(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7164547号
(P7164547)

(45)発行日　令和4年11月1日(2022.11.1)

(24)登録日　令和4年10月24日(2022.10.24)

(51)国際特許分類

	FI		
C07D 207/16 (2006.01)	C07D	207/16	CSP
A61K 31/7088(2006.01)	A61K	31/7088	
A61K 31/713 (2006.01)	A61K	31/713	
A61K 47/22 (2006.01)	A61K	47/22	
A61K 47/24 (2006.01)	A61K	47/24	

請求項の数　14　（全64頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-561687(P2019-561687)
(86)(22)出願日　平成30年12月25日(2018.12.25)
(86)国際出願番号　PCT/JP2018/047440
(87)国際公開番号　WO2019/131580
(87)国際公開日　令和1年7月4日(2019.7.4)
審査請求日　令和3年10月20日(2021.10.20)
(31)優先権主張番号　特願2017-251870(P2017-251870)
(32)優先日　平成29年12月27日(2017.12.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　506137147
エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社
東京都文京区小石川四丁目６番１０号
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100194423
弁理士　植竹 友紀子
(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木 康仁
(72)発明者　鈴木 裕太
茨城県つくば市東光台５丁目１番地３
エーザイ株式会社 筑波研究所内
(72)発明者　高橋 良典
茨城県つくば市東光台５丁目１番地３
最終頁に続く

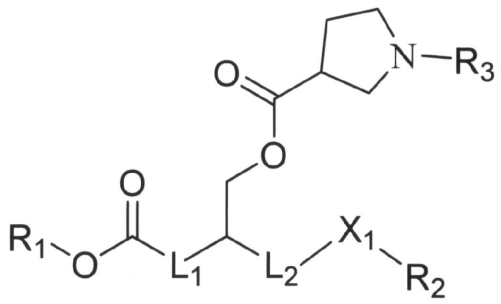
(54)【発明の名称】　カチオン性脂質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

式（１）で表される化合物又はその薬学的に許容される塩。

【化４５】



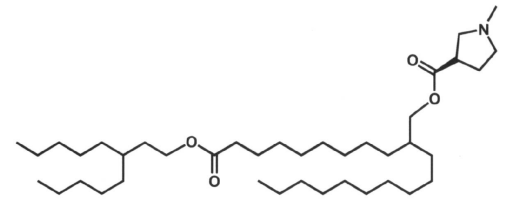
（１）

［式中、L_1及びL_2はそれぞれ独立に炭素数３～１０のアルキレン基、R_1及びR_2はそれぞれ独立に炭素数４～２４のアルキル基又は炭素数４～２４のアルケニル基を表し、R_3は炭素数１～３のアルキル基を表し、X_1は単結合又は－ＣＯ－Ｏ－を表す。］

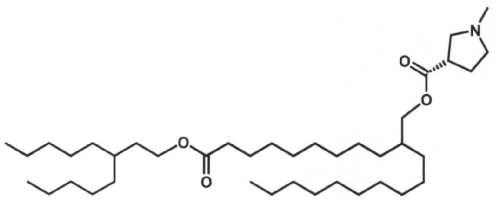
【請求項２】

下記式（Ａ１）～（Ａ９）で表される化合物からなる群より選択される、請求項１に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

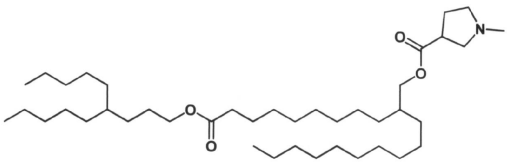
【化４６】



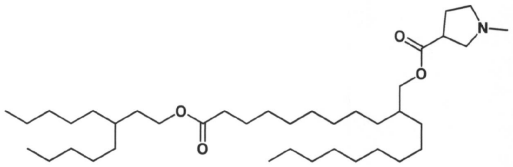
（A1）



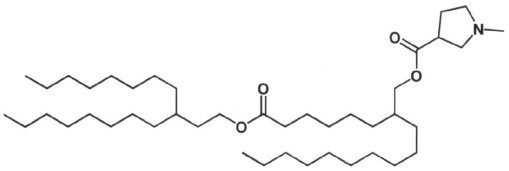
（A2）



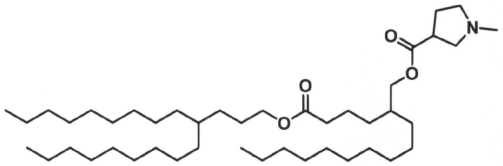
（A3）



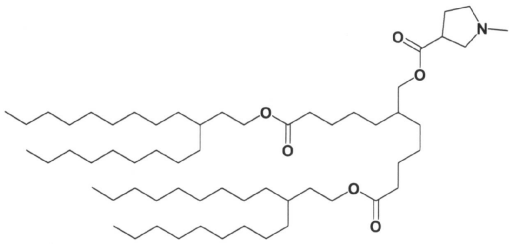
（A4）



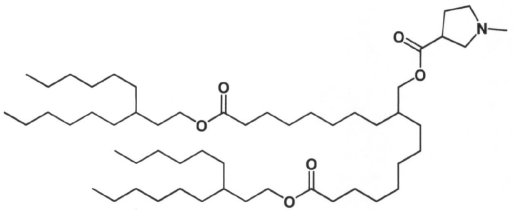
（A5）



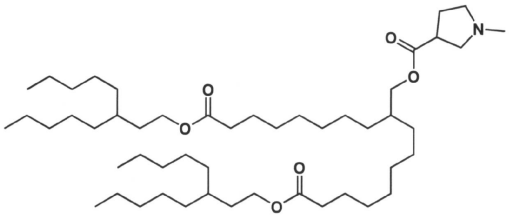
（A6）



（A7）



（A8）

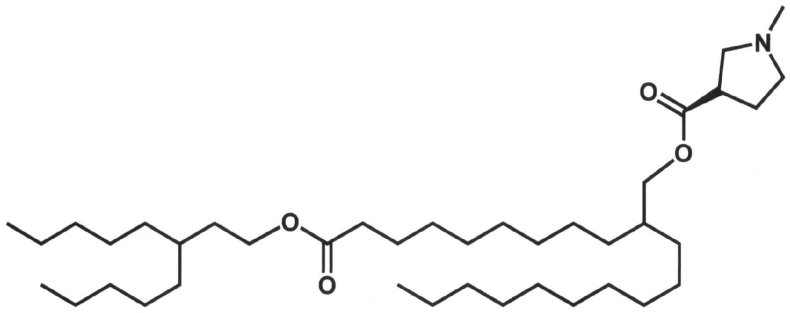


（A9）

【請求項３】

下記式（Ａ１）で表される、請求項１または２に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

【化４７】

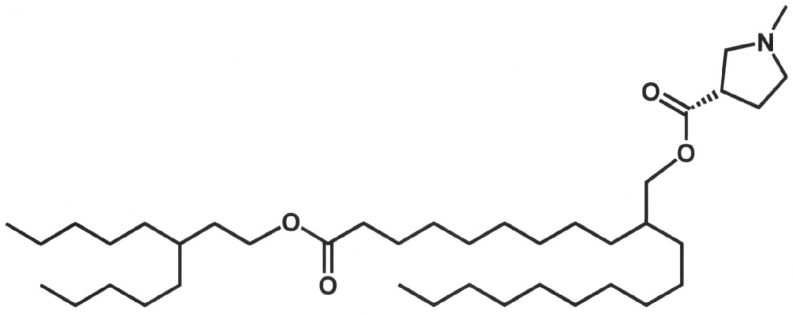


（Ａ１）

【請求項４】

下記式（Ａ２）で表される、請求項１または２に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

【化４８】

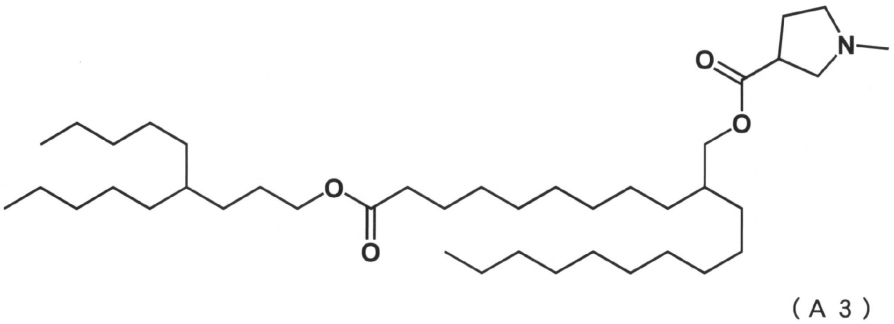


（Ａ２）

【請求項５】

下記式（Ａ３）で表される、請求項１または２に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

【化４９】

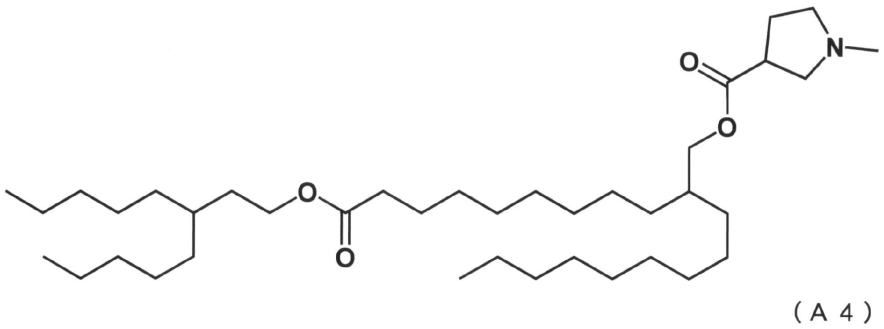


（Ａ３）

【請求項６】

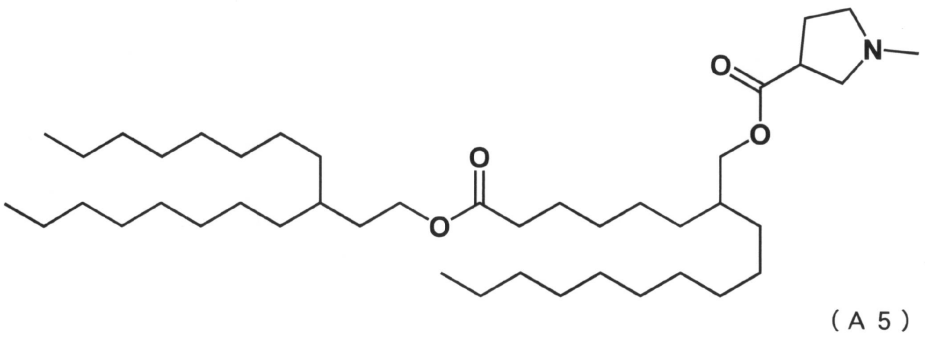
下記式（Ａ４）で表される、請求項１または２に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

【化５０】



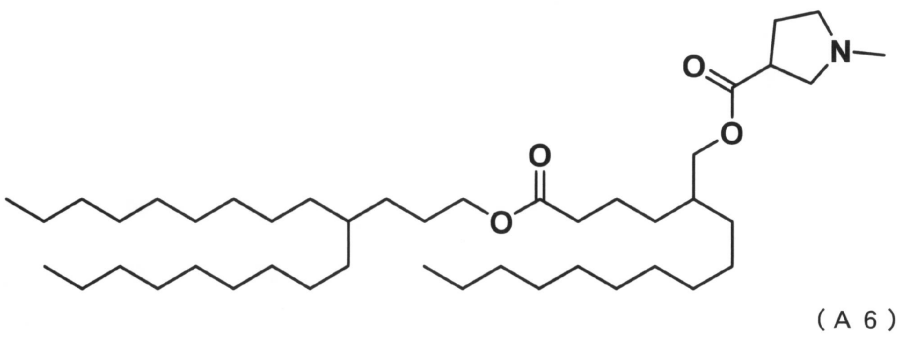
（Ａ４）

【請求項７】
下記式（Ａ５）で表される、請求項１または２に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。
【化５１】



（Ａ５）

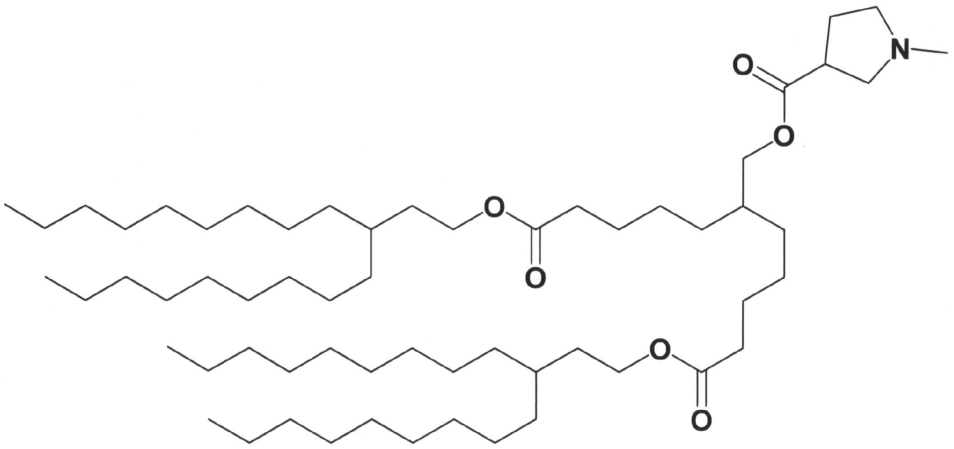
【請求項８】
下記式（Ａ６）で表される、請求項１または２に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。
【化５２】



（Ａ６）

【請求項９】
下記式（Ａ７）で表される、請求項１または２に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

【化５３】

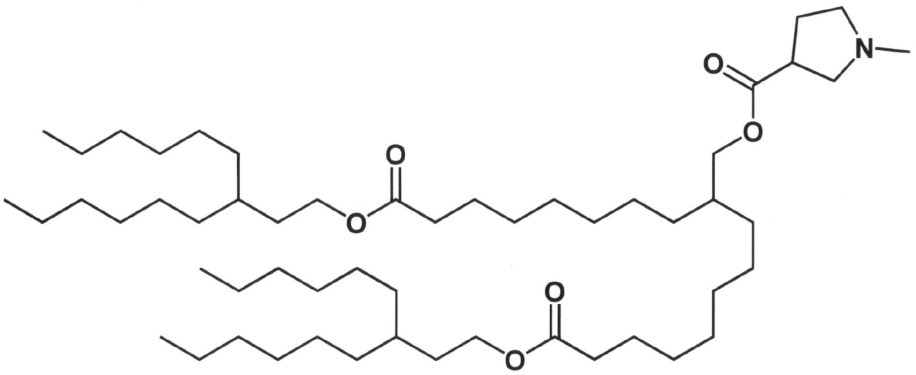


（Ａ７）

【請求項１０】

下記式（Ａ８）で表される、請求項１または２に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

【化５４】

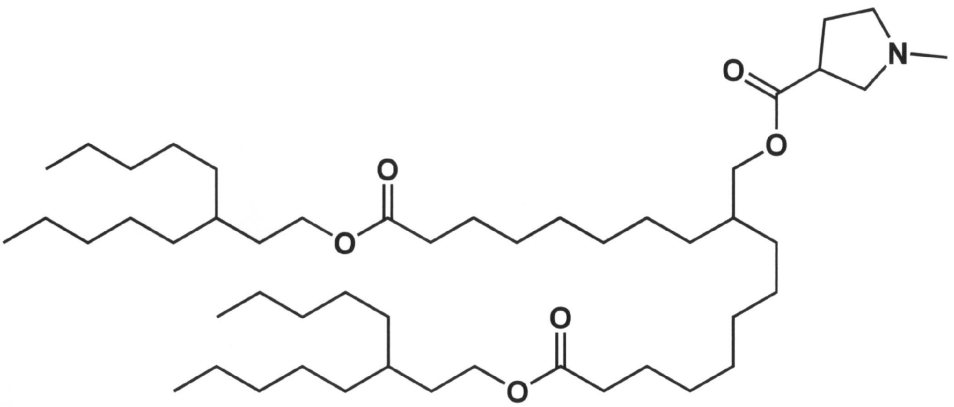


（Ａ８）

【請求項１１】

下記式（Ａ９）で表される、請求項１または２に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

【化５５】



（Ａ９）

【請求項１２】
（Ｉ）請求項１～１１のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩と、（ＩＩ）中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及びステロールからなる群から選ばれる少なくとも一種の脂質と、を含有する脂質複合体。
【請求項１３】
（Ｉ）請求項１～１１のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩と、（ＩＩ）中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及びステロールからなる群から選ばれる少なくとも一種の脂質と、（ＩＩＩ）核酸と、を含有する組成物。
【請求項１４】
（Ｉ）請求項１～１１のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩と、（ＩＩ）中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及びステロールからなる群から選ばれる少なくとも一種の脂質とを含有する極性有機溶媒含有水溶液と、（ＩＩＩ）核酸を含有する水溶液とを混合して混合液を得る工程と、混合液中の極性有機溶媒の含有率を減少させる工程と、を含む組成物の製造方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、新規なカチオン性脂質に関する。
【背景技術】
【０００２】
ｓｉＲＮＡ（ｓｍａｌｌ ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ ＲＮＡ）、ｍｉＲＮＡ（ｍｉｃｒｏＲＮＡ）、ｓｈＲＮＡ（ｓｈｏｒｔ ｈａｉｒｐｉｎ ＲＮＡ、または、ｓｍａｌｌ ｈａｉｒｐｉｎ ＲＮＡ）発現ベクター、アンチセンスオリゴヌクレオチド等の核酸は、生体内で配列特異的な遺伝子発現抑制を誘導する核酸であり、核酸医薬として知られている。
【０００３】
これらの核酸医薬の中でも、特にｓｉＲＮＡが注目を集めている。ｓｉＲＮＡは、１９～２３塩基対からなる二本鎖ＲＮＡであり、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ、ＲＮＡｉ）と呼ばれる配列特異的な遺伝子発現抑制を誘導する。
【０００４】
ｓｉＲＮＡは化学的には安定であるが、血しょう中のＲＮａｓｅ（ｒｉｂｏｎｕｃｌｅａｓｅ）により分解されやすい点、及び、単独では細胞膜を透過しにくいという点等において、治療用用途としての問題点を有している（例えば、特許文献１参照。）。
【０００５】
上記の問題点に対して、カチオン性脂質を含有する微粒子内にｓｉＲＮＡを封入することにより、封入されたｓｉＲＮＡを血しょう中での分解から保護し、かつ脂溶性の細胞膜へ透過させることを可能とすることが知られている（例えば、特許文献１参照。）。
【０００６】
また、特許文献２～６には、ｓｉＲＮＡ等の核酸医薬の送達に用いられるカチオン性脂質であって、生分解能を向上させたカチオン性脂質が記載されている。
【０００７】
また、カチオン性脂質を含有する微粒子は、保管期間中に凝集しやすいという安定性の問題点があり、ポリエチレングリコール修飾脂質（ＰＥＧ脂質）を該微粒子に含有させて凝集を抑制する方法が知られている。さらに、特定のＰＥＧ脂質であるＰＥＧ－ＤＰＧを微粒子の構成成分とすることや該微粒子と脱イオン化された溶媒とからなる製剤とすることで、凝集抑制と核酸の送達効率とを改善する方法が、特許文献７に記載されている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００８】
【文献】国際公開第２０１０／１４４７４０号パンフレット
国際公開第２０１１／１５３４９３号パンフレット

国際公開第２０１３／０８６３５４号パンフレット
国際公開第２０１３／１５８５７９号パンフレット
国際公開第２０１５／０９５３４６号パンフレット
国際公開第２０１６／１０４５８０号パンフレット
国際公開第２０１４／０８９２３９号パンフレット

【発明の概要】

【０００９】

しかしながら、最近の進展にもかかわらず、細胞質への核酸送達に利用できるカチオン性脂質が依然として求められている。

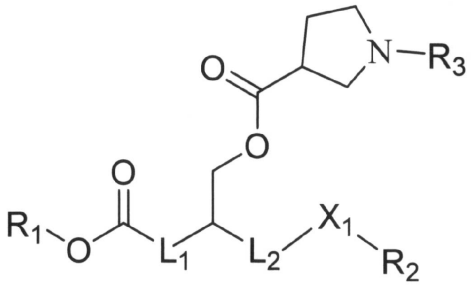
【００１０】

本発明は、以下の[１]から[１４]に関する。

【００１１】

［１］下記式（１）で表される化合物又はその薬学的に許容される塩。

【化１】



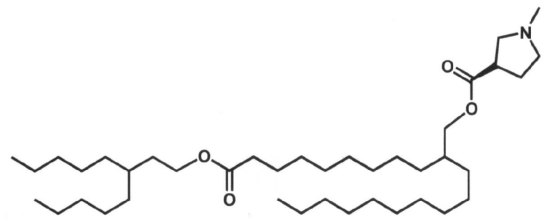
（１）

［式中、L_1及びL_2はそれぞれ独立に炭素数３～１０のアルキレン基、R_1及びR_2はそれぞれ独立に炭素数４～２４のアルキル基又は炭素数４～２４のアルケニル基を表し、R_3は炭素数１～３のアルキル基を表し、X_1は単結合又は－ＣＯ－Ｏ－を表す。］

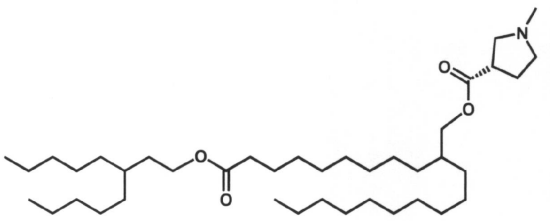
【００１２】

［２］下記式（Ａ１）～（Ａ９）で表される化合物からなる群より選択される、［１］に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

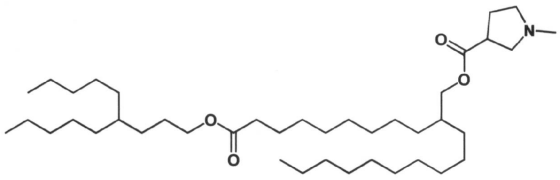
【化２－１】



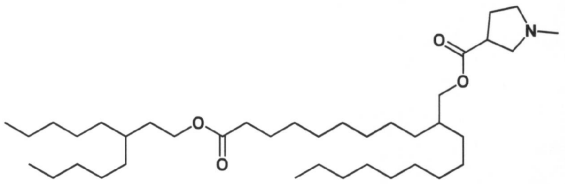
（A1）



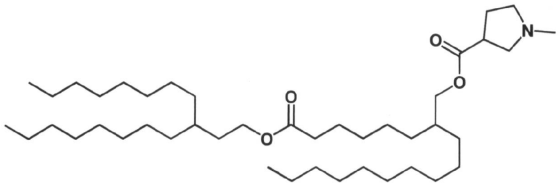
（A2）



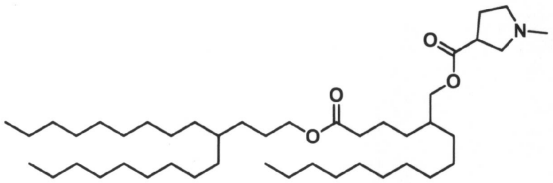
（A3）



（A4）

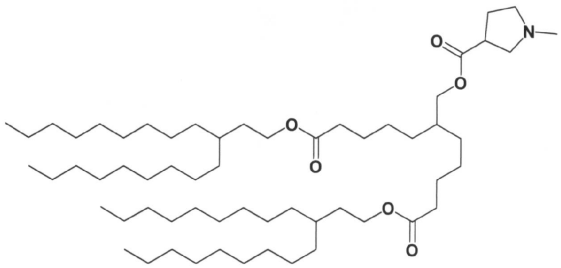


（A5）

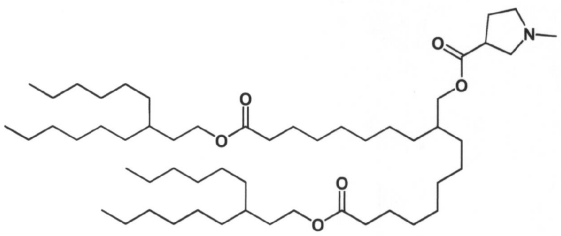


（A6）

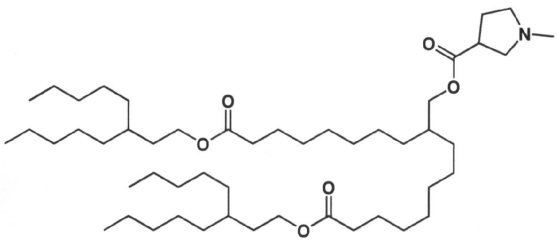
【化２－２】



（A7）



（A8）

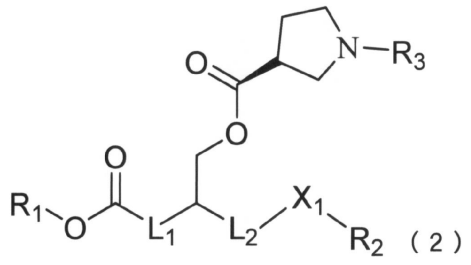


（A9）

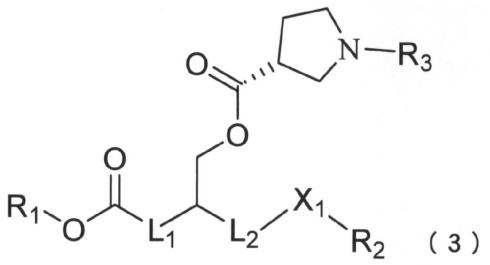
【００１３】

［２ａ］上記式（Ａ１）、（Ａ２）、（Ａ３）、（Ａ４）、（Ａ５）、（Ａ６）、（Ａ８）、または（Ａ９）で表される化合物からなる群より選択される、［２］に記載の化合物

又はその薬学的に許容される塩。
［２ｂ］上記式（Ａ１）、（Ａ２）、（Ａ３）、（Ａ４）、（Ａ５）、（Ａ６）、または（Ａ９）で表される化合物からなる群より選択される、［２］に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。
［２ｃ］上記式（Ａ１）、（Ａ２）、（Ａ４）、または（Ａ６）で表される化合物からなる群より選択される、［２］に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。
［２ｄ］下記式（２）または（３）で表される、［１］に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。
【化３】

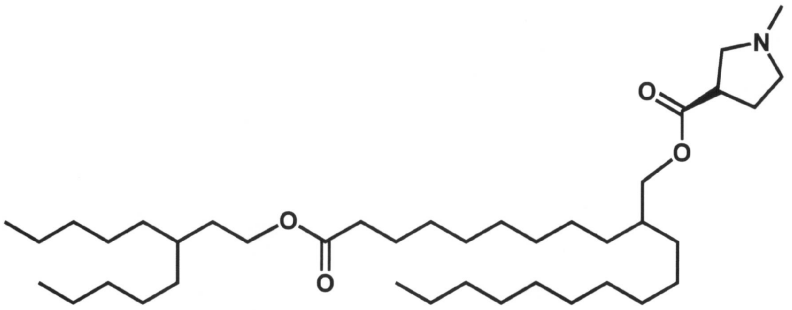


（２）



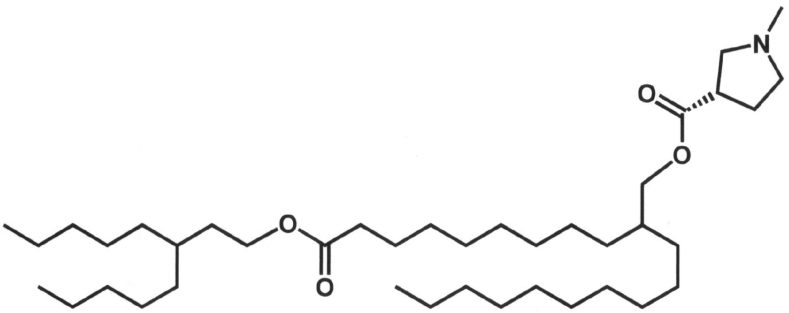
（３）

［式中、Ｌ１及びＬ２、Ｒ１～Ｒ３、並びにＸ１は上記式（１）と同義である。］
［２ｅ］Ｒ３はメチル基である、［１］または［２ｄ］に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。
【００１４】
［３］下記式（Ａ１）で表される、［１］または［２］に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。
【化４】



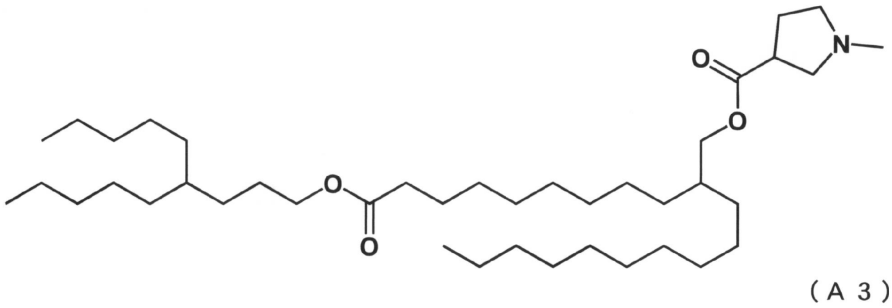
（Ａ１）

【００１５】
［４］下記式（Ａ２）で表される、［１］または［２］に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。
【化５】



