

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年12月28日(28.12.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/222016 A1

(51) 国際特許分類:

C07D 211/36 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) C07D 211/62 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01) C07D 209/52 (2006.01)
A61K 47/28 (2006.01) C07D 241/04 (2006.01)
A61K 47/44 (2017.01)

MANAGEMENT CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1128088
東京都文京区小石川四丁目6番1
0号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/023051

(22) 国際出願日: 2017年6月22日(22.06.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2016-125925 2016年6月24日(24.06.2016) JP

(71) 出願人: エーザイ・アール・アンド・デ
ィー・マネジメント株式会社 (EISAI R&D

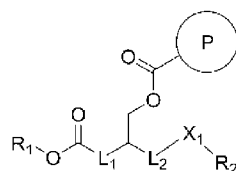
(72) 発明者: 鈴木 裕太(SUZUKI Yuta); 〒3002635 茨
城県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザ
イ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 高橋
良典(TAKAHASHI Yoshinori); 〒3002635 茨城
県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザイ
株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI Hiroshi et
al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目
8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・
片山法律事務所 Tokyo (JP).

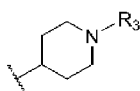
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

(54) Title: CATIONIC LIPID

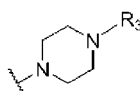
(54) 発明の名称: カチオン性脂質



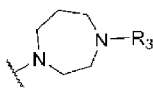
(1a)



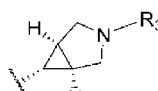
(P-1)



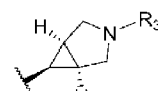
(P-2)



(P-3)



(P-4)



(P-5)

(57) **Abstract:** The present invention provides a cationic lipid which is able to be used for nucleic acid delivery to the cytoplasm. A cationic lipid according to the present invention is, for example, a compound represented by formula (1a) or a pharmaceutically acceptable salt thereof. (In formula (1a), each of L₁ and L₂ independently represents an alkylene group having 3-10 carbon atoms; each of R₁ and R₂ independently represents an alkyl group having 4-22 carbon atoms or an alkenyl group having 4-22 carbon atoms; X₁ represents a single bond or -CO-O-; and ring P represents one of formulae (P-1) to (P-5).) (In formulae (P-1) to (P-5), R₃ represents an alkyl group having 1-3 carbon atoms.)

(57) 要約: 本発明は、細胞質への核酸送達に利用可能なカチオン性脂質を提供する。本発明のカチオン性脂質は、例えば、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。〔式中、L₁及びL₂はそれぞれ独立に炭素数3～10のアルキレン基、R₁及びR₂はそれぞれ独立に炭素数4～22のアルキル基又は炭素数4～22のアルケニル基を表し、X₁は単結合又は-CO-O-を表し、環Pは下記式(P-1)～(P-5)のいずれかを表す。〕〔式中、R₃は炭素数1～3のアルキル基を表す。〕

[続葉有]

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称： カチオン性脂質

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 (micro RNA)、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2～5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6に記載されている。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：国際公開第2010/144740号パンフレット
 特許文献2：国際公開第2011/153493号パンフレット
 特許文献3：国際公開第2013/086354号パンフレット
 特許文献4：国際公開第2013/158579号パンフレット
 特許文献5：国際公開第2015/095346号パンフレット
 特許文献6：国際公開第2014/089239号パンフレット

発明の概要

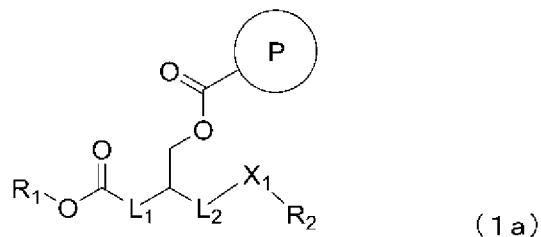
発明が解決しようとする課題

- [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。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明は、以下の[1]から[15]に関する。
 [0011] [1] 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。

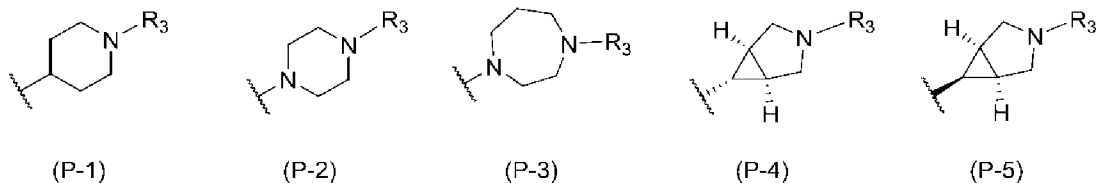
[化1]



[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4～22のアルキル基又は炭素数4～22のア

ルケニル基を表し、 X_1 は単結合又は $-COO-$ を表し、環Pは下記式（P-1）～（P-5）のいずれかを表す。]

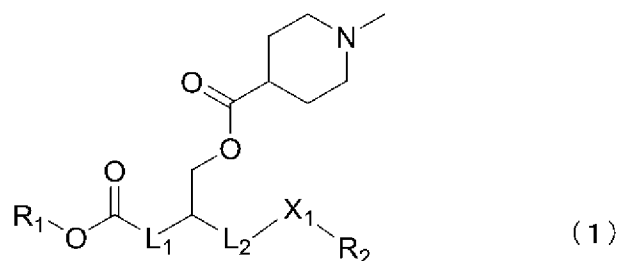
[化2]



[式中、 R_3 は炭素数1～3のアルキル基を表す。]

[2] 下記式（1）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。

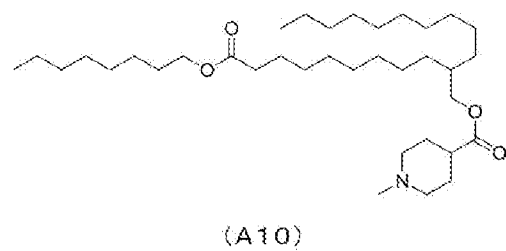
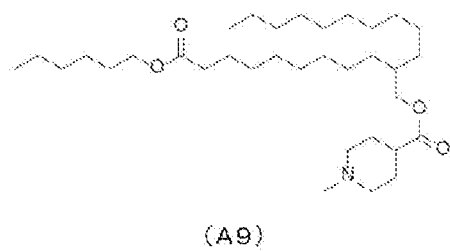
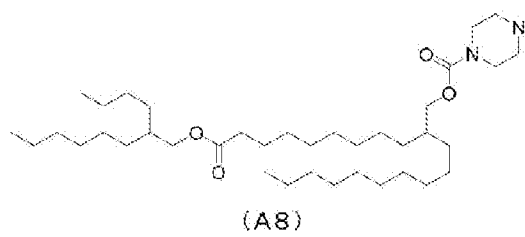
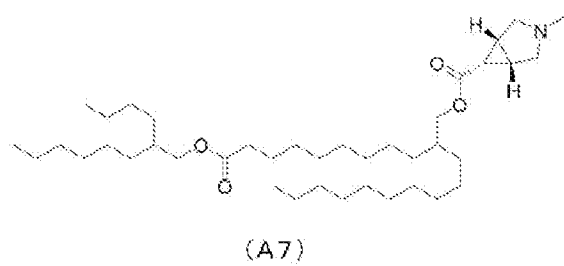
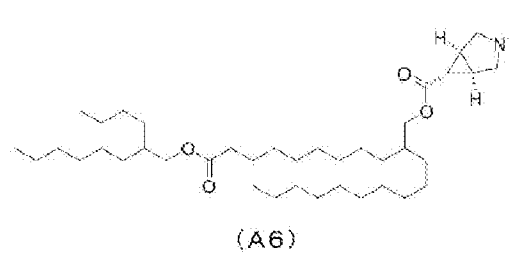
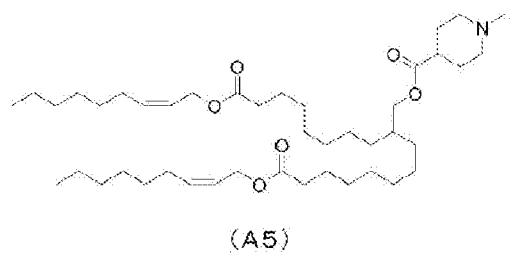
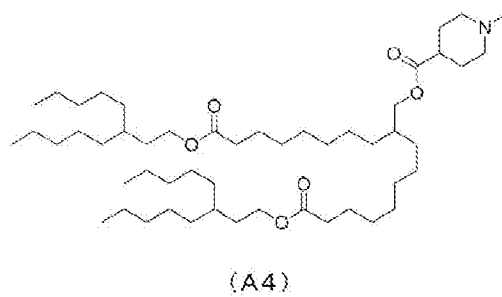
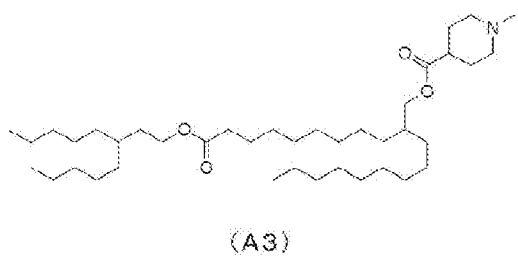
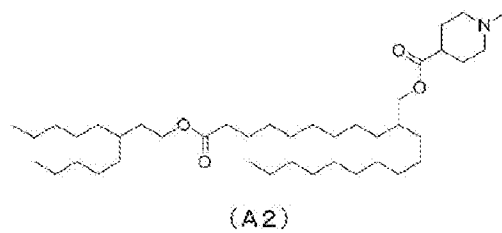
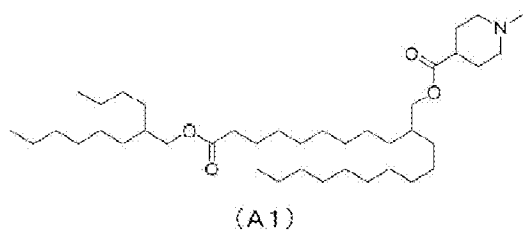
[化3]



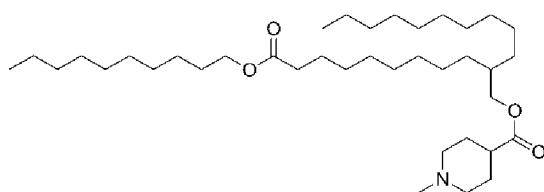
[式中、 L_1 及び L_2 はそれぞれ独立に炭素数3～10のアルキレン基、 R_1 及び R_2 はそれぞれ独立に炭素数4～22のアルキル基又は炭素数4～22のアルケニル基を表し、 X_1 は単結合又は $-COO-$ を表す。]

[0012] [3] 下記式（A1）～（A22）で表される化合物からなる群より選択される、[1]又は[2]に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

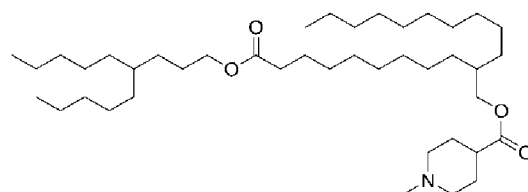
[化4-1]



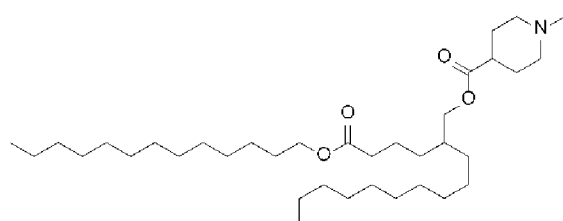
[化4-2]



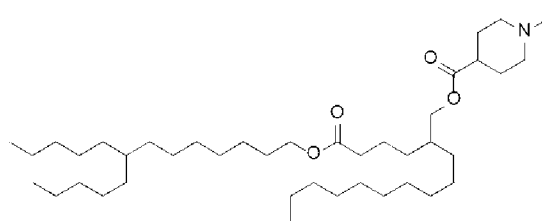
(A11)



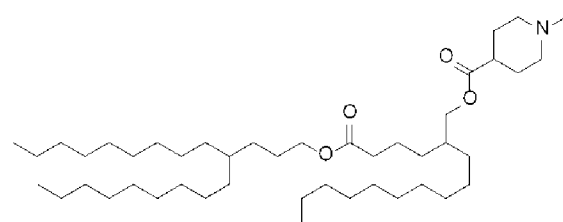
(A12)



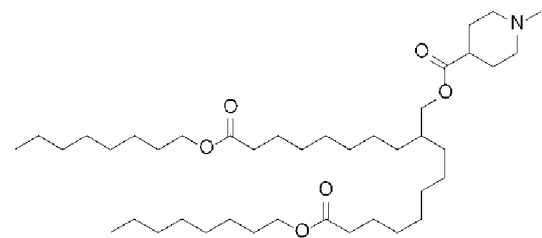
(A13)



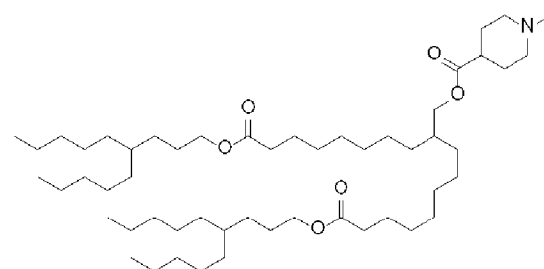
(A14)



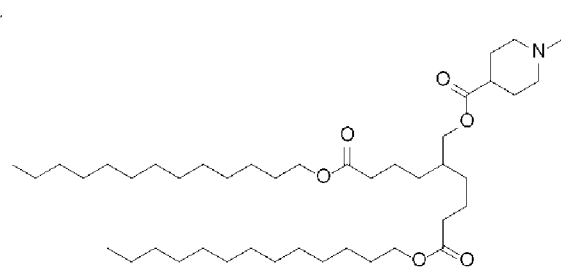
(A15)



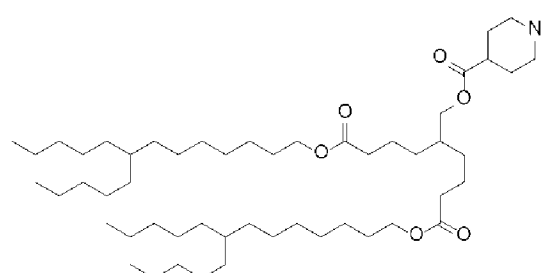
(A16)



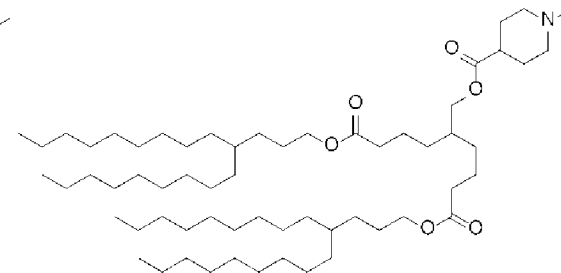
(A17)



(A18)

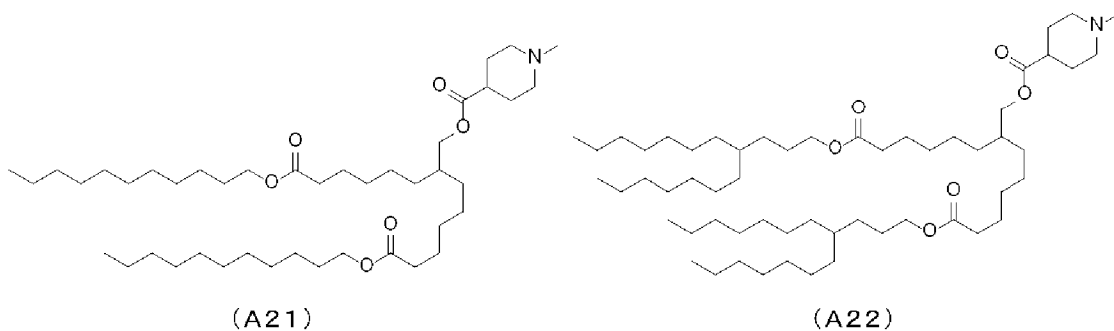


(A19)



(A20)

[化4-3]



[0013] [3 a] 上記式 (A 1)、(A 2)、(A 3)、(A 4)、(A 5)、(A 9)、(A 12)、(A 15)、(A 16)、(A 17)、(A 19)、(A 20)、(A 22) で表される化合物からなる群より選択される、[3] に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

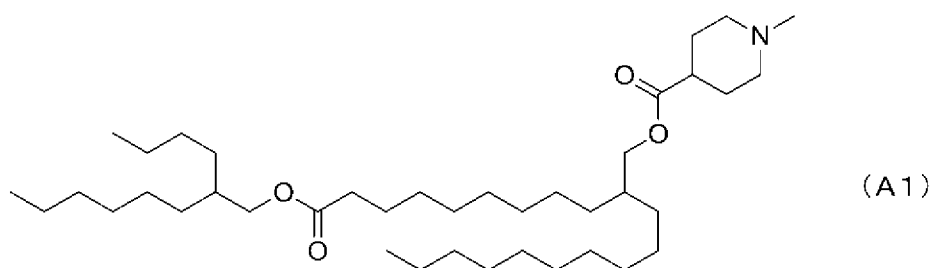
[3 b] 上記式 (A 1)、(A 2)、(A 3)、(A 4)、(A 5)、(A 9)、(A 12)、(A 15)、(A 20) で表される化合物からなる群より選択される、[3] に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

[3 c] 上記式 (A 1) ~ (A 5) で表される化合物からなる群より選択される、[3] に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

[3 d] 上記式 (A 6) ~ (A 8) で表される化合物からなる群より選択される、[3] に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

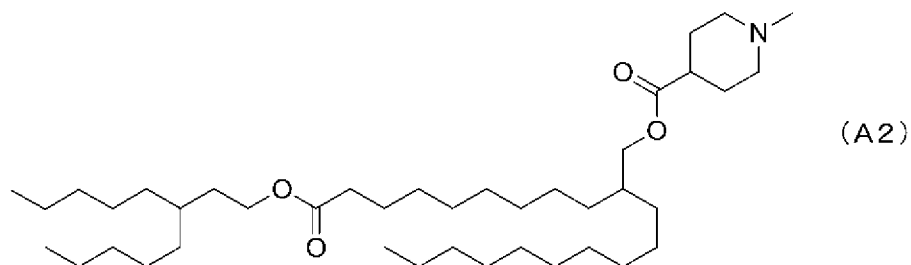
[0014] [3] 下記式 (A 1) で表される、[1] ~ [3] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

[化5]



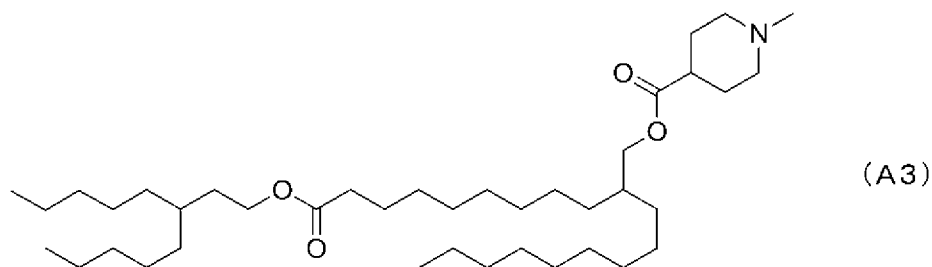
[0015] [4] 下記式 (A2) で表される、[1] ~ [3] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

[化6]



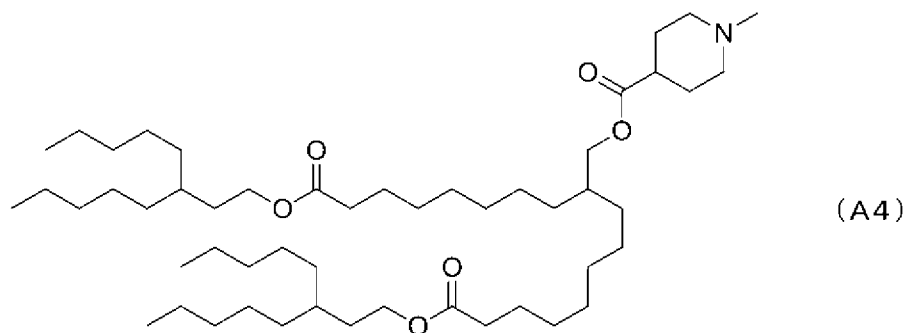
[0016] [5] 下記式 (A3) で表される、[1] ~ [3] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

[化7]



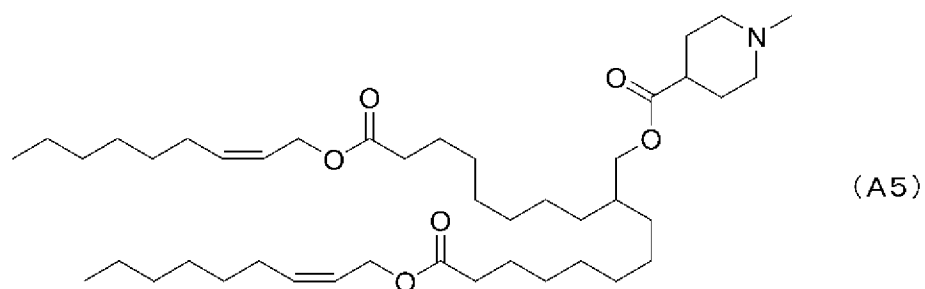
[0017] [6] 下記式 (A4) で表される、[1] ~ [3] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

[化8]



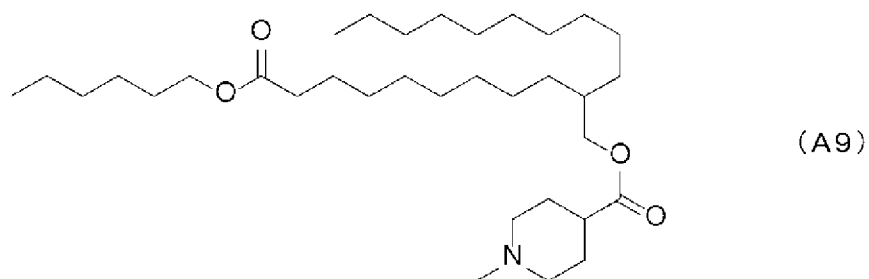
[0018] [7] 下記式 (A 5) で表される、[1] ~ [3] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

[化9]



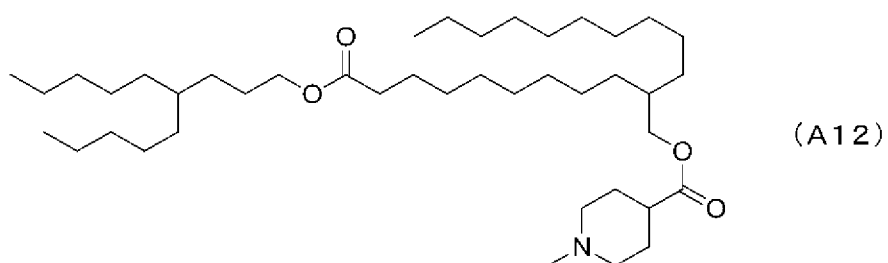
[0019] [8] 下記式 (A 9) で表される、[1] ~ [3] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

[化10]



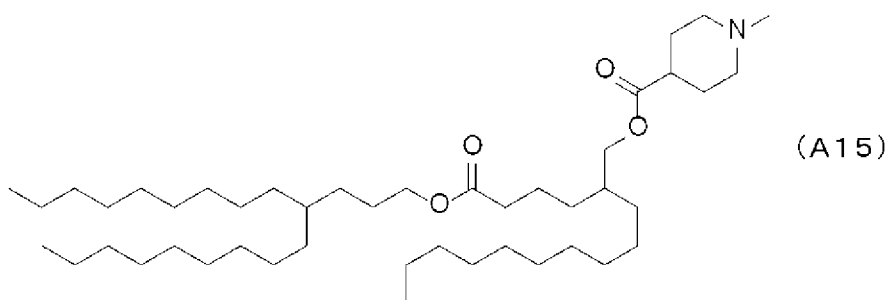
[0020] [9] 下記式 (A 1 2) で表される、[1] ~ [3] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

[化11]



[0021] [10] 下記式 (A 1 5) で表される、[1] ~ [3] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

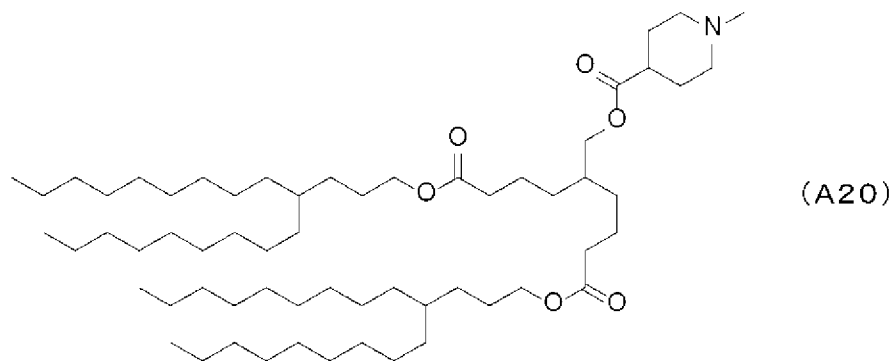
[化12]



[0022] [11] 下記式 (A 2 0) で表される、[1] ~ [3] のいずれかに記載の

化合物又はその薬学的に許容される塩。

[化13]



[0023] [13] (I) [1] ~ [12] 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] [14] (I) [1] ~ [12] 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] [15] (I) [1] ~ [12] 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。

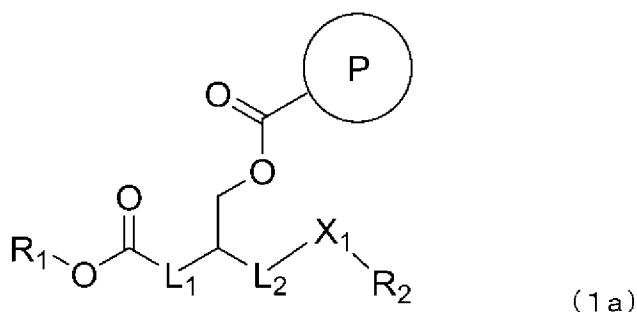
発明を実施するための形態

[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>

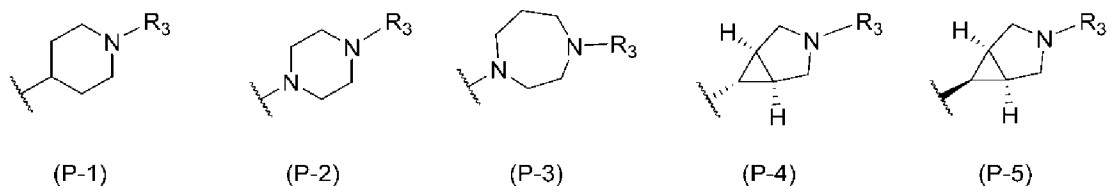
一実施形態において、本発明は、下記式(1a)で表される化合物又はその薬学的に許容される塩であり、カチオン性脂質として用いることができる。カチオン性脂質は、前記塩の水和物又は前記塩の溶媒和物であってもよい。

[化14]



式(1a)中、環Pは下記式(P-1)～(P-5)のいずれかを表す。

[化15]



上記式 (P-1) ~ (P-5) 中、 R_3 は炭素数 1 ~ 3 のアルキル基を表す。

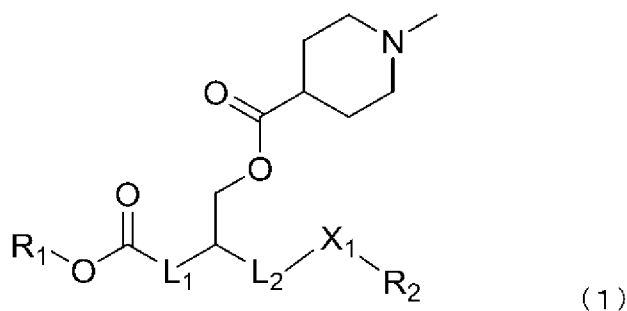
[0030] 一実施形態において、環 P は下記式 (P-1)、式 (P-2)、(P-4)、(P-5) のいずれかを表す。

一実施形態において、環 P は下記式 (P-1) を表す。

[0031] 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。

[0032] [化16]



[0033] 式 (1 a) および式 (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 ~ 22 のアルキル基又は炭素数 4 ~ 22 のアルケニル基を表し、 X_1 は単結合又は $-COO-$ を表す。

[0034] 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。

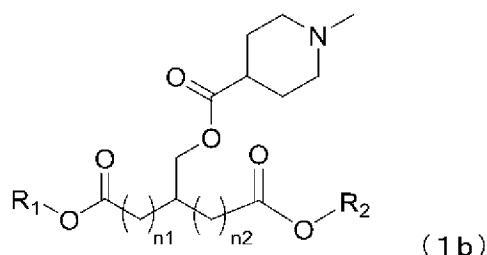
本明細書において、「ハロゲン」は、F、Cl、Br、Iを意味する。

[0035] 本発明の一実施形態は、上記式(1a)または式(1)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5~10又は炭素数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4~18のアルキル基又は炭素数4~18のアルケニル基、 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。

[0036] 本発明の一実施形態は、上記式(1a)または式(1)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5~10又は炭素数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4~18の直鎖状または分岐状のアルキル基又は炭素数4~18の直鎖状のアルケニル基であり、 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。

したがって、本発明の一実施形態は、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17]



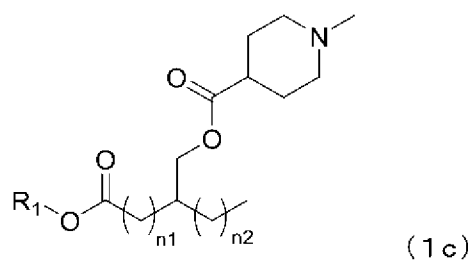
式(1b)中、 R_1 及び R_2 はそれぞれ独立に炭素数4～22のアルキル基又は炭素数4～22のアルケニル基、好ましくは炭素数4～18の直鎖状又は分岐状のアルキル基又は炭素数4～18の直鎖状のアルケニル基であり、 n_1 および n_2 はそれぞれ独立に3～10(例えば5～10又は3～8)の整数を表す。

[0037] 本発明の一実施形態において、本発明は、上記式(1a)または式(1)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。

[0038] 本発明の一実施形態において、本発明は、上記式(1a)または式(1)中、 L_1 及び L_2 はそれぞれ独立に炭素数5～10の直鎖状のアルキレン基であり、 R_1 は炭素数4～18の直鎖状又は分岐状のアルキル基又は炭素数4～18の直鎖状のアルケニル基であり、 R_2 は炭素数4～18の直鎖状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。

したがって、本発明の一実施形態は、下記式(1c)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。

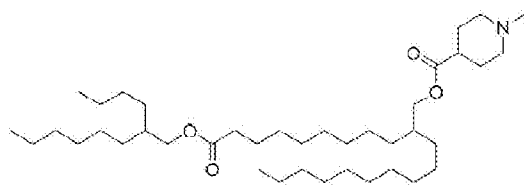
[化18]



