(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-505971
(P2025-505971A)
(43)公表日　令和7年3月5日(2025.3.5)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C07C 237/12	*(2006.01)*	C07C	237/12	CSP　4B065
C07C 311/06	*(2006.01)*	C07C	311/06	4C076
C07C 243/34	*(2006.01)*	C07C	243/34	4C084
C07C 233/47	*(2006.01)*	C07C	233/47	4C086
C07D 295/15	*(2006.01)*	C07D	295/15	4H006

審査請求　未請求　予備審査請求　有　（全323頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-544928(P2024-544928)
(86)(22)出願日　令和5年1月31日(2023.1.31)
(85)翻訳文提出日　令和6年9月12日(2024.9.12)
(86)国際出願番号　PCT/IB2023/050811
(87)国際公開番号　WO2023/144798
(87)国際公開日　令和5年8月3日(2023.8.3)
(31)優先権主張番号　63/305,181
(32)優先日　令和4年1月31日(2022.1.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　521194024
ジェネヴァント サイエンシズ ゲーエムベーハー
GENEVANT SCIENCES GMBH
スイス国 ４０５１ バーゼル ヴィアドゥクトシュトラーセ ８
(74)代理人　100139723
弁理士　樋口 洋
(74)代理人　100116540
弁理士　河野 香
(72)発明者　ホランド，リチャード ジェイ
スイス国 ４０５１ バーゼル ヴィアドゥクトシュトラーセ ８ ケアオブ ジェネヴァント サイエンシズ ゲーエムベー
最終頁に続く

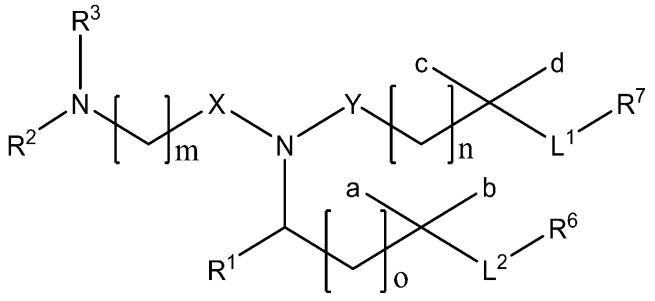
(54)【発明の名称】　脂質ナノ粒子用のイオン化できるカチオン性脂質

(57)【要約】
本発明の特定の実施形態は、最適化されたクリアランス特性を有するイオン化できる脂質を提供する。本発明の特定の実施形態はまた、イオン化できる脂質を含む核酸－脂質粒子、脂質粒子を作製する方法、および脂質粒子を送達する、および／または投与する方法を提供する。
【選択図】なし

10

20

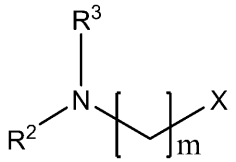
【特許請求の範囲】
【請求項１】
式（Ｉ）の化合物またはその塩：
【化１】



（Ｉ）

［式中、
Ｘは、－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）、または－Ｃ（＝Ｏ）－であり；
Ｙは、存在しないか、あるいは－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－、－ＳＯ$_2$－、または－Ｃ（＝Ｏ）－であり；
Ｒ^{1}はＣ$_2$～Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；
Ｒ^{2}はＣ$_1$～Ｃ$_3$アルキルであり、Ｒ^{3}はＣ$_1$～Ｃ$_3$アルキルであり；またはＲ^{2}およびＲ^{3}はそれらが結合している窒素と一緒になってアジリジノ環、アゼチジノ環、またはピロリジノ環を形成し；
ｍは、０、１、２、３、４、５、または６であり；
ｎは、０～１５であり；
ｏは、０～１５であり；
Ｌ^{1}は、存在しないか、あるいは－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｒ^4）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－Ｎ＝Ｃ（Ｒ^4）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｒ^4）（Ｒ^5）－、－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｒ^z、または－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－Ｒ^w－であり；
Ｌ^{2}は、存在しないか、あるいは－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｒ$^{4'}$）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－Ｎ＝Ｃ（Ｒ$^{4'}$）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｒ$^{4'}$）（Ｒ$^{5'}$）－、－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｒ$^{z'}$、または、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－Ｒ^x－であり；
ａはＨまたはＦであり；
ｂはＨまたはＦであり；
ｃはＨもしくはＦであり、ｄはＨもしくはＦであり；またはｃとｄはそれらが結合している炭素と一緒になって－Ｃ（＝Ｏ）－を形成し；
Ｒ^{4}は、ＨまたはＣ$_2$～Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；
Ｒ^{5}は、ＨまたはＣ$_2$～Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；
Ｒ$^{4'}$は、Ｃ$_2$～Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；
Ｒ$^{5'}$は、ＨまたはＣ$_2$～Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；
Ｒ^{6}は、Ｃ$_2$～Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；
Ｒ^{7}は、Ｃ$_2$～Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；
Ｒ^{w}は、存在しないか、あるいは－Ｃ（Ｆ）Ｈ－、または－Ｃ（Ｆ）$_2$－であり；
Ｒ^{x}は、存在しないか、あるいは－Ｃ（Ｆ）Ｈ－、または－Ｃ（Ｆ）$_2$－であり；
Ｒ^{z}は、Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$ヒドロカルビルから独立して選択される１、２、または３の基で置換されたフェニルであり；かつ
Ｒ$^{z'}$は、Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$ヒドロカルビルから独立して選択される１、２、または３の基で置換されたフェニルである］。

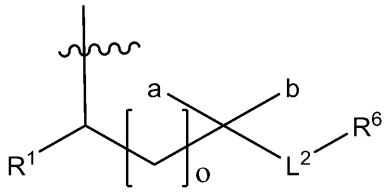
【請求項２】
Ｘが－ＣＨ$_2$－である、請求項１に記載の化合物または塩。
【請求項３】
Ｘが－Ｃ（＝Ｏ）－である、請求項１に記載の化合物または塩。
【請求項４】
Ｘが－Ｏ－である、請求項１に記載の化合物または塩。
【請求項５】
Ｒ^{2}がメチルである、請求項１～４のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項６】
Ｒ^{2}がエチルである、請求項１～４のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項７】
Ｒ^{2}がプロピルである、請求項１～４のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項８】
Ｒ^{3}がメチルである、請求項１～７のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項９】
Ｒ^{3}がエチルである、請求項１～７のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項１０】
Ｒ^{3}がプロピルである、請求項１～７のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項１１】
ｍが１である、請求項１～１０のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項１２】
ｍが２である、請求項１～１０のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項１３】
ｍが３である、請求項１～１０のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項１４】
【化２】



が、（ＣＨ$_3$）$_2$ＮＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）－、（ＣＨ$_3$）$_2$ＮＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）－、（ＣＨ$_3$）$_2$ＮＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）－、（ＣＨ$_3$）$_2$ＮＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－、
（ＣＨ$_3$）$_2$ＮＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ－、５－ピロリジン－１－イルペンタノイル、および（ＣＨ$_3$）$_2$ＮＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－から成る群から選択される、請求項１に記載の化合物。
【請求項１５】
Ｒ^{1}がＣ$_5$～Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルである、請求項１～１４のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項１６】
Ｒ^{1}がＣ$_2$～Ｃ$_{25}$アルキルである、請求項１～１４のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項１７】
Ｒ^{1}がＣ$_5$～Ｃ$_{25}$アルキルである、請求項１～１４のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項１８】
Ｒ^{1}がＣ$_5$～Ｃ$_{25}$アルケニルである、請求項１～１４のいずれか１項に記載の化合物

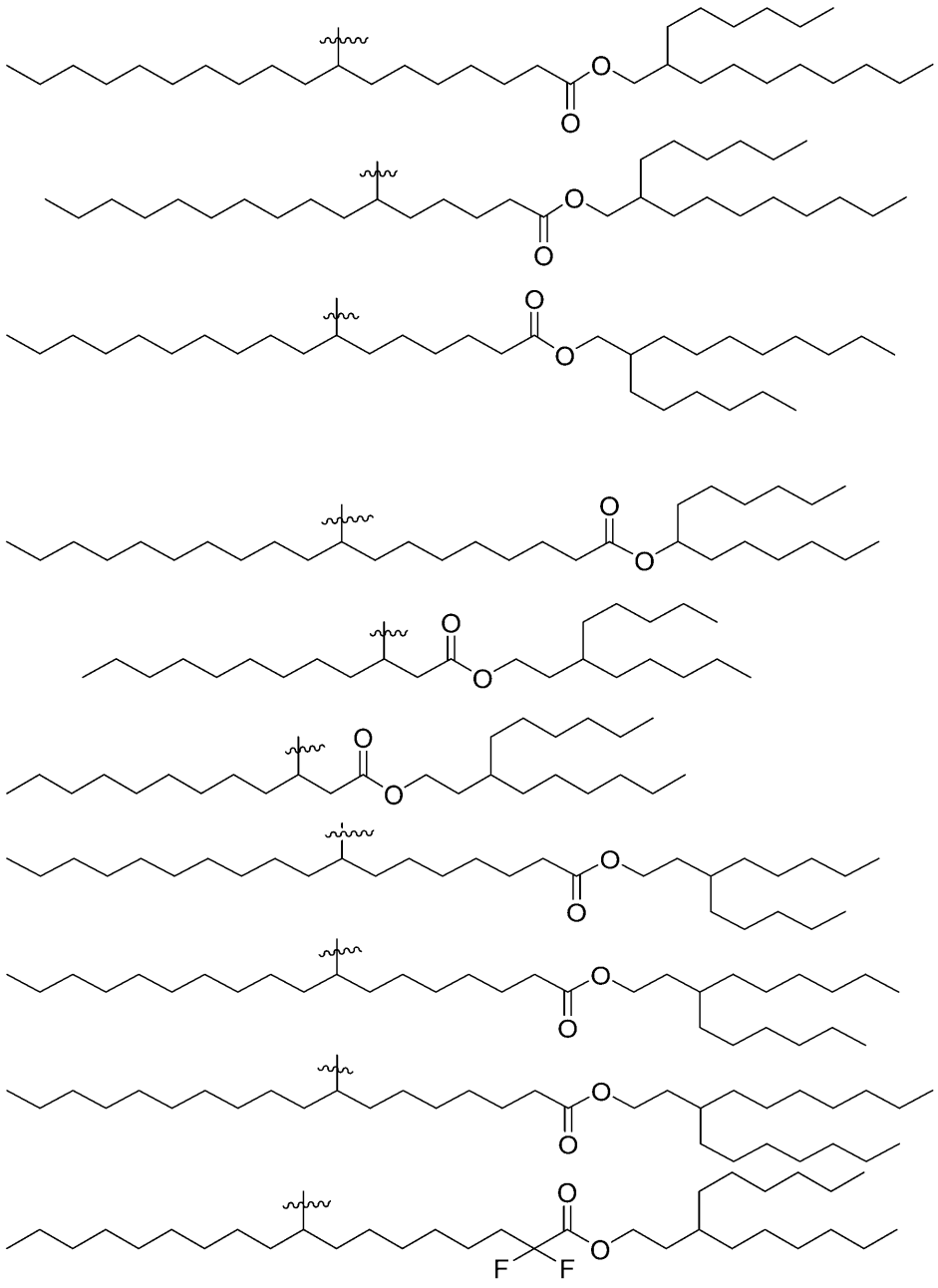
または塩。
【請求項１９】
R^1が１－ノニルまたは１－デシルである、請求項１～１４のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項２０】
ｏが２～１５である、請求項１～１９のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項２１】
ｏが１０～１５である、請求項１～１９のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項２２】
ｏが２～１０である、請求項１～１９のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項２３】
ｏが２～５である、請求項１～１９のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項２４】
L^2が、－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（R^4）（R^5）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－Ｎ＝Ｃ（R^4）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｈ）Ｃ（R^4）（R^5）－、または－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－CH_2－R^zである、請求項１～２３のいずれか１項に記載の化合物。
【請求項２５】
L^2が－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－である、請求項１～２３のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項２６】
L^2が－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（R^4）（R^5）－である、請求項１～２３のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項２７】
L^2が－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－CH_2－R^zである、請求項１～２３のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項２８】
ａがＨである、請求項１～２７のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項２９】
ａがＦである、請求項１～２７のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項３０】
ｂがＨである、請求項１～２９のいずれか１項に記載の化合物。
【請求項３１】
ｂがＦである、請求項１～２９のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項３２】
R^6がC_2～C_{25}ヒドロカルビルである、請求項１～３１のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項３３】
R^6がC_5～C_{25}ヒドロカルビルである、請求項１～３１のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項３４】
R^6がC_2～C_{25}アルキルである、請求項１～３１のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項３５】
R^6がC_5～C_{25}アルキルである、請求項１～３１のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項３６】
R^6がC_5～C_{25}アルケニルである、請求項１～３１のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項３７】

【化３】

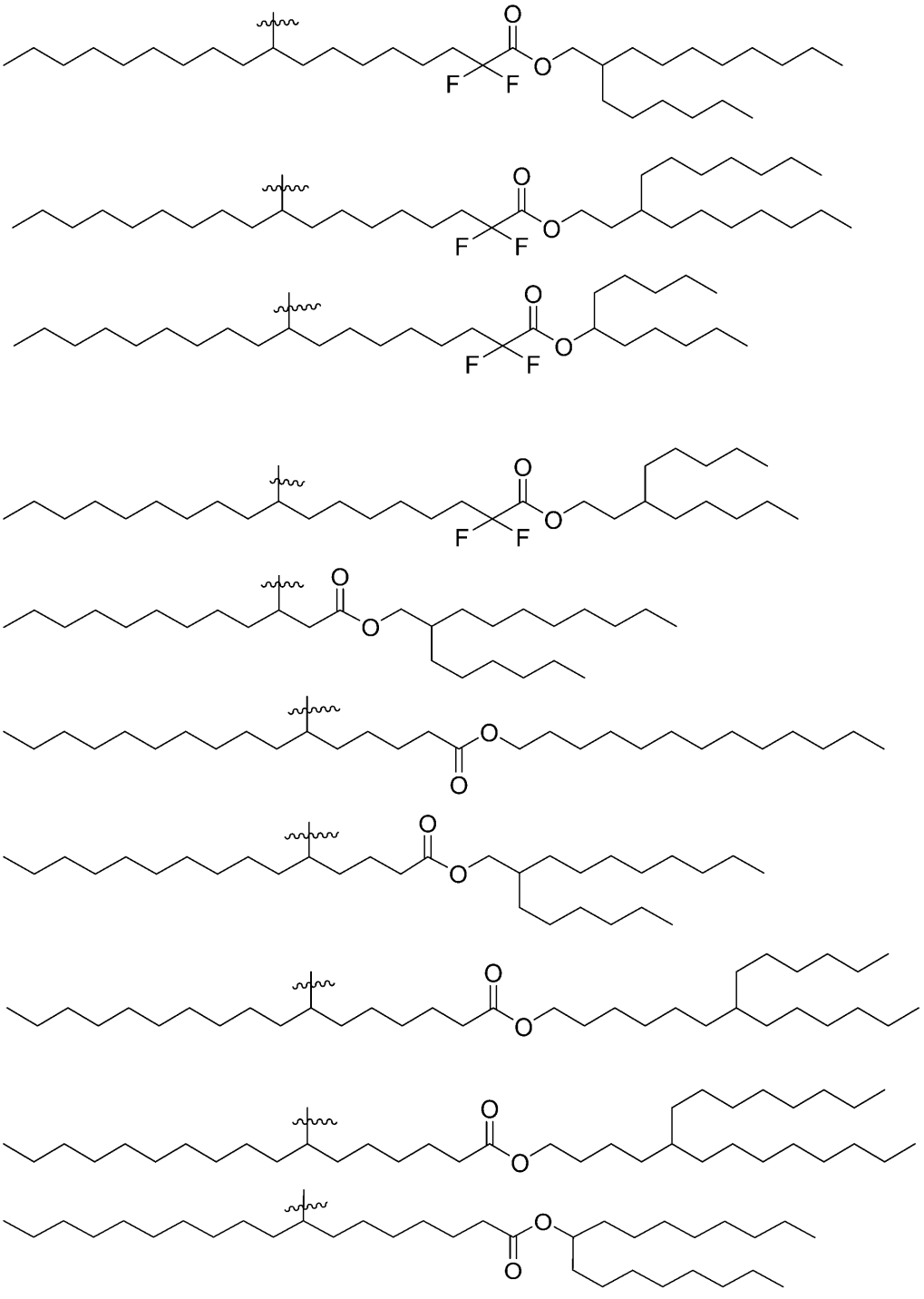


が、

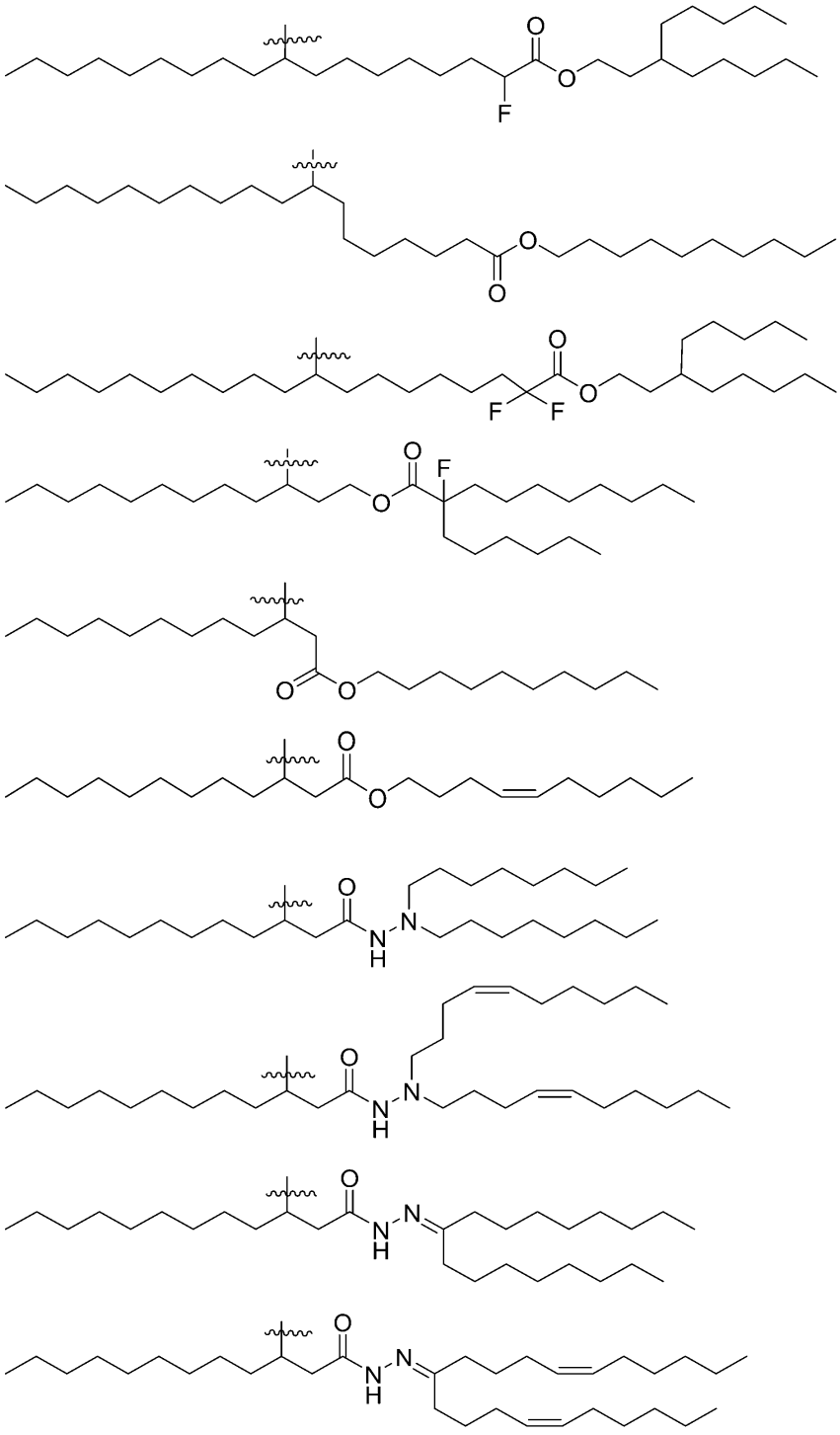
【化４】



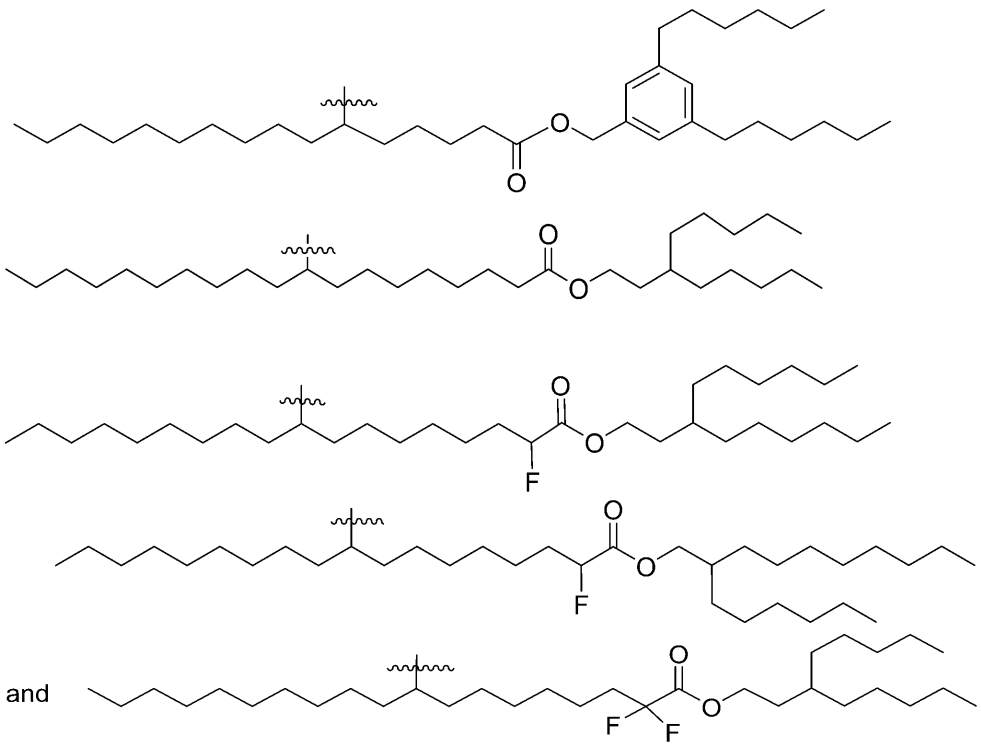
【化５】



【化６】



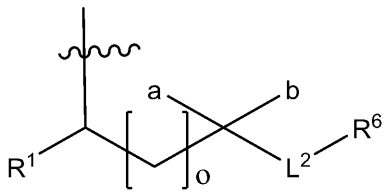
【化７】



から成る群から選択される、請求項１～１４のいずれか１項に記載の化合物または塩。

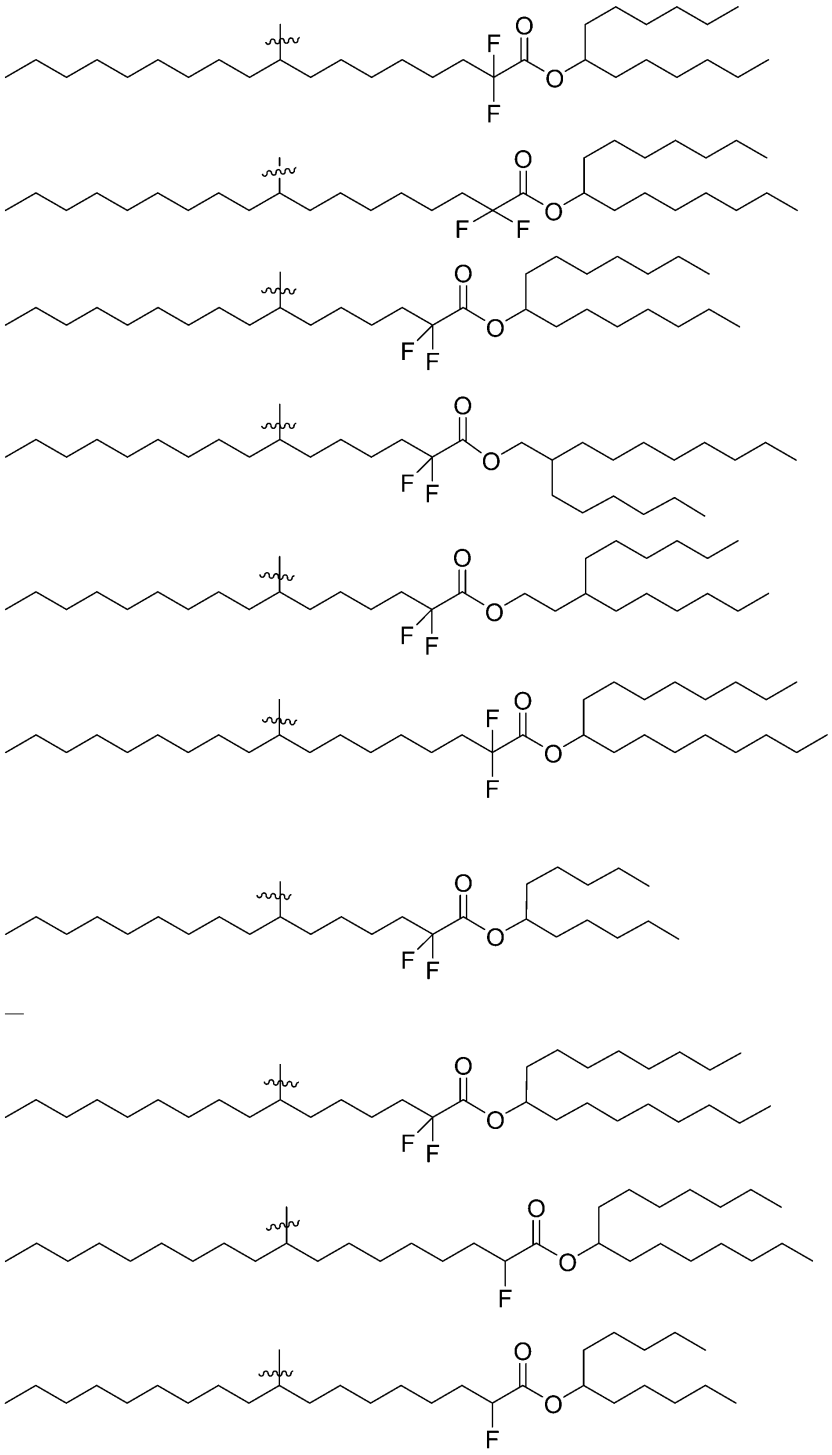
【請求項３８】

【化８】

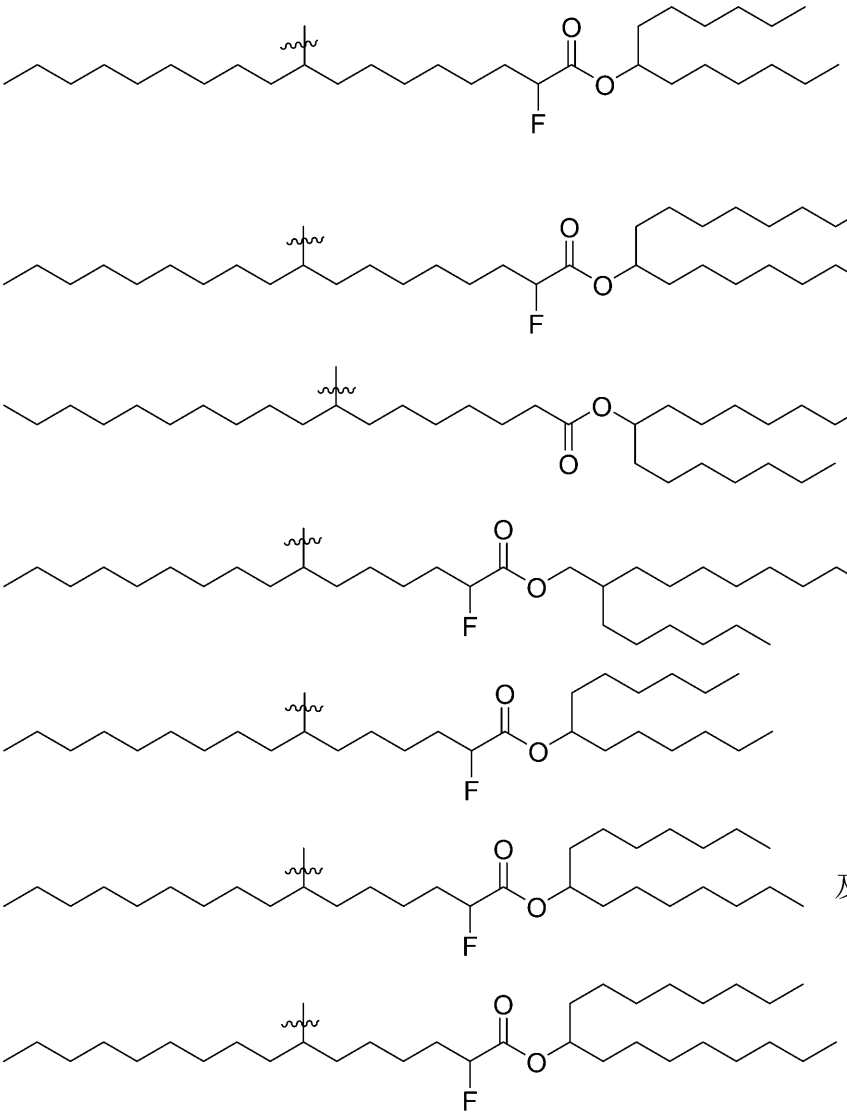


が、

【化９】



【化１０】

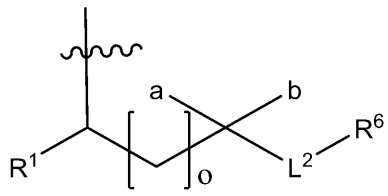


及び

から成る群から選択される、請求項１～１４のいずれか１項に記載の化合物または塩。

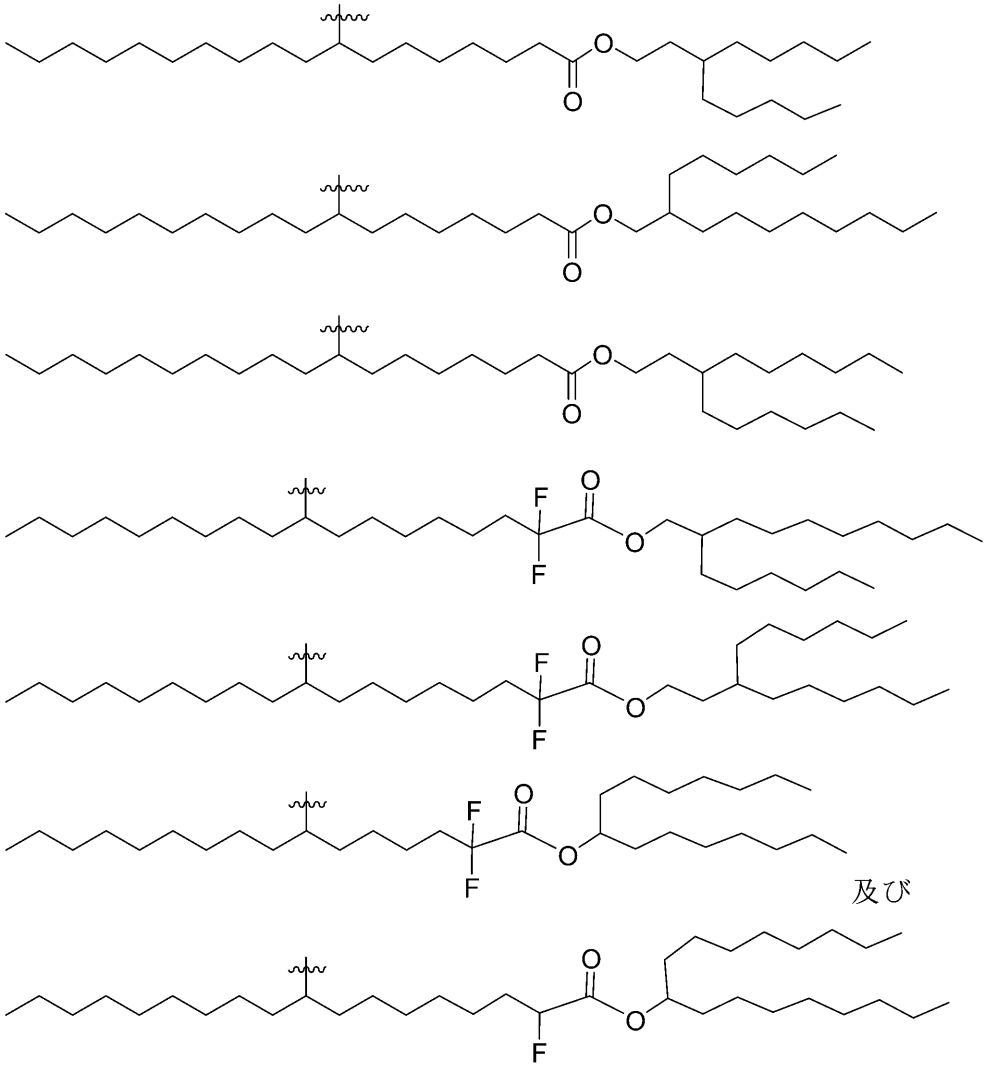
【請求項３９】

【化１１】



が、

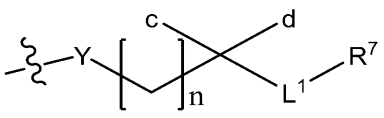
【化１２】



及び

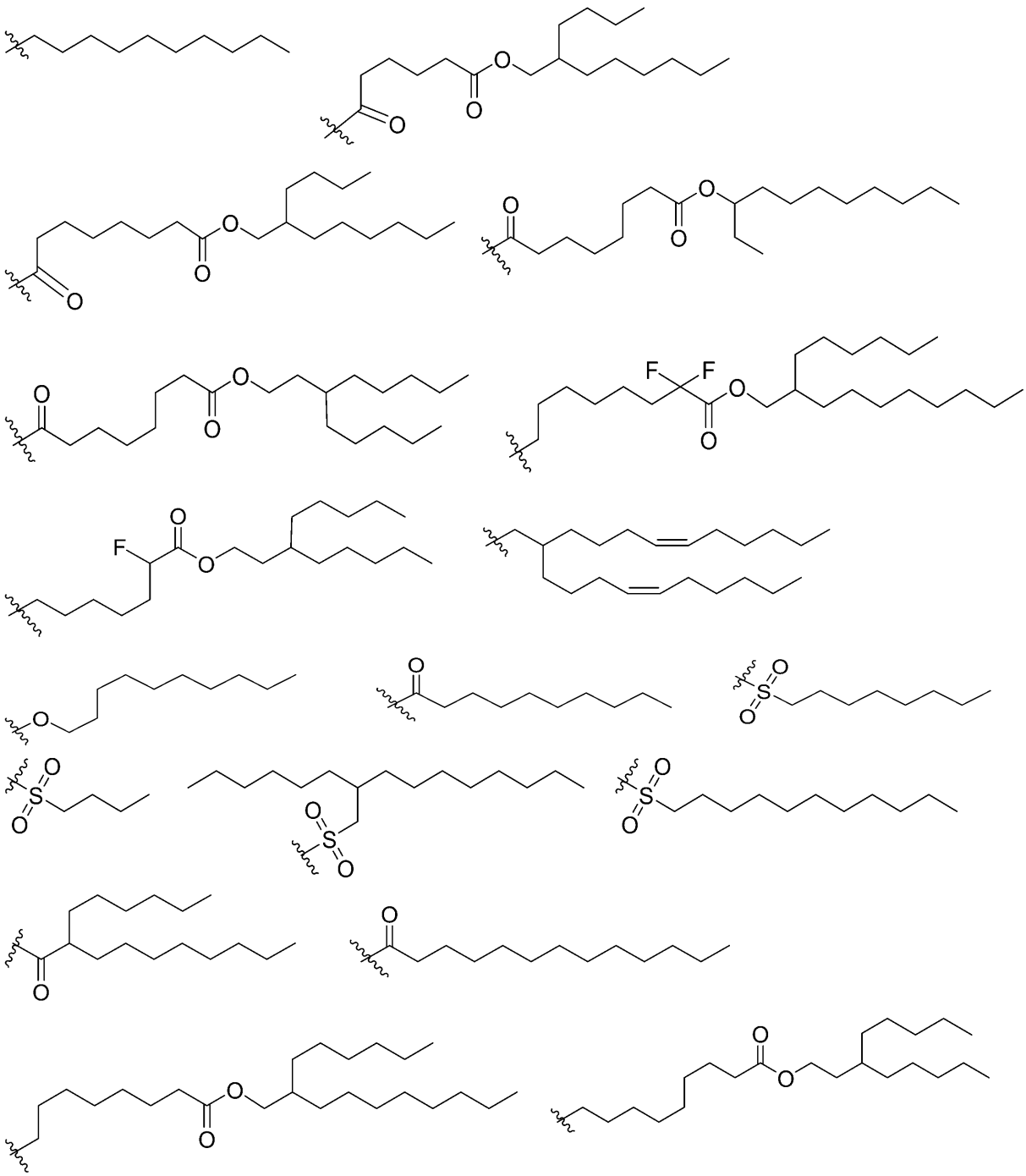
から成る群から選択される、請求項１～１４のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項４０】
Ｙが－ＣＨ$_2$－である、請求項１～３９のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項４１】
Ｙが－Ｃ（＝Ｏ）－である、請求項１～３９のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項４２】
Ｙが－Ｏ－である、請求項１～３９のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項４３】
ｎが２～１５である、請求項１～４２のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項４４】
ｎが１０～１５である、請求項１～４２のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項４５】
ｎが２～１０である、請求項１～４２のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項４６】
ｎが２～５である、請求項１～４２のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項４７】
Ｌ^{1}が存在せず；かつＬ^{2}が、－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｒ^4）（Ｒ^5）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－Ｎ＝Ｃ（Ｒ^4）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｒ^4）（Ｒ^5）－、または－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｒ^{z}である、請求項１～４６

のいずれか１項に記載の化合物。
【請求項４８】
L^1が、－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（R^4）（R^5）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－Ｎ＝Ｃ（R^4）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｈ）Ｃ（R^4）（R^5）－、または－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－CH_2－R^aであり；かつL^2が存在しない、請求項１～４６のいずれか１項に記載の化合物。
【請求項４９】
L^1が、－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（R^4）（R^5）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－Ｎ＝Ｃ（R^4）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｈ）Ｃ（R^4）（R^5）－、または－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－CH_2－R^aである、請求項１～４６のいずれか１項に記載の化合物。
【請求項５０】
L^1が－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏである、請求項１～４６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項５１】
L^1が－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（R^4）（R^5）－である、請求項１～４６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項５２】
L^1が－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－CH_2－R^zである、請求項１～４６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項５３】
ｃがＨである、請求項１～５２のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項５４】
ｃがＦである、請求項１～５２のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項５５】
ｄがＨである、請求項１～５４のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項５６】
ｄがＦである、請求項１～５４のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項５７】
R^7がC_2～C_{25}ヒドロカルビルである、請求項１～５６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項５８】
R^7がC_5～C_{25}ヒドロカルビルである、請求項１～５６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項５９】
R^7がC_2～C_{25}アルキルである、請求項１～５６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項６０】
R^7がC_5～C_{25}アルキルである、請求項１～５６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項６１】
R^7がC_5～C_{25}アルケニルである、請求項１～５６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項６２】
【化１３】

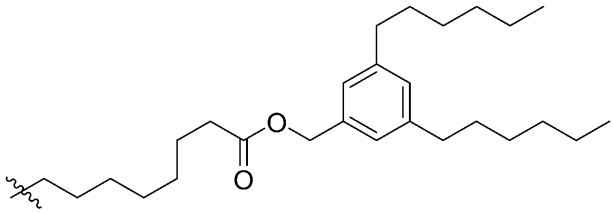
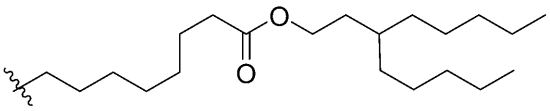
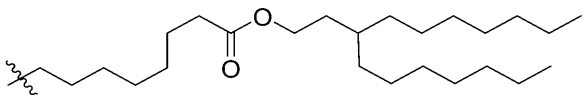
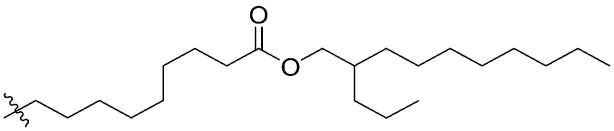
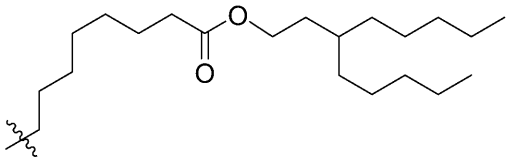
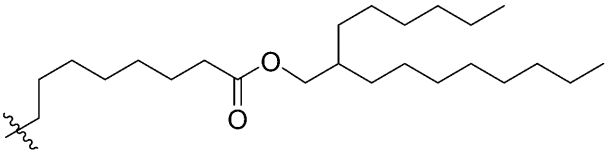
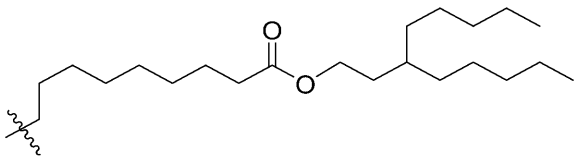
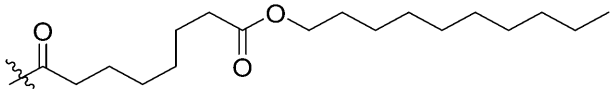
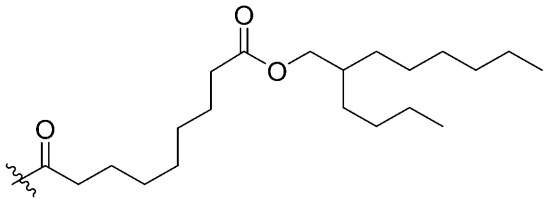
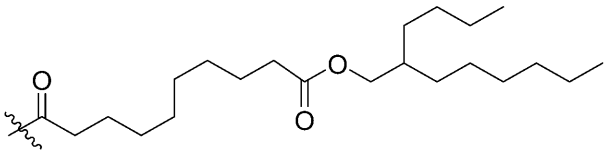
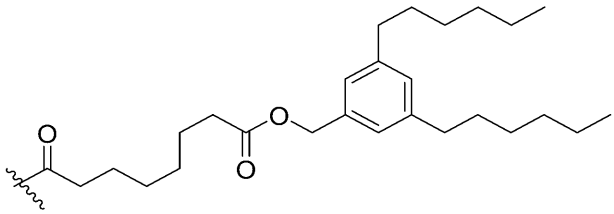
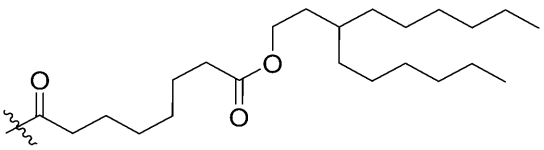
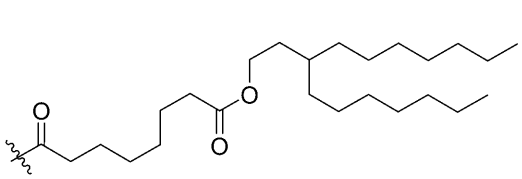
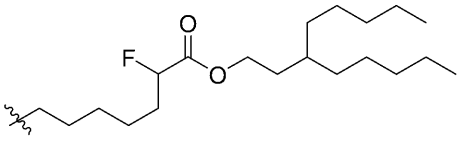


が、

【化１４】



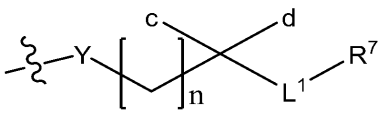
【化１５】














及び


から成る群から選択される、請求項１～３９のいずれか１項に記載の化合物または塩。

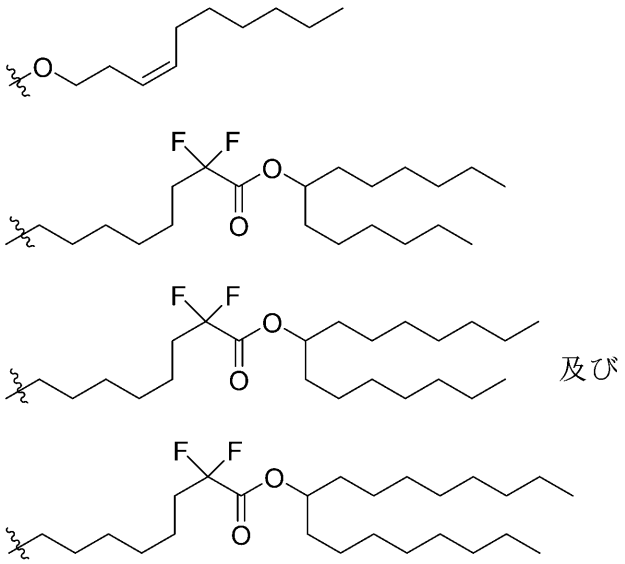
【請求項６３】

【化１６】



が、

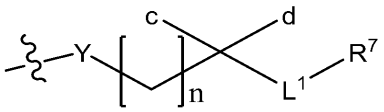
【化１７】



から成る群から選択される、請求項１～３９のいずれか１項に記載の化合物または塩。

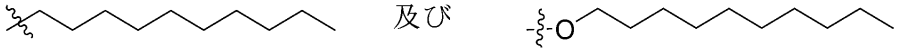
【請求項６４】

【化１８】



が、

【化１９】



から成る群から選択される、請求項１～３７のいずれか１項に記載の化合物または塩。

【請求項６５】

R^4がC_2～C_{25}ヒドロカルビルである、請求項１～４６および５３～６１のいずれか１項に記載の化合物または塩。

【請求項６６】

R^4がC_5～C_{25}ヒドロカルビルである、請求項１～４６および５３～６１のいずれか１項に記載の化合物または塩。

【請求項６７】

R^4がC_2～C_{25}アルキルである、請求項１～４６および５３～６１のいずれか１項に記載の化合物または塩。

【請求項６８】

R^4がC_5～C_{25}アルキルである、請求項１～４６および５３～６１のいずれか１項に記載の化合物または塩。

【請求項６９】

R^4がC_5～C_{25}アルケニルである、請求項１～４６および５３～６１のいずれか１項に記載の化合物または塩。

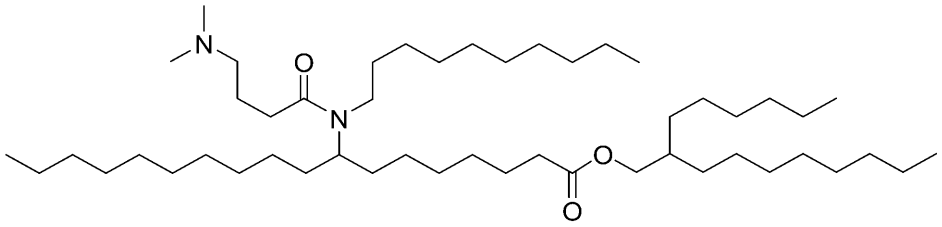
【請求項７０】

R^5がC_2～C_{25}ヒドロカルビルである、請求項１～４６および５３～６１のいずれ

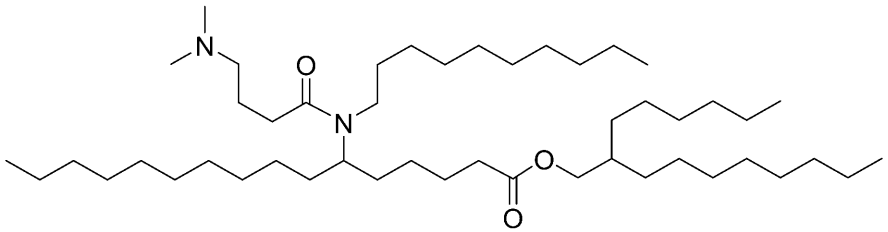
か１項に記載の化合物または塩。
【請求項７１】
R^5がC_5～C_{25}ヒドロカルビルである、請求項１～４６および５３～６１のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項７２】
R^5がC_2～C_{25}アルキルである、請求項１～４６および５３～６１のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項７３】
R^5がC_5～C_{25}アルキルである、請求項１～４６および５３～６１のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項７４】
R^5がC_5～C_{25}アルケニルである、請求項１～４６および５３～６１のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項７５】
$R^{4'}$がC_2～C_{25}ヒドロカルビルである、請求項１～２３および２８～３６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項７６】
$R^{4'}$がC_5～C_{25}ヒドロカルビルである、請求項１～２３および２８～３６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項７７】
$R^{4'}$がC_2～C_{25}アルキルである、請求項１～２３および２８～３６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項７８】
$R^{4'}$がC_5～C_{25}アルキルである、請求項１～２３および２８～３６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項７９】
$R^{4'}$がC_5～C_{25}アルケニルである、請求項１～２３および２８～３６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項８０】
$R^{5'}$がC_2～C_{25}ヒドロカルビルである、請求項１～２３および２８～３６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項８１】
$R^{5'}$がC_5～C_{25}ヒドロカルビルである、請求項１～２３および２８～３６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項８２】
$R^{5'}$がC_2～C_{25}アルキルである、請求項１～２３および２８～３６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項８３】
$R^{5'}$がC_5～C_{25}アルキルである、請求項１～２３および２８～３６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項８４】
$R^{5'}$がC_5～C_{25}アルケニルである、請求項１～２３および２８～３６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項８５】
R^zが、C_2～C_{10}ヒドロカルビルから独立して選択される１または２の基で置換されたフェニルである、請求項１～４６および５３～６１のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項８６】
各C_2～C_{10}ヒドロカルビルはC_5～C_{10}ヒドロカルビルから成る群から独立して選択される、請求項８５に記載の化合物または塩。

【請求項８７】
各C_2～C_{10}ヒドロカルビルはC_2～C_{10}アルキルから成る群から独立して選択される、請求項８５に記載の化合物または塩。
【請求項８８】
各C_2～C_{10}ヒドロカルビルはC_5～C_{10}アルキルから成る群から独立して選択される、請求項８５に記載の化合物または塩。
【請求項８９】
各C_2～C_{10}ヒドロカルビルはC_5～C_{10}アルケニルから成る群から独立して選択される、請求項８５に記載の化合物または塩。
【請求項９０】
$R^{z'}$が、C_2～C_{10}ヒドロカルビルから独立して選択される１または２の基で置換されているフェニルである、請求項１～２３および２８～３６のいずれか１項に記載の化合物または塩。
【請求項９１】
各C_2～C_{10}ヒドロカルビルがC_5～C_{10}ヒドロカルビルから成る群から独立して選択される、請求項９０に記載の化合物または塩。
【請求項９２】
各C_2～C_{10}ヒドロカルビルがC_2～C_{10}アルキルから成る群から独立して選択される、請求項９０に記載の化合物または塩。
【請求項９３】
各C_2～C_{10}ヒドロカルビルがC_5～C_{10}アルキルから成る群から独立して選択される、請求項９０に記載の化合物または塩。
【請求項９４】
各C_2～C_{10}ヒドロカルビルがC_5～C_{10}アルケニルから成る群から独立して選択される、請求項９０に記載の化合物または塩。
【請求項９５】

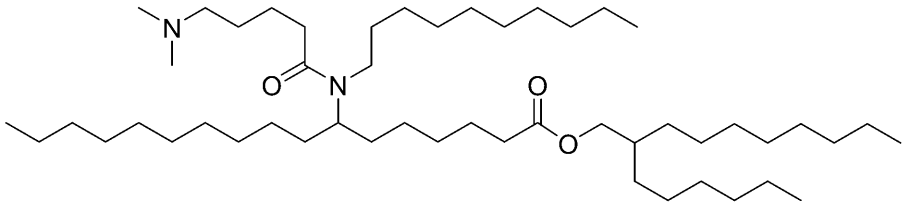
【化２０】



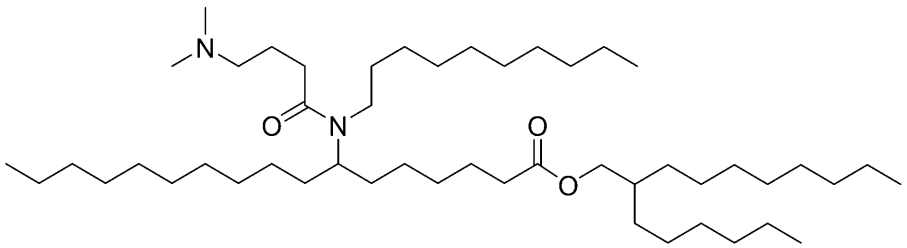
(1)



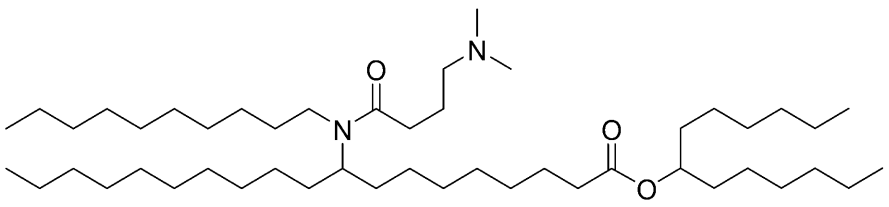
(2)



(3)

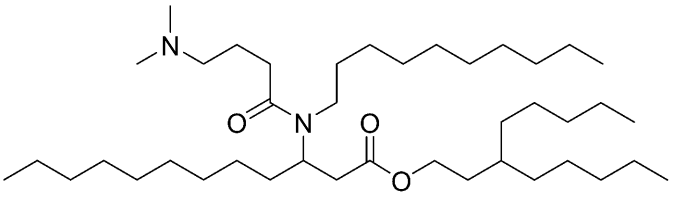


(4)

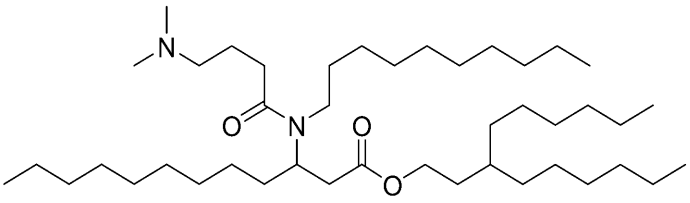


(5)

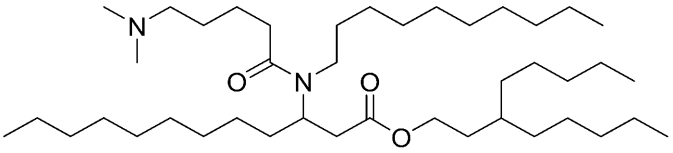
【化２１】



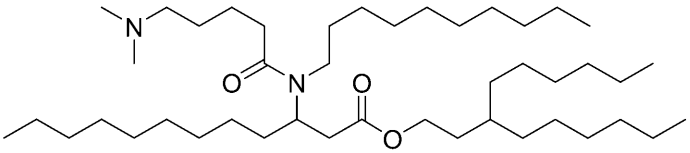
(6)



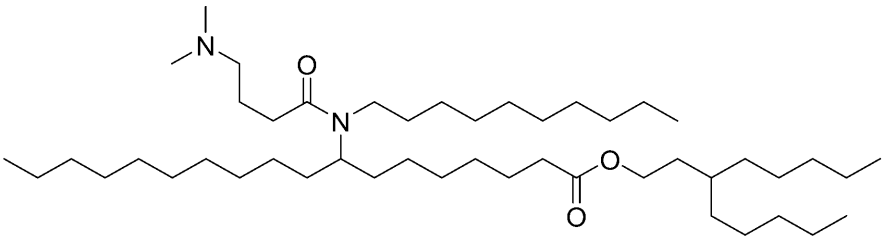
(7)



(8)

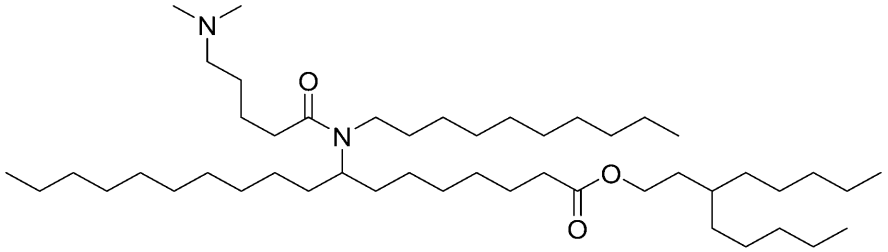


(9)

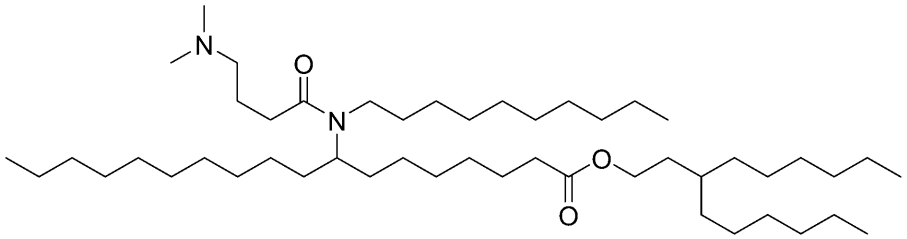


(10)

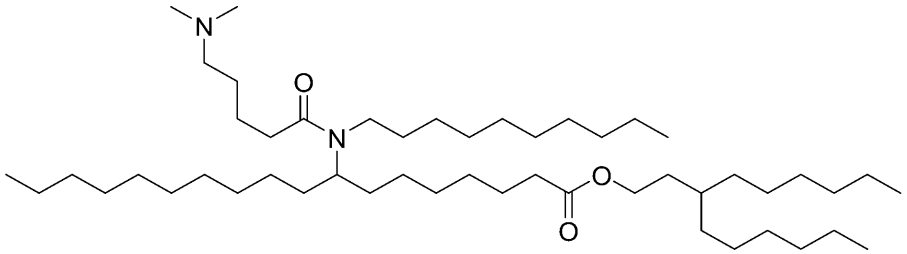
【化２２】



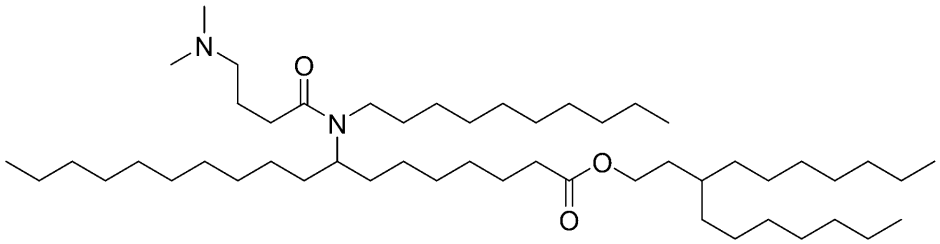
(11)



(12)

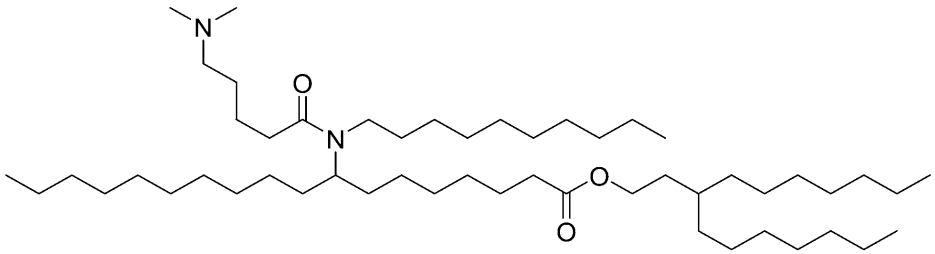


(13)

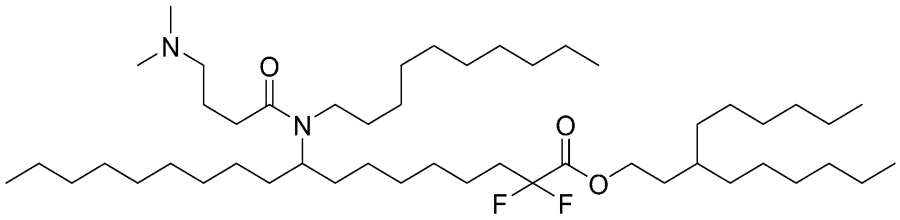


(14)

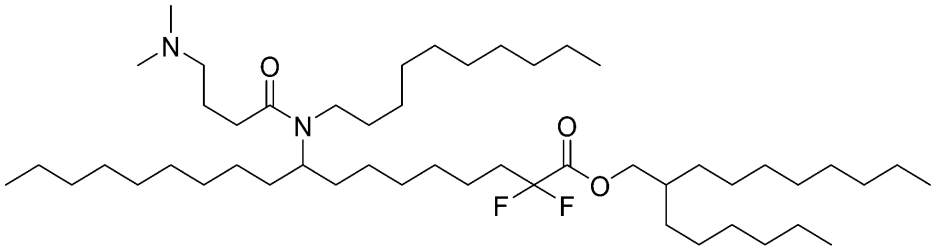
【化２３】



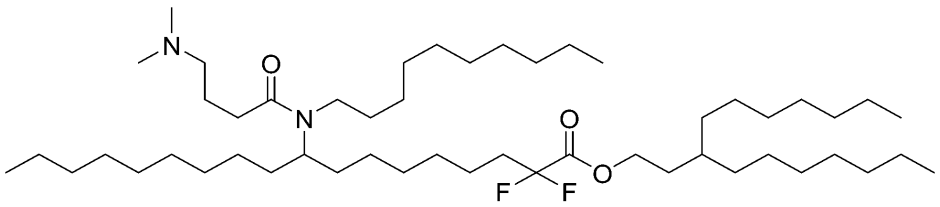
(15)



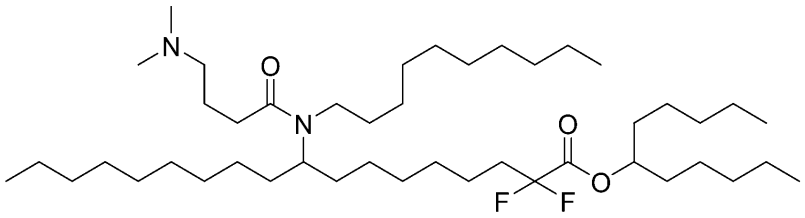
(16)



(17)

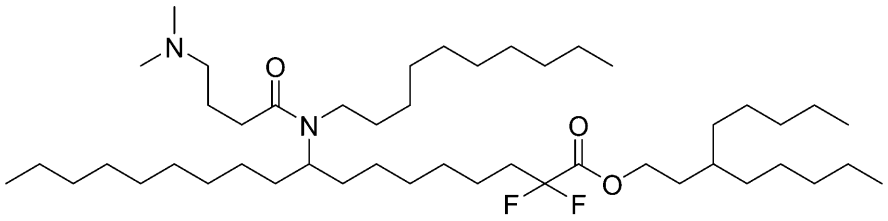


(18)

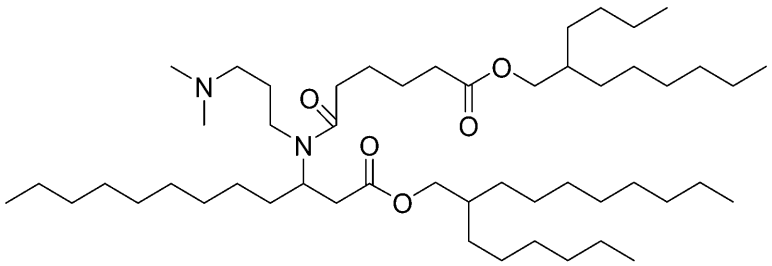


(19)

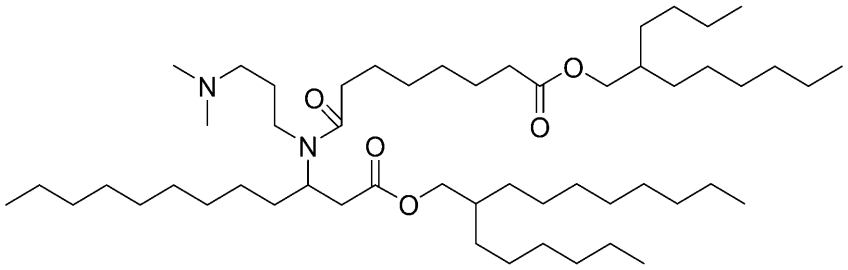
【化２４】



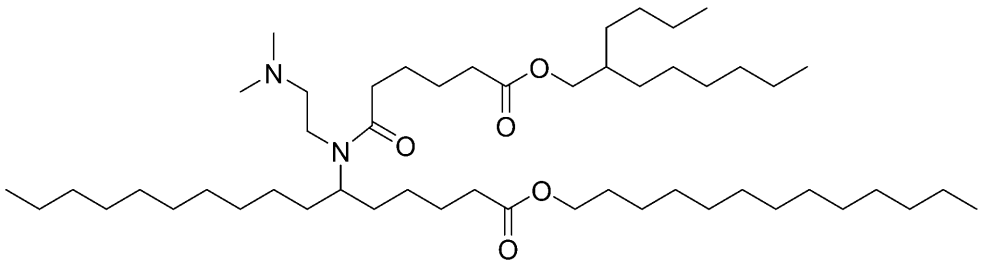
(20)



(21)

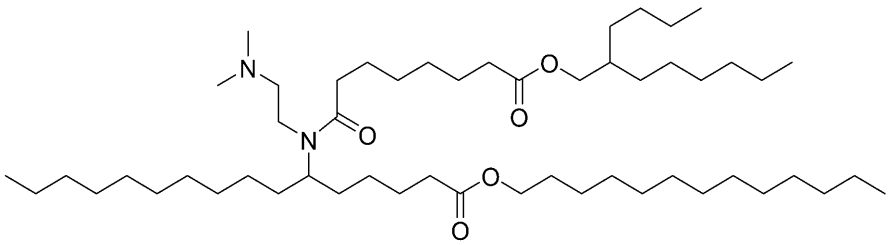


(22)

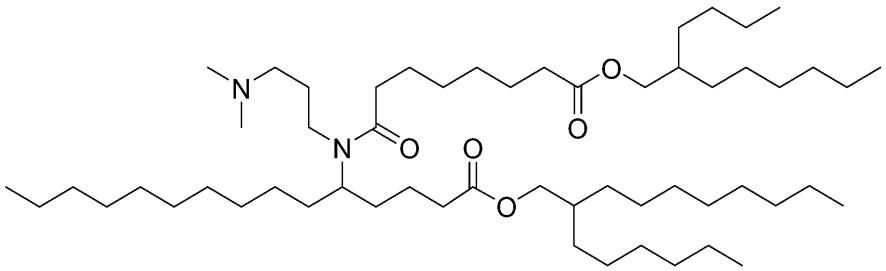


(23)

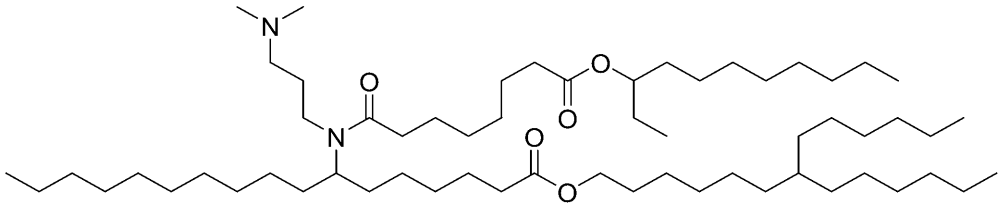
【化２５】



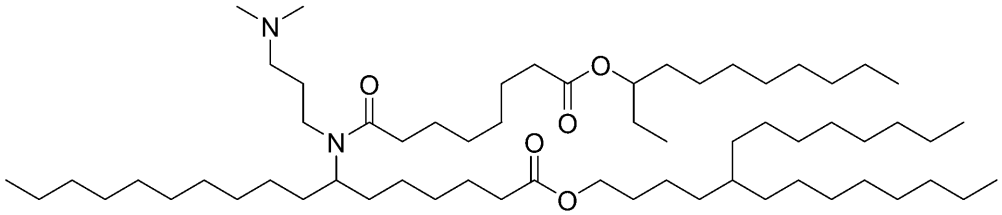
(24)



(25)

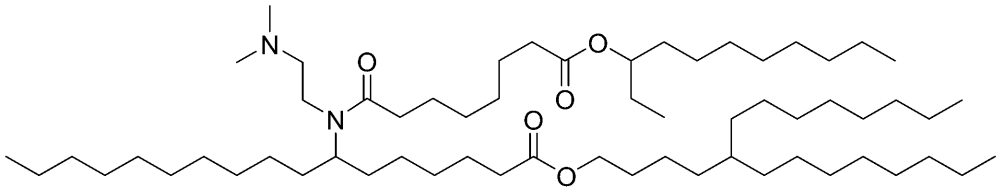


(26)

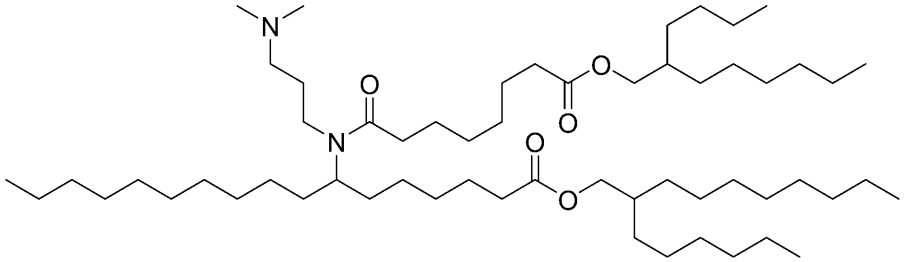


(27)

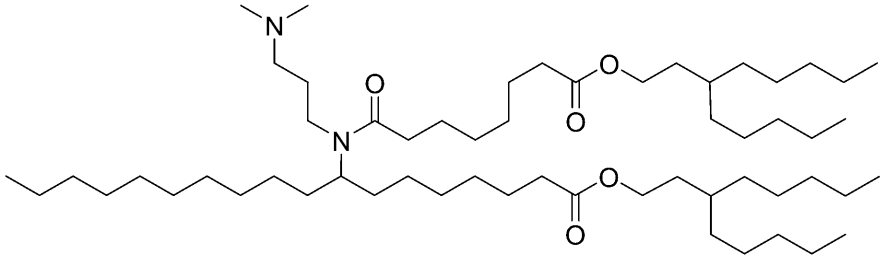
【化２６】



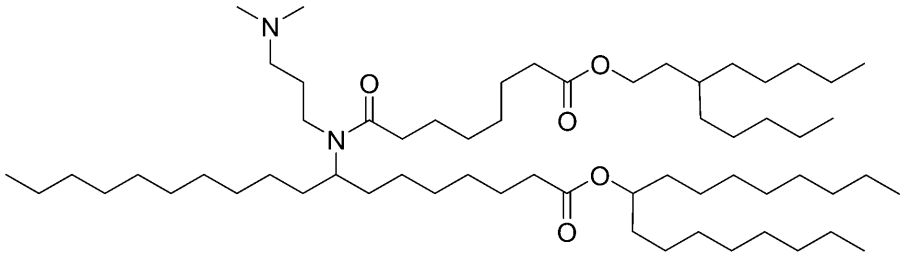
(**28**)



(**29**)

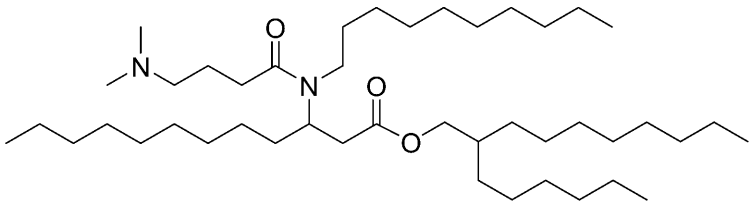


(**30**)

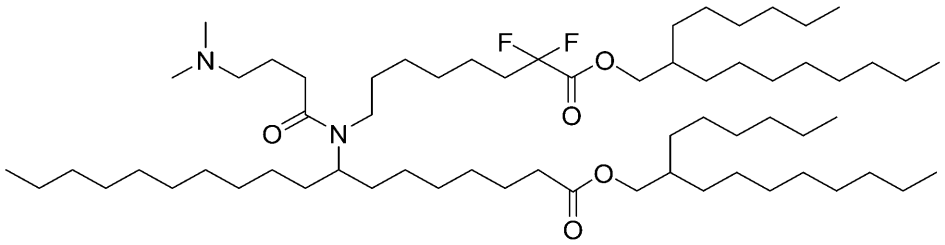


(**31**)

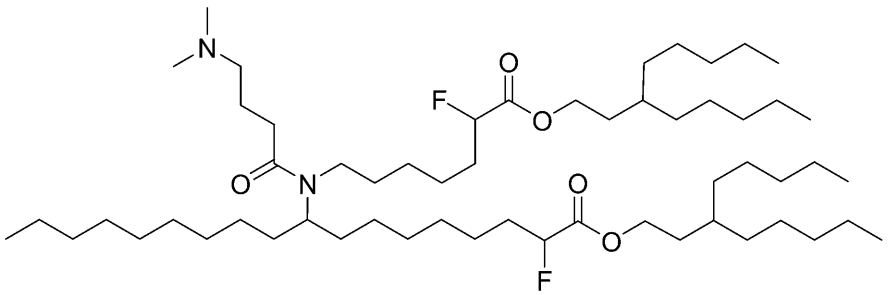
【化２７】



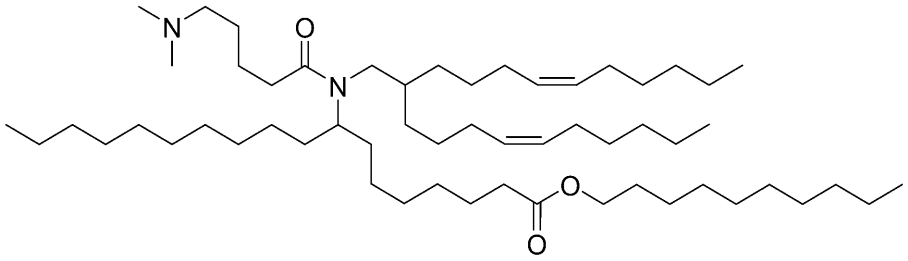
(32)



(33)

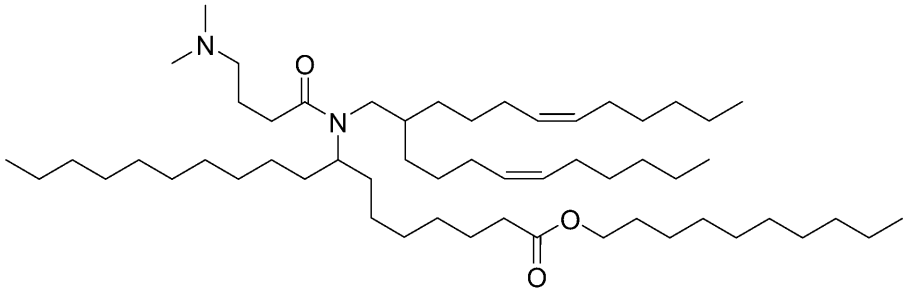


(34)

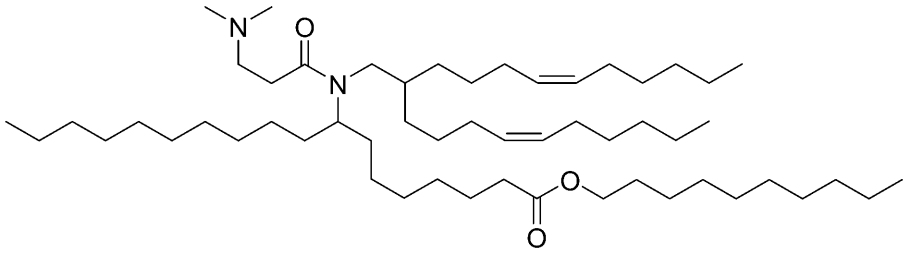


(35)

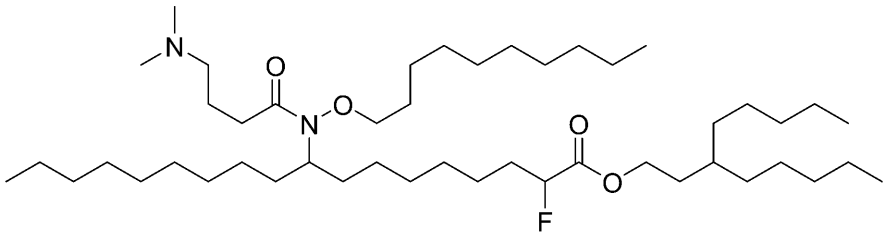
【化２８】



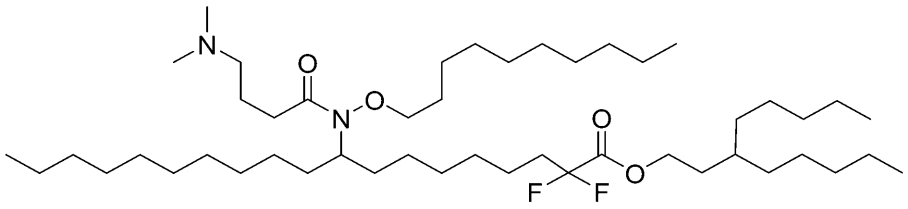
(36)



(37)

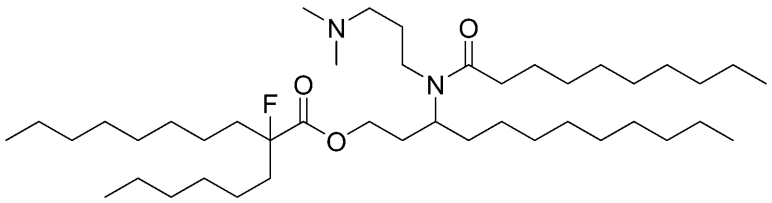


(38)

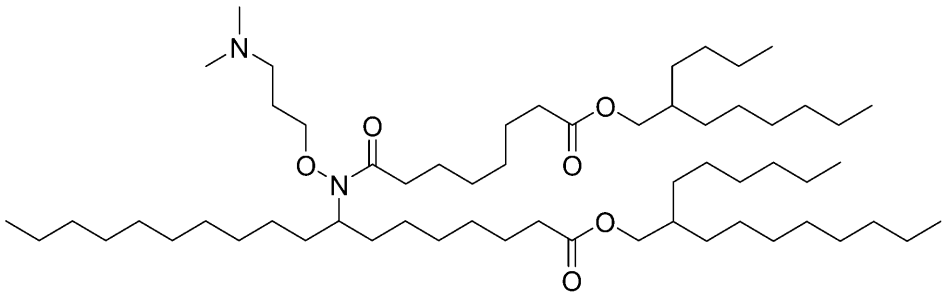


(39)

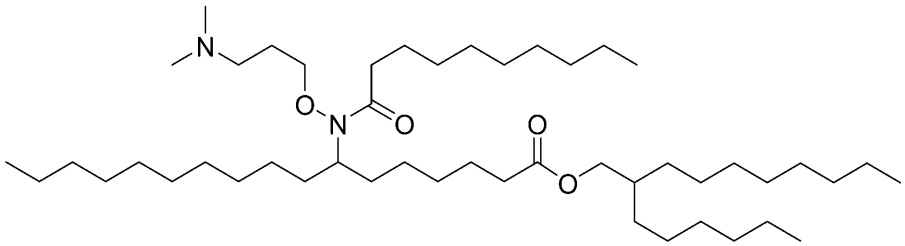
【化２９】



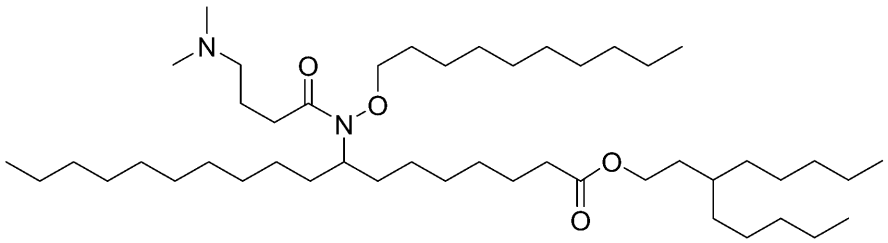
(**40**)



(**41**)

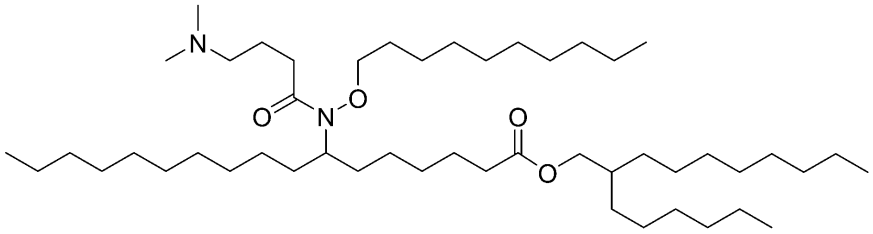


(**42**)

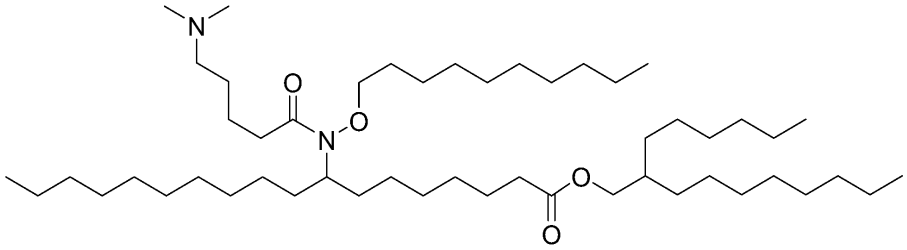


(**43**)

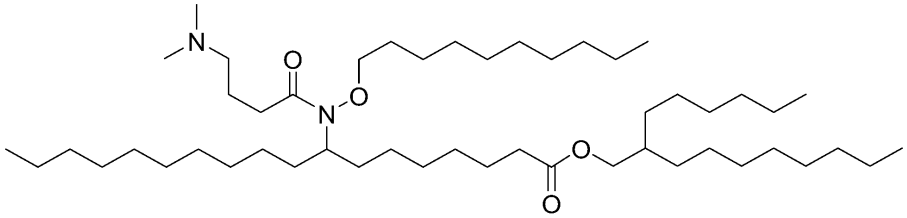
【化３０】



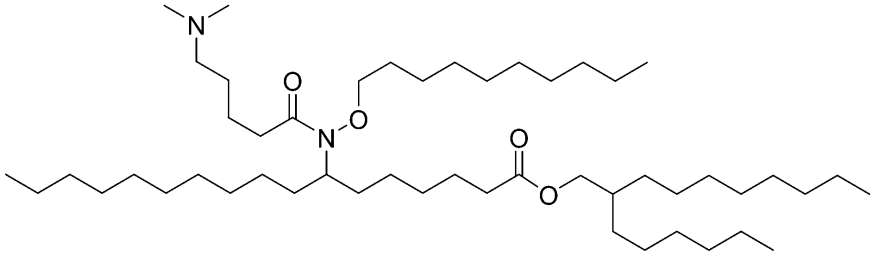
(44)



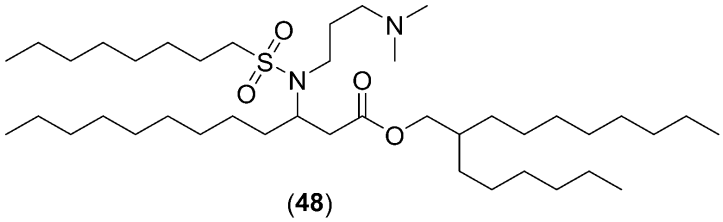
(45)



(46)

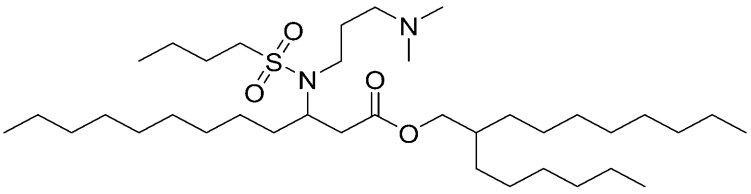


(47)

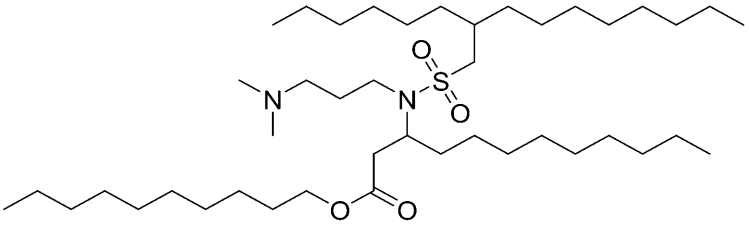


(48)

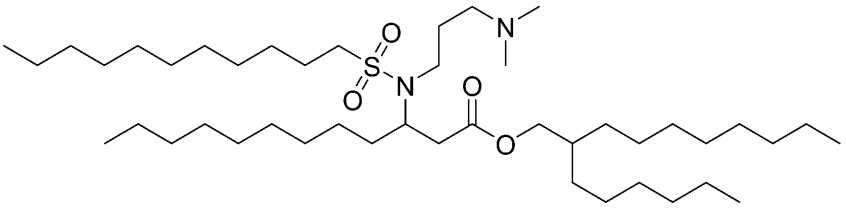
【化３１】



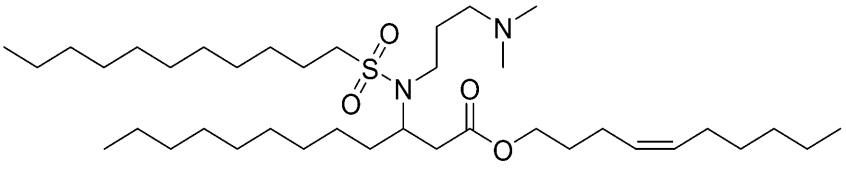
(49)



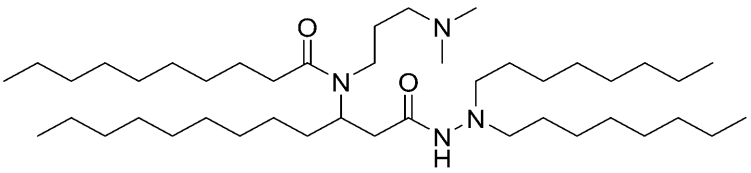
(50)



(51)

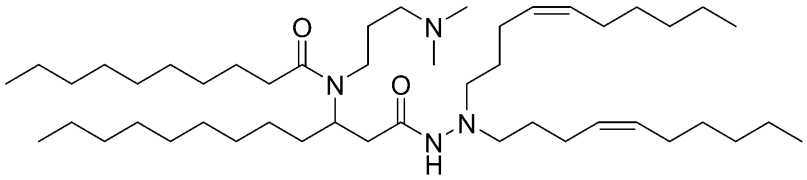


(52)

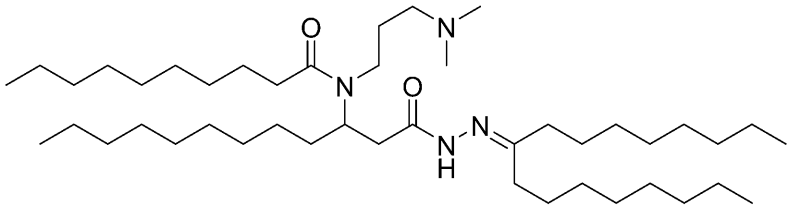


(53)

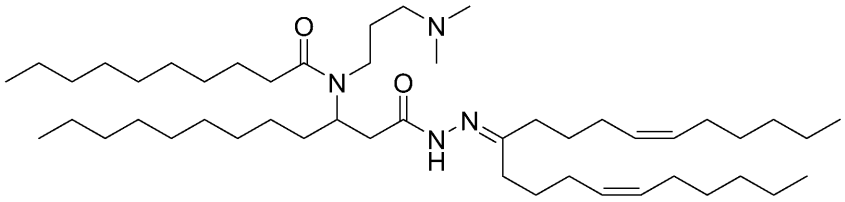
【化３２】



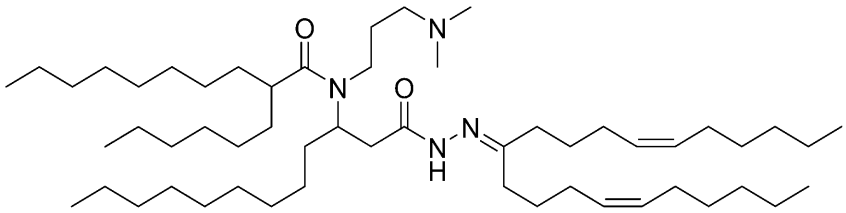
(54)



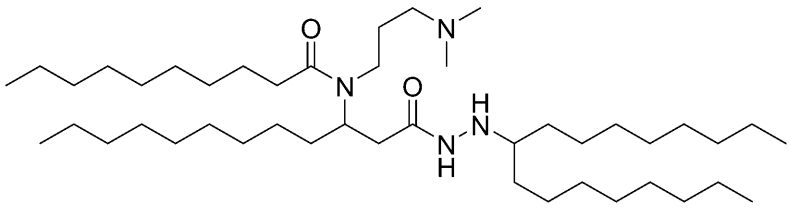
(55)



(56)

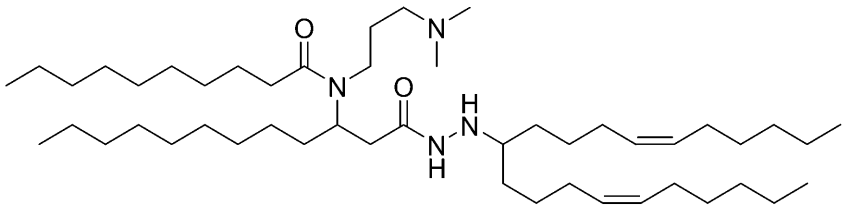


(57)

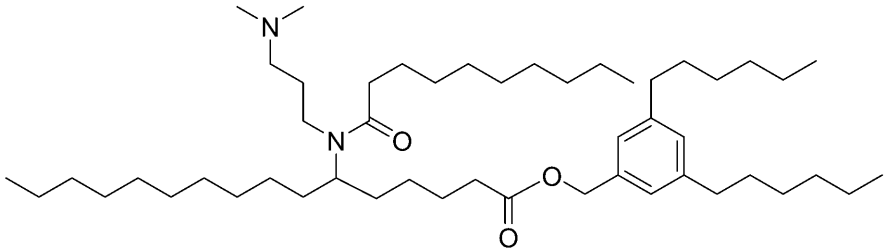


(58)

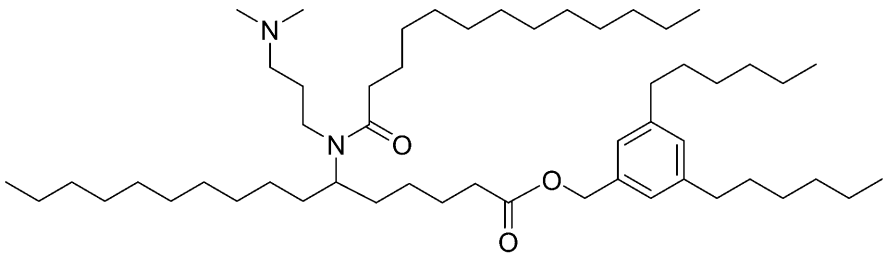
【化３３】



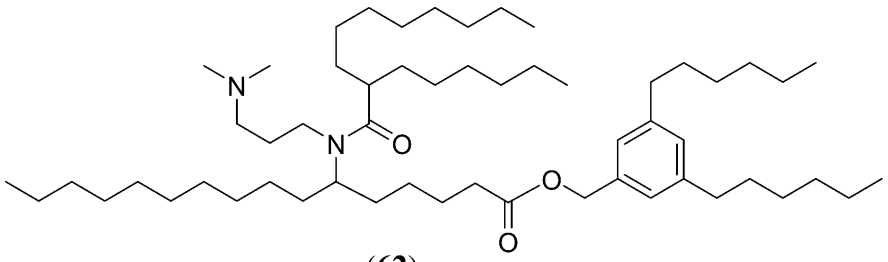
(**59**)



(**60**)

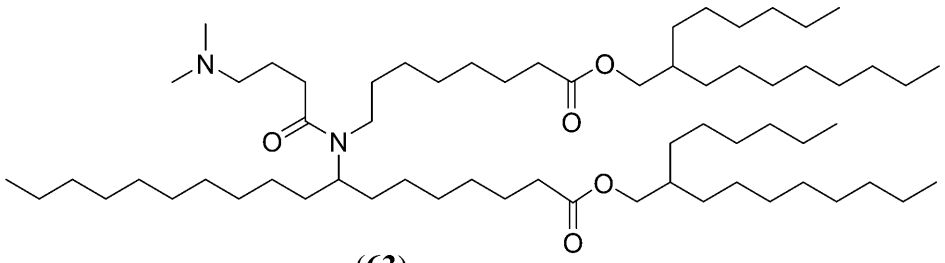


(**61**)

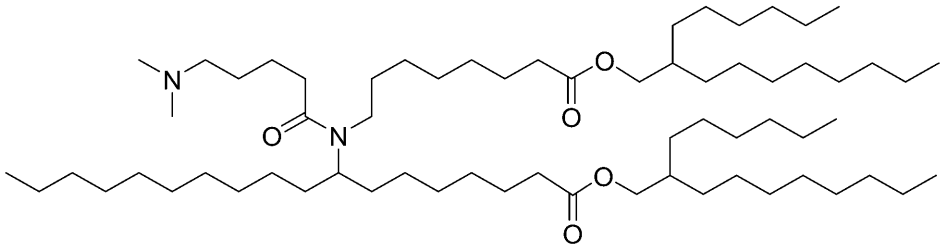


(**62**)

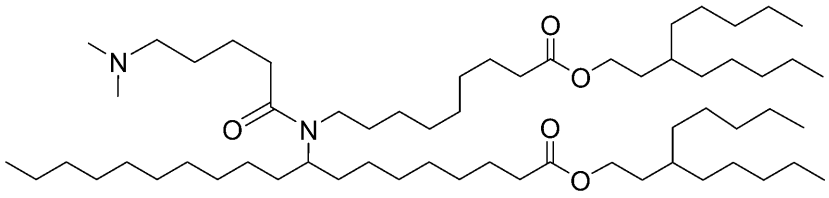
【化３４】



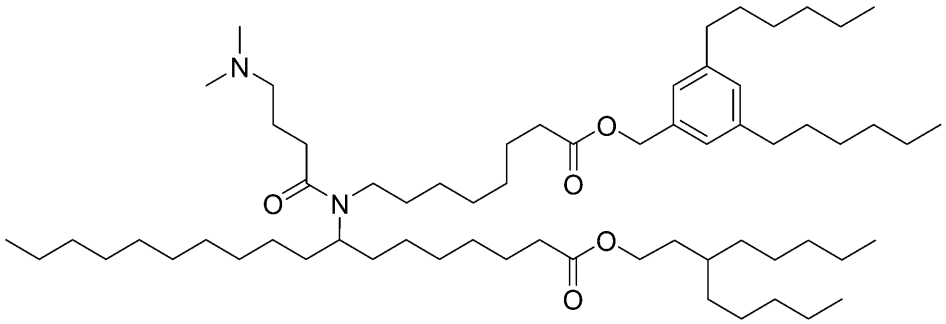
(63)



(64)

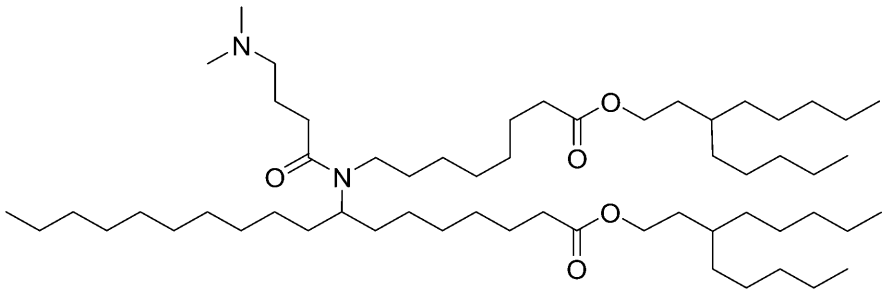


(65)

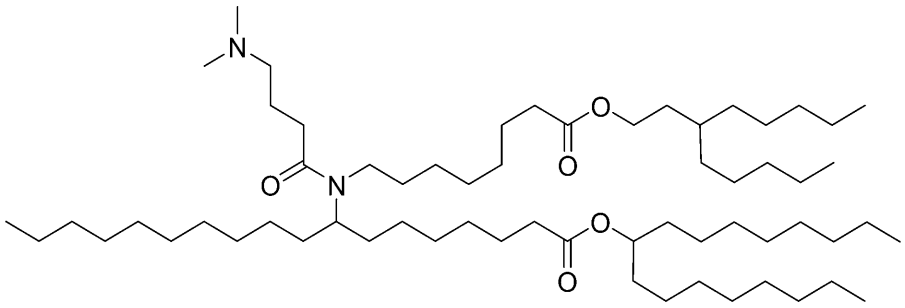


(66)

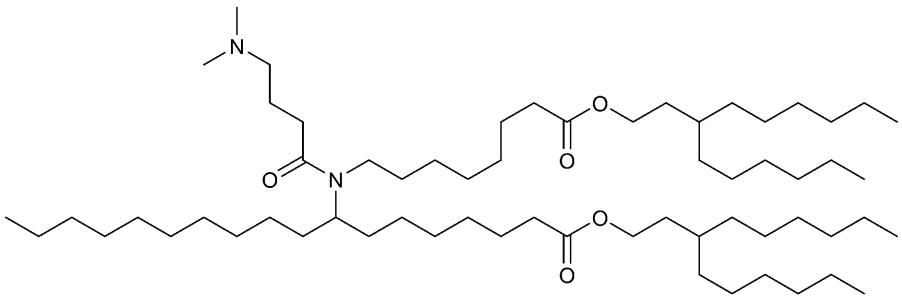
【化３５】



(**67**)

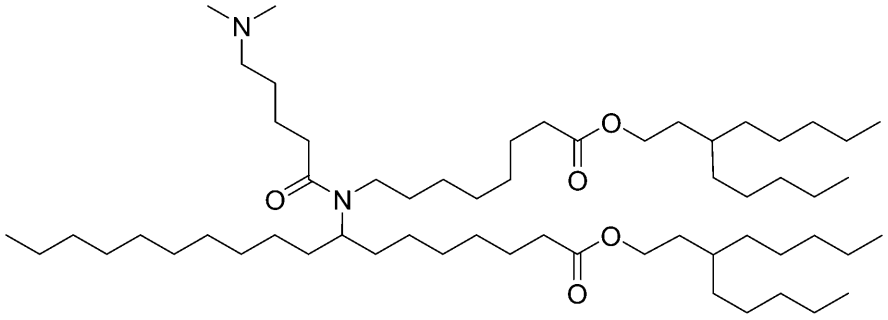


(**68**)

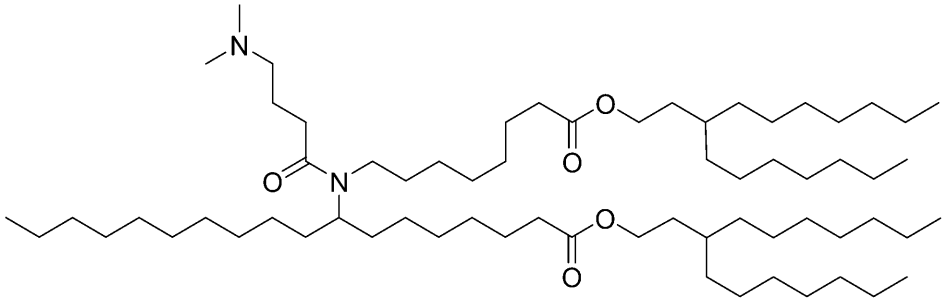


(**69**)

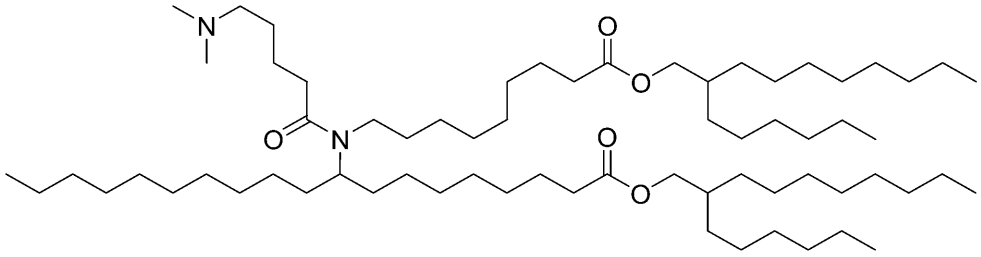
【化３６】



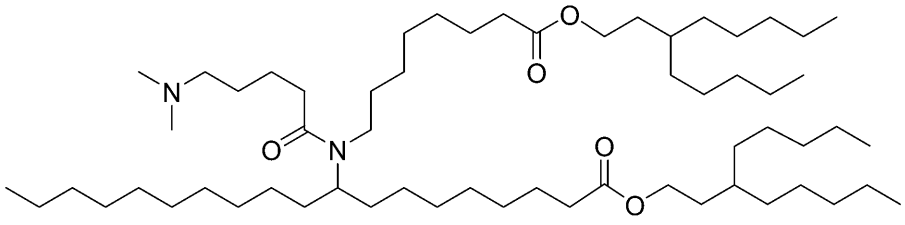
(70)



(71)

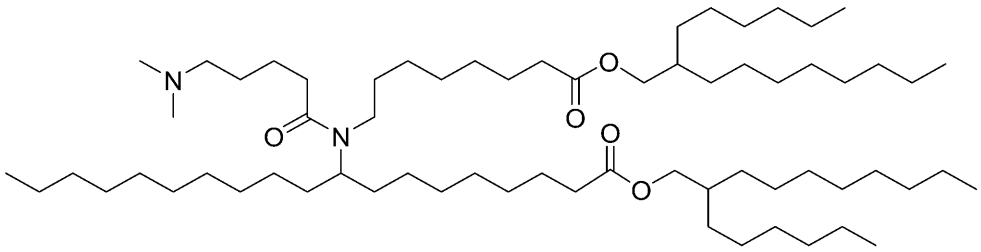


(72)

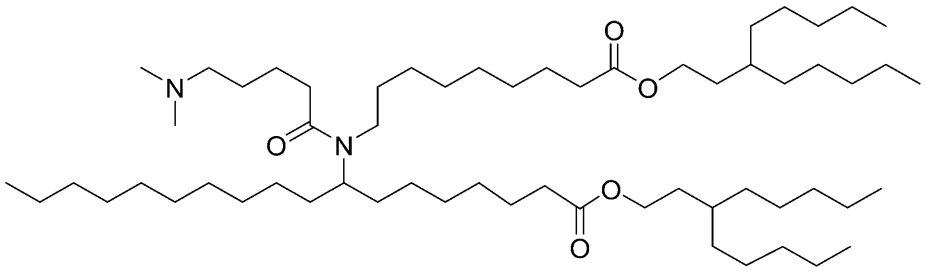


(73)

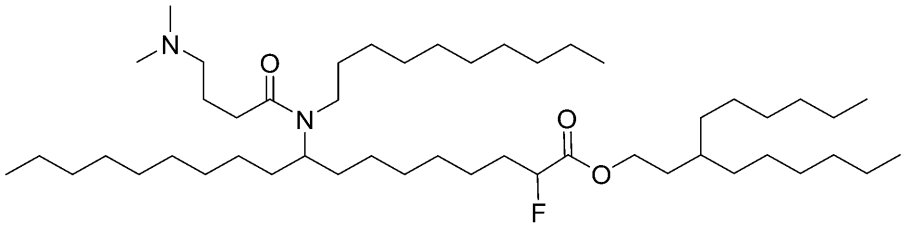
【化３７】



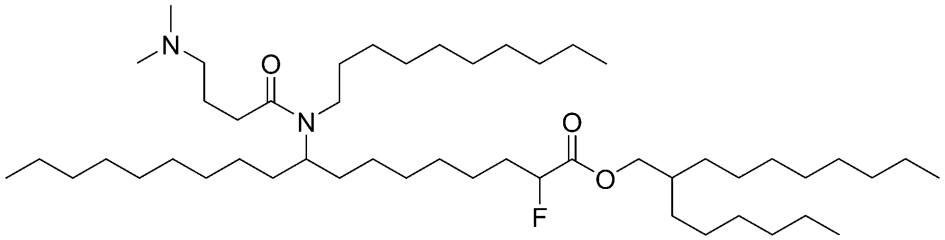
(74)



(75)

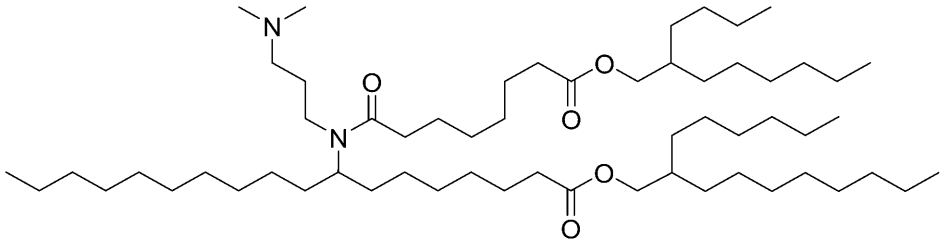


(76)

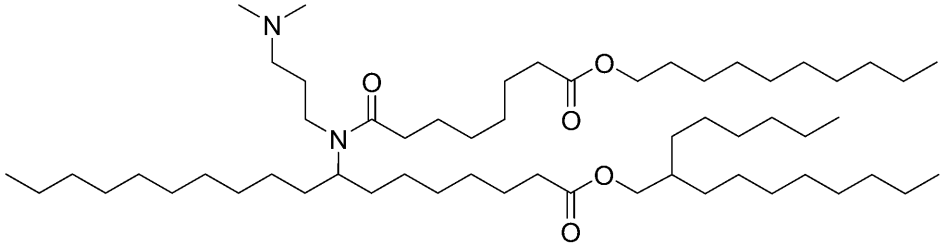


(77)

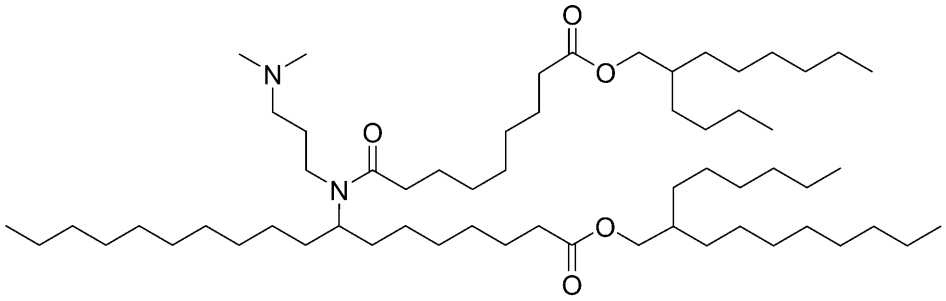
【化３８】



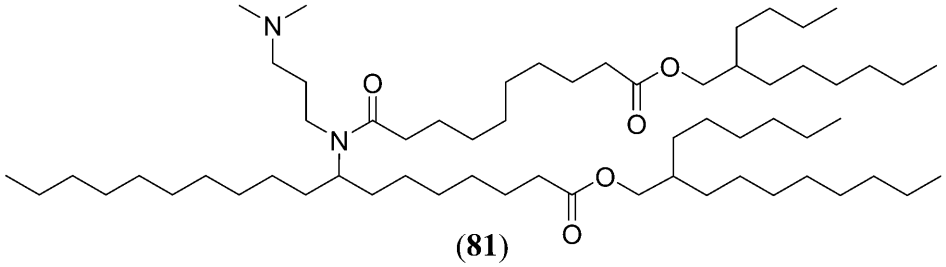
(78)



(79)

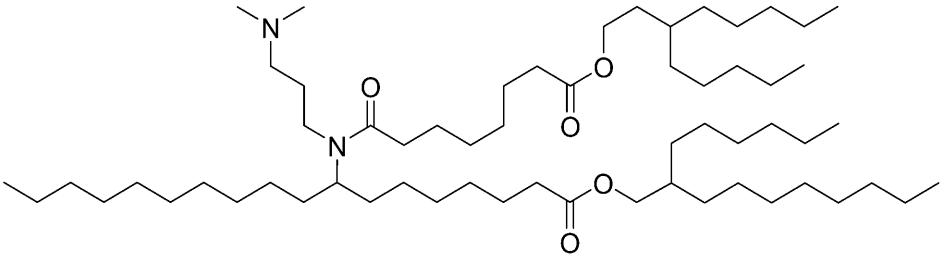


(80)

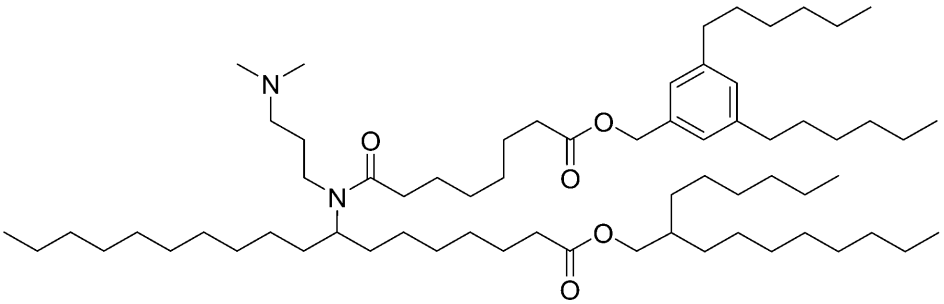


(81)

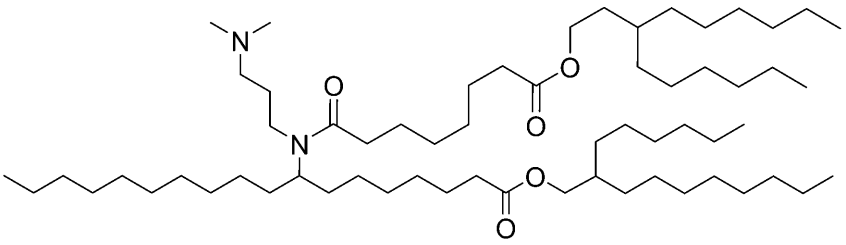
【化３９】



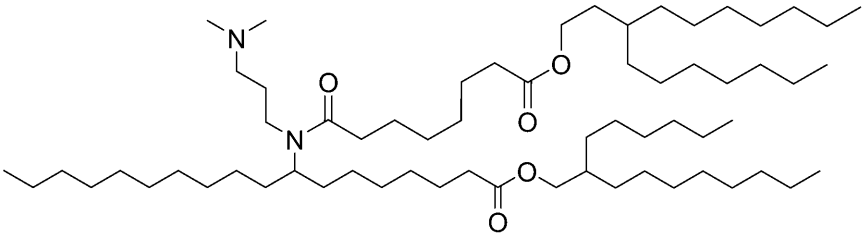
(**82**)



(**83**)

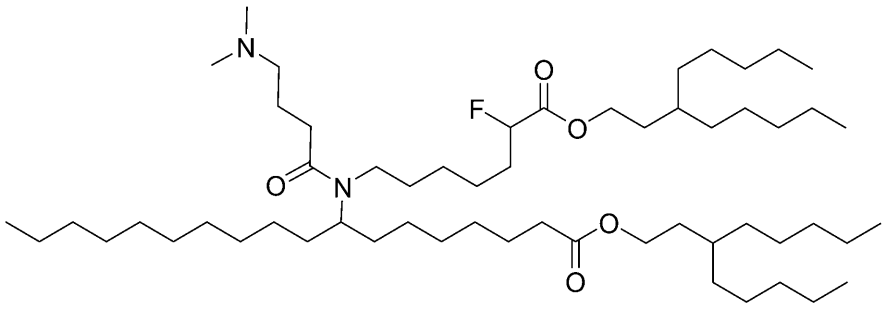


(**84**)

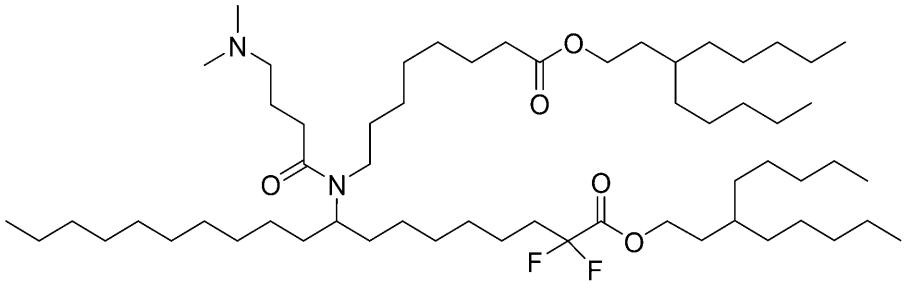


(**85**)

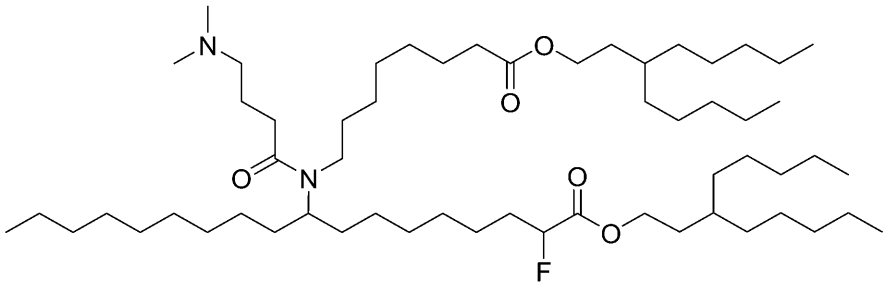
【化４０】



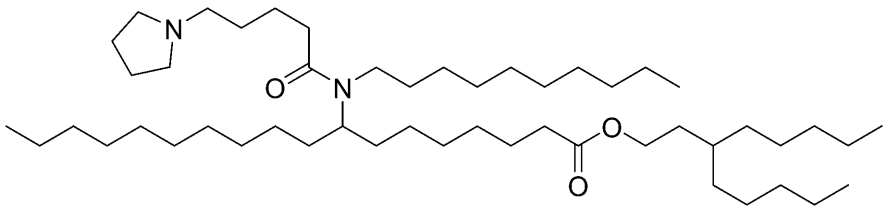
(**86**)



(**87**)

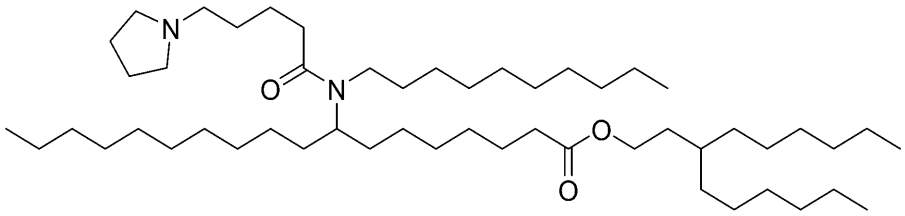


(**88**)

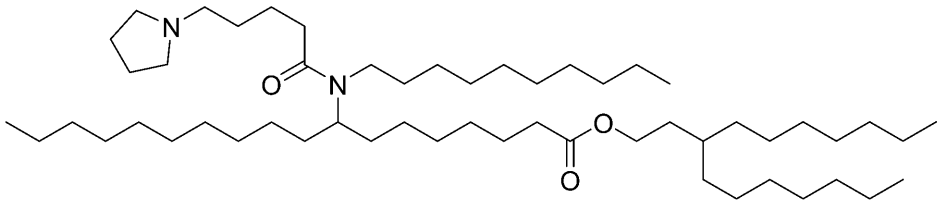


(**89**)

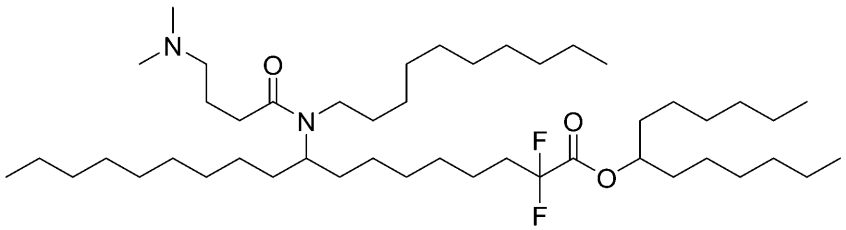
【化４１】



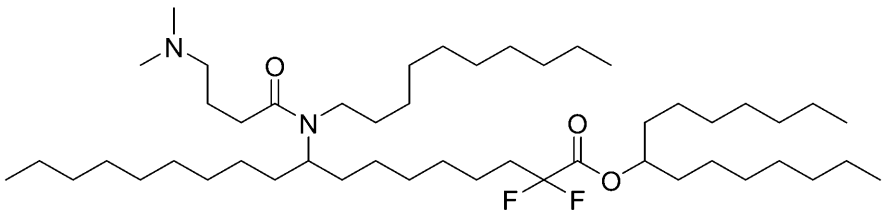
(**90**)



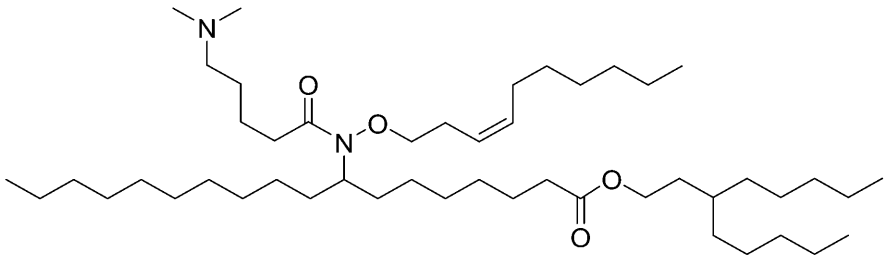
(**91**)



(**92**)

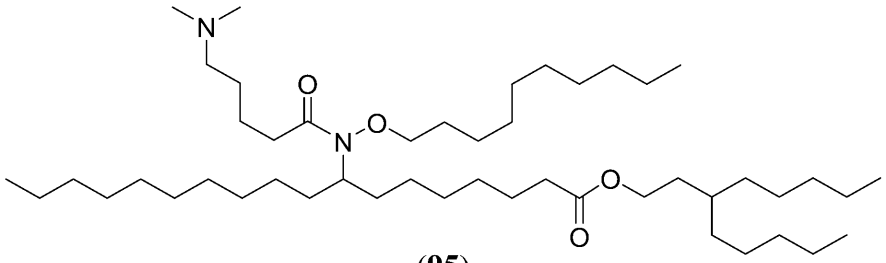


(**93**)

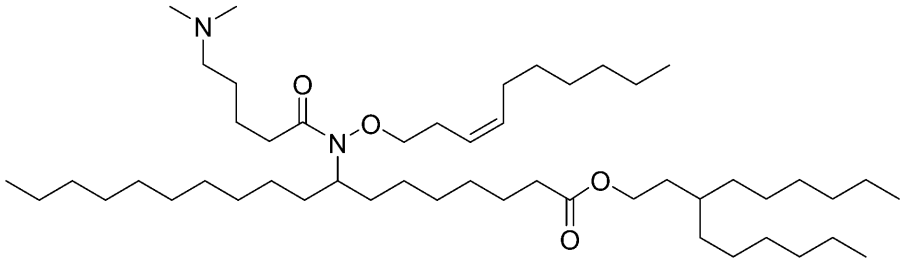


(**94**)

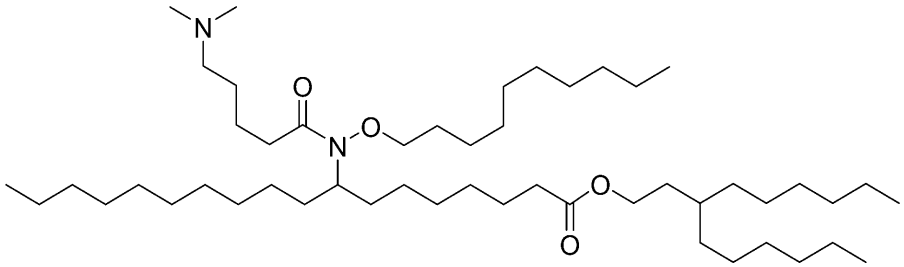
【化４２】



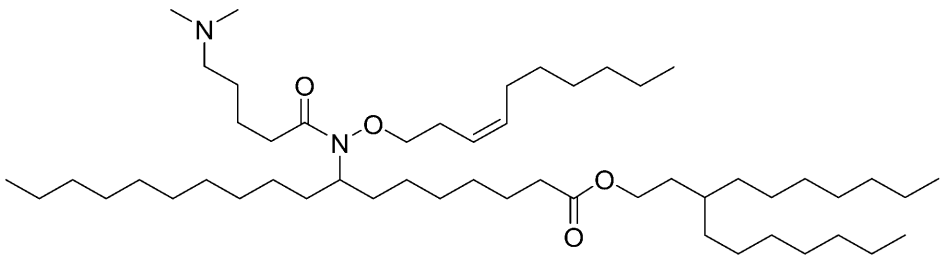
(**95**)



(**96**)

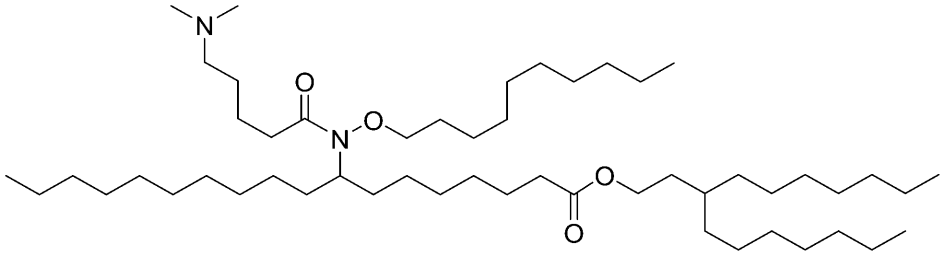


(**97**)

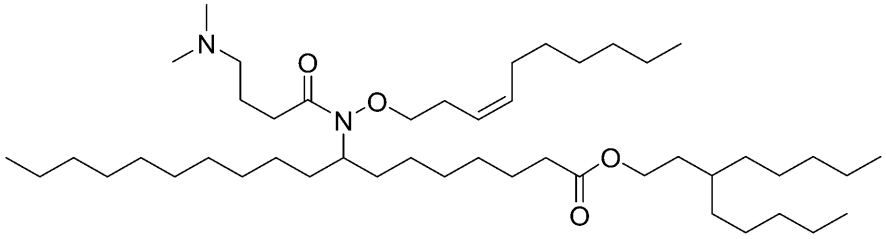


(**98**)

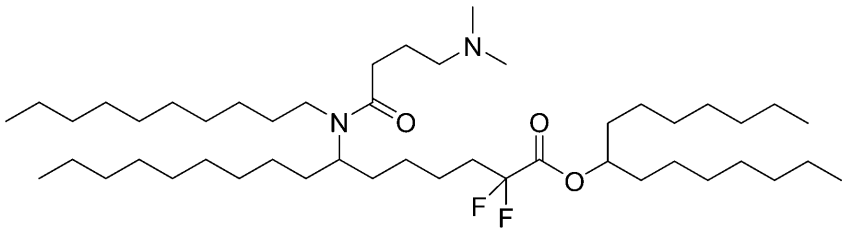
【化４３】



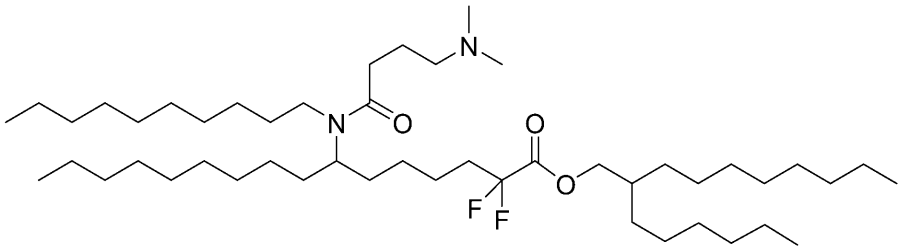
(**99**)



(**100**)

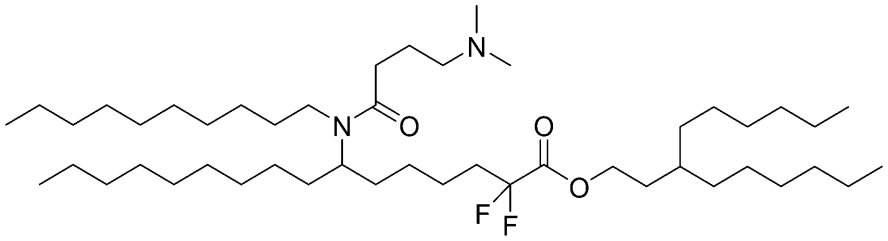


(**101**)

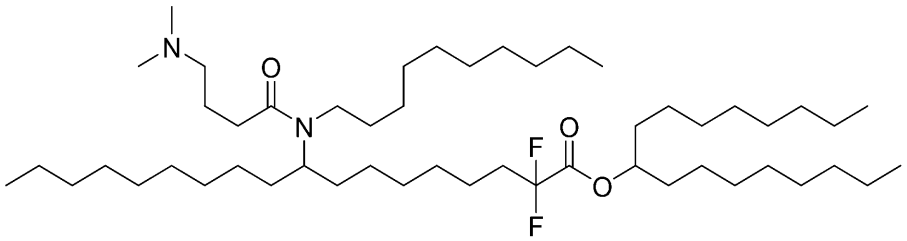


(**102**)

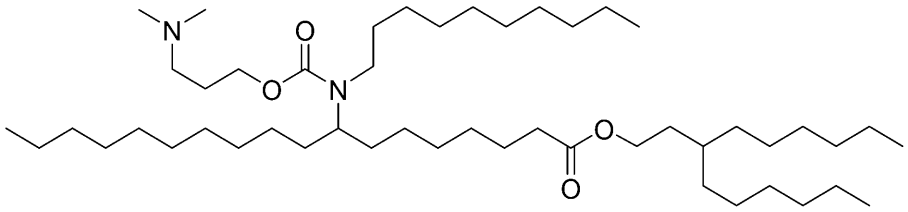
【化４４】



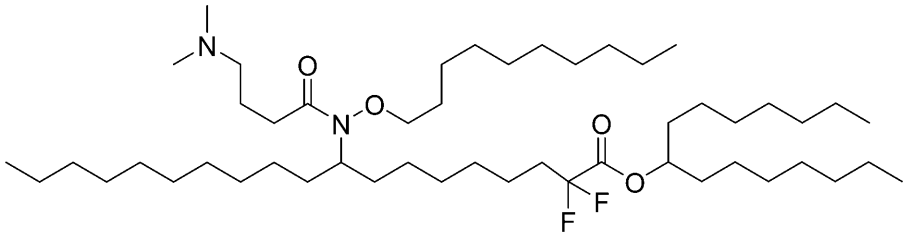
(103)



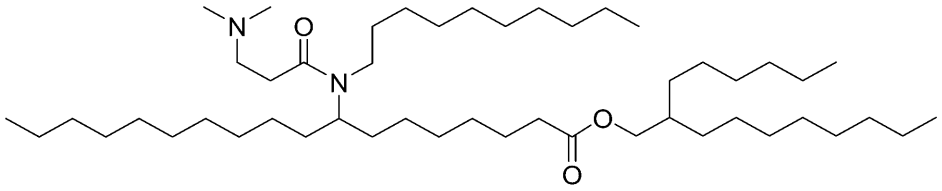
(104)



(105)

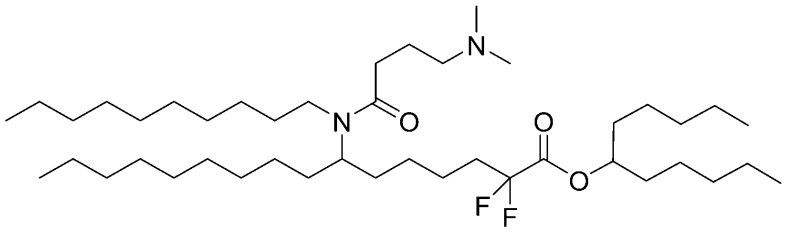


(106)

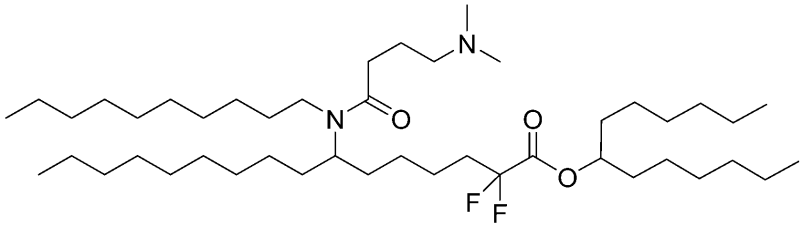


(107)

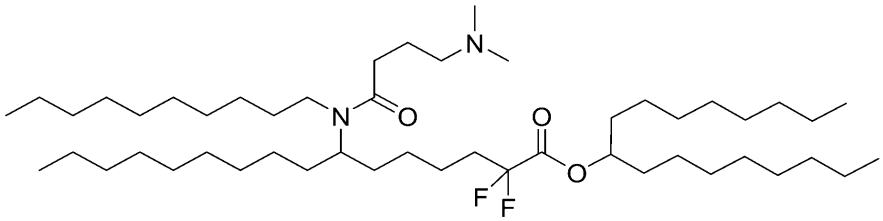
【化４５】



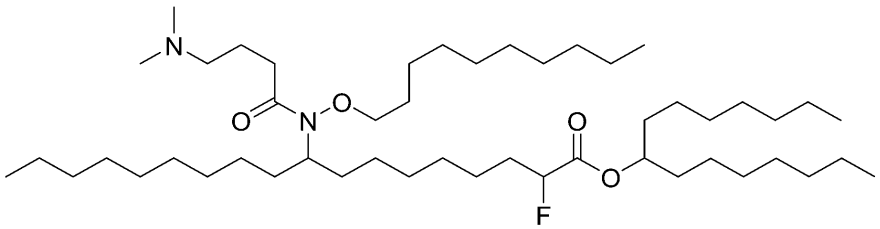
(108)



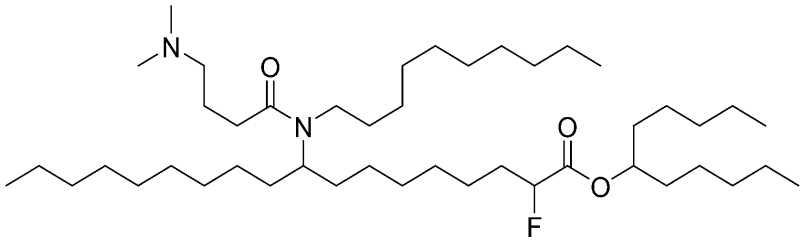
(109)



(110)

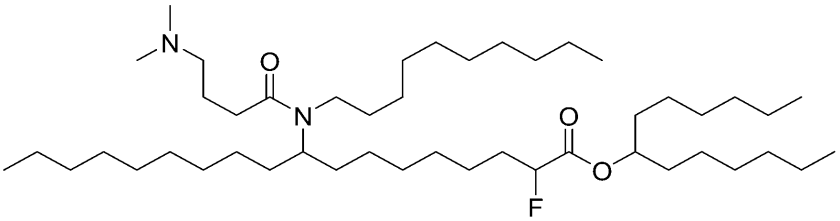


(111)

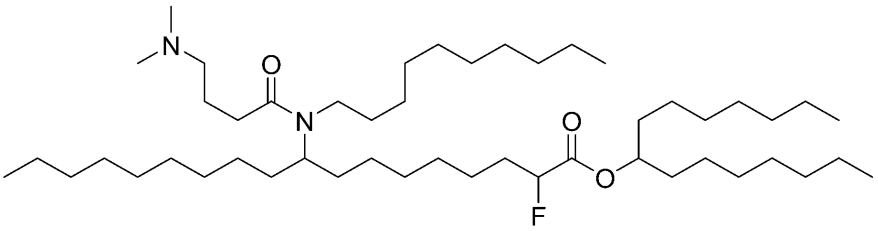


(112)

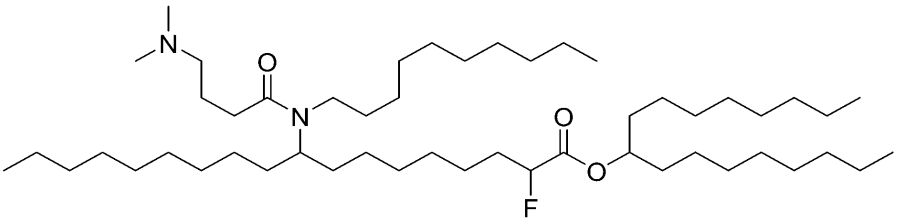
【化４６】



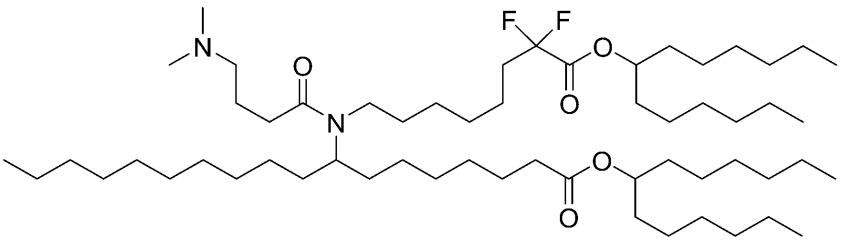
(113)



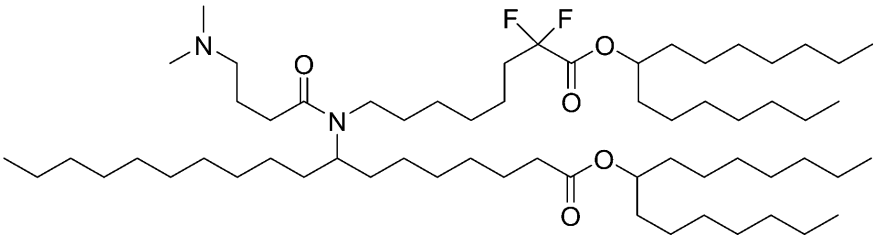
(114)



(115)

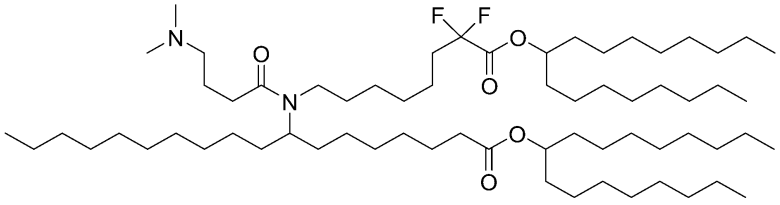


(116)

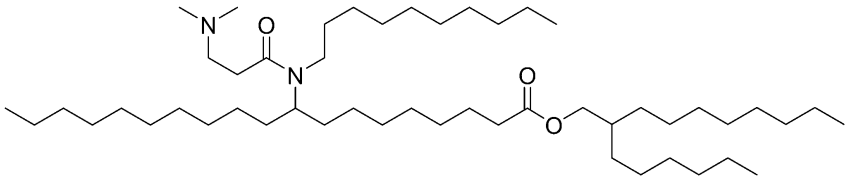


(117)

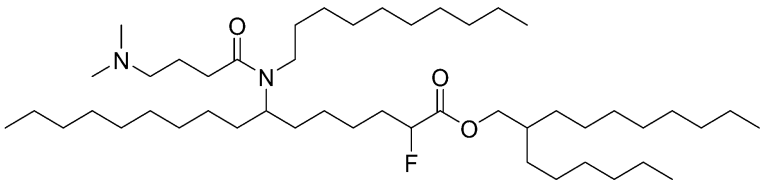
【化４７】



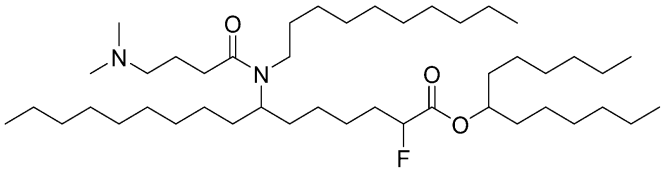
(118)



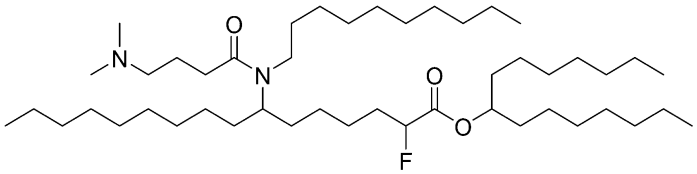
(119)