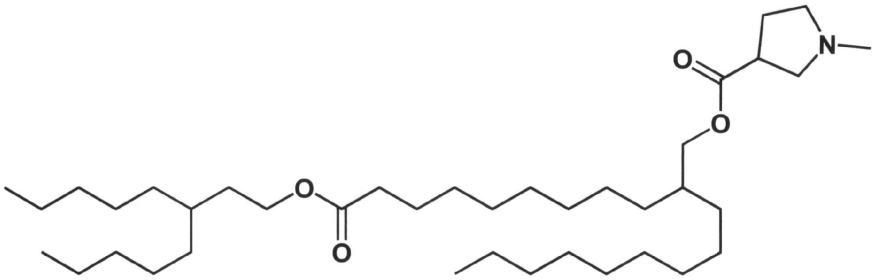
（Ａ２）

【００１６】
［５］下記式（Ａ３）で表される、［１］または［２］に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。
【化６】



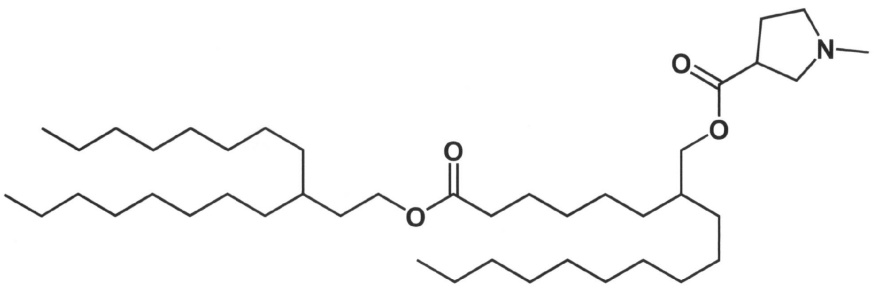
（Ａ３）

【００１７】
［６］下記式（Ａ４）で表される、［１］または［２］に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。
【化７】



（Ａ４）

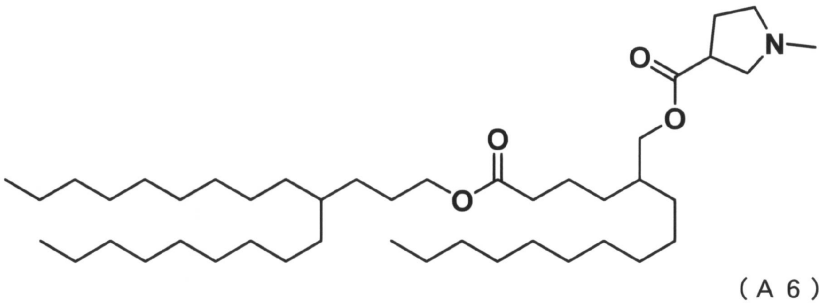
【００１８】
［７］下記式（Ａ５）で表される、［１］または［２］に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。
【化８】



（Ａ５）

【００１９】
［８］　下記式（Ａ６）で表される、［１］または［２］に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

【化９】

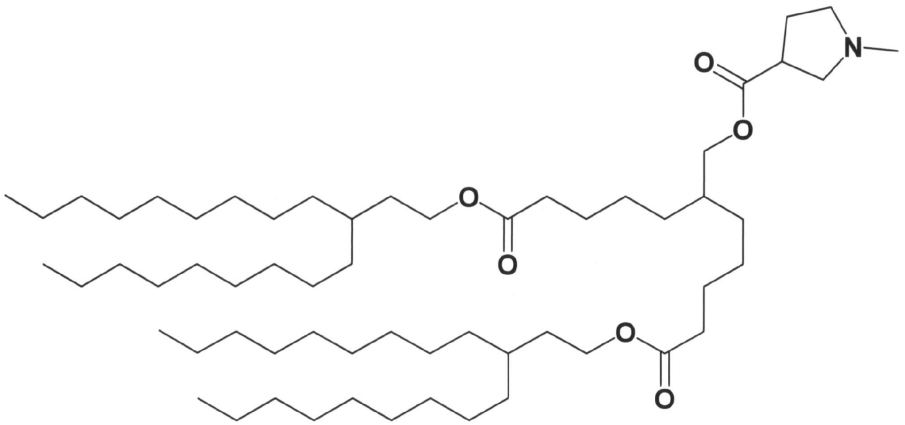


（Ａ６）

【００２０】

［９］下記式（Ａ７）で表される、［１］または［２］に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

【化１０】

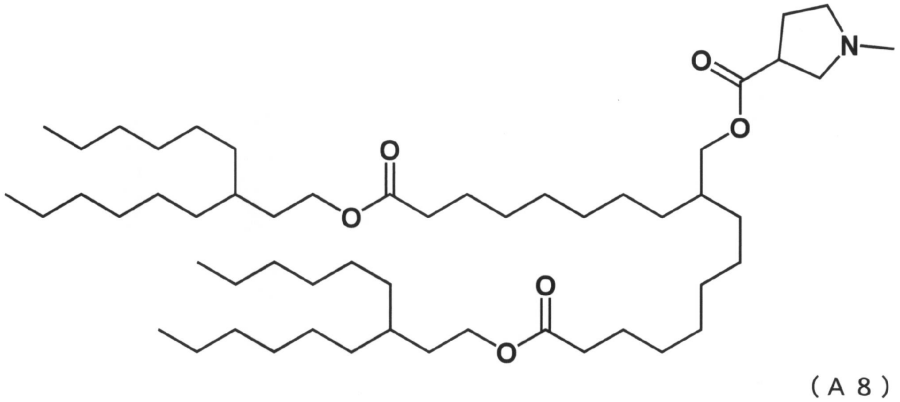


（Ａ７）

【００２１】

［１０］下記式（Ａ８）で表される、［１］または［２］に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

【化１１】

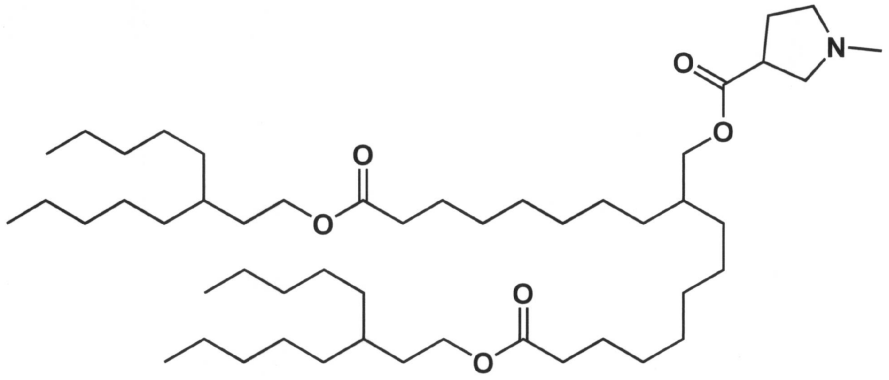


（Ａ８）

【００２２】

［１１］下記式（Ａ９）で表される、［１］または［２］に記載の化合物又はその薬学的

に許容される塩。
【化１２】



（Ａ９）

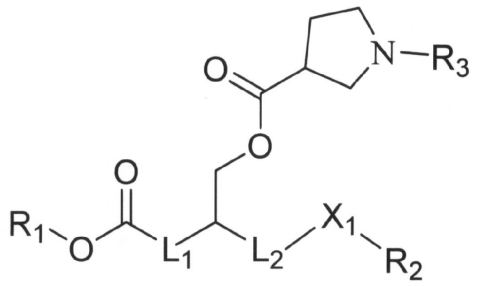
【００２３】
［１２］（Ｉ）［１］～［１１］、［２ａ］～［２ｅ］のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩と、（ＩＩ）中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及びステロールからなる群から選ばれる少なくとも一種の脂質と、を含有する脂質複合体。
【００２４】
［１３］（Ｉ）［１］～［１１］、［２ａ］～［２ｅ］のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩と、（ＩＩ）中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及びステロールからなる群から選ばれる少なくとも一種の脂質と、（ＩＩＩ）核酸と、を含有する組成物。
【００２５】
［１４］（Ｉ）［１］～［１１］、［２ａ］～［２ｅ］のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩と、（ＩＩ）中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及びステロールからなる群から選ばれる少なくとも一種の脂質とを含有する極性有機溶媒含有水溶液と、（ＩＩＩ）核酸を含有する水溶液とを混合して混合液を得る工程と、混合液中の極性有機溶媒の含有率を減少させる工程と、を含む組成物の製造方法。
【発明の効果】
【００２６】
本発明のカチオン性脂質は以下の一以上の効果を有する。
（１）本発明のカチオン性脂質によれば、核酸を細胞質に効率よく放出することを可能とする。
（２）本発明のカチオン性脂質によれば、一定期間保管した場合に脂質複合体の粒子径の増大を抑制することを可能とする。
したがって、本発明のカチオン性脂質は、細胞質への核酸送達用の脂質としての利用可能性を有している。
【図面の簡単な説明】
【００２７】
【図１】試験例１の結果を示すグラフである。
【図２】試験例２の結果を示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００２８】
以下、本発明について実施形態及び例示物等を示して詳細に説明するが、本発明は以下に示す実施形態及び例示物等に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において任意に変更して実施できる。なお、本明細書に記載した全ての文献及び刊行物は、その目的にかかわらず参照によりその全体を本明細書に組み込むものとする。
【００２９】

＜カチオン性脂質＞

一実施形態において、本発明は、下記式（１）で表される化合物又はその薬学的に許容される塩であり、カチオン性脂質として用いることができる。カチオン性脂質は、前記塩の水和物又は前記塩の溶媒和物であってもよい。

【００３０】

【化１３】



（１）

【００３１】

式（１）中、L_1及びL_2はそれぞれ独立に炭素数３～１０のアルキレン基、R_1及びR_2はそれぞれ独立に炭素数４～２４のアルキル基又は炭素数４～２４のアルケニル基を表し、R_3は炭素数１～３のアルキル基を表し、X_1は単結合又は－ＣＯ－Ｏ－を表す。

【００３２】

本明細書において、「アルキル」とは、指定された数の炭素原子を有する直鎖状、環状または分岐状の飽和脂肪族炭化水素基を意味する。

本明細書において、「アルケニル」とは、指定された数の炭素原子および少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を有する直鎖または分岐の炭化水素基を意味する。例えば、モノエン、ジエン、トリエン及びテトラエンなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

本明細書において、「アルキレン」とは、指定された数の炭素原子を有する直鎖状、環状または分岐状の２価の飽和脂肪族炭化水素基を意味する。

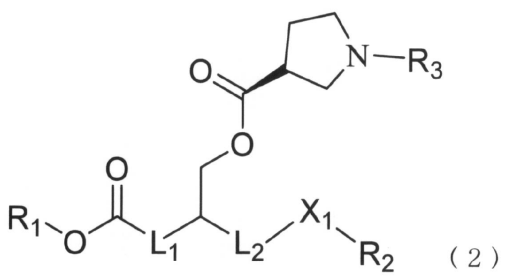
本明細書において、「ハロゲン」は、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉを意味する。

【００３３】

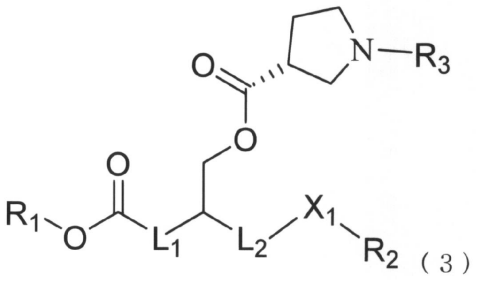
本発明の化合物中の不斉原子（例えば、炭素など）は、ラセミ体または鏡像異性体が濃縮された形、例えば（Ｒ）－、（Ｓ）－または（Ｒ，Ｓ）－立体配置で存在し得る。

本発明の一実施形態は、下記式（２）または（３）で表される化合物又はその薬学的に許容される塩である。

【化１４】



（２）



（３）

式（２）または（３）中、L_1及びL_2、R_1～R_3、並びにX_1は上記式（１）と同義である。本実施形態の化合物はカチオン性脂質として用いることができる。カチオン性脂質は、前記塩の水和物又は前記塩の溶媒和物であってもよい。

【００３４】

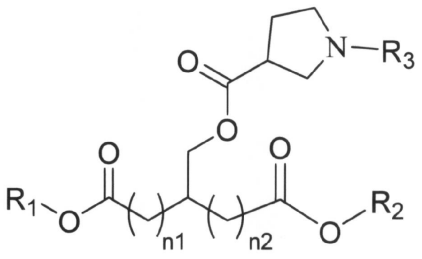
本発明の一実施形態は、上記式（１）～（３）中、L_1及びL_2はそれぞれ独立に炭素数３～１０（例えば、炭素数３～８）のアルキレン基、R_1及びR_2はそれぞれ独立に炭素数４～２４のアルキル基又は炭素数４～２４のアルケニル基、R_3は炭素数１～３のアルキル基を表し、X_1は単結合又は－ＣＯ－Ｏ－で表される化合物又はその薬学的に許容される塩であり、カチオン性脂質として用いることができる。カチオン性脂質は、前記塩の水和物又は前記塩の溶媒和物であってもよい。

【００３５】

本発明の一実施形態は、上記式（１）～（３）中、L_1及びL_2はそれぞれ独立に炭素数３～１０（例えば、炭素数３～８）の直鎖状のアルキレン基であり、R_1及びR_2はそれぞれ独立に炭素数４～２４の直鎖状または分岐状のアルキル基又は炭素数４～２４の直鎖状のアルケニル基であり、R_3は炭素数１～３のアルキル基であり、X_1は－ＣＯ－Ｏ－である化合物又はその薬学的に許容される塩であり、カチオン性脂質として用いることができる。カチオン性脂質は、前記塩の水和物又は前記塩の溶媒和物であってもよい。

本発明の特定の一実施形態は、下記式（１ａ）で表される化合物又はその薬学的に許容される塩である。

【化１５】



（１ａ）

式（１ａ）中、R_1及びR_2はそれぞれ独立に炭素数４～２４のアルキル基又は炭素数４～２４のアルケニル基であり、R_3は炭素数１～３のアルキル基であり、ｎ１およびｎ２はそれぞれ独立に３～１０（例えば、３～８）の整数を表す。

【００３６】

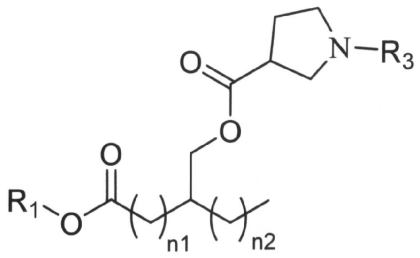
本発明の一実施形態において、本発明は、上記式（１）～（３）中、X_1は－ＣＯ－Ｏ－であり、L_1はL_2と同一であり、R_1はR_2と同一である化合物又はその薬学的に許容される塩であり、カチオン性脂質として用いることができる。カチオン性脂質は、前記塩の水和物又は前記塩の溶媒和物であってもよい。

【００３７】

本発明の一実施形態において、本発明は、上記式（１）～（３）中、L_1及びL_2はそれぞれ独立に炭素数３～１０（例えば、炭素数３～８）の直鎖状のアルキレン基であり、R_1は炭素数４～２４の直鎖状又は分岐状のアルキル基又は炭素数４～２４の直鎖状のアルケニル基であり、R_2は炭素数４～２４の直鎖状のアルキル基であり、R_3は炭素数１～３のアルキル基であり、X_1は単結合である化合物又はその薬学的に許容される塩である。本実施形態において好ましくは、L_2及びR_2の合計の炭素数が９～１２である。本実施形態の化合物はカチオン性脂質として用いることができる。カチオン性脂質は、前記塩の水和物又は前記塩の溶媒和物であってもよい。

本発明の特定の一実施形態は、下記式（１ｂ）で表される化合物又はその薬学的に許容される塩である。

【化１６】



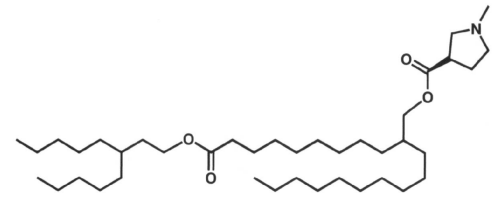
（１ｂ）

式（１ｂ）中、R_1は炭素数４～２４のアルキル基又は炭素数４～２４のアルケニル基であり、R_3は炭素数１～３のアルキル基であり、ｎ１は３～１０（例えば、３～８）の整数を表し、ｎ２は６～３３、好ましくは８～１１の整数を表す。

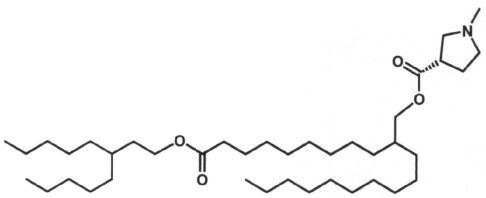
【００３８】

以下に実施形態の化合物の一例を示す。

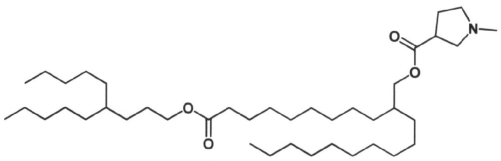
【化１７】



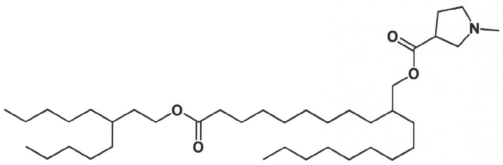
（A1）



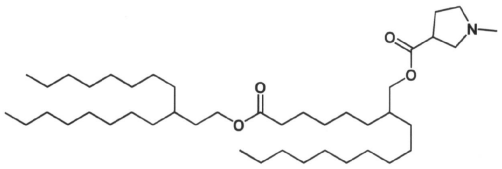
（A2）



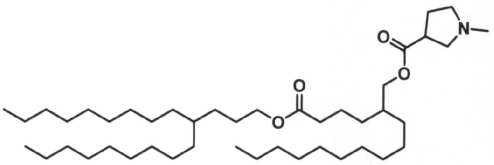
（A3）



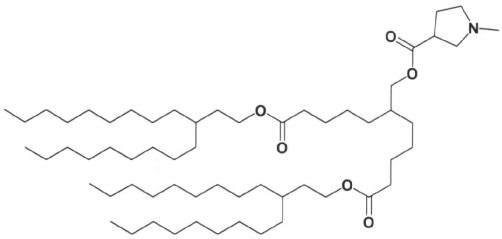
（A4）



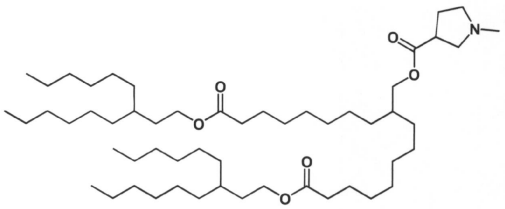
（A5）



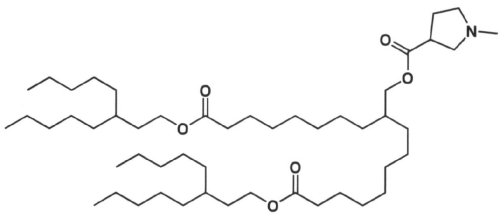
（A6）



（A7）



（A8）



（A9）

【００３９】

本発明の一実施形態は、上記式（Ａ１）、（Ａ２）、（Ａ３）、（Ａ４）、（Ａ５）、（Ａ６）、（Ａ８）、または（Ａ９）のいずれかで表される化合物又はその薬学的に許容される塩であり、カチオン性脂質として用いることができる。カチオン性脂質は、前記塩の水和物又は前記塩の溶媒和物であってもよい。

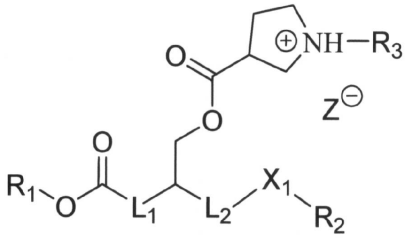
本発明の一実施形態は、上記式（Ａ１）、（Ａ２）、（Ａ３）、（Ａ４）、（Ａ５）、（Ａ６）、または（Ａ９）のいずれかで表される化合物又はその薬学的に許容される塩であり、カチオン性脂質として用いることができる。カチオン性脂質は、前記塩の水和物又は前記塩の溶媒和物であってもよい。

本発明の一実施形態は、上記式（Ａ１）、（Ａ２）、（Ａ４）、または（Ａ６）のいずれかで表される化合物又はその薬学的に許容される塩であり、カチオン性脂質として用いることができる。カチオン性脂質は、前記塩の水和物又は前記塩の溶媒和物であってもよい。

【００４０】

本明細書において、カチオン性脂質とは、一つ以上の炭化水素基を含む脂質親和性領域と、生理的ｐＨで中性またはプロトン化する極性基を含む親水性領域とを有する両親媒性分子である。即ち、本発明のカチオン性脂質は、プロトン化し、陽イオンを形成し得る。例えば上記式（１）で表される化合物は、下記式（１）’に示すように、ピロリジン環の窒素原子上の孤立電子対に水素イオンが配位した化合物（陽イオン性化合物）を包含する。当該陽イオン性化合物は、陰イオンとともに、下記式（１）’に示す塩、および当該塩の水和物又は溶媒和物を形成しうる。

【化１８】



（１）’

式（１）’中、Ｌ１及びＬ２、Ｒ１～Ｒ３、並びにＸ１は上記式（１）と同義である。Ｚは陰イオン（対イオン）である。本実施形態の化合物はカチオン性脂質として用いることができる。

上記陽イオン性化合物と対になって、本実施形態のカチオン性脂質が含有し得る陰イオン（上記式（１）’におけるＺ）としては、薬学的に許容されるものであれば特に限定されず、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挙げられる。

本発明のカチオン性脂質は、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が、本発明のカチオン性脂質は、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。

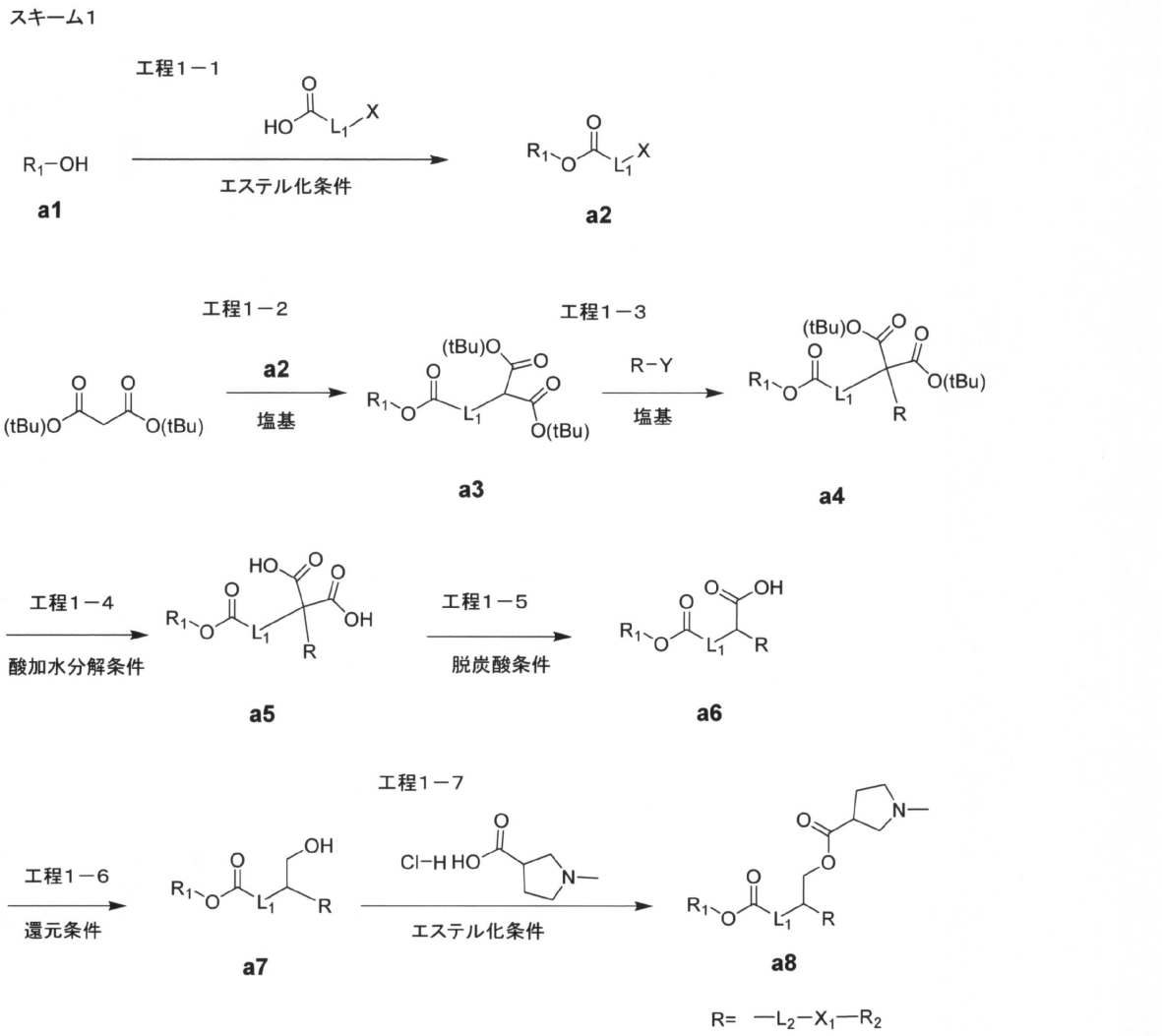
【００４１】

＜カチオン性脂質の製造方法＞

本発明のカチオン性脂質の製造方法について説明する。下記に、カチオン性脂質の合成スキームの一実施形態を示す。本明細書に記載されている化合物はすべて、化合物として本発明に含まれる。本発明の化合物は、以下のスキームにおいて記載されている方法の少なくとも１つに従って合成することができる。本発明のカチオン性脂質は、１つ又は２つ以上の不斉中心を備え得るため、合成された化合物は、（Ｒ）－もしくは（Ｓ）－立体異性体またはこれらの混合物（Ｒ，Ｓ）として生成され得る。特記しない限り、本明細書における特定の化合物の記載は、個々のエナンチオマーとそれらのラセミ混合物との両方を含むことを意図する。立体化学の決定及び立体異性体の分離のための方法は当業者には周知である。

【００４２】

【化１９】



（式中、Ｌ１及びＲ１はそれぞれ前記式（１）と同義であり、Ｘ及びＹはそれぞれハロゲン原子であり、Ｒは式（１）における－Ｌ２－Ｘ１－Ｒ２..（Ｌ２、Ｘ１及びＲ２はそれぞれ前記式（１）と同義）である。）

【００４３】

式（１）のカチオン性脂質（Ｘ１が単結合である化合物）は、例えば、上記スキーム１に従って合成することができる。

（工程１－１：エステル化）

まず、アルコール（ａ１）とハロゲン置換カルボン酸　Ｘ－Ｌ１－ＣＯＯＨ（Ｘはハロゲン原子であり、Ｌ１は前記と同義）（好ましくは臭素置換カルボン酸）とを縮合剤の存在下で反応させてエステルのハロゲン化物（ａ２）を得る。縮合剤としては、例えば、１－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－３－エチルカルボジイミド（ＥＤＣ）塩酸塩、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）等が挙げられる。必要に応じて、塩基を加えても良い。塩基としては、例えば、Ｎ－メチルモルホリン（ＮＭＭ）、トリエチルアミン（ＴＥＡ）、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ）、４－（ジメチルアミノ）ピリジン（ＤＭＡＰ）、ピリジン、ピコリン、ルチジン等が挙げられる。溶媒としては、例えば、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）、塩化メチレン、クロロホルム、トルエン、ヘキサン、酢酸エチル等が挙げられる。

あるいは、ハロゲン置換カルボン酸　Ｘ－Ｌ１－ＣＯＯＨ（Ｘはハロゲン原子であり、Ｌ１は前記と同義）（好ましくは臭素置換カルボン酸）を必要に応じてジメチルホルムアミドの存在下でオキザリルクロリドなどの求電子的ハロゲン化剤と反応させてカルボン酸塩

化物に変換し、さらに、カルボン酸塩化物とアルコールとを反応させてエステルのハロゲン化物（ａ２）を得ることができる。溶媒としては、例えば、テトラヒドロフラン、塩化メチレン、クロロホルム、トルエン、ヘキサン等が挙げられる。

