



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106573877 B

(45) 授权公告日 2021.04.13

(21) 申请号 201580042288.1

(22) 申请日 2015.08.06

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106573877 A

(43) 申请公布日 2017.04.19

(30) 优先权数据  
2014-161718 2014.08.07 JP(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.02.06(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/JP2015/072344 2015.08.06(87) PCT国际申请的公布数据  
W02016/021683 JA 2016.02.11(73) 专利权人 武田药品工业株式会社  
地址 日本大阪

(72) 发明人 帆足保孝

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限  
责任公司 11219

代理人 杨青 穆德骏

(51) Int.Cl.

C07C 229/12 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 03102150 A2, 2004.08.05

CN 1455664 A, 2003.11.12

CN 101780286 A, 2010.07.21

CN 102884041 A, 2013.01.16

CN 102898549 A, 2013.01.30

JP 2009023972 A, 2009.02.05

WO 2013086354 A1, 2013.06.13

US 6043390 A, 2000.03.28

WO 2013086322 A, 2013.06.13

审查员 吴俊威

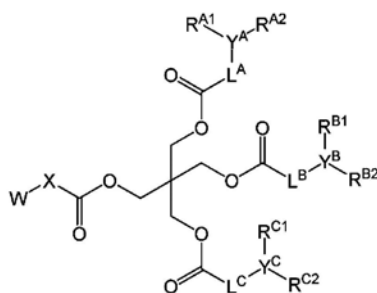
权利要求书1页 说明书34页  
序列表8页

(54) 发明名称

阳离子脂质

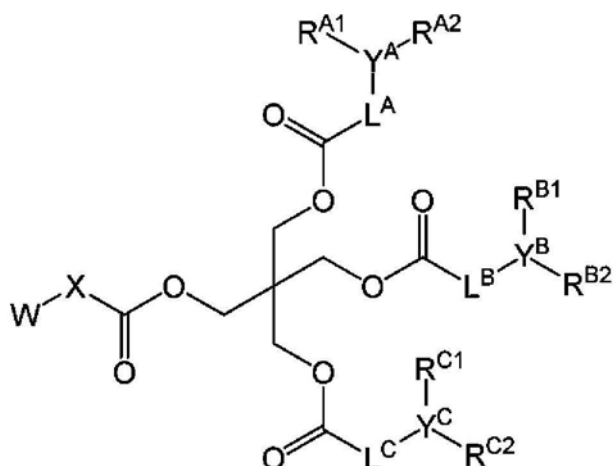
(57) 摘要

本发明提供了一种能够将活性成分(例如核酸)高效引入到各种不同细胞中的技术以及用于所述技术的化合物。本发明提供了由式(1)表示的化合物或其盐(在式(1)中,每个符号如本申请说明书中所定义)。[式1]



1. 一种由下式表示的化合物或其盐：

[式1]



其中，

W表示式- $\text{NR}^1\text{R}^2$ 或式- $\text{N}^+\text{R}^3\text{R}^4\text{R}^5(\text{Z}^-)$ ；

$\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 和 $\text{R}^5$ 表示甲基；

$\text{Z}^-$ 表示卤素离子；

X表示亚乙基、三亚甲基或四亚甲基；

$\text{Y}^A$ 、 $\text{Y}^B$ 和 $\text{Y}^C$ 表示次甲基；

$\text{L}^A$ 、 $\text{L}^B$ 和 $\text{L}^C$ 各自独立地表示键或亚甲基；并且

$\text{R}^{A1}$ 、 $\text{R}^{A2}$ 、 $\text{R}^{B1}$ 、 $\text{R}^{B2}$ 、 $\text{R}^{C1}$ 和 $\text{R}^{C2}$ 各自独立地表示丁基、戊基或己基。

2. 2-戊基庚酸3-((5-(二甲基氨基)戊酰基)氧基)-2,2-双(((2-戊基庚酰基)氧基)甲基)丙基酯或其盐。

3. 3-戊基辛酸3-((5-(二甲基氨基)戊酰基)氧基)-2,2-双(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙基酯或其盐。

4. N,N,N-三甲基-5-氧代-5-(3-((3-戊基辛酰基)氧基)-2,2-双(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙氧基)戊烷-1-铵与阴离子的盐。

5. 一种脂质粒子，其含有根据权利要求1所述的化合物或其盐。

6. 一种组合物，其含有活性成分和根据权利要求1所述的化合物或其盐。

7. 根据权利要求6所述的组合物，其中所述活性成分是核酸。

8. 根据权利要求7所述的组合物，其中所述核酸是siRNA或mRNA。

## 阳离子脂质

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种能够将活性成分、特别是核酸引入到各种不同细胞、组织或器官中的阳离子脂质。本发明还涉及含有所述阳离子脂质的脂质粒子或含有活性成分和所述阳离子脂质的组合物。

### 背景技术

[0002] 近些时候,集中进行了关于含有核酸作为活性成分的核酸医药的研究和开发。例如,关于包含对靶mRNA具有分解作用或功能抑制作用的核酸例如siRNA、miRNA、miRNA模拟物或反义寡核苷酸的核酸医药,已进行了大量研究。此外,已进行了关于用于在细胞中表达靶蛋白的核酸医药的研究。与这些研究和开发相关,已在开发作为药物递送系统(DDS)技术的用于将核酸高效引入到细胞、组织或器官中的技术。

[0003] 作为上述DDS技术,在将核酸与脂质混合以形成复合体后通过所述复合体将所述核酸引入到细胞中的技术,在传统上是已知的。作为用于形成上述复合体的脂质,阳离子脂质、亲水聚合物脂质或辅助脂质在传统上是已知的。作为上述阳离子脂质,在专利文献1至5中描述的化合物是已知的。

[0004] [现有技术参考文献]

[0005] [专利文献]

[0006] [文献1]W003/102150小册子

[0007] [文献2]W02011/153493小册子

[0008] [文献3]W02013/126803小册子

[0009] [文献4]W02012/054365小册子

[0010] [文献5]W02010/054401小册子

[0011] 发明概述

[0012] [本发明待解决的问题]

[0013] 能够将核酸高效引入细胞内的阳离子脂质,预期有助于在药理效果和安全性(低毒性)的发挥中有益的核酸医药的产生。此外,能够将核酸引入细胞内的阳离子脂质预期能够产生用于在各种不同组织中发生的各种不同疾病的核酸医药。然而,到目前为止,尚未找到充分满足这些要求的阳离子脂质。

[0014] 本发明的目的在于提供一种能够将活性成分、特别是核酸高效引入到细胞内的技术,以及用于所述技术的阳离子脂质。此外,从不同的观点来看,本发明的目的在于提供一种能够将活性成分、特别是核酸引入到细胞内的技术,以及用于所述技术的化合物。

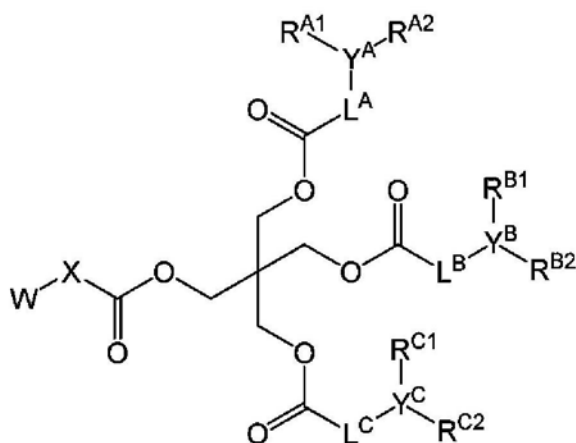
[0015] [解决问题的手段]

[0016] 着眼于解决上面提到的问题进行研究,本发明人发现上述问题可以通过使用由下式表示的化合物或其盐来解决,从而完成本发明。也就是说,本发明至少涉及下面的发明:

[0017] [1]一种由下式表示的化合物或其盐:

[0018] [化学式1]

[0019]



[0020] [其中,

[0021] W表示式- $\text{NR}^1\text{R}^2$ 或式- $\text{N}^+\text{R}^3\text{R}^4\text{R}^5(\text{Z}^-)$ ;[0022]  $\text{R}^1$ 和 $\text{R}^2$ 各自独立地表示 $\text{C}_{1-4}$ 烷基或氢原子;[0023]  $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 和 $\text{R}^5$ 各自独立地表示 $\text{C}_{1-4}$ 烷基;[0024]  $\text{Z}^-$ 表示阴离子;[0025] X表示可能被取代的 $\text{C}_{1-6}$ 亚烷基;[0026]  $\text{Y}^A$ 、 $\text{Y}^B$ 和 $\text{Y}^C$ 各自独立地表示可能被取代的次甲基;[0027]  $\text{L}^A$ 、 $\text{L}^B$ 和 $\text{L}^C$ 各自独立地表示键或可能被取代的亚甲基;并且[0028]  $\text{R}^{A1}$ 、 $\text{R}^{A2}$ 、 $\text{R}^{B1}$ 、 $\text{R}^{B2}$ 、 $\text{R}^{C1}$ 和 $\text{R}^{C2}$ 各自独立地表示可能被取代的 $\text{C}_{4-10}$ 烷基]。(在本说明书中,可以使用缩略语“化合物(I)”或“本发明的化合物”)。

[0029] [2]符合上述[1]的化合物或其盐,其中

[0030]  $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 和 $\text{R}^5$ 是甲基;[0031]  $\text{Z}^-$ 是卤素离子;

[0032] X是亚乙基、三亚甲基或四亚甲基;

[0033]  $\text{Y}^A$ 、 $\text{Y}^B$ 和 $\text{Y}^C$ 是次甲基;[0034]  $\text{L}^A$ 、 $\text{L}^B$ 和 $\text{L}^C$ 各自独立地是键或亚甲基;并且[0035]  $\text{R}^{A1}$ 、 $\text{R}^{A2}$ 、 $\text{R}^{B1}$ 、 $\text{R}^{B2}$ 、 $\text{R}^{C1}$ 和 $\text{R}^{C2}$ 各自独立地是丁基、戊基或己基。

[0036] [3] 3-((5-(二甲基氨基)戊酰基)氧基)-2,2-双(((2-戊基庚酰基)氧基)甲基)丙基2-戊基庚酸酯或其盐。

[0037] [4] 3-((5-(二甲基氨基)戊酰基)氧基)-2,2-双(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙基3-戊基辛酸酯或其盐。

[0038] [5] N,N,N-三甲基-5-氧代-5-(3-((3-戊基辛酰基)氧基)-2,2-双(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙氧基)戊烷-1-铵与阴离子的盐。

[0039] [6] 一种脂质粒子,其含有符合上述[1]-[5]的化合物或其盐。

[0040] [7] 一种组合物,其含有活性成分和符合上述[1]-[5]的化合物或其盐。

[0041] [8] 符合上述[7]的组合物,其中所述活性成分是核酸。

[0042] [9] 符合上述[8]的组合物,其中所述核酸是siRNA或mRNA。

[0043] [本发明的效果]

[0044] 通过本发明,可以将活性成分、特别是核酸以出色的效率成功引入到细胞、组织或

器官中。此外,通过本发明,可以将活性成分(特别是核酸)成功地引入到各种不同细胞、组织或器官(例如肝脏、癌、脂肪、骨髓、造血细胞)中。通过本发明,可以成功地获得用于将活性成分(特别是核酸)引入到各种不同细胞、组织或器官中的医药或研究试剂。此外,通过本发明,如果活性成分已被引入到细胞、组织或器官中,则可以获得所述活性成分的活性(例如药理效果)的高表达效率。

[0045] 发明详述

[0046] 在下文中,将详细描述本发明的化合物、生产所述化合物的方法及其用途。

[0047] 下面详细描述在本说明书中使用的每种取代基的定义。除非另有规定,否则每种取代基具有下述定义。

[0048] 在本说明书中,“卤素原子”的实例包括氟、氯、溴和碘。

[0049] 在本说明书中,“ $C_{1-6}$ 烷基”的实例包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、1-乙基丙基、己基、异己基、1,1-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基和2-乙基丁基。

[0050] 在本说明书中,“任选卤代的 $C_{1-6}$ 烷基”的实例包括任选地具有1至7个、优选地1至5个卤素原子的 $C_{1-6}$ 烷基。其具体实例包括甲基、氯甲基、二氟甲基、三氟甲基、三氟甲基、乙基、2-溴乙基、2,2,2-三氟乙基、四氟乙基、五氟乙基、丙基、2,2-二氟丙基、3,3,3-三氟丙基、异丙基、丁基、4,4,4-三氟丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、5,5,5-三氟戊基、己基和6,6,6-三氟己基。

[0051] 在本说明书中,“ $C_{2-6}$ 烯基”的实例包括乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、2-甲基-1-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、3-甲基-2-丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、4-甲基-3-戊烯基、1-己烯基、3-己烯基和5-己烯基。

[0052] 在本说明书中,“ $C_{2-6}$ 炔基”的实例包括乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、4-戊炔基、1-己炔基、2-己炔基、3-己炔基、4-己炔基、5-己炔基和4-甲基-2-戊炔基。

[0053] 在本说明书中,“ $C_{3-10}$ 环烷基”的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、双环[2.2.1]庚基、双环[2.2.2]辛基、双环[3.2.1]辛基和金刚烷基。

[0054] 在本说明书中,“任选卤代的 $C_{3-10}$ 环烷基”的实例包括任选地具有1至7个、优选地1至5个卤素原子的 $C_{3-10}$ 环烷基。其具体实例包括环丙基、2,2-二氟环丙基、2,3-二氟环丙基、环丁基、二氟环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0055] 在本说明书中,“ $C_{3-10}$ 环烯基”的实例包括环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基、环庚烯基和环辛烯基。

[0056] 在本说明书中,“ $C_{6-14}$ 芳基”的实例包括苯基、1-萘基、2-萘基、1-蒎基、2-蒎基和9-蒎基。

[0057] 在本说明书中,“ $C_{7-16}$ 芳烷基”的实例包括苯甲基、苯乙基、萘甲基和苯丙基。

[0058] 在本说明书中,“ $C_{1-6}$ 烷氧基”的实例包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基和己氧基。

[0059] 在本说明书中,“任选卤代的 $C_{1-6}$ 烷氧基”的实例包括任选地具有1至7个、优选地1至5个卤素原子的 $C_{1-6}$ 烷氧基。其具体实例包括甲氧基、二氟甲氧基、三氟甲氧基、乙氧基、2,2,2-三氟乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、4,4,4-三氟丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、戊氧基

基和己氧基。

[0060] 在本说明书中，“ $C_{3-10}$ 环烷氧基”的实例包括环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基、环庚氧基和环辛氧基。

[0061] 在本说明书中，“ $C_{1-6}$ 烷基硫基”的实例包括甲基硫基、乙基硫基、丙基硫基、异丙基硫基、丁基硫基、仲丁基硫基、叔丁基硫基、戊基硫基和己基硫基。

[0062] 在本说明书中，“任选卤代的 $C_{1-6}$ 烷基硫基”的实例包括任选地具有1至7个、优选地1至5个卤素原子的 $C_{1-6}$ 烷基硫基。其具体实例包括甲基硫基、二氟甲基硫基、三氟甲基硫基、乙基硫基、丙基硫基、异丙基硫基、丁基硫基、4,4,4-三氟丁基硫基、戊基硫基和己基硫基。

[0063] 在本说明书中，“ $C_{1-6}$ 烷基-羰基”的实例包括乙酰基、丙酰基、丁酰基、2-甲基丙酰基、戊酰基、3-甲基丁酰基、2-甲基丁酰基、2,2-二甲基丙酰基、己酰基和庚酰基。

[0064] 在本说明书中，“任选卤代的 $C_{1-6}$ 烷基-羰基”的实例包括任选地具有1至7个、优选地1至5个卤素原子的 $C_{1-6}$ 烷基-羰基。其具体实例包括乙酰基、氯乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、丙酰基、丁酰基、戊酰基和己酰基。

[0065] 在本说明书中，“ $C_{1-6}$ 烷氧基-羰基”的实例包括甲氧基羰基、乙氧基羰基、丙氧基羰基、异丙氧基羰基、丁氧基羰基、异丁氧基羰基、仲丁氧基羰基、叔丁氧基羰基、戊氧基羰基和己氧基羰基。

[0066] 在本说明书中，“ $C_{6-14}$ 芳基-羰基”的实例包括苯甲酰基、1-萘甲酰基和2-萘甲酰基。

[0067] 在本说明书中，“ $C_{7-16}$ 芳烷基-羰基”的实例包括苯乙酰基和苯丙酰基。

[0068] 在本说明书中，“5-至14-元芳香族杂环基羰基”的实例包括烟酰基、异烟酰基、噻吩甲酰基和糠酰基。

[0069] 在本说明书中，“3-至14-元非芳香族杂环基羰基”的实例包括吗啉基羰基、哌啶基羰基和吡咯烷基羰基。

[0070] 在本说明书中，“单-或双- $C_{1-6}$ 烷基-氨甲酰基”的实例包括甲基氨甲酰基、乙基氨甲酰基、二甲基氨甲酰基、二乙基氨甲酰基和N-乙基-N-甲基氨甲酰基。

[0071] 在本说明书中，“单-或双- $C_{7-16}$ 芳烷基-氨甲酰基”的实例包括苯甲基氨甲酰基和苯乙基氨甲酰基。

[0072] 在本说明书中，“ $C_{1-6}$ 烷基磺酰基”的实例包括甲基磺酰基、乙基磺酰基、丙基磺酰基、异丙基磺酰基、丁基磺酰基、仲丁基磺酰基和叔丁基磺酰基。

[0073] 在本说明书中，“任选卤代的 $C_{1-6}$ 烷基磺酰基”的实例包括任选地具有1至7个、优选地1至5个卤素原子的 $C_{1-6}$ 烷基磺酰基。其具体实例包括甲基磺酰基、二氟甲基磺酰基、三氟甲基磺酰基、乙基磺酰基、丙基磺酰基、异丙基磺酰基、丁基磺酰基、4,4,4-三氟丁基磺酰基、戊基磺酰基和己基磺酰基。