(120)

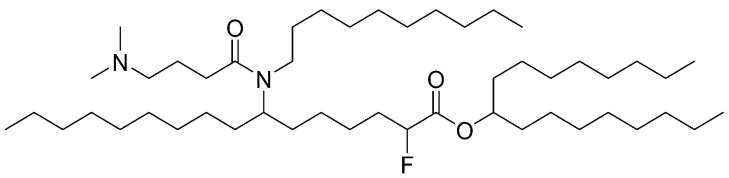


(121)



(122)

及び

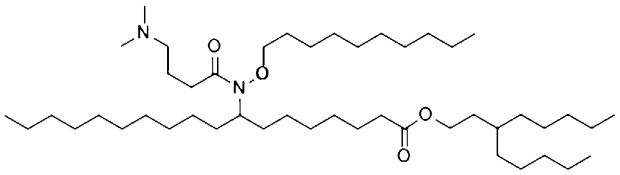


(123)

またはそれらの塩から成る群から選択される、化合物。

【請求項９６】

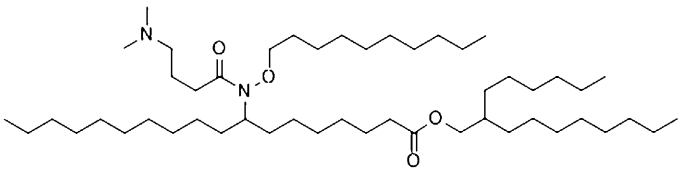
【化４８】



またはその塩である、請求項１に記載の化合物または塩。

【請求項９７】

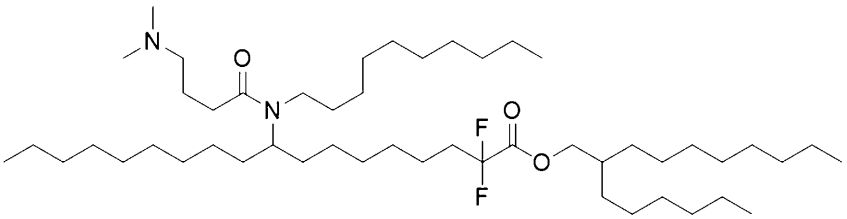
【化４９】



またはその塩である、請求項１に記載の化合物または塩。

【請求項９８】

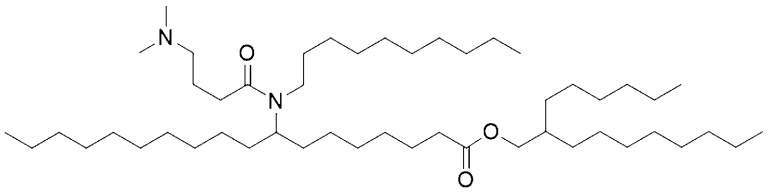
【化５０】



またはその塩である、請求項１に記載の化合物または塩。

【請求項９９】

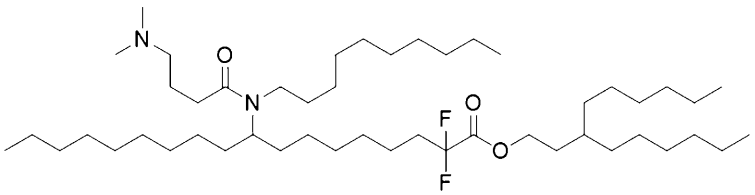
【化５１】



またはその塩である、請求項１に記載の化合物または塩。

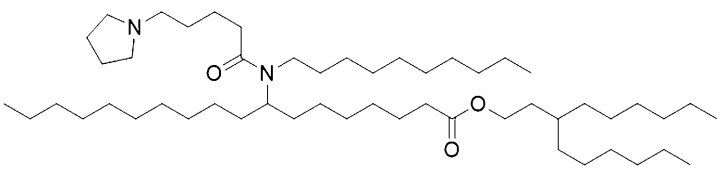
【請求項１００】

【化５２】

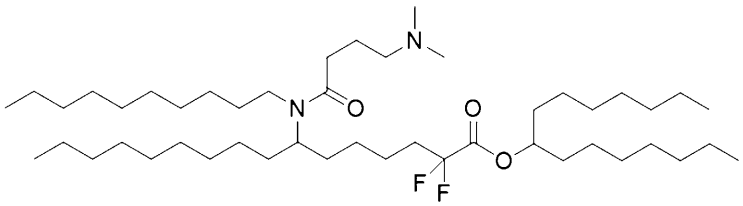


またはその塩である、請求項１に記載の化合物または塩。

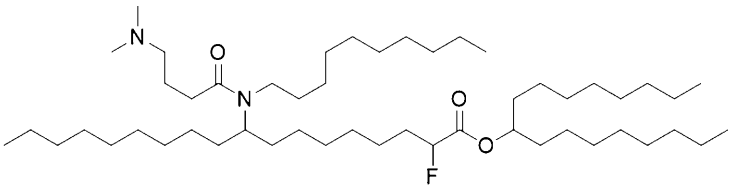
【請求項１０１】
【化５３】



またはその塩である、請求項１に記載の化合物または塩。
【請求項１０２】
【化５４】



またはその塩である、請求項１に記載の化合物または塩。
【請求項１０３】
【化５５】



またはその塩である、請求項１に記載の化合物または塩。
【請求項１０４】
核酸－脂質粒子であって、
（ａ）１つまたは複数の核酸分子；
（ｂ）非カチオン性脂質；
（ｃ）複合脂質；および
（ｄ）請求項１～１０３のいずれか１項に記載の化合物または塩
を含み、前記１つまたは複数の核酸分子が脂質粒子内に封入されている、前記核酸－脂質粒子。
【請求項１０５】
前記化合物または塩が前記粒子中に存在する総脂質の約３０ｍｏｌ％～約８５ｍｏｌ％を構成し；前記非カチオン性脂質が前記粒子中に存在する総脂質の約１３ｍｏｌ％～約４９．５ｍｏｌ％を構成し；前記複合脂質が前記粒子中に存在する総脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を構成する、請求項１０４に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１０６】
前記化合物または塩が前記粒子中に存在する総脂質の約３０ｍｏｌ％～約８５ｍｏｌ％を構成し；前記非カチオン性脂質が前記粒子中に存在する総脂質の約１３ｍｏｌ％～約４９．５ｍｏｌ％を構成し；前記複合脂質が前記粒子中に存在する総脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を構成する、請求項１０４に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１０７】

前記核酸が、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、ダイサー基質ｄｓＲＮＡ、低分子ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、非対称干渉ＲＮＡ（ａｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ウイルスＲＮＡ（ｖＲＮＡ）、自己増幅ＲＮＡ、およびこれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項１０４～１０６のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１０８】

前記核酸がｍＲＮＡ分子である、請求項１０７に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１０９】

前記核酸が二本鎖ｓｉＲＮＡ分子を含む、請求項１０７に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１１０】

前記二本鎖ｓｉＲＮＡ分子が少なくとも１つの修飾されたヌクレオチドを含む、請求項１０９に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１１１】

前記ｓｉＲＮＡが少なくとも１つの２’－Ｏ－メチル（２’ＯＭｅ）ヌクレオチドを含む、請求項１１０に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１１２】

前記非カチオン性脂質がコレステロールまたはその誘導体を含む、請求項１０４～１１１のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１１３】

前記コレステロールまたはその誘導体が、前記粒子中に存在する総脂質の約３１．５ｍｏｌ％～約４２．５ｍｏｌ％を構成する、請求項１１２に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１１４】

前記非カチオン性脂質がリン脂質を含む、請求項１０４～１１１のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１１５】

前記非カチオン性脂質がリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含む、請求項１０４～１１１のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１１６】

前記リン脂質が、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）、またはそれらの混合物を含む、請求項１１５に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１１７】

前記リン脂質が、前記粒子中に存在する総脂質の約４ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を構成し、前記コレステロールが、前記粒子中に存在する総脂質の約３０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％を構成する、請求項１１５に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１１８】

前記リン脂質が、前記粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％を構成し、前記コレステロールが、前記粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％を構成する、請求項１１５に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１１９】

前記複合脂質が、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）－脂質複合物を含む、請求項１０４～１１８のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１２０】

前記ＰＥＧ－脂質複合物が、ＰＥＧ－ジアシルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＡＧ）複合物、ＰＥＧ－ジアルキルオキシプロピル（ＰＥＧ－ＤＡＡ）複合物、またはこれらの混合物を含む、請求項１１９に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１２１】

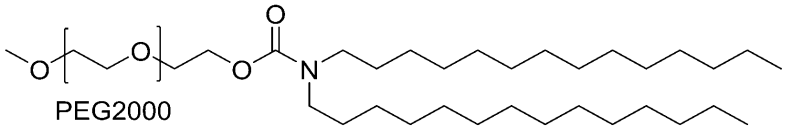
前記ＰＥＧ－ＤＡＡ複合物が、ＰＥＧ－ジミリスチルオキシプロピル（ＰＥＧ－ＤＭＡ）複合物、ＰＥＧ－ジステアリルオキシプロピル（ＰＥＧ－ＤＳＡ）複合物、またはそれらの混合物を含む、請求項１２０に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１２２】
前記ＰＥＧ－ＤＡＡ複合物が、ＰＥＧ－ジミリスチルオキシプロピル（ＰＥＧ－ＤＭＡ）複合物を含む、請求項１２０に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１２３】
前記ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）－脂質複合物が、式：

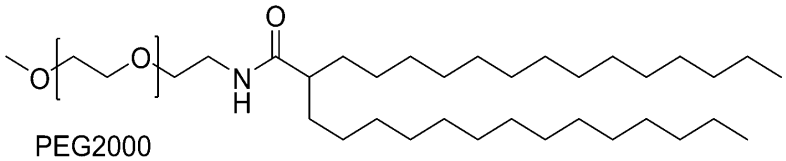
Ａ－Ｂ－Ｃ

の化合物またはその塩であり、式中、
Ａは、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシ、（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）アルケニル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）アルキニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシカルボニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキルチオ、もしくは（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）アルカノイルオキシであり、ここで、任意の（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシ、（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）アルケニル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）アルキニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシカルボニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキルチオ、および（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）アルカノイルオキシは、１つまたは複数のアニオン前駆体基で置換されており、かつここで、任意の（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシ、（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）アルケニル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）アルキニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシカルボニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキルチオ、および（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）アルカノイルオキシは、任意で、ハロ、ヒドロキシル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_3$）アルコキシ、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_3$）アルコキシカルボニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_3$）アルキルチオ、もしくは（Ｃ$_2$－Ｃ$_3$）アルカノイルオキシから成る群から独立して選択される１つまたは複数の基で置換されており、
Ｂは、約５５０ダルトン～約１０，０００ダルトンの分子量を有するポリエチレングリコール鎖であり、
Ｃは、－Ｌ－Ｒ^{a}であり、
Ｌは、直接結合、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^b－、－ＮＲ^b－、－Ｃ（Ｏ）－、－ＮＲ^{b}Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＮＲ^{b}Ｃ（Ｏ）ＮＲ^b－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｏ－、－（Ｏ）ＣＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ（Ｏ）－、および－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ（Ｏ）ＮＨ－から成る群から選択され、
Ｒ^{a}は、分枝状（Ｃ$_{10}$－Ｃ$_{50}$）アルキルもしくは分枝状（Ｃ$_{10}$－Ｃ$_{50}$）アルケニルであり、ここで、前記分枝状（Ｃ$_{10}$－Ｃ$_{50}$）アルキルもしくは分枝状（Ｃ$_{10}$－Ｃ$_{50}$）アルケニルの１つまたは複数の炭素原子は、－Ｏ－で置換されており、
各Ｒ^{b}は独立してＨまたは（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキルである、請求項１１９に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１２４】
前記ＰＥＧが約２，０００ダルトンの平均分子量を有する、請求項１０４～１２３のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１２５】
前記複合脂質が、

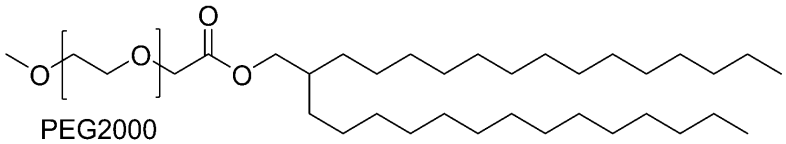
【化５６】



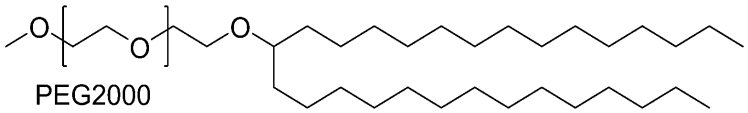
;



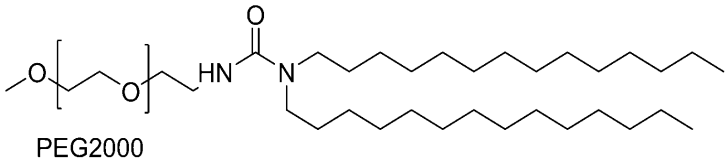
;



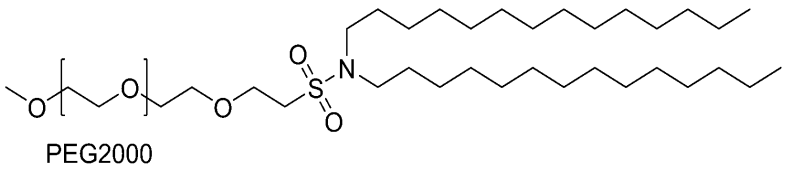
;



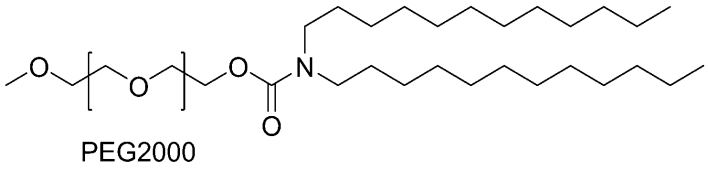
;



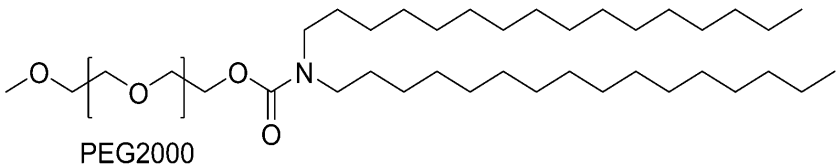
;



;



; 及び



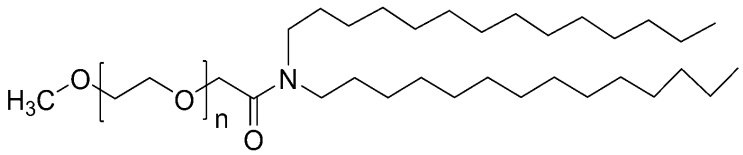
;

またはそれらの塩から選択されるＰＥＧ－脂質複合物を含む、請求項１０４～１１８のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１２６】

前記複合脂質が以下の式：

【化５７】



の化合物を含み、
式中、ｎは４５～５０である、請求項９３～１０７のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１２７】
前記複合脂質が、前記粒子中に存在する総脂質の約１ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％を構成する、請求項１０４～１２６のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１２８】
前記核酸－脂質粒子における前記核酸が、血清中にて前記粒子を３７℃で３０分間インキュベートした後に実質的に分解されない、請求項１０４～１２７のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１２９】
前記核酸が、前記核酸－脂質粒子内に完全に封入される、請求項１０４～１２８のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１３０】
前記核酸－脂質粒子が約５～約１５の脂質：核酸の質量比を有する、請求項１０４～１２９のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１３１】
前記核酸－脂質粒子が約５～約３０の脂質：核酸の質量比を有する、請求項１０４～１２９のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１３２】
前記核酸－脂質粒子が、約４０ｎｍ～約１５０ｎｍの中位径を有する、請求項１０４～１３１のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１３３】
前記化合物または塩が前記粒子中に存在する総脂質の約５６．５ｍｏｌ％～約６６．５ｍｏｌ％を構成し；前記非カチオン性脂質が前記粒子中に存在する総脂質の約３１．５ｍｏｌ％～約４２．５ｍｏｌ％を構成するコレステロールまたはその誘導体を含み；ＰＥＧ－脂質複合物が前記粒子中に存在する総脂質の約１ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％を構成する、請求項１０４に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１３４】
前記核酸－脂質粒子が、約６１．５ｍｏｌ％の化合物または塩と、約３６．９％のコレステロールまたはその誘導体と、約１．５ｍｏｌ％のＰＥＧ－脂質複合物とを含む、請求項１３３に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１３５】
前記化合物または塩が前記粒子中に存在する総脂質の約５２ｍｏｌ％～約６２ｍｏｌ％を構成し；前記非カチオン性脂質が前記粒子中に存在する総脂質の約３６ｍｏｌ％～約４７ｍｏｌ％を構成するリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含み；前記ＰＥＧ－脂質複合物が前記粒子中に存在する総脂質の約１ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％を構成する、請求項１０４に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１３６】
前記核酸－脂質粒子が、約５７．１ｍｏｌ％の化合物または塩と、約７．１％のリン脂質と、約３４．３ｍｏｌ％のコレステロールまたはその誘導体と、約１．４ｍｏｌ％のＰＥＧ－脂質複合物とを含む、請求項１３５に記載の核酸－脂質粒子。
【請求項１３７】

前記核酸－脂質粒子が、約５７．１ｍｏｌ％の化合物または塩と、約２０ｍｏｌ％のリン脂質と、約２０ｍｏｌ％のコレステロールまたはその誘導体と、約１．４ｍｏｌ％のＰＥＧ－脂質複合物とを含む、請求項１３５に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１３８】

前記化合物または塩が前記粒子中に存在する総脂質の５０ｍｏｌ％～６５ｍｏｌ％を構成し；前記非カチオン性脂質がリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含み、前記リン脂質は前記粒子中に存在する総脂質の４ｍｏｌ％～１０ｍｏｌ％を構成し、前記コレステロールまたはその誘導体は前記粒子中に存在する総脂質の３０ｍｏｌ％～４０ｍｏｌ％を構成し；前記複合脂質が前記粒子中に存在する総脂質の０．５ｍｏｌ％～２ｍｏｌ％を構成する、請求項１０４に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１３９】

前記化合物または塩が前記粒子中に存在する総脂質の５０ｍｏｌ％～６５ｍｏｌ％を構成し；前記非カチオン性脂質がリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含み、前記リン脂質は前記粒子中に存在する総脂質の３ｍｏｌ％～１５ｍｏｌ％を構成し、前記コレステロールまたはその誘導体は前記粒子中に存在する総脂質の３０ｍｏｌ％～４０ｍｏｌ％を構成し；前記複合脂質が前記粒子中に存在する総脂質の０．５ｍｏｌ％～２ｍｏｌ％を構成する、請求項１０４に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１４０】

前記化合物または塩が前記粒子中に存在する総脂質の５０ｍｏｌ％～６５ｍｏｌ％を構成し；前記非カチオン性脂質が前記粒子中に存在する総脂質の最大４９．５ｍｏｌ％を構成し；前記コレステロールまたはその誘導体が前記粒子中に存在する総脂質の３０ｍｏｌ％～４０ｍｏｌ％を構成し、前記複合脂質が前記粒子中に存在する総脂質の０．５ｍｏｌ％～２ｍｏｌ％を構成する、請求項１０４に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１４１】

前記化合物または塩が前記粒子中に存在する総脂質の５０ｍｏｌ％～８５ｍｏｌ％を構成し；前記非カチオン性脂質が前記粒子中に存在する総脂質の１３ｍｏｌ％～４９．５ｍｏｌ％を構成し；前記複合脂質が前記粒子中に存在する総脂質の０．５ｍｏｌ％～２ｍｏｌ％を構成する、請求項１０４に記載の核酸－脂質粒子。

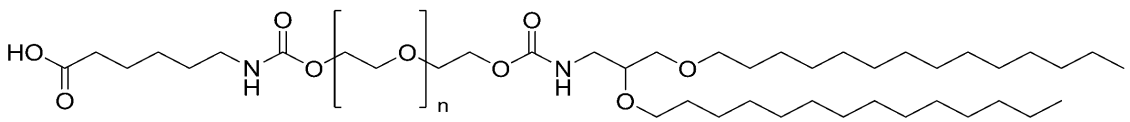
【請求項１４２】

前記化合物または塩が前記粒子中に存在する総脂質の約３０ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％を構成し；前記非カチオン性脂質が前記粒子中に存在する総脂質の約４７ｍｏｌ％～約６９ｍｏｌ％を構成するリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含み；前記複合脂質が前記粒子中に存在する総脂質の約１ｍｏｌ％～約３ｍｏｌ％を構成する、請求項１０４に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１４３】

前記非カチオン性脂質が、コレステロールとＤＳＰＣとの混合物を含み、前記複合脂質は、

【化５８】



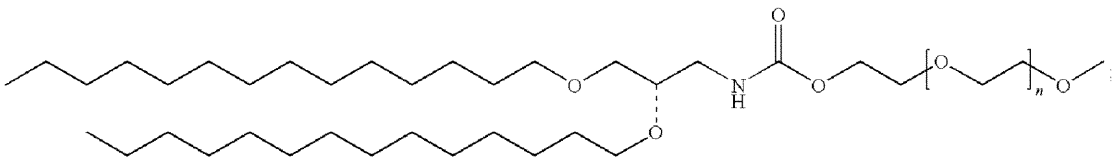
であり；式中、ｎは、得られるポリマー鎖が約２０００ダルトンの分子量を有するように選択され、

前記複合脂質は前記粒子中に存在する総脂質の約２ｍｏｌ％を構成し；前記ＤＳＰＣは前記粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％を構成し；コレステロールは前記粒子中に存在する総脂質の約４８ｍｏｌ％を構成し、前記化合物または塩は前記粒子中に存在する総脂質の約４０ｍｏｌ％を構成する、請求項１０４に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１４４】

前記非カチオン性脂質が、コレステロールとＤＳＰＣとの混合物を含み；前記複合脂質は、

【化５９】



(PEG-C-DMA)

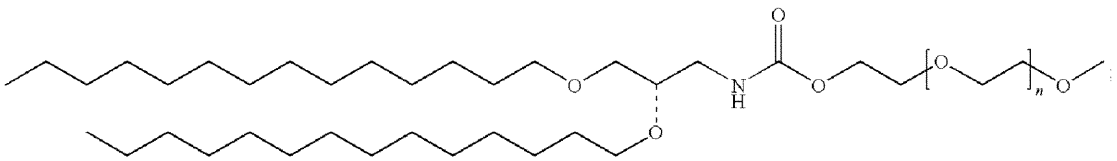
であり、式中、ｎは得られるポリマー鎖が約２０００ダルトンの分子量を有するように選択され；

前記複合脂質は前記粒子中に存在する総脂質の約２ｍｏｌ％を構成し；前記ＤＳＰＣは前記粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％を構成し；コレステロールは前記粒子中に存在する総脂質の約４８ｍｏｌ％を構成し、前記化合物または塩は前記粒子中に存在する総脂質の約４０ｍｏｌ％を構成する、請求項１０４に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１４５】

前記非カチオン性脂質はコレステロールとＤＳＰＣとの混合物を含み；前記複合脂質は、

【化６０】



(PEG-C-DMA)

であり；式中、ｎは、得られるポリマー鎖が約２０００ダルトンの分子量を有するように選択され；

前記複合脂質は前記粒子中に存在する総脂質の約１．６ｍｏｌ％を構成し；前記ＤＳＰＣは前記粒子中に存在する総脂質の約１０．９ｍｏｌ％を構成し；コレステロールは前記粒子中に存在する総脂質の約３２．８ｍｏｌ％を構成し；前記化合物または塩は前記粒子中に存在する総脂質の約５４．９ｍｏｌ％を構成する、請求項１０４に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１４６】

前記脂質の核酸に対する比が約２４である、請求項１４２～１４５のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１４７】

請求項１～１０３のいずれかに記載の化合物または塩を２以上含む、請求項１０４～１４６のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子。

【請求項１４８】

請求項１０４～１４７のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項１４９】

細胞に核酸を導入する方法であって、

請求項１０４～１４７のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子または請求項１４８に記載の組成物に前記細胞を接触させることを含む、前記方法。

【請求項１５０】

前記細胞が哺乳類に存在する、請求項１４９に記載の方法。
【請求項１５１】
核酸を生体内送達する方法であって、
請求項１０４～１４７のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子または請求項１４８に記載の組成物を哺乳類対象に投与することを含む、前記方法。
【請求項１５２】
前記投与が、経口、鼻腔内、静脈内、腹腔内、筋肉内、関節内、病巣内、気管内、皮下、および皮内から成る群から選択される、請求項１５１に記載の方法。
【請求項１５３】
哺乳類への核酸の生体内送達に使用するための、請求項１０４～１４７のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子または請求項１４８に記載の組成物。
【請求項１５４】
哺乳類に核酸を生体内送達するために薬物を調製するための、請求項１０４～１４７のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子または請求項１４８に記載の組成物の使用。
【請求項１５５】
治療が必要な哺乳類対象にて疾患または障害を治療する方法であって、
請求項１０４～１４７のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子または請求項１４８に記載の組成物の治療有効量を前記哺乳類対象に投与することを含む、前記方法。
【請求項１５６】
前記疾患または障害が、ウイルス感染症、肝疾患または肝障害、およびがんから成る群から選択される、請求項１５５に記載の方法。
【請求項１５７】
哺乳類にて疾患または障害を治療するのに使用するための、請求項１０４～１４７のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子または請求項１４８に記載の組成物。
【請求項１５８】
哺乳類にて疾患または障害を治療するために薬物を調製するための、請求項１０４～１４７のいずれか１項に記載の核酸－脂質粒子または請求項１４８に記載の組成物の使用。
【発明の詳細な説明】
【関連出願の相互参照】
【０００１】
優先権
本出願は、２０２０年１月３１日に出願した米国仮特許出願第６３／３０５，１８１号に対する優先権を主張する。この米国仮特許出願の全内容は、参照によって本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
イオン化できるカチオン性脂質は通常、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の主要な脂質成分である。それらは、標準的な生理学的ｐＨ（約７）では電荷中性であるように設計されるが、さらに低い（酸性）ｐＨでは正電荷を獲得する。エンドソーム融合工程はイオン化できる脂質の正電荷を必要とするので、これはＬＮＰ形成時の核酸ペイロードの封入および細胞内送達に役立つ。
【０００３】
ＭＣ３（ＦＤＡ承認のｓｉＲＮＡ－ＬＮＰ製品Ｏｎｐａｔｔｒｏで使用）や３Ｄ－Ｐ－ＤＭＡのようなイオン化できる脂質は、種々の用途で優れた活性と忍容性を実証している。しかしながら、それらは急速に代謝されず、標的組織から排出されるまでに数週間かかる。このため、複数回の投与を必要とする用途、特に投与間隔が短い用途および／または慢性的な適応症での用途には、あまり適していない。
【０００４】
現在、核酸を送達する能力にて良好な活性を保持しながら、クリアランスの改善を示すイオン化できる脂質が求められている。有益な、または改善された生分解性を有するイオ

ン化できる脂質も必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

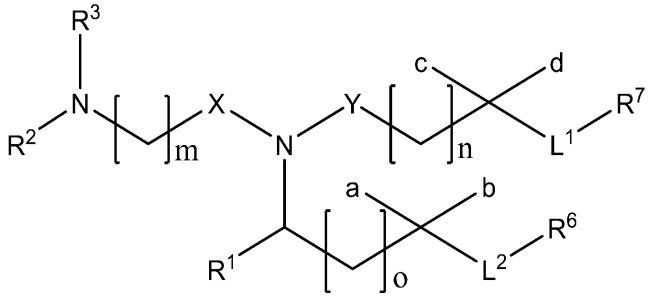
【０００５】

本発明は、生分解性および／またはクリアランス速度が改善されたイオン化できる脂質を提供する。

【０００６】

一実施形態では、本発明は、式（Ｉ）：

【化１】



（Ｉ）

の化合物、またはその塩であるイオン化できる脂質を提供するものであり、式中、

Ｘは－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）；または－Ｃ（＝Ｏ）－であり；

Ｙは－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－、－ＳＯ$_2$－、または－Ｃ（＝Ｏ）－であり；

Ｒ^{1}はＣ$_2$－Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；

Ｒ^{2}はＣ$_1$－Ｃ$_3$アルキルであり、Ｒ^{3}はＣ$_1$－Ｃ$_3$アルキルであり、またはＲ^{2}およびＲ^{3}はそれらが結合している窒素と一緒になってアジリジノ環、アゼチジノ環、またはピロリジノ環を形成し；

ｍは０、１、２、３、４、５、または６であり；

ｎは０～１５であり；

ｏは０～１５であり；

Ｌ^{1}は存在しない、－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｒ^4）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－Ｎ＝Ｃ（Ｒ^4）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｒ^4）（Ｒ^5）－、－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｒ^z、または、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－Ｒ^w－であり；

Ｌ^{2}は存在しない、－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｒ$^{4'}$）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－Ｎ＝Ｃ（Ｒ$^{4'}$）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｒ$^{4'}$）（Ｒ$^{5'}$）－、－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｒ$^{z'}$、または、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－Ｒ^x－であり；

ａはＨまたはＦであり；

ｂはＨまたはＦであり；

ｃはＨまたはＦであり；ｄはＨまたはＦであり；またはｃとｄはそれらが結合している炭素と一緒になって－Ｃ（＝Ｏ）－を形成し；

Ｒ^{4}はＨまたはＣ$_2$－Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；

Ｒ^{5}はＨまたはＣ$_2$－Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；

Ｒ$^{4'}$はＨまたはＣ$_2$－Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；

Ｒ$^{5'}$はＨまたはＣ$_2$－Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；

Ｒ^{6}はＣ$_2$－Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；

Ｒ^{7}はＣ$_2$－Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；

Ｒ^{w}は存在しない、－Ｃ（Ｆ）Ｈ－、または－Ｃ（Ｆ）$_2$－であり；

Ｒ^{x}は存在しない、－Ｃ（Ｆ）Ｈ－、または－Ｃ（Ｆ）$_2$－であり；

Ｒ^{z}はＣ$_2$－Ｃ$_{10}$ヒドロカルビルから独立して選択される１、２、または３の基で置換されたフェニルであり；

$R^{z'}$はＣ$_2$－Ｃ$_{10}$ヒドロカルビルから独立して選択される１、２、または３の基で置換されたフェニルである。

【０００７】

本発明はまた、１）本発明のイオン化できる脂質と、２）活性剤または治療剤とを含む組成物も提供する。

【０００８】

本発明はまた、本発明のイオン化できる脂質を含む脂質ナノ粒子も提供する。

【０００９】

本発明はまた、（ａ）１つまたは複数の活性剤または治療剤と；（ｂ）本発明のイオン化できる脂質と；（ｃ）非カチオン性脂質と；（ｄ）複合脂質とを含む脂質ナノ粒子も提供する。通常、１つまたは複数の薬剤は脂質ナノ粒子内に封入される。

【００１０】

本発明はまた、１）本発明のイオン化できる脂質と、２）１つまたは複数の活性剤または治療剤とを含む医薬組成物も提供する。

【００１１】

本発明はまた、本発明の脂質ナノ粒子と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物も提供する。

【００１２】

本発明はまた、本発明のナノ粒子を動物に投与することを含む、活性剤または治療剤（例えば、核酸）を動物に送達する方法も提供する。

【００１３】

本発明はまた、生体内、生体外または試験管内で本明細書に記載されている核酸－脂質粒子に細胞を接触させることを含む、細胞に核酸を導入する方法を提供する。

【００１４】

本発明はまた、治療有効量の本明細書に記載されている核酸－脂質粒子を動物に投与することを含む、動物にて疾患または障害を治療する方法を提供する。

【００１５】

本発明はまた、本発明の化合物、製剤、またはナノ粒子を作製するのに有用である、本明細書に開示されているプロセスおよび中間体も提供する。

【発明を実施するための形態】

【００１６】

定義

本明細書で使用されるとき、以下の用語は、別途特定されない限り、以下に定める意味を有する。

【００１７】

本明細書で使用されるとき、「ヒドロカルビル」という用語は、炭素および水素から選択される約４～約５００の原子から成る有機化合物またはラジカルを説明する。特定の具体的なヒドロカルビル部分は、指定された数の炭素原子を有し、例えば、Ｃ$_2$－Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルは、不飽和度に応じて、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、または２５の炭素原子と最大５２の水素原子を有する炭化水素である。ヒドロカルビル部分には限定しないで、分岐または非分岐アルキル、分岐または非分岐アルケニル、分岐または非分岐アルキニル、シクロアルキル、およびアリールの部分が挙げられる。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約４～約４００の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約４～約３００の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約４～約２００の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約４～約１００の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約４～約６２の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約２０～約５００の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは

炭素および水素から選択される約２０～約４００の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約２０～約３００の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約２０～約２００の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約２０～約１００の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約２０～約６２の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約４０～約５００の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約４０～約４００の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約４０～約３００の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約４０～約２００の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約４０～約１００の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは炭素および水素から選択される約４０～約６２の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは、炭素および水素から選択される少なくとも約２０、少なくとも約４０、少なくとも約６０、または少なくとも約８０の原子から成る。一実施形態では、ヒドロカルビルは、炭素および水素から選択される約５００未満、約４００未満、約３００未満、約２００未満、または約１００未満の原子から成る。

【００１８】

「アルキル」という用語は、別段の記載のない限り、それ自体で、または別の置換基の一部として、示されている数の炭素原子を有する（すなわち、C_{1-8}は１～８の炭素を意味する）直鎖または分岐鎖の炭化水素ラジカルを意味する。例には、（C_1－C_8）アルキル、（C_2－C_8）アルキル、C_1－C_6）アルキル、（C_2－C_6）アルキルおよび（C_3－C_6）アルキルが挙げられる。アルキル基の例には、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｔ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル、ｎ－オクチル、および高級同族体および異性体が挙げられる。

【００１９】

「アルケニル」という用語は、１つまたは複数（例えば、１、２、３、または４）の二重結合を有する不飽和アルキルラジカルを指す。そのような不飽和アルキル基の例には、ビニル、２－プロペニル、クロチル、２－イソペンテニル、２－（ブタジエニル）、２，４－ペンタジエニル、３－（１，４－ペンタジエニル）、および高級同族体および異性体が挙げられる。

【００２０】

「アルキニル」という用語は、１つまたは複数（例えば、１、２、３、または４）の三重結合を有する不飽和アルキルラジカルを指す。そのような不飽和アルキル基の例には、エチニル、１－および３－プロピニル、３－ブチニル、および高級同族体および異性体が挙げられる。

【００２１】

「アルコキシ」という用語は、酸素原子（「オキシ」）を介して分子の残りの部分に連結されるアルキル基を指す。

【００２２】

「アルキルチオ」という用語は、チオ基を介して分子の残りの部分に連結されるアルキル基を指す。

【００２３】

「シクロアルキル」という用語は、３～８の炭素原子を有する飽和または部分不飽和（非芳香族）のあらゆる炭素環（すなわち、（C_3－C_8）炭素環）を指す。この用語には、すべて炭素である飽和複数縮合環系（例えば、炭素環を２個、３個または４個含む環系）も含まれる。したがって、炭素環には、二環式の炭素環（例えば、ビシクロ［３．１．０］ヘキサンおよびビシクロ［２．１．１］ヘキサンなど、約３～１５個の炭素原子、約６～１５個の炭素原子または６～１２個の炭素原子を有する二環式の炭素環）、ならびに

多環式の炭素環（例えば、最大で約２０個の炭素原子を有する三環式および四環式の炭素環）のような多環式の炭素環が含まれる。複数縮合環系の環は、価数の要件が許す場合、縮合結合、スピロ結合および架橋結合を介して、互いに連結できる。例えば、多環式の炭素環は、単一の炭素原子を介して互いに連結して、スピロ結合を形成するか（例えば、スピロペンタン、スピロ［４，５］デカンなど）、隣接する２個の炭素原子を介して互いに連結して、縮合結合を形成するか（例えば、デカヒドロナフタレン、ノルサビナン、ノルカランのような炭素環）、または２個の非隣接炭素原子を介して互いに連結して、架橋結合を形成する（例えば、ノルボルナン、ビシクロ［２．２．２］オクタンなど）ことができる。シクロアルキルの非限定的な例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、ビシクロ［２．２．１］ヘプタン、ピナンおよびアダマンタンが挙げられる。

【００２４】

「アリール」という用語は、本明細書で使用されるとき、単一の全炭素芳香族環、または環の少なくとも１つが芳香族である複数の縮合全炭素環系を指す。例えば、特定の実施形態では、アリール基は、６～２０の炭素原子、６～１４の炭素原子、６～１２の炭素原子または６～１０の炭素原子を有する。アリールにはフェニルラジカルが含まれる。アリールにはまた、約９～２０の炭素原子を有する、少なくとも１つの環が芳香族である多重縮合炭素環系（例えば、２、３または４の環を含む環系）も含まれ、他の環は芳香族であっても、芳香族でなくてもよい（すなわち、シクロアルキルでもよい）。その多重縮合環系の環は、価数の要件が許す場合、縮合結合、スピロ結合および架橋結合を介して、互いに連結され得る。上記に定義されているように、多重縮合環系の連結点は、環の芳香族部分または炭素環部分を含む、環系の任意の位置であることができることを理解すべきである。アリール基の非限定的な例には、フェニル、インデニル、インダニル、ナフチル、１，２，３，４－テトラヒドロナフチル、アントラセニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【００２５】

「干渉ＲＮＡ」または「ＲＮＡｉ」または「干渉ＲＮＡ配列」という用語は、標的とする遺伝子または配列と同じ細胞内に干渉ＲＮＡがある場合に、標的とする遺伝子または配列の発現を（例えば、干渉ＲＮＡ配列に相補性のｍＲＮＡの分解に介在する、またはその翻訳を阻害することによって）減らす、または阻害することができる一本鎖ＲＮＡ（例えば、成熟ｍｉＲＮＡ）または二本鎖ＲＮＡ（すなわち、ｓｉＲＮＡ、ａｉＲＮＡ、またはｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのような二重鎖ＲＮＡ）を指す。したがって、干渉ＲＮＡとは、標的ｍＲＮＡ配列に相補性の一本鎖ＲＮＡ、または２本の相補鎖によって，もしくは１本の自己相補鎖によって形成された二本鎖ＲＮＡを指す。干渉ＲＮＡは、標的とする遺伝子もしくは配列との実質的もしくは完全な同一性を有する場合もあれば、ミスマッチの領域（すなわち、ミスマッチモチーフ）を含む場合もある。干渉ＲＮＡの配列は、完全長標的遺伝子またはその部分配列に対応することができる。

【００２６】

干渉ＲＮＡには、「低分子干渉ＲＮＡ」または「ｓｉＲＮＡ」、例えば、長さが約１５～６０、１５～５０、または１５～４０（二重鎖）ヌクレオチド、より通常長さが約１５～３０、１５～２５、または１９～２５（二重鎖）ヌクレオチド、好ましくは長さが約２０～２４、２１～２２、または２１～２３（二重鎖）ヌクレオチドの干渉ＲＮＡ（例えば、二本鎖ｓｉＲＮＡの各相補配列が、１５～６０、１５～５０、１５～４０、１５～３０、１５～２５、または１９～２５ヌクレオチド長、好ましくは約２０～２４、２１～２２、または２１～２３ヌクレオチド長であり、二本鎖ｓｉＲＮＡが、約１５～６０、１５～５０、１５～４０、１５～３０、１５～２５、または１９～２５塩基対の長さ、好ましくは約１８～２２、１９～２０、または１９～２１塩基対の長さである）が含まれる。ｓｉＲＮＡ二重鎖は、約１～約４ヌクレオチドまたは約２～約３ヌクレオチドの３’オーバーハングおよび５’リン酸末端を含んでもよい。ｓｉＲＮＡの例には限定しないで、鎖が別々の２つの分子から構築された二本鎖ポリヌクレオチド分子であって、一方の鎖がセンス

鎖であり、他方が相補性アンチセンス鎖であるもの；一本鎖分子から構築された二本鎖ポリヌクレオチド分子であって、センス領域とアンチセンス領域が、核酸ベースまたは非核酸ベースのリンカーにより連結されているもの；自己相補性のセンス領域およびアンチセンス領域を有するヘアピン二次構造のある二本鎖ポリヌクレオチド分子；並びに２以上のループ構造および自己相補性のセンス領域とアンチセンス領域とを有するステムを有する、環状一本鎖ポリヌクレオチド分子であって、環状ポリヌクレオチドが、活性のある二本鎖ｓｉＲＮＡ分子を生成するよう生体内または試験管内でプロセシングされ得るものが挙げられる。

【００２７】

好ましくは、ｓｉＲＮＡは化学合成される。ｓｉＲＮＡはまた、長いｄｓＲＮＡ（例えば、約２５ヌクレオチド長を超えるｄｓＲＮＡ）の、Ｅ．ｃｏｌｉのＲＮａｓｅ ＩＩＩまたはＤｉｃｅｒによる切断によっても生成され得る。これらの酵素は、ｄｓＲＮＡをプロセシングして生物学的に活性があるｓｉＲＮＡにする（例えば、Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９９：９９４２－９９４７（２００２）、Ｃａｌｅｇａｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９９：１４２３６（２００２）、Ｂｙｒｏｍ ｅｔ ａｌ．，Ａｍｂｉｏｎ ＴｅｃｈＮｏｔｅｓ，１０（１）：４－６（２００３）、Ｋａｗａｓａｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，３１：９８１－９８７（２００３）、Ｋｎｉｇｈｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２９３：２２６９－２２７１（２００１）、およびＲｏｂｅｒｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２４３：８２（１９６８）を参照のこと）。好ましくは、ｄｓＲＮＡは、少なくとも５０ヌクレオチドから約１００、２００、３００、４００、または５００ヌクレオチドの長さである。ｄｓＲＮＡは、長さが１０００、１５００、２０００、５０００ヌクレオチド以上であってもよい。ｄｓＲＮＡは遺伝子転写物全体または部分的な遺伝子転写物をコードすることができる。特定の場合では、ｓｉＲＮＡは、プラスミドによってコードされ得る（例えば、ヘアピンループを有する二重鎖に自発的にフォールディングする配列として転写される）。

【００２８】

本明細書で使用されるとき、「ミスマッチモチーフ」または「ミスマッチ領域」という用語は、標的とする配列に対して相補性が１００％ではない、干渉ＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ、ａｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ）配列の一部分を指す。干渉ＲＮＡは、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、またはそれ以上のミスマッチ領域を有し得る。ミスマッチ領域は、隣接している場合もあれば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２もしくはそれ以上のヌクレオチドで区切られている場合もある。ミスマッチモチーフまたはミスマッチモ領域は、単一ヌクレオチドを含む場合もあれば、２、３、４、５、またはそれ以上のヌクレオチドを含む場合もある。

【００２９】

核酸（例えば、干渉ＲＮＡまたはｍＲＮＡ）のような活性剤または治療剤の「有効量」または「治療有効量」は、所望の効果を生じるのに十分な量、例えば、干渉ＲＮＡの非存在下で検出された正常発現レベルと比較した標的配列の発現の阻害を生じさせるのに十分な量、またはそのタンパク質が発現される生物にて望ましい生体効果を引き起こすある量のタンパク質のｍＲＮＡが導く発現を生じさせるのに十分な量である。標的遺伝子または標的配列の発現の阻害は、干渉ＲＮＡを用いて得られる値が対照と比べて約９０％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、または０％である場合に達成される。他の実施形態では、発現されるタンパク質は、体内の細胞型で通常発現される活性型のタンパク質であり、ｍＲＮＡの治療有効量は、ある量のコードされたタンパク質を生成させる量であって、健常個体のその細胞型において通常発現されるタンパク質量の少なくとも５０％（例えば、少なくとも６０％、または少なくとも７０％、または少なくとも８０％、または少なくとも９０％）である。標的遺伝子または標的配列の発現を測定するのに好適なアッセイには、例えば、ドットブロット、ノーザンブロット、ｉｎ ｓｉｔｕハ

イブリダイゼーション、ＥＬＩＳＡ、免疫沈降法、酵素機能、と同様に当業者に既知の表現型アッセイ等の当業者に既知の技法を使用する、タンパク質またはＲＮＡのレベルの検査が挙げられる。

【００３０】

干渉ＲＮＡによる免疫応答を「低下させる」、「低下させること」、「低減させる」、または「低減させること」とは、所与の干渉ＲＮＡ（例えば、修飾干渉ＲＮＡ）に対する免疫応答の検出可能な低下を意味することが意図される。修飾干渉ＲＮＡによる免疫応答の低下量は、未修飾干渉ＲＮＡの存在下での免疫応答のレベルに対して決定されてもよい。検出可能な低下は、未修飾干渉ＲＮＡの存在下で検出される免疫応答よりも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％、またはそれ以上低くなり得る。干渉ＲＮＡに対する免疫応答の低下は、典型的に、試験管内でのレスポンダー細胞によるサイトカイン産生（例えば、ＩＦＮγ、ＩＦＮα、ＴＮＦα、ＩＬ－６、またはＩＬ－１２）の低下、または干渉ＲＮＡ投与後の、哺乳類対象の血清中のサイトカイン産生の低下により測定される。

【００３１】

ｍＲＮＡによる免疫応答を「低下させる」、「低下させること」、「低減させる」、または「低減させること」とは、所与のｍＲＮＡ（例えば、修飾ｍＲＮＡ）に対する免疫応答の検出可能な低下を意味することが意図される。修飾ｍＲＮＡによる免疫応答の低下量は、未修飾ｍＲＮＡの存在下での免疫応答のレベルに対して決定され得る。検出可能な低下は、未修飾ｍＲＮＡの存在下で検出される免疫応答よりも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％、またはそれ以上低くなり得る。ｍＲＮＡに対する免疫応答の低下は通常、試験管内でのレスポンダー細胞によるサイトカイン産生（例えば、ＩＦＮγ、ＩＦＮα、ＴＮＦα、ＩＬ－６、またはＩＬ－１２）の低下、またはｍＲＮＡの投与後の哺乳類対象の血清中のサイトカイン産生の低下により測定される。

【００３２】

本明細書で使用されるとき、「レスポンダー細胞」という用語は、未修飾ｓｉＲＮＡ等の免疫刺激性干渉ＲＮＡと接触した場合に、検出可能な免疫応答を生じる細胞、好ましくは哺乳類細胞を指す。例示的レスポンダー細胞としては、例えば、樹状細胞、マクロファージ、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）、脾細胞等が含まれる。検出可能な免疫応答としては、例えば、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＴＧＦ、およびそれらの組み合わせ等の、サイトカインまたは増殖因子の産生が含まれる。

【００３３】

「実質的同一性」とは、ストリンジェントな条件下で参照配列にハイブリダイズする配列、または参照配列の特定の領域にわたって特定の同一性パーセントを有する配列を指す。

【００３４】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」という語句は、核酸が、通常核酸の複合混合物中で、その標的配列にはハイブリダイズするが他の配列にはハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、状況が異なれば条件は異なってくる。長い配列ほど特に高温でハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションに対する広範な手引きは、Ｔｉｊｓｓｅｎ，Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ－Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ｗｉｔｈ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ｐｒｏｂｅｓ，“Ｏｖｅｒｖｉｅｗ ｏｆ ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｔｈｅ ｓｔｒａｔｅｇｙ ｏｆ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ａｓｓａｙｓ”（１９９３）に見出される。一般に、ストリンジェントな条件は、定義されたイオン強度ｐＨでの特定の配列の熱融点（ｔｈ

ｅｒｍａｌ ｍｅｌｔｉｎｇ ｐｏｉｎｔ）（Ｔｍ）よりも約５～１０℃低くなるよう選択される。Ｔｍは、標的に相補性のプローブの５０％が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする（定義されたイオン強度、ｐＨおよび核濃度（ｎｕｃｌｅｉｃ ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｉｏｎ）での）温度である（標的配列が過剰に存在する場合、Ｔｍでは、プローブの５０％が平衡状態で占有されている）。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミド等の不安定化剤の添加で達成され得る。選択的または特異的なハイブリダイゼーションの場合、ポジティブシグナルはバックグラウンドの少なくとも２倍、好ましくはバックグラウンドハイブリダイゼーションの１０倍である。

【００３５】

例示的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、以下のとおりであり得る：５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ、および１％ＳＤＳ、４２℃でインキュベートするか、または５×ＳＳＣ、１％ＳＤＳ、６５℃でインキュベートし、０．２×ＳＳＣ、および０．１％ＳＤＳにて６５℃で洗浄する。ＰＣＲの場合、低ストリンジェンシーの増幅には約３６℃の温度が典型的であるが、アニーリング温度はプライマーの長さに応じて約３２℃～４８℃で変動し得る。高ストリンジェンシーのＰＣＲ増幅の場合、約６２℃の温度が典型的であるが、高ストリンジェンシーのアニーリング温度は、プライマーの長さおよび特異性に応じて約５０℃～約６５℃の範囲であり得る。高ストリンジェンシー増幅および低ストリンジェンシー増幅の両方の典型的なサイクル条件には、９０℃～９５℃で３０秒～２分間の変性段階、３０秒～２分間続くアニーリング段階、および約７２℃で１～２分間の伸長段階が含まれる。低ストリンジェンシー増幅反応および高ストリンジェンシーの増幅反応についてのプロトコルおよびガイドラインは、例えば、Ｉｎｎｉｓ ｅｔ ａｌ．，ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．Ｎ．Ｙ．（１９９０）に記載されている。

【００３６】

ストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズしない核酸は、それらがコードするポリペプチドが実質的に同一であれば、依然として実質的に同一である。これは、例えば、遺伝暗号によって許容される最大限のコドンの縮重を使用して核酸のコピーが生成される場合に生じる。そのような場合、核酸は通常、中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。例示的な「中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」には、４０％ホルムアミド、１Ｍ ＮａＣｌ、１％ＳＤＳの緩衝液中３７℃でのハイブリダイゼーション、および１×ＳＳＣ中４５℃での洗浄が含まれる。ポジティブハイブリダイゼーションは、バックグラウンドの少なくとも２倍である。当業者は、代替的なハイブリダイゼーション条件および洗浄条件を利用して、同様のストリンジェンシー条件を得ることができることを容易に認識するであろう。ハイブリダイゼーションパラメータを決定するためのさらなるガイドラインは、多数の参照文献、例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓに記載されている。

【００３７】

２つ以上の核酸との関連における「実質的に同一」または「実質的同一性」という用語は、以下の配列比較アルゴリズムのうちの１つを使用するか、もしくは手作業によるアラインメントと目視検査によって測定されるように、比較ウィンドウまたは指定領域にわたって最大一致度について比較およびアラインメントを行った場合、同じである、または同じヌクレオチドを特定のパーセンテージ（すなわち、特定の領域にわたる少なくとも約６０％、好ましくは少なくとも約６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％または９５％の同一性）を有する、２つ以上の配列または部分列を指す。この定義は、文脈で示される場合、配列の相補体も同様に指す。好ましくは、実質的な同一性は、少なくとも約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、または６０ヌクレオチド長である領域にわたり存在する。

【００３８】

配列比較の場合、通常、１つの配列が参照配列としての役割を果たし、それに対して試験配列を比較する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列および参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じて部分列座標を指定して、配列アルゴリズムプログラムのパラメータを指定する。デフォルトのプログラムパラメータを使用することも、また代替的パラメータを指定することもできる。配列比較アルゴリズムはその後、プログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントを計算する。

【００３９】

本明細書で使用されるとき、「比較ウィンドウ」は、約５～約６０、ふつう約１０～約４５、さらにふつう約１５～約３０から成る群から選択される隣接位置のうちのいずれか１つの区分に対する参照を含み、２つの配列を最適に整列させた後である配列を同じ数の隣接位置の参照配列と比較してもよい。比較のための配列アラインメントの方法は、当該技術分野において周知である。比較のための最適な配列アラインメントは、例えば、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．，２：４８２（１９８１）の局所的相同性アルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，４８：４４３（１９７０）の相同性アラインメントアルゴリズム、Ｐｅａｒｓｏｎ ａｎｄ Ｌｉｐｍａｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８５：２４４４（１９８８）の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピュータ実装（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷｉｓにおけるＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、およびＴＦＡＳＴＡ）、または手動アラインメントおよび目視検査（例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．（１９９５ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ）を参照のこと）により実施することができる。

【００４０】

配列同一性パーセントおよび配列類似性の決定に適したアルゴリズムの好ましい例は、ＢＬＡＳＴおよびＢＬＡＳＴ２．０アルゴリズムであり、それらはそれぞれ、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃ． Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２５：３３８９－３４０２（１９７７）およびＡｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２１５：４０３－４１０（１９９０）に記載されている。本発明の核酸の配列同一性パーセントを決定するために、ＢＬＡＳＴおよびＢＬＡＳＴ ２．０を本明細書に記載されるパラメータを用いて使用する。ＢＬＡＳＴ分析を実施するためのソフトウェアは、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／）により公的に利用可能である。

【００４１】

ＢＬＡＳＴアルゴリズムはまた、２つの配列間の類似性の統計解析も行う（例えば、Ｋａｒｌｉｎ ａｎｄ Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：５８７３－５７８７（１９９３）を参照のこと）。ＢＬＡＳＴアルゴリズムによって提供される類似性の尺度の１つは最小和確率（Ｐ（Ｎ））であり、これは、２つのヌクレオチド配列間の一致が偶然発生する確率の指標を提供する。例えば、試験核酸と参照核酸との比較における最小和確率が約０．２未満、より好ましくは約０．０１未満、最も好ましくは約０．００１未満である場合、その核酸は参照配列と類似していると見なされる。

【００４２】

本明細書で使用される「核酸」という用語は、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態の、少なくとも２つのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含有するポリマーを指し、ＤＮＡおよびＲＮＡを含む。ＤＮＡは、例えば、アンチセンス分子、プラスミドＤＮＡ、予備縮合（ｐｒｅ－ｃｏｎｄｅｎｓｅｄ）ＤＮＡ、ＰＣＲ産物、ベクター（Ｐ１、ＰＡＣ、ＢＡＣ、ＹＡＣ、人工染色体）、発現カセット、キメラ配列、染色体ＤＮＡ

、またはこれらの群の誘導体および組み合わせの形態であり得る。ＲＮＡは、ｓｉＲＮＡ、非対称干渉ＲＮＡ（ａｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ウイルスＲＮＡ（ｖＲＮＡ）、自己増幅ＲＮＡ、およびそれらの組合せの形態であり得る。核酸には、既知のヌクレオチド類似体または修飾骨格の残基または結合を含有する核酸が含まれ、それらは、合成のもの、天然に存在するのもの、および天然には存在しないものであり、参照核酸と同様の結合特性を有する。そのような類似体の例には、ホスホロチオアート、ホスホロアミダート、メチルホスホナート、キラル－メチルホスホナート、２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチド、およびペプチド核酸（ＰＮＡ）が含まれるが、これらに限定されない。具体的に限定されない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有する、天然ヌクレオチドの既知の類似体を含有する核酸を包含する。特に示さない限り、特定の核酸配列はまた、明示された配列に加えて、保存的に修飾されたその変異体（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、ＳＮＰ、および相補配列を暗黙的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、１つまたは複数の選択された（またはすべての）コドンの第３の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作製することによって実現することができる（Ｂａｔｚｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．，１９：５０８１（１９９１）、Ｏｈｔｓｕｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６０：２６０５－２６０８（１９８５）、Ｒｏｓｓｏｌｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｐｒｏｂｅｓ，８：９１－９８（１９９４））。「ヌクレオチド」は、糖デオキシリボース（ＤＮＡ）またはリボース（ＲＮＡ）、塩基、およびリン酸基を含有する。ヌクレオチドは、リン酸基を介して互いに連結される。「塩基」には、プリンおよびピリミジンが含まれ、それにはさらに、天然化合物であるアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン、および天然類似体、並びにプリンおよびピリミジンの合成誘導体が含まれ、それらには、アミン、アルコール、チオール、カルボキシレート、およびハロゲン化アルキル等のこれらに限定されない新たな反応性基を配置する修飾が非限定的に含まれる。

【００４３】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチドまたは前駆体ポリペプチドの生成に必要な、部分長または全長のコード配列を含む核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）配列を指す。

【００４４】

本明細書で使用されるとき、「遺伝子産物」とは、ＲＮＡ転写物またはポリペプチド等の遺伝子の産物を指す。

【００４５】

「脂質」という用語は、脂肪酸のエステルが含まれるがそれに限定されない一群の有機化合物を指し、水に不溶性であるが多くの有機溶媒に可溶性であることを特徴とする。それらは通常、（１）油脂およびロウが含まれる「単純脂質」、（２）リン脂質および糖脂質が含まれる「配合脂質」、ならびに（３）ステロイドのような「誘導脂質」という少なくとも３つのクラスに分類される。

【００４６】

本明細書で使用されるとき、「ＬＮＰ」という用語は、脂質－核酸粒子または核酸－脂質粒子（例えば、安定核酸－脂質粒子）を指す。ＬＮＰは、脂質（例えば、本発明のイオン化できる脂質、非カチオン性脂質、および粒子の凝集を防ぐ複合脂質）と核酸とから作製された粒子を表し、核酸（例えば、ｓｉＲＮＡ、ａｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｓＤＮＡ、ｄｓＤＮＡ、ｓｓＲＮＡ、低分子ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、ｄｓＲＮＡ、ｍＲＮＡ、自己増幅ＲＮＡ、または干渉ＲＮＡもしくはｍＲＮＡの転写元のプラスミドを含むプラスミド）は脂質内に封入されている。一実施形態では、核酸は脂質に少なくとも５０％封入されており、一実施形態では、核酸は脂質に少なくとも７５％封入されており、一実施形態では、核酸は脂質に少なくとも９０％封入されており、一実施形態では、核酸は脂質に完全に封入されている。ＬＮＰは通常、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、および脂質複合物（例えば、ＰＥＧ－脂質複合物）を含有する。ＬＮＰは、それらが静脈内（ｉ．ｖ．）注射後に長期の循環寿命を示し得ること、それらが遠位部位（例えば、投与部位

から物理的に隔てられた部位）で蓄積することができること、それらがこれら遠位部位において、形質移入された遺伝子の発現または標的遺伝子発現のサイレンシングを仲介することができることから、全身適用に極めて有用である。

【００４７】

本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）は通常、約４０ｎｍ～約１５０ｎｍの平均径を有する。一実施形態では、本発明の脂質粒子は約４０ｎｍ～約８０ｎｍの平均径を有する。一実施形態では、本発明の脂質粒子は約４０ｎｍ～約７０ｎｍの平均径を有する。一実施形態では、本発明の脂質粒子は約４０ｎｍ～約６０ｎｍの平均径を有する。一実施形態では、本発明の脂質粒子は約５０ｎｍ～約６０ｎｍの平均径を有する。一実施形態では、本発明の脂質粒子は約５０ｎｍ～約１５０ｎｍの平均径を有する。一実施形態では、本発明の脂質粒子は約６０ｎｍ～約１３０ｎｍの平均径を有する。一実施形態では、本発明の脂質粒子は約７０ｎｍ～約１１０ｎｍの平均径を有する。一実施形態では、本発明の脂質粒子は約７０ｎｍ～約９０ｎｍの平均径を有する。本発明の脂質粒子は実質的に無毒である。さらに、核酸は、本発明の脂質粒子に存在する場合、水溶液中でヌクレアーゼによる分解に耐性である。核酸－脂質粒子およびそれらの調製方法は、例えば、米国特許公開第２００４０１４２０２５号および第２００７００４２０３１号に開示されており、それらの開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【００４８】

本明細書で使用されるとき、「脂質封入された」とは、完全に封入されたか、部分的に封入されたかまたはその両方である核酸（例えば、干渉ＲＮＡまたはｍＲＮＡ）などの活性剤または治療剤を提供する脂質粒子を指し得る。好ましい実施形態では、核酸は、（例えば、ＳＰＬＰ、ｐＳＰＬＰ、ＬＮＰまたは他の核酸－脂質粒子を形成するために）脂質粒子に完全に封入される。

【００４９】

「脂質複合物」という用語は、脂質粒子の凝集を抑制するポリマー・複合脂質を指す。そのような脂質複合物には、ポリアミドオリゴマー（例えば、ＡＴＴＡ－脂質複合物）、ポリサルコシン－脂質複合物、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）－脂質複合物、例えば、ジアルキルオキシプロピルに結合させたＰＥＧ、ジアシルグリセロールに結合させたＰＥＧ、コレステロールに結合させたＰＥＧ、ホスファチジルエタノールアミンに結合させたＰＥＧ、セラミドに結合させたＰＥＧのようなＰＥＧ－脂質複合物（例えば、その開示があらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第５，８８５，６１３号を参照のこと）、カチオン性ＰＥＧ脂質、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ＰＥＧは脂質に直接結合することができ、またリンカー部分により脂質に連結されてもよい。例えば、エステル不含のリンカー部分およびエステル含有リンカー部分を含む、ＰＥＧを脂質にカップリングするのに適した任意のリンカー部分を使用することができる。好ましい実施形態では、エステル不含のリンカー部分が使用される。

【００５０】

「両親媒性脂質」という用語は、部分的に、脂質物質の疎水性部分が疎水性相に配向し、その一方で親水性部分が水相に配向する、任意の好適な物質を指す。親水性の特性は、炭水化物、リン酸、カルボキシル、スルファート、アミノ、スルフヒドリル、ニトロ、ヒドロキシルおよび他の同様の基等の極性基または荷電基の存在に由来する。疎水性は、飽和および不飽和の長鎖脂肪族炭化水素基、ならびにそのような基が１つまたは複数の芳香族、脂環式、または複素環式の基（複数可）により置換されているもの等を含め、これらに限定されない無極性基を含めることによって付与され得る。両親媒性化合物の例としては、リン脂質、アミノ脂質、およびスフィンゴ脂質が含まれるが、これらに限定されない。

【００５１】

リン脂質の代表例としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、パルミトイ

ルオレオイルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、およびジリノレオイルホスファチジルコリンが含まれるが、これらに限定されない。スフィンゴ脂質、スフィンゴ糖脂質ファミリー、ジアシルグリセロール、およびβ－アシルオキシ酸等のリンを欠く他の化合物もまた、両親媒性脂質とされる群に入る。さらに、上記の両親媒性脂質は、トリグリセリドおよびステロール等の他の脂質と混合することができる。

【００５２】

「中性脂質」という用語は、選択ｐＨにて非荷電または中性の双性イオン形態のいずれかで存在するいくつかの脂質種のうちのいずれかを指す。生理的ｐＨにおいては、そのような脂質には、例えば、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、コレステロール、セレブロシド、およびジアシルグリセロールが含まれる。

【００５３】

「非カチオン性脂質」という用語は、任意の両親媒性脂質および任意の他の中性脂質またはアニオン性脂質を指す。

【００５４】

「アニオン性脂質」という用語は、生理学的ｐＨで負に荷電する任意の脂質を指す。これらの脂質には、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、Ｎ－ドデカノイルホスファチジルエタノールアミン、Ｎ－スクシニルホスファチジルエタノールアミン、Ｎ－グルタリルホスファチジルエタノールアミン、リシルホスファチジルグリセロール、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール（ＰＯＰＧ）、および中性脂質に連結された他のアニオン性修飾基が含まれるが、これらに限定されない。

【００５５】

「カチオン性脂質」という用語は正に帯電することができる脂質を指する。これらの脂質には、正電荷を帯びた１つまたは複数のアミン基を持つ脂質が含まれる。特定のカチオン性脂質はイオン化でき（「イオン化できる脂質」と呼ばれる）、周囲のｐＨに応じて電荷が中性または正に帯電した状態で存在してもよい。

【００５６】

一実施形態では、カチオン性脂質は、本明細書に記載されている式（Ｉ）の化合物であり、特定の実施形態では、投与後７日目にイオン化できる親脂質の１０％未満が残存するようなクリアランス率を有する（例えば、実施例３３に記載されているアッセイにて）。

【００５７】

「疎水性脂質」という用語は、飽和および不飽和の長鎖脂肪族炭化水素基、および１つまたは複数の芳香族、脂環式、または複素環式の基（複数可）によって任意で置換されたそのような基を含むが、これらに限定されない無極性基を有する化合物を指す。好適な例には、ジアシルグリセロール、ジアルキルグリセロール、Ｎ－Ｎ－ジアルキルアミノ、１，２－ジアシルオキシ－３－アミノプロパン、および１，２－ジアルキル－３－アミノプロパンが挙げられるが、これらに限定されない。

【００５８】

「膜融合性」という用語は、ＬＮＰ等の脂質粒子が細胞の膜と融合する能力を指す。膜は、形質膜または細胞小器官、例えばエンドソーム、核等を取り囲む膜のいずれかであり得る。

【００５９】

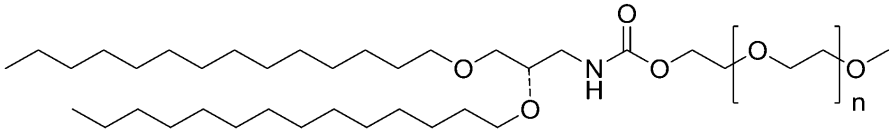
本明細書で使用されるとき、「水溶液」という用語は、全部または一部が水で構成される組成物を指す。

【００６０】

本明細書で使用されるとき、「有機脂質溶液」という用語は、全部または一部が脂質を有する有機溶媒で構成される組成物を指す。

【００６１】
本明細書で使用されるとき、「遠位部位」とは、物理的に隔てられた部位を指し、隣接する毛細血管床に限られるわけではなく、生体全体に広く分布する部位を含む。
【００６２】
ＬＮＰ等の核酸－脂質粒子に関連する「血清安定性」とは、遊離のＤＮＡまたはＲＮＡを著しく分解するような血清アッセイまたはヌクレアーゼアッセイへの曝露後に、粒子が著しく分解されることがないことを意味する。好適なアッセイとしては、例えば、標準的な血清アッセイ、ＤＮＡｓｅアッセイ、またはＲＮＡｓｅアッセイが含まれる。
【００６３】
本明細書で使用されるとき、「全身送達」とは、生体内での干渉ＲＮＡまたはｍＲＮＡ等の活性剤または治療剤の広い生体内分布をもたらす、脂質粒子の送達を指す。ある特定の薬剤の全身送達をもたらすことができる投与技術もあれば、そうではない投与技術もある。全身送達とは、有用な量、好ましくは治療量の薬剤が体の大部分に曝露されることを意味する。広範な生体内分布を得るために、薬剤が投与部位から遠位の疾患部位に到達する前に、（初回通過器官（肝臓、肺など）または迅速な非特異的細胞結合などにより）迅速な分解またはクリアランスを受けないような血中寿命が一般に必要とされる。脂質粒子の全身送達は、例えば、静脈内、皮下、および腹腔内を含む当該技術分野で公知の任意の手段によるものであり得る。好ましい実施形態では、脂質粒子の全身送達は、静脈内送達によるものである。
【００６４】
本明細書で使用されるとき、「局所送達」とは、干渉ＲＮＡまたはｍＲＮＡなどの活性剤または治療剤を生体内の標的部位に直接送達することを指す。例えば、薬剤は、腫瘍などの疾患部位、または炎症部位などの他の標的部位、または標的器官、例えば肝臓、心臓、膵臓、腎臓などに直接注射により局所送達することができる。
【００６５】
「哺乳類」という用語は、例えば、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ハムスター、モルモット、ウサギ、家畜等の任意の哺乳類種を指す。
【００６６】
「がん」という用語は、異常細胞の制御されない増殖を特徴とする疾患クラスの任意のメンバーを指す。この用語には、特徴が悪性、良性、軟部組織または固形であるかを問わない、あらゆる既知のがんおよび腫瘍性疾患、並びに転移前および転移後を含め、あらゆる病期およびグレードのがんが含まれる。異なる種類のがんの例としては、肺癌、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胆管癌、小腸癌、胃癌（ｓｔｏｍａｃｈ（ｇａｓｔｒｉｃ）ｃａｎｃｅｒ）、食道癌；胆嚢癌、肝癌、膵癌、虫垂癌、乳癌、卵巣癌；子宮頸癌、前立腺癌、腎癌（例えば、腎細胞癌）、中枢神経系のがん、神経膠芽腫、皮膚癌、リンパ腫、絨毛癌、頭頸部癌、骨原性肉腫、および血液癌が含まれるが、これらに限定されない。特定の型の肝癌の非限定的な例としては、肝細胞癌（ＨＣＣ）、続発性肝癌（例えば、他のいくつかの非肝癌細胞型の転移に起因するもの）、および肝芽腫が含まれる。本明細書で使用されるとき、「腫瘍」は、１つまたは複数のがん性細胞を含む。
【００６７】
「アニオン前駆体基」という用語には、生理的ｐＨでイオンを形成する能力がある基が含まれる。例えば、この用語には、－CO_2H、－Ｏ－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＨ）$_2$、－ＯＳ（＝Ｏ）$_2$（ＯＨ）、－Ｏ－Ｓ（＝Ｏ）（ＯＨ）、および－Ｂ（ＯＨ）$_2$という基が含まれる。一実施形態では、アニオン前駆体は－CO_2Hである。
【００６８】
特定の実施形態では、ＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡは以下の構造を有する：

【化２】



式中、ｎは、得られるポリマー鎖が約５００～約１０，０００の分子量を有するように選択される。一実施形態では、ｎは得られるポリマー鎖が約５００～約７５００の分子量を有するように選択される。一実施形態では、ｎは得られるポリマー鎖が約５００～約６０００の分子量を有するように選択される。一実施形態では、ｎは得られるポリマー鎖が約５００～約５０００の分子量を有するように選択される。一実施形態では、ｎは得られるポリマー鎖が約５００～約３０００の分子量を有するように選択される。一実施形態では、ｎは得られるポリマー鎖が約１０００～約７５００の分子量を有するように選択される。一実施形態では、ｎは得られるポリマー鎖が約１０００～約６０００の分子量を有するように選択される。一実施形態では、ｎは得られるポリマー鎖が約１０００～約５０００の分子量を有するように選択される。一実施形態では、ｎは得られるポリマー鎖が約１０００～約３０００の分子量を有するように選択される。別の実施形態では、ｎは得られるポリマー鎖が約２０００の分子量を有するよう選択される。ＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡは、Ｈｅｙｅｓ ｅｔ ａｌ，Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｎｏｖｅｌ Ｐｏｌｙ（Ｅｔｈｙｌｅｎｅ Ｇｌｙｃｏｌ）－ｌｉｐｉｄ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ Ｓｕｉｔａｂｌｅ ｆｏｒ ｕｓｅ ｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，”Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，２００６，および米国特許第８，９３６，９４２号によって記載されたように調製することができる。

【００６９】

実施形態の説明

本発明は、１つまたは複数の活性剤または治療剤を含む新規の血清安定性脂質粒子、脂質粒子を作製する方法、および脂質粒子を（例えば、疾患または障害の治療のために）送達および／または投与する方法を提供する。

【００７０】

一態様では、本発明は、（ａ）１つまたは複数の活性剤または治療剤と、（ｂ）粒子中に存在する総脂質の約３０ｍｏｌ％～約８５ｍｏｌ％を構成する本発明の１つまたは複数のイオン化できる脂質と、（ｃ）粒子中に存在する総脂質の約１３ｍｏｌ％～約４９．５ｍｏｌ％を構成する１つまたは複数の非カチオン性脂質と、（ｄ）粒子中に存在する総脂質の０．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を構成する、粒子の凝集を抑制する１つまたは複数の複合脂質とを含む脂質粒子を提供する。

【００７１】

一態様では、本発明は、（ａ）１つまたは複数の活性剤または治療剤と、（ｂ）粒子中に存在する総脂質の約５０ｍｏｌ％～約８５ｍｏｌ％を構成する本発明の１つまたは複数のイオン化できる脂質と、（ｃ）粒子中に存在する総脂質の約１３ｍｏｌ％～約４９．５ｍｏｌ％を構成する１つまたは複数の非カチオン性脂質と、（ｄ）粒子中に存在する総脂質の０．５ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％を構成する、粒子の凝集を抑制する１つまたは複数の複合脂質とを含む脂質粒子を提供する。

【００７２】

特定の実施形態では、活性剤または治療剤は、脂質粒子における活性剤または治療剤が水溶液にて、例えばヌクレアーゼまたはプロテアーゼによる、酵素分解に耐性であるように、脂質粒子の脂質部分内に完全に封入される。他の特定の実施形態では、脂質粒子は、ヒト等の哺乳類に対して実質的に無毒である。

【００７３】

いくつかの実施形態では、活性剤または治療剤は、核酸を含む。特定の場合では、核酸は、例えば、ｓｉＲＮＡ、ａｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、またはそれらの混合物等の干渉ＲＮＡ分子を含む。他の特定の場合には、核酸は、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、プラスミド、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、またはそれらの混合物等の、一本鎖または二本鎖のＤＮＡ、ＲＮＡ、またはＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドを含む。特定の場合では、核酸は、ｍＲＮＡ分子を含む。

【００７４】

他の実施形態では、活性剤または治療剤は、ペプチドまたはポリペプチドを含む。特定の場合では、ペプチドまたはポリペプチドは、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体断片；ヒト化抗体、組換え抗体、組換えヒト抗体、Ｐｒｉｍａｔｉｚｅｄ（商標）抗体、またはそれらの混合物等の抗体を含む。他の特定の場合には、ペプチドまたはポリペプチドは、サイトカイン、増殖因子、アポトーシス因子、分化誘導因子、細胞表面受容体、リガンド、ホルモン、低分子（例えば、有機低分子または化合物）、またはそれらの混合物を含む。

【００７５】

一実施形態では、活性剤または治療剤は、ｓｉＲＮＡを含む。一実施形態では、ｓｉＲＮＡ分子は、約１５～約６０ヌクレオチド長（例えば、約１５～６０、１５～５０、１５～４０、１５～３０、１５～２５、もしくは１９～２５のヌクレオチド長、または１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、もしくは２５のヌクレオチド長）の二本鎖領域を含む。本発明のｓｉＲＮＡ分子は、試験管内および／または生体内で標的配列の発現をサイレンシングする能力がある。

【００７６】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡ分子は、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む。特定の好ましい実施形態では、ｓｉＲＮＡ分子は、二本鎖領域に１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、またはそれ以上の修飾ヌクレオチドを含む。特定の場合では、ｓｉＲＮＡは、二本鎖領域に約１％～約１００％（例えば、約１％、約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％）の修飾ヌクレオチドを含む。好ましい実施形態では、二本鎖領域のヌクレオチドの約２５％未満（例えば、約２５％未満、２０％未満、１５％未満、１０％未満、もしくは５％未満）または約１％～約２５％（例えば、約１％～２５％、５％～２５％、１０％～２５％、１５％～２５％、２０％～２５％、もしくは１０％～２０％）は、修飾ヌクレオチドを含む。

【００７７】

他の実施形態では、ｓｉＲＮＡ分子は、２’－Ｏ－メチル（２’ＯＭｅ）ヌクレオチド、２’－デオキシ－２’－フルオロ（２’Ｆ）ヌクレオチド、２’－デオキシヌクレオチド、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（ＭＯＥ）ヌクレオチド、ロックド核酸（ＬＮＡ）ヌクレオチド、およびこれらの混合物を含むがこれらに限定されない、修飾ヌクレオチドを含む。好ましい実施形態では、ｓｉＲＮＡは、例えば、２’ＯＭｅ－グアノシンヌクレオチド、２’ＯＭｅ－ウリジンヌクレオチド、２’ＯＭｅ－アデノシンヌクレオチド、２’ＯＭｅ－シトシンヌクレオチドなどの２’ＯＭｅヌクレオチド（例えば、２’ＯＭｅプリンおよび／またはピリミジンヌクレオチド）、ならびにこれらの混合物を含む。特定の場合では、ｓｉＲＮＡは、２’ＯＭｅ－シトシンヌクレオチドを含まない。他の実施形態では、ｓｉＲＮＡは、ヘアピンループ構造を含む。

【００７８】

ｓｉＲＮＡは、ｓｉＲＮＡ分子の二本鎖領域の一方の鎖（すなわち、センスまたはアンチセンス）または両鎖に修飾ヌクレオチドを含んでもよい。好ましくは、ウリジンヌクレオチドおよび／またはグアノシンヌクレオチドは、ｓｉＲＮＡ二重鎖の二本鎖領域での選択的位置にて修飾される。ウリジンヌクレオチド修飾に関して、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の少なくとも１、２、３、４、５、６またはそれ以上のウリジンヌクレオ

チドが、２’ＯＭｅ－ウリジンヌクレオチド等の修飾ウリジンヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、センス鎖および／またはアンチセンス鎖のすべてのウリジンヌクレオチドが、２’ＯＭｅ－ウリジンヌクレオチドである。グアノシンヌクレオチド修飾に関して、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の少なくとも１、２、３、４、５、６またはそれ以上のグアノシンヌクレオチドが、２’ＯＭｅ－グアノシンヌクレオチド等の修飾グアノシンヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、センス鎖および／またはアンチセンス鎖のすべてのグアノシンヌクレオチドが、２’ＯＭｅ－グアノシンヌクレオチドである。

【００７９】

特定の実施形態では、ｓｉＲＮＡ配列中の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、またはそれ以上の５’－ＧＵ－３’モチーフを、例えば、５’－ＧＵ－３’モチーフが除去されるようミスマッチを導入すること、および／または２’ＯＭｅヌクレオチド等の修飾ヌクレオチドを導入することによって、修飾し得る。５’－ＧＵ－３’モチーフは、ｓｉＲＮＡ配列のセンス鎖中、アンチセンス鎖中、または両鎖にあり得る。５’－ＧＵ－３’モチーフは、互いに隣接していても、またはその代わりに１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、１１個、１２個もしくはそれ以上のヌクレオチドで分離されていてもよい。

【００８０】

いくつかの好ましい実施形態では、修飾ｓｉＲＮＡ分子は、対応する非修飾ｓｉＲＮＡ配列よりも免疫刺激性が低い。そのような実施形態では、免疫刺激特性が低減した修飾ｓｉＲＮＡ分子は、標的配列に対するＲＮＡｉ活性を好都合に保持している。別の実施形態では、修飾ｓｉＲＮＡ分子の免疫刺激特性と、それが標的遺伝子発現をサイレンシングする能力とは、例えば、ｓｉＲＮＡ二重鎖の二本鎖領域等のｓｉＲＮＡ配列内に最小限かつ選択的な２’ＯＭｅ修飾を導入することによってバランスをとり、かつ最適化することができる。特定の場合では、修飾ｓｉＲＮＡは、対応する未修飾ｓｉＲＮＡよりも免疫刺激が少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％少ない。修飾ｓｉＲＮＡ分子および対応する未修飾ｓｉＲＮＡ分子の免疫刺激特性を、例えば、脂質を用いる適切な送達システム（本明細書に開示されているＬＮＰ送達システム等）を使用して、哺乳類での全身投与または哺乳類のレスポンダー細胞のトランスフェクションの約２～約１２時間後にＩＮＦ－αおよび／またはＩＬ－６レベルを測定することによって決定することができることは、当業者には容易に明らかとなるであろう。

【００８１】

特定の実施形態では、修飾ｓｉＲＮＡ分子は、IC_{50}（すなわち、半数阻害濃度）が、対応する未修飾ｓｉＲＮＡのそれの１０分の１以下である（すなわち、修飾ｓｉＲＮＡは、IC_{50}が、対応する未修飾ｓｉＲＮＡのIC_{50}の１０分の１以下である）。他の実施形態では、修飾ｓｉＲＮＡは、IC_{50}が、対応する未修飾ｓｉＲＮＡ配列のそれの３分の１以下である。さらに別の実施形態では、修飾ｓｉＲＮＡは、IC_{50}が、対応する未修飾ｓｉＲＮＡのそれの２分の１以下である。当業者に公知の方法を使用して、用量応答曲線を生成することができ、また修飾ｓｉＲＮＡおよび対応する未修飾ｓｉＲＮＡのIC_{50}値を容易に決定することができることは、当業者には容易に明らかとなるであろう。

【００８２】

さらに別の実施形態では、修飾ｓｉＲＮＡ分子は、対応する未修飾ｓｉＲＮＡ配列と比べて、標的配列の発現の少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％をサイレンシングする能力がある。

【００８３】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡ分子は、例えば、二本鎖領域のセンス鎖および／

またはアンチセンス鎖に、リン酸骨格修飾を含まない。他の実施形態では、ｓｉＲＮＡは、例えば、二本鎖領域のセンス鎖および／またはアンチセンス鎖に、１つ、２つ、３つ、４つ、またはそれ以上のリン酸骨格修飾を含む。好ましい実施形態では、ｓｉＲＮＡは、リン酸骨格修飾を含まない。

【００８４】

さらなる実施形態では、ｓｉＲＮＡは、例えば、二本鎖領域のセンス鎖および／またはアンチセンス鎖に、２’－デオキシヌクレオチドを含まない。なおさらなる実施形態では、ｓｉＲＮＡは、例えば、二本鎖領域のセンス鎖および／またはアンチセンス鎖に、１つ、２つ、３つ、４つ、またはそれ以上の２’－デオキシヌクレオチドを含む。好ましい実施形態では、ｓｉＲＮＡは、２’－デオキシヌクレオチドを含まない。

【００８５】

特定の場合では、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の二本鎖領域の３’末端のヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドではない。他の特定の場合には、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の二本鎖領域の３’末端近傍（例えば、３’末端から１、２、３または４ヌクレオチド以内）のヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドではない。

【００８６】

本明細書に記載されるｓｉＲＮＡ分子は、二本鎖領域の片側または両側に１、２、３、４、またはそれ以上のヌクレオチドの３’オーバーハングを有する場合もあれば、二本鎖領域の片側または両側にオーバーハングを欠く（すなわち、平滑末端を有する）場合もある。好ましくは、ｓｉＲＮＡは、二本鎖領域のいずれの側にも２ヌクレオチドの３’オーバーハングを有する。特定の場合では、アンチセンス鎖上の３’オーバーハングは、標的配列に対する相補性を有し、センス鎖上の３’オーバーハングは、標的配列の相補鎖に対する相補性を有する。別法として、３’オーバーハングは、標的配列に対しても、その相補鎖に対しても相補性がない。いくつかの実施形態では、３’オーバーハングは、２’－デオキシ（２’Ｈ）ヌクレオチド等の１つ、２つ、３つ、４つ、またはそれ以上のヌクレオチドを含む。特定の好ましい実施形態では、３’オーバーハングは、デオキシチミジン（ｄＴ）および／またはウリジンヌクレオチドを含む。他の実施形態では、二本鎖領域の片側または両側の３’オーバーハング中のヌクレオチドのうちの１つまたは複数は、修飾ヌクレオチドを含む。修飾ヌクレオチドの非限定的な例は前述されており、２’ＯＭｅヌクレオチド、２’－デオキシ－２’Ｆヌクレオチド、２’－デオキシヌクレオチド、２’－Ｏ－２－ＭＯＥヌクレオチド、ＬＮＡヌクレオチド、およびこれらの混合物が含まれる。好ましい実施形態では、ｓｉＲＮＡのセンス鎖および／またはアンチセンス鎖上に存在する３’オーバーハング中の１つ、２つ、３つ、４つ、またはそれ以上のヌクレオチドは、例えば、２’ＯＭｅ－グアノシンヌクレオチド、２’ＯＭｅ－ウリジンヌクレオチド、２’ＯＭｅ－アデノシンヌクレオチド、２’ＯＭｅ－シトシンヌクレオチドなどの２’ＯＭｅヌクレオチド（例えば、２’ＯＭｅプリンおよび／またはピリミジンヌクレオチド）、ならびにこれらの混合物を含む。

【００８７】

ｓｉＲＮＡは、標的遺伝子の発現をサイレンシングする非修飾および／または修飾ｓｉＲＮＡ配列の少なくとも１つまたはそれらのカクテル（例えば、少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、またはそれ以上）を含んでもよい。ｓｉＲＮＡのカクテルは、１つまたは複数の標的遺伝子の、同じ領域もしくはドメイン（例えば、「ホットスポット」）および／または異なる領域もしくはドメインを対象とする配列を含んでもよい。特定の場合では、標的遺伝子発現をサイレンシングする１つまたは複数（例えば、少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０つ、またはそれ以上）の修飾ｓｉＲＮＡが、カクテル中に存在する。他の特定の場合には、標的遺伝子発現をサイレンシングする１つまたは複数の（例えば、少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０、またはそれ以上）の未修飾ｓｉＲＮＡ配列が、カクテル中に存在する。

【００８８】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡ分子のアンチセンス鎖は、標的配列またはその一部分に少なくとも約８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％相補性の配列を含むかまたはそれから成る。他の実施形態では、ｓｉＲＮＡ分子のアンチセンス鎖は、標的配列またはその一部分に１００％相補性の配列を含むかまたはそれから成る。さらなる実施形態では、ｓｉＲＮＡ分子のアンチセンス鎖は、標的配列またはその一部分に特異的にハイブリダイズする配列を含むかまたはそれから成る。

【００８９】

さらなる実施形態では、ｓｉＲＮＡ分子のセンス鎖は、標的配列またはその一部分と少なくとも約８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一な配列を含むかまたはそれから成る。追加の実施形態では、ｓｉＲＮＡ分子のセンス鎖は、標的配列またはその一部に対して１００％同一である配列を含む、またはそれから成る。

【００９０】

いくつかの実施形態では、本発明のイオン化できる脂質は、粒子中に存在する総脂質の約３０ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約８５ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約８０ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約７５ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約７０ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約６５ｍｏｌ％、または約３０ｍｏｌ％～約６０ｍｏｌ％を構成してもよい。

【００９１】

いくつかの実施形態では、本発明のイオン化できる脂質は、粒子中に存在する総脂質の約４０ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％、約４０ｍｏｌ％～約８５ｍｏｌ％、約４０ｍｏｌ％～約８０ｍｏｌ％、約４０ｍｏｌ％～約７５ｍｏｌ％、約４０ｍｏｌ％～約７０ｍｏｌ％、約４０ｍｏｌ％～約６５ｍｏｌ％、または約４０ｍｏｌ％～約６０ｍｏｌ％を構成してもよい。

【００９２】

他の実施形態では、本発明のイオン化できる脂質は、粒子中に存在する総脂質の約５５ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％、約５５ｍｏｌ％～約８５ｍｏｌ％、約５５ｍｏｌ％～約８０ｍｏｌ％、約５５ｍｏｌ％～約７５ｍｏｌ％、約５５ｍｏｌ％～約７０ｍｏｌ％、または約５５ｍｏｌ％～約６５ｍｏｌ％を構成してもよい。

【００９３】

さらに別の実施形態では、本発明のイオン化できる脂質は、粒子中に存在する総脂質の約６０ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％、約６０ｍｏｌ％～約８５ｍｏｌ％、約６０ｍｏｌ％～約８０ｍｏｌ％、約６０ｍｏｌ％～約７５ｍｏｌ％、または約６０ｍｏｌ％～約７０ｍｏｌ％を構成してもよい。

【００９４】

なおそのうえ他の実施形態では、本発明のイオン化できる脂質は、粒子中に存在する総脂質の約６５ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％、約６５ｍｏｌ％～約８５ｍｏｌ％、約６５ｍｏｌ％～約８０ｍｏｌ％、または約６５ｍｏｌ％～約７５ｍｏｌ％を構成してもよい。

【００９５】

さらなる実施形態では、本発明のイオン化できる脂質は、粒子中に存在する総脂質の約７０ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％、約７０ｍｏｌ％～約８５ｍｏｌ％、約７０ｍｏｌ％～約８０ｍｏｌ％、約７５ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％、約７５ｍｏｌ％～約８５ｍｏｌ％、または約８０ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％を構成してもよい。

【００９６】

追加の実施形態では、本発明のイオン化できる脂質は、粒子中に存在する総脂質の（少なくとも）約３０、３５、４０、４５、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、または９０ｍｏｌ％（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）を構成してもよい。

【００９７】
本発明の脂質粒子では、非カチオン性脂質は、例えば、１つまたは複数のアニオン性脂質および／または中性脂質を含んでもよい。好ましい実施形態では、非カチオン性脂質は、以下の中性脂質成分、すなわち、（１）コレステロールもしくはその誘導体、（２）リン脂質、または（３）リン脂質とコレステロールもしくはその誘導体との混合物のうちの１つを含む。
【００９８】
コレステロール誘導体の例には、コレスタノール、コレスタノン、コレステノン、コプロスタノール、コレステリル－２’－ヒドロキシエチルエーテル、コレステリル－４’－ヒドロキシブチルエーテル、およびこれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。コレステリル－２’－ヒドロキシエチルエーテルの合成は、本明細書に記載されている。
【００９９】
リン脂質は、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）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルグリセロール（ＰＯＰＧ）、ジパルミトイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジミリストイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、モノメチル－ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル－ホスファチジルエタノールアミン、ジエライドイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＥＰＥ）、ステアロイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、タマゴホスファチジルコリン（ＥＰＣ）、およびこれらの混合物を含むが、これらに限定されない中性脂質であってもよい。特定の好ましい実施形態では、リン脂質はＤＰＰＣ、ＤＳＰＣ、またはこれらの混合物である。
【０１００】
いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質（例えば、１つまたは複数のリン脂質および／またはコレステロール）は、粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約７０ｍｏｌ％、約１５ｍｏｌ％～約７０ｍｏｌ％、約２０ｍｏｌ％～約７０ｍｏｌ％、約２５ｍｏｌ％～約７０ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約７０ｍｏｌ％、約１０ｍｏｌ％～約５５ｍｏｌ％、約１５ｍｏｌ％～約５５ｍｏｌ％、約２０ｍｏｌ％～約５５ｍｏｌ％、約２５ｍｏｌ％～約５５ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約５５ｍｏｌ％、約１３ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％、約１５ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％または約２０ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％を構成してもよい。非カチオン性脂質がリン脂質とコレステロールまたはコレステロール誘導体との混合物である場合、混合物は粒子中に存在する総脂質の最大約４０、５０、または６０ｍｏｌ％を構成してもよい。
【０１０１】
他の実施形態では、非カチオン性脂質（例えば、１つまたは複数のリン脂質および／またはコレステロール）は、粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約４９．５ｍｏｌ％、約１３ｍｏｌ％～約４９．５ｍｏｌ％、約１５ｍｏｌ％～約４９．５ｍｏｌ％、約２０ｍｏｌ％～約４９．５ｍｏｌ％、約２５ｍｏｌ％～約４９．５ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約４９．５ｍｏｌ％、約３５ｍｏｌ％～約４９．５ｍｏｌ％、または約４０ｍｏｌ％～約４９．５ｍｏｌ％を構成し得る。
【０１０２】
さらに別の実施形態では、非カチオン性脂質（例えば、１つまたは複数のリン脂質および／またはコレステロール）は、粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約１３ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約１５ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約２０ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約２５ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、または約３５ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％を構成し得る。
【０１０３】
なおさらなる他の実施形態では、非カチオン性脂質（例えば、１つまたは複数のリン脂

質および／またはコレステロール）は、粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、約１３ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、約１５ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、約２０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、約２５ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、または約３０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％を構成し得る。

【０１０４】

さらなる実施形態では、非カチオン性脂質（例えば、１つまたは複数のリン脂質および／またはコレステロール）は、粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約３５ｍｏｌ％、約１３ｍｏｌ％～約３５ｍｏｌ％、約１５ｍｏｌ％～約３５ｍｏｌ％、約２０ｍｏｌ％～約３５ｍｏｌ％、または約２５ｍｏｌ％～約３５ｍｏｌ％を構成し得る。

【０１０５】

よりさらなる実施形態では、非カチオン性脂質（例えば、１つまたは複数のリン脂質および／またはコレステロール）は、粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％、約１３ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％、約１５ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％、約２０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％、約１０ｍｏｌ％～約２５ｍｏｌ％、約１３ｍｏｌ％～約２５ｍｏｌ％、または約１５ｍｏｌ％～約２５ｍｏｌ％を構成し得る。

【０１０６】

追加の実施形態では、非カチオン性脂質（例えば、１つまたは複数のリン脂質および／またはコレステロール）は、粒子中に存在する総脂質の（少なくとも）約１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、もしくは６０ｍｏｌ％（または任意のその端数もしくはその中の範囲）を構成し得る。

【０１０７】

特定の好ましい実施形態では、非カチオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約３１．５ｍｏｌ％～約４２．５ｍｏｌ％のコレステロールまたはその誘導体を含む。非限定的な例として、本発明のリン脂質不含脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の約３７ｍｏｌ％のコレステロールまたはその誘導体を含んでもよい。他の好ましい実施形態では、本発明のリン脂質不含脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の約３０ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約３５ｍｏｌ％、約３５ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約４０ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約３２ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約３２ｍｏｌ％～約４２ｍｏｌ％、約３２ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、約３４ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約３４ｍｏｌ％～約４２ｍｏｌ％、約３４ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、または約３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、もしくは４５ｍｏｌ％（あるいは任意のその端数またはその中の範囲）のコレステロールまたはその誘導体を含んでもよい。

【０１０８】

特定の他の好ましい実施形態では、非カチオン性脂質は、（ｉ）粒子中に存在する総脂質の約４ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％のリン脂質と、（ｉｉ）粒子中に存在する総脂質の約３０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％のコレステロールまたはその誘導体との混合物を含む。非限定的な例として、リン脂質とコレステロールとの混合物を含む脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の約７ｍｏｌ％のＤＰＰＣおよび約３４ｍｏｌ％のコレステロールを含んでもよい。他の実施形態では、非カチオン性脂質は、（ｉ）粒子中に存在する総脂質の約３ｍｏｌ％～約１５ｍｏｌ％、約４ｍｏｌ％～約１５ｍｏｌ％、約４ｍｏｌ％～約１２ｍｏｌ％、約４ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％、約４ｍｏｌ％～約８ｍｏｌ％、約５ｍｏｌ％～約１２ｍｏｌ％、約５ｍｏｌ％～約９ｍｏｌ％、約６ｍｏｌ％～約１２ｍｏｌ％、約６ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％、または約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、もしくは１５ｍｏｌ％（あるいは任意のその端数またはその中の範囲）のリン脂質と、（ｉｉ）粒子中に存在する総脂質の約２５ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約２５ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約４０ｍｏ

ｌ％、約２５ｍｏｌ％～約３５ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約３５ｍｏｌ％、約３５ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約４０ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約２８ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、約２８ｍｏｌ％～約３８ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約３８ｍｏｌ％、約３２ｍｏｌ％～約３６ｍｏｌ％、または約２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、もしくは４５ｍｏｌ％（あるいは任意のその端数またはその中の範囲）のコレステロールまたはその誘導体との混合物を含む。

【０１０９】

さらに好ましい実施形態では、非カチオン性脂質は、（ｉ）粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％のリン脂質と、（ｉｉ）粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％のコレステロールまたはその誘導体との混合物を含む。非限定的な例として、リン脂質とコレステロールとの混合物を含む脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の約２０ｍｏｌ％のＤＰＰＣおよび約２０ｍｏｌ％のコレステロールを含んでもよい。他の実施形態では、非カチオン性脂質は、（ｉ）粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％、約１０ｍｏｌ％～約２５ｍｏｌ％、約１０ｍｏｌ％～約２０ｍｏｌ％、約１５ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％、約２０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％、約１５ｍｏｌ％～約２５ｍｏｌ％、約１２ｍｏｌ％～約２８ｍｏｌ％、約１４ｍｏｌ％～約２６ｍｏｌ％、または約１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、もしくは３０ｍｏｌ％（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）のリン脂質、および（ｉｉ）粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％、約１０ｍｏｌ％～約２５ｍｏｌ％、約１０ｍｏｌ％～約２０ｍｏｌ％、約１５ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％、約２０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％、約１５ｍｏｌ％～約２５ｍｏｌ％、約１２ｍｏｌ％～約２８ｍｏｌ％、約１４ｍｏｌ％～約２６ｍｏｌ％、または約１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、もしくは３０ｍｏｌ％（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）のコレステロールまたはその誘導体、の混合物を含む。

【０１１０】

複合脂質

本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ（例えばｓｉＲＮＡなどの干渉ＲＮＡ、またはｍＲＮＡを含む））において、複合脂質は、例えば、以下、すなわちポリエチレングリコール（ＰＥＧ）－脂質複合物、ポリアミド（ＡＴＴＡ）－脂質複合物、またはこれらの混合物のうちの１つまたは複数を含んでもよい。好ましい一実施形態では、核酸－脂質粒子は、ＰＥＧ－脂質複合物またはＡＴＴＡ－脂質複合物のいずれかを含む。複合脂質は、例えば、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）、またはこれらの混合物を含むＰＥＧ－脂質を含んでもよい。ＰＥＧ－ＤＡＡ複合物は、ＰＥＧ－ジラウリルオキシプロピル（Ｃ１２）、ＰＥＧ－ジミリスチルオキシプロピル（Ｃ１４）、ＰＥＧ－ジパルミチルオキシプロピル（Ｃ１６）、ＰＥＧ－ジステアリルオキシプロピル（Ｃ１８）、またはそれらの混合物であり得る。

【０１１１】

本発明での使用に好適な追加のＰＥＧ－脂質複合物としては、ｍＰＥＧ２０００－１，２－ジ－Ｏ－アルキル－ｓｎ３－カルボモイルグリセリド（ＰＥＧ－Ｃ－ＤＯＭＧ）が含まれるが、これに限定されない。ＰＥＧ－Ｃ－ＤＯＭＧの合成は、２００８年１２月３１日に出願されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ０８／８８６７６号に記載されており、その開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なさらに追加のＰＥＧ－脂質複合物としては、限定することなく、１－［８’－（１，２－ジミリストイル－３－プロパノキシ）－カルボキサミド－３’，６’－ジオキサオクタニル］カルバモイル－ｗ－メチル－ポリ（エチレングリコール）（２ＫＰＥＧ－ＤＭＧ）が含まれる。２ＫＰＥＧ－ＤＭＧの合成は、米国特許第７，４０４，９６９号

に記載されており、その開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１１２】

本明細書に記載されているＰＥＧ－脂質複合物のＰＥＧ部分は、約５５０ダルトン～約１０，０００ダルトンの範囲の平均分子量を含んでもよい。特定の場合では、ＰＥＧ部分は、約７５０ダルトン～約５，０００ダルトン（例えば、約１，０００ダルトン～約５，０００ダルトン、約１，５００ダルトン～約３，０００ダルトン、約７５０ダルトン～約３，０００ダルトン、約７５０ダルトン～約２，０００ダルトンなど）の平均分子量を有する。好ましい実施形態では、ＰＥＧ部分は、約２，０００ダルトンまたは約７５０ダルトンの平均分子量を有する。

【０１１３】

特定の場合では、複合脂質（例えば、ＰＥＧ－脂質複合物）は、粒子中に存在する総脂質の約０．１～約１０％（または任意のその端数もしくはその中の範囲）を構成し得る。特定の場合では、複合脂質（例えば、ＰＥＧ－脂質複合物）は、粒子中に存在する総脂質の約０．１ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％、約０．５ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％、約１ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％、約０．６ｍｏｌ％～約１．９ｍｏｌ％、約０．７ｍｏｌ％～約１．８ｍｏｌ％、約０．８ｍｏｌ％～約１．７ｍｏｌ％、約１ｍｏｌ％～約１．８ｍｏｌ％、約１．２ｍｏｌ％～約１．８ｍｏｌ％、約１．２ｍｏｌ％～約１．７ｍｏｌ％、約１．３ｍｏｌ％～約１．６ｍｏｌ％、約１．４ｍｏｌ％～約１．５ｍｏｌ％、または約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、もしくは２ｍｏｌ％（あるいは任意のその端数またはその中の範囲）を構成し得る。

【０１１４】

本発明の脂質粒子において、活性剤または治療剤は粒子の脂質部分内に完全に封入されており、このことにより、活性剤または治療剤をヌクレアーゼ分解から保護することができる。好ましい実施形態では、干渉ＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）またはｍＲＮＡなどの核酸を含むＬＮＰは、粒子の脂質部分内に完全に封入されており、このことにより、核酸をヌクレアーゼ分解から保護する。特定の場合では、ＬＮＰ中の核酸は、３７℃で少なくとも約２０、３０、４５、または６０分間粒子をヌクレアーゼに曝露させた後に、実質的に分解されない。他の特定の場合には、ＬＮＰ中の核酸は、３７℃で少なくとも約３０、４５、もしくは６０分間、または少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４もしくは３６時間の血清中での粒子のインキュベート後、実質的に分解されていない。他の実施形態では、活性剤または治療剤（例えば、ｓｉＲＮＡ等の核酸）は、粒子の脂質部分と複合体を形成している。本発明の製剤の利点の１つは、脂質粒子組成物が、ヒト等の哺乳類に対して実質的に無毒であることである。

【０１１５】

「完全に封入された」という用語は、脂質粒子中の活性剤または治療剤が、遊離のＤＮＡ、ＲＮＡ、またはタンパク質が著しく分解され得る血清またはヌクレアーゼもしくはプロテアーゼのアッセイへの曝露後に、著しく分解されないことを示す。完全に封入された系では、通常なら遊離の活性剤または治療剤の１００％を分解する処理において、好ましくは粒子中の活性剤または治療剤の約２５％未満が分解され、より好ましくは粒子中の活性剤または治療剤の約１０％未満、最も好ましくは約５％未満が分解される。核酸治療剤との関連において、完全な封入は、Ｏｌｉｇｒｅｅｎ（登録商標）アッセイにより決定され得る。Ｏｌｉｇｒｅｅｎ（登録商標）は、溶液中のオリゴヌクレオチドおよび一本鎖ＤＮＡまたはＲＮＡを定量化するための超高感度蛍光核酸染色剤である（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ；Ｃａｒｌｓｂａｄ，Ｃａｌｉｆ．から入手可能）。「完全に封入された」とはまた、脂質粒子が血清で安定であること、すなわち、生体内投与時にそれらがその構成成分に急速に分解されないことも示す。

【０１１６】

別の態様では、本発明は、複数の脂質粒子を含む脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）組成物を

提供する。好ましい実施形態では、活性剤または治療剤（例えば、核酸）は、脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）の約３０％～約１００％、約４０％～約１００％、約５０％～約１００％、約６０％～約１００％、約７０％～約１００％、約８０％～約１００％、約９０％～約１００％、約３０％～約９５％、約４０％～約９５％、約５０％～約９５％、約６０％～約９５％、約７０％～約９５％、約８０％～約９５％、約８５％～約９５％、約９０％～約９５％、約３０％～約９０％、約４０％～約９０％、約５０％～約９０％、約６０％～約９０％、約７０％～約９０％、約８０％～約９０％、または少なくとも約３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％（あるいは任意のその端数またはその中の範囲）がその中に封入された活性剤または治療剤を有するように、脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）の脂質部分内に完全に封入される。

【０１１７】

通常、本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）は、約１～約１００の脂質：活性剤（例えば、脂質：核酸）比（質量／質量比）を有する。場合によっては、脂質：活性剤（例えば、脂質：核酸）比（質量／質量比）は、約１～約５０、約２～約２５、約３～約２０、約４～約１５、または約５～約１０の範囲である。好ましい実施形態では、本発明の脂質粒子は、約５～約１５、例えば、約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、もしくは１５（または任意のその端数もしくはその中の範囲）の脂質：活性剤（例えば、脂質：核酸）比（質量／質量比）を有する。

【０１１８】

通常、本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）は約４０ｎｍ～約１５０ｎｍの平均径を有する。好ましい実施形態では、本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）は、約４０ｎｍ～約１３０ｎｍ、約４０ｎｍ～約１２０ｎｍ、約４０ｎｍ～約１００ｎｍ、約５０ｎｍ～約１２０ｎｍ、約５０ｎｍ～約１００ｎｍ、約４０ｎｍ～約８０ｎｍ、約４０ｎｍ～約６０ｎｍ、約５０ｎｍ～約６０ｎｍ、約６０ｎｍ～約１２０ｎｍ、約６０ｎｍ～約１１０ｎｍ、約６０ｎｍ～約１００ｎｍ、約６０ｎｍ～約９０ｎｍ、約６０ｎｍ～約８０ｎｍ、約７０ｎｍ～約１２０ｎｍ、約７０ｎｍ～約１１０ｎｍ、約７０ｎｍ～約１００ｎｍ、約７０ｎｍ～約９０ｎｍ、約７０ｎｍ～約８０ｎｍ、または約１５０ｎｍ、１２０ｎｍ、１１０ｎｍ、１００ｎｍ、９０ｎｍ、もしくは８０ｎｍ未満（または任意のその端数またはその中の範囲）の平均径を有する。

【０１１９】

本発明の具体的な一実施形態では、ＬＮＰは、（ａ）１つまたは複数の非修飾および／または修飾核酸分子（例えば、ｓｉＲＮＡ、ａｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡのような標的遺伝子の発現をサイレンシングする干渉ＲＮＡ；または標的タンパク質の発現を生じさせるｍＲＮＡ）と；（ｂ）粒子中に存在する総脂質の約５６．５ｍｏｌ％～約６６．５ｍｏｌ％を構成する本発明のイオン化できる脂質と；（ｃ）粒子中に存在する総脂質の約３１．５ｍｏｌ％～約４２．５ｍｏｌ％を構成する非カチオン性脂質と；（ｄ）粒子中に存在する総脂質の約１ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％を構成する、粒子の凝集を抑制する複合脂質とを含む。ＬＮＰのこの具体的な実施形態は、本明細書では一般に「１：６２」製剤と呼ばれる。

【０１２０】

本発明の別の具体的な実施形態では、ＬＮＰは、（ａ）１つまたは複数の非修飾および／または修飾核酸分子（例えば、ｓｉＲＮＡ、ａｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡのような標的遺伝子の発現をサイレンシングする干渉ＲＮＡ、または標的タンパク質の発現を生じさせるｍＲＮＡ）と；（ｂ）粒子中に存在する総脂質の約５２ｍｏｌ％～約６２ｍｏｌ％を構成する本発明のイオン化できる脂質と；（ｃ）粒子中に存在する総脂質の約３６ｍｏｌ％～約４７ｍｏｌ％を構成する非カチオン性脂質と；（ｄ）粒子中に存在する総脂質の約１ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％を構成する、粒子の凝集を抑制する複合脂質とを含む。ＬＮＰのこの具体的な実施形態は、本明細書では一般に「１：５７」製剤と呼ばれる。

【０１２１】

本発明はまた、本明細書に記載されている脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物も提供する。

【０１２２】

さらなる態様では、本発明は、１つまたは複数の活性剤または治療剤（例えば、核酸）を細胞に導入するための方法を提供し、細胞を、本明細書に記載されている脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）と接触させることを含む。一実施形態では、細胞は哺乳類にあり、哺乳類はヒトである。別の実施形態では、本発明は、１つまたは複数の活性剤または治療剤（例えば、核酸）を生体内送達するための方法であって、本明細書に記載されている脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）を哺乳類対象に投与することを含む方法を提供する。好ましい実施形態では、投与様式には、経口、鼻腔内、静脈内、腹腔内、筋肉内、関節内、病巣内、気管内、皮下、および皮内が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、哺乳類対象はヒトである。

【０１２３】

一実施形態では、脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）の総注射用量の少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、または２５％が、注射の約８、１２、２４、３６、または４８時間後の血漿中に存在する。他の実施形態では、注射の約８時間、１２時間、２４時間、３６時間、または４８時間後、脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）の総注射用量の約２０％超、３０％超、４０％超、および約６０％、７０％または８０％と同程度が血漿中に存在している。特定の場合では、投与の約１時間後、複数の粒子の約１０％超が哺乳類の血漿中に存在している。他の特定の場合には、脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）の存在は、粒子の投与の少なくとも約１時間後に検出可能である。特定の実施形態では、干渉ＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）またはｍＲＮＡ等の活性剤または治療剤の存在は、投与の約８時間、１２時間、２４時間、３６時間、４８時間、６０時間、７２または９６時間後に細胞内で検出可能である（例えば、肺、肝臓、腫瘍、または炎症部位）。他の実施形態では、干渉ＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）等の活性剤または治療剤による標的配列の発現の下方制御は、投与の約８時間、１２時間、２４時間、３６時間、４８時間、６０時間、７２または９６時間後に検出可能である。さらに他の実施形態では、干渉ＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）などの活性剤または治療剤による標的配列の発現の下方制御は、腫瘍細胞内で、または炎症部位の細胞内で優先的に生じる。さらなる実施形態では、投与部位から近位もしくは遠位の部位の細胞内または肺、肝臓、もしくは腫瘍の細胞内の干渉ＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）などの活性剤または治療剤の存在または作用は、投与の約１２、２４、４８、７２、もしくは９６時間後、または約６、８、１０、１２、１４、１６、１８、１９、２０、２２、２４、２６、もしくは２８日後に検出可能である。他の実施形態では、ｍＲＮＡまたは自己増幅ＲＮＡなどの活性剤または治療剤による標的配列の発現の上方制御は、投与の約８、１２、２４、３６、４８、６０、７２または９６時間後に検出可能である。さらに別の実施形態では、ｍＲＮＡもしくは自己増幅ＲＮＡ等の活性剤または治療剤による標的配列の発現の上方制御は、腫瘍細胞内、または炎症部位の細胞内で選択的に生じる。さらなる実施形態では、投与部位から近位もしくは遠位の部位の細胞内または肺、肝臓、もしくは腫瘍の細胞内でのｍＲＮＡもしくは自己複製ＲＮＡ等の活性剤または治療剤の存在または効果は、投与の約１２時間、２４時間、４８時間、７２時間、もしくは９６時間後、または約６日、８日、１０日、１２日、１４日、１６日、１８日、１９日、２０日、２２日、２４日、２６日、もしくは２８日後に検出可能である。追加の実施形態では、本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）は、非経口投与または腹腔内投与される。

【０１２４】

いくつかの実施形態では、本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）は、干渉ＲＮＡ配列（例えばｓｉＲＮＡ）を含む１つまたは複数の核酸の治療的送達のための方法において特に有用である。特に、１つまたは複数の標的核酸配列または目的遺伝子の転写および／または翻訳を下方制御またはサイレンシングすることによって、哺乳類（例えば、マウスなどのげっ歯類またはヒト、チンパンジー、もしくはサルなどの霊長類）における疾患または障害を治療するための試験管内法および生体内法を提供することは、本発明の１つの目的

である。非限定的な例として、本発明の方法は、哺乳類対象の肝臓および／または腫瘍への干渉ＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）の生体内送達に有用である。特定の実施形態では、疾患または障害は、遺伝子の発現および／または過剰発現と関連しており、遺伝子の発現または過剰発現は、干渉ＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）によって低減される。他の特定の実施形態では、治療有効量の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）を、哺乳類に投与し得る。場合によっては、干渉ＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）をＬＮＰに製剤化し、この粒子を、そのような治療を必要とする患者に投与する。他の場合には、細胞を患者から取り出し、干渉ＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）を試験管内で（例えば、本明細書に記載されているＬＮＰを使用して）送達し、その細胞を患者に再注入する。

【０１２５】

追加の態様では、本発明は、標的遺伝子の発現をサイレンシングする非対称干渉ＲＮＡ（ａｉＲＮＡ）分子を含む脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）、およびそのような粒子を使用して標的遺伝子の発現をサイレンシングする方法を提供する。

【０１２６】

一実施形態では、ａｉＲＮＡ分子は、約１０～約２５（塩基対）ヌクレオチド長の二本鎖（二重鎖）領域を含み、ａｉＲＮＡ分子は５’および３’オーバーハングを含むアンチセンス鎖を含み、ａｉＲＮＡ分子は標的遺伝子発現をサイレンシングする能力がある。

【０１２７】

特定の場合ではａｉＲＮＡ分子は、約１２～２０、１２～１９、１２～１８、１３～１７、または１４～１７（塩基対）のヌクレオチド長、より通常、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０（塩基対）のヌクレオチド長の二本鎖（二重鎖）領域を含む。他の特定の場合には、アンチセンス鎖上の５’および３’のオーバーハングは標的ＲＮＡ配列に相補性である配列を含み、任意で、非標的配列をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖上の５’および３’のオーバーハングの各々は、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、もしくはそれ以上のヌクレオチドを含むか、またはそれらから成る。

【０１２８】

他の実施形態では、ａｉＲＮＡ分子は、２’ＯＭｅヌクレオチド、２’Ｆヌクレオチド、２’－デオキシヌクレオチド、２’－Ｏ－ＭＯＥヌクレオチド、ＬＮＡヌクレオチド、およびこれらの混合物から成る群から選択される修飾ヌクレオチドを含む。好ましい実施形態では、ａｉＲＮＡ分子は、２’ＯＭｅヌクレオチドを含む。非限定的な例として、２’ＯＭｅヌクレオチドは、２’ＯＭｅ－グアノシンヌクレオチド、２’ＯＭｅ－ウリジンヌクレオチド、およびこれらの混合物から成る群から選択され得る。

【０１２９】

関連態様では、本発明は、標的遺伝子の発現をサイレンシングするマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）分子を含む脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）、およびそのような組成物を使用して標的遺伝子発現をサイレンシングする方法を提供する。

【０１３０】

一実施形態では、ｍｉＲＮＡ分子は、約１５～約６０ヌクレオチド長を有し、ｍｉＲＮＡ分子は標的遺伝子の発現をサイレンシングする能力がある。

【０１３１】

特定の場合では、ｍｉＲＮＡ分子は、約１５～５０、１５～４０、または１５～３０ヌクレオチド長、より通常約１５～２５または１９～２５ヌクレオチド長、好ましくは約２０～２４、２１～２２、または２１～２３ヌクレオチド長を有する。好ましい実施形態では、ｍｉＲＮＡ分子は、目的ＲＮＡ配列を標的とする成熟ｍｉＲＮＡ分子である。

【０１３２】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ分子は、２’ＯＭｅヌクレオチド、２’Ｆヌクレオチド、２’－デオキシヌクレオチド、２’－Ｏ－ＭＯＥヌクレオチド、ＬＮＡヌクレオチド、およびこれらの混合物から成る群から選択される修飾ヌクレオチドを含む。好ましい実施形態では、ｍｉＲＮＡ分子は、２’ＯＭｅヌクレオチドを含む。非限定的な例として、

２’ＯＭｅヌクレオチドは、２’ＯＭｅ－グアノシンヌクレオチド、２’ＯＭｅ－ウリジンヌクレオチド、およびこれらの混合物から成る群から選択され得る。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）は、１つまたは複数のｍＲＮＡ分子の治療的送達のための方法において有用である。特に、１つまたは複数の標的タンパク質の発現を介して哺乳類（例えば、マウス等のげっ歯類またはヒト、チンパンジー、もしくはサル等の霊長類）における疾患または障害の治療のための試験管内法および生体内法を提供することが、本発明の１つの目的である。非限定的な例として、本発明の方法は、哺乳類対象への１つまたは複数のｍＲＮＡ分子の生体内送達に有用である。他の特定の実施形態では、治療有効量の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）を哺乳類に投与し得る。場合によっては、１つまたは複数のｍＲＮＡ分子をＬＮＰに製剤化し、この粒子を、そのような治療を必要とする患者に投与する。他の場合には、細胞を患者から取り出し、１つまたは複数のｍＲＮＡ分子を試験管内で（例えば、本明細書に記載されているＬＮＰを使用して）送達し、その細胞を患者に再注入する。

【０１３４】

したがって、本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）は、これらが循環中に安定しており、血管外部位へのアクセスをもたらす薬力学的挙動に必要とされるサイズであり、標的細胞集団に到達することができるので、核酸（例えば、ｓｉＲＮＡ、ａｉＲＮＡ、および／またはｍｉＲＮＡのような干渉ＲＮＡ；またはｍＲＮＡ；ガイドＲＮＡ；自己増幅ＲＮＡ；環状ＲＮＡ；プラスミドＤＮＡおよび閉末端ＤＮＡを含むＤＮＡ）のような活性剤または治療剤の対象（例えば、ヒトのような哺乳類）への投与に使用するのに有利であり、好適である。

【０１３５】

活性剤

活性剤（例えば、治療剤）には、細胞、組織、器官、もしくは対象で所望の効果を示す能力がある任意の分子または化合物が含まれる。そのような効果は、例えば、生物学的、生理学的、および／または美容的な効果であり得る。活性剤は、核酸、ペプチド、ポリペプチド、低分子、およびそれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない、任意の種類の分子または化合物であり得る。核酸の非限定的な例としては、干渉ＲＮＡ分子（例えば、ｓｉＲＮＡ、ａｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ｍＲＮＡ、自己増幅ＲＮＡ、プラスミド、リボザイム、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、およびそれらの混合物が含まれる。ペプチドまたはポリペプチドの例には、抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体断片；ヒト化抗体、組換え型抗体、組換え型ヒト抗体、Ｐｒｉｍａｔｉｚｅｄ（商標）抗体）、サイトカイン、増殖因子、アポトーシス因子、分化誘導因子、細胞表面受容体とそれらのリガンド、ホルモン、およびそれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。低分子の例としては、当業者に公知の従来の任意の薬剤もしくは薬物等の有機低分子または化合物が含まれるが、これらに限定されない。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、活性剤は、治療剤、またはその塩もしくは誘導体である。治療剤誘導体は、それ自体が治療活性である場合もあれば、さらに修飾されると活性となるプロドラッグである場合もある。したがって、一実施形態では、治療剤誘導体は、未修飾薬剤と比較して治療活性の一部または全部を保持しており、また別の実施形態では、治療剤誘導体は、治療活性を欠くがさらに修飾されると活性となるプロドラッグである。

【０１３７】

核酸

特定の実施形態では、本発明の脂質粒子は、核酸と会合し、核酸－脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）となる。いくつかの実施形態では、核酸は、脂質粒子に完全に封入される。本明細書で使用されるとき、「核酸」という用語には、任意のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが含まれ、最大６０ヌクレオチドを含有する断片は一般にオリゴヌクレオチ

ドと称され、より長い断片はポリヌクレオチドと称される。特定の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、約１５～約６０ヌクレオチド長である。核酸は、本発明の脂質粒子で単独で投与される場合もあれば、ペプチド、ポリペプチド、もしくは従来の薬物等の低分子を含む本発明の脂質粒子と組み合わせて投与（例えば、併用投与）される場合もある。

【０１３８】

本発明との関連において、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、天然に存在する塩基、糖および糖間（骨格）結合から成る、ヌクレオチドまたはヌクレオシドモノマーのポリマーまたはオリゴマーを指す。「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語にはまた、同様に機能する天然には存在しないモノマーを含むポリマーもしくはオリゴマー、またはその部分も含まれる。そのような修飾または置換されたオリゴヌクレオチドは、例えば、細胞内への取り込みの向上、免疫原性の低減、およびヌクレアーゼ存在下での安定性の増大等の特性故に、天然型よりも好ましいことが多い。

【０１３９】

オリゴヌクレオチドは一般に、デオキシリボオリゴヌクレオチドまたはリボオリゴヌクレオチドに分類される。デオキシリボオリゴヌクレオチドは、デオキシリボースと呼ばれる５炭糖が、この糖の５’および３’の炭素でリン酸に共有結合で結合し、非分枝の交互ポリマーを形成してなる。リボオリゴヌクレオチドは、５炭糖がリボースである類似の繰り返し構造から成る。

【０１４０】

本発明による脂質－核酸粒子中に存在する核酸には、既知である任意の形態の核酸が含まれる。本明細書で使用される核酸は、一本鎖ＤＮＡもしくはＲＮＡ、または二本鎖ＤＮＡもしくはＲＮＡ、またはＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッドであり得る。二本鎖ＤＮＡの例は本明細書に記載されており、例えば、構造遺伝子、制御および終結領域を含む遺伝子、ならびにウイルスＤＮＡまたはプラスミドＤＮＡ等の自己複製系が含まれる。二本鎖ＲＮＡの例は本明細書に記載されており、例えば、ｓｉＲＮＡ、ならびにａｉＲＮＡおよびｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ等の他のＲＮＡｉ剤が含まれる。一本鎖核酸には、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、成熟ｍｉＲＮＡ、および三重鎖形成性オリゴヌクレオチドが含まれる。

【０１４１】

本発明の核酸は、様々な長さであり得、概して核酸の特定の形態に応じて異なる。例えば、特定の実施形態では、プラスミドまたは遺伝子は、約１，０００～約１００，０００のヌクレオチド残基の長さであり得る。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約１０～約１００ヌクレオチド長の範囲であり得る。様々な関連実施形態では、オリゴヌクレオチドは、一本鎖、二本鎖、および三本鎖のいずれも、長さが約１０～約６０ヌクレオチド長、約１５～約６０ヌクレオチド長、約２０～約５０ヌクレオチド長、約１５～約３０ヌクレオチド長、または約２０～約３０ヌクレオチド長の範囲であり得る。

【０１４２】

特定の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド（またはその鎖）は、標的ポリヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズするか、またはそれに相補性である。本明細書で使用される「特異的にハイブリダイズ可能」および「相補性」という用語は、標的のＤＮＡまたはＲＮＡとオリゴヌクレオチドとの間で安定かつ特異的な結合が生じるような十分な程度の相補性を示す。オリゴヌクレオチドは、特異的にハイブリダイズ可能であるために、その標的核酸配列に対して１００％相補性である必要はないことを理解されたい。好ましい実施形態では、標的配列へのオリゴヌクレオチドの結合が標的配列の正常な機能を妨げて標的配列からの有用性または発現の喪失を引き起こし、かつ、特異的結合が所望される条件下、すなわち、生体内アッセイもしくは治療的処置の場合は生理学的条件下で、また試験管内アッセイの場合はそのアッセイが行われる条件下で、非標的配列へのオリゴヌクレオチドの非特異的結合を回避するのに十分な程度の相補性がある場合、そのオリゴ

ヌクレオチドは特異的にハイブリダイズ可能である。したがって、オリゴヌクレオチドは、それが標的とするかまたはそれが特異的にハイブリダイズする遺伝子またはｍＲＮＡ配列の領域と比較して、１つ、２つ、３つ、またはそれ以上の塩基置換を含んでもよい。

【０１４３】

ｓｉＲＮＡ

本発明の核酸－脂質粒子のｓｉＲＮＡ成分は、目的の標的遺伝子の発現をサイレンシングする能力がある。ｓｉＲＮＡ二重鎖の各鎖は典型的に、約１５～約６０ヌクレオチド長、好ましくは約１５～約３０ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、ｓｉＲＮＡは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む。修飾ｓｉＲＮＡは一般に、対応する未修飾ｓｉＲＮＡ配列よりも免疫刺激が少なく、目的の標的遺伝子に対するＲＮＡｉ活性を保持している。いくつかの実施形態では、修飾ｓｉＲＮＡは、少なくとも１つの２’ＯＭｅプリンヌクレオチドまたは２’ＯＭｅピリミジンヌクレオチド、例えば、２’ＯＭｅ－グアノシンヌクレオチド、２’ＯＭｅ－ウリジンヌクレオチド、２’ＯＭｅ－アデノシンヌクレオチド、および／または２’ＯＭｅ－シトシンヌクレオチドを含有する。好ましい実施形態では、ウリジンおよび／またはグアノシンヌクレオチドのうちの１つまたは複数は、修飾されている。修飾ヌクレオチドは、ｓｉＲＮＡの一方の鎖（すなわち、センスもしくはアンチセンス）または両方の鎖に存在し得る。ｓｉＲＮＡ配列は、オーバーハング（例えば、Ｅｌｂａｓｈｉｒ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．，１５：１８８（２００１）またはＮｙｋａｎｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１０７：３０９（２００１）に記載のような３’または５’のオーバーハング）を有する場合もあれば、オーバーハングを欠く（すなわち、平滑末端を有する）場合もある。

【０１４４】

修飾ｓｉＲＮＡは一般に、ｓｉＲＮＡ二重鎖の二本鎖領域に約１％～約１００％（例えば、約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％）の修飾ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、ｓｉＲＮＡの二本鎖領域内のヌクレオチドのうちの１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上が、修飾ヌクレオチドを含む。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡの二本鎖領域内のヌクレオチドの約２５％未満（例えば、約２５％未満、約２４％未満、約２３％未満、約２２％未満、約２１％未満、約２０％未満、約１９％未満、約１８％未満、約１７％未満、約１６％未満、約１５％未満、約１４％未満、約１３％未満、約１２％未満、約１１％未満、約１０％未満、約９％未満、約８％未満、約７％未満、約６％未満、約５％未満、約４％未満、約３％未満、約２％未満、または約１％未満）が、修飾ヌクレオチドを含む。

【０１４６】

他の実施形態では、ｓｉＲＮＡの二本鎖領域内のヌクレオチドの約１％～約２５％（例えば、約１％～２５％、２％～２５％、３％～２５％、４％～２５％、５％～２５％、６％～２５％、７％～２５％、８％～２５％、９％～２５％、１０％～２５％、１１％～２５％、１２％～２５％、１３％～２５％、１４％～２５％、１５％～２５％、１６％～２５％、１７％～２５％、１８％～２５％、１９％～２５％、２０％～２５％、２１％～２５％、２２％～２５％、２３％～２５％、２４％～２５％等）または約１％～約２０％（例えば、約１％～２０％、２％～２０％、３％～２０％、４％～２０％、５％～２０％、６％～２０％、７％～２０％、８％～２０％、９％～２０％、１０％～２０％、１１％～２０％、１２％～２０％、１３％～２０％、１４％～２０％、１５％～２０％、１６％～２０％、１７％～２０％、１８％～２０％、１９％～２０％、１％～１９％、２％～１９％、３％～１９％、４％～１９％、５％～１９％、６％～１９％、７％～１９％、８％～１９％、９％～１９％、１０％～１９％、１１％～１９％、１２％～１９％、１３％～１

９％、１４％～１９％、１５％～１９％、１６％～１９％、１７％～１９％、１８％～１９％、１％～１８％、２％～１８％、３％～１８％、４％～１８％、５％～１８％、６％～１８％、７％～１８％、８％～１８％、９％～１８％、１０％～１８％、１１％～１８％、１２％～１８％、１３％～１８％、１４％～１８％、１５％～１８％、１６％～１８％、１７％～１８％、１％～１７％、２％～１７％、３％～１７％、４％～１７％、５％～１７％、６％～１７％、７％～１７％、８％～１７％、９％～１７％、１０％～１７％、１１％～１７％、１２％～１７％、１３％～１７％、１４％～１７％、１５％～１７％、１６％～１７％、１％～１６％、２％～１６％、３％～１６％、４％～１６％、５％～１６％、６％～１６％、７％～１６％、８％～１６％、９％～１６％、１０％～１６％、１１％～１６％、１２％～１６％、１３％～１６％、１４％～１６％、１５％～１６％、１％～１５％、２％～１５％、３％～１５％、４％～１５％、５％～１５％、６％～１５％、７％～１５％、８％～１５％、９％～１５％、１０％～１５％、１１％～１５％、１２％～１５％、１３％～１５％、１４％～１５％等）が、修飾ヌクレオチドを含む。

【０１４７】

さらなる実施形態では、例えば、ｓｉＲＮＡの一方または両方の鎖がウリジンおよび／またはグアノシンヌクレオチドにおいて選択的に修飾される場合、生じる修飾ｓｉＲＮＡは、約３０％未満の修飾ヌクレオチド（例えば、約３０％未満、約２９％未満、約２８％未満、約２７％未満、約２６％未満、約２５％未満、約２４％未満、約２３％未満、約２２％未満、約２１％未満、約２０％未満、約１９％未満、約１８％未満、約１７％未満、約１６％未満、約１５％未満、約１４％未満、約１３％未満、約１２％未満、約１１％未満、約１０％未満、約９％未満、約８％未満、約７％未満、約６％未満、約５％未満、約４％未満、約３％未満、約２％未満、もしくは約１％未満の修飾ヌクレオチド）、または約１％～約３０％の修飾ヌクレオチド（例えば、約１％～３０％、２％～３０％、３％～３０％、４％～３０％、５％～３０％、６％～３０％、７％～３０％、８％～３０％、９％～３０％、１０％～３０％、１１％～３０％、１２％～３０％、１３％～３０％、１４％～３０％、１５％～３０％、１６％～３０％、１７％～３０％、１８％～３０％、１９％～３０％、２０％～３０％、２１％～３０％、２２％～３０％、２３％～３０％、２４％～３０％、２５％～３０％、２６％～３０％、２７％～３０％、２８％～３０％、もしくは２９％～３０％の修飾ヌクレオチド）を含むことができる。

【０１４８】

ｓｉＲＮＡ配列の選択

好適なｓｉＲＮＡ配列は、当技術分野で公知の任意の手段を使用して同定することができる。通常、Ｅｌｂａｓｈｉｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，４１１：４９４－４９８（２００１）およびＥｌｂａｓｈｉｒ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．，２０：６８７７－６８８８（２００１）に記載されている方法を、Ｒｅｙｎｏｌｄｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．，２２（３）：３２６－３３０（２００４）に記載の合理的設計規則と組み合わせる。

【０１４９】

一般に、目的の標的遺伝子からの転写物のＡＵＧ開始コドンのヌクレオチド配列３’を、ジヌクレオチド配列（例えば、ＡＡ、ＮＡ、ＣＣ、ＧＧ、またはＵＵ（Ｎ＝Ｃ、GもしくはＵ））についてスキャンする（例えば、Ｅｌｂａｓｈｉｒ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．，２０：６８７７－６８８８（２００１）を参照のこと）。ジヌクレオチド配列の３’に隣接するヌクレオチドを、潜在的ｓｉＲＮＡ配列（すなわち、標的配列またはセンス鎖配列）として同定する。通常、ジヌクレオチド配列の３’に隣接する１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５またはそれ以上のヌクレオチドを、潜在的ｓｉＲＮＡ配列として同定する。いくつかの実施形態では、ジヌクレオチド配列はＡＡまたはＮＡ配列であり、ＡＡまたはＮＡジヌクレオチドの３’に隣接する１９個のヌクレオチドを潜在的ｓｉＲＮＡ配列として同定する。ｓｉＲＮＡ配列は通常、標的遺伝子の長さに沿って異なる位置で間隔を空けて配置される。ｓｉＲＮＡ配列のサイレンシング効率をさらに高めるために、潜在的ｓｉＲＮＡ配列を分析して、例えば標的細胞または生物における、

他のコード配列との相同領域を含まない部位を同定してよい。例えば、約２１塩基対の好適なｓｉＲＮＡ配列は典型的に、標的細胞または生物におけるコード配列に対して相同である連続塩基対を１６～１７を超えて有しない。ｓｉＲＮＡ配列をＲＮＡ　Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターから発現させる場合、４超の連続するＡまたはＴを欠くｓｉＲＮＡ配列が選択される。

【０１５０】

潜在的ｓｉＲＮＡ配列が同定されたら、相補配列（すなわち、アンチセンス鎖配列）を設計することができる。潜在的ｓｉＲＮＡ配列はまた、当該技術分野で公知の様々な基準を使用して分析することができる。例えば、それらのサイレンシング効率を高めるために、ｓｉＲＮＡ配列を合理的設計アルゴリズムによって分析して、以下の特徴のうちの１つまたは複数を有する配列を同定してよい：（１）Ｇ／Ｃ含量が約２５％～約６０％であるＧ／Ｃ、（２）センス鎖の１５～１９位における少なくとも３つのＡ／Ｕ、（３）内部リピートなし、（４）センス鎖の１９位がＡ、（５）センス鎖の３位がＡ、（６）センス鎖の１０位がＵ、（７）センス鎖の１９位がＧ／Ｃではない、および（８）センス鎖の１３位がＧではない。これらの特徴の各々の適切な値を割り当て、ｓｉＲＮＡの選択に有用なアルゴリズムを組み込んだｓｉＲＮＡ設計ツールは、例えば、ｈｔｔｐ：／／ｂｏｚ０９４．ｕｓｔ．ｈｋ／ＲＮＡｉ／ｓｉＲＮＡに見出すことができる。当業者は、前述の特性のうちの１つまたは複数を有する配列が、潜在的ｓｉＲＮＡ配列としてさらなる分析および試験のために選択され得ることを理解するであろう。

【０１５１】

さらに、以下の基準のうちの１つまたは複数を有する潜在的ｓｉＲＮＡ配列は、多くの場合ｓｉＲＮＡとしては除外され得る：（１）同じ塩基が４つ以上並んだ領域を含む配列、（２）Ｇのホモポリマーを含む配列（すなわち、これらのポリマーの構造的特性に起因する非特異的作用の可能性を低減するため）、（３）三重塩基モチーフ（例えば、ＧＧＧ、ＣＣＣ、ＡＡＡ、またはＴＴＴ）を含む配列、（４）Ｇ／Ｃが７つ以上並んだ領域を含む配列、および（５）候補内に４つ以上の塩基のダイレクトリピートを含み内部フォールドバック構造をもたらす配列。しかしながら、当業者は、前述の特徴のうちの１つまたは複数を有する配列が、潜在的ｓｉＲＮＡ配列としてさらなる分析および試験のために依然として選択され得ることを理解するであろう。

【０１５２】

いくつかの実施形態では、潜在的なｓｉＲＮＡ配列を、例えば、Ｋｈｖｏｒｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１１５：２０９－２１６（２００３）、およびＳｃｈｗａｒｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１１５：１９９－２０８（２００３）に記載されているように、ｓｉＲＮＡ二重鎖非対称に基づいてさらに分析することができる。他の実施形態では、潜在的なｓｉＲＮＡ配列を、例えば、Ｌｕｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，３１８：３０３－３１０（２００４）に記載されているように、標的部位での二次構造に基づいてさらに分析することができる。例えば、標的部位での二次構造を、Ｍｆｏｌｄアルゴリズム（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｉｎｆｏ．ｒｐｉ．ｅｄｕ／ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ／ｍｆｏｌｄ／ＲＮＡ／ｆｏｒｍ１．ｃｇｉで入手可能）を使用してモデル化し、塩基対合およびステムループの形態の二次構造の存在が少ない、標的部位での接近可能性に有利なｓｉＲＮＡ配列を選択することができる。

【０１５３】

潜在的なｓｉＲＮＡ配列が同定された後で、例えば、試験管内サイトカインアッセイまたは生体内動物モデルを使用して、任意の免疫刺激特性の存在について配列を分析することができる。ｓｉＲＮＡ配列のセンス鎖および／またはアンチセンス鎖内のモチーフ、例えばＧＵリッチモチーフ（例えば、５’－ＧＵ－３’、５’－ＵＧＵ－３’、５’－ＧＵＧＵ－３’、５’－ＵＧＵＧＵ－３’等）もまた、配列が免疫刺激性であり得るか否かの指標を提供し得る。ｓｉＲＮＡ分子が免疫刺激性であることが判明したら、次に、本明細書に記載されているとおりに、その免疫刺激性が低下するようｓｉＲＮＡ分子を修飾することができる。非限定的な例として、ｓｉＲＮＡが免疫刺激性ｓｉＲＮＡであるのか、または非免

疫刺激性ｓｉＲＮＡであるのかを決定するために、細胞が検出可能な免疫応答を生じるような条件下で、ｓｉＲＮＡ配列を哺乳類のレスポンダー細胞と接触させることができる。哺乳類のレスポンダー細胞は、ナイーブな哺乳類（すなわち、以前にｓｉＲＮＡ配列の遺伝子産物と接触したことのない哺乳類）からのものであり得る。哺乳類のレスポンダー細胞は、例えば、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）、マクロファージ等であり得る。検出可能な免疫応答は、例えば、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－６、ＩＬ－１２、およびその組み合わせ等の、サイトカインまたは増殖因子の産生を含んでもよい。免疫刺激性であると同定されたｓｉＲＮＡ分子はその後、その免疫刺激特性を低下させるよう、センス鎖および／またはアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの少なくとも１つを修飾ヌクレオチドで置換することによって修飾することができる。例えば、ｓｉＲＮＡ二重鎖の二本鎖領域内のヌクレオチドの約３０％未満（例えば、約３０％未満、約２５％未満、約２０％未満、約１５％未満、約１０％未満、または約５％未満）を、２’ＯＭｅヌクレオチド等の修飾ヌクレオチドで置換することができる。次に、修飾ｓｉＲＮＡを前述の通りに哺乳類のレスポンダー細胞と接触させて、その免疫刺激特性が低減または抑制されていることを確認することができる。

【０１５４】

免疫応答を検出するための好適な試験管内アッセイとしては、Ｄａｖｉｄ ｅｔ ａｌ．の二重モノクローナル抗体サンドイッチイムノアッセイ法（米国特許第４，３７６，１１０号）、モノクローナル－ポリクローナル抗体サンドイッチアッセイ（Ｗｉｄｅ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｋｉｒｋｈａｍ ａｎｄ Ｈｕｎｔｅｒ，ｅｄｓ．，Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ Ｍｅｔｈｏｄｓ，Ｅ．ａｎｄ Ｓ．Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎｅ，Ｅｄｉｎｂｕｒｇｈ（１９７０））、Ｇｏｒｄｏｎ ｅｔ ａｌ．の「ウエスタンブロット」法（米国特許第４，４５２，９０１号）、標識リガンドの免疫沈降（Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２５５：４９８０－４９８３（１９８０））、例えばＲａｉｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２５７：５１５４－５１６０（１９８２）により記載されている酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、蛍光色素の使用を含む免疫細胞化学法（Ｂｒｏｏｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ． Ｉｍｍｕｎｏｌ．，３９：４７７（１９８０））；および活性の中和（Ｂｏｗｅｎ－Ｐｏｐｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：２３９６－２４００（１９８４））が含まれるが、これらに限定されない。上記のイムノアッセイに加え、米国特許第３，８１７，８２７号、同第３，８５０，７５２号、同第３，９０１，６５４号、同第３，９３５，０７４号、同第３，９８４，５３３号、同第３，９９６，３４５号、同第４，０３４，０７４号、および同第４，０９８，８７６号に記載のものを含め、他の多くのイムノアッセイが利用可能である。これらの参照文献の開示は、すべての目的のためにその全体が本明細書に参照によって組み込まれる。