（工程１－２：アルキル鎖導入）

次いで、エステルのハロゲン化物（ａ２）とジ－ｔｅｒｔ－ブチル マロネートとを塩基の存在下で反応させる。これによりマロン酸ジエステルの活性メチレンの水素原子が引き抜かれて、アルキルエステル鎖が導入され、化合物（ａ３）を得る。塩基としては例えば水素化ナトリウム（ＮａＨ）が挙げられる。溶媒としては、例えば、ジオキサン、テトラヒドロフラン、シクロペンチルメチルエーテル、１，２－ジメトキシエタン、ＤＭＦ、Ｎ－メチルピロリジノン等が挙げられる。

（工程１－３：アルキル鎖導入）

次いで、化合物（ａ３）とハロゲン化アルキル（Ｒ－Ｙ）（好ましくはヨウ化物）を塩基の存在下で反応させ、アルキル鎖を導入し、化合物（ａ４）を得る。塩基および溶媒は上記工程１－２と同様のものを使用できる。

（工程１－４：脱保護）

次いで、化合物（ａ４）のｔｅｒｔ－ブチル基（ｔＢｕ）を酸加水分解条件下で脱保護し、化合物（ａ５）を得る。脱保護に使用する酸としては、例えば、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）、塩酸等が挙げられる。溶媒としては、例えば、塩化メチレン等が挙げられる。

（工程１－５：脱炭酸）

次いで、化合物（ａ５）の脱炭酸によりモノカルボン酸（ａ６）を得る。脱炭酸反応は、例えば、溶媒中、加熱することにより行うことができる。溶媒としては、例えば、トルエン、キシレンなどの芳香族炭化水素類等が用いられる。

（工程１－６：還元工程）

化合物（ａ６）のカルボキシル基を還元剤の存在下でヒドロキシル基へと還元して化合物（ａ７）を得る。還元剤としては、例えばボラン（BH_3）－テトラヒドロフラン錯体、ボラン－ジメチルスルフィド錯体等のボラン錯体などが挙げられる。溶媒としては、例えばジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサンなどのエーテル類、クロロホルム、塩化メチレン、ジクロロエタンなどのハロゲン化炭化水素類、ヘキサン、トルエンなどの炭化水素類、およびこれらの混合溶媒等が用いられる。

（工程１－７：エステル化）

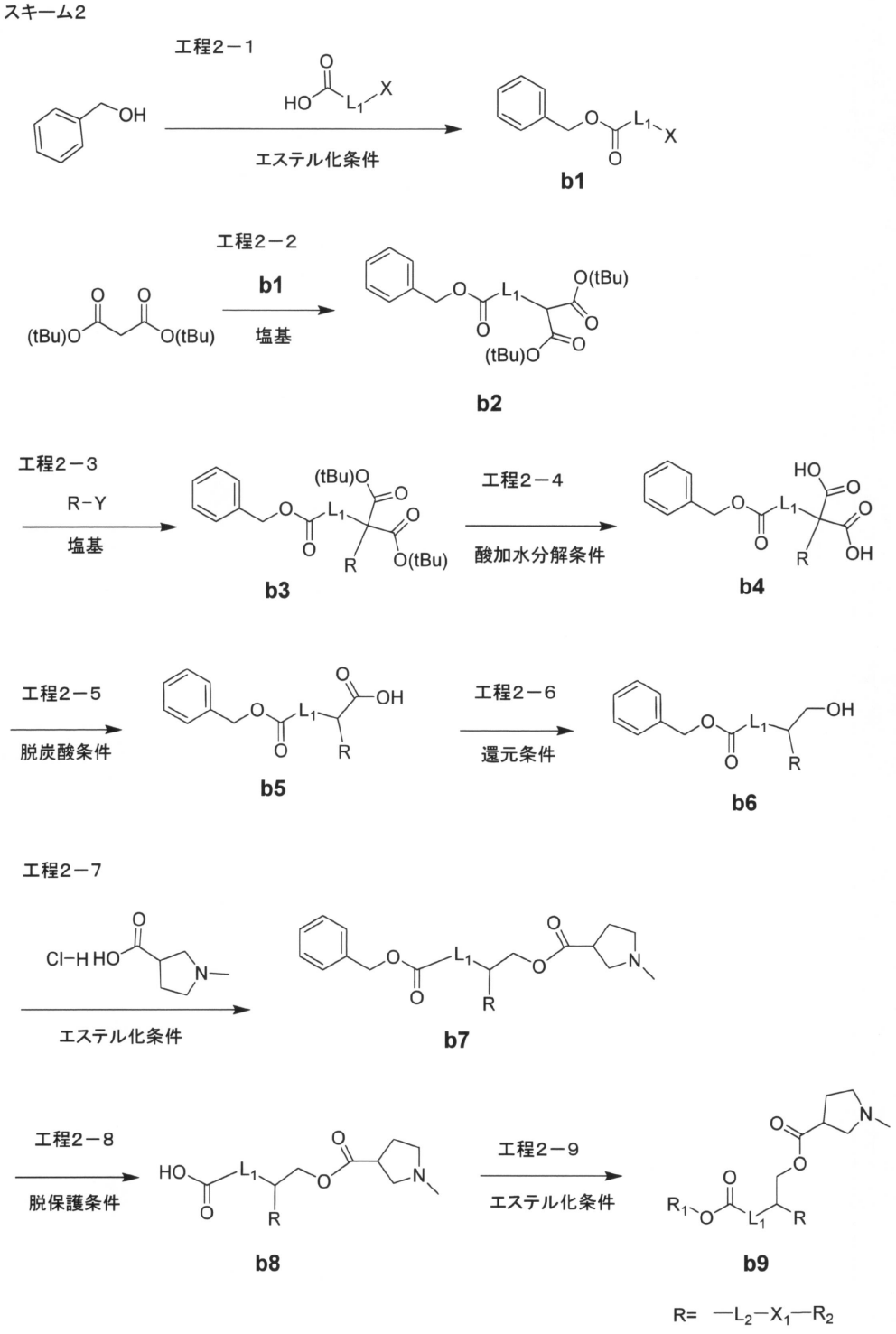
得られたアルコール（ａ７）と１－メチル－ピロリジン－３－カルボン酸またはその誘導体（ハロゲン化水素塩など）とを縮合剤、塩基の存在下で反応させて最終物である化合物（ａ８）（Ｒ＝$L_2-X_1-R_2$）（式（１）のカチオン性脂質に相当する化合物）が得られる。縮合剤および塩基としては工程１－１と同様のものを使用できる。

【００４４】

なお、X_1が－ＣＯ－Ｏ－である化合物を合成する際には、上記スキーム１の工程１－３において、後述する工程２－１に準じてカルボキシル基が保護された化合物（エステルのハロゲン化物）を調製し、これを化合物（ａ３）と反応させ、さらに得られた化合物について工程１－４～工程１－７を行い、最後にカルボキシル基の脱保護およびエステル化（R_2－ＯＨとの反応）を行えばよい。

【００４５】

【化２０】



（式中、Ｌ１及びＲ１はそれぞれ前記式（１）と同義であり、Ｘ及びＹはそれぞれハロゲン原子であり、Ｒは式（１）における－Ｌ２－Ｘ１－Ｒ２..（Ｌ２、Ｘ１及びＲ２はそれぞれ前記式（１）と同義）である。）

上記スキーム２は、当業者が、異なる方法によって式（１）のカチオン性脂質（Ｘ１が単結合である化合物）を合成する方法を示したものである。

【００４６】

（工程２－１：エステル化）

まず、ベンジルアルコールとハロゲン置換カルボン酸　Ｘ－Ｌ１－ＣＯＯＨ（Ｘはハロゲン原子であり、Ｌ１は前記と同義）とをエステル化反応させることでエステルのハロゲ

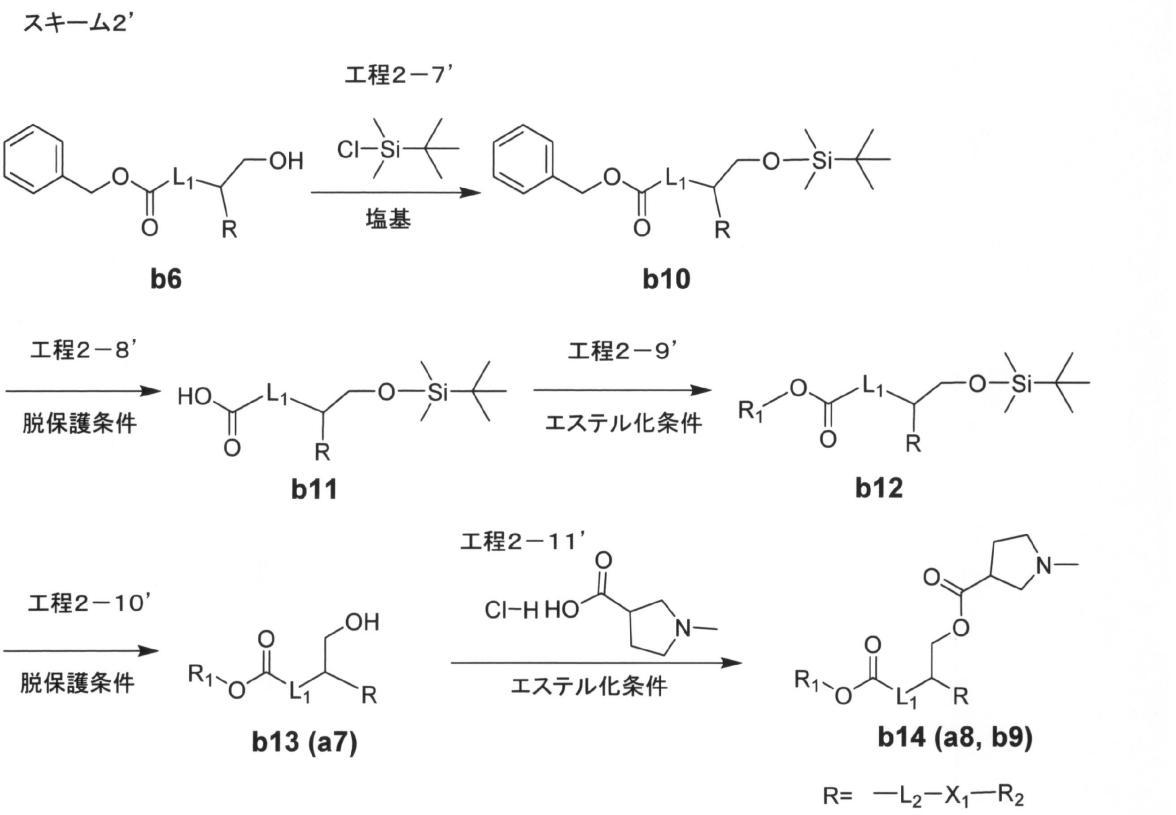
ン化物（ｂ１）を得る。エステル化条件は工程１－１と同様である。
（工程２－２：アルキル鎖導入）
次いで、工程１－２と同様に、エステルのハロゲン化物（ｂ１）とジ－ｔｅｒｔ－ブチル　マロネートとを塩基の存在下で反応させ、化合物（ｂ２）を得る。
（工程２－３：アルキル鎖導入）
次いで、工程１－３と同様に、化合物（ｂ２）とハロゲン化アルキル（Ｒ－Ｙ）を塩基の存在下で反応させ、化合物（ｂ３）を得る。
（工程２－４：脱保護）
次いで、工程１－４と同様に、化合物（ｂ３）のｔｅｒｔ－ブチル基（ｔＢｕ）を酸加水分解条件下で脱保護し、化合物（ｂ４）を得る。
（工程２－５：脱炭酸）
次いで、工程１－５と同様に、モノカルボン酸（ｂ５）を得る。
（工程２－６：還元工程）
さらにこれを、工程１－６と同様に還元剤の存在下で還元して化合物（ｂ６）を得る。
（工程２－７：エステル化）
得られた化合物（ｂ６）と１－メチル－ピロリジン－３－カルボン酸またはその誘導体（ハロゲン化水素塩など）とを縮合剤、塩基の存在下でエステル化反応させて、化合物（ｂ７）を得る。縮合剤および塩基としては工程１－１と同様のものを使用できる。
（工程２－８：脱保護）
続いて、還元条件下で、ベンジル保護基を脱保護して化合物（ｂ８）を得る。脱保護は例えば、パラジウム／炭素等の金属触媒存在下、接触水素添加反応することにより行えばよい。
（工程２－９：エステル化）
最後に、化合物（ｂ８）を縮合剤、塩基の存在下でアルコール（$Ｒ_{1}$－ＯＨ）と反応させることにより化合物（ｂ９）（Ｒ＝$Ｌ_{2}$－$Ｘ_{1}$－$Ｒ_{2}$）（式（１）のカチオン性脂質に相当する化合物）を得ることができる。縮合剤および塩基としては工程１－１と同様のものを使用できる。

【００４７】

上記スキーム２では、工程２－６で得た化合物（ｂ６）を１－メチル－ピロリジン－３－カルボン酸またはその誘導体でエステル化（工程２－７）した後に、アルコール（$Ｒ_{1}$－ＯＨ）とのエステル化反応（工程２－９）を行っているが、例えば下記のスキーム２’に示すように、工程２－６で得た化合物（ｂ６）の水酸基を保護し、ベンジル基を脱保護、アルコール（$Ｒ_{1}$－ＯＨ）とのエステル化反応を行ったのちに、１－メチル－ピロリジン－３－カルボン酸またはその誘導体とのエステル化反応を行ってもよい。

【００４８】

【化２１】



（式中、Ｌ１及びＲ１はそれぞれ前記式（１）と同義であり、Ｒは式（１）における－Ｌ２－Ｘ１－Ｒ２..（Ｌ２、Ｘ１及びＲ２はそれぞれ前記式（１）と同義）である。）

【００４９】

（工程２－７’：保護）

工程２－６で得られた化合物（ｂ６）の水酸基を保護する。例えば、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミドなどの溶媒中、イミダゾールなどの塩基の存在下で、ｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリルクロリド（ＴＢＤＭＳ－Ｃｌ）を作用させ、水酸基がｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリル基（ＴＢＤＭＳ）で保護された化合物（ｂ１０）を得る。

（工程２－８’：脱保護）

続いて、還元条件下で、ベンジル保護基を脱保護して化合物（ｂ１１）を得る。脱保護は例えば、パラジウム／炭素等の金属触媒存在下、接触水素添加反応することにより行えばよい。

（工程２－９’：エステル化）

得られた化合物（ｂ１１）を縮合剤、塩基の存在下でアルコール（Ｒ１－ＯＨ）と反応させることにより化合物（ｂ１２）得る。縮合剤および塩基としては工程１－１と同様のものを使用できる。

（工程２－１０’：脱保護）

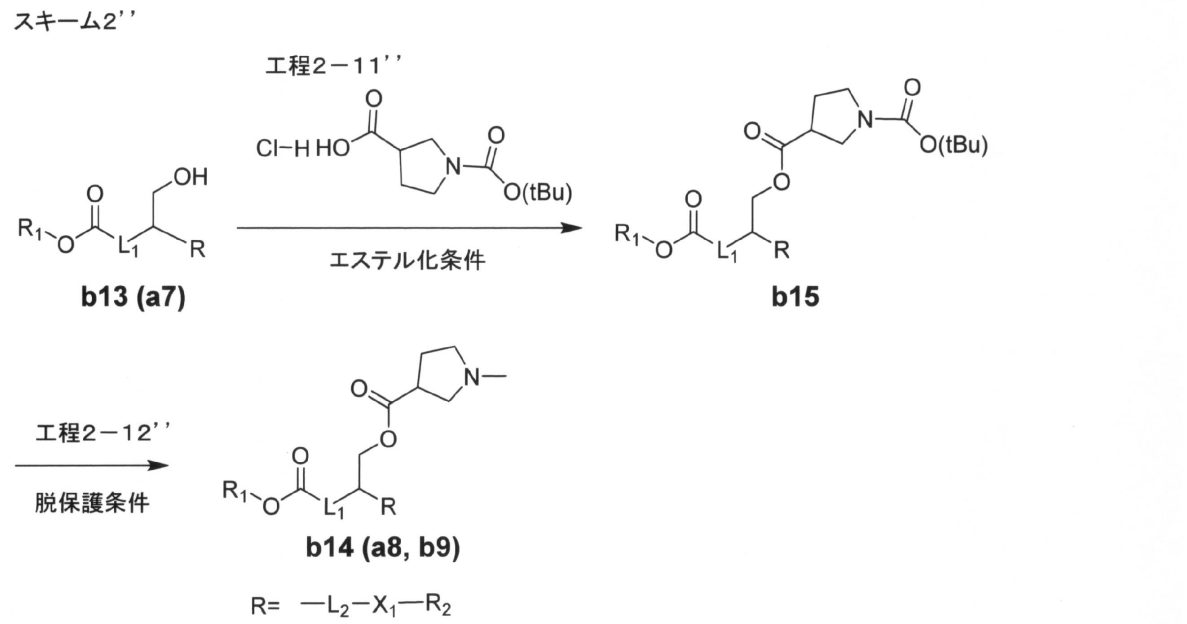
続いて、ＴＢＤＭＳ基を脱保護して化合物（ｂ１３）を得る。脱保護は例えば、テトラヒドロフラン等の有機溶媒中でフッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム（ＴＢＡＦ）などのフッ化物塩を作用させることにより行えばよい。

（工程２－１１’：エステル化）

最後に、工程１－７と同様に、得られたアルコール（ｂ１３）と１－メチル－ピロリジン－３－カルボン酸またはその誘導体（ハロゲン化水素塩など）とを縮合剤、塩基の存在下で反応させることで、最終物である化合物（ｂ１４）（Ｒ＝Ｌ２－Ｘ１－Ｒ２）（式（１）のカチオン性脂質に相当する化合物）が得られる。

【００５０】

【化２２】



（式中、Ｌ１及びＲ１はそれぞれ前記式（１）と同義であり、Ｒは式（１）における－Ｌ２－Ｘ１－Ｒ２（Ｌ２、Ｘ１及びＲ２はそれぞれ前記式（１）と同義）である。）

【００５１】

（工程２－１１’’：エステル化）

あるいは、工程２－１１’に代えて、カルボン酸またはその誘導体として、ピロリジン環の窒素原子を保護基（例えば、ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基（ｔＢｕ－Ｏ－ＣＯ－；Ｂｏｃ））で保護したものを用いて、工程１－７と同様に、アルコール（ｂ１３）と縮合剤、塩基の存在下で反応させ、化合物（ｂ１５）を得てもよい。

（工程２－１２’’：脱保護・還元的アミノ化）

次いで、化合物（ｂ１５）のｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基（Ｂｏｃ）を脱保護し、還元的アミノ化によりメチル化する。具体的には、化合物（ｂ１５）のＢｏｃ基をトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）等の強酸を作用することにより脱保護してＮＨとし、該ＮＨにホルムアルデヒドを作用させてイミン（イミニウムカチオン）を生成させ、さらに、ＮａＢＨ（ＯＡｃ）$_3$やＮａＢＨ$_3$ＣＮなどの還元剤を作用させることで、最終物であるアミン化合物（ｂ１４）（Ｒ＝Ｌ２－Ｘ１－Ｒ２）（式（１）のカチオン性脂質に相当する化合物）が得られる。

【００５２】

上記工程２－１１’または工程２－１１’’において、カルボン酸またはその誘導体として、ピロリジン環の３位炭素原子の立体配置が制御された原料、例えば、（３Ｓ）－１－メチル－ピロリジン－３－カルボン酸もしくは（３Ｒ）－１－メチル－ピロリジン－３－カルボン酸またはこれらの誘導体を用いることで、式（１）の化合物におけるピロリジン環の立体配置を制御することが可能である。

【００５３】

なお、Ｘ１が－ＣＯ－Ｏ－である化合物（例えば式（１ａ）の化合物等）を合成する際には、上記スキーム２において、工程２－１に準じてカルボキシル基が保護された化合物（エステルの化合物）を調製し、これを工程２－３において化合物（ｂ２）と反応させ、さらに得られた化合物を用いて続く工程を行い、工程２－８および工程２－９または工程２－８’および工程２－９’において脱保護してエステル化すればよい。この際、２つのカルボキシル基の保護基の種類を異なる脱保護条件で脱保護できるものとすることでＲ１およびＲ２の異なる化合物を得ることも可能である。

【００５４】

上記スキームでは、式（１）におけるR_3がメチル基である場合を例にとって合成方法を示したが、R_3がメチル基以外の化合物についても、上記スキームに準じて、上記工程１－７または工程２－７において、１－メチル－ピロリジン－３－カルボン酸に代えて１－アルキル－ピロリジン－３－カルボン酸を用いることにより合成することができる。

【００５５】

本発明の化合物の合成において、出発原料の製造が特に記載されていない限り、それらの化合物は公知であるか、または当技術分野で公知の類似の方法により、もしくは以下の実施例中に記載されているとおり、調製することができる。当業者であれば、上記のスキームが、単に本発明の化合物の代表的な調製法に過ぎないことを理解しており、他の周知の方法を同様に使用することができる。

【００５６】

本発明の化合物の調製において、分子の官能基を保護することが必要かつ／又は望ましい場合がある。これは、当業者に周知の従来の保護基によって行うことができる。保護基は、その後の都合のよい段階で、当該技術分野で周知の方法を用いて除去することができる。なお、上記スキームで示した保護基（ｔｅｒｔ－ブチル保護基、ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル保護基、ベンジル保護基、ｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリル保護基）は当業者に周知の他の保護基に置換することもできる。

【００５７】

＜脂質複合体＞

本発明は、（Ｉ）上述したカチオン性脂質と、（ＩＩ）中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質と、を含有する脂質複合体を提供する。本発明の一実施形態として、脂質複合体は、（Ｉ）上述したカチオン性脂質と、（ＩＩ）中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質と、（ＩＩＩ）核酸と、を含有する。したがって、本発明の脂質複合体は、核酸を含んでいても含んでいなくてもよい。本実施形態の脂質複合体は、核酸を細胞質に効率よく放出することを可能とする。また、本実施形態の脂質複合体は、一定期間（例えば１か月、１．５か月又は３か月）保管した場合に粒子径の増大が抑制され、優れた物理的安定性を示し得る。

【００５８】

カチオン性脂質を含有する脂質と核酸とで形成される複合体の形態としては、例えば、核酸と脂質一重(一分子)層からなる膜(逆ミセル)との複合体、核酸とリポソームとの複合体、核酸とミセルとの複合体等が挙げられる。本発明の一実施形態の脂質複合体において、核酸はカチオン性脂質を含有する脂質で構成された微粒子内に封入されている。

【００５９】

本実施形態の脂質複合体は、脂質複合体が含有する全脂質を基準として、上述したカチオン性脂質を、例えば１０～１００モル％、例えば２０～９０モル％、例えば４０～８０モル％含有する。カチオン性脂質は、１種を単独で、又は２種以上を混合して用いることができる。

【００６０】

核酸としては、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ発現ベクター、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ｍＲＮＡ、リボザイム等が挙げられる。一実施形態において、核酸は、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｍＲＮＡであってもよい。

【００６１】

本実施形態の脂質複合体は、脂質複合体の全重量に対して、核酸を例えば０．０１～５０重量％、例えば０．１～３０重量％、例えば１～１０重量％含有する。

【００６２】

本実施形態の脂質複合体は、脂質成分として、（Ｉ）上述したカチオン性脂質と、（ＩＩ）中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質とを含有する。本実施形態の脂質複合体は、脂質複合体の全重量に対して、脂質成分を例えば５０～１００重量％、例えば７０～９９．９９重量％、例

えば９０～９９重量％含有する。
【００６３】
中性脂質とは、生理的ｐＨで、非電荷または中性の両性イオンの形のいずれかで存在する脂質を意味する。中性脂質としては、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、卵ホスファチジルコリン（ＥＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジアラキドイルホスファチジルコリン（ＤＡＰＣ）、ジベヘノイルホスファチジルコリン（ＤＢＰＣ）、ジリグノセロイルホスファチジルコリン（ＤＬＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、スフィンゴミエリン、セラミド、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）等が挙げられる。中性脂質は、１種を単独で、又は２種以上を混合して用いることができる。
【００６４】
本実施形態の脂質複合体は、脂質複合体が含有する全脂質を基準として、中性脂質を、例えば０～５０モル％、例えば０～４０モル％、例えば０～３０モル％含有してもよい。
【００６５】
ポリエチレングリコール修飾脂質としては、ＰＥＧ２０００－ＤＭＧ（ＰＥＧ２０００－ジミリスチルグリセロール）、ＰＥＧ２０００－ＤＰＧ（ＰＥＧ２０００－ジパルミトイルグリセロール）、ＰＥＧ２０００－ＤＳＧ（ＰＥＧ２０００－ジステアロイルグリセロール）、ＰＥＧ５０００－ＤＭＧ（ＰＥＧ５０００－ジミリスチルグリセロール）、ＰＥＧ５０００－ＤＰＧ（ＰＥＧ５０００－ジパルミトイルグリセロール）、ＰＥＧ５０００－ＤＳＧ（ＰＥＧ５０００－ジステアロイルグリセロール）、ＰＥＧ－ｃＤＭＡ（Ｎ－［（メトキシポリ（エチレングリコール）２０００）カルバミル］－１，２－ジミリスチルオキシルプロピル－３－アミン）、ＰＥＧ－Ｃ－ＤＯＭＧ（Ｒ－３－［（ω－メトキシ－ポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル）］－１，２－ジミリスチルオキシルプロピル－３－アミン）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）－ジアシルグリセロール（ＤＡＧ）、ＰＥＧ－ジアルキルオキシプロピル（ＤＡＡ）、ＰＥＧ－リン脂質、ＰＥＧ－セラミド（Ｃｅｒ）等が挙げられる。
【００６６】
ＰＥＧ－ジアルキルオキシプロピルとしては、ＰＥＧ－ジラウリルオキシプロピル、ＰＥＧ－ジミリスチルオキシプロピル、ＰＥＧ－ジパルミチルオキシプロピル、ＰＥＧ－ジステアリルオキシプロピル等が挙げられる。
ポリエチレングリコール修飾脂質は、１種を単独で、又は２種以上を混合して用いることができる。また、上記ポリエチレングリコール修飾脂質は、ＰＥＧ（ポリエチレングリコール）の末端がメトキシ化されていてもよい（ＭＰＥＧ；メトキシ（ポリエチレングリコール））。
【００６７】
本実施形態の脂質複合体は、脂質複合体が含有する全脂質を基準として、ポリエチレングリコール修飾脂質を、例えば０～３０モル％、例えば０～２０モル％、例えば０～１０モル％含有してもよい。
【００６８】
ステロールはステロイド骨格を有するアルコールである。ステロールとしては、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、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）等が挙げられる。ステロールは、１種を単独で、又は２種以上を混合して用いることができる。

【００６９】
本実施形態の脂質複合体は、脂質複合体が含有する全脂質を基準として、ステロールを、例えば０～９０モル％、例えば１０～８０モル％、例えば２０～５０モル％含有してもよい。
【００７０】
本実施形態の脂質複合体における脂質成分の組み合わせは、特に限定されず、例えば、上述したカチオン性脂質、中性脂質及びステロールの組み合わせ、上述したカチオン性脂質、中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールの組み合わせ等が挙げられる。
【００７１】
本実施形態の脂質複合体の「平均粒子径」は、体積平均、数平均、Ｚ－平均のいずれかの方法で算出することができる。本実施形態の脂質複合体の平均粒子径（Ｚ－平均）は、例えば１０～１０００ｎｍ、例えば３０～５００ｎｍ、例えば３０～２００ｎｍであってよい。
本実施形態の脂質複合体は、保管期間中、粒子径が保管前と比べて極力増大しないものが好ましい。例えば、４℃で１．５ヶ月保管した場合の平均粒子径（Ｚ－平均）の大きさが保管前の粒子径の大きさに対して１．２５倍以下であるものが好ましく、１．２倍以下であるものがより好ましく、１．１倍以下であるものが特に好ましい。
【００７２】
本実施形態の脂質複合体は、非特異的な吸着や免疫反応を抑制する観点から、例えば血液中等の約ｐＨ７．４の環境下において、表面の荷電がほとんどないことが好ましい。また、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる際、エンドソーム膜との融合効率を向上させる観点から、低ｐＨ（例えば３．５～７．０）環境下で正に帯電することが好ましい。
【００７３】
＜組成物＞
本発明は、（Ｉ）上述したカチオン性脂質と、（ＩＩ）中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質と、（ＩＩＩ）核酸と、を含有する組成物を提供する。本発明の一実施形態として、組成物は、上述した核酸を含む脂質複合体を含有する。本実施形態の組成物は、核酸を細胞質に効率よく放出することを可能とする。本実施形態の組成物は、上述した脂質複合体、薬学的に許容される媒体、及び場合によりその他の添加剤を含有するものであってもよい。薬学的に許容される媒体、その他の添加剤については後述する。
【００７４】
本発明の組成物は、組成物が含有する全脂質を基準として、上述したカチオン性脂質を、例えば１０～１００モル％、例えば２０～９０モル％、例えば４０～７０モル％含有する。カチオン性脂質は、１種を単独で、又は２種以上を混合して用いることができる。
【００７５】
核酸としては、上述したものと同様のものが挙げられる。本発明の組成物は、組成物の全重量に対して、核酸を例えば０．０１～５０重量％、例えば０．１～３０重量％、例えば１～１０重量％含有する。
【００７６】
本発明の組成物は、脂質成分として、（Ｉ）上述したカチオン性脂質と、（ＩＩ）中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質とを含有する。
【００７７】
中性脂質としては、上述したものと同様のものが挙げられる。本発明の組成物は、組成物が含有する全脂質を基準として、中性脂質を、例えば０～５０モル％、例えば０～４０モル％、例えば０～３０モル％含有してもよい。
【００７８】

