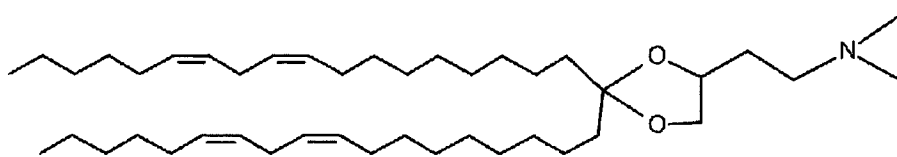




(式中， R^4 及 R^5 為氫原子等， n^3 為 2~6 之整數)、或式(B)



特徵化學式：



發明摘要

※ 申請案號：104121198

※ 申請日：104.6.30.

※IPC 分類：

C07D227/00(2006.01)
A61K9/127(2006.01)
C12N15/113(2010.01)
A61K31/713(2006.01)
A61K47/22(2006.01)
A61K48/00(2006.01)
A61P1/16(2006.01)
A61P11/00(2006.01)
A61P13/12(2006.01)
A61P43/00(2006.01)

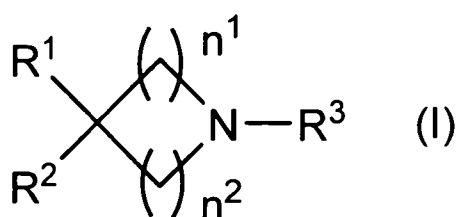
【發明名稱】

陽離子性脂質

CATIONIC LIPID

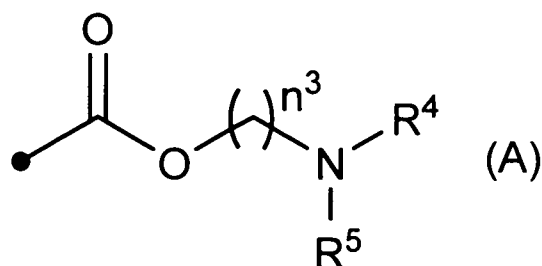
【中文】

● 本發明提供一種下述式(I)所表示之陽離子性脂質、以及含有該陽離子性脂質及核酸之組合物等，

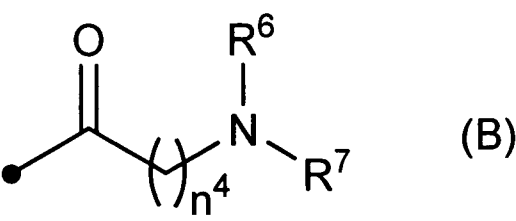


[式中， R^1 及 R^2 為碳數8~24之烷基等， R^3 為氫原子、碳數1~3之

● 烷基、式(A)



(式中， R^4 及 R^5 為氫原子等， n^3 為2~6之整數)、或式(B)



(式中， R^6 及 R^7 為氫原子等， n^4 為1～6之整數)，
 n^1 為0～4之整數， n^2 為1～4之整數(其中， n^1 為0且 n^2 為1之情形除外)]。

【英文】

無

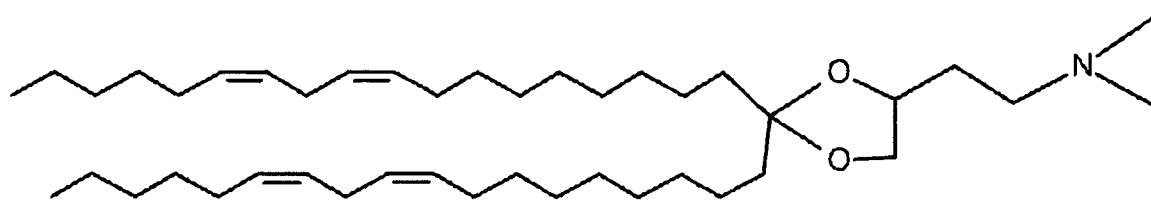
【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

陽離子性脂質

CATIONIC LIPID

【技術領域】

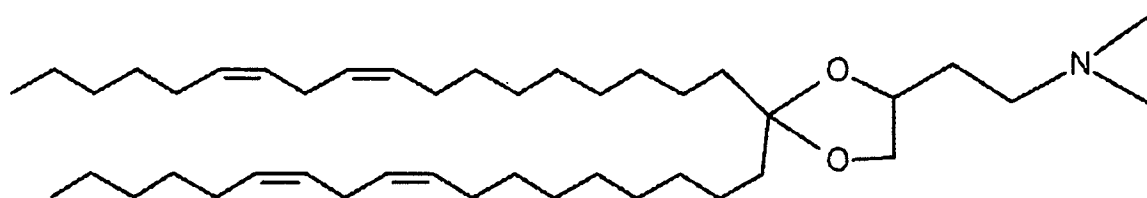
本發明係關於一種容易將核酸導入至例如細胞內等之陽離子性脂質、含有該陽離子性脂質之組合物等。

【先前技術】

陽離子性脂質係具有包含一個或複數個烴基之脂質親和性區域及包含至少一個帶正電之極性頂部基團之親水性區域的兩親媒性分子。陽離子性脂質及核酸等巨大分子形成總荷電帶正電之複合體，藉此核酸等巨大分子容易通過細胞之原生質膜而進入細胞質內，故而陽離子性脂質有用。可於體外及體內進行之該製程已知為轉染。

專利文獻1～5揭示有於體內將核酸傳遞至細胞內時、及用於適合於疾病治療之核酸-脂質粒子組合物時有用之陽離子性脂質及包含該脂質之脂質粒子。專利文獻1中，例如揭示有

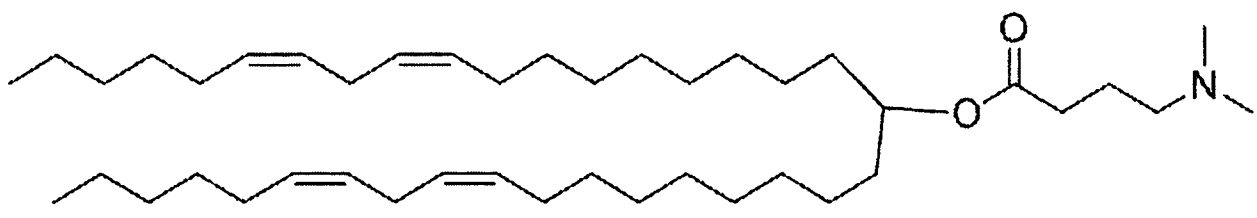
[化1]



2,2-二亞油烯基-4-(2-二甲胺基乙基)-[1,3]-二氧雜環戊烷(2,2-dilinoleyl-4-(2-dimethylaminoethyl)-[1,3]-dioxolane; DLin-KC2-DMA)

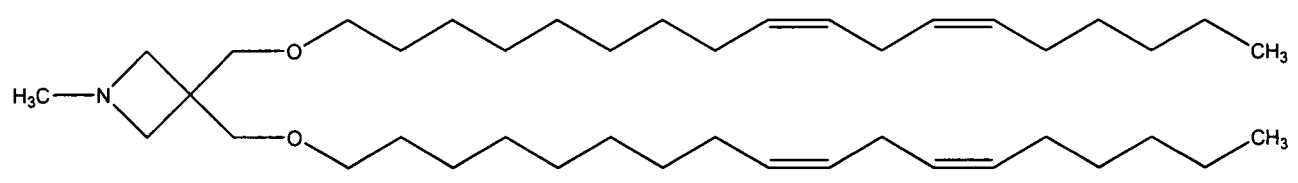
等，專利文獻2中例如揭示有

[化2]



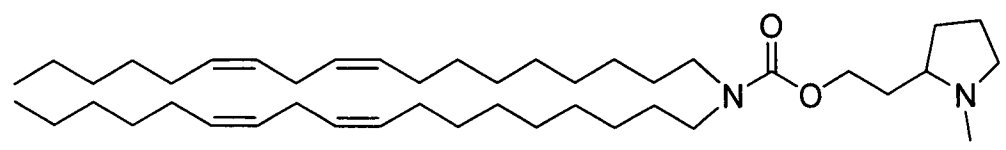
4-(二甲胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基 酯 ((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino)butanoate；DLin-MC3-DMA)等，專利文獻3中例如揭示有

[化3]



1-甲基-3,3-雙{[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]甲基}吡丁啉(1-methyl-3,3-bis{[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-diene-1-yloxy]methyl}azetidine)等，專利文獻4中例如揭示有

[化4]



二[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基]胺基甲酸2-(1-甲基吡咯啉-2-基)乙酯 (2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethyl di[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienyl]carbamate)

等陽離子性脂質。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[專利文獻1]

國際公開第2010/042877號

[專利文獻2]

國際公開第2010/054401號

[專利文獻3]

國際公開第2012/108397號

[專利文獻4]

國際公開第2014/007398號

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

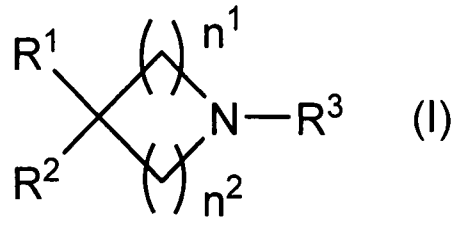
本發明之目的在於提供一種容易將核酸導入至例如細胞內等之陽離子性脂質、含有該陽離子性脂質之組合物等。

[解決問題之手段]

本發明係關於以下之(1)~(35)。

(1)一種陽離子性脂質，其以下述式(I)表示，

[化5]

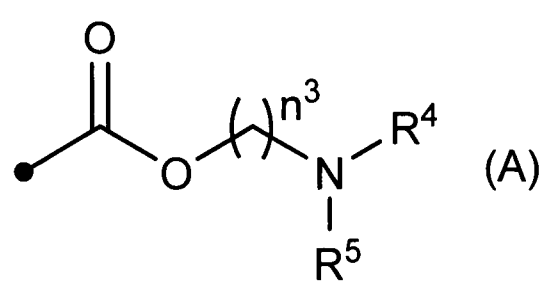


[式中，R¹及R²相同或不同，為碳數8~24之直鏈狀或支鏈狀之烷

基、烯基或炔基、或者C7-C20烷氧基C1-C3烷基或C7-C20炔氧基C1-C3烷基，

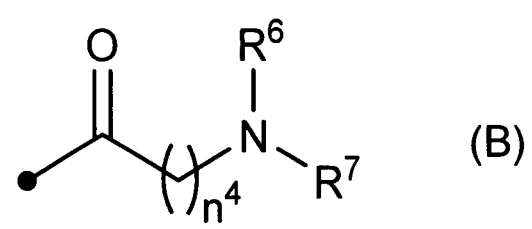
R^3 為氫原子、碳數1~3之烷基、式(A)

[化6]



(式中， R^4 及 R^5 相同或不同，為氫原子或碳數1~3之烷基，或者亦可與 R^4 及 R^5 所鍵結之氮原子一併形成碳數2~6之含氮雜環， n^3 為2~6之整數)、或式(B)

[化7]



(式中， R^6 及 R^7 相同或不同，為氫原子或碳數1~3之烷基，或者亦可與 R^6 及 R^7 所鍵結之氮原子一併形成碳數2~6之含氮雜環， n^4 為1~6之整數)，

n^1 為0~4之整數， n^2 為1~4之整數(其中， n^1 為0且 n^2 為1之情形除外)]。

(2)如上述(1)之陽離子性脂質，其中 R^1 及 R^2 相同或不同，選自由十四烷基、十六烷基、(Z)-十四碳-9-烯基、(Z)-十六碳-9-烯基、(Z)-

十八碳-6-烯基、(Z)-十八碳-9-烯基、(E)-十八碳-9-烯基、(Z)-十八碳-11-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基、(9Z,12Z,15Z)-十八碳-9,12,15-三烯基、(Z)-二十碳-11-烯基、(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基及(Z)-二十二碳-13-烯基所組成之群中。

(3)如上述(1)之陽離子性脂質，其中 R^1 及 R^2 相同或不同，選自由(Z)-十六碳-9-烯基、(Z)-十八碳-9-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基及(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基所組成之群中。

(4)如上述(1)至(3)中任一者之陽離子性脂質，其中 R^3 為碳數1~3之烷基或式(A)。

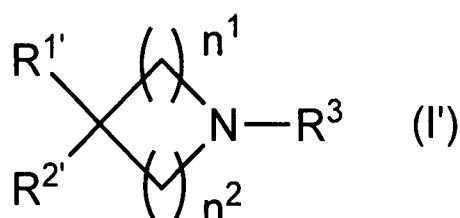
(5)如上述(1)至(4)中任一者之陽離子性脂質，其中 R^1 及 R^2 相同。

(6)如上述(1)至(5)中任一者之陽離子性脂質，其中 n^1 為1， n^2 為1~3之整數。

(7)如上述(1)至(5)中任一者之陽離子性脂質，其中 n^1 及 n^2 均為1。

(8)一種陽離子性脂質，其以下述式(I')表示，

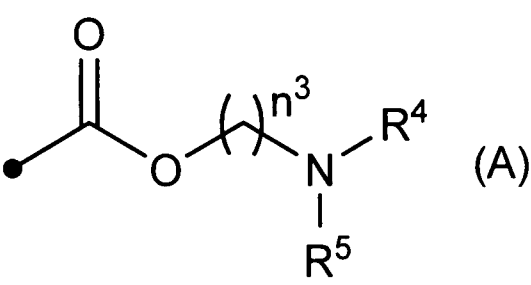
[化8]



[式中， $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 相同或不同，為碳數8~24之直鏈狀或支鏈狀之烷基、烯基或炔基、或者C7-C20烷氧基C1-C3烷基、C7-C20烯氧基C1-C3烷基或C7-C20炔氧基C1-C3烷基，

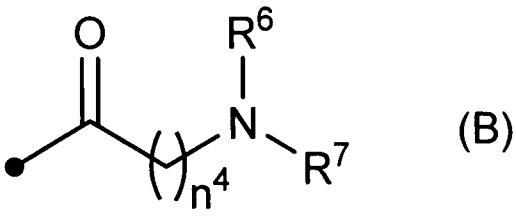
R^3 為氫原子、碳數1~3之烷基、式(A)

[化9]



(式中， R^4 及 R^5 相同或不同，為氫原子或碳數1～3之烷基，或者亦可與 R^4 及 R^5 所鍵結之氮原子一併形成碳數2～6之含氮雜環， n^3 為2～6之整數)、或式(B)

[化10]



(式中， R^6 及 R^7 相同或不同，為氫原子或碳數1～3之烷基，或者亦可與 R^6 及 R^7 所鍵結之氮原子一併形成碳數2～6之含氮雜環， n^4 為1～6之整數)，

n^1 為0～4之整數， n^2 為1～4之整數(其中， n^1 為0且 n^2 為1之情形除外)]。

(9)如上述(8)之陽離子性脂質，其中 $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 相同或不同，選自由十四烷基、十六烷基、(Z)-十四碳-9-烯基、(Z)-十六碳-9-烯基、(Z)-十八碳-6-烯基、(Z)-十八碳-9-烯基、(E)-十八碳-9-烯基、(Z)-十八碳-11-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基、(9Z,12Z,15Z)-十八碳-9,12,15-三烯基、(Z)-二十碳-11-烯基、(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基及(Z)-二十二碳-13-烯基所組成之群中。

(10)如上述(8)之陽離子性脂質，其中 $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 相同或不同，選自由(Z)-十六碳-9-烯基、(Z)-十八碳-9-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基及(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基所組成之群中。

(11)如上述(8)至(10)中任一者之陽離子性脂質，其中 R^3 為碳數1~3之烷基或式(A)。

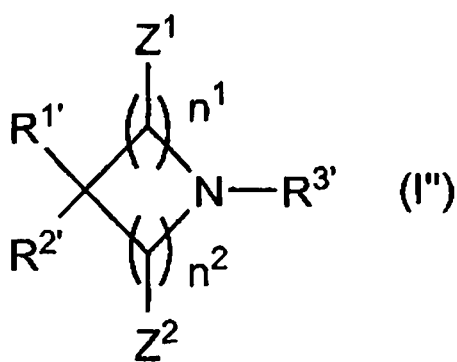
(12)如上述(8)至(11)中任一者之陽離子性脂質，其中 $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 相同。

(13)如上述(8)至(12)中任一者之陽離子性脂質，其中 n^1 為1， n^2 為1~3之整數。

(14)如上述(8)至(12)中任一者之陽離子性脂質，其中 n^1 及 n^2 均為1。

(15)一種陽離子性脂質，其以下述式(I'')表示，

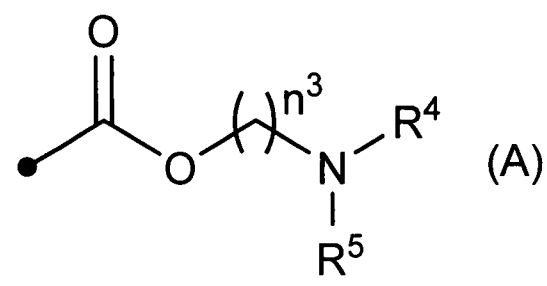
[化11]



[式中， $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 相同或不同，為碳數8~24之直鏈狀或支鏈狀之烷基、烯基或炔基、或者C7-C20烷氧基C1-C3烷基、C7-C20烯氧基C1-C3烷基或C7-C20炔氧基C1-C3烷基，

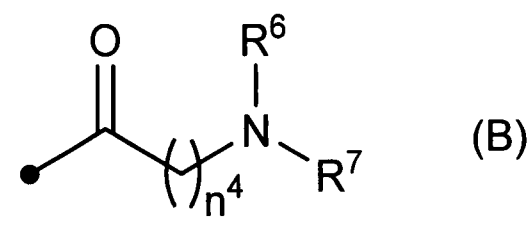
R^3 為氫原子、碳數1~3之烷基、羥基C2-C4烷基、C1-C3二烷基胺基C2-C4烷基、式(A)

[化12]



(式中， R^4 及 R^5 相同或不同，為氫原子或碳數1~3之烷基，或者亦可與 R^4 及 R^5 所鍵結之氮原子一併形成碳數2~6之含氮雜環， n^3 為2~6之整數)、或式(B)

[化13]



(式中， R^6 及 R^7 相同或不同，為氫原子或碳數1~3之烷基，或者亦可與 R^6 及 R^7 所鍵結之氮原子一併形成碳數2~6之含氮雜環， n^4 為1~6之整數)，

n^1 為0~4之整數， n^2 為1~4之整數，(其中， n^1 為0且 n^2 為1之情形除外)、

Z^1 於每個所鍵結之各碳上係分別獨立為氫原子或碳數1~3之烷基，

Z^2 於每個所鍵結之各碳上係分別獨立為氫原子或碳數1~3之烷基]。

(16)如上述(15)之陽離子性脂質，其中 $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 相同或不同，選自由十四烷基、十六烷基、(Z)-十四碳-9-烯基、(Z)-十六碳-9-烯基、

(Z)-十八碳-6-烯基、(Z)-十八碳-9-烯基、(E)-十八碳-9-烯基、(Z)-十八碳-11-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基、(9Z,12Z,15Z)-十八碳-9,12,15-三烯基、(Z)-二十碳-11-烯基、(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基及(Z)-二十二碳-13-烯基所組成之群中。

(17)如上述(15)之陽離子性脂質，其中 $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 相同或不同，選自由(Z)-十六碳-9-烯基、(Z)-十八碳-9-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基及(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基所組成之群中。

(18)如上述(15)至(17)中任一者之陽離子性脂質，其中 $R^{3'}$ 為碳數1~3之烷基或式(A)。

(19)如上述(15)至(18)中任一者之陽離子性脂質，其中 $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 相同。

(20)如上述(15)至(19)中任一者之陽離子性脂質，其中 n^1 為1， n^2 為1~3之整數。

(21)如上述(15)至(19)中任一者之陽離子性脂質，其中 n^1 及 n^2 均為1。

(22)一種組合物，其含有如上述(1)至(21)中任一者之陽離子性脂質及核酸。

(23)如上述(22)之組合物，其中該陽離子性脂質與該核酸形成複合體，或者於該陽離子性脂質中組合有中性脂質及/或高分子者與該核酸形成複合體。

(24)如上述(22)之組合物，其中該陽離子性脂質與該核酸形成複合體，或者於該陽離子性脂質中組合有中性脂質及/或高分子者與該核酸形成複合體，且含有封入該複合體之脂質膜。

(25)如上述(22)至(24)中任一項之組合物，其中核酸為具有利用RNA干涉(RNAi)之標的基因之表現抑制作用的核酸。

(26)如上述(25)之組合物，其中標的基因為於肝臟、肺、腎臟或

脾臟中表現之基因。

(27)一種方法，其係使用如上述(22)至(26)中任一項之組合物將該核酸導入至細胞內。

(28)如上述(27)之方法，其中細胞為存在於哺乳動物之肝臟、肺、腎臟或脾臟中之細胞。

(29)如上述(27)或(28)之方法，其中導入至細胞內之方法為藉由該組合物之靜脈內投予而導入至細胞內之方法。

(30)一種肝臟、肺、腎臟或脾臟相關之疾病之治療方法，其包括將如上述(26)之組合物投予至哺乳動物之步驟。

(31)如上述(30)之方法，其中投予之方法為靜脈內投予。

(32)一種用於疾病治療之醫藥，其包含如上述(25)之組合物。

(33)如上述(32)之醫藥，其係靜脈內投予用。

(34)一種肝臟、肺、腎臟或脾臟相關之疾病之治療劑，其包含如上述(26)之組合物。

(35)如上述(34)之肝臟、肺、腎臟或脾臟相關之疾病之治療劑，其係靜脈內投予用。

[發明之效果]

藉由將含有本發明之陽離子性脂質及核酸之組合物投予至哺乳動物等，可將該核酸容易地導入至例如細胞內等。

【圖式簡單說明】

圖1表示將實施例21及22中所獲得之製劑(使用化合物1、2、4~7各者之製劑)分別以siRNA 0.03 mg/kg相當量投予至小鼠後48小時後之血漿中的因子VII蛋白質濃度。縱軸表示將生理食鹽水投予群設為100之情形時之血漿中的因子VII蛋白質濃度之相對值。橫軸表示化合物編號。

圖2表示將實施例22中所獲得之製劑(使用化合物2、4各者之製

劑)分別以siRNA 0.3 mg/kg相當量投予至小鼠後48小時後之血漿中的因子VII蛋白質濃度。縱軸表示將生理食鹽水投予群設為100之情形時之血漿中的因子VII蛋白質濃度之相對值。橫軸表示化合物編號。

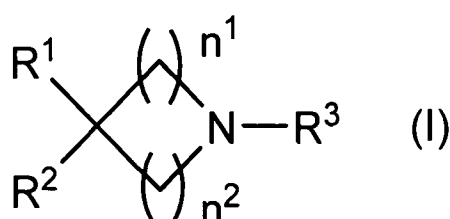
圖3表示將實施例23中所獲得之製劑(使用化合物1之製劑)及比較例1中所獲得之製劑(使用化合物A之製劑)分別以siRNA 0.3 mg/kg及0.03 mg/kg相當量投予至小鼠後48小時後之血漿中的因子VII蛋白質濃度。縱軸表示將生理食鹽水投予群設為100之情形時之血漿中的因子VII蛋白質濃度之相對值。橫軸表示化合物編號。

【實施方式】

本發明之陽離子性脂質為

式(I)

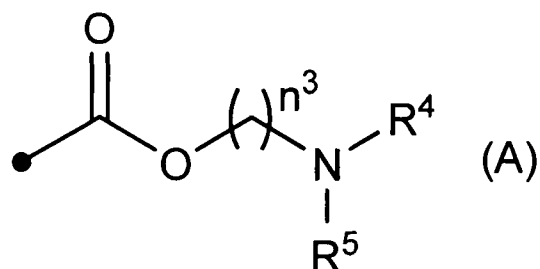
[化14]



(式中， R^1 及 R^2 相同或不同，為碳數8~24之直鏈狀或支鏈狀之烷基、烯基或炔基、或者C7-C20烷氧基C1-C3烷基或C7-C20炔氧基C1-C3烷基，

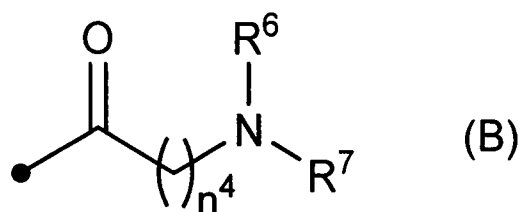
R^3 為氫原子、碳數1~3之烷基、式(A)

[化15]



(式中， R^4 及 R^5 相同或不同，為氫原子、碳數1~3之烷基、或亦可與 R^4 及 R^5 所鍵結之氮原子一併形成碳數2~6之含氮雜環， n^3 為2~6之整數)、或式(B)

[化16]

