

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年6月30日(30.06.2016)



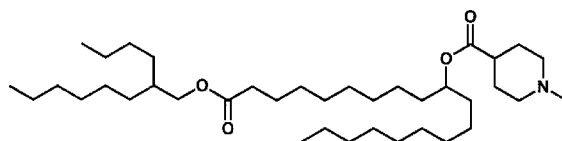
(10) 国際公開番号

WO 2016/104580 A1

- (51) 国際特許分類:
C07C 229/06 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C07D 211/62 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/085969
- (22) 国際出願日: 2015年12月24日(24.12.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-266548 2014年12月26日(26.12.2014) JP
- (71) 出願人: エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社(EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1128088 東京都文京区小石川4-6-10 Tokyo (JP). 相互薬工株式会社(SOGO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1000004 東京都千代田区大手町2-6-2 日本ビル Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 鈴木 裕太(SUZUKI Yuta); 〒3002635 茨城県つくば市東光台5-1-3 エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 兵頭 健治(HYODO Kenji); 〒3002635 茨城県つくば市東光台5-1-3 エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 田中 陽平(TANAKA Yohei); 〒8090003 福岡県中間市上底井野曽根ヶ崎408-1 相互薬工株式会社 福岡事業所内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 志賀 正武, 外(SHIGA Masatake et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: CATIONIC LIPID

(54) 発明の名称: カチオン性脂質



(1)

(57) Abstract: The invention provides a cationic lipid that can be utilized for nucleic acid delivery into the cytoplasm. This cationic lipid is, for example, a compound represented by formula (1) or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

(57) 要約: 本発明は、細胞質への核酸送達に利用可能なカチオン性脂質を提供する。本発明のカチオン性脂質は、例えば、下記式(1)で表される化合物又はその薬剤学的に許容される塩である。

WO 2016/104580 A1

明 細 書

発明の名称： カチオン性脂質

技術分野

[0001] 本発明は、新規なカチオン性脂質に関する。本願は、2014年12月26日に、日本に出願された特願2014-266548号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] siRNA (small interfering RNA)、miRNA (micro RNA)、shRNA (short hairpin RNA、または、small hairpin RNA) 発現ベクター、アンチセンスオリゴヌクレオチド等の核酸は、生体内で配列特異的な遺伝子発現抑制を誘導する核酸であり、核酸医薬として知られている。

[0003] これらの核酸医薬の中でも、特にsiRNAが注目を集めている。siRNAは、19～23塩基対からなる二本鎖RNAであり、RNA干渉 (RNA interference、RNAi) と呼ばれる配列特異的な遺伝子発現抑制を誘導する。

[0004] siRNAは化学的には安定であるが、血しょう中のRNase (ribonuclease) により分解されやすい点、及び、単独では細胞膜を透過しにくいという点等において、治療用途としての問題点を有している (例えば、特許文献1 参照。)。

[0005] 上記の問題点に対して、カチオン性脂質を含有する微粒子内にsiRNAを封入することにより、封入されたsiRNAを血しょう中での分解から保護し、かつ脂溶性の細胞膜への透過を可能とすることが知られている (例えば、特許文献1 参照。)。

[0006] また、特許文献2～4 には、siRNA等の核酸医薬の送達に用いられるカチオン性脂質であって、生分解能を向上させたカチオン性脂質が記載されている。

[0007] また、カチオン性脂質を含有する微粒子は、保管期間中に凝集しやすいという安定性の問題点があり、ポリエチレングリコール修飾脂質（PEG脂質）を該微粒子に含有させて凝集を抑制する方法が知られている。さらに、特定のPEG脂質であるPEG-DPGを微粒子の構成成分とすることや該微粒子と脱イオン化された溶媒とからなる製剤とすることで、凝集抑制と核酸の送達効率を改善する方法が、特許文献5に記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特表2012-530059号公報

特許文献2：国際公開第2011/153493号パンフレット

特許文献3：国際公開第2013/086354号パンフレット

特許文献4：国際公開第2013/158579号パンフレット

特許文献5：国際公開第2014/089239号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

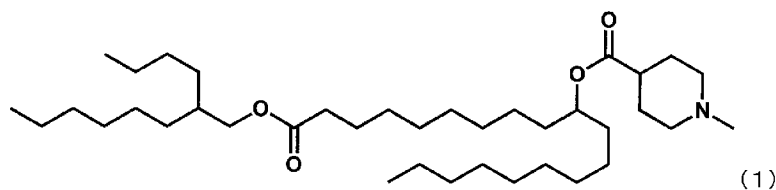
[0009] しかしながら、最近の進展にもかかわらず、細胞質への核酸送達に利用できるカチオン性脂質が依然として求められている。

課題を解決するための手段

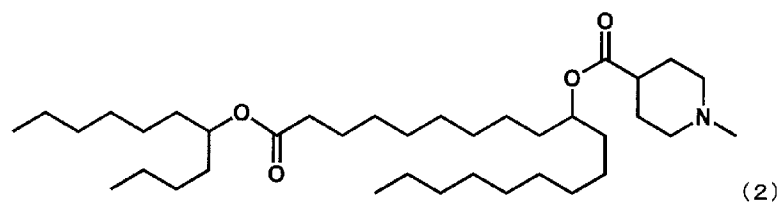
[0010] 本発明は、以下の[1]から[8]に関する。

[1] 下記式(1)～(11)で表される化合物からなる群より選択される化合物又はその薬学的に許容される塩。

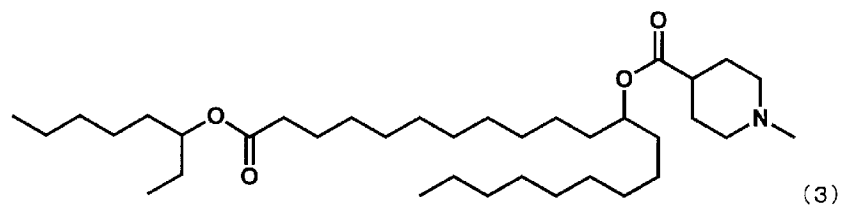
[化1]



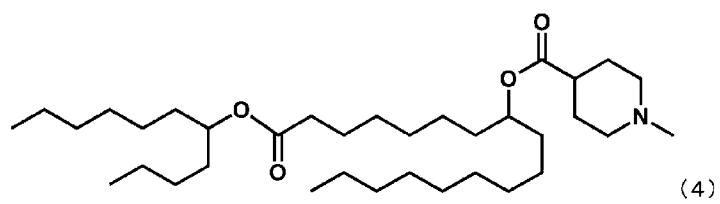
[化2]



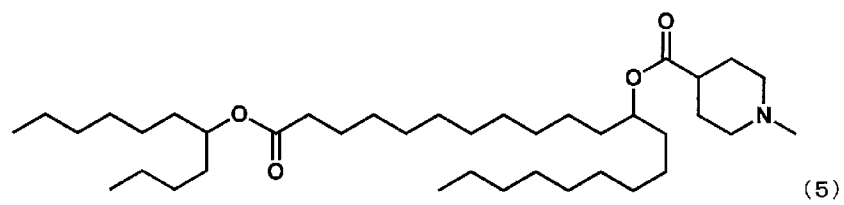
[化3]



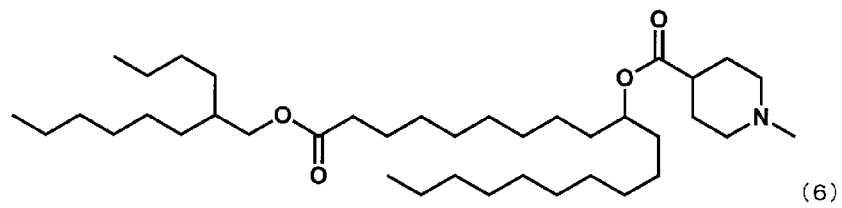
[化4]



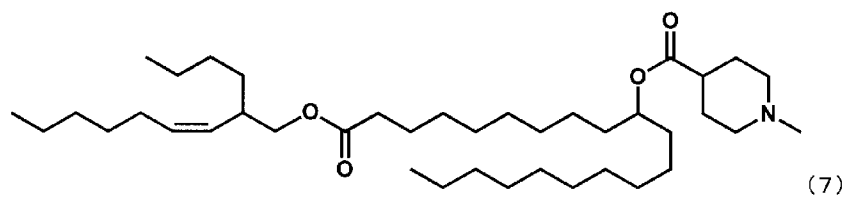
[化5]



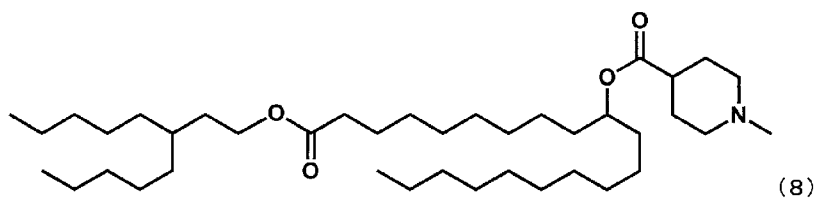
[化6]



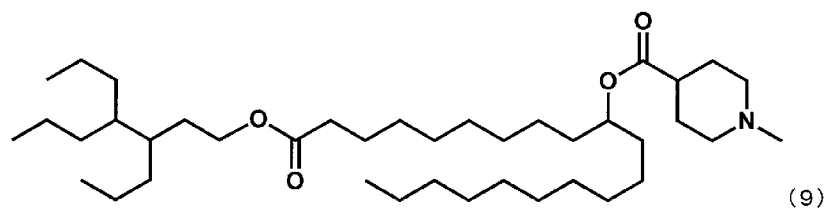
[化7]



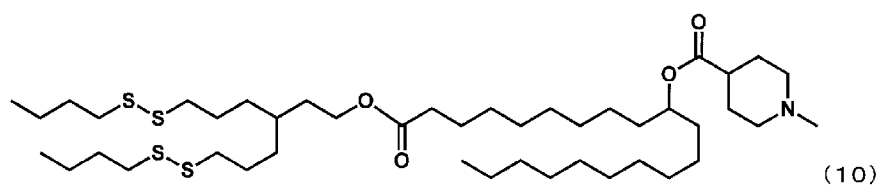
[化8]



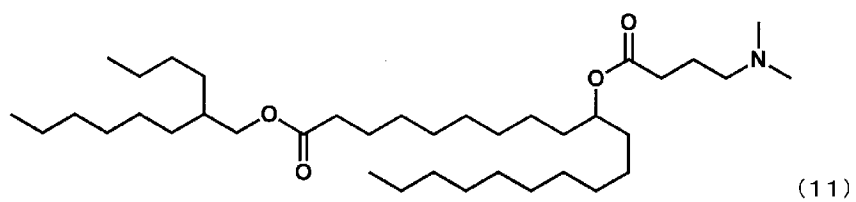
[化9]



[化10]

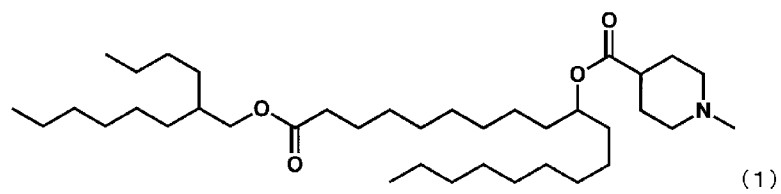


[化11]

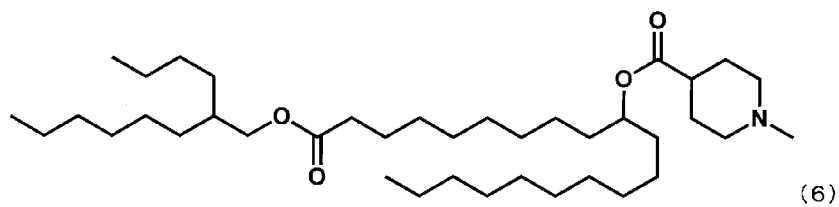


[0011] [2] 下記式(1)及び(6)～(9)で表される化合物からなる群より選択される、[1]に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

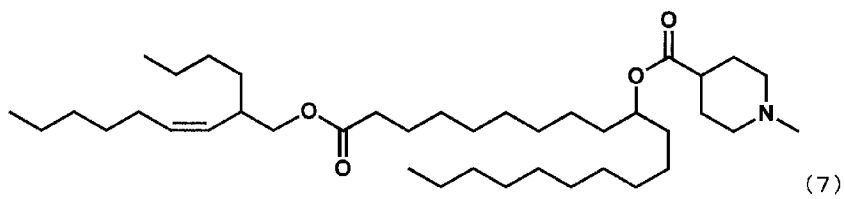
[化12]



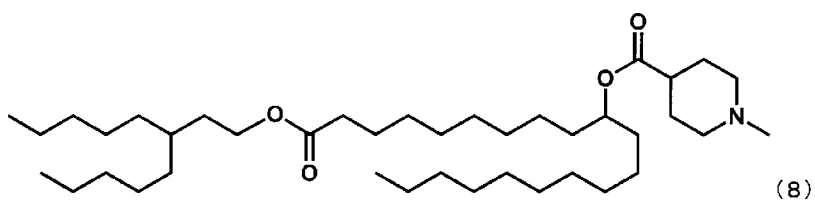
[化13]



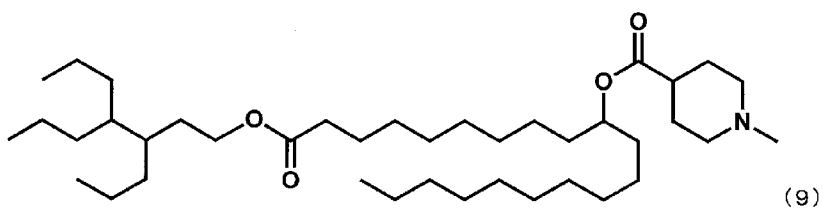
[化14]



[化15]

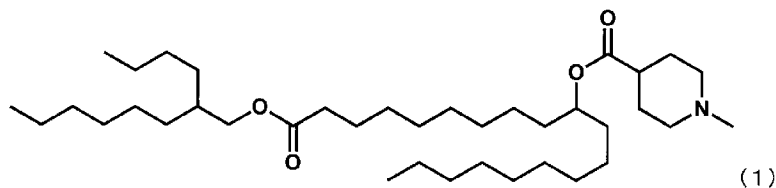


[化16]



[0012] [3] 下記式(1)で表される、[1]又は[2]に記載の化合物又はその薬剤学的に許容される塩。

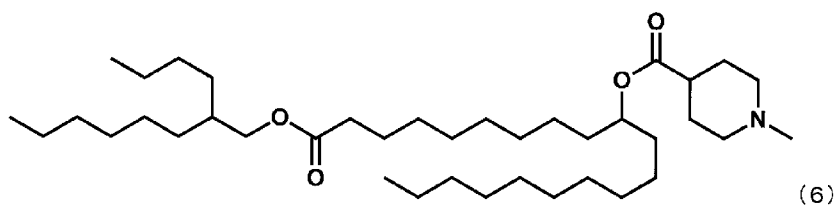
[化17]



上記式（１）で表される化合物はカチオン性脂質である。

[0013] [４] 下記式（６）で表される、[１] 又は [２] に記載の化合物又はその薬剤学的に許容される塩。

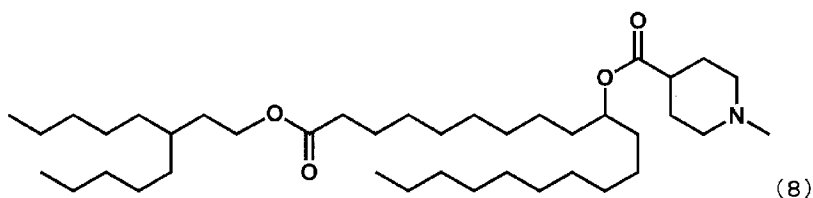
[化18]



上記式（６）で表される化合物はカチオン性脂質である。

[0014] [５] 下記式（８）で表される、[１] 又は [２] に記載の化合物又はその薬剤学的に許容される塩。

[0015] [化19]



上記式（８）で表される化合物はカチオン性脂質である。

[0016] [６] (１) [１] ～ [５] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容される塩と、(１１) 中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質と、を含有する脂質複合体。

[0017] [７] (１) [１] ～ [５] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許

容される塩と、(11)中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質と、(111)核酸と、を含有する組成物。

[0018] [8] (1) [1] ~ [5] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容される塩と、(11)中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質とを含有する極性有機溶媒含有水溶液と、(111)核酸を含有する水溶液とを混合して混合液を得る工程と、混合液中の極性有機溶媒の含有量を減少させる工程と、を備える組成物の製造方法。

発明の効果

[0019] 本発明のカチオン性脂質によれば、核酸を細胞質に効率よく放出することを可能とする。したがって、本発明のカチオン性脂質は、細胞質への核酸送達用の脂質としての利用可能性を有している。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]動物実験(4)の結果を示すグラフである。

[図2]動物実験(5)の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0021] <カチオン性脂質>

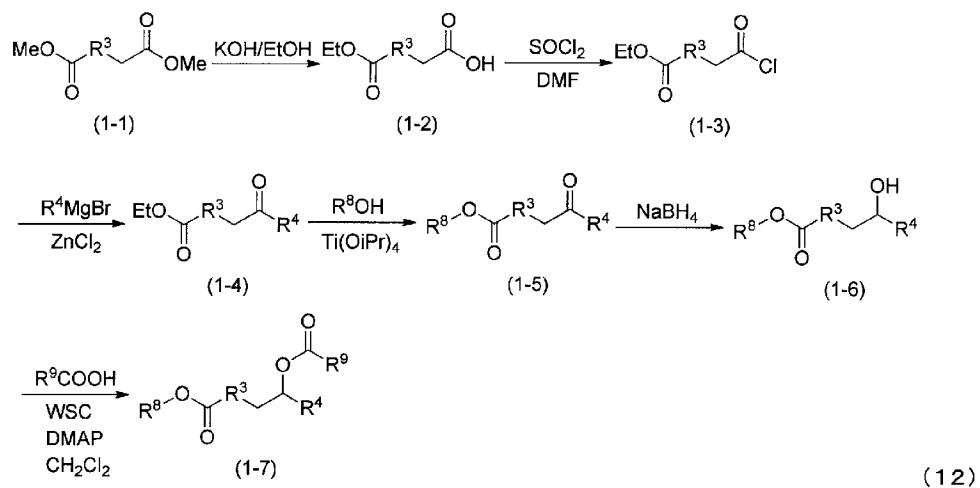
一実施形態において、本発明は、上記式(1)~(11)のいずれかで表される化合物又はその薬剤学的に許容される塩であり、カチオン性脂質として用いることができる。カチオン性脂質は、前記塩の水和物又は前記塩の溶媒和物であってもよい。本明細書において、カチオン性脂質とは、一つ以上の炭化水素基を含む脂質親和性領域と、生理的pHでプロトン化する極性基を含む親水性領域を有する両親媒性分子である。即ち、本発明のカチオン性脂質は、プロトン化し、陽イオンを形成し得る。上記陽イオンと対になって、本実施形態のカチオン性脂質が含有し得る陰イオンとしては、薬剤学的に許容されるものであれば特に限定されず、例えば、塩化物イオン、臭化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオン、リン酸イオン等の無機イオン；酢酸イオン

