明　細　書

発明の名称 ： KRAS遺伝子発現抑制RNAi医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、KRAS遺伝子発現を抑制する組成物、該組成物からなる医薬等に関する。

背景技術

[0002] KRASは、分子量約21 kDaのGTP加水分解活性を有する蛋白質であるRASファミリーに属する。KRASは細胞膜の内側に存在し、上皮成長因子(Epidermal Growth Factor; EGF)等細胞外の増殖因子とその受容体の結合によるシグナルを細胞内へ伝達する役目を担っている。KRASには活性化変異があり、ヒトの癌の約20%で活性化変異が認められている。特に膵臓癌、大腸癌および肺癌においては高い頻度でKRASの活性化変異が認められている(キャンサーリサーチ(Cancer Res), 2012年, 第72巻, p.2457参照)。大腸癌においては、抗上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR)抗体医薬であるcetuximabとpanitumumabがKRASの活性化変異をもった患者において無効であることが報告されている(“ニューイングランド ジャーナル オブ メディシン(N Engl J Med)”, 2009年, 第360巻, p.1408、“ジャーナル オブ クリニカル オンコロジ(J Clin Oncol)”, 2008年, 第26巻, p.374、“ジャーナル オブ クリニカル オンコロジ(J Clin Oncol)”, 2008年, 第26巻, p.1626参照)。KRASは抗癌剤の良い標的であると考えられ、低分子創薬によるKRAS阻害剤創製の試みが長年なされてきた(“キャンサー バイオロジ アンド セラピー(Cancer Biology & Therapy)”, 2002年, 第1巻, p.599参照)。しかしながら、未だKRASを標的とした癌等の有効な治療薬はない。

[0003] 標的遺伝子の発現を抑制する方法として、例えばRNA干渉(RNA interference、以下、RNAiとよぶ)を利用した方法等が知られており、具体的には、線虫において標的とする遺伝子と同一の配列を有する二本鎖RNAを導入することにより、該標的遺伝子の発現が特異的に抑制される現象が報告されている(“ネ

イチャー(Nature)”,1998年,第391巻,第6669号,p.806-811参照)。また、ショウジョウバエにおいて長い二本鎖RNAの代わりに、21～23塩基の長さの二本鎖RNAを導入することによっても、標的遺伝子の発現が抑制されることが見出され、これはshort interfering RNA(siRNA)と名づけられている(国際公開第01/75164号パンフレット参照)。

[0004] RNAiについては、in vivo試験においても多く検証されており、50塩基対以下のsiRNAを用いた胎児の動物での効果(米国特許出願公開第第2002-132788号明細書参照)および成体マウスでの効果(国際公開第03/10180号パンフレット参照)が報告されている。また、siRNAをマウス胎児に静脈内投与した場合に、腎臓、脾臓、肺、膵臓および肝臓の各臓器で特定の遺伝子の発現抑制効果が確認されている(“ネイチャー・ジェネティクス(Nature Genetics)”, 2002年, 第32巻, 第1号, p.107-108参照)。さらに、脳細胞においてもsiRNAを直接投与することで特定の遺伝子が発現抑制されることが報告されている(“ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotechnology)”, 2002年, 第20巻, 第10号, p.1006-1010参照)。

[0005] KRAS siRNAは、例えば特許文献1、特許文献2等に記載されている。

[0006] siRNA類を含有する医薬は、例えば、特許文献3、特許文献4、特許文献5等に記載されている。

特許文献3中には、siRNA類と、例えば、1,2-ジリノレイルオキシ- N,N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)等を含有する医薬が開示されている。DLinDMA等は、より柔軟なカチオン性脂質を開発すること、それによりリポソーム等の膜流動性を高めることを目的に、構造上類似のカチオン性脂質であるN-(2,3-ジ-(9-(Z)-オクタデセノイルオキシ))-プロパン-1-イル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTAP)およびN-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)の高級アルキル基を、不飽和部位を少なくとも2ヵ所含む高級アルキル基としたことにより特徴付けられる。また、特許文献4中には、siRNA類と、例えば、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-K-DMA)等を含有する医薬が開示

されている。

また、特許文献5中には、例えば、trans-3,4-ビス(((Z)-オクタデカ-9-エノイルオキシ)メチル)ピロリジン(化合物I-3)等が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第2008/109516号パンフレット

特許文献2：国際公開第2010/115206号パンフレット

特許文献3：国際公開第2005/121348号パンフレット

特許文献4：国際公開第2009/086558号パンフレット

特許文献5：国際公開第2011/136368号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

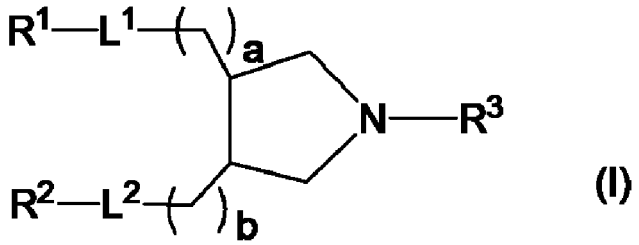
[0008] 本発明の目的は、KRAS遺伝子発現を抑制する組成物、該組成物からなる医薬等を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は以下の(1)～(23)に関する。

(1) センス鎖およびアンチセンス鎖を有し、該センス鎖と該アンチセンス鎖とは少なくとも25塩基対を有し、該アンチセンス鎖は、配列番号1～3のいずれか1つのKRAS遺伝子のmRNAの連続する少なくとも19塩基の配列に相補的な塩基の配列を有し、最大35ヌクレオチドの長さを有する、薬物としての二本鎖核酸と、式(I)

[0010] [化1]



(I)

(式中、R^1およびR^2は、同一または異なって炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルキル、アルケニルもしくはアルキニルであり、

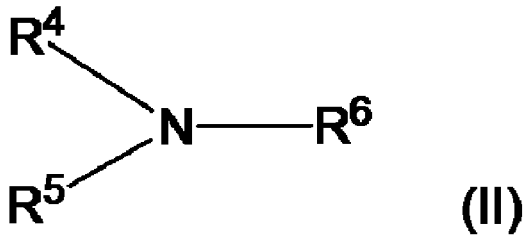
L^1およびL^2は、同一または異なって-CO-O-または-O-CO-であり、

aおよびbは、同一または異なって1～3であり、

R^3は水素原子、炭素数1～6のアルキルまたは炭素数3～6のアルケニルである)で表されるカチオン性脂質を含有する脂質粒子を含有する組成物。

(2) 脂質粒子が、さらに式(II)

[0011] [化2]



(II)

(式中、R^4およびR^5は、同一または異なって炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルキル、アルケニルもしくはアルキニルであり、

R^6は水素原子、炭素数1～6のアルキル、炭素数3～6のアルケニル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1～3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1～6のアルキルもしくは炭素数3～6のアルケニルである)で表されるカチオン性脂質を含有する脂質粒子である、前記(1)の組成物。

(3) R^4およびR^5が、ともにドデシル、トリデシル、テトラデシル、2,6,10-トリメチルウンデシル、ペンタデシル、3,7,11-トリメチルドデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、6,10,14-トリメチルペンタデカン-2-イル、ノナデシル、2,6,10,14-テトラメチルペンタデシル、イコシル、3,7,11,15-テトラメチルヘキサデシル、ヘニコシル、ドコシル、トリコシル、テトラコシル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタ

デカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニル、(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニル、3,7,11-トリメチルドデカ-2,6,10-トリエニルまたは3,7,11,15-テトラメチルヘキサデカ-2-エニルである前記(2)の組成物。

(4) R^4およびR^5が、ともにテトラデシル、ヘキサデシル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(Z)-イコサ-11-エニルまたは(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニルである前記(2)記載の組成物。

(5) R^6が水素原子、メチル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1～3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1～6のアルキルもしくは炭素数3～6のアルケニルである前記(3)または(4)記載の組成物。

(6) R^3が水素原子またはメチルである前記(1)～(5)のいずれかに記載の組成物。

(7) L^1およびL^2が-O-CO-であり、R^1およびR^2が、同一にドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、イコシル、ドコシル、テトラコシル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニル、(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニル、3,7,11-トリメチルドデカ-2,6,10-トリエニルまたは3,7,11,15-テトラメチルヘキサデカ-2-エニルである前記(1)～(6)のいずれかに記載の組成物。

(8) L^1およびL^2が、-CO-O-であり、R^1およびR^2が、同一にトリデシル、ペンタデシル、ヘプタデシル、ノナデシル、ヘニコシル、トリコシル、(Z)-トリデ

カ-8-エニル、(Z)-ペンタデカ-8-エニル、(Z)-ヘプタデカ-5-エニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニル、(E)-ヘプタデカ-8-エニル、(Z)-ヘプタデカ-10-エニル、(8Z,11Z)-ヘプタデカ-8,11-ジエニル、(8Z,11Z,14Z)-ヘプタデカ-8,11,14-トリエニル、(Z)-ノナデカ-10-エニル、(10Z,13Z)-ノナデカ-10,13-ジエニル、(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニル、2,6,10-トリメチルウンデカ-1,5,9-トリエニルまたは2,6,10,14-テトラメチルペンタデカ-1-エニルである前記(1)～(6)のいずれかに記載の組成物。

(9) 薬物として、配列番号4および5、6および7、8および9、4および10または4および11の、それぞれセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する二本鎖核酸を含有する前記(1)～(8)のいずれかに記載の組成物。

(10) カチオン性脂質が、該二本鎖核酸と複合体を形成しているか、または中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと該二本鎖核酸との複合体を形成している、前記(1)～(9)のいずれかに記載の組成物。

(11) カチオン性脂質が、該二本鎖核酸と複合体を形成しているか、または中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと該二本鎖核酸との複合体を形成しており、脂質粒子が該複合体と該複合体を封入する脂質膜から構成された脂質粒子である前記(1)～(9)のいずれかに記載の組成物。

(12) 前記(1)～(11)のいずれかに記載の組成物を用いて該二本鎖核酸を細胞内に導入することを特徴とする、RAS遺伝子の発現を抑制する方法。

(13) 細胞が、ほ乳類の腫瘍にある細胞である前記(12)記載の方法。

(14) 細胞が、ほ乳類の大腸または膵臓にある細胞である前記(12)記載の方法。

(15) 細胞内に導入する方法が、静脈内投与によって細胞内に導入する方法である前記(12)～(14)のいずれかに記載の方法。

(16) 前記(1)～(11)のいずれかに記載の組成物を哺乳動物に投与するRAS関連疾患の治療方法。

(17) 投与する方法が、静脈内投与である前記(16)記載の方法。

(18) 前記(1)～(11)のいずれかに記載の組成物を哺乳動物に投与する癌の治

療方法。

(19) 投与する方法が、静脈内投与である前記(18)記載の方法。

(20) 前記(1)～(11)のいずれかに記載の組成物からなる、RAS関連疾患の治療に用いるための医薬。

(21) 静脈内投与用である前記(20)記載の医薬。

(22) 前記(1)～(11)のいずれかに記載の組成物からなる、癌の治療剤。

(23) 静脈内投与用である前記(22)記載の癌の治療剤。

発明の効果

[0012] 例えば本発明の組成物を、哺乳動物に投与して、生体内において、KRAS遺伝子発現を抑制し、RAS関連疾患を治療することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]MIAPaCa-2ゼノグラフトマウスに実施例1で得られた製剤1-A～Cのそれぞれ siRNA 10 mg/kg相当量を投与後48時間後の腫瘍中KRAS mRNA量を示す。縦軸は生理食塩水投与群を1としたKRAS mRNA量の相対値を示す。

[図2]MIAPaCa-2ゼノグラフトマウスに実施例1で得られた製剤1-A～CのsiRNA 10 mg/kg相当量を0日目および7日目に投与した際の腫瘍体積の相対値の推移を示す。縦軸は0日目を1とした腫瘍体積の相対値を示す。横軸は実験開始後の経過日数を示す。それぞれ白丸は生理食塩水投与群、黒丸は製剤投与群を示す。

[図3]BALB/cマウスに実施例1で得られた製剤1-A～Cの、それぞれsiRNA 10 mg/kg相当量を投与後7日目の血中抗PEG抗体量を示す。縦軸は抗PEG抗体量を示す。

[図4]MIAPaCa-2ゼノグラフトマウスに実施例2で得られた製剤2-A, DまたはEのそれぞれsiRNA 1, 3または10 mg/kg相当量を投与後48時間後の腫瘍中KRAS mRNA量を示す。縦軸は生理食塩水投与群を1としたKRAS mRNA量の相対値を示す。横軸は各製剤の投与量を示す。

[図5]MIAPaCa-2ゼノグラフトマウスに実施例2で得られた製剤2-A, DまたはEのそれぞれsiRNA 1, 3または10 mg/kg相当量を投与後7日目の腫瘍体積の相対

値を示す。縦軸は0日目を1とした腫瘍体積の相対値を示す。横軸は各製剤の投与量を示す。

[図6]MIAPaCa-2ゼノグラフトマウスに実施例1で得られた製剤1-Aおよび実施例2で得られた製剤2-AのそれぞれsiRNA 2.5 mg/kg相当量を投与後7日目の腫瘍体積の相対値を示す。縦軸は0日目を1とした腫瘍体積の相対値を示す。

[図7]MIAPaCa-2ゼノグラフトマウスに実施例1で得られた製剤1-A、実施例3で得られた製剤3-Aおよび実施例4で得られた製剤4-AのそれぞれsiRNA 2.5 mg/kg相当量を投与後7日目の腫瘍体積の相対値を示す。縦軸は0日目を1とした腫瘍体積の相対値を示す。

[図8]MIAPaCa-2ゼノグラフトマウスに実施例1で得られた製剤1-A、実施例5で得られた製剤5-Aおよび実施例6で得られた製剤6-AのそれぞれsiRNA 2.5 mg/kg相当量を投与後7日目の腫瘍体積の相対値を示す。縦軸は0日目を1とした腫瘍体積の相対値を示す。

[図9]MIAPaCa-2ゼノグラフトマウスに実施例1で得られた製剤1-Aおよび実施例7で得られた製剤7-AのそれぞれsiRNA 5 mg/kg相当量を投与後7日目の腫瘍体積の相対値を示す。縦軸は0日目を1とした腫瘍体積の相対値を示す。

[図10]HCT116(ATCC)ゼノグラフトマウスに実施例1で得られた製剤1-Aを、0日目および7日目にsiRNA 10 mg/k相当量を投与した際の腫瘍体積の相対値の推移を示す。縦軸は0日目を1とした腫瘍体積の相対値を示す。横軸は実験開始後の経過日数を示す。白丸は生理食塩水投与群、黒丸は製剤投与群を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明は、薬物としてのKRAS遺伝子の発現を低下または停止させる能力を有する二本鎖核酸と、カチオン性脂質を含有する脂質粒子を含有する組成物を提供する。