【０１５５】

免疫応答を検出するための生体内モデルの非限定的な例には、例えば、Ｊｕｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，１３：４９４－５０５（２００６）に記載されている生体内マウスサイトカイン誘導アッセイが含まれる。特定の実施形態では、実施可能なアッセイは以下のとおりである：（１）ｓｉＲＮＡを、標準的な静脈内注射により外側尾静脈に投与することができる、（２）投与の約６時間後に心臓穿刺により採血して、サイトカイン分析用の血漿として処理することができる、および（３）サンドイッチＥＬＩＳＡキットを製造業者の指示に従って使用してサイトカインを定量化することができる（例えば、マウスおよびヒトのＩＦＮ－α（ＰＢＬ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ；Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）、ヒトＩＬ－６およびＴＮＦ－α（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ；Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）、およびマウスＩＬ－６、ＴＮＦ－α、およびＩＦＮ－γ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．））。

【０１５６】

サイトカインおよび増殖因子に特異的に結合するモノクローナル抗体は、複数の供給源から市販されており、当該技術分野で公知の方法を使用して作製することができる（例え

ば、Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５－４９７（１９７５）およびＨａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ，Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９９）を参照のこと）。モノクローナル抗体の作製は以前に記載されており、当技術分野で公知の任意の手段により行うことができる（Ｂｕｈｒｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ，Ｖｏｌ．１０，Ｎｏ．１，ｐｐ．７７－７８（１９９１））。いくつかの方法では、モノクローナル抗体は、検出を容易にするために（例えば、分光学的、光化学的、生化学的、電気的、光学的、または化学的な手段によって検出可能な任意の組成物で）標識される。

【０１５７】

ｓｉＲＮＡ分子の作製

ｓｉＲＮＡは、いくつかの形態で提供され得、例えば、１つまたは複数の単離された低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）二重鎖としての形態か、より長い二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）としての形態か、またはＤＮＡプラスミド中の転写カセットから転写されたｓｉＲＮＡもしくはｄｓＲＮＡとしての形態が含まれる。ｓｉＲＮＡ配列は、オーバーハング（例えば、Ｅｌｂａｓｈｉｒ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．，１５：１８８（２００１）またはＮｙｋａｎｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１０７：３０９（２００１）に記載のような３’または５’のオーバーハング）を有する場合もあれば、オーバーハングを欠く（すなわち、平滑末端を有する）場合もある。

【０１５８】

ＲＮＡ集団を使用して長い前駆体ＲＮＡを得ることができ、または選択した標的配列に対して実質的もしくは完全な同一性を有する長い前駆体ＲＮＡを使用してｓｉＲＮＡを作製することができる。ＲＮＡは、当業者に周知の方法に従って細胞または組織から単離し、合成し、および／またはクローン化することができる。ＲＮＡは、（細胞もしくは組織から得られる、ｃＤＮＡから転写される、サブトラクトされる、選択される等の）混合集団であり得、または単一の標的配列を表し得る。ＲＮＡは、天然に存在する（例えば、組織または細胞試料から分離される）か、試験管内で（例えば、Ｔ７もしくはＳＰ６ポリメラーゼおよびＰＣＲ産物またはクローニングされたｃＤＮＡを使用）合成されるか、または化学合成され得る。

【０１５９】

長いｄｓＲＮＡを形成するために、合成ＲＮＡの場合、相補体も試験管内で転写させ、ハイブリダイズしてｄｓＲＮＡを形成する。天然に存在するＲＮＡ集団を使用する場合、例えば、ＲＮＡ集団に対応するｃＤＮＡを転写させるか、またはＲＮＡポリメラーゼを使用することによって、ＲＮＡ相補体もまた（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ ＲＮＡｓｅ ＩＩＩまたはダイサーに消化されるためのｄｓＲＮＡを形成するために）提供される。その後、前駆体ＲＮＡをハイブリダイズさせて、消化される二本鎖ＲＮＡを形成する。ｄｓＲＮＡは、対象に直接投与することも、または投与前に試験管内で消化させることもできる。

【０１６０】

ＲＮＡの単離、ＲＮＡの合成、核酸のハイブリダイズ、ｃＤＮＡライブラリーの作成およびスクリーニング、ならびにＰＣＲの実施のための方法は、当該技術分野において周知であり（例えば、Ｇｕｂｌｅｒ ａｎｄ Ｈｏｆｆｍａｎ，Ｇｅｎｅ，２５：２６３－２６９（１９８３）、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（上掲）、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（上掲）を参照のこと）、ＰＣＲ法も同様である（米国特許第４，６８３，１９５号および同第４，６８３，２０２号、ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（Ｉｎｎｉｓ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ，１９９０）を参照のこと）。発現ライブラリーもまた、当業者に周知である。本発明における一般的な使用方法を開示するさらなる基本的な文書としては、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｎｄ ｅｄ．１９８９）、Ｋｒｉｅｇｌｅｒ，Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ

（１９９０）、およびＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，１９９４）が含まれる。これらの参照文献の開示は、すべての目的のためにその全体が本明細書に参照によって組み込まれる。

【０１６１】

好ましくは、ｓｉＲＮＡは化学合成される。本発明のｓｉＲＮＡ分子を含むオリゴヌクレオチドは、Ｕｓｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１０９：７８４５（１９８７）、Ｓｃａｒｉｎｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１８：５４３３（１９９０）、Ｗｉｎｃｏｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２３：２６７７－２６８４（１９９５）、およびＷｉｎｃｏｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏ．，７４：５９（１９９７）に記載のもの等の、当技術分野で公知の様々な技術のいずれかを使用して合成することができる。オリゴヌクレオチドの合成は、５’末端のジメトキシトリチルおよび３’末端のホスホロアミダイト等の一般的な核酸保護基およびカップリング基を使用する。非限定的な例として、スモールスケールの合成は、０．２μｍｏｌスケールのプロトコルを使用してＡｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ合成装置で実施することができる。別法として、０．２μｍｏｌスケールでの合成は、Ｐｒｏｔｏｇｅｎｅ（Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，Ｃａｌｉｆ．）の９６ウェルプレート合成装置で実施することができる。ただし、より大規模または小規模のスケールの合成もまた、本発明の範囲内である。オリゴヌクレオチド合成のための好適な試薬、ＲＮＡ脱保護のための方法、およびＲＮＡ精製のための方法は、当業者に公知である。

【０１６２】

ｓｉＲＮＡ分子はまた、タンデム合成技術により合成することもでき、ここで、両鎖とも、切断可能なリンカーによって区切られた単一の連続オリゴヌクレオチドの断片または鎖として合成され、リンカーがその後切断されて別個の断片または鎖が得られ、これらがハイブリダイズしてｓｉＲＮＡ二重鎖を形成する。リンカーは、ポリヌクレオチドリンカーまたは非－ヌクレオチドリンカーであり得る。ｓｉＲＮＡのタンデム合成は、マルチウェル／マルチプレート合成プラットフォーム、およびバッチ反応器、合成カラム等を用いるラージスケール合成プラットフォームの両方に容易に適応させることができる。別法として、ｓｉＲＮＡ分子を２つの別個のオリゴヌクレオチドから構築することができ、ここで、一方のオリゴヌクレオチドはｓｉＲＮＡのセンス鎖を含み、他方がアンチセンス鎖を含む。例えば、各鎖を別々に合成し、合成および／または脱保護の後にハイブリダイゼーションまたはライゲーションによって共に連結させることができる。他の特定の場合には、ｓｉＲＮＡ分子は、連続するオリゴヌクレオチドの単一断片として合成することができ、ここで、自己相補性センス領域とアンチセンス領域がハイブリダイズして、ヘアピン二次構造を有するｓｉＲＮＡ二重鎖を形成する。

【０１６３】

ｓｉＲＮＡ配列の修飾

特定の態様では、ｓｉＲＮＡ分子は、２本の鎖と、二本鎖領域に少なくとも１つの修飾ヌクレオチドとを有する二重鎖を含み、ここで、各鎖は、約１５～約６０ヌクレオチド長である。有利なことに、修飾ｓｉＲＮＡは、対応する非修飾ｓｉＲＮＡ配列よりも免疫刺激性が低いが、標的配列の発現をサイレンシングする能力を保持している。好ましい実施形態では、ｓｉＲＮＡ分子に導入される化学修飾の程度は、ｓｉＲＮＡの免疫刺激特性の低減または抑制と、ＲＮＡｉ活性の保持との間のバランスをとる。非限定的な例として、目的遺伝子を標的とするｓｉＲＮＡ分子は、標的遺伝子発現をサイレンシングするその能力を保持しながらｓｉＲＮＡによって生じる免疫応答を排除するように、ｓｉＲＮＡ二重鎖内の選択的なウリジンおよび／またはグアノシンヌクレオチドにおいて最小限に修飾され得る（例えば、約３０％未満、約２５％未満、約２０％未満、約１５％未満、約１０％未満、または約５％未満修飾される）。

【０１６４】

本発明での使用に好適な修飾ヌクレオチドの例としては、２’－Ｏ－メチル（２’ＯＭｅ

）、２’－デオキシ－２’－フルオロ（２’Ｆ）、２’－デオキシ、５－Ｃ－メチル、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（ＭＯＥ）、４’－チオ、２’－アミノ、または２’－Ｃ－アリル基を有するリボヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。ノーザンコンホメーションを有する修飾ヌクレオチド、例えば、Ｓａｅｎｇｅｒ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ Ｅｄ．（１９８４）に記載されているもの等もまた、ｓｉＲＮＡ分子での使用に好適である。そのような修飾ヌクレオチドには、限定することなく、ロックド核酸（ＬＮＡ）ヌクレオチド（例えば、２’－Ｏ，４’－Ｃ－メチレン－（Ｄ－リボフラノシル）ヌクレオチド）、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（ＭＯＥ）ヌクレオチド、２’－メチル－チオ－エチルヌクレオチド、２’－デオキシ－２’－フルオロ（２’Ｆ）ヌクレオチド、２’－デオキシ－２’－クロロ（２’Ｃｌ）ヌクレオチド、および２’－アジドヌクレオチドが含まれる。特定の場合では、本明細書に記載されるｓｉＲＮＡ分子には、１つまたは複数のＧ－クランプヌクレオチドが含まれる。Ｇ－クランプヌクレオチドは、修飾シトシン類似体であって、その修飾が、二重鎖内の相補性のグアニンヌクレオチドのワトソン－クリック面およびフーグスティーン面の両方に水素結合する能力を付与する類似体を指す（例えば、Ｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１２０：８５３１－８５３２（１９９８）を参照のこと）。さらに、ヌクレオチド塩基類似体、例えば、Ｃ－フェニル、Ｃ－ナフチル等、他の芳香族誘導体、イノシン、アゾール カルボキサミド、ならびにニトロアゾール誘導体、例えば、３－ニトロピロール、４－ニトロインドール、５－ニトロインドール、および６－ニトロインドール、を有するヌクレオチド（例えば、Ｌｏａｋｅｓ，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２９：２４３７－２４４７（２００１）を参照のこと）をｓｉＲＮＡ分子に組み込むことができる。

【０１６５】

特定の実施形態では、ｓｉＲＮＡ分子はさらに、１つまたは複数の化学修飾、例えば、末端キャップ部分、リン酸骨格修飾等を含んでもよい。末端キャップ部分の例には、逆位デオキシ脱塩基残基、グリセリル修飾、４’，５’－メチレンヌクレオチド、１－（β－Ｄ－エリスロフラノシル）ヌクレオチド、４’－チオヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド、１，５－アンヒドロヘキシトールヌクレオチド、Ｌ－ヌクレオチド、α－ヌクレオチド、修飾塩基ヌクレオチド、トレオ－ペントフラノシルヌクレオチド、非環式３’，４’－セコヌクレオチド、非環式３，４－ジヒドロキシブチルヌクレオチド、非環式３，５－ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、３’－３’－逆位ヌクレオチド部分、３’－３’－逆位脱塩基部分、３’－２’－逆位ヌクレオチド部分、３’－２’－逆位脱塩基部分、５’－５’－逆位ヌクレオチド部分、５’－５’－逆位脱塩基部分、３’－５’－逆位デオキシ脱塩基部分、５’－アミノ－アルキルホスファート、１，３－ジアミノ－２－プロピルホスファート、３－アミノプロピルホスファート、６－アミノヘキシルホスファート、１，２－アミノドデシルホスファート、ヒドロキシプロピルホスファート、１，４－ブタンジオールホスファート、３’－ホスホロアミダート、５’－ホスホロアミダート、ヘキシルホスファート、アミノヘキシルホスファート、３’－ホスファート、５’－アミノ、３’－ホスホロチオアート、５’－ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、および架橋もしくは非架橋メチルホスホナートまたは５’－メルカプト部分が含まれるが、これらに限定されない（例えば、米国特許第５，９９８，２０３号、Ｂｅａｕｃａｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ ４９：１９２５（１９９３）を参照のこと）。リン酸骨格修飾（すなわち、修飾されたヌクレオチド間結合をもたらす）の非限定的な例としては、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、メチルホスホナート、ホスホトリエステル、モルホリノ、アミダート、カルバマート、カルボキシメチル、アセトアミダート、ポリアミド、スルホナート、スルホンアミド、スルファマート、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、およびアルキルシリル置換が含まれる（例えば、Ｈｕｎｚｉｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ａｎａｌｏｇｕｅｓ：Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，ｉｎ Ｍｏｄｅｒｎ Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｍｅｔｈｏｄｓ，ＶＣＨ，３３１－４１７（１９９５）、Ｍｅｓｍａｅｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎｏｖｅｌ Ｂａｃｋｂｏｎ

ｅ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔｓ ｆｏｒ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ，ｉｎ Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，ＡＣＳ，２４－３９（１９９４）を参照のこと）。そのような化学修飾は、ｓｉＲＮＡのセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の５’末端および／または３’末端で出現し得る。これらの参照文献の開示は、すべての目的のためにその全体が本明細書に参照によって組み込まれる。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡ分子のセンス鎖および／またはアンチセンス鎖はさらに、約１つ～約４つ（例えば、１つ、２つ、３つ、または４つ）の２’－デオキシリボヌクレオチドおよび／または修飾ヌクレオチドと未修飾ヌクレオチドの任意の組み合わせを有する３’末端オーバーハングを含むことができる。ｓｉＲＮＡ分子に導入することができる修飾ヌクレオチドおよび化学修飾の種類のさらなる例は、例えば、英国特許第ＧＢ２，３９７，８１８Ｂ号ならびに米国特許公開第２００４０１９２６２６号、同第２００５０２８２１８８号、および同第２００７０１３５３７２号に記載されており、これらの開示は、すべての目的のためにその全体が本明細書に参照によって組み込まれる。

【０１６７】

本明細書に記載されているｓｉＲＮＡ分子は、任意で、ｓｉＲＮＡの一方または両方の鎖に１つまたは複数の非ヌクレオチドを含むことができる。本明細書で使用されるとき、「非ヌクレオチド」という用語は、糖および／またはリン酸置換を含め、１つまたは複数のヌクレオチド単位の代わりに核酸鎖に組み込まれることができ、残りの塩基がそれらの活性を示すことを可能にする、任意の基または化合物を指す。この基または化合物は、アデノシン、グアニン、シトシン、ウラシル、またはチミン等の一般的に認識されているヌクレオチド塩基を含有せず、そのため、１’位に塩基を欠いているという点で脱塩基性である。

【０１６８】

他の実施形態では、ｓｉＲＮＡの化学修飾は、ｓｉＲＮＡ分子に複合物を結合させることを含む。複合物は、共有結合、例えば、生物分解性リンカー等を介してｓｉＲＮＡのセンス鎖および／またはアンチセンス鎖の５’末端および／または３’末端に結合させることができる。複合物はまた、ｓｉＲＮＡに、例えば、カルバマート基または他の連結基を介して結合させることができる（例えば、米国特許公開第２００５００７４７７１号、同第２００５００４３２１９号、および同第２００５０１５８７２７号を参照のこと）。特定の場合では、複合物は、細胞へのｓｉＲＮＡの送達を容易にする分子である。ｓｉＲＮＡへの結合に好適な複合物分子の例には、コレステロール等のステロイド、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等のグリコール、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、脂肪酸、カロテノイド、テルペン、胆汁酸、葉酸塩（例えば、葉酸、葉酸塩類似体およびその誘導体）、糖（例えば、ガラクトース、ガラクトサミン、Ｎ－アセチルガラクトサミン、グルコース、マンノース、フルクトース、フコース等）、リン脂質、ペプチド、細胞取り込みを媒介する能力がある細胞受容体のリガンド、およびこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない（例えば、米国特許公開第２００３０１３０１８６号、同第２００４０１１０２９６号、および同第２００４０２４９１７８号、米国特許第６，７５３，４２３号を参照のこと）。他の例としては、米国特許公開第２００５０１１９４７０号および同第２００５０１０７３２５号に記載されている、親油性部分、ビタミン、ポリマー、ペプチド、タンパク質、核酸、低分子、オリゴ糖、炭水化物クラスター、インターカレーター、副溝結合剤、切断剤、および架橋剤複合物分子が含まれる。さらに他の例としては、米国特許公開第２００５０１５３３３７号に記載されている、２’－Ｏ－アルキルアミン、２’－β－アルコキシアルキルアミン、ポリアミン、Ｃ５－カチオン性修飾ピリミジン、カチオン性ペプチド、グアニジウム基、アミジニニウム（ａｍｉｄｉｎｉｕｍ）基、カチオン性アミノ酸複合物分子が含まれる。追加の例としては、米国特許公開第２００４０１６７０９０号に記載されている、疎水性基、膜活性化合物、細胞透過性化合物、細胞標的化シグナル、相互作用修飾因子、および立体安定剤複合物分子が含まれる。さらなる例とし

ては、米国特許公開第２００５０２３９７３９号に記載されている複合物分子が含まれる。使用する複合物の種類およびｓｉＲＮＡ分子とのコンジュゲーションの程度を、ＲＮＡｉ活性を保持しつつ、改善されたｓｉＲＮＡの薬物動態プロファイル、バイオアベイラビリティ、および／または安定性について、評価することができる。したがって、当業者は、様々な周知の試験管内細胞培養物または生体内動物モデルのいずれかを使用して、種々の複合物を結合させたｓｉＲＮＡ分子をスクリーニングし、改善された特性および完全なＲＮＡｉ活性を有するものを同定することができる。上記の特許文献の開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１６９】

標的遺伝子

特定の実施形態では、本明細書に記載されている核酸－脂質粒子の核酸成分（例えば、ｓｉＲＮＡ）を使用して、目的遺伝子の翻訳（すなわち、発現）を下方制御またはサイレンシングすることができる。目的遺伝子には、ウイルスの感染および生存に関連する遺伝子、代謝性疾患および障害（例えば、肝疾患および肝障害）に関連する遺伝子、腫瘍形成および細胞形質転換（例えば、がん）に関連する遺伝子、血管新生遺伝子、炎症応答および自己免疫応答に関連するものなどの免疫調節遺伝子、リガンド受容体遺伝子、ならびに神経変性障害に関連する遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、目的遺伝子は、肝細胞で発現される。

【０１７０】

ウイルスの感染および生存に関連する遺伝子には、細胞と結合して、侵入し、細胞内で複製するためにウイルスによって発現される遺伝子が含まれる。特に対象となるものは、慢性ウイルス疾患に関連するウイルス配列である。特に対象となるウイルス配列には、エボラウイルスおよびマールブルグウイルスなどのフィロウイルス（例えば、Ｇｅｉｓｂｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．，１９３：１６５０－１６５７（２００６）を参照のこと）、ラッサウイルス、フニンウイルス、マチュポウイルス、グアナリトウイルス、およびサビアウイルスなどのアレナウイルス（Ｂｕｃｈｍｅｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｒｅｎａｖｉｒｉｄａｅ：ｔｈｅ ｖｉｒｕｓｅｓ ａｎｄ ｔｈｅ ｉｒｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ，Ｉｎ：ＦＩＥＬＤＳＶＩＲＯＬＯＧＹ，Ｋｎｉｐｅ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），４ｔｈｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，（２００１））、インフルエンザＡ、Ｂ、およびＣウイルスなどのインフルエンザウイルス（例えば、Ｓｔｅｉｎｈａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｇｅｎｅｔ．，３６：３０５－３３２（２００２）、およびＮｅｕｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｇｅｎ Ｖｉｒｏｌ．，８３：２６３５－２６６２（２００２）を参照のこと）、肝炎ウイルス（例えば、Ｈａｍａｓａｋｉ ｅｔ ａｌ．，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．，５４３：５１（２００３）、Ｙｏｋｏｔａ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｒｅｐ．，４：６０２（２００３）、Ｓｃｈｌｏｍａｉ ｅｔ ａｌ．，Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ，３７：７６４（２００３）、Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１００：２７８３（２００３）、Ｋａｐａｄｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１００：２０１４（２００３）、およびＦＩＥＬＤＳ ＶＩＲＯＬＯＧＹ，Ｋｎｉｐｅ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），４ｔｈ ｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ（２００１）を参照のこと）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）（Ｂａｎｅｒｊｅａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，８：６２（２００３）、Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７７：７１７４（２００３）、Ｓｔｅｐｈｅｎｓｏｎ，ＪＡＭＡ，２８９：１４９４（２００３）、Ｑｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１００：１８３（２００３））、ヘルペスウイルス（Ｊｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７７：３３０１（２００３））、ならびにヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）（Ｈａｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７７：６０６６（２００３）、Ｊｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，２１：６０４１（２００２））の配列が含まれる。

【０１７１】

サイレンシングすることができる例示的なフィロウイルス核酸配列には、構造タンパク質（例えば、ＶＰ３０、ＶＰ３５、核タンパク質（ＮＰ）、ポリメラーゼタンパク質（Ｌ－ｐｏｌ））、および膜結合タンパク質（例えば、ＶＰ４０、糖タンパク質（ＧＰ）、ＶＰ２４）をコードする核酸配列が含まれるが、これらに限定されない。エボラウイルスの完全なゲノム配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＣ＿００２５４９、ＡＹ７６９３６２、ＮＣ＿００６４３２、ＮＣ＿００４１６１、ＡＹ７２９６５４、ＡＹ３５４４５８、ＡＹ１４２９６０、ＡＢ０５０９３６、ＡＦ５２２８７４、ＡＦ４９９１０１、ＡＦ２７２００１、およびＡＦ０８６８３３に記載されている。エボラウイルスＶＰ２４の配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号Ｕ７７３８５およびＡＹ０５８８９７に記載されている。エボラウイルスＬ－ｐｏｌの配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号Ｘ６７１１０に記載されている。エボラウイルスＶＰ４０の配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＹ０５８８９６に記載されている。エボラウイルスＮＰの配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＹ０５８８９５に記載されている。エボラウイルスＧＰの配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＹ０５８８９８、Ｓａｎｃｈｅｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｖｉｒｕｓ　Ｒｅｓ．，２９：２１５－２４０（１９９３）、Ｗｉｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，６７：１２０３－１２１０（１９９３）、Ｖｏｌｃｈｋｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．，３０５：１８１－１８４（１９９２）、および米国特許第６，７１３，０６９号に記載されている。さらなるエボラウイルス配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号Ｌ１１３６５およびＸ６１２７４に記載されている。マールブルグウイルスの完全なゲノム配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＣ＿００１６０８、ＡＹ４３０３６５、ＡＹ４３０３６６、およびＡＹ３５８０２５に記載されている。マールブルグウイルスＧＰの配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＦ００５７３４、ＡＦ００５７３３、およびＡＦ００５７３２に記載されている。マールブルグウイルスＶＰ３５の配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＦ００５７３１およびＡＦ００５７３０に記載されている。さらなるマールブルグウイルス配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号Ｘ６４４０６、Ｚ２９３３７、ＡＦ００５７３５、およびＺ１２１３２に記載されている。エボラウイルスおよびマールブルグウイルスの核酸配列を標的とするｓｉＲＮＡ分子の非限定的な例としては、開示が、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第２００７０１３５３７０号に記載のものが含まれる。

【０１７２】

サイレンシングすることができる例示的なインフルエンザウイルス核酸配列としては、核タンパク質（ＮＰ）、マトリックスタンパク質（Ｍ１およびＭ２）、非構造タンパク質（ＮＳ１およびＮＳ２）、ＲＮＡポリメラーゼ（ＰＡ、ＰＢ１、ＰＢ２）、ノイラミニダーゼ（ＮＡ）、並びにヘマグルチニン（ＨＡ）をコードする核酸配列が含まれるが、これらに限定されない。インフルエンザＡ型のＮＰ配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＣ＿００４５２２、ＡＹ８１８１３８、ＡＢ１６６８６３、ＡＢ１８８８１７、ＡＢ１８９０４６、ＡＢ１８９０５４、ＡＢ１８９０６２、ＡＹ６４６１６９、ＡＹ６４６１７７、ＡＹ６５１４８６、ＡＹ６５１４９３、ＡＹ６５１４９４、ＡＹ６５１４９５、ＡＹ６５１４９６、ＡＹ６５１４９７、ＡＹ６５１４９８、ＡＹ６５１４９９、ＡＹ６５１５００、ＡＹ６５１５０１、ＡＹ６５１５０２、ＡＹ６５１５０３、ＡＹ６５１５０４、ＡＹ６５１５０５、ＡＹ６５１５０６、ＡＹ６５１５０７、ＡＹ６５１５０９、ＡＹ６５１５２８、ＡＹ７７０９９６、ＡＹ７９０３０８、ＡＹ８１８１３８、およびＡＹ８１８１４０に記載されている。インフルエンザＡ型のＰＡ配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＹ８１８１３２、ＡＹ７９０２８０、ＡＹ６４６１７１、ＡＹ８１８１３２、ＡＹ８１８１３３、ＡＹ６４６１７９、ＡＹ８１８１３４、ＡＹ５５１９３４、ＡＹ６５１６１３、ＡＹ６５１６１０、ＡＹ６５１６２０、ＡＹ６５１６１７、ＡＹ６５１６００、ＡＹ６５１６１１、ＡＹ６５１６０６、ＡＹ６５１６１８、ＡＹ６５１６０８、ＡＹ６５１６０７、ＡＹ６５１６０５、ＡＹ６５１６０９、ＡＹ６５１６１５、ＡＹ６５１６１６、ＡＹ６５１６４０、ＡＹ６５１６１４、ＡＹ６５１６１２、ＡＹ６５１６２１、ＡＹ６５１６１９、ＡＹ７７０９９５、およびＡＹ７２４７８６に記載されている。インフルエン

ザウイルスの核酸配列を標的とするｓｉＲＮＡ分子の非限定的な例としては、開示が、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第２００７０２１８１２２号に記載のものが含まれる。

【０１７３】

サイレンシングすることができる例示的な肝炎ウイルスの核酸配列としては、転写および翻訳に関与する核酸配列（例えば、Ｅｎ１、Ｅｎ２、Ｘ、Ｐ）、ならびに構造タンパク質（例えば、Ｃタンパク質およびＣ関連タンパク質を含むコアタンパク質、Ｓ、Ｍ、および／またはＬタンパク質を含むカプシドおよびエンベロープタンパク質、またはそれらの断片）をコードする核酸配列が含まれるが、これらに限定されない（例えば、ＦＩＥＬＤＳ　ＶＩＲＯＬＯＧＹ（上掲）を参照のこと）。サイレンシングすることができる例示的なＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）の核酸配列としては、５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）、３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）、ポリタンパク質翻訳開始コドン領域、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）配列、および／またはコアタンパク質、Ｅ１タンパク質、Ｅ２タンパク質、ｐ７タンパク質、ＮＳ２タンパク質、ＮＳ３プロテアーゼ／ヘリカーゼ、ＮＳ４Ａタンパク質、ＮＳ４Ｂタンパク質、ＮＳ５Ａタンパク質、および／またはＮＳ５Ｂ　ＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼをコードする核酸配列が含まれるが、これらに限定されない。ＨＣＶのゲノム配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＣ＿００４１０２（ＨＣＶ遺伝子型１ａ）、ＡＪ２３８７９９（ＨＣＶ遺伝子型１ｂ）、ＮＣ＿００９８２３（ＨＣＶ遺伝子型２）、ＮＣ＿００９８２４（ＨＣＶ遺伝子型３）、ＮＣ＿００９８２５（ＨＣＶ遺伝子型４）、ＮＣ＿００９８２６（ＨＣＶ遺伝子型５）、およびＮＣ＿００９８２７（ＨＣＶ遺伝子型６）に記載されている。Ａ型肝炎のウイルス核酸配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＣ＿００１４８９に記載されており、Ｂ型肝炎ウイルスの核酸配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＣ＿００３９７７に記載されており、Ｄ型肝炎ウイルスの核酸配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＣ＿００１６５３に記載されており、Ｅ型肝炎ウイルスの核酸配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＣ＿００１４３４に記載されており、Ｇ型肝炎ウイルスの核酸配列は、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＣ＿００１７１０に記載されている。ウイルスの感染および生存に関連する遺伝子をコードする配列のサイレンシングは、ウイルス性の状態を治療するために使用される従来の薬剤の投与と組み合わせて好都合に使用することができる。肝炎ウイルス核酸配列を標的とするｓｉＲＮＡ分子の非限定的な例には、米国特許公開第２００６０２８１１７５号、同第２００５００５８９８２号、および同第２００７０１４９４７０号、米国特許第７，３４８，３１４号、並びに２００９年３月２０日に出願された米国仮特許出願第６１／１６２，１２７号に記載されているものが含まれ、これらの開示は、すべての目的のためにその全体が本明細書に参照によって組み込まれる。

【０１７４】

代謝性疾患および障害（例えば、肝臓が標的である障害、ならびに肝疾患および肝障害）に関連する遺伝子には、例えば、脂質異常症において発現する遺伝子（例えば、ＬＸＲαおよびＬＸＲβなどの肝臓Ｘ受容体（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿００７１２１）、ファルネソイドＸ受容体（ＦＸＲ）（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿００５１２３）、ステロール調節エレメント結合タンパク質（ＳＲＥＢＰ）、部位－１プロテアーゼ（Ｓ１Ｐ）、３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリル補酵素－Ａレダクターゼ（ＨＭＧ補酵素－Ａレダクターゼ）、アポリポタンパク質Ｂ（ＡｐｏＢ）（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿０００３８４）、アポリポタンパク質ＣＩＩＩ（ＡｐｏＣ３）（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿０００４０およびＮＧ＿００８９４９ＲＥＧＩＯＮ：５００１．８１６４）、およびアポリポタンパク質Ｅ（ＡｐｏＥ）（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿０００４１およびＮＧ＿００７０８４　ＲＥＧＩＯＮ：５００１．８６１２））、ならびに糖尿病（例えば、グルコース６－ホスファターゼ）が含まれる（例えば、Ｆｏｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，８１：６８７（１９９５）、Ｓｅｏｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．，９：７２（１９９５）、Ｚａｖａｃｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ

，９４：７９０９（１９９７）、Ｓａｋａｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，８５：１０３７－１０４６（１９９６）、Ｄｕｎｃａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７２：１２７７８－１２７８５（１９９７）、Ｗｉｌｌｙ ｅｔ ａｌ．，ＧｅｎｅｓＤｅｖ．，９：１０３３－１０４５（１９９５）、Ｌｅｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７２：３１３７－３１４０（１９９７）、Ｊａｎｏｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３８３：７２８－７３１（１９９６）、およびＰｅｅｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，９３：６９３－７０４（１９９８）を参照のこと）。当業者は、代謝性疾患および障害（例えば、肝臓が標的である障害、ならびに肝疾患および肝障害）に関連する遺伝子には、肝臓自体で発現する遺伝子ならびに他の器官および組織で発現する遺伝子が含まれることを理解するであろう。代謝性疾患および障害に関連する遺伝子をコードする配列のサイレンシングは、その疾患または障害を治療するために使用される従来の薬剤の投与と組み合わせて好都合に使用することができる。ＡｐｏＢ遺伝子を標的とするｓｉＲＮＡ分子の非限定的な例には、米国特許出願公開第２００６０１３４１８９号に記載されているものが含まれ、この開示は、すべての目的のためにその全体が本明細書に参照によって組み込まれる。ＡｐｏＣ３遺伝子を標的とするｓｉＲＮＡ分子の非限定的な例には、２００９年１月２６日に出願された米国仮特許出願第６１／１４７，２３５号に記載されているものが含まれ、この開示は、すべての目的のためにその全体が本明細書に参照によって組み込まれる。

【０１７５】

腫瘍形成および細胞形質転換（例えば、がんまたは他の新生物形成）に関連する遺伝子配列の例には、Ｅｇ５（ＫＳＰ、ＫＩＦ１１；Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿００４５２３）などの有糸分裂キネシン；ポロ様キナーゼ１（ＰＬＫ－１）（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿００５０３０、Ｂａｒｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，５：４２９－４４０（２００４）ＷＥＥ１（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿００３３９０およびＮＭ＿００１１４３９７６）等のチロシンキナーゼ；ＸＩＡＰ（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿００１１６７）等のアポトーシス阻害因子；ＣＳＮ１、ＣＳＮ２、ＣＳＮ３、ＣＳＮ４、ＣＳＮ５（ＪＡＢ１；Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿００６８３７）、ＣＳＮ６、ＣＳＮ７Ａ、ＣＳＮ７ＢおよびＣＳＮ８等のＣＯＰ９シグナロソームサブユニット；ＣＯＰ１（ＲＦＷＤ２；Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿０２２４５７およびＮＭ＿００１００１７４０）等のユビキチンリガーゼ；並びにＨＤＡＣ１、ＨＤＡＣ２（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿００１５２７）、ＨＤＡＣ３、ＨＤＡＣ４、ＨＤＡＣ５、ＨＤＡＣ６、ＨＤＡＣ７、ＨＤＡＣ８、ＨＤＡＣ９等のヒストンデアセチラーゼ等が含まれる。Ｅｇ５およびＸＩＡＰ遺伝子を標的とするｓｉＲＮＡ分子の非限定的な例としては、２００７年５月２９日に出願された米国特許出願第１１／８０７，８７２号に記載のものが挙げられ、この開示はあらゆる目的のためにその全体が本明細書に参照によって組み込まれる。ＰＬＫ－１遺伝子を標的とするｓｉＲＮＡ分子の非限定的な例には、米国特許公開第２００５０１０７３１６号および同第２００７０２６５４３８号、並びに２００８年１２月２３日に出願された米国特許出願第１２／３４３，３４２号に記載されており、それらの開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。ＣＳＮ５遺伝子を標的とするｓｉＲＮＡ分子の非限定的な例としては、２００８年４月１５日に出願された米国仮特許出願第６１／０４５，２５１号に記載されているものが含まれ、この開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１７６】

腫瘍形成および細胞形質転換に関連する遺伝子配列のさらなる例には、転座配列、例えば、ＭＬＬ融合遺伝子、ＢＣＲ－ＡＢＬ（Ｗｉｌｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，２１：５７１６（２００２）、Ｓｃｈｅｒｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１０１：１５６６（２００３））、ＴＥＬ－ＡＭＬ１、ＥＷＳ－ＦＬＩ１、ＴＬＳ－ＦＵＳ、ＰＡＸ３－ＦＫＨＲ、ＢＣＬ－２、ＡＭＬ１－ＥＴＯ、およびＡＭＬ１－ＭＴＧ８（Ｈｅｉｄｅｎｒｅｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１０１：３１５７（２００３））；過剰発現

配列、例えば、多剤耐性遺伝子（Ｎｉｅｔｈ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．，５４５：１４４（２００３）、Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．６３：１５１５（２００３））、サイクリン（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６３：３５９３（２００３）、Ｚｏｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．，１６：２９２３（２００２））、ベーターカテニン（Ｖｅｒｍａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，９：１２９１（２００３））、テロメラーゼ遺伝子（Ｋｏｓｃｉｏｌｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒ．，２：２０９（２００３））、ｃ－ＭＹＣ、Ｎ－ＭＹＣ、ＢＣＬ－２、増殖因子受容体（例えば、ＥＧＦＲ／ＥｒｂＢ１（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿００５２２８、ＮＭ＿２０１２８２、ＮＭ＿２０１２８３、およびＮＭ＿２０１２８４、またＮａｇｙ　ｅｔ　ａｌ．Ｅｘｐ．ＣｅｌｌＲｅｓ．，２８５：３９－４９（２００３）を参照、ＥｒｂＢ２／ＨＥＲ－２（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿００４４４８およびＮＭ＿００１００５８６２）、ＥｒｂＢ３（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿００１９８２およびＮＭ＿００１００５９１５）、およびＥｒｂＢ４（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿００５２３５およびＮＭ＿００１０４２５９９）；およびＲＡＳ等の変異配列（Ｔｕｓｃｈｌ　ａｎｄ　Ｂｏｒｋｈａｒｄｔ，Ｍｏｌ．Ｉｎｔｅｒｖｅｎｔｉｏｎｓ，２：１５８（２００２）で概説される）が挙げられる。ＥＧＦＲ遺伝子を標的とするｓｉＲＮＡ分子の非限定的な例には、２００７年５月２９日に出願された米国特許出願第１１／８０７，８７２号に記載されるものが挙げられ、その開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１７７】

ＤＮＡ修復酵素をコードする配列のサイレンシングは、化学療法剤の投与と組み合わせて使用される（Ｃｏｌｌｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６３：１５５０（２００３））。腫瘍遊走に関連するタンパク質をコードする遺伝子はまた、目的標的配列、例えば、インテグリン、セレクチン、およびメタロプロテイナーゼである。前述の例は排他的なものではない。当業者は、腫瘍形成もしくは細胞形質転換、腫瘍増殖、または腫瘍遊走を促進するかまたは推進する、いかなる全体的または部分的な遺伝子配列も、鋳型配列として含まれ得ることを理解するであろう。

【０１７８】

血管新生遺伝子は、新たな血管の形成を促進することができる。特に対象となるのは血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）（Ｒｅｉｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｖｉｓ．，９：２１０（２００３））またはＶＥＧＦＲである。ＶＥＧＦＲを標的とするｓｉＲＮＡ配列は、例えば、ＧＢ２３９６８６４、米国特許出願公開第２００４０１４２８９５号、およびＣＡ２４５６４４４に記載されており、それらの開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１７９】

抗血管新生遺伝子は、新血管新生を阻害することができる。これらの遺伝子は、血管新生が疾患の病理学的発生における役割を担うがんの治療に特に有用である。抗血管新生遺伝子の例としては、限定されないが、エンドスタチン（例えば、米国特許第６，１７４，８６１号を参照のこと）、アンジオスタチン（例えば、米国特許第５，６３９，７２５号を参照のこと）、およびＶＥＧＦＲ２（例えば、Ｄｅｃａｕｓｓｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．，１８８：３６９－３７７（１９９９）を参照のこと）が含まれ、それらの開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１８０】

免疫調節遺伝子は、１つまたは複数の免疫応答を調節する遺伝子である。免疫調節遺伝子の例としては、増殖因子（例えば、ＴＧＦ－α、ＴＧＦ－β、ＥＧＦ、ＦＧＦ、ＩＧＦ、ＮＧＦ、ＰＤＧＦ、ＣＧＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＳＣＦ等）、インターロイキン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－１２（Ｈｉｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１７１：６９１（２００３））、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２０等）、インターフェロン（例えば、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ等）およびＴＮＦ等のサイトカインが含まれるが、これらに限定されない。ＦａｓおよびＦａｓリガンド遺伝子もまた、目的

の免疫調節標的配列である（Ｓｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．，９：３４７（２００３））。造血細胞およびリンパ系細胞において二次シグナル伝達分子をコードする遺伝子、例えば、ブルトン型チロシンキナーゼ（Ｂｔｋ）（Ｈｅｉｎｏｎｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．，５２７：２７４（２００２））等のＴｅｃファミリーキナーゼもまた、本発明に含まれる。

【０１８１】

細胞受容体リガンドには、細胞表面受容体（例えば、インスリン受容体、ＥＰＯ受容体、Ｇタンパク質共役型受容体、チロシンキナーゼ活性を有する受容体、サイトカイン受容体、増殖因子受容体等）に結合して、その受容体が関与する生理学的経路（例えば、グルコースレベルの調節、血球発生、有糸分裂生起等）を調節（例えば、阻害、活性化等）することができるリガンドが含まれる。細胞受容体リガンドの例としては、サイトカイン、増殖因子、インターロイキン、インターフェロン、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、インスリン、グルカゴン、Ｇタンパク質共役型受容体リガンド等が含まれる、これらに限定されない。トリヌクレオチドリピート（例えば、ＣＡＧリピート）の伸長をコードする鋳型は、球脊髄性筋萎縮症およびハンチントン病（Ｃａｐｌｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．，１１：１７５（２００２））等のトリヌクレオチドリピートの伸長に起因する神経変性障害における病原性配列のサイレンシングに使用される。

【０１８２】

遺伝子の発現を下方制御またはサイレンシングするために核酸によって（例えば、ｓｉＲＮＡによって）標的化され得る他の特定の標的遺伝子としては、大動脈平滑筋アルファ２アクチン（ＡＣＴＡ２）、アルコール脱水素酵素１Ａ（ＡＤＨ１Ａ）、アルコール脱水素酵素４（ＡＤＨ４）、アルコール脱水素酵素６（ＡＤＨ６）、アファミン（Ａｆａｍｉｎ）（ＡＦＭ）、アンジオテンシノーゲン（ＡＧＴ）、セリン－ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＧＸＴ）、アルファ－２－ＨＳ－糖タンパク質（ＡＨＳＧ）、アルド－ケトレダクターゼファミリー１メンバーＣ４（ＡＫＲ１Ｃ４）、血清アルブミン（ＡＬＢ）、アルファ－１－ミクログロブリン／ビクニン前駆体（ＡＭＢＰ）、アンジオポエチン関連タンパク質３（ＡＮＧＰＴＬ３）、血清アミロイドＰ成分（ＡＰＣＳ）、アポリポタンパク質Ａ－ＩＩ（ＡＰＯＡ２）、アポリポタンパク質Ｂ－１００（ＡＰＯＢ）、アポリポタンパク質Ｃ３（ＡＰＯＣ３）、アポリポタンパク質Ｃ－ＩＶ（ＡＰＯＣ４）、アポリポタンパク質Ｆ（ＡＰＯＦ）、ベーター２－糖タンパク質１（ＡＰＯＨ）、アクアポリン－９（ＡＱＰ９）、胆汁酸－ＣｏＡ：アミノ酸Ｎ－アシルトランスフェラーゼ（ＢＡＡＴ）、Ｃ４ｂ結合タンパク質ベータ鎖（Ｃ４ＢＰＢ）、ＬＩＮＣ０１５５４（Ｃ５ｏｒｆ２７）によりコードされる性質不明の推定タンパク質、補体第３因子（Ｃ３）、補数第５因子（Ｃ５）、補体成分Ｃ６（Ｃ６）、補体成分Ｃ８アルファ鎖（Ｃ８Ａ）、補体成分Ｃ８ベータ鎖（Ｃ８Ｂ）、補体成分Ｃ８ガンマ鎖（Ｃ８Ｇ）、補体成分Ｃ９（Ｃ９）、カルモジュリン結合転写活性化因子１（ＣＡＭＴＡ１）、ＣＤ３８（ＣＤ３８）、補体因子Ｂ（ＣＦＢ）、補体因子Ｈ関連タンパク質１（ＣＦＨＲ１）、補体因子Ｈ関連タンパク質２（ＣＦＨＲ２）、補体因子Ｈ関連タンパク質３（ＣＦＨＲ３）、カンナビノイド受容体１（ＣＮＲ１）、セルロプラスミン（ＣＰ）、カルボキシペプチダーゼＢ２（ＣＰＢ２）、結合組織増殖因子（ＣＴＧＦ）、Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフケモカイン２（ＣＸＣＬ２）、シトクロムＰ４５０　１Ａ２（ＣＹＰ１Ａ２）、シトクロムＰ４５０　２Ａ６（ＣＹＰ２Ａ６）、シトクロムＰ４５０　２Ｃ８（ＣＹＰ２Ｃ８）、シトクロムＰ４５０　２Ｃ９（ＣＹＰ２Ｃ９）、シトクロムＰ４５０ファミリー２サブファミリーＤメンバー６（ＣＹＰ２Ｄ６）、シトクロムＰ４５０　２Ｅ１（ＣＹＰ２Ｅ１）、フィロキノンオメガ－ヒドロキシラーゼＣＹＰ４Ｆ２（ＣＹＰ４Ｆ２）、７－アルファ－ヒドロキシコレスト－４－エン－３－オン１２－アルファ－ヒドロキシラーゼ（ＣＹＰ８Ｂ１）、ジペプチジルペプチダーゼ４（ＤＰＰ４）、凝固第１２因子（Ｆ１２）、凝固第ＩＩ因子（トロンビン）（Ｆ２）、凝固第ＩＸ因子（Ｆ９）、フィブリノーゲンアルファ鎖（ＦＧＡ）、フィブリノーゲンベータ鎖（ＦＧＢ）、フィブリノーゲンガンマ鎖（ＦＧＧ）、フィブリノーゲン様１（ＦＧＬ１）、フラビン含有モノオキシゲナーゼ３（ＦＭＯ３）、フラビン含有モノオキシゲナ

ーゼ５（ＦＭＯ５）、グループスペシフィックコンポーネント（ビタミンＤ結合タンパク質）（ＧＣ）、成長ホルモン受容体（ＧＨＲ）、グリシンＮ－メチルトランスフェラーゼ（ＧＮＭＴ）、ヒアルロナン結合タンパク質２（ＨＡＢＰ２）、ヘプシジン抗菌ペプチド（ＨＡＭＰ）、ヒドロキシ酸オキシダーゼ（グリコール酸オキシダーゼ）１（ＨＡＯ１）、ＨＧＦ活性化因子（ＨＧＦＡＣ）、ハプトグロビン関連タンパク質；ハプトグロビン（ＨＰＲ）、ヘモペキシン（ＨＰＸ）、ヒスチジンリッチ糖タンパク質（ＨＲＧ）、ヒドロキシステロイド（１１－ベータ）デヒドロゲナーゼ１（ＨＳＤ１１Ｂ１）、ヒドロキシステロイド（１７－ベータ）デヒドロゲナーゼ１３（ＨＳＤ１７Ｂ１３）、インターアルファ－トリプシンインヒビター重鎖Ｈ１（ＩＴＩＨ１）、インターアルファ－トリプシンインヒビター重鎖Ｈ２（ＩＴＩＨ２）、インターアルファ－トリプシンインヒビター重鎖Ｈ３（ＩＴＩＨ３）、インターアルファ－トリプシンインヒビター重鎖Ｈ４（ＩＴＩＨ４）、プレカリクレイン（ＫＬＫＢ１）、乳酸デヒドロゲナーゼＡ（ＬＤＨＡ）、肝臓発現抗菌ペプチド２（ＬＥＡＰ２）、白血球細胞由来ケモタキシン２（ＬＥＣＴ２）、リポタンパク質（ａ）（ＬＰＡ）、マンナン結合レクチンセリンペプチダーゼ２（ＭＡＳＰ２）、Ｓ－アデノシルメチオニン合成酵素アイソフォーム１型（ＭＡＴ１Ａ）、ＮＡＤＰＨオキシダーゼ４（ＮＯＸ４）、ポリ［ＡＤＰ－リボース］ポリメラーゼ１（ＰＡＲＰ１）、パラオキソナーゼ１（ＰＯＮ１）、パラオキソナーゼ３（ＰＯＮ３）、ビタミンＫ依存性プロテインＣ（ＰＲＯＣ）、レチノールデヒドロゲナーゼ１６（ＲＤＨ１６）、構成的血清アミロイドＡ４（ＳＡＡ４）、セリンデヒドラターゼ（ＳＤＳ）、セルピンファミリーＡメンバー１（ＳＥＲＰＩＮＡ１），セルピンＡ１１（ＳＥＲＰＩＮＡ１１），カリスタチン（ＳＥＲＰＩＮＡ４）、コルチコステロイド結合グロブリン（ＳＥＲＰＩＮＡ６）、アンチトロンビンＩＩＩ（ＳＥＲＰＩＮＣ１）、ヘパリン補因子２（ＳＥＲＰＩＮＤ１）、セルピンファミリーＨメンバー１（ＳＥＲＰＩＮＨ１），溶質キャリアファミリー５メンバー２（ＳＬＣ５Ａ２）、ナトリウム／胆汁酸共輸送体（ＳＬＣ１０Ａ１）、溶質キャリアファミリー１３メンバー５（ＳＬＣ１３Ａ５）、溶質キャリアファミリー２２メンバー１（ＳＬＣ２２Ａ１）、溶質キャリアファミリー２５メンバー４７（ＳＬＣ２５Ａ４７）、溶質キャリアファミリー２促進性グルコース輸送体メンバー２（ＳＬＣ２Ａ２）、ナトリウム共役型中性アミノ酸輸送体４（ＳＬＣ３８Ａ４）、溶質キャリア有機アニオン輸送体ファミリーメンバー１Ｂ１（ＳＬＣＯ１Ｂ１）、スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ１（ＳＭＰＤ１）、胆汁酸塩スルホトランスフェラーゼ（ＳＵＬＴ２Ａ１）、チロシンアミノトランスフェラーゼ（ＴＡＴ）、トリプトファン２，３－ジオキシゲナーゼ（ＴＤＯ２）、ＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ２ファミリーポリペプチドＢ１０（ＵＧＴ２Ｂ１０）、ＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ２ファミリーポリペプチドＢ１５（ＵＧＴ２Ｂ１５）、ＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ２ファミリーポリペプチドＢ４（ＵＧＴ２Ｂ４）、およびビトロネクチン（ＶＴＮ）が含まれるが、これらに限定されない。

【０１８３】

治療目的で上述の遺伝子のいずれかの発現をサイレンシングするその有用性に加えて、本明細書に記載されている特定の核酸（例えば、ｓｉＲＮＡ）はまた、研究および開発用途、ならびに診断的、予防的、予後診断的、臨床的、および他の健康管理用途においても有用である。非限定的な例として、特定の核酸（例えば、ｓｉＲＮＡ）を、目的遺伝子が治療標的である可能性があるか否かを試験することを目的とした標的検証試験において使用することができる。特定の核酸（例えば、ｓｉＲＮＡ）はまた、潜在的な治療標的としての遺伝子を見出すことを目的とした標的同定試験にも使用することができる。

【０１８４】

ＣＲＩＳＰＲ

標的化ゲノム編集は、ニッチ技術から多くの生物学研究者が使用する方法へと進化した。この進化は、クラスター化され規則的に間隔が空いた短い回文構造の繰り返し（ＣＲＩＳＰＲ）技術の出現により大いに促進された（例えば、Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎを含むＳａｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃ

ｈｎｏｌｏｇｙ，３２（４），３４７－３５５（２０１４）、国際公開第ＷＯ２０１６／１９７１３２号および同第ＷＯ２０１６／１９７１３３号を参照のこと）。したがって、本明細書では、ＨＢＶ等の疾患を治療するためにＣＲＩＳＰＲ技術と組み合わせて使用することができる改善物（例えば、脂質ナノ粒子およびその製剤）を提供する。ＣＲＩＳＰＲを使用するための標的に関して、ＣＲＩＳＰＲ技術で利用されるガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を、特異的に同定された配列、例えば、標的遺伝子（例えばＨＢＶゲノムの標的遺伝子）を標的とするように設計することができる。そのような標的配列の例は、国際公開第ＷＯ２０１６／１９７１３２号に示されている。さらに、国際公開第ＷＯ２０１３／１５１６６５号（例えば、表６を参照のこと。この文書は、表６および付随する配列表を特に含めて、具体的に参照によって組み込まれる）は、ｍＲＮＡ発現コンストラクトに関連して特許請求された約３５，０００のｍＲＮＡ配列を記載している。本発明の特定の実施形態は、これらの配列のいずれかの発現を標的とするためにＣＲＩＳＰＲ技術を利用する。本発明の特定の実施形態はまた、本明細書で論じられる標的遺伝子の発現を標的とするためにＣＲＩＳＰＲ技術を利用し得る。

【０１８５】

ａｉＲＮＡ

ｓｉＲＮＡと同様に、非対称干渉ＲＮＡ（ａｉＲＮＡ）は、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）を動員し、アンチセンス鎖の５’末端に対するヌクレオチド１０と１１の間で標的配列の配列特異的切断を媒介することによって、哺乳類細胞における種々の遺伝子の効果的なサイレンシングをもたらすことができる（Ｓｕｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．，２６：１３７９－１３８２（２００８））。通常、ａｉＲＮＡ分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を有する短いＲＮＡ二重鎖を含み、この二重鎖は、アンチセンス鎖の３’末端および５’末端にオーバーハングを含有する。ａｉＲＮＡは一般に、センス鎖が、相補性アンチセンス鎖と比較して両末端で短いため、非対称である。いくつかの態様では、ａｉＲＮＡ分子は、ｓｉＲＮＡ分子に使用されるものと類似の条件下で、設計、合成、およびアニーリングされ得る。非限定的な例として、ａｉＲＮＡ配列は、ｓｉＲＮＡ配列を選択するための上述の方法を使用して、選択および作製され得る。

【０１８６】

別の実施形態では、目的のｍＲＮＡを標的とするよう、様々な長さ（例えば、約１０～２５、１２～２０、１２～１９、１２～１８、１３～１７、または１４～１７塩基対、より通常１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または塩基対）のａｉＲＮＡ二重鎖が、アンチセンス鎖の３’末端および５’末端にオーバーハングを含めて設計され得る。特定の場合では、ａｉＲＮＡ分子のセンス鎖は、約１０～２５、１２～２０、１２～１９、１２～１８、１３～１７、または１４～１７ヌクレオチド長、より通常、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０ヌクレオチド長である。他の特定の場合には、ａｉＲＮＡ分子のアンチセンス鎖は、約１５～６０、１５～５０、または１５～４０ヌクレオチド長、より通常約１５～３０、１５～２５または１９～２５ヌクレオチド長、好ましくは約２０～２４、２１～２２、または２１～２３ヌクレオチド長である。

【０１８７】

いくつかの実施形態では、５’アンチセンスオーバーハングは、１、２、３、４、またはそれ以上の非標的ヌクレオチド（例えば、「ＡＡ」、「ＵＵ」、「ｄＴｄＴ」等）を含有する。他の実施形態では、３’アンチセンスオーバーハングは、１、２、３、４、またはそれ以上の非標的ヌクレオチド（例えば、「ＡＡ」、「ＵＵ」、「ｄＴｄＴ」等）を含有する。特定の態様では、本明細書に記載されているａｉＲＮＡ分子は、例えば、二本鎖（二重鎖）領域に、および／またはアンチセンスオーバーハングに、１つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含んでもよい。非限定的な例として、ａｉＲＮＡ配列は、ｓｉＲＮＡ配列について前述した修飾ヌクレオチドのうちの１つまたは複数を含んでもよい。好ましい実施形態では、ａｉＲＮＡ分子は、例えば、２’ＯＭｅ－グアノシンヌクレオチド、２’ＯＭｅ－ウリジンヌクレオチド等の２’ＯＭｅヌクレオチド、またはこれらの混合物を含む。

【０１８８】
特定の実施形態では、ａｉＲＮＡ分子は、ｓｉＲＮＡ分子のアンチセンス鎖に対応するアンチセンス鎖、例えば、本明細書に記載されているｓｉＲＮＡ分子のうちの１つを含んでもよい。他の実施形態では、ａｉＲＮＡ分子は、上述の標的遺伝子のいずれか、例えば、ウイルスの感染および生存に関連する遺伝子、代謝性疾患および障害に関連する遺伝子、腫瘍形成および細胞形質転換に関連する遺伝子、血管新生遺伝子、炎症応答および自己免疫応答に関連するもの等の免疫調節遺伝子、リガンド受容体遺伝子、ならびに神経変性疾患に関連する遺伝子等の発現をサイレンシングするために使用され得る。

【０１８９】
ｍｉＲＮＡ
一般に、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）は、遺伝子発現を制御する約２１～２３ヌクレオチド長の一本鎖ＲＮＡ分子である。ｍｉＲＮＡは、それらの転写元のＤＮＡの遺伝子によってコードされるが、ｍｉＲＮＡはタンパク質に翻訳されず（非コードＲＮＡ）、代わりに、各一次転写物（ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ）が、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡと称される短いステムループ構造にプロセシングされ、最終的に機能的な成熟ｍｉＲＮＡへとプロセシングされる。成熟ｍｉＲＮＡ分子は、１つまたは複数のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）分子に部分的に相補性であるかまたは完全に相補性であるかのいずれかであり、それらの主要な機能は、遺伝子発現を下方制御することである。ｍｉＲＮＡ分子の同定は、例えば、Ｌａｇｏｓ－Ｑｕｉｎｔａｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２９４：８５３－８５８、Ｌａｕ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２９４：８５８－８６２、およびＬｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２９４：８６２－８６４に記載されている。

【０１９０】
ｍｉＲＮＡをコードする遺伝子は、プロセシングされた成熟ｍｉＲＮＡ分子よりもはるかに長い。ｍｉＲＮＡは、まず、キャップおよびポリＡテールを有する一次転写産物またはｐｒｉ－ｍｉＲＮＡとして転写され、細胞核において、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡとして知られる約７０ヌクレオチドの短いステムループ構造にプロセシングされる。このプロセシングは、動物では、ヌクレアーゼＤｒｏｓｈａおよび二本鎖ＲＮＡ結合タンパク質Ｐａｓｈａから成るマイクロプロセッサー複合体として知られるタンパク質複合体によって行われる（Ｄｅｎｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，４３２：２３１－２３５（２００４））。次に、これらのｐｒｅ－ｍｉＲＮＡは、エンドヌクレアーゼＤｉｃｅｒとの相互作用により細胞質内で成熟ｍｉＲＮＡにプロセシングされ、これはまた、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）の形成を開始させる（Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，４０９：３６３－３６６（２００１）。ＤＮＡのセンス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかが、ｍｉＲＮＡを生じさせるための鋳型として機能することができる。

【０１９１】
Ｄｉｃｅｒがｐｒｅ－ｍｉＲＮＡステムループを切断すると、２つの相補性の短いＲＮＡ分子が形成されるが、その１つのみがＲＩＳＣ複合体に組み込まれる。この鎖は、ガイド鎖として知られており、５’末端の安定性に基づいて、ＲＩＳＣ複合体中の触媒的に活性なＲＮａｓｅであるアルゴノートタンパク質によって選択される（Ｐｒｅａｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．，１６：５３０－５３５（２００６））。アンチガイドまたはパッセンジャー鎖として知られる残りの鎖は、ＲＩＳＣ複合体基質として分解される（Ｇｒｅｇｏｒｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１２３：６３１－６４０（２００５））。活性ＲＩＳＣ複合体に組み込まれた後、ｍｉＲＮＡは、それらの相補性ｍＲＮＡ分子と塩基対合し、標的ｍＲＮＡの分解および／または翻訳のサイレンシングを誘導する。

【０１９２】
哺乳類のｍｉＲＮＡ分子は通常、標的ｍＲＮＡ配列の３’ＵＴＲ内の部位に相補性である。特定の場合では、ｍｉＲＮＡの標的ｍＲＮＡへのアニーリングは、タンパク質の翻訳機序を遮断することによりタンパク質の翻訳を阻害する。他の特定の場合には、ｍｉＲＮＡの標的ｍＲＮＡへのアニーリングは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）と類似のプロセスを通じて、標的ｍＲＮＡの切断および分解を促進する。ｍｉＲＮＡはまた、標的化ｍＲＮＡに対

応するゲノム部位のメチル化を標的とし得る。一般に、ｍｉＲＮＡは、ｍｉＲＮＰと総称されるタンパク質の補体と関連して機能する。

【０１９３】

特定の態様では、本明細書に記載されているｍｉＲＮＡ分子は、約１５～１００、１５～９０、１５～８０、１５～７５、１５～７０、１５～６０、１５～５０、または１５～４０のヌクレオチド長、より通常約１５～３０、１５～２５または１９～２５のヌクレオチド長、好ましくは約２０～２４、２１～２２、または２１～２３のヌクレオチド長である。特定の他の態様では、ｍｉＲＮＡ分子は、１つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含んでもよい。非限定的な例として、ｍｉＲＮＡ配列は、ｓｉＲＮＡ配列について前述した修飾ヌクレオチドのうちの１つまたは複数を含んでもよい。好ましい実施形態では、ｍｉＲＮＡ分子は、例えば、２’ＯＭｅ－グアノシンヌクレオチド、２’ＯＭｅ－ウリジンヌクレオチド等の２’ＯＭｅヌクレオチド、またはこれらの混合物を含む。

【０１９４】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ分子を使用して前述の標的遺伝子のいずれか、例えば、ウイルスの感染および生存に関連する遺伝子、代謝性疾患および障害に関連する遺伝子、腫瘍形成および細胞形質転換に関連する遺伝子、血管新生遺伝子、炎症応答および自己免疫応答に関連するものなどの免疫調節遺伝子、リガンド受容体遺伝子、ならびに神経変性障害に関連する遺伝子などの発現をサイレンシングすることができる。

【０１９５】

他の実施形態では、目的のｍＲＮＡを標的とするｍｉＲＮＡの活性を遮断する１つまたは複数の薬剤は、本発明の脂質粒子（例えば、核酸－脂質粒子）を使用して投与される。遮断剤の例としては、立体遮断オリゴヌクレオチド、ロックド核酸オリゴヌクレオチド、およびモルフォリノオリゴヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。そのような遮断剤は、ｍｉＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡ上のｍｉＲＮＡ結合部位に直接結合し得る。

【０１９６】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

一実施形態では、核酸は、目的の標的遺伝子または配列を対象とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。「アンチセンスオリゴヌクレオチド」または「アンチセンス」という用語は、標的とするポリヌクレオチド配列に相補性のオリゴヌクレオチドを含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、選択された配列に相補性であるＤＮＡまたはＲＮＡの一本鎖である。アンチセンスＲＮＡオリゴヌクレオチドは、相補性ＲＮＡ鎖の翻訳を、そのＲＮＡに結合することによって阻止する。アンチセンスＤＮＡオリゴヌクレオチドを使用して、特定の相補性（コードまたは非コード）ＲＮＡを標的とすることができる。結合が生じると、このＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドは、酵素ＲＮａｓｅ　Ｈによって分解され得る。特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約１０～約６０のヌクレオチド、より好ましくは約１５～約３０のヌクレオチドを含む。この用語はまた、所望の標的遺伝子に厳密に相補性ではない可能性のあるアンチセンスオリゴヌクレオチドを包含する。したがって、本発明は、標的非特異的活性がアンチセンスに見られる場合、または標的配列との１つまたは複数のミスマッチを含有するアンチセンス配列が特定の使用に最も好ましい場合に、利用可能である。

【０１９７】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、タンパク質合成の有効かつ標的化された阻害因子であることが示されており、したがって、標的とする遺伝子によるタンパク質合成を特異的に阻害するために使用することができる。タンパク質合成を阻害するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性は、十分に確立されている。例えば、ポリガラクツロナーゼ（ｐｏｌｙｇａｌａｃｔａｕｒｏｎａｓｅ）およびムスカリン２型アセチルコリン受容体の合成は、それらのそれぞれのｍＲＮＡ配列を対象とするアンチセンスオリゴヌクレオチドによって阻害される（米国特許第５，７３９，１１９号および同第５，７５９，８２９号を参照のこと）。さらに、アンチセンス阻害の例は、核タンパク質サイクリン、多剤耐性遺伝子（ＭＤＲ１）、ＩＣＡＭ－１、Ｅ－セレクチン、ＳＴＫ－１、線条体ＧＡＢＡ

Ａ受容体、およびヒトＥＧＦで示されている（Ｊａｓｋｕｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４０：１５４４－６（１９８８）、Ｖａｓａｎｔｈａｋｕｍａｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｏｍｍｕｎ．，１：２２５－３２（１９８９）、Ｐｅｎｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｒａｉｎ　Ｒｅｓ　Ｍｏｌ　Ｂｒａｉｎ　Ｒｅｓ．，１５；５７：３１０－２０（１９９８）、並びに米国特許第５，８０１，１５４号、同第５，７８９，５７３号、同第５，７１８，７０９号、および同第５，６１０，２８８号を参照のこと）。さらに、様々な異常細胞増殖、例えばがんを阻害し、それを治療するために使用することができるアンチセンスコンストラクトも記載されている（米国特許第５，７４７，４７０号、同第５，５９１，３１７号、および同第５，７８３，６８３号を参照のこと）。これらの参照文献の開示は、すべての目的のためにその全体が本明細書に参照によって組み込まれる。

【０１９８】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを生成する方法は当技術分野で公知であり、任意のポリヌクレオチド配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを生成するように容易に適合させることができる。所与の標的配列に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド配列の選択は、選択された標的配列の分析、並びに二次構造、T_m、結合エネルギー、および相対的安定性の判定に基づく。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、宿主細胞内で標的ｍＲＮＡへの特異的結合を低減させるかまたは阻止する、それらの二量体、ヘアピン、または他の二次構造の形成の相対的不能性に基づいて選択され得る。ｍＲＮＡの極めて好ましい標的領域には、ＡＵＧ翻訳開始コドンの領域またはその近傍の領域、およびｍＲＮＡの５’領域に実質的に相補性の配列が含まれる。これらの二次構造分析および標的部位選択の考察は、例えば、ＯＬＩＧＯプライマー分析ソフトウェアのｖ．４（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　Ｉｎｓｉｇｈｔｓ）および／またはＢＬＡＳＴＮ　２．０．５アルゴリズムソフトウェア（Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２５：３３８９－４０２（１９９７））を使用して実施することができる。

【０１９９】

リボザイム

本発明の別の実施形態によれば、核酸－脂質粒子はリボザイムと会合している。リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を有する特定の触媒ドメインを有するＲＮＡ－タンパク質複合体である（Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，８４：８７８８－９２（１９８７）、およびＦｏｒｓｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，４９：２１１－２０（１９８７）を参照のこと）。例えば、多くのリボザイムは、高度な特異性でリン酸エステル転移反応を促進させ、多くの場合、オリゴヌクレオチド基質内のいくつかのリン酸エステルのうちの１つのみを切断する（Ｃｅｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，２７：４８７－９６（１９８１）、Ｍｉｃｈｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２１６：５８５－６１０（１９９０）、Ｒｅｉｎｈｏｌｄ－Ｈｕｒｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５７：１７３－６（１９９２）を参照のこと）。この特異性は、基質が、化学反応の前にリボザイムの内部ガイド配列（「ＩＧＳ」）に対し、特異的な塩基対合相互作用を介して結合するという要件に起因している。

【０２００】

現在、天然に存在する酵素ＲＮＡ分子の少なくとも６つの基本的な種類が知られている。それぞれが、生理学的条件下でＲＮＡホスホジエステル結合の加水分解をトランスで触媒することができる（したがって、他のＲＮＡ分子を切断することができる）。一般に、酵素的核酸は、まず標的ＲＮＡに結合することによって作用する。そのような結合は、標的ＲＮＡを切断するように作用する分子の酵素的部分に近接して保持される、酵素的核酸の標的結合部分を介して生じる。したがって、酵素的核酸はまず、標的ＲＮＡを認識し、次に相補性塩基対合を介してそれに結合し、正しい部位に結合すると、標的ＲＮＡを切断するように酵素的に作用する。そのような標的ＲＮＡの戦略的切断は、コードされたタンパク質の合成を指示するその能力を消失させる。酵素的核酸がそのＲＮＡ標的に結合して

それを切断した後、その酵素的核酸は、そのＲＮＡから放出されて別の標的を探し、そして繰り返し新しい標的に結合し、それを切断することができる。

【０２０１】

酵素的核酸分子は、例えば、ハンマーヘッド、ヘアピン、肝炎δウイルス、Ｉ群イントロンもしくはＲＮＡｓｅＰ ＲＮＡ（ＲＮＡガイド配列と会合）またはＮｅｕｒｏｓｐｏｒａ ＶＳ ＲＮＡモチーフで形成され得る。ハンマーヘッドモチーフの具体的な例は、例えば、Ｒｏｓｓｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２０：４５５９－６５（１９９２）に記載されている。ヘアピンモチーフの例は、例えば、ＥＰ０３６０２５７、Ｈａｍｐｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２８：４９２９－３３（１９８９）、Ｈａｍｐｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１８：２９９－３０４（１９９０）、および米国特許第５，６３１，３５９号に記載されている。δ型肝炎ウイルスモチーフの例は、例えば、Ｐｅｒｒｏｔｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３１：１１８４３－５２（１９９２）に記載されている。ＲＮＡｓｅＰモチーフの例は、例えば、Ｇｕｅｒｒｉｅｒ－Ｔａｋａｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，３５：８４９－５７（１９８３）に記載されている。Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ＶＳ ＲＮＡリボザイムモチーフの例は、例えば、Ｓａｖｉｌｌｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，６１：６８５－９６（１９９０）、Ｓａｖｉｌｌｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：８８２６－３０（１９９１）、Ｃｏｌｌｉｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３２：２７９５－９（１９９３）に記載されている。Ｉ群イントロンの例は、例えば、米国特許第４，９８７，０７１号に記載されている。本発明に従って使用される酵素的核酸分子の重要な特徴は、それらが標的遺伝子のＤＮＡまたはＲＮＡ領域のうちの１つまたは複数に相補性の特異的基質結合部位を有すること、およびそれらが、その基質結合部位内またはその周囲に、ＲＮＡ切断活性を分子に付与するヌクレオチド配列を有することである。したがって、リボザイムコンストラクトは、必ずしも本明細書において言及される特定のモチーフに限定されない。これらの参照文献の開示は、すべての目的のためにその全体が本明細書に参照によって組み込まれる。

【０２０２】

任意のポリヌクレオチド配列を標的とするリボザイムの生成方法は、当該技術分野で公知である。リボザイムを、例えば、ＰＣＴ公開第ＷＯ９３／２３５６９号および同第ＷＯ９４／０２５９５号に記載されているように設計し、それらに記載されているように試験管内および／または生体内で試験するために合成してよい。これらのＰＣＴ公開の開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【０２０３】

リボザイム活性は、リボザイム結合アームの長さを変化させることによって、または血清リボヌクレアーゼによるそれらの分解を阻止する修飾（例えば、ＰＣＴ公開第ＷＯ９２／０７０６５号、同第ＷＯ９３／１５１８７号、同第ＷＯ９１／０３１６２号、および同第ＷＯ９４／１３６８８号、ＥＰ９２１１０２９８．４号、ならびに米国特許第５，３３４，７１１号を参照のこと。これらは、酵素ＲＮＡ分子の糖部分に行うことができる種々の化学修飾について記載しており、これらの開示は、それぞれ、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる）、細胞内でのそれらの有効性を高める修飾、ならびにＲＮＡ合成時間の短縮および化学的要件の低減のためのステムＩＩ塩基の除去、を有するリボザイムを化学合成することによって、最適化することができる。

【０２０４】

免疫刺激性オリゴヌクレオチド

本発明の脂質粒子に会合する核酸は、ヒト等の哺乳類であり得る対象に投与されたときに免疫応答を誘導することができる免疫刺激性オリゴヌクレオチド（ＩＳＳ；一本鎖または二本鎖）を含む、免疫刺激性であり得る。ＩＳＳには、例えば、ヘアピン二次構造をもたらす特定の回文構造（Ｙａｍａｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８：４０７２－６（１９９２）を参照のこと）、またはＣｐＧモチーフ、および他の公知

のＩＳＳの特徴（例えば、多重Ｇドメイン；その開示があらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれるＰＣＴ公開第ＷＯ９６／１１２６６号を参照のこと）が含まれる。

【０２０５】

免疫刺激性核酸は、それらが、免疫応答を誘発するために、標的配列に特異的に結合してその発現を低減させる必要がない場合、配列非特異的と見なされる。したがって、特定の免疫刺激性核酸は、天然に存在する遺伝子またはｍＲＮＡの領域に対応する配列を含んでもよいが、それらは依然として配列非特異的免疫刺激性核酸と見なされ得る。

【０２０６】

一実施形態では、免疫刺激性核酸またはオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドまたはＣｐＧジヌクレオチドは、メチル化されていなくても、またはメチル化されていてもよい。別の実施形態では、免疫刺激性核酸は、メチル化シトシンを有する少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドを含む。一実施形態では、核酸は、単一のＣｐＧジヌクレオチドを含み、このＣｐＧジヌクレオチド中のシトシンは、メチル化されている。代替的実施形態では、核酸は、少なくとも２つのＣｐＧジヌクレオチドを含み、このＣｐＧジヌクレオチド中の少なくとも１つのシトシンは、メチル化されている。さらなる実施形態では、配列内に存在するＣｐＧジヌクレオチド中の各シトシンは、メチル化されている。別の実施形態では、核酸は、複数のＣｐＧジヌクレオチドを含み、このＣｐＧジヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、メチル化シトシンを含む。本発明の組成物および方法における使用に好適な免疫刺激性オリゴヌクレオチドの例は、２００８年１２月３１日に出願されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ０８／８８６７６号、ＰＣＴ公開第ＷＯ０２／０６９３６９号、および同第ＷＯ０１／１５７２６号、米国特許第６，４０６，７０５号、並びにＲａｎｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｅｘｐｅｒ．Ｔｈｅｒ．，２９８：１１８５－９２（２００１）に記載されており、それらの開示はそれぞれ、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、本発明の組成物および方法に使用されるオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル（「ＰＯ」）骨格もしくはホスホロチオエート（「ＰＳ」）骨格、および／またはＣｐＧモチーフ内の少なくとも１つのメチル化シトシン残基を有する。

【０２０７】

ｍＲＮＡ

特定の実施形態では、核酸は、１つまたは複数のｍＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ分子のカクテル）である。

【０２０８】

ｍＲＮＡに対する修飾

本発明の実施において使用されるｍＲＮＡは、１つ、２つ、または２つより多いヌクレオシド修飾を含んでもよい。いくつかの実施形態では、修飾ｍＲＮＡは、対応する未修飾ｍＲＮＡと比較して、ｍＲＮＡが導入される細胞において分解の低減を示す。

【０２０９】

いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオシドには、ピリジン－４－オンリボヌクレオシド、５－アザ－ウリジン、２－チオ－５－アザ－ウリジン、２－チオウリジン、４－チオ－シュードウリジン、２－チオ－シュードウリジン、５－ヒドロキシウリジン、３－メチルウリジン、５－カルボキシメチル－ウリジン、１－カルボキシメチル－シュードウリジン、５－プロピニル－ウリジン、１－プロピニル－シュードウリジン、５－タウリノメチルウリジン、１－タウリノメチル－シュードウリジン、５－タウリノメチル－２－チオ－ウリジン、１－タウリノメチル－４－チオ－ウリジン、５－メチル－ウリジン、１－メチル１－シュードウリジン、４－チオ－１－メチル１－シュードウリジン、２－チオ－１－メチル１－シュードウリジン、１－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、２－チオ－１－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、２－チオ－ジヒドロウリジン、２－チオ－ジヒドロシュードウリジン、２－メトキシウリジン、２－メトキシ－４－チオ－ウリジン、４－メトキシ－シュードウリジン、お

よび４－メトキシ－２－チオ－シュードウリジンが含まれる。
【０２１０】
いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオシドには、５－アザ－シチジン、シュードイソシチジン、３－メチル－シチジン、Ｎ４－アセチルシチジン、５－ホルミルシチジン、Ｎ４－メチルシチジン、５－ヒドロキシメチルシチジン、１－メチル－シュードイソシチジン、ピロロ－シチジン、ピロロ－シュードイソシチジン、２－チオ－シチジン、２－チオ－５－メチル－シチジン、４－チオ－シュードイソシチジン、４－チオ－１－メチル－シュードイソシチジン、４－チオ－１－メチル－１－デアザ－シュードイソシチジン、１－メチル－１－デアザ－シュードイソシチジン、ゼブラリン、５－アザ－ゼブラリン、５－メチル－ゼブラリン、５－アザ－２－チオ－ゼブラリン、２－チオ－ゼブラリン、２－メトキシ－シチジン、２－メトキシ－５－メチル－シチジン、４－メトキシ－シュードイソシチジン、および４－メトキシ－１－メチル－シュードイソシチジンが含まれる。
【０２１１】
他の実施形態では、修飾ヌクレオシドには、２－アミノプリン、２，６－ジアミノプリン、７－デアザ－アデニン、７－デアザ－８－アザ－アデニン、７－デアザ－２－アミノプリン、７－デアザ－８－アザ－２－アミノプリン、７－デアザ－２，６－ジアミノプリン、７－デアザ－８－アザ－２，６－ジアミノプリン、１－メチルアデノシン、Ｎ６－メチルアデノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデノシン、Ｎ６－（シス－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン、２－メチルチオ－Ｎ６－（シス－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン、Ｎ６－グリシニルカルバモイルアデノシン、Ｎ６－スレオニルカルバモイルアデノシン、２－メチルチオ－Ｎ６－スレオニルカルバモイルアデノシン、Ｎ６，Ｎ６－ジメチルアデノシン、７－メチルアデニン、２－メチルチオ－アデニン、および２－メトキシ－アデニンが含まれる。
【０２１２】
特定の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、５’－Ｏ－（１－チオホスファート）－アデノシン、５’－Ｏ－（１－チオホスファート）－シチジン、５’－Ｏ－（１－チオホスファート）－グアノシン、５’－Ｏ－（１－チオホスファート）－ウリジンまたは５’－Ｏ－（１－チオホスファート）－シュードウリジンである。α－チオ置換されたリン酸部分は、非天然ホスホロチオアート骨格結合を介してＲＮＡポリマーに安定性を付与するために提供される。ホスホロチオアートＲＮＡは、ヌクレアーゼ耐性が増加し、次いで細胞環境における半減期が長くなる。ホスホロチオアート結合核酸は、細胞の自然免疫分子の比較的弱い結合／活性化を通じて、自然免疫応答を低減させることも予期される。
【０２１３】
特定の実施形態では、例えば、タンパク質産生の正確なタイミングが望まれる場合、細胞に導入された修飾核酸を細胞内で分解することが望ましい。したがって、本発明は、細胞内で指示された方法で作用することができる分解ドメインを含有する修飾核酸を提供する。
【０２１４】
他の実施形態では、修飾ヌクレオシドには、イノシン、１－メチル－イノシン、ワイオシン、ワイブトシン、７－デアザ－グアノシン、７－デアザ－８－アザ－グアノシン、６－チオ－グアノシン、６－チオ－７－デアザ－グアノシン、６－チオ－７－デアザ－８－アザ－グアノシン、７－メチル－グアノシン、６－チオ－７－メチル－グアノシン、７－メチルイノシン、６－メトキシ－グアノシン、１－メチルグアノシン、Ｎ２－メチルグアノシン、Ｎ２，Ｎ２－ジメチルグアノシン、８－オキソ－グアノシン、７－メチル－８－オキソ－グアノシン、１－メチル－６－チオ－グアノシン、Ｎ２－メチル－６－チオ－グアノシン、およびＮ２，Ｎ２－ジメチル－６－チオ－グアノシンが含まれる。
【０２１５】
修飾核酸の任意成分
さらなる実施形態では、修飾核酸は、いくつかの実施形態では有益であり得る、他の任意成分を含んでもよい。これらの任意成分には、非翻訳領域、コザック配列、イントロン

ヌクレオチド配列、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）、キャップ、およびポリＡテールが含まれるが、これらに限定されない。例えば、５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および／または３’ＵＴＲを提供することができ、これらのいずれかまたは両方は独立して１つまたは複数の異なるヌクレオシド修飾を含んでもよい。そのような実施形態では、ヌクレオシド修飾はまた、翻訳可能領域にも存在し得る。コザック配列を含有する核酸も提供される。

【０２１６】

さらに、核酸から切り取ることができる１つまたは複数のイントロンヌクレオチド配列を含有する核酸が提供される。

【０２１７】

非翻訳領域（ＵＴＲ）

遺伝子の非翻訳領域（ＵＴＲ）は、転写されるが翻訳はされない。５’ＵＴＲは、転写開始部位で開始し、開始コドンまで続くが、開始コドンは含まない；一方、３’ＵＴＲは終止コドンの直後から開始し、転写終結シグナルまで続く。核酸分子の安定性および翻訳という点でのＵＴＲが担う調節性の役割についての証拠が増え続けている。分子の安定性を増加させるために、ＵＴＲの調節機能を本発明で使用されるｍＲＮＡに組み込むことができる。特定の機能を組み込んで、望ましくない器官部位に誤って誘導された場合の転写物の下方制御を確実に制御することもできる。

【０２１８】

５’キャッピング

ｍＲＮＡの５’キャップ構造は、核外輸送に関与し、ｍＲＮＡの安定性を増加させ、ｍＲＮＡキャップ結合タンパク質（ＣＢＰ）に結合し、これは、ＣＢＰとポリ（Ａ）結合タンパク質とが会合して成熟環状ｍＲＮＡ種を形成することを通じて、細胞内のｍＲＮＡの安定性および翻訳能力に関与する。キャップはさらに、ｍＲＮＡスプライシングの際に５’近位イントロンの除去を補助する。

【０２１９】

内因性ｍＲＮＡ分子は５’末端がキャッピングされ、ｍＲＮＡ分子の末端グアノシンキャップ残基と５’末端の転写されたセンスヌクレオチドとの間に５’－ｐｐｐ－５’－三リン酸結合を生じ得る。次に、この５’－グアニル酸キャップはメチル化され、Ｎ７－メチル－グアニル酸残基を生じ得る。ｍＲＮＡの５’末端および／または末端前の転写されたヌクレオチドのリボース糖もまた、任意で２’－Ｏ－メチル化され得る。グアニル酸キャップ構造の加水分解および切断による５’－キャップ除去は、分解のために、ｍＲＮＡ分子等の核酸分子を標的にし得る。

【０２２０】

ＩＲＥＳ配列

内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）を含有するｍＲＮＡもまた、本発明の実施に有用である。ＩＲＥＳは、唯一のリボソーム結合部位として機能する場合もあれば、ｍＲＮＡの複数のリボソーム結合部位の１つとして機能する場合もある。２以上の機能的なリボソーム結合部位を含有するｍＲＮＡは、リボソームによって独立して翻訳されるいくつかのペプチドまたはポリペプチドをコードし得る（「マルチシストロン性ｍＲＮＡ」）。ｍＲＮＡがＩＲＥＳと共に提供される場合、さらに任意で、第２の翻訳可能領域が提供される。本発明に従って使用できるＩＲＥＳ配列の例には、ピコルナウイルス（例えば、ＦＭＤＶ）、ペストウイルス（ｐｅｓｔ　ｖｉｒｕｓ）（ＣＦＦＶ）、ポリオウイルス（ＰＶ）、脳心筋炎ウイルス（ＥＣＭＶ）、口蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、ブタコレラウイルス（ＣＳＦＶ）、ネズミ白血病ウイルス（ＭＬＶ）、サル免疫不全ウイルス（Ｓ１Ｖ）またはコオロギ麻痺ウイルス（ＣｒＰＶ）由来のものが含まれるが、これらに限定されない。

【０２２１】

ポリＡテール

ＲＮＡプロセシング中に、安定性を増加させるために、アデニンヌクレオチドの長鎖（

ポリＡテール）がｍＲＮＡ分子のようなポリヌクレオチドに付加されてもよい。転写直後に、転写物の３’末端が切断され、３’ヒドロキシルが遊離してもよい。次に、ポリＡポリメラーゼがＲＮＡにアデニンヌクレオチドの鎖を付加する。ポリアデニル化と呼ばれるこのプロセスでは、１００～２５０残基長であり得るポリＡテールが付加される。

【０２２２】

一般的に、ポリＡテールの長さは３０ヌクレオチド長を超える。別の実施形態では、ポリＡテールは、３５ヌクレオチド長を超える（例えば、少なくとも約３５以上、４０以上、４５以上、５０以上、５５以上、６０以上、７０以上、８０以上、９０以上、１００以上、１２０以上、１４０以上、１６０以上、１８０以上、２００以上、２５０以上、３００以上、３５０以上、４００以上、４５０以上、５００以上、６００以上、７００以上、８００以上、９００以上、１０００以上、１１００以上、１２００以上、１３００以上、１４００以上、１５００以上、１６００以上、１７００以上、１８００以上、１９００以上、２，０００以上、２，５００以上、および３，０００以上のヌクレオチド）。

【０２２３】

この状況において、ポリＡテールは、修飾ｍＲＮＡよりも長さが１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％長くなり得る。ポリＡテールはまた、それが属する修飾核酸の一部として設計され得る。この状況において、ポリＡテールは、修飾ｍＲＮＡの全長または修飾ｍＲＮＡの全長からポリＡテールを引いたものの１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０％、またはそれ以上であり得る。

【０２２４】

ｍＲＮＡ分子の作製

ＲＮＡの単離、ＲＮＡの合成、核酸のハイブリダイズ、ｃＤＮＡライブラリーの作成およびスクリーニング、並びにＰＣＲの実施のための方法は、ＰＣＲ法（米国特許第４，６８３，１９５号および同第４，６８３，２０２号、ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（Ｉｎｎｉｓ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ，１９９０）を参照のこと）と同様に、当技術分野において周知である（例えば、Ｇｕｂｌｅｒ ａｎｄ Ｈｏｆｆｍａｎ，Ｇｅｎｅ，２５：２６３－２６９（１９８３）、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｎｄ ｅｄ．１９８９）を参照のこと）。発現ライブラリーもまた、当業者に周知である。本発明における一般的な使用方法を開示するさらなる基本的な文書には、Ｋｒｉｅｇｌｅｒ，Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９９０）、およびＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，１９９４）が含まれる。これらの参照文献の開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【０２２５】

コードされるポリペプチド

本明細書に記載されている核酸－脂質粒子のｍＲＮＡ成分を使用して、目的ポリペプチドを発現させることができる。ヒトにおける特定の疾患は、機能性タンパク質の、そのタンパク質が通常存在しかつ活性である細胞タイプにおける欠如または障害によって引き起こされる。機能性タンパク質は、例えば、コード化遺伝子の転写不活性に起因して、またはタンパク質を完全にもしくは部分的に非機能的にする突然変異がコード化遺伝子に存在していることに起因して、完全にまたは部分的に欠如する可能性がある。タンパク質の完全または部分的な不活性化によって引き起こされるヒトの疾患の例には、Ｘ連鎖重症複合免疫不全症（Ｘ－ＳＣＩＤ）および副腎白質ジストロフィー（Ｘ－ＡＬＤ）が含まれる。Ｘ－ＳＣＩＤは、免疫系内のＢ細胞およびＴ細胞の発生および成熟に関与するいくつかのインターロイキンの受容体の成分である、共通ガンマ鎖タンパク質をコードする遺伝子の１つまたは複数の変異によって引き起こされる。Ｘ－ＡＬＤは、ＡＢＣＤ１と呼ばれるペルオキシソーム膜輸送体タンパク質遺伝子の１つまたは複数の変異によって引き起こされる。Ｘ－ＡＬＤに罹患している個体は、全身の組織に極めて高レベルの長鎖脂肪酸を有し

、これが、精神障害または死に至るおそれのある様々な症状を引き起こす。
【０２２６】
機能性タンパク質の、そのタンパク質が通常存在しかつ活性である細胞タイプにおける欠如または障害によって引き起こされるいくつかの疾患を治療するために、遺伝子療法を用いる試みがなされてきた。遺伝子療法は、通常、罹患タンパク質の機能的形態をコードする遺伝子を含むベクターの罹患者への導入、および疾患を治療するための機能的タンパク質の発現を伴う。これまでのところ、遺伝子療法における成功は限られている。さらに、ＬＮＰを使用してｍＲＮＡを送達する特定の態様が、例えば、国際公開第ＷＯ２０１８／００６０５２号および同第ＷＯ２０１５／０１１６３３号で説明されてきた。
【０２２７】
このため、機能性タンパク質の完全または部分的な欠如によって引き起こされる疾患に罹患しているヒト内でタンパク質の機能的形態を発現するための改善が引き続き必要とされており、かつ、例えば、療法に対する免疫応答の誘発をより低減させることができる方法および組成物を介した核酸（例えば、ｍＲＮＡ）送達の改善が必要とされている。本発明の特定の実施形態は、この文脈において有用である。したがって、特定の実施形態では、ポリペプチドの発現は、疾患または障害の１つまたは複数の症状を改善する。本発明の特定の組成物および方法は、人体内の機能的ポリペプチドの欠如またはレベルの低減によって引き起こされるヒトの疾患の治療に有用であり得る。他の実施形態では、本発明の特定の組成物および方法は、がんを治療するためのワクチン抗原の発現に有用であり得る。
【０２２８】
自己増幅ＲＮＡ
特定の実施形態では、核酸は、１つまたは複数の自己増幅ＲＮＡ分子である。自己増幅ＲＮＡ（ｓａ－ＲＮＡ）はまた、自己複製ＲＮＡ、複製可能ＲＮＡ、レプリコン、またはＲｅｐＲＮＡと称されることもある。自己増幅ｍＲＮＡと称されるＲｅｐＲＮＡは、プラス鎖ウイルスに由来する場合、少なくとも１つの構造遺伝子を欠くウイルスゲノムから生成され、ＲｅｐＲＮＡは、感染性の子孫ウイルスを生成することなく、翻訳および複製（したがって「自己増幅」）することができる。特定の実施形態では、ＲｅｐＲＮＡ技術は、所望の目的抗原をコードする遺伝子カセットを挿入するために使用され得る。例えば、アルファウイルスゲノムは２つのオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）に分割されており、第１のＯＲＦはＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ（レプリカーゼ）のタンパク質をコードし、第２のＯＲＦは構造タンパク質をコードする。ｓａ－ＲＮＡワクチンコンストラクトでは、ウイルス構造タンパク質をコードするＯＲＦは、任意の選択した抗原に置き換えられ得るが、ウイルスレプリカーゼは依然としてワクチンの不可欠な部分であり、免疫化後のＲＮＡの細胞内増幅を促進する。
【０２２９】
他の活性剤
特定の実施形態では、本発明の脂質粒子と会合する活性剤は、１つまたは複数の治療用タンパク質、ポリペプチド、または有機低分子もしくは化合物を含んでもよい。そのような治療上有効な薬剤または薬物の非限定的な例には、腫瘍薬（例えば、化学療法薬、ホルモン療法剤、免疫療法剤、放射線療法剤等）、脂質低下剤、抗ウイルス薬、抗炎症化合物、抗うつ薬、刺激薬、鎮痛薬、抗生物質、避妊薬、解熱薬、血管拡張薬、抗血管新生薬、細胞血管剤（ｃｙｔｏｖａｓｃｕｌａｒ　ａｇｅｎｔ）、シグナル伝達阻害薬、抗不整脈剤等の心血管薬、ホルモン、血管収縮薬、およびステロイドが含まれる。これらの活性剤は、本発明の脂質粒子で単独で投与されてもよく、または干渉ＲＮＡまたはｍＲＮＡのような核酸を含む本発明の脂質粒子と組み合わせて投与（例えば、併用投与）されてもよい。
【０２３０】
化学療法薬の非限定的な例には、白金系薬物（例えば、オキサリプラチン、シスプラチン、カルボプラチン、スピロプラチン、イプロプラチン、サトラプラチン等）、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、イホスファミド、クロラムブシル、ブスルファン、

メルファラン、メクロレタミン、ウラムスチン、チオテパ、ニトロソウレア等）、代謝拮抗薬（例えば、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）、アザチオプリン、メトトレキサート、ロイコボリン、カペシタビン、シタラビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン、ペメトレキセド、ラルチトレキセド等）、植物アルカロイド（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンデシン、ポドフィロトキシン、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル等）、トポイソメラーゼ阻害薬（例えば、イリノテカン（ＣＰＴ－１１、カンプトサール）、トポテカン、アムサクリン、エトポシド（ＶＰ１６）、リン酸エトポシド、テニポシド等）、抗腫瘍抗生物質（例えば、ドキソルビシン、アドリアマイシン、ダウノルビシン、エピルビシン、アクチノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン等）、チロシンキナーゼ阻害薬（例えば、ゲフィチニブ（Ｉｒｅｓｓａ（登録商標））、スニチニブ（Ｓｕｔｅｎｔ（登録商標）、ＳＵ１１２４８）、エルロチニブ（Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標）、ＯＳＩ－１７７４）、ラパチニブ（ＧＷ５７２０１６、ＧＷ２０１６）、カネルチニブ（ＣＩ１０３３）、セマキシニブ（ＳＵ５４１６）、バタラニブ（ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２２５８４）、ソラフェニブ（ＢＡＹ　４３－９００６）、イマチニブ（Ｇｌｅｅｖｅｃ（登録商標）、ＳＴＩ５７１）、ダサチニブ（ＢＭＳ－３５４８２５）、レフルノミド（ＳＵ１０１）、バンデタニブ（Ｚａｃｔｉｍａ（商標）、ＺＤ６４７４）等）、これらの薬学的に許容される塩、これらの立体異性体、これらの誘導体、これらの類似体、およびこれらの組み合わせが含まれる。

【０２３１】

従来のホルモン療法剤の例には、ステロイド（例えば、デキサメタゾン）、フィナステリド、アロマターゼ阻害薬、タモキシフェン、およびゴセレリン、ならびに他のゴナドトロピン放出ホルモンアゴニスト（ＧｎＲＨ）が含まれるが、これらに限定されない。

【０２３２】

従来の免疫療法剤の例には、免疫賦活薬（例えば、カルメット・ゲラン桿菌（ＢＣＧ）、レバミゾール、インターロイキン－２、アルファ－インターフェロン等）、モノクローナル抗体（例えば、抗ＣＤ２０、抗ＨＥＲ２、抗ＣＤ５２、抗ＨＬＡ－ＤＲ、および抗ＶＥＧＦモノクローナル抗体）、免疫毒素（例えば、抗ＣＤ３３モノクローナル抗体－カリケアマイシン複合物、抗ＣＤ２２モノクローナル抗体－シュードモナス外毒素複合物等）、ならびに放射免疫療法（例えば、^{111}Ｉｎ、^{90}Ｙ、または^{131}Ｉ等に複合物された抗ＣＤ２０モノクローナル抗体）が含まれるが、これらに限定されない。

【０２３３】

従来の放射線療法剤の例には、任意で腫瘍抗原を対象とする抗体に複合物されている、^{47}Ｓｃ、^{64}Ｃｕ、^{67}Ｃｕ、^{89}Ｓｒ、^{86}Ｙ、^{87}Ｙ、^{90}Ｙ、^{105}Ｒｈ、^{111}Ａｇ、^{111}Ｉｎ、^{117m}Ｓｎ、^{149}Ｐｍ、^{153}Ｓｍ、^{166}Ｈｏ、^{177}Ｌｕ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{211}Ａｔ、および^{212}Ｂｉ等の放射性核種が含まれるが、これらに限定されない。

【０２３４】

本発明に従って使用され得るさらなる腫瘍薬には、アルケラン、アロプリノール、アルトレタミン、アミホスチン、アナストロゾール、ａｒａＣ、三酸化ヒ素、ベキサロテン、ｂｉＣＮＵ、カルムスチン、ＣＣＮＵ、セレコキシブ、クラドリビン、シクロスポリンＡ、シトシンアラビノシド、シトキサン、デクスラゾキサン、ＤＴＩＣ、エストラムスチン、エキセメスタン、ＦＫ５０６、ゲムツズマブ－オゾガマイシン、ハイドレア、ヒドロキシウレア、イダルビシン、インターフェロン、レトロゾール、ロイスタチン、ロイプロリド、リトレチノイン（ｌｉｔｒｅｔｉｎｏｉｎ）、メガストロール（ｍｅｇａｓｔｒｏｌ）、Ｌ－ＰＡＭ、メスナ、メトキサレン、ミトラマイシン、ナイトロジェンマスタード、パミドロネート、ペガデマーゼ、ペントスタチン、ポルフィマーナトリウム、プレドニゾン、リツキサン、ストレプトゾシン、ＳＴＩ－５７１、タキソテール、テモゾラミド（ｔｅｍｏｚｏｌａｍｉｄｅ）、ＶＭ－２６、トレミフェン、トレチノイン、ＡＴＲＡ、バルルビシン、およびベルバンが含まれるが、これらに限定されない。本発明に従って使用さ

れ得る腫瘍薬の他の例は、エリプチシンおよびエリプチシン類似体または誘導体、エポチロン、細胞内キナーゼ阻害薬、ならびにカンプトテシンである。

【０２３５】

トリグリセリド、コレステロール、および／またはグルコースの上昇に関連する脂質疾患または障害を治療するための脂質低下剤の非限定的な例には、スタチン、フィブラート、エゼチミブ、チアゾリジンジオン、ナイアシン、ベータ遮断薬、ニトログリセリン、カルシウムアンタゴニスト、魚油、およびこれらの混合物が含まれる。

【０２３６】

抗ウイルス薬の例には、アバカビル、アシクロビル（ａｃｉｃｌｏｖｉｒ）、アシクロビル（ａｃｙｃｌｏｖｉｒ）、アデホビル、アマンタジン、アンプレナビル、アルビドール、アタザナビル、アトリプラ、シドフォビル、コンビビル、ダルナビル、デラビルジン、ジダノシン、ドコサノール、エドクスジン、エファビレンツ、エムトリシタビン、エンフビルチド、エンテカビル、侵入阻害薬、ファムシクロビル、固定用量配合剤、ホミビルセン、ホスアンプレナビル、ホスカルネット、ホスホネット、融合阻害薬、ガンシクロビル、イバシタビン、イムノビル（ｉｍｕｎｏｖｉｒ）、イドクスウリジン、イミキモド、インジナビル、イノシン、インテグラーゼ阻害薬、ＩＩＩ型インターフェロン（例えば、ＩＦＮ－λ１、ＩＦＮ－λ２、およびＩＦＮ－λ３等のＩＦＮ－λ分子）、ＩＩ型インターフェロン（例えば、ＩＦＮ－γ）、Ｉ型インターフェロン（例えば、ＰＥＧ化ＩＦＮ－α等のＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－κ、ＩＦＮ－δ、ＩＦＮ－ε、ＩＦＮ－τ、ＩＦＮ－ω、およびＩＦＮ－ζ）、インターフェロン、ラミブシン、ロピナビル、ロビリド、ＭＫ－０５１８、マラビロク、モロキシジン、ネルフィナビル、ネビラピン、ネキサビル（ｎｅｘａｖｉｒ）、ヌクレオシド類似体、オセルタミビル、ペンシクロビル、ペラミビル、プレコナリル、ポドフィロトキシン、プロテアーゼ阻害薬、逆転写酵素阻害薬、リバビリン、リマンタジン、リトナビル、サキナビル、スタブジン、相乗的増強剤（ｓｙｎｅｒｇｉｓｔｉｃ　ｅｎｈａｎｃｅｒ）、テノホビル、テノホビルジソプロキシル、チプラナビル、トリフルリジン、トリジビル、トロマンタジン、ツルバダ、バラシクロビル、バルガンシクロビル、ビクリビロク、ビダラビン、ビラミジン、ザルシタビン、ザナミビル、ジドブジン、これらの薬学的に許容される塩、これらの立体異性体、これらの誘導体、これらの類似体、ならびにこれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。

【０２３７】

脂質粒子

本発明の脂質粒子は通常、活性剤または治療剤と、本発明のイオン化できる脂質と、非カチオン性脂質と、粒子の凝集を抑制する複合脂質とを含む。いくつかの実施形態では、活性剤または治療剤は、脂質粒子中の活性剤または治療剤が水溶液にて、例えば、ヌクレアーゼまたはプロテアーゼによる酵素分解に耐性であるように、脂質粒子の脂質部分内に完全に封入される。他の実施形態では、本明細書に記載されている脂質粒子は、ヒトのような哺乳類に対して実質的に無毒性である。本発明の脂質粒子は通常、約４０ｎｍ～約１５０ｎｍ、約４０ｎｍ～約８０ｎｍ、約４０ｎｍ～約６０ｎｍ、約５０ｎｍ～約８０ｎｍ、約５０ｎｍ～約６０ｎｍ、約５０ｎｍ～約１５０ｎｍ、約６０ｎｍ～約１３０ｎｍ、約７０ｎｍ～約１１０ｎｍ、または約７０～約９０ｎｍの平均径を有する。

【０２３８】

好ましい実施形態では、本発明の脂質粒子は、干渉ＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ、ａｉＲＮＡ、および／またはｍｉＲＮＡ）またはｍＲＮＡのような１つまたは複数の核酸分子と；本発明のイオン化できる脂質（例えば、式Ｉのカチオン性脂質）と；非カチオン性脂質（例えば、コレステロール単独または１つまたは複数のリン脂質とコレステロールとの混合物）と；粒子の凝集を抑制する複合脂質（例えば、１つまたは複数のＰＥＧ－脂質複合物）とを含む、血清安定性核酸－脂質粒子（ＬＮＰ）である。ＬＮＰは、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれ以上の非修飾および／または修飾核酸分子を含んでもよい。核酸－脂質粒子およびそれらの調製方法は、例えば、米国特許第５，７５３，６１３号、同第５，７８５，９９２号、同第５，７０５，３８５号、同第５

，９７６，５６７号、同第５，９８１，５０１号、同第６，１１０，７４５号、および同第６，３２０，０１７号、ならびにＰＣＴ公開第ＷＯ９６／４０９６４号に記載されており、それらの開示はそれぞれ、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【０２３９】

イオン化できる脂質

一実施形態では、本発明は、式－ＮＲ^{2}Ｒ^{3}のイオン化できる基（式中、Ｒ^{2}はＣ$_{1}$－Ｃ$_{4}$アルキルであり、Ｒ^{3}はＣ$_{1}$－Ｃ$_{4}$アルキルである）；１５～４０の炭素原子、３０～８０の水素原子；０～１０の酸素原子；０～１０の窒素原子；０～４のフッ素；および０～５の硫黄原子から成るイオン化できる脂質を提供し、イオン化できる脂質は、投与後７日目にイオン化できる親脂質の１０％未満が残存するようなクリアランス率を有する（例えば、本明細書の実施例３２に記載されているアッセイにて）。

【０２４０】

一実施形態では、イオン化できる脂質は式－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－の基を少なくとも１つ含む。

【０２４１】

一実施形態では、イオン化できる脂質は式－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－の基を少なくとも２つ含む。

【０２４２】

一実施形態では、イオン化できる脂質は、式－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｒ^{4}）（Ｒ^{5}）－の少なくとも１つの基を含み、式中、Ｒ^{4}はＣ$_{2}$～Ｃ$_{30}$ヒドロカルビルであり；およびＲ^{5}はＣ$_{2}$～Ｃ$_{30}$ヒドロカルビルである。

【０２４３】

一実施形態では、イオン化できる脂質は、式－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－Ｎ＝Ｃ（Ｒ^{4}）－の少なくとも１つの基を含み、式中、Ｒ^{4}はＣ$_{2}$～Ｃ$_{30}$ヒドロカルビルであり；およびＲ^{5}はＣ$_{2}$～Ｃ$_{30}$ヒドロカルビルである。

【０２４４】

一実施形態では、イオン化できる脂質は、式－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｈ）（Ｒ^{4}）（Ｒ^{5}）－の少なくとも１つの基を含み、式中、Ｒ^{4}はＣ$_{2}$～Ｃ$_{30}$ヒドロカルビルであり；およびＲ^{5}はＣ$_{2}$～Ｃ$_{30}$ヒドロカルビルである。

【０２４５】

一実施形態では、イオン化できる脂質は式－ＣＨＦ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－または－ＣＦ$_{2}$－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－の少なくとも１つの基を含む。

【０２４６】

一実施形態では、Ｘは－ＣＨ$_{2}$－である。

【０２４７】

一実施形態では、Ｘは－Ｃ（＝Ｏ）－である。

【０２４８】

一実施形態では、Ｘは－Ｏ－である。

【０２４９】

一実施形態では、Ｒ^{2}はメチルである。

【０２５０】

一実施形態では、Ｒ^{2}はエチルである。

【０２５１】

一実施形態では、Ｒ^{2}はプロピルである。

【０２５２】

一実施形態では、Ｒ^{3}はメチルである。

【０２５３】

一実施形態では、Ｒ^{3}はエチルである。

【０２５４】

一実施形態では、R^3はプロピルである。

【０２５５】

一実施形態では、ｍは１である。

【０２５６】

一実施形態では、ｍは２である。

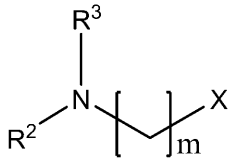
【０２５７】

一実施形態では、ｍは３である。

【０２５８】

一実施形態では、基：

【化３】

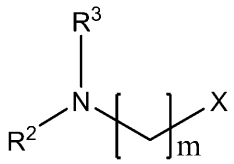


は、（CH_3）$_2$$NCH_2CH_2C$（＝Ｏ）－、（$CH_3$）$_2$$NCH_2CH_2CH_2C$（＝Ｏ）－、（$CH_3$）$_2$$NCH_2CH_2CH_2CH_2C$（＝Ｏ）－、（$CH_3$）$_2$$NCH_2CH_2$－、（$CH_3$）$_2$$NCH_2CH_2CH$－、５－ピロリジン－１－イルペンタノイル、および（CH_3）$_2$$NCH_2CH_2CH_2O$－から成る群から選択される。

【０２５９】

一実施形態では、基：

【化４】



は、（CH_3）$_2$$NCH_2CH_2C$（＝Ｏ）－、（$CH_3$）$_2$$NCH_2CH_2CH_2C$（＝Ｏ）－、（$CH_3$）$_2$$NCH_2CH_2CH_2CH_2C$（＝Ｏ）－、（$CH_3$）$_2$$NCH_2CH_2$－、（$CH_3$）$_2$$NCH_2CH_2CH$－、および（$CH_3$）$_2$$NCH_2CH_2CH_2O$－から成る群から選択される。

【０２６０】

一実施形態では、R^1はC_5～C_{25}ヒドロカルビルである。

【０２６１】

一実施形態では、R^1はC_2～C_{25}アルキルである。

【０２６２】

一実施形態では、R^1はC_5～C_{25}）アルキルである。

【０２６３】

一実施形態では、R^1はC_5～C_{25}アルケニルである。

【０２６４】

一実施形態では、R^1は１－ノニルまたは１－デシルである。

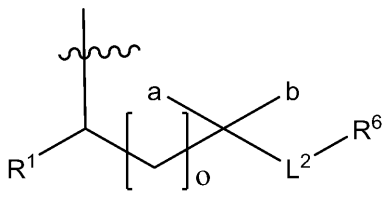
【０２６５】

一実施形態では、ｏは２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５である。

【０２６６】

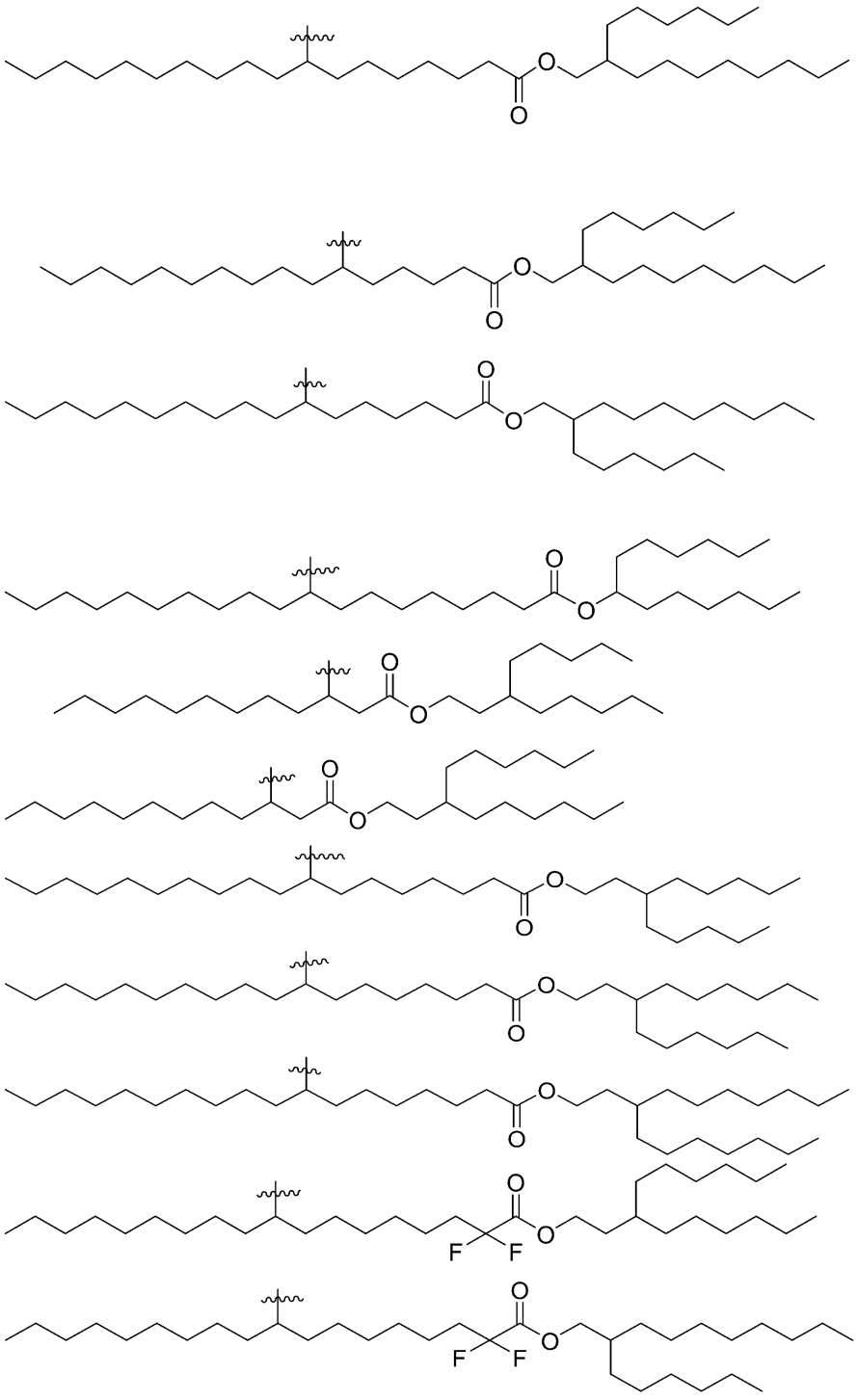
一実施形態では、ｏは１０、１１、１２、１３、１４、または１５である。

【０２６７】
一実施形態では、ｏは２、３、４、５、６、７、８、９、または１０である。
【０２６８】
一実施形態では、ｏは２、３、４、または５である。
【０２６９】
一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（R^4）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－Ｎ＝Ｃ（R^4）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｈ）Ｃ（R^4）（R^5）－、または－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－CH_2－R^zである。
【０２７０】
一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－である。
【０２７１】
一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（R^4）－である。
【０２７２】
一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－CH_2－R^zである。
【０２７３】
一実施形態では、ａはＨである。
【０２７４】
一実施形態では、ａはＦである。
【０２７５】
一実施形態では、ｂはＨである。
【０２７６】
一実施形態では、ｂはＦである。
【０２７７】
一実施形態では、R^6はC_2～C_{25}ヒドロカルビルである。
【０２７８】
一実施形態では、R^6はC_5～C_{25}ヒドロカルビルである。
【０２７９】
一実施形態では、R^6はC_2～C_{25}アルキルである。
【０２８０】
一実施形態では、R^6はC_5～C_{25}アルキルである。
【０２８１】
一実施形態では、R^6はC_5～C_{25}アルケニルである。
【０２８２】
一実施形態では、基：
【化５】

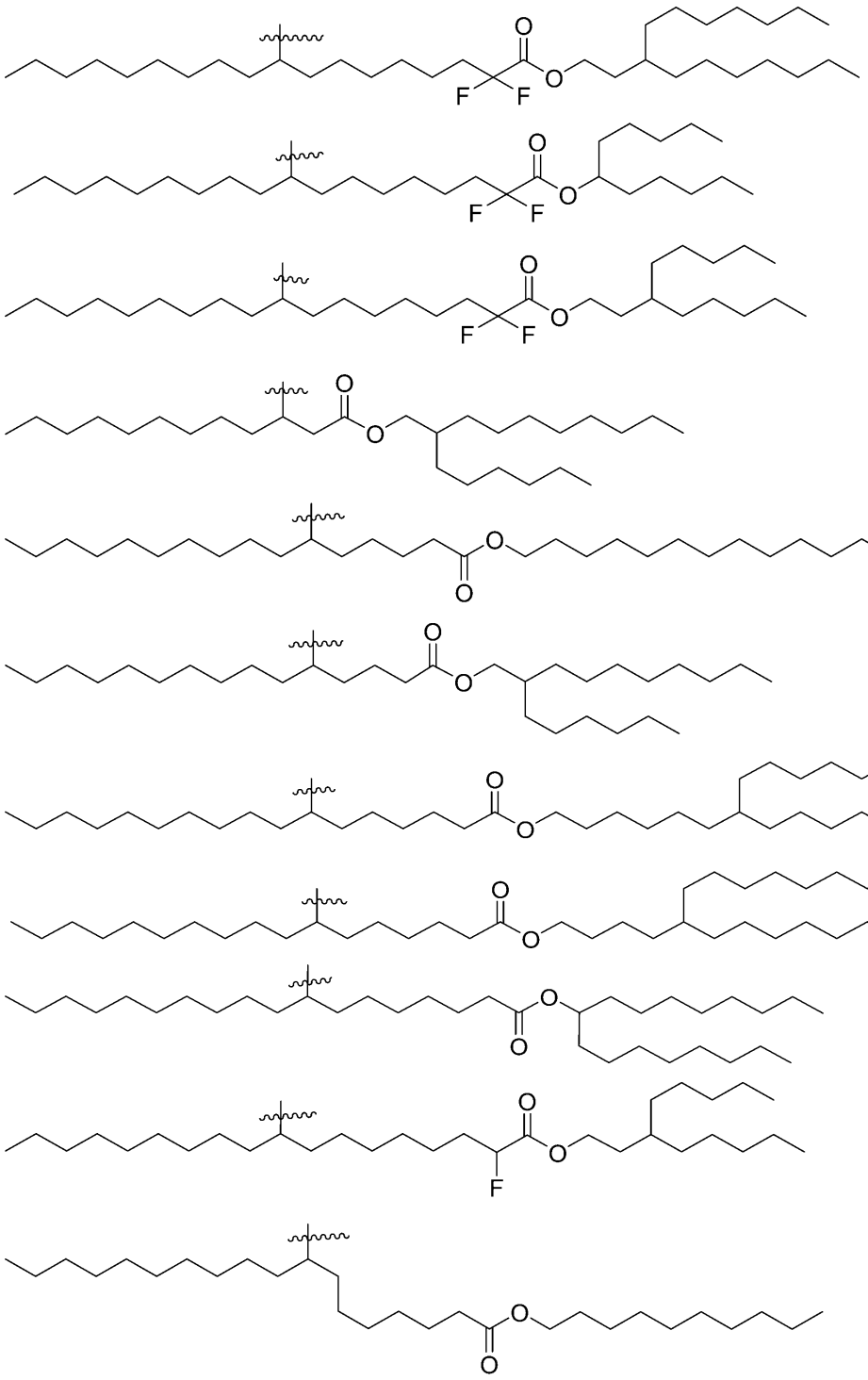


は、

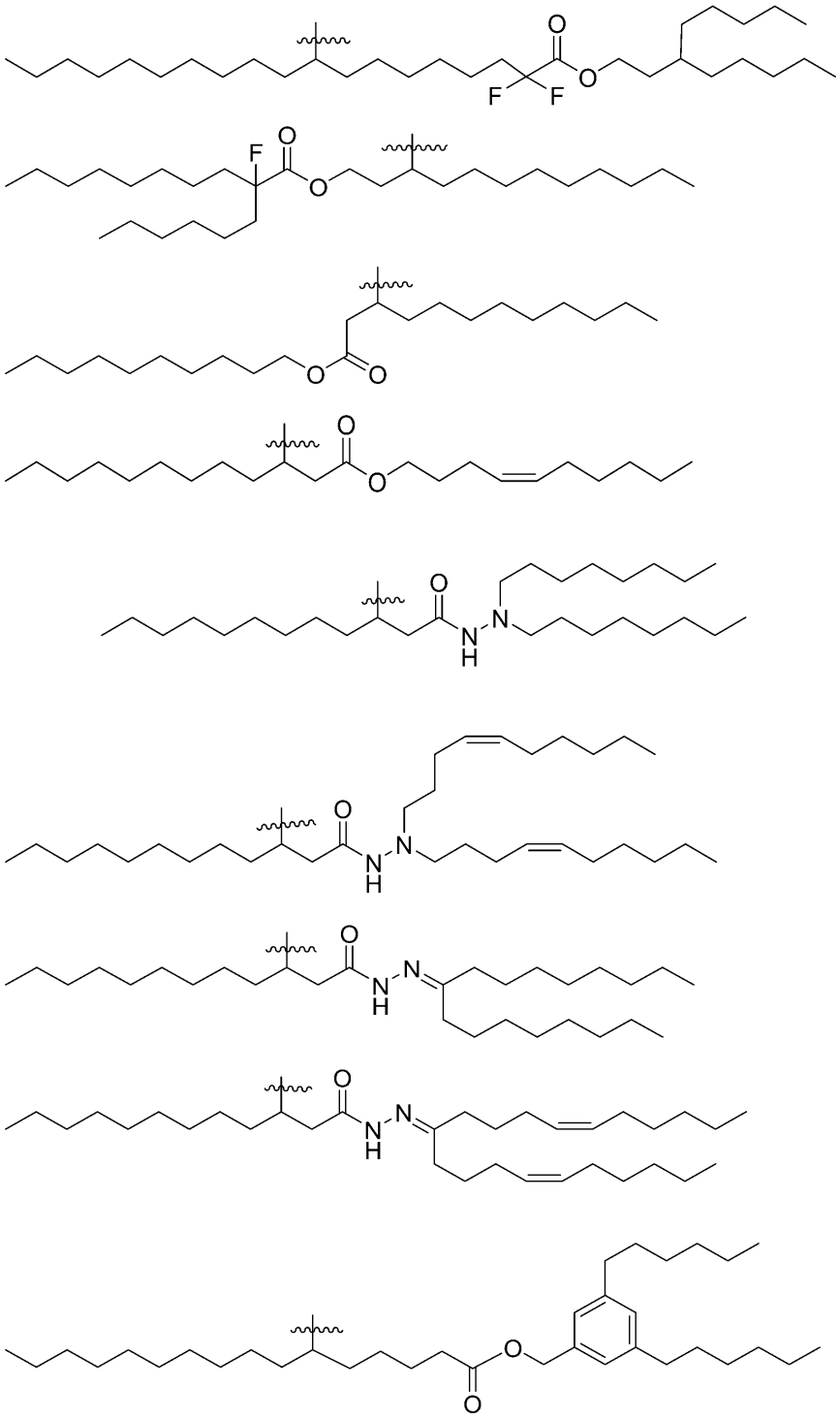
【化６】



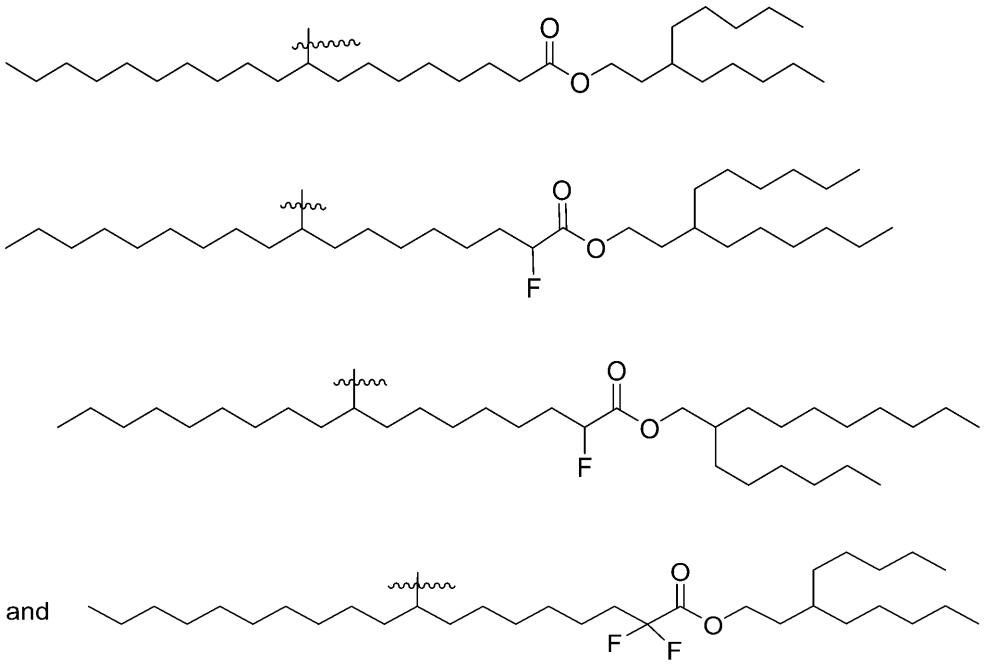
【化７】



【化８】



【化９】

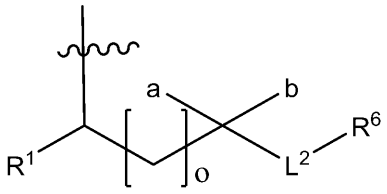


から成る群から選択される。

【０２８３】

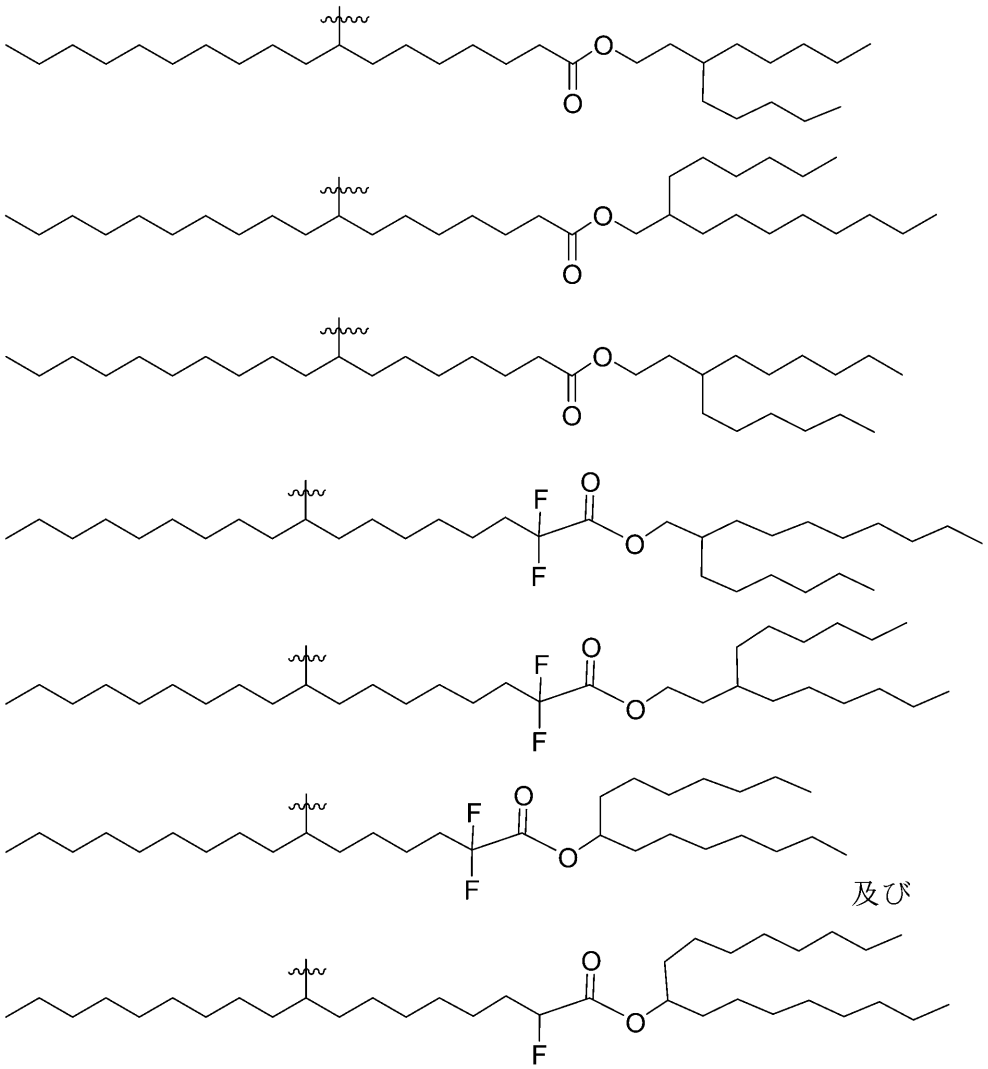
一実施形態では、基：

【化１０】



は、

【化１１】



及び

から成る群から選択される。

【０２８４】

一実施形態では、Ｙは－ＣＨ$_2$－である。

【０２８５】

一実施形態では、Ｙは－Ｃ（＝Ｏ）－である。

【０２８６】

一実施形態では、Ｙは－Ｏ－である。

【０２８７】

一実施形態では、ｎは２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５である。

【０２８８】

一実施形態では、ｎは１０、１１、１２、１３、１４、または１５である。

【０２８９】

一実施形態では、ｎは２、３、４、５、６、７、８、９、または１０である。

【０２９０】

一実施形態では、ｎは２、３、４、または５である。

【０２９１】

一実施形態では、Ｌ^{1}は存在しない；およびＬ^{2}は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｒ^4）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－Ｎ＝Ｃ（Ｒ^4）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ

）Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｒ^{4}）（Ｒ^{5}）－、または－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ２－Ｒ^{z}である。

【０２９２】

一実施形態では、Ｌ^{1}は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｒ^{4}）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－Ｎ＝Ｃ（Ｒ^{4}）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｒ^{4}）（Ｒ^{5}）－、または－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_{2}$－Ｒ^{a}であり；かつＬ^{2}は存在しない。

【０２９３】

一実施形態では、Ｌ^{1}は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｒ^{4}）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－Ｎ＝Ｃ（Ｒ^{4}）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｈ）Ｃ（Ｒ^{4}）（Ｒ^{5}）－、または－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_{2}$－Ｒ^{a}である。

【０２９４】

一実施形態では、Ｌ^{1}は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏである。

【０２９５】

一実施形態では、Ｌ^{1}は－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｒ^{4}）－である。

【０２９６】

一実施形態では、Ｌ^{1}は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_{2}$－Ｒ^{z}である。

【０２９７】

一実施形態では、ｃはＨである。

【０２９８】

一実施形態では、ｃはＦである。

【０２９９】

一実施形態では、ｄはＨである。

【０３００】

一実施形態では、ｄはＦである。

【０３０１】

一実施形態では、Ｒ^{7}は、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルである。

【０３０２】

一実施形態では、Ｒ^{7}はＣ$_{5}$～Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルである。

【０３０３】

一実施形態では、Ｒ^{7}はＣ$_{2}$～Ｃ$_{25}$アルキルである。

【０３０４】

一実施形態では、Ｒ^{7}はＣ$_{5}$～Ｃ$_{25}$アルキルである。

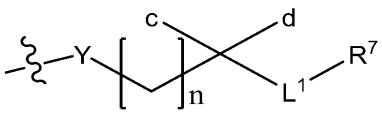
【０３０５】

一実施形態では、Ｒ^{7}はＣ$_{5}$～Ｃ$_{25}$アルケニルである。

【０３０６】

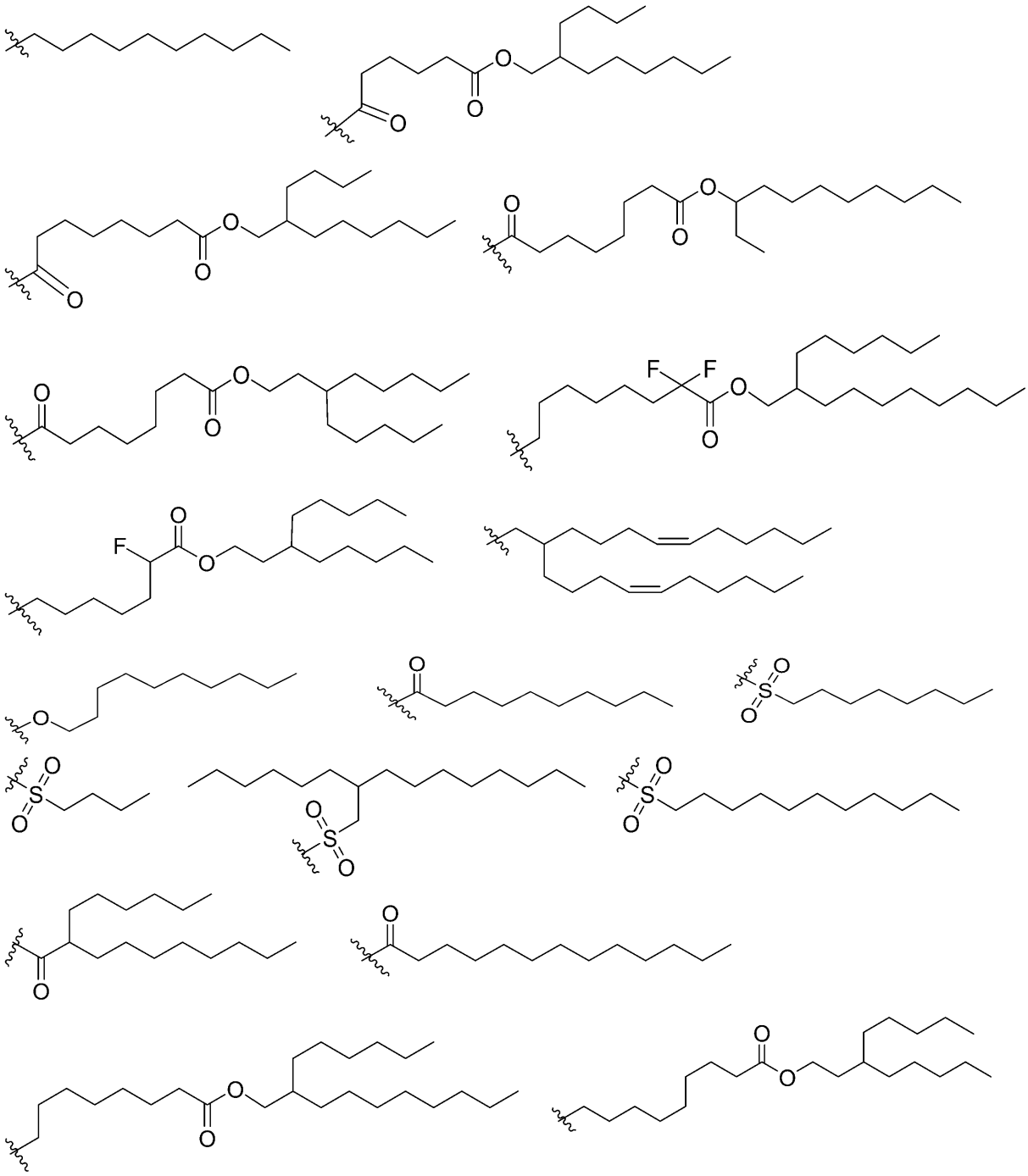
一実施形態では、基：

【化１２】

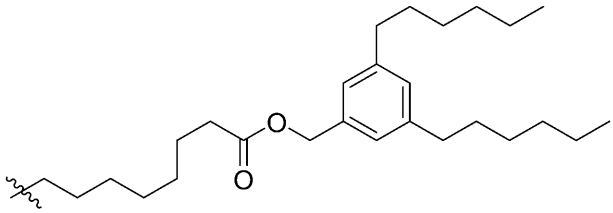
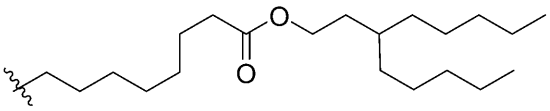
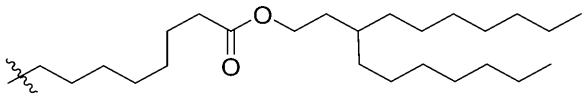
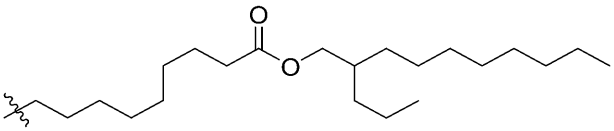
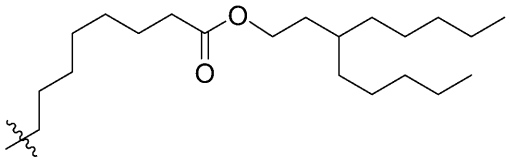
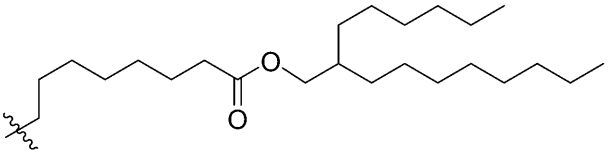
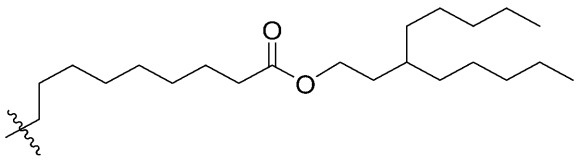
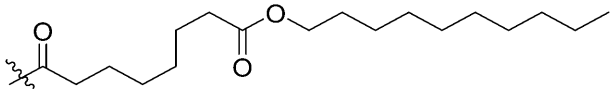
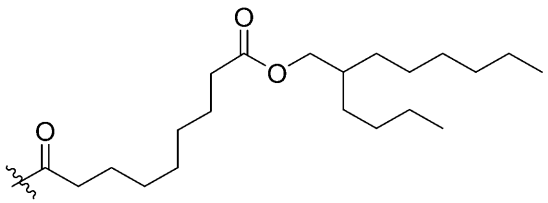
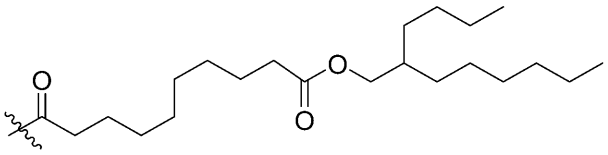
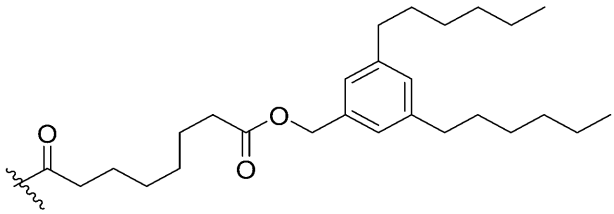
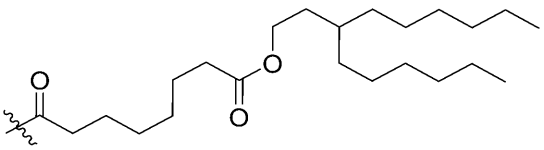
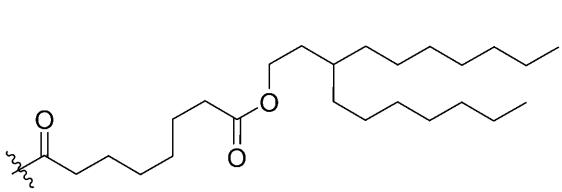
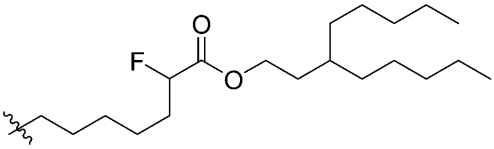