、シュウ酸イオン、マレイン酸イオン、フマル酸イオン、クエン酸イオン、安息香酸イオン、メタンスルホン酸イオン等の有機酸イオン等が挙げられる。

[0022] <カチオン性脂質の製造方法>

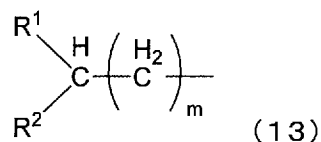
本発明のカチオン性脂質の製造方法について説明する。下記式（１２）に、カチオン性脂質の合成スキームの一実施形態を示す。

[0023] [化20]



[0024] 上記式（１２）中、 R^3 は炭素数４～１２のアルキレン基を表し、 R^4 は炭素数７～１２のアルキル基を表し、 R^8 は下記式（１３）で表される構造を表し、 R^9 は下記式（１４）で表される構造を表す。

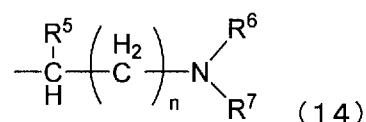
[0025] [化21]



[式（１３）中、 R^1 は炭素鎖の一部が縮合して形成されたシクロプロパン若しくはシクロブタンを１以上有していてもよい炭素数４～１０のアルキル基、又は炭素数４～１０のアルケニル基を表し、 R^2 は水素原子又は炭素数２～８のアルキル基を表し、 m は０～５の整数を表す。]

[0026]

[化22]



[式(14)中、 R^5 、 R^6 及び R^7 はそれぞれ独立に水素原子又は炭素数1～10のアルキル基を表し、 n は0～5の整数を表す。 R^5 及び R^6 は一緒になって単環式複素環を形成してもよく、 R^6 及び R^7 は一緒になって単環式複素環を形成してもよい。]

[0027] 本実施形態の合成スキームにおいて、カチオン性脂質(1-7)は、次のようにして合成することができる。

[0028] まず、例えば式(1-1)で表されるジカルボン酸ジアルキルを加水分解して、式(1-2)で表されるモノエステル体を得る。ここで、式(1-1)ではジカルボン酸ジアルキルのアルキル基がメチル基である例を示しているが、ジカルボン酸ジアルキルのアルキル基はメチル基に限定されず、適宜のアルキル基を選択することができる。

[0029] 続いて、式(1-2)で表される化合物を酸クロライド化し、式(1-3)で表される化合物を得る。続いて、式(1-3)で表される化合物にグリニャール試薬を反応させることにより、式(1-4)で表される化合物が得られる。続いて、エステル交換反応により、式(1-5)で表される化合物を得、還元することにより、式(1-6)で表される化合物が得られる。続いて、式(1-6)で表される化合物をカルボン酸と縮合することにより、カチオン性脂質(1-7)を合成することができる。

[0030] <脂質複合体>

本発明は、(I)上述したカチオン性脂質と、(II)中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質と、を含有する脂質複合体を提供する。本発明の一実施形態として、脂質複合体は、(I)上述したカチオン性脂質と、(II)中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールからなる群より選択さ

れる少なくとも一種の脂質と、(111)核酸と、を含有する。本実施形態の脂質複合体は、核酸を細胞質に効率よく放出することを可能とする。

[0031] 本実施形態の脂質複合体は、脂質複合体が含有する全脂質を基準として、上述したカチオン性脂質を、例えば10～100モル%、例えば20～90モル%、例えば40～70モル%含有する。カチオン性脂質は、1種を単独で、又は2種以上を混合して用いることができる。

[0032] 核酸としては、siRNA、miRNA、shRNA発現ベクター、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム等が挙げられる。核酸は、siRNA、miRNAであってもよい。

[0033] 本実施形態の脂質複合体は、核酸を例えば0.01～50重量%、例えば0.1～30重量%、例えば1～10重量%含有する。

[0034] 本実施形態の脂質複合体は、脂質成分として、(1)上述したカチオン性脂質と、(11)中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質とを含有する。

[0035] 中性脂質としては、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、卵ホスファチジルコリン(EPC)、ジミリス Toilホスファチジルコリン(DMPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジアラキドイルホスファチジルコリン(DAPC)、ジベヘノイルホスファチジルコリン(DBPC)、ジリグノセロイルホスファチジルコリン(DLPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、スフィンゴミエリン、セラミド、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)、ホスファチジルエタノールアミン(POPE)、ジオレオイルーホスファチジルエタノールアミン4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート(DOPE-mal)等が挙げられる。中性脂質は、1種を単独で、又は2種以上を混合して用いることができる。

- [0036] 本実施形態の脂質複合体は、脂質複合体が含有する全脂質を基準として、中性脂質を、例えば0～50モル%、例えば0～40モル%、例えば0～30モル%含有してもよい。
- [0037] ポリエチレングリコール修飾脂質としては、PEG2000-DMG (PEG2000-ジミリスチルグリセロール、PEG2000-DPG (PEG2000-ジパルミトイルグリセロール)、PEG2000-DSG (PEG2000-ジステアロイルグリセロール)、PEG5000-DMG (PEG5000-ジミリスチルグリセロール、PEG5000-DPG (PEG5000-ジパルミトイルグリセロール)、PEG5000-DSG (PEG5000-ジステアロイルグリセロール)、PEG-cDMA (N-[(メトキシポリ (エチレングリコール) 2000) カルバミル] -1, 2-ジミリスチルオキシプロピル-3-アミン)、PEG-C-DOMG (R-3-[(ω-メトキシポリ (エチレングリコール) 2000) カルバモイル)] -1, 2-ジミリスチルオキシプロピル-3-アミン)、ポリエチレングリコール (PEG) -ジアシルグリセロール (DAG)、PEG-ジアルキルオキシプロピル (DAA)、PEG-リン脂質、PEG-セラミド (Cer) 等が挙げられる。
- [0038] PEG-ジアルキルオキシプロピルとしては、PEG-ジラウリルオキシプロピル、PEG-ジミリスチルオキシプロピル、PEG-ジパルミチルオキシプロピル、PEG-ジステアリルオキシプロピル等が挙げられる。ポリエチレングリコール修飾脂質は、1種を単独で、又は2種以上を混合して用いることができる。
- [0039] 本実施形態の脂質複合体は、脂質複合体が含有する全脂質を基準として、ポリエチレングリコール修飾脂質を、例えば0～30モル%、例えば0～20モル%、例えば0～10モル%含有してもよい。
- [0040] ステロールとしては、コレステロール、ジヒドロコレステロール、ラノステロール、 β -シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、エルゴカステロール、フコステロール、 3β -[N-

(N' , N' -ジメチルアミノエチル)カルバモイル] コレステロール (D C - C h o l) 等が挙げられる。ステロールは、1種を単独で、又は2種以上を混合して用いることができる。

[0041] 本実施形態の脂質複合体は、脂質複合体が含有する全脂質を基準として、ステロールを、例えば0～90モル%、例えば10～80モル%、例えば20～50モル%含有してもよい。

[0042] 本実施形態の脂質複合体における脂質成分の組み合わせは、特に限定されず、例えば、上述したカチオン性脂質、中性脂質及びステロールの組み合わせ、上述したカチオン性脂質、中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールの組み合わせ等が挙げられる。

[0043] <組成物>

一実施形態において、本発明は、(I) 上述したカチオン性脂質と、(II) 中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質と、(III) 核酸と、を含有する組成物を提供する。本実施形態の組成物は、核酸を細胞質に効率よく放出することを可能とする。本実施形態の組成物は、上述した脂質複合体、薬学的に許容される媒体、及び場合によりその他の添加剤を含有するものであってもよい。薬学的に許容される媒体、その他の添加剤については後述する。

[0044] 本実施形態の組成物は、組成物が含有する全脂質を基準として、上述したカチオン性脂質を、例えば10～100モル%、例えば20～90モル%、例えば40～70モル%含有する。カチオン性脂質は、1種を単独で、又は2種以上を混合して用いることができる。

[0045] 核酸としては、上述したものと同様のものが挙げられる。本実施形態の組成物は、核酸を例えば0.01～50重量%、例えば0.1～30重量%、例えば1～10重量%含有する。

[0046] 本実施形態の組成物は、脂質成分として、(I) 上述したカチオン性脂質と、(II) 中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質とを含有する。

- [0047] 中性脂質としては、上述したものと同様のものが挙げられる。本実施形態の組成物は、組成物が含有する全脂質を基準として、中性脂質を、例えば0～50モル%、例えば0～40モル%、例えば0～30モル%含有してもよい。
- [0048] ポリエチレングリコール修飾脂質としては、上述したものと同様のものが挙げられる。本実施形態の組成物は、組成物が含有する全脂質を基準として、ポリエチレングリコール修飾脂質を、例えば0～30モル%、例えば0～20モル%、例えば0～10モル%含有してもよい。
- [0049] ステロールとしては、上述したものと同様のものが挙げられる。本実施形態の組成物は、組成物が含有する全脂質を基準として、ステロールを、例えば0～90モル%、例えば10～80モル%、例えば20～50モル%含有してもよい。
- [0050] 本実施形態の組成物における脂質成分の組み合わせは、特に限定されず、例えば、上述したカチオン性脂質、中性脂質及びステロールの組み合わせ、上述したカチオン性脂質、中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールの組み合わせ等が挙げられる。
- [0051] 本実施形態の組成物は、上述した成分の他にも、その他の添加剤として、ショ糖、ブドウ糖、ソルビトール、乳糖等の糖；グルタミン、グルタミン酸、グルタミン酸ナトリウム、ヒスチジン等のアミノ酸；クエン酸、リン酸、酢酸、乳酸、炭酸、酒石酸等の酸の塩等を含有してもよい。
- [0052] 本実施形態の組成物は、医薬組成物として製剤化されていてもよい。医薬組成物の剤型としては、例えば注射剤が挙げられる。
- [0053] 本実施形態の組成物は、例えば、凍結乾燥等により溶媒を除去した粉末状態であってもよく、液体状態であってもよい。組成物が粉末状態である場合には、使用前に薬学的に許容される媒体に懸濁又は溶解させて注射剤として用いることができる。組成物が液体状態である場合には、そのまま又は薬学的に許容される媒体に懸濁又は溶解させて注射剤として用いることができる。

[0054] 薬学的に許容される媒体としては、滅菌水；生理食塩水；ブドウ糖、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム等の補助薬を含む等張液等が挙げられる。本実施形態の組成物は、更に、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等のアルコール等の溶解補助剤、安定剤、酸化防止剤、防腐剤等の添加剤を含有していてもよい。

[0055] 組成物の患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等により行うことができる。組成物の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なる。

[0056] 本実施形態の組成物は、カチオン性脂質を含有する脂質で構成された微粒子内に核酸が封入された脂質複合体を形成している。脂質複合体の「平均粒子径」は、体積平均、数平均、Z-平均のいずれかの方法で算出することができる。本実施形態の組成物において、脂質複合体の平均粒子径（Z-平均）は、例えば10～1000nm、例えば30～500nm、例えば30～200nmであってよい。

[0057] 本実施形態の組成物は、非特異的な吸着や免疫反応を抑制する観点から、例えば血液中等の約pH7.4の環境下において、表面の荷電がほとんどないことが好ましい。また、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる際、エンドソーム膜との融合効率を向上させる観点から、低pH環境下で正に帯電することが好ましい。

[0058] <組成物の製造方法>

一実施形態において、本発明は、（I）上述したカチオン性脂質と、（II）中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質とを含有する極性有機溶媒含有水溶液と、（III）核酸を含有する水溶液とを混合して混合液を得る工程（a）と、混合液中の極性有機溶媒の含有量を減少させる工程（b）とを備える、組成物の製造方法を提供する。本実施形態の製造方法によれば、核酸を細胞質に効率よく放出することが可能な組成物を製造することができる。

[0059] 水溶性の核酸と上述したカチオン性脂質との静電的相互作用、及び脂質間

の疎水的相互作用により、脂質で構成された微粒子内に核酸が封入された脂質複合体を形成することができる。例えば、(I) 上述したカチオン性脂質と、(II) 中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質とを含む脂質成分の、極性有機溶媒含有水溶液に対する溶解度を変化させることにより、脂質複合体を形成させることができる。極性有機溶媒としては、エタノール等のアルコールが挙げられる。

[0060] まず、工程(a)において、(I) 上述したカチオン性脂質と、(II) 中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質及びステロールからなる群より選択される少なくとも一種の脂質とを溶解させた、極性有機溶媒含有水溶液と、(III) 核酸を含有する水溶液とを混合して混合液を得る。極性有機溶媒含有水溶液中の極性有機溶媒の濃度は、核酸の水溶液と混合後も、脂質分子が溶解する条件を満たしていれば特に限定されない。

[0061] 続いて、工程(b)において、上記の混合液に水等を添加することにより、極性有機溶媒の含有量を減少させる。これにより、脂質複合体を形成させることができる。脂質複合体を効率よく形成させるためには、極性有機溶媒の含有量を急激に低下させることが好ましい。

[0062] 本実施形態の組成物の製造方法によれば、核酸が効率よく微粒子内部に封入された脂質複合体を得ることができる。

[0063] 組成物に封入される核酸が核酸医薬である場合には、組成物を医薬組成物として利用することができる。

実施例

[0064] 以下に実施例を挙げて本発明を更に詳述するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。また、実施例中の化合物名は、ソフトウェア（商品名「ChemDraw Ultra ver. 12.0」、パーキンエルマー社製）を用いて命名した。

[0065] 実施例において使用される略語は当業者に周知の慣用的な略語である。いくつかの略語を以下に示す。

DMF : N, N-ジメチルホルムアミド

TFA : トリフルオロ酢酸

WSC : 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩

DMA P : N, N-ジメチル-4-アミノピリジン

THF : テトラヒドロフラン

LC-MS : 液体クロマトグラフィー-マススペクトルメトリー

ESI-MS : エレクトロスプレーイオン化質量分析

[0066] プロトン核磁気共鳴スペクトルの化学シフトは、テトラメチルシランに対する δ 単位 (ppm) で記録されている。パターンの略語は、次の通りである。

s : シングレット、d : ダブルレット、t : トリプレット、q : カルテット、dd : ダブルダブルレット、ddd : ダブルダブルダブルレット、dt : ダブルトリプレット、tt : トリプルトリプレット、m : マルチプレット。

[0067] <カチオン性脂質の合成>

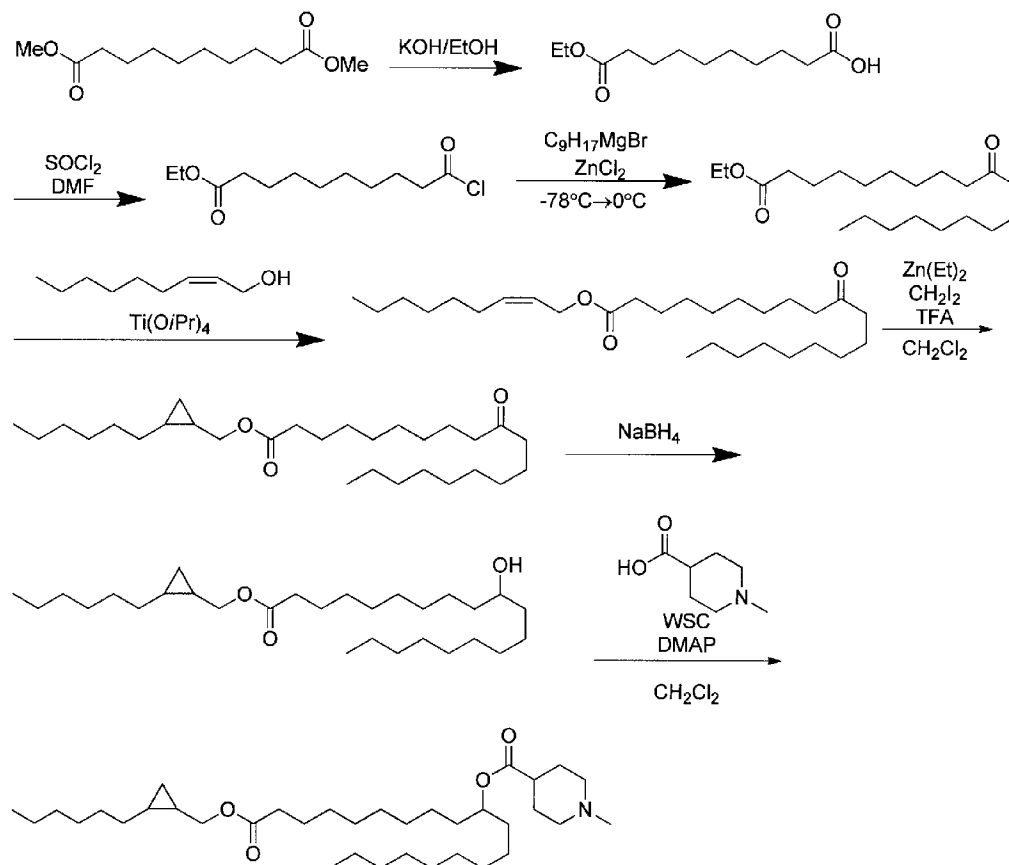
[実施例 1]

(1-((2-ヘキシルシクロプロピル) メトキシ)-1-オキソノナデカン-10-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート (以下、「YS-102」という場合がある。) の合成)

以下に、YS-102 の合成スキームを示す。

[0068]

[化23]



[0069] (第1工程：加水分解)