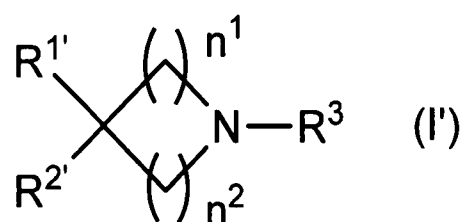


(式中， R^6 及 R^7 相同或不同，為氫原子、碳數1~3之烷基、或亦可與 R^6 及 R^7 所鍵結之氮原子一併形成碳數2~6之含氮雜環， n^4 為1~6之整數)，

n^1 為0~4之整數， n^2 為1~4之整數(其中， n^1 為0且 n^2 為1之情形除外))所表示之陽離子性脂質；或者為

式(I')

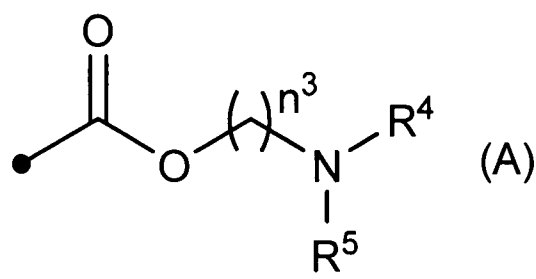
[化17]



[式中， $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 相同或不同，為碳數8～24之直鏈狀或支鏈狀之烷基、烯基或炔基、或者C7-C20烷氧基C1-C3烷基、C7-C20烯氧基C1-C3烷基或C7-C20炔氧基C1-C3烷基，

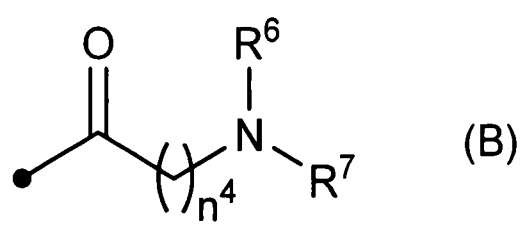
R^3 為氫原子、碳數1～3之烷基、式(A)

[化18]



(式中， R^4 及 R^5 相同或不同，為氫原子或碳數1～3之烷基，或者亦可與 R^4 及 R^5 所鍵結之氮原子一併形成碳數2～6之含氮雜環， n^3 為2～6之整數)、或式(B)

[化19]

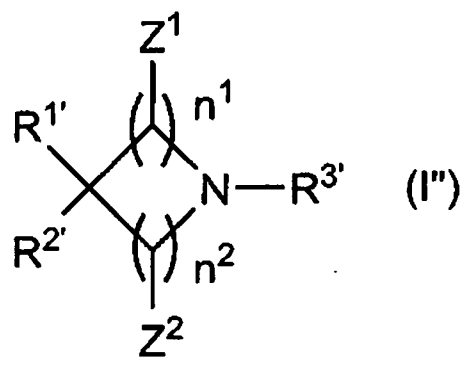


(式中， R^6 及 R^7 相同或不同，為氫原子或碳數1～3之烷基，或者亦可與 R^6 及 R^7 所鍵結之氮原子一併形成碳數2～6之含氮雜環， n^4 為1～6之整數)，

n^1 為0～4之整數， n^2 為1～4之整數(其中， n^1 為0且 n^2 為1之情形除外)]所表示之陽離子性脂質；或者為

式(I'')

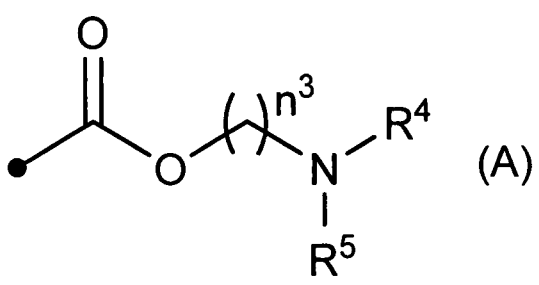
[化20]



[式中，R^{1'}及R^{2'}相同或不同，為碳數8～24之直鏈狀或支鏈狀之烷基、烯基或炔基、或者C7-C20烷氧基C1-C3烷基、C7-C20烯氧基C1-C3烷基或C7-C20炔氧基C1-C3烷基，

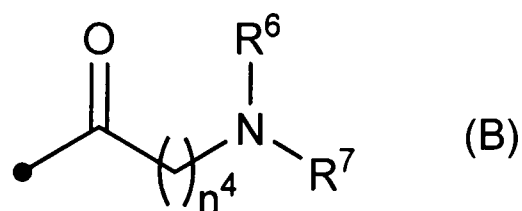
R^{3'}為氫原子、碳數1～3之烷基、羥基C2-C4烷基、C1-C3二烷基胺基C2-C4烷基、式(A)

[化21]



(式中，R⁴及R⁵相同或不同，為氫原子或碳數1～3之烷基，或者亦可與R⁴及R⁵所鍵結之氮原子一併形成碳數2～6之含氮雜環，n³為2～6之整數)、或式(B)

[化22]



(式中， R^6 及 R^7 相同或不同，為氫原子或碳數1~3之烷基，或者亦可與 R^6 及 R^7 所鍵結之氮原子一併形成碳數2~6之含氮雜環， n^4 為1~6之整數)，

n^1 為0~4之整數， n^2 為1~4之整數，(其中， n^1 為0且 n^2 為1之情形除外)、

Z^1 於每個所鍵結之各碳上係分別獨立為氫原子或碳數1~3之烷基，

Z^2 於每個所鍵結之各碳上係分別獨立為氫原子或碳數1~3之烷基]所表示之陽離子性脂質。

以下，將式(I)所表示之化合物亦稱為化合物(I)，將式(I')所表示之化合物亦稱為化合物(I')，將式(I'')所表示之化合物亦稱為化合物(I'')。其他式編號之化合物亦同樣。

作為碳數8~24之直鏈狀或支鏈狀之烷基，例如可列舉：辛基、癸基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、2,6,10-三甲基十一烷基、十五烷基、3,7,11-三甲基十二烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、6,10,14-三甲基十五烷-2-基、十九烷基、2,6,10,14-四甲基十五烷基、二十烷基、3,7,11,15-四甲基十六烷基、二十一烷基、二十二烷基、二十三烷基、二十四烷基等，較佳為可列舉：癸基、十二烷基、十四烷基、十六烷基、十八烷基、二十烷基等，更佳為可列舉十四烷基、十六烷基。

作為碳數8~24之直鏈狀或支鏈狀之烯基，只要為包含1個以上之雙鍵之碳數8~24之直鏈狀或支鏈狀之烯基即可，例如可列舉：(Z)-十四碳-9-烯基、(Z)-十六碳-9-烯基、(Z)-十八碳-6-烯基、(Z)-十

八碳-9-烯基、(E)-十八碳-9-烯基、(Z)-十八碳-11-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基、(9Z,12Z,15Z)-十八碳-9,12,15-三烯基、(Z)-二十碳-11-烯基、(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基、3,7,11-三甲基十二碳-2,6,10-三烯基、3,7,11,15-四甲基十六碳-2-烯基、(Z)-二十二碳-13-烯基等，較佳為可列舉：(Z)-十四碳-9-烯基、(Z)-十六碳-9-烯基、(Z)-十八碳-6-烯基、(Z)-十八碳-9-烯基、(E)-十八碳-9-烯基、(Z)-十八碳-11-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基、(9Z,12Z,15Z)-十八碳-9,12,15-三烯基、(Z)-二十碳-11-烯基、(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基、(Z)-二十二碳-13-烯基等。

作為碳數8~24之直鏈狀或支鏈狀之炔基，只要為包含1個以上之三重鍵之碳數8~24之直鏈狀或支鏈狀之炔基即可，例如可列舉：十二碳-11-炔基、十四碳-6-炔基、十六碳-7-炔基、十六碳-5,7-二炔基、十八碳-9-炔基等。

作為C7-C20烷氧基C1-C3烷基中之C7-C20烷基部分，例如可列舉：庚基、辛基、癸基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、2,6,10-三甲基十一烷基、十五烷基、3,7,11-三甲基十二烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、6,10,14-三甲基十五烷-2-基、十九烷基、2,6,10,14-四甲基十五烷基、二十烷基、3,7,11,15-四甲基十六烷基等，作為C1-C3烷基部分，可列舉：與甲基、乙基、丙基等對應之伸烷基。

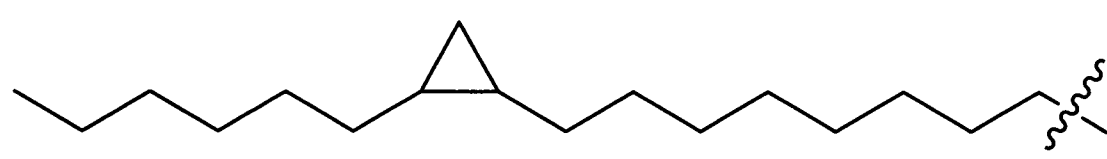
作為C7-C20烯氧基C1-C3烷基中之C7-C20烯基部分，例如可列舉：(Z)-十四碳-9-烯基、(Z)-十六碳-9-烯基、(Z)-十八碳-6-烯基、(Z)-十八碳-9-烯基、(E)-十八碳-9-烯基、(Z)-十八碳-11-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基、(9Z,12Z,15Z)-十八碳-9,12,15-三烯基、(Z)-二十碳-11-烯基、(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基、3,7,11-三甲基十二碳-2,6,10-三烯基、3,7,11,15-四甲基十六碳-2-烯基等，較佳為可列舉：(Z)-十六碳-9-烯基、(Z)-十八碳-6-烯基、(Z)-十八碳-9-烯

基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基、(Z)-二十碳-11-烯基、(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基等，作為C1-C3烷基部分，可列舉：與甲基、乙基、丙基等對應之伸烷基。

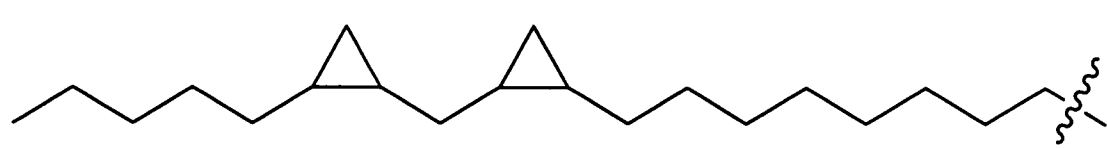
作為C7-C20炔氧基C1-C3烷基中之C7-C20炔基部分，例如可列舉：十二碳-11-炔基、十四碳-6-炔基、十六碳-7-炔基、十六碳-5,7-二炔基、十八碳-9-炔基等，作為C1-C3烷基部分，可列舉甲基、乙基、丙基等。

又，於本發明中，具有亞甲基雙自由基在形式上加成於碳數8～24之直鏈狀或支鏈狀之烯基之雙鍵上的環丙烷環之基亦包含於碳數8～24之直鏈狀或支鏈狀之烯基中。進而，C7-C20烯氧基C1-C3烷基中之C7-C20烯基部分亦同樣。例如可列舉：與(Z)-十六碳-9-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基、(8Z,11Z)-十七碳-8,11-二烯基對應之具有以下之環丙烷環之基

[化23]



[化24]



及

[化25]



等。

作為碳數1~3之烷基，可列舉：甲基、乙基、丙基、異丙基、環丙基等。

作為經基C2-C4烷基中之C2-C4烷基部分，可列舉：與乙基、丙基、丁基等對應之伸烷基。

作為C1-C3二烷基胺基C2-C4烷基中之C1-C3烷基部分，可列舉甲基、乙基、丙基等，該等可相同亦可不同。又，作為C1-C3二烷基胺基C2-C4烷基中之C2-C4烷基部分，可列舉：與乙基、丙基、丁基等對應之伸烷基。

作為碳數2~6之含氮雜環，可列舉：氮丙啶環、吡丁啶環、吡咯啶環、哌啶環、哌啶環、氮雜環庚烷環等。

再者， R^1 及 R^2 更佳為相同或不同，為碳數8~24之直鏈狀或支鏈狀之烷基或烯基、或C7-20烷氧基C1-C3烷基，進而較佳為相同或不同，為直鏈狀之碳數8~24之烯基。又， R^1 及 R^2 更佳為相同，於該情形時，更佳為碳數12~24之直鏈狀或支鏈狀之烷基、烯基或炔基，進而較佳為碳數12~24之直鏈狀之烯基。又， $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 更佳為相同或不同，為碳數8~24之直鏈狀或支鏈狀之烷基或烯基、或C7-20烷氧基C1-C3烷基或C7-C20烯氧基C1-C3烷基，進而較佳為相同或不同，為直鏈狀之碳數8~24之烯基。又， $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 更佳為相同，於該情形時，更佳為碳數12~24之直鏈狀或支鏈狀之烷基、烯基或炔基，進而較佳為碳數12~24之直鏈狀之烯基。

於 R^1 及 R^2 以及 $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 不同之情形時， R^1 及 $R^{1'}$ 為碳數16~24之直鏈狀或支鏈狀之烷基、烯基或炔基且 R^2 及 $R^{2'}$ 為碳數8~12之直鏈狀或

支鏈狀之烷基、烯基或炔基之情形亦為本發明之較佳的形態之一。於該情形時，更佳為 R^1 及 $R^{1'}$ 為碳數16~24之直鏈狀之烯基， R^2 及 $R^{2'}$ 為碳數8~12之直鏈狀之烷基，最佳為 R^1 及 $R^{1'}$ 為(Z)-十八碳-9-烯基或(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基， R^2 及 $R^{2'}$ 為辛基、癸基或十二烷基。

R^1 及 R^2 以及 $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 相同或不同，於為碳數8~24之直鏈狀或支鏈狀之烷基或烯基之情形時，較佳為相同或不同，為癸基、十二烷基、十四烷基、十六烷基、十八烷基、二十烷基、(Z)-十四碳-9-烯基、(Z)-十六碳-9-烯基、(Z)-十八碳-6-烯基、(Z)-十八碳-9-烯基、(E)-十八碳-9-烯基、(Z)-十八碳-11-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基、(9Z,12Z,15Z)-十八碳-9,12,15-三烯基、(Z)-二十碳-11-烯基、(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基或(Z)-二十二碳-13-烯基，更佳為相同或不同，為十四烷基、十六烷基、(Z)-十四碳-9-烯基、(Z)-十六碳-9-烯基、(Z)-十八碳-6-烯基、(Z)-十八碳-9-烯基、(E)-十八碳-9-烯基、(Z)-十八碳-11-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基、(9Z,12Z,15Z)-十八碳-9,12,15-三烯基、(Z)-二十碳-11-烯基、(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基或(Z)-二十二碳-13-烯基。

R^3 及 $R^{3'}$ 較佳為碳數1~3之烷基或上述式(A)，更佳為甲基、乙基、丙基或環丙基，進而較佳為甲基或乙基，最佳為甲基。並且，於 R^3 為式(A)之情形時， R^4 及 R^5 較佳為相同或不同，為氫原子或碳數1~3之烷基，於 R^3 為式(B)之情形時， R^6 及 R^7 較佳為相同或不同，為氫原子或碳數1~3之烷基。

作為 R^4 與 R^5 所鍵結之氮原子一併形成之碳數2~6之含氮雜環，較佳為可列舉：吡啶環、吡咯環、哌啶環、氮雜環庚烷環。

再者，於 R^4 未與 R^5 一併形成碳數2~6之含氮雜環之情形時， R^5 較佳為甲基或乙基，更佳為甲基，最佳為 R^4 與 R^5 分別為甲基。又，於 R^4 與 R^5 一併形成碳數2~6之含氮雜環之情形時，較佳為形成吡咯環或

哌啶環。

n^3 較佳為2~4之整數，更佳為3。

於上述式(B)中之 R^6 未與 R^7 一併形成碳數2~6之含氮雜環之情形時， R^7 較佳為甲基或乙基，更佳為甲基，最佳為 R^6 與 R^7 分別為甲基。又，於 R^6 與 R^7 一併形成碳數2~6之含氮雜環之情形時，較佳為形成吡咯啶環或哌啶環。

n^4 較佳為2~4之整數，更佳為3。

n^1 較佳為1。於該情形時， n^2 較佳為1~3之整數，更佳為1。

Z^1 於每個所鍵結之各碳上係分別獨立，較佳為氫原子或碳數1~3之烷基，更佳為氫原子或甲基，進而較佳為氫原子。此處，所謂用語「於每個所鍵結之各碳上係分別獨立」，於式(I'')上存在2個以上之 Z^1 之情形時係指 Z^1 於每個所鍵結之各碳原子上，各 Z^1 相同或不同，可選擇氫原子或碳數1~3之烷基。例如於式(I'')中存在2個 Z^1 之情形時，不僅係指各 Z^1 可選擇相同之取代基，而且亦包含一 Z^1 為氫原子而另一 Z^1 為碳數1~3之烷基之情形。

Z^2 於每個所鍵結之各碳上係分別獨立，較佳為氫原子或碳數1~3之烷基，更佳為氫原子或甲基，進而較佳為氫原子。此處，所謂用語「於每個所鍵結之各碳上係分別獨立」，於式(I'')中存在2個以上之 Z^2 之情形時係指 Z^2 於每個所鍵結之各碳原子上，各 Z^2 相同或不同，可選擇氫原子或碳數1~3之烷基。例如於式(I'')中存在2個 Z^2 之情形時，不僅係指各 Z^2 可選擇相同之取代基，而且亦包含一 Z^2 為氫原子而另一 Z^2 為碳數1~3之烷基之情形。

又，於 n^1 及 n^2 均為1時， Z^1 與 Z^2 分別相同或不同，較佳為氫原子或甲基，更佳為 Z^1 為氫原子或甲基， Z^2 為氫原子，最佳為 Z^1 與 Z^2 相同而為氫原子。

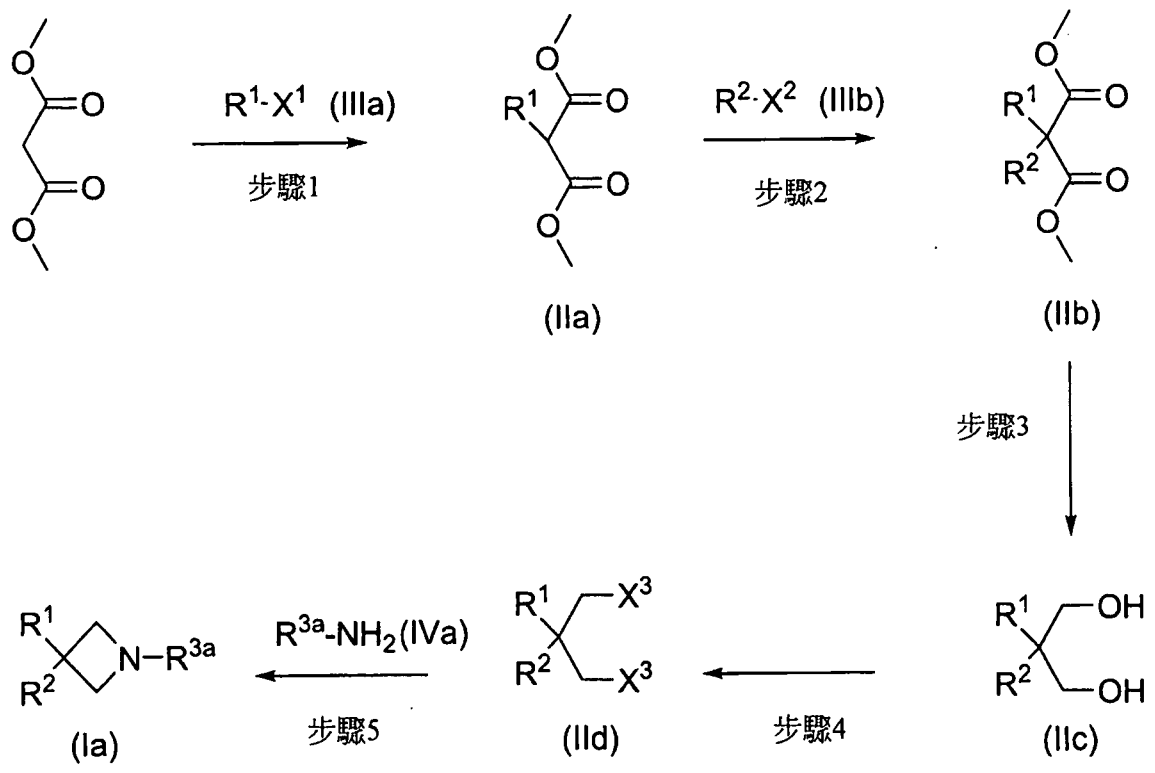
其次，對本發明之陽離子性脂質之方法進行說明。再者，於以

下所示之製造方法中，所定義之基在該製造方法之條件下發生變化或不適合於實施該製造方法之情形時，藉由使用有機合成化學中常用之保護基之導入及去除方法[例如有機合成中之保護基第3版(Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、格林(T.W.Greene)著、John Wiley & Sons Inc.(1999年)等中所記載之方法]等，可製造目標化合物。又，視需要亦可改變取代基導入等反應步驟之順序。

製造法1

化合物(I)中， n^1 及 n^2 均為1且 R^3 為氫原子或碳數1~3之烷基之化合物(Ia)可藉由以下方法而製造。再者，化合物(I')中， n^1 及 n^2 均為1且 R^3 為氫原子或碳數1~3之烷基之化合物亦可藉由以下方法而同樣地製造。進而，化合物(I'')中， n^1 及 n^2 均為1， Z^1 及 Z^2 均為氫原子， $R^{3'}$ 為氫原子、碳數1~3之烷基、羥基C2-C4烷基或C1-C3二烷基胺基C2-C4烷基之化合物亦可藉由以下方法而同樣地製造。

[化26]



(式中， R^1 及 R^2 分別與上述含義相同， R^{3a} 為氫原子或與上述 R^3 為碳數1~3之烷基之情形含義相同之碳數1~3之烷基， X^1 、 X^2 及 X^3 相同或不同，表示氯原子、溴原子、碘原子、三氟甲磺醯氧基、甲磺醯氧基、苯磺醯氧基、對甲苯磺醯氧基等脫離基)

步驟1及2

化合物(IIa)可藉由如下方式製造：於無溶劑下或於溶劑中，在1~10當量之鹼之存在下，在室溫與200℃之間的溫度下，使丙二酸二甲酯與化合物(IIIa)反應5分鐘~100小時。進而，化合物(IIb)可藉由如下方式製造：於無溶劑下或於溶劑中，在1~10當量之鹼之存在下，在室溫與200℃之間的溫度下，使化合物(IIa)與化合物(IIIb)反應5分鐘~100小時。

作為溶劑，例如可列舉：甲醇、乙醇、二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷、甲苯、乙酸乙酯、乙腈、二乙醚、四氫呋喃、1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷、N,N-二甲基甲醯胺、N,N-二甲基乙醯胺、N-甲基吡咯啉酮、吡啶等，該等可單獨使用，或混合使用。

作為鹼，例如可列舉：碳酸鉀、碳酸鈉、氫氧化鉀、氫氧化鈉、甲醇鈉、第三丁醇鉀、氫化鈉、三乙胺、二異丙基乙胺、N-甲基嗎啉、吡啶、1,8-二氮雜雙環[5.4.0]-7-十一碳烯(DBU)等。

化合物(IIIa)及化合物(IIIb)亦可作為市售品或藉由公知方法(例如「第5版實驗化學講座13有機化合物之合成I」、第5版、p.374、丸善(2005年))或依據其之方法或者下述方法而獲得。

R^1 與 R^2 相同之情形時之化合物(IIb)可藉由在步驟1中使用2當量以上之化合物(IIIa)而獲得。

丙二酸二甲酯可作為市售品而獲得。

步驟3

化合物(IIc)可藉由如下方式製造：於4當量～遠過量之氫化還原劑及視需要之觸媒量～10當量之添加劑的存在下，於溶劑中在-20℃與150℃之間的溫度下，使化合物(IIb)反應5分鐘～72小時。此處，所謂觸媒量係指0.01當量～0.5當量。

作為氫化還原劑，例如可列舉：氫化鋁鋰、硼氫化鋰、三乙基硼氫化鋰、氫化二異丁基鋁、氫化雙(2-甲氧基乙氧基)鋁鈉等。

作為溶劑，例如可列舉：甲苯、二氯甲烷、二乙醚、四氫呋喃、1,2-二甲氧基乙烷、1,4-二噁烷等，該等可單獨使用，或混合使用。

作為添加劑，可使用氯化鋁、氯化銻、四氯化鈦、四異丙醇鈦等。

步驟4

化合物(IIId)可藉由如下方式製造：於2當量以上之鹵素化試劑或擬鹵素化試劑、及在無溶劑下或在溶劑中視需要之較佳為1～10當量之鹼及視需要之較佳為1～10當量之添加劑的存在下，於-20℃與150℃之間的溫度下，使化合物(IIc)反應5分鐘～100小時。

作為鹵素化試劑或擬鹵素化試劑，例如可列舉：亞硫醯氯、磺醯氯、三氯化磷、五氯化磷、磷醯氯、三溴化磷、溴化氫、碘化氫、甲磺酸酐、甲磺醯氯、對甲苯磺酸酐、苯磺醯氯、苯磺酸酐、對甲苯磺醯氯、三氟甲磺酸酐等。

