

【發明說明書】

【中文發明名稱】

作為陽離子性脂質之化合物

【技術領域】

本發明係關於一種作為陽離子性脂質之新穎化合物及含有該新穎化合物之組合物等。

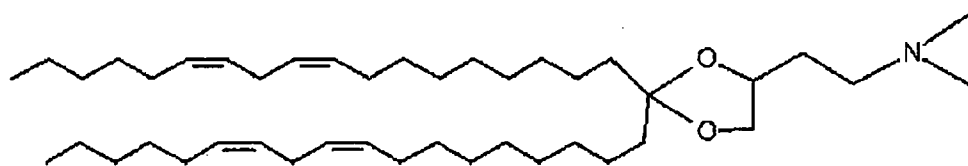
【先前技術】

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、與包含至少一個帶正電之極性頭基之親水性區域之兩親媒性分子。陽離子性脂質與核酸等巨大分子形成作為總荷電而帶正電之複合體，藉此核酸等巨大分子變得易於通過細胞之細胞膜而進入至細胞質，故而陽離子性脂質有用。可於體外及體內進行之該過程已知為轉染。

專利文獻1~4係揭示一種為了於體內將核酸傳遞至細胞內、及為了使用於適於治療疾病之核酸-脂質粒子組合物而有用之陽離子性脂質、及包含該脂質之脂質粒子。

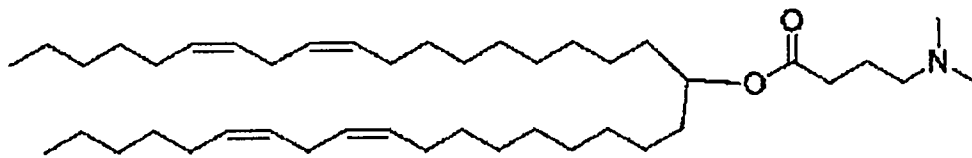
於專利文獻1中，例如揭示

[化1]



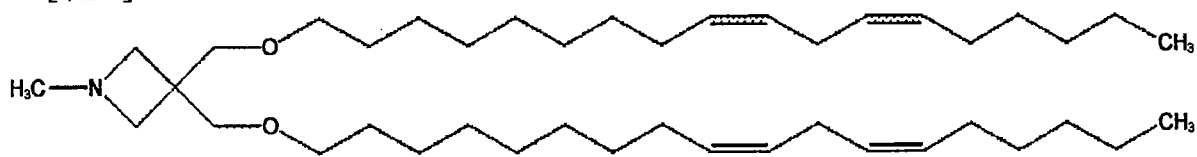
2,2-二亞油基-4-(2-二甲胺基乙基)-[1,3]-二氧雜環戊烷(2,2-dilinoleyl-4-(2-dimethylaminoethyl)-[1,3]-dioxolane, DLin-KC2-DMA)等陽離子性脂質，於專利文獻2中，例如揭示

[化2]



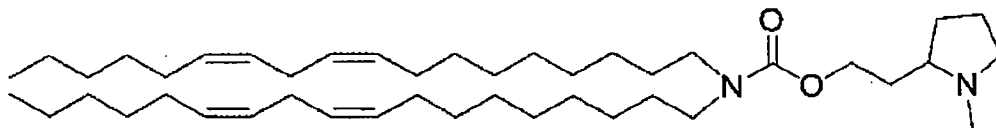
4-(二甲胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基
 酯((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-
 (dimethylamino)butanoate, DLin-MC3-DMA)等陽離子性脂質，於專利
 文獻3中，例如揭示

[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)等陽離子性脂質，於專利文獻4中，例如揭示

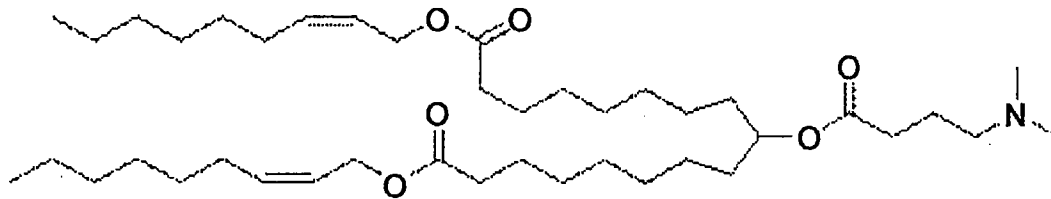
[化4]