ポリエチレングリコール修飾脂質としては、上述したものと同様のものが挙げられる。本発明の組成物は、組成物が含有する全脂質を基準として、ポリエチレングリコール修飾脂質を、例えば０～３０モル％、例えば０～２０モル％、例えば０～１０モル％含有してもよい。

【００７９】

ステロールとしては、上述したものと同様のものが挙げられる。本発明の組成物は、組成物が含有する全脂質を基準として、ステロールを、例えば０～９０モル％、例えば１０～８０モル％、例えば２０～５０モル％含有してもよい。

【００８０】

本発明の組成物における脂質成分の組み合わせは、特に限定されず、例えば、上述したカチオン性脂質、中性脂質及びステロールの組み合わせ、上述したカチオン性脂質、中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールの組み合わせ等が挙げられる。

【００８１】

本発明の組成物は、上述した成分の他にも、その他の添加剤として、ショ糖、ブドウ糖、ソルビトール、乳糖等の糖；グルタミン、グルタミン酸、グルタミン酸ナトリウム、ヒスチジン等のアミノ酸；クエン酸、リン酸、酢酸、乳酸、炭酸、酒石酸等の酸の塩等を含有してもよい。

【００８２】

本発明の組成物は、医薬組成物として製剤化されていてもよい。医薬組成物の剤型としては、例えば注射剤が挙げられる。

【００８３】

本発明の組成物は、例えば、凍結乾燥等により溶媒を除去した粉末状態であってもよく、液体状態であってもよい。本発明の一実施形態の組成物は、上述した実施形態の脂質複合体を含む粉末組成物である。粉末組成物は、液体状態の組成物（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調製してもよいし、該分散液を凍結乾燥して調製してもよい。組成物が粉末状態である場合には、使用前に薬学的に許容される媒体に懸濁又は溶解させて注射剤として用いることができる。本発明の一実施形態の組成物は、上述した実施形態の脂質複合体および薬学的に許容される媒体を含む液体組成物である。組成物が液体状態である場合には、そのままで又は薬学的に許容される媒体に懸濁又は溶解させて注射剤として用いることができる。

【００８４】

薬学的に許容される媒体としては、滅菌水；生理食塩水；ブドウ糖、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンノース、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウム等の補助薬を含む等張液；リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液等の緩衝液等が挙げられる。本実施形態の組成物は、更に、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等のアルコール等の溶解補助剤、安定剤、酸化防止剤、防腐剤、薬剤製造上一般に用いられる賦形剤、充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、潤滑剤、界面活性剤、分散剤、保存剤、矯味矯臭剤、無痛化剤等の添加剤を含有していてもよい。

【００８５】

組成物の患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等の非経口用法により行うことができる。組成物の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なる。組成物の投与対象は限定されず、各種動物に適用することができるが、特に、哺乳動物、好ましくはヒトおよび臨床試験、スクリーニング、実験における実験動物に適用することができる。

【００８６】

＜組成物の製造方法＞

一実施形態において、本発明は、（Ｉ）上述したカチオン性脂質と、（ＩＩ）中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質とを含有する極性有機溶媒含有水溶液と、（ＩＩＩ）核酸を含有する水溶液とを混合して混合液を得る工程（ａ）と、混合液中の極性有機溶媒の含有率を減少させる工

程（ｂ）とを備える、組成物の製造方法を提供する。本実施形態の製造方法によれば、核酸を細胞質に効率よく放出することが可能な組成物を製造することができる。

【００８７】

水溶性の核酸と上述したカチオン性脂質との静電的相互作用、及び脂質間の疎水的相互作用により、脂質で構成された微粒子内に核酸が封入された脂質複合体を形成することができる。例えば、混合液中の極性有機溶媒の含有率を減少させることによって、（Ｉ）上述したカチオン性脂質と、（ＩＩ）中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質とを含む脂質成分の、極性有機溶媒含有水溶液に対する溶解度を変化させ、これにより、脂質複合体を形成させることができる。極性有機溶媒としては、エタノール等のアルコールが挙げられる。

【００８８】

まず、工程（ａ）において、（Ｉ）上述したカチオン性脂質と、（ＩＩ）中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質とを溶解させた、極性有機溶媒含有水溶液と、（ＩＩＩ）核酸を含有する水溶液とを混合して混合液を得る。極性有機溶媒含有水溶液中の極性有機溶媒の濃度は、核酸の水溶液と混合後も、脂質分子が溶解する条件を満たしていれば特に限定されない。一例をあげると、工程（ａ）の極性有機溶媒含有水溶液における極性有機溶媒の濃度は０～６０重量％でありうる。

【００８９】

続いて、工程（ｂ）において、上記の混合液に水等を添加することにより、極性有機溶媒の含有率を減少させる。これにより、脂質複合体を形成させることができる。脂質複合体を効率よく形成させるためには、極性有機溶媒の含有率を急激に低下させることが好ましい。一例をあげると、工程（ｂ）における最終の極性有機溶媒含有水溶液における極性有機溶媒の濃度は０～５重量％でありうる。

【００９０】

また、工程（ａ）で得られた上記混合液を、透析によって、極性有機溶媒を除去し、溶媒を薬学的に許容される媒体に置換してもよい。透析過程で溶液中の極性有機溶媒の含有率が減少するため、これにより、脂質複合体を形成させることができる。

【００９１】

本実施形態の組成物の製造方法によれば、核酸が効率よく微粒子内部に封入された脂質複合体を得ることができる。かかる脂質複合体は優れた物理的安定性を有し得る。例えば、一定期間（例えば１か月、例えば３か月）保管した場合に、粒子径の増大が抑制され得る。

【００９２】

組成物に封入される核酸が核酸医薬である場合には、組成物を医薬組成物として利用することができる。例えば、本発明の組成物は、標的となる細胞質（例えば各種疾患の原因となる細胞質）にｉｎ ｖｉｖｏまたはｉｎ ｖｉｔｒｏで所望の核酸を導入する治療（例えば遺伝子治療）に用いることができる。よって本発明の一実施形態は、上述した脂質複合体を含む医薬組成物を用いる各種疾患の治療方法（特に遺伝子治療方法）を提供する。なお、投与の対象、投与の方法及び条件は上記と同様である。

【００９３】

本発明の一実施形態は上記カチオン性脂質を含む核酸医薬送達用キットでありうる。また、当該キットは、各種標的細胞に対する治療（例えば遺伝子治療）などに好ましく用いることができる。本実施形態のキットにおいて、カチオン性脂質の保存状態は特に限定されず、それぞれの安定性（保存性）及び使用容易性等を考慮して溶液状又は粉末状など任意の状態に設定することができる。本実施形態のキットは、上記カチオン性脂質以外に、例えば、各種核酸、各種媒体（薬学的に許容される媒体、バッファ）、及び使用説明書（使用マニュアル）等を含んでもよい。本実施形態のキットは、標的細胞内に導入する所望の核酸および上記カチオン性脂質を含有する脂質を含む組成物または脂質複合体を調製するために使用される。調製した組成物または脂質複合体は、標的細胞への核酸送達のため

に有効に用いることができる。さらに、本発明の一実施形態は、上記カチオン性脂質を含む医薬組成物を含む核酸医薬送達用キットでありうる。本実施形態のキットは、上記医薬組成物以外に、例えば、各種媒体（薬学的に許容される媒体）、および使用説明書（使用マニュアル）等を含んでもよい。

【実施例】

【００９４】

以下に実施例、製造例および試験例を挙げて本発明を更に詳述するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。実施例、製造例中の化合物名は、ソフトウエア（商品名「ＣｈｅｍＤｒａｗ　Ｐｌｕｇｉｎ　ｖｅｒ．１５．１」、パーキンエルマー社製）を用いて命名した。

本発明の化合物を合成するために利用される出発原料、試薬、酸、塩基、脱水剤、溶媒、および触媒はすべて、市販されているか、または当業者に公知の有機合成法によって生成することができる。さらに、本発明の化合物は、以下の実施例で示されている通り、当業者に公知の有機合成法により製造することができる。

【００９５】

実施例において使用される略語は当業者に周知の慣用的な略語である。いくつかの略語を以下に示す。

ＤＩＰＥＡ：Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン

ＤＭＡＰ：４－（ジメチルアミノ）ピリジン

ＤＭＳＯ：ジメチルスルホキシド

ＤＭＦ：Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド

ＥＤＣ・ＨＣｌ：１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩

ｎ－：ノルマル

ｔｅｒｔ－：ターシャリー

ＴＦＡ：トリフルオロ酢酸

ＴＨＦ：テトラヒドロフラン

ＬＡＨ：水素化アルミニウムリチウム

ＴＢＡＦ：フッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム

^{1}Ｈ－ＮＭＲ：プロトン核磁気共鳴スペクトルメトリー

【００９６】

以下の実施例及び製造例中の「室温」は通常約１０℃から約３５℃を示す。％は特記しない限り重量パーセントを示す。

【００９７】

プロトン核磁気共鳴スペクトルの化学シフトは、テトラメチルシランに対するδ単位（ｐｐｍ）で記録されている。パターンの略語は、次の通りである。

ｓ：シングレット、ｄ：ダブレット、ｔ：トリプレット、ｑ：カルテット、ｑｕｉｎ：クインテット、ｍ：マルチプレット、ｂｒ：ブロード。

クロマトグラフィーに関しては、ＹＡＭＡＺＥＮ社製パラレルプレップ｛カラム：ＹＡＭＡＺＥＮ社製　Ｈｉ－Ｆｌａｓｈ　Ｃｏｌｕｍｎ（Ｓｉｌｉｃａｇｅｌ）、サイズ；Ｓ（１６×６０ｍｍ）、Ｍ（２０×７５ｍｍ）、Ｌ（２６×１００ｍｍ）、２Ｌ（２６×１５０ｍｍ）｝、あるいはＢｉｏｔａｇｅ社製フラッシュ自動精製システムＩｓｏｌｅｒａ｛カラム：ＳＮＡＰ　Ｃａｒｔｒｉｄｇｅ　ＫＰ－Ｓｉｌ（１０ｇ、２５ｇ、５０ｇ、１００ｇ、３４０ｇ）｝を用いた。

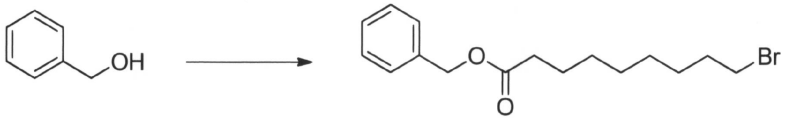
【００９８】

Ａ．カチオン性脂質の合成

［製造例１］

ベンジル ９－ブロモノナノエートの合成

【化２３】



【００９９】

ベンジルアルコール（１．３ｍＬ，１２．６ｍｍｏｌ）、９－ブロモノナン酸（３．０ｇ，１２．６５ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（１５５ｍｇ，１．２７ｍｍｏｌ）を塩化メチレン（２５ｍＬ）に溶解し、氷冷下、ＥＤＣ・ＨＣｌ（２．６７ｇ，１３．９２ｍｍｏｌ）を加え、室温で２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、ジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ｎ－ヘプタン／酢酸エチル）にて精製し、標記化合物（３．７ｇ，１１．３１ｍｍｏｌ）を得た。

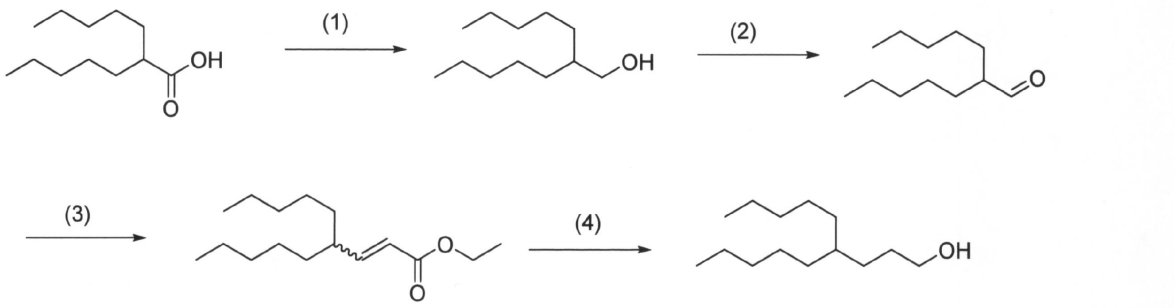
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：１．２２－１．４８（ｍ，８Ｈ），１．５８－１．７１（ｍ，２Ｈ），１．７８－１．９０（ｍ，２Ｈ），２．３０－２．４０（ｍ，２Ｈ），３．３５－３．４４（ｍ，２Ｈ），５．１２（ｓ，２Ｈ），７．２６－７．４５（ｍ，５Ｈ）．

【０１００】

［製造例２］

４－ペンチルノナン－１－オールの合成

【化２４】



【０１０１】

（１）２－ペンチルヘプタン－１－オール合成

２－ペンチルヘプタン酸（２．０ｇ，９．９８ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（５０ｍＬ）に溶解し、－７８℃でボラン－ＴＨＦ錯体（１．０Ｍ，２５．０ｍＬ，２５．０ｍｍｏｌ）を滴下した。室温まで昇温したのち終夜撹拌した。再び－７８℃まで冷却し、ボラン－ＴＨＦ錯体（１．０Ｍ，１０．０ｍＬ，１０．０ｍｍｏｌ）を追加したのち室温で終夜攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、ジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シクロヘキサン／酢酸エチル）にて精製し、標記化合物（１．４０ｇ，７．４９ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，６Ｈ），１．２４－１．３５（ｍ，１９Ｈ），１．４５－１．４７（ｍ，１Ｈ），１．６２－１．７１（ｍ，１Ｈ），３．５４（ｂｒ　ｄ，Ｊ＝５．５Ｈｚ，２Ｈ）．

【０１０２】

（２）２－ペンチルヘプタナールの合成

オキザリルクロリド（１．３ｍＬ，１５．０ｍｍｏｌ）の塩化メチレン（１．０ｍＬ）溶液に、－７８℃でＤＭＳＯ（２．１ｍＬ，３０．０ｍｍｏｌ）の塩化メチレン（１．０ｍＬ）溶液を滴下した。３０分撹拌したのち、製造例２－（１）で得た化合物（１．４０ｇ，７．４９ｍｍｏｌ）の塩化メチレン（２．０ｍＬ）溶液を加えた。１時間撹拌したのち、トリエチルアミン（５．２ｍＬ，３７．５ｍｍｏｌ）を加えた。室温まで昇温し２時間撹拌したのち、水を加え有機相を分離した。有機相を水および飽和食塩水で洗浄し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シクロヘキサン／ジエチルエーテル）にて精製し、標記化合物（１．２６ｇ，６．８２ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，７Ｈ），１．１９－１．３４（ｍ，１３Ｈ），１．４０－１．４７（ｍ，４Ｈ），１．５７（ｓ，１Ｈ），１．５８－１．６６（ｍ，２Ｈ），２．１５－２．２８（ｍ，１Ｈ），２．６６（ｓ，１Ｈ），９．５６（ｄ，Ｊ＝３．３Ｈｚ，１Ｈ）．

【０１０３】

（３）エチル ４－ペンチルノナン－２－エノエートの合成

エトキシカルボニルメチル（トリフェニル）ホスホニウムブロミド（２．２３ｇ，５．１９ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（１４ｍＬ）溶液に、－７８℃でヘキサメチルジシラザンナトリウム－ＴＨＦ溶液（１Ｍ，５．２ｍＬ，５．１９ｍｍｏｌ）を滴下した。２時間で０℃まで昇温させたのち、製造例２－（２）で得られた化合物（０．４８ｇ，２．５９ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（４．０ｍＬ）溶液にカニューラで滴下した。室温で終夜撹拌したのち、４時間加熱還流した。水を加えジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シクロヘキサン／ジエチルエーテル）にて精製し、標記化合物（０．２８ｇ，１．０９ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｂｒ　ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，５Ｈ），０．８７（ｂｒ　ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，６Ｈ），１．１８－１．３５（ｍ，２６Ｈ），１．３８－１．４６（ｍ，３Ｈ），１．５３－１．６４（ｍ，４Ｈ），２．０９－２．２４（ｍ，１Ｈ），２．３８（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，３Ｈ），４．１９（ｑ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），５．７６（ｄ，Ｊ＝１５．８Ｈｚ，１Ｈ），６．７４（ｄｄ，Ｊ＝１５．６，９．４Ｈｚ，１Ｈ）．

【０１０４】

（４）４－ペンチルノナン－１－オールの合成

製造例２－（３）で得た化合物（０．２８ｇ，１．１０ｍｍｏｌ）のＴＨＦ溶液（２．２ｍＬ）に、窒素雰囲気下、０℃でＬＡＨ－ＴＨＦ溶液（１Ｍ，２．２ｍＬ，２．２ｍｍｏｌ）を滴下した。室温まで昇温したのち、１８時間加熱還流した。０℃で、ｔｅｒｔ－ブチルメチルエーテル（４．６ｍＬ）で希釈したのち、水（０．０７８ｍＬ）、水酸化ナトリウム水溶液（１５％，０．０７８ｍＬ）および水（０．２３４ｍＬ）を順次加えた。反応混合物を１５分間撹拌したのち、セライトでろ過しジエチルエーテルで洗浄した。ろ液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シクロヘキサン／ジエチルエーテル）にて精製し、標記化合物（０．０４８ｇ，０．２２ｍｍｏｌ）を得た。

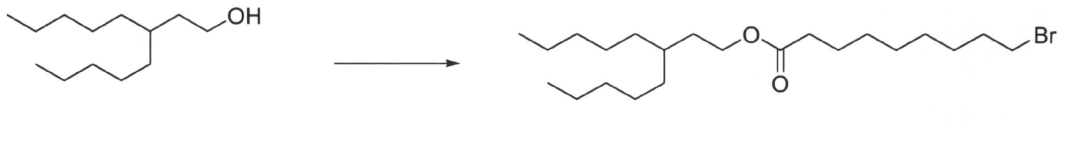
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，６Ｈ），１．１９－１．３３（ｍ，２１Ｈ），１．４３（ｓ，１Ｈ），１．４７（ｂｒ　ｓ，１Ｈ），１．５０－１．５８（ｍ，２Ｈ），３．６２（ｔ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，２Ｈ）．

【０１０５】

［製造例３］

３－ペンチルオクチル ９－ブロモノナノエートの合成

【化２５】



【０１０６】

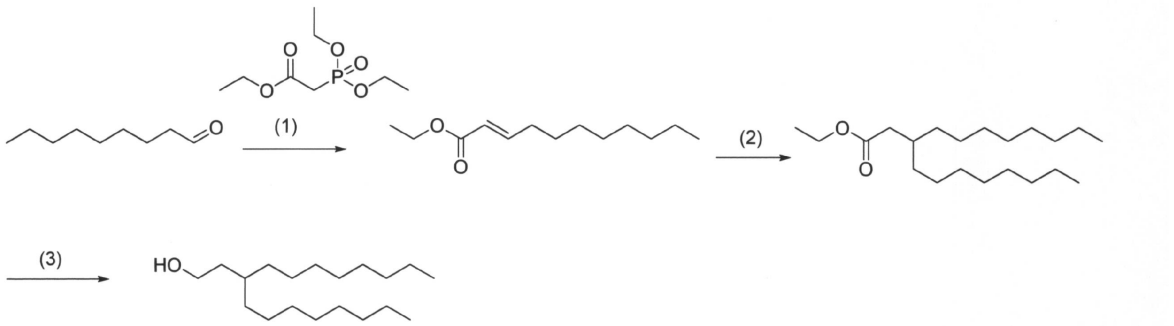
９－ブロモノナン酸（１．６１ｇ，６．７７ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（３５ｍＬ）に、氷冷下、オキザリルクロリド（０．９５ｍＬ，１０．８ｍｍｏｌ）を加えたのち、ＤＭＦ（０．０５０ｍＬ，０．６８ｍｍｏｌ）を４０分かけて加えた。室温で４０分間攪拌したのち、減圧下濃縮しトルエンで共沸した。残渣を塩化メチレン（３５ｍＬ）に溶解し、３－ペンチルオクタン－１－オール（１．３６ｇ，６．７７ｍｍｏｌ）を加え、室温で１時間攪拌した。反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シクロヘキサン／ジエチルエーテル）にて精製し、標記化合物（２．２２ｇ，５．２８ｍｍｏｌ）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，６Ｈ），１．２２－１．３５（ｍ，２２Ｈ），１．３７－１．４７（ｍ，３Ｈ），１．５３－１．６６（ｍ，５Ｈ），１．８６（ｑｕｉｎ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ），２．２９（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），３．４１（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），４．０９（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ）．

【０１０７】

［製造例４］

３－オクチルウンデカン－１－オールの合成

【化２６】



【０１０８】

（１）（Ｅ）－エチル　２－ウンデセノエートの合成

エチル　２－（ジエトキシホスホリル）アセテート（５．０ｍＬ，２５．３ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（４０ｍＬ）懸濁液に、氷冷下、６０％水素化ナトリウム（０．９３ｇ，２３．２ｍｍｏｌ）をゆっくり加えた。３０分後、ノニルアルデヒド（３．６ｍＬ，２１．１ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（４０ｍＬ）溶液を滴下し、３０分間攪拌した。室温で２時間攪拌したのち水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後、溶媒を減圧下留去した。エチル　２－（ジエトキシホスホリル）アセテート（２．５ｍＬ，１２．７ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（２０ｍＬ）懸濁液に、氷冷下、６０％水素化ナトリウム（１．０ｇ，２５．０ｍｍｏｌ）をゆっくり加えたのち、先に得られた粗生成物のＴＨＦ溶液（２０ｍＬ）を滴下した。１時間攪拌したのち水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シクロヘキサン／ジエチルエーテル）にて精製し、標記

化合物（３．０７ｇ，１４．６ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：１．２２－１．３５（ｍ，１４Ｈ），１．４１－１．５０（ｍ，２Ｈ），２．１５－２．２３（ｍ，２Ｈ），４．１４－４．２２（ｍ，２Ｈ），５．８１（ｄｔ，Ｊ＝１５．６，１．５Ｈｚ，１Ｈ），６．９６（ｄｔ，Ｊ＝１５．６，７．０Ｈｚ，１Ｈ）．

【０１０９】

（２）エチル　３－オクチルウンデカノエートの合成

臭化銅（Ｉ）（０．２１ｇ，１．４５ｍｍｏｌ）と塩化リチウム（０．１２ｇ，２．８９ｍｍｏｌ）とをＴＨＦ（４０ｍＬ）に懸濁させ、室温で１０分間攪拌した。氷冷下、製造例４－（１）で得た化合物（３．０７ｇ，１４．４６ｍｍｏｌ）とクロロトリメチルシラン（２．２ｍＬ，１７．４ｍｍｏｌ）とを順次加え、２０分間攪拌した。オクチルマグネシウムブロミド－ＴＨＦ溶液（２．０Ｍ，８．７ｍＬ，１７．４ｍｍｏｌ）を滴下し、さらに１．５時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、ジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シクロヘキサン／ジエチルエーテル）にて精製し、標記化合物（４．４３ｇ，１３．５８ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８８（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，６Ｈ），１．１９－１．３３（ｍ，３４Ｈ），１．３５－１．３５（ｍ，１Ｈ），１．８４（ｂｒ　ｄ，Ｊ＝５．０Ｈｚ，１Ｈ），２．２１（ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），４．１２（ｑ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ）．

【０１１０】

（３）３－オクチルウンデカン－１－オールの合成

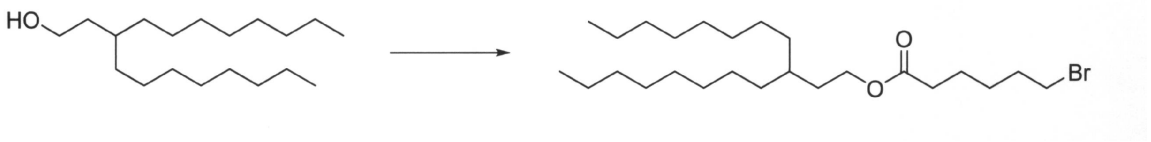
製造例４－（２）で得た化合物（４．４３ｇ，１３．５６ｍｍｏｌ）のＴＨＦ溶液（３０ｍＬ）に、窒素雰囲気下、室温でＬＡＨ－ＴＨＦ溶液（２Ｍ，１３．６ｍＬ，２７．１ｍｍｏｌ）を滴下した。６５℃で５時間加熱しのち、氷冷下、水（１ｍＬ）、水酸化ナトリウム水溶液（２Ｍ，１ｍＬ）および水（２ｍＬ）を順次加えた。反応混合物を１０分間攪拌したのち、セライトでろ過しジエチルエーテルで洗浄した。ろ液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シクロヘキサン／ジエチルエーテル）にて精製し、標記化合物（４．４３ｇ，ｑｕａｎｔ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８８（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，６Ｈ），１．１２（ｂｒ　ｓ，１Ｈ），１．１９－１．３３（ｍ，３０Ｈ），１．３９－１．４４（ｍ，２Ｈ），１．４９－１．５４（ｍ，２Ｈ），３．６２－３．７１（ｍ，２Ｈ）．

【０１１１】

［製造例５］

３－オクチルウンデシル ６－ブロモヘキサノエートの合成

【化２７】



【０１１２】

製造例４で得られた化合物（３．４６ｇ，１２．１６ｍｍｏｌ）、６－ブロモヘキサン酸（２．６１ｇ，１３．３８ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（０．１５ｇ，１．２２ｍｍｏｌ）を塩化メチレン（２２ｍＬ）に溶解し、氷冷下、ＥＤＣ・ＨＣｌ（２．９１ｇ，１５．２０ｍｍｏｌ）を加え、室温で３日間撹拌した。反応混合物を減圧下濃縮しジエチルエーテルで希釈した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水および１０％クエン酸水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ｎ－ヘプタン／酢酸エチル）にて精製し、標記化合物（４

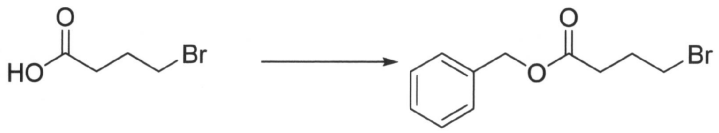
．６７ｇ，１０．０９ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８８（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，６Ｈ），１．２１－１．３２（ｍ，３０Ｈ），１．３９（ｂｒ　ｓ，１Ｈ），１．４４－１．５１（ｍ，２Ｈ），１．５７（ｑ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），１．６６（ｑｕｉｎ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，２Ｈ），１．８４－１．９１（ｍ，２Ｈ），２．３１（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），３．４０（ｔ，Ｊ＝６.７Ｈｚ，２Ｈ），４．０９（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ）．

【０１１３】

［製造例６］

ベンジル　４－ブロモブタノエートの合成

【化２８】



【０１１４】

４－ブロモブタン酸（２．９４ｇ，１７．６１ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（８８ｍＬ）に、室温で、オキザリルクロリド（１．６ｍＬ，１８．５ｍｍｏｌ）とＤＭＦ（０．４０ｍＬ，１．８ｍｍｏｌ）とを順次加えた。室温で３０分間攪拌したのち、ベンジルアルコール（１．９０ｇ，１７．６１ｍｍｏｌ）を加え、１５分間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シクロヘキサン／ジエチルエーテル）にて精製し、標記化合物（３．６４ｇ，１４．０９ｍｍｏｌ）を得た。

