



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119136789 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 13

(21) 申请号 202380031621.3

(22) 申请日 2023.03.24

(30) 优先权数据

2022-051913 2022.03.28 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/011843 2023.03.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/190170 JA 2023.10.05

(71) 申请人 日油株式会社

地址 日本国东京都涉谷区惠比寿四丁目20番3号

申请人 国立大学法人千叶大学

(72) 发明人 丹下耕太 中井悠太 秋田英万

田中浩挥 樱井游 山川拓真

佐藤裕果

(74) 专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300

专利代理师 刘煜

(51) Int. Cl.

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 47/14 (2006.01)

A61K 47/20 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 47/28 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

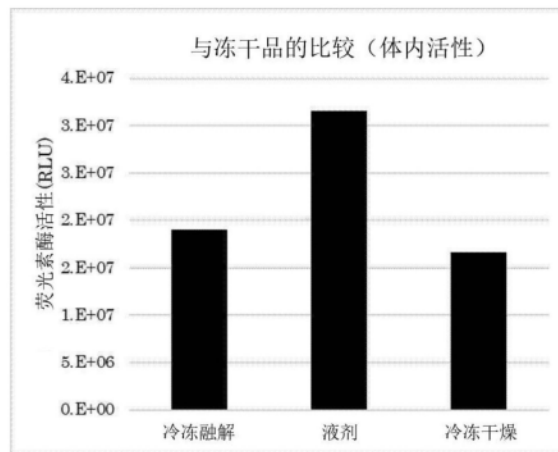
权利要求书2页 说明书99页 附图21页

(54) 发明名称

包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法和包括该制造方法的药物组合物的制造方法,以及将核酸导入细胞内或靶细胞内的方法

(57) 摘要

本发明提供一种可以高效且简便地包封任意核酸的包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法。一种包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法,其包括以下步骤:a)将包含离子性脂质、甾醇和PEG脂质的醇溶液与在pH1~6.5具有缓冲作用的酸性缓冲液混合,制备不含核酸的脂质纳米粒子悬浮液的步骤,以及b)将步骤a中得到的脂质纳米粒子悬浮液不经冷冻干燥地与包含核酸且任选包含0~25v/v%的醇的水溶液混合,任选将混合物在0~95°C下培育0~60分钟,得到包封核酸的脂质纳米粒子的步骤。



1. 一种包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法,其特征在于,包括以下步骤:

a) 将包含离子性脂质、甾醇和PEG脂质的醇溶液与在pH1 ~ 6.5具有缓冲作用的酸性缓冲液混合,制备不含核酸的脂质纳米粒子悬浮液的步骤,以及

b) 将步骤a中得到的脂质纳米粒子悬浮液不经冷冻干燥地与包含核酸且任选包含0 ~ 25v/v%的醇的水溶液混合,任选将混合物在0 ~ 95°C下0 ~ 60分钟,得到包封核酸的脂质纳米粒子的步骤。

2. 根据权利要求1所述的包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法,其在步骤b之后包括以下步骤c:

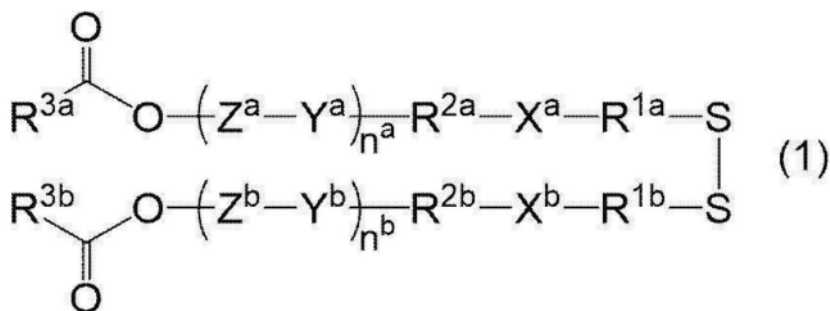
c) 通过透析、超滤或稀释,将得到的包封核酸的脂质纳米粒子的外水相更换为中性缓冲液的步骤。

3. 根据权利要求1或2所述的包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法,其中,在步骤a中,进一步包括:将不含核酸的脂质纳米粒子在-80 ~ 0°C下冷冻后,在0 ~ 95°C下融解的步骤。

4. 根据权利要求1 ~ 3中任一项所述的包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法,其中,在步骤a中,进一步包括:制备脂质纳米粒子悬浮液后,通过透析、超滤或稀释,将外水相更换为在pH1 ~ 6.5具有缓冲作用的其他酸性缓冲液的步骤。

5. 根据权利要求1 ~ 4中任一项所述的包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法,其中,在步骤a中,醇溶液进一步包含磷脂。

6. 根据权利要求1 ~ 5中任一项所述的包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法,其中,离子性脂质是式(1)表示的化合物:



式(1)中,

$\text{R}^{1a}$ 和 $\text{R}^{1b}$ 各自独立地表示碳原子数为1 ~ 6的亚烷基,

$\text{X}^a$ 和 $\text{X}^b$ 各自独立地表示碳原子数为1 ~ 6且叔氨基数为1的非环状烷基叔氨基、或碳原子数为2 ~ 5且叔氨基数为1 ~ 2的环状亚烷基叔氨基,

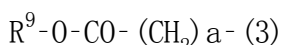
$\text{R}^{2a}$ 和 $\text{R}^{2b}$ 各自独立地表示碳原子数8以下的亚烷基或氧二亚烷基,

$\text{Y}^a$ 和 $\text{Y}^b$ 各自独立地表示酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键、醚键或脲键,

$\text{Z}^a$ 和 $\text{Z}^b$ 各自独立地表示由碳原子数为3 ~ 16且具有至少1个芳香环且具有或不具有杂原子的芳香族化合物衍生的二价基团,

$n^a$ 和 $n^b$ 各自独立地为0或1,

$\text{R}^{3a}$ 和 $\text{R}^{3b}$ 各自独立地表示来自具有羟基的脂溶性维生素与琥珀酸酐或戊二酸酐的反应物的残基、来自具有羟基的甾醇衍生物与琥珀酸酐或戊二酸酐的反应物的残基、碳原子数1 ~ 40的脂肪族烃基、具有环丙烷环的碳原子数3 ~ 40的烷基、或式(3)表示的基团:

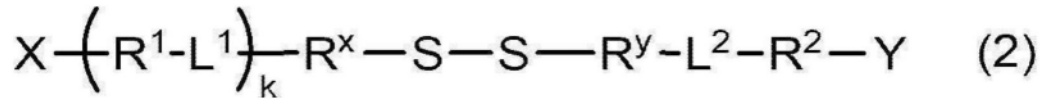


式(3)中,

$R^9$ 表示碳原子数2~20的脂肪族烃基,

a表示2~10的整数。

7. 根据权利要求1~5中任一项所述的包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法,其中,离子性脂质是式(2)表示的化合物:



式中,

X表示包含1个以上叔氮的含氮脂肪族基,

$R^1$ 表示碳原子数为8以下的脂肪族烃基,

$L^1$ 表示酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键、N-烷基氨基甲酸酯键、碳酸酯键或脲键,

k表示0或1,

$R^x$ 和 $R^y$ 各自独立地表示碳原子数为2~5的亚烷基,

$L^2$ 表示酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键、碳酸酯键、醚键或脲键,

$R^2$ 表示碳原子数为8以下的亚烷基或不存在,

Y表示基团,该基团(i)包含1个以上的由具有或不具有杂原子的芳香族化合物衍生的二价基团、并且(ii)在所述二价基团的芳香环上具有包含选自由酯键和碳酸酯键组成的组中的至少1个的基团、并且(iii)包含选自由碳原子数为10~37的脂肪族烃基、脂溶性维生素残基和甾醇衍生物的残基组成的组中的至少1个。

8. 一种将核酸导入细胞内的方法,其包括:使通过权利要求1~7中任一项所述的方法制造的包封核酸的脂质纳米粒子与细胞在生物体外接触的步骤。

9. 一种将核酸导入靶细胞内的方法,其包括:向生物体给予通过权利要求1~7中任一项所述的方法制造的包封核酸的脂质纳米粒子的步骤。

10. 一种药物组合物的制造方法,其包括权利要求1~7中任一项所述的方法。

# 包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法和包括该制造方法的药物组合物的制造方法,以及将核酸导入细胞内或靶细胞内的方法

## 技术领域

[0001] 本发明涉及一种包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法和包括该制造方法的药物组合物的制造方法,以及将核酸导入细胞内或靶细胞内的方法,所述包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法包括在制备不含核酸的脂质纳米粒子后加入核酸的步骤。

## 背景技术

[0002] 为了将使用siRNA等寡核酸的核酸治疗、使用mRNA或pDNA等的基因治疗投入实际应用,需要有效且安全的核酸递送载体。病毒载体是高表达效率的核酸递送载体,但正在开发可以更安全地使用的非病毒核酸递送载体。

[0003] 由于使用具有季铵的阳离子性脂质的阳离子性脂质体带正电荷,因此它们可以与带负电荷的核酸通过静电相互作用形成脂质复合物(lipoplex),从而可以将核酸递送至细胞内。此外,利用季铵与核酸发生静电相互作用,制备不含核酸的阳离子性脂质体的冻干复合物,并通过与核酸的水溶液进行再水合也能够形成脂质复合物,因此显示也可以作为基因导入试剂使用(例如,参照专利文献1和2)。

[0004] 然而,通过这种方法制备的脂质复合物难以控制粒径,并且来自带正电荷的阳离子脂质的细胞毒性成为问题。

[0005] 因此,使用在酸性条件下带正电荷且在中性附近不带电荷的在分子内具有叔胺的离子性脂质的脂质纳米粒子(称为Lipid Nanoparticle或LNP)被开发,其正在成为目前最通常使用的非病毒核酸递送载体(例如,参照非专利文献1)。

[0006] 作为使用分子内具有叔胺的离子性脂质的脂质纳米粒子,也有对离子性脂质赋予分解性基团的例子(例如,参照非专利文献3)。

[0007] 如上所述,已经开发出各种非病毒载体,但核酸通常是不稳定的化合物,因此其作为制剂的稳定性仍然存在问题。

现有技术文献

专利文献

[0008] 专利文献1:日本专利第4919397号公报

专利文献2:日本专利第4598908号公报

专利文献3:日本专利第6093710号公报

专利文献4:国际公布第2017/218704号

专利文献5:国际公布第2021/060440号

非专利文献:

[0009] 非专利文献1:Gene Therapy 6:271-281,1999

非专利文献2:Biol.Pharm.Bull.41,1291-1294(2018)

## 发明内容

### 发明所要解决的问题

[0010] 作为提高作为制剂的稳定性的方法之一,尝试将包封有核酸的脂质纳米粒子冷冻干燥,并在使用时进行再水合,以重构脂质纳米粒子(专利文献4和非专利文献2)。

[0011] 虽然这些方法作为提高包封有特定核酸的脂质纳米粒子的保存稳定性的方法是有用的,但作为更简便地将任意核酸包封在脂质纳米粒子中的方法存在问题。

[0012] 作为简便地将任意核酸包封在脂质纳米粒子中的方法,可以举出如专利文献1和2中记载的方法,制备不含核酸的冻干组合物后再用核酸的水溶液进行再水合的方法。

[0013] 但是,使用在分子内具有叔胺的离子性脂质得到的脂质纳米粒子,由于制备后的表面电荷为弱负电荷至中性,因此不与核酸发生静电相互作用,无法通过专利文献1和2中公开的制备不含核酸的冻干组合物后用核酸水溶液再水合的方法来制备包封核酸的脂质纳米粒子。

[0014] 在这一点上,专利文献5中示出了:在酸性缓冲液中制备不含核酸的脂质纳米粒子,进一步加入冷冻保护剂进行冷冻干燥后,用含核酸的水溶液再水合,由此能够高效且简便地将任意核酸包封在脂质纳米粒子中。

然而,在上述的技术中需要冷冻干燥步骤,因此在简便性的方面尚有改善的余地。

[0015] 本发明鉴于上述问题,其目的在于,提供一种现有技术无法实现的可以高效且简便地包封任意核酸的包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法和包括该制造方法的药物组合物的制造方法,以及将核酸导入细胞内或靶细胞内的方法。

### 解决问题的技术方案

[0016] 本发明人鉴于上述问题,经过不懈努力,结果发现,在酸性缓冲液中制备不含核酸的脂质纳米粒子并添加含核酸的水溶液,由此可以高效且简便地将任意核酸包封在脂质纳米粒子中。此外,使用通过本方法制备的脂质纳米粒子向细胞进行基因导入实验,意外发现,与现有技术相比,基因导入效率提高,从而完成了本发明。

[0017] 即,本发明包括以下内容:

[1]一种包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法,其包括以下步骤:

a) 将包含离子性脂质、甾醇和PEG脂质的醇溶液与在pH1~6.5具有缓冲作用的酸性缓冲液混合,制备不含核酸的脂质纳米粒子悬浮液的步骤,以及

b) 将步骤a中得到的脂质纳米粒子悬浮液不经冷冻干燥地与包含核酸且任选包含0~25v/v%的醇的水溶液混合,任选将混合物在0~95℃下培育0~60分钟,得到包封核酸的脂质纳米粒子的步骤。

[0018] [2]根据[1]所述的包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法,其在步骤b之后包括以下步骤c:

c) 通过透析、超滤或稀释,将得到的包封核酸的脂质纳米粒子的外水相更换为中性缓冲液的步骤。

[0019] [3]根据[1]或[2]所述的包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法,其中,在步骤a中,进一步包括:将不含核酸的脂质纳米粒子在-80~0℃下冷冻后,在0~95℃下融解的步骤。

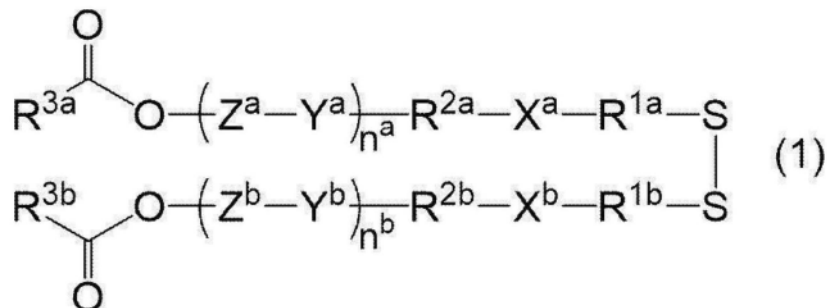
[0020] [4]根据[1]~[3]中任一项所述的包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法,其中,在步骤a中,进一步包括:制备脂质纳米粒子悬浮液后,通过透析、超滤或稀释,将外水相更换

为在pH1 ~ 6.5具有缓冲作用的其他酸性缓冲液的步骤。

[0021] [5]根据[1] ~ [4]中任一项所述的包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法,其中,在步骤a中,醇溶液进一步包含磷脂。

[0022] [6]根据[1] ~ [5]中任一项所述的包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法,其中,离子性脂质是式(1)表示的化合物。

[0023] [化学式1]



[0024] (式(1)中,

$\text{R}^{1a}$ 和 $\text{R}^{1b}$ 各自独立地表示碳原子数为1 ~ 6的亚烷基,

$\text{X}^a$ 和 $\text{X}^b$ 各自独立地表示碳原子数为1 ~ 6且叔氨基数为1的非环状烷基叔氨基、或碳原子数为2 ~ 5且叔氨基数为1 ~ 2的环状亚烷基叔氨基,

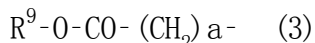
$\text{R}^{2a}$ 和 $\text{R}^{2b}$ 各自独立地表示碳原子数8以下的亚烷基或氧二亚烷基,

$\text{Y}^a$ 和 $\text{Y}^b$ 各自独立地表示酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键、醚键或脲键,

$\text{Z}^a$ 和 $\text{Z}^b$ 各自独立地表示由碳原子数为3 ~ 16且具有至少1个芳香环且可具有杂原子的芳香族化合物衍生的二价基团,

$n^a$ 和 $n^b$ 各自独立地为0或1,

$\text{R}^{3a}$ 和 $\text{R}^{3b}$ 各自独立地表示来自具有羟基的脂溶性维生素与琥珀酸酐或戊二酸酐的反应物的残基、来自具有羟基的甾醇衍生物与琥珀酸酐或戊二酸酐的反应物的残基、碳原子数1 ~ 40的脂肪族烃基、具有环丙烷环的碳原子数3 ~ 40的烷基、或式(3)表示的基团:



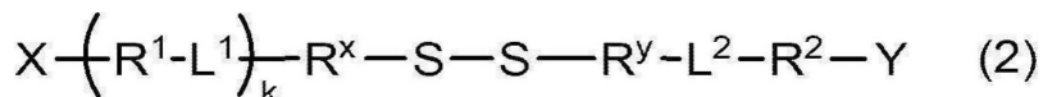
(式(3)中,

$\text{R}^9$ 表示碳原子数2 ~ 20的脂肪族烃基,

$a$ 表示2 ~ 10的整数。))。

[0025] [7]根据[1] ~ [5]中任一项所述的包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法,其中,离子性脂质是式(2)表示的化合物。

[0026] [化学式2]



[0027] (式中,

$\text{X}$ 表示包含1个以上叔氮的含氮脂肪族基,

$\text{R}^1$ 表示碳原子数为8以下的脂肪族烃基,

$\text{L}^1$ 表示酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键、N-烷基氨基甲酸酯键、碳酸酯键或脲键,

$k$ 表示0或1,

$R^x$ 和 $R^y$ 各自独立地表示碳原子数为2~5的亚烷基,  
 $L^2$ 表示酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键、碳酸酯键、醚键或脲键,  
 $R^2$ 表示碳原子数为8以下的亚烷基或不存在,

Y表示基团,该基团(i)包含1个以上的由可具有杂原子的芳香族化合物衍生的二价基团、并且(ii)在所述二价基团的芳香环上具有包含选自由酯键和碳酸酯键组成的组中的至少1个的基团、并且(iii)包含选自由碳原子数为10~37的脂肪族烃基、脂溶性维生素残基和甾醇衍生物的残基组成的组中的至少1个。)

[0028] [8]一种将核酸导入细胞内的方法,其包括:使通过[1]~[7]中任一项所述的方法制造的包封核酸的脂质纳米粒子与细胞在生物体外接触的步骤。

[0029] [9]一种将核酸导入靶细胞内的方法,其包括:向生物体给予通过[1]~[7]中任一项所述的方法制造的包封核酸的脂质纳米粒子的步骤。

[0030] [10]一种药物组合物的制造方法,其包括[1]~[7]中任一项所述的方法。

发明效果

[0031] 在本发明的包封核酸的脂质纳米粒子的制造方法中,由于在制备不含核酸的脂质纳米粒子后不经冷冻干燥地添加核酸水溶液,因此能够高效且简便地制造包封有任意核酸的脂质纳米粒子。此外,与现有技术相比,使用本发明的制造方法制备的包封核酸的脂质纳米粒子的核酸导入效率高,有利于细胞或生物体中的基因导入,特别是作为药物组合物是有用的。

## 附图说明

[0032] 图1是评价缓冲液对包封率的影响的图。

图2是评价缓冲液对粒径的影响的图。

图3是评价蔗糖浓度和培育温度对包封率的影响的图。培育温度以 $^{\circ}\text{C}$ 表示。

图4是评价蔗糖浓度和培育温度对粒径的影响的图。培育温度以 $^{\circ}\text{C}$ 表示。

图5是评价蔗糖浓度和培育温度对体外活性的影响的图。培育温度以 $^{\circ}\text{C}$ 表示。

图6是评价培育时间对包封率的影响的图。

图7是评价培育时间对粒径的影响的图。

图8是评价培育时间对体外活性的影响的图。

图9是表示图8的曲线下面积(AUC)的图。

图10是评价缓冲液的pH对包封率的影响的图。

图11是评价缓冲液的pH对粒径的影响的图。

图12是评价缓冲液的盐浓度对包封率的影响的图。

图13是评价缓冲液的盐浓度对粒径的影响的图。

图14是比较本发明的包封核酸的纳米粒子与冻干品的包封率的图。

图15是比较本发明的包封核酸的纳米粒子与冻干品的粒径的图。

图16是比较本发明的包封核酸的纳米粒子与冻干品的体外活性的图。

图17是表示图16的曲线下面积(AUC)的图。

图18是比较本发明的包封核酸的纳米粒子与冻干品的体内活性的图。

图19是评价混合比和混合方式对包封率的影响的图。

图20是评价混合比和混合方式对粒径的影响的图。

图21是评价混合比和混合方式对体外活性的影响的图。

图22是评价缓冲液对包封率的影响的图。

图23是评价缓冲液对粒径的影响的图。

图24是评价培育温度对包封率的影响的图。

图25是评价培育温度对粒径的影响的图。

图26是评价培育温度对体外活性的影响的图。

图27是评价培育时间对包封率的影响的图。

图28是评价培育时间对粒径的影响的图。

图29是评价培育时间对体外活性的影响的图。

图30是评价缓冲液的pH对包封率的影响的图。

图31是评价缓冲液的pH对粒径的影响的图。

图32是评价缓冲液的pH对体外活性的影响的图。

图33是表示mRNA混合时pH与各pH中的Zeta电位的关系的图。

图34是评价缓冲液的盐浓度对包封率的影响的图。

图35是评价缓冲液的盐浓度对粒径的影响的图。

图36是比较本发明的包封核酸的纳米粒子与冻干品的包封率的图。

图37是比较本发明的包封核酸的纳米粒子与冻干品的粒径的图。

图38是比较本发明的包封核酸的纳米粒子与冻干品的体内活性的图。

图39是比较本发明的包封核酸的纳米粒子与通过微通道制备的包封核酸的纳米粒子(MF)的包封率的图。

图40是表示通过微通道制备的包封核酸的纳米粒子(MF)中的表达分布的图。

图41是表示本发明的包封核酸的纳米粒子中的表达分布的图。

图42是比较本发明的包封核酸的纳米粒子与冻干品的体外活性的图。

## 具体实施方式

[0033] 以下,对本发明的实施方式进行说明,但本发明不限于此。

[0034] 本发明涉及将不含核酸而含离子性脂质、甾醇和PEG脂质的脂质溶液与在pH1~6.5具有缓冲作用的酸性缓冲液混合来制备不含核酸的脂质纳米粒子后,添加核酸水溶液,由此制造包封核酸的脂质纳米粒子的方法。

[0035] 脂质纳米粒子是指具有两亲性脂质的亲水基团朝向界面的水相侧排列的膜结构的粒子。“两亲性脂质”是指具有表现出亲水性的亲水性基团和表现出疏水性的疏水性基团这个两者的脂质。作为两亲性脂质,例如可举出:离子性脂质、磷脂、PEG脂质等。

本发明中使用的脂质纳米粒子中,作为膜的构成物质,含有离子性脂质、甾醇和PEG脂质,还可以含有磷脂。脂质纳米粒子的粒径没有特别限制,优选为10nm~500nm,更优选为30nm~300nm。粒径的测定例如可以使用Zetasizer Nano(Malvern公司)等粒径分布测定装置来进行。脂质纳米粒子的粒径可以通过脂质纳米粒子的制造方法进行适当调整。在本发明中,粒径是指通过动态光散射法测定的平均粒径(个数平均)。

在本发明中,“总脂质”是指脂质的总量。作为脂质,可举出:离子性脂质、甾醇、PEG

脂质、磷脂。

在本发明中，“不含核酸”或“无核酸”是指实质上不含核酸，是指核酸的含量在检测限以下。

在本发明中，“包封核酸的脂质纳米粒子”是指在脂质纳米粒子的内部包封有核酸的脂质纳米粒子。

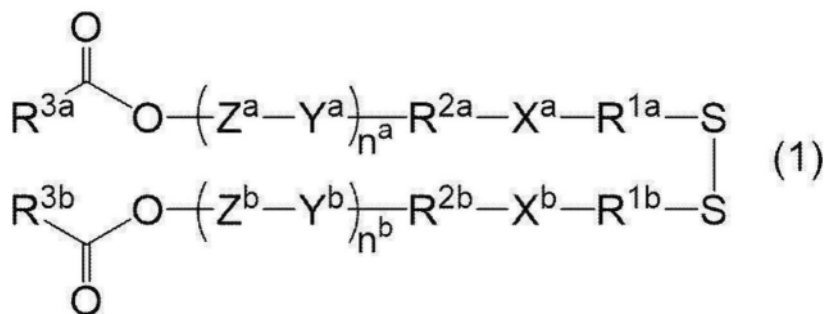
#### [0036] 离子性脂质

作为本发明中可以使用的离子性脂质，只要是由叔氨基和疏水基团构成，并且可以构成脂质纳米粒子即可。

作为离子性脂质的具体例，可举出：1,2-二油酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DODAP)、1,2-二油氧基-3-二甲基氨基丙烷(DODMA)、1,2-二亚油酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLi正KC2-DMA)、4-(二甲基氨基)丁酸-三十七碳-6,9,28,31-四稀-19-基酯(称为DLi正MC3-DMA或MC3)、8-((2-羟乙基)(8-(壬氧基)-8-氧代辛基)氨基)辛酸十七碳-9-基酯(脂质5)、8-((2-羟乙基)(6-氧代-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸十七碳-9-基酯(脂质8)、下式(1)或式(2)的化合物，优选下式(1)或式(2)的化合物、DODMA、MC3、脂质5、脂质8，最优选为下述式(1)或式(2)的化合物。

式(1)

#### [0037] [化学式3]



#### [0038] (式(1)中，

$\text{R}^{1a}$ 和 $\text{R}^{1b}$ 各自独立地表示碳原子数为1~6的亚烷基，

$\text{X}^a$ 和 $\text{X}^b$ 各自独立地表示碳原子数为1~6且叔氨基数为1的非环状烷基叔氨基、或碳原子数为2~5且叔氨基数为1~2的环状亚烷基叔氨基，

$\text{R}^{2a}$ 和 $\text{R}^{2b}$ 各自独立地表示碳原子数8以下的亚烷基或氧二亚烷基，

$\text{Y}^a$ 和 $\text{Y}^b$ 各自独立地表示酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键、醚键或脲键，

$\text{Z}^a$ 和 $\text{Z}^b$ 各自独立地表示由碳原子数为3~16且具有至少1个芳香环且可具有杂原子的芳香族化合物衍生的二价基团，

$n^a$ 和 $n^b$ 各自独立地为0或1，

$\text{R}^{3a}$ 和 $\text{R}^{3b}$ 各自独立地表示来自具有羟基的脂溶性维生素与琥珀酸酐或戊二酸酐的反应物的残基、来自具有羟基的甾醇衍生物与琥珀酸酐或戊二酸酐的反应物的残基、碳原子数1~40的脂肪族烃基、具有环丙烷环的碳原子数3~40的烷基、或式(3)表示的基团。

$\text{R}^9 - \text{O} - \text{CO} - (\text{CH}_2)_a - (3)$

(式(3)中，

$R^9$ 表示碳原子数2~20的脂肪族烃基,  
a表示2~10的整数。))

[0039]  $R^{1a}$ 和 $R^{1b}$ 各自独立地表示碳原子数为1~6的亚烷基,可以为直链状,也可以具有支链,优选直链状。该亚烷基的碳原子数优选为1~4,更优选为1~2。作为碳原子数1~6的亚烷基,具体地可举出:亚甲基、亚乙基、三亚甲基、异亚丙基、四亚甲基、异亚丁基、五亚甲基、亚新戊基等。 $R^{1a}$ 和 $R^{1b}$ 优选各自独立地为亚甲基、亚乙基、三亚甲基、异亚丙基或四亚甲基,最优选各自为亚乙基。

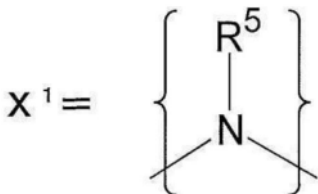
[0040]  $R^{1a}$ 可以与 $R^{1b}$ 相同也可以不同,但优选 $R^{1a}$ 是与 $R^{1b}$ 相同的基团。

[0041]  $X^a$ 和 $X^b$ 各自独立地表示碳原子数为1~6且叔氨基数为1的非环状烷基叔氨基、或碳原子数为2~5且叔氨基数为1~2的环状亚烷基叔氨基,优选各自独立地为碳原子数为2~5且叔氨基数为1~2的环状亚烷基叔氨基。

[0042] 碳原子数为1~6且叔氨基数为1的非环状烷基叔氨基中的碳原子数1~6的烷基可以是直链状,也可以是支链状,还可以是环状。该烷基的碳原子数优选为1~3。作为碳原子数1~6的烷基,具体地可举出:甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、1,2-二甲基丙基、2-甲基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、环己基等,优选甲基、乙基、丙基或异丙基,最优选甲基。

[0043] 碳原子数为1~6且叔氨基数为1的非环状烷基叔氨基的优选的具体结构以 $X^1$ 表示。

[0044] [化学式4]

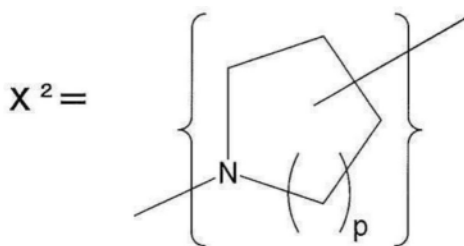


[0045]  $X^1$ 的 $R^5$ 表示碳原子数1~6的烷基,可以是直链状,也可以是支链状,还可以是环状。该烷基的碳原子数优选1~3。作为碳原子数1~6的烷基,具体地可举出:甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、1,2-二甲基丙基、2-甲基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、环己基等。优选甲基、乙基、丙基或异丙基,最优选甲基。

[0046] 碳原子数为2~5且叔氨基数为1~2的环状亚烷基叔氨基中的碳原子数优选为4~5。作为碳原子数为2~5且叔氨基数为1~2的环状亚烷基叔氨基,具体为亚氮丙啶基、亚氮杂环丁基、亚吡咯烷基、亚哌啶基、亚咪唑啉基、亚哌嗪基,优选亚吡咯烷基、亚哌啶基、亚哌嗪基,最优选亚哌啶基。

[0047] 碳原子数为2~5且叔氨基数为1的环状亚烷基叔氨基的优选的具体结构以 $X^2$ 表示。

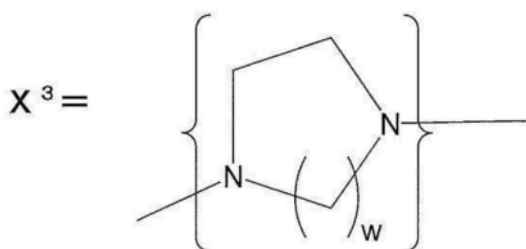
[0048] [化学式5]



[0049]  $X^2$ 的 $p$ 为1或2。 $p$ 为1时, $X^2$ 为亚吡咯烷基, $p$ 为2时, $X^2$ 为亚哌啶基。优选 $p$ 为2。

[0050] 碳原子数为2~5且叔氨基数为2的环状亚烷基叔氨基的优选的具体结构以 $X^3$ 表示。

[0051] [化学式6]



[0052]  $X^3$ 的 $w$ 为1或2。 $w$ 为1时, $X^3$ 为亚咪唑啉基, $w$ 为2时, $X^3$ 为亚哌嗪基。

[0053]  $X^a$ 可以与 $X^b$ 相同也可以不同,但优选 $X^a$ 与 $X^b$ 是相同的基团。

[0054]  $R^{2a}$ 和 $R^{2b}$ 各自独立地表示碳原子数8以下的亚烷基或氧二亚烷基,优选各自独立地为碳原子数8以下的亚烷基。

[0055] 碳原子数8以下的亚烷基可以为直链状,也可以具有支链,但优选直链状。该亚烷基中包含的碳原子数优选为6以下,最优选为4以下。作为碳原子数8以下的亚烷基,具体地可举出:亚甲基、亚乙基、三亚甲基、异亚丙基、四亚甲基、异亚丁基、五亚甲基、六亚甲基、七亚甲基、八亚甲基等,优选亚甲基、亚乙基、三亚甲基、四亚甲基,最优选亚乙基。

[0056] 在本说明书中,“碳原子数8以下的氧二亚烷基”是经由醚键连结的亚烷基(亚烷基-0-亚烷基,换而言之“亚烷基氧亚烷基”),是指存在的2个亚烷基的碳原子数的总和为8以下的基团。其中,存在的2个亚烷基可以相同,也可以不同,但优选相同。作为碳原子数8以下的氧二亚烷基,具体地可举出:氧二亚甲基、氧二亚乙基、氧二(三亚甲基)基(即三亚甲基氧三亚甲基)、氧二(四亚甲基)基(即四亚甲基氧四亚甲基)等。优选氧二亚甲基、氧二亚乙基、氧二(三亚甲基)基,最优选氧二亚乙基。

[0057]  $R^{2a}$ 可以与 $R^{2b}$ 相同也可以不同,但优选 $R^{2a}$ 是与 $R^{2b}$ 相同的基团。

[0058]  $Y^a$ 和 $Y^b$ 各自独立地为酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键、醚键或脲键,优选各自独立地为酯键、酰胺键或氨基甲酸酯键,更优选各自独立地为酯键或酰胺键,最优选各自为酯键。 $Y^a$ 和 $Y^b$ 的键合方向没有限制,但在 $Y^a$ 和 $Y^b$ 为酯键的情况下,优选呈现 $-Z^a-CO-O-R^{2a}-$ 和 $-Z^b-CO-O-R^{2b}-$ 的结构。

[0059]  $Y^a$ 可以与 $Y^b$ 相同也可以不同,但优选 $Y^a$ 是与 $Y^b$ 相同的基团。

[0060]  $Z^a$ 和 $Z^b$ 各自独立地表示由碳原子数为3~16且具有至少1个芳香环且可具有杂原子的芳香族化合物衍生的二价基团。该芳香族化合物中包含的碳原子数优选为6~12,最优选为6~7。此外,该芳香族化合物中包含的芳香环优选为1个。

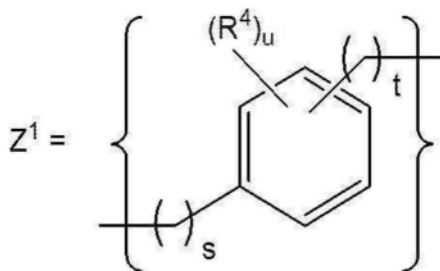
[0061] 作为碳原子数3~16的芳香族化合物中包含的芳香环的种类,关于芳香族烃环,可

举出:苯环、萘环、蒽环,关于芳香族杂环,可举出:咪唑环、吡唑环、噁唑环、异噁唑环、噻唑环、异噻唑环、三嗪环、吡咯环、呋喃并噻吩环、嘧啶环、哒嗪环、吡嗪环、吡啶环、嘌呤环、蝶啶环、苯并咪唑环、吲哚环、苯并呋喃环、喹啉环、酞嗪环、喹啉环、异喹啉环、香豆素环、色酮环、苯并二氮卓环、吩噻嗪环、吩噻嗪环、吡啶环等,优选苯环、萘环、蒽环,最优选苯环。

[0062] 芳香环可具有取代基,作为其取代基,可举出:碳原子数2~4的酰基、碳原子数2~4的烷氧基羰基、碳原子数2~4的氨基甲酰基、碳原子数2~4的酰氧基、碳原子数2~4的酰氨基、碳原子数2~4的烷氧基羰基氨基、氟原子、氯原子、溴原子、碘原子、碳原子数1~4的烷基对氨基苯磺酰基、碳原子数1~4的烷基磺酰基、碳原子数6~10的芳基磺酰基、硝基、三氟甲基、氰基、碳原子数1~4的烷基、碳原子数1~4的脲基、碳原子数1~4的烷氧基、碳原子数6~10的芳基、碳原子数6~10的芳氧基等,作为优选例,可举出:乙酰基、甲氧基羰基、甲基氨基甲酰基、乙酰氧基、乙酰胺基、甲氧基羰基氨基、氟原子、氯原子、溴原子、碘原子、甲基对氨基苯磺酰基、苯基磺酰基、硝基、三氟甲基、氰基、甲基、乙基、丙基、异丙基、叔丁基、脲基、甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、叔丁氧基、苯基和苯氧基等。

[0063] 作为 $Z^a$ 和 $Z^b$ 的优选的具体结构,可举出 $Z^1$ 。

[0064] [化学式7]



[0065] 式中, $s$ 表示0~3的整数, $t$ 表示0~3的整数, $u$ 表示0~4的整数, $u$ 个 $R^4$ 各自独立地表示取代基。

[0066]  $Z^1$ 的 $s$ 优选为0~1的整数,更优选为0。

$Z^1$ 的 $t$ 优选为0~2的整数,更优选为1。

$Z^1$ 的 $u$ 优选为0~2的整数,更优选为0~1的整数。

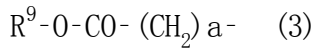
[0067]  $Z^1$ 的 $R^4$ 是不抑制该离子性脂质的合成过程中反应的碳原子数3~16的芳香族化合物中包含的芳香环(苯环)的取代基。作为该取代基,可举出:碳原子数2~4的酰基、碳原子数2~4的烷氧基羰基、碳原子数2~4的氨基甲酰基、碳原子数2~4的酰氧基、碳原子数2~4的酰氨基、碳原子数2~4的烷氧基羰基氨基、氟原子、氯原子、溴原子、碘原子、碳原子数1~4的烷基对氨基苯磺酰基、碳原子数1~4的烷基磺酰基、碳原子数6~10的芳基磺酰基、硝基、三氟甲基、氰基、碳原子数1~4的烷基、碳原子数1~4的脲基、碳原子数1~4的烷氧基、碳原子数6~10的芳基、碳原子数6~10的芳氧基等,作为优选例,可举出:乙酰基、甲氧基羰基、甲基氨基甲酰基、乙酰氧基、乙酰胺基、甲氧基羰基氨基、氟原子、氯原子、溴原子、碘原子、甲基对氨基苯磺酰基、苯基磺酰基、硝基、三氟甲基、氰基、甲基、乙基、丙基、异丙基、叔丁基、脲基、甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、叔丁氧基、苯基和苯氧基等。在多个 $R^4$ 存在的情况下,各 $R^4$ 可以相同,也可以不同。

[0068]  $Z^a$ 可以与 $Z^b$ 相同也可以不同,但优选 $Z^a$ 是与 $Z^b$ 相同的基团。

[0069]  $n^a$ 和 $n^b$ 各自独立地为0或1。

[0070]  $n^a$ 可以与 $n^b$ 相同也可以不同,但优选 $n^a$ 与 $n^b$ 相同。

[0071]  $R^{3a}$ 和 $R^{3b}$ 各自独立地表示来自具有羟基的脂溶性维生素与琥珀酸酐或戊二酸酐的反应物的残基、来自具有羟基的甾醇衍生物与琥珀酸酐或戊二酸酐的反应物的残基、碳原子数1~40的脂肪族烃基、具有环丙烷环的碳原子数3~40的烷基、或式(3):



(式(3)中,

$R^9$ 表示碳原子数2~20的脂肪族烃基,

$a$ 表示2~10的整数。)表示的基团,优选各自独立地为来自具有羟基的脂溶性维生素与琥珀酸酐或戊二酸酐的反应物的残基、或碳原子数12~22的脂肪族烃基,最优选各自独立地为碳原子数12~22的脂肪族烃基。

[0072] 来自具有羟基的脂溶性维生素与琥珀酸酐或戊二酸酐的反应物的残基表示具有如下结构的基团:具有羟基的脂溶性维生素的羟基被\*-O-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-或\*-O-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-取代。\*表示与脂溶性维生素的键合位置。来自具有羟基的甾醇衍生物与琥珀酸酐或戊二酸酐的反应物的残基表示具有如下结构的基团:具有羟基的甾醇衍生物的羟基被\*-O-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-或\*-O-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-取代。\*表示与甾醇衍生物的键合位置。

[0073] 作为具有羟基的脂溶性维生素,例如可举出:视黄醇、麦角甾醇、7-脱氢胆固醇、钙化醇、胆钙化醇、二氢麦角钙化醇、二氢速甾醇、生育酚、生育三烯酚等。具有羟基的脂溶性维生素优选生育酚。

[0074] 作为具有羟基的甾醇衍生物,例如可举出:胆固醇、胆甾醇、豆甾醇、 $\beta$ -谷甾醇、羊毛甾醇和麦角甾醇等,优选胆固醇或胆甾醇。

[0075] 碳原子数1~40的脂肪族烃基可以为直链状,也可以具有支链。该脂肪族烃基可以是饱和的,也可以是不饱和的。在不饱和脂肪族烃基的情况下,该脂肪族烃基中包含的不饱和键数通常为1~6个,优选为1~3个,更优选为1~2个。不饱和键包括碳-碳双键和碳-碳三键,但优选碳-碳双键。该脂肪族烃基中包含的碳原子数优选为12~22,更优选为13~19,最优选为13~17。脂肪族烃基包括烷基、烯基、炔基等,但优选包括烷基或烯基。作为碳原子数1~40的脂肪族烃基,具体地可举出:甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基、二十一烷基、二十二烷基、二十三烷基、二十四烷基、二十五烷基、二十六烷基、二十七烷基、二十八烷基、二十九烷基、三十烷基、四十烷基、十二碳烯基、十三碳烯基、十四碳烯基、十五碳烯基、十六碳烯基、十七碳烯基、十八碳烯基、十九碳烯基、二十碳烯基、二十一碳烯基、二十二碳烯基、十二碳二烯基、十三碳二烯基、十四碳二烯基、十五碳二烯基、十六碳二烯基、十七碳二烯基、十八碳二烯基、十九碳二烯基、二十碳二烯基、二十一碳二烯基、二十二碳二烯基、十八碳三烯基、二十碳三烯基、二十碳四烯基、二十碳五烯基、二十碳六烯基、异硬脂基、1-己基庚基、1-己基壬基、1-辛基壬基、1-辛基十一烷基、1-癸基十一烷基等。碳原子数1~40的脂肪族烃基优选十三烷基、十五烷基、十七烷基、十九烷基、十七碳烯基、十七碳二烯基、1-己基壬基,特别优选十三烷基、十七烷基、十七碳烯基、十七碳二烯基。

[0076] 在本发明的一个实施方式中, $R^{3a}$ 和 $R^{3b}$ 表示的碳原子数1~40(优选碳原子数12~22)的脂肪族烃基来自脂肪酸。在该情况下,来自脂肪酸的羰基碳包含在式(1)中的-CO-O-

中。作为脂肪族烃基的具体例,在使用亚油酸作为脂肪酸的情况下,为十七碳二烯基,在使用油酸作为脂肪酸的情况下,为十七碳烯基。

[0077]  $R^{3a}$ 和 $R^{3b}$ 中的具有环丙烷环的碳原子数3~40的烷基是指烷基链中具有至少1个环丙烷环的碳原子数3~40的烷基。烷基的碳原子数3~40不包括环丙烷环的碳原子数。该烷基所具有的环丙烷环数优选为1个。 $R^{3a}$ 和 $R^{3b}$ 中的具有环丙烷环的碳原子数3~40的烷基优选式(4)表示的基团。

[0078] [化学式8]



[0079] (式(4)中,b和c各自独立地为整数,b和c的总和为2~39。)

优选b为1~20的整数,c为1~19的整数。b更优选为2~18的整数,进一步优选为3~17的整数,更进一步优选为4~12的整数。c更优选为3~15的整数,进一步优选为3~11的整数,更进一步优选为3~9的整数。作为式(4)表示的基团,例如可举出:7-(2-辛基环丙基)庚基等。

[0080] 在式(3)中, $R^9$ 表示的碳原子数2~20的脂肪族烃基可以为直链状,也可以具有支链。该脂肪族烃基可以是饱和的,也可以是不饱和的。在不饱和脂肪族烃基的情况下,该脂肪族烃基中包含的不饱和键数通常为1~6个,优选为1~3个,更优选为1~2个。不饱和键包括碳-碳双键和碳-碳三键,但优选碳-碳双键。该脂肪族烃基中包含的碳原子数优选为8~20,更优选为9~19,进一步优选为13~19,最优选为13~17。脂肪族烃基包括烷基、烯基、炔基等,但优选包括烷基或烯基,更优选烷基。作为碳原子数2~20的脂肪族烃基,具体地可举出:甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基、十二碳烯基、十三碳烯基、十四碳烯基、十五碳烯基、十六碳烯基、十七碳烯基、十八碳烯基、十九碳烯基、二十碳烯基、二十一碳烯基、二十二碳烯基、十二碳二烯基、十三碳二烯基、十四碳二烯基、十五碳二烯基、十六碳二烯基、十七碳二烯基、十八碳二烯基、十九碳二烯基、二十碳二烯基、二十碳三烯基、二十碳四烯基、二十碳五烯基、异硬脂基、1-己基庚基、1-乙基壬基、1-丁基壬基、1-己基壬基、1-辛基壬基、1-辛基十一烷基、3-辛基十一烷基等。碳原子数2~20的脂肪族烃基优选十三烷基、十五烷基、十七烷基、十九烷基、十七碳烯基、十七碳二烯基、1-己基壬基,特别优选十三烷基、十七烷基、十七碳烯基、十七碳二烯基。

[0081] 在式(3)中,a优选为3~9的整数,更优选为3~7的整数,进一步优选为5~7的整数,最优选为5或7。

[0082]  $R^{3a}$ 可以与 $R^{3b}$ 相同也可以不同,但优选 $R^{3a}$ 是与 $R^{3b}$ 相同的基团。

[0083] 在本发明的一个实施方式中, $R^{1a}$ 与 $R^{1b}$ 相同, $X^a$ 与 $X^b$ 相同, $R^{2a}$ 与 $R^{2b}$ 相同, $Y^a$ 与 $Y^b$ 相同, $Z^a$ 与 $Z^b$ 相同, $R^{3a}$ 与 $R^{3b}$ 相同。

[0084] 作为式(1)表示的离子性脂质(本说明书中有时简称为“离子性脂质(1)”)的优选例,可举出以下的离子性脂质。

[离子性脂质(1-1)]

离子性脂质(1),其中,

$R^{1a}$ 和 $R^{1b}$ 各自独立地为碳原子数1~6的亚烷基(例如亚甲基、亚乙基);

$X^a$ 和 $X^b$ 各自独立地为碳原子数为1~6且叔氨基数为1的非环状烷基叔氨基(例如-N(CH<sub>3</sub>)-)、或碳原子数为2~5且叔氨基数为1~2的环状亚烷基叔氨基(例如亚哌啶基);

$R^{2a}$ 和 $R^{2b}$ 各自独立地为碳原子数8以下的亚烷基(例如亚甲基、亚乙基、三亚甲基);

$Y^a$ 和 $Y^b$ 各自独立地为酯键或酰胺键;

$Z^a$ 和 $Z^b$ 各自独立地为由碳原子数为3~16且具有至少1个芳香环且可具有杂原子的芳香族化合物衍生的二价基团(例如-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-);

$n^a$ 和 $n^b$ 各自独立地为0或1;

$R^{3a}$ 和 $R^{3b}$ 各自独立地为来自具有羟基的脂溶性维生素(例如生育酚)与琥珀酸酐或戊二酸酐的反应物的残基、或碳原子数12~22的脂肪族烃基(例如十七碳烯基、十七碳二烯基、1-己基壬基)。

[0085] [离子性脂质(1-2)]

离子性脂质(1),其中,

$R^{1a}$ 和 $R^{1b}$ 各自独立地为碳原子数1~4的亚烷基(例如亚甲基、亚乙基);

$X^a$ 和 $X^b$ 各自独立地为碳原子数为1~3且叔氨基数为1的非环状烷基叔氨基(例如-N(CH<sub>3</sub>)-)、或碳原子数为2~5且叔氨基数为1的环状亚烷基叔氨基(例如亚哌啶基);