[0074] 在本说明书中，“ $C_{6-14}$ 芳基磺酰基”的实例包括苯基磺酰基、1-萘基磺酰基和2-萘基磺酰基。

[0075] 在本说明书中，“取代基”的实例包括卤素原子、氰基、硝基、任选取代的烃基、任选取代的杂环基、酰基、任选取代的氨基、任选取代的氨甲酰基、任选取代的硫代氨甲酰基、任选取代的氨磺酰基、任选取代的羟基、任选取代的巯基(SH)和任选取代的甲硅烷基。

[0076] 在本说明书中，“烃基”(包括“任选取代的烃基”的“烃基”)的实例包括 $C_{1-6}$ 烷基、

C<sub>2-6</sub>烯基、C<sub>2-6</sub>炔基、C<sub>3-10</sub>环烷基、C<sub>3-10</sub>环烯基、C<sub>6-14</sub>芳基和C<sub>7-16</sub>芳烷基。

[0077] 在本说明书中，“任选取代的烃基”的实例包括任选地具有选自下列A组取代基的取代基的烃基。

[0078] [A组取代基]

[0079] (1) 卤素原子，

[0080] (2) 硝基，

[0081] (3) 氰基，

[0082] (4) 桥氧基，

[0083] (5) 羟基，

[0084] (6) 任选卤代的C<sub>1-6</sub>烷基氧基，

[0085] (7) C<sub>6-14</sub>芳氧基(例如苯氧基、萘氧基)，

[0086] (8) C<sub>7-16</sub>芳烷基氧基(例如苯甲基氧基)，

[0087] (9) 5-至14-元芳香族杂环基氧基(例如吡啶基氧基)，

[0088] (10) 3-至14-元非芳香族杂环基氧基(例如吗啉基氧基、哌啶基氧基)，

[0089] (11) C<sub>1-6</sub>烷基-羰基氧基(例如乙酰氧基、丙酰基氧基)，

[0090] (12) C<sub>6-14</sub>芳基-羰基氧基(例如苯甲酰基氧基、1-萘甲酰基氧基、2-萘甲酰基氧基)，

[0091] (13) C<sub>1-6</sub>烷基氧基-羰基氧基(例如甲氧基羰基氧基、乙氧基羰基氧基、丙氧基羰基氧基、丁氧基羰基氧基)，

[0092] (14) 单-或双-C<sub>1-6</sub>烷基-氨基甲酰基氧基(例如甲基氨基甲酰基氧基、乙基氨基甲酰基氧基、二甲基氨基甲酰基氧基、二乙基氨基甲酰基氧基)，

[0093] (15) C<sub>6-14</sub>芳基-氨基甲酰基氧基(例如苯基氨基甲酰基氧基、萘基氨基甲酰基氧基)，

[0094] (16) 5-至14-元芳香族杂环基羰基氧基(例如烟酰基氧基)，

[0095] (17) 3-至14-元非芳香族杂环基羰基氧基(例如吗啉基羰基氧基、哌啶基羰基氧基)，

[0096] (18) 任选卤代的C<sub>1-6</sub>烷基磺酰基氧基(例如甲基磺酰基氧基、三氟甲基磺酰基氧基)，

[0097] (19) 任选被C<sub>1-6</sub>烷基取代的C<sub>6-14</sub>芳基磺酰基氧基(例如苯基磺酰基氧基、甲苯磺酰基氧基)，

[0098] (20) 任选卤代的C<sub>1-6</sub>烷基硫基，

[0099] (21) 5-至14-元芳香族杂环基，

[0100] (22) 3-至14-元非芳香族杂环基，

[0101] (23) 甲酰基，

[0102] (24) 羧基，

[0103] (25) 任选卤代的C<sub>1-6</sub>烷基-羰基，

[0104] (26) C<sub>6-14</sub>芳基-羰基，

[0105] (27) 5-至14-元芳香族杂环基羰基，

[0106] (28) 3-至14-元非芳香族杂环基羰基，

[0107] (29) C<sub>1-6</sub>烷基氧基-羰基，

- [0108] (30)  $C_{6-14}$  芳氧基-羰基 (例如苯基氧基羰基、1-萘基氧基羰基、2-萘基氧基羰基),
- [0109] (31)  $C_{7-16}$  芳烷基氧基-羰基 (例如苯甲基氧基羰基、苯乙基氧基羰基),
- [0110] (32) 氨甲酰基,
- [0111] (33) 硫代氨甲酰基,
- [0112] (34) 单-或双- $C_{1-6}$  烷基-氨甲酰基,
- [0113] (35)  $C_{6-14}$  芳基-氨甲酰基 (例如苯基氨甲酰基),
- [0114] (36) 5-至14-元芳香族杂环基氨甲酰基 (例如吡啶基氨甲酰基、噻吩基氨甲酰基),
- [0115] (37) 3-至14-元非芳香族杂环基氨甲酰基 (例如吗啉基氨甲酰基、哌啶基氨甲酰基),
- [0116] (38) 任选卤代的  $C_{1-6}$  烷基磺酰基,
- [0117] (39)  $C_{6-14}$  芳基磺酰基,
- [0118] (40) 5-至14-元芳香族杂环基磺酰基 (例如吡啶基磺酰基、噻吩基磺酰基),
- [0119] (41) 任选卤代的  $C_{1-6}$  烷基亚磺酰基,
- [0120] (42)  $C_{6-14}$  芳基亚磺酰基 (例如苯基亚磺酰基、1-萘基亚磺酰基、2-萘基亚磺酰基),
- [0121] (43) 5-至14-元芳香族杂环基亚磺酰基 (例如吡啶基亚磺酰基、噻吩基亚磺酰基),
- [0122] (44) 氨基,
- [0123] (45) 单-或双- $C_{1-6}$  烷基氨基 (例如甲基氨基、乙基氨基、丙基氨基、异丙基氨基、丁基氨基、二甲基氨基、二乙基氨基、二丙基氨基、二丁基氨基、N-乙基-N-甲基氨基),
- [0124] (46) 单-或双- $C_{6-14}$  芳基氨基 (例如苯基氨基),
- [0125] (47) 5-至14-元芳香族杂环基氨基 (例如吡啶基氨基),
- [0126] (48)  $C_{7-16}$  芳烷基氨基 (例如苯甲基氨基),
- [0127] (49) 甲酰基氨基,
- [0128] (50)  $C_{1-6}$  烷基-羰基氨基 (例如乙酰基氨基、丙酰基氨基、丁酰基氨基),
- [0129] (51) ( $C_{1-6}$  烷基) ( $C_{1-6}$  烷基-羰基) 氨基 (例如N-乙酰基-N-甲基氨基),
- [0130] (52)  $C_{6-14}$  芳基-羰基氨基 (例如苯基羰基氨基、萘基羰基氨基),
- [0131] (53)  $C_{1-6}$  烷氧基-羰基氨基 (例如甲氧基羰基氨基、乙氧基羰基氨基、丙氧基羰基氨基、丁氧基羰基氨基、叔丁氧基羰基氨基),
- [0132] (54)  $C_{7-16}$  芳烷基氧基-羰基氨基 (例如苯甲基氧基羰基氨基),
- [0133] (55)  $C_{1-6}$  烷基磺酰基氨基 (例如甲基磺酰基氨基、乙基磺酰基氨基),
- [0134] (56) 任选被  $C_{1-6}$  烷基取代的  $C_{6-14}$  芳基磺酰基氨基 (例如苯基磺酰基氨基、甲苯磺酰基氨基),
- [0135] (57) 任选卤代的  $C_{1-6}$  烷基,
- [0136] (58)  $C_{2-6}$  烯基,
- [0137] (59)  $C_{2-6}$  炔基,
- [0138] (60)  $C_{3-10}$  环烷基,
- [0139] (61)  $C_{3-10}$  环烯基, 和
- [0140] (62)  $C_{6-14}$  芳基。
- [0141] 在“任选取代的烃基”中上述取代基的数目为例如1至5, 优选为1 至3。当取代基的

数目为2或更多时,相应的取代基可能相同或不同。

[0142] 在本说明书中,“杂环基”(包括“任选取代的杂环基”的“杂环基”)的实例包括(i)芳香族杂环基,(ii)非芳香族杂环基,和(iii)7-至10-元桥接杂环基,其含有作为除了碳原子之外的构成环的原子的1至4个选自氮原子、硫原子和氧原子的杂原子。

[0143] 在本说明书中,“芳香族杂环基”(包括“5-至14-元芳香族杂环基”)的实例包括5-至14-元(优选地5-至10-元)芳香族杂环基,其含有作为除了碳原子之外的构成环的原子的1至4个选自氮原子、硫原子和氧原子的杂原子。

[0144] “芳香族杂环基”的优选实例包括5-或6-元单环芳香族杂环基,例如噻吩基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、噻唑基、异噻唑基、噁唑基、异噁唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、1,2,4-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、1,2,4-噻二唑基、1,3,4-噻二唑基、三唑基、四唑基、三嗪基等;以及8-至14-元稠合多环(优选为双环或三环)芳香族杂环基,例如苯并噻吩基、苯并呋喃基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、苯并异噁唑基、苯并噻唑基、苯并异噻唑基、苯并三唑基、咪唑并吡啶基、噻吩并吡啶基、呋喃并吡啶基、吡咯并吡啶基、吡唑并吡啶基、噁唑并吡啶基、咪唑并吡啶基、咪唑并吡嗪基、咪唑并嘧啶基、噻吩并嘧啶基、呋喃并嘧啶基、吡咯并嘧啶基、吡唑并嘧啶基、噁唑并嘧啶基、噻唑并嘧啶基、吡唑并三嗪基、萘并[2,3-b]噻吩基、吩噻噻基、吲哚基、异吲哚基、1H-吲唑基、嘌呤基、异喹啉基、喹啉基、酞嗪基、萘啶基、喹喔啉基、喹唑啉基、噌啉基、呋唑基、 $\beta$ -呋啉基、菲啶基、吡啶基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噁嗪基等。

[0145] 在本说明书中,“非芳香族杂环基”(包括“3-至14-元非芳香族杂环基”)的实例包括3-至14-元(优选地4-至10-元)非芳香族杂环基,其含有作为除了碳原子之外的构成环的原子的1至4个选自氮原子、硫原子和氧原子的杂原子。

[0146] “非芳香族杂环基”的优选实例包括3-至8-元单环非芳香族杂环基,例如氮杂环丙烷基、氧杂环丙烷基、硫杂环丙烷基、氮杂环丁烷基、氧杂环丁烷基、硫杂环丁烷基、四氢噻吩基、四氢呋喃基、吡咯啉基、吡咯烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、噁唑啉基、噁唑烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、噻唑啉基、噻唑烷基、四氢异噻唑基、四氢噁唑基、四氢异噁唑基、哌啶基、哌嗪基、四氢吡啶基、二氢吡啶基、二氢噻喃基、四氢嘧啶基、四氢哒嗪基、二氢吡喃基、四氢吡喃基、四氢噻喃基、吗啉基、硫代吗啉基、氮杂环庚烷基、二氮杂环庚烷基、吡啶基、氧杂环庚烷基、氮杂环辛烷基、二氮杂环辛烷基等;以及9至14-元稠合多环(优选为双环或三环)非芳香族杂环基,例如二氢苯并呋喃基、二氢苯并咪唑基、二氢苯并噁唑基、二氢苯并噻唑基、二氢苯并异噻唑基、二氢萘并[2,3-b]噻吩基、四氢异喹啉基、四氢喹啉基、4H-喹啉基、吲哚啉基、异吲哚啉基、四氢噻吩并[2,3-c]吡啶基、四氢苯并吡啶基、四氢喹喔啉基、四氢菲啶基、六氢吩噻嗪基、六氢吩噁嗪基、四氢酞嗪基、四氢萘啶基、四氢喹唑啉基、四氢噌啉基、四氢呋唑基、四氢- $\beta$ -呋啉基、四氢吡啶基、四氢吩嗪基、四氢噻吨基、八氢异喹啉基等。

[0147] 在本说明书中,“7-至10-元桥接杂环基”的优选实例包括奎宁环基和7-氮杂双环[2.2.1]庚烷基。

[0148] 在本说明书中,“含氮杂环基”的实例包括含有至少一个氮原子作为构成环的原子的“杂环基”。

[0149] 在本说明书中,“任选取代的杂环基”的实例包括任选地具有选自上述A组取代基

的取代基的杂环基。

[0150] “任选取代的杂环基”中取代基的数目为例如1至3。当取代基的数目为2或更大时，相应的取代基可能相同或不同。

[0151] 在本说明书中，“酰基”的实例包括甲酰基、羧基、氨甲酰基、硫代氨甲酰基、亚磺酰基、磺酰基、氨磺酰基和磷酰基，其各自任选地具有1或2个选自如下的取代基： $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{3-10}$ 环烷基、 $C_{3-10}$ 环烯基、 $C_{6-14}$ 芳基、 $C_{7-16}$ 芳烷基、5-至14-元芳香族杂环基和3-至14-元非芳香族杂环基，每个所述取代基任选地具有1至3个选自卤素原子、任选卤代的 $C_{1-6}$ 烷基、羟基、硝基、氰基、氨基和氨甲酰基的取代基。

[0152] “酰基”的实例还包括烃基磺酰基、杂环基磺酰基、烃基亚磺酰基和杂环基亚磺酰基。

[0153] 在这里，烃基磺酰基意味着键合有烃基的磺酰基，杂环基磺酰基意味着键合有杂环基的磺酰基，烃基亚磺酰基意味着键合有烃基的亚磺酰基，杂环基亚磺酰基意味着键合有杂环基的亚磺酰基。

[0154] “酰基”的优选实例包括甲酰基、羧基、 $C_{1-6}$ 烷基-羰基、 $C_{2-6}$ 烯基-羰基（例如巴豆酰基）、 $C_{3-10}$ 环烷基-羰基（例如环丁烷羰基、环戊烷羰基、环己烷羰基、环庚烷羰基）、 $C_{3-10}$ 环烯基-羰基（例如2-环己烯羰基）、 $C_{6-14}$ 芳基-羰基、 $C_{7-16}$ 芳烷基-羰基、5-至14-元芳香族杂环基羰基、3-至14-元非芳香族杂环基羰基、 $C_{1-6}$ 烷氧基-羰基、 $C_{6-14}$ 芳氧基-羰基（例如苯基氧基羰基、萘基氧基羰基）、 $C_{7-16}$ 芳烷基氧基-羰基（例如苯甲基氧基羰基、苄基氧基羰基）、氨甲酰基、单-或双- $C_{1-6}$ 烷基-氨甲酰基、单-或双- $C_{2-6}$ 烯基-氨甲酰基（例如二烯丙基氨甲酰基）、单-或双- $C_{3-10}$ 环烷基-氨甲酰基（例如环丙基氨甲酰基）、单-或双- $C_{6-14}$ 芳基-氨甲酰基（例如苯基氨甲酰基）、单-或双- $C_{7-16}$ 芳烷基-氨甲酰基、5-至14-元芳香族杂环基氨甲酰基（例如吡啶基氨甲酰基）、硫代氨甲酰基、单-或双- $C_{1-6}$ 烷基-硫代氨甲酰基（例如甲基硫基氨甲酰基、N-乙基-N-甲基硫基氨甲酰基）、单-或双- $C_{2-6}$ 烯基-硫代氨甲酰基（例如二烯丙基硫代氨甲酰基）、单-或双- $C_{3-10}$ 环烷基-硫代氨甲酰基（例如环丙基硫基氨甲酰基、环己基硫基氨甲酰基）、单-或双- $C_{6-14}$ 芳基-硫代氨甲酰基（例如苯基硫基氨甲酰基）、单-或双- $C_{7-16}$ 芳烷基-硫代氨甲酰基（例如苯甲基硫基氨甲酰基、苄基硫基氨甲酰基）、5-至14-元芳香族杂环基硫代氨甲酰基（例如吡啶基硫代氨甲酰基）、亚磺酰基、 $C_{1-6}$ 烷基亚磺酰基（例如甲基亚磺酰基、乙基亚磺酰基）、磺酰基、 $C_{1-6}$ 烷基磺酰基、 $C_{6-14}$ 芳基磺酰基、磷酰基和单-或双- $C_{1-6}$ 烷基磷酰基（例如二甲基磷酰基、二乙基磷酰基、二异丙基磷酰基、二丁基磷酰基）。

[0155] 在本说明书中，“任选取代的氨基”的实例包括任选地具有1或2个选自如下取代基的氨基： $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{3-10}$ 环烷基、 $C_{6-14}$ 芳基、 $C_{7-16}$ 芳烷基、 $C_{1-6}$ 烷基-羰基、 $C_{6-14}$ 芳基-羰基、 $C_{7-16}$ 芳烷基-羰基、5-至14-元芳香族杂环基羰基、3-至14-元非芳香族杂环基羰基、 $C_{1-6}$ 烷氧基-羰基、5-至14-元芳香族杂环基、氨甲酰基、单-或双- $C_{1-6}$ 烷基-氨甲酰基、单-或双- $C_{7-16}$ 芳烷基-氨甲酰基、 $C_{1-6}$ 烷基磺酰基和 $C_{6-14}$ 芳基磺酰基，每个所述取代基任选地具有1至3个选自A组取代基的取代基。

[0156] 任选取代的氨基的优选实例包括氨基、单-或双-（任选卤代的 $C_{1-6}$ 烷基）氨基（例如甲基氨基、三氟甲基氨基、二甲基氨基、乙基氨基、二乙基氨基、丙基氨基、二丁基氨基）、单-或双- $C_{2-6}$ 烯基氨基（例如二烯丙基氨基）、单-或双- $C_{3-10}$ 环烷基氨基（例如环丙基氨基、环己基氨基）、单-或双- $C_{6-14}$ 芳基氨基（例如苯基氨基）、单-或双- $C_{7-16}$ 芳烷基氨基（例如苯甲基氨基）。