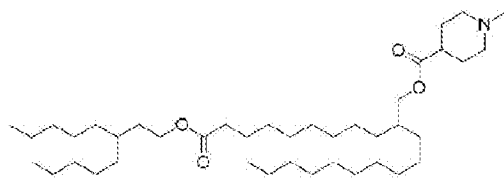
式(1c)中、 R_1 は炭素数4～22のアルキル基又は炭素数4～22のアルケニル基、好ましくは炭素数4～18の直鎖状又は分岐状のアルキル基又は炭素数4～18の直鎖状のアルケニル基であり、 n_1 は3～10(例えば5～10又は3～8)の整数を表し、 n_2 は8～25、好ましくは8～11の整数を表す。

[0039] 以下に実施形態の化合物の一例を示す。

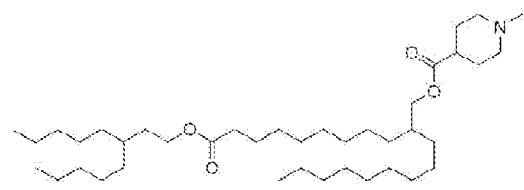
[化19-1]



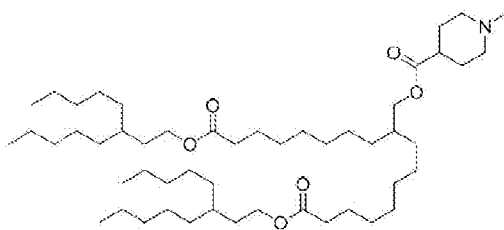
(A1)



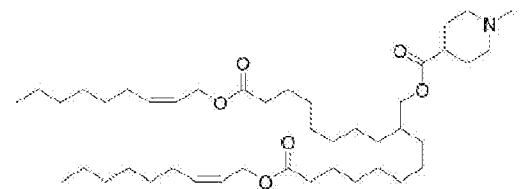
(A2)



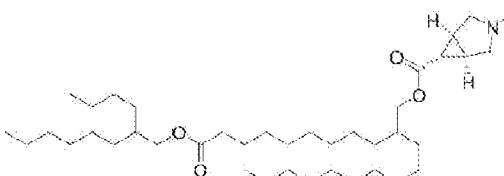
(A3)



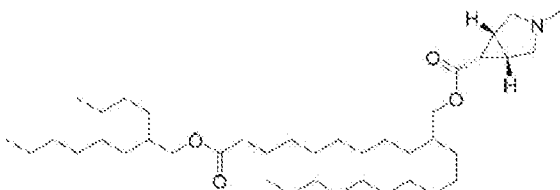
(A4)



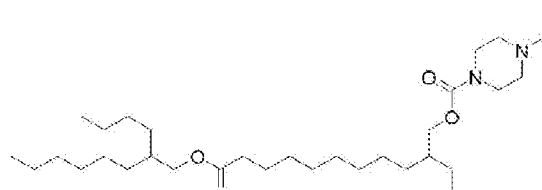
(A5)



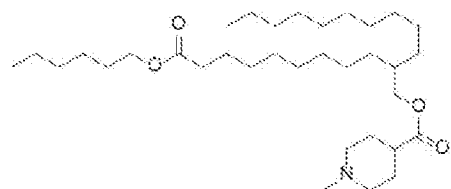
(A6)



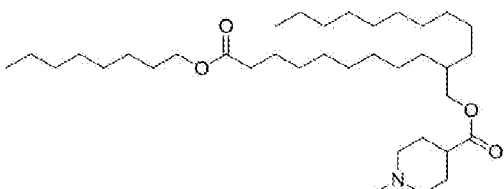
(A7)



(A8)

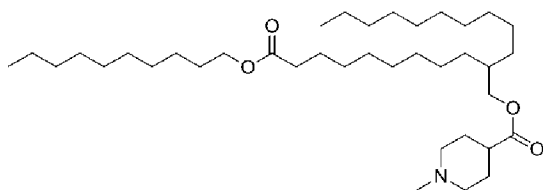


(A9)

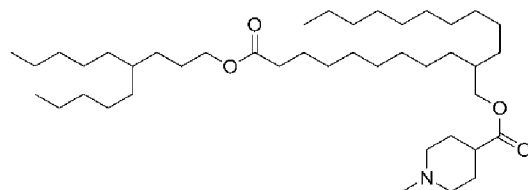


(A10)

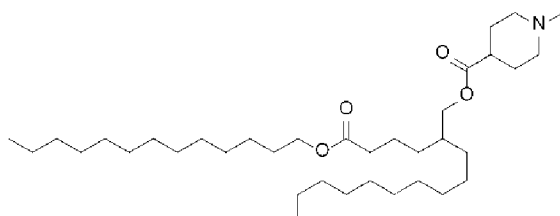
[化19-2]



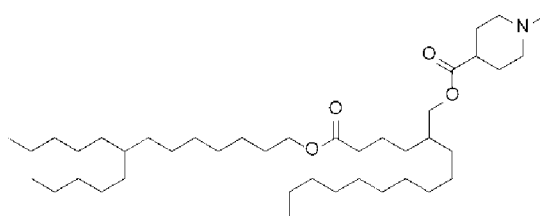
(A11)



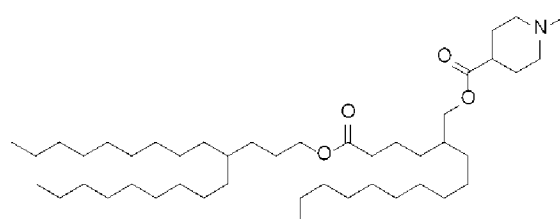
(A12)



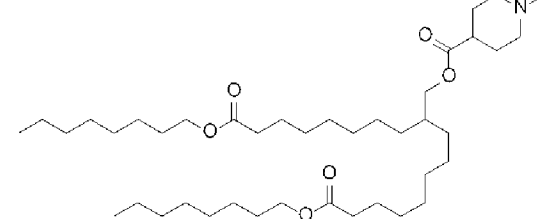
(A13)



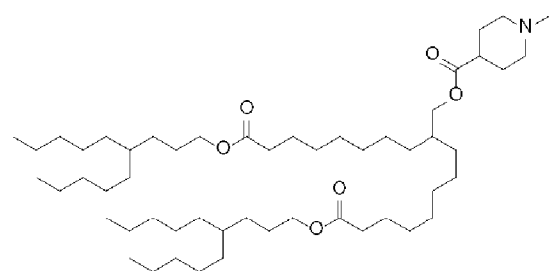
(A14)



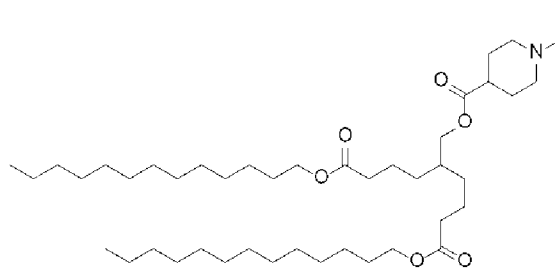
(A15)



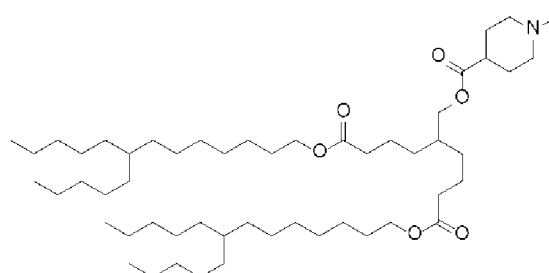
(A16)



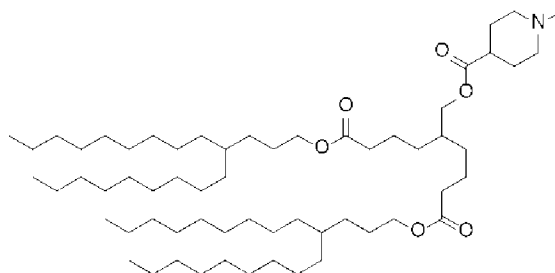
(A17)



(A18)

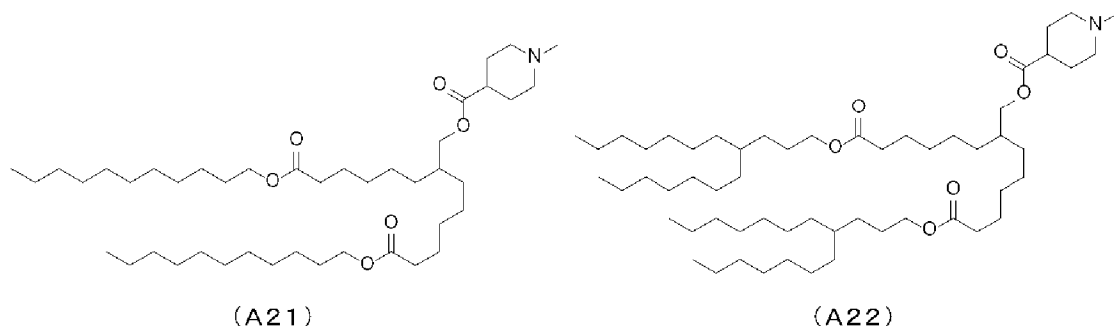


(A19)



(A20)

[化19-3]



[0040] 本発明の一実施形態は、上記式（A1）～（A22）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）～（A5）、（A9）～（A22）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）、（A9）、（A12）、（A15）、（A16）、（A17）、（A19）、（A20）、（A22）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）、（A9）、（A12）、（A15）、（A20）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。

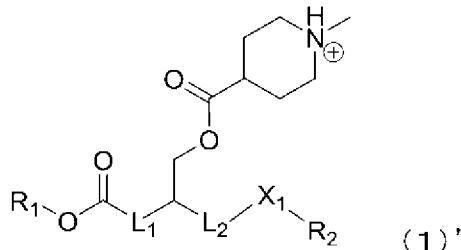
本発明の一実施形態は、上記式（A1）、（A2）、（A3）、（A4）、（A5）のいずれかで表される化合物又はその薬学的に許容される塩であ

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（A 6）、（A 7）、（A 8）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。

[0041] 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、ピペ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下記式（1）' で表される化合物（陽イオン）を包含する。

[化20]



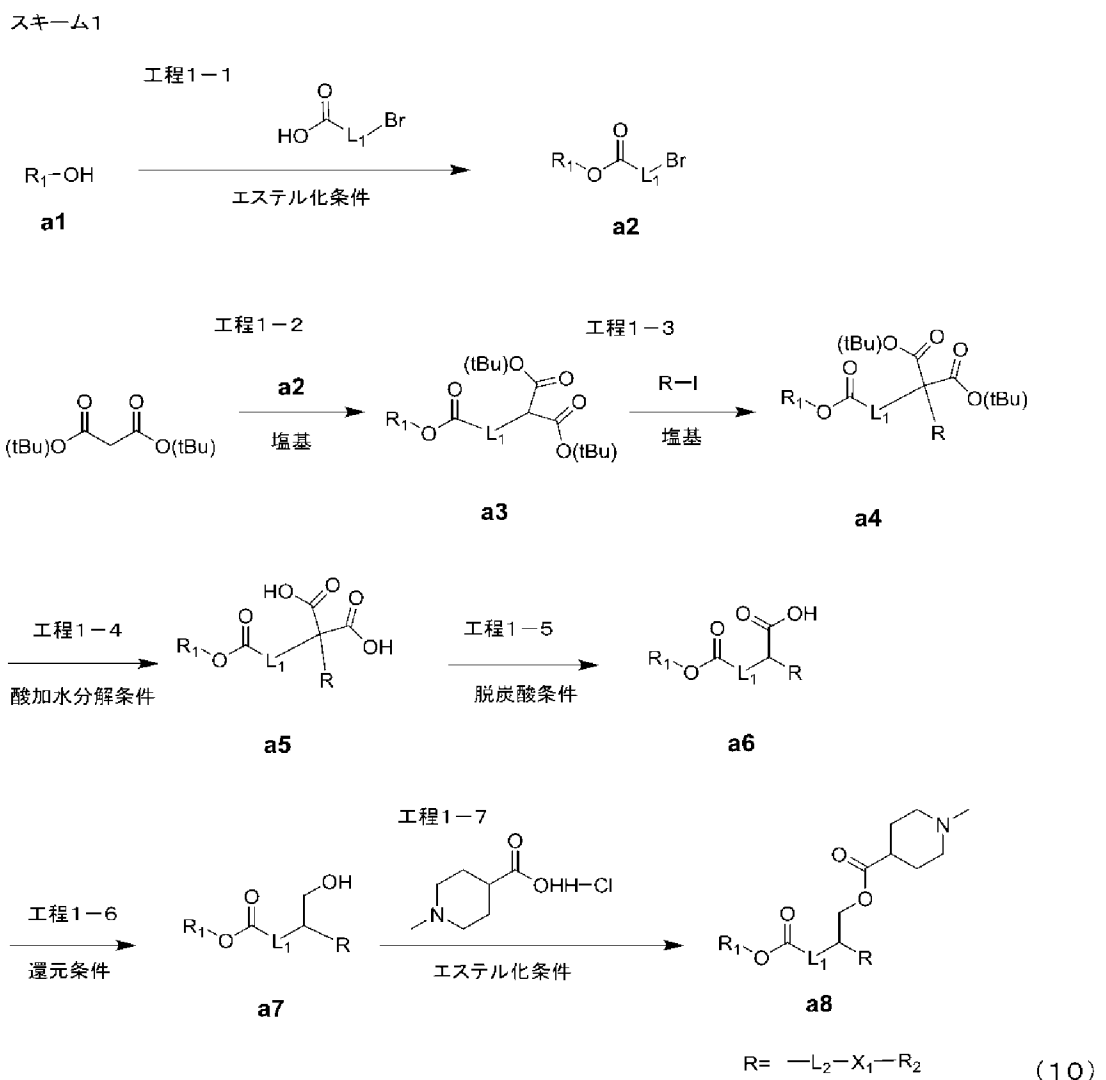
上記陽イオンと対になって、本実施形態のカチオン性脂質が含有し得る陰イオンとしては、薬学的に許容されるものであれば特に限定されず、例えば、塩化物イオン、臭化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオン、リン酸イオン等の無機イオン；酢酸イオン、シュウ酸イオン、マレイン酸イオン、フマル酸イオン、クエン酸イオン、安息香酸イオン、メタンスルホン酸イオン等の有機酸イオン等が挙げられる。

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。

[0042] <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。下記式（10）および（11）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。

[0043] [化21]



（式中 L_1 及び R_1 はそれぞれ前記と同義であり、 R は式（1）における $\text{-L}_2\text{-X}_1\text{-R}_2\text{-}$ （ L_2 、 X_1 及び R_2 はそれぞれ前記と同義）である。）

[0044] 式(1)のカチオン性脂質(X_1 が単結合である化合物)は、例えば、上記式(10)に示すスキーム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)とハロゲン化アルキルカルボン酸 $X-L_1-COOH$ (X はハロゲン原子であり、 L_1 は前記と同義) (好ましくは臭化アルキルカルボン酸)とを縮合剤の存在下で反応させてエステルハロゲン化物(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、NMM、TEA、DIPEA、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、ベンゼン、ヘキサン、酢酸エチル等が挙げられる。

(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-ジメトキシエタン等のエーテル類等が挙げられる。

(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(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 (a 5) の脱炭酸によりカルボン酸 (a 6) 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、ベンゼン、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 (a 6) 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 (a 7) 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、ベンゼン、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)

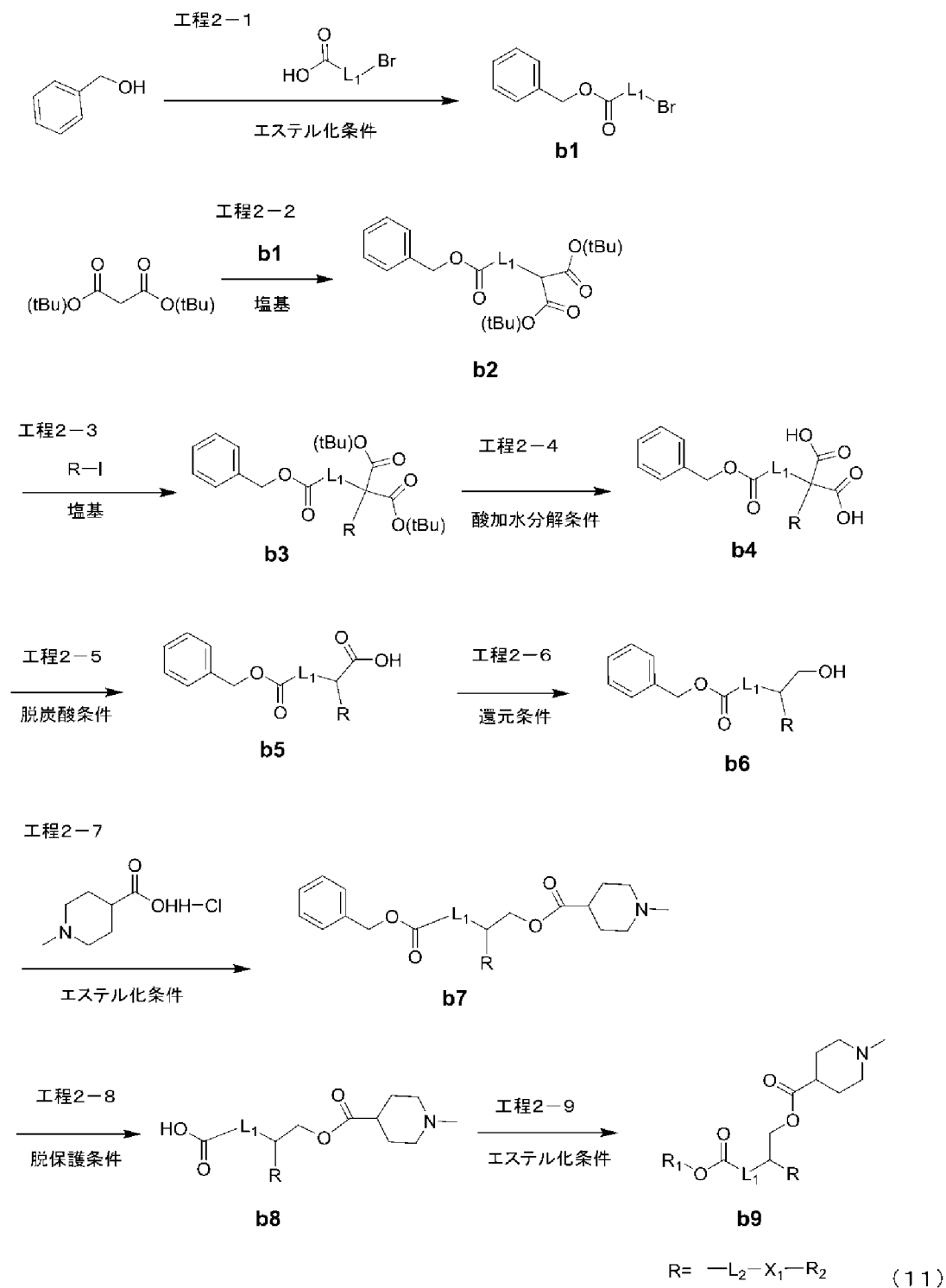
得られたアルコール (a 7) と 1-メチル-ピペリジン-4-カルボン酸またはその誘導体 (ハロゲン化水素塩など) とを縮合剤、塩基の存在下で反応させて最終物である化合物 (a 8) ($R = L_2 - X_1 - R_2$) (式 (1) のカチオン性脂質に相当する化合物) が得られる。縮合剤および塩基としては工程 1 - 1 と同様のものを使用できる。

[0045] 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を調製し、これを化合物 (a 3) と反応させ、最後に脱保護およびエステル化を行えばよい。

[0046]

[化22]

スキーム2



(式中 L_1 及び R_1 はそれぞれ前記と同義であり、 R は式 (1) における $-L_2$
 $-X_1-R_2$ (L_2 、 X_1 及び R_2 はそれぞれ前記と同義) 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(X_1 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。

(工程2-1: エステル化)

まず、ベンジルアルコールに対してハロゲン化アルキルカルボン酸を縮合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-ブトキシカルボニル基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、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-メチルピペリジン-4-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。

(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 (b 8) をアルコール (R_1OH) と反応させることにより化合物 (b 9) ($R=L_2-X_1-R_2$) (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。

[0047] 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 2 の工程 2-3 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を化合物 (b 2) と反応させ、これを工程 2-8 において脱保護すればよい。

[0048] 上記式 (1 a) の化合物についても、上記スキーム 1 又は 2 に準じて合成することができる。具体的には、環 P が式 (P-1)、(P-4)、(P-5) の構造である場合には、例えば、上記工程 1-7 または工程 2-7 において 1-メチルピペリジイン-4-カルボン酸に代えて、式 (P-1)、(P-4)、(P-5) の構造に対応するカルボン酸を用いてエステル化反応させればよい。また、環 P が式 (P-2)、(P-3) の構造である場合には、工程 1-7 に代えて、塩基の存在下、工程 1-6 で得られた化合物 a 7、カルボニル化試薬 (例えばクロロギ酸 4-ニトロフェニルなどのクロロギ酸エステル)、N-アルキルピペラジン又は N-アルキルホモピペラジン (式 (P-2)、(P-3) の構造を有する化合物) を反応させることにより式 (1 a) で表される化合物を得ることができる (後述の実施例 A-8 を参照)。

[0049] 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。

[0050] 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、ベンジル保護基）は当業者に周知の他の保護基に置換することもできる。

[0051] <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。

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。

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 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。

[0055] 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。

[0056] 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 Toil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)、ジオレオイルー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。

[0057] 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。

[0058] ポリエチレングリコール修飾脂質としては、PEG2000-DMG (P

EG2000-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。

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] <組成物>

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、(III) 核酸と、を含有する組成物を提供する。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。

[0065] 本実施形態の組成物は、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。

[0066] 核酸としては、上述したものと同様のものが挙げられる。本実施形態の組成物は、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。

[0067] 本実施形態の組成物は、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。

[0068] 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。本実施形態の組成物は、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。

[0069] 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。本実施形態の組成物は、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。

[0070] 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。本実施形態の組成物は、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。

[0071] 本実施形態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。

[0072] 本実施形態の組成物は、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。

[0073] 本実施形態の組成物は、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。

[0074] 本実施形態の組成物は、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。

[0075] 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。

[0076] 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。

[0077] 本実施形態の組成物は、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核酸が封入された脂質複合体を形成している。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。本実施形態の組成物において、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。

本実施形態の組成物は、保管期間中、脂質複合体の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3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1.3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。

[0078] 本実施形態の組成物は、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の

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。

[0079] ＜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。

[0080] 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ることにより、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。

[0081] 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。

- [0082] 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。
- [0083] 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。
- [0084] 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。
- [0085] 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*又は*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。
- [0086] 本発明の一実施形態は上記アニ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、アニ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、上記アニオン性脂質以外に、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アニ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、上記アニ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）、及び使用説明書（使用マニュアル）等を含んでもよい。

実施例

[0087] 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、ソフトウェア（商品名「ChemDraw Ultra ver. 12.0」、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。

[0088] 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。

D I P E A : N, N-ジイソプロピルエチルアミン

D M A P : 4-(ジメチルアミノ)ピリジン

D M F : N, N-ジメチルホルムアミド

E D C : 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

t e r t - : ターシャリー

E t O A c : 酢酸エチル

T F A : トリフルオロ酢酸

T H F : テトラヒドロフラン

$^1\text{H-NMR}$: プロトン核磁気共鳴スペクトルメトリー

[0089] 以下の実施例及び製造例中の「室温」は通常約 10°C から約 35°C を示す。
% は特記しない限り重量パーセントを示す。

[0090] 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 : ダブルット、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。

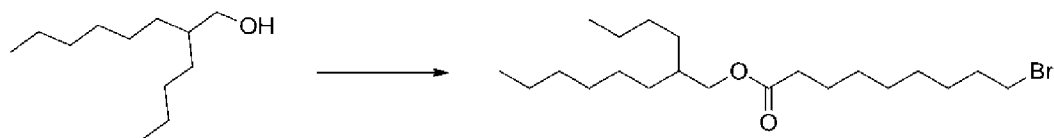
クロマトグラフィーに関しては、YAMAZEN社製パラレルプレップ {カラム: YAMAZEN社製 Hi-FlashTM Column (Silicagel)、サイズ; S ($16 \times 60\text{mm}$)、M ($20 \times 75\text{mm}$)、L ($26 \times 100\text{mm}$)、2L ($26 \times 150\text{mm}$)}、あるいはBiotage社製フラッシュ自動精製システム IsoleraTM {カラム: SNAP Cartridge KP-Sil (10g 、 25g 、 50g 、 100g 、 340g)} を用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

[0091] A. カチオン性脂質の合成

[製造例1]

2-ブチルオクチル 9-ブロモノナノエートの合成

[化23]



[0092] 9-ブロモノナン酸 (1.1g , 4.7mmol)、DIPEA (0.91mL , 5.3mmol) およびDMAP (76mg , 0.63mmol) を塩化メチレン (13mL) に溶解し、氷冷下、EDC (1.0g , 5.3m

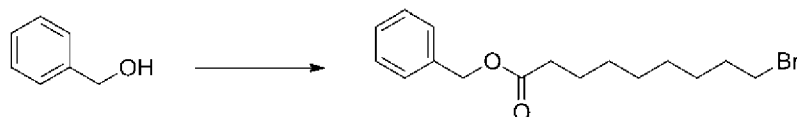
mol)を加えた。2-ブチル-1-オクタノール(0.58g, 3.1mmol)を加え、室温で2時間攪拌した。反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(n-ヘプタン/酢酸エチル)にて精製し、標記化合物(1.2g, 2.96mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.82–0.95 (m, 6H), 1.17–1.49 (m, 24H), 1.52–1.70 (m, 3H), 1.75–1.93 (m, 2H), 2.23–2.36 (m, 2H), 3.34–3.47 (m, 2H), 3.91–4.02 (m, 2H).

[0093] [製造例2]

ベンジル 9-ブロモノナノエートの合成

[化24]



[0094] ベンジルアルコール(0.50mL, 4.84mmol)、9-ブロモノナン酸(1.38g, 5.80mmol)およびDMAP(59mg, 0.48mmol)を塩化メチレン(9.6mL)に溶解し、氷冷下、EDC(1.16g, 6.05mmol)を加え、室温で2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(n-ヘプタン/酢酸エチル)にて精製し、標記化合物(1.49g, 4.55mmol)を得た。

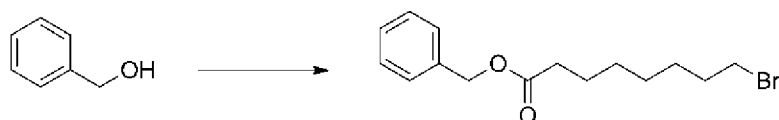
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.22–1.4

8 (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).

[0095] [製造例3]

ベンジル 8-ブロオクタノエートの合成

[化25]



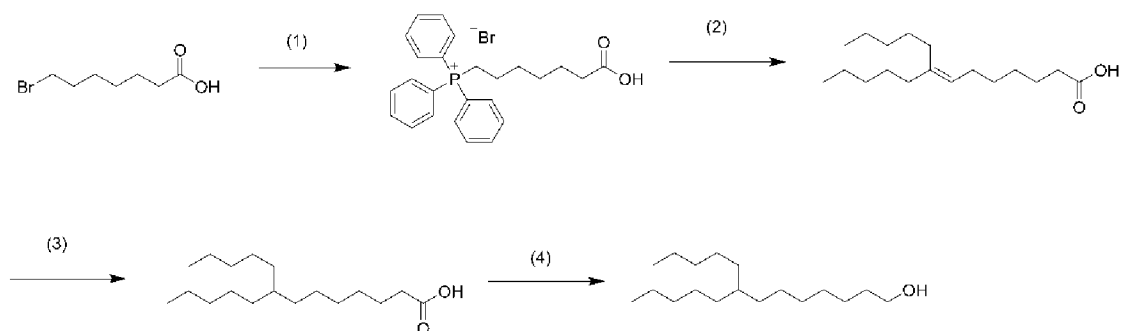
[0096] 製造例2の方法に準じ、ベンジルアルコール (1.85 mL, 17.9 mmol)、8-ブロモオクタン酸 (4.0 g, 17.9 mmol)、EDC (3.78 g, 19.7 mmol)、DMAP (0.22 g, 1.79 mmol)、および塩化メチレン (36 mL) から標記化合物 (4.8 g, 15.3 mmol) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 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).

[0097] [製造例4]

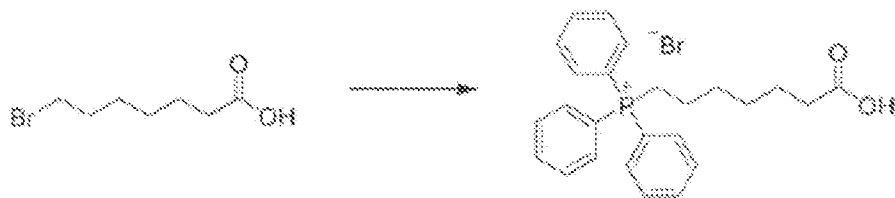
8-ペンチルトリデカン-1-オール

[化26]



[0098] (1) (6-カルボキシヘキシル) トリフェニルホスホニウム ブロミドの合成

[化27]

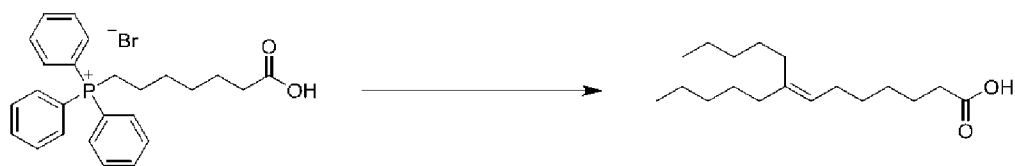


7-ブロモヘプタン酸 (2.0 g, 9.57 mmol) とトリフェニルホスフィン (2.5 g, 9.57 mmol) とをアセトニトリル (20 mL) に懸濁し、18時間加熱還流した。室温に放冷したのち減圧下濃縮し標記化合物 (4.1 g, 8.66 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 1.22–1.59 (m, 8H), 2.12–2.25 (m, 2H), 3.47–3.62 (m, 2H), 7.19–7.28 (m, 2H), 7.34–7.44 (m, 2H), 7.71–7.85 (m, 10H), 7.85–7.94 (m, 3H), 11.97 (br s, 1H).

[0099] (2) 8-ペンチル-7-トリデセン酸の合成

[化28]

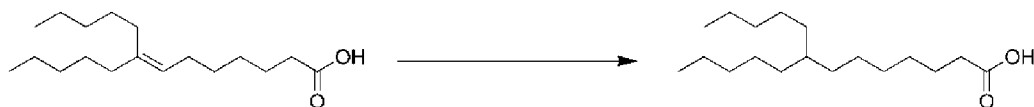


製造例4-(1)で得た化合物(4.65g, 9.87mmol)をTHF(15mL)に溶解し、窒素雰囲気下、室温でナトリウムビス(トリメチルシリル)アミド/THF溶液(1M, 19.7mL, 19.7mmol)を加えた。反応液を45℃まで加熱したのち30分間攪拌した。ウンデカン-6-オン(1.7mL, 8.22mmol)のTHF(5mL)溶液を滴下したのち加熱還流した。反応混合物を22時間攪拌したのち、塩酸(2M)をpHが2になるまで注意深く加えた。水(100mL)を加えジエチルエーテルで抽出したのち、有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/シクロヘキサン)にて精製し、標記化合物とウンデカン-6-オンとの1:1の混合物(1.36g)として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) : 0.80–0.89 (m, 6H), 1.16–1.38 (m, 18H), 1.43–1.53 (m, 2H), 1.89–1.99 (m, 4H), 2.17 (t, $J=7.43\text{ Hz}$, 2H), 5.07 (t, $J=6.90\text{ Hz}$, 1H), 11.83 (br s, 1H).