$R^{2a}$ 和 $R^{2b}$ 各自独立地为碳原子数6以下的亚烷基(例如亚甲基、亚乙基、三亚甲基);

$Y^a$ 和 $Y^b$ 各自独立地为酯键或酰胺键;

$Z^a$ 和 $Z^b$ 各自独立地为由碳原子数为6~12且具有至少1个芳香环且可具有杂原子的芳香族化合物衍生的二价基团(例如-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-);

$n^a$ 和 $n^b$ 各自独立地为0或1;

$R^{3a}$ 和 $R^{3b}$ 各自独立地为来自具有羟基的脂溶性维生素(例如生育酚)与琥珀酸酐的反应物的残基、或碳原子数13~19的脂肪族烃基(例如十七碳烯基、十七碳二烯基、1-己基壬基)。

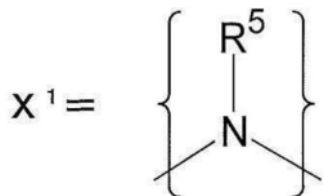
[0086] [离子性脂质(1-3)]

离子性脂质(1),其中,

$R^{1a}$ 和 $R^{1b}$ 各自独立地为碳原子数1~2的亚烷基(即亚甲基或亚乙基);

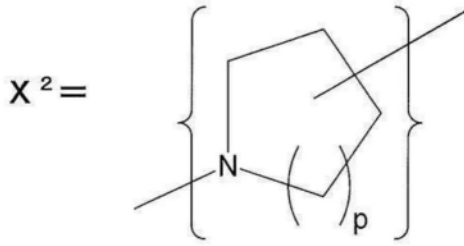
$X^a$ 和 $X^b$ 各自独立地为 $X^1$ :

[0087] [化学式9]



[0088] (式中, $R^5$ 为碳原子数1~3的烷基(例如甲基)。)、或 $X^2$ :

[0089] [化学式10]



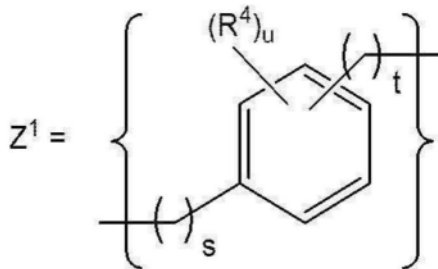
[0090] (式中,  $p$ 为1或2。);

$R^{2a}$ 和 $R^{2b}$ 各自独立地为碳原子数4以下的亚烷基(例如亚甲基、亚乙基、三亚甲基);

$Y^a$ 和 $Y^b$ 各自独立地为酯键或酰胺键;

$Z^a$ 和 $Z^b$ 各自独立地为 $Z^1$ ;

[0091] [化学式11]



[0092] (式中,  $s$ 为0~1的整数,  $t$ 为0~2的整数,  $u$ 为0~2的整数(优选为0),  $u$ 个 $R^4$ 各自独立地表示取代基。);

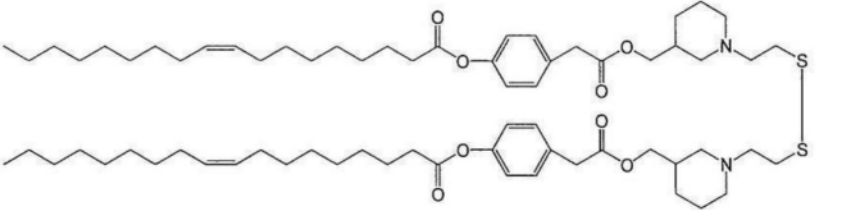
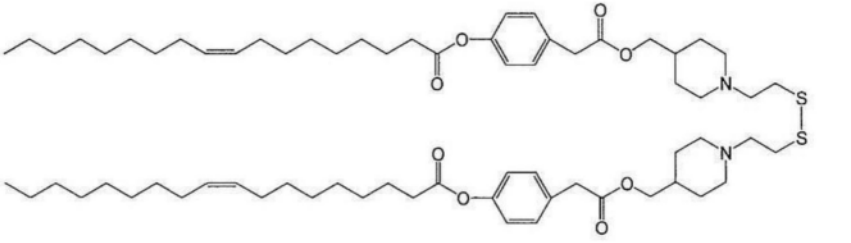
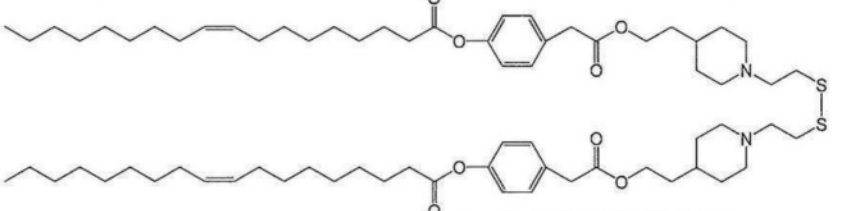
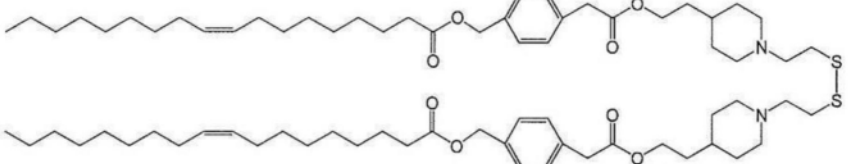
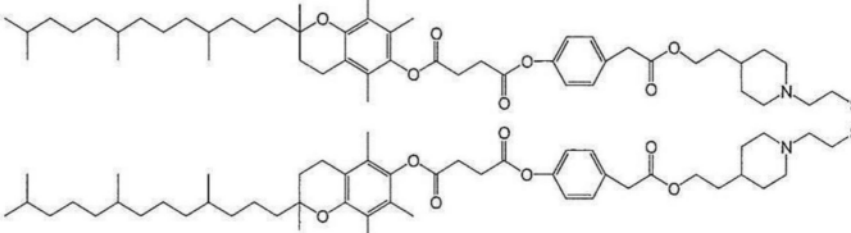
$n^a$ 和 $n^b$ 各自独立地为0或1;

$R^{3a}$ 和 $R^{3b}$ 各自独立地为来自具有羟基的脂溶性维生素(例如生育酚)与琥珀酸酐的反应物的残基、或碳原子数13~17的脂肪族烃基(例如十七碳烯基、十七碳二烯基、1-己基壬基)。

[0093] 作为离子性脂质(1)的具体例,可举出:以下的O-Ph-P3C1、O-Ph-P4C1、O-Ph-P4C2、O-Bn-P4C2、E-Ph-P4C2、L-Ph-P4C2、HD-Ph-P4C2、O-Ph-amide-P4C2、O-Ph-C3M、B-2、B-2-5、TS-P4C2、L-P4C2、O-P4C2。

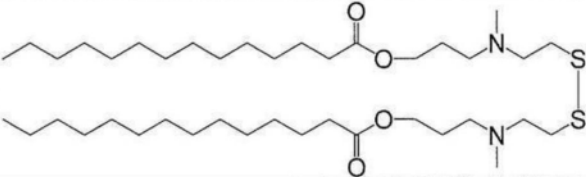
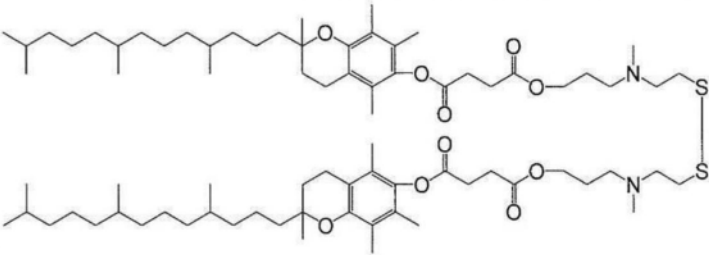
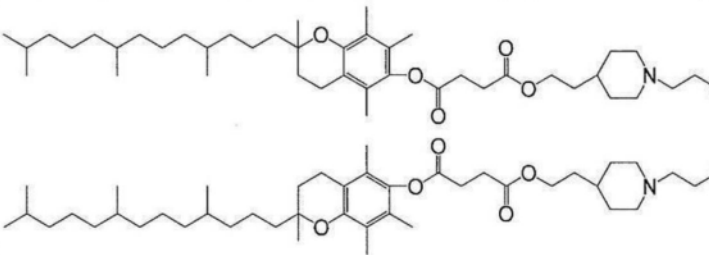
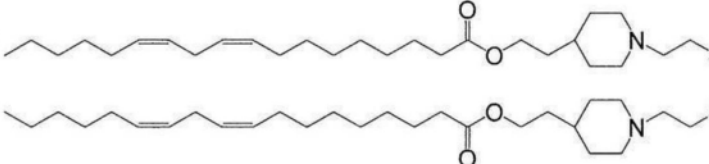
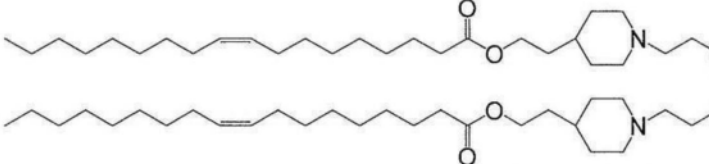
[0094] 另外,作为离子性脂质(1)的具体例,可举出:W02021/195529A2中记载的脂质1至脂质20。

[0095] [表1-1]

离子性脂质的名称	结构
O-Ph-P3C1	
O-Ph-P4C1	
O-Ph-P4C2 (或称为 SS-OP)	
O-Bn-P4C2	
E-Ph-P4C2 (或称为 SS-EP)	

[0096] [表1-2]

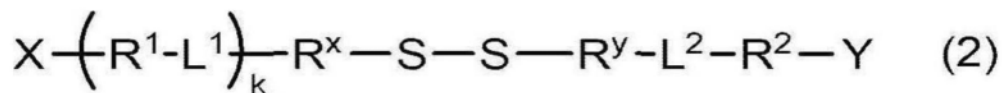


离子性脂质的名称	结构
B-2	
B-2-5	
TS-P4C2	
L-P4C2	
O-P4C2 (或称为 SS-OC)	

[0098] 离子性脂质 (1) 可以通过公知的方法 (例如, W02019/188867A1 (US2021/0023008A1)、US9708628B2、W02021/195529A2 中记载的方法) 来制造。

[0099] 式 (2) 表示的化合物。

[0100] [化学式12]



[0101] (式中,

X 表示包含 1 个以上叔氮的含氮脂肪族基,

$R^1$  表示碳原子数为 8 以下的脂肪族烃基,

$L^1$  表示酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键、N-烷基氨基甲酸酯键、碳酸酯键或脲键,

k 表示 0 或 1,

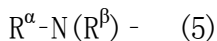
$R^x$  和  $R^y$  各自独立地表示碳原子数为 2 ~ 5 的亚烷基,

$L^2$  表示酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键、碳酸酯键、醚键或脲键,

$R^2$ 表示碳原子数为8以下的亚烷基或不存在,

Y表示 (i) 包含1个以上的由可具有杂原子的芳香族化合物衍生的二价基团、并且 (ii) 在所述二价基团的芳香环上具有包含选自由酯键和碳酸酯键组成的组中的至少1个的基团、并且 (iii) 包含选自由碳原子数为10~37的脂肪族烃基、脂溶性维生素残基和甾醇衍生物的残基组成的组中的至少1个的基团。)

[0102] 优选的X的一例可以用下述通式(5)表示。



(式中,

$R^a$ 为脂肪族烃基,

$R^b$ 为脂肪族烃基、包含1个以上的氮以外的杂原子的脂肪族基、或包含1个以上的叔胺的脂肪族基,或

$R^a$ 和 $R^b$ 也可以键合形成3~8元的含氮脂环)

[0103] 作为更优选的X,为二烷基氨基(所述二烷基氨基的2个烷基的碳原子数各自独立地为1~8)、3~6元的可具有杂原子的环状氨基、或 $-N(R^a)-R^b$ ,

$R^a$ 为碳原子数为1~8的烷基,

$R^b$ 为 $-(CH_2)_q-O-R^c$ ,

$R^c$ 为氢或碳原子数为1~8的烷基,

q为2~4的整数。

[0104] 二烷基氨基中的2个烷基的碳原子数优选各自独立地为1~5,更优选各自独立地为1~4。上述烷基可以为直链状、支链状或环状中的任一种。

具体地可举出:甲基、乙基、丙基、异丙基、环丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、环丁基、戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、1,2-二甲基丙基、2-甲基丁基、环戊基等。优选各自独立地为甲基、乙基、丙基或异丙基,更优选各自独立地为甲基或乙基。

[0105] 3~6元的可具有杂原子的环状氨基是指如下基团:氨基的取代基键合形成环,形成上述环的原子数为3~6个,所述基团任选包含氧等杂原子。3~6元的可具有杂原子的环状氨基优选为5或6元的可具有杂原子的环状氨基,更优选为6元的可具有杂原子的环状氨基。作为环状氨基,优选为环仅由氮原子和亚甲基 $(-CH_2-)$ 形成的氨基,环中任选包含氧原子。具体地为1-吡咯烷基、1-哌啶基、吗啉基(4-吗啉基),优选1-哌啶基、吗啉基。

[0106] 作为 $R^1$ 中的碳原子数为8以下的脂肪族烃基,优选亚烷基、亚烯基或亚炔基,更优选亚烷基或亚烯基。

[0107] 碳原子数为8以下的亚烷基可以为直链状或支链状中的任一种。上述亚烷基的碳原子数优选为6以下,更优选为4以下。碳原子数为8以下的亚烷基优选亚甲基、亚乙基、三亚甲基、四亚甲基、异亚丙基 $(-CH(CH_3)CH_2-)$ 、 $-CH_2CH(CH_3)-$ 、异亚丁基 $(-C(CH_3)_2CH_2-)$ 、 $-CH_2C(CH_3)_2-$ 、五亚甲基或六亚甲基,更优选亚甲基、亚乙基、三亚甲基、异亚丙基 $(-CH(CH_3)CH_2-)$ 、 $-CH_2CH(CH_3)-$ 、四亚甲基或异亚丁基 $(-C(CH_3)_2CH_2-)$ 、 $-CH_2C(CH_3)_2-$ 。

[0108] 碳原子数为8以下的亚烯基可以为直链状或支链状中的任一种。上述亚烯基的碳原子数优选为6以下,更优选为4以下。碳原子数为8以下的亚烯基优选亚丙烯基 $(-CH_2CH=CH-)$ 、 $-CH=CHCH_2-$ 、亚丁烯基、异亚丙烯基、异亚丁烯基、亚戊烯基或亚己烯基,更优选亚丙烯基 $(-CH_2CH=CH-)$ 、 $-CH=CHCH_2-$ 、亚丁烯基、异亚丙烯基或异亚丁烯基。

[0109]  $L^1$ 为酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键、N-烷基氨基甲酸酯键、碳酸酯键或脲键,优选酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键、N-甲基氨基甲酸酯键或碳酸酯键。

[0110] 在本说明书中,N-烷基氨基甲酸酯键表示 $-NR^{10}-CO-O-$ 或 $-O-CO-NR^{10}-$ , $R^{10}$ 表示碳原子数为1~8的烷基。碳原子数为1~8的烷基可以为直链状、支链状或环状中的任一种。上述烷基的碳原子数优选为1~6,更优选为1~4。具体地可举出:甲基、乙基、丙基、异丙基、环丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、环丁基、戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、1,2-二甲基丙基、2-甲基丁基、环戊基等。优选甲基、乙基、丙基或异丙基,更优选甲基。

[0111]  $k$ 表示0或1。在此, $k$ 为0是指不存在 $R^1-L^1$ ,即 $X$ 与 $R^x$ 直接键合。在 $l$ 、 $m$ 、 $n$ 等为0的情况下,也为同样的含义。

[0112] 作为关于 $R^x$ 和 $R^y$ 的碳原子数为2~5的亚烷基,可以为直链状或支链状中的任一种,但优选直链状。上述亚烷基的碳原子数优选为2~4,更优选为2。

具体地为亚乙基、三亚甲基、四亚甲基、异亚丙基( $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ )或异亚丁基( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ ),优选亚乙基或三亚甲基,更优选亚乙基。

[0113]  $L^2$ 为酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键、碳酸酯键、醚键或脲键,优选酯键或酰胺键,更优选酯键。

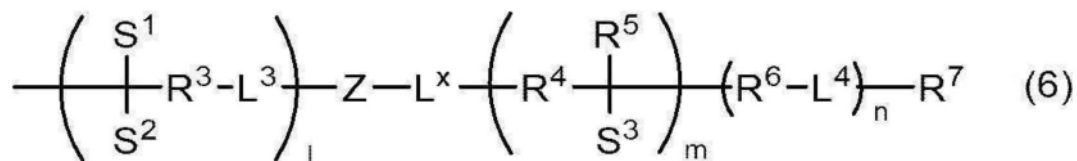
[0114]  $R^2$ 表示碳原子数为8以下的亚烷基,或不存在。 $R^2$ 不存在是指 $L^2$ 与 $Y$ 直接键合。

$R^2$ 中的碳原子数为8以下的亚烷基可以为直链状或支链状中的任一种,但优选直链状。上述亚烷基的碳原子数优选为6以下,更优选为4以下。碳原子数为8以下的亚烷基优选亚甲基、亚乙基、三亚甲基、四亚甲基、异亚丙基( $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ )、异亚丁基( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ )、五亚甲基或六亚甲基,更优选亚甲基、亚乙基、三亚甲基、异亚丙基( $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ )、四亚甲基或异亚丁基( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ )。

[0115]  $R^a$ 和 $R^c$ 中的碳原子数为1~8的烷基可以为直链状或支链状中的任一种,但优选直链状。上述烷基的碳原子数优选为1~6,更优选为1~4。作为碳原子数为1~8的烷基,具体地可举出:甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、1,2-二甲基丙基、2-甲基丁基等。优选甲基、乙基、丙基或异丙基,更优选甲基。

[0116] 优选的 $Y$ 的一例可以用下述通式(6)来表示。

[0117] [化学式13]



[0118] (式中,

$R^3$ 表示碳原子数为8以下的亚烷基,

$L^3$ 表示酯键或碳酸酯键,

$S^1$ 表示氢、碳原子数为1~8的烷基、 $-R^e-L^a-R^{7'}$ 或 $-R^e-L^a-Z'-L^b-R^{7'}$ ,

$S^2$ 表示 $-R^{e'}-L^a-R^{7''}$ 或 $-R^{e'}-L^a-Z''-L^b-R^{7''}$ ,

$R^e$ 和 $R^{e'}$ 各自独立地表示碳原子数为8以下的亚烷基,

$L^a$ 表示酯键或碳酸酯键,

$L^b$ 表示酯键或碳酸酯键,

1表示0或1,

Z、Z' 和Z'' 各自独立地表示碳原子数为3~16且具有至少1个芳香环且由可具有杂原子的芳香族化合物衍生的二价基团,

L<sup>x</sup>表示酯键或碳酸酯键,

R<sup>4</sup>表示碳原子数为8以下的亚烷基或不存在,

R<sup>5</sup>表示氢或碳原子数为1~8的烷基,

S<sup>3</sup>表示-R<sup>6'</sup>-L<sup>4'</sup>-R<sup>7'''</sup>,

m表示0或1,

R<sup>6</sup>和R<sup>6'</sup> 各自独立地表示碳原子数为8以下的亚烷基或不存在,

L<sup>4</sup>和L<sup>4'</sup> 各自独立地表示酯键或碳酸酯键,

R<sup>7</sup>、R<sup>7'</sup>、R<sup>7''</sup> 和R<sup>7'''</sup> 各自独立地表示碳原子数为10~37的脂肪族烃基或-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-C(=O)-R<sup>f</sup>,

R<sup>f</sup>表示具有羟基的脂溶性维生素的残基或具有羟基的甾醇衍生物的残基,p表示2或3,

n表示0或1。

[0119] R<sup>4</sup>表示碳原子数为8以下的亚烷基或不存在。R<sup>4</sup>不存在是指R<sup>5</sup>和S<sup>3</sup>所键合的碳原子与L<sup>x</sup>直接键合。

[0120] R<sup>6</sup>和R<sup>6'</sup> 各自独立地表示碳原子数为8以下的亚烷基或不存在。m=0时,R<sup>6</sup>不存在是指L<sup>x</sup>与L<sup>4</sup>直接键合,m=1时,R<sup>6</sup>不存在是指R<sup>5</sup>和S<sup>3</sup>所键合的碳原子与L<sup>4</sup>直接键合。R<sup>6'</sup> 不存在是指R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>所键合的碳原子与L<sup>4'</sup> 直接键合。

[0121] R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>6'</sup>、R<sup>e</sup>和R<sup>e'</sup> 中的碳原子数为8以下的亚烷基可以为直链状或支链状中的任一种,但优选直链状。上述亚烷基的碳原子数优选为6以下,更优选为4以下。碳原子数为8以下的亚烷基优选亚甲基、亚乙基、三亚甲基、四亚甲基、异亚丙基(-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-)、异亚丁基(-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-)、五亚甲基或六亚甲基,更优选亚甲基、亚乙基、三亚甲基、异亚丙基(-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-)、四亚甲基或异亚丁基(-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-)。

[0122] R<sup>5</sup>和S<sup>1</sup>中的碳原子数为1~8的烷基可以为直链状或支链状中的任一种,但优选直链状。上述烷基的碳原子数优选为1~6,更优选为1~4。作为碳原子数为1~8的烷基,具体地可举出:甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、1,2-二甲基丙基、2-甲基丁基等。优选甲基、乙基、丙基或异丙基,更优选甲基。

[0123] L<sup>x</sup>、L<sup>3</sup>、L<sup>4</sup>、L<sup>4'</sup>、L<sup>a</sup>和L<sup>b</sup>为酯键或碳酸酯键,优选酯键。

[0124] Z、Z' 和Z'' 各自独立地表示碳原子数为3~16且具有至少1个芳香环且由可具有杂原子的芳香族化合物衍生的二价基团。在此,二价基团是指具有通过从上述芳香族化合物除去2个氢原子而得到的结构的二价基团。上述芳香族化合物的碳原子数优选为6~12,更优选为6~7。此外,上述芳香族化合物的芳香环数优选为1。Z、Z' 和Z'' 可以各自相同或不同,但优选Z、Z' 和Z'' 相同。

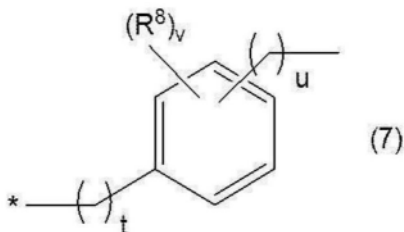
[0125] 作为上述芳香族化合物的芳香环,可以为芳香族烃环或芳香族杂环中的任一种。作为芳香族烃环,例如可举出:苯环、萘环、蒽环等。作为芳香族杂环,例如可举出:咪唑环、吡唑环、噁唑环、异噁唑环、噻唑环、异噻唑环、三嗪环、吡咯环、呋喃并噻吩环、嘧啶环、哒嗪

环、吡嗪环、吡啶环、嘌呤环、蝶啶环、苯并咪唑环、吲哚环、苯并呋喃环、喹啉环、酞嗪环、喹啉环、异喹啉环、香豆素环、色酮环、苯并二氮卓环、吩噻嗪环、吩噻嗪环、吡啶环等。上述芳香族化合物的芳香环优选苯环、萘环或蒽环,更优选苯环。

[0126] 上述芳香族化合物的芳香环可具有取代基。作为取代基,例如可举出:碳原子数为2~4的酰基、碳原子数为2~4的烷氧基羰基、碳原子数为2~4的氨基甲酰基、碳原子数为2~18的酰氧基、碳原子数为2~4的酰氨基、碳原子数为2~4的烷氧基羰基氨基、氟原子、氯原子、溴原子、碘原子、碳原子数为1~4的烷基对氨基苯磺酰基、碳原子数为1~4的烷基磺酰基、碳原子数为6~10的芳基磺酰基、硝基、三氟甲基、氰基、碳原子数为1~4的烷基、碳原子数为1~4的脲基、碳原子数为1~4的烷氧基、碳原子数为6~10的芳基、碳原子数为6~10的芳氧基等。作为上述取代基的优选例,可举出:乙酰基、甲氧基羰基、甲基氨基甲酰基、乙酰氧基、乙酰胺基、甲氧基羰基氨基、氟原子、氯原子、溴原子、碘原子、甲基对氨基苯磺酰基、苯基磺酰基、硝基、三氟甲基、氰基、甲基、乙基、丙基、异丙基、叔丁基、脲基、甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、叔丁氧基、苯基、苯氧基等。

[0127] Z、Z' 和Z'' 优选各自独立地为式(7):

[0128] [化学式14]



[0129] (式中,

t表示0~3的整数,

u表示0~3的整数,

v表示0~4的整数,

v个R<sup>8</sup>各自独立地表示取代基,

\*表示与L<sup>3</sup>或L<sup>a</sup>的键合位置。)

t优选为0或1,更优选为1。

u优选为0~2的整数,更优选为0。

v优选为0~2的整数,更优选为0或1,进一步优选为0。

[0130] 作为R<sup>8</sup>,例如可举出:碳原子数为2~4的酰基、碳原子数为2~4的烷氧基羰基、碳原子数为2~4的氨基甲酰基、碳原子数为2~18的酰氧基、碳原子数为2~4的酰氨基、碳原子数为2~4的烷氧基羰基氨基、氟原子、氯原子、溴原子、碘原子、碳原子数为1~4的烷基对氨基苯磺酰基、碳原子数为1~4的烷基磺酰基、碳原子数为6~10的芳基磺酰基、硝基、三氟甲基、氰基、碳原子数为1~4的烷基、碳原子数为1~4的脲基、碳原子数为1~4的烷氧基、碳原子数为6~10的芳基、碳原子数为6~10的芳氧基等。作为R<sup>8</sup>的优选例,可举出:乙酰基、甲氧基羰基、甲基氨基甲酰基、乙酰氧基、丙酰氧基、丁酰氧基、戊酰氧基、己酰氧基、庚酰氧基、辛酰氧基、壬酰氧基、癸酰氧基、十一烷酰氧基、十二烷酰氧基、十三烷酰氧基、十四烷酰氧基、十五烷酰氧基、十六烷酰氧基、十七烷酰氧基、十八烷酰氧基、十八碳酰基氧基、十八碳二烯酰氧基、乙酰胺基、甲氧基羰基氨基、氟原子、氯原子、溴原子、碘原子、甲基对氨基苯

磺酰基、苯基磺酰基、硝基、三氟甲基、氰基、甲基、乙基、丙基、异丙基、叔丁基、脲基、甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、叔丁氧基、苯基、苯氧基等。在存在多个 $R^8$ 的情况下,多个 $R^8$ 可以相互相同或不同。

[0131]  $R^7$ 、 $R^{7'}$ 、 $R^{7''}$ 和 $R^{7'''}$ 各自独立地表示碳原子数为10~37的脂肪族烃基或 $-(CH_2)_p-C(=O)-R^f$ , $R^f$ 表示具有羟基的脂溶性维生素的残基或具有羟基的甾醇衍生物的残基, $p$ 表示2或3。 $R^7$ 、 $R^{7'}$ 、 $R^{7''}$ 和 $R^{7'''}$ 分别相同或不同。

[0132] 在本说明书中,具有羟基的脂溶性维生素的残基表示具有通过从脂溶性维生素的羟基除去氢原子而得到的结构的一价基团。此外,具有羟基的甾醇衍生物的残基表示具有通过从甾醇衍生物的羟基除去氢原子而得到的结构的一价基团。

[0133] 碳原子数为10~37的脂肪族烃基可以为直链状或支链状中的任一种。上述脂肪族烃基的碳原子数优选为12~37,更优选为13~37,进一步优选为15~37。

[0134] 上述脂肪族烃基可以是饱和的,也可以是不饱和的。在上述脂肪族烃基为不饱和脂肪族烃基的情形下,其不饱和键数优选为1~6个,更优选为1~3个,进一步优选为1~2个。不饱和键可以为碳-碳双键或碳-碳三键中的任一种,但优选碳-碳双键。上述脂肪族烃基优选为烷基或烯基。

[0135] 作为碳原子数为10~37的脂肪族烃基,例如可举出:癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基、二十一烷基、二十二烷基、癸烯基、十一碳烯基、十二碳烯基、十三碳烯基、十四碳烯基、十五碳烯基、十六碳烯基、十七碳烯基、十八碳烯基、十九碳烯基、二十碳烯基、二十一碳烯基(henicosenyl group)、二十一碳烯基(heneicosenyl group)、二十二碳烯基、十二碳二烯基、十三碳二烯基、十四碳二烯基、十五碳二烯基、十六碳二烯基、十七碳二烯基、十八碳二烯基、十九碳二烯基、二十碳二烯基、二十一碳二烯基(henicodienyl group)、二十一碳二烯基(heneicodienyl group)、二十二碳二烯基、十八碳三烯基、二十碳三烯基、二十碳四烯基、二十碳五烯基、二十碳六烯基、异硬脂基、1-己基庚基、1-己基壬基、1-辛基壬基、1-辛基十一烷基、1-癸基十一烷基、1-十二烷基十三烷基、1-十四烷基十五烷基、1-十六烷基十七烷基、1-十八烷基十九烷基等。

[0136] 碳原子数为10~37的脂肪族烃基优选十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基、二十一烷基、二十二烷基、癸烯基、十一碳烯基、十二碳烯基、十三碳烯基、十四碳烯基、十五碳烯基、十六碳烯基、十七碳烯基、十八碳烯基、十九碳烯基、二十碳烯基、二十一碳烯基、二十一碳烯基、二十二碳烯基、十二碳二烯基、十三碳二烯基、十四碳二烯基、十五碳二烯基、十六碳二烯基、十七碳二烯基、十八碳二烯基、十九碳二烯基、二十碳二烯基、二十一碳二烯基、二十一碳二烯基、二十二碳二烯基、十八碳三烯基、二十碳三烯基、二十碳四烯基、二十碳五烯基、二十碳六烯基、异硬脂基、1-己基庚基、1-己基壬基、1-辛基壬基、1-辛基十一烷基、1-癸基十一烷基、1-十二烷基十三烷基、1-十四烷基十五烷基、1-十六烷基十七烷基、1-十八烷基十九烷基,特别优选十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基、二十一烷基、二十二烷基、十七碳烯基、十二碳二烯基、十三碳二烯基、十四碳二烯基、十五碳二烯基、十六碳二烯基、十七碳二烯基、十八碳二烯基、十九碳二烯基、二十碳二烯基、二十一碳二烯基、二十一碳二烯基、二十二碳二烯基、十八碳三烯基、二十碳三烯基、二十碳四烯基、二十碳五烯基、二十碳五烯基。

基、二十碳六烯基、异硬脂基、1-己基庚基、1-己基壬基、1-辛基壬基、1-辛基十一烷基、1-癸基十一烷基、1-十二烷基十三烷基、1-十四烷基十五烷基、1-十六烷基十七烷基、1-十八烷基十九烷基。

[0137] 作为具有羟基的脂溶性维生素,例如可举出:视黄醇、麦角甾醇、7-脱氢胆固醇、钙化醇、胆钙化醇、二氢麦角钙化醇、二氢速甾醇、生育酚、生育三烯酚等。具有羟基的脂溶性维生素优选生育酚。

[0138] 作为具有羟基的甾醇衍生物,例如可举出:胆固醇、胆甾醇、豆甾醇、 $\beta$ -谷甾醇、羊毛甾醇、麦角甾醇等。具有羟基的甾醇衍生物优选为胆固醇或胆甾醇。

$R^f$  优选具有羟基的脂溶性维生素的残基。 $p$  优选为2。

[0139]  $l$ 、 $m$ 、 $n$  表示0或1。作为优选的 $l$ 、 $m$ 、 $n$  的组合,为

$l=0, m=0, n=0$ ;

$l=0, m=0, n=1$ ;

$l=0, m=1, n=1$ ;

$l=1, m=0, n=0$ ,

特别优选为

$l=0, m=0, n=0$ ;

$l=0, m=1, n=1$ ;

$l=1, m=0, n=0$ 。

[0140] 作为式(2)表示的离子性脂质(有时在本说明书中简称为“离子性脂质(2)”)的优选例,可举出:以下的离子性脂质。

离子性脂质(2),其中,

$X$  表示二烷基氨基(所述二烷基氨基的2个烷基的碳原子数各自独立地为1~8)、3~6元的可具有杂原子的环状氨基或  $-N(R^a)-R^b$ ,

$R^a$  表示碳原子数为1~8的烷基,

$R^b$  表示  $-(CH_2)_q-O-R^c$ ,

$R^c$  表示氢或碳原子数为1~8的烷基,

$q$  为2~4的整数;

$R^1$  为碳原子数为6以下的亚烷基或碳原子数为6以下的亚烯基;

$L^1$  为酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键或碳酸酯键,

$K$  为0或1;

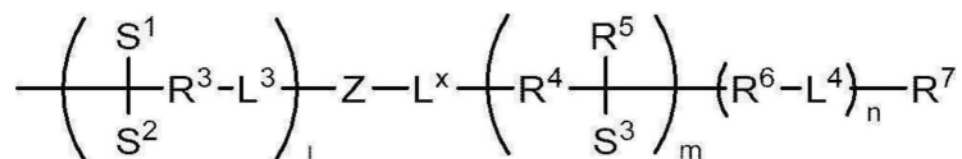
$R^x$  和  $R^y$  各自独立地表示碳原子数为2~4的亚烷基;

$L^2$  为酯键或酰胺键;

$R^2$  为碳原子数为6以下的亚烷基或不存在;

$Y$  为式(Y)表示的基团:

[0141] [化学式15]



[0142] (式中,

$R^3$ 表示碳原子数为6以下的亚烷基,

$L^3$ 表示酯键,

$S^1$ 表示氢、碳原子数为1~8的烷基、 $-R^e-L^a-R^{7'}$  或  $-R^e-L^a-Z'-L^b-R^{7'}$ ,

$S^2$ 表示 $-R^{e'}-L^a-R^{7''}$  或  $-R^{e'}-L^a-Z''-L^b-R^{7''}$ ,

$R^e$ 和 $R^{e'}$ 各自独立地表示碳原子数为6以下的亚烷基,

$L^a$ 表示酯键,

$L^b$ 表示酯键,

$l$ 表示0或1,

$L^x$ 表示酯键或碳酸酯键,

$R^4$ 表示碳原子数为6以下的亚烷基或不存在,

$R^5$ 表示氢或碳原子数为1~8的烷基,

$S^3$ 表示 $-R^{6'}-L^4-R^{7'''}$ ,

$m$ 表示0或1,

$R^6$ 和 $R^{6'}$ 各自独立地表示碳原子数为6以下的亚烷基或不存在,

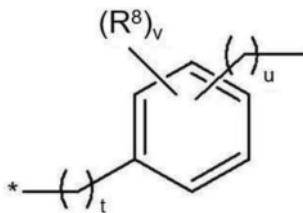
$L^4$ 和 $L^4'$ 均表示酯键,

$R^7$ 、 $R^{7'}$ 、 $R^{7''}$ 和 $R^{7'''}$ 各自独立地表示碳原子数为10~37的脂肪族烃基或 $-(CH_2)_p-C(=O)-R^f$ ,

$R^f$ 表示具有羟基的脂溶性维生素的残基或具有羟基的甾醇衍生物的残基, $p$ 为2或3, $n$ 表示0或1.);

$Z$ 、 $Z'$ 和 $Z''$ 各自独立地为式(Z)表示的基团:

[0143] [化学式16]



[0144] (式中,

$t$ 表示0或1的整数,

$u$ 表示0~2的整数,

$v$ 表示0~2的整数,

$v$ 个 $R^8$ 各自独立地表示碳原子数为2~4的酰基、碳原子数为2~4的烷氧基羰基、碳原子数为2~4的氨基甲酰基、碳原子数为2~18的酰氧基、碳原子数为2~4的酰氨基、碳原子数为2~4的烷氧基羰基氨基、氟原子、氯原子、溴原子、碘原子、碳原子数为1~4的烷基对氨基苯磺酰基、碳原子数为1~4的烷基磺酰基、碳原子数为6~10的芳基磺酰基、硝基、三氟甲基、氰基、碳原子数为1~4的烷基、碳原子数为1~4的脲基、碳原子数为1~4的烷氧基、碳原子数为6~10的芳基或碳原子数为6~10的芳氧基。)

[0145] 作为离子性脂质(2)的优选的具体例,可举出:后述的制造例1~制造例46中记载的化合物,本发明不应解释为由此而限定。制造例1~制造例46中记载的化合物分别称为化

合物1~化合物46。

[0146] 离子性脂质(2)优选由这些组成的组中的至少1个,更优选自由化合物5、7、8、9、10、11、15、19、21、22、23、24、25、28、29、30、31、32、34、35、36和42组成的组中的至少1个,进一步优选自由化合物5、7、8、9、10、11、15、21、22、24、31、32、34、35和36组成的组中的至少1个,最优选化合物31或化合物34。

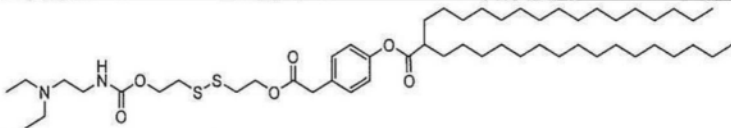
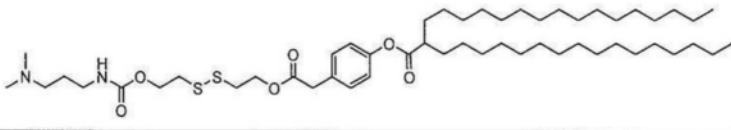
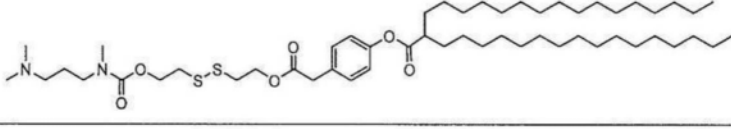
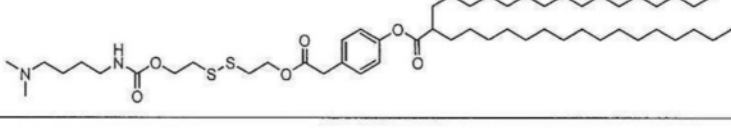
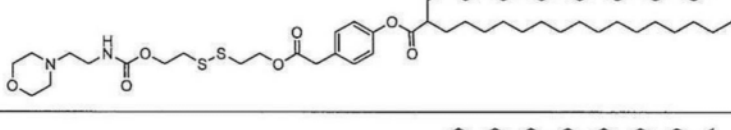
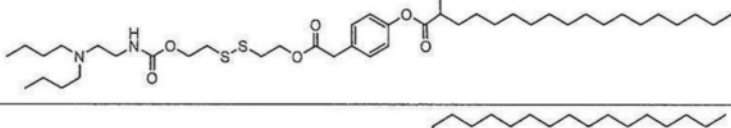
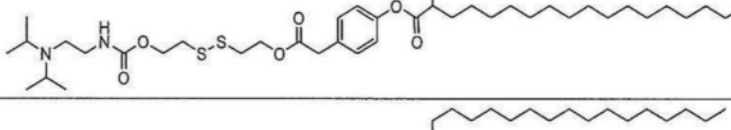
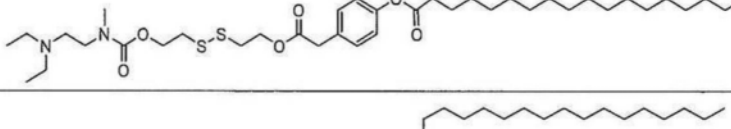
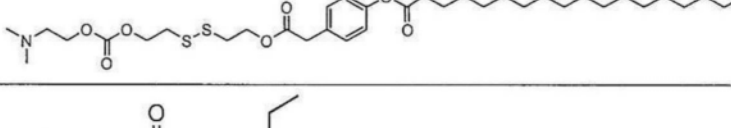
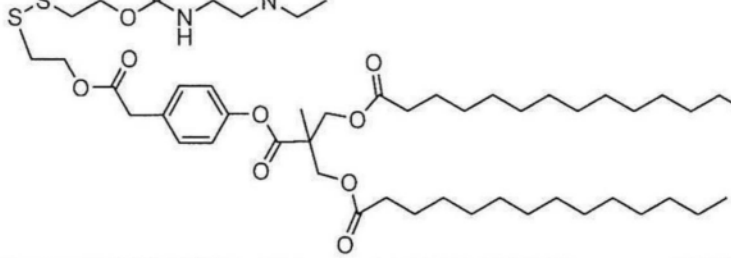
[0147] [表2-1]

名称	结构
化合物 1	
化合物 2	
化合物 3	
化合物 4	
化合物 5	
化合物 6	
化合物 7	
化合物 8	
化合物 9	
化合物 10	

[0148] [表2-2]

名称	结构
化合物 1 1	
化合物 1 2	
化合物 1 3	
化合物 1 4	
化合物 1 5	
化合物 1 6	
化合物 1 7	
化合物 1 8	
化合物 1 9	
化合物 2 0	
化合物 2 1	

[0149] [表2-3]

名称	结构
化合物 2 2	
化合物 2 3	
化合物 2 4	
化合物 2 5	
化合物 2 6	
化合物 2 7	
化合物 2 8	
化合物 2 9	
化合物 3 0	
化合物 3 1	

[0150] [表2-4]

名称	结构
化合物 3 2	
化合物 3 3	
化合物 3 4 (LN-81)	
化合物 3 5	
化合物 3 6	

[0151] [表2-5]

名称	结构
化合物 3 7	
化合物 3 8	
化合物 3 9	
化合物 4 0	
化合物 4 1	
化合物 4 2	
化合物 4 3	

[0152] [表2-6]

名称	结构
化合物 4 4	
化合物 4 5	
化合物 4 6	

[0153] 下面对离子性脂质 (2) 的制造方法进行说明。

离子性脂质 (2) 具有 -S-S- (二硫) 键。因此, 作为离子性脂质 (2) 的制造方法, 可举出:

(A) 制造  $X-(R^1-L^1)_k-R^X-SH$  表示的硫醇和  $HS-R^Y-L^2-R^2-Y$  表示的硫醇后, 将其氧化和偶联的方法、和

(B) 在包含 -S-S- 键的起始化合物上依次合成所需的部分, 最终得到离子性脂质 (2) 的方法等。离子性脂质 (2) 的制造方法优选 (B) 的方法。

[0154] 以下, 说明 (B) 的方法, 但离子性脂质 (2) 的制造方法不限于此。

[0155] 以下的制造方法中的各步骤中使用的原料、试剂和得到的化合物分别可以分别形成盐。作为这种盐, 例如可举出与前述的本发明的化合物中的盐同样的盐。

[0156] 在各步骤中得到的化合物为游离化合物的情况下, 可以通过公知的方法转换为作为目标的盐。相反, 在各步骤中得到的化合物为盐的情况下, 可以通过公知的方法转换为游离体或作为目标的其他种类的盐。

[0157] 在各步骤中得到的化合物保持反应液或作为粗产物而得到后, 也可以用于下一反应。或者, 可以将在各步骤中得到的化合物通过从反应混合物中萃取、再结晶、吸附、再沉淀、柱色谱、离子交换色谱等通常的纯化方法进行适当纯化。

[0158] 在各步骤的原料、试剂的化合物有市售的情况下, 可以直接使用市售品。

[0159] 在各步骤的反应中, 在没有特别说明时, 反应时间通常为 1 分钟 ~ 48 小时, 优选为

10分钟~22小时。

[0160] 在各步骤的反应中,在没有特别说明时,反应温度通常为 $-78^{\circ}\text{C}$ ~ $300^{\circ}\text{C}$ ,优选为 $-78^{\circ}\text{C}$ ~ $150^{\circ}\text{C}$ 。

[0161] 在各步骤的反应中,在没有特别说明时,试剂相对于基质使用0.5当量~20当量,优选0.8当量~8当量。在使用试剂作为催化剂的情况下,试剂相对于基质使用0.001当量~1当量,优选为0.01当量~0.4当量。试剂兼作反应溶剂的情况下,试剂使用溶剂量。

[0162] 在各步骤的反应中,在没有特别说明时,这些反应在无溶剂或者适当的溶剂中溶解或悬浮来进行。作为溶剂的具体例,可举出实施例记载的溶剂或者甲醇、乙醇、异丙醇、叔丁醇、四氢呋喃、甲苯、环己烷、己烷、庚烷、N,N-二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮、氯仿、二氯甲烷、乙腈、二甲基亚砜、乙酸乙酯、丙酮、水等。上述溶剂可以以适当的比例混合使用两种以上。

[0163] 在各步骤的反应中使用碱的情况下,可举出实施例记载的碱、或者氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠、碳酸钙、碳酸氢钠、三乙胺、N,N-二异丙基乙胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶、1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)、咪唑、哌啶、乙醇钠、叔丁醇钾、叔丁醇钠、氢化锂等。

[0164] 在各步骤的反应中使用酸或酸性催化剂的情况下,可举出实施例记载的酸、酸性催化剂、或者盐酸、硫酸、硝酸、磷酸、乙酸、三氟乙酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、对甲苯磺酸吡啶鎓、三氟化硼二乙醚配合物等。

[0165] 在各步骤中,官能团的保护或脱保护反应根据公知的试剂和方法(例如,GREENE'S PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS,第4版,WILEY-INTERSCIENCE中记载的试剂和方法)或者实施例记载的方法来进行。

[0166] 作为醇等的羟基、酚性羟基的保护基团,例如可举出:四氢吡喃基醚、甲氧基甲基醚、苄基醚、对甲氧基苄基醚、叔丁基二甲基甲硅烷基醚、叔丁基二苯基甲硅烷基醚等醚型保护基团;乙酸酯等羧酸酯型保护基团;甲磺酸酯等磺酸酯型保护基团;叔丁基碳酸酯等碳酸酯型保护基团等。

[0167] 保护基团的除去例如可以使用酸、碱、紫外光、肼、苯基肼、N-甲基二硫代氨基甲酸钠、四丁基氟化铵、乙酸钡、三烷基甲硅烷基卤化物的方法、还原法等公知的方法来进行。

[0168] 在各步骤中,在进行碳酸酯化反应、或者氨基甲酸酯化反应的情况下,作为所使用的试剂,可举出:N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)、4-硝基苯基氯甲酸酯(pNPCl)等和碱(碱性盐类、有机碱类等)。在进行碳酸酯化的情况下,可以进一步添加4-二甲氨基吡啶(DMAP)等添加剂。

[0169] 在各步骤中,在进行甲磺酰化反应的情况下,作为所使用的试剂,使用甲基磺酰氯和碱(碱性盐类、有机碱类等)。

[0170] 在各步骤中,在进行酯化反应、酰胺化反应或脲化反应的情况下,作为所使用的试剂,可举出:酸氯等卤化酰基体、酸酐、活性酯体等经活化的羧酸类。作为羧酸的活化剂,可举出:1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)等碳二亚胺系缩合剂、4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉氯化物N水合物(DMT-MM)等三嗪系缩合剂、0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N',N''-四甲基脲六氟磷酸盐(HATU),或者它们的组合等。在使用碳二亚胺系缩合剂的情况下,也可以在反应中进一步添加1-羟基苯并三唑(HOBT)、N-羟基