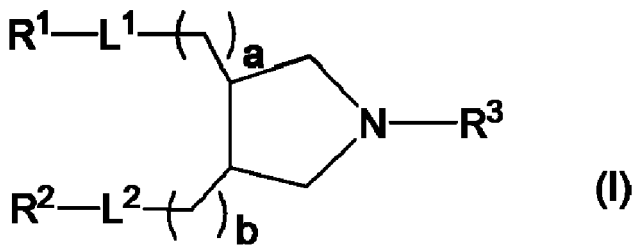
また、該組成物を、哺乳動物に投与して、生体内において、KRAS遺伝子発現を抑制し、RAS関連疾患を治療する方法も、提供する。

本発明は、過剰増殖性疾病または疾患(例えば、白血病、メラノーマ、細胞腫、癌、腫瘍、腺腫)または不適切なRAS遺伝子の発現に関連する1つ以上の血

管新生性疾病を治療または予防するための方法も、提供する。

[0015] 本発明の組成物における脂質粒子は、式(I)

[0016] [化3]



(I)

(式中、R^1およびR^2は、同一または異なって炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルキル、アルケニルもしくはアルキニルであり、

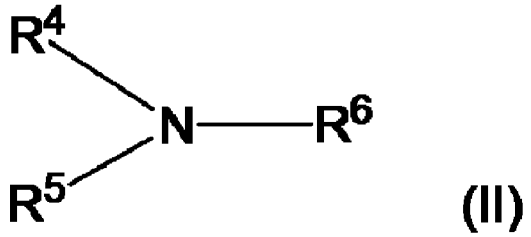
L^1およびL^2は、同一または異なって-CO-O-または-O-CO-であり、

aおよびbは、同一または異なって1～3であり、

R^3は水素原子、炭素数1～6のアルキルまたは炭素数3～6のアルケニルである)で表されるカチオン性脂質を含有する。以下、式(I)で表される化合物を、化合物(I)ということもある。他の式番号の化合物についても同様である。

また、本発明の組成物における脂質粒子は、化合物(I)および式(II)

[0017] [化4]



(II)

(式中、R^4およびR^5は、同一または異なって炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルキル、アルケニルもしくはアルキニルであり、

R^6は水素原子、炭素数1～6のアルキル、炭素数3～6のアルケニル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1～3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバ

モイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1～6のアルキルもしくは炭素数3～6のアルケニルである)で表されるカチオン性脂質を含有する脂質粒子である。

[0018] 式(I)の各基の定義において、炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルキルとしては、例えばドデシル、トリデシル、テトラデシル、2,6,10-トリメチルウンデシル、ペンタデシル、3,7,11-トリメチルドデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、6,10,14-トリメチルペンタデカン-2-イル、ノナデシル、2,6,10,14-テトラメチルペンタデシル、イコシル、3,7,11,15-テトラメチルヘキサデシル、ヘニコシル、ドコシル、トリコシル、テトラコシル等があげられる

[0019] 式(I)の各基の定義において、炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルケニルとしては、1～3つの2重結合を含む炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルケニルであればよく、例えば(Z)-トリデカ-8-エニル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ペンタデカ-8-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-ヘプタデカ-5-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-ヘプタデカ-8-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-ヘプタデカ-10-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(8Z,11Z)-ヘプタデカ-8,11-ジエニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(8Z,11Z,14Z)-ヘプタデカ-8,11,14-トリエニル、(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエニル、(Z)-ノナデカ-10-エニル、(Z)-イコサ-11-エニル、(10Z,13Z)-ノナデカ-10,13-ジエニル、(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニル、2,6,10-トリメチルウンデカ-1,5,9-トリエニル、3,7,11-トリメチルドデカ-2,6,10-トリエニル、2,6,10,14-テトラメチルペンタデカ-1-エニル、3,7,11,15-テトラメチルヘキサデカ-2-エニル等があげられ、好ましくは(Z)-ペンタデカ-8-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-ヘプタデカ-5-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(8Z,11Z)-ヘプタデカ-8,11-ジエニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル等があげられる。

[0020] 式(I)の各基の定義において、炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルキ

ニルとしては、1～3つの3重結合を含む炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルキニルであればよく、例えばドデカ-11-イニル、トリデカ-12-イニル、ペンタデカ-6-イニル、ヘキサデカ-7-イニル、ペンタデカ-4,6-ジイニル、ヘキサデカ-5,7-ジイニル、ヘプタデカ-8-イニル、オクタデカ-9-イニル等があげられる。

[0021] なお、化合物(I)において、R^1およびR^2は、同一の、炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルキル、アルケニルもしくはアルキニルであることが好ましい。また、R^1およびR^2は、炭素数12～24の直鎖状もしくは分枝状のアルキルもしくはアルケニルであることがより好ましく、炭素数12～24の直鎖状のアルケニルであることがさらに好ましい。

[0022] 式(II)の各基の定義において、炭素数12～24の直鎖状もしくは分枝状のアルキルとしては、例えばドデシル、トリデシル、テトラデシル、2,6,10-トリメチルウンデシル、ペンタデシル、3,7,11-トリメチルドデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、6,10,14-トリメチルペンタデカン-2-イル、ノナデシル、2,6,10,14-テトラメチルペンタデシル、イコシル、3,7,11,15-テトラメチルヘキサデシル、ヘニコシル、ドコシル、トリコシル、テトラコシル等があげられる。

[0023] 式(II)の各基の定義において、炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルケニルとしては、1～3つの2重結合を含む炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルケニルであればよく、例えば(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニル、(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニル、3,7,11-トリメチルドデカ-2,6,10-トリエニル、3,7,11,15-テトラメチルヘキサデカ-2-エニル等があげられ、好ましくは(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(Z)-イコサ-11-エニル、(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニル等があげられる。

[0024] 式(II)の各基の定義において、炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルキニルとしては、1～3つの3重結合を含む炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルキニルであればよく、例えばドデカ-11-イニル、テトラデカ-6-イニル、ヘキサデカ-7-イニル、ヘキサデカ-5,7-ジイニル、オクタデカ-9-イニル等があげられる。

[0025] なお、式(II)において、R^4およびR^5は、同一の、炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルキル、アルケニルもしくはアルキニルであることが好ましい。また、R^4およびR^5は、炭素数12～24の直鎖状もしくは分枝状のアルキルもしくはアルケニルであることがより好ましく、炭素数12～24の直鎖状のアルケニルであることがさらに好ましい。

[0026] 式(I)および式(II)の各基の定義において、炭素数1～6のアルキルとしては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、シクロブチル、シクロプロピルメチル、ペンチル、イソペンチル、sec-ペンチル、ネオペンチル、tert-ペンチル、シクロペンチル、ヘキシル、シクロヘキシル等があげられ、好ましくはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、sec-ペンチル、tert-ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル等があげられ、さらに好ましくはメチル、エチル、プロピル等があげられる。

[0027] 炭素数3～6のアルケニルとしては、例えばアリル、1-プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル等があげられ、好ましくはアリル等があげられる。

[0028] 置換された炭素数1～6のアルキルにおけるアルキル部分および置換された炭素数3～6のアルケニルにおけるアルケニル部分は、それぞれ前記炭素数1～6のアルキルおよび炭素数3～6のアルケニルと同義である。

[0029] 化合物(I)および化合物(II)において、構造中の窒素原子上の孤立電子対に水素イオンが配位してもよく、該水素イオンが配位した窒素原子は、製薬上許容し得る陰イオンと塩を形成していてもよく、化合物(I)および化合物(II)

は、該窒素原子上に孤立電子対に水素イオンが配位した化合物も包含する。

製薬上許容し得る陰イオンとしては、例えば塩化物イオン、臭化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオン、リン酸イオン等の無機イオン、酢酸イオン、シュウ酸イオン、マレイン酸イオン、フマル酸イオン、クエン酸イオン、安息香酸イオン、メタンスルホン酸イオン等の有機酸イオン等があげられる。

[0030] 式(II)の定義において、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イルおよびピペリジン-4-イルは、それぞれ、環中の窒素原子上に結合した水素原子が、メチルまたはエチルに変換されたものを包含する。

[0031] モノアルキルアミノおよびジアルキルアミノとしては、それぞれ1つおよび同一または異なって2つの、炭素数1～6のアルキル(前記と同義)または、アミノ、メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1～6のアルキル(前記と同義)で置換されたアミノであればよく、例えばメチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、ブチルアミノ、ペンチルアミノ、ヘキシルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、エチルメチルアミノ、メチルプロピルアミノ、ブチルメチルアミノ、メチルペンチルアミノ、ヘキシルメチルアミノ、アミノエチルアミノ、アミノプロピルアミノ、(アミノエチル)メチルアミノ、ビス(アミノエチル)アミノ等があげられ、好ましくはメチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、アミノプロピルアミノ、ビス(アミノエチル)アミノ等があげられる。

化合物(II)において、アミノ、モノアルキルアミノおよびジアルキルアミノは、それぞれ、窒素原子上の孤立電子対に、水素イオンが配位して、アンモニオ、モノアルキルアンモニオおよびジアルキルアンモニオを形成していてもよく、アミノ、モノアルキルアミノおよびジアルキルアミノは、それぞれアンモニオ、モノアルキルアンモニオおよびジアルキルアンモニオを包含する。この場合、アミノ、モノアルキルアミノおよびジアルキルアミノの窒素原子上の孤立電子対に、水素イオンが配位したアンモニオ、モノアルキルアンモニオおよびジアルキルアンモニオは、製薬上許容し得る陰イオン(前記

と同義)と塩を形成していてもよい。

[0032] アルコキシとしては、炭素数1～6のアルキル(前記と同義)または、アミノ、メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1～6のアルキル(前記と同義)で置換されたヒドロキシであればよく、例えばメトキシ、エトキシ、プロピルオキシ、ブチルオキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ、アミノエトキシ、メチルアミノエトキシ等があげられ、好ましくはメトキシ、エトキシ、アミノエトキシ、メチルアミノエトキシ等があげられる。

[0033] モノアルキルカルバモイルおよびジアルキルカルバモイルとしては、それぞれ1つおよび同一または異なって2つの、炭素数1～6のアルキル(前記と同義)または、アミノ、メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1～6のアルキル(前記と同義)で置換されたカルバモイルであればよく、例えばメチルカルバモイル、エチルカルバモイル、プロピルカルバモイル、ブチルカルバモイル、ペンチルカルバモイル、ヘキシルカルバモイル、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル、エチルメチルカルバモイル、メチルプロピルカルバモイル、ブチルメチルカルバモイル、メチルペンチルカルバモイル、ヘキシルメチルカルバモイル、アミノエチルカルバモイル、アミノプロピルカルバモイル、(アミノエチル)メチルカルバモイル、ビス(アミノエチル)カルバモイル等があげられ、好ましくはメチルカルバモイル、エチルカルバモイル、ジメチルカルバモイル等があげられる。

[0034] 化合物(I)において、L^1およびL^2が、-O-CO-である場合には、R^1およびR^2は、同一または異なってドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、イコシル、ドコシル、テトラコシル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニル、(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニル、3,7,11-トリメチルドデカ-

2,6,10-トリエニルまたは3,7,11,15-テトラメチルヘキサデカ-2-エニルであることがより好ましく、同一または異なってテトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(Z)-イコサ-11-エニルまたは(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニルであることがさらに好ましい。なお、いずれの場合も、R^1およびR^2は、同一であることがさらに好ましい。

[0035] また、L^1およびL^2が、-CO-O-である場合には、R^1およびR^2は、同一または異なってトリデシル、ペンタデシル、ヘプタデシル、ノナデシル、ヘニコシル、トリコシル、(Z)-トリデカ-8-エニル、(Z)-ペンタデカ-8-エニル、(Z)-ヘプタデカ-5-エニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニル、(E)-ヘプタデカ-8-エニル、(Z)-ヘプタデカ-10-エニル、(8Z,11Z)-ヘプタデカ-8,11-ジエニル、(8Z,11Z,14Z)-ヘプタデカ-8,11,14-トリエニル、(Z)-ノナデカ-10-エニル、(10Z,13Z)-ノナデカ-10,13-ジエニル、(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニル、2,6,10-トリメチルウンデカ-1,5,9-トリエニルまたは2,6,10,14-テトラメチルペンタデカ-1-エニルであることがより好ましく、同一または異なってトリデシル、ペンタデシル、ヘプタデシル、(Z)-ペンタデカ-8-エニル、(Z)-ヘプタデカ-5-エニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニル、(8Z,11Z)-ヘプタデカ-8,11-ジエニルまたは(Z)-ノナデカ-10-エニル、(10Z,13Z)-ノナデカ-10,13-ジエニルであることがさらに好ましい。なお、いずれの場合も、R^1およびR^2は、同一であることが好ましい。

[0036] また、aおよびbは、同時に1であることがより好ましい。

また、aおよびbが、同時に1であり、L^1およびL^2が、-CO-O-であることも本発明のより好ましい形態の一つである。その場合には、R^1およびR^2は、同一または異なって(Z)-ヘプタデカ-8-エニルまたは(8Z,11Z)-ヘプタデカ-8,11-ジエニルであることがより好ましく、同一に(Z)-ヘプタデカ-8-エニルまたは(8Z,11Z)-ヘプタデカ-8,11-ジエニルであることが最も好ましい。

[0037] また、R^3は水素原子またはメチルであることがより好ましい。

また、aおよびbが1であり、L^1およびL^2が、同一に-CO-O-または-O-CO-、好ましくは-CO-O-であり、R^3がメチルであることも、本発明のさらに好ましい形態の1つであり、R^1およびR^2は、同一または異なって(Z)-ヘプタデカ-8-エニルまたは(8Z,11Z)-ヘプタデカ-8,11-ジエニルであることがより好ましく、同一に(Z)-ヘプタデカ-8-エニルまたは(8Z,11Z)-ヘプタデカ-8,11-ジエニルであることが最も好ましい。

なお、R^3が水素原子の場合には、L^1およびL^2が、同一に-CO-O-または-O-CO-、好ましくは-CO-O-であることも、本発明のより好ましい形態の1つであり、R^1およびR^2は、同一または異なって(Z)-ヘプタデカ-5-エニルまたは(Z)-ヘプタデカ-8-エニルであることがより好ましく、同一に(Z)-ヘプタデカ-5-エニルまたは(Z)-ヘプタデカ-8-エニルであることが最も好ましい。

[0038] 化合物(II)において、R^4およびR^5は、同一または異なってテトラデシル、ヘキサデシル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニルまたは(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニルであることが好ましく、同一または異なって(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニルであることがより好ましく、同一に(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニルであることが最も好ましい。

[0039] また、R^6が水素原子、メチル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1～3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1～6のアルキルもしくは炭素数3～6のアルケニルであることが好ましく、水素原子、メチルまたは1つのアミノ、ヒドロキシもしくはカルバモイルで置換された炭素数1～6のアルキルもしくは炭素数3～6のアルケニルであることがより好ましく、水素原子、メチ

ル等であることが最も好ましい。

[0040] また、R^6が水素原子であることも、本発明のより好ましい形態の1つである。この場合、R^4およびR^5は、同一または異なってテトラデシル、ヘキサデシル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(Z)-イコサ-11-エニルまたは(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニルであることがより好ましく、同一に(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニルまたは(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニルであることが最も好ましい。