[0100] (3) 8-ペンチルトリデシル酸の合成

[化29]



製造例4-(2)で得た化合物(1.36g)と10%パラジウム-炭素(0.06g, 0.060mmol)とをエタノール(5mL)に懸濁し、水素雰囲気下、室温常圧下で18時間攪拌した。反応混合物をセライトでろ過しエタノールで洗浄した。ろ液を減圧下濃縮し、標記化合物(0.60g, 2.18mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) : 0.85 (t, $J=7.1\text{ Hz}$, 6H), 1.14–1.32 (m, 25H), 1.42–1.52 (m, 2H), 2.18 (t, $J=7.43\text{ Hz}$, 2H).

[0101] (4) 8-ペンチルトリデカン-1-オールの合成

[化30]



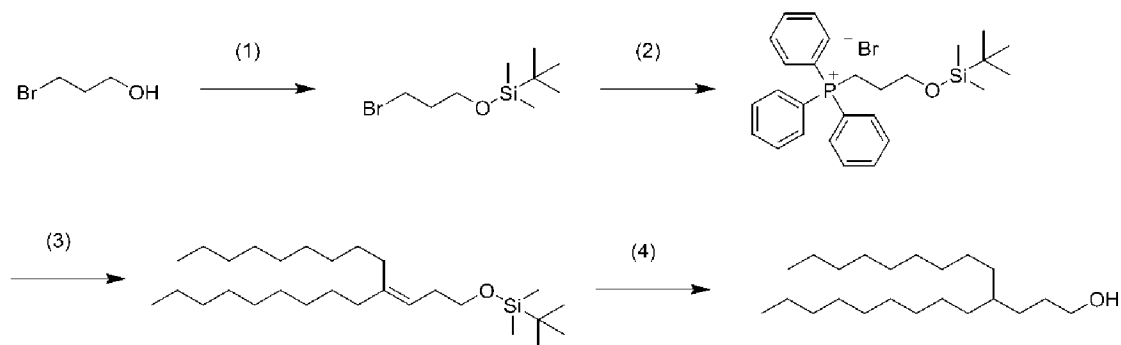
水素化リチウムアルミニウム/THF溶液(2.4M, 1.3mL, 3.15mmol)に、窒素雰囲気下、製造例4-(3)で得た化合物(1.36g)のTHF(5mL)溶液を氷冷下滴下した。室温で2時間攪拌したのち塩酸(1M, 8mL)を滴下し1時間攪拌した。有機相をジエチルエーテルで抽出したのち、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順に洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/シクロヘキサン)にて精製し、標記化合物(0.28g, 1.02mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.88 (t, $J=7.24\text{ Hz}$, 6H), 1.13–1.41 (m, 28H), 1.54–1.60 (m, 2H), 3.59–3.68 (m, 2H).

[0102] [製造例5]

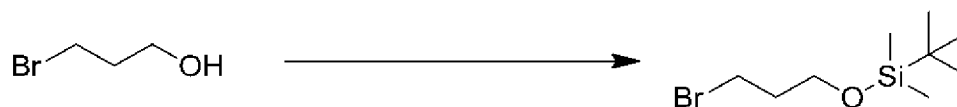
4-ノニルトリデカン-1-オールの合成

[化31]



[0103] (1) (3-ブロモプロポキシ) (tert-ブチル) ジメチルシランの合成

[化32]



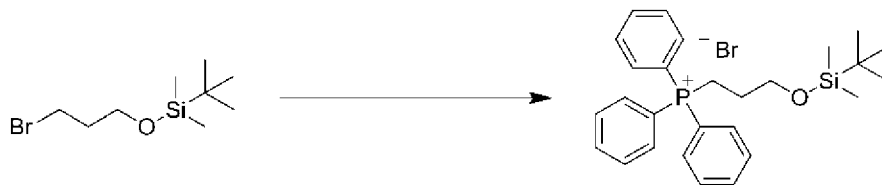
3-ブロモ-1-プロパノール (6.5 mL, 71.9 mmol) を塩化メチレン (250 mL) に溶解し、室温でイミダゾール (7.84 g, 115.0 mmol) を加え完全に溶解した。tert-ブチルジメチルシリルクロリド (13.0 g, 86.3 mmol) を加え、室温で3日間攪拌した。反応液をろ過したのち減圧下濃縮した。残渣にジエチルエーテル (300 mL) を加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順に洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (シクロヘキサン) にて精製し、標記化合物 (16.2 g, 64.0 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.08 (s, 6 H), 0.91 (s, 9 H), 2.05 (quin, $J=6.05$ Hz, 2 H), 3.53 (t, $J=6.42$ Hz, 2 H), 3.75 (t, $J=5.69$ Hz, 2 H).

[0104] (2) {3-[(tert-ブチルジメチルシリル) オキシ] プロピル} ト

リフェニルホスホニウム ブロミドの合成

[化33]

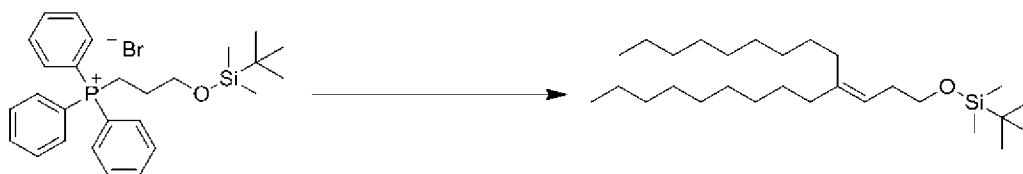


製造例4－(1)の方法に準じ、製造例5－(1)で得られた化合物(16.2g, 63.9mmol)、トリフェニルホスフィン(16.8g, 63.9mmol)およびアセトニトリル(125mL)から、標記化合物(21.2g, 41.1mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) : 0.01 (s, 6H), 0.84 (s, 9H), 1.65–1.75 (m, 2H), 3.48–3.57 (m, 2H), 3.69 (t, $J=6.14\text{Hz}$, 2H), 7.73–7.84 (m, 12H), 7.87–7.93 (m, 3H).

[0105] (3) tert-ブチルジメチル[(4-ノニル-3-トリデセン-1-イル)オキシ]シランの合成

[化34]



製造例5－(2)で得た化合物(4.38g, 8.50mmol)をTHF(15mL)に溶解し、窒素雰囲気下、室温でナトリウムビス(トリメチルシリル)アミド/THF溶液(1M, 8.5mL, 8.5mmol)を加えた。反応液を45℃まで加熱したのち30分間攪拌した。ノナデカン-10-オン(2.0g, 7.08mmol)のTHF(10mL)溶液を滴下したのち21時間加熱還流した。反応混合物を室温まで冷却したのちジエ

チルエーテルを加え、水、飽和食塩水の順に洗浄し、有機相を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）にて精製し、標記化合物（1.16 g）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.07 (s, 6H), 0.90 (m, 15H), 1.21–1.41 (m, 28H), 1.92–2.04 (m, 4H), 2.24 (q, $J=7.34$ Hz, 2H), 3.58 (t, $J=7.24$ Hz, 2H), 5.09 (t, $J=7.15$ Hz, 1H).

[0106] (4) 4-ノニルトリデカン-1-オールの合成

[化35]



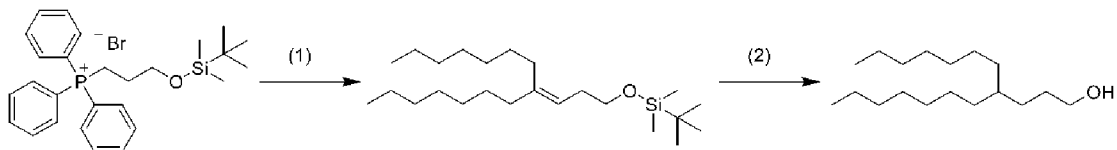
製造例5-(3)で得た化合物（1.16 g, 2.64 mmol）および10%パラジウム-炭素（0.28 g, 0.26 mmol）を酢酸エチル（10 mL）および酢酸（0.15 mL, 2.64 mmol）に懸濁し、水素雰囲気下、室温で常圧で18時間攪拌した。反応混合物をセライトでろ過しエタノールで洗浄したのち、ろ液を減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル/シクロヘキサン）にて精製し、標記化合物（0.35 g, 1.08 mmol）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 0.80–0.90 (m, 6H), 1.13–1.30 (m, 35H), 1.32–1.39 (m, 2H), 3.32–3.38 (m, 2H), 4.30 (t, $J=5.23$ Hz, 1H).

[0107] [製造例6]

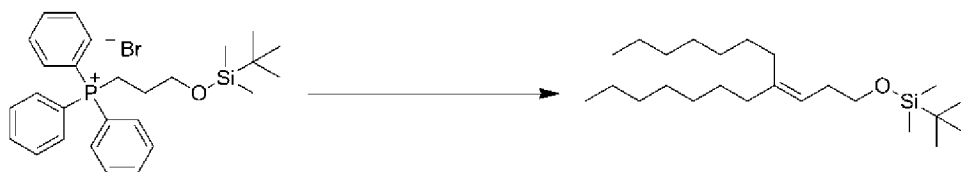
4-ヘプチルウンデカン-1-オールの合成

[化36]



[0108] (1) *tert*-ブチル〔(4-ヘプチル-3-ウンデセン-1-イル) オキシ〕ジメチルシランの合成

[化37]



製造例5-(3)の方法に準じ、{3-〔(*tert*-ブチルジメチルシリル) オキシ〕プロピル} トリフェニルホスホニウム ブロミド (3.0 g, 5.83 mmol)、THF (10 mL)、ナトリウム ビス(トリメチルシリル) アミド/THF 溶液 (1M, 5.8 mL, 5.8 mmol)、およびペンタデカン-8-オン (1.1 g, 4.86 mmol) から、標記化合物 (0.83 g, 2.17 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 Hz, CDCl_3) δ (ppm): 0.07 (s, 6H), 0.84–0.95 (m, 15H), 0.89 (s, 1H), 1.21–1.41 (m, 20H), 1.92–2.05 (m, 4H), 2.24 (q, $J=7.34$ Hz, 2H), 3.58 (t, $J=7.24$ Hz, 2H), 5.09 (t, $J=7.24$ Hz, 1H).

[0109] (2) 4-ヘプチルウンデカン-1-オール合成

[化38]



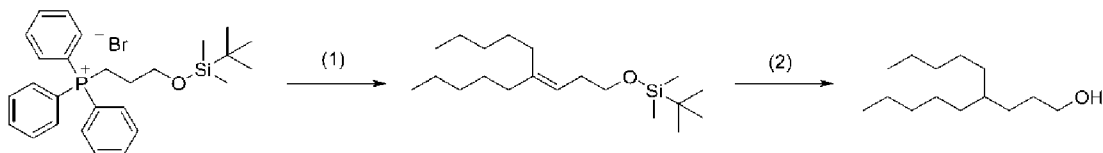
製造例 5 - (4) の方法に準じ、製造例 6 - (1) で得た化合物 (0.83 g, 2.17 mmol)、10%パラジウム-炭素 (0.23 g, 0.22 mmol)、酢酸エチル (10 mL)、および酢酸 (0.25 mL, 4.35 mmol) から、標記化合物 (0.42 g, 1.56 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) : 0.82–0.89 (m, 6H), 1.14–1.31 (m, 27H), 1.33–1.39 (m, 2H), 3.32–3.38 (m, 2H), 4.30 (t, $J = 5.14$ Hz, 1H).

[0110] [製造例 7]

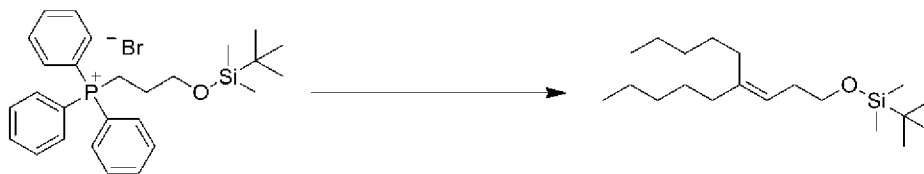
4-ペンチルノナン-1-オール合成

[化39]



[0111] (1) tert-ブチルジメチルシリル [(4-ペンチル-3-ノネン-1-イル) オキシ] シランの合成

[化40]



製造例 5 - (3) の方法に順じ、{3-[(tert-ブチルジメチルシリル) オキシ] プロピル} トリフェニルホスホニウム ブロミド (5.0 g, 9.72 mmol)、THF (4 mL)、ナトリウム ビス(トリメチルシリル) アミド/THF 溶液 (1M, 9.7 mL, 9.7 mmol)、およ

びウンデカン-6-オン（1.7 mL, 8.10 mmol）から、標記化合物（1.16 g）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 Hz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.07 (s, 6H), 0.90 (m, 15H), 1.19–1.43 (m, 13H), 1.92–2.05 (m, 4H), 2.21–2.29 (m, 2H), 3.58 (t, $J=7.24$ Hz, 2H), 5.10 (t, $J=7.15$ Hz, 1H).

[0112] (2) 4-ペンチルノナン-1-オール合成

[化41]



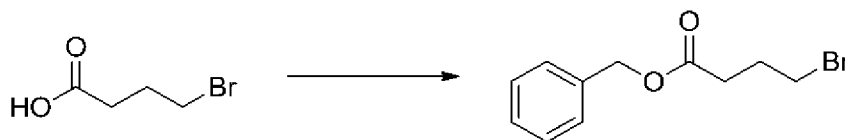
製造例5-(4)の方法に準じ、製造例7-(1)で得た化合物（1.12 g, 3.43 mmol）、10%パラジウム-炭素（0.37 g, 0.34 mmol）、酢酸エチル（15 mL）、および酢酸（0.39 mL, 6.86 mmol）から、標記化合物（0.22 g, 1.02 mmol）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 0.87–0.93 (m, 6H), 1.18–1.36 (m, 19H), 1.37–1.45 (m, 2H), 3.36–3.42 (m, 2H), 4.35 (t, $J=5.23$ Hz, 1H).

[0113] [製造例8]

ベンジル 4-ブロモブタノエートの合成

[化42]



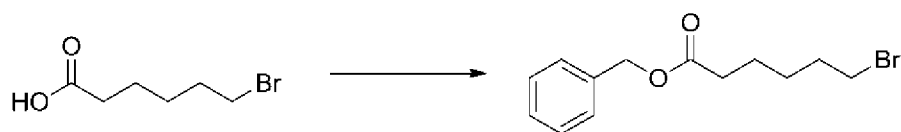
ベンジルアルコール (2.84 mL, 27.3 mmol)、4-ブロモブタン酸 (5.01 g, 30.0 mmol) および DMAP (0.33 g, 2.73 mmol) を塩化メチレン (50 mL) に溶解し、氷冷下、EDC (6.5 g, 34.1 mmol) を加え、室温で 2.5 時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮したのちジエチルエーテルに溶解した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、10%クエン酸水溶液で順に洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去し、標記化合物 (6.41 g, 24.9 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 2.20 (quin, $J=6.83$ Hz, 2H), 2.56 (t, $J=7.15$ Hz, 2H), 3.46 (t, $J=6.51$ Hz, 2H), 5.13 (s, 2H), 7.28–7.42 (m, 5H).

[0114] [製造例 9]

ベンジル 6-ブロモヘキサノエートの合成

[化43]



製造例 8 の方法に準じ、ベンジルアルコール (1.93 mL, 18.5 mmol)、6-ブロモヘキサノ酸 (4.33 g, 22.2 mmol)、DMAP (0.23 g, 1.85 mmol)、EDC (4.43 g, 23.1 mmol) および塩化メチレン (35 mL) から、標記化合物 (5.43 g, 19.0 mmol) を得た。

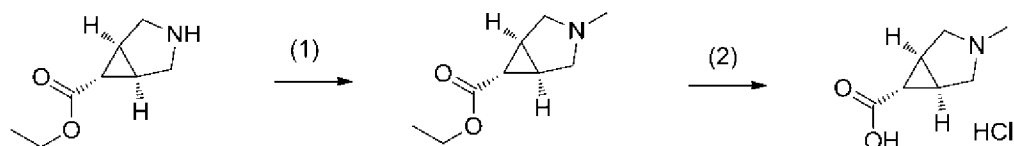
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1.44–1.51 (m, 2H), 1.64–1.72 (m, 2H), 1.83–1.90 (m, 2H), 2.38 (t, $J=7.43$ Hz, 2H), 3.39 (t, $J=6.69$ Hz, 2H), 5.12 (s, 2H), 7.30–7.40

(m, 5 H) .

[0115] [製造例 10]

(1 R, 5 S, 6 r) - 3 - メチル - 3 - アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン - 6 - カルボン酸 塩酸塩の合成

[化44]



[0116] (1) (1 R, 5 S, 6 r) - エチル 3 - メチル - 3 - アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン - 6 - カルボキシレート の合成

(1 R, 5 S, 6 r) - エチル 3 - アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン - 6 - カルボキシレート (CAS 174456-77-0) (0.89 g, 5.74 mmol) を THF (20 mL) に溶解し、酢酸 (0.49 mL, 8.6 mmol)、ホルムアルデヒド溶液 (11.7 mL, 161.5 mmol) を室温で順に加え、30 分間攪拌した。ナトリウムトリ (アセトキシ) ボロヒドリド (2.43 g, 11.5 mmol) を加え、室温で3時間攪拌した。反応混合物を、減圧下、濃縮したのち、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、塩化メチレンで抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥した。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 (塩化メチレン/メタノール) にて精製し、標記化合物 (0.70 g, 4.14 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1.25 (t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 3 H), 1.94 (br s, 2 H), 2.01 (br s, 1 H), 2.29 (s, 3 H), 2.35 (d, $J = 9.2 \text{ Hz}$, 2 H), 3.05 (d, $J = 9.2 \text{ Hz}$, 2 H), 4.09 (q, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 2 H) .

[0117] (2) (1 R, 5 S, 6 r) - 3 - メチル - 3 - アザビシクロ [3. 1. 0]

〕ヘキサノー６－カルボン酸 塩酸塩の合成

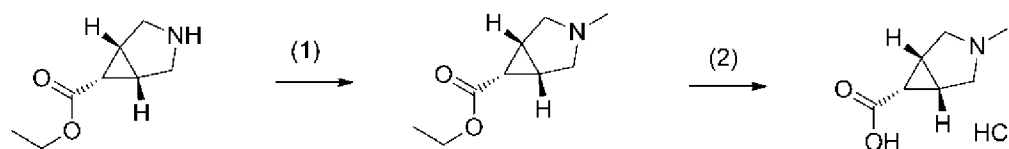
製造例１０－（１）で得た化合物（０．６０ｇ，３．５５ｍｍｏｌ）に濃塩酸（１０ｍＬ）を加え、７０℃で１２時間攪拌した。反応混合物を、減圧下、濃縮し、標記化合物（０．５２ｇ，３．０５ｍｍｏｌ）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ （４００ＭＨｚ， DMSO-d_6 ） δ （ｐｐｍ）：２．１４（ｂｒ ｓ，２Ｈ），２．２５（ｂｒ ｓ，１Ｈ），２．７４（ｂｒ ｓ，３Ｈ），３．２５－３．３７（ｍ，２Ｈ），３．５６－３．６７（ｍ，２Ｈ）、１０．９１（ｂｒ ｓ，１Ｈ），１２．４９（ｂｒ ｓ，１Ｈ）．

[0118] [製造例１１]

（１Ｒ，５Ｓ，６ｓ）－３－メチルー３－アザビシクロ〔３．１．０〕ヘキサノー６－カルボン酸 塩酸塩の合成

[化45]



[0119] （１）（１Ｒ，５Ｓ，６ｓ）－エチル ３－メチルー３－アザビシクロ〔３．１．０〕ヘキサノー６－カルボキシレート

製造例１０－（１）の方法に準じ、（１Ｒ，５Ｓ，６ｓ）－エチル ３－アザビシクロ〔３．１．０〕ヘキサノー６－カルボキシレート（ＣＡＳ １１４４０９９－５４－６）（２．５ｇ，１６．１ｍｍｏｌ）、酢酸（１．４ｍＬ，２４．２ｍｍｏｌ）、ホルムアルデヒド溶液（１０．０ｍＬ，１３４．３ｍｍｏｌ）、ナトリウムトリ（アセトキシ）ボロヒドリド（６．８ｇ，３２．２ｍｍｏｌ）、およびＴＨＦ（５０ｍＬ）から、標記化合物（２．５ｇ，１４．８ｍｍｏｌ）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ （４００ＭＨｚ， CDCl_3 ） δ （ｐｐｍ）：１．２３（ｔ， $J=7.1\text{ Hz}$ ，３Ｈ），１．４８－１．６８（ｍ，３Ｈ），２．２２（ｓ，３Ｈ），２．３３（ｂｒ ｄ， $J=8.8\text{ Hz}$ ，２Ｈ），３．０２（ｄ， J

= 8.8 Hz, 2H), 4.10 (q, J = 7.1 Hz, 2H).

[0120] (2) (1R, 5S, 6s) - 3-メチル-3-アザビシクロ [3.1.0]ヘキサン-6-カルボン酸 塩酸塩の合成

製造例10-(2)の方法に準じ、製造例10-(2)で得た化合物 (500 mg, 2.96 mmol) と濃塩酸 (10 mL) とから、標記化合物 (350 mg, 1.97 mmol) を得た。

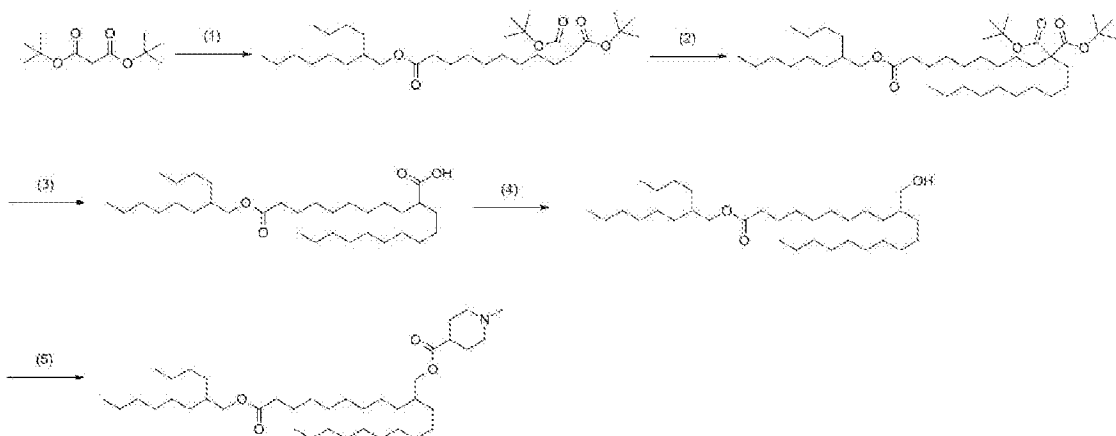
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) : 1.88–1.94 (m, 0.45 H), 1.94–2.00 (m, 0.55 H), 2.35–2.45 (m, 2H), 2.68 (br s, 1.65 H), 2.67 (br s, 1.35 H), 3.08–3.18 (m, 1.1 H), 3.45–3.57 (m, 0.9 H)、3.73–3.88 (m, 2H), 9.16 (br s, 1H), 11.52 (br s, 1H).

[0121] <カチオン性脂質の合成 (1)>

[実施例 A-1]

2- {9- [(2-ブチルオクチル) オキシ] -9-オキソノニル} ドデシル 1-メチルピペリジニ-4-カルボキシレート (カチオン性脂質 1)

[化46]



[0122] (1) 1,1-ジ-tert-ブチル 9-(2-ブチルオクチル)ノナン-1,1,9-トリカルボキシレートの合成

60%水素化ナトリウム (59 mg, 1.48 mmol) を1,4-ジオ

キサソ (6.5 mL) に懸濁させ、室温でジ-tert-ブチル マロネート (0.30 mL, 1.35 mmol) をゆっくり加え、20分間攪拌した。製造例1で得た化合物 (573 mg, 1.41 mmol) を1,4-ジオキサソ (1 mL) を使って加え、70℃で3時間、95℃で15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 (490 mg, 0.91 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.80–0.98 (m, 6H), 1.18–1.38 (m, 24H), 1.39–1.54 (m, 2H), 1.46 (s, 18H), 1.55–1.69 (m, 3H), 1.71–1.87 (m, 2H), 2.24–2.35 (m, 2H), 3.06–3.15 (m, 1H), 3.91–4.02 (m, 2H).

[0123] (2) 9,9-ジ-tert-ブチル 1-(2-ブチルオクチル) 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 (490 mg, 0.91 mmol) を1,4-ジオキサソ (4 mL) に溶解し、水冷下、60%水素化ナトリウム (47 mg, 1.18 mmol) を加え、室温で5分間攪拌した。1-ヨードデカン (0.39 mL, 1.81 mmol) を加え、80℃で15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 (450 mg, 0.66 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.80–0.96 (m, 9H), 1.05–1.36 (m, 40H), 1.39–1.49 (m, 2H), 1.44 (s, 18H), 1.53–1.68 (m, 3H)

, 1.70–1.82 (m, 4H), 2.23–2.34 (m, 2H), 3.92–4.01 (m, 2H).

[0124] (3) 2- {9- [(2-ブチルオクチル) オキシ] -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 (450 mg, 0.66 mmol) を塩化メチレン (2 mL) に溶解し、氷冷下、TFA (1 mL) を加え、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 (5 mL) 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 (240 mg, 0.46 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.80–0.97 (m, 9H), 1.16–1.70 (m, 49H), 2.22–2.41 (m, 3H), 3.92–4.02 (m, 2H).

[0125] (4) 2-ブチルオクチル 10-(ヒドロキシメチル) イコサノエートの合成

実施例A-1-(3) で得た化合物 (240 mg, 0.46 mmol) をTHF (4 mL) に溶解し、-15℃で0.92 M ボラン-THF 錯体 (0.75 mL, 0.69 mmol) を滴下し、0℃で2時間攪拌した。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 (197 mg, 0.39 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.80–0.98 (m, 9H), 1.10–1.39 (m, 46H), 1.39–1.50

(m, 1H), 1.54–1.69 (m, 4H), 2.23–2.36 (m, 2H), 3.48–3.59 (m, 2H), 3.92–4.02 (m, 2H).

[0126] (5) 2- {9- [(2-ブチルオクチル) オキシ] -9-オキソノニル} ドデシル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレートの合成

実施例A-1-(4) で得た化合物 (38 mg, 0.074 mmol)、DIEA (0.054 mL, 0.31 mmol)、1-メチルピペリジン-4-カルボン酸 塩酸塩 (27 mg, 0.15 mmol) およびDMA P (1.8 mg, 0.015 mmol) を塩化メチレン (0.8 mL) に溶解し、氷冷下、EDC (31 mg, 0.16 mmol) を加え、室温で15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 (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 (38 mg, 0.060 mmol) を得た。

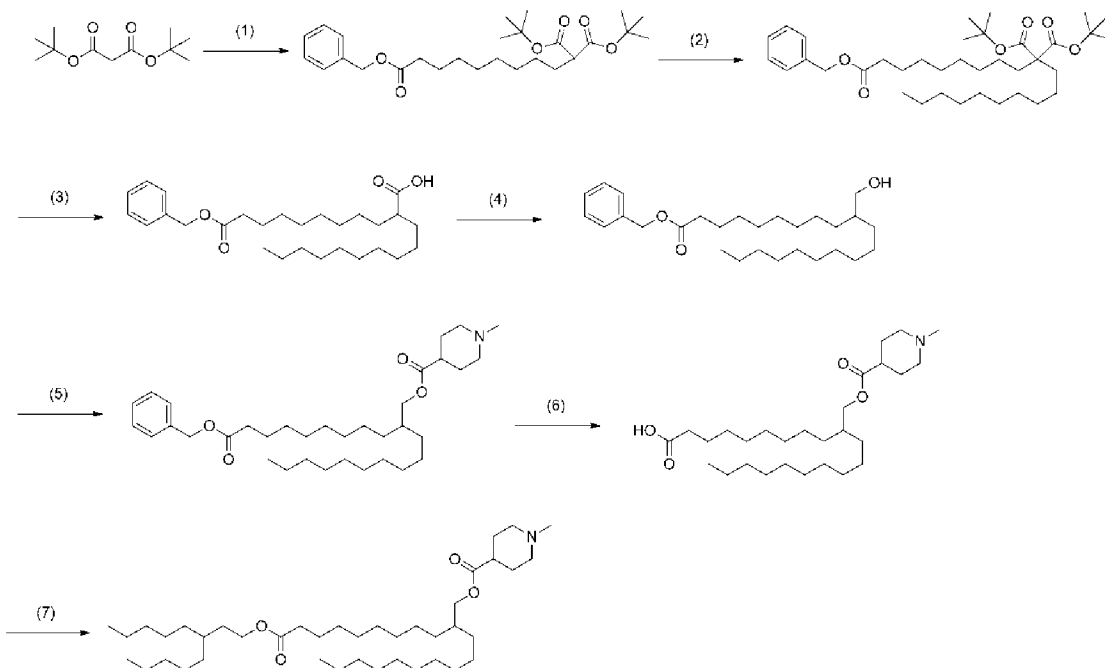
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.77–0.97 (m, 9H), 1.13–1.41 (m, 46H), 1.50–1.69 (m, 4H), 1.69–1.85 (m, 2H), 1.85–2.09 (m, 4H), 2.18–2.35 (m, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.72–2.88 (m, 2H), 3.90–4.03 (m, 4H).

[0127] <カチオン性脂質の合成 (2)>

[実施例A-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-メチルピペリジン-4-カルボキシレート (カチオン性脂質2)

[化47]



[0128] (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(83mg, 2.07mmol)を1,4-ジオキサン(9.4mL)に懸濁させ、室温でジ-*tert*-ブチル マロネート(0.42mL, 1.88mmol)をゆっくり加え、10分間攪拌した。製造例2で得た化合物(650mg, 1.99mmol)を加え、95℃で13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(536mg, 1.16mmol)を得た。

[0129] (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-(2)の方法に準じ、実施例A-2-(1)で得られた化合物(590mg, 1.28mmol)、1-ヨードデカン(0.54mL

, 2.55 mmol)、65%水素化ナトリウム(71 mg, 1.91 mmol)および1,4-ジオキサン(5 mL)から標記化合物(470 mg, 0.78 mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 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).

[0130] (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-(3)の方法に準じ、実施例A-2-(2)で得られた化合物(470 mg, 0.78 mmol)、塩化メチレン(2 mL)、TFA(1 mL)、およびキシレン(2 mL)から標記化合物(286 mg, 0.64 mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 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).