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。

又，於非專利文獻1中，揭示藉由在陽離子性脂質之脂肪鏈之一部分
 加入生物降解性基而體內之核酸向細胞之傳遞能力可直接減輕肝臟中之毒
 性，例如揭示

[化5]



9-{{4-(二甲胺基)丁醯基}氧基}十七烷二酸二[(Z)-2-壬烯-1-基]酯
(Di[(Z)-non-2-en-1-yl] 9-{{4-(dimethylamino)butanoyl}oxy}heptadecanedioate)
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

非專利文獻

非專利文獻1：Molecular Therapy[分子治療]，2013年，第21卷，
p.1570-1578。

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

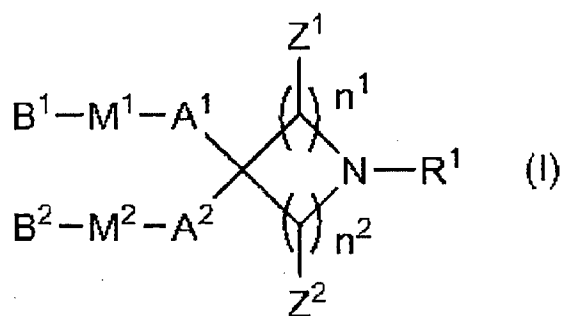
本發明之目的在於，例如提供一種可將核酸導入至細胞內等之作為
陽離子性脂質之新穎化合物及含有該新穎化合物之組合物等。

[解決問題之技術手段]

本發明係關於以下之(1)~(30)。

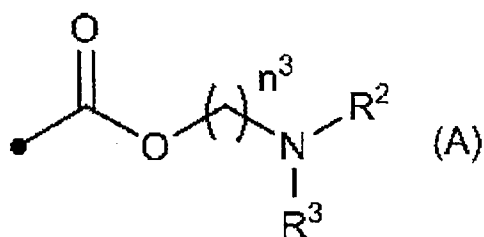
(1)一種化合物、或其製藥上可容許之鹽(陽離子性脂質)，其係以如
下之式(I)表示：

[化6]



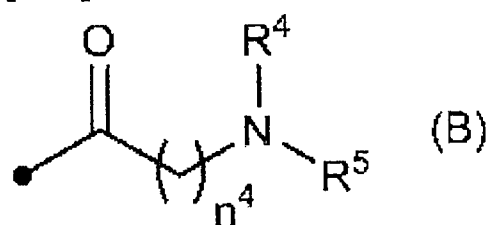
[於式中， R^1 為氫原子、C1-C3烷基、羥基C2-C4烷基、二C1-C3烷基胺基C2-C4烷基、式(A)

[化7]



(於式中， R^2 與 R^3 相同或不同，為氫原子或C1-C3烷基，或者 R^2 及 R^3 亦可與鍵結之氮原子一起形成C2-C6含氮雜環， n^3 為2~6之整數)、或式(B)

[化8]



(於式中， R^4 與 R^5 相同或不同，為氫原子或C1-C3烷基，或者 R^4 及 R^5 亦可與鍵結之氮原子一起形成C2-C6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、 n^2 為1之情形除外)，

Z^1 對應於所鍵結之各碳而分別獨立，為氫原子或C1-C3烷基，

Z^2 對應於所鍵結之各碳而分別獨立，為氫原子或C1-C3烷基，

A¹與A²相同或不同，為直鏈狀或支鏈狀之C8-C20伸烷基或C8-C20伸烯基，或者為C6-C18伸烷氧基C1-C3伸烷基或C6-C18伸烯氧基C1-C3伸烷基，

