(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7683120号
(P7683120)

(45)発行日　令和7年5月26日(2025.5.26)

(24)登録日　令和7年5月16日(2025.5.16)

(51)国際特許分類

		FI		
C07C 233/62 (2006.01)		C07C	233/62	CSP
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	35/00	ZNA
A61P 31/00 (2006.01)		A61P	31/00	
A61P 37/04 (2006.01)		A61P	37/04	
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	43/00	105

請求項の数　20　（全67頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-503626(P2024-503626)
(86)(22)出願日　令和4年7月15日(2022.7.15)
(65)公表番号　特表2024-528684(P2024-528684A)
(43)公表日　令和6年7月30日(2024.7.30)
(86)国際出願番号　PCT/CZ2022/050065
(87)国際公開番号　WO2023/001323
(87)国際公開日　令和5年1月26日(2023.1.26)
審査請求日　令和6年2月8日(2024.2.8)
(31)優先権主張番号　PV2021-345
(32)優先日　令和3年7月19日(2021.7.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
チェコ(CZ)

(73)特許権者　516213013
ウスタフ オルガニッケ ヘミエ アー ビオヘミエ アカデミエ ヴェド ツェーエル，ヴェー．ヴェー．イー
チェコ共和国，１６６　１０　プラハ　６，フレミンゴヴォ ナム．５４２／２
(74)代理人　110000338
弁理士法人 HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK
(72)発明者　ツィグラー，ペトル
チェコ共和国，１６０　００　プラハ　６，コモルニツカー　５
(72)発明者　グランツ サスコヴァ，クララ
チェコ共和国，１６０　００　プラハ　６
最終頁に続く

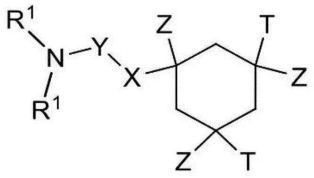
(54)【発明の名称】　核酸トランスフェクション用シクロヘキサンリピドイドおよびその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

一般式（Ｉ）の化合物であって、

【化１】



（Ｉ），

ここで

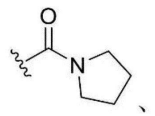
Ｘは、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－からなる群から選択され；

Ｙは、アルキレンＣ$_2$－Ｃ$_8$鎖からなる群から選択され；

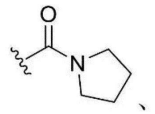
Ｒ^{1}は、同一または互いに異なり、各Ｒ^{1}は、独立して、アルキルＣ$_{10}$－Ｃ$_{20}$、アルケニルＣ$_{10}$－Ｃ$_{20}$、アルキニルＣ$_{10}$－Ｃ$_{20}$からなる群から選択され、ここで、前記アルキル、アルケニルまたはアルキニルは、直鎖であっても分岐であってもよく、前記アルキル、アルケニルまたはアルキニルにおいて、１つ以上の－ＣＨ$_2$－基は任意に、－ＯＣ（＝Ｏ）－および－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－から選択される１つ以上の基で置換されていてもよく；

ただし、少なくとも１つのＲ^{1}は、少なくとも１０個の炭素原子を含み；

Ｚは互いに同一または異なり、各Ｚは独立して、水素、－ＣＨ３およびＣＨ２ＯＨからなる群から選択され、
およびＴは、互いに同一であるかまたは異なり、各Ｔは、－Ｘ－Ｙ－Ｎ（Ｒ１）２、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ（Ｃ１－Ｃ３アルキル）、
【化２】



－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨおよび－ＮＨＣ（＝Ｏ）ＣＨ３からなる群から独立して選択され、
ここで、少なくとも１つのＴが、Ｘ－Ｙ－Ｎ（Ｒ１）２であり、
および、Ｚが－ＣＨ２ＯＨであり、かつＴが－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨである場合、ＺはＴおよびそれらの間の３個の炭素原子とともに、４～５個の炭素原子を含む環状ラクトンを形成することができる；
化合物、またはその薬学的に許容される塩、付加塩および溶媒和物。
【請求項２】
分子中の全てのＲ１が同一である、請求項１に記載の化合物。
【請求項３】
両方の置換基Ｔが－Ｘ－Ｙ－Ｎ（Ｒ１）２である、請求項１に記載の化合物。
【請求項４】
Ｚは、水素、－ＣＨ３および－ＣＨ２ＯＨからなる群から選択され；
およびＴは、－Ｘ－Ｙ－Ｎ（Ｒ１）２、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ（ＣＨ３）、
【化３】

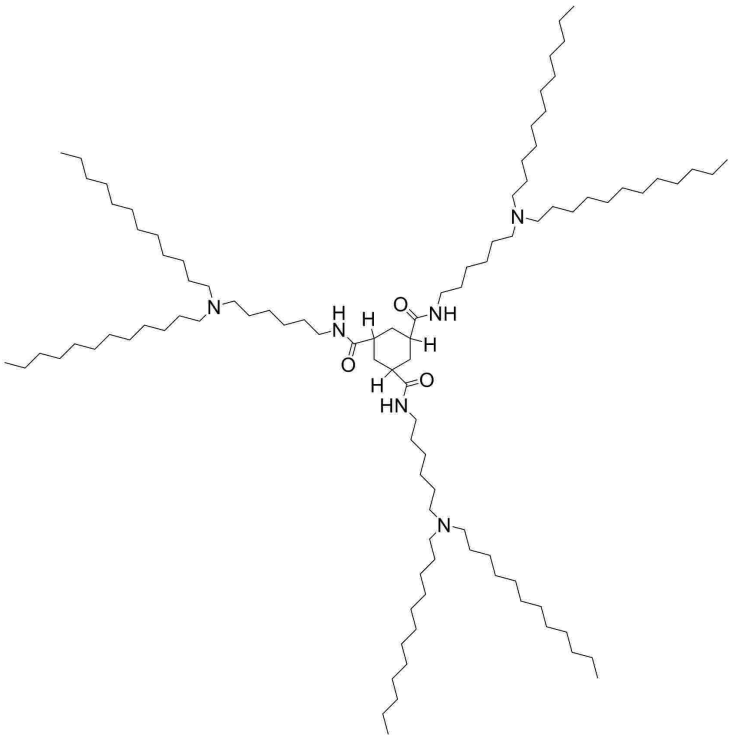


および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨからなる群から選択され；
および／または、Ｚが－ＣＨ２ＯＨであり、かつＴが－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨである場合、ＺはＴおよびそれらの間の３個の炭素原子とともに、４～５個の炭素原子を含む環状ラクトンを形成してもよい、請求項１に記載の化合物。
【請求項５】
一般式（Ｉ）の化合物が少なくとも２つのＲ１置換基を含み、それらの各置換基が少なくとも１２個の炭素原子を含む、請求項１に記載の化合物。
【請求項６】
請求項１に記載の一般式（Ｉ）の少なくとも１種の化合物と、少なくとも１種のヘルパー脂質とを含み；前記ヘルパー脂質は、コレステロール、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリ（エチレングリコール）－２０００、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－ポリ（エチレングリコール）－２０００、１、２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミンポリ（エチレングリコール）－２０００、および１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミンポリ（エチレングリコール）－２０００を含む群から選択される、トランスフェクション剤。
【請求項７】
請求項１に記載の一般式（Ｉ）の少なくとも１種の化合物を１０～５０モル％の量で含み、少なくとも１種のヘルパー脂質を５０～９０モル％の量で含む、請求項６に記載のト

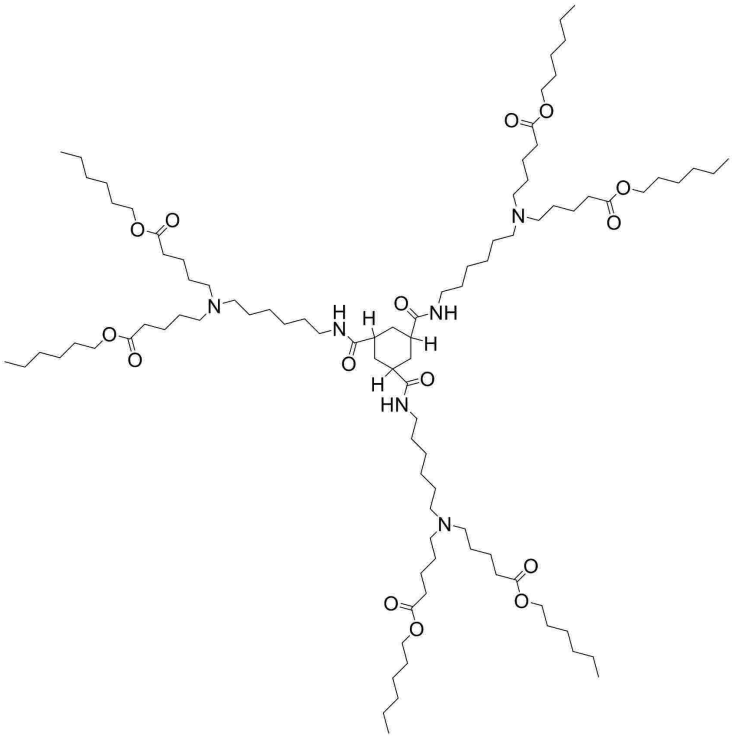
ランスフェクション剤。
【請求項８】
１５～４０モル％の量の請求項１に記載の一般式（Ｉ）の少なくとも１つの化合物、３０～５５モル％の量のコレステロール、および２０～５０モル％の量の少なくとも１つの別のヘルパー脂質を含み；前記別のヘルパー脂質は、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリ（エチレングリコール）－２０００、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－ポリ（エチレングリコール）－２０００、１、２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミンポリ（エチレングリコール）－２０００、および１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミンポリ（エチレングリコール）－２０００を含む群から選択される、請求項６に記載のトランスフェクション剤。
【請求項９】
請求項１に記載の一般式（Ｉ）の少なくとも１種の化合物、少なくとも１種の核酸および／またはその一部および／または核酸誘導体；ならびに少なくとも１種のヘルパー脂質を含む、トランスフェクション粒子。
【請求項１０】
核酸および／またはその一部および／または核酸誘導体による細胞または組織のインビトロトランスフェクションのための、請求項１～５のいずれか１項に記載の一般式（Ｉ）の化合物、または請求項６、７もしくは８に記載のトランスフェクション剤、または請求項９に記載のトランスフェクション粒子の、使用方法。
【請求項１１】
染色体遺伝子のサイレンシングもしくは活性化、免疫遺伝子のサイレンシングもしくは活性化、シグナル伝達経路の阻害もしくは活性化、ゲノムもしくはトランスクリプトームの編集、または核酸によりコードされるタンパク質の発現可能化のための、請求項１０に記載の使用方法。
【請求項１２】
インビボでの核酸および／またはその一部および／または核酸誘導体による細胞または組織のトランスフェクションに使用するための、請求項１～５のいずれか１項に記載の一般式（Ｉ）の化合物、または請求項６、７もしくは８に記載のトランスフェクション剤、または請求項９に記載のトランスフェクション粒子であって、産業目的または商業目的で使用するためのヒト胚のトランスフェクションを除き、かつヒト生殖系列の改変を除く、トランスフェクション粒子。
【請求項１３】
染色体遺伝子のサイレンシングもしくは活性化、免疫遺伝子のサイレンシングもしくは活性化、シグナル伝達経路の阻害もしくは活性化、ゲノムもしくはトランスクリプトームの編集、または核酸によってコードされるタンパク質（複数可）の発現を可能にする、核酸および／またはその一部および／または核酸誘導体による細胞または組織のインビトロトランスフェクションに使用するための、請求項１～５のいずれか１項に記載の一般式（Ｉ）の化合物、または請求項６、７もしくは８に記載のトランスフェクション剤、または請求項９に記載のトランスフェクション粒子。
【請求項１４】
医薬品として使用するための、請求項１～５のいずれか１項に記載の一般式（Ｉ）の化合物、または請求項６、７もしくは８に記載のトランスフェクション剤、または請求項９に記載のトランスフェクション粒子。
【請求項１５】
前記医薬品は、悪性腫瘍および／または遺伝性疾患の治療のためのものである、請求項１

４に記載の化合物、またはトランスフェクション剤、またはトランスフェクション粒子。
【請求項１６】
前記医薬品は、遺伝子治療のためのものである、請求項１４に記載の化合物、またはトランスフェクション剤、またはトランスフェクション粒子。
【請求項１７】
予防ワクチンとして使用するための、請求項１～５のいずれか１項に記載の一般式（Ｉ）の化合物、または請求項６、７もしくは８に記載のトランスフェクション剤、または請求項９に記載のトランスフェクション粒子。
【請求項１８】
前記予防ワクチンは、感染症の予防のためのものである、請求項１７に記載の化合物、またはトランスフェクション剤、またはトランスフェクション粒子。
【請求項１９】
有効成分を作用部位に送達するための化粧品製剤における、請求項１～５のいずれか１項に記載の一般式（Ｉ）の化合物、または請求項６、７もしくは８に記載のトランスフェクション剤、または請求項９に記載のトランスフェクション粒子の、使用方法。
【請求項２０】
以下からなる群より選択される、請求項１に記載の一般式（Ｉ）の化合物：

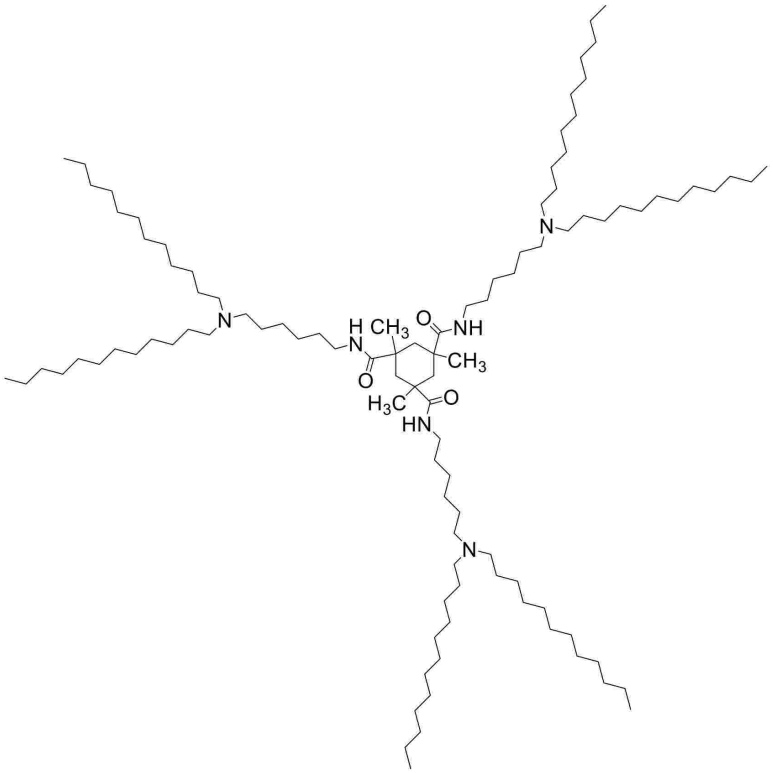
【化４】



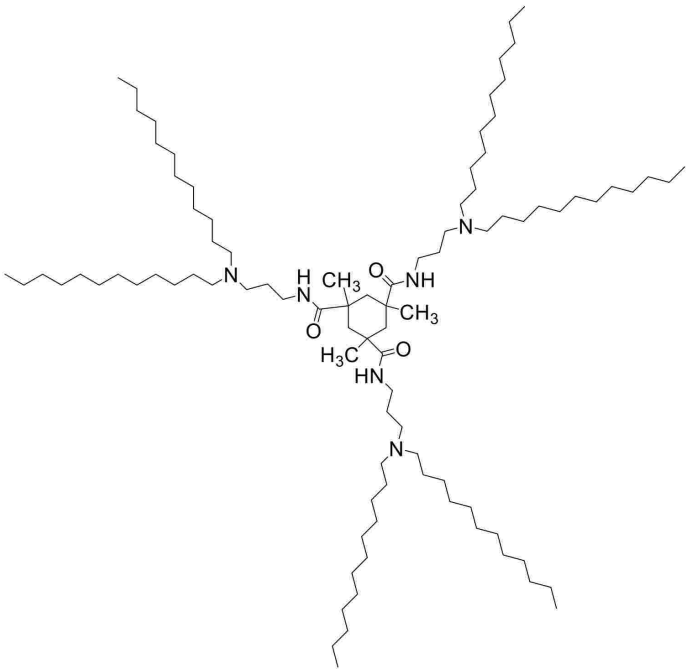
(3)；



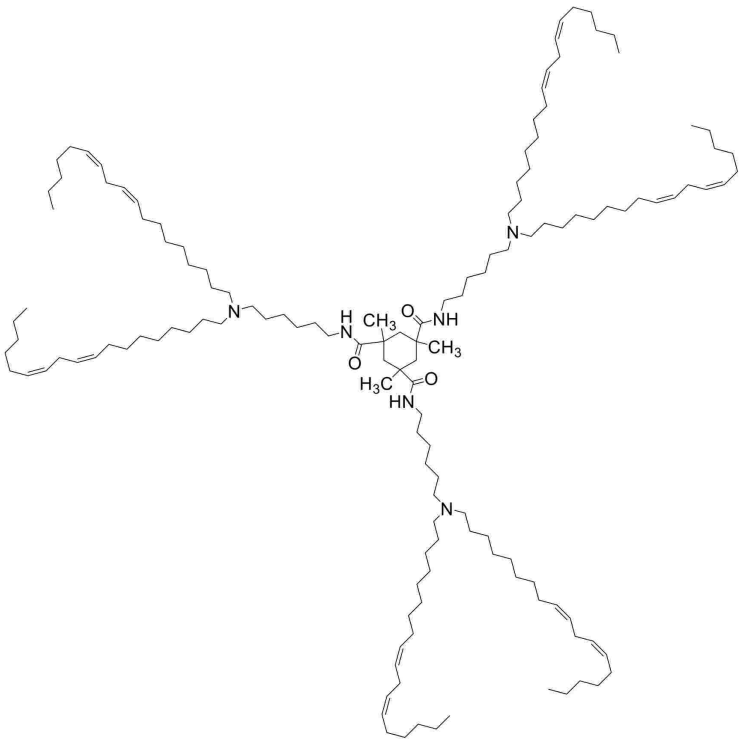
(7)；



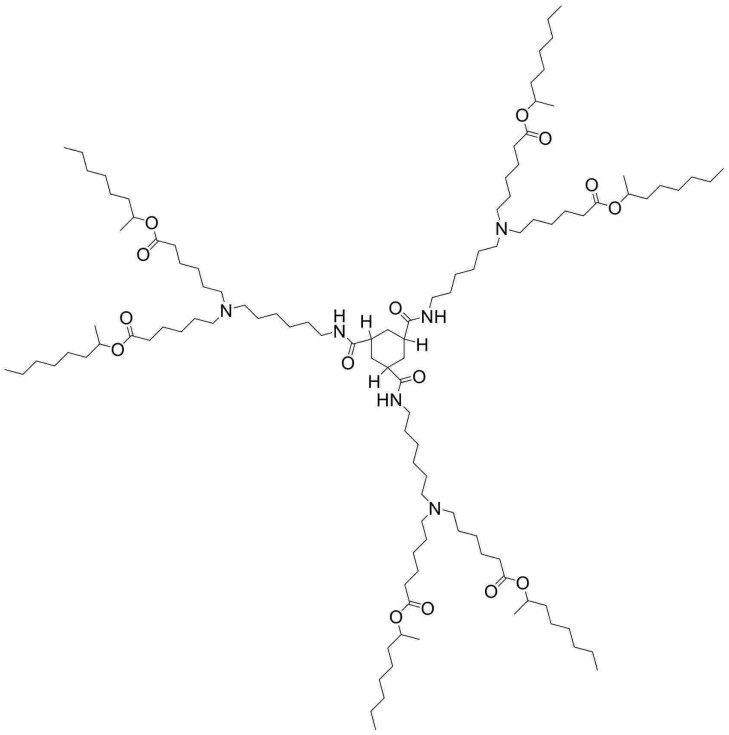
(8)；



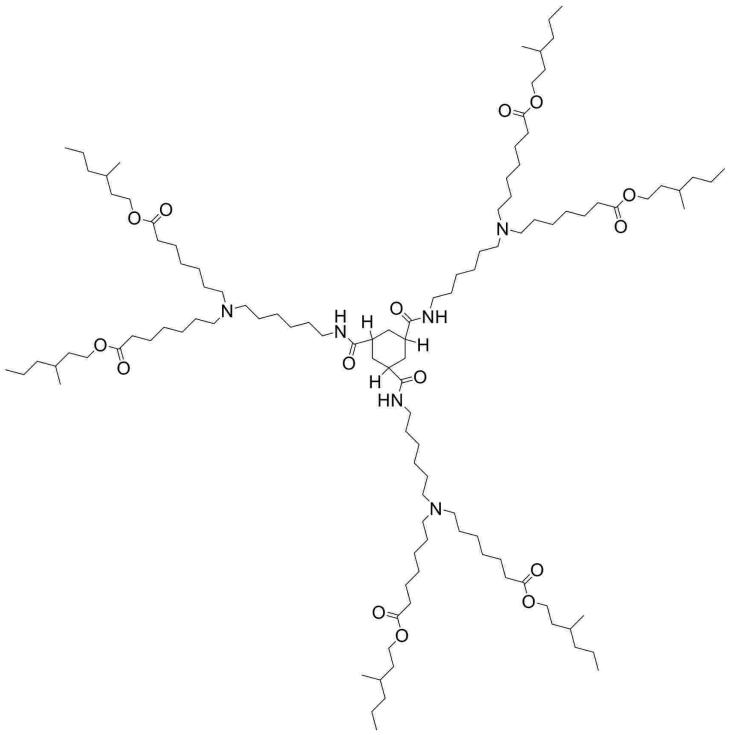
(11)；



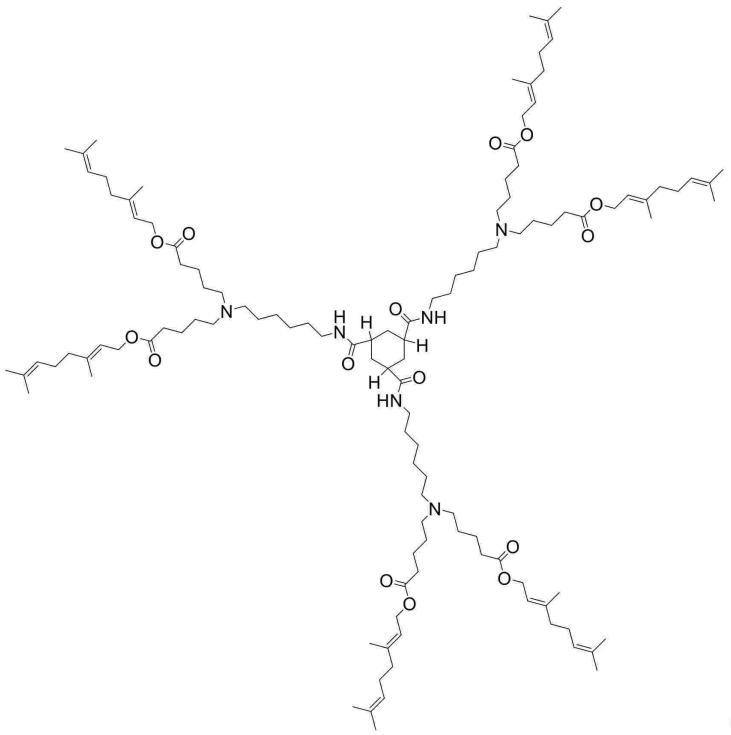
(15);



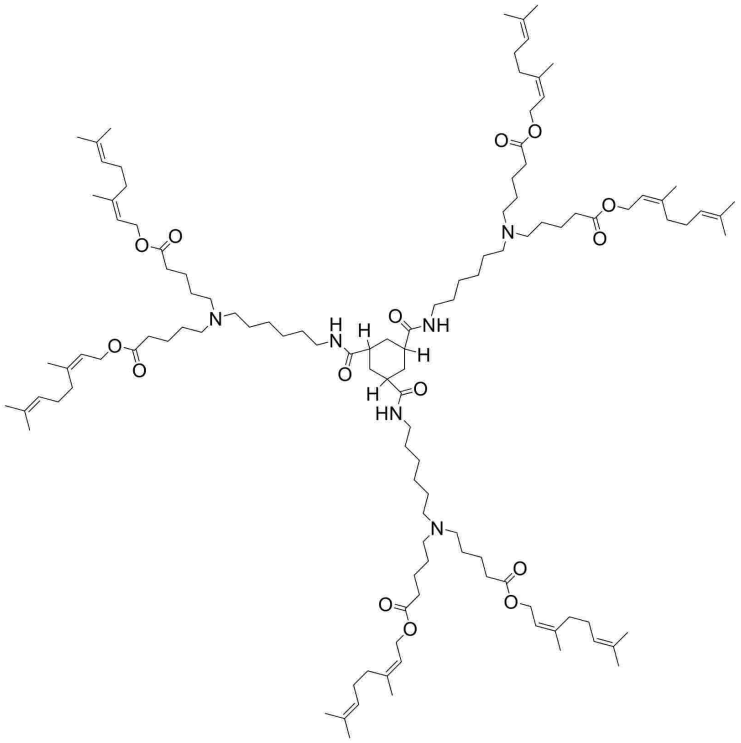
(19);



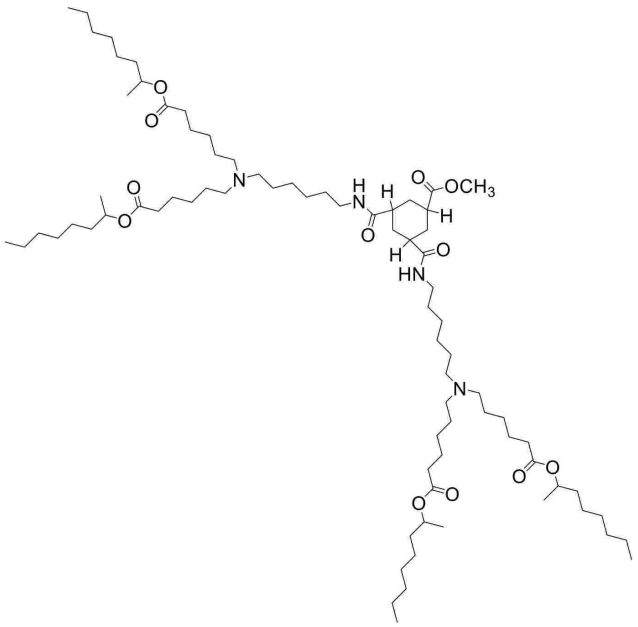
(23);



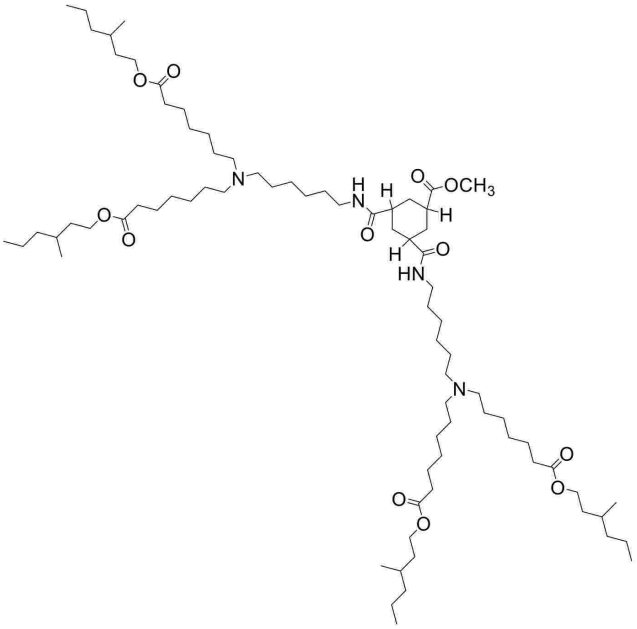
(27);



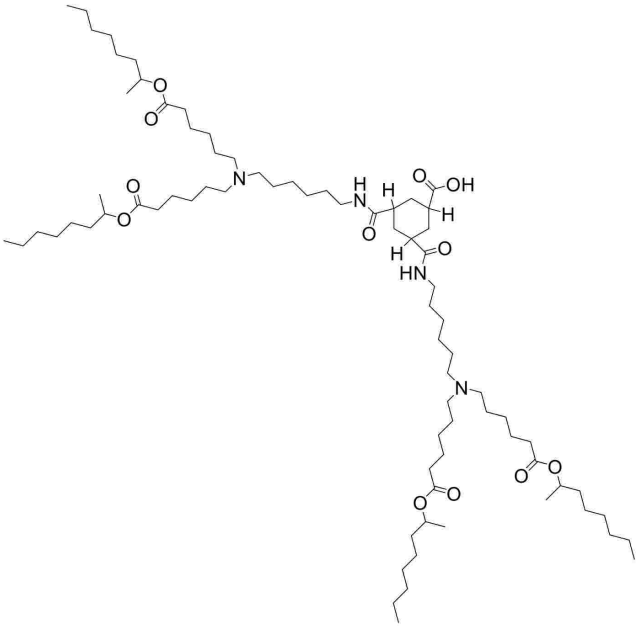
(31);



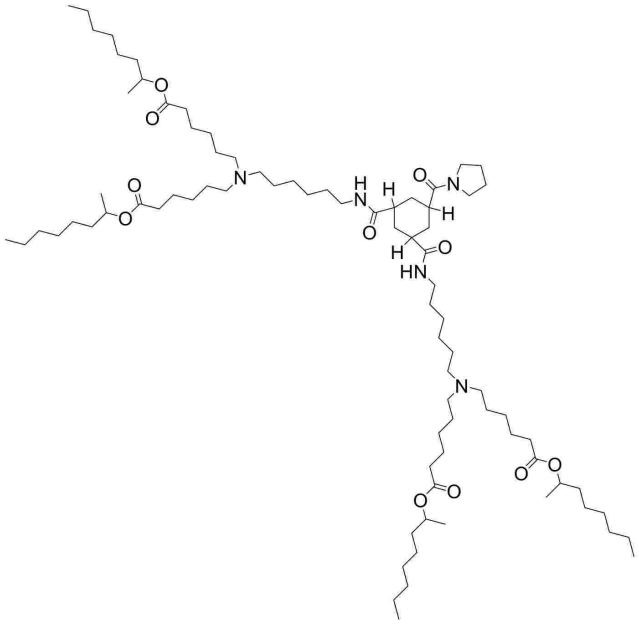
(32);