[0131] (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-(4)の方法に準じ、実施例A-2-(3)で得た化合物(285 mg, 0.64 mmol)、0.92 M ボラン-THF 錯体(1.0 mL, 0.96 mmol)、およびTHF(3.2 mL)から標記化合物(223 mg, 0.52 mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 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).

[0132] (5) 2-[9-(ベンジロキシ)-9-オキソノニル]ドデシル 1-メチ

ルピペリジン-4-カルボキシレート合成

実施例A-1-(5)の方法に準じ、実施例A-2-(4)で得た化合物(114 mg, 0.26 mmol)、1-メチルピペリジン-4-カルボン酸 塩酸塩(95 mg, 0.53 mmol)、EDC(111 mg, 0.58 mmol)、DIPEA(0.090 mL, 0.53 mmol)、DMAP(6.4 mg, 0.053 mmol)および塩化メチレン(1.3 mL)から標記化合物(128 mg, 0.23 mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.81–0.96 (m, 3H), 1.15–1.41 (m, 31H), 1.52–1.70 (m, 2H), 1.70–1.84 (m, 2H), 1.85–2.06 (m, 4H), 2.18–2.40 (m, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.73–2.89 (m, 2H), 3.92–4.03 (m, 2H), 5.12 (s, 2H), 7.28–7.44 (m, 5H).

[0133] (6) 10- {[(1-メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ] メチル} イコサン酸の合成

実施例A-2-(5)で得た化合物(127 mg, 0.23 mmol)を酢酸エチル(2 mL)に溶解し、室温で10%パラジウム-炭素(24 mg, 50%含水)を加え、水素雰囲気下、常圧で3時間攪拌した。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、得られた残渣をカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記化合物(94 mg, 0.20 mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.81–0.95 (m, 3H), 1.12–1.44 (m, 31H), 1.53–1.71 (m, 2H), 1.74–1.95 (m, 2H), 1.97–2.10 (m, 2H), 2.11–2.37 (m, 5H), 2.40 (s, 3H), 3.11–3.28 (m, 2H), 3.79–3.92 (m, 1H), 4.14–4.25 (m, 1H).

[0134] (7) 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-メチルピペリジン-4-カルボキシレートの合成

製造例2の方法に準じ、実施例A-2-(6)で得た化合物(93mg, 0.20mmol)、3-ペンチルオクタン-1-オール(CAS 1443519-63-8)(60mg, 0.30mmol)、EDC(42mg, 0.22mmol)、DMAP(4.9mg, 0.040mmol)および塩化メチレン(1.5mL)から標記化合物(103mg, 0.16mmol)を得た。

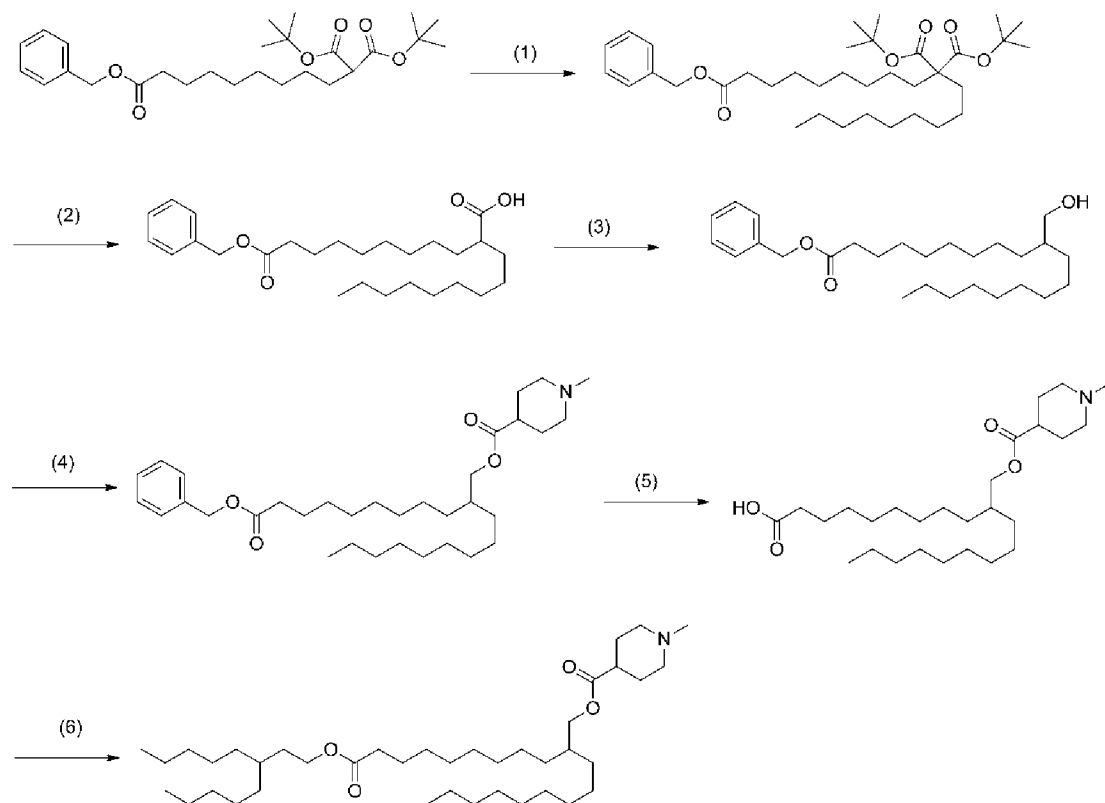
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.82-0.95 (m, 9H), 1.14-1.46 (m, 46H), 1.50-1.68 (m, 6H), 1.70-1.84 (m, 2H), 1.85-2.06 (m, 4H), 2.19-2.33 (m, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.74-2.87 (m, 2H), 3.93-4.02 (m, 2H), 4.03-4.14 (m, 2H).

[0135] <カチオン性脂質の合成(3)>

[実施例A-3]

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

[化48]



[0136] (1) 1-ベンジル 9,9-ジ-*tert*-ブチル オクタデカン-1,9,9-トリカルボキシレート合成

実施例A-2-(1)で得られた化合物(536mg, 1.16mmol)をTHF(6mL)に溶解し、水冷下、60%水素化ナトリウム(58mg, 1.45mmol)を加え、室温で5分間攪拌した。1-ヨードノナン(0.23mL, 1.16mmol)を加え、80℃で20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(340mg, 0.577mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.82–0.92 (m, 3H), 1.03–1.36 (m, 24H), 1.44 (s, 18

H), 1.57–1.68 (m, 2H), 1.71–1.81 (m, 4H), 2.28–2.40 (m, 2H), 5.11 (s, 2H), 7.28–7.41 (m, 5H).

[0137] (2) 11-(ベンジロキシ)-2-ノニル-11-オキソ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-3-(1)で得られた化合物(340mg, 0.58mmol)、塩化メチレン(2mL)、TFA(1mL)、およびキシレン(2mL)から標記化合物(96mg, 0.22mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.80–0.95 (m, 3H), 1.12–1.74 (m, 30H), 2.28–2.41 (m, 3H), 5.11 (s, 2H), 7.28–7.40 (m, 5H).

[0138] (3) ベンジル 10-(ヒドロキシメチル)ノナデカノエートの合成

実施例A-1-(4)の方法に準じ、実施例A-3-(2)で得た化合物(96mg, 0.22mmol)、0.92Mボラン-THF錯体(0.36mL, 0.33mmol)およびTHF(1.1mL)から標記化合物(80mg, 0.19mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.81–0.94 (m, 3H), 1.09–1.38 (m, 29H), 1.38–1.50 (m, 1H), 1.58–1.71 (m, 2H), 2.30–2.40 (m, 2H), 3.48–3.58 (m, 2H), 5.11 (s, 2H), 7.29–7.42 (m, 5H).

[0139] (4) 11-(ベンジロキシ)-2-ノニル-11-オキソウンデシル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレートの合成

実施例A-1-(5)の方法に準じ、実施例A-3-(3)で得た化合物(80mg, 0.19mmol)、1-メチルピペリジン-4-カルボン酸 塩酸塩(69mg, 0.38mmol)、EDC(81mg, 0.42mmol)、DIPEA(0.066mL, 0.38mmol)、DMAP

(4.7 mg, 0.038 mmol) および塩化メチレン (1.0 mL) から標記化合物 (97 mg, 0.18 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.83–0.94 (m, 3H), 1.15–1.39 (m, 29H), 1.52–1.70 (m, 2H), 1.70–1.85 (m, 2H), 1.85–2.07 (m, 4H), 2.19–2.40 (m, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.73–2.88 (m, 2H), 3.94–4.02 (m, 2H), 5.12 (s, 2H), 7.28–7.43 (m, 5H).

[0140] (5) 10- { [(1-メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ] メチル } ノナデカン酸の合成

実施例 A-2-(6) の方法に準じ、実施例 A-3-(4) で得た化合物 (96 mg, 0.18 mmol) を酢酸エチル (2 mL) に溶解し、室温で 10% パラジウム-炭素 (19 mg, 50% 含水) を加え、水素雰囲気下、常圧で 3 時間攪拌した。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、得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール) にて精製し、標記化合物 (74 mg, 0.163 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.81–0.95 (m, 3H), 1.12–1.44 (m, 29H), 1.53–1.71 (m, 2H), 1.74–1.94 (m, 2H), 1.98–2.08 (m, 2H), 2.08–2.38 (m, 5H), 2.39 (s, 3H), 3.10–3.30 (m, 2H), 3.80–3.91 (m, 1H), 4.14–4.25 (m, 1H).

[0141] (6) 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-メチルピペリジン-4-カルボキシレートの合成

製造例 2 の方法に準じ、実施例 A-3-(5) で得た化合物 (74 mg, 0.16 mmol)、3-ペンチルオクタン-1-オール (CAS 1443519-63-8) (49 mg, 0.25 mmol)、EDC (38 mg

, 0.20 mmol)、DMAP (4.0 mg, 0.033 mmol) および塩化メチレン (1.2 mL) から標記化合物 (81 mg, 0.13 mmol) を得た。

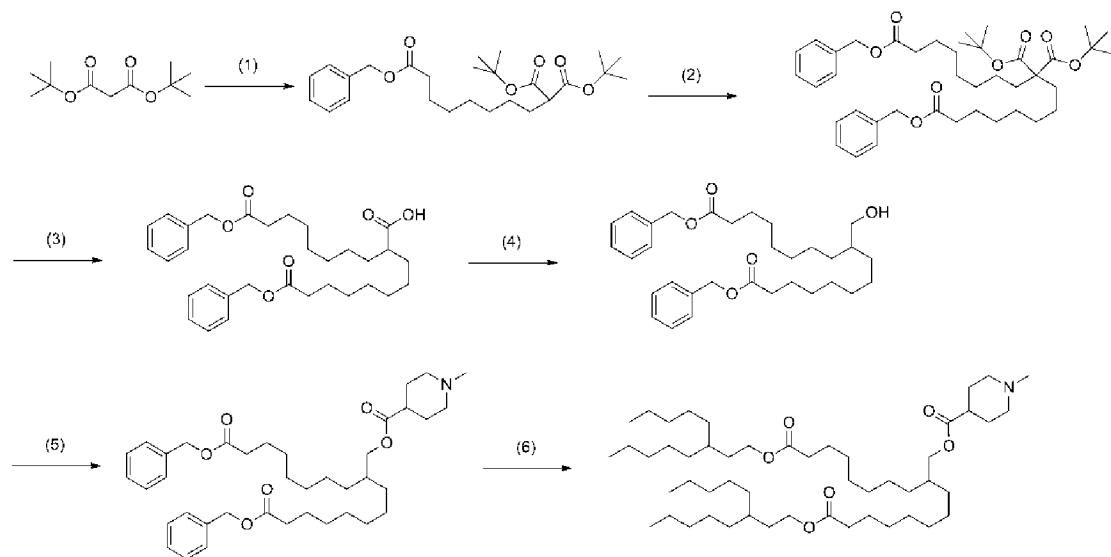
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.81–0.95 (m, 9H), 1.15–1.47 (m, 44H), 1.50–1.68 (m, 6H), 1.70–1.84 (m, 2H), 1.84–2.06 (m, 4H), 2.18–2.33 (m, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.73–2.87 (m, 2H), 3.94–4.01 (m, 2H), 4.04–4.12 (m, 2H).

[0142] <カチオン性脂質の合成 (4)>

[実施例 A-4]

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

[化49]



[0143] (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

60%水素化ナトリウム (59 mg, 1.48 mmol) を DMF (5.4 mL) に懸濁させ、氷冷下、ジ-tert-ブチル マロネート (0.3

0 mL, 1.35 mmol) をゆっくり加え、0℃で5分間攪拌したのちバスを取り外して20分間攪拌した。氷冷下、ナトリウムヨージド (61 mg, 0.40 mmol)、製造例3で得た化合物 (443 mg, 1.41 mmol) を加え、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 (456 mg, 1.02 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 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).

[0144] (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-4-(1)の方法に準じ、実施例A-4-(1)で得られた化合物 (456 mg, 1.02 mmol)、製造例3で得た化合物 (478 mg, 1.53 mmol)、ナトリウムヨージド (46 mg, 0.31 mmol)、60%水素化ナトリウム (49 mg, 1.22 mmol) およびDMF (3.3 mL) から標記化合物 (380 mg, 0.56 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 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).

[0145] (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-4-(2)で得られた化合物(380mg, 0.56mmol)、塩化メチレン(2mL)、TFA(1mL)、およびキシレン(2mL)から標記化合物(234mg, 0.45mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, 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).

[0146] (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

実施例A-1-(4)の方法に準じ、実施例A-4-(3)で得た化合物(234mg, 0.45mmol)、0.92Mボラン-THF錯体(0.73mL, 0.67mmol)とTHF(1.8mL)とから標記化合物(188mg, 0.37mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, 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).

[0147] (5) ジベンジル 9-{[(1-メチルピペリジン-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

実施例A-1-(5)の方法に準じ、実施例A-4-(4)で得た化合物(188mg, 0.37mmol)、1-メチルピペリジン-4-カルボン酸 塩酸塩(132mg, 0.74mmol)、EDC(155mg, 0.81mmol)、DIPEA(0.126mL, 0.74mmol)、DMAP(9.0mg, 0.074mmol)および塩化メチレン(1.9mL)から標記化合物(217mg, 0.34mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.16–1.38 (m, 21H), 1.53–1.69 (m, 4H), 1.70–1.84

(m, 2H), 1.85–2.04 (m, 4H), 2.19–2.40 (m, 5H), 2.26 (s, 3H), 2.74–2.86 (m, 2H), 3.92–4.01 (m, 2H), 5.11 (s, 4H), 7.28–7.41 (m, 10H).

[0148] (6) ビス(3-ペンチルオクチル) 9- {[(1-メチルピペリジン-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

実施例A-4-(5) で得た化合物(217mg, 0.34mmol)をTHF(4mL)およびメタノール(2mL)に溶解し、室温で10%パラジウム-炭素(19mg, 50%含水)を加え、水素雰囲気下、常圧で2時間攪拌した。反応系を窒素で置換したのち反応液を濾過し、メタノールで洗浄した。濾液を減圧下濃縮し、9- {[(1-メチルピペリジン-4-カルボニル)オキシ] メチル} ヘプタデカン二酸の粗生成物(160mg)を得た。

製造例2の方法に準じ、得られた粗生成物(40mg)、3-ペンチルオクタン-1-オール(CAS 1443519-63-8)(44mg, 0.22mmol)、EDC(37mg, 0.19mmol)、DMAP(2.1mg, 0.018mmol)およびTHF(1mL)から標記化合物(34mg, 0.041mmol)を得た。

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃) δ(ppm): 0.83–0.94 (m, 12H), 1.14–1.48 (m, 53H), 1.51–1.67 (m, 10H), 1.70–1.84 (m, 2H), 1.85–2.07 (m, 4H), 2.18–2.34 (m, 5H), 2.27 (s, 3H), 2.74–2.88 (m, 2H), 3.93–4.01 (m, 2H), 4.03–4.12 (m, 4H).

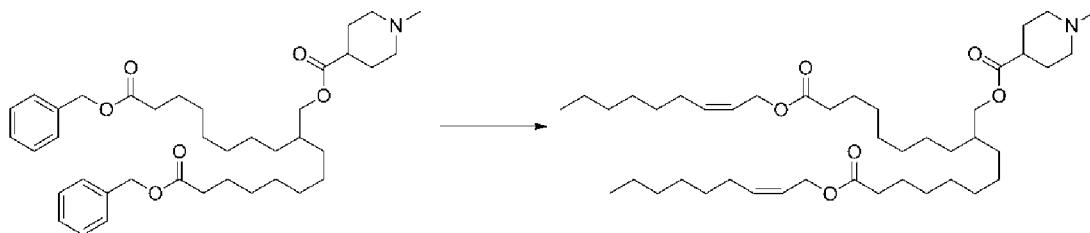
[0149] <カチオン性脂質の合成(5)>

[実施例A-5]

ジ[(Z)-2-ノネン-1-イル] 9- {[(1-メチルピペリジン-4-カルボニル)オキシ] メチル} ヘプタデカンジオエート(カチオン性脂

質 5)

[化50]



[0150] 製造例2の方法に準じ、実施例A-4-(6)で得た9-[[[(1-メチルピペリジン-4-カルボニル)オキシ]メチル]ヘプタデカン二酸の粗生成物(60mg)と*cis*-2-ノネン-1-オール(0.066mL, 0.40mmol)、EDC(56mg, 0.29mmol)、DMAP(3.2mg, 0.026mmol)およびTHF(1.3mL)から標記化合物(76mg, 0.11mmol)を得た。

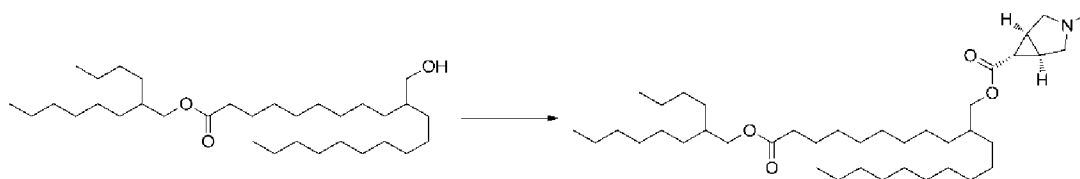
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.81-0.96 (m, 6H), 1.15-1.44 (m, 35H), 1.52-1.68 (m, 6H), 1.70-1.84 (m, 2H), 1.85-2.05 (m, 4H), 2.05-2.15 (m, 4H), 2.21-2.35 (m, 5H), 2.27 (s, 3H), 2.74-2.88 (m, 2H), 3.93-4.01 (m, 2H), 4.57-4.67 (m, 4H), 5.47-5.58 (m, 2H), 5.59-5.70 (m, 2H).

[0151] <カチオン性脂質の合成(6)>

[実施例A-6]

(1*R*, 5*S*, 6*r*)-2-{9-[(2-ブチルオクチル)オキシ]-9-オキソノニル}ドデシル 3-メチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-6-カルボキシレート(カチオン性脂質6)

[化51]



[0152] 実施例A-1-(5)の方法に準じ、実施例A-1-(4)で得た化合物 (40 mg, 0.078 mmol)、製造例10-(2)で得た化合物 (28 mg, 0.16 mmol)、EDC (33 mg, 0.17 mmol)、DIPEA (0.027 mL, 0.16 mmol)、DMAP (1.9 mg, 0.016 mmol) および塩化メチレン (1.0 mL) から標記化合物 (40 mg, 0.063 mmol) を得た。

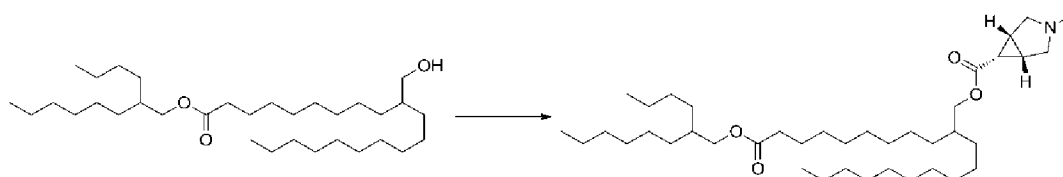
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.80–1.00 (m, 9H), 1.16–1.40 (m, 46H), 1.52–1.70 (m, 4H), 1.89–1.97 (m, 2H), 1.98–2.06 (m, 1H), 2.23–2.42 (m, 4H), 2.30 (s, 3H), 3.00–3.12 (m, 2H), 3.87–4.03 (m, 4H).

[0153] <カチオン性脂質の合成(7)>

[実施例A-7]

(1R, 5S, 6s)-2-{9-[(2-ブチルオクチル)オキシ]-9-オキソノニル}ドデシル 3-メチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-6-カルボキシレート (カチオン性脂質7)

[化52]



[0154] 実施例A-1-(5)の方法に準じ、実施例A-1-(4)で得た化合物(40mg, 0.078mmol)、製造例11-(2)で得た化合物(27.8mg, 0.16mmol)、EDC(33mg, 0.17mmol)、DIPEA(0.027mL, 0.157mmol)、DMAP(1.9mg, 0.016mmol)および塩化メチレン(1.0mL)から標記化合物(38mg, 0.060mmol)を得た。

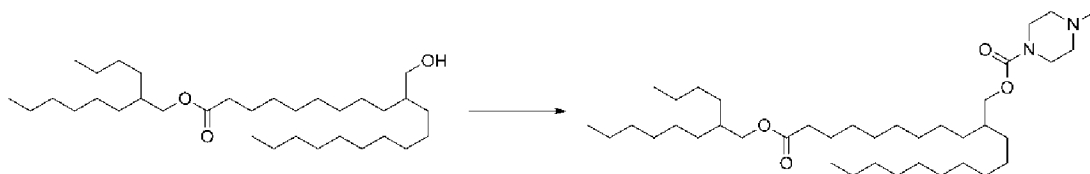
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.81–0.97 (m, 9H), 1.15–1.40 (m, 46H), 1.46–1.70 (m, 7H), 2.21 (s, 3H), 2.24–2.38 (m, 4H), 2.96–3.07 (m, 2H), 3.85–4.02 (m, 4H).

[0155] <カチオン性脂質の合成(8)>

[実施例A-8]

2-{9-[(2-ブチルオクチル)オキシ]-9-オキソノニル}ドデシル4-メチルピペラジーン-1-カルボキシレート(カチオン性脂質8)

[化53]



[0156] 実施例A-1-(4)で得た化合物(11mg, 0.022mmol)とピリジン(0.0043mL, 0.054mmol)を塩化メチレン(0.8mL)に溶解し、氷冷下、クロロギ酸4-ニトロフェニル(12mg, 0.060mmol)を加え、同温で10分間、室温で1時間半撹拌した。反応液に1-メチルピペラジン(0.010mL, 0.090mmol)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、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（11 mg, 0.017 mmol）を得た。

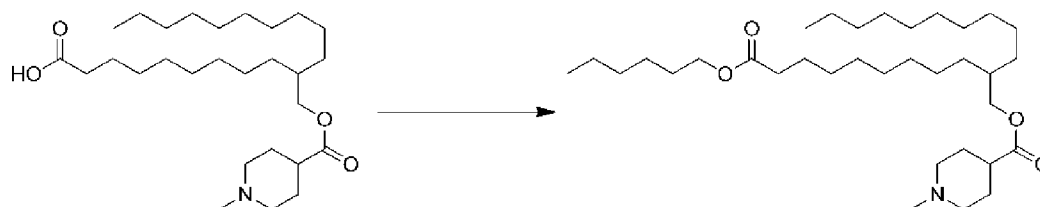
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.80–0.98 (m, 9H), 1.16–1.42 (m, 46H), 1.52–1.77 (m, 4H), 2.23–2.44 (m, 6H), 2.30 (s, 3H), 3.42–3.57 (m, 4H), 3.90–4.04 (m, 4H).

[0157] <カチオン性脂質の合成（9）>

[実施例 A-9]

2-〔9-（ヘキシルオキシ）-9-オキソノニル〕ドデシル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート（カチオン性脂質 9）

[化54]



製造例 2 の方法に準じ、実施例 A-2-（6）で得た化合物（100 mg, 0.21 mmol）、ヘキサノール（32 μL , 0.26 mmol）、EDC（49 mg, 0.26 mmol）、DMAP（5.0 mg, 0.050 mmol）および塩化メチレン（5.0 mL）から標記化合物（102 mg, 0.19 mmol）を得た。

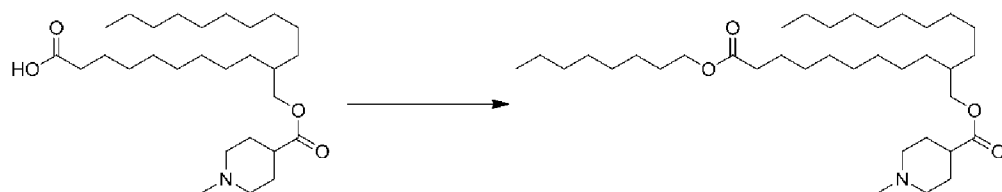
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.85–0.92 (m, 6H), 1.19–1.39 (m, 37H), 1.57–1.66 (m, 5H), 1.73–1.84 (m, 2H), 1.87–1.94 (m, 2H), 1.96–2.07 (m, 2H), 2.22–2.32 (m, 6H), 2.73–2.87 (m, 2H), 3.98 (d, $J=5.50\text{ Hz}$, 2H), 4.06 (t, $J=6.79\text{ Hz}$, 2H).

[0158] <カチオン性脂質の合成 (10)>

[実施例 A-10]

2- [9- (オクチルオキシ) -9-オキソノニル] ドデシル 1-メチル
 ピペリジン-4-カルボキシレート (カチオン性脂質 10)

[化55]



製造例 2 の方法に準じ、実施例 A-2-(6) で得た化合物 (200 mg, 0.42 mmol)、オクタン-1-オール (67 mg, 0.51 mmol)、EDC (98 mg, 0.51 mmol)、DMAP (10 mg, 0.09 mmol) および塩化メチレン (10 mL) から標記化合物 (109 mg, 0.19 mmol) を得た。

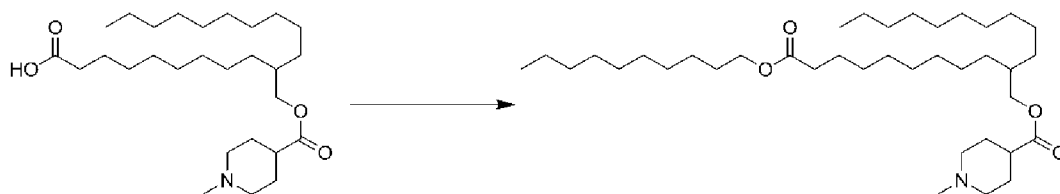
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.91 (t, $J=6.97$ Hz, 6H), 1.23–1.40 (m, 40H), 1.60–1.68 (m, 5H), 1.76–1.85 (m, 2H), 1.89–1.95 (m, 2H), 1.97–2.06 (m, 2H), 2.25–2.33 (m, 6H), 2.78–2.86 (m, 2H), 4.00 (d, $J=5.69$ Hz, 2H), 4.08 (t, $J=6.79$ Hz, 2H).

[0159] <カチオン性脂質の合成 (11)>

[実施例 A-11]

2- [9- (デシルオキシ) -9-オキソノニル] ドデシル 1-メチルピ
 ペリジン-4-カルボキシレート (カチオン性脂質 11)

[化56]



製造例2の方法に準じ、実施例A-2-(6)で得た化合物(200mg, 0.42mmol)、デカン-1-オール(100 μ L, 0.51mmol)、EDC(98mg, 0.51mmol)、DMAP(10mg, 0.09mmol)および塩化メチレン(10mL)から標記化合物(153mg, 0.25mmol)を得た。

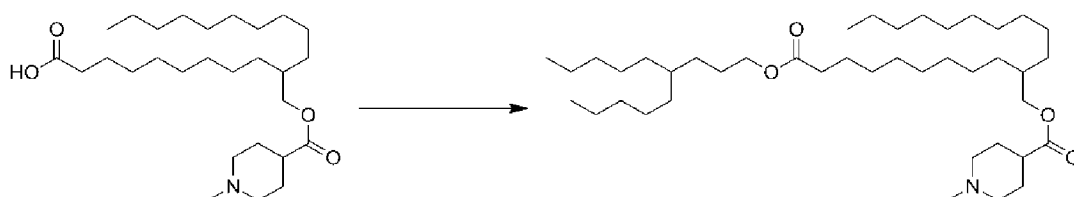
$^1\text{H-NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.91 (t, $J=7.06\text{Hz}$, 6H), 1.17–1.42 (m, 44H), 1.60–1.68 (m, 5H), 1.75–1.86 (m, 2H), 1.88–1.96 (m, 2H), 1.97–2.07 (m, 2H), 2.24–2.35 (m, 6H), 2.78–2.87 (m, 2H), 4.00 (d, $J=5.50\text{Hz}$, 2H), 4.08 (t, $J=6.79\text{Hz}$, 2H).

[0160] <カチオン性脂質の合成(12)>

[実施例A-12]

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-メチルピペリジン-4-カルボキシレート(カチオン性脂質12)

[化57]



製造例2の方法に準じ、実施例A-2-(6)で得た化合物(200mg, 0.42mmol)、製造例7-(2)で得た化合物(115mg, 0.60mmol)、EDC(98mg, 0.51mmol)、DMAP(10mg, 0.09mmol)および塩化メチレン(10mL)から標記化合物(212mg, 0.32mmol)を得た。

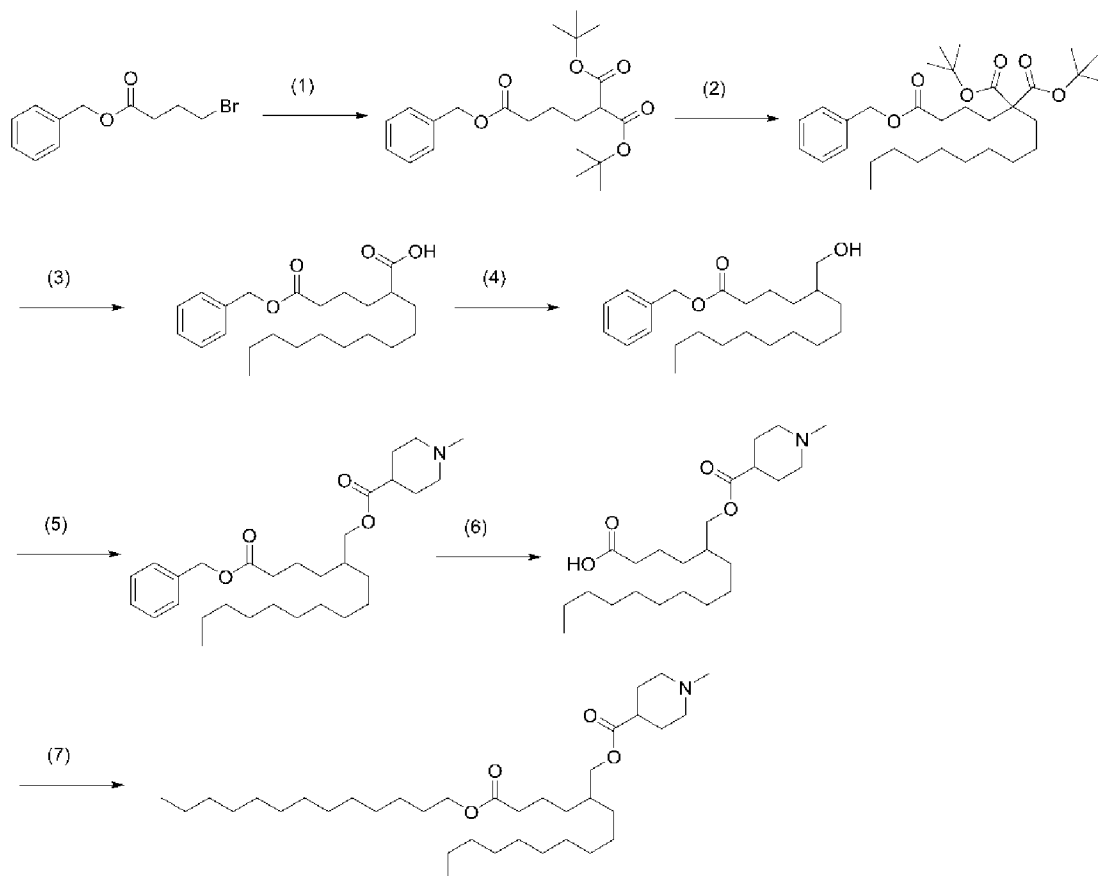
$^1\text{H-NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.85-0.92 (m, 9H), 1.16-1.34 (m, 49H), 1.51-1.66 (m, 5H), 1.73-1.84 (m, 2H), 1.86-1.94 (m, 2H), 1.95-2.05 (m, 2H), 2.23-2.31 (m, 6H), 2.75-2.85 (m, 2H), 3.98 (d, $J=5.50\text{Hz}$, 2H), 4.04 (t, $J=6.79\text{Hz}$, 2H) .