M¹與M²相同或不同，選自由-OC(O)-、-C(O)O-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(S)-、-C(S)O-、-SS-、-C(R⁶)=N-、-N=C(R⁶)-、-C(R⁶)=N-O-、-O-N=C(R⁶)-、-N(R⁶)C(O)-、-C(O)N(R⁶)-、-N(R⁶)C(S)-、-C(S)N(R⁶)-、-N(R⁶)C(O)N(R⁷)-、-N(R⁶)C(O)O-、-OC(O)N(R⁶)-及-OC(O)O-所組成之群，

R⁶與R⁷相同或不同，為氫原子或C1-C4烷基，

B¹與B²相同或不同，為直鏈狀或支鏈狀之C1-C16烷基或C2-C16烯基]。

(2)如上述(1)之化合物、或其製藥上可容許之鹽(陽離子性脂質)，其中M¹與M²相同或不同，選自由-OC(O)-、-C(O)O-、-N(R⁶)C(O)-及-C(O)N(R⁶)-所組成之群。

(3)如上述(2)之化合物、或其製藥上可容許之鹽(陽離子性脂質)，其中M¹與M²相同或不同，為-OC(O)-或-C(O)O-。

(4)如上述(1)至(3)中任一項之化合物、或其製藥上可容許之鹽(陽離子性脂質)，其中A¹與A²相同或不同，為直鏈狀或支鏈狀之C8-C20伸烷基或C8-C20伸烯基。

(5)如上述(1)至(4)中任一項之化合物、或其製藥上可容許之鹽(陽離子性脂質)，其中B¹-M¹-A¹-與B²-M²-A²-相同。

(6)如上述(1)至(5)中任一項之化合物、或其製藥上可容許之鹽(陽離子性脂質)，其中R¹為C1-C3烷基。

(7)如上述(1)至(6)中任一項之化合物、或其製藥上可容許之鹽(陽離子性脂質)，其中 n^1 為1， n^2 為1~3之整數。

(8)如上述(1)至(7)中任一項之化合物、或其製藥上可容許之鹽(陽離子性脂質)，其中 n^1 及 n^2 均為1。

(9)一種組合物，其含有如上述(1)至(8)中任一項之化合物、或其製藥上可容許之鹽(陽離子性脂質)及核酸。

(10)如上述(9)之組合物，其進而含有中性脂質及/或高分子。

(11)如上述(9)或(10)之組合物，其中化合物、或其製藥上可容許之鹽(陽離子性脂質)與核酸形成複合體，或者於化合物、或其製藥上可容許之鹽(陽離子性脂質)中組合中性脂質及/或高分子而成者與核酸形成複合體。

(12)如上述(11)之組合物，其含有封入複合體之脂質膜。

(13)如上述(9)至(12)中任一項之組合物，其中核酸為具有利用RNA干涉(RNAi)之靶基因之表現抑制作用之核酸。

(14)如上述(13)之組合物，其中靶基因為於肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟中表現之基因。

(15)如上述(9)至(14)中任一項之組合物，其係靜脈內投予用。

(16)一種方法，其係使用如上述(9)至(15)中任一項之組合物將核酸導入至細胞內。

(17)如上述(16)之方法，其中細胞為位於哺乳動物之肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟之細胞。

(18)如上述(16)或(17)之方法，其係藉由靜脈內投予組合物而將核酸導入至細胞內。

(19)一種與肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟相關之疾病之治療方法，其包含將如上述(9)至(15)中任一項之組合物投予至哺乳動物之步驟。

(20)如上述(19)之方法，其係進行靜脈內投予。

(21)一種醫藥，其包含如上述(9)至(15)中任一項之組合物。

(22)一種用於治療疾病之醫藥，其包含如上述(9)至(15)中任一項之組合物。

(23)如上述(22)之醫藥，其中疾病為與肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟相關之疾病。

(24)如上述(21)至(23)中任一項之醫藥，其係靜脈內投予用。

(25)一種與肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟相關之疾病之治療劑，其包含如上述(9)至(15)中任一項之組合物。

(26)如上述(25)之肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟治療劑，其係靜脈內投予用。

(27)一種與肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟相關之疾病之治療方法，其包含將如上述(9)至(15)中任一項之組合物投予至需要該組合物之患者。