[0041] また、R^6がメチルであることも、本発明のより好ましい形態の1つである。この場合、R^4およびR^5は、同一または異なってテトラデシル、ヘキサデシル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(Z)-イコサ-11-エニルまたは(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニルであることがより好ましく、同一に(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニルであることが最も好ましい。

[0042] 化合物(I)は、国際公開第2011/136368号パンフレットに記載の製造方法と同様の方法で得ることができる。なお、定義した基が該製造方法の条件下で変化するかまたは該製造方法を実施するのに不適切な場合、有機合成化学で常用される保護基の導入および除去方法[例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス第3版(Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、グリーン(T.W.Greene)著、John Wiley&Sons Inc.(1999年)等に記載の方法]等を用いることにより、目的化合物を製造することができる。また、必要に応じて置換基導入等の反応工程の順序を変えることもできる。

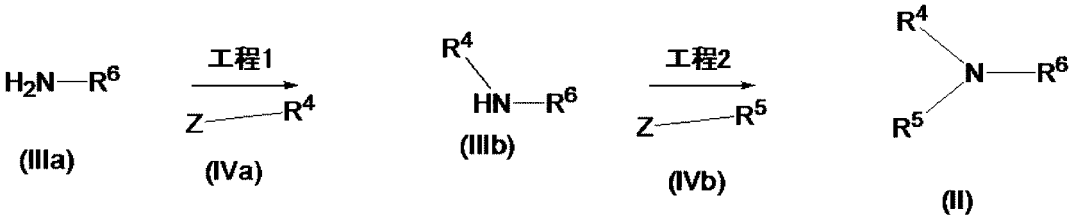
[0043] 次に化合物(II)の製造方法について説明する。なお、以下に示す製造方法において、定義した基が該製造方法の条件下で変化するかまたは該製造方法を実施するのに不適切な場合、有機合成化学で常用される保護基の導入および除去方法[例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シ

ンセシス第3版(Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、グリーン(T.W.Greene)著、John Wiley＆Sons Inc.(1999年)等に記載の方法]等を用いることにより、目的化合物を製造することができる。また、必要に応じて置換基導入等の反応工程の順序を変えることもできる。

[0044] 製造方法1

化合物(II)は以下の方法によって製造することができる。

[0045] [化5]



(式中、R^4、R^5およびR^6は、それぞれ前記と同義であり、Zは、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、トリフルオロメタンスルホニルオキシ、メタンスルホニルオキシ、ベンゼンスルホニルオキシ、p-トルエンスルホニルオキシ等の脱離基を表す)

[0046] 工程1および2

化合物(IIIb)は、化合物(IIIa)と化合物(IVa)を、無溶媒でまたは溶媒中、必要により好ましくは1～10当量の塩基の存在下、室温と200℃の間の温度で、5分間～100時間反応させることにより製造することができる。さらに、化合物(II)は、化合物(IIIb)と化合物(IVb)を、無溶媒でまたは溶媒中、必要により好ましくは1～10当量の塩基の存在下、室温と200℃の間の温度で、5分間～100時間反応させることにより製造することができる。

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

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

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

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

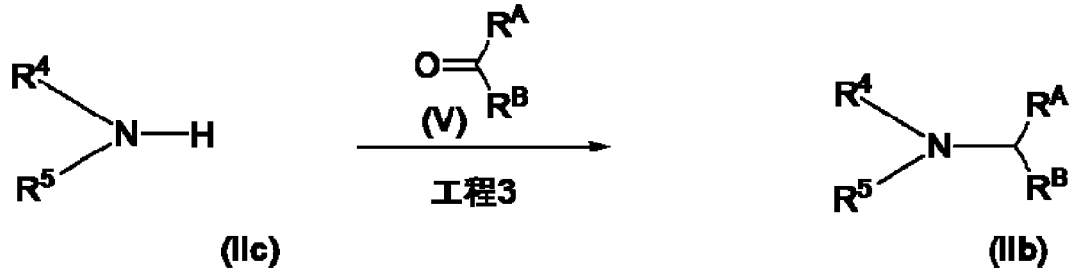
R^4とR^5が同一の場合の化合物(IIa)は、工程1において、2当量以上の化合物(IVa)を用いることで得ることができる。

[0047] 製造方法2

化合物(II)のうち、R^6が$-CHR^AR^B$(式中、R^AおよびR^Bは、同一または異なって水素原子、炭素数1～5のアルキル、炭素数2～5のアルケニル、ピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イル、モルホリン-3-イルまたは同一もしくは異なって1～3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1～5のアルキルもしくは炭素数2～5のアルケニルであるか、または隣接する炭素原子と一緒になってピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イルもしくはピペリジン-4-イルを形成し、R^AおよびR^Bが、ともに水素原子である場合を除き、R^AおよびR^Bのアルキル、置換されたアルキルのアルキル部分、アルケニルおよび置換されたアルケニルのアルケニル部分の炭素数の総和は1～5であり、R^AおよびR^Bのいずれかが、ピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イルまたはモルホリン-3-イルである場合には、該R^AおよびR^Bのもう一方は、水

素原子、炭素数1～5のアルキル、炭素数2～5のアルケニル、ピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イル、モルホリン-3-イルまたは同一もしくは異なって1つもしくは2つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1～5のアルキルもしくは炭素数2～5のアルケニルであり、R^AおよびR^Bが、置換されたアルキルまたはアルケニルである場合には、該置換基の総数は2または3である)である、化合物(IIb)は以下の方法によって製造することもできる。

[0048] [化6]



(式中、R^4、R^5、R^AおよびR^Bは、それぞれ前記と同義である)

[0049] 工程3

化合物(IIb)は、化合物(II)のうちR^6が水素原子である化合物(IIc)を、好ましくは1～10当量の化合物(V)と、溶媒中、好ましくは1～大過剰量の還元剤および必要により好ましくは1～10当量の酸の存在下、-20℃と150℃の間の温度で、5分間～72時間反応させることにより製造することができる。

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

還元剤としては、例えばトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、シアン

化水素化ホウ素ナトリウム等があげられる。

酸としては、例えば塩酸、酢酸等があげられる。

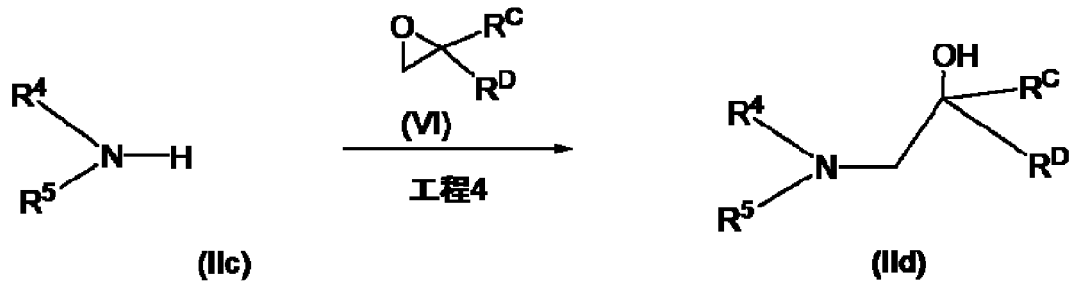
[0050] 化合物(V)は、市販品としてまたは公知の方法(例えば、第5版実験化学講座15「有機化合物の合成III」、第5版、p.1、丸善(2005年)、第5版実験化学講座15「有機化合物の合成III」、第5版、p.153、丸善(2005年))もしくはそれに準じて得ることができる。

[0051] 製造方法3

化合物(II)のうち、R^6が$-CH_2-C(OH)R^CR^D$(式中、R^CおよびR^Dは、同一または異なって水素原子、炭素数1～4のアルキル、炭素数2～4のアルケニル、ピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イル、モルホリン-3-イルまたは同一もしくは異なって1つもしくは2つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1～4のアルキルもしくは炭素数2～4のアルケニルであり、R^CおよびR^Dが、ともに水素原子である場合を除き、R^CおよびR^Dのアルキル、置換されたアルキルのアルキル部分、アルケニルおよび置換されたアルケニルのアルケニル部分の炭素数の総和は1～4であり、R^CおよびR^Dのいずれかが、ピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イルまたはモルホリン-3-イルである場合には、該R^CおよびR^Dのもう一方は水素原子、炭素数1～4のアルキル、炭素数2～4のアルケニル、ピロリジン-2-イル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-2-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-2-イル、モルホリン-3-イルまたは1つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1～4のアルキルもしくは炭素数2～4のアルケニルであり、R^CおよびR^Dが、置換されたアルキルまたはアルケニルである場合に

は、該置換基の総数は2である)である、化合物(IId)は以下の方法によって製造することもできる。

[0052] [化7]



(IIc) (IId)

(式中、R^4、R^5、R^CおよびR^Dは、それぞれ前記と同義である)

[0053] 工程4

化合物(IId)は、化合物(IIc)と化合物(VI)を溶媒中または無溶媒で、0℃と230 ℃の間の温度で、5分間から100時間反応させることにより製造することができる。

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

[0054] 化合物(VI)は、市販品としてまたは公知の方法(例えば、第5版実験化学講座17「有機化合物の合成V」、第5版、p.186、丸善(2005年))もしくはそれに準じて得ることができる。

[0055] 化合物(II)におけるR^4、R^5またはR^6に含まれる官能基の変換は、公知の方法[例えば、コンプリヘンシブ・オーガニック・トランスフォーメーションズ第2版(Comprehensive Organic Transformations 2nd edition)、R.C.ラロック(Larock)著、Vch Verlagsgesellschaft Mbh(1999年)等に記載の方法]またはそれらに準じて行うこともできる。

上記各製造方法における中間体および目的化合物は、有機合成化学で常用

される分離精製法、例えば、ろ過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、再結晶、各種クロマトグラフィー等に付して単離精製することができる。また、中間体においては特に精製することなく次の反応に供することも可能である。

[0056] 化合物(I)および化合物(II)の中には、幾何異性体、光学異性体等の立体異性体、互変異性体等が存在し得るものもあるが、化合物(I)および化合物(II)は、これらを含め、全ての可能な異性体およびそれらの混合物を包含する。

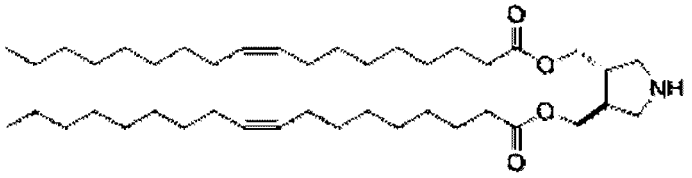
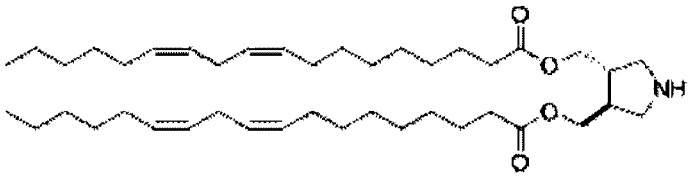
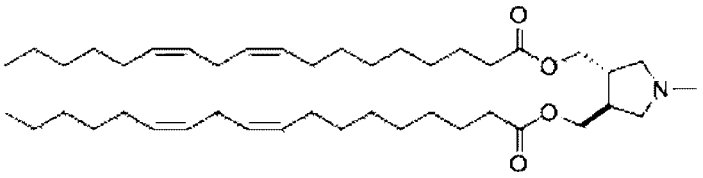
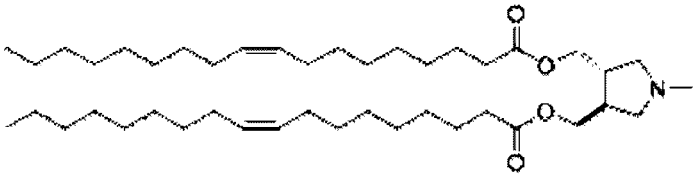
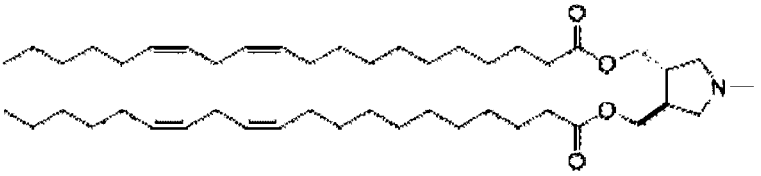
化合物(I)および化合物(II)中の各原子の一部またはすべては、それぞれ対応する同位体原子で置き換わっていてもよく、化合物(I)および化合物(II)は、これら同位体原子で置き換わった化合物も包含する。例えば、化合物(I)および化合物(II)中の水素原子の一部またはすべては、原子量2の水素原子(重水素原子)であってもよい。

化合物(I)および化合物(II)中の各原子の一部またはすべてが、それぞれ対応する同位体原子で置き換わった化合物は、市販のビルディングブロックを用いて、上記各製造方法と同様な方法で製造することができる。また、化合物(I)および化合物(II)中の水素原子の一部またはすべてが重水素原子で置き換わった化合物は、例えば、イリジウム錯体を触媒として用い、重水を重水素源として用いてアルコール、カルボン酸等を重水素化する方法[ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティ(J.Am.Chem.Soc.), Vol.124,No.10,2092(2002)参照]等を用いて合成することもできる。

[0057] 化合物(I)の具体例を第1表に示し、化合物(II)の具体例を第2表に示す。ただし、本発明における化合物(I)および化合物(II)は、これらに限定されるものではない。

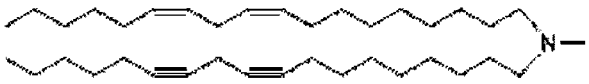
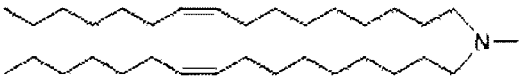
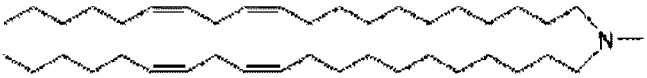
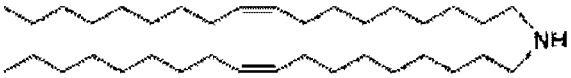
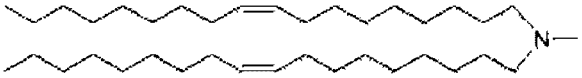
[0058]

[表1]

化合物番号	構造式
I-1	
I-2	
I-3	
I-4	
I-5	

[0059]

[表2]

化合物番号	構造式
II-1	
II-2	
II-3	
II-4	
II-5	
II-6	

[0060] また、本発明で用いられる薬物としての二本鎖核酸は、哺乳類細胞に導入された場合、KRAS遺伝子の発現を低下または停止させる能力を有する二本鎖核酸であって、センス鎖およびアンチセンス鎖を有する二本鎖核酸であり、該センス鎖と該アンチセンス鎖とは少なくとも25塩基対を有し、該アンチセンス鎖は、配列番号1～3のいずれか1つのKRAS遺伝子のmRNA(KRAS mRNA)の標的配列の、連続する少なくとも19塩基の配列に相補的な塩基の配列を有し、最大35ヌクレオチドの長さを有する二本鎖核酸である。

[0061] 二本鎖核酸としては、ヌクレオチドおよび/または該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子が重合した二本鎖の分子であれば、いかなる分子であってもよく、例えばリボヌクレオチドの重合体であるRNA、デオキシリボヌクレオ