[0161] <カチオン性脂質の合成(13)>

[実施例A-13]

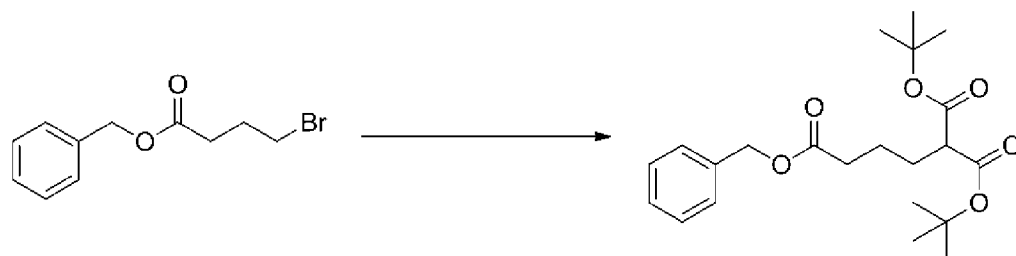
2-(4-オキソ-4-(トリデシルオキシ)ブチル)ドデシル 1-メチルピペリジーン-4-カルボキシレート(カチオン性脂質13)

[化58]



[0162] (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

[化59]



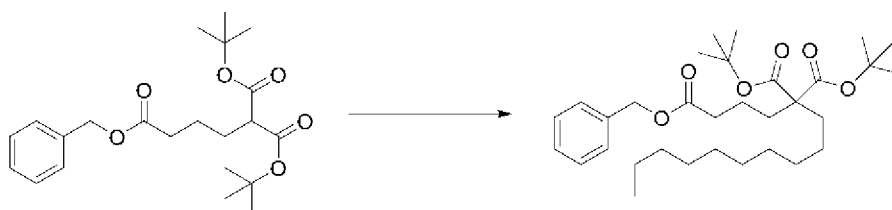
60%水素化ナトリウム (1.05 g, 26.2 mmol) を THF (50 mL) に懸濁させ、氷冷下、ジ-*tert*-ブチル マロネート (5.86 mL, 26.2 mmol) を滴下し、室温で20分間攪拌した。氷冷下、

ヨウ化ナトリウム (0.37 g, 2.49 mmol) を加えたのち、製造例 8 で得た化合物 (6.41 g, 24.9 mmol) を滴下し、室温で 18 時間攪拌した。反応混合物をジエチルエーテルで希釈し、水で洗浄したのち、水層をジエチルエーテルで抽出した。有機相を合わせ、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 (9.88 g, 25.2 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1.42–1.49 (m, 18H), 1.65–1.72 (m, 2H), 1.80–1.87 (m, 2H), 2.39 (t, $J=7.52$ Hz, 2H), 3.13 (t, $J=7.52$ Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 7.29–7.40 (m, 5H).

[0163] (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

[化60]

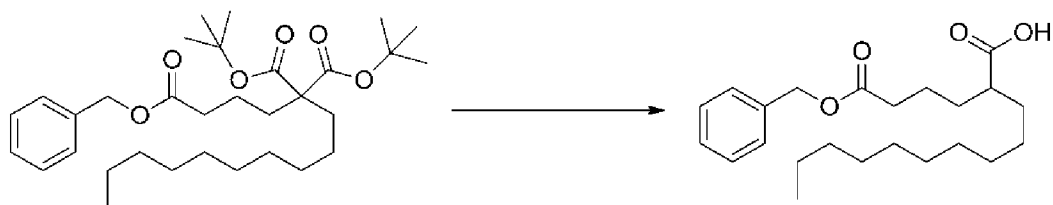


実施例 A-13-(1) で得られた化合物 (9.88 g, 25.2 mmol) を THF (100 mL) に溶解し、水冷下、60%水素化ナトリウム (1.51 g, 37.8 mmol) を加え、室温で 30 分間攪拌した。1-ヨードデカン (10.7 mL, 50.4 mmol) をゆっくり加えたのち、室温で 4 時間攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、n-ペンタンで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘプタン/ジエチルエーテル) にて精製し、標記化合物 (4.31 g, 8.09 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.85–0.91 (m, 3H), 1.07–1.17 (m, 2H), 1.21–1.33 (m, 16H), 1.44 (s, 18H), 1.49–1.54 (m, 2H), 1.74–1.84 (m, 4H), 2.36 (t, $J=7.34$ Hz, 2H), 5.11 (s, 2H), 7.28–7.38 (m, 5H).

[0164] (3) 2-[4-(ベンジルオキシ)-4-オキソブチル]ドデカン酸の合成

[化61]

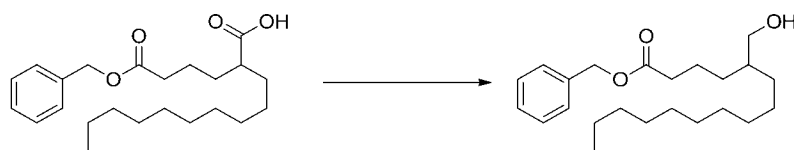


実施例A-13-(2)で得られた化合物(4.31g, 8.09mmol)を塩化メチレン(20mL)に溶解し、氷冷下、TFA(10mL)を滴下し、室温で4時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮したのち、トルエンを加え2回共沸した。得られた粗生成物をキシレン(25mL)に溶解し、8時間加熱還流した。反応混合物を室温に戻し、減圧下濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー(シクロヘキサン/酢酸エチル)にて精製し、標記化合物(2.74g, 7.28mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 0.82–0.89 (m, 3H), 1.17–1.31 (m, 16H), 1.32–1.42 (m, 3H), 1.43–1.57 (m, 4H), 2.16–2.22 (m, 1H), 2.32–2.38 (m, 2H), 5.08 (s, 2H), 7.29–7.40 (m, 5H), 12.06 (br s, 1H).

[0165] (4) ベンジル 5-(ヒドロキシメチル)ペンタデカノエートの合成

[化62]

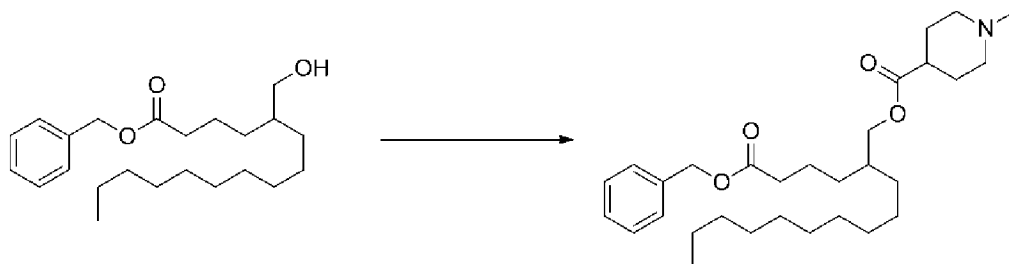


実施例 A-13-(3) で得た化合物 (2.74 g, 7.28 mmol) を THF (30 mL) に溶解し、 -78°C でボラン-THF 錯体 (1 M, 16.9 mL, 16.9 mmol) を滴下した。 0°C で 8 時間攪拌したのち、 15°C で 22 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (シクロヘキサン/酢酸エチル) にて精製し、標記化合物 (2.30 g, 6.34 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) : 0.85 (t, $J=6.88\text{ Hz}$, 3H), 1.08–1.37 (m, 18H), 1.49–1.58 (m, 2H), 2.27–2.36 (m, 2H), 3.21–3.29 (m, 2H), 4.28 (t, $J=5.14\text{ Hz}$, 1H), 5.01–5.12 (m, 2H), 7.30–7.40 (m, 5H).

[0166] (5) 2-(4-(ベンジルオキシ)-4-オキソブチル)ドデシル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート

[化63]



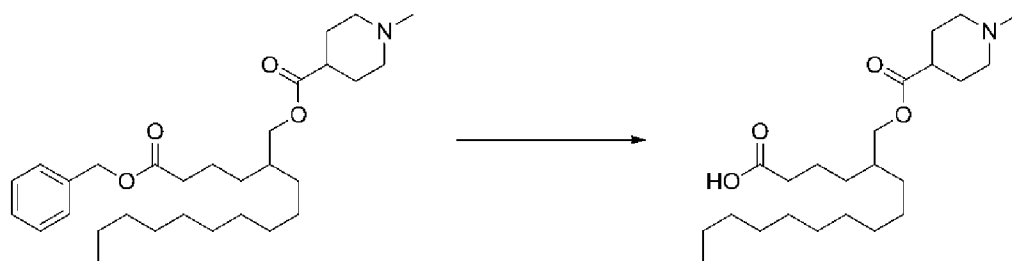
実施例 A-13-(4) で得た化合物 (2.30 g, 6.34 mmol)

、D I P E A (2 . 2 m L , 1 2 . 7 m m o l) 、 1 - メチルピペリジン - 4 - カルボン酸 塩酸塩 (2 . 2 8 g , 1 2 . 7 m m o l) およびDMA P (0 . 1 6 g , 1 . 2 7 m m o l) を塩化メチレン (3 0 m L) に溶解し、氷冷下、E D C (2 . 6 8 g , 1 3 . 9 m m o l) を加え、室温で4時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮したのち、ジエチルエーテルに溶解した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と水で順次洗浄し、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 (2 . 9 7 g , 6 . 0 9 m m o l) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (6 0 0 M H z , CDCl_3) δ (p p m) : 0 . 8 8 (t , $J = 7 . 0 6 \text{ Hz}$, 3 H) , 1 . 1 7 - 1 . 3 8 (m , 2 1 H) , 1 . 6 0 - 1 . 7 0 (m , 3 H) , 1 . 7 7 - 1 . 8 7 (m , 2 H) , 1 . 8 9 - 1 . 9 9 (m , 2 H) , 2 . 2 3 - 2 . 3 8 (m , 6 H) , 2 . 7 4 - 2 . 9 1 (m , 2 H) , 3 . 9 4 - 4 . 0 2 (m , 2 H) , 5 . 0 9 - 5 . 1 3 (m , 2 H) , 7 . 3 0 - 7 . 4 1 (m , 5 H) .

[0167] (6) 5 - { [(1 - メチルピペリジン - 4 - カルボニル) オキシ] メチル } ペンタデカン酸の合成

[化64]

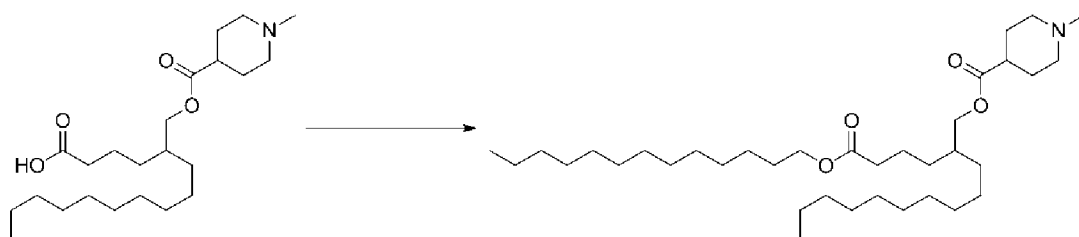


実施例A - 1 3 - (5) で得た化合物 (2 . 9 7 g , 6 . 0 9 m m o l) を酢酸エチル (3 5 m L) に溶解し、室温で10%パラジウム-炭素 (0 . 6 5 g , 0 . 6 1 m m o l , 5 0 % 含水) を加え、水素雰囲気下、常圧で3時間攪拌した。反応液を濾過し、酢酸エチルで洗浄した。濾液を減圧下濃縮し、標記化合物 (2 . 3 1 g , 5 . 8 1 m m o l) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 0.85 (t, $J=6.88$ Hz, 3H), 1.21–1.32 (m, 20H), 1.44–1.66 (m, 5H), 1.75–1.83 (m, 2H), 1.95–1.98 (m, 1H), 1.99–2.06 (m, 1H), 2.13–2.23 (m, 5H), 2.23–2.30 (m, 1H), 2.64–2.77 (m, 2H), 3.88–3.97 (m, 2H).

[0168] (7) 2-(4-オキソ-4-(トリデシルオキシ)ブチル)ドデシル 1-メチルピペリジーン-4-カルボキシレート

[化65]



実施例A-13-(6)で得た化合物(200mg, 0.50mmol)、トリデカン-1-オール(121mg, 0.60mmol)およびDMA P(12mg, 0.10mmol)を塩化メチレン(5mL)に溶解し、室温でEDC(116mg, 0.60mmol)を加え、室温で4時間撹拌した。反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(メタノール/酢酸エチル)にて精製し、標記化合物(170mg, 0.29mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.88 (t, $J=6.7$ Hz, 6H), 1.26 (br s, 41H), 1.57–1.69 (m, 6H), 1.73–1.82 (m, 2H), 1.90 (br dd, $J=13.5, 3.03$ Hz, 2H), 1.94–2.04 (m, 2H), 2.22–2.34 (m, 6H), 2.67–2.90 (br d, $J=9.8$ Hz, 2H), 3.95–4.02 (m, 2H), 4.03–4.0

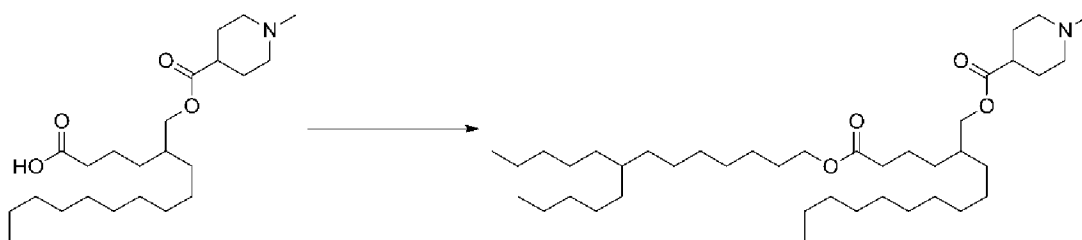
8 (t, J = 6.8 Hz, 2H).

[0169] <カチオン性脂質の合成 (14)>

[実施例 A-14]

2-(4-オキソ-4-((8-ペンチルトリデシル)オキシ)ブチル)ドデシル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート (カチオン性脂質 14)

[化66]



実施例 A-13-(7)の方法に準じ、実施例 A-13-(6)で得た化合物 (120 mg, 0.30 mmol)、製造例 4-(4)で得た化合物 (90 mg, 0.33 mmol)、EDC (64 mg, 0.33 mmol)、DMAP (4.0 mg, 0.033 mmol) および塩化メチレン (1.5 mL) から、標記化合物 (133 mg, 0.21 mmol) を得た。

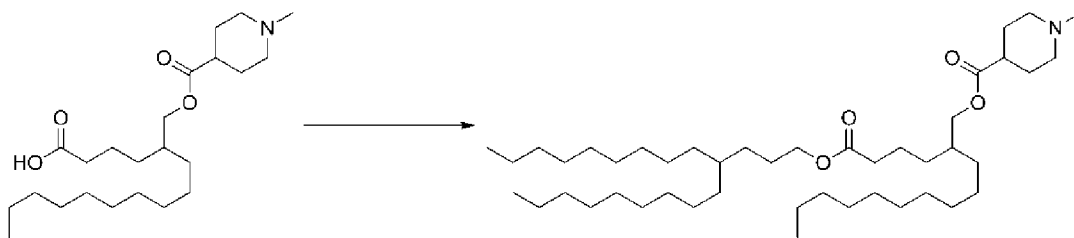
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 0.87–0.97 (m, 9H), 1.18–1.45 (m, 47H), 1.60–1.73 (m, 5H), 1.73–1.83 (m, 2H), 1.88–1.99 (m, 2H), 2.06–2.19 (m, 2H), 2.23–2.43 (m, 6H), 2.77–2.89 (m, 2H), 3.99–4.15 (m, 4H).

[0170] <カチオン性脂質の合成 (15)>

[実施例 A-15]

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-メチルピペリジン-4-カルボキシレート (カチオン性脂質 15)

[化67]



実施例 A-13-(7)の方法に準じ、実施例 A-13-(6)で得た化合物 (110 mg, 0.28 mmol)、製造例 5-(4)で得た化合物 (99 mg, 0.30 mmol)、EDC (58 mg, 0.30 mmol)、DMAP (4.0 mg, 0.033 mmol) および塩化メチレン (1.3 mL) から、標記化合物 (106 mg, 0.15 mmol) を得た。

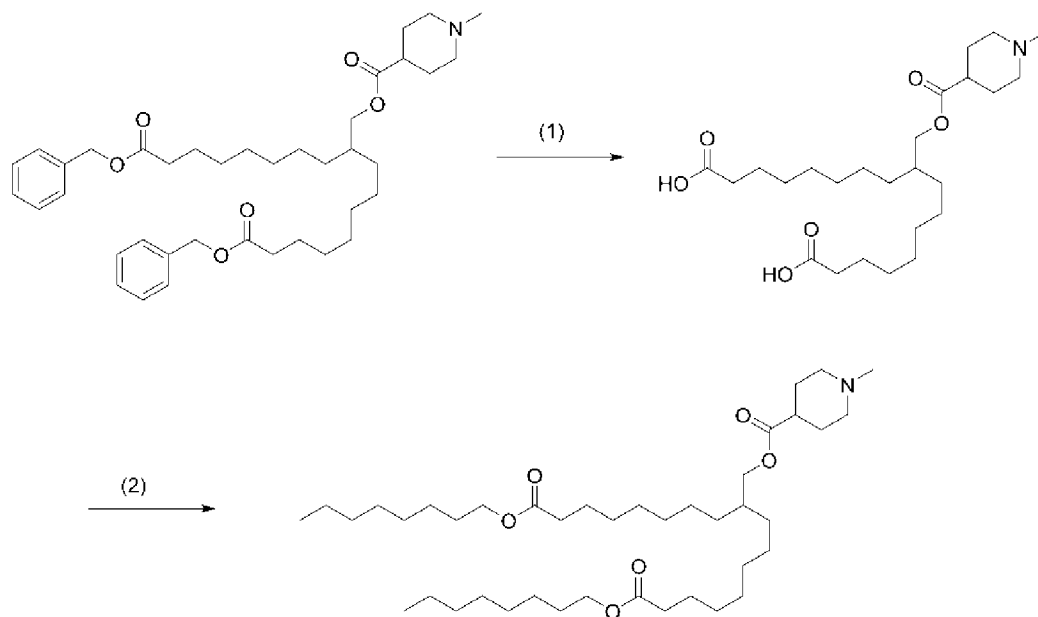
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 0.85–0.99 (m, 9H), 1.15–1.44 (m, 55H), 1.56–1.84 (m, 7H), 1.94 (m, $J=13.2\text{ Hz}$, 2H), 2.06–2.19 (m, 2H), 2.23–2.44 (m, 6H), 2.76–2.90 (m, 2H), 3.96–4.14 (m, 4H).

[0171] <カチオン性脂質の合成 (16)>

[実施例 A-16]

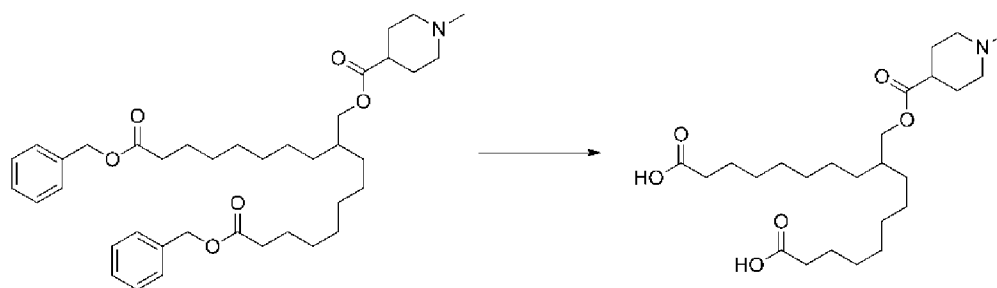
ジオクチル 9- { [(1-メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ] メチル } ヘプタデカンジオエート (カチオン性脂質 16)

[化68]



[0172] (1) 9- { [(1-メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ] メチル } ヘプタデカンジオン酸の合成

[化69]



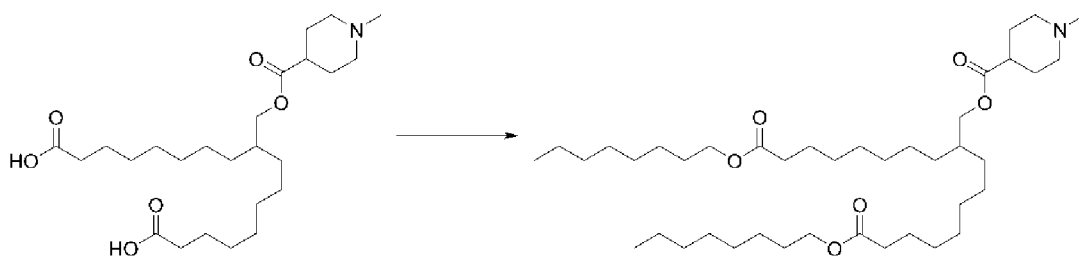
実施例A-4-(5)で得た化合物(0.80g, 1.25mmol)をエタノール(5mL)に溶解し、室温で10%パラジウム-炭素(0.13g, 0.13mmol, 50%含水)を加え、水素雰囲気下、常圧で18時間攪拌した。反応液をセライトで濾過し、エタノールで洗浄した。濾液を減圧下濃縮し、標記化合物(0.58g, 1.26mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) : 1.17-

1. 30 (m, 20H), 1. 43–1. 52 (m, 4H), 1. 52–1. 62 (m, 3H), 1. 77–1. 82 (m, 2H), 1. 92–2. 03 (m, 2H), 2. 12–2. 22 (m, 7H), 2. 23–2. 33 (m, 1H), 2. 66–2. 75 (m, 2H), 3. 93 (d, $J=5.5$ Hz, 2H).

[0173] (2) ジオクチル 9- { [(1-メチルピペリジン-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

[化70]



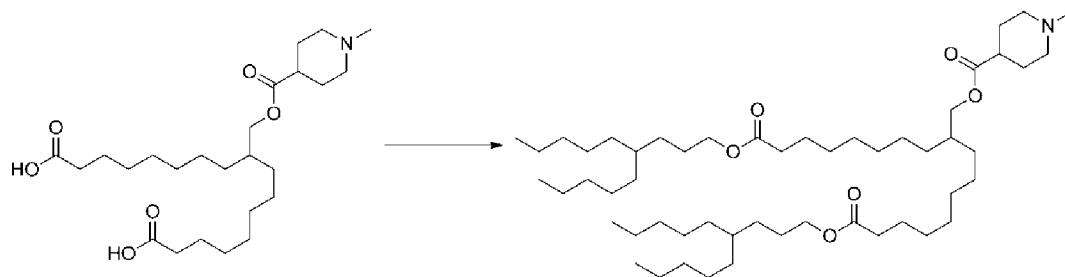
実施例A-16-(1)で得た化合物(100mg, 0.22mmol)、オクタン-1-オール(83 μ L, 0.53mmol)およびDMAP(11mg, 0.09mmol)を塩化メチレン(5mL)に溶解し、室温でEDC(101mg, 0.53mmol)を加え、室温で18時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮したのち、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(メタノール／酢酸エチル)にて精製し、標記化合物(101mg, 0.15mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.83–0.92 (m, 6H), 1.21–1.39 (m, 40H), 1.55–1.66 (m, 9H), 1.72–1.83 (m, 2H), 1.85–1.95 (m, 2H), 1.95–2.06 (m, 2H), 2.22–2.33 (m, 8H), 2.75–2.87 (m, 2H), 3.97 (d, $J=5.69$ Hz, 2H), 4.05 (t, $J=6.69$ Hz, 4H).

[0174] <カチオン性脂質の合成 (17)>

[実施例 A-17]

ビス(4-ペンチルノニル) 9- {[(1-メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ] メチル} ヘプタデカンジオエート (カチオン性脂質 17)
[化71]



実施例 A-16-(2) の方法に準じ、実施例 A-16-(1) で得た化合物 (0.20 g, 0.44 mmol)、製造例 7-(2) で得た化合物 (0.23 g, 1.05 mmol)、EDC (0.20 g, 1.05 mmol)、DMAP (11 mg, 0.09 mmol) および塩化メチレン (5 mL) から、標記化合物 (0.23 g, 0.27 mmol) を得た。

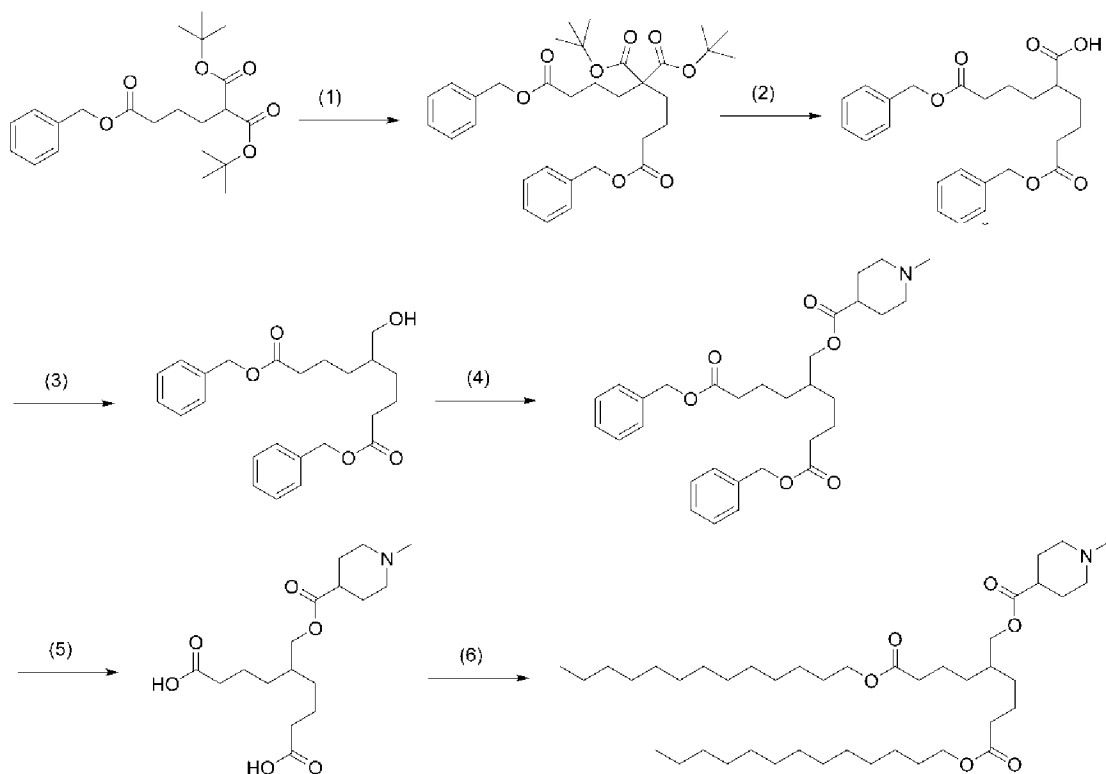
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.88 (t, $J = 7.24$ Hz, 12H), 1.17–1.35 (m, 58H), 1.58–1.65 (m, 9H), 1.73–1.83 (m, 2H), 1.87–1.93 (m, 2H), 1.95–2.04 (m, 2H), 2.23–2.32 (m, 8H), 2.75–2.86 (m, 2H), 3.97 (d, $J = 5.50$ Hz, 2H), 4.04 (t, $J = 6.79$ Hz, 4H).

[0175] <カチオン性脂質の合成 (18)>

[実施例 A-18]

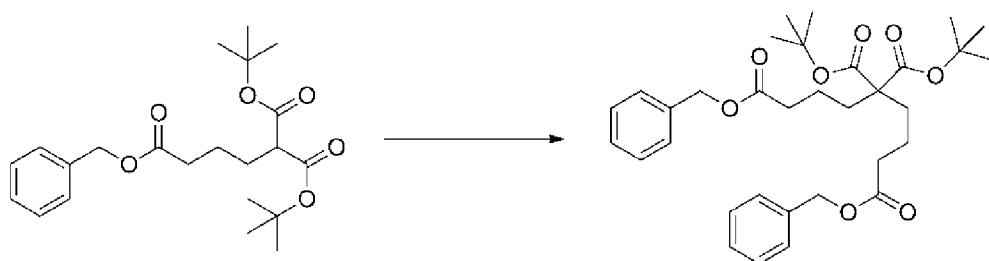
ジトリデシル 5- {[(1-メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ] メチル} ノナンジオエート (カチオン性脂質 18)

[化72]



[0176] (1) 1, 7-ジベンジル 4, 4-ジ-*tert*-ブチル ヘプタン-1, 4, 4, 7-テトラカルボキシレート

[化73]



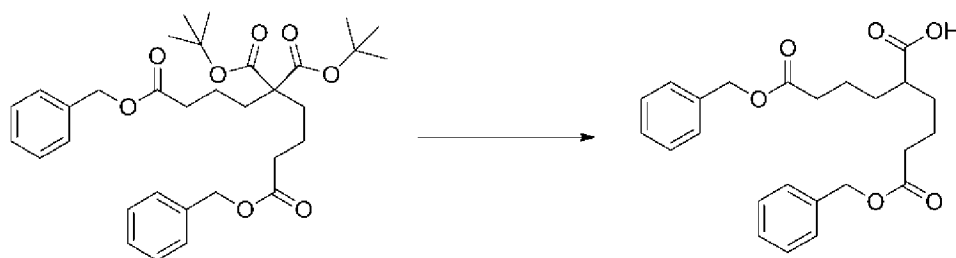
実施例 A-13-(1) で得られた化合物 (3.84 g, 9.78 mmol) を THF (30 mL) に溶解し、水冷下、60%水素化ナトリウム (0.43 g, 10.8 mmol) を加え、室温で 30 分間攪拌した。ベンジル 4-ブロモブタノエート (3.02 g, 11.7 mmol) の THF (10 mL) 溶液を加えたのち、18 時間加熱還流した。反応液を室温に戻し、

ジエチルエーテルで希釈した。有機相を水、飽和食塩水で順次洗浄し、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／シクロヘキサン）にて精製し、標記化合物（1.88 g, 3.31 mmol）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1.43 (s, 18H), 1.47–1.54 (m, 4H), 1.78–1.85 (m, 4H), 2.36 (t, $J=7.34$ Hz, 4H), 5.10 (s, 4H), 7.27–7.40 (m, 10H).