基、二苯甲基氨基)、单-或双-(任选卤代的 $C_{1-6}$ 烷基)-羰基氨基(例如乙酰基氨基、丙酰基氨基)、单-或双- $C_{6-14}$ 芳基-羰基氨基(例如苯甲酰基氨基)、单-或双- $C_{7-16}$ 芳烷基-羰基氨基(例如苯甲基羰基氨基)、单-或双-5-至14-元芳香族杂环基羰基氨基(例如烟酰基氨基、异烟酰基氨基)、单-或双-3-至14-元非芳香族杂环基羰基氨基(例如哌啶基羰基氨基)、单-或双- $C_{1-6}$ 烷氧基-羰基氨基(例如叔丁氧基羰基氨基)、5-至14-元芳香族杂环基氨基(例如吡啶基氨基)、氮甲酰基氨基、(单-或双- $C_{1-6}$ 烷基-氮甲酰基)氨基(例如甲基氮甲酰基氨基)、(单-或双- $C_{7-16}$ 芳烷基-氮甲酰基)氨基(例如苯甲基氮甲酰基氨基)、 $C_{1-6}$ 烷基磺酰基氨基(例如甲基磺酰基氨基、乙基磺酰基氨基)、 $C_{6-14}$ 芳基磺酰基氨基(例如苯基磺酰基氨基)、( $C_{1-6}$ 烷基)( $C_{1-6}$ 烷基-羰基)氨基(例如N-乙酰基-N-甲基氨基)和( $C_{1-6}$ 烷基)( $C_{6-14}$ 芳基-羰基)氨基(例如N-苯甲酰基-N-甲基氨基)。

[0157] 在本说明书中,“任选取代的氮甲酰基”的实例包括任选地具有1或2个选自如下取代基的氮甲酰基: $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{3-10}$ 环烷基、 $C_{6-14}$ 芳基、 $C_{7-16}$ 芳烷基、 $C_{1-6}$ 烷基-羰基、 $C_{6-14}$ 芳基-羰基、 $C_{7-16}$ 芳烷基-羰基、5-至14-元芳香族杂环基羰基、3-至14-元非芳香族杂环基羰基、 $C_{1-6}$ 烷氧基-羰基、5-至14-元芳香族杂环基、氮甲酰基、单-或双- $C_{1-6}$ 烷基-氮甲酰基和单-或双- $C_{7-16}$ 芳烷基-氮甲酰基,每个所述取代基任选地具有1至3个选自A组取代基的取代基。

[0158] 任选取代的氮甲酰基的优选实例包括氮甲酰基、单-或双- $C_{1-6}$ 烷基-氮甲酰基、单-或双- $C_{2-6}$ 烯基-氮甲酰基(例如二烯丙基氮甲酰基)、单-或双- $C_{3-10}$ 环烷基-氮甲酰基(例如环丙基氮甲酰基、环己基氮甲酰基)、单-或双- $C_{6-14}$ 芳基-氮甲酰基(例如苯基氮甲酰基)、单-或双- $C_{7-16}$ 芳烷基-氮甲酰基、单-或双- $C_{1-6}$ 烷基-羰基-氮甲酰基(例如乙酰基氮甲酰基、丙酰基氮甲酰基)、单-或双- $C_{6-14}$ 芳基-羰基-氮甲酰基(例如苯甲酰基氮甲酰基)和5-至14-元芳香族杂环基氮甲酰基(例如吡啶基氮甲酰基)。

[0159] 在本说明书中,“任选取代的硫代氮甲酰基”的实例包括任选地具有1或2个选自如下取代基的硫代氮甲酰基: $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{3-10}$ 环烷基、 $C_{6-14}$ 芳基、 $C_{7-16}$ 芳烷基、 $C_{1-6}$ 烷基-羰基、 $C_{6-14}$ 芳基-羰基、 $C_{7-16}$ 芳烷基-羰基、5-至14-元芳香族杂环基羰基、3-至14-元非芳香族杂环基羰基、 $C_{1-6}$ 烷氧基-羰基、5-至14-元芳香族杂环基、氮甲酰基、单-或双- $C_{1-6}$ 烷基-氮甲酰基和单-或双- $C_{7-16}$ 芳烷基-氮甲酰基,每个所述取代基任选地具有1至3个选自A组取代基的取代基。

[0160] 任选取代的硫代氮甲酰基的优选实例包括硫代氮甲酰基、单-或双- $C_{1-6}$ 烷基-硫代氮甲酰基(例如甲基硫代氮甲酰基、乙基硫代氮甲酰基、二甲基硫代氮甲酰基、二乙基硫代氮甲酰基、N-乙基-N-甲基硫代氮甲酰基)、单-或双- $C_{2-6}$ 烯基-硫代氮甲酰基(例如二烯丙基硫代氮甲酰基)、单-或双- $C_{3-10}$ 环烷基-硫代氮甲酰基(例如环丙基硫代氮甲酰基、环己基硫代氮甲酰基)、单-或双- $C_{6-14}$ 芳基-硫代氮甲酰基(例如苯基硫代氮甲酰基)、单-或双- $C_{7-16}$ 芳烷基-硫代氮甲酰基(例如苯甲基硫代氮甲酰基、苯乙基硫代氮甲酰基)、单-或双- $C_{1-6}$ 烷基-羰基-硫代氮甲酰基(例如乙酰基硫代氮甲酰基、丙酰基硫代氮甲酰基)、单-或双- $C_{6-14}$ 芳基-羰基-硫代氮甲酰基(例如苯甲酰基硫代氮甲酰基)和5-至14-元芳香族杂环基硫代氮甲酰基(例如吡啶基硫代氮甲酰基)。

[0161] 在本说明书中,“任选取代的氮磺酰基”的实例包括任选地具有1或2个选自如下取代基的氮磺酰基: $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{3-10}$ 环烷基、 $C_{6-14}$ 芳基、 $C_{7-16}$ 芳烷基、 $C_{1-6}$ 烷基-羰基、

C<sub>6-14</sub>芳基-羰基、C<sub>7-16</sub>芳烷基-羰基、5-至14-元芳香族杂环基羰基、3-至14-元非芳香族杂环基羰基、C<sub>1-6</sub>烷氧基-羰基、5-至14-元芳香族杂环基-氨甲酰基、单-或双-C<sub>1-6</sub>烷基-氨甲酰基和单-或双-C<sub>7-16</sub>芳烷基-氨甲酰基,每个所述取代基任选地具有1至3个选自A组取代基的取代基。

[0162] 任选取代的氨磺酰基的优选实例包括氨磺酰基、单-或双-C<sub>1-6</sub>烷基-氨磺酰基(例如甲基氨磺酰基、乙基氨磺酰基、二甲基氨磺酰基、二乙基氨磺酰基、N-乙基-N-甲基氨磺酰基)、单-或双-C<sub>2-6</sub>烯基-氨磺酰基(例如二烯丙基氨磺酰基)、单-或双-C<sub>3-10</sub>环烷基-氨磺酰基(例如环丙基氨磺酰基、环己基氨磺酰基)、单-或双-C<sub>6-14</sub>芳基-氨磺酰基(例如苯基氨磺酰基)、单-或双-C<sub>7-16</sub>芳烷基-氨磺酰基(例如苯甲基氨磺酰基、苯乙基氨磺酰基)、单-或双-C<sub>1-6</sub>烷基-羰基-氨磺酰基(例如乙酰基氨磺酰基、丙酰基氨磺酰基)、单-或双-C<sub>6-14</sub>芳基-羰基-氨磺酰基(例如苯甲酰基氨磺酰基)和5-至14-元芳香族杂环基氨磺酰基(例如吡啶基氨磺酰基)。

[0163] 在本说明书中,“任选取代的羟基”的实例包括任选地具有选自如下取代基的羟基:C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>2-6</sub>烯基、C<sub>3-10</sub>环烷基、C<sub>6-14</sub>芳基、C<sub>7-16</sub>芳烷基、C<sub>1-6</sub>烷基-羰基、C<sub>6-14</sub>芳基-羰基、C<sub>7-16</sub>芳烷基-羰基、5-至14-元芳香族杂环基羰基、3-至14-元非芳香族杂环基羰基、C<sub>1-6</sub>烷氧基-羰基、5-至14-元芳香族杂环基-氨甲酰基、单-或双-C<sub>1-6</sub>烷基-氨甲酰基、单-或双-C<sub>7-16</sub>芳烷基-氨甲酰基、C<sub>1-6</sub>烷基磺酰基和C<sub>6-14</sub>芳基磺酰基,每个取代基任选地具有1至3个选自A组取代基的取代基。

[0164] 任选取代的羟基的优选实例包括羟基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>2-6</sub>烯基氧基(例如烯丙基氧基、2-丁烯基氧基、2-戊烯基氧基、3-己烯基氧基)、C<sub>3-10</sub>环烷氧基(例如环己基氧基)、C<sub>6-14</sub>芳氧基(例如苯氧基、萘基氧基)、C<sub>7-16</sub>芳烷氧基(例如苯甲基氧基、苯乙基氧基)、C<sub>1-6</sub>烷基-羰基氧基(例如乙酰基氧基、丙酰基氧基、丁酰基氧基、异丁酰基氧基、新戊酰基氧基)、C<sub>6-14</sub>芳基-羰基氧基(例如苯甲酰基氧基)、C<sub>7-16</sub>芳烷基-羰基氧基(例如苯甲基羰基氧基)、5-至14-元芳香族杂环基羰基氧基(例如烟酰基氧基)、3-至14-元非芳香族杂环基羰基氧基(例如哌啶基羰基氧基)、C<sub>1-6</sub>烷氧基-羰基氧基(例如叔丁氧基羰基氧基)、5-至14-元芳香族杂环基氧基(例如吡啶基氧基)、氨甲酰基氧基、C<sub>1-6</sub>烷基-氨甲酰基氧基(例如甲基氨甲酰基氧基)、C<sub>7-16</sub>芳烷基-氨甲酰基氧基(例如苯甲基氨甲酰基氧基)、C<sub>1-6</sub>烷基磺酰基氧基(例如甲基磺酰基氧基、乙基磺酰基氧基)和C<sub>6-14</sub>芳基磺酰基氧基(例如苯基磺酰基氧基)。

[0165] 在本说明书中,“任选取代的巯基”的实例包括任选地具有选自如下取代基的巯基:C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>2-6</sub>烯基、C<sub>3-10</sub>环烷基、C<sub>6-14</sub>芳基、C<sub>7-16</sub>芳烷基、C<sub>1-6</sub>烷基-羰基、C<sub>6-14</sub>芳基-羰基和5-至14-元芳香族杂环基,每个所述取代基任选地具有1至3个选自A组取代基的取代基,以及卤代的巯基。

[0166] 任选取代的巯基的优选实例包括巯基(-SH)、C<sub>1-6</sub>烷基巯基、C<sub>2-6</sub>烯基巯基(例如烯丙基巯基、2-丁烯基巯基、2-戊烯基巯基、3-己烯基巯基)、C<sub>3-10</sub>环烷基巯基(例如环己基巯基)、C<sub>6-14</sub>芳基巯基(例如苯基巯基、萘基巯基)、C<sub>7-16</sub>芳烷基巯基(例如苯甲基巯基、苯乙基巯基)、C<sub>1-6</sub>烷基-羰基巯基(例如乙酰基巯基、丙酰基巯基、丁酰基巯基、异丁酰基巯基、新戊酰基巯基)、C<sub>6-14</sub>芳基-羰基巯基(例如苯甲酰基巯基)、5-至14-元芳香族杂环基巯基(例如吡啶基巯基)和卤代的巯基(例如五氟巯基)。

[0167] 在本说明书中,“任选取代的甲硅烷基”的实例包括任选地具有1至3个选自如下

取代基的甲硅烷基： $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{3-10}$ 环烷基、 $C_{6-14}$ 芳基和 $C_{7-16}$ 芳烷基，每个所述取代基任选地具有1至3个选自A组取代基的取代基。

[0168] 任选取代的甲硅烷基的优选实例包括三 $C_{1-6}$ 烷基甲硅烷基（例如三甲基甲硅烷基、叔丁基（二甲基）甲硅烷基）。

[0169] 在本说明书中，“ $C_{1-6}$ 亚烷基”的实例包括 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_4-$ 、 $-(CH_2)_5-$ 、 $-(CH_2)_6-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、 $-C(CH_3)_2-$ 、 $-CH(C_2H_5)-$ 、 $-CH(C_3H_7)-$ 、 $-CH(CH(CH_3)_2)-$ 、 $-(CH(CH_3))_2-$ 、 $-CH_2-CH(CH_3)-$ 、 $-CH(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-C(CH_3)_2-$ 、 $-C(CH_3)_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-C(CH_3)_2-$ 和 $-C(CH_3)_2-CH_2-CH_2-CH_2-$ 。

[0170] 在本说明书中，“ $C_{2-6}$ 亚烯基”的实例包括 $-CH=CH-$ 、 $-CH_2-CH=CH-$ 、 $-CH=CH-CH_2-$ 、 $-C(CH_3)_2-CH=CH-$ 、 $-CH=CH-C(CH_3)_2-$ 、 $-CH_2-CH=CH-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH=CH-$ 、 $-CH=CH-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-CH=CH-$ 、 $-CH=CH-CH_2-CH_2-CH_2-$ 和 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH=CH-$ 。

[0171] 在本说明书中，“ $C_{2-6}$ 亚炔基”的实例包括 $-C\equiv C-$ 、 $-CH_2-C\equiv C-$ 、 $-C\equiv C-CH_2-$ 、 $-C(CH_3)_2-C\equiv C-$ 、 $-C\equiv C-C(CH_3)_2-$ 、 $-CH_2-C\equiv C-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-C\equiv C-$ 、 $-C\equiv C-CH_2-CH_2-$ 、 $-C\equiv C-C\equiv C-$ 、 $-C\equiv C-CH_2-CH_2-CH_2-$ 和 $-CH_2-CH_2-CH_2-C\equiv C-$ 。

[0172] 在本说明书中，“炔环”的实例包括 $C_{6-14}$ 芳香族炔环、 $C_{3-10}$ 环炔烃和 $C_{3-10}$ 环烯炔。

[0173] 在本说明书中，“ $C_{6-14}$ 芳香族炔环”的实例包括苯和萘。

[0174] 在本说明书中，“ $C_{3-10}$ 环炔烃”的实例包括环丙烷、环丁烷、环戊烷、环己烷、环庚烷和环辛烷。

[0175] 在本说明书中，“ $C_{3-10}$ 环烯炔”的实例包括环丙烯、环丁烯、环戊烯、环己烯、环庚烯或环辛烯。

[0176] 在本说明书中，“杂环”的实例包括芳香族杂环和非芳香族杂环，其各自含有1至4个选自氮原子、硫原子和氧原子的杂原子作为除了碳原子之外的构成环的原子。

[0177] 在本说明书中，“芳香族杂环”的实例包括5-至14-元（优选地5-至10-元）芳香族杂环，其含有1至4个选自氮原子、硫原子和氧原子的杂原子作为除了碳原子之外的构成环的原子。“芳香族杂环”的优选实例包括5-或6-元单环芳香族杂环例如噻吩、呋喃、吡咯、咪唑、吡唑、噻唑、异噻唑、噁唑、异噁唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、哒嗪、1,2,4-噁二唑、1,3,4-噁二唑、1,2,4-噻二唑、1,3,4-噻二唑、三唑、四唑、三嗪等；以及8-至14-元稠合的多环（优选为双环或三环）芳香族杂环，例如苯并噻吩、苯并呋喃、苯并咪唑、苯并噁唑、苯并异噁唑、苯并噻唑、苯并异噻唑、苯并三唑、咪唑并吡啶、噻吩并吡啶、呋喃并吡啶、吡咯并吡啶、噁唑并吡啶、噻唑并吡啶、咪唑并吡嗪、咪唑并嘧啶、噻吩并嘧啶、呋喃并嘧啶、吡咯并嘧啶、噁唑并嘧啶、噻唑并嘧啶、吡唑并三嗪、萘并[2,3-b]噻吩、吩噻嗪、吲哚、异吲哚、1H-吲哚、嘌呤、喹啉、喹啉、酞嗪、萘啶、喹喔啉、喹唑啉、噌啉、咔唑、 $\beta$ -咔啉、菲啶、吡啶、吩嗪、吩噻嗪、吩噁嗪等。

[0178] 在本说明书中，“非芳香族杂环”的实例包括3-至14-元（优选为4-至10-元）非芳香族杂环，其含有1至4个选自氮原子、硫原子和氧原子的杂原子作为除了碳原子之外的构成环的原子。“非芳香族杂环”的优选实例包括3-至8-元单环非芳香族杂环，例如氮杂环丙烷、氧杂环丙烷、硫杂环丙烷、氮杂环丁烷、氧杂环丁烷、硫杂环丁烷、四氢噻吩、四氢呋喃、吡咯啉、吡咯烷、咪唑啉、咪唑烷、噁唑啉、噁唑烷、吡唑啉、吡唑烷、噻唑啉、噻唑烷、四氢异噻唑、四氢噁唑、四氢异噁唑、哌啶、哌嗪、四氢吡啶、二氢吡啶、二氢噻喃、四氢嘧啶、四氢哒

嗪、二氢吡喃、四氢吡喃、四氢噻喃、吗啉、硫代吗啉、氮杂环庚烷、二氮杂环庚烷、吡啶、氧杂环庚烷、二氮杂环辛烷、氮杂环辛烷等；以及9至14-元稠合多环（优选为双环或三环）非芳香族杂环，例如二氢苯并呋喃、二氢苯并咪唑、二氢苯并噁唑、二氢苯并噻唑、二氢苯并异噻唑、二氢萘并[2,3-b]噻吩、四氢异喹啉、四氢喹啉、4H-喹啉、吡啶、异吡啶、四氢噻吩并[2,3-c]吡啶、四氢苯并吡啶、四氢喹啉、四氢菲啶、六氢吩噻嗪、六氢吩噁嗪、四氢酞嗪、四氢萘啶、四氢喹啉、四氢噻啉、四氢吡啶、四氢-β-吡啶、四氢吡啶、四氢吩噻、四氢噻吨、八氢异喹啉基等。