チドの重合体であるDNA、RNAとDNAとからなるキメラ核酸、およびこれらの核酸の少なくとも一つのヌクレオチドが該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子で置換されたヌクレオチド重合体があげられる。また、ヌクレオチドおよび/または該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子が重合した分子を、構成単位として少なくとも一つ含む誘導体も、本発明の二本鎖核酸に含まれる。さらにペプチド核酸(PNA)[Acc. Chem. Res., 32, 624(1999)]、オキシペプチド核酸(OPNA)[J. Am. Chem. Soc., 123, 4653(2001)]、ペプチドリボ核酸(PRNA)[J. Am. Chem. Soc., 122, 6900(2000)]等もあげられる。なお、本発明において、RNA中のウリジンUと、DNA中のチミンTとは、それぞれ読み替えることができる。

[0062] ヌクレオチドと同等の機能を有する分子としては、例えばヌクレオチド誘導体等があげられる。

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

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

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

[0063] 糖部修飾ヌクレオチドにおける修飾基としては、例えば、2'-シアノ、2'-アルキル、2'-置換アルキル、2'-アルケニル、2'-置換アルケニル、2'-ハロゲン、2'-O-シアノ、2'-O-アルキル、2'-O-置換アルキル、2'-O-アルケニル、2'-O-置換アルケニル、2'-S-アルキル、2'-S-置換アルキル、2

’-S-アルケニル、2’-S-置換アルケニル、2’-アミノ、2’-NH-アルキル、2’-NH-置換アルキル、2’-NH-アルケニル、2’-NH-置換アルケニル、2’-SO-アルキル、2’-SO-置換アルキル、2’-カルボキシ、2’-CO-アルキル、2’-CO-置換アルキル、2’-Se-アルキル、2’-Se-置換アルキル、2’-SiH_2-アルキル、2’-SiH_2-置換アルキル、2’-ONO_2、2’-NO_2、2’-N_3、2’-アミノ酸残基(アミノ酸のカルボン酸から水酸基が除去されたもの)、2’-O-アミノ酸残基(前記アミノ酸残基と同義)等があげられる。また、2’位の修飾基が4’位の炭素原子に架橋した構造を有する架橋構造型人工核酸(Bridged Nucleic Acid)(BNA)、より具体的には、2’位の酸素原子と4’位の炭素原子がメチレンを介して架橋したロックト人工核酸(Locked Nucleic Acid)(LNA)、およびエチレン架橋構造型人工核酸(Ethylene bridged nucleic acid)(ENA)[Nucleic Acid Research, 32, e175(2004)]等も本発明における2’位において修飾基で置換されたヌクレオチドに含まれる。

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

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

[0064] 糖部修飾ヌクレオチドの修飾基におけるアルキルは、化合物(II)における炭素数1～6のアルキルと同義である。

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

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

[0065] アミノ酸残基におけるアミノ酸としては、例えば脂肪族アミノ酸(具体的には、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン等)、ヒドロキシアミノ酸(具体的には、セリン、トレオニン等)、酸性アミノ酸(具体的には、アスパラギン酸、グルタミン酸等)、酸性アミノ酸アミド(具体的には、アスパラギン、グルタミン等)、塩基性アミノ酸(具体的には、リジン、ヒドロキシリジン、アルギニン、オルニチン等)、含硫アミノ酸(具体的には、システイン、シスチン、メチオニン等)、イミノ酸(具体的には、プロリン、4-ヒドロキシプロリン等)等があげられる。

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

[0066] リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾

もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、リン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がホスホロジチオエート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がアルキルホスホネート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がホスホロアミデート結合に置換されたヌクレオチド等があげられる。

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

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

また、ヌクレオチド誘導体は、二本鎖核酸内の他のヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体とアルキレン構造、ペプチド構造、ヌクレオチド構造、エーテル構造、エステル構造、およびこれらの少なくとも一つを組み合わせた構造等の架橋構造を形成してもよい。

[0067] 二本鎖核酸は、siRNAを産生するためダイサーによってプロセッシングされ

るために十分な長さを有する。本態様に従って、二本鎖核酸は、好ましくは26から30ヌクレオチドの間の長さのセンス鎖、および、細胞の細胞質中に見出される条件等の、生物学的条件下で、センス鎖とアニーリングするアンチセンス鎖を含む。

[0068] また、二本鎖核酸は、ダイサーによるそのプロセッシングを亢進させるいくつかの特性を有してもよい。本態様に従って、二本鎖核酸はダイサーによってプロセッシングされsiRNAを産生するために十分な長さ、および、以下の特性の少なくとも1つ、好ましくはすべてを有する:(i)二本鎖核酸は非対称であり、例えば、アンチセンス鎖に3'突出物を有する。(ii)センス鎖の3'末端にヌクレオチド誘導体(前記と同義)を、ダイサー結合およびプロセッシングのために含有する。適切なヌクレオチド誘導体としては、デオキシリボヌクレオチド、アシクロヌクレオチド、およびその類似物等のヌクレオチド、および、蛍光分子およびその類似物等の立体的に込み合った分子、好ましくはデオキシリボヌクレオチドが含まれる。ヌクレオチド誘導体が使用される場合、それらは、二本鎖核酸の長さが変化しないように、二本鎖核酸中のリボヌクレオチドと置換される。(iii)センス鎖は、5'末端にリン酸を含む。5'末端にリン酸を含むとは、5' 末端の塩基に結合する糖の5' 位の水酸基が、リン酸基または生体内の核酸分解酵素等でリン酸基に変換される基によって修飾されている。

[0069] また、二本鎖核酸は、好ましくはアンチセンス鎖、またはセンス鎖、または両方の鎖において、1つまたはそれ以上の2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する。

最も好ましくは、センス鎖は25～28ヌクレオチドを含み、センス鎖の3'末端の2ヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドである。センス鎖は、5'末端にリン酸を含む。アンチセンス鎖は、26～30ヌクレオチドを含み、そして、1～4ヌクレオチドの3'突出部を含む。アンチセンス鎖およびセンス鎖は、1つまたはそれ以上の2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する。

例えば、25ヌクレオチドセンス鎖、および2ヌクレオチドの3'突出部を含む

27ヌクレオチドアンチセンス鎖で、センス鎖およびアンチセンス鎖の5'末端の第一塩基をポジション番号1と数える場合、2'-0-メチル修飾の位置としては、センス鎖のポジション番号1、2、4、6、8、12、14、16、18および23ならびにアンチセンス鎖のポジション番号1、2、3、4、11、13、25および27、センス鎖のポジション番号1、2、4、6、8、12、14、16、18および23ならびにアンチセンス鎖のポジション番号1、2、3、4、11、13、21、23、25、26および27、センス鎖のポジション番号1、2、4、6、8、12、14、16、18および23ならびにアンチセンス鎖のポジション番号1、2、3、4、11、13、15、17、19、21、23、25、26および27等があげられ、いずれの場合も、好ましくはセンス鎖の3'末端の2ヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドであり、アンチセンス鎖は5'末端にリン酸を含む。

[0070] 本発明で用いられる二本鎖核酸には、核酸の構造中のリン酸部、エステル部等に含まれる酸素原子等が、例えば硫黄原子等の他の原子に置換された誘導体を包含する。

[0071] また、アンチセンス鎖およびセンス鎖の5'末端の塩基に結合する糖は、それぞれ5'位の水酸基が、リン酸基もしくは前記の修飾基、または生体内の核酸分解酵素等でリン酸基もしくは前記の修飾基に変換される基によって修飾されていてもよい。

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

[0072] なお、本発明で用いられる二本鎖核酸は、既知のRNAまたはDNA合成法、およびRNAまたはDNA修飾法を用いて製造すればよい。

二本鎖核酸は、KRAS遺伝子配列内の標的配列と相互作用するように設計することができる。

二本鎖核酸の1つの鎖の配列は、上で記述した標的部位配列に対して相補的である。二本鎖核酸は、本明細書に記述された方法を使用して、化学的に合

成することができる。

RNAは、酵素的または部分/全有機合成によって生成してもよく、また修飾されたリボヌクレオチドは、インビトロで酵素的または有機合成によって導入することができる。一つの態様において、それぞれの鎖は、化学的に調製される。RNA分子を化学的に合成する方法は、当該技術分野において公知である[ヌクレイック・アシッズ・リサーチ (Nucleic. Acids. Res.) 、1998年、第32巻、p.936-948参照]。一般に、二本鎖核酸は、固相オリゴヌクレオチド合成法を使用することによって合成することができる(たとえば、Usman et al.,米国特許第5,804,683号;第5,831,071号;第5,998,203号;第6,117,657号;第6,353,098号;第6,362,323号;第6,437,117号;第6,469,158号;Scaringe et al.,米国特許第6,111,086号;第6,008,400号;第6,111,086号を参照)。

一本鎖核酸は、固相ホスホロアミダイト法 (ヌクレイック・アシッズ・レサーチ (Nucleic. Acids. Res.)、1993年、第30巻、p.2435-2443参照)を使用して合成され、脱保護され、およびNAP-5カラム(Amersham Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ)上で脱塩される。オリゴマーは、15分工程のリニア勾配を使用するAmersham Source 15Qカラム-1.0cm。高さ.25 cm (Amersham Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ)でのイオン交換高性能液体クロマトグラフィー(IE-HPLC)を使用して精製する。勾配は、90:10の緩衝液A:Bから52:48の緩衝液A:Bに変化し、緩衝液Aは100mM Tris pH 8.5であり、および緩衝液Bは、100mM Tris pH 8.5(1MのNaCl)である。試料は、260nmにてモニターされ、全長オリゴヌクレオチド種に対応するピークは、収集され、プールされ、NAP-5カラムで脱塩され、および凍結乾燥される。

[0073] 各一本鎖核酸の純度は、Beckman PACE 5000(Beckman Coulter、Inc., Fullerton, Calif)でのキャピラリー電気泳動(CE)によって決定される。CEキャピラリーは、100μmの内径を有し、ssDNA 100R Gel(Beckman-Coulter)を含む。典型的には、約0.6nmoleのオリゴヌクレオチドをキャピラリーに注射して、444V/cmの電界において実行して、260nmにおけるUV吸光度によって検出される。変性トリス-ホウ酸-7M-尿素泳動緩衝液は、Beckman-Coulterから購入する

。以下に記述した実験に使用するための、CEによって評価すると少なくとも90%純粋である一本鎖核酸が得られる。化合物同一性は、製造業者の推奨プロトコルにしたがって、Voyager DE.TM.Biospectometryワークステーション(Applied Biosystems、Foster City、Calif.)でのマトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型(MALDI-TOF)質量分光法によって検証される。一本鎖核酸の相対的な分子質量は、予想される分子質量の0.2%以内で得ることができる。

一本鎖核酸は、100mM 酢酸カリウム、30mM HEPES、pH 7.5からなる緩衝液中に100μM濃度にて再懸濁させる。相補的センス鎖およびアンチセンス鎖を同等のモル量で混合して、50μM二本鎖核酸の最終溶液を得る。試料を95℃まで5分間加熱して、使用前に室温に冷却させる。二本鎖核酸は、-20℃にて保存する。一本鎖核酸は、凍結乾燥させるか、またはヌクレアーゼフリー水中に、-80℃で貯蔵する。

本発明で用いられる二本鎖核酸の具体例を第3表に示す。なお、表中のr、mおよびdが付された塩基に結合する糖は、それぞれリボース、2’位の水酸基が-O-メチルで置換されているリボースおよびデオキシリボースである。

[0074]

[表3]

KRAS mRNAの標的配列 (5’から3’へ)	配列番号	siRNAの配列 アンチセンス鎖(上)およびセンス鎖(下) (5’から3’へ)	配列番号	siRNA名
GUGUAUUUGCCAUAAAUAAUA	1	mGmUrAmUrUmUrGmCrCrArUmArAmArUmArAmUrArCrUrAmAdAdT	4	A
		mAmUmUmUrArGrUrArUrUmArUmUrUrArUrGrGrCrArArArUrAmCrAmC	5	
UACUAAAUCAUUUGAAGAUAU	2	mCmUrAmArAmUrCmArUrUrUmGrAmArGmArUmAmUrUrCrAmCdCdA	6	B
		rUmGrGrUrGrArArUrArUrUmCrUmUrCmArAmArUmGrAmUrUmUrAmGmUmA	7	
AUACUAAAUCAUUUGAAGAUA	3	mAmCmUrArArArUrCrArUrUrUrGrArAmGmAmUrArUrUrCrAdCdC	8	C
		mGmGmUmGrArArUrArUrCmUrUmCrArArArUrGrArUrUrUmArGmUrAmU	9	
GUGUAUUUGCCAUAAAUAAUA	1	mGmUrAmUrUmUrGmCrCrArUmArAmArUmArAmUrArCrUrAmAdAdT	4	D
		mAmUmUmUrArGrUrArUrUmArUmUrUrArUrGrGrCrAmArAmUrAmCmAmC	10	
GUGUAUUUGCCAUAAAUAAUA	1	mGmUrAmUrUmUrGmCrCrArUmArAmArUmArAmUrArCrUrAmAdAdT	4	E
		mAmUmUmUrArGrUrArUrUmArUmUrUmArUmGrGmCrAmArAmUrAmCmAmC	11	

[0075] 本発明における脂質粒子は、化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)と二本鎖核酸とを含有する脂質粒子であり、例えば、化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)と二本鎖核酸との複合体、あるいは化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと二本鎖核酸との複合体を含有する脂質粒子、該複合体および該複合体を封入する脂質膜から構成された脂質粒子等があげられる。脂質膜は、脂質一重膜(脂質1分子膜)でも脂質二重膜(脂質2分子膜)であってもよい。なお、該脂質膜に、化合物(I)、化合物(II)、中性脂質および/または高分子を含有していてもよい。また、該複合体および/または該脂質膜に、化合物(I)および化合物(II)以外のカチオン性脂質を含有していてもよい。

また、本発明における脂質粒子としては、例えば化合物(II)と二本鎖核酸との複合体、または化合物(II)に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと二本鎖核酸との複合体ならびに該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物(I)を含有する脂質粒子等もあげられる。この場合の

脂質膜も、脂質一重膜(脂質1分子膜)でも脂質二重膜(脂質2分子膜)であってもよい。なお、該脂質膜に、化合物(II)、中性脂質および/または高分子を含有していてもよい。また、該複合体および/または該脂質膜に、化合物(I)および化合物(II)以外のカチオン性脂質を含有していてもよい。

該複合体の形態としては、いずれの場合も二本鎖核酸と脂質一重層からなる膜(逆ミセル)との複合体、二本鎖核酸とリポソームとの複合体、二本鎖核酸とミセルとの複合体等があげられ、好ましくは二本鎖核酸と脂質一重層からなる膜との複合体または二本鎖核酸とリポソームとの複合体があげられる。

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

なお、本発明における脂質粒子には、化合物(I)および化合物(II)のそれぞれ一種または複数種を使用してもよく、また化合物(I)および/または化合物(II)には、化合物(I)および化合物(II)以外のカチオン性脂質を混合してもよい。