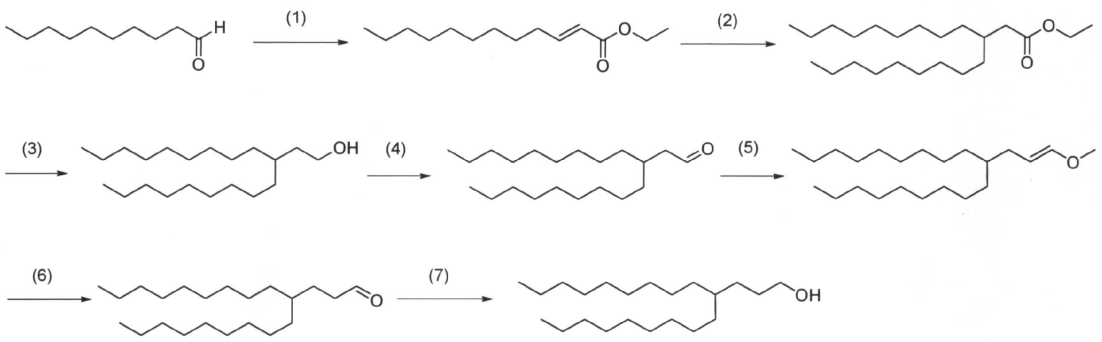
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：１．６１（ｓ，１Ｈ），２．２１（ｑｕｉｎ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，２Ｈ），２．５７（ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），３．４７（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，２Ｈ），５．１５（ｓ，２Ｈ），７．３３－７．４０（ｍ，５Ｈ）．

【０１１５】

［製造例７］

４－ノニルトリデカン－１－オールの合成

【化２９】



【０１１６】

（１）（Ｅ）－エチル　２－ドデセノエートの合成

６０％水素化ナトリウム（１．２８ｇ，３２．０ｍｍｏｌ）の１，２－ジメトキシエタン（７０ｍＬ）懸濁液に、氷冷下、エチル　２－（ジエトキシホスホリル）アセテート（６．４ｍＬ，３２．０ｍｍｏｌ）を滴下した。２０分後、デシルアルデヒド（５．０ｍＬ，３２．０ｍｍｏｌ）の１，２－ジメトキシエタン（３０ｍＬ）溶液を加え、室温で終夜攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後、溶媒を減圧下留去した。有機相を無水硫酸マグネシウ

ムで乾燥し、濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ｎ－ペンタン／ジエチルエーテル）にて精製し、標記化合物（５．１８ｇ，２３．０ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８８（ｔ，Ｊ＝７．０６Ｈｚ，４Ｈ），１．２５－１．３２（ｍ，１８Ｈ），１．４５（ｄｔ，Ｊ＝１４．５，７．３Ｈｚ，２Ｈ），２．１５－２．２２（ｍ，２Ｈ），４．１５－４．２６（ｍ，２Ｈ），５．７２－５．９０（ｍ，１Ｈ），６．９６（ｄｔ，Ｊ＝１５．６，７．０Ｈｚ，１Ｈ）．

【０１１７】

（２）エチル　３－ノニルドデカノエートの合成

製造例４－（２）の方法に準じ、製造例７－（１）で得た化合物（２．２２ｇ，９．８０ｍｍｏｌ）、臭化銅（Ｉ）（０．１４１ｇ，０．９８ｍｍｏｌ）、塩化リチウム（０．０８３ｇ，１．９６ｍｍｏｌ）、クロロトリメチルシラン（１．４ｍＬ，１０．８ｍｍｏｌ）、ノニルマグネシウムブロミド－ＴＨＦ溶液（１．０Ｍ，１０．８ｍＬ，１０．８ｍｍｏｌ）およびＴＨＦ（５３ｍＬ）から標記化合物（２．７６ｇ，７．８４ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．７７（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，９Ｈ），１．０４（ｂｒ　ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，１Ｈ），１．１１－１．２６（ｍ，４８Ｈ），１．２９－１．３９（ｍ，１Ｈ），１．４４（ｓ，１Ｈ），１．６８－１．８４（ｍ，１Ｈ），２．０５－２．０９（ｍ，１Ｈ），２．０９－２．１６（ｍ，２Ｈ），３．４６（ｔ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，１Ｈ），３．４２－３．４９（ｍ，１Ｈ），４．０１（ｑ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），４．０７（ｑ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，１Ｈ），５．７０（ｄｔ，Ｊ＝１５．７，１．５Ｈｚ，１Ｈ），６．８５（ｄｔ，Ｊ＝１５．８，７．０Ｈｚ，１Ｈ），７．１５（ｓ，１Ｈ）．

【０１１８】

（３）３－ノニルドデカン－１－オールの合成

製造例４－（３）の方法に準じ、製造例７－（２）で得た化合物（２．７６ｇ，７．８０ｍｍｏｌ）、ＬＡＨ－ＴＨＦ溶液（１Ｍ，１０．１ｍＬ，１０．１ｍｍｏｌ）およびＴＨＦ（１５ｍＬ）から標記化合物（１，３４ｇ，４．２９ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，６Ｈ），１．１８（ｂｒ　ｓ，２Ｈ），１．２３－１．３３（ｍ，３３Ｈ），１．４３（ｂｒ　ｄ，Ｊ＝９．９Ｈｚ，１Ｈ），１．５３（ｑ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，２Ｈ），１．５９（ｂｒ　ｓ，１Ｈ），３．６７（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ）．

【０１１９】

（４）３－ノニルドデカナールの合成

製造例２－（２）の方法に準じ、製造例７－（３）で得た化合物（０．３０ｇ，０．９７ｍｍｏｌ）、オキザリルクロリド（０．１７ｍＬ，１．９４ｍｍｏｌ）、ＤＭＳＯ（０．２７ｍＬ，３．８８ｍｍｏｌ）およびトリエチルアミン（０．６８ｍＬ，４．８５ｍｍｏｌ）から標記化合物（０．３０ｇ，ｑｕａｎｔ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，６Ｈ），１．１５－１．３８（ｍ，１Ｈ），１．４４（ｓ，９Ｈ），１．５５（ｓ，１Ｈ），１．９５（ｂｒ　ｓ，１Ｈ），２．３３（ｄｄ，Ｊ＝６．６，２．６Ｈｚ，２Ｈ），９．７７（ｔ，Ｊ＝２．４Ｈｚ，１Ｈ）．

【０１２０】

（５）１０－（３－メトキシアリル）ノナデカンの合成

（メトキシメチル）トリフェニルホスホニウムクロリド（１．１０ｇ，３．２１ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（５．０ｍＬ）溶液に、－７８℃で、ヘキサメチルジシラザンナトリウム－ＴＨＦ溶液（１Ｍ，３．２ｍＬ，３．２ｍｍｏｌ）を滴下した。１５分後、製造例７－（４）で得られた化合物（０．５０ｇ，１．６０ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（２．０ｍＬ）溶液に、氷冷下、カニューラで滴下した。１．５時間攪拌したのち、水を加えジエチルエーテル

で抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シクロヘキサン／ジエチルエーテル）にて精製し、標記化合物（０．３３ｇ，０．９８ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，６Ｈ），１．２０－１．３５（ｍ，２８Ｈ），１．４１－１．４８（ｍ，１Ｈ），１．５５（ｓ，１Ｈ），１．８８（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，１Ｈ），１．９６－２．１１（ｍ１Ｈ），３．５２（ｓ，１Ｈ），３．５７（ｓ，１Ｈ），４．３２（ｑ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，１Ｈ），４．６９（ｄｔ，Ｊ＝１２．７，７．４Ｈｚ，１Ｈ），５．９１（ｄ，Ｊ＝６．２Ｈｚ，１Ｈ），６．２５（ｄ，Ｊ＝１２．８Ｈｚ，１Ｈ）．

【０１２１】

（６）４－ノニルトリデカナールの合成

製造例７－（５）で得た化合物（０．３３ｇ，０．９７ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（２．０ｍＬ）に溶解し、室温で１Ｎ塩酸（２．９５ｍＬ，２．９５ｍｍｏｌ）を加え７０℃で加熱した。３６時間後、水を加えジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去し、標記化合物（０．２８ｇ，０．８７ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，７Ｈ），１．２０－１．３４（ｍ，３９Ｈ），１．４４（ｓ，１Ｈ），１．５４－１．６２（ｍ，３Ｈ），２．３７－２．４３（ｍ，２Ｈ），９．７８（ｔ，Ｊ＝１．８Ｈｚ，１Ｈ）．

【０１２２】

（７）４－ノニルトリデカン－１－オールの合成

製造例７－（６）で得た化合物（０．２８ｇ，０．８８ｍｍｏｌ）をエタノール（１３ｍＬ）に溶解し、０℃で、水素化ホウ素ナトリウム（０．１３ｇ，３．５０ｍｍｏｌ）を加えた。１．５時間後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、塩化メチレンで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後、溶媒を減圧下留去し、標記化合物（０．２８ｇ，０．８６ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，６Ｈ），１．２０－１．３３（ｍ，３７Ｈ），１．４４（ｓ，１Ｈ），１．４９－１．６５（ｍ，３Ｈ），３．６３（ｔ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，２Ｈ）．

【０１２３】

［製造例８］

ベンジル　５－ブロモペンタノエートの合成

【化３０】



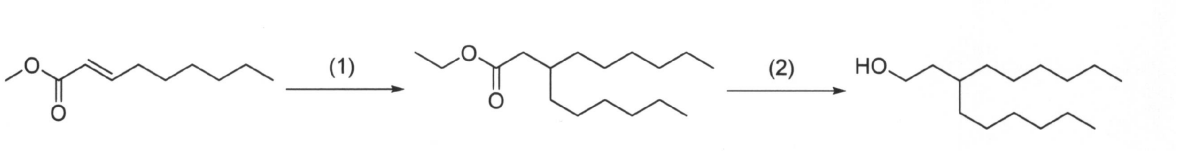
【０１２４】

製造例６の方法に準じ、５－ブロモペンタン酸（４．０ｇ，２２．１ｍｍｏｌ）、ベンジルアルコール（２．３ｍＬ，２２．１ｍｍｏｌ）、塩化メチレン（１１０ｍＬ）、オキザリルクロリド（２．０ｍＬ，２３．２ｍｍｏｌ）およびＤＭＦ（０．１７ｍＬ，２．２１ｍｍｏｌ）から標記化合物（５．３９ｇ，１９．８９ｍｍｏｌ）を得た

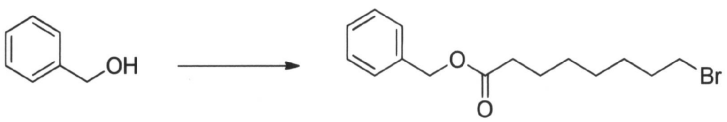
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：１．６２（ｓ，１Ｈ），１．７９－１．８５（ｍ，２Ｈ），１．８８－１．９３（ｍ，２Ｈ），２．４１（ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），３．４１（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，２Ｈ），５．１４（ｓ，２Ｈ），７．３３－７．４０（ｍ，５Ｈ）．

【０１２５】

［製造例９］
３－ヘキシルノナン－１－オールの合成
【化３１】

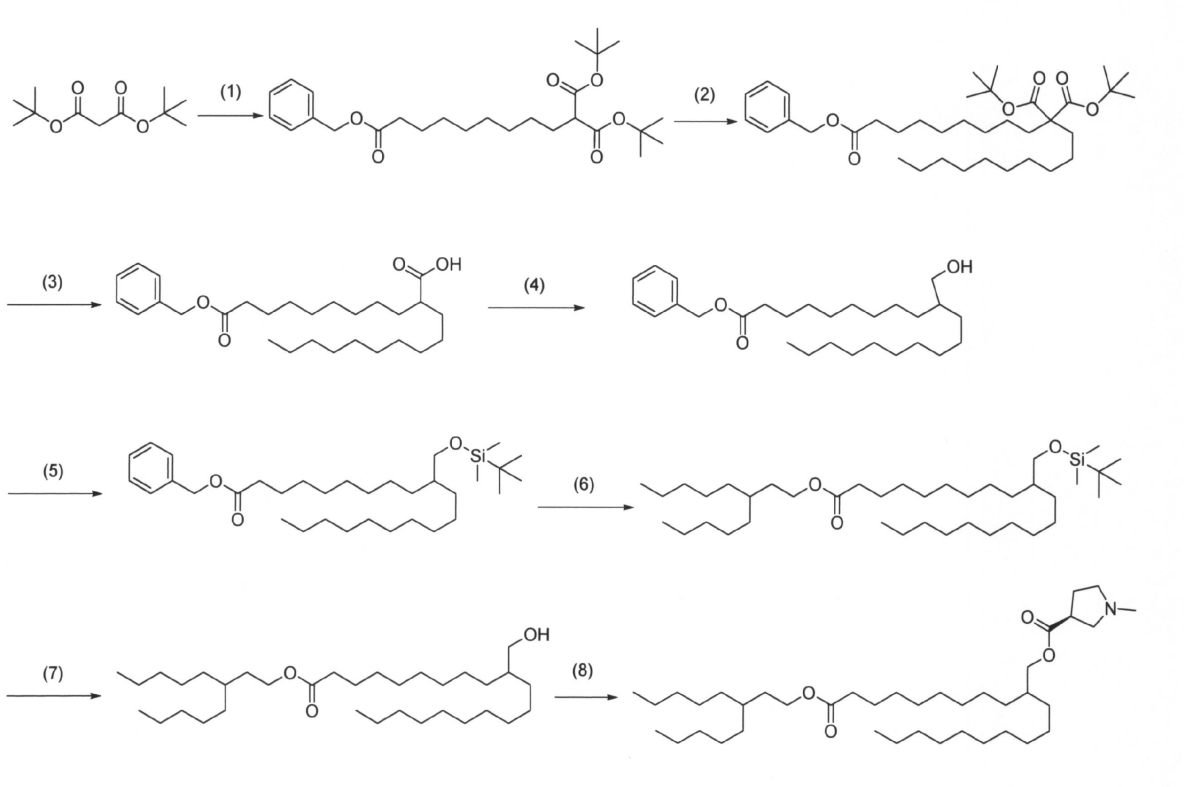


【０１２６】
（１）メチル　３－ヘキシルノナノエートの合成
　製造例４－（２）の方法に準じ、メチル　（Ｅ）－２－ノネノエート（３．６ｍＬ，１８．９２ｍｍｏｌ）、臭化銅（Ｉ）（０．２７５ｇ，１．９２ｍｍｏｌ）、塩化リチウム（０．１６０ｇ，３．７６ｍｍｏｌ）、クロロトリメチルシラン（２．７ｍＬ，２１．２７ｍｍｏｌ）、ヘキシルマグネシウムブロミド－ＴＨＦ溶液（２．０Ｍ，１０．５ｍＬ，２１．０ｍｍｏｌ）およびＴＨＦ（５０ｍＬ）から標記化合物（４．１８ｇ，１６．２７ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８６－０．９１（ｍ，７Ｈ），１．１２－１．３７（ｍ，２５Ｈ），１．７９－１．８７（ｍ，１Ｈ），２．２３（ｄ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，２Ｈ），３．６６（ｓ，３Ｈ）．
【０１２７】
（２）３－ヘキシルノナン－１－オールの合成
　製造例４－（３）の方法に準じ、製造例９－（１）で得た化合物（４．０ｇ，１５．６ｍｍｏｌ）、ＬＡＨ－ＴＨＦ溶液（２．４Ｍ，１３．０ｍＬ，３１．２ｍｍｏｌ）、ＴＨＦ（６０ｍＬ）から標記化合物（２．３３ｇ，１０．１４ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８８（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，６Ｈ），１．１３（ｂｒ　ｓ，１Ｈ），１．１９－１．３４（ｍ，２０Ｈ），１．４１（ｂｒ　ｓ，１Ｈ），１．４９－１．５７（ｍ，４Ｈ），３．６６（ｂｒ　ｄ，Ｊ＝５．５Ｈｚ，２Ｈ）．
【０１２８】
［製造例１０］
ベンジル ８－ブロモオクタノエートの合成
【化３２】



【０１２９】
　製造例１の方法に準じ、ベンジルアルコール（１．３ｍＬ，１２．５ｍｍｏｌ）、８－ブロモオクタン酸（３．０６ｇ，１２．７３ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（０．１５ｇ，１．２５ｍｍｏｌ）を塩化メチレン（６０ｍＬ）に溶解し、氷冷下、ＥＤＣ・ＨＣｌ（２．９９ｇ，１５．６１ｍｍｏｌ）を加え、室温で２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、ジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ｎ－ヘプタン／酢酸エチル）にて精製し、標記化合物（３．９１ｇ，１２．５ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：１．２２－１．４８（ｍ，６Ｈ），１．５８－１．７１（ｍ，２Ｈ），１．７８－１．９０（ｍ，２Ｈ），２．３０－２．３８（ｍ，２Ｈ），３．３３－３．４５（ｍ，２Ｈ），５．１２（ｓ，２Ｈ），７．２８－７．４４（ｍ，５Ｈ）．

【０１３０】
＜カチオン性脂質の合成（１）＞
［実施例Ａ－１］
（３Ｓ）－２－｛９－オキソ－９－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ノニル｝ドデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレートの合成（カチオン性脂質１）
【化３３】



【０１３１】
（１）９－ベンジル １，１－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル ノナン－１，１，９－トリカルボキシレートの合成
　６０％水素化ナトリウム（０．４３ｇ，１０．８５ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（４０ｍＬ）に懸濁させ、氷冷下、ジ－ｔｅｒｔ－ブチル　マロネート（２．２ｍＬ，９．８７ｍｍｏｌ）をゆっくり加え５分間攪拌したのち、冷却バスを取り外し２０分間攪拌した。氷冷下、ヨウ化ナトリウム（０．４４ｇ，２．９６ｍｍｏｌ）と製造例１で得た化合物（３．３９ｇ，１０．３６ｍｍｏｌ）を順次加えたのち、室温で１５時間攪拌した。反応混合物を氷水バスで冷却し、水を加え、ジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ｎ－ヘプタン／酢酸エチル）にて精製し、標記化合物（３．６ｇ，７．７８ｍｍｏｌ）を得た。
　^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：１．２５－１．３３（ｍ，９Ｈ），１．３６（ｓ，１Ｈ），１．３９（ｓ，１Ｈ），１．４４－１．４９（ｍ，１６Ｈ），１．５６－１．６７（ｍ，３Ｈ），１．７９（ｑ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，２Ｈ），２．３５（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），３．１１（ｔ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），５．１２（ｓ，２Ｈ），７．３２－７．３９（ｍ，５Ｈ）．
【０１３２】
（２）１－ベンジル ９，９－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル ノナデカン－１，９，９－トリカルボキシレートの合成
　実施例Ａ－１－（１）で得られた化合物（３．６ｇ，７．７８ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（３６ｍＬ）に溶解し、水冷下、６０％水素化ナトリウム（０．４７ｇ，１１．６７ｍｍｏｌ）を加え１０分間攪拌したのち室温で２０分間攪拌した。１－ヨードデカン（３．３ｍＬ

，１５．５６ｍｍｏｌ）を加え室温で４時間攪拌した。反応混合物を氷水バスで冷却し、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、ｎ－ヘプタンで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ｎ－ヘプタン／酢酸エチル）にて精製し、標記化合物（３．４ｇ，５．６４ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８３－０．９３（ｍ，３Ｈ），１．０５－１．３６（ｍ，２６Ｈ），１．４４（ｓ，１８Ｈ），１．５７－１．６８（ｍ，２Ｈ），１．７１－１．８２（ｍ，４Ｈ），２．２９－２．３９（ｍ，２Ｈ），５．１１（ｓ，２Ｈ），７．２８－７．４２（ｍ，５Ｈ）．

【０１３３】

（３）２－［９－（ベンジロキシ）－９－オキソノニル］ドデカン酸の合成

実施例Ａ－１－（２）で得られた化合物（３．４ｇ，５．６４ｍｍｏｌ）を塩化メチレン（１１．２ｍＬ）に溶解し、氷冷下、ＴＦＡ（５．６ｍＬ）を滴下し、室温で１．５時間攪拌した。反応混合物にトルエンを加え、減圧下、溶媒を留去した。トルエンの添加および留去を２回繰り返すことにより乾燥し、２－｛９－[（２－ブチルオクチル）オキシ]－９－オキソノニル｝－２－デシルマロン酸の粗生成物を得た。得られた粗生成物をキシレン（１２ｍＬ）に溶解し、１５０℃で８時間攪拌した。反応混合物を室温に戻し、減圧下濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー（ｎ－ヘプタン／酢酸エチル）にて精製し、標記化合物（２．２６ｇ，５．０６ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８１－０．９５（ｍ，３Ｈ），１．１８－１．３７（ｍ，２６Ｈ），１．３９－１．５２（ｍ，２Ｈ），１．５４－１．６９（ｍ，４Ｈ），２．２８－２．４１（ｍ，３Ｈ），５．１１（ｓ，２Ｈ），７．２８－７．４０（ｍ，５Ｈ）．

【０１３４】

（４）ベンジル　１０－（ヒドロキシメチル）イコサノエートの合成

実施例Ａ－１－（３）で得た化合物（２．２ｇ，４．９３ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（２５ｍＬ）に溶解し、－１５℃でＭボラン－ＴＨＦ錯体（０．９２，８．０ｍＬ，７．３９ｍｍｏｌ）を滴下し、０℃で２時間撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、室温で５分間攪拌し、酢酸エチルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ｎ－ヘプタン／酢酸エチル）にて精製し、標記化合物（１．８６ｇ，４．３０ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８１－０．９５（ｍ，３Ｈ），１．１２－１．３８（ｍ，３１Ｈ），１．３９－１．５０（ｍ，１Ｈ），１．５８－１．７２（ｍ，２Ｈ），２．２３－２．３６（ｍ，２Ｈ），３．４８－３．５９（ｍ，２Ｈ），５．１１（ｓ，２Ｈ），７．２８－７．４１（ｍ，５Ｈ）．

【０１３５】

（５）ベンジル １０－｛[（ｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリル）オキシ]メチル｝イコサノエートの合成

実施例Ａ－１－（４）で得た化合物（７００ｍｇ，１．６２ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（３．２ｍＬ）に溶解し、室温でイミダゾール（１６５ｍｇ，２．４３ｍｍｏｌ）を加え溶解した。氷冷下、ｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリルクロリド（２９３ｍｇ，１．９４ｍｍｏｌ）を加え、室温で３時間撹拌した。反応液に水を加えたのち、ジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ｎ－ヘプタン／酢酸エチル）にて精製し、標記化合物（８１０ｍｇ，１．４８ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．０２（ｓ，６Ｈ），０．７７－０．９７（ｍ，１２Ｈ），１．０６－１．４７（ｍ，３１Ｈ），１．６４（ｂｒ．ｓ，２Ｈ），２．３５（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），３．４５（ｄ，Ｊ＝５．７Ｈｚ，２Ｈ），５．１１（ｓ，２Ｈ），７．２７－７．４２（ｍ，５Ｈ）．

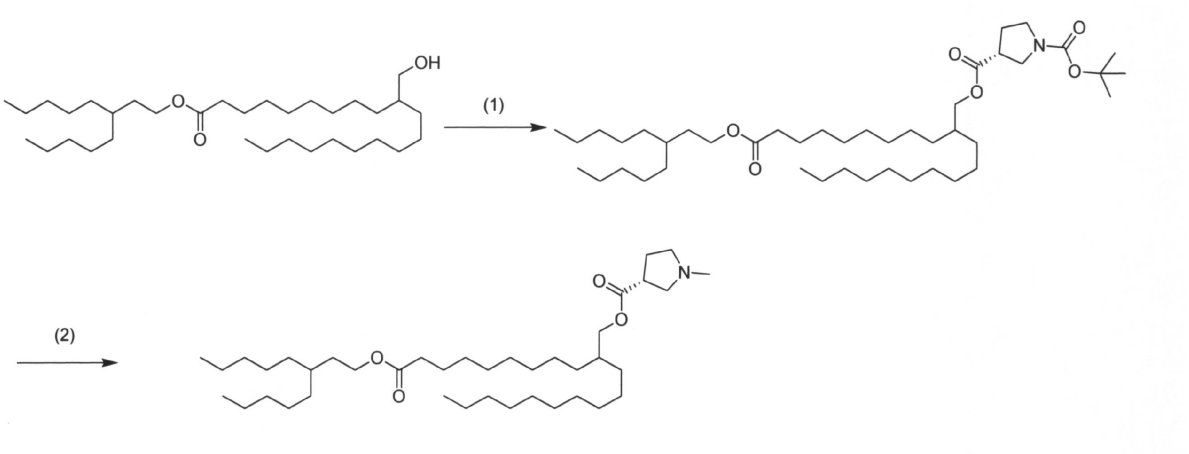
【０１３６】
（６）３－ペンチルオクチル １０－｛［（ｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリル）オキシ］メチル｝イコサノエートの合成
実施例Ａ－１－（５）で得た化合物（８１０ｍｇ，１．４８ｍｍｏｌ）を酢酸エチル（１０ｍＬ）に溶解し、室温で１０％パラジウム－炭素（１５８ｍｇ，５０％含水）を加え、水素雰囲気下、常圧で４．５時間撹拌した。反応液を濾過し、酢酸エチルで洗浄した。濾液を減圧下濃縮し、カルボン酸の粗生成物（６８０ｍｇ）を得た。
得られたカルボン酸、３－ペンチルオクタン－１－オール（ＣＡＳ １４４３５１９－６３－８）（４１６ｍｇ，２．０８ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（３６ｍｇ，０.３０ｍｍｏｌ）を塩化メチレン（７．４ｍＬ）に溶解し、氷冷下、ＥＤＣ・ＨＣｌ（３４１ｍｇ，１．７８ｍｍｏｌ）を加え、室温で１６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、酢酸エチルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ｎ－ヘプタン／酢酸エチル）にて精製し、標記化合物（９２６ｍｇ，１．４５ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．０２（ｓ，５Ｈ），０．８８（ｓ，１７Ｈ），１．１２－１．４６（ｍ，４６Ｈ），１．５５（ｓ，８Ｈ），２．２１－２．３４（ｍ，２Ｈ），３．３９－３．５２（ｍ，２Ｈ），４．００－４．１３（ｍ，２Ｈ）．
【０１３７】
（７）３－ペンチルオクチル １０－（ヒドロキシメチル）イコサノエートの合成
実施例Ａ－１－（６）で得た化合物（９２５ｍｇ，１．４５ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（４．５ｍＬ）に溶解し、氷冷下、ＴＢＡＦ／ＴＨＦ溶液（１Ｍ，３．６ｍＬ）をゆっくり加えたのち、室温で１時間撹拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ｎ－ヘプタン／酢酸エチル）にて精製し、標記化合物（５８４ｍｇ，１．１１ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．７８－０．９９（ｍ，９Ｈ），１．２６（ｄ，Ｊ＝２．９Ｈｚ，５５Ｈ），１．５０－１．７５（ｍ，８Ｈ），２．２８（ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，２Ｈ），３．５３（ｓ，２Ｈ），４．０８（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ）．
【０１３８】
（８）（３Ｓ）－２－｛９－オキソ－９－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ノニル｝ドデシル １－メチルピロリジン－３－カルボキシレートの合成
実施例Ａ－１－（７）で得た化合物（５０ｍｇ，０．０９５ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．０３６ｍＬ，０．２１ｍｍｏｌ）、（３Ｓ）－１－メチルピロリジン－３－カルボン酸 塩酸塩（３２ｍｇ，０．１９ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（２．３ｍｇ，０．０１９ｍｍｏｌ）を塩化メチレン（０．８ｍＬ）に溶解し、氷冷下、ＥＤＣ・ＨＣｌ（４０ｍｇ，０．２１ｍｍｏｌ）を加え、室温で１５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、酢酸エチルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ｎ－ヘプタン／酢酸エチル／メタノール）にて精製し、標記化合物（４７ｍｇ，０．０７４ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８２－０．９６（ｍ，９Ｈ），１．１４－１．４８（ｍ，４９Ｈ），１．５１－１．７３（ｍ，４Ｈ），２．０３－２．１６（ｍ，２Ｈ），２．２８（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），２．３５（ｓ，３Ｈ），２．４９（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，１Ｈ），２．５８－２．７１（ｍ，２Ｈ），２．７６－２．９２（ｍ，１Ｈ），２．９７－３．１２（ｍ，１Ｈ），３．９８（ｄ，Ｊ＝５．７Ｈｚ，２Ｈ），４．０８（ｓ，２Ｈ）．
【０１３９】

＜カチオン性脂質の合成（２）＞

［実施例Ａ－２］

（３Ｒ）－２－｛９－オキソ－９－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ノニル｝ドデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレートの合成（カチオン性脂質２）

【化３４】



【０１４０】

（１）（３Ｒ）－１－ｔｅｒｔ－ブチル ３－（２－｛９－オキソ－９－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ノニル｝ドデシル）ピロリジン－１，３－ジカルボキシレートの合成

実施例Ａ－１－（８）の方法に準じ、実施例Ａ－１－（７）で得た化合物（６０ｍｇ，０．１１ｍｍｏｌ）、（Ｒ）－１－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）ピロリジン－３－カルボン酸（４９ｍｇ，０．２３ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ・ＨＣｌ（４８ｍｇ，０．２５ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．０３９ｍＬ，０．２３ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（２．８ｍｇ，０．０２３ｍｍｏｌ）および塩化メチレン（０．８０ｍＬ）から標記化合物（８０ｍｇ，０．１１ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８８（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，９Ｈ），１．１０－１．３８（ｍ，５３Ｈ），１．４６（ｓ，９Ｈ），１．５０－１．７２（ｍ，４Ｈ），１．９９－２．１９（ｍ，２Ｈ），２．２８（ｓ，２Ｈ），２．９０－３．１７（ｍ，１Ｈ），３．２４－３．７５（ｍ，４Ｈ），３．９７－４．０３（ｍ，２Ｈ），４．０５－４．１２（ｍ，２Ｈ）．