[0179] 在本说明书中，“含氮杂环”的实例包括含有至少一个氮原子作为构成环的原子的“杂环”。

[0180] 在本说明书中，“C<sub>1-4</sub>烷基”的实例包括在上面的C<sub>1-6</sub>烷基中所示例的烷基中碳原子数为1至4的烷基。

[0181] 在本说明书中，“C<sub>4-10</sub>烷基”的实例包括在上面的C<sub>1-6</sub>烷基中所示例的烷基中碳原子数为4或更大的烷基以及庚基、辛基、壬基、癸基。

[0182] 在本说明书中，“C<sub>1-6</sub>亚烷基”的实例包括-CH<sub>2</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-、-CH(CH<sub>3</sub>)-、-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-、-CH(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)-、-CH(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-、-CH(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)-、-(CH(CH<sub>3</sub>))<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-、-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-、-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-、-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-。

[0183] 在本说明书中，“任选取代的C<sub>4-10</sub>烷基”包括任选地具有选自上述A组取代基的取代基的C<sub>4-10</sub>烷基。

[0184] 在本说明书中，“任选取代的C<sub>1-6</sub>亚烷基”包括具有选自上述A组取代基的取代基的C<sub>1-6</sub>亚烷基。

[0185] 在本说明书中，“任选取代的次甲基”包括任选地具有选自上述A组取代基的取代基的次甲基。

[0186] 在本说明书中，“任选取代的亚甲基”包括具有选自上述A组取代基的取代基的亚甲基。

[0187] 由上述通式所表示的化合物中R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、Z<sup>-</sup>、X、Y<sup>A</sup>、Y<sup>B</sup>、Y<sup>C</sup>、L<sup>A</sup>、L<sup>B</sup>、L<sup>C</sup>、R<sup>A1</sup>、R<sup>A2</sup>、R<sup>B1</sup>、R<sup>B2</sup>、R<sup>C1</sup>和R<sup>C2</sup>的优选实例如下所述。

[0188] R<sup>1</sup>优选为C<sub>1-4</sub>烷基，更优选为甲基。

[0189] R<sup>2</sup>优选为C<sub>1-4</sub>烷基，更优选为甲基。

[0190] R<sup>3</sup>优选为甲基。

[0191] R<sup>4</sup>优选为甲基。

[0192] R<sup>5</sup>优选为甲基。

[0193] 作为Z<sup>-</sup>，优选的是可药用阴离子，其中可以提到的适合实例是：卤素离子（氟离子、氯离子、溴离子和碘离子）；选自硝酸根离子、硫酸根离子、磷酸根离子的无机酸阴离子；选自甲酸根离子、乙酸根离子、三氟乙酸根离子、邻苯二甲酸根离子、延胡索酸根离子、草酸根离子、酒石酸根离子、苹果酸根离子、柠檬酸根离子、琥珀酸根离子、马来酸根离子、甲磺酸根离子、苯磺酸根离子、对甲苯磺酸根离子的有机酸阴离子；以及选自天冬氨酸根离子和谷氨酸根离子的酸性氨基酸阴离子。Z<sup>-</sup>更优选为卤素离子（特别是碘离子）。

[0194] X优选为C<sub>1-6</sub>亚烷基，更优选为亚乙基、三亚甲基或四亚甲基。

- [0195]  $Y^A$  优选为次甲基。
- [0196]  $Y^B$  优选为次甲基。
- [0197]  $Y^C$  优选为次甲基。
- [0198]  $L^A$  优选为键或亚甲基。
- [0199]  $L^B$  优选为键或亚甲基。
- [0200]  $L^C$  优选为键或亚甲基。
- [0201]  $R^{A1}$  优选为  $C_{4-10}$  烷基, 更优选为丁基、戊基或己基。
- [0202]  $R^{A2}$  优选为  $C_{4-10}$  烷基, 更优选为丁基、戊基或己基。
- [0203]  $R^{B1}$  优选为  $C_{4-10}$  烷基, 更优选为丁基、戊基或己基。
- [0204]  $R^{B2}$  优选为  $C_{4-10}$  烷基, 更优选为丁基、戊基或己基。
- [0205]  $R^{C1}$  优选为  $C_{4-10}$  烷基, 更优选为丁基、戊基或己基。
- [0206]  $R^{C2}$  优选为  $C_{4-10}$  烷基, 更优选为丁基、戊基或己基。
- [0207] 作为化合物 (I) 的适合实例, 可以提到下述化合物:
- [0208] 化合物 (A):
- [0209] 化合物 (I), 其中
- [0210]  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  和  $R^5$  是甲基;
- [0211]  $Z^-$  是卤素离子 (特别是碘离子);
- [0212]  $X$  是亚乙基、三亚甲基或四亚甲基;
- [0213]  $Y^A$ 、 $Y^B$  和  $Y^C$  是次甲基;
- [0214]  $L^A$ 、 $L^B$  和  $L^C$  彼此独立地是键或亚甲基;
- [0215]  $R^{A1}$ 、 $R^{A2}$ 、 $R^{B1}$ 、 $R^{B2}$ 、 $R^{C1}$  和  $R^{C2}$  彼此独立地是丁基、戊基或己基。
- [0216] 化合物 (B):
- [0217] 化合物 (A), 其中  $W$  是式  $-NR^1R^2$ 。
- [0218] 化合物 (C):
- [0219] 化合物 (A), 其中
- [0220]  $W$  是式  $-N^+R^3R^4R^5(Z^-)$ ;
- [0221]  $Z^-$  是碘离子;
- [0222]  $X$  是四亚甲基;
- [0223]  $R^{A1}$ 、 $R^{A2}$ 、 $R^{B1}$ 、 $R^{B2}$ 、 $R^{C1}$  和  $R^{C2}$  是戊基。
- [0224] 化合物 (I) 的盐优选为可药用盐。其实例包括与无机碱的盐、与有机碱的盐、与无机酸的盐、与有机酸的盐和与碱性或酸性氨基酸的盐。
- [0225] 与无机碱的盐的优选实例包括: 碱金属盐例如钠盐和钾盐; 碱土金属盐例如钙盐和镁盐; 以及铝盐和铵盐。
- [0226] 与有机碱的盐的优选实例包括与三甲胺、三乙胺、吡啶、甲基吡啶、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨丁三醇 [三 (羟甲基) 甲胺]、叔丁胺、环己胺、苯甲胺、二环己胺或  $N,N$ -二苯甲基乙二胺的盐。
- [0227] 与无机酸的盐的优选实例包括与氢氟酸、盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硝酸、硫酸或磷酸的盐。
- [0228] 与有机酸的盐的优选实例包括与甲酸、乙酸、三氟乙酸、邻苯二甲酸、延胡索酸、草

酸、酒石酸、马来酸、柠檬酸、琥珀酸、苹果酸、甲磺酸、苯磺酸或对甲苯磺酸的盐。

[0229] 与碱性氨基酸的盐的优选实例包括与精氨酸、赖氨酸或鸟氨酸的盐。

[0230] 与酸性氨基酸的盐的优选实例包括与天冬氨酸或谷氨酸的盐。

[0231] 在本发明中使用的“活性成分”表示具有生物或药理活性的物质,特别是表示可用于制药用途或研究辅助用途的物质。作为活性成分,可以提到的是例如核酸。

[0232] “核酸”可以是任何分子,只要它是核苷酸或由核苷酸或功能上与核苷酸等同的分子的聚合产生的分子即可;可以提到的是例如作为核糖核苷酸聚合物的RNA、作为脱氧核糖核苷酸聚合物的DNA、核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的混合聚合物以及核苷酸聚合物,包括核苷酸类似物;此外,所述核酸可以是包含核酸衍生物的核苷酸聚合物。另外,所述核酸可以是单链核酸或双链核酸。双链核酸包含其中一条链在严紧条件下与另一条链杂交的双链核酸。

[0233] 所述核苷酸类似物可以是任何分子,只要它是通过修饰核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、RNA或DNA而制备的分子即可,所述修饰是为了与所述RNA或DNA相比提高其核酸酶抗性、使其稳定、提高其对互补链核酸的亲和性、提高其细胞透过性 or 使其可视化。所述核苷酸类似物可以是天然存在的分子或非天然分子;例如,可以提到的是在糖组成部分处修饰的核苷酸类似物、在磷酸二酯键处修饰的核苷酸类似物等。

[0234] 在糖组成部分处修饰的核苷酸类似物可以是任一种核苷酸类似物,只要已将任何任选的化学结构性物质添加到所述核苷酸的糖的化学结构或替换一部分或全部所述化学结构即可;可以提到的实例是用 2'-O-甲基核糖替换的核苷酸类似物、用2'-O-丙基核糖替换的核苷酸类似物、用2'-甲氧基乙氧基核糖替换的核苷酸类似物、用2'-O-甲氧基乙基核糖替换的核苷酸类似物、用2'-O-[2-(胍)乙基]核糖替换的核苷酸类似物、用2'-O-氟代核糖替换的核苷酸类似物,作为将桥接结构引入到糖组成部分中的结果而具有两个环状结构的桥接核酸(BNA),更特别是其中2'位置处的氧原子和4'位置处的碳原子已通过亚甲基桥接的锁核酸(LNA),以及亚乙基桥接的核酸(ENA) [Nucleic Acid Research, 32,e175 (2004)]。此外,可以提到的是肽核酸(PNA) [Acc.Chem.Res., 32,624 (1999)]、氧化肽核酸(OPNA) [J.Am.Chem.Soc., 123,4653 (2001)]和肽核糖核酸(PRNA) [J.Am.Chem.Soc., 122, 6900 (2000)]等。

[0235] 在磷酸二酯键处修饰的核苷酸类似物是任一种核苷酸类似物,只要已将任何任选的化学物质添加到所述核苷酸的磷酸二酯键的化学结构或替换一部分或全部所述化学结构即可;可以提到的实例是用硫代磷酸酯键替换的核苷酸类似物、用N3'-P5磷酰胺酯键替换的核苷酸类似物[SAIBO KOGAKU, 16,1463-1473 (1997)] [《RNAi方法和反义方法》(RNAi Method and Antisense Method), Kodansha (2005)]等。

[0236] 所述核酸衍生物可以是任何分子,只要它是通过向所述核酸添加另一种化学物质而制备的分子即可,所述添加是为了与所述核酸相比提高其核酸酶抗性、使其稳定、提高其对互补链核酸的亲和性、提高其细胞透过性 or 使其可视化;可以提到的实例是5'-多胺偶联的衍生物、胆甾醇偶联的衍生物、甾醇偶联的衍生物、胆汁酸偶联的衍生物、维生素偶联的衍生物、Cy5偶联的衍生物、Cy3偶联的衍生物、6-FAM偶联的衍生物、生物素偶联的衍生物等。

[0237] 所述活性成分优选为核酸;作为所述核酸的具体实例,可以提到的是例如siRNA、

miRNA、miRNA模拟物、反义寡核苷酸、核酶、mRNA、诱饵核酸、适体活性成分。作为所述核酸，优选的是siRNA或mRNA。

[0238] 在本发明中，“siRNA”是具有10至30个碱基、优选地15至20个碱基的双链RNA或其类似物，意味着也具有互补序列的类似物。所述 siRNA优选地在3'末端处具有1至3个碱基、更优选地2个碱基的突出端。所述互补序列部分可以是完全互补的，或者可以包含非互补碱基；所述互补序列部分优选为完全互补的。

[0239] 在本发明中，“mRNA”意味着包含可翻译成蛋白质的碱基序列的RNA。

[0240] 在本发明中，化合物(I)可用作阳离子脂质。阳离子脂质在溶剂或悬浮介质中，可以与多个分子形成复合体。在上面提到的复合体中，除了化合物(I)之外，还可以包含另一种组分。作为上述另一种组分的实例，可以提到的是其他脂质(结构性脂质(例如胆甾醇和磷脂酰胆碱(例如二棕榈酰基磷脂酰胆碱或二硬脂酰基磷脂酰胆碱)、聚乙二醇脂质(例如GM-020(NOF CORPORATION)、GS-020(NOF CORPORATION)等)) 和活性成分。

[0241] 在本发明中，“脂质粒子”意味着包括在上述复合体中但不包含活性成分的复合体。

[0242] (1) (i) 本发明的化合物或(ii)含有所述化合物的脂质粒子，可以作为与(2)活性成分和(3)如有必要的话上述其他脂质的组合物，用于药物或药剂(在本说明书中，这种组合物可以被简写为本发明的组合物)。本发明的组合物可以使用可药用载体，利用在配制技术领域本身已知的方法来生产。作为上述药物的配方，例如包括与常规添加剂例如缓冲剂和/或稳定剂掺混的用于肠胃外给药的配方(例如液体配方如注射液)，以及与用于药物的常规载体例如软膏、霜剂、液体或膏药掺混的表面配方。

[0243] 本发明的组合物可用于将活性成分引入到许多种类的细胞、组织或器官中。作为这些细胞、组织或器官，可以提到的如下：脾细胞，神经细胞，神经胶质细胞，胰腺β细胞，骨髓细胞，肾小球系膜细胞，朗格汉斯细胞，表皮细胞，上皮细胞，内皮细胞，成纤维细胞，纤维细胞，肌细胞，脂肪细胞，免疫细胞(例如巨噬细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、肥大细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜曙红细胞、单核细胞)，巨核细胞，滑膜细胞，软骨细胞，骨细胞，成骨细胞，破骨细胞，乳腺细胞，肝细胞或间质细胞；或这些细胞的前体细胞，干细胞等，或造血细胞；或存在这些细胞的任何组织或器官，即例如脑或任何脑区(例如嗅球、杏仁核、基底神经节、海马、丘脑、下丘脑、丘脑底核、大脑皮层、延髓、小脑、枕极、额叶、颞叶、硬膜、尾状核、胼胝体、黑质)，脊髓，脑下垂体，胃，胰，肾，肝，性腺，甲状腺，胆囊，骨髓，肾上腺，皮肤，肌肉，肺，胃肠道(例如大肠和小肠)，血管，心脏，胸腺，脾脏，颌下腺，外周血，外周血细胞，前列腺，睾丸，卵巢，胎盘，子宫，骨骼，关节，骨骼肌。这些细胞、组织或器官可能是癌化的癌细胞或癌组织等。

[0244] 本发明的组合物在将活性成分引入到肝脏、癌细胞、脂肪细胞、造血细胞或骨髓细胞中的效率方面是特别出色的。

[0245] 本发明的化合物和本发明的组合物可以稳定且安全地使用，具有低的毒性。在使用本发明的组合物作为药物中，可以给药所述组合物以使所述活性成分以有效的量给药到给药靶(例如哺乳动物如人类)中。

[0246] 下面解释本发明的化合物的生产方法。

[0247] 在下面给出的生产方法中每一步中使用的起始原料或试剂以及得到的化合物，可

以各自形成盐。作为这些盐,可以提到的是与上面提到的本发明的化合物的盐相似的盐。

[0248] 当在每一步中得到的化合物是游离化合物时,可以通过本身在本领域中已知的方法将这种化合物转变成目标盐。相反,当在每一步中得到的化合物是盐时,可以通过本身在本领域中已知的方法将这种盐转变成游离形式或另一种类型的目标盐。

[0249] 在每一步中得到的化合物可以以其反应溶液的形式或在作为粗产物获得后,使用在下一个反应中。或者,可以通过分离方法例如浓缩、结晶、重结晶、蒸馏、溶剂萃取、分馏或层析,按照常规方法从反应混合物分离和/或纯化在每一步中得到的化合物。

[0250] 如果用于每一步的起始原料或试剂化合物是可商购的,则可以直接使用所述可商购产品。

[0251] 在每一步的反应中,取决于所使用的试剂或溶剂,反应时间可能不同,并且通常为1分钟至48小时,优选为10分钟至8小时,除非另有指明。

[0252] 在每一步的反应中,取决于所使用的试剂或溶剂,反应温度可能不同,并且通常为-78℃至300℃,优选为-78℃至150℃,除非另有指明。

[0253] 在每一步的反应中,取决于所使用的试剂或溶剂,压力可能不同,并且通常为1atm至20atm,优选为1atm至3atm,除非另有指明。

[0254] 在每一步的反应中,可以使用例如微波合成装置例如Biotage Initiator。取决于所使用的试剂或溶剂,反应温度可能不同,并且通常为室温至300℃,优选为50℃至250℃,除非另有指明。取决于所使用的试剂或溶剂,反应时间可能不同,并且通常为1分钟至48小时,优选为1分钟至8小时,除非另有指明。

[0255] 在每一步的反应中,所述试剂以相对于底物0.5当量至20当量、优选地0.8当量至5当量的量使用,除非另有指明。在使用所述试剂作为催化剂的情况下,所述试剂以相对于底物0.001当量至1当量、优选地0.01 当量至0.2当量的量使用。当所述试剂也充当反应溶剂时,所述试剂以溶剂的量使用。

[0256] 在反应的每一步中,反应在没有溶剂的情况下或通过溶解或悬浮在适合的溶剂中进行,除非另有指明。可以使用的溶剂的具体实例包括在实施例中描述的溶剂和下面给出的溶剂:

[0257] 醇类例如甲醇、乙醇、叔丁醇和2-甲氧基乙醇;

[0258] 醚类例如二乙醚、二苯醚、四氢呋喃和1,2-二甲氧基乙烷;

[0259] 芳香族烃类例如氯苯、甲苯和二甲苯;

[0260] 饱和烃类例如环己烷和己烷;

[0261] 酰胺类例如N,N-二甲基甲酰胺和N-甲基吡咯烷酮;

[0262] 卤代烃类例如二氯甲烷和四氯化碳;

[0263] 腈类例如乙腈;

[0264] 亚砷类例如二甲基亚砷;

[0265] 芳香族有机碱例如吡啶;

[0266] 酸酐例如乙酸酐;