化合物(I)および化合物(II)以外のカチオン性脂質としては、例えば、特開昭61-161246号公報(米国特許5049386号明細書)中で開示される、DOTMA、DOTAP等、国際公開第91/16024号パンフレットおよび国際公開第97/019675号パンフレット中で開示される、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシプロピル)]-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチル臭化アンモニウム(DORIE)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スペルミンカルボキシアミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパナミニウムトリフルオロ酢酸(DOSPA)等、国際公開第2005/121348号パンフレット中で開示される、DLinDMA等、国際公開第2009/086558号パンフレット中で開示される、DLin-K-DMA等があげられ、好ましくはDOTMA、DOTAP、DORIE、DOSPA、DLinDMA、DLin-K-DMA等の2つの非置換アルキル基を有する3級アミン部位または3つの非置換アルキル基を有する4級アンモニウム部位を有するカチオン性脂質があげられ、より好ましくは該3級アミン部位を有するカチオン性脂質

があげられる。該3級アミン部位および該4級アンモニウム部位の非置換アルキル基はメチル基であることがより好ましい。

[0076] 本発明における脂質粒子は、公知の製造方法またはそれに準じて製造することができ、いかなる製造方法で製造されたものであってもよい。例えば、脂質粒子の1つであるリポソームの製造には、公知のリポソームの調製方法が適用できる。公知のリポソームの調製方法としては、例えばバンガム(Bangham)らのリポソーム調製法[“ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J.Mol.Biol.)”,1965年,第13巻,p.238-252参照]、エタノール注入法[“ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー(J.Cell Biol.)”,1975年,第66巻,p.621-634参照]、フレンチプレス法[“エフイービーエス・レターズ(FEBS Lett.)”,1979年,第99巻,p.210-214参照]、凍結融解法[“アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス(Arch.Biochem.Biophys.)”,1981年,第212巻,p.186-194参照]、逆相蒸発法[“プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)”,1978年,第75巻, p.4194-4198参照]またはpH勾配法(例えば特許第2572554号公報、特許第2659136号公報等参照)等があげられる。リポソームの製造の際にリポソームを分散させる溶液としては、例えば水、酸、アルカリ、種々の緩衝液、生理食塩水またはアミノ酸輸液等を用いることができる。また、リポソームの製造の際には、例えばクエン酸、アスコルビン酸、システインまたはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)等の抗酸化剤、例えばグリセリン、ブドウ糖または塩化ナトリウム等の等張化剤等の添加も可能である。また、脂質等を例えばエタノール等の有機溶媒に溶解し、溶媒を留去した後、生理食塩水等を添加、振とう撹拌し、リポソームを形成させることによってもリポソームを製造することができる。

[0077] また、本発明における脂質粒子は、例えば、化合物(I)、化合物(I)および化合物(II)、化合物(I)と化合物(I)および化合物(II)以外のカチオン性脂質または化合物(I)および化合物(II)と化合物(I)および化合物(II)以外のカチオン性脂質をクロロホルムに予め溶解し、次いで二本鎖核酸の水溶液とメタ

ノールを加えて混合してカチオン性脂質/二本鎖核酸の複合体を形成させ、さらにクロロホルム層を取り出し、これにポリエチレングリコール化リン脂質と中性の脂質と水を加えて油中水型(W/O)エマルジョンを形成し、逆相蒸発法で処理して製造する方法(特表2002-508765号公報参照)や、二本鎖核酸を、酸性の電解質水溶液に溶解し、脂質(エタノール中)を加え、エタノール濃度を20v/v%まで下げて前記二本鎖核酸内包リポソームを調製し、サイジングろ過し、透析によって、過剰のエタノールを除去した後、試料をさらにpHを上げて透析してリポソーム表面に付着した二本鎖核酸を除去して製造する方法(特表2002-501511号公報およびバイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ(Biochimica et Biophysica Acta),2001年,第1510巻,p.152-166参照)等によって製造することができる。

[0078] 本発明における脂質粒子のうち、複合体および該複合体を封入した脂質二重膜から構成されたリポソームは、例えば、国際公開第02/28367号パンフレットおよび国際公開第2006/080118号パンフレット等に記載の製造方法に従って製造することができる。

[0079] また、本発明における脂質粒子のうち、例えば化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)と二本鎖核酸との複合体、あるいは化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと二本鎖核酸との複合体ならびに該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物(I)、化合物(II)、ならびに/または化合物(I)および化合物(II)以外のカチオン性脂質を含有する脂質粒子、化合物(II)と二本鎖核酸との複合体、または化合物(II)に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと二本鎖核酸との複合体ならびに該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)を含有する脂質粒子等は、国際公開第02/28367号パンフレットおよび国際公開第2006/080118号パンフレット等に記載の製造方法に従って、それぞれの複合体を製造し、水または0～20%エタノール水溶液中に、該複合体を溶解させずに分散させ(A液)、別途、それぞれの脂質膜成分を、エタノール水溶液中に溶解させ(B液)、A

液とB液を混合し、さらに適宜に水を加えることで、得ることができる。また、A液およびB液中の化合物(I)、化合物(II)、ならびに化合物(I)および化合物(II)以外のカチオン性脂質は、そえぞれ一種または複数種を使用してもよい。

なお、本発明において、化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)と二本鎖核酸との複合体、あるいは化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと二本鎖核酸との複合体ならびに該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物(I)、化合物(II)、ならびに/または化合物(I)および化合物(II)以外のカチオン性脂質を含有する脂質粒子、化合物(II)と核酸との複合体、または化合物(II)に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと核酸との複合体ならびに該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)を含有する脂質粒子等の製造中および製造後に、複合体中の二本鎖核酸と脂質膜中のカチオン性脂質との静電相互作用や、複合体中のカチオン性脂質と脂質膜中のカチオン性脂質との融合によって、複合体および膜の構造が変位したものも、それぞれ化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)と二本鎖核酸との複合体、あるいは化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと二本鎖核酸との複合体ならびに該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物(I)、化合物(II)、ならびに/または化合物(I)および化合物(II)以外のカチオン性脂質を含有する脂質粒子、化合物(II)と核酸との複合体、または化合物(II)に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと核酸との複合体ならびに該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)を含有する脂質粒子等に包含される。

本発明における脂質粒子としては、化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)と二本鎖核酸との複合体、あるいは化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)に中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと二本鎖核酸との複合体ならびに該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化

合物(I)、化合物(II)または化合物(I)および化合物(II)以外のカチオン性脂質を含有する脂質粒子がより好ましく、化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)と二本鎖核酸との複合体、あるいは化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)に中性脂質および/または高分子を組み合わせたものと二本鎖核酸との複合体ならびに該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物(I)または化合物(I)および化合物(II)を含有する脂質粒子がより好ましく、化合物(I)もしくは化合物(I)に中性脂質を組み合わせたものと二本鎖核酸との複合体および該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物(I)を含有する脂質粒子または化合物(II)もしくは化合物(II)に中性脂質を組み合わせたものと二本鎖核酸との複合体および該複合体を封入する脂質膜から構成され、脂質膜に化合物(I)および化合物(II)を含有する脂質粒子がさらに好ましい。

[0080] 該複合体中の化合物(I)および化合物(II)の分子の総数は、該二本鎖核酸のリン原子の数に対して0.5～4倍であるのが好ましく、1.5～3.5倍であるのがより好ましく、2～3倍であるのがさらに好ましい。また、該複合体中の化合物(I)および化合物(II)、ならびに化合物(I)および化合物(II)以外のカチオン性脂質の分子の総数は、該二本鎖核酸のリン原子の数に対して0.5～4倍であるのが好ましく、1.5～3.5倍であるのがより好ましく、2～3倍であるのがさらに好ましい。

本発明の脂質粒子において、複合体および該複合体を封入する脂質膜から構成される場合には、該脂質粒子中の化合物(I)および化合物(II)の分子の総数は、該二本鎖核酸のリン原子の数に対して1～10倍であるのが好ましく、2.5～9倍であるのがより好ましく、3.5～8倍であるのがさらに好ましい。また、該脂質粒子中の化合物(I)および化合物(II)、ならびに化合物(I)および化合物(II)以外のカチオン性脂質の分子の総数は、該二本鎖核酸のリン原子の数に対して1～10倍であるのが好ましく、2.5～9倍であるのがより好ましく、3.5～8倍であるのがさらに好ましい。

[0081] 中性脂質としては、単純脂質、複合脂質または誘導脂質のいかなるもので

あってもよく、例えばリン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴイドまたはステロール等があげられるがこれらに限定されない。

本発明の脂質粒子において中性脂質を含有する場合には、中性脂質の分子の総数は、化合物(I)および化合物(II)、ならびに化合物(I)および化合物(II)以外のカチオン性脂質の分子の総数に対して0.1～1.8倍であるのが好ましく、0.3～1.1倍であるのがより好ましく、0.4～0.9倍であるのがさらに好ましい。本発明における脂質粒子は、中性脂質を、複合体に含有していてもよく、該複合体を封入する脂質膜に含有していてもよく、少なくとも該複合体を封入する脂質膜に含有していることがより好ましく、該複合体および該該複合体を封入する脂質膜のどちらにも含有していることがさらに好ましい。

[0082] 中性脂質におけるリン脂質としては、例えばホスファチジルコリン(具体的には大豆ホスファチジルコリン、卵黄ホスファチジルコリン(EPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)等)、ホスファチジルエタノールアミン(具体的にはジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、ジミリストイルホスホエタノールアミン(DMPE)、16-0-モノメチルPE、16-0-ジメチルPE、18-1-トランスPE、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(POPE)、1 -ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(SOPE)等)、グリセロリン脂質(具体的にはホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール(POPG)、リゾホスファチジルコリン等)、スフィンゴリン脂質(具体的にはスフィンゴミエリン、セラミドホスホエタノールアミン、セラミドホスホグリセロール、セラミドホスホグリセロリン酸等)、グリセロホスホノ脂質、スフィンゴホスホノ脂質、天然レシチン(具体的には卵黄レシチン、大豆レシチン等)または水素

添加リン脂質(具体的には水素添加大豆ホスファチジルコリン等)等の天然または合成のリン脂質があげられる。

[0083] 中性脂質におけるグリセロ糖脂質としては、例えばスルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリドまたはグリコシルジグリセリド等があげられる。

[0084] 中性脂質におけるスフィンゴ糖脂質としては、例えばガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシドまたはガングリオシド等があげられる。

[0085] 中性脂質におけるスフィンゴイドとしては、例えばスフィンガン、イコサスフィンガン、スフィンゴシンまたはそれらの誘導体等があげられる。誘導体としては、例えばスフィンガン、イコサスフィンガンまたはスフィンゴシン等の$-NH_2$を$-NHCO(CH_2)xCH_3$(式中、xは0～18の整数であり、中でも6、12または18が好ましい)に変換したもの等があげられる。

[0086] 中性脂質におけるステロールとしては、例えばコレステロール、ジヒドロコレステロール、ラノステロール、β-シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、エルゴカステロール、フコステロールまたは3β-[N-(N',N'-ジメチルアミノエチル)カルバモイル]コレステロール(DC-Chol)等があげられる。

[0087] 中性脂質として、好ましくはリン脂質、ステロール等があげられ、より好ましくは、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、コレステロールがあげられ、さらに好ましくは、ホスファチジルエタノールアミン、コレステロールおよびそれらの組み合わせがあげられる。

[0088] 高分子としては、例えばタンパク質、アルブミン、デキストラン、ポリフェクト(polyfect)、キトサン、デキストラン硫酸、ポリ-L-リジン、ポリエチレンイミン、ポリアスパラギン酸、スチレンマレイン酸共重合体、イソプロピルアクリルアミド-アクリルピロリドン共重合体、ポリエチレングリコール修飾デンドリマー、ポリ乳酸、ポリ乳酸ポリグリコール酸またはポリエチレングリコール化ポリ乳酸等の高分子またはそれらの塩の1以上があげられる。

[0089] ここで、高分子における塩は、例えば金属塩、アンモニウム塩、酸付加塩

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

[0090] また、本発明における脂質粒子は、さらに水溶性高分子の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体を含有することが好ましい。該水溶性高分子の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体は、複合体に含有していてもよく、複合体を封入する脂質膜に含有していてももよく、複合体および該複合体を封入する脂質膜ともに含有していることがより好ましい。

本発明の脂質粒子において水溶性高分子の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体を含有する場合には、水溶性高分子の脂質誘導体および脂肪酸誘導体の分子の総数は、化合物(I)および化合物(II)、ならびに化合物(I)および化合物(II)以外のカチオン性脂質の分子の総数に対して0.05～0.3倍であるのが好ましく、0.07～0.25倍であるのがより好ましく、0.1～0.2倍であるのがさらに好ましい。

[0091] 水溶性高分子の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体は、分子の一部が脂質粒子の他の構成成分と例えば疎水性親和力、静電的相互作用等で結合する性質をもち、他の部分が脂質粒子の製造時の溶媒と例えば親水性親和力、静電的相互作用等で結合する性質をもつ、2面性をもつ物質であるのが好ましい。

[0092] 水溶性高分子の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えばポリエチレングリコール、ポリグリセリン、ポリエチレンイミン、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、オリゴ糖、デキストリン、水

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

[0093] ポリエチレングリコール誘導体の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えばポリエチレングリコール化脂質(具体的にはポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン(より具体的には1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG-DSPE)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG-DMPE)等)、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、クレモフォアイーエル(CREMOPHOR EL)等)、ポリエチレングリコールソルビタン脂肪酸エステル類(具体的にはモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン等)またはポリエチレングリコール脂肪酸エステル類等があげられ、より好ましくは、ポリエチレングリコール化脂質があげられ、さらに好ましくはPEG-DSPE、PEG-DMPEがあげられる。

[0094] ポリグリセリン誘導体の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えばポリグリセリン化脂質(具体的にはポリグリセリン-ホスファチジルエタノールアミン等)またはポリグリセリン脂肪酸エステル類等があげられ、より好ましくは、ポリグリセリン化脂質があげられる。

[0095] また、本発明における脂質粒子には、例えば水溶性高分子、ポリオキシエチレン誘導体等による表面改質も任意に行うことができる[ラジック(D.D.Lasic)、マーティン(F.Martin)編,“ステルス・リポソームズ(Stealth Liposomes)”(米国),シーアールシー・プレス・インク(CRC Press Inc),1995年,p.93-

102参照]。表面改質に使用し得る高分子としては、例えばデキストラン、プルラン、マンナン、アミロペクチンまたはヒドロキシエチルデンプン等があげられる。ポリオキシエチレン誘導体としては、例えばポリソルベート80、プルロニックF68、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、ポリオキシエチレンラウリルアルコールまたはPEG-DSPE等があげられる。該表面改質によって、脂質粒子中の複合体および脂質膜に水溶性高分子の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体を含有させることができる。