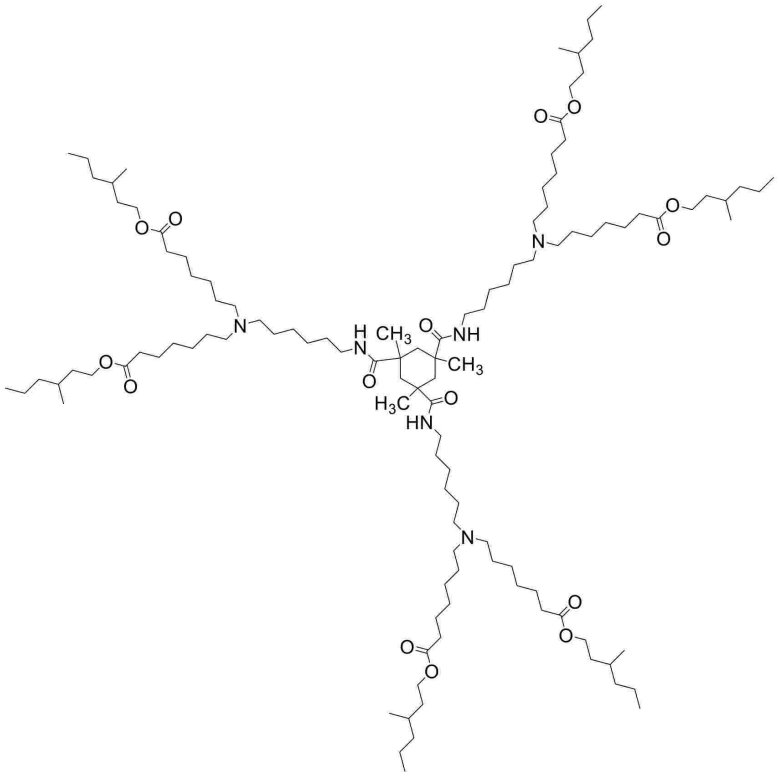
(33)；



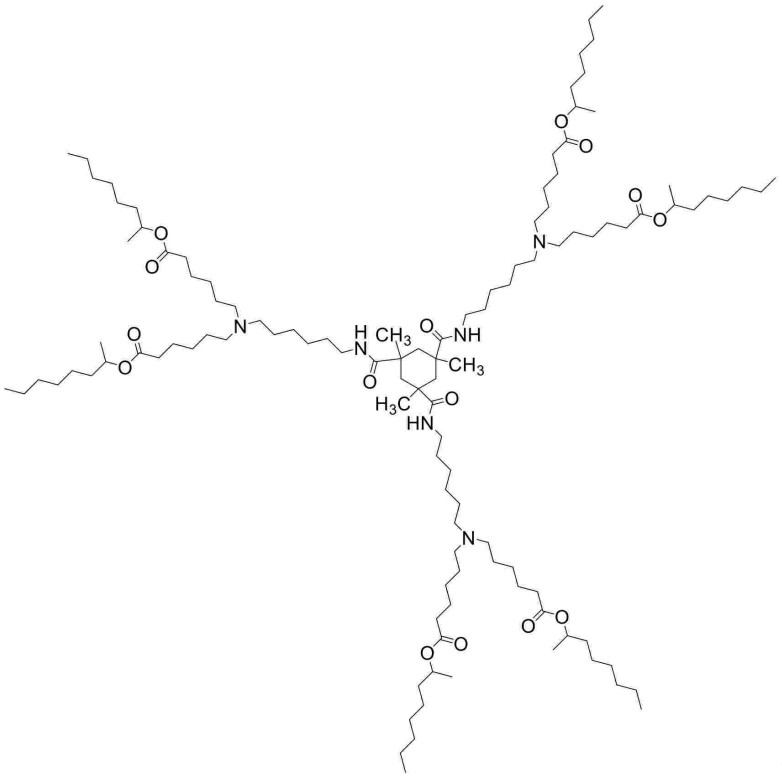
(35)；



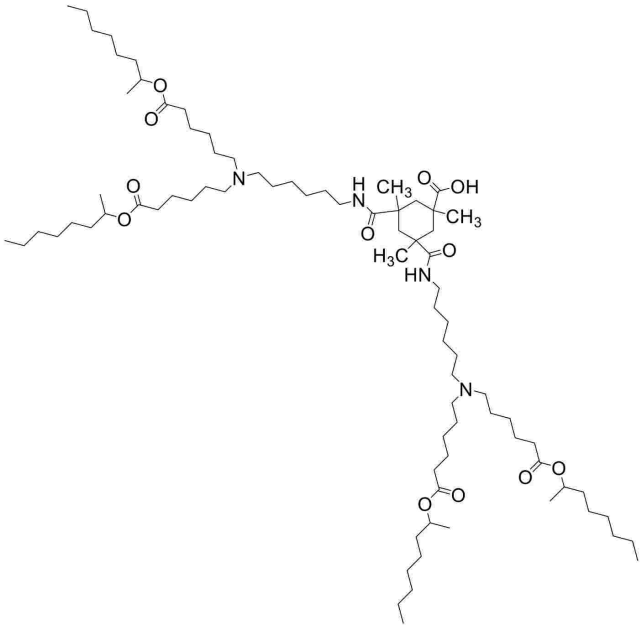
(36)；



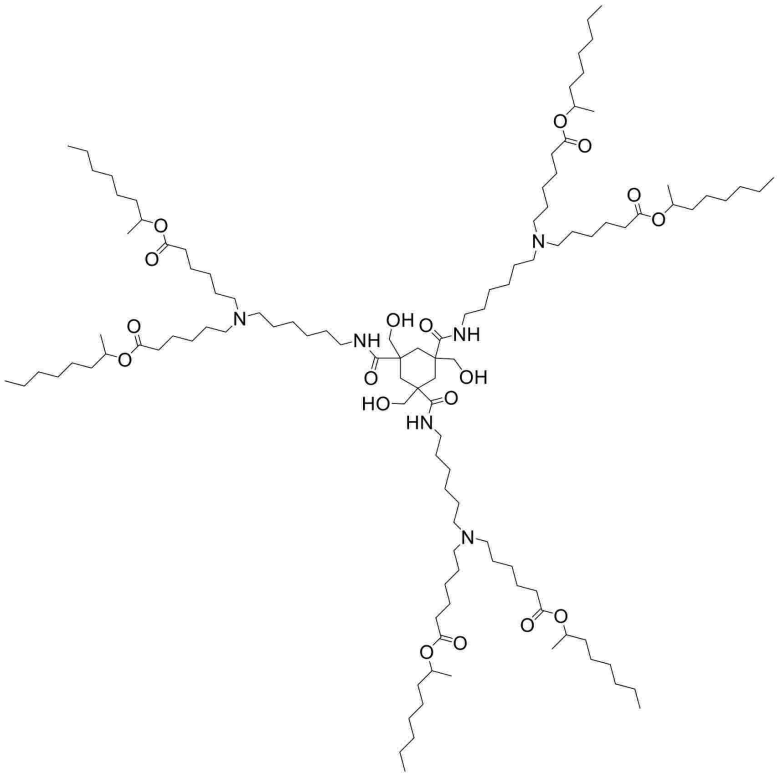
(40)；



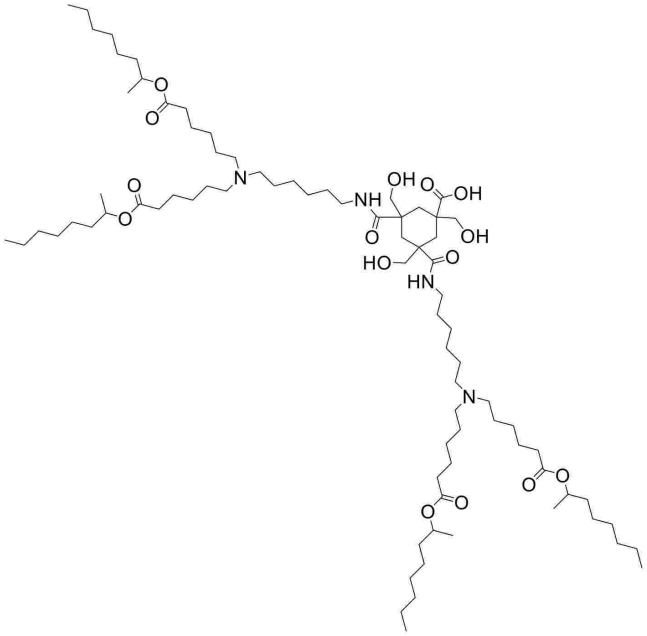
(41)；



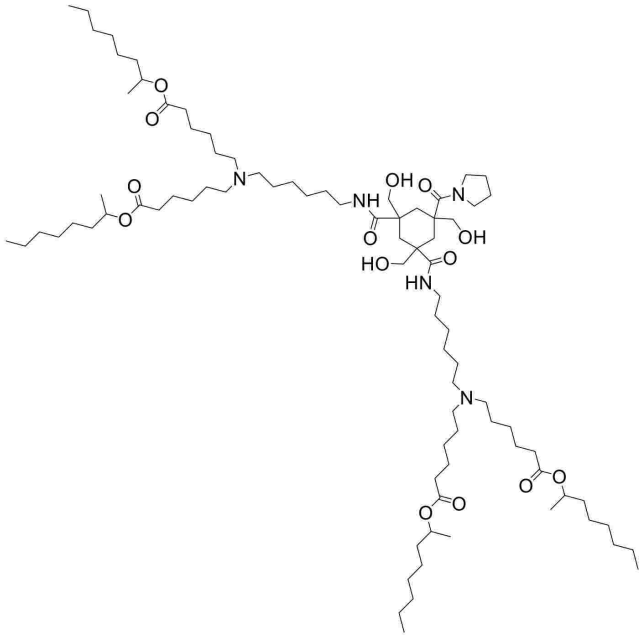
(42)；



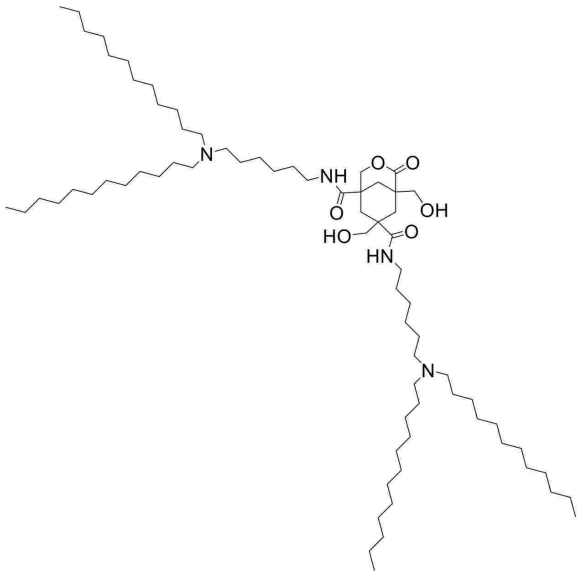
(47);



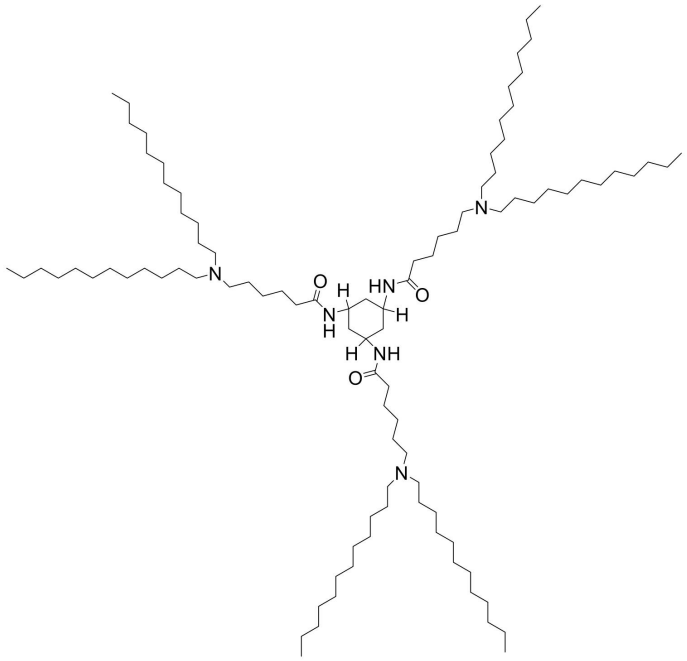
(48);



(50)；



(52)；および



(56)

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、新規なイオン化可能なリピドイド、ならびにヌクレオチドおよび核酸、ならびにそれらの合成類似体を細胞および組織にトランスフェクションおよび投与するためのこれらの化合物の使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
核酸（ＮＡ）ベースの治療の開発は、近年かつてないルネッサンスを経験している。これまでに試験されてきた治療用デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）に比べ、有効性が高く、同時に副作用のリスクも低いことから、リボ核酸（ＲＮＡ）治療が台頭してきている。いくつかのこのような薬剤は既に臨床使用まで到達しており、例えば、遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスに対するパティシラン、ある種のデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエテプリルセン、脊髄性筋萎縮症に対するヌシネルセンなどである。これらの疾患はすべて生命を脅かすものであり、代替治療はない。リボ核酸（ＲＮＡ）またはその使用を標的とする可能性のある薬剤は、ＮＡまたはタンパク質を標的とするか、タンパク質をコードするかによって３つのカテゴリーに分けられる。最初のカテゴリーには、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の翻訳やＲＮＡスプライシングを阻害する、１３－２５ヌクレオチド（ｎｔ）の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド（ヌシネルセン、エテプリルセン）；およびｍＲＮＡを分解する短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ、２１－２３ｎｔ）（パティシラン）が含まれる。タンパク質を標的とする治療用ＲＮＡ分子は、ＲＮＡアプタマーとして知られるタイプの分子を用いる。これは特定のタンパク質の機能を調節するように設計されている。このような薬剤の例としては、新生血管性加齢黄斑変性の治療に使われるペガプタニブがあり、２００４年にこの種の薬剤として初めて承認された。ｍＲＮＡを利用した治療法は、主にがんに対するいわゆる個別化ワクチンや、感染症（例えば、ジカウイルス）に対するワクチンの調製に用いられている。ウイルス性疾患では、狂犬病や新型インフルエンザに対するｍＲＮＡに基づく予防ワクチンの候補が、健康なボランティアにおいて安全な抗体生産を誘導することが示されている。タンパク質を置換するｍＲＮＡ治療薬も、例えば血友病の治療として前臨床開発段階にある。
【０００３】
直接的なゲノム編集を可能にする分子技術、特にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９システムに基

づく技術が、現在ブームとなっている。ＣＲＩＳＰＲ技術は、ＤＮＡ配列を変化させ、遺伝子の機能を改変することを可能にするツールである。遺伝子異常の修復、病気の治療や蔓延防止、農作物の改良などに応用される可能性がある。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９システムは、ＨＩＶ治療、血液学的悪性腫瘍の治療、鎌状赤血球症やβ－サラセミアなどの遺伝性疾患などを含む、多くの前臨床試験や臨床試験で検証されている。その後、ＡＤＡＲシステム（ＲＮＡに作用するアデノシンデアミナーゼ）によってＲＮＡ編集が可能になるが、これまでのところ、臨床的見地からはＡＤＡＲシステムの方が安全であるように思われる。ゲノムを直接編集する分子技術は、編集を担う適切な酵素をコードするｍＲＮＡの形で作用部位に送達することができる。

【０００４】

これらすべての技術（またはＮＡに基づく他の技術）の安全な使用を可能にする重要な要因は、作用部位への安全かつ効率的な輸送である。重要な工程は、負に帯電したＮＡを細胞のリン脂質膜に浸透させることである；真核細胞にＮＡを意図的に導入するプロセスはトランスフェクションと呼ばれる。直近の数十年、ＮＡをｉｎ　ｖｉｖｏでの分解から保護しながら細胞膜を渡って効率的に輸送するための担体（いわゆるベクター）の開発が精力的に行われている（Stewart, M. P.:Chem. Rev. 2018, 118, 7409-7531）。

【０００５】

ＮＡのトランスフェクションには、ウイルス性ベクターと非ウイルス性（物理的、化学的）ベクターの両方が用いられる。遺伝子治療分野の臨床試験の約７０％は、今のところウイルスベクターを用いて行われているが、このアプローチには多くのリスク（発がん性、免疫反応の誘導、組織の非特異性、ＮＡ取り込み能力の制限、製造の複雑さ）を抱えている。物理的な方法（例えば、エレクトロポレーション）は、ヒトの医療で全身的に使用するのは困難である。

【０００６】

対照的に、合成化学ベクターは通常、免疫原性が低く、より大量の遺伝物質を輸送することができ、またよく定義された分子で構成されているため、必要に応じて構造を調整し、効率を高め、毒性を抑制することができる。カチオン性ポリマーまたはカチオン性脂質が化学ベクターとして使用され、負に帯電したＮＡと複合体を形成する。この複合体は細胞膜を貫通すると同時に、細胞外環境での分解からＮＡを保護する。

【０００７】

構造的見地から、いわゆる脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は現在、これらの複合体の中で最も有望で臨床的に進んだ形態である。そこでは、カチオン性脂質は通常、例えばｓｉＲＮＡトランスフェクションシステムで示されているように（Kulkarni, J.: Nanoscale, 2019, 11, 21733-21739）、安定したＮＡのカプセル化に必要なヘルパー脂質およびコレステロールとともに、凝集を防ぎ、粒子サイズおよびトランスフェクション効率に影響を及ぼす、ＰＥＧ化脂質とともに形成される。ＬＮＰは、数ヌクレオチド単位から数百万までのサイズのＮＡ分子を収容することができる。

【０００８】

合成カチオン性脂質およびリピドイド（疎水性鎖の数が多い点が異なる、脂質に類似した合成分子）は、カチオン性ドメインと疎水性ドメインによって形成される。現在までに、これらの物質の多くは、標的設計とコンビナトリアルに生成されたライブラリーのテストの両方によって、両方のドメインにおいて高い構造可変性を持って開発されてきた。

【０００９】

Ｄ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、Ｃ１２－２００、ｃＫＫ－Ｅ１２、ＳＡ２－ＳＣ８などの脂質およびリピドイドは、ｓｉＲＮＡトランスフェクション用に特別に開発されている（Dong, Y.: Adv. Drug Deliv. Rev. 2019, 144, 133-147）。Ｄ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡを含む製剤は最近（２０１８年８月）、オンパトロ（旧パティシラン）の名称で臨床に導入され、史上初の承認されたｓｉＲＮＡ医薬品となった（Zhang, X.:J. Clin.Pharmacol. 2020, 60 (1), 37-49）。しかし、ｓｉＲＮＡ用に開発された製剤がｍＲＮＡに有効とは限らないため、標的を絞った最適化が必要である（Cullis, P...:Mol.Ther. 201

7, 25 (7), 1467-1475）。

【００１０】

Ｄ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、Ｃ１２－２００、ｃＫＫ－Ｅ１２、ＴＴ３などのイオン化可能な脂質およびリピドイドは、ｍＲＮＡをトランスフェクトするために使用される（Zhong,Z.Nano Today 2018,23,16-39;Kowalski,P.Mol.Ther. 2019, 27 (4), 1-19; Li, B.: Nano Lett. 2015, 15, 8099-8107）。イオン化可能な脂質もＤＮＡトランスフェクションに用いられる。ここでも、低分子（ｓｉＲＮＡ）トランスフェクション用に最適化されたトランスフェクション系が必ずしもＤＮＡトランスフェクションに適しているとは限らず、ｍＲＮＡ用に開発された製剤であってもＤＮＡには有効でない場合があることは強調されるべきである（Buck, J.: ACS Nano 2019, 13, 3754-3782）。

【００１１】

膨大な治療の可能性があるにもかかわらず、イオン化可能な脂質をベースにした合成ベクターは、これまでほとんど臨床使用されていないため、より効率が高く、ｉｎ ｖｉｖｏ毒性が非常に低い新しいシステムを開発する必要がある。

【発明の概要】

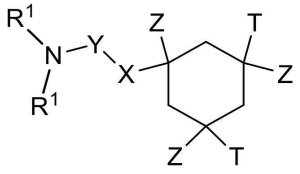
【００１２】

本発明は、イオン化可能な（カチオン性）脂質を用いたヌクレオチドおよび核酸ならびにそれらの合成アナログのトランスフェクションおよび標的化送達の効率の問題、ならびに標的生物または細胞に対するこれらの脂質の毒性の問題に対する解決策を提供する。我々は、シクロヘキサンをイオン化可能なリピドイドの中心核として用いると、このようなリピドイドのトランスフェクション効率が、従来知られていた溶液に比べて著しく向上することを見出した。同時に、これらのシクロヘキサン含有リピドイドは、適切な投与量で極めて低い細胞毒性を示す。新しいイオン化可能なリピドイドの中心構造モチーフとして用いられているシクロヘキサンコアの特異的な性質は、その近傍の立体的な複雑さと、これまでに知られているイオン化可能な脂質やリピドイドと比較した場合の置換範囲の広さである。

【００１３】

本発明の目的は、一般式（Ｉ）のイオン化可能なリピドイドであって、

【化１】



（Ｉ），

ここで

Ｘは、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｓ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、－Ｃ（＝Ｓ）Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨＮＨ－、－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－、－ＯＣ（＝Ｏ）－、－Ｓ－、－ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨ－、－ＮＨＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ≡Ｃ－、－ＣＨ＝ＣＨ－、少なくとも２個の窒素原子を含む５員複素環、－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｓ）Ｏ－、－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｓ）Ｓ－、－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨＮＨ－、－Ｎ＝ＣＨ－、－ＣＨ＝Ｎ－、－ＮＨ－Ｎ＝ＣＨ－、および－ＣＨ＝Ｎ－ＮＨ－を含む群から選択され；

Ｙは、アルキレンＣ$_2$－Ｃ$_{10}$鎖を含む群から選択され、前記アルキレン鎖において、１つ以上の－ＣＨ$_2$－基は、任意に、１つ以上のＯおよび／またはＳ原子で置換されていてもよく；好ましくは、Ｙは、アルキレンＣ$_2$－Ｃ$_{10}$鎖を含む群、特にアルキレンＣ$_3$－Ｃ$_6$鎖、好ましくはプロピレン（－（ＣＨ$_2$）$_3$－）、ペンチレン（－（ＣＨ$_2$）$_5$－）、ヘキシレン（－（ＣＨ$_2$）$_6$－）から選択され；

Ｒ^{1}は、同一または互いに異なり、各Ｒ^{1}は、独立して、アルキルＣ$_1$－Ｃ$_{46}$、アルケニルＣ$_2$－Ｃ$_{46}$、アルキニルＣ$_2$－Ｃ$_{46}$を含む群から選択され、ここで、前記アルキル

、アルケニルまたはアルキニルは、直鎖であっても分岐であってもよく、前記アルキル、アルケニルまたはアルキニルにおいて、１つ以上の－ＣＨ$_2$－基は任意に、－ＣＨ（ＯＨ）－、－ＯＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、および－Ｓ－から選択される１つ以上の基で置換されていてもよく；

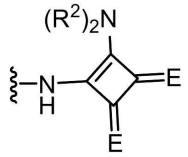
ここで、前記アルキル、アルケニルまたはアルキニルが分岐である場合、１つ以上の＞ＣＨ－基は任意に、＞Ｃ（ＯＨ）－で置換されていてもよく；

ここで、Ｒ^{1}がアルキルＣ$_1$－Ｃ$_4$である場合、末端－ＣＨ$_3$基の水素１個はＺで置換されていてもよく；

ただし、少なくとも１つのＲ^{1}は、少なくとも８個の炭素原子、好ましくは少なくとも１０個の炭素原子、より好ましくは少なくとも１２個の炭素原子を含み；より好ましくは、少なくとも２つのＲ^{1}は、少なくとも８個の炭素原子、好ましくは少なくとも１０個の炭素原子、より好ましくは少なくとも１２個の炭素原子を含み

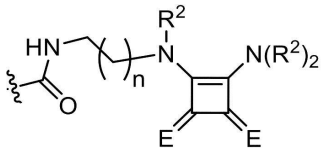
Ｚは互いに同一または異なり、各Ｚは独立して、水素、－ＯＨ、－ＣＨ$_3$－、ＣＨ$_2$ＯＨ、－ＮＨ$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_2$ＯＨ、
－ＣＯＮ［（ＣＨ$_2$）$_2$ＯＨ］$_2$，－ＣＯＮＨＣＨ（ＣＨ$_2$ＯＨ）$_2$，－ＣＯＮＨＣＨ$_2$ＣＨ（－ＯＨ）ＣＨ$_2$ＯＨ、
－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_2$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$，－ＣＯＮ［ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$］$_2$，－ＣＯＮＨＣＨ［Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$］$_2$、
－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_2$ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$，－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_3$－Ｎ$^+$（ＣＨ$_3$）$_2$－（ＣＨ$_2$）$_2$－ＳＯ$_3$$^-$、
－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_3$－Ｎ$^+$（ＣＨ$_3$）$_2$－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＳＯ$_3$$^-$、－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_3$－Ｎ$^+$（ＣＨ$_3$）$_2$－（ＣＨ$_2$）$_2$－ＣＯＯ$^-$、
－ＣＯＯ（ＣＨ$_2$）$_2$－Ｏ－Ｐ（＝Ｏ）（Ｏ$^-$）－Ｏ（ＣＨ$_2$）$_2$－Ｎ$^+$（ＣＨ$_3$）$_3$、－Ｎ$^+$（ＣＨ$_3$）$_2$－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＳＯ$_3$$^-$、－Ｎ$^+$（ＣＨ$_3$）$_2$－（ＣＨ$_2$）$_2$－ＣＯＯ$^-$、

【化２】



および

【化３】



を含む群から選択され、

ここで

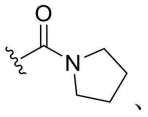
Ｒ^{2}は、水素および－ＣＨ$_3$から独立して選択され；

Ｅは、ＯおよびＳ原子から独立して選択され；

ｎは１～５の範囲の整数であり；

およびＴは、互いに同一であるかまたは異なり、各Ｔは、－Ｘ－Ｙ－Ｎ（Ｒ^1）$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$－Ｃ$_3$アルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＯＨ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$、

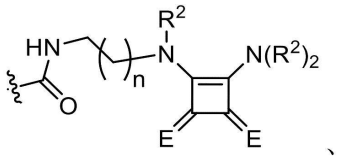
【化４】



、

－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、－ＣＯＮＨ（ＣＨ２）２ＯＨ，－ＣＯＮ［（ＣＨ２）２ＯＨ］２、－ＣＯＮＨＣＨ（ＣＨ２ＯＨ）２、
－ＣＯＮＨＣＨ２ＣＨ（－ＯＨ）ＣＨ２ＯＨ，－ＣＯＮＨ（ＣＨ２）２Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ２、
－ＣＯＮ［ＣＨ２Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ２］２、
－ＣＯＮＨＣＨ［Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ２］２、－ＣＯＮＨ（ＣＨ２）２ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ２、
－ＣＯＮＨ（ＣＨ２）３－Ｎ＋（ＣＨ３）２－（ＣＨ２）２－ＳＯ３－、
－ＣＯＮＨ（ＣＨ２）３－Ｎ＋（ＣＨ３）２－（ＣＨ２）３－ＳＯ３－，－ＣＯＮＨ（ＣＨ２）３－Ｎ＋（ＣＨ３）２－（ＣＨ２）２－ＣＯＯ－、
－ＣＯＯ（ＣＨ２）２－Ｏ－Ｐ（＝Ｏ）（Ｏ－）－Ｏ（ＣＨ２）２－Ｎ＋（ＣＨ３）３、

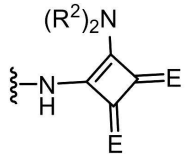
【化５】



、

－ＯＨ、－Ｏ（Ｃ１－Ｃ３アルキル）、－ＮＨ２、－ＮＨＣ（＝Ｏ）ＣＨ３、－ＮＨＳ（＝Ｏ）２ＣＨ３、ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｎ（ＣＨ３）２、
－ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ３）、－ＮＨＣ（＝Ｓ）Ｎ（ＣＨ３）２、－ＮＨＣ（＝Ｓ）ＮＨ（ＣＨ３）、－ＮＨＣ（＝Ｎ－ＣＮ）ＮＨ２、
－ＮＨＣ（＝Ｎ－ＣＮ）ＮＨ（ＣＨ３）、－ＮＨＣ（＝Ｎ－ＣＮ）Ｎ（ＣＨ３）２、－ＮＨＣ［＝Ｎ－Ｓ（＝Ｏ）２ＮＨ２］ＮＨ２、
－Ｎ＋（ＣＨ３）２－（ＣＨ２）３－ＳＯ３－、－Ｎ＋（ＣＨ３）２－（ＣＨ２）２－ＣＯＯ－、

【化６】



を含む群から独立して選択され、
ここで、Ｒ２、Ｅおよびｎは上記で定義した通りであり；
および／または、ＺがＯＨまたはＣＨ２ＯＨであり、かつＴがＣ（＝Ｏ）ＯＨである場合、ＺはＴおよびそれらの間の３個の炭素原子とともに、４～５個の炭素原子を含む環状ラクトンを形成することができる、リピドイドである。本発明は、上記で定義したリピドイドの薬学的に許容される塩、付加塩および溶媒和物も包含する。

【００１４】

用語「アルキル」は、飽和炭化水素鎖を意味し、直鎖、分岐、環状またはサイクル含有であってもよく、１個の水素原子を除去することによりアルカンから誘導される。

【００１５】

用語「アルケニル」は、炭素原子間に少なくとも１つの二重結合を含む炭化水素鎖であって、１つの水素原子を除去することによりアルケンから誘導されるものを意味する。炭化水素鎖は、直鎖、分岐鎖、環状鎖または環含有鎖であってもよい。

【００１６】

用語「アルキニル」は、炭素原子間に少なくとも１つの三重結合を含み、任意に炭素原子間に１つ以上の二重結合も含む炭化水素鎖であって、１つの水素原子を除去することに

よりアルキンから誘導されるものを意味する。炭化水素鎖は、直鎖、分岐鎖、環状鎖または環含有鎖であってもよい。

【００１７】

用語「アルキレン」は、二価の飽和炭化水素鎖を意味し、直鎖、分岐鎖、環状鎖または環含有鎖であってもよく、好ましくは直鎖である。この鎖は２の価数を有し、すなわち、異なる炭素原子から２つの水素原子を除去することによってアルカンから誘導され、２つの単結合を介してリンカーまたは架橋として結合する。

【００１８】

用語「分岐鎖アルキル」、「分岐鎖アルケニル」、「分岐鎖アルキニル」は、主炭化水素鎖に結合した１～５個の分岐（炭化水素鎖）を含むアルキル、アルケニルまたはアルキニルを意味する。

【００１９】

一般式Ｉの分子が正の電荷を有する場合、化合物は対イオンを含み、これは有機酸または無機酸の薬学的に許容されるアニオンであり得、薬学的に許容される塩を形成する。このようなアニオンは、例えば、酢酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼスルホン酸塩、安息香酸塩、ベシル酸塩、炭酸水素塩、酒石酸水素塩、臭化物、カムシル酸塩、炭酸塩、塩化物、クエン酸塩、デカン酸塩、エデト酸塩、エシル酸塩、フマル酸塩、グルセプチン酸塩、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコール酸塩、ヘキサン酸塩、ヨウ素酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、メタンスルホン酸塩、ナプシル酸塩、硝酸塩、オクタン酸塩、オレイン酸塩、パルモ酸塩、パントテン酸塩、リン酸塩、ポリガラクツロン酸塩、プロピオン酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、およびトシル酸塩を含む群から選択され得る。

【００２０】

式Ｉの化合物がキラル中心を含む場合、式Ｉには純粋なエナンチオマーだけでなく、ラセミ体を含むエナンチオマーの混合物も含まれる。

【００２１】

式Ｉには、遊離形態の式Ｉの化合物、ならびに塩、（酸または塩基との）付加塩、および／または水和物またはアルコール溶媒和物を含む溶媒和物の形態の化合物が含まれる。

【００２２】

一実施形態において、Ｘは、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨＮＨ－、－ＯＣ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＮＨＣ（＝Ｏ）－、および少なくとも２個の窒素原子を含む５員複素環からなる群から選択される。好ましくは、Ｘは、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－または－ＮＨＣ（＝Ｏ）－である。