は、

【化１３】



【化１４】

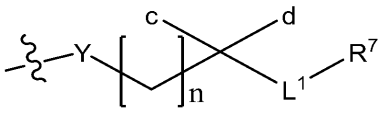













及び


から成る群から選択される。

【０３０７】

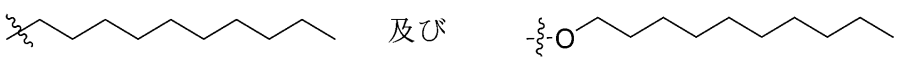
一実施形態では、基：

【化１５】



は、

【化１６】



から成る群から選択される。

【０３０８】

一実施形態では、R^4はC_2～C_{25}ヒドロカルビルである。

【０３０９】

一実施形態では、R^4はC_5～C_{25}ヒドロカルビルである。

【０３１０】

一実施形態では、R^4はC_2～C_{25}アルキルである。

【０３１１】

一実施形態では、R^4はC_5～C_{25}アルキルである。

【０３１２】

一実施形態では、R^4はC_5～C_{25}アルケニルである。

【０３１３】

一実施形態では、R^5はC_2～C_{25}ヒドロカルビルである。

【０３１４】

一実施形態では、R^5はC_5～C_{25}ヒドロカルビルである。

【０３１５】

一実施形態では、R^5はC_2～C_{25}アルキルである。

【０３１６】

一実施形態では、R^5はC_5～C_{25}アルキルである。

【０３１７】

一実施形態では、R^5はC_5～C_{25}アルケニルである。

【０３１８】

一実施形態では、$R^{4'}$はC_2－C_{25}ヒドロカルビルである。

【０３１９】

一実施形態では、$R^{'4}$はC_5－C_{25}ヒドロカルビルである。

【０３２０】

一実施形態では、$R^{4'}$はC_2～C_{25}アルキルである。

【０３２１】

一実施形態では、$R^{4'}$はC_5～C_{25}アルキルである。

【０３２２】

一実施形態では、$R^{4'}$はC_5～C_{25}アルケニルである。

【０３２３】

一実施形態では、$R^{'5}$はC_2～C_{25}ヒドロカルビルである。

【０３２４】

一実施形態では、$R^{'5'}$はC_5～C_{25}ヒドロカルビルである。

【０３２５】

一実施形態では、$R^{5'}$はC_2～C_{25}アルキルである。

【０３２６】

一実施形態では、R^5はC_5～C_{25}アルキルである。

【０３２７】

一実施形態では、$R^{5'}$はC_5～C_{25}アルケニルである。

【０３２８】

一実施形態では、R^zはC_2～C_{10}ヒドロカルビルから独立して選択される１または２の基で置換されたフェニルである。一実施形態では、各C_2～C_{10}ヒドロカルビルはC_5～C_{10}ヒドロカルビルから成る群から独立して選択される。一実施形態では、各C

２～Ｃ１０ヒドロカルビルはＣ２～Ｃ１０アルキルから成る群から独立して選択される。一実施形態では、各Ｃ２～Ｃ１０ヒドロカルビルはＣ５～Ｃ１０アルキルから成る群から独立して選択される。一実施形態では、各Ｃ２～Ｃ１０ヒドロカルビルはＣ５～Ｃ１０アルケニルから成る群から独立して選択される。

【０３２９】

一実施形態では、Ｒ$^{z'}$はＣ２～Ｃ１０ヒドロカルビルから独立して選択される１または２の基で置換されたフェニルである。一実施形態では、各Ｃ２～Ｃ１０ヒドロカルビルはＣ５～Ｃ１０ヒドロカルビルから成る群から独立して選択される。一実施形態では、各Ｃ２～Ｃ１０ヒドロカルビルはＣ２～Ｃ１０アルキルから成る群から独立して選択される。一実施形態では、各Ｃ２～Ｃ１０ヒドロカルビルはＣ５～Ｃ１０アルキルから成る群から独立して選択される。一実施形態では、各Ｃ２～Ｃ１０ヒドロカルビルはＣ５～Ｃ１０アルケニルから成る群から独立して選択される。

【０３３０】

一実施形態では、イオン化できる脂質は、実施例１、１６、１７、４３、４６、９０、１０１、および１１５の化合物、およびそれらの塩から選択される。

【０３３１】

一実施形態では、Ｘは－Ｃ（＝Ｏ）－であり、Ｙは存在しない、または－Ｏ－である。

【０３３２】

一実施形態では、Ｘは－Ｃ（＝Ｏ）－であり、Ｙは－Ｏ－である。

【０３３３】

一実施形態では、Ｙは－ＣＨ２－であり、Ｌ^{1}は存在しない、ｃおよびｄはそれぞれＨである。

【０３３４】

一実施形態では、ａはＦであり、またはｂはＨである。

【０３３５】

一実施形態では、ａはＦであり、かつｂはＦである。

【０３３６】

一実施形態では、ａはＦであり；ｂはＨであり；かつＬ^{1}は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－である。

【０３３７】

一実施形態では、ａはＦであり；ｂはＦであり；かつＬ^{1}は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－である。

【０３３８】

一実施形態では、Ｒ^{2}およびＲ^{3}はそれぞれメチルである。

【０３３９】

一実施形態では、Ｌ^{1}は存在しない；ｃおよびｄはそれぞれＨである。

【０３４０】

一実施形態では、Ｌ^{1}は存在しない；ａ、ｂ、ｃおよびｄはそれぞれＨである。

【０３４１】

一実施形態では、Ｌ^{1}およびＬ^{2}のうちの一方は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－である。

【０３４２】

一実施形態では、Ｌ^{1}は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり、Ｒ^{7}は分岐鎖Ｃ２～Ｃ２５ヒドロカルビルである。

【０３４３】

一実施形態では、Ｌ^{1}は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり、Ｒ^{7}はＬ^{1}への結合点から３炭素以内の炭素で分岐するＣ５～Ｃ２５ヒドロカルビルである。

【０３４４】

一実施形態では、Ｌ^{1}は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり、Ｒ^{7}はＬ^{1}への結合点から２炭素以内の炭素で分岐するＣ４～Ｃ２５ヒドロカルビルである。

【０３４５】

一実施形態では、L^1は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり、R^7はL^1に結合する炭素で分岐するC_3～C_{25}ヒドロカルビルである。

【０３４６】

一実施形態では、L^1およびL^2の一方は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり、R^7は分岐鎖C_2～C_{25}ヒドロカルビルである。

【０３４７】

一実施形態では、L^1およびL^2の一方は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり、R^7はL^1への結合点から３炭素以内の炭素で分岐するC_5～C_{25}ヒドロカルビルである。

【０３４８】

一実施形態では、L^1およびL^2の一方は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり、R^7はL^1への結合点から２炭素以内の炭素で分岐するC_4～C_{25}ヒドロカルビルである。

【０３４９】

一実施形態では、L^1およびL^2の一方は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり、R^7はL^1に結合する炭素で分岐するC_3～C_{25}ヒドロカルビルである。

【０３５０】

一実施形態では、Ｙは存在しない、または－Ｏ－であり；Ｎは０であり；ｃはＨであり；ｄはＨであり；L^1は存在しない；R^7はC_2～C_{25}ヒドロカルビルである。

【０３５１】

一実施形態では、Ｙは存在しない、または－Ｏ－であり；Ｎは０であり；ｃはＨであり；ｄはＨであり；L^1は存在しない；R^7はC_5～C_{15}ヒドロカルビルである。

【０３５２】

一実施形態では、Ｙは存在しない、または－Ｏ－であり；Ｎは０であり；ｃはＨであり；ｄはＨであり；L^1は存在しない；R^7はC_{10}ヒドロカルビルである。

【０３５３】

一実施形態では、Ｙは存在しない，または－Ｏ－であり；Ｎは０であり；ｃはＨであり；ｄはＨであり；L^1は存在しない；R^7は式（Ｉ）の化合物の残りの部分への結合点から３炭素以内の炭素で分岐するC_5－C_{15}ヒドロカルビルである。

【０３５４】

一実施形態では、Ｙは存在しない、または－Ｏ－であり；Ｎは０であり；ｃはＨであり；ｄはＨであり；L^1は存在しない；R^7は式（Ｉ）の化合物の残りの部分への結合点から２炭素以内の炭素で分岐するC_5－C_{15}ヒドロカルビルである。

【０３５５】

一実施形態では、Ｙは存在しない、または－Ｏ－であり；Ｎは０であり；ｃはＨであり；ｄはＨであり；L^1は存在しない；R^7は式（Ｉ）の化合物の残りの部分に結合する炭素で分岐するC_5－C_{15}ヒドロカルビルである。

【０３５６】

一実施形態では、Ｙは存在しない，または－Ｏ－であり；Ｎは０であり；ｃはＨであり；ｄはＨであり；L^1は存在しない；R^7は式（Ｉ）の化合物の残りの部分への結合点から３炭素以内の炭素で分岐するC_{10}ヒドロカルビルである。

【０３５７】

一実施形態では、Ｙは存在しない，または－Ｏ－であり；Ｎは０であり；ｃはＨであり；ｄはＨであり；L^1は存在しない；R^7は式（Ｉ）の化合物の残りの部分への結合点から２炭素以内の炭素で分岐するC_{10}ヒドロカルビルである。

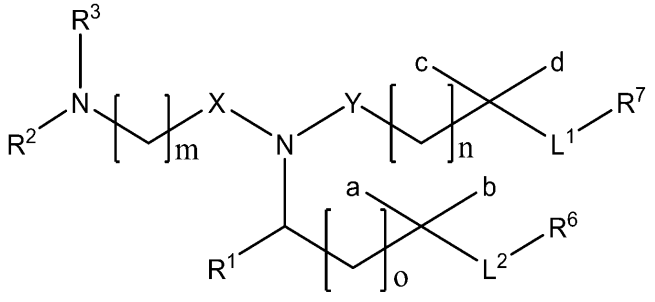
【０３５８】

一実施形態では、Ｙは存在しない、または－Ｏ－であり；Ｎは０であり；ｃはＨであり；ｄはＨであり；L^1は存在しない；R^7は式（Ｉ）の化合物の残りの部分に結合する炭素で分岐するC_{10}ヒドロカルビルである。

【０３５９】

一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり、R^6は分岐鎖C_2～C_{25}ヒドロカルビルである。

【０３６０】
一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり、R^6はL^2への結合点から３炭素以内の炭素で分岐するC_5～C_{25}ヒドロカルビルである。
【０３６１】
一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり、R^6はL^2への結合点から２炭素以内の炭素で分岐するC_4～C_{25}ヒドロカルビルである。
【０３６２】
一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり、R^6はL^2に結合する炭素で分岐するC_3～C_{25}ヒドロカルビルである。
【０３６３】
一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり；ａはＦであり；ｂはＨであり；R^6は分岐鎖C_2～C_{25}ヒドロカルビルである。
【０３６４】
一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり；ａはＦであり；ｂはＨであり；R^6はL^2への結合点から３炭素以内の炭素で分岐するC_5～C_{25}ヒドロカルビルである。
【０３６５】
一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり；ａはＦであり；ｂはＨであり；R^6はL^2への結合点から２炭素以内の炭素で分岐するC_4～C_{25}ヒドロカルビルである。
【０３６６】
一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり；ａはＦであり；ｂはＨであり；R^6はL^2に結合する炭素で分岐するC_3～C_{25}ヒドロカルビルである。
【０３６７】
一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり；ａはＦであり；ｂはＦであり；R^6は分岐鎖C_2～C_{25}ヒドロカルビルである。
【０３６８】
一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり；ａはＦであり；ｂはＦであり；R^6はL^2への結合点から３炭素以内の炭素で分岐するC_5～C_{25}ヒドロカルビルである。
【０３６９】
一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり；ａはＦであり；ｂはＦであり；R^6はL^2への結合点から２炭素以内の炭素で分岐するC_4～C_{25}ヒドロカルビルである。
【０３７０】
一実施形態では、L^2は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり；ａはＦであり；ｂはＦであり；R^6はL^2に結合する炭素で分岐するC_3～C_{25}ヒドロカルビルである。
【０３７１】
一実施形態では、本発明は、式（Ｉ）：
【化１７】



（Ｉ）

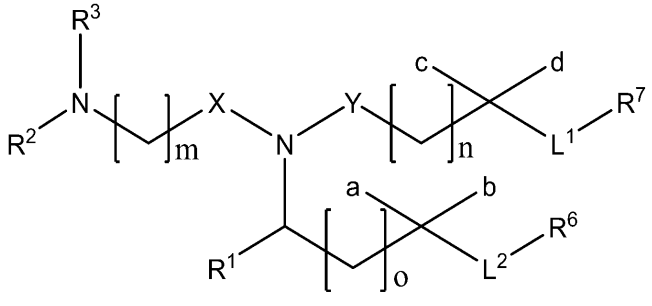
の化合物、またはその塩を提供するものであり、式中、
Ｘは－CH_2－、－Ｏ－、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）、または－Ｃ（＝Ｏ）－であり；
Ｙは－CH_2－、－Ｏ－、－SO_2－、または－Ｃ（＝Ｏ）－であり；

R^1はC$_2$～C$_{25}$ヒドロカルビルであり；
R^2はC$_1$～C$_3$アルキルであり、R^3はC$_1$～C$_3$アルキルであり；またはR^2およびR^3はそれらが結合している窒素と一緒になってアジリジノ環、アゼチジノ環、またはピロリジノ環を形成し；
mは０、１、２、３、４、５、または６であり；
nは０～１５であり；
oは０～１５であり；
L^1は存在しない、－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（R^4）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－Ｎ＝Ｃ（R^4）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｈ）Ｃ（R^4）（R^5）－、－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－R^z、または－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－R^w－であり；
L^2は存在しない、－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（$R^{4'}$）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－Ｎ＝Ｃ（$R^{4'}$）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）Ｎ（Ｈ）Ｃ（$R^{4'}$）（$R^{5'}$）－、－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－$R^{z'}$、または、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－R^x－であり；
ａはＨまたはＦであり；
ｂはＨまたはＦであり；
ｃはＨまたはＦであり、ｄはＨまたはＦであり、またはｃとｄはそれらが結合している炭素と一緒になって－Ｃ（＝Ｏ）－を形成し；
R^4はＨまたはC$_2$～C$_{25}$ヒドロカルビルであり；
R^5はＨまたはC$_2$～C$_{25}$ヒドロカルビルであり；
$R^{4'}$はＨまたはC$_2$～C$_{25}$ヒドロカルビルであり；
$R^{5'}$はＨまたはC$_2$～C$_{25}$ヒドロカルビルであり；
R^6はC$_2$～C$_{25}$ヒドロカルビルであり；
R^7はC$_2$～C$_{25}$ヒドロカルビルであり；
R^wは存在しない、－Ｃ（Ｆ）Ｈ－、または－Ｃ（Ｆ）$_2$－であり；
R^xは存在しない、－Ｃ（Ｆ）Ｈ－、または－Ｃ（Ｆ）$_2$－であり；
R^zはC$_2$～C$_{10}$ヒドロカルビルから独立して選択される１、２、または３の基で置換されたフェニルであり；
$R^{z'}$はC$_2$～C$_{10}$ヒドロカルビルから独立して選択される１、２、または３の基で置換されたフェニルである。

【０３７２】

一実施形態では、本発明は、式（Ｉ）：

【化１８】



（Ｉ）

の化合物、またはその塩を提供するものであり、式中、
Ｘは－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）、または－Ｃ（＝Ｏ）－であり；
Ｙは－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－、－ＳＯ$_2$－、または－Ｃ（＝Ｏ）－であり；
R^1はC$_2$～C$_{25}$ヒドロカルビルであり；
R^2はC$_1$～C$_3$アルキルであり、R^3はC$_1$～C$_3$アルキルであり；またはR^2およびR^3はそれらが結合している窒素と一緒になってアジリジノ環、アゼチジノ環、またはピロリジノ環を形成し；

ｍは０、１、２、３、４、５、または６であり；
ｎは０～１５であり；
ｏは０～１５であり；
Ｌ^{1}は存在しない、または－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり；
Ｌ^{2}は存在しない、または－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり；
ａはＨまたはＦであり；
ｂはＨまたはＦであり；
ｃはＨもしくはＦであり、ｄはＨもしくはＦであり、またはｃとｄはそれらが結合している炭素と一緒になって－Ｃ（＝Ｏ）－を形成し；
Ｒ^{4}はＨまたはＣ$_{2}$～Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；
Ｒ^{5}はＨまたはＣ$_{2}$～Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；
Ｒ$^{4'}$はＨまたはＣ$_{2}$～Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；
Ｒ$^{5'}$はＨまたはＣ$_{2}$～Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；
Ｒ^{6}はＣ$_{2}$～Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；
Ｒ^{7}はＣ$_{2}$－Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルであり；
Ｒ^{w}は存在しない、－Ｃ（Ｆ）Ｈ－、または－Ｃ（Ｆ）$_{2}$－であり；
Ｒ^{x}は存在しない、－Ｃ（Ｆ）Ｈ－、または－Ｃ（Ｆ）$_{2}$－であり；
Ｒ^{z}はＣ$_{2}$－Ｃ$_{10}$ヒドロカルビルから独立して選択される１、２、または３の基で置換されたフェニルであり；かつ
Ｒ$^{z'}$はＣ$_{2}$－Ｃ$_{10}$ヒドロカルビルから独立して選択される１、２、または３の基で置換されたフェニルである。

【０３７３】

具体的な実施形態

特定の一実施形態では、本発明は、Ｘが－Ｃ（＝Ｏ）－である式（Ｉ）のイオン化できる脂質を提供する。そのようなイオン化できる脂質は通常、高い活性を示す。

【０３７４】

具体的な一実施形態では、本発明は、Ｘが－Ｃ（＝Ｏ）－であり、Ｙが－Ｏ－である式（Ｉ）のイオン化できる脂質を提供する。そのようなイオン化できる脂質は通常、高い活性を示し、望ましいｐＫａ特性を有する。

【０３７５】

具体的な一実施形態では、本発明は、式（Ｉ）のイオン化できる脂質を提供し、式中、Ｙは－ＣＨ$_{2}$－であり；Ｌ^{1}は存在しない、ｃおよびｄはそれぞれＨである。そのようなイオン化できる脂質は通常、高い活性を示す。

【０３７６】

具体的な一実施形態では、本発明は式（Ｉ）のイオン化できる脂質を提供し、式中、Ｒ^{2}はメチルであり、Ｒ^{3}はメチルである。そのようなイオン化できる脂質は通常、高い活性を示す。

【０３７７】

具体的な一実施形態では、本発明は式（Ｉ）のイオン化できる脂質を提供し、式中、Ｌ^{1}は存在しない、ｃおよびｄはそれぞれＨである。そのようなイオン化できる脂質は通常、高い活性を示す。

【０３７８】

具体的な一実施形態では、本発明は、式（Ｉ）のイオン化できる脂質を提供し、式中、Ｌ^{2}は－（Ｃ＝Ｏ）－Ｏ－であり、Ｒ^{6}はＬ^{2}に結合している炭素原子で分岐する、またはＬ^{2}への結合点から２炭素である炭素原子で分岐する、またはＬ^{2}への結合点から３炭素である炭素原子で分岐するＣ$_{2}$－Ｃ$_{25}$ヒドロカルビルである。そのようなイオン化できる脂質は通常、高い活性を示す。

【０３７９】

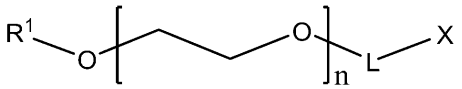
ヒドロカルビルがＬ^{1}もしくはＬ^{2}に結合している炭素原子で分岐する、またはＬ^{1}もしくはＬ^{2}への結合点から２炭素である炭素原子で分岐する、またはＬ^{1}もしくはＬ^{2}へ

の結合点から３炭素である炭素原子で分岐する場合、ヒドロカルビルは、次の式に示される炭素の１つで分岐すると理解される：
【化１９】



【０３８０】
一実施形態では、本発明は、
（ａ）１つまたは複数の核酸分子と；
（ｂ）非カチオン性脂質と；
（ｃ）複合脂質と；
（ｄ）式（Ｉ）の化合物またはその塩とを含み、前記１つまたは複数の核酸分子が脂質粒子内に封入されている、核酸－脂質粒子を提供する。
【０３８１】
一実施形態では、化合物または塩は粒子中に存在する総脂質の約３０ｍｏｌ％～約８５ｍｏｌ％を構成し；非カチオン性脂質は粒子中に存在する総脂質の約１３ｍｏｌ％～約４９．５ｍｏｌ％を構成し；複合脂質は粒子中に存在する総脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を構成する。
【０３８２】
一実施形態では、化合物または塩は粒子中に存在する総脂質の約３０ｍｏｌ％～約８５ｍｏｌ％を構成し；非カチオン性脂質は粒子中に存在する総脂質の約１３ｍｏｌ％～約４９．５ｍｏｌ％を構成し；複合脂質は粒子中に存在する総脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を構成する。
【０３８３】
一実施形態では、核酸は、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、Ｄｉｃｅｒ基質ｄｓＲＮＡ、低分子ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、非対称干渉ＲＮＡ（ａｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ウイルスＲＮＡ（ｖＲＮＡ）、自己増幅ＲＮＡ、およびそれらの組み合わせから成る群から選択される。
【０３８４】
一実施形態では、核酸はｍＲＮＡ分子である。
【０３８５】
一実施形態では、核酸は二本鎖ｓｉＲＮＡ分子を含む。
【０３８６】
一実施形態では、二本鎖ｓｉＲＮＡ分子は少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む。
【０３８７】
一実施形態では、ｓｉＲＮＡは少なくとも１つの２’－Ｏ－メチル（２’ＯＭｅ）ヌクレオチドを含む。
【０３８８】
一実施形態では、非カチオン性脂質はコレステロールまたはその誘導体を含む。
【０３８９】
一実施形態では、コレステロールまたはその誘導体は、粒子中に存在する総脂質の約３１．５ｍｏｌ％～約４２．５ｍｏｌ％を構成する。
【０３９０】
一実施形態では、非カチオン性脂質はリン脂質を含む。
【０３９１】
一実施形態では、非カチオン性脂質はリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含む。

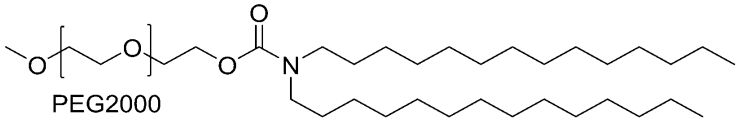
【０３９２】
一実施形態では、リン脂質はジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、またはこれらの混合物を含む。
【０３９３】
一実施形態では、リン脂質は粒子中に存在する総脂質の約４ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％を構成し、コレステロールは粒子中に存在する総脂質の約３０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％を構成する。
【０３９４】
一実施形態では、リン脂質は粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％を構成し、コレステロールは粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％を構成する。
【０３９５】
一実施形態では、複合脂質はポリエチレングリコール（ＰＥＧ）－脂質複合物を含む。
【０３９６】
一実施形態では、ＰＥＧ－脂質複合物は式（Ｉ）：
【化２０】



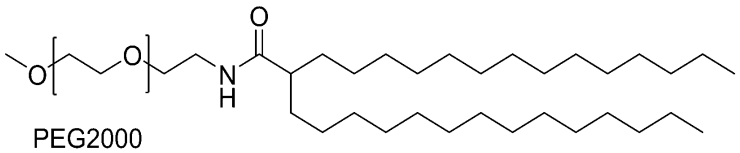
（Ｉ）

の化合物またはその塩を含み、式中、
R^1は、Ｈ、（C_1～C_6）アルキル、または（C_1～C_6）アルカノイルであり；
ｎは約１０～約１５０の範囲の整数であり；
Ｌは存在しない、Ｘは－Ｃ（＝Ｏ）NR^2R^3であるか；または
Ｌは（C_1－C_6）アルキルであり、Ｘは－Ｎ（R^4）Ｃ（＝Ｏ）ＣＨ（R^2）（R^3）、－ＯＣＨ（R^2）（R^3）、－Ｃ（＝Ｏ）OCH_2CH（R^2）（R^3）、－Ｎ（R^4）Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（R^2）（R^3）、および－SO_2N（R^2）（R^3）から成る群から選択され；
R^2は（C_{10}－C_{20}）アルキルであり；
R^3は（C_{10}－C_{20}）アルキルであり；および
R^4はＨまたは（C_1－C_6）アルキルである。
【０３９７】
一実施形態では、ＰＥＧ－脂質複合物は、

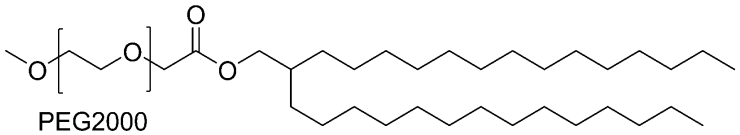
【化２１】



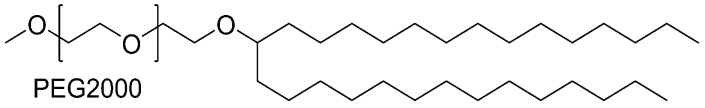
;



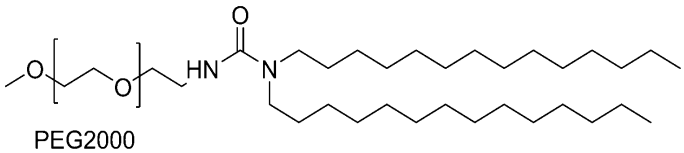
;



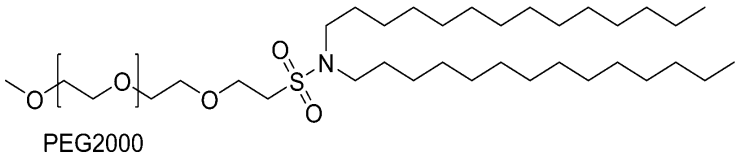
;

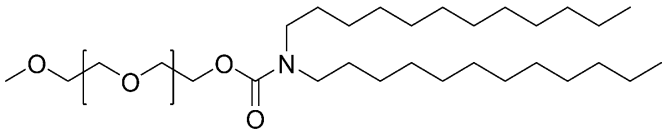


;

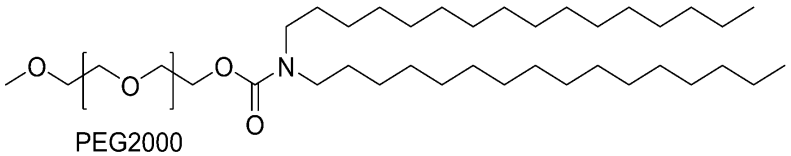


;





；及び



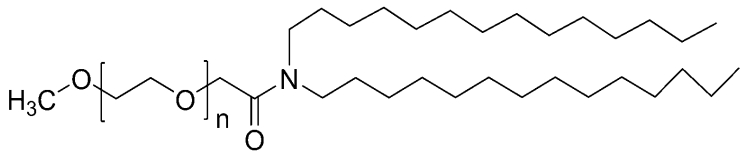
;

から選択される化合物、またはその塩を含む。

【０３９８】

一実施形態では、ＰＥＧ－脂質複合物は以下の式：（Ｉ）：

【化２２】



の化合物を含み、式中、ｎは４５～５０である。

【０３９９】

一実施形態では、ＰＥＧ－脂質複合物は、ＰＥＧ－ジアシルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＡＧ）複合物、ＰＥＧ－ジアルキルオキシプロピル（ＰＥＧ－ＤＡＡ）複合物、またはそれらの混合物を含む。

【０４００】

一実施形態では、ＰＥＧ－ＤＡＡ複合物は、ＰＥＧ－ジミリスチルオキシプロピル（ＰＥＧ－ＤＭＡ）複合物、ＰＥＧ－ジステアリルオキシプロピル（ＰＥＧ－ＤＳＡ）複合物、またはそれらの混合物を含む。

【０４０１】

一実施形態では、ＰＥＧ－ＤＡＡ複合物はＰＥＧ－ジミリスチルオキシプロピル（ＰＥＧ－ＤＭＡ）複合物を含む。

【０４０２】

一実施形態では、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）－脂質複合物は、以下の式の化合物：

Ａ－Ｂ－Ｃ

またはその塩であり、式中、

Ａは、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{8}$）シクロアルキル、（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{8}$）シクロアルキル（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルコキシ、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$）アルケニル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$）アルキニル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルカノイル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルコキシカルボニル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキルチオ、もしくは（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$）アルカノイルオキシであり、ここで、任意の（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{8}$）シクロアルキル、（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{8}$）シクロアルキル（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルコキシ、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$）アルケニル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$）アルキニル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルカノイル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルコキシカルボニル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキルチオ、および（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$）アルカノイルオキシは、１つまたは複数のアニオン前駆体基で置換されており、かつここで、任意の（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{8}$）シクロアルキル、（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{8}$）シクロアルキル（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルコキシ、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$）アルケニル、（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$）アルキニル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルカノイル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルコキシカルボニル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキルチオ、および（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$）アルカノイルオキシは、任意で、ハロ、ヒドロキシル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{3}$）アルコキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルカノイル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{3}$）アルコキシカルボニル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{3}$）アルキルチオ、もしくは（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{3}$）アルカノイルオキシから成る群から独立して選択される１つまたは複数の基で置換されており、

Ｂは、約５５０ダルトン～約１０，０００ダルトンの分子量を有するポリエチレングリコール鎖であり、

Ｃは、－Ｌ－Ｒ^{a}であり、

Ｌは、直接結合、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{b}－、－ＮＲ^{b}－、－Ｃ（Ｏ）－、－ＮＲ^{b}Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＮＲ^{b}Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{b}－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｏ－、－（Ｏ）ＣＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$Ｃ（Ｏ）－、および－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$Ｃ（Ｏ）ＮＨ－から成る群から選択され、

Ｒ^{a}は、分枝状（Ｃ$_{10}$－Ｃ$_{50}$）アルキルもしくは分枝状（Ｃ$_{10}$－Ｃ$_{50}$）アルケニルであり、ここで、前記分枝状（Ｃ$_{10}$－Ｃ$_{50}$）アルキルもしくは分枝状（Ｃ$_{10}$－Ｃ$_{50}$

）アルケニルの１つまたは複数の炭素原子は、－Ｏ－で置換されており、
R^bは、それぞれ独立してＨまたは（C_1～C_6）アルキルである。
【０４０３】
一実施形態では、ＰＥＧは約２，０００ダルトンの平均分子量を有する。
【０４０４】
一実施形態では、複合脂質は粒子中に存在する総脂質の約１ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％を構成する。
【０４０５】
一実施形態では、核酸－脂質粒子における核酸は血清にて粒子を３７℃で３０分間インキュベートした後に実質的に分解されない。
【０４０６】
一実施形態では、核酸は核酸－脂質粒子に完全に封入される。
【０４０７】
一実施形態では、核酸－脂質粒子は約５～約１５の脂質：核酸の質量比を有する。
【０４０８】
一実施形態では、核酸－脂質粒子は約５～約３０の脂質：核酸の質量比を有する。
【０４０９】
一実施形態では、核酸－脂質粒子は約４０ｎｍ～約１５０ｎｍの中位径を有する。
【０４１０】
一実施形態では、化合物または塩は粒子中に存在する総脂質の約５６．５ｍｏｌ％～約６６．５ｍｏｌ％を構成し；非カチオン性脂質は粒子中に存在する総脂質の約３１．５ｍｏｌ％～約４２．５ｍｏｌ％を構成するコレステロールまたはその誘導体を含み；ＰＥＧ－脂質複合物は粒子中に存在する総脂質の約１ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％を構成する。
【０４１１】
一実施形態では、核酸－脂質粒子は約６１．５ｍｏｌ％の化合物または塩と、約３６．９％のコレステロールまたはその誘導体と、約１．５ｍｏｌ％のＰＥＧ－脂質複合物とを含む。
【０４１２】
一実施形態では、化合物または塩は粒子中に存在する総脂質の約５２ｍｏｌ％～約６２ｍｏｌ％を構成し；非カチオン性脂質は粒子中に存在する総脂質の約３６ｍｏｌ％～約４７ｍｏｌ％を構成するリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含み；ＰＥＧ－脂質複合物は粒子中に存在する総脂質の約１ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％を構成する。
【０４１３】
一実施形態では、核酸－脂質粒子は約５７．１ｍｏｌ％の化合物または塩と、約７．１ｍｏｌ％のリン脂質と、約３４．３ｍｏｌ％のコレステロールまたはその誘導体と、約１．４ｍｏｌ％のＰＥＧ－脂質複合物とを含む。
【０４１４】
一実施形態では、核酸－脂質粒子は約５７．１ｍｏｌ％の化合物または塩と、約２０ｍｏｌ％のリン脂質と、約２０ｍｏｌ％のコレステロールまたはその誘導体と、約１．４ｍｏｌ％のＰＥＧ－脂質複合物とを含む。
【０４１５】
一実施形態では、化合物または塩は粒子中に存在する総脂質の５０ｍｏｌ％～６５ｍｏｌ％を構成し；非カチオン性脂質はリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含み、リン脂質は粒子中に存在する総脂質の４ｍｏｌ％～１０ｍｏｌ％を構成し、コレステロールまたはその誘導体は粒子中に存在する総脂質の３０ｍｏｌ％～４０ｍｏｌ％を構成し；複合脂質は粒子中に存在する総脂質の０．５ｍｏｌ％～２ｍｏｌ％を構成する。
【０４１６】
一実施形態では、化合物または塩は粒子中に存在する総脂質の５０ｍｏｌ％～６５ｍｏｌ％を構成し；非カチオン性脂質はリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合

物を含み、リン脂質は粒子中に存在する総脂質の３ｍｏｌ％～１５ｍｏｌ％を構成し、コレステロールまたはその誘導体は粒子中に存在する総脂質の３０ｍｏｌ％～４０ｍｏｌ％を構成し；複合脂質は粒子中に存在する総脂質の０．５ｍｏｌ％～２ｍｏｌ％を構成する。

【０４１７】

一実施形態では、化合物または塩は粒子中に存在する総脂質の５０ｍｏｌ％～６５ｍｏｌ％を構成し；非カチオン性脂質は粒子中に存在する総脂質の最大４９．５ｍｏｌ％を構成し；コレステロールまたはその誘導体は粒子中に存在する総脂質の３０ｍｏｌ％～４０ｍｏｌ％を構成し；複合脂質は粒子中に存在する総脂質の０．５ｍｏｌ％～２ｍｏｌ％を構成する。

【０４１８】

一実施形態では、化合物または塩は粒子中に存在する総脂質の５０ｍｏｌ％～８５ｍｏｌ％を構成し；非カチオン性脂質は粒子中に存在する総脂質の１３ｍｏｌ％～４９．５ｍｏｌ％を構成し；複合脂質は粒子中に存在する総脂質の０．５ｍｏｌ％～２ｍｏｌ％を構成する。

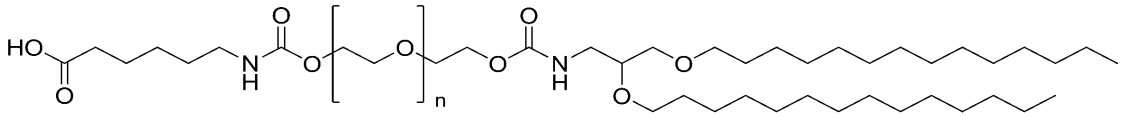
【０４１９】

一実施形態では、化合物または塩は粒子中に存在する総脂質の約３０ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％を構成し；非カチオン性脂質は粒子中に存在する総脂質の約４７ｍｏｌ％～約６９ｍｏｌ％を構成するリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含み；複合脂質は粒子中に存在する総脂質の約１ｍｏｌ％～約３ｍｏｌ％を構成する。

【０４２０】

一実施形態では、非カチオン性脂質はコレステロールとＤＳＰＣとの混合物を含み、複合脂質は、

【化２３】



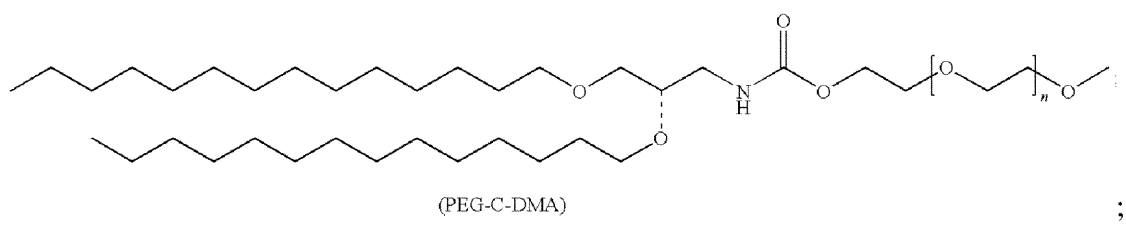
；

であり、式中、ｎは、得られるポリマー鎖が約２０００ダルトンの分子量を有するように選択され、複合脂質は粒子中に存在する総脂質の約２ｍｏｌ％を構成し；ＤＳＰＣは粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％を構成し；コレステロールは粒子中に存在する総脂質の約４８ｍｏｌ％を構成し；化合物または塩は粒子中に存在する総脂質の約４０ｍｏｌ％を構成する。

【０４２１】

一実施形態では、非カチオン性脂質はコレステロールとＤＳＰＣとの混合物を含み；複合脂質は、

【化２４】



(PEG-C-DMA)

；

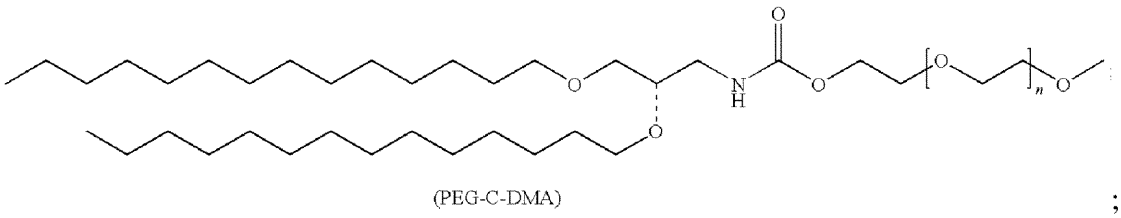
であり、式中、ｎは得られるポリマー鎖が約２０００ダルトンの分子量を有するように選択され、複合脂質は粒子中に存在する総脂質の約２ｍｏｌ％を構成し；ＤＳＰＣは粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％を構成し；コレステロールは粒子中に存在する総脂質

の約４８ｍｏｌ％を構成し；化合物または塩は粒子中に存在する総脂質の約４０ｍｏｌ％を構成する。

【０４２２】

一実施形態では、非カチオン性脂質はコレステロールとＤＳＰＣとの混合物を含み、複合脂質は、

【化２５】



(PEG-C-DMA)

；

であり、式中、ｎは得られるポリマー鎖が約２０００ダルトンの分子量を有するように選択され；複合脂質は粒子中に存在する総脂質の約１．６ｍｏｌ％を構成し；ＤＳＰＣは粒子中に存在する総脂質の約１０．９ｍｏｌ％を構成し；コレステロールは粒子中に存在する総脂質の約３２．８ｍｏｌ％を構成し；化合物または塩は粒子中に存在する総脂質の約５４．９ｍｏｌ％を構成する。

【０４２３】

一実施形態では、脂質の核酸に対する比は約２４である。

【０４２４】

一実施形態では、核酸－脂質粒子は、式（Ｉ）の２以上の異なる化合物またはその塩を含む。

【０４２５】

非カチオン性脂質

本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）に使用される非カチオン性脂質は、安定複合体を生成することができる任意の様々な中性非荷電性、双性イオン性、またはアニオン性脂質であり得る。

【０４２６】

非カチオン性脂質の非限定的な例としては、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン（ＥＳＭ）、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、ジセチルホスファート、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、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）、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）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、パルミトイルオレイオル－ホスファチジルグリセロール（ＰＯＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシラート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、ジパルミトイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジミリストイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、モノメチル－ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル－ホスファチジルエタノールアミン、ジエライドイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＥＰＥ）、ステアロイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、リゾホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルコリン、およびそれらの混合物等の、リン脂質が含まれる。他のジアシルホスファチジルコリンおよびジアシルホスファチジルエタノールアミンリン脂質も使用することができる。これらの脂質中のアシル基は、好ましくは、Ｃ$_{10}$－

Ｃ２４炭素鎖を有する脂肪酸由来のアシル基、例えば、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、またはオレオイルである。

【０４２７】

非カチオン性脂質のさらなる例には、コレステロール等のステロール、およびその誘導体、例えば、コレスタノール、コレスタノン、コレステノン、コプロスタノール、コレステリル－２’－ヒドロキシエチルエーテル、コレステリル－４’－ヒドロキシブチルエーテル、ならびにこれらの混合物が含まれる。

【０４２８】

いくつかの実施形態では、脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）中に存在する非カチオン性脂質は、コレステロールまたはその誘導体、例えば、リン脂質不含の脂質粒子製剤を含むか、またはそれから成る。他の実施形態では、脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）中に存在する非カチオン性脂質は、１つまたは複数のリン脂質、例えば、コレステロール不含の脂質粒子製剤を含むか、またはそれから成る。さらなる実施形態では、脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）中に存在する非カチオン性脂質は、１つまたは複数のリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含む、またはそれから成る。

【０４２９】

本発明での使用に好適な非カチオン性脂質の他の例には、例えば、リノレイルアルコール、パルミチン酸アセチル、グリセロールリシノレート、ステアリン酸ヘキサデシル、ミリスチン酸イソプロピル、両性アクリル酸ポリマー、トリエタノールアミン－ラウリル硫酸、硫酸アルキル－アリールポリエチロキシ化脂肪酸アミド、セラミド、スフィンゴミエリン等のようなリン不含の脂質が挙げられる。

【０４３０】

いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約１３ｍｏｌ％～約４９．５ｍｏｌ％、約２０ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約２５ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約３５ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約２０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、約２５ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、または約３０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％を構成する。

【０４３１】

特定の実施形態では、リン脂質不含脂質粒子中に存在するコレステロールは、粒子中に存在する総脂質の約３０ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、約３５ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％、または約３５ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％を構成する。非限定的な例として、リン脂質不含脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の約３７ｍｏｌ％のコレステロールを含んでもよい。

【０４３２】

特定の他の実施形態では、リン脂質とコレステロールとの混合物を含有する脂質粒子中に存在するコレステロールは、粒子中に存在する総脂質の約３０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％～約３５ｍｏｌ％、または約３５ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％を構成する。非限定的な例として、リン脂質とコレステロールとの混合物を含む脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の約３４ｍｏｌ％でコレステロールを含んでもよい。他の非限定的な例として、粒子はコレステロールを３３％または３８．５％で含んでもよい。

【０４３３】

さらなる実施形態では、リン脂質とコレステロールとの混合物を含有する脂質粒子中に存在するコレステロールは、粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％、約１５ｍｏｌ％～約２５ｍｏｌ％、または約１７ｍｏｌ％～約２３ｍｏｌ％を構成する。非限定的な例として、リン脂質とコレステロールとの混合物を含む脂質粒子は粒子中に存在する総脂質の約２０ｍｏｌ％でコレステロールを含んでもよい。

【０４３４】

脂質粒子がリン脂質とコレステロールまたはコレステロール誘導体との混合物を含有する実施形態では、その混合物は粒子中に存在する総脂質の最大約４０、４５、５０、５５、または６０ｍｏｌ％を構成してもよい。特定の場合では、混合物におけるリン脂質成分

は、粒子中に存在する総脂質の約２ｍｏｌ％～約２０ｍｏｌ％、約２ｍｏｌ％～約１５ｍｏｌ％、約２ｍｏｌ％～約１２ｍｏｌ％、約２ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％、約２ｍｏｌ％～約９ｍｏｌ％、約２ｍｏｌ％～約８ｍｏｌ％、４ｍｏｌ％～約２０ｍｏｌ％、約４ｍｏｌ％～約１５ｍｏｌ％、約４ｍｏｌ％～約１２ｍｏｌ％、約４ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％、約４ｍｏｌ％～約９ｍｏｌ％、約４ｍｏｌ％～約８ｍｏｌ％、約６ｍｏｌ％～約２０ｍｏｌ％、約６ｍｏｌ％～約１５ｍｏｌ％、約６ｍｏｌ％～約１２ｍｏｌ％、約６ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％、約６ｍｏｌ％～約９ｍｏｌ％、約２ｍｏｌ％～約８ｍｏｌ％、８ｍｏｌ％～約２０ｍｏｌ％、約８ｍｏｌ％～約１５ｍｏｌ％、約８ｍｏｌ％～約１２ｍｏｌ％、約８ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％、約８ｍｏｌ％～約９ｍｏｌ％を構成してもよい。非限定的な例として、リン脂質とコレステロールとの混合物を含む脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の約７ｍｏｌ％でＤＰＰＣまたはＤＳＰＣのようなリン脂質を（例えば、約３４ｍｏｌ％のコレステロールとの混合物にて）含んでもよい。特定の他の場合では、混合物におけるリン脂質成分は、粒子中に存在する総脂質の約１０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％、約１０ｍｏｌ％～約１５ｍｏｌ％、約１５ｍｏｌ％～約２０ｍｏｌ％、約１５ｍｏｌ％～約２５ｍｏｌ％、または約１７ｍｏｌ％～約２３ｍｏｌ％を構成してもよい。別の非限定的な例として、リン脂質とコレステロールとの混合物を含む脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の約２０ｍｏｌ％でＤＰＰＣまたはＤＳＰＣのようなリン脂質を（例えば、約２０ｍｏｌ％のコレステロールとの混合物にて）含んでもよい。

【０４３５】

脂質複合物

カチオン性脂質および非カチオン性脂質に加えて、本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）は脂質複合物を含む。複合脂質は、粒子の凝集を防ぐという点で有用である。好適な複合脂質には、ＰＥＧ－脂質複合物、ＡＴＴＡ－脂質複合物、カチオン性ポリマー－脂質複合物（ＣＰＬ）、ＰＯＺポリオキサゾリン（ＰＯＺ）－脂質、ポリサルコシン（ｐＳＡＲ）－脂質、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、粒子はＣＰＬと共にＰＥＧ－脂質複合物またはＡＴＴＡ－脂質複合物のいずれかを含む。

【０４３６】

好ましい実施形態では、脂質複合物はＰＥＧ－脂質である。ＰＥＧ－脂質の例には、例えばＰＣＴ公開第０５／０２６３７２号に記載されているジアルキルオキシプロピルにカップリングしたＰＥＧ（ＰＥＧ－ＤＡＡ）、例えば米国特許出願公開第２００３００７７８２９号および同第２００５００８６８９号に記載されているジアシルグリセロールにカップリングしたＰＥＧ（ＰＥＧ－ＤＡＧ）、ホスファチジルエタノールアミンなどのリン脂質にカップリングしたＰＥＧ（ＰＥＧ－ＰＥ）、例えば米国特許第５，８８５，６１３号に記載されているセラミドに複合物したＰＥＧ、コレステロールまたはその誘導体に複合物したＰＥＧ、ならびにこれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。これらの特許文書の開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。さらなるＰＥＧ－脂質には限定しないで、ＰＥＧ－Ｃ－ＤＯＭＧ、２ＫＰＥＧ－ＤＭＧ、およびこれらの混合物が挙げられる。

【０４３７】

ＰＥＧは、エチレングリコール繰り返し単位の直鎖状水溶性ポリマーである。ＰＥＧは、その分子量によって分類され、例えば、ＰＥＧ２０００は約２，０００ダルトンの平均分子量を有し、ＰＥＧ５０００は約５，０００ダルトンの平均分子量を有する。ＰＥＧはＳｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．および他の会社から市販されており、例えば以下のもの、すなわち、モノメトキシポリエチレングリコール（ＭｅＰＥＧ－ＯＨ）、モノメトキシポリエチレングリコール－スクシネート（ＭｅＰＥＧ－Ｓ）、モノメトキシポリエチレングリコール－スクシンイミジルスクシネート（ＭｅＰＥＧ－Ｓ－ＮＨＳ）、モノメトキシポリエチレングリコール－アミン（ＭｅＰＥＧ－NH_2）、モノメトキシポリエチレングリコール－トレシレート（ｔｒｅｓｙｌａｔｅ）（ＭｅＰＥＧ－ＴＲＥＳ）、およびモノメトキシポリエチレングリコール－イミダゾリル－カルボニル（ＭｅＰＥＧ－ＩＭ

）を含む。米国特許第６，７７４，１８０号および同第７，０５３，１５０号に記載されているもの等の他のＰＥＧ（例えば、ｍＰＥＧ（２０ＫＤａ）アミン）もまた、本発明のＰＥＧ－脂質複合物の調製に有用である。これらの特許の開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。さらに、モノメトキシポリエチレングリコール酢酸（ＭｅＰＥＧ－ＣＨ$_2$ＣＯＯＨ）は、例えば、ＰＥＧ－ＤＡＡ複合物を含むＰＥＧ－脂質複合物の調製に特に有用である。

【０４３８】

本明細書に記載されているＰＥＧ－脂質複合物のＰＥＧ部分は、約５５０ダルトン～約１０，０００ダルトンの範囲の平均分子量を構成し得る。特定の場合では、ＰＥＧ部分は、約７５０ダルトン～約５，０００ダルトン（例えば、約１，０００ダルトン～約５，０００ダルトン、約１，５００ダルトン～約３，０００ダルトン、約７５０ダルトン～約３，０００ダルトン、約７５０ダルトン～約２，０００ダルトンなど）の平均分子量を有する。好ましい実施形態では、ＰＥＧ部分は、約２，０００ダルトンまたは約７５０ダルトンの平均分子量を有する。

【０４３９】

特定の場合では、ＰＥＧは、アルキル基、アルコキシ基、アシル基、またはアリール基によって任意に置換されていてもよい。ＰＥＧは、脂質に直接複合物することができ、またリンカー部分により脂質に連結される場合もある。例えば、エステル不含のリンカー部分およびエステル含有リンカー部分を含む、ＰＥＧを脂質にカップリングするのに適した任意のリンカー部分を使用することができる。好ましい実施形態では、リンカー部分は、エステル不含のリンカー部分である。本明細書で使用されるとき、「エステル不含のリンカー部分」という用語は、カルボン酸エステル結合（－ＯＣ（Ｏ）－）を含有しないリンカー部分を指す。好適なエステル不含のリンカー部分には、アミド（－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、アミノ（－ＮＲ－）、カルボニル（－Ｃ（Ｏ）－）、カルバミン酸（－ＮＨＣ（Ｏ）Ｏ－）、尿素（－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨ－）、ジスルフィド（－Ｓ－Ｓ－）、エーテル（－Ｏ－）、スクシニル（－（Ｏ）ＣＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ（Ｏ）－）、スクシンアミジル（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、エーテル、ジスルフィド、およびこれらの組み合わせ（例えば、カルバミン酸リンカー部分とアミドリンカー部分の両方を含有するリンカー）が含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、カルバミン酸リンカーは、ＰＥＧを脂質にカップリングするために使用される。

【０４４０】

他の実施形態では、エステル含有リンカー部分は、ＰＥＧを脂質にカップリングするために使用される。好適なエステル含有リンカー部分には、例えば、炭酸（－ＯＣ（Ｏ）Ｏ－）、スクシノイル、リン酸エステル（－Ｏ－（Ｏ）ＰＯＨ－Ｏ－）、スルホン酸エステル、およびこれらの組み合わせが含まれる。

【０４４１】

本発明での使用に好適なさらなるＰＥＧ－脂質複合物には、限定するわけではないが、以下の式の化合物

Ａ－Ｂ－Ｃ

またはその塩が含まれ、式中、

Ａは、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシ、（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）アルケニル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）アルキニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシカルボニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキルチオ、もしくは（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）アルカノイルオキシであり、ここで、任意の（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシ、（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）アルケニル、（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）アルキニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルカノイル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルコキシカルボニル、（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキルチオ、および（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）アルカノイルオキシは、１つまたは複数のアニオン前駆体基で置換されており、かつここで、任意の（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）アルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シクロアルキル、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$）シク

ロアルキル（Ｃ１－Ｃ６）アルキル、（Ｃ１－Ｃ６）アルコキシ、（Ｃ２－Ｃ６）アルケニル、（Ｃ２－Ｃ６）アルキニル、（Ｃ１－Ｃ６）アルカノイル、（Ｃ１－Ｃ６）アルコキシカルボニル、（Ｃ１－Ｃ６）アルキルチオ、および（Ｃ２－Ｃ６）アルカノイルオキシは、任意で、ハロ、ヒドロキシル、（Ｃ１－Ｃ３）アルコキシ、（Ｃ１－Ｃ６）アルカノイル、（Ｃ１－Ｃ３）アルコキシカルボニル、（Ｃ１－Ｃ３）アルキルチオ、もしくは（Ｃ２－Ｃ３）アルカノイルオキシから成る群から独立して選択される１つまたは複数の基で置換されており、
Ｂは、約５５０ダルトン～約１０，０００ダルトンの分子量を有するポリエチレングリコール鎖であり；
Ｃは－Ｌ－Ｒａであり；
Ｌは、直接結合、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）ＮＲｂ－、－ＮＲｂ－、－Ｃ（Ｏ）－、－ＮＲｂＣ（Ｏ）Ｏ－、－ＮＲｂＣ（Ｏ）ＮＲｂ－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｏ－、－（Ｏ）ＣＣＨ２ＣＨ２Ｃ（Ｏ）－、および－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ２ＣＨ２Ｃ（Ｏ）ＮＨ－から成る群から選択され、
Ｒａは、分枝状（Ｃ１０－Ｃ５０）アルキルもしくは分枝状（Ｃ１０－Ｃ５０）アルケニルであり、ここで、前記分枝状（Ｃ１０－Ｃ５０）アルキルもしくは分枝状（Ｃ１０－Ｃ５０）アルケニルの１つまたは複数の炭素原子は、－Ｏ－で置換されており、
Ｒｂはそれぞれ独立して、Ｈまたは（Ｃ１－Ｃ６）アルキルである。

【０４４２】

複合脂質は、例えば、式Ａ－ＰＥＧ－ジアシルグリセロール（ＤＡＧ）、Ａ－ＰＥＧジアルキルオキシプロピル（ＤＡＡ）、Ａ－ＰＥＧ－リン脂質、Ａ－ＰＥＧ－セラミド（Ｃｅｒ）の化合物またはこれらの混合物を含むＰＥＧ－脂質を含み得、式中、Ａは、（Ｃ１－Ｃ６）アルキル、（Ｃ３－Ｃ８）シクロアルキル、（Ｃ３－Ｃ８）シクロアルキル（Ｃ１－Ｃ６）アルキル、（Ｃ１－Ｃ６）アルコキシ、（Ｃ２－Ｃ６）アルケニル、（Ｃ２－Ｃ６）アルキニル、（Ｃ１－Ｃ６）アルカノイル、（Ｃ１－Ｃ６）アルコキシカルボニル、（Ｃ１－Ｃ６）アルキルチオ、または（Ｃ２－Ｃ６）アルカノイルオキシであり、ここで、任意の（Ｃ１－Ｃ６）アルキル、（Ｃ３－Ｃ８）シクロアルキル、（Ｃ３－Ｃ８）シクロアルキル（Ｃ１－Ｃ６）アルキル、（Ｃ１－Ｃ６）アルコキシ、（Ｃ２－Ｃ６）アルケニル、（Ｃ２－Ｃ６）アルキニル、（Ｃ１－Ｃ６）アルカノイル、（Ｃ１－Ｃ６）アルコキシカルボニル、（Ｃ１－Ｃ６）アルキルチオ、および（Ｃ２－Ｃ６）アルカノイルオキシは、１つまたは複数のアニオン前駆体基で置換されており、かつここで、任意の（Ｃ１－Ｃ６）アルキル、（Ｃ３－Ｃ８）シクロアルキル、（Ｃ３－Ｃ８）シクロアルキル（Ｃ１－Ｃ６）アルキル、（Ｃ１－Ｃ６）アルコキシ、（Ｃ２－Ｃ６）アルケニル、（Ｃ２－Ｃ６）アルキニル、（Ｃ１－Ｃ６）アルカノイル、（Ｃ１－Ｃ６）アルコキシカルボニル、（Ｃ１－Ｃ６）アルキルチオ、および（Ｃ２－Ｃ６）アルカノイルオキシは、任意で、ハロ、ヒドロキシル、（Ｃ１－Ｃ３）アルコキシ、（Ｃ１－Ｃ６）アルカノイル、（Ｃ１－Ｃ３）アルコキシカルボニル、（Ｃ１－Ｃ３）アルキルチオ、または（Ｃ２－Ｃ３）アルカノイルオキシから成る群から独立して選択される１つまたは複数の基で置換されている。Ａ－ＰＥＧ－ＤＡＡ複合物は、Ａ－ＰＥＧ－ジラウリルオキシプロピル（Ｃ１２）、Ａ－ＰＥＧ－ジミリスチルオキシプロピル（Ｃ１４）、Ａ－ＰＥＧ－ジパルミチルオキシプロピル（Ｃ１６）、もしくはＡ－ＰＥＧ－ジステアリルオキシプロピル（Ｃ１８）、またはこれらの混合物であり得る。

【０４４３】

様々な鎖長および飽和度の種々のアシル鎖基を有するホスファチジルエタノールアミンをＰＥＧに複合物して、脂質複合物を形成することができる。そのようなホスファチジルエタノールアミンは、市販されているか、または、当業者に公知の従来技術を使用して単離もしくは合成することができる。Ｃ１０－Ｃ２０の範囲の炭素鎖長を有する飽和または不飽和脂肪酸を含有するホスファチジルエタノールアミンが好ましい。モノまたはジ不飽和脂肪酸、および飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸との混合物を有するホスファチジルエタノールアミンもまた、使用することができる。好適なホスファチジルエタノールアミンには、

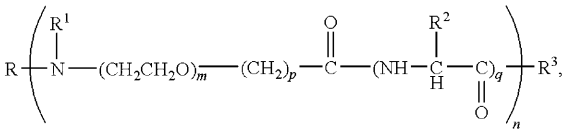
ジミリストイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジパルミトイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、およびジステアロイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）が含まれるが、これらに限定されない。

【０４４４】

「ＡＴＴＲ」または「ポリアミド」という用語は、非限定的に、米国特許第６，３２０，０１７号および同第６，５８６，５５９号（これらの開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている化合物を指す。これらの化合物には、式

【化２６】

(IV)



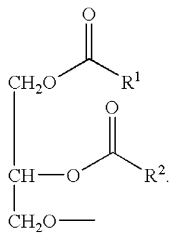
を有する化合物が含まれ、式中、Ｒは、水素、アルキルおよびアシルから成る群から選択されるメンバーであり、R^1は、水素およびアルキルから成る群から選択されるメンバーであるか、または任意で、ＲおよびＲ^{1}ならびにそれらが結合する窒素はアジド部分を形成し、R^2は、水素、任意で置換されたアルキル、任意で置換されたアリール、およびアミノ酸側鎖から選択される群のメンバーであり、R^3は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、メルカプト、ヒドラジノ、アミノならびにＮ$R^4$$R^5$から成る群から選択されるメンバーであり、ここで、$R^4$および$R^5$は独立して水素またはアルキルであり、ｎは、４～８０であり、ｍは、２～６であり、ｐは、１～４であり、ｑは、０または１である。当業者には、他のポリアミドを本発明の化合物に使用することができることが明らかであろう。

【０４４５】

「ジアシルグリセロール」という用語は、２本の脂肪アシル鎖であるR^1およびR^2を有する化合物を指し、これらは両方とも独立して、エステル結合によりグリセロールの１位および２位に結合している２～３０個の炭素を有する。アシル基は、飽和していてもよく、または様々な不飽和度を有していてもよい。好適なアシル基には、ラウリル（Ｃ$_{12}$）、ミリスチル（Ｃ$_{14}$）、パルミチル（Ｃ$_{16}$）、ステアリル（Ｃ$_{18}$）、およびイコシル（Ｃ$_{20}$）が含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、R^1およびR^2は同じであり、すなわち、R^1およびR^2はいずれもミリスチル（すなわちジミリスチル）である、R^1およびR^2はいずれもステアリル（すなわちジステアリル）である、などである。ジアシルグリセロールは、以下の一般式：

【化２７】

(V)



を有する。

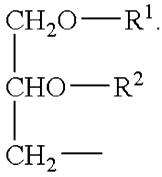
【０４４６】

「ジアルキルオキシプロピル」という用語は、２本のアルキル鎖であるR^1およびR^2

を有する化合物を指し、これらは両方とも独立して、２～３０個の炭素を有する。アルキル基は、飽和していてもよく、または様々な不飽和度を有していてもよい。ジアルキルオキシプロピルは、以下の一般式：

【化２８】

(VI)



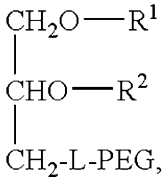
を有する。

【０４４７】

好ましい実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、以下の式：

【化２９】

(VII)



を有するＰＥＧ－ＤＡＡ複合物であり、式中、Ｒ^{1}およびＲ^{2}は独立して選択され、約１０～約２２の炭素原子を有する長鎖アルキル基であり、ＰＥＧはポリエチレングリコールであり、Ｌは上述のエステル不含のリンカー部分またはエステル含有リンカー部分である。長鎖アルキル基は、飽和または不飽和であり得る。好適なアルキル基には、ラウリル（Ｃ$_{12}$）、ミリスチル（Ｃ$_{14}$）、パルミチル（Ｃ$_{16}$）、ステアリル（Ｃ$_{18}$）、およびイコシル（Ｃ$_{20}$）が含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、Ｒ^{1}およびＲ^{2}は同じであり、すなわち、Ｒ^{1}およびＲ^{2}はいずれもミリスチル（すなわちジミリスチル）である、Ｒ^{1}およびＲ^{2}はいずれもステアリル（すなわちジステアリル）である、などである。

【０４４８】

上記式ＶＩＩにおいて、ＰＥＧは、約５５０ダルトン～約１０，０００ダルトンの範囲の平均分子量を有する。特定の場合では、ＰＥＧは、約５００ダルトン～約５，０００ダルトン（例えば、約１，０００ダルトン～約５，０００ダルトン、約１，５００ダルトン～約３，０００ダルトン、約７５０ダルトン～約３，０００ダルトン、約７５０ダルトン～約２，０００ダルトンなど）の平均分子量を有する。好ましい実施形態では、ＰＥＧは、約２，０００ダルトンまたは約７５０ダルトンの平均分子量を有する。ＰＥＧは、任意的にアルキル、アルコキシ、アシル、またはアリールで置換されていてもよい。特定の実施形態では、末端ヒドロキシル基は、メトキシ基またはメチル基で置換されている。

【０４４９】

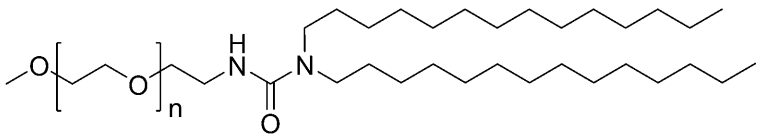
好ましい実施形態では、「Ｌ」は、エステル不含のリンカー部分である。好適なエステル不含のリンカーには、アミドリンカー部分、アミノリンカー部分、カルボニルリンカー部分、カルバミン酸リンカー部分、尿素リンカー部分、エーテルリンカー部分、ジスルフィドリンカー部分、スクシンアミジルリンカー部分、およびこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、エステル不含のリンカー部分は、カルバミン酸リンカー部分である（すなわち、ＰＥＧ－Ｃ－ＤＡＡ複合物）。別の好ましい実施形態では、エステル不含のリンカー部分は、アミドリンカー部分である（すなわち

、ＰＥＧ－Ａ－ＤＡＡ複合物）。さらに別の好ましい実施形態では、エステル不含のリンカー部分は、スクシンアミジルリンカー部分である（すなわち、ＰＥＧ－Ｓ－ＤＡＡ複合物）。

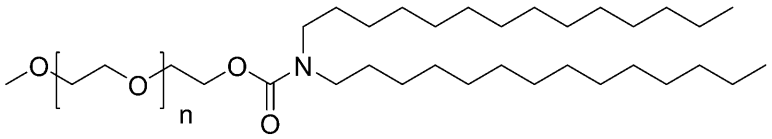
【０４５０】

特定の実施形態では、ＰＥＧ－脂質複合物は、以下から選択される：

【化３０】



メトキシＰＥＧ１，１－ジテトラデシルウレア



メトキシＰＥＧジテトラデシルカルバミン酸

【０４５１】

一実施形態では、ｎは、約２０００の分子量を有するポリマー鎖が得られるよう選択される。

【０４５２】

ＰＥＧ－ＤＡＡ複合物は、当業者に公知の標準的な技術および試薬を使用して合成される。ＰＥＧ－ＤＡＡ複合物は、様々なアミド結合、アミン結合、エーテル結合、チオ結合、カルバマート結合、および尿素結合を含有することが認識されるであろう。当業者は、これらの結合を形成するための方法および試薬が周知であり、容易に入手可能であることを認識するであろう。例えば、Ｍａｒｃｈ，ＡＤＶＡＮＣＥＤ ＯＲＧＡＮＩＣ ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ（Ｗｉｌｅｙ １９９２）、Ｌａｒｏｃｋ，ＣＯＭＰＲＥＨＥＮＳＩＶＥ ＯＲＧＡＮＩＣ ＴＲＡＮＳＦＯＲＭＡＴＩＯＮＳ（ＶＣＨ １９８９）、およびＦｕｒｎｉｓｓ，ＶＯＧＥＬ’Ｓ ＴＥＸＴＢＯＯＫ ＯＦ ＰＲＡＣＴＩＣＡＬ ＯＲＧＡＮＩＣ ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ，５ｔｈ ｅｄ．（Ｌｏｎｇｍａｎ １９８９）を参照のこと。存在する任意の官能基は、ＰＥＧ－ＤＡＡ複合物の合成における様々な時点で保護および脱保護を必要とし得ることも理解されよう。当業者は、そのような技術が周知であることを認識するであろう。例えば、Ｇｒｅｅｎ ａｎｄ Ｗｕｔｓ，ＰＲＯＴＥＣＴＩＶＥ ＧＲＯＵＰＳ ＩＮ ＯＲＧＡＮＩＣ ＳＹＮＴＨＥＳＩＳ（Ｗｉｌｅｙ １９９１）を参照のこと。

【０４５３】

好ましくは、ＰＥＧ－ＤＡＡ複合物は、ジラウリルオキシプロピル（C_{12}）－ＰＥＧ複合物、ジミリスチルオキシプロピル（C_{14}）－ＰＥＧ複合物、ジパルミチルオキシプロピル（C_{16}）－ＰＥＧ複合物、またはジステアリルオキシプロピル（C_{18}）－ＰＥＧ複合物である。当業者は、他のジアルキルオキシプロピルを本発明のＰＥＧ－ＤＡＡ複合物に使用できることを容易に理解するであろう。

【０４５４】

上述に加えて、ＰＥＧの代わりに他の親水性ポリマーを使用できることが、当業者には容易に明らかになるであろう。ＰＥＧの代わりに使用することのできる好適なポリマーの

例には、ポリビニルピロリドン、ポリメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミドおよびポリジメチルアクリルアミド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、およびヒドロキシメチルセルロースまたはヒドロキシエチルセルロース等の誘導体化セルロースが含まれるが、これらに限定されない。

【０４５５】

ポリカチオン性部分の電荷は、粒子部分全体にわたり分布し得るか、またはその代わりに、粒子部分のある特定の領域における異なる濃度の電荷密度、例えば、電荷スパイクであり得るかのいずれかである。電荷密度が粒子上に分布している場合、電荷密度は、均一に分布し得るかまたは不均一に分布し得る。ポリカチオン性部分の電荷分布のすべての変形が、本発明に包含される。

【０４５６】

特定の場合では、ポリカチオン性部分には、標的化リガンドまたはカルシウムを錯化するためのキレート化部分のようなリガンドを結合させることができる。好ましくは、リガンドが結合した後、カチオン性部分は正電荷を維持する。特定の場合では、結合されたリガンドは正電荷を有する。好適なリガンドには、反応性官能基を有する化合物またはデバイスが含まれるが、これらに限定されず、脂質、両親媒性脂質、担体化合物、生体親和性化合物、生体材料、バイオポリマー、生物医学用デバイス、分析で検出可能な化合物、治療上活性がある化合物、酵素、ペプチド、タンパク質、抗体、免疫刺激剤、放射性標識、蛍光発生物質、ビオチン、薬物、ハプテン、ＤＮＡ、ＲＮＡ、多糖類、リポソーム、ビロソーム、ミセル、免疫グロブリン、官能基、他の標的化部分、または毒素が含まれる。

【０４５７】

脂質複合物（例えば、ＰＥＧ－脂質）は通常、粒子中に存在する総脂質の約０．１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％、約０．５ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％、約１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％、約２ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％、約２ｍｏｌ％～約８ｍｏｌ％、約２ｍｏｌ％～約５ｍｏｌ％、約２ｍｏｌ％～約４ｍｏｌ％、約０．６ｍｏｌ％～約１．９ｍｏｌ％、約０．７ｍｏｌ％～約１．８ｍｏｌ％、約０．８ｍｏｌ％～約１．７ｍｏｌ％、約０．９ｍｏｌ％～約１．６ｍｏｌ％、約０．９ｍｏｌ％～約１．８ｍｏｌ％、約１ｍｏｌ％～約１．８ｍｏｌ％、約１ｍｏｌ％～約１．７ｍｏｌ％、約１．２ｍｏｌ％～約１．８ｍｏｌ％、約１．２ｍｏｌ％～約１．７ｍｏｌ％、約１．３ｍｏｌ％～約１．６ｍｏｌ％、または、約１．４ｍｏｌ％～約１．５ｍｏｌ％を構成する。

【０４５８】

当業者は、採用される脂質複合物、および核酸－脂質粒子が膜融合性になる速度に応じて、脂質複合物の濃度を変化させることができることを理解するであろう。

【０４５９】

脂質複合物の組成および濃度を制御することによって、脂質複合物が核酸－脂質粒子の外側と入れ替わる速度、および次に、核酸－脂質粒子が膜融合性となる速度を制御することができる。例えば、ＰＥＧ－ホスファチジルエタノールアミン複合物またはＰＥＧ－セラミド複合物を脂質複合物として使用する場合、核酸－脂質粒子が膜融合性となる速度を、例えば、脂質複合物の濃度を変化させることによって、ＰＥＧの分子量を変化させることによって、またはホスファチジルエタノールアミンもしくはセラミド上のアシル鎖基の鎖長および飽和度を変化させることによって、変化させることができる。さらに、例えば、ｐＨ、温度、イオン強度等を含む他の変数を使用して、核酸－脂質粒子が膜融合性となる速度を変化させるおよび／または制御することができる。核酸－脂質粒子が膜融合性となる速度を制御するために使用することができる他の方法は、本開示を読むことで当業者には明らかとなるであろう。

【０４６０】

脂質粒子の調製

核酸分子のような活性剤または治療剤が脂質二重層中に封入され、分解から保護される本発明の脂質粒子、例えばＬＮＰは、連続混合法または直接希釈プロセスを含むが、これ

らに限定されない、当該技術分野で既知の任意の方法によって形成することができる。

【０４６１】

好ましい実施形態では、非カチオン性脂質は、タマゴスフィンゴミエリン（ＥＳＭ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、ジパルミトイル－ホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、モノメチル－ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル－ホスファチジルエタノールアミン、１４：０　ＰＥ（１，２－ジミリストイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ））、１６：０　ＰＥ（１，２－ジパルミトイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ））、１８：０　ＰＥ（１，２－ジステアロイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ））、１８：１　ＰＥ（１，２－ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ））、１８：１トランスＰＥ（１，２－ジエライドイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＥＰＥ））、１８：０－１８：１　ＰＥ（１－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ））、１６：０－１８：１　ＰＥ（１－パルミトイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ））、ポリエチレングリコール系ポリマー（例えば、ＰＥＧ２０００、ＰＥＧ５０００、ＰＥＧ修飾ジアシルグリセロール、またはＰＥＧ修飾ジアルキルオキシプロピル）、コレステロール、またはそれらの組み合わせである。

【０４６２】

特定の実施形態では、本発明は、連続混合法を介して、例えば、第１のリザーバに干渉ＲＮＡまたはｍＲＮＡのような核酸を含む水溶液を供給することと、第２のリザーバに有機脂質溶液を供給することと、核酸（例えば、干渉ＲＮＡまたはｍＲＮＡ）を封入するリポソームを実質的に瞬時に生成するために有機脂質溶液が水溶液と混ざり合うように水溶液を有機脂質溶液と混合することとを含むプロセスを介して生成されるＬＮＰを提供する。このプロセスおよびこのプロセスを実施するための装置は、米国特許出願公開第２００４０１４２０２５号に詳細に記載されており、その開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【０４６３】

脂質および緩衝溶液を混合チャンバ内等の混合環境に連続的に導入する操作により、緩衝溶液による脂質溶液の連続希釈が生じ、これにより、混合すると実質的に瞬時にリポソームが生成される。本明細書で使用されるとき、「脂質溶液を緩衝溶液で連続的に希釈する」という語句（および変形）は、一般に、脂質溶液が水和プロセスにおいて小胞の生成をもたらすのに十分な力で十分に迅速に希釈されることを意味する。核酸を含む水溶液を有機脂質溶液と混合することによって、有機脂質溶液は、緩衝溶液（すなわち水溶液）の存在下で連続的な段階希釈を受けて、核酸－脂質粒子を生成する。

【０４６４】

連続混合法を使用して形成されたＬＮＰは通常、約４０ｎｍ～約１５０ｎｍ、約４０ｎｍ～約８０ｎｍ、約４０ｎｍ～約６０ｎｍ、約５０ｎｍ～約６０ｎｍ、約５０ｎｍ～約１５０ｎｍ、約６０ｎｍ～約１３０ｎｍ、約７０ｎｍ～約１１０ｎｍ、または約７０ｎｍ～約９０ｎｍのサイズを有する。こうして形成された粒子は凝集せず、均一な粒度を達成するように任意でサイズ調整される。

【０４６５】

別の実施形態では、本発明は、リポソーム溶液を形成すること、および制御された量の希釈緩衝液が入っている収集容器にリポソーム溶液を直ちに直接導入することを含む、直接希釈プロセスにより生成されるＬＮＰを提供する。好ましい態様では、収集容器は、希釈を促進するために収集容器の内容物を撹拌するように構成された１つまたは複数の構成要素を含む。一態様では、収集容器中に存在する希釈緩衝液の量は、その中に導入されるリポソーム溶液の体積に実質的に等しい。非限定的な例として、４５％エタノール中のリポソーム溶液は、等体積の希釈緩衝液が入っている収集容器中に導入される場合、より小さな粒子を有利にもたらすであろう。

【０４６６】
さらに別の実施形態では、本発明は、希釈緩衝液が入っている第３のリザーバを第２の混合領域に流体連結する、直接希釈プロセスにより生成されるＬＮＰを提供する。本実施形態では、第１の混合領域中で形成されたリポソーム溶液が、第２の混合領域中で希釈緩衝液と直ちに直接混合される。好ましい態様では、第２の混合領域は、リポソーム溶液および希釈緩衝液の流れが、１８０°対向する流れとして合流するように配置されたＴ－コネクタを含むが、より浅い角度、例えば約２７°～約１８０°をもたらすコネクタを使用することができる。ポンプ機構は、第２の混合領域に制御可能な緩衝液流を送達する。一態様では、第２の混合領域に供給される希釈緩衝液の流速は、第１の混合領域からそこに導入されるリポソーム溶液の流速と実質的に等しくなるように制御される。別の態様では、第２の混合領域に供給される希釈緩衝液の流速は、第１の混合領域からそこに導入されるリポソーム溶液の流速とは実質的に異なるように制御される。この実施形態は、第２の混合領域にてリポソーム溶液と混ざり合っている希釈緩衝液の流れ、したがってまた、第２の混合プロセス全体にわたる緩衝液中のリポソーム溶液の濃度の、さらなる制御を有利に可能にする。そのような希釈緩衝液の流速の制御により、低減された濃度での小粒子径の形成が有利に可能となる。

【０４６７】
これらのプロセスおよびこれらの直接希釈プロセスを実施するための装置は、米国特許公開第２００７００４２０３１号に詳細に記載されており、その開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【０４６８】
直接希釈プロセスを使用して形成されたＬＮＰは、通常、約４０ｎｍ～約１５０ｎｍ、約４０ｎｍ～約８０ｎｍ、約４０ｎｍ～約６０ｎｍ、約５０ｎｍ～約６０ｎｍ、約５０ｎｍ～約１５０ｎｍ、約６０ｎｍ～約１３０ｎｍ、約７０ｎｍ～約１１０ｎｍ、または約７０ｎｍ～約９０ｎｍのサイズを有する。こうして形成された粒子は凝集せず、均一な粒度を達成するように任意でサイズ調整される。

【０４６９】
必要であれば、本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）を、リポソームをサイジングするために利用可能な任意の方法によりサイジングすることができる。サイジングは、所望のサイズ範囲および比較的狭い粒子径分布が得られるよう実施され得る。

【０４７０】
所望のサイズに粒子をサイジングするためのいくつかの技術が利用可能である。リポソームのために使用され、本発明の粒子に等しく適用可能な１つのサイジング方法は、米国特許第４，７３７，３２３号に記載されており、その開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。槽内超音波処理またはプローブ超音波処理のいずれかにより粒子懸濁液を超音波処理することで、約５０ｎｍ未満のサイズの粒子までサイズを漸減させる。ホモジナイゼーションは、より大きな粒子をより小さな粒子に断片化するための剪断エネルギーに依存する、別の方法である。典型的なホモジナイゼーション手順では、選択された粒子径、通常約６０～約８０ｎｍが観察されるまで、標準的なエマルジョンホモジナイザーを通じて粒子を再循環させる。両方の方法において、従来のレーザー光粒子径識別またはＱＥＬＳにより、粒子径分布をモニタリングすることができる。

【０４７１】
細孔ポリ炭酸膜または非対称セラミック膜を通した粒子の押出しもまた、比較的明確なサイズ分布へと粒子径を低減させるための有効な方法である。通常、所望の粒子径分布が得られるまで、懸濁液を膜を通して１回以上循環させる。粒子は、サイズを段階的に縮小するために、順次、孔のより小さい膜に通過させて押し出され得る。

【０４７２】
いくつかの実施形態では、ＬＮＰ中の核酸は、例えば、米国特許出願第０９／７４４，１０３号（この開示はすべての目的のためにその全体が本明細書に参照によって組み込ま

れる）に記載されているように予め濃縮される。

【０４７３】

他の実施形態では、方法は、本発明の組成物を使用して細胞のリポフェクションを行うために有用な非脂質性ポリカチオンを添加することをさらに含む。好適な非脂質性ポリカチオンの例には、臭化ヘキサジメトリン（ＰＯＬＹＢＲＥＮＥ（登録商標）の商品名でＡｌｄｒｉｃｈＣｈｅｍｉｃａｌＣｏ．，Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ，Ｗｉｓ．，ＵＳＡから販売されている）またはヘキサジメトリンの他の塩が含まれる。他の好適なポリカチオンには、例えば、ポリ－Ｌ－オルニチン、ポリ－Ｌ－アルギニン、ポリ－Ｌ－リジン、ポリ－Ｄ－リジン、ポリアリルアミン、およびポリエチレンイミンの塩が含まれる。これらの塩を添加するのは、好ましくは粒子が形成された後である。

【０４７４】

いくつかの実施形態では、形成されたＬＮＰ中の核酸対脂質比（質量／質量比）は、約０．０１～約０．２、約０．０２～約０．１、約０．０３～約０．１、または約０．０１～約０．０８の範囲である。出発物質の比もまた、この範囲内に入る。他の実施形態では、ＬＮＰ調製物は、総脂質１０ｍｇあたり約４００μｇの核酸を使用するか、または約０．０１～約０．０８の、より好ましくは核酸５０μｇあたり１．２５ｍｇの総脂質に対応する約０．０４の核酸対脂質質量比を使用する。他の好ましい実施形態では、粒子は、約０．０８の核酸：脂質質量比を有する。

【０４７５】

他の実施形態では、形成されたＬＮＰ中の脂質対核酸比（質量／質量比）は、約１（１：１）～約１００（１００：１）、約５（５：１）～約１００（１００：１）、約１（１：１）～約５０（５０：１）、約２（２：１）～約５０（５０：１）、約３（３：１）～約５０（５０：１）、約４（４：１）～約５０（５０：１）、約５（５：１）～約５０（５０：１）、約１（１：１）～約２５（２５：１）、約２（２：１）～約２５（２５：１）、約３（３：１）～約２５（２５：１）、約４（４：１）～約２５（２５：１）、約５（５：１）～約２５（２５：１）、約５（５：１）～約２０（２０：１）、約５（５：１）～約１５（１５：１）、約５（５：１）～約１０（１０：１）、約５（５：１）、６（６：１）、７（７：１）、８（８：１）、９（９：１）、（１０：１）、１１（１１：１）、１２（１２：１）、１３（１３：１）、１４（１４：１）、１５（１５：１）、１６（１６：１）、１７（１７：１）、１８（１８：１）、１９（１９：１）、２０（２０：１）、２１（２１：１）、２２（２２：１）、２３（２３：１）、２４（２４：１）、２５（２５：１）、２６（２６：１）、２７（２７：１）、２８（２８：１）、２９（２９：１）または３０（３０：１）の範囲である。出発物質の比もまた、通常この範囲内に入る。

【０４７６】

上述のように、複合脂質は、ＣＰＬをさらに含んでもよい。ＬＮＰ－ＣＰＬ（ＣＰＬ含有ＬＮＰ）を作製するための様々な一般的方法が本明細書で論じられる。２つの一般的技法には、「ポストインサーション」技法、すなわち、例えば予め形成されたＬＮＰへのＣＰＬの挿入と、例えば、ＬＮＰ形成工程の際にＣＰＬを脂質混合物中に含ませる「標準」技法とが含まれる。ポストインサーション技法は、主にＬＮＰ二重層膜の外面にＣＰＬを有するＬＮＰを生じさせ、一方で、標準技法は、内面および外面の両方にＣＰＬを有するＬＮＰをもたらす。この方法は、リン脂質（コレステロールを含有し得る）から作製された小胞に特に有用であり、また、ＰＥＧ－脂質（例えば、ＰＥＧ－ＤＡＡおよびＰＥＧ－ＤＡＧ）を含有する小胞にも有用である。ＬＮＰ－ＣＰＬを作製する方法は、例えば、米国特許第５，７０５，３８５号、同第６，５８６，４１０号、同第５，９８１，５０１号、同第６，５３４，４８４号、および同第６，８５２，３３４号、米国特許出願公開第２００２００７２１２１号、ならびにＰＣＴ公開第ＷＯ００／６２８１３号に教示されており、それらの開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【０４７７】

ＬＮＰを作製するための他の方法は、例えば、米国特許第９，００５，６５４号およびＰＣＴ公開第ＷＯ２００７／０１２１９１号に見出され得、それらの開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【０４７８】

キット

本発明はまた、キット形態の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）を提供する。キットは、脂質粒子の様々な構成要素（例えば、核酸等の活性剤または治療剤、および粒子の個々の脂質成分）を保持するように区画化された容器を含んでもよい。いくつかの実施形態では、キットは、エンドソーム膜不安定化剤（例えば、カルシウムイオン）をさらに含んでもよい。キットは通常、本発明の脂質粒子組成物を、好ましくは脱水形態で、その再水和および投与のための説明書とともに含む。

【０４７９】

本明細書で説明するように、本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）は、目的の特定の組織、器官、または腫瘍を優先的に標的とするように適応させることができる。特定の場合では、粒子自体の組成を制御することにより、ＬＮＰなどの脂質粒子の優先的な標的化を行うことができる。例えば、実施例１１に記載の通り、１：５７ＰＥＧ－ｃＤＳＡＬＮＰ製剤を使用して肝臓外部の腫瘍を優先的に標的とすることができるが、一方で、１：５７ＰＥＧ－ｃＤＭＡＬＮＰ製剤を使用して、肝臓（肝腫瘍を含む）を優先的に標的とすることができることが判明している。

【０４８０】

特定の他の場合では、粒子の標的化をさらに向上させるために、脂質粒子の表面に結合した標的化部分を有することが望ましい場合がある。標的化部分（例えば、抗体、タンパク質等）を脂質（本発明の粒子に使用されるもの等）に結合させる方法は、当業者に公知である。

【０４８１】

脂質粒子の投与

本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）は、形成された後、活性剤または治療剤（例えば、干渉ＲＮＡまたはｍＲＮＡ等の核酸）の細胞への導入に有用である。したがって、本発明はまた、核酸（例えば、干渉ＲＮＡまたはｍＲＮＡ）等の活性剤または治療剤を細胞に導入するための方法も提供する。この方法は、まず上述のように粒子を形成し、次に、活性剤または治療剤の細胞への送達が生じるのに十分な一定時間、その粒子を細胞に接触させることにより、試験管内または生体内で実施される。

【０４８２】

本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）は、それらと混合させるかまたは接触させるほぼすべての細胞タイプに吸着させることができる。粒子は、一旦吸着させると細胞の一部によりエンドサイトーシスされるか、脂質を細胞膜と交換するか、または細胞と融合するかのいずれかであり得る。粒子の活性剤または治療剤（例えば、核酸）部分の導入または組み込みは、これらの経路のいずれか１つを介して生じ得る。特に、融合が生じると、粒子膜は細胞膜に組み込まれ、粒子の内容物は細胞内液と混ざる。

【０４８３】

本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）は、単独で、または投与経路および標準的な薬務に従って選択される薬学的に許容される担体（例えば、生理食ブラインまたはリン酸緩衝液）との混合物のいずれかで、投与することができる。一般に、緩衝生理食ブライン（例えば１３５～１５０ｍＭ　ＮａＣｌ）が薬学的に許容される担体として用いられるであろう。他の好適な担体には、アルブミン、リポタンパク質、グロブリン等の安定性増強のための糖タンパク質を含む、例えば、水、緩衝水、０．４％生理食ブライン、０．３％グリシン等が含まれる。さらなる好適な担体は、例えば、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ，Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，Ｐａ．，１７ｔｈ　ｅｄ．（１９８５）に記載されている。本明細書で使用されるとき、「担体」には、あらゆるすべての溶媒、分散媒、ビ

ヒクル、コーティング剤、希釈剤、抗細菌および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、緩衝液、担体溶液、懸濁液、コロイド等が含まれる。「薬学的に許容可能」という語句は、ヒトに投与したときにアレルギー性または類似の有害反応を生じない分子実体および組成物を指す。

【０４８４】

薬学的に許容される担体は、一般に、脂質粒子の形成後に添加される。したがって、粒子の形成後に、通常の緩衝生理食ブライン等の薬学的に許容される担体中に粒子を希釈することができる。

【０４８５】

医薬製剤中の粒子の濃度は大幅に、すなわち約０．０５重量％未満、通常は約２～５重量％から、約１０～９０重量％もの高さまで変動し得、選択された特定の投与様式に従って、主として流体体積、粘度等により選択されることになる。例えば、治療に伴う流体負荷を低下させるために、濃度を増加させてよい。これは、アテローム性動脈硬化症に関連するうっ血性心不全または重度の高血圧症を有する患者に特に望ましい場合がある。あるいは、投与部位の炎症を軽減するために、刺激性脂質から構成される粒子を低濃度に希釈してもよい。

【０４８６】

本発明の医薬組成物を、従来の周知の滅菌技術により滅菌してもよい。水溶液は、使用のためにパッケージ化してもよく、または無菌条件下で濾過して凍結乾燥し、その凍結乾燥調製物を投与前に無菌水溶液と混合してもよい。組成物は、生理学的条件に近似させるために必要とされる、ｐＨ調整剤および緩衝剤、浸透圧調整剤等の薬学的に許容される補助物質、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、および塩化カルシウムを含有してもよい。さらに、粒子懸濁液は、貯蔵時のフリーラジカルおよび脂質過酸化による損傷から脂質を保護する脂質保護剤を含んでもよい。アルファトコフェロール等の親油性フリーラジカルクエンチャーおよびフェリオキサミン等の水溶性鉄特異的キレート剤が好適である。

【０４８７】

生体内投与

生体内療法のための全身送達、例えば、循環等の身体系を介した遠位標的細胞への治療用核酸の送達は、ＰＣＴ公開第ＷＯ０５／００７１９６号、同第ＷＯ０５／１２１３４８号、同第ＷＯ０５／１２０１５２号、および同第ＷＯ０４／００２４５３号（これらの開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているもの等の核酸－脂質粒子を使用して実現されている。本発明はまた、血清中でヌクレアーゼ分解から核酸を保護し、非免疫原性でありサイズが小さく反復投薬に好適である、完全に封入された脂質粒子を提供する。

【０４８８】

生体内投与の場合、投与は、当該技術分野で公知の任意の方法、例えば、注射、経口投与、吸入（例えば、鼻腔内または気管内）、経皮適用、または直腸投与によるものであり得る。投与は、単回用量または分割用量により行うことができる。医薬組成物は、非経口的、すなわち、関節内に、静脈内に、腹腔内に、皮下に、または筋肉内に投与することができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、ボーラス注射により静脈内または腹腔内投与される（例えば、米国特許第５，２８６，６３４号を参照のこと）。細胞内核酸送達はまた、Ｓｔｒａｕｂｒｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１０１：５１２（１９８３）、Ｍａｎｎｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，６：６８２（１９８８）、Ｎｉｃｏｌａｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒ．Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔ．，６：２３９（１９８９）、およびＢｅｈｒ，Ａｃｃ．Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．，２６：２７４（１９９３）で論じられている。脂質ベースの治療薬を投与するさらなる他の方法は、例えば、米国特許第３，９９３，７５４号、同第４，１４５，４１０号、同第４，２３５，８７１号、同第４，２２４，１７９号、同第４，５２２，８０３号、および同第４，５８８，５７８号に記載されて

いる。脂質粒子は、疾患部位での直接注射により、または疾患部位から遠位の部位での注射により投与することができる（例えば、Ｃｕｌｖｅｒ，ＨＵＭＡＮ　ＧＥＮＥ　ＴＨＥＲＡＰＹ，ＭａｒｙＡｎｎ　Ｌｉｅｂｅｒｔ，Ｉｎｃ．，Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，ＮｅｗＹｏｒｋ．ｐｐ．７０－７１（１９９４）を参照のこと）。上述の参照文献の開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【０４８９】

本発明の組成物は、吸入（例えば、鼻腔内または気管内）を介して投与するために、単独で、または他の適切な成分と組み合わせてのいずれかで、エアロゾル製剤に作製することができる（すなわち、それらを「噴霧する」ことができる）（Ｂｒｉｇｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｓｃｉ．，２９８：２７８（１９８９）を参照のこと）。エアロゾル製剤を、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素等の加圧された許容され得る噴射剤中に入れることができる。

【０４９０】

特定の実施形態では、医薬組成物は、鼻腔内スプレー、吸入、および／または他のエアロゾル送達ビヒクルにより送達され得る。核酸組成物を経鼻エアロゾルスプレーにより肺に直接送達するための方法は、例えば米国特許第５，７５６，３５３号および同第５，８０４，２１２号に記載されている。同様に、鼻腔内微粒子樹脂およびリゾホスファチジル－グリセロール化合物を使用した薬物送達（米国特許第５，７２５，８７１号）もまた、薬学的分野において周知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン支持マトリックスの形態での経粘膜薬物送達は、米国特許第５，７８０，０４５号に記載されている。前述の特許の開示は、すべての目的のためにその全体が本明細書に参照によって組み込まれる。

【０４９１】

例えば、関節内（関節の中）、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、および皮下経路などによる非経口投与に適した製剤には、酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、および製剤を意図されたレシピエントの血液と等張にする溶質を含有し得る水性および非水性の等張無菌注射溶液、並びに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、および保存剤を含んでもよい水性および非水性無菌懸濁液が含まれる。本発明の実施において、組成物は、好ましくは例えば、静脈内注入によって、経口で、局所的に、腹腔内に、膀胱内に、または髄腔内に投与される。

【０４９２】

一般に、静脈内投与する場合、脂質粒子製剤を適切な医薬担体を用いて製剤化する。多くの薬学的に許容され得る担体が、本発明の組成物および方法で用いられ得る。本発明における使用に好適な製剤は、例えば、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ，Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，Ｐａ．，１７ｔｈ　ｅｄ．（１９８５）に見出される。様々な水性担体、例えば、水、緩衝水、０．４％生理食ブライン、０．３％グリシン等を使用してよく、それらの水性担体は、アルブミン、リポタンパク質、グロブリン等の安定性増強のための糖タンパク質を含んでもよい。一般に、薬学的に許容され得る担体として緩衝生理食ブライン（１３５～１５０ｍＭ　ＮａＣｌ）が用いられるが、他の好適な担体でも十分であろう。これらの組成物は、濾過等の従来のリポソーム滅菌技術により滅菌することができる。組成物は、生理学的条件に近似させるために必要とされる、ｐＨ調整剤および緩衝剤、浸透圧調整剤、湿潤剤等の薬学的に許容され得る補助物質、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレエート等を含有してもよい。これらの組成物は、上述の技術を使用して滅菌することができ、また、別法として、滅菌条件下で生成することもできる。得られた水溶液は、使用のためにパッケージ化してもよく、または無菌条件下で濾過して凍結乾燥し、その凍結乾燥調製物を投与前に無菌水溶液と混合してもよい。

【０４９３】

ある特定の用途では、本明細書に開示されている脂質粒子は、経口投与により個体に送

達され得る。粒子を賦形剤に組み込み、摂取可能な錠剤、バッカル錠、トローチ剤、カプセル剤、丸剤、ロゼンジ、エリキシル剤、洗口剤、懸濁液、口腔スプレー剤、シロップ剤、オブラート等の形態で使用することができる（例えば、米国特許第５，６４１，５１５号、同第５，５８０，５７９号、および同第５，７９２，４５１を参照のこと。これらの開示はあらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる）。これらの経口剤形はまた、以下、すなわち結合剤、ゼラチン；賦形剤、滑沢剤、および／または香味剤を含有し得る。単位剤形がカプセルの場合、その剤形は、上述の物質に加えて液体担体を含有してよい。様々な他の物質が、コーティング剤として、またはその他の方法で投薬単位の物理的形態を変更するために、存在してもよい。当然ながら、任意の単位剤形の調製に使用される任意の物質は、薬学的に純粋であり、用いられる量で実質的に無毒性であるべきである。

【０４９４】

通常、これらの経口製剤は、少なくとも約０．１％またはそれよりも多い脂質粒子を含有し得るが、粒子のパーセンテージは当然ながら変動してもよく、好都合には製剤の総重量または総体積の約１％もしくは２％～約６０％もしくは７０％またはそれより多くてもよい。必然的に、治療的に有用な各組成物中の粒子の量は、好適な投薬量が化合物の任意の所与の単位用量で得られるような方式で調製され得る。溶解度、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与経路、生成物の有効期間、および他の薬理学的考慮事項等の要因が、そのような医薬製剤を調製する当業者によって企図され、したがって、様々な投薬量および治療レジメンが望ましい場合がある。

【０４９５】

経口投与に好適な製剤は以下、すなわち、（ａ）液体溶液、例えば、水、生理食ブライン、またはＰＥＧ４００等の希釈剤中に懸濁した、核酸（例えば、干渉ＲＮＡまたはｍＲＮＡ）等の有効量のパッケージ化された治療剤、（ｂ）所定量の核酸（例えば干渉ＲＮＡまたはｍＲＮＡ）等の治療剤を液体、固体、顆粒、またはゼラチンとしてそれぞれ含有する、カプセル剤、サシェ、または錠剤、（ｃ）適切な液体中の懸濁液、および（ｄ）好適なエマルションから構成され得る。錠剤形態は、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、微結晶セルロース、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、および他の賦形剤、着色剤、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、保存剤、香味剤、色素、崩壊剤、並びに薬学的に適合可能な担体のうちの１つまたは複数を含んでもよい。ロゼンジ形態は、香料、例えば、スクロース中の核酸（例えば、干渉ＲＮＡまたはｍＲＮＡ）等の治療剤、ならびに治療剤に加えて当該技術分野で公知の担体を含有するゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアラビアゴムエマルション、ゲル等の不活性基剤中に治療剤を含む香錠を含んでもよい。

【０４９６】

それらの別の使用例では、脂質粒子を広範な局所剤形に組み込むことができる。例えば、ＬＮＰ等の核酸－脂質粒子を含有する懸濁液は、ゲル、油、エマルション、局所クリーム、ペースト、軟膏、ローション、泡、ムース等として製剤化および投与することができる。

【０４９７】

本発明の脂質粒子の医薬調製物を調製する場合、空の粒子または核酸等の治療剤が外表面と会合した粒子を低減または除去するために精製された、多量の粒子を使用することが好ましい。

【０４９８】

本発明の方法は、様々な宿主において実施することができる。好ましい宿主には、霊長類（例えば、ヒトおよびチンパンジーならびに他の非ヒト霊長類）、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、げっ歯類（例えば、ラットおよびマウス）、ウサギ、ならびにブタなどの哺乳類種が含まれる。

【０４９９】

投与される粒子の量は、治療剤（例えば、核酸）対脂質の比、使用される特定の治療剤（例えば、核酸）、治療される疾患または障害、患者の年齢、体重、および状態、ならびに臨床医の判断に依存するが、一般に、約０．０１～約５０ｍｇ／ｋｇ体重、好ましくは約０．１～約５ｍｇ／ｋｇ体重、または投与（例えば、注射）１回あたり約10^{8}～10^{10}粒子であろう。

【０５００】

試験管内投与

試験管内用途の場合、核酸（例えば、干渉ＲＮＡまたはｍＲＮＡ）などの治療剤の送達は、植物起源であるか動物起源であるか、脊椎動物であるか無脊椎動物であるか、およびいずれの組織またはタイプであるかを問わず、培養で増殖させた任意の細胞に対して行うことができる。好ましい実施形態では、細胞は、動物細胞、より好ましくは哺乳類細胞、最も好ましくはヒト細胞である。

【０５０１】

試験管内で行われる場合、細胞と脂質粒子との間の接触は、生物学的に適合する媒体中で起こる。粒子の濃度は、特定の用途に応じて広く変動するが、一般的には約１μｍｏｌ～約１０ｍｍｏｌである。脂質粒子を用いた細胞の処置は、一般的に、生理学的温度（約３７℃）で、約１～４８時間、好ましくは約２～４時間の期間にわたって実施される。

【０５０２】

好ましい実施形態の一群では、脂質粒子懸濁液を、約10^{3}～約10^{5}細胞／ｍｌ、より好ましくは約２×10^{4}細胞／ｍｌの細胞密度を有する、６０～８０％コンフルエントでプレーティングした細胞に添加する。細胞に添加される懸濁液の濃度は、好ましくは約０．０１～０．２μｇ／ｍｌ、より好ましくは約０．１μｇ／ｍｌである。

【０５０３】

エンドソーム放出パラメータ（Ｅｎｄｏｓｏｍａｌ　Ｒｅｌｅａｓｅ　Ｐａｒａｍｅｔｅｒ）（ＥＲＰ）アッセイを使用して、本発明のＬＮＰまたは他の脂質粒子の送達効率を最適化することができる。ＥＲＰアッセイは、米国特許公開第２００３００７７８２９号に詳細に記載されており、その開示は、あらゆる目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。より詳細には、ＥＲＰアッセイの目的は、ＬＮＰの様々なカチオン性脂質およびヘルパー脂質成分の作用を、エンドソーム膜の結合／取り込みまたはエンドソーム膜との融合／その不安定化に対するそれらの相対的作用に基づいて判別することである。このアッセイにより、ＬＮＰまたは他の脂質粒子の各成分が送達効率にどのように影響を及ぼすかを定量的に決定し、それにより、ＬＮＰまたは他の脂質粒子を最適化することが可能となる。通常、ＥＲＰアッセイは、レポータータンパク質（例えば、ルシフェラーゼ、β－ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）等）の発現を測定する。場合によっては、発現プラスミドに対して最適化されたＬＮＰ製剤はまた、干渉ＲＮＡまたはｍＲＮＡを封入するのに適している。他の場合では、ＥＲＰアッセイを、干渉ＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）の存在下または非存在下で標的配列の転写または翻訳の下方制御を測定するために適合させることができる。他の場合では、ＥＲＰアッセイを、ｍＲＮＡの存在下または非存在下で標的タンパク質の発現を測定するために適合させることができる。様々なＬＮＰまたは他の脂質粒子の各々についてのＥＲＰを比較することにより、最適化された系、例えば、細胞内に最も多く取り込まれるＬＮＰまたは他の脂質粒子を容易に決定することができる。

【０５０４】

脂質粒子の送達のための細胞

本発明の組成物および方法は、多種多様な細胞タイプを生体内および試験管内で治療するために使用される。好適な細胞には、例えば、造血前駆（幹）細胞、線維芽細胞、ケラチノサイト、肝細胞、内皮細胞、骨格筋および平滑筋細胞、骨芽細胞、神経細胞、静止リンパ球、最終分化細胞、周期が遅いまたは周期が止めた（ｎｏｎｃｙｃｌｉｎｇ）初代細胞、実質細胞、リンパ系細胞、上皮細胞、骨細胞などが含まれる。好ましい実施形態では、１つまたは複数の核酸分子（例えば、干渉ＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）またはｍＲＮ

Ａ）などの活性剤または治療剤は、例えば、肺癌細胞、結腸癌細胞、直腸癌細胞、肛門癌細胞、胆管癌細胞、小腸癌細胞、胃癌（ｓｔｏｍａｃｈ（ｇａｓｔｒｉｃ））細胞、食道癌細胞、胆嚢癌細胞、肝癌細胞、膵癌細胞、虫垂癌細胞、乳癌細胞、卵巣癌細胞、子宮頸癌細胞、前立腺癌細胞、腎癌細胞、中枢神経系の癌細胞、神経膠芽腫腫瘍細胞、皮膚癌細胞、リンパ腫細胞、絨毛癌腫瘍細胞、頭頸部癌細胞、骨原性肉腫腫瘍細胞、および血液癌細胞などのがん細胞に送達される。

【０５０５】

１つまたは複数の核酸分子（例えば、干渉ＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）またはｍＲＮＡ）を封入しているＬＮＰなどの脂質粒子の生体内送達は、任意の細胞タイプの細胞を標的とするのに適している。本方法および組成物は、例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、およびモルモット）、ウサギ、ブタ、ならびに霊長類（例えば、サル、チンパンジー、およびヒト）等の哺乳類を含む、多種多様な脊椎動物の細胞で用いることができる。

【０５０６】

必要とされ得る範囲内で、細胞の組織培養は当該技術分野において周知である。例えば、Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ，ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ，３ｒｄ Ｅｄ．，Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９４）、Ｋｕｃｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ ａｎｄ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，Ｄｏｗｄｅｎ，Ｈｕｔｃｈｉｎｓｏｎ ａｎｄ Ｒｏｓｓ，Ｉｎｃ．（１９７７）およびこれらに引用された参照文献は、細胞培養への一般的な手引きを提供する。培養細胞系は、多くの場合単層細胞の形態であるが、細胞懸濁液も使用される。

【０５０７】

脂質粒子の検出

いくつかの実施形態では、本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）は、約１、２、３、４、５、６、７、８時間またはそれ以上の時点で、対象において検出可能である。他の実施形態では、本発明の脂質粒子（例えば、ＬＮＰ）は、粒子の投与から約８、１２、２４、４８、６０、７２、もしくは９６時間後、または約６、８、１０、１２、１４、１６、１８、１９、２２、２４、２５、もしくは２８日後に対象において検出可能である。粒子の存在は、対象由来の細胞、組織、または他の生体試料から検出することができる。粒子は、例えば、粒子の直接検出により、干渉ＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）もしくはｍＲＮＡ配列等の治療用核酸の検出により、目的標的配列の検出により（すなわち目的配列の発現もしくは発現の低減を検出することにより）、またはそれらの組み合わせにより、検出され得る。

【０５０８】

粒子の検出

ＬＮＰ等の本発明の脂質粒子は、当技術分野で公知の任意の方法を使用して検出することができる。例えば、当該技術分野で周知の方法を使用して、脂質粒子の成分に標識を直接または間接的にカップリングさせることができる。必要とされる感度、脂質粒子成分とのコンジュゲーションの容易さ、安定性要件、並びに利用可能な計測手段および使い捨て設備（ｄｉｓｐｏｓａｌ ｐｒｏｖｉｓｉｏｎ）に応じて標識を選択して、多種多様な標識を使用することができる。好適な標識には、蛍光色素（例えば、フルオレセインならびにフルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）およびＯｒｅｇｏｎ Ｇｒｅｅｎ（商標）等の誘導体；ローダミンおよびテキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）等の誘導体、ジゴキシゲニン、ビオチン、フィコエリトリン、ＡＭＣＡ、ＣｙＤｙｅ（商標）等）等の分光標識；^{3}Ｈ、^{125}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{33}Ｐ等の放射標識；西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素；コロイド状金または着色ガラスまたはポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス等のプラスチックビーズ等の分光比色標識が含まれるが、これらに限定されない。標識は、当該技術分野で公知の任意の手段を使用して検出することができる。

【０５０９】
核酸の検出
核酸（例えば、干渉ＲＮＡまたはｍＲＮＡ）は、本明細書において当業者に周知の任意のいくつかの手段により検出および定量される。核酸の検出は、サザン分析、ノーザン分析、ゲル電気泳動、ＰＣＲ、放射標識、シンチレーション計数、およびアフィニティークロマトグラフィー等の周知の方法により行われ得る。分光光度法、Ｘ線撮影法、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）、および高拡散（ｈｙｐｅｒｄｉｆｆｕｓｉｏｎ）クロマトグラフィー等のさらなる生化学的分析方法もまた、用いられ得る。
【０５１０】
核酸ハイブリダイゼーション形式の選択は、重要ではない。様々な核酸ハイブリダイゼーション形式が、当業者に公知である。例えば、一般的な形式には、サンドイッチアッセイおよび競合または置換アッセイが含まれる。ハイブリダイゼーション技術は、概して、例えば“Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，”Ｅｄｓ．Ｈａｍｅｓ ａｎｄ Ｈｉｇｇｉｎｓ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９８５）に記載されている。
【０５１１】
ハイブリダイゼーションアッセイの感度は、検出される標的核酸を増加させる核酸増幅系の使用を通じて向上され得る。分子プローブとして使用するための配列の増幅、またはその後のサブクローニングのための核酸フラグメントの生成に好適な試験管内増幅技術が知られている。ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、Ｑβ－レプリカーゼ増幅、および他のＲＮＡポリメラーゼ媒介性技術（例えば、ＮＡＳＢＡ（商標））を含む、そのような試験管内増幅法を介して当事者を導くのに十分な技術の例は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（２０００）、およびＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ＳＨＯＲＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，ｅｄｓ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｉｎｃ．ａｎｄ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．（２００２）、ならびに米国特許第４，６８３，２０２号、ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（Ｉｎｎｉｓ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｃ．Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）、Ａｒｎｈｅｉｍ ＆ Ｌｅｖｉｎｓｏｎ（Ｏｃｔ．１，１９９０），Ｃ＆ＥＮ ３６；Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ Ｏｆ ＮＩＨ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，３：８１（１９９１）、Ｋｗｏｈ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８６：１１７３（１９８９）、Ｇｕａｔｅｌｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８７：１８７４（１９９０）、Ｌｏｍｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．，３５：１８２６（１９８９）、Ｌａｎｄｅｇｒｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４１：１０７７（１９８８）、Ｖａｎ Ｂｒｕｎｔ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，８：２９１（１９９０）、Ｗｕ ａｎｄ Ｗａｌｌａｃｅ，Ｇｅｎｅ，４：５６０（１９８９）、Ｂａｒｒｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ，８９：１１７（１９９０）、およびＳｏｏｋｎａｎａｎ ａｎｄ Ｍａｌｅｋ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１３：５６３（１９９５）に見出される。増幅された核酸を試験管内でクローニングする改善された方法は、米国特許第５，４２６，０３９号に記載されている。当該技術分野で説明されている他の方法は、核酸配列ベース増幅（ＮＡＳＢＡ（商標）、Ｃａｎｇｅｎｅ，Ｍｉｓｓｉｓｓａｕｇａ，Ｏｎｔａｒｉｏ）およびＱβ－レプリカーゼ系である。これらの系は、選択した配列が存在する場合のみＰＣＲまたはＬＣＲプライマーが伸長またはライゲートするように設計した場合、変異体を直接同定するために使用することができる。あるいは、選択した配列を、一般に、例えば非特異的ＰＣＲプライマーを使用して増幅することができ、その後、変異を示す特定の配列について、

増幅された標的領域を探索することができる。上述の参照文献の開示は、あらゆる目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０５１２】

例えば、試験管内増幅法におけるプローブとしての使用のための、遺伝子プローブとしての使用のための、または阻害物質成分としての核酸は、通常、Ｂｅａｕｃａｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔｓ．，２２：１８５９ １８６２（１９８１）により記載されている固相ホスホラミダイトトリエステル法に従って、例えば、Ｎｅｅｄｈａｍ ＶａｎＤｅｖａｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１２：６１５９（１９８４）に記載されている自動合成装置を使用して化学合成される。必要な場合、ポリヌクレオチドの精製は通常、未変性アクリルアミドゲル電気泳動、またはＰｅａｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｈｒｏｍ．，２５５：１３７ １４９（１９８３）に記載されているアニオン交換ＨＰＬＣのいずれかにより実施される。合成ポリヌクレオチドの配列は、Ｍａｘａｍ ａｎｄ Ｇｉｌｂｅｒｔ（１９８０）ｉｎ Ｇｒｏｓｓｍａｎ ａｎｄ Ｍｏｌｄａｖｅ（ｅｄｓ．）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，６５：４９９の化学分解法を使用して検証することができる。

【０５１３】

転写レベルを測定するための代替的手段は、ｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーションである。ｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーションアッセイは周知であり、概して、Ａｎｇｅｒｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１５２：６４９（１９８７）に記載されている。ｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーションアッセイでは、細胞を固体支持体、通常はスライドガラスに固定する。ＤＮＡを探索する場合、熱またはアルカリで細胞を変性させる。次に、細胞を中程度の温度でハイブリダイゼーション溶液と接触させ、標識した特異的プローブをアニーリングさせる。プローブを、好ましくは放射性同位体または蛍光レポーターで標識する。

【０５１４】

イオン化できる脂質

イオン化できるカチオン性脂質は通常、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）における主要な脂質成分である。それらは、標準的な生理的ｐＨ（約７）では電荷中性であるように設計されるが、さらに低い（酸性）ｐＨでは正電荷を獲得する。これはＬＮＰ形成時の核酸ペイロードの封入および細胞内送達に役立つ（エンドソーム融合工程はイオン化できる脂質の正電荷を必要とする）。

【０５１５】

ＭＣ３（ＦＤＡ承認のｓｉＲＮＡ－ＬＮＰ製品Ｏｎｐａｔｔｒｏで使用）および３Ｄ－Ｐ－ＤＭＡのようなイオン化できる脂質は、種々の用途で優れた活性と忍容性を実証している。しかしながら、それらは急速に代謝されず、標的組織から排出されるまでに数週間かかる。このため、複数回の投与を必要とする用途、特に投与間隔が短い用途および／または慢性的な適応症での用途には、あまり適していない。

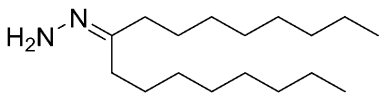
【０５１６】

さらに好ましいプロファイルを達成する１つの方法は、脂質の疎水性ドメインにカルボキシルエステル基を含めることである。エステル基は体内で酵素分解を受け、これによって標的組織での脂質クリアランスが改善することが報告されている（Ｍａｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。ただし、エステルのすぐ周囲の化学構造は戦略の有効性に影響するため、考慮する必要がある。ＢＮＴ１６２ｂ２（ファイザーのＣＯＶＩＤワクチンとしても知られる）におけるイオン化できる脂質であるＡＬＣ－０３１５は、疎水性ドメインにカルボン酸エステルを有するが、ＭＣ３と同様の速度で代謝されることが分かった［参照：Ｃｏｍｉｒｎａｔｙ評価報告書、欧州医薬品庁］。さらに、好ましい活性および忍容性のプロファイルを維持しながらエステルを組み込む必要がある。

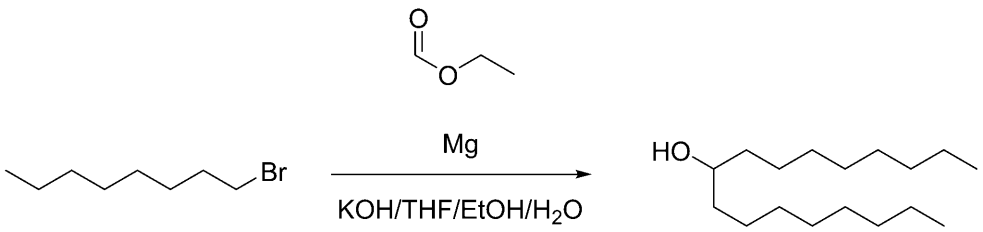
【０５１７】

この目的のために、エステル官能基を組み込んだ一連のイオン化できるカチオン性脂質

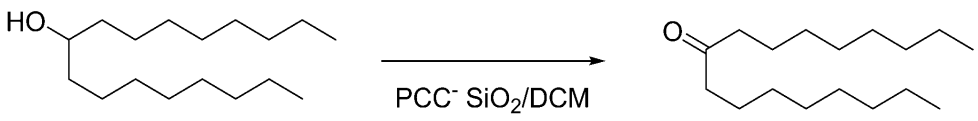
が、以下の方法で設計され、合成され、評価された。
・配合性（粒度、多分散性、ペイロードの封入、ｐＫａ）
・効力（マウス肝臓発現モデル、ルシフェラーゼをコードするｍＲＮＡとＯＴＣ　ｍＲＮＡを送達する）
・忍容性（マウス免疫刺激モデル、サイトカインの読み出し）
・脂質クリアランス（マウスモデル－標的組織（肝臓）からのクリアランス）。
【０５１８】
本発明を、具体的な実施例によってさらに詳細に説明する。以下の実施例は例示目的のみに提供され、いかなる方法によっても本発明を限定することを意図するものではない。当業者は、本質的に同じ結果をもたらすように変更または修正することができる、種々の重要ではないパラメータを容易に認識するであろう。
【実施例】
【０５１９】
調製実施例１．ヘプタデカン－９－イリデンヒドラジンの合成
【化３１】



工程１．９－ヘプタデカノールの合成
【化３２】



グリニャール試薬は、ＴＨＦ中の１－ブロモオクタン（６ｇ、３１ｍｍｏｌ）とマグネシウム（８０８ｍｇ、３３ｍｍｏｌ）から４５℃で２時間撹拌して調製した。反応物を１０℃まで冷却し、ＴＨＦ（５ｍＬ）中のギ酸エチル（２．６ｍＬ、３２ｍｍｏｌ）を一滴ずつ加えた。残留マグネシウムを溶解するためにＨ$_2$Ｏ（３ｍＬ）と６ＭのＨＣｌ（８ｍＬ）とを加えた。反応物をヘキサンとＨ$_2$Ｏの間で分配した。有機物をブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物をＫＯＨ（１．６ｇ）水（３ｍＬ）溶液を伴うエタノール中で撹拌した。エタノールを真空にて除去し、残留物を６ＭのＨＣｌとヘキサンの間で分配した。有機物をＨ$_2$ＯおよびブラインでＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗生成物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～２０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製し、９－ヘプタデカノール（３．２ｇ、８１．２％）を得た。
【０５２０】
工程２．９－ヘプタデカノンの合成
【化３３】



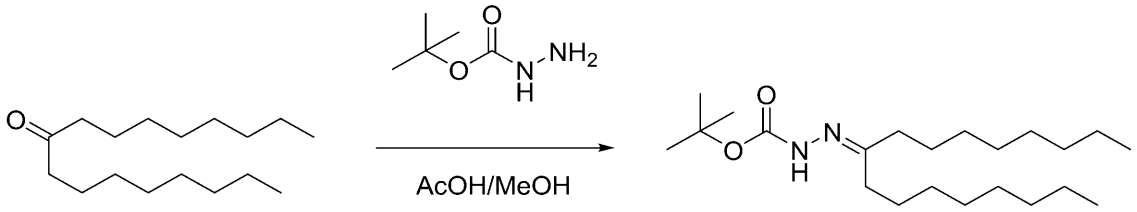
９－ヘプタデカノール（３．２ｇ、１２．６ｍｍｏｌ）とＰＣＣ－ＳｉＯ$_2$（１：１）

（１６．３ｇ、３８ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（１００ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。シリカを介して反応物を濾過し、ＥｔＯＡｃで溶出した。有機物を真空にて濃縮し、自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して、９－ヘプタデカノン（３．２ｇ、９９．６％）を得た。

【０５２１】

工程３．Ｎ’－（ヘプタデカン－９－イリデン）ｔｅｒｔ－ブトキシカルボヒドラジドの合成

【化３４】



ｔｅｒｔ－ブトキシカルボヒドラジド（１９５ｍｇ、１．４７ｍｍｏｌ）、９－ヘプタデカノン（７５０ｍｇ、２．９ｍｍｏｌ）およびＡｃＯＨ（触媒）をＭｅＯＨ（１０ｍＬ）中で還流しながら１５時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、自動フラッシュクロマトグラフィー（０～２０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製してＮ’－（ヘプタデカン－９－イリデン）ｔｅｒｔ－ブトキシカルボヒドラジド（３２０ｍｇ、５８．９％）を得た。

【０５２２】

工程４．ヘプタデカン－９－イリデンヒドラジンの合成

【化３５】

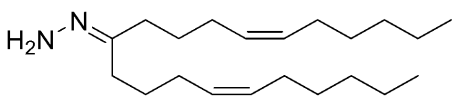


Ｎ’－（ヘプタデカン－９－イリデン）ｔｅｒｔ－ブトキシカルボヒドラジド（３２０ｍｇ、０．９ｍｍｏｌ）を２５％ＴＦＡ／ＤＣＭ（４０ｍＬ）中にて室温で反応が完了するまで撹拌した。溶媒を真空にて除去してヘプタデカン－９－イリデンヒドラジン（２３１ｍｇ、９９．１％）を得、これをさらに精製することなく使用した。

【０５２３】

調製実施例２．（（６Ｚ，１５Ｚ）－ヘニコサ－６，１５－ジエン－１１－イリデン）ヒドラジンの合成

【化３６】

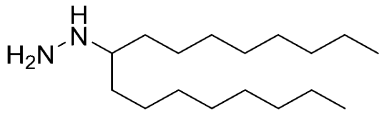


上記と同様の方法を使用して（（６Ｚ，１５Ｚ）－ヘニコサ－６，１５－ジエン－１１－イリデン）ヒドラジンを調製した。

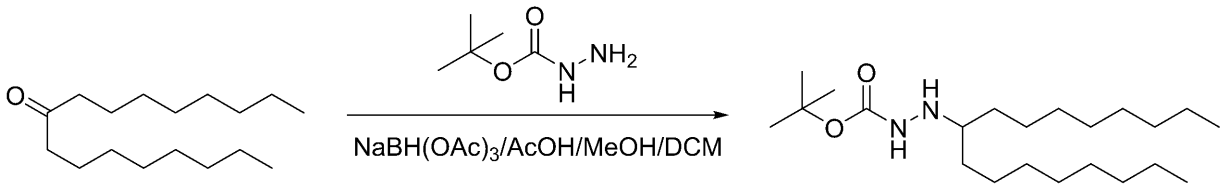
【０５２４】

調製実施例３．ヘプタデカン－９－イルヒドラジンの合成

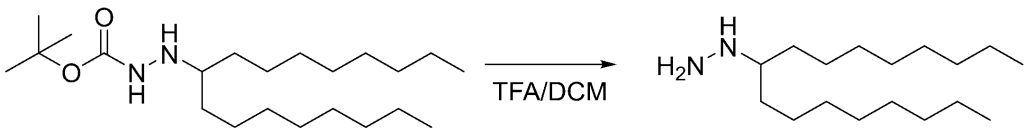
【化３７】



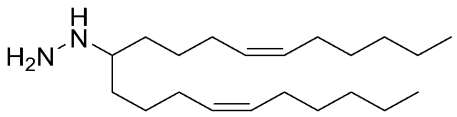
工程１．Ｎ’－（ヘプタデカン－９－イル）ｔｅｒｔ－ブトキシカルボヒドラジドの合成
【化３８】



ｔｅｒｔ－ブトキシカルボヒドラジド（４１２ｍｇ、３．１ｍｍｏｌ）、９－ヘプタデカノン（７９４ｍｇ、３．１ｍｍｏｌ）、ＡｃＯＨ（０．７５ｍＬ、３．２ｍｍｏｌ）およびＮａＢＨ（ＯＡｃ）$_3$（２．０ｇ、９．４ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（２０ｍＬ）中にて室温で２日間撹拌し、４０℃でさらに２０時間撹拌した。反応物を飽和ＮａＨＣＯ$_3$およびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１２％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製してＮ’－（ヘプタデカン－９－イル）ｔｅｒｔ－ブトキシカルボヒドラジド（７００ｍｇ、６０．５％）を得た。
【０５２５】
工程２．ヘプタデカン－９－イルヒドラジンの合成
【化３９】

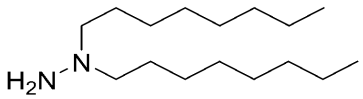


Ｎ’－（ヘプタデカン－９－イル）ｔｅｒｔ－ブトキシカルボヒドラジド（７００ｍｇ、１．９ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（１０ｍＬ）中の２５％ＴＦＡとともに室温で１．５時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮してヘプタデカン－９－イルヒドラジン（５００ｍｇ、９７．９％）を得、それを精製することなく使用した。
【０５２６】
調製実施例４．（（６Ｚ，１５Ｚ）－ヘニコサ－６，１５－ジエン－１１－イル）ヒドラジンの合成
上記と同様の方法を使用して（（６Ｚ，１５Ｚ）－ヘニコサ－６，１５－ジエン－１１－イル）ヒドラジンを調製した。
【化４０】

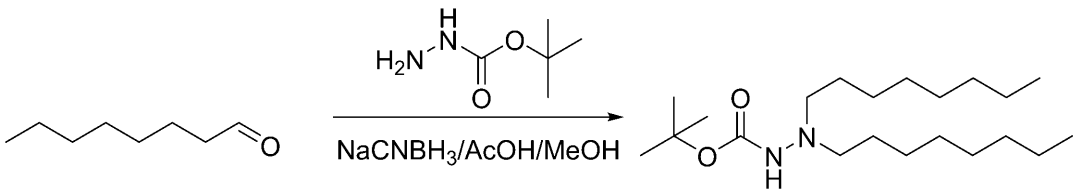


【０５２７】
調製実施例５．１，１－ジオクチルヒドラジンの合成

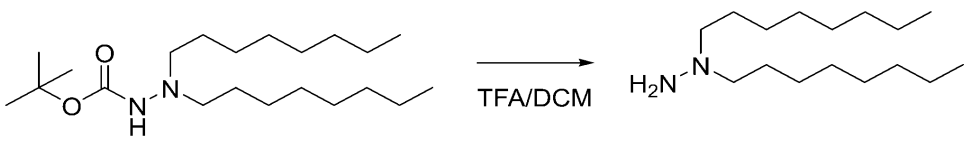
【化４１】



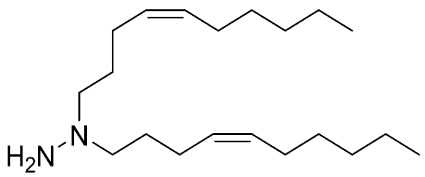
工程１．Ｎ’，Ｎ’－ジオクチルｔｅｒｔ－ブトキシカルボヒドラジドの合成
【化４２】



オクタナール（２．４ｍＬ、１５．０ｍｍｏｌ）、ｔｅｒｔ－ブトキシカルボヒドラジド（１ｇ、７．６ｍｍｏｌ）およびＡｃＯＨ（７．６ｍｍｏｌ）を無水ＭｅＯＨ中にて窒素雰囲気下、７５℃で１時間撹拌した。室温まで冷却した後、ＮａＢＨ３ＣＮ（１．９ｇ、３０．３ｍｍｏｌ）を加え、混合物を室温で１５時間撹拌した。溶媒を真空にて除去し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、H_2Oおよびブラインで洗浄し、乾燥（$MgSO_4$）させ、濾過し、濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製し、Ｎ’，Ｎ’－ジオクチルｔｅｒｔ－ブトキシカルボヒドラジド（２．０ｇ、７４．３％）を得た。
【０５２８】
工程２．１，１－ジオクチルヒドラジンの合成
【化４３】

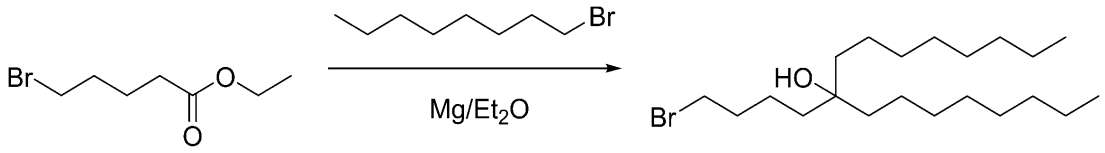


Ｎ’，Ｎ’－ジオクチルｔｅｒｔ－ブトキシカルボヒドラジド（１．１ｇ、３．０ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（２０ｍＬ）中３０％ＴＦＡにて反応が完了するまで０℃で撹拌し、室温に温めた。溶媒を真空にて除去して１，１－ジオクチルヒドラジン（７８２ｍｇ、Ｑｕａｎｔ）を得、それを精製することなく使用した。
【０５２９】
調製実施例６．１，１－ジ（（Ｚ）－デク－４－エン－１－イル）ヒドラジンの合成
【化４４】

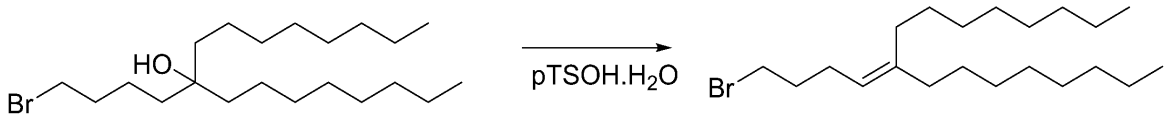


同様の方法を使用して１，１－ジ（（Ｚ）－デク－４－エン－１－イル）ヒドラジンを調製した。
【０５３０】
調製実施例７．分岐アルキルアルコールの合成のための一般的な方法（ａ）：５－オク

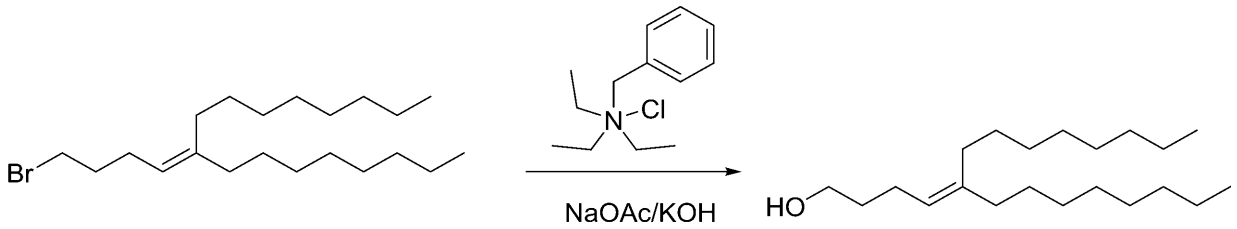
チルトリデク－４－エン－１－オールの合成によって例示する
工程１．９－（４－ブロモブチル）ヘプタデカン－９－オールの合成
【化４５】



グリニャール試薬は、無水Ｅｔ$_2$Ｏ（３５ｍＬ）中のＭｇ（２．６ｇ、１０５ｍｍｏｌ）と１－ブロモオクタン（２０．０ｇ、１０５ｍｍｏｌ）から１時間還流して調製した。反応物を冷却し、５－ブロモペンタン酸エチル（８．０ｇ、３８．３ｍｍｏｌ）の無水Ｅｔ$_2$Ｏ（２５ｍＬ）溶液を一滴ずつ加え、その後さらに１時間還流した。反応物を室温まで冷却し、１００ｍＬの飽和氷冷／ＮＨ$_4$Ｃｌ溶液に注いだ。水性部分をＥｔ$_2$Ｏで抽出し、有機物を乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～２０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して９－（４－ブロモブチル）ヘプタデカン－９－オール（１０．６ｇ、７０．７％）を得た。
【０５３１】
工程２．９－（４－ブロモブチリデン）ヘプタデカンの合成
【化４６】

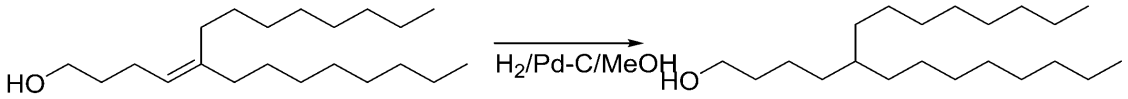


９－（４－ブロモブチル）ヘプタデカン－９－オール（１０．６ｇ、２７．０ｍｍｏｌ）およびｐ－ＴｓＯＨ．Ｈ$_2$Ｏ（９３ｍｇ、０．５４ｍｍｏｌ）をＮ$_2$のもと１３０℃で２時間撹拌した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～４％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して９－（４－ブロモブチリデン）ヘプタデカン（８．８４ｇ、８７．５％）を得た。
【０５３２】
工程３．５－オクチルトリデク－４－エン－１－オールの合成
【化４７】

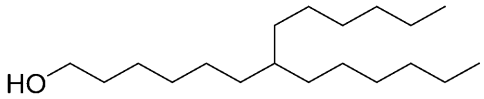


９－（４－ブロモブチリデン）ヘプタデカン（８．８４ｇ、２３．７ｍｍｏｌ）、ベンジル（クロロ）トリエチルアミン（５４０ｍｇ、２．４ｍｍｏｌ）およびＮａＯＡｃ（７．８ｇ、９４．７ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（６０ｍＬ）中にて７０℃で２０時間撹拌した。反応物を氷／水に注ぎ、Ｅｔ$_2$Ｏで抽出した。合わせた有機物を乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物をＭｅＯＨに溶解し、Ｈ$_2$Ｏ中のＫＯＨ（１８．６ｇ、３３２ｍｍｏｌ）を加え、反応物を３０分間撹拌した。ＭｅＯＨを真空にて除去し、反応物をＨ$_2$ＯとＥｔ$_2$Ｏの間で分配した。合わせた有機物を乾燥（ＭｇＳＯ$_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮し、粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して５－オクチルトリデク－４－エン－１－オール（４．５

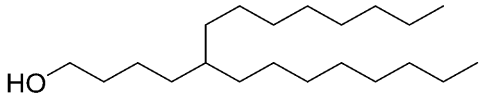
ｇ、６０．８％）を得た。
【０５３３】
工程４．５－オクチルトリデカン－１－オールの合成
【化４８】



５－オクチルトリデク－４－エン－１－オール（４．４６９ｇ、１４．３９ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（５０ｍＬ）中にて室温で１５時間、Ｐｄ－Ｃ上での接触水素化に供した。反応物を濾過し、真空にて濃縮して５－オクチルトリデカン－１－オール（３．５ｇ、７７．８％）を得、それをさらに精製することなく使用した。
【０５３４】
以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。
【化４９】

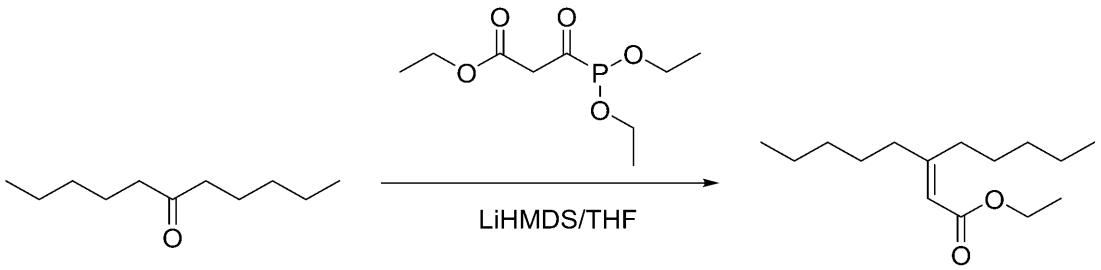


７－ヘキシルトリデカン－１－オール



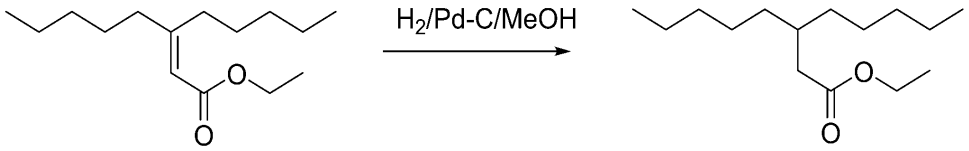
５－オクチルトリデカン－１－オール

【０５３５】
調製実施例８．分岐アルキルアルコールの一般的合成法（ｂ）：３－ペンチルオクタン－１－オールの合成によって例示する
工程１．３－ペンチルオクト－２－エノ酸エチルの合成
【化５０】



ホスホノ酢酸トリエチル（６５．８ｇ、２９４ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（２２０ｍＬ）にて－１０℃で撹拌した。ＴＨＦ中の１ＭのＬｉＨＭＤＳ（２９４ｍＬ、２９４ｍｍｏｌ）を一滴ずつ加え、反応物を－１０℃で１時間、続いて０℃で１時間撹拌した。６－ウンデカノン（２５ｇ、１４７ｍｍｏｌ）を加え、反応物を４５℃で１６時間撹拌した。Ｈ２Ｏで反応を止め、Ｅｔ２Ｏで抽出し、ブラインで洗浄した。有機物を乾燥（ＭｇＳＯ４）させ、濾過し、真空にて濃縮して３－ペンチルオクト－２－エン酸エチル（４３．５ｇ）を得、それをさらに処理することなく次の工程で使用した。
【０５３６】
工程２．３－ペンチルオクタン酸エチルの合成

【化５１】

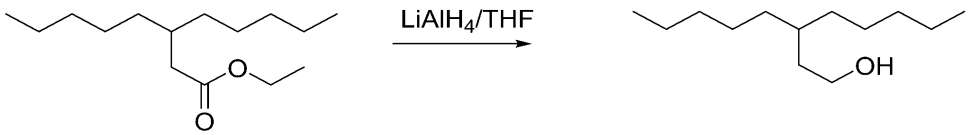


３－ペンチルオクト－２－エン酸エチル（３５ｇ、１４７ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（１００ｍＬ）中にて室温で２０時間、Ｐｄ－Ｃ上での接触水素化に供した。反応物を濾過し、真空にて濃縮して３－ペンチルオクタン酸エチル（３３．３ｇ、９３．６％）を得、それをさらに精製することなく使用した。

【０５３７】

工程３．３－ペンチルオクタン－１－オールの合成

【化５２】

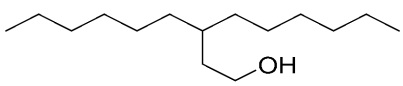


ＬｉＡｌＨ$_4$（６．８ｇ，１７９ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（５００ｍＬ）中にて０℃で３０分間撹拌した。３－ペンチルオクタン酸エチル（３３．３ｇ，１３８ｍｍｏｌ／ＴＨＦ（５００ｍＬ））を一滴ずつ加え、反応物を完了するまで室温で撹拌した。反応物を０℃まで冷却し、Ｅｔ$_2$Ｏ（５００ｍＬ）で希釈し、１ＭのＮａＯＨ（１６ｍＬ）で反応を止めた。反応物を３０分間撹拌し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、セライトを介して濾過し、真空にて濃縮した。粗製物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～３０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して３－ペンチルオクタン－１－オール（２４．７ｇ、８９．７％）を得た。

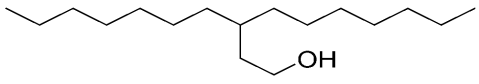
【０５３８】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【化５３】



３－ヘキシルノナン－１－オール



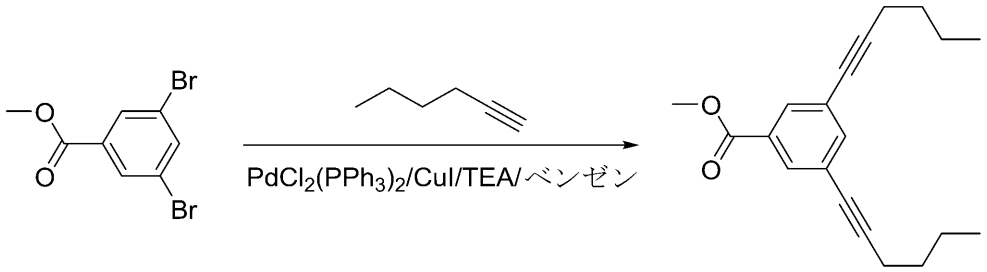
３－ヘプチルデカン－１－オール

【０５３９】

調製実施例９．（３，５－ジヘキシルフェニル）メタノールの合成

工程１．３，５－ビス（ヘクス－１－イン－１－イル）安息香酸メチルの合成

【化５４】

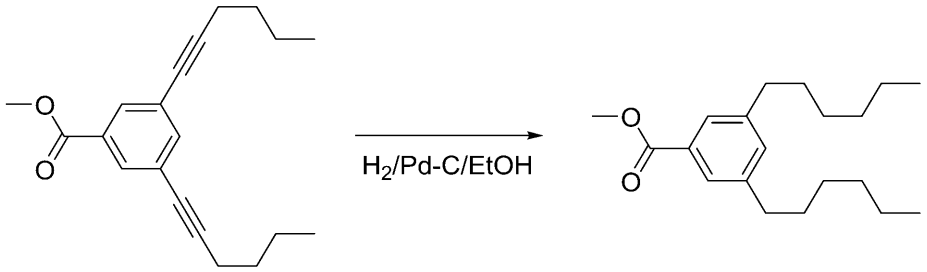


３，５－ジブロモ安息香酸メチル（７．４ｇ、２５．０ｍｍｏｌ）、ヘキシン（８．２ｇ、１００．０ｍｍｏｌ）、ジクロロビス［４－（ジフェニルホスファニル）フェニル］パラジウム（１．４ｇ、２．０ｍｍｏｌ）、ＣｕＩ（０．２ｇ、１．０ｍｍｏｌ）およびＴＥＡ（２１．０ｍＬ、１５０ｍｍｏｌ）をベンゼン（１００ｍＬ）中にて８０℃で４８時間撹拌した。シリカのパッドを介して反応物を濾過し、ＥｔＯＡｃで溶出した。有機物を真空にて濃縮し、粗製物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～２０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して３，５－ビス（ヘクス－１－イン－１－イル）安息香酸メチル（７．０ｇ、９４．４％）を得た。