[0096] 本発明における脂質粒子の平均粒子径は、所望により自由に選択できるが、下記する平均粒子径とするのが好ましい。平均粒子径を調節する方法としては、例えばエクストルージョン法、大きな多重膜リポソーム(MLV)等を機械的に粉砕(具体的にはマントンゴウリン、マイクロフルイダイザー等を使用)する方法[ミュラー(R.H.Muller)、ベニタ(S.Benita)、ボーム(B.Bohm)編著,“エマルジョン・アンド・ナノサスペンジョンズ・フォー・ザ・フォーミュレーション・オブ・ポアリー・ソラブル・ドラッグズ(Emulsion and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs)”,ドイツ,サイエンティフィック・パブリッシャーズ・スチュットガルト(Scientific Publishers Stuttgart),1998年,p.267-294参照]等があげられる。

[0097] 本発明における脂質粒子の大きさは、平均粒子径が約10nm～1000nmであるのが好ましく、約30nm～300nmであるのがより好ましく、約50nm～200nmであるのがさらに好ましい。

[0098] 本発明の組成物を、ほ乳類の細胞に投与することで、本発明の組成物中の二本鎖核酸を細胞内に導入することができる。

[0099] インビボにおける本発明の組成物のほ乳類の細胞への導入方法は、インビボにおいて行うことのできる公知のトランスフェクションの手順に従って行えばよい。例えば、本発明の組成物を、人を含む哺乳動物に静脈内投与することで、例えば癌または炎症の生じた臓器または部位へ送達され、送達臓器または部位の細胞内に本発明の組成物中の二本鎖核酸を導入することができる。癌または炎症の生じた臓器または部位としては、特に限定されないが、

例えば胃、大腸、肝臓、肺、脾臓、膵臓、腎臓、膀胱、皮膚、血管、眼球等があげられ、好ましくは大腸または膵臓があげられる。また、本発明の組成物を、人を含む哺乳動物に静脈内投与することで、例えば血管、肝臓、肺、脾臓および/または腎臓へ送達され、送達臓器または部位の細胞内に本発明の組成物中の二本鎖核酸を導入することができる。血管、肝臓、肺、脾臓および/または腎臓の細胞は、正常細胞であってもよい。

送達臓器または部位の細胞内に本発明の組成物中の二本鎖核酸が導入されると、その細胞内のRAS遺伝子の発現を低下させ、KRAS関連疾患、例えば白血病、メラノーマ、細胞腫、癌、腫瘍、腺腫等を治療することができる。

即ち、本発明の組成物を哺乳動物に投与することで、RAS遺伝子の発現を低下させ、RAS関連疾患、例えば白血病、メラノーマ、細胞腫、癌、腫瘍、腺腫等を治療することができる。投与対象は、人であることが好ましい。

また、本発明における組成物は、癌の治療剤または予防剤に関するインビボの薬効評価モデルにおいて、KRAS遺伝子を抑制することの有効性を検証するためのツールとして使用することもできる。

[0100] 本発明の組成物を、癌の治療剤または予防剤として使用する場合、投与経路としては、治療に際し最も効果的な投与経路を使用するのが望ましく、好ましくは静脈内投与または筋肉内投与をあげることができ、より好ましくは静脈内投与があげられる。

投与量は、投与対象の病状や年齢、投与経路等によって異なるが、例えば二本鎖核酸に換算した1日投与量が約0.1μg～1000mgとなるように投与すればよい。

[0101] 静脈内投与または筋肉内投与に適当な製剤としては、例えば注射剤があげられ、上述の方法により調製した脂質粒子の分散液をそのまま例えば注射剤等の形態として用いることも可能であるが、該分散液から例えば濾過、遠心分離等によって溶媒を除去して使用することも、該分散液を凍結乾燥して使用する、および/または例えばマンニトール、ラクトース、トレハロース、マルトースもしくはグリシン等の賦形剤を加えた分散液を凍結乾燥して使用す

ることもできる。

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

[0102] 次に、実施例、参考例および試験例により、本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例および試験例に限定されるものではない。

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

[0103] 参考例1

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

メチルアミン(アルドリッチ(Aldrich)社製、約2 mol/Lテトラヒドロフラン溶液、10.5 mL、21.0 mmol)に(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル メタンスルホナート(ニューチェック・プレップ(Nu-Chek Prep,Inc)社製, 1.03 g, 3.00 mmol)を加え、マイクロ波反応装置を用いて150℃で90分間加熱撹拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、2 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、ついで飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過し、減圧下濃縮することでメチル((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル)アミンの粗生成物を得た。

得られた粗生成物に(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル メタンスルホナート(Nu-Chek Prep,Inc社製, 0.93 g, 2.70 mmol)および50%水酸化ナトリウム水溶液(0.960 g, 12.0 mmol)を加え、油浴上135℃で60分間加熱撹拌した。

室温まで冷却後、反応液を酢酸エチルで希釈し、水、ついで飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール=100/0～97/3)で精製することにより化合物II-1(1.07 g, 67.2 %)を得た。

ESI-MS m/z: 529 $(M + H)^+$; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 0.89 (t, J = 6.7 Hz, 6H), 1.29 (br s, 32H), 1.40-1.51 (m, 4H), 1.97-2.06 (m, 8H), 2.20 (s, 3H), 2.30 (t, J = 7.6 Hz, 4H), 2.77 (t, J = 5.8 Hz, 4H), 5.28-5.43 (m, 8H).

[0104] 参考例2

メチルジ((Z)-ヘキサデカ-9-エニル)アミン (化合物II-2)

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

ESI-MS m/z: 477 $(M + H)^+$; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 6H), 1.29 (br s, 36H), 1.46-1.57 (m, 4H), 1.97-2.05 (m, 8H), 2.33 (s, 3H), 2.45 (t, J = 7.9 Hz, 4H), 5.29-5.41 (m, 4H).

[0105] 参考例3

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

参考例1と同様の方法で、メチルアミン(Aldrich社製、約2 mol/Lテトラヒドロフラン溶液、16.0 mL、32.0 mmol)および(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニル メタンスルホナート(Nu-Chek Prep,Inc社製, 2.98 g, 8.00 mmol)を用い、化合物II-3(1.27 g, 54.4%)を得た。

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

[0106] 参考例4

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

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

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

[0107] 参考例5

ジ((Z)-オクタデカ-9-エニル)アミン（化合物II-5）

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

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

[0108] 参考例6

メチルジ((Z)-オクタデカ-9-エニル)アミン（化合物II-6）

参考例1と同様の方法で、メチルアミン(Aldrich社製、約2 mol/Lテトラヒドロフラン溶液、11.2 mL、22.4 mmol)および(Z)-オクタデカ-9-エニル メタンスルホナート(Nu-Chek Prep,Inc社製, 2.11 g, 6.09 mmol)を用い、化合物II-6(1.20 g, 70.2 %)を得た。

ESI-MS m/z: 533 $(M + H)^+$; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 0.88 (t, J = 6.6 Hz, 6H), 1.27 (br s, 44H), 1.39-1.50 (m, 4H), 1.97-2.06 (m, 8H), 2.20 (s, 3H), 2.30 (t, J = 7.6 Hz, 4H), 5.28-5.40 (m, 4H).

[0109] 参考例7 trans-1-(tert-ブトキシカルボニル)-3,4-ビス(((Z)-オクタデカ-9-エノイルオキシ)メチル)ピロリジン（化合物VII-1）

国際公開第2006/100036号パンフレットを参考にして合成したtrans-3,4-ビス(ヒドロキシメチル)ピロリジン-1-カルボン酸tert-ブチル(156 mg, 0.674 mmol)をジクロロメタン(6 mL)に溶解させ、オレイン酸(東京化成工業社製、419 mg, 1.48 mmol)、水溶性 カルボジイミド(WSCD)(国産化学社製、297 mg, 1.55 mmol)および4-ジメチルアミノピリジン(東京化成工業社製、DMAP (20.6 mg, 0.169 mmol)を加え室温で終夜撹拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/クロロホルム=50/50～0/100)で精製することにより化合物VII-1 (280 mg, 54.6%)を得た。

ESI-MS m/z: 761 $(M + H)^+$; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 0.88 (t, J = 6.6 Hz, 6H), 1.25-1.46 (m, 36H), 1.46 (s, 9H), 1.46-1.66 (m, 8H), 1.97-2.04 (m, 8H), 2.27-2.38 (m, 6H), 3.10-3.23 (m, 2H), 3.53-3.66 (m, 2H), 4.03 (dd, J = 10.8, 6.0 Hz, 2H), 4.14 (dd, J = 10.8, 6.0 Hz, 2H), 5.28-5.40 (m, 4H).

[0110] 参考例8 trans-1-(tert-ブトキシカルボニル)-3,4-ビス(((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエノイルオキシ)メチル)ピロリジン (化合物VII-2)

参考例7と同様の方法で、国際公開第2006/100036号パンフレットを参考にして合成したtrans-3,4-ビス(ヒドロキシメチル)ピロリジン-1-カルボン酸tert-ブチル(150 mg, 0.674 mmol)およびリノール酸(アルドリッチ社製、400 mg, 1.48 mmol)を用い、化合物VII-2 (351 mg, 71.7%)を得た。

ESI-MS m/z: 757 $(M + H)^+$; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 0.89 (t, J = 6.8 Hz, 6H), 1.21-1.45 (m, 26H), 1.46 (s, 9H), 1.47-1.68 (m, 6H), 2.05 (q, J = 6.7 Hz, 8H), 2.26-2.38 (m, 6H), 2.77 (t, J = 5.9 Hz, 4H), 3.10-3.23 (m, 2H), 3.53-3.66 (m, 2H), 4.03 (dd, J = 11.0, 6.0 Hz, 2H), 4.14 (dd, J = 11.0, 6.0 Hz, 2H), 5.28-5.43 (m, 8H).

[0111] 参考例9 trans-3,4-ビス(((Z)-オクタデカ-9-エノイルオキシ)メチル)ピロリジン(化合物I-1)

参考例7で得られた化合物VII-1 (278 mg, 0.366 mmol)をジクロロメタン(6 mL)に溶解させ、トリフルオロ酢酸(0.563 mL, 7.31 mmol)を加え室温で3時間撹拌した。反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、水層をクロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣を少量のメタノールに溶解し、プラスチックカラムに充填したBONDESIL-SCX(ヴァリアン(VARIAN)社製、6 g)の上部に吸着させ、メタノールで洗浄し、次いでアンモニア・メタノール溶液(東京化成工業社製、2 mol/L)で目的物を溶出させた。目的物を含むフラクションを減圧下濃縮することで化合物I-1 (162 mg, 67.2%)を得た。

ESI-MS m/z: 661 $(M + H)^+$; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 0.88 (t, J = 6.6 Hz, 6H), 1.27-1.35 (m, 40H), 1.56-1.64 (m, 4H), 2.01 (q, J = 5.9 Hz, 8H), 2.09-2.16 (m, 2H), 2.30 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 2.72 (dd, J = 11.3, 5.5 Hz, 2H), 3.11 (dd, J = 11.3, 7.1 Hz, 2H), 3.99-4.12 (m, 4H), 5.29-5.40 (m, 4H).

[0112] 参考例10 trans-3,4-ビス(((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエノイルオキシ)メチル)ピロリジン(化合物I-2)

参考例9と同様の方法で、参考例8で得られた化合物VII-2(350 mg, 0.463 mmol)を用い、化合物I-2 (224 mg, 73.6%)を得た。

ESI-MS m/z: 657 $(M + H)^+$; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 0.89 (t, J = 6.8 Hz, 6H), 1.26-1.40 (m, 28H), 1.57-1.66 (m, 4H), 2.05 (q, J = 6.6 Hz, 8H), 2.09-2.17 (m, 2H), 2.31 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 2.72 (dd, J = 11.3, 6.0 Hz, 2H), 2.77 (t, J = 6.2 Hz, 4H), 3.11 (dd, J = 11.3, 7.3 Hz, 2H), 3.99-4.13 (m, 4H), 5.28-5.43 (m, 8H).

[0113] 参考例11 trans-1-メチル-3,4-ビス(((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエノイルオキシ)メチル)ピロリジン(化合物I-3)

参考例10で得られた化合物I-2 (80 mg, 0.12 mmol)を1,2-ジクロロエタン(1.5 mL)、メタノール(1.5 mL)に溶解させ、ホルムアルデヒド(0.091 mL, 1.22 mmol)、ナトリウムトリアセトキシボロヒドリド(アクロス・オーガニクス(

Acros Organics)社製、129 mg, 0.610 mmol)を複数回にわたって加え室温で1.5時間撹拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール=100/0～93/7)で精製することで化合物I-3（66 mg, 81%)を得た。

ESI-MS m/z: 671 $(M + H)^+$; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 0.89 (t, J = 6.8 Hz, 6H), 1.25-1.40 (m, 28H), 1.57-1.66 (m, 4H), 2.05 (q, J = 6.7 Hz, 8H), 2.13-2.24 (m, 2H), 2.27-2.37 (m, 9H), 2.66 (dd, J = 9.2, 7.3 Hz, 2H), 2.77 (t, J = 5.7 Hz, 4H), 3.99-4.12 (m, 4H), 5.28-5.43 (m, 8H).

[0114] 参考例12　trans-1-メチル-3,4-ビス(((Z)-オクタデカ-9-エノイルオキシ)メチル)ピロリジン(化合物I-4)

参考例11と同様の方法で、参考例9で得られた化合物I-1（50 mg, 0.076 mmol)を用い、化合物I-4（47 mg, 92%)を得た。

ESI-MS m/z: 675 $(M + H)^+$; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 0.88 (t, J = 6.6 Hz, 6H), 1.26-1.35 (m, 40H), 1.56-1.65 (m, 4H), 2.01 (q, J = 5.5 Hz, 8H), 2.15-2.24 (m, 2H), 2.27-2.37 (m, 9H), 2.67 (dd, J = 9.3, 7.1 Hz, 2H), 3.99-4.12 (m, 4H), 5.29-5.40 (m, 4H).