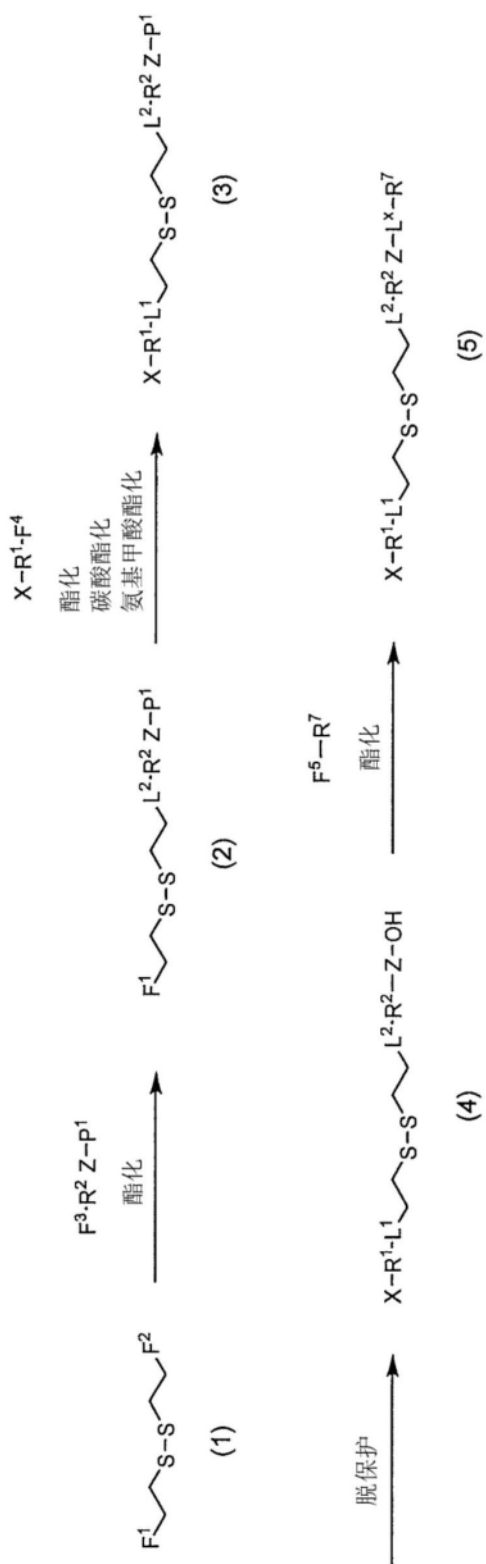
琥珀酰亚胺 (HOSu)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 等添加剂。

[0171] 在各步骤中,在进行氨基化等亲核取代反应的情况下,作为试剂,使用亲核试剂(胺类等)和碱(碱性盐类、有机碱类等)。也可以在反应中进一步添加碘化钾(KI)、四丁基碘化铵(TBAI)等添加剂。

[0172] 离子性脂质(2)例如可以通过以下的制法来制造。此外,离子性脂质(2)的盐可以通过与无机酸、有机酸的适当混合而得到。

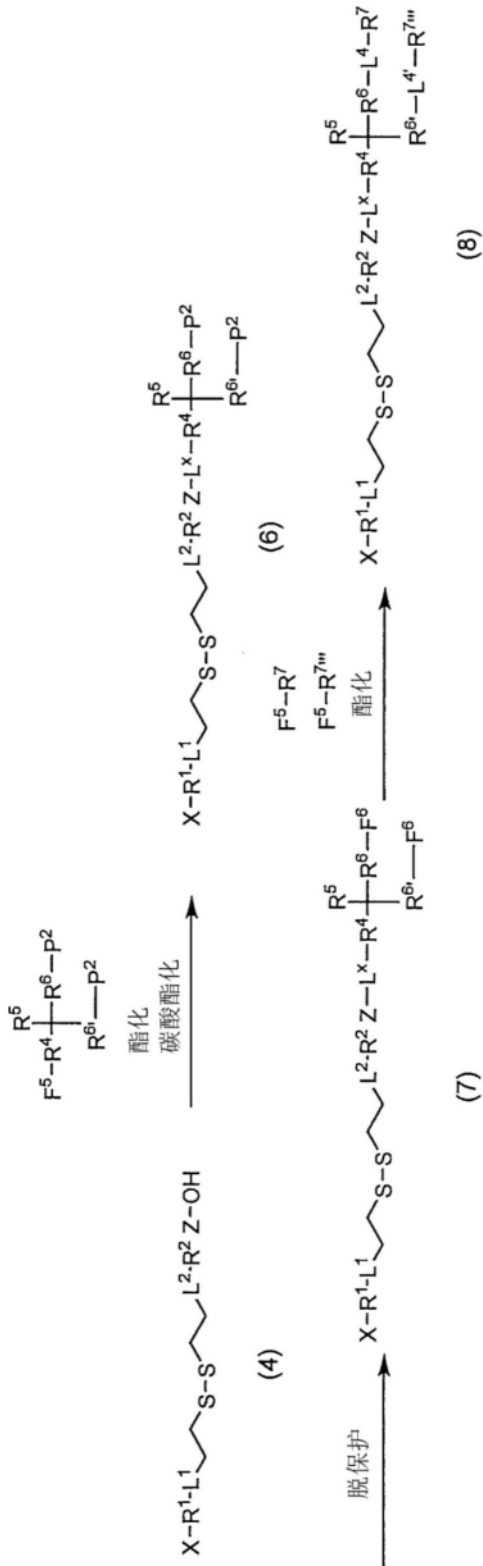
[0173] 制法A:k=1、l=0、m=0、n=0,  $R^x$ 和 $R^y$ 均为亚乙基时

[0174] [化学式17]



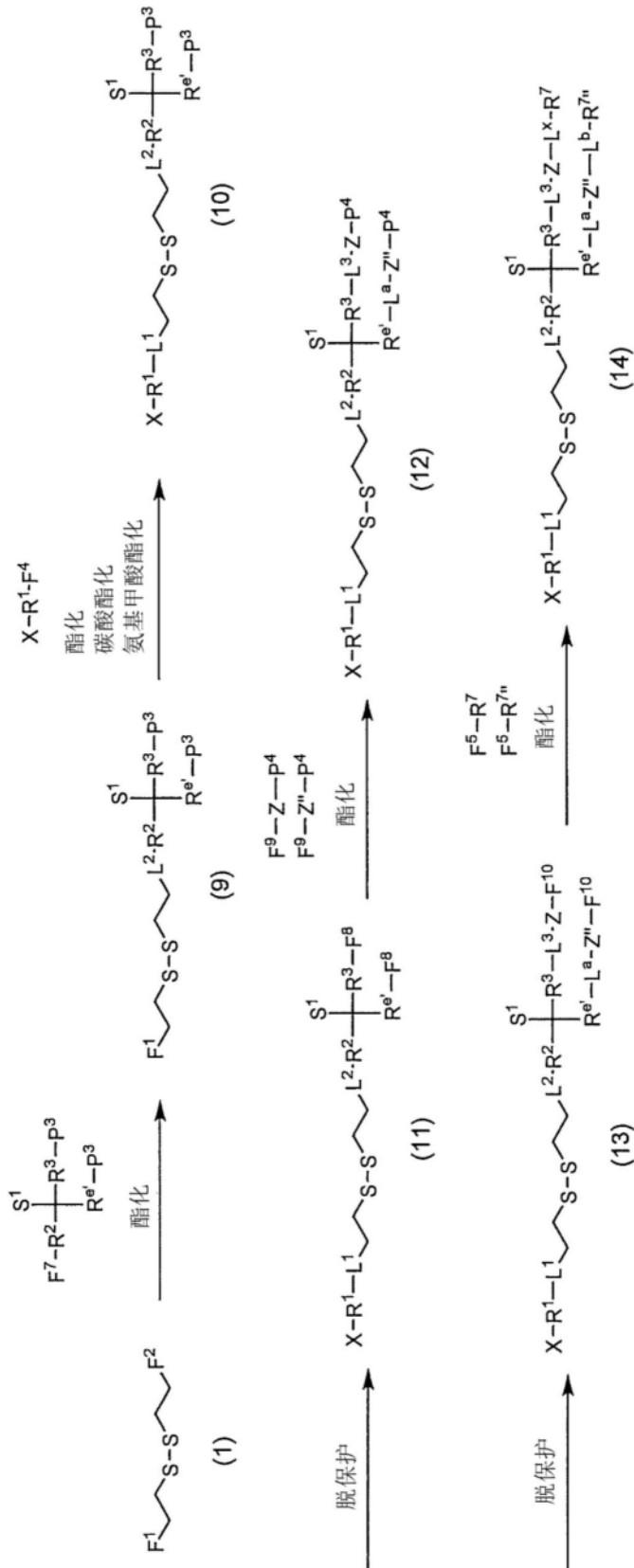
[0175] 制法B:k=1、l=0、m=1、n=1,R<sup>x</sup>和R<sup>y</sup>均为亚乙基时

[0176] [化学式18]



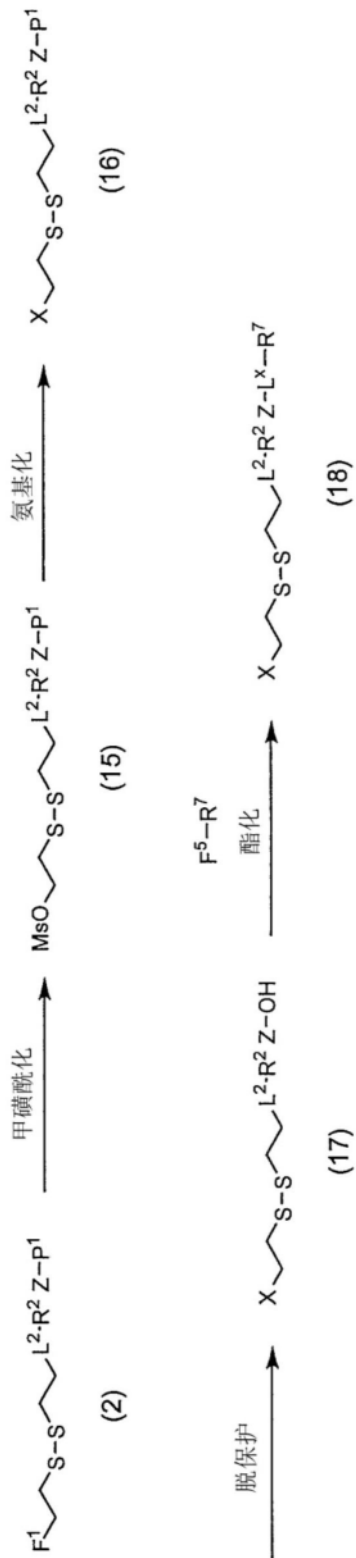
[0177] 制法C:k=1,l=1,m=0,n=0,R<sup>x</sup>和R<sup>y</sup>均为亚乙基,S<sup>1</sup>为氢或烷基时

[0178] [化学式19]



[0179] 制法D:k=0、l=0、m=0、n=0,R<sup>x</sup>和R<sup>y</sup>均为亚乙基时

[0180] [化学式20]



[0181] 上述式中,  $F^1 \sim F^{10}$  各自独立地表示反应性官能团,  $P^1 \sim P^4$  各自独立地表示保护基团。

[0182] 具体的制造方法记载在后述的制造例1~46中。只要是本领域技术人员, 则能够适当选择原料, 根据制造例1~46中记载的方法进行反应, 由此可以制造所期望的离子性脂质(2)。

[0183] 磷脂

磷脂可以用作脂质纳米粒子的脂质膜构成成分。

作为磷脂的例子,有:1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(PC)、1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(PE)、1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷脂酰丝氨酸(PS)、1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷脂酰甘油(PG)、1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷脂酸(PA)或它们的溶血体,

具体地,有:

1,2-二癸酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DDPC)、

1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DLPC)、

1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DMPC)、

1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DPPC)、

1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DSPC)、

1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DOPC)、

1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DLoPC)、

1,2-二芥酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DEPC)、

1-肉豆蔻酰基-2-棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(MPPC)、

1-肉豆蔻酰基-2-硬脂酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(MSPC)、

1-棕榈酰基-2-肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(PMPC)、

1-棕榈酰基-2-硬脂酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(PSPC)、

1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(POPC)、1-硬脂酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(SOPC),可以使用将这些PC适当转换为PE、PS、PG、PA而成的物质。

[0184] 作为本发明中使用的磷脂,优选PC或PE,进一步优选为DOPC、DSPC、DEPC、POPC、DOPE(1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、POPE(1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺),特别优选为DOPC、DSPC、DEPC。

#### [0185] 甾醇

甾醇可以用作调节脂质纳米粒子的脂质膜流动性的成分。作为甾醇的例子,有:胆固醇、羊毛甾醇、植物甾醇、酵母甾醇、酶烯醇、链甾醇、豆甾醇、二氢羊毛甾醇和7-脱氢胆固醇,优选为胆固醇、羊毛甾醇、植物甾醇,进一步优选为胆固醇。

#### [0186] PEG脂质

PEG脂质用于在脂质纳米粒子表面包覆亲水性聚乙二醇(PEG)以抑制粒子间相互凝集的稳定化剂、或用于在给予生物体时用于抑制生物体成分与粒子之间的相互作用。

PEG区域可以是任意的分子量。在一些方式中,PEG区域具有200~10,000Da的分子量,可以是直链,也可以是支链。

[0187] 作为PEG脂质的例子,有PEG-磷脂、PEG-神经酰胺、PEG-二酰基甘油、PEG-胆固醇,优选为PEG的分子量为1,000~10,000的二酰基甘油PEG,进一步优选PEG的分子量为1,000~10,000的二肉豆蔻酰基甘油PEG或二硬脂酰基甘油PEG。

#### [0188] 酸性缓冲液

可以使用在酸性范围具有缓冲作用的缓冲液。具体地可举出:HCl/KCl缓冲液、对甲苯磺酸/对甲苯磺酸钠盐缓冲液、酒石酸/NaOH缓冲液、柠檬酸/NaOH缓冲液、邻苯二甲酸HK/HCl缓冲液、甘氨酸/HCl缓冲液、反式乌头酸/NaOH缓冲液、甲酸/甲酸钠缓冲液、柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液、3,3-二甲基戊二酸/NaOH缓冲液、3,3-二甲基戊二酸/NaOH/0.1MNaCl缓冲

液、苯乙酸/苯乙酸钠盐缓冲液、乙酸/乙酸钠缓冲液、琥珀酸/NaOH缓冲液、邻苯二甲酸HK/NaOH缓冲液、二甲砷酸钠/HCl缓冲液、马来酸HNa/NaOH缓冲液、马来酸/Tris/NaOH缓冲液、磷酸缓冲液、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /NaOH缓冲液、咪唑/HCl缓冲液、s-三甲基吡啶(2,4,6-三甲基吡啶)/HCl缓冲液、三乙醇胺HCl/NaOH缓冲液、5,5-二乙基巴比妥酸钠/HCl缓冲液、N-甲基吗啉/HCl缓冲液、焦磷酸钠/HCl缓冲液、MES缓冲液、苹果酸缓冲液、ADA缓冲液、PIPES缓冲液、ACES缓冲液、HEPES、BES、Bis-Tris缓冲液、Bis-Tris丙烷缓冲液、无水碳酸钠缓冲液、甘氨酸甘氨酸缓冲液、MOPS、MOPSO、TES。

[0189] 优选为在pH1~6.5、更优选为在pH3~6.5具有缓冲作用的酸性缓冲液,可举出:酒石酸/NaOH缓冲液、柠檬酸/NaOH缓冲液、邻苯二甲酸HK/HCl缓冲液、甘氨酸/HCl缓冲液、反式乌头酸/NaOH缓冲液、甲酸/甲酸钠缓冲液、柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液、3,3-二甲基戊二酸/NaOH缓冲液、3,3-二甲基戊二酸/NaOH/0.1M NaCl缓冲液、苯乙酸/苯乙酸钠盐缓冲液、乙酸/乙酸钠缓冲液、琥珀酸/NaOH缓冲液、邻苯二甲酸HK/NaOH缓冲液、二甲砷酸钠/HCl缓冲液、马来酸HNa/NaOH缓冲液、马来酸/Tris/NaOH缓冲液、磷酸缓冲液、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /NaOH缓冲液、MES缓冲液、苹果酸缓冲液、邻苯二甲酸缓冲液、马来酸缓冲液、琥珀酸缓冲液、酒石酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、Bis-Tris缓冲液、甘氨酸甘氨酸缓冲液等,进一步优选为苹果酸缓冲液或MES缓冲液。

#### [0190] 脂质纳米粒子的制备方法

在本发明的方法中,通过将包含离子性脂质、甾醇和PEG脂质的醇溶液与在pH1~6.5具有缓冲作用的酸性缓冲液混合来制备不含核酸的脂质纳米粒子悬浮液。为了制备脂质纳米粒子,可以使用任意的诱导组织化的操作。作为醇,例如可举出:乙醇、叔丁醇等。

[0191] 作为用于制备脂质纳米粒子的“诱导组织化的操作”,例如可举出:使用微通道或涡旋的醇稀释法、单纯水合法、超声处理、加热、涡旋、醚注入法、法式压制法、胆酸法、 $\text{Ca}^{2+}$ 融合法、冷冻-融解法、反相蒸发法等本身公知的方法,优选为使用微通道或涡旋的醇稀释法,进一步优选为使用微通道的醇稀释法。在使用微通道的醇稀释法中的粒子制备例如可以使用NanoAssemblr(Precision NanoSystems公司)来进行。制备的脂质纳米粒子可通过超滤、透析、稀释等操作,更换外水相的缓冲液。优选的方式中,在制备脂质纳米粒子悬浮液后,通过超滤、透析、稀释等操作,可以将外水相更换为在pH1~6.5(优选为pH3~6.5)具有缓冲作用的其他酸性缓冲液。此外,可以向脂质纳米粒子悬浮液中添加单糖、糖醇、二糖、寡糖、多糖等糖类。作为糖类,优选为二糖,进一步优选为蔗糖。糖类的浓度作为终浓度,优选为0~320mg/mL,进一步优选为0~160mg/mL。

#### [0192] 脂质纳米粒子的保存条件

不含核酸的脂质纳米粒子可以在0°C~50°C的温度范围内作为液体保存,也可以在-80°C~0°C的范围内冷冻而保存。

从构成成分的稳定性的观点出发,作为液体保存时的保存温度优选为0°C~30°C,进一步优选为0°C~10°C,最优选为0°C~5°C。

从构成成分的稳定性的观点出发,进行冷冻而保存时的保存温度优选为-80°C~-10°C,进一步优选为-80°C~-20°C。

进行冷冻而保存时,使用时在0°C~100°C下融解而使用。从构成成分的稳定性的观点出发,融解温度优选为0°C~95°C,更优选为0°C~50°C,进一步优选为0°C~30°C,最优

选为0°C ~ 10°C。

冷冻和融解优选在大气压下实施。

#### [0193] 核酸添加步骤

核酸添加步骤是不将通过前一步骤制备的不含核酸的脂质纳米粒子冷冻干燥而与含核酸的水溶液混合,制备包封核酸的脂质纳米粒子的步骤。

需要说明的是,“不冷冻干燥”是指在紧接着不含核酸的脂质纳米粒子的制备步骤后,实施核酸添加步骤。不含核酸的脂质纳米粒子的制备步骤包括:将不含核酸的脂质纳米粒子作为液体进行保存、或将不含核酸的脂质纳米粒子冷冻保存、融解。

添加包含如下核酸的水溶液,所述核酸的水溶液中核酸的量为脂质纳米粒子中包含的总脂质与核酸之比例例如为总脂质/核酸=1~1000nmol/ $\mu$ g,优选为总脂质/核酸=50~500nmol/ $\mu$ g,可以通过吹吸(pipetting)或涡旋混合来制备包封核酸的脂质纳米粒子。此外,为了提高核酸的包封率,可以添加醇,作为醇可以使用甲醇、乙醇、正丁醇、叔丁醇,优选为乙醇。含核酸的水溶液中的醇的浓度优选为0~50v/v%,更优选为0~30v/v%,进一步优选为0~25v/v%。此外,进一步在核酸添加步骤中,为了提高核酸包封效率,可以在液体状或冷冻体状的不含核酸的脂质纳米粒子中加入含核酸的水溶液、进一步加入醇后进行培育。培育的条件例如为在0~100°C下0~120分钟,优选为在0~95°C下0~60分钟。

作为含核酸的水溶液,优选使用含核酸的酸性缓冲液。作为酸性缓冲液,可以使用在酸性范围具有缓冲作用的缓冲液,优选为在pH1~6.5、更优选为在pH3~6.5具有缓冲作用的酸性缓冲液。具体地,作为脂质纳米粒子的制备中使用的酸性缓冲液,可举出与前述例示的相同的缓冲液,例如可举出:MES缓冲液、苹果酸缓冲液、邻苯二甲酸缓冲液、马来酸缓冲液、琥珀酸缓冲液、酒石酸缓冲液、柠檬酸缓冲液等。

#### [0194] 将外水相更换为中性缓冲液的步骤

通过在核酸添加步骤中将得到的包封核酸的脂质纳米粒子的外水相更换为中性缓冲液,可以制备可用作核酸导入剂的包封核酸的脂质纳米粒子。

作为将外水相更换为中性缓冲液的方法,可举出:利用透析、超滤或稀释的方法。

作为中性缓冲液,可举出:磷酸缓冲生理盐水(PBS)、Tris-HCl缓冲液、ADA、PIPES、PIPES倍半钠、ACES、MOPS、BES、MOPSO、TES、HEPES、TAPSO、POPSO、HEPSO等。中性缓冲液的pH为6~8。

[0195] 通过将本发明的方法中制备的包封核酸的脂质纳米粒子与细胞接触,由此可以在生物体内和/或生物体外将该核酸导入该细胞内。因此,本发明提供一种在生物体内和/或生物体外将该核酸导入该细胞内的方法。

[0196] 通过本发明的方法,能够将任意核酸导入细胞内。作为核酸的种类,可举出:DNA、RNA、RNA的嵌合核酸、DNA/RNA的杂合体等,但并不限于此。此外,核酸可以使用1~3条链中的任一种,但优选为单链或双链。核酸可以是作为嘌呤或嘧啶碱基的N-葡萄糖苷的其他类型的核苷酸、或具有非核苷酸骨架的其他低聚物(例如,市售的肽核酸(PNA)等)、或具有特殊键的其他低聚物(其中,该低聚物含有在DNA或RNA中中发现的碱基的配对、具有允许碱基附着的构型的核苷酸)等。进一步,该核酸还可以是例如,带有公知修饰的核酸、具有本领域已知标记的核酸、加帽的核酸、经甲基化的核酸、1个以上的天然核苷酸用类似物取代而成的核酸、经分子内核苷酸修饰的核酸、具有无带电荷键合(例如,甲基磺酸酯、磷酸三酯、氨

基磷酸酯、氨基甲酸酯等)的核酸、具有含电荷的键或含硫键(例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的核酸、具有例如蛋白质(例如,核酸酶、核酸酶抑制剂、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等)、糖(例如,单糖等)等侧链基的核酸、具有插入性化合物(例如,吡啶、补骨脂素等)的核酸、含有螯合物(例如,金属、具有放射活性的金属、硼、氧化性的金属等)的核酸、含有烷基化剂的核酸、具有经修饰的键的核酸(例如, $\alpha$ 异构体型的核酸等)等。

[0197] 能够在本发明中使用的DNA的种类没有特别限制,可根据使用目的而适当选择。例如可举出:质粒DNA、cDNA、反义DNA、染色体DNA、PAC、BAC、CpG寡核苷酸等,优选为质粒DNA、cDNA、反义DNA,更优选为质粒DNA。质粒DNA等环状DNA可通过适当限制性内切酶等被消化,也可以用作线性DNA。

[0198] 能够在本发明中使用的RNA的种类没有特别限制,可根据使用目的而适当选择。例如可举出:siRNA、miRNA、shRNA、反义RNA、信使RNA(mRNA)、单链RNA基因组、双链RNA基因组、RNA复制子、转运RNA、核糖体RNA等,优选为siRNA、miRNA、shRNA、mRNA、反义RNA、RNA复制子。

[0199] 本发明中使用的核酸优选利用本领域技术人员通常使用的方法进行纯化。

[0200] 出于例如疾病的预防和/或治疗的目的,可以将用本发明的方法制造的包封核酸的脂质纳米粒子给予至生物体内(in vivo)。因此,本发明中使用的核酸优选为对某种指定疾病具有预防和/或治疗活性的核酸(预防/治疗用核酸)。作为这样的核酸,例如可举出可用于称为基因治疗的核酸等。

[0201] 用本发明的方法制造的包封核酸的脂质纳米粒子可用作药物递送系统,用于将核酸等选择性地递送到特定细胞内,可用于例如基于向树突细胞的抗原基因导入的DNA疫苗、肿瘤的基因治疗药、利用RNA干扰抑制靶基因的表达的核酸药物等。因此,本发明提供一种药物组合物的制造方法。

[0202] 包封有核酸的脂质纳米粒子的粒径没有特别限制,但优选为10nm~500nm,更优选为30nm~300nm。粒径的测定例如可以使用Zetasizer Nano(Malvern公司)等粒度分布测定装置来进行。脂质纳米粒子的粒径可以通过脂质纳米粒子的制造方法来适当调整。

[0203] 包封有核酸的脂质纳米粒子的表面电位( $\xi$ 电位)没有特别限制,但优选为-15~+15mV、进一步优选为-10~+10mV。在以往的基因导入中,主要使用表面电位被带正电的粒子。这作为用于促进与具有负电荷的细胞表面的硫酸肝素之间的静电相互作用,从而促进向细胞摄取的方法是有用的,但有可能正表面电荷在细胞内与递送核酸之间的相互作用而抑制核酸从载体的释放、或mRNA与递送核酸之间的相互作用而抑制蛋白质的合成。通过将表面电荷调整至上述范围内,可以解决该问题。表面电荷的测定例如可以使用Zetasizer Nano等 $\xi$ 电位测定装置来进行。脂质纳米粒子的表面电荷可以通过脂质纳米粒子的构成成分的组成进行调整。

[0204] 以下,对在生物体外(in vitro)使包封有核酸的脂质纳米粒子与细胞接触的步骤进行具体地说明。

[0205] 细胞在使其与该脂质纳米粒子接触的数天前悬浮在适当的培养基中,并在适当的条件下进行培养。在使其与脂质纳米粒子接触时,细胞可以在增殖期,也可以不在增殖期。

[0206] 该接触时的培养液可以是含血清的培养基,也可以是不含血清的培养基,但培养基中的血清浓度优选为30重量%以下,更优选为20重量%以下。当培养基中包含过量的血清等蛋白质时,则有可能阻碍该脂质纳米粒子与细胞的接触。

[0207] 该接触时的细胞密度没有特别限定,但可以考虑细胞的种类等进行适当设定,通常为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 细胞/mL的范围内。

[0208] 在这样制备的细胞中,例如添加包封有上述核酸的脂质纳米粒子悬浮液。该悬浮液的添加量没有特别限定,可以考虑细胞数等进行适当设定。与细胞接触时的脂质纳米粒子的浓度只要能够实现目标核酸向细胞内的导入,就没有特别限定,但作为脂质浓度,通常为 $1 \sim 300 \text{nmol/mL}$ ,优选为 $10 \sim 200 \text{nmol/mL}$ ,作为核酸的浓度,通常为 $0.01 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ ,优选为 $0.05 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ 。

[0209] 在将上述悬浮液添加到细胞中后,对该细胞进行培养。培养时的温度、湿度、 $\text{CO}_2$ 浓度等考虑细胞的种类进行适当设定。在细胞为源自哺乳动物的细胞的情况下,通常,温度约为 $37^\circ\text{C}$ 、湿度约为95%、 $\text{CO}_2$ 浓度约为5%。此外,培养时间也可以考虑到所使用的细胞的种类等的条件进行适当设定,但通常在 $0.1 \sim 96$ 小时的范围内,优选为 $0.2 \sim 72$ 小时的范围内,更优选为 $0.5 \sim 48$ 小时的范围内。当上述培养时间过短时,则核酸不能充分导入细胞内,当培养时间过长时,则细胞有时会变弱。

[0210] 通过上述培养,核酸被导入细胞内,但优选将培养基更换为新鲜的培养基、或向培养基中添加新鲜的培养基而进一步继续培养。在细胞为源自哺乳动物的细胞的情况下,新鲜的培养基优选含有血清或营养因子。

[0211] 另外,如上所述,通过使用包封有核酸的脂质纳米粒子,不仅在生物体外(in vitro),而且在生物体内(in vivo)也能够向细胞内导入核酸。即,通过将包封有核酸的脂质纳米粒子给予至对象,可使该脂质纳米粒子到达并接触靶细胞,从而在生物体内将包封于该脂质纳米粒子中的核酸导入细胞内。作为能够给与该脂质纳米粒子的对象,没有特别限定,例如可举出:哺乳类(例如,人、猴、小鼠、大鼠、仓鼠、牛等)、鸟类(例如,鸡、鸵鸟等)、两栖类(例如,蛙等)、鱼类(例如,斑马鱼、青鳉鱼等)等脊椎动物、昆虫(例如,蚕、蛾、果蝇等)等无脊椎动物、植物等。作为包封有核酸的脂质纳米粒子的给与对象,优选为人或其他哺乳动物。

[0212] 靶细胞的种类没有特别限定,通过使用包封有核酸的脂质纳米粒子,能够向各种组织(例如,肝脏、肾脏、胰脏、肺、脾脏、心脏、血液、肌肉、骨、脑、胃、小肠、大肠、皮肤、脂肪组织、淋巴结、肿瘤等)中的细胞导入核酸。

[0213] 作为向导入有核酸和/或核酸以外的化合物的脂质纳米粒子的对象(例如,脊椎动物、无脊椎动物等)的给予方法,只要是能够使该脂质纳米粒子到达并接触靶细胞,从而将导入至该脂质纳米粒子的化合物导入细胞内的方法就没有特别限定,考虑导入化合物的种类、靶细胞的种类、部位等,可以适当选择本身公知的给予方法(例如,经口给予、非经口给予(例如,静脉内给予、肌内给予、局部给予、经皮给予、皮下给予、腹腔内给予、喷雾等)等)。该脂质纳米粒子的给予量只要在能够实现化合物向细胞内的导入的范围内,就没有特别限定,可以考虑给与对象的种类、给予方法、导入化合物的种类、靶细胞的种类、部位等进行适当选择。

[0214] 在使用包封有核酸的脂质纳米粒子作为核酸导入剂的情况下,可以按照常规方法进行制剂化。

[0215] 在提供该核酸导入剂作为研究用试剂的情况下,该本发明的核酸导入剂可以将包封有核酸的脂质纳米粒子直接使用、或者使用与例如水或其以外的生理学上可接受的液

(例如,水溶性溶剂(例如,苹果酸缓冲液等)、有机溶剂(例如,乙醇、甲醇、DMSO、叔丁醇等)或水溶性溶剂与有机溶剂的混合液等)形成的无菌性溶液或悬浮液来提供。本发明的核酸导入剂可以适当包含本身公知的生理学上可接受的添加剂(例如,赋形剂、媒介物(vehicle)、防腐剂、稳定剂、结合剂等)。

[0216] 另外,在提供该核酸导入剂作为药物的情况下,该本发明的核酸导入剂通过将包封有核酸的脂质纳米粒子直接使用、或者与药物上可接受的公知的添加剂(例如,载体、香味剂、赋形剂、媒介物、防腐剂、稳定剂、结合剂等)一起使用,并将它们以常规认可的制剂实施所要求的单位用量形式进行混合,可以制造为口服剂(例如,片剂、胶囊剂等)或者非口服剂(例如注射剂、喷雾剂等),优选作为非口服剂(更优选注射剂)。

[0217] 本发明的核酸导入剂除了成年人用之外,还可以作为儿童用制剂。

#### 实施例

[0218] 以下,对本发明的实施例进行更为详细的说明,但本发明完全不受到该实施例的限定。

[0219] 在以下的实施例等中,将式(1)或式(2)表示的离子性脂质用上述表中记载的名称示出。有时将包封核酸的脂质纳米粒子成为“包封核酸的纳米粒子”。此外,以下的实施例等中使用的缩写的含义分别如下所示。

Chol:胆固醇

DMG-PEG2000:1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油,甲氧基聚乙二醇(PEG的数均分子量(Mn):2000)

DOPC:1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱

DSPC:1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱

DEPC:1,2-二芥酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱

MES:2-吗啉乙磺酸

PBS:磷酸缓冲生理盐水

DDW:去离子蒸馏水

DCM:二氯甲烷

THF:四氢呋喃

IPA:2-丙醇

DHP:3,4-二氢-2H-吡喃

PPTS:对甲苯磺酸吡啶鎓

THP:2-四氢吡喃

DMAP:4-二甲氨基吡啶

DMT-MM:4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉氯化物N水合物

DSC:碳酸二(N-琥珀酰亚胺基)酯

EDC:1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐

TEA:三乙胺

TBAI:四丁基碘化铵

DIPEA:N,N-二异丙基乙胺

NPM:4-苯基吗啉

MsCl: 甲基磺酰氯

Ms: 甲磺酰基

pNPCl: 4-硝基苯基氯甲酸酯

[0220] 实施例1缓冲液的影响

作为离子性脂质,分别使用SS-0P和MC3。作为离子性脂质,在使用SS-0P时的脂质组成以摩尔比计为SS-0P:DOPC:Chol:DMG-PEG2000=52.5:7.5:40:1.5,作为离子性脂质,在使用MC3时的脂质组成以摩尔比计为MC3:DSPC:Chol:DMG-PEG2000=50:10:38.5:1.5。

[0221] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液(20mM, pH3.0) 2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液300 $\mu$ L。使用NanoAssembler(注册商标)超高速纳米药物制备装置(Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH5),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件(25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟)下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液(pH5)将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件(25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟)下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。进行2次以上的操作,将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4,进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH5),然后在离心条件(25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟)下进行超滤,浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL,制成粒子溶液。

[0222] 将粒子溶液(总脂质20mM, 15 $\mu$ L)与含有编码荧光素酶的mRNA(CleanCap(注册商标)FLuc mRNA-(L-7602))的MES(pH5)、邻苯二甲酸(pH5)、马来酸(pH5)、琥珀酸(pH5)、DL-苹果酸(pH5)、DL-酒石酸(pH5)或柠檬酸(pH5)的缓冲液(核酸浓度1.5 $\mu$ g/135 $\mu$ L, 135 $\mu$ L)在利用涡旋混合器的搅拌条件下稀释并混合,使用铝块型培养箱在37 $^{\circ}$ C下培育5分钟。向培育后的溶液加入150 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

[0223] 对得到的包封核酸的纳米粒子的粒径、多分散指数(Polydispersity Index, PdI)、mRNA的包封率进行分析。粒径和PdI通过使用Zetasizer(注册商标)的动态光散射法进行测定。mRNA的包封率通过Ribogreen(注册商标)测定法进行测定。作为结果,mRNA被包封在所有MES、邻苯二甲酸、马来酸、琥珀酸、DL-苹果酸、DL-酒石酸或柠檬酸的缓冲液中,未观察到包封率的差异(参照表3、图1和图2)。粒径用Z-Ave(Z-平均)和Number Mean(个数平均)来表示(以下也相同)。

[0224] [表3]

样品		包封率 (%)	Z-Ave (d.nm)	个数平均 (d.nm)	PdI	
1	SS-OP	MES	91.5	124.7	74.8	0.180
2		邻苯二甲酸	96.6	123.7	80.1	0.155
3		马来酸	97.1	124.9	74.7	0.152
4		琥珀酸	95.9	124.7	79.1	0.154
5		DL-苹果酸	94.3	126.0	75.4	0.138
6		DL-酒石酸	92.0	125.7	75.2	0.135
7		柠檬酸	95.6	127.2	78.2	0.157
8	MC3	MES	97.9	78.1	37.8	0.254
9		邻苯二甲酸	99.4	93.4	54.2	0.207
10		马来酸	100.0	89.3	38.6	0.261
11		DL-酒石酸	99.9	87.5	43.6	0.264
12		DL-苹果酸	98.7	89.2	40.9	0.300
13		琥珀酸	91.7	100.6	67.9	0.194
14		柠檬酸	99.5	90.1	56.5	0.164

[0225] 实施例2蔗糖浓度和培育温度的影响

作为离子性脂质,使用SS-OP。脂质组成以摩尔比计为SS-OP:DOPC:Chol:DMG-PEG2000=52.5:7.5:40:1.5。

[0226] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液(20mM,pH3.0)2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液300 $\mu$ L。使用NanoAssblr(注册商标)超高速纳米药物制备装置(Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液(pH6)将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。进行2次以上的操作,将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4,进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液或无DNase/RNase蒸馏水至蔗糖终浓度为0mg/mL、160mg/mL或320mg/mL,制成粒子溶液。

[0227] 将粒子溶液(总脂质20mM,15 $\mu$ L)在4 $^{\circ}$ C下保存得到的溶液(以下也称为液剂)或将粒子溶液在-80 $^{\circ}$ C下冷冻后并在4 $^{\circ}$ C下融解得到的溶液(以下也称为冷冻融解粒子)与含有编码荧光素酶的mRNA(CleanCap(注册商标)FLuc mRNA-(L-7602))的溶液(核酸浓度1.5 $\mu$ g/135 $\mu$ L,缓冲液条件为MES(pH5),135 $\mu$ L)在利用涡旋混合器的搅拌条件下稀释并混合,对于各自的蔗糖浓度的混合物,使用铝块型培养箱,液剂样品在95 $^{\circ}$ C、75 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、室温下培育5分钟。其中,蔗糖浓度为160mg/mL的混合物进一步在冰上培育5分钟而成的样品。冷冻融解粒子在95 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、室温下培育5分钟。向培育后的溶液加入150 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

[0228] 对得到的包封核酸的纳米粒子的粒径、多分散指数(PdI)、mRNA的包封率进行分

析。粒径和PdI通过使用Zetasizer(注册商标)的动态光散射法进行测定。mRNA的包封率通过Ribogreen(注册商标)测定法进行测定。作为结果,在任一培育温度下mRNA均被包封,未观察到包封率的差异。此外,在任一蔗糖浓度下均被包封,未观察到包封率的差异。得到的包封核酸的纳米粒子的粒径在95°C下培育得到的较大,在其他温度(75°C、55°C、35°C或者室温)下未观察到粒径的差异(参照表4、图3和图4)。

[0229] 使得到的包封核酸的纳米粒子作用于HeLa细胞,评价核酸导入效率。将HeLa细胞在D-MEM培养基(高葡萄糖)(含有L-谷氨酰胺、酚红)(添加10%FBS、1%青霉素-链霉素溶液)中以 $5 \times 10^3$ 细胞/100 $\mu$ L接种在96孔透明平底板中。添加得到的核酸包封粒子至培养基中的核酸浓度为0.02 $\mu$ g/4 $\mu$ L。16小时后,使用发光量评价荧光素酶蛋白质的导入量。加入100 $\mu$ L的Steady-Glo(注册商标),振荡5分钟,溶解细胞,用GloMax20/20发光检测仪定量发光量。作为结果,在任一培育温度下确认到荧光素酶蛋白质的导入,未观察到体外(in vitro)活性的差异。此外,与液剂相比,在冷冻融解粒子中观察到较高的活性(参照图5)。

[0230] [表4]

样品	制法	蔗糖浓度	温度(°C)	包封率(%)	Z-Ave(d.nm)	个数平均(d.nm)	PdI
1	液剂	160 mg/mL	95	90.2	149.9	116.1	0.091
2			75	90.5	136.8	97.45	0.106
3			55	93.3	134.8	91.51	0.124
4			35	92.4	132.4	92.97	0.117
5			室温	91.5	135.1	95.15	0.095
6			冰上	92.1	130.9	83.14	0.128
7		0 mg/mL	95	92.0	147.3	111.4	0.086
8			75	93.7	136	85.81	0.107
9			55	92.7	132.5	100.9	0.104
10			35	93.0	133.2	102.8	0.067
11			室温	93.2	133.3	100.1	0.075
12		320 mg/mL	95	91.8	152.7	115	0.08
13			75	92.8	137.5	92.7	0.114
14			55	96.8	134.3	98.42	0.109
15			35	92.1	132.5	86.81	0.123
16			室温	96.1	133.9	102.3	0.069
17	冷冻融解粒子	160 mg/mL	95	85.5	169.5	123.3	0.101
18			35	88.8	152.3	111.4	0.125
19			室温	86.1	150.1	102.2	0.119

[0231] 实施例3培育时间的影响

作为离子性脂质,使用SS-OP。脂质组成以摩尔比计为SS-OP:DOPC:Chol:DMG-PEG2000=52.5:7.5:40:1.5。

[0232] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液(20mM,pH3.0)2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液

300 $\mu$ L。使用NanoAssmblr(注册商标)超高速纳米药物制备装置(Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液(pH6)将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。进行2次以上的操作,将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4,进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL,制成粒子溶液。

[0233] 将粒子溶液(总脂质20mM,15 $\mu$ L)与含有编码荧光素酶的mRNA(CleanCap(注册商标)FLuc mRNA-(L-7602))的溶液(核酸浓度1.5 $\mu$ g/135 $\mu$ L,缓冲液条件为MES(pH6),135 $\mu$ L)在利用涡旋混合器的搅拌条件下稀释并混合,使用铝块型培养箱在室温下培育60分钟、30分钟、15分钟、10分钟、5分钟或1分钟。向培育后的溶液加入150 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。或者,为了比较,先在粒子溶液(总脂质20mM,15 $\mu$ L)加入150 $\mu$ L的PBS,然后加入编码荧光素酶的mRNA(同上)使终浓度为1.5 $\mu$ g/300 $\mu$ L。

[0234] 对得到的包封核酸的纳米粒子的粒径、多分散指数(PdI)、mRNA的包封率进行分析。粒径和PdI通过使用Zetasizer(注册商标)的动态光散射法进行测定。mRNA的包封率通过Ribogreen(注册商标)测定法进行测定。作为结果,在任一培育时间下均被包封,未观察到包封率的差异。此外,先在粒子溶液中加入PBS的溶液(PBS $\rightarrow$ mRNA)中,得到较低的包封率(参照图6和图7)。

[0235] 使得到的包封核酸的纳米粒子作用于HeLa细胞,评价核酸导入效率。将HeLa细胞在D-MEM培养基(高葡萄糖)(含有L-谷氨酰胺、酚红)(添加10%FBS、1%青霉素-链霉素溶液)中以 $5 \times 10^3$ 细胞/100 $\mu$ L接种在96孔透明平底板中。添加得到的核酸包封粒子至培养基中的核酸浓度为0.02 $\mu$ g/4 $\mu$ L。培养基中添加荧光素至0.1mM,使用发光量随时间评价荧光素酶蛋白质的导入量。将在含有包封核酸的纳米粒子和荧光素的培养基中培养的HeLa细胞设置在培育型发光检测仪(Kronos)中,每隔1小时测量2分钟的累积发光量。作为结果,核酸导入效率不随培育时间发生变化。此外,先在粒子溶液中加入PBS的溶液(PBS $\rightarrow$ mRNA)中,核酸导入效率低(参照图8和图9)。

[0236] 实施例4pH的影响

作为离子性脂质,使用SS-OP、SS-OC、MC3或DODAP,进一步,在使用SS-OP或SS-OC时作为其他脂质,使用DOPC、Cho1和DMG-PEG2000,在使用MC3或DODAP时作为其他脂质,使用DSPC、Cho1和DMG-PEG2000。使用的SS-OP或SS-OC:DOPC:Cho1的摩尔比为52.5:7.5:40,相对于SS-OP或SS-OC、DOPC与Cho1的总和,使用1.5mol%的DMG-PEG2000。此外,使用的MC3或DODAP: DSPC:Cho1:DMG-PEG2000的摩尔比为50:10:38.5:1.5。

[0237] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液(20mM,pH3.0)2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液300 $\mu$ L。使用NanoAssmblr(注册商标)超高速纳米药物制备装置(Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH5、pH5.5、pH6、pH6.5或pH7),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液(pH5、pH5.5、pH6、pH6.5或pH7)将得到的浓缩物

稀释至15mL,再次在离心条件(25°C,1000g,5分钟)下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。进行2次以上的操作,将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4,进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH5、pH5.5、pH6、pH6.5或pH7),然后在离心条件(25°C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL,制成粒子溶液。

[0238] 将粒子溶液(总脂质20mM,15 $\mu$ L)与含有编码荧光素酶的mRNA(CleanCap(注册商标)FLuc mRNA-(L-7602))的溶液(核酸浓度1.5 $\mu$ g/135 $\mu$ L,缓冲液条件为MES(pH6),135 $\mu$ L)在利用涡旋混合器的搅拌条件下稀释并混合,对于各自的pH与离子性脂质组合的混合物,使用铝块型培养箱在37°C下培育5分钟。向培育后的溶液加入150 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

[0239] 对得到的包封核酸的纳米粒子的粒径、多分散指数(PdI)、mRNA的包封率进行分析。粒径和PdI通过使用Zetasizer(注册商标)的动态光散射法进行测定。mRNA的包封率通过Ribogreen(注册商标)测定法进行测定。作为结果,SS-OP、MC3在pH6为止时被包封,在pH6.5、pH7时包封率降低。另一方面,SS-OC、DODAP在pH5.5为止时被包封,在pH6、pH6.5、pH7时包封率降低(参照图10和图11)。

[0240] 实施例5盐浓度的影响

作为离子性脂质,分别使用SS-OP和MC3。作为离子性脂质,在使用SS-OP时的脂质组成以摩尔比计为SS-OP:DOPC:Chol:DMG-PEG2000=52.5:7.5:40:1.5,作为离子性脂质,在使用MC3时的脂质组成以摩尔比计为MC3:DSPC:Chol:DMG-PEG2000=50:10:38.5:1.5。

[0241] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液(20mM,pH3.0)2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液300 $\mu$ L。使用NanoAsmblr(注册商标)超高速纳米药物制备装置(Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25°C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件(25°C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液(pH6)将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件(25°C,1000g,5分钟)下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。进行2次以上的操作,将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4,进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后在离心条件(25°C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL,制成粒子溶液。

[0242] 将粒子溶液(总脂质20mM,15 $\mu$ L)与含有编码荧光素酶的mRNA(CleanCap(注册商标)FLuc mRNA-(L-7602))的溶液(核酸浓度1.5 $\mu$ g/135 $\mu$ L,缓冲液条件为含有NaCl为0mM、1mM、10mM、30mM、50mM、100mM、150mM或300mM的MES(pH6),135 $\mu$ L)在利用涡旋混合器的搅拌条件下稀释并混合,对于各自的盐浓度与离子性脂质组合的混合物,使用铝块型培养箱在37°C下培育5分钟。向培育后的溶液加入150 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

[0243] 对得到的包封核酸的纳米粒子的粒径、多分散指数(PdI)、mRNA的包封率进行分析。粒径和PdI通过使用Zetasizer(注册商标)的动态光散射法进行测定。mRNA的包封率通过Ribogreen(注册商标)测定法进行测定。作为结果,随着缓冲液的盐浓度增加,mRNA的包封率降低(参照图12和图13)。

[0244] 实施例6:混合比和混合方式的影响

作为离子性脂质,使用SS-OP。脂质组成以摩尔比计为SS-OP:DOPC:Chol:DMG-PEG2000=52.5:7.5:40:1.5。

[0245] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液 (20mM, pH3.0) 2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液 300 $\mu$ L。使用NanoAssmblr (注册商标) 超高速纳米药物制备装置 (Precision NanoSystems制造), 在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下, 制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液 (pH6), 然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中, 在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟) 下进行超滤, 浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液 (pH6) 将得到的浓缩物稀释至15mL, 再次在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟) 下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。进行2次以上的操作, 将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4, 进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液 (pH6), 然后在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟) 下进行超滤, 浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL, 制成粒子溶液。