(28)如上述(27)之方法，其係進行靜脈內投予。

(29)如上述(9)至(15)中任一項之組合物，其用於治療與肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟相關之疾病。

(30)如上述(29)之組合物，其係靜脈內投予用。

[發明之效果]

根據本發明，例如可提供一種可將核酸導入至細胞內等之作為陽離

子性脂質之新穎化合物、及含有該新穎化合物之組合物等。

【圖式簡單說明】

圖1係根據RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, 反轉錄聚合酶連鎖反應)之準定量評估分別對人胰腺癌細胞株MIA-PaCa2處理於實施例5及6中所獲得之製劑1~3(含有化合物1~3各者之組合物)時之HPRT1的mRNA(messenger Ribonucleic Acid, 傳訊核糖核酸)之表現量。檢體之mRNA量係算出相對於GAPDH之mRNA量的HPRT1之mRNA量, 作為將陰性對照處理群之該值設為1時之相對比率而算出。縱軸表示如上所述般算出之檢體之mRNA量之相對值, 橫軸表示製劑編號及製劑中之siRNA濃度(nM)。

圖2係根據RT-PCR之準定量評估分別對人肺癌細胞株NCI-H358處理於實施例5及6中所獲得之製劑1~3(含有化合物1~3各者之組合物)時之HPRT1的mRNA之表現量。檢體之mRNA量係算出相對於GAPDH之mRNA量的HPRT1之mRNA量, 作為將陰性對照處理群之該值設為1時之相對比率而算出。縱軸表示如上所述般算出之檢體之mRNA量之相對值, 橫軸表示製劑編號及製劑中之siRNA濃度(nM)。

圖3係根據RT-PCR之準定量評估分別對人胰腺癌細胞株MIA-PaCa2處理於實施例7及8中所獲得之製劑4~8(含有化合物1~4各者之組合物)時之HPRT1的mRNA之表現量。檢體之mRNA量係算出相對於GAPDH之mRNA量的HPRT1之mRNA量, 作為將陰性對照處理群之該值設為1時之相對比率而算出。縱軸表示如上所述般算出之檢體之mRNA量之相對值, 橫軸表示製劑編號及製劑中之siRNA濃度(nM)。

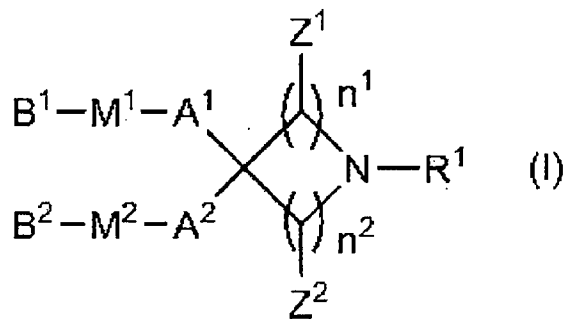
圖4係根據RT-PCR之準定量評估分別對人肺癌細胞株NCI-H358處理

於實施例7及8中所獲得之製劑4~8(含有化合物1~4各者之組合物)時之HPRT1的mRNA之表現量。檢體之mRNA量係算出相對於GAPDH之mRNA量的HPRT1之mRNA量，作為將陰性對照處理群之該值設為1時之相對比率而算出。縱軸表示如上所述般算出之檢體之mRNA量之相對值，橫軸表示製劑編號及製劑中之siRNA濃度(nM)。

【實施方式】

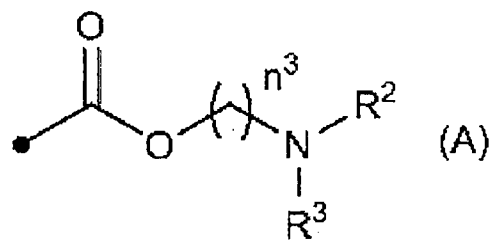
本發明之化合物係以如下之式(I)表示之化合物：

[化9]