実施例 1

[0115] 参考例1で得られた化合物II-1および参考例11で得られた化合物I-3、および第3表のsiRNA A～Cを用いて、以下のように製剤を製造した。

二本鎖核酸は蒸留水に溶解し、24 mg/mLに調製して用いた(以下siRNA溶液という)。

化合物II-1/1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-(メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000)ナトリウム塩(PEG-DMPE Na、N-(カルボニルメトキシポリエチレングリコール2000)-1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン=ナトリウム塩、日油社製)=57.3/5.52 mmol/Lとなるように、各脂質を塩酸およびエタノールを含有する水溶液に懸濁

させ、vortex攪拌ミキサーで攪拌および、加温を繰り返して均一な懸濁液を得た。この懸濁液を室温下で0.2 μmのポリカーボネートメンブランフィルターおよび0.05 μmのポリカーボネートメンブランフィルターに通し、リード粒子の分散液を得た。Dynamic light scattering (DLS) 粒子径測定装置(Zetasizer Nano ZS、マルバーン(Malvern)社製、以下同じ)で得られたリード粒子の平均粒子径を測定し、30 nmから100 nmの範囲内であることを確認した。得られたリード粒子の分散液 に、siRNA 溶液を、3:1(=リード粒子の分散液:siRNA溶液)の割合で混合し、さらに3倍量の蒸留水を加えて混合することでカチオン性脂質/二本鎖核酸複合体粒子の分散液を調製した。

一方、化合物II-1/化合物I-3/1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-(メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000)ナトリウム塩(PEG-DSPE Na、N-(カルボニルメトキシポリエチレングリコール2000)-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン=ナトリウム塩、日油社製)/ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、日油社製)/コレステロール(日油社製)= 2.98/5.97/2.94/5.71/11.8 mmol/Lとなるように、各脂質を秤量し90 vol%エタノールに溶解させ、脂質膜構成成分の溶液を調製した。

得られた脂質膜構成成分の溶液を加温した後、得られたカチオン性脂質/二本鎖核酸複合体粒子の分散液を、1:1の割合で混合し、さらに数倍量の蒸留水を混合し、粗製剤を得た。

得られた粗製剤はアミコンウルトラ(Millipore社製)を用いて濃縮し、さらに溶媒を生理食塩水に置換し、0.2 μmのフィルター(東洋濾紙社製)を用いてクリーンベンチ内でろ過した。さらに得られた製剤のsiRNA濃度を測定し、siRNA濃度で1.0 mg/mLとなるように生理食塩水を用いて希釈することで、製剤1-A～C(化合物II-1および化合物I-3を脂質として含有し、siRNA A, BまたはCを二本鎖核酸として含有する組成物)を得た。粒子径測定装置で製剤中の脂質粒子の平均粒子径を測定した。結果を第4表に示す。

[0116]

[表4]

製剤	1-A	1-B	1-C
siRNA	A	B	C
得られた製剤の粒子径(nm)	94	95	93

実施例 2

[0117] 参考例1で得られた化合物II-1および参考例11で得られた化合物I-3、および第3表のsiRNA A, DまたはEを用いて、以下のように製剤を製造した。

二本鎖核酸は蒸留水に溶解し24 mg/mLに調製して用いた(以下siRNA溶液という)。

化合物II-1/PEG-DSPE Na=57.3/5.52 mmol/Lとなるように、各脂質を塩酸およびエタノールを含有する水溶液に懸濁させ、vortex攪拌ミキサーで攪拌および、加温を繰り返して均一な懸濁液を得た。この懸濁液を室温下で0.2 μmのポリカーボネートメンブランフィルターおよび0.05 μmのポリカーボネートメンブランフィルターに通し、リード粒子の分散液を得た。粒子径測定装置で得られたリード粒子の平均粒子径を測定し、30 nmから100 nmの範囲内であることを確認した。得られたリード粒子の分散液 に、siRNA 溶液を、3:1(=リード粒子の分散液:siRNA溶液)の割合で混合し、さらに3倍量の蒸留水を加えて混合することでカチオン性脂質/二本鎖核酸複合体粒子の分散液を調製した。

一方、化合物II-1/化合物I-3/PEG-DSPE Na/DSPC/コレステロール= 2.98/5.97/2.94/5.71/11.8 mmol/Lとなるように、各脂質を秤量し90 vol%エタノールに溶解させ、脂質膜構成成分の溶液を調製した。

得られた脂質膜構成成分の溶液を加温した後、得られたカチオン性脂質/二本鎖核酸複合体粒子の分散液を、1:1の割合で混合し、さらに数倍量の蒸留水を混合し、粗製剤を得た。

得られた粗製剤はアミコンウルトラ(Millipore社製)を用いて濃縮し、溶媒を生理食塩水に置換した。さらに生理食塩水に対して透析膜(Spectrum Laboratories社、Spectra Por Biotechセルロースエステル膜、MWCO:300 KDa)で透

析し、アミコンウルトラ(Millipore社製)を用いて濃縮し、0.2 μmのフィルター(東洋濾紙社製)を用いてクリーンベンチ内でろ過した。得られた製剤のsiRNA濃度を測定し、siRNA濃度で1.0 mg/mLとなるように生理食塩水を用いて希釈することで、製剤2-A, 2-Dおよび2-E(化合物II-1および化合物I-3を脂質として含有し、siRNA A, DまたはEを二本鎖核酸として含有する組成物)を得た。粒子径測定装置で製剤中の脂質粒子の平均粒子径を測定した。結果を第5表に示す。

[0118] [表5]

製剤	2-A	2-D	2-E
siRNA	A	D	E
得られた製剤の粒子径(nm)	87	86	84

実施例 3

[0119] 参考例1で得られた化合物II-1および参考例11で得られた化合物I-3、および第3表のsiRNA Aを用い、リード粒子を化合物II-1/PEG-DSPE Na=57.3/5.52 mmol/Lとし、脂質膜構成成分を化合物II-1/化合物I-3/PEG-DSPE Na/DSPC/コレステロール= 2.98/8.83/3.93/8.83/14.7 mmol/Lとすることで、実施例1と同様の方法により製剤3-A(化合物II-1および化合物I-3を脂質として含有し、siRNA Aを二本鎖核酸として含有する組成物)を得た。粒子径測定装置で測定した製剤中の脂質粒子の平均粒子径は101 nmであった。

実施例 4

[0120] 参考例1で得られた化合物II-1および参考例11で得られた化合物I-3、および第3表のsiRNA Aを用い、リード粒子を化合物II-1/PEG-DSPE Na=57.3/5.52 mmol/Lとし、脂質膜構成成分を化合物II-1/化合物I-3/PEG-DSPE Na/DSPC/コレステロール= 0.736/8.83/2.70/8.83/5.89 mmol/Lとすることで、実施例1と同様の方法により製剤4-A(化合物II-1および化合物I-3を脂質として含有し、siRNA Aを二本鎖核酸として含有する組成物)を得た。粒子径測定装置で測定した製剤中の脂質粒子の平均粒子径は80 nmであった。

実施例 5

[0121] 参考例1で得られた化合物II-1および参考例11で得られた化合物I-3、および第3表のsiRNA Aを用い、リード粒子を化合物II-1/PEG-DSPE Na=57.3/5.52 mmol/Lとし、脂質膜構成成分を化合物II-1/化合物I-3/PEG-DSPE Na/DSPC/コレステロール= 2.98/8.83/2.95/8.83/5.89 mmol/Lとすることで、実施例1と同様の方法により製剤5-A(化合物II-1および化合物I-3を脂質として含有し、siRNA Aを二本鎖核酸として含有する組成物)を得た。粒子径測定装置で測定した製剤中の脂質粒子の平均粒子径は79 nmであった。

実施例 6

[0122] 参考例1で得られた化合物II-1および参考例11で得られた化合物I-3、および第3表のsiRNA Aを用い、リード粒子を化合物II-1/PEG-DSPE Na=57.3/5.52 mmol/Lとし、脂質膜構成成分を化合物II-1/化合物I-3/PEG-DSPE Na/DSPC/コレステロール= 0.736/8.83/3.68/8.83/14.7 mmol/Lとすることで、実施例1と同様の方法により製剤6-A(化合物II-1および化合物I-3を脂質として含有し、siRNA Aを二本鎖核酸として含有する組成物)を得た。粒子径測定装置で測定した製剤中の脂質粒子の平均粒子径は98 nmであった。

実施例 7

[0123] 参考例1で得られた化合物I-3、および第3表のsiRNA Aを用い、リード粒子を化合物I-3/PEG-DSPE Na=57.3/5.52 mmol/Lとし、脂質膜構成成分を化合物I-3/PEG-DSPE Na/DSPC/コレステロール= 8.95/2.94/5.71/11.8 mmol/Lとすることで、実施例1と同様の方法により製剤7-A(化合物I-3を脂質として含有し、siRNA Aを二本鎖核酸として含有する組成物)を得た。粒子径測定装置で測定した製剤中の脂質粒子の平均粒子径は92 nmであった。

[0124] 試験例1

実施例1で得られた製剤1-A～Cを用いて、それぞれ以下の方法によりインビボ mRNAノックダウン評価試験を実施した。

ヒト膵臓癌由来細胞株であるMIA PaCa-2はJCRB細胞バンクより受領し、10%非働化ウシ胎仔血清(ギブコ(GIBCO)社製)及び1vol%ペニシリン - ストレプトマイシン(GIBCO社製、15140-122)を含む高グルコース含有DMEM培地(GIBCO社

製, 11995-065)で37℃、5%CO_2条件下で培養した。MIA PaCa-2を8×10^7 cells / mLの濃度となるようにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁し、この細胞懸濁液100 μLをSCIDマウス(Harlan Labsより入荷)の背部皮下に移植した(8×10^6 cells /0.1mL PBS /head)。移植5日後、腫瘍体積を指標に一群5匹として群分けを行い、siRNA 10 mg/kgに相当する量の実施例1で得られた各製剤をマウスに静脈内投与した。生理食塩水投与群は、生理食塩水 10mL/kgを投与した。投与前及び投与48時間後にマウスの体重を測定した。体重測定後にマウスを安楽死させ、皮下腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍は直ちに液体窒素で凍結し、使用するまで-80℃に保存した。

得られた腫瘍サンプルについて、サンプルの入った2 mL丸底tubeに1 mLのTrizol reagent (インビトロジェン(Invitrogen)製, 10296-028)及び5mmのStainless Steel Beads (キアゲン(QIAGEN)製, 69989)を添加し、Tissue lyser II (キアゲン(QIAGEN)製)にて1/25 freq, 1.5 分 x 2回の条件で破砕した。破砕後遠心(10000 rpm, 10 分)し上清を回収、200 μLのクロロホルムを添加し激しく攪拌後再び遠心(15000 rpm, 15 分)した。得られた上清に同量の70%エタノール溶液を加えて混ぜ、RNeasy Mini Kit スピンカラム(キアゲン製)にアプライし遠心(8000 x g, 15秒)した。ろ液を捨て、700μLのRNeasy Mini Kit RW1(キアゲン製)を加えて遠心(8000 x g, 15秒)し、ろ液を捨て、新たに500μLのRNeasy Mini Kit RPE(キアゲン(QIAGEN)製)を加えて遠心(8000 x g, 15秒)した。ろ液を捨て、再度500μLのRNeasy Mini Kit RPEを加えて遠心(8000 x g, 2分)し、ろ液を捨てた後、更に遠心(15000 rpm, 1分)してカラム内の溶液を除外した。RNeasyスピンカラムに30μLのRNase free waterを加えて遠心(8000 x g, 1分)しRNAを抽出した。抽出したRNAの濃度を吸光光度計Spectra Max M3 (モリュキュラーデバイシス(Molecular Devices)社製)にて測定し、500-1000 ng相当のRNAについてTranscriptor (ロシュ(Roche)製、4897030)を用いて逆転写を行った。反応液、反応条件はTranscriptor添付の使用説明書に従った。得られたcDNAサンプルをdH_2Oで10倍希釈し、qPCRの鋳型として用いた。qPCR反応にはTaqMan Gene Expression Master Mix (アプライドバ

イオシステムズ(Applied Biosystems)製, 4369542), TaqMan Gene Expression Assays(アプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems)製, 4331182)を用いた。PCR反応の条件はTaqMan Gene Expression添付の使用説明書に従った。検体のmRNA量は、生理食塩水投与群における、KRASのmRNA量を1としたときの相対的な割合として算出した。

図1に、腫瘍中KRAS mRNA量を示す。

[0125] 図1から明らかなように、実施例1で得られた各製剤は、極めて強くKRAS遺伝子の発現を抑制した。

[0126] 試験例2

実施例1で得られた製剤1-A～Cを用いて、以下の方法により腫瘍増殖評価試験を実施した。

試験例1と同様にして、ヒト膵臓癌由来細胞株であるMIA PaCa-2をSCIDマウスに移植したゼノグラフトモデルを用いて実施した。腫瘍体積を指標に一群7匹となるように群分けを実施(Day0)し、Day0及びDay7にsiRNA 10 mg/kgに相当する量の実施例1で得られた各製剤を静脈内投与した。対照として生理食塩水 10mL/kgを投与した。各個体の腫瘍径を、Day0からDay17まで測定し、以下の式を用いて腫瘍体積、体積比を算出した。

[数1]

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

[数2]

$$\text{体積比}(V/V0) = \text{各時点の腫瘍体積}(mm^3) \div \text{Day0 の腫瘍体積}(mm^3)$$

図2に腫瘍体積の相対値の推移を示す。

[0127] 図2から明らかなように、実施例1で得られた各製剤を、インビボで薬効評価試験した結果は、抗腫瘍作用が強い。

よって、本発明の組成物を、哺乳動物に投与して、生体内において、RAS遺伝子の発現を低下させ、RAS関連疾患を治療することができることが明らかになった。

[0128] 試験例3

実施例1で得られた製剤1-Aおよび1-Cを1週間間隔で2回投与した後の血中濃度推移を比較した。

実施例1で得られた製剤1-Aまたは1-CのsiRNA 10 mg/kgに相当する量を雄性CD1マウス(6週齢、日本チャールス・リバー)に、尾静脈より投与した。7日間の間隔をあけ、同様に2回目の投与を行った。初回および2回目の投与の後、0.5, 2, 6および24時間目に、尾動脈より20 μLの血液を採取し、denaturing solution (4 mol/L グアニジンチオシアネート、25 mmol/L クエン酸ナトリウム、1 mmol/L ジチオスレイトール、0.5 w/v% sodium N-lauroyl sarcosine) 100 μLを添加して混合した。

得られた液に、内部標準物質と、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール pH 8.0 (Invitrogen)を添加して混合し遠心分離した。

上清に酢酸ナトリウムとGenTLE precipitation carrier (タカラバイオ)を添加して混合した後、エタノール を添加して混合し、遠心分離した後、上清を捨てた。沈殿に75 v/v% エタノールを添加して遠心分離した後、上清を捨て、沈殿を風乾した後、蒸留水に溶解し、LC/MSによってアンチセンス鎖およびセンス鎖(配列番号5または配列番号9の核酸)を定量した。

＜装置＞

HPLC装置;ACQUITY UPLC system (Waters)

質量分析装置;TQ Detector (Waters)

＜HPLC条件＞

内標準物質

以下に示した二本鎖の核酸

5'-mGmUrAmUrUmUrGmCrGrUrAmUrUmUrAmUrUmArUrGrUrAmAdAdT-3' (配列番号12)

5'-mAmUmUmUrArCrArUrArAmUrAmArArUrArCrGrCrArArArUrAmCrAmC-3' (配列番号13)

(mおよびrが付された塩基に結合する糖は、それぞれ2'-O-メチルで置換されているリボースおよびリボースである)

カラム;ACQUITY UPLC OST C18 (1.7 μm、2.1 mm I.D. x 100 mm、Waters)

カラム温度：70℃

移動相：

A液　15 mmol/L トリエチルアミン, 400 mmol/L ヘキサフルオロイソプロピルアルコール　水溶液

B液　メタノール

グラジエント：B液濃度を10%から25%まで9分間で直線的に上昇させた。

流速：0.4 mL/分

[0129] 製剤1-Aと製剤1-Cのいずれの投与群においても、1回目投与と2回目投与における血中濃度推移に差は認められなかった。

すなわち、例えば配列番号4および5、6および7、8および9、4および10または4および11の、それぞれセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する二本鎖核酸等は、例えば、本発明の組成物等を、哺乳動物に投与する場合において、すぐれた血中濃度推移を示すことが明らかとなった。