【０１４１】

（２）（３Ｒ）－２－｛９－オキソ－９－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ノニル｝ドデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレートの合成

実施例Ａ－２－（１）で得られた化合物（８０ｍｇ，０．１１ｍｍｏｌ）を塩化メチレン（２．２ｍＬ）に溶解し、室温でＴＦＡ（１．１ｍＬ）を滴下し０．５時間攪拌した。反応混合物にトルエンを加え、減圧下、溶媒を留去した。残渣を塩化メチレン（１ｍＬ）に溶解し、ホルムアルデヒド溶液（３７％，０．２５ｍＬ，３．３ｍｍｏｌ）および硫酸ナトリウム（０．７９ｇ，５．５４ｍｍｏｌ）を室温で加え１０分間攪拌した。ナトリウムトリ（アセトキシ）ボロヒドリド（１１７ｍｇ，０．５５ｍｍｏｌ）を加え、室温で１６時間攪拌した。反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、クロロホルムで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル／メタノール）にて精製し、標記化合物（２０ｍｇ，０．０３１ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８２－０．９６（ｍ，９Ｈ），１．１４－１．４８（ｍ，４９Ｈ），１．５１－１．７３（ｍ，４Ｈ），２．０３－２．１６（ｍ，２Ｈ），２．２３－２．３２（ｍ，２Ｈ），，２．３５（ｓ，３Ｈ），２．４９（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，１Ｈ），２．５８－２．７１（ｍ，２Ｈ），２．７６－２．９２（ｍ，１Ｈ），２．９７－３．１２（ｍ，１Ｈ），３．９８（ｄ，Ｊ＝５．７Ｈ

ｚ，２Ｈ），４．０４－４．１２（ｍ，２Ｈ）．

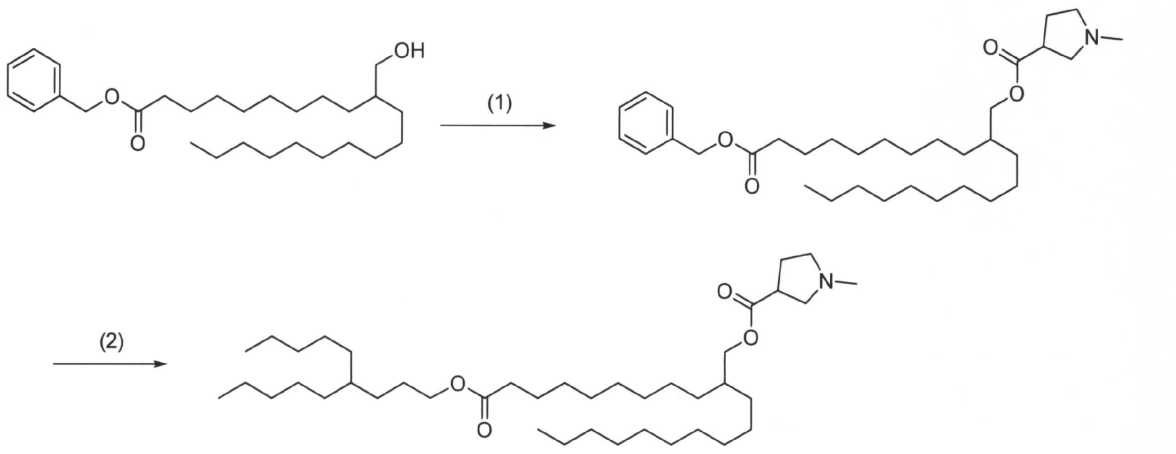
【０１４２】

＜カチオン性脂質の合成（３）＞

［実施例Ａ－３］

２－｛９－オキソ－９－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ノニル｝ドデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレートの合成（カチオン性脂質３）

【化３５】



【０１４３】

（１）２－［９－（ベンジロキシ）－９－オキソノニル］ドデシル １－メチルピロリジン－３－カルボキシレートの合成

実施例Ａ－１－（４）で得た化合物（０．２０ｇ，０．４６ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．１６１ｍＬ，０．９２ｍｍｏｌ）、１－メチルピロリジン－３－カルボン酸　塩酸塩（０．１５ｇ，０．９２ｍｍｏｌ）を塩化メチレン（２．０ｍＬ）に溶解し、ＥＤＣ・ＨＣｌ（０．１９ｇ，１．０２ｍｍｏｌ）を加え、室温で１８時間撹拌した。反応混合物を減圧濃縮したのち、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル／メタノール）にて精製し、標記化合物（０．１５ｇ，０．２８ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，３Ｈ），１．２７（ｓ，４０Ｈ），１．６１－１．６７（ｍ，３Ｈ），１．７４－１．８６（ｍ，１Ｈ），２．０７－２．１３（ｍ，２Ｈ），２．３４－２．３８（ｍ，６Ｈ），２．４７－２．５２（ｍ，１Ｈ），２．６１－２．６６（ｍ，２Ｈ），２．８５（ｔ，Ｊ＝８．８Ｈｚ，１Ｈ），３．０２－３．０７（ｍ，１Ｈ），３．９９（ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ，２Ｈ），５．０８（ｓ，１Ｈ），５．１２（ｓ，２Ｈ），７．３１－７．３８（ｍ，５Ｈ）．

【０１４４】

（２）２－｛９－オキソ－９－［（４－ペンチルノニル）オキシ］ノニル｝ドデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレート合成

実施例Ａ－１－（６）に準じ、実施例Ａ－３－（１）で得た化合物（０．１５ｇ，０．２８ｍｍｏｌ）、１０％パラジウム／炭素（０．３０ｇ，５０％含水）、酢酸エチル（５ｍＬ）からカルボン酸の粗生成物を得た。

得られたカルボン酸、製造例２－（４）で得た化合物（０．０４８ｇ，０．２３ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ・ＨＣｌ（０．０８６ｇ，０．４５ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（０．００５ｇ，０．０５ｍｍｏｌ）および塩化メチレン（１．０ｍＬ）から標記化合物（０．０８１ｇ，０．１４ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８６－０．９１（ｍ，９Ｈ），１．２０－１．３３（ｍ，５４Ｈ），１．５６－１．６５（ｍ，５Ｈ），２．０５－２．１４（ｍ，２Ｈ），２．２９（ｔ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，２Ｈ），２．３６（ｓ，３Ｈ

），２．５０（ｑ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），２．６０－２．６７（ｍ，２Ｈ），２．８６（ｔ，Ｊ＝８．８Ｈｚ，１Ｈ），３．０１－３．０７（ｍ，１Ｈ），３．９９（ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ，２Ｈ），４．０５（ｔ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，２Ｈ），４．５２（ｄ，Ｊ＝４．８Ｈｚ，１Ｈ），５．３０（ｓ，１Ｈ），５．４０（ｂｒ　ｄ，Ｊ＝４．０Ｈｚ，１Ｈ），５．４７－５．５３（ｍ，１Ｈ）．

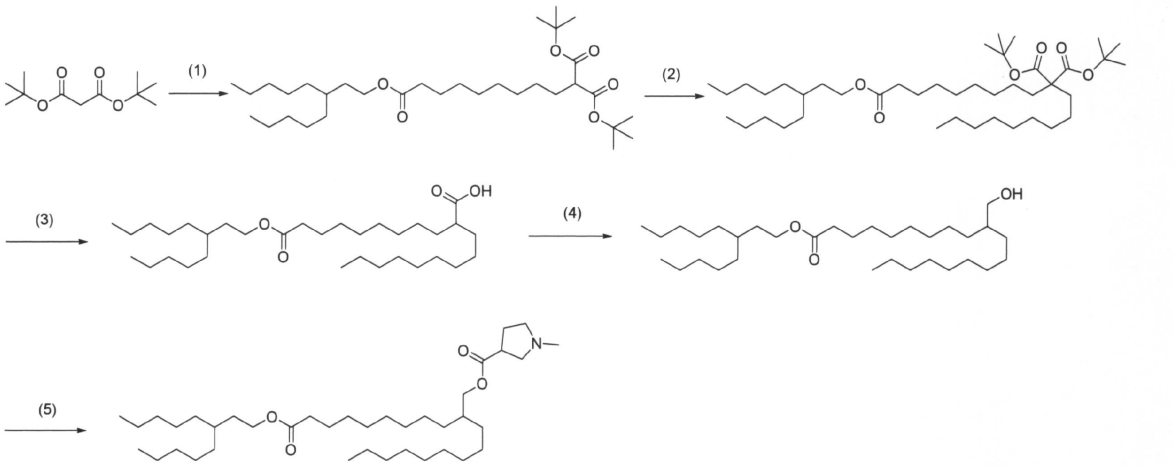
【０１４５】

＜カチオン性脂質の合成（４）＞

［実施例Ａ－４］

２－ノニル－１１－オキソ－１１－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ウンデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレートの合成（カチオン性脂質４）

【化３６】



【０１４６】

（１）１，１－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル　９－（３－ペンチルオクチル）ノナン－１，１，９－トリカルボキシレートの合成

ジ－ｔｅｒｔ－ブチル　マロネート（１．２０ｇ，５．５６ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（２６ｍＬ）に溶解し、氷冷下、６０％水素化ナトリウム（０．２２ｇ，５．５６ｍｍｏｌ）を加え、１５分間攪拌した。室温で１０分間攪拌したのち、製造例３で得た化合物（２．２２ｇ，５．２９ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（３ｍＬ）溶液を加えた。室温で１８時間攪拌したのち、水を加えジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シクロヘキサン／ジエチルエーテル）にて精製し、標記化合物（１．７９ｇ，３．３９ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，６Ｈ），１．２６（ｂｒ　ｓ，１２Ｈ），１．２７－１．３４（ｍ，１３Ｈ），１．４６（ｓ，１３Ｈ），１．４８（ｓ，８Ｈ），１．５４－１．６４（ｍ，５Ｈ），１．７９（ｂｒ　ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），２．２８（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），３．１１（ｔ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），３．１９（ｓ，１Ｈ），３．４１（ｓ，１Ｈ），４．０８（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ）．

【０１４７】

（２）９，９－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル　１－（３－ペンチルオクチル）オクタデカン－１，９，９－トリカルボキシレートの合成

実施例Ａ－４－（１）で得られた化合物（０．９６ｇ，１．７２ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（７．６ｍＬ）に溶解し、氷冷下、６０％水素化ナトリウム（０．０７６ｇ，１．８９ｍｍｏｌ）を加え、２０分間攪拌した。室温で２０分間攪拌したのち、１－ヨードノナン（０．４４ｇ，１．７２ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（２ｍＬ）溶液を加えた。６時間加熱還流したのち、水を加えジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグ

ネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シクロヘキサン／ジエチルエーテル）にて精製し、標記化合物（０．５９ｇ，０．８６ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８３－０．９４（ｍ，１２Ｈ），１．１３（ｂｒ　ｓ，６Ｈ），１．２７（ｂｒ　ｄ，Ｊ＝１６．５Ｈｚ，４３Ｈ），１．３１－１．３６（ｍ，４Ｈ），１．４１－１．４８（ｍ，２８Ｈ），１．５１－１．６５（ｍ，５Ｈ），１．７０－１．８５（ｍ，６Ｈ），２．２２－２．３４（ｍ，２Ｈ），４．０２－４．１５（ｍ，２Ｈ）．

【０１４８】

（３）２－ノニル－１１－オキソ－１１－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ウンデカン酸の合成

実施例Ａ－１－（３）の方法に準じ、実施例Ａ－４－（２）で得られた化合物（０．５９ｇ，０．８６ｍｍｏｌ）、塩化メチレン（２ｍＬ）、ＴＦＡ（１ｍＬ）およびキシレン（２ｍＬ）から標記化合物（０．１８ｇ，０．３５ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８４－０．９２（ｍ，９Ｈ），１．１７－１．３３（ｍ，４２Ｈ），１．３６－１．５１（ｍ，４Ｈ），１．５４－１．６６（ｍ，６Ｈ），２．２４－２．３７（ｍ，３Ｈ），４．０９（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ）．

【０１４９】

（４）３－ペンチルオクチル　１０－（ヒドロキシメチル）ノナデカノエートの合成

製造例２－（１）の方法に準じ、実施例Ａ－４－（３）で得た化合物（０．０９３ｇ，０．１８ｍｍｏｌ）、ボラン－ＴＨＦ錯体（１Ｍ，０．３５ｍＬ，０．３５ｍｍｏｌ）、ボラン－ＴＨＦ錯体（１Ｍ，０．５３ｍＬ，０．５３ｍｍｏｌ）およびＴＨＦ（２．０ｍＬ）から標記化合物（０．０６８ｇ，０．１４ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８７－０．９０（ｍ，１０Ｈ），１．２７（ｂｒ　ｄｄ，Ｊ＝１１．４，７．３Ｈｚ，５２Ｈ），１．４０－１．４６（ｍ，７Ｈ），１．５６－１．６３（ｍ，４Ｈ），２．２８（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），３．５３（ｄ，Ｊ＝５．５Ｈｚ，２Ｈ），４．０８（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ）．

【０１５０】

（５）２－ノニル－１１－オキソ－１１－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ウンデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレートの合成

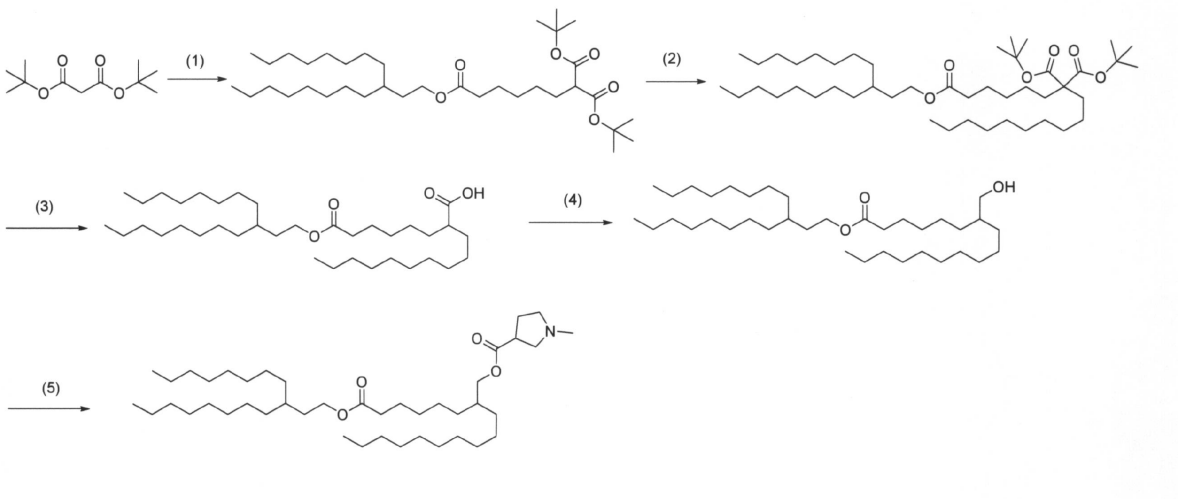
実施例Ａ－４－（４）で得た化合物（０．０６９ｇ，０．１３ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．０４７ｍＬ，０．２７ｍｍｏｌ）、１－メチルピロリジン－３－カルボン酸　塩酸塩（０．０４４ｇ，０．２７ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（３ｍｇ，０．０３ｍｍｏｌ）を塩化メチレン（１ｍＬ）およびＴＨＦ（１ｍＬ）に溶解し、ＥＤＣ・ＨＣｌ（０．０５７ｇ，０．３０ｍｍｏｌ）を加え、室温で１８時間撹拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル／メタノール）にて精製し、標記化合物（０．０４６ｇ，０．０７２ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，３Ｈ），０．８９（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，６Ｈ），１．１９－１．３３（ｍ，４６Ｈ），１．４１（ｂｒ　ｓ，１Ｈ），１．５８（ｑ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），１．６０－１．６６（ｍ，３Ｈ），１．７０（ｂｒ　ｓ，１Ｈ），２．０７－２．１７（ｍ，２Ｈ），２．２９（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），２．３６（ｓ，３Ｈ），２．５０（ｑ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，１Ｈ），２．５８－２．６９（ｍ，２Ｈ），２．８５（ｔ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，１Ｈ），３．０５（ｔｔ，Ｊ＝８．８，６．７Ｈｚ，１Ｈ），３．９９（ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ，２Ｈ），４．０９（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ）．

【０１５１】

＜カチオン性脂質の合成（５）＞

［実施例Ａ－５］

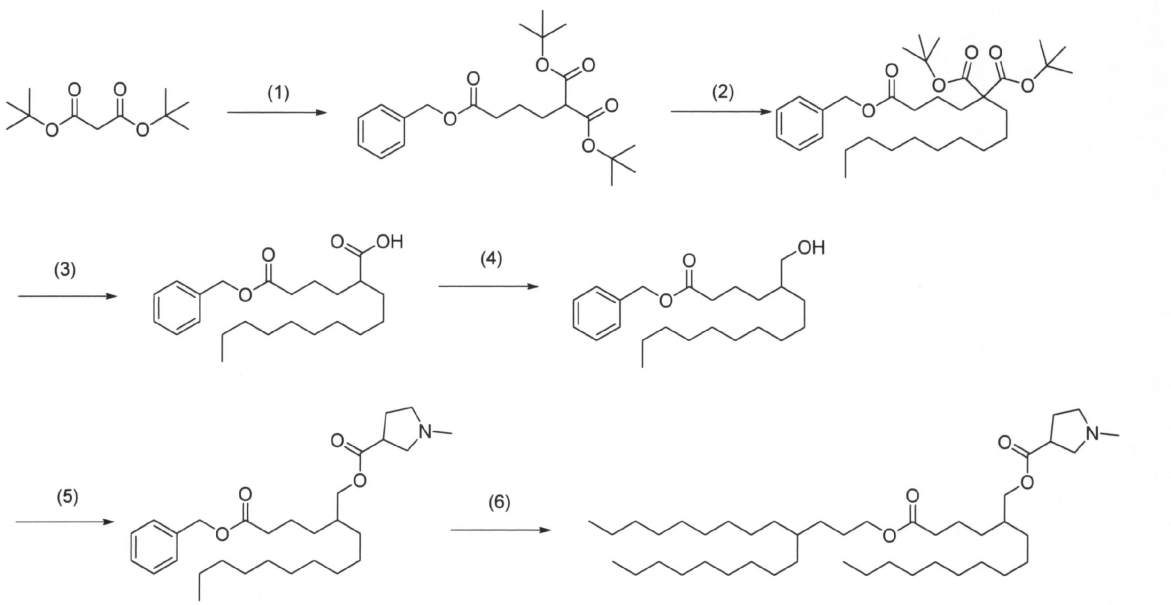
２－｛６－［（３－オクチルウンデシル）オキシ］－６－オキソヘキシル｝ドデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレートの合成
（カチオン性脂質５）
【化３７】



【０１５２】
（１）１，１－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル　６－（３－オクチルウンデシル）ヘキサン－１，１，６－トリカルボキシレートの合成
　６０％水素化ナトリウム（０．４３ｇ，１０．６２ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（２１ｍＬ）に懸濁させ、氷冷下、ジ－ｔｅｒｔ－ブチル　マロネート（２．４ｍＬ，１０．６ｍｍｏｌ）を滴下した。３０分かけて室温まで昇温したのち、氷冷下、製造例５で得た化合物（４．６７ｇ，１０．１２ｍｍｏｌ）とヨウ化ナトリウム（０．１５ｇ，１．０１ｍｍｏｌ）を加え、室温で１８時間攪拌した。反応混合物に水を加え、ジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シクロヘキサン／ジエチルエーテル）にて精製し、標記化合物（２．９ｇ，５．１０ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８８（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，６Ｈ），１．１９－１．３１（ｍ，３１Ｈ），１．３１－１．３６（ｍ，５Ｈ），１．４１－１．５１（ｍ，２６Ｈ），１．５５－１．５８（ｍ，２Ｈ），１．５９－１．６７（ｍ，２Ｈ），１．７９（ｑ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），２．２７（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），３．１０（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，１Ｈ），４．０７（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ）．
【０１５３】
（２）６，６－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル　１－（３－オクチルウンデシル）ヘキサデカン－１，６，６－トリカルボキシレートの合成
　実施例Ａ－４－（２）の方法に準じ、実施例Ａ－５－（１）で得られた化合物（２．２５ｇ，３．７８ｍｍｏｌ）、１－ヨードデカン（１．０ｇ，３．７８ｍｍｏｌ）、６０％水素化ナトリウム（０．１７ｇ，４．１５ｍｍｏｌ）およびＴＨＦ（１６．７ｍＬ）から標記化合物（０．９９ｇ，１．３２ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．０１（ｓ，１Ｈ），０．８９（ｔｄ，Ｊ＝７．１，２．８Ｈｚ，９Ｈ），１．０６－１．２３（ｍ，６Ｈ），１．２６（ｂｒ　ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，３４Ｈ），１．３０－１．３７（ｍ，５Ｈ），１．４０（ｂｒ　ｓ，１Ｈ），１．４２－１．４９（ｍ，１８Ｈ），１．５２－１．６５（ｍ，６Ｈ），１．７１－１．８５（ｍ，４Ｈ），２．２８（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），４．０８（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ）．
【０１５４】

（３）２－｛６－［（３－オクチルウンデシル）オキシ］－６－オキソヘキシル｝ドデカン酸の合成
実施例Ａ－１－（３）の方法に準じ、実施例Ａ－５－（２）で得られた化合物（０．９９ｇ，１．３４ｍｍｏｌ）、塩化メチレン（３ｍＬ）、ＴＦＡ（１．４ｍＬ）からジカルボン酸の粗生成物（１．０１ｇ）を得た。得られた粗生成物（０．８４ｇ）およびキシレン（３ｍＬ）から標記化合物（０．３１ｇ，０．５５ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１１Ｈ），１．２３－１．３６（ｍ，６０Ｈ），１．４０（ｂｒ　ｓ，１Ｈ），１．４８（ｂｒ　ｄｄ，Ｊ＝１３．８，６．１Ｈｚ，２Ｈ），１．５６－１．６６（ｍ，７Ｈ），２．２９（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），２．３３－２．３６（ｍ，１Ｈ），４．０９（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ）．
【０１５５】
（４）３－オクチルウンデシル　７－（ヒドロキシメチル）ヘプタデカノエートの合成
製造例２－（１）の方法に準じ、実施例Ａ－５－（３）で得た化合物（０．３１ｇ，０．５４ｍｍｏｌ）、ボラン－ＴＨＦ錯体（１Ｍ，１．１ｍＬ，１．１ｍｍｏｌ）およびＴＨＦ（６．０ｍＬ）から標記化合物（０．１９ｇ，０．３３ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１０Ｈ），１．２２－１．３７（ｍ，５５Ｈ），１．４０（ｂｒ　ｓ，１Ｈ），１．４３－１．４７（ｍ，１Ｈ），１．５７（ｑ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，３Ｈ），１．６１－１．７０（ｍ，２Ｈ），２．２９（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），３．５４（ｄ，Ｊ＝５．５Ｈｚ，２Ｈ），４．０９（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ）．
【０１５６】
（５）２－｛６－［（３－オクチルウンデシル）オキシ］－６－オキソヘキシル｝ドデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレートの合成
実施例Ａ－４－（５）の方法に準じ、実施例Ａ－５－（４）で得た化合物（０．１９ｇ，０．３３ｍｍｏｌ）、１－メチルピロリジン－３－カルボン酸　塩酸塩（０．１１ｇ，０．６７ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ・ＨＣｌ（０．１４ｇ，０．７３ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．１１６ｍＬ，０．６７ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（８ｍｇ，０．０７ｍｍｏｌ）および塩化メチレン（１．５ｍＬ）から標記化合物（０．０５５ｇ，０．０８３ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，９Ｈ），１．２０－１．３４（ｍ，５３Ｈ），１．４０（ｂｒ　ｓ，１Ｈ），１．５７（ｑ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，２Ｈ），１．６１－１．６６（ｍ，３Ｈ），２．０５－２．１７（ｍ，２Ｈ），２．２９（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），２．３７（ｓ，３Ｈ），２．４５－２．５６（ｍ，１Ｈ），２．６４（ｄｄ，Ｊ＝９．５，７．０Ｈｚ，１Ｈ），２．６８（ｄｔ，Ｊ＝９．１，６．５Ｈｚ，１Ｈ），２．９０（ｔ，Ｊ＝８．８Ｈｚ，１Ｈ），３．０６（ｑｕｉｎ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，１Ｈ），３．９９（ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ，２Ｈ），４．０８（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ）．
【０１５７】
＜カチオン性脂質の合成（６）＞
［実施例Ａ－６］
２－｛４－［（４－ノニルトリデシル）オキシ］－４－オキソブチル｝ドデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレートの合成（カチオン性脂質６）

【化３８】



【０１５８】

（１）４－ベンジル １，１－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル ブタン－１，１，４－トリカルボキシレートの合成

実施例Ａ－４－（１）の方法に準じ、ジ－ｔｅｒｔ－ブチル マロネート（２．６５ｇ，１２．２５ｍｍｏｌ）、ＴＨＦ（５８ｍＬ）、６０％水素化ナトリウム（０．４９ｇ，１２．２５ｍｍｏｌ）および製造例６で得た化合物（３．００ｇ，１１．６７ｍｍｏｌ）から標記化合物（２．９３ｇ，７．４６ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：１．４３－１．４８（ｍ，２０Ｈ），１．６６－１．７２（ｍ，２Ｈ），１．８２－１．８６（ｍ，２Ｈ），２．４０（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），３．１３（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，１Ｈ），５．１２（ｓ，２Ｈ），７．３１－７．３８（ｍ，５Ｈ）．

【０１５９】

（２）１－ベンジル ４，４－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル テトラデカン－１，４，４－トリカルボキシレートの合成

実施例Ａ－６－（１）で得られた化合物（２．９３ｇ，７．４６ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（３８ｍＬ）に溶解し、氷冷下、６０％水素化ナトリウム（０．３１ｇ，７．８３ｍｍｏｌ）を加え、１時間攪拌した。１－ヨードデカン（２．１０ｇ，７．８３ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（５ｍＬ）溶液を加え、終夜加熱還流した。水を加えジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シクロヘキサン／ジエチルエーテル）にて精製し、標記化合物（２．５９ｇ，４．８５ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，３Ｈ），１．０９－１．２０（ｍ，２Ｈ），１．２２－１．３３（ｍ，１５Ｈ），１．４５（ｓ，１８Ｈ），１．４８－１．５６（ｍ，２Ｈ），１．５９（ｓ，１Ｈ），１．７６－１．８４（ｍ，４Ｈ），２．３７（ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），５．１２（ｓ，２Ｈ），７．３２－７．３８（ｍ，５Ｈ）．

【０１６０】

（３）２－［４－（ベンジロキシ）－４－オキソブチル］ドデカン酸の合成

実施例Ａ－１－（３）の方法に準じ、実施例Ａ－６－（２）で得られた化合物（２．５９ｇ，４．８７ｍｍｏｌ）、塩化メチレン（１１ｍＬ）およびＴＦＡ（５ｍＬ）からジカルボン酸の粗生成物（２．３４ｇ）を得た。得られた粗生成物（２．０５ｇ）およびキシレン（１１ｍＬ）から標記化合物（１．５８ｇ，４．２１ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，３Ｈ），１．０７－１．２２（ｍ，１Ｈ），１．２４－１．３２（ｍ，１６Ｈ），１．４１－１．５７（ｍ，２Ｈ），１．６０－１．７４（ｍ，４Ｈ），２．３４－２．４１（ｍ，３Ｈ），５．１０－５．１５（ｍ，２Ｈ），７．３１－７．４０（ｍ，５Ｈ）．

【０１６１】

（４）２－｛４－［（４－ノニルトリデシル）オキシ］－４－オキソブチル｝ドデシル１－メチルピロリジン－３－カルボキシレートの合成

製造例２－（１）の方法に準じ、実施例Ａ－６－（３）で得た化合物（１．５８ｇ，４．２１ｍｍｏｌ）、ボラン－ＴＨＦ錯体（１Ｍ，８．４ｍＬ，８．４ｍｍｏｌ）およびＴＨＦ（４８ｍＬ）から標記化合物（１．２９ｇ，３．５４ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，３Ｈ），１．２４－１．３４（ｍ，２２Ｈ），１．３５－１．４２（ｍ，２Ｈ），１．４６－１．５０（ｍ，１Ｈ），１．６７（ｑｕｉｎ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，３Ｈ），２．３６－２．３９（ｍ，２Ｈ），３．５１－３．５８（ｍ，２Ｈ），５．１３（ｓ，２Ｈ），７．３２－７．３９（ｍ，５Ｈ）．

【０１６２】

（５）２－［４－（ベンジロキシ）－４－オキソブチル］ドデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレートの合成