[0246] 将粒子溶液或者粒子溶液用MES (pH6) 的缓冲液中稀释而得到的溶液 (脂质浓度 300nmol/15 $\mu$ L、300nmol/75 $\mu$ L或300nmol/135 $\mu$ L) 和含有编码荧光素酶的mRNA (CleanCap (注册商标) FLuc mRNA- (L-7602)) 的MES (pH6) 的缓冲液 (核酸浓度3 $\mu$ g/135 $\mu$ L、3 $\mu$ g/75 $\mu$ L或者3 $\mu$ g/15 $\mu$ L) 在利用涡旋混合器的搅拌条件下, 或者通过在吹吸后轻敲进行稀释并混合, 使用铝块型培养箱在37 $^{\circ}$ C下培育5分钟。向培育后的溶液加入150 $\mu$ L的PBS, 得到包封核酸的纳米粒子。

[0247] 对得到的包封核酸的纳米粒子的粒径、多分散指数 (PdI)、mRNA的包封率进行分析。粒径和PdI通过使用Zetasizer (注册商标) 的动态光散射法进行测定。mRNA的包封率通过Ribogreen (注册商标) 测定法进行测定。作为结果, 在利用涡旋混合器的搅拌条件下, 在任一混合比率时均得到较高的包封率, 但通过在吹吸后轻敲进行混合时, 核酸水溶液的体积越小, 包封率越低 (参照图19、图20和图21)。

[0248] 使得到的包封核酸的纳米粒子作用于HeLa细胞, 评价核酸导入效率。将HeLa细胞在D-MEM培养基 (高葡萄糖) (含有L-谷氨酰胺、酚红) (添加10% FBS、1% 青霉素-链霉素溶液) 中以 $5 \times 10^3$ 细胞/100 $\mu$ L接种在96孔透明平底板中。添加得到的核酸包封粒子至培养基中的核酸浓度为0.02 $\mu$ g/4 $\mu$ L。13小时后, 使用发光量评价荧光素酶蛋白质的导入量。加入100 $\mu$ L的Steady-Glo (注册商标), 振荡5分钟, 溶解细胞, 用GloMax20/20发光检测仪定量发光量。作为结果, 在利用涡旋混合器的搅拌条件下未观察到体外活性的差异, 吹吸后通过轻敲进行混合, 并且在核酸水溶液的体积小时体外活性降低 (参照图21)。

[0249] 实施例7缓冲液的影响

作为离子性脂质, 分别使用SS-OP和MC3。作为离子性脂质, 在使用SS-OP时的脂质组成以摩尔比计为SS-OP:DOPC:Chol:DMG-PEG2000=52.5:7.5:40:1.5, 作为离子性脂质, 在使用MC3时的脂质组成以摩尔比计为MC3:DSPC:Chol:DMG-PEG2000=50:10:38.5:1.5。

[0250] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液 (20mM, pH3.0) 2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液 300 $\mu$ L。使用NanoAssmblr (注册商标) 超高速纳米药物制备装置 (Precision NanoSystems制造), 在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下, 制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液 (pH5), 然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中, 在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟) 下进行超滤, 浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液 (pH5) 将得到的浓缩物稀释至15mL, 再次在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟) 下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。进行2次以上的操作, 将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4, 进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液 (pH5), 然后在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分

钟)下进行超滤,浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL,制成粒子溶液。

[0251] 将粒子溶液(总脂质20mM,15 $\mu$ L)与含有编码荧光素酶的mRNA(CleanCap(注册商标)FLuc mRNA-(L-7602))的MES(pH5)、邻苯二甲酸(pH5)、马来酸(pH5)、琥珀酸(pH5)、DL-苹果酸(pH5)、DL-酒石酸(pH5)或柠檬酸(pH5)的缓冲液(核酸浓度3 $\mu$ g/135 $\mu$ L,135 $\mu$ L)在利用涡旋混合器的搅拌条件下稀释并混合,使用铝块型培养箱在37 $^{\circ}$ C下培育5分钟。向培育后的溶液加入150 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

[0252] 对得到的包封核酸的纳米粒子的粒径、多分散指数(PdI)、mRNA的包封率进行分析。粒径和PdI通过使用Zetasizer(注册商标)的动态光散射法进行测定。mRNA的包封率通过Ribogreen(注册商标)测定法进行测定。作为结果,mRNA被包封在所有MES、邻苯二甲酸、马来酸、琥珀酸、DL-苹果酸、DL-酒石酸或柠檬酸的缓冲液中,未观察到包封率的差异(参照图22和图23)。

[0253] 实施例8培育温度的影响

作为离子性脂质,使用SS-OP。脂质组成以摩尔比计为SS-OP:DOPC:Chol:DMG-PEG2000=52.5:7.5:40:1.5。

[0254] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液(20mM,pH3.0)2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液300 $\mu$ L。使用NanoAsmblr(注册商标)超高速纳米药物制备装置(Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液(pH6)将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。进行2次以上的操作,将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4,进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液或无DNase/RNase蒸馏水至蔗糖终浓度为0mg/mL、160mg/mL或320mg/mL,制成粒子溶液。

[0255] 将粒子溶液(总脂质20mM,15 $\mu$ L)与含有编码荧光素酶的mRNA(CleanCap(注册商标)FLuc mRNA-(L-7602))的溶液(核酸浓度3 $\mu$ g/135 $\mu$ L,缓冲液条件为MES(pH5),135 $\mu$ L)在利用涡旋混合器的搅拌条件下稀释并混合,使用铝块型培养箱,在95 $^{\circ}$ C、75 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C或37 $^{\circ}$ C下培育5分钟。向培育后的溶液加入150 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

[0256] 对得到的包封核酸的纳米粒子的粒径、多分散指数(PdI)、mRNA的包封率进行分析。粒径和PdI通过使用Zetasizer(注册商标)的动态光散射法进行测定。mRNA的包封率通过Ribogreen(注册商标)测定法进行测定。作为结果,在任一培育温度下均被包封,未观察到包封率的差异。观察到得到的包封核酸的纳米粒子的粒径存在越是以高温培育则粒径越大的倾向(参照图24和图25)。

[0257] 使得到的包封核酸的纳米粒子作用于HeLa细胞,评价核酸导入效率。将HeLa细胞在D-MEM培养基(高葡萄糖)(含有L-谷氨酰胺、酚红)(添加10%FBS、1%青霉素-链霉素溶液)中以 $5 \times 10^3$ 细胞/100 $\mu$ L接种在96孔透明平底板中。添加得到的核酸包封粒子至培养基中的核酸浓度为0.02 $\mu$ g/4 $\mu$ L。13小时后,使用发光量评价荧光素酶蛋白质的导入量。加入100 $\mu$ L的Steady-Glo(注册商标),振荡5分钟,溶解细胞,用GloMax20/20发光检测仪定量发光量。作为结果,在任一培育温度下确认到荧光素酶蛋白质的导入,未观察到体外活性的差

异(参照图26)。

[0258] 实施例9培育时间的影响

作为离子性脂质,使用SS-OP。脂质组成以摩尔比计为SS-OP:DOPC:Chol:DMG-PEG2000=52.5:7.5:40:1.5。

[0259] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液(20mM,pH3.0)2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液300 $\mu$ L。使用NanoAsmblr(注册商标)超高速纳米药物制备装置(Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液(pH6)将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。进行2次以上的操作,将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4,进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL,制成粒子溶液。

[0260] 将粒子溶液(总脂质20mM,15 $\mu$ L)与含有编码荧光素酶的mRNA(CleanCap(注册商标)FLuc mRNA-(L-7602))的溶液(核酸浓度3 $\mu$ g/135 $\mu$ L,缓冲液条件为MES(pH6),135 $\mu$ L)在利用涡旋混合器的搅拌条件下稀释并混合,使用铝块型培养箱在室温下培育60分钟、30分钟、15分钟、10分钟、5分钟或1分钟。向培育后的溶液加入150 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。或者,为了比较,先在粒子溶液(总脂质20mM,15 $\mu$ L)中加入150 $\mu$ L的PBS,然后加入编码荧光素酶的mRNA(同上)使终浓度为1.5 $\mu$ g/300 $\mu$ L。

[0261] 对得到的包封核酸的纳米粒子的粒径、多分散指数(PdI)、mRNA的包封率进行分析。粒径和PdI通过使用Zetasizer(注册商标)的动态光散射法进行测定。mRNA的包封率通过Ribogreen(注册商标)测定法进行测定。作为结果,在任一培育时间下均被包封,未观察到包封率的差异。此外,先在粒子溶液中加入PBS的溶液(PBS $\rightarrow$ mRNA)中,得到较低的包封率(参照图27和图28)。

[0262] 使得到的包封核酸的纳米粒子作用于HeLa细胞,评价核酸导入效率。将HeLa细胞在D-MEM培养基(高葡萄糖)(含有L-谷氨酰胺、酚红)(添加10%FBS、1%青霉素-链霉素溶液)中以 $5 \times 10^3$ 细胞/100 $\mu$ L接种在96孔透明平底板中。添加得到的核酸包封粒子至培养基中的核酸浓度为0.02 $\mu$ g/4 $\mu$ L。13小时后,使用发光量评价荧光素酶蛋白质的导入量。加入100 $\mu$ L的Steady-Glo(注册商标),振荡5分钟,溶解细胞,用GloMax20/20发光检测仪定量发光量。作为结果,在任一培育时间下确认到荧光素酶蛋白质的导入,未观察到体外活性的差异。此外,先在粒子溶液中加入PBS的溶液(PBS $\rightarrow$ mRNA)中,观察到体外活性的降低(参照图29)。

[0263] 实施例10pH的影响

作为离子性脂质,使用SS-OP、SS-OC、MC3或DODAP,进一步,在使用SS-OP或SS-OC时作为其他脂质,使用DOPC、Chol和DMG-PEG2000,在使用MC3或DODAP时作为其他脂质,使用DSPC、Chol和DMG-PEG2000。使用的SS-OP或SS-OC:DOPC:Chol的摩尔比为52.5:7.5:40,相对于SS-OP或SS-OC、DOPC与Chol的总和,使用1.5mol%的DMG-PEG2000。此外,使用的MC3或DODAP: DSPC:Chol:DMG-PEG2000的摩尔比为50:10:38.5:1.5。

[0264] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液(20mM,pH3.0)2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液

300 $\mu$ L。使用NanoAssemblr(注册商标)超高速纳米药物制备装置(Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH5、pH5.5、pH6、pH6.5或pH7),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液(pH5、pH5.5、pH6、pH6.5或pH7)将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。进行2次以上的操作,将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4,进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH5、pH5.5、pH6、pH6.5或pH7),然后在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL,制成粒子溶液。

[0265] 将粒子溶液(总脂质20mM,15 $\mu$ L)与含有编码荧光素酶的mRNA(CleanCap(注册商标)FLuc mRNA-(L-7602))的溶液(核酸浓度3 $\mu$ g/135 $\mu$ L,缓冲液条件为MES(pH5、pH5.5、pH6、pH6.5或pH7),135 $\mu$ L)在利用涡旋混合器的搅拌条件下稀释并混合,对于各自的pH与离子性脂质组合的混合物,使用铝块型培养箱在37 $^{\circ}$ C下培育5分钟。向培育后的溶液加入150 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

[0266] 对得到的包封核酸的纳米粒子的粒径、多分散指数(PdI)、mRNA的包封率进行分析。粒径和PdI通过使用Zetasizer(注册商标)的动态光散射法进行测定。mRNA的包封率通过Ribogreen(注册商标)测定法进行测定。作为结果,SS-OP、SS-OC、MC3、DODAP在pH6为止时均被包封,在pH6.5和pH7时包封率降低(参照图30和图31)。

[0267] 使得到的包封核酸的纳米粒子中使用SS-OP制作的粒子作用于HeLa细胞,评价核酸导入效率。将HeLa细胞在D-MEM培养基(高葡萄糖)(含有L-谷氨酰胺、酚红)(添加10% FBS、1%青霉素-链霉素溶液)中以 $5 \times 10^3$ 细胞/100 $\mu$ L接种在96孔透明平底板中。添加得到的核酸包封粒子至培养基中的核酸浓度为0.02 $\mu$ g/4 $\mu$ L。13小时后,使用发光量评价荧光素酶蛋白质的导入量。加入100 $\mu$ L的Steady-Glo(注册商标),振荡5分钟,溶解细胞,用GloMax20/20发光检测仪定量发光量。作为结果,在pH6时显示最高的体外活性,在pH6.5下活性略有降低,其他在pH5、pH5.5、pH7下显示低活性(参照图32)。

[0268] 对得到的包封核酸的纳米粒子中使用SS-OP制作的粒子的Zeta电位进行分析。Zeta电位分别使用MES缓冲液(pH5、pH5.5、pH6、pH6.5或pH7),并通过使用Zetasizer(注册商标)的电泳光散射法进行测定。作为结果,在pH5、pH5.5下制作的粒子与在pH6、pH6.5、pH7下制作的粒子相比,在低pH环境中显示出更高的值(参照图33)。

[0269] 实施例11盐浓度的影响

作为离子性脂质,分别使用SS-OP和MC3。作为离子性脂质,在使用SS-OP时的脂质组成以摩尔比计为SS-OP:DOPC:Chol:DMG-PEG2000=52.5:7.5:40:1.5,作为离子性脂质,在使用MC3时的脂质组成以摩尔比计为MC3:DSPC:Chol:DMG-PEG2000=50:10:38.5:1.5。

[0270] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液(20mM,pH3.0)2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液300 $\mu$ L。使用NanoAssemblr(注册商标)超高速纳米药物制备装置(Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液(pH6)将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分

钟)下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。进行2次以上的操作,将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4,进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL,制成粒子溶液。

[0271] 将粒子溶液(总脂质20mM,15 $\mu$ L)与含有编码荧光素酶的mRNA(CleanCap(注册商标)FLuc mRNA-(L-7602))的溶液(核酸浓度3 $\mu$ g/135 $\mu$ L,缓冲液条件为含有NaCl为0mM、1mM、10mM、30mM、50mM、100mM、150mM或300mM的MES(pH6),135 $\mu$ L)在利用涡旋混合器的搅拌条件下稀释并混合,对于各自的盐浓度与离子性脂质组合的混合物,使用铝块型培养箱在37 $^{\circ}$ C下培育5分钟。向培育后的溶液加入150 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

[0272] 对得到的包封核酸的纳米粒子的粒径、多分散指数(PdI)、mRNA的包封率进行分析。粒径和PdI通过使用Zetasizer(注册商标)的动态光散射法进行测定。mRNA的包封率通过Ribogreen(注册商标)测定法进行测定。作为结果,随着缓冲液的盐浓度增加,存在mRNA的包封率降低的倾向(参照图34和图35)。

[0273] 实施例12离子性脂质种类的影响

作为离子性脂质,使用LN-81(后述的制造例的化合物34)。脂质组成以摩尔比计为LN-81:DEPC:Chol:DMG-PEG2000=52.5:17.5:30:1和LN-81:DEPC:Chol:DMG-PEG2000=60:5:35:1。

[0274] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液(20mM,pH5.0)2400 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液800 $\mu$ L。使用NanoAsmblr(注册商标)超高速纳米药物制备装置(Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为3:1、总流速为4mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下,制备LNP。向收集物中加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6.0),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液(pH6.0)将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4,进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6.0),然后在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL,制成粒子溶液。

[0275] 将液剂或冷冻融解粒子与含有编码荧光素酶的mRNA(CleanCap(注册商标)FLuc mRNA-(L-7602))的MES(pH6)的缓冲液(核酸浓度11.1 $\mu$ g/180 $\mu$ L、180 $\mu$ L)在利用涡旋混合器的搅拌条件下稀释并混合,使用铝块型培养箱在37 $^{\circ}$ C下培育5分钟。分注培育后的溶液100 $\mu$ L,向其中加入1010 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

[0276] 对得到的包封核酸的纳米粒子的粒径、多分散指数(PdI)、mRNA的包封率进行分析。粒径和PdI通过使用Zetasizer(注册商标)的动态光散射法进行测定。mRNA的包封率通过Ribogreen(注册商标)测定法进行测定。作为结果,包封有mRNA(参照表5)。

[0277] [表5]

样品		制法	包封率(%)	Z-Ave (d.nm)	个数平均 (d.nm)	PdI	
1	LN-81	52.5:17.5: 30:1	液剂	87	117	81	0.120
2		60:5:35:1	液剂	94	92	58	0.115
3			冷冻融解粒子	93	111	71	0.116

**[0278] 比较例1冻干物的制备方法**

作为离子性脂质,使用SS-OP,进一步,作为其他脂质,使用DOPC、Chol和DMG-PEG2000。使用的SS-OP:DOPC:Chol的摩尔比为52.5:7.5:40,相对于SS-OP、DOPC和Chol的总和,使用1.5mol%的DMG-PEG2000。

[0279] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液(20mM,pH3.0)2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液300 $\mu$ L。使用NanoAsmblr(注册商标)超高速纳米药物制备装置(Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液(pH6)将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL。将得到的溶液以各200 $\mu$ L加入样本瓶(Mighty Vial)中,进行冷冻干燥得到冻干物。

[0280] 将冻干物溶解在含有编码荧光素酶的mRNA(CleanCap(注册商标)FLuc mRNA-(L-7602))的溶液(核酸浓度2 $\mu$ g/200 $\mu$ L,溶解于DDW中)中。将该混合物使用铝块型培养箱在95 $^{\circ}$ C下培育5分钟。向培育后的溶液加入200 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

**[0281] 比较例2冻干物的制备方法**

作为离子性脂质,使用SS-OP,进一步,作为其他脂质,使用DOPC、Chol和DMG-PEG2000。使用的SS-OP:DOPC:Chol的摩尔比为52.5:7.5:40,相对于SS-OP、DOPC和Chol的总和,使用1.5mol%的DMG-PEG2000。

[0282] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液(20mM,pH3.0)2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液300 $\mu$ L。使用NanoAsmblr(注册商标)超高速纳米药物制备装置(Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液(pH6)将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL。将得到的溶液以各200 $\mu$ L加入样本瓶(Mighty Vial)中,进行冷冻干燥得到冻干物。

[0283] 将冻干物溶解在含有编码荧光素酶的mRNA(CleanCap(注册商标)FLuc mRNA-(L-7602))的溶液(核酸浓度4 $\mu$ g/200 $\mu$ L,溶解于DDW中)中。将该混合物使用铝块型培养箱在95 $^{\circ}$ C下培育5分钟。向培育后的溶液加入200 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

**[0284] 比较例3冻干物的制备方法**

作为离子性脂质,使用SS-OP,进一步,作为其他脂质,使用DOPC、Chol和DMG-PEG2000。使用的SS-OP:DOPC:Chol的摩尔比为52.5:7.5:40,相对于SS-OP、DOPC和Chol的总和,使用1.5mol%的DMG-PEG2000。

[0285] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液(20mM,pH3.0)2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液300 $\mu$ L。使用NanoAsmblr(注册商标)超高速纳米药物制备装置(Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为16mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件(25 $^{\circ}$ C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约

1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液 (pH6) 将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟) 下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL。将得到的溶液以各200 $\mu$ L加入样本瓶 (Mighty Vial) 中,进行冷冻干燥得到冻干物。

[0286] 将冻干物溶解在含有编码荧光素酶的mRNA (CleanCap (注册商标) FLuc mRNA- (L-7602)) 的溶液 (核酸浓度4 $\mu$ g/200 $\mu$ L, 溶解于DDW中) 中。将该混合物使用铝块型培养箱在75 $^{\circ}$ C下培育5分钟。向培育后的溶液加入200 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

[0287] 试验例1体外活性

作为离子性脂质,使用SS-OP,进一步,作为其他脂质,使用DOPC、Chol和DMG-PEG2000。使用的SS-OP:DOPC:Chol的摩尔比为52.5:7.5:40,相对于SS-OP、DOPC和Chol的总和,使用1.5mol%的DMG-PEG2000。

[0288] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液 (20mM, pH3.0) 2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液300 $\mu$ L。使用NanoAsmblr (注册商标) 超高速纳米药物制备装置 (Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液 (pH6),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟) 下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液 (pH6) 将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟) 下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。进行2次以上的操作,将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4,进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液 (pH6),然后在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟) 下进行超滤,浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL,制成粒子溶液。

[0289] 将粒子溶液 (总脂质20mM, 15 $\mu$ L) 在4 $^{\circ}$ C下保存得到的溶液 (液剂) 或将粒子溶液在-80 $^{\circ}$ C下冷冻后并在4 $^{\circ}$ C下融解得到的溶液 (冷冻融解粒子) 与含有编码荧光素酶的mRNA (CleanCap (注册商标) FLuc mRNA- (L-7602)) 的溶液 (核酸浓度1.5 $\mu$ g/135 $\mu$ L, 缓冲液条件为MES (pH5), 135 $\mu$ L) 在利用涡旋混合器的搅拌条件下稀释并混合,使用铝块型培养箱在95 $^{\circ}$ C下培育5分钟。向培育后的溶液加入150 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

[0290] 对得到的包封核酸的纳米粒子或在比较例1中制作的利用冻干技术的包封核酸的纳米粒子的粒径、多分散指数 (PdI)、mRNA的包封率进行分析。粒径和PdI通过使用Zetasizer (注册商标) 的动态光散射法进行测定。mRNA的包封率通过Ribogreen (注册商标) 测定法进行测定。作为结果,在液剂和冷冻融解得到的溶液中,得到与利用冻干技术的包封核酸的纳米粒子相同的mRNA的包封率。此外,与利用冻干技术的包封核酸的纳米粒子相比,得到包封核酸的纳米粒子的粒径较小 (参照图14和图15)。

[0291] 使得到的包封核酸的纳米粒子或在比较例1中制作的利用冻干技术的包封核酸的纳米粒子作用于HeLa细胞,评价核酸导入效率。将HeLa细胞在D-MEM培养基 (高葡萄糖) (含有L-谷氨酰胺、酚红) (添加10%FBS、1%青霉素-链霉素溶液) 中以 $5 \times 10^3$ 细胞/100 $\mu$ L接种在96孔透明平底板中。添加得到的核酸包封粒子至培养基中的核酸浓度为0.02 $\mu$ g/4 $\mu$ L。培养基中添加荧光素至0.1mM,使用发光量随时间评价荧光素酶蛋白质的导入量。将在含有包封核酸的纳米粒子和荧光素的培养基中培养的HeLa细胞设置在培育型发光检测仪 (Kronos) 中,每隔1小时测量2分钟的累积发光量。作为结果,与利用冻干技术的包封核酸的纳米粒子相比,在液剂和冷冻融解得到的溶液中得到较高的核酸导入效率 (参照图16和图17)。

[0292] 试验例2体内 (in vivo) 活性

作为离子性脂质,使用SS-OP,进一步,作为其他脂质,使用DOPC、Chol和DMG-PEG2000。使用的SS-OP:DOPC:Chol的摩尔比为52.5:7.5:40,相对于SS-OP、DOPC和Chol的总和,使用1.5mol%的DMG-PEG2000。

[0293] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液 (20mM, pH3.0) 2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液 300 $\mu$ L。使用NanoAsmblr (注册商标) 超高速纳米药物制备装置 (Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液 (pH6),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟) 下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液 (pH6) 将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟) 下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。进行2次以上的操作,将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4,进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液 (pH6),然后在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟) 下进行超滤,浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL,制成粒子溶液。

[0294] 将粒子溶液 (总脂质20mM, 15 $\mu$ L) 在4 $^{\circ}$ C下保存得到的溶液 (液剂) 或将粒子溶液在-80 $^{\circ}$ C下冷冻后并在4 $^{\circ}$ C下融解得到的溶液 (冷冻融解粒子) 与含有编码荧光素酶的mRNA (CleanCap (注册商标) FLuc mRNA- (L-7602)) 的溶液 (核酸浓度1.5 $\mu$ g/135 $\mu$ L, 缓冲液条件为MES (pH5), 135 $\mu$ L) 在利用涡旋混合器的搅拌条件下稀释并混合,使用铝块型培养箱在95 $^{\circ}$ C下培育5分钟。向培育后的溶液加入150 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

[0295] 将得到的包封核酸的纳米粒子或在比较例1中制作的利用冻干技术的包封核酸的纳米粒子作用于小鼠 (Balb/c, 6周龄, 雌性), 肝脏中的基因表达活性用GloMax 20/20发光检测仪进行评价。从小鼠尾静脉给予各包封核酸的纳米粒子至0.05mg/kg。在给予起6小时后,取出肝脏并评价荧光素酶蛋白质的表达量。作为结果,与利用冻干技术的包封核酸的纳米粒子相比,在液剂和冷冻融解得到的溶液中观察到较高的肝脏中的基因表达活性 (参照图18)。

[0296] 试验例3体内 (in vivo) 活性

作为离子性脂质,使用SS-OP,进一步,作为其他脂质,使用DOPC、Chol和DMG-PEG2000。使用的SS-OP:DOPC:Chol的摩尔比为52.5:7.5:40,相对于SS-OP、DOPC和Chol的总和,使用1.5mol%的DMG-PEG2000。

[0297] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液 (20mM, pH3.0) 2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液 300 $\mu$ L。使用NanoAsmblr (注册商标) 超高速纳米药物制备装置 (Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25 $^{\circ}$ C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液 (pH6),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟) 下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液 (pH6) 将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟) 下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。进行2次以上的操作,将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4,进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液 (pH6),然后在离心条件 (25 $^{\circ}$ C, 1000g, 5分钟) 下进行超滤,浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL,制成粒子溶液。

[0298] 将粒子溶液 (总脂质20mM, 15 $\mu$ L) (液剂) 与含有编码荧光素酶的mRNA (CleanCap (注册商标) FLuc mRNA- (L-7602)) 的溶液 (核酸浓度3 $\mu$ g/135 $\mu$ L, 缓冲液条件为MES (pH6), 135 $\mu$

L) 在利用涡旋混合器的搅拌条件下稀释并混合,使用铝块型培养箱在37°C下培育5分钟。向培育后的溶液加入150 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

[0299] 对得到的包封核酸的纳米粒子或在比较例2、比较例3中制作的利用冻干技术的包封核酸的纳米粒子的粒径、多分散指数(PdI)、mRNA的包封率进行分析。粒径和PdI通过使用Zetasizer(注册商标)的动态光散射法进行测定。mRNA的包封率通过Ribogreen(注册商标)测定法进行测定。作为结果,在液剂中得到与利用冻干技术的包封核酸的纳米粒子相同的mRNA的包封率。此外,与利用冻干技术的包封核酸的纳米粒子相比,得到包封核酸的纳米粒子的粒径较小(参照图36和图37)。在图36、图37和图38中,将脂质纳米粒子的制备时的总流速为1mL/分钟的比较例2表示为“冷冻干燥(FR=1)”,将总流速为16mL/分钟的比较例3表示为“冷冻干燥(FR=16)”。

[0300] 使得到的包封核酸的纳米粒子或在比较例2、比较例3中制作的利用冻干技术的包封核酸的纳米粒子作用于小鼠(Balb/c,6周龄,雌性),肝脏中的基因表达活性用IVIS成像系统进行评价。从小鼠尾静脉给予各包封核酸的纳米粒子至0.1mg/kg。在给予起6小时后,拍照并评价荧光素酶蛋白质的表达量。作为结果,与利用冻干技术的包封核酸的纳米粒子相比,在液剂中观察到较高的肝脏中的基因表达活性(参照图38)。

[0301] 试验例4体内(in vivo)活性

作为离子性脂质,使用SS-OP,进一步,作为其他脂质,使用DOPC、Chol和DMG-PEG2000。使用的SS-OP:DOPC:Chol的摩尔比为52.5:7.5:40,相对于SS-OP、DOPC和Chol的总和,使用1.5mol%的DMG-PEG2000。

[0302] 分别在注射器中量取酸性苹果酸缓冲液(20mM,pH3.0)2100 $\mu$ L和脂质的乙醇溶液300 $\mu$ L。使用NanoAsmblr(注册商标)超高速纳米药物制备装置(Precision NanoSystems制造),在酸性缓冲溶液:脂质的乙醇溶液的流量比为7:1、总流速为1mL/分钟和注射器支架温度:25°C的条件下,制备LNP。向收集物中加入9000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后将得到的混合物转移到Amicon Ultra 15中,在离心条件(25°C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约1500 $\mu$ L。使用MES缓冲液(pH6)将得到的浓缩物稀释至15mL,再次在离心条件(25°C,1000g,5分钟)下进行超滤浓缩至约500 $\mu$ L。进行2次以上的操作,将通过浓缩得到的混合物全部移至Amicon Ultra 4,进一步加入3000 $\mu$ L的MES缓冲液(pH6),然后在离心条件(25°C,1000g,5分钟)下进行超滤,浓缩至约100 $\mu$ L。加入蔗糖溶液至终浓度为160mg/mL,制成粒子溶液。

[0303] 将粒子溶液(总脂质20mM,15 $\mu$ L)(液剂)与含有编码荧光素酶的mRNA(CleanCap(注册商标)FLuc mRNA-(L-7602))的溶液(核酸浓度3 $\mu$ g/135 $\mu$ L,缓冲液条件为MES(pH6),135 $\mu$ L)在利用涡旋混合器的搅拌条件下稀释并混合,使用铝块型培养箱在37°C下培育5分钟。向培育后的溶液加入150 $\mu$ L的PBS,得到包封核酸的纳米粒子。

[0304] 对得到的包封核酸的纳米粒子(液剂)或通过微通道制备的包封核酸的纳米粒子(MF)(使用含有核酸的MES缓冲液(20mM,pH6.5)和脂质的乙醇溶液,用相同脂质组成制作的LNP)的粒径、多分散指数(PdI)、mRNA的包封率进行分析。粒径和PdI通过使用Zetasizer(注册商标)的动态光散射法进行测定。mRNA的包封率通过Ribogreen(注册商标)测定法进行测定。作为结果,在液剂中得到与通过微通道制备的包封核酸的纳米粒子相同的mRNA的包封率(参照图39)。

[0305] 使得到的包封核酸的纳米粒子(液剂)或通过微通道制备的包封核酸的纳米粒子

(MF) 作用于小鼠 (Balb/c, 6 周龄, 雌性), 各脏器 (肝脏、心脏、脾脏、肾脏和肺) 中的基因表达活性用 IVIS 成像系统进行评价。从小鼠尾静脉给予各包封核酸的纳米粒子至 0.1mg/kg。在给予起 6 小时后, 解剖后, 拍照并评价荧光素酶蛋白质的表达量。作为结果, 在液剂中与通过微通道制备的包封核酸的纳米粒子相比, 观察到相同的表达分布 (参照图 40 和图 41)。

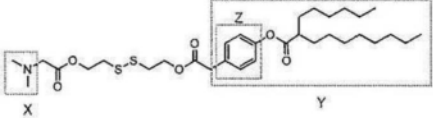
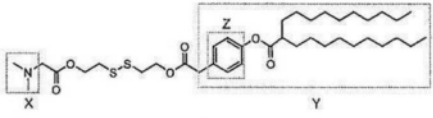
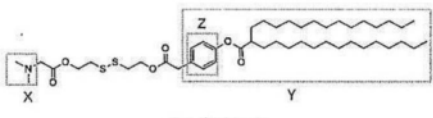
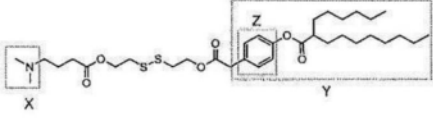
[0306] 试验例 5 实施例 12 的粒子的体外活性

使实施例 12 中得到的包封核酸的纳米粒子或在比较例 1 中制作的利用冻干技术的包封核酸的纳米粒子作用于 HeLa 细胞, 评价核酸导入效率。将 HeLa 细胞在 D-MEM 培养基 (高葡萄糖) (含有 L-谷氨酰胺、酚红) (添加 10% FBS、1% 青霉素-链霉素溶液) 中以  $3 \times 10^4$  细胞/600 $\mu$ L 接种在 48 孔透明平底板中。次日向培养基中添加荧光素钾后, 添加得到的核酸包封粒子至培养基中的核酸浓度为 0.12 $\mu$ g/60 $\mu$ L, 用 Kronos HT 评价 24 小时的荧光素酶蛋白质的导入量。作为结果, 与利用冻干技术的包封核酸的纳米粒子相比, 液剂、冷冻融解粒子得到了较高的核酸导入效率。此外, 当液剂与冷冻融解粒子进行比较时, 冷冻融解粒子的核酸导入效率更高。另一方面, 作为组成, 以 LN-81:DEPC:Chol:DMG-PEG2000=52.5:17.5:30:1 制作的液剂显示出最高的核酸导入效率 (参照图 42)。

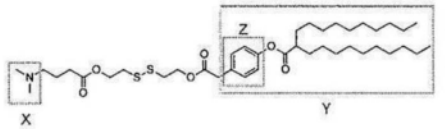
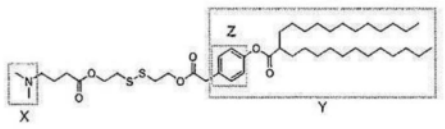
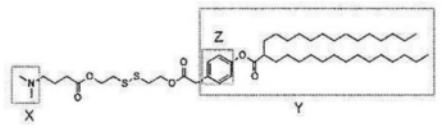
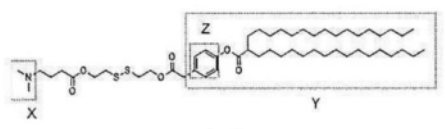
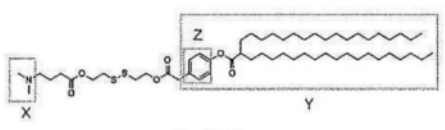
[0307] 离子性脂质 (2) 的制造

表 6 中示出以下的制造例中制造的离子性脂质的名称和结构。

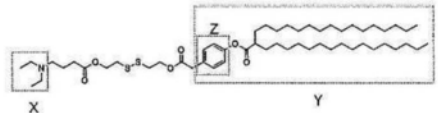
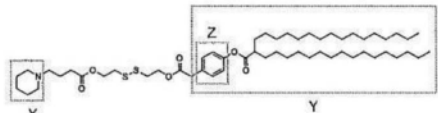
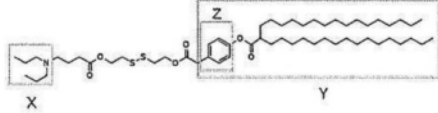
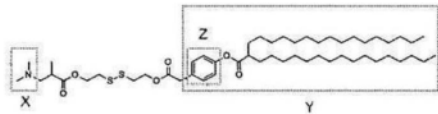
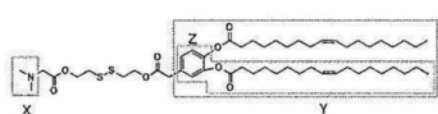
[0308] [表 6-1]

制造例编号	名称和结构 (X、Y、Z与式(2)对应)	与式(2)、(5)~(7)中记载的参数的对应1	与式(2)、(5)~(7)中记载的参数的对应2
1	 <p>化合物1</p>	R <sup>1</sup> : 亚甲基 R <sup>2</sup> : 亚甲基 R <sup>x</sup> : 亚乙基 R <sup>y</sup> : 亚乙基 R <sup>7</sup> : 1-己基壬基 L <sup>1</sup> : 酯 L <sup>2</sup> : 酯 L <sup>x</sup> : 酯	k=1 l=0 m=0 n=0 t=0 u=0 v=0
2	 <p>化合物2</p>	R <sup>1</sup> : 亚甲基 R <sup>2</sup> : 亚甲基 R <sup>x</sup> : 亚乙基 R <sup>y</sup> : 亚乙基 R <sup>7</sup> : 1-癸基十一烷基 L <sup>1</sup> : 酯 L <sup>2</sup> : 酯 L <sup>x</sup> : 酯	k=1 l=0 m=0 n=0 t=0 u=0 v=0
3	 <p>化合物3</p>	R <sup>1</sup> : 亚甲基 R <sup>2</sup> : 亚甲基 R <sup>x</sup> : 亚乙基 R <sup>y</sup> : 亚乙基 R <sup>7</sup> : 1-十四烷基十五烷基 L <sup>1</sup> : 酯 L <sup>2</sup> : 酯 L <sup>x</sup> : 酯	k=1 l=0 m=0 n=0 t=0 u=0 v=0
4	 <p>化合物4</p>	R <sup>1</sup> : 三亚甲基 R <sup>2</sup> : 亚甲基 R <sup>x</sup> : 亚乙基 R <sup>y</sup> : 亚乙基 R <sup>7</sup> : 1-己基壬基 L <sup>1</sup> : 酯 L <sup>2</sup> : 酯 L <sup>x</sup> : 酯	k=1 l=0 m=0 n=0 t=0 u=0 v=0

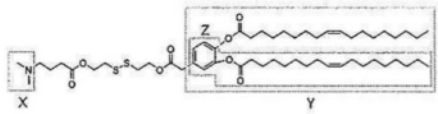
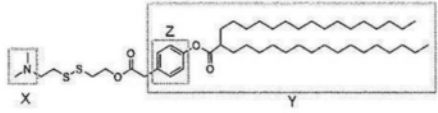
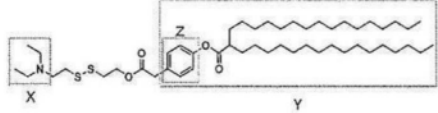
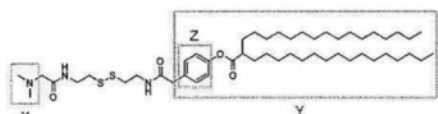
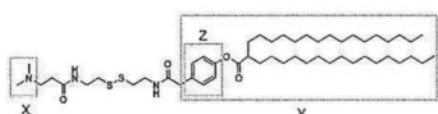
[0309] [表6-2]

5	 <p>化合物 5</p>	<p>R<sup>1</sup>: 三亚甲基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-癸基十一烷基  L<sup>1</sup>: 酯  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>
6	 <p>化合物 6</p>	<p>R<sup>1</sup>: 三亚甲基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十二烷基十三烷基  L<sup>1</sup>: 酯  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>
7	 <p>化合物 7</p>	<p>R<sup>1</sup>: 三亚甲基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十四烷基十五烷基  L<sup>1</sup>: 酯  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>
8	 <p>化合物 8</p>	<p>R<sup>1</sup>: 三亚甲基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基  L<sup>1</sup>: 酯  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>
9	 <p>化合物 9</p>	<p>R<sup>1</sup>: 三亚甲基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十八烷基十九烷基  L<sup>1</sup>: 酯  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>

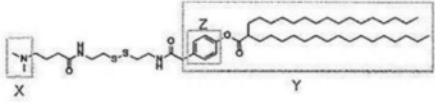
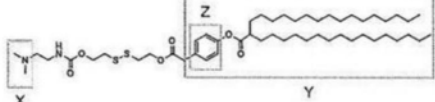
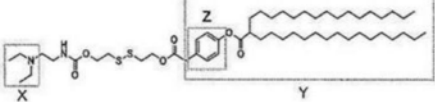
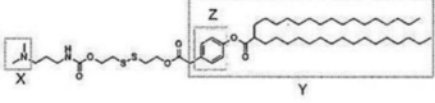
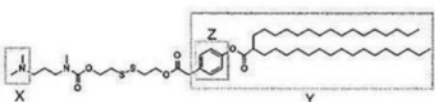
[0310] [表6-3]

<p>1 0</p>  <p>化合物 1 0</p>	<p>R<sup>1</sup>: 三亚甲基 R<sup>2</sup>: 亚甲基 R<sup>x</sup>: 亚乙基 R<sup>y</sup>: 亚乙基 R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基 L<sup>1</sup>: 酯 L<sup>2</sup>: 酯 L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1 l=0 m=0 n=0 t=0 u=0 v=0</p>
<p>1 1</p>  <p>化合物 1 1</p>	<p>R<sup>1</sup>: 三亚甲基 R<sup>2</sup>: 亚甲基 R<sup>x</sup>: 亚乙基 R<sup>y</sup>: 亚乙基 R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基 L<sup>1</sup>: 酯 L<sup>2</sup>: 酯 L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1 l=0 m=0 n=0 t=0 u=0 v=0</p>
<p>1 2</p>  <p>化合物 1 2</p>	<p>R<sup>1</sup>: 三亚甲基 R<sup>2</sup>: 亚甲基 R<sup>x</sup>: 亚乙基 R<sup>y</sup>: 亚乙基 R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基 L<sup>1</sup>: 酯 L<sup>2</sup>: 酯 L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1 l=0 m=0 n=0 t=0 u=0 v=0</p>
<p>1 3</p>  <p>化合物 1 3</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚异丙基 R<sup>2</sup>: 亚甲基 R<sup>x</sup>: 亚乙基 R<sup>y</sup>: 亚乙基 R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基 L<sup>1</sup>: 酯 L<sup>2</sup>: 酯 L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1 l=0 m=0 n=0 t=0 u=0 v=0</p>
<p>1 4</p>  <p>化合物 1 4</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚甲基 R<sup>2</sup>: 亚甲基 R<sup>x</sup>: 亚乙基 R<sup>y</sup>: 亚乙基 R<sup>7</sup>: 十七碳烯基 R<sup>8</sup>: 十八碳烯酰基氧基 L<sup>1</sup>: 酯 L<sup>2</sup>: 酯 L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1 l=0 m=0 n=0 t=0 u=0 v=1</p>

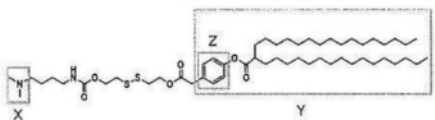
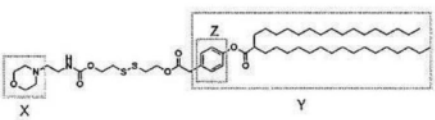
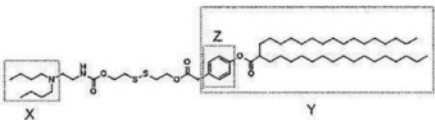
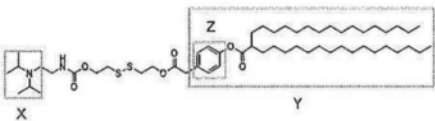
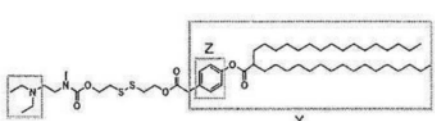
[0311] [表6-4]

15	 <p>化合物 15</p>	<p>R<sup>1</sup>: 三亚甲基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 十七碳烯基  R<sup>8</sup>: 十八碳烯酰基  氧基  L<sup>1</sup>: 酯  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=1</p>
16	 <p>化合物 16</p>	<p>R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七  烷基  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=0  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>
17	 <p>化合物 17</p>	<p>R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七  烷基  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=0  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>
18	 <p>化合物 18</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚甲基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七  烷基  L<sup>1</sup>: 酰胺  L<sup>2</sup>: 酰胺  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>
19	 <p>化合物 19</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚甲基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七  烷基  L<sup>1</sup>: 酰胺  L<sup>2</sup>: 酰胺  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>

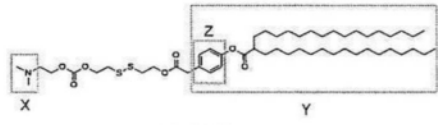
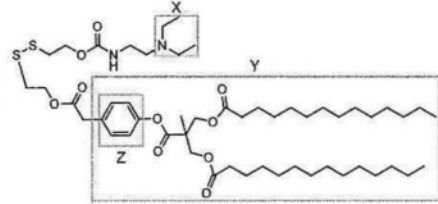
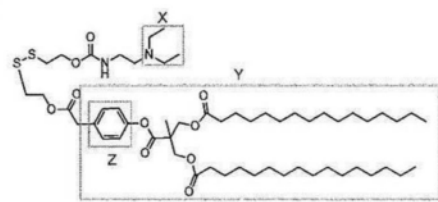
[0312] [表6-5]

20	 <p>化合物 20</p>	<p>R<sup>1</sup>: 三亚甲基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基  L<sup>1</sup>: 酰胺  L<sup>2</sup>: 酰胺  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>
21	 <p>化合物 21</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚甲基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>
22	 <p>化合物 22</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>
23	 <p>化合物 23</p>	<p>R<sup>1</sup>: 三亚甲基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>
24	 <p>化合物 24</p>	<p>R<sup>1</sup>: 三亚甲基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基  L<sup>1</sup>: N-甲基氨基甲酸酯  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>

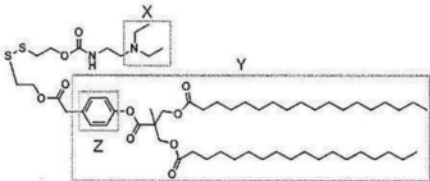
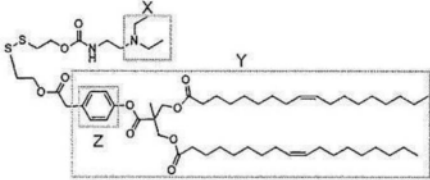
[0313] [表6-6]

25	 <p>化合物 25</p>	<p>R<sup>1</sup>: 四亚甲基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>
26	 <p>化合物 26</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>
27	 <p>化合物 27</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>
28	 <p>化合物 28</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>
29	 <p>化合物 29</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基  R<sup>2</sup>: 亚甲基  R<sup>x</sup>: 亚乙基  R<sup>y</sup>: 亚乙基  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基  L<sup>1</sup>: N-甲基氨基甲酸酯  L<sup>2</sup>: 酯  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1  l=0  m=0  n=0  t=0  u=0  v=0</p>

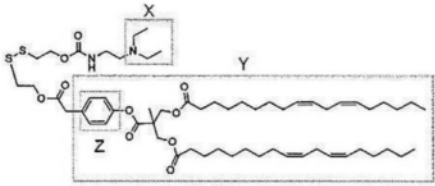
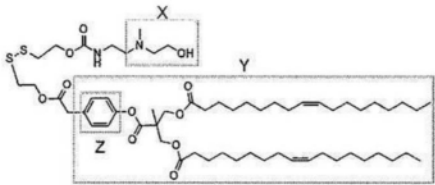
[0314] [表6-7]

<p>30</p>  <p>化合物 30</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基 R<sup>2</sup>: 亚甲基 R<sup>x</sup>: 亚乙基 R<sup>y</sup>: 亚乙基 R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基 L<sup>1</sup>: 碳酸酯 L<sup>2</sup>: 酯 L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1 l=0 m=0 n=0 t=0 u=0 v=0</p>
<p>31</p>  <p>化合物 31</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基 R<sup>2</sup>: 亚甲基 R<sup>4</sup>: 无 R<sup>5</sup>: 甲基 R<sup>6</sup>: 亚甲基 R<sup>6'</sup>: 亚甲基 R<sup>7</sup>: 十三烷基 R<sup>7'''</sup>: 十三烷基 R<sup>x</sup>: 亚乙基 R<sup>y</sup>: 亚乙基 L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯 L<sup>2</sup>: 酯 L<sup>4</sup>: 酯 L<sup>4'</sup>: 酯 L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1 l=0 m=1 n=1 t=0 u=0 v=0</p>
<p>32</p>  <p>化合物 32</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基 R<sup>2</sup>: 亚甲基 R<sup>4</sup>: 无 R<sup>5</sup>: 甲基 R<sup>6</sup>: 亚甲基 R<sup>6'</sup>: 亚甲基 R<sup>7</sup>: 十五烷基 R<sup>7'''</sup>: 十五烷基 R<sup>x</sup>: 亚乙基 R<sup>y</sup>: 亚乙基 L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯 L<sup>2</sup>: 酯 L<sup>4</sup>: 酯 L<sup>4'</sup>: 酯 L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1 l=0 m=1 n=1 t=0 u=0 v=0</p>