[0267] 有机酸例如甲酸、乙酸和三氟乙酸;

[0268] 无机酸例如盐酸和硫酸;

[0269] 酯类例如乙酸乙酯;

[0270] 酮类例如丙酮和甲乙酮;以及

[0271] 水。

[0272] 这些溶剂中的两者或更多者可以以适当的比率作为混合物使用。

[0273] 在利用碱的每一个反应步骤中,可以使用的碱的实例是在实施例中给出的或下面列出的碱:

[0274] 无机碱例如氢氧化钠和氢氧化镁;

[0275] 碱性盐例如碳酸钠、碳酸钾和碳酸氢钠;

[0276] 有机碱例如三乙胺、二乙胺、吡啶、4-二甲基氨基吡啶、N,N-二甲基苯胺、1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷、1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一碳烯、咪唑和哌啶;

[0277] 金属醇盐例如乙醇钠和叔丁醇钾;

[0278] 碱金属氢化物例如氢化钠;

[0279] 氨基金属例如氨基钠、二异丙基氨基锂和六甲基二甲硅烷基氨基锂;以及

[0280] 有机锂试剂例如正丁基锂。

[0281] 在利用酸或酸催化剂的每一个反应步骤中,可以使用的酸或酸催化剂的实例是在实施例中给出或下面列出的物质:

[0282] 无机酸例如盐酸、硫酸、硝酸、氢溴酸和磷酸;

[0283] 有机酸例如乙酸、三氟乙酸、柠檬酸、对甲苯磺酸和10-樟脑磺酸;以及

[0284] 路易斯酸例如三氟化硼-二乙醚复合物、碘化锌、无水氯化铝、无水氯化锌和无水氯化铁。

[0285] 除非另有陈述,否则每一个反应步骤都可以按照实施例中给出的方法或本身在本领域中已知的标准方法来进行,例如在下述文献中描述的方法:Jikken Kagaku Koza(《实验化学百科全书》(英文名称为 Encyclopedia of Experimental Chemistry)),第五版,Vol.13至Vol.19(由日本化学学会主编);Shin Jikken Kagaku Koza(《实验化学新百科全书》(英文名称为 New Encyclopedia of Experimental Chemistry)),Vol.14至Vol.15(由日本化学学会主编);《有机化学实验室中的反应与合成》(Reactions and Syntheses:In the Organic Chemistry Laboratory),第二版,修订本(L.F.Tietze,Th.Eicher,Nankodo);《有机命名反应:反应机制和本质》(Organic Name Reactions:The Reaction Mechanism and Essence),修订本(Hideo Togo,Kodansha);《有机合成汇编》(Organic Syntheses Collective),第I-VII卷(John Wiley&Sons,Inc.);《实验室中的现代有机合成:标准实验程序汇编》(Modern Organic Synthesis in the Laboratory:A Collection of Standard Experimental Procedures)(Jie Jack Li,Oxford University Press);《综合杂环化学》(Comprehensive Heterocyclic Chemistry)III,Vol.1至Vol. 14(Elsevier Japan KK);《命名反应在有机合成中的策略应用》(Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis)(由 Kiyoshi Tomioka翻译,Kagaku-Dojin Publishing);《综合有机转化》(Comprehensive Organic Transformations)(VCH Publishers,Inc.),1989;等。

[0286] 在每一步骤中,官能团的保护或去保护反应可以按照实施例中描述的方法或本身在本领域中已知的方法来进行,例如在下述文献中描述的方法:《有机合成中的保护基团》(Protective Groups in Organic Synthesis),第四版,(Theodora W.Greene,Peter

G.M.Wuts), Wiley-Interscience, 2007;《保护基团》(Protecting Groups), 第三版, (P.J.Kocienski) Thieme, 2004;等。

[0287] 用于醇类等中的羟基或酚羟基的保护基团的实例包括:醚型保护基团例如甲氧基甲基醚、苯甲基醚、叔丁基二甲基甲硅烷基醚和四氢吡喃基醚;羧酸酯型保护基团例如乙酸酯;磺酸酯型保护基团例如甲磺酸酯;以及碳酸酯型保护基团例如碳酸叔丁酯。

[0288] 用于醛类中的羰基的保护基团的实例包括:缩醛型保护基团例如二甲基缩醛;以及环状缩醛型保护基团例如环状1,3-二噁烷。

[0289] 用于酮类中的羰基的保护基团的实例包括:缩酮型保护基团例如二甲基缩酮;环状缩酮型保护基团例如环状1,3-二噁烷;脞型保护基团例如O-甲基脞;以及脲型保护基团例如N,N-二甲基脲。

[0290] 用于羧基的保护基团的实例包括:酯型保护基团例如甲基酯;以及酰胺型保护基团例如N,N-二甲基酰胺。

[0291] 用于巯基的保护基团的实例包括:醚型保护基团例如苯甲基硫醚;以及酯型保护基团例如硫代乙酸酯、硫代碳酸酯和硫代氨基甲酸酯。

[0292] 用于氨基或芳香族杂环例如咪唑、吡咯或吡啶的保护基团的实例包括:氨基甲酸酯型保护基团例如氨基甲酸苯甲基酯;酰胺型保护基团例如乙酰胺;烷基胺型保护基团例如N-三苯基胺;以及磺酰胺型保护基团例如甲磺酰胺。

[0293] 这些保护基团可以使用本身在本领域中已知的方法来去除,例如使用酸、碱、紫外光、肼、苯肼、N-甲基二硫代氨基甲酸钠、四丁基氟化铵、乙酸钡或三烷基甲硅烷基卤化物(例如三甲基甲硅烷基碘或三甲基甲硅烷基溴)的方法或还原方法。

[0294] 在利用还原反应的每一步中,可以使用的还原剂的实例包括:金属氢化物例如氢化锂铝、三乙酰氧基硼氢化钠、氰基硼氢化钠、二异丁基氢化铝(DIBAL-H)、硼氢化钠和三乙酰氧基硼氢化四甲基铵;硼烷类例如硼烷-四氢呋喃复合物;雷尼镍;雷尼钴;氢;和甲酸。在还原碳-碳双键或三键的情况下,可以使用利用催化剂例如钯-碳或 Lindlar's 催化剂的方法。

[0295] 在利用氧化反应的每一步中,可以使用的氧化剂的实例包括:过酸类例如间氯过苯甲酸(MCPBA)、过氧化氢和叔丁基过氧化氢;高氯酸盐例如四丁基高氯酸铵;氯酸盐例如氯酸钠;次氯酸盐例如次氯酸钠;高碘酸盐例如高碘酸钠;高价碘试剂例如亚碘酰苯;锰试剂例如二氧化锰和高锰酸钾;铅试剂例如四乙酸铅;铬试剂例如氯铬酸吡啶鎓(PCC)、重铬酸吡啶鎓(PDC)和Jones'试剂;卤素试剂例如N-溴代琥珀酰亚胺(NBS);氧;臭氧;三氧化硫-吡啶复合物;四氧化钨;二氧化硒;以及2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌(DDQ)。

[0296] 在利用自由基环化反应的每一步中,可以使用的自由基引发剂的实例包括:偶氮化合物例如偶氮双异丁腈(AIBN);水溶性自由基引发剂例如4-4'-偶氮双-4-氰基戊酸(ACPA);在空气或氧气存在下的三乙基硼;以及过氧化苯甲酰。可以使用的自由基引发剂的实例包括三丁基锡烷、三(三甲基甲硅烷基)硅烷、1,1,2,2-四苯基乙硅烷、二苯基硅烷和碘化钆。

[0297] 在利用Wittig反应的每一步中,可以使用的Wittig试剂的实例包括次烷基磷烷类。所述次烷基磷烷可以通过本身在本领域中已知的方法例如磷盐与强碱之间的反应来制备。

[0298] 在利用Horner-Emmons反应的每一步中,可以使用的试剂的实例包括磷酰基乙酸酯例如二甲基磷酰基乙酸甲酯和二乙基磷酰基乙酸乙酯,以及碱例如碱金属氢化物和有机锂。

[0299] 在利用Friedel-Crafts反应的每一步中,可以使用的试剂的实例包括路易斯酸和酰基氯或烷基化试剂(例如卤代烷、醇类和烯烃)。或者,可以使用有机或无机酸代替路易斯酸,并且可以使用酸酐例如乙酸酐代替酰基氯。

[0300] 在利用芳香族化合物亲核取代反应的每一步中,可以使用亲核剂(例如胺或咪唑)和碱(例如碱性盐或有机碱)作为试剂。

[0301] 在利用使用碳负离子的亲核加成反应、使用碳负离子的亲核1,4-加成反应(Michael加成反应)或使用碳负离子的亲核取代反应的每一步中,可用于产生碳负离子的碱的实例包括有机锂试剂、金属醇盐、无机碱和有机碱。

[0302] 在利用Grignard反应的每一步中,可以使用的Grignard试剂的实例包括芳基卤化镁例如苯基溴化镁,以及烷基卤化镁例如甲基溴化镁。所述Grignard试剂可以通过本身在本领域中已知的方法来制备,例如卤代烷或芳基卤化物与镁金属之间在作为溶剂的醚或四氢呋喃中的反应。

[0303] 在利用Knoevenagel缩合反应的每一步中,可以使用侧翼带有两个吸电子基团的活性亚甲基化合物(例如丙二酸、丙二酸二乙酯或丙二腈)和碱(例如有机碱、金属醇盐或无机碱)作为试剂。

[0304] 在利用Vilsmeier-Haack反应的每一步中,可以使用磷酰氯和酰胺衍生物(例如N,N-二甲基甲酰胺)作为试剂。

[0305] 在利用醇类、卤代烷或磺酸酯的叠氮化反应的每一步中,可以使用的叠氮化试剂的实例包括叠氮磷酸二苯酯(DPPA)、三甲基甲硅烷基叠氮化物和叠氮化钠。在例如醇类的叠氮化的情况下,可以利用使用叠氮磷酸二苯酯和1,8-二氮杂双环[5,4,0]十一碳-7-烯(DBU)的方法、利用三甲基甲硅烷基叠氮化物和路易斯酸的方法等。

[0306] 在利用还原胺化反应的每一步中,可以使用的还原剂的实例包括三乙酰氧基硼氢化钠、氰基硼氢化钠、氢气和甲酸。当底物是胺化合物时,可以使用的羰基化合物的实例包括多聚甲醛以及醛类例如乙醛和酮类例如环己酮。当底物是羰基化合物时,可以使用的胺的实例包括伯胺例如氨和甲胺以及仲胺例如二甲胺。

[0307] 在利用Mitsunobu反应的每一步中,可以使用偶氮二甲酸酯(例如偶氮二甲酸二乙酯(DEAD)和偶氮二甲酸二异丙酯(DIAD))和三苯基膦作为试剂。

[0308] 在利用酯化、酰胺化或脲化反应的每一步中,可以使用的试剂的实例包括酰基卤例如酰基氯或酰基溴,以及活化的羧酸例如酸酐、活性酯或硫酸酯。用于羧酸的活化试剂的实例包括:碳二亚胺缩合剂例如1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(WSCD);三嗪缩合剂例如4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉鎓-n-水合物(DMT-MM);碳酸酯缩合剂例如1,1'-羰基二咪唑(CDI);叠氮磷酸二苯酯(DPPA);苯并三唑-1-基氧基-三(二甲基氨基)磷盐(BOP试剂);2-氯-1-甲基-碘化吡啶鎓(Mukaiyama试剂);亚硫酸氯;卤代甲酸低级烷基酯例如氯甲酸乙酯;O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基六氟磷酸脲(HATU);硫酸;及其组合。在使用碳二亚胺缩合剂的情况下,向反应添加添加剂例如1-羟基苯并三唑(HOBt)、N-羟基琥珀酰亚胺(HOSu)或二甲基氨基吡啶(DMAP),可能是

有益的。

[0309] 在利用偶联反应的每一步中,可以使用的金属催化剂的实例包括钯化合物例如乙酸钯(II)、四(三苯基膦)钯(0)、二氯双(三苯基膦)钯(II)、二氯双(三乙基膦)钯(II)、三(二次苯甲基丙酮)二钯(0)、1,1'-双(二苯基膦)二茂铁氯化钯(II)和乙酸钯(II);镍化合物例如四(三苯基膦)镍(0);铑化合物例如三(三苯基膦)氯化铑(III);钴化合物;铜化合物例如氧化铜和碘化亚铜(I);以及铂化合物。向反应添加碱也可能是有益的。这些碱的实例包括无机碱和碱性盐。

[0310] 在利用硫羰基化反应的每一步中,通常使用五硫化二磷作为硫羰基化试剂。可以使用具有1,3,2,4-二硫杂二磷环丁烷-2,4-二硫化物结构的试剂例如2,4-双(4-甲氧基苯基)-1,3,2,4-二硫杂二磷环丁烷-2,4-二硫化物(Lawesson试剂)代替五硫化二磷。

[0311] 在利用Wohl-Ziegler反应的每一步中,可以使用的卤代试剂的实例包括N-碘琥珀酰亚胺、N-溴琥珀酰亚胺(NBS)、N-氯琥珀酰亚胺(NCS)、溴和磺酰氯。所述反应可以通过另外添加自由基引发剂例如热、光、过氧化苯甲酰或偶氮双异丁腈来加速。

[0312] 在利用羟基的卤代反应的每一步中,可以使用的卤化试剂的实例包括氢卤酸或无机酸的酰基卤;实例包括用于氯化的盐酸、亚硫酸氯和磷酸氯,以及用于溴化的48%氢溴酸。此外,通过三苯基膦与四氯化碳或四溴化碳等的作用从醇获得卤代烷的方法,也可以使用。或者,通过包括将醇转变成磺酸酯,然后与溴化锂、氯化锂或碘化钠反应的2步反应来合成卤代烷的方法,也可以使用。

[0313] 在利用Arbuzov反应的每一步中,可以使用的试剂的实例包括卤代烷例如乙酸溴乙酯和亚磷酸酯例如亚磷酸三乙酯和亚磷酸三(异丙基)酯。

[0314] 在利用砷-酯化反应的每一步中,使用的磺酰化试剂的实例包括甲磺酰氯、对甲苯磺酰氯、甲磺酸酐和对甲苯磺酸酐。

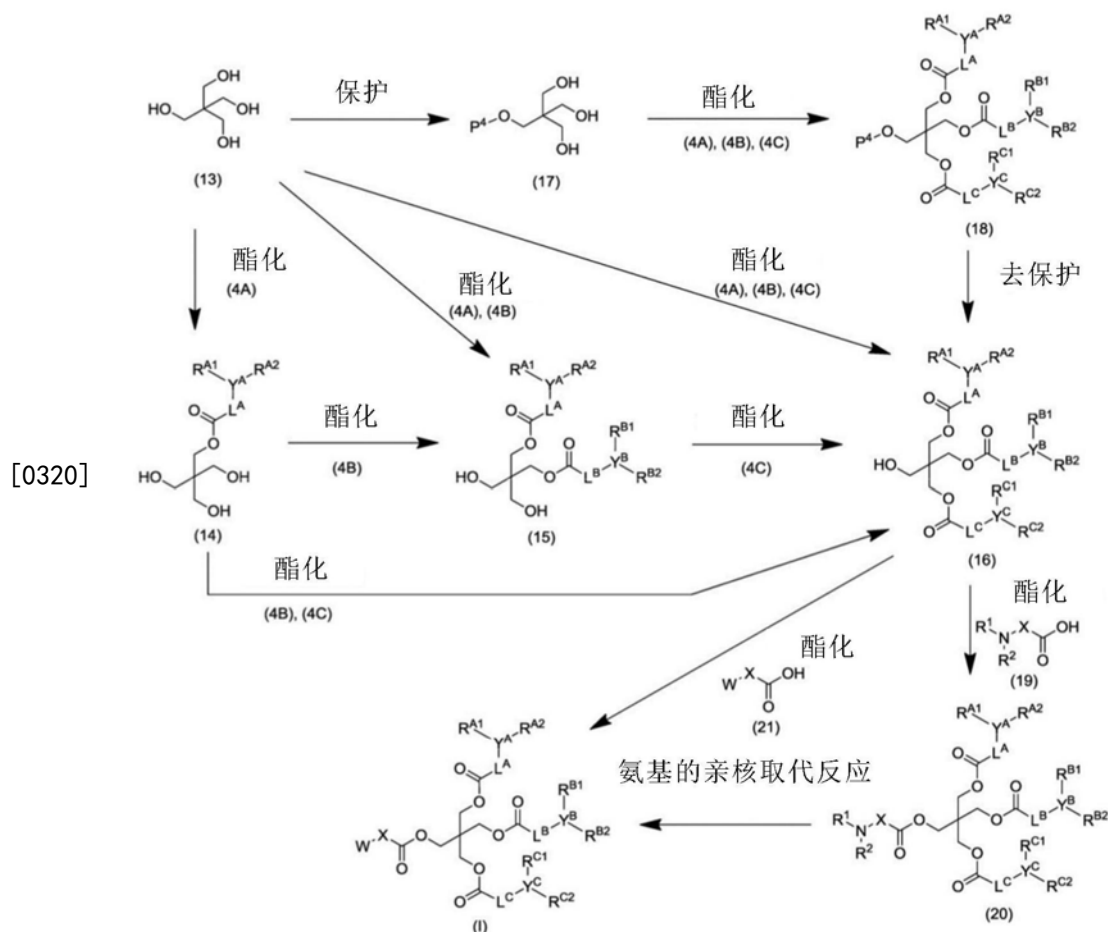
[0315] 在利用水解反应的每一步中,可以使用酸或碱作为试剂。在进行叔丁基酯的酸水解反应的情况下,可以添加试剂例如甲酸、三乙基甲硅烷等以还原性捕获副产物叔丁基阳离子。

[0316] 在利用脱水反应的每一步中,可以使用的脱水试剂的实例包括硫酸、五氧化二磷、磷酸氯、N,N'-二环己基碳二亚胺、氧化铝和多磷酸。

[0317] 化合物(I)可以例如使用下面的生产方法A来生产。

[0318] (生产方法A)