【０５４０】

工程２．３，５－ジヘキシル安息香酸メチルの合成

【化５５】

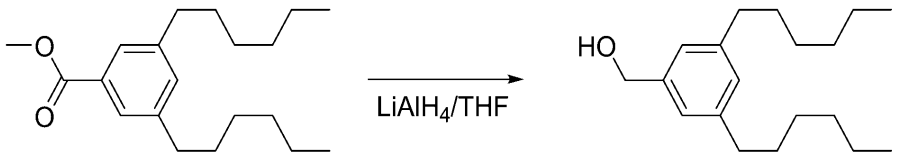


３，５－ビス（ヘクス－１－イン－１－イル）安息香酸メチル（７．０ｇ、２３．６ｍｍｏｌ）を、ＥｔＯＨ（１００ｍＬ）中にて室温で１８時間、Ｐｄ－Ｃ上での接触水素化に供した。セライトを介して反応物を濾過し、真空にて濃縮して３，５－ジヘキシル安息香酸メチル（６．３ｇ、８７．７％）を得、それをさらに精製することなく使用した。

【０５４１】

工程３．（３，５－ジヘキシルフェニル）メタノールの合成

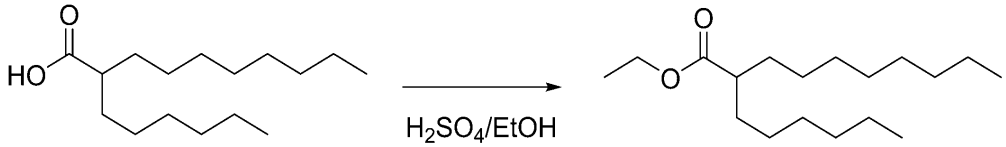
【化５６】



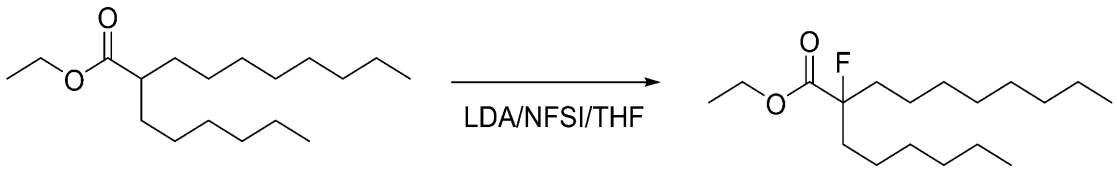
３，５－ジヘキシル安息香酸メチル（６．３ｇ、２０．７ｍｍｏｌ）を無水ＴＨＦ中にて０℃で撹拌した。ＬｉＡｌＨ$_4$（１．２ｇ，３１．０ｍｍｏｌ）を少しずつ加え、反応物を１時間撹拌して室温まで温めた。完了した後、反応物の反応をＨ$_2$Ｏおよび１ＭのＮａＯＨで止め、ＥｔＯＡｃで抽出した。有機物を乾燥（ＭｇＳＯ$_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮し、自動フラッシュクロマトグラフィー（１０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して（３，５－ジヘキシルフェニル）メタノール（３．０ｇ、５２．４％）を得た。

【０５４２】

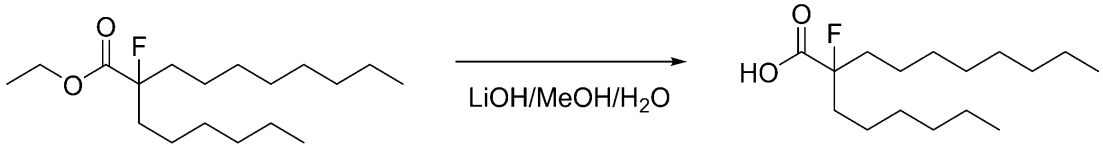
調製実施例１０．２－フルオロ－２－ヘキシルデカン酸の合成
工程１．２－ヘキシルデカン酸エチルの合成
【化５７】



ヘキシルデカン酸（３ｇ、１１．７ｍｍｏｌ）およびH_2SO_4（触媒）をＥｔＯＨ（２０ｍＬ）中にて１５時間還流した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をヘキサンと水の間で分配した。有機物を乾燥（$MgSO_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～６％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して２－ヘキシルデカン酸エチル（３．０ｇ、９０．７％）を得た。
【０５４３】
工程２．２－フルオロ－２－ヘキシルデカン酸エチルの合成
【化５８】

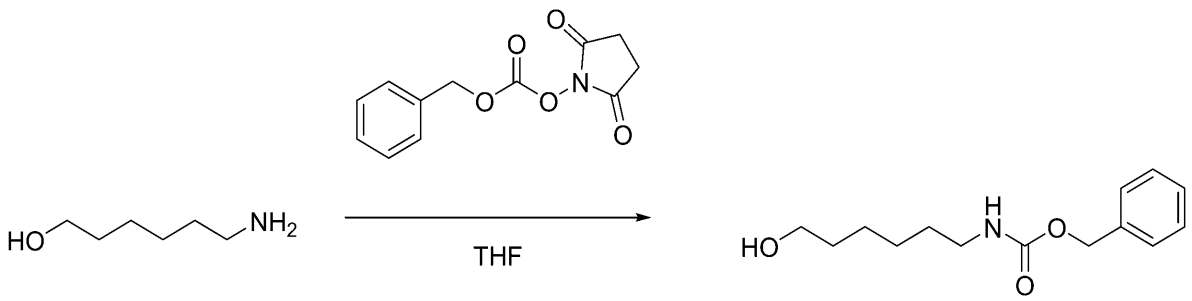


ＴＨＦ中の２－ヘキシルデカン酸エチル（１ｇ、３．５ｍｍｏｌ）を－７８℃でＬＤＡ（２．６ｍＬ、２Ｍ、５．２７３ｍｍｏｌ）の溶液に一滴ずつ加え、０．５時間撹拌した。ＴＨＦ（１５ｍＬ）中のＮ－フルオロベンゼンスルホンイミド（１．７ｇ、５．３ｍｍｏｌ）を一滴ずつ加え、反応物を室温まで温めながら１８時間撹拌した。反応物をＥｔＯＡｃで希釈し、NH_4Cl、水およびブラインで順次洗浄し、乾燥（$MgSO_4$）させ、真空にて濃縮し、自動フラッシュクロマトグラフィー（０～６％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製した。ＮＭＲは６０％の変換を示した。反応をもう一度繰り返して、２－フルオロ－２－ヘキシルデカン酸エチル（７７０ｍｇ、７２．４％）を得た。
【０５４４】
工程３．２－フルオロ－２－ヘキシルデカン酸の合成
【化５９】



２－フルオロ－２－ヘキシルデカン酸エチル（７７０ｍｇ、２．５ｍｍｏｌ）とＬｉＯＨ（１２５ｍｇ、５．２ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（１０ｍＬ）とH_2O（２ｍＬ）中にて室温で１５時間撹拌した。６ＭのＨＣｌ（０．８７ｍＬ）を加え、ＭｅＯＨを真空にて除去した。残留物をＤＣＭに溶解し、ブラインで洗浄し、乾燥（$MgSO_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮して２－フルオロ－２－ヘキシルデカン酸（５２０ｍｇ、７４．４％）を得た。
【０５４５】
調製実施例１１．５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンタン－１－アミンの合成によって例示されるアミノアルコールＴＨＰエーテルの合成

工程１．Ｎ－（５－ヒドロキシペンチル）カルバミン酸ベンジルの合成
【化６０】



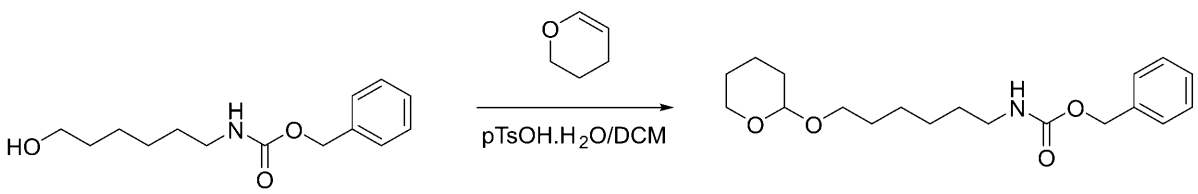
５－アミノペンタノール（２１．０ｇ、２０３ｍｍｏｌ）と炭酸ベンジル２，５－ジオキソピロリジン－１－イル（５０．７ｇ、２０３ｍｍｏｌ）をＴＨＦ中にて室温で１６時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃ（２５０ｍＬ）に溶解し、１ＭのＨＣｌおよび０．５ＭのＮａＯＨで洗浄し、乾燥（$MgSO_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮した。生成物が結晶化するまで、得られた油をヘキサン中で撹拌した。固形物を濾過によって回収してＮ－（５－ヒドロキシペンチル）カルバミン酸ベンジル（４４ｇ、９１．０％）を得た。

【０５４６】

工程２．Ｎ－［５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンチル］カルバミン酸ベンジルの合成

Ｎ－（５－ヒドロキシペンチル）カルバミン酸ベンジル（２０．０ｇ、８４ｍｍｏｌ）、２Ｈ－ピラン、３，４－ジヒドロ－（８．６ｇ、１０１）および$pTsOH-H_2O$（１．６ｇ、８．４ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（２７０ｍＬ）中にて室温で２時間撹拌した。

【化６１】

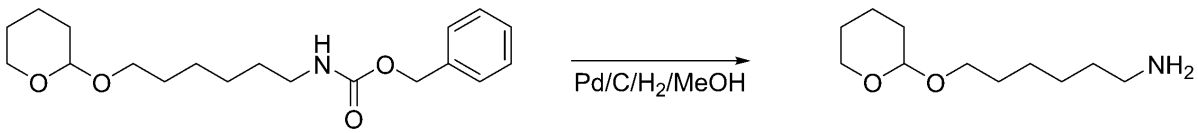


Ｎ－（５－ヒドロキシペンチル）カルバミン酸ベンジル（２０．０ｇ、８４ｍｍｏｌ）、２Ｈ－ピラン、３，４－ジヒドロ－（８．６ｇ、１０１）および$pTsOH-H_2O$（１．６ｇ、８．４ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（２７０ｍＬ）中にて室温で２時間撹拌した。反応物を$NaHCO_3$（飽和溶液）とブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（１０～５０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製してＮ－［５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンチル］カルバミン酸ベンジル（１９．５ｇ、７２．０％）を得た。

【０５４７】

工程３．５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンタン－１－アミンの合成

【化６２】



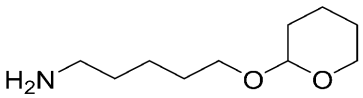
Ｎ－［５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンチル］カルバミン酸ベンジル（１９．０

ｇ、５９ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ中にてＰｄ／Ｃ上での接触水素化に室温で１６時間供した。セライトを介して反応物を濾過し、真空にて濃縮して５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンタン－１－アミン（１０．９ｇ、９８．５％）を得、それを精製することなく使用した。

【０５４８】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【化６３】



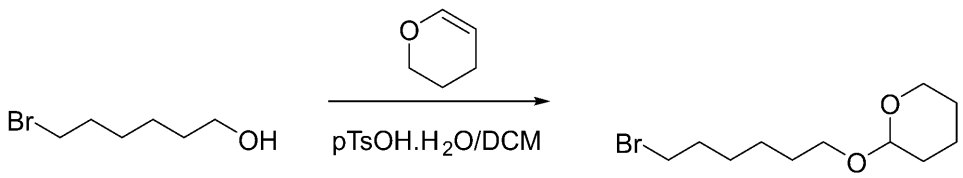
５－（(テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン－２－イル）オキシ）ペンタン－１－アミン

【０５４９】

調製実施例１２．１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－オンの合成によって例示されるケト－ＴＨＰエーテルの合成

工程１．２－［（６－ブロモヘキシル）オキシ］オキサンの合成

【化６４】

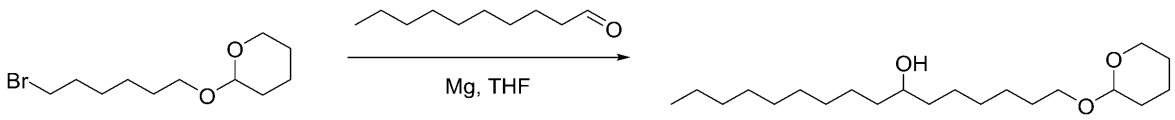


６－ブロモ－１－ヘキサノール（４０ｇ、２２０ｍｍｏｌ）、ジヒドロピラン（２３ｇ、２６５ｍｍｏｌ）およびｐＴｓＯＨ－Ｈ$_2$Ｏ（４．２ｇ、２２．０ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（５００ｍＬ）中にて室温で２時間撹拌した。反応物をＮａＨＣＯ$_3$（飽和溶液）とブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料をフラッシュクロマトグラフィー（０～２０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して２－［（６－ブロモヘキシル）オキシ］オキサン（４９ｇ、８３．６％）を得た。

【０５５０】

工程２．１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－オールの合成

【化６５】

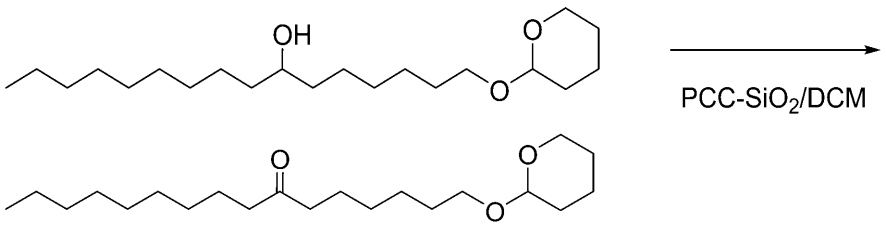


グリニャール試薬は、無水ＴＨＦ（１７５ｍＬ）中の２－［（６－ブロモヘキシル）オキシ］オキサン（４９ｇ、１８５ｍｍｏｌ）とマグネシウム（５．４ｇ、２２２ｍｍｏｌ）から３０分間還流して調製した。反応物を０℃に冷却し、無水ＴＨＦ（１４４ｍＬ）中のデカナール（２３ｇ、１４８ｍｍｏｌ）を１時間かけて一滴ずつ加えた。反応物を２時間撹拌し、室温まで温めた後、飽和ＮＨ$_4$Ｃｌ溶液で反応を止めた。有機物を分離し、水とブラインで洗浄し、乾燥（ＭｇＳＯ$_4$）させた。濾液を真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－オール（４７ｇ，９２．８％）を得た。

【０５５１】

工程３．１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－オンの合成

【化６６】



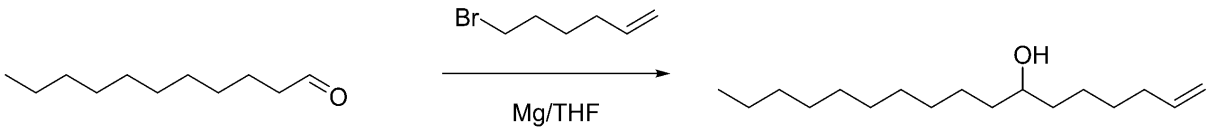
１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－オール（４７ｇ、１３７ｍｍｏｌ）およびＰＣＣ／ＳｉＯ$_2$（１：１）（１１８ｇ、２７４ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（２９４ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。シリカのパッドを介して混合物を濾過し、５０：５０　ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘで溶出した。濾液を真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－オン（３７．５ｇ、８０．３％）を得た。

【０５５２】

調製実施例１３．ヘプタデク－１－エン－７－オンの合成によって例示されるオキソ－アルケンの合成

工程１．ヘプタデク－１－エン－７－オールの合成

【化６７】

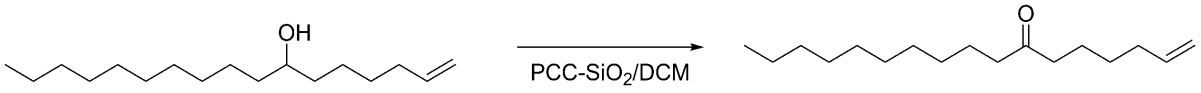


グリニャール試薬は、ＴＨＦ（２５０ｍＬ）中の６－ブロモヘクス－１－エン（３５ｇ、２１５ｍｍｏｌ）とマグネシウム（６．３ｇ、２５８ｍｍｏｌ）から調製した。最初の還流後、反応物を２時間撹拌し、次いで０℃に冷却し、ウンデカナール（２９ｇ、１７２ｍｍｏｌ）を一滴ずつ加え、反応物を室温で１６時間撹拌した。水（１００ｍＬ）で反応を止め、０℃に冷却し、６ＭのＨＣｌ（５０ｍＬ）を加えて残留マグネシウムを溶解した。溶液をEt_2O（２５０ｍＬ）で希釈し、有機物を分離し、ブラインで洗浄し、乾燥（$MgSO_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮してヘプタデク－１－エン－７－オール（４３ｇ、９８．４％）を得、それをさらに精製することなく使用した。

【０５５３】

工程２．ヘプタデク－１－エン－７－オンの合成

【化６８】

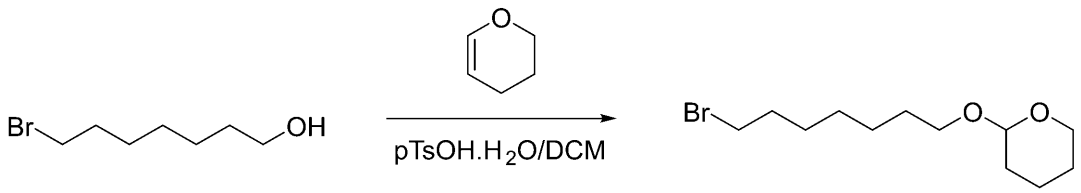


ヘプタデク－１－エン－７－オール（４３ｇ、１６９ｍｍｏｌ）とＰＣＣ／シリカ１：１ｗｔ（９１ｇ、２１１ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（３００ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。シリカを介して反応物を濾過し、ＤＣＭで溶出し、濾液を真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製してヘプタデク－１－エン－７－オン（３１ｇ、７２．７％）を得た。

【０５５４】

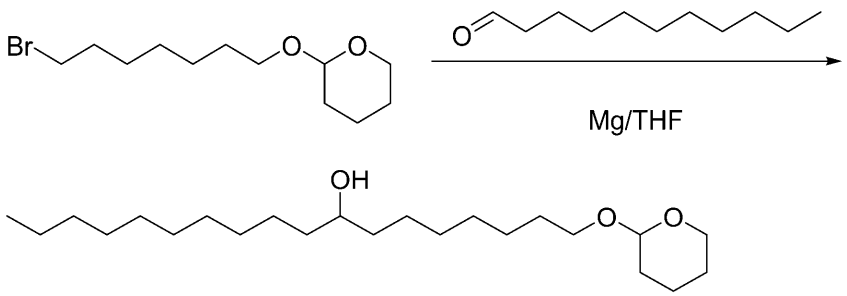
調製実施例１４．オキソ－カルボン酸の合成。８－オキソオクタデカン酸の合成によって例示される方法（ａ）

工程１．２－［（７－ブロモヘプチル）オキシ］オキサンの合成
【化６９】



７－ブロモヘプタン－１－オール（１０２ｇ、５２３ｍｍｏｌ）、ジヒドロピラン（５３ｇ、６２７ｍｍｏｌ）およびｐＴｓＯＨ－Ｈ$_2$Ｏ（１０ｇ、５２ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（１３７０ｍＬ）中にて２時間撹拌した。反応物をＮａＨＣＯ$_3$（飽和溶液）とブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を２５％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘでシリカのパッドに通し、合わせた有機物を真空にて濃縮して２－［（７－ブロモヘプチル）オキシ］オキサン（１３５ｇ、９２．５％）を得、それをさらに精製することなく使用した。

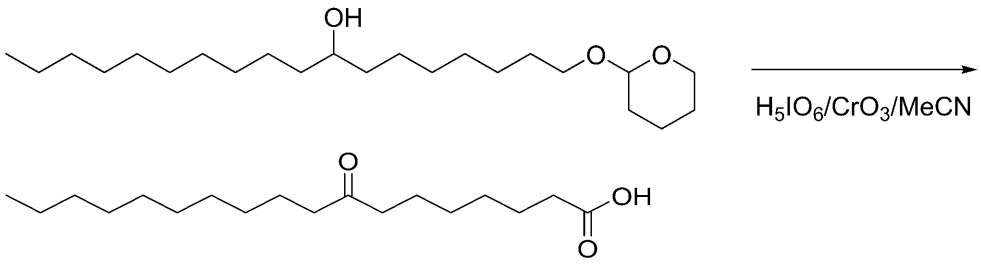
【０５５５】
工程２．１－（オキサン－２－イルオキシ）オクタデカン－８－オールの合成
【化７０】



グリニャール試薬は、無水ＴＨＦ（８２ｍＬ）中の２－［（７－ブロモヘプチル）オキシ］オキサン（１３５ｇ、４８３ｍｍｏｌ）とマグネシウム（１４．１ｇ、５８０ｍｍｏｌ）から調製した。臭化物を加えた後、反応物を還流にて３０分間撹拌した。反応物を０℃に冷却し、無水ＴＨＦ（４１２ｍＬ）中のウンデカナール（６６ｇ、３８７ｍｍｏｌ）を１時間かけて一滴ずつ加えた。反応物を１６時間撹拌し、室温に温めた後、Ｈ$_2$Ｏ（１００ｍＬ）、続いて６ＭのＨＣｌ（２００ｍＬ）で反応を止めた。反応物をＥｔＯＡｃで抽出し、Ｈ$_2$Ｏとブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～５０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して１－（オキサン－２－イルオキシ）オクタデカン－８－オール（６８ｇ，４７．０％）を得た。

【０５５６】
工程３．８－オキソオクタデカン酸の合成

【化７１】



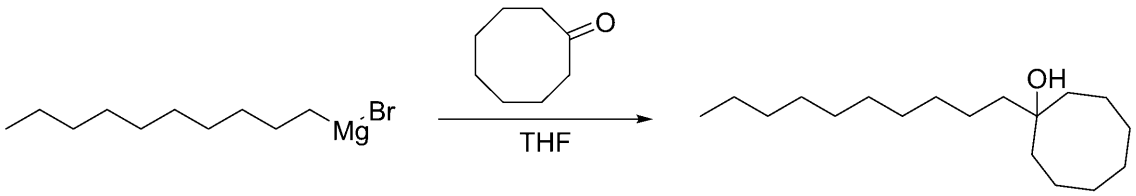
過ヨウ素酸（２３９ｇ、１００９ｍｍｏｌ）およびCrO_3（０．５ｇ、２．６ｍｏｌ％）をＭｅＣＮ（３Ｌ、０．７５％H_2Oｖ／ｖ）に室温で１６時間溶解した。反応温度を０～５℃に維持しながら、ＭｅＣＮ（１Ｌ、０．７５ｖ％水）中の１－（オキサン－２－イルオキシ）オクタデカン－８－オール（６８ｇ、１８３ｍｍｏｌ）を３０～６０分かけて加えた。反応物を１６時間撹拌し、室温まで温めた。Na_2HPO_4（２．７ＬH_2O中１６３ｇ）を加えて反応を止め、反応物をＥｔＯＡｃで抽出した。有機物をブライン、$NaHSO_3$水溶液（６８０ｍＬのH_2O中２９．９１ｇ）およびブラインで順次洗浄した。反応物を乾燥（$MgSO_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮した。残留固形物を最小量のＭｅＣＮでトリチュレーションして８－オキソオクタデカン酸（４０．９ｇ、７４．７％）を得た。

【０５５７】

調製実施例１５．オキソ－カルボン酸の合成。８－オキソオクタデカン酸の合成によって例示される方法（ｂ）

工程１．１－デシルシクロオクタン－１－オールの合成

【化７２】

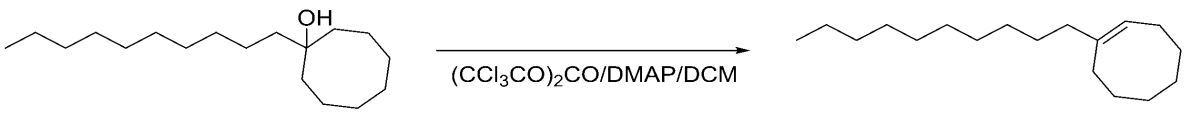


ブロモ（デシル）マグネシウム（２２．２ｇ、９０．４ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１５０ｍＬ）にて１０℃で撹拌した。ＴＨＦ（５０ｍＬ）中のシクロオクタノン（９．３ｇ、７２ｍｍｏｌ）を一滴ずつ加えた。添加が完了した後、反応物を０℃まで冷却し、水（１００ｍＬ）と６ＭのＨＣｌ（４００ｍＬ）で反応を止めた。有機物を分離し、ブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＥｔＯＡｃ－ヘキサン）によって精製して１－デシルシクロオクタン－１－オール（１４．２ｇ、７３．１％）を得た。

【０５５８】

工程２．（Ｚ）－１－デシルシクロオクト－１－エンの合成

【化７３】



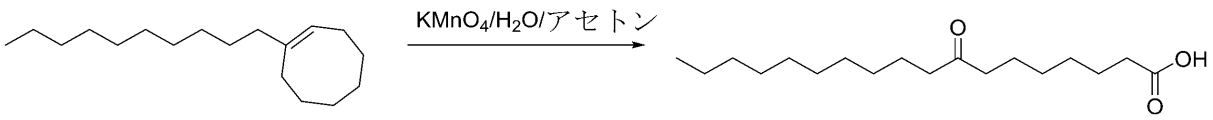
１－デシルシクロオクタン－１－オール（７．７１ｇ、２８．８）とＤＭＡＰ（７．０ｇ、５７．４ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（７７．１ｍＬ）中にて０℃で撹拌した。トリホスゲン（４．３ｇ、１４．４ｍｍｏｌ）のＤＣＭ（４０ｍＬ）溶液を一滴ずつ加えた。反応物を

３時間撹拌し、室温まで温めた後、２ＭのＨＣｌで反応を止めた。有機物を分離し、ブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ４）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（１００％ヘキサン）によって精製して（Ｚ）－１－デシルシクロオクト－１－エン（７．２ｇ、７６．５％）を得た。

【０５５９】

工程３．８－オキソオクタデカン酸の合成

【化７４】

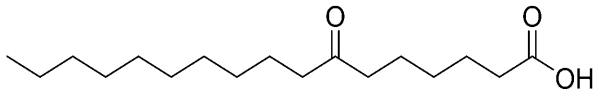


（１Ｚ）－１－デシルシクロオクト－１－エン（５．５ｇ、２２ｍｍｏｌ）をアセトン（５５ｍＬ）およびＨ２Ｏ（５．５ｍＬ）中にて０℃で撹拌した。温度を０℃に保ちながら、ＫＭｎＯ４（１７．４ｇ、１１０ｍｍｏｌ）を４時間かけて少しずつ加えた。反応物を１８時間撹拌し、室温まで温めた後、亜硫酸ナトリウムと６ＭのＨＣｌを交互に加えて反応を止めた。反応物を１ＭのＨＣｌとＥｔＯＡｃの間で分配し、合わせた有機物をブラインで洗浄し、乾燥（ＭｇＳＯ４）させ、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（５～３０％ＥｔＯＡｃ－ヘキサン）によって精製して８－オキソオクタデカン酸（３．７ｇ、５６．０％）を得た。

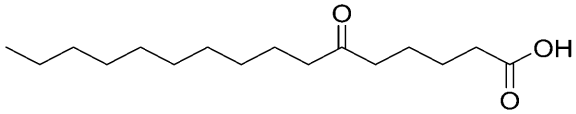
【０５６０】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

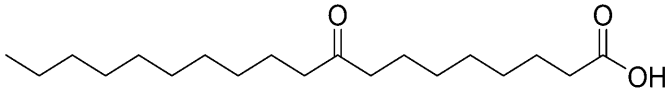
【化７５】



７－オキソヘプタデカン酸



６－オキソヘキサデカン酸

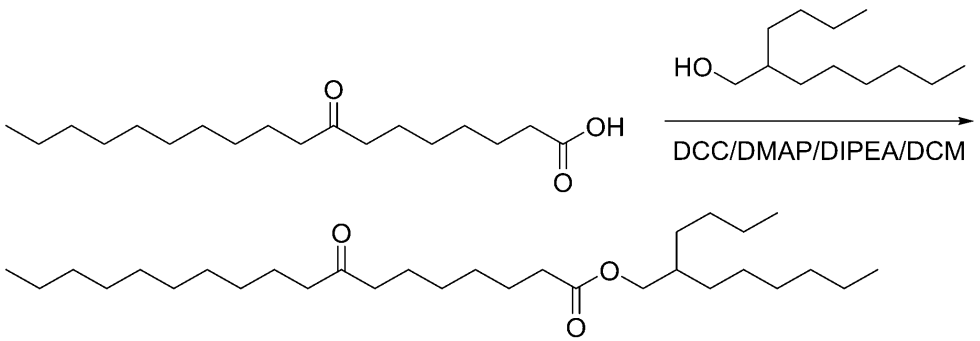


９－オキソノナデカン酸

【０５６１】

調製実施例１６．８－オキソオクタデカン酸２－ブチルオクチルの合成によって例示されるオキソエステルの合成

【化７６】

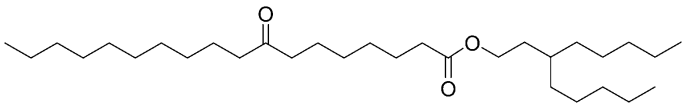


８－オキソオクタデカン酸（１ｇ、３．４ｍｍｏｌ）、ブチルオクタノール（６８７ｍｇ、３．７ｍｍｏｌ）、ＤＣＣ（１．４ｇ、６．７ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（２０ｍｇ、０．１７ｍｍｏｌ）をＤＣＭ中にて室温で１．５時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をヘキサンに懸濁して濾過した。濾液を真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～２５％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して８－オキソオクタデカン酸２－ブチルオクチル（１．１ｇ、６８．９％）を得た。

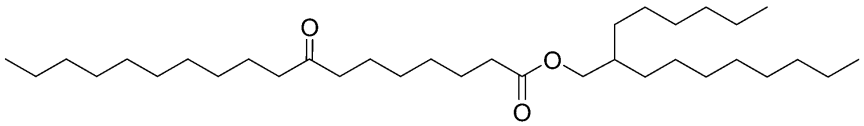
【０５６２】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

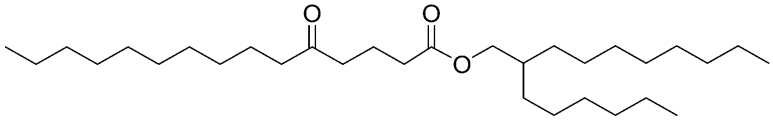
【化７７】



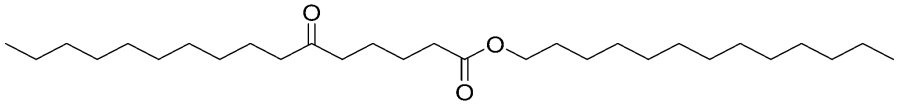
８－オキソオクタデカン酸３－ペンチルオクチル



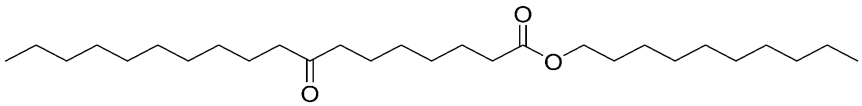
８－オキソオクタデカン酸２－ヘキシルデシル



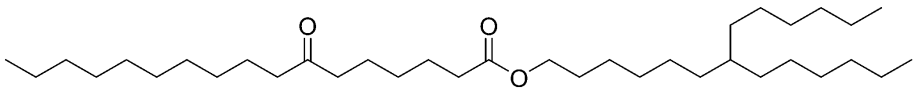
５－オキソペンタデカン酸２－ヘキシルデシル



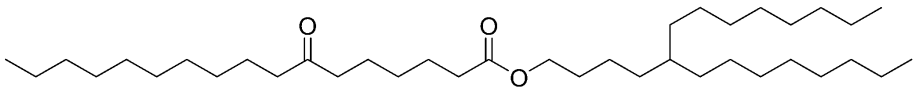
６－オキソヘキサデカン酸トリデシル



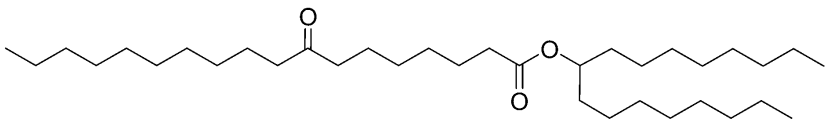
８－オキソオクタデカン酸デシル



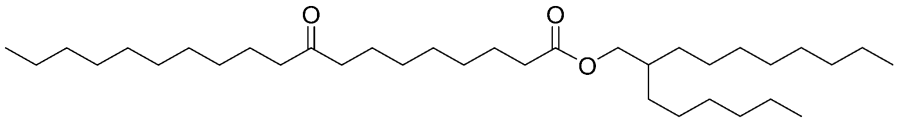
７－オキソヘプタデカン酸７－ヘキシルトリデシル



７－オキソヘプタデカン酸５－オクチルトリデシル

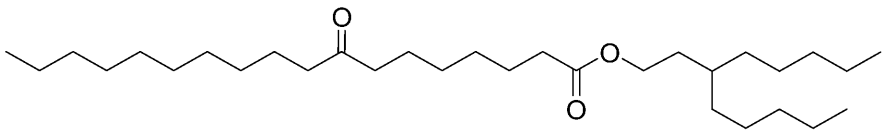


８－オキソオクタデカン酸ヘプタデカン－９－イル

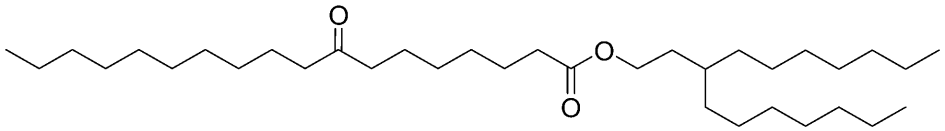


９－オキソノナデカン酸２－ヘキシルデシル

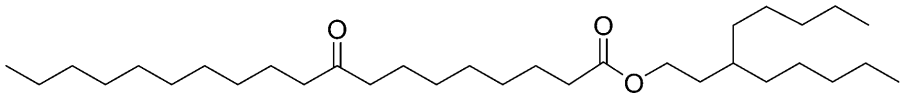
【化７８】



８－オキソオクタデカン酸３－ペンチルオクチル



８－オキソオクタデカン酸３－ヘプチルデシル

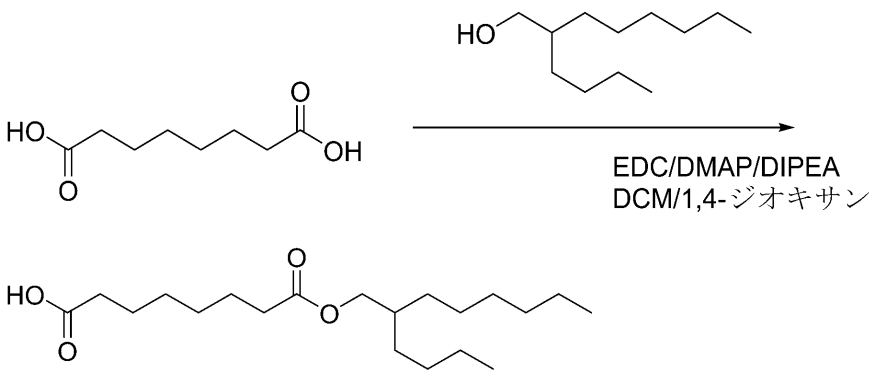


９－オキソノナデカン酸３－ペンチルオクチル

【０５６３】

調製実施例１７．８－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－８－オキソオクタン酸の合成

【化７９】

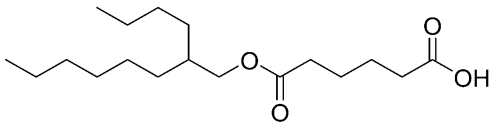


スベリン酸（５ｇ、２８．７ｍｍｏｌ）、ブチルオクタノール（５．４ｇ、２８．７ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ（５．８ｇ、３０．１ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（１０ｍＬ、５７．４ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（触媒量）をＤＣＭ（１０ｍＬ）および１，４－ジオキサン（１８０ｍＬ）とともに室温で１８時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＤＣＭに溶解し、$NaHCO_3$（飽和溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥（$MgSO_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（５～３０％ＥｔＯＡｃ－ヘキサン）によって精製して８－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－８－オキソオクタン酸（４．４ｇ、４５．０％）を得た。

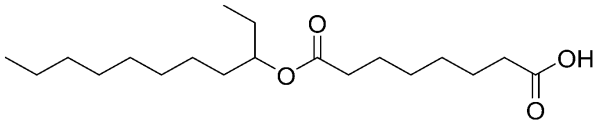
【０５６４】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

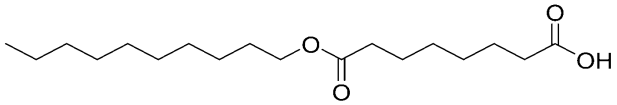
【化８０】



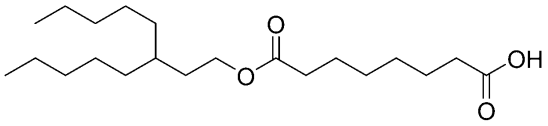
６－（（２－ブチルオクチル）オキシ）－６－オキソヘキサン酸



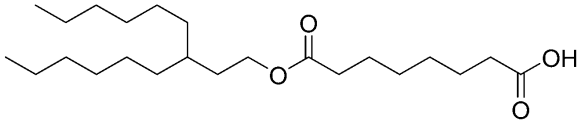
８－オキソ－８－（ウンデカン－３－イルオキシ）オクタン酸



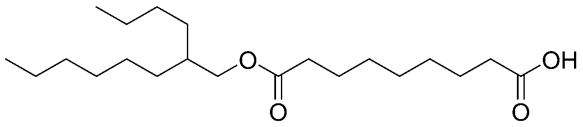
８－（デシルオキシ）－８－オキソオクタン酸



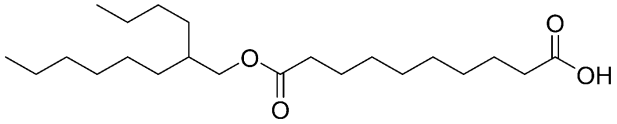
８－オキソ－８－（（３－ペンチルオクチル）オキシ）オクタン酸



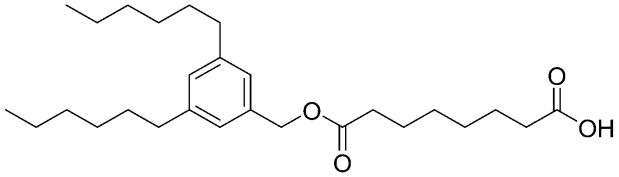
８－（（３－ヘキシルノニル）オキシ）－８－オキソオクタン酸



９－（（２－ブチルオクチル）オキシ）－９－オキソノナン酸



１０－（（２－ブチルオクチル）オキシ）－１０－オキソデカン酸



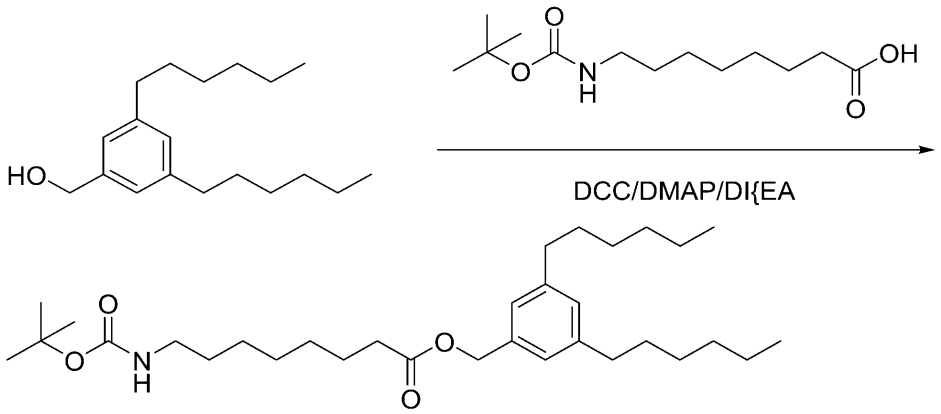
８－（（３，５－ジヘキシルベンジル）オキシ）－８－オキソオクタン酸

【０５６５】

調製実施例１８．８－アミノオクタン酸３，５－ジヘキシルベンジルの合成

工程１．８－［（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ］オクタン酸（３，５－ジヘキシルフェニル）メチルの合成

【化８１】

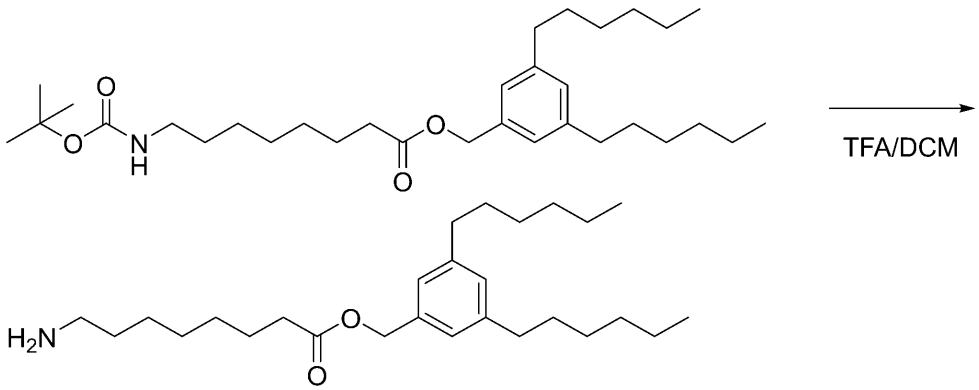


（３，５－ジヘキシルフェニル）メタノール（３．０ｇ、１０．９ｍｍｏｌ）、８－［（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－アミノ］オクタン酸（２．８ｇ、１０．９ｍｍｏｌ）、ＤＣＣ（２．５ｇ、１１．９ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（３．８ｍＬ、２１．７ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（１３３ｍｇ、１．１ｍｍｏｌ）をＤＣＭ中にて室温で１６時間撹拌した。得られた沈殿物を濾過によって除去し、濾液を真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（１０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して８－［（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ］オクタン酸（３，５－ジヘキシルフェニル）メチル（１．８１ｇ、３２．２％）を得た。

【０５６６】

工程２．８－アミノオクタン酸（３，５－ジヘキシルフェニル）メチルの合成

【化８２】



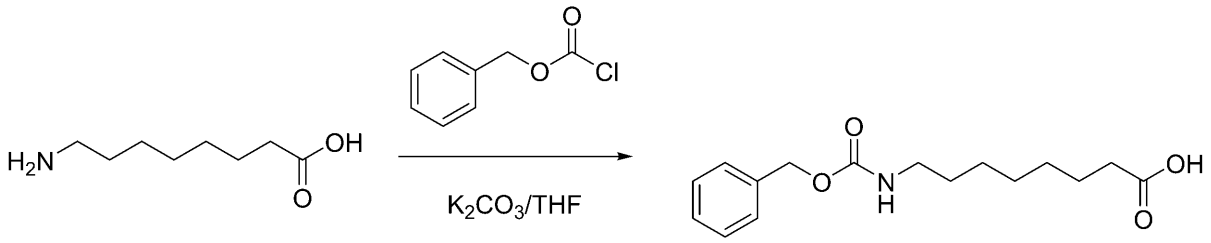
８－［（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ］オクタン酸（３，５－ジヘキシルフェニル）メチル（１．８ｇ、３．５ｍｍｏｌ）をＤＣＭ中２０％ＴＦＡ溶液にて室温で１時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＤＣＭに溶解し、１ＭのＮａＯＨで遊離塩基に変換した。有機物を分離し、乾燥（$MgSO_4$）させ、真空にて濃縮して８－アミノオクタン酸（３，５－ジヘキシルフェニル）メチル（１．３５ｇ、９３．０％）を得、それを精製することなく使用した。

【０５６７】

調製実施例１９．８－アミノオクタン酸２－ヘキシルデシルの合成

工程１．８－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］アミノ｝オクタン酸の合成

【化８３】

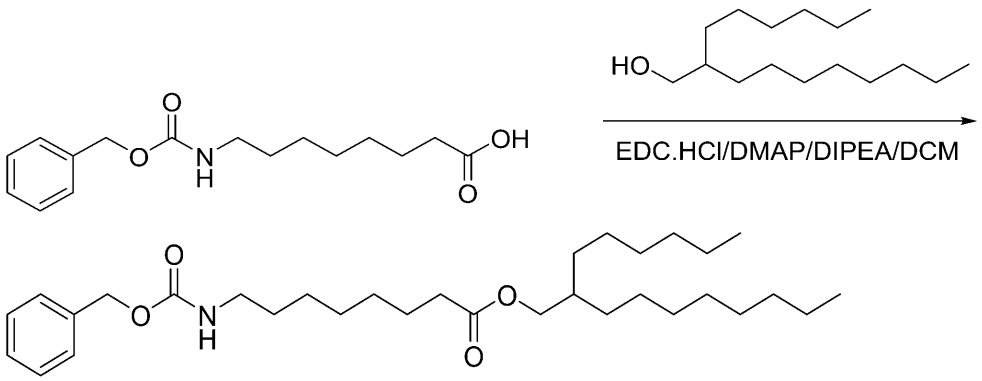


８－アミノオクタン酸（５ｇ、３１．４ｍｍｏｌ）、K_2CO_3（８．７ｇ、６３ｍｍｏｌ）およびクロロギ酸ベンジル（７．０ｍＬ、４７．１ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１５０ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。反応物を酸性化し（６ＭのＨＣｌ）、真空にて濃縮した。残留物をＤＣＭ（１００ｍＬ）とH_2O水（１００ｍＬ）の間で分配し、水性物をＤＣＭで抽出した。合わせた有機物を乾燥（$MgSO_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮して８－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］アミノ｝オクタン酸（８．４ｇ、９１．２％）を得、それを精製することなく使用した。

【０５６８】

工程２．８－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］アミノ｝オクタン酸２－ヘキシルデシルの合成

【化８４】

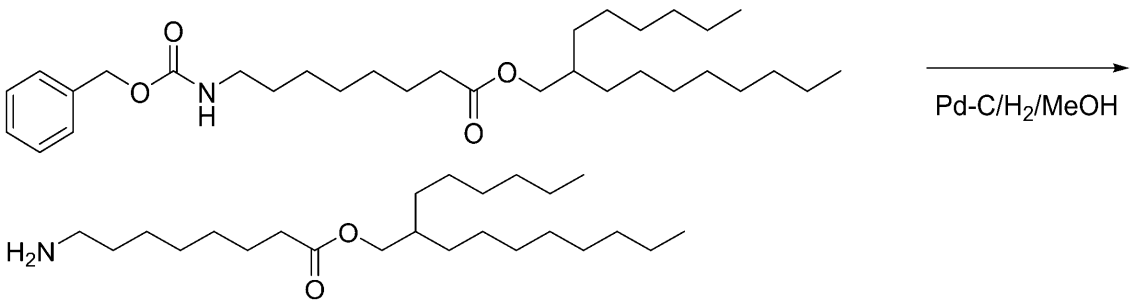


８－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］アミノ｝オクタン酸（１．０５ｇ、３．６ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ．ＨＣｌ（１．４ｇ、７．２ｍｍｏｌ）、ヘキシルデカノール（１．０ｇ、４．０ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（２２ｍｇ、０．１８ｍｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（１．９ｍＬ、１０．７ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（２５ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。反応物を真空で濃縮し、ＥｔＯＡｃ（１００ｍＬ）に溶解し、飽和$NaHCO_3$およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～５０％ＥｔＯＡｃ／ヘキサン）によって精製して８－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］アミノ｝オクタン酸２－ヘキシルデシル（１．４５ｇ、６４．５％）を得た。

【０５６９】

工程３．８－アミノオクタン酸２－ヘキシルデシルの合成

【化８５】

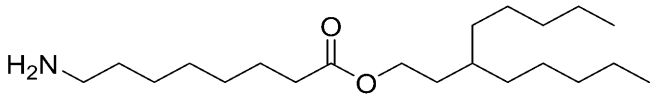


８－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］アミノ｝オクタン酸２－ヘキシルデシル（１ｇ、１．９ｍｍｏｌ）を、ＭｅＯＨ（２５ｍＬ）中にて室温で１６時間、炭素（１００ｍｇ）上１０％パラジウムでの接触水素化に供した。セライトを介して反応物を濾過し、真空にて濃縮して８－アミノオクタン酸２－ヘキシルデシル（０．７１ｇ、９５．８％）を得た。

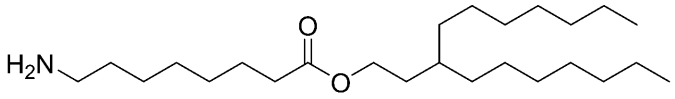
【０５７０】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

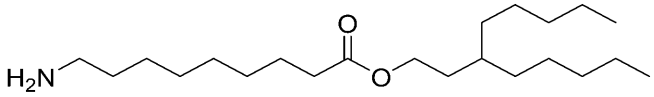
【化８６】



８－アミノオクタン酸３－ペンチルオクチル



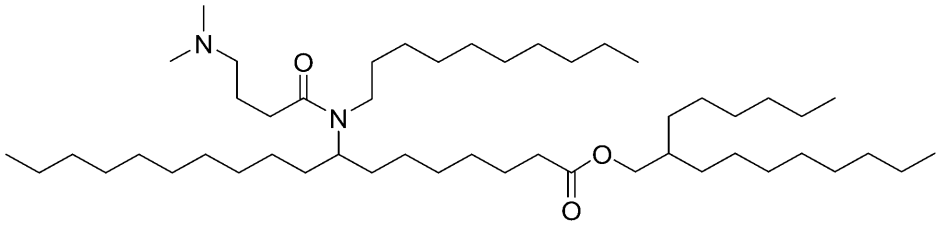
８－アミノオクタン酸３－ヘプチルデシル



９－アミノノナン酸３－ペンチルオクチル

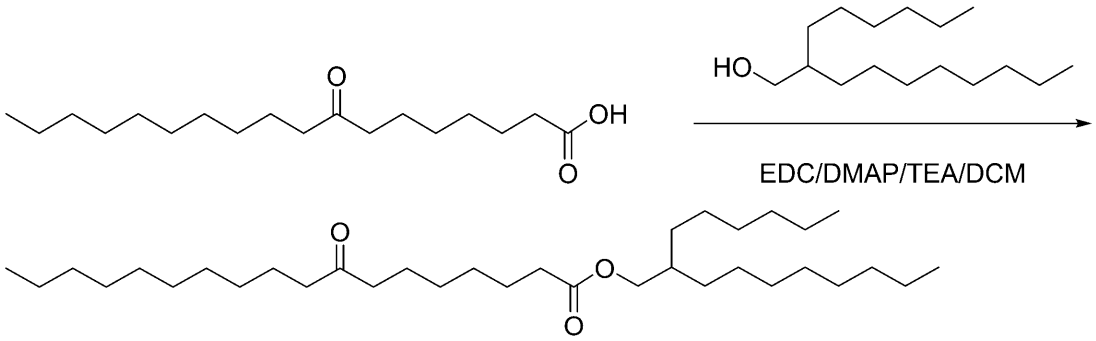
実施例１．８－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－オクタデカン酸２－ヘキシルデシル（１）の合成

【化８７】



(**1**)

工程１．８－オキソオクタデカン酸２－ヘキシルデシルの合成

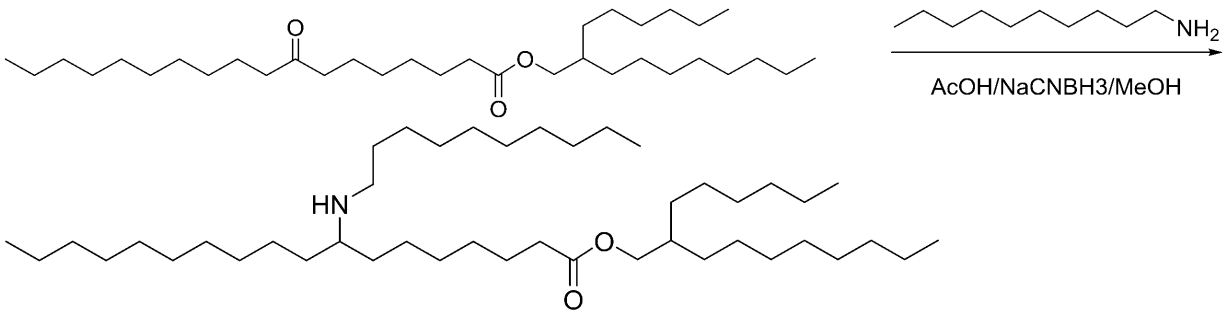


８－オキソオクタデカン酸（１ｇ、３．４ｍｍｏｌ）、ヘキシルデカノール（８９４ｍｇ、３．７ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ（１．２９ｇ、６．７ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（１．８ｍＬ、１０．１ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（触媒量）をＤＣＭ（３０ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。反応物をＤＣＭで希釈し、$NaHCO_3$（飽和）およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＥｔＯＡｃ－ヘキサン）によって精製して８－オキソオクタデカン酸２－ヘキシルデシル（１．３３ｇ、７５．９％）を得た。

【０５７１】

工程２．８－（デシルアミノ）オクタデセン酸２－ヘキシルデシルの合成

【化８８】



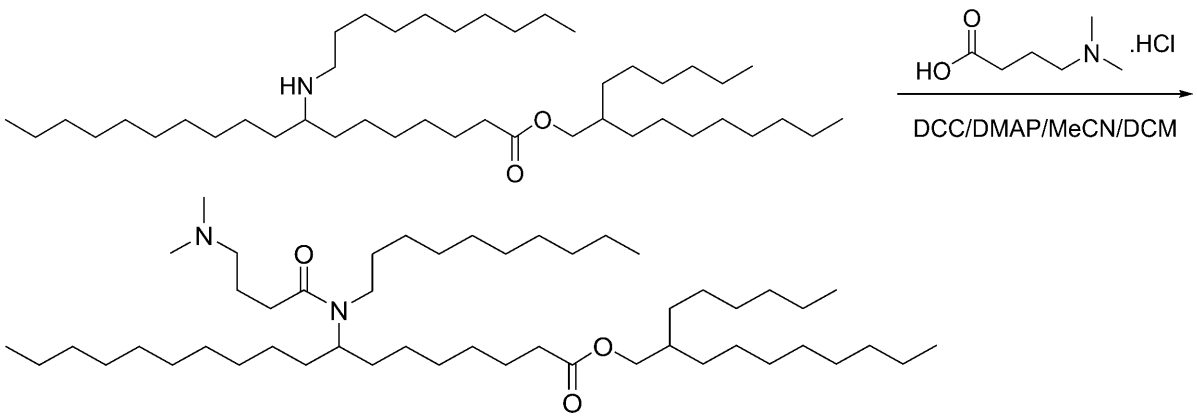
８－オキソオクタデカン酸２－ヘキシルデシル（９３３ｍｇ、１．８ｍｍｏｌ）、Ｎ－デシルアミン（０．３ｇ、１．９ｍｍｏｌ）、$NaCNBH_3$（３４０ｍｇ、５．４ｍｍｏｌ）およびＡｃＯＨ（０．２ｇ、３．６ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（１０ｍｌ）中にて５０℃で１８時間加熱した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＤＣＭに溶解し、$NaHCO_3$（飽和）およびブラインで洗浄し、乾燥（$MgSO_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～５％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して８－（デシルアミノ）オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（４４７ｍｇ、３７．７％）を得た。

【０５７２】

工程３．８－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－オクタデセン酸２

－ヘキシルデシル（１）の合成

【化８９】



(1)

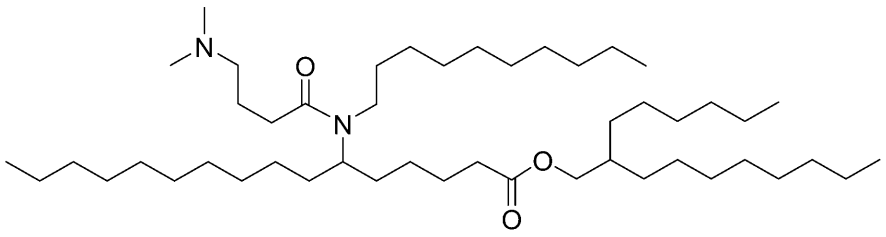
４－ジメチルアミノブタン酸（ＨＣｌ）（０．３８ｇ、２．２ｍｍｏｌ）、ＤＣＣ（０．５１ｇ、２．５ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（０．４１ｇ、３．４ｍｍｏｌ）をＭｅＣＮ（６ｍＬ）中にて室温で３時間撹拌した。８－（デシルアミノ）オクタデカン酸２－ヘキシルデシル（７４４ｍｇ、１．１ｍｍｏｌ）のＤＣＭ（８ｍＬ）溶液を加え、反応物を室温で１８時間撹拌した。反応物を濃縮し、ヘキサン：ＥｔＯＡｃ：ＴＥＡ（７５：２５：１）に分散させ、セライトを介して濾過し、濾液を真空にて濃縮した。残留物を自動クロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して８－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］オクタデカン酸２－ヘキシルデシル（１）（２３０ｍｇ、２６．４％）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．０１－３．９２（ｍ，２Ｈ），３．６３（ｓ，１Ｈ），３．１０－２．９７（ｍ，２Ｈ），２．３１（ｈ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，６Ｈ），２．２２（ｓ，６Ｈ），１．８２（ｑ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，２Ｈ），１．４８（ｄ，Ｊ＝３６．９Ｈｚ，１０Ｈ），１．２７（ｓ，５８Ｈ），０．８８（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５７３】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【０５７４】

【化９０】

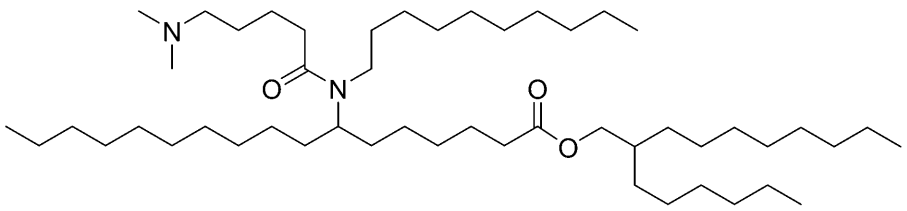


(2)

６－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）ヘキサデカン酸２－ヘキシルデシル（２）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ３．９５（ｄ，Ｊ＝５．７Ｈｚ，２Ｈ），３．６５（ｓ，１Ｈ），３．０９－２．９８（ｍ，２Ｈ），２．３１（ｄｔ，Ｊ＝１５．３，７．４Ｈｚ，６Ｈ），２．２１（ｓ，６Ｈ），１．８２（ｑ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，２Ｈ），１．４８（ｄ，Ｊ＝２９．４Ｈｚ，１０Ｈ），１．２７（ｓ，５４Ｈ），０．８８（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５７５】

【化９１】

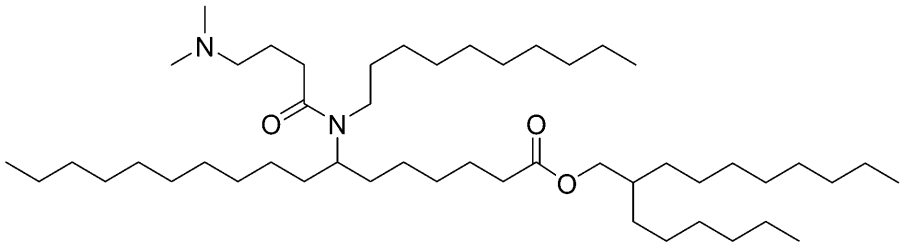


(3)

７－（Ｎ－デシル－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド）ヘプタデカン酸２－ヘキシルデシル（３）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ３．９８（ｄｄ，Ｊ＝５．８，３．９Ｈｚ，２Ｈ），３．７０－３．５７（ｍ，１Ｈ），３．０４（ｓ，２Ｈ），２．３１（ｄｔｔ，Ｊ＝７．５，５．８，３．０Ｈｚ，６Ｈ），２．２４（ｓ，６Ｈ），１．７５－１．４０（ｍ，１７Ｈ），１．２８（ｐ，Ｊ＝５．４Ｈｚ，５５Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．８，２．１Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５７６】

【化９２】

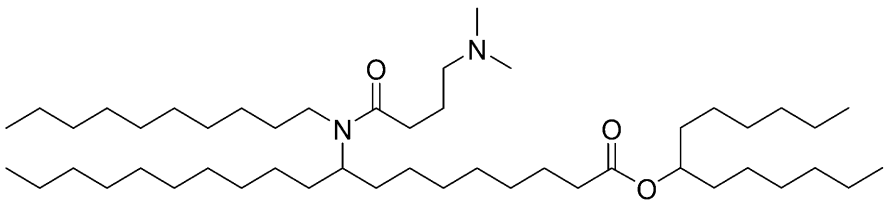


(4)

７－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）ヘプタデカン酸２－ヘキシルデシル（４）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ３．９８（ｄｄ，Ｊ＝５．８，４．１Ｈｚ，２Ｈ），３．７２－３．６０（ｍ，１Ｈ），３．０６（ｑ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，２Ｈ），２．３９－２．２７（ｍ，６Ｈ），２．２４（ｄ，Ｊ＝１．１Ｈｚ，６Ｈ），１．８５（ｈ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），１．７２－１．４０（ｍ，１３Ｈ），１．２９（ｄｑ，Ｊ＝１０．３，６．５Ｈｚ，５５Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．８，２．３Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５７７】

【化９３】



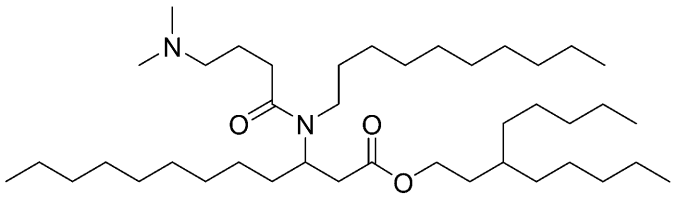
(5)

９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）ノナデカン酸トリデカン－７－イル（５）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．８８（ｑ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，１Ｈ），３．６６（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，１Ｈ），３．０６（ｑ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，２Ｈ），２．３９－２．２５（ｍ，６Ｈ），２．２４（ｓ，６Ｈ），１．８４（ｈ，Ｊ

＝７．６Ｈｚ，２Ｈ），１．７２－１．４０（ｍ，１７Ｈ），１．２９（ｄ，Ｊ＝８．９Ｈｚ，５７Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５７８】

【化９４】

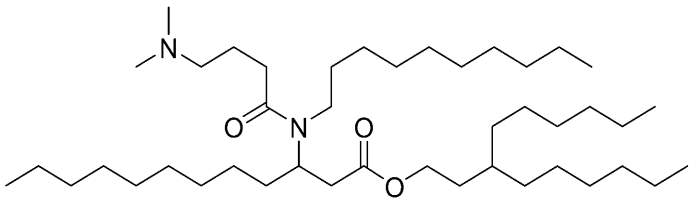


(6)

３－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）ドデカン酸３－ペンチルオクチル（６）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．３７－４．１６（ｍ，１Ｈ），４．０８（ｑ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），３．１７（ｔｔ，Ｊ＝８．４，４．９Ｈｚ，１Ｈ），２．８３－２．３５（ｍ，３Ｈ），２．３２（ｑｄ，Ｊ＝８．０，１．８Ｈｚ，３Ｈ），２．２４（ｍ，６Ｈ），１．８３（ｑｄ，Ｊ＝７．６，５．３Ｈｚ，２Ｈ），１．５８（ｑ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，４Ｈ），１．５０（ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ，２Ｈ），１．２９（ｄｄ，Ｊ＝１３．２，５．６Ｈｚ。

【０５７９】

【化９５】

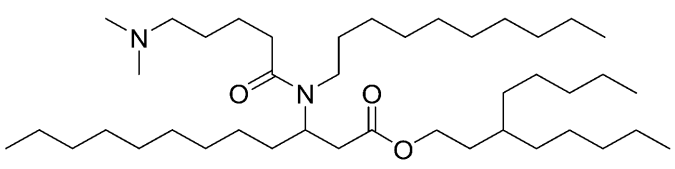


(7)

３－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）ドデカン酸３－ヘキシルノニル（７）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．３６－４．１９（ｍ，１Ｈ），４．０８（ｑ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ），３．１７（ｔｔ，Ｊ＝８．１，４．７Ｈｚ，２Ｈ），２．７７－２．３６（ｍ，４Ｈ），２．３２（ｑｄ，Ｊ＝７．７，２．２Ｈｚ，３Ｈ），２．２４（ｍ，６Ｈ），１．８３（ｑｄ，Ｊ＝７．６，５．１Ｈｚ，２Ｈ），１．７６（ｓ，１Ｈ），１．５５（ｄｈ，Ｊ＝２４．３，６．８Ｈｚ，５Ｈ），１．３７－１．１８（ｍ，４７Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５８０】

【化９６】



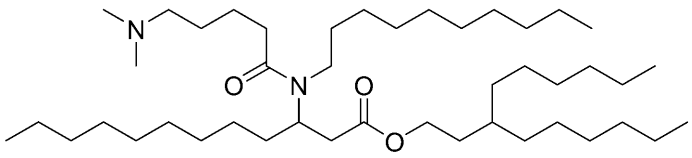
(8)

３－（Ｎ－デシル－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド）ドデカン酸３－ペンチルオクチル（８）。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．３５－４．１５（ｍ，１

Ｈ），４．０８（ｑ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），３．２３－３．０９（ｍ，１Ｈ），３．０６－２．９１（ｍ，１Ｈ），２．８０－２．３３（ｍ，３Ｈ），２．２９（ｄｄｄ，Ｊ＝７．７，６．１，３．９Ｈｚ，３Ｈ），２．２３（ｄ，Ｊ＝１．２Ｈｚ，６Ｈ），１．６６（ｐ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，３Ｈ），１．６１－１．４５（ｍ，７Ｈ），１．３７－１．１４（ｍ，４４Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．９，２．７Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５８１】

【化９７】

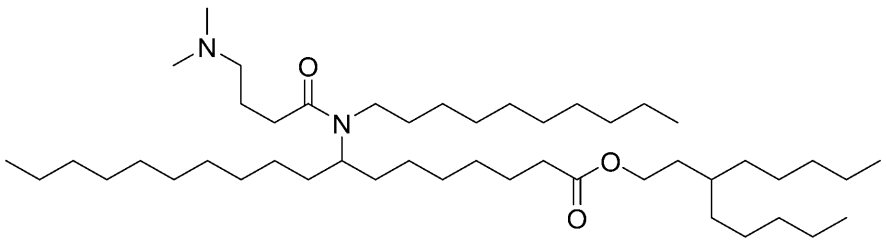


(9)

３－（Ｎ－デシル－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド）ドデカン酸３－ヘキシルノニル（９）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．２６（ｓ，１Ｈ），４．０８（ｑ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），３．２１－３．０８（ｍ，１Ｈ），２．７８－２．３３（ｍ，３Ｈ），２．２９（ｄｄｄ，Ｊ＝７．５，６．１，３．７Ｈｚ，３Ｈ），２．２３（ｄ，Ｊ＝１．２Ｈｚ，６Ｈ），１．６７（ｐ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，３Ｈ），１．６１－１．４５（ｍ，７Ｈ），１．２８（ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ，４９Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．９，２．５Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５８２】

【化９８】

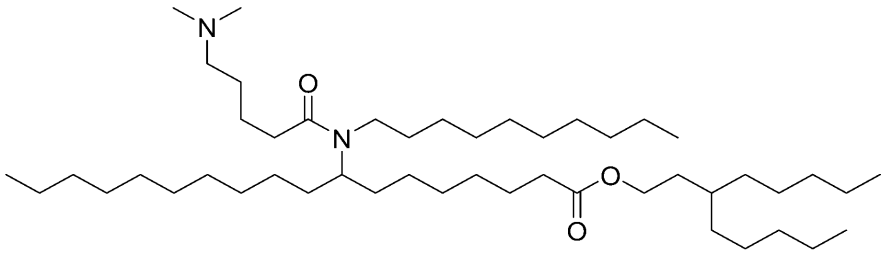


(10)

８－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）オクタデセン酸３－ペンチルオクチル（１０）^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．１０（ｔｄ，Ｊ＝７．１，２．８Ｈｚ，２Ｈ），３．０５（ｔ，Ｊ＝８．３Ｈｚ，２Ｈ），２．４０（ｄｄ，Ｊ＝２０．２，１１．９Ｈｚ，６Ｈ），２．２９（ｔｄ，Ｊ＝７．６，４．９Ｈｚ，３Ｈ），１．６５－１．５４（ｍ，６Ｈ），１．４４（ｑ，Ｊ＝６．２Ｈｚ，５Ｈ），１．２９（ｄ，Ｊ＝１０．３Ｈｚ，５２Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．９，２．７Ｈｚ，１２Ｈ），０．０９（ｓ，２Ｈ）。

【０５８３】

【化９９】

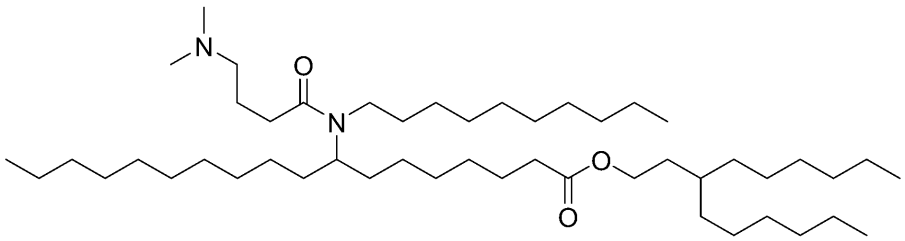


(11)

８－（Ｎ－デシル－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド）オクタデセン酸３－ペンチルオクチル（１１）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．１０（ｔｄ，Ｊ＝７．１，２．８Ｈｚ，２Ｈ），３．０４（ｔ，Ｊ＝８．３Ｈｚ，２Ｈ），２．３７（ｓ，３Ｈ），２．３６－２．２６（ｍ，６Ｈ），１．６４－１．５５（ｍ，６Ｈ），１．５３（ｓ，２Ｈ），１．４５（ｓ，５Ｈ），１．２９（ｄ，Ｊ＝１０．２Ｈｚ，４８Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．９，２．９Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５８４】

【化１００】

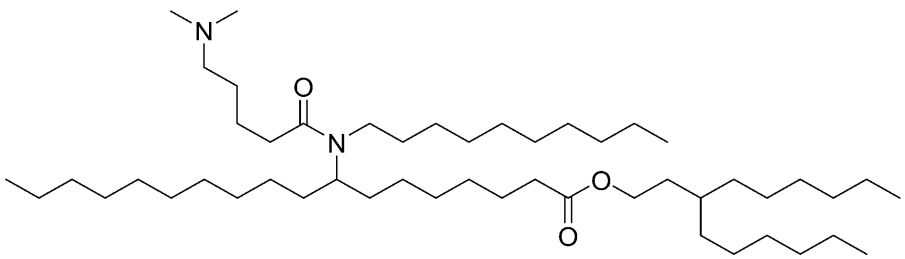


(12)

８－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）オクタデセン酸３－ヘキシルノニル（１２）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．１０（ｔｄ，Ｊ＝７．１，３．０Ｈｚ，２Ｈ），３．０６（ｑ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，２Ｈ），２．４７（ｓ，１Ｈ），２．４２－２．３４（ｍ，６Ｈ），２．２９（ｔｄ，Ｊ＝７．６，５．１Ｈｚ，４Ｈ），１．９６－１．８８（ｍ，２Ｈ），１．６６－１．５１（ｍ，７Ｈ），１．４４（ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，５Ｈ），１．２９（ｄ，Ｊ＝９．５Ｈｚ，５６Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．９，２．４Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５８５】

【化１０１】



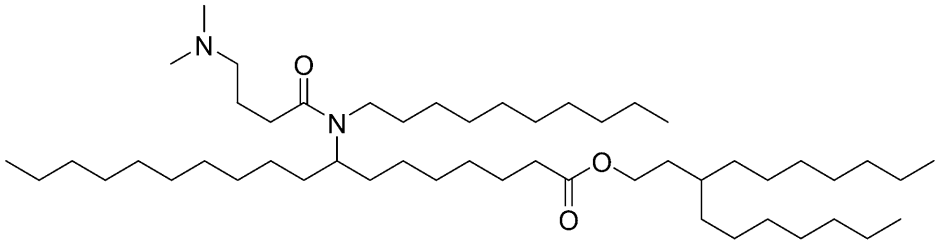
(13)

８－（Ｎ－デシル－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド）オクタデセン酸３－ヘキシルノニル（１３）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．１０（ｔｄ，Ｊ＝

７．１，２．７Ｈｚ，２Ｈ），３．０８－２．９９（ｍ，２Ｈ），２．４７（ｓ，２Ｈ），２．３４（ｄ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，６Ｈ），２．２９（ｔｄ，Ｊ＝７．５，５．６Ｈｚ，３Ｈ），１．７５－１．５４（ｍ，１０Ｈ），１．４５（ｓ，５Ｈ），１．２９（ｄ，Ｊ＝９．９Ｈｚ，５６Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．８，２．３Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５８６】

【化１０２】

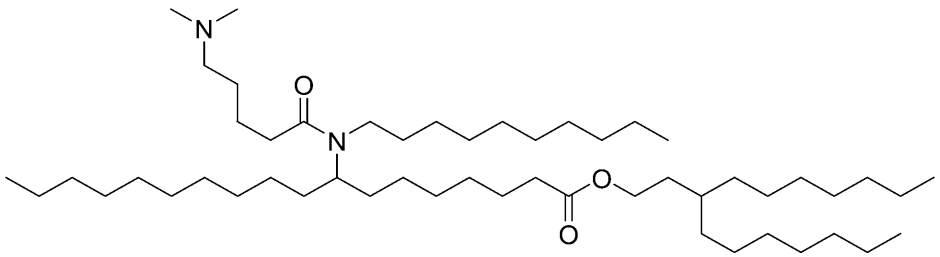


(14)

８－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）オクタデセン酸３－ヘプチルデシル（１４）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．０９（ｔｄ，Ｊ＝７．１，２．９Ｈｚ，２Ｈ），３．０６（ｑ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，２Ｈ），２．６２（ｓ，２Ｈ），２．４０（ｄｔ，Ｊ＝９．５，７．０Ｈｚ，６Ｈ），２．２９（ｔｄ，Ｊ＝７．５，５．０Ｈｚ，２Ｈ），１．９８（ｓ，２Ｈ），１．５９（ｔｑ，Ｊ＝１６．８，８．３Ｈｚ，６Ｈ），１．４４（ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，５Ｈ），１．２９（ｄ，Ｊ＝９．８Ｈｚ，６１Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．８，２．１Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５８７】

【化１０３】

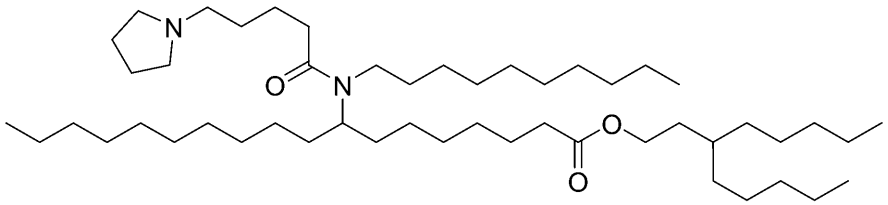


(15)

８－（Ｎ－デシル－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド）オクタデセン酸３－ヘプチルデシル（１５）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．０９（ｔｄ，Ｊ＝７．１，２．６Ｈｚ，２Ｈ），３．０４（ｑ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），２．６７（ｓ，２Ｈ），２．５３（ｓ，６Ｈ），２．４１－２．２４（ｍ，４Ｈ），１．７２（ｓ，４Ｈ），１．６０（ｄｑ，Ｊ＝１３．８，７．０Ｈｚ，７Ｈ），１．４９－１．３８（ｍ，５Ｈ），１．２９（ｄ，Ｊ＝９．３Ｈｚ，５９Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．９，２．２Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５８８】

【化１０４】

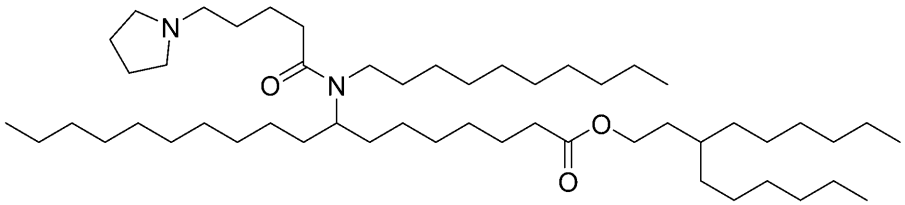


(89)

８－（Ｎ－デシル－５－（ピロリジン－１－イル）ペンタンアミド）オクタデカン酸３－ペンチルオクチル（８９）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．１０（ｔｄ，Ｊ＝７．１，３．１Ｈｚ，２Ｈ），３．０４（ｄｄ，Ｊ＝１１．３，７．０Ｈｚ，２Ｈ），２．５４－２．４２（ｍ，６Ｈ），２．３０（ｄｄｄ，Ｊ＝１５．２，７．７，５．３Ｈｚ，４Ｈ），１．８３－１．７５（ｍ，４Ｈ），１．７０（ｄｑ，Ｊ＝１６．０，７．７Ｈｚ，３Ｈ），１．６４－１．５０（ｍ，１１Ｈ），１．４９－１．４１（ｍ，５Ｈ），１．２９（ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ，５３Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．９，２．８Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５８９】

【化１０５】

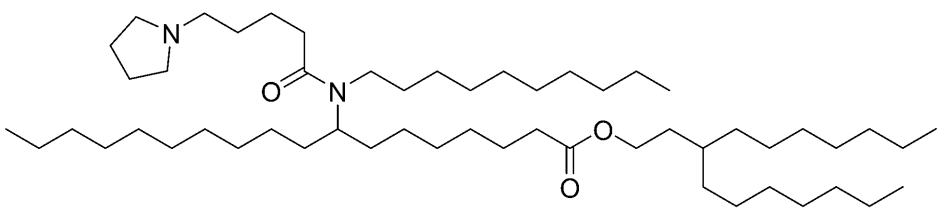


(90)

８－（Ｎ－デシル－５－（ピロリジン－１－イル）ペンタンアミド）オクタデカン酸３－ヘキシルノニル（９０）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．１０（ｔｄ，Ｊ＝７．１，３．１Ｈｚ，２Ｈ），３．０４（ｄｄ，Ｊ＝１０．９，６．４Ｈｚ，２Ｈ），２．４８（ｄｄｔ，Ｊ＝１８．２，７．６，３．０Ｈｚ，６Ｈ），２．３０（ｄｄｄ，Ｊ＝１５．２，７．７，５．３Ｈｚ，４Ｈ），１．７９（ｑ，Ｊ＝３．２Ｈｚ，４Ｈ），１．７１（ｄｄ，Ｊ＝１０．０，７．２Ｈｚ，３Ｈ），１．６６－１．５２（ｍ，９Ｈ），１．４９－１．４１（ｍ，５Ｈ），１．２９（ｄ，Ｊ＝１０．０Ｈｚ，５５Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．９，２．４Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５９０】

【化１０６】



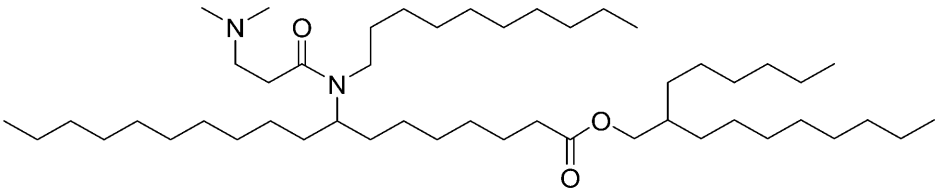
(91)

８－（Ｎ－デシル－５－（ピロリジン－１－イル）ペンタンアミド）オクタデカン酸３－ヘプチルデシル（９１）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．１０（ｔｄ

，Ｊ＝７．１，３．１Ｈｚ，２Ｈ），３．０３（ｄ，Ｊ＝１２．６Ｈｚ，２Ｈ），２．５４－２．４２（ｍ，６Ｈ），２．３０（ｄｄｄ，Ｊ＝１５．３，７．７，５．４Ｈｚ，４Ｈ），１．７９（ｑ，Ｊ＝３．６Ｈｚ，４Ｈ），１．７４－１．６５（ｍ，２Ｈ），１．６３－１．５４（ｍ，１２Ｈ），１．４６（ｓ，６Ｈ），１．２９（ｄ，Ｊ＝１０．０Ｈｚ，５４Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．８，２．３Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５９１】

【化１０７】

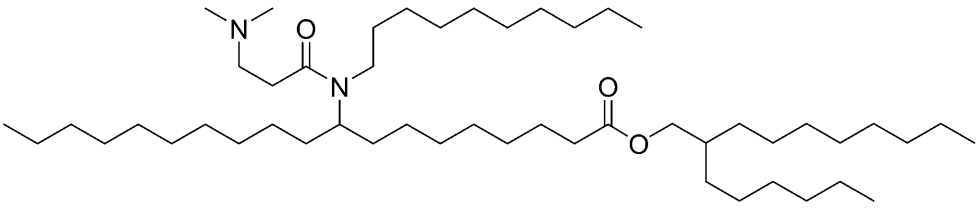


(107)

８－（Ｎ－デシル－３－（ジメチルアミノ）プロパンアミド）オクタデカン酸２－ヘキシルデシル（１０７）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ３．９８（ｄｄ，Ｊ＝５．８，２．７Ｈｚ，２Ｈ），３．６８－３．５７（ｍ，１Ｈ），３．１０－３．０１（ｍ，２Ｈ），２．６８（ｑ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，２Ｈ），２．５１（ｑ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，２Ｈ），２．３５－２．２６（ｍ，８Ｈ），１．７９－１．４０（ｍ，１２Ｈ），１．２８（ｄ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，６４Ｈ），０．９０（ｑ，Ｊ＝４．２Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５９２】

【化１０８】



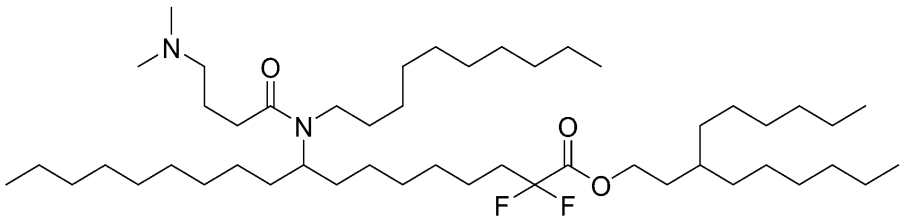
(119)

９－（Ｎ－デシル－３－（ジメチルアミノ）プロパンアミド）ノナデカン酸２－ヘキシルデシル（１１９）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ３．９９（ｄ，Ｊ＝５．７Ｈｚ，２Ｈ），３．６９－３．５８（ｍ，１Ｈ），３．０６（ｄｄ，Ｊ＝１０．８，５．９Ｈｚ，２Ｈ），２．７０（ｄｄ，Ｊ＝１０．９，６．４Ｈｚ，２Ｈ），２．５３（ｑ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，２Ｈ），２．３０（ｔ，Ｊ＝４．２Ｈｚ，８Ｈ），１．７１－１．１１（ｍ，７７Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０５９３】

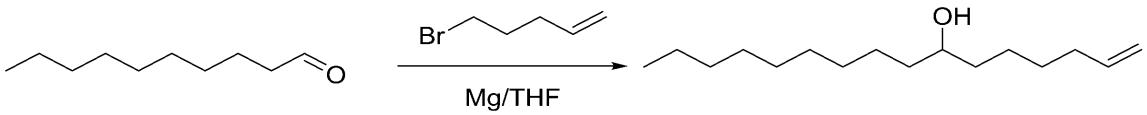
実施例２．９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロオクタデカン酸３－ヘキシルノニル（１６）の合成

【化１０９】



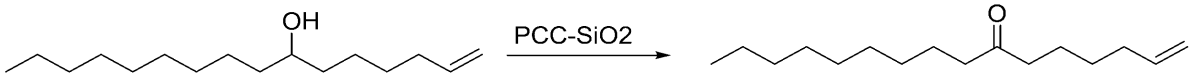
(16)

工程１．ヘプタデク－１－エン－７－オールの合成
【化１１０】



グリニャール試薬はＴＨＦ（１５０ｍＬ）中の６－ブロモヘクス－１－エン（７０ｇ、４２９ｍｍｏｌ）とマグネシウム（１１．２ｇ、４５９ｍｍｏｌ）で調製し、４５℃で２時間撹拌した。反応物を１５℃まで冷却し、ＴＨＦ（１５０ｍＬ）中のデカナール（５４ｇ、３４３ｍｍｏｌ）を一滴ずつ加えた。１時間後、反応物を冷却し（０℃、氷浴）、H_2Oで、続いて６ＭのＨＣｌ（３５０ｍＬ）で反応を止めた。反応物をヘキサンで抽出し、有機物をブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動カラムクロマトグラフィー（２～２０％ＥｔＯＡｃ－ヘキサン）によって精製してヘキサデク－１－エン－７－オール（６５ｇ、収率７８．７％）を得た。

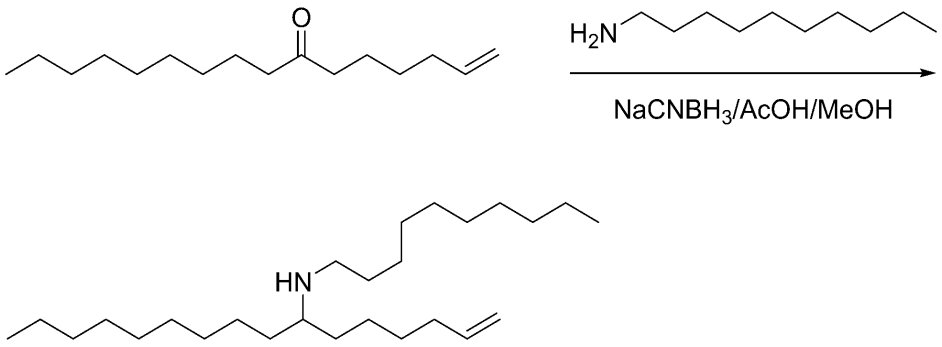
【０５９４】
工程２．ヘキサデク－１－エン－７－オンの合成
【化１１１】



ヘキサデク－１－エン－７－オール（６５ｇ、２７０ｍｍｏｌ）および$PCC-SiO_2$（１：１）（１４０ｇ、３２４ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（６００ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。混合物を真空にて部分的に濃縮し、シリカの短床を介してＥｔＯＡｃ－ヘキサン（２５％、７００ｍＬ）で溶出した。合わせた有機物を真空にて濃縮し、自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＥｔＯＡｃ－ヘキサン）によって精製してヘキサデク－１－エン－７－オン（５９ｇ、９１．５％）を得た。

【０５９５】
工程３．デシル（ヘキサデク－１－エン－７－イル）アミンの合成

【化１１２】

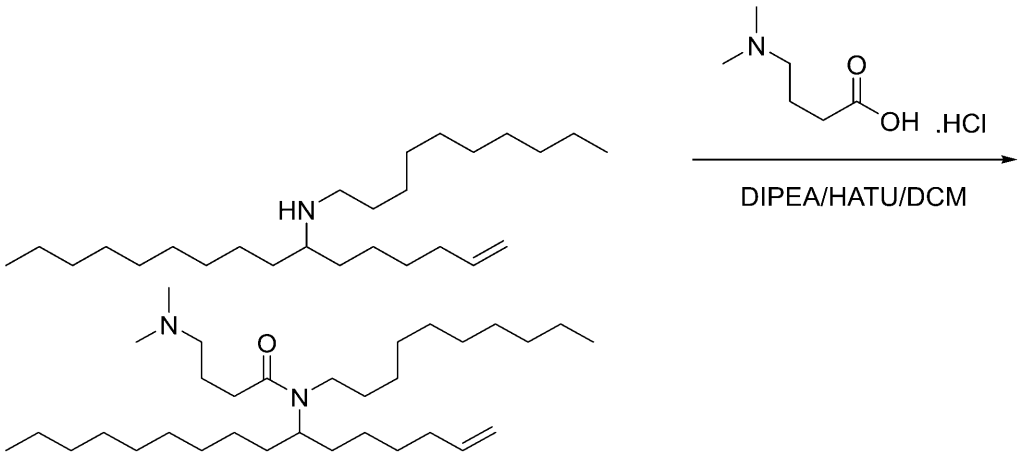


ヘキサデク－１－エン－７－オン（５９ｇ、２４７ｍｍｏｌ）、Ｎ－デシルアミン（４０．９ｇ、２６０ｍｍｏｌ）、ＮａＣＮＢＨ$_3$（４７ｇ、７４２ｍｍｏｌ）およびＡｃＯＨ（３０ｇ、４９５ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ中にて５０℃で１８時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔ$_2$Ｏに溶解し、ＮａＨＣＯ$_3$（飽和溶液）およびブラインで順次洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製してデシル（ヘキサデク－１－エン－７－イル）アミン（５０ｇ、５３．２％）を得た。

【０５９６】

工程４．Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（ヘキサデク－１－エン－７－イル）ブタンアミドの合成

【化１１３】

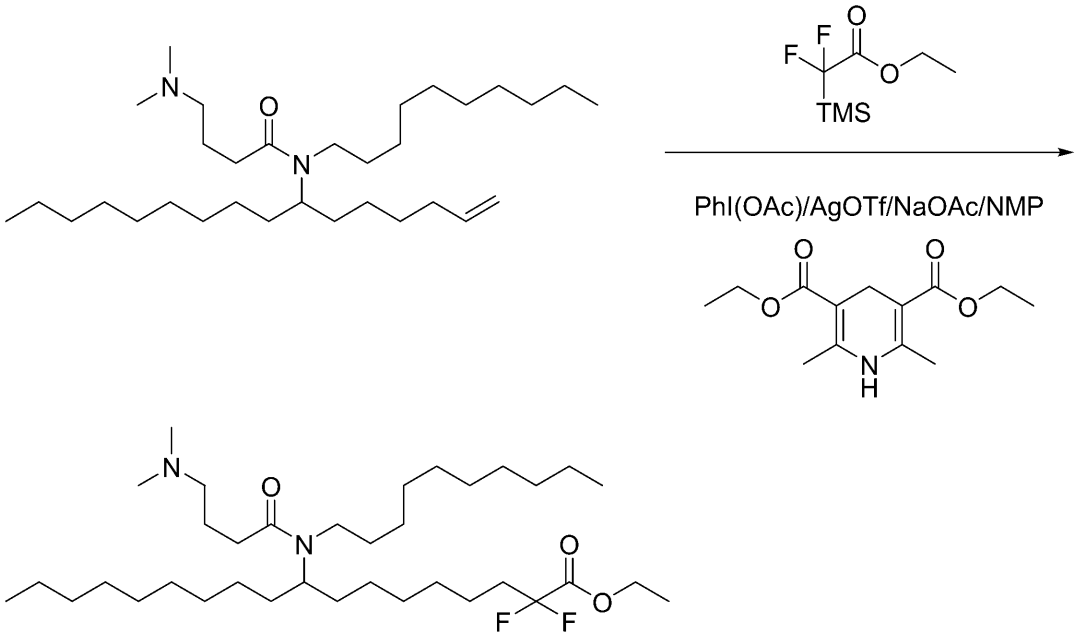


４－ジメチルアミノ］ブタン酸（ＨＣｌ塩）（２５．４ｇ、１５１ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（６０ｇ、１５８ｍｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（４６ｍＬ、２６３ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（５００ｍＬ）中にて室温で１時間撹拌した。デシル（ヘキサデク－１－エン－７－イル）アミン（２５ｇ、６６ｍｍｏｌ／ＤＣＭ（６５ｍＬ）を加え、反応物を室温で１８時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔ$_2$Ｏに溶解し、１ＭのＮａＯＨ、ＮａＨＣＯ$_3$（飽和溶液）水およびブラインで順次洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製してＮ－デシル－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（ヘキサデク－１－エン－７－イル）ブタンアミド（２０ｇ、６１．６％）を得た。

【０５９７】

工程５．９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２，２－ジフルオロオクタデカン酸エチルの合成

【化１１４】

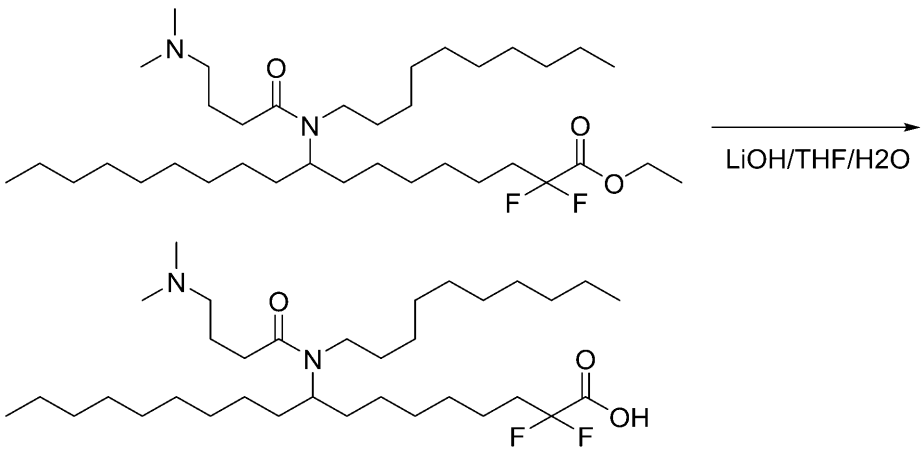


真空にて加熱乾燥したフラスコに、Ｈａｎｔｓｃｈエステル（２．３ｇ、９．１３ｍｍｏｌ）、ＮａＯＡｃ（２．２５ｇ、２７．４ｍｍｏｌ）、ＡｇＯＴｆ（５．９ｇ、２２．８ｍｍｏｌ）および二酢酸ヨードベンゼン（５．９ｇ、１８．３ｍｍｏｌ）を加え、フラスコの空気を抜き、窒素で再充填した。ＮＭＰ（１５ｍＬ）と、ＮＭＰ中のＮ－デシル－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（ヘキサデク－１－エン－７－イル）ブタンアミド（４．５ｇ、９．１ｍｍｏｌ）と、２，２－ジフルオロ－２－（トリメチルシリル）酢酸エチル（９．０ｇ、４６ｍｍｏｌ）とを加え、反応物を室温で１８時間撹拌した。セライトを介して混合物を濾過し、Et_2Oで溶出した。有機物を水とブラインで洗浄し、乾燥（$MgSO_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２，２－ジフルオロオクタデカン酸エチル（５ｇ、８０．０％）を得た。

【０５９８】

工程６．９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２，２－ジフルオロオクタデカン酸の合成

【化１１５】

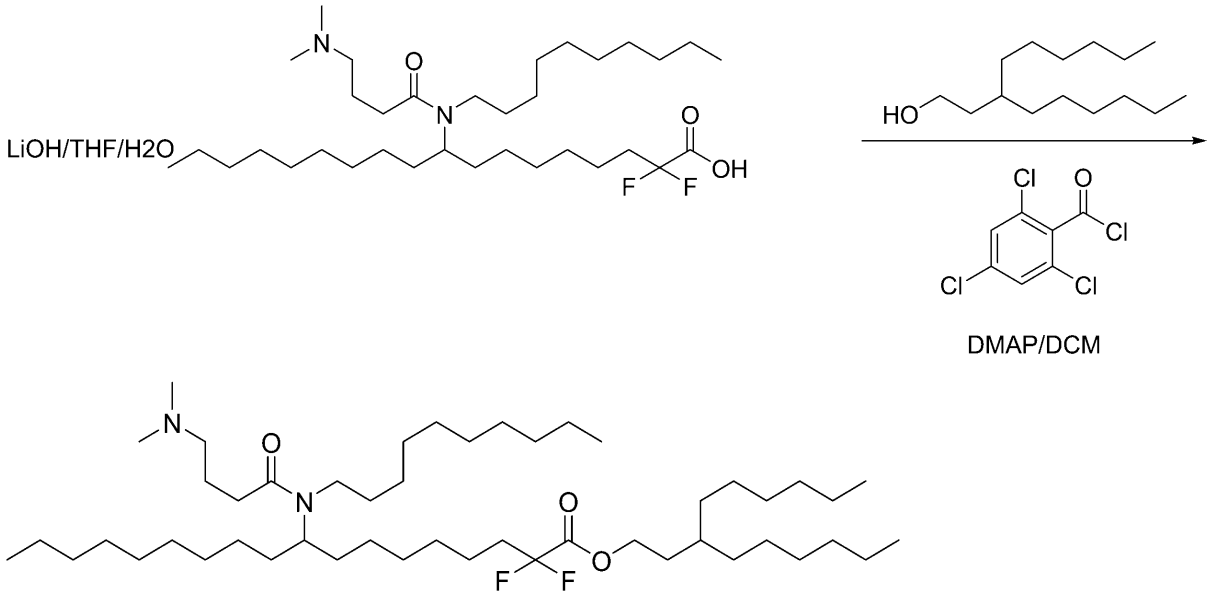


９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２，２－ジフルオロオクタデカン酸エチル（５ｇ、８．１ｍｍｏｌ）およびＬｉＯＨ（０．３９ｇ、１６．２ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（５０ｍＬ）およびH_2O（１０ｍＬ）中にて５０℃で２時間撹拌した。６ＭのＨＣｌ（３．０ｍＬ）で反応を止め、部分的に濃縮した。水性残留物をH_2Oで希釈し、ＤＣＭで抽出した。合わせた有機物をブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物をトルエン（５０ｍＬ）と共沸させて９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２，２－ジフルオロオクタデカン酸を得、それを精製することなく使用した。

【０５９９】

工程７．９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロオクタデカン酸３－ヘキシルノニルの合成

【化１１６】



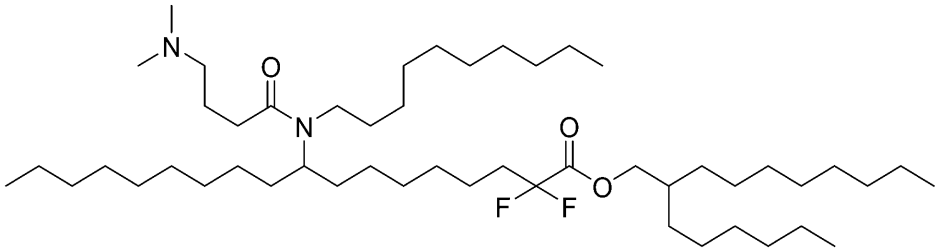
(16)

９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２，２－ジフルオロオクタデカン酸（４ｇ、６．８ｍｍｏｌ）、３－ヘキシルノナン－１－オール（１．６３ｇ、７．１ｍｍｏｌ）、塩化２，４，６－トリクロロベンゾイル（１．８ｇ、７．５ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（１．７ｇ、１３．６ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（１００ｍＬ）中にて室温で３時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をEt_2OとH_2Oの間で分配した。有機物を$NaHCO_3$（飽和溶液）とブラインで洗浄し、乾燥（$MgSO_4$）し、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１２％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２，２－ジフルオロオクタデカン酸３－ヘキシルノニル（１６）（２．４４ｇ、４４．９％）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．２９（ｔｄ，Ｊ＝７．１，１．９Ｈｚ，２Ｈ），３．６６（ｄｄ，Ｊ＝９．４，４．８Ｈｚ，１Ｈ），３．０６（ｑ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），２．４１－２．３１（ｍ，４Ｈ），２．２７（ｓ，６Ｈ），２．１３－１．９６（ｍ，２Ｈ），１．８７（ｈ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），１．６７（ｑ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，２Ｈ），１．６０－１．３９（ｍ，９Ｈ），１．２８（ｑ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，５６Ｈ），０．９５－０．８４（ｍ，１２Ｈ）．^{19}Ｆ　ＮＭＲ（３７６ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ－１０５．９（２Ｆ）。

【０６００】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

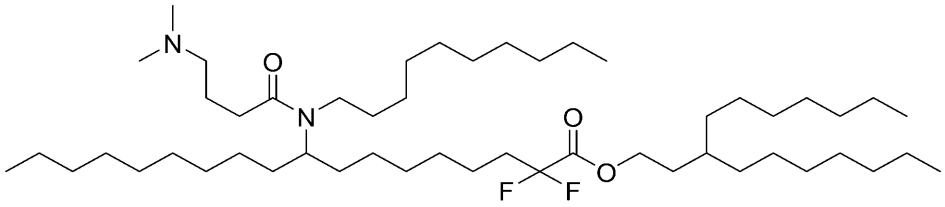
【０６０１】
【化１１７】



(17)

９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロオクタデカン酸２－ヘキシルデシル（１７）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．１８（ｄｄ、Ｊ＝６．０、２．０Ｈｚ、２Ｈ）、３．６９－３．５７（ｍ、１Ｈ）、３．０６（ｑ、Ｊ＝７．１Ｈｚ、２Ｈ）、２．５７（ｓ、２Ｈ）、２．４６－２．３４（ｍ、８Ｈ）、２．０１－１．８９（ｍ、３Ｈ）、１．５９－１．４０（ｍ、８Ｈ）、１．３８－１．１８（ｍ、６０Ｈ）、０．９０（ｔｄ、Ｊ＝６．８、２．７Ｈｚ、１２Ｈ）。

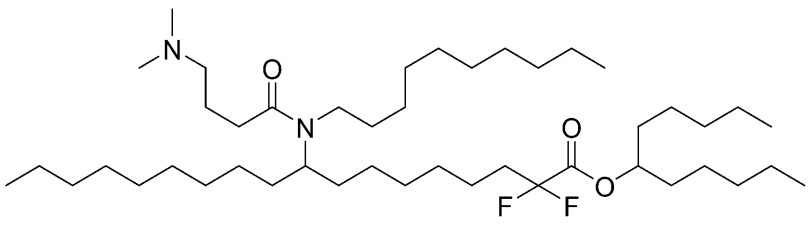
【０６０２】
【化１１８】



(18)

９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロオクタデカン酸３－ヘプチルデシル（１８）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．２９（ｔｄ，Ｊ＝７．１，１．９Ｈｚ，２Ｈ），３．７１－３．５６（ｍ，１Ｈ），３．０６（ｑ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），２．４２－２．２９（ｍ，８Ｈ），２．０４（ｄｄｔ，Ｊ＝１６．８，１１．４，５．３Ｈｚ，３Ｈ），１．９１（ｈ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，３Ｈ），１．６７（ｑ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，２Ｈ），１．６０－１．３９（ｍ，９Ｈ），１．２９（ｄ，Ｊ＝８．３Ｈｚ，５３Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．７，３．１Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６０３】
【化１１９】



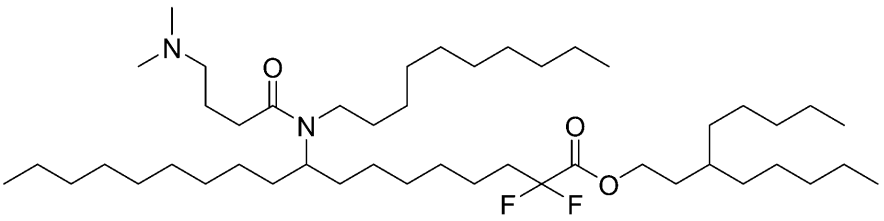
(19)

９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロオクタデカン酸ウンデカン－６－イル（１９）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ

３．５７（ｓ，１Ｈ），３．２８（ｑ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，２Ｈ），３．０６（ｄｄ，Ｊ＝１１．９，５．３Ｈｚ，２Ｈ），２．９４（ｄ，Ｊ＝２．３Ｈｚ，６Ｈ），２．６０（ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ，１Ｈ），２．５３（ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ，１Ｈ），２．１８－１．７５（ｍ，１１Ｈ），１．７０－１．４２（ｍ，１３Ｈ），１．４２－１．１６（ｍ，５５Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６０４】

【化１２０】

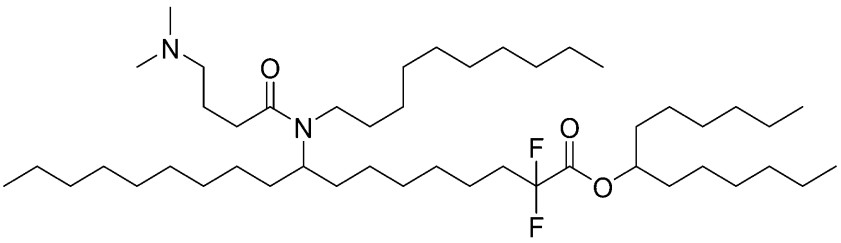


(20)

９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロオクタデカン酸３－ペンチルオクチル（２０）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．２９（ｔｄ，Ｊ＝７．１，１．９Ｈｚ，２Ｈ），３．７１－３．６０（ｍ，１Ｈ），３．０６（ｑ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），２．３５（ｔｄｄ，Ｊ＝６．６，４．２，２．４Ｈｚ，４Ｈ），２．２６（ｓ，６Ｈ），２．１３－１．９６（ｍ，３Ｈ），１．８５（ｈ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），１．６８（ｑ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，２Ｈ），１．６０－１．４０（ｍ，９Ｈ），１．３８－１．１９（ｍ，４９Ｈ），０．９４－０．８６（ｍ，１２Ｈ）。

【０６０５】

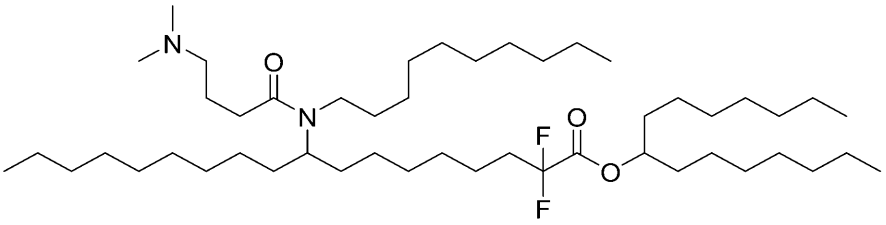
【化１２１】



(92)

９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロオクタデカン酸トリデカン－７－イル（９２）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．０２（ｐ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，１Ｈ），３．６５（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，１Ｈ），３．０６（ｑ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），２．４０－２．３１（ｍ，４Ｈ），２．２９（ｓ，６Ｈ），２．１６－１．９４（ｍ，２Ｈ），１．６８－１．１０（ｍ，６５Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１２Ｈ）。

【化１２２】

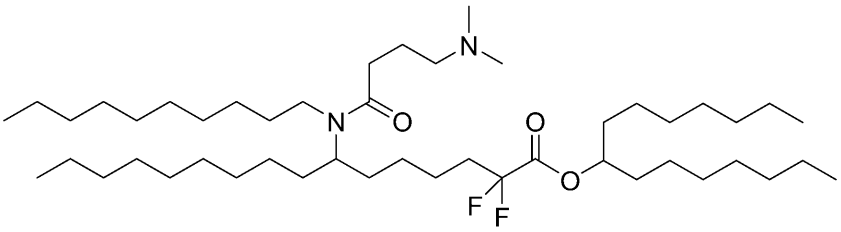


(93)

９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロオクタデカン酸ペンタデカン－８－イル（９３）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．０９－４．９４（ｍ，１Ｈ），３．６５（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，１Ｈ），３．０６（ｑ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），２．３７（ｄｔ，Ｊ＝１４．７，７．７Ｈｚ，４Ｈ），２．３０（ｓ，６Ｈ），２．２０－１．９７（ｍ，２Ｈ），１．８８（ｈ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ），１．６７－１．０８（ｍ，６８Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６０６】

【化１２３】

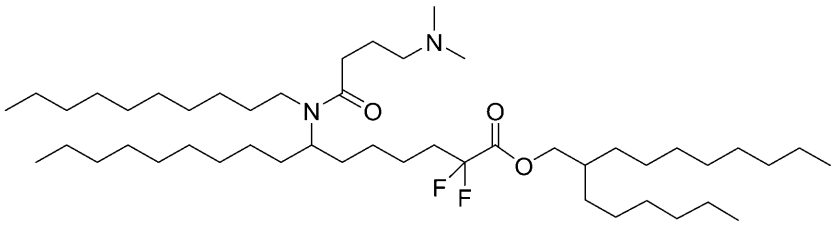


(101)

７－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロヘキサデカン酸ペンタデカン－８－イル（１０１）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．０１（ｑ，Ｊ＝５．８Ｈｚ，１Ｈ），３．７８－３．５７（ｍ，１Ｈ），３．１５－２．９４（ｍ，２Ｈ），２．５８－２．１７（ｍ，１０Ｈ），２．０４（ｔｑ，Ｊ＝１６．１，７．６Ｈｚ，２Ｈ），１．８８（ｈ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），１．７３－１．０１（ｍ，６６Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６０７】

【化１２４】



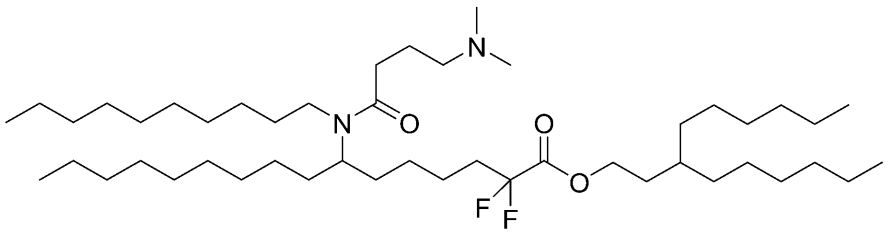
(102)

７－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロヘキサデカン酸２－ヘキシルデシル（１０２）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．１８（ｄｄ，Ｊ＝５．７，３．２Ｈｚ，２Ｈ），３．７１－３．６１（ｍ，０Ｈ），

３．０５（ｄｄ，Ｊ＝１０．６，６．２Ｈｚ，２Ｈ），２．５９－２．２７（ｍ，９Ｈ），２．０６（ｄｐ，Ｊ＝１６．６，８．１Ｈｚ，１Ｈ），１．９２（ｑ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ），１．７３（ｓ，１Ｈ），１．５９－１．４０（ｍ，８Ｈ），１．２９（ｄｔ，Ｊ＝１０．２，６．３Ｈｚ，５３Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．７，２．７Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６０８】

【化１２５】

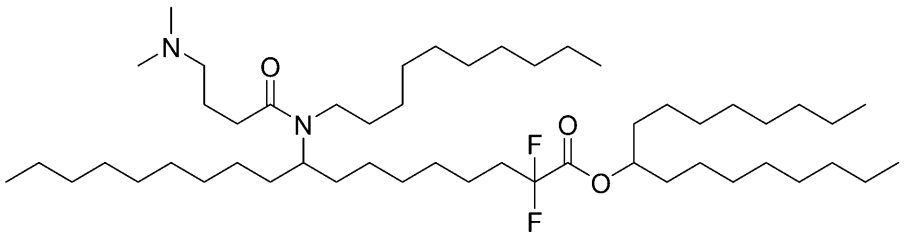


(103)

７－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロヘキサデカン酸３－ヘキシルノニル（１０３）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．２９（ｔｄ，Ｊ＝７．１，２．９Ｈｚ，２Ｈ），３．６５（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），３．０５（ｄｄ，Ｊ＝１０．５，６．２Ｈｚ，２Ｈ），２．４９（ｓ，２Ｈ），２．４５－２．３１（ｍ，７Ｈ），２．０４（ｔｔ，Ｊ＝１６．５，８．２Ｈｚ，２Ｈ），１．９１（ｐ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），１．７２－１．６２（ｍ，２Ｈ），１．５９－１．４０（ｍ，１３Ｈ），１．２９（ｄ，Ｊ＝８．３Ｈｚ，５３Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．８、３．０Ｈｚ、１２Ｈ）。

【０６０９】

【化１２６】

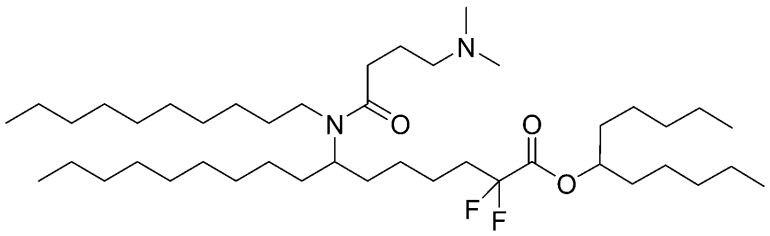


(104)

９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロオクタデカン酸ヘプタデカン－９－イル（１０４）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．０６－４．９６（ｍ，１Ｈ），３．７４－３．５０（ｍ，１Ｈ），３．０６（ｑ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），２．６４－２．２６（ｍ，９Ｈ），２．１４－１．８９（ｍ，４Ｈ），１．７３－１．１２（ｍ，７１Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６１０】

【化１２７】

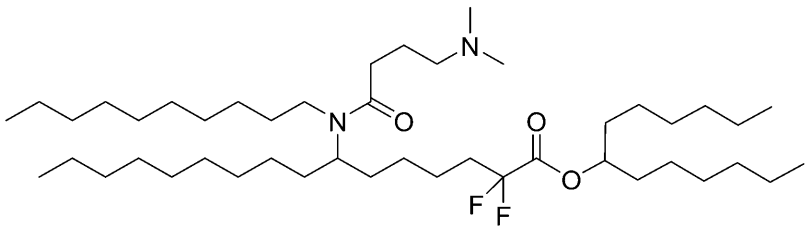


(108)

７－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロヘキサデカン酸ウンデカン－６－イル（１０８）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．０１（ｄ、Ｊ＝８．０Ｈｚ、１Ｈ）、３．６７（ｓ、０Ｈ）、３．０５（ｄ、Ｊ＝１０．４Ｈｚ、２Ｈ）、２．３５（ｑ、Ｊ＝７．７Ｈｚ、４Ｈ）、２．２７（ｓ、６Ｈ）、２．０５（ｄｔ、Ｊ＝１６．２、８．２Ｈｚ、２Ｈ）、１．８６（ｈ、Ｊ＝７．７Ｈｚ、２Ｈ）、１．６７－１．４２（ｍ、８Ｈ）、１．４０－１．２４（ｍ、４１Ｈ）、０．９４－０．８６（ｍ、１２Ｈ）。

【０６１１】

【化１２８】

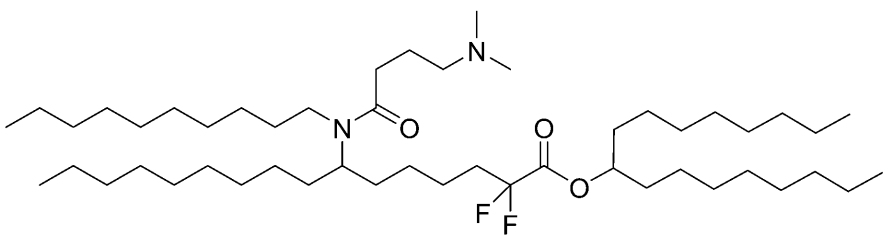


(109)

７－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロヘキサデカン酸トリデカン－７－イル（１０７）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．１４－４．９３（ｍ，１Ｈ），３．０５（ｄｄ，Ｊ＝１１．０，６．０Ｈｚ，２Ｈ），２．３５（ｑ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，３Ｈ），２．２７（ｓ，５Ｈ），２．０３（ｔｔ，Ｊ＝１６．２，８．２Ｈｚ，２Ｈ），１．８７（ｈ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），１．７４－１．４１（ｍ，１０Ｈ），１．３４－１．２１（ｍ，４７Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６１２】

【化１２９】



(110)

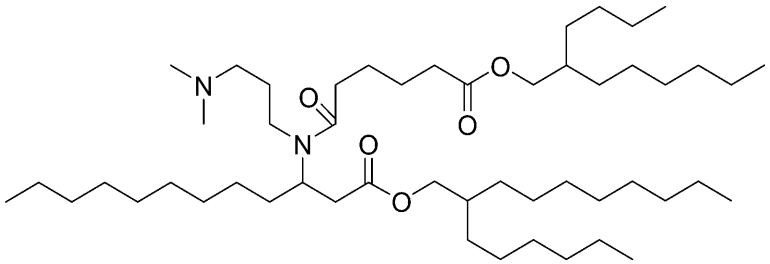
７－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロヘキサ

デカン酸ヘプタデカン－９－イル（１１０）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．０１（ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，１Ｈ），３．０５（ｄｄ，Ｊ＝１０．９，６．１Ｈｚ，２Ｈ），２．５２（ｓ，２Ｈ），２．３９（ｄ，Ｊ＝６．２Ｈｚ，７Ｈ），２．１５－１．８７（ｍ，３Ｈ），１．７３－１．４０（ｍ，１０Ｈ），１．２９（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，５４Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６１３】

実施例３．３－｛６－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－６－オキソヘキサンアミド｝ドデカン酸２－ヘキシルデシル（２１）の合成

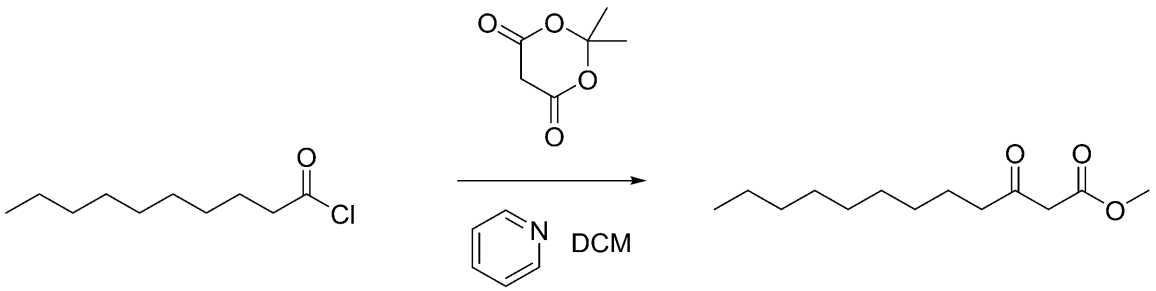
【化１３０】



(21)

工程１．３－オキソドデカン酸メチルの合成

【化１３１】

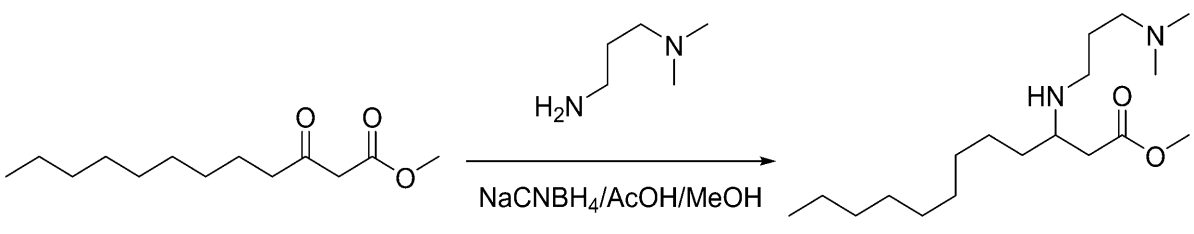


メルドラム酸（１５ｇ、１０４ｍｍｏｌ）とピリジン（１６．５ｇ、２０８ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（２５０ｍＬ）中にて０℃で撹拌した。塩化デカノイル（２１．６ｍＬ、１０４ｍｍｏｌ）を一滴ずつ加え、反応物を１６時間撹拌して室温まで温めた。反応物を１ＭのＨＣｌで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_{4}$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物をＭｅＯＨ（２００ｍＬ）にて３．５時間還流し、次いで真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（２～２０％ＥｔＯＡｃ－ヘキサン）によって精製して３－オキソドデカン酸メチル（１７．７ｇ、７４．４％）を得た。

【０６１４】

工程２．３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸エステルの合成

【化１３２】

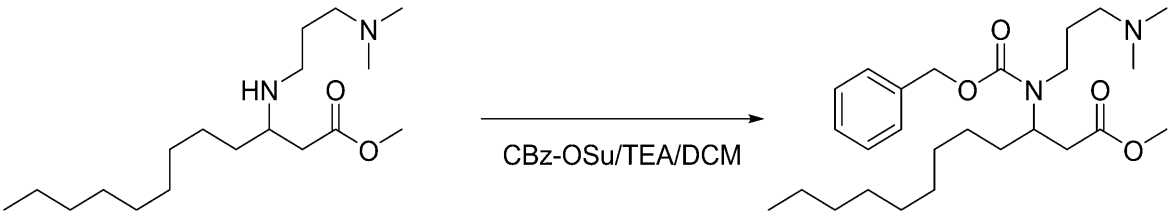


３－オキソドデカン酸メチル（７．９２ｇ、３４．７ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（４．０８ｇ、４０．０ｍｍｏｌ）およびＡｃＯＨ（７．９ｍＬ、１３９ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（２８５ｍＬ）中にて１時間加熱還流し、その後０℃に冷却し、$NaCNBH_3$（４．９ｇ、６９ｍｍｏｌ）で少しずつ処理した。反応物を室温にて４０時間撹拌し、真空にて部分的に濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、$NaHCO_3$（飽和溶液）およびブラインで順次洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１２％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸エステル（１．９ｇ、１７．４％）を得た。

【０６１５】

工程３．３－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸メチルの合成

【化１３３】

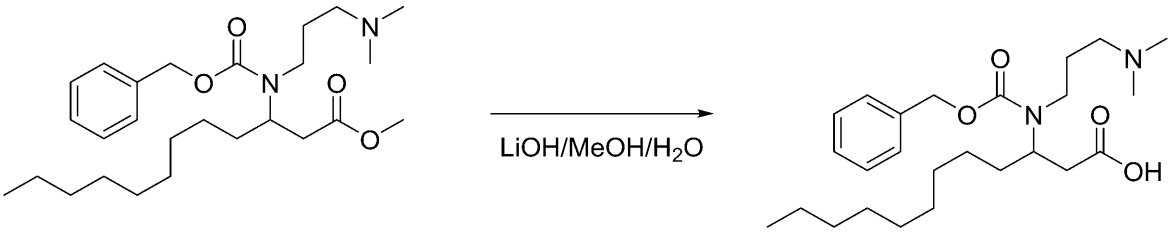


３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸メチル（１．２ｇ、３．８ｍｍｏｌ）、ＣＢｚ－ＯＳｕ（１．０ｇ、４．２ｍｍｏｌ）およびＴＥＡ（０．８ｍＬ、５．７ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（３５ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。有機物を$NaHCO_3$（飽和溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（５０：５０ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して３－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸メチル（１．６ｇ、９３．５％）を得た。

【０６１６】

工程４．３－（（（ベンジルオキシ）カルボニル）（３－（ジメチルアミノ）プロピル）アミノ）ドデカン酸の合成

【化１３４】

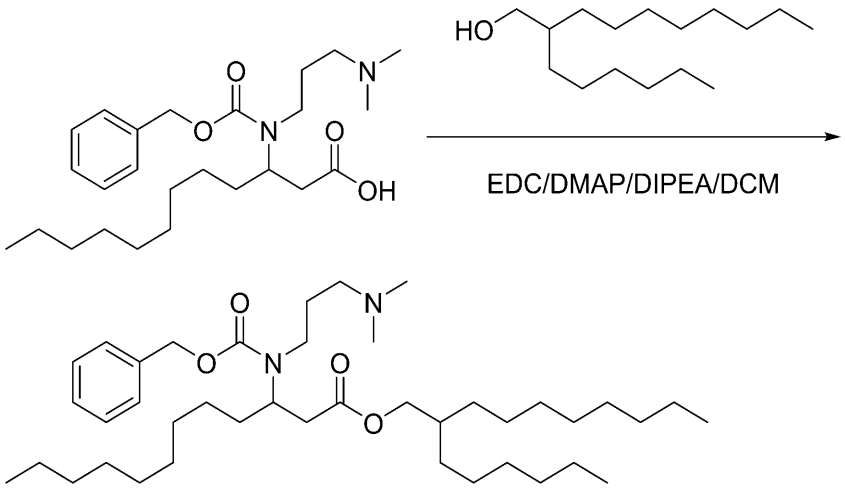


３－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸メチル（１．６８ｇ、３．７ｍｍｏｌ）とＬｉＯＨ（０．１８ｇ、７．５ｍｍｏｌ）を$MeOH／H_2O$（２０：３）中にて５０℃で１８時間加熱した。反応物を室温に冷却し、１ＭのＨＣｌ（１．３ｍＬ）で反応を止め、真空にて濃縮した。残留物をＤＣＭに溶解し、ブラインで洗浄し、乾燥（$MgSO_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮して３－（（（ベンジルオキシ）カルボニル）（３－（ジメチルアミノ）プロピル）アミノ）ドデカン酸を得、それを精製することなく使用した。

【０６１７】

工程５．３－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸２－ヘキシルデシルの合成

【化１３５】

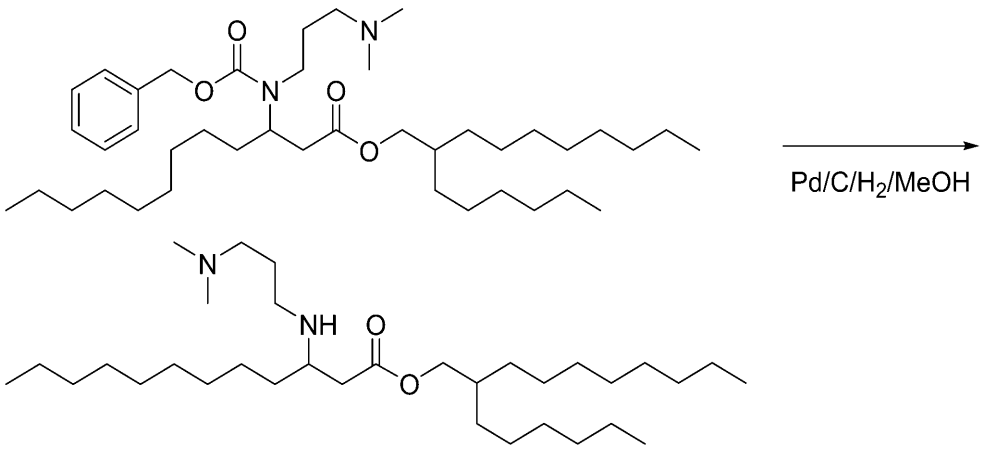


３－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸（１．２ｇ、２．８ｍｍｏｌ）、ヘキシルデカノール（０．７２ｇ、３．０ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ（１．０４ｇ、５．４ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（１．４ｍＬ、８．１ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（触媒量）をＤＣＭ（３０ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。反応物を$NaHCO_3$（飽和溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィーによって精製して３－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸２－ヘキシルデシル（８２７ｍｇ、４６．２％）を得た。

【０６１８】

工程６．３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸２－ヘキシルデシルの合成

【化１３６】

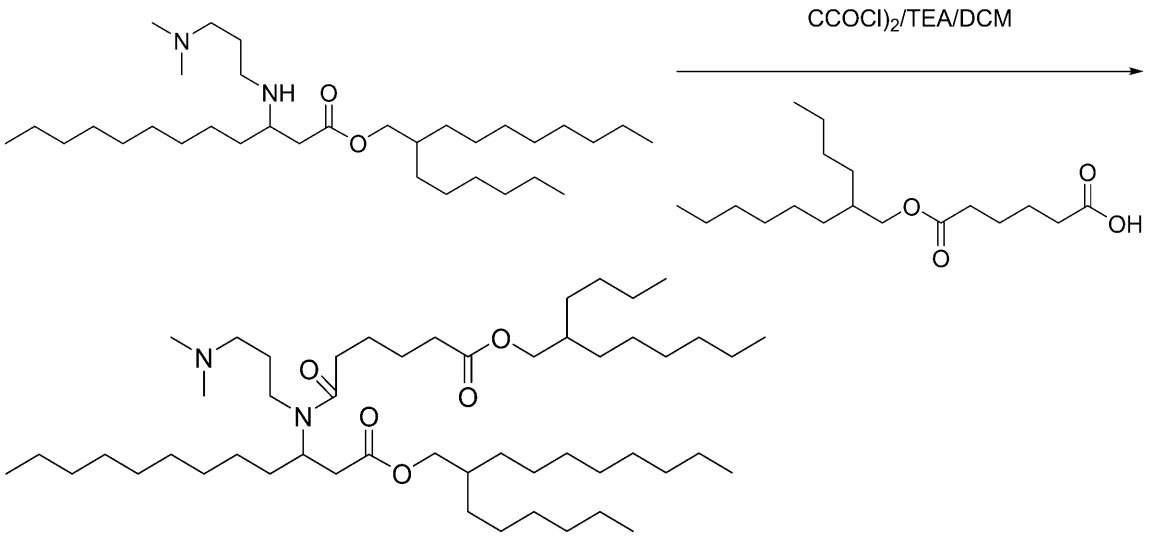


３－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸２－ヘキシルデシル（８７４ｍｇ、１．３ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（５ｍＬ）中にて１８時間、１０％Ｐｄ／Ｃ上での接触水素化に供した。セライトを介して反応物を濾過し、真空にて濃縮し、粗製物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸２－ヘキシルデシル（２９４ｍｇ、４２．２％）を得た。

【０６１９】

工程７．３－｛６－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）

プロピル］－６－オキソヘキサンアミド｝ドデカン酸２－ヘキシルデシル（２１）の合成
【化１３７】



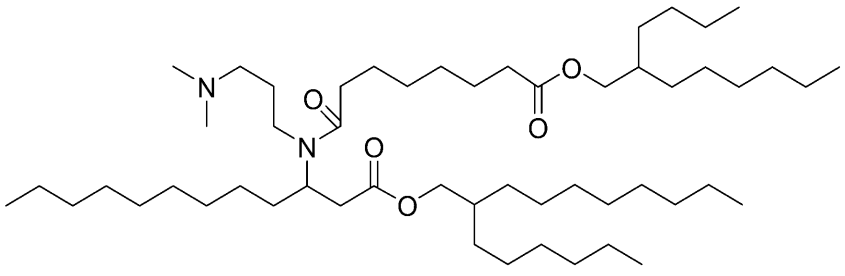
(21)

６－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－６－オキソヘキサン酸（２５２ｍｇ、０．８ｍｍｏｌ）と塩化オキサリル（０．２０ｇ、１．７ｍｍｏｌ）を室温で３時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＤＣＭ（５ｍＬ）に再溶解した。酸塩化物中間体をＤＣＭ（５ｍＬ）中の３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸２－ヘキシルデシル（２９５ｍｇ、０．６ｍｍｏｌ）およびＴＥＡ（０．１４ｍｌ、１．６ｍｍｏｌ）に加え、室温で２時間撹拌した。反応物をＤＣＭで希釈し、ＮａＨＣＯ$_3$（飽和溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して３－｛６－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－６－オキソヘキサンアミド｝ドデカン酸２－ヘキシルデシル（２１）（２３１ｍｇ、５０％）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ４．２３（ｓ，１Ｈ），３．９５（ｑ，Ｊ＝５．３Ｈｚ，４Ｈ），３．２２（ｑ，Ｊ＝８．２Ｈｚ，２Ｈ），３．０４（ｓ，１Ｈ），２．５２（ｔｄ，Ｊ＝１５．１，６．８Ｈｚ，２Ｈ），２．４０－２．２３（ｍ，６Ｈ），２．２１（ｓ，６Ｈ），１．７９－１．５５（ｍ，１１Ｈ），１．２５（ｑ，Ｊ＝４．８Ｈｚ，５３Ｈ），０．８８（ｔｄ，Ｊ＝６．７，３．９Ｈｚ，１５Ｈ）。

【０６２０】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【化１３８】



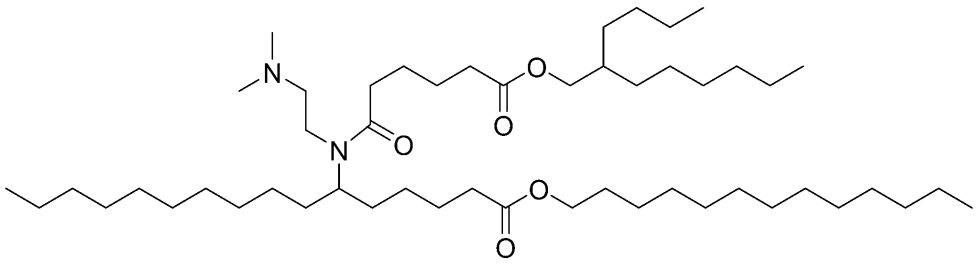
(22)

３－（８－（（２－ブチルオクチル）オキシ）－Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－８－オキソオクタンアミド）ドデカン酸２－ヘキシルデシル（２２）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．２７（ｓ，１Ｈ），３．９７（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，４Ｈ），３．２４（ｄｑ，Ｊ＝１２．２，６．８Ｈｚ，２Ｈ），３．０７（ｄ，Ｊ＝４．７Ｈｚ，１Ｈ），２．６２－２．４５（ｍ，２Ｈ），２．３６－２．２５（ｍ，５Ｈ），２．２４（ｓ，６Ｈ），１．７１－１．５９（ｍ，８Ｈ），１．２９（ｑ，Ｊ＝４．６Ｈｚ，５７Ｈ），０．９１（ｔｄ，Ｊ＝６．７，３．９Ｈｚ，１５Ｈ）。

【０６２１】

実施例４．６－｛６－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－Ｎ－［２－（ジメチルアミノ）エチル］－６－オキソヘキサンアミド｝ヘキサデカン酸トリデシル（２３）の合成

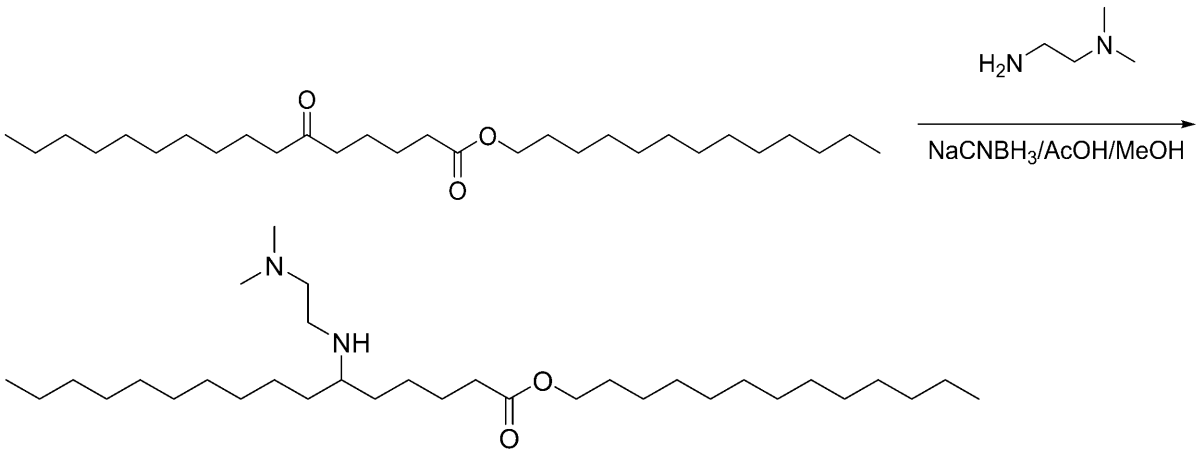
【化１３９】



(23)