【００２３】

R^1鎖は、分子全体で同じであっても、もしくは互いに異なっていてもよいし、またはR^1鎖は、１つの窒素原子については同じであるが、分子全体では同じでなくてもよい。好ましくは、R^1鎖は分子全体で同じであるか、または合成の簡単のために、すべての窒素原子が同一に置換されている（２つの同一のR^1、または２つの異なるR^1のいずれか）。少なくとも１つのR^1置換基は、少なくとも８個の炭素原子の脂肪鎖であり、R^1は、アルキルC_1－C_{46}、アルケニルC_2－C_{46}、アルキニルC_2－C_{46}を含む群から選択され、ここで、前記アルキル、アルケニルまたはアルキニルは、直鎖であっても分岐鎖であってもよく、そしてここで、前記アルキル、アルケニルまたはアルキニルにおいて、１つ以上の－CH_2－基は任意に、－ＣＨ（ＯＨ）－、－ＯＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、および－Ｓ－から選択される１つ以上の基で置換されていてもよく；

ここで、前記アルキル、アルケニルまたはアルキニルが分岐鎖である場合、１つ以上の＞ＣＨ－基は任意に、＞Ｃ（ＯＨ）－で置換されていてもよく；

ここで、R^1がアルキルC_1－C_4である場合、末端－CH_3基の水素１個はＺで置換されていてもよい。

【００２４】

一実施形態において、R^1は、アルキルC_1－C_{46}、およびアルケニルC_2－C_{46}を含む群から独立して選択され、ここで、前記アルキルまたはアルケニルにおいて、１つ以上の－CH_2－基は任意に、－ＣＨ（ＯＨ）－、－ＯＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－から選択される１つ以上の基で置換されていてもよい。

【００２５】

好ましくは、R^1は、直鎖または分岐鎖アルキルC_8－C_{20}、および直鎖または分岐鎖アルケニルC_8－C_{20}を含む群から独立して選択され、前記アルキルまたはアルケニルにおいて、１つ以上の－CH_2－基は任意に、－ＯＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－から選択される１つ以上の基で置換されていてもよい。より好ましくは、R^1は、－ＯＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－から選択される１つ以上の基で任意に置換されていてもよい直鎖または分岐鎖アルキルC_{10}－C_{15}、および－ＯＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－から選択される１つ以上の基で任意に置換されていてもよい直鎖または分岐鎖アルケニルC_{12}－C_{18}を含む群から選択される。

【００２６】

好ましくは、アルケニル鎖は１個から５個の炭素－炭素二重結合を含む。

【００２７】

一実施形態では、分子内のすべてのR^1は同じである。

【００２８】

一実施形態では、R^1基を有する分子内の各窒素原子は、２つの同一のR^1によって同一に置換される（ただし、同一のリピドイド構造内の異なる窒素原子に結合したR^1は同一でなくてもよい）。

【００２９】

一実施形態では、２つの異なるR^1が、１つの窒素原子に結合している。

【００３０】

分子の脂質様特性を可能にするために、リピドイド構造中の少なくとも１つのR^1が、少なくとも８個の炭素原子、好ましくは少なくとも１０個の炭素原子、より好ましくは少なくとも１２個の炭素原子を含まなければならない。好ましくは、リピドイド構造中の２つのR^1が、少なくとも８個の炭素原子、好ましくは少なくとも１０個の炭素原子、より好ましくは少なくとも１２個の炭素原子を含む。

【００３１】

一実施形態において、１つの置換基Ｔは、－Ｘ－Ｙ－Ｎ（R^1）$_2$である。

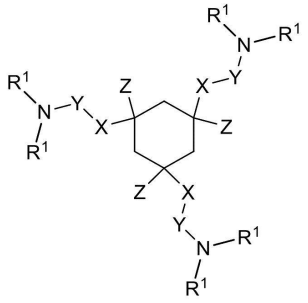
【００３２】

別の実施形態では、両方の置換基Ｔが－Ｘ－Ｙ－Ｎ（R^1）$_2$である。

【００３３】

後者の場合、得られるリピドイドの分子は、一般式ＩＩを有し、

【化７】



（ＩＩ）、

ここで、Ｘ、Ｙ、ＺおよびＲ^{1}は上記で定義した通りである。

【００３４】

一般式ＩＩの構造は、好ましくは以下の置換基を有する：

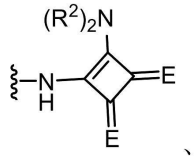
Ｘは、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｓ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、－Ｃ（＝Ｓ）Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨＮＨ－、－CH_2－、－Ｏ－、－ＯＣ（＝Ｏ）－、

－Ｓ－、－ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨ－、－ＮＨＮＨ－、
－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ≡Ｃ－、－ＣＨ＝ＣＨ－、少なくとも２個の窒素原子を含む５員複素環、－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｓ）Ｏ－、－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｓ）Ｓ－、
－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨＮＨ－、－Ｎ＝ＣＨ－、－ＣＨ＝Ｎ－を含む群から選択され；

Ｙは、アルキレン鎖Ｃ$_2$－Ｃ$_{10}$であり、ここで、１つ以上の－ＣＨ$_2$－基は任意に、１つ以上のＯおよび／またはＳ原子で置換されていてもよく；

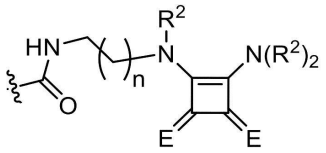
Ｚは互いに同一または異なり、各Ｚは水素原子、－ＯＨ、－ＣＨ$_3$－、ＣＨ$_2$ＯＨ、－ＮＨ$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_2$ＯＨ、－ＣＯＮ［（ＣＨ$_2$）$_2$ＯＨ］$_2$，
－ＣＯＮＨＣＨ（ＣＨ$_2$ＯＨ）$_2$，－ＣＯＮＨＣＨ$_2$ＣＨ（－ＯＨ）ＣＨ$_2$ＯＨ、－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_2$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$，
－ＣＯＮ［ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$］$_2$，－ＣＯＮＨＣＨ［Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$］$_2$、－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_2$ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$、
－Ｎ$^+$（ＣＨ$_3$）$_2$－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＳＯ$_3$$^-$、－Ｎ$^+$（ＣＨ$_3$）$_2$－（ＣＨ$_2$）$_2$－ＣＯＯ$^-$、

【化８】



、

【化９】



からなる群から選択され；

およびＲ^{1}は、互いに同一または異なり、各Ｒ^{1}は、アルキルＣ$_8$－Ｃ$_{20}$、アルケニルＣ$_8$－Ｃ$_{20}$、アルキニルＣ$_8$－Ｃ$_{20}$からなる群から選択され、前記アルキル、アルケニルまたはアルキニルにおいて、１つ以上の－ＣＨ$_2$－基は任意に、－ＣＨ（ＯＨ）－、
－ＯＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ－から選択される１つ以上の基で置換されていてもよい。

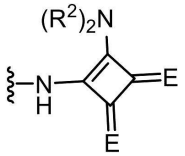
【００３５】

リンカーＸは、分子のアミン部分の、中心シクロヘキサンコアへの付着反応によって形成される。したがってこれらは、例えばエステル、アミドおよびそれらの類似体の形成などの、クリック反応（例えば、アジド－アルキン環化付加反応）を介して選択される反応に依拠する異なるリンカーであってもよい。

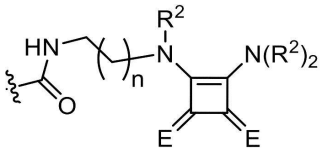
【００３６】

Ｘはそれゆえ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｓ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、－Ｃ（＝Ｓ）Ｓ－、
－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨＮＨ－、－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－、－ＯＣ（＝Ｏ）－、－Ｓ－、－ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨ－、－ＮＨＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＮＨＣ（＝Ｏ）－、
－Ｃ≡Ｃ－、－ＣＨ＝ＣＨ－、少なくとも２個の窒素原子を含む５員複素環、
－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｓ）Ｏ－、－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｓ）Ｓ－、－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨＮＨ－、－Ｎ＝ＣＨ－、
－ＣＨ＝Ｎ－、－ＮＨ－Ｎ＝ＣＨ－、および－ＣＨ＝Ｎ－ＮＨ－を含む群から選択される。好ましくは、Ｘは、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、少なくとも２個の窒素原子を含む５員複素環、－ＯＣ（＝Ｏ）－、および－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－から選択される。

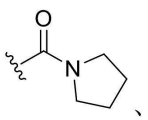
【００３７】
リンカーＹは、リンカーＸおよびシクロヘキサンコアから少なくともアミンの最小距離を提供するアルキレン鎖である。Ｙは、Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$アルキレン鎖、好ましくはＣ$_2$～Ｃ$_8$アルキレン鎖であり、ここで１つ以上の－ＣＨ$_2$－基は、任意に１つ以上のＯおよび／またはＳ原子で置換されていてもよい。
【００３８】
置換基Ｚは、式ＩおよびＩＩの化合物の特性をさらに修飾することができる。
【００３９】
一実施形態において、Ｚは、水素、－ＯＨ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨ、－ＮＨ$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_2$ＯＨ、－ＣＯＮ［（ＣＨ$_2$）$_2$ＯＨ］$_2$、
－ＣＯＮＨＣＨ（ＣＨ$_2$ＯＨ）$_2$、－ＣＯＮＨＣＨ$_2$ＣＨ（－ＯＨ）ＣＨ$_2$ＯＨ、－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_2$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$、
－ＣＯＮ［ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$］$_2$、－ＣＯＮＨＣＨ［Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$］$_2$、－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_2$ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$、
－Ｎ$^+$（ＣＨ$_3$）$_2$－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＳＯ$_3^-$、－Ｎ$^+$（ＣＨ$_3$）$_2$－（ＣＨ$_2$）$_2$－ＣＯＯ$^-$、
【化１０】



および
【化１１】

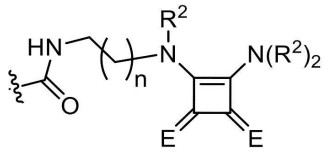


からなる群から選択され、
ここで、Ｒ^2、Ｅおよびｎは上記で定義した通りである。好ましくは、Ｚは、Ｈ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨであるか、またはＺが－ＯＨまたは－ＣＨ$_2$ＯＨであり、かつＴが－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨである場合、Ｚは、Ｔおよびそれらの間の３個の炭素原子とともに、４～５個の炭素原子を含む環状ラクトンを形成し得る。
【００４０】
置換基Ｔは、式ＩおよびＩＩの化合物の特性をさらに修飾し得る。一実施形態において、Ｔは、－Ｘ－Ｙ－Ｎ（Ｒ^1）$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$－Ｃ$_3$アルキル）、
－Ｃ（＝Ｏ）ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＯＨ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$、
【化１２】



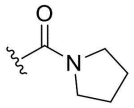
、
－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_2$ＯＨ、
－ＣＯＮ［（ＣＨ$_2$）$_2$ＯＨ］$_2$、－ＣＯＮＨＣＨ（ＣＨ$_2$ＯＨ）$_2$、－ＣＯＮＨＣＨ$_2$ＣＨ（－ＯＨ）ＣＨ$_2$ＯＨ、
－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_2$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$、－ＣＯＮ［ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$］$_2$、－ＣＯＮＨＣＨ［Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$］$_2$、
－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_2$ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$、－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_3$－Ｎ$^+$（ＣＨ$_3$）$_2$－（ＣＨ$_2$）$_2$－ＳＯ$_3^-$、

－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_3$－Ｎ$^+$（ＣＨ$_3$）$_2$－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＳＯ$_3$$^-$、－ＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_3$－Ｎ$^+$（ＣＨ$_3$）$_2$－（ＣＨ$_2$）$_2$－ＣＯＯ$^-$、
－ＣＯＯ（ＣＨ$_2$）$_2$－Ｏ－Ｐ（＝Ｏ）（Ｏ$^-$）－Ｏ（ＣＨ$_2$）$_2$－Ｎ$^+$（ＣＨ$_3$）$_3$、
【化１３】



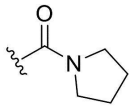
からなる群から選択され、

ここで、Ｒ^2、Ｅおよびｎは、上記で定義したとおりである。より好ましくは、Ｔは、－Ｘ－Ｙ－Ｎ（Ｒ^1）$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$－Ｃ$_3$アルキル）、
【化１４】



、

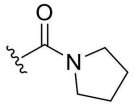
－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨからなる群から選択される。最も好ましくは、Ｔは、－Ｘ－Ｙ－Ｎ（Ｒ^1）$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＣＨ$_3$、
【化１５】



、

－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨからなる群から選択される。
【００４１】

具体的な一実施形態では、式Ｉのリピドイドは、水素、－ＯＨ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨからなる群から選択されるＺ；
および－Ｘ－Ｙ－Ｎ（Ｒ^1）$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_3$アルキル）、
【化１６】



、

－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨからなる群より選択されるＴ、を有し；

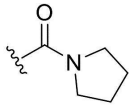
および／または、Ｚが－ＯＨまたは－ＣＨ$_2$ＯＨであり、かつＴが－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨである場合、ＺはＴおよびそれらの間の３個の炭素原子とともに、４～５個の炭素原子を含む環状ラクトンを形成し得る。好ましくは、式Ｉのリピドイドは以下の置換基を有する：

Ｘは、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－または－ＮＨＣ（＝Ｏ）－であり；

Ｙは、－（ＣＨ$_2$）$_3$－、－（ＣＨ$_2$）$_4$－、－（ＣＨ$_2$）$_5$－、および－（ＣＨ$_2$）$_6$－から選択され；

Ｒ^{1}は、－ＯＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－から選択される１つ以上の基で任意に置換されていてもよい直鎖または分岐鎖アルキルＣ$_{10}$－Ｃ$_{15}$、および－ＯＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－から選択される１つ以上の基で任意に置換されていてもよい直鎖または分岐鎖アルケニルＣ$_{12}$－Ｃ$_{18}$を含む群から選択され；

Ｔは、－Ｘ－Ｙ－Ｎ（Ｒ^1）$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＣＨ$_3$、
【化１７】



、

および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨから選択され；
Ｚは、Ｈ、－ＣＨ$_3$、および－ＣＨ$_2$ＯＨから選択される。
【００４２】
具体的には、以下のリピドイドが好ましい：
ｃｉｓ，ｃｉｓ－Ｎ^1，Ｎ^3，Ｎ^5－トリス（６－（ジドデシルアミノ）ヘキシル）シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボキサミド（３）；
ｃｉｓ，ｃｉｓ－Ｎ^1，Ｎ^3，Ｎ^5－トリス（６－（ジ（（ヘキシルオキシカルボニル）ブチル）アミノ）ヘキシル）シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボキサミド（７）；
ｃｉｓ，ｃｉｓ－Ｎ^1，Ｎ^3，Ｎ^5－トリス（６－（ジドデシルアミノ）ヘキシル）－１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１，３，５－トリカルボキサミド（８）；
ｃｉｓ，ｃｉｓ－Ｎ^1，Ｎ^3，Ｎ^5－トリス（３－（ジドデシルアミノ）プロピル）－１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１，３，５－トリカルボキサミド（１１）；
ｃｉｓ，ｃｉｓ－Ｎ^1，Ｎ^3，Ｎ^5－トリス（６－（ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）アミノ）ヘキシル）－１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１，３，５－トリカルボキサミド（１５）；
ヘキサ（オクタン－２－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’，６’’’’，６’’’’’，６’’’’’’－（（（（シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボニル）トリス（アザンジイル））トリス（ヘキサン－６，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサヘキサノエート（１９）；
ヘキサキス（３－メチルヘキシル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－７，７’，７’’，７’’’，７’’’’，７’’’’’，７’’’’’’－（（（（シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボニル）トリス（アザンジイル））トリス（ヘキサン－６，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサヘプタノエート（２３）；
ヘキサキス（（Ｅ）－３，７－ジメチルオクター２，６－ジエン－１－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－５，５’，５’’，５’’’，５’’’’，５’’’’’，５’’’’’’－（（（（シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボニル）トリス（アザンジイル））トリス（ヘキサン－６，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサペンタノエート（２７）；
ヘキサキス（（Ｚ）－３，７－ジメチルオクター２，６－ジエン－１－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－５，５’，５’’，５’’’，５’’’’，５’’’’’，５’’’’’’－（（（（シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボニル）トリス（アザンジイル））トリス（ヘキサン－６，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサペンタノエート（３１）；
テトラ（オクタン－２－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’－（（（（５－（メトキシカルボニル）シクロヘキサン－１，３－ジカルボニル）ビス（アザンジイル））ビス（ヘキサン－６，１－ジイル））ビス（アザントリイル））テトラヘキサノエート（３２）；
テトラキス（３－メチルヘキシル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－７，７’，７’’，７’’’－（（（（５－（メトキシカルボニル）シクロヘキサン－１，３－ジカルボニル）ビス（アザンジイル））ビス（ヘキサン－６，１－ジイル））ビス（アザントリイル））テトラヘプタノエート（３３）；
ｃｉｓ，ｃｉｓ－３，５－ビス（（６－（ビス（６－（オクタン－２－イルオキシ）－６－オキソヘキシル）アミノ）ヘキシル）カルバモイル）シクロヘキサン－１－カルボン酸（３５）；
テトラ（オクタン－２－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’－（（（（５－（ピロリジン－１－カルボニル）シクロヘキサン－１，３－ジカルボニル）ビス（アザンジイル））ビス（ヘキサン－６，１－ジイル））ビス（アザントリイル））テトラヘキサノエート（３６）；
ヘキサキス（３－メチルヘキシル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－７，７’，７’’，７’’’，７’’’’，７’’’’’，７’’’’’’－（（（（１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１，３，５－トリカルボニル）トリス（アザンジイル））トリス（ヘキサン－６，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサヘプタノエート（４０）；

ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’，６’’’’，６’’’’’－（（（（１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１，３，５－トリカルボニル）トリス（アザンジイル））トリス（ヘキサン－６，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサヘキサノエート（４１）；
ｃｉｓ，ｃｉｓ－３，５－ビス（（６－（ビス（６－（オクタン－２－イルオキシ）－６－オキソヘキシル）アミノ）ヘキシル）カルバモイル）－１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１－カルボン酸（４２）；
テトラ（オクタン－２－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’－（（（（１，３，５－トリス（（ベンジルオキシ）メチル）－５－（ビス（６－（オクタン－２－イルオキシ）－６－オキソヘキシル）カルバモイル）シクロヘキサン－１．３－ジカルボニル）ビス（アザンジイル））ビス（ヘキサン－６，１－ジイル））ビス（アザントリイル））テトラヘキサノエート（４５）；
ｃｉｓ，ｃｉｓ－１，３，５－トリス（（ベンジルオキシ）メチル）－３，５－ビス（（６－（ビス（６－（オクタン－２－イルオキシ）－６－オキソヘキシル）アミノ）ヘキシル）カルバモイル）シクロヘキサン－１－カルボン酸（４６）；
ヘキサ（オクタン－２－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’，６’’’’，６’’’’’，６’’’’’’－（（（１，３，５－トリス（ヒドロキシメチル）シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボニル）トリス（アザンジイル））トリス（ヘキサン－６，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサヘキサノエート（４７）；
ｃｉｓ，ｃｉｓ－３，５－ビス（（６－（ビス（６－（オクタン－２－イルオキシ）－６－オキソヘキシル）アミノ）ヘキシル）カルバモイル）－１，３，５－トリス（ヒドロキシメチル）シクロヘキサン－１－カルボン酸（４８）；
テトラ（オクタン－２－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’－（（（（１，３，５－トリス（（ベンジルオキシ）メチル）－５－（ピロリジン－１－カルボニル）シクロヘキサン－１，３－ジカルボニル）ビス（アザンジイル））ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（アザントリイル））テトラヘキサノエート（４９）；
テトラ（オクタン－２－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’－（（（（１，３，５－トリス（ヒドロキシメチル）－５－（ピロリジン－１－カルボニル）シクロヘキサン－１，３－ジカルボニル）ビス（アザンジイル））ビス（ヘキサン－６，１－ジイル））ビス（アザントリイル））テトラヘキサノエート（５０）；
ｃｉｓ，ｃｉｓ－N^{1}，N^{7}－ビス（６－（ジドデシルアミノ）ヘキシル）－５，７－ビス（ヒドロキシメチル）－４－オキソ－３－オキサビシクロ［３．３．１］ノナン－１，７－ジカルボキシアミド（５２）；
ｃｉｓ，ｃｉｓ－Ｎ，Ｎ’，Ｎ’’－（シクロヘキサン－１，３，５－トリイル）トリス（６－（ジドデシルアミノ）ヘキサンアミド）（５６）。

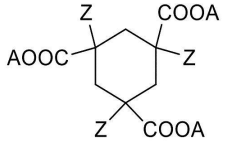
【００４３】

式ＩおよびＩＩの化合物は、１位、３位、５位の基Ｚおよび１位；１位および３位；または１位、３位および５位のリンカーＸの前駆基で置換されたシクロヘキサン前駆体と、一般式Ｘ’－Ｙ－Ｎ（R^{1}）$_2$の三級アミンとの対応する反応によって調製され、ここでＸ’はリンカーＸの前駆基である。好ましくは、Ｘ’は－NH_2または活性化カルボキシル基である。一般式Ｘ’－Ｙ－Ｎ（R^{1}）$_2$の三級アミンは、当業者にとって既知の反応および手順によって調製でき、いくつかの適したアミンは市販されてもいる。

【００４４】

一実施形態では、式Ｉの化合物は、好ましくは式ＩＩＩの化合物を式ＩＶのジアミンと反応させることによって調製され、

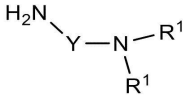
【化１８】



（ＩＩＩ）

ここで、ＡはＨ、ハロゲンまたはベンジルであり、

【化１９】



（ＩＶ）

任意に、ＭｅＯＨ、ＢｎＯＨから選択されるアルコールの存在下で反応させ、また、任意にピロリジン、縮合剤および／または塩基の存在下で反応させ、任意に水素化分解が続くか、または水素化分解が先行する。式ＩＩＩおよびＩＶにおいて、Ｒ^{1}、ＹおよびＺは、式Ｉについて上述した通りである。

【００４５】

より具体的な例では、式ＩＩの化合物は、好ましくは、Ａが水素である式ＩＩＩの化合物を、縮合剤および塩基の存在下で式ＩＶのジアミンと反応させることによって、またはＡがハロゲンである式ＩＩＩの化合物を、塩基の存在下で式ＩＶのジアミンと反応させることによって調製される。式ＩＩＩおよびＩＶにおいて、Ｒ^{1}、ＹおよびＺは、式ＩＩについて上述した通りである。

【００４６】

本発明の別の目的は、一般式ＩまたはＩＩの少なくとも１種のリピドイドと、少なくとも１種のヘルパー脂質とを含むトランスフェクション剤である。トランスフェクション剤は、成分を溶解および混合することにより溶液の形態で調製することができ、またはマイクロ流体混合などの従来のナノ粒子技術で使用される技術により粒子の形態で調製することができる。粒子は一般に、１～５００ｎｍの範囲の寸法を有するナノ粒子を意味すると理解される。好ましくは、ナノ粒子の寸法は３０から２５０ｎｍの範囲、さらに好ましくは４０から１５０ｎｍの範囲である。

【００４７】

一実施形態では、トランスフェクション剤は、少なくとも１種の一般式Ｉのリピドイドを１０～５０モル％の量で含有し、少なくとも１種のヘルパー脂質を５０～９０モル％の量で含有する。好ましくは、トランスフェクション剤は、少なくとも１種の一般式Ｉのリピドイドを１５～４０モル％の量で含有し、少なくとも１種のヘルパー脂質を６０～８５モル％の量で含有する。いくつかの好ましい実施形態では、トランスフェクション剤は、１５～４０モル％の量の少なくとも１種の一般式Ｉのリピドイド、３０～５５モル％量のコレステロール、および２０～５０モル％の量の少なくとも１つの他のヘルパー脂質を含む。

【００４８】

特に好ましい実施形態において、トランスフェクション剤は、１５～４０モル％の量の少なくとも１種の一般式Ｉのリピドイド、３０～５５モル％の量のコレステロール、２０～４５モル％の量の１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、および０．５～５モル％の量の１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール－２０００を含有する。

【００４９】

本発明はまた、少なくとも１種の一般式Ｉのリピドイド、少なくとも１種の核酸および／またはその一部および／または核酸誘導体、ならびに好ましくはさらに少なくとも１種のヘルパー脂質を含むトランスフェクション粒子に関する。トランスフェクション粒子は、例えば、任意にヘルパー脂質を含む一般式Ｉのリピドイドの溶液と、核酸および／またはその一部および／または核酸誘導体の溶液とを混合することによって、調製することができる。混合は、従来のナノ粒子技術で用いられている技術、例えばマイクロ流体混合によって行うことができる。

【００５０】

トランスフェクション粒子中の、一般式Ｉのリピドイドおよびヘルパー脂質の総量に対する、核酸および／またはその一部および／または核酸誘導体の総量の重量比は、好まし

くは１：２から１：５００の範囲、より好ましくは１：５から１：１００の範囲である。具体的に例示すると、以下の実施例で調製した粒子では、この比率はｍＲＮＡに対して約１：９、ｓｉＲＮＡに対して約１：６８であった。

【００５１】

トランスフェクション粒子は通常ナノ粒子であり、これは一般に１～５００ｎｍの範囲の寸法を有する粒子を意味すると理解される。典型的には、トランスフェクション・ナノ粒子の寸法は５０から２５０ｎｍの範囲であり、より好ましくは４０から１５０ｎｍである。

【００５２】

トランスフェクション粒子の構造を低温透過型電子顕微鏡で観察したところ、トランスフェクション粒子は内部に核酸を含むコンパクトな層状の脂質ナノ粒子であった。

【００５３】

トランスフェクション試薬およびトランスフェクション粒子に含まれるヘルパー脂質は、主に中性脂質、ステロール、または脂質と親水性ポリマーとの脂質コンジュゲートである。

【００５４】

中性脂質は、生理的条件下で正味の電荷がゼロであり、非荷電形態または電気的に中性な双性イオン形態で存在することができる。中性脂質は、例えば、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）、および１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－（Ｃｙａｎｉｎｅ　５）から選択することができる。

【００５５】

ステロールは、例えば、コレステロール、β－シトステロール、スチグマスタノール、カンペステロール、フコステロール、アベナステロール、フェコステロール、ブラシカステロール、エルゴステロール、および９，１１－デヒドロエルゴステロールから選択することができる。好ましくは、ステロールはコレステロールである。

【００５６】

親水性ポリマーを有する脂質コンジュゲートは、脂質部分と、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（２－エチル－２－オキサゾリン）、ポリ（２－メチル－２－オキサゾリン）、ポリ（グリセロール）、ポリ（サルコシン）などのポリマー部分とを含む。好ましくは、ポリマー部分は、約５００～約１０，０００Ｄａ、より好ましくは約１，０００～約５，０００Ｄａの範囲の分子量を有するポリ（エチレングリコール）からなる。親水性ポリマーとの脂質コンジュゲートは、例えば、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリ（エチレングリコール）－２０００、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－ポリ（エチレングリコール）－２０００、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミンポリ（エチレングリコール）－２０００、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミンポリ（エチレングリコール）－２０００、および類似のコンジュゲートから選択してもよい。親水性ポリマーとの脂質コンジュゲートは、好ましくは、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリ（エチレングリコール）－２０００であってもよい。

【００５７】

核酸またはその一部は、１つ以上のヌクレオチドおよび／またはデオキシヌクレオチドを含む。核酸またはその一部は、治療剤、診断剤または予防剤であってもよく、またはそれらがトランスフェクトされる細胞または組織に標識を提供してもよい。式Ｉの化合物はそれゆえ、主に治療的またはバイオテクノロジー的用途を有する。

【００５８】

用語「核酸またはその一部」は、好ましくはオリゴヌクレオチド（１～１００ヌクレオチド、例えばアプタマー）、環状ジヌクレオチド（例えば２’、３’－ｃＧＡＭＰ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、デオキシリボ核酸（一本鎖ＤＮＡ、二本鎖ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、遺伝子または遺伝子をコードするプラスミドＤＮＡ）、リボ核酸、典型的にはメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、二本鎖ＲＮＡ、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ＰｉｗｉＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）、アンチセンスＲＮＡ（ａｓＲＮＡ）、ＣＲＩＳＰＲシステムのためのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、およびそれらの組み合わせ（典型的には、例えばＣａｓ９ヌクレアーゼをコードするｇＲＮＡとｍＲＮＡ、Ｃａｓ１３ａ／Ｃ２ｃ２およびＣａｓ１３ｂ、または類似のヌクレアーゼであって、ＣＲＩＳＰＲ、ＣＲＩＳＰＲｉおよび他のバリエーションおよびその後の宿主細胞または組織のゲノムの改変または宿主細胞または組織のトランスクリプトームの改変における使用に適したもの）から選択される、１つ以上の核酸のタイプを意味すると理解される。さらに、本明細書に開示されるすべての核酸（ＮＡ）は、例えば、生物学的系における安定性を高めるために、合成塩基アナログにより形成または修飾され得る。合成ＮＡアナログは、特に、以下の置換を含む：２’－Ｏ－メチル、２’－Ｏ－メトキシ－エチル、２’－フルオロ、ペントース環の２’－酸素と４’－炭素との間のメチレン架橋（いわゆるロックされた核酸）、ストランドの５’末端および／または３’末端でのリン酸化、ボランホスホネート、またはホスホロチオエート。

【００５９】

本発明はさらに、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで細胞または組織を核酸および／またはその一部および／または核酸誘導体でトランスフェクトするための式Ｉのリピドイドまたはトランスフェクション剤またはトランスフェクション粒子の使用を含む。さらに、本発明は、ｉｎ　ｖｉｖｏでの核酸および／またはその一部および／または核酸誘導体による細胞または組織のトランスフェクション（工業的または商業的使用のためのヒト胚のトランスフェクションを除き、ヒト生殖系列の改変を除く）に使用するための式Ｉのリピドイドまたはトランスフェクション粒子を含む。

【００６０】

一般式Ｉのリピドイドを含むトランスフェクション粒子は、基礎研究における多くの生物学的用途、特に、活性核酸を送達するための細胞培養物または動物のトランスフェクション、およびそれに続く染色体遺伝子または遺伝子のサイレンシングまたは活性化、ゲノム編集（遺伝子切除、遺伝子挿入または突然変異導入）またはトランスクリプトーム編集、あるいはトランスフェクション粒子によって挿入された核酸によってコードされる所定のタンパク質の発現を可能にする、いわゆる「ｉｎ　ｔｒａｎｓ」に有用である。

【００６１】

獣医学およびヒト医学において、一般式Ｉのリピドイドを含むトランスフェクション粒子は、好ましくは、治療目的または予防目的で使用することができる。治療用核酸を含む粒子を動物またはヒトに投与して、染色体遺伝子をサイレンシングさせるか活性化させるか、免疫原をサイレンシングさせるか活性化させるか、シグナル伝達経路を阻害するか活性化させるか、ゲノムを編集（遺伝子切除、遺伝子挿入または突然変異導入）するかトランスクリプトームを編集するか、または核酸によってコードされるタンパク質の発現を可能にすることができる。

【００６２】

本発明はまた、医薬品として、特に遺伝子治療のために使用するための、一般式Ｉのリピドイドまたはトランスフェクション剤またはトランスフェクション粒子を提供する。特に、これらは、悪性腫瘍および／または遺伝性疾患の治療における使用に適している。