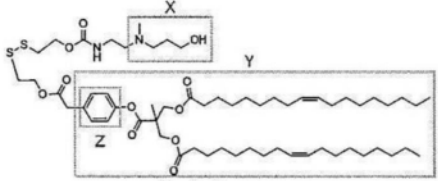
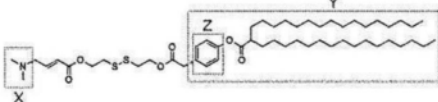
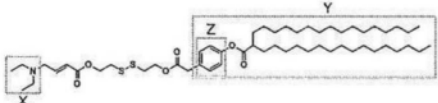
[0315] [表6-8]

<p>3 3</p>  <p>化合物 3 3</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基                  R<sup>2</sup>: 亚甲基                  R<sup>4</sup>: 无                  R<sup>5</sup>: 甲基                  R<sup>6</sup>: 亚甲基                  R<sup>6'</sup>: 亚甲基                  R<sup>7</sup>: 十七烷基                  R<sup>7'''</sup>: 十七烷基                  R<sup>x</sup>: 亚乙基                  R<sup>y</sup>: 亚乙基                  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯                  L<sup>2</sup>: 酯                  L<sup>4</sup>: 酯                  L<sup>4'</sup>: 酯                  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k = 1                  l = 0                  m = 1                  n = 1                  t = 0                  u = 0                  v = 0</p>
<p>3 4</p>  <p>化合物 3 4</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基                  R<sup>2</sup>: 亚甲基                  R<sup>4</sup>: 无                  R<sup>5</sup>: 甲基                  R<sup>6</sup>: 亚甲基                  R<sup>6'</sup>: 亚甲基                  R<sup>7</sup>: 十七碳烯基                  R<sup>7'''</sup>: 十七碳烯基                  R<sup>x</sup>: 亚乙基                  R<sup>y</sup>: 亚乙基                  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯                  L<sup>2</sup>: 酯                  L<sup>4</sup>: 酯                  L<sup>4'</sup>: 酯                  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k = 1                  l = 0                  m = 1                  n = 1                  t = 0                  u = 0                  v = 0</p>

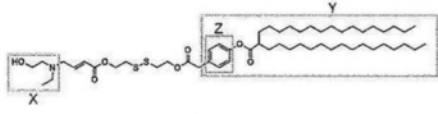
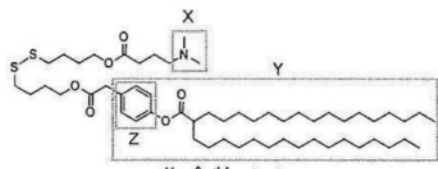
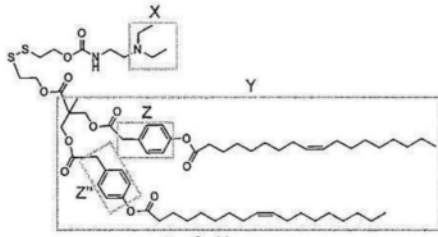
[0316] [表6-9]

<p>3 5</p>	 <p>化合物 3 5</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基                  R<sup>2</sup>: 亚甲基                  R<sup>4</sup>: 无                  R<sup>5</sup>: 甲基                  R<sup>6</sup>: 亚甲基                  R<sup>6'</sup>: 亚甲基                  R<sup>7</sup>: 十七碳二烯基                  R<sup>7'''</sup>: 十七碳二烯基                  R<sup>x</sup>: 亚乙基                  R<sup>y</sup>: 亚乙基                  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯                  L<sup>2</sup>: 酯                  L<sup>4</sup>: 酯                  L<sup>4'</sup>: 酯                  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1                  l=0                  m=1                  n=1                  t=0                  u=0                  v=0</p>
<p>3 6</p>	 <p>化合物 3 6</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基                  R<sup>2</sup>: 亚甲基                  R<sup>4</sup>: 无                  R<sup>5</sup>: 甲基                  R<sup>6</sup>: 亚甲基                  R<sup>6'</sup>: 亚甲基                  R<sup>7</sup>: 十七碳烯基                  R<sup>7'''</sup>: 十七碳烯基                  R<sup>x</sup>: 亚乙基                  R<sup>y</sup>: 亚乙基                  R<sup>a</sup>: 甲基                  R<sup>c</sup>: 氢                  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯                  L<sup>2</sup>: 酯                  L<sup>4</sup>: 酯                  L<sup>4'</sup>: 酯                  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1                  l=0                  m=1                  n=1                  t=0                  u=0                  v=0                  q=2</p>

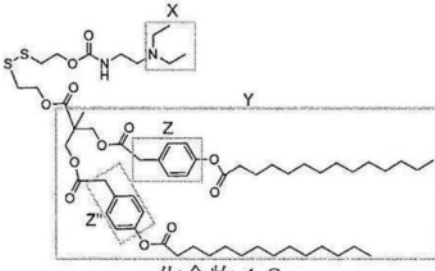
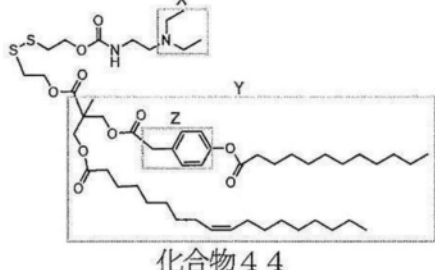
[0317] [表6-10]

<p>37</p>	 <p>化合物 37</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基                  R<sup>2</sup>: 亚甲基                  R<sup>4</sup>: 无                  R<sup>5</sup>: 甲基                  R<sup>6</sup>: 亚甲基                  R<sup>6'</sup>: 亚甲基                  R<sup>7</sup>: 十七碳烯基                  R<sup>7''</sup>: 十七碳烯基                  R<sup>x</sup>: 亚乙基                  R<sup>y</sup>: 亚乙基                  R<sup>a</sup>: 甲基                  R<sup>c</sup>: 氢                  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯                  L<sup>2</sup>: 酯                  L<sup>4</sup>: 酯                  L<sup>4'</sup>: 酯                  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1                  l=0                  m=1                  n=1                  t=0                  u=0                  v=0                  q=3</p>
<p>38</p>	 <p>化合物 38</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚丙烯基                  R<sup>2</sup>: 亚甲基                  R<sup>x</sup>: 亚乙基                  R<sup>y</sup>: 亚乙基                  L<sup>1</sup>: 酯                  L<sup>2</sup>: 酯                  L<sup>x</sup>: 酯                  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基</p>	<p>k=1                  l=0                  m=0                  n=0                  t=0                  u=0                  v=0</p>
<p>39</p>	 <p>化合物 39</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚丙烯基                  R<sup>2</sup>: 亚甲基                  R<sup>x</sup>: 亚乙基                  R<sup>y</sup>: 亚乙基                  L<sup>1</sup>: 酯                  L<sup>2</sup>: 酯                  L<sup>x</sup>: 酯                  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基</p>	<p>k=1                  l=0                  m=0                  n=0                  t=0                  u=0                  v=0</p>

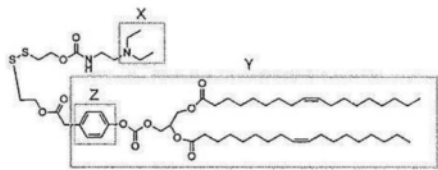
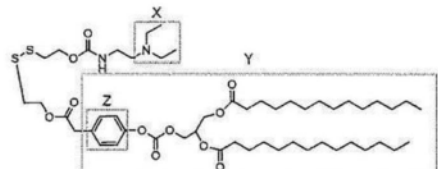
[0318] [表6-11]

<p>40</p>  <p>化合物 40</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚丙烯基                  R<sup>2</sup>: 亚甲基                  R<sup>x</sup>: 亚乙基                  R<sup>y</sup>: 亚乙基                  R<sup>a</sup>: 乙基                  R<sup>c</sup>: 氢                  L<sup>1</sup>: 酯                  L<sup>2</sup>: 酯                  L<sup>x</sup>: 酯                  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基</p>	<p>k=1                  l=0                  m=0                  n=0                  t=0                  u=0                  v=0                  q=2</p>
<p>41</p>  <p>化合物 41</p>	<p>R<sup>1</sup>: 三亚甲基                  R<sup>2</sup>: 亚甲基                  R<sup>x</sup>: 四亚甲基                  R<sup>y</sup>: 四亚甲基                  L<sup>1</sup>: 酯                  L<sup>2</sup>: 酯                  L<sup>x</sup>: 酯                  R<sup>7</sup>: 1-十六烷基十七烷基</p>	<p>k=1                  l=0                  m=0                  n=0                  t=0                  u=0                  v=0</p>
<p>42</p>  <p>化合物 42</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基                  R<sup>2</sup>: 无                  R<sup>3</sup>: 亚甲基                  R<sup>7</sup>: 十七碳烯基                  R<sup>7''</sup>: 十七碳烯基                  R<sup>x</sup>: 亚乙基                  R<sup>y</sup>: 亚乙基                  R<sup>e</sup>: 亚甲基                  S<sup>1</sup>: 甲基                  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯                  L<sup>2</sup>: 酯                  L<sup>3</sup>: 酯                  L<sup>a</sup>: 酯                  L<sup>b</sup>: 酯                  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1                  l=1                  m=0                  n=0                  t=1                  u=0                  v=0</p>

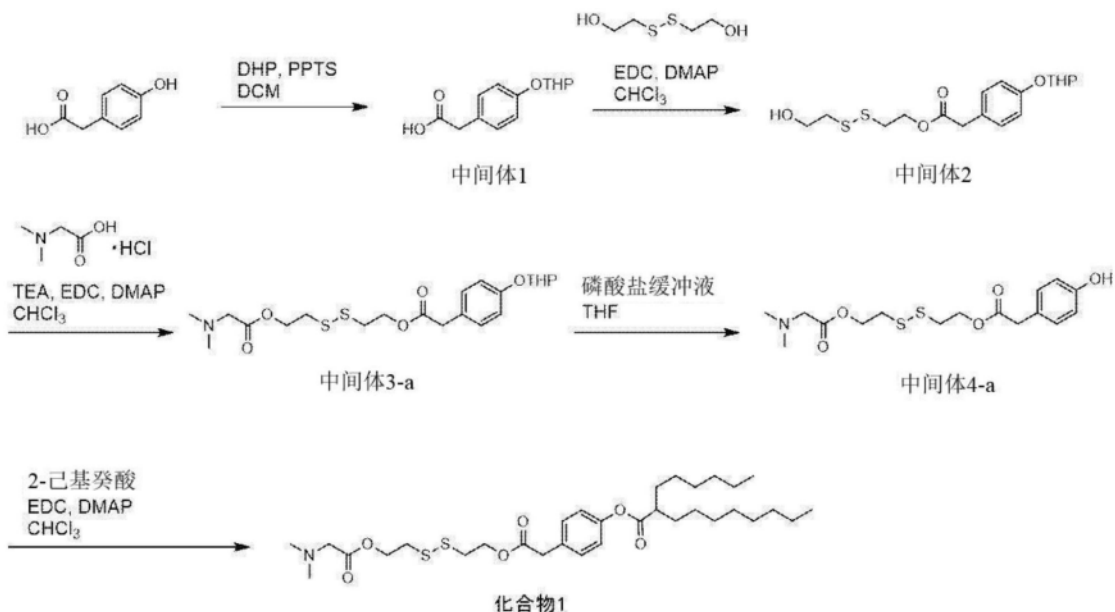
[0319] [表6-12]

<p>4 3</p>	 <p>化合物 4 3</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基                  R<sup>2</sup>: 无                  R<sup>3</sup>: 亚甲基                  R<sup>7</sup>: 十三烷基                  R<sup>7''</sup>: 十三烷基                  R<sup>x</sup>: 亚乙基                  R<sup>y</sup>: 亚乙基                  R<sup>e'</sup>: 亚甲基                  S<sup>1</sup>: 甲基                  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯                  L<sup>2</sup>: 酯                  L<sup>3</sup>: 酯                  L<sup>a</sup>: 酯                  L<sup>b</sup>: 酯                  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1                  l=1                  m=0                  n=0                  t=1                  u=0                  v=0</p>
<p>4 4</p>	 <p>化合物 4 4</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基                  R<sup>2</sup>: 无                  R<sup>3</sup>: 亚甲基                  R<sup>7</sup>: 十一烷基                  R<sup>7''</sup>: 十七碳烯基                  R<sup>x</sup>: 亚乙基                  R<sup>y</sup>: 亚乙基                  R<sup>e'</sup>: 亚甲基                  S<sup>1</sup>: 甲基                  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯                  L<sup>2</sup>: 酯                  L<sup>3</sup>: 酯                  L<sup>a</sup>: 酯                  L<sup>x</sup>: 酯</p>	<p>k=1                  l=1                  m=0                  n=0                  t=1                  u=0                  v=0</p>

[0320] [表6-13]

<p>4 5</p>  <p>化合物 4 5</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基                  R<sup>2</sup>: 亚甲基                  R<sup>4</sup>: 亚甲基                  R<sup>5</sup>: 氢                  R<sup>6</sup>: 亚甲基                  R<sup>6'</sup>: 无                  R<sup>7</sup>: 十七碳烯基                  R<sup>7'''</sup>: 十七碳烯基                  R<sup>x</sup>: 亚乙基                  R<sup>y</sup>: 亚乙基                  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯                  L<sup>2</sup>: 酯                  L<sup>4</sup>: 酯                  L<sup>4'</sup>: 酯                  L<sup>x</sup>: 碳酸酯</p>	<p>k = 1                  l = 0                  m = 1                  n = 1                  t = 0                  u = 0                  v = 0</p>
<p>4 6</p>  <p>化合物 4 6</p>	<p>R<sup>1</sup>: 亚乙基                  R<sup>2</sup>: 亚甲基                  R<sup>4</sup>: 亚甲基                  R<sup>5</sup>: 氢                  R<sup>6</sup>: 亚甲基                  R<sup>6'</sup>: 无                  R<sup>7</sup>: 十三烷基                  R<sup>7'''</sup>: 十三烷基                  R<sup>x</sup>: 亚乙基                  R<sup>y</sup>: 亚乙基                  L<sup>1</sup>: 氨基甲酸酯                  L<sup>2</sup>: 酯                  L<sup>4</sup>: 酯                  L<sup>4'</sup>: 酯                  L<sup>x</sup>: 碳酸酯</p>	<p>k = 1                  l = 0                  m = 1                  n = 1                  t = 0                  u = 0                  v = 0</p>

- [0321] [制造例1]化合物1的合成  
 化合物1用以下的合成路径进行制造,但本发明不限于这种合成路径。
- [0322] [化学式21]



### [0323] <中间体1的合成>

在室温下将4-羟基苯乙酸(75.0g)和PPTS(12.4g)溶解在二氯甲烷400g中,将得到的溶液冷却至10~20℃。通过向其中滴加将DHP(207g)溶解在二氯甲烷100g中而得到的溶液后,在25℃下反应2小时。将反应溶液冷却至10~20℃,加入DMAP(30.1g),进行淬灭。向淬灭后的溶液中加入2-丙醇590g后,冷却至10~20℃。向冷却后的溶液中滴加400g/L氢氧化钠水溶液98.8g和离子交换水307g的溶液,在25℃下反应2小时。反应溶液用蒸发器浓缩,蒸馏除去二氯甲烷和2-丙醇。将得到的浓缩物用氯仿750g洗涤2次后,加入6N盐酸,得到pH5.0的溶液。将得到的溶液用氯仿750g萃取2次后,加入硫酸钠75.0g对有机层进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,得到98.2g的中间体1。

### [0324] <中间体2的合成>

在室温下将中间体1(10.2g)、双(2-羟乙基)二硫化物(9.99g)和DMAP(1.06g)溶解在氯仿153g中。向得到的溶液中加入EDC(12.4g)并在25℃下反应2小时。反应溶液用20重量%食盐水102g洗涤,然后加入硫酸钠5.1g进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,通过用色谱柱纯化得到的粗产物,得到9.01g的中间体2。

### [0325] <中间体3-a的合成>

在室温下将中间体2(350mg)、二甲基甘氨酸盐酸盐(144mg)、三乙胺(143mg)和DMAP(23.0mg)溶解在氯仿5.25mL中。向得到的溶液中加入EDC(270mg)并在室温下反应2小时。反应溶液依次用0.5M磷酸缓冲液(pH4.0)3.5g、7重量%碳酸氢钠溶液3.5g、20重量%食盐水3.5g洗涤,然后加入硫酸钠175mg进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,得到378mg的中间体3-a。

### [0326] <中间体4-a的合成>

将中间体3-a(363mg)溶解于3.27g的THF后,加入0.5M磷酸缓冲液(pH2.0)13.1g在室温下反应2小时。向反应溶液中加入氯仿5.45g进行洗涤。向洗涤后的水层中添加1N氢氧化钠水溶液,将其pH调节为6.0后,pH调节后的水层用氯仿5.45g萃取。向有机层中加入硫酸钠180mg进行脱水,通过过滤除去硫酸钠。滤液用蒸发器浓缩,得到187mg的中间体4-a。

### [0327] <化合物1的合成>

在室温下将中间体4-a (187mg)、2-己基癸酸 (128mg) 和DMAP (12.0mg) 溶解在氯仿 2.81g中。向得到的溶液中加入EDC (144mg) 并在25°C下反应2小时。反应溶液用20重量%食盐水1.87g洗涤, 然后加入硫酸钠93.0mg进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后, 滤液用蒸发器浓缩, 通过用色谱柱纯化得到的粗产物, 得到159mg的化合物1。

<化合物1的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ: 0.86-0.90 (m, 6H)、1.20-1.45 (m, 22H)、1.69-1.75 (m, 2H)、2.36 (s, 6H)、2.52-2.59 (m, 1H)、2.88-2.97 (m, 4H)、3.19 (s, 2H)、3.63 (s, 2H)、4.34-4.42 (m, 4H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

[0328] [制造例2] 化合物2的合成

<化合物2的合成>

使用中间体4-a和2-癸基十二烷酸, 按照与制造例1相同的合成路径来合成化合物2。

<化合物2的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ: 0.88 (t, 6H)、1.20-1.45 (m, 34H)、1.69-1.75 (m, 2H)、2.36 (s, 6H)、2.52-2.59 (m, 1H)、2.88-2.97 (m, 4H)、3.19 (s, 2H)、3.63 (s, 2H)、4.34-4.42 (m, 4H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

[0329] [制造例3] 化合物3的合成

<化合物3的合成>

使用中间体4-a和2-十四烷基十六烷酸, 按照与制造例1相同的合成路径来合成化合物3。

<化合物3的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

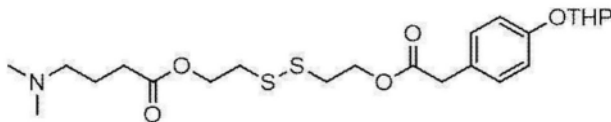
δ: 0.88 (t, 6H)、1.20-1.45 (m, 50H)、1.69-1.75 (m, 2H)、2.36 (s, 6H)、2.52-2.59 (m, 1H)、2.88-2.97 (m, 4H)、3.19 (s, 2H)、3.63 (s, 2H)、4.34-4.42 (m, 4H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

[0330] [制造例4] 化合物4的合成

<中间体3-b的合成>

除了使用4-(二甲基氨基)丁酸盐以外, 与制造1相同地合成下式表示的中间体3-b。

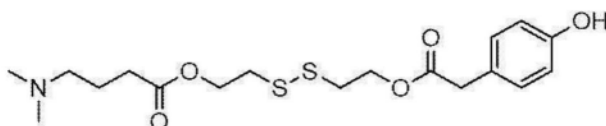
[0331] [化学式22]



[0332] <中间体4-b的合成>

除了使用中间体3-b以外, 与制造1相同地合成下式表示的中间体4-b。

[0333] [化学式23]



[0334] <化合物4的合成>

除了使用中间体4-b以外,与制造例1相同地合成化合物4。

<化合物4的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ:0.86-0.90(m、6H)、1.20-1.45(m、22H)、1.69-1.82(m、4H)、2.21(s、6H)、2.28(t、2H)、2.35(t、2H)、2.52-2.59(m、1H)、2.88-2.97(m、4H)、3.63(s、2H)、4.28-4.38(m、4H)、7.02-7.05(m、2H)、7.27-7.30(m、2H)

[0335] [制造例5]化合物5的合成

<化合物5的合成>

使用中间体4-b和2-癸基十二烷酸,按照与制造例1相同的合成路径来合成化合物5。

<化合物5的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ:0.88(t、6H)、1.20-1.45(m、34H)、1.69-1.84(m、4H)、2.21(s、6H)、2.28(t、2H)、2.35(t、2H)、2.52-2.59(m、1H)、2.88-2.97(m、4H)、3.63(s、2H)、4.28-4.38(m、4H)、7.02-7.05(m、2H)、7.27-7.30(m、2H)

[0336] [制造例6]化合物6的合成

<化合物6的合成>

使用中间体4-b和2-十二烷基十四烷酸,按照与制造例1相同的合成路径来合成化合物6。

<化合物6的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ:0.88(t、6H)、1.20-1.45(m、42H)、1.69-1.84(m、4H)、2.21(s、6H)、2.28(t、2H)、2.35(t、2H)、2.52-2.59(m、1H)、2.88-2.97(m、4H)、3.63(s、2H)、4.28-4.38(m、4H)、7.02-7.05(m、2H)、7.27-7.30(m、2H)

[0337] [制造例7]化合物7的合成

<化合物7的合成>

使用中间体4-b和2-十四烷基十六烷酸,按照与制造例1相同的合成路径来合成化合物7。

<化合物7的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ:0.88(t、6H)、1.20-1.45(m、50H)、1.69-1.84(m、4H)、2.21(s、6H)、2.28(t、2H)、2.35(t、2H)、2.52-2.59(m、1H)、2.88-2.97(m、4H)、3.63(s、2H)、4.28-4.38(m、4H)、7.02-7.05(m、2H)、7.27-7.30(m、2H)

[0338] [制造例8]化合物8的合成

<化合物8的合成>

使用中间体4-b和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例1相同的合成路径来合成化合物8。

<化合物8的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ:0.88(t、6H)、1.20-1.45(m、58H)、1.69-1.84(m、4H)、2.21(s、6H)、2.28(t、2H)、2.35(t、2H)、2.52-2.59(m、1H)、2.88-2.97(m、4H)、3.63(s、2H)、4.28-4.38(m、4H)、7.02-7.05(m、2H)、7.27-7.30(m、2H)

[0339] [制造例9]化合物9的合成

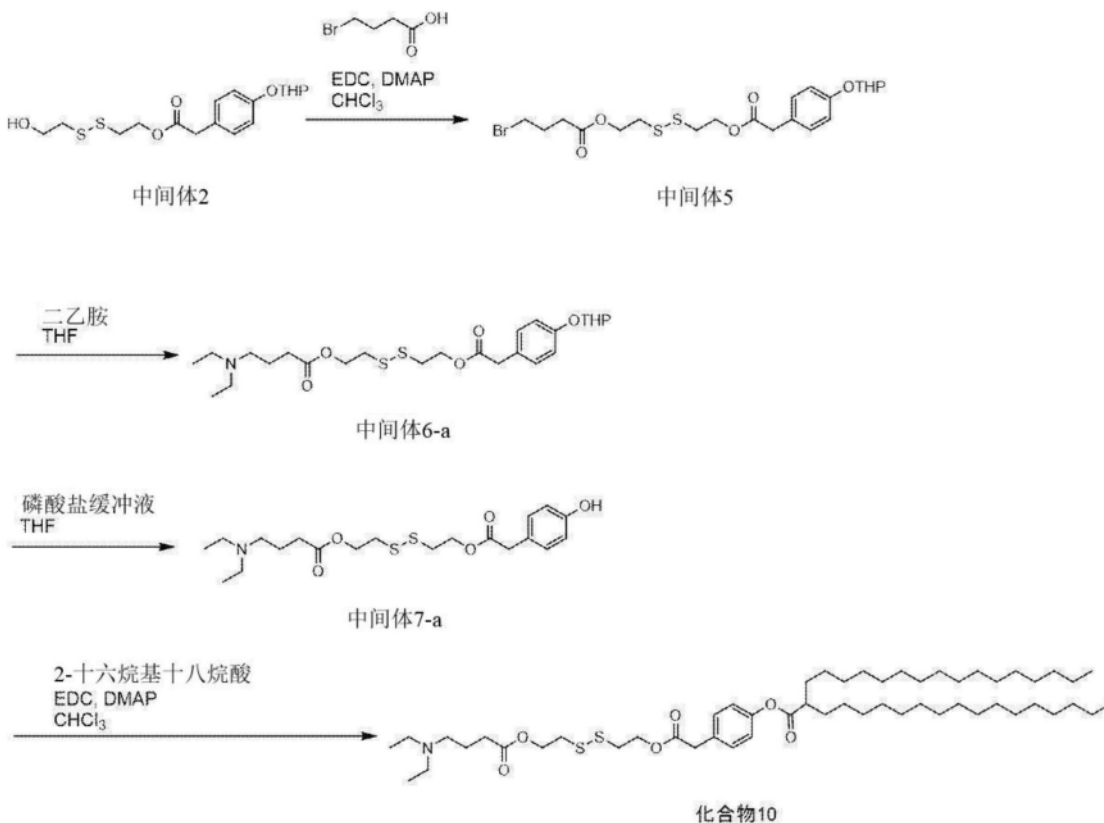
<化合物9的合成>

使用中间体4-b和2-十八烷基二十烷酸,按照与制造例1相同的合成路径来合成化合物9。

<化合物9的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ:0.88(t,6H)、1.20-1.45(m,66H)、1.69-1.84(m,4H)、2.21(s,6H)、2.28(t,2H)、2.35(t,2H)、2.52-2.59(m,1H)、2.88-2.97(m,4H)、3.63(s,2H)、4.28-4.38(m,4H)、7.02-7.05(m,2H)、7.27-7.30(m,2H)

[0340] [化学式24]



[0341] [制造例10]化合物10的合成

<中间体5的合成>

在室温下将中间体2(5.10g)、4-溴丁酸(2.52g)和DMAP(335mg)溶解在氯仿76.5g中。向得到的溶液中加入EDC(3.94g)并在25℃下反应2小时。反应溶液用20重量%食盐水51.0g洗涤,然后加入硫酸钠2.55g进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,得到6.07g的中间体5。

[0342] <中间体6-a的合成>

在室温下将二乙胺(258mg)溶解在THF 1.04g中。通过向其中滴加将中间体5(230mg)溶解在THF 780mg中而得到的溶液后,在50℃下反应15小时。向反应溶液中加入氯仿3.45g后,依次用0.5M乙酸缓冲液(pH4.0)2.30g、7重量%碳酸氢钠溶液2.30g、20重量%食盐水2.30g洗涤。加入硫酸钠130mg进行脱水后,通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,得到130mg的中间体6-a。

[0343] <中间体7-a的合成>

使用中间体6-a,按照与制造例1的中间体4-a相同的方法来合成中间体7-a。

## [0344] &lt;化合物10的合成&gt;

使用中间体7-a和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例1的化合物1相同的方法来合成化合物10。

<化合物10的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

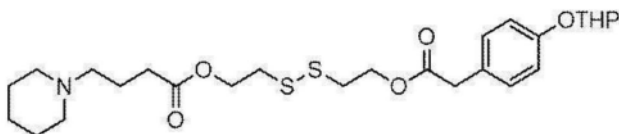
δ:0.88(t、6H)、1.00(t、6H)、1.20-1.45(m、58H)、1.69-1.84(m、4H)、2.28-2.60(m、9H)、2.88-2.97(m、4H)、3.63(s、2H)、4.28-4.38(m、4H)、7.02-7.05(m、2H)、7.27-7.30(m、2H)

## [0345] [制造例11]化合物11的合成

<中间体6-b的合成>

除了使用哌啶以外,与制造例10相同地合成下式表示的中间体6-b。

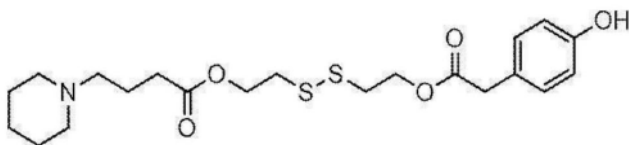
## [0346] [化学式25]



## [0347] &lt;中间体7-b的合成&gt;

除了使用中间体6-b以外,与制造例10相同地合成下式表示的中间体7-b。

## [0348] [化学式26]



## [0349] &lt;化合物11的合成&gt;

使用中间体7-b和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例10相同的合成路径来合成化合物11。

<化合物11的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

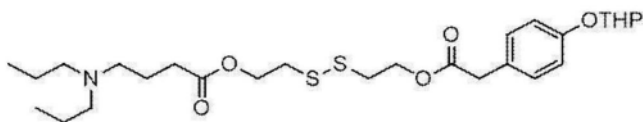
δ:0.88(t、6H)、1.20-1.45(m、60H)、1.45-1.60(m、4H)、1.69-1.84(m、4H)、2.20-2.50(m、8H)、2.52-2.59(m、1H)、2.88-2.97(m、4H)、3.63(s、2H)、4.28-4.38(m、4H)、7.02-7.05(m、2H)、7.27-7.30(m、2H)

## [0350] [制造例12]化合物12的合成

<中间体6-c的合成>

除了使用二丙胺以外,与制造例10相同地合成下式表示的中间体6-c。

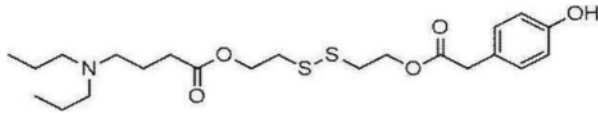
## [0351] [化学式27]



## [0352] &lt;中间体7-c的合成&gt;

除了使用中间体6-c以外,与制造例10相同地合成下式表示的中间体7-c。

## [0353] [化学式28]



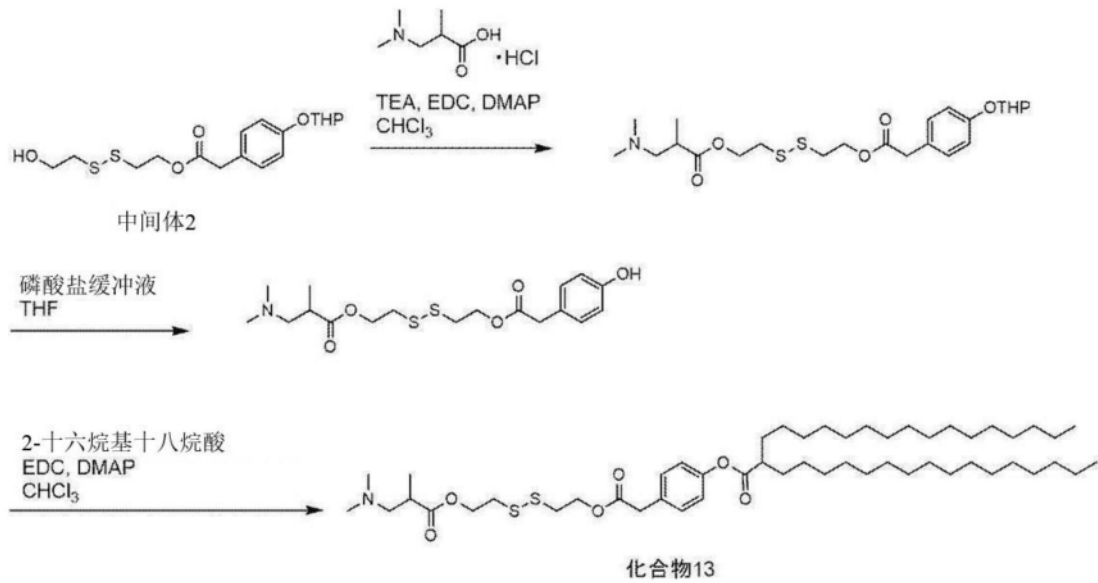
## [0354] &lt;化合物12的合成&gt;

使用中间体7-c和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例10相同的合成路径来合成化合物12。

<化合物12的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ: 0.86-0.92 (m, 12H)、1.20-1.45 (m, 62H)、1.69-1.84 (m, 4H)、2.28-2.60 (m, 9H)、2.88-2.97 (m, 4H)、3.63 (s, 2H)、4.28-4.38 (m, 4H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

## [0355] [化学式29]



## [0356] [制造例13]化合物13的合成

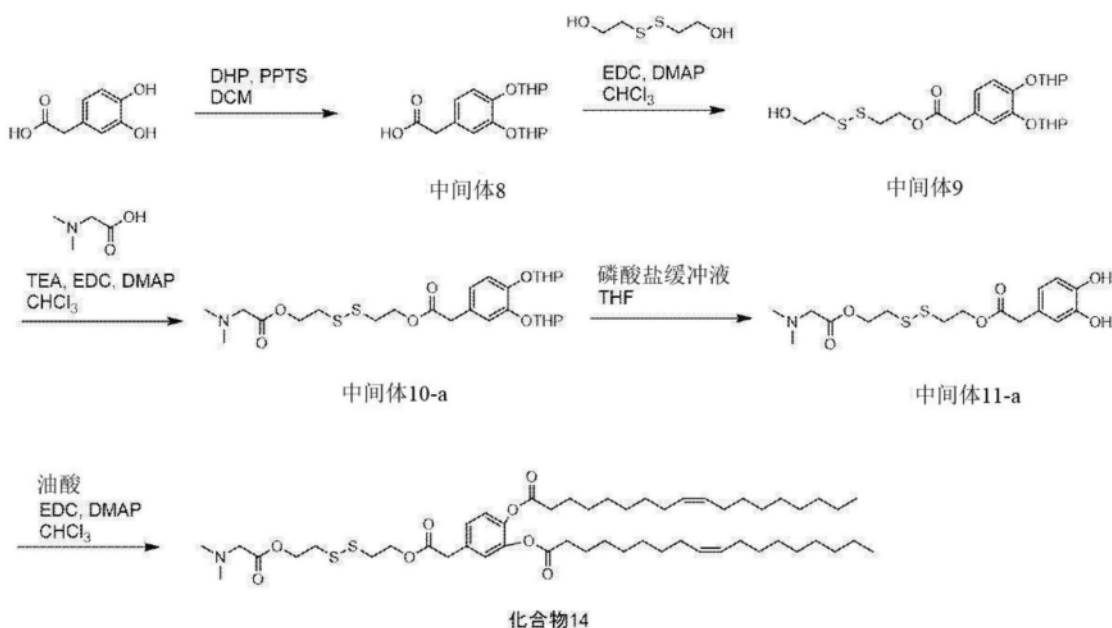
<化合物13的合成>

除了使用中间体2和3-(二甲基氨基)-2-甲基丙酸盐酸盐作为起始原料以外,按照与制造例8相同的合成路径来合成化合物13。

<化合物13的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ: 0.88 (t, 6H)、1.13 (d, 3H)、1.20-1.45 (m, 58H)、1.68-1.78 (m, 2H)、2.18-2.22 (m, 7H)、2.52-2.70 (m, 3H)、2.88-2.97 (m, 4H)、3.63 (s, 2H)、4.28-4.38 (m, 4H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

## [0357] [化学式30]



## [0358] [制造例14]化合物14的合成

## 〈中间体8的合成〉

在室温下将3,4-二羟基苯乙酸(3.00g)和PPTS(448mg)溶解在二氯甲烷40.0g中,将得到的溶液冷却至20℃。通过向其中滴加DHP(7.50g)后,在室温下反应2小时。将反应溶液冷却至20℃,加入DMAP(1.09g),进行淬灭。向淬灭后的溶液中加入2-丙醇47.0g后,冷却至10~20℃。向冷却后的溶液中滴加1N氢氧化钠水溶液30.0g,在25℃下反应2小时。反应溶液用蒸发器浓缩,蒸馏除去二氯甲烷和2-丙醇。将得到的浓缩物用氯仿30.0g洗涤,然后加入6N盐酸,得到pH5.0的溶液。将得到的溶液用氯仿30.0g萃取后,向有机层中加入硫酸钠1.50g进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,得到4.98g的中间体8。

## [0359] 〈中间体9的合成〉

在室温下将中间体8(800mg)、双(2-羟乙基)二硫化物(550mg)和DMAP(58.0mg)溶解在氯仿12.0g中。向得到的溶液中加入EDC(684mg)并在25℃下反应2小时。反应溶液用20重量%食盐水8.00g洗涤,然后加入硫酸钠400mg进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,通过用色谱柱纯化得到的粗产物,得到530mg的中间体9。

## [0360] 〈中间体10-a的合成〉

在室温下将中间体9(525mg)、二甲基甘氨酸盐酸盐(171mg)、三乙胺(169mg)和DMAP(27.0mg)溶解在氯仿7.90g中。向得到的溶液中加入EDC(319mg)并在室温下反应2小时。反应溶液依次用0.5M磷酸缓冲液(pH4.0)5.25g、7重量%碳酸氢钠溶液5.25g、20重量%食盐水5.25g洗涤,然后加入硫酸钠250mg进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,得到558mg的中间体10-a。

## [0361] 〈中间体11-a的合成〉

将中间体10-a(550mg)溶解于4.95g的THF后,加入0.5M磷酸缓冲液(pH2.0)19.8g在室温下反应2小时。向反应溶液中加入氯仿8.25g进行洗涤。向洗涤后的水层中添加1N氢氧化钠水溶液,将其pH调节为6.5后,pH调节后的水层用氯仿8.25g萃取。在其有机层中加入硫酸钠300mg进行脱水,通过过滤除去硫酸钠。滤液用蒸发器浓缩,得到503mg的中间体11-a。

## [0362] &lt;化合物14的合成&gt;

在室温下将中间体11-a (190mg)、油酸 (289mg) 和DMAP (24.0mg) 溶解在氯仿2.85g中。向得到的溶液中加入EDC (234mg) 并在25°C下反应2小时。反应溶液用20重量%食盐水1.90g洗涤, 然后加入硫酸钠100mg进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后, 滤液用蒸发器浓缩, 通过用色谱柱纯化, 得到291mg的化合物14。

<化合物14的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

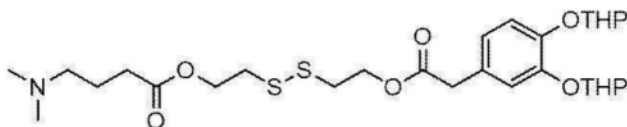
δ: 0.88 (t, 6H)、1.22-1.42 (m, 40H)、1.69-1.83 (m, 6H)、1.99-2.05 (m, 8H)、2.36 (s, 6H)、2.50-2.53 (m, 4H)、2.88-2.97 (m, 4H)、3.63 (s, 2H)、4.34-4.42 (m, 4H)、5.32-5.38 (m, 4H)、7.10-7.17 (m, 3H)

## [0363] [制造例15] 化合物15的合成

<中间体10-b的合成>

除了使用4-(二甲基氨基)丁酸盐以外, 与制造例14相同地合成下式表示的中间体10-b。

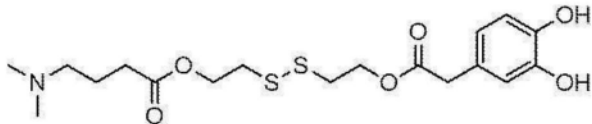
## [0364] [化学式31]



## [0365] &lt;中间体11-b的合成&gt;

除了使用中间体10-b以外, 与制造例14相同地合成下式表示的中间体11-b。

## [0366] [化学式32]



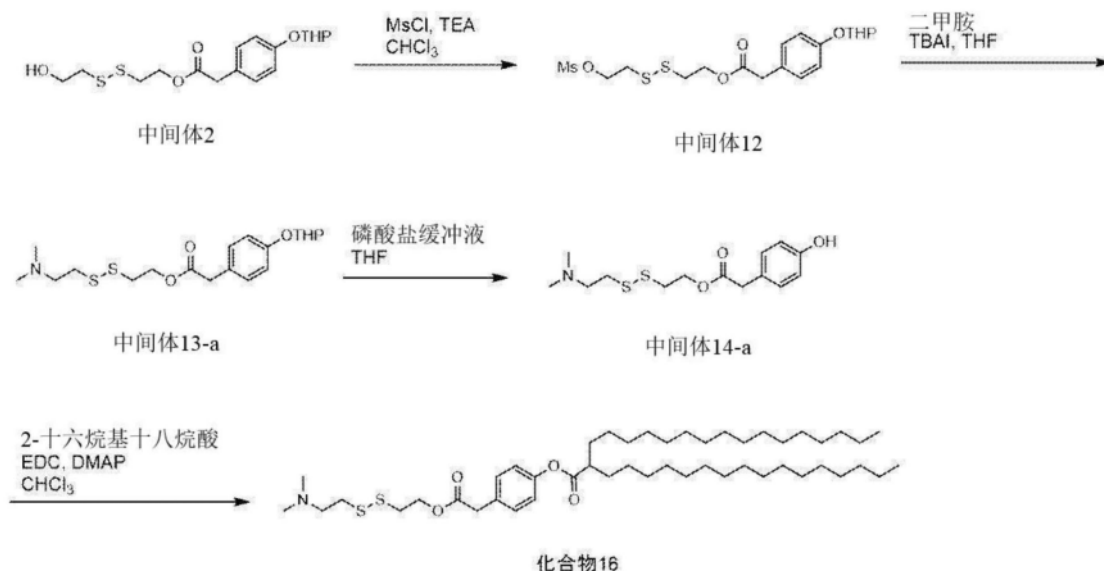
## [0367] &lt;化合物15的合成&gt;

使用中间体11-b和油酸, 按照与制造例14相同的合成路径来合成化合物15。

<化合物15的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ: 0.88 (t, 6H)、1.22-1.42 (m, 40H)、1.69-1.83 (m, 6H)、1.99-2.05 (m, 8H)、2.26 (s, 6H)、2.33-2.54 (m, 4H)、2.50-2.53 (m, 4H)、2.88-2.97 (m, 4H)、3.63 (s, 2H)、4.34-4.42 (m, 4H)、5.32-5.38 (m, 4H)、7.10-7.17 (m, 3H)

## [0368] [化学式33]



## [0369] [制造例16]化合物16的合成

## 〈中间体12的合成〉

在室温下将中间 2 (5.00g) 和三乙胺 (2.72g) 溶解在氯仿 125g 中。向得到的溶液中加入甲基磺酰氯 (2.31g) 在 25°C 下反应 3 小时。反应溶液用 75.0g 的 7 重量 % 碳酸氢钠溶液洗涤, 加入硫酸钠 5.00g 进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后, 滤液用蒸发器浓缩, 通过用色谱柱纯化, 得到 4.42g 的中间 12。

## [0370] 〈中间 13-a 的合成〉

将中间 12 (600mg) 溶解在二甲胺 (THF 中 2.0mol/L) 5.40g 中, 加入 TBAI (49.0mg), 在 25°C 下反应 20 小时。向反应溶液中加入氯仿 9.00g, 使用 0.5M 乙酸缓冲液 (pH4.0) 6.00g 进行洗涤, 加入硫酸钠 300mg 进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后, 该滤液使用蒸发器进行浓缩, 得到 470mg 的中间 13-a。

## [0371] 〈中间 14-a 的合成〉

除了使用中间 13-a 以外, 与制造例 1 的中间 4-a 相同地合成中间 14-a。

## [0372] 〈化合物 16 的合成〉

使用中间 14-a 和 2-十六烷基十八烷酸, 按照与制造例 1 的化合物 1 相同的方法来合成化合物 16。

〈化合物 16 的  $^1\text{H-NMR}$  (600MHz、 $\text{CDCl}_3$ )〉

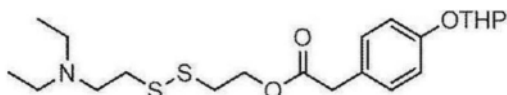
$\delta$ : 0.88 (t, 6H)、1.20-1.45 (m, 58H)、1.69-1.84 (m, 2H)、2.25 (s, 6H)、2.52-2.60 (m, 3H)、2.80 (t, 2H)、2.90 (t, 2H)、3.63 (s, 2H)、4.35 (t, 2H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

## [0373] [制造例17]化合物17的合成

## 〈中间 13-b 的合成〉

在室温下向中间 12 (600mg) 和二乙胺 (779mg) 中加入 THF 4.20g 并使其溶解。向得到的溶液中加入 TBAI (49.0mg) 并在 25°C 下反应 3 小时。向反应溶液中加入氯仿 9.00g, 使用 0.5M 乙酸缓冲液 (pH4.0) 6.00g 进行洗涤, 加入硫酸钠 300mg 进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后, 该滤液用蒸发器浓缩, 得到下式表示的中间 13-b 473mg。

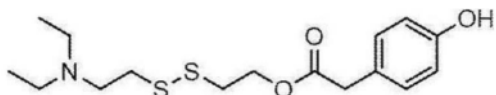
## [0374] [化学式34]



[0375] <中间体14-b的合成>

除了使用中间体13-b以外,与制造例16相同地合成下式表示的中间体14-b。

[0376] [化学式35]



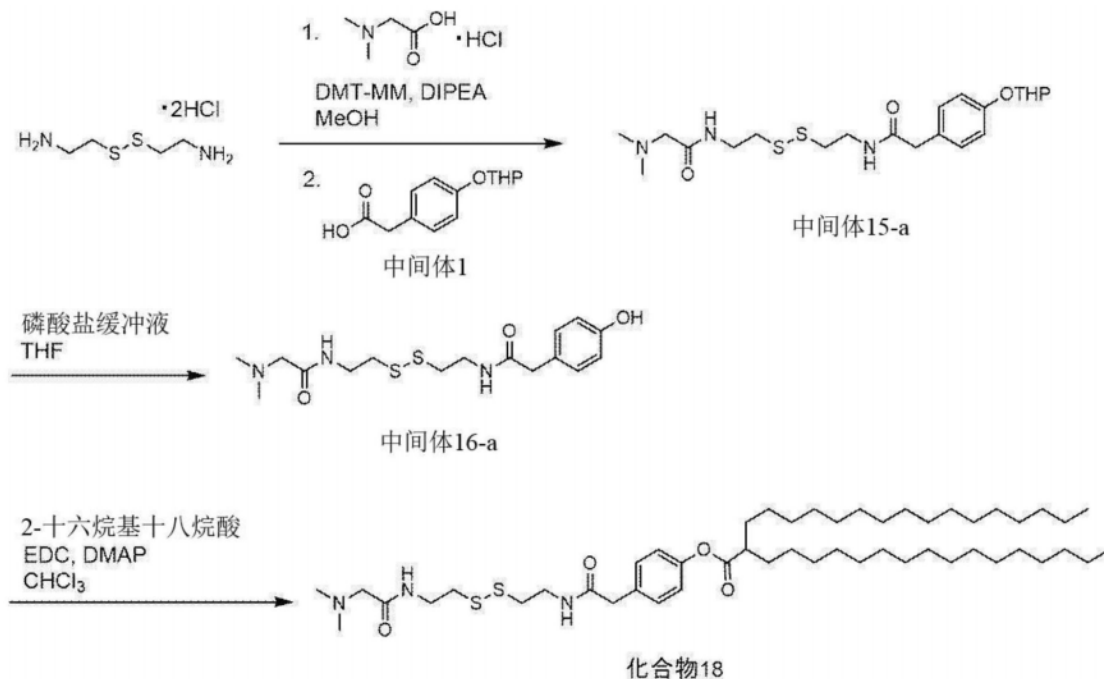
[0377] <化合物17的合成>

使用中间体14-b和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例16相同的合成路径来合成化合物17。

<化合物17的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ: 0.88 (t、6H)、1.03 (t、6H)、1.20-1.45 (m、58H)、1.69-1.84 (m、2H)、2.53-2.57 (m、5H)、2.75-2.80 (m、4H)、2.91 (t、2H)、3.63 (s、2H)、4.35 (t、2H)、7.02-7.05 (m、2H)、7.27-7.30 (m、2H)