[0319] [化学反应图式2]



[0321] [在所述反应图式中,  $P^4$  表示保护基团,

[0322] 化合物 (4A) 由下式表示:  $\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{L}^{\text{A}}-\text{Y}^{\text{A}}-\text{R}^{\text{A1}}-\text{R}^{\text{A2}}$ ,

[0323] 化合物 (4B) 由下式表示:  $\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{L}^{\text{B}}-\text{Y}^{\text{B}}-\text{R}^{\text{B1}}-\text{R}^{\text{B2}}$ ,

[0324] 化合物 (4C) 由下式表示:  $\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{L}^{\text{C}}-\text{Y}^{\text{C}}-\text{R}^{\text{C1}}-\text{R}^{\text{C2}}$ , 并且

[0325] 其他符号代表与上述相同的意义。]

[0326] 作为由  $P^4$  表示的保护基团, 使用上文描述的用于羟基的保护基团。

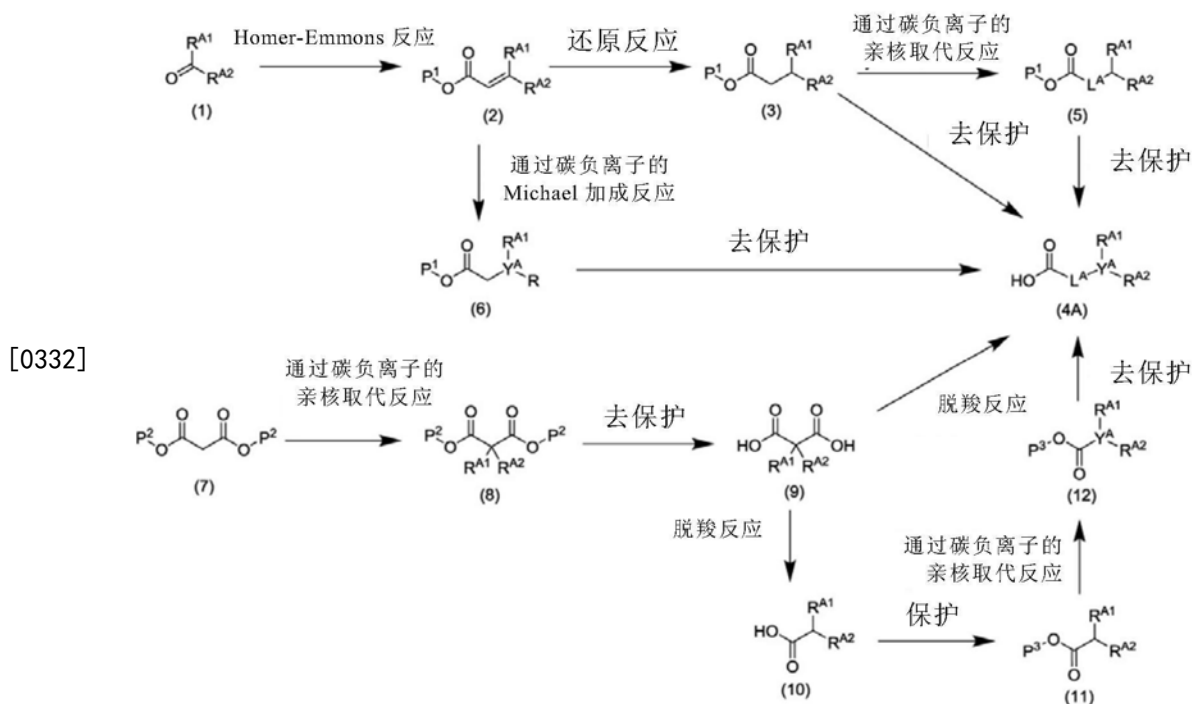
[0327] 化合物 (16) 可以通过从化合物 (18) 除去保护基团来生产。为了除去所述保护基团, 可以使用四正丁基氟化铵和酸的组合。

[0328] 化合物 (I) 也可以使用化合物 (20) 中的氨基的亲核取代反应来生产。作为用于上面指定的亲核取代反应的试剂的实例, 可以提到的是卤代烷。

[0329] 在上述生产方法A中使用的化合物 (4A) 可以使用化合物 (1) 或化合物 (7), 通过例如下面描述的生产方法B来生产。

[0330] (生产方法B)

[0331] [化学反应图式3]



[0333] [在所述反应图式中,  $P^1$ 、 $P^2$ 和 $P^3$ 各自独立地表示保护基团,并且其他符号表示与上述相同的意义。]

[0334] 作为由 $P^1$ 、 $P^2$ 和 $P^3$ 所表示的保护基团,使用如上所述用于羧基的保护基团。

[0335] 化合物(4A)和化合物(10)也可以利用化合物(9)上的脱羧反应来生产。反应温度可能随着使用的试剂或溶剂而变,通常为室温至300℃,优选为50℃至250℃。在所述脱羧反应中,可以使用酸。

[0336] 化合物(5)可以利用化合物(3)与碳负离子的亲核取代反应来生产。作为在所述亲核取代反应中使用的试剂的实例,可以提到的是卤代烷和氟化试剂(例如N-氟苯磺酰亚胺、3,3-二甲基-1-(三氟甲基)-1,2-苯并呋喃)。

[0337] 化合物(6)可以利用化合物(2)与碳负离子的Michael加成反应来生产。作为在所述加成反应中使用的试剂的实例,可以提到的是有机铜(可以通过将Grignard试剂或有机锂试剂与卤化铜反应来制备)。此外,作为上面提到的试剂,可以使用将有机铜试剂与酸或三甲基甲硅烷基氯化物合并的试剂。

[0338] 化合物(8)可以利用化合物(7)与碳负离子的亲核取代反应来生产。作为在所述亲核取代反应中使用的试剂的实例,可以提到的是卤代烷。

[0339] 化合物(12)可以利用化合物(11)与碳负离子的亲核取代反应来生产。作为在所述亲核取代反应中使用的试剂的实例,可以提到的是卤代烷。

[0340] 在生产方法A中使用的化合物(4B)和(4C)也可以与化合物(4A)相似的方式来生产。

[0341] 下面解释包含本发明的化合物的脂质粒子和组合物的生产方法。

[0342] 所述脂质粒子可以如下生产:将本发明的化合物在与另一种脂质组分混合后溶解在有机溶剂中,并将得到的有机溶剂溶液与水或缓冲液混合作为脂质粒子悬液。上述混合可以使用微流体混合系统(例如亚洲微流体系统(Syrris))来进行。得到的脂质粒子可以进行透析或除菌过滤。

[0343] 作为上述的“另一种脂质组分”，可以提到的是结构脂质（例如胆甾醇和磷脂酰胆碱（例如二棕榈酰基磷脂酰胆碱、二硬脂酰基磷脂酰胆碱））以及聚乙二醇脂质（例如GM-020（NOF CORPORATION）、GS-020（NOF CORPORATION））。“另一种脂质组分”以例如1mol 本发明的化合物0.25至4mol的量使用。使用与另一种脂质组分（特别是胆甾醇、磷脂酰胆碱和聚乙二醇脂质）混合的本发明的化合物是优选的。在本发明的化合物通过与另一种脂质组分混合来使用的情况下，优选实施方式是1至4mol本发明的化合物、0至3mol胆甾醇、0至2mol 磷脂酰胆碱和0至1mol聚乙二醇脂质的混合物。

[0344] 在有机溶剂溶液中，本发明的化合物的浓度或本发明的化合物和另一种脂质组分的浓度优选为0.5至100mg/mL。

[0345] 作为所述有机溶剂，可以提到的是例如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、叔丁醇、丙酮、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷或其混合物。所述有机溶剂可以含有0至20%的水或缓冲溶液。

[0346] 作为所述缓冲液，可以提到的是酸性缓冲液（例如乙酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液）或中性缓冲液（例如4-（2-羟基乙基）-1-哌嗪乙磺酸（HEPE）缓冲液、三（羟甲基）氨基甲烷（Tris）缓冲液、磷酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲盐水（PBS））。

[0347] 在使用微流体混合系统进行混合的情况下，优选地将1份有机溶剂溶液与1至5份水或缓冲液混合。此外，在所述系统中，混合物（有机溶剂溶液与水或缓冲液的混合溶液）的流速优选为0.1至10mL/min，并且温度优选为15至45℃。

[0348] 本发明的组合物可以通过在生产脂质粒子或脂质粒子的悬液时将活性成分（优选为核酸）添加到水或缓冲液中，生产成包含所述组合物的粒子悬液。优选地，添加所述活性成分的方式使得水或缓冲液中所述活性成分的浓度为0.05至2.0mg/mL。

[0349] 此外，本发明的组合物可以通过利用本身已知的方法将脂质粒子或脂质粒子悬液与活性成分混合，生产成包含组合物的粒子悬液。

[0350] 在本发明的组合物中，本发明的化合物的含量优选为20至80重量%。

[0351] 在本发明的组合物中，活性成分的含量优选为1至20重量%。

[0352] 脂质粒子或用于所述组分的悬浮介质可以通过透析用水或缓冲液替换。对于透析来说，使用截留分子量为10至20K的超滤膜在4℃至室温下进行。所述透析可以重复进行。对于所述透析来说，可以使用切向流过滤。

[0353] 下面解释用于本发明的脂质粒子或组合物的分析方法。

[0354] 脂质粒子或组合物的粒子尺寸可以使用Zetasizer Nano ZS（Malvern Instruments），在自相关函数的累积量分析的基础上作为Z-平均粒子尺寸来计算。所述脂质粒子或组合物的粒子尺寸（平均粒子尺寸）优选为10至200nm。

[0355] 本发明的组合物中活性成分（特别是核酸）的浓度和包封率可以使用Quant-iT<sup>TM</sup> RiboGreen（注册商标）（Invitrogen）来测量。上述浓度使用活性成分（例如核酸（特别是siRNA、mRNA））的标准曲线来计算，包封率可以在添加或不添加Triton-X100的情况下的荧光强度差值的基础上计算。

[0356] 本发明利用下面的实施例和试验例更详细地描述；这些实例不以任何方式限制本发明，并且可以在不超出本发明的范围的情况下做出改变。

[0357] 在下面的实施例中，术语“室温”通常意味着约10℃至约35℃。除非另有规定，否则

用于混合溶剂的比率表示体积比。除非另有规定,否则%表示重量%。

[0358] 在硅胶柱层析中,术语“NH”表示使用结合有氨基丙基甲硅烷的硅胶,“Diol”表示使用结合有3-(2,3-二羟基丙氧基)丙基甲硅烷的硅胶。除非另有规定,否则用于洗脱溶剂的比率表示体积比。

[0359] 在下面的实施例和试验例中,使用了下述缩写:

[0360] MS:质谱

[0361] M:摩尔浓度

[0362] N:常态

[0363]  $\text{CDCl}_3$ :氘化氯仿

[0364]  $^1\text{H}$  NMR:质子核磁共振

[0365] MALDI:基质辅助激光解吸/电离

[0366] TOFMS:飞行时间质谱术

[0367] CHCA: $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸

[0368] DMAP:N,N-二甲基-4-氨基吡啶

[0369] THF:四氢呋喃

[0370] DMF:N,N-二甲基甲酰胺

[0371] DPPC:二棕榈酰基磷脂酰胆碱

[0372]  $^1\text{H}$  NMR谱图通过傅里叶变换NMR来测量。在所述分析中使用 ACD/SpecManager (商品名)等。没有提到羟基、氨基等的质子的非常宽的峰。

[0373] MS使用MALDI/TOFMS来测量。将CHCA用作基质。展现的数据是实验测量值(实测值)。一般来说,观察分子的离子峰;在例如具有叔丁氧基羰基的化合物的情况下,可以观察从叔丁氧基羰基或叔丁基的消除产生的片段离子峰。在具有羟基的化合物的情况下,可以观察从 $\text{H}_2\text{O}$ 的消除产生的片段离子峰。在盐的情况下,通常观察分子的离子峰、游离形式的阳离子性物质、阴离子性物质或片段离子峰。

## [实施例]

[0374] [化合物的合成例]

[0375] 实施例1

[0376] 2-戊基庚酸3-((5-(二甲基氨基)戊酰基)氧基)-2,2-双(((2-戊基庚酰基)氧基)甲基)丙基酯

[0377] A) 2-戊基庚酸

[0378] 将氢化钠(0.5g,含有40%矿物油)在DMF(10mL)中的悬液在冰冷却下搅拌,向其添加丙二酸二甲酯。10分钟后,将所述混合物升温至室温并添加1-碘代戊烷(1.95mL)。18小时后,向反应混合物添加乙酸(1mL),将其用乙酸乙酯稀释,用水洗涤两次并用饱和盐水洗涤一次,然后在无水硫酸钠上干燥;随后在减压下蒸发掉溶剂。残留物使用硅胶柱层析(乙酸乙酯/己烷)进行纯化。将得到的化合物、8N氢氧化钠水溶液(3.75mL)和乙醇(10mL)的混合物在60℃搅拌 20小时。将所述反应混合物用1N盐酸稀释,并用乙酸乙酯萃取。将萃取液用饱和盐水洗涤,并在无水硫酸钠上干燥。然后在减压下蒸发掉溶剂。将残留物在160℃加热1.5小时,并在冷却至室温后,使用硅胶柱层析(乙酸乙酯/己烷)进行纯化,得到标题化合

物 (786mg)。

[0379]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.77-0.97 (6H, m), 1.16-1.38 (12H, m), 1.39-1.53 (2H, m), 1.54-1.72 (2H, m), 2.26-2.42 (1H, m)。

[0380] B) 2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇

[0381] 在室温下,向2,2-双(羟甲基)丙烷-1,3-二醇 (5.45g)、1H-咪唑 (2.72 g) 和DMF (190mL) 的混合物加入叔丁基氯二甲基甲硅烷 (3.01g) 在DMF (10mL) 中的溶液。在搅拌24小时后,将反应混合物在减压下浓缩。将残留物用乙酸乙酯稀释,用水洗涤三次并用饱和盐水洗涤一次,然后在无水硫酸钠上干燥;随后在减压下蒸发掉溶剂。将残留物用硅胶柱层析(乙酸乙酯/己烷)进行纯化,得到标题化合物 (2.25g)。

[0382]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.08 (6H, s), 0.90 (9H, s), 2.53 (3H, t,  $J=5.5\text{Hz}$ ), 3.66 (2H, s), 3.73 (6H, d,  $J=5.5\text{Hz}$ )。

[0383] C) 2-(羟甲基)-2-(((2-戊基庚酰基)氧基)甲基)丙烷-1,3-二基双(2-戊基庚酸酯)

[0384] 在室温下向2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇 (75.0mg)、DMAP (37.0mg) 和2-戊基庚酸 (198mg) 在DMF (0.75mL) 中的溶液添加1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (230mg)。在搅拌18小时后,向反应混合物添加乙酸乙酯,将其用水洗涤两次并用饱和盐水洗涤一次,然后在无水硫酸钠上干燥;在减压下蒸发掉溶剂。将残留物用硅胶柱层析(乙酸乙酯/己烷)纯化。将得到的化合物溶解在THF (0.6mL) 中,并在室温下向其添加四正丁基氟化铵在THF中的溶液 (1M, 0.66mL) 和乙酸 (0.218mL)。在搅拌4天后,将反应混合物在减压下浓缩。将残留物用乙酸乙酯稀释,用水和饱和盐水洗涤,并在无水硫酸钠上干燥。随后在减压下蒸发掉溶剂。将残留物用硅胶柱层析(乙酸乙酯/己烷)纯化,得到标题化合物 (189mg)。

[0385]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.79-0.95 (18H, m), 1.14-1.36 (36H, m), 1.38-1.65 (12H, m), 2.29-2.43 (3H, m), 2.69 (1H, t,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 3.47 (2H, d,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 4.11 (6H, s)。

[0386] D) 2-戊基庚酸3-((5-(二甲基氨基)戊酰基)氧基)-2,2-双(((2-戊基庚酰基)氧基)甲基)丙基酯

[0387] 在室温下向2-(羟甲基)-2-(((2-戊基庚酰基)氧基)甲基)丙烷-1,3-二基双(2-戊基庚酸酯) (189mg)、DMAP (16.9mg)、5-(二甲基氨基)戊酸盐 (60.3mg) 和DMF (0.8mL) 的混合物添加1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (69.0mg)。在搅拌1小时后,向反应混合物添加乙酸乙酯,将其用饱和碳酸氢钠溶液洗涤一次,用水洗涤两次,用饱和盐水洗涤一次,然后在无水硫酸钠上干燥;随后在减压下蒸发掉溶剂。将残留物用硅胶柱层析(乙醇, 乙酸乙酯/己烷)进行纯化,得到标题化合物 (149mg)。

[0388]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.80-0.92 (18H, m), 1.15-1.35 (36H, m), 1.37-1.66 (16H, m), 2.20 (6H, s), 2.22-2.42 (7H, m), 4.10 (8H, s)。

[0389] 实施例7

[0390] 3-戊基辛酸3-((5-(二甲基氨基)戊酰基)氧基)-2,2-双(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙基酯

[0391] A) 3-戊基辛酸

[0392] 将氢化钠 (1.12g, 含有40%矿物油) 在THF (40mL) 中的悬液在冰冷却下搅拌,向其

添加2-(二乙氧基磷酰基)乙酸乙酯(6.01mL)。10分钟后,将所述混合物升温至室温并向其添加十一碳-6-酮(4.10 mL)。在50℃下搅拌24小时后,将反应混合物在减压下浓缩。将残留物用乙酸乙酯稀释,用饱和盐水洗涤,然后在无水硫酸钠上干燥;随后在减压下蒸发掉溶剂。将残留物用硅胶柱层析(乙酸乙酯/己烷)纯化。将得到的化合物、10%钨-碳(100mg)和乙醇(100mL)的混合物在氢气气氛下搅拌18小时。将反应混合物过滤,并将滤液在减压下浓缩。向所述残留物添加8N氢氧化钠溶液(10.6mL)和乙醇(40mL),并在60℃下搅拌1小时。将反应混合物在减压下浓缩,向其添加6N盐酸,并用乙酸乙酯萃取。将萃取液用饱和盐水洗涤,并在无水硫酸钠上干燥。随后在减压下蒸发掉溶剂。将残留物用硅胶柱层析(乙酸乙酯/己烷)纯化,得到标题化合物(3.47g)。