[0130] 試験例4

実施例1で得られた製剤1-A～Cを用いて、それぞれ以下の方法によりインビボにおける抗PEG抗体産生作用を検討した。

BALB/cマウス(Harlan Labsより入荷)一群3匹で無作為に群分けを行い、siRNA 10 mg/kgに相当する量の実施例1で得られた各製剤をマウスに静脈内投与した。生理食塩水投与群は、生理食塩水 10mL/kgを投与した。投与1週間後にイソフルランを用いてマウスに麻酔をかけた。その後、開腹し、腹部大静脈より血液を約500μL回収した。回収した血液は血清分離剤入りのチューブに入れ、30分間室温に放置した。その後、3000rpmで10分間遠心分離し、回収した血清は使用するまで-20℃に保存した。

アビジンコートのプレート(サーモ　フィッシャー　サイエンティフィック　インク(Thermo Fisher Scientific Inc.)社, (Nunc), 236001)にPBSで40μg/mLに希釈したビオチンPEG入り(Biotin-PEG) (ナノックス インク(Nanocs Inc.)社, PEG5-0001)を50μL添加した。ただし、スタンダードを添加するウェ

ルにはBiotin-PEGを添加しなかった。約1時間室温で放置後、トリスバッファー生理食塩水Tween20入り(Tris-Buffered Saline Tween-20;TBST)でプレートを3回洗浄した。Biotin-PEGを添加したウェルに1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBSで50倍希釈した血清サンプルを50μL添加した。また、Biotin-PEGを添加していないウェルにBiotin-mouse anti-human CCR4 antibody(ビィ ディ バイオサイエンシス(BD Biosciences)社, 551266)をスタンダードとして50μL添加した(0.98～62.5 pg/mL)。約2時間室温で放置後、TBSTでプレートを4回洗浄した。すべてのウェルに1%BSAを含むPBSで5000倍希釈したPOD conjugated anti-mouse IgGAM antibody (アイシーエヌ カッペル(ICN/Cappel)社, 55570)を50μL添加した。約2時間室温で放置後、TBSTでプレートを4回洗浄した。TMB Substrate Reagent Set(BD Biosciences社, 555214)を50μL添加した。約30分間暗所で室温放置後、1M-H_2SO_4を50μL加えて酵素反応を止めた。プレートリーダーで450nmと620nmの吸光度を測定し、スタンダードサンプルによる検量線によりサンプルの相対的な抗PEG抗体量を算出した。

図3に血中抗PEG抗体量を示す。

[0131] 試験例5

実施例2で得られた製剤2-A、2-Dおよび2-Eを用いて、以下の方法によりインビボ mRNAノックダウン評価試験を実施した。

試験例1と同様にして、ヒト膵臓癌由来細胞株であるMIA PaCa-2をSCIDマウス(日本クレアより入荷)に移植したゼノグラフトモデルを用いて実施した。腫瘍体積を指標に一群3匹となるように群分けを実施(Day0)し、Day0にsiRNA 10 mg/kg、3 mg/kgまたは1 mg/kgに相当する量の実施例2で得られた各製剤を投与した。生理食塩水投与群は、生理食塩水10mL/kgを投与した。試験例1と同様にして、得られた腫瘍サンプルを破砕し、遠心して上清を回収し、上清にクロロホルムを添加し激しく攪拌後再び遠心(15000 rpm, 15 分)し、得られた上清200 μLから自動核酸抽出機MagNA PURE 96 (ロシュ(Roche)製)にて、Cellular RNA Large Volume Kit (ロシュ(Roche)製, 5467535)を用いてRNAを抽出した。試験例1と同様にして、抽出したRNA検体のmRNA量を、生理食塩

水投与群における、KRASのmRNA量を1としたときの相対的な割合として算出した。

図4に、腫瘍中KRAS mRNA量を示す。

[0132] 図4から明らかなように、実施例2で得られた各製剤は、極めて強くKRAS遺伝子の発現を抑制した。

[0133] 試験例6

実施例2で得られた製剤2-A、2-Dおよび2-Eを用いて、以下の方法により腫瘍増殖評価試験を実施した。

試験例2と同様にして、ヒト膵臓癌由来細胞株であるMIA PaCa-2をSCIDマウス(日本クレアより入荷)に移植したゼノグラフトモデルを用いて実施した。腫瘍体積を指標に一群5匹となるように群分けを実施(Day0)し、Day0にsiRNA 10 mg/kg、3 mg/kgまたは1 mg/kgに相当する量の実施例2で得られた各製剤を静脈内投与した。生理食塩水投与群は、生理食塩水10mL/kgを投与した。各個体の腫瘍径を、Day7に測定し、試験例2と同様の方法で腫瘍体積、体積比を算出した。

図5に、腫瘍体積の相対値を示す。

[0134] 図5から明らかなように、実施例2で得られた各製剤を、インビボで薬効評価試験した結果は、抗腫瘍作用が強い。

よって、本発明の組成物を、哺乳動物に投与して、生体内において、RAS遺伝子の発現を低下させ、RAS関連疾患を治療することができることが明らかになった。

[0135] 試験例7

実施例1で得られた製剤1-Aおよび実施例2で得られた製剤2-Aを用いて、以下の方法により腫瘍増殖評価試験を実施した。

試験例2と同様にして、ヒト膵臓癌由来細胞株であるMIA PaCa-2をSCIDマウス(日本クレアより入荷)に移植したゼノグラフトモデルを用いて実施した。腫瘍体積を指標に一群5匹となるように群分けを実施(Day0)し、Day0にsiRNA 2.5 mg/kgに相当する量の各製剤を静脈内投与した。生理食塩水投与群は、生

理食塩水10mL/kgを投与した。各個体の腫瘍径を、Day7に測定し、試験例2と同様の方法で腫瘍体積、体積比を算出した。

図6に、腫瘍体積の相対値を示す。

[0136] 試験例8

実施例1で得られた製剤1-A、実施例3で得られた製剤3-Aおよび実施例4で得られた製剤4-Aを用いて、試験例7と同様の方法により腫瘍増殖評価試験を実施した。

図7に、腫瘍体積の相対値を示す。

[0137] 試験例9

実施例1で得られた製剤1-A、実施例5で得られた製剤5-Aおよび実施例6で得られた製剤6-Aを用いて、試験例7と同様の方法により腫瘍増殖評価試験を実施した。

図8に、腫瘍体積の相対値を示す。

[0138] 試験例10

実施例1で得られた製剤1-Aおよび実施例7で得られた製剤7-Aを用いて、以下の方法により腫瘍増殖評価試験を実施した。

試験例2と同様にして、ヒト膵臓癌由来細胞株であるMIA PaCa-2をSCIDマウス(日本クレアより入荷)に移植したゼノグラフトモデルを用いて実施した。腫瘍体積を指標に一群5匹となるように群分けを実施(Day0)し、Day0にsiRNA 5 mg/kgに相当する量の各製剤を静脈内投与した。生理食塩水投与群は、生理食塩水10mL/kgを投与した。各個体の腫瘍径を、Day7に測定し、試験例2と同様の方法で腫瘍体積、体積比を算出した。

図9に、腫瘍体積の相対値を示す。

[0139] 試験例11

実施例1で得られた製剤1-Aを用いて、以下の方法により腫瘍増殖評価試験を実施した。

試験例2と同様にして、ヒト大腸癌由来細胞株であるHCT116(ATCC)をSCIDマウス（日本クレアより入荷）に移植したゼノグラフトモデルを用いて実施し

た。腫瘍体積を指標に一群5匹となるように群分けを実施(Day0)し、Day0及びDay7にsiRNA 10 mg/kgに相当する量の実施例1で得られた製剤1-Aをマウスに静脈内投与した。生理食塩水投与群は、生理食塩水10mL/kgを投与した。各個体の腫瘍径を、Day0からDay17まで測定し、試験例2と同様の方法で腫瘍体積、体積比を算出した。

図10に、腫瘍体積の相対値の推移を示す。

産業上の利用可能性

[0140] 本発明の組成物を、哺乳動物に投与して、生体内において、KRAS遺伝子発現を抑制し、RAS関連疾患を治療することができる。

配列表フリーテキスト

[0141] 配列番号1-KRASmRNA内のターゲット

配列番号2-KRASmRNA内のターゲット

配列番号3-KRASmRNA内のターゲット

配列番号4-siRNA センス

配列番号5-siRNA アンチセンス

配列番号6-siRNA センス

配列番号7-siRNA アンチセンス

配列番号8-siRNA センス

配列番号9-siRNA アンチセンス

配列番号10-siRNA アンチセンス

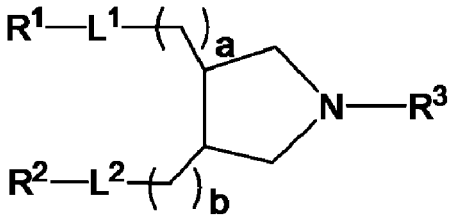
配列番号11-siRNA アンチセンス

配列番号12-siRNA センス用のIS

配列番号13-siRNA アンチセンス用のIS

請求の範囲

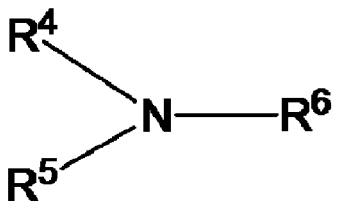
[請求項1] センス鎖およびアンチセンス鎖を有し、該センス鎖と該アンチセンス鎖とは少なくとも25塩基対を有し、該アンチセンス鎖は、配列番号1～3のいずれか1つのKRAS遺伝子のmRNAの連続する少なくとも19塩基の配列に相補的な塩基の配列を有し、最大35ヌクレオチドの長さを有する、薬物としての二本鎖核酸と、式(I)



(I)

(式中、R^1およびR^2は、同一または異なって炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルキル、アルケニルもしくはアルキニルであり、
L^1およびL^2は、同一または異なって-CO-O-または-O-CO-であり、
aおよびbは、同一または異なって1～3であり、
R^3は水素原子、炭素数1～6のアルキルまたは炭素数3～6のアルケニルである)で表されるカチオン性脂質を含有する脂質粒子を含有する組成物。

[請求項2] 脂質粒子が、さらに式(II)



(II)

(式中、R^4およびR^5は、同一または異なって炭素数12～24の直鎖状または分枝状のアルキル、アルケニルもしくはアルキニルであり、
R^6は水素原子、炭素数1～6のアルキル、炭素数3～6のアルケニル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1～3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキ

ルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1～6のアルキルもしくは炭素数3～6のアルケニルである)で表されるカチオン性脂質を含有する脂質粒子である、請求項1記載の組成物。

[請求項3] R^4およびR^5が、ともにドデシル、トリデシル、テトラデシル、2,6,10-トリメチルウンデシル、ペンタデシル、3,7,11-トリメチルドデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、6,10,14-トリメチルペンタデカン-2-イル、ノナデシル、2,6,10,14-テトラメチルペンタデシル、イコシル、3,7,11,15-テトラメチルヘキサデシル、ヘニコシル、ドコシル、トリコシル、テトラコシル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニル、(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニル、3,7,11-トリメチルドデカ-2,6,10-トリエニルまたは3,7,11,15-テトラメチルヘキサデカ-2-エニルである請求項2記載の組成物。

[請求項4] R^4およびR^5が、ともにテトラデシル、ヘキサデシル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(Z)-イコサ-11-エニルまたは(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニルである請求項2記載の組成物。

[請求項5] R^6が水素原子、メチル、ピロリジン-3-イル、ピペリジン-3-イル、ピペリジン-4-イルまたは同一もしくは異なって1～3つのアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルバモイル、モノアルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、ピロリジニル、ピペリジルもしくはモルホリニルで置換された炭素数1～6のアルキルもしくは炭素数3～6のアルケニルである請求項3または

4記載の組成物。

[請求項6] R^3が水素原子またはメチルである請求項1～5のいずれかに記載の組成物。

[請求項7] L^1およびL^2が-O-CO-であり、R^1およびR^2が、同一にドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、イコシル、ドコシル、テトラコシル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエニル、(Z)-イコサ-11-エニル、(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニル、3,7,11-トリメチルドデカ-2,6,10-トリエニルまたは3,7,11,15-テトラメチルヘキサデカ-2-エニルである請求項1～6のいずれかに記載の組成物。

[請求項8] L^1およびL^2が、-CO-O-であり、R^1およびR^2が、同一にトリデシル、ペンタデシル、ヘプタデシル、ノナデシル、ヘニコシル、トリコシル、(Z)-トリデカ-8-エニル、(Z)-ペンタデカ-8-エニル、(Z)-ヘプタデカ-5-エニル、(Z)-ヘプタデカ-8-エニル、(E)-ヘプタデカ-8-エニル、(Z)-ヘプタデカ-10-エニル、(8Z,11Z)-ヘプタデカ-8,11-ジエニル、(8Z,11Z,14Z)-ヘプタデカ-8,11,14-トリエニル、(Z)-ノナデカ-10-エニル、(10Z,13Z)-ノナデカ-10,13-ジエニル、(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニル、2,6,10-トリメチルウンデカ-1,5,9-トリエニルまたは2,6,10,14-テトラメチルペンタデカ-1-エニルである請求項1～6のいずれかに記載の組成物。

[請求項9] 薬物として、配列番号4および5、6および7、8および9、4および10または4および11の、それぞれセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する二本鎖核酸を含有する請求項1～8のいずれかに記載の組成物。

[請求項10] カチオン性脂質が、該二本鎖核酸と複合体を形成しているか、または中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと該二本鎖核酸との複合体を形成している、請求項1～9のいずれかに記載の組成物。

[請求項11] カチオン性脂質が、該二本鎖核酸と複合体を形成しているか、または中性脂質および/もしくは高分子を組み合わせたものと該二本鎖核酸との複合体を形成しており、脂質粒子が該複合体と該複合体を封入する脂質膜から構成された脂質粒子である請求項1～9のいずれかに記載の組成物。

[請求項12] 請求項1～11のいずれかに記載の組成物を用いて該二本鎖核酸を細胞内に導入することを特徴とする、RAS遺伝子の発現を抑制する方法。

[請求項13] 細胞が、ほ乳類の腫瘍にある細胞である請求項12記載の方法。

[請求項14] 細胞が、ほ乳類の大腸または膵臓にある細胞である請求項12記載の方法。

[請求項15] 細胞内に導入する方法が、静脈内投与によって細胞内に導入する方法である請求項12～14のいずれかに記載の方法。

[請求項16] 請求項1～11のいずれかに記載の組成物を哺乳動物に投与するRAS関連疾患の治療方法。

[請求項17] 投与する方法が、静脈内投与である請求項16記載の方法。

[請求項18] 請求項1～11のいずれかに記載の組成物を哺乳動物に投与する癌の治療方法。

[請求項19] 投与する方法が、静脈内投与である請求項18記載の方法。

[請求項20] 請求項1～11のいずれかに記載の組成物からなる、RAS関連疾患の治療に用いるための医薬。

[請求項21] 静脈内投与用である請求項20記載の医薬。

[請求項22] 請求項1～11のいずれかに記載の組成物からなる、癌の治療剤。

[請求項23] 静脈内投与用である請求項22記載の癌の治療剤。