[0378] [化学式36]



[0379] [制造例18]化合物18的合成

<中间体15-a的合成>

在室温下将胱氨酸二盐酸盐 (227mg)、DIPEA (391mg) 和二甲基甘氨酸盐酸盐 (141mg) 溶解在甲醇4.54g中。向得到的溶液中加入DMT-MM (837mg), 在25°C下反应2小时。然后,向反应溶液中加入中间体1 (239mg), 在25°C下反应2小时。将反应溶液浓缩后,加入氯仿3.40g,依次用0.5M磷酸缓冲液 (pH6.0) 2.27g、7重量%碳酸氢钠溶液2.27g、20重量%食盐水2.27g洗涤。向得到的溶液中加入硫酸钠100mg进行脱水,通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,以粗产物得到748mg的中间体15-a。

## [0380] &lt;中间体16-a的合成&gt;

除了使用中间体15-a的粗产物以外,与制造例1的中间体4-a相同地合成中间体16-a。

## [0381] &lt;化合物18的合成&gt;

使用中间体16-a和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例1相同的合成路径来合成化合物18。

<化合物18的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

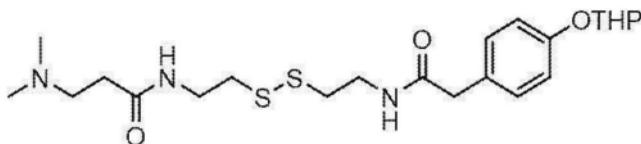
δ:0.88(t、6H)、1.20-1.45(m、58H)、1.69-1.84(m、2H)、2.30(s、6H)、2.52-2.59(m、1H)、2.76-2.82(m、4H)、2.95(s、2H)、3.50-3.60(m、6H)、6.34(s、1H)、7.02-7.05(m、2H)、7.27-7.30(m、2H)、7.50(s、1H)

## [0382] [制造例19]化合物19的合成

<中间体15-b的合成>

除了使用3-(二甲基氨基)丙酸盐以外,与制造例18相同地合成下式表示的中间体15-b。

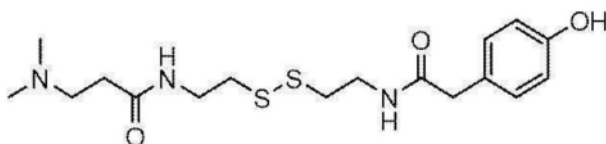
## [0383] [化学式37]



## [0384] &lt;中间体16-b的合成&gt;

除了使用中间体15-b以外,与制造例18相同地合成下式表示的中间体16-b。

## [0385] [化学式38]



## [0386] &lt;化合物19的合成&gt;

使用中间体16-b和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例18相同的合成路径来合成化合物19。

<化合物19的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

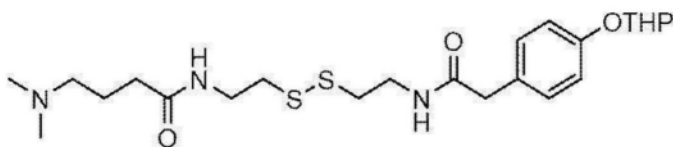
δ:0.88(t、6H)、1.20-1.45(m、58H)、1.69-1.84(m、2H)、2.28(s、6H)、2.33-2.38(m、2H)、2.52-2.59(m、3H)、2.76-2.82(m、4H)、3.50-3.60(m、6H)、6.34(s、1H)、7.02-7.05(m、2H)、7.27-7.30(m、2H)、7.50(s、1H)

## [0387] [制造例20]化合物20的合成

<中间体15-c的合成>

除了使用4-(二甲基氨基)丁酸盐以外,与制造例18相同地合成下式表示的中间体15-c。

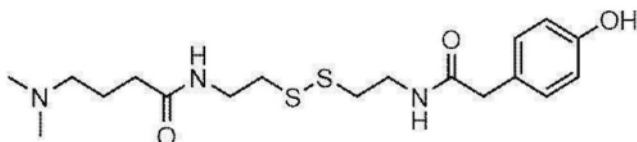
## [0388] [化学式39]



## [0389] &lt;中间体16-c的合成&gt;

除了使用中间体15-c以外,与制造例18相同地合成下式表示的中间体16-c。

## [0390] [化学式40]



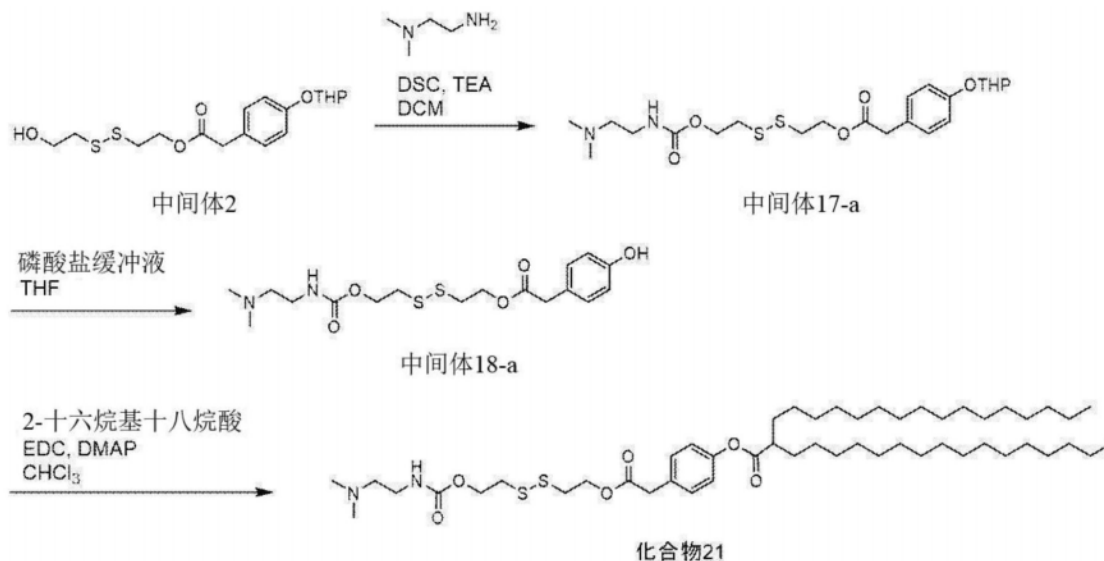
## [0391] &lt;化合物20的合成&gt;

使用中间体16-c和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例18相同的合成路径来合成化合物20。

<化合物20的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

$\delta$ : 0.88 (t, 6H)、1.20-1.45 (m, 58H)、1.69-1.80 (m, 4H)、2.25-2.38 (m, 8H)、2.52-2.59 (m, 1H)、2.76-2.82 (m, 4H)、3.50-3.60 (m, 6H)、6.34 (s, 1H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)、7.50 (s, 1H)

## [0392] [化学式41]



## [0393] [制造例21]化合物21的合成

## &lt;中间体17-a的合成&gt;

在室温下向中间体2 (393mg) 和三乙胺 (235mg) 中加入二氯甲烷7.10g并使其溶解。向得到的溶液中加入DSC (541mg), 在25℃下反应2小时。通过过滤除去残留于反应溶液中的DSC后,向滤液中加入N,N-二甲基乙二胺 (112mg), 在25℃下反应1小时。将反应后的溶液依次用0.5M乙酸缓冲液 (pH4.0) 5.90g、7重量%碳酸氢钠溶液5.90g、20重量%食盐水5.90g洗涤, 然后加入硫酸钠200mg进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩, 得到472mg的中间体17-a。

## [0394] &lt;中间体18-a的合成&gt;

除了使用中间体17-a以外,与制造例1的中间体4-a相同地合成中间体18-a。

[0395] <化合物21的合成>

使用中间体18-a和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例1的化合物1相同的方法来合成化合物21。

<化合物21的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

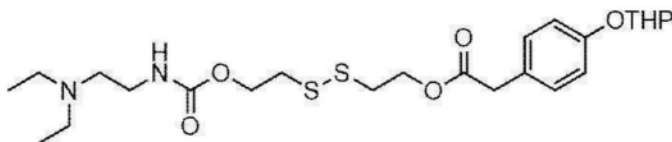
δ:0.88 (t,6H)、1.20-1.45 (m,58H)、1.69-1.84 (m,2H)、2.22 (s,6H)、2.38-2.42 (m,2H)、2.52-2.59 (m,1H)、2.88-2.97 (m,4H)、3.22-3.26 (m,2H)、3.63 (s,2H)、4.28-4.38 (m,4H)、5.26 (s,1H)、7.02-7.05 (m,2H)、7.27-7.30 (m,2H)

[0396] [制造例22]化合物22的合成

<中间体17-b的合成>

除了使用N,N-二乙基乙二胺以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体17-b。

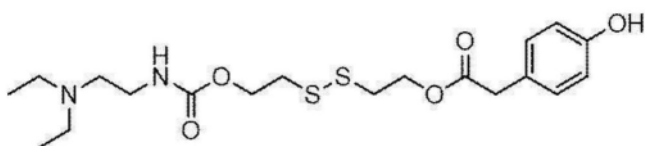
[0397] [化学式42]



[0398] <中间体18-b的合成>

除了使用中间体17-b以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体18-b。

[0399] [化学式43]



[0400] <化合物22的合成>

使用中间体18-b和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例21相同的合成路径来合成化合物22。

<化合物22的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

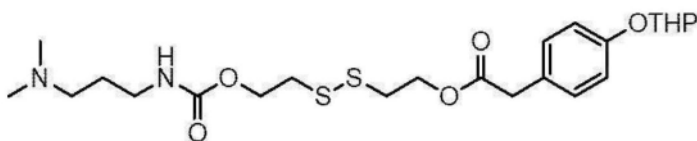
δ:0.88 (t,6H)、1.00 (t,6H)、1.20-1.45 (m,58H)、1.69-1.84 (m,2H)、2.47-2.57 (m,7H)、2.88-2.97 (m,4H)、3.22-3.26 (m,2H)、3.63 (s,2H)、4.28-4.38 (m,4H)、5.28 (s,1H)、7.02-7.05 (m,2H)、7.27-7.30 (m,2H)

[0401] [制造例23]化合物23的合成

<中间体17-c的合成>

除了使用N,N-二甲基-1,3-丙二胺以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体17-c。

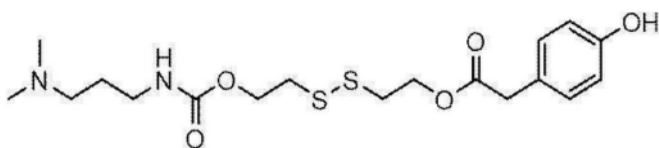
[0402] [化学式44]



[0403] <中间体18-c的合成>

除了使用中间体17-c以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体18-c。

[0404] [化学式45]



[0405] <化合物23的合成>

使用中间体18-c和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例21相同的合成路径来合成化合物23。

<化合物23的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

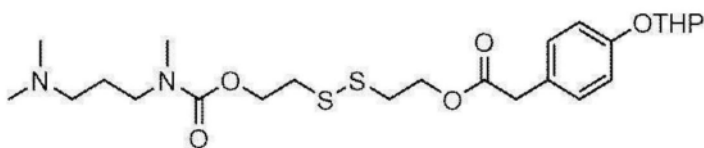
$\delta$ : 0.88 (t、6H)、1.20-1.45 (m、58H)、1.69-1.84 (m、4H)、2.24 (s、6H)、2.38-2.42 (m、2H)、2.52-2.59 (m、1H)、2.88-2.97 (m、4H)、3.22-3.26 (m、2H)、3.63 (s、2H)、4.28-4.38 (m、4H)、5.70 (s、1H)、7.02-7.05 (m、2H)、7.27-7.30 (m、2H)

[0406] [制造例24]化合物24的合成

<中间体17-d的合成>

除了使用N,N,N'-三甲基-1,3-丙二胺以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体17-d。

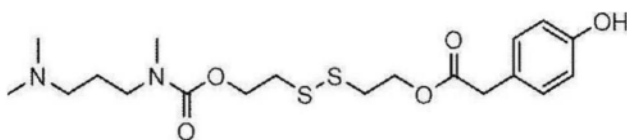
[0407] [化学式46]



[0408] <中间体18-d的合成>

除了使用中间体17-d以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体18-d。

[0409] [化学式47]



[0410] <化合物24的合成>

使用中间体18-d和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例21相同的合成路径来合成化合物24。

<化合物24的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

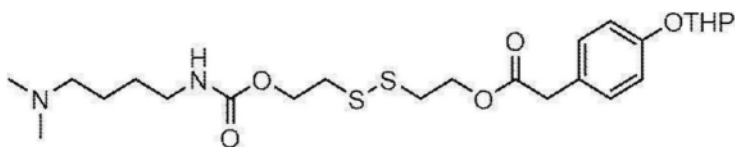
$\delta$ : 0.88 (t、6H)、1.20-1.45 (m、58H)、1.69-1.84 (m、4H)、2.24 (s、6H)、2.38-2.42 (m、2H)、2.52-2.59 (m、1H)、2.88-2.97 (m、7H)、3.22-3.26 (m、2H)、3.63 (s、2H)、4.28-4.38 (m、4H)、7.02-7.05 (m、2H)、7.27-7.30 (m、2H)

[0411] [制造例25]化合物25的合成

<中间体17-e的合成>

除了使用N,N-二甲基-1,4-丁二胺以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体17-e。

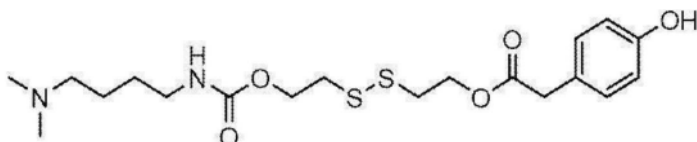
[0412] [化学式48]



## [0413] &lt;中间体18-e的合成&gt;

除了使用中间体17-e以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体18-e。

## [0414] [化学式49]



## [0415] &lt;化合物25的合成&gt;

使用中间体18-e和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例21相同的合成路径来合成化合物25。

<化合物25的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

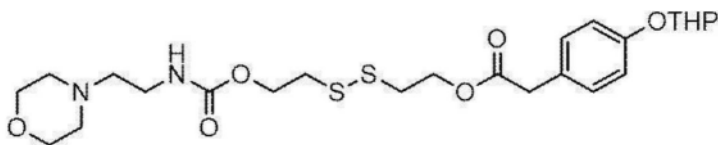
δ: 0.88 (t, 6H)、1.20-1.45 (m, 58H)、1.50-1.62 (m, 4H)、1.69-1.84 (m, 2H)、2.20-2.42 (m, 8H)、2.52-2.59 (m, 1H)、2.88-2.97 (m, 4H)、3.22-3.26 (m, 2H)、3.63 (s, 2H)、4.28-4.38 (m, 4H)、5.70 (s, 1H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

## [0416] [制造例26]化合物26的合成

<中间体17-f的合成>

除了使用4-(2-氨基乙基)吗啉以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体17-f。

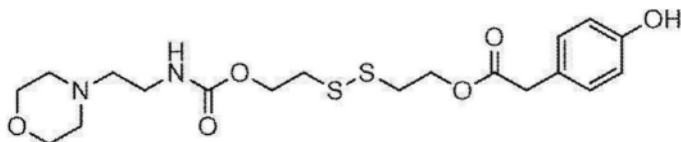
## [0417] [化学式50]



## [0418] &lt;中间体18-f的合成&gt;

除了使用中间体17-f以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体18-f。

## [0419] [化学式51]



## [0420] &lt;化合物26的合成&gt;

使用中间体18-f和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例21相同的合成路径来合成化合物26。

<化合物26的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

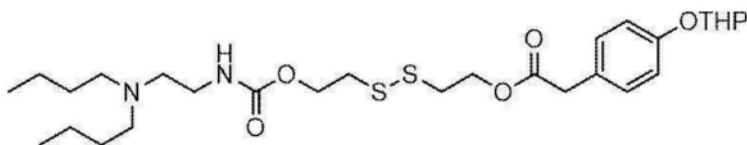
δ: 0.88 (t, 6H)、1.20-1.45 (m, 58H)、1.69-1.84 (m, 2H)、2.40-2.46 (m, 6H)、2.52-2.59 (m, 1H)、2.88-2.97 (m, 4H)、3.22-3.26 (m, 2H)、3.63 (s, 2H)、4.28-4.38 (m, 4H)、5.26 (s, 1H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

[0421] [制造例27]化合物27的合成

<中间体17-g的合成>

除了使用N,N-二丁基乙二胺以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体17-g。

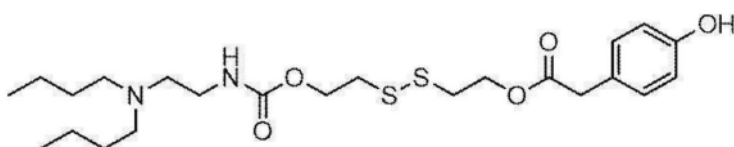
[0422] [化学式52]



[0423] <中间体18-g的合成>

除了使用中间体17-g以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体18-g。

[0424] [化学式53]



[0425] <化合物27的合成>

使用中间体18-g和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例21相同的合成路径来合成化合物27。

<化合物27的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

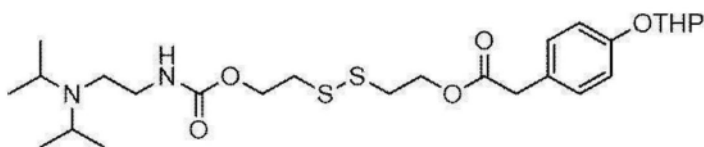
δ: 0.87-0.93 (m, 12H)、1.20-1.45 (m, 66H)、1.69-1.84 (m, 2H)、2.39-2.57 (m, 7H)、2.88-2.97 (m, 4H)、3.22-3.26 (m, 2H)、3.63 (s, 2H)、4.28-4.38 (m, 4H)、5.28 (s, 1H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

[0426] [制造例28]化合物28的合成

<中间体17-h的合成>

除了使用N,N-二异丙基乙二胺以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体17-h。

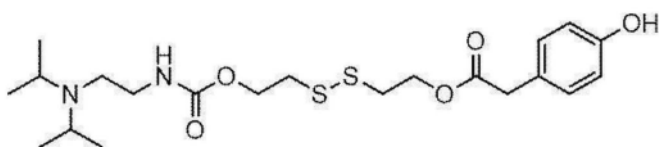
[0427] [化学式54]



[0428] <中间体18-h的合成>

除了使用中间体17-h以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体18-h。

[0429] [化学式55]



[0430] <化合物28的合成>

使用中间体18-h和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例21相同的合成路径来合成

化合物28。

<化合物28的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

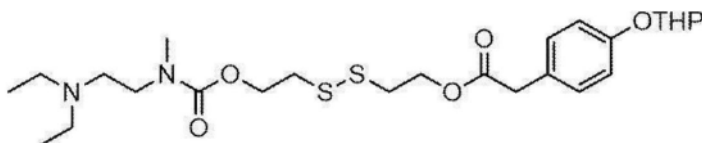
δ: 0.88 (t, 6H)、0.95-1.03 (d, 12H)、1.20-1.45 (m, 58H)、1.60-1.84 (m, 6H)、2.52-2.59 (m, 1H)、2.88-3.00 (m, 6H)、3.22-3.26 (m, 2H)、3.63 (s, 2H)、4.28-4.38 (m, 4H)、5.28 (s, 1H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

[0431] [制造例29]化合物29的合成

<中间体17-i的合成>

除了使用N,N-二乙基-N'-甲基乙二胺以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体17-i。

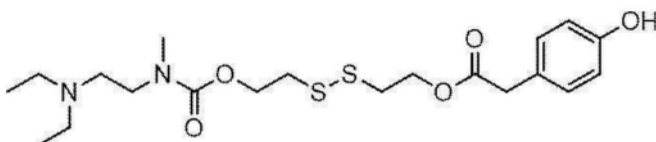
[0432] [化学式56]



[0433] <中间体18-i的合成>

除了使用中间体17-i以外,与制造例21相同地合成下式表示的中间体18-i。

[0434] [化学式57]



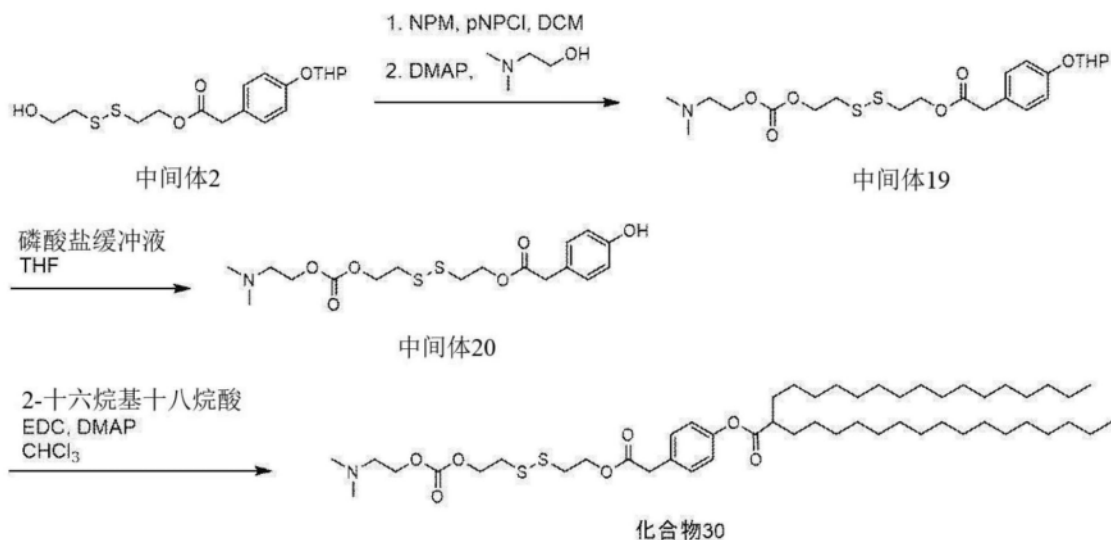
<化合物29的合成>

使用中间体18-i和2-十六烷基十八烷酸,按照与制造例21相同的合成路径来合成化合物29。

<化合物29的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ: 0.88 (t, 6H)、1.00 (t, 6H)、1.20-1.45 (m, 58H)、1.69-1.84 (m, 2H)、2.47-2.57 (m, 7H)、2.88-2.97 (m, 7H)、3.22-3.26 (m, 2H)、3.63 (s, 2H)、4.28-4.38 (m, 4H)、5.28 (s, 1H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

[0435] [化学式58]



## [0436] [制造例30]化合物30的合成

## 〈中间体19的合成〉

在室温下向中间体2 (510mg) 和NPM (670mg) 中加入二氯甲烷5.10g并使其溶解。向得到的溶液中加入pNPCl (690mg), 在25°C下反应2小时。向该反应溶液中加入DMAP (33.0mg) 和2-(二甲基氨基)乙醇 (976mg), 在25°C下反应6小时。反应后的溶液依次用0.5M乙酸缓冲液 (pH4.0) 5.10g、7重量%碳酸氢钠溶液5.10g、20重量%食盐水5.10g洗涤, 然后加入硫酸钠250mg进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后, 滤液用蒸发器浓缩, 得到287mg的中间体19。

## [0437] 〈中间体20的合成〉

除了使用中间体19以外, 与制造例1的中间体4-a相同地合成中间体20。

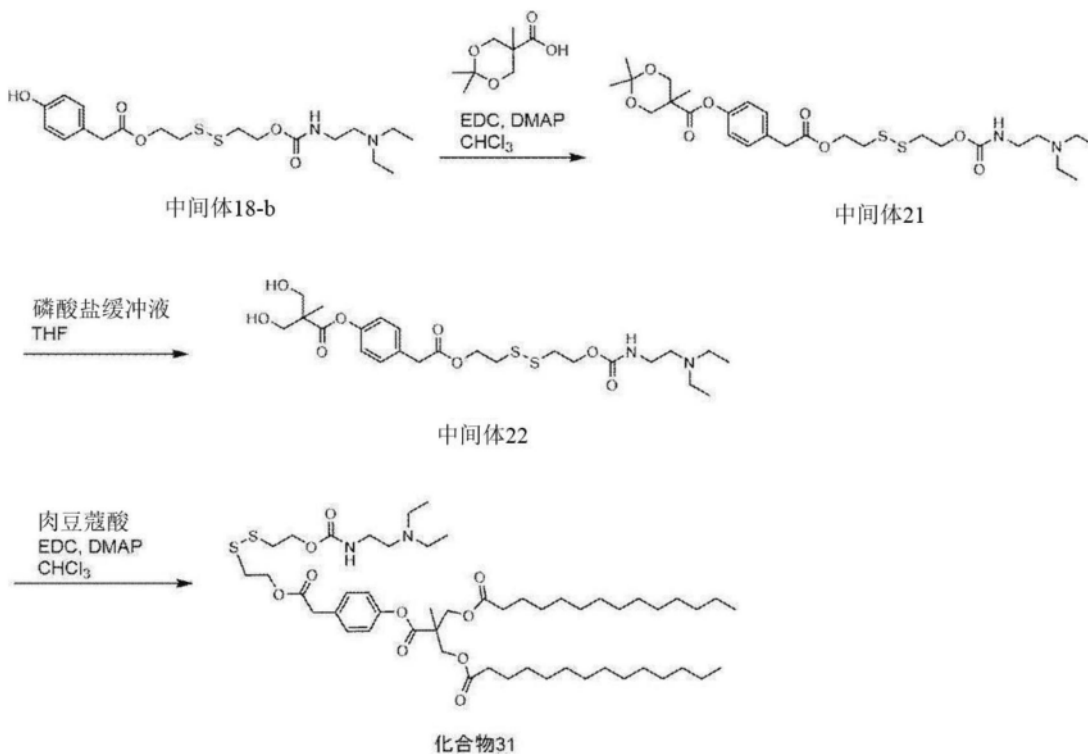
## [0438] 〈化合物30的合成〉

使用中间体20和2-十六烷基十八烷酸, 按照与制造例1的化合物1相同的方法来合成化合物30。

〈化合物30的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)〉

δ: 0.88 (t, 6H)、1.20-1.45 (m, 58H)、1.69-1.84 (m, 2H)、2.28 (s, 6H)、2.58-2.61 (m, 3H)、2.91-2.94 (m, 4H)、3.63 (s, 2H)、4.23 (t, 2H)、4.32-4.38 (m, 4H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

## [0439] [化学式59]



## [0440] [制造例31]化合物31的合成

## 〈中间体21的合成〉

在室温下将中间体18-b (1.00g)、2,2,5-三甲基-1,3-二噁烷-5-羧酸 (445mg) 和DMAP (57.0mg) 溶解在氯仿15.0g中。向得到的溶液中加入EDC (668mg) 并在25°C下反应2小时。反应溶液用20重量%食盐水10.0g洗涤, 然后加入硫酸钠500mg进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后, 滤液用蒸发器浓缩, 通过用色谱柱纯化, 得到1.25g的中间体21。

**[0441]** <中间体22的合成>

将中间体21 (1.25g) 溶解于THF 11.3g后,加入0.5M磷酸缓冲液 (pH2.0) 45.0g在40℃下反应22小时。向反应溶液中加入氯仿18.8g进行洗涤。向洗涤后的水层中添加400g/L氢氧化钠水溶液,将其pH调节为6.0后,水层用氯仿18.8g萃取。向萃取的有机层中加入硫酸钠600mg进行脱水,通过过滤除去硫酸钠。滤液用蒸发器浓缩,得到908mg的中间体22。

**[0442]** <化合物31的合成>

在室温下将中间体22 (200mg)、豆蔻酸 (175mg) 和DMAP (18.0mg) 溶解在氯仿3.00g中。向得到的溶液中加入EDC (175mg) 并在25℃下反应2小时。反应溶液用蒸发器浓缩,通过用色谱柱纯化,得到106mg的化合物31。

<化合物31的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ: 0.89 (t, 6H)、1.04 (t, 6H)、1.25-1.35 (m, 40H)、1.42 (s, 3H)、1.55-1.65 (m, 4H)、2.36 (t, 4H)、2.52-2.58 (m, 6H)、2.92-2.96 (m, 4H)、3.22-3.26 (m, 2H)、3.66 (s, 2H)、4.30-4.40 (m, 8H)、5.28 (s, 1H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

**[0443]** [制造例32] 化合物32的合成

<化合物32的合成>

使用中间体22和棕榈酸,按照与制造例31相同的合成路径来合成化合物32。

<化合物32的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ: 0.89 (t, 6H)、1.04 (t, 6H)、1.25-1.35 (m, 48H)、1.42 (s, 3H)、1.55-1.65 (m, 4H)、2.36 (t, 4H)、2.52-2.58 (m, 6H)、2.92-2.96 (m, 4H)、3.22-3.26 (m, 2H)、3.66 (s, 2H)、4.30-4.40 (m, 8H)、5.28 (s, 1H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

**[0444]** [制造例33] 化合物33的合成

<化合物33的合成>

使用中间体22和硬脂酸,按照与制造例31相同的合成路径来合成化合物33。

<化合物33的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ: 0.89 (t, 6H)、1.04 (t, 6H)、1.25-1.35 (m, 56H)、1.42 (s, 3H)、1.55-1.65 (m, 4H)、2.36 (t, 4H)、2.52-2.58 (m, 6H)、2.92-2.96 (m, 4H)、3.22-3.26 (m, 2H)、3.66 (s, 2H)、4.30-4.40 (m, 8H)、5.28 (s, 1H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

**[0445]** [制造例34] 化合物34的合成

<化合物34的合成>

使用中间体22和油酸,按照与制造例31相同的合成路径来合成化合物34。

<化合物34的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ: 0.89 (t, 6H)、1.04 (t, 6H)、1.25-1.38 (m, 40H)、1.42 (s, 3H)、1.55-1.65 (m, 4H)、1.99-2.05 (m, 8H)、2.36 (t, 4H)、2.52-2.58 (m, 6H)、2.92-2.96 (m, 4H)、3.22-3.26 (m, 2H)、3.66 (s, 2H)、4.30-4.40 (m, 8H)、5.32-5.38 (m, 5H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

**[0446]** [制造例35] 化合物35的合成

<化合物35的合成>

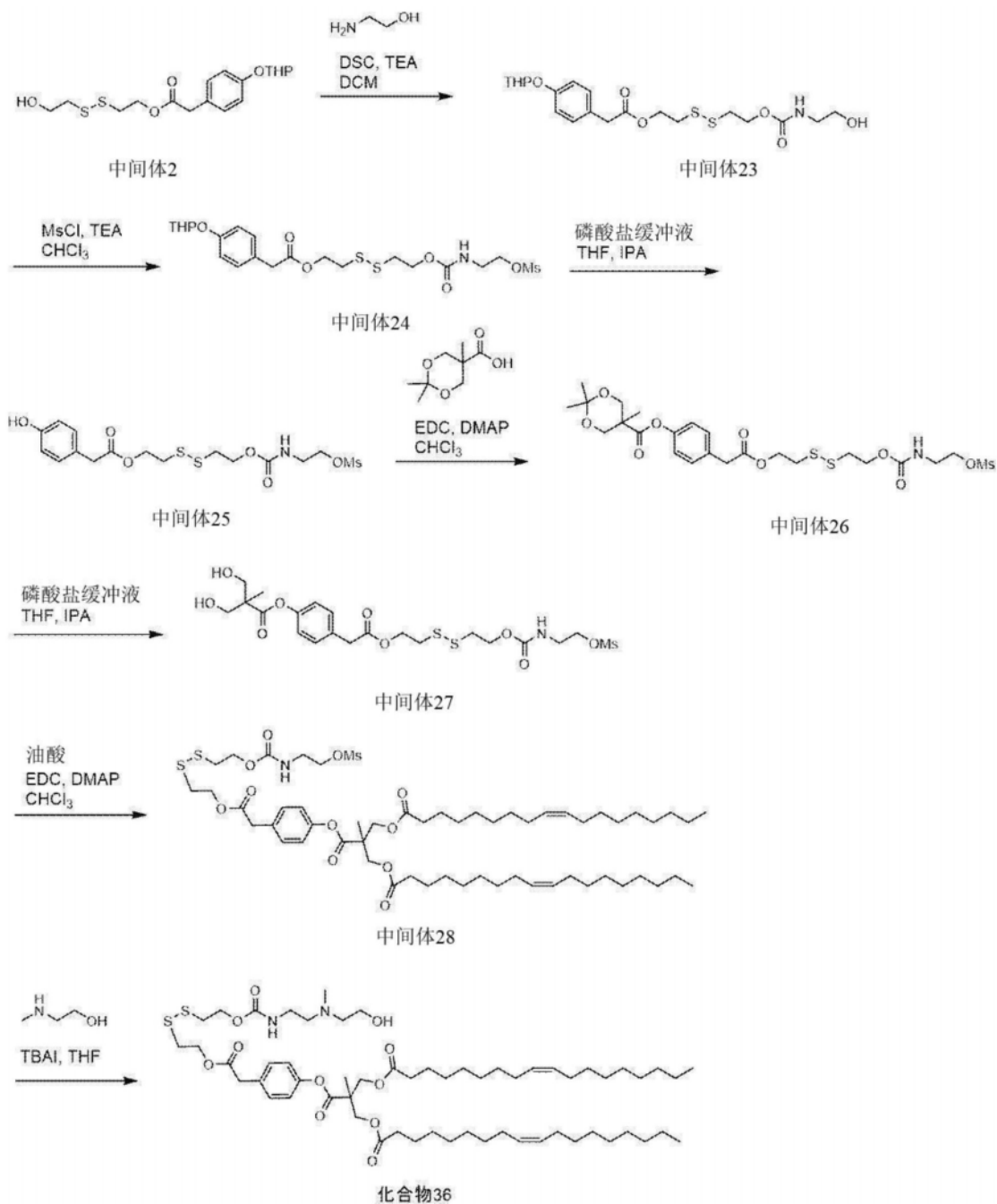
使用中间体22和亚油酸,按照与制造例31相同的合成路径来合成化合物35。

<化合物35的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ: 0.89 (t, 6H)、1.04 (t, 6H)、1.25-1.38 (m, 28H)、1.42 (s, 3H)、1.55-1.65 (m, 4H)、

1.99-2.05 (m, 8H)、2.36 (t, 4H)、2.52-2.58 (m, 6H)、2.75-2.78 (m, 4H)、2.92-2.96 (m, 4H)、3.22-3.26 (m, 2H)、3.66 (s, 2H)、4.30-4.40 (m, 8H)、5.32-5.38 (m, 9H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

[0447] [化学式60]



[0448] [制造例36]化合物36的合成

<中间体23的合成>

在室温下向中间体2 (2.0g) 和三乙胺 (1.20g) 中加入二氯甲烷36.0g并使其溶解。向得到的溶液中加入DSC (2.75g), 在25℃下反应2小时。通过过滤除去残留于反应溶液中的DSC后, 向滤液中加入乙醇胺 (394mg), 在25℃下反应1小时。反应后的溶液用0.5M乙酸缓冲液 (pH4.0) 30.0g洗涤, 然后加入硫酸钠1.00g进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后, 滤液用蒸

发器浓缩,得到1.41g的中间体23。

[0449] <中间体24的合成>

在室温下将中间体23 (1.35g) 和三乙胺 (594mg) 溶解在氯仿20.0g中。向得到的溶液中加入甲基磺酰氯 (505mg) 并在室温下反应3小时。反应溶液用7重量%碳酸氢钠溶液15.0g洗涤,加入硫酸钠500mg进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,得到1.34g的中间体24。

[0450] <中间体25的合成>

将中间体2 (1.31g) 溶解于THF 11.8g与IPA 13.1g的混合溶剂后,加入0.5M磷酸缓冲液 (pH2.0) 47.2g在40°C下反应2小时。向反应溶液中加入氯仿19.7g进行洗涤。向洗涤后的水层中添加400g/L氢氧化钠水溶液中和,然后在水层中加入氯仿19.7g进行萃取。在萃取的有机层中加入硫酸钠3.0g进行脱水,通过过滤除去硫酸钠。滤液用蒸发器浓缩,得到939mg的中间体25。

[0451] <中间体26的合成>

在室温下将中间体25 (930mg)、2,2,5-三甲基-1,3-二噁烷-5-羧酸 (393mg) 和DMAP (50.0mg) 溶解在氯仿15g中。向得到的溶液中加入EDC (590mg) 并在25°C下反应2小时。反应溶液用20重量%食盐水9.30g洗涤,然后加入硫酸钠500mg进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,通过用色谱柱纯化,得到1.06g的中间体26。

[0452] <中间体27的合成>

将中间体26 (1.00g) 溶解于THF 9.00g与IPA 9.00g的混合溶剂后,加入0.5M磷酸缓冲液 (pH2.0) 40.0g在40°C下反应2小时。向反应溶液中加入氯仿15.0g进行洗涤。向洗涤后的水层中添加400g/L氢氧化钠水溶液中和,然后向水层中加入氯仿15.0g进行萃取。在有机层中加入硫酸钠500mg进行脱水,通过过滤除去硫酸钠。滤液用蒸发器浓缩,得到785mg的中间体27。

[0453] <中间体28的合成>

在室温下将中间体27 (770mg)、油酸 (802mg) 和DMAP (66.0mg) 溶解在氯仿11.6g中。向得到的溶液中加入EDC (648mg) 并在25°C下反应2小时。反应溶液用20重量%食盐水8.00g洗涤,然后加入硫酸钠2.0g进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,通过用色谱柱纯化,得到1.15g的中间体28。

[0454] <化合物36的合成>

将中间体28 (250mg) 溶解在THF 2.50g中,加入2-(甲基氨基)乙醇 (137mg) 和TBAI (17.0mg) 在40°C下反应8小时。向该反应溶液中加入氯仿3.75g,依次用0.5M乙酸缓冲液 (pH4.0) 2.50g、7重量%碳酸氢钠溶液2.50g、20重量%食盐水2.50g洗涤。滤液用蒸发器浓缩,通过用色谱柱纯化,得到79mg的化合物36。

<化合物36的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ: 0.89 (t, 6H)、1.25-1.38 (m, 40H)、1.42 (s, 3H)、1.55-1.65 (m, 4H)、1.99-2.05 (m, 8H)、2.30-2.40 (m, 7H)、2.52-2.58 (m, 4H)、2.92-2.96 (m, 4H)、3.22-3.26 (m, 2H)、3.58-3.63 (m, 4H)、4.30-4.40 (m, 8H)、5.32-5.38 (m, 5H)、7.02-7.05 (m, 2H)、7.27-7.30 (m, 2H)

[0455] [制造例37] 化合物37的合成

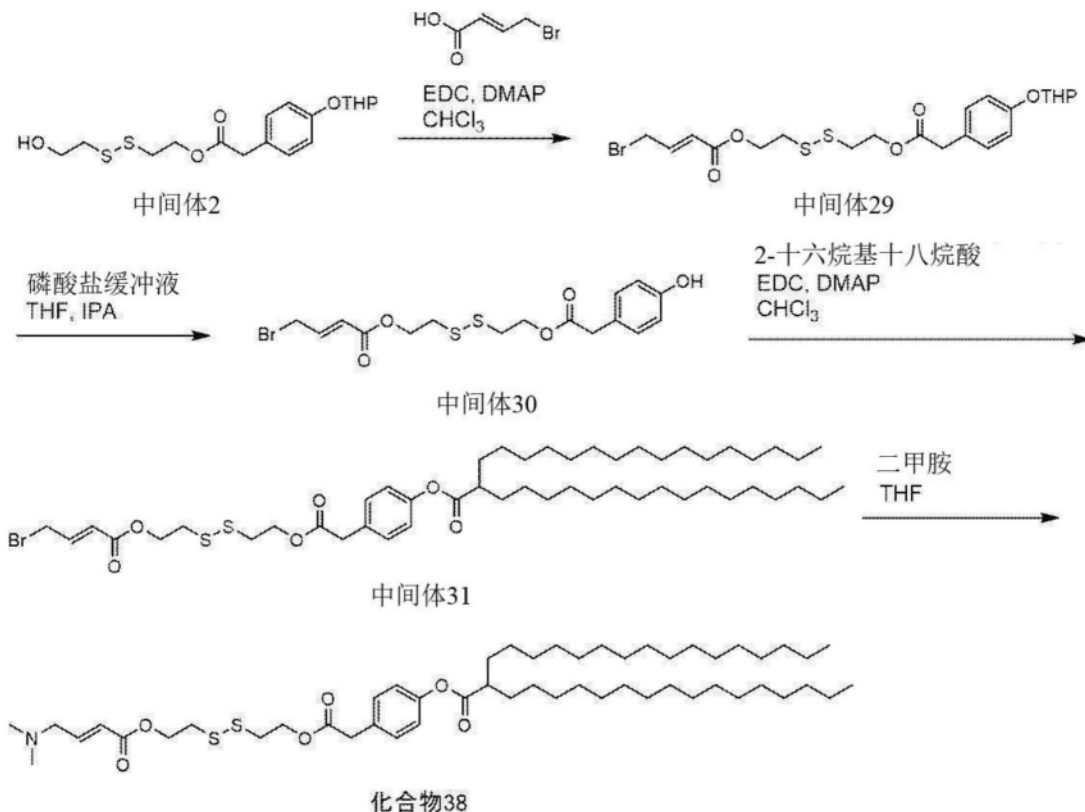
<化合物37的合成>

使用中间体28和3-(甲基氨基)-1-丙醇,按照与制造例36相同的合成路径来合成化合物37。

<化合物37的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ:0.89(t,6H)、1.25-1.38(m,40H)、1.42(s,3H)、1.55-1.72(m,6H)、1.99-2.05(m,8H)、2.30-2.40(m,7H)、2.52-2.58(m,4H)、2.92-2.96(m,4H)、3.22-3.26(m,2H)、3.58-3.63(m,4H)、4.30-4.40(m,8H)、5.32-5.38(m,5H)、7.02-7.05(m,2H)、7.27-7.30(m,2H)

[0456] [化学式61]



[0457] [制造例38]化合物38的合成

<中间体29的合成>

在室温下将中间体2(2.00g)、(E)-4-溴巴豆酸(974mg)和DMAP(131mg)溶解在氯仿30.0g中。向得到的溶液中加入EDC(1.54g)并在25℃下反应2小时。反应溶液用20重量%食盐水9.0mL洗涤,然后加入硫酸钠2.0g进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,得到2.26g的中间体29。

[0458] <中间体30的合成>

将中间体29(2.25g)溶解于THF 20.23g与IPA 22.5g的混合溶剂后,加入0.5M磷酸缓冲液(pH2.0)81.0g在40℃下反应2小时。向反应溶液中加入氯仿34.0g进行洗涤。向洗涤后的水层中添加400g/L氢氧化钠水溶液中和,然后向水层中加入氯仿34.0g进行萃取。向萃取的有机层中加入硫酸钠1.00g进行脱水,通过过滤除去硫酸钠。滤液用蒸发器浓缩,得到1.51g的中间体30。

[0459] <中间体31的合成>

在室温下将中间体30(1.40g)、2-十六烷基十八烷酸(1.80g)和DMAP(79.0mg)溶解在氯仿21.0g中。向得到的溶液中加入EDC(925mg)并在25℃下反应2小时。反应溶液用蒸发

器浓缩,得到中间体31的粗产物2.98g。

[0460] <化合物38的合成>

将中间体31的粗产物500mg和二甲胺(THF中2.0mol/L)2.30g溶解在THF 5.00g中,加入碘化钾(0.12mmol)在25°C下反应10小时。通过过滤除去不溶物后,向滤液中加入氯仿7.50g,依次用0.5M乙酸缓冲液(pH4.0)5.00g、7重量%碳酸氢钠溶液5.00g、20重量%食盐水5.00g洗涤。加入硫酸钠250mg进行脱水后,通过过滤除去硫酸钠。滤液用蒸发器浓缩,通过用色谱柱纯化,得到270mg的化合物38。

<化合物38的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ:0.88(t,6H)、1.20-1.45(m,58H)、1.69-1.84(m,2H)、2.25(s,6H)、2.52-2.59(m,1H)、2.88-2.97(m,4H)、3.07(t,2H)、3.63(s,2H)、4.28-4.38(m,4H)、5.97-6.00(m,1H)、6.95-7.05(m,3H)、7.27-7.30(m,2H)

[0461] [制造例39]化合物39的合成

<化合物39的合成>

除了使用二乙胺以外,与制造例38相同地合成化合物39。

<化合物39的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ:0.88(t,6H)、1.03(t,6H)、1.20-1.45(m,58H)、1.69-1.84(m,2H)、2.50-2.59(m,5H)、2.88-2.97(m,4H)、3.23(t,2H)、3.63(s,2H)、4.28-4.38(m,4H)、5.97-6.00(m,1H)、6.95-7.05(m,3H)、7.27-7.30(m,2H)

[0462] [制造例40]化合物40的合成

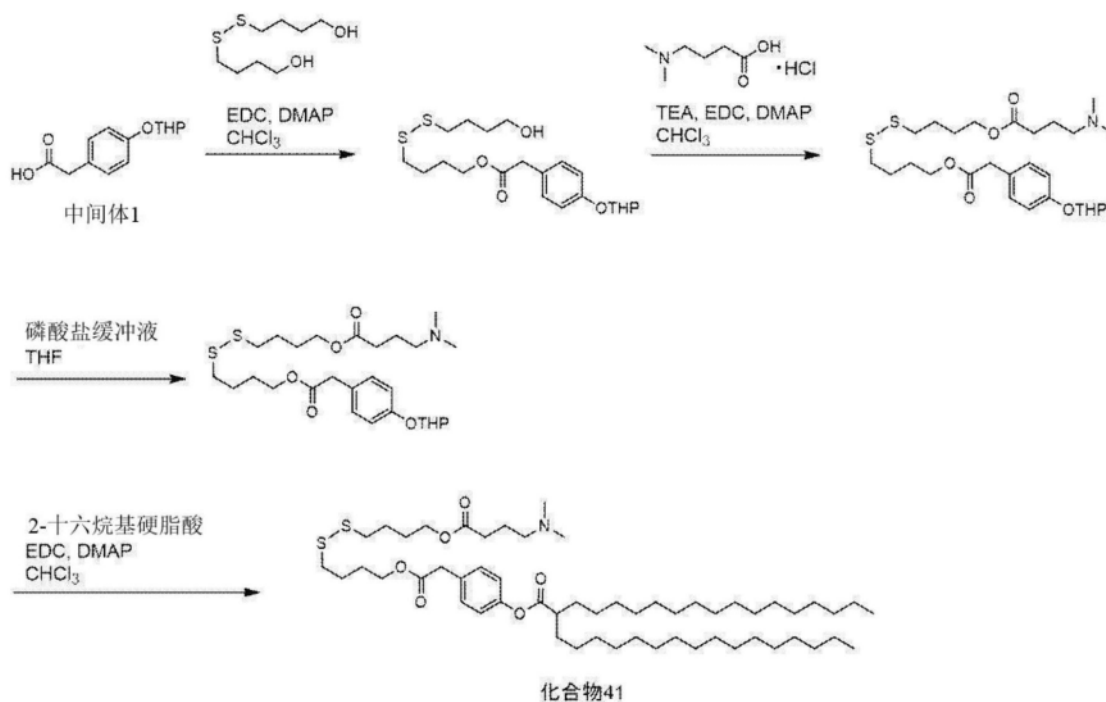
<化合物40的合成>

除了使用2-(乙氨基)乙醇以外,与制造例38相同地合成化合物40。

<化合物40的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ:0.88(t,6H)、1.03(t,3H)、1.20-1.45(m,58H)、1.69-1.84(m,2H)、2.50-2.59(m,5H)、2.88-2.97(m,4H)、3.23(t,2H)、3.55-3.58(m,2H)、3.63(s,2H)、4.28-4.38(m,4H)、5.97-6.00(m,1H)、6.95-7.05(m,3H)、7.27-7.30(m,2H)