実施例Ａ－４－（５）の方法に準じ、実施例Ａ－６－（４）で得た化合物（０．５０ｇ，１．４ｍｍｏｌ）、１－メチルピロリジン－３－カルボン酸　塩酸塩（０．４６ｇ，２．７６ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ・ＨＣｌ（０．５８ｇ，３．０３ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．４８ｍＬ，２．７６ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（３４ｍｇ，０．２８ｍｍｏｌ）および塩化メチレン（２ｍＬ）から標記化合物（０．３３ｇ，０．７１ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８８（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，３Ｈ），１．２３－１．３６（ｍ，２３Ｈ），１．４２（ｓ，５Ｈ），１．６３－１．６９（ｍ，３Ｈ），１．８５（ｄｔ，Ｊ＝６．３，３．３Ｈｚ，１Ｈ），２．０６－２．１１（ｍ，２Ｈ），２．３３－２．３６（ｍ，６Ｈ），２．４９（ｑ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），２．５９－２．６４（ｍ，２Ｈ），２．８２（ｔ，Ｊ＝８．８Ｈｚ，１Ｈ），２．９４（ｓ，１Ｈ），３．０２（ｂｒ　ｔ，Ｊ＝８．３Ｈｚ，１Ｈ），３．７４（ｂｒ　ｔ，Ｊ＝６．２Ｈｚ，１Ｈ），３．９６－４．００（ｍ，２Ｈ），５．１１（ｓ，２Ｈ），７．３１－７．３７（ｍ，５Ｈ）．

【０１６３】

（６）２－｛４－［（４－ノニルトリデシル）オキシ］－４－オキソブチル｝ドデシル１－メチルピロリジン－３－カルボキシレートの合成

実施例Ａ－１－（６）に準じ、実施例Ａ－６－（５）で得た化合物（０．１８ｇ，０．３７ｍｍｏｌ）、１０％パラジウム／炭素（０．２０ｇ，５０％含水）および酢酸エチル（９ｍＬ）からカルボン酸の粗生成物（０．１５ｇ）を得た。

得られたカルボン酸（０．０８６ｇ，０．２３ｍｍｏｌ）、製造例７－（７）で得た化合物（０．０５０ｇ，０．１６ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ・ＨＣｌ（０．０８６ｇ，０．４５ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．０７４ｍＬ，０．４５ｍｍｏｌ）および塩化メチレン（１．０ｍＬ）から標記化合物（９ｍｇ，０．０１４ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８９（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，９Ｈ），１．２１－１．３７（ｍ，５７Ｈ），１．５７－１．７０（ｍ，７Ｈ），２．０６－２．１５（ｍ，２Ｈ），２．３０（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），２．３６（ｓ，３Ｈ），２．４５－２．５７（ｍ，１Ｈ），２．６４（ｄｄｄ，Ｊ＝９．４，６．８，２．９Ｈｚ，２Ｈ），２．８５（ｔ，Ｊ＝８．８Ｈｚ，１Ｈ），３．００－３．０８（ｍ，１Ｈ），３．９７－４．０７（ｍ，４Ｈ）．

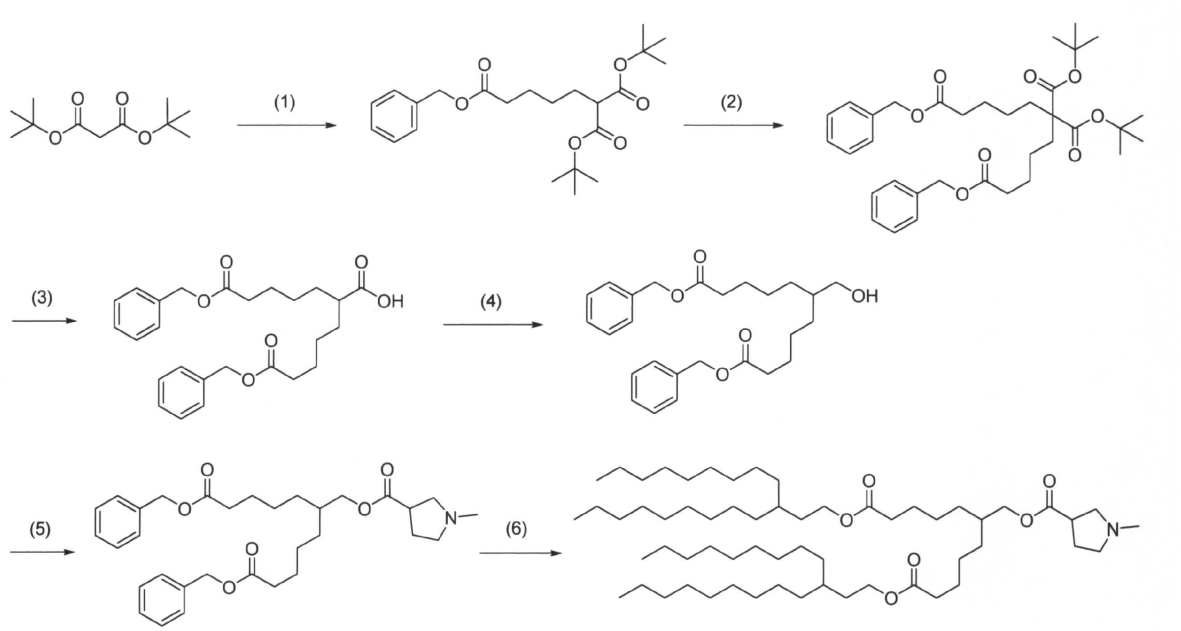
【０１６４】

＜カチオン性脂質の合成（７）＞

［実施例Ａ－７］

ビス（３－ノニルドデシル）　６－｛［（１－メチルピロリジン－３－カルボニル）オキシ］メチル｝ウンデカンジオエートの合成（カチオン性脂質７）

【化３９】



【０１６５】

（１）５－ベンジル　１，１－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル　ペンタン－１，１，５－トリカルボキシレートの合成

実施例Ａ－４－（１）の方法に準じ、ジ－ｔｅｒｔ－ブチル　マロネート（２．３４ｇ，１０．８４ｍｍｏｌ）、ＴＨＦ（５２ｍＬ）、６０％水素化ナトリウム（０．２６ｇ，１０．８ｍｍｏｌ）および製造例８で得た化合物（２．８ｇ，１０．３ｍｍｏｌ）から標記化合物（２．０９ｇ，５．７７ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：１．２６－１．４１（ｍ，３Ｈ），１．４３－１．４９（ｍ，２０Ｈ），１．５５－１．６０（ｍ，１Ｈ），１．６９（ｑｕｉｎ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，２Ｈ），１．７８－１．８６（ｍ，２Ｈ），２．３７（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），３．１１（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，１Ｈ），５．１１（ｓ，２Ｈ），７．３１－７．４０（ｍ，５Ｈ）．

【０１６６】

（２）１，９－ジベンジル　５，５－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル　ノナン－１，５，５，９－テトラカルボキシレートの合成

実施例Ａ－７－（１）で得た化合物（２．０９ｇ，５．１４ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（２３ｍＬ）に溶解し、室温で、６０％水素化ナトリウム（０．２３ｇ，５．６６ｍｍｏｌ）およびヨウ化ナトリウム（０．０７７ｇ，０．５１ｍｍｏｌ）を順次加え、３０分間攪拌した。反応混合物に製造例８で得た化合物（１．３９ｇ，５．１４ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（２ｍＬ）溶液を加え、６５℃で加熱した。３日後、氷水を加えジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジエチルエーテル／ｎ－ペンタン）にて精製し、標記化合物（２．２７ｇ，３．８０ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：１．１３－１．２０（ｍ，４Ｈ），１．４２（ｓ，１７Ｈ），１．５８－１．７０（ｍ，４Ｈ），１．７４－１．８０（ｍ，４Ｈ），２．３５（ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，４Ｈ），５．１０（ｓ，４Ｈ），７．２９－７．３９（ｍ，１０Ｈ）．

【０１６７】

（３）７－（ベンジロキシ）－２－［５－（ベンジロキシ）－５－オキソペンチル］－７

－オキソペンタン酸の合成
実施例Ａ－１－（３）の方法に準じ、実施例Ａ－７－（２）で得られた化合物（２．２７ｇ，３．８０ｍｍｏｌ）、塩化メチレン（９ｍＬ）およびＴＦＡ（４．１ｍＬ）からジカルボン酸の粗生成物（２．０２ｇ）を得た。得られた粗生成物およびキシレン（１０ｍＬ）から標記化合物（１．４７ｇ，３．３４ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：１．２７－１．４１（ｍ，５Ｈ），１．４２－１．５０（ｍ，６Ｈ），１．５９－１．７０（ｍ，７Ｈ），２．３１－２．４０（ｍ，５Ｈ），５．１２（ｓ，４Ｈ），７．３１－７．３８（ｍ，１０Ｈ）．
【０１６８】
（４）ジベンジル　６－（ヒドロキシメチル）ウンデカンジオエートの合成
製造例２－（１）の方法に準じ、実施例Ａ－７－（３）で得た化合物（１．４７ｇ，３．３３ｍｍｏｌ）、ボラン－ＴＨＦ錯体（１Ｍ，６．７ｍＬ、６．７ｍｍｏｌ）およびＴＨＦ（３８ｍＬ）から標記化合物（１．１４ｇ，２．７０ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：１．２４－１．３８（ｍ，１０Ｈ），１．４２－１．４７（ｍ，３Ｈ），１．６５（ｑｕｉｎ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，４Ｈ），１．７１（ｂｒ　ｓ，１Ｈ），２．３７（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，４Ｈ），３．５０（ｂｒ　ｄ，Ｊ＝４．０Ｈｚ，２Ｈ），５．１２（ｓ，４Ｈ），７．３１－７．３９（ｍ，７Ｈ）．
【０１６９】
（５）ジベンジル　６－｛［（１－メチルピロリジン－３－カルボニル）オキシ）メチル］ウンデカンジオエートの合成
実施例Ａ－４－（５）の方法に準じ、実施例Ａ－７－（４）で得た化合物（１．１４ｇ，２．６８ｍｍｏｌ）、１－メチルピロリジン－３－カルボン酸　塩酸塩（０．８９ｇ，５．３６ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ・ＨＣｌ（１．１３ｇ，５．９０ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．９３ｍＬ，５．３６ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（０．０６６ｇ，０．５４ｍｍｏｌ）および塩化メチレン（１２ｍＬ）から標記化合物（０．５６ｇ，１．０５ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：１．２６－１．３８（ｍ，９Ｈ），１．５９－１．７０（ｍ，５Ｈ），１．８１（ｂｒ　ｓ，１Ｈ），２．０６－２．１４（ｍ，２Ｈ），２．３４－２．４０（ｍ，７Ｈ），２．４７－２．５５（ｍ，１Ｈ），２．５８－２．６８（ｍ，２Ｈ），２．８４（ｔ，Ｊ＝８．８Ｈｚ，１Ｈ），３．０４（ｑｕｉｎ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），３．９８（ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ，２Ｈ），５．１３（ｓ，４Ｈ），５．３２（ｓ，１Ｈ），７．２８（ｓ，１Ｈ），７．３２－７．４０（ｍ，１０Ｈ）．
【０１７０】
（６）ビス（３－ノニルドデシル）　６－｛［（１－メチルピロリジン－３－カルボニル）オキシ）メチル］ウンデカンジオエートの合成
実施例Ａ－１－（６）に準じ、実施例Ａ－７－（５）で得た化合物（０．５６ｇ，１．０３ｍｍｏｌ）、１０％パラジウム／炭素（０．５５ｇ，５０％含水）および酢酸エチル（２７ｍＬ）からジカルボン酸の粗生成物（０．２４ｇ）を得た。
得られたカルボン酸（０．０５５ｇ，０．１５ｍｍｏｌ）、製造例７－（３）で得た化合物（０．０９６ｇ，０．３１ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ・ＨＣｌ（０．１１８ｇ，０．６２ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．１１ｍＬ，０．６２ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（４ｍｇ，０．０３１ｍｍｏｌ）および塩化メチレン（０．７ｍＬ）から標記化合物（０．０２９ｇ，０．０３０ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８８（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１３Ｈ），１．１２－１．４５（ｍ，８４Ｈ），１．４８－１．７０（ｍ，１２Ｈ），２．０９（ｑ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），２．２８（ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，４Ｈ），２．３６（ｓ，３Ｈ），２．４５－２．５７（ｍ，１Ｈ），２．６３（ｂｒ　ｄｄ，Ｊ＝８．９，６．９Ｈｚ，２Ｈ），２．８３（ｂｒ　ｔ，Ｊ＝８．６Ｈｚ，１Ｈ），３．０３（ｑｕｉｎ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），３．９４－４．０２（ｍ，２Ｈ），４．０７（ｔ，

Ｊ＝７．２Ｈｚ，４Ｈ）．

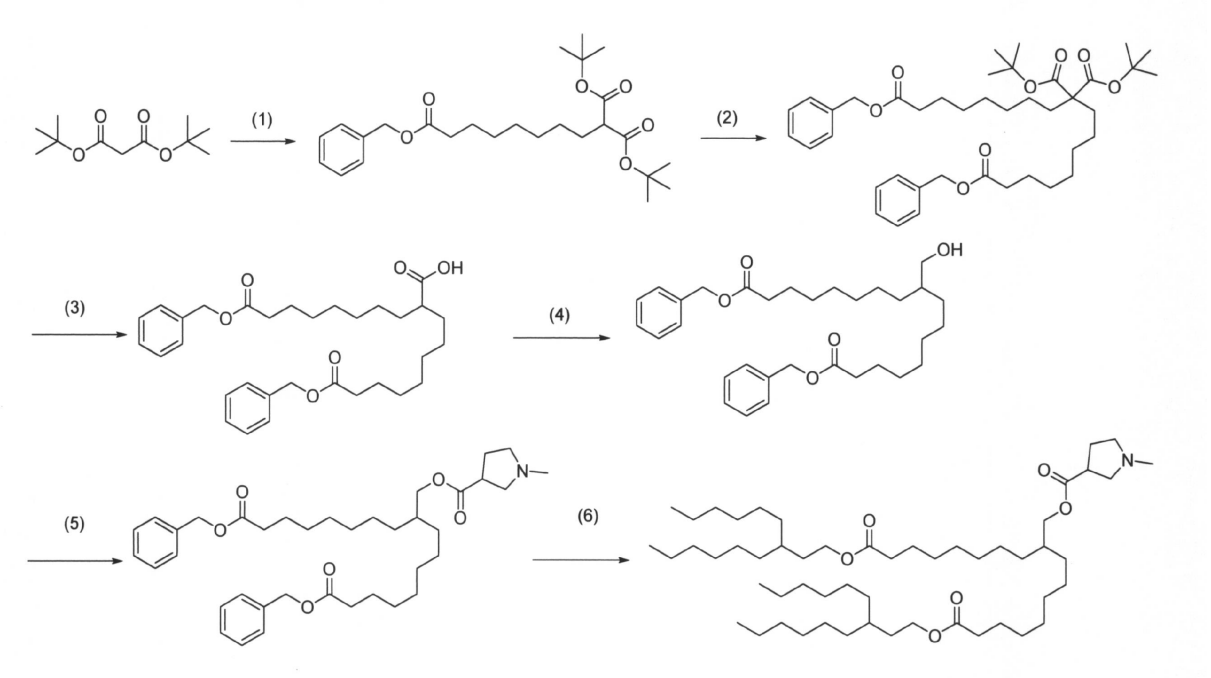
【０１７１】

＜カチオン性脂質の合成（８）＞

［実施例Ａ－８］

ビス（３－ペンチルオクチル）　９－｛［（１－メチルピロリジン－４－カルボニル）オキシ］メチル｝ヘプタデカンジオエートの合成（カチオン性脂質８）

【化４０】



【０１７２】

（１）８－ベンジル １，１－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル オクタン－１，１，８－トリカルボキシレートの合成

実施例Ａ－５－（１）の方法に準じ、ジ－ｔｅｒｔ－ブチル　マロネート（１．５ｍＬ，６．７０ｍｍｏｌ）、製造例１０で得た化合物（２．０ｇ，６．３９ｍｍｏｌ）、６０％水素化ナトリウム（０．２７ｇ，６．７０ｍｍｏｌ）、ヨウ化ナトリウム（０．０９６ｇ，０．６４ｍｍｏｌ）およびＴＨＦ（６０ｍＬ）から標記化合物（１．６０ｇ，３．５７ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：１．２３－１．３６（ｍ，８Ｈ），１．４５（ｓ，１８Ｈ），１．５８－１．６９（ｍ，２Ｈ），１．７２－１．８４（ｍ，２Ｈ），２．３０－２．４０（ｍ，２Ｈ），３．０５－３．１５（ｍ，１Ｈ），５．１１（ｓ，２Ｈ），７．２８－７．４１（ｍ，５Ｈ）．

【０１７３】

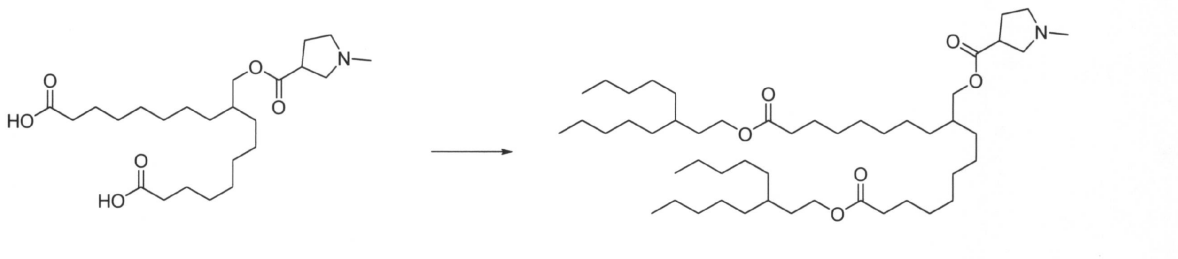
（２）１，１５－ジベンジル ８，８－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル ペンタデカン－１，８，８，１５－テトラカルボキシレートの合成

実施例Ａ－７－（２）の方法に準じ、実施例Ａ－８－（１）で得られた化合物（１．６ｇ，３．５７ｍｍｏｌ）、製造例１０で得た化合物（１．１７ｇ，３．７５ｍｍｏｌ）、ヨウ化ナトリウム（０．０５３ｇ，０．３６ｍｍｏｌ）、６０％水素化ナトリウム（０．１６ｇ，４．０ｍｍｏｌ）およびＴＨＦ（１５ｍＬ）から標記化合物（１．４ｇ，２．０７ｍｍｏｌ）を得た。

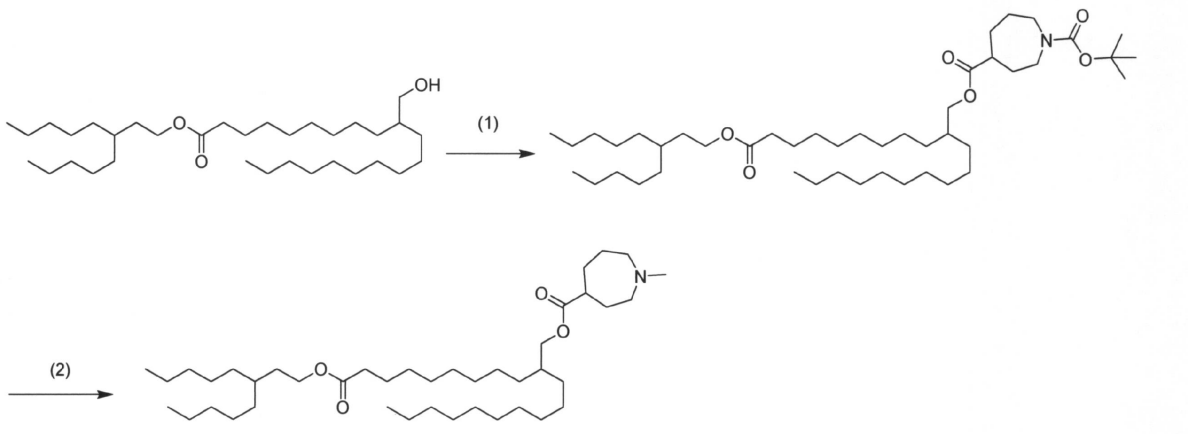
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：１．０３－１．１７（ｍ，４Ｈ），１．２３－１．３６（ｍ，１２Ｈ），１．４３（ｓ，１８Ｈ），１．５６－１．６８（ｍ，４Ｈ），１．７０－１．８０（ｍ，４Ｈ），２．２９－２．３８（ｍ，４Ｈ），５．１１（ｓ，４Ｈ），７．２７－７．４１（ｍ，１０Ｈ）．

【０１７４】
（３）１０－（ベンジロキシ）－２－［８－（ベンジロキシ）－８－オキソオクチル］－１０－オキソデカン酸の合成
実施例Ａ－１－（３）の方法に準じ、実施例Ａ－８－（２）で得られた化合物（１．４０ｇ，２．０６ｍｍｏｌ）、塩化メチレン（１０ｍＬ）およびＴＦＡ（２．４ｍＬ）からジカルボン酸の粗生成物（１．１７ｇ）を得た。得られた粗生成物およびキシレン（２５ｍＬ）から標記化合物（０．８３ｇ，１．６１ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：１．１８－１．３７（ｍ，１６Ｈ），１．３８－１．７１（ｍ，８Ｈ），２．２６－２．４１（ｍ，５Ｈ），５．１１（ｓ，４Ｈ），７．２８－７．４３（ｍ，１０Ｈ）．
【０１７５】
（４）ジベンジル　９－（ヒドロキシメチル）ヘプタデカンジオエートの合成
製造例２－（１）の方法に準じ、実施例Ａ－８－（３）で得た化合物（０．８３ｇ，１．５９ｍｍｏｌ）、ボラン－ＴＨＦ錯体（１Ｍ，４．０ｍＬ、４．０ｍｍｏｌ）およびＴＨＦ（６．０ｍＬ）から標記化合物（０．７２ｇ，１．４３ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：１．１２－１．５１（ｍ，２２Ｈ），１．５６－１．７２（ｍ，４Ｈ），２．２９－２．４１（ｍ，４Ｈ），３．４７－３．５８（ｍ，２Ｈ），５．１１（ｓ，４Ｈ），７．２８－７．４４（ｍ，１０Ｈ）．
【０１７６】
（５）ジベンジル　９－｛［（１－メチルピロリジン－３－カルボニル）オキシ）メチル］ヘプタデカンジオエートの合成
実施例Ａ－４－（５）の方法に準じ、実施例Ａ－８－（４）で得た化合物（０．７３ｇ，１．４３ｍｍｏｌ）、１－メチルピロリジン－３－カルボン酸　塩酸塩（０．３６ｇ，２．１４ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ・ＨＣｌ（０．４３８ｇ，２．２９ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．３７ｍＬ，２．１４ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（０．０３５ｇ，０．２９ｍｍｏｌ）および塩化メチレン（６ｍＬ）から標記化合物（０．８１ｇ，１．３０ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：１．１３－１．３５（ｍ，２２Ｈ），１．５８－１．６９（ｍ，５Ｈ），２．０４－２．１４（ｍ，２Ｈ），２．２９－２．３９（ｍ，７Ｈ），２．４３－２．５４（ｍ，１Ｈ），２．５７－２．６７（ｍ，２Ｈ），２．８４（ｔ，Ｊ＝８．８Ｈｚ，１Ｈ），２．９９－３．０８（ｍ，１Ｈ），３．９７（ｄ，Ｊ＝５．７Ｈｚ，２Ｈ），５．１１（ｓ，４Ｈ），７．２９－７．４０（ｍ，９Ｈ）．
【０１７７】
（６）ビス（３－ヘキシルノニル）　９－｛［（１－メチルピロリジン－３－カルボニル）オキシ）メチル］ヘプタデカンジオエートの合成
実施例Ａ－１－（６）に準じ、実施例Ａ－８－（５）で得た化合物（０．８１ｇ，１．３０ｍｍｏｌ）、１０％パラジウム／炭素（０．０２８ｇ，５０％含水）および酢酸エチル（１５ｍＬ）からジカルボン酸の粗生成物（０．６６ｇ）を得た。
得られたジカルボン酸（０．１０ｇ，０．２３ｍｍｏｌ）、製造例９－（２）で得た化合物（０．１２４ｇ，０．５４ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ・ＨＣｌ（０．１１３ｇ，０．５９ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．１０ｍＬ，０．５９ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（６ｍｇ，０．０５０ｍｍｏｌ）および塩化メチレン（５ｍＬ）から標記化合物（０．０７７ｇ，０．０９０ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８８（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１３Ｈ），１．１８－１．３５（ｍ，６４Ｈ），１．３７－１．４２（ｍ，２Ｈ），１．５２－１．６６（ｍ，９Ｈ），２．０６－２．１３（ｍ，２Ｈ），２．２５－２．３２（ｍ，４Ｈ），２．３６（ｓ，３Ｈ），２．４５－２．５３（ｍ，１Ｈ），２．５９－２．６６（ｍ，２Ｈ），２．８５（ｔ，Ｊ＝８．８Ｈｚ，１Ｈ），３．００－３．０８（ｍ，１Ｈ），３．９８（ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ，２Ｈ），４．０８（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，４Ｈ）．

【０１７８】
＜カチオン性脂質の合成（９）＞
［実施例Ａ－９］
ビス（３－ペンチルオクチル）　９－｛［（１－メチルピロリジン－３－カルボニル）オキシ］メチル｝ヘプタデカンジオエートの合成（カチオン性脂質９）
【化４１】



【０１７９】
実施例Ａ－１－（６）に準じ、実施例Ａ－８－（６）で得たジカルボン酸（０．１０ｇ，０．２３ｍｍｏｌ）、３－ペンチルオクタン－１－オール（ＣＡＳ　１４４３５１９－６３－８）（０．１１ｇ，０．５４ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ・ＨＣｌ（０．１１ｇ，０．５９ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．１０ｍＬ，０．５９ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（６ｍｇ，０．０５０ｍｍｏｌ）および塩化メチレン（５ｍＬ）から標記化合物（０．０８９ｇ，０．１１ｍｍｏｌ）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：０．８８（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，１３Ｈ），１．１７－１．３４（ｍ，５６Ｈ），１．３７－１．４３（ｍ，２Ｈ），１．５３－１．６９（ｍ，１０Ｈ），２．０６－２．１４（ｍ，２Ｈ），２．２８（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，４Ｈ），２．３６（ｓ，３Ｈ），２．４５－２．５３（ｍ，１Ｈ），２．５８－２．６６（ｍ，２Ｈ），２．８４（ｔ，Ｊ＝８．９Ｈｚ，１Ｈ），３．００－３．０８（ｍ，１Ｈ），３．９８（ｄ，Ｊ＝５．７Ｈｚ，２Ｈ），４．０８（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，４Ｈ）．
【０１８０】
＜カチオン性脂質の合成（１０）＞
［比較例Ａ’－１］
２－｛９－オキソ－９－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ノニル｝ドデシル　１－メチルアゼパン－４－カルボキシレートの合成（カチオン性脂質１０）
【化４２】



【０１８１】
（１）１－ｔｅｒｔ－ブチル　４－（２－｛９－オキソ－９－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ノニル｝ドデシル）　アゼパン－１，４－ジカルボキシレートの合成

実施例Ａ－１－（８）の方法に準じ、実施例Ａ－１－（７）で得た化合物（６０ｍｇ，０．１１ｍｍｏｌ）、１－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アゼパン－４－カルボン酸（５６ｍｇ，０．２３ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ・ＨＣｌ（４８ｍｇ，０．２５ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．０３９ｍＬ，０．２３ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（２．８ｍｇ，０．０２３ｍｍｏｌ）および塩化メチレン（０．８０ｍＬ）から標記化合物（８１ｍｇ，０．１１ｍｍｏｌ）を得た。

【０１８２】

（２）２－｛９－オキソ－９－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ノニル｝ドデシル１－メチルアゼパン－４－カルボキシレートの合成

実施例Ａ－２－（２）の方法に準じ、比較例Ａ’－１（１）で得られた化合物（８１ｍｇ，０．１１ｍｍｏｌ）、ＴＦＡ（１．１ｍＬ）、ＴＨＦ（１ｍＬ）、ホルムアルデヒド溶液（３７％，０．０８０ｍＬ，１．１ｍｍｏｌ）、硫酸ナトリウム（４６０ｍｇ，３．２３ｍｍｏｌ）およびナトリウムトリ（アセトキシ）ボロヒドリド（６９ｍｇ，０．３２ｍｍｏｌ）から標記化合物（５１ｍｇ，０．０７７ｍｍｏｌ）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８８（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，９Ｈ），１．１４－１．４９（ｍ，４９Ｈ），１．５１－１．７１（ｓ，４Ｈ），１．７３－２．１０（ｍ，５Ｈ），２．２３－２．３１（ｍ，２Ｈ），２．３４（ｓ，３Ｈ），２．４５－２．７６（ｍ，５Ｈ），３．９２－３．９８（ｍ，２Ｈ），４．０３－４．１２（ｍ，２Ｈ）．