[於式中， R^1 為氫原子、C1-C3烷基、羥基C2-C4烷基、二C1-C3烷基胺基C2-C4烷基、式(A)

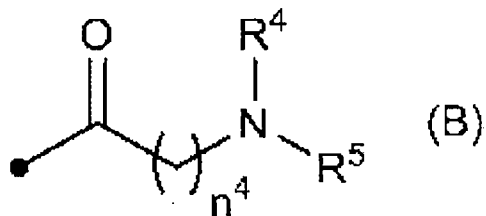
[化10]



(於式中， R^2 與 R^3 相同或不同，為氫原子或C1-C3烷基，或者 R^2 及 R^3 亦可與鍵結之氮原子一起形成C2-C6含氮雜環， n^3 為2~6之整數)、或式

(B)

[化11]



(於式中， R^4 與 R^5 相同或不同，為氫原子或C1-C3烷基，或者 R^4 及 R^5 亦可與鍵結之氮原子一起形成C2-C6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、 n^2 為1之情形除外)，

Z^1 對應於所鍵結之各碳而分別獨立，為氫原子或C1-C3烷基，

Z^2 對應於所鍵結之各碳而分別獨立，為氫原子或C1-C3烷基，

A^1 與 A^2 相同或不同，為直鏈狀或支鏈狀之C8-C20伸烷基或C8-C20伸烯基，或者為C6-C18伸烷氧基C1-C3伸烷基或C6-C18伸烯氧基C1-C3伸烷基，

M^1 與 M^2 相同或不同，選自由-OC(O)-、-C(O)O-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(S)-、-C(S)O-、-SS-、-C(R^6)=N-、-N=C(R^6)-、-C(R^6)=N-O-、-O-N=C(R^6)-、-N(R^6)C(O)-、-C(O)N(R^6)-、-N(R^6)C(S)-、-C(S)N(R^6)-、-N(R^6)C(O)N(R^7)-、-N(R^6)C(O)O-、-OC(O)N(R^6)-及-OC(O)O-所構成的群，

R^6 與 R^7 相同或不同，為氫原子或C1-C4烷基，

B^1 與 B^2 相同或不同，為直鏈狀或支鏈狀之C1-C16烷基或C2-C16烯基]。

以式(I)表示之化合物具有包含兩個烴基之脂質親和性區域、與包含一個可帶正電之極性頭基之親水性區域，且具有作為陽離子性脂質之性質。

以下，亦存在將以式(I)表示之化合物稱為化合物(I)之情形。對於其

他編號之式之化合物亦相同。又，以下亦存在將以式(I)表示之化合物、或其製藥上可容許之鹽統稱為「陽離子性脂質」之情形。

作為C1-C3烷基，可列舉甲基、乙基、丙基、異丙基及環丙基等。

於本發明中，若例示C1-C3烷基之情形進行說明，則C1-C3烷基之C1-C3係指碳數為1~3。

羥基C2-C4烷基係指於C2-C4烷基之任一碳上取代有羥基，作為C2-C4烷基部分，例如可列舉乙基、丙基及丁基等。

二C1-C3烷基胺基C2-C4烷基係指於C2-C4烷基之任一碳上取代有二C1-C3烷基胺基，作為C2-C4烷基部分，例如可列舉乙基、丙基及丁基等。

作為二C1-C3烷基胺基之C1-C3烷基部分，可列舉甲基、乙基、丙基、異丙基及環丙基等，C1-C3烷基部分可相同亦可不同。

作為C2-C6含氮雜環，例如可列舉氮丙啶環、吡啶環、吡咯啶環、哌啶環及氮雜環庚烷環等，C2-C6含氮雜環相同或不同，亦可由1~3個C1-C3烷基(含義與上述內容相同)、羥基或甲氧基等取代。

作為直鏈狀或支鏈狀之C8-C20伸烷基，例如可列舉伸辛基、伸壬基、伸十一烷基、伸十三烷基、伸十四烷基、2,6,10-三甲基伸十一烷基、伸十五烷基、3,7,11-三甲基伸十二烷基、伸十六烷基、伸十七烷基、伸十八烷基、伸十九烷基、2,6,10,14-四甲基伸十五烷基及3,7,11,15-四甲基伸十六烷基等，較佳為伸壬基、伸十一烷基、伸十三烷基或伸十六烷基，更佳為伸壬基或伸十一烷基。