[0463] [化学式62]



[0464] [制造例41]化合物41的合成

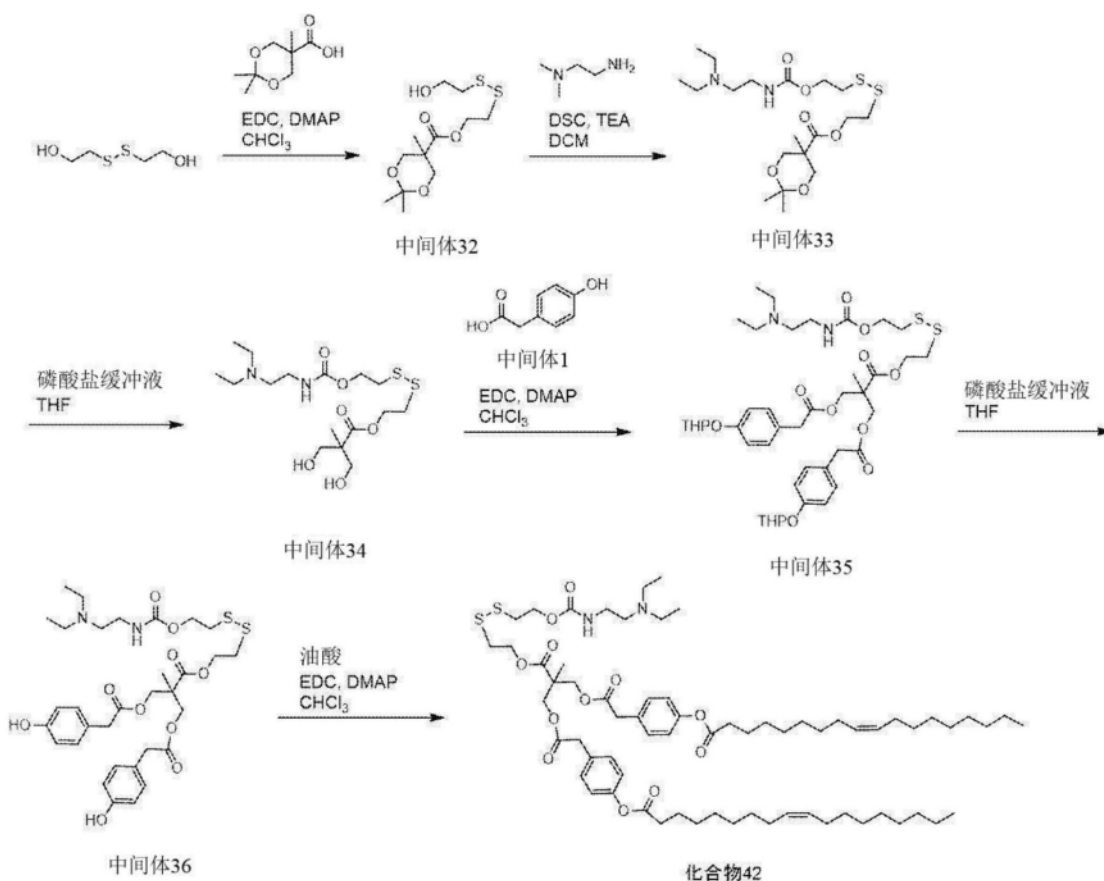
<化合物41的合成>

除了将中间休1、4,4'-二硫代双丁烷-1-醇和4-(二甲基氨基)丁酸盐用作起始原料以外,按照与制造例1相同的合成路径来合成化合物41。

<化合物41的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

$\delta$ : 0.88 (t、6H)、1.20-1.50 (m、64H)、1.69-1.84 (m、4H)、2.21 (s、6H)、2.28 (t、2H)、2.35 (t、2H)、2.52-2.59 (m、1H)、2.59-2.70 (m、4H)、3.63 (s、2H)、4.22-4.33 (m、4H)、7.02-7.05 (m、2H)、7.27-7.30 (m、2H)

[0465] [化学式63]



## [0466] [制造例42]化合物42的合成

## 〈中间体32的合成〉

在室温下将双(2-羟乙基)二硫化物(33.2g)、2,2,5-三甲基-1,3-二噁烷-5-羧酸(25.0g)和DMAP(3.50g)溶解在氯仿250g中。向得到的溶液中加入EDC(41.0g)并在25°C下反应2小时。反应溶液用20重量%食盐水9.0mL洗涤,然后加入硫酸钠25.0g进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,通过用色谱柱纯化,得到21.8g的中间体32。

## [0467] 〈中间体33的合成〉

在室温下向中间体32(10.0g)和三乙胺(7.17g)中加入二氯甲烷180g并使其溶解。向得到的溶液中加入DSC(16.5g),在25°C下反应2小时。通过过滤除去残留于反应溶液中的DSC后,向滤液中加入N,N-二乙基乙二胺(5.00g),在25°C下反应1小时。反应后溶液依次用0.5M乙酸缓冲液(pH4.0)150g、7重量%碳酸氢钠溶液150g、20重量%食盐水150g洗涤,然后加入硫酸钠5.00g进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,得到13.1g的中间体33。

## [0468] 〈中间体34的合成〉

将中间体33(13.0g)溶解于THF 49.0g后,加入0.5M磷酸缓冲液(pH2.0)195g在40°C下反应3小时。向反应溶液中加入氯仿120g进行洗涤。向洗涤后的水层中添加400g/L氢氧化钠水溶液,将其pH调节为7.0后,水层用氯仿195g萃取。在萃取的有机层中加入硫酸钠6.50g进行脱水,通过过滤除去硫酸钠。滤液用蒸发器浓缩,得到5.01g的中间体34。

## [0469] 〈中间体35的合成〉

在室温下将中间体34(5.00g)、中间体1(6.01g)和DMAP(592mg)溶解在氯仿75.0g

中。向得到的溶液中加入EDC (5.81g) 并在25°C下反应2小时。反应溶液用20重量%食盐水50.0g洗涤, 然后加入硫酸钠2.50g进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后, 滤液用蒸发器浓缩, 得到中间体35的粗产物6.25g。

[0470] <中间体36的合成>

将中间体35的粗产物6.25g溶解于THF 56.3g后, 加入0.5M磷酸缓冲液 (pH2.0) 225g在25°C下反应2小时。向反应溶液中加入氯仿94.0g进行洗涤。向洗涤后的水层中添加400g/L氢氧化钠水溶液, 将其pH调节为6.0后, 水层用氯仿94.0g萃取。在萃取的有机层中加入硫酸钠3.00g进行脱水, 通过过滤除去硫酸钠。滤液用蒸发器浓缩, 得到3.7g的中间体36。

[0471] <化合物42的合成>

在室温下将中间体36 (500mg)、油酸 (436mg) 和DMAP (36.0mg) 溶解在氯仿7.50g中。向得到的溶液中加入EDC (352mg) 并在25°C下反应2小时。反应溶液用20重量%食盐水5.00g洗涤, 然后加入硫酸钠250mg进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后, 滤液用蒸发器浓缩, 通过用色谱柱纯化, 得到453mg的化合物42。

<化合物42的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ: 0.88 (t, 6H)、1.04 (t, 6H)、1.25-1.38 (m, 40H)、1.42 (s, 3H)、1.55-1.65 (m, 4H)、1.99-2.05 (m, 8H)、2.36 (t, 4H)、2.52-2.58 (m, 6H)、2.92-2.96 (m, 4H)、3.22-3.26 (m, 2H)、3.66 (s, 4H)、4.30-4.40 (m, 8H)、5.32-5.38 (m, 5H)、7.02-7.05 (m, 4H)、7.27-7.30 (m, 4H)

[0472] [制造例43] 化合物43的合成

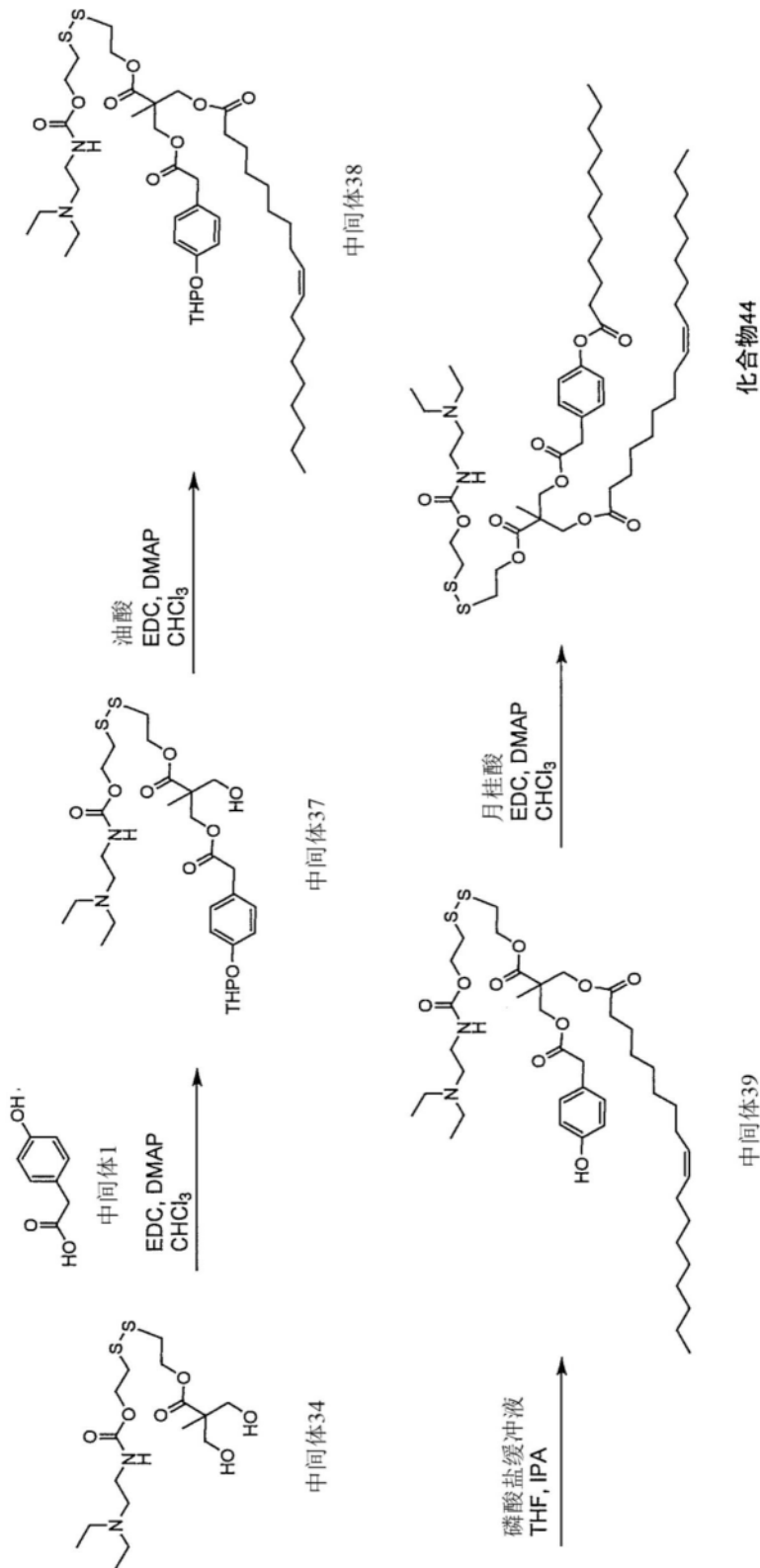
<化合物43的合成>

使用中间体36和豆蔻酸, 按照与制造例42相同的合成路径来合成化合物43。

<化合物43的<sup>1</sup>H-NMR (600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ: 0.89 (t, 6H)、1.04 (t, 6H)、1.25-1.35 (m, 40H)、1.42 (s, 3H)、1.55-1.65 (m, 4H)、2.36 (t, 4H)、2.52-2.58 (m, 6H)、2.92-2.96 (m, 4H)、3.22-3.26 (m, 2H)、3.66 (s, 4H)、4.30-4.40 (m, 8H)、5.32 (s, 1H)、7.02-7.05 (m, 4H)、7.27-7.30 (m, 4H)

[0473] [化学式64]



[0474] [制造例44] 化合物44的合成<中间体37的合成>

在室温下将中间体34 (1.60g)、中间体1 (4.19g) 和DMAP (165mg) 溶解在氯仿24.0g中。向得到的溶液中加入EDC (1.95g) 并在25℃下反应2小时。反应溶液用20重量%食盐水16.0g洗涤, 然后加入硫酸钠500mg进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后, 滤液用蒸发器浓缩, 通过用色谱柱纯化, 得到1.85g的中间体37。

[0475] <中间体38的合成>

在室温下将中间体37(450mg)、油酸(241mg)和DMAP(19.0mg)溶解在氯仿6.75g中。向得到的溶液中加入EDC(223mg)并在25°C下反应2小时。反应溶液用20重量%食盐水4.5g洗涤,然后加入硫酸钠2.0g进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,得到中间体38的粗产物670mg。

[0476] <中间体39的合成>

将中间体38的粗产物(670mg)溶解于THF 4.00g与IPA 4.00g的混合溶剂后,加入0.5M磷酸缓冲液(pH2.0)16.2g在40°C下反应3小时。向反应溶液中加入氯仿13.5g进行萃取后,向有机层中加入0.5M磷酸缓冲液(pH6.5)9.00g进行洗涤。在洗涤后的有机层中加入硫酸钠300mg进行脱水,通过过滤除去硫酸钠。滤液用蒸发器浓缩,通过用色谱柱纯化,得到240mg的中间体39。

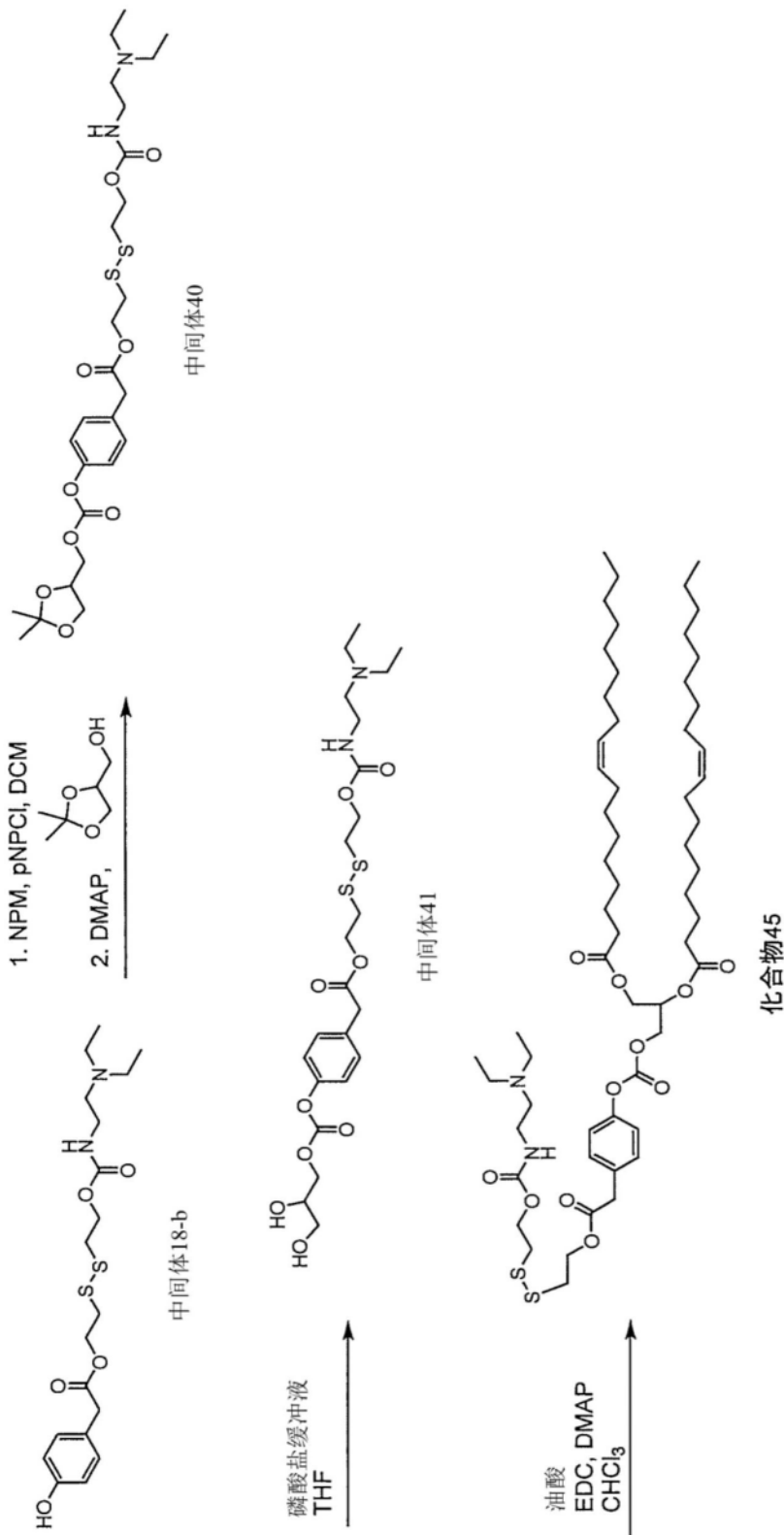
[0477] <化合物44的合成>

在室温下将中间体39(150mg)、月桂酸(41.0mg)和DMAP(5.0mg)溶解在氯仿2.25g中。向得到的溶液中加入EDC(53.0mg)并在25°C下反应2小时。反应溶液用20重量%食盐水1.50g洗涤,然后加入硫酸钠50.0mg进行脱水。通过过滤除去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,通过用色谱柱纯化,得到116mg的化合物44。

<化合物44的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ:0.80-0.92(m、6H)、1.04(t、6H)、1.25-1.38(m、36H)、1.42(s、3H)、1.55-1.65(m、4H)、1.99-2.05(m、4H)、2.36(t、2H)、2.52-2.58(m、6H)、2.92-2.96(m、4H)、3.22-3.26(m、2H)、3.66(s、4H)、4.30-4.40(m、8H)、5.32-5.36(m、3H)、7.02-7.05(m、2H)、7.27-7.30(m、2H)

[0478] [化学式65]



[0479] [制造例45]化合物45的合成<中间体40的合成>

在室温下向中间体18-b(3.00g)和NPM(3.41g)中加入二氯甲烷30.0g并使其溶解。向得到的溶液中加入pNPCl(3.51g),在25℃下反应10小时。向该反应溶液中加入DMAP(170mg)和1,2-异亚丙基甘油(7.37g),在25℃下反应8小时。反应溶液依次用7重量%碳酸氢钠溶液30.0g、20重量%食盐水30.0g洗涤,然后加入硫酸钠9.00g进行脱水。通过过滤除

去硫酸钠后,滤液用蒸发器浓缩,通过用色谱柱纯化,得到2.16g的中间体40。

[0480] <中间体41的合成>

将中间体40(2.16g)溶解于THF 11.3g后,加入0.5M磷酸缓冲液(pH2.0)45.0g在40℃下反应2小时。向反应溶液中加入氯仿19.0g进行洗涤。向洗涤后的水层中添加400g/L氢氧化钠水溶液,将其pH调节为6.0后,水层用氯仿19.0g萃取。在萃取的有机层中加入硫酸钠1.20g进行脱水,通过过滤除去硫酸钠。滤液用蒸发器浓缩,得到850mg的中间体41。

[0481] <化合物45的合成>

除了使用中间体41和油酸以外,按照与制造例42相同的合成路径来合成化合物45。

<化合物45的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ:0.89(t,6H)、1.04(t,6H)、1.25-1.38(m,40H)、1.42(s,3H)、1.55-1.65(m,4H)、1.99-2.05(m,8H)、2.36(t,4H)、2.52-2.58(m,6H)、2.92-2.96(m,4H)、3.22-3.26(m,2H)、3.66(s,2H)、4.30-4.50(m,8H)、5.28-5.38(m,6H)、6.97-7.00(m,2H)、7.27-7.30(m,2H)

[0482] [制造例46]化合物46的合成

<化合物46的合成>

除了使用中间体41和豆蔻酸以外,按照与制造例42相同的合成路径来合成化合物46。

<化合物46的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ:0.89(t,6H)、1.04(t,6H)、1.25-1.35(m,32H)、1.42(s,3H)、1.55-1.65(m,4H)、2.36(t,4H)、2.52-2.58(m,6H)、2.92-2.96(m,4H)、3.22-3.26(m,2H)、3.66(s,2H)、4.30-4.50(m,8H)、5.28-5.31(m,2H)、6.97-7.00(m,2H)、7.27-7.30(m,2H)

[0483] [比较例]O-Ph-P4C2的合成

按照专利文献3的制造例3中记载的合成路径进行合成。

<O-Ph-P4C2的<sup>1</sup>H-NMR(600MHz、CDCl<sub>3</sub>)>

δ0.88(t,6H)、1.22-1.42(m,46H)、1.54-1.76(m,12H)、1.94-2.03(m,12H)、2.52-2.56(m,4H)、2.62-2.66(m,4H)、2.80-2.89(m,8H)、3.59(s,4H)、4.13(t,4H)、5.34-5.37(m,4H)、7.02-7.05(m,4H)、7.27-7.30(m,4H)