セバシン酸ジメチル (200 g、868.4 mmol) をエタノール (868 mL) に溶かした溶液を0℃まで冷却した。その溶液に水酸化カリウム (48.73 g、868.4 mmol) のエタノール (300 mL) 溶液を滴下し、滴下後0℃で12時間攪拌した。反応終了後、酢酸エチルと水を加え、未反応物を有機層に抽出することで除去した。水層を塩酸にて酸性にし、酢酸エチルを加えて目的物を抽出した。有機層を水、食塩水で洗浄し、濃縮した。第1工程品モノエステル体 (150.3 g、652.6 mmol、75%) は精製を行わずに次のステップへ用いた。

[0070] (第2工程：酸クロライド化)

第1工程品モノエステル体 (50.0 g、231.2 mmol) と触媒量のDMF (23 mL) との懸濁液に、塩化チオニル (41.3 g、346.4 mmol) を加え、室温で攪拌した。

8 mmol) を滴下した。反応終了後、塩化チオニルを減圧下留去した後、蒸留精製し、第2工程品 (25.8 g、109.9 mmol、48%) を得た。

[0071] (第3工程：グリニャール試薬との反応)

塩化亜鉛 (2.7 g、20.1 mmol) を THF (61 mL) に溶解させ、 -78°C まで冷却した。この溶液に 1 M のノニルマグネシウムブロミド (40.2 mL、40.2 mmol) を窒素雰囲気下 -78°C で滴下した。滴下後 0°C まで昇温し、 0°C で 30 分攪拌した後、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム (0.58 mg、0.5 mmol) を投下し、次いで第2工程品 (5.0 g、20.1 mmol) を滴下した。 0°C で更に 1 時間攪拌した後に 1 M 塩酸水溶液を加えてクエンチした。反応溶液より析出物をろ別し、ろ液を酢酸エチルで抽出し有機層を水、食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、第3工程品 (5.0 g、14.7 mmol、73%) を得た。

[0072] (第4工程：エステル交換)

第3工程品 (2.0 g、5.9 mmol)、2-ノネノール (4.2 g、29.4 mmol)、チタニウムテトラプロポキシド (0.2 g、0.6 mmol) の混合液を攪拌しながら、外浴を 110°C まで昇温した。出てくる留出液を除きながら攪拌を続け、留出が見えなくなった時点を反応終点として冷却後水を加えてクエンチした。反応液を酢酸エチルで抽出し水、食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、第4工程品 (2.6 g、5.8 mmol、99%) を得た。

[0073] (第5工程：シクロプロパン化)

ジエチル亜鉛 (8.3 mL、8.3 mmol) をジクロロメタン (15 mL) に溶解させ、 0°C まで冷却した。そこへトリフルオロメタンスルホン酸 (0.9 g、8.3 mmol) を滴下し、次いでジヨードメタン (2.2 g

、8. 3 mmol) を滴下後、0℃で1時間攪拌した。この溶液に第4工程品 (1. 2 g、2. 8 mmol) のジクロロメタン (5 mL) 溶液を滴下し、室温まで昇温した。反応をTLCで確認し、原料の消失を終点として水でクエンチした。析出した固体をろ別し、ろ液を酢酸エチルで抽出、水、食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、第4工程品 (1. 2 g、2. 7 mmol、99%) を得た。

[0074] (第6工程：還元)

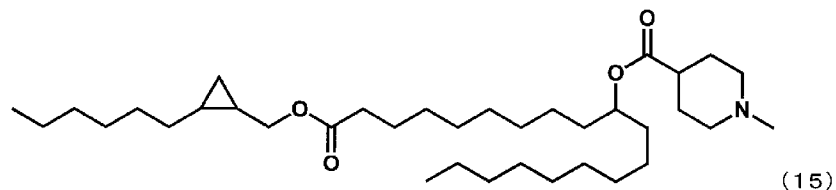
第5工程品 (1. 0 g、2. 2 mmol) をエタノール (22 mL) に溶かした溶液中に、水素化ホウ素ナトリウム (0. 08 g、2. 2 mmol) を添加し、10分間反応させた。反応終了後1N塩酸でクエンチした。酢酸エチルで抽出し、水、食塩水で洗浄後、有機層を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、第6工程品 (0. 3 g、0. 7 mmol、30%) を得た。

[0075] (第7工程：縮合)

第6工程品 (0. 8 g、1. 8 mmol) を塩化メチレン (7 mL) に溶かした溶液中に、WSC (0. 7 g、3. 7 mmol)、ジメチルアミノピリジン (0. 04 g、0. 4 mmol)、1-メチルピペリジン-4-カルボン酸 (0. 5 g、3. 7 mmol) を添加した。室温で翌日まで攪拌した後、水を加え、有機層を分液した。有機層を水で5回洗浄後、1N水酸化ナトリウム水溶液で1度洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、下記式 (15) で表されるYS-102 (0. 12 g、0. 2 mmol、12%) を得た。

[0076]

[化24]



[0077] 得られた化合物を以下の条件でHPLC-LC/MSにより確認した。カラム：YMC-Triart C18、150×4.6mm、5 μ m、溶離液：MeOH（均一溶媒）、流速：1.0mL/分、ランタイム：15分、カラム温度：45℃、検出：UV（215nm）、エレクトロスプレーイオン化質量分析（ESI-MS）。

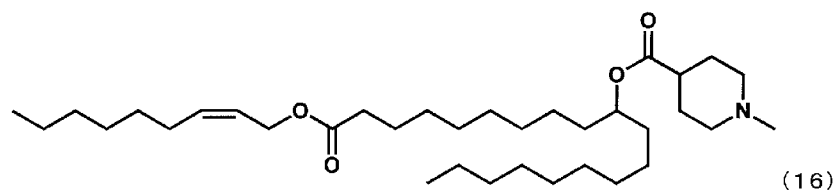
[0078] HPLC-LC/MS、Rt 6.24分、ESI-MS (M+H)
 calcd 577.5、found 578.6、¹H NMR (400MHz、CDCl₃) δ 4.87 (1H, q)、2.82 (2H, d)、2.27 (4H, m)、2.04 (1H, m)、1.91 (1H, m)、1.82 (2H, m)、1.61 (2H, m)、1.50 (4H, m)、1.36 (5H, m)、1.25 (24H, m)、0.88 (6H, m)

[0079] [実施例2]

((Z)-1-(ノン-2-エン-1-イルオキシ)-1-オキソノナデカン-10-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート（以下、「YS-101」という場合がある。）の合成)

第5工程を行わなかった点以外は実施例1と同様にして、下記式(16)で表されるYS-101を合成した。

[0080] [化25]



[0081] HPLC-LC/MS、Rt 5.51分、ESI-MS (M+H) c

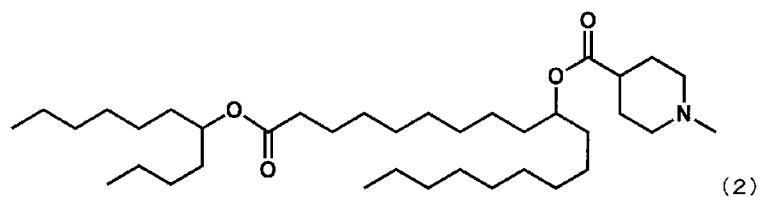
acld 563.5、found 564.5、 ^1H NMR (400MHz、 CDCl_3) δ 5.32 (2H, m)、4.87 (1H, q)、4.11 (1H, dd)、4.05 (2H, t)、2.82 (2H, d)、2.27 (7H, m)、2.04 (8H, m)、1.89 (2H, m)、1.79 (2H, m)、1.61 (4H, m)、1.49 (4H, m)、1.36 (5H, m)、1.25 (30H, m)、0.95 (3H, m)、0.88 (3H, m)

[0082] [実施例3]

(1-オキソ-1-(ウンデカン-5-イルオキシ)ノナデカン-10-イル-1-メチルピペリジンを4-カルボキシレート(以下、「YS-103」という場合がある。)の合成)

第4工程において、2-ノネノールの代わりに2-ブチルオクタン-1-オールを反応させ、第5工程を行わなかった点以外は実施例1と同様にして、下記式(2)で表されるYS-103を合成した。

[0083] [化26]



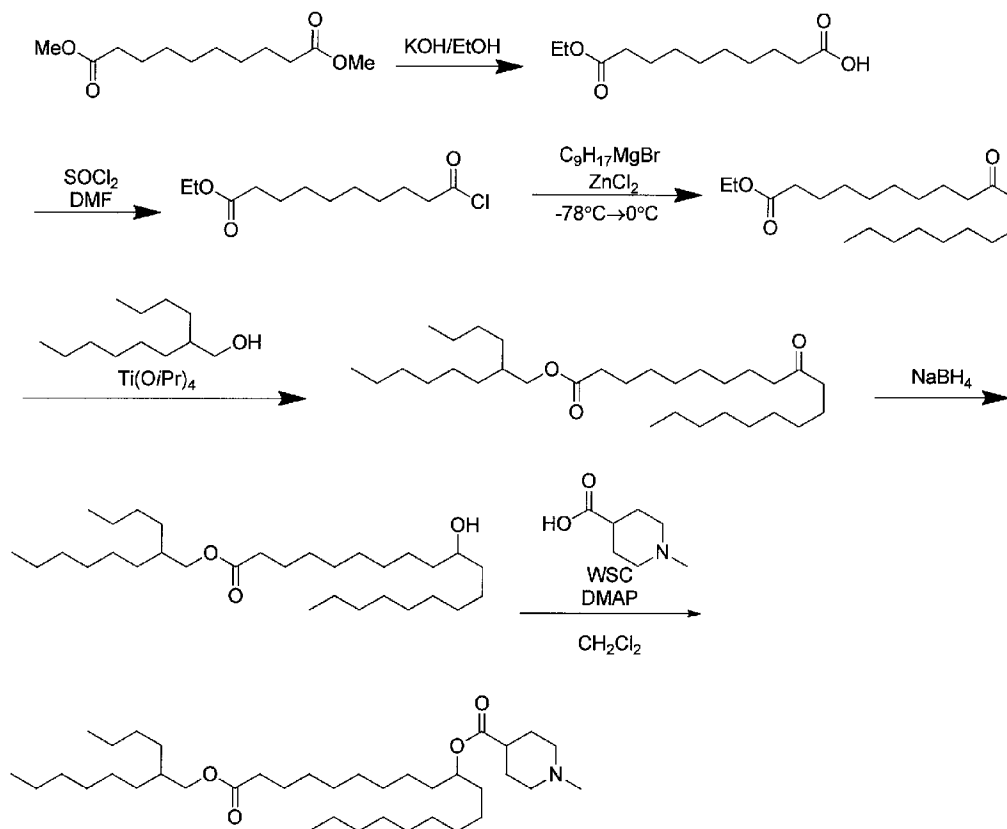
[0084] HPLC-LC/MS、 R_t 7.52分、ESI-MS (M+H) c
acld 593.5、found 594.6、 ^1H NMR (400MHz、 CDCl_3) δ 4.86 (1H, q)、4.06 (2H, t)、2.82 (2H, d)、2.27 (7H, m)、1.99 (2H, m)、1.88 (2H, m)、1.79 (2H, m)、1.60 (4H, m)、1.49 (4H, m)、1.38 (7H, m)、1.25 (30H, m)、0.97 (3H, m)、0.88 (3H, m)、0.64 (2H, m)、0.59 (1H, m)、-0.33 (1H, dd)

[0085] [実施例4]

(1 - ((2 - ブチルオクチル) オキシ) - 1 - オキソノナデカン - 10 - イル - 1 - メチルピペリジン - 4 - カルボキシレート (以下、「YS - 119」という場合がある。) の合成)

以下に、YS - 119 の合成スキームを示す。

[0086] [化27]



[0087] (第1工程から第3工程)

第1工程から第3工程は上述したYS - 102の合成と同様に行った。

[0088] (第4工程：エステル交換)

第3工程品 (4.1 g、12.0 mmol)、2 - ブチルオクタン - 1 - オール (6.73 g、36.12 mmol)、チタニウムテトラプロポキシド (0.34 g、1.2 mmol) の混合液を攪拌しながら、外浴を110℃まで昇温した。出てくる留出液を除きながら攪拌を続け、留出が見えなくなった時点を反応終点として冷却後水を加えてクエンチした。反応液を酢酸エチルで抽出し、水、食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。

乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、第4工程品（4.5 g、9.4 mmol、78%）を得た。

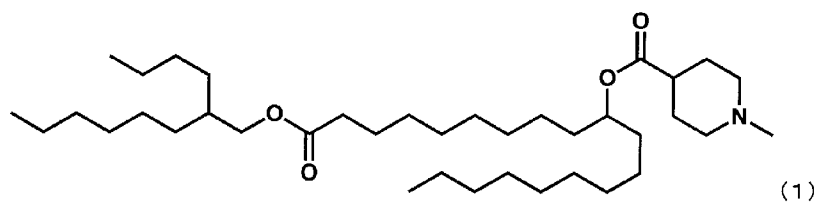
[0089]（第5工程：還元）

第4工程品（4.5 g、9.4 mmol）をTHF（18.7 mL）、メタノール（18.7 mL）に溶かした溶液中に、水素化ホウ素ナトリウム（1.8 g、46.8 mmol）を添加し、一時間反応させた。反応終了後1 N塩酸でクエンチした。酢酸エチルで抽出し、水、食塩水で洗浄後、有機層を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、第5工程品（3.1 g、6.42 mmol、69%）を得た。

[0090]（第6工程：縮合）

第5工程品（2.0 g、4.14 mmol）を塩化メチレン（8.28 mL）に溶かした溶液中に、WSC（1.59 g、8.28 mmol）、ジメチルアミノピリジン（0.04 g、0.4 mmol）、1-メチルピペリジン-4-カルボン酸（1.19 g、8.28 mmol）を添加した。室温で翌日まで攪拌した後、水を加え、有機層を分液した。有機層を水で5回洗浄後、1 N水酸化ナトリウム水溶液で1度洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、式（1）で表されるYS-119（1.9 g、3.1 mmol、74%）を得た。

[0091] [化28]



[0092] HPLC-LC/MS、Rt 8.01分、ESI-MS (M+H)⁺ calcd 607.6、found 608.6、¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.87 (1H, q)、3.96 (2H, d)、2.81

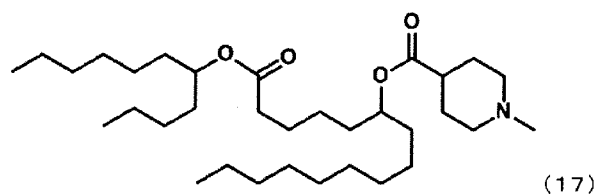
(2 H, d)、2. 27 (6 H, m)、1. 98 (2 H, m)、1. 91 (2 H, m)、1. 82 (2 H, m)、1. 61 (4 H, m)、1. 49 (4 H, m)、1. 20 (46 H, m)、0. 86 (9 H, m)

[0093] [実施例5]

(1-オキソ-1-(ウンデカン-5-イルオキシ)ペンタデカン-6-イル-1-メチルピペリジン4-カルボキシレート(以下、「YS-111」という場合がある。)の合成)

第1工程において、セバシン酸ジメチルの代わりにアジピン酸ジメチルを反応させ、第4工程において、2-ブチルオクタン-1-オールの代わりにウンデカン-5-オールを反応させた以外は実施例4と同様にして、下記式(17)で表されるYS-111を合成した。

[0094] [化29]



[0095] HPLC-LC/MS、Rt 5.35分、ESI-MS (M+H) c
acld 537.5、found 538.5、¹H NMR (400MHz、CDCl₃) δ4.87 (2H, q)、2.81 (2H, d)、2.27 (6H, m)、1.98 (2H, m)、1.91 (2H, m)、1.82 (2H, m)、1.62-1.50 (10H, m)、1.24 (28H, m)、0.87 (9H, m)

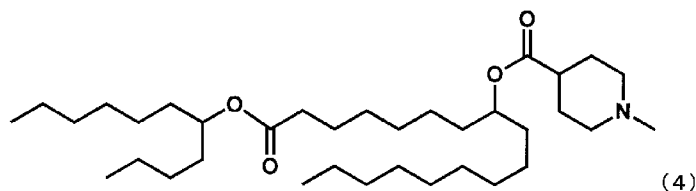
[0096] [実施例6]

(1-オキソ-1-(ウンデカン-5-イルオキシ)ヘプタデカン-8-イル-1-メチルピペリジン4-カルボキシレート(以下、「YS-112」という場合がある。)の合成)

第1工程において、セバシン酸ジメチルの代わりにスベリン酸ジメチルを反応させ、第4工程において、2-ブチルオクタン-1-オールの代わりに

ウンデカン-5-オールを反応させた以外は実施例4と同様にして、下記式(4)で表されるYS-112を合成した。

[0097] [化30]



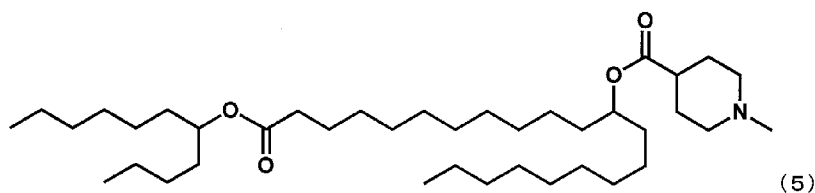
[0098] HPLC-LC/MS、Rt 6.05分、ESI-MS (M+H) calcd 565.5、found 566.5、¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.87 (2H, q)、2.81 (2H, d)、2.27 (6H, m)、1.98 (2H, m)、1.91 (2H, m)、1.82 (2H, m)、1.62-1.50 (10H, m)、1.24 (32H, m)、0.87 (9H, m)

[0099] [実施例7]

(21-オキソ-21-(ウンデカン-5-イルオキシ)ヘンイコサン-10-イル-1-メチルピペリジン4-カルボキシレート(以下、「YS-113」という場合がある。)の合成)

第1工程において、セバシン酸ジメチルの代わりにドデカン二酸ジメチルを反応させ、第4工程において、2-ブチルオクタン-1-オールの代わりにウンデカン-5-オールを反応させた以外は実施例4と同様にして、下記式(5)で表されるYS-113を合成した。

[0100] [化31]