【００６３】

一般式（Ｉ）のリピドイドまたは本発明によるトランスフェクション剤またはトランスフェクション粒子は、予防ワクチン、好ましくは感染症の予防のためのワクチンとしての使用にも適している。

【００６４】

一般式Ｉのリピドイドまたはトランスフェクション粒子は、薬学的に許容される賦形剤との製剤の形態で、治療用、化粧用またはバイオテクノロジー用に製剤化することができる。製剤は液体または固体の形態であり得る。液体形態には、例えば注射または経口投与に適合した溶液、懸濁液、分散液、ゲル、軟膏が含まれる。固体形態としては、例えば、カプセル剤、錠剤、コーティング錠剤、粉末剤、坐剤などが挙げられる。

【００６５】

液体製剤は、不活性ガスによってネブライジングすることができる。ネブライジングされた懸濁液は、直接、またはネブライジングデバイスから吸入することができ、ネブライジングデバイスはフェイスマスクまたは呼吸器に取り付けることができる。固形製剤は、乾燥粉末吸入器を用いて投与することができる。懸濁液または乾燥粉末製剤は、適切なデバイスから経口または経鼻投与することができる。

【００６６】

皮膚または粘膜に適用するために、製剤は、クリーム、ゲル、軟膏、ペースト、バーム、液体等の形態で調製することもでき、作用部位に直接適用することができる。

【００６７】

薬学的に許容される賦形剤としては、溶媒、溶解度調整剤、ｐＨ調整剤、担体、充填剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、保存剤、吸着剤、粘度調整剤、製剤の味、匂い、色などの官能特性に影響を与える薬剤などが挙げられる。

【００６８】

さらに、一般式Ｉのリピドイドまたはトランスフェクション剤もしくはトランスフェクション粒子は、活性物質を作用部位に送達するために、好ましくは化粧品産業の目的に使用することができる。活性物質を有するトランスフェクション粒子は、クリーム、ゲル、軟膏、ペースト、バーム、液体などの形態で調製することができ、メークアップ、毛髪化粧品または個人衛生製品として使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【００６９】

【図１】リピドイド３および７の合成スキーム。

【図２】リピドイド８および１１の合成スキーム。

【図３】リピドイド１５の合成スキーム。

【図４】リピドイド１９および２３の合成スキーム。

【図５】リピドイド２７および３１の合成スキーム。

【図６】リピドイド３２、３３、３５、および３６の合成スキーム。

【図７】前駆体３９および４４ならびにリピドイド４０－４２の合成スキーム。

【図８】リピドイド４７、４８、５０、および５２の合成スキーム。

【図９】リピドイド５６の合成スキーム。

【図１０】組織学的に分析したベンチマークＬＮＰ（Ｂ４５）と比較した、マウス肝臓におけるｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｂ４０）の機能的送達。

【図１１】ゲノムＤＮＡのＰＣＲ増幅によって解析したベンチマークＬＮＰ（Ｂ４５）と比較した、マウス肝臓におけるｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｂ４０）の機能的送達。１から４までのレーンはＢ４０に関する。５から８までのレーンはＢ４５に関する。

【発明を実施するための形態】

【００７０】

（実施例）

略語のリスト：

ｅｑ．	等価
Ｒｆ	リテンション・ファクター
ＴＬＣ	薄層クロマトグラフィー
ＲＶＥ	ロータリー真空蒸発器
ｒｔ	室温
ｖ／ｖ	体積／体積

ｂｒ　ｓ　ブロード信号
ｓ　シングル
ｄ　ダブレット
ｔ　トリプレット
ｍ　マルチプレット
ｄｄ　ダブレットのダブレット
Ｊ　相互作用定数
δ　化学シフト
ＨＲＭＳ　高分解能質量分析
ＥＩ　電子イオン化
ＥＳＩ　エレクトロスプレーイオン化
ＭＡＬＤＩ　マトリックス支援レーザー脱離イオン化
ＧＣ－ＭＳ　ガスクロマトグラフ－質量分析
ＩＲ　赤外分光法
ＮＭＲ　核磁気共鳴
ＣＥ５　９５：５（ｖ／ｖ）シクロヘキサン－酢酸エチル混合物
ＣＥ２０　８０：２０（ｖ／ｖ）シクロヘキサン－酢酸エチル混合物
ＣＥ５０　５０：５０（ｖ／ｖ）シクロヘキサン－酢酸エチル混合物
Ｄ１　７５：２２：３（ｖ／ｖ／ｖ）ジクロロメタン－メタノール－２５％水性NH_3混合物
Ｄ２　１７５：２２：３（ｖ／ｖ／ｖ）ジクロロメタン－メタノール－２５％水性NH_3混合物
Ｄ３　２７５：２２：３（ｖ／ｖ／ｖ）ジクロロメタン－メタノール－２５％水性NH_3混合物
Ｄ４　３７５：２２：３（ｖ／ｖ／ｖ）ジクロロメタン－メタノール－２５％水性NH_3混合物
ＴＦＡ　トリフルオロ酢酸
ＤＩＰＥＡ　Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン
ＤＭＦ　Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド
ＤＣＭ　ジクロロメタン
ＡＣＮ　アセトニトリル
ＤＩＣ　ジイソプロピルカルボジイミド
ＤＭＡＰ　４－ジメチルアミノピリジン
ＰｙＢｒｏＰ　ブロモトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート
ＴＣＥ　１，１，２，２－テトラクロロエタン
ＬＮＰ　脂質ナノ粒子
ＮＡ　核酸
ＤＮＡ　デオキシリボ核酸
ＲＮＡ　リボ核酸
ｍＲＮＡ　メッセンジャーＲＮＡ
ｓｉＲＮＡ　短鎖干渉ＲＮＡ
ｔＲＮＡ　トランスファーＲＮＡ
ｍｉＲＮＡ　マイクロＲＮＡ
ｓｓＤＮＡ／ＲＮＡ　一本鎖ＤＮＡ／ＲＮＡ
ｄｓＤＮＡ／ＲＮＡ　二本鎖ＤＮＡ／ＲＮＡ
ＤＭＧ－ＰＥＧ$_{2000}$　１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール－２０００
ＤＯＰＥ　１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン
ＤＯＰＣ　１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン
ＤＳＰＣ　１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン

ＤＯＰＥ－Ｃｙ５　　１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－（Ｃｙａｎｉｎｅ　５）
Ｌｉｐ２０００　　Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）２０００　（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）
ｈ　　時間（ｈｏｕｒ）
実施例１
Ｎ^{1}，Ｎ^{1}－ジドデシルエタン－１，６－ジアミン　２
塩化カルシウム乾燥管とマグネチックスターラーを備えた５００ｍｌ丸底フラスコに、ＤＣＭ（１００ｍｌ）中のＮ^{1}－ｔｅｒｃ－ブチルオキシカルボニル－１，６－ジアミノヘキサン（５．０ｇ、２３．１１ｍｍｏｌ）の溶液を入れ、氷浴で０℃に冷却した。激しく攪拌しながら、ｎ－ドデシルアルデヒド（１５．３８ｍｌ、６９．３４ｍｍｏｌ、３ｅｑ．）を加え、続いてトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム（１４．７０ｇ、６９．３４ｍｍｏｌ、３ｅｑ．）を１０分かけて３回に分けて加えた。冷却浴を除去し、反応混合物を室温で２時間撹拌した。反応の進行は、あらかじめアンモニアで飽和させたＴＬＣプレート上で、８０：２０（ｖ／ｖ）ヘキサン－酢酸エチル移動相を用いたＴＬＣでモニターした（ニンヒドリンで検出）。反応終了後、ＮａＯＨ水溶液（１Ｍ、２００ｍｌ）を加え、反応混合物を１５分間撹拌した後、分液漏斗に注ぎ、水（３００ｍｌ）で希釈した。生成物をＤＣＭ（３００ｍｌ、２×５０ｍｌ）で抽出し、合わせた有機相をブライン（５０ｍｌ）で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、Ｓ２フリットで濾過し、溶媒をＲＶＥで蒸発させた。暗いオイル状の残渣を、ヘキサン中の酢酸エチルの直線勾配（１０－３０％）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。アミン１（３．６７ｇ，２８．７％）を黄色がかったオイルとして得た。
【００７１】
ＤＣＭ（１０ｍｌ）中の化合物１の溶液にトリフルオロ酢酸（１０ｍｌ）を加え、氷浴中で撹拌しながら０℃に冷却し、反応混合物を０℃で３時間放置した。次いで、溶液を１ｌのセパラブルフラスコに注ぎ、２０％水性Na_2CO_3（３００ｍｌ）で希釈し、生成物をＤＣＭ（２５０ｍｌ、２×５０ｍｌ）で抽出した。合わせた有機相をブライン（１００ｍｌ）で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、Ｓ２フリットで濾過し、溶媒をＲＶＥで蒸発させた。粗生成物を、ＤＣＭ中のＤ１の直線勾配（０－７０％）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。ジアミン２（２．１７ｇ、収率７２．２％；あらかじめアンモニアで飽和させたＴＬＣプレート上の移動相Ｄ２でR_f　０．３１、ニンヒドリンで検出）が黄色がかったオイルの形で得られた。
【００７２】
^{1}Ｈ　ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝２．７３，２．６５，２．５７，１．５６，１．５２，１．５１，１．３６，１．３１，１．２８，１．２５－１．２９，１．２４，０．８７ｐｐｍ。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝５３．５１，５３．２０，４１．６２，３２．４０，３１．８９，２９．６３，２９．６１，２９．５７，２９．４４，２９．３２，２７．３９，２７．０９，２６．５３，２５．６５，２５．０２，２２．６６，１４．１０ｐｐｍ。ＩＲ（ｆｉｌｍ）：ν_{max}／ｃｍ$^{-1}$＝３３７４ｗおよび３２９４ｗ（νNH_2），２７９７ｍ（$\nu_s N-CH_2$），２９５６ｓ（$\nu_{as} CH_3$），２９２４ｖｓ（$\nu_{as} CH_2$），２８５３ｓ（$\nu_s CH_2$），１４６７ｍおよび１４５５ｍ，ｓｈ（$\beta_s CH_2$および$\delta_{as} CH_3$），１３７８ｗおよび１３６７ｗ（$\delta_s CH_3$），７２１ｍ（$\beta_{as} CH_2$）。ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）：$C_{30}H_{65}N_2$［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$に対して計算されたｍ／ｚは４５３．５１４２３であり；実測値は４５３．５１３４０であった。
【００７３】
ｃｉｓ，ｃｉｓ－Ｎ^{1}，Ｎ^{3}，Ｎ^{5}－トリス（６－（ジドデシルアミノ）ヘキシル）シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボキサミド　３
ｃｉｓ，ｃｉｓ－１，３，５－シクロヘキサントリカルボン酸（１７ｍｇ，０．０７９ｍｍｏｌ）にＤＭＦ（２μｌ）およびチオニルクロリド（３００μｌ）を加え、懸濁液を

密閉バイアル中で７０℃で３０分間撹拌し、反応混合物を徐々に均一な無色溶液に清澄化した。過剰のＳＯＣｌ$_2$を７０℃で乾燥窒素気流で吹き飛ばし、残渣を真空下で乾燥させ（１０分間）、ｒｔまで冷却した。Ｎ^1，Ｎ^1－ジドデシルヘキサン－１，６－ジアミン２（１４２ｍｇ，０．３１５ｍｍｏｌ，４ｅｑ．）とＤＩＰＥＡ（１３７μｌ，０．７８６ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）の溶液をＤＣＭ（１．５ｍｌ）とＤＭＦ（０．５ｍｌ）の混合物中に、注射器を用いて隔壁を介して加え、反応混合物を１０分間撹拌した。その後、反応混合物をクロマトグラフィー用シリカゲル（１０ｇ）に吸着させ、溶媒をＲＶＥで除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（４０ｇ）により、ＤＣＭ中Ｄ１の直線勾配（０～５５％）を用いて精製した。リピドイド３が黄色がかった半固体の形で得られた（８１ｍｇ、収率６７．７％；移動相Ｄ２でＲ$_f$　０．３６、ニンヒドリンで検出）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝７．８０，３．２０，３．０２－２．９６，２．６０，２．０７，１．８１－１．７４，１．３７，１．３２５，１．２８－１．２３，０．８７ｐｐｍ。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝１７５．９０，５２．８５，５２．２２，４２．８３，３９．４２，３１．８７，３１．６６，２９．５８，２９．４８，２９．４３，２９．３０，２９．０８，２６．８４，２６．１８，２６．００，２３．５０，２３．１６，２２．６５，１４．０９ｐｐｍ。ＩＲ（ＣＣｌ$_4$）：ν$_{max}$／ｃｍ$^{-1}$＝３２９３ｍ（νＮＨ），１６４０ｓ（アミドＩ）および１５５０ｍ（アミドＩＩ），２９６４ｓ，ｓｈ（ν$_{as}$ＣＨ$_3$），２８７１ｍ，ｓｈ（ν$_s$ＣＨ$_3$），２９２７ｖｓ（ν$_{as}$ＣＨ$_2$）、２８５６ｓ，ｓｈ（ν$_s$ＣＨ$_2$），１４６８ｍおよび１４６０ｍ，１４４５ｗ（β$_s$ＣＨ$_2$およびδ$_{as}$ＣＨ$_3$），１３７８ｗ（δ$_s$ＣＨ$_3$），７２１ｗ（β$_{as}$ＣＨ$_2$およびδ$_{as}$ＣＨ$_2$）；ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：Ｃ$_{99}$Ｈ$_{199}$Ｎ$_6$Ｏ$_3$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１５２０．５５９８であり；実測値は１５２０．５５９８を見出した。

【００７４】

実施例２

Ｎ^1，Ｎ^1－ジ（（ヘキシルオキシカルボニル）ブチル）ヘキサン－１，６－ジアミン６

１－ヘキサノール（２．４８ｍｌ，１９．８９ｍｍｏｌ，１．２ｅｑ．）、ＤＭＡＰ（６１ｍｇ，０．５０ｍｍｏｌ，０．０３ｅｑ．）およびＤＩＣ（３．３７ｍｌ，２１．５４ｍｍｏｌ，１．３ｅｑ．）をＤＣＭ（６０ｍｌ）中の５－ブロモペンタン酸（３．００ｇ，１６．５７ｍｍｏｌ）の溶液に加え、反応混合物をｒｔで１時間撹拌した。その後、反応混合物をクロマトグラフィー用シリカゲル（１６ｇ）に吸着させ、溶媒をＲＶＥで除去し、残渣をシクロヘキサン中の酢酸エチルの直線勾配（０～１０％）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー（８０ｇ）で精製した。５－ブロモペンタン酸ヘキシル　４（３．９３８ｇ，収率８９．６％；移動相ＣＥ５でＲ$_f$　０．３１，ＫＭｎＯ$_4$検出）を無色液体として得た。

【００７５】

５－ブロモペンタン酸ヘキシル　４（１．５３ｇ，５．７８ｍｍｏｌ，２．５ｅｑ．）および無水Ｋ$_2$ＣＯ$_3$（３．１９ｇ，２３．１１ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）を、Ｎ^1－ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル－１，６－ジアミノヘキサン（０．５０ｇ，２．３１ｍｍｏｌ）の無水ＡＣＮ（１０ｍｌ）中溶液に加え、反応混合物を３５℃で２日間激しく撹拌した。その後、反応混合物をクロマトグラフィー用シリカゲル（１６ｇ）に吸着させ、溶媒をＲＶＥで除去し、残渣をシクロヘキサン中の酢酸エチルの直線勾配（０－１００％）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー（４０ｇ）で精製した。アミン５がわずかに黄色がかったオイルの形で得られた（１．０８０ｇ、収率７９．９％；アンモニアであらかじめ飽和させたＴＬＣプレート上の移動相ＣＥ５０でＲ$_f$　０．３１、ニンヒドリンで検出）。

【００７６】

トリフルオロ酢酸（４ｍｌ）を、氷浴中で撹拌しながら０℃に冷却したＤＣＭ（４ｍｌ）中の化合物５の溶液に添加し、反応混合物を０℃で１時間放置した。次いで、溶液を５

００ｍｌのセパラブルフラスコに注ぎ、２０％水性ＮａＨＣＯ$_3$（２００ｍｌ）で希釈し、生成物をＤＣＭ（１５０ｍｌ、２×５０ｍｌ）で抽出した。合わせた有機相をブライン（５０ｍｌ）で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、Ｓ２フリットで濾過し、クロマトグラフィシリカゲル（１６ｇ）に吸着させ、溶媒をＲＶＥで除去し、残渣をＤＣＭ中のＤ１の直線勾配（０～８０％）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィ（４０ｇ）で精製した。ジアミン６を黄色がかったオイルとして得た（０．７８８ｇ、収率８６．９％；移動相Ｄ２でR_f ０．１４、ニンヒドリンで検出）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝４．０５，３．６３，３．２１，３．１５，２．７９，２．６８，２．６０，２．５１，２．４２，２．３２，１．６１，１．５０，１．３６－１．２８，０．８８ｐｐｍ。^{13}Ｃ ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝１７３．６２，６４．５２，５３．６８，５３．２９，４１．２２，４０．２６，３４．０３，３１．４１，２８．５８，２５．７５，２５．５７，２２．８０，２２．５１，１３．９８ｐｐｍ。ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）：$C_{28}H_{57}O_4N_2$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは４８５．４３１２８であり；実測値は４８５．４３０５２であった。

【００７７】

ｃｉｓ，ｃｉｓ－Ｎ^1，Ｎ^3，Ｎ^5－トリス（６－（ジ（（ヘキシルオキシカルボニル）ブチル）アミノ）ヘキシル）シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボキサミド　７

実施例１のリピドイド３について記載した手順に従って、ｃｉｓ，ｃｉｓ－１，３，５－シクロヘキサンカルボン酸（２１ｍｇ，０．０９７ｍｍｏｌ）、Ｎ^1，Ｎ^1－ジ（（ヘキシルオキシカルボニル）ブチル）ヘキサン－１，６－ジアミン６（１８８ｍｇ，３８９ｍｍｏｌ，４ｅｑ．）およびＤＩＰＥＡ（１６９μｌ，０．９７１ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）からリピドイド７を調製した。リピドイド７（５５ｍｇ，３５％；移動相Ｄ２でR_f ０．４２、ニンヒドリンで検出）を黄色がかった半固形物として得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝６．２３，４．０５，３．２０５，２．６５，２．３４，２．３０，２．０８５，１．６３－１．６０，１．４９，１．３３－１．２９，０．８８ｐｐｍ。^{13}Ｃ ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝１７４．３５，１７３．３７，６４．６０，５３．３５，５２．８８，４３．９８，３９．１２，３３．７９，３１．９４，３１．４０，２９．２１，２８．５７，２６．６２，２６．３３，２５．５６，２２．５８，２２．５１，１３．９８ｐｐｍ。ＩＲ（ＣＣｌ$_4$）：ν_{max}／ｃｍ$^{-1}$＝１７３６ｖｓ（ν_sＣ＝Ｏ），１１７３ｍ，１０７５ｗ（ν_sＣ－Ｏ），３２９３ｍ（νＮＨ），１６４０ｓ（アミドＩ）および１５５１ｍ（アミドＩＩ），２９５５ｓ（ν_{as}ＣＨ$_3$）、２９３３ｖｓ（ν_{as}ＣＨ$_2$），２８７５ｍ，ｓｈ（ν_sＣＨ$_3$），２８６０ｍ（ν_sＣＨ$_2$），１４６７ｍおよび１４６０ｍ（β_sＣＨ$_2$およびδ_{as}ＣＨ$_3$），１３７９ｗ（δ_sＣＨ$_3$），７２４ｗ（β_{as}ＣＨ$_2$およびγ_{as}ＣＨ$_2$）。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{93}H_{175}N_6O_{15}$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１６１６．３１１０であり；実測値は１６１６．３０９５であった。

【００７８】

実施例３

ｃｉｓ，ｃｉｓ－Ｎ^1，Ｎ^3，Ｎ^5－トリス（６－（ジドデシルアミノ）ヘキシル）－１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１，３，５－トリカルボキサミド　８

実施例１のリピドイド３について記載した手順に従って、ｃｉｓ，ｃｉｓ－１，３，５－トリメチル－１，３，５－シクロヘキサントリカルボン酸（２０ｍｇ，０．０７７ｍｍｏｌ）、Ｎ^1，Ｎ^1－ジ（ドデシル）ヘキサン－１，６－ジアミン２（１４０ｍｇ，３１０ｍｍｏｌ，４ｅｑ．）およびＤＩＰＥＡ（１３５μｌ，０．７７４ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）からリピドイド８を調製した。リピドイド８（６４ｍｇ，５３％；移動相Ｄ２でR_f ０．４３、ニンヒドリンで検出）をわずかに黄色がかった固体オイルの形で得た。ＩＲ（ＣＣｌ$_4$）：ν_{max}／ｃｍ$^{-1}$＝３２８８ｗ，ｂｒ（νＮＨ），１６５１ｍ（アミドＩ），１５８５ｗ，ｂｒ，ｓｈおよび１５５９ｍ，ｂｒ（アミドＩＩ），２９５６ｓ（ν_{as}ＣＨ$_3$），２９２７ｖｓ（ν_{as}ＣＨ$_2$）、２８７８ｍ，ｓｈ（ν_sＣＨ$_3$），２８５５ｓ（ν_sＣＨ$_2$），１４６８ｍ，および１４５９ｍ，ｓｈ，１４４８ｍ，ｓｈ（β_sＣＨ$_2$お

よびδ$_{as}$CH$_3$），１３７８ｗ（δ$_s$CH$_3$）；７２１ｗ（β$_{as}$CH$_2$およびγ$_{as}$CH$_2$）。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：C$_{102}$H$_{205}$N$_6$O$_3$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１５６２．６０６８であり；実測値は１５６２．６０１１であった。

【００７９】

実施例４

Ｎ^1，Ｎ^1－ジドデシルプロパン－１，３－ジアミン　１０

実施例１の化合物１について記載した手順に従って、Ｎ^1－ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル－１，３－ジアミノプロパン（６．０ｇ，３４．４３ｍｍｏｌ）、ｎ－ドデシルアルデヒド（２２．９１ｍｌ，１０３．３０ｍｍｏｌ，３ｅｑ．）およびトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム（２１．８９ｇ，１０３．３ｍｍｏｌ，３ｅｑ．）からアミン９を調製した。アミン９を黄色がかったオイルとして得た（７．７２ｇ，４３．９％）。

【００８０】

アミン９の脱保護は、実施例１の化合物２について記載した手順に従って行った。ジアミン１０（４．２６ｇ，６８．６％；；あらかじめアンモニアで飽和させたＴＬＣプレート上の移動相Ｄ２でＲ$_f$　０．３５，ニンヒドリンで検出）を黄色がかったオイルの形で得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝３．０７，２．７０，２．５０，１．８１，１．４６，１．２８，１．２６，１．２５－１．２９，１．２４，０．８７ｐｐｍ。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝５３．７０，５３．３０，４１．１８，３１．９０，２９．６４，２９．６２，２９．６０，２９．５８，２９．４８，２９．３３，２７．４２，２５．７１，２３．８７，２２．６７，１４．１０ｐｐｍ。ＩＲ（ｆｉｌｍ）：ν$_{max}$／ｃｍ$^{-1}$＝３３６１ｗおよび３２７４ｗ（νＮＨ$_2$），２８０３ｍ（ν$_s$Ｎ－ＣＨ$_2$），２９５４ｓ（ν$_{as}$ＣＨ$_3$），２９２４ｖｓ（ν$_{as}$ＣＨ$_2$），２８５３ｓ（ν$_s$ＣＨ$_2$），１４６７ｍおよび１４５６ｍ，ｓｈ（β$_s$ＣＨ$_2$およびδ$_{as}$ＣＨ$_3$），１３７８ｗおよび１３６４ｗ（δ$_s$ＣＨ$_3$），７２０ｍ（β$_{as}$ＣＨ$_2$）。ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）：C$_{27}$H$_{59}$N$_2$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは４１１．４６７２８であり；実測値は４１１．４６６５２であった。

【００８１】

ｃｉｓ，ｃｉｓ－Ｎ^1，Ｎ^3，Ｎ^5－トリス（３－（ジドデシルアミノ）プロピル）－１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１，３，５－トリカルボンアミド　１１

実施例１のリピドイド３について記載した手順に従って、ｃｉｓ，ｃｉｓ－１，３，５－トリメチル－１，３，５－シクロヘキサントリカルボン酸（２０ｍｇ，０．０７７ｍｍｏｌ）、Ｎ^1，Ｎ^1－ジ（ドデシル）プロパン－１，３－ジアミン１０（１２７ｍｇ，３１０ｍｍｏｌ，４ｅｑ．）およびＤＩＰＥＡ（１３５μｌ，０．７７４ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）からリピドイド１１を調製した。リピドイド１１（４１ｍｇ、収率３７％；移動相Ｄ２でＲ$_f$　０．３６、ニンヒドリンで検出）をわずかに黄色がかった固体オイルの形で得た。ＩＲ（ＣＣｌ$_4$）：ν$_{max}$／ｃｍ$^{-1}$＝３３０ｗ，ｖｂｒ（νＮＨ），１６７９ｓ，ｓｈ（アミドＩ），１５１３ｗ，ｂｒ，ｓｈ（アミドＩＩ），２９５６ｓ（ν$_{as}$ＣＨ$_3$），２９２７ｖｓ（ν$_{as}$ＣＨ$_2$），２８７８ｍ，ｓｈ（ν$_s$ＣＨ$_3$），２８５５ｓ（ν$_s$ＣＨ$_2$），１４６４ｍ，ｓｈ（β$_s$ＣＨ$_2$およびδ$_{as}$ＣＨ$_3$），１３８０ｗ（δ$_s$ＣＨ$_3$）；７２１ｗ（β$_{as}$ＣＨ$_2$およびγ$_{as}$ＣＨ$_2$）。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：C$_{93}$H$_{187}$N$_6$O$_3$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１４３６．４６６５であり；実測値は１４３６．４６２９であった。

【００８２】

実施例５

リノールアルデヒド　１２

デス－マーチンペルヨージナン（４．４５ｇ，１０．４９ｍｍｏｌ，１．３ｅｑ．）を、氷浴で０℃に冷却したＤＣＭ（１２０ｍｌ）中のリノレイルアルコール（２．５０ｍｌ，８．０７ｍｍｏｌ）の溶液に加え、混合物を０℃で４時間撹拌した。その後、チオ硫酸ナトリウム水溶液（２０ｇ　Ｎａ$_2$Ｓ$_2$Ｏ$_3$・５Ｈ$_2$Ｏ／１００ｍｌ　Ｈ$_2$Ｏ）と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（５０ｍｌ）を加え、最初は乳白色だった溶液が透明になるまでｒ

ｔで１時間撹拌した。溶液を１０００ｍｌのセパラブルフラスコに注ぎ、水（１５０ｍｌ）で希釈し、生成物をＤＣＭ（１５０ｍｌ、２ｘ５０ｍｌ）で抽出した。合わせた有機相をブライン（１５０ｍｌ）で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、Ｓ２フリットで濾過し、溶媒をＲＶＥ上で蒸発させた。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（アイソクラティック条件、シクロヘキサン中酢酸エチル５％）で精製した。アルデヒド１２（１．２７１ｇ，収率５９．６％；移動相ＣＥ５でＲｆ　０．３６，$KMnO_4$で検出）を無色オイルとして得た。

【００８３】

N^1，N^1－ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）ヘキサン－１，６－ジアミン　１４

実施例１の化合物１について記載した手順に従って、N^1－ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル－１，６－ジアミノヘキサン（０．３４５ｇ，１．５９ｍｍｏｌ）、アルデヒド１２（１．２７ｇ，４．７８ｍｍｏｌ，３ｅｑ．）およびトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム（１．０１ｇ，４．７８ｍｍｏｌ，３ｅｑ．）からアミン１３を調製した。アミン１３を黄色がかったオイルとして得た（１．０８ｇ、収率９４．９％；移動相ＣＥ２０でＲｆ　０．１８、ニンヒドリンで検出）。

【００８４】

アミン１３の脱保護を、ＴＦＡ（４ｍｌ）およびＤＣＭ（５ｍｌ）の混合物中で、実施例１の化合物２について記載した手順に従って行い、ジアミン１４（０．５９４ｇ、６４．０％；移動相Ｄ２でＲｆ　０．１３、ニンヒドリンで検出）を黄色がかったオイルとして得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝５．３０－５．４０，２．７６５，２．７３，２．６７，２．５９，２．０４，１．５１，１．３８５，１．３７，１．３４，１．２９５，１．２９，１．２８－１．３４，１．２８，０．８８ｐｐｍ。^{13}ＣＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝１３０．１９，１３０．０６，１２７．９９，１２７．８９，５３．４９，５３．４５，４１．６７，３２．５２，３１．５０，２９．６２，２９．４６，２９．２０－２９．４８，２７．３７，２７．２０，２７．１８，２６．５２，２５．６１，２２．５６，１４．０６ｐｐｍ。ＩＲ（CCl_4）：ν_{max}／cm^{-1}＝３０１１ｓ（ν_{as}＝ＣＨ）；１６４６－１６７３ｍ（νＣ＝Ｃ）；３４５５ｗ（$\nu_{as}NH_2$）；３３９４（$\nu_{s}NH_2$）；１６２０ｗ（$\beta_{s}NH_2$）；１０８７ｍ（νＣ－NH_2）；２９５７ｓ，ｓｈ（$\nu_{as}CH_3$）；２９２８ｖｓ（$\nu_{as}CH_2$）；２８７３ｓ，ｓｈ（$\nu_{s}CH_3$）；２８５６ｖｓ（$\nu_{s}CH_2$）；２８０１ｍ（ν_{s}Ｎ－CH_2）；１４６７ｍおよび１４５７ｍ，ｓｈ（$\beta_{s}CH_2$および$\delta_{as}CH_3$）；１３７８ｍ（$\delta_{s}CH_3$）；７２１ｍ（β_{as}および$\gamma_{as}CH_2$）。ＨＲＭＳ：$C_{42}H_{81}N_2$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは６１３．６３９４３であり；実測値は６１３．６３８９９であった。

【００８５】

ｃｉｓ，ｃｉｓ－N^1，N^3，N^5－トリス（６－（ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）アミノ）ヘキシル）－１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１，３，５－トリカルボキサミド　１５

リピドイド１５は、ｃｉｓ，ｃｉｓ－１，３，５－トリメチル－１，３，５－シクロヘキサンカルボン酸（１７ｍｇ，０．０６６ｍｍｏｌ）、N^1，N^1－ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）ヘキサン－１，６－ジアミン１４（１６１ｍｇ，２７３ｍｍｏｌ，４ｅｑ．）およびＤＩＰＥＡ（１１５μｌ，０．６５８ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）から、実施例１のリピドイド３について記載した手順に従って調製した。リピドイド１５（８６ｍｇ、収率６４％；移動相Ｄ２でＲｆ　０．３６、ニンヒドリンで検出）を淡黄色固体として得た。ＩＲ（CCl_4）：ν_{max}／cm^{-1}＝３３４８ｗ，ｂｒ，ｓｈおよび３３０２ｗ，ｂｒ（νＮＨ），１６５６ｍおよび１６３５ｍ，ｓｈ（アミドＩ＋νＣ＝Ｃ），１５６５ｗ，ｓｈおよび１５５７ｗ，ｂｒ（アミドＩＩ）、３０１１ｍ（ν_{as}＝Ｃ－Ｈ），２９５６ｓ（$\nu_{as}CH_3$），２９２９ｖｓ（$\nu_{as}CH_2$），２８７５ｍ，ｓｈ（$\nu_{s}CH_3$），２８５６ｓ（$\nu_{s}CH_2$），１４６７ｍおよび１４５０

m，ｓｈ，（$\beta_s CH_2$および$\delta_{as} CH_3$），１３７９ｗ（$\delta_s CH_3$）；７２０ｗ（$\beta_{as} CH_2 + \gamma_{as} CH_2 + \gamma = C-H$）。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{138}H_{253}N_6O_3$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは２０４２．９８２９であり；実測値は２０４２．９８６１であった。