[0177] (2) 6-(ベンジルオキシ)-2-[4-(ベンジルオキシ)-4-オキソブチル]-6-ヘキサン酸の合成

[化74]

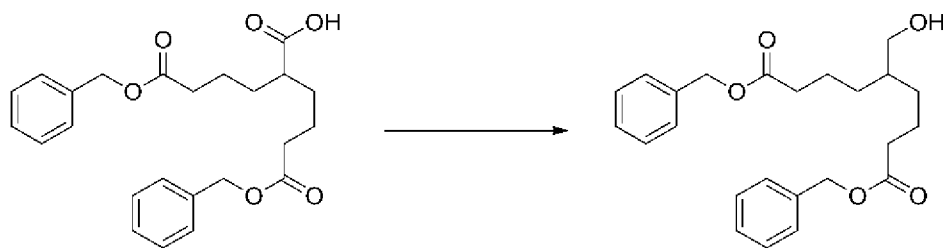


実施例A-13-(3)の方法に準じ、実施例A-18-(1)で得られた化合物（1.88 g, 3.31 mmol）、TFA（4 mL）、塩化メチレン（8 mL）、およびキシレン（10 mL）から、標記化合物（1.01 g, 2.45 mmol）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) : 1.31–1.58 (m, 8H), 2.19–2.25 (m, 1H), 2.33–2.37 (m, 4H), 5.05–5.11 (m, 4H), 7.27–7.40 (m, 10H), 12.14 (br s, 1H).

[0178] (3) ジベンジル 5-(ヒドロキシメチル)ノナンジオエートの合成

[化75]

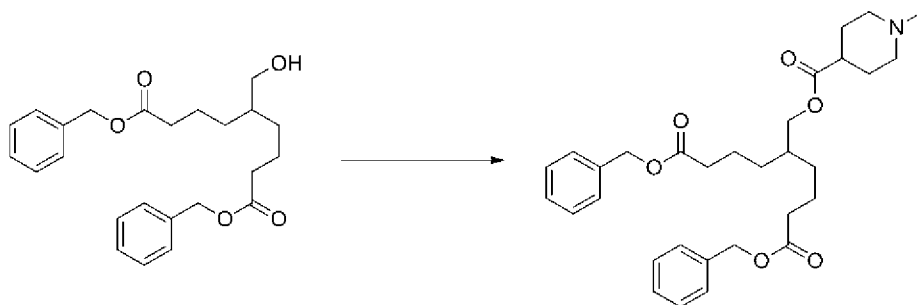


実施例A-18-(2)で得た化合物(1.01g, 2.45mmol)をTHF(10mL)に溶解し、 -78°C でボラン-THF錯体(1M, 4.9mL, 4.9mmol)を滴下した。 0°C で16時間撹拌したのち、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、ジエチルエーテルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(シクロヘキサン/酢酸エチル)にて精製し、標記化合物(0.59g, 1.47mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 1.09–1.37 (m, 6H), 1.48–1.56 (m, 4H), 2.32 (t, $J=7.34\text{ Hz}$, 4H), 3.26 (t, $J=5.23\text{ Hz}$, 2H), 4.32 (t, $J=5.14\text{ Hz}$, 1H), 5.08 (s, 4H), 7.28–7.41 (m, 10H).

[0179] (4) ジベンジル 5- { [(1-メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ] メチル } ノナンジオエートの合成

[化76]

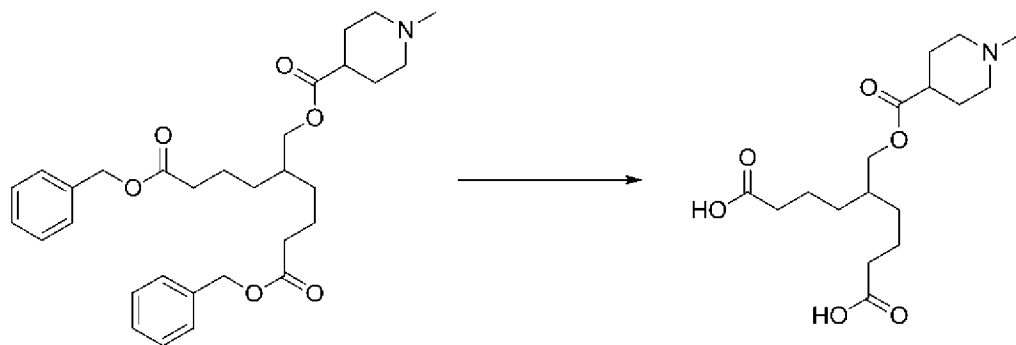


実施例 A-13-(5) の方法に準じ、実施例 A-18-(3) で得た化合物 (0.58 g, 1.47 mmol)、DIPEA (0.51 mL, 2.95 mmol)、1-メチルピペリジン-4-カルボン酸 塩酸塩 (0.52 g, 2.95 mmol)、DMAP (36 mg, 0.30 mmol)、EDC (0.62 g, 3.24 mmol) および塩化メチレン (7 mL) から、標記化合物 (0.62 g, 1.19 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1.27–1.38 (m, 4H), 1.59–1.69 (m, 5H), 1.70–1.81 (m, 2H), 1.85–1.92 (m, 2H), 1.92–2.02 (m, 2H), 2.26 (s, 4H), 2.33 (t, $J=7.34$ Hz, 4H), 2.74–2.83 (m, 2H), 3.97 (d, $J=5.69$ Hz, 2H), 5.11 (s, 4H), 7.28–7.39 (m, 10H).

[0180] (5) 5- [{ (1-メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ } メチル] ジノナン酸の合成

[化77]



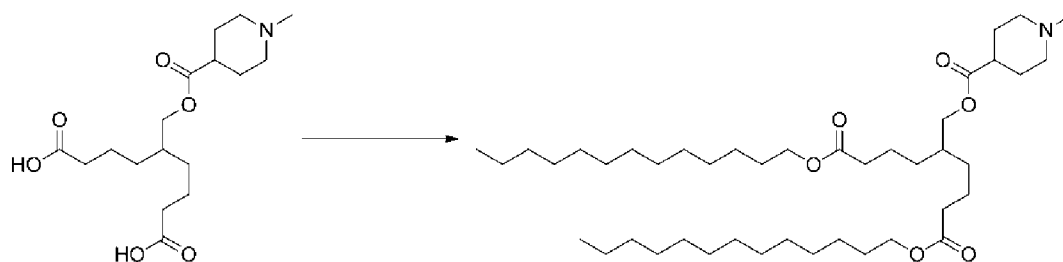
実施例 A-16-(1) の方法に準じ、実施例 A-18-(4) で得た化合物 (0.62 g, 1.19 mmol)、10%パラジウム-炭素 (62 mg, 0.06 mmol, 50%含水) およびエタノール (2 mL) から、標記化合物 (0.41 g, 1.19 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) : 1.20–1.31 (m, 4H), 1.44–1.66 (m, 7H), 1.72–1.

8.1 (m, 4H), 1.88–1.97 (m, 2H), 2.13 (s, 3H), 2.16–2.22 (m, 4H), 2.22–2.30 (m, 1H), 2.64–2.71 (m, 2H), 3.93 (d, $J=5.32$ Hz, 2H).

[0181] (6) ジトリデシル 5- { [(1-メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ] メチル} ノナンジオエートの合成

[化78]



実施例A-13-(7)の方法に準じ、実施例A-18-(5)で得た化合物 (135 mg, 0.39 mmol)、トリデカン-1-オール (189 mg, 0.94 mmol)、DMAP (9 mg, 0.08 mmol)、EDC (166 mg, 0.87 mmol) および塩化メチレン (5 mL) から、標記化合物 (107 mg, 0.15 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.88 (t, $J=7.06$ Hz, 6H), 1.20–1.41 (m, 45H), 1.58–1.71 (m, 9H), 1.71–1.82 (m, 2H), 1.86–1.94 (m, 2H), 1.95–2.04 (m, 2H), 2.23–2.30 (m, 8H), 2.77–2.83 (m, 2H), 4.00 (d, $J=5.5$ Hz, 2H), 4.05 (t, $J=6.88$ Hz, 4H).

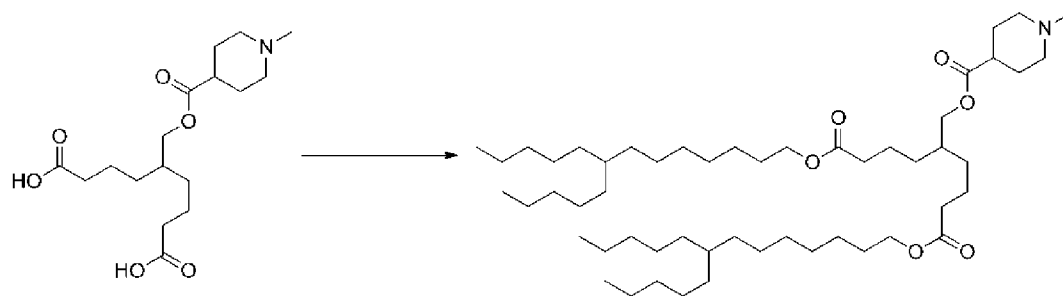
[0182] <カチオン性脂質の合成 (19)>

[実施例A-19]

ビス (8-ペンチルトリデシル) 5- { [(1-メチルピペリジン-4-

カルボニル) オキシ] メチル} ノナンジオエート (カチオン性脂質 19)

[化79]



実施例 A-13-(7) の方法に準じ、実施例 A-18-(5) で得た化合物 (80 mg, 0.23 mmol)、製造例 4-(4) で得た化合物 (151 mg, 0.56 mmol)、DMAP (6 mg, 0.05 mmol)、EDC (98 mg, 0.51 mmol) および塩化メチレン (5 mL) から、標記化合物 (79 mg, 0.09 mmol) を得た。

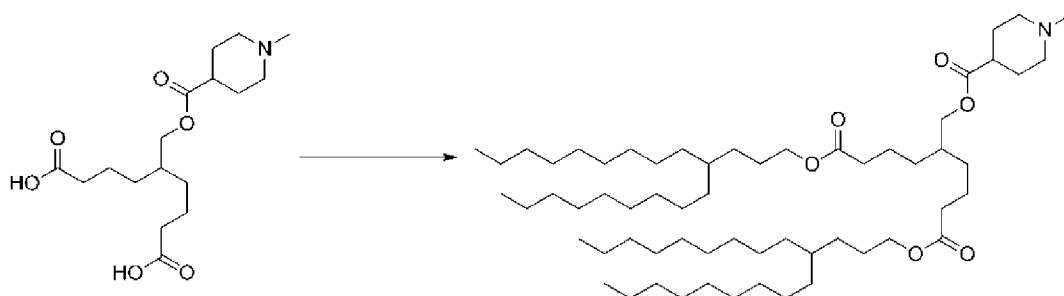
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.88 (t, $J = 7.24 \text{ Hz}$, 12H), 1.15–1.40 (m, 60H), 1.59–1.71 (m, 10H), 1.72–1.82 (m, 2H), 1.86–1.94 (m, 2H), 1.94–2.04 (m, 2H), 2.23–2.32 (m, 8H), 2.77–2.85 (m, 2H), 4.00 (d, $J = 5.5 \text{ Hz}$, 2H), 4.05 (t, $J = 6.88 \text{ Hz}$, 4H).

[0183] <カチオン性脂質の合成 (20)>

[実施例 A-20]

ビス (4-ノニルトリデシル) 5- { [(1-メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ] メチル} ノナンジオエート (カチオン性脂質 20)

[化80]



実施例 A-13-(7) の方法に準じ、実施例 A-18-(5) で得た化合物 (80 mg, 0.23 mmol)、製造例 5-(4) で得た化合物 (198 mg, 0.61 mmol)、DMAP (6 mg, 0.05 mmol)、EDC (98 mg, 0.51 mmol) および塩化メチレン (5 mL) から、標記化合物 (46 mg, 0.05 mmol) を得た。

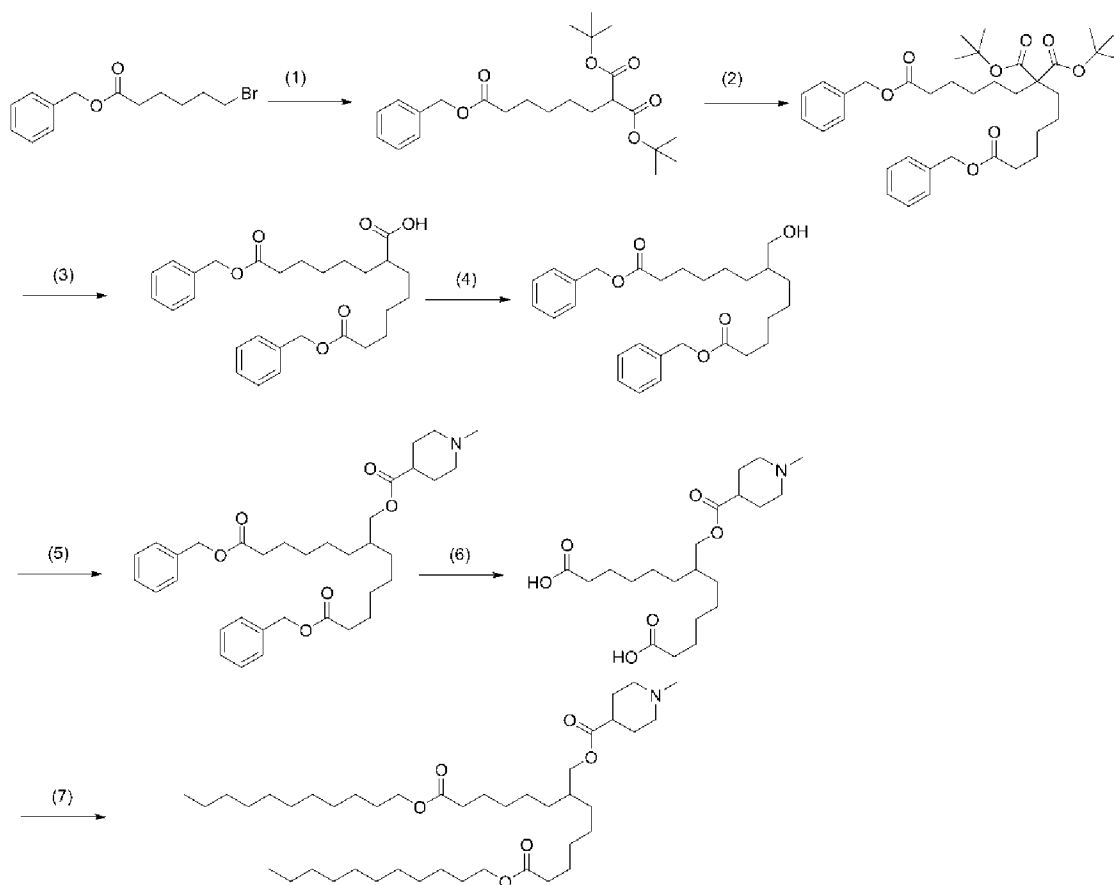
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.88 (t, $J = 6.97$ Hz, 12H), 1.17–1.41 (m, 77H), 1.57–1.72 (m, 9H), 1.72–1.81 (m, 2H), 1.85–1.94 (m, 2H), 1.94–2.03 (m, 2H), 2.23–2.31 (m, 8H), 2.80 (m, $J = 10.50$ Hz, 2H), 4.00 (d, $J = 5.50$ Hz, 2H), 4.03 (t, $J = 6.88$ Hz, 4H).

[0184] <カチオン性脂質の合成 (21)>

[実施例 A-21]

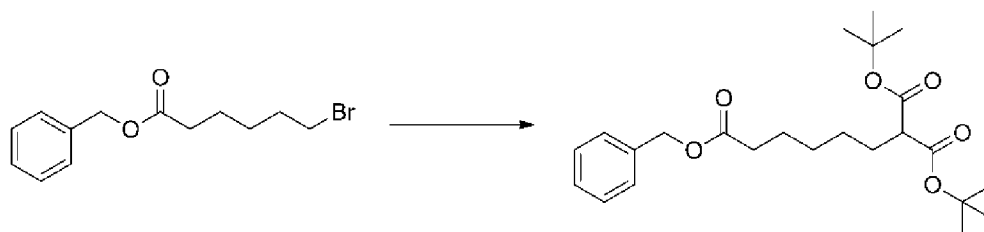
ジウンデシル 7- { [(1-メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ] メチル } トリデカンジオエート (カチオン性脂質 21)

[化81]



[0185] (1) 6-ベンジル 1, 1-ジ-*tert*-ブチル ヘキサン-1, 1, 6-トリカルボキシレート

[化82]



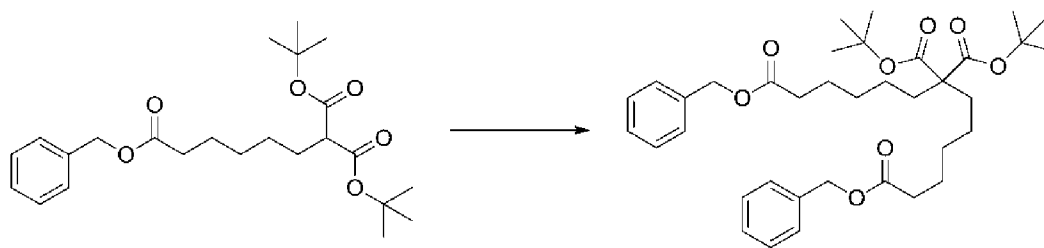
60%水素化ナトリウム (0.80 g, 20.0 mmol) を THF (35 mL) に懸濁させ、氷冷下、ジ-*tert*-ブチル マロネート (4.48 mL, 20.0 mmol) を滴下し、室温で15分間攪拌した。氷冷下、

ヨウ化ナトリウム (0.29 g, 1.90 mmol) を加えたのち、製造例 9 で得た化合物 (5.43 g, 19.0 mmol) の THF (10 mL) 溶液を滴下し、室温で 18 時間攪拌した。反応混合物をジエチルエーテルで希釈し、水で洗浄したのち、水層をジエチルエーテルで抽出した。有機相を合わせ、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 (6.01 g, 14.3 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1.27–1.38 (m, 4H), 1.45 (s, 18H), 1.62–1.68 (m, 2H), 1.73–1.82 (m, 2H), 2.35 (t, $J=7.52$ Hz, 2H), 3.09 (t, $J=7.61$ Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 7.29–7.40 (m, 5H).

[0186] (2) 1, 11-ジベンジル 6, 6-ジ-tert-ブチル ウンデカン-1, 6, 6, 11-テトラカルボキシレート

[化83]



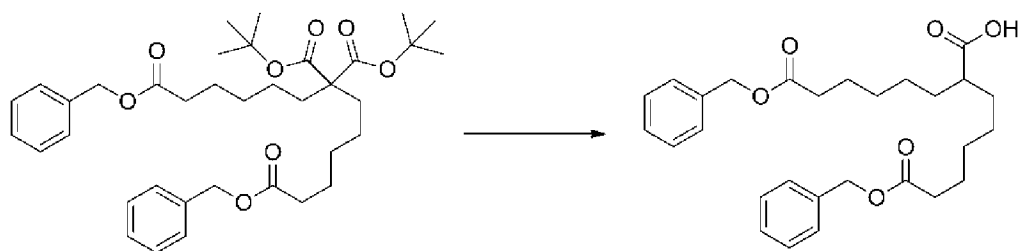
実施例 A-18-(1) の方法に準じ、実施例 A-21-(1) で得た化合物 (4.0 g, 9.51 mmol)、60%水素化ナトリウム (0.42 g, 10.5 mmol)、製造例 9 で得た化合物 (3.25 g, 11.4 mmol) および THF (30 mL) から、標記化合物 (5.18 g, 8.29 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1.09–1.19 (m, 4H), 1.28–1.36 (m, 5H), 1.43 (s, 18H)

), 1.60–1.69 (m, 4H), 1.72–1.80 (m, 4H), 2.34 (t, $J=7.52$ Hz, 4H), 5.05–5.15 (m, 4H), 7.28–7.41 (m, 9H).

[0187] (3) 8-(ベンジルオキシ)-2-[6-(ベンジルオキシ)-6-オキソヘキシル]-8-オキソオクタン酸の合成

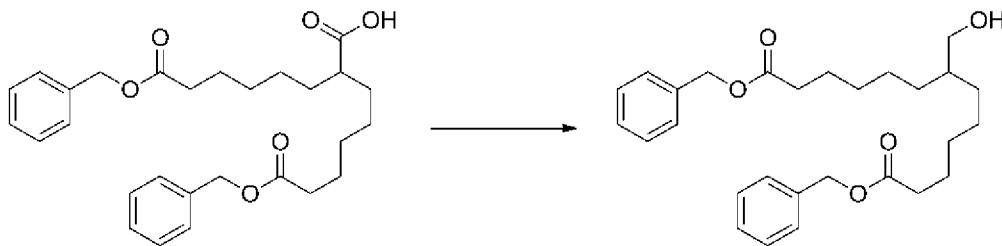
[化84]



実施例A-13-(3)の方法に準じ、実施例A-21-(2)で得られた化合物(5.18g, 8.29mmol)、TFA(10mL)、塩化メチレン(20mL)およびキシレン(25mL)から、標記化合物(2.49g, 5.31mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.15–1.57 (m, 16H), 2.11–2.20 (m, 1H), 2.33 (t, $J=7.34$ Hz, 4H), 5.08 (s, 4H), 7.23–7.43 (m, 10H), 12.01 (br s, 1H).

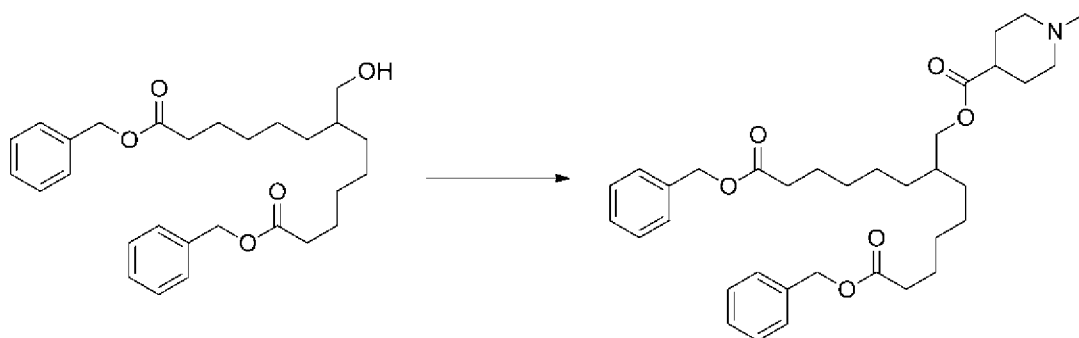
[0188] (4) ジベンジル 7-(ヒドロキシメチル)トリデカンジオエートの合成
[化85]



実施例 A-18-(3) の方法に準じ、実施例 A-21-(3) で得た化合物 (2.49 g, 5.31 mmol)、ボラン-THF 錯体 (1M, 13.2 mL, 13.2 mmol) および THF (20 mL) から、標記化合物 (1.95 g, 4.29 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1.11–1.36 (m, 13H), 1.39–1.46 (m, 1H), 1.60–1.70 (m, 4H), 2.35 (t, $J=7.52$ Hz, 4H), 3.51 (d, $J=5.32$ Hz, 2H), 5.11 (s, 4H), 7.29–7.40 (m, 10H).

[0189] (5) ジベンジル 7- { [(1-メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ] メチル } トリデカンジオエートの合成
[化86]



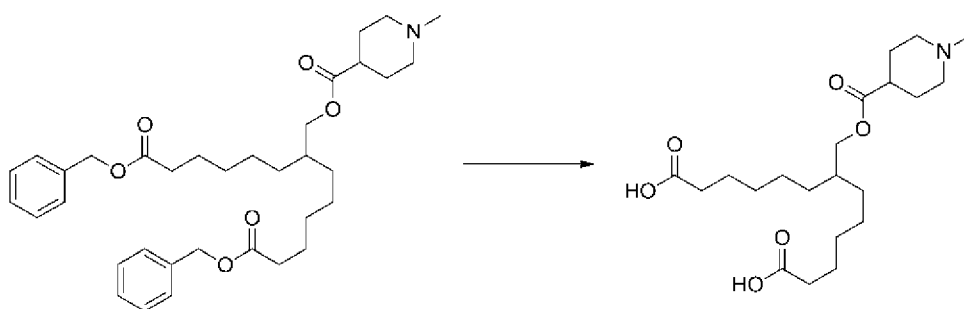
実施例 A-13-(5) の方法に準じ、実施例 A-21-(4) で得た化合物 (1.95 g, 4.29 mmol)、DIPEA (1.5 mL, 8.58 mmol)、1-メチル-ピペリジン-4-カルボン酸 塩酸塩 (1.54 g, 8.58 mmol)、DMAP (0.11 g, 0.86 mmol)、EDC (1.81 g, 9.44 mmol) および塩化メチレン (20 mL) から、標記化合物 (2.97 g, 6.09 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1.22–1.35 (m, 12H), 1.61–1.68 (m, 4H), 1.70–1.84 (m, 3H), 1.85–1.93 (m, 2H), 1.95–2.06 (m

, 2 H), 2. 21–2. 30 (m, 4 H), 2. 35 (t, J=7. 52 Hz, 4 H), 2. 74–2. 85 (m, 2 H), 3. 96 (d, J=5. 50 Hz, 2 H), 5. 11 (s, 4 H), 7. 29–7. 39 (m, 10 H).

[0190] (6) 7- { [(1-メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ] メチル } トリデカンジオン酸の合成

[化87]

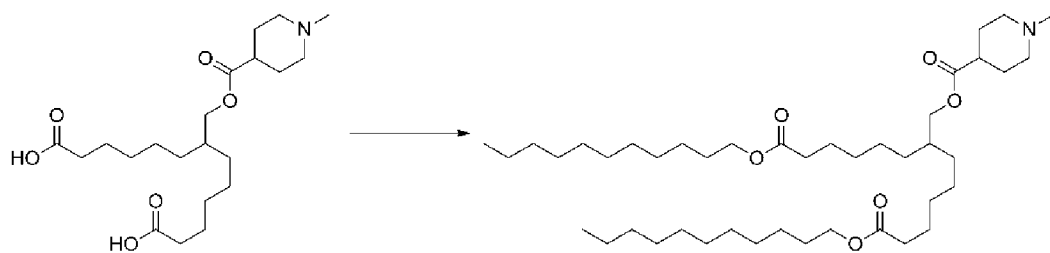


実施例 A-16-(1)の方法に準じ、実施例 A-21-(5)で得た化合物 (2. 28 g, 3. 93 mmol)、10%パラジウム-炭素 (0. 42 g, 0. 39 mmol, 50%含水) およびエタノール (20 mL) からし、標記化合物 (1. 34 g, 3. 35 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) : 1. 19–1. 30 (m, 12 H), 1. 44–1. 53 (m, 4 H), 1. 53–1. 63 (m, 3 H), 1. 72–1. 81 (m, 2 H), 1. 90–1. 98 (m, 2 H), 2. 14 (s, 3 H), 2. 18 (t, J=7. 43 Hz, 4 H), 2. 23–2. 31 (m, 1 H), 2. 64–2. 73 (m, 2 H), 3. 93 (d, J=5. 50 Hz, 2 H).

[0191] (7) ジウンデシル 7- { [(1-メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ] メチル } トリデカンジオエートの合成

[化88]



実施例 A-21-(6) で得た化合物 (200 mg, 0.50 mmol)、ウンデカン-1-オール (83 μ L, 1.20 mmol) および DMAP (24 mg, 0.20 mmol) を塩化メチレン (10 mL) に溶解し、室温で EDC (230 mg, 1.20 mmol) を加え、室温で 18 時間撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、塩化メチレンで抽出したのち有機相を減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/シクロヘキサン/メタノール) にて精製し、標記化合物 (220 mg, 0.32 mmol) を得た。

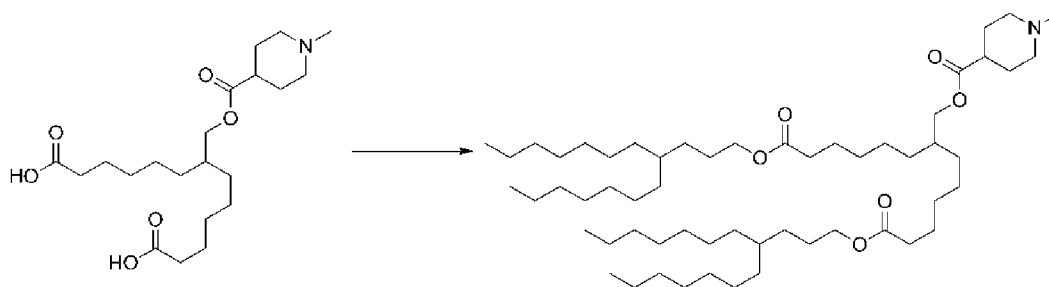
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.88 (t, $J = 7.06$ Hz, 6H), 1.19–1.39 (m, 44H), 1.57–1.68 (m, 9H), 1.71–1.86 (m, 2H), 1.84–1.95 (m, 2H), 1.95–2.06 (m, 2H), 2.21–2.34 (m, 8H), 2.75–2.87 (m, 2H), 3.97 (d, $J = 5.69$ Hz, 2H), 4.05 (t, $J = 6.79$ Hz, 4H) .