[0393]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.81-0.95 (6H, m), 1.15-1.43 (16H, m), 1.74-1.96 (1H, m), 2.28 (2H, d,  $J=6.8\text{Hz}$ )。

[0394] B) 2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙烷-1,3-二基双(3-戊基辛酸酯)

[0395] 在室温下向2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇(751mg)、DMAP(367mg)和3-戊基辛酸(2.12g)在DMF(10mL)中的溶液添加1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(2.07g)。在搅拌1小时后,向反应混合物添加乙酸乙酯,将其用饱和碳酸氢钠溶液洗涤,用水洗涤两次并用饱和盐水洗涤一次,然后在无水硫酸钠上干燥;随后在减压下蒸发掉溶剂。将残留物用硅胶柱层析(NH,乙酸乙酯/己烷)纯化,得到标题化合物(2.50g)。

[0396]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.03 (6H, s), 0.76-0.96 (27H, m), 1.11-1.39 (48H, m), 1.75-1.92 (3H, m), 2.23 (6H, d,  $J=6.8\text{Hz}$ ), 3.58 (2H, s), 4.07 (6H, s)。

[0397] C) 2-(羟甲基)-2-(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙烷-1,3-二基双(3-戊基辛酸酯)

[0398] 将2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙烷-1,3-二基双(3-戊基辛酸酯)(2.50g)溶解在THF(6.0mL)中,并在室温下向其添加四正丁基氟化铵在THF中的溶液(1M, 6.55 mL)和乙酸(2.17mL)的混合物。在搅拌4天后,将反应混合物在减压下浓缩。将残留物用乙酸乙酯稀释,用水和饱和盐水洗涤,然后在无水硫酸钠上干燥。随后在减压下蒸发掉溶剂。将残留物用硅胶柱层析(乙酸乙酯/己烷)纯化,得到标题化合物(2.05g)。

[0399]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.81-0.96 (18H, m), 1.13-1.40 (48H, m), 1.73-1.92 (3H, m), 2.26 (6H, d,  $J=6.8\text{Hz}$ ), 2.56 (1H, t,  $J=7.0\text{Hz}$ ), 3.48 (2H, d,  $J=7.0\text{Hz}$ ), 4.10 (6H, s)。

[0400] D) 3-戊基辛酸3-((5-(二甲基氨基)戊酰基)氧基)-2,2-双(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙基酯

[0401] 在室温下向2-(羟甲基)-2-(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙烷-1,3-二基双(3-戊基辛酸酯)(2.05g)、DMAP(173mg)、5-(二甲基氨基)戊酸盐(822mg)和DMF(8.0mL)的混合物添加1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(976mg)。在搅拌1小时后,向反应混合物添加乙酸乙酯,用饱和碳酸氢钠溶液洗涤一次,用水洗涤两次并用饱和盐水洗涤一次,然后在无水硫酸钠上干燥;随后在减压下蒸发掉溶剂。将残留物用硅胶柱层析(乙酸乙酯/己烷,乙酸乙酯/甲醇)纯化,得到标题化合物(2.24g)。

[0402]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.81-0.92 (18H, m), 1.15-1.37 (48H, m), 1.42-1.53 (2H, m), 1.59-1.69 (2H, m), 1.73-1.90 (3H, m), 2.18-2.38 (16H, m), 4.10 (8H, s)。

[0403] 实施例8

[0404] N,N,N-三甲基-5-氧代-5-(3-((3-戊基辛酰基)氧基)-2,2-双(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙氧基)戊烷-1-碘化铵

[0405] 在室温下向3-戊基辛酸3-((5-(二甲基氨基)戊酰基)氧基)-2,2-双(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙基酯(50.0mg)在乙酸乙酯(0.6mL)中的溶液添加甲基碘(7.34 $\mu\text{L}$ )。在搅拌2小时后,将反应混合物在减压下浓缩。将残留物用硅胶柱层析(NH,乙酸乙酯/己烷)纯化,得到标题化合物(46.8mg)。

[0406]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.79-0.97 (18H, m), 1.13-1.40 (48H, m), 1.68-1.92 (7H, m), 2.25 (6H, d,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 2.46 (2H, t,  $J=6.4\text{Hz}$ ), 3.46 (9H, s), 3.61-3.75 (2H, m), 4.10 (8H, s)。

[0407] 按照在每个实施例中给出的方法或与其相似的方法,生产了在下表中列出的实施例2至6和实施例9至10的化合物。对于这些实施例来说,与实施例1、7和8一起,将化合物名、化学结构和生产时实际测量的质量数(在表中用MS表示)提供在表 1-1 和表 1-2 中。在“盐”的一列中,给出了构成所述化合物的阳离子。

[0408] [表1-1]

[0409]

| Ex. No. | IUPAC 名                                                                 | 结构 | 盐 | MS      |
|---------|-------------------------------------------------------------------------|----|---|---------|
| 1       | 2-戊基庚酸 3-((5-(二甲基氨基)戊酰基)氧基)-2,2-双(((2-戊基庚酰基)氧基)甲基)丙基酯                   |    |   | 810.670 |
| 2       | 2-戊基庚酸 3-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)-2,2-双(((2-戊基庚酰基)氧基)甲基)丙基酯                   |    |   | 796.530 |
| 3       | 2-丁基己酸 3-(2-(丁基己酰基)氧基)-2-(((2-丁基己酰基)氧基)甲基)-2-(((5-(二甲基氨基)戊酰基)氧基)甲基)丙基酯  |    |   | 726.696 |
| 4       | 2-丁基己酸 3-((2-(丁基己酰基)氧基)-2-(((2-丁基己酰基)氧基)甲基)-2-(((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)甲基)丙基酯 |    |   | 712.628 |
| 5       | 2-己基辛酸 3-((5-(二甲基氨基)戊酰基)氧基)-2,2-双(((2-己基辛酰基)氧基)甲基)丙基酯                   |    |   | 894.818 |

[0410] [表1-2]

[0411]

|    | IUPAC 名                                                              | 结构 | 盐  | MS      |
|----|----------------------------------------------------------------------|----|----|---------|
| 6  | 2-己基辛酸 3-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)-2,2-双(((2-己基辛酰基)氧基)甲基)丙基酯                |    |    | 880.740 |
| 7  | 3-戊基辛酸 3-((5-(二甲基氨基)戊酰基)氧基)-2,2-双(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙基酯                |    |    | 852.707 |
| 8  | N,N,N-三甲基-5-氧代-5-(3-((3-戊基辛酰基)氧基)-2,2-双(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙氧基)戊烷-1-碘化铵 |    | I- | 866.609 |
| 9  | 3-戊基辛酸 3-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)-2,2-双(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙基酯                |    |    | 838.752 |
| 10 | 3-戊基辛酸 3-((N,N-二甲基-β-丙氨酰基)氧基)-2,2-双(((3-戊基辛酰基)氧基)甲基)丙基酯              |    |    | 824.796 |

[0412] [本发明的组合物的生产例]

[0413] 实施例11

[0414] 将脂质混合物(在实施例7中得到的化合物:DPPC:胆甾醇:GS-020 =60:10.6:28:1.4,摩尔比)溶解在90%EtOH和10%pH 4.0的25mM乙酸盐缓冲液中,以获得7.4mg/ml的脂质溶液。以相等的量添加萤光素酶(luc) siRNA和因子VII(FVII) siRNA(参见表2)并溶解在pH4.0的 25mM乙酸盐缓冲液中,得到0.15mg/ml的核酸溶液。将得到的脂质溶液和核酸溶液在室温下用亚洲微流体系统(Syrris)以1ml/min:5ml/min 的流速混合,获得包含上述组合物的粒子悬液。使用Slide-A-Lyzer(截留分子量20K,Thermo scientific)将得到的悬液在室温下针对水透析1 小时并在室温下针对PBS透析18小时。然后使用0.2μm针式过滤器(Iwaki)进行过滤并储存在4℃。分析结果示出在表3中。

[0415] [表2]

|        |      |                                                                                                                                                |
|--------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| [0416] | 靶基因  | 序列5'-3'                                                                                                                                        |
|        | FVII | GGAU(F)C(F)AU(F)C(F)U(F)C(F)AAGU(F)C(F)U(F)U(F)AC(F)<br>tst (SEQ ID NO: 1)<br>GU(F)AAGAC(F)U(F)U(F)GAGAU(F)GAU(F)C(F)C(F)tst<br>(SEQ ID NO: 2) |
|        | luc  | C(M)U(M)U(M)AC(M)GC(M)U(M)GAGU(M)AC(M)U(M)U(M)<br>C(M)GAtst (SEQ ID NO: 3)<br>UCGAAGUACUCAGCGUAAGtst<br>(SEQ ID NO: 4)                         |

[0417] N (M) :2'-OMe RNA, N (F) :2'-脱氧-2'-氟RNA, t:2'-脱氧胸苷, s:硫代磷酸酯键

[0418] [表3]

|        |      |                 |     |
|--------|------|-----------------|-----|
| [0419] | 粒子尺寸 | siRNA浓度 (μg/μL) | 包封率 |
|        | 78nm | 0.098           | 96% |

[0420] 实施例12

[0421] 将脂质混合物(在实施例7中得到的化合物:DPPC:胆甾醇:GS-020 =60:10.6:28:1.4,摩尔比)溶解在90%EtOH和10%pH 4.0的25mM乙酸盐缓冲液中,以获得8.9mg/ml的脂质溶液。将次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HPRT) siRNA (参见表4) 溶解在pH4.0的25mM乙酸盐缓冲液中,得到0.25mg/ml的核酸溶液。将得到的脂质溶液和核酸溶液在室温下用亚洲微流体系统以1ml/min:3ml/min的流速混合,获得包含所述组合物的粒子悬液。使用Slide-A-Lyzer(截留分子量20K)将得到的溶液在室温下针对水透析1小时并在室温下针对PBS透析18小时。另外,在使用充填氮气的升高压力下,将所述溶液在4℃下针对PBS进行透析以浓缩所述溶液。然后使用0.2μm或0.45μm针式过滤器进行过滤并储存在4℃。分析结果示出在表5中。

[0422] [表4]

|        |      |                                                                                                                                          |
|--------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| [0423] | 靶基因  | 序列5'-3'                                                                                                                                  |
|        | HPRT | U(M)C(M)C(M)U(M)AU(M)GAC(M)U(M)GU(M)AGAU(M)<br>U(M)U(M)U(M)tst<br>(SEQ ID NO: 5)<br>AAAAUCU(M)AC(M)AGUC(M)AU(M)AGGAtst (SEQ ID<br>NO: 6) |

[0424] N (M) :2'-OMe RNA, N (F) :2'-脱氧-2'-氟RNA, t:2'-脱氧胸苷, s:硫代磷酸酯键

[0425] [表5]

|        |      |                 |     |
|--------|------|-----------------|-----|
| [0426] | 粒子尺寸 | siRNA浓度 (μg/μL) | 包封率 |
|        | 81nm | 1.36            | 98% |

## [0427] 实施例13

[0428] 将脂质混合物(在实施例7中得到的化合物:在实施例8中得到的化合物:DPPC:胆甾醇:GS-020=59.1:0.9:10.6:28:1.4,摩尔比)溶解在90% EtOH和10% pH 4.0的25mM乙酸盐缓冲液中,以获得7.6mg/ml的脂质溶液。将HPRT siRNA(参见表4)溶解在pH4.0的25mM乙酸盐缓冲液中,得到0.21mg/ml的核酸溶液。将得到的脂质溶液和核酸溶液在室温下用亚洲微流体系统以1ml/min:3ml/min的流速混合,获得包含所述组合物的分散系。使用Slide-A-Lyzer(截留分子量20K)将得到的溶液在室温下针对水透析1小时并在室温下针对PBS透析18小时。然后使用 0.2μm针式过滤器进行过滤并储存在4℃。分析结果示出在表6中。

## [0429] [表6]

|        |      |                 |     |
|--------|------|-----------------|-----|
| [0430] | 粒子尺寸 | siRNA浓度 (μg/μL) | 包封率 |
|        | 80nm | 0.286           | 98% |

## [0431] 实施例14

[0432] 将脂质混合物(在实施例1中得到的化合物:DPPC:胆甾醇:GS-020 =60:10.6:28:1.4,摩尔比)溶解在90%EtOH和10%无RNA酶的水中,以获得8.4mg/ml的脂质溶液。将Fluc mRNA(TriLink BioTechnologies)溶解在pH3.0的10mM柠檬酸盐缓冲液中,得到0.125mg/ml的核酸溶液。将得到的脂质溶液和核酸溶液在室温下用亚洲微流体系统以1 ml/min:3ml/min的流速混合,获得包含所述组合物的悬液。使用 Slide-A-Lyzer(截留分子量20K)将得到的溶液在4℃下针对水透析1小时并在4℃下针对PBS透析18小时。然后使用0.2μm针式过滤器进行过滤并储存在4℃。分析结果示出在表7中。

## [0433] [表7]

|        |      |                |     |
|--------|------|----------------|-----|
| [0434] | 粒子尺寸 | mRNA浓度 (μg/μL) | 包封率 |
|        | 78nm | 0.065          | 98% |

## [0435] 实施例15

[0436] 将脂质混合物(在实施例7中得到的化合物:DPPC:胆甾醇:GS-020 =60:10.6:28:1.4,摩尔比)溶解在90%EtOH和10%无RNA酶的水中,以获得8.7mg/ml的脂质溶液。将Fluc mRNA(TriLink BioTechnologies)溶解在pH3.0的10mM柠檬酸盐缓冲液中,得到0.125mg/ml的核酸溶液。将得到的脂质溶液和核酸溶液在室温下用亚洲微流体系统以1 ml/min:3ml/min的流速混合,获得包含所述组合物的悬液。使用 Slide-A-Lyzer(截留分子量20K)将得到的溶液在4℃下针对水透析1小时并在4℃下针对PBS透析18小时。然后使用0.2μm针式过滤器进行过滤并储存在4℃。分析结果示出在表8中。

## [0437] [表8]

|        |      |                |     |
|--------|------|----------------|-----|
| [0438] | 粒子尺寸 | mRNA浓度 (μg/μL) | 包封率 |
|        | 85nm | 0.125          | 97% |

## [0439] [试验例]

[0440] 试验例1:在肝脏中的体内敲减(knockdown)试验

[0441] FVII是外在凝血反应中的重要凝血因子,在肝细胞中产生并分泌到血液中;血浆

FVII浓度可以使用板通过简单的比色分析来测量,因此FVII是可用于测量肝实质细胞中通过siRNA进行的敲减(KD)的典型模型。将磷酸盐缓冲盐水(PBS)或实施例11中透析过的分散系(0.25 mg/kg,作为FVII siRNA)给药到BALB/cA小鼠(9周龄,雌性,Japan Clea Corporation)的尾静脉中,并在给药后24小时收集血液(N=3)。将血液立即与EDTA(终浓度0.1%)混合并以5000g离心10分钟。使用 BIOPHEN FACTOR 7CHROMOGENIC ASSAY (HYPHEN BioMed) 测量上清液的FVII浓度。在将PBS给药组中的FVII浓度视为100%的基础上,计算残留率。如表9中所示,实施例11给药组中的FVII浓度为6.9%。这个结果清楚地表明,通过使用本发明的化合物可以将siRNA引入到肝中。

[0442] [表9]

|        |       |                    |
|--------|-------|--------------------|
| [0443] |       | 在0.25mg/kg下的残留率(%) |
|        | 实施例11 | 6.9                |

[0444] 试验例2:在癌细胞上的体内敲减试验

[0445] 将HCT 116细胞(人结肠癌细胞系,American Type Culture Collection(ATCC),  $1 \times 10^6$ 个细胞/小鼠)和Matrigel(Becton Dickinson and Company,356237,在液体体积中50%)皮下移植到裸小鼠(BALB /c-nu/nu,6周龄,雌性,Charles River Japan)的右肋中。在15天后将那些小鼠在肿瘤体积的基础上分组(每组4只动物;平均肿瘤体积为521 至544mm<sup>3</sup>)。将PBS或在实施例12中透析过的粒子悬液(10mg/kg,作为HPRT siRNA)从尾静脉给药,并在给药后48小时将小鼠在2.5%异氟烷麻醉下通过颈椎脱位进行安乐死,切下皮下肿瘤,并在称重后在干冰上快速冷冻。将所述皮下肿瘤的冷冻物质如下进行匀浆:添加TRIzol试剂(Invitrogen),然后添加氯仿,并离心分离含有RNA的水性相。使用RNeasy小量试剂盒(QIAGEN)提取并纯化所述水性相,以获得总RNA。使用SuperScript VILO cDNA合成试剂盒(Invitrogen)进行反转录,并通过qPCR方法测量人类HPRT(hHPRT)的mRNA量。用于hHPRT的探针和引物从Applied Biosystems Inc.(ABI)获得(探针:FAM-TAMRA,5'-CCATCACATTGTAGCCCTCTGTGTGCTC-3'(SEQ ID NO:7);正向引物:5'-CGTCTTGCTCGAGATGTGATG-3'(SEQ ID NO:8);反向引物:5'-CCAGCAGGTCAGCAAAGAATT-3'(SEQ ID NO:9))。作为内部标准基因,使用人类肌动蛋白 $\beta$ (hACTB),并在将PBS给药组的值视为100%的基础上计算hHPRT的mRNA的量。用于hACTB的探针和引物从ABI获得(探针:FAM-TAMRA,5'-ATCAAGATCATGCTCCTCCTGAGCGC-3'(SEQ ID NO:10);正向引物:5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'(SEQ ID NO:11);反向引物:5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'(SEQ ID NO:12))。如表9中所示,结果是用在实施例12中进行的透析后的粒子悬液给药的组中相对于PBS给药组的hHPRT的残留量,为48%。这个结果清楚地表明,通过使用本发明的化合物可以将siRNA引入到肿瘤细胞中。