【００８６】

実施例６

化合物１８

ＤＩＣ（４．４１ｍＬ、２８．７ｍｍｏｌ、１．６ｅｑ）およびＤＭＡＰ（８８ｍｇ、０．７２ｍｍｏｌ、０．０４ｅｑ）を、ＤＣＭ（３０ｍＬ）中の６－ブロモヘキサン酸（３．５０ｇ、１７．９ｍｍｏｌ）およびオクタン－２－オール（３．５１ｇ、２６．９ｍｍｏｌ，１．５ｅｑ．）をＤＣＭ（３０ｍＬ）に溶解し、混合物をｒｔで一晩撹拌した。次いで、反応混合物をシリカ（１６ｇ）に吸着させ、溶媒をｉｎ　ｖａｃｕｏで蒸発させた。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（８０ｇ、シクロヘキサン中の酢酸エチルの直線勾配で溶出、０－１０％）で精製し、化合物１６（４．０２ｇ，７７％；ＣＥ５中でＲｆ　０．４１，$KMnO_4$により可視化）を無色オイルとして得た。

【００８７】

ブロモエステル１６（４．００ｇ，１３．１ｍｍｏｌ，２．６ｅｑ．）および炭酸カリウム（７．２３ｇ，５２．３ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）を、無水ＡＣＮ（１０ｍＬ）中のＮ－Ｂｏｃ－１，６－ヘキサンジアミン（１．１３ｇ，５．２３ｍｍｏｌ，１ｅｑ．）の溶液に添加し、混合物を４０℃で３日間撹拌した。その後、反応混合物をシリカ（１６ｇ）に吸着させ、溶媒をｉｎ　ｖａｃｕｏで蒸発させた。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（８０ｇ、シクロヘキサン中の酢酸エチルの直線勾配で溶出、０－１００％）で精製し、化合物１７（２．８０ｇ、８０％；NH_3－前処理ＴＬＣプレート上のＣＥ５０中でＲｆ　０．５８、ニンヒドリンにより可視化）を淡黄色オイルとして得た。

【００８８】

ジオキサン中の塩酸（４ｍＬ、４Ｍ）を、無水ＤＣＭ（４ｍＬ）中の化合物１７（２．７５ｇ、４．１１ｍｍｏｌ）の溶液に添加し、反応混合物をｒｔで１時間撹拌した。次いで、溶液を５００ｍＬの分液漏斗に注ぎ、飽和水性$NaHCO_3$（１００ｍＬ）で希釈し、生成物をジエチルエーテル（１００ｍＬ、２×５０ｍＬ）で抽出した。合わせた有機相をブライン（７５ｍＬ）で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、Ｓ２焼結ガラスでろ過し、溶媒をＲＶＥで蒸発させた。粗生成物を、ＤＣＭ中のＤ１の直線勾配（０～７０％）を用いたシリカ上のカラムクロマトグラフィーにより精製した。アミン１８（１．７４ｇ，７４％；NH_3－前処理ＴＬＣプレート上のＤ２中でＲｆ　０．２５，ニンヒドリンにより可視化）を淡黄色オイルとして得た。^1H　ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝４．９０－４．７７（ｍ），２．７２－２．６２（ｍ），２．３９－２．２９（ｍ），２．２１（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ），１．６４－１．４４（ｍ），１．４７－１．３２（ｍ），１．３０－１．１７（ｍ），１．１５－１．０８（ｍ），０．８６－０．７８（ｍ）ｐｐｍ。^{13}C　ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝１７３．４２，７０．８３，５３．８９，４１．８７，３５．９８，３１．７７，２９．１３，２７．４１，２７．１７，２６．８４，２６．６９，２５．４０，２５．０９，２２．６０，２０．０４，１４．０９ｐｐｍ。ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）：$C_{34}H_{68}N_2O_4$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは５６９．５２５２であり；実測値は５６９．５２４７であった。

【００８９】

ヘキサ（オクタン－２－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’，６’’’’，６’’’’’，６’’’’’’（（（（シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボニル）トリス（アザンジイル））トリス（ヘキサン－６，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサヘキサノエート

１９

チオニルクロリド（７００μＬ）とＤＭＦ（６μＬ）をｃｉｓ，ｃｉｓ－シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボン酸（８０ｍｇ，３７０μｍｏｌ）に加え、懸濁液を密閉バイアル中で７０℃で３時間撹拌した。過剰の$SOCl_2$を７０℃で乾燥窒素気流で除去し

、残渣をｒｔでｉｎ　ｖａｃｕｏにて乾燥し（２０分）、得られた固体をアルゴン下、無水ＴＣＥ（２．５ｍＬ）およびＤＩＰＥＡ（６４５μＬ，３．７０ｍｍｏｌ）に溶解した。次いで、無水ＴＣＥ（２．５ｍＬ）中のアミン１８（１．０５ｇ，１．８５ｍｍｏｌ，５ｅｑ．）の溶液を加え、反応混合物をｒｔで４０分間撹拌した。次いで、反応混合物をｉｎ　ｖａｃｕｏで蒸発させ、ＤＣＭに再溶解し、シリカ（１０ｇ）に吸着させ、ＤＣＭをｉｎ　ｖａｃｕｏで除去した。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ中Ｄ１の直線勾配で溶出、５～３５％）で精製し、目的化合物１９（４８９ｍｇ、７１％）を黄色の蝋状の半固形物として得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ＝５．７５，４．８８，３．２１，２．４２，２．２７，２．２２，２．１１，１．６２，１．５８，１．５６，１．４７，１．４６，１．３０，１．２８，１．２７，１．２６，１．１９，０．８７ｐｐｍ。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）：１７３．８８，１７３．３９，７０．８２，５３．８７，５３．７７，４４．１０，３９．４４，３５．９３，３４．６７，３１．８６，３１．７３，２９．５１，２９．０９，２７．０８，２６．７４，２５．３６，２５．０１，２２．５６，２０．０１，１４．０６ｐｐｍ。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：Ｃ$_{111}$Ｈ$_{211}$Ｎ$_{6}$Ｏ$_{15}$［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$に対して計算されたｍ／ｚは１８６８．５９２７であり；実測値は１８６８．５９０６であった。

【００９０】

実施例７

化合物２２

ＤＩＣ（３．６０ｍＬ、２３．０ｍｍｏｌ、１．６ｅｑ）およびＤＭＡＰ（７０ｍｇ、０．５８ｍｍｏｌ、０．０４ｅｑ）を７－ブロモヘプタン酸（３．００ｇ、１４．４ｍｍｏｌ）および３－メチルヘキサン－１－オール（２．５０ｇ、２１．５ｍｍｏｌ、１．５ｅｑ．）をＤＣＭ（３０ｍＬ）に溶解し、混合物をｒｔで一晩撹拌した。次いで、反応混合物をシリカ（１６ｇ）に吸着させ、溶媒をｉｎ　ｖａｃｕｏで蒸発させた。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（８０ｇ、シクロヘキサン中の酢酸エチルの直線勾配で溶出、０－１０％）で精製し、化合物２０（３．６４ｇ，８３％；ＣＥ５中でＲｆ　０．２７，ＫＭｎＯ$_{4}$により可視化）を無色オイルとして得た。

【００９１】

ブロモエステル２０（３．６３ｇ，１１．８ｍｍｏｌ，２．６ｅｑ．）および炭酸カリウム（６．２９ｇ，４５．５ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）を、無水ＡＣＮ（１０ｍＬ）中のＮ－Ｂｏｃ－ヘキサン－１，６－ジアミン（０．９８ｇ，４．５５ｍｍｏｌ，１ｅｑ．）の溶液に添加し、混合物を４０℃で３日間撹拌した。その後、反応混合物をシリカ（１６ｇ）に吸着させ、溶媒をｉｎ　ｖａｃｕｏで蒸発させた。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（８０ｇ、シクロヘキサン中の酢酸エチルの直線勾配で溶出、０－１００％）で精製し、化合物２１（２．９０ｇ，９５％；ＮＨ$_{3}$－前処理ＴＬＣプレート上のＣＥ５０中でＲｆ　０．５４，ニンヒドリンにより可視化）を淡黄色オイルとして得た。

【００９２】

ジオキサン中の塩酸（４ｍＬ、４Ｍ）を、無水ＤＣＭ（４ｍＬ）中の化合物２１（２．８５ｇ、４．２６ｍｍｏｌ）の溶液に添加し、反応混合物をｒｔで１時間撹拌した。次いで、溶液を５００ｍＬの分液漏斗に注ぎ、飽和水性ＮａＨＣＯ$_{3}$（１００ｍＬ）で希釈し、生成物をジエチルエーテル（１００ｍＬ、２×５０ｍＬ）で抽出した。合わせた有機相をブライン（７５ｍＬ）で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、Ｓ２焼結ガラスで濾過し、溶媒をＲＶＥで蒸発させた。粗生成物を、ＤＣＭ中のＤ１の直線勾配（０～７０％）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。アミン２２（２．３８ｇ，９６％；ＮＨ$_{3}$－前処理ＴＬＣプレート上のＤ２中でＲｆ　０．４８、ニンヒドリンにより可視化）を淡黄色オイルとして得た。

【００９３】

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ＝４．０８－３．９６（ｍ），２．６３－２．５８（ｍ），２．３３－２．２６（ｍ），２．２１（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ），１．６１－１．５０（ｍ），１．４９－１．４０（ｍ），１．４０－１．３０（ｍ），１．３０

－１．１４（ｍ），１．１４－１．００（ｍ），０．８５－０．７６（ｍ）ｐｐｍ。^{13}Ｃ ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：１７３．８５，６２．７７，５４．１３，４２．１９，３８．９８，３５．５５，３４．３５，３３．７９，２９．５６，２９．１５，２７．４９，２７．２９，２６．８８，２５．０１，１９．９５，１９．４８，１４．２６ｐｐｍ。ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）：Ｃ$_{34}$Ｈ$_{68}$Ｎ$_2$Ｏ$_4$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは５６９．５２５２であり；実測値は５６９．５２５０であった。

【００９４】

ヘキサキス（３－メチルヘキシル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－７，７’，７’’，７’’’，７’’’’，７’’’’’－（（（（シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボニル）トリス（アザンジイル））トリス（ヘキサン－６，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサヘプタノエート２３

チオニルクロリド（５００μＬ）およびＤＭＦ（４μＬ）をｃｉｓ，ｃｉｓ－シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボン酸（６０ｍｇ、２７８μｍｏｌ）に加え、懸濁液を密閉バイアル中で７０℃で３時間撹拌した；この間に懸濁液は透明な溶液に変化した。過剰のＳＯＣｌ$_2$を７０℃で乾燥窒素気流で除去し、残渣をｒｔでｉｎ ｖａｃｕｏにて乾燥し（２０分）、得られた固体をアルゴン下、無水ＴＣＥ（２ｍＬ）およびＤＩＰＥＡ（４８３μＬ，２．７８ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）に溶解した。次に、無水ＴＣＥ（２ｍＬ）中のアミン２２（６３２ｍｇ，１．１１ｍｍｏｌ，４ｅｑ．）の溶液を加え、反応混合物をｒｔで４０分間撹拌した。次いで、反応混合物をｉｎ ｖａｃｕｏで蒸発させ、ＤＣＭに再溶解し、シリカ（１０ｇ）に吸着させ、ＤＣＭをｉｎ ｖａｃｕｏで除去した。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ中Ｄ１の直線勾配で溶出、０～４６％）で精製し、目的化合物２３（３４６ｍｇ，６７％；ＮＨ$_3$－前処理したＴＬＣプレート上のＤ２でＲ$_f$ ０．６６，ニンヒドリンにより可視化）を黄色の蝋状の半固形物として得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝５．７５，４．０９，３．２１，２．４１，２．２８，２．２２，２．１１，１．６４，１．６２，１．６１，１．５８，１．５４，１．４８，１．４４，１．４２，１．３３，１．３２，１．２９，１．２８，１．１３，０．８９，０．８８ｐｐｍ。^{13}Ｃ ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝１７３．９２，１７３．８７，６２．６４，５３．９０，４４．１０，３９．４５，３９．１４，３５．５１，３４．２３，３１．８６，２９．５４，２９．５２，２９．０９，２７．２２，２７．１３，２６．７７，２４．９７，１９．９４，１９．４７，１４．２６ｐｐｍ。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：Ｃ$_{111}$Ｈ$_{211}$Ｎ$_6$Ｏ$_{15}$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１８６８．５９２７であり；実測値は１８６８．５９０５であった。

【００９５】

実施例８

化合物２４

無水ＤＣＭ（１５０ｍＬ）中の６ブロモペンタン酸（３．００ｇ，１６．６ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（８１ｍｇ，０．６６ｍｍｏｌ，０．０４ｅｑ．）およびゲラニオール（４．３６ｍＬ，２４．９ｍｍｏｌ，１．５ｅｑ．）を含む溶液に、Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド（４．０７ｍＬ，２４．９ｍｍｏｌ，１．６ｅｑ．）を加えた。反応混合物をシリカ（２０ｇ）に吸着させ、溶媒をｉｎ ｖａｃｕｏで蒸発させた。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（１２０ｇ、シクロヘキサン中の酢酸エチルの直線勾配で溶出、０－１０％）で精製し、目的化合物２４（４．８０ｇ，９１％；ＣＥ５中でＲ$_f$ ０．３９，ＫＭｎＯ$_4$により可視化）を淡黄色オイルとして得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ５．３７－５．３０（ｍ，１Ｈ），５．１１－５．０５（ｍ，１Ｈ），４．６０（ｄ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），３．４１（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，２Ｈ），２．３５（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ），２．１５－２．０１（ｍ，４Ｈ），１．９５－１．８６（ｍ，２Ｈ），１．８３－１．７４（ｍ，２Ｈ），１．７０（ｓ，３Ｈ），１．６８（ｓ，３Ｈ），１．６０（ｓ，３Ｈ）。

【００９６】

化合物２６

ブロモエステル２４（４．８０ｇ，１５．１ｍｍｏｌ，２．３ｅｑ．）および炭酸カリウム（７．２７ｇ，５２．３ｍｍｏｌ，８ｅｑ．）を、Ｎ－Ｂｏｃ－１，６－ヘキサンジアミン（１．４２ｇ，６．５８ｍｍｏｌ，１ｅｑ．）の無水ＡＣＮ（３０ｍＬ）溶液に加えた。その後、反応混合物をシリカ（２０ｇ）に吸着させ、溶媒をｉｎ　ｖａｃｕｏで蒸発させた。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（１２０ｇ、ガス状NH_3で前処理したカラム、シクロヘキサン中の酢酸エチルの直線勾配で溶出、０－１００％）で精製し、化合物２５（２．８０ｇ，５４％；NH_3－前処理したＴＬＣプレート上のＣＥ５０でR_f　０．５８，$KMnO_4$により可視化）を淡黄色オイルとして得た。

【００９７】

マグネチックスターバーを備えたフラスコに化合物２５（２．８０ｇ，４．０６ｍｍｏｌ）を入れ、ゴム製セプタムで閉じ、アルゴンで洗浄した。ＡＣＮ（１０ｍＬ）とＤＣＭ（２０ｍＬ）を針と注射器でセプタムを通して加え、撹拌をオンにし、ＡＣＮ（２０ｍＬ）中の４－トルエンスルホン酸一水和物（２．３２ｇ，１２．２ｍｍｏｌ，３ｅｑ．）の溶液を針と注射器で５分かけてセプタムを通してｒｔで加えた。反応混合物をｒｔで６時間撹拌し、その後、気体アンモニアを流して中和した。反応混合物をシリカ（２０ｇ）に吸着させ、粗生成物をＤＣＭ中のＤ１の直線勾配（１０－４３％）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。アミン２６（８１０ｍｇ，３４％；NH_3－前処理ＴＬＣプレート上のＤ２中でR_f　０．４５，ニンヒドリンで可視化）を黄色オイルとして得た。ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）：$C_{36}H_{64}N_2O_4$ $[M+H]^+$に対して計算されたｍ／ｚは５８９．４９３９であり；実測値は５８９．４９３６であった。

【００９８】

ヘキサキス（（Ｅ）－３，７－ジメチルオクタ－２，６－ジエン－１－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－５，５’，５’’，５’’’，５’’’’，５’’’’’，５’’’’’’－（（（（シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボニル）トリス（アザンジイル））トリス（ヘキサン－６，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサペンタノエート　２７

チオニルクロリド（７００μＬ）およびＤＭＦ（６μＬ）をｃｉｓ，ｃｉｓ－シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボン酸（４５ｍｇ、２０８μｍｏｌ）に添加し、懸濁液を密閉バイアル中で７０℃で３時間撹拌した；この間に懸濁液は透明な溶液に変化した。過剰の$SOCl_2$を７０℃で乾燥窒素気流で除去し、残渣をｒｔでｉｎ　ｖａｃｕｏにて乾燥し（２０分）、得られた固体を無水ＴＣＥ（１．５ｍＬ）およびＤＩＰＥＡ（３６３μＬ，２．０８ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）にアルゴン下で溶解した。次いで、無水ＴＣＥ（１．０ｍＬ）中のアミン２６（４９０ｍｇ，８３３μｍｏｌ，４ｅｑ．）の溶液を添加し、反応混合物をｒｔで４０分間撹拌した。次いで、反応混合物をｉｎ　ｖａｃｕｏで蒸発させ、ＤＣＭに再溶解し、シリカ（１０ｇ）に吸着させ、ＤＣＭをｉｎ　ｖａｃｕｏで除去した。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ中Ｄ１の直線勾配で溶出、０－３１％）で精製し、目的化合物２７（２６２ｍｇ，６５％；NH_3－前処理ＴＬＣプレート上のＤ２でR_f　０．５９，ニンヒドリンにより可視化）を黄色のワックス状半固形物として得た。^1H　ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝５．７２，５．３２，５．０８，４．５８，３．２１，２．４４，２．４１，２．３２，２．２２，２．１１，２．１０，２．０９，２．０３，１．６９，１．６８，１．６１，１．６０，１．５９，１．５８，１．４７，１．４５，１．２９ｐｐｍ。^{13}C　ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝１７３．８５，１７３．６０，１４２．１６，１３１．８０，１２３．７２，１１８．３２，６２．２５，５３．７９，５３．４５，４４．１２，３９．５２，３９．４２，３４．１４，３１．８５，２９．４８，２７．０３，２６．７２，２６．２９，２５．６７，２２．９０，１７．６８，１６．４６ｐｐｍ。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{117}H_{199}N_6O_{15}$ $[M+H]^+$に対して計算されたｍ／ｚは１９２８．４９８８であり；実測値は１９２８．４９６７であった。

【００９９】

実施例９

化合物２８

Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド（４．０７ｍＬ，２４．９ｍｍｏｌ，１．６ｅｑ．）を、無水ＤＣＭ（６０ｍＬ）中の６－ブロモペンタン酸（３．００ｇ，１６．６ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＰ（８１ｍｇ，０．６６ｍｍｏｌ，０．０４ｅｑ．）、およびネロール（４．３８ｍＬ，２４．９ｍｍｏｌ，１．５ｅｑ．）を含む溶液に添加した。反応混合物をシリカ（２０ｇ）に吸着させ、溶媒をｉｎ　ｖａｃｕｏで蒸発させた。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（１２０ｇ、シクロヘキサン中の酢酸エチルの直線勾配で溶出、０－１０％）で精製し、目的化合物２８（４．７５ｇ，９０％；ＣＥ５中でR_f　０．３９，$KMnO_4$により可視化）を淡黄色オイルとして得た。^1H　ＮＭＲ（４０１ＭＨｚ，$CDCl_3$）δ　５．３５（ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，１Ｈ），５．１２－５．０６（ｍ，１Ｈ），４．５７（ｄｄ，Ｊ＝７．２，１．１Ｈｚ，２Ｈ），３．４０（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，２Ｈ），２．３４（ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），２．１５－２．０３（ｍ，４Ｈ），１．９４－１．８６（ｍ，２Ｈ），１．８２－１．７４（ｍ，５Ｈ），１．６８（ｄ，Ｊ＝１．４Ｈｚ，３Ｈ），１．６０（ｓ，３Ｈ）．

【０１００】

化合物３０

ブロモエステル２８（４．７５ｇ，１５．０ｍｍｏｌ，２．３ｅｑ．）および炭酸カリウム（７．２０ｇ，５２．１ｍｍｏｌ，８ｅｑ．）を、Ｎ－Ｂｏｃ－１，６－ヘキサンジアミン（１．４１ｇ，６．５１ｍｍｏｌ，１ｅｑ．）の無水ＡＣＮ（４５ｍＬ）溶液に加えた。その後、反応混合物をシリカ（２０ｇ）に吸着させ、溶媒をｉｎ　ｖａｃｕｏで蒸発させた。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（１２０ｇ、ガス状NH_3で前処理したカラム、シクロヘキサン中の酢酸エチルの直線勾配で溶出、０－１００％）で精製し、化合物２９（３．６２ｇ、８１％；NH_3－前処理ＴＬＣプレート上のＣＥ５０でR_f　０．５４、ニンヒドリンにより可視化）を淡黄色オイルとして得た。

【０１０１】

マグネチックスターバーを備えたフラスコに化合物２９（３．６２ｇ，５．２５ｍｍｏｌ）を入れ、ゴム製セプタムで閉じ、アルゴンで洗浄した。ＤＣＭ（１０ｍＬ）を針と注射器を用いてセプタムを通して加え、撹拌をオンにし、ＡＣＮ（２５ｍＬ）中の４－トルエンスルホン酸一水和物（２．５０ｇ、１３．１ｍｍｏｌ、２．５ｅｑ）の溶液を針と注射器を用いて５分間かけてセプタムを通してｒｔで加えた。反応混合物をｒｔで５時間撹拌し、その後、気体アンモニアを流して中和した。反応混合物をシリカ（２０ｇ）に吸着させ、粗生成物をＤＣＭ中のＤ１の直線勾配（１０－４３％）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。アミン３０（１．３６ｇ，４４％；NH_3－前処理ＴＬＣプレート上のＤ２中でR_f　０．４６，$KMnO_4$により可視化）を黄色オイルとして得た。ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）：$C_{36}H_{64}N_2O_4$ $[M+H]^+$に対して計算されたｍ／ｚは５８９．４９３９であり；実測値は５８９．４９３７であった。

【０１０２】

ヘキサキス（（Ｚ）－３，７－ジメチルオクター２，６－ジエン－１－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－５，５’，５’’，５’’’，５’’’’，５’’’’’，５’’’’’’－（（（（シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボニル）トリス（アザンジイル））トリス（ヘキサン－６，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサペンタノエート　３１

チオニルクロリド（７００μＬ）とＤＭＦ（６μＬ）をｃｉｓ，ｃｉｓ－シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボン酸（６５ｍｇ，３０１μｍｏｌ）に加え、懸濁液を密閉バイアル中で７０℃で３時間撹拌した。過剰の$SOCl_2$を７０℃で乾燥窒素気流で除去し、残渣をｒｔでｉｎ　ｖａｃｕｏにて乾燥し（２０分）、得られた固体をアルゴン下、無水ＴＣＥ（２ｍＬ）およびＤＩＰＥＡ（５２４μＬ，３．０１ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）に溶解した。次いで、無水ＴＣＥ（２．０ｍＬ）中のアミン３０（７９６ｍｇ，１．３５ｍｍｏｌ，４．５ｅｑ．）の溶液を加え、反応混合物をｒｔで３０分間撹拌した。次いで、反応混合物をｉｎ　ｖａｃｕｏで蒸発させ、ＤＣＭに再溶解し、シリカ（１０ｇ）に吸着させ、ＤＣＭをｉｎ　ｖａｃｕｏで除去した。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマト

グラフィー（ＤＣＭ中Ｄ１の直線勾配で溶出、５～２９％）で精製し、目的化合物３１（３５１ｍｇ、５１％）を黄色の蝋状の半固形物として得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝５．６９，５．３４，５．０８，４．５５，３．２１，２．４１，２．３８，２．３０，２．２２，２．１０，２．０６，１．７５，１．６７，１．６０，１．５９，１．５８，１．４７，１．２８ｐｐｍ。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝１７３．８１，１７３．５８，１４２．４４，１３２．１２，１２３．５６，１１９．２２，６０．９６，５３．８２，５３．４８，４４．１２，３９．４４，３４．１７，３２．１５，３１．８５，２９．５０，２７．０７，２６．７５，２６．６３，２５．６８，２３．５０，２２．９１，１７．６５ｐｐｍ。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{117}H_{199}N_6O_{15}$［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$に対して計算されたｍ／ｚは１９２８．４９８８であり；実測値は１９２８．４９６３であった。

【０１０３】

テトラ（オクタン－２－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’－（（（（５－（メトキシカルボニル）シクロヘキサン－１，３－ジカルボニル）ビス（アザンジイル））ビス（ヘキサン－６，１－ジイル））ビス（アザントリイル））テトラヘキサノエート３２

チオニルクロリド（７００μＬ）およびＤＭＦ（６μＬ）をｃｉｓ，ｃｉｓ－シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボン酸（６０ｍｇ、２７８μｍｏｌ）に添加し、懸濁液を密閉バイアル中で７０℃で３時間撹拌した；この間に懸濁液は透明な溶液に変化した。過剰の$SOCl_2$を７０℃で乾燥窒素気流で除去し、残渣をｒｔでｉｎ　ｖａｃｕｏにて乾燥し（２０分）、得られた固体を無水ＴＣＥ（２ｍＬ）およびＤＩＰＥＡ（４８３μＬ，２．７８ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）にアルゴン下で溶解した。次に、無水ＴＣＥ（１．０ｍＬ）中のアミン１８（６３２ｍｇ，１．１１ｍｍｏｌ，４ｅｑ．）の溶液を加え、反応混合物をｒｔで４０分間撹拌した。次に、反応混合物をｉｎ　ｖａｃｕｏで蒸発させ、ＤＣＭに再溶解し、シリカ（１０ｇ）に吸着させ、ＤＣＭをｉｎ　ｖａｃｕｏで除去した。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ中のＤ１の直線勾配で溶出、５～２９％）で精製し、化合物３２（２４２ｍｇ、６５％；NH_3－前処理したＴＬＣプレート上のＤ２でR_f　０．６８、ニンヒドリンにより可視化）を黄色オイルとして得た。生成物３２は、アミン１８からＭｅＯＨを不完全に除去した結果である。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝５．６８，５．２９，４．８８，３．６７，３．２２，２．４３，２．４０，２．２７，２．２０，２．１９，２．１８，２．０９，１．６２，１．５９，１．５７，１．５６，１．４８，１．４７，１．４６，１．３０，１．２８，１．２７，１．１９，０．８７ｐｐｍ。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝１７４．６４，１７３．７５，１７３．３８，７０．８３，５３．８２，５３．７６，５１．８４，４３．９９，４２．０９，３９．４３，３５．９３，３４．６６，３１．８１，３１．７３，３１．２０，２９．５０，２９．０９，２７．０６，２６．７２，２５．３６，２４．９９，２２．５６，２０．００，１４．０５ｐｐｍ。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{78}H_{146}N_4O_{12}$［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$に対して計算されたｍ／ｚは１３３２．１０１０であり；実測値は１３３２．０９８７であった。

【０１０４】

実施例１１

テトラキス（３－メチルヘキシル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－７，７’，７’’，７’’’－（（（（５－（メトキシカルボニル）シクロヘキサン－１，３－ジカルボニル）ビス（アザンジイル））ビス（ヘキサン－６，１－ジイル））ビス（アザントリイル））テトラヘプタノエート３３

チオニルクロリド（７００μＬ）とＤＭＦ（６μＬ）をｃｉｓ，ｃｉｓ－シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボン酸（５５ｍｇ，２５４μｍｏｌ）に加え、懸濁液を密閉バイアル中で７０℃で３時間撹拌した。過剰の$SOCl_2$を７０℃で乾燥窒素気流で除去し、残渣をｒｔでｉｎ　ｖａｃｕｏにて乾燥し（２０分）、得られた固体をアルゴン下、無水ＴＣＥ（２ｍＬ）およびＤＩＰＥＡ（４４３μＬ，２．５４ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）に溶解した。次に、ＴＣＥ（０．５ｍＬ）中のＭｅＯＨ（１０．３μＬ，２５４μｍｏｌ，

１．０ｅｑ．）の溶液を０℃で加えた。反応混合物を室温まで温め、１時間撹拌した後、無水ＴＣＥ（２．０ｍＬ）中のアミン２２（３７６ｍｇ，６６１μｍｏｌ，２．６ｅｑ．）を添加し、反応混合物をｒｔで４０分間撹拌した。次いで、反応混合物をｉｎ ｖａｃｕｏで蒸発させ、ＤＣＭに再溶解し、シリカ（１０ｇ）に吸着させ、ＤＣＭをｉｎ ｖａｃｕｏで除去した。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ中Ｄ１の直線勾配で溶出、５－２９％）で精製し、淡黄色オイルとして目的化合物３３（８７ｍｇ，２６％；NH_3－前処理ＴＬＣプレート上のＤ２でR_f ０．７５、ニンヒドリンにより可視化）を得た。^1H ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝５．６８，５．２９，４．０９，３．６７，３．２２，２．４３，２．４０，２．２８，２．２０，２．１８，２．０９，１．６４，１．６１，１．５７，１．５３，１．４８，１．４５，１．４２，１．３４，１．３１，１．２８，１．１３，０．８９，０．８８ｐｐｍ。^{13}C ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝１７４．６５，１７３．９１，１７３．７６，６２．８５，５３．８５，５１．８５，４３．９８，４２．０９，３９．４２，３９．１５，３５．５２，３４．２２，３１．８９，３１．１９，２９．５５，２９．５１，２９．０６，２７．２０，２７．１０，２６．７２，２４．９５，１９．９４，１９．４７，１４．２６ｐｐｍ。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{78}H_{147}N_4O_{12}$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１３３２．１０１０であり；実測値は１３３２．０９８４であった。

【０１０５】

実施例１２

化合物３４

チオニルクロリド（１．２ｍＬ）とＤＭＦ（１０μＬ）をｃｉｓ，ｃｉｓ－シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボン酸（１６０ｍｇ，７４０μｍｏｌ）に加え、懸濁液を密閉バイアル中で７０℃で３時間撹拌した。過剰の$SOCl_2$を７０℃で乾燥窒素気流で除去し、残渣をｒｔでｉｎ ｖａｃｕｏにて乾燥し（２０分）、得られた固体を無水ＴＣＥ（３ｍＬ）およびＤＩＰＥＡ（１．２９ｍＬ，７．４０ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）にアルゴン下で溶解した。次に、ＴＣＥ（０．５ｍＬ）中のＢｎＯＨ（７６μＬ，７４０μｍｏｌ，１．０ｅｑ．）の溶液を０℃で加えた。反応混合物を室温まで温め、２時間撹拌した後、無水ＴＣＥ（３．０ｍＬ）中のアミン１８（１．０９ｇ，１．９２ｍｍｏｌ，２．６ｅｑ．）を加え、反応混合物をｒｔで４０分間撹拌した。次いで、反応混合物をｉｎ ｖａｃｕｏで蒸発させ、ＤＣＭに再溶解し、シリカ（１０ｇ）に吸着させ、ＤＣＭをｉｎ ｖａｃｕｏで除去した。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィーで精製し（ＤＣＭ中Ｄ１の直線勾配で溶出、５－２９％）、化合物３４（１５０ｍｇ，１４％；NH_3－前処理したＴＬＣプレート上のＤ２でR_f ０．６７、ニンヒドリンにより可視化）を淡黄色オイルとして得た。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{84}H_{151}N_4O_{12}$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１４０８．１３２３であり；実測値は１４０８．１２８３であった。