[0192] <カチオン性脂質の合成 (22)>

[実施例 A-22]

ビス (4-ヘプチルウンデシル) 7- { [(1-メチルピペリジン-4-カルボニル) オキシ] メチル } トリデカンジオエート (カチオン性脂質 22)

[化89]



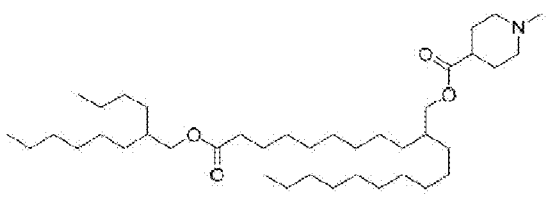
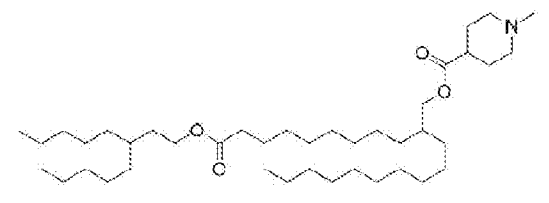
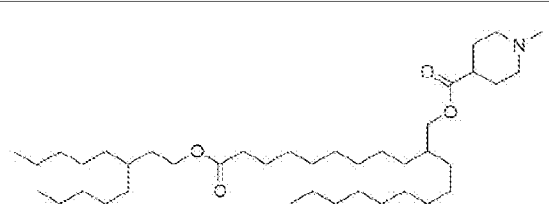
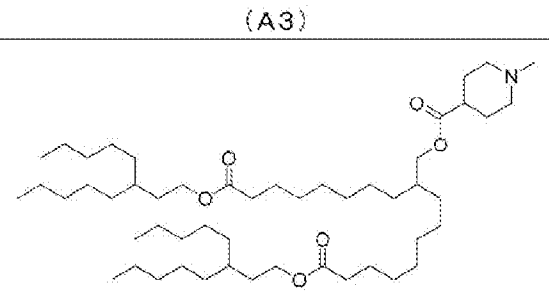
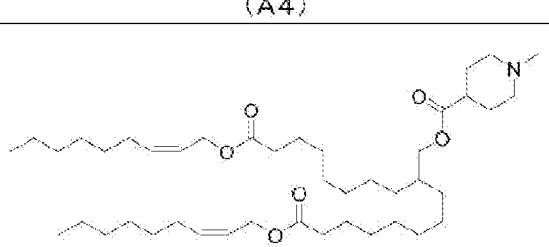
実施例 A-16-(2) の方法に準じ、実施例 A-21-(6) で得た化合物 (200 mg, 0.25 mmol)、製造例 6-(2) で得た化合物 (160 mg, 0.60 mmol)、DMAP (12 mg, 0.10 mmol)、EDC (120 mg, 0.60 mmol) および塩化メチレン (5 mL) から、標記化合物 (88 mg, 0.10 mmol) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.88 (t, $J=6.97\text{ Hz}$, 12H), 1.11–1.36 (m, 66H), 1.49–1.67 (m, 9H), 1.71–1.84 (m, 2H), 1.84–1.95 (m, 2H), 1.95–2.05 (m, 2H), 2.21–2.33 (m, 8H), 2.74–2.88 (m, 2H), 3.97 (d, $J=5.50\text{ Hz}$, 2H), 4.04 (t, $J=6.88\text{ Hz}$, 4H).

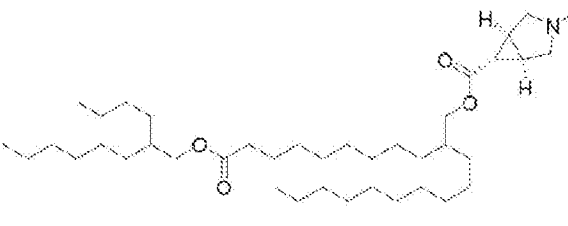
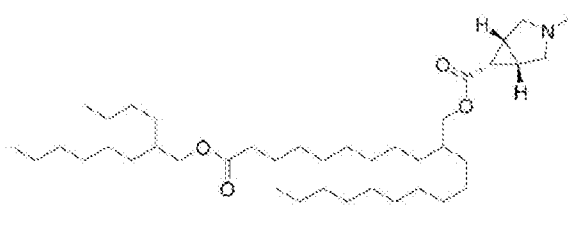
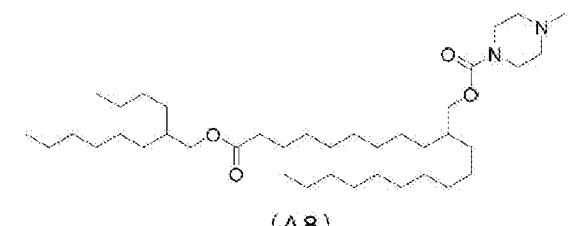
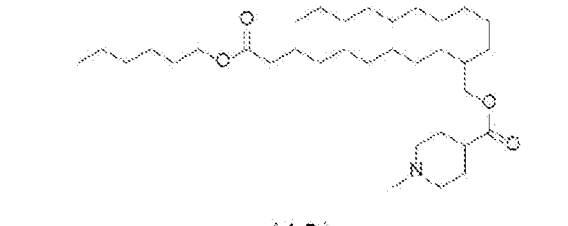
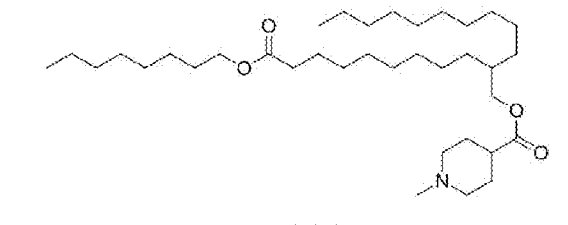
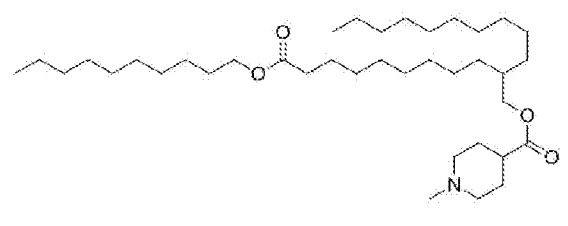
[0193] 合成したカチオン性脂質 1～22 を下記表 A に示す。

[表A-1]

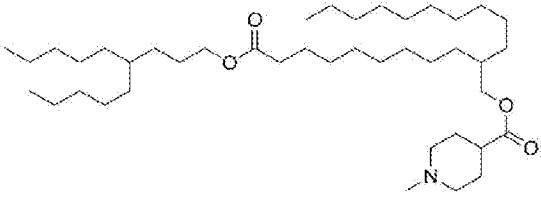
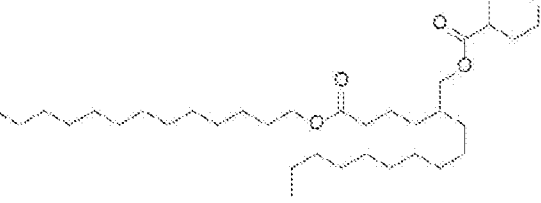
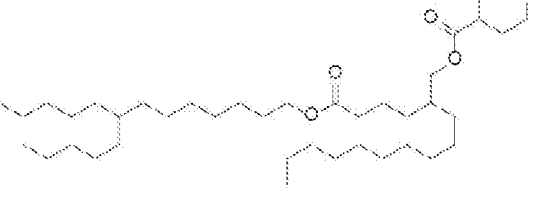
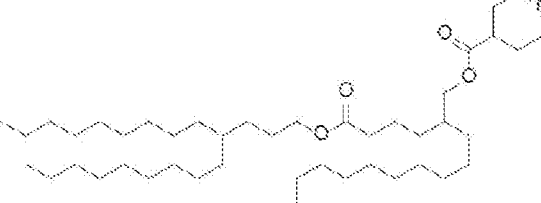
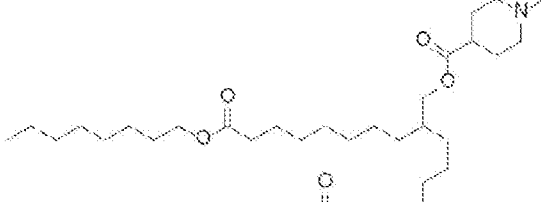
表 A: 合成したカチオン性脂質 1~22

	構造
カチオン性脂質 1: 2-[9-[(2-ブチルオクチル)オキシ]-9-オキソノニル]ドデシル 1-メチル ピペリジン-4-カルボキシレート	 (A1)
カチオン性脂質 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 チルピペリジン-4-カルボキシレート	 (A2)
カチオン性脂質 3: 2-ノニル-11-オキソ-11-[(3-ペンチルオクチル)オキシ]ウンデシル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレ ート	 (A3)
カチオン性脂質 4: ビス(3-ペンチルオクチル) 9-[[[(1-メチルピペリジン-4-カルボニル)オ キシ]メチル]ヘプタデカンジオエート	 (A4)
カチオン性脂質 5: ジ[(Z)-2-ノネン-1-イル] 9-[[[(1-メチルピペリジン-4-カルボニ ル)オキシ]メチル]ヘプタデカンジオエート	 (A5)

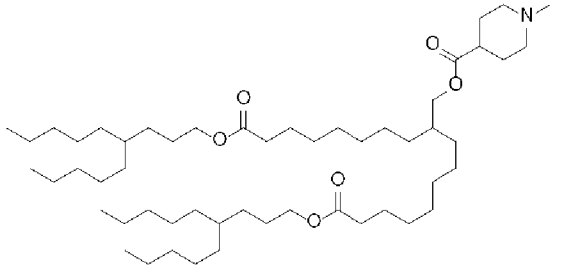
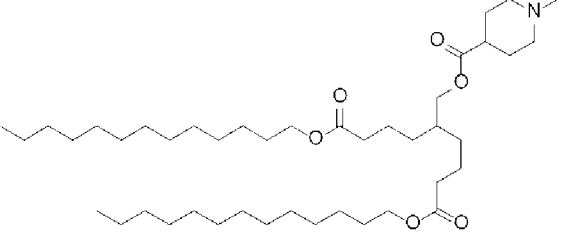
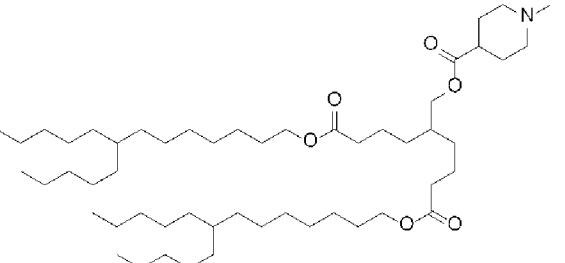
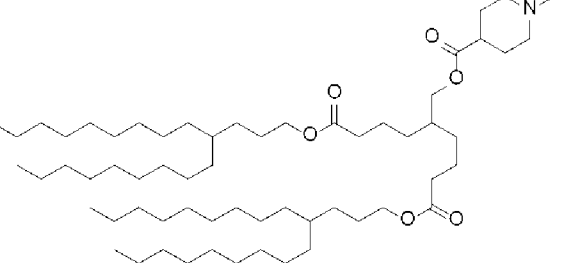
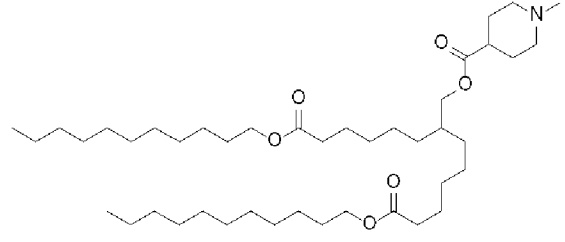
[表A-2]

カチオン性脂質6: (1R, 5S, 6r)-2-[9-[(2-ブチルオクチル)オキシ]-9-オキソノニル]ドデシル 3-メチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-6-カルボキシレート	 (A6)
カチオン性脂質7: (1R, 5S, 6s)-2-[9-[(2-ブチルオクチル)オキシ]-9-オキソノニル]ドデシル 3-メチル-3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-6-カルボキシレート	 (A7)
カチオン性脂質8: 2-[9-[(2-ブチルオクチル)オキシ]-9-オキソノニル]ドデシル 4-メチルピペラジン-1-カルボキシレート	 (A8)
カチオン性脂質9: 2-[9-(ヘキシルオキシ)-9-オキソノニル]ドデシル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート	 (A9)
カチオン性脂質10: 2-[9-(オクチルオキシ)-9-オキソノニル]ドデシル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート	 (A10)
カチオン性脂質11 2-[9-(デシルオキシ)-9-オキソノニル]ドデシル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート	 (A11)

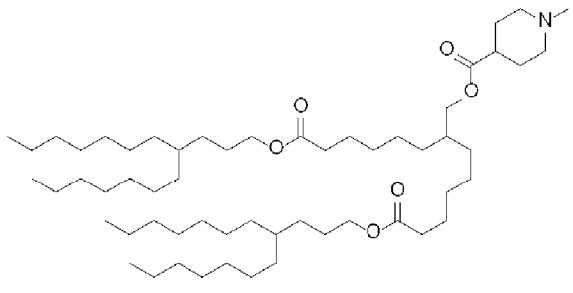
[表A-3]

カチオン性脂質 12: 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-メチルピペリジン-4-カルボキシレート	 (A12)
カチオン性脂質 13: 2-(4-オキソ-4-(トリデシルオキシ)ブチル)ドデシル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート	 (A13)
カチオン性脂質 14: 2-(4-オキソ-4-((8-ペンチルトリデシル)オキシ)ブチル)ドデシル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート	 (A14)
カチオン性脂質 15: 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-メチルピペリジン-4-カルボキシレート	 (A15)
カチオン性脂質 16: ジオクチル 9-[[1-メチルピペリジン-4-カルボニル]オキシ]メチル]ヘプタデカンジオエート	 (A16)

[表A-4]

カチオン性脂質 17: ビス(4-ペンチルノニル) 9-[[[(1-メチルピペリジン-4-カルボニル)オキシ]メチル]ヘプタデカンジオエート	 (A17)
カチオン性脂質 18: ジトリデシル 5-[[[(1-メチルピペリジン-4-カルボニル)オキシ]メチル]ノナンジオエート	 (A18)
カチオン性脂質 19: ビス(8-ペンチルトリデシル) 5-[[[(1-メチルピペリジン-4-カルボニル)オキシ]メチル]ノナンジオエート	 (A19)
カチオン性脂質 20: ビス(4-ノニルトリデシル) 5-[[[(1-メチルピペリジン-4-カルボニル)オキシ]メチル]ノナンジオエート	 (A20)
カチオン性脂質 21: ジウンデシル 7-[[[(1-メチルピペリジン-4-カルボニル)オキシ]メチル]トリデカンジオエート	 (A21)

[表A-5]

カチオン性脂質 22: ビス(4-ヘプチルウンデシル) 7- [[〔1-メチルピペリジン-4-カルボニ ル)オキシ]メチル]トリデカンジオエート	 (A22)
--	---

[0194] 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。

[0195] Factor VII siRNAを25mM酢酸ナトリウム(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)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「F l o a t - A - L y z e r G 2」、S P E C T R U M社、50K M W C O）を用いた透析に供し、外液をリン酸緩衝液（P B S、p H 7. 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。

[0196] [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 A - 7 の組成物を得た。

[0197] [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 を用いた以外は実施例 B - 1 と同様にして、実施例 B - 3 の組成物を得た。

[0198] [実施例 B - 4]

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 - 4 のカチオン性脂質 4 を用いた以外は実施例 B - 1 と同様にして、実施例 B - 4 の組成物を得た。

[0199] [実施例 B - 5]

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 - 5 のカチオン性脂質 5 を用いた以外は実施例 B - 1 と同様にして、実施例 B - 5 の組成物を得た。

[0200] [実施例 B - 6]

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 - 6 のカチオン性脂質 6 を用いた以外は実施例 B - 1 と同様にして、実施例 B - 6 の組成物を得た。

[0201] [実施例 B - 7]

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 - 7 のカチオン性脂質 7 を用いた以外は実施例 B - 1 と同様にして、実施例 B - 7 の組

成物を得た。

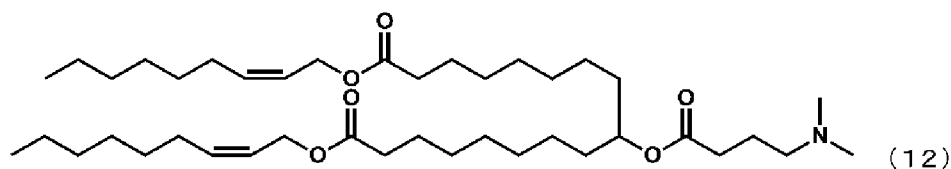
[0202] [実施例 B-8]

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-8 のカチオン性脂質 8 を用いた以外は実施例 B-1 と同様にして、実施例 B-8 の組成物を得た。

[0203] [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、特許文献 2 に記載された下記式 (12) で表されるジ ((Z)-ノン-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-1 と同様にして、比較例 B-1 の組成物を得た。

[0204] [化90]



[0205] <組成物の解析 (1)>

実施例 B-1 ~ 実施例 B-8 及び比較例 B-1 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。

[0206] 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。

$$\text{封入率 (\%)} = 100 - (A/B) \times 100 \quad (\text{F1})$$

[0207] また、粒子径測定装置 (商品名「Zetasizer Nano ZS」

、M a l v e r n社製）で脂質複合体の平均粒子径を測定した。

[0208] 表1に、s i R N A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。

[0209] [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	98	87	0.11
実施例B-2	2	98	78	0.09
実施例B-3	3	98	77	0.10
実施例B-4	4	99	86	0.11
実施例B-5	5	96	76	0.14
実施例B-6	6	91	69	0.17
実施例B-7	7	96	69	0.14
実施例B-8	8	97	69	0.14
比較例B-1	ALN-319	98	84	0.11

実施例B-1～実施例B-8の組成物は、比較例B-1の組成物と同等の高いs i R N Aの封入率を示すことが確認される。

[0210] <組成物の調製(2)>

[実施例B-9]

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、F i r e f l y L u c i f e r a s e (F L u c)のmRNA (T r i L i n k B i o t e c h n o l o g i e s、以下「F L u c mRNA」という場合がある。)を使用した。

[0211] F L u c mRNAを50mM酢酸ナトリウム(pH4.0)で27μg/mLに溶解し、mRNA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)、C h o l e s t e r o l (日本精化株式会社)、M P E G 2 0 0 0 - D M G (日油株式会社)を60/8.5/30/1.5(モル比)の割合で総脂質濃度2.4mMとなるようにエタノールに溶解し、脂質溶液とした。mRNA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「F l o a t - A - L y z e r G2」、S P E C T R U M社、50K MWCO)を用いた透析に供

し、外液をリン酸緩衝液（PBS、pH 7.4）に置換した。透析後、濃縮及び濾過滅菌を行い、実施例B-9の組成物を得た。

[0212] [実施例B-10]

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-9と同様にして、実施例B-10の組成物を得た。

[0213] [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、上述したALN-319を用いた以外は実施例B-9と同様にして、比較例B-2の組成物を得た。

[0214] <組成物の解析(2)>

組成物の解析(1)と同様にして、実施例B-9、実施例B-10及び比較例B-2の組成物について、脂質複合体へのmRNA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、mRNAの封入率及び脂質複合体の平均粒子径（Z-平均）を示す。

[0215] [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-9	1	94	104	0.06
実施例B-10	2	92	110	<0.01
比較例B-2	ALN-319	95	125	0.04

実施例B-9～実施例B-10の組成物は、比較例B-2の組成物と同等の高いmRNAの封入率を示すことが確認される。

[0216] <組成物の調製(3)>

[実施例B-11]

実施例A-2のカチオン性脂質2を用いて組成物を調製した。カチオン性脂質として、カチオン性脂質1の代わりに、カチオン性脂質2を用い、核酸として、FLuc mRNAの代わりに、Human Erythropoietin (hEPO)のmRNA (TriLink Biotechnol

ogies、以下「EPO mRNA」という場合がある。)を使用した以外は実施例B-9と同様にして、実施例B-11の組成物を得た。

[0217] [比較例B-3]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質2の代わりに、上述したALN-319を用いた以外は実施例B-11と同様にして、比較例B-3の組成物を得た。

[0218] <組成物の解析(3)>

組成物の解析(1)と同様にして、実施例B-11および比較例B-3の組成物について、脂質複合体へのmRNAの封入率、及び脂質複合体の平均粒子径を測定した。表3に、mRNAの封入率及び脂質複合体の平均粒子径(Z-平均)を示す。

[0219] [表3]

表3

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-11	2	98	109	0.06
比較例B-3	ALN-319	92	127	0.06

実施例B-11の組成物は、比較例B-3の組成物と同等の高いmRNAの封入率を示すことが確認される。

[0220] <組成物の調製(4)>

[実施例B-12]

組成物の調製(1)と同様にして、実施例A-1のカチオン性脂質1を用いて、Factor VII siRNAを含む、実施例B-12の組成物を得た。

[0221] [実施例B-13]

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-12と同様にして、実施例B-13の組成物を得た。

[0222] [比較例B-4]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質1の代わりに、上述したALN-

319を用いた以外は実施例B-12と同様にして、比較例B-4の組成物を得た。

[0223] <組成物の解析(4)>

組成物の解析(1)と同様にして、実施例B-12、実施例B-13および比較例B-4の組成物について、脂質複合体の平均粒子径(保管前平均粒子径)を測定した。さらに、各組成物を密閉したバイアルにて4℃で3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)を測定した。表4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。

[0224] [表4]

表4

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-12	1	91	96	105
実施例B-13	2	90	92	102
比較例B-4	ALN-319	76	115	151

[0225] 実施例B-12及び実施例B-13の組成物は、3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-4の組成物よりも物理的に安定であることが示された。

[0226] <組成物の調製(5)>

[実施例B-14]

組成物の調製(1)と同様にして、実施例A-9のカチオン性脂質9を用いて、Factor VII siRNAを含む、実施例B-14の組成物を得た。

[0227] [実施例B-15]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質9の代わりに、実施例A-10のカチオン性脂質10を用いた以外は実施例B-14と同様にして、実施例B-15の組成物を得た。

[0228] [実施例B-16]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質 9 の代わりに、実施例 A-11 のカチオン性脂質 11 を用いた以外は実施例 B-14 と同様にして、実施例 B-16 の組成物を得た。

[0229] [実施例 B-17]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質 9 の代わりに、実施例 A-12 のカチオン性脂質 12 を用いた以外は実施例 B-14 と同様にして、実施例 B-17 の組成物を得た。

[0230] [実施例 B-18]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質 9 の代わりに、実施例 A-13 のカチオン性脂質 13 を用いた以外は実施例 B-14 と同様にして、実施例 B-18 の組成物を得た。

[0231] [実施例 B-19]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質 9 の代わりに、実施例 A-14 のカチオン性脂質 14 を用いた以外は実施例 B-14 と同様にして、実施例 B-19 の組成物を得た。

[0232] [実施例 B-20]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質 9 の代わりに、実施例 A-15 のカチオン性脂質 15 を用いた以外は実施例 B-14 と同様にして、実施例 B-20 の組成物を得た。

[0233] [実施例 B-21]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質 9 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-14 と同様にして、実施例 B-21 の組成物を得た。

[0234] <組成物の解析 (5)>

組成物の解析 (1) と同様にして、実施例 B-14 ~ 実施例 B-21 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 5 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。

[0235] [表5]

表 5

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-14	9	80	84	0.11
実施例B-15	10	94	78	0.14
実施例B-16	11	96	71	0.06
実施例B-17	12	98	78	0.16
実施例B-18	13	99	77	0.12
実施例B-19	14	99	73	0.05
実施例B-20	15	99	74	0.06
実施例B-21	2	99	87	0.16

[0236] <組成物の調製(6)>

[実施例B-22]

組成物の調製(1)と同様にして、実施例A-16のカチオン性脂質16を用いて、Factor VII siRNAを含む、実施例B-22の組成物を得た。

[0237] [実施例B-23]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質16の代わりに、実施例A-17のカチオン性脂質17を用いた以外は実施例B-22と同様にして、実施例B-23の組成物を得た。

[0238] [実施例B-24]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質16の代わりに、実施例A-18のカチオン性脂質18を用いた以外は実施例B-22と同様にして、実施例B-24の組成物を得た。

[0239] [実施例B-25]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質16の代わりに、実施例A-19のカチオン性脂質19を用いた以外は実施例B-22と同様にして、実施例B-25の組成物を得た。

[0240] [実施例B-26]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質16の代わりに、実施例A-20のカチオン性脂質20を用いた以外は実施例B-22と同様にして、実施例

B-26の組成物を得た。

[0241] [実施例B-27]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質16の代わりに、実施例A-21のカチオン性脂質21を用いた以外は実施例B-22と同様にして、実施例B-27の組成物を得た。

[0242] [実施例B-28]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質16の代わりに、実施例A-22のカチオン性脂質22を用いた以外は実施例B-22と同様にして、実施例B-28の組成物を得た。

[0243] [実施例B-29]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質16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-22と同様にして、実施例B-29の組成物を得た。

<組成物の解析(6)>

組成物の解析(1)と同様にして、実施例B-22～実施例B-29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6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。

[0244] [表6]

表6

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-22	16	72	87	0.12
実施例B-23	17	97	80	0.08
実施例B-24	18	97	90	0.13
実施例B-25	19	97	78	0.18
実施例B-26	20	97	91	0.11
実施例B-27	21	96	90	0.13
実施例B-28	22	97	82	0.14
実施例B-29	2	99	87	0.16

[0245] <組成物の調製(7)>

[実施例B-30]

組成物の調製（１）と同様にして、実施例Ａ－１のカチオン性脂質１を用いて、Factor VII siRNAを含む、実施例Ｂ－３０の組成物を得た。

[0246] [実施例Ｂ－３１]

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－３０と同様にして、実施例Ｂ－３０の組成物を得た。

[0247] [実施例Ｂ－３２]

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を用いた以外は実施例Ｂ－３０と同様にして、実施例Ｂ－３２の組成物を得た。

[0248] [実施例Ｂ－３３]

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－４のカチオン性脂質４を用いた以外は実施例Ｂ－３０と同様にして、実施例Ｂ－３３の組成物を得た。

[0249] [比較例Ｂ－５]

カチオン性脂質として、カチオン性脂質１の代わりに、上述したALN-319を用いた以外は実施例Ｂ－３０と同様にして、比較例Ｂ－５の組成物を得た。

[0250] <組成物の解析（７）>

組成物の解析（１）と同様にして、実施例Ｂ－３０～実施例Ｂ－３３及び比較例Ｂ－５の組成物について、脂質複合体の平均粒子径（保管前平均粒子径）を測定した。さらに、各組成物を密閉したバイアルに４℃で保管し、３ヶ月後および６ヶ月後の脂質複合体の平均粒子径（保管後粒子径）を測定した。表７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（６ヶ月後）／保管前平均粒子径×１００で算出した。

[0251]

[表7]

表 7

組成物	カチオン性脂質	保管前		3ヶ月後		6か月後		平均粒子径の変化(%)
		平均粒子径(nm)	多分散指数	平均粒子径(nm)	多分散指数	平均粒子径(nm)	多分散指数	
実施例B-30	1	87	0.11	88	0.09	91	0.12	105
実施例B-31	2	78	0.09	80	0.12	85	0.14	109
実施例B-32	3	77	0.10	79	0.12	83	0.12	108
実施例B-33	4	86	0.11	85	0.11	87	0.08	101
比較例B-5	ALN-319	84	0.11	102	0.10	117	0.09	139

[0252] 実施例B-30～実施例B-33の組成物は、6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-5の組成物よりも物理的に安定であることが示された。

[0253] <組成物の調製(8)>

[実施例B-34]

実施例A-2のカチオン性脂質2を用いて組成物を調製した。核酸としては、EPO mRNAを使用した。

[0254] EPO mRNAを10mMクエン酸ナトリウム(pH4.0)で80μg/mLに溶解し、mRNA希釈液とした。また、カチオン性脂質2、DOPE(日油株式会社)、Cholesterol(日本精化株式会社)、MPEG2000-DMG(日油株式会社)を60/5.0/33.5/1.5(モル比)の割合で総脂質濃度2.25mMとなるようにエタノールに溶解し、脂質溶液とした。mRNA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、50K 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-34の組成物を得た。

[0255] [実施例B-35]

核酸として、Factor VII siRNAの代わりにLuciferase siRNAを、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を用いた以外は組成物の調製(1)と同様にして、実施例B-35の組成物を得た。なお、Luciferase siRNAは、センス鎖5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAT*T-3' (T:DNA、*=Phosphorothioate linkage) (配列番号3)、アンチセンス鎖5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGT*T-3' (T:DNA、*=Phosphorothioate linkage) (配列番号4)の塩基配列からなり、アニーリング済みのもの(株式会社ジーンデザイン)を使用した。

[0256] <組成物の解析(8)>

組成物の解析(1)と同様にして、実施例B-34および実施例B-35の組成物について、脂質複合体へのmRNAまたはsiRNAの封入率、及び脂質複合体の平均粒子径を測定した。表8に、mRNAまたはsiRNAの封入率及び脂質複合体の平均粒子径(Z-平均)を示す。

[0257] [表8]

表8

組成物	核酸	封入率 (%)	平均粒子径 (nm)	多分散指数
実施例B-34	EPO mRNA	98	105	0.06
実施例B-35	Luciferase siRNA	99	66	0.06

実施例B-34および実施例B-35の組成物は、高い核酸封入率を示すことが確認される。この結果は、実施例の組成物が、核酸の種類によらず、核酸送達に利用可能であることを示す。

[0258] C. 試験例

[試験例1]

実施例B-1～実施例B-3及び比較例B-1の組成物を、脂質複合体に封入されたFactor VII siRNA濃度が1 µg/mL又は5 µg/mLとなるようにPBSで希釈した。各組成物を、ICRマウス(5週

齢、メス、平均体重25g、n=3)に10mL/kgの投与容量で尾静脈内投与し、投与から24時間後に麻酔下で採血及び肝臓の採取を実施した。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。

[0259] PBS投与群の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9に示す。

[0260] [表9]

表9

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)
0.01	実施例B-1	1	50%
	実施例B-2	2	46%
	実施例B-3	3	44%
	比較例B-1	ALN-319	63%
0.05	実施例B-1	1	13%
	実施例B-2	2	12%
	実施例B-3	3	11%
	比較例B-1	ALN-319	21%

実施例B-1～実施例B-3の組成物は、比較例B-1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。

[0261] [試験例2]

実施例B-4及び比較例B-1の組成物を試験例1と同様にしてICRマウス(5週齢、メス、平均体重25g、n=3)に投与し、投与から24時間後の血漿中の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10に示す。

[0262] [表10]

表 10

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)
0.01	実施例B-4	4	68%
	比較例B-1	ALN-319	77%
0.05	実施例B-4	4	18%
	比較例B-1	ALN-319	24%

実施例B-4の組成物は、比較例B-1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。

[0263] [試験例3]

実施例B-5の組成物を試験例1と同様にしてICRマウス（5週齢、メス、平均体重25g、n=3）に投与し、投与から24時間後の血漿中のFactor VIIタンパク質濃度の相対値を算出した。結果を表11に示す。

[0264] [表11]

表 11

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)
0.01	実施例B-5	5	77%
0.05	実施例B-5	5	14%

実施例B-5の組成物は、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。

[0265] [試験例4]

実施例B-11と比較例B-3の組成物を、脂質複合体に封入されたhEPOMRNA濃度が1μg/mL又は3μg/mLとなるようにPBSで希釈した。各組成物を、ICRマウス（5週齢、メス、平均体重25g、n

＝3) に10 mL/kgの投与容量で尾静脈内投与し、投与から24時間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hEPOタンパク質濃度を市販のキット(商品名「Human Erythropoietin Quantikine IVD ELISA Kit」、R&D Systems)により定量した。陰性対照として、何も投与していない(無処理)群とPBSを投与した群に同様の処理を行った。結果を表12に示す。

[0266] [表12]

表12

mRNA 投与量 (mg/kg)	組成物	カチオン性脂質	hEPO タンパク質濃度 (pg/mL)
無処理			未検出
PBS投与			未検出
0.01	実施例B-11	2	29.7
0.03	実施例B-11	2	234.1
	比較例B-3	ALN-319	165.4