工程１．６－｛［２－（ジメチルアミノ）エチル］アミノ｝ヘキサデカン酸トリデシルの合成

【化１４０】

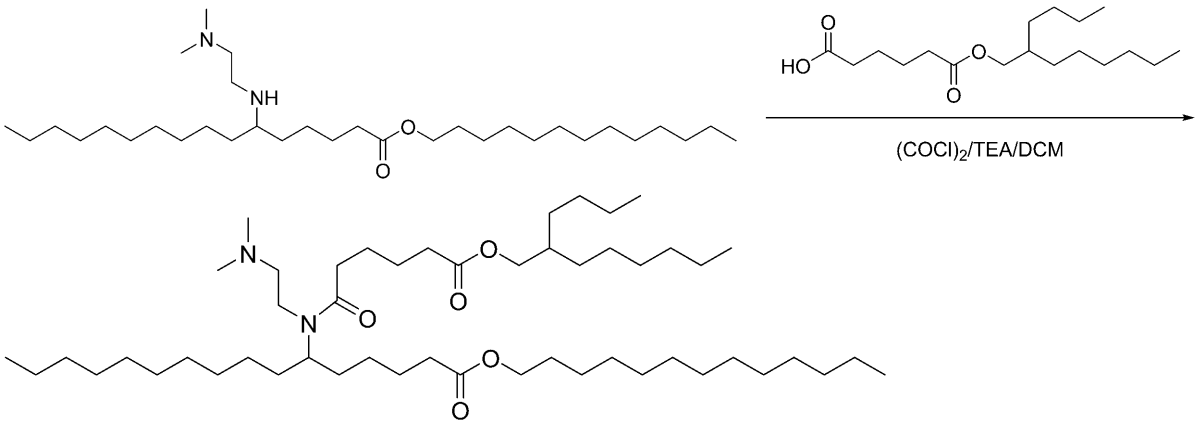


６－オキソヘキサデカン酸トリデシル（３７７ｍｇ、０．８３ｍｍｏｌ）、１，１－ジメチルエチレンジアミン（８１ｍｇ、０．９２ｍｍｏｌ）、ＡｃＯＨ（０．１ｍＬ、１．７ｍｍｏｌ）、およびＮａＣＮＢＨ$_{3}$（１５７ｍｇ、２．５ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ中にて５０℃で２時間撹拌した。反応物を加熱から取り出し、さらに３０時間撹拌を続けた。反応物を真空にて部分的に濃縮し、次いでＤＣＭに溶解し、洗浄し（ＮａＨＣＯ$_{3}$およびブライン）、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_{4}$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して６－｛［２－（ジメチルアミノ）エチル］アミノ｝ヘキサデカン酸トリデシル（２０１ｍｇ、４６．０％）を得た。

【０６２２】

工程２．６－｛６－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－Ｎ－［２－（ジメチルアミノ）

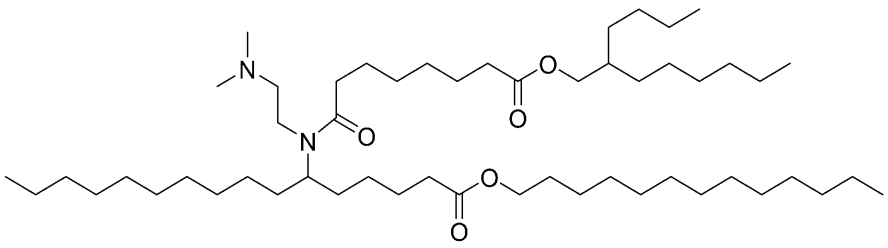
エチル］－６－オキソヘキサンアミド｝ヘキサデカン酸エステル（２３）の合成
【化１４１】



(23)

６－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－６－オキソヘキサン酸（０．２ｇ、０．６４ｍｍｏｌ）および塩化オキサリル（０．１５ｍＬ、１．７４ｍｍｏｌ）を、ＤＭＦ（１滴）を伴ったＤＣＭ（１０ｍＬ）中にて室温で３時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＤＣＭ（５ｍＬ）に溶解し、ＤＣＭ（１０ｍＬ）中の６－｛［２－（ジメチルアミノ）エチル］アミノ｝ヘキサデカン酸トリデシル（３０３ｍｇ、０．６ｍｍｏｌ）およびＴＥＡ（０．３２ｍＬ、２．３ｍｍｏｌ）に加えた。室温で１時間撹拌した後、反応物をＤＣＭで希釈し、洗浄し（$NaHCO_3$（飽和溶液）およびブライン）、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１２％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して６－｛６－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－Ｎ－［２－（ジメチルアミノ）エチル］－６－オキソヘキサンアミド｝ヘキサデカン酸トリデシル（２３）（１１３ｍｇ、２３．８％）を得た。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）δ４．０７（ｔｄ，Ｊ＝６．８，４．４Ｈｚ，２Ｈ），３．９９（ｄ，Ｊ＝５．８Ｈｚ，２Ｈ），３．３１（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），２．５８（ｓ，１Ｈ），２．４７－２．２５（ｍ，１２Ｈ），１．７４－１．５８（ｍ，９Ｈ），１．４９（ｔｄ，Ｊ＝１１．９，７．６Ｈｚ，４Ｈ），１．３９－１．１６（ｍ，５２Ｈ），０．９１（ｍ，１２Ｈ）。

【０６２３】
以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。
【０６２４】
【化１４２】



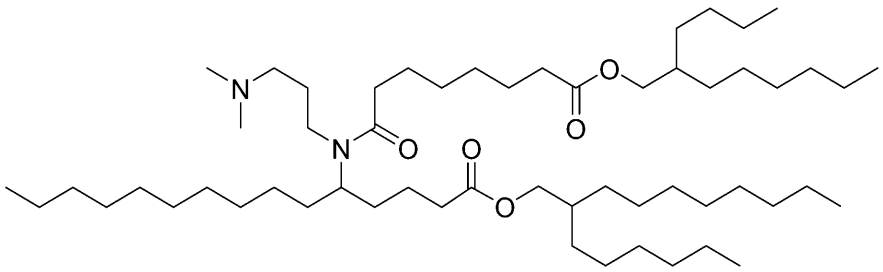
(24)

６－（８－（（２－ブチルオクチル）オキシ）－Ｎ－（２－（ジメチルアミノ）エチル）－８－オキソオクタンアミド）ヘキサデカン酸トリデシル（２４）。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）δ４．０７（ｔｄ，Ｊ＝６．８，４．４Ｈｚ，２Ｈ），３．９９（

ｄ，Ｊ＝５．８Ｈｚ，２Ｈ），３．３１（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），２．５８（ｓ，１Ｈ），２．４７－２．２５（ｍ，１２Ｈ），１．７４－１．５８（ｍ，９Ｈ），１．４９（ｔｄ，Ｊ＝１１．９，７．６Ｈｚ，４Ｈ），１．３９－１．１６（ｍ，５２Ｈ），０．９１（ｍ，１２Ｈ）。

【０６２５】

【化１４３】

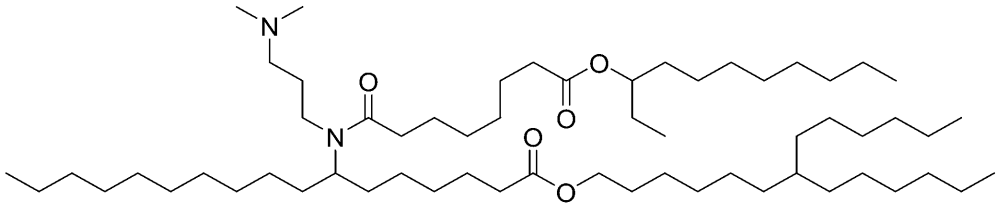


(25)

５－（８－（（２－ブチルオクチル）オキシ）－Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－８－オキソオクタンアミド）ペンタデカン酸２－ヘキシルデシル（２５）。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ３．９９（ｄｄ，Ｊ＝５．８，２．１Ｈｚ，４Ｈ），３．１４（ｄｄ，Ｊ＝１１．０，５．８Ｈｚ，２Ｈ），２．４４－２．２２（ｍ，１３Ｈ），１．７１－１．６０（ｍ，７Ｈ），１．４８（ｓ，６Ｈ），１．４０－１．１６（ｍ，６０Ｈ），０．９１（ｔｄ，Ｊ＝６．７，４．０Ｈｚ，１５Ｈ）。

【０６２６】

【化１４４】

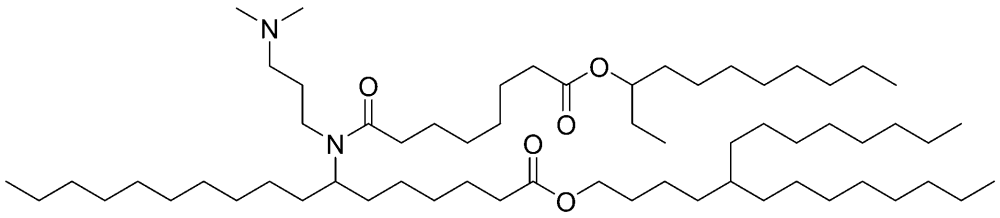


(26)

７－（Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－８－オキソ－８－（ウンデカン－３－イルオキシ）オクタンアミド）ヘプタデカン酸７－ヘキシルトリデシル（２６）。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．１２－４．０２（ｍ，３Ｈ），２．４６－２．１５（ｍ，１４Ｈ），１．５９（ｄｔ，Ｊ＝３４．１，５．６Ｈｚ，２８Ｈ），１．４２－１．１６（ｍ，５８Ｈ），０．９８－０．７９（ｍ，１５Ｈ）。

【０６２７】

【化１４５】

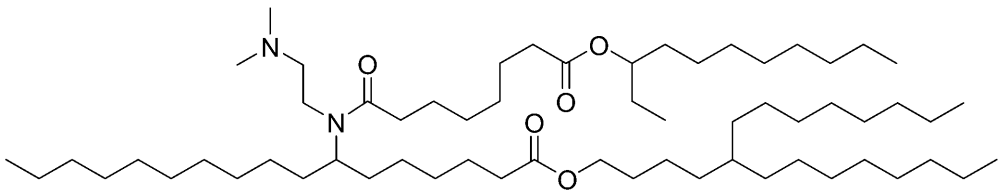


(27)

７－（Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－８－オキソ－８－（ウンデカン－３－イルオキシ）オクタンアミド）－ヘプタデカン酸５－オクチルトリデシル（２７）。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ３．６９－３．６３（ｍ，１Ｈ），３．３６－３．２９（ｍ，２Ｈ），２．３６－２．２７（ｍ，２Ｈ），２．１５－１．９６（ｍ，１４Ｈ），１．８５－１．４８（ｍ，４４Ｈ），１．４６－１．１６（ｍ，４４Ｈ），０．８９（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１５Ｈ）。

【０６２８】

【化１４６】

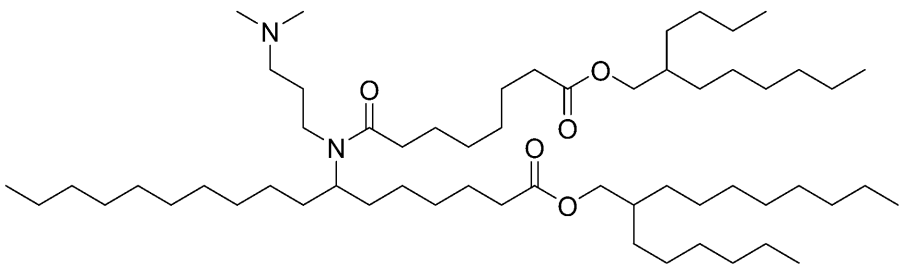


(28)

７－（Ｎ－（２－（ジメチルアミノ）エチル）－８－オキソ－８－（ウンデカン－３－イルオキシ）オクタンアミド）－ヘプタデカン酸５－オクチルトリデシル（２８）。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ３．６９－３．６３（ｍ，１Ｈ），３．３５－３．２８（ｍ，２Ｈ），２．１８－１．９３（ｍ，１５Ｈ），１．８９－１．８２（ｍ，２Ｈ），１．７１－１．５５（ｍ，４１Ｈ），１．４３－１．１９（ｍ，４４Ｈ），０．８９（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１５Ｈ）。

【０６２９】

【化１４７】



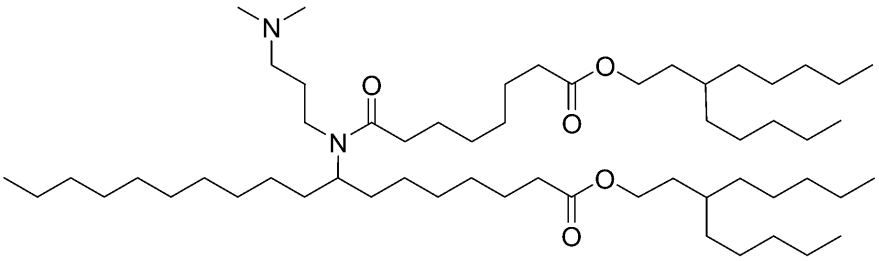
(29)

７－（８－（（２－ブチルオクチル）オキシ）－Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－８－オキソオクタンアミド）－ヘプタデカン酸２－ヘキシルデシル（２９）。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．０３－３．９４（ｍ，４Ｈ），３．６７－３．６１（ｍ，１Ｈ），３．１８－３．０９（ｍ，２Ｈ），２．４２－２．１２（ｍ，１２

Ｈ），１．８１－１．４１（ｍ，２４Ｈ），１．４１－１．０３（ｍ，５６Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝３．２Ｈｚ，１５Ｈ）。

【０６３０】

【化１４８】

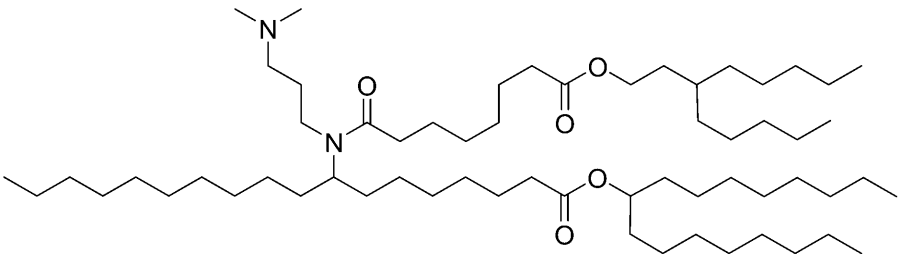


(30)

８－（Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－８－オキソ－８－（（３－ペンチルオクチル）オキシ）－オクタンアミド）オクタデセン酸３－ペンチルオクチル（３０）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．１４－４．０７（ｍ，４Ｈ），３．６７－３．６１（ｍ，１Ｈ），３．１９－３．１１（ｍ，２Ｈ），２．３６－２．２１（ｍ，１０Ｈ），１．７２－１．５３（ｍ，２２Ｈ），１．５３－１．３９（ｍ，６Ｈ），１．３９－１．１８（ｍ，５２Ｈ），０．９７－０．８４（ｍ，１５Ｈ）。

【０６３１】

【化１４９】



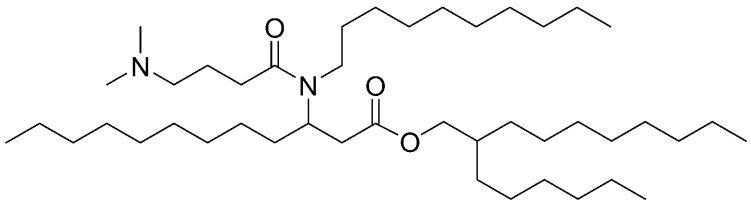
(31)

８－（Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－８－オキソ－８－（（３－ペンチルオクチル）オキシ）－オクタンアミド）オクタデセン酸ヘプタデカン－９－イル（３１）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．９１－４．８５（ｍ，１Ｈ），４．１０（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），２．４２－２．１９（ｍ，１２Ｈ），２．０４－１．８３（ｍ，１２Ｈ），１．７７－１．４６（ｍ，１８Ｈ），１．３９－１．１３（ｍ，６０Ｈ），０．９６－０．８２（ｍ，１５Ｈ）。

【０６３２】

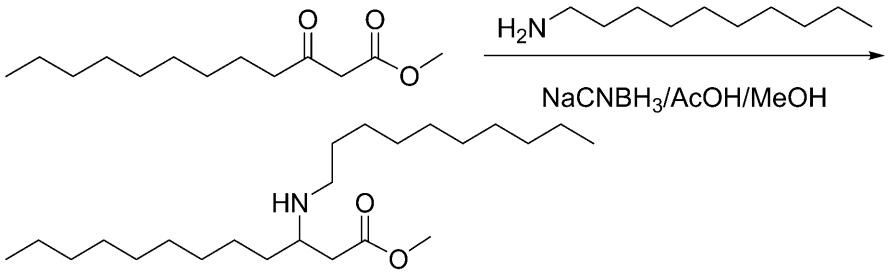
実施例５．３－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）－ブタンアミド］ドデカン酸２－ヘキシルデシル（３２）の合成

【化１５０】



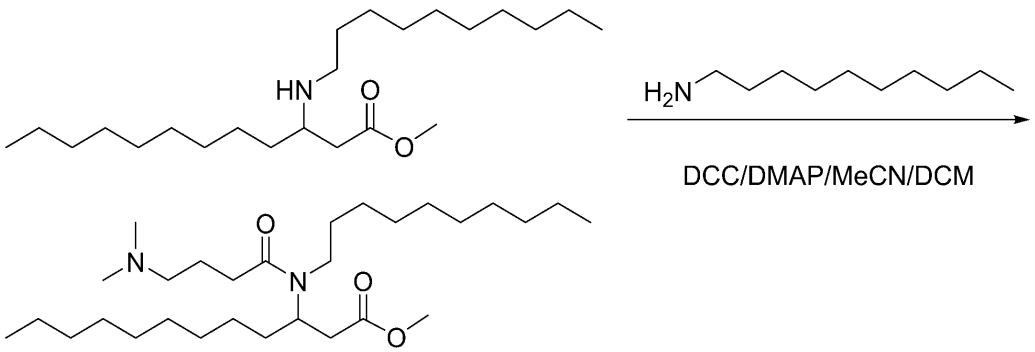
(32)

工程１．３－（デシルアミノ）ドデカン酸メチルの合成
【化１５１】



３－オキソドデカン酸メチル（１ｇ、４．４ｍｍｏｌ）、Ｎ－デシルアミン（７２３ｍｇ、５．０ｍｍｏｌ）、ＮａＣＮＢＨ$_3$（８２６ｍｇ、１３．１ｍｍｏｌ）およびＡｃＯＨ（０．５ｍＬ、８．８ｍｍｏｌ）をメタノール中のＭｅＯＨにて５０℃で１８時間撹拌した。反応物を室温に冷却し、真空にて部分的に濃縮した。混合物をＤＣＭに溶解し、ＮａＨＣＯ$_3$（飽和水溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥（ＭｇＳＯ$_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１２％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して３－（デシルアミノ）ドデカン酸メチル（５６０ｍｇ、３４．６％）を得た。

【０６３３】
工程２．３－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］ドデカン酸メチルの合成
【化１５２】



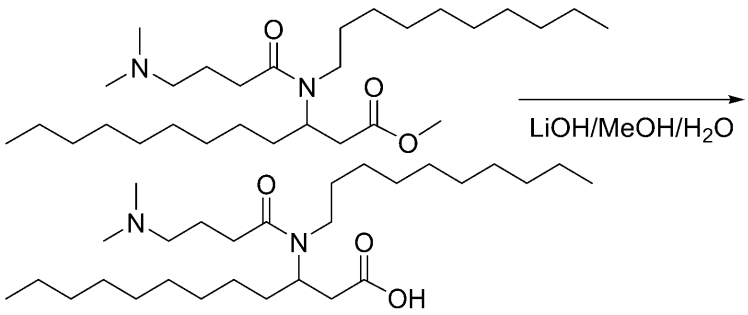
４－ジメチルアミノ］ブタン酸ＨＣｌ塩（５０８ｍｇ、３．０３ｍｍｏｌ）、ＤＣＣ（６８８ｍｇ、３．３ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（５５５ｍｇ、４．５ｍｍｏｌ）をＭｅＣＮ（５ｍＬ）中にて室温で２時間撹拌した。ＤＣＭ（５ｍＬ）中の３－（デシルアミノ）ドデカン酸メチル（５６０ｍｇ、１．５ｍｍｏｌ）を加え、７２時間撹拌を続けた。セライトを介して反応物を濾過し、ＤＣＭですすぎ、濾液をＮａＨＣＯ$_3$（飽和水溶液）およ

びブラインで洗浄し、乾燥（$MgSO_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して３－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］ドデカン酸メチル（４９８ｍｇ、６８．１％）を得た。

【０６３４】

工程３．３－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］ドデカン酸の合成

【化１５３】

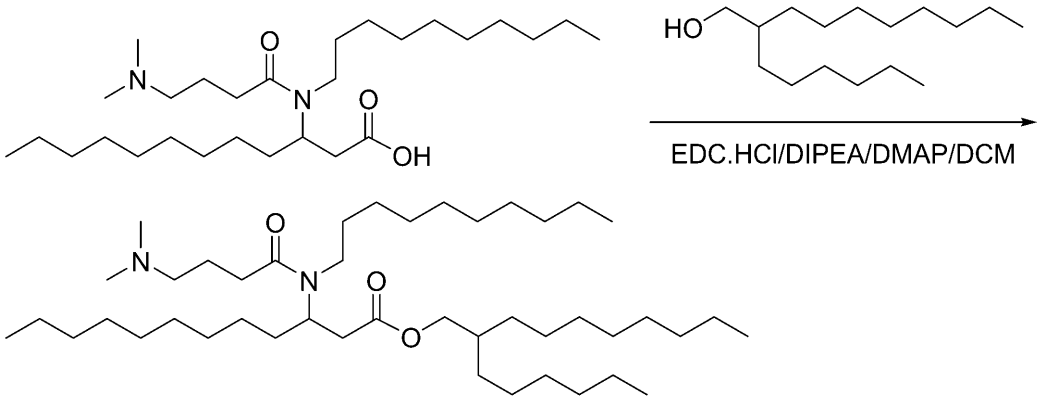


３－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］ドデカン酸メチル（４９８ｍｇ、１．０ｍｍｏｌ）とＬｉＯＨ（４９ｍｇ、２．１ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（３．０ｍＬ）とH_2O水（０．５ｍＬ）中にて５０℃で２時間撹拌した。反応物を室温まで冷却し、６ＭのＨＣｌ（０．３５ｍＬ）で反応を止めた。反応物を真空にて部分的に濃縮し、次いでH_2O水とＤＣＭの間で分配した。水性層をＤＣＭで抽出し、合わせた有機物をブラインで洗浄し、乾燥（$MgSO_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮して３－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］ドデカン酸（４０９ｍｇ、８４．６％）を得、それをさらに精製することなく使用した。

【０６３５】

工程４．３－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）－ブタンアミド］ドデカン酸２－ヘキシルデシル（３２）の合成

【化１５４】



(32)

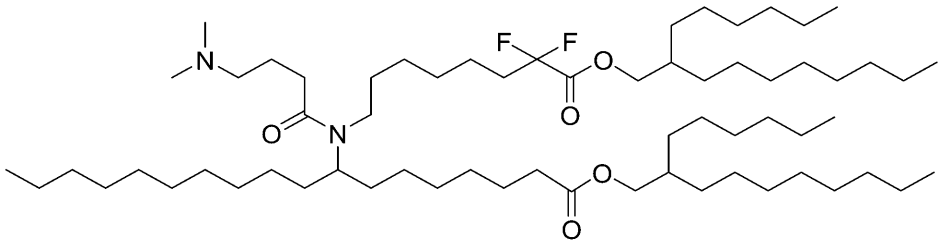
３－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］ドデカン酸（３６９ｍｇ、０．８ｍｍｏｌ）、ヘキシルデカノール（２２９ｍｇ、０．９５ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ（３０２ｍｇ、１．６ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．４１１ｍＬ、２．４ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（触媒量）をＤＣＭ（５ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。反応物を$NaHCO_3$（飽和水溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１２％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ

）によって精製して３－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］ドデカン酸２－ヘキシルデシル（３２）を得た。（８８ｍｇ、１６．１％）。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．２６（ｓ，１Ｈ），４．０３－３．９３（ｍ，２Ｈ），３．８９－３．７６（ｍ，１Ｈ），３．１６（ｄｄｔ，Ｊ＝１５．２，１０．６，５．７Ｈｚ，１Ｈ），２．９８（ｓ，１Ｈ），２．７９－２．２２（ｍ，１３Ｈ），１．９０（ｄｄｄ，Ｊ＝２７．０，１４．０，７．１Ｈｚ，３Ｈ），１．５１（ｄｑ，Ｊ＝２２．６，６．４Ｈｚ，５Ｈ），１．２８（ｑ，Ｊ＝４．２Ｈｚ，５１Ｈ），０．９０（ｍ，１２Ｈ）。

【０６３６】

実施例６．８－（Ｎ－｛７，７－ジフルオロ－８－［（２－ヘキシルデシル）オキシ］－８－オキソオクチル｝－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（３３）の合成

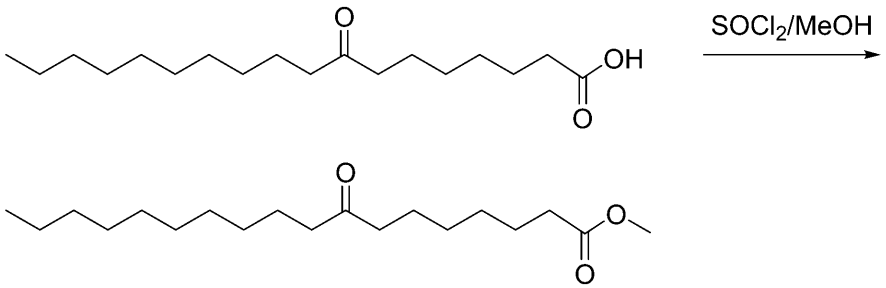
【化１５５】



(33)

工程１．８－オキソオクタデカン酸メチルの合成

【化１５６】

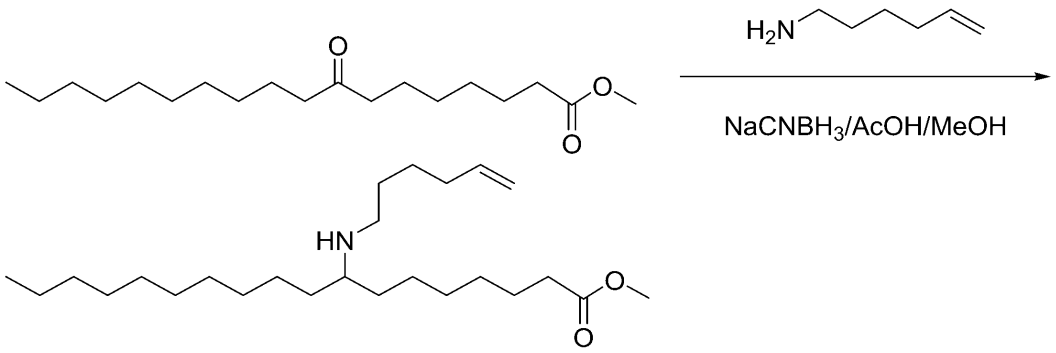


８－オキソオクタデカン酸（３．３ｇ、１０．９ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（６０ｍＬ）中にて０℃で撹拌した。塩化チオニル（１．４３ｇ、１２．０ｍｍｏｌ）を一滴ずつ加え、反応物を１８時間撹拌して室温まで温めた。反応物を真空にて濃縮し、残留物をヘキサンに溶解し、ＮａＨＣＯ$_{3}$（飽和溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥（ＭｇＳＯ$_{4}$）させ、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（２～２０％ＥｔＯＡｃ－ヘキサン）によって精製して８－オキソオクタデカン酸メチル（３．３３ｇ、９７．９％）を得た。

【０６３７】

工程２．８－（ヘクス－５－エン－１－イルアミノ）オクタデセン酸メチルの合成

【化１５７】

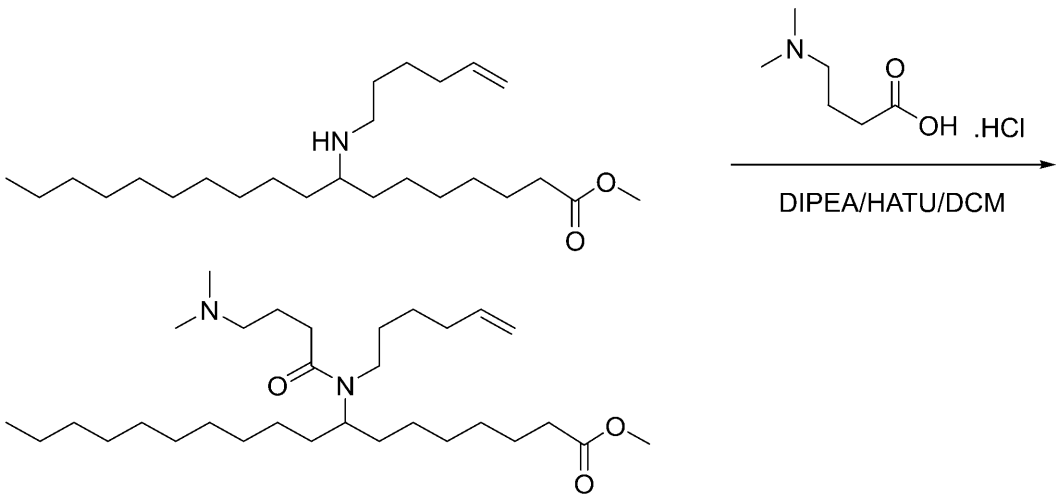


８－オキソオクタデカン酸メチル（２．６８ｇ、８．６ｍｍｏｌ）、ヘクス－５－エン－１－アミン（０．９４ｇ、９．４ｍｍｏｌ）、ＡｃＯＨ（１．０ｍＬ、１７．２ｍｍｏｌ）およびＮａＣＮＢＨ$_3$（１．６２ｇ、２５．７ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（３２ｍＬ）中にて５０℃で１８時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、ＮａＨＣＯ$_3$（飽和溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥（ＭｇＳＯ$_4$）させ、濾過し、濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して、８－（ヘクス－５－エン－１－イルアミノ）オクタデカン酸メチル（２．１ｇ、６１．９％）を得た。

【０６３８】

工程３．８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（ヘクス－５－エン－１－イル）ブタンアミド］オクタデセン酸エステルの合成

【化１５８】



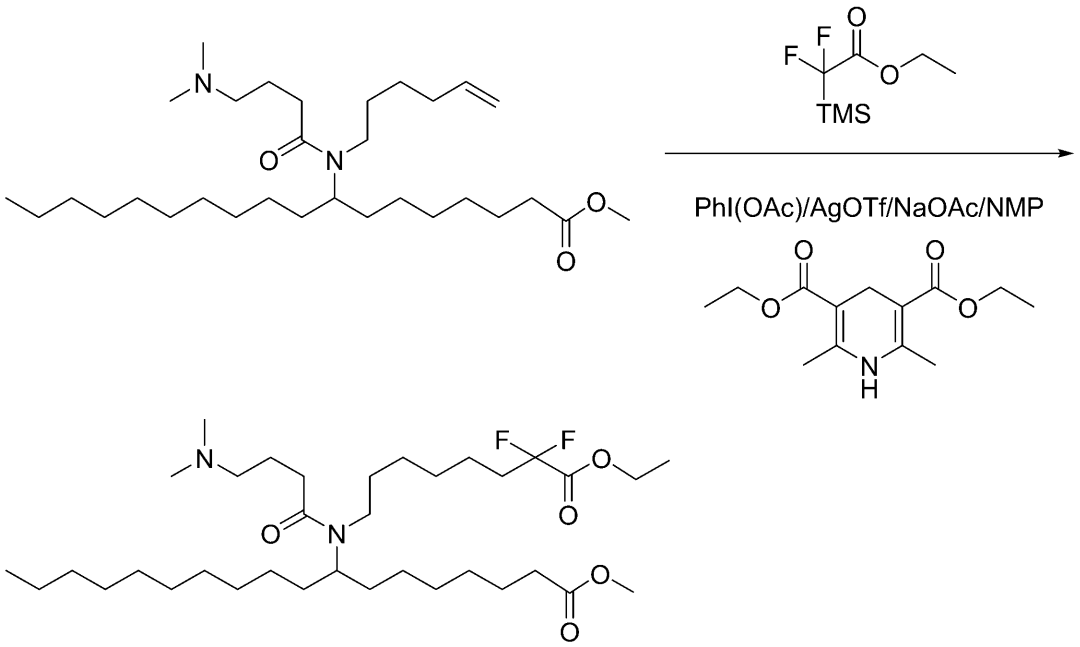
４－ジメチルアミノブタン酸（ＨＣｌ塩）（１．８ｇ、１０．６ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（４．０ｇ、１０．６ｍｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（３．７ｍＬ、２１．２ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（５０ｍＬ）中にて室温で１時間撹拌した。ＤＣＭ（５ｍＬ）中の８－（ヘクス－５－エン－１－イルアミノ）オクタデカン酸メチル（２．１ｇ、５．３ｍｍｏｌ）を加え、反応物を室温で１８時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、ＮａＨＣＯ$_3$（飽和溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥（ＭｇＳＯ$_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（１～１５％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（ヘクス－５－エン－１－イル）ブタンアミド］オクタデカン酸メチル（２．０ｇ、７４．１％）を得た。

【０６３９】

工程４．８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［（５Ｅ）－８－エトキシ－７，７－ジフ

ルオロ－８－オキソオクト－５－エン－１－イル］ブタンアミド］オクタデセン酸メチルの合成

【化１５９】

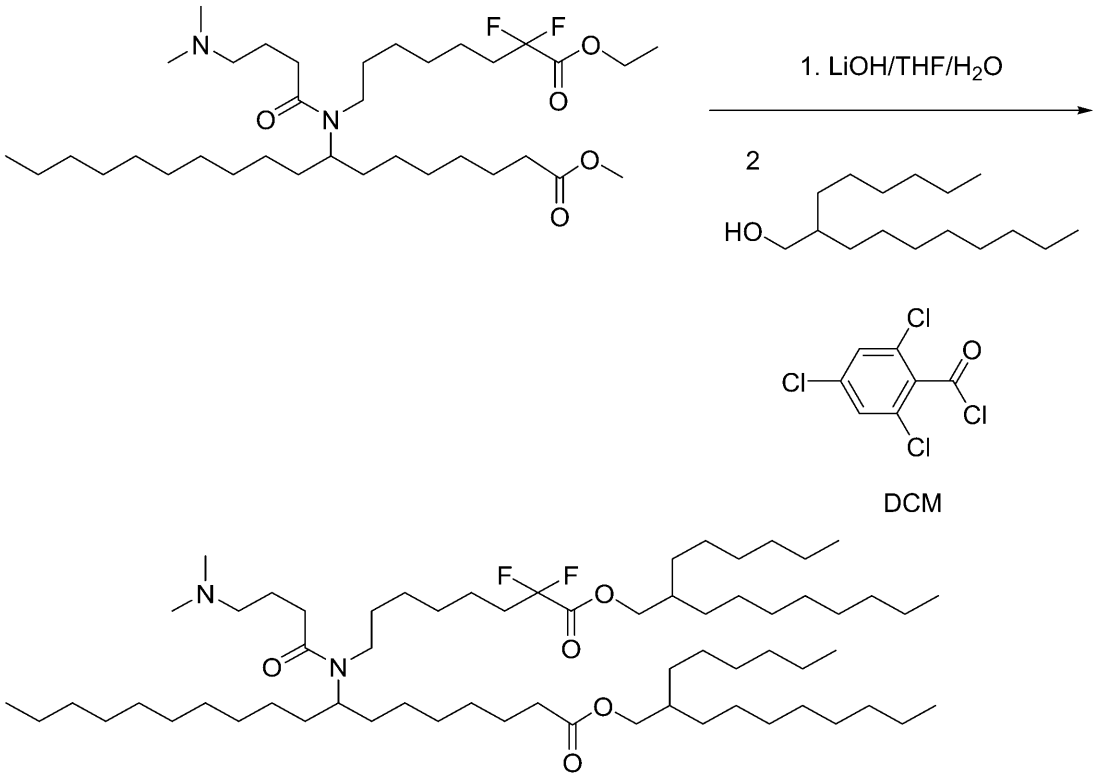


真空加熱乾燥したフラスコにて、Ｈａｎｔｚｃｈエステル（１．０ｇ、３．９ｍｍｏｌ）、二酢酸ヨードベンゼン（２．５ｇ、７．９ｍｍｏｌ）、ＮａＯＡｃ（１．０ｇ、１１．８ｍｍｏｌ）およびＡｇＯＴｆ（２．５ｇ、９．８ｍｍｏｌ）を窒素でパージし、ＮＭＰ（４０ｍＬ）に溶解した。８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（ヘクス－５－エン－１－イル）ブタンアミド］オクタデカン酸メチル（２ｇ、３．９ｍｍｏｌ）および２，２－ジフルオロ－２－（トリメチルシリル）酢酸エチル（３．６ｇ、２０．０ｍｍｏｌ）を加え、反応物を室温で１８時間撹拌した。セライトを介して反応物を濾過し、濾液を水とブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［（５Ｅ）－８－エトキシ－７，７－ジフルオロ－８－オキソオクト－５－エン－１－イル］ブタンアミド］オクタデカン酸メチル（２．２１ｇ、６６．８％）を得た。

【０６４０】

工程５．８－（Ｎ－｛７，７－ジフルオロ－８－［（２－ヘキシルデシル）オキシ］－８－オキソオクチル｝－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（３３）の合成

【化１６０】



(33)

８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（８－エトキシ－７，７－ジフルオロ－８－オキソオクチル）ブタンアミド］オクタデカン酸メチル（２．２１ｇ、３．９ｍｍｏｌ）およびＬｉＯＨ（３３５ｍｇ、１４．０ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（２２ｍＬ）およびH_2O（６．６ｍＬ）中にて５０℃で２時間撹拌した。６ＭのＨＣｌ（１１．６ｍＬ）で反応を止め、真空にて部分的に濃縮した。水性物をＨＣｌ（１Ｍ）で希釈し、ＤＣＭで抽出した。合わせた有機物をブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、トルエンと共沸させて真空にて濃縮した。

【０６４１】

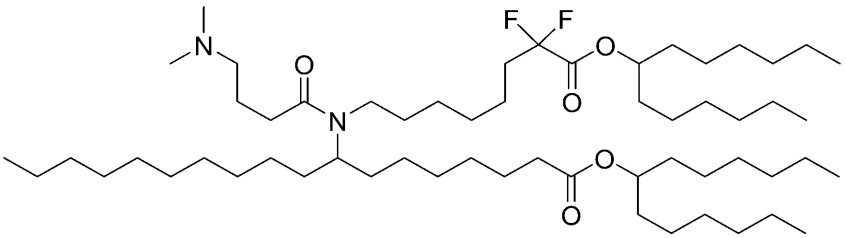
ビス酸および２－ヘキシルデカン－１－オール（１．８ｇ、７．３ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（２２ｍＬ）に溶解し、塩化２，４，６－トリクロロベンゾイル（１．８７ｇ、７．７６ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（１．７１ｇ、１４．０ｍｍｏｌ）を加えた。反応物を室温で１８時間撹拌し、真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解した。有機物を$NaHCO_3$（飽和溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料をフラッシュクロマトグラフィー（０～１２％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して８－（Ｎ－｛７，７－ジフルオロ－８－［（２－ヘキシルデシル）オキシ］－８－オキソオクチル｝－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（３３）（６１５ｍｇ、１６．９％）を得た。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）δ４．１８（ｄｄ，Ｊ＝５．８，４．０Ｈｚ，２Ｈ），３．９８（ｄｄ，Ｊ＝５．８，３．２Ｈｚ，２Ｈ），３．６５（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，１Ｈ），３．１１－３．００（ｍ，２Ｈ），２．３９－２．２８（ｍ，６Ｈ），２．２６（ｓ，６Ｈ），２．１６－１．９７（ｍ，３Ｈ），１．８５（ｄｔ，Ｊ＝９．２，６．９Ｈｚ，３Ｈ），１．７３（ｓ，１Ｈ），１．６８－１．３８（ｍ，１３Ｈ），１．２９（ｍ，７３Ｈ），０．９５－０．８６（ｍ，１５Ｈ）．^{19}ＦＮＭＲ（３７６ＭＨｚ，$CDCl_3$）δ－１０５．７８（ｍ，２Ｆ）。

【０６４２】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【０６４３】

【化１６１】

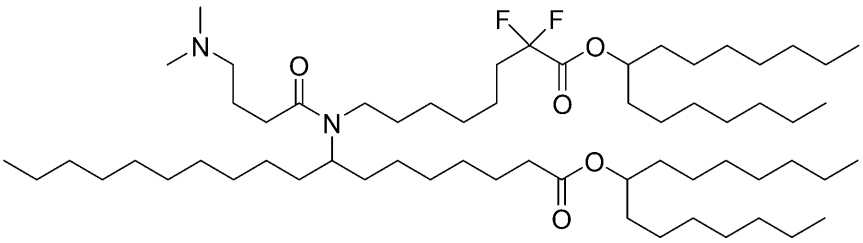


(116)

８－（Ｎ－（７，７－ジフルオロ－８－オキソ－８－（トリデカン－７－イルオキシ）オクチル）－４－（ジメチルアミノ）－ブタンアミド）オクタデカン酸トリデカン－７－イル（１１６）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．０２（ｑ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，１Ｈ），４．８９（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，１Ｈ），３．６７（ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，０Ｈ），３．４０（ｓ，０Ｈ），３．０６（ｔ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），２．３８－２．２５（ｍ，５Ｈ），２．２４（ｓ，４Ｈ），２．０７（ｔｑ，Ｊ＝１６．８，９．２Ｈｚ，２Ｈ），１．８４（ｑ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，２Ｈ），１．７３－１．１５（ｍ，５９Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６４４】

【化１６２】

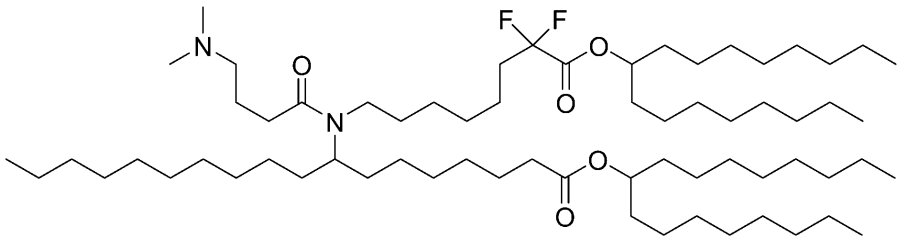


(117)

８－（Ｎ－（７，７－ジフルオロ－８－オキソ－８－（ペンタデカン－８－イルオキシ）オクチル）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）オクタデカン酸ペンタデカン－８－イル（１１７）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．０７－４．９８（ｍ，１Ｈ），４．８８（ｔｄ，Ｊ＝６．５，３．１Ｈｚ，１Ｈ），３．６４（ｓ，０Ｈ），２．４７（ｓ，１Ｈ），２．４２－２．２４（ｍ，７Ｈ），２．０６（ｔｔ，Ｊ＝１６．７，８．３Ｈｚ，２Ｈ），１．９６－１．８８（ｍ，２Ｈ），１．７２－１．１５（ｍ，６５Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６４５】

【化１６３】



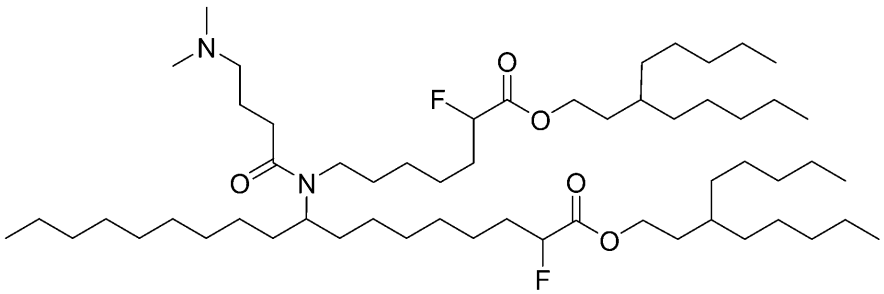
(118)

８－（Ｎ－（７，７－ジフルオロ－８－（ヘプタデカン－９－イルオキシ）－８－オキソオクチル）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）オクタデカン酸ヘプタデカン－９－イル（１１８）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．０２（ｑ，Ｊ＝５．９Ｈｚ，１Ｈ），４．８８（ｔ，Ｊ＝６．１Ｈｚ，１Ｈ），３．６４（ｓ，１Ｈ），３．４３－３．３８（ｍ，０Ｈ），３．０６（ｄｄ，Ｊ＝１１．６，５．５Ｈｚ，２Ｈ），２．５１（ｓ，２Ｈ），２．４３－２．２４（ｍ，７Ｈ），２．０７（ｔｑ，Ｊ＝１６．７，９．２Ｈｚ，２Ｈ），１．９３（ｑ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ），１．７２－１．１３（ｍ，７６Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６４６】

実施例７．９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛６－フルオロ－７－オキソ－７－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ヘプチル｝ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸３－ペンチルオクチル（３４）の合成

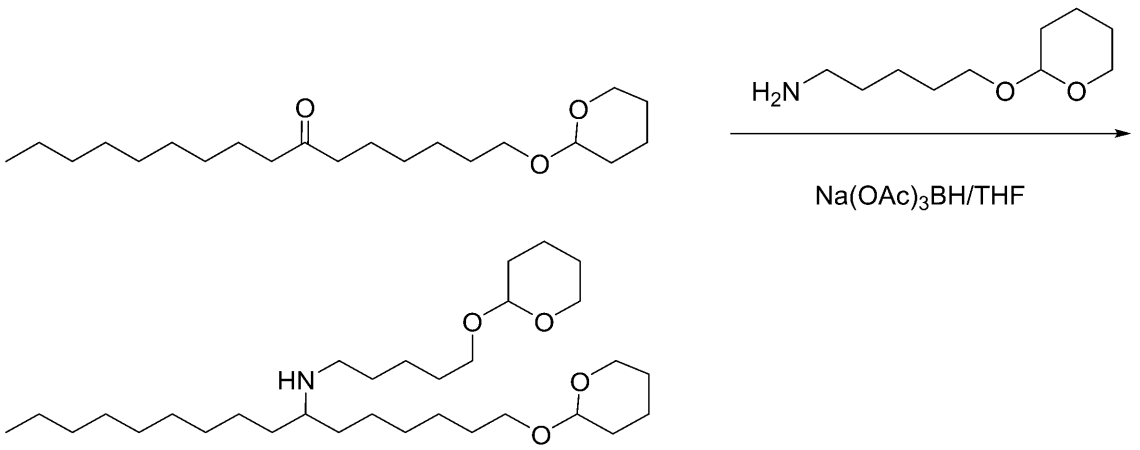
【化１６４】



(34)

工程１．［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］［５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンチル］アミンの合成

【化１６５】

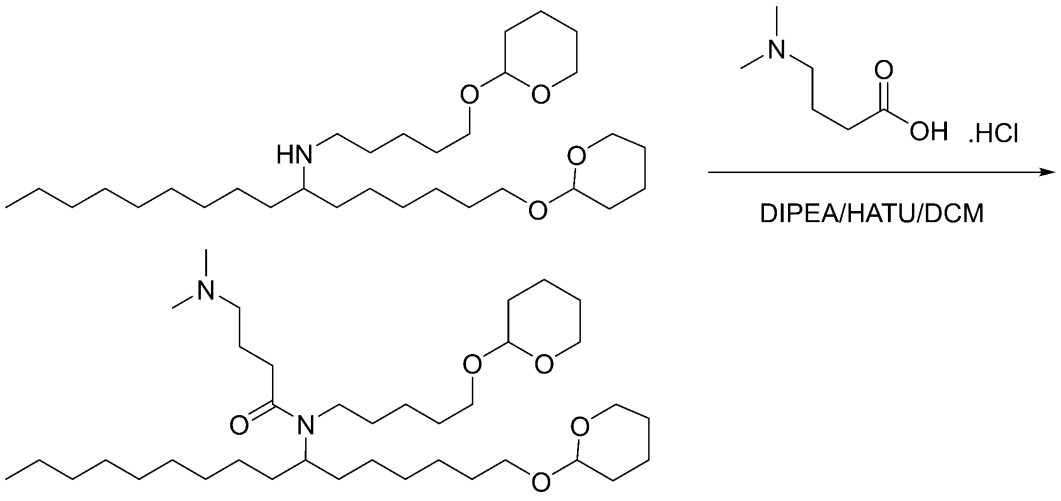


１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－オン（９．９ｇ、２９．１ｍｍｏｌ）、５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンタン－１－アミン（６ｇ、３２．０ｍｍｏｌ）およびＮａ（ＯＡｃ）$_3$ＢＨ（１８．５ｇ、８７．４ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１００ｍＬ）中にて５０℃で１８時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯ$_2$に溶解し、ＮａＨＣＯ$_3$（飽和溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］［５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンチル］アミン（５．２ｇ、３４．９％）を得た。

【０６４７】

工程２．４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］－Ｎ－［５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンチル］ブタンアミドの合成

【化１６６】



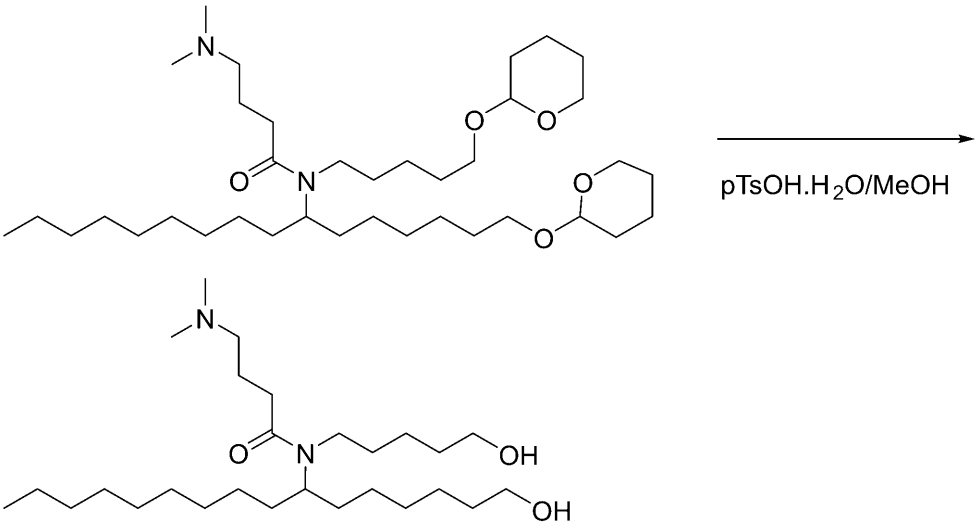
４－ジメチルアミノ］ブタン酸（ＨＣｌ塩）（５．２ｇ、３１．１ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（１１．８ｇ、３１．０ｍｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（１０．８ｍＬ、６２．１ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（７５ｍＬ）中にて室温で１時間撹拌した。［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］［５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンチル］アミン（５．３ｇ、１０．４ｍｍｏｌ）のＤＣＭ（１０ｍＬ）溶液を加え、室温で１８時間撹拌を続けた。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、ＮａＨＣＯ$_3$（飽和

溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（１～１５％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］－Ｎ－［５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンチル］ブタンアミド（２．０８ｇ、３２．１％）を得た。

【０６４８】

工程３．４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－ヒドロキシヘキサデカン－７－イル）－Ｎ－（５－ヒドロキシペンチル）ブタンアミドの合成

【化１６７】

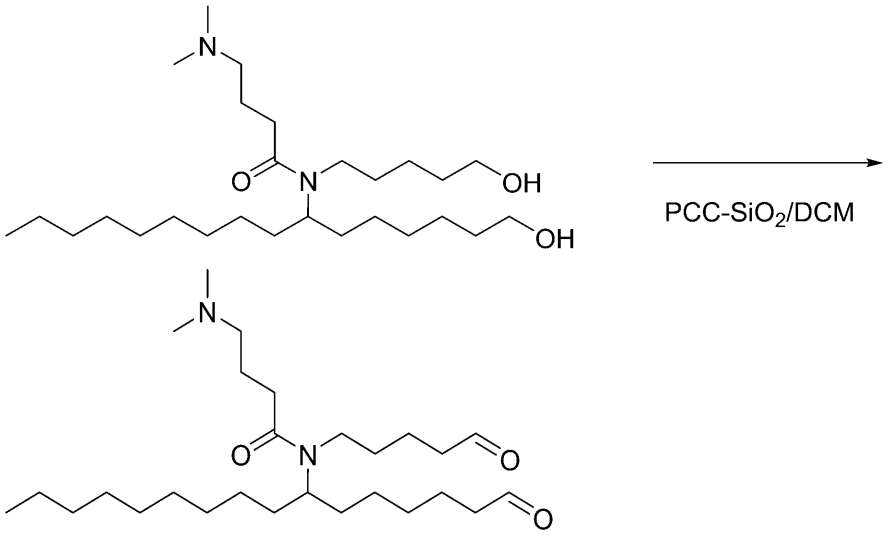


４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］－Ｎ－［５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンチル］ブタンアミド（２．０８ｇ、３．３ｍｍｏｌ）およびｐＴｓＯＨ－Ｈ$_2$Ｏ（１２７ｍｇ、０．７ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（２５ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、ＮａＨＣＯ$_3$（飽和溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮して４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－ヒドロキシヘキサデカン－７－イル）－Ｎ－（５－ヒドロキシペンチル）ブタンアミド（１．５ｇ，９８．７％）を得、それをさらに処理することなく使用した。

【０６４９】

工程４．４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－オキソヘキサデカン－７－イル）－Ｎ－（５－オキソペンチル）－ブタンアミドの合成

【化１６８】

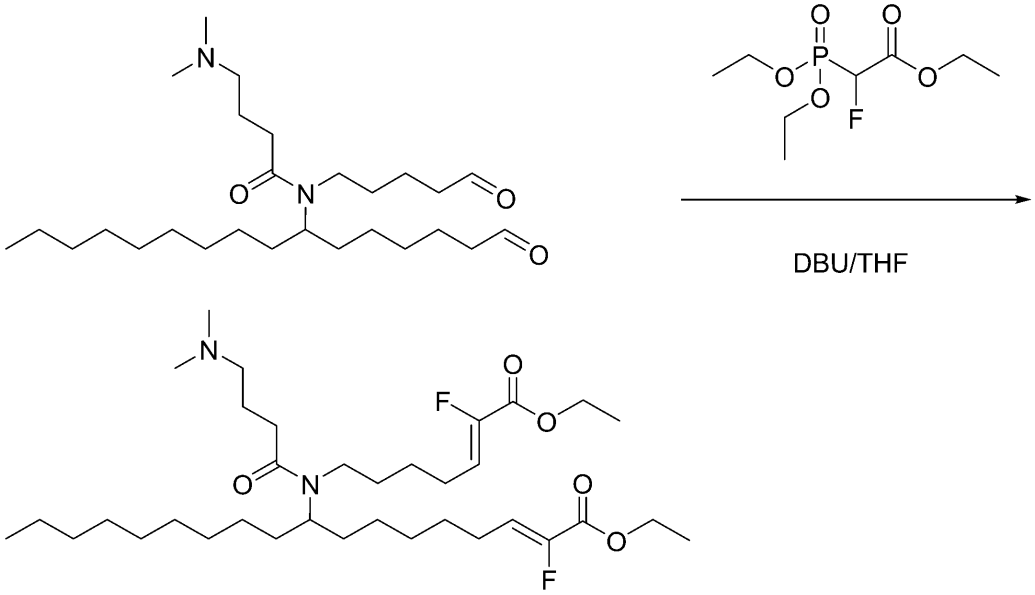


４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－ヒドロキシヘキサデカン－７－イル）－Ｎ－（５－ヒドロキシペンチル）ブタンアミド（１．５ｇ、３．３ｍｍｏｌ）およびＰＣＣ－ＳｉＯ$_2$（１：１）（５．０ｇ、１１．５ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（３０ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。シリカ床を介して混合物を濾過し、ＥｔＯＡｃで溶出した。濾液を真空にて濃縮し、粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１２％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－オキソヘキサデカン－７－イル）－Ｎ－（５－オキソペンチル）ブタンアミド（４８６ｍｇ、３２．７％）を得た。

【０６５０】

工程５．（２Ｚ）－９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［（５Ｚ）－７－エトキシ－６－フルオロ－７－オキソヘプト－５－エン－１－イル］ブタンアミド］－２－フルオロオクタデク－２－エン酸エチルの合成

【化１６９】



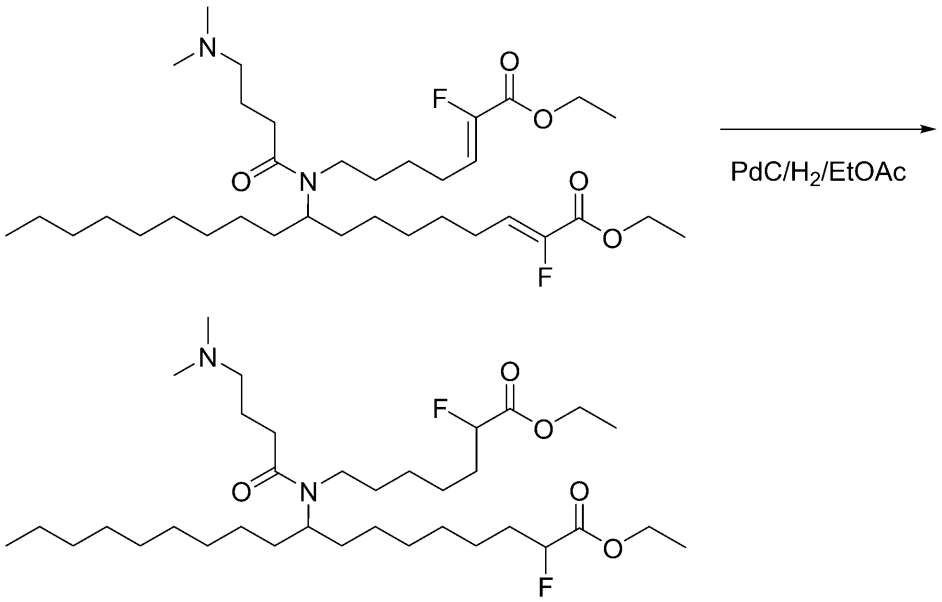
４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－オキソヘキサデカン－７－イル）－Ｎ－（５－オキソペンチル）ブタンアミド（３４６ｍｇ、０．７６ｍｍｏｌ）、２－（ジエトキシホスホリル）－２－フルオロ酢酸エチル（０．６２ｍＬ、３．１ｍｍｏｌ）およびＤＢＵ（０

．４６ｍＬ、３．１ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１０ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、ＮａＨＣＯ$_3$（飽和溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して（２Ｚ）－９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［（５Ｚ）－７－エトキシ－６－フルオロ－７－オキソヘプト－５－エン－１－イル］ブタンアミド］－２－フルオロオクタデク－２－エン酸エチル（１１６ｍｇ、２４．１％）を得た。

【０６５１】

工程６．９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（７－エトキシ－６－フルオロ－７－オキソヘプチル）－ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸エチルの合成

【化１７０】

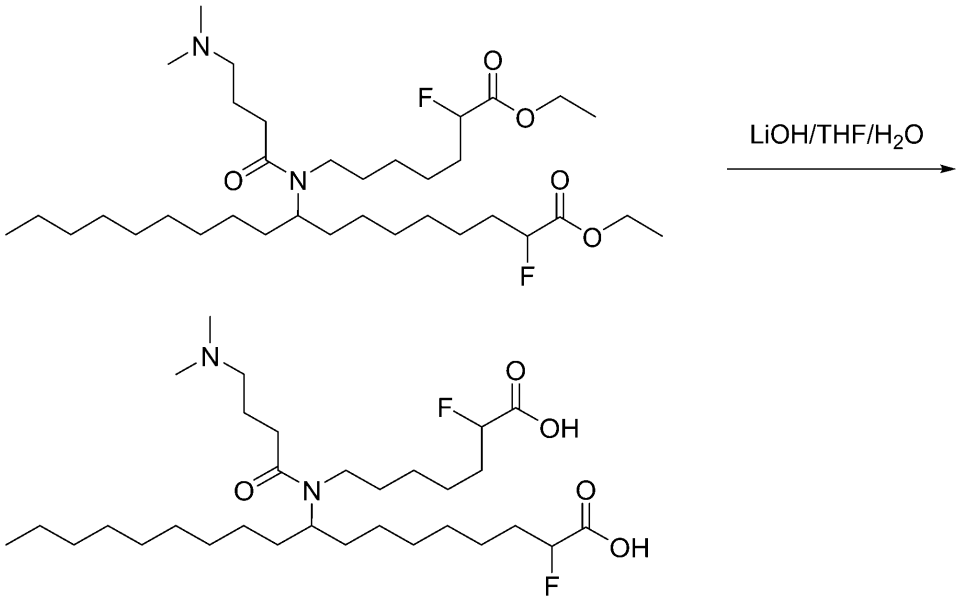


（２Ｚ）－９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［（５Ｚ）－７－エトキシ－６－フルオロ－７－オキソヘプト－５－エン－１－イル］ブタンアミド］－２－フルオロオクタデク－２－エン酸エチル（１１６ｍｇ、０．１８ｍｍｏｌ）をＥｔＯＡｃ（５ｍＬ）中にて室温で１８時間、Ｐｄ／Ｃ（１０％ｗ／ｗ）（１５ｍｇ）上での接触水素化に供した。セライトを介して混合物を濾過し、濾液を真空にて濃縮して９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（７－エトキシ－６－フルオロ－７－オキソヘプチル）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸エチル（１１７ｍｇ、１００％）を得、それを精製することなく使用した。

【０６５２】

工程７．９－［Ｎ－（６－カルボキシ－６－フルオロヘキシル）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸の合成

【化１７１】

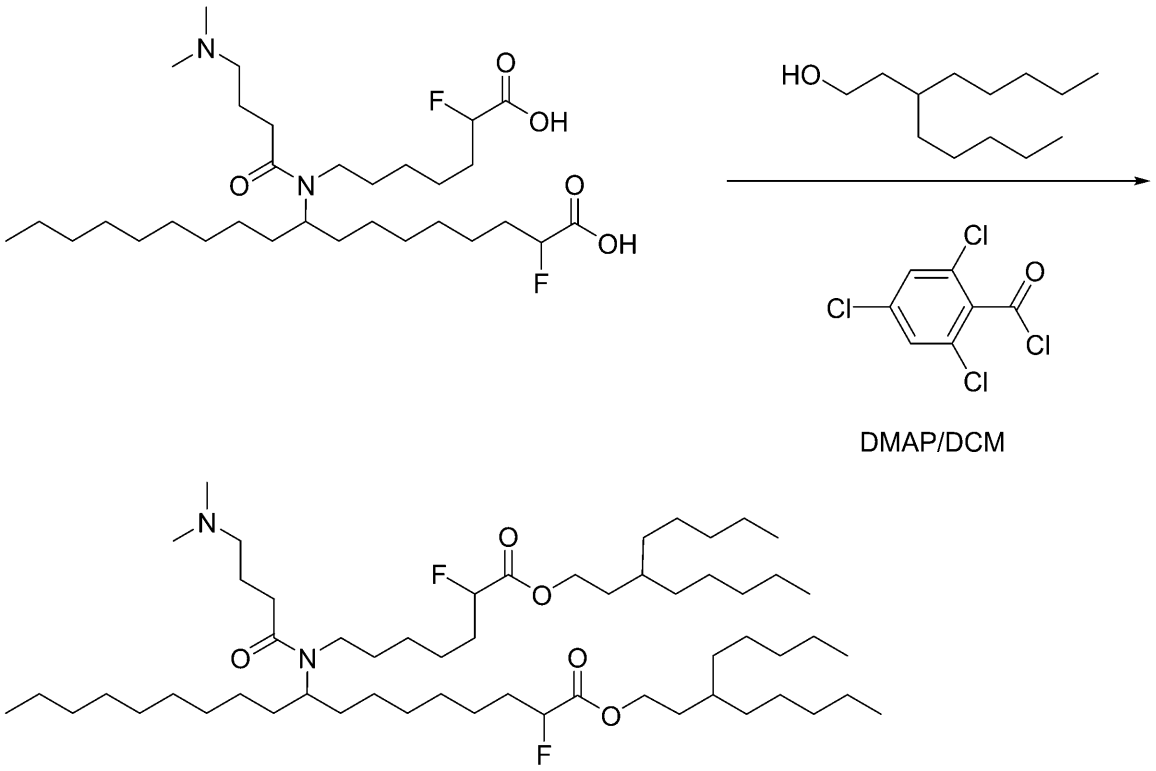


９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（７－エトキシ－６－フルオロ－７－オキソヘプチル）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸エチル（１１７ｍｇ、０．１９ｍｍｏｌ）およびＬｉＯＨ（１８ｍｇ、０．７４ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（０．６ｍＬ）およびH_2O水（０．１８ｍＬ）中にて５０℃で２時間撹拌した。反応物を室温まで冷却し、６ＭのＨＣｌ（０．１２６ｍＬ）で反応を止め、ＤＣＭで抽出した。合わせた有機物をブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮して９－［Ｎ－（６－カルボキシ－６－フルオロヘキシル）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸（７５ｍｇ、７０．３％）を得、それを精製することなく使用した。

【０６５３】

工程８．９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛６－フルオロ－７－オキソ－７－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ヘプチル｝ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸３－ペンチルオクチル（３４）の合成

【化１７２】



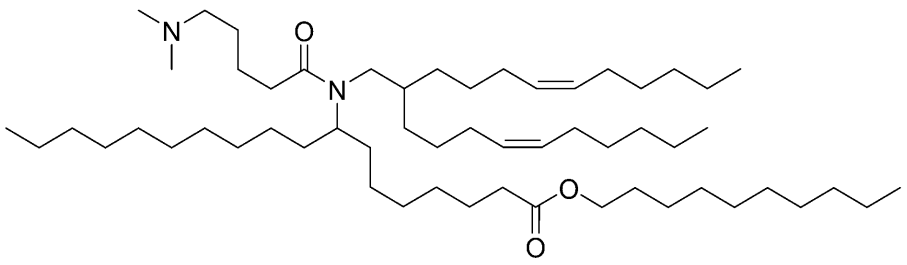
(34)

９－［Ｎ－（６－カルボキシ－６－フルオロヘキシル）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸（７５ｍｇ、０．１３ｍｍｏｌ）、３－ペンチルオクタン－１－オール（７２ｍｇ、０．３６ｍｍｏｌ）、塩化２，４，６－トリクロロベンゾイル（９５ｇ、０．４ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（６４ｍｇ、０．５２ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（４ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、ＮａＨＣＯ$_3$（飽和溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１２％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛６－フルオロ－７－オキソ－７－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ヘプチル｝ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸３－ペンチルオクチル（３４）（４２ｍｇ、３４．３％）を得た。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ５．００－４．９１（ｍ，１Ｈ），４．８８－４．７９（ｍ，１Ｈ），４．２３（ｑｄ，Ｊ＝６．２，２．９Ｈｚ，４Ｈ），３．７１－３．５６（ｍ，１Ｈ），３．０７（ｄ，Ｊ＝８．３Ｈｚ，２Ｈ），２．６２（ｓ，２Ｈ），２．４５（ｍ，８Ｈ），１．９９－１．８０（ｍ，７Ｈ），１．６９－１．４０（ｍ，１８Ｈ），１．３９－１．１５（ｍ，５６Ｈ），０．９５－０．８６（ｍ，１５Ｈ）。

【０６５４】

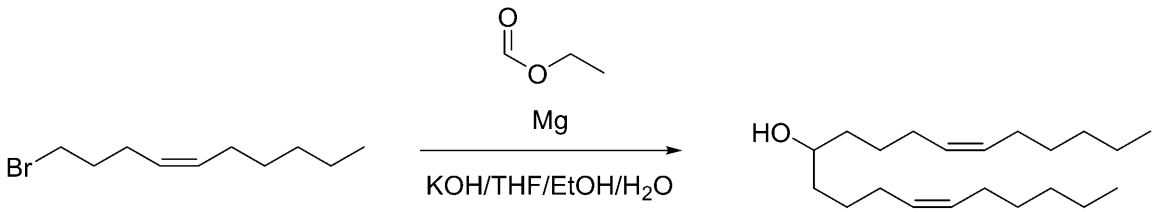
実施例８．８－｛Ｎ－［（６Ｚ）－２－［（４Ｚ）－デク－４－エン－１－イル］ドデク－６－エン－１－イル］－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド｝オクタデセン酸デシル（３５）の合成

【化１７３】



(35)

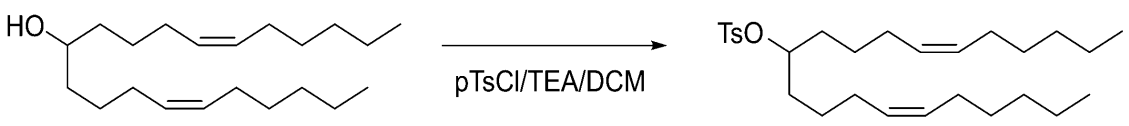
工程１．（６Ｚ，１５Ｚ）－ヘニコサ－６，１５－ジエン－１１－オールの合成
【化１７４】



グリニャール試薬は、ＴＨＦ中の（４Ｚ）－１－ブロモデク－４－エン（１９．９ｇ、９１ｍｍｏｌ）とマグネシウム（２．４ｇ、９７．０ｍｍｏｌ）から調製した。反応物を４５℃で３時間加熱した。１０℃に冷却した後、ＴＨＦ（３５ｍＬ）中のギ酸エチル（７．０ｇ、９３．５ｍｍｏｌ）を一滴ずつ加え、反応物を１時間撹拌した。水（４０ｍＬ）と６ＭのＨＣｌ（５０ｍＬ）を加えて反応を止め、反応物を水とヘキサンの間で分配した。有機物を分離し、ブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物をＥｔＯＨ（３０ｍＬ）に溶解し、ＫＯＨ（４．６ｇ）水（１０ｍＬ）溶液で処理した。５分後、ＥｔＯＨを除去し、残留物をヘキサンと６ＭのＨＣｌの間で分配した。有機物を水およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＥｔＯＡｃ－ヘキサン）によって精製して（６Ｚ，１５Ｚ）－ヘニコサ－６，１５－ジエン－１１－オール（１１．４ｇ、８１．４％）を得た。

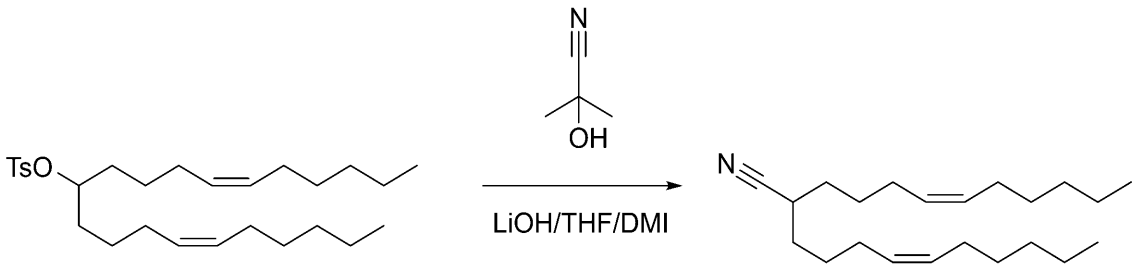
【０６５５】

工程２．４－メチルベンゼンスルホン酸（６Ｚ，１５Ｚ）－ヘニコサ－６，１５－ジエン－１１－イルの合成
【化１７５】

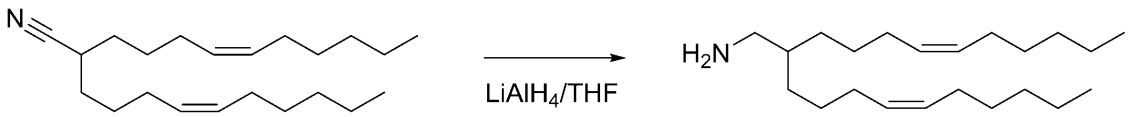


（６Ｚ，１５Ｚ）－ヘニコサ－６，１５－ジエン－１１－オール（１０ｇ、３２．４ｍｍｏｌ）、ＴＥＡ（９．０ｍＬ、６４．８ｍｍｏｌ）、トリメチルアンモニウムＨＣｌ（０．３１ｇ、３．２ｍｍｏｌ）および塩化ｐトルエンスルホニル（８．０ｇ、４２．１ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（５０ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。Ｎ，Ｎジメチルプロパンジアミン（１．０９ｇ、１０．７ｍｍｏｌ）で反応をゆっくり止めた。１５分間撹拌した後、反応物を水およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０－５％ＥｔＯＡｃ－ヘキサン）によって精製して、４－メチルベンゼンスルホン酸（６Ｚ，１５Ｚ）－ヘニコサ－６，１

５－ジエン－１１－イル（８．７ｇ、５７．９％）を得た。
【０６５６】
工程３．（６Ｚ）－２－［（４Ｚ）－デク－４－エン－１－イル］ドデク－６－エンニトリルの合成
【化１７６】

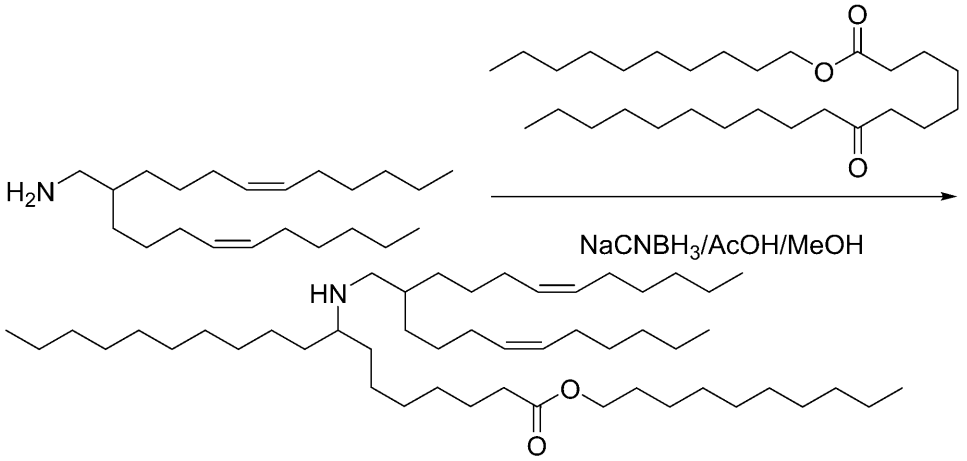


４－メチルベンゼンスルホン酸（６Ｚ，１５Ｚ）－ヘニコサ－６，１５－ジエン－１１－イル（８．７ｇ、１８．８ｍｍｏｌ）、ジメチルイミダゾリジノン（２２．６ｍＬ、０．８３Ｍ）、アセトンシアノヒドリン（３．５ｇ、４１．５ｍｍｏｌ）およびＬｉＯＨ（８８０ｍｇ、３６．６ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（５２ｍＬ）中にて６５℃で１８時間撹拌した。反応物をＥｔＯＡｃ－ヘキサン（１：１、５００ｍＬ）と水の間で分配し、有機層をブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＥｔＯＡｃ－ヘキサン）によって精製して（６Ｚ）－２－［（４Ｚ）－デク－４－エン－１－イル］ドデク－６－エンニトリル（４．９ｇ、８１．５％）を得た。
【０６５７】
工程４．収量（６Ｚ，１５Ｚ）－１１－（アミノメチル）ヘニコサ－６，１５－ジエンの合成
【化１７７】



（６Ｚ）－２－［（４Ｚ）－デク－４－エン－１－イル］ドデク－６－エンニトリル（３．４ｇ、９．９ｍｍｏｌ）および$LiAlH_4$（１．９ｇ、５０．０ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（７５ｍＬ）中にて０℃で１８時間撹拌し、室温まで温めた。反応物を０℃まで冷却し、１ＭのＮａＯＨ（１．９ｍＬ）で反応を止めた。混合物を乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮し、粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して（６Ｚ，１５Ｚ）－１１－（アミノメチル）ヘニコサ－６，１５－ジエン（２．４ｇ、７５．４％）を得た。
【０６５８】
工程５．８－｛［（６Ｚ）－２－［（４Ｚ）－デク－４－エン－１－イル］ドデク－６－エン－１－イル］アミノ｝オクタデセン酸デシルの合成

【化１７８】

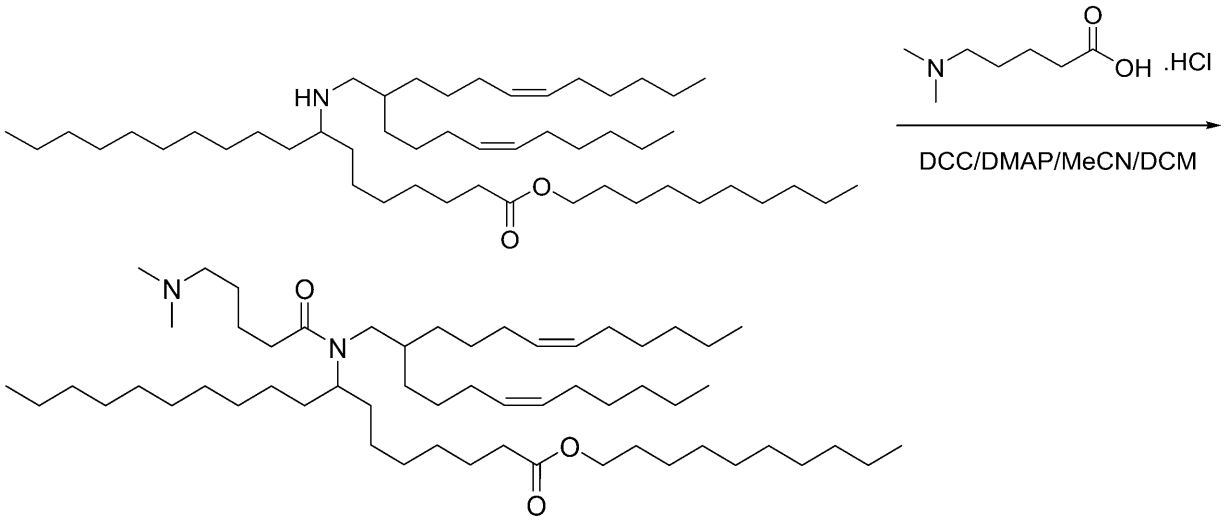


８－オキソオクタデカン酸デシル（３６８ｍｇ、０．８４ｍｍｏｌ）、（６Ｚ，１５Ｚ）－１１－（アミノメチル）ヘニコサ－６，１５－ジエン（２９７ｍｇ、０．９ｍｍｏｌ）、ＡｃＯＨ（０．１ｍＬ、１．７ｍｍｏｌ）およびＮａＣＮＢＨ$_3$（１５６ｍｇ、２．５ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（１０ｍＬ）中にて（５０℃）で１８時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＤＣＭに溶解し、ＮａＨＣＯ$_3$（飽和溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（５～４０％ＥｔＯＡｃ－ヘキサン）によって精製して８－｛［（６Ｚ）－２－［（４Ｚ）－デク－４－エン－１－イル］ドデク－６－エン－１－イル］アミノ｝オクタデカン酸デシル（４３８ｍｇ、７０．２％）を得た。

【０６５９】

工程６．８－｛Ｎ－［（６Ｚ）－２－［（４Ｚ）－デク－４－エン－１－イル］ドデク－６－エン－１－イル］－５－（ジメチルアミノ）－ペンタンアミド｝オクタデセン酸デシル

【化１７９】



(35)

５－ジメチルアミノ］ペンタン酸、ＨＣｌ塩（７１ｍｇ、０．４ｍｍｏｌ）、ＤＣＣ（９０ｍｇ、０．４３ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（７２ｍｇ、０．６ｍｍｏｌ）をＭｅＣＮ（５ｍＬ）中にて室温で３時間撹拌した。ＤＣＭ（２ｍＬ）中の８－｛［（６Ｚ）－２－［（４Ｚ）－デク－４－エン－１－イル］ドデク－６－エン－１－イル］アミノ｝オクタ

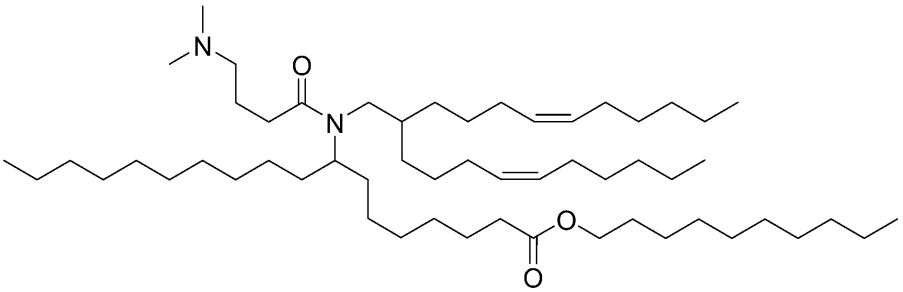
デカン酸デシル（１４６ｍｇ、０．２ｍｍｏｌ）を加え、反応物を室温で１８時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をヘキサン：ＥｔＯＡｃ：ＴＥＡ（７５：２５：１）に分散させ、セライトを介して濾過し、濾液を真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１２％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製して８－｛Ｎ－［（６Ｚ）－２－［（４Ｚ）－デク－４－エン－１－イル］ドデク－６－エン－１－イル］－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド｝オクタデカン酸デシル（３５）（８８ｍｇ、５１．５％）を得た。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．３８（ｈｄ，Ｊ＝７．９，５．４Ｈｚ，４Ｈ），４．０７（ｔｄ，Ｊ＝６．８，２．４Ｈｚ，２Ｈ），３．６３（ｓ，１Ｈ），３．０９（ｄｄ，Ｊ＝１８．４，７．５Ｈｚ，２Ｈ），２．４２－２．２６（ｍ，６Ｈ），２．２３（ｄ，Ｊ＝１．５Ｈｚ，６Ｈ），２．０１（ｄｄ，Ｊ＝１３．６，６．８Ｈｚ，８Ｈ），１．７６－１．５７（ｍ，１１Ｈ），１．５１（ｄｑ，Ｊ＝１４．７，７．２Ｈｚ，５Ｈ），１．４３－１．１７（ｍ，５３Ｈ），０．９６－０．８４（ｍ，１２Ｈ）。

【０６６０】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【０６６１】

【化１８０】

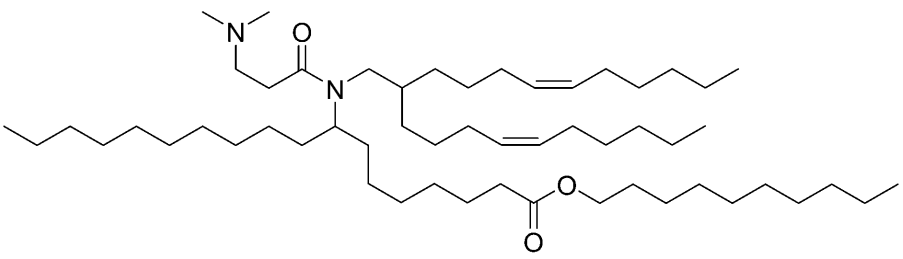


(36)

８－（Ｎ－（（Ｚ）－２－（（Ｚ）－デク－４－エン－１－イル）ドデク－６－エン－１－イル）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－オクタデセン酸デシル（３６）。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．４８－５．２５（ｍ，４Ｈ），４．０７（ｔｄ，Ｊ＝６．８，２．７Ｈｚ，２Ｈ），３．６６（ｓ，１Ｈ），３．０９（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），２．４２－２．２６（ｍ，６Ｈ），２．２４（ｓ，６Ｈ），２．０２（ｔ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，７Ｈ），１．８２（ｄｔ，Ｊ＝９．７，７．２Ｈｚ，２Ｈ），１．６３（ｄ，Ｊ＝４．１Ｈｚ，９Ｈ），１．４７（ｓ，２Ｈ），１．４１－１．１８（ｍ，５３Ｈ），０．９７－０．８４（ｍ，１２Ｈ）。

【０６６２】

【化１８１】



(37)

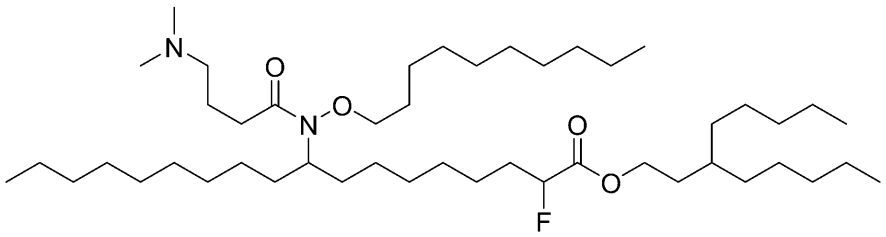
８－（Ｎ－（（Ｚ）－２－（（Ｚ）－デク－４－エン－１－イル）ドデク－６－エン－１

－イル）－３－（ジメチルアミノ）プロパンアミド）－オクタデセン酸デシル（３７）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ５．４６－５．３０（ｍ，４Ｈ），４．９６－４．８３（ｍ，１Ｈ），４．０７（ｔｄ，Ｊ＝６．８，２．０Ｈｚ，３Ｈ），３．０９（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），２．７５－２．６１（ｍ，３Ｈ），２．６０－２．４５（ｍ，３Ｈ），２．３５－２．２３（ｍ，９Ｈ），２．０３（ｑ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，７Ｈ），１．５８（ｄ，Ｊ＝５３．６Ｈｚ，２０Ｈ），１．４３－１．１９（ｍ，５７Ｈ），０．９１（ｄｄｔ，Ｊ＝６．９，３．６，２．３Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６６３】

実施例９．９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸３－ペンチルオクチル（３８）の合成

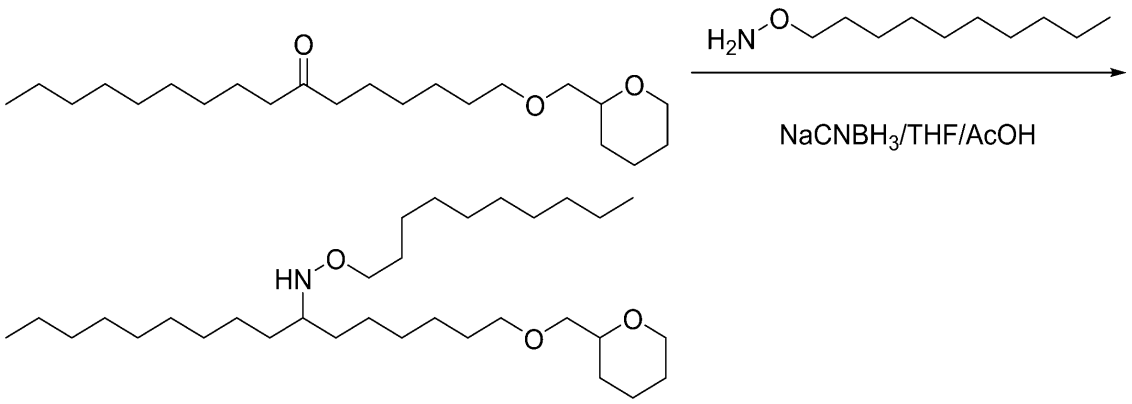
【化１８２】



(38)

工程１．（デシルオキシ）［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］アミンの合成

【化１８３】

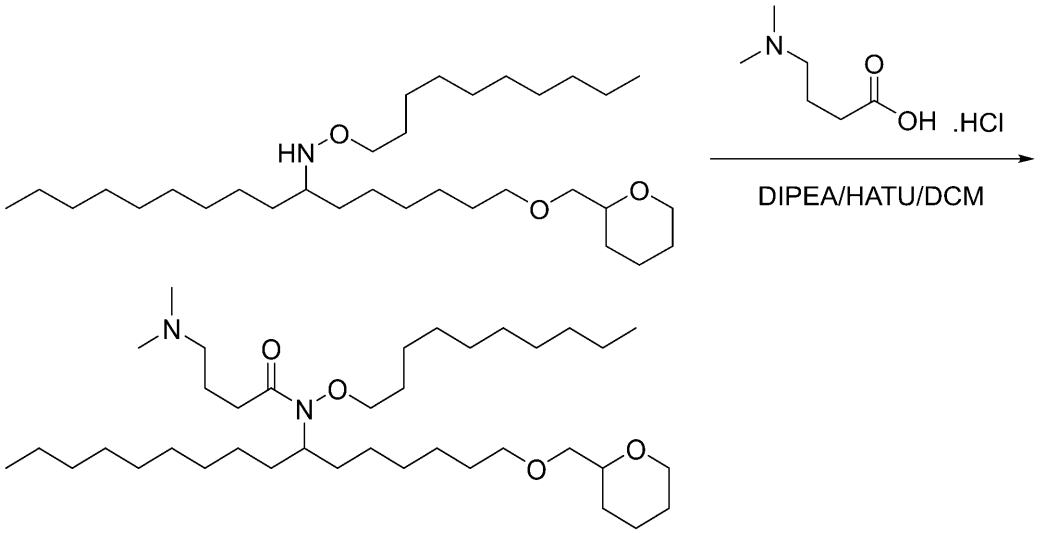


１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－オン（７ｇ、２０．６ｍｍｏｌ）、Ｏ－デシルヒドロキシルアミン（３．６ｇ、２１ｍｍｏｌ）およびＮａＣＮＢＨ$_3$（３．９ｇ、６１．７ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１０ｍＬ）中にて５０℃で１６時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、水で洗浄した。水性物をＥｔＯＡｃで逆抽出し、合わせた有機物をブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製し、（デシルオキシ）［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］アミン（７００ｍｇ，６．８％）を得た。

【０６６４】

工程２．Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］ブタンアミドの合成

【化１８４】

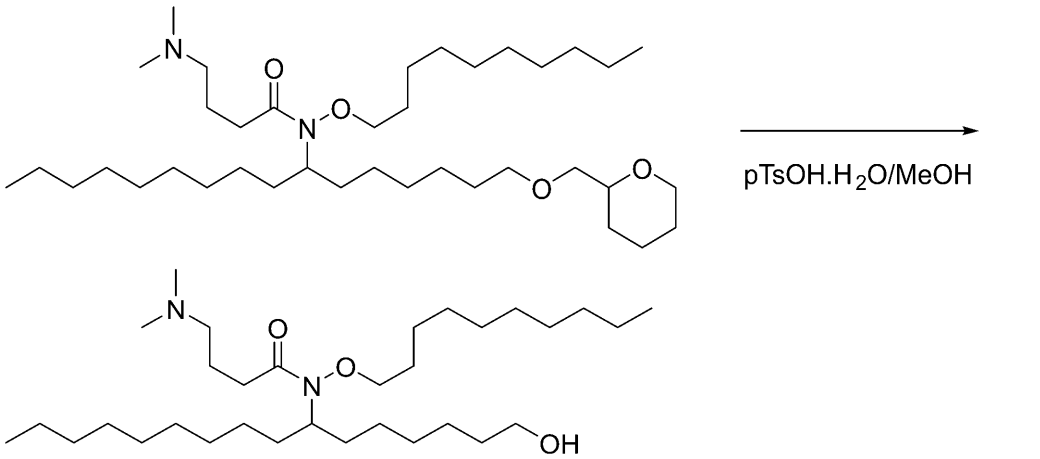


４－（ジメチルアミノ）ブタン酸ＨＣｌ塩（１．４ｇ、８．０ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（３．１ｇ、８．０ｍｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（４．２ｍＬ、２４．１ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（４０ｍＬ）中にて室温で１時間撹拌した。ＤＣＭ（１０ｍＬ）中の（デシルオキシ）［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］アミン（２ｇ、４．０ｍｍｏｌ）を加え、反応物を１６時間還流した。室温まで冷却後、反応物を１ＭのＨＣｌ、飽和ＮａＨＣＯ$_3$、およびブラインで順次洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製してＮ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］ブタンアミド（２ｇ、８１．８％）を得た。

【０６６５】

工程３．Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－ヒドロキシヘキサデカン－７－イル）ブタンアミドの合成

【化１８５】



Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］ブタンアミド（２．５ｇ、４．１ｍｍｏｌ）およびｐＴｓＯＨ－Ｈ$_2$Ｏ（３８９ｍｇ、２．０５ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（１０ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。

【０６６６】

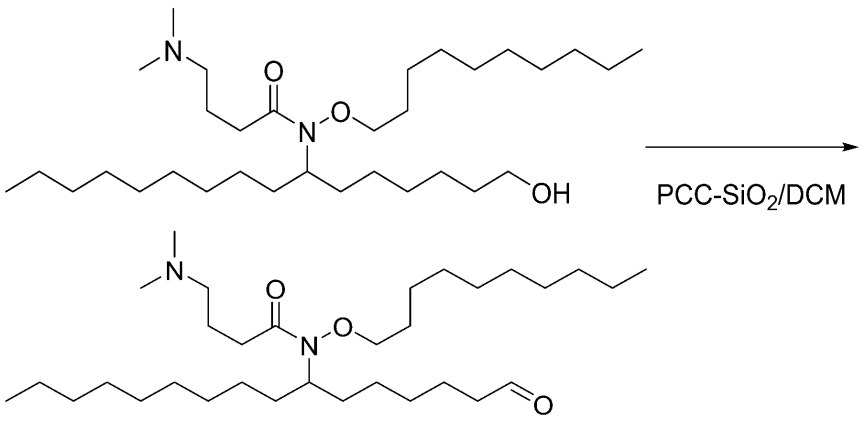
反応物を真空にて濃縮し、残留物をＤＣＭに溶解し、飽和ＮａＨＣＯ$_3$およびブライン

で洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過した。濾液を真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～２０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製してＮ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－ヒドロキシヘキサデカン－７－イル）ブタンアミド（１．０ｇ、４６．４％）を得た。

【０６６７】

工程４．Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－オキソヘキサデカン－７－イル）ブタンアミドの合成

【化１８６】

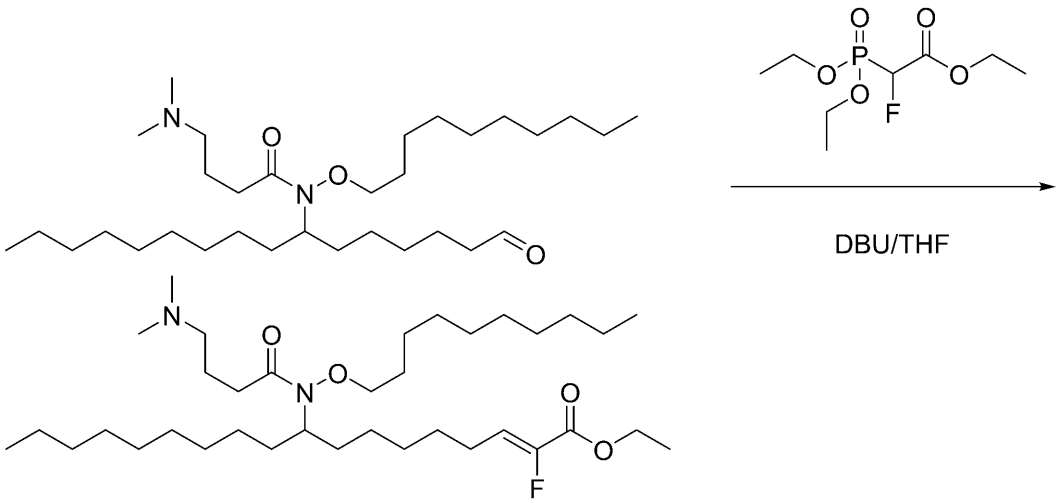


Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－ヒドロキシヘキサデカン－７－イル）ブタンアミド（１．０ｇ、１．９ｍｍｏｌ）およびＰＣＣ－SiO_2（１：１）（３．３ｇ、７．６ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（１０ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。シリカを介して反応物を濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～３０％ＡＣＮ／ＤＣＭ）によって精製し、Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－オキソヘキサデカン－７－イル）ブタンアミド（４３８ｍｇ、４４．０％）を得た。

【０６６８】

工程５．（２Ｚ）－９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデク－２－エン酸エチルの合成

【化１８７】



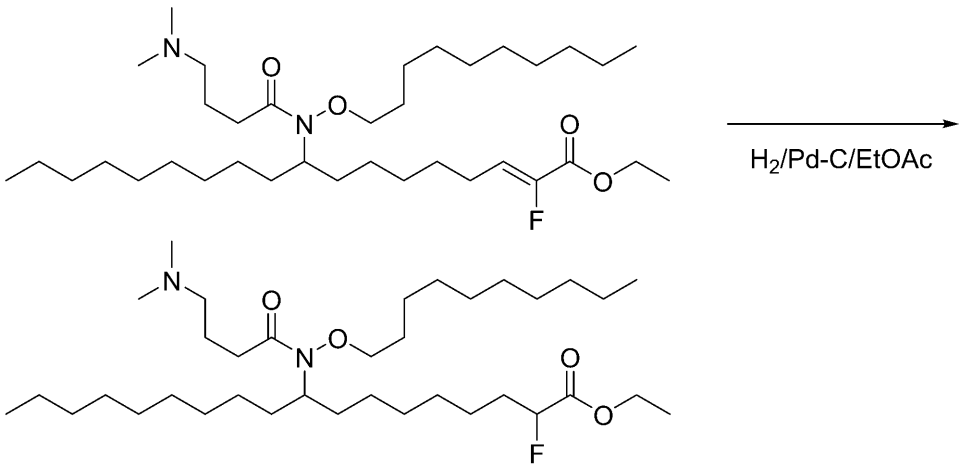
Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－オキソヘキサデカン－７－イル）ブタンアミド（４３８ｍｇ、０．８ｍｍｏｌ）、２－（ジエトキシホスホリル）－２－フルオロ酢酸エチル（６０６ｍｇ、２．５ｍｍｏｌ）およびＤＢＵ（３８１ｍｇ、

２．５ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１０ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。溶媒を真空にて除去し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、ブラインで洗浄し、乾燥させた（$MgSO_4$）。濾液を真空にて濃縮し、自動フラッシュクロマトグラフィー（０～２０％ＡＣＮ／ＤＣＭ）によって精製して（２Ｚ）－９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデク－２－エン酸エチル（５１２ｍｇ、１００．０％）を得た。

【０６６９】

工程６．粗製の９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸エチルの合成

【化１８８】

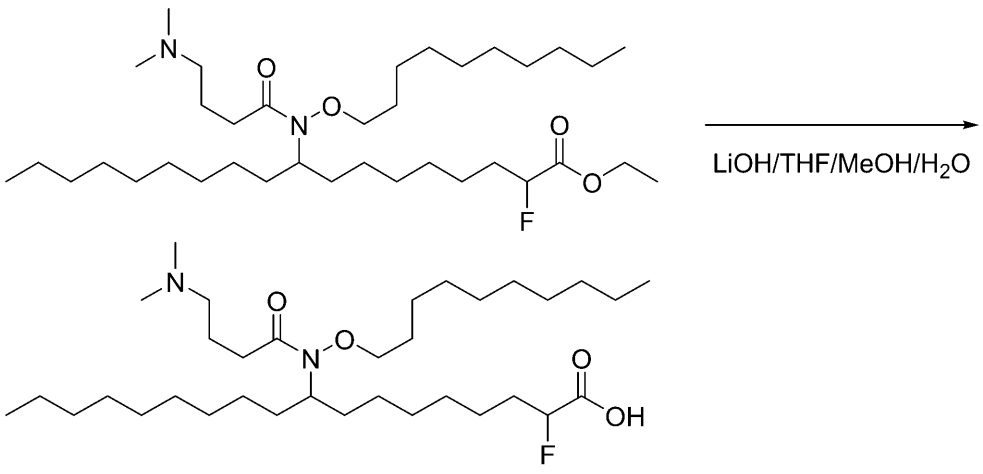


（２Ｚ）－９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデク－２－エン酸エチル（５４６ｍｇ、０．９ｍｍｏｌ）を、ＥｔＯＡｃ（１０ｍＬ）中にてＰｄ－Ｃ上での接触水素化に室温で完了するまで供した。セライトを介して反応物を濾過し、真空にて濃縮して９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸エチルを得、それを精製することなく使用した。

【０６７０】

工程７．９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸の合成

【化１８９】



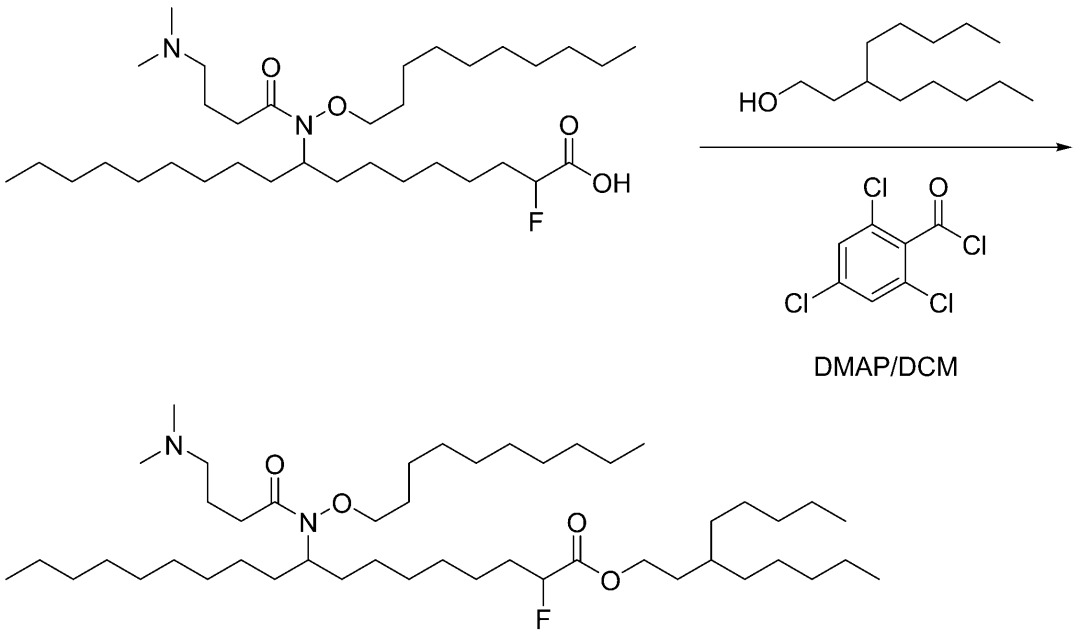
９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸エチル（５４８ｍｇ，０．９ｍｍｏｌ）およびＬｉＯＨ（８５ｍｇ，３．

６ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１０ｍＬ）およびＨ$_2$Ｏ（１ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。６ＭのＨＣｌ（０．９ｍＬ）を加え、ＴＨＦを真空にて除去した。残留物をＤＣＭに溶解し、水で洗浄し、水性層をＤＣＭで逆抽出し、合わせた有機物をブラインで洗浄した。有機物を乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮して９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸（３９０ｍｇ、７４．６％）を得、それを精製することなく使用した。

【０６７１】

工程８．９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸３－ペンチルオクチル（３８）の合成

【化１９０】



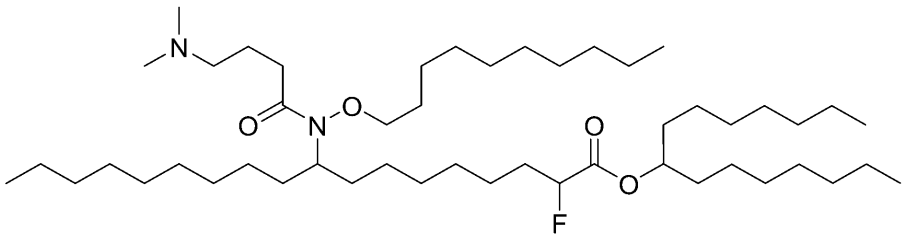
(38)

９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸（３９０ｍｇ、０．６６ｍｍｏｌ）、３－ペンチルオクタン－１－オール（０．２ｇ、１．０ｍｍｏｌ）、塩化２，４，６－トリクロロベンゾイル（３２４ｍｇ、１．３３ｍｍｏｌ）、ＴＥＡ（８１ｍｇ、０．８ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（１０６ｍｇ、０．８６ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（６ｍＬ）中にて室温で１．５時間撹拌した。反応物を濾過し、真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１００％ＤＣＭ／Ｈｅｘおよび０～３０％ＡＣＮ／ＤＣＭ）によって精製して９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸３－ペンチルオクチル（３８）（３０ｍｇ、５．９％）を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．３０－４．２０（ｍ，３Ｈ），３．９８－３．８９（ｍ，２Ｈ），３．３０（ｄ，Ｊ＝５．３Ｈｚ，２Ｈ），２．９７（ｓ，６Ｈ），２．９３－２．８８（ｍ，２Ｈ），２．２９－２．０９（ｍ，２Ｈ），２．０９－１．５８（ｍ，８Ｈ），１．５６－０．９２（ｍ，５６Ｈ），０．９５－０．７５（ｍ，１２Ｈ）。

【０６７２】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【化１９１】



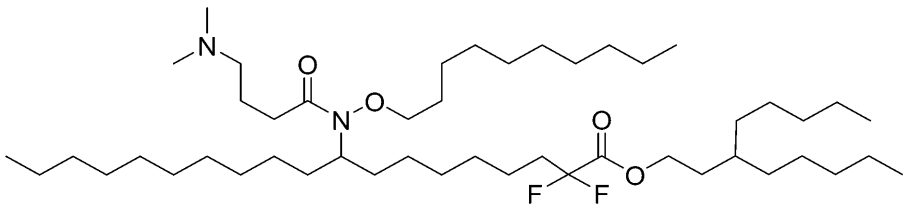
(111)

９－（Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２－フルオロオクタデカン酸ペンタデカン－８－イル（１１１）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．０５－４．９０（ｍ，１Ｈ），４．８１（ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ，０Ｈ），４．３９－４．１８（ｍ，１Ｈ），３．８６（ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，２Ｈ），２．４８（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），２．３３（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），２．２５（ｓ，６Ｈ），１．９４－１．７７（ｍ，４Ｈ），１．６９－１．５３（ｍ，１１Ｈ），１．４５（ｔｄ，Ｊ＝１３．９，６．４Ｈｚ，５Ｈ），１．２９（ｄｄ，Ｊ＝１１．９，６．１Ｈｚ，５６Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６７３】

実施例１０．９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸３－ペンチルオクチル（３９）の合成

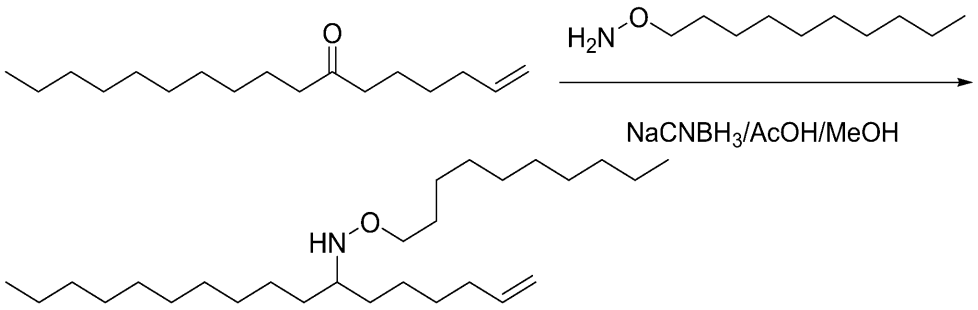
【化１９２】



(39)

工程１．（デシルオキシ）（ヘプタデク－１－エン－７－イル）アミンの合成

【化１９３】



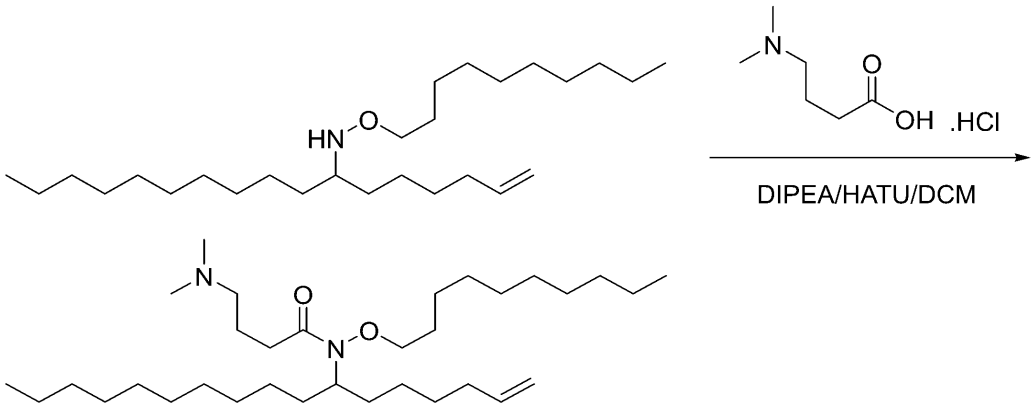
ヘプタデク－１－エン－７－オン（５．２ｇ、２０．８ｍｍｏｌ）、ＡｃＯＨ（２．４ｍＬ、４２ｍｍｏｌ）およびＮａＣＮＢＨ$_{3}$（４．０ｇ、６２．０ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（６０ｍＬ）中にて５０℃で１５時間撹拌した。溶媒を真空にて除去し、残留物をＨ$_{2}$０（５０ｍＬ）とＤＣＭ（５０ｍＬ）の間で分配した。水性層をさらにＤＣＭで抽出し、合わせた有機物を乾燥させ（Ｎａ$_{2}$ＳＯ$_{4}$）、真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して（デシルオキシ）（

ヘプタデク－１－エン－７－イル）アミン（４．０４ｇ、４７．５％）を得た。

【０６７４】

工程２．Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（ヘプタデク－１－エン－７－イル）ブタンアミドの合成

【化１９４】

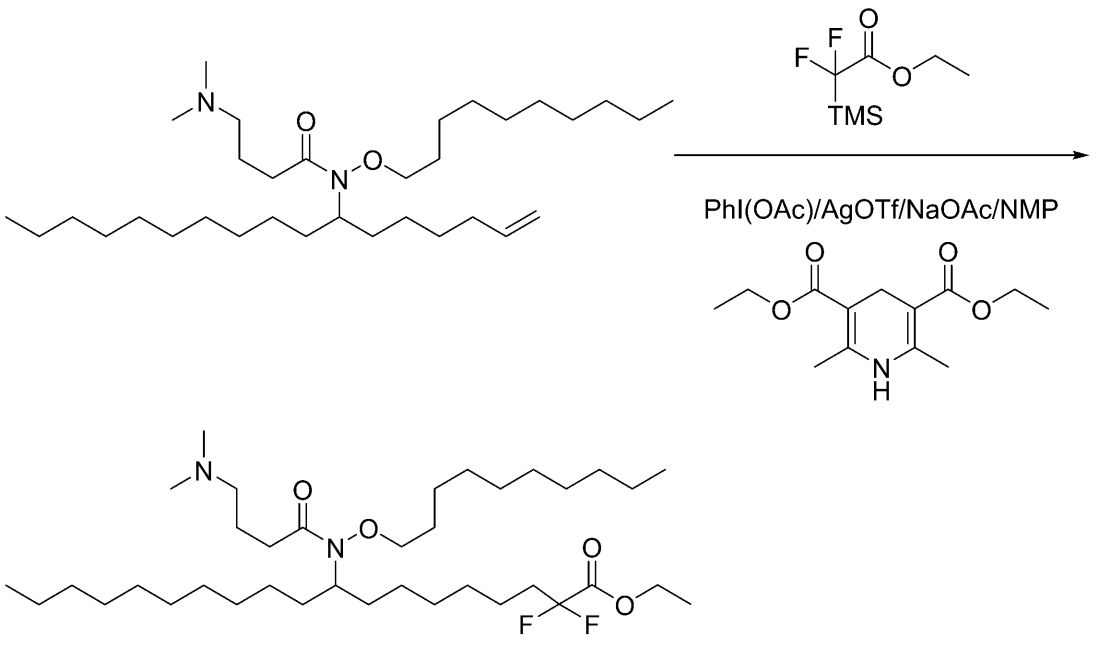


４－（ジメチルアミノ）ブタン酸ＨＣｌ塩（３．３ｇ、１９．５ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（７．４ｇ、１９．５ｍｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（７．６ｇ、５８．６ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（４０ｍＬ）中にて室温で１時間撹拌した。ＤＣＭ（１０ｍＬ）中の（デシルオキシ）（ヘプタデク－１－エン－７－イル）アミン（４ｇ、９．８ｍｍｏｌ）を加え、反応物を１６時間加熱還流した。冷却後、反応物を１ＭのＨＣｌ、飽和ＮａＨＣＯ$_3$およびブラインで順次洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、濾液を真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ－ＤＣＭ）によって精製してＮ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（ヘプタデク－１－エン－７－イル）ブタンアミド（４．１ｇ、８０．３％）を得た。

【０６７５】

工程３．９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸エチルの合成

【化１９５】

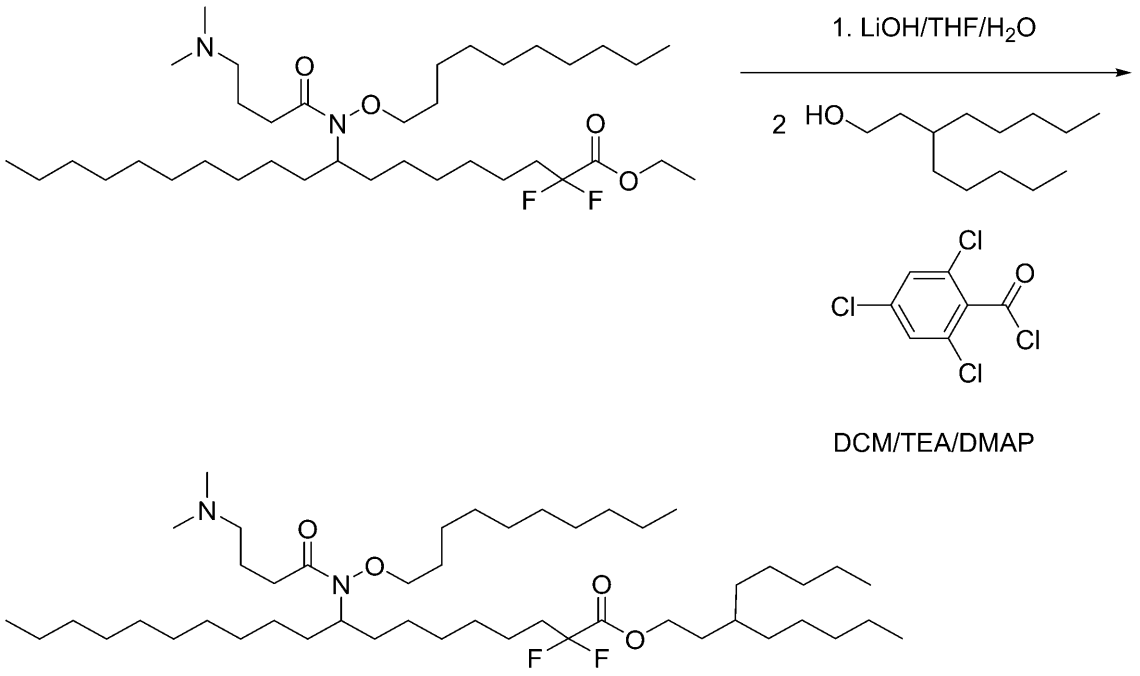


真空乾燥したフラスコにて、Ｈａｎｔｓｃｈエステル（２．０ｇ、７．７ｍｍｏｌ）、ＮａＯＡｃ（４．９ｇ、１５．３ｍｍｏｌ）、ＡｇＯＴｆ（４．９ｇ、１９．１ｍｍｏｌ）および二酢酸ヨードベンゼン（４．９ｇ、１５．３ｍｍｏｌ）を窒素雰囲気下、ＮＭＰ（３０ｍＬ）中で撹拌した。Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（ヘプタデク－１－エン－７－イル）ブタンアミド（４ｇ，７．７ｍｍｏｌ）のＮＭＰ（３０ｍＬ）溶液および２，２－ジフルオロ－２－（トリメチルシリル）酢酸エチル（７．５ｇ，３８．３ｍｍｏｌ）を加え、反応物を室温で１８時間撹拌した。セライトを介して反応物を濾過し、濾液をブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～５０％ＡＣＮ／ＤＣＭ）によって精製して９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸エチル（３．２ｇ、６４．７％）を得た。

【０６７６】

工程４．９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸３－ペンチルオクチル（３９）の合成

【化１９６】



(39)

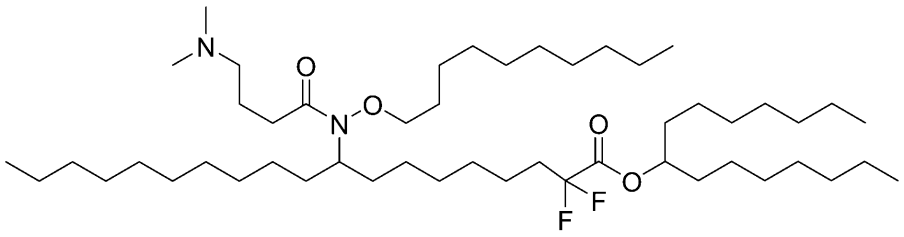
９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸エチル（７３１ｍｇ、１．１ｍｍｏｌ）およびＬｉＯＨ（１０８ｍｇ、４．５ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１０ｍＬ）および水（２ｍＬ）中にて室温で完了するまで撹拌した。６ＭのＨＣｌ（０．７５ｍＬ）で反応を止め、真空にて部分的に濃縮した。反応物をＤＣＭで希釈し、ブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、トルエン（２５ｍＬ）と共沸させて真空にて濃縮した。粗製カルボン酸、３－ペンチルオクタン－１－オール（０．３４ｇ、１．７ｍｍｏｌ）、塩化２，４，６－トリクロロベンゾイル（０．６ｇ、２．３ｍｍｏｌ）、ＴＥＡ（１３７ｍｇ、１．４ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（１７９ｍｇ、１．５ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（６ｍＬ）中にて室温で１．５時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１００％ＤＣＭ／Ｈｅｘおよび０～１５％ＡＣＮ／ＤＣＭ）によって精製して９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸３－ペンチルオクチルと不飽和不純物の混合物を得た。混合物をＥｔＯＡｃ（１０ｍＬ）中にて室温で１時間、Ｐｄ－Ｃ上での接触水素化に供した。セライトを介して反応物を濾過し、

真空にて濃縮して９－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸３－ペンチルオクチル（３９）（３７１ｍｇ、４１．０％）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．３０（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），４．２４（ｄｄ，Ｊ＝９．５，４．６Ｈｚ，１Ｈ），３．９９－３．９２（ｍ，２Ｈ），３．３０（ｄｄ，Ｊ＝１２．４，７．１Ｈｚ，２Ｈ），２．９８（ｓ，６Ｈ），２．９２（ｄｄ，Ｊ＝７．３，４．３Ｈｚ，２Ｈ），２．０４（ｄｔ，Ｊ＝１１．６，６．４Ｈｚ，４Ｈ），１．７４－１．６１（ｍ，６Ｈ），１．５３－１．１９（ｍ，５７Ｈ），０．９４－０．８７（ｚｍ，１２Ｈ）。

【０６７７】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【化１９７】



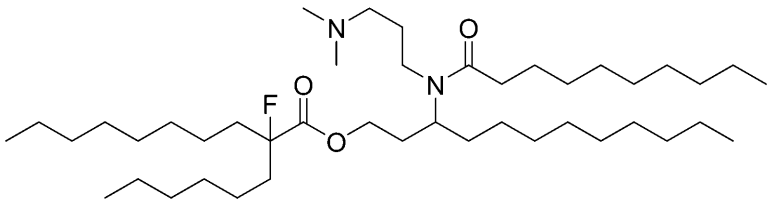
(106)

９－（Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２，２－ジフルオロ－ノナデカン酸ペンタデカン－８－イル（１０６）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ７．３１，７．２８，５．３２，５．０３，５．０２，５．００，４．３０，３．８８，３．８６，３．８４，２．５０，２．４８，２．４６，２．３４，２．３２，２．３０，２．２５，２．０７，２．０５，２．０３，２．０１，１．９９，１．８７，１．８５，１．８３，１．８１，１．６４，１．６２，１．６０，１．５８，１．４７，１．３０，１．２９，１．２７，０．９２，０．９１，０．９０，０．８８。

【０６７８】

実施例１１．２－フルオロ－２－ヘキシルデカン酸３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］デカンアミド｝－ドデシル（４０）の合成

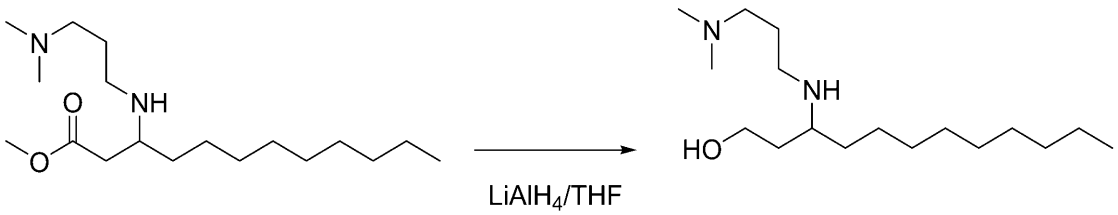
【化１９８】



(40)

工程１．３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン－１－オールの合成

【化１９９】

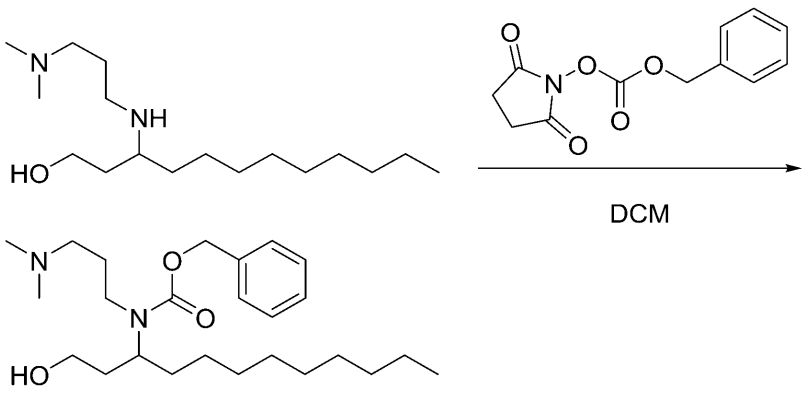


ＬｉＡｌＨ$_4$（１．７ｇ、２６．８ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１００ｍＬ）中にて０℃で撹拌した。ＴＨＦ（１００ｍＬ）中の３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸メチル（２．８ｇ、８．９ｍｍｏｌ）を一滴ずつ加え、完了するまで反応物を室温で撹拌した。反応物を０℃まで冷却し、１ＭのＮａＯＨ（２０ｍＬ）を加え、ＥｔＯＡｃで抽出した。有機物を乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、濾液を真空にて濃縮して粗製の３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン－１－オール（２．６ｇ、１００．０％）を得、それを精製することなく使用した。

【０６７９】

工程２．Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－Ｎ－（１－ヒドロキシドデカン－３－イル）カルバミン酸ベンジルの合成

【化２００】

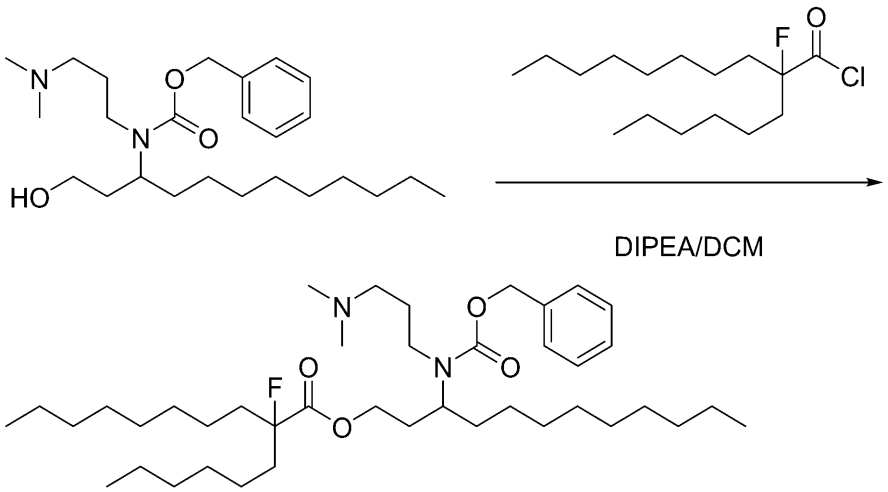


３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン－１－オール（２．６ｇ、８．９ｍｍｏｌ）および炭酸ベンジル２，５－ジオキソピロリジン－１－イル（２．２ｇ、８．９ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（５０ｍＬ）中にて０℃で１６時間撹拌し、室温まで温めた。反応物を真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～２０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製してＮ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－Ｎ－（１－ヒドロキシドデカン－３－イル）カルバミン酸ベンジル（２．１ｇ、５６．０％）を得た。

【０６８０】

工程３．２－フルオロ－２－ヘキシルデカン酸３－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデシルの合成

【化２０１】

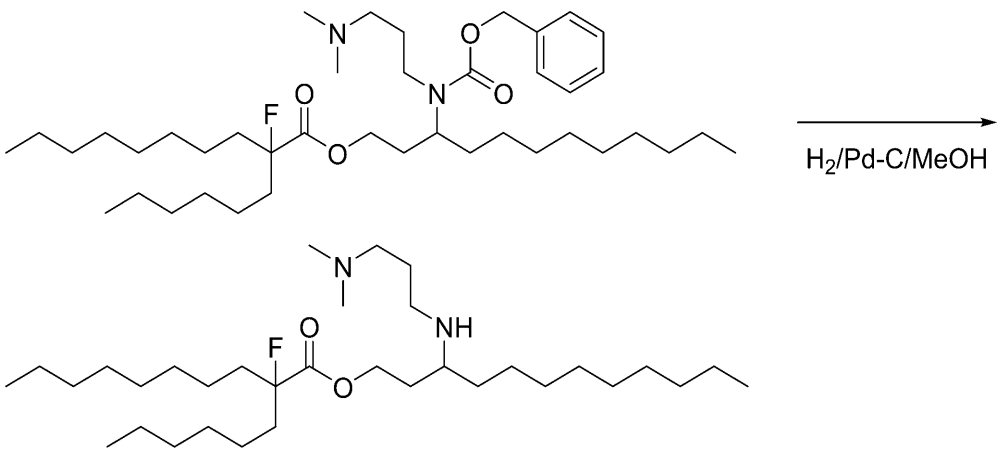


Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－Ｎ－（１－ヒドロキシドデカン－３－イル）カルバミン酸ベンジル（２３０ｍｇ、０．５ｍｍｏｌ）、塩化２－フルオロ－２－ヘキシルデカノイル（１６０ｍｇ、０．５ｍｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（０．２ｍＬ、１．１ｍｍｏｌ）をＤＣＭ中にてマイクロ波照射のもと８０℃で１０分間加熱した。反応物を真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して２－フルオロ－２－ヘキシルデカン酸３－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデシル（１９６ｍｇ、５３．０％）を得た。

【０６８１】

工程４．２－フルオロ－２－ヘキシルデカン酸３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデシルの合成

【化２０２】

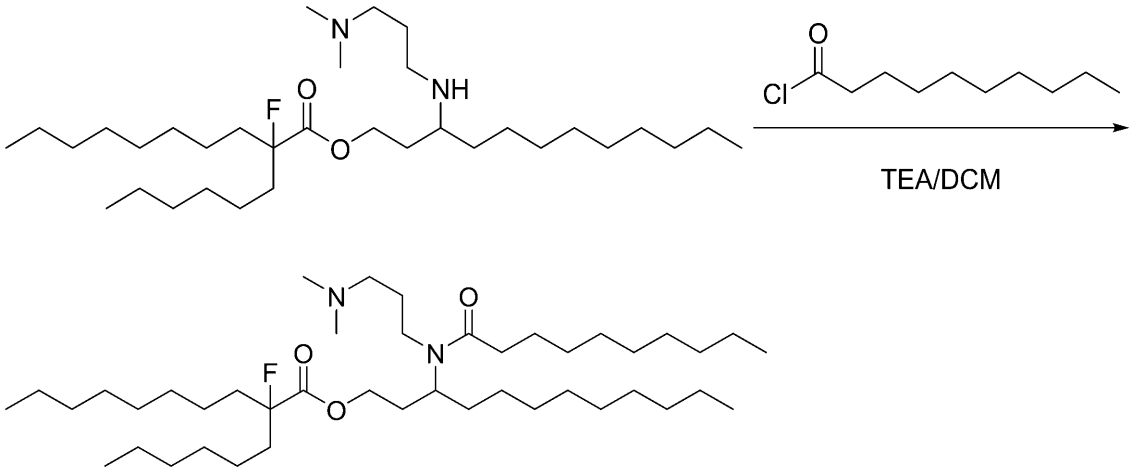


２－フルオロ－２－ヘキシルデカン酸３－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデシル（１９６ｍｇ、０．３ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ中にて室温で１６時間、Ｐｄ／Ｃ上での接触水素化に供した。反応物を濾過し、真空にて濃縮して２－フルオロ－２－ヘキシルデカン酸３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデシル（１５７ｍｇ、９９．９％）を得、それをさらに精製することなく使用した。

【０６８２】

工程５．２－フルオロ－２－ヘキシルデカン酸３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロ

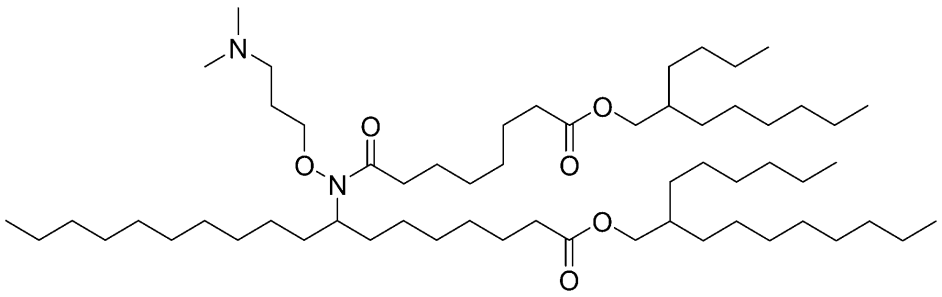
ピル］デカンアミド｝ドデシル（４０）の合成
【化２０３】



(40)

２－フルオロ－２－ヘキシルデカン酸３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデシル（１５７ｍｇ、０．３ｍｍｏｌ）、塩化デカノイル（６１ｍｇ、０．３２ｍｍｏｌ）およびＴＥＡ（５９ｍｇ、０．６ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（２０ｍＬ）中にて２４時間還流した。冷却後、反応物を$NaHCO_3$、ブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過した。濾液を真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して２－フルオロ－２－ヘキシルデカン酸３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］デカンアミド｝ドデシル（４０）（６４ｍｇ、３１．７％）を得た。^1H ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．４１－４．３４（ｍ，１Ｈ），４．２３－４．１６（ｍ，１Ｈ），４．１２－４．０５（ｍ，１Ｈ），４．０１－３．９４（ｍ，１Ｈ），３．９３－３．８５（ｍ，１Ｈ），３．７８－３．７１（ｍ，１Ｈ），３．２４－３．１５（ｍ，２Ｈ），２．３９－２．２３（ｍ，７Ｈ），１．９６－１．７２（ｍ，８Ｈ），１．５１（ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，８Ｈ），１．３９－１．０８（ｍ，４２Ｈ），０．９０（ｔ，１２Ｈ）。

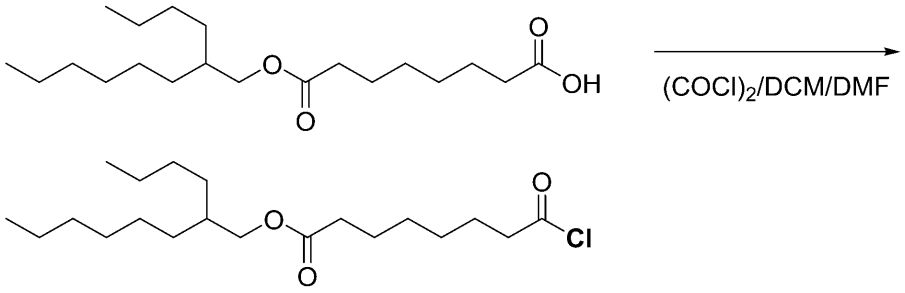
【０６８３】
実施例１２．８－｛８－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロポキシ］－８－オキソオクタンアミド｝オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（４１）の合成
【化２０４】



(41)

工程１．８－クロロ－８－オキソオクタン酸２－ブチルオクチルの合成

【化２０５】

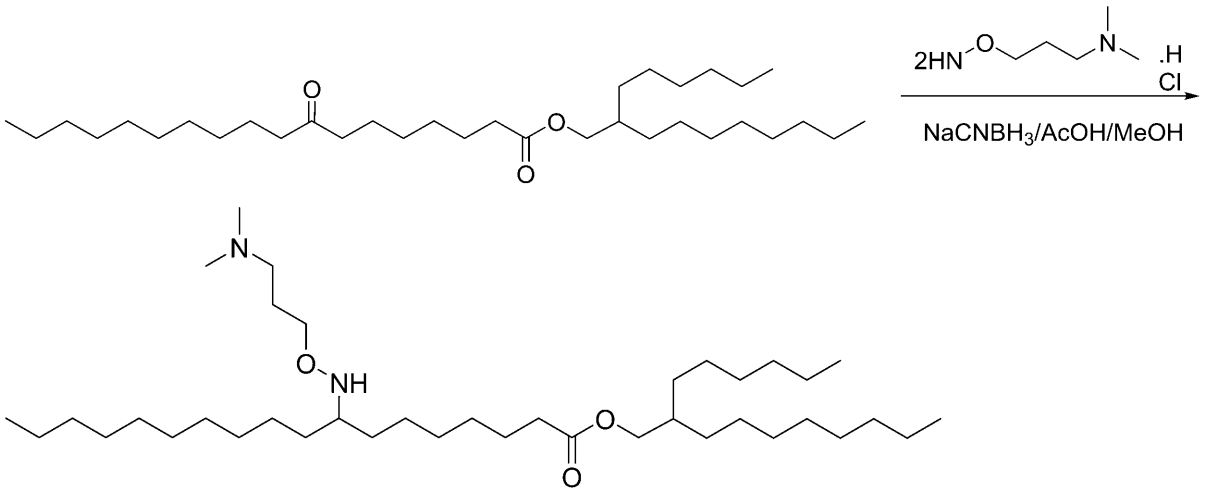


８－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－８－オキソオクタン酸（１２０ｍｇ、０．３５ｍｍｏｌ）、塩化オキサリル（６７ｍｇ、０．５３ｍｍｏｌ）およびＤＭＦ（触媒量）をＤＣＭ中にて室温で３時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物を真空下で乾燥させて８－クロロ－８－オキソオクタン酸２－ブチルオクチル（１２６ｍｇ、９９．６％）を得、それを精製することなく使用した。

【０６８４】

工程２．８－｛［３－（ジメチルアミノ）プロポキシ］アミノ｝オクタデセン酸２－ヘキシルデシルの合成

【化２０６】

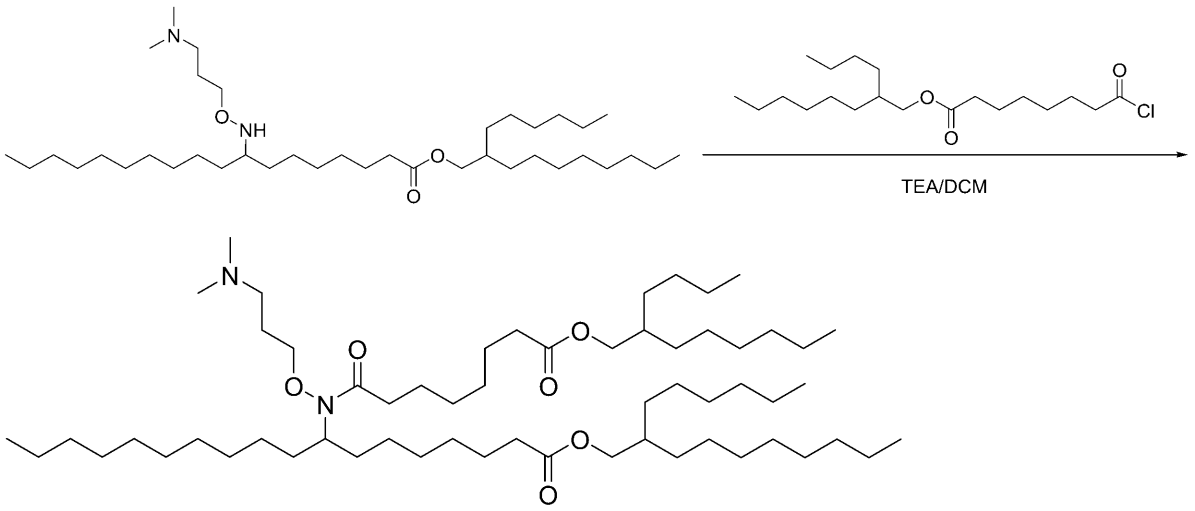


［３－（ジメチルアミノ）プロポキシ］アミン（ＨＣｌ塩）（１４８ｍｇ、１．０ｍｍｏｌ）、８－オキソオクタデカン酸２－ヘキシルデシル（５００ｍｇ、１．０ｍｍｏｌ）、ＡｃＯＨ（１１５ｍｇ、１．９ｍｍｏｌ）およびＮａＣＮＢＨ$_3$（１８０ｍｇ、２．９ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（８ｍＬ）中にて４５℃で３日間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物を１：１ＤＣＭ／Ｈ$_2$Ｏに分配した。水性物をさらにＤＣＭで抽出し、有機物をブラインで洗浄し、ＭｇＳＯ$_4$で乾燥させ、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して８－｛［３－（ジメチルアミノ）プロポキシ］アミノ｝オクタデカン酸２－ヘキシルデシル（３８５ｍｇ、６４．４％）を得た。