[0446] [表10]

|        |       |                  |
|--------|-------|------------------|
| [0447] |       | 在10mg/kg下的残留率(%) |
|        | 实施例12 | 48               |

[0448] 试验例3:在脂肪组织上的体内敲减试验

[0449] 将HT29-Luc细胞(稳定表达萤光素酶基因的人类结肠癌细胞系 HT29(购自ATCC),  $5 \times 10^6$ 个细胞/小鼠)和Matrigel(Becton Dickinson and Company,356237,在液体体积中50%)皮下移植到裸小鼠(BALB /c-nu/nu,7周龄,雌性,Charles River Japan)的右肋中。

在16天后将那些小鼠在肿瘤体积的基础上分组(每组4只动物;平均肿瘤体积为271 至288mm<sup>3</sup>)。将PBS或以与实施例12中所进行的相同的方式获得的粒子悬液(5mg/kg,作为HPRT siRNA)从尾静脉给药,并在给药后48 小时将小鼠在2.5%异氟烷麻醉下通过颈椎脱位进行安乐死,然后切下门静脉周的脂肪,并在称重后在干冰上快速冷冻。将所述冷冻的脂肪组织如下进行匀浆:添加TRIzol试剂(Invitrogen),添加氯仿,然后离心以分离含有RNA的水性相。萃取水性相并使用RNeasy小量试剂盒(QIAGEN)纯化所述总RNA。使用SuperScript VIL0 cDNA合成试剂盒(Invitrogen)进行反转录,并通过qPCR方法测量小鼠HPRT (mHPRT)的mRNA量。用于mHPRT的探针和引物从ABI获得(Mm01545399\_m1)。作为内部标准基因,使用小鼠肌动蛋白 $\beta$  (mACTB),并在将PBS给药组的值视为100%的基础上计算mHPRT的mRNA的量。用于mACTB的探针和引物购自ABI (4352341E)。作为结果,在用与实施例12中所进行的相同的方式获得的粒子悬液给药的组中,mHPRT的相对残留量为44%(表11)。这个结果清楚地表明,通过使用本发明的化合物可以将 siRNA引入到脂肪组织中。

[0450] [表11]

|        |       |                 |
|--------|-------|-----------------|
| [0451] |       | 在5mg/kg下的残留率(%) |
|        | 实施例12 | 44              |

[0452] 试验例4:在骨髓上的体内敲减试验

[0453] 将HT29-Luc细胞(稳定表达萤光素酶基因的人类结肠癌细胞系 HT29(购自ATCC),5x 10<sup>6</sup>个细胞/小鼠)和Matrigel(Becton Dickinson and Company,356237,在液体体积中50%)皮下移植到裸小鼠(BALB /c-nu/nu,6周龄,雌性,Japan Clea Corporation)的右肋中。在17天后将那些小鼠在肿瘤体积的基础上分组(每组4只动物;平均肿瘤体积为321至329mm<sup>3</sup>)。将PBS或以与实施例12中所进行的相同的方式获得的粒子悬液(5mg/kg,作为HPRT siRNA)从尾静脉给药,并在给药后48小时将小鼠在2.5%异氟烷麻醉下通过颈椎脱位进行安乐死。从股骨收集骨髓细胞并使用RNeasy小量试剂盒(QIAGEN)提取并纯化总 RNA。使用SuperScript VIL0 cDNA合成试剂盒(Invitrogen)进行反转录,并通过qPCR方法测量小鼠HPRT (mHPRT)的mRNA量。用于mHPRT 的探针和引物从ABI获得(Mm01545399\_m1)。作为内部标准基因,使用小鼠肌动蛋白 $\beta$  (mACTB),并在将PBS给药组的值视为100%的基础上计算mHPRT的mRNA的量。用于mACTB的探针和引物购自ABI (4352341E)。作为结果,在用与实施例12中所进行的相同的方式获得的粒子悬液给药的组中,mHPRT的相对残留量为56%(表12)。这个结果清楚地表明,通过使用本发明的化合物可以将siRNA引入到骨髓中。

[0454] [表12]

|        |       |                 |
|--------|-------|-----------------|
| [0455] |       | 在5mg/kg下的残留率(%) |
|        | 实施例12 | 56              |

[0456] 试验例5:在悬浮的造血细胞Ramos上的体外敲减试验

[0457] 将Ramos细胞(人类B-细胞淋巴瘤来源的细胞系)以1×10<sup>4</sup>个细胞/孔的密度接种在96孔板中(RPMI1640基本培养基,10%FBS,青霉素-链霉素)。添加PBS、HPRT siRNA和Lipofectamine(注册商标)的混合物以及RNAiMAX(Life technologies)(按照实验方案进行混合)或在实施例13中透析后的粒子悬液(N=3,HPRT siRNA的终浓度为100 nM),并在48小时后收集细胞。使用RNeasy小量试剂盒(QIAGEN)对细胞进行提取并纯化总RNA。使用SuperScript VIL0 cDNA合成试剂盒进行反转录,并通过qPCR方法测量hHPRT的mRNA量。用

于hHPRT 的探针和引物与试验例2中使用的相同。作为内部标准基因使用 hACTB,并在将PBS给药组的值视为100%的基础上计算hHPRT的 mRNA的量。用于hACTB的探针和引物与试验例2中使用的相同。作为结果,在用以与实施例12中所进行的相同的方式获得的粒子悬液给药的组中,hHPRT的相对残留量为17%。另一方面,在用RNAiMAX处理的组中为109%(表13)。这个结果清楚地表明,通过使用本发明的化合物可以将siRNA引入到造血细胞中。

[0458] [表13]

|        |         |                |
|--------|---------|----------------|
| [0459] |         | 在100nM下的残留率(%) |
|        | RNAiMAX | 109            |
|        | 实施例13   | 17             |

[0460] 试验例6:萤光素酶的体内表达试验

[0461] 作为动物,使用雌性BALB/c小鼠。将在6周龄时提供的动物在正常养育条件下适应环境约三周,并将在实施例14或15中透析的粒子悬液(0.25mg/kg,作为Fluc mRNA)从尾静脉给药(N=2)。6小时后,在使用异氟烷麻醉下,腹膜内给药200 $\mu$ l D-萤光素(15mg/ml);在D-萤光素给药后10分钟,使用体内成像系统(IVIS,Caliper)观察整个身体中的发光以计算发光的平均量。试验结果示出在表14中。这个结果显示,通过使用本发明的化合物可以在体内引入mRNA。

[0462] [表14]

|        |       |                   |
|--------|-------|-------------------|
| [0463] |       | 发光的量( $10^8$ p/s) |
|        | 实施例14 | 190               |
|        | 实施例15 | 69                |

[0464] [工业实用性]

[0465] 本发明的化合物、脂质粒子或组合物可以将核酸高效引入到各种不同的细胞、组织或器官中。因此,本发明的化合物、脂质粒子或组合物可作为DDS技术用于核酸医药。此外,本发明的化合物、脂质粒子或组合物也可作为核酸引入试剂获得,用于研究用途。

[0466] 本申请基于在日本提交的日本专利申请号2014-161718,其内容整体并入到本说明书中。

|        |                                  |
|--------|----------------------------------|
| [0001] | 序列表                              |
| [0002] | <110> 武田药品工业株式会社                 |
| [0003] | <120> 阳离子脂质                      |
| [0004] | <150> JP 2014-161718             |
| [0005] | <151> 2014-08-07                 |
| [0006] | <160> 12                         |
| [0007] | <210> 1                          |
| [0008] | <211> 21                         |
| [0009] | <212> DNA                        |
| [0010] | <213> Mus musculus               |
| [0011] | <220>                            |
| [0012] | <221> misc_feature               |
| [0013] | <222> (1) .. (19)                |
| [0014] | <223> RNA                        |
| [0015] | <220>                            |
| [0016] | <221> modified_base              |
| [0017] | <222> (4) .. (4)                 |
| [0018] | <223> 2'-deoxy-2'-fluorouridine  |
| [0019] | <220>                            |
| [0020] | <221> modified_base              |
| [0021] | <222> (5) .. (5)                 |
| [0022] | <223> 2'-deoxy-2'-fluorocytidine |
| [0023] | <220>                            |
| [0024] | <221> modified_base              |
| [0025] | <222> (7) .. (7)                 |
| [0026] | <223> 2'-deoxy-2'-fluorouridine  |
| [0027] | <220>                            |
| [0028] | <221> modified_base              |
| [0029] | <222> (8) .. (8)                 |
| [0030] | <223> 2'-deoxy-2'-fluorocytidine |
| [0031] | <220>                            |
| [0032] | <221> modified_base              |
| [0033] | <222> (9) .. (9)                 |
| [0034] | <223> 2'-deoxy-2'-fluorouridine  |
| [0035] | <220>                            |
| [0036] | <221> modified_base              |
| [0037] | <222> (10) .. (10)               |
| [0038] | <223> 2'-deoxy-2'-fluorocytidine |

[0039] <220>  
[0040] <221> modified\_base  
[0041] <222> (14) .. (14)  
[0042] <223> 2'-deoxy-2'-fluorouridine  
[0043] <220>  
[0044] <221> modified\_base  
[0045] <222> (15) .. (15)  
[0046] <223> 2'-deoxy-2'-fluorocytidine  
[0047] <220>  
[0048] <221> modified\_base  
[0049] <222> (16) .. (17)  
[0050] <223> 2'-deoxy-2'-fluorouridine  
[0051] <220>  
[0052] <221> modified\_base  
[0053] <222> (19) .. (19)  
[0054] <223> 2'-deoxy-2'-fluorocytidine  
[0055] <220>  
[0056] <221> misc\_feature  
[0057] <222> (20) .. (21)  
[0058] <223> phosphorothioate bond  
[0059] <400> 1  
[0060] ggaucaucuc aagucuuact t  
[0061] <210> 2  
[0062] <211> 21  
[0063] <212> DNA  
[0064] <213> Mus musculus  
[0065] <220>  
[0066] <221> misc\_feature  
[0067] <222> (1) .. (19)  
[0068] <223> RNA  
[0069] <220>  
[0070] <221> modified\_base  
[0071] <222> (2) .. (2)  
[0072] <223> 2'-deoxy-2'-fluorouridine  
[0073] <220>  
[0074] <221> modified\_base  
[0075] <222> (7) .. (7)  
[0076] <223> 2'-deoxy-2'-fluorocytidine  
[0077] <220>

[0078] <221> modified\_base  
[0079] <222> (8) .. (9)  
[0080] <223> 2'-deoxy-2'-fluorouridine  
[0081] <220>  
[0082] <221> modified\_base  
[0083] <222> (14) .. (14)  
[0084] <223> 2'-deoxy-2'-fluorouridine  
[0085] <220>  
[0086] <221> modified\_base  
[0087] <222> (17) .. (17)  
[0088] <223> 2'-deoxy-2'-fluorouridine  
[0089] <220>  
[0090] <221> modified\_base  
[0091] <222> (18) .. (19)  
[0092] <223> 2'-deoxy-2'-fluorocytidine  
[0093] <220>  
[0094] <221> misc\_feature  
[0095] <222> (20) .. (21)  
[0096] <223> phosphorothioate bond  
[0097] <400> 2  
[0098] gaaagacuug agaugaucct t  
[0099] <210> 3  
[0100] <211> 21  
[0101] <212> DNA  
[0102] <213> Photinus pyralis  
[0103] <220>  
[0104] <221> misc\_feature  
[0105] <222> (1) .. (19)  
[0106] <223> RNA  
[0107] <220>  
[0108] <221> modified\_base  
[0109] <222> (1) .. (1)  
[0110] <223> cm  
[0111] <220>  
[0112] <221> modified\_base  
[0113] <222> (2) .. (3)  
[0114] <223> um  
[0115] <223> RNA  
[0116] <220>

---

|        |                             |
|--------|-----------------------------|
| [0117] | <221> modified_base         |
| [0118] | <222> (5) .. (5)            |
| [0119] | <223> cm                    |
| [0120] | <220>                       |
| [0121] | <221> modified_base         |
| [0122] | <222> (7) .. (7)            |
| [0123] | <223> cm                    |
| [0124] | <220>                       |
| [0125] | <221> modified_base         |
| [0126] | <222> (8) .. (8)            |
| [0127] | <223> um                    |
| [0128] | <220>                       |
| [0129] | <221> modified_base         |
| [0130] | <222> (12) .. (12)          |
| [0131] | <223> um                    |
| [0132] | <220>                       |
| [0133] | <221> modified_base         |
| [0134] | <222> (14) .. (14)          |
| [0135] | <223> cm                    |
| [0136] | <220>                       |
| [0137] | <221> modified_base         |
| [0138] | <222> (15) .. (16)          |
| [0139] | <223> um                    |
| [0140] | <220>                       |
| [0141] | <221> modified_base         |
| [0142] | <222> (17) .. (17)          |
| [0143] | <223> cm                    |
| [0144] | <220>                       |
| [0145] | <221> misc_feature          |
| [0146] | <222> (20) .. (21)          |
| [0147] | <223> phosphorothioate bond |
| [0148] | <400> 3                     |
| [0149] | cuuacgcuga guacuucgat t     |
| [0150] | <210> 4                     |
| [0151] | <211> 21                    |
| [0152] | <212> DNA                   |
| [0153] | <213> Photinus pyralis      |
| [0154] | <220>                       |
| [0155] | <221> misc_feature          |

---

[0156] <222> (1) .. (19)  
[0157] <223> RNA  
[0158] <220>  
[0159] <221> misc\_feature  
[0160] <222> (20) .. (21)  
[0161] <223> phosphorothioate bond  
[0162] <400> 4  
[0163] ucgaaguacu cagcguaagt t  
[0164] <210> 5  
[0165] <211> 21  
[0166] <212> DNA  
[0167] <213> Homo sapiens  
[0168] <220>  
[0169] <221> misc\_feature  
[0170] <222> (1) .. (19)  
[0171] <223> RNA  
[0172] <220>  
[0173] <221> modified\_base  
[0174] <222> (1) .. (1)  
[0175] <223> um  
[0176] <220>  
[0177] <221> modified\_base  
[0178] <222> (2) .. (3)  
[0179] <223> cm  
[0180] <220>  
[0181] <221> modified\_base  
[0182] <222> (4) .. (4)  
[0183] <223> um  
[0184] <220>  
[0185] <221> modified\_base  
[0186] <222> (6) .. (6)  
[0187] <223> um  
[0188] <220>  
[0189] <221> modified\_base  
[0190] <222> (9) .. (9)  
[0191] <223> cm  
[0192] <220>  
[0193] <221> modified\_base  
[0194] <222> (10) .. (10)

---

|        |                             |
|--------|-----------------------------|
| [0195] | <223> um                    |
| [0196] | <220>                       |
| [0197] | <221> modified_base         |
| [0198] | <222> (12) .. (12)          |
| [0199] | <223> um                    |
| [0200] | <220>                       |
| [0201] | <221> modified_base         |
| [0202] | <222> (16) .. (19)          |
| [0203] | <223> um                    |
| [0204] | <220>                       |
| [0205] | <221> misc_feature          |
| [0206] | <222> (20) .. (21)          |
| [0207] | <223> phosphorothioate bond |
| [0208] | <400> 5                     |
| [0209] | uccuaugacu guagauuuut t     |
| [0210] | <210> 6                     |
| [0211] | <211> 21                    |
| [0212] | <212> DNA                   |
| [0213] | <213> Homo sapiens          |
| [0214] | <220>                       |
| [0215] | <221> misc_feature          |
| [0216] | <222> (1) .. (19)           |
| [0217] | <223> RNA                   |
| [0218] | <220>                       |
| [0219] | <221> modified_base         |
| [0220] | <222> (7) .. (7)            |
| [0221] | <223> um                    |
| [0222] | <220>                       |
| [0223] | <221> modified_base         |
| [0224] | <222> (9) .. (9)            |
| [0225] | <223> cm                    |
| [0226] | <220>                       |
| [0227] | <221> modified_base         |
| [0228] | <222> (13) .. (13)          |
| [0229] | <223> cm                    |
| [0230] | <220>                       |
| [0231] | <221> modified_base         |
| [0232] | <222> (15) .. (15)          |
| [0233] | <223> um                    |

[0234] <220>  
[0235] <221> misc\_feature  
[0236] <222> (20) .. (21)  
[0237] <223> phosphorothioate bond  
[0238] <400> 6  
[0239] aaaaucuaca gucauaggat t  
[0240] <210> 7  
[0241] <211> 28  
[0242] <212> DNA  
[0243] <213> Homo sapiens  
[0244] <400> 7  
[0245] ccatcacatt gtagccctct gtgtgctc  
[0246] <210> 8  
[0247] <211> 21  
[0248] <212> DNA  
[0249] <213> Homo sapiens  
[0250] <400> 8  
[0251] cgtcttgctc gagatgtgat g  
[0252] <210> 9  
[0253] <211> 21  
[0254] <212> DNA  
[0255] <213> Homo sapiens  
[0256] <400> 9  
[0257] ccagcaggtc agcaaagaat t  
[0258] <210> 10  
[0259] <211> 27  
[0260] <212> DNA  
[0261] <213> Homo sapiens  
[0262] <400> 10  
[0263] atcaagatca ttgctcctcc tgagegc  
[0264] <210> 11  
[0265] <211> 18  
[0266] <212> DNA  
[0267] <213> Homo sapiens  
[0268] <400> 11  
[0269] cctggcaccc agcacaat  
[0270] <210> 12  
[0271] <211> 20  
[0272] <212> DNA

---

[0273] <213> Homo sapiens  
[0274] <400> 12  
[0275] gccgatccac acggagtact