【０１０６】

ｃｉｓ，ｃｉｓ－３，５－ビス（（６－（ビス（６－（オクタン－２－イルオキシ）－６－オキソヘキシル）アミノ）ヘキシル）カルバモイル）シクロヘキサン－１－カルボン酸　３５

洋ナシ型フラスコにマグネチックスターバーを取り付け、炭素上のパラジウム（１０％Ｐｄ／Ｃ、２５ｍｇ）を装填した。フラスコをゴム製セプタムで閉じ、ニードルを介してシュレンクラインに接続し、ｖａｃ－Ａｒを３サイクル経由してフラスコ内の雰囲気をアルゴンに交換した。その後、ＭｅＯＨ（３ｍＬ）中の化合物３４（１５０ｍｇ、１０７μｍｏｌ）の溶液を、針と注射器を用いてセプタムから加え、攪拌を開始した。フラスコを２本目の注射針で水素の連続流に接続し、シュレンクラインへの主アルゴン注入口を閉じた（過剰の水素はシュレンクラインのバブラーを通してフラスコから連続的に放出される）。反応混合物をｒｔで４時間激しく撹拌した後、フラスコをアルゴンで十分に洗浄し、ＰＴＦＥシリンジフィルターでろ過して炭素上のパラジウムを除去した。その後、揮発性

物質をｉｎ　ｖａｃｕｏで除去し、生成物３５（１１０ｍｇ，７９％，NH_3－前処理したＴＬＣプレート上のＤ２でR_f　０．２７，ニンヒドリンにより可視化）を無色オイルとして得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝６．５９，４．８８，３．２０，３．１５，２．７１，２．６７，２．２７，２．２４，２．２０，２．１３，２．０２，１．６４，１．６３，１．６０，１．５８，１．５７，１．５６，１．５４，１．４７，１．４５，１．３２，１．２８，１．２７，１．２６，１．１８，０．８７ｐｐｍ。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝１８０．０９，１７５．１９，１７３．１０，７０．９４，５３．０１，５２．０６，４４．３６，４４．３２，３９．２２，３５．９１，３４．４３，３２．４８，３２．１６，３１．７２，２９．１５，２９．０８，２６．７２，２６．６２，２６．３０　２５．３６，２４．６９，２４．１１，２２．５５，１９．９９，１４．０６ｐｐｍ。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{77}H_{145}N_4O_{12}$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１３１８．０８５４であり；実測値は１３１８．０８４２であった。

【０１０７】

テトラ（オクタン－２－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’－（（（（５－（ピロリジン－１－カルボニル）シクロヘキサン－１，３－ジカルボニル）ビス（アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（アザントリイル））テトラヘキサノエート　３６

マグネチックスターバーを備えたバイアルに化合物３５（６０ｍｇ，４５．５μｍｏｌ），NH_4Cl（１２．２ｍｇ，２２８μｍｏｌ，５ｅｑ．）を入れ、針で隔壁を貫通させてアルゴンで洗浄した。その後、無水ＤＭＦ（１．５ｍＬ）とＤＩＰＥＡ（４８μＬ，２７３μｍｏｌ，６ｅｑ．）を針と注射器を用いて加えた。得られた懸濁液をｒｔで１０分間撹拌した後、無水ＤＭＦ（０．５ｍＬ）中のＰｙＢｒｏＰ（５３ｍｇ，１１４μｍｏｌ，２．５ｅｑ．）の溶液を加え、反応混合物をｒｔで９０分間撹拌した。その後、反応混合物をｉｎ　ｖａｃｕｏで蒸発させ、ＤＣＭに再溶解し、シリカ（１０ｇ）に吸着させ、ＤＣＭをｉｎ　ｖａｃｕｏで除去した。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ中Ｄ１の直線勾配で溶出、５～２９％）で精製し、淡黄色オイルの形態の主生成物として化合物３６（１８ｍｇ、２９％；NH_3－前処理したＴＬＣプレート上のＤ２でR_f　０．４２、ニンヒドリンにより可視化）を得た。化合物３６は、ＰｙＢｒｏＰの加水分解により生じたＰｙＢｒｏＰ中のピロリジン不純物の生成物である。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝６．０８，４．８８，３．４８，３．４３，３．３５，３．２５，３．２６，３．２０，３．１６，２．７２，２．５０，２．３２，２．２８，２．１５，１．９８，１．９５，１．８５，１．６９，１．６８，１．６６，１．６５，１．６０，１．５７，１．５０，１．４６，１．３４，１．２８，１．２６，１．１９，０．８８ｐｐｍ。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝１７４．３９，１７３．１４，１７２．７９，７０．９７，５３．３７，４７．４４，４７．４０，４７．２２，４７．１９，４６．４３，４６．３０，４６．２７，４５．９０，４４．０３，４１．３９，３９．０９，３５．９２，３４．４４，３２．０８，３１．７３，３１．２０，２９．１０，２６．７０，２６．１４，２５．３７，２４．６９，２４．２４，２２．５７，２０．００，１４．０６．ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{81}H_{152}N_5O_{11}$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１３７１．１４８３であり；実測値は１３７１．１４６７であった。

【０１０８】

実施例１３

ｃｉｓ，ｃｉｓ－Ｌ，３，５－シクロヘキサンカルボン酸トリメチル　３７

塩化カルシウム乾燥管およびマグネチックスターラーを備えた丸底フラスコに入れた無水メタノール（１５０ｍＬ）中のｃｉｓ，ｃｉｓ－ｌ，３，５－シクロヘキサンカルボン酸（９．９０ｇ，４５．８ｍｍｏｌ）の溶液に、シリンジを介してゴム製セプタムを通して塩化チオニル（１５．２９ｍＬ，２１０．８ｍｍｏｌ，４．６ｅｑ．）をゆっくりと加えた。激しい発熱反応が停止した後、溶液を室温で１２時間撹拌した。その後、溶媒をｉ

ｎ　ｖａｃｕｏで除去し、オイル状の残渣を５００ｍＬのセパラブルフラスコに注ぎ、飽和水性ＮａＨＣＯ$_3$（２５０ｍＬ）で希釈し、生成物をジエチルエーテル（２×１００ｍＬ）で抽出した。合わせた有機相をブライン（１００ｍＬ）で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、Ｓ２焼結ガラスでろ過し、溶媒をＲＶＥで蒸発させて３７を淡黄色オイルとして得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝３．６８（ｓ，９Ｈ），２．４４－２．３２（ｍ，３Ｈ），２．３１－２．２１（ｍ，３Ｈ），１．５９－１．４５（ｍ，３Ｈ）ｐｐｍ。ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）：Ｃ$_{12}$Ｈ$_{19}$Ｏ$_6$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは２５９．１１７６１であり；実測値は２５９．１１７６６であった。

【０１０９】

トリメチルｃｉｓ，ｃｉｓ－１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１，３，５－トリカルボキシレート　３８

ジイソプロピルアミンは、使用前に水酸化ナトリウムから蒸留した。無水ジエチルエーテル（１０ｍＬ）中のジイソプロピルアミン（２．１９ｍＬ，１５．５ｍｍｏｌ，４ｅｑ．）の溶液を、０℃で２．０Ｍ　ｎ－ブチルリチウム（７．７４ｍＬ，１５．５ｍｍｏｌ，４ｅｑ．）の溶液に滴下添加し、ｉｎ　ｓｉｔｕでリチウムジイソプロピルアミドを生成した。無水ジエチルエーテル（１０ｍＬ）中の３７（１．００ｇ，３．８７ｍｍｏｌ；１ｅｑ．）の溶液を０℃で反応溶液に滴下添加し、混合物を０℃で２時間撹拌した。硫酸ジメチル（２．２０ｍＬ，２３．２ｍｍｏｌ，６ｅｑ．）を加え、撹拌をｒｔで一晩続けた。生成物を水、１Ｍ塩酸、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、Ｓ２焼結ガラスでろ過し、溶媒をＲＶＥで蒸発させた。ＧＣ－ＭＳ分析の結果、粗生成物中の２つの異性体の比率はｃｉｓ，ｃｉｓ／ｃｉｓ，ｔｒａｎｓ＝７：１であった。ジエチルエーテルとペンタンの混合溶媒で分別結晶化すると、ｃｉｓ，ｃｉｓ異性体３８（２２５ｍｇ，１９％）が白色結晶として得られた。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ＝３．６５（ｓ，９Ｈ），２．７４（ｄ，Ｊ＝１３．４Ｈｚ，３Ｈ），１．２１（ｓ，９Ｈ），０．９７（ｄ，Ｊ＝１４．８Ｈｚ，３Ｈ）ｐｐｍ。ＨＲＭＳ（ＥＩ）：Ｃ$_{15}$Ｈ$_{24}$Ｏ$_6$［Ｍ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは３００．１５６７であり；実測値は３００．１５６５であった。

【０１１０】

ｃｉｓ，ｃｉｓ－１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１，３，５－トリカルボン酸　３９

ｃｉｓ，ｃｉｓ－１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１，３，５－トリカルボン酸トリメチル３８（２２０ｍｇ，０．７３ｍｍｏｌ，１ｅｑ．）をメタノール（３．０ｍＬ）に溶解した。水（２．０ｍＬ）中の水酸化リチウム一水和物（３６９ｍｇ，６．５９ｍｍｏｌ，９ｅｑ．）の溶液を加え、反応混合物をｒｔで一晩撹拌した。メタノールをＲＶＥで蒸発させて除去した。溶液を氷浴で冷却し、濃塩酸でｐＨを１に調整した。白色の沈殿物が直ちに形成され、吸引濾過によって回収され、３９（６０ｍｇ，３２％）が得られた。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）：δ＝１１．９６（ｂｒ　ｓ，３Ｈ），２．５２（ｄ，３Ｈ，溶媒シグナルと一部重複），１．２０（ｄ，Ｊ＝１４．７Ｈｚ，３Ｈ），１．１９（ｓ，９Ｈ）ｐｐｍ。

【０１１１】

ヘキサキス（３－メチルヘキシル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－７，７’，７’’，７’’’，７’’’’，７’’’’’，７’’’－（（（（１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１，３，５－トリカルボニル）トリス（アザンジイル））トリス（ヘキサン－６，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサヘプタノエート　４０

チオニルクロリド（０．５０ｍＬ）およびＤＭＦ（２μＬ）をｃｉｓ，ｃｉｓ－１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１，３，５－トリカルボン酸３９（３４ｍｇ，０．１３ｍｍｏｌ）に加え、懸濁液を密閉バイアル中で７０℃で一晩撹拌した。過剰のＳＯＣｌ$_2$を乾燥窒素気流で吹き飛ばし、残渣をｉｎ　ｖａｃｕｏで乾燥させ（１０分）、ｒｔまで冷却後、残渣を無水ＴＣＥ（０．５ｍＬ）に溶解した。次いで、無水ＴＣＥ（１．００ｍＬ）中のアミン２２（３３７ｍｇ，０．５９ｍｍｏｌ，４．５ｅｑ．）およびＤＩＰＥ

Ａ（２２９μＬ，１．３２ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）の溶液を添加し、反応混合物をｒｔで１５分間撹拌した。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（４０ｇ、ＤＣＭ中Ｄ１の直線勾配で溶出、０－３０％）で精製し、目的化合物４０（６ｍｇ、５％；Ｄ４中でR_f　０．２６、ニンヒドリンにより可視化）を粘性の淡黄色オイルとして得た。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{114}H_{216}N_6O_{15}$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１９１０．６３９６であり；実測値は１９１０．６３６８であった。

【０１１２】

実施例１４

ヘキサ（オクタン－２－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’，６’’’’，６’’’’’－（（（１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１，３，５－トリカルボニル）トリス（アザンジイル））トリス（ヘキサン－６，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサヘキサノエート　４１およびｃｉｓ，ｃｉｓ－３，５－ビス（（６－（ビス（６－（オクタン－２－イルオキシ）－６－オキソヘキシル）アミノ）ヘキシル）カルバモイル）－１，３，５－トリメチルシクロヘキサン－１－カルボン酸　４２

チオニルクロリド（０．５０ｍＬ）およびＤＭＦ（２μＬ）を３９（２８ｍｇ，０．１１ｍｍｏｌ）に加え、懸濁液を密閉バイアル中で７０℃で２時間撹拌した。過剰の$SOCl_2$を乾燥窒素気流で吹き飛ばし、残渣をｉｎ　ｖａｃｕｏで乾燥させ（１０分）、ｒｔまで冷却後、残渣を無水ＴＣＥ（０．２５ｍＬ）に溶解した。次に、無水ＴＣＥ（０．７５ｍＬ）中のアミン１８（２７８ｍｇ，０．４９ｍｍｏｌ，４．５ｅｑ．）およびＤＩＰＥＡ（１８０μＬ，１．０８ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）の溶液を添加し、反応混合物をｒｔで１５分間撹拌した。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（４０ｇ、ＤＣＭ中のＤ１の直線勾配で溶出、０－３０％）で精製し、標的化合物４１（４９ｍｇ、２４％；Ｄ４中でR_f　０．３０、ニンヒドリンにより可視化）を淡黄色粘性オイルとして、化合物４２（５２ｍｇ、４５％；Ｄ４中でR_f　０．２８、ニンヒドリンにより可視化）を淡黄色オイルとして得た。

【０１１３】

４１　^{1}Ｈ　ＮＭＲ（６００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝７．９８，４．８８，３．１２，２．８８，２．７５，２．６８，２．２７，１．６４，１．５６，１．４６，１．４５，１．２８，１．２７，１．２６，１．２３，１．１９，１．１２，０．８７ｐｐｍ。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ＝１８４．２６，１７７．４５，１７３．０６，７０．９６，５２．４５，５１．６８，４３．０３，４３．００，４２．３８，３８．８３，３５．９２，３４．４３，３４．１７，３３．２１，３１．７２，２９．０８，２８．９５，２２．５６，１９．９９，１４．０５ｐｐｍ。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{114}H_{216}N_6O_{15}$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１９１０．６３９６であり；実測値は１９１０．６３６４であった。

【０１１４】

４２　ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{80}H_{150}N_4O_{12}$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１３６０．１３２３であり；実測値は１３６０．１８７５であった。

【０１１５】

実施例１５

ｃｉｓ，ｃｉｓ－１，３，５－トリス（（ベンジルオキシ）メチル）シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボン酸トリメチル　４３

ジイソプロピルアミンは、使用前に水酸化ナトリウムから蒸留した。無水ジエチルエーテル（３０ｍＬ）中のジイソプロピルアミン（６．５６ｍＬ，４６．５ｍｍｏｌ，４ｅｑ．）の溶液を、０℃で２．０Ｍｎ－ブチルリチウム（２３．２ｍＬ，４６．５ｍｍｏｌ，４ｅｑ．）の溶液に滴下添加し、ｉｎ　ｓｉｔｕでリチウムジイソプロピルアミドを生成した。無水ジエチルエーテル（３０ｍＬ）中のトリメチルシクロヘキサン－１，３，５－トリカルボキシレート３７（３．００ｇ，１１．６ｍｍｏｌ；１ｅｑｕｉｖ．）の溶液を０℃で反応溶液に滴下添加し、混合物を０℃で２時間撹拌した。ベンジルクロロメチルエーテル（９．６９ｍＬ，６９．７ｍｍｏｌ，６ｅｑ．）を加え、撹拌をｒｔで一晩続けた

。生成物を水、１Ｍ塩酸およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、Ｓ２焼結ガラスで濾過し、溶媒をＲＶＥで蒸発させた。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィーで精製した（２００ｇ、シクロヘキサン中の酢酸エチルの直線勾配で溶出、０～２０％）。ジエチルエーテル（３．０ｍＬ）とペンタン（１８．０ｍＬ）の混合溶媒で分取したところ、ｃｉｓ，ｃｉｓ異性体４３（１．５２ｍｇ，２２％）が白色結晶として得られた。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ＝７．３６－７．２２（ｍ，１５Ｈ，溶媒シグナルと一部重複），４．４６（ｓ，６Ｈ），３．６９（ｓ，９Ｈ），３．３９（ｓ，６Ｈ），２．６８（ｄ，Ｊ＝１４．２Ｈｚ，３Ｈ），１．１８（ｄ，Ｊ＝１４．９Ｈｚ，３Ｈ）ｐｐｍ。ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）：Ｃ$_{36}$Ｈ$_{42}$Ｏ$_{9}$［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$に対して計算されたｍ／ｚは６４１．２７２１であり；実測値は６４１．２７１９であった。

【０１１６】

ｃｉｓ，ｃｉｓ－１，３，５－トリス（（ベンジルオキシ）メチル）シクロヘキサン－１，３，５－トリカルボン酸　４４

化合物４３（２５０ｍｇ，０．４０ｍｍｏｌ，１ｅｑ．）をメタノール（４．０ｍＬ）に溶解した。水（２．０ｍＬ）中の水酸化リチウム一水和物（１５２ｍｇ，３．６４ｍｍｏｌ，９ｅｑ．）の溶液を加え、反応混合物をｒｔで一晩撹拌した。メタノールをＲＶＥで蒸発させて除去した。溶液を氷浴で冷却し、濃塩酸でｐＨを１に調整した。白色の沈殿物が直ちに形成され、吸引濾過によって回収され、４４（２００ｍｇ，８６％）が得られた。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）：δ＝１２．１２（ｂｒ　ｓ，３Ｈ），７．３７－７．１８（ｍ，１５Ｈ），４．３９（ｓ，６Ｈ），３．３９（ｓ，６Ｈ），２．３６（ｄ，Ｊ＝１４．９Ｈｚ，３Ｈ），ｐｐｍ。

【０１１７】

テトラ（オクタン－２－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’－（（（（１，３，５－トリス（（ベンジルオキシ）メチル）－５－（ビス（６－（オクタン－２－イルオキシ）－６－オキソヘキシル）カルバモイル）シクロヘキサン－１．３－ジカルボニル）ビス（アザンジイル））ビス（ヘキサン－６，１－ジイル））ビス（アザントリイル））テトラヘキサノエート　４５およびｃｉｓ，ｃｉｓ－１，３，５－トリス（（ベンジルオキシ）メチル）－３，５－ビス（（６－（ビス（６－（オクタン－２－イルオキシ）－６－オキソヘキシル）アミノ）ヘキシル）カルバモイル）シクロヘキサン－１－カルボン酸　４６

４４（１００ｍｇ、０．１７ｍｍｏｌ、１ｅｑ．）にチオニルクロリド（０．５０ｍＬ）およびＤＭＦ（２μＬ）を加え、懸濁液を密閉バイアル中で７０℃で一晩撹拌した。過剰のＳＯＣｌ$_{2}$を乾燥窒素気流で吹き飛ばし、残渣をｉｎ　ｖａｃｕｏで乾燥させ（１０分）、ｒｔまで冷却後、残渣を無水ＴＣＥ（０．５ｍＬ）に溶解した。次に、無水ＴＣＥ（１．５０ｍＬ）中のアミン１８（４４４ｍｇ，０．７８ｍｍｏｌ，４．５ｅｑ．）およびＤＩＰＥＡ（３０２μＬ，１．７３ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）の溶液を加え、反応混合物をｒｔで１５分間撹拌した。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（８０ｇ、ＤＣＭ中のＤ１の直線勾配で溶出、０－２０％）で精製し、目的化合物４５（４６ｍｇ、１２％；Ｄ４中でＲ$_{ｆ}$　０．４６、ニンヒドリンにより可視化）を淡黄色粘性オイルとして、化合物４６（３７ｍｇ、１３％；Ｄ４中でＲ$_{ｆ}$　０．３９、ニンヒドリンにより可視化）を淡黄色オイルとして得た。

【０１１８】

４５　ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：Ｃ$_{135}$Ｈ$_{234}$Ｎ$_{6}$Ｏ$_{18}$［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$に対して計算されたｍ／ｚは２２２８．７６５２であり；実測値は２２２８．７７０２であった。

【０１１９】

４６　ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：Ｃ$_{101}$Ｈ$_{168}$Ｎ$_{4}$Ｏ$_{15}$［Ｍ］$^{+}$に対して計算されたｍ／ｚは１６７７．２５０６であり；実測値は１６７７．２４７９であった。

【０１２０】

ヘキサ（オクタン－２－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’，６’’’’，６’’’’’，６’’’’’’（（（１，３，５－トリス（ヒドロキシメチル）シクロヘキサン－１，３，５－トリカル

ボニル）トリス（アザンジイル））トリス（ヘキサン－６，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサヘキサノエート　４７

３５について概説した手順に従って、リピドイド４５（２０ｍｇ，０．００８ｍｍｏｌ，１ｅｑ．）、炭素上パラジウム（１０％Ｐｄ／Ｃ，１９ｍｇ，０．０１８ｍｍｏｌ，２ｅｑ．）および酢酸（８０μＬ，１．７３ｍｍｏｌ）から標的化合物４７を調製し、濃厚な淡黄色オイルとしてリピドイド４７（５ｍｇ，３０％）を得た。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{114}H_{216}N_6O_{18}$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１９５８．６２４４であり；実測値は１９５８．６３１４であった。

【０１２１】

ｃｉｓ，ｃｉｓ－３，５－ビス（（６－（ビス（６－（オクタン－２－イルオキシ）－６－オキソヘキシル）アミノ）ヘキシル）カルバモイル）－１，３，５－トリス（ヒドロキシメチル）シクロヘキサン－１－カルボン酸　４８

３５について概説した手順に従って、リピドイド４６（１５ｍｇ，０．００９ｍｍｏｌ，１ｅｑ．）、炭素上パラジウム（１９ｍｇ，０．０１８ｍｍｏｌ，２ｅｑ．）および酢酸（８０μＬ，１．７３ｍｍｏｌ）から標的化合物４８を調製し、濃厚な淡黄色オイルとしてリピドイド４８（７ｍｇ，５９％）を得た。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{80}H_{150}N_4O_{15}$［Ｍ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１４０７．１０９８であり；実測値は１４０７．１０４２であった。

【０１２２】

実施例１６

テトラ（オクタン－２－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’－（（（（１，３，５－トリス（（ベンジルオキシ）メチル）－５－（ピロリジン－１－カルボニル）シクロヘキサン－１，３－ジカルボニル）ビス（アザンジイル））ビス（ヘキサン－６，１－ジイル））ビス（アザントリイル））テトラヘキサノエート　４９

化合物４４（１００ｍｇ，０．１７ｍｍｏｌ，１ｅｑ．）を無水ＤＭＦ（１．０ｍＬ）に溶解し、ＤＭＡＰ（３ｍｇ，０．０２ｍｍｏｌ，０．１５ｅｑ．）およびＤＩＰＥＡ（４５０μＬ，２．６０ｍｍｏｌ，１０ｅｑ．）を加えた。無水ＤＭＦ（１．０ｍＬ）中のＰｙＢｒｏＰ（３６３ｍｇ，０．７８ｍｍｏｌ，４．５ｅｑ．）の溶液を滴下し、反応混合物をアルゴン雰囲気下、ｒｔで１．５時間撹拌した。次に、無水ＤＭＦ（１．０ｍＬ）中のアミン１８（４４４ｍｇ，０．７８ｍｍｏｌ，４．５ｅｑ．）の溶液を添加し、反応混合物をアルゴン雰囲気下、ｒｔで１時間撹拌した。その後、反応混合物をシリカ（４ｇ）に吸着させ、溶媒をｉｎ　ｖａｃｕｏで蒸発させた。粗生成物をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー（８０ｇ、ＤＣＭ中Ｄ１の直線勾配で溶出、０～３０％）で精製し、目的化合物４９（１４６ｍｇ、５１％；Ｄ３中でR_f　０．５８、ニンヒドリンにより可視化）を淡黄色オイルとして得た。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{105}H_{175}N_5O_{14}$［Ｍ＋Ｎａ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１７５３．３０２８であり；実測値は１７５３．３０４４であった。

【０１２３】

テトラ（オクタン－２－イル）ｃｉｓ，ｃｉｓ－６，６’，６’’，６’’’－（（（（１，３，５－トリス（ヒドロキシメチル）－５－（ピロリジン－１－カルボニル）シクロヘキサン－１，３－ジカルボニル）ビス（アザンジイル））ビス（ヘキサン－６，１－ジイル））ビス（アザントリイル））テトラヘキサノエート　５０

３５について概説した手順に従って、リピドイド４９（７０ｍｇ，０．０４ｍｍｏｌ，１ｅｑ．）、炭素上パラジウム（８６ｍｇ，０．４０ｍｍｏｌ，２ｅｑ．）および酢酸（８０μＬ，１．７３ｍｍｏｌ）から標的化合物５０を調製し、リピドイド５０（５７ｍｇ，９６％）を淡黄色の濃厚なオイルとして得た。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：$C_{84}H_{157}N_5O_{14}$［Ｍ＋Ｎａ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１４８３．１６１９であり；実測値は１４８３．１６５６であった。

【０１２４】

実施例１７

ｃｉｓ，ｃｉｓ－Ｎ^{1}，Ｎ^{7}－ビス（６－（ジドデシルアミノ）ヘキシル）－５，７－ビス（ヒドロキシメチル）－４－オキソ－３－オキサビシクロ［３．３．１］ノナン－１，７－ジカルボキサミド　５２

ＰｙＢｒｏＰ（０．３２３ｇ，０．６９４ｍｍｏｌ，５ｅｑ．），Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ，０．４８３ｍＬ，２．７７ｍｍｏｌ，２０ｅｑ．）およびアミン１０（０．３１４ｇ，０．６９４ｍｍｏｌ，５ｅｑ．）を三酸４４（８０ｍｇ，０．１３９ｍｍｏｌ）の無水ＴＣＥ（４ｍＬ）溶液に加えた。１３９ｍｍｏｌ）の無水ＴＣＥ（４ｍＬ）中溶液に添加し、反応混合物をｒｔで１２時間撹拌した。次いで、反応混合物をシリカ（１０ｇ）に吸着させ、溶媒をｉｎ　ｖａｃｕｏで蒸発させた。粗生成物を、ＤＣＭ中のＤ１の直線勾配（２０～８０％）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。ジアミド５１（１６ｍｇ，８．０％；移動相３中でＲ$_{f}$　０．５６、ニンヒドリンにより検出）が粘稠な黄色がかったオイルの形で得られた。

【０１２５】

アルゴン雰囲気下、メタノール－酢酸エチル混合溶媒（１０＋１０ｍＬ）中のジアミド５１の溶液に木炭上のパラジウム（１０％）を加えた。懸濁液をセライトのパッドでろ過し、蒸発させて、リピドイド５２を無色オイルとして得た（５．５ｍｇ，４２．９％，移動相Ｄ３中でＲ$_{f}$　０．６１，ニンヒドリンにより検出）。ＨＲＭＳ（ＭＡＬＤＩ）：Ｃ$_{72}$Ｈ$_{141}$Ｎ$_{4}$Ｏ$_{6}$［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$に対して計算されたｍ／ｚは１１５８．０８４６であり；実測値は１１５８．０８２２であった。

【０１２６】

実施例１８

６－（ジドデシルアミノ）ヘキサン酸　５３

塩化カルシウム乾燥管およびマグネチックスターラーを備えた５００ｍＬ丸底フラスコに、ＡＣＮ（１５０ｍＬ）中の６－アミノヘキサン酸（２．００ｇ，１５．２ｍｍｏｌ）溶液を入れ、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム（１２．９３ｇ，６１．０ｍｍｏｌ，４ｅｑ．）を加えた。激しく撹拌しながら、ｎ－ドデシルアルデヒド（１０．１６ｍＬ，４５．７ｍｍｏｌ，３ｅｑ．）をゴム製セプタムを通してシリンジでゆっくりと加え、得られた白色懸濁液を室温で５日間撹拌した。粗生成物を、ＤＣＭ中のＤ１の直線勾配（０～１００％）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。アミノ酸５３（３．２０３ｇ，４４．９％）を無色オイルとして得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ＝２．８８－２．８４（ｍ，６Ｈ），２．２４（ｔ，２Ｈ），１．６２－１．７２（ｍ，２Ｈ），１．４２－１．２６（ｍ，４４Ｈ）０．８９（ｔ，６Ｈ）ｐｐｍ。^{13}Ｃ　ＮＭＲ（１５０．９ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ＝１７８．６５，５１．３７，３６．２２，３１．９０，２９．６１－２９．２０，２７．０７，２６．７４，２５．４５，２３．７８，２３．３１，２２．６７，１４．１０ｐｐｍ。ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）：Ｃ$_{30}$Ｈ$_{60}$Ｏ$_{2}$Ｎ［Ｍ－Ｈ］$^{-}$に対して計算されたｍ／ｚは４６６．４６２９５であり；実測値は４６６．４６２８６であった。

【０１２７】

ｃｉｓ，ｃｉｓ－１，３，５－トリアミノシクロヘキサントリ臭化水素酸塩　５５

合成はBowen, T. et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 6, No. 7, 1996, 807-810にしたがって行い、わずかに変形させた。ｃｉｓ，ｃｉｓ－ｌ，３，５－シクロヘキサントリカルボン酸（２．０ｇ，９．２５ｍｍｏｌ）をトルエン（７５ｍＬ）に懸濁し、ＤＩＰＥＡ（４．８３ｍＬ，２７．７５ｍｍｏｌ）を加えた。２５ｍｍｏｌ）をトルエン（７５ｍＬ）に懸濁し、ＤＩＰＥＡ（４．８３ｍＬ，２７．７５ｍｍｏｌ，３ｅｑ．）を加え、続いてジフェニルホスホリルアジド（５．９７ｍＬ，２７．７５ｍｍｏｌ，３ｅｑ．）を加えた。混合物をｒｔで０．５時間撹拌した後、９０℃に０．５時間加熱した。ベンジルアルコール（３．２０ｍＬ，３０．８１ｍｍｏｌ，３．３３ｅｑ．）を加え、溶液を９０℃に１８時間加熱した。ｒｔまで冷却した後、生成物を真空濾過で回収し、最小限の冷トルエンで洗浄し、真空下で乾燥して、０．３８６ｇ（７．８５％）のｃｉｓ，ｃｉｓ－１，３，５－トリ（Ｎ－ベンジルオキシカルボニル）シクロヘキサン

５４を得た。

【０１２８】

化合物５４（０．３８６ｇ，０．７２６ｍｍｏｌ）を酢酸（５ｍＬ）中のＨＢｒの３３％溶液に懸濁し、ｒｔで１２時間撹拌した。次いで、黄色懸濁液をジエチルエーテル（２０ｍＬ）で希釈し、Ｓ２焼結ガラスで濾過して、トリ臭化水素酸塩５５を黄色固体（０．２４８ｇ，９１．８％）として得た。