[0101] HPLC-LC/MS、Rt 8.95分、ESI-MS (M+H) calcd 621.6、found 622.6、¹H NMR (400MHz

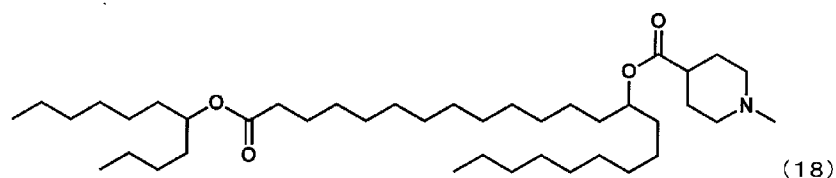
z、 CDCl_3) δ 4.87 (2H, q)、2.81 (2H, d)、2.27 (6H, m)、1.98 (2H, m)、1.91 (2H, m)、1.82 (2H, m)、1.62–1.50 (10H, m)、1.24 (40H, m)、0.87 (9H, m)

[0102] [実施例8]

(23-オキソ-23-(ウンデカン-5-イルオキシ)トリコサン-10-イル-1-メチルピペリジン4-カルボキシレート (以下、「YS-114」という場合がある。)の合成)

第1工程において、セバシン酸ジメチルの代わりにテトラデカン二酸ジメチルを反応させ、第4工程において、2-ブチルオクタン-1-オールの代わりにウンデカン-5-オールを反応させた以外は実施例4と同様にして、下記式(18)で表されるYS-114を合成した。

[0103] [化32]



[0104] HPLC-LC/MS、 R_t 11.1分、ESI-MS ($M+H$) c a c i d 649.6、 f o u n d 650.6、 ^1H NMR (400MHz、 CDCl_3) δ 4.87 (2H, q)、2.81 (2H, d)、2.27 (6H, m)、1.98 (2H, m)、1.91 (2H, m)、1.82 (2H, m)、1.62–1.50 (10H, m)、1.24 (44H, m)、0.87 (9H, m)

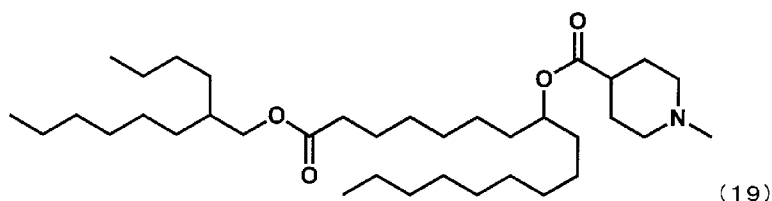
[0105] [実施例9]

(1-((2-ブチルオクチル)オキシ)-1-オキソヘプタデカン-8-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート (以下、「YS-115」という場合がある。)の合成)

第1工程において、セバシン酸ジメチルの代わりにスベリン酸ジメチルを

反応させた以外は実施例4と同様にして、下記式(19)で表されるYS-115を合成した。

[0106] [化33]



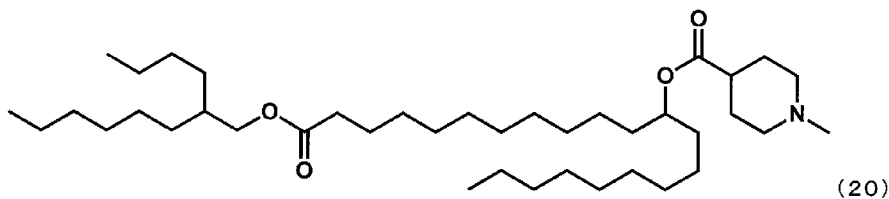
[0107] HPLC-LC/MS、Rt 6.72分、ESI-MS (M+H) calcd 579.5、found 580.7、¹H NMR (400MHz、CDCl₃) δ 4.87 (2H, q)、3.96 (2H, d)、2.81 (2H, d)、2.27 (6H, m)、1.98 (2H, m)、1.91 (2H, m)、1.82 (2H, m)、1.62-1.50 (10H, m)、1.24 (32H, m)、0.87 (9H, m)

[0108] [実施例10]

(21-((2-ブチルオクチル)オキシ)-21-オキソヘンイコサン-10-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート(以下、「YS-116」という場合がある。)の合成)

第1工程において、セバシン酸ジメチルの代わりにスベリン酸ジメチルを反応させた以外は実施例4と同様にして、下記式(20)で表されるYS-116を合成した。

[0109] [化34]



[0110] HPLC-LC/MS、Rt 10.0分、ESI-MS (M+H) calcd 635.6、found 636.7、¹H NMR (400MHz、CDCl₃) δ 4.87 (2H, q)、3.96 (2H, d)、2.81

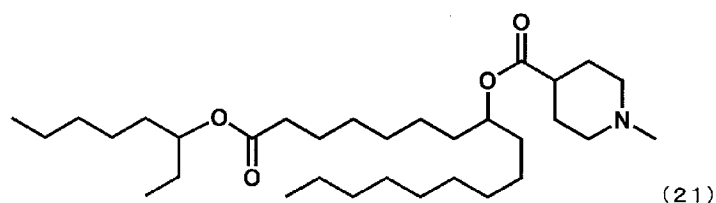
(2 H, d)、2. 27 (6 H, m)、1. 98 (2 H, m)、1. 91 (2 H, m)、1. 82 (2 H, m)、1. 62–1. 50 (10 H, m)、1. 24 (40 H, m)、0. 87 (9 H, m)

[0111] [実施例 1 1]

(1 – (オクタン–3–イルオキシ) – 1 –オキソヘプタデカン–8–イル–1–メチルピペリジン–4–カルボキシレート (以下、「YS–117」という場合がある。) の合成)

第1工程において、セバシン酸ジメチルの代わりにスベリン酸ジメチルを反応させ、第4工程において、2–ブチルオクタン–1–オールの代わりにオクタン–3–オールを反応させた以外は実施例4と同様にして、下記式 (21) で表される YS–117 を合成した。

[0112] [化35]



[0113] HPLC–LC/MS、R_t 4. 71分、ESI–MS (M+H)⁺ c a c l d 523. 5、found 524. 6、¹H NMR (400 MHz、CDCl₃) δ 4. 87 (1 H, q)、4. 80 (1 H, q)、2. 82 (2 H, d)、2. 27 (6 H, m)、1. 98 (2 H, m)、1. 91 (2 H, m)、1. 82 (2 H, m)、1. 62–1. 29 (10 H, m)、1. 24 (26 H, m)、0. 87 (9 H, m)

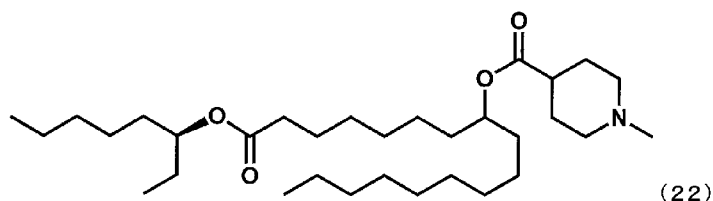
[0114] [実施例 1 2]

(1 – ((S) オクタン–3–イルオキシ) – 1 –オキソヘプタデカン–8–イル–1–メチルピペリジン–4–カルボキシレート (以下、「YS–117 S」という場合がある。) の合成)

第1工程において、セバシン酸ジメチルの代わりにスベリン酸ジメチルを反応させ、第4工程において、2–ブチルオクタン–1–オールの代わりに

(S) -オクタン-3-オールを反応させた以外は実施例4と同様にして、下記式(22)で表されるYS-117Sを合成した。

[0115] [化36]



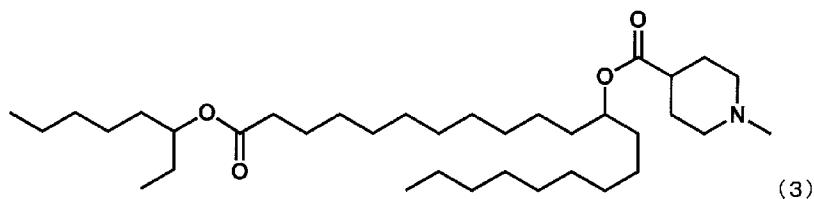
[0116] HPLC-LC/MS、Rt 4.70分、ESI-MS (M+H) m/z 523.5、found 524.6、 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.87 (1H, q)、4.80 (1H, q)、2.82 (2H, d)、2.27 (6H, m)、1.98 (2H, m)、1.91 (2H, m)、1.82 (2H, m)、1.62-1.29 (10H, m)、1.24 (26H, m)、0.86 (9H, m)

[0117] [実施例13]

(21-(オクタン-3-イルオキシ)-21-オキソヘンイコサン-10-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート (以下、「YS-118」という場合がある。))の合成

第1工程において、セバシン酸ジメチルの代わりにドデカン二酸ジメチルを反応させ、第4工程において、2-ブチルオクタン-1-オールの代わりにオクタン-3-オールを反応させた以外は実施例4と同様にして、下記式(3)で表されるYS-118を合成した。

[0118] [化37]



[0119] HPLC-LC/MS、Rt 6.55分、ESI-MS (M+H) m/z 579.5、found 580.6、 ^1H NMR (400MHz

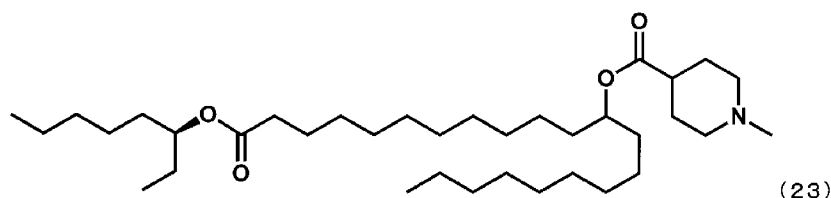
z、 CDCl_3) δ 4.87 (1H, q)、4.80 (1H, q)、2.82 (2H, d)、2.27 (6H, m)、1.98 (2H, m)、1.91 (2H, m)、1.82 (2H, m)、1.62–1.29 (10H, m)、1.24 (30H, m)、0.86 (9H, m)

[0120] [実施例14]

(21-((S)-オクタン-3-イルオキシ)-21-オキソヘンイコサン-10-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート (以下、「YS-118S」という場合がある。)) の合成

第1工程において、セバシン酸ジメチルの代わりにドデカン二酸ジメチルを反応させ、第4工程において、2-ブチルオクタン-1-オールの代わりに(S)-オクタン-3-オールを反応させた以外は実施例4と同様にして、下記式(23)で表されるYS-118Sを合成した。

[0121] [化38]



[0122] HPLC-LC/MS、 R_t 6.54分、ESI-MS ($M+H$) m/z 579.5、found 580.6、 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.87 (1H, q)、4.80 (1H, q)、2.82 (2H, d)、2.27 (6H, m)、1.98 (2H, m)、1.91 (2H, m)、1.82 (2H, m)、1.62–1.29 (10H, m)、1.24 (30H, m)、0.86 (9H, m)

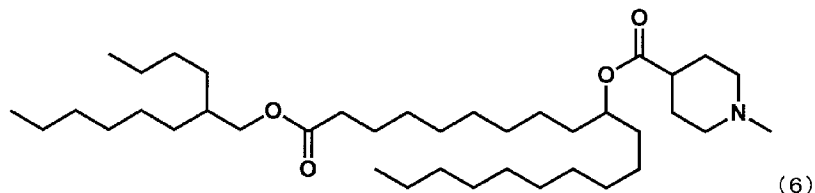
[0123] [実施例15]

(1-((2-ブチルオクチル)オキシ)-1-オキソイコサン-10-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート (以下、「YS-120」という場合がある。)) の合成

第3工程において、ノニルマグネシウムブロミドの代わりにデカニルマグ

ネシウムブロミドを反応させた以外は実施例4と同様にして、下記式(6)で表されるYS-120を合成した。

[0124] [化39]



[0125] HPLC-LC/MS、Rt 8.70分、ESI-MS (M+H) calcd 621.6、found 622.7、¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.86 (1H, ddd)、3.96 (2H, d)、2.81 (2H, d)、2.27 (6H, m)、2.03 (2H, m)、1.98 (1H, d)、1.90 (1H, m)、1.78 (4H, m)、1.61 (4H, m)、1.49 (4H, m)、1.27-1.21 (41H, m)、0.87 (9H, m)

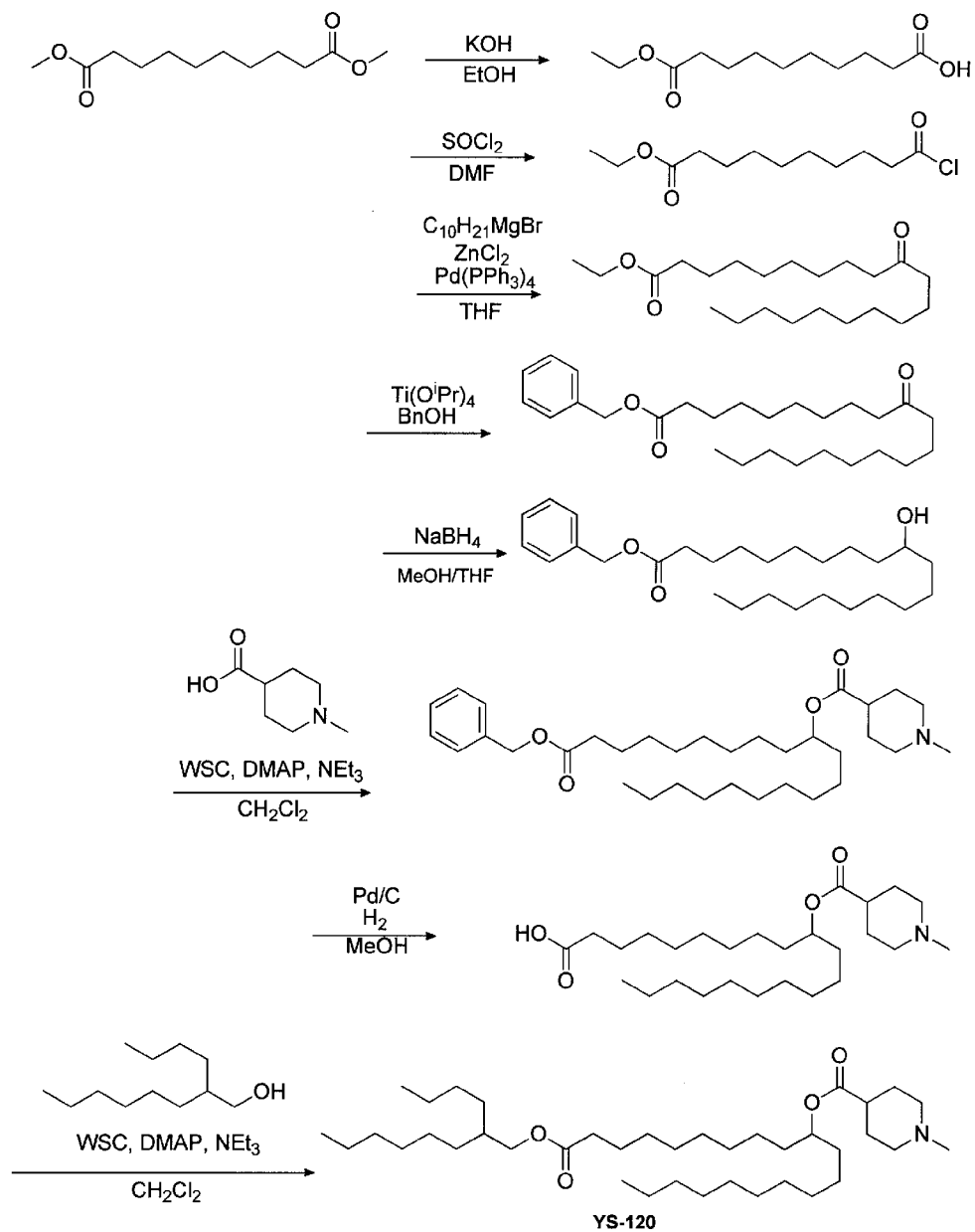
[0126] 後述するように、上記式(6)で表される化合物で脂質複合体を形成すると、一定期間保管した場合の脂質複合体の粒子径の増大が抑制されており、安定性が高い。

[0127] [実施例16]

(1-((2-ブチルオクチル)オキシ)-1-オキソイコサン-10-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート(「YS-120」)の合成)

以下に、YS-120の別の合成スキームを示す。

[化40]



[0128] (第1工程から第3工程)

第1工程から第3工程は上述したYS-102の合成と同様に行った。

[0129] (第4工程：エステル交換)

第3工程品 (150.0 g、440.5 mmol)、ベンジルアルコール (142.9 g、1321.4 mmol)、チタニウムテトラプロポキシド (12.5 g、44.5 mmol) の混合液を攪拌しながら、外浴を130℃まで昇温した。出てくる留出液を除きながら攪拌を続け、留出が見えなく

なった時点を反応終点として冷却後水を加えてクエンチした。反応液を酢酸エチルで抽出し、水、食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、第4工程品（146.2 g、350.9 mmol）を得た。

[0130]（第5工程：還元）

第4工程品（100.0 g、240.0 mmol）をTHF（480.0 mL）、メタノール（480.0 mL）に溶かした溶液中に、水素化ホウ素ナトリウム（10.9 g、288.0 mmol）を添加し、10分間反応させた。反応終了後1 N塩酸でクエンチした。酢酸エチルで抽出し、水、食塩水で洗浄後、有機層を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、第5工程品（70.0 g、167.2 mmol）を得た。

[0131]（第6工程：縮合）

第5工程品（50.0 g、119.4 mmol）をTHF（480.0 mL）に溶かした溶液中に、WSC（45.8 g、238.9 mmol）、ジメチルアミノピリジン（2.92 g、23.9 mmol）、1-メチルピペリジン-4-カルボン酸（34.2 g、238.9 mmol）を添加した。室温で翌日まで攪拌した後、水を加え、有機層を分液した。有機層を水で5回洗浄後、1 N水酸化ナトリウム水溶液で1度洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、第6工程品（37.2 g、68.4 mmol）を得た。

[0132]（第7工程：接触還元）

第6工程品（37.2 g、68.4 mmol）、パラジウム／炭素（4.9 mL）を酢酸エチル（136.8 mL）に懸濁させ、水素雰囲気下一晩攪拌した。反応液をろ別し、パラジウム／炭素を除いて濃縮した。シリカゲルクロマトグラフィーにて精製し、第7工程品（26.8 g、59.1 mmol）を得た。

[0133] (第8工程：縮合)