作為溶劑，可列舉步驟3中所例示者。

作為鹼，例如可列舉：吡啶、2,6-二甲基吡啶、2,4,6-三甲基吡啶、三乙胺、N,N-二異丙基乙胺等。

作為添加劑，例如可列舉：氯化鈉、溴化鈉、溴化鋰、氯化鋰等。

步驟5

化合物(Ia)可藉由如下方式製造：於無溶劑下或於溶劑中，在室溫與200℃之間的溫度下，使化合物(IIId)與1當量～遠過量之化合物(IVa)反應5分鐘～100小時。

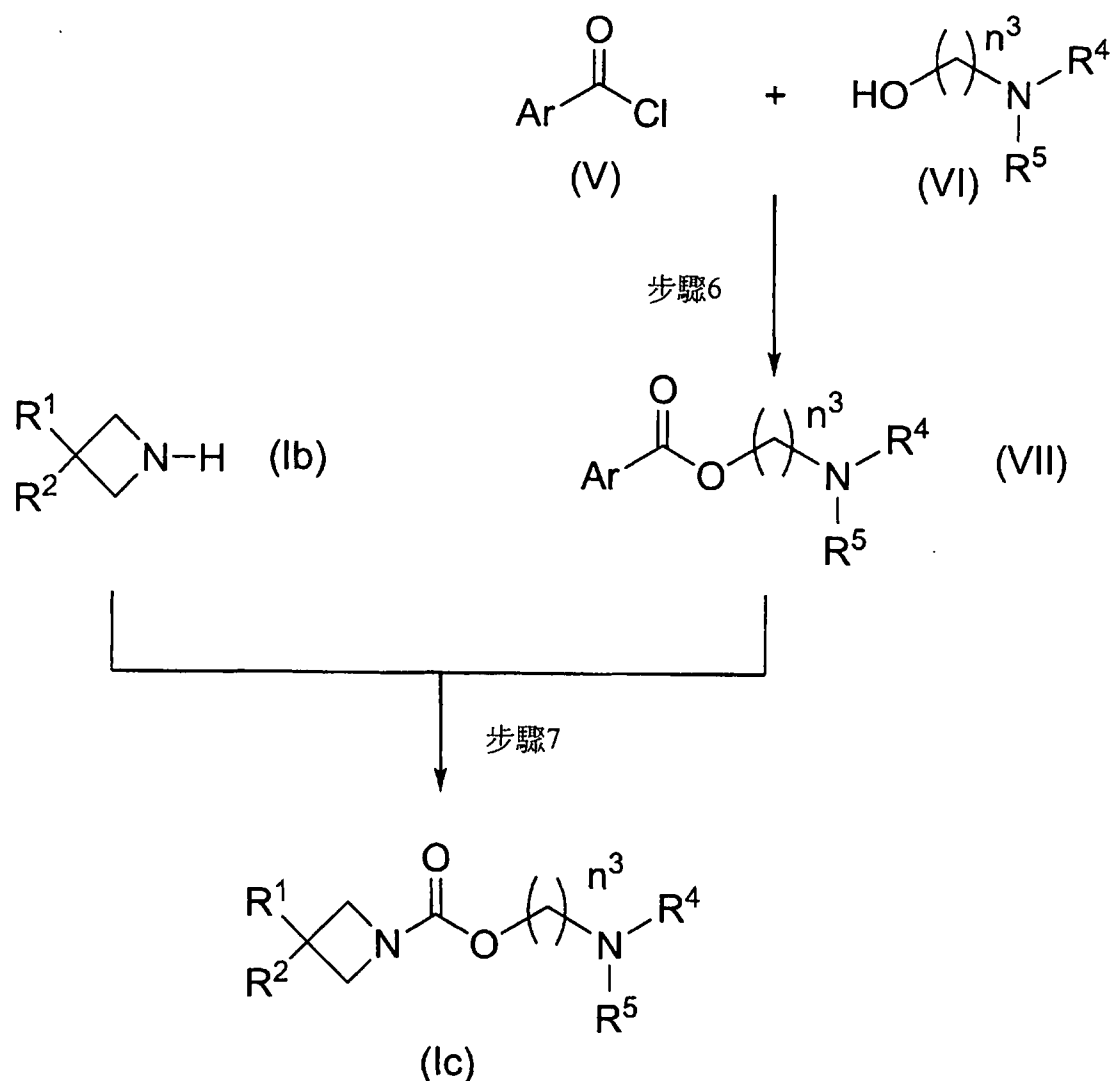
作為溶劑，可列舉步驟1及2中所例示者。

化合物(IVa)可作為市售品而獲得。

製造法2

化合物(I)中， n^1 及 n^2 均為1且 R^3 為式(A)之化合物(Ic)可藉由以下之方法而製造。再者，化合物(I')中， n^1 及 n^2 均為1且 R^3 為式(A)之化合物亦可藉由以下之方法而同樣地製造。進而，化合物(I'')中， n^1 及 n^2 均為1， Z^1 及 Z^2 均為氫原子， $R^{3'}$ 為式(A)之化合物亦可藉由以下之方法而同樣地製造。

[化27]



(式中， R^1 、 R^2 、 R^4 、 R^5 及 n^3 分別與上述含義相同，Ar表示對硝基苯、鄰硝基苯、對氯苯等經取代之苯基或未經取代之苯基)

步驟6

化合物(VII)可藉由如下方式製造：於無溶劑下或於溶劑中之視需要之較佳為1~10當量之添加劑的存在下、及/或視需要之較佳為1~10當量之鹼之存在下，在 -20°C 與 150°C 之間的溫度下，使化合物(V)與化合物(VI)反應5分鐘~72小時。

作為溶劑，例如可列舉：二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷、甲苯、乙酸乙酯、乙腈、二乙醚、四氫呋喃、1,2-二甲氧基乙烷、1,4-二噁烷、N,N-二甲基甲醯胺、N,N-二甲基乙醯胺、N-甲基吡咯啉酮、

二甲基亞碲等，該等可單獨使用，或混合使用。

作為添加劑，例如可列舉1-羥基苯并三唑、4-二甲胺基吡啶等。

作為鹼，例如可列舉：碳酸鉀、氫氧化鉀、氫氧化鈉、甲醇鈉、第三丁醇鉀、三乙胺、二異丙基乙胺、N-甲基嗎啉、吡啶、1,8-二氮雜雙環[5.4.0]-7-十一碳烯(DBU)等。

化合物(V)可作為市售品而獲得。

化合物(VI)可作為市售品或藉由公知之方法(例如「第5版實驗化學講座14有機化合物之合成II」、第5版、p.1、丸善(2005年))或依據其之方法而獲得。

步驟7

化合物(Ic)可藉由如下方式製造：於無溶劑下或於溶劑中之視需要之1~10當量之添加劑之存在下及/或視需要之1~10當量之鹼之存在下，於-20℃與150℃之間的溫度下，使化合物(Ib)與化合物(VII)反應5分鐘~72小時。

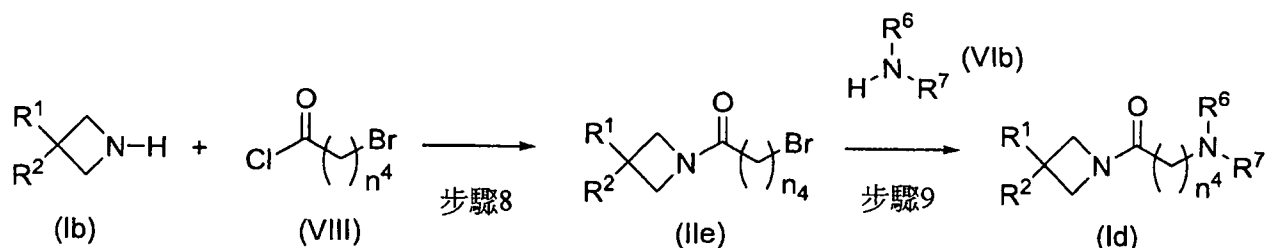
化合物(Ib)可於製造法1之步驟5中使用鉍作為化合物(IVa)，或藉由製造法7而製造。

作為溶劑、添加劑及鹼，分別可列舉步驟6中所例示者。

製造法3

化合物(I)中， n^1 及 n^2 均為1且 R^3 為式(B)之化合物(Id)可藉由以下之方法而製造。再者，化合物(I')中， n^1 及 n^2 均為1且 R^3 為式(B)之化合物亦可藉由以下之方法而同樣地製造。進而，化合物(I'')中， n^1 及 n^2 均為1， Z^1 及 Z^2 均為氫原子， $R^{3'}$ 為式(B)之化合物亦可藉由以下之方法而同樣地製造。

[化28]



(式中，R¹、R²、R⁶、R⁷及n⁴分別與上述含義相同)

步驟8

化合物(IIe)可藉由如下方式製造：於無溶劑下或於溶劑中之視需要之較佳為1~10當量之鹼之存在下，於-20℃與150℃之間的溫度下，使化合物(Ib)與化合物(VIII)反應5分鐘~72小時。

作為溶劑，可列舉步驟6中所例示者。

作為鹼，可列舉步驟4中所例示者。

化合物(VIII)可作為市售品而獲得。

步驟9

化合物(Id)可藉由如下方式製造：於無溶劑下或於溶劑中之視需要之1~10當量之鹼之存在下，於室溫與200℃之間的溫度下，使化合物(IIe)與1~20當量之化合物(VIb)反應5分鐘~100小時。

化合物(VIb)可作為市售品而獲得。

作為溶劑，可列舉步驟1及2中所例示者。

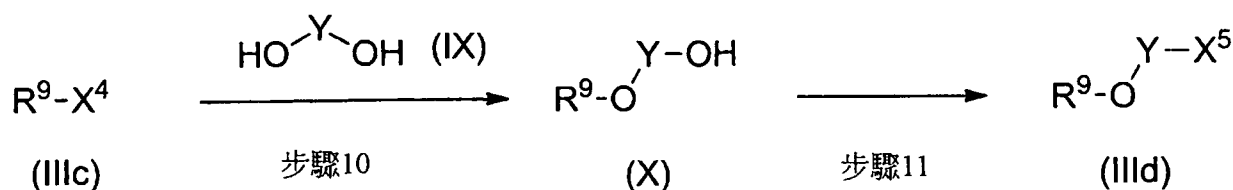
作為鹼，可列舉步驟6中所例示者。

製造法4

於化合物(IIIa)及化合物(IIIb)中，R¹及/或R²為C7-C20烷氧基C2-C3烷基或C7-C20炔氧基C2-C3烷基之化合物(IIId)可藉由以下之方法而製造。再者，製造於化合物(I')及化合物(I'')中R^{1'}及/或R^{2'}為C7-C20烷氧基C2-C3烷基、C7-C20烯氧基C2-C3烷基或C7-C20炔氧基C2-C3烷基之化合物時使用的相當於化合物(IIId)之化合物亦可藉由以下之

方法而同樣地製造。

[化29]



(式中， X^4 及 X^5 與上述 X^1 含義相同， R^9 為與上述C7-C20烷氧基C1-C3烷基中之C7-C20烷基部分含義相同之碳數7~20之烷基、與上述C7-C20烯氧基C1-C3烷基中之C7-C20烯基部分含義相同之碳數7~20之烯基、或與上述C7-C20炔氧基C1-C3烷基中之C7-C20炔基部分含義相同之碳數7~20之炔基，Y表示乙烯或丙烯)

步驟10

化合物(X)可藉由如下方式製造：於無溶劑下或於溶劑中之視需要之1~10當量之鹼之存在下，於室溫與200℃之間的溫度下，使化合物(IIIc)與化合物(IX)反應5分鐘~100小時。

作為溶劑及鹼，分別可列舉步驟6中所例示者。

化合物(IIIc)可作為市售品或藉由公知之方法(例如「第5版實驗化學講座14有機化合物之合成II」、第5版、p.1、丸善(2005年))或依據其之方法而獲得。

化合物(IX)可作為市售品而獲得。

步驟11

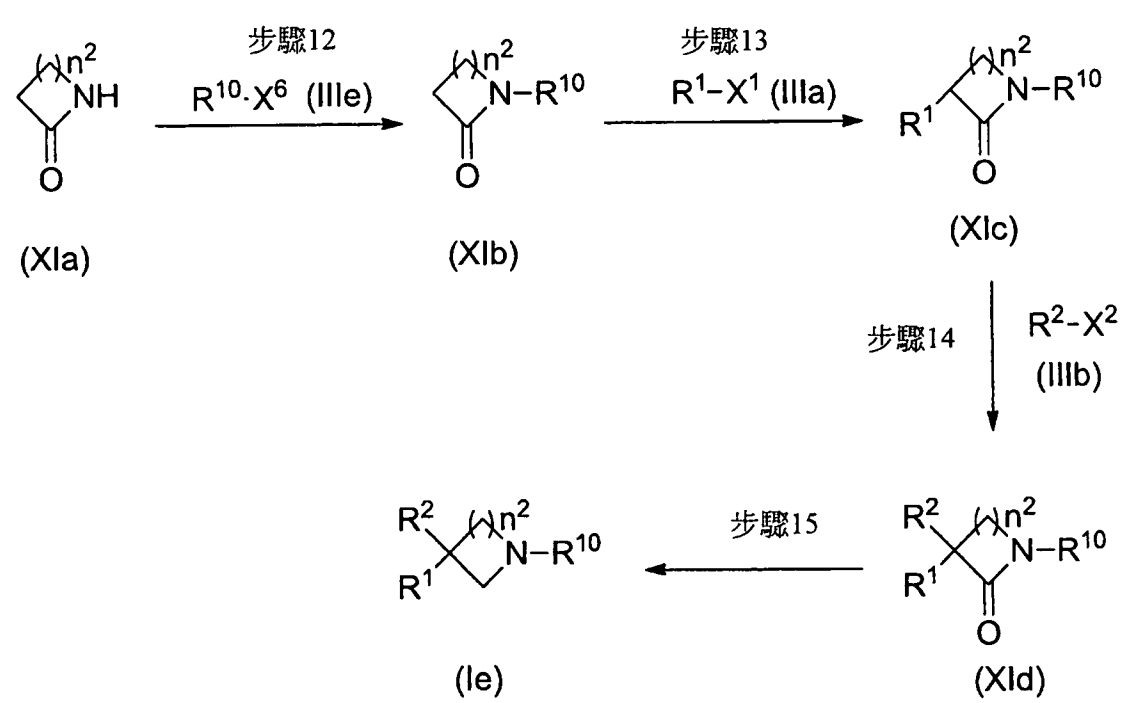
化合物(IIId)可藉由如下方式製造：於無溶劑下或於溶劑中之視需要之較佳為1~10當量之鹼及視需要之較佳為1~10當量之添加劑之存在下，於-20℃與150℃之間的溫度下，使化合物(X)與鹵素化試劑或擬鹵素化試劑反應5分鐘~100小時。

作為溶劑及鹼，分別可列舉步驟6中所例示者。
作為鹵素化試劑或擬鹵素化試劑，可列舉步驟4中所例示者。
作為添加劑，可列舉步驟4中所例示者。

製造法5

化合物(I)中， n^1 為1且 R^3 為碳數1~3之烷基之化合物(Ie)可藉由以下之方法而製造。再者，化合物(I')中， n^1 為1且 R^3 為碳數1~3之烷基之化合物亦可藉由以下之方法而同樣地製造。進而，化合物(I'')中， n^1 為1， Z^1 及 Z^2 均為氫原子， $R^{3'}$ 為碳數1~3之烷基之化合物亦可藉由以下之方法而同樣地製造。

[化30]



(式中， R^1 、 R^2 、 n^2 、 X^1 及 X^2 分別與上述含義相同， X^6 與上述 X^1 含義相同， R^{10} 表示與上述 R^3 為碳數1~3之烷基之情形含義相同之碳數1~3之烷基)

步驟12

化合物(XIb)可藉由如下方式製造：於無溶劑下或於溶劑中，在1～10當量之鹼之存在下，於室溫與200℃之間的溫度下，使化合物(XIa)與化合物(IIIe)反應5分鐘～100小時。

作為溶劑及鹼，分別可列舉步驟1及步驟2中所例示者。

化合物(XIa)及化合物(IIIe)可分別作為市售品而獲得。

步驟13及步驟14

化合物(XIc)可藉由如下方式製造：於無溶劑下或於溶劑中，在1～10當量之鹼之存在下，於室溫與200℃之間的溫度，使化合物(XIb)與化合物(IIIa)反應5分鐘～100小時。進而，化合物(XId)可藉由如下方式製造：於無溶劑下或於溶劑中於1～10當量之鹼之存在下，於室溫與200℃之間的溫度下，使化合物(XIc)與化合物(IIIb)反應5分鐘～100小時。

作為溶劑，可列舉步驟3中所例示者。

作為鹼，可列舉二異丙基醯胺鋰、六甲基二矽氮烷鋰、六甲基二矽氮烷鈉、正丁基鋰等。

R^1 與 R^2 相同之情形時之化合物(XId)可藉由於步驟13中使用2當量以上之化合物(IIIa)而獲得。

步驟15

化合物(Ie)可藉由如下方式製造：於4～100當量之氫化還原劑及視需要之觸媒量～10當量之添加劑之存在下，在溶劑中，於-20℃與150℃之間的溫度下，使化合物(XId)反應5分鐘～72小時。此處，觸媒量與上述含義相同。

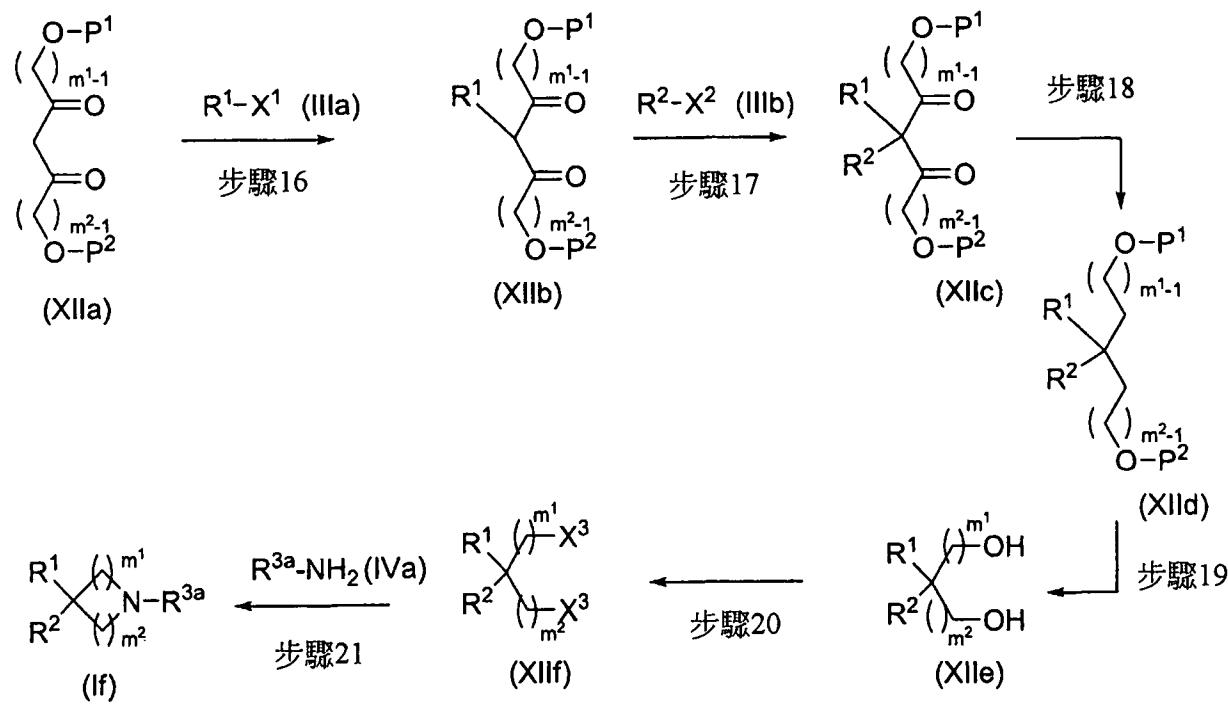
作為氫化還原劑、添加劑及溶劑，可列舉步驟3中所例示者。

製造法6

化合物(I)中， n^1 及 n^2 相同或不同，為1～4之整數(其中， n^1 為1且 n^2 為1之情形除外)， R^3 為氫原子或碳數1～3之烷基之化合物(If)可藉由

以下之方法而製造。再者，化合物(I')中， n^1 及 n^2 相同或不同，為1~4之整數(其中， n^1 為1而 n^2 為1之情形除外)， R^3 為氫原子或碳數1~3之烷基之化合物亦可藉由以下之方法而同樣地製造。進而，化合物(I'')中， n^1 及 n^2 相同或不同，為1~4之整數(其中， n^1 為1且 n^2 為1之情形除外)， Z^1 及 Z^2 均為氫原子， $R^{3'}$ 為氫原子、碳數1~3之烷基、羥基C2-C4烷基或C1-C3二烷基胺基C2-C4烷基的化合物亦可藉由以下之方法而同樣地製造。

[化31]



[式中， R^1 、 R^2 、 R^{3a} 、 X^1 、 X^2 及 X^3 分別與上述含義相同， m^1 及 m^2 相同或不同，為1~4之整數(其中， m^1 為1且 m^2 為1之情形除外)、 P^1 及 P^2 相同或不同，表示保護基]

步驟16及步驟17

化合物(XIIb)係代替丙二酸二甲酯而使用化合物(XIIa)，藉由與步驟1相同之方法而獲得。化合物(XIIc)係代替化合物(IIa)而使用化合

物(XIIb)，藉由與步驟2相同之方法而獲得。 R^1 與 R^2 相同之情形時之(XIIc)係藉由於步驟16中使用2等量以上之化合物(IIIa)而獲得。此處，作為 P^1 及 P^2 ，可使用有機合成化學中常用之保護基[例如有機合成中之保護基第3版(Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、格林(T.W.Greene)著、John Wiley & Sons Inc.(1999年)等中所記載之保護基]。又，化合物(XIIa)係藉由公知之方法[例如「新實驗化學講座14有機化合物之合成與反應(II)」、初版、p.751、丸善(1977年)]或依據其之方法而獲得。

步驟18

化合物(XIIId)係藉由利用公知之方法[例如「新實驗化學講座15氧化與還原(II)」、初版、丸善(1977年)]或依據其之方法使化合物(XIIc)還原而獲得。

步驟19

化合物(XIIe)係藉由分別利用適當之方法去除化合物(XIIId)之保護基 P^1 及 P^2 而獲得。作為保護基之去除方法，可使用有機合成化學中常用之保護基之去除方法[例如有機合成中之保護基第3版(Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、格林(T.W.Greene)著、John Wiley & Sons Inc.(1999年)等中所記載之去除方法]，藉此可製造目標化合物。

步驟20

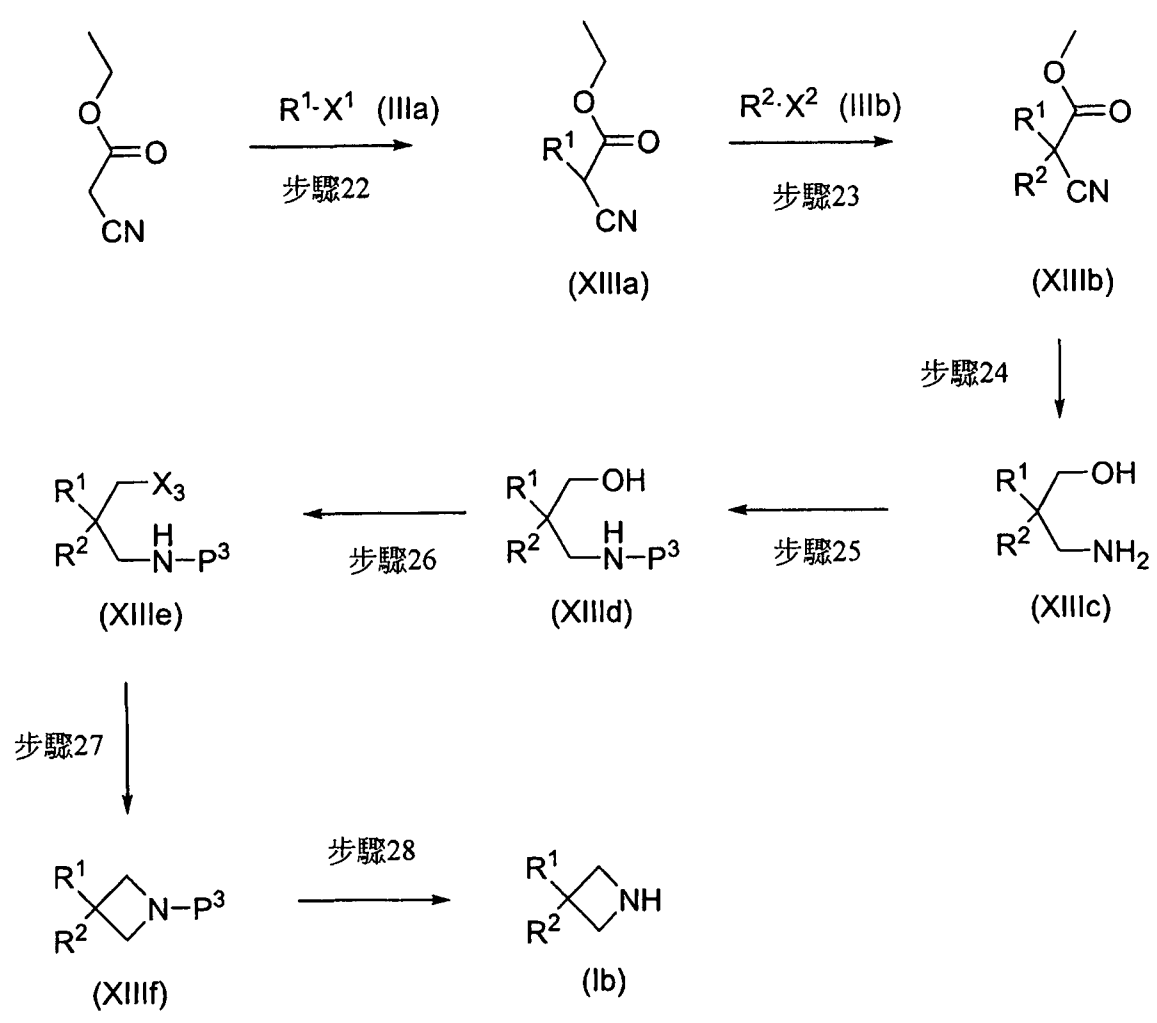
化合物(XIIIf)係代替化合物(IIc)而使用化合物(XIIe)，藉由與步驟4相同之方法而獲得。