実施例B-11の組成物は、比較例B-3の組成物に比べてhEPOタンパク質の発現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。

[0267] [試験例5]

実施例B-14～実施例B-21の組成物を、脂質複合体に封入されたFactor VII siRNA濃度が3 µg/mL又は30 µg/mLとなるようにPBSで希釈した。各組成物を、ICRマウス(5週齢、メス、平均体重25 g、n＝3)に10 mL/kgの投与容量で尾静脈内投与し、投与から24時間後に麻酔下で採血及び肝臓の採取を実施した。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 Bio Med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。

[0268] P B S 投与群の F a c t o r V I I タンパク質濃度を 1 0 0 % とし、組成物投与群の F a c t o r V I I タンパク質濃度を相対値として算出した。結果を表 1 3 に示す。

[0269] [表13]

表 1 3

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-14	9	38%
	実施例 B-15	10	69%
	実施例 B-16	11	71%
	実施例 B-17	12	52%
	実施例 B-18	13	93%
	実施例 B-19	14	88%
	実施例 B-20	15	44%
	実施例 B-21	2	45%
0.3	実施例 B-14	9	7%
	実施例 B-15	10	15%
	実施例 B-16	11	19%
	実施例 B-17	12	3%
	実施例 B-18	13	93%
	実施例 B-19	14	57%
	実施例 B-20	15	2%
	実施例 B-21	2	2%

[0270] [試験例 6]

実施例 B-22～実施例 B-29 の組成物を試験例 5 と同様にして I C R マウス（5 週齢、メス、平均体重 2 5 g、n = 3）に投与し、投与から 2 4 時間後の血漿中の F a c t o r V I I タンパク質濃度の相対値を算出した。結果を表 1 4 に示す。

[0271]

[表14]

表 14

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-22	16	45%
	実施例B-23	17	51%
	実施例B-24	18	101%
	実施例B-25	19	53%
	実施例B-26	20	18%
	実施例B-27	21	62%
	実施例B-28	22	59%
	実施例B-29	2	20%
0.3	実施例B-22	16	6%
	実施例B-23	17	4%
	実施例B-24	18	83%
	実施例B-25	19	4%
	実施例B-26	20	<1%
	実施例B-27	21	23%
	実施例B-28	22	<1%
	実施例B-29	2	1%

[0272] [試験例 7]

EPO mRNAを封入した実施例B-34の組成物を、脂質複合体に封入されたRNA濃度が $30\mu\text{g/mL}$ となるようにPBSで希釈した。各組成物を、BALB/cマウス（メス、 $n=4$ ）に、 10mL/kg の投与容量で尾静脈内投与し、投与から1日及び4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hEPOタンパク濃度を市販のキット（商品名「Human Erythropoietin Quantikine IVD ELISA Kit」、R&D Systems）により定量した。また、網状赤血球数を測定した。陰性対照として、何も投与していない（無処理）群とLuciferase siRNAを封入した実施例B-35の組成物を投与した群に同様の処理を行った。結果を表15に示す

[0273]

[表15]

表 15

投与検体	組成物	核酸投与量 (mg/kg)	投与後日数	hEPO 濃度 (pg/mL) (Ave±S.D.)	網状赤血球数 ($10^9/L$) (Ave±S.D.)
無処置	—	—	—	未検出	435±57
Luc siRNA	実施例B-35	0.30	1日後	未検出	404±74
EPO mRNA	実施例B-34	0.30	1日後	3175±379	310±25
Luc siRNA	実施例B-35	0.30	4日後	未検出	330±101
EPO mRNA	実施例B-34	0.30	4日後	未検出	615±60

[0274] 無処置群及びLuc siRNA投与群ではhEPOが検出されず、EPO mRNA投与群では投与1日後にhEPOが検出された。また、産生したEPOの作用により、投与4日後に網状赤血球数が増加したことが確認された。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。

[0275] 以上の結果から、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が可能となる。また、本発明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。

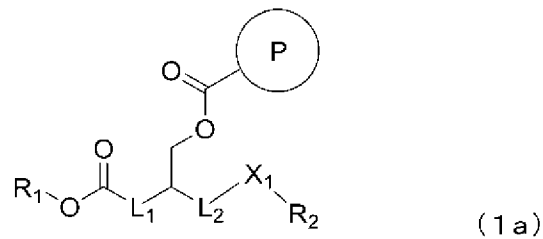
産業上の利用可能性

[0276] 本発明によれば、核酸を細胞質に効率よく放出することが可能なカチオン性脂質を提供することができる。

請求の範囲

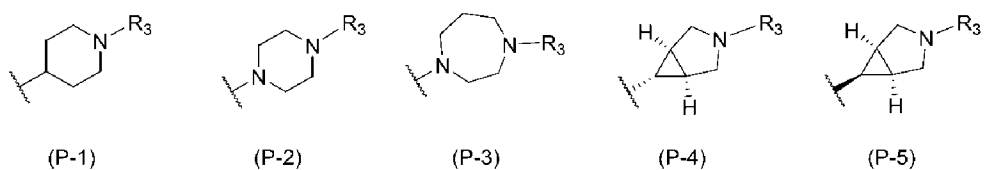
〔請求項1〕 下記式（1 a）で表される化合物又はその薬学的に許容される塩。

〔化91〕



〔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4～22のアルキル基又は炭素数4～22のアルケニル基を表し、 X_1 は単結合又は $-COO-$ を表し、環Pは下記式（P-1）～（P-5）のいずれかを表す。〕

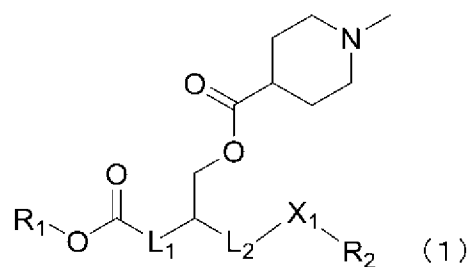
〔化92〕



〔式中、 R_3 は炭素数1～3のアルキル基を表す。〕

〔請求項2〕 式（1）で表される、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。

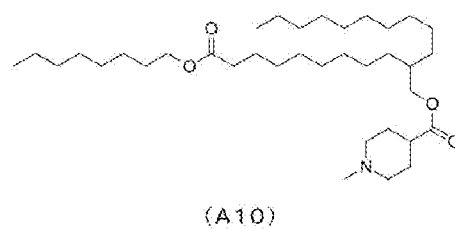
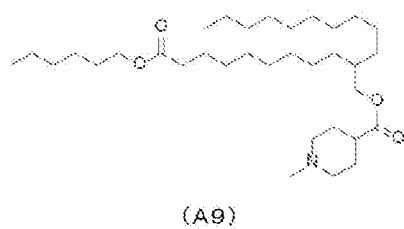
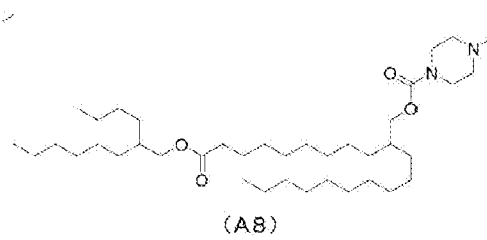
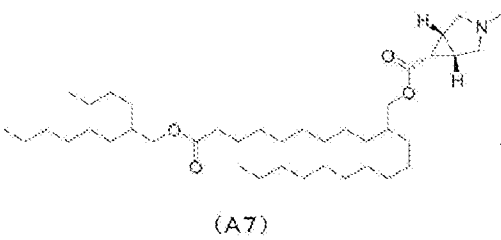
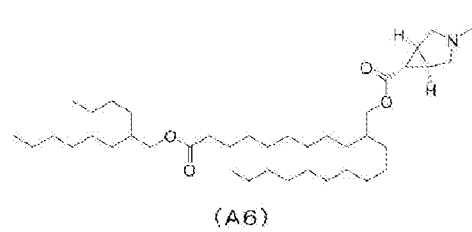
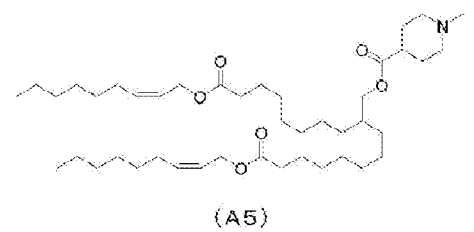
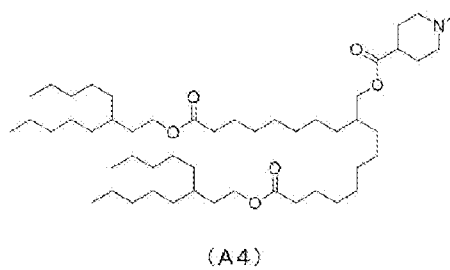
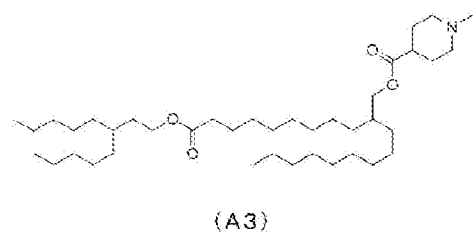
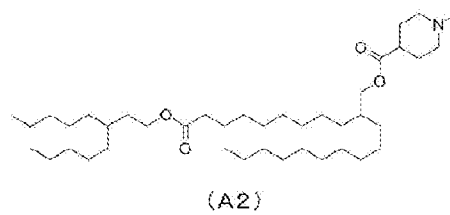
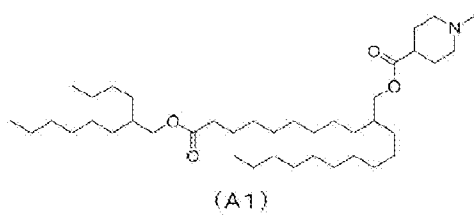
〔化93〕



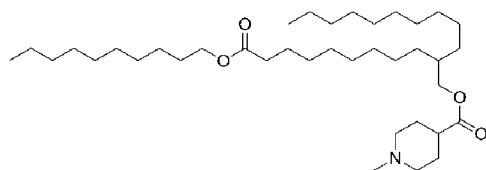
[式中、 L_1 及び L_2 はそれぞれ独立に炭素数3～10のアルキレン基、 R_1 及び R_2 はそれぞれ独立に炭素数4～22のアルキル基又は炭素数4～22のアルケニル基を表し、 X_1 は単結合又は $-COO-$ を表す。]

[請求項3] 下記式(A1)～(A22)で表される化合物からなる群より選択される、請求項1又は2に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

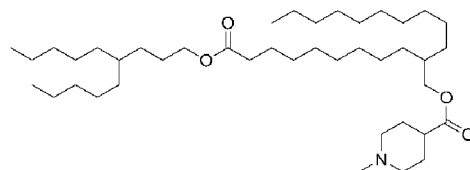
[化94-1]



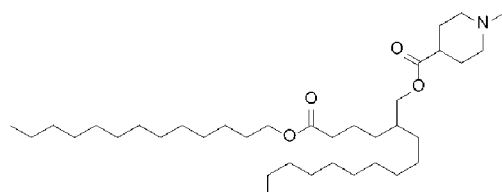
[化94-2]



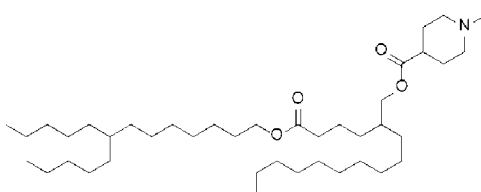
(A11)



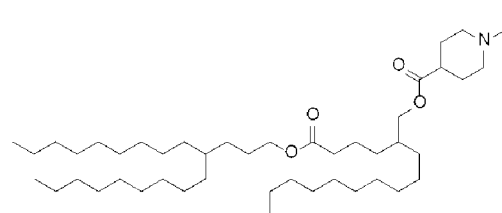
(A12)



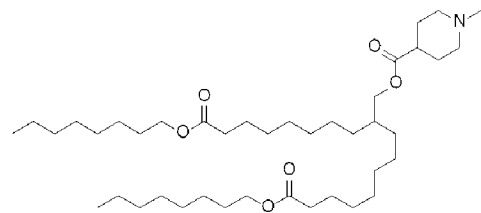
(A13)



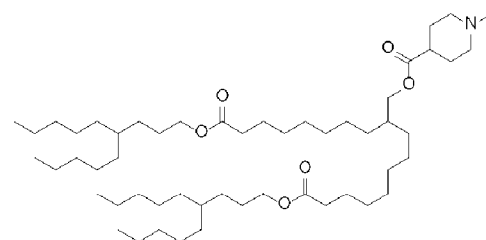
(A14)



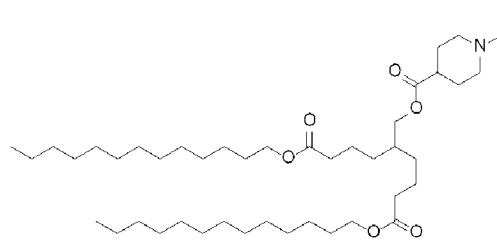
(A15)



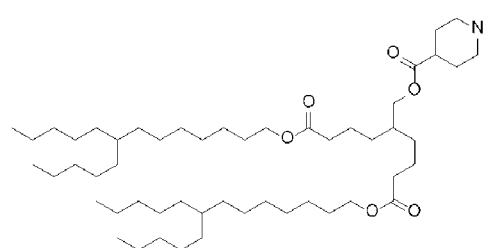
(A16)



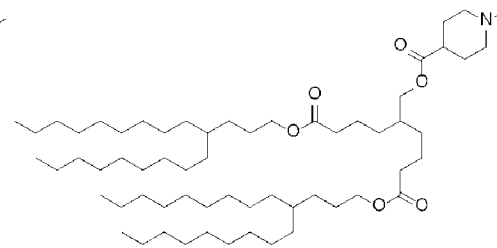
(A17)



(A18)

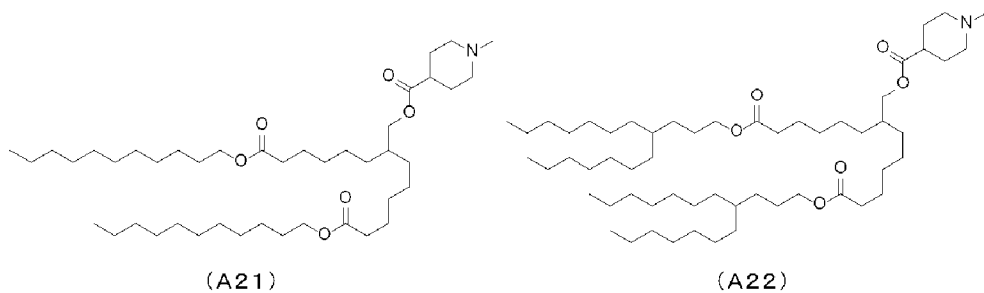


(A19)



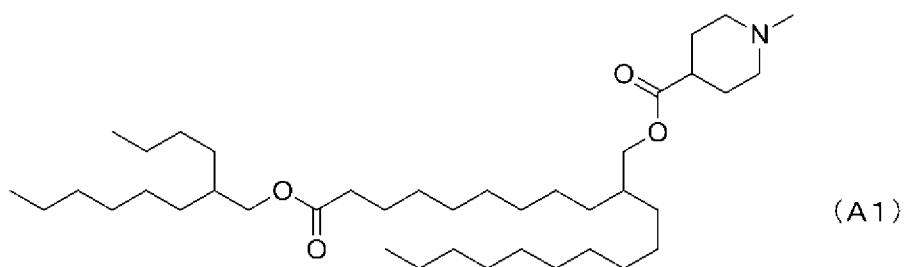
(A20)

[化94-3]



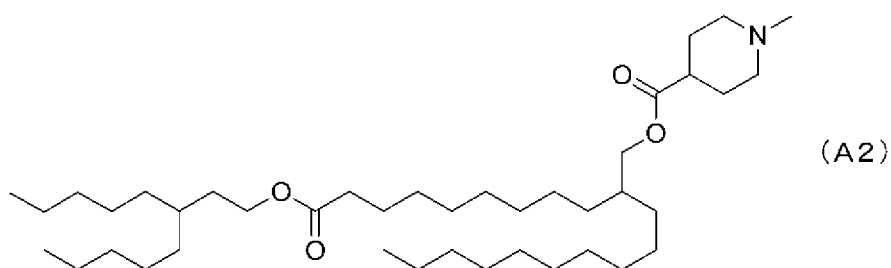
[請求項4] 下記式（A 1）で表される、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

[化95]



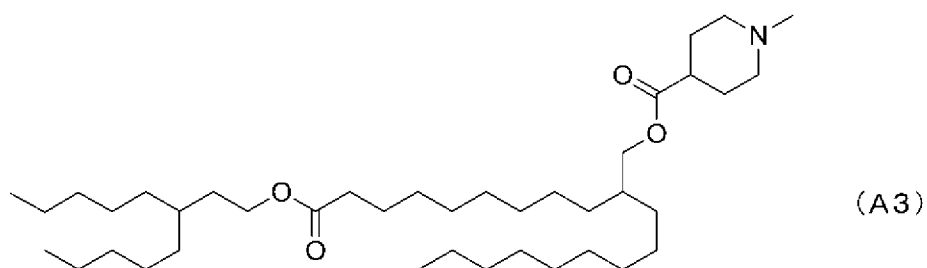
[請求項5] 下記式（A 2）で表される、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

[化96]



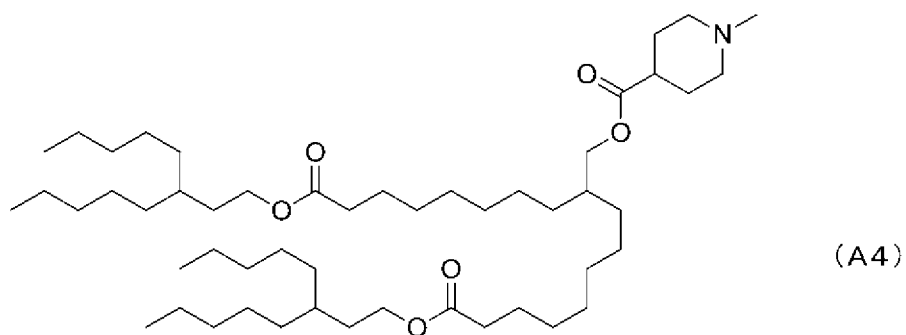
[請求項6] 下記式（A 3）で表される、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

[化97]



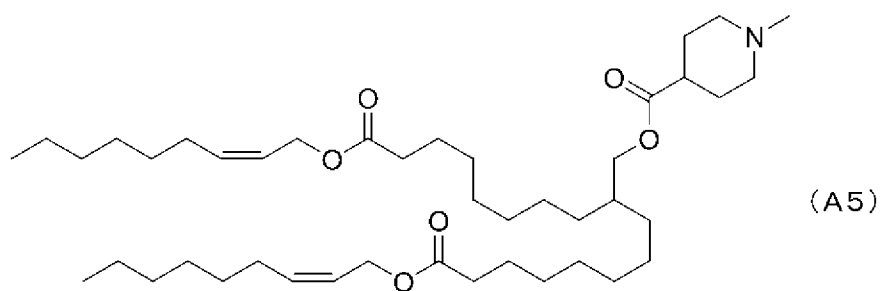
[請求項7] 下記式 (A 4) で表される、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

[化98]



[請求項8] 下記式 (A 5) で表される、請求項 1 ～ 3 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。

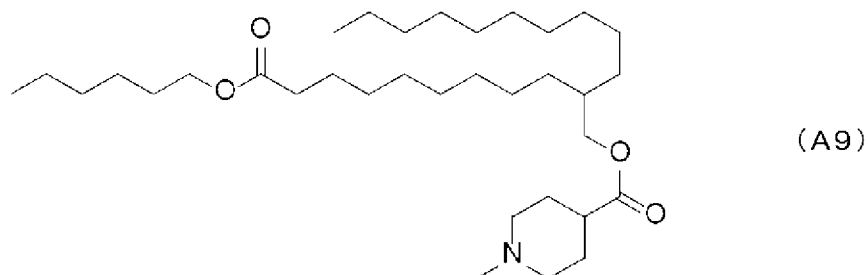
[化99]



[請求項9] 下記式 (A 9) で表される、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の

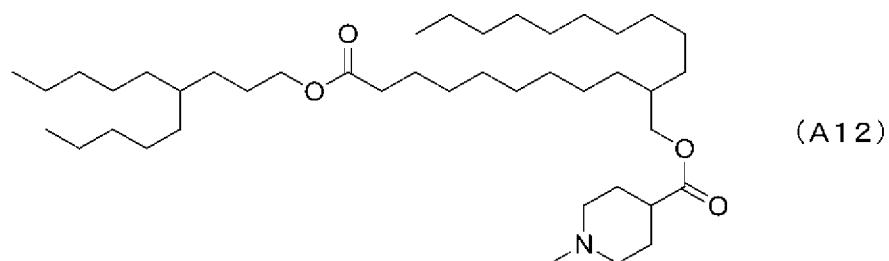
化合物又はその薬学的に許容される塩。

[化100]



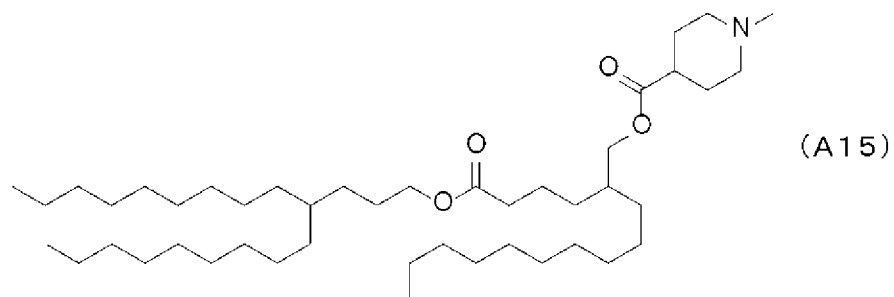
[請求項10] 下記式 (A 1 2) で表される、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

[化101]



[請求項11] 下記式 (A 1 5) で表される、請求項 1 ～ 3 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。

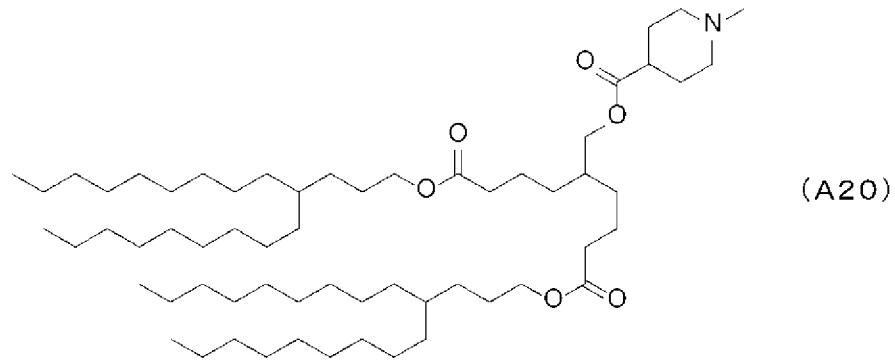
[化102]



[請求項12] 下記式 (A 2 0) で表される、請求項 1 ～ 3 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。

[化103]

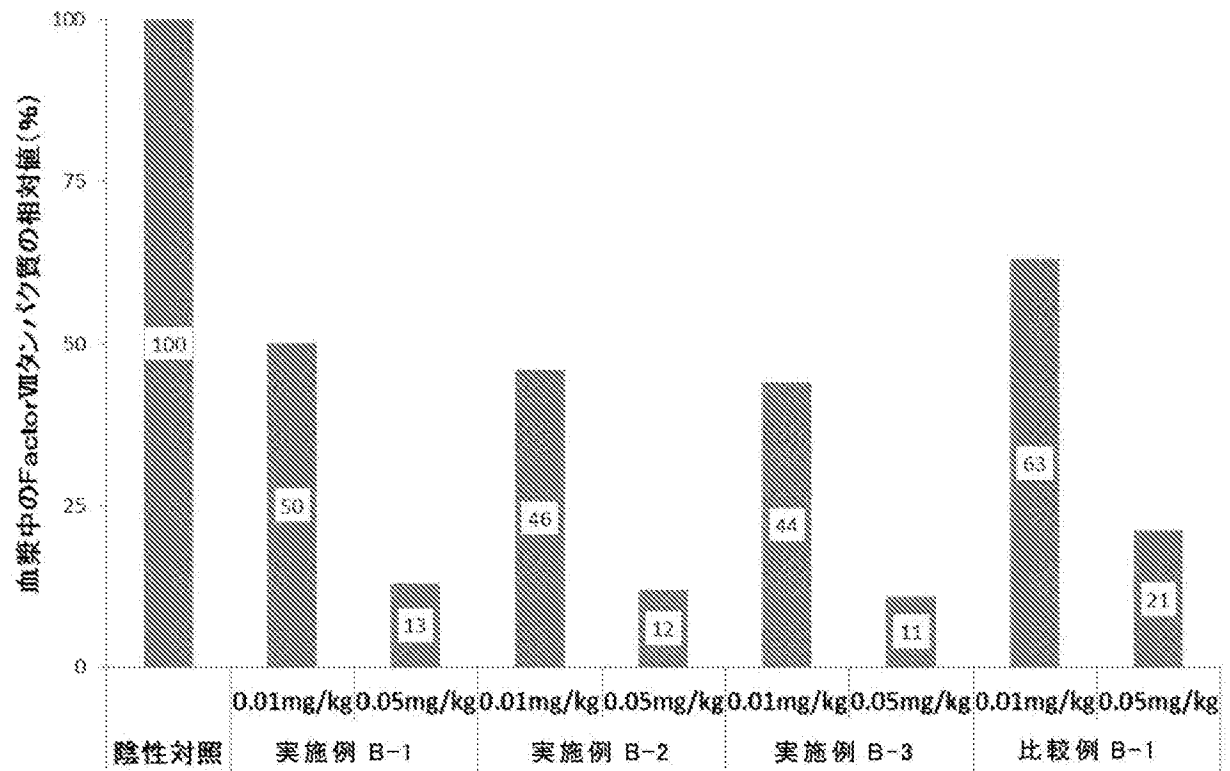


[請求項13] (I) 請求項1～12のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩と、(II) 中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及びステロールからなる群から選ばれる少なくとも一種の脂質と、を含有する脂質複合体。

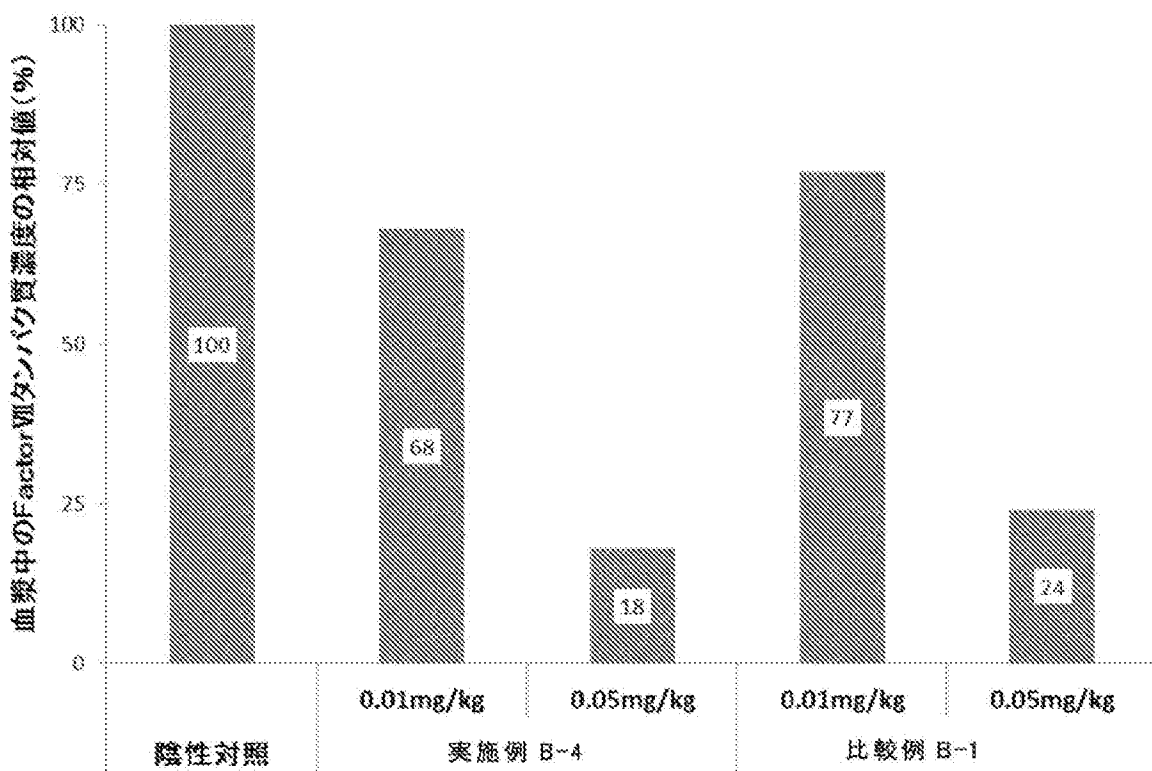
[請求項14] (I) 請求項1～12のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩と、(II) 中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及びステロールからなる群から選ばれる少なくとも一種の脂質と、(III) 核酸と、を含有する組成物。

[請求項15] (I) 請求項1～12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。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/023051

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D211/36(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K47/18(2006.01)i, A61K47/28(2006.01)i, A61K47/44(2017.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07D211/62(2006.01)i, C07D209/52(2006.01)n, C07D241/04(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D211/36, A61K31/7105, A61K47/18, A61K47/28, A61K47/44, A61P43/00, C07D211/62, C07D209/52, C07D241/04

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/153493 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.), 08 December 2011 (08.12.2011), claim 1; page 40; example 12 & US 2012/0027803 A1 & US 2016/0009637 A1 & EP 2575764 A2	1-15
A	WO 2013/086354 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.), 13 June 2013 (13.06.2013), claim 1; page 42; example 35 & US 2013/0195920 A1 & US 2015/0273068 A1 & EP 2788006 A1	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 August 2017 (07.08.17)

Date of mailing of the international search report
05 September 2017 (05.09.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07D211/36(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K47/18(2006.01)i, A61K47/28(2006.01)i, A61K47/44(2017.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07D211/62(2006.01)i, C07D209/52(2006.01)n, C07D241/04(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07D211/36, A61K31/7105, A61K47/18, A61K47/28, A61K47/44, A61P43/00, C07D211/62, C07D209/52, C07D241/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

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

CAplus/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2011/153493 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 2011.12.08, claim1, p.40, example12 & US 2012/0027803 A1 & US 2016/0009637 A1 & EP 2575764 A2	1-15
A	WO 2013/086354 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 2013.06.13, claim1, p.42, example35 & US 2013/0195920 A1 & US 2015/0273068 A1 & EP 2788006 A1	1-15

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- | | |
|--|---|
| 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの | 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの |
| 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの | 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの |
| 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | 「&」 同一パテントファミリー文献 |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | |

国際調査を完了した日

07.08.2017

国際調査報告の発送日

05.09.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

池上 京子

4 P

4667

電話番号 03-3581-1101 内線 3492