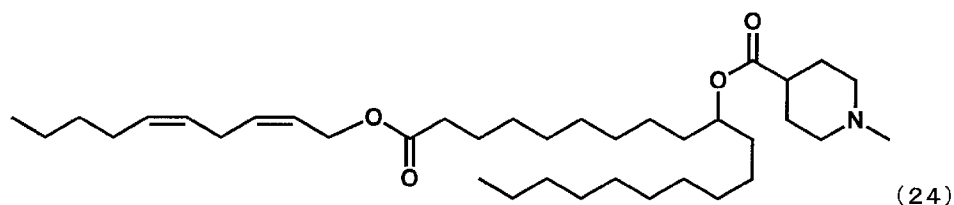
第7工程品 (20.0 g、44.1 mmol) を塩化メチレン (220.0 mL) に溶かした溶液中に、WSC (8.9 g、46.3 mmol)、ジメチルアミノピリジン (1.08 g、0.4 mmol)、2-ブチルオクタン-1-オール (16.4 g、88.2 mmol) を添加した。室温で翌日まで攪拌した後、水を加え、有機層を分液した。有機層を水で5回洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、式(6)で表されるYS-120 (22.0 g、35.4 mmol) を得た。

[0134] [実施例17]

(1-((2Z, 5Z)-デカ-2, 5-ジエン-1-イルオキシ)-1-オキソイコサン-10-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート (以下、「YS-121」という場合がある。) の合成)

第8工程において、2-ブチルオクタン-1-オールの代わりに(2Z, 5Z)-デカ-2, 5-ジエン-1-オールを反応させた以外は実施例16と同様にして、下記式(24)で表されるYS-121を合成した。

[0135] [化41]



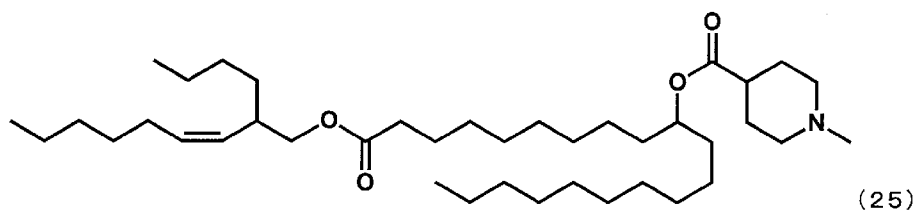
[0136] ESI-MS (M+H) calcd 589.5, found 590.7, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.60 (1H, m), 5.36 (1H, m), 4.87 (1H, tt), 4.64 (1H, d), 2.86 (2H, m), 2.36 (3H, s), 2.32 (2H, t), 2.22 (1H, m), 2.02 (2H, m), 1.97 (2H, m), 1.61 (2H, m), 1.50 (3H, m), 1.27 (40H, m), 0.88 (6H, m)

[0137] [実施例 18]

((Z)-1-((2-ブチルノン-3-エン-1-イル)オキシ)-1-オキソイコサン-10-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート (以下、「YS-122」という場合がある。)の合成)

第8工程において、2-ブチルオクタン-1-オールの代わりに(Z)-2-ブチルノン-3-エン-1-オールを反応させた以外は実施例16と同様にして、下記式(25)で表されるYS-122を合成した。

[0138] [化42]



[0139] ESI-MS (M+H) calc'd 633.6, found 634.7, ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5.60 (1H, m), 5.36 (1H, m), 4.87 (1H, tt), 4.64 (1H, d), 2.86 (2H, m), 2.36 (3H, s), 2.32 (2H, t), 2.22 (1H, m), 2.02 (2H, m), 1.97 (2H, m), 1.61 (2H, m), 1.50 (3H, m), 1.27 (48H, m), 0.88 (6H, m)

[0140] 後述するように、上記式(25)で表される化合物で脂質複合体を形成すると、一定期間保管した場合の脂質複合体の粒子径の増大が抑制されており、安定性が高い。

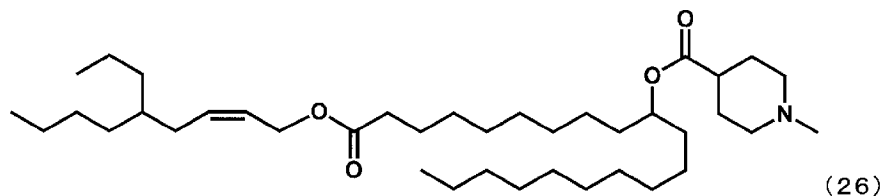
[0141] [実施例 19]

((Z)-1-オキソ-1-((5-プロピルノン-2-エン-1-イル)オキシ)イコサン-10-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート (以下、「YS-123」という場合がある。)の合成)

第8工程において、2-ブチルオクタン-1-オールの代わりに(Z)-5-プロピルノン-2-エン-1-オールを反応させた以外は実施例16と

同様に、下記式（26）で表されるYS-123を合成した。

[0142] [化43]



[0143] ESI-MS (M+H) calc'd 619.6, found 620.7, ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5.60 (2H, m), 4.87 (1H, tt), 4.61 (2H, d), 2.93 (2H, d), 2.42 (3H, s), 2.31 (2H, t), 2.29 (2H, t), 2.05 (4H, t), 1.93 (2H, m), 1.61 (2H, m), 1.50 (4H, m), 1.27 (43H, m), 0.88 (6H, m)

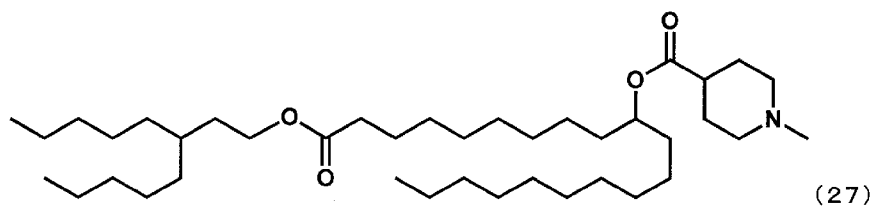
[0144] 後述するように、上記式（26）で表される化合物で脂質複合体を形成すると、一定期間保管した場合の脂質複合体の粒子径の増大が抑制されており、安定性が高い。

[0145] [実施例20]

（1-オキソ-1-（（3-ペンチルオクチル）オキシ）イコサン-10-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート（以下、「YS-124」という場合がある。）の合成）

第8工程において、2-ブチルオクタン-1-オールの代わりに3-ペンチルオクタン-1-オールを反応させた以外は実施例16と同様に、下記式（27）で表されるYS-124を合成した。

[0146] [化44]



[0147] ESI-MS (M+H) calc'd 635.6, found 636.7, ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.87 (1H, tt)、4.06 (2H, m)、2.81 (2H, d)、2.27 (6H, m)、2.02 (2H, m)、1.97 (2H, m)、1.77 (4H, m)、1.61 (2H, m)、1.50 (3H, m)、1.43 (1H, m)、1.27 (43H, m)、0.88 (9H, m)

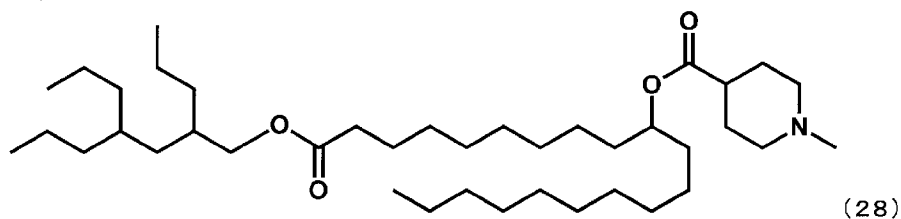
[0148] 後述するように、上記式(27)で表される化合物で脂質複合体を形成すると、一定期間保管した場合の脂質複合体の粒子径の増大が抑制されており、安定性が高い。

[0149] [実施例21]

(1-((2,4-ジプロピルヘプチル)オキシ)-1-オキソイコサン-10-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート(以下、「YS-125」という場合がある。)の合成)

第8工程において、2-ブチルオクタン-1-オールの代わりに2,4-ジプロピルヘプタン-1-オールを反応させた以外は実施例16と同様にし、下記式(28)で表されるYS-125を合成した。

[0150] [化45]



[0151] ESI-MS (M+H) calc'd 635.6, found 636.7, ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.87 (1H, tt)、3.95 (1H, d)、3.55 (2H, t)、2.96 (2H, m)、2.45 (3H, s)、2.32 (2H, t)、2.22 (1H, m)、2.02 (2H, m)、1.97 (2H, m)、1.61 (2H, m)、1.50 (3H, m)、1.27 (49H, m)、0.88 (12H, m)

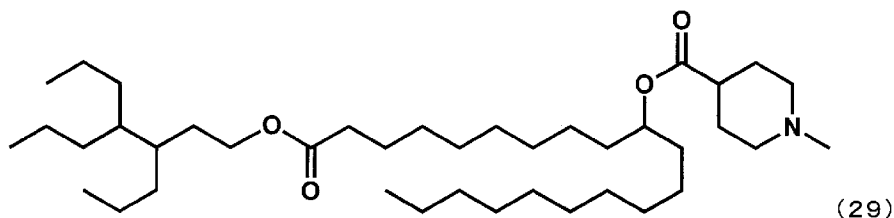
[0152] 後述するように、上記式（28）で表される化合物で脂質複合体を形成すると、一定期間保管した場合の脂質複合体の粒子径の増大が抑制されており、安定性が高い。

[0153] [実施例22]

（1-（（3,4-ジプロピルヘプチル）オキシ）-1-オキソイコサン-10-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート（以下、「YS-126」という場合がある。）の合成）

第8工程において、2-ブチルオクタン-1-オールの代わりに3,4-ジプロピルヘプタン-1-オールを反応させた以外は実施例16と同様にし、下記式（29）で表されるYS-126を合成した。

[0154] [化46]



[0155] ESI-MS (M+H) calc'd 635.6, found 636.7, ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.87 (1H, tt), 4.06 (2H, m), 3.00 (2H, m), 2.45 (5H, m), 2.27 (2H, t), 2.02 (2H, m), 1.97 (2H, m), 1.61 (2H, m), 1.50 (3H, m), 1.43 (2H, m), 1.27 (42H, m), 0.88 (12H, m)

[0156] 後述するように、上記式（29）で表される化合物で脂質複合体を形成すると、一定期間保管した場合の脂質複合体の粒子径の増大が抑制されており、安定性が高い。

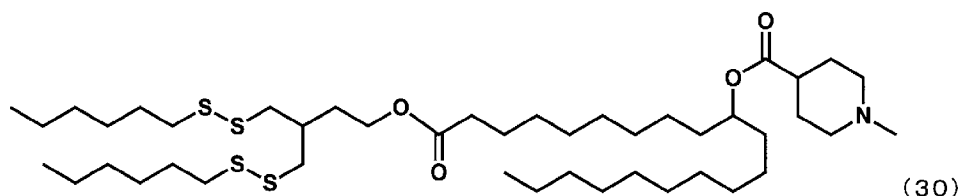
[0157] [実施例23]

（1-（4-（ヘキシルジスルファニル）-3-（（ヘキシルジスルファニル）メチル）ブトキシ）-1-オキソイコサン-10-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート（以下、「YS-127」という場合があ

る。)の合成)

第8工程において、2-ブチルオクタン-1-オールの代わりに4-(ヘキシルジスルファニル)-3-((ヘキシルジスルファニル)メチル)ブタン-1-オールを反応させた以外は実施例16と同様にして、下記式(30)で表されるYS-127を合成した。

[0158] [化47]



[0159] ESI-MS (M+H) calc'd 819.5, found 820.6, ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.86 (1H, t), 4.13 (2H, t), 2.81 (6H, d), 2.67 (2H, t), 2.29 (3H, t), 2.27 (3H, s), 1.99 (2H, m), 1.90 (2H, dd), 1.79 (2H, dt), 1.68 (12H, m), 1.50 (6H, m), 1.42 (6H, m), 1.24 (29H, m), 0.88 (9H, m)

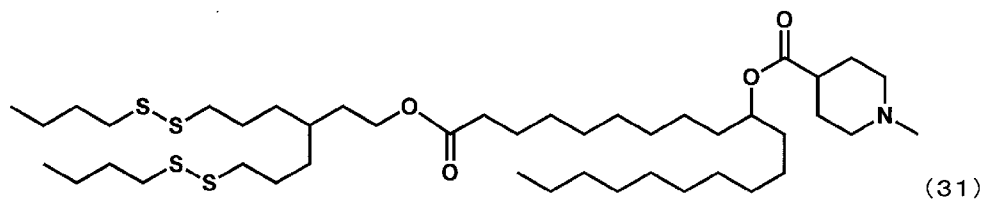
[0160] [実施例24]

(1-((6-(ブチルジスルファニル)-3-(3-(ブチルジスルファニル)プロピル)ヘキシル)オキシ)-1-オキソイコサン-10-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート (以下、「YS-128」という場合がある。)の合成)

第8工程において、2-ブチルオクタン-1-オールの代わりに6-(ブチルジスルファニル)-3-(3-(ブチルジスルファニル)プロピル)ヘキサン-1-オールを反応させた以外は実施例16と同様にして、下記式(31)で表されるYS-128を合成した。

[0161]

[化48]



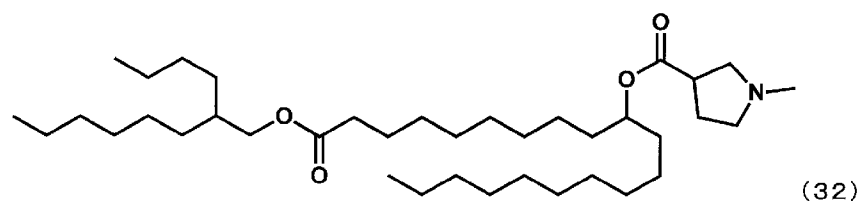
[0162] ESI-MS (M+H) calcd 819.5, found 821.0, ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.86 (1H, tt), 4.08 (2H, t), 2.81 (2H, d), 2.67 (8H, dd), 2.29 (3H, t), 2.27 (3H, s), 1.99 (2H, m), 1.90 (2H, dd), 1.79 (2H, dt), 1.68 (12H, m), 1.50 (6H, m), 1.42 (6H, m), 1.24 (37H, m), 0.92-0.88 (9H, m)

[0163] [実施例25]

(1-((2-ブチルオクチル)オキシ)-1-オキソイコサン-10-イル-1-メチルピロリジン-3-カルボキシレート (以下、「YS-129」という場合がある。)の合成)

第6工程において、1-メチルピペリジン-4-カルボン酸の代わりに1-メチルピロリジン-3-カルボン酸を反応させた以外は実施例16と同様にして、下記式(32)で表されるYS-129を合成した。

[0164] [化49]



[0165] ESI-MS (M+H) calcd 607.6, found 608.8, ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.86 (1H, tt), 3.98 (2H, d), 3.05 (1H, tt), 2.86 (1H, t)

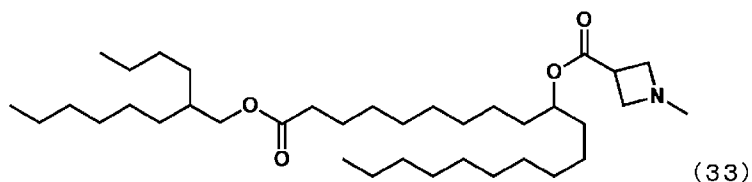
t)、2.67 (2H, m)、2.49 (1H, tt)、2.35 (3H, s)、2.29 (2H, t)、2.17 (2H, m)、1.72 (2H, s)、1.60 (3H, m)、1.50 (4H, m)、1.24 (44H, m)、0.92–0.88 (9H, m)

[0166] [実施例26]

(1-((2-ブチルオクチル)オキシ)-1-オキソイコサン-10-イル-1-メチルアゼチジン-3-カルボキシレート (以下、「YS-131」という場合がある。)の合成)

第6工程において、1-メチルピペリジン-4-カルボン酸の代わりに1-メチルアゼチジン-3-カルボン酸を反応させた以外は実施例16と同様にして、下記式(33)で表されるYS-131を合成した。

[0167] [化50]



[0168] ESI-MS (M+H) calc'd 593.4, found 594.7, ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.87 (1H, tt)、3.96 (2H, d)、3.57 (2H, d)、3.25 (2H, d)、3.23 (1H, tt)、2.32 (3H, s)、2.29 (2H, t)、2.03 (2H, m)、1.61 (4H, m)、1.49 (4H, m)、1.27–1.21 (41H, m)、0.87 (9H, m)

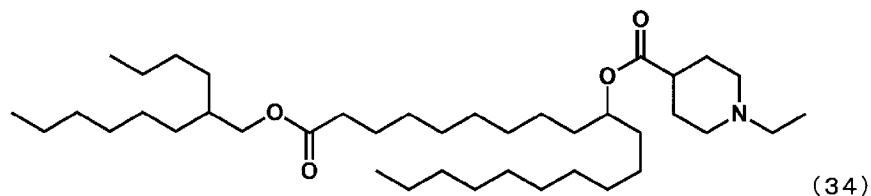
[0169] [実施例27]

(1-((2-ブチルオクチル)オキシ)-1-オキソイコサン-10-イル-1-エチルピペリジン-4-カルボキシレート (以下、「YS-132」という場合がある。)の合成)

第6工程において、1-メチルピペリジン-4-カルボン酸の代わりに1-エチルピペリジン-4-カルボン酸を反応させた以外は実施例16と同様

にして、下記式(34)で表されるYS-132を合成した。

[0170] [化51]



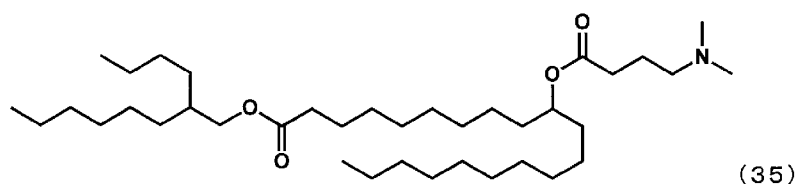
[0171] ESI-MS (M+H) calcd 636.0, found 636.7, 1H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.87 (1H, dd), 3.96 (2H, d), 2.91 (2H, d), 2.40 (2H, dd), 2.29 (4H, m), 2.03-1.93 (4H, m), 1.80 (2H, m), 1.61 (4H, m), 1.49 (4H, m), 1.27-1.21 (41H, m), 1.08 (4H, t), 0.87 (9H, m)

[0172] [実施例28]

(2-ブチルオクチル-10-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)イコサノエート(以下、「YS-133」という場合がある。)の合成)

第6工程において、1-メチルピペリジン-4-カルボン酸の代わりに4-(ジメチルアミノ)ブタン酸を反応させた以外は実施例16と同様にして、下記式(35)で表されるYS-133を合成した。

[0173] [化52]