步驟21

化合物(If)係代替化合物(IIId)而使用化合物(XIIIf)，藉由與步驟5相同之方法而獲得。

製造法7

化合物(I)中， n^1 及 n^2 為1且 R^3 為氫原子之化合物(Ib)可藉由以下之方法而製造。再者，化合物(I')中， n^1 及 n^2 為1且 R^3 為氫原子之化合物亦可藉由以下之方法而同樣地製造。進而，化合物(I'')中， n^1 及 n^2 為1， Z^1 及 Z^2 均為氫原子， $R^{3'}$ 為氫原子之化合物亦可藉由以下之方法而同樣地製造。



(式中， R^1 、 R^2 、 X^1 、 X^2 及 X^3 分別與上述含義相同， P^3 表示第三丁氧基羰基、鄰硝基苯磺醯基或對甲基苯磺醯基等保護基)

步驟22及23

化合物(XIIIa)可藉由於與步驟1相同之條件下使氰基乙酸乙酯與化合物(IIIa)反應而製造。進而，化合物(XIIIb)可藉由於與步驟2相同

之條件下使化合物(XIIIa)與化合物(IIIb)反應而製造。

R^1 與 R^2 相同之情形時之化合物(XIIIb)可藉由於步驟22中使用2當量以上之化合物(IIIa)而獲得。

氰基乙酸乙酯可作為市售品而獲得。

化合物(IIIa)及化合物(IIIb)係與製造法1中所記載者相同。

步驟24

化合物(XIIIc)可藉由於與步驟3相同之條件下使化合物(XIIIb)反應而製造。

步驟25

化合物(XIIId)可藉由如下方式製造：於1～10當量之碳酸二第三丁氧基羰基酯、鄰硝基苯磺醯氯或對甲基苯磺醯氯等、及溶劑中1～10當量之鹼之存在下，在0℃與200℃之間的溫度下，使化合物(XIIIc)反應5分鐘～100小時。

作為溶劑，可列舉步驟6中所例示者。

作為鹼，可列舉步驟4中所例示者。

步驟26

化合物(XIIIe)可藉由如下方式製造：於無溶劑下或於溶劑中之視需要之較佳為1～10當量的鹼之存在下，在-0℃與150℃之間的溫度下，使化合物(XIIId)與1當量以上之鹵素化試劑或擬鹵素化試劑反應5分鐘～100小時。

作為鹵素化試劑或擬鹵素化試劑，可列舉步驟4中所例示者。

作為溶劑，可列舉步驟3中所例示者。

作為鹼，可列舉步驟4中所例示者。

步驟27

化合物(XIIIf)可藉由如下方式製造：於無溶劑下或於溶劑中之視需要之較佳為1～10當量之鹼之存在下，在0℃與150℃之間的溫度

下，使化合物(XIIIe)於分子內反應5分鐘～72小時。

作為鹼，例如可列舉：碳酸鉀、氫氧化鉀、氫氧化鈉、甲醇鈉、鉀第三丁氧化物、三乙胺、二異丙基乙胺、N-甲基嗎啉、吡啶、1,8-二氮雜雙環[5.4.0]-7-十一碳烯(DBU)、二異丙基醯胺鋰、六甲基二矽氮烷鋰、六甲基二矽氮烷鈉、正丁基鋰等。

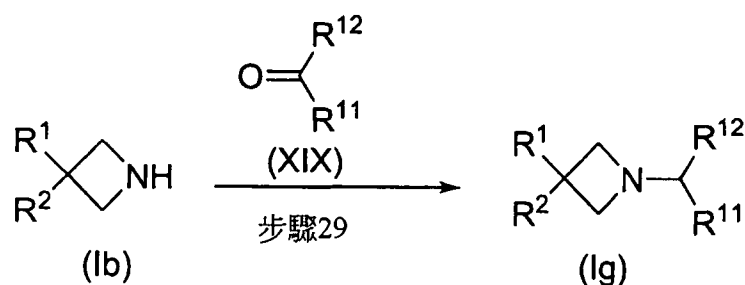
作為溶劑，可列舉步驟1及2中所例示者。

步驟28

化合物(Ib)係藉由利用適當之方法去除化合物(XIII f)之保護基 P^3 而獲得。作為保護基之去除方法，可使用有機合成化學中常用之保護基之去除方法[例如有機合成中之保護基第3版(Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、格林(T.W.Greene)著、John Wiley & Sons Inc.(1999年)等中所記載之去除方法]，藉此可製造目標化合物。

製造法8

化合物(I)中， n^1 及 n^2 為1且 R^3 為碳數1-3之烷基之(Ig)可藉由以下之方法而製造。再者，化合物(I')中， n^1 及 n^2 為1且 R^3 為碳數1-3之烷基之化合物亦可藉由以下之方法而同樣地製造。進而，化合物(I'')中， n^1 及 n^2 為1， Z^1 及 Z^2 均為氫原子， $R^{3'}$ 為碳數1-3之烷基之化合物亦可藉由以下之方法而同樣地製造。



[式中， R^1 、 R^2 分別與上述含義相同， R^{11} 為氫原子、甲基或乙基， R^{12} 為氫原子或甲基，或 R^{11} 及 R^{12} 與鄰接之碳一併形成環丙基環(其中，於 R^{11} 為氫原子或乙基時， R^{12} 並非甲基)]

步驟29

化合物(Ig)可藉由如下方式製造：於溶劑中之較佳為1當量～遠過量之還原劑及視需要之較佳為1～10當量之酸之存在下，在-20℃與150℃之間的溫度下，使化合物(Ib)與較佳為1～10當量之化合物(XIX)反應5分鐘～72小時。

作為溶劑，例如可列舉甲醇、乙醇、二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷、甲苯、乙酸乙酯、乙腈、二乙醚、四氫呋喃、1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷、N,N-二甲基甲醯胺、N,N-二甲基乙醯胺、N-甲基吡咯啉酮、水等，該等可單獨使用，或混合使用。

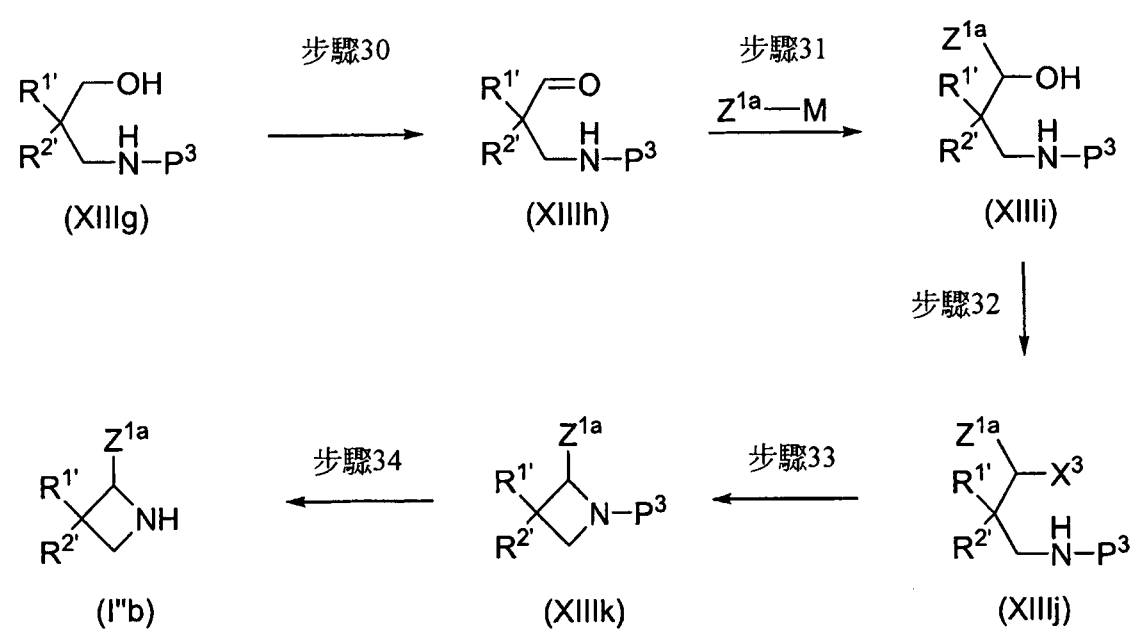
作為還原劑，例如可列舉三乙醯氧基硼氫化鈉、氰基硼氫化鈉等。

作為酸，例如可列舉鹽酸、乙酸等。

化合物(XIX)可作為市售品而獲得。

製造法9

化合物(I'')中， n^1 及 n^2 為1， $R^{3'}$ 為氫， Z^1 為碳數1～3之烷基， Z^2 為氫原子之化合物(I''b)可藉由以下之方法而製造。



(式中， $R^{1'}$ 、 $R^{2'}$ 、 X^3 及 P^3 分別與上述含義相同， Z^{1a} 為與上述 Z^1 為碳數1~3之烷基之情形含義相同之碳數1~3之烷基，M表示鋰、溴化鎂、氯化鎂等)

步驟30

化合物(XIIIh)可藉由如下方式製造：於 0°C 與 150°C 之間的溫度下，使化合物(XIIIg)與溶劑中之1~10當量之氧化劑反應5分鐘~72小時。

作為氧化劑，例如可列舉：戴斯-馬丁試劑、氯鉻酸吡啶鎂、二鉻酸吡啶鎂、過釷酸四丙基銨等。

作為溶劑，可列舉步驟6中所例示者。

化合物(XIIIg)可藉由與製造法7中之化合物(XIIIId)相同之方法而製造。

步驟31

化合物(XIIIi)可藉由如下方式製造：於 -78°C 與 100°C 之間的溫度下，使化合物(XIIIh)與溶劑中之1~10當量之有機金屬試劑反應5分鐘~72小時。

作為有機金屬試劑，例如可列舉：甲基鋰、乙基鋰等烷基鋰試劑、甲基溴化鎂、乙基溴化鎂等格里納德試劑、二甲基鋅、二乙基鋅等有機鋅試劑等。

作為溶劑，可列舉步驟3中所例示者。

步驟32

化合物(XIIIj)可藉由與步驟26相同之方法而製造。

步驟33

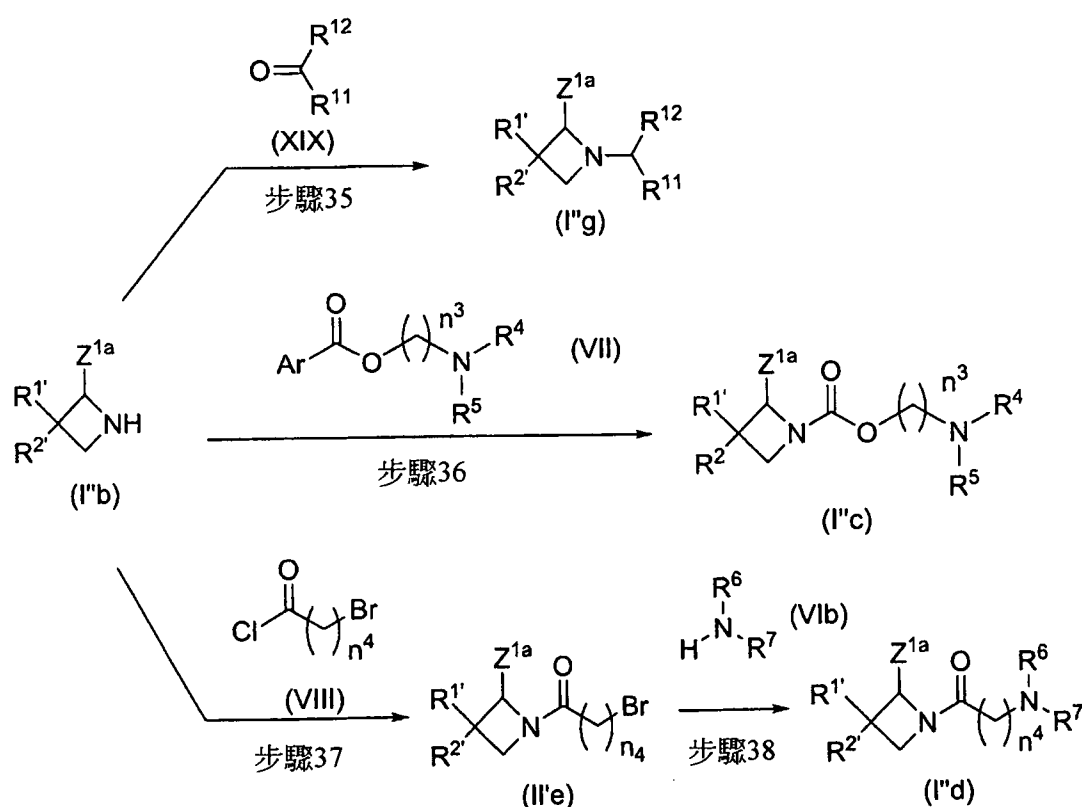
化合物(XIIIk)可藉由與步驟27相同之方法而製造。

步驟34

化合物(I''b)可藉由與步驟28相同之方法而製造。

製造法9

化合物(I'')中， n^1 及 n^2 為1， $R^{3'}$ 為碳數1-3之烷基， Z^1 為碳數1~3之烷基， Z^2 為氫原子之化合物(I'g)可藉由以下之方法而製造。又， n^1 及 n^2 為1， $R^{3'}$ 為式(A)， Z^1 為碳數1~3之烷基， Z^2 為氫原子之化合物(I'c)可藉由以下之方法而製造。進而， n^1 及 n^2 為1， $R^{3'}$ 為式(B)， Z^1 為碳數1~3之烷基， Z^2 為氫原子之化合物(I'd)可藉由以下之方法而製造。



(式中， $R^{1'}$ 、 $R^{2'}$ 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^{11} 、 R^{12} 、 n^3 、 n^4 、Ar及 Z^{1a} 分別與上述含義相同)

步驟35

化合物(I'g)可藉由與步驟29相同之方法而製造。

步驟36

化合物(I'c)可藉由與步驟7相同之方法而製造。

步驟37

化合物(II'e)可藉由與步驟8相同之方法而製造。

步驟38

化合物(I''d)可藉由與步驟9相同之方法而製造。

再者，化合物(I)、(I')、(I'')中之除上述化合物(Ia)~(Ig)及(I''b)~(I''d)以外之化合物可藉由如下方式製造：藉由採用適合於目標化合物之結構的原料或試劑等而依據上述方法或使用有機合成化學中常用之通常之製造方法。

上述各方法中之中間體及目標化合物可根據有機合成化學中常用之分離純化法例如過濾、萃取、洗淨、乾燥、濃縮、再結晶、各種層析法等而單離純化。又，中間體亦可不特別地進行純化而供給至繼而之反應。

於本發明之陽離子性脂質中，亦可使氫離子配位於結構中之氮原子上之孤立電子對上，於該情形時，亦可與製藥上可容許之陰離子(與上述含義相同)形成鹽，於本發明之陽離子性脂質中，亦包含氫離子配位於該氮原子上之孤立電子對上之化合物。

於本發明中，作為製藥上可容許之陰離子，例如可列舉：氯化物離子、溴化物離子、硝酸離子、硫酸離子、磷酸離子等無機離子、乙酸離子、草酸離子、順丁烯二酸離子、反丁烯二酸離子、檸檬酸離子、苯甲酸離子、甲磺酸離子等有機酸離子等。

於本發明之陽離子性脂質中，亦可存在幾何異構物、光學異構物等立體異構物、互變異構物等，本發明之陽離子性脂質包含該等，包含全部可能之異構物及該等之混合物。

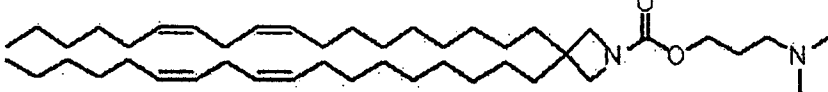
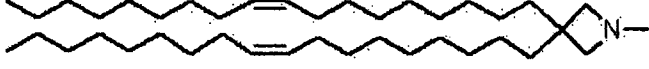
本發明之陽離子性脂質中之各原子之一部分或全部亦可分別經對應之同位體原子取代，化合物(I)亦包含經該等同位體原子取代之化合物。例如化合物(I)中之氫原子之一部分或全部亦可為原子量2之氫

原子(氘原子)。

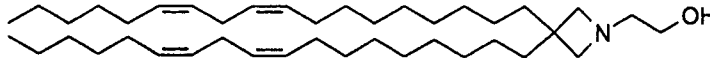
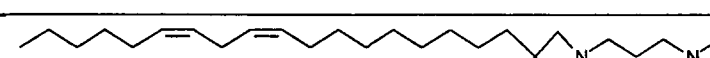
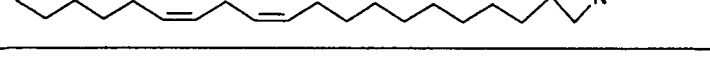
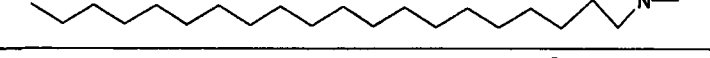
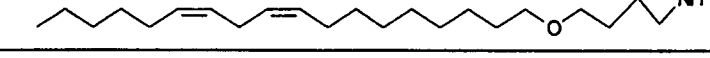
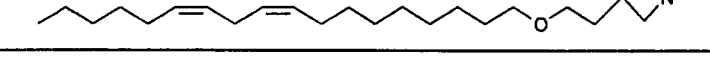
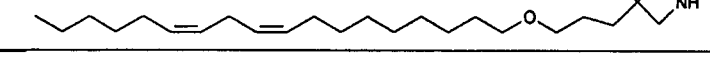
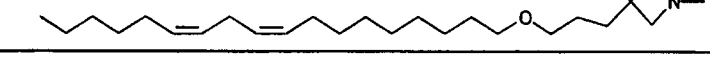
本發明之陽離子性脂質中之各原子之一部分或全部分別經對應的同位體原子取代之化合物亦可使用市售之基本組份並利用與上述各方法相同之方法製造。又，化合物(I)中之氫原子之一部分或全部經氘原子取代之化合物例如亦可利用使用鈹錯合物作為觸媒並使用重水作為氘源使醇、羧酸等氘化之方法[參照美國化學會誌(J. Am. Chem. Soc.)，Vol.124, No.10, 2092(2002)]等進行合成。

將本發明之陽離子性脂質之具體例示於表1～表3。其中，本發明之陽離子性脂質並不限定於該等。

[表1]

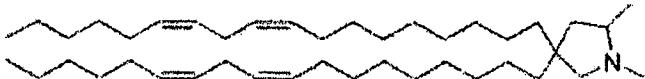
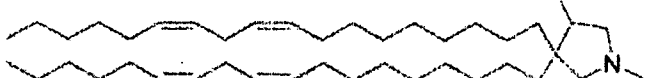
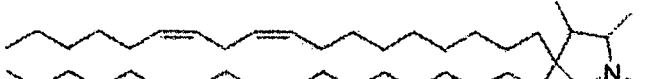
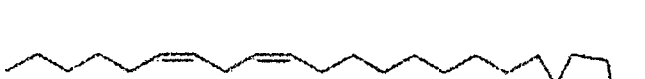
表1	
化合物編號	結構式
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	

[表2]

表2	
化合物編號	結構式
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	

[表3]

表3

化合物編號	結構式
21	
22	
23	
24	
25	

又，作為本發明中所使用之核酸，只要為具有與例如核苷酸及/或核苷酸相同功能之分子聚合而成之分子，則可為任何分子，例如可列舉：作為核糖核苷酸之聚合物之核糖核酸(RNA)、作為去氧核糖核苷酸之聚合物之去氧核糖核酸(DNA)、包含RNA及DNA之嵌合體核酸、及該等核酸之至少一種核苷酸經具有與該核苷酸相同功能之分子取代之核苷酸聚合物等。又，於至少一部分包含核苷酸及/或具有與核苷酸相同功能之分子聚合而成之分子之結構的衍生物亦包含於本發明之核酸中。再者，於本發明中，尿嘧啶U與胸腺嘧啶T可分別換用。

作為具有與核苷酸相同功能之分子，例如可列舉核苷酸衍生物等。

作為核苷酸衍生物，只要為對例如核苷酸進行修飾而成之分子，則可為任何分子，例如與RNA或DNA相比，為了提昇核酸酶耐性或對於其他分解因子而穩定化，為了提高與互補鏈核酸之親和性，為

了提高細胞透過性，或者為了可視化，可較佳地使用對核糖核苷酸或去氧核糖核苷酸進行修飾而成之分子等。

作為核苷酸衍生物，例如可列舉：糖部修飾核苷酸、磷酸二酯鍵修飾核苷酸、鹼基修飾核苷酸等。

作為糖部修飾核苷酸，只要為對於例如核苷酸之糖之化學結構之一部分或全部利用任意之取代基進行修飾或取代而成者、或經任意之原子取代者，則可為任何者，可較佳地使用2'-修飾核苷酸。

作為糖部修飾核苷酸中之修飾基，例如可列舉：2'-氰基、2'-烷基、2'-取代烷基、2'-烯基、2'-取代烯基、2'-鹵素、2'-O-氰基、2'-O-烷基、2'-O-取代烷基、2'-O-烯基、2'-O-取代烯基、2'-S-烷基、2'-S-取代烷基、2'-S-烯基、2'-S-取代烯基、2'-胺基、2'-NH-烷基、2'-NH-取代烷基、2'-NH-烯基、2'-NH-取代烯基、2'-SO-烷基、2'-SO-取代烷基、2'-羧基、2'-CO-烷基、2'-CO-取代烷基、2'-Se-烷基、2'-Se-取代烷基、2'-SiH₂-烷基、2'-SiH₂-取代烷基、2'-ONO₂、2'-NO₂、2'-N₃、2'-胺基酸殘基(自胺基酸之羧酸中去除羥基而成者)、2'-O-胺基酸殘基(與上述胺基酸殘基含義相同)等。

作為糖部修飾核苷酸，可列舉藉由將交聯結構導入至糖部而具有2個環狀結構之交聯結構型人工核酸(Bridged Nucleic Acid)(BNA)，具體而言，可列舉：2'位之氧原子與4'位之碳原子經由亞甲基而交聯之鎖定人工核酸(Locked Nucleic Acid)(LNA)[「四面體通訊(Tetrahedron Letters)」，Volume 38, Issue 50, 1997, Pages 8735 - 8738、及「四面體(Tetrahedron)」，Volume 54, Issue 14, 1998, Pages 3607 - 3630]、乙烯交聯結構型人工核酸(Ethylene bridged nucleic acid)(ENA)[「核酸研究(Nucleic Acid Research)」，32, e175(2004)]等。

進而，作為糖部修飾核苷酸，亦可列舉肽核酸(PNA)[Acc. Chem.