【０６８５】

工程３．８－｛８－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロポキシ］－８－オキソオクタンアミド｝オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（４１）の合成

【化２０７】



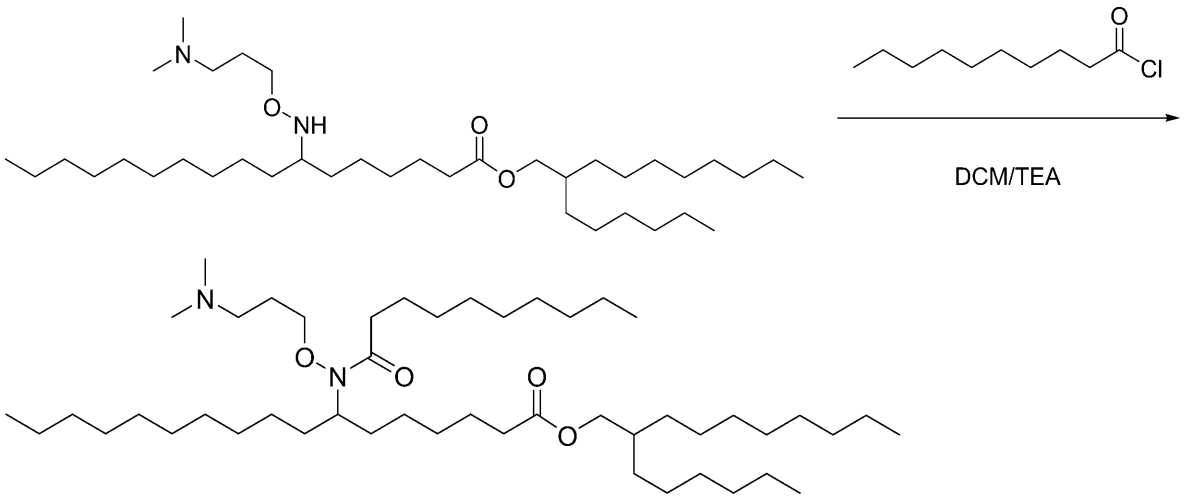
(41)

８－｛［３－（ジメチルアミノ）プロポキシ］アミノ｝オクタデカン酸２－ヘキシルデシル（１９２ｍｇ、０．３１ｍｍｏｌ）およびＴＥＡ（６２ｍｇ、０．６ｍｍｏｌ）をＤＣＭ中にて室温で撹拌した。ＤＣＭ中の８－クロロ－８－オキソオクタン酸２－ブチルオクチル（１３３ｍｇ、０．３７ｍｍｏｌ）を加え、反応物を室温で１８時間撹拌した。有機物を飽和$NaHCO_3$およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して８－｛８－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロポキシ］－８－オキソオクタンアミド｝オクタデカン酸２－ヘキシルデシル（４１）（８８ｍｇ、３０．２％）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．３２－４．２４（ｍ，１Ｈ），３．９９（ｍ，４Ｈ），３．９３－３．８９（ｍ，２Ｈ），２．５３－２．１３（ｍ，１４Ｈ），１．６０－１．４２（ｍ，１４Ｈ），１．４３－１．０２（ｍ，６６Ｈ），０．９４－０．８５（ｍ，１５Ｈ）。

【０６８６】

実施例１３．７－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロポキシ］デカンアミド｝－ヘプタデカン酸２－ヘキシルデシルの合成（４２）

【化２０８】



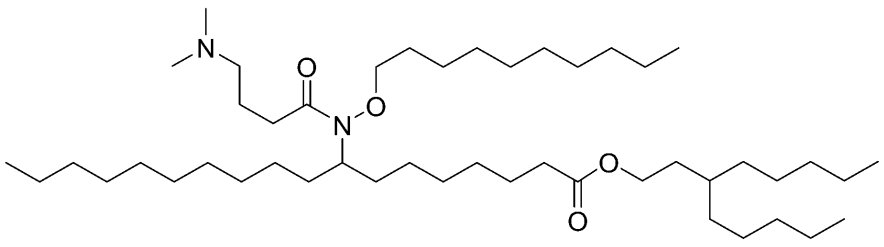
(42)

７－｛［３－（ジメチルアミノ）プロポキシ］アミノ｝ヘプタデカン酸２－ヘキシルデシル（１３３ｍｇ、０．２２ｍｍｏｌ）およびＴＥＡ（４４ｍｇ、０．４４ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（３ｍＬ）中にて室温で撹拌した。ＤＣＭ中の塩化デカノイル（５ｍｇ、０．２６ｍｍｏｌ）を一滴ずつ加えた。反応物を室温で１８時間撹拌した。有機物を飽和ＮａＨＣＯ$_3$溶液およびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗生成物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して７－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロポキシ］デカンアミド｝ヘプタデカン酸２－ヘキシルデシル（４２）（５１ｍｇ、３０．６％）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．３０（ｓ，２Ｈ），３．９８（ｄ，Ｊ＝５．８Ｈｚ，２Ｈ），３．９２（ｓ，１Ｈ），２．５７－２．１９（ｍ，１２Ｈ），１．８７－１．８１（ｍ，２Ｈ），１．６５－１．５６（ｍ，１１Ｈ），１．４８－１．４２（ｓ，３Ｈ），１．３８－１．１７（ｍ，５１Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．９，１．８Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６８７】

実施例１４．８－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］オクタデセン酸エステル（４３）の合成

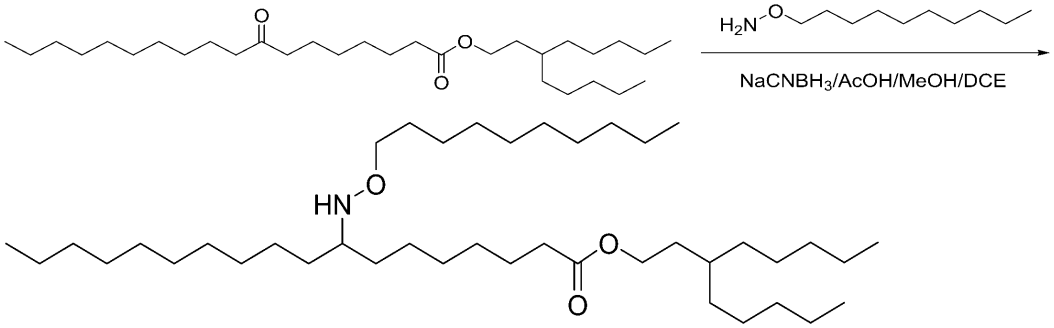
【化２０９】



(43)

工程１．８－［（デシルオキシ）アミノ］オクタデセン酸３－ペンチルオクチルの合成

【化２１０】

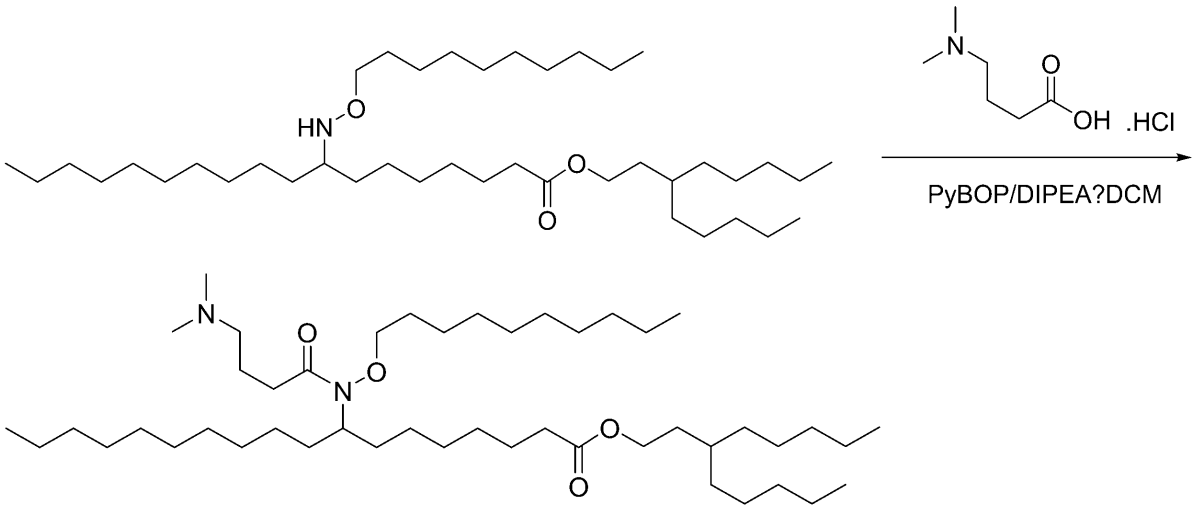


８－オキソオクタデカン酸３－ペンチルオクチル（１３．３ｇ、２８ｍｍｏｌ）、Ｏ－デシルヒドロキシルアミン（７．２ｇ、４１．５ｍｍｏｌ）、ＡｃＯＨ（３．２ｍＬ、５５ｍｍｏｌ）およびＮａＣＮＢＨ$_3$（５．２ｇ、８３ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（１００ｍＬ）およびＤＣＥ（５０ｍＬ）中にて５０℃で１５時間撹拌した。追加のＮａＣＮＢＨ$_3$（１当量）を加え、反応物を６０℃で７２時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＨ$_2$Ｏ（５０ｍＬ）とＤＣＭ（５０ｍＬ）の間で分配した。水性層をＤＣＭで抽出し、合わせた有機物をＭｇＳＯ$_4$で乾燥させ、濾過し、真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィーによって精製して８－［（デシルオキシ）アミノ］オクタデカン酸３－ペンチルオクチル（１８ｇ、２８．２ｍｍｏｌ、Ｑｕａｎｔ）を得た。

【０６８８】

工程２．８－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］オクタデセン酸３－ペンチルオクチル（４３）の合成

【化２１１】



(43)

８－［（デシルオキシ）アミノ］オクタデカン酸３－ペンチルオクチル（１６．２１ｇ、２５．４ｍｍｏｌ）、４－（ジメチルアミノ）ブタンカルボン酸ＨＣｌ塩（４．７ｇ、２７．９ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（１０．８ｇ、８３．８ｍｍｏｌ）およびＰｙＢＯＰ（１４．５ｇ、２７．９ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（５０ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。反応物を１ＭのＨＣｌ、ＮａＨＣＯ$_3$（飽和水溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して８－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－

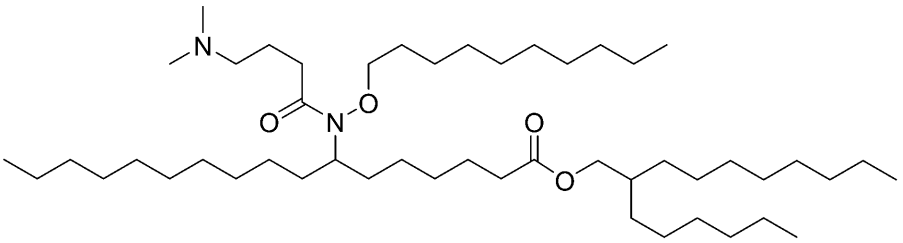
（ジメチルアミノ）ブタンアミド］オクタデカン酸３－ペンチルオクチルを得たが、これをＥｔＯＡｃに溶解し、飽和ＮａＨＣＯ$_3$（３×）および１ＭのＮａＯＨ（２×）で２回洗浄し、乾燥（ＭｇＳＯ$_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮して８－［Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］オクタデカン酸エステル（４３）（６．４ｇ、３３．５％）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．２５（ｔｔ，Ｊ＝９．９，５．０Ｈｚ，１Ｈ），４．０５（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），３．８１（ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，２Ｈ），２．４３（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），２．２６（ｄｔ，Ｊ＝１７．２，７．４Ｈｚ，４Ｈ），２．２０（ｓ，６Ｈ），１．７８（ｐ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），１．５６（ｄｑ，Ｊ＝２０．５，６．６Ｈｚ，８Ｈ），１．４７－１．３３（ｍ，５Ｈ），１．２４（ｄｄ，Ｊ＝１３．４，４．８Ｈｚ，５０Ｈ），０．８５（ｔｄ，Ｊ＝６．９，３．０Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６８９】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【０６９０】

【化２１２】

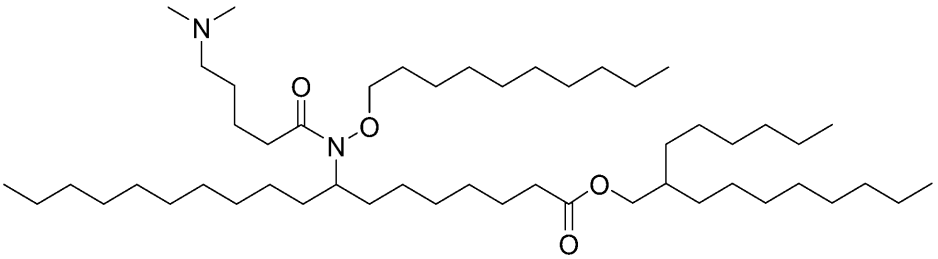


(44)

７－（Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）ヘプタデカン酸２－ヘキシルデシル（４４）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．２９（ｓ，１Ｈ），３．９８（ｄ，Ｊ＝５．８Ｈｚ，２Ｈ），３．８６（ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，２Ｈ），２．５５－２．２１（ｍ，１０Ｈ），１．６１－１．９０（ｍ，１９Ｈ），１．２９（ｍ，４８Ｈ），０．９９－０．７３（ｍ，１２Ｈ）。

【０６９１】

【化２１３】

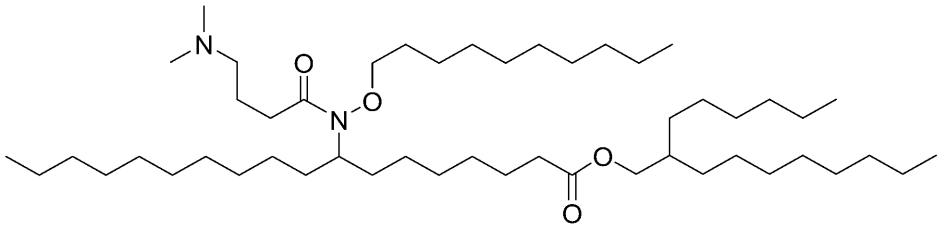


(45)

８－（Ｎ－（デシルオキシ）－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド）オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（４５）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．２９（ｓ，１Ｈ），３．９８（ｄ，Ｊ＝５．８Ｈｚ，２Ｈ），３．８５（ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，２Ｈ），２．４７（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ），２．３８（ｓ，２Ｈ），２．２９（ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，６Ｈ），１．８４－１．５２（ｍ，２２Ｈ），１．５２－１．０６（ｍ，５３Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．９，２．０Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６９２】

【化２１４】

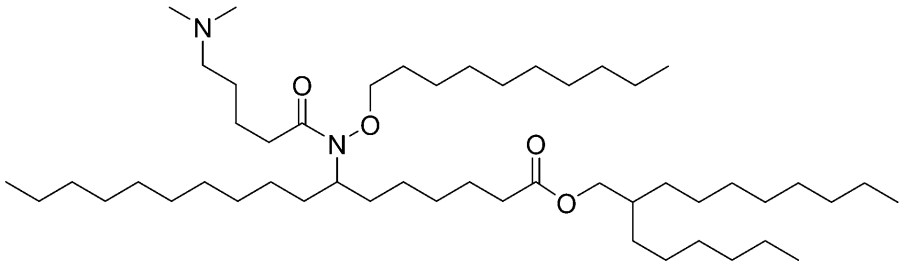


(46)

８－（Ｎ－（デシルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（４６）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．２８（ｓ，１Ｈ），３．９８（ｄ，Ｊ＝５．８Ｈｚ，２Ｈ），３．８６（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，２Ｈ），２．５１（ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，３Ｈ），２．３０（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，４Ｈ），１．９６－１．８３（ｍ，２Ｈ），１．６３（ｄ，Ｊ＝１６．９Ｈｚ，２２Ｈ），１．５４－１．２２（ｍ，５２Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．８，２．１Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６９３】

【化２１５】

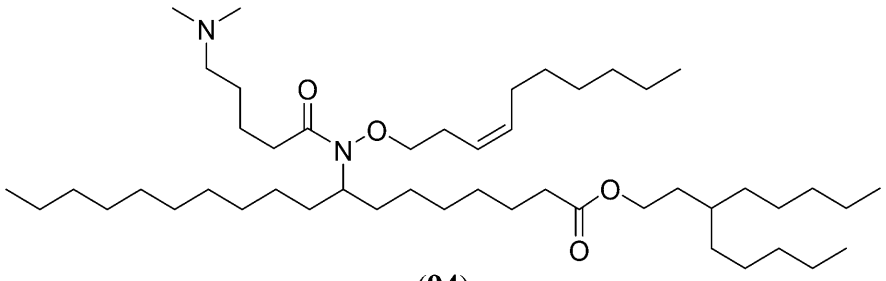


(47)

７－（Ｎ－（デシルオキシ）－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド）ヘプタデカン酸２－ヘキシルデシル（４７）。ＭＳによって確認された製品（ＥＳＩ＋ｖｅ）

【０６９４】

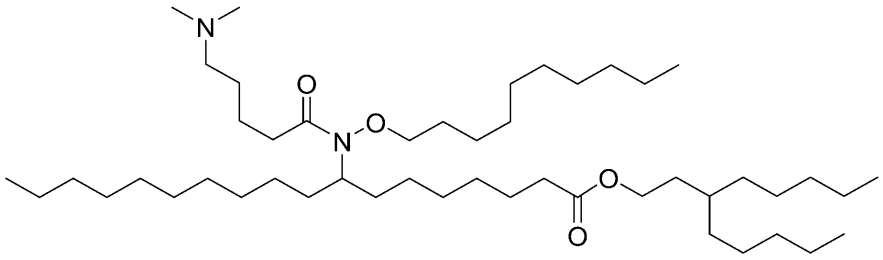
【化２１６】



(94)

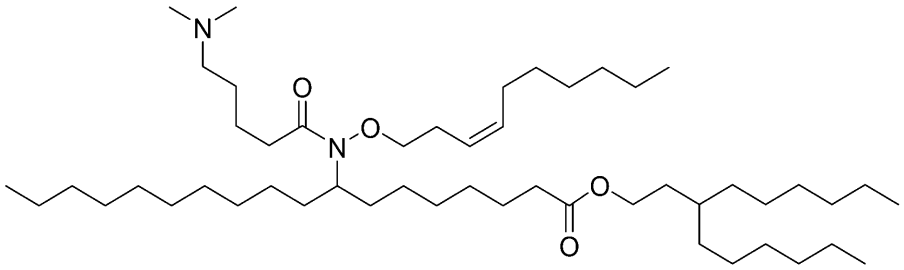
（Ｚ）－８－（Ｎ－（デク－３－エン－１－イルオキシ）－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド）オクタデカン酸３－ペンチルオクチル（９４）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．５１－５．３０（ｍ，２Ｈ），４．３９－４．１９（ｍ，１Ｈ），４．１０（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），３．８６（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，２Ｈ），２．４７（ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），２．４０－２．２４（ｍ，１０Ｈ），２．０５（ｄｄ，Ｊ＝１３．８，６．７Ｈｚ，２Ｈ），１．９５（ｓ，７Ｈ），１．７６－１．４９（ｍ，７Ｈ），１．４４－１．２０（ｍ，４４Ｈ），０．９１（ｄｄｔ，Ｊ＝７．０，５

．３，２．６Ｈｚ，１２Ｈ）。
【０６９５】
【化２１７】



(95)

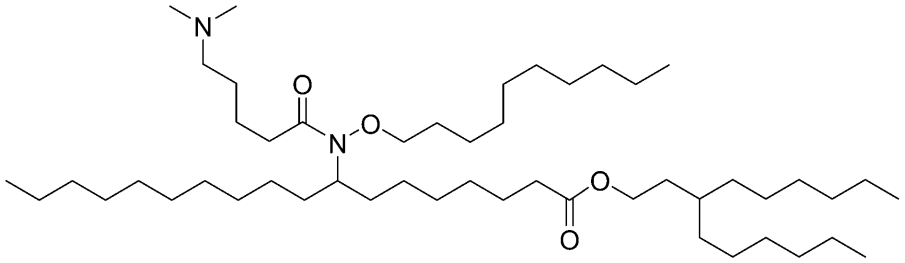
８－（Ｎ－（デシルオキシ）－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド）オクタデカン酸３－ペンチルオクチル（９５）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．２９（ｄ，Ｊ＝４．９Ｈｚ，０Ｈ），４．１０（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），３．８５（ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，２Ｈ），２．４７（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），２．３４（ｄｄ，Ｊ＝１６．２，８．８Ｈｚ，３Ｈ），２．２９（ｄ，Ｊ＝５．３Ｈｚ，７Ｈ），１．７４－１．５１（ｍ，２０Ｈ），１．５１－１．１４（ｍ，５７Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．９，２．６Ｈｚ，１２Ｈ）。
【０６９６】
【化２１８】



(96)

（Ｚ）－８－（Ｎ－（デク－３－エン－１－イルオキシ）－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド）オクタデカン酸３－ヘキシルノニル（９６）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．５０－５．３１（ｍ，２Ｈ），４．２９（ｓ，１Ｈ），４．１０（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），３．８６（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，２Ｈ），２．４７（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），２．３７－２．２３（ｍ，１０Ｈ），２．１６（ｑ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），２．０５（ｑ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），１．７６－１．５４（ｍ，２０Ｈ），１．５２－１．１５（ｍ，４７Ｈ），０．９１（ｔｔ，Ｊ＝６．８，２．８Ｈｚ，１２Ｈ）。
【０６９７】

【化２１９】

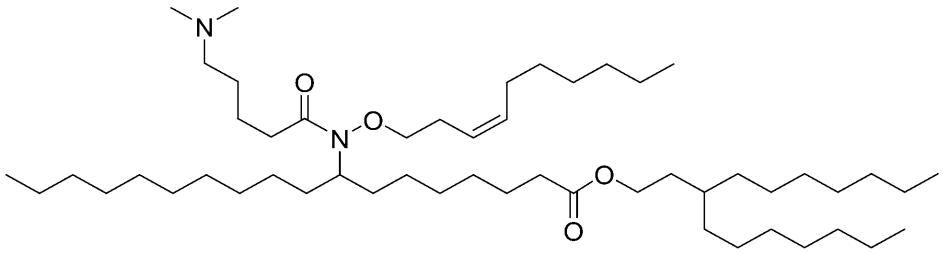


(97)

８－（Ｎ－（デシルオキシ）－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド）オクタデカン酸３－ヘキシルノニル（９７）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．２９（ｄ，Ｊ＝５．１Ｈｚ，０Ｈ），４．１０（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），３．８５（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，２Ｈ），２．４７（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），２．３８－２．２２（ｍ，９Ｈ），１．７４－１．５１（ｍ，１７Ｈ），１．５０－１．１９（ｍ，５７Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．８，２．２Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６９８】

【化２２０】

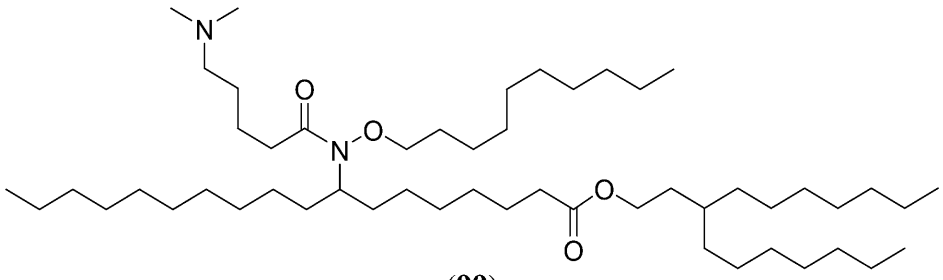


(98)

（Ｚ）－８－（Ｎ－（デク－３－エン－１－イルオキシ）－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド）オクタデカン酸３－ヘプチルデシル（９８）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．５１－５．３１（ｍ，２Ｈ），４．２９（ｓ，１Ｈ），４．０９（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），３．８６（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，２Ｈ），２．４８（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ），２．４４－２．２３（ｍ，９Ｈ），２．１７（ｑ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），１．７７－１．１８（ｍ，７０Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．７，２．３Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０６９９】

【化２２１】



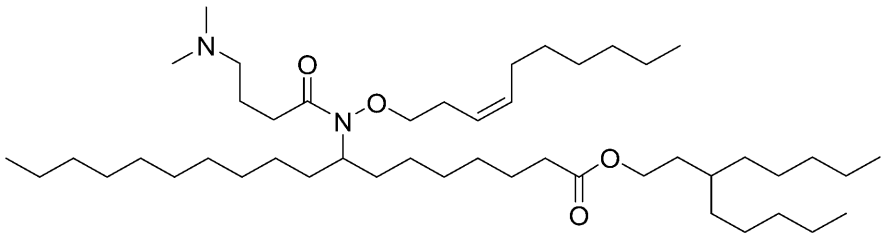
(99)

８－（Ｎ－（デシルオキシ）－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド）オクタデカン酸３－ヘプチルデシル（９９）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．２９（

ｓ，１Ｈ），４．０９（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），３．８５（ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，２Ｈ），２．６８－２．１４（ｍ，１２Ｈ），１．６３（ｔｑ，Ｊ＝１３．９，７．３Ｈｚ，２１Ｈ），１．５３－１．１６（ｍ，６０Ｈ），１．００－０．７９（ｍ，１２Ｈ）。

【０７００】

【化２２２】



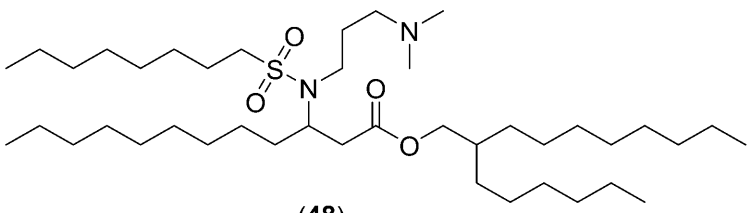
(100)

（Ｚ）－８－（Ｎ－（デク－３－エン－１－イルオキシ）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）オクタデカン酸３－ペンチルオクチル（１００）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．５０－５．３１（ｍ，２Ｈ），４．２９（ｓ，０Ｈ），４．１０（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），３．８７（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，２Ｈ），２．５０（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），２．４０（ｓ，２Ｈ），２．３３－２．２７（ｍ，７Ｈ），２．１６（ｑ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），２．０５（ｑ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），１．８７（ｐ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），１．７７－１．５４（ｍ，１６Ｈ），１．２９（ｄ，Ｊ＝１３．９Ｈｚ，４２Ｈ），０．９１（ｔｔ，Ｊ＝６．９，２．８Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０７０１】

実施例１５．３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］オクタン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸２－ヘキシルデシル（４８）の合成

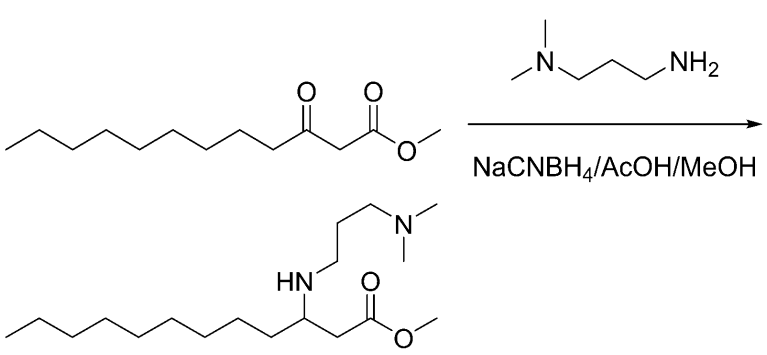
【化２２３】



(48)

工程１．３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸メチルの合成

【化２２４】



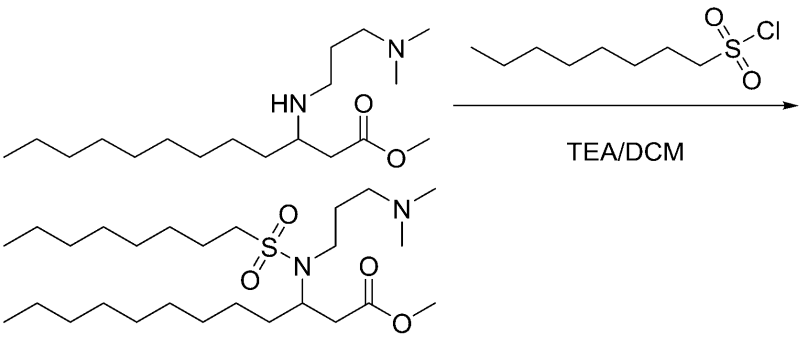
３－オキソドデカン酸メチル（５ｇ、２１．９ｍｍｏｌ）、ジメチルアミノプロピルア

ミン（２．２ｇ、２１．９ｍｍｏｌ）およびＡｃＯＨ（１．４ｇ、２２．６ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（１００ｍＬ）中にて７５℃で１時間撹拌した。冷却後、ＮａＣＮＢＨ$_3$（２．８ｇ、４３．８ｍｍｏｌ）を少しずつ加え、反応物を室温で１８時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、Ｈ$_2$Ｏおよびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ／０．５％ＴＥＡ）によって精製して３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸メチル（２．６２ｇ、３８．０％）を得た。

【０７０２】

工程２．３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］オクタン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸メチルの合成

【化２２５】

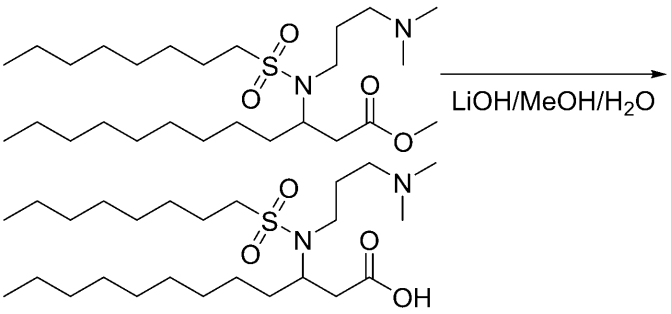


３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸メチル（３００ｍｇ、１．０ｍｍｏｌ）、ＴＥＡ（１９３ｍｇ、１．９ｍｍｏｌ）および塩化１－オクタンスルホニル（２１３ｍｇ、１．０ｍｍｏｌ）をＤＣＭ中にて室温で１８時間撹拌した。有機物をブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～５％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］オクタン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸メチル（２７６ｍｇ、５９．０％）を得た。

【０７０３】

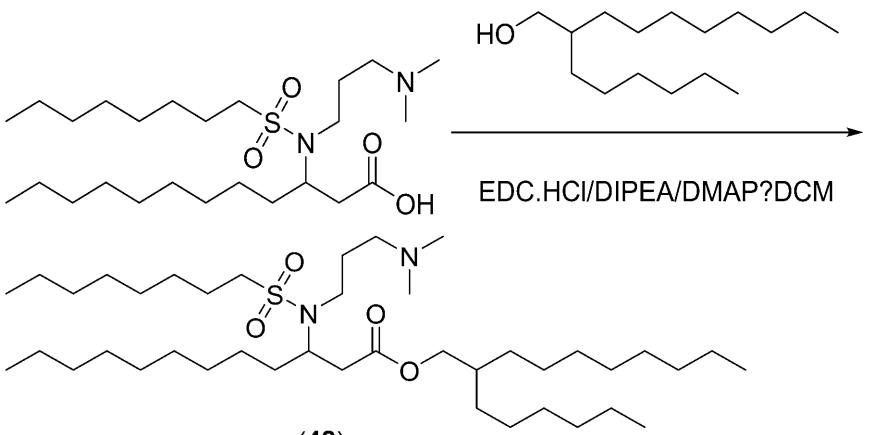
工程３．３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］オクタン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸の合成

【化２２６】



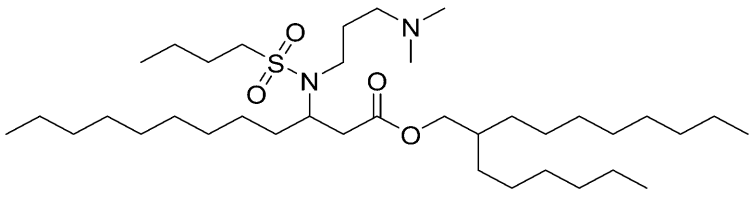
３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］オクタン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸メチル（２７８ｍｇ，０．６ｍｍｏｌ）およびＬｉＯＨ（２７ｍｇ，１．１ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（１０ｍＬ）およびＨ$_2$Ｏ（２ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。６ＭのＨＣｌ（０．１９ｍＬ，６Ｍ，１．１ｍｍｏｌ）を加え、反応物を水で希釈し、ＤＣＭで抽出した。有機物を乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮して３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］オクタン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸（０．

２７ｇ、Ｑｕａｎｔ）を得、それを精製することなく使用した。
【０７０４】
工程４．３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］オクタン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸２－ヘキシルデシル（４８）の合成
【化２２７】



(48)

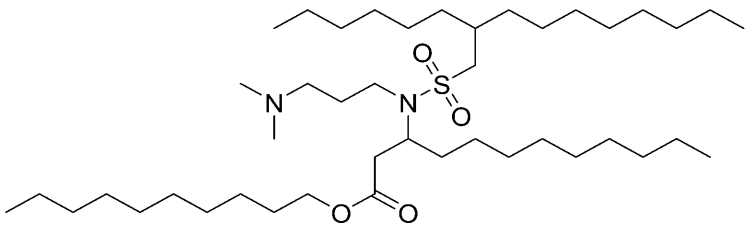
３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］オクタン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸（０．２７ｇ、０．６ｍｍｏｌ）、ヘキシルデカノール（１５１ｍｇ、０．６ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ ＨＣｌ（２１７ｍｇ、１．１ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．３ｍＬ、１．７ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（触媒）を室温で１８時間撹拌した。有機物を飽和ＮａＨＣＯ$_3$およびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１２％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）および（０～２％ＭｅＯＨ／ＥｔＯＡｃ）によって精製して３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］オクタン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸２－ヘキシルデシル（４８）（６１ｍｇ、１５．４％）を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．０５－４．００（ｍ，３Ｈ），３．２５－３．１４（ｍ，２Ｈ），２．９５（ｔｄ，Ｊ＝７．０，３．２Ｈｚ，２Ｈ），２．７１－２．５３（ｍ，２Ｈ），２．３２－２．２４（ｍ，７Ｈ），１．９１－１．５８（ｍ，１２Ｈ），１．４３－１．２８（ｍ，４４Ｈ），０．９３－０．７５（ｍ，１２Ｈ）。
【０７０５】
以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。
【化２２８】



(49)

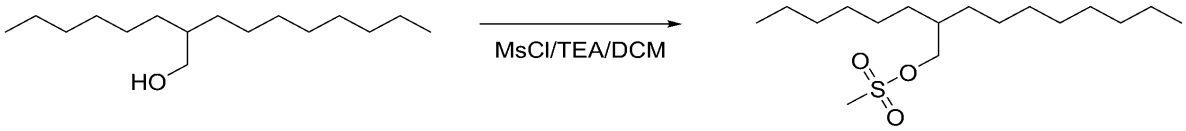
３－（Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）ブチルスルホンアミド）ドデカン酸２－ヘキシルデシル（４９）。ＭＳによって確認された生成物（ＥＳＩ＋ｖｅ）
【０７０６】
実施例１６．３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］２－ヘキシルデカンスルホンアミド｝ドデカン酸デシル（５０）の合成

【化２２９】

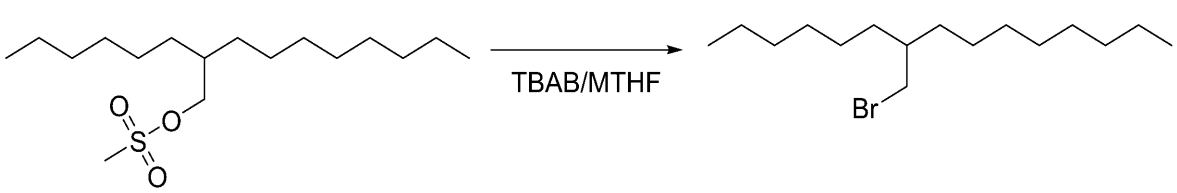


(50)

工程１．メタンスルホン酸２－ヘキシルデシルの合成
【化２３０】

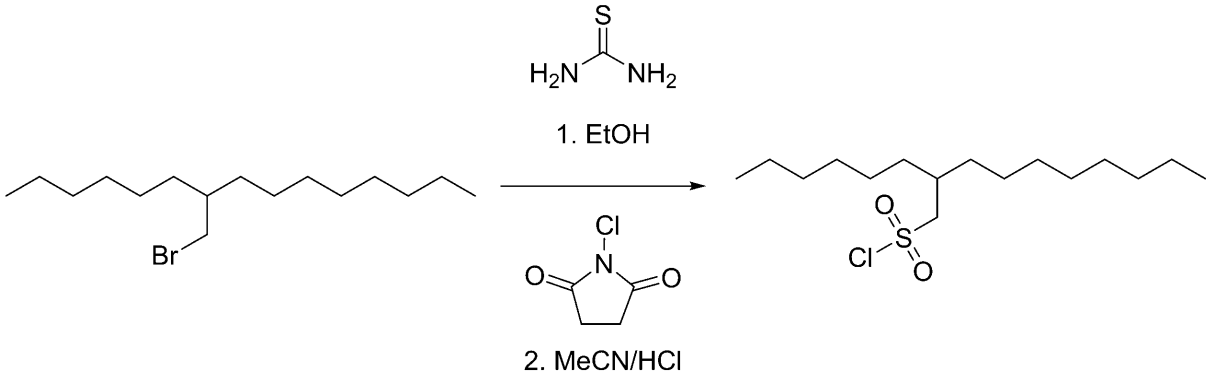


ヘキシルデカノール（２ｇ、８．２ｍｍｏｌ）およびＴＥＡ（１．４４ｍＬ、１０．３ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（３０ｍＬ）中にて０℃で撹拌した。ＭｓＣｌ（０．７ｍＬ、９．１ｍｍｏｌ）を一滴ずつ加え、反応物を室温で２時間撹拌した。飽和$NaHCO_3$で反応を止め、Et_2Oで希釈した。有機物をブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、真空にて濃縮して粗製のメタンスルホン酸２－ヘキシルデシル（２．６４ｇ、Ｑｕａｎｔ）を得、それを精製することなく使用した。
【０７０７】
工程２．７－（ブロモメチル）ペンタデカンの合成
【化２３１】



メタンスルホン酸２－ヘキシルデシル（２．６４ｇ、８．２ｍｍｏｌ）およびＴＢＡＢ（３．５ｇ、１０．７ｍｍｏｌ）をメチルＴＨＦ（５０ｍＬ）中にて８０℃で２．５時間撹拌した。反応物を氷水に注ぎ、ヘキサンで抽出した。水性層をヘキサンで逆抽出し、合わせた有機物をブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（１００％ヘキサン）によって精製して７－（ブロモメチル）ペンタデカン（２．５２ｇ、９５．２％）を得た。
【０７０８】
工程３．塩化２－ヘキシルデカン－１－スルホニルの合成

【化２３２】

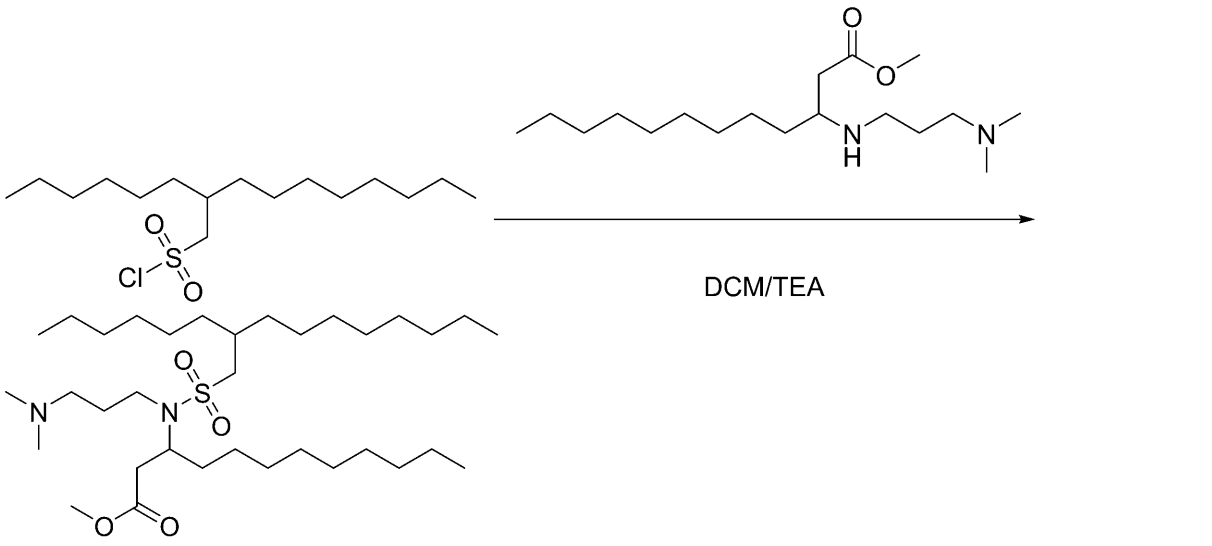


７－（ブロモメチル）ペンタデカン（５００ｍｇ，１．６４ｍｍｏｌ）およびチオ尿素（１２４ｍｇ，１．６４ｍｍｏｌ）をＥｔＯＨ（１０ｍＬ）中にて１時間還流した。溶媒を真空にて除去し、残留物をクロロスクシンイミド（１．１ｇ、８．２ｍｍｏｌ）、２ＭのＨＣｌ（１．１ｍＬ、１．１ｍｍｏｌ）およびＭｅＣＮ（１０ｍＬ）とともに、温度を１０～２０℃の間に保ちながら１５分間撹拌した。反応物をEt_2O（１５ｍＬ）とH_2O（１５ｍＬ）の間で分配した。有機物を分離し、乾燥させ（Na_2SO_4）、真空にて濃縮し、粗製物を自動フラッシュクロマトグラフィー（ＰＥ－ＥｔＯＡｃ、５：１）によって精製して塩化２－ヘキシルデカン－１－スルホニル（４３６ｍｇ、８２．０％）を得た。

【０７０９】

工程４．３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］２－ヘキシルデカンスルホンアミド｝ドデカン酸メチルの合成

【化２３３】

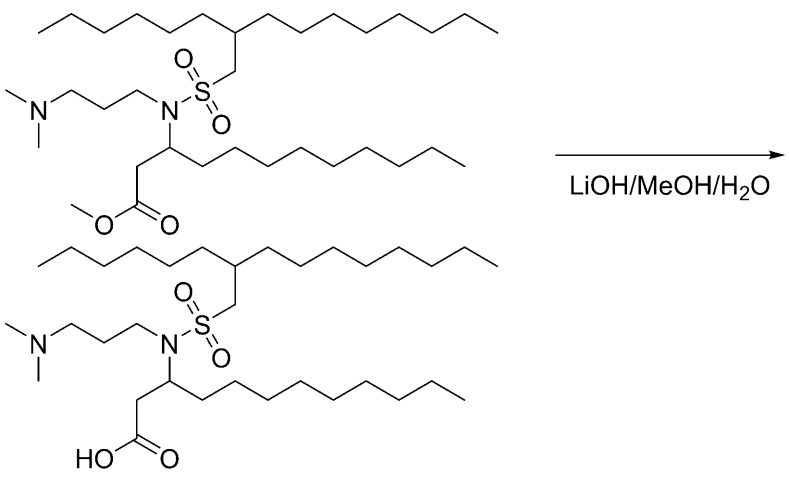


３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸メチル（４２６ｍｇ，１．４ｍｍｏｌ）、ＴＥＡ（３８０μＬ、２．７ｍｍｏｌ）、および塩化２－ヘキシルデカン－１－スルホニル（４６２ｍｇ，１．４ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（１０ｍＬ）中にて室温で２日間撹拌した。有機物をブラインで洗浄し、乾燥（$MgSO_4$）させ、濾過し、濾液を真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］２－ヘキシルデカンスルホンアミド｝ドデカン酸メチル（３６６ｍｇ、４４．８％）を得た。

【０７１０】

工程５．３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］２－ヘキシルデカンスルホンアミド｝－ドデカン酸の合成

【化２３４】

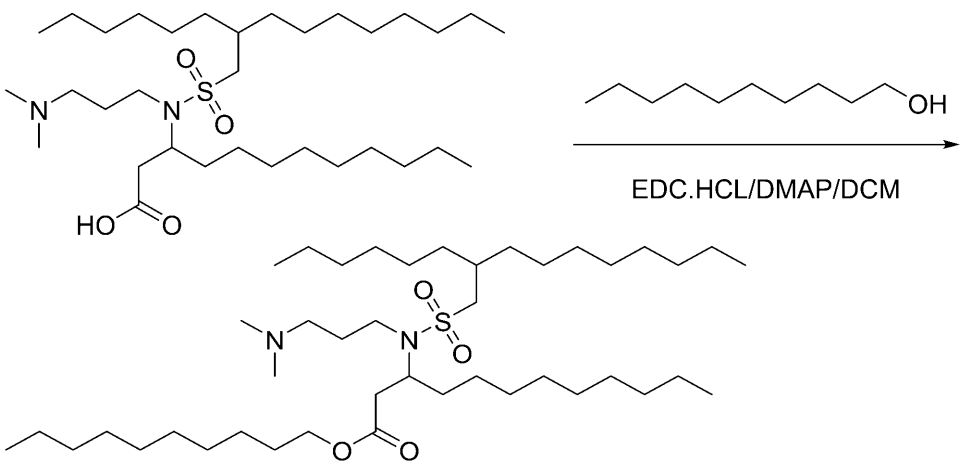


３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］２－ヘキシルデカンスルホンアミド｝ドデカン酸メチル（３６６ｍｇ、０．６１ｍｍｏｌ）およびＬｉＯＨ（２９ｍｇ、１．２ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（１０ｍＬ）およびH_2O（２ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。６ＭのＨＣｌ（０．２ｍＬ）で反応を止め、H_2Oで希釈し、ＤＣＭで抽出した。有機物を乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮して３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］２－ヘキシルデカンスルホンアミド｝ドデカン酸（２９１ｍｇ、８１．４％）を得、それをさらに精製することなく使用した。

【０７１１】

工程６．３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］２－ヘキシルデカン－スルホンアミド｝ドデカン酸デシル（５０）の合成

【化２３５】



(50)

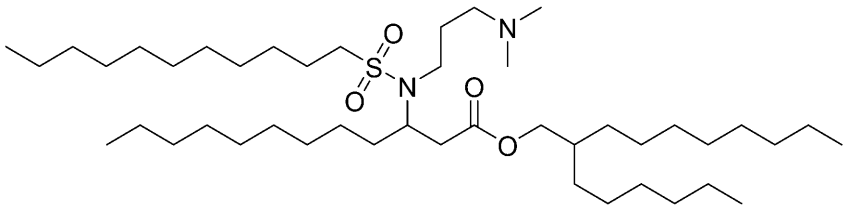
デカノール（８６ｍｇ、０．５４ｍｍｏｌ）、３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］２－ヘキシルデカン－スルホンアミド｝ドデカン酸（２９１ｍｇ、０．５ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ ＨＣｌ（１８９ｍｇ、１．０ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（０．２６ｍＬ、１．５ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（６ｍｇ、０．０５ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（２ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。有機物を飽和$NaHCO_3$およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィ

ー（０～２％ＭｅＯＨ／ＥｔＯＡｃ）によって２回精製して３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］２－ヘキシルデカン－スルホンアミド｝ドデカン酸デシル（５０）（４１ｍｇ、１１．４％）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．１１－４．０４（ｍ，３Ｈ），３．２０－３．１４（ｍ，２Ｈ），２．９１（ｄｄ，Ｊ＝１３．７，６．２Ｈｚ，１Ｈ），２．８０（ｄｄ，Ｊ＝１３．７，６．１Ｈｚ，１Ｈ），２．６５（ｄｄ，Ｊ＝１５．４，７．１Ｈｚ，１Ｈ），２．５５（ｄｄ，Ｊ＝１５．５，６．９Ｈｚ，１Ｈ），２．３１－２．２３（ｍ，７Ｈ），２．０８－２．０２（ｍ，１Ｈ），１．８４－１．６３（ｍ，１０Ｈ），１．４２－１．４９（ｍ，５Ｈ），１．４９－１．２８（ｍ，４４Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０７１２】

実施例１７．３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］ウンデカン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸エステルの合成（５１）

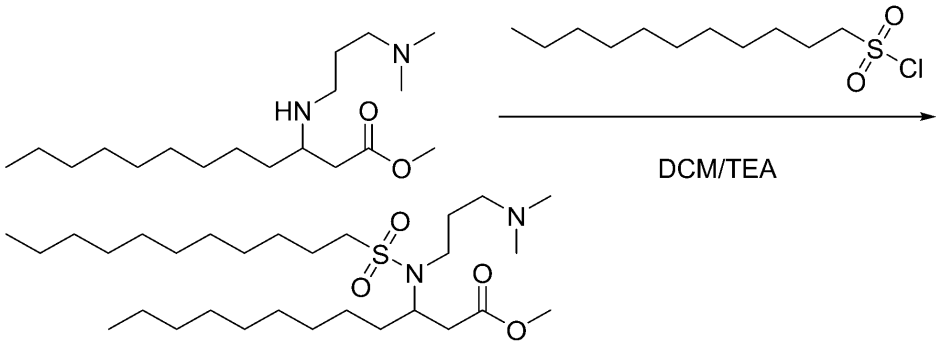
【化２３６】



(51)

工程１．３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］ウンデカン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸メチルの合成

【化２３７】

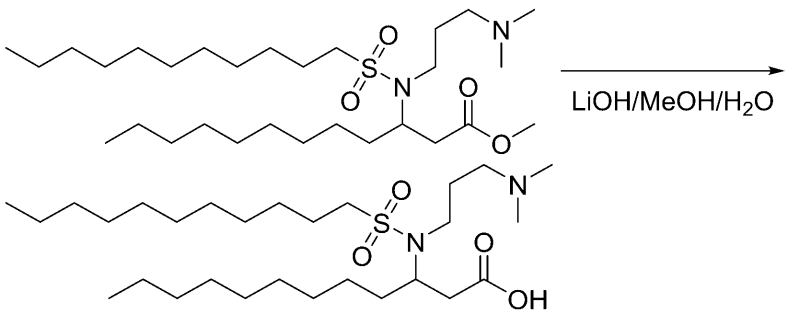


３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸メチル（９３９ｍｇ、３．０ｍｍｏｌ）、ＴＥＡ（０．８ｍＬ、６．０ｍｍｏｌ）および塩化ウンデカン－１－スルホニル（９８９ｍｇ、３．９ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（３０ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。有機物をブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、濾液を真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］ウンデカン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸メチル（５６４ｍｇ、３５．５％）を得た。

【０７１３】

工程２．３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］ウンデカン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸の合成

【化２３８】

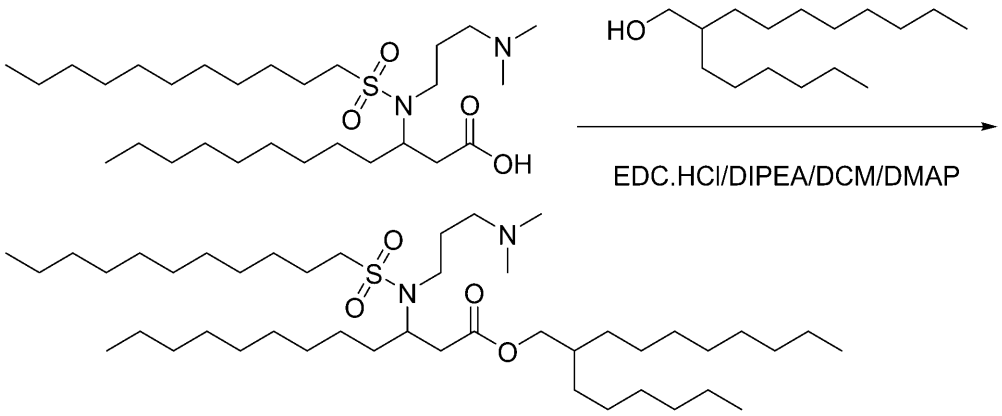


３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］ウンデカン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸メチル（５６４ｍｇ，１．１ｍｍｏｌ）およびＬｉＯＨ（７６ｍｇ，３．２ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（１０ｍＬ）および$Ｈ_2Ｏ$（２ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。６ＭのＨＣｌ（０．５３ｍＬ）を加え、反応物を$Ｈ_2Ｏ$で希釈し、ＤＣＭで抽出した。有機物を乾燥させ（$ＭｇＳＯ_4$）、濾過し、真空にて濃縮して３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］ウンデカン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸を得、それを精製することなく使用した。

【０７１４】

工程３．３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］ウンデカン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸２－ヘキシルデシル（５１）の合成

【化２３９】

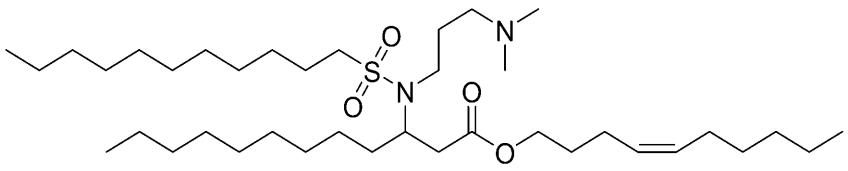


(51)

ヘキシルデカノール（１３９ｍｇ、０．６ｍｍｏｌ）、３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］ウンデカン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸（２７０ｍｇ、０．５２ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ　ＨＣｌ（０．２ｇ、１．０４ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（２０２ｍｇ、０．３ｍＬ、１．５６ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（１３ｍｇ、０．１ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（１０ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。有機物を飽和$ＮａＨＣＯ_3$およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$ＭｇＳＯ_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～４％ＭｅＯＨ／ＥｔＯＡｃおよび０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］ウンデカン－１－スルホンアミド｝ドデカン酸２－ヘキシルデシル（５１）（５０ｍｇ、１３．０％）を得た。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．０８－３．８９（ｍ，３Ｈ），３．２９－３．０８（ｍ，２Ｈ），３．０１－２．８３（ｍ，２Ｈ），２．７２－２．４７（ｍ，２Ｈ），２．３３－２．０９（ｍ，７Ｈ），１．８６－１．４５（ｍ，１０Ｈ），１．４４－０．９４（ｍ，５２Ｈ），０．８７（ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，１２Ｈ）。

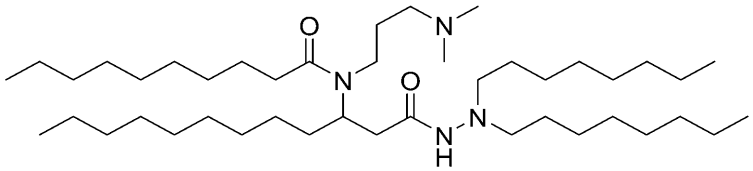
【０７１５】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。
【化２４０】



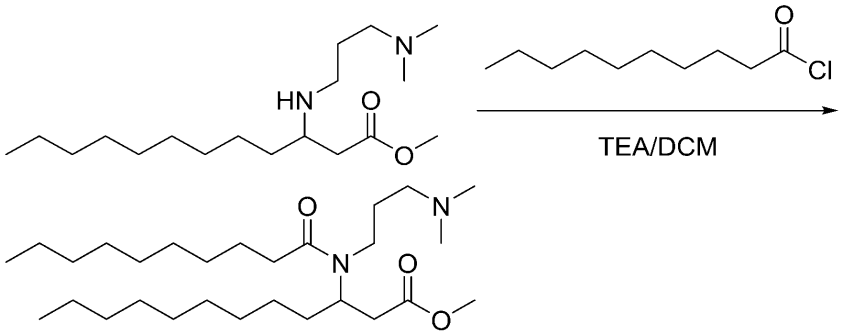
(52)

３－（Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）ウンデシルスルホンアミド）ドデカン酸（Ｚ）－デク－４－エン－１－イル（５２）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ５．４６－５．２６（ｍ，２Ｈ），４．１５－３．９１（ｍ，３Ｈ），３．２３－３．０６（ｍ，２Ｈ），３．０１－２．８２（ｍ，２Ｈ），２．７０－２．４６（ｍ，２Ｈ），２．３５－２．１３（ｍ，７Ｈ），２．０５（ｄｑ，Ｊ＝３５．５，７．２Ｈｚ，４Ｈ），１．８９－１．４５（ｍ，１０Ｈ），１．４４－０．９９（ｍ，３５Ｈ），０．９４－０．８０（ｍ，９Ｈ）。
【０７１６】
実施例１８．Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－Ｎ－［１－（Ｎ’，Ｎ’－ジオクチルヒドラジンカルボニル）ウンデカン－２－イル］デカンアミド（５３）の合成
【化２４１】



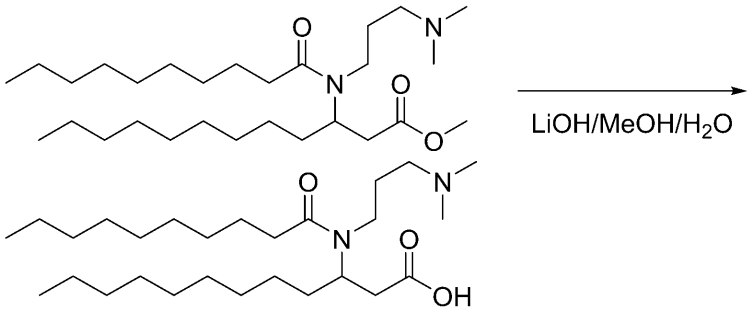
(53)

工程１．３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］デカンアミド｝ドデカン酸メチルの合成
【化２４２】



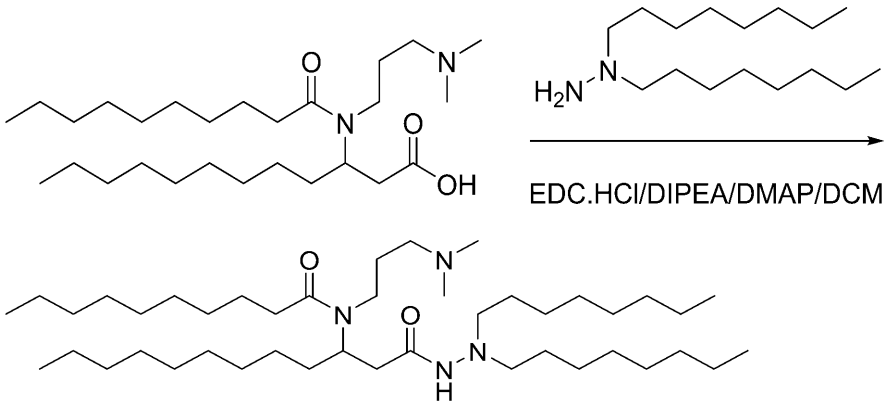
３－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ドデカン酸メチル（２ｇ、６．４ｍｍｏｌ）およびＴＥＡ（４．６ｍＬ、１２．７ｍｍｏｌ））をＤＣＭ中にて室温で撹拌した。塩化デカノイル（１．３ｇ、７．０ｍｍｏｌ）を一滴ずつ加え、反応物を室温で１８時間撹拌した。有機物をブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を（０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］デカンアミド｝ドデカン酸メチル（２ｇ、６７．４％）を得た。

【０７１７】
工程２．３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］デカンアミド｝ドデカン酸の合成
【化２４３】



３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］デカンアミド｝ドデカン酸メチル（３．４ｇ、７．３ｍｍｏｌ）およびＬｉＯＨ（３４７ｍｇ、１４．５ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（８ｍＬ）および$Ｈ_2Ｏ$（２ｍＬ）中にて室温で１８時間撹拌した。６ＭのＨＣｌ（２．４ｍＬ）を加え、反応物をＤＣＭで抽出した。有機物を合わせ、乾燥させ（$ＭｇＳＯ_4$）、濾過し、真空にて濃縮して３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］デカンアミド｝ドデカン酸（３．０３ｇ，９１．９％）を得、それを精製することなく使用した。

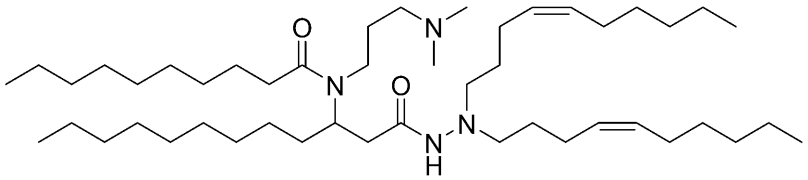
【０７１８】
工程３．Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－Ｎ－［１－（Ｎ’，Ｎ’－ジオクチルヒドラジン－カルボニル）ウンデカン－２－イル］デカンアミド（５３）の合成
【化２４４】



(53)

１，１－ジオクチルヒドラジン（７８２ｍｇ、３．０ｍｍｏｌ）、３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－デカンアミド｝ドデカン酸（１．５ｇ、３．３５ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ　ＨＣｌ（１．１７ｇ、６．１ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（３７ｍｇ、０．３１ｍｍｏｌ）をＤＣＭ中にて室温で１６時間撹拌した。飽和$ＮａＨＣＯ_3$で反応を止め、ＤＣＭで抽出し、有機物をブラインで洗浄し、乾燥させ（$ＭｇＳＯ_4$）、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（５％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製してＮ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－Ｎ－［１－（Ｎ’，Ｎ’－ジオクチルヒドラジンカルボニル）ウンデカン－２－イル］デカンアミド（５３）（４９５ｍｇ、２３．４％）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ５．７４（ｓ，１Ｈ），３．３２－３．０７（ｍ，２Ｈ），２．８３－２．５５（ｍ，５Ｈ），２．５５－２．１４（ｍ，１２Ｈ），１．７９－１．６４（ｍ，５Ｈ），１．５５－１．４０（ｍ，５Ｈ），１．３９－０．９９（ｍ，４６Ｈ），０．９６－０．８４（ｍ，１２Ｈ）。

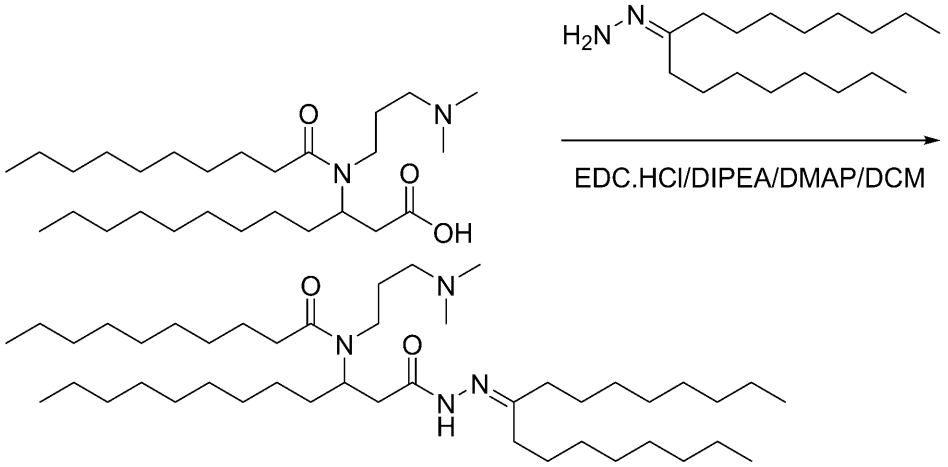
【０７１９】
以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。
【化２４５】



(54)

Ｎ－（１－（２，２－ジ（（Ｚ）－デク－４－エン－１－イル）ヒドラジネイル）－１－オキソドデカン－３－イル）－Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）－プロピル）デカンアミド（５４）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ５．７２（ｄ，Ｊ＝３１．３Ｈｚ，１Ｈ），５．４５－５．２２（ｍ，４Ｈ），４．４５（ｄ，Ｊ＝５７．４Ｈｚ，１Ｈ），３．３１－３．１６（ｍ，１Ｈ），２．８０－２．５９（ｍ，６Ｈ），２．５９－２．２０（ｍ，９Ｈ），２．１１－１．９３（ｍ，８Ｈ），１．８２－１．４３（ｍ，１０Ｈ），１．４３－１．１３（ｍ，４０Ｈ），０．９９－０．７８（ｍ，１２Ｈ）。

【０７２０】
実施例１９．Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－Ｎ－｛１－［Ｎ’－（ヘプタデカン－９－イリデン）ヒドラジンカルボニル］ウンデカン－２－イル｝デカンアミド（５５）の合成
【化２４６】



(55)

ヘプタデカン－９－イリデンヒドラジン（２３１ｍｇ、０．８６ｍｍｏｌ）、３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］デカンアミド｝ドデカン酸（４３０ｍｇ、０．９５ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ　ＨＣｌ（３３０ｍｇ、１．７ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（１０ｍｇ、０．１ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（２０ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。飽和ＮａＨＣＯ$_{3}$溶液で反応を止め、ＤＣＭで抽出した。有機物をブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ４）、真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（５％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製してＮ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－Ｎ－｛１－［Ｎ’－（ヘプタデカン－９－イリデン）ヒドラジンカルボニル］ウンデカン－２－イル｝デカンアミド（５５）（１７６ｍｇ、２９．０％）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ

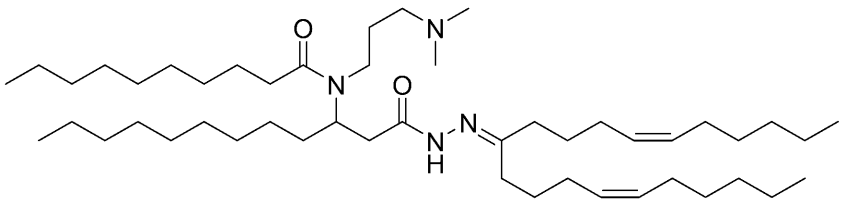
，ＣＤＣｌ３）δ８．１９（ｓ，１Ｈ），４．５３－４．３８（ｍ，１Ｈ），３．７３－３．６５（ｍ，１Ｈ），３．３９－３．０９（ｍ，３Ｈ），２．９５－２．８６（ｍ，１Ｈ），２．８２－２．６５（ｍ，３Ｈ），２．５９－２．１９（ｍ，１２Ｈ），２．１９－２．１０（ｍ，２Ｈ），１．５７－１．４１（ｍ，６Ｈ），１．４０－１．１５（ｍ，４６Ｈ），０．９５－０．８４（ｍ，１２Ｈ）。

【０７２１】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【０７２２】

【化２４７】

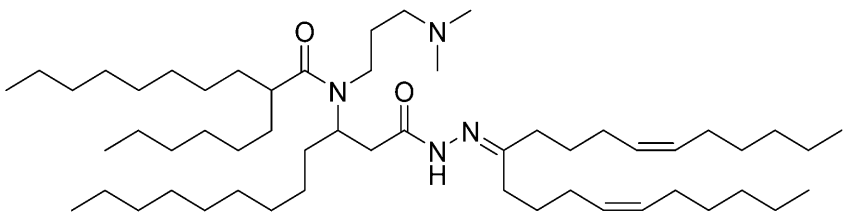


(56)

Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－Ｎ－（１－（２－（（６Ｚ，１５Ｚ）－ヘニコサ－６，１５－ジエン－１１－イリデン）ヒドラジネイル）－１－オキソドデカン－３－イル）デカンアミド（５６）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ８．２１（ｓ，１Ｈ），５．４９－５．３０（ｍ，４Ｈ），４．５８－４．３５（ｍ，３Ｈ），３．３５－３．１２（ｍ，３Ｈ），３．０４－２．５９（ｍ，７Ｈ），２．５４－２．２１（ｍ，１０Ｈ），２．１８－１．７７（ｍ，１２Ｈ），１．５１－１．０５（ｍ，４０Ｈ），０．９５－０．７７（ｍ，１２Ｈ）。

【０７２３】

【化２４８】



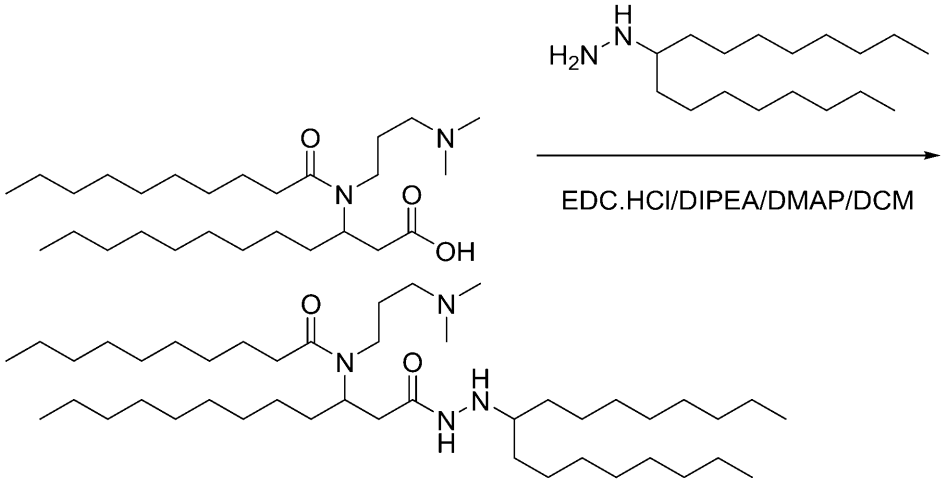
(57)

Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－Ｎ－（１－（２－（（６Ｚ，１５Ｚ）－ヘニコサ－６，１５－ジエン－１１－イリデン）ヒドラジネイル）－１－オキソドデカン－３－イル）－２－ヘキシルデカンアミド（５７）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ５．５３－５．２２（ｍ，４Ｈ），４．５７－４．３８（ｍ，２Ｈ），４．３２－４．１９（ｍ，２Ｈ），３．４４－３．１５（ｍ，４Ｈ），３．１５－２．１５（ｍ，１６Ｈ），２．１５－１．７５（ｍ，９Ｈ），１．６０－１．０１（ｍ，５２Ｈ），０．９７－０．６７（ｍ，１５Ｈ）。

【０７２４】

実施例２０．Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－Ｎ－｛１－［Ｎ’－（ヘプタデカン－９－イル）ヒドラジンカルボニル］ウンデカン－２－イル｝デカンアミド（５８）の合成

【化２４９】



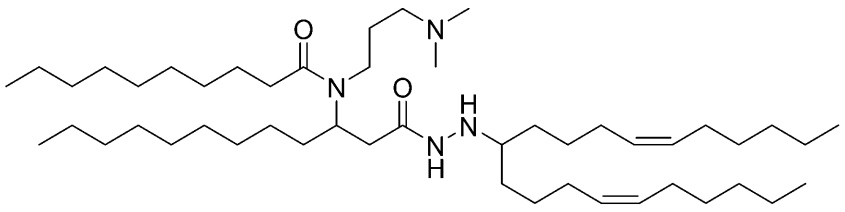
(58)

ヘプタデカン－９－イルヒドラジン（５００ｍｇ、１．９ｍｍｏｌ）、３－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］デカンアミド｝ドデカン酸（９２５ｍｇ、２．０ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ．ＨＣｌ（７０９ｍｇ、３．７ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（２３ｍｇ、０．１９ｍｍｏｌ）を室温で１６時間撹拌した。飽和$NaHCO_3$溶液で反応を止め、ＤＣＭで抽出し、ブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１００％ＥｔＯＡｃ／ヘキサンおよび０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製してＮ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－Ｎ－｛１－［Ｎ’－（ヘプタデカン－９－イル）ヒドラジンカルボニル］ウンデカン－２－イル｝デカンアミド（５８）（５９８ｍｇ、４５．７％）を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ８．２９－８．１５（ｍ，１Ｈ），４．４５（ｓ，１Ｈ），３．５４－３．１３（ｍ，４Ｈ），２．７６－２．０３（ｍ，１４Ｈ），２．０１－１．７０（ｍ，２Ｈ），１．５９－１．０３（ｍ，５６Ｈ），１．０２－０．８１（ｍ，１２Ｈ）。

【０７２５】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【化２５０】



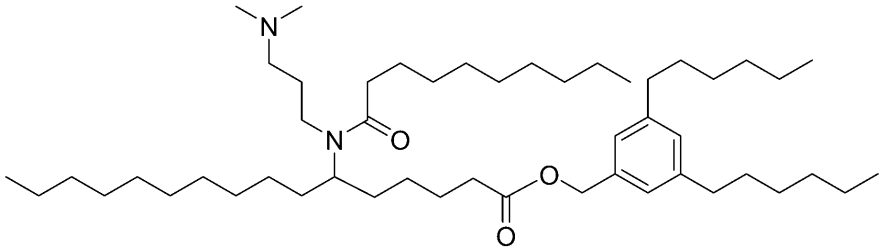
(59)

Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－Ｎ－（１－（２－（（６Ｚ，１５Ｚ）－ヘニコサ－６，１５－ジエン－１１－イル）ヒドラジネイル）－１－オキソドデカン－３－イル）デカンアミド（５９）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ８．２０（ｄ，Ｊ＝２５．７Ｈｚ，１Ｈ），５．４７－５．２６（ｍ，４Ｈ），３．３４－３．１９（ｍ，２Ｈ），３．０９－２．９５（ｍ，１Ｈ），２．７９－２．６６（ｍ，１Ｈ），２．６２－２．１９（ｍ，１０Ｈ），２．１１－１．９７（ｍ，８Ｈ），１．７７－１．４６（ｍ，７Ｈ），１．４５－１．１３（ｍ，４８Ｈ），０．９４－０．８６（ｍ，１２Ｈ）。

【０７２６】

実施例２１．６－{Ｎ－[３－（ジメチルアミノ）プロピル]デカンアミド}ヘキサデカン酸（３，５－ジヘキシルフェニル）メチル（６０）の合成

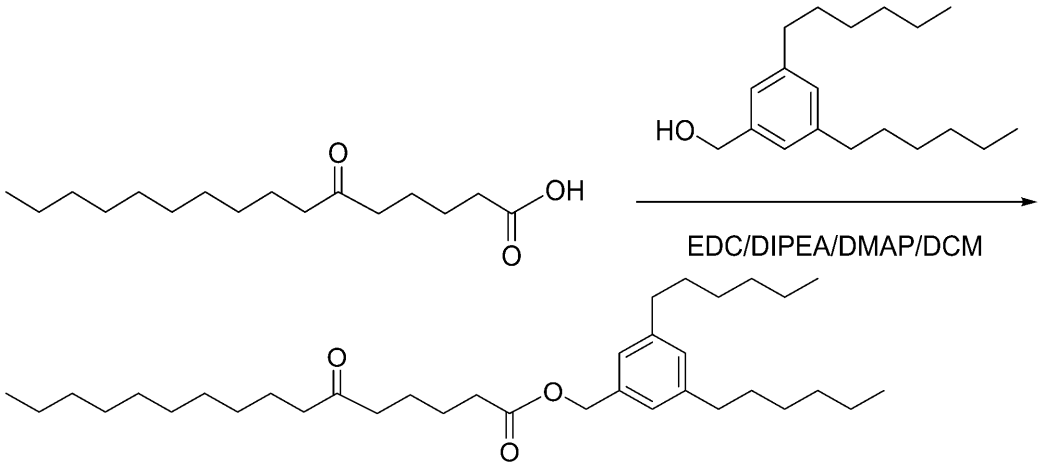
【化２５１】



(60)

工程１．６－オキソヘキサデカン酸（３，５－ジヘキシルフェニル）メチルの合成

【化２５２】

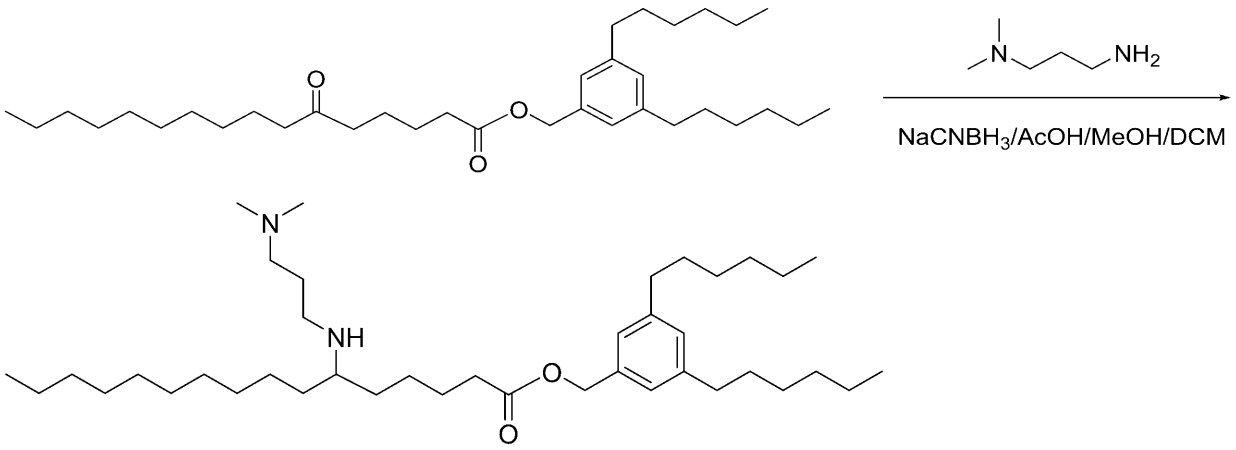


６－オキソヘキサデカン酸（５００ｍｇ、１．８ｍｍｏｌ）、（３，５－ジヘキシルフェニル）メタノール（５１１ｍｇ、１．８ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（１．０ｍＬ、５．５ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ（７１０ｍｇ、３．７ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（１００ｍｇ、０．１９ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（１０ｍＬ）中にて０℃で１６時間撹拌し、室温まで温めた。反応物を飽和$NaHCO_3$およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して６－オキソヘキサデカン酸（３，５－ジヘキシルフェニル）メチル（５４６ｍｇ、５５．８％）を得た。

【０７２７】

工程２．６－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ヘキサデカン酸（３，５－ジヘキシルフェニル）メチルの合成

【化２５３】

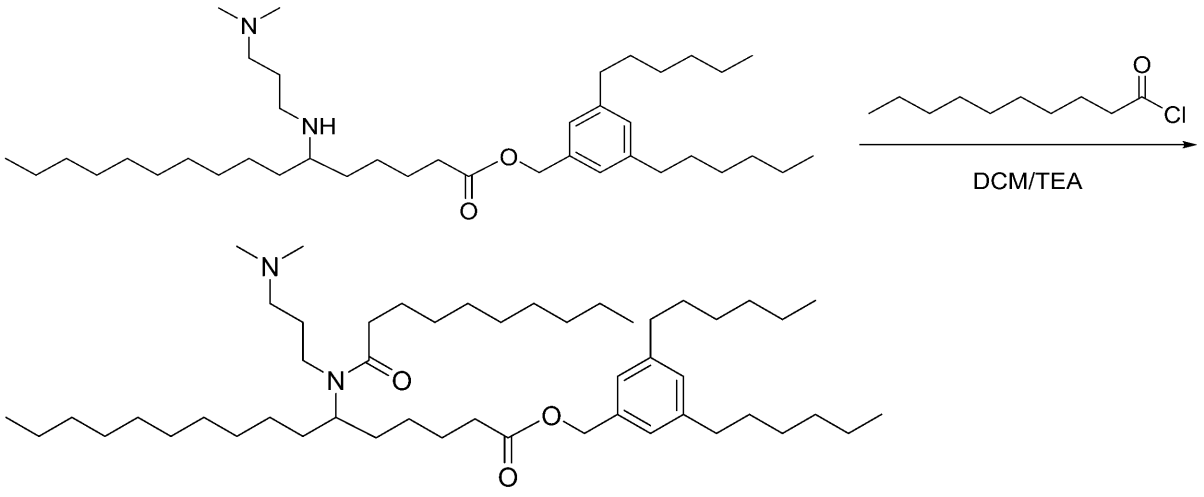


６－オキソヘキサデカン酸（３，５－ジヘキシルフェニル）メチル（５４６ｍｇ、１．１ｍｍｏｌ）、ジメチルアミノプロパン（１１９ｍｇ、１．２ｍｍｏｌ）、ＡｃＯＨ（０．１２ｍＬ、２．１２ｍｍｏｌ）およびＮａＣＮＢＨ$_3$（２００ｍｇ、３．２ｍｍｏｌ）を、ＭｅＯＨ（１０ｍＬ）およびＤＣＭ（３ｍＬ）中にて室温で１５時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をH_2O（５０ｍＬ）とＥｔＯＡｃ（５０ｍＬ）の間で分配した。水性層をＥｔＯＡｃで抽出し、合わせた有機物を乾燥させ（Na_2SO_4）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＭＥＯＨ／ＤＣＭ／０．５％ＴＥＡ）によって精製して６－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ヘキサデカン酸（３，５－ジヘキシルフェニル）メチル（４９０ｍｇ、７５．１％）を得た。

【０７２８】

工程３．６－{Ｎ－[３－（ジメチルアミノ）プロピル]デカンアミド}ヘキサデカン酸（３，５－ジヘキシルフェニル）メチル（６０）の合成

【化２５４】



(60)

６－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝ヘキサデカン酸（３，５－ジヘキシルフェニル）メチル（１６３ｍｇ、０．２７ｍｍｏｌ）とＴＥＡ（８０ｍｇ、０．８０ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（１０ｍＬ）に溶解し、続いてＤＣＭ（１０ｍＬ）中の塩化デカノイル（０．１１ｍＬ、０．５３ｍｍｏｌ）を一滴ずつ加えた。反応物を室温で２０時間撹拌

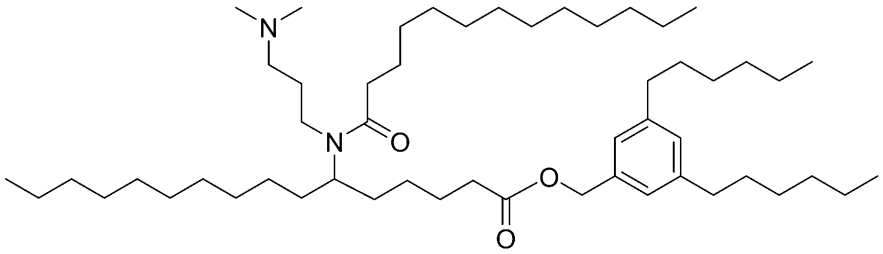
し、次いでそれを飽和ＮａＨＣＯ$_3$およびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＭＥＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して６－｛Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］デカンアミド｝ヘキサデカン酸（３，５－ジヘキシルフェニル）メチル（６０）（６１ｍｇ、３０．０％）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ６．９８（ｓ，３Ｈ），５．０６（ｓ，２Ｈ），３．７０－３．６２（ｍ，１Ｈ），３．２２－３．１２（ｍ，２Ｈ），２．６４－２．４９（ｍ，８Ｈ），２．４０－２．２５（ｍ，６Ｈ），１．７１－１．５８（ｍ，８Ｈ），１．５４－１．４２（ｍ，４Ｈ），１．４２－１．１４（ｍ，４６Ｈ），０．９３－０．８６（ｍ，１２Ｈ）。

【０７２９】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【０７３０】

【化２５５】

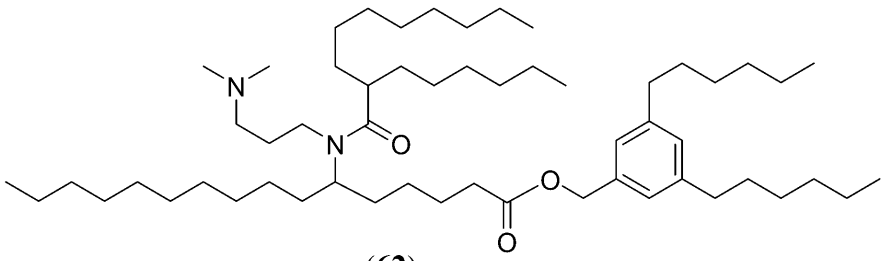


(61)

６－（Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）トリデカンアミド）ヘキサデカン酸３，５－ジヘキシルベンジル（６１）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ６．９８（ｓ，３Ｈ），５．０７（ｓ，２Ｈ），３．６９－３．６２（ｍ，１Ｈ），３．１９－３．１０（ｍ，２Ｈ），２．６２－２．５６（ｍ，４Ｈ），２．４１－２．２０（ｍ，１０Ｈ），１．６４－１．５６（ｍ，８Ｈ），１．５６－１．４１（ｍ，６Ｈ），１．４１－１．１３（ｍ，５０Ｈ），０．９５－０．８６（ｍ，１２Ｈ）。

【０７３１】

【化２５６】



(62)

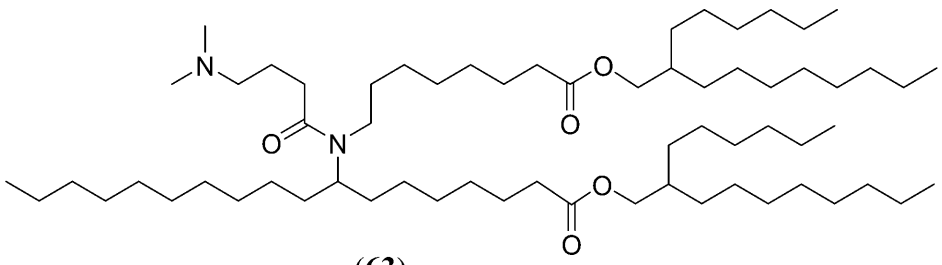
６－（Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－２－ヘキシルデカンアミド）ヘキサデカン酸３，５－ジヘキシルベンジル（６２）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ６．９８（ｓ，３Ｈ），５．０６（ｓ，２Ｈ），３．７８－３．７１（ｍ，１Ｈ），３．２４－２．９６（ｍ，４Ｈ），２．６９－２．５５（ｍ，６Ｈ），２．５１－２．４５（ｍ，１Ｈ），２．４３－２．２０（ｍ，７Ｈ），１．６１－１．１２（ｍ，６５Ｈ），０．９６－０．８１（ｍ，１５Ｈ）。

【０７３２】

実施例２２．７－（｛９－［（２－ヘキシルデシル）オキシ］－９－オキソノニル｝アミ

ノ）ヘプタデカン酸２－ヘキシルデシル（６３）の合成

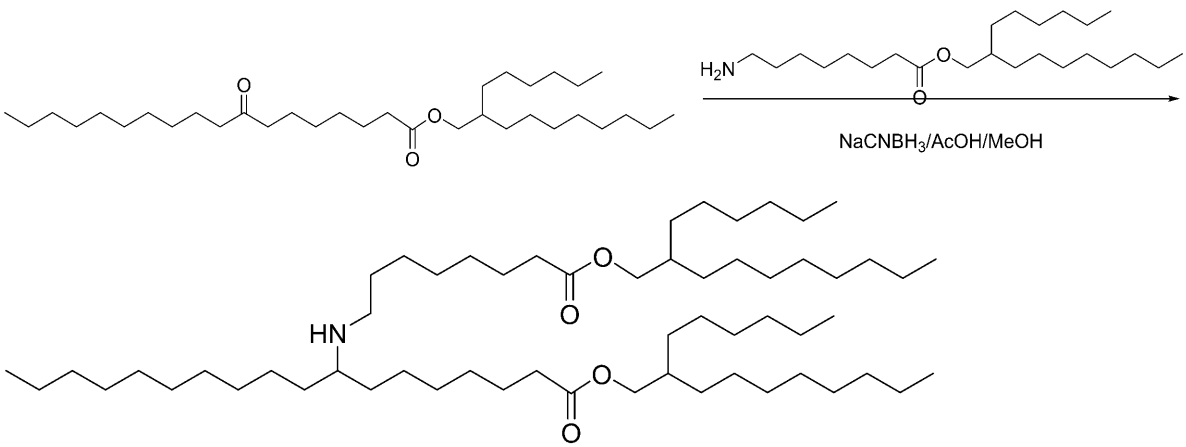
【化２５７】



(63)

工程１．８－（｛８－［（２－ヘキシルデシル）オキシ］－８－オキソオクチル｝アミノ）－オクタデセン酸２－ヘキシルデシルの合成

【化２５８】

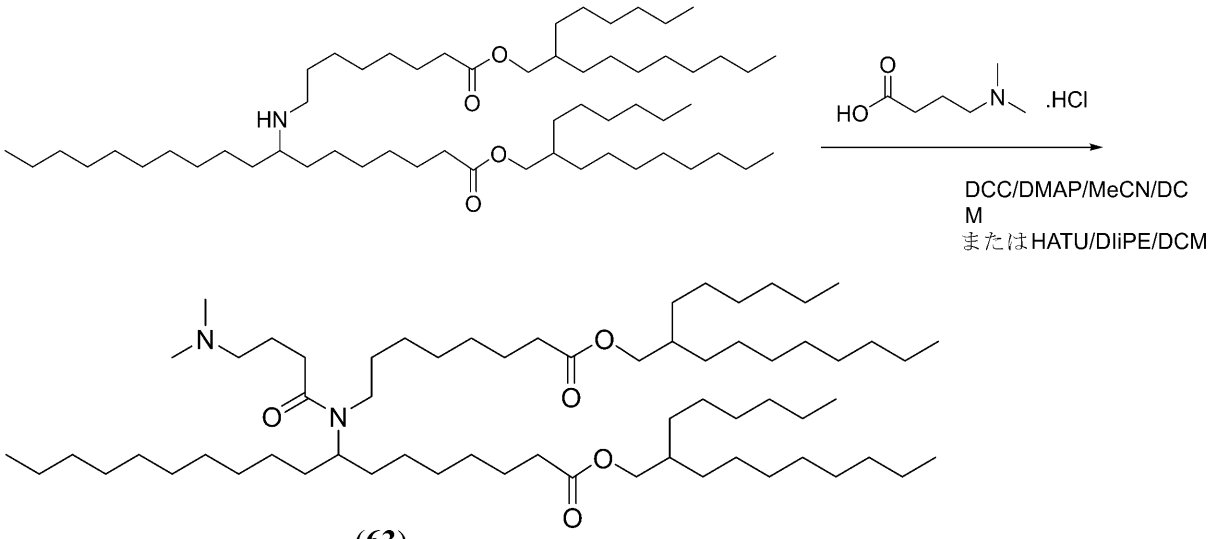


８－オキソオクタデカン酸２－ヘキシルデシル（７４３ｍｇ、１．４ｍｍｏｌ）、８－アミノオクタン酸２－ヘキシルデシル（６００ｍｇ、１．６ｍｍｏｌ）およびＡｃＯＨ（１７０ｍｇ、２．８ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ中にて５０℃で３０分間撹拌した。ＮａＣＮＢＨ$_3$（２６８ｍｇ、４．３ｍｍｏｌ）を加え、１６時間撹拌を続けた。溶液を真空にて濃縮し、ＥｔＯＡｃ（７５ｍＬ）に溶解し、飽和ＮａＨＣＯ$_3$およびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して８－（｛８－［（２－ヘキシルデシル）オキシ］－８－オキソオクチル｝アミノ）オクタデカン酸２－ヘキシルデシル（５６７ｍｇ、４４．８％）を得た。

【０７３３】

工程２．８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛８－［（２－ヘキシルデシル）オキシ］－８－オキソオクチル｝ブタンアミド］オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（６３）の合成

【化２５９】



(63)

４－ジメチルアミノブタン酸ＨＣｌ塩（９４ｍｇ、０．６ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（１０３ｍｇ、０．８４ｍｍｏｌ）およびＤＣＣ（１２７ｍｇ、０．６２ｍｍｏｌ）をＡＣＮ（１．２５ｍＬ）中にて室温で２時間撹拌した。ＤＣＭ（１．２５ｍＬ）中の８－（｛８－［（２－ヘキシルデシル）オキシ］－８－オキソオクチル｝アミノ）オクタデカン酸２－ヘキシルデシル（２５０ｍｇ、０．２８ｍｍｏｌ）を加え、１８時間撹拌を続けた。反応物を真空にて濃縮し、残留物をヘキサンに懸濁して濾過し、濾液を真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（１００％ＥｔＯＡｃ、次いで０～１０％ＭｅＯＨ／ＥｔＯＡｃ）によって精製して８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛８－［（２－ヘキシルデシル）オキシ］－８－オキソオクチル｝ブタンアミド］オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（６３）（６４ｍｇ、２２．７％）を得た。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）δ３．９９（ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ，４Ｈ），３．６７（ｓ，１Ｈ），３．１３－３．００（ｍ，２Ｈ），２．３９－２．２７（ｍ，８Ｈ），２．２５（ｓ，６Ｈ），１．８５（ｑ，Ｊ＝７．９Ｈｚ，３Ｈ），１．６３（ｄ，Ｊ＝１０．２Ｈｚ，１５Ｈ），１．４６（ｓ，４Ｈ），１．３０（ｓ，７４Ｈ），０．９１（ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，１５Ｈ）。ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：［Ｍ＋Ｈ］＋、$C_{64}H_{126}N_2O_5$についての計算値１００３９７；実測値１００３．２

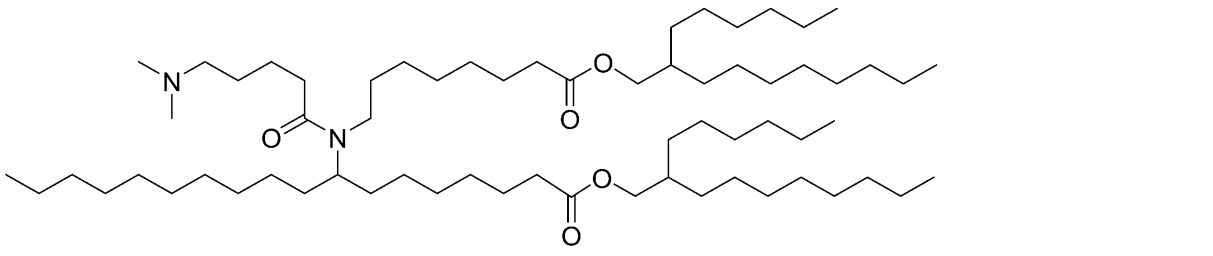
【０７３４】

ＨＡＴＵ／ＤＩＰＥＡ／ＤＣＭは最終的なアミドカップリングを生成するのに使用されてもよいことに留意のこと。

【０７３５】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【化２６０】

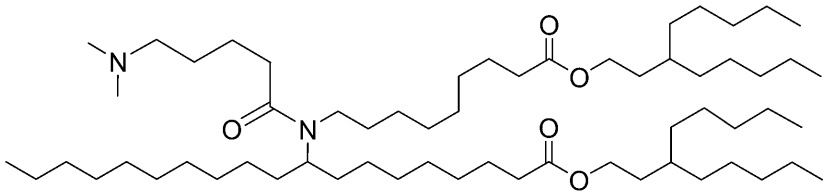


(64)

８－（５－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（８－（（２－ヘキシルデシル）オキシ）－８－オキソオクチル）ペンタンアミド）－オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（６４）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ３．９９（ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，４Ｈ），３．６４（ｓ，１Ｈ），３．０４（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，２Ｈ），２．４１－２．２６（ｍ，８Ｈ），２．２４（ｄ，Ｊ＝３．１Ｈｚ，６Ｈ），１．７９－１．４１（ｍ，２０Ｈ），１．４１－１．０２（ｍ，７４Ｈ），１．０２－０．７９（ｍ，１５Ｈ）。ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：［Ｍ＋Ｈ］＋、Ｃ$_{65}$Ｈ$_{128}$Ｎ$_{2}$Ｏ$_{5}$についての計算値１０１７．９８；実測値１０１７．２

【０７３６】

【化２６１】

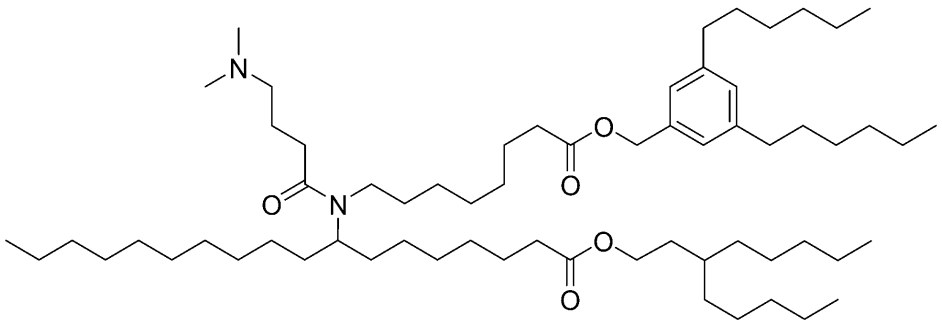


(65)

９－（５－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（９－オキソ－９－（（３－ペンチルオクチル）オキシ）ノニル）ペンタンアミド）ノナデカン酸３－ペンチルオクチル（６５）ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：［Ｍ＋Ｈ］＋、Ｃ$_{59}$Ｈ$_{116}$Ｎ$_{2}$Ｏ$_{5}$についての計算値９３３．８９；実測値９３３。

【０７３７】

【化２６２】

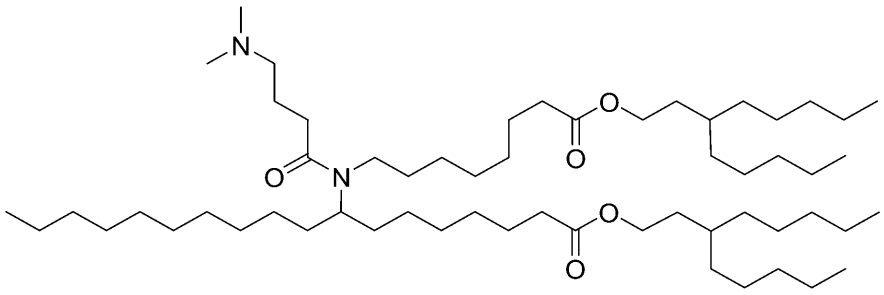


(66)

８－（Ｎ－（８－（（３，５－ジヘキシルベンジル）オキシ）－８－オキソオクチル）－４－（ジメチルアミノ）－ブタンアミド）－オクタデセン酸３－ペンチルオクチル（６６）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ７．２８（ｓ，１Ｈ），６．９９（ｓ，２Ｈ），５．０７（ｓ，２Ｈ），４．０９（ｍ，２Ｈ），３．０５（ｍ，２Ｈ），２．８３（ｓ，６Ｈ），２．６５（ｍ，１０Ｈ），２．２９－２．３７（ｍ，５Ｈ），１．２８－１．６（ｍ，６６Ｈ），０．８９（ｍ，１５Ｈ）。

【０７３８】

【化２６３】

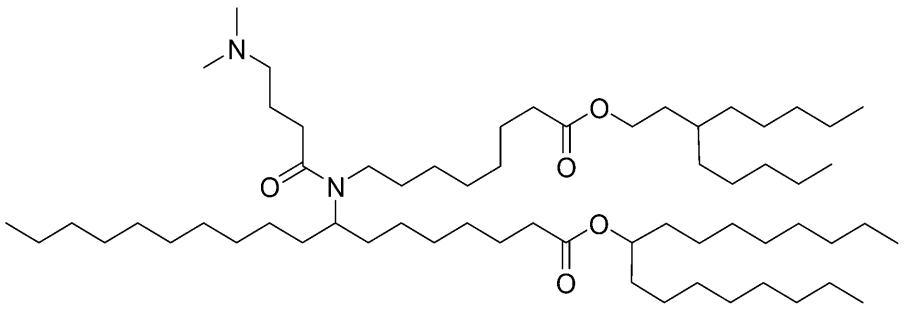


(67)

８－（４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（８－オキソ－８－（（３－ペンチルオクチル）オキシ）オクチル）－ブタンアミド）－オクタデセン酸３－ペンチルオクチル（６７）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．１１（ｄ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，４Ｈ），３．６６（ｓ，１Ｈ），３．１１－３．０１（ｍ，２Ｈ），２．３３（ｄｑ，Ｊ＝１５．０，６．８Ｈｚ，８Ｈ），２．２４（ｓ，６Ｈ），１．８５（ｈ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，２Ｈ），１．６１（ｄｑ，Ｊ＝１４．１，７．２Ｈｚ，１３Ｈ），１．４７（ｓ，０Ｈ），１．４４（ｓ，７Ｈ），１．３０（ｄ，Ｊ＝１６．７Ｈｚ，６０Ｈ），０．９１（ｔ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，１５Ｈ）。ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：［Ｍ＋Ｈ］＋Ｃ$_{58}$Ｈ$_{114}$Ｎ$_{2}$Ｏ$_{5}$についての計算値９１９．８８；実測値９２０．０

【０７３９】

【化２６４】

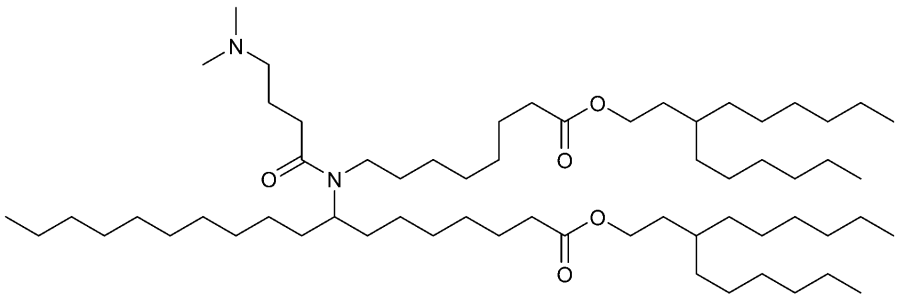


(68)

８－（４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（８－オキソ－８－（（３－ペンチルオクチル）オキシ）－オクチル）ブタンアミド）－オクタデセン酸ヘプタデカン－９－イル（６８）。ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：［Ｍ＋Ｈ］＋、Ｃ$_{62}$Ｈ$_{122}$Ｎ$_{2}$Ｏ$_{5}$についての計算値９７５．９４；実測値９７５．２

【０７４０】

【化２６５】

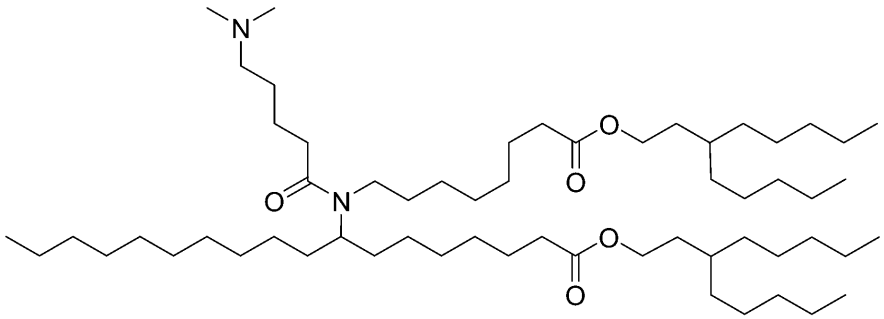


(69)

８－（４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（８－（（３－ヘキシルノニル）オキシ）－８－オキソオクチル）－ブタンアミド）－オクタデセン酸３－ヘキシルノニル（６９）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．１０（ｔ，４Ｈ），２．３８－２．２５（ｍ，８Ｈ），２．２４（ｓ，６Ｈ），１．６８（ｓ，５Ｈ），１．６０（ｄｑ，Ｊ＝１５．２，７．５Ｈｚ，１３Ｈ），１．４９－１．４０（ｍ，５Ｈ），１．３３（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，８Ｈ），１．３０（ｓ，９Ｈ），１．２７（ｓ，４５Ｈ），０．９４－０．８６（ｍ，１５Ｈ）。

【０７４１】

【化２６６】

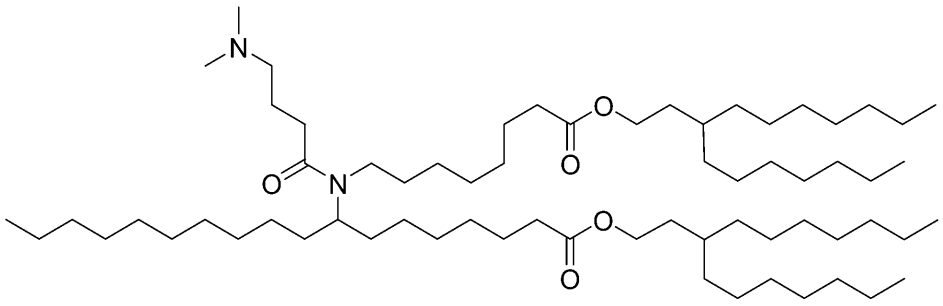


(70)

８－（５－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（８－オキソ－８－（（３－ペンチルオクチル）オキシ）オクチル）－ペンタンアミド）－オクタデセン酸３－ペンチルオクチル（７０）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．１０（ｔ，Ｊ＝７．１，４Ｈ），２．３８－２．２９（ｍ，７Ｈ），２．２７（ｓ，６Ｈ），１．５８（ｄｔ，Ｊ＝１７．０，８．５Ｈｚ，１９Ｈ），１．４３（ｓ，７Ｈ），１．２９（ｄ，Ｊ＝１５．８Ｈｚ，６５Ｈ），０．９１（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１５Ｈ）。

【０７４２】

【化２６７】

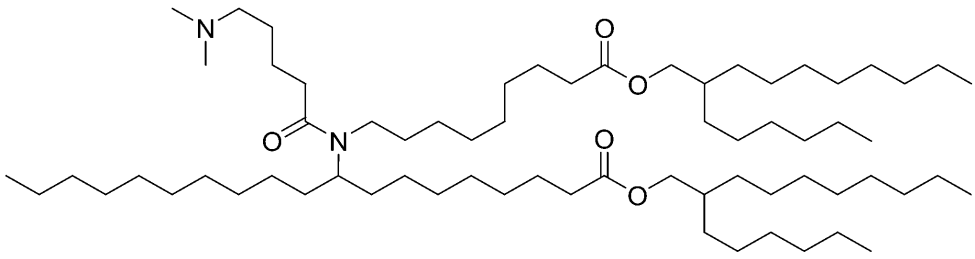


(71)

８－（４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（８－（（３－ヘプチルデシル）オキシ）－８－オキソオクチル）ブタンアミド）オクタデセン酸３－ヘプチルデシル（７１）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．１０（ｔｄ，Ｊ＝７．２，２．６Ｈｚ，４Ｈ），３．１１－２．９９（ｍ，２Ｈ），２．４１－２．２９（ｍ，７Ｈ），２．２８（ｓ，７Ｈ），１．８５（ｄｔ，Ｊ＝１４．９，７．５Ｈｚ，２Ｈ），１．７５（ｓ，８Ｈ），１．６０（ｄｔ，Ｊ＝１３．９，６．８Ｈｚ，７Ｈ），１．４５（ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，６Ｈ），１．３７－１．１８（ｍ，７６Ｈ），０．９４－０．８７（ｍ，１５Ｈ）。

【０７４３】

【化２６８】

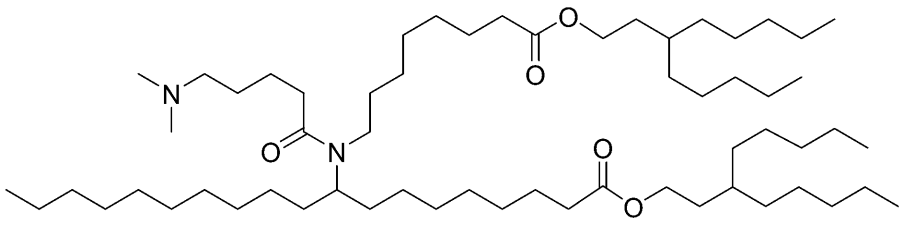


(72)

９－（５－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（９－（（２－ヘキシルデシル）オキシ）－９－オキソノニル）ペンタンアミド）－ノナデカン酸２－ヘキシルデシル（７２）。ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：［Ｍ＋Ｈ］＋、Ｃ$_{67}$Ｈ$_{132}$Ｎ$_{2}$Ｏ$_{5}$についての計算値１０４５．０１；実測値１０４６．３

【０７４４】

【化２６９】



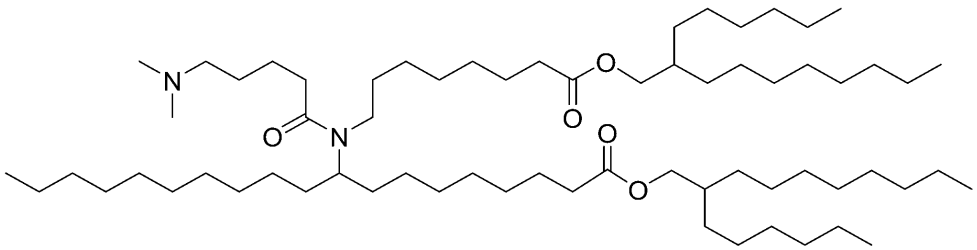
(73)

９－（５－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（８－オキソ－８－（（３－ペンチルオクチル）オ

キシ）オクチル）－ペンタンアミド）－ノナデカン酸３－ペンチルオクチル（７３）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ４．１０（ｔＪ＝７．１，４Ｈ），２．３４（ｓ，６Ｈ），２．３０（ｔ，Ｊ＝８．６Ｈｚ，５Ｈ），１．６２－１．５６（ｍ，１７Ｈ），１．４９－１．４１（ｍ，６Ｈ），１．３０（ｄ，Ｊ＝１６．９Ｈｚ，５７Ｈ），０．９１（ｔ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，１５Ｈ）。

【０７４５】

【化２７０】

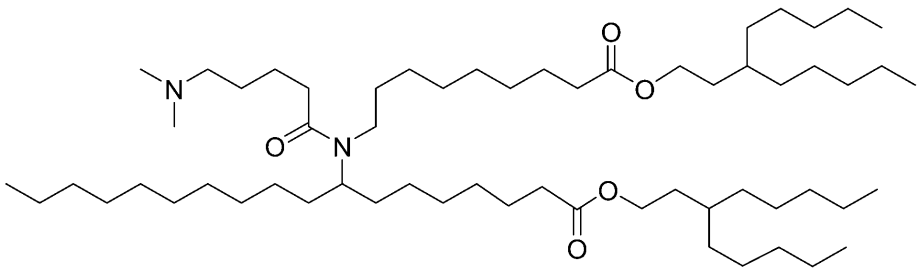


(74)

９－（５－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（８－（（２－ヘキシルデシル）オキシ）－８－オキソオクチル）－ペンタンアミド）－ノナデカン酸２－ヘキシルデシル（７４）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ３．９８（ｄ，Ｊ＝５．４Ｈｚ，４Ｈ），２．３８－２．２９（ｍ，７Ｈ），２．２７（ｓ，６Ｈ），１．８４－１．７７（ｍ，３Ｈ），１．６４（ｈ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，９Ｈ），１．３０（ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，７８Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１５Ｈ）。

【０７４６】

【化２７１】



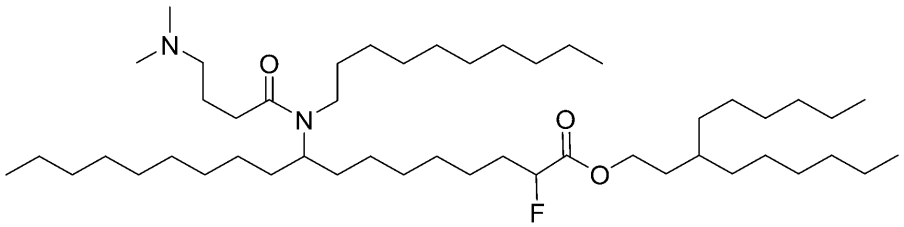
(75)

８－（５－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（９－オキソ－９－（（３－ペンチルオクチル）オキシ）ノニル）ペンタンアミド）オクタデセン酸３－ペンチルオクチル（７５）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ４．１０（ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，４Ｈ），２．３４（ｄｄ，Ｊ＝１４．１，７．２Ｈｚ，５Ｈ），２．２９（ｓ，６Ｈ），１．６２（ｑｑ，Ｊ＝１７．６，５．４Ｈｚ，１６Ｈ），１．４９－１．３９（ｍ，６Ｈ），１．３８－１．２２（ｍ，６２Ｈ），０．９１（ｔ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，１５Ｈ）。

【０７４７】

実施例２３．９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２－フルオロオクタデカン酸３－ヘキシルノニル（７６）の合成

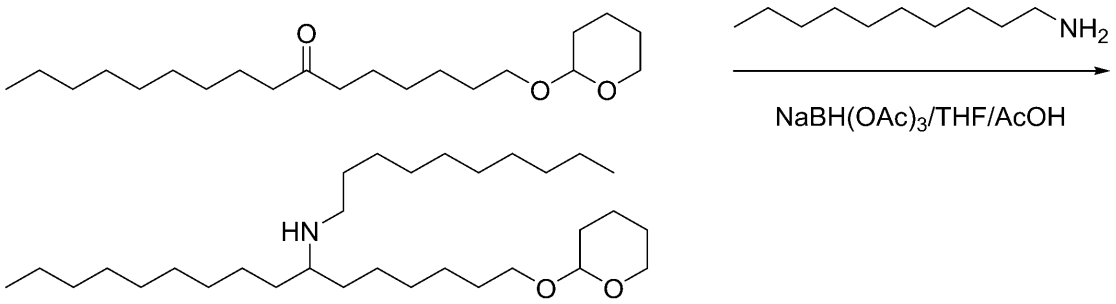
【化２７２】



(76)

工程１．デシル［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］アミンの合成

【化２７３】

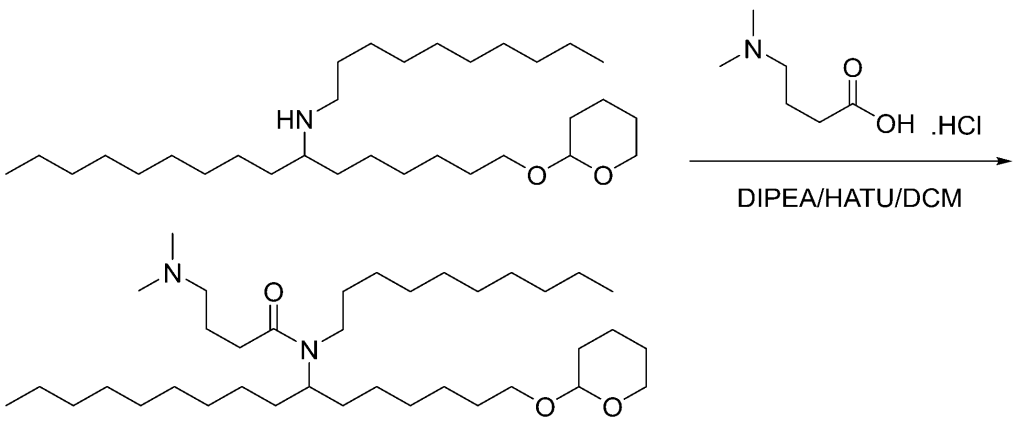


１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－オン（５ｇ，１４．７ｍｍｏｌ）およびＮ－デシルアミン（２．３１ｇ，１４．７ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１００ｍＬ）中にて５０℃で３０分間撹拌した。ＮａＢＨ（ＯＡｃ）$_3$（９．３ｇ，４４．０ｍｍｏｌ）を加え、１６時間撹拌を続けた。反応物を真空にて濃縮し、残留物の反応を飽和ＮａＨＣＯ$_3$ で止め、水性物をＥｔＯＡｃで抽出した。有機物を乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィーによって精製してデシル［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］アミン（４．９ｇ、６９．３３％）を得た。

【０７４８】

工程２．Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］ブタンアミドの合成

【化２７４】



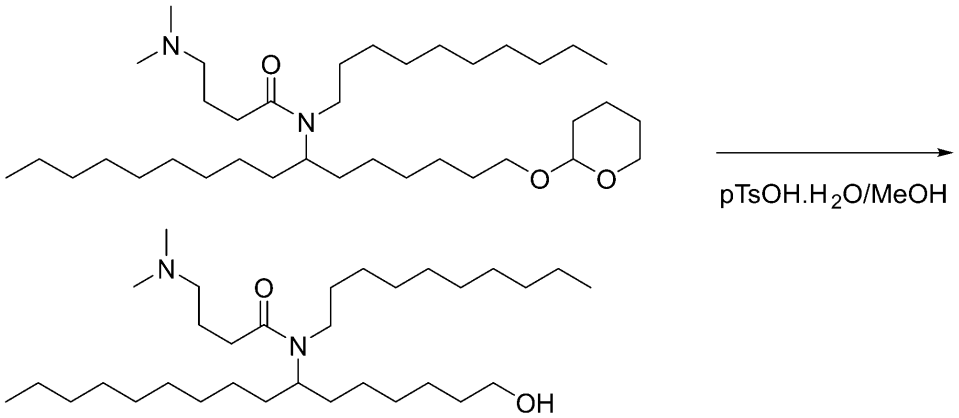
４－（ジメチルアミノ）ブタン酸ＨＣｌ塩（４．０ｇ、３０．５ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ

（１１．６ｇ、３０．５ｍｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（１０．７ｍＬ、６１．０ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（５０ｍＬ）中にて室温で３０分間撹拌した。ＤＣＭ中のデシル［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］アミン（４．９ｇ、１０．２ｍｍｏｌ）を加え、反応が完了するまで撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物を飽和ＮａＨＣＯ$_3$とＥｔＯＡｃの間で分配した。有機物をブラインで洗浄し、乾燥（ＭｇＳＯ$_4$）させ、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製してＮ－デシル－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］ブタンアミド（４．７ｇ、７７．７％）を得た。

【０７４９】

工程３．Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－ヒドロキシヘキサデカン－７－イル）ブタンアミドの合成

【化２７５】

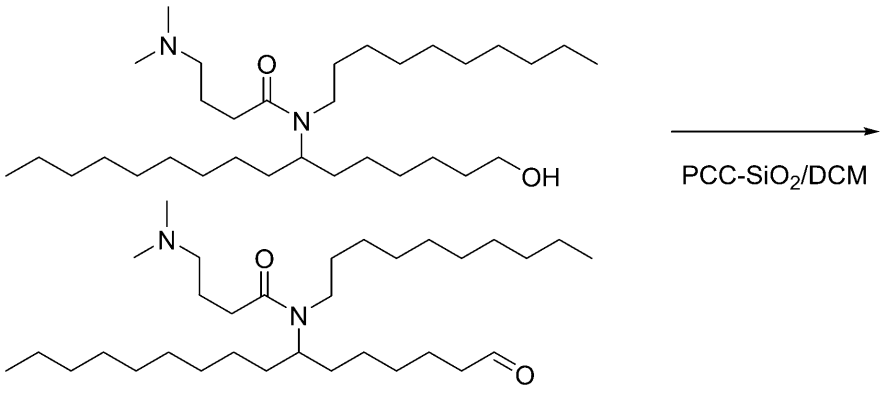


Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］ブタンアミド（４．６ｇ、７．７ｍｍｏｌ）およびｐ－ＴｓＯＨ（６７ｍｇ、０．４ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（１５０ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。メタノールを真空にて除去し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、飽和ＮａＨＣＯ$_3$で洗浄した。有機物を乾燥（ＭｇＳＯ$_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮してＮ－デシル－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－ヒドロキシヘキサデカン－７－イル）ブタンアミド（３．５ｇ、８８．６％）を得、それを精製することなく使用した。

【０７５０】

工程４．Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－オキソヘキサデカン－７－イル）ブタンアミドの合成

【化２７６】



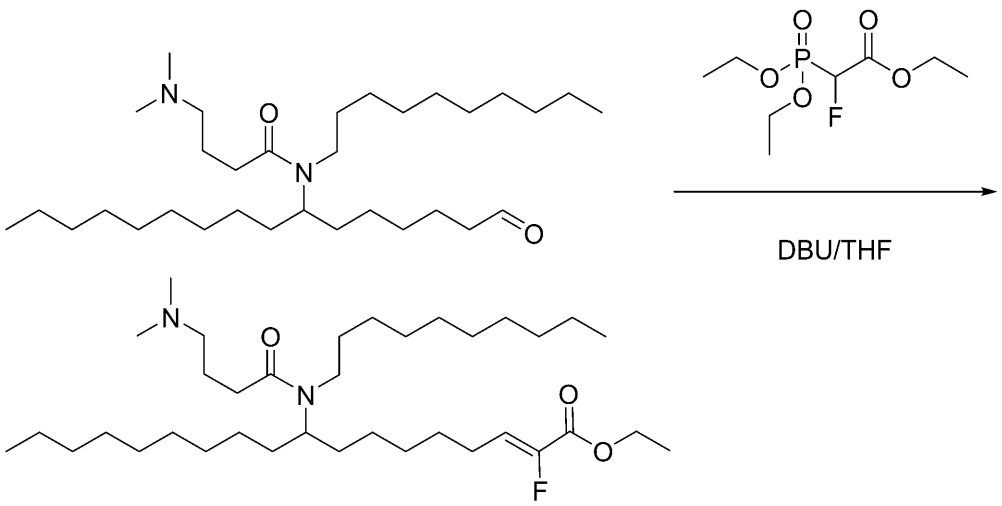
Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－ヒドロキシヘキサデカン－７－イル

）ブタンアミド（３．５ｇ、６．９ｍｍｏｌ）およびシリカ上のＰＣＣ（１：１）（５．９ｇ、１３．７ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（１００ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。シリカを介して混合物を濾過し、真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＭｅｏＨ／ＤＣＭ）によって精製してＮ－デシル－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－オキソヘキサデカン－７－イル）ブタンアミド（１．８ｇ、５１．６％）を得た。

【０７５１】

工程５．（２Ｚ）－９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデク－２－エン酸エチルの合成

【化２７７】

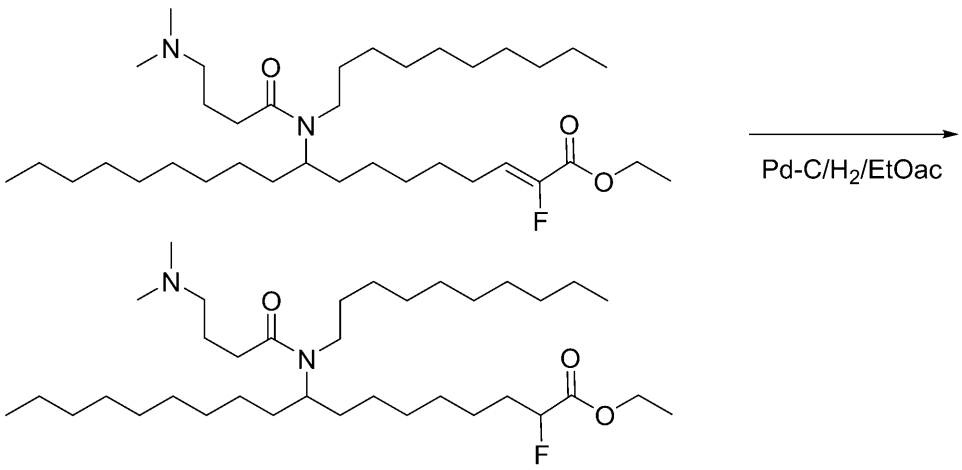


Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－オキソヘキサデカン－７－イル）ブタンアミド（１．８ｇ、３．５ｍｍｏｌ）、２－（ジエトキシホスホリル）－２－フルオロ酢酸エチル（１．７ｇ、７．１ｍｍｏｌ）およびＤＢＵ（１．１ｇ、７．１ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（２５ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１００％ＥｔＯＡｃ／ヘキサン）によって精製して（２Ｚ）－９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデク－２－エン酸エチル（１．５４ｇ、７２．９％）を得た。

【０７５２】

工程６．９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸エチルの合成

【化２７８】

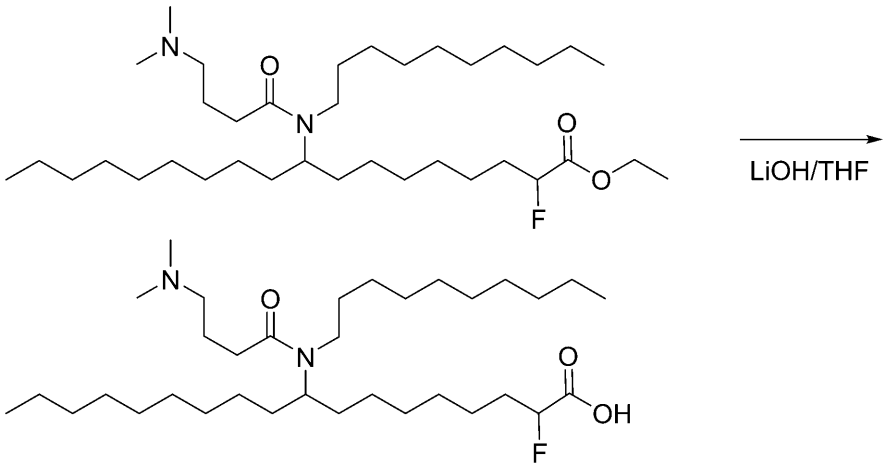


（２Ｚ）－９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデク－２－エン酸エチル（１．５ｇ、２．５ｍｍｏｌ）をＥｔＯＡｃ中にて室温で１６時間、Ｐｄ－Ｃ１０％（１５０ｍｇ）上での接触水素化に供した。セライトを介して反応物を濾過し、真空にて濃縮して９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸エチル（１．２ｇ、７９．７％）を得た。

【０７５３】

工程７．９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸の合成

【化２７９】

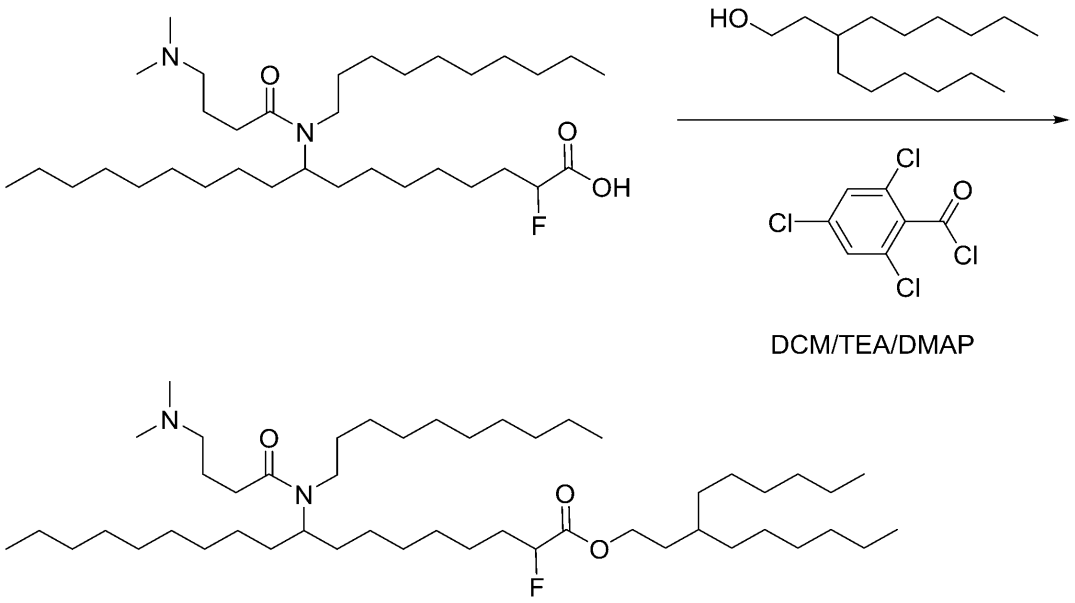


９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸エチル（１．２ｇ、２．０ｍｍｏｌ）およびＬｉＯＨ（１４４ｍｇ、６．０ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（５０ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。６ＭのＨＣｌ（１．３ｍＬ）を加え、反応物をＤＣＭで抽出した。合わせた抽出物を乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮して９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸（８１０ｍｇ、７０．８％）を得、それを精製することなく使用した。

【０７５４】

工程８．９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸３－ヘキシルノニル（７６）の合成

【化２８０】



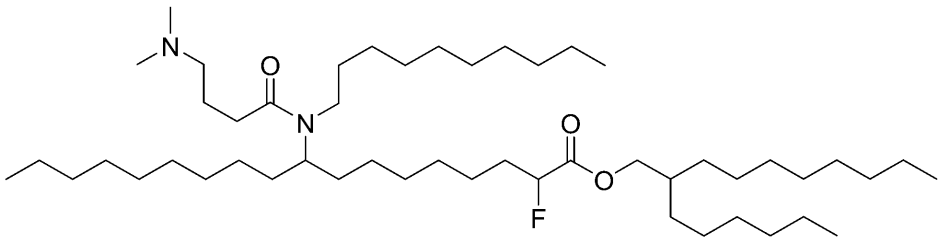
(76)

９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸（８００ｍｇ、１．４ｍｍｏｌ）、塩化２，４，６－トリクロロベンゾイル（６８４ｍｇ、２．８ｍｍｏｌ）、３－ヘキシルノナン－１－オール（４００ｍｇ、１．７５ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（５１４ｍｇ、４．２ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（１０ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃ（５０ｍＬ）に溶解し、０．５ＭのＮａＯＨ（２×２５ｍＬ）、水（２５ｍＬ）およびブライン（２５ｍＬ）で洗浄した。有機物を乾燥（ＭｇＳＯ$_4$）させ、真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して９－［Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸３－ヘキシルノニル（７６）（４６８ｍｇ、４２．７％）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ４．９２（ｄ，Ｊ＝５．８Ｈｚ，１Ｈ），４．８３－４．７６（ｍ，１Ｈ），４．２０（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ），３．６２（ｓ，１Ｈ），３．０４（ｑ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ），２．５１－２．２３（ｍ，１０Ｈ），１．９９－１．５５（ｍ，１６Ｈ），１．４４（ｑ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，１０Ｈ），１．２６（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，５５Ｈ），０．９３－０．８４（ｍ，１２Ｈ）．^{19}ＦＮＭＲ（３７６ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ－１９１．８６（ｄｔｄ，Ｊ＝４９．６，２５．４，１９．６Ｈｚ）。ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：［Ｍ＋Ｈ］＋、Ｃ$_{49}$Ｈ$_{97}$ＦＮ$_2$Ｏ$_3$についての計算値７８１．８；実測値７８１．２

【０７５５】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【化２８１】



(77)

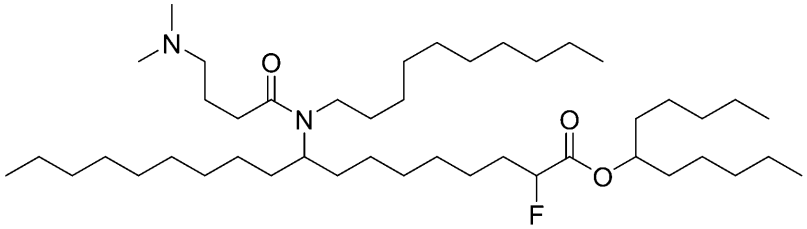
９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２－フルオロオクタデカン酸２－ヘキシルデシル（７７）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．０１－４．７４（ｍ，１Ｈ），４．０８（ｄ，Ｊ＝５．７Ｈｚ，２Ｈ），３．６３－３．５０（ｍ，１Ｈ），３．２５（ｄｄｔ，Ｊ＝１１．１，５．９，２．２Ｈｚ，２Ｈ），３．１３－３．０１（ｍ，２Ｈ），２．９１（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，６Ｈ），２．７９－２．７２（ｍ，１Ｈ），２．６８（ｔ，Ｊ＝５．６Ｈｚ，１Ｈ），２．００（ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，３Ｈ），１．９５－１．８０（ｍ，２Ｈ），１．６０－１．３９（ｍ，１Ｈ），１．３７－１．０８（ｍ，５８Ｈ），０．８８（ｔｄ，Ｊ＝６．９，１．７Ｈｚ，１２Ｈ）。ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：［Ｍ＋Ｈ］＋、Ｃ$_{50}$Ｈ$_{99}$ＦＮ$_{2}$Ｏ$_{3}$についての計算値７９５．８；実測値７９５．６。

【０７５６】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【０７５７】

【化２８２】

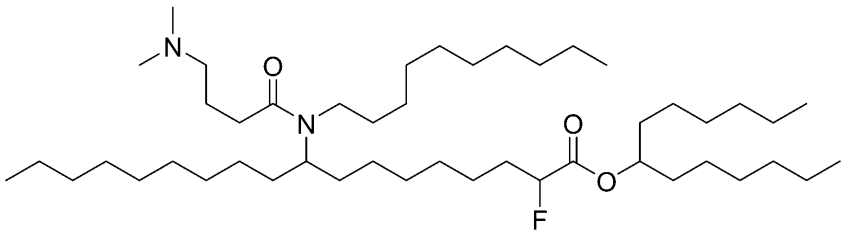


(112)

９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２－フルオロオクタデカン酸ウンデカン－６－イル（１１２）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．１３－４．９０（ｍ，２Ｈ），４．８２（ｑ，Ｊ＝５．４Ｈｚ，０Ｈ），３．７５－３．６０（ｍ，１Ｈ），３．０６（ｑ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ），２．３５（ｑ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，４Ｈ），２．２６（ｓ，６Ｈ），１．８６（ｄｐ，Ｊ＝１４．５，６．３Ｈｚ，４Ｈ），１．７５－１．０９（ｍ，６４Ｈ），０．９０（ｔｄ，Ｊ＝６．８，２．７Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０７５８】

【化２８３】

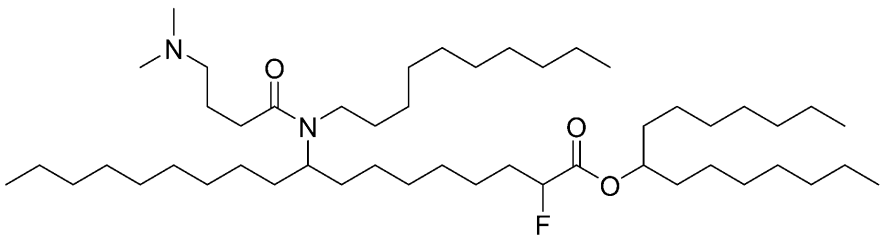


(113)

９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２－フルオロオクタデカン酸トリデカン－７－イル（１１３）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．１２－４．９２（ｍ，２Ｈ），４．８２（ｑ，Ｊ＝５．４Ｈｚ，０Ｈ），３．７３－３．５７（ｍ，１Ｈ），３．１１－３．０１（ｍ，２Ｈ），２．３５（ｑ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，４Ｈ），２．２７（ｓ，６Ｈ），１．８７（ｔｄ，Ｊ＝１２．５，５．６Ｈｚ，４Ｈ），１．７７－１．３９（ｍ，１７Ｈ），１．３０（ｄｑ，Ｊ＝１１．４，６．４Ｈｚ，５３Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０７５９】

【化２８４】

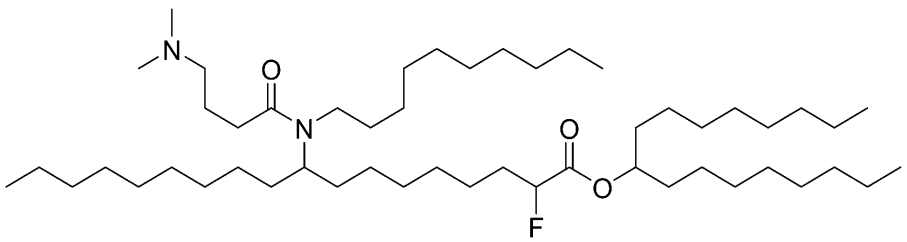


(114)

９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２－フルオロオクタデカン酸ペンタデカン－８－イル（１１４）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．１０－４．９０（ｍ，１Ｈ），４．８２（ｑ，Ｊ＝５．４Ｈｚ，０Ｈ），３．７４－３．５７（ｍ，１Ｈ），３．０６（ｑ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），２．３５（ｑ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，４Ｈ），２．２６（ｓ，６Ｈ），１．８７（ｔｔ，Ｊ＝１０．７，６．０Ｈｚ，４Ｈ），１．８１－１．１６（ｍ，７３Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０７６０】

【化２８５】

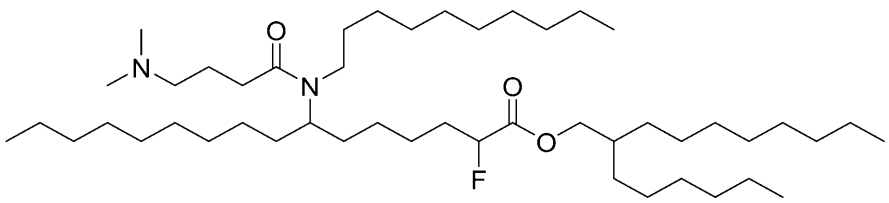


(115)

９－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２－フルオロオクタデカン酸ヘプタデカン－９－イル（１１５）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．０８－４．９０（ｍ，１Ｈ），４．８２（ｑ，Ｊ＝５．５Ｈｚ，０Ｈ），３．７９－３．５８（ｍ，１Ｈ），３．１５－２．９５（ｍ，２Ｈ），２．３５（ｑ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，４Ｈ），２．２５（ｓ，６Ｈ），１．８６（ｄｐ，Ｊ＝１４．５，６．４Ｈｚ，４Ｈ），１．７７－１．１３（ｍ，８０Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０７６１】