[0174] ESI-MS (M+H) calcd 609.6, found 610.7, 1H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.86 (1H, tt), 3.96 (2H, d), 2.33-2.26 (6H, m), 2.21 (6H, s), 2.03 (2H, m), 1.80 (2H, m), 1.61 (4

H, m)、1.49 (4H, m)、1.27–1.21 (41H, m)、0.87 (9H, m)

[0175] <組成物の調製(1)>

[実施例29]

(YS-102)

実施例1のカチオン性脂質(YS-102)を用いて組成物を調製した。核酸としては、センス鎖5'-GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUafCT*T-3' (配列番号1、T:DNA、fU, fC=2'-Fluoro RNA、*=Phosphorothioate linkage)、アンチセンス鎖5'-GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCT*T-3' (配列番号2、T:DNA、fU, fC=2'-Fluoro RNA、*=Phosphorothioate linkage)の塩基配列からなる、Factor VII (血液凝固第VII因子)遺伝子の発現を抑制するsiRNAであり、アニーリング済みのもの(株式会社ジーンデザイン、以下「Factor VII siRNA」という場合がある。)を使用した。

[0176] Factor VII siRNAを25mM酢酸ナトリウム(pH4.0)で216 μ g/mLに溶解し、siRNA希釈液とした。また、カチオン性脂質(YS-102)、DSPC(日本精化株式会社)、Cholesterol(日本精化株式会社)、MPEG2000-DMG(日油株式会社)を60/8.5/30/1.5(モル比)の割合で総脂質濃度15mMとなるようにエタノールに溶解し、脂質溶液とした。siRNA希釈液と脂質溶液とを、それぞれ2.4mL/分、1.29mL/分の流速で混合し、更に25mM酢酸ナトリウム(pH4.0)を9.25mL/分の流速で混合することにより、脂質複合体水溶液を得た。得られた脂質複合体水溶液を、透析膜(商品名「Float-A-Lyzer G2」、SPECTRUM社、50K MWCO)を用いた透析に供し、外液をリン酸緩衝液(PBS、pH7.5)に置換した。透析後、濃縮及び濾過滅菌を行い、実施例2

9の組成物を得た。

[0177] [実施例30]

(YS-101)

カチオン性脂質として、YS-102の代わりに実施例2のカチオン性脂質(YS-101)を用いた以外は実施例29と同様にして、実施例30の組成物を得た。

[0178] [実施例31]

(YS-103)

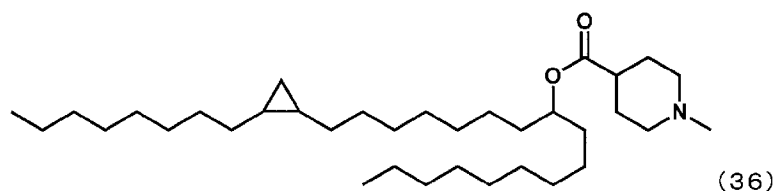
カチオン性脂質として、YS-102の代わりに実施例3のカチオン性脂質(YS-103)を用いた以外は実施例29と同様にして、実施例31の組成物を得た。

[0179] [参考例1]

(YS-021)

カチオン性脂質として、YS-102の代わりに下記式(36)で表される1-(2-オクチルシクロプロピル)ヘプタデカン-8-イル-1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート(以下、「YS-021」という場合がある。)を用いた以外は実施例29と同様にして、参考例1の組成物を得た。

[0180] [化53]



[0181] <組成物の解析(1)>

実施例29～31及び参考例1の組成物について、脂質複合体へのsiRNAの封入率を測定した。

[0182] 具体的には、組成物をRNase Free Waterで希釈し、Quant-iT RiboGreen RNA Reagent (Invitrogen)

rogen社)を使用して測定したsiRNA濃度(A)を、脂質複合体外液に存在するsiRNAとした。また、組成物を1% Triton X-100で希釈して測定したsiRNA濃度(B)を組成物中の全siRNA濃度とした。続いて、次式(F1)により、核酸の封入率を算出した。

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

[0183] また、粒子径測定装置(商品名「Zetasizer Nano ZS」、Malvern社製)で脂質複合体の平均粒子径を測定した。

[0184] 表1に、siRNAの封入率及び脂質複合体の平均粒子径(Z-平均)を示す。

[0185] [表1]

組成物	カチオン性脂質	封入率(%)	平均粒子径(nm)
実施例29	YS-102	98	74
実施例30	YS-101	>99	79
実施例31	YS-103	98	68
参考例1	YS-021	>99	65

[0186] <組成物の調製(2)>

[実施例32]

(YS-111)

実施例5のカチオン性脂質(YS-111)を用いて組成物を調製した。核酸としては、実施例29の組成物で用いたものと同じFactor VII siRNAを使用した。

[0187] Factor VII siRNAを25mM酢酸ナトリウム(pH4.0)で181μg/mLに溶解し、siRNA希釈液とした。また、カチオン性脂質(YS-111)、DSPC(日本精化株式会社)、Cholesterol(日本精化株式会社)、MPEG2000-DMG(日油株式会社)を60/8.5/30/1.5(モル比)の割合で総脂質濃度10mMとなるようにエタノールに溶解し、脂質溶液とした。siRNA希釈液と脂質溶液とを、それぞれ2.4mL/分、1.29mL/分の流速で混合し、更に25mM酢酸ナトリウム(pH4.0)を5.0mL/分の流速で混合

することにより、脂質複合体水溶液を得た。得られた脂質複合体水溶液を、透析膜（商品名「Float-A-Lyzer G2」、SPECTRUM社、50K MWCO）を用いた透析に供し、外液をリン酸緩衝液（PBS、pH 7.5）に置換した。透析後、濃縮及び濾過滅菌を行い、実施例32の組成物を得た。

[0188] [実施例33]

(YS-112)

カチオン性脂質として、YS-111の代わりに実施例6のカチオン性脂質（YS-112）を用いた以外は実施例32と同様にして、実施例33の組成物を得た。

[0189] [実施例34]

(YS-113)

カチオン性脂質として、YS-111の代わりに実施例7のカチオン性脂質（YS-113）を用いた以外は実施例32と同様にして、実施例34の組成物を得た。

[0190] [実施例35]

(YS-114)

カチオン性脂質として、YS-111の代わりに実施例8のカチオン性脂質（YS-114）を用いた以外は実施例32と同様にして、実施例35の組成物を得た。

[0191] [実施例36]

(YS-115)

カチオン性脂質として、YS-111の代わりに実施例9のカチオン性脂質（YS-115）を用いた以外は実施例32と同様にして、実施例36の組成物を得た。

[0192] [実施例37]

(YS-116)

カチオン性脂質として、YS-111の代わりに実施例10のカチオン性

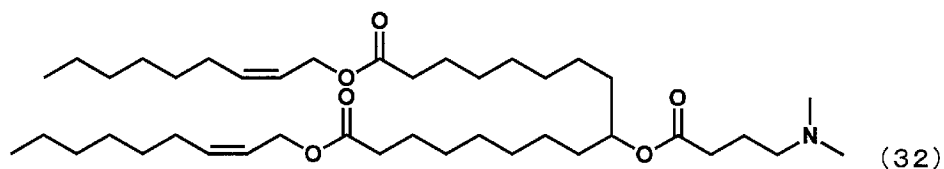
脂質（YS-116）を用いた以外は実施例32と同様にして、実施例36の組成物を得た。

[0193] [比較例1]

(ALN-319)

カチオン性脂質として、YS-111の代わりに、特許文献1に記載された下記式(32)で表されるジ((Z)-ノン-2-エン-1-イル)9-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオエート(以下、「ALN-319」という場合がある。)を、特許文献1に記載された方法にしたがって合成して用いた以外は実施例32と同様にして、比較例1の組成物を得た。

[0194] [化54]



[0195] <組成物の解析(2)>

実施例29の組成物と同様にして、実施例32～37及び比較例1の組成物について、脂質複合体へのsiRNAの封入率、及び脂質複合体の平均粒子径を測定した。表2に、siRNAの封入率及び脂質複合体の平均粒子径(Z-平均)を示す。

[0196] [表2]

組成物	カチオン性脂質	封入率(%)	平均粒子径(nm)
実施例32	YS-111	95	78
実施例33	YS-112	94	71
実施例34	YS-113	88	70
実施例35	YS-114	86	73
実施例36	YS-115	95	68
実施例37	YS-116	91	72
比較例1	ALN-319	96	77

[0197] <組成物の調製(3)>

[実施例 38]

(YS-117)

実施例 11 のカチオン性脂質 (YS-117) を用いて組成物を調製した。核酸としては、実施例 29 の組成物で用いたものと同じ Factor VII siRNA を使用した。

[0198] Factor VII siRNA を 25 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.0) で $108 \mu\text{g}/\text{mL}$ に溶解し、siRNA 希釈液とした。また、カチオン性脂質 (YS-111)、DSPC (日本精化株式会社)、Cholesterol (日本精化株式会社)、MPEG2000-DMG (日油株式会社) を 60/8.5/30/1.5 (モル比) の割合で総脂質濃度 6 mM となるようにエタノールに溶解し、脂質溶液とした。siRNA 希釈液と脂質溶液とを、それぞれ 2.4 mL/分、1.29 mL/分の流速で混合し、更に 25 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.0) を 9.25 mL/分の流速で混合することにより、脂質複合体水溶液を得た。得られた脂質複合体水溶液を、透析膜 (商品名「Float-A-Lyzer G2」、SPECTRUM 社、50K MWCO) を用いた透析に供し、外液をリン酸緩衝液 (PBS、pH 7.5) に置換した。透析後、濃縮及び濾過滅菌を行い、実施例 38 の組成物を得た。

[0199] [実施例 39]

(YS-117S)

カチオン性脂質として、YS-117 の代わりに実施例 12 のカチオン性脂質 (YS-117S) を用いた以外は実施例 38 と同様にして、実施例 39 の組成物を得た。

[0200] [実施例 40]

(YS-118)

カチオン性脂質として、YS-117 の代わりに実施例 13 のカチオン性脂質 (YS-118) を用いた以外は実施例 38 と同様にして、実施例 40 の組成物を得た。

[0201] [実施例 4 1]

(Y S - 1 1 8 S)

カチオン性脂質として、Y S - 1 1 7 の代わりに実施例 1 4 のカチオン性脂質 (Y S - 1 1 8 S) を用いた以外は実施例 3 8 と同様にして、実施例 4 1 の組成物を得た。

[0202] [実施例 4 2]

(Y S - 1 1 9)

カチオン性脂質として、Y S - 1 1 7 の代わりに実施例 4 のカチオン性脂質 (Y S - 1 1 9) を用いた以外は実施例 3 8 と同様にして、実施例 4 2 の組成物を得た。

[0203] <組成物の解析 (3)>

実施例 2 9 の組成物と同様にして、実施例 3 8 ~ 4 2 の組成物について、脂質複合体への s i R N A の封入率、及び脂質複合体の平均粒子径を測定した。表 3 に、s i R N A の封入率及び脂質複合体の平均粒子径 (Z - 平均) を示す。

[0204] [表3]

組成物	カチオン性脂質	封入率 (%)	平均粒子径 (nm)
実施例 38	Y S - 1 1 7	58	110
実施例 39	Y S - 1 1 7 S	65	126
実施例 40	Y S - 1 1 8	74	74
実施例 41	Y S - 1 1 8 S	73	71
実施例 42	Y S - 1 1 9	77	72

[0205] <組成物の調製 (4)>

[実施例 4 3]

(Y S - 1 1 9)

実施例 4 のカチオン性脂質 (Y S - 1 1 9) を用いて組成物を調製した。核酸としては、実施例 2 9 の組成物で用いたものと同じ F a c t o r V I I s i R N A を使用した。

[0206] F a c t o r V I I s i R N A を 2 5 m M 酢酸ナトリウム (p H 4 .

0) で $108 \mu\text{g}/\text{mL}$ に溶解し、s i R N A 希釈液とした。また、カチオン性脂質 (Y S - 1 1 9)、D S P C (日本精化株式会社)、C h o l e s t e r o l (日本精化株式会社)、M P E G 2 0 0 0 - D M G (日油株式会社) を $60/8.5/30/1.5$ (モル比) の割合で総脂質濃度 6 mM となるようにエタノールに溶解し、脂質溶液とした。s i R N A 希釈液と脂質溶液とを、それぞれ $1.80 \text{ mL}/\text{分}$ 、 $0.97 \text{ mL}/\text{分}$ の流速で混合し、更に 25 mM 酢酸ナトリウム ($\text{pH} 4.0$) を $6.94 \text{ mL}/\text{分}$ の流速で混合することにより、脂質複合体水溶液を得た。得られた脂質複合体水溶液を、透析膜 (商品名「F l o a t - A - L y z e r G 2」、S P E C T R U M 社、 50 K MWCO) を用いた透析に供し、外液をリン酸緩衝液 (P B S、 $\text{pH} 7.5$) に置換した。透析後、濃縮及び濾過滅菌を行い、実施例 4 3 の組成物を得た。

[0207] [比較例 2]

(A L N - 3 1 9)

カチオン性脂質として、Y S - 1 1 9 の代わりに、上述した A L N - 3 1 9 を用いた以外は実施例 4 3 と同様にして、比較例 2 の組成物を得た。

[0208] <組成物の解析 (4)>

実施例 2 9 の組成物と同様にして、実施例 4 3 及び比較例 2 の組成物について、脂質複合体への s i R N A の封入率、及び脂質複合体の平均粒子径 (Z - 平均) を測定した。表 4 に、s i R N A の封入率及び脂質複合体の平均粒子径を示す。

[0209] [表4]

組成物	カチオン性脂質	封入率 (%)	平均粒子径 (nm)
実施例 43	Y S - 1 1 9	88	94
比較例 2	A L N - 3 1 9	75	95

[0210] <組成物の調製 (5)>

[実施例 4 4]

(Y S - 1 1 9)

実施例4のカチオン性脂質（YS-119）を用いて組成物を調製した。
核酸としては、実施例29の組成物で用いたものと同じFactor Vll siRNAを使用した。

[0211] Factor Vll siRNAを25mM酢酸ナトリウム（pH4.0）で216 μ g/mLに溶解し、siRNA希釈液とした。また、カチオン性脂質（YS-119）、Cholesterol（日本精化株式会社）、MPEG2000-DPG（日油株式会社）を60/38.5/1.5（モル比）の割合で総脂質濃度6mMとなるようにエタノールに溶解し、脂質溶液とした。siRNA希釈液と脂質溶液とを、それぞれ3.36mL/分、1.81mL/分の流速で混合し、更に25mM酢酸ナトリウム（pH4.0）を12.95mL/分の流速で混合することにより、脂質複合体水溶液を得た。得られた脂質複合体水溶液を、透析膜（商品名「Float-A-Lyzer G2」、SPECTRUM社、50K MWCO）を用いた透析に供し、外液をリン酸緩衝液（PBS、pH7.5）に置換した。透析後、濃縮及び濾過滅菌を行い、実施例44の組成物を得た。

[0212] [実施例45]

（YS-120）

カチオン性脂質として、YS-119の代わりに、実施例15のカチオン性脂質（YS-120）を用いた以外は実施例44と同様にして、実施例45の組成物を得た。

[0213] <組成物の解析（5）>

実施例29の組成物と同様にして、実施例44及び45の組成物について、脂質複合体へのsiRNAの封入率、及び脂質複合体の平均粒子径（Z-平均）を測定した。表5に、siRNAの封入率及び脂質複合体の平均粒子径を示す。

[0214] [表5]

組成物	カチオン性脂質	封入率(%)	平均粒子径(nm)
実施例44	YS-119	96	80
実施例45	YS-120	94	79

[0215] <組成物の調製 (6)>

[実施例 46]

(YS-120)

実施例 16 のカチオン性脂質 (YS-120) を用いて組成物を調製した。核酸としては、実施例 29 の組成物で用いたものと同じ Factor VII siRNA を使用した。

[0216] Factor VII siRNA を 25 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.0) で $450 \mu\text{g}/\text{mL}$ に溶解し、siRNA 希釈液とした。また、カチオン性脂質 (YS-120)、DSPC (日本精化株式会社)、Cholesterol (日本精化株式会社)、MPEG2000-DMG (日油株式会社) を 60/8.5/30/1.5 (モル比) の割合で総脂質濃度 40 mM となるようにエタノールに溶解し、脂質溶液とした。siRNA に対する脂質の比を質量比 0.06 とし、siRNA 希釈液と脂質溶液とを、それぞれ 4.0 mL/分、1.3 mL/分の流速で混合することにより、脂質複合体水溶液を得た。得られた脂質複合体水溶液を、透析膜 (商品名「Float-A-Lyzer G2」、SPECTRUM 社、50K MWCO) を用いた透析に供し、外液をリン酸緩衝液 (PBS、pH 7.4) に置換した。透析後、濃縮及び濾過滅菌を行い、実施例 46 の組成物を得た。

[0217] [実施例 47]

(YS-121)

カチオン性脂質として、YS-120 の代わりに、実施例 17 のカチオン性脂質 (YS-121) を用いた以外は実施例 46 と同様にして、実施例 47 の組成物を得た。

[0218] [実施例 48]

(YS-122)

カチオン性脂質として、YS-120 の代わりに、実施例 18 のカチオン性脂質 (YS-122) を用いた以外は実施例 46 と同様にして、実施例 48 の組成物を得た。

[0219] [実施例 4 9]

(Y S - 1 2 3)

カチオン性脂質として、Y S - 1 2 0 の代わりに、実施例 1 9 のカチオン性脂質 (Y S - 1 2 3) を用いた以外は実施例 4 6 と同様にして、実施例 4 9 の組成物を得た。

[0220] [実施例 5 0]

(Y S - 1 2 4)

カチオン性脂質として、Y S - 1 2 0 の代わりに、実施例 2 0 のカチオン性脂質 (Y S - 1 2 4) を用いた以外は実施例 4 6 と同様にして、実施例 5 0 の組成物を得た。

[0221] [実施例 5 1]

(Y S - 1 2 5)

カチオン性脂質として、Y S - 1 2 0 の代わりに、実施例 2 1 のカチオン性脂質 (Y S - 1 2 5) を用いた以外は実施例 4 6 と同様にして、実施例 5 1 の組成物を得た。

[0222] [実施例 5 2]

(Y S - 1 2 6)

カチオン性脂質として、Y S - 1 2 0 の代わりに、実施例 2 2 のカチオン性脂質 (Y S - 1 2 6) を用いた以外は実施例 4 6 と同様にして、実施例 5 2 の組成物を得た。