Res., 32, 624(1999)]、羥基肽核酸(OPNA)[J. Am. Chem. Soc., 123, 4653(2001)]、肽核糖核酸(PRNA)[J. Am. Chem. Soc., 122, 6900(2000)]等。

作為糖部修飾核苷酸中之修飾基，較佳為2'-氰基、2'-鹵素、2'-O-氰基、2'-烷基、2'-取代烷基、2'-O-烷基、2'-O-取代烷基、2'-O-烯基、2'-O-取代烯基、2'-Se-烷基、2'-Se-取代烷基等，更佳為2'-氰基、2'-氟、2'-氯、2'-溴、2'-三氟甲基、2'-O-甲基、2'-O-乙基、2'-O-異丙基、2'-O-三氟甲基、2'-O-[2-(甲氧基)乙基]、2'-O-(3-胺基丙基)、2'-O-[2-(N,N-二甲胺基氧基)乙基]、2'-O-[3-(N,N-二甲胺基)丙基]、2'-O-{2-[2-(N,N-二甲胺基)乙氧基]乙基}、2'-O-[2-(甲基胺基)-2-側氧乙基]、2'-Se-甲基等，進而較佳為2'-O-甲基、2'-O-乙基、2'-氟等，最佳為2'-O-甲基及2'-O-乙基。

又，糖部修飾核苷酸中之修飾基亦可根據其大小而定義較佳之範圍，較佳為根據氟之大小而相當於-O-丁基之大小者，更佳為根據-O-甲基之大小而相當於-O-乙基之大小者。

作為糖部修飾核苷酸中之修飾基中之烷基，可列舉碳數1~6之烷基，例如為甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、戊基、異戊基、新戊基、己基等碳數1~6之烷基。

作為糖部修飾核苷酸中之修飾基中之烯基，可列舉碳數3~6之烯基，例如可列舉烯丙基、1-丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基等。

作為糖部修飾核苷酸中之修飾基中之鹵素，例如可列舉氟原子、氯原子、溴原子、碘原子等。

作為胺基酸殘基中之胺基酸，例如可列舉：脂肪族胺基酸(具體而言，甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸等)、羥基胺基酸(具體而言，絲胺酸、蘇胺酸等)、酸性胺基酸(具體而言，天冬胺酸、麩胺酸等)、酸性胺基酸醯胺(具體而言，天冬醯胺、麩醯胺等)、

鹼性胺基酸(具體而言，離胺酸、羥基離胺酸、精胺酸、鳥胺酸等)、含硫胺基酸(具體而言，半胱胺酸、胱胺酸、甲硫胺酸等)、亞胺酸(具體而言，脯胺酸、4-羥基脯胺酸等)等。

作為糖部修飾核苷酸中之修飾基中之取代烷基及取代烯基中之取代基，例如可列舉：鹵素(與上述含義相同)、羥基、硫基、胺基、側氧基、-O-烷基(該-O-烷基之烷基部分與上述碳數1~6之烷基含義相同)、-S-烷基(該-S-烷基之烷基部分與上述碳數1~6之烷基含義相同)、-NH-烷基(該-NH-烷基之烷基部分與上述碳數1~6之烷基含義相同)、二烷基胺氧基(該二烷基胺氧基之2個烷基部分相同或不同，與上述碳數1~6之烷基含義相同)、二烷基胺基(該二烷基胺基之2個烷基部分相同或不同，與上述碳數1~6之烷基含義相同)、二烷基胺基烷氧基(該二烷基胺基烷氧基之2個烷基部分相同或不同，與上述碳數1~6之烷基含義相同，伸烷基部分係指自上述烷基去除1個氫原子而成者)等，取代數較佳為1~3。

作為磷酸二酯鍵修飾核苷酸，只要為相對於核苷酸之磷酸二酯鍵之化學結構之一部分或全部而經任意之取代基修飾或取代者、或經任意之原子取代者，則可為任何者，例如可列舉：將磷酸二酯鍵取代為硫代磷酸酯鍵之核苷酸、將磷酸二酯鍵取代為二硫代磷酸酯鍵之核苷酸、將磷酸二酯鍵取代為磷酸烷基酯鍵之核苷酸、將磷酸二酯鍵取代為亞磷醯胺鍵之核苷酸等。

作為鹼基修飾核苷酸，只要為相對於核苷酸之鹼基之化學結構之一部分或全部而經任意之取代基修飾或取代者或經任意之原子取代者，則可為任何者，例如可列舉：使鹼基內之氧原子經硫原子取代者、使氫原子經碳數1~6之烷基取代者、使甲基經氫原子或碳數2~6之烷基取代者、使胺基經碳數1~6之烷基、碳數1~6之烷醯基等保護基保護者等。

進而，作為核苷酸衍生物，亦可列舉於對核苷酸或糖部、磷酸二酯鍵或鹼基之至少一者進行修飾之核苷酸衍生物中加成脂質、磷脂質、啡咉、葉酸鹽、啡咉、蔥醌、吡咉、螢光素、玫瑰紅、香豆素、色素等其他化學物質而成者，具體而言，可列舉：經5'-聚胺加成之核苷酸衍生物、經膽固醇加成之核苷酸衍生物、經類固醇加成之核苷酸衍生物、經膽汁酸加成之核苷酸衍生物、經維生素加成之核苷酸衍生物、經綠色螢光色素(Cy3)加成之核苷酸衍生物、經紅色螢光色素(Cy5)加成之核苷酸衍生物、經螢光素(6-FAM)加成之核苷酸衍生物、及經生物素加成之核苷酸衍生物等。

又，於本發明中所使用之核酸中，核苷酸或核苷酸衍生物亦可與該核酸內之其他核苷酸或核苷酸衍生物形成伸烷基結構、肽結構、核苷酸結構、醚結構、酯結構及組合該等之至少一者之結構等交聯結構。

作為本發明中所使用之核酸，較佳為可列舉抑制標的基因之表現之核酸，更佳為可列舉：具有利用RNA干涉(RNAi)之標的基因之表現抑制作用的核酸。

作為本發明中之標的基因，只要為產生mRNA而進行表現之基因，則無特別限定，例如較佳為與腫瘤或炎症相關之基因，例如可列舉：編碼血管內皮增殖因子(vascular endothelial growth factor，以下簡稱為VEGF)、血管內皮增殖因子受體(vascular endothelial growth factor receptor，以下簡稱為VEGFR)、纖維母細胞增殖因子、纖維母細胞增殖因子受體、來自血小板之增殖因子、來自血小板之增殖因子受體、肝細胞增殖因子、肝細胞增殖因子受體、Kruppel樣因子(Kruppel-like factor，以下簡稱為KLF)、表現序列標籤(Ets)轉錄因子、核因子、低氧誘導因子、細胞週期相關因子、染色體複製相關因子、染色體修復相關因子、微小管相關因子、增殖訊號路徑相關因

子、增殖相關轉錄因子、細胞凋亡相關因子等蛋白質之基因等，具體而言，可列舉：VEGF基因、VEGFR基因、纖維母細胞增殖因子基因、纖維母細胞增殖因子受體基因、來自血小板之增殖因子基因、來自血小板之增殖因子受體基因、肝細胞增殖因子基因、肝細胞增殖因子受體基因、KLF基因、Ets轉錄因子基因、核因子基因、低氧誘導因子基因、細胞週期相關因子基因、染色體複製相關因子基因、染色體修復相關因子基因、微小管相關因子基因(例如CKAP5基因等)、增殖訊號路徑相關因子基因(例如KRAS基因等)、增殖相關轉錄因子基因、細胞凋亡相關因子(例如BCL-2基因等)等。

又，作為本發明中之標的基因，例如較佳為於肝臟、肺、腎臟或脾臟中表現之基因，更佳為於肝臟中表現之基因，例如可列舉：與上述腫瘤或炎症相關之基因、B型肝炎病毒基因組、C型肝炎病毒基因組、編碼載脂蛋白質(APO)、羥基甲基戊二醯(HMG)CoA還原酵素、Kexin 9型絲胺酸蛋白酶(PCSK9)、第12因子、胰高血糖素受體、糖皮質素受體、白三烯受體、凝血脂素A2受體、組織胺H1受體、碳酸脫水酵素、血管緊張素轉化酵素、腎素、p53、酪胺酸磷酸酯酶(PTP)、鈉依存性葡萄糖輸送載體、腫瘤壞死因子、介白素、鐵調素、轉甲狀腺素蛋白、抗凝血酶、蛋白質C、間質蛋白酶(例如TMPRSS6基因等)等蛋白質之基因等。

作為抑制標的基因之表現之核酸，例如只要為包含與編碼蛋白質等之基因(標的基因)的mRNA之一部分鹼基序列互補之鹼基序列且抑制標的基因之表現的核酸，例如可使用siRNA(short interference RNA，短干擾RNA)、miRNA(micro RNA，微RNA)等雙鏈核酸、shRNA(short hairpin RNA，短髮夾RNA)、反義核酸、核酶等單鏈核酸等中之任一核酸，較佳為雙鏈核酸。

將包含與標的基因之mRNA之一部分鹼基序列互補之鹼基序列的

核酸稱為反義鏈核酸，將包含與反義鏈核酸之鹼基序列互補之鹼基序列的核酸稱為義鏈核酸。義鏈核酸係指包含標的基因之一部分鹼基序列之核酸本身等與反義鏈核酸配對而形成雙重鏈形成部之核酸。

所謂雙鏈核酸係指兩條鏈配對而具有雙重鏈形成部之核酸。所謂雙重鏈形成部係指構成雙鏈核酸之核苷酸或其衍生物構成鹼基對而形成雙重鏈之部分。構成雙重鏈形成部之鹼基對通常為15～27個鹼基對，較佳為15～25個鹼基對，更佳為15～23個鹼基對，進而較佳為15～21個鹼基對，尤佳為15～19個鹼基對。

作為雙重鏈形成部之反義鏈核酸，例如可較佳地使用包含標的基因之mRNA之一部分序列的核酸、或該核酸中有1～3個鹼基、較佳為1～2個鹼基、更佳為1個鹼基經置換、缺失或附加且具有標的蛋白質之表現抑制活性之核酸。構成雙鏈核酸之單鏈之核酸通常包含15～30個鹼基(核苷)之類，較佳為15～29個鹼基，更佳為15～27個鹼基，進而較佳為15～25個鹼基，尤佳為17～23個鹼基，最佳為19～21個鹼基。

構成雙鏈核酸之反義鏈、義鏈之任一種或兩種核酸亦可於繼雙重鏈形成部後之3'側或5'側具有未形成雙重鏈的追加之核酸。該未形成雙重鏈之部分亦稱為突出部(懸突)。

作為具有突出部之雙鏈核酸，例如使用在至少一條鏈之3'末端或5'末端具有包含1～4個鹼基、通常1～3個鹼基之突出部者，可較佳地使用具有包含2個鹼基之突出部者，可更佳地使用具有包含dTdT或UU之突出部者。突出部可僅存在於反義鏈上，僅存在於義鏈上，及存在於反義鏈與義鏈兩者上，可較佳地使用於反義鏈與義鏈兩者上具有突出部之雙鏈核酸。

又，亦可使用繼雙重鏈形成部後一部分或全部與標的基因之mRNA之鹼基序列一致之序列、或繼雙重鏈形成部後一部分或全部與

標的基因之mRNA之互補鏈之鹼基序列一致之序列。進而，作為抑制標的基因之表現之核酸，例如亦可使用利用切丁酶等核糖核酸酶之作用而生成上述雙鏈核酸之核酸分子(國際公開第2005/089287號)、或不具有3'末端或5'末端之突出部的雙鏈核酸等。

又，於上述雙鏈核酸為siRNA之情形時，較佳為反義鏈係自5'末端側朝向3'末端側至少第1～17號鹼基(核苷)序列為與標的基因之mRNA之連續的17個鹼基序列互補之鹼基序列，更佳為該反義鏈係自5'末端側朝向3'末端側第1～19號鹼基序列為與標的基因之mRNA之連續的19個鹼基序列互補之鹼基序列，或者第1～21號鹼基序列為與標的基因之mRNA之連續的21個鹼基序列互補之鹼基序列，或者第1～25號鹼基之序列為與標的基因之mRNA之連續的25個鹼基序列互補之鹼基序列。

進而，於本發明中所使用之核酸為siRNA之情形時，較佳為該核酸中之糖之10～70%、更佳為15～60%、進而較佳為20～50%為於2'位經修飾基取代之核糖。所謂於本發明中之2'位上經修飾基取代之核糖係指將核糖之2'位羥基取代為修飾基者，核糖之2'位羥基與立體配置可相同，亦可不同，較佳為立體配置與核糖之2'位羥基相同。作為於2'位上經修飾基取代之核糖中之修飾基，可列舉糖部修飾核苷酸中的2'-修飾核苷酸中之修飾基之定義中所例示者及氫原子，較佳為2'-氰基、2'-鹵素、2'-O-氰基、2'-烷基、2'-取代烷基、2'-O-烷基、2'-O-取代烷基、2'-O-烯基、2'-O-取代烯基、2'-Se-烷基、2'-Se-取代烷基等，更佳為2'-氰基、2'-氟、2'-氯、2'-溴、2'-三氟甲基、2'-O-甲基、2'-O-乙基、2'-O-異丙基、2'-O-三氟甲基、2'-O-[2-(甲氧基)乙基]、2'-O-(3-胺基丙基)、2'-O-[2-(N,N-二甲基)胺氧基]乙基、2'-O-[3-(N,N-二甲胺基)丙基]、2'-O-{2-[2-(N,N-二甲胺基)乙氧基]乙基}、2'-O-[2-(甲胺基)-2-側氧乙基]、2'-Se-甲基、氫原子等，進而較佳為2'-O-甲基、2'-

O-乙基、2'-氟、氫原子等，最佳為2'-O-甲基及2'-O-氟。

本發明中所使用之核酸包含將核酸之結構中之磷酸部、酯部等中所含之氧原子等取代為例如硫原子等其他原子而成之衍生物。

又，鍵結於反義鏈及義鏈之5'末端之鹼基上的糖亦可分別藉由磷酸基或上述修飾基、或者利用生體內之核酸分解酶等轉化為磷酸基或上述修飾基之基而修飾5'位羥基。

又，鍵結於反義鏈及義鏈之3'末端之鹼基上的糖亦可分別藉由磷酸基或上述修飾基、或者利用生體內之核酸分解酶等轉化為磷酸基或上述修飾基之基而修飾3'位羥基。

作為單鏈之核酸，只要為具有包含例如標的基因之連續的15～27個鹼基(核苷)、較佳為15～25個鹼基、更佳為15～23個鹼基、進而較佳為15～21個鹼基、尤佳為15～19個鹼基之序列的互補序列之核酸、或於該核酸上使1～3個鹼基、較佳為1～2個鹼基、更佳為1個鹼基置換、缺失或附加且具有標的蛋白質之表現抑制活性之核酸，則可為任何者。該單鏈之核酸較佳為包含15～30個鹼基(核苷)之類，可較佳地使用更佳為15～27個鹼基、進而較佳為15～25個鹼基、尤佳為15～23個鹼基之單鏈核酸。

作為單鏈核酸，亦可使用使構成上述雙鏈核酸之反義鏈及義鏈經由間隔序列(間隔寡核苷酸)而連結者。作為間隔寡核苷酸，較佳為6～12個鹼基之單鏈核酸分子，其5'末端側之序列較佳為2個U。作為間隔寡核苷酸之例，可列舉包含UUCAAGAGA序列之核酸。以間隔寡核苷酸連結之反義鏈及義鏈之順序亦可任一者成為5'側。作為該單鏈核酸，較佳為藉由例如莖環結構而具有雙重鏈形成部之shRNA等單鏈核酸。shRNA等單鏈核酸通常為50～70個鹼基長。

根據核糖核酸酶等之作用，亦可使用以生成上述單鏈核酸或雙鏈核酸之方式設計之70個鹼基長以下、較佳為50個鹼基長以下、進而

較佳為30個鹼基長以下之核酸。

再者，本發明中所使用之核酸亦可使用已知之RNA或DNA合成法及RNA或DNA修飾法進行製造。

本發明之組合物為含有本發明之陽離子性脂質及核酸之組合物，例如可列舉：含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體或於本發明之陽離子性脂質中組合中性脂質及/或高分子者與核酸之複合體的組合物、含有該複合體及封入該複合體之脂質膜之組合物等。該脂質膜可為脂質單重膜(脂質1分子膜)，亦可為脂質雙重膜(脂質2分子膜)。再者，於該脂質膜中，亦可含有本發明之陽離子性脂質、中性脂質及/或高分子。又，於該複合體及/或該脂質膜中，亦可含有除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質。

又，作為本發明之組合物，例如亦可列舉：含有除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質與核酸之複合體或於除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質中組合中性脂質及/或高分子者與核酸之複合體以及封入該複合體之脂質膜，並於該脂質膜中含有本發明之陽離子性脂質的組合物等。該情形時之脂質膜可為脂質單重膜(脂質1分子膜)，亦可為脂質雙重膜(脂質2分子膜)。又，於該脂質膜中，亦可含有除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質、中性脂質及/或高分子。

於本發明之組合物中，更佳為含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體的組合物、含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體及封入該複合體之脂質膜並於該脂質膜中含有本發明之陽離子性脂質的組合物、以及含有除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質與核酸之複合體及封入該複合體之脂質膜並於該脂質膜中含有本發明之陽離子性脂質的組合物，進而較佳為含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體的組合物、以及含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體

及封入該複合體之脂質膜並於該脂質膜中含有本發明之陽離子性脂質的組合物，最佳為含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體及封入該複合體之脂質膜並於該脂質膜中含有本發明之陽離子性脂質的組合物。再者，於任一情形時，均可於該脂質膜中含有中性脂質及/或高分子。又，於該複合體及/或該脂質膜中，亦可含有除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質。

作為複合體之形態，例如可列舉：核酸與包含脂質單重(一分子)層之膜(逆微胞)之複合體、核酸與脂質體之複合體、核酸與微胞之複合體等，較佳為可列舉：核酸與包含脂質單重層之膜之複合體或核酸與脂質體之複合體。

作為含有複合體及封入該複合體之脂質膜之組合物，例如可列舉：該複合體及以脂質雙重膜封入該複合體之脂質體等。

再者，於本發明之組合物中，亦可使用一種或複數種本發明之陽離子性脂質，又，於本發明之陽離子性脂質中，亦可混合除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質。

作為除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質，例如可列舉：日本專利特開昭61-161246號公報(美國專利5049386號說明書)中所揭示之N-[1-(2,3-二油氧基)丙基]-N,N,N-三甲基銨氯化物(DOTMA)、N-(2,3-二-(9-(Z)-十八碳烯醯氧基))-丙-1-基-N,N,N-三甲基銨氯化物(DOTAP)等、國際公開第91/16024號及國際公開第97/019675號中所揭示之N-[1-(2,3-二油氧基丙基)]-N,N-二甲基-N-羥基乙基溴化銨(DORIE)、2,3-二油氧基-N-[2-(精胺羧基醯胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙銨三氟乙酸(DOSPA)等、國際公開第2005/121348號中所揭示之DLinDMA等、國際公開第2009/086558號中所揭示之DLin-K-DMA、國際公開第2011/136368號中所揭示之(3R,4R)-3,4-雙((Z)-十六碳-9-烯氧基)-1-甲基吡咯啉、N-甲基-N,N-雙(2-((Z)-十八碳-6-烯氧基)乙基)

胺等，較佳為可列舉：DOTMA、DOTAP、DORIE、DOSPA、1,2-二亞油烯基氧基-N,N-二甲胺基丙烷(DLinDMA)、2,2-二亞油烯基-4-二甲胺基甲基-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-K-DMA)等含有具有2個未經取代之烷基的三級胺部位或具有3個未經取代之烷基的四級銨部位之陽離子性脂質，更佳為可列舉具有該三級胺部位之陽離子性脂質。該三級胺部位及該四級銨部位之未經取代之烷基更佳為甲基。

再者，本發明之組合物可含有核酸，亦可含有化學上與核酸近似之化合物。

本發明之組合物可依據公知之製造方法而製造，亦可依據任一製造方法而製造。例如含有作為組合物之1種之脂質體的組合物之製造可使用公知之脂質體之製備方法。作為公知之脂質體之製備方法，例如可列舉：邦格漢姆(Bangham)等人之脂質體製備法[參照「分子生物學雜誌(J.Mol.Biol.)」,1965年,第13卷,p.238-252]、乙醇注入法[參照「細胞生物學雜誌(J.Cell Biol.)」,1975年,第66卷,p.621-634]、法式壓製法[參照「歐洲生物化學會聯盟(FEBS Lett.)」,1979年,第99卷,p.210-214]、凍結融解法[參照「生物化學與生物物理學集刊(Arch. Biochem. Biophys.)」,1981年,第212卷,p.186-194]、逆相蒸發法[參照「美國國家科學研究院學報(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)」,1978年,第75卷,p.4194-4198]或pH值勾配法(例如參照日本專利第2572554號公報、日本專利第2659136號公報等)等。作為於脂質體之製造時使脂質體分散之溶液，例如可使用水、酸、鹼、各種緩衝液、生理食鹽水或胺基酸輸液等。又，於脂質體之製造時，例如可添加檸檬酸、抗壞血酸、半胱胺酸或乙二胺四乙酸(EDTA)等抗氧化劑例如甘油、葡萄糖或氯化鈉等等張化劑等。又，例如亦可藉由如下方式製造脂質體：將本發明之陽離子性脂質、或本發明之陽離子性脂質與除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質的混合物等溶解於例如乙醇等有機溶劑中，餾

去溶劑後，添加生理食鹽水等並進行振盪攪拌而形成脂質體。

又，本發明之組合物例如可藉由如下方法製造：將本發明之陽離子性脂質或本發明之陽離子性脂質與除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質的混合物預先溶解於氯仿中，其此，添加核酸之水溶液及甲醇並混合而形成陽離子性脂質/核酸之複合體，進而，提取氯仿層並於其中添加聚乙二醇化磷脂質、中性脂質及水而形成油中水型(W/O)乳膠，利用逆相蒸發法進行處理而製造之方法(參照日本專利特表2002-508765號公報)；或者將核酸溶解於酸性電解質水溶液中，例如添加本發明之陽離子性脂質或本發明之陽離子性脂質與除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質的混合物(乙醇中)，將乙醇濃度提昇至20 v/v%而製備上述核酸內包脂質體，進行上漿過濾並利用透析去除過量之乙醇後，進而提昇試樣之pH值，進行透析而去除附著於組合物表面之核酸而製造之方法(參照日本專利特表2002-501511號公報及生物化學與生物物理學報(Biochimica et Biophysica Acta),2001年,第1510卷,p.152-166)等。

於本發明之組合物中，包含含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體或於本發明之陽離子性脂質中組合中性脂質及/或高分子者與核酸之複合體以及封入該複合體之脂質雙重膜的脂質體之組合物例如可藉由國際公開第02/28367號及國際公開第2006/080118號等中所記載之製造方法而製造。

又，於本發明之組合物中，例如含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體或於本發明之陽離子性脂質中組合中性脂質及/或高分子者與核酸之複合體及封入該複合體之脂質膜的組合物、含有除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質與核酸之複合體或於除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質中組合中性脂質及/或高分子者與核酸之複合體以及封入該複合體之脂質膜並於該脂質膜中含有本發

明之陽離子性脂質的組合物等可藉由如下方式獲得：根據國際公開第02/28367號及國際公開第2006/080118號等中所記載之製造方法而製造各複合體，於水或0～40%乙醇水溶液中不溶解該複合體而使其分散(A液)，另外，使各脂質膜成分溶解於例如乙醇水溶液中(B液)，將等量或體積比1：1～7：3之A液與B液混合，進而適當地添加水。再者，作為A液及B液中之陽離子性脂質，可使用一種或複數種本發明之陽離子性脂質或除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質，又，亦可組合本發明之陽離子性脂質與除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質而混合使用。

再者，於本發明中，含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體或於本發明之陽離子性脂質中組合中性脂質及/或高分子者與核酸之複合體以及封入該複合體之脂質膜的組合物、含有除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質與核酸之複合體或於除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質中組合中性脂質及/或高分子者與核酸之複合體以及封入該複合體之脂質膜並於該脂質膜中含有本發明之陽離子性脂質的組合物等之製造過程中及製造後，根據複合體中之核酸與脂質膜中之陽離子性脂質之靜電相互作用或複合體中之陽離子性脂質與脂質膜中之陽離子性脂質的融合，複合體及膜之結構變位者亦包含於如下組合物中：分別於含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體或於本發明之陽離子性脂質中組合中性脂質及/或高分子者與核酸之複合體以及封入該複合體之脂質膜的組合物、或含有除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質與核酸之複合體或於除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質中組合中性脂質及/或高分子者與核酸之複合體以及封入該複合體之脂質膜並於該脂質膜中含有本發明之陽離子性脂質的組合物等。

根據國際公開第02/28367號及國際公開第2006/080118號等中所

記載之製造方法而製造核酸(與上述含義相同)、較佳為雙鏈核酸與含有本發明之陽離子性脂質及/或除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質之脂質體的複合體，於水或0~40%乙醇水溶液中不溶解該複合體而使其分散(A液)，另外，使本發明之陽離子性脂質及/或除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質溶解於乙醇水溶液中(B液)，將等量或體積比1:1~7:3之A液與B液混合，或者，進而適當地添加水，藉此亦可獲得含有該核酸與該陽離子性脂質之組合物。該組合物較佳為含有陽離子性脂質與核酸之複合體及封入該複合體之脂質膜之組合物、或含有該核酸與包含含有該陽離子性脂質之脂質單重層的膜(逆微胞)之複合體及封入該複合體之脂質膜的組合物。該等情形時之脂質膜可為脂質單重膜(脂質1分子膜)，亦可為脂質雙重膜(脂質2分子膜)。