【０１２９】

ｃｉｓ，ｃｉｓ－Ｎ，Ｎ’，Ｎ’’－（シクロヘキサン－１，３，５－トリイル）トリス（６－（ジドデシルアミノ）ヘキサンアミド）　５６

ＰｙＢｒｏＰ（０．７５２ｇ、１．６１ｍｍｏｌ、６ｅｑ．）、ＤＩＰＥＡ（０．９３７ｍＬ、５．３８ｍｍｏｌ、２０ｅｑ．）および酸５３（０．７５５ｇ、１．６１ｍｍｏｌ、６ｅｑ．）をトリアミン塩５５（０．１００ｇ、０．２６９ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。２６９ｍｍｏｌ）の無水ＴＣＥ（３ｍＬ）と無水ＤＭＦ（３ｍＬ）の混合溶液に加え、反応混合物をｒｔで１２時間撹拌した。粗生成物を、ＤＣＭ（２０～３０％）中のＤ１の直線勾配を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。リピドイド５６（１１３ｍｇ，２８．４％；移動相Ｄ２中でＲｆ　０．６５、ニンヒドリンにより検出）が粘性の黄色がかったオイルの形で得られた。ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）：$C_{96}H_{193}O_6N_3$［Ｍ＋Ｈ］$^+$に対して計算されたｍ／ｚは１４７８．５１３４であり；実測値は１４７８．５１６２であった。

【０１３０】

実施例１９

トランスフェクション試薬の調製

試薬は表１から表４までの各成分を混合して作製した。すべての表はトランスフェクション試薬中の最終モル濃度を含む。Ａ０１からＡ１６、Ａ２１、Ａ２２、Ａ２４、Ａ２８およびＡ２９の調製には、９９．７％エタノール（ｖ／ｖ）中の各成分のストック５ｍＭ溶液を用いた。Ａ１７～Ａ２０、Ａ２３、およびＡ２５～Ａ２７の調製には、９９．７％エタノール（ｖ／ｖ）中のリピドイド、ＤＯＰＥおよびＤＭＧ－ＰＥＧ２０００のストック５ｍＭ溶液、ならびにコレステロールのストック１０ｍＭ溶液を使用した。ＤＯＰＥ－Ｃｙ５ストック溶液の濃度は０．７９ｍＭで、クロロホルム中で調製した。ＴＴ３は、ＷＯ２０１６／１８７５３１による脂質であり、本明細書では比較のために使用した。ベンチマークＤ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ脂質（ＭｅｄＣｈｅｍＥｘｐｒｅｓｓ　Ｅｕｒｏｐｅ）も比較のために使用した。

【０１３１】

【表１】

表１．トランスフェクション試薬Ａ０１－Ａ０６の組成。

化合物	トランスフェクション試薬中の各成分の濃度（mM）					
	A01	A02	A03	A04	A05	A06
３	1.1	–	–	–	–	–
７	–	1.1	–	–	–	–
８	–	–	1.1	–	–	–
１１	–	–	–	1.1	–	–
１５	–	–	–	–	1.1	–
ＴＴ３	–	–	–	–	–	1.1
コレステロール	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18
DOPE	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64
$DMG\text{-}PEG_{2000}$	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075

【０１３２】

【表２】

表２．トランスフェクション試薬Ａ０７－Ａ１２の組成。

化合物	トランスフェクション試薬中の各成分の濃度（mM）					
	A07	A08	A09	A10	A11	A12
３	1.1	–	–	–	–	–
７	–	1.1	–	–	–	–
８	–	–	1.1	–	–	–
１１	–	–	–	1.1	–	–
１５	–	–	–	–	1.1	–
ＴＴ３	–	–	–	–	–	1.1
コレステロール	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18
DOPE	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64
DMG-PEG_{2000}	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075
DOPE-Cy5	1.19×10^{-3}	1.19×10^{-3}	1.19×10^{-3}	1.19×10^{-3}	1.19×10^{-3}	1.19×10^{-3}

【０１３３】

【表３】

表３．トランスフェクション試薬Ａ１３－Ａ２２の組成。

化合物	トランスフェクション試薬中の各成分の濃度（mM）									
	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22
１９	1.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
２３	–	1.1	–	–	–	–	–	–	–	–
２７	–	–	1.1	–	–	–	–	–	–	–
３１	–	–	–	1.1	–	–	–	–	–	–
３２	–	–	–	–	1.64	–	–	–	–	–
３３	–	–	–	–	–	1.64	–	–	–	–
３５	–	–	–	–	–	–	1.64	–	–	–
３６	–	–	–	–	–	–	–	1.64	–	–
４０	–	–	–	–	–	–	–	–	1.1	–
４１	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.1
コレステロール	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18
DOPE	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64
DMG-PEG_{2000}	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075

【０１３４】

【表４】

表４．トランスフェクション試薬Ａ２３－Ａ２９の組成。

化合物	トランスフェクション試薬中の各成分の濃度（ｍＭ）						
	A23	A24	A25	A26	A27	A28	A29
４２	1.64	–	–	–	–	–	–
４７	–	1.1	–	–	–	–	–
４８	–	–	1.64	–	–	–	–
５０	–	–	–	1.64	–	–	–
５２	–	–	–	–	1.64	–	–
５６	–	–	–	–	–	1.1	–
D-Lin-MC3-DMA	–	–	–	–	–	–	2.5
コレステロール	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	1.93
DOPE	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	–
DSPC	–	–	–	–	–	–	0.5
$DMG\text{-}PEG_{2000}$	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075

【０１３５】

実施例２０

核酸を含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の調製

ｓｉＲＮＡ含有ＬＮＰ（ｓｉＲＮＡ－ＬＮＰ）は以下のように調製した：実施例１９で調製したＡ０１－Ａ０６トランスフェクション試薬の各溶液３００μｌを、サンプリング用に２つの入力と１つの出力を持つ「Ｙ」マイクロ流体デバイスを用いて、３００μｌの１０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ３．０）中の１．２ｎｍｏｌ ｓｉＲＮＡ（カタログ番号４３９２４２０、Ａｍｂｉｏｎ）の溶液と混合した。脂質混合液とｓｉＲＮＡ溶液は、リニアポンプにより３００μｌ／分の一定流速でそれぞれの注入口に別々に注入した。こうして、トランスフェクション試薬Ａ０１－Ａ０６から、Ｂ０１－Ｂ０６と名付けられた対応するナノ粒子サンプルが形成された。

【０１３６】

蛍光タンパク質ｍＫａｔｅ２をコードするＤＮＡを、プライマー（５’－ＡＴＣＡＡＣＡＴＡＴＧＧＴＧＡＧＣＧＡＧＣＴＧ－３’（配列番号１）；５’－ＡＡＧＡＡＴＴＣＣＴＡＴＣＡＴＣＴＧＴＧＣＣＡＧ－３’（配列番号２））を用いてプラスミドｐｍＫａｔｅ２－Ｃ（Ｅｖｒｏｇｅｎ）から増幅し、Ｔ７プロモーター下でｐＥＴ２４ａベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にクローニングした。ｍＫａｔｅ２をコードするメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を、Ａｍｐｌｉｓｃｒｉｂｅ Ｔ７－Ｆｌａｓｈ転写キット（Ｌｕｃｉｇｅｎ）を用いて、製造業者のプロトコールに従ってｉｎ ｖｉｔｒｏで転写した。ＲＮＡ ｃａｐ ａｎａｌｏｇ ＡＲＣＡ（Ｊｅｎａ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）をｉｎ ｖｉｔｒｏ転写反応に添加し、ポリ（Ａ）ポリメラーゼ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を用いて標準プロトコールに従ってポリ（Ａ）末端を合成した。

【０１３７】

ｍＲＮＡ含有ＬＮＰ（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ）を以下のように調製した：実施例１９で調製したＡ０７－Ａ２９トランスフェクション試薬の各溶液３００μｌを、１０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ３．０）３００μｌ中のｍＲＮＡ１２０μｇの溶液と混合し、調製はｓｉＲＮＡ－ＬＮＰに類似させた。このようにして、トランスフェクション試薬Ａ０７－Ａ２９から、Ｂ０７－Ｂ２９と命名した対応するナノ粒子サンプルを作製した。Ｂ０８ａおよびＢ１１ａと名付けたナノ粒子サンプルは、それぞれトランスフェクション試薬Ａ０２およびＡ０５から作製した。

【０１３８】

各ＬＮＰサンプル（Ｂ０１～Ｂ２９）を３回に分けて調製した。形成したてのＬＮＰの

流体力学的直径は、動的光散乱（ＮａｎｏＺＳ　Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ、Ｍａｌｖｅｒｎ、Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ、英国）を用いて、２５℃で１７３°の散乱角で測定した。ｓｉＲＮＡ－ＬＮＰの流体力学的直径は６７～１１０ｎｍ、ｍＲＮＡ－ＬＮＰの流体力学的直径は８２～２８８ｎｍであった（表５）。この形状の粒子をその後の生物学的試験に用いた。

【０１３９】

【表５】

表５．動的光散乱法で測定した標準偏差を含むＬＮＰの流体力学的直径。

LNP	直径（ｎｍ）		LNP	直径	（ｎｍ）
B01	83.3	± 4.0	B16	143.2	± 6.2
B02	109.9	± 12.7	B17	190.8	± 2.5
B03	100.1	± 6.3	B18	190.4	± 2.1
B04	81.7	± 8.8	B19	194.8	± 5.2
B05	72.3	± 13.2	B20	194.4	± 6.2
B06	67.1	± 3.5	B21	179.4	± 10.5
B07	90.4	± 1.3	B22	261.0	± 11.4
B08	153.5	± 11.9	B23	221.0	± 12.7
B09	117.0	± 7.6	B24	217.1	± 13.8
B10	90.5	± 3.9	B25	287.8	± 10.5
B11	157.7	± 3.5	B26	165.1	± 11.9
B12	81.5	± 5.4	B27	242.1	± 3.9
B13	174.3	± 7.8	B28	227.9	± 10.5
B14	144.6	± 17.8	B29	119.1	± 4.5
B15	124.5	± 14.3			

【０１４０】

実施例２１

脂質ナノ粒子へのｓｉＲＮＡおよびｍＲＮＡの組み込み効率

実施例２０で調製したｓｉＲＮＡ（チロシルＤＮＡホスホジエステラーゼ（ＴＤＰ２）をコードするｍＲＮＡの分解を引き起こす）のｓｉＲＮＡ－ＬＮＰ　Ｂ０１－Ｂ０６へのパッケージングの効率は、Ｑｕｂｉｔ　ｍｉｃｒｏＲＮＡ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて、製造業者のプロトコールに従って決定した。実施例２０で調製したｍＲＮＡ－ＬＮＰ　Ｂ０７－Ｂ２９へのｍＲＮＡ（蛍光タンパク質ｍＫａｔｅ２をコードする）のパッケージングの効率は、Ｑｕｂｉｔ　ＲＮＡ　ＨＳ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて、製造業者のプロトコールに従って決定した。組み込み効率は、ナノ粒子溶液中で自由に利用できるｓｉＲＮＡおよびｍＲＮＡの濃度と、分解後にナノ粒子から放出されるｓｉＲＮＡおよびｍＲＮＡの濃度を比較することにより決定した。ＬＮＰはＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含むバッファー（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ　８．０；０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ，２％　ＴｒｉｔｏｎＸ－１００）で分解した。ｓｉＲＮＡのパッケージング効率は高く、７６～９１％であった。ｍＲＮＡのパッケージング効率は６０～９６％であった（表６）。

【０１４１】

【表６】

表６．チロシル－ＤＮＡホスホジエステラーゼ２（ＴＤＰ２）に対するｓｉＲＮＡのパッケージング効率と、蛍光タンパク質ｍＫａｔｅ２をコードするｍＲＮＡのＬＮＰへのパッケージング効率（３連の標準偏差を含む）。

LNP	ｓｉＲＮＡパッケージング（％）
B01	76.1 ± 4.9
B02	91.1 ± 1.3
B03	77.4 ± 4.6
B04	85.0 ± 6.9
B05	75.6 ± 2.21
B06	89.9 ± 0.1

LNP	ｍＲＮＡパッケージング（％）	LNP	ｍＲＮＡパッケージング（％）
B07	88.3 ± 1.6	B19	67.0 ± 2.8
B08	86.2 ± 0.9	B20	64.2 ± 0.2
B09	70.4 ± 6.8	B21	65.0 ± 0.1
B10	86.9 ± 0.6	B22	60.8 ± 3.2
B11	64.3 ± 3.4	B23	63.7 ± 0.4
B12	83.2 ± 3.2	B24	68.7 ± 3.3
B13	85.5 ± 0.5	B25	78.8 ± 1.3
B14	94.0 ± 0.1	B26	61.1 ± 1.1
B15	96.0 ± 1.0	B27	75.0 ± 0.1
B16	86.5 ± 6.5	B28	70.0 ± 0.1
B17	75.0 ± 11.0	B29	77.0 ± 2.0
B18	65.1 ± 0.1		

【０１４２】

実施例２２

ＬＮＰの細胞毒性

ＳＶ４０ラージＴ抗原を発現する胚性腎臓細胞由来のヒト細胞株（ＨＥＫ２９３Ｔ）、およびヒト肝細胞癌細胞株（ＨｅｐＧ２）を、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を添加したダルベッコ改変培地（ＤＭＥＭ）中、９６ウェルプレート（１ウェルあたり１００μｌの培養液中５×１０^{4}細胞）で、３７℃、５％CO_2で培養した。細胞を、実施例２０で３重反復して作製したＬＮＰ　Ｂ０７－Ｂ１２（ウェル中の全脂質成分の最終総濃度は２０μＭ）またはＬＮＰ　１０μｌ（ウェル中の全脂質成分の最終総濃度は１００μＭ）で２μｌトランスフェクトし、その後２４時間インキュベートした。ＬＮＰの細胞毒性は、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒＧｌｏ　２．０細胞生存率アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ、米国）で分析した。細胞生存率は非導入細胞（コントロール）に対して正規化した。結果を表７と表８にまとめた。

【０１４３】

使用した両細胞株について、新しいＬＮＰはいずれも、ＴＴ３脂質との１００μＭ混合物と比較して有意な毒性を示さず、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞とＨｅｐＧ２細胞の生存率はわずか２７％と１５％に低下した（表８）。

【０１４４】

【表７】

表７．個々の細胞株タイプについて、２０μＭトランスフェクション混合物Ｂ０７－Ｂ１２添加後の細胞生存率（％）として表したＬＮＰの細胞毒性。

LNP	HEK293T		HepG2	
コントロール	100.00	± 4.29	100.00	± 3.44
B07	91.85	± 4.34	93.49	± 4.25
B08	95.90	± 6.14	100.85	± 6.35
B09	102.19	± 5.75	103.10	± 7.13
B10	100.49	± 3.12	100.93	± 5.87
B11	103.51	± 5.79	101.74	± 6.09
B12	102.55	± 5.67	104.55	± 4.98

【０１４５】

【表８】

表８．個々の細胞株タイプについて、１００μＭのトランスフェクション混合物Ｂ０７－Ｂ１２添加後の細胞生存率（％）として表したＬＮＰの細胞毒性。

LNP	HEK293T		HepG2	
コントロール	100.00	± 4.29	100.00	± 3.44
B07	99.86	± 3.95	107.75	± 7.27
B08	103.07	± 2.05	117.75	± 3.71
B09	106.79	± 2.32	113.40	± 5.38
B10	70.88	± 3.77	95.77	± 3.37
B11	108.84	± 3.31	110.43	± 1.19
B12	27.29	± 2.38	14.92	± 4.19

【０１４６】

実施例２３

新しいＬＮＰを用いたｉｎ ｖｉｔｒｏでのｓｉＲＮＡのトランスフェクション

チロシル－ＤＮＡホスホジエステラーゼ２（ＴＤＰ２）をコードするｍＲＮＡの分解を引き起こす短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ、カタログ番号４３９２４２０、Ａｍｂｉｏｎ）を含むｓｉＲＮＡ－ＬＮＰ粒子を、実施例２０に従って調製した。ｓｉＲＮＡトランスフェクション専用のコントロールトランスフェクション試薬として、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＲＮＡｉＭａｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）を用いた。ｓｉＲＮＡ－ＬＮＰノックダウンには、ヒト細胞株ＨＥＫ２９３Ｔと、入手可能なトランスフェクション試薬ではトランスフェクションが非常に困難なヒト多発性骨髄腫由来の細胞株を用いた（Brito J.L.R., Brown N., Morgan G.J. (2010) The transfection of siRNAs in Multiple Myeloma Cell Lines.In:Min WP., Ichim T. (eds) RNA Interference.Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 623.Humana Press）。細胞は９６ウェルプレート（１ウェルあたり１００μｌの培養液に５×１０^{4}細胞）で、１０％ＦＢＳ添加ＤＭＥＭ培地中、３７℃、５％ CO_2 で培養した。細胞を２μｌのｓｉＲＮＡ－ＬＮＰ（全脂質成分の最終総濃度は２０μＭ、最終ｓｉＲＮＡ濃度は１６ｎＭ）でトランスフェクトし、その後２４時間インキュベートした。トランスフェクションは生物学的３重反復で行った。ＲＮＡはＲＮＡｅａｓｙ Ｐｌｕｓ Ｍｉｃｒｏ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて単離した。ｃＤＮＡはＴＡＴＡＡ ＧｒａｎｄＳｃｒｉｐｔ ｃＤＮＡ Ｓｕｐｅｒｍｉｘ（ＴＡＴＡＡｂｉｏｃｅｎｔｅｒ）を用いて、製造元の推奨に従って調製した。定量的ＲＴ－ＰＣＲは、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ ４８０（Ｒｏｃｈｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ）を用いて行った。ＴＤＰ２をコードするｍＲＮＡを増幅するためのプライマーは以下の通りであった：ＧＡＰＤＨをコードするｍＲＮＡは、データの標準化に使用した（プライマー：５’－ＡＡＴＣＣＣＡＴＣＡＣＣＡＴＣＴＴＣＣＡ－３’（配列番号５）および５’－ＴＧＧＡＣＴＣＣＡＣＧＡＣＧＴＡＣＴＣＡ－３’（配列番号６））。

【０１４７】
これらすべての場合において、新しいｓｉＲＮＡ－ＬＮＰは、市販のトランスフェクション試薬ＲＮＡｉＭａｘと比較して、細胞内のＴＤＰ２　ｍＲＮＡのレベルを有意に減少させた。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞株では、新規ＬＮＰ　Ｂ０２－Ｂ０５は、ＲＮＡｉＭａｘよりもほぼ３倍高い効率を示した。ＯＰＭ－２骨髄腫株では、Ｂ０３は市販のｓｉＲＮＡトランスフェクション試薬よりも１３倍もｍＲＮＡ発現を低下させた（表９）。
【０１４８】
【表９】
表９．ＨＥＫ２９３Ｔ細胞株およびＯＰＭ－２細胞株における、市販のトランスフェクション試薬ＲＮＡｉＭａｘと比較した、新しいｓｉＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｂ０１－Ｂ０６）による細胞内の内因性に発現されたＴＤＰ２　ｍＲＮＡの減少。統計はＳｔｕｄｅｎｔの不対ｔ検定で評価した。Ｐ値は、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＲＮＡｉＭａｘコントロールトランスフェクション混合液に基づく；ｐ値＜０．００１には文字“ａ”、ｐ値＜０．０５には文字“ｃ”が付されている。

LNP	HEK293T	p	OPM-2	p
コントロール	1.00 ± 0.10		1.00 ± 0.10	
B01	0.24 ± 0.17		0.52 ± 0.05	
B02	0.04 ± 0.02	c	0.11 ± 0.01	a
B03	0.05 ± 0.03	c	0.04 ± 0.01	a
B04	0.06 ± 0.02	c	0.08 ± 0.02	a
B05	0.05 ± 0.01	c	0.05 ± 0.01	a
B06	0.05 ± 0.01	c	0.07 ± 0.02	a
ＲＮＡｉＭａｘ	0.15 ± 0.06	-	0.52 ± 0.02	-

【０１４９】
実施例２４
新規ＬＮＰを用いたｉｎ　ｖｉｔｒｏでのｍＲＮＡトランスフェクション
大型ＳＶ４０　Ｔ抗原を発現する胚性腎臓細胞由来のヒト細胞株（ＨＥＫ２９３Ｔ）、肝癌細胞（ＨｅｐＧ２）およびヒト骨肉腫由来細胞株（Ｕ２ＯＳ）を、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を添加したダルベッコ改変培地（ＤＭＥＭ）中、９６ウェルプレート（１ウェルあたり１００μｌ培養液中５×１０^{4}細胞）で、３７℃、５％CO_2細胞を、実施例２０で調製したｍＲＮＡ－ＬＮＰ　Ｂ０７～Ｂ１２で２μｌトランスフェクトし、その後２４時間インキュベートした。ウェル中の脂質成分の最終総濃度は２０μＭで、蛍光タンパク質ｍＫａｔｅ２をコードするｍＲＮＡの量は１００ｎｇであった。コントロールのトランスフェクション試薬としてＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）２０００を用いた。トランスフェクションは３つの生物学的反復で行い、各生物学的反復は３つの技術的反復を有していた。Ｃｙ５およびｍＫａｔｅ２の蛍光は、ＢＤ　ＬＳＲ　Ｆｏｒｔｅｓｓａサイトメーターを用いて検出し、ＬＮＰの細胞内への侵入を示すＣｙ５蛍光陽性細胞の割合（表１０）、蛍光タンパク質ｍＫａｔｅ２を発現する細胞の割合、およびｍＫａｔｅ２の蛍光強度（表１１）を算出した。蛍光強度については、市販のトランスフェクション試薬Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）２０００に対してデータを正規化した。Ｃｙ５蛍光によると、すべてのＬＮＰが９０％を超える効率で細胞に導入されていることがわかる（表１０）。さらに、新しいＬＮＰ　Ｂ１１は、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）２０００トランスフェクション・コントロールでトランスフェクションした細胞に比べて、トランスフェクションしたｍＲＮＡから２．１３倍の蛍光ｍＫａｔｅ２タンパク質を産生した（表１１）。
【０１５０】

【表１０】

表１０．細胞株ＨＥＫ２９３ＴおよびＨｅｐＧ２に対するＣｙ５陽性細胞のパーセンテージで表した新規ｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｂ０７－Ｂ１２）のトランスフェクション効率。トランスフェクション混合物には蛍光色素Ｃｙ５で標識した脂質が含まれており、ＬＮＰの細胞内への侵入を観察することが可能である。

LNP	HEK293T	HepG2
B07	99.28 ± 0.10	98.59 ± 0.15
B08	99.19 ± 0.09	94.73 ± 0.88
B09	97.83 ± 0.63	90.52 ± 2.39
B10	97.79 ± 0.36	92.93 ± 0.77
B11	98.59 ± 0.47	96.49 ± 1.70
B12	97.94 ± 0.94	95.19 ± 0.98

【０１５１】

【表１１】

表１１．Ｕ２ＯＳ細胞株について、蛍光ｍＫａｔｅ２タンパク質を発現する細胞のパーセンテージとして表される新規ｍＲＮＡ－ＬＮＰのトランスフェクション効率、および粒子をトランスフェクトしたｍＲＮＡからのｍＫａｔｅ２の蛍光強度。統計はＳｔｕｄｅｎｔの不対ｔ検定で評価した。ｐ値はコントロールのトランスフェクション混合物Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００との関係であり、ｐ値＜０．００１は文字“ａ”で示している。

LNP	mKate2を発現している細胞の%	p	mKate2の蛍光	p
B07	28.76 ± 1.51		0.10 ± 0.00	
B08	88.62 ± 0.60	a	1.08 ± 0.07	
B09	88.38 ± 1.00	a	1.79 ± 0.23	a
B10	84.46 ± 1.06	a	0.69 ± 0.08	
B11	92.32 ± 2.18	a	2.13 ± 0.19	a
B12	90.63 ± 0.92	a	1.86 ± 0.31	a
Lip2000	47.67 ± 1.25	-	1.00 ± 0.05	-

【０１５２】

実施例２５

新規ＬＮＰを用いたｉｎ　ｖｉｔｒｏでのｍＲＮＡトランスフェクション

大型ＳＶ４０Ｔ抗原を発現する胚性腎臓細胞由来のヒト細胞株（ＨＥＫ２９３Ｔ）を、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）添加ダルベッコ改変培地（ＤＭＥＭ）中、９６ウェルプレート（１ウェル当たり１００μｌ培養液中２．５×１０^{4}細胞）で、３７℃、５％CO_2で培養した。細胞を、実施例２０で調製したｍＲＮＡ－ＬＮＰ　Ｂ０８ａ、Ｂ１１ａ、Ｂ１３～Ｂ１８、Ｂ２０～Ｂ２５およびＢ２９でトランスフェクトし、２４時間インキュベートした。ウェル中の全脂質成分の最終総濃度は２０μＭであり、蛍光タンパク質ｍＫａｔｅ２をコードするｍＲＮＡの量は１００ｎｇであった。ベンチマークＤ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ脂質を含むＢ２９　ＬＮＰをコントロールとして用いた。トランスフェクションは３重反復で行った。蛍光タンパク質ｍＫａｔｅ２を発現する細胞のパーセンテージとｍＫａｔｅ２の蛍光強度（表１２）を、ＢＤ　ＬＳＲ　Ｆｏｒｔｅｓｓａサイトメーターで５６１－６１０／２０　ｎｍの波長で分析した。蛍光強度については、ベンチマークであるＤ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ含有ＬＮＰ（Ｂ２９）に対してデータを正規化した。ベンチマークであるＤ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ　ＬＮＰと比較して、トランスフェクトされた細胞の割合が有意に高く、蛍光強度が有意に増加したことから明らかなように、すべての新しいＬＮＰはＨＥＫ２９３Ｔ細胞をより効率的にトランスフェクトした。特に、新し

いＬＮＰ　Ｂ２２は、ベンチマークであるＤ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ脂質を含むＢ２９ＬＮＰでトランスフェクトした細胞に比べ、トランスフェクトしたｍＲＮＡから１３．６６倍の蛍光ｍＫａｔｅ２タンパク質を生成した（表１２）。

【０１５３】

【表１２】

表１２．ＨＥＫ２９３Ｔ細胞株に対する新規ｍＲＮＡ－ＬＮＰのトランスフェクション効率を、ＬＮＰによって送達されたｍＲＮＡから蛍光ｍＫａｔｅ２タンパク質を発現する細胞のパーセンテージとして示す。統計はＳｔｕｄｅｎｔの不対ｔ検定で評価した。ｐ値はコントロールのＤ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（Ｂ２９）ＬＮＰｓとの関係である。ｐ値＜０．０００１は文字“ａ”で、ｐ＜０．００１は“ｂ”で、ｐ＜０．０１は“ｃ”でそれぞれ示している。

LNP	トランスフェクトされた細胞の%		p(D-Lin-MC3-DMA)	mKate2の正規化蛍光		p (D-Lin-MC3-DMA)
B08a	86.2	± 2.1	a	3.72	± 0.11	a
B11a	76.0	± 3.8	b	3.10	± 0.16	b
B13	94.0	± 0.7	a	5.27	± 0.25	a
B14	77.1	± 5.3	b	1.70	± 0.12	b
B15	83.5	± 3.8	b	1.98	± 0.31	c
B16	69.5	± 1.3	b	1.37	± 0.05	b
B17	85.4	± 3.2	b	3.79	± 0.67	c
B18	82.8	± 1.5	a	3.99	± 0.39	b
B20	86.6	± 9.1	c	7.78	± 1.63	c
B21	56.5	± 2.3	c	2.41	± 0.21	b
B22	93.3	± 1.5	a	13.66	± 1.46	a
B23	89.7	± 5.7	b	7.89	± 1.35	b
B24	72.4	± 1.3	b	1.88	± 0.09	a
B25	62.2	± 4.2	c	1.58	± 0.13	c
B29	29.9	± 4.2	-	1.00	± 0.02	-

【０１５４】

実施例２６

Ｃｒｅベースの組換えによってモニターされる新規ｍＲＮＡ－ＬＮＰのトランスフェクション効果

グローバルデュアルＣｒｅレポーターを有するマウスモデル（Mazumdar, M.D.: Genesis 2007, 45:593-605）に由来するマウス胚線維芽細胞（ＭＥＦ）を、９６ウェルプレートに播種し（１ウェルあたり１００μｌの培養液中２．５×10^4細胞）、１０％ＦＢＳを添加したＤＭＥＭ中、３７℃、５％CO_2で２４時間培養した。Ｃｒｅリコンビナーゼをコードするメッセンジャーｒｎａ（ｍＲＮＡ）を、直鎖化プラスミドから実施例２０と同様にｉｎ　ｖｉｔｒｏで調製し、以下のようにＬＮＰにパッケージした：３００μｌのトランスフェクション試薬Ａ１３～Ａ２５、Ａ０２およびＡ２７、ならびにベンチマークＤ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ脂質を含む対照トランスフェクション試薬Ａ２９のサンプル、ならびに３００μｌの１０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ３．０）中の１２０μｇのｍＲＮＡを、実施例２０に類似したマイクロ流体デバイスを用いてＬＮＰに組み込んだ。得られたｍＲＮＡ－ＬＮＰを直ちに６００μｌのＰＢＳで希釈した；Ｂ３１～Ｂ４３と標識された対応するナノ粒子（トランスフェクション試薬Ａ１３～Ａ２５から形成）、ナノ粒子Ｂ３０（トランスフェクション試薬Ａ０２から形成）、ナノ粒子Ｂ４４（トランスフェクション試薬Ａ２７から形成）、および同様に、Ｂ４５と標識されたベンチマークナノ粒子は、こうしてトランスフェクション試薬Ａ２９から形成された。

【０１５５】

細胞を、ＣｒｅリコンビナーゼをコードするｍＲＮＡを１００ｎｇ含有するそれぞれの

ｍＲＮＡ－ＬＮＰ（ウェル中の全脂質成分の最終総濃度は２０μＭ）でトランスフェクトし、その後４８時間インキュベートした。ベンチマークＤ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ脂質を含むＢ４５　ＬＮＰをコントロールとして用いた。トランスフェクションは四重反復で行った。ＧＦＰを発現する細胞の割合は、ＢＤ　ＬＳＲ　Ｆｏｒｔｅｓｓａサイトメーターを用いて分析した（波長４８８～５３０／３０ｎｍ）。ベンチマークであるＤ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ　ＬＮＰでトランスフェクトした細胞と比較して、ＧＦＰを発現している細胞の割合が有意に高いことから明らかなように、すべての新しいＬＮＰはｍＴ／ｍＧ細胞をより効率的にトランスフェクトした（Ｂ４５）。興味深いことに、ＧＦＰを発現する細胞のパーセンテージは、テストしたすべての新しいＬＮＰ（Ｂ４４を除く）で常に９５％以上であったのに対し、ベンチマークのＤ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ脂質を含むＬＮＰでは、組換え細胞のパーセンテージはわずか２１％であった（表１３）。

【０１５６】

【表１３】

表１３．ｍＴ／ｍＧレポーターマウス胚由来のＭＥＦにおいてｔｄトマトをＧＦＰに変換するための新規Ｃｒｅ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰの有効性の比較。統計はスチューデントの不対ｔ検定を用いて評価した。ｐ値はコントロールのＤ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（Ｂ４５）ＬＮＰｓとの関係である；ｐ値＜０．０００１は文字“ａ”で示している。