[0223] <組成物の解析 (6)>

実施例 2 9 の組成物と同様にして、実施例 4 6 ~ 5 2 の組成物について、脂質複合体への s i R N A の封入率、及び脂質複合体の平均粒子径 (Z - 平均) を測定した。表 6 に、s i R N A の封入率及び脂質複合体の平均粒子径を示す。

[0224]

[表6]

組成物	カチオン性脂質	封入率(%)	平均粒子径(nm)
実施例46	YS-120	99	64
実施例47	YS-121	84	74
実施例48	YS-122	98	66
実施例49	YS-123	99	61
実施例50	YS-124	99	64
実施例51	YS-125	96	63
実施例52	YS-126	99	63

[0225] <組成物の解析(7)>

実施例46～52の組成物について、密閉したバイアルにて4℃で保管し、保管前、保管後3ヶ月目、及び6ヶ月目の粒子径（Z-平均及び多分散指数）を実施例29の組成物と同様にして測定した。

[0226] 表7に、実施例46～52の組成物の平均粒子径の経時変化及び保管6ヶ月目と保管前の粒子径変化(d)を示す。YS-121以外のカチオン性脂質を含む組成物は、保管期間中、脂質複合体の粒子径の増大が抑制されることが示された。

[0227] [表7]

組成物	カチオン性脂質	保管前		3ヶ月後		6ヶ月後		d(nm)
		平均粒子径(nm)	多分散指数	平均粒子径(nm)	多分散指数	平均粒子径(nm)	多分散指数	
実施例46	YS-120	64.4	0.04	64.7	0.05	66.7	0.05	2.3
実施例47	YS-121	74.2	0.03	86.5	0.06	98.0	0.07	23.8
実施例48	YS-122	65.5	0.06	65.4	0.08	64.6	0.05	-0.9
実施例49	YS-123	60.9	0.03	63.5	0.06	65.3	0.07	4.4
実施例50	YS-124	64.4	0.04	63.6	0.04	62.5	0.07	-1.9
実施例51	YS-125	63.3	0.01	62.3	0.12	62.4	0.06	-0.9
実施例52	YS-126	62.9	0.05	65.8	0.08	64.0	0.04	1.1

[0228] <組成物の調製(7)>

[実施例53]

(Y S - 1 2 0)

「組成物の調製 (6)」と同様にして、実施例 1 6 のカチオン性脂質 (Y S - 1 2 0) を用いて組成物を調製した。

[0229] [実施例 5 4]

(Y S - 1 2 4)

カチオン性脂質として、Y S - 1 2 0 の代わりに、実施例 2 3 のカチオン性脂質 (Y S - 1 2 7) を用いた以外は実施例 5 3 と同様にして、実施例 5 4 の組成物を得た。

[0230] [比較例 3]

(A L N - 3 1 9)

カチオン性脂質として、Y S - 1 2 0 の代わりに、上述した A L N - 3 1 9 を用いた以外は実施例 5 3 と同様にして、比較例 3 の組成物を得た。

[0231] <組成物の解析 (8)>

実施例 2 9 の組成物と同様にして、実施例 5 3、5 4、及び比較例 3 の組成物について、脂質複合体への s i R N A の封入率、及び脂質複合体の平均粒子径 (Z - 平均) を測定した。表 8 に、s i R N A の封入率及び脂質複合体の平均粒子径を示す。

[0232] [表8]

組 成 物	カチオン性脂質	封入率 (%)	平均粒子径 (nm)
実施例 53	Y S - 1 2 0	97	66
実施例 54	Y S - 1 2 4	96	67
比較例 3	A L N - 3 1 9	98	95

[0233] <組成物の解析 (9)>

実施例 5 3、5 4、及び比較例 3 の組成物について、各組成物の調製において s i R N A 希釈液と脂質溶液との混合により脂質複合体が生じた直後、該脂質複合体を P B S に透析した後、密閉したバイアルにて 4 °C で保管後 2 ヶ月目、及び 6 ヶ月目の粒子径 (Z - 平均及び多分散指数) を粒子径測定装置 (商品名「Z e t a s i z e r N a n o Z S」、M a l v e r n 社製

）により測定した。

[0234] 表 9 に、実施例 5 3、5 4、及び比較例 3 の組成物の平均粒子径の経時変化及び保管 6 ヶ月目と混合直後の粒子径変化（d）を示す。YS-120 または YS-124 のカチオン性脂質を含む組成物は、比較例 3 の組成物に比べて、保管期間中、脂質複合体の粒子径の増大が抑制されることが示された。

[0235]

[表9]

組成物	カチオン性脂質	2液混合直後		PBS透析後		2ヶ月後		6ヶ月後		d (nm)
		平均 粒子径 (nm)	多分散 指数	平均 粒子径 (nm)	多分散 指数	平均 粒子径 (nm)	多分散 指数	平均 粒子径 (nm)	多分散 指数	
実施例53	YS-120	66.4	0.11	65.5	0.11	68.0	0.10	65.0	0.14	-1.3
実施例54	YS-124	66.7	0.14	66.9	0.11	67.2	0.13	67.2	0.11	0.5
比較例3	ALN-319	74.3	0.13	94.9	0.07	106.2	0.13	111.5	0.10	37.2

[0236] <組成物の調製 (8)>

[実施例 55]

(YS-120)

「組成物の調製 (6)」と同様にして、実施例 16 のカチオン性脂質 (YS-120) を用いて組成物を調製した。

[0237] [実施例 56]

(YS-127)

カチオン性脂質として、YS-120 の代わりに、実施例 23 のカチオン性脂質 (YS-127) を用いた以外は実施例 55 と同様にして、実施例 56 の組成物を得た。

[0238] [実施例 57]

(YS-128)

カチオン性脂質として、YS-120 の代わりに、実施例 24 のカチオン性脂質 (YS-128) を用いた以外は実施例 55 と同様にして、実施例 57 の組成物を得た。

[0239] [実施例 58]

(YS-129)

カチオン性脂質として、YS-120 の代わりに、実施例 25 のカチオン性脂質 (YS-129) を用いた以外は実施例 55 と同様にして、実施例 58 の組成物を得た。

[0240] <組成物の解析 (10)>

実施例 29 の組成物と同様にして、実施例 55 ~ 58 の組成物について、脂質複合体への siRNA の封入率、及び脂質複合体の平均粒子径 (Z-平均) を測定した。表 10 に、siRNA の封入率及び脂質複合体の平均粒子径を示す。

[0241]

[表10]

組成物	カチオン性脂質	封入率(%)	平均粒子径(nm)
実施例55	YS-120	87	63
実施例56	YS-127	72	80
実施例57	YS-128	84	65
実施例58	YS-129	76	61

[0242] <組成物の調製(9)>

[実施例59]

(YS-101)

「組成物の調製(6)」と同様にして、実施例2のカチオン性脂質(YS-101)を用いて組成物を調製した。

[0243] [実施例60]

(YS-131)

カチオン性脂質として、YS-101の代わりに、実施例26のカチオン性脂質(YS-131)を用いた以外は実施例59と同様にして、実施例60の組成物を得た。

[0244] [実施例61]

(YS-132)

カチオン性脂質として、YS-101の代わりに、実施例27のカチオン性脂質(YS-132)を用いた以外は実施例59と同様にして、実施例61の組成物を得た。

[0245] [実施例62]

(YS-133)

カチオン性脂質として、YS-101の代わりに、実施例28のカチオン性脂質(YS-133)を用いた以外は実施例59と同様にして、実施例62の組成物を得た。

[0246] [実施例63]

(YS-120)

カチオン性脂質として、YS-101の代わりに、実施例16のカチオン

性脂質（YS-120）を用いた以外は実施例59と同様にして、実施例63の組成物を得た。

[0247] [比較例4]

(ALN-319)

カチオン性脂質として、YS-101の代わりに、上述したALN-319を用いた以外は実施例59と同様にして、比較例4の組成物を得た。

[0248] <組成物の解析(11)>

実施例29の組成物と同様にして、実施例59～63、及び比較例4の組成物について、脂質複合体へのsiRNAの封入率、及び脂質複合体の平均粒子径（Z-平均）を測定した。表11に、siRNAの封入率及び脂質複合体の平均粒子径を示す。

[0249] [表11]

組成物	カチオン性脂質	封入率(%)	平均粒子径(nm)
実施例59	YS-101	96	70
実施例60	YS-131	92	75
実施例61	YS-132	95	74
実施例62	YS-133	98	71
実施例63	YS-120	97	70
比較例4	ALN-319	97	76

[0250] <動物実験(1)>

実施例29～31及び参考例1の組成物を、脂質複合体に封入されたFactor VII siRNA濃度が10 μ g/mLとなるようにPBSで希釈した。各組成物を、C57/BL6マウス（5週齢、オス）に10mL/kgの投与容量で尾静脈内投与し、投与から24時間後に麻酔下で採血及び肝臓の採取を実施した。遠心により血液から血漿を分離し、血漿中のFactor VIIタンパク質濃度を市販のキット（商品名「BIOPHEN FVII」、HYPHEN BioMed社）により定量した。陰性対照として、PBSを投与した群に同様の処理を行った。

[0251] PBS投与群のFactor VIIタンパク質濃度を100%とし、組成物投与群のFactor VIIタンパク質濃度を相対値として算出した

。また、肝臓をホモジナイズし、メタノールで組成物構成脂質を抽出後、LC-MSによりカチオン性脂質を定量した。投与したカチオン性脂質の量を100%とし、肝臓に残存していたカチオン性脂質の量を相対値として算出した。結果を表12に示す。

[0252] [表12]

siRNA 投与量 (mg/kg)	組成物	カチオン性脂質	Factor VII タンパク質濃度 (相対値)	肝臓に残存していた カチオン性脂質量 (相対値)
0.1	実施例29	YS-102	55%	<1%
	実施例30	YS-101	43%	<1%
	実施例31	YS-103	11%	5%
	参考例1	YS-021	54%	56%

[0253] <動物実験(2)>

実施例32～37及び比較例1の組成物を「動物実験(1)」と同様にしてC57/BL6マウス(5週齢、オス)に投与し、投与から24時間後の血漿中のFactor VIIタンパク質濃度の相対値及び肝臓に残存していたカチオン性脂質量の相対値を算出した。結果を表13に示す。

[0254] [表13]

siRNA 投与量 (mg/kg)	組成物	カチオン性脂質	Factor VII タンパク質濃度 (相対値)	肝臓に残存していた カチオン性脂質量 (相対値)
0.1	実施例32	YS-111	78%	5%
	実施例33	YS-112	19%	1%
	実施例34	YS-113	20%	25%
	実施例35	YS-114	51%	16%
	実施例36	YS-115	32%	<1%
	実施例37	YS-116	35%	<1%
	比較例1	ALN-319	22%	<1%

[0255] <動物実験(3)>

実施例38～42の組成物を「動物実験(1)」と同様にしてC57/BL6マウス(5週齢、オス)に投与し、投与から24時間後の血漿中のFactor VIIタンパク質濃度の相対値及び肝臓に残存していたカチオン性脂質量の相対値を算出した。結果を表14に示す。

[0256]

[表14]

siRNA 投与量 (mg/kg)	組成物	カチオン性脂質	Factor VII タンパク質濃度 (相対値)	肝臓に残存していた カチオン性脂質量 (相対値)
0.1	実施例38	YS-117	93%	—
	実施例39	YS-117S	62%	—
	実施例40	YS-118	14%	10%
	実施例41	YS-118S	26%	13%
	実施例42	YS-119	5%	<1%

[0257] <動物実験(4)>

実施例43及び比較例2の組成物を、脂質複合体に封入されたFactor VII siRNA濃度が $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は $5\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにPBSで希釈した。各組成物を、C57/BL6マウス(5週齢、オス)に $10\text{mL}/\text{kg}$ の投与容量で尾静脈内投与し、投与から24時間後に麻酔下で採血及び肝臓の採取を実施した。遠心により血液から血漿を分離し、血漿中のFactor VIIタンパク質濃度を市販のキット(商品名「BIOPHEN FVII」、HYPHEN BioMed社)により定量した。陰性対照として、PBSを投与した群に同様の処理を行った。

[0258] PBS投与群のFactor VIIタンパク質濃度を100%とし、組成物投与群のFactor VIIタンパク質濃度を相対値として算出した。結果を表15及び図1に示す。実施例43の組成物は、比較例2の組成物よりもFactor VIIタンパク質の発現抑制効果が高いことが示された。

[0259] [表15]

siRNA 投与量 (mg/kg)	組成物	カチオン性脂質	Factor VII タンパク質濃度 (相対値)
0.01	実施例43	YS-119	57.5%
0.05	実施例43	YS-119	13.6%
0.01	比較例2	ALN-319	83.1%
0.05	比較例2	ALN-319	34.6%

[0260] <動物実験(5)>

実施例44及び45の組成物を、脂質複合体に封入されたFactor

V I I siRNA濃度が $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は $5\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにPBSで希釈した。各組成物を、C57／BL6マウス（5週齢、オス）に $10\text{mL}/\text{kg}$ の投与容量で尾静脈内投与し、投与から24時間後に麻酔下で採血及び肝臓の採取を実施した。遠心により血液から血漿を分離し、血漿中のFactor VIIタンパク質濃度を市販のキット（商品名「BIOPHEN FVII」、HYPHEN BioMed社）により定量した。陰性対照として、PBSを投与した群に同様の処理を行った。

[0261] PBS投与群のFactor VIIタンパク質濃度を100%とし、組成物投与群のFactor VIIタンパク質濃度を相対値として算出した。結果を表16及び図2に示す。実施例44及び45の組成物は、いずれも、Factor VIIタンパク質の高い発現抑制効果を示した。

[0262] [表16]

siRNA 投与量 (mg/kg)	組成物	カチオン性脂質	Factor VII タンパク質濃度 (相対値)
0.01	実施例44	YS-119	72%
0.05	実施例44	YS-119	16%
0.01	実施例45	YS-120	62%
0.05	実施例45	YS-120	27%

[0263] <動物実験（6）>

実施例46～52の組成物を「動物実験（5）」と同様にしてC57／BL6マウス（5週齢、オス）に投与し、投与から24時間後の血漿中のFactor VIIタンパク質濃度の相対値を算出した。結果を表17に示す。

[0264]

[表17]

siRNA 投与量 (mg/kg)	組成物	カチオン性脂質	Factor VII タンパク質濃度 (相対値)
0.01	実施例46	YS-120	70%
	実施例47	YS-121	78%
	実施例48	YS-122	66%
	実施例49	YS-123	72%
	実施例50	YS-124	62%
	実施例51	YS-125	73%
	実施例52	YS-126	78%
0.05	実施例46	YS-120	38%
	実施例47	YS-121	43%
	実施例48	YS-122	35%
	実施例49	YS-123	59%
	実施例50	YS-124	33%
	実施例51	YS-125	46%
	実施例52	YS-126	39%

[0265] <動物実験(7)>

実施例53、54、及び比較例3の組成物を、脂質複合体に封入された Factor VII siRNA濃度が $2\mu\text{g/mL}$ 又は $10\mu\text{g/mL}$ となるようにPBSで希釈した。各組成物を、ICRマウス(6週齢、メス)に 10mL/kg の投与容量で尾静脈内投与し、投与から24時間後に麻酔下で採血及び肝臓の採取を実施した。遠心により血液から血漿を分離し、血漿中のFactor VIIタンパク質濃度を市販のキット(商品名「BIOPHEN FVII」、HYPHEN BioMed社)により定量した。陰性対照として、PBSを投与した群に同様の処理を行った。

[0266] PBS投与群のFactor VIIタンパク質濃度を100%とし、組成物投与群のFactor VIIタンパク質濃度を相対値として算出した。結果を表18に示す。実施例53及び54の組成物は、比較例3の組成物に比べて、Factor VIIタンパク質の高い発現抑制効果を示した。

[0267]

[表18]

siRNA 投与量 (mg/kg)	組成物	カチオン性脂質	Factor VII タンパク質濃度 (相対値)
0.02	実施例53	YS-120	53%
	実施例54	YS-124	51%
	比較例3	ALN-319	82%
0.1	実施例53	YS-120	17%
	実施例54	YS-124	15%
	比較例3	ALN-319	37%

[0268] <動物実験(8)>

実施例55～58の組成物を「動物実験(7)」と同様にしてICRマウス(6週齢、メス)に投与し、投与から24時間後の血漿中のFactor VIIタンパク質濃度の相対値を算出した。結果を表19に示す。

[0269] [表19]

siRNA 投与量 (mg/kg)	組成物	カチオン性脂質	Factor VII タンパク質濃度 (相対値)
0.02	実施例56	YS-127	78%
	実施例57	YS-128	52%
	実施例58	YS-129	65%
	実施例55	YS-120	59%
0.1	実施例56	YS-127	63%
	実施例57	YS-128	20%
	実施例58	YS-129	35%
	実施例55	YS-120	18%

[0270] <動物実験(9)>

実施例59～63、及び比較例4の組成物を「動物実験(7)」と同様にしてICRマウス(5週齢、メス)に投与し、投与から24時間後の血漿中のFactor VIIタンパク質濃度の相対値を算出した。結果を表20に示す。

[0271]

[表20]

siRNA 投与量 (mg/kg)	組成物	カチオン性脂質	Factor VII タンパク質濃度 (相対値)
0.01	実施例59	YS-101	71%
0.02	実施例60	YS-131	102%
	実施例61	YS-132	78%
	実施例62	YS-133	33%
	実施例63	YS-120	38%
	比較例4	ALN-319	57%
0.03	実施例59	YS-101	24%
0.1	実施例59	YS-101	11%
	実施例60	YS-131	72%
	実施例61	YS-132	18%
	実施例62	YS-133	8%
	実施例63	YS-120	7%
	比較例4	ALN-319	14%