又，本揭示之該核酸與該脂質體之複合體中之脂質體較佳為預先將大小調節至平均粒徑10 nm~400 nm、更佳為20 nm~110 nm、進而較佳為30 nm~80 nm之脂質體。又，於該複合體及/或脂質膜中，亦可含有中性脂質及/或高分子。又，A液只要可形成脂質體與該核酸之複合體，則乙醇濃度亦可為20~70%。

又，代替將等量之A液與B液混合，亦可按照成為如下乙醇濃度之比率混合：該乙醇濃度係將A液與B液混合後複合體不溶解且B液中之陽離子性脂質不溶解。較佳為亦可代替按照成為複合體不溶解、B液中之陽離子性脂質不溶解且乙醇濃度為30~60%之乙醇水溶液的比將A液與B液混合，或者按照成為將A液與B液混合後複合體不溶解之乙醇濃度的比將A液與B液混合，進而添加水，藉此亦可設為B液中之陽離子性脂質變得不溶解之乙醇濃度。

本揭示之該A液中之核酸與脂質體之複合體係於將A液與B液混合，進而適當添加水後，形態變化為包含含有陽離子性脂質之脂質單

重層的膜(逆微胞)與核酸之複合體。含有本揭示之製造方法中所獲得之該核酸與該陽離子性脂質之組合物較佳為含有陽離子性脂質與核酸之複合體及封入該複合體之脂質膜的組合物，或者，為含有如下膜(逆微胞)與核酸之複合體及封入該複合體之脂質膜並於該脂質膜中含有陽離子性脂質的組合物，該膜(逆微胞)包含含有陽離子性脂質之脂質單重層，其製造性(產率及/或均勻性)優異。

於本發明之組合物中，複合體中之本發明之陽離子性脂質之分子總數較佳為相對於該核酸之磷原子之數而為0.5~4倍，更佳為1.5~3.5倍，進而較佳為2~3倍。又，該複合體中之本發明之陽離子性脂質及除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質之分子總數較佳為相對於該核酸之磷原子之數而為0.5~4倍，更佳為1.5~3.5倍，進而較佳為2~3倍。

於本發明之組合物中，含有複合體及封入該複合體之脂質膜之組合物中的本發明之陽離子性脂質之分子總數較佳為相對於該核酸之磷原子之數而為1~10倍，更佳為2.5~9倍，進而較佳為3.5~8倍。又，該組合物中之本發明之陽離子性脂質及除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質的分子總數較佳為相對於該核酸之磷原子數而為1~10倍，更佳為2.5~9倍，進而較佳為3.5~8倍。

作為中性脂質，亦可為單純脂質、複合脂質或誘導脂質者之任一者，例如可列舉：磷脂質、甘油糖脂質、抱合糖脂質、神經鞘胺醇或固醇等，但並不限定於該等。

於本發明之組合物中含有中性脂質之情形時，中性脂質之分子總數較佳為相對於本發明之陽離子性脂質及除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質的分子總數而為0.1~2倍，更佳為0.2~1.5倍，進而較佳為0.3~1.2倍。本發明之組合物均可使中性脂質包含於複合體中，亦可包含於封入複合體之脂質膜中，更佳為包含於至少封入複

合體之脂質膜，進而較佳為包含於複合體及封入該複合體之脂質膜之任一者中。

作為中性脂質中之磷脂質，例如可列舉：磷脂酰膽鹼(具體而言，大豆磷脂酰膽鹼、卵黃磷脂酰膽鹼(EPC)、二硬脂酰基磷脂酰膽鹼(DSPC)、二軟脂酰基磷脂酰膽鹼(DPPC)、棕櫚酰油酰磷脂酰膽鹼(POPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰膽鹼(DMPC)、二油酰基磷脂酰膽鹼(DOPC)等)、磷脂酰乙醇胺(具體而言，二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE)、二軟脂酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、16-0-單甲基PE、16-0-二甲基PE、18-1-反式PE、棕櫚酰油酰-磷脂酰乙醇胺(POPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)等)、甘油脂質(具體而言，磷脂酰絲胺酸、磷脂酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、棕櫚酰油酰磷脂酰甘油(POPG)、溶血磷脂酰膽鹼等)、鞘脂(具體而言，神經鞘磷脂、腦酰胺磷酸乙醇胺、腦酰胺磷酸甘油、腦酰胺磷酸甘油酸等)、甘油磷酸脂質、抱合糖磷酸脂質、天然卵磷脂(具體而言，卵黃卵磷脂、大豆卵磷脂等)或氫添加磷脂質(具體而言，氫添加大豆磷脂酰膽鹼等)等天然或合成之磷脂質。

作為中性脂質中之甘油糖脂質，例如可列舉：磺酰基核糖甘油酯、二葡萄糖基二甘油酯、二半乳糖基二甘油酯、半乳糖基二甘油酯或葡萄糖二甘油酯等。

作為中性脂質中之抱合糖脂質，例如可列舉：半乳糖基腦苷脂、乳糖基腦苷脂或神經節苷脂等。

作為中性脂質中之神經鞘胺醇，例如可列舉：鞘胺糖、二十鞘胺糖、抱合糖脂醇或該等之衍生物等。作為衍生物，例如可列舉：使鞘胺糖、二十鞘胺糖或抱合糖脂醇等之 $-NH_2$ 轉化為 $-NHCO(CH_2)_xCH_3$ (式中， x 為0~18之整數，其中，較佳為6、12或18)

者等。

作為中性脂質中之固醇，例如可列舉：膽固醇、二氫膽固醇、羊毛固醇、 β -穀固醇、菜油固醇、豆固醇、菜籽固醇、麥角固醇、海藻固醇或 3β -[N-(N',N'-二甲胺基乙基)胺甲醯基]膽固醇(DC-Chol)等。

作為高分子，例如可列舉：蛋白質、白蛋白、葡聚糖、(polyfect)、殼聚糖、葡聚糖硫酸、例如聚-L-離胺酸、聚伸乙基亞胺、聚天冬胺酸、苯乙烯順丁烯二酸共聚合物、異丙基丙烯醯胺-丙烯吡咯啉酮共聚合物、經聚乙二醇修飾之樹枝狀聚合物、聚乳酸、聚乳酸聚二醇酸或聚乙二醇化聚乳酸等高分子或包含該等之鹽的1種以上之微胞等。

此處，高分子之鹽例如包含金屬鹽、銨鹽、酸加成鹽、有機胺加成鹽、胺基酸加成鹽等。作為金屬鹽，例如可列舉：鋰鹽、鈉鹽、鉀鹽等鹼金屬鹽、鎂鹽、鈣鹽等鹼土類金屬鹽、鋁鹽或鋅鹽等。作為銨鹽，例如可列舉銨或四甲基銨等鹽。作為酸加成鹽，例如可列舉：鹽酸鹽、硫酸鹽、硝酸鹽或磷酸鹽等無機酸鹽、及乙酸鹽、順丁烯二酸鹽、反丁烯二酸鹽或檸檬酸鹽等有機酸鹽。作為有機胺加成鹽，例如可列舉嗎啉或哌啉等加成鹽。作為胺基酸加成鹽，例如可列舉：甘胺酸、苯丙胺酸、天冬胺酸、麩胺酸或離胺酸等加成鹽。

又，本發明之組合物均較佳為含有選自例如糖、肽、核酸及水溶性高分子中之1種以上之物質之脂質衍生物或脂肪酸衍生物或界面活性劑等，可包含於複合體中，亦可包含於封入複合體之脂質膜中，更佳為包含於複合體及封入該複合體之脂質膜之兩者中。

於本發明之組合物含有選自糖、肽、核酸及水溶性高分子中之1種以上之物質的脂質衍生物或脂肪酸衍生物之情形時，選自糖、肽、核酸及水溶性高分子中之1種以上之物質的脂質衍生物及脂肪酸衍生物之分子總數較佳為相對於本發明之陽離子性脂質及除本發明之陽離

子性脂質以外之陽離子性脂質的分子總數而為0.01～0.3倍，更佳為0.02～0.25倍，進而較佳為0.03～0.15倍。

作為選自糖、肽、核酸及水溶性高分子中之1種以上之物質的脂質衍生物或脂肪酸衍生物或界面活性劑，較佳為可列舉糖脂質或水溶性高分子之脂質衍生物或脂肪酸衍生物，更佳為可列舉水溶性高分子之脂質衍生物或脂肪酸衍生物。選自糖、肽、核酸及水溶性高分子中之1種以上之物質的脂質衍生物或脂肪酸衍生物或界面活性劑較佳為分子之一部分具有以例如疏水性親和力、靜電的相互作用等與組合物之其他構成成分鍵結之性質，其他部分具有以例如親水性親和力、靜電的相互作用等與組合物之製造時的溶劑鍵結之性質，具有兩面性之物質。

作為糖、肽或核酸之脂質衍生物或脂肪酸衍生物，例如可列舉：蔗糖、山梨糖醇、乳糖等糖、例如來自酪蛋白之肽、來自卵白之肽、來自大豆之肽、麩胱甘肽等肽、或例如DNA、RNA、質體、siRNA、ODN等核酸與上述組合物之定義中所列舉之中性脂質或本發明之陽離子性脂質或例如硬脂酸、棕櫚酸、肉豆蔻酸、月桂酸等脂肪酸鍵結而成者等。

又，作為糖之脂質衍生物或脂肪酸衍生物，例如亦包含上述組合物之定義中所列舉之甘油糖脂質或抱合糖脂質等。

作為水溶性高分子之脂質衍生物或脂肪酸衍生物，例如可列舉：聚乙二醇、聚甘油、聚伸乙基亞胺、聚乙烯醇、聚丙烯酸、聚丙烯醯胺、寡糖、糊精、水溶性纖維素、葡聚糖、軟骨素硫酸、聚甘油、殼聚糖、聚乙烯吡咯啉酮、聚天冬胺酸醯胺、聚-L-離胺酸、甘露聚醣、支鏈澱粉、寡甘油等或該等之衍生物與上述組合物之定義中所列舉之中性脂質或本發明之陽離子性脂質、或例如硬脂酸、棕櫚酸、肉豆蔻酸或月桂酸等脂肪酸鍵結而成者、該等之鹽等，更佳為可

列舉聚乙二醇或聚甘油等脂質衍生物或脂肪酸衍生物及該等之鹽，進而較佳為可列舉聚乙二醇之脂質衍生物或脂肪酸衍生物及該等之鹽。

作為聚乙二醇之脂質衍生物或脂肪酸衍生物，例如可列舉：聚乙二醇化脂質[具體而言，聚乙二醇-磷脂醯乙醇胺(更具體而言，1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](PEG-DSPE)、1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](PEG-DMPE)等)、聚氧乙烯硬化蓖麻油60、聚氧乙烯蓖麻油(CREMOPHOR EL)等]、聚乙二醇山梨醇酐脂肪酸酯類(具體而言，聚氧乙烯山梨醇酐單油酸酯等)或聚乙二醇脂肪酸酯類等，更佳為可列舉聚乙二醇化脂質。

作為聚甘油之脂質衍生物或脂肪酸衍生物，例如可列舉聚甘油化脂質(具體而言，聚甘油-磷脂醯乙醇胺等)或聚甘油脂肪酸酯類等，更佳為可列舉聚甘油化脂質。

作為界面活性劑，例如可列舉：聚氧乙烯山梨醇酐單油酸酯(具體而言，聚山梨醇酯80等)、聚氧乙烯聚氧丙烯二醇(具體而言，普朗尼克F68等)、山梨醇酐脂肪酸酯(具體而言，山梨醇酐單月桂酸酯、山梨醇酐單油酸酯等)、聚氧乙烯衍生物(具體而言，聚氧乙烯硬化蓖麻油60、聚氧乙烯月桂基醇等)、甘油脂肪酸酯或聚乙二醇烷基醚等，較佳為可列舉聚氧乙烯聚氧丙烯二醇、甘油脂肪酸酯或聚乙二醇烷基醚等。

又，對於本發明之組合物中之複合體及脂質膜，亦可任意地進行利用例如水溶性高分子等之表面改質[參照D.D.Lasic、F.Martin編，「隱形脂質體(Stealth Liposomes)」(美國)，CRC Press Inc，1995年，p.93-102]。作為可用於表面改質之水溶性高分子，例如可列舉：聚乙二醇、聚甘油、聚伸乙基亞胺、聚乙烯醇、聚丙烯酸、聚丙烯醯胺、寡糖、糊精、水溶性纖維素、葡聚糖、軟骨素硫酸、聚甘油、殼聚

糖、聚乙烯吡咯啉酮、聚天冬胺酸鹽胺、聚-L-離胺酸、甘露聚醣、支鏈澱粉、寡甘油等，較佳為可列舉：葡聚糖、支鏈澱粉、甘露聚醣、支鏈澱粉或羥乙基澱粉等。又，表面改質可使用選自糖、肽、核酸及水溶性高分子中之1種以上之物質之脂質衍生物或脂肪酸衍生物(與上述含義相同)等。該表面改質係於本發明之組合物中之複合體及脂質膜中含有選自糖、肽、核酸及水溶性高分子中之1種以上之物質的脂質衍生物或脂肪酸衍生物或界面活性劑之方法之一。

又，藉由使標的化配位體共價鍵結於本發明之組合物之脂質成分之極性頭部殘基上，亦可任意直接鍵結於本發明之組合物之表面(參照國際公開第2006/116107號)。

本發明之組合物中之複合體或封入複合體之脂質膜之平均粒徑可視需要自由地選擇，較佳為設為下述平均粒徑。作為調節平均粒徑之方法，例如可列舉：擠出法、對較大之多重膜脂質體(MLV)等進行機械粉碎(具體而言，使用Manton Gaulin、微噴均質機等)之方法[R.H.Muller、S.Benita、B.Bohm)編著，「Emulsion and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs」，德國司徒加科學出版社(參照Scientific Publishers Stuttgart)，1998年，p.267-294]等。

本發明之組合物中之複合體之大小較佳為平均粒徑為約5nm～200 nm，更佳為約20 nm～150 nm，進而較佳為約30 nm～100 nm。

本發明之組合物(封入複合體之脂質膜)之大小較佳為平均粒徑約10 nm～300 nm，更佳為約30 nm～200 nm，進而較佳為約50 nm～150 nm。

本發明之組合物中之複合體或封入複合體之脂質膜之平均粒徑例如可藉由動態光散射法而進行測定。

藉由將本發明之組合物導入至哺乳動物之細胞中，可將本發明

之組合物中之核酸導入至細胞內。

體內之本發明之組合物向哺乳動物之細胞中之導入只要根據可於體內進行之公知之轉染之工序進行即可。例如藉由將本發明之組合物靜脈內投予至包含人之哺乳動物中，可向例如產生腫瘤或炎症之臟器或部位傳遞並將本發明之組合物中之核酸導入至傳遞臟器或部位之細胞內。作為產生腫瘤或炎症之臟器或部位，並無特別限定，例如可列舉：胃、大腸、肝臟、肺、脾臟、胰臟、腎臟、膀胱、皮膚、血管、眼球等。又，藉由將本發明之組合物靜脈內投予至包含人之哺乳動物，可傳遞至例如肝臟、肺、脾臟及/或腎臟並將本發明之組合物中之核酸導入至傳遞臟器或部位之細胞內。肝臟、肺、脾臟及/或腎臟之細胞可為正常細胞、與腫瘤或炎症相關之細胞或與其他疾病相關之細胞之任一者。

若本發明之組合物中之核酸為具有利用RNA干涉(RNAi)之標的基因之表現抑制作用的核酸，則可於體內將抑制標的基因之表現之該核酸等導入至哺乳動物之細胞內，可抑制標的基因之表現。投予對象較佳為人。

又，若本發明中之標的基因為於例如肝臟、肺、腎臟或脾臟中表現之基因、較佳為於肝臟中表現之基因，則可使用本發明之組合物作為與肝臟、肺、腎臟或脾臟相關之疾病之治療劑或預防劑、較佳為與肝臟相關之疾病之治療劑或預防劑。即，本發明亦提供將上述說明之本發明之組合物投予至哺乳動物的與肝臟、肺、腎臟或脾臟相關之疾病之治療方法。投予對象較佳為人，更佳為罹患與肝臟、肺、腎臟或脾臟相關之疾病的人。

又，本發明之組合物亦可用作於與肝臟、肺、腎臟或脾臟相關之疾病之治療劑或預防劑的體內之藥效評價模型中檢測抑制標的基因之有效性之工具。

本發明之組合物亦可用作以例如血液成分等生體成分(例如血液、消化管等)中之上述核酸之穩定化、副作用之降低或包含標的基因之表現部位的組織或臟器中之藥劑集積性之增大等作為目標之製劑。

於將本發明之組合物用作與醫藥品之肝臟、肺、腎臟或脾臟相關之疾病等之治療劑或預防劑之情形時，作為投予路徑，較理想為使用治療時最有效之投予路徑，例如可列舉口腔內、氣道內、直腸內、皮下、肌肉內或靜脈內等非經口投予或經口投予，較佳為可列舉靜脈內投予或肌肉內投予，更佳為可列舉靜脈內投予。

投予量根據投予對象之症狀或年齡、投予路徑等而不同，例如只要以換算成核酸之1日投予量成為約0.1 μg ~1000 mg之方式投予即可。

作為適合於靜脈內投予或肌肉內投予之製劑，例如可列舉注射劑，亦可將由上述方法所製備之組合物之分散液直接用作例如注射劑等形態，亦可藉由例如過濾、離心分離等自該分散液去除溶劑而使用，亦可對該分散液進行凍結乾燥而使用、及/或對添加有例如甘露醇、乳糖、海藻糖、麥芽糖或甘胺酸等賦形劑之分散液進行凍結乾燥而使用。

於為注射劑之情形時，較佳為於對上述組合物之分散液或上述溶劑進行去除或凍結乾燥之組合物中混合例如水、酸、鹼、各種緩衝液、生理食鹽水或胺基酸輸液等而製備注射劑。又，例如亦可添加檸檬酸、抗壞血酸、半胱胺酸或EDTA等抗氧化劑或甘油、葡萄糖或氯化鈉等等張化劑等而製備注射劑。又，例如亦可添加甘油等凍結保存劑而進行凍結保存。

其次，根據實施例、參考例及試驗例而具體地說明本發明。其中，本發明並不限定於該等實施例、參考例及試驗例。

再者，實施例及參考例中所示之質子核磁共振光譜(^1H NMR)係於270 MHz、300 MHz、400 MHz或500 MHz下所測得者，根據化合物及測定條件，有時無法明顯地觀測到交換性質子。再者，作為訊號之多重度之表記，使用通常使用者。

參考例1

2,2-雙[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基]丙烷-1,3-二醇(化合物IIc-1)

使丙二酸二甲酯(東京化成工業公司製造，0.50 g，3.78 mmol)溶解於四氫呋喃(20 mL)中，添加(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基甲磺酸酯(Nu-Chek Prep, Inc公司製造，3.26 g，9.46 mmol)、氫化鈉(Nacalai Tesque公司製造，油性60%，0.454 g，11.4 mmol)及碘化四丁基銨(和光純藥工業公司製造，0.280 g，0.757 mmol)並於70°C下攪拌3小時。於反應混合物中添加飽和氯化銨水溶液並利用庚烷對水層進行萃取。使用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後過濾並減壓濃縮。藉由利用短管柱使所獲得之殘渣純化而獲得2,2-雙[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基]丙二酸二甲酯之粗產物。

使所獲得之粗產物溶解於四氫呋喃(4 mL)中，於冰浴冷卻下添加氫化鋁鋰(東京化成工業公司製造，0.826 g，21.8 mmol)並攪拌1小時。於反應混合物中依序添加水(0.75 mL)、15%氫氧化鈉水溶液(0.75 mL)、水(2.25 mL)並停止反應。藉由對所產生之不溶物進行過濾而去除。對濾液進行減壓濃縮，利用矽膠管柱層析法(庚烷/乙酸乙酯=80/20)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得化合物IIc-1(1.51 g，產率70%)。

ESI-MS m/z : 573($M + H$) $^+$

[實施例1]

1-甲基-3,3-雙[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基]吡啶(化合物1)

步驟1

使參考例1中所獲得之化合物IIc-1(1.00 g, 1.75 mmol)溶解於二氯甲烷(5 mL)中，添加吡啶(和光純藥工業公司製造，1.41 mL, 17.5 mmol)及二甲胺基吡啶(Nacalai Tesque公司製造，0.0210 g, 0.175 mmol)。於冰浴冷卻下添加三氟甲磺酸酐(Nacalai Tesque公司製造，0.855 mL, 5.24 mmol)並攪拌1小時。於反應混合物中添加水並利用庚烷進行3次萃取。利用氯化銨水溶液、飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥並過濾。對濾液進行減壓濃縮，藉此獲得2,2-雙[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基]丙烷-1,3-二基雙(三氟甲磺酸酯)之粗產物(1.50 g, 產率100%)。

步驟2

使步驟1中所獲得之粗產物(0.500 g, 0.597 mmol)溶解於N,N-二甲基乙醯胺(3 mL)中，添加甲胺(東京化成工業公司製造，約9.8 mol/L 甲醇溶液，3.05 mmol, 29.9 mmol)並於油浴中在60℃下攪拌1小時。冷卻至室溫後，於反應混合物中添加水並利用己烷進行萃取。使用無水硫酸鎂對有機層進行乾燥並過濾。對濾液進行減壓濃縮，利用矽膠管柱層析法(NH矽膠、己烷/乙酸乙酯=100/0~70/30)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得化合物1(0.32 g, 產率94%)。

ESI-MS m/z : 568($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.89(6H, t, $J = 6.8$ Hz), 1.12-1.38(36H, m), 1.48-1.55(4H, m), 2.05(8H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.30(3H, s), 2.78(4H, t, $J = 6.8$ Hz), 2.93(4H, s), 5.29-5.43(8H, m).

[實施例2]

3,3-雙[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基]-1-丙基吡啶(化合物2)

步驟1

使參考例1中所獲得之化合物IIc-1(3.50 g, 6.11 mmol)溶解於二氯甲烷(15 mL)中，於冰浴冷卻下添加三乙胺(和光純藥工業公司製造，2.55 mL, 18.3 mmol)及甲磺醯氯(東京化成工業公司製造，1.12

mL, 15.3 mmol)並攪拌1小時。於反應混合物中添加水並利用庚烷進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥並過濾。對濾液進行減壓濃縮，利用矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇=100/0~97/3)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得2,2-雙[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基]丙烷-1,3-二基二甲磺酸酯(3.30 g, 產率74%)。

步驟2

使步驟1中所獲得之2,2-雙[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基]丙烷-1,3-二基二甲磺酸酯(0.200 g, 0.274 mmol)溶解於N,N-二甲基乙醯胺(0.5 mL)中，添加丙基胺(0.451 mL, 5.49 mmol)並利用微波反應裝置於130℃下攪拌6小時。於反應混合物中添加水並利用庚烷進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥並過濾。對濾液進行減壓濃縮，利用矽膠管柱層析法(NH矽膠、庚烷/乙酸乙酯=100/0~80/20)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得化合物2(14.8 mg, 產率9%)。

ESI-MS m/z : 597($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.84-0.92(9H, m), 1.11-1.41(38H, m), 1.49-1.56(4H, m), 2.05(8H, q, $J = 6.6$ Hz), 2.36(2H, t, $J = 7.7$ Hz), 2.77(4H, t, $J = 5.9$ Hz), 2.90(4H, s), 5.27-5.45(8H, m).

[實施例3]

3,3-雙[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基]吡啶(化合物3)

於與實施例1相同之方法中，代替甲胺而使用鉍(西格瑪奧德里奇(Sigma-Aldrich)公司製造，約7 mol/L 甲醇溶液，4.27 mL, 29.9 mmol)，獲得化合物3(0.0750 g, 產率23%)。

ESI-MS m/z : 554($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.89(6H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.12-1.38(36H, m), 1.53-1.58(4H, m), 2.05(8H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.78(4H, t, $J = 6.8$ Hz), 3.28(4H, s), 5.31-5.41(8H, m).

[實施例4]

3-(二甲氨基)丙基3,3-雙[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基]吡啶-1-羧酸酯(化合物4)

使實施例3中所獲得之化合物3溶解於乙腈(2 mL)中，藉由依據「美國化學會志(J.Am.Chem.Soc.)」,1981年,第103卷,p.4194-4199中所記載之方法的方法而合成之3-(二甲氨基)丙基-4-硝基苯碳酸酯鹽酸鹽(化合物VII-1)(0.0620 g, 0.203 mmol)及三乙胺(0.0570 mL, 0.406 mmol)，於80℃下攪拌2小時。利用乙酸乙酯對反應混合物進行稀釋並用水洗淨。使用無水硫酸鎂對有機層進行乾燥後，進行過濾並減壓濃縮。利用矽膠管柱層析法(NH矽膠、己烷/乙酸乙酯=80/20)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得化合物4(0.0580 g，產率63%)。

ESI-MS m/z : 683($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.89(6H, t, $J = 6.8$ Hz), 1.13-1.22(4H, m), 1.25-1.39(32H, m), 1.49-1.55(4H, m), 1.73-1.81(2H, m), 2.05(8H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.22(6H, s), 2.33(2H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.77(4H, t, $J = 6.8$ Hz), 3.58(4H, s), 4.08(2H, t, $J = 6.5$ Hz), 5.29-5.42(8H, m).

