デー 0 6 1 1 0 ハレ、ベーゼナー・シュトラセ 7 番
- (72)発明者 クラウディア・ムーラー
ドイツ連邦共和国デー 0 4 6 8 5 ネルヒャウ、マルクト 1 1 番

F ターム (参考) 4C076 AA19 AA95 CC04 CC07 CC27 DD46 DD51 DD63 DD70 FF34
4C084 AA13 MA24 NA13 NA14 ZB071 ZB111 ZB261 ZC411
4C086 AA01 EA16 MA03 MA05 MA24 NA13 NA14 ZB07 ZB11 ZB26
ZC41