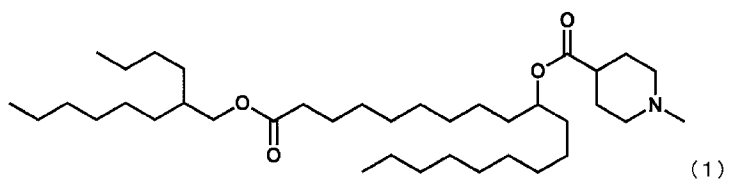
産業上の利用可能性

[0272] 本発明によれば、核酸を細胞質に効率よく放出することが可能なカチオン性脂質を提供することができる。

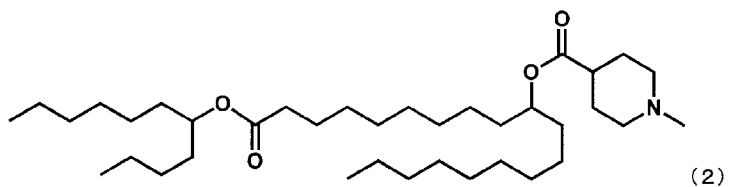
請求の範囲

[請求項1] 下記式（１）～（１１）で表される化合物からなる群より選択される化合物又はその薬学的に許容される塩。

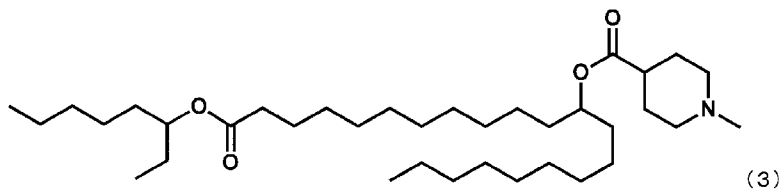
[化1]



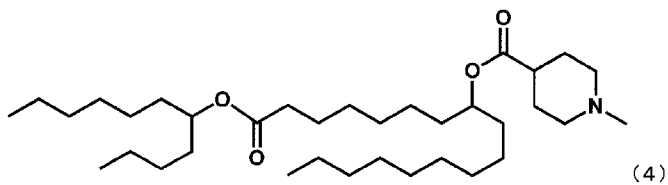
[化2]



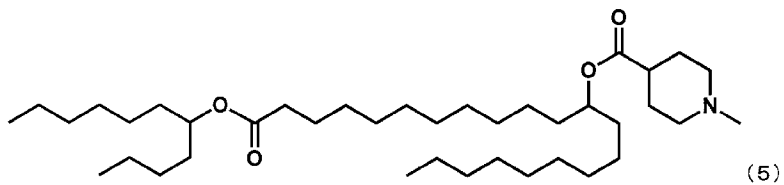
[化3]



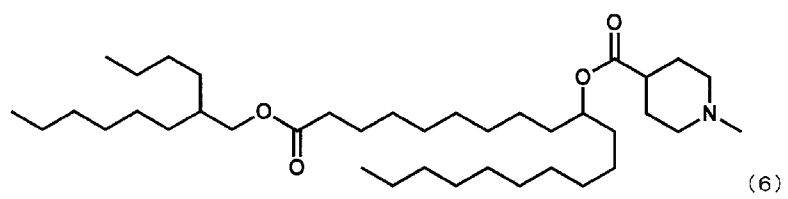
[化4]



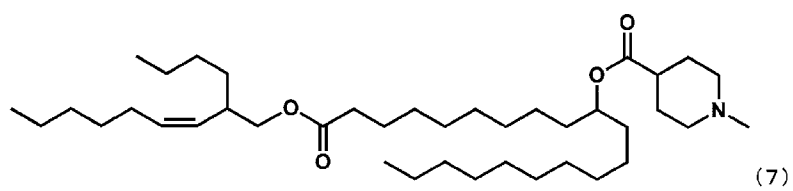
[化5]



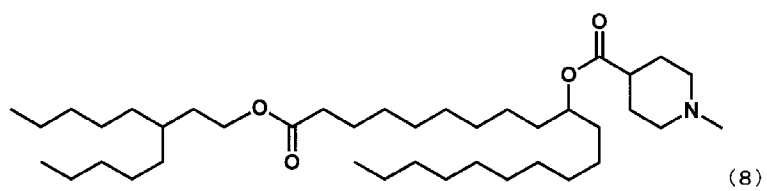
[化6]



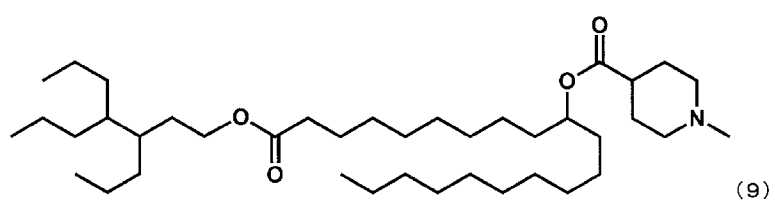
[化7]



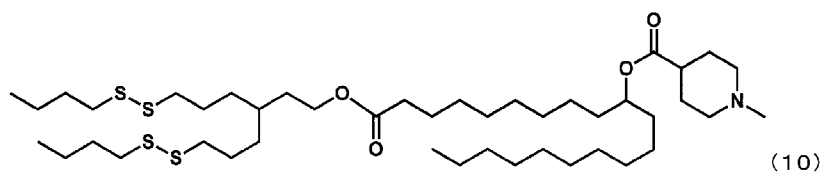
[化8]



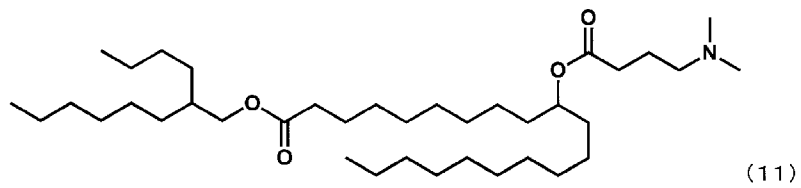
[化9]



[化10]

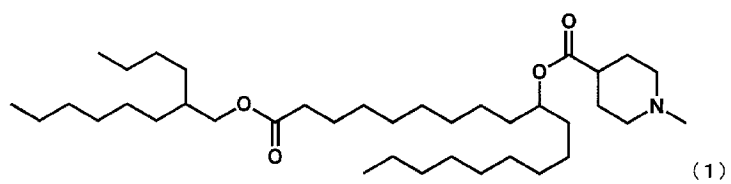


[化11]

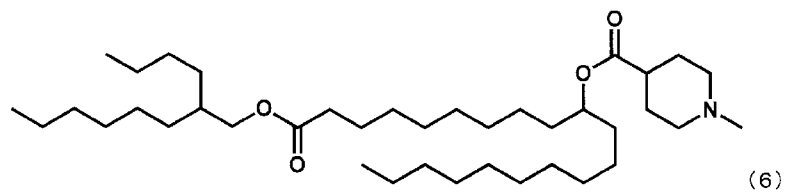


[請求項2] 下記式（１）及び（６）～（９）で表される化合物からなる群より選択される、請求項１に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩。

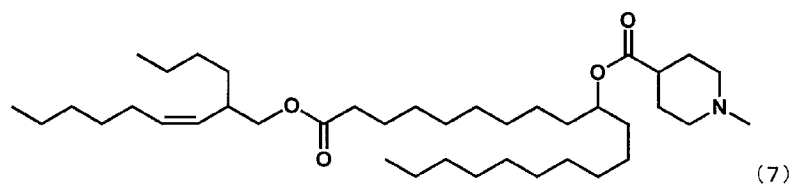
[化12]



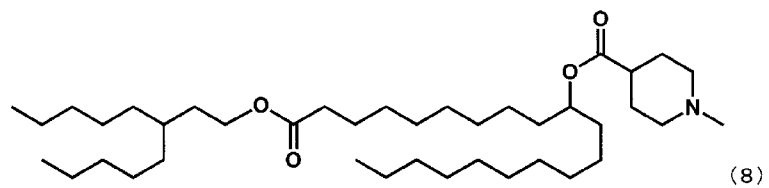
[化13]



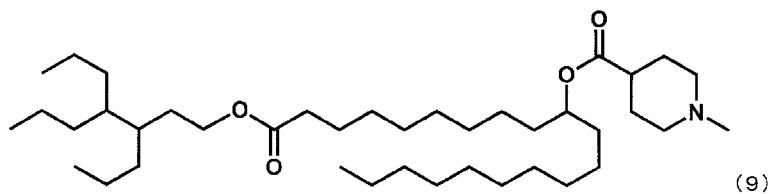
[化14]



[化15]



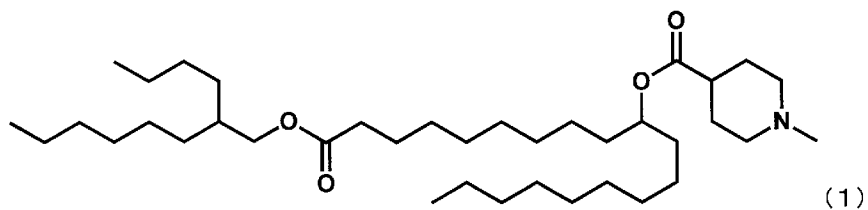
[化16]



[請求項3]

下記式（１）で表される、請求項１又は２に記載の化合物又はその薬剤学的に許容される塩。

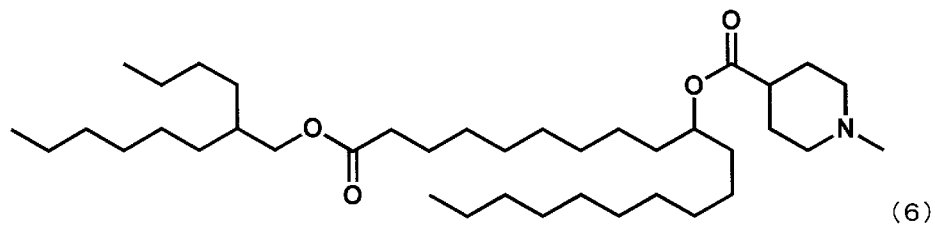
[化17]



[請求項4]

下記式（６）で表される、請求項１又は２に記載の化合物又はその薬剤学的に許容される塩。

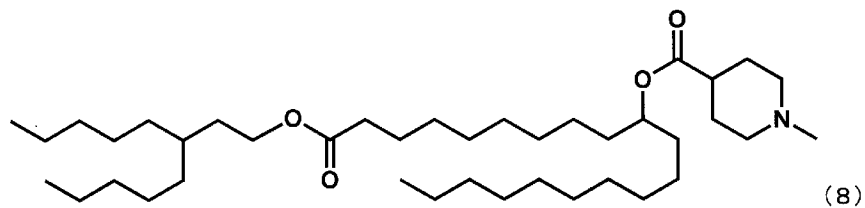
[化18]



[請求項5]

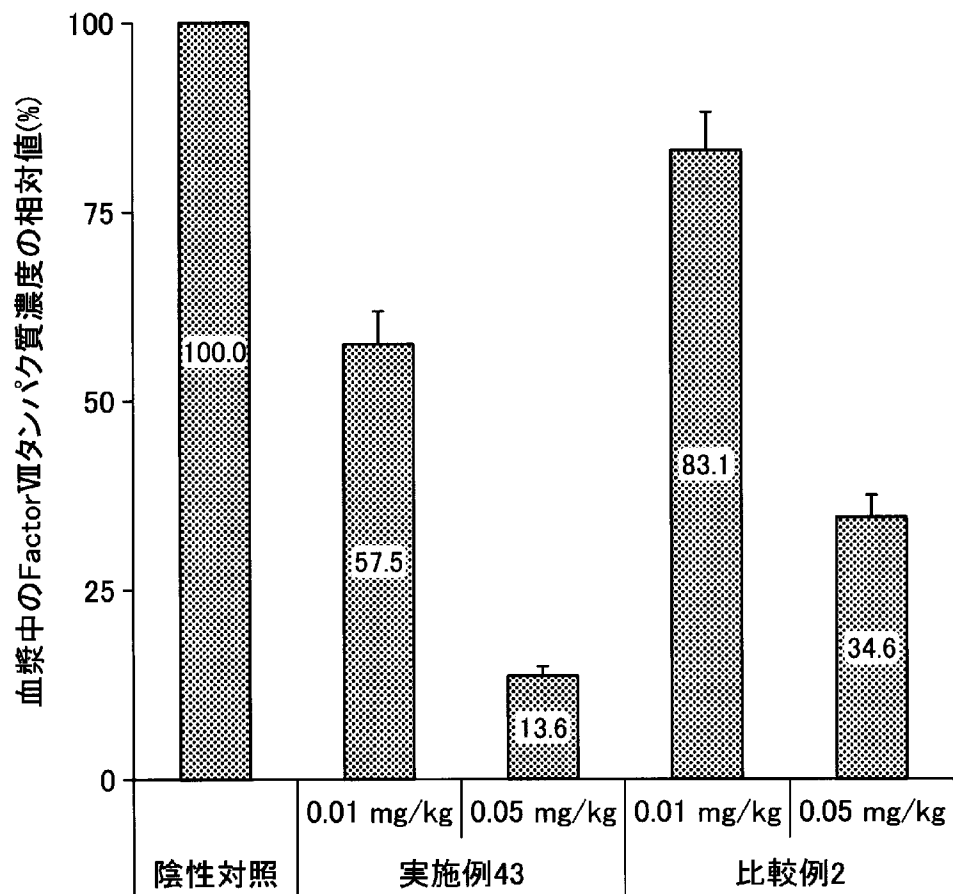
下記式（８）で表される、請求項１又は２に記載の化合物又はその薬剤学的に許容される塩。

[化19]

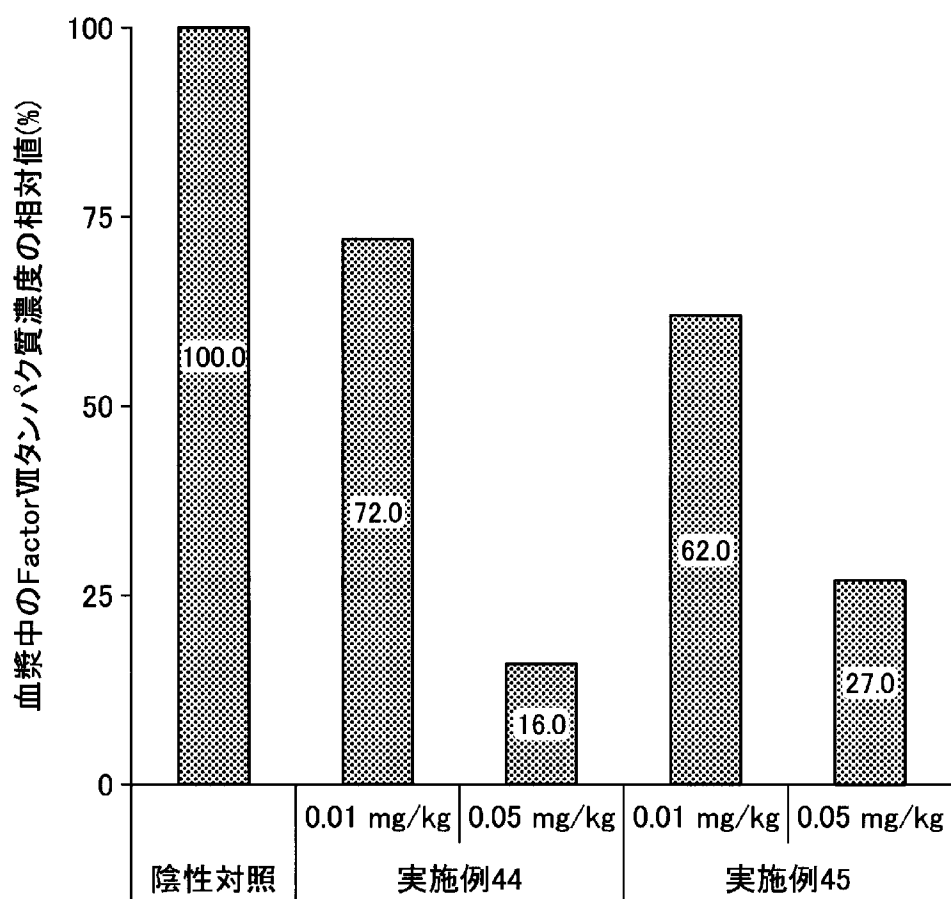


- [請求項6] (I) 請求項1～5のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩と、(II) 中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及びステロールからなる群から選ばれる少なくとも一種の脂質と、を含有する脂質複合体。
- [請求項7] (I) 請求項1～5のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩と、(II) 中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及びステロールからなる群から選ばれる少なくとも一種の脂質と、(III) 核酸と、を含有する組成物。
- [請求項8] (I) 請求項1～5のいずれか一項に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩と、(II) 中性脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及びステロールからなる群から選ばれる少なくとも一種の脂質とを含有する極性有機溶媒含有水溶液と、(III) 核酸を含有する水溶液とを混合して混合液を得る工程と、混合液中の極性有機溶媒の含有量を減少させる工程と、を含む組成物の製造方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/085969

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07C229/06(2006.01)i, C07D211/62(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n,
C12N15/113(2010.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07C229/06, C07D211/62, C12N15/09, C12N15/113

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2013-533224 A (Alnylam Pharmaceuticals, Inc.), 22 August 2013 (22.08.2013), claims; table 12; paragraphs [0177] to [0191] & US 2012/0027803 A1 & US 2016/0009637 A1 & WO 2011/153493 A2 claims; table 12; page 107, line 5 to page 112, line 26	1, 6-8 2-5
X A	WO 2013/158579 A1 (MERCK SHARP & DOHME CORP.), 24 October 2013 (24.10.2013), claims; compound 1; page 27, LNP process description & JP 2015-520733 A & US 2015/0133519 A1	1, 6-8 2-5

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 March 2016 (01.03.16)

Date of mailing of the international search report
15 March 2016 (15.03.16)

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/085969

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 2015/105131 A1 (Eisai R & D Management Co., Ltd.), 16 July 2015 (16.07.2015), & TW 201532614 A	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07C229/06(2006.01)i, C07D211/62(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12N15/113(2010.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07C229/06, C07D211/62, C12N15/09, C12N15/113

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

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

CAplus/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	JP 2013-533224 A (アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド) 2013.08.22, 特許請求の範囲、表12、【0177】 - 【0191】 & US 2012/0027803 A1 & US 2016/0009637 A1 & WO 2011/153493 A2, Claims, Table12, p.107 1.5 - p.112 1.26	1,6-8 2-5
X A	WO 2013/158579 A1 (MERCK SHARP & DOHME CORP.) 2013.10.24, Claims, Compound 1, p.27 LNP process description & JP 2015-520733 A & US 2015/0133519 A1	1,6-8 2-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.03.2016

国際調査報告の発送日

15.03.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

井上 千弥子

4H

9356

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P A	WO 2015/105131 A1 (エーザイ・アール・アンド・デュー・マネジメ ント株式会社) 2015.07.16, & TW 201532614 A	1-8