參考例2

2,2-雙[(Z)-十八碳-9-烯-1-基]丙烷-1,3-二醇(化合物IIc-2)

於與參考例1相同之方法中，代替(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基甲磺酸酯而使用(Z)-十八碳-9-烯-1-基甲磺酸酯(Nu-Chek Prep, Inc公司製造，4.50 g, 13.0 mmol)，獲得化合物IIc-2(1.06 g，產率35%)。

ESI-MS m/z : 577($M + H$)⁺

[實施例5]

1-甲基-3,3-雙[(Z)-十八碳-9-烯-1-基]吡啶(化合物5)

於與實施例1相同之方法中，代替參考例1中所獲得之化合物IIc-1而使用參考例2中所獲得之化合物IIc-2(0.300 g, 0.520 mmol)，獲得化合物5(0.272 g，產率92%)。

ESI-MS m/z : 572($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.88(6H, t, $J = 6.8$ Hz), 1.14-1.35(48H, m), 1.50-1.53(4H, m), 2.02(8H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.31(3H, s), 2.94(4H, s), 5.31-5.39(4H, m).

參考例3

2,2-雙[(Z)-十六碳-9-烯-1-基]丙烷-1,3-二醇(化合物IIc-3)

於與參考例1相同之方法中，代替(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基甲磺酸酯而使用(Z)-十六碳-9-烯-1-基甲磺酸酯(Nu-Chek Prep, Inc公司製造，5.00 g，15.7 mmol)，獲得化合物IIc-3(2.07 g，產率59%)。

ESI-MS m/z : 521($M + H$)⁺

[實施例6]

3,3-雙[(Z)-十六碳-9-烯-1-基]-1-甲基吡啶(化合物6)

於與實施例1相同之方法中，代替參考例1中所獲得之化合物IIc-1而使用參考例3中所獲得之化合物IIc-3(0.300 g，0.576 mmol)，獲得化合物6(0.263 g，產率89%)。

ESI-MS m/z : 516($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.89(6H, t, $J = 6.8$ Hz), 1.14-1.35(40H, m), 1.50-1.53(4H, m), 2.02(8H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.31(3H, s), 2.94(4H, s), 5.31-5.39(4H, m).

參考例4

2,2-雙[(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯-1-基]丙烷-1,3-二醇(化合物IIc-4)

於與參考例1相同之方法中，代替(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基甲磺酸酯而使用(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯-1-基甲磺酸酯(Nu-Chek Prep, Inc公司製造，5.00 g，13.4 mmol)，獲得化合物IIc-4(2.07 g，產率59%)。

ESI-MS m/z : 629($M + H$)⁺

[實施例7]

3,3-雙[(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯-1-基]-1-甲基吡丁啉(化合物7)

於與實施例1相同之方法中，代替參考例1中所獲得之化合物IIc-1而使用參考例4中所獲得之化合物IIc-4(0.300 g、0.477 mmol)，獲得化合物7(0.256 g、產率86%)。

ESI-MS m/z : 624($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.89(6H, t, $J = 6.4$ Hz), 1.16-1.37(44H, m), 1.50-1.54(4H, m), 2.05(8H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.31(3H, s), 2.78(4H, t, $J = 6.4$ Hz), 2.94(4H, s), 5.30-5.42(8H, m).

[實施例8]

3-(3,3-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)吡丁啉-1-基)丙烷-1-醇(化合物8)

於與實施例1相同之方法中，代替甲胺而使用3-胺基丙烷-1-醇(東京化成工業公司製造，0.468 mL，6.16 mmol)，獲得化合物8(0.237 g，產率63%)。

ESI-MS m/z : 613($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.89(6H, t, $J = 6.8$ Hz), 1.13-1.39(40H, m), 1.50-1.56(2H, m), 2.05(8H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.69(2H, t, $J = 5.4$ Hz), 2.77(4H, t, $J = 6.3$ Hz), 2.93(4H, s), 3.75(2H, t, $J = 5.4$ Hz), 5.27-5.44(8H, m).

[實施例9]

2-(3,3-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)吡丁啉-1-基)乙烷-1-醇(化合物9)

於與實施例2相同之方法中，代替甲胺而使用2-胺基乙醇(東京化成工業公司製造，0.800 g，13.1 mmol)，獲得化合物9(0.012 g，產率13%)。

ESI-MS m/z : 598($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.89(6H, t, $J = 6.8$ Hz), 1.14-1.42(40H, m), 2.05(8H, q, $J = 6.5$ Hz), 2.59(2H, t, $J = 5.3$ Hz),

2.77(4H, t, $J = 5.9$ Hz), 2.96(4H, s), 3.48(2H, t, $J = 5.3$ Hz), 5.28-5.44(8H, m).

參考例5

2-癸基-2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)丙烷-1,3-二醇(化合物 IIc-5)

步驟1

使丙二酸二甲酯(0.400 g, 3.03 mmol)溶解於乙腈(10 mL)中，添加(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基甲磺酸酯(1.25 g, 3.63 mmol)、碳酸鉍(和光純藥工業公司製造，1.97 g, 6.06 mmol)及碘化四丁基銨(1.34 g, 3.63 mmol)並於60°C下攪拌1小時。於反應混合物中添加水並利用己烷對水層進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後，進行過濾並減壓濃縮。利用管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=90/10)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得二甲基2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)丙二酸酯(0.800 g, 產率69%)。

ESI-MS m/z : 381($M + H$)⁺;

步驟2

使步驟1中所獲得之二甲基2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)丙二酸酯(0.400 g, 1.05 mmol)溶解於四氫呋喃(2 mL)中，添加1-溴癸烷(東京化成工業公司製造，0.326 g, 1.58 mmol)、氫化鈉(油性60%，0.063 g, 1.58 mmol)及碘化四丁基銨(0.280 g, 0.757 mmol)並於70°C下攪拌3小時。於反應混合物中添加水並利用己烷對水層進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後進行過濾。對濾液進行減壓濃縮，藉此獲得二甲基2-癸基-2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)丙二酸酯之粗產物。

使所獲得之粗產物溶解於四氫呋喃(3 mL)中，於冰浴冷卻下添加氫化鋁鋰(0.122 g, 3.23 mmol)並攪拌1小時。於反應混合物中依序添

加水(0.1 mL)、15%氫氧化鈉水溶液(0.1 mL)、水(0.3 mL)並停止反應。藉由對所產生之不溶物進行過濾而去除。對濾液進行減壓濃縮，利用矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=90/10~50/50)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得化合物IIc-5(0.265 g，產率53%)。

ESI-MS m/z : 465($M + H$)⁺

[實施例10]

3-癸基-1-甲基-3-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)吡啶(化合物10)

於與實施例1相同之方法中，代替參考例1中所獲得之化合物IIc-1而使用參考例5中所獲得之化合物IIc-5(0.265 g，0.570 mmol)，獲得化合物10(0.206 g，產率79%)。

ESI-MS m/z : 460($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.84-0.93(6H, m), 1.11-1.40(34, m), 1.50-1.55(4H, m), 2.05(4H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.30(3H, s), 2.77(2H, t, $J = 6.5$ Hz), 2.93(4H, s), 5.29-5.43(4H, m).

[實施例11]

3-(3,3-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)吡啶-1-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(化合物11)

於與實施例1相同之方法中，代替甲胺而使用N,N-二甲基-1,3-丙二胺(東京化成工業公司製造，0.427 mL，4.18 mmol)，獲得化合物11(0.091 g，產率34%)。

ESI-MS m/z : 639($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.86(6H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.08-1.18(4H, m), 1.21-1.38(32H, m), 1.56-1.60(4H, m), 1.61-1.69(2H, m), 2.01(8H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.21(6H, s), 2.31(2H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.65-2.72(2H, m), 2.75(4H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.20(4H, s), 5.25-5.40(8H, m).

[實施例12]

2-(3,3-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)吡啶-1-基)-N,N-二甲基乙烷-1-胺(化合物12)

於與實施例1相同之方法中，代替甲胺而使用N,N-二甲基乙二胺(東京化成工業公司製造，0.709 mL，6.51 mmol)，獲得化合物12(0.312 g，產率77%)。

ESI-MS m/z : 625($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.89(6H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.11-1.20(4H, m), 1.23-1.39(32H, m), 1.49-1.55(4H, m), 2.05(8H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.21(6H, s), 2.22-2.26(2H, m), 2.52-2.58(2H, m), 2.77(4H, t, $J = 6.7$ Hz), 2.93(4H, s), 5.28-5.43(8H, m).

參考例6

2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-2-十八烷基丙烷-1,3-二醇(化合物IIc-6)

於與參考例5相同之方法中，代替1-溴癸烷而使用1-溴十八烷(東京化成工業公司製造，0.394 g，1.18 mmol)，獲得化合物IIc-6(0.186 g，整體產率28%)。

ESI-MS m/z : 577($M + H$)⁺

[實施例13]

1-甲基-3-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-3-十八烷基吡啶(化合物13)

於與實施例1相同之方法中，代替參考例1中所獲得之化合物IIc-1而使用參考例6中所獲得之化合物IIc-6(0.186 g，0.322 mmol)，獲得化合物13(0.030 g，產率16%)。

ESI-MS m/z : 572($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.84-0.90(6H, m), 1.10-1.22(4H, m), 1.23-1.38(46H, m), 1.56-1.62(4H, m), 2.04(4H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.51(3H, s), 2.76(2H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.25(4H, s), 5.28-5.42(4H, m).

參考例7

1-((2-硝基苯)磺醯基)-3,3-雙(2-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)乙基)吡啶(化合物XIIIIf-1)

步驟1

使由國際公開第2012/108397號中所記載之方法合成之2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基)乙醇(2.30 g, 7.41 mmol)溶解於二氯甲烷(20 mL)中，於冰浴冷卻下添加三乙胺(1.55 mL, 11.1 mmol)、2-硝基苯-1-磺醯氯(2.13 g, 9.63 mmol)並攪拌2小時。於反應混合物中添加水並利用乙酸乙酯對水層進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後，進行過濾並減壓濃縮。利用管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=90/10)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基)乙基2-硝基苯磺酸酯(1.93 g, 產率53%)。

ESI-MS m/z : 496($M + H$)⁺

步驟2

使步驟1中所獲得之2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基)乙基2-硝基苯磺酸酯(1.93g, 3.89 mmol)溶解於N,N-二甲基甲醯胺(8 mL)中，添加2-氰基乙酸乙酯(東京化成工業公司製造，0.189mL, 1.77 mmol)、碳酸銨(1.73 g, 5.30 mmol)並於100℃下攪拌1小時。於反應混合物中添加水並利用己烷對水層進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後進行過濾。對濾液進行減壓濃縮，藉此獲得乙基2-氰基-4-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)-2-(2-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)乙基)丁酸酯之粗產物。

使所獲得之粗產物溶解於四氫呋喃(8 mL)中，於冰浴冷卻下添加氫化鋁鋰(0.239g, 6.30 mmol)並於室溫下攪拌1小時。於反應混合物中依序添加水(0.24 mL)、15%氫氧化鈉水溶液(0.24 mL)、水(0.72 mL)並停止反應。藉由對所產生之不溶物進行過濾而去除。對濾液進

行減壓濃縮，利用矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=99/1~50/50)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得2-(胺基乙基)-4-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)-2-(2-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)乙基)丁烷-1-醇(0.350 g，產率34%)。

ESI-MS m/z : 660($M + H$)⁺

步驟3

使步驟2中所獲得之2-(胺基乙基)-4-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)-2-(2-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)乙基)丁烷-1-醇(0.53 g，0.803 mmol)溶解於二氯甲烷(4 mL)中，於冰浴冷卻下添加三乙胺(0.168 mL，1.20 mmol)、2-硝基苯-1-磺醯氯(0.231 g，1.04 mmol)並攪拌1小時。於反應混合物中添加水並利用己烷對水層進行萃取。利用水、飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後進行過濾。對濾液進行濃縮，藉此獲得N-(2-(羥基甲基)-4-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)-2-(2-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)乙基)丁基)-2-硝基苯磺醯胺之粗產物。

使所獲得之粗產物溶解於四氫呋喃(4 mL)中，添加三苯基膦(Nacalai Tesque公司製造，0.340 g，1.30 mmol)、偶氮二羧酸二異丙酯(東京化成工業公司製造，40%甲苯溶液，1.9 mol/L，0.682 mL，1.30 mmol)並於室溫下攪拌15分鐘。於反應混合物中添加水並利用己烷對水層進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後，進行過濾並減壓濃縮。利用矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=95/5~70/30)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得化合物XIIIIf-1(0.585 g，產率82%)。

ESI-MS m/z : 827($M + H$)⁺

[實施例14]

3,3-雙(2-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)乙基)吡啶(化

合物14)

使參考例7中所獲得之化合物XIIIIf-1(0.585 g, 0.707 mmol)溶解於乙腈(7 mL)中，添加1-十二烷硫醇(東京化成工業公司製造，0.412 mL, 1.77 mmol)、1,8-二氮雜雙環[5.4.0]-7-十一碳烯(Nacalai Tesque公司製造，0.246 mL, 1.77 mmol)並於70℃下攪拌1小時。於反應混合物中添加水並利用己烷對水層進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後，進行過濾並減壓濃縮。利用NH矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=99/1~30/70)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得化合物14(0.045 g, 產率10%)。

ESI-MS m/z : 642($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.89(6H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.24-1.39(32H, m), 1.50-1.57(4H, m), 1.91(4H, t, $J = 7.0$ Hz), 2.05(8H, q, $J = 6.9$ Hz), 2.77(4H, t, $J = 6.6$ Hz), 3.38(4H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.41(4H, s), 3.46(4H, t, $J = 7.0$ Hz), 5.28-5.44(8H, m).

[實施例15]

1-甲基-3,3-雙(2-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)乙基)吡啶(化合物15)

使實施例14中所獲得之化合物14(0.134 g, 0.209 mmol)溶解於1,2-二氯乙烷(1 mL)と甲醇(1 mL)中，添加甲醛(和光純藥工業公司製造，37%水溶液，0.076 mL, 1.04 mmol)、三乙醯氧基硼氫化鈉(東京化成工業公司製造，0.111 g, 0.522 mmol)並於室溫下攪拌一晚。於反應混合物中添加飽和碳酸氫鈉水溶液並利用氯仿對水層進行萃取。使用無水硫酸鎂對有機層進行乾燥後，進行過濾並減壓濃縮。利用NH矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=90/10)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得化合物15(0.088 g, 產率64%)。

ESI-MS m/z : 656($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.89(6H, t, $J = 6.8$ Hz), 1.24-1.40(32H, m), 1.49-1.57(4H, m), 1.87(4H, t, $J = 6.8$ Hz),

2.05(8H, q, $J = 6.9$ Hz), 2.30(3H, s), 2.77(4H, t, $J = 6.3$ Hz), 3.04(4H, s), 3.37(4H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.44(4H, t, $J = 7.0$ Hz), 5.28-5.44(8H, m).

參考例8

1-((2-硝基苯)磺醯基)-3,3-雙(3-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)丙基)吡啶(化合物XIII f-2)

步驟1

使(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基甲磺酸酯(10.0 g、29.0 mmol)溶解於1,4-二噁烷(20 mL)中，添加1,3-丙二醇(和光純藥工業公司製造，55.2 g，726 mmol)並於加熱回流下攪拌2天。於反應混合物中添加水並利用氯仿對水層進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後，進行過濾並減壓濃縮。利用矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=90/10)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得3-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基)丙基)-1-醇(4.96 g，產率53%)。

ESI-MS m/z : 324($M + H$)⁺;

步驟2

使步驟1中所獲得之3-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基)丙基)-1-醇(4.95 g，15.3 mmol)溶解於二氯甲烷(20 mL)中，於冰浴冷卻下添加三乙胺(4.25 mL，30.5 mmol)、甲磺醯氯(2.36 mL、30.5 mmol)並於0°C下攪拌2小時。於反應混合物中添加水並利用乙酸乙酯對水層進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後，進行過濾並減壓濃縮。利用矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=90/10)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得3-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基)丙基)甲磺酸酯(5.47 g，產率89%)。

ESI-MS m/z : 403($M + H$)⁺;

步驟3

於與參考例7之步驟2、步驟3相同之方法中，代替2-((9Z,12Z)-十

八碳-9,12-二烯-1-基氧基)乙基2-硝基苯磺酸酯而使用步驟2中所獲得之3-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基)丙基甲磺酸酯(1.57 g, 3.89 mmol), 獲得化合物XIIIIf-2(0.109 g, 整體產率7.6%)。

ESI-MS m/z : 855($M + H$)⁺;

[實施例16]

3,3-雙(3-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)丙基)吡啶(化合物16)

於與實施例14相同之方法中, 代替化合物XIIIIf-1而使用化合物XIIIIf-2(0.109 g, 0.135 mmol), 獲得化合物16(0.062 g, 產率69%)。

ESI-MS m/z : 670($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.89(6H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.22-1.40(32H, m), 1.44-1.67(12H, m), 2.05(8H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.77(4H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.31(4H, s), 3.39(8H, t, $J = 6.7$ Hz), 5.28-5.45(8H, m).

[實施例17]

1-甲基-3,3-雙(3-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)丙基)吡啶(化合物17)

於與實施例15相同之方法中, 代替化合物14而使用化合物16(0.062 g, 0.093 mmol), 獲得化合物17(0.056 g, 產率88%)。

ESI-MS m/z : 684($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.89(6H, t, $J = 6.8$ Hz), 1.23-1.40(32H, m), 1.42-1.62(12H, m), 2.05(8H, q, $J = 6.9$ Hz), 2.31(3H, s), 2.77(4H, t, $J = 6.7$ Hz), 2.96(4H, s), 3.35-3.43(8H, m), 5.25-5.47(8H, m).

[實施例18]

2-二甲基-3,3-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)吡啶(化合物18)
步驟1

使氰基乙酸乙酯(2.00 g, 17.7 mmol)溶解於乙腈(50 mL)中, 添加

(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基甲磺酸酯(13.4 g, 38.9 mmol)、碳酸鉀(17.3 g, 53.1 mmol)並於60°C下攪拌2小時。於反應混合物中添加水並利用己烷對水層進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後進行過濾，對濾液進行減壓濃縮，藉此獲得乙基(11Z,14Z)-2-氰基-2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十碳-11,14-二基酯之粗產物。

使所獲得之粗產物溶解於四氫呋喃(5 mL)中，於冰浴冷卻下添加氫化鋁鋰(2.49g, 65.6 mmol)並攪拌30分鐘。於反應混合物中依序添加水(2.5 mL)、15%氫氧化鈉水溶液(2.5 mL)、水(7.5 mL)並停止反應。藉由對所產生之不溶物進行過濾而去除。對濾液進行減壓濃縮，利用矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇=99/1~90/10)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得(11Z,14Z)-2-(胺基乙基)-2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十碳-11,14-二烯-1-醇(2.50 g, 產率25%)。

ESI-MS m/z : 572($M + H$)⁺

步驟2

使步驟1中所獲得之(11Z,14Z)-2-(胺基乙基)-2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十碳-11,14-二烯-1-醇(2.50 g, 4.37 mmol)溶解於四氫呋喃(20 mL)中，添加三乙胺(1.83 mL, 13.1 mmol)、二碳酸第三丁基(渡邊化學公司製造, 1.12 mL, 4.81 mmol)並於室溫下攪拌一整夜。於減壓下對反應混合物進行濃縮，利用矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=95/5)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得第三丁基((11Z,14Z)-2-(羥基甲基)-2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十碳-11,14-二烯-1-基)胺基甲酸酯(2.65 g, 產率90%)。

ESI-MS m/z : 672($M + H$)⁺

步驟3

使步驟2中所獲得之第三丁基((11Z,14Z)-2-(羥基甲基)-2-

((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十碳-11,14-二烯-1-基)胺基甲酸酯 (2.10 g, 3.12 mmol) 溶解於二氯甲烷(10 mL)中，於冰浴冷卻下添加 Dess-Martin 試劑(東京化成工業公司製造，1.72 g, 4.06 mmol)並於室溫下攪拌2小時。於反應混合物中添加水並利用己烷進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後，過濾並於減壓下進行濃縮。利用矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=100/0~80/20)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得第三丁基((11Z,14Z)-2-甲醯基-2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十碳-11,14-二烯-1-基)胺基甲酸酯 (2.00 g, 產率96%)。

ESI-MS m/z : 670($M + H$)⁺

步驟4

使步驟3中所獲得之第三丁基((11Z,14Z)-2-甲醯基-2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十碳-11,14-二烯-1-基)胺基甲酸酯(0.432 g, 0.645 mmol)溶解於四氫呋喃(2 mL)中，於冰浴冷卻下添加甲基溴化鎂(關東化學工業公司製造，mol/L, 0.258 mL, 0.774 mmol)。其後，冷卻至-50℃，添加甲基溴化鎂(3 mol/L, 0.150 mL, 0.451 mmol)並攪拌1小時。於反應混合物中添加飽和氯化銨水溶液並停止反應後，利用乙酸乙酯進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後，進行過濾並減壓濃縮。利用矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=95/5~50/50)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得第三丁基((11Z,14Z)-2-(1-羥基乙基)-2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十碳-11,14-二烯-1-基)胺基甲酸酯(0.200 g, 產率45%)。

ESI-MS m/z : 686($M + H$)⁺

步驟5

使步驟4中所獲得之第三丁基((11Z,14Z)-2-(1-羥基乙基)-2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十碳-11,14-二烯-1-基)胺基甲酸酯

(0.290 g, 0.423 mmol)溶解於二氯甲烷(2 mL)中，於冰浴冷卻下添加吡啶(0.171 mL, 2.11 mmol)、甲磺醯氯(0.049 mL, 0.634 mmol)並於0℃下攪拌30分鐘。進而，依序添加吡啶(0.171 mL, 2.11 mmol)、甲磺醯氯(0.098 mL, 1.27 mmol)並停止反應。於反應混合物中添加水並利用乙酸乙酯對水層進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後進行過濾。對所獲得之濾液進行減壓濃縮，藉此獲得(12Z,15Z)-3-(((第三丁氧基羰基)胺基)甲基)-3-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十一碳-12,15-二烯-2-基甲磺酸酯之粗產物。

使所獲得之粗產物溶解於N,N-二甲基甲醯胺(8 mL)中，於冰浴冷卻下添加氫化鈉(油性60%，8 mg, 0.335 mmol)。其後，於50℃下攪拌1小時並於室溫下攪拌一整夜。於反應混合物中添加飽和氯化銨水溶液並利用乙酸乙酯對水層進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後，進行過濾並減壓濃縮。利用矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=95/5~50/50)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得第三丁基2-甲基-3,3-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)吡啶-1-羧酸酯(0.070 g, 產率31%)。

ESI-MS m/z : 668(M + H)⁺

步驟6

使步驟5中所獲得之第三丁基2-甲基-3,3-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)吡啶-1-羧酸酯(0.090 g, 0.135 mmol)溶解於二氯甲烷(2 mL)中，於冰浴冷卻下添加三氟乙酸(0.500 mL, 6.49 mmol)並於0℃下攪拌30分鐘。於反應混合物中添加飽和碳酸氫鈉水溶液並利用氯仿進行萃取。使用無水硫酸鎂對有機層進行乾燥後，進行過濾並減壓濃縮。利用NH矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇=100/0~90/10)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得化合物18(0.030 g, 產率39%)。

ESI-MS m/z : 568(M + H)⁺;

[實施例19]

1,2-二甲基-3,3-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)吡啶(化合物19)

於與實施例15相同之方法中，代替化合物14而使用化合物18(0.030 g, 0.053 mmol)，獲得化合物19(0.020 g，產率65%)。

ESI-MS m/z : 582($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.89(6H, t, $J = 6.8$ Hz), 1.03(3H, d, $J = 6.6$ Hz), 1.07-1.65(40H, m), 2.05(8H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.27(3H, s), 2.39(1H, d, $J = 6.8$ Hz), 2.69-2.81(5H, m), 3.21(1H, d, $J = 6.6$ Hz), 5.28-5.44(8H, m).