产业上的可利用性

[0484] 根据本发明,可以高效地将核酸导入至细胞内,因此可以用于核酸药物、基因治疗、生物化学实验中。

[0485] 本申请基于在日本申请的日本特愿2022-051913,其全部内容包含在本说明书中。

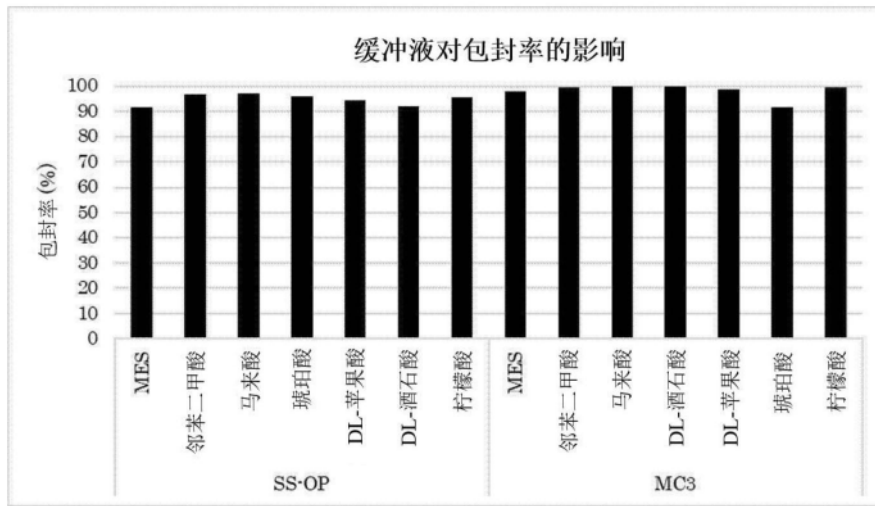


图1

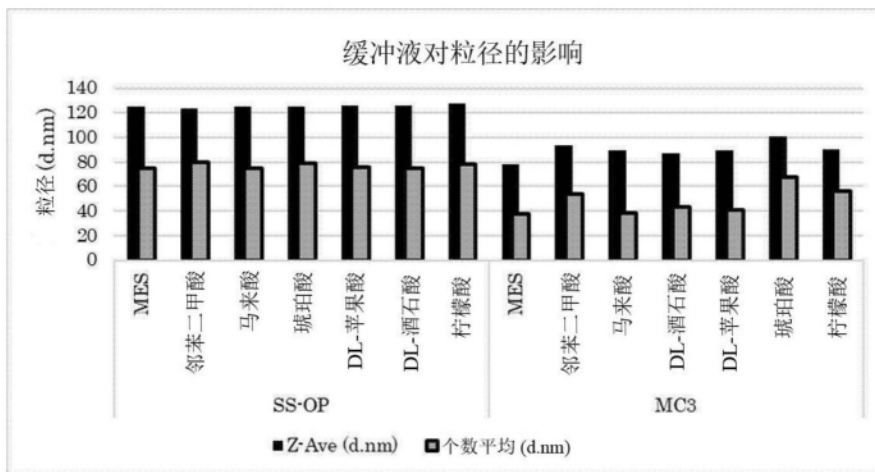


图2

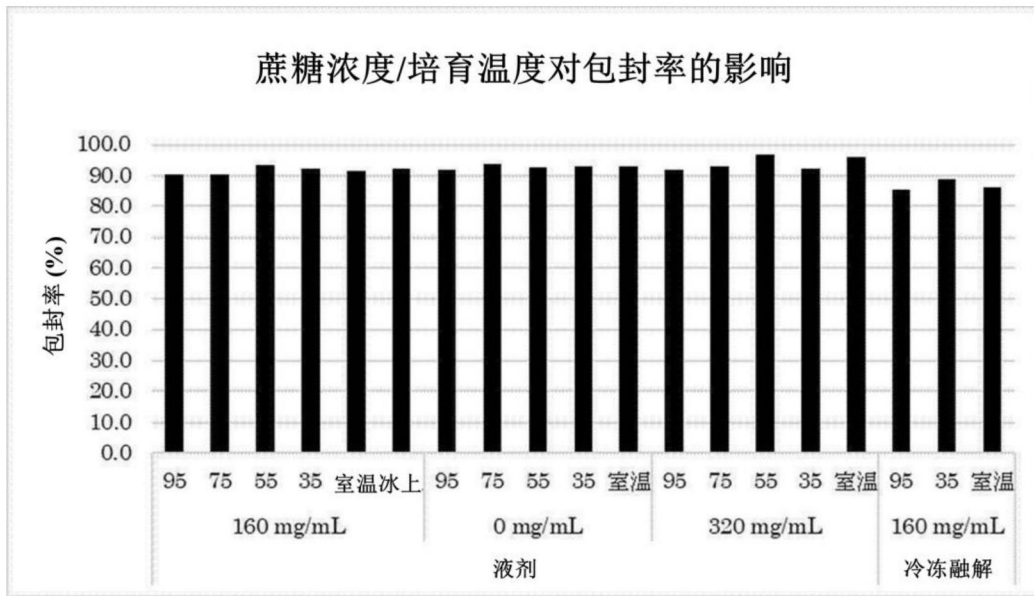


图3

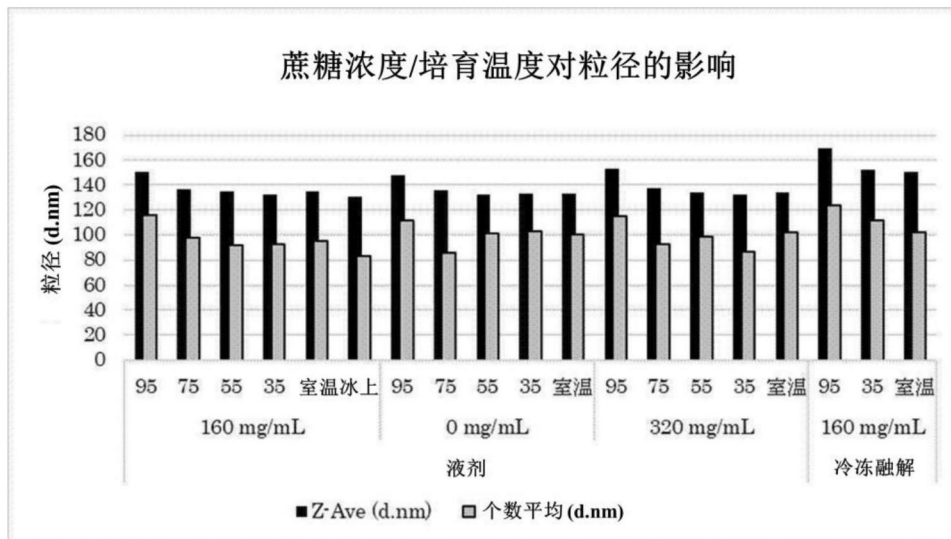


图4

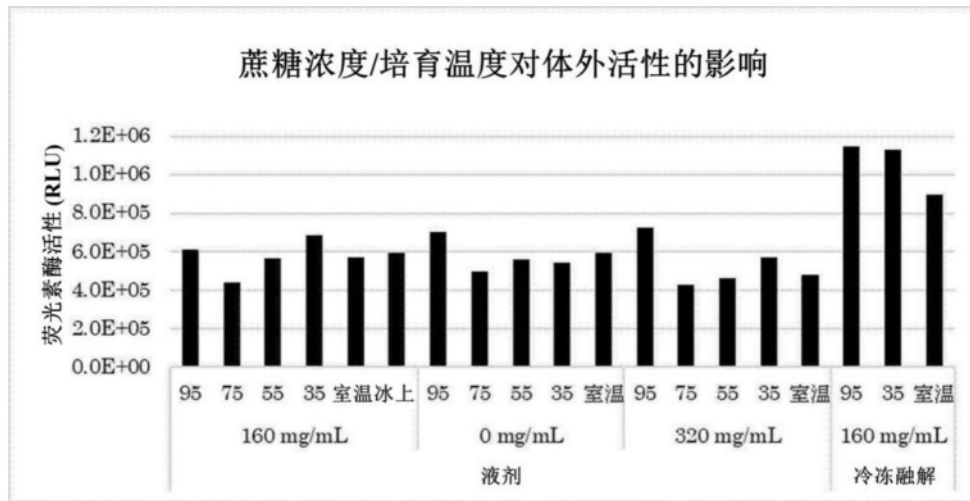


图5

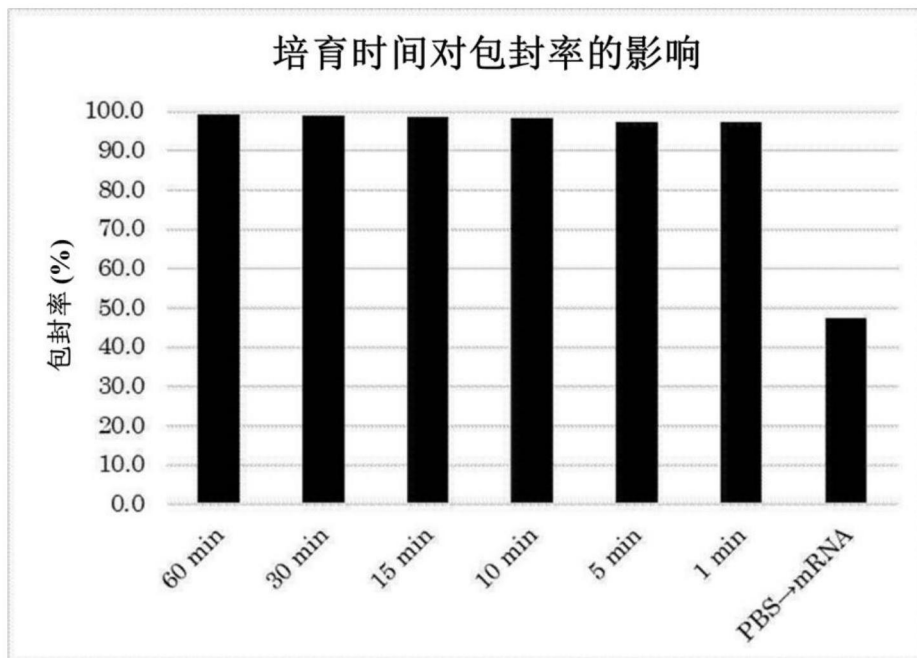


图6

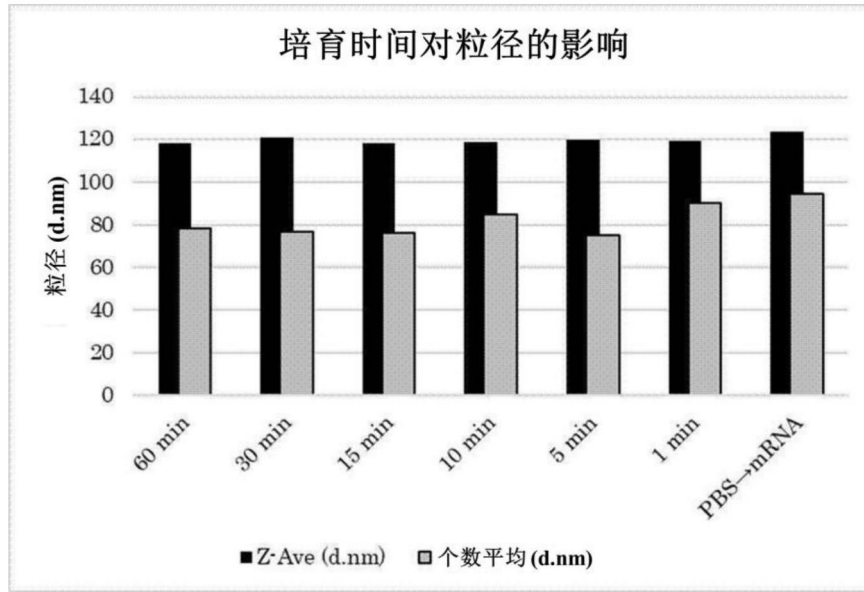


图7

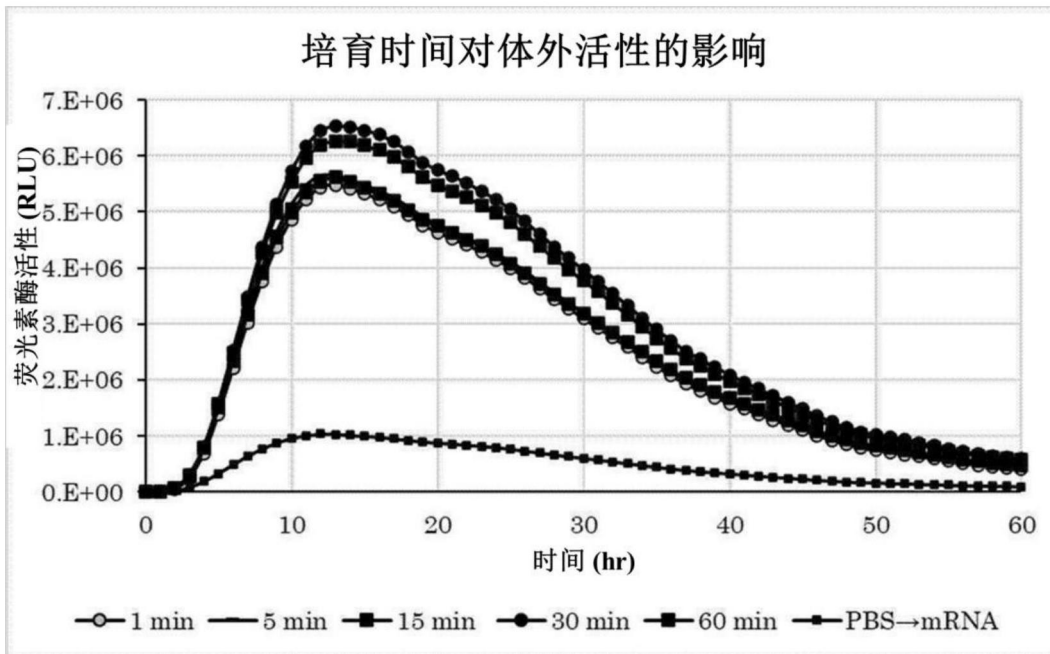


图8

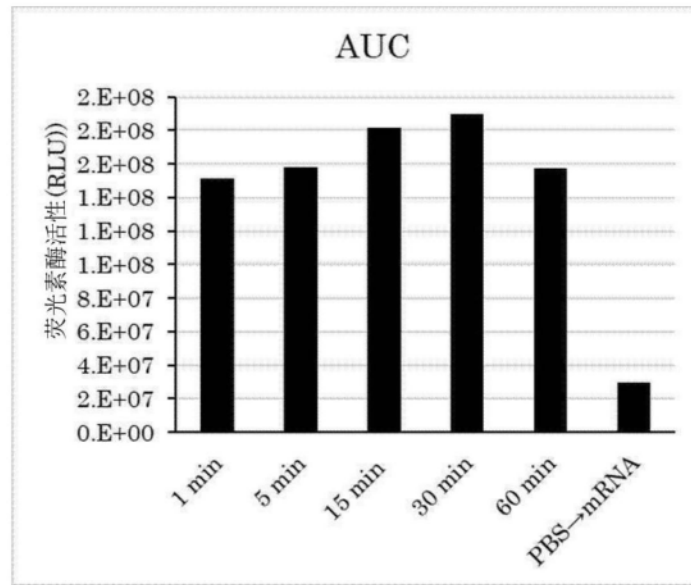


图9

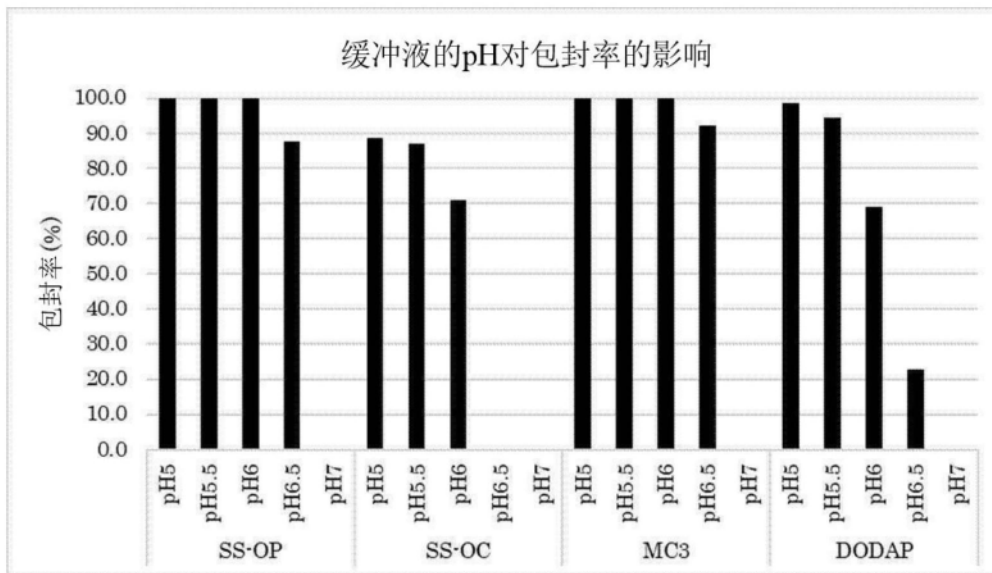


图10

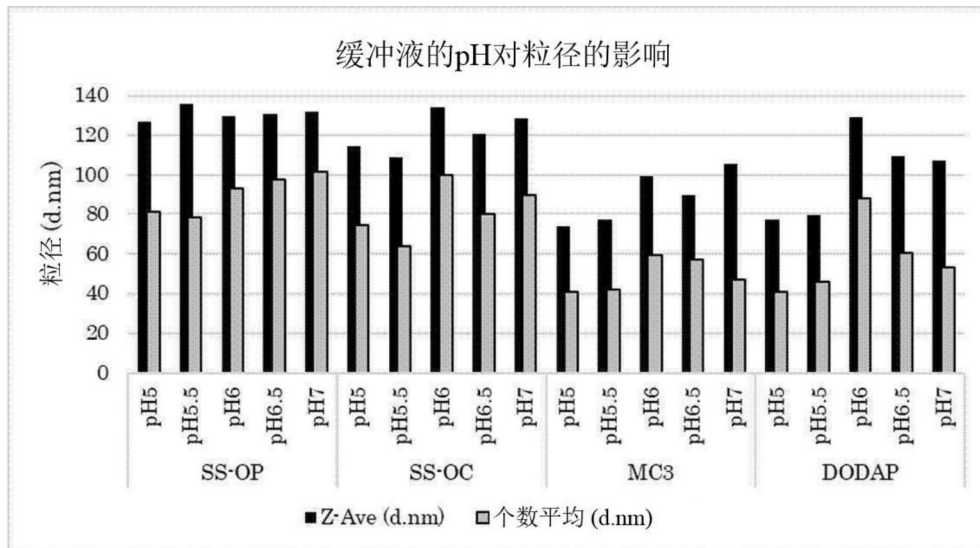


图11

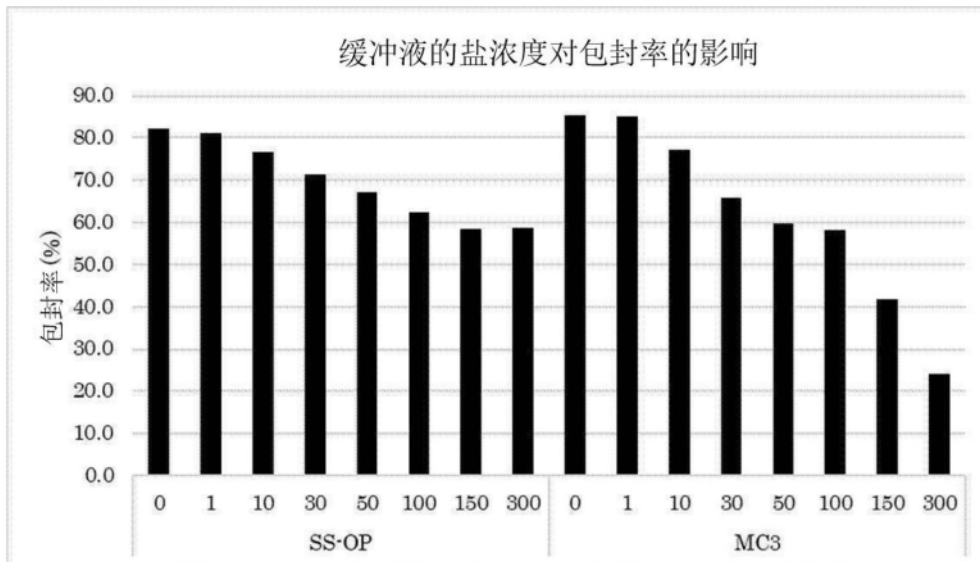


图12

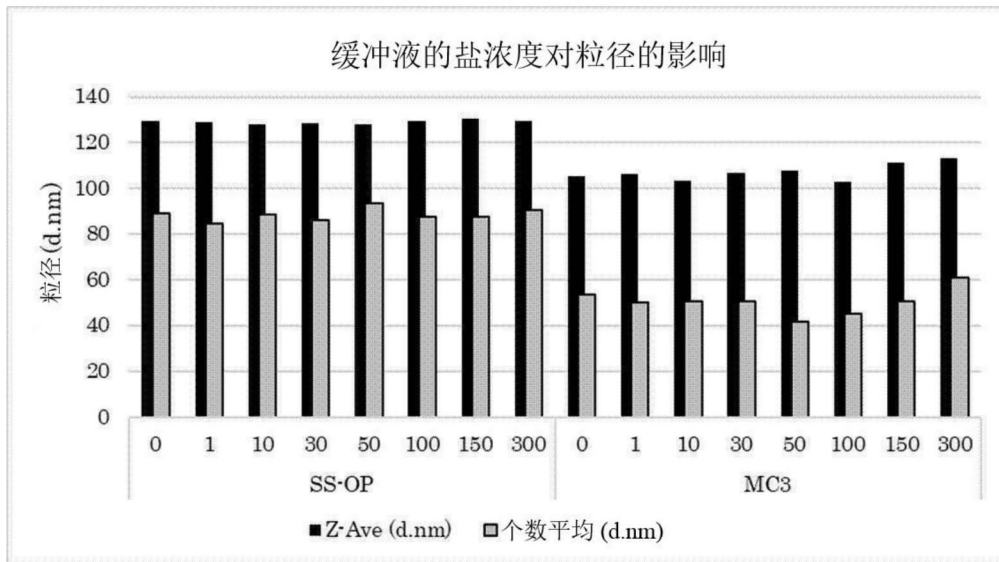


图13

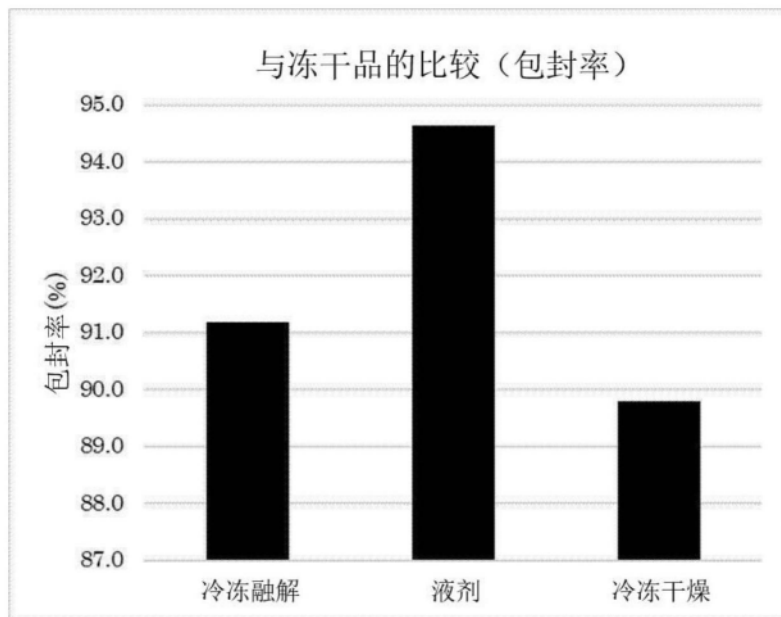


图14

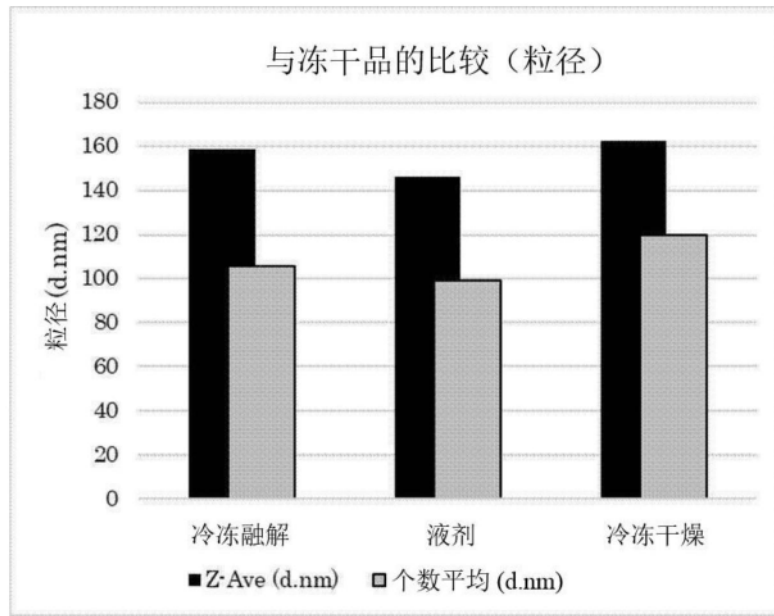


图15

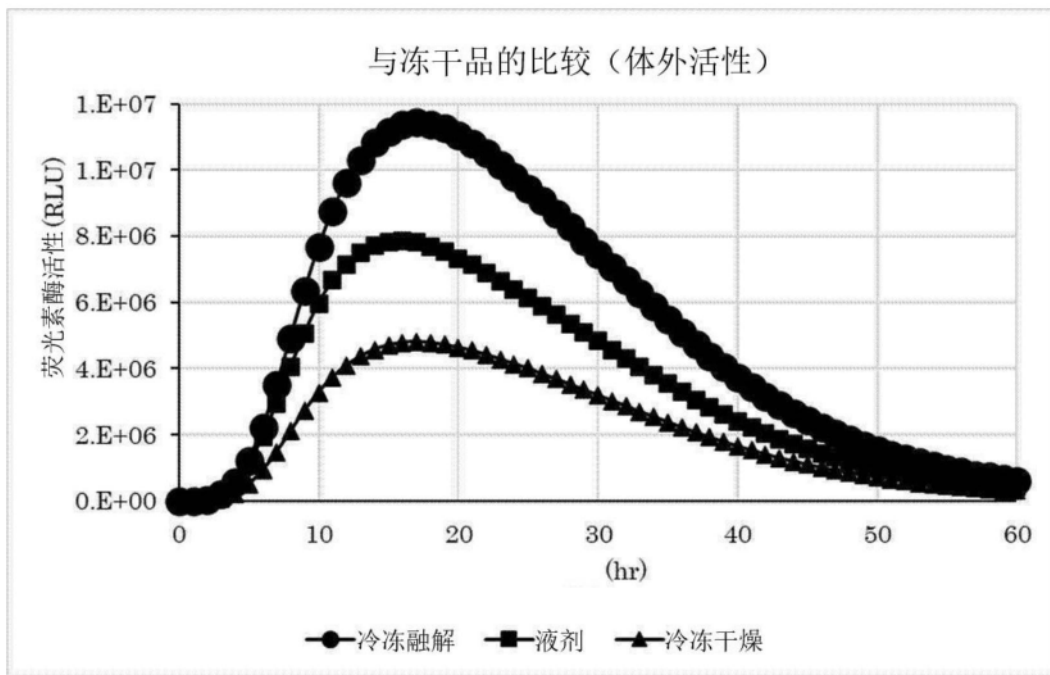


图16

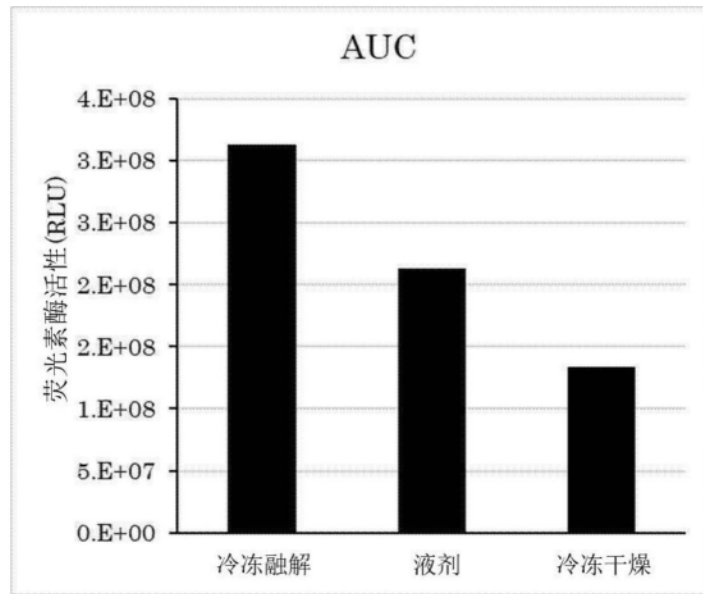


图17

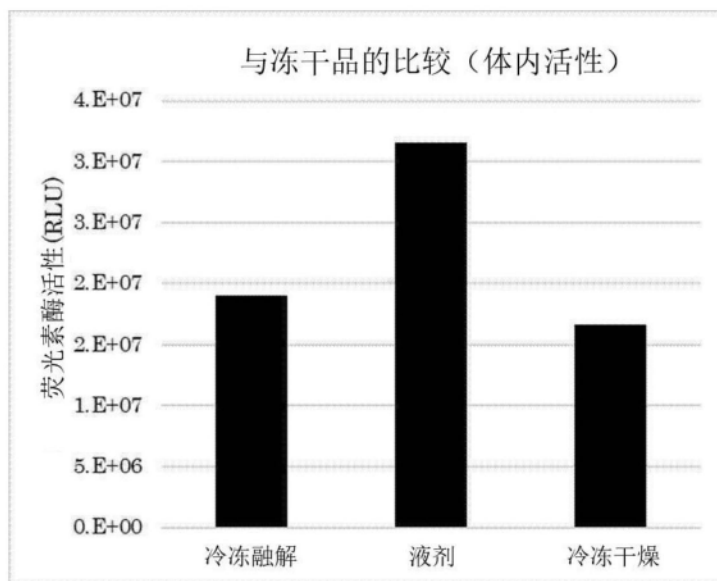


图18

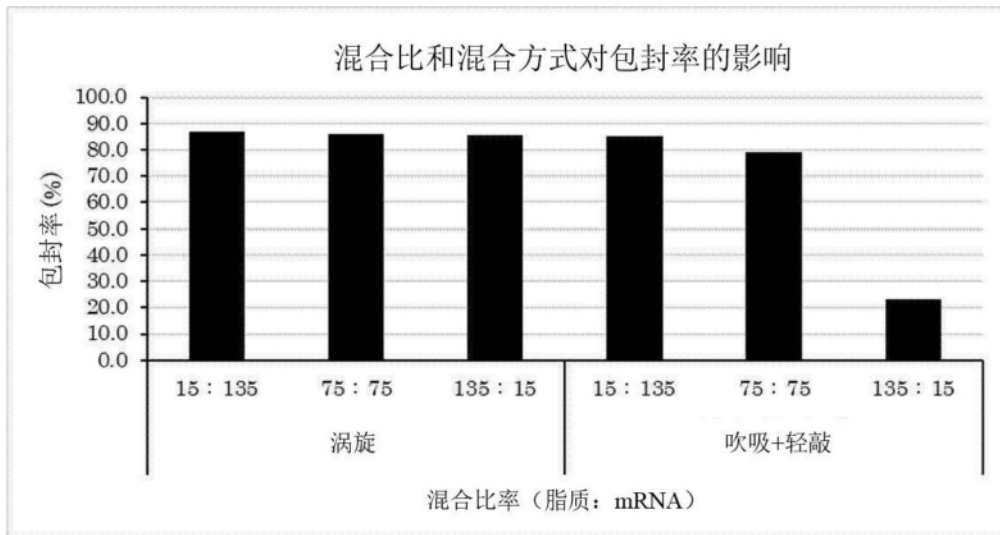


图19

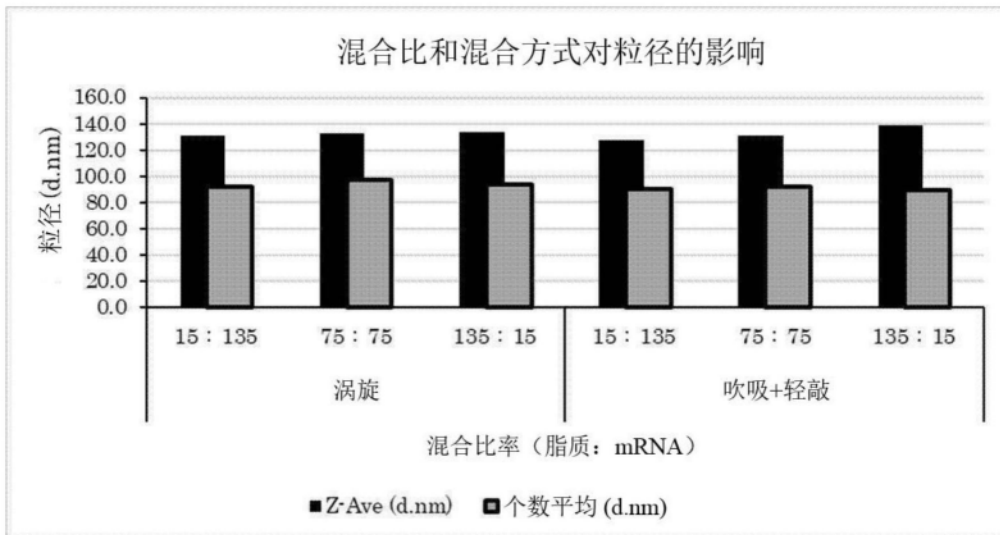


图20

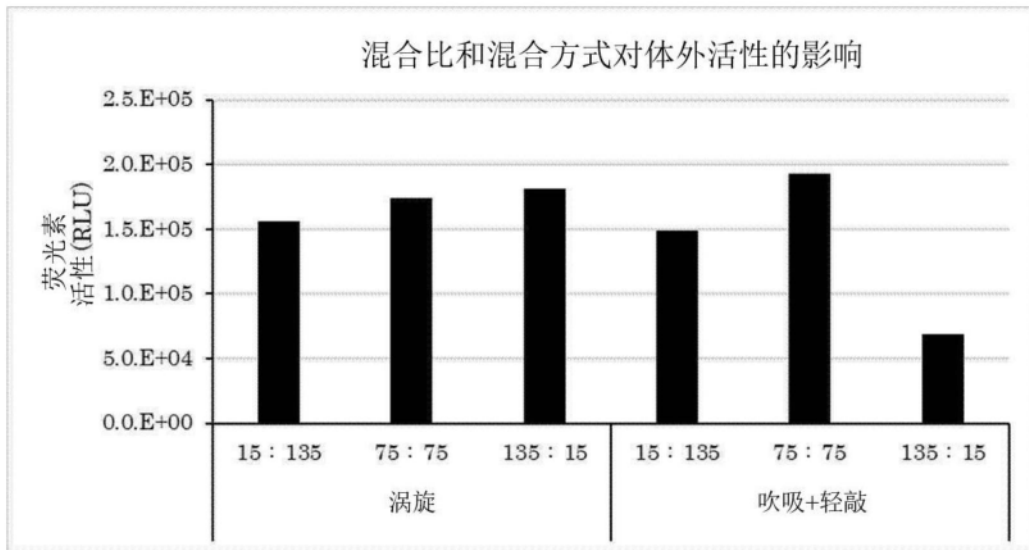


图21

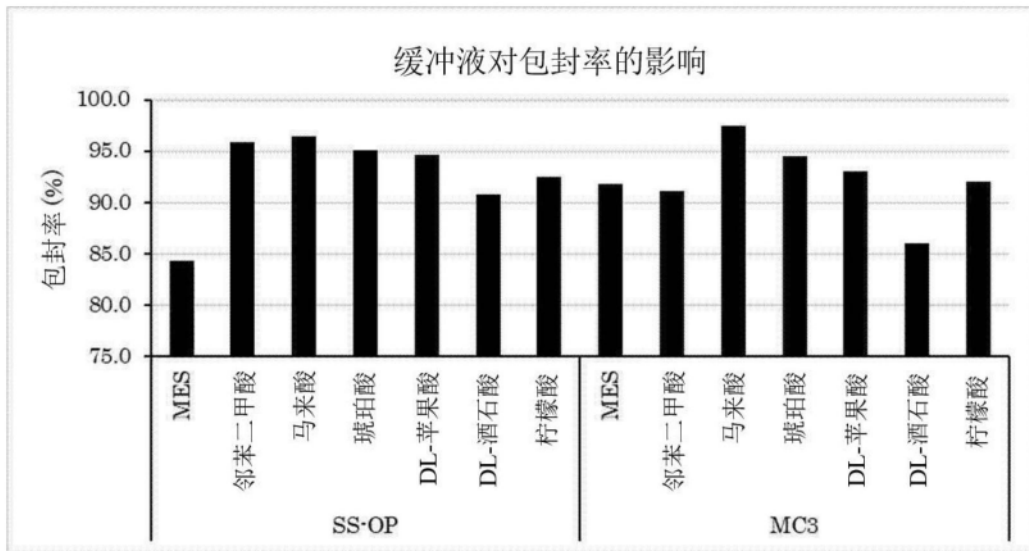


图22

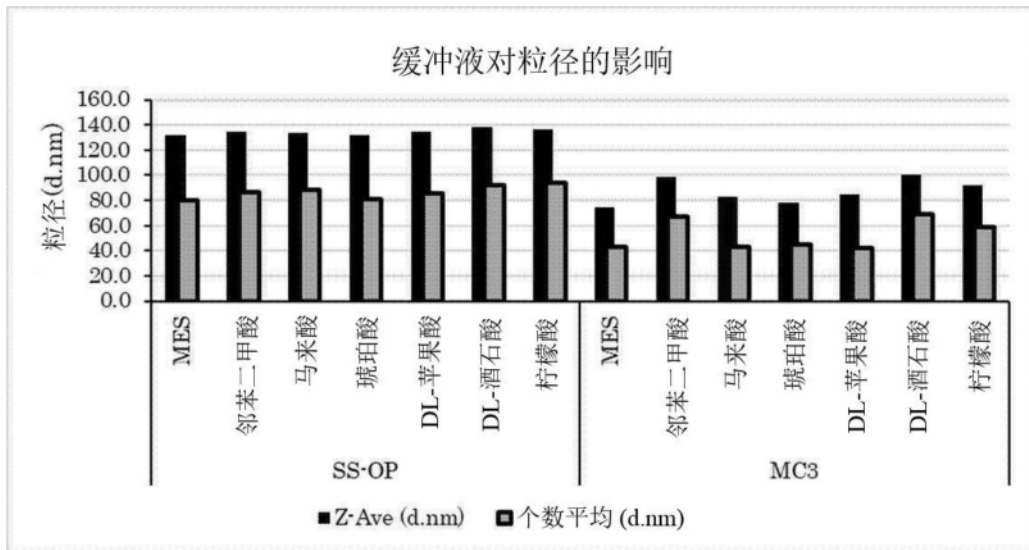


图23

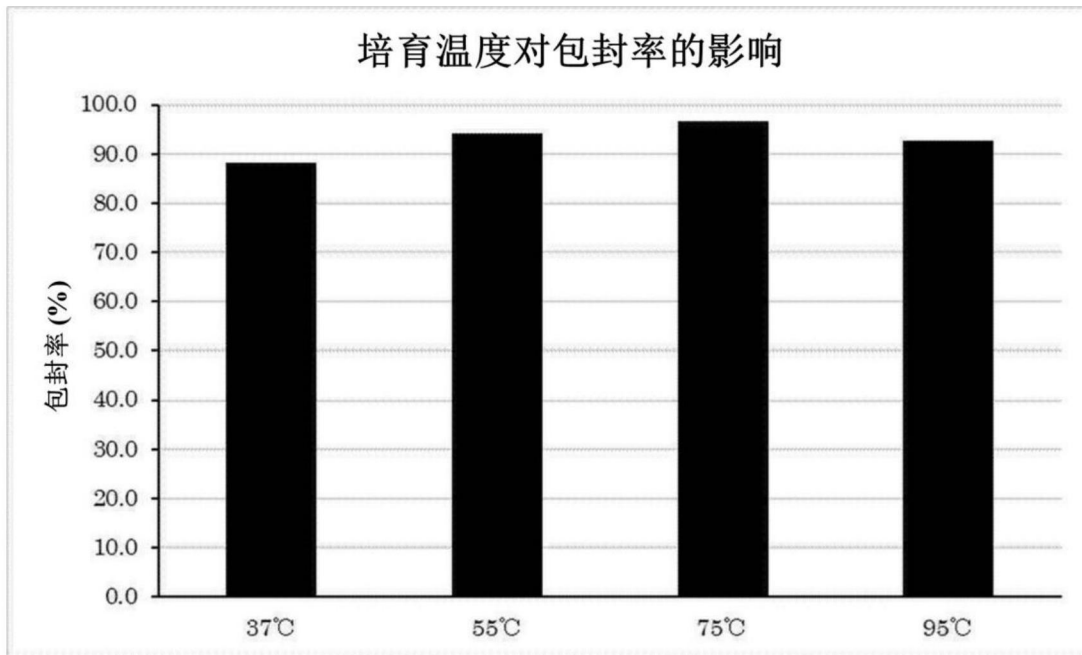


图24

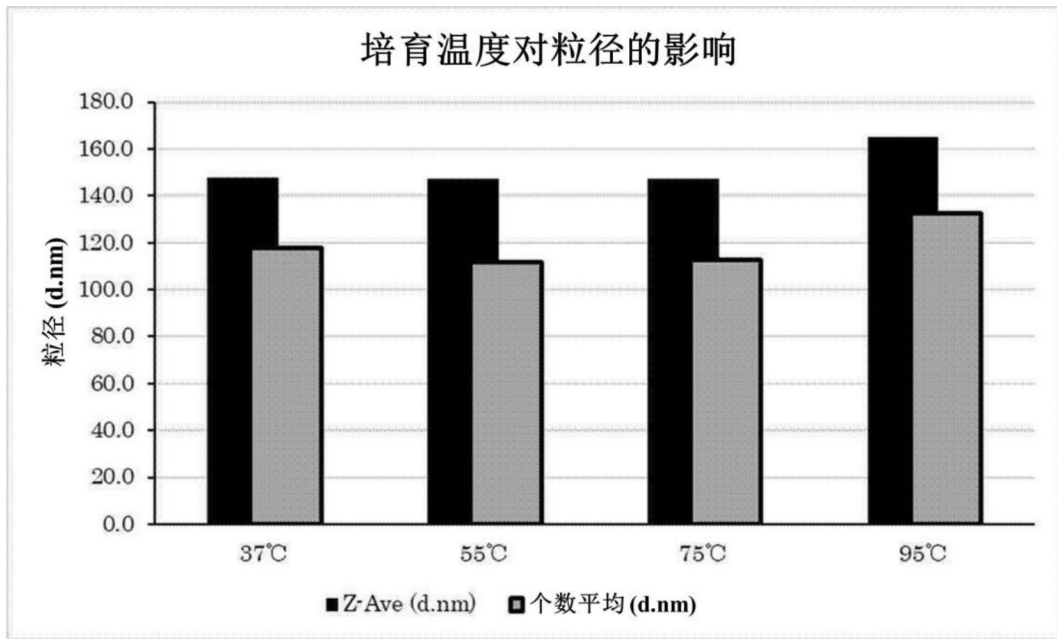


图25

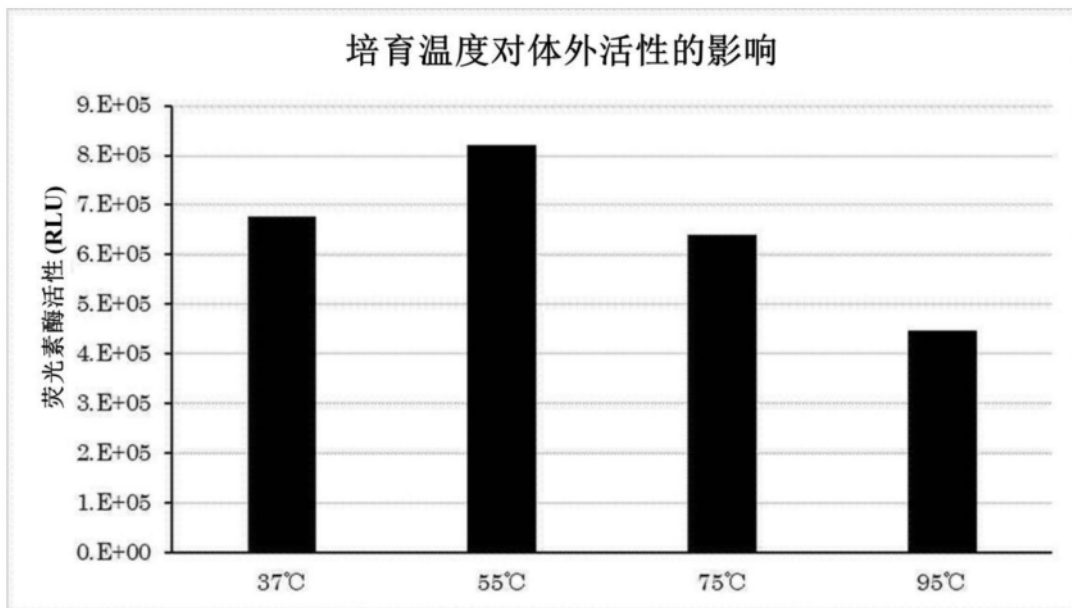


图26

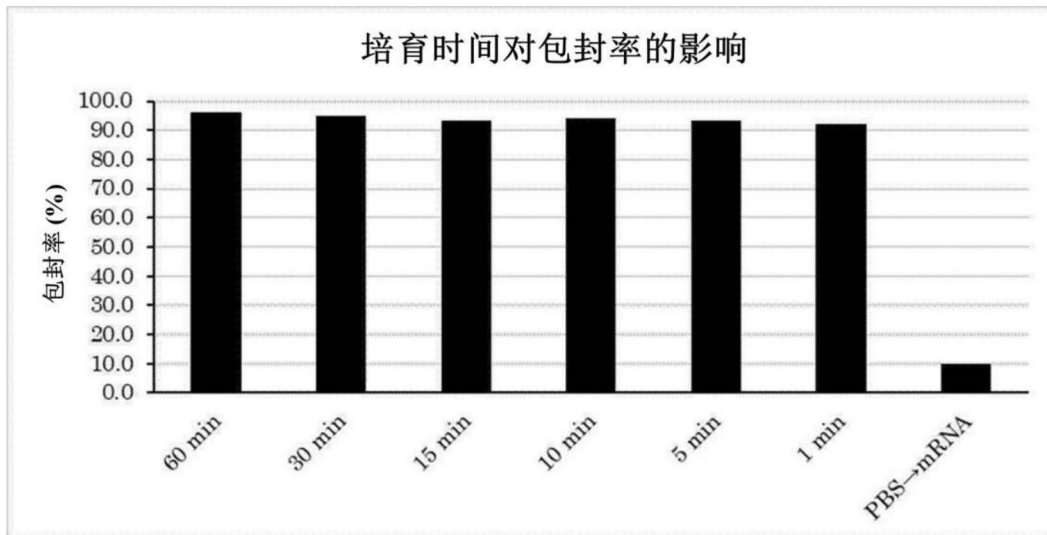


图27

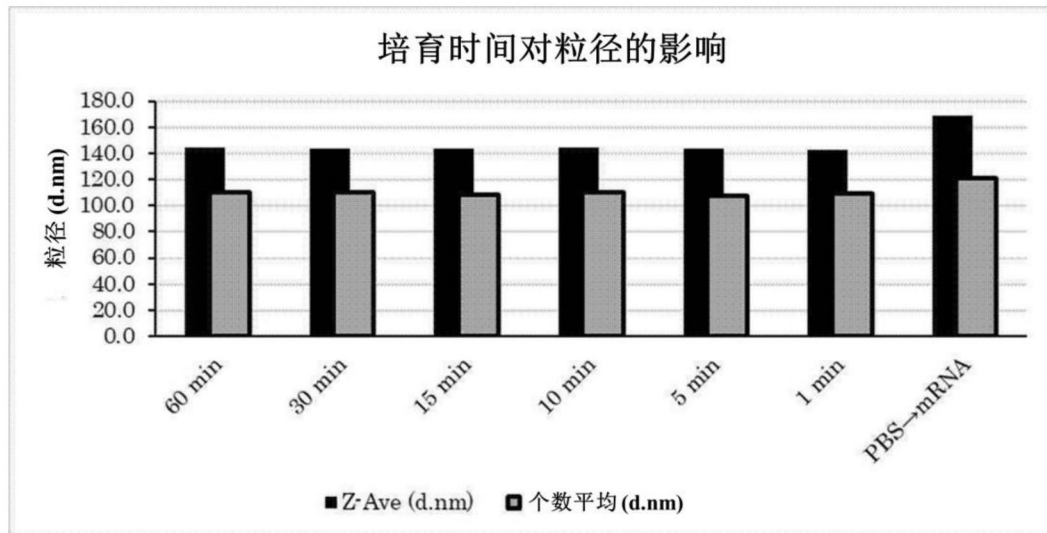


图28

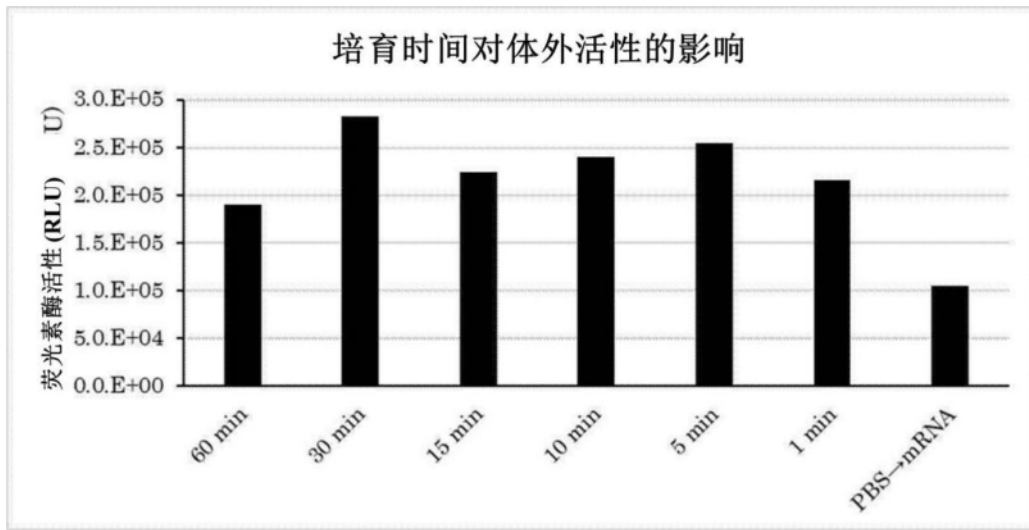


图29

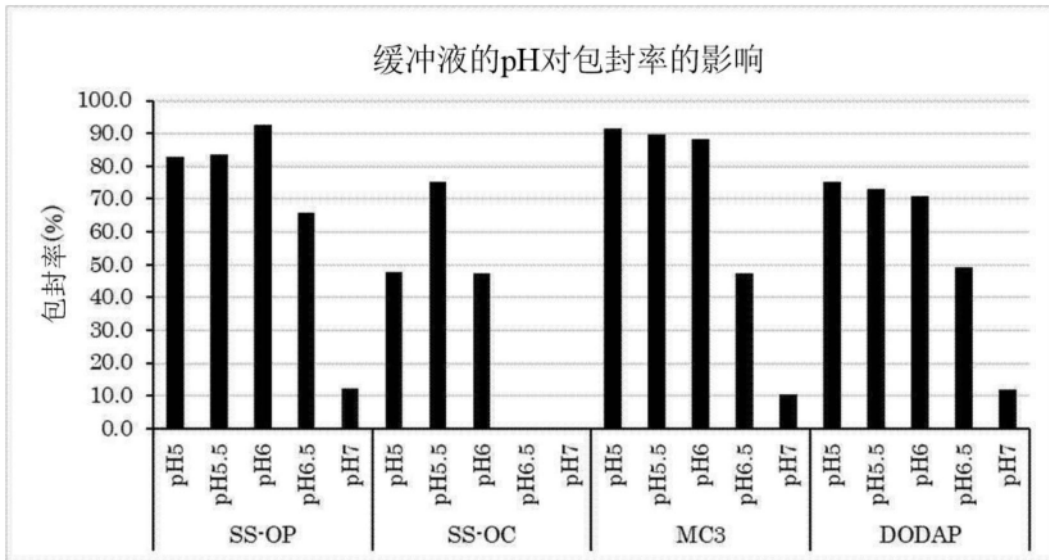


图30

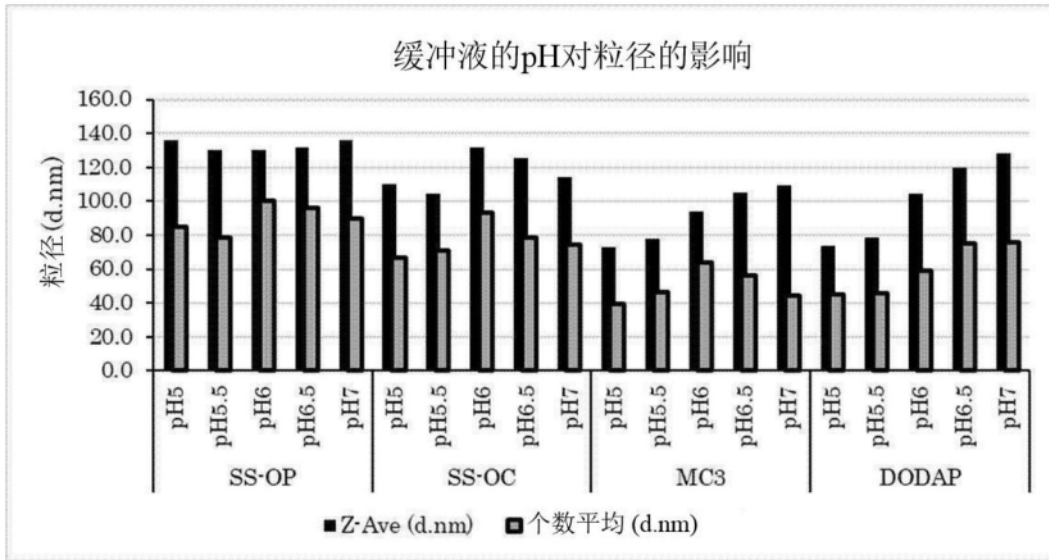


图31

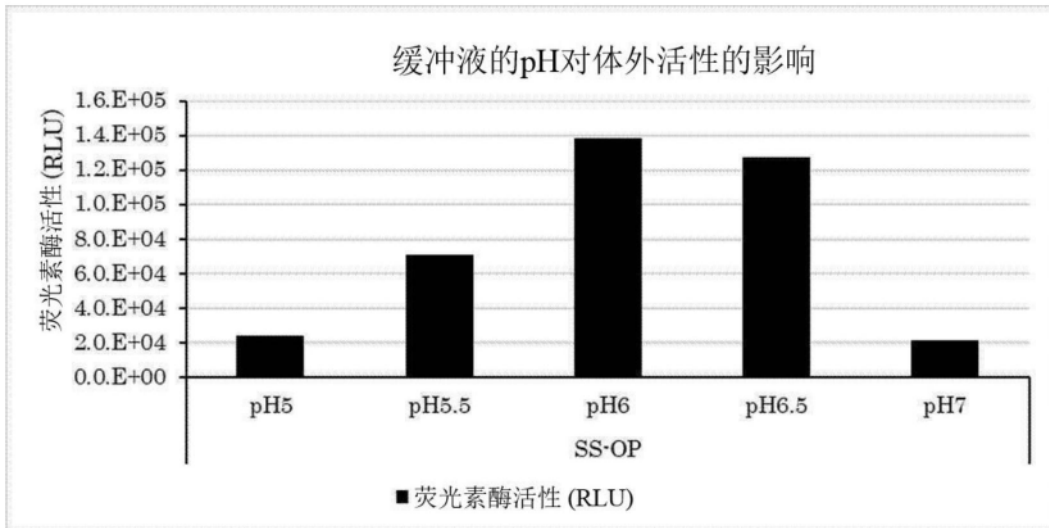


图32

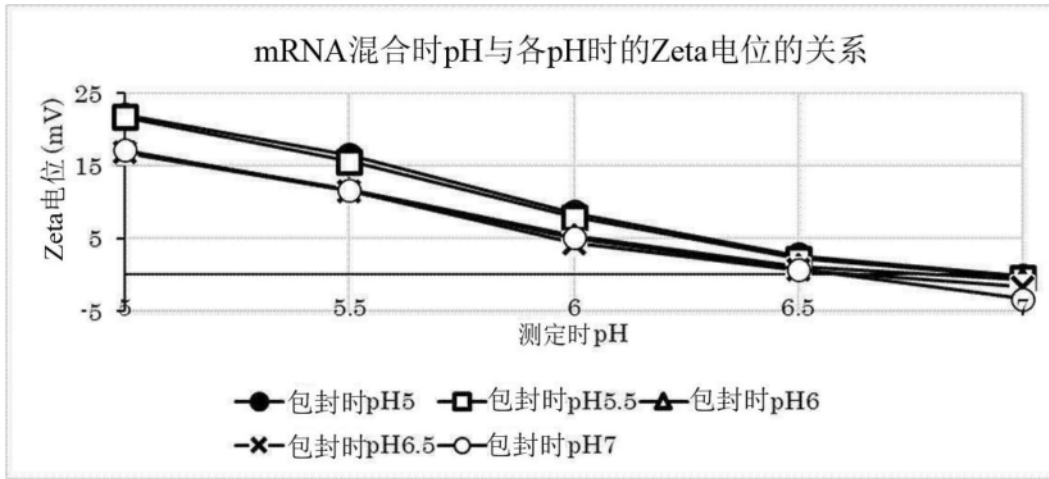


图33

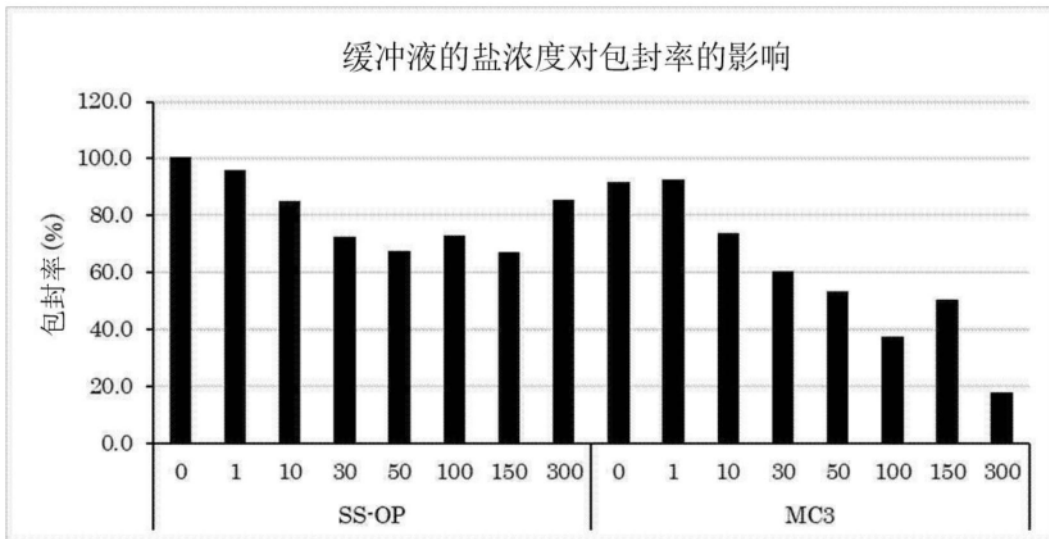


图34

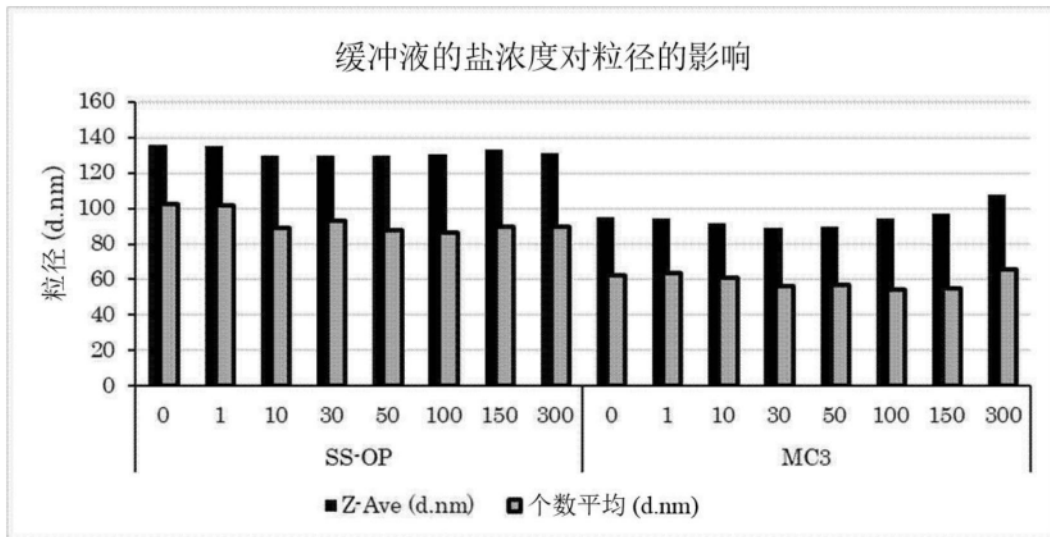


图35

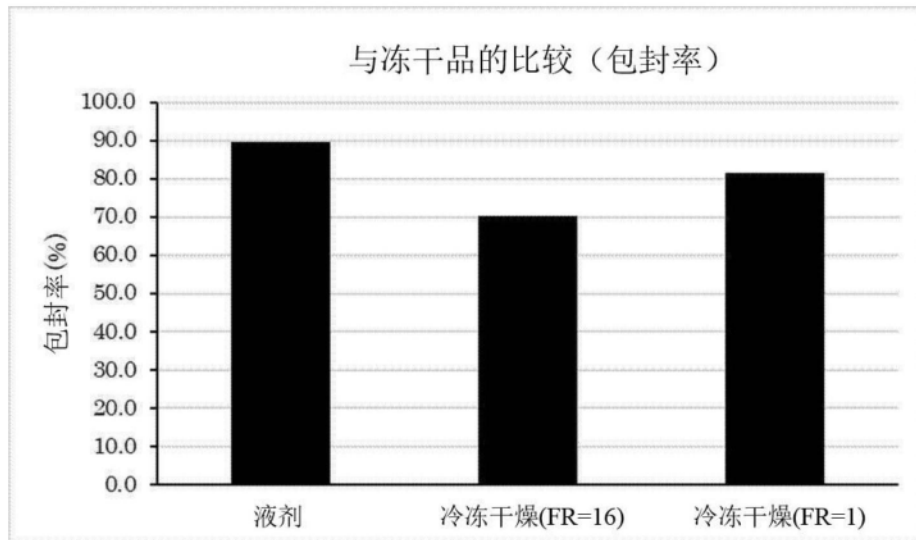


图36

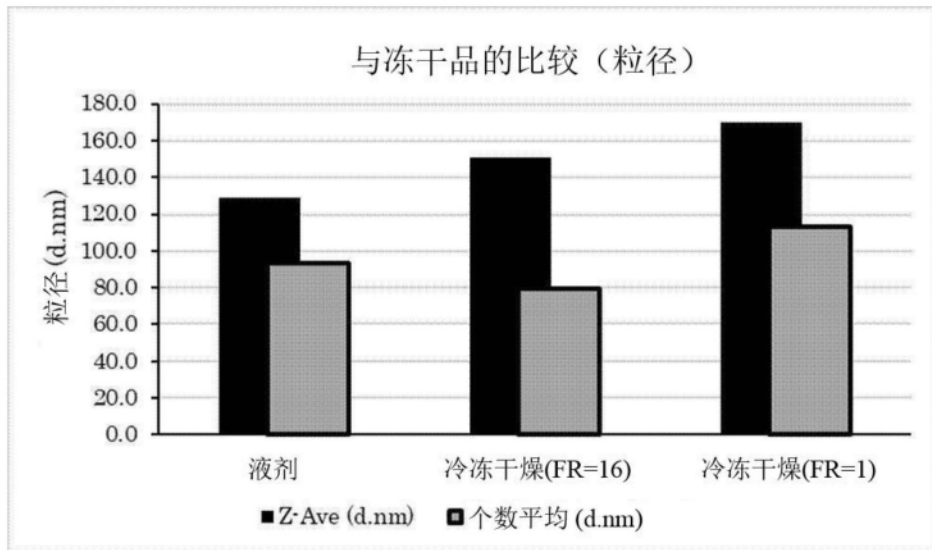


图37

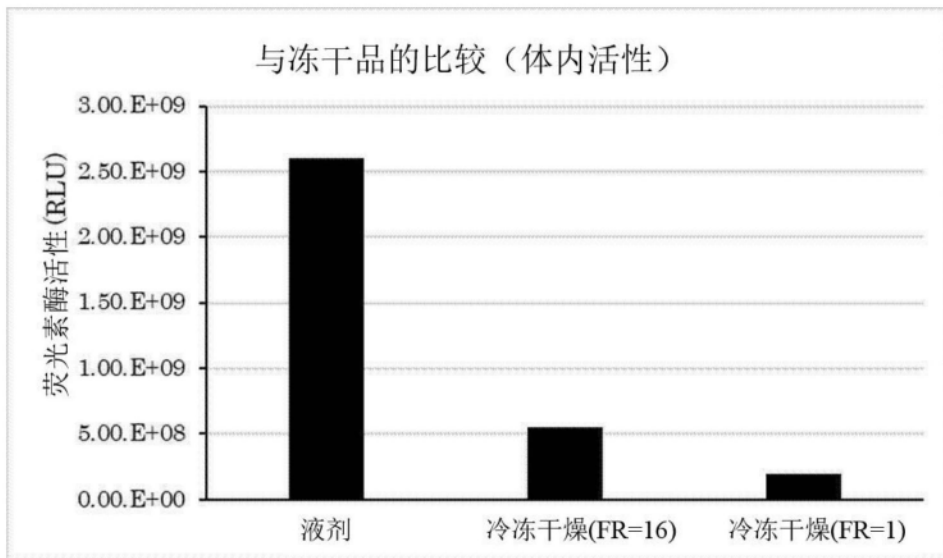


图38

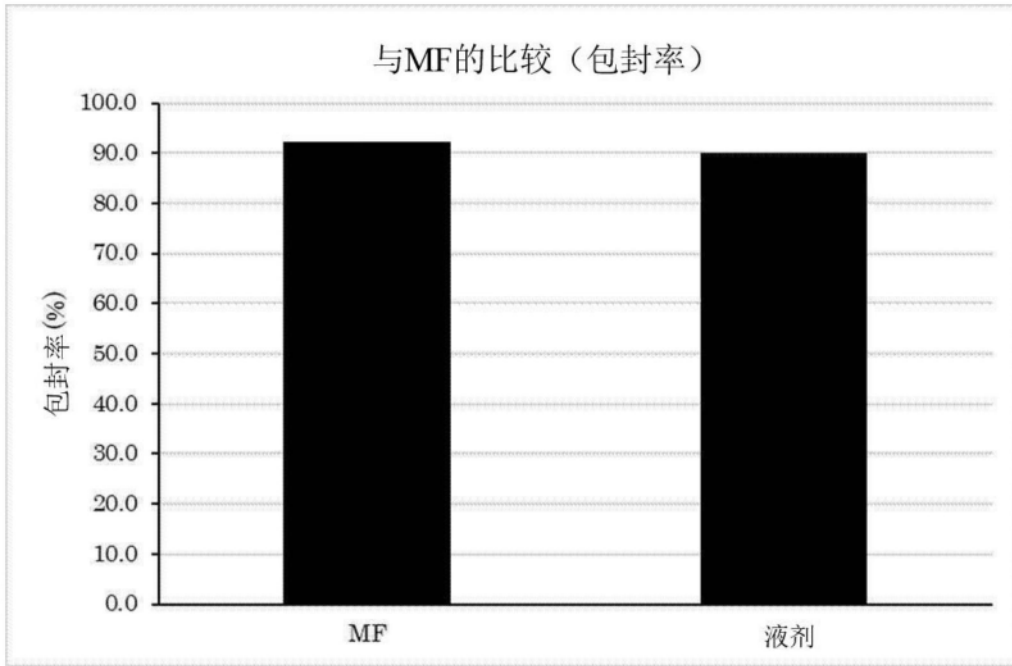


图39

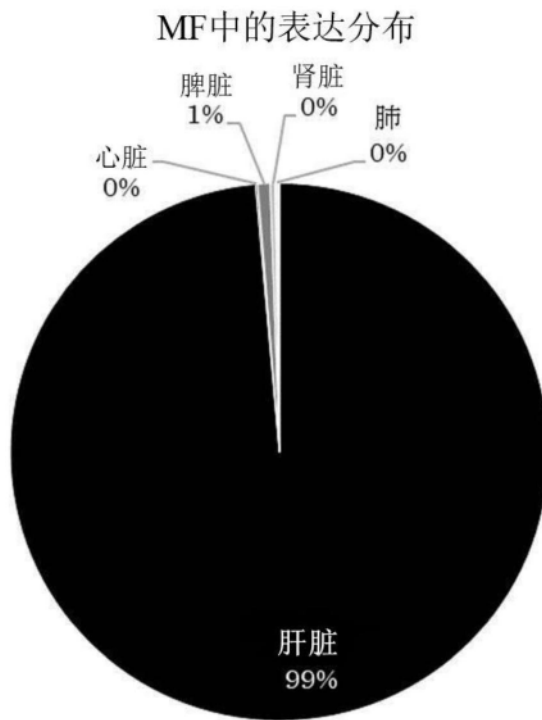


图40

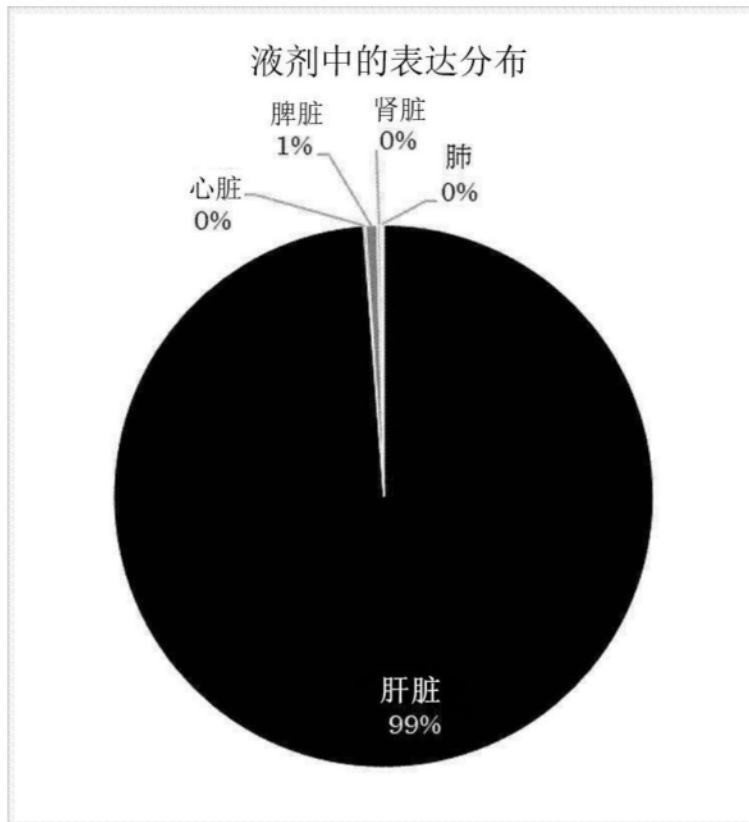


图41

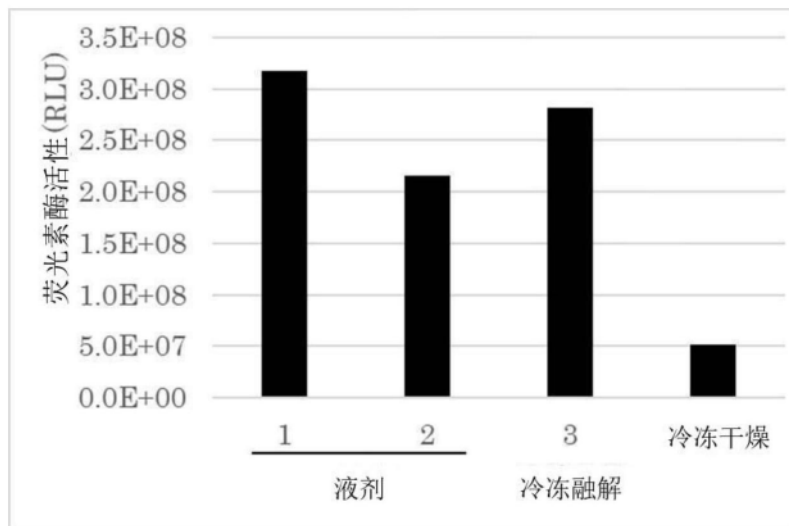


图42