【化２８６】

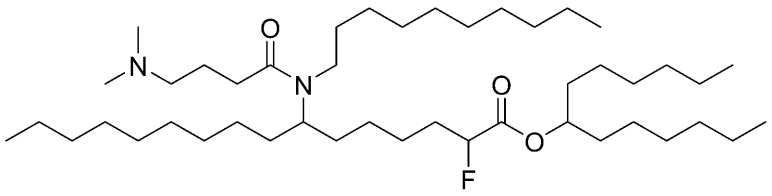


(120)

７－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２－フルオロヘキサデカン酸２－ヘキシルデシル（１２０）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．９７（ｔ，Ｊ＝５．８Ｈｚ，０Ｈ），４．８４（ｑ，Ｊ＝５．９Ｈｚ，０Ｈ），４．１１（ｔ，Ｊ＝４．９Ｈｚ，２Ｈ），３．０５（ｄ，Ｊ＝９．５Ｈｚ，２Ｈ），２．５７－２．２４（ｍ，１０Ｈ），２．２０（ｓ，１Ｈ），１．９５－１．８０（ｍ，４Ｈ），１．６７（ｓ，６Ｈ），１．４８（ｔｔ，Ｊ＝１４．２，８．８Ｈｚ，７Ｈ），１．２８（ｄｄ，Ｊ＝１０．０，５．６Ｈｚ，５３Ｈ），０．９５－０．８６（ｍ，１２Ｈ）。

【０７６２】

【化２８７】

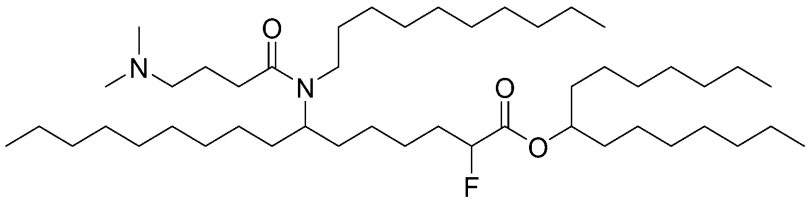


(121)

７－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２－フルオロヘキサデカン酸トリデカン－７－イル（１２１）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．０５－４．８５（ｍ，２Ｈ），４．７９（ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，１Ｈ），３．６５（ｓ，１Ｈ），３．０３（ｔ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），２．３２（ｄｔ，Ｊ＝１１．９，６．９Ｈｚ，４Ｈ），２．２２（ｓ，６Ｈ），１．８４（ｄｔ，Ｊ＝１５．０，７．３Ｈｚ，４Ｈ），１．７３－１．３５（ｍ，１６Ｈ），１．２７（ｐ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，４７Ｈ），０．８８（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０７６３】

【化２８８】

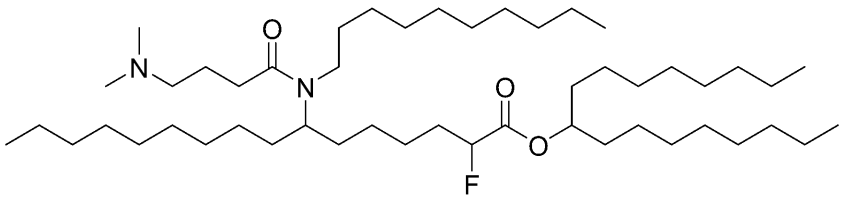


(122)

７－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２－フルオロヘキサデカン酸ペンタデカン－８－イル（１２２）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．１２－４．８５（ｍ，１Ｈ），４．７８（ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ，１Ｈ），３．６４（ｓ，１Ｈ），３．０２（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），２．３４（ｐ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，４Ｈ），２．２６（ｓ，６Ｈ），１．８５（ｄｄ，Ｊ＝１５．６，８．３Ｈｚ，６Ｈ），１．６７－１．３６（ｍ，１２Ｈ），１．２６（ｑ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，５１Ｈ），０．８８（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０７６４】

【化２８９】



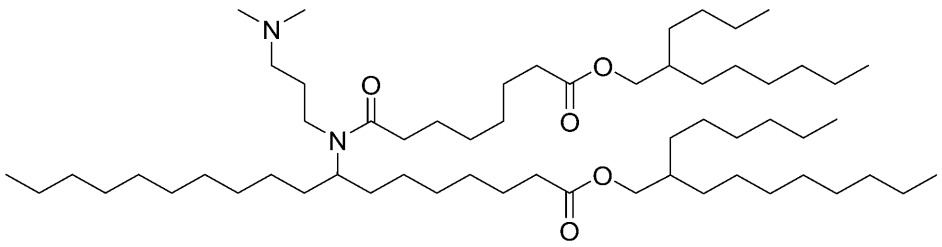
(123)

７－（Ｎ－デシル－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド）－２－フルオロヘキサデカン酸ヘプタデカン－９－イル（１２３）。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ５．０９－４．８７（ｍ，２Ｈ），４．７９（ｔ，Ｊ＝５．８Ｈｚ，１Ｈ），３．０４（ｑ，Ｊ＝９．７Ｈｚ，２Ｈ），２．３３（ｑ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，４Ｈ），２．２４（ｓ，５Ｈ），１．８４（ｔｔ，Ｊ＝１７．５，８．４Ｈｚ，６Ｈ），１．６５－１．４０（ｍ，１２Ｈ），１．２７（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，５７Ｈ），０．８８（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０７６５】

実施例２４．８－｛８－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－Ｎ－［３－（ジメチル－アミノ）プロピル］－８－オキソオクタンアミド｝オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（７８）の合成

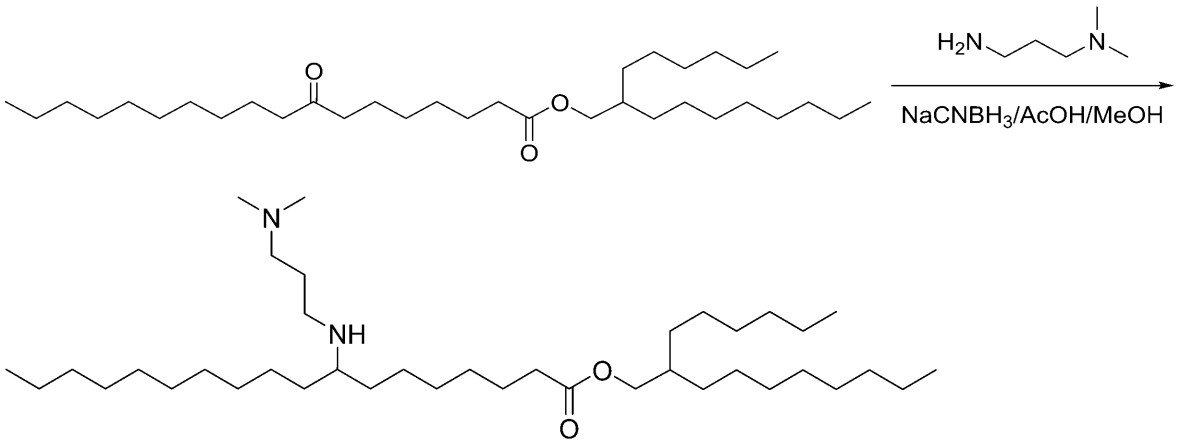
【化２９０】



(78)

工程１．８－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝オクタデセン酸２－ヘキシルデシルの合成

【化２９１】

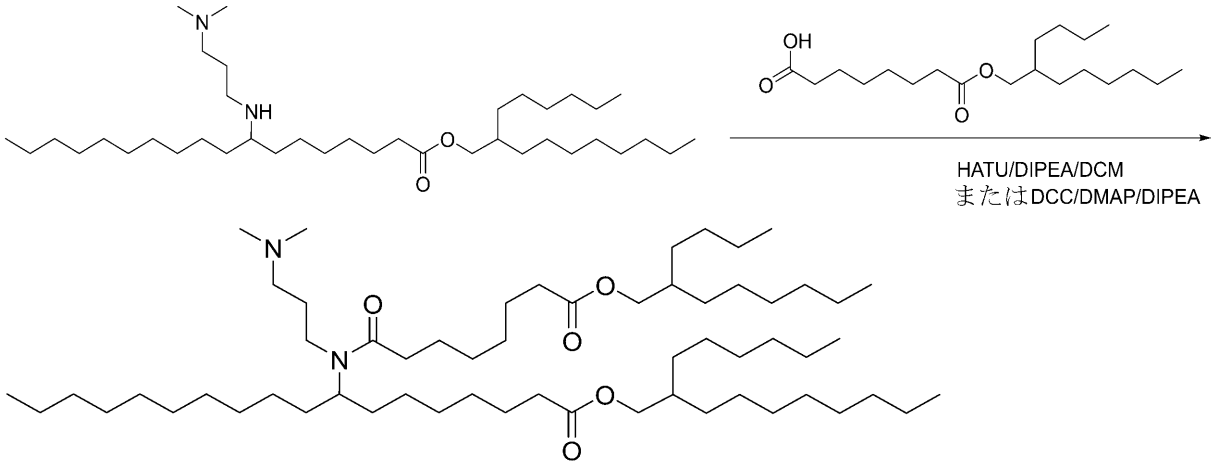


８－オキソオクタデカン酸２－ヘキシルデシル（５００ｍｇ、１．０ｍｍｏｌ）、ジメチルアミノプロピルアミン（１１７ｍｇ、１．１４ｍｍｏｌ）およびＡｃＯＨ（０．１１ｍＬ、１．９ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（１５ｍＬ）中にて５０℃で１時間撹拌した。反応物を室温まで冷却し、ＮａＣＮＢＨ$_3$（１８０ｍｇ，２．９ｍｍｏｌ）を加え、１６時間撹拌を続けた。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃ（５０ｍＬ）に溶解し、飽和ＮａＨＣＯ$_3$およびブラインで洗浄した。有機物を乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～２０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して８－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝オクタデカン酸２－ヘキシルデシル（４３０ｍｇ、７３．８％）を得た。

【０７６６】

工程２．８－｛８－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－８－オキソオクタンアミド｝オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（７８）の合成

【化２９２】



(78)

８－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－８－オキソオクタン酸（１６９ｍｇ，０．５ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（１８７ｍｇ，０．５ｍｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（０．１２ｍＬ，０．６６ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（５ｍＬ）中にて室温で１５分間撹拌した。８－｛［３－（ジメチルアミノ）プロピル］アミノ｝オクタデカン酸２－ヘキシルデシル（２００ｍｇ，０．３３ｍｍｏｌ）を加え、１６時間撹拌を続けた。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃ（５０ｍＬ）に溶解し、$NaHCO_3$およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～５％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ、１００％ＥｔＯＡｃ）によって精製して８－｛８－［（２－ブチルオクチル）オキシ］－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピル］－８－オキソオクタンアミド｝オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（７８）（１１２ｍｇ、３６．５％）を得た。^1H ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ３．９６（ｄｄ，Ｊ＝５．９，３．０Ｈｚ，４Ｈ），３．７０（ｓ，１Ｈ），３．３０（ｂｓ，２Ｈ），３．１３（ｂｓ，２Ｈ），２．９４（ｓ，６Ｈ），２．３８（ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，２Ｈ），２．３０（ｔｄ，Ｊ＝７．４，３．８Ｈｚ，４Ｈ），１．９６（ｓ，２Ｈ），１．６２（ｐ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，１４Ｈ），１．３８－１．０６（ｍ，６４Ｈ），０．８８（ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，１５Ｈ）。

【０７６７】

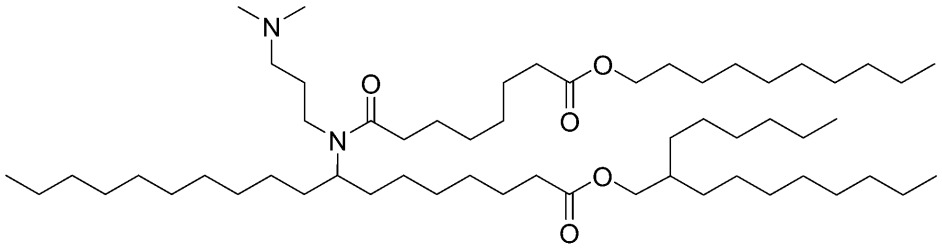
最終的なアミドカップリングはＤＣＣ／ＤＭＡＰ／ＤＩＰＥＡカップリング法を使用して達成できることに留意のこと。

【０７６８】

以下の化合物は上記と同様の方法を使用して調製された。

【０７６９】

【化２９３】

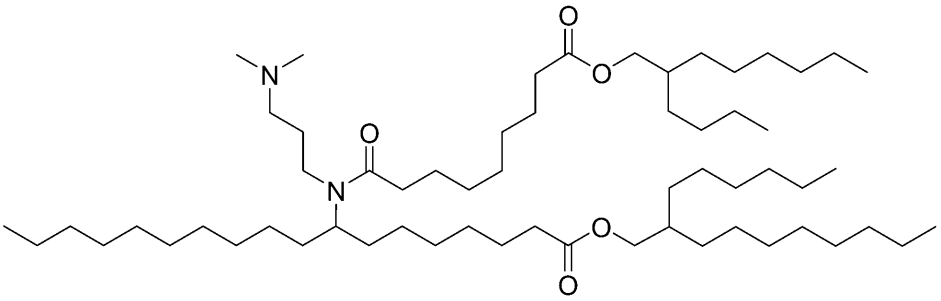


(79)

８－（８－（デシルオキシ）－Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－８－オキソオクタンアミド）－オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（７９）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．０８（ｔ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，２Ｈ），３．９９（ｄ，Ｊ＝５．８Ｈｚ，２Ｈ），３．７４（ｓ，１Ｈ），３．３３（ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，２Ｈ），３．１７（ｓ，２Ｈ），２．９７（ｓ，５Ｈ），２．４１（ｔ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，２Ｈ），２．３３（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，４Ｈ），１．９９（ｓ，２Ｈ），１．６４（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，１２Ｈ），１．２９（ｓ，５７Ｈ），０．９１（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０７７０】

【化２９４】

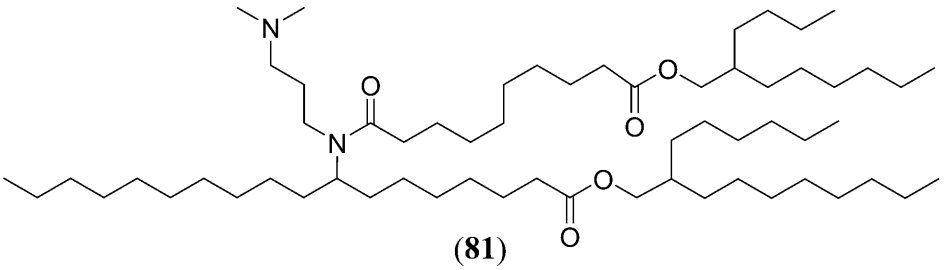


(80)

８－（９－（（２－ブチルオクチル）オキシ）－Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－９－オキソノナンアミド）－オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（８０）。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ３．９８（ｄｄ，Ｊ＝５．８，２．３Ｈｚ，４Ｈ），３．７１（ｓ，１Ｈ），３．２９（ｔ，Ｊ＝６．２Ｈｚ，２Ｈ），３．０４（ｓ，２Ｈ），２．８６（ｓ，６Ｈ），２．８２（ｓ，２０Ｈ），２．３８（ｄｄ，Ｊ＝８．６，６．２Ｈｚ，２Ｈ），２．３２（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，４Ｈ），１．９４（ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，２Ｈ），１．５０（ｄｄ，Ｊ＝２９．４，６．７Ｈｚ，１３Ｈ），１．３８－１．２４（ｍ，６８Ｈ），０．９４－０．８８（ｍ，１５Ｈ）。

【０７７１】

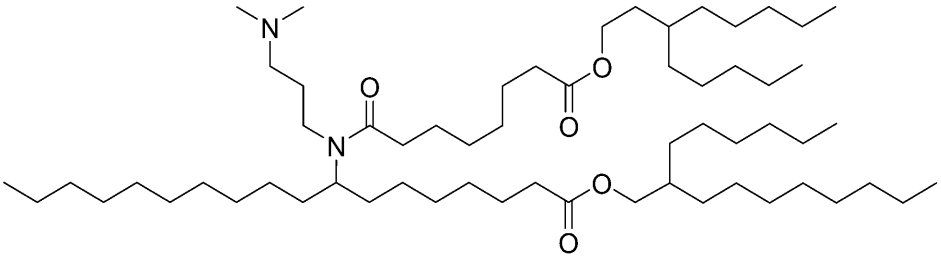
【化２９５】



(81)

８－（１０－（（２－ブチルオクチル）オキシ）－Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－１０－オキソデカンアミド）－オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（８１）。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．１０（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），３．９８（ｄ，Ｊ＝５．８Ｈｚ，２Ｈ），３．２９（ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，２Ｈ），３．０６（ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），２．８７（ｓ，６Ｈ），２．８３（ｓ，１Ｈ），２．３８（ｄｄ，Ｊ＝８．５，６．５Ｈｚ，２Ｈ），２．３２（ｔｄ，Ｊ＝７．５，２．５Ｈｚ，４Ｈ），２．０１－１．９３（ｍ，２Ｈ），１．６１（ｄｑ，Ｊ＝２０．５，６．７Ｈｚ，１０Ｈ），１．４１－１．１７（ｍ，６８Ｈ），０．９１（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１５Ｈ）。

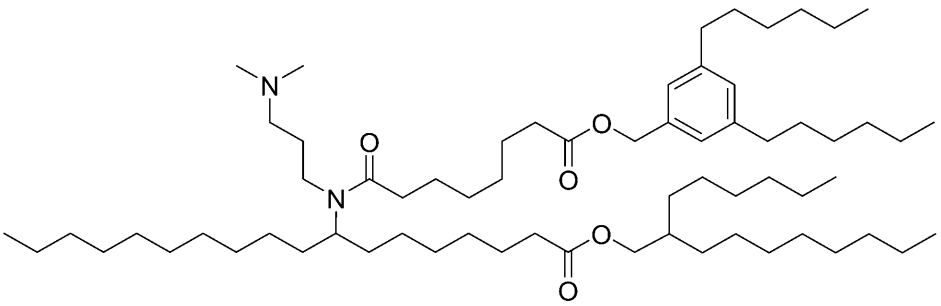
【０７７２】
【化２９６】



(82)

８－（Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－８－オキソ－８－（（２－ペンチルオクチル）オキシ）－オクタンアミド）－オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（８２）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．１０（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），３．９８（ｄ，Ｊ＝５．８Ｈｚ，２Ｈ），３．２９（ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，２Ｈ），３．０６（ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），２．８７（ｓ，６Ｈ），２．８３（ｓ，１Ｈ），２．３８（ｄｄ，Ｊ＝８．５，６．５Ｈｚ，２Ｈ），２．３２（ｔｄ，Ｊ＝７．５，２．５Ｈｚ，４Ｈ），２．０１－１．９３（ｍ，２Ｈ），１．６１（ｄｑ，Ｊ＝２０．５，６．７Ｈｚ，１０Ｈ），１．４１－１．１７（ｍ，６８Ｈ），０．９１（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１５Ｈ）。

【０７７３】
【化２９７】

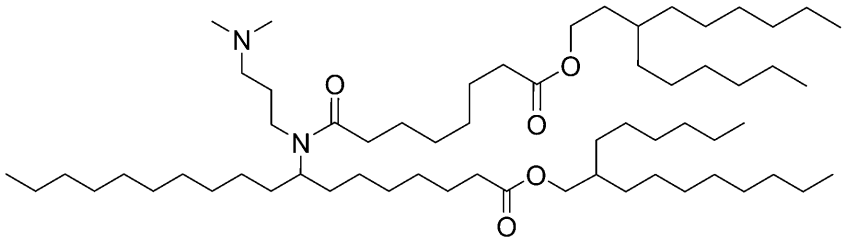


(83)

８－（８－（（３，５－ジヘキシルベンジル）オキシ）－Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－８－オキソオクタンアミド）－オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（８３）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ６．９８（ｍ，３Ｈ），５．０７（ｓ，２Ｈ），３．９８（ｄｄ，Ｊ＝５．９，２．８Ｈｚ，２Ｈ），３．６９－３．５６（ｍ，１Ｈ），３．１２（ｔ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），２．５９（ｔ，ｂ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，４Ｈ），２．４２－２．２０（ｍ，１３Ｈ），１．７９－１．５６（ｍ，２１Ｈ），１．４６（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，４Ｈ），１．４１－１．１０（ｍ，６１Ｈ），０．９８－０．８６（ｍ，１５Ｈ）。

【０７７４】

【化２９８】

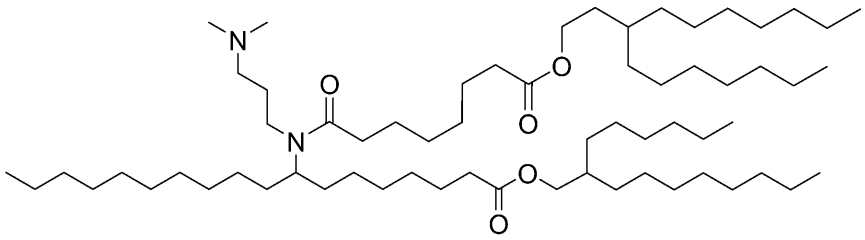


(84)

８－（Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－８－（（３－ヘキシルノニル）オキシ）－８－オキソオクタンアミド）オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（８４）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．１０（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），３．９８（ｄｄ，Ｊ＝５．８，１．９Ｈｚ，２Ｈ），３．２０（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），２．７５（ｓ，２Ｈ），２．５８（ｓ，６Ｈ），２．３１（ｑｄ，Ｊ＝７．５，２．９Ｈｚ，６Ｈ），２．２６（ｓ，２Ｈ），１．８８（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），１．７４－１．５５（ｍ，１０Ｈ），１．４９（ｔｄ，Ｊ＝１３．１，５．６Ｈｚ，４Ｈ），１．４１－１．１９（ｍ，６９Ｈ），０．９０（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１５Ｈ）。

【０７７５】

【化２９９】



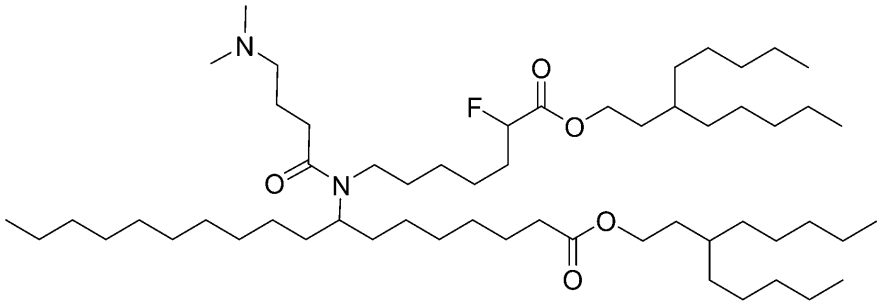
(85)

８－（Ｎ－（３－（ジメチルアミノ）プロピル）－８－（（３－ヘプチルデシル）オキシ）－８－オキソオクタンアミド）オクタデセン酸２－ヘキシルデシル（８５）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ４．０９（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），３．９８（ｄｄ，Ｊ＝５．８，３．２Ｈｚ，２Ｈ），３．１３（ｄｄ，Ｊ＝１０．４，５．９Ｈｚ，２Ｈ），２．３０（ｐｄ，Ｊ＝４．９，３．０Ｈｚ，８Ｈ），２．２４（ｓ，６Ｈ），１．７７－１．５５（ｍ，１３Ｈ），１．４７（ｑ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，４Ｈ），１．２９（ｄｄ，Ｊ＝８．３，５．０Ｈｚ，７４Ｈ），０．９４－０．８６（ｍ，１５Ｈ）。

【０７７６】

実施例２５．８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛６－フルオロ－７－オキソ－７－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ヘプチル｝ブタンアミド］オクタデセン酸３－ペンチルオクチル（８６）の合成

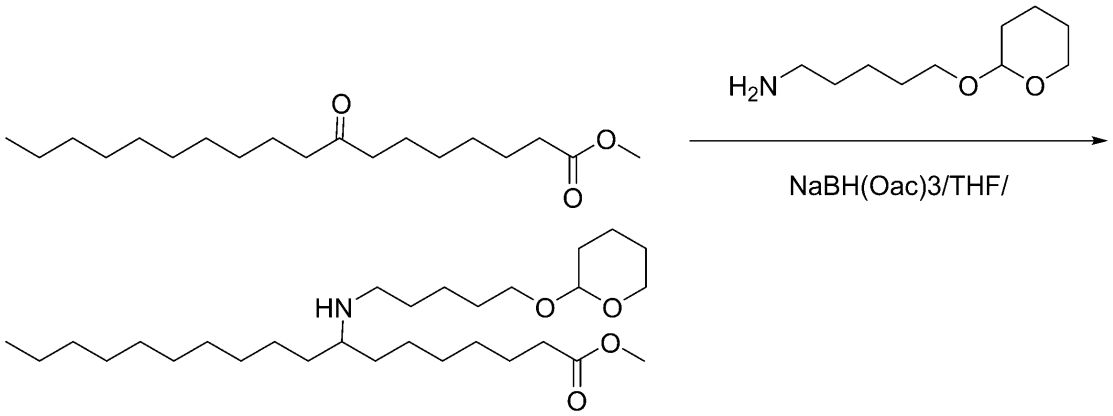
【化３００】



(86)

工程１．８－｛［５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンチル］アミノ｝オクタデセン酸メチルの合成

【化３０１】

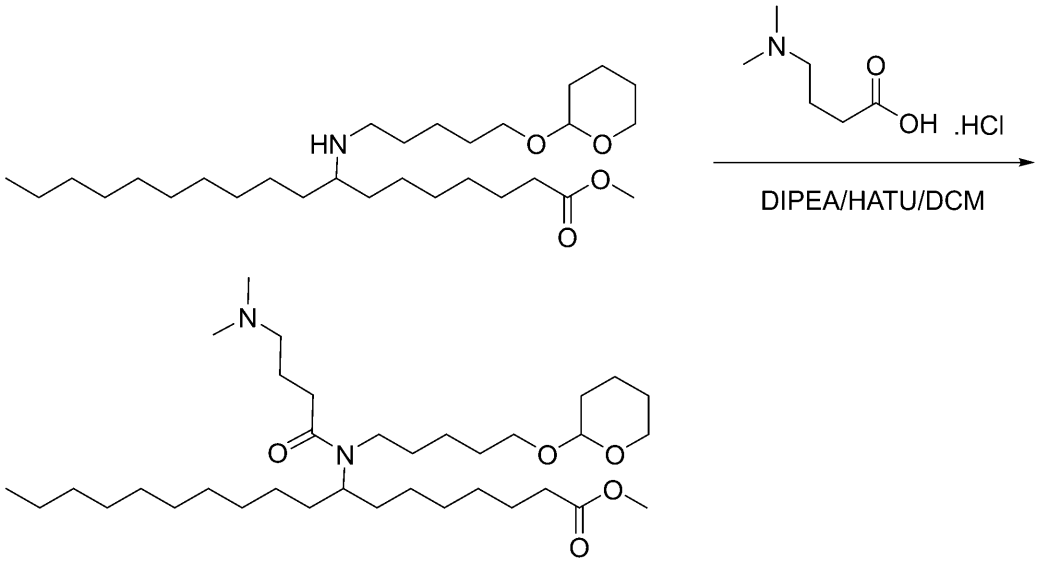


５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンタン－１－アミン（１．８ｇ、９．６ｍｍｏｌ）および８－オキソオクタデカン酸メチル（３ｇ、９．６ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（２５ｍＬ）中にて５０℃で４５分間加熱した。ＮａＢＨ（ＯＡｃ）$_3$（６.１ｇ，２８．８ｍｍｏｌ）を加え、１６時間撹拌を続けた。室温まで冷却した後、反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃ（１００ｍＬ）に溶解し、ＮａＨＣＯ$_3$およびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１００％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して８－｛［５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンチル］アミノ｝オクタデカン酸メチル（１．６ｇ、３４．５％）を得た。

【０７７７】

工程２．８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンチル］－ブタンアミド］オクタデセン酸メチルの合成

【化３０２】

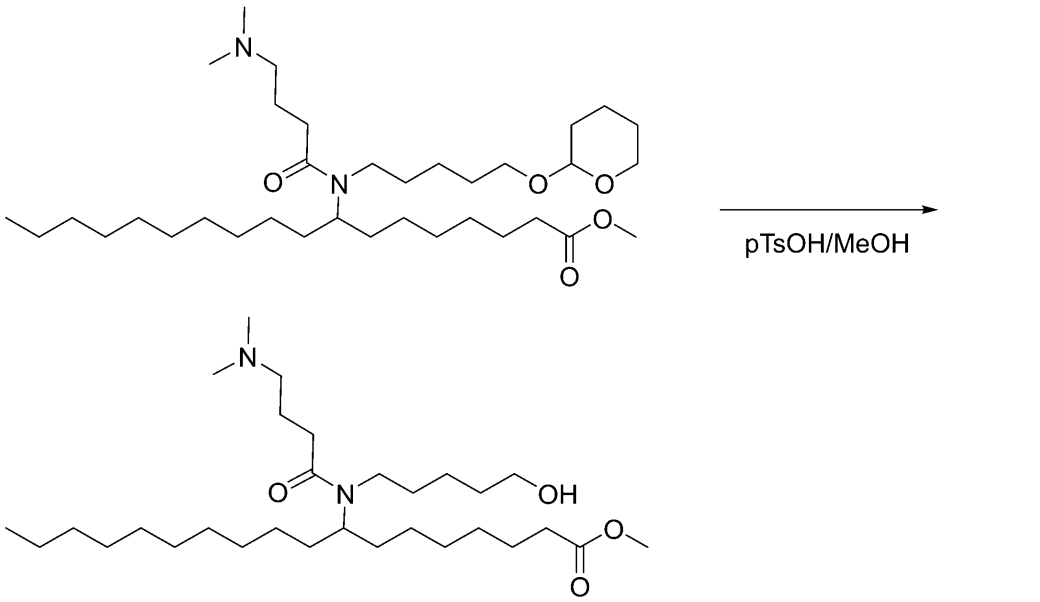


４－（ジメチルアミノ）ブタン酸ＨＣｌ（１．３０ｇ、９．９ｍｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ（３．５ｍＬ、２０．０ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（３．８ｇ、９．９ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（５０ｍＬ）中にて室温で３０分間撹拌した。ＤＣＭ（１０ｍＬ）中の８－｛［５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンチル］アミノ｝オクタデカン酸メチル（１．６ｇ、３．３ｍｍｏｌ）を加え、室温で１６時間撹拌を続けた。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解した。合わせた有機物を０.５ＭのＮａＯＨ、水およびブライン（２５ｍＬ）で洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンチル］ブタンアミド］オクタデカン酸メチル（１．８５ｇ、９３．７％）を得た。

【０７７８】

工程３．８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（５－ヒドロキシペンチル）－ブタンアミド］－オクタデセン酸メチルの合成

【化３０３】

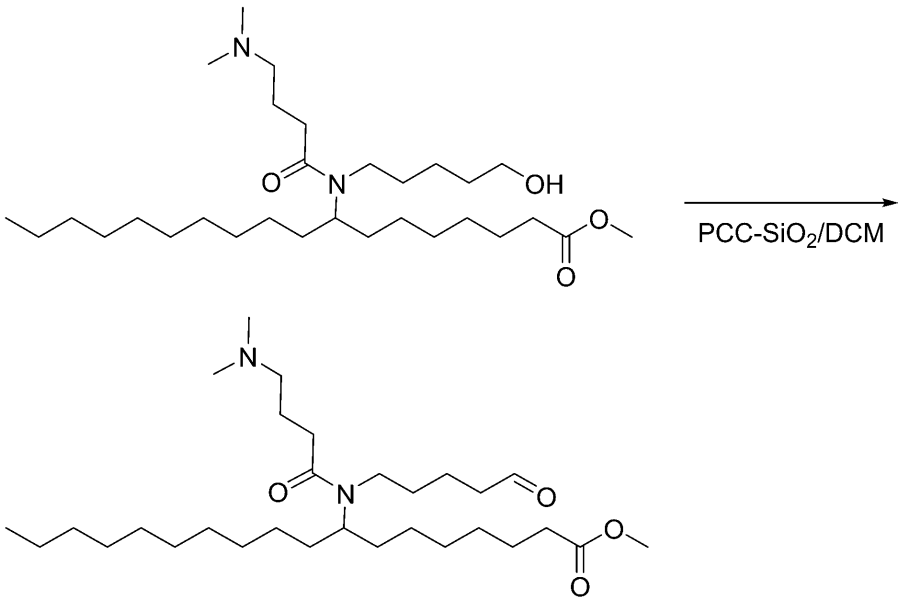


８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［５－（オキサン－２－イルオキシ）ペンチル］ブタンアミド］オクタデカン酸メチル（１．９ｇ、３．２ｍｍｏｌ）およびｐ－ＴｏＳＨ．H_2O（２７ｍｇ、０．１６ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ（２５ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃ（１００ｍＬ）に溶解し、飽和$NaHCO_3$で洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮して８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（５－ヒドロキシペンチル）ブタンアミド］オクタデカン酸メチル（Ｑｕａｎｔ）を得、それを精製することなく使用した。

【０７７９】

工程４．８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（５－オキソペンチル）－ブタンアミド］－オクタデセン酸メチルの合成

【化３０４】

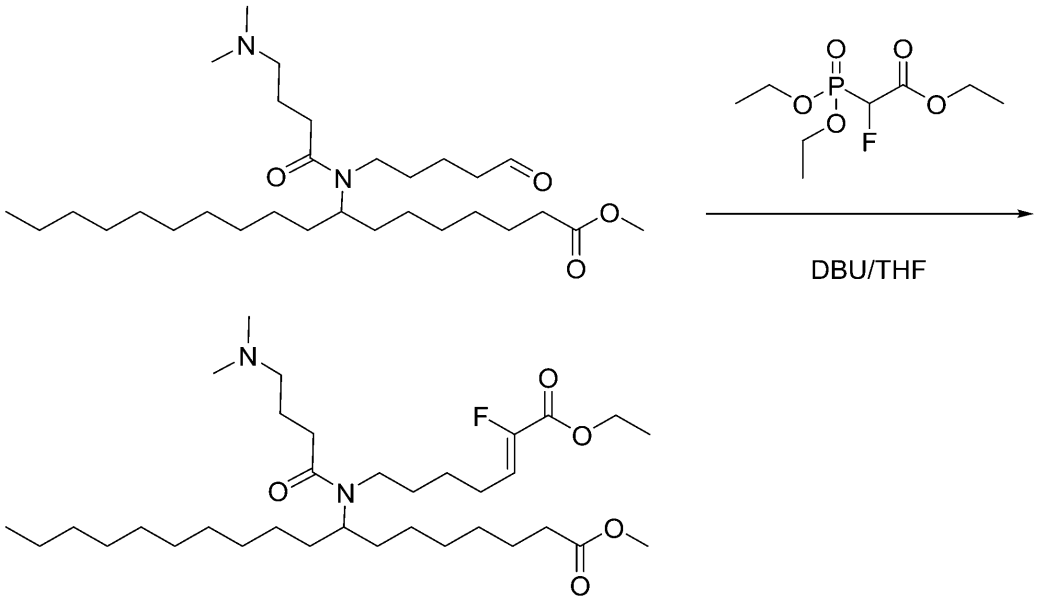


８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（５－ヒドロキシペンチル）ブタンアミド］オクタデカン酸メチル（１．６ｇ，３．１ｍｍｏｌ）およびＰＣＣ／シリカ１：１ｗｔ（１．３ｇ，３．１２ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（５０ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。シリカゲルを介して反応物を濾過し、ＤＣＭで溶出した。濾液を真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～２０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（５－オキソペンチル）ブタンアミド］オクタデカン酸メチル（１．６ｇ、Ｑｕａｎｔ）を得た。

【０７８０】

工程５．８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（７－エトキシ－６－フルオロ－７－オキソヘプト－５－エン－１－イル）ブタンアミド］オクタデセン酸メチルの合成

【化３０５】

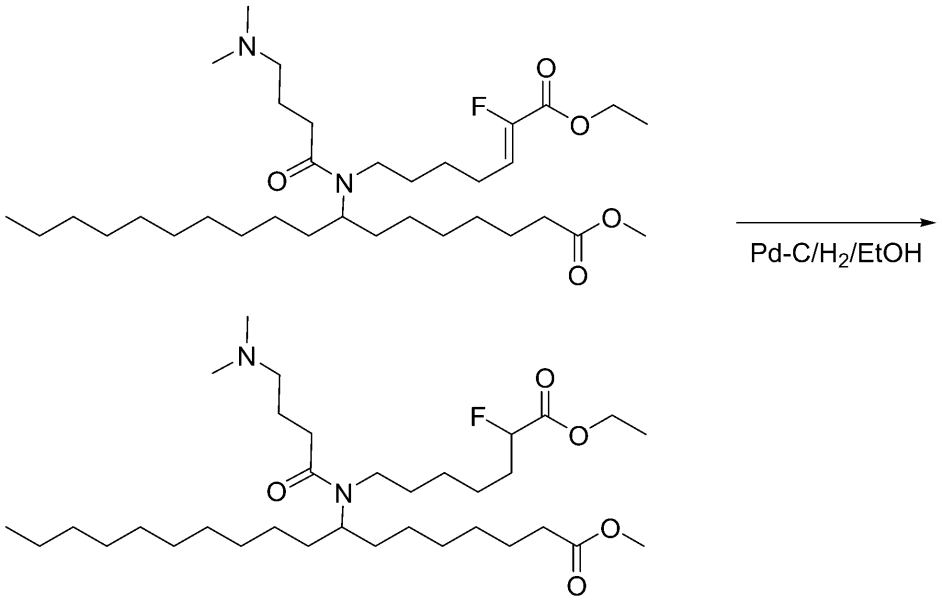


８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（５－オキソペンチル）ブタンアミド］オクタデカン酸メチル（１．６ｇ、３．１ｍｍｏｌ）、２－（ジエトキシホスホリル）－２－フルオロ酢酸エチル（１．９ｇ、７．８ｍｍｏｌ）およびＤＢＵ（１．１７ｍＬ、７．８）を無水ＴＨＦ（２５ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。追加の２－（ジエトキシホスホリル）－２－フルオロ酢酸エチル（３７９ｍｇ、１．６ｍｍｏｌ）およびＤＢＵ（０．２３ｍＬ、１．６ｍｍｏｌ）を加え、さらに３時間撹拌を続けた。反応物を真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１５％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ、０～１００％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（７－エトキシ－６－フルオロ－７－オキソヘプト－５－エン－１－イル）ブタンアミド］オクタデセン酸メチル（５００ｍｇ、２６．７％）を得た。

【０７８１】

工程６．８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（７－エトキシ－６－フルオロ－７－オキソヘプチル）ブタンアミド］オクタデセン酸メチルの合成

【化３０６】

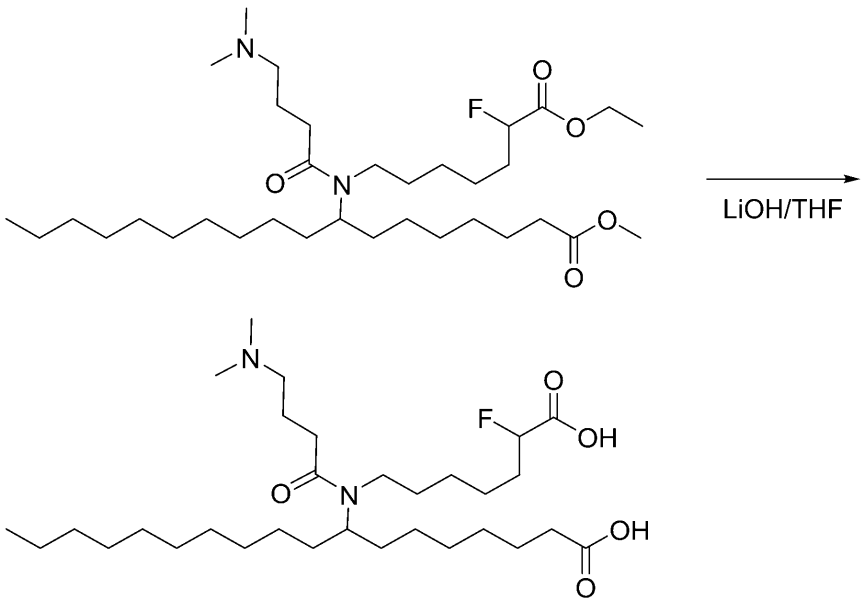


８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（７－エトキシ－６－フルオロ－７－オキソヘプト－５－エン－１－イル）ブタンアミド］オクタデカン酸メチル（５００ｍｇ、０．８４ｍｍｏｌ）をＥｔＯＨ（２５ｍＬ）中にて室温で１６時間、パラジウム炭素（５０ｍｇ）上での接触水素化に供した。セライトを介して反応物を濾過し、濾液を真空にて濃縮して８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（７－エトキシ－６－フルオロ－７－オキソヘプチル）ブタンアミド］オクタデカン酸メチル（３７５ｍｇ、７４．７％）を得、それを精製することなく使用した。

【０７８２】

工程７．８－［Ｎ－（６－カルボキシ－６－フルオロヘキシル）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－オクタデカン酸の合成

【化３０７】



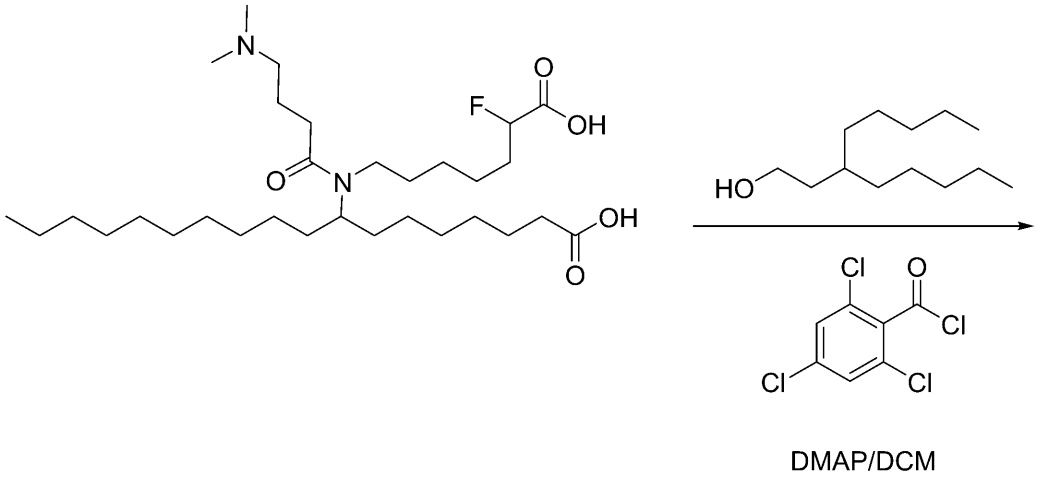
８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（７－エトキシ－６－フルオロ－７－オキソヘプチル）ブタンアミド］オクタデカン酸メチル（３７５ｍｇ，０．６ｍｍｏｌ）およびＬｉ

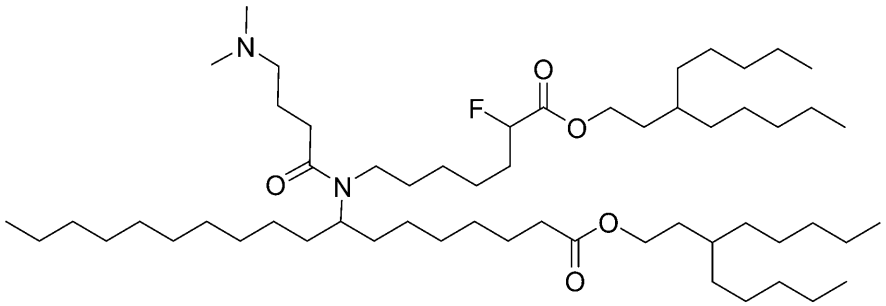
ＯＨ（６０．０ｍｇ，２．５ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１０ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。６ＭのＨＣｌ（０．６ｍＬ）を加え、反応物をH_2Oで希釈し、反応物をＤＣＭで抽出した。合わせた有機物を乾燥（$MgSO_4$）させ、濾過し、真空にて濃縮して８－［Ｎ－（６－カルボキシ－６－フルオロヘキシル）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－オクタデカン酸（２０５ｍｇ、５９．０％）を得、それを精製することなく使用した。

【０７８３】

工程８．８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛６－フルオロ－７－オキソ－７－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ヘプチル｝ブタンアミド］オクタデセン酸３－ペンチルオクチル（８６）の合成

【化３０８】





(86)

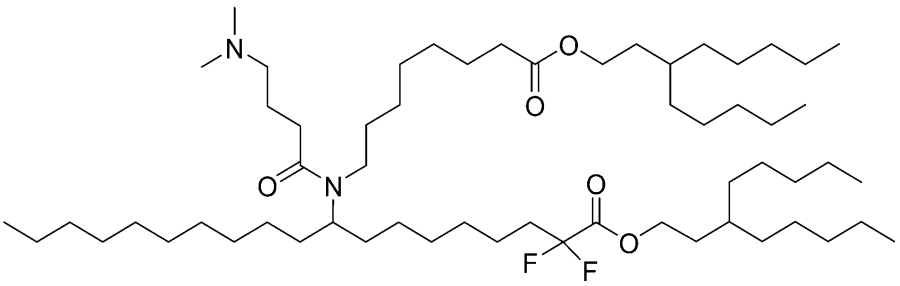
８－［Ｎ－（６－カルボキシ－６－フルオロヘキシル）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］オクタデカン酸（２００ｍｇ，０．３６ｍｍｏｌ）、３－ペンチルオクタン－１－オール（２１５ｍｇ，１．０ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（１７５ｍｇ，１．４ｍｍｏｌ）および塩化２，４，６－トリクロロベンゾイル（２６２ｍｇ，１．０ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（１０ｍＬ）中にて室温で１６時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、０．５ＭのＮａＯＨ、H_2Oおよびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～２５％ＡＣＮ／ＤＣＭ、０～１５％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛６－フルオロ－７－オキソ－７－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］ヘプチル｝ブタンアミド］オクタデセン酸３－ペンチルオクチル（８６）（９３ｍｇ、２８．１４％）を得た。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）δ４．９７（ｄｄｄ，Ｊ＝６．９，４．５，２．３Ｈｚ，１Ｈ），４．８５（ｄｄｄ，Ｊ＝７．１，５．１，２．４Ｈｚ，１Ｈ），４．２３（ｔｔ，Ｊ＝７．３，２．０Ｈｚ，２Ｈ），４．０９（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），３．５９（ｓ，１Ｈ），３．３３－３．２３（ｍ，２Ｈ），３．１０（ｄ，Ｊ＝９．１Ｈｚ，２Ｈ），２．９５（ｄ，Ｊ＝１１．７Ｈｚ，６Ｈ），

２．８２－２．７６（ｍ，１Ｈ），２．７２（ｔ，Ｊ＝５．６Ｈｚ，１Ｈ），２．３０（ｔｄ，Ｊ＝７．５，３．１Ｈｚ，２Ｈ），２．０６－１．８４（ｍ，４Ｈ），１．７１－１．３８（ｍ，２２Ｈ），１．３８－１．１６（ｍ，５５Ｈ），０．９１（ｔｔ，Ｊ＝７．１，１．５Ｈｚ，１５Ｈ）。ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：［Ｍ＋Ｈ］＋、$C_{57}H_{111}FN_2O_5$についての計算値９２３．９；実測値９２３．２

【０７８４】

実施例２６．９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛８－オキソ－８－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］オクチル｝ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸３－ペンチルオクチル（８７）の合成

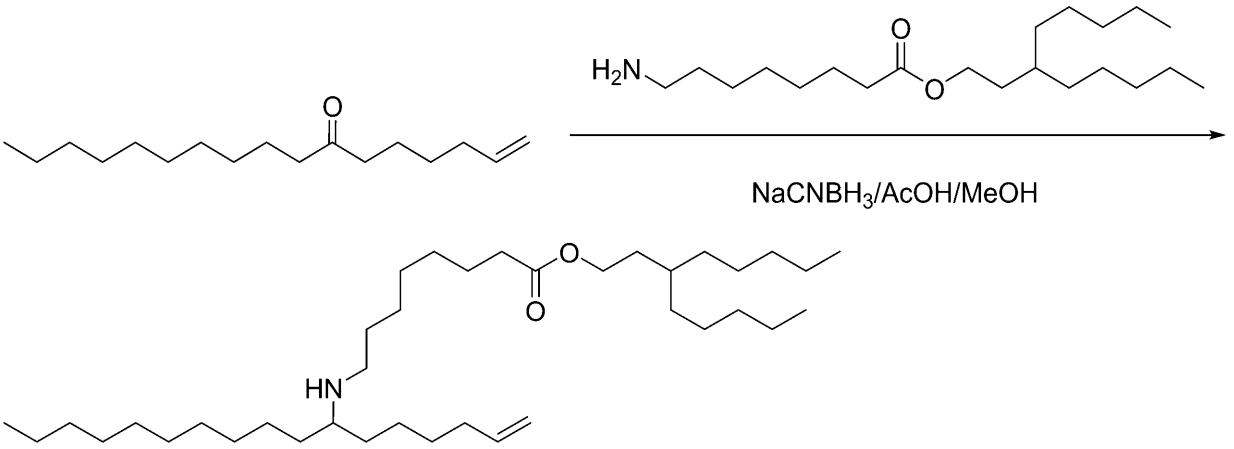
【化３０９】



(87)

工程１．８－（ヘプタデク－１－エン－７－イルアミノ）オクタン酸３－ペンチルオクチルの合成

【化３１０】

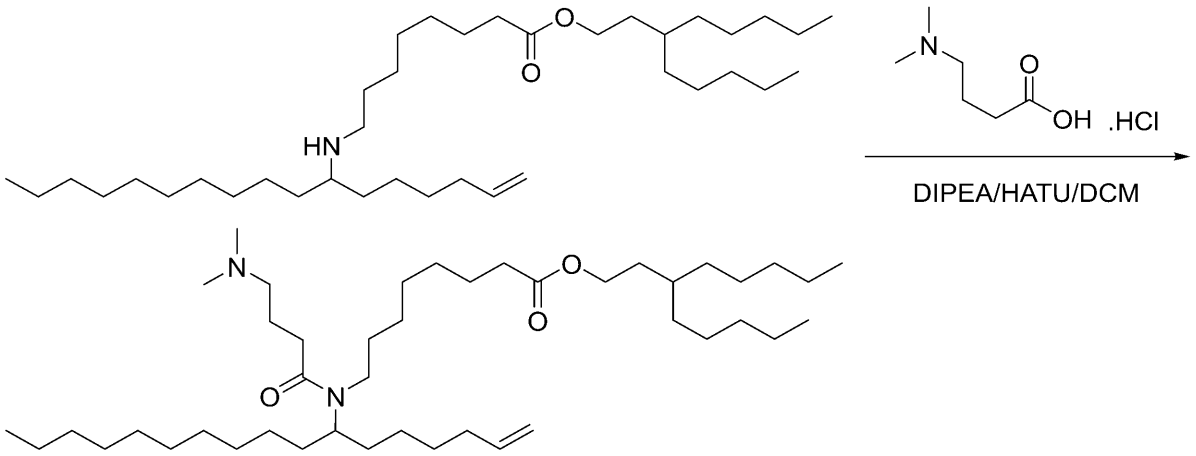


８－アミノオクタン酸３－ペンチルオクチル（１．２ｇ、３．５ｍｍｏｌ）、ヘプタデク－１－エン－７－オン（８７２ｍｇ、３．５ｍｍｏｌ）およびＡｃＯＨ酸（２００μＬ、３．５ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ中にて６０℃で３０分間撹拌した。$NaCNBH_3$を加え、１６時間撹拌を続けた。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＤＣＭに溶解し、$NaHCO_3$（飽和水溶液）およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～６０％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ）によって精製して８－（ヘプタデク－１－エン－７－イルアミノ）オクタン酸３－ペンチルオクチル（１．３３ｇ、６６．７％）を得た。

【０７８５】

工程２．８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（ヘプタデク－１－エン－７－イル）ブタンアミド］オクタン酸３－ペンチルオクチルの合成

【化３１１】

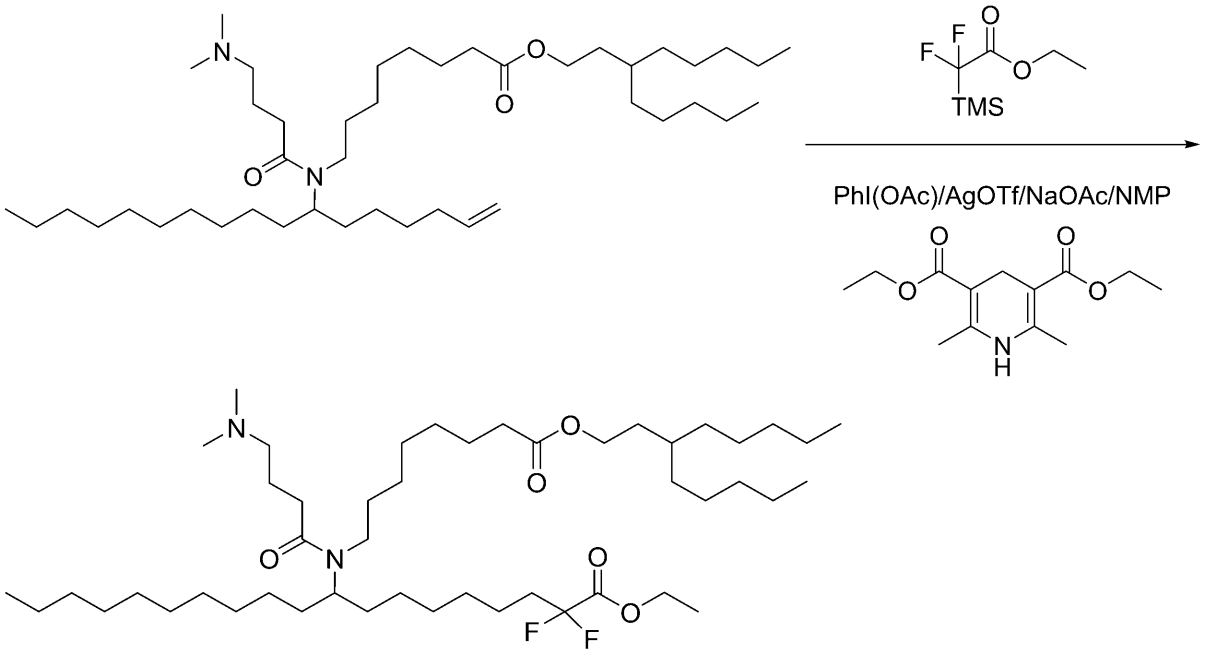


４－（ジメチルアミノ）酪酸塩酸塩（１．１６ｇ、６．９ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（３．１５ｇ、８．３ｍｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（３．６ｍＬ、２０．７ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（４０ｍＬ）中にて室温で３時間撹拌した。ＤＣＭ（４０ｍＬ）中の８－（ヘプタデク－１－エン－７－イルアミノ）オクタン酸３－ペンチルオクチル（１．３３ｇ、２．３ｍｍｏｌ）を加え、１８時間撹拌を続けた。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、飽和$NaHCO_3$で洗浄し、水性層をＥｔＯＡｃで逆抽出した。合わせた有機物を乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１００％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘおよび０～２０％ＭｅＯＨ／ＥｔＯＡｃ）によって精製して８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（ヘプタデク－１－エン－７－イル）ブタンアミド］オクタン酸３－ペンチルオクチル（１．５４ｇ、９７．１％）を得た。

【０７８６】

工程３．９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛８－オキソ－８－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］オクチル｝ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸エチルの合成

【化３１２】

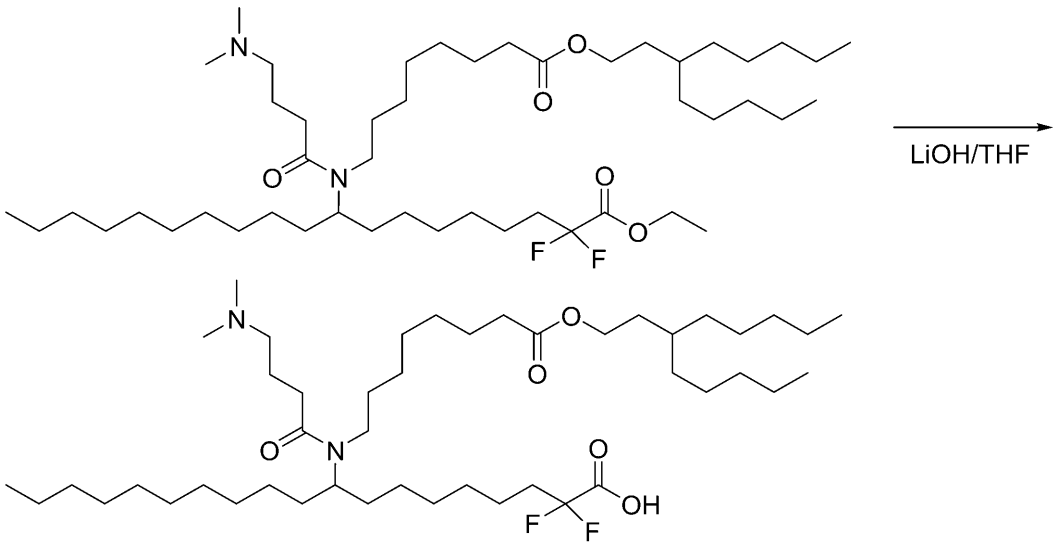


加熱／真空乾燥したフラスコにて、Ｈａｎｔｓｃｈエステル（５６６ｍｇ，２．２４ｍｍｏｌ）、ＮａＯＡｃ（３６７ｍｇ，４．５ｍｍｏｌ）、ＡｇＯＴｆ（１．４４ｇ，５．６ｍｍｏｌ）および二酢酸ヨードベンゼン（１．４４ｇ，４．４７１ｍｍｏｌ，２当量）をN_2のもと、ＮＭＰ（１５ｍＬ）中にて撹拌した。ＮＭＰ（７ｍＬ）中の８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（ヘプタデク－１－エン－７－イル）ブタンアミド］オクタン酸３－ペンチルオクチル（１．５５ｇ，２．２４ｍｍｏｌ）および２，２－ジフルオロ－２－（トリメチルシリル）酢酸エチル（２．２ｇ，１１．２ｍｍｏｌ）を加え、反応物を室温で１８時間撹拌した。セライトを介して反応物を濾過し、Et_2Oで溶出した。合わせた有機物をブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～２５％ＡＣＮ／ＤＣＭ）によって精製して９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛８－オキソ－８－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］オクチル｝ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸エチル（５８８ｍｇ、３２．３％）を得た。

【０７８７】

工程４．９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛８－オキソ－８－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］オクチル｝ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸の合成

【化３１３】

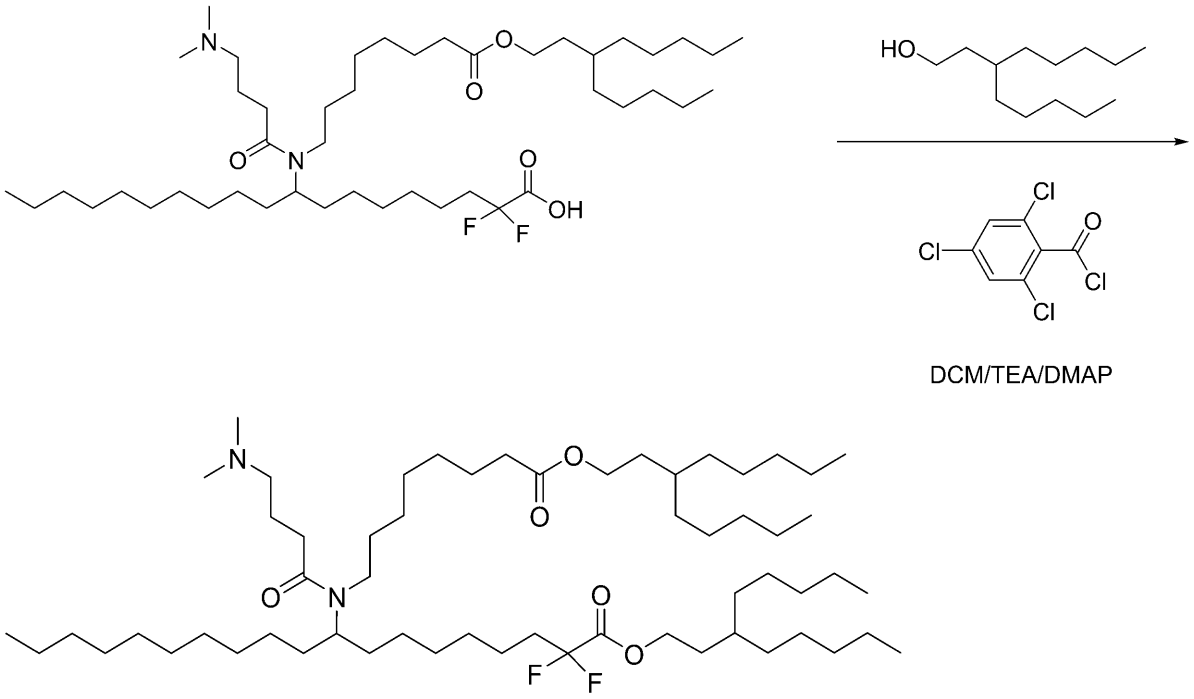


９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛８－オキソ－８－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］オクチル｝ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸エチル（５８８ｍｇ、０．７ｍｍｏｌ）およびＬｉＯＨ　１Ｍ（２．２ｍＬ、２．２ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１０ｍＬ）中にて０℃で反応が完了するまで撹拌した。６ＭのＨＣｌ（０．３６ｍＬ）を加え、反応物をトルエンと共沸させた。残留物をＤＣＭに溶解し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮して９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛８－オキソ－８－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］オクチル｝ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸（６００ｍｇ、９８．８％）を得、それを精製することなく使用した。

【０７８８】

工程５．９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛８－オキソ－８－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］オクチル｝ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸３－ペンチルオクチル（８７）の合成

【化３１４】



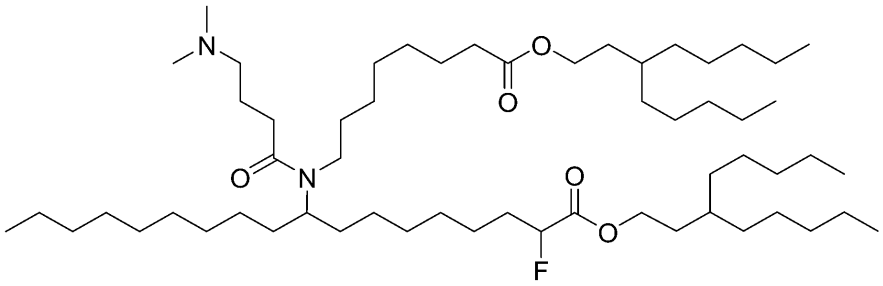
(87)

９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛８－オキソ－８－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］オクチル｝ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸（５６１ｍｇ，０．７ｍｍｏｌ）、３－ペンチルオクタン－１－オール（１５７ｍｇ，０．７８ｍｍｏｌ）、塩化２，４，６－トリクロロベンゾイル（３８２ｍｇ，１．６ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（２６１ｍｇ，２．１ｍｍｏｌ）を０℃にてＤＣＭ（１０ｍＬ）中で混合した。反応物を１６時間撹拌し、室温まで温めた。Et_2Oを加え、得られたＰＰＴを濾過によって除去した。有機物を$NaHCO_3$で洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮し、残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭおよび１：１ＡＣＮ／ＤＣＭ３ＣＶ、０～２０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛８－オキソ－８－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］オクチル｝ブタンアミド］－２，２－ジフルオロノナデカン酸３－ペンチルオクチル（８７）（１２８ｍｇ、１８．５％）を得た。^1H ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＭｅＯＤ）δ４．３３（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，２Ｈ），４．１２（ｔ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，２Ｈ），３．１９（ｄ，Ｊ＝８．３Ｈｚ，１Ｈ），３．１２（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），２．８１（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，３Ｈ），２．６２（ｓ，６Ｈ），２．５２（ｄｔ，Ｊ＝１０．２，７．０Ｈｚ，３Ｈ），２．３３（ｔｄ，Ｊ＝７．３，４．３Ｈｚ，３Ｈ），１．９３（ｈ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，３Ｈ），１．６４（ｄｑ，Ｊ＝２９．９，６．６Ｈｚ，９Ｈ），１．５５（ｓ，３Ｈ），１．４６（ｓ，３Ｈ），１．３９（ｄ，Ｊ＝３．８Ｈｚ，７Ｈ），１．３７（ｓ，９Ｈ），１．３１（ｄ，Ｊ＝４．２Ｈｚ，３９Ｈ），０．９３（ｔ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，１５Ｈ）。

【０７８９】

実施例２７．９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛８－オキソ－８－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］オクチル｝ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸３－ペンチルオクチル（８８）の合成

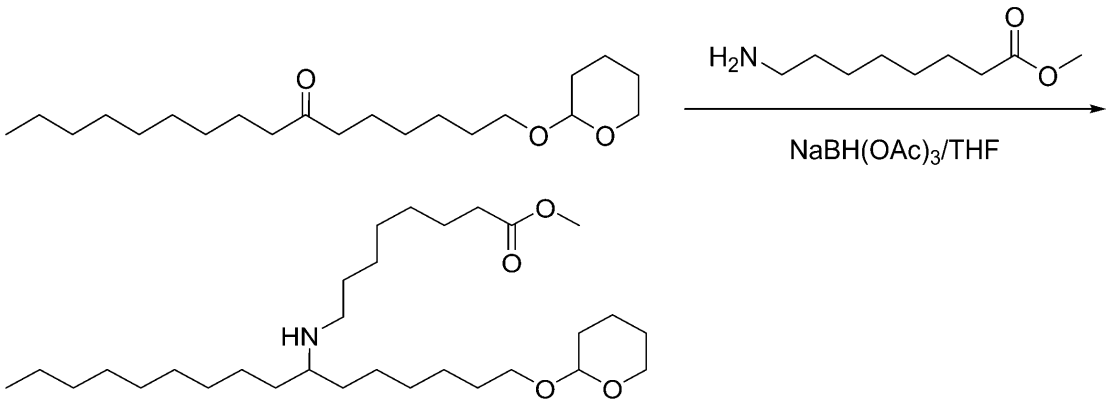
【化３１５】



(88)

工程１．８－｛［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］アミノ｝オクタン酸メチルの合成

【化３１６】

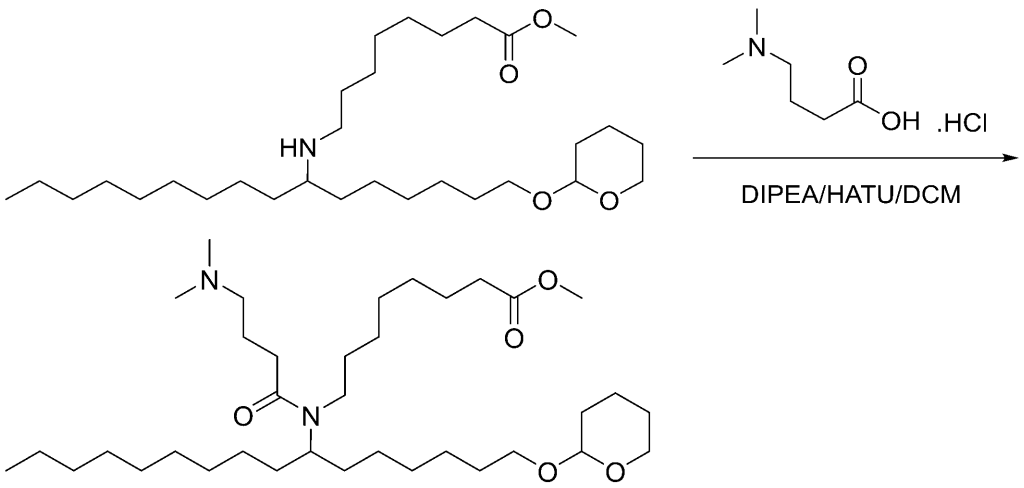


１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－オン（５．７ｇ、１６．７ｍｍｏｌ）、８－アミノオクタン酸メチル（２．９ｇ、１６．７ｍｍｏｌ）およびＮａＣＮ（ＯＡｃ）$_3$（１０．６ｇ、５０．２ｍｍｏｌ）をＴＨＦ中にて５０℃で１６時間撹拌した。反応物を濾過し、ＥｔＯＡｃで溶出し、有機物をＮａＨＣＯ$_3$飽和溶液、水およびブラインで洗浄した。有機物を乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、真空にて濃縮し、自動フラッシュクロマトグラフィー（７％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して８－｛［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］アミノ｝オクタン酸メチル（２．９ｇ、３４．２％）を得た。

【０７９０】

工程２．８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］ブタンアミド］オクタン酸メチルの合成

【化３１７】

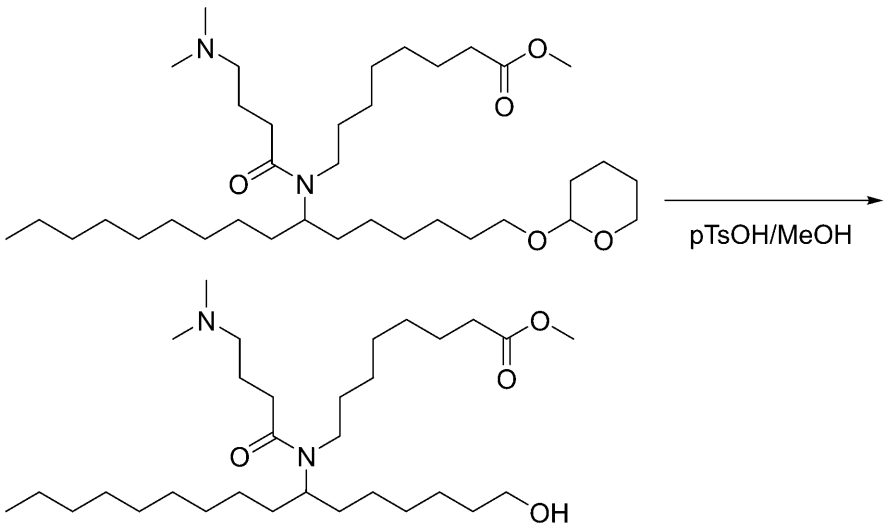


４－ジメチルアミノブタン酸ＨＣｌ塩（３．８４ｇ、２２．９ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（８．７ｇ、２２．９ｍｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（８．０ｍＬ、４５．８ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（４０ｍＬ）中にて室温で３時間撹拌した。ＤＣＭ（４０ｍＬ）中の８－｛［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］アミノ｝オクタン酸メチル（２．８５ｇ、５．７ｍｍｏｌ）を加え、１８時間撹拌を続けた。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、飽和ＮａＨＣＯ$_3$で洗浄し、水性層を追加のＥｔＯＡｃで抽出した。合わせた有機物を真空にて濃縮し、粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１００％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ、および０～２０％ＭｅＯＨ／ＥｔＯＡｃ）によって精製して８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］ブタンアミド］オクタン酸メチル（Ｑｕａｎｔ）を得た。

【０７９１】

工程３．８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－ヒドロキシヘキサデカン－７－イル］ブタンアミド］オクタン酸メチルの合成

【化３１８】



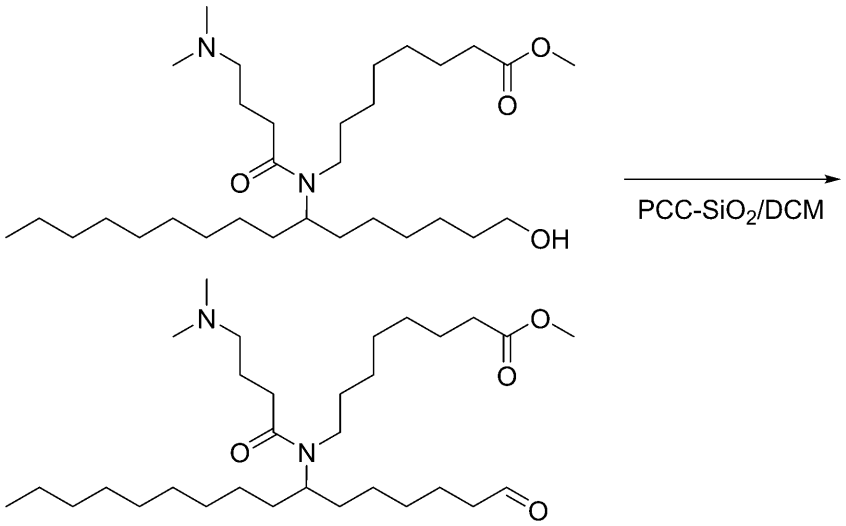
８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－［１－（オキサン－２－イルオキシ）ヘキサデカン－７－イル］ブタンアミド］オクタン酸メチル（３．５ｇ、５．７ｍｍｏｌ）およびｐＴｓＯＨ－Ｈ$_2$Ｏ（１０９ｍｇ、０．５７ｍｍｏｌ）をＭｅＯＨ中にて室温で２．５時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮して８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－ヒドロ

キシヘキサデカン－７－イル）ブタンアミド］オクタン酸メチル（５．０６ｇ）を得、それを精製することなく使用した。

【０７９２】

工程４．８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－オキソヘキサデカン－７－イル］ブタンアミド］オクタン酸メチルの合成

【化３１９】

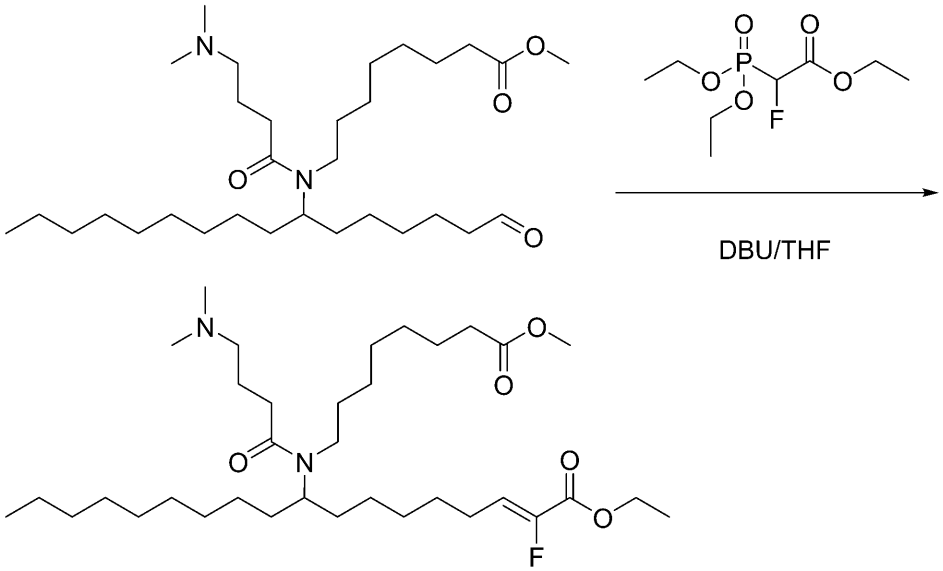


８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－ヒドロキシヘキサデカン－７－イル）ブタンアミド］オクタン酸メチル（３．０２ｇ、５．７３ｍｍｏｌ）およびＰＣＣ－ＳｉＯ$_2$（１：１）（４．３ｇ、１０．０ｍｍｏｌ）をＤＣＭ中にて室温で１６時間撹拌した。ＭｅＣＮを加え、シリカを介して反応物を濾過し、１：１ＭｅＣＮ／ＤＣＭで溶出した。濾液を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解し、セライトを介して濾過した。濾液を真空にて濃縮し、自動フラッシュクロマトグラフィー（０～５０％ＡＣＮ／ＤＣＭ）によって精製して８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－オキソヘキサデカン－７－イル）ブタンアミド］オクタン酸メチル（１．７９ｇ、５９．３％）を得た。

【０７９３】

工程５．（２Ｚ）－９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（８－メトキシ－８－オキソオクチル）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデク－２－エン酸エチルの合成

【化３２０】

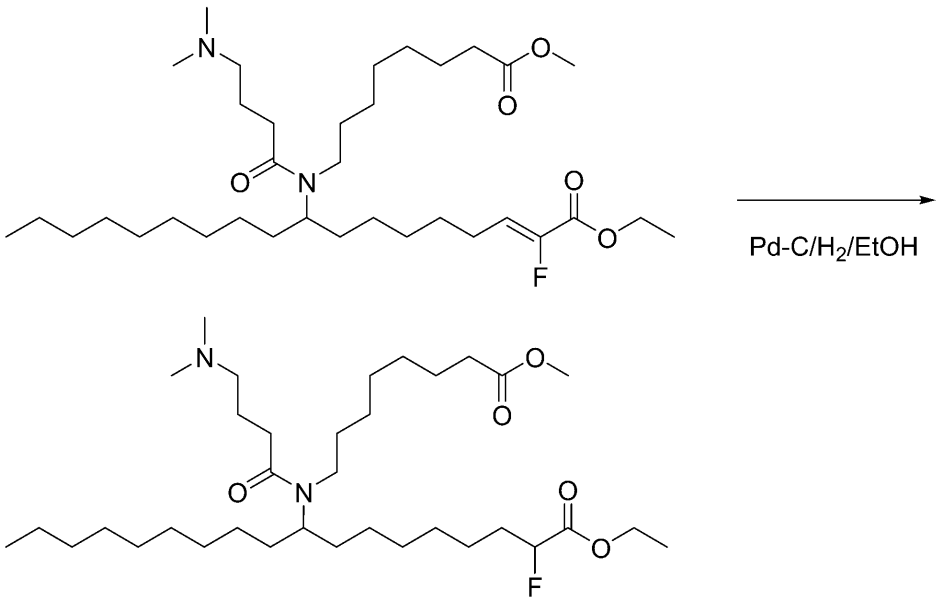


８－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（１－オキソヘキサデカン－７－イル）ブタンアミド］オクタン酸メチル（１．７９ｇ、３．４ｍｍｏｌ）、２－（ジエトキシホスホリル）－２－フルオロ酢酸エチル（１．４ｇ、６．０ｍｍｏｌ）およびＤＢＵ（０．９ｍＬ、６．０ｍｍｏｌ）をＴＨＦ中にて室温で１６時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解した。有機物を$NaHCO_3$およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。粗材料を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１００％ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘおよび０～１５％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して（２Ｚ）－９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（８－メトキシ－８－オキソオクチル）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデク－２－エン酸エチル（６２６ｍｇ、３０．０％）を得た。

【０７９４】

工程６．９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（８－メトキシ－８－オキソオクチル）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸エチルの合成

【化３２１】

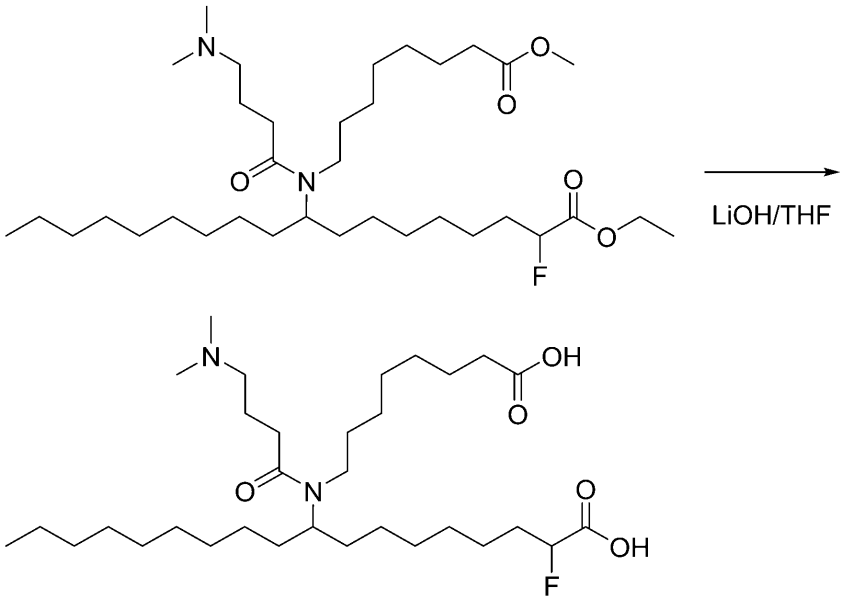


（２Ｚ）－９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（８－メトキシ－８－オキソオクチル）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデク－２－エン酸エチル（６２０ｍｇ、１．０ｍｍｏｌ）をＥｔＯＨ中にて室温で１６時間、Ｐｄ－Ｃ上での接触水素化に供した。セライトを介して反応物を濾過し、真空にて濃縮して９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（８－メトキシ－８－オキソオクチル）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸エチル（５５０ｍｇ、８８．４％）を得、それを精製することなく使用した。

【０７９５】

工程７．９－［Ｎ－（７－カルボキシヘプチル）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸の合成

【化３２２】

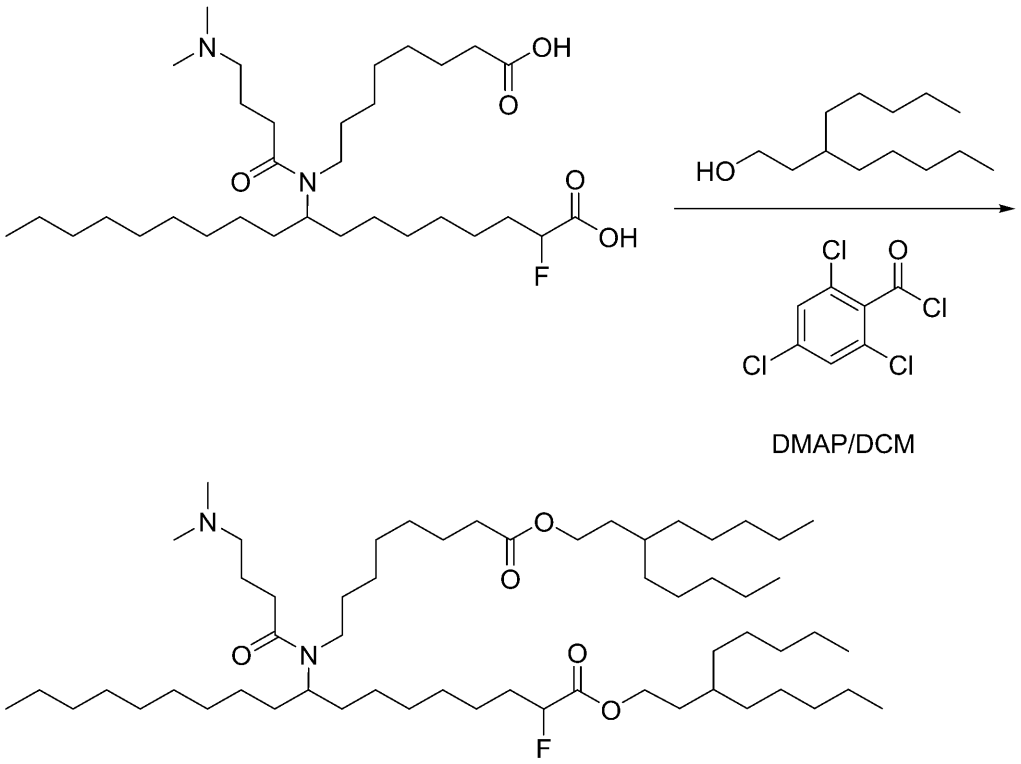


９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－（８－メトキシ－８－オキソオクチル）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸エチル（５５０ｍｇ、０．９０ｍｍｏｌ）およびＬｉＯＨ（９６ｍｇ、４．０ｍｍｏｌ）をＴＨＦ中にて室温で１６時間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、６ＭのＨＣｌ（１．０ｍＬ）で酸性化し、ＤＣＭ（５０ｍＬ）に抽出した。有機物をブラインで洗浄し、水性層をさらにＤＣＭで抽出した。合わせた有機物を乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、真空にて濃縮して９－［Ｎ－（７－カルボキシヘプチル）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸（２８４ｍｇ，５５．４％）を得、それをさらに精製することなく使用した。

【０７９６】

工程８．９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛８－オキソ－８－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］オクチル｝ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸３－ペンチルオクチル（８８）の合成

【化３２３】



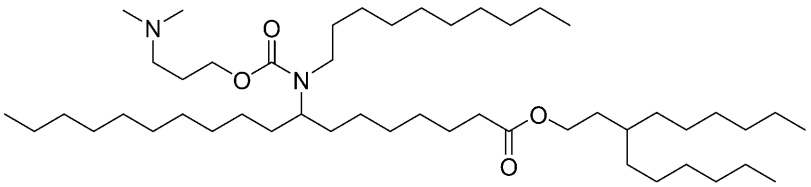
(88)

９－［Ｎ－（７－カルボキシヘプチル）－４－（ジメチルアミノ）ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸（２７５ｍｇ、０．４８ｍｍｏｌ）、３－ペンチルオクタン－１－オール（２８９ｍｇ、１．４４ｍｍｏｌ）、塩化２，４，６－トリクロロベンゾイル（３５１ｍｇ、１．４４ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（２３５ｍｇ、１．９２ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（１０ｍＬ）中にて０℃で混合した。反応物を１６時間撹拌し、室温まで温めた。反応物を真空にて濃縮し、残留物をＥｔＯＡｃに溶解した。合わせた有機物を飽和ＮａＨＣＯ$_3$およびブラインで洗浄し、乾燥させ（ＭｇＳＯ$_4$）、濾過し、真空にて濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して９－［４－（ジメチルアミノ）－Ｎ－｛８－オキソ－８－［（３－ペンチルオクチル）オキシ］オクチル｝ブタンアミド］－２－フルオロオクタデカン酸３－ペンチルオクチル（８８）（２１１ｍｇ、４６．９％）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ４．２３（ｔｄ，Ｊ＝７．１，２．１Ｈｚ，２Ｈ），４．１０（ｔｄ，Ｊ＝７．１，４．０Ｈｚ，２Ｈ），３．０９－３．０１（ｍ，２Ｈ），２．３３（ｄｔ，Ｊ＝２３．１，７．３Ｈｚ，９Ｈ），１．６９－１．５３（ｍ，１１Ｈ），１．３８－１．１８（ｍ，５７Ｈ），０．９５－０．８６（ｍ，１５Ｈ）．１９ＦＮＭＲ（３７６ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ－１９１．６７－－１９２．０７（ｍ）。

【０７９７】

実施例２８．８－（デシル（（３－（ジメチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）－アミノ）オクタデカン酸３－ヘキシルノニル（１０５）の合成

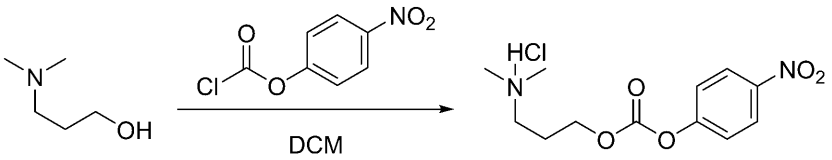
【化３２４】



(105)

工程１：３－（ジメチルアミノ）プロピル（４－ニトロフェニル）カーボネート塩酸塩の合成

【化３２５】

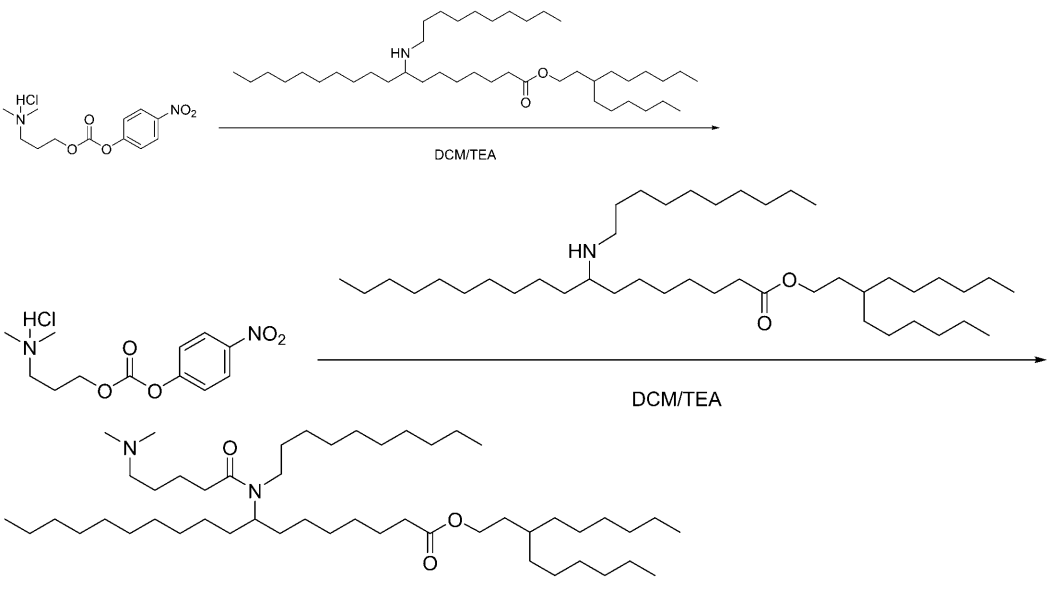


ＤＣＭ（２０ｍＬ）中の３－（ジメチルアミノ）プロパン－１－オール（２．５ｇ、２４．２ｍｍｏｌ）をクロロギ酸４－ニトロフェニル（４．９ｇ、２４．２ｍｍｏｌ）のＤＣＭ（８０ｍＬ）撹拌溶液に０℃で一滴ずつ加えた。反応物を１６時間撹拌し、室温まで温めた。溶媒を真空にて除去して３－（ジメチルアミノ）プロピル（４－ニトロフェニル）カーボネート塩酸塩（５．３ｇ、７０．９％）を粗製混合物として得、それをさらに精製することなく使用した。

【０７９８】

工程２：８－（Ｎ－デシル－５－（ジメチルアミノ）ペンタンアミド）オクタデセン酸３－ヘキシルノニル（１０５）の合成

【化３２６】



(105)

８－（デシルアミノ）オクタデカン酸３－ヘキシルノニル（０．６１ｇ、０．９４ｍｍ

ｏｌ）、トリエチルアミン（０．２９ｇ、２．８２ｍｍｏｌ）および３－（ジメチルアンモニオ）プロピル４－ニトロフェニルカーボネート塩酸塩（０．３６ｇ、１．１８ｍｍｏｌ）をＤＣＭ中にて室温で１６時間撹拌した。さらに１当量の３－（ジメチルアミノ）プロピル４－ニトロフェニルカーボネート塩酸塩とトリエチルアミンをＤＭＡＰ（触媒量）とともに加え、反応物を１６時間加熱還流した。溶媒を真空にて除去し、残留物をヘキサンに溶解し、濾過し、濃縮した。得られた油をＤＣＭに溶解し、塩化デカノイル（９０ｍｇ、０．５当量）を加えて１５分間撹拌した。反応物を真空にて濃縮し、ジエチルエーテルで希釈し、$NaHCO_3$飽和溶液およびブラインで洗浄し、乾燥させ（$MgSO_4$）、濾過し、濃縮した。残留物を自動フラッシュクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して８－［デシル（｛［３－（ジメチルアミノ）プロポキシ］カルボニル｝）アミノ］オクタデカン酸３－ヘキシルノニル（０．３０ｇ、４０．５％）を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ４．０９（ｄｔ，Ｊ＝１７．８，６．７Ｈｚ，４Ｈ），３．０２－２．８９（ｍ，２Ｈ），２．３９（ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，２Ｈ），２．２６（ｄ，Ｊ＝４．５Ｈｚ，７Ｈ），１．８２（ｓ，６Ｈ），１．５７（ｄｐ，Ｊ＝１６．８，８．４Ｈｚ，４Ｈ），１．４１（ｄ，Ｊ＝１０．５Ｈｚ，３Ｈ），１．３５－１．２３（ｍ，５５Ｈ），０．８８（ｔｄ，Ｊ＝６．８，１．９Ｈｚ，１２Ｈ）。

【０７９９】

一般的な方法

脂質ナノ粒子製剤

脂質溶液は４つの成分：ＰＥＧ－複合脂質、イオン化できる脂質、コレステロール、およびリン脂質（例えば、ＤＳＰＣ）を含有する。脂質ストックは記載されている脂質の同一性とモル比を使用して調製し、１００％エタノールにて約７ｍｇ／ｍＬの総濃度を達成した。ホタルルシフェラーゼｍＲＮＡ（ＴｒｉＬｉｎｋ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｌ－７２０２）またはオルニチントランスカルバミラーゼ（ＯＴＣ）ｍＲＮＡ（ＴｒｉＬｉｎｋ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、特注設計）を酢酸ｐＨ５緩衝液とヌクレアーゼ不含水で希釈し、１００ｍＭ酢酸ｐＨ５にて０．３６６ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの目標濃度を達成した。等体積の脂質溶液と核酸溶液をＴ－コネクターを介して４００ｍＬ／分の流速で混合し、約４容量のＰＢＳ（ｐＨ７．４）で希釈した。製剤をＳｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ透析ユニット（ＭＷＣＯ１０，０００）に入れ、１０ｍＭのトリス、５００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８緩衝液に対して一晩透析した。透析後、ＶｉｖａＳｐｉｎ濃縮装置（ＭＷＣＯ１００，０００）を使用して製剤を約０．６ｍｇ／ｍＬまで濃縮し、５ｍＭ Ｔｒｉｓ、１０％スクロース、ｐＨ８緩衝剤で一晩透析した。製剤を０．２μｍシリンジフィルタ（ＰＥＳ膜）を通して濾過した。核酸濃度をＲｉｂｏＧｒｅｅｎアッセイにより決定した。粒度および多分散性はＭａｌｖｅｒｎ Ｎａｎｏ Ｓｅｒｉｅｓ Ｚｅｔａｓｉｚｅｒを使用して決定した。

【０８００】

ルシフェラーゼＬＮＰの生体内投与

ホタルルシフェラーゼｍＲＮＡを封入したＬＮＰ製剤を、メスＢＡＬＢ／ｃマウス（６～８週齢）に０．５ｍｇ／ｋｇで静脈内注射した。注射の当日に、ＬＮＰストックを濾過し、リン酸緩衝生理食塩水で必要な投与濃度まで希釈した。投与の６時間後、動物を致死量のケタミン／キシラジンで麻酔した。肝臓試料（左側葉）を採取し、秤量し、液体窒素中で急速凍結した。肝臓試料を、ルシフェラーゼ活性について分析するまで－８０℃でＦａｓｔＰｒｅｐ（登録商標）チューブに保存した。

【０８０１】

ルシフェラーゼ活性の分析

肝臓の凍結アリコートを解凍し、ＦａｓｔＰｒｅｐ（登録商標）ホモジナイザーを使用して１×ＣＣＬＲ（細胞培養溶解試薬）１ｍＬ中でホモジナイズした。次いで、ホモジネートを１６，０００ＲＰＭで１０分間、４℃にて遠心分離した。２０μＬの上清を９６ウェル白色プレートに入れ、ルシフェラーゼ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ Ａｓｓａｙ Ｓｙｓｔｅｍ）の添加後に発光を測定した。ホモジナイズした試料の発光を

ルシフェラーゼタンパク質標準と比較することによってルシフェラーゼ活性を決定した。肝臓ホモジネート中の成分による発光の消光を説明するために、ルシフェラーゼを未処理動物の肝臓ホモジネートに加え、得られた発光を測定した。得られた消光因子を全ての試料に適用して補正されたルシフェラーゼ活性を得て、分析した組織の単位質量あたりに基準化した。

【０８０２】

ＯＴＣ　ＬＮＰの生体内投与

オルニチントランスカルバミラーゼｍＲＮＡを封入したＬＮＰ製剤を、指定された用量レベルでオスＣ５７ＢＬ／６マウス（６～８週齢）に静脈内注射した。注射の当日、ＬＮＰストックを濾過し、リン酸緩衝生理食塩水で必要な投与濃度まで希釈した。投与の２４時間後、動物を致死量のケタミン／キシラジンで麻酔した。肝臓試料（左側葉）を採取し、秤量し、液体窒素中で急速凍結した。ＯＴＣ発現について分析するまで－８０℃でＦａｓｔＰｒｅｐ（登録商標）チューブに肝臓試料を保存した。

【０８０３】

ヒトＯＴＣ発現の解析

肝臓ホモジネートは、ＰＢＳ、Ｈａｌｔプロテアーゼ阻害剤カクテル、ＦａｓｔＰｒｅｐ均質化で調製し、ＢＣＡタンパク質アッセイで２ｍｇ／ｍＬタンパク質に基準化した後、ＥＬＩＳＡで分析した。簡単に説明すると、試料をＰＢＳで希釈し、Ｎｕｎｃ　Ｍａｘｉｓｏｒｐプレートに入れた。未処理の動物対照（ビヒクル）からヒトＰＲＯＴＥＩＮ１タンパク質を使用した標準曲線を作成した。２時間のインキュベートの後、プレートを洗浄し、一次抗体を加えた。１時間のインキュベートの後、二次抗体を加え、さらに１時間インキュベートした。洗浄の後、発色のためにＴＭＢ基質を加え、２Ｎの硫酸で反応を止めた。４５０／５７０　ＯＤでプレートを読み取った。

【０８０４】

ＥＧＦＰ　ＬＮＰの生体内投与

高感度緑色蛍光タンパク質ｍＲＮＡを封入したＬＮＰ製剤をメスＢＡＬＢ／ｃマウス（６～８週齢）に０．５ｍｇ／ｋｇで静脈内注射した。注射の当日、ＬＮＰストックを濾過し、リン酸緩衝生理食水で必要な投与濃度まで希釈した。投与の２４時間後、動物を致死量のケタミン／キシラジンで麻酔した。肝臓試料（左側葉）を採取し、秤量し、液体窒素中で急速凍結した。肝臓試料を、ＥＧＦＰ発現について分析するまで－８０℃でＦａｓｔＰｒｅｐ（登録商標）チューブに肝臓試料を保存した。

【０８０５】

ＥＧＦＰ発現の解析

肝臓ホモジネートを細胞抽出緩衝液で調製し、希釈し、製造元の説明書（Ａｂｃａｍ、ＧＦＰ　ＥＬＩＳＡキット）に従ってＥＬＩＳＡを使用してＥＧＦＰタンパク質のレベルについて分析した。

【０８０６】

脂質のＬＣ－ＭＳ分析

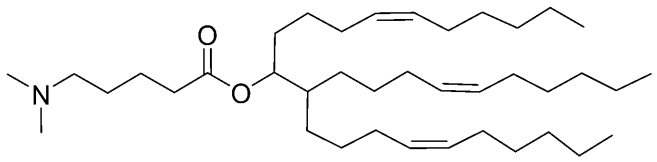
肝臓組織をＰＢＳで処理し、ＦａｓｔＰｒｅｐ装置によって５ｍ／ｓ×１５秒の３サイクルでホモジナイズした。ＰＢＳ処理した対照動物からのホモジネートをプールし、標準曲線の作成に使用した。内部適合性標準２５０ｕＬとともに試料をディープウェルプレートに抽出した。４℃にて２０００ｒｐｍで１５分間プレートを遠心分離した。Ａｇｉｌｅｎｔ　１２９０　ＵＨＰＬＣに連結したＡｇｉｌｅｎｔ　６５２０　ＱＴＯＦを使用し、逆相ＬＣ分離を使用して分析を実行した。イオン化できる脂質の定量は、適切に適合したブランクマトリックスにスパイクされた較正曲線に対してＭＳ／ＭＳによって行った。較正では同様のクラスの合成脂質を内部標準として使用した。

【０８０７】

実施例２９．新規イオン化できる脂質を含有するＬＮＰ製剤の粒子特性

新規イオン化できる脂質を含有するＬＮＰ製剤はすべて、高い封入効率を持つ安定した粒子を生成した（表１～７）。

【０８０８】
１３－Ｂ４３として特定された次の化合物は、比較のために以下に含まれている。
【化３２７】



１３－Ｂ４３

【０８０９】
【表１】

表１．ルシフェラーゼｍＲＮＡと新規イオン化できる脂質とを含有する生体内投与用ＬＮＰの粒子特性

１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG2000-C-DMA:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	最終生成物	
	Z平均(PDI)nm	%EE
１３－Ｂ４３	70(0.13)	94
化合物４８	71(0.04)	96
化合物４９	61(0.08)	96
化合物５０	61(0.07)	93
化合物５１	62(0.09)	94
化合物５２	72(0.05)	95

【０８１０】

【表２】

表２．ルシフェラーゼｍＲＮＡと新規イオン化できる脂質とを含有する生体内投与用ＬＮＰの粒子特性

１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG2000-C-DMA:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	最終生成物	
	Z平均(PDI)nm	%EE
１３－Ｂ４３	72(0.03)	99
化合物５３	106(0.07)	97
化合物２１	77(0.03)	98
化合物２２	74(0.04)	98
化合物４０	87(0.05)	98
化合物５５	94(0.17)	98
化合物５８	81(0.13)	99
化合物５６	97(0.10)	96
化合物２５	78(0.03)	99

【０８１１】
【表３】

表３．ルシフェラーゼｍＲＮＡと新規イオン化できる脂質とを含有する生体内投与用ＬＮＰの粒子特性

１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG2000-C-DMA:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	最終生成物	
	Z平均(PDI)nm	%EE
１３－Ｂ４３	72(0.06)	99
化合物５９	82(0.07)	99
化合物５４	82(0.05)	97
化合物５７	84(0.03)	80
化合物３２	85(0.02)	99
化合物４	82(0.03)	99
化合物３	91(0.05)	99
化合物６０	73(0.05)	99
化合物６１	76(0.05)	99
化合物６２	67(0.08)	98
化合物２３	69(0.06)	97
化合物２４	72(0.08)	96

【０８１２】

【表４】

表４．ルシフェラーゼｍＲＮＡと新規イオン化できる脂質とを含有する生体内投与用ＬＮＰの粒子特性

１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG2000-C-DMA:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	最終生成物	
	Z平均(PDI)nm	%EE
１３－Ｂ４３	72(0.07)	98
化合物３５	85(0.06)	99
化合物３６	81(0.04)	96
化合物３７	73(0.05)	82
化合物２６	97(0.03)	98
化合物２７	86(0.04)	98
化合物２８	90(0.20)	95
化合物７８	65(0.03)	99
化合物７９	65(0.06)	99

【０８１３】

【表５】

表５．ルシフェラーゼｍＲＮＡと新規イオン化できる脂質とを含有する生体内投与用ＬＮＰの粒子特性

１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比、PEG2000-C-DMA:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	最終生成物	
	Z平均(PDI)nm	%EE
１３－Ｂ４３	69(0.06)	98
化合物４４	68(0.06)	98
化合物６３	70(0.03)	99
化合物６４	84(0.00)	99
化合物４２	65(0.10)	97
化合物２	81(0.08)	96
化合物１	77(0.04)	99
化合物２９	80(0.02)	98
化合物６７	77(0.04)	99
化合物３０	79(0.03)	98
化合物４１	70(0.04)	94
化合物３１	79(0.04)	98
化合物６８	67(0.06)	99
化合物８０	75(0.08)	99
化合物８１	73(0.06)	99
化合物８２	64(0.03)	99
化合物８３	75(0.08)	96

【０８１４】

【表６】

表６．ルシフェラーゼｍＲＮＡと新規イオン化できる脂質とを含有する生体内投与用ＬＮＰの粒子特性

１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比、PEG2000-C-DMA:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	最終生成物	
	Z平均(PDI)nm	%EE
１３－Ｂ４３	77(0.07)	99
化合物８４	80(0.04)	98
化合物８５	84(0.03)	99
化合物４３	73(0.05)	99
化合物４５	83(0.01)	99
化合物４６	72(0.11)	99
化合物１７	68(0.10)	99
化合物１６	76(0.10)	95
化合物１８	73(0.07)	98
化合物１９	73(0.07)	99
化合物６９	68(0.07)	99
化合物５	68(0.05)	99
化合物６５	83(0.01)	98
化合物７１	86(0.02)	97
化合物７２	79(0.00)	99

【０８１５】

【表７】

表７．ルシフェラーゼｍＲＮＡと新規イオン化できる脂質とを含有する生体内投与用ＬＮＰの粒子特性

１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG2000-C-DMA:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	最終生成物	
	Z平均(PDI)nm	%EE
１３－Ｂ４３	74(0.06)	98
化合物７３	82(0.00)	99
化合物４７	77(0.07)	98
化合物７６	69(0.07)	98
化合物７４	89(0.05)	99
化合物３３	61(0.12)	99
化合物７５	84(0.03)	99
化合物２０	72(0.08)	98
化合物３９	59(0.19)	98
化合物８７	78(0.05)	98
化合物６６	73(0.04)	99
化合物３４	70(0.10)	99
化合物８８	72(0.04)	99
化合物８６	65(0.23)	99
化合物７７	63(0.09)	99
化合物３８	65(0.17)	98

【０８１６】

実施例３０．静脈内マウスモデルにおける新規イオン化できる脂質を含有するＬＮＰの性能

ルシフェラーゼｍＲＮＡペイロードとさまざまな新規イオン化できる脂質を有するＬＮＰ製剤を、静脈内投与後のルシフェラーゼマウスモデルにおける活性についての評価基準対照と比較した。投与の６時間後、新規脂質製剤は肝臓における高レベルのルシフェラーゼ活性に介在した。いくつかの新規脂質では評価基準と同等またはそれ以上の活性が報告された一方で、他の脂質はこのモデルでは評価基準ほど活性がないが、他のＬＮＰ応用では有用性を有する場合がある（表８～１４）。

【０８１７】

【表８】

表８．ＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）における静脈内投与の６時間後でのホタルルシフェラーゼｍＲＮＡ及び種々のイオン化できる脂質を含有する０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰのルシフェラーゼ活性。

処理 １．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比、 PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	IV投与の6時間後	
	Luc活性（pg/g肝臓）	標準偏差（pg/g肝臓）
１３－Ｂ４３	5.94E+07	1.73E+07
化合物４８	6.49E+06	1.26E+06
化合物４９	8.36E+06	1.18E+06
化合物５０	4.82E+06	1.06E+06
化合物５１	2.50E+07	1.93E+06
化合物５２	5.65E+06	1.17E+06

【０８１８】
【表９】

表９．ＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）における静脈内投与の６時間後でのホタルルシフェラーゼｍＲＮＡ及び種々のイオン化できる脂質を含有する０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰのルシフェラーゼ活性。

処理 １．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比、 PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	IV投与の6時間後	
	Luc活性（pg/g肝臓）	標準偏差（pg/g肝臓）
１３－Ｂ４３	7.29E+07	9.59E+06
化合物５３	8.02E+06	1.36E+06
化合物２１	4.58E+07	4.10E+06
化合物２２	4.71E+07	8.19E+06
化合物４０	3.57E+07	7.78E+06
化合物５５	1.22E+06	3.01E+05
化合物５８	3.11E+05	7.64E+04
化合物５６	9.00E+06	1.82E+06
化合物２５	7.76E+06	1.42E+06

【０８１９】

【表１０】

表１０．ＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）における静脈内投与の６時間後でのホタルルシフェラーゼｍＲＮＡ及び種々のイオン化できる脂質を含有する０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰのルシフェラーゼ活性。

処理 １．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比、 PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	IV投与の6時間後	
	Luc活性（pg/g肝臓）	標準偏差（pg/g肝臓）
１３－Ｂ４３	7.04E+07	2.41E+07
化合物５９	1.12E+06	9.00E+05
化合物５４	3.28E+06	8.08E+05
化合物５７	2.43E+06	7.28E+05
化合物３２	3.07E+07	7.90E+06
化合物４	7.84E+07	1.06E+07
化合物３	5.94E+07	1.18E+07
化合物６０	8.23E+06	1.18E+06
化合物６１	2.45E+07	6.04E+06
化合物６２	7.84E+06	1.51E+06
化合物２３	4.44E+06	5.65E+05
化合物２４	3.98E+06	6.96E+05

【０８２０】

【表１１】

表１１．ＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）における静脈内投与の６時間後でのホタルルシフェラーゼｍＲＮＡ及び種々のイオン化できる脂質を含有する０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰのルシフェラーゼ活性。

処理 １．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG2000-C-DMA:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	IV投与の6時間後	
	Luc活性（pg/g肝臓）	標準偏差（pg/g肝臓）
１３－Ｂ４３	6.86E+07	1.11E+07
化合物３５	1.40E+07	4.66E+06
化合物３６	5.54E+06	1.36E+06
化合物３７	3.01E+06	2.58E+05
化合物２６	2.03E+07	2.75E+06
化合物２７	9.17E+06	1.49E+06
化合物２８	6.50E+06	8.73E+05
化合物７８	5.30E+07	1.18E+07
化合物７９	1.05E+07	3.29E+06

【０８２１】

【表１２】

表１２．ＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）における静脈内投与の６時間後でのホタルルシフェラーゼｍＲＮＡ及び種々のイオン化できる脂質を含有する０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰのルシフェラーゼ活性。

処理 １．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG2000-C-DMA:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	IV投与の6時間後	
	Luc活性（pg/g肝臓）	標準偏差（pg/g肝臓）
１３－Ｂ４３	7.83E+07	5.16E+06
化合物４４	6.17E+07	6.12E+07
化合物６３	6.23E+07	1.45E+07
化合物６４	9.76E+07	2.26E+07
化合物４２	1.14E+07	6.81E+05
化合物２	7.11E+07	5.10E+06
化合物１	1.70E+08	2.64E+07
化合物２９	6.74E+07	4.00E+07
化合物６７	1.31E+08	2.94E+07
化合物３０	3.76E+07	9.34E+06
化合物４１	6.69E+06	5.40E+05
化合物３１	1.47E+07	2.93E+06
化合物６８	4.36E+07	1.00E+06
化合物８０	3.28E+07	8.20E+06
化合物８１	3.47E+07	4.92E+06
化合物８２	1.23E+07	2.69E+06
化合物８３	4.59E+07	2.41E+06

【０８２２】

【表１３】

表１３．ＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）における静脈内投与の６時間後でのホタルルシフェラーゼｍＲＮＡ及び種々のイオン化できる脂質を含有する０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰのルシフェラーゼ活性。

処理 １．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG2000-C-DMA:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	IV投与の6時間後	
	Luc活性（pg/g肝臓）	標準偏差（pg/g肝臓）
１３－Ｂ４３	7.60E+07	8.27E+06
化合物８４	6.26E+07	2.01E+07
化合物８５	4.79E+07	1.30E+07
化合物４３	1.04E+08	4.11E+07
化合物４５	8.00E+07	1.41E+07
化合物４６	1.08E+08	2.22E+07
化合物１７	5.52E+07	5.92E+06
化合物１６	4.39E+07	1.07E+07
化合物１８	4.32E+07	4.15E+06
化合物１９	1.25E+06	2.48E+05
化合物６９	4.10E+07	7.07E+06
化合物５	9.49E+07	1.06E+07
化合物６５	3.88E+07	1.74E+07
化合物７１	4.58E+07	4.96E+06
化合物７２	2.26E+07	9.80E+06

【０８２３】

【表１４】

表１４．ＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）における静脈内投与の６時間後でのホタルルシフェラーゼｍＲＮＡ及び種々のイオン化できる脂質を含有する０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰのルシフェラーゼ活性。

処理 １．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG2000-C-DMA:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	IV投与の6時間後	
	Luc活性（pg/g肝臓）	標準偏差（pg/g肝臓）
１３－Ｂ４３	6.02E+07	8.72E+06
化合物７３	3.64E+07	5.95E+06
化合物４７	8.09E+07	4.67E+06
化合物７６	2.09E+07	7.52E+06
化合物７４	6.77E+07	1.21E+07
化合物７５	2.58E+07	3.61E+06
化合物２０	2.71E+07	5.48E+06
化合物３９	4.30E+06	8.30E+05
化合物８７	1.18E+06	5.56E+05
化合物６６	2.00E+07	4.53E+06
化合物３４	1.91E+06	4.04E+05
化合物８８	1.64E+07	7.91E+06
化合物８６	1.21E+07	6.99E+06
化合物７７	3.26E+07	7.41E+06
化合物３８	2.13E+07	8.50E+06

【０８２４】

実施例３１．静脈内投与後の用量反応試験における新規イオン化できる脂質を含有するＬＮＰの性能

ＯＴＣｍＲＮＡペイロードとさまざまな新規イオン化できる脂質を有するＬＮＰ製剤を、静脈内投与後のマウスにおける活性についての評価基準対照と比較した。投与の２４時間後、新規脂質製剤では肝臓におけるヒトＯＴＣ発現での用量依存性の上昇が報告された（表１５）。

【０８２５】

【表１５】

表１５．オスＣ５７ＢＬ／６マウス（ｎ＝４）への静脈内投与の２４時間後でのヒトＯＴＣ ｍＲＮＡ及びさまざまなイオン化できる脂質を含有するＬＮＰの用量反応

処理 1.6:54.6:32.8:10.9のLNP モル比： PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	ヒトＯＴＣの発現 （肝臓におけるタンパク質１ｍｇあたりのｎｇ　ｈＯＴＣ）					
	0.3mg/kg	標準偏差	1mg/kg	標準偏差	3mg/kg	標準偏差
１３－Ｂ４３	908	175	6651	3325	12413	1946
化合物４３	1247	404	5713	775	12887	1260
化合物１６	1155	330	4127	366	10316	1762
化合物３３	660	204	2954	765	11080	3883

【０８２６】

実施例３２：静脈内投与の６時間後での肝臓にて検出された親イオン化できる脂質

ルシフェラーゼｍＲＮＡペイロードおよびさまざまな新規イオン化できる脂質を有するＬＮＰ製剤を、静脈内投与後に肝臓に残るイオン化できる脂質の量についての評価基準と比較した。投与の６時間後、いくつかの処理群では、マウス肝臓中の新規イオン化できる脂質のレベルが評価基準と比較して低下したと報告された（表１６～１８）。全体として、これらの新規イオン化できる脂質は、対照と比較して優れた活性および/またはクリアランスを示す。

【０８２７】

【表１６】

表１６．メスＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）に０．５ｍｇ／ｋｇのルシフェラーゼｍＲＮＡ ＬＮＰを静脈内投与した６時間後に肝臓にて残留する親イオン化できる脂質

処理 １．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC]	平均（nmol/g肝臓）	標準偏差（nmol/g肝臓）
１３－Ｂ４３	22.64	5.62
化合物５９	22.67	2.58
化合物５４	17.78	0.68
化合物５７	15.88	1.68
化合物３２	21.66	2.21
化合物４	18.97	2.38
化合物３	7.72	0.77
化合物６０	35.39	5.02
化合物６１	27.21	3.49
化合物６２	20.17	4.14
化合物２３	31.85	2.88
化合物２４	35.16	20.53

【０８２８】

【表１７】

表１７．メスＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）に０．５ｍｇ／ｋｇのルシフェラーゼｍＲＮＡＬＮＰを静脈内投与した６時間後に肝臓にて残留する親イオン化できる脂質

処理 １．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	平均（nmol/g肝臓）	標準偏差（nmol/g肝臓）
１３－Ｂ４３	43.87	15.72
化合物８４	38.96	3.46
化合物８５	37.66	10.20
化合物４３	25.97	12.36
化合物４５	36.39	14.81
化合物４６	47.63	16.10
化合物１７	24.00	7.00
化合物１６	6.32	0.66
化合物１８	17.02	3.14
化合物１９	20.22	6.27
化合物６９	50.57	14.28
化合物５	49.53	33.93
化合物６５	27.84	10.74
化合物７１	27.52	5.53
化合物７２	47.56	12.24

【０８２９】

【表１８】

表１８．メスＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）に０．５ｍｇ／ｋｇのルシフェラーゼｍＲＮＡＬＮＰを静脈内投与した６時間後に肝臓にて残留する親イオン化できる脂質

処理 [１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC]	平均（nmol/g肝臓）	標準偏差（nmol/g肝臓）
１３－Ｂ４３	63.32	7.62
化合物６７	31.32	6.01
化合物１７	36.58	20.51
化合物１６	17.06	3.48
化合物４３	23.83	3.74
化合物７３	31.41	4.58
化合物４７	54.78	9.98
化合物７６	17.86	2.26
化合物７４	17.92	1.40
化合物７５	20.44	3.29
化合物２０	1.82	0.66
化合物３９	2.91	0.72
化合物８７	3.23	0.64
化合物６６	34.35	4.06
化合物３４	1.78	0.65
化合物８８	7.88	1.49
化合物８６	12.79	5.26
化合物７７	30.63	5.83
化合物３８	3.14	2.44

【０８３０】

実施例３３．静脈内投与後の新規イオン化できる脂質を含有するＬＮＰのクリアランス

ＯＴＣ　ｍＲＮＡペイロードおよびさまざまな新規イオン化できる脂質を有するＬＮＰ製剤を、静脈内投与後の肝臓における脂質クリアランスについての評価基準と比較した。投与後の種々の時点で、肝臓にて脂質レベルを評価した。いくつかの新規イオン化できる脂質では、評価基準と比較してさらに速いクリアランス速度が報告された（表１９）。

【０８３１】

【表１９】

表１９．オスＣ５７ＢＬ／６マウス（ｎ＝４）に０．５ｍｇ／ｋｇのヒトＯＴＣ　ｍＲＮＡ ＬＮＰを静脈内投与した後に肝臓にて残留する親イオン化できる脂質

処理 [1.6:54.6:32.8:10.9のLNPモル比、PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC]	投与後経過時間（時間）	平均（nmol/g肝臓）	標準偏差（nmol/g肝臓）
１３－Ｂ４３	0.25	29.17	10.45
	1	46.37	7.13
	3	63.61	9.80
	6	45.23	2.66
	24	40.01	2.93
	168	34.42	3.91
化合物６７	0.25	12.37	1.61
	1	21.11	0.44
	3	16.12	1.48
	6	10.82	2.69
	24	11.31	1.80
	168	0.72	0.20
化合物４３	0.25	22.97	4.05
	1	38.91	6.47
	3	28.99	2.81
	6	24.19	4.79
	24	13.50	3.24
	168	0.19	0.02
化合物１６	0.25	11.11	3.02
	1	15.47	2.03
	3	10.91	1.84
	6	4.71	0.60
	24	1.33	0.43
	168	0.04	0.03
化合物３３	0.25	33.97	5.84
	1	98.57	22.91
	3	76.20	14.36
	6	86.57	8.83
	24	58.68	6.57
	168	6.22	0.46

【０８３２】

実施例３４．新規イオン化できる脂質を含有するＬＮＰ製剤の粒子特性

新規イオン化できる脂質を含有するＬＮＰ製剤はすべて、高い封入効率を持つ安定した粒子を生成した（表２０～２３）。

【０８３３】

【表２０】

表２０．ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ及び新規イオン化できる脂質を含有する生体内投与用のＬＮＰの粒子特性

１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG2000-C-DMA:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	最終生成物	
	Z平均(PDI)nm	%EE
１３－Ｂ４３	75(0.07)	98
化合物８９	83(0.03)	99
化合物９０	79(0.07)	99
化合物９１	85(0.03)	99

【０８３４】
【表２１】

表２１．ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ及び新規イオン化できる脂質を含有する生体内投与用のＬＮＰの粒子特性

１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG2000-C-DMA:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	最終生成物	
	Z平均(PDI)nm	%EE
１３－Ｂ４３	75(0.08)	97
化合物９２	71(0.09)	99
化合物９３	69(0.02)	98
化合物９４	83(0.06)	98
化合物９５	80(0.08)	96
化合物９６	88(0.05)	99
化合物９７	85(0.07)	99
化合物９８	84(0.06)	99
化合物９９	86(0.04)	97
化合物１００	72(0.08)	98
化合物１０１	70(0.10)	100
化合物１０２	67(0.09)	98
化合物１０３	67(0.09)	98

【０８３５】

【表２２】

表２２．ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ及び新規イオン化できる脂質を含有する生体内投与用のＬＮＰの粒子特性

１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG2000-C-DMA:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	最終生成物	
	Z平均(PDI)nm	%EE
１３－Ｂ４３	73(0.08)	97
化合物１０４	74(0.07)	99
化合物１０５	82(0.08)	97
化合物１０６	73(0.13)	95
化合物１０７	76(0.06)	98
化合物１０８	80(0.07)	95
化合物１０９	75(0.10)	98
化合物１１０	67(0.11)	98
化合物１１１	69(0.09)	97
化合物１１２	82(0.08)	95
化合物１１３	72(0.05)	98
化合物１１４	73(0.08)	98
化合物１１５	72(0.04)	98
化合物１１６	75(0.09)	98
化合物１１７	80(0.06)	99
化合物１１８	83(0.06)	98
化合物１１９	73(0.09)	97

【０８３６】
【表２３】

表２３．ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ及び新規イオン化できる脂質を含有する生体内投与用ＬＮＰの粒子特性

１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG2000-C-DMA:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC	最終生成物	
	Z平均(PDI)nm	%EE
１３－Ｂ４３	76(0.15)	98
化合物１２０	69(0.15)	99
化合物１２１	77(0.10)	99
化合物１２２	70(0.13)	100
化合物１２３	73(0.15)	99

【０８３７】

実施例３５．静脈内マウスモデルにおける新規イオン化できる脂質を含有するＬＮＰの性能

ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡペイロードとさまざまな新規イオン化できる脂質を有するＬＮＰ製剤を、静脈内投与後のＥＧＦＰマウスモデルにおける活性についての評価基準対照と比較した。投与の２４時間後、新規脂質製剤は肝臓における高レベルのＥＧＦＰの発現に介在した。いくつかの新規脂質では評価基準と同等またはそれ以上の活性が報告された一方で、他の脂質はこのモデルでは評価基準ほど活性がないが、他のＬＮＰ応用では有用性を有する場合がある（表２４～２７）。

【０８３８】

【表２４】

表２４．ＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）への静脈内投与の２４時間後の、ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ及び種々のイオン化できる脂質を含有する０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰのＥＧＦＰ発現

処理 [１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC]	IV投与の24時間後	
	ＥＧＦＰ（pg/g肝臓）	標準偏差（pg/g肝臓）
１３－Ｂ４３	3.75E+07	1.11E+07
化合物８９	2.01E+07	4.14E+06
化合物９０	2.12E+07	5.94E+06
化合物９１	3.15E+07	1.17E+07

【０８３９】

【表２５】

表２５．ＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）への静脈内投与の２４時間後の、ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ及び種々のイオン化できる脂質を含有する０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰのＥＧＦＰ発現

処理 [１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC]	IV投与の24時間後	
	ＥＧＦＰ（pg/g肝臓）	標準偏差（pg/g肝臓）
１３－Ｂ４３	9.74E+04	4.62E+04
化合物９２	6.34E+05	1.69E+05
化合物９３	1.77E+05	8.03E+04
化合物９４	1.20E+06	5.66E+05
化合物９５	8.76E+05	2.75E+05
化合物９６	1.50E+06	1.60E+05
化合物９７	1.48E+06	3.22E+05
化合物９８	9.76E+05	2.33E+05
化合物９９	1.05E+06	2.26E+05
化合物１００	5.98E+05	2.47E+05
化合物１０１	2.25E+05	3.52E+04
化合物１０２	1.94E+05	1.26E+05
化合物１０３	9.54E+04	9.11E+04

【０８４０】

【表２６】

表２６．ＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）への静脈内投与の２４時間後の、ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ及び種々のイオン化できる脂質を含有する０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰのＥＧＦＰ発現

処理 [１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC]	IV投与の24時間後	
	ＥＧＦＰ（pg/g肝臓）	標準偏差（pg/g肝臓）
１３－Ｂ４３	5.23E+07	1.18E+07
化合物１０４	7.36E+06	1.26E+05
化合物１０５	1.86E+07	3.14E+06
化合物１０６	2.45E+07	5.36E+06
化合物１０７	3.66E+07	6.62E+06
化合物１０８	5.41E+07	1.10E+07
化合物１０９	5.30E+07	5.45E+06
化合物１１０	4.01E－07	4.19E+06
化合物１１１	3.89E+07	2.12E+06
化合物１１２	4.78E+07	8.51E+06
化合物１１３	3.45E+07	6.79E+06
化合物１１４	4.29E+07	1.15E+07
化合物１１５	6.06E+07	9.14E+06
化合物１１６	2.93E+07	8.42E+06
化合物１１７	3.15E+07	2.86E+06
化合物１１８	1.86E+07	1.19E+06
化合物１１９	1.60E+07	1.73E+06

【０８４１】

【表２７】

表２７．ＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）への静脈内投与の２４時間後の、ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ及び種々のイオン化できる脂質を含有する０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰのＥＧＦＰ発現

処理 [１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC]	IV投与の24時間後	
	ＥＧＦＰ（pg/g肝臓）	標準偏差（pg/g肝臓）
１３－Ｂ４３	6.46E+07	1.37E+07
化合物１２０	1.90E+07	5.37E+06
化合物１２１	3.81E+07	6.70E+06
化合物１２２	2.35E+07	4.61E+06
化合物１２３	3.94E+07	4.23E+06

【０８４２】

実施例３６．静脈内投与の２４時間後に肝臓にて検出された親イオン化できる脂質

ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡペイロードおよびさまざまな新規イオン化できる脂質を有するＬＮＰ製剤を、静脈内投与後に肝臓に残留するイオン化できる脂質の量についての評価基準と比較した。投与の２４時間後、いくつかの処理群では、マウス肝臓における新規イオン化できる脂質のレベルが評価基準と比較して低下したと報告された（表２８～３１）。全体として、これらの新規イオン化できる脂質は、対照と比較して優れた活性および/またはクリアランスを示す。

【０８４３】

【表２８】

表２８．メスＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）に０．５ｍｇ／ｋｇのＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ　ＬＮＰを静脈内投与した２４時間後に肝臓にて残留する親イオン化できる脂質

処理 [１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC]	IV投与の24時間後	
	平均（nmol/g肝臓）	標準偏差（nmol/g肝臓）
１３－Ｂ４３	38.48	6.56
化合物８９	4.32	0.80
化合物９０	13.37	0.36
化合物９１	18.58	0.83

【０８４４】

【表２９】

表２９．メスＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）に０．５ｍｇ／ｋｇのＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ　ＬＮＰを静脈内投与した２４時間後に肝臓にて残留する親イオン化できる脂質

処理 [１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC]	IV投与の24時間後	
	平均 (nmol/g肝臓)	標準偏差 (nmol/g肝臓)
１３－Ｂ４３	29.77	4.09
化合物９２	8.83	1.83
化合物９３	24.61	6.54
化合物９４	6.57	1.14
化合物９５	9.44	2.33
化合物９６	17.68	1.69
化合物９７	19.31	1.44
化合物９８	30.21	4.04
化合物９９	19.93	2.90
化合物１００	5.03	1.03
化合物１０１	16.30	1.84
化合物１０２	5.72	1.13
化合物１０３	0.00	0.00

【０８４５】

【表３０】

表３０．メスＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）に０．５ｍｇ／ｋｇのＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ　ＬＮＰを静脈内投与した２４時間後に肝臓にて残留する親イオン化できる脂質

処理 [１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC]	IV投与の24時間後	
	平均 (nmol/g肝臓)	標準偏差 (nmol/g肝臓)
１３－Ｂ４３	50.86	2.51
化合物１０４	51.14	15.83
化合物１０５	18.96	2.32
化合物１０６	56.97	24.23
化合物１０７	28.74	4.34
化合物１０８	3.86	1.02
化合物１０９	7.32	1.44
化合物１１０	33.07	3.52
化合物１１１	17.74	3.63
化合物１１２	1.73	0.32
化合物１１３	4.68	1.48
化合物１１４	12.79	1.71
化合物１１５	27.15	7.40
化合物１１６	60.05	7.75
化合物１１７	49.53	8.08
化合物１１８	62.81	6.24
化合物１１９	25.25	4.12

【０８４６】

【表３１】

表３１．メスＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）に０．５ｍｇ／ｋｇのＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ　ＬＮＰを静脈内投与した２４時間後に肝臓にて残留する親イオン化できる脂質

処理 [１．６：５４．６：３２．８：１０．９のＬＮＰモル比 PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC]	IV投与の24時間後	
	平均 (nmol/g肝臓)	標準偏差 (nmol/g肝臓)
１３－Ｂ４３	23.9	7.13
化合物１２０	4.8	1.33
化合物１２１	2.1	0.68
化合物１２２	6.3	1.25
化合物１２３	10.5	1.23

【０８４７】

実施例３７．静脈内投与後の用量反応試験における新規イオン化できる脂質を含有するＬＮＰの性能

ＥＧＦＰ　ＲＮＡペイロードおよびさまざまな新規イオン化できる脂質を有するＬＮＰ製剤を、静脈内投与後のマウスにおける活性についての評価基準対照と比較した。投与の２４時間後、新規脂質製剤では肝臓におけるＥＧＦＰ発現での用量依存性の上昇が報告された（表３２）。

【表３２】

表３２．メスＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）への静脈内投与の２４時間後でのＥＧＰＦｍＲＮＡ及び種々のイオン化できる脂質を含有するＬＮＰの用量反応

処理 [1.6:54.6:32.8:10.9のLNPモル比： PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC]	ＥＧＦＰ発現（ｎｇ　ＥＧＦＰ／ｇ肝臓）					
	0.3mg/kg	標準偏差	1mg/kg	標準偏差	3mg/kg	標準偏差
１３－Ｂ４３	3.65E+07	6.48E+06	1.88E+08	3.84E+07	4.40E+08	7.11E+07
化合物１０１	2.65E+07	1.11E+07	1.04E+08	2.70E+07	3.90E+08	5.54E+07
化合物１１１	1.34E+07	1.88E+06	8.58E+07	4.87E+06	2.48E+08	2.88E+07
化合物１１５	2.98E+07	2.81E+06	1.31E+08	2.64E+07	3.41E+08	5.46E+07

【０８４８】

実施例３８：静脈内投与後の新規イオン化できる脂質を含有するＬＮＰのクリアランス

ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡペイロードおよびさまざまな新規イオン化できる脂質を有するＬＮＰ製剤を、静脈内投与後の肝臓における脂質クリアランスについての評価基準と比較した。投与後の種々の時点で、肝臓にて脂質レベルを評価した。いくつかの新規イオン化できる脂質では、評価基準と比較してさらに速いクリアランス速度が報告された（表３３）。

【０８４９】
【表３３】

表３３．メスＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝４）に０．５ｍｇ／ｋｇのＥＧＦＰ　ｍＲＮＡ　ＬＮＰを静脈内投与後に肝臓にて残留する親イオン化できる脂質

処理 1.6:54.6:32.8:10.9のLNPモル比： PEG－脂質:イオン化できる脂質:コレステロール:DSPC]	投与後経過時間（時間）	平均 (nmol/g肝臓)	標準偏差 (nmol/g肝臓)
１３－Ｂ４３	0.25	29.8	2427
	1	31.2	1763
	3	40.2	5235
	6	45.2	2210
	24	26.4	688
	168	25.6	1767
化合物１０１	0.25	23.8	3753
	1	42.4	2078
	3	26.9	2103
	6	30.6	718
	24	12.6	1727
	168	0.6	35
化合物１１１	0.25	30.4	1174
	1	43.0	2145
	3	39.1	1934
	6	32.0	1151
	24	12.8	2732
	168	0.0	0
化合物１１５	0.25	36.7	4930
	1	51.3	7591
	3	44.8	4707
	6	45.3	630
	24	0.0	0
	168	1.3	232

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2023/050811

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07C233/36 C07C237/12 C07C243/28 C07C251/76 C07C251/78
C07C259/14 C07C271/22 C07C311/06 C07D295/15 A61K9/00
A61K47/00
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)
C07C C07D A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018/273467 A1 (BENENATO KERRY E [US]) 27 September 2018 (2018-09-27) See the compounds illustrated in table 1; in particular, pages 15-16, 20, 29, 43 and 46.	1-158
X	WO 2020/061367 A1 (MODERNATX INC [US]) 26 March 2020 (2020-03-26) See, e.g. compound 14, page 85;see also compounds on page 102	1-158
X	WO 2019/152557 A1 (MODERNATX INC [US]) 8 August 2019 (2019-08-08) See, e.g. compound I14, page 79	1-158
A	WO 2019/036008 A1 (ACUITAS THERAPEUTICS INC [CA]) 21 February 2019 (2019-02-21) See the compounds exemplified in table 1, pages 33-35.	1-158

☐ 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	Date of mailing of the international search report
2 May 2023	11/05/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Menchaca, Roberto

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2023/050811

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2018273467 A1	27-09-2018	AU 2016324310 A1	12-04-2018
		AU 2021204763 A1	05-08-2021
		CA 2998810 A1	23-03-2017
		DK 3350157 T3	14-02-2022
		EP 3350157 A2	25-07-2018
		EP 3736261 A1	11-11-2020
		ES 2910425 T3	12-05-2022
		HR P20220156 T1	15-04-2022
		HU E057613 T2	28-05-2022
		JP 6948313 B2	13-10-2021
		JP 6948313 B6	10-11-2021
		JP 6948313 B6	14-01-2022
		JP 6948313 B6	08-02-2022
		JP 2018532721 A	08-11-2018
		JP 2022008431 A	13-01-2022
		LT 3350157 T	25-02-2022
		PL 3350157 T3	16-05-2022
		PT 3350157 T	18-03-2022
		RS 63030 B1	29-04-2022
		SI 3350157 T1	29-04-2022
		TW 201718017 A	01-06-2017
		TW 202241844 A	01-11-2022
		US 2017210697 A1	27-07-2017
		US 2017210698 A1	27-07-2017
		US 2017224844 A1	10-08-2017
		US 2017233332 A1	17-08-2017
		US 2018201572 A1	19-07-2018
		US 2018273467 A1	27-09-2018
		US 2019016669 A1	17-01-2019
		US 2020123100 A1	23-04-2020
		US 2022380299 A1	01-12-2022
		WO 2017049245 A2	23-03-2017
WO 2020061367 A1	26-03-2020	CA 3113436 A1	26-03-2020
		EP 3853202 A1	28-07-2021
		JP 2022501360 A	06-01-2022
		US 2022409536 A1	29-12-2022
		WO 2020061367 A1	26-03-2020
WO 2019152557 A1	08-08-2019	AU 2019216307 A1	09-07-2020
		CA 3089117 A1	08-08-2019
		EP 3746052 A1	09-12-2020
		JP 2021512090 A	13-05-2021
		US 2019314291 A1	17-10-2019
		US 2023027864 A1	26-01-2023
		WO 2019152557 A1	08-08-2019
WO 2019036008 A1	21-02-2019	CA 3073020 A1	21-02-2019
		EP 3668833 A1	24-06-2020
		JP 2020531418 A	05-11-2020
		US 2021128488 A1	06-05-2021
		WO 2019036008 A1	21-02-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
A61K	*31/7105(2006.01)*	A61K	31/7105	
A61K	*9/127(2025.01)*	A61K	9/127	
A61K	*31/713(2006.01)*	A61K	31/713	
A61K	*47/28 (2006.01)*	A61K	47/28	
A61K	*47/24 (2006.01)*	A61K	47/24	
A61K	*47/16 (2006.01)*	A61K	47/16	
A61K	*48/00 (2006.01)*	A61K	48/00	
A61P	*31/12 (2006.01)*	A61P	31/12	
A61P	*1/16 (2006.01)*	A61P	1/16	
A61P	*35/00 (2006.01)*	A61P	35/00	
C12N	*15/88 (2006.01)*	C12N	15/88	Z
C12N	*15/113(2010.01)*	C12N	15/113	Z
C12N	*15/11 (2006.01)*	C12N	15/11	Z
A01K	*67/0275(2024.01)*	A01K	67/0275	
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ハー

(72)発明者 ラム，キュー モン
スイス国 ４０５１ バーゼル ヴィアドゥクトシュトラーセ ８ ケアオブ ジェネヴァント サイエンシズ ゲーエムベーハー
(72)発明者 ルーイ，ダイナ
スイス国 ４０５１ バーゼル ヴィアドゥクトシュトラーセ ８ ケアオブ ジェネヴァント サイエンシズ ゲーエムベーハー
(72)発明者 ヘイズ，ジェイムズ
スイス国 ４０５１ バーゼル ヴィアドゥクトシュトラーセ ８ ケアオブ ジェネヴァント サイエンシズ ゲーエムベーハー
(72)発明者 マーティン，アラン
スイス国 ４０５１ バーゼル ヴィアドゥクトシュトラーセ ８ ケアオブ ジェネヴァント サイエンシズ ゲーエムベーハー
(72)発明者 ウッド，マーク
スイス国 ４０５１ バーゼル ヴィアドゥクトシュトラーセ ８ ケアオブ ジェネヴァント サイエンシズ ゲーエムベーハー
(72)発明者 ヂャン，ウェンシュエン
スイス国 ４０５１ バーゼル ヴィアドゥクトシュトラーセ ８ ケアオブ ジェネヴァント サイエンシズ ゲーエムベーハー

Ｆターム（参考） 4B065 AA93X AA93Y AB01 BA05 CA23 CA44
4C076 AA19 AA95 CC16 CC27 CC35 CC41 DD52 DD52N DD63 DD63N DD70 EE23 EE23N EE59 FF34
4C084 AA13 MA05 MA24 NA13 ZA75 ZB26 ZB33
4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA24 NA13 ZA75 ZB26 ZB33
4H006 AA01 AA03 AB20 BJ50 BM10 BM71 BT12 BU32 BV22