LNP	ＧＦＰを発現している細胞の％	ｐ（D-Lin-MC3-DMA）
B30	99.05 ± 0.10	a
B31	99.83 ± 0.07	a
B32	99.60 ± 0.01	a
B33	95.50 ± 0.04	a
B34	99.75 ± 0.13	a
B35	99.13 ± 0.32	a
B36	99.00 ± 0.17	a
B37	98.85 ± 0.45	a
B38	99.48 ± 0.10	a
B39	95.50 ± 1.25	a
B40	99.13 ± 0.22	a
B41	98.00 ± 0.43	a
B42	99.80 ± 0.06	a
B43	99.73 ± 0.04	a
B44	69.05 ± 2.00	a
B45	21.25 ± 2.35	-
未処理	0.325 ± 0.248	a

【０１５７】

実施例２７

新規ｍＲＮＡ－ＬＮＰの生体内分布

Ｃｒｅリコンビナーゼをコードするメッセンジャーｒｎａ（ｍＲＮＡ）を、直鎖化プラスミドから実施例２０と同様にｉｎ　ｖｉｔｒｏで調製し、以下のようにＬＮＰにパッケージした：トランスフェクション試薬Ａ２２の３００μｌサンプルと、ベンチマーク脂質Ｄ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡを含む対照トランスフェクション試薬Ａ２９と、１０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ３．０）３００μｌ中のｍＲＮＡ１２０μｇとを、実施例２０に類似したマイクロ流体デバイスを用いてＬＮＰに組み込んだ。得られたｍＲＮＡ－ＬＮＰを直ちに６００μｌのＰＢＳで希釈し、トランスフェクション試薬Ａ２２から対応するＢ４０標識ナノ粒子を形成させた。同様に、Ｂ４５標識ナノ粒子はトランスフェクション試薬Ａ２９から形成された。ｍＲＮＡ－ＬＮＰをＰＢＳで透析し、ろ過した。エンドトキシンレベルは２ＥＵ／ｍｌ未満であった。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｂ４０およびＢ４５）を、グローバルデュアルＣｒｅレポーター（Mazumdar, M.D.: Genesis 2007, 45:593-605）を

有する４匹のマウス（繁殖ＢＩＯＣＥＶ，Ｖｅｓｔｅｃ）に、それぞれ２．０ｍｇ　ｍＲＮＡ／ｋｇの濃度で静脈内投与し、組換えが成功したことを分析できるようにした。Ｃｒｅリコンビナーゼ mＲＮＡを搭載したｍＲＮＡ－ＬＮＰが正常に送達された細胞では、染色体組み換えとそれに続く膜赤タンパク質遺伝子（いわゆる赤いトマト）の切除、膜緑タンパク質（ＧＦＰ）遺伝子の転写の「オン」が起こった。非微粒子化対照マウスを含むマウスは、微粒子投与５日後に犠牲にされ、標準化されたプロトコールに従って特定の臓器（肝臓、心臓、腎臓、肺、および脾臓）の組織学的分析が行われた。組織学的画像の分析から、Ｂ４０ナノ粒子が肝臓に完全に分布し、塗布５日後に赤色膜タンパク質を発現する細胞が緑色膜タンパク質を発現する細胞に５０～８０％転換したことが明らかになった。Ｄ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ脂質を含むＬＮＰｓ　Ｂ４５の場合、転換率は約２０％であった（図１０）。

【０１５８】

組織学的分析は、ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）ＰＣＲ分析によるｍＴ／ｍＧマウスの肝臓におけるｔｄＴｏｍａｔｏ／ＧＦＰ転換の評価によってさらに補完された。簡単に述べると、それぞれの肝臓サンプルから単離したｇＤＮＡ鋳型５０ｎｇを、後続のプライマー：（５’－ＡＡＣＧＴＧＣＴＧＧＴＴＡＴＴＧＣＴＧ－’３（配列番号７）；５’－ＡＡＧＴＣＧＴＧＣＴＧＣＴＴＣＡＴＧＴＧ－’３（配列番号８））を用いたＰＣＲ反応に用いた。図１１において、得られた肝臓サンプルのｇＤＮＡ　ＰＣＲ増幅の電気泳動解析は、ｔｄＴｏｍａｔｏ／ｔＧＦＰ遺伝子座において活性なＣｒｅ組換えが起こった場合には５３０ｂｐのＰＣＲ産物を示し、Ｃｒｅ組換えが起こらなかった場合には２９４３ｂｐのＰＣＲ産物（上部バンド）を示す。指定されたＢ４０　ｍＲＮＡ－ＬＮＰは、試験した４匹のマウスすべてで完全なＣｒｅ組換えを示したが、ベンチマークＬＮＰ（Ｂ４５）の場合、組換えは試験したマウスの５０％でのみ完全であった。

【０１５９】

実施例２８

新規ｍＲＮＡ－ＬＮＰの生体内における有効性

ｈＥＰＯ（ヒトエリスロポエチン）をコードするメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を、直鎖化プラスミドから実施例２０に類似してｉｎ　ｖｉｔｒｏで調製し、以下のようにＬＮＰにパッケージした：３００μｌのトランスフェクション試薬Ａ２３、またはベンチマーク脂質Ｄ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡを含む対照トランスフェクション試薬Ａ２９、および３００μｌの１０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ３．０）中の１２０μｇのｍＲＮＡを、実施例２０に類似したマイクロ流体装置を用いてＬＮＰに組み込んだ。こうしてトランスフェクション試薬Ａ２３から、対応するＢ４６標識ナノ粒子が形成された。同様に、Ｂ４７標識ナノ粒子はトランスフェクション試薬Ａ２９から形成された。ｍＲＮＡ－ＬＮＰをＰＢＳで透析し、ろ過した。エンドトキシンレベルは０．３ＥＵ／ｍｌ未満であった。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｂ４６およびＢ４７）を、それぞれ０．５ｍｇ　ｍＲＮＡ／ｋｇの濃度で３匹のＣ５７Ｂ１／６マウス（ＢＩＯＣＥＶ、Ｖｅｓｔｅｃ）に静脈内投与し、対照の３匹のＣ５７Ｂ１／６マウスにはＰＢＳを投与した。投与６時間後、マウスから尾静脈経由で血液を採取し、血清分離チューブに入れて室温で凝固させた。その後、チューブを７０００ｒｐｍで７分間遠心分離し、血清サンプルを分注し、分析まで－８０℃で保存した。ｈＥＰＯ濃度は、ｈＥＰＯ　ＥＬＩＳＡアッセイ（カタログ番号ＤＥＰ００；Ｒ＆Ｄシステムズ、ミネアポリス、ＭＮ、ＵＳＡ）を用いて、製造業者の説明書に従って決定した。血液学プロファイルは、標準化されたプロトコールを用いて決定した。

【０１６０】

Ｂ４６と命名されたナノ粒子は、対照のＢ４７　ＬＮＰと比較して、投与６時間後にヒトＥＰＯタンパク質の高い産生を示したが、統計的には有意ではなかった。重要なことは、新しいリピドイド（Ｂ４６）を含むＬＮＰは、対照のＢ４７　ＬＮＰとは対照的に、血液学的プロフィールを変化させなかったことである。新しいＬＮＰ投与後の血液検査は、ＰＢＳ対照と同等であった（表１４）。

【０１６１】

【表１４】

表１４．投与６時間後のタンパク質産生における新規ヒトＥＰＯ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰのｉｎ　ｖｉｖｏ効力の比較。

LNP	hEPO [mIU/ml]		WBS# [*10^9/L]		Neu# [*10^9/L]		Lym# [*10^9/L]	
B46	750	± 514	4.91	± 0.57	0.90	± 0.19	3.58	± 0.73
B47	465	± 154	10.06	± 2.59	4.89	± 2.66	4.23	± 0.43
PBS			4.40	± 1.12	1.02	± 0.84	3.09	± 0.33

【０１６２】

実施例２９

新規ｓｉＲＮＡ－ＬＮＰの生体内における有効性

実施例１９のトランスフェクション試薬Ａ０２、Ａ１４、Ａ１６、Ａ１７、Ａ２２、Ａ２３およびＡ２９を使用して、コレステロール輸送に関与する肝細胞発現遺伝子であるマウスアポリポタンパク質Ｂ（ＡｐｏＢ）遺伝子を標的とするｓｉＲＮＡで、それぞれＢ４８～Ｂ５４と指定されるｓｉＲＮＡ－ＬＮＰを形成した（カタログ番号２３８０５５　Ａｐｏｂ　ｍｏｕｓｅ　ｓｉＰＯＯＬ－４０　ｋｉｔ、ｓｉＴＯＯＬｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＧｍｂＨ）、および対照の非標的ｓｉＲＮＡ－ＬＮＰ（２３８０５５　Ａｐｏｂ　ｍｏｕｓｅ　ｓｉＰＯＯＬ－４０　ｋｉｔ，ｓｉＴＯＯＬｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＧｍｂＨに同封）と交互にｓｉＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｂ５５からＢ６０）を、実施例２０に記載されるように組み立てた。動的光散乱によって測定された流体力学的直径は１０３ｎｍから１５４ｎｍの範囲であり、ｓｉＲＮＡプールのパッケージング効率は５９％から９９％の範囲であった。ｓｉＲＮＡ－ＬＮＰはＰＢＳに透析された。エンドトキシンレベルは２ＥＵ／ｍｌ未満であった。マウスは、後眼窩出血による血漿採取の前に４時間絶食させた。ＡｐｏＢを標的とするｓｉＲＮＡ－ＬＮＰを、１６μｇのｓｉＲＮＡ濃度で３匹のＣ５７Ｂ１／６マウス（ＢＩＯＣＥＶ、Ｃｚｅｃｈ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｏｆ　Ｐｈｅｎｏｇｅｎｏｍｉｃｓ，　Ｖｅｓｔｅｃ）に静脈内投与し、対照の３匹には１６μｇの非標的ｓｉＲＮＡ－ＬＮＰを投与し、別の３匹にはＰＢＳ対照を投与した。すべてのマウスはＬＮＰ塗布の２日後に犠牲にした。コレステロール、トリグリセリド、ＬＤＬ－Ｃの血漿レベルは、標準化されたプロトコールに従って、チェコ・フェノゲノミクス・センターの自動システムを用いて測定した。

【０１６３】

ＡｐｏＢノックダウンによって影響を受けた総コレステロール、トリグリセリド、ＬＤＬ－Ｃのような血漿マーカーの臨床生化学は、対照動物と比較して有意に低下しており、新規ＬＮＰによるＡｐｏＢ　ｓｉＲＮＡの肝臓への効率的な送達が実証された（表１５）。

【０１６４】

【表１５】

表１５．肝臓における効率的なＡｐｏＢノックダウンを示す血漿マーカーの臨床生化学。統計はスチューデントの不対ｔ検定で評価した。ｐ１の値は常に、ＰＢＳを注射した対照マウスに対する相対値であり、ｐ２の値は常に、対照の非標的ｓｉＲＮＡを有するそれぞれの（Ｂ５５からＢ６０）ＬＮＰを注射したマウスに対する相対値であり、ｐ＜０．０００１の値は“ａ”、ｐ＜０．００１の値は“ｂ”、ｐ＜０．０１の値は“ｃ”、ｐ＜０．０５の値は“ｄ”と記した。評価されなかった症例には“ｎ．ｅ．”を付した。

LNP	総コレステロール、ｍｍｏｌ／Ｌ	p1	p2	トリグリセリド、ｍｍｏｌ／Ｌ	p1	p2	ＬＤＬ－Ｃ、ｍｍｏｌ／Ｌ	p1	p2
ＰＢＳコントロール	2.27 ± 0.20			0.60 ± 0.12			0.45 ± 0.05		
B48	0.82 ± 0.02	a	a	0.71 ± 0.07			0.21 ± 0.02	b	
B49	0.52 ± 0.06	a	a	0.19 ± 0.01	b	b	0.15 ± 0.03	b	d
B50	0.85 ± 0.45	c	d	0.42 ± 0.13		c	0.33 ± 0.20		d
B51	0.51 ± 0.10	a	b	0.25 ± 0.01	c	a	0.22 ± 0.05	c	d
B52	0.50 ± 0.21	a	b	0.27 ± 0.01	c	a	0.19 ± 0.08	c	d
B53	0.62 ± 0.15	a	b	0.3 ± 0.01	c	a	0.29 ± 0.02	c	
B55	2.36 ± 0.61		n.e.	0.52 ± 0.01		n.e.	0.64 ± 0.14		n.e.
B56	2.47 ± 0.20		n.e.	0.65 ± 0.10		n.e.	0.63 ± 0.10	d	n.e.
B57	2.41 ± 0.50		n.e.	0.80 ± 0.20		n.e.	0.8 ± 0.22	d	n.e.
B58	2.46 ± 0.76		n.e.	0.92 ± 0.14	d	n.e.	0.78 ± 0.24	d	n.e.
B59	2.50 ± 0.77		n.e.	0.79 ± 0.08		n.e.	0.77 ± 0.32		n.e.
B60	2.56 ± 0.76		n.e.	1.00 ± 0.07	c	n.e.	0.73 ± 0.19	d	n.e.

新しいｓｉＲＮＡ－ＬＮＰの毒性は、生理食塩水を注射したコントロール（ＰＢＳ）および脂質Ｄ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡを含むコントロールＬＮＰ（Ｂ５４）と比較して、臓器不全を示す血漿マーカーおよび血液学的プロファイルの臨床生化学を分析することによってさらに評価された。特に、Ｂ４９と名付けられた新しいｓｉＲＮＡ－ＬＮＰは、コントロールのＢ５４　ＬＮＰと比較して、より優れた毒性プロファイルを示した（表１６）。

【０１６５】

【表１６】

表１６．ベンチマーク脂質Ｄ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（Ｂ５４）を含む対照ｓｉＲＮＡ－ＬＮＰと比較した、Ｂ４９として指定された新規ｓｉＲＮＡ－ＬＮＰの血漿マーカーの臨床生化学および血液学プロファイル。統計はスチューデントの不対ｔ検定で評価した。ｐ１の値は常にＰＢＳを注射したコントロールマウスに対する相対値であり、ｐ２の値は常にコントロールＢ５４　ＬＮＰを注射したマウスに対する相対値である。ｐ＜０．０１の値は“ｃ”、ｐ＜０．０５の値は“ｄ”と記した。

LNP	B49			p1	p2	B54			p1	PBS		
総ビリルビン、μmol/L	2.8	±	1.06			2.5	±	0.34		2.14	±	0.43
AST､U/L	66	±	12.06			150	±	76.14		74.6	±	7.78
ALT､U/L	25	±	3.79			75	±	47.52		23.8	±	1.6
HBDH､U/L	81.03	±	18.8		d	148.7	±	15.2	c	63.2	±	8.24
LDH､U/L	310.1	±	73.82			567	±	61.8	c	231.2	±	30.45
WBC､$*10^9$/L	3.17	±	0.91			6.58	±	1.43		4.35	±	0.44
好中球，％.	34	±	7	d		51	±	11	c	18	±	2
好中球、$*10^9$/L	1.18	±	0.55			3.65	±	1.37	d	0.79	±	0.09
リンパ球，％.	64	±	6	d		45	±	1	c	77	±	2
リンパ球、$*10^9$/L	1.93	±	0.41			2.69	±	0.36		3.35	±	0.38

【産業上の利用可能性】

【０１６６】

本発明のリピドイドを含むトランスフェクション粒子は、基礎研究における様々な生物学的用途、特に活性ＮＡを送達し、その後染色体遺伝子もしくは遺伝子をサイレンシングもしくは活性化し、ゲノムもしくはトランスクリプトームを編集し、またはトランスフェクション粒子を用いて挿入されたＮＡにコードされるタンパク質の発現を可能にするための細胞培養もしくは動物トランスフェクションに有用である。

【０１６７】

獣医学およびヒト医学において、一般式Ｉのリピドイドを含有するトランスフェクション粒子は、好ましくは治療目的または予防目的で使用することができる。治療用ＮＡ含有粒子は、染色体遺伝子のサイレンシングもしくは活性化、免疫原のサイレンシングもしくは活性化、シグナル伝達経路の阻害もしくは活性化、ゲノムもしくはトランスクリプトームの編集、またはＮＡコード化タンパク質の発現を可能にするために、動物またはヒトに投与することができる。

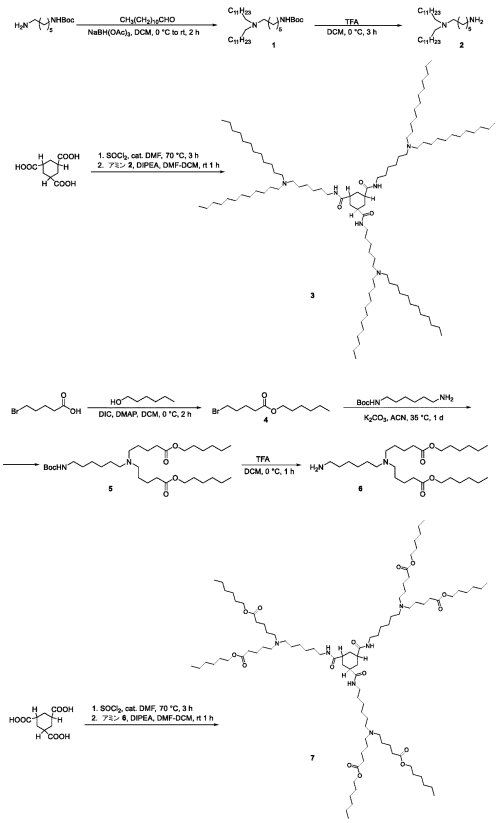
【０１６８】

式Ｉのリピドイドまたはトランスフェクション剤またはトランスフェクション粒子は、医薬品として、特に遺伝子治療に使用することもでき、悪性腫瘍および／または遺伝性疾患の治療に使用するのに適している。これらはまた、化粧品またはバイオテクノロジー用途に処方することもできる。

【図面】

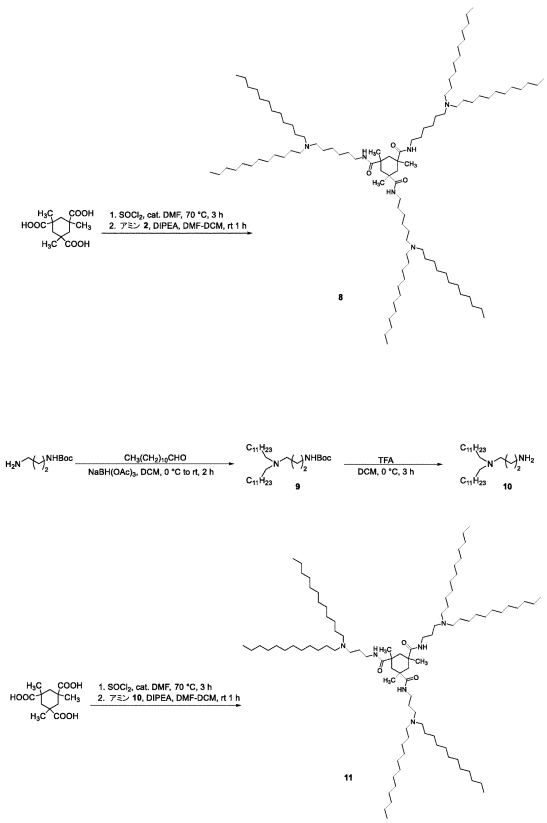
【図１】

図 1



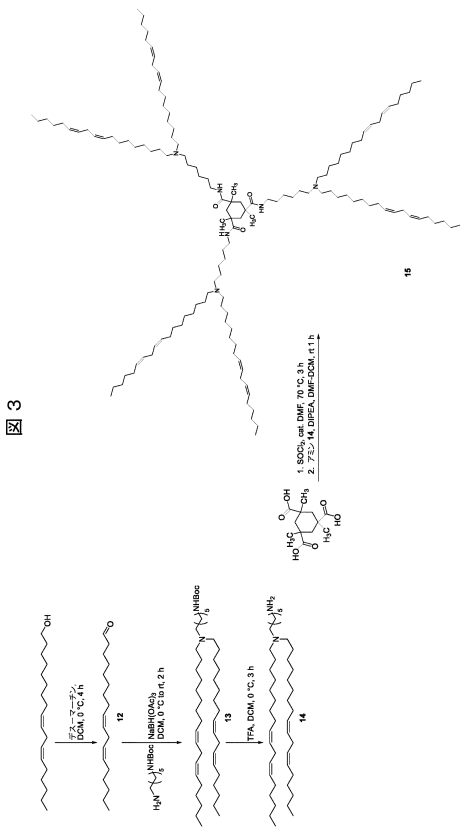
【図２】

図 2



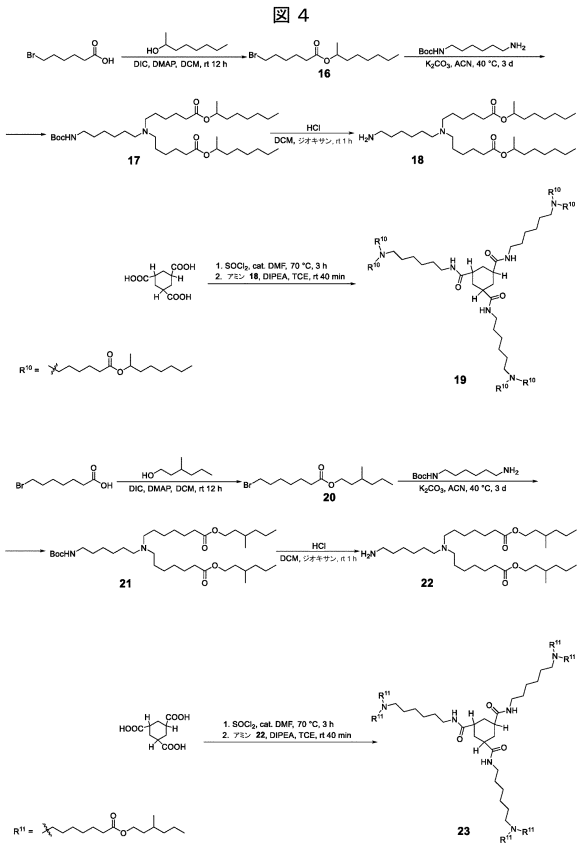
【図３】

図 3



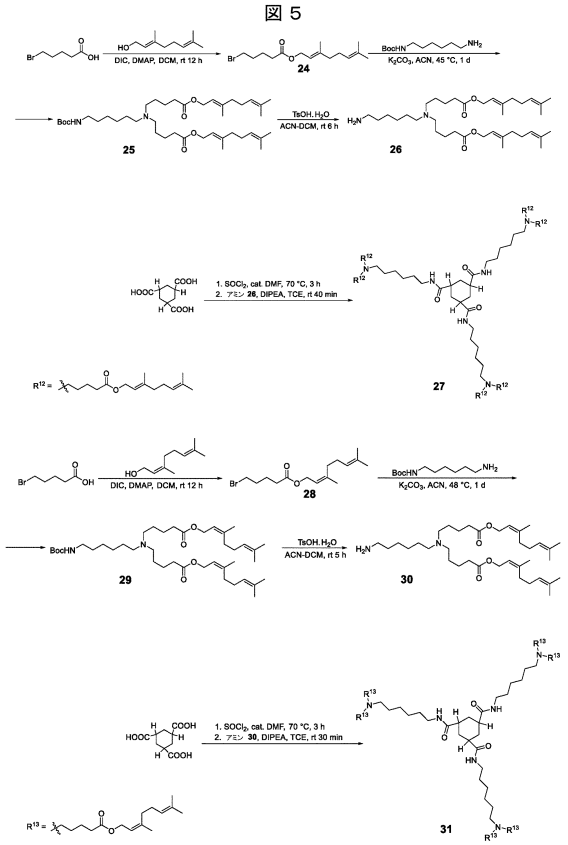
【図４】

図 4



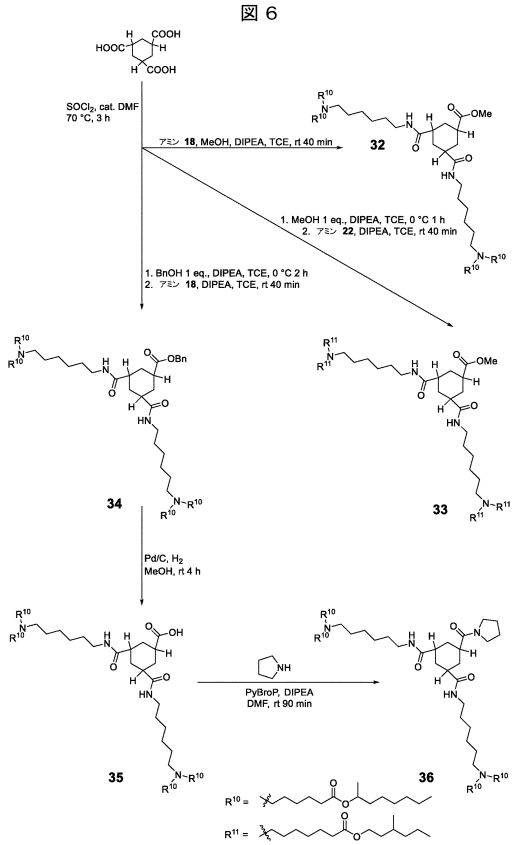
【図５】

図５



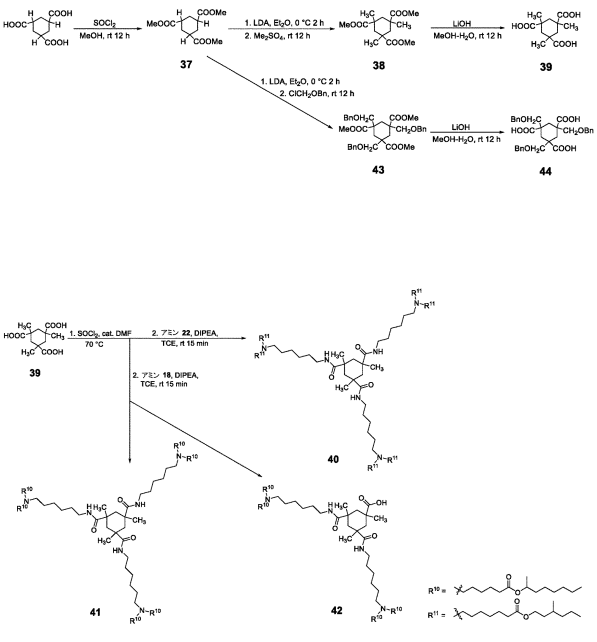
【図６】

図６



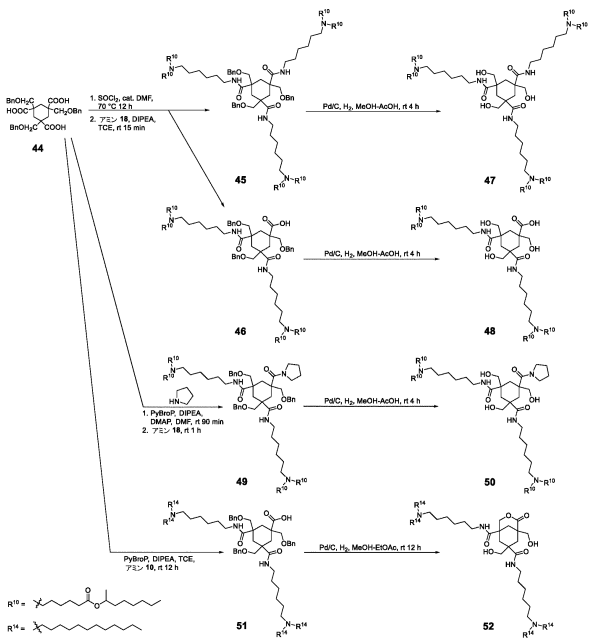
【図７】

図７



【図８】

図８



【図９】

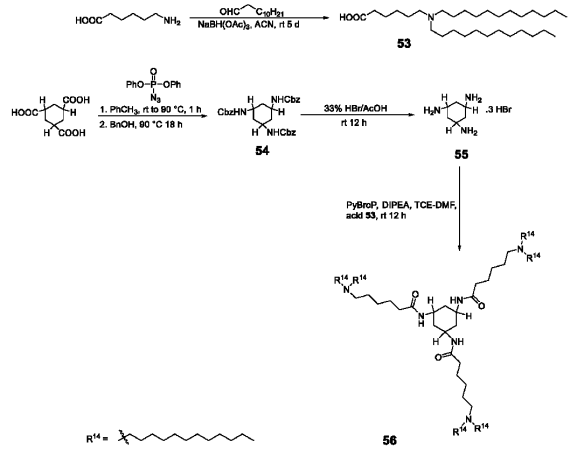


Fig. 9

【図１０】

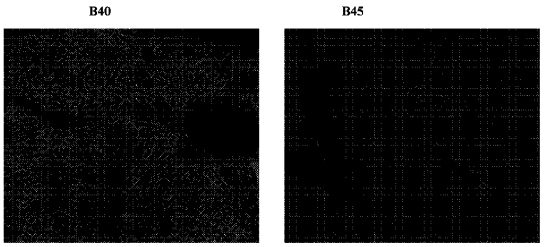
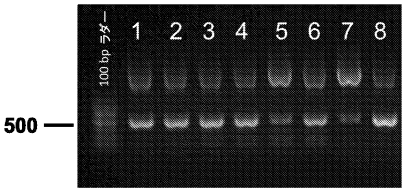


Fig. 10

【図１１】

図 11



【配列表】

<u>0007683120000001.xml</u>

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
A61K 48/00 (2006.01)		A61K	48/00	
A61K 39/00 (2006.01)		A61K	39/00	G
A61K 31/7088(2006.01)		A61K	31/7088	
A61K 47/18 (2017.01)		A61K	47/18	
A61K 47/28 (2006.01)		A61K	47/28	
A61K 47/24 (2006.01)		A61K	47/24	
A61K 9/16 (2006.01)		A61K	9/16	
A61K 8/41 (2006.01)		A61K	8/41	
A61K 8/63 (2006.01)		A61K	8/63	
A61K 8/55 (2006.01)		A61K	8/55	
A61Q 1/00 (2006.01)		A61Q	1/00	
A61Q 5/00 (2006.01)		A61Q	5/00	
A61K 8/86 (2006.01)		A61K	8/86	
C12N 15/88 (2006.01)		C12N	15/88	Z
C07D 295/185 (2006.01)		C07D	295/185	
C07D 311/00 (2006.01)		C07D	311/00	

，コモルニツカー ５
(72)発明者 ヴァネク，ヴァーツラフ
チェコ共和国，１４０ ００ プラハ ４，フラヴニー １２０３／４４
(72)発明者 ヘイダンコヴァ，ズザナ
チェコ共和国，１５２ ００ プラハ ５，レノイロヴァ ６２０／４
(72)発明者 ロウコトヴァ，レンカ
チェコ共和国，１６５ ００ プラハ ６－リソライェ，ロズヴォヨヴァー ２４７／６
(72)発明者 シュヴェック，パヴェル
チェコ共和国，３７０ ０１ チェスケー ブジェヨビツェ，マティツェ シュコルスケー １９１／１６
(72)発明者 プリス，アナスタシア
チェコ共和国，１６０ ００ プラハ ６，クラデンスカー ５３１／４
(72)発明者 ペトレセルヨヴァ，シルヴィア
チェコ共和国，１４２ ００ プラハ ４，ルケショヴァ ５１

審査官 土橋 敬介
(56)参考文献 国際公開第２０１６／１８７５３１（WO，A１）
国際公開第２０１９／０９９５０１（WO，A１）
国際公開第２０２０／１８５２９３（WO，A１）
(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｃ
Ｃ０７Ｄ
Ａ６１Ｋ
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）