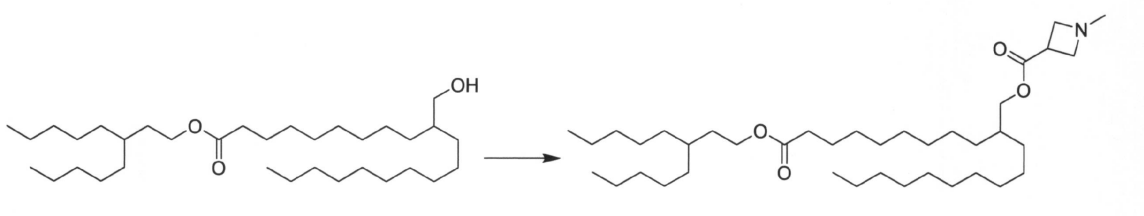
【０１８３】

＜カチオン性脂質の合成（１１）＞

［比較例Ａ’－２］

２－ブチルオクチル ９－ブロモノナノエートの合成（カチオン性脂質１１）

【化４３】



【０１８４】

実施例Ａ－１－（８）の方法に準じ、実施例Ａ－１－（７）で得た化合物（５０ｍｇ，０．０９５ｍｍｏｌ）、１－メチル－３－アゼチジンカルボン酸（２２ｍｇ，０．１９ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ・ＨＣｌ（４０ｍｇ，０．２１ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．０３３ｍＬ，０．１９ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（２．３ｍｇ，０．０１９ｍｍｏｌ）および塩化メチレン（０．８０ｍＬ）から標記化合物（３０ｍｇ，０．０４８ｍｍｏｌ）を得た。

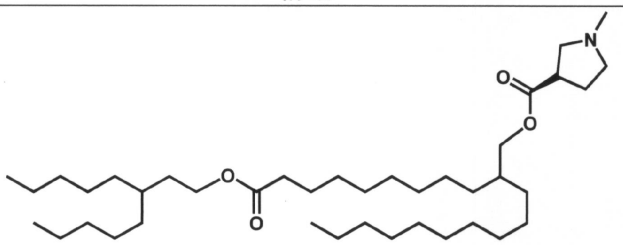
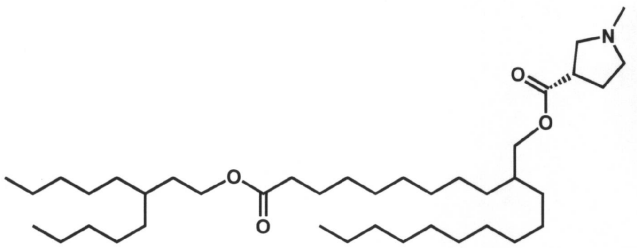
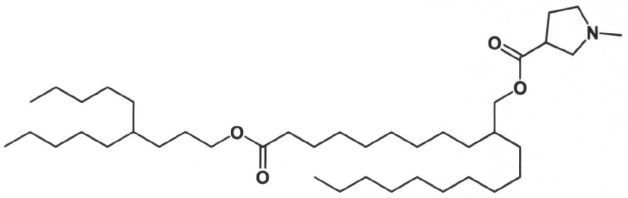
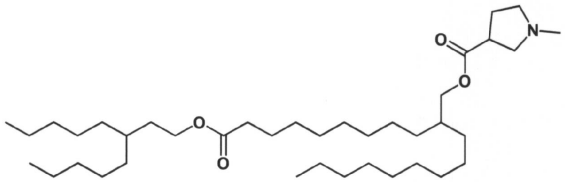
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：０．８８（ｔ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，９Ｈ），１．１４－１．４７（ｍ，４４Ｈ），１．６１（ｓ，８Ｈ），２．３０（ｓ，５Ｈ），３．２６（ｓ，３Ｈ），３．４６－３．６４（ｍ，２Ｈ），３．９９（ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ，２Ｈ），４．０８（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ）．

【０１８５】

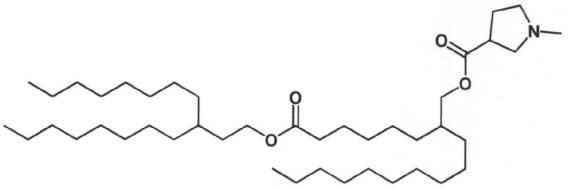
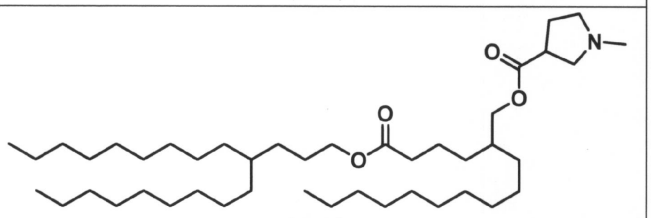
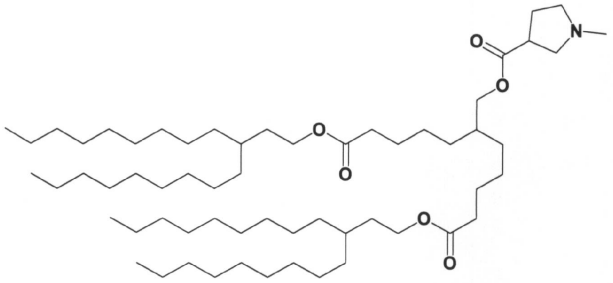
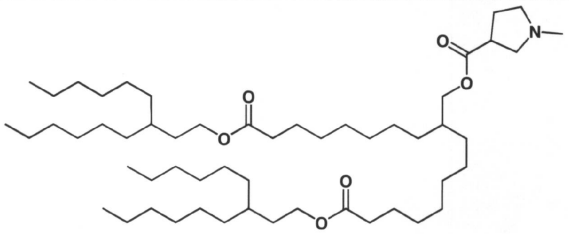
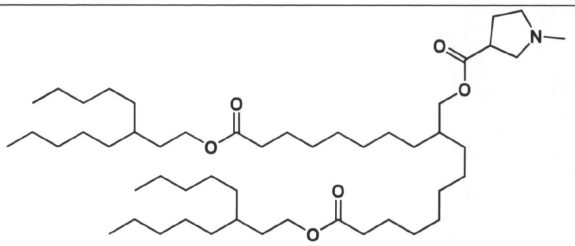
合成したカチオン性脂質１～１１を下記表Ａに示す。

【表Ａ－１】

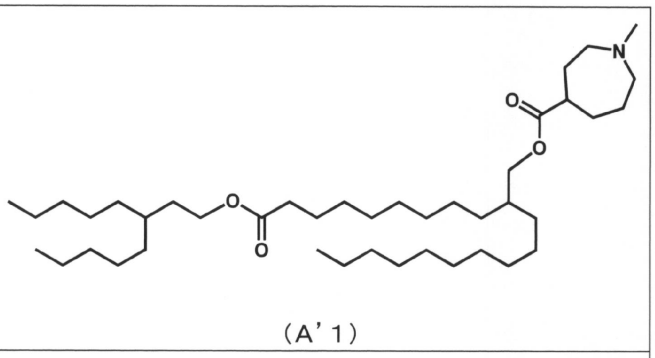
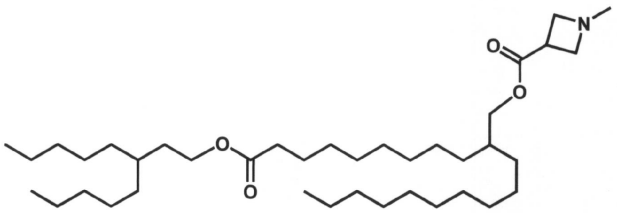
表Ａ：合成したカチオン性脂質１～１１

	構造
カチオン性脂質１： （３Ｓ）－２－｛９－オキソ－９－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ノニル｝ドデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレート	 （Ａ１）
カチオン性脂質２： （３Ｒ）－２－｛９－オキソ－９－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ノニル｝ドデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレート	 （Ａ２）
カチオン性脂質３： ２－｛９－オキソ－９－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ノニル｝ドデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレート	 （Ａ３）
カチオン性脂質４： ２－ノニル－１１－オキソ－１１－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ウンデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレート	 （Ａ４）

【表Ａ－２】

カチオン性脂質５： ２－｛６－［（３－オクチルウンデシル）オキシ］－６－オキソヘキシル｝ドデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレート	 （A5）
カチオン性脂質６： ２－｛４－［（４－ノニルトリデシル）オキシ］－４－オキソブチル｝ドデシル　１－メチルピロリジン－３－カルボキシレート	 （A6）
カチオン性脂質７： ビス（３－ノニルドデシル）　６－｛［（１－メチルピロリジン－３－カルボニル）オキシ］メチル｝ウンデカンジオエート	 （A7）
カチオン性脂質８： ビス（３－ペンチルオクチル）　９－｛［（１－メチルピロリジン－４－カルボニル）オキシ］メチル｝ヘプタデカンジオエート	 （A8）
カチオン性脂質９： ビス（３－ペンチルオクチル）　９－｛［（１－メチルピロリジン－３－カルボニル）オキシ］メチル｝ヘプタデカンジオエート	 （A9）

【表Ａ－３】

カチオン性脂質１０: ２－{９－オキソ－９－[（３－ペンチルオクチル）オキシ]ノニル}ドデシル　１－メチルアゼパン－４－カルボキシレート	 （Ａ’１）
カチオン性脂質１１ ２－ブチルオクチル　９－ブロモノナノエート	 （Ａ’２）

【０１８６】
Ｂ．組成物の調製および解析
＜組成物の調製（１）＞
［実施例Ｂ－１］
実施例Ａ－１のカチオン性脂質１を用いて組成物を調製した。核酸としては、センス鎖５’－ＧＧＡｆＵｆＣＡｆＵｆＣｆＵｆＣＡＡＧｆＵｆＣｆＵｆＵＡｆＣＴ＊Ｔ－３’（Ｔ：ＤＮＡ、ｆＵ，ｆＣ＝２’－Ｆｌｕｏｒｏ　ＲＮＡ、＊＝Ｐｈｏｓｐｈｏｒｏｔｈｉｏａｔｅ　ｌｉｎｋａｇｅ）（配列番号１）、アンチセンス鎖５’－ＧｆＵＡＡＧＡｆＣｆＵｆＵＧＡＧＡｆＵＧＡｆＵｆＣｆＣＴ＊Ｔ－３’（Ｔ：ＤＮＡ、ｆＵ，ｆＣ＝２’－Ｆｌｕｏｒｏ　ＲＮＡ、＊＝Ｐｈｏｓｐｈｏｒｏｔｈｉｏａｔｅ　ｌｉｎｋａｇｅ）（配列番号２）の塩基配列からなる、Ｆａｃｔｏｒ　ＶＩＩ（血液凝固第ＶＩＩ因子）遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡであり、アニーリング済みのもの（株式会社ジーンデザイン、以下「Ｆａｃｔｏｒ　ＶＩＩ　ｓｉＲＮＡ」という場合がある。）を使用した。
【０１８７】
Ｆａｃｔｏｒ　ＶＩＩ　ｓｉＲＮＡを２５ｍＭ酢酸ナトリウム水溶液（ｐＨ４．０）で８０μｇ／ｍＬに溶解し、ｓｉＲＮＡ希釈液とした。また、カチオン性脂質１、ＤＳＰＣ（日本精化株式会社）、Ｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌ（日本精化株式会社）、ＭＰＥＧ２０００－ＤＭＧ（日油株式会社，メトキシ（ポリエチレングリコール，分子量＝２０００）－ジミリスチルグリセロール）を６０／８．５／３０／１．５（モル比）の割合で総脂質濃度７．２ｍＭとなるようにエタノールに溶解し、脂質溶液とした。ｓｉＲＮＡ希釈液と脂質溶液とを、それぞれ３ｍＬ／分、１ｍＬ／分の流速で投入して混合することにより、脂質複合体水溶液を得た。得られた脂質複合体水溶液を、透析膜（商品名「Ｆｌｏａｔ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ　Ｇ２」、ＳＰＥＣＴＲＵＭ社、１００Ｋ　ＭＷＣＯ）を用いた透析に供し、外液をリン酸緩衝液（ＰＢＳ、ｐＨ７．４）に置換した。透析後、濃縮及び濾過滅菌を行い、実施例Ｂ－１の液体組成物を得た。
【０１８８】
［実施例Ｂ－２］
カチオン性脂質として、カチオン性脂質１の代わりに実施例Ａ－２のカチオン性脂質２を用いた以外は実施例Ｂ－１と同様にして、実施例Ｂ－２の組成物を得た。
【０１８９】
［比較例Ｂ’－１］

カチオン性脂質として、カチオン性脂質１の代わりに比較例Ａ’－１のカチオン性脂質１０を用いた以外は実施例Ｂ－１と同様にして、比較例Ｂ’－１の組成物を得た。

【０１９０】

［比較例Ｂ’－２］

カチオン性脂質として、カチオン性脂質１の代わりに比較例Ａ’－２のカチオン性脂質１１を用いた以外は実施例Ｂ－１と同様にして、比較例Ｂ’－２の組成物を得た。

【０１９１】

＜組成物の解析（１）＞

実施例Ｂ－１、実施例Ｂ－２、比較例Ｂ’－１及び比較例Ｂ’－２の組成物について、脂質複合体へのｓｉＲＮＡの封入率を測定した。

【０１９２】

具体的には、組成物をＲＮａｓｅ　Ｆｒｅｅ　Ｗａｔｅｒで希釈し、Ｑｕａｎｔ－ｉＴ　ＲｉｂｏＧｒｅｅｎ　ＲＮＡ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を使用して測定したｓｉＲＮＡ濃度（Ａ）を、脂質複合体外液に存在するｓｉＲＮＡとした。また、組成物を１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で希釈して測定したｓｉＲＮＡ濃度（Ｂ）を組成物中の全ｓｉＲＮＡ濃度とした。続いて、次式（Ｆ１）により、核酸の封入率を算出した。

封入率（％）＝１００－（Ａ／Ｂ）×１００　（Ｆ１）

【０１９３】

また、粒子径測定装置（商品名「Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ」、Ｍａｌｖｅｒｎ社製）で脂質複合体の平均粒子径を測定した。

【０１９４】

表１に、ｓｉＲＮＡの封入率ならびに脂質複合体の平均粒子径（Ｚ－平均）および多分散指数を示す。

【０１９５】

【表１】

表１

組成物	カチオン性脂質	封入率(%)	平均粒子径(nm)	多分散指数
実施例B－1	1	94	90	0.14
実施例B－2	2	96	91	0.11
比較例B'－1	10	99	95	0.13
比較例B'－2	11	95	105	0.13

実施例Ｂ－１及び実施例Ｂ－２の組成物は、比較例Ｂ’－１及び比較例Ｂ’－２の組成物と同等の高いｓｉＲＮＡの封入率を示すことが確認される。

【０１９６】

＜組成物の調製（２）＞

［実施例Ｂ－３］

カチオン性脂質として、カチオン性脂質１の代わりに実施例Ａ－３のカチオン性脂質３を用いた以外は、組成物の調製（１）における実施例Ｂ－１と同様にして、実施例Ｂ－３の組成物を得た。

【０１９７】

［実施例Ｂ－４］

カチオン性脂質として、カチオン性脂質３の代わりに、実施例Ａ－４のカチオン性脂質４を用いた以外は実施例Ｂ－３と同様にして、実施例Ｂ－４の組成物を得た。

【０１９８】

［実施例Ｂ－５］

カチオン性脂質として、カチオン性脂質３の代わりに、実施例Ａ－５のカチオン性脂質５を用いた以外は実施例Ｂ－３と同様にして、実施例Ｂ－５の組成物を得た。

【０１９９】

［実施例Ｂ－６］

カチオン性脂質として、カチオン性脂質３の代わりに、実施例Ａ－６のカチオン性脂質６を用いた以外は実施例Ｂ－３と同様にして、実施例Ｂ－６の組成物を得た。

【０２００】

［実施例Ｂ－７］

カチオン性脂質として、カチオン性脂質３の代わりに、実施例Ａ－７のカチオン性脂質７を用いた以外は実施例Ｂ－３と同様にして、実施例Ｂ－７の組成物を得た。

【０２０１】

［実施例Ｂ－８］

カチオン性脂質として、カチオン性脂質３の代わりに、実施例Ａ－８のカチオン性脂質８を用いた以外は実施例Ｂ－３と同様にして、実施例Ｂ－８の組成物を得た。

【０２０２】

［実施例Ｂ－９］

カチオン性脂質として、カチオン性脂質３の代わりに、実施例Ａ－９のカチオン性脂質９を用いた以外は実施例Ｂ－３と同様にして、実施例Ｂ－９の組成物を得た。

【０２０３】

［実施例Ｂ－１０］

カチオン性脂質として、カチオン性脂質３の代わりに、実施例Ａ－１のカチオン性脂質１を用いた以外は実施例Ｂ－３と同様にして、実施例Ｂ－１０の組成物を得た。

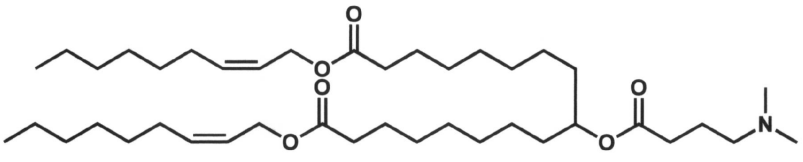
【０２０４】

［比較例Ｂ’－３］

カチオン性脂質として、カチオン性脂質３の代わりに、特許文献２に記載された下記式（ｉ）で表されるジ（（Ｚ）－ノナン－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（以下、「ＡＬＮ－３１９」という場合がある。）を、特許文献２に記載された方法にしたがって合成して用いた以外は実施例Ｂ－３と同様にして、比較例Ｂ’－３の組成物を得た。

【０２０５】

【化４４】



（ｉ）

【０２０６】

＜組成物の解析（２）＞

組成物の解析（１）と同様にして、実施例Ｂ－３～実施例Ｂ－１０及び比較例Ｂ’－３の組成物について、脂質複合体へのｓｉＲＮＡの封入率、及び脂質複合体の平均粒子径を測定した。表２に、ｓｉＲＮＡの封入率、脂質複合体の平均粒子径（Ｚ－平均）、および多分散指数を示す。

【表２】

表２

組成物	カチオン性脂質	封入率(%)	平均粒子径(nm)	多分散指数
実施例Ｂ－３	３	９３	１０２	０．１０
実施例Ｂ－４	４	８９	１０１	０．１６
実施例Ｂ－５	５	９６	８６	０．１２
実施例Ｂ－６	６	９７	８９	０．１５
実施例Ｂ－７	７	９５	１０６	０．１３
実施例Ｂ－８	８	９３	９５	０．１４
実施例Ｂ－９	９	９４	８５	０．０９
実施例Ｂ－１０	１	９４	９０	０．１４
比較例Ｂ’－３	ＡＬＮ－３１９	８４	９５	０．０８

【０２０７】

＜組成物の解析（４）＞

さらに、実施例Ｂ－３～実施例Ｂ－９および比較例Ｂ’－３の組成物を密閉したバイアルにて４℃で１．５ヶ月間保管し、脂質複合体の平均粒子径（保管後平均粒子径）を組成物の解析（１）と同様にして測定した。表３に、脂質複合体の平均粒子径（Ｚ－平均）の変化を示す。表中、平均粒子径の変化（％）は、保管後平均粒子径／保管前平均粒子径×１００で算出した。

【０２０８】

【表３】

表３

組成物	カチオン性脂質	保管前 平均粒子径(nm)	保管後 平均粒子径(nm)	平均粒子径の 変化(%)
実施例Ｂ－３	３	１０２	１０７	１０５
実施例Ｂ－４	４	１０１	１０８	１０６
実施例Ｂ－５	５	８６	９０	１０４
実施例Ｂ－６	６	８９	９２	１０４
実施例Ｂ－７	７	１０６	１１５	１０９
実施例Ｂ－８	８	９５	１０２	１０７
実施例Ｂ－９	９	８５	９１	１０７
比較例Ｂ’－３	ＡＬＮ－３１９	９５	１２１	１２７

【０２０９】

実施例Ｂ－３～実施例Ｂ－９の組成物は、１．５ヶ月保管後においても平均粒子径がほとんど変化せず、比較例Ｂ’－３の組成物よりも物理的に安定であることが示された。これらの結果は、本発明のカチオン性脂質が、一定期間保管した場合に脂質複合体の粒子径の増大を抑制し得ることを示す。

【０２１０】

Ｃ．試験例

［試験例１］

実施例Ｂ－１、実施例Ｂ－２、比較例Ｂ’－１および比較例Ｂ’－２の組成物を、脂質複合体に封入されたＦａｃｔｏｒ　ＶＩＩ　ｓｉＲＮＡ濃度が３μｇ／ｍＬ又は３０μｇ／ｍＬとなるようにＰＢＳで希釈した。各組成物を、ＩＣＲマウス（ｎ＝３）に１０ｍＬ／ｋｇの投与容量で尾静脈内投与し、投与１日後に麻酔下で採血を実施した。遠心により血液から血漿を分離し、血漿中のＦａｃｔｏｒ　ＶＩＩタンパク質濃度を市販のキット（商品名「ＢＩＯＰＨＥＮ　ＦＶＩＩ」、ＨＹＰＨＥＮ　ＢｉｏＭｅｄ社）により定量した。陰性対照として、ＰＢＳを投与した群に同様の処理を行った。

【０２１１】

ＰＢＳ投与群（陰性対照）のＦａｃｔｏｒ　ＶＩＩタンパク質濃度を１００％とし、組成物投与群のＦａｃｔｏｒ　ＶＩＩタンパク質濃度を相対値として算出した。結果を図１および表４に示す。

【０２１２】

【表４】

表４

siRNA 投与量 （mg／kg）	組成物	カチオン性脂質	Factor VII タンパク質濃度 （相対値）
0.03	実施例Ｂ－１	1	47%
	実施例Ｂ－２	2	40%
	比較例Ｂ’－１	10	76%
	比較例Ｂ’－２	11	83%
0.3	実施例Ｂ－１	1	3%
	実施例Ｂ－２	2	2%
	比較例Ｂ’－１	10	21%
	比較例Ｂ’－２	11	50%

実施例Ｂ－１及び実施例Ｂ－２の組成物は、比較例Ｂ’－１及び比較例Ｂ’－２の組成物よりも、Ｆａｃｔｏｒ　ＶＩＩタンパク質の発現抑制効果が高いことが確認される。この結果は実施例の組成物が、核酸を細胞質に効率よく放出していることを示す。

【０２１３】

［試験例２］

実施例Ｂ－３～実施例Ｂ－１０及び比較例Ｂ’－３の組成物を試験例１と同様にしてＩＣＲマウス（ｎ＝３）に投与し、ＰＢＳ投与群（陰性対照）のＦａｃｔｏｒ　ＶＩＩタンパク質濃度を１００％として、投与１日後の血漿中のＦａｃｔｏｒ　ＶＩＩタンパク質濃度の相対値を算出した。結果を図２および表５に示す。

【０２１４】

【表５】

表５

siRNA 投与量 （mg／kg）	組成物	カチオン性脂質	Factor VII タンパク質濃度 （相対値）
0.03	実施例Ｂ－３	３	79%
	実施例Ｂ－４	４	62%
	実施例Ｂ－５	５	81%
	実施例Ｂ－６	６	63%
	実施例Ｂ－７	７	105%
	実施例Ｂ－８	８	108%
	実施例Ｂ－９	９	87%
	実施例Ｂ－10	１	50%
	比較例Ｂ’－３	ALN－319	69%
0.3	実施例Ｂ－３	３	22%
	実施例Ｂ－４	４	8%
	実施例Ｂ－５	５	11%
	実施例Ｂ－６	６	5%
	実施例Ｂ－７	７	61%
	実施例Ｂ－８	８	34%
	実施例Ｂ－９	９	15%
	実施例Ｂ－10	１	4%
	比較例Ｂ’－３	ALN－319	9%

上記試験例１～２の結果は、実施例の組成物が、核酸を細胞質へ放出可能であることを示す。

また、上記試験１～２の結果は、実施例Ｂ－１、実施例Ｂ－２、実施例Ｂ－３、実施例Ｂ－４、実施例Ｂ－５、実施例Ｂ－６、実施例Ｂ－８、実施例Ｂ－９及び実施例Ｂ－１０の組成物（カチオン性脂質１，２，３，４，５，６，８，９）は、Ｆａｃｔｏｒ ＶＩＩタンパク質の発現の抑制効果（特にｓｉＲＮＡ投与量が比較的高い場合）に優れることを示す。これらの結果から、これらの組成物は核酸を細胞質に効率よく放出することが確認される。

また、上記試験１～２の結果は、実施例Ｂ－１、実施例Ｂ－２、実施例Ｂ－３、実施例Ｂ－４、実施例Ｂ－５、実施例Ｂ－６、実施例Ｂ－９及び実施例Ｂ－１０の組成物（カチオン性脂質１，２，３，４，５，６，９）が、ｓｉＲＮＡ投与量が少ない場合であっても、Ｆａｃｔｏｒ ＶＩＩタンパク質の発現を抑制したことを示す。これらの結果から、これらの組成物は核酸を細胞質に効率よく放出することが確認される。

特に実施例Ｂ－１、実施例Ｂ－２、実施例Ｂ－４、実施例Ｂ－６及び実施例Ｂ－１０の組成物（カチオン性脂質１，２，４，６）は、比較例Ｂ’－３の組成物よりも、Ｆａｃｔｏｒ ＶＩＩタンパク質の発現抑制効果が高い。これらの組成物は核酸を細胞質により効率的に放出できることを示唆する。

【０２１５】

以上の結果から、本発明の一形態のカチオン性脂質によれば、核酸を細胞質に効率よく放出することが可能となる。また、本発明の一形態のカチオン性脂質によれば、一定期間保管した際に、脂質複合体の粒子径の増大を抑制することが可能となる。

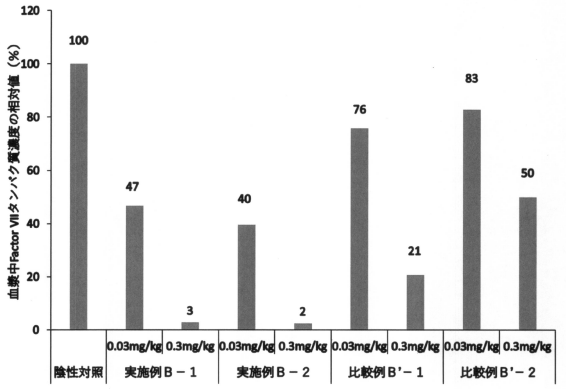
【産業上の利用可能性】

【０２１６】

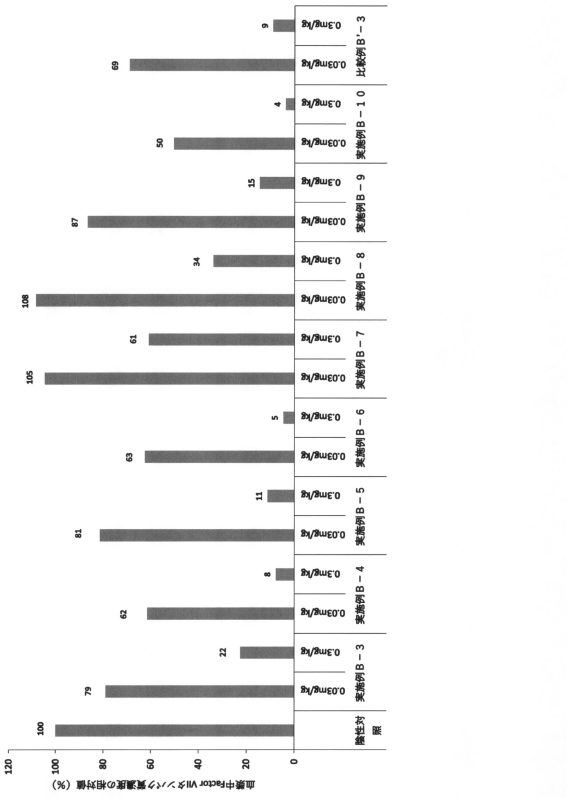
本発明によれば、核酸を細胞質に放出することが可能なカチオン性脂質を提供することができる。

【図面】

【図１】



【図２】



【配列表】

0007164547000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ	*47/28*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/28
Ａ６１Ｋ	*47/34*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/34
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00

エーザイ株式会社 筑波研究所内

審査官 神谷 昌克

(56)参考文献

国際公開第２０１６／１０４５８０（WO，Ａ１）
国際公開第２０１５／１０５１３１（WO，Ａ１）
国際公開第２０１５／０９５３５１（WO，Ａ１）
国際公開第２０１２／０６１２５９（WO，Ａ２）
国際公開第２０１１／１５３４９３（WO，Ａ２）
国際公開第２０１３／１５８５７９（WO，Ａ１）
国際公開第２０１５／０９５３４６（WO，Ａ１）

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)

Ｃ０７Ｄ
Ａ６１Ｋ
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）