參考例9

2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-2-((((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)甲基)丙烷-1,3-二醇(化合物IIc-7)

步驟1

於與參考例5相同之方法中，代替1-溴癸烷而使用2-(氯甲氧基)乙基三甲基矽烷(0.210 mL, 1.18 mmol)，藉此獲得2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-2-((2-(三甲基矽烷基)乙氧基)甲基)丙烷-1,3-二醇(0.312 g，整體產率87%)。

ESI-MS m/z : 455($M + H$)⁺

步驟2

使步驟1中所獲得之2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-2-((2-(三甲基矽烷基)乙氧基)甲基)丙烷-1,3-二醇(0.312 g, 0.686 mmol)溶解於四氫呋喃(4 mL)中，於冰浴冷卻下添加氫化鈉(油性60%，0.063 g, 1.58 mmol)及(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基甲磺酸酯(0.355 g, 1.03 mmol)並於60℃下攪拌2小時。於反應混合物中添加飽和氯化銨水溶液並利用己烷對水層進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後，過濾並於減壓下進行濃縮。利用矽膠管柱層

析法(己烷/乙酸乙酯=99/1~70/30)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得(11Z,14Z)-2-((((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)甲基)-2-((2-(三甲基矽烷基)乙氧基)甲基)二十碳-11,14-二烯-1-醇(0.230 g，產率48%)。

ESI-MS m/z : 703($M + H$)⁺

步驟3

使步驟2中所獲得之(11Z,14Z)-2-((((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)甲基)-2-((2-(三甲基矽烷基)乙氧基)甲基)二十碳-11,14-二烯-1-醇(0.230 g、0.327 mmol)溶解於二氯甲烷(2 mL)中，於冰浴冷卻下添加三氟化硼二乙醚錯合物(東京化成工業公司製造，0.207 mL，1.64 mmol)並於0℃下攪拌1小時。於反應混合物中添加飽和碳酸氫鈉水溶液並利用乙酸乙酯對水層進行萃取。利用飽和食鹽水將有機層洗淨，使用無水硫酸鎂進行乾燥後，過濾並於減壓下進行濃縮。利用矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=99/1~50/50)對所獲得之殘渣進行純化，藉此獲得化合物IIc-7(0.150 g，產率76%)。

ESI-MS m/z : 603($M + H$)⁺

[實施例20]

1-甲基-3-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-3-((((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)甲基)吡啶(化合物20)

於與實施例1相同之方法中，代替參考例1中所獲得之化合物IIc-1而使用參考例8中所獲得之化合物IIc-7(0.140 g，0.232 mmol)，獲得化合物20(0.080 g，產率58%)。

ESI-MS m/z : 598($M + H$)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.89(6H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.17-1.40(34H, m), 1.52-1.61(4H, m), 2.02-2.08(8H, m), 2.30(3H, s), 2.77(4H, t, $J = 6.6$ Hz), 2.90(2H, d, $J = 7.6$ Hz), 3.10(2H, d, $J = 7.6$ Hz), 3.39-3.45(4H, m), 5.27-5.44(8H, m).

[實施例21]

使用實施例1中所獲得之化合物1並按照以下之方式製備組合物。所使用之核酸係包含義鏈 [5'-rGrGrAfUfCrAfUfCfUfCrArArGfUfCfUfUrAfCdTdT-3' (鍵結於附有r、d及f之鹼基上的糖分別為核糖、去氧核糖及2'位之羥基經氟取代之核糖，自5'末端側向3'末端側鍵結於第20號鹼基上之去氧核糖與鍵結於第21號鹼基上之去氧核糖的鍵為硫代磷酸酯鍵)]及反義鏈 [5'-rGfUrArArGrAfCfUfUrGrArGrAfUrGrAfUfCfCdTdT-3' (鍵結於附有r、d及f之鹼基上之糖分別為核糖、去氧核糖及2'位之羥基經氟取代之核糖，自5'末端側向3'末端側鍵結於第20號鹼基上之去氧核糖與鍵結於第21號鹼基上之去氧核糖的鍵為硫代磷酸酯鍵)]之抑制血液凝固第7因子 (Blood Coagulation Factor VII，以下記作f7) 基因之表現的抗f7 siRNA，自GeneDesign公司獲得 (以下，稱為f7 siRNA-1)。核酸係利用蒸餾水製成24 mg/mL而使用。

以成為化合物1/PEG-DMPE Na (日油公司製造)=57.3/5.52 mmol/L之方式稱量各試樣，懸濁於含有鹽酸及乙醇之水溶液中，使用渦流攪拌機進行攪拌並且反覆加熱而獲得均勻之懸濁液。使該懸濁液於室溫下通過0.05 μm 之聚碳酸酯膜濾器而獲得化合物1/PEG-DMPE Na之粒子 (脂質體) 之分散液。對利用粒徑測定裝置所獲得之脂質體之平均粒徑進行測定，確認於30 nm至100 nm之範圍內。將所獲得之脂質體之分散液與f7 siRNA-1溶液以脂質體之分散液：f7 siRNA-1溶液=3:1之比率混合，進而添加3倍量之蒸餾水並混合，藉此製備化合物1/PEG-DMPE Na/ f7 siRNA-1複合體之分散液。

另一方面，以成為化合物1/PEG-DMPE Na (日油公司製造)/DSPC (日油公司製造)/膽固醇 (日油公司製造)=8.947/0.147/5.981/14.355 mmol/L之方式稱量各試樣，溶解於乙醇

中而製備脂質膜構成成分之溶液。

使所獲得之脂質膜構成成分之溶液與所獲得之化合物1/PEG-DMPE Na/ f7 siRN-1複合體之分散液以1:1之比率混合，進而混合數倍量之蒸餾水而獲得粗製劑。

所獲得之粗製劑係使用Amicon Ultra(Millipore公司製造)進行濃縮後，利用生理食鹽水進行稀釋，使用0.2 μm之過濾器(東洋濾紙公司製造)於清潔台內進行過濾。對所獲得之組合物之siRNA濃度進行測定，根據投予濃度而使用生理食鹽水進行稀釋，藉此獲得製劑(含有化合物1及f7 siRNA-1之組合物)。

[實施例22]

分別使用實施例2及4～7中所獲得之化合物即化合物2及4～7，以與實施例21相同之方式獲得製劑(分別含有化合物2及4～7且含有f7 siRNA-1之組合物)。

利用粒徑測定裝置對實施例21及22中所獲得之製劑(組合物)之平均粒徑進行測定，將其結果示於表4。

[表4]

表4

化合物編號	1	2	4	5	6	7
所獲得之製劑之粒徑(nm)	113	116	127	115	123	128

[實施例23]

將實施例21中所使用之f7 siRNA-1變更為義鏈為5'-CCCUGUCUUGGUUUCAAUUAA-3'(鍵結於鹼基上之糖全部為核糖)而反義鏈為5'-AAUUGAAACCAAGACAGGGUG-3'(鍵結於鹼基上之糖全部為核糖。以磷酸基修飾5'末端)的f7 siRNA-2，藉由與實施例21相同之方法而製備製劑。

比較例1

將化合物1設為依據專利文獻3記載之方法的方法合成之1-甲基-3,3-雙{[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]甲基}吡啶(化合物A)，除此以外，藉由與實施例23相同之方法而製備製劑。

利用粒徑測定裝置對實施例23與比較例1中所獲得之製劑(組合物)之平均粒徑進行測定，將其結果示於表5。

[表5]

表5

	實施例23	比較例1
所獲得之製劑之粒徑(nm)	119	140

試驗例1

對於實施例21及22中所獲得之各製劑(分別含有化合物1、2、4～7並且含有f7 siRNA-1之組合物)，分別藉由以下之方法而實施體內藥效評價試驗。再者，各製劑係根據試驗利用生理食鹽水進行稀釋而使用。

馴化飼育小鼠(Balb/c、自CLEA Japan獲得)後，將各製劑以siRNA濃度並以0.03及/或0.3 mg/kg靜脈內投予至小鼠。自投予開始48小時後進行採血，使用微量高速冷卻離心機(TOMY MX305：Tomy Seiko公司製造)以8000 rpm、8分鐘、4℃對採取之血液進行離心分離。使用BIOPHEN VII kit(ANIARA公司製造 cat#: A221304)並依據製品之說明書中所記載之方法，以ARVO(405 nm)對標準液及血漿樣品中之吸光度進行測定。根據所獲得之吸光度而製作校準曲線，算出血漿中之因子VII蛋白質濃度。再者，例數係設為各群3匹。

將算出之血漿中之因子VII蛋白質濃度之結果示於圖1及圖2。

試驗例2

將實施例21及22中所獲得之各製劑設為實施例23及比較例1中所獲得之各製劑，除此以外，以與試驗例1相同之方式實施試驗例2。

將算出之血漿中之因子VII蛋白質濃度之結果示於圖3。

根據圖1及圖2而明確，藉由投予實施例21及22中所獲得之各製劑(分別含有化合物1、2、4~7並且含有f7 siRNA-1之組合物)而強烈地抑制因子VII基因之表現。

又，根據圖3而明確，實施例23中所獲得之製劑(含有化合物1及f7 siRNA-2之組合物)係與比較例1中所獲得之製劑(含有化合物A及f7 siRNA-2之組合物)相比更強地抑制因子VII基因之表現。

因此，明確本發明之組合物可將核酸導入至細胞內等，本發明之陽離子性脂質容易於體內將核酸傳遞至細胞內。

[產業上之可利用性]

藉由將含有本發明之陽離子性脂質及核酸之組合物投予至哺乳動物等，可將該核酸容易地導入至例如細胞內等。

[序列表非關鍵文字]

序列編號1-血液凝固第7因子 siRNA-1 義鏈

序列編號2-血液凝固第7因子 siRNA-1反義鏈

序列編號3-血液凝固第7因子 siRNA-2 義鏈

序列編號4-血液凝固第7因子 siRNA-2反義鏈

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 協和醱酵麒麟有限公司

<120> 陽離子脂質

<130> 1000P12337

<150> JP2014-133913

<151> 2014-06-30

<160> 4

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 凝血因子VII siRNA-1義鏈

<220>

<221> 無法歸類之特徵

<222> (1)..(19)

<223> RNA

<220>

<221> 無法歸類之特徵

<222> (4)..(4)

<223> n = 尿嘧啶

<220>

<221> 無法歸類之特徵

<222> (7)..(7)

<223> n = 尿嘧啶

<220>

<221> 無法歸類之特徵

<222> (9)..(9)

<223> n = 尿嘧啶

<220>

<221> 無法歸類之特徵

<222> (14)..(14)

<223> n = 尿嘧啶

<220>

<221> 無法歸類之特徵

<222> (16)..(17)

<223> n = 尿嘧啶

<220>

<221> 修飾鹼基

<222> (4)..(5)

<223> 2'-氟基

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (7)..(10)
<223> 2'-氟基

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (14)..(17)
<223> 2'-氟基

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (19)..(19)
<223> 2'-氟基

<220>
<221> 無法歸類之特徵
<222> (21)..(21)
<223> 5'-硫代磷酸酯胸苷

<400> 1
ggancancnc aagncnnact t

21

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血因子VII siRNA-1反義鏈

<220>
<221> 無法歸類之特徵
<222> (1)..(19)
<223> RNA

<220>
<221> 無法歸類之特徵
<222> (2)..(2)
<223> n = 尿嘧啶

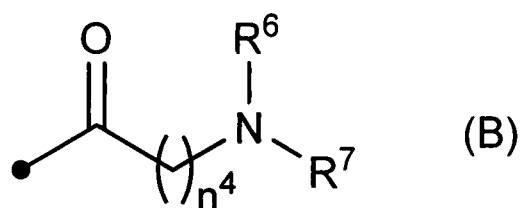
<220>
<221> 無法歸類之特徵
<222> (8)..(9)
<223> n = 尿嘧啶

<220>
<221> 無法歸類之特徵
<222> (14)..(14)
<223> n = 尿嘧啶

<220>
<221> 無法歸類之特徵

<222>	(17)..(17)	
<223>	n = 尿嘧啶	
<220>		
<221>	修飾鹼基	
<222>	(2)..(2)	
<223>	2'-氟基	
<220>		
<221>	修飾鹼基	
<222>	(7)..(9)	
<223>	2'-氟基	
<220>		
<221>	修飾鹼基	
<222>	(14)..(14)	
<223>	2'-氟基	
<220>		
<221>	修飾鹼基	
<222>	(17)..(19)	
<223>	2'-氟基	
<220>		
<221>	無法歸類之特徵	
<222>	(21)..(21)	
<223>	5'-硫代磷酸酯胸苷	
<400>	2	
	gnaagacnng agangancct t	21
<210>	3	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	凝血因子VII siRNA-2 義鏈	
<400>	3	
	cccugucuug guuucaauua a	21
<210>	4	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	凝血因子VII siRNA-2 反義鏈	
<220>		
<221>	無法歸類之特徵	
<222>	(1)..(1)	
<223>	5'-O-硫代磷酸酯腺嘌呤	

<400> 4
nauugaaacc aagacagggg g

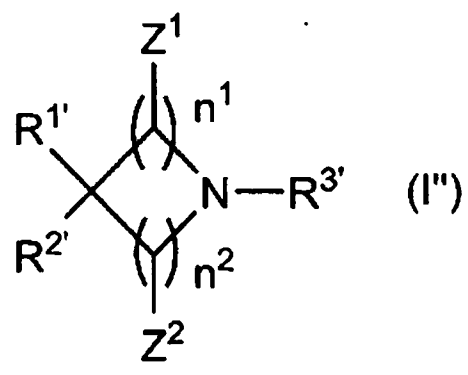


(式中， R^6 及 R^7 相同或不同，為氫原子或碳數1~3之烷基，或者亦可與 R^6 及 R^7 所鍵結之氮原子一併形成碳數2~6之含氮雜環， n^4 為1~6之整數)，

n^1 為0~4之整數， n^2 為1~4之整數(其中， n^1 為0且 n^2 為1之情形除外)]。

2. 如請求項1之陽離子性脂質，其中 R^1 及 R^2 相同或不同，選自由十四烷基、十六烷基、(Z)-十四碳-9-烯基、(Z)-十六碳-9-烯基、(Z)-十八碳-6-烯基、(Z)-十八碳-9-烯基、(E)-十八碳-9-烯基、(Z)-十八碳-11-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基、(9Z,12Z,15Z)-十八碳-9,12,15-三烯基、(Z)-二十碳-11-烯基、(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基及(Z)-二十二碳-13-烯基所組成之群中。
3. 如請求項1之陽離子性脂質，其中 R^1 及 R^2 相同或不同，選自由(Z)-十六碳-9-烯基、(Z)-十八碳-9-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基及(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基所組成之群中。
4. 如請求項1至3中任一項之陽離子性脂質，其中 R^3 為碳數1~3之烷基或式(A)。
5. 如請求項1至4中任一項之陽離子性脂質，其中 R^1 及 R^2 相同。
6. 如請求項1至5中任一項之陽離子性脂質，其中 n^1 為1， n^2 為1~3之整數。
7. 如請求項1至5中任一項之陽離子性脂質，其中 n^1 及 n^2 均為1。
8. 一種陽離子性脂質，其以下述式(I'')表示，

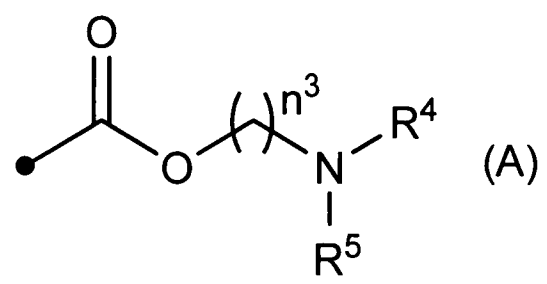
[化4]



[式中，R^{1'}及R^{2'}相同或不同，為碳數8～24之直鏈狀或支鏈狀之烷基、烯基或炔基、或者C7-C20烷氧基C1-C3烷基、C7-C20烯氧基C1-C3烷基或C7-C20炔氧基C1-C3烷基，

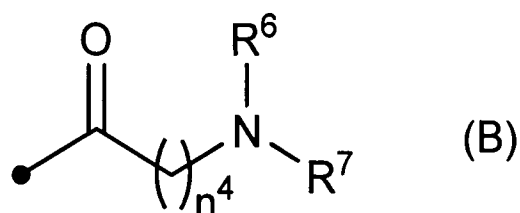
R^{3'}為氫原子、碳數1～3之烷基、羥基C2-C4烷基、C1-C3二烷基胺基C2-C4烷基、式(A)

[化5]



(式中，R⁴及R⁵相同或不同，為氫原子或碳數1～3之烷基，或者亦可與R⁴及R⁵所鍵結之氮原子一併形成碳數2～6之含氮雜環，n³為2～6之整數)、或式(B)

[化6]



(式中， R^6 及 R^7 相同或不同，為氫原子或碳數1~3之烷基，或者亦可與 R^6 及 R^7 所鍵結之氮原子一併形成碳數2~6之含氮雜環， n^4 為1~6之整數)，

n^1 為0~4之整數， n^2 為1~4之整數(其中， n^1 為0且 n^2 為1之情形除外)，

Z^1 於每個所鍵結之各碳上係分別獨立為氫原子或碳數1~3之烷基，

Z^2 於每個所鍵結之各碳上係分別獨立為氫原子或碳數1~3之烷基]。

9. 如請求項8之陽離子性脂質，其中 $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 相同或不同，選自由十四烷基、十六烷基、(Z)-十四碳-9-烯基、(Z)-十六碳-9-烯基、(Z)-十八碳-6-烯基、(Z)-十八碳-9-烯基、(E)-十八碳-9-烯基、(Z)-十八碳-11-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基、(9Z,12Z,15Z)-十八碳-9,12,15-三烯基、(Z)-二十碳-11-烯基、(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基及(Z)-二十二碳-13-烯基所組成之群中。
10. 如請求項8之陽離子性脂質，其中 $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 相同或不同，選自由(Z)-十六碳-9-烯基、(Z)-十八碳-9-烯基、(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基及(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基所組成之群中。
11. 如請求項8至9中任一項之陽離子性脂質，其中 $R^{3'}$ 為碳數1~3之烷基或式(A)。
12. 如請求項8至11中任一項之陽離子性脂質，其中 $R^{1'}$ 及 $R^{2'}$ 相同。

13. 如請求項8至12中任一項之陽離子性脂質，其中 n^1 為1， n^2 為1～3之整數。
14. 如請求項8至12中任一項之陽離子性脂質，其中 n^1 及 n^2 均為1。
15. 一種組合物，其含有如請求項1至14中任一項之陽離子性脂質及核酸。
16. 如請求項15之組合物，其中該陽離子性脂質與該核酸形成複合體，或者於該陽離子性脂質中組合有中性脂質及/或高分子者與該核酸形成複合體。
17. 如請求項15之組合物，其中該陽離子性脂質與該核酸形成複合體，或者於該陽離子性脂質中組合有中性脂質及/或高分子者與該核酸形成複合體，且含有封入該複合體之脂質膜。
18. 如請求項15至17中任一項之組合物，其中核酸為具有利用RNA干涉(RNAi)之標的基因之表現抑制作用的核酸。
19. 如請求項18之組合物，其中標的基因為於肝臟、肺、腎臟或脾臟中表現之基因。
20. 一種將該核酸導入至細胞內之方法，其係使用如請求項15至19中任一項之組合物。
21. 如請求項20之方法，其中細胞為存在於哺乳動物之肝臟、肺、腎臟或脾臟中之細胞。
22. 如請求項20或21之方法，其中導入至細胞內之方法為藉由該組合物之靜脈內投予而導入至細胞內之方法。
23. 一種肝臟、肺、腎臟或脾臟相關之疾病之治療方法，其包含將如請求項26之組合物投予至哺乳動物之步驟。
24. 如請求項23之方法，其中投予之方法為靜脈內投予。
25. 一種用於疾病之治療之醫藥，其包含如請求項18之組合物。
26. 如請求項25之醫藥，其係靜脈內投予用。

27. 一種肝臟、肺、腎臟或脾臟相關之疾病之治療劑，其包含如請求項19之組合物。
28. 如請求項27之肝臟、肺、腎臟或脾臟相關之疾病之治療劑，其係靜脈內投予用。

圖式

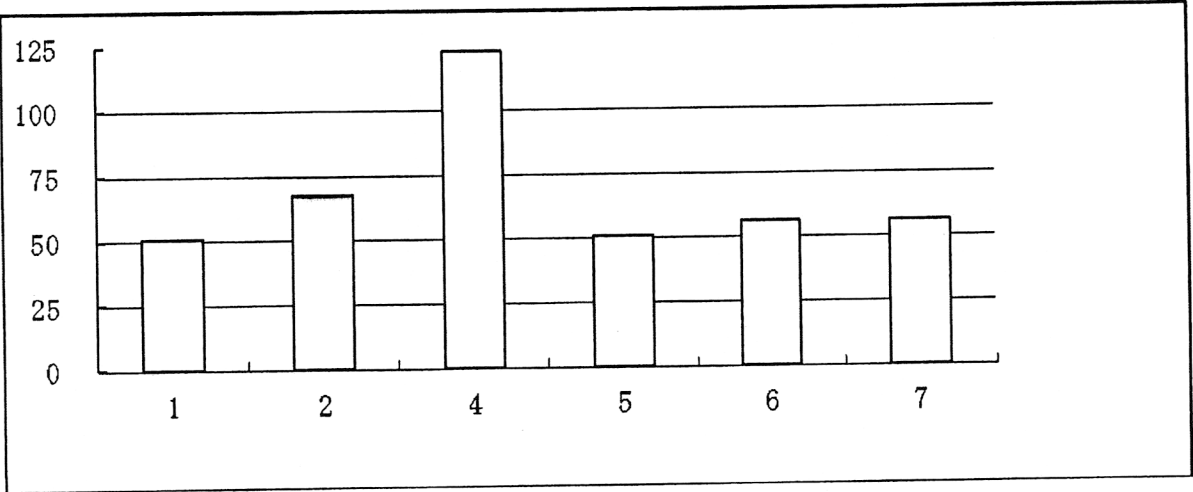


圖1

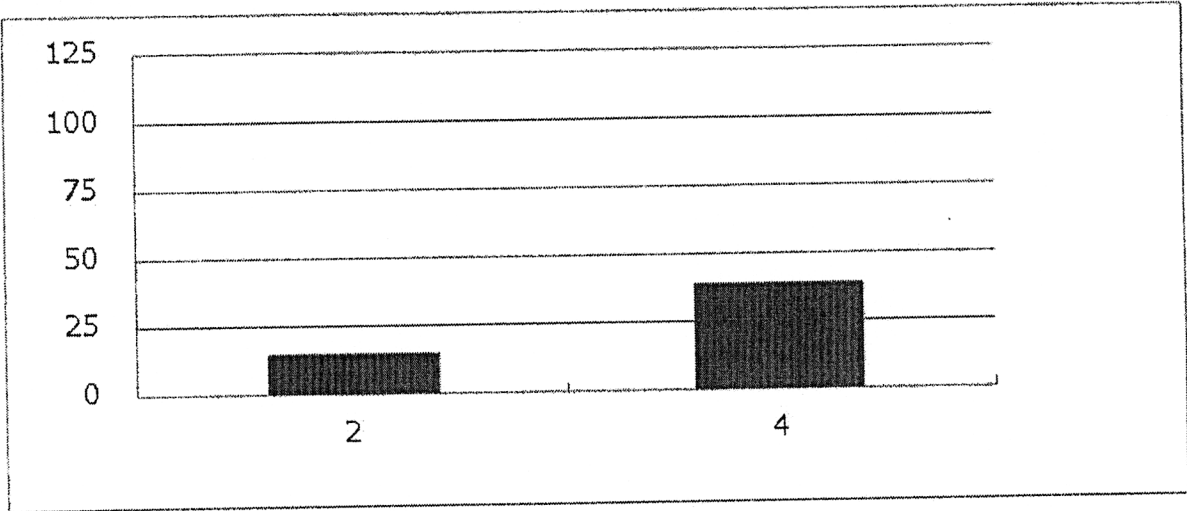


圖2

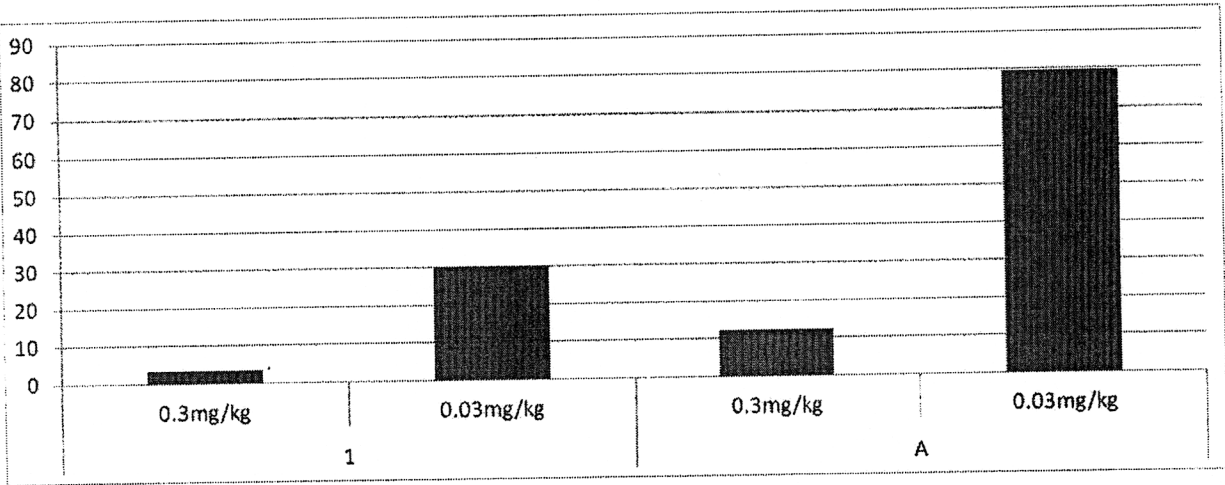


圖3