於作為直鏈狀或支鏈狀之C8-C20伸烷基之記載中，若以2,6,10-三甲基伸十一烷基為例進行說明，則表示取代基之取代位置之2,6,10-係將鏈結

至含氮雜環之碳原子的A¹及A²之碳原子設為1位。

作為直鏈狀或支鏈狀之C8-C20伸烯基，只要為於直鏈狀或支鏈狀之C8-C20伸烷基中包含1個以上之雙鍵之基即可，例如可列舉(Z)-伸十四碳-9-烯基、(Z)-伸十六碳-9-烯基、(Z)-伸十八碳-6-烯基、(Z)-伸十八碳-9-烯基、(E)-伸十八碳-9-烯基、(Z)-伸十八碳-11-烯基、(9Z,12Z)-伸十八碳-9,12-二烯基及(9Z,12Z,15Z)-伸十八碳-9,12,15-三烯基等，較佳為(Z)-伸十四碳-9-烯基、(Z)-伸十六碳-9-烯基、(Z)-伸十八碳-9-烯基、(Z)-伸十八碳-11-烯基或(9Z,12Z)-伸十八碳-9,12-二烯基。

於作為直鏈狀或支鏈狀之C8-C20伸烯基之記載中，若以(Z)-伸十四碳-9-烯基為例進行說明，則表示雙鍵之位置之-9-係將鍵結至含氮雜環之碳原子的A¹及A²之碳原子設為1位。

作為C6-C18伸烷氧基C1-C3伸烷基之C1-C3伸烷基部分，例如可列舉亞甲基、伸乙基及伸丙基等。

作為C6-C18伸烷氧基C1-C3伸烷基之C6-C18伸烷基部分，例如可列舉伸己基、伸庚基、伸辛基、伸壬基、伸十烷基、伸十一烷基、伸十三烷基、伸十四烷基、2,6,10-三甲基伸十一烷基、伸十五烷基、3,7,11-三甲基伸十二烷基、伸十六烷基、伸十七烷基及伸十八烷基等，較佳為可列舉伸己基、伸庚基、伸辛基、伸壬基、伸十烷基。

作為C6-C18伸烯氧基C1-C3伸烷基之C1-C3伸烷基部分，例如可列舉亞甲基、伸乙基及伸丙基，作為C6-C18伸烯基部分，只要為於C6-C18伸烷氧基C1-C3伸烷基之C6-C18伸烷基部分中包含1個以上之雙鍵之部分即可，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-烯基及(E)-十八碳-9-烯基等，較佳為(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-烯基或(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯基。

構成C6-C18伸烷氧基C1-C3伸烷基及C6-C18伸烯氧基C1-C3伸烷基之C1-C3伸烷基部分位於式(I)中之含氮雜環側。

作為C1-C4烷基，例如可列舉甲基、乙基、丙基、異丙基、環丙基、丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基及環丁基等。

作為直鏈狀或支鏈狀之C1-C16烷基，例如可列舉甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、第三丁基、己基、辛基、壬基、癸基、十二烷基、十四烷基、3,7,11-三甲基十二烷基及十六烷基等，較佳為辛基、壬基、癸基或十二烷基。

於作為直鏈狀或支鏈狀之C1-C16烷基之記載中，若以3,7,11-三甲基十二烷基為例進行說明，則表示取代基之取代位置之3,7,11-係將鏈結至M¹及M²之B¹及B²的碳原子設為1位。

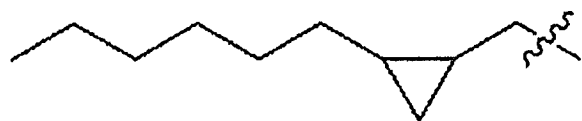
作為直鏈狀或支鏈狀之C2-C16之烯基，只要為於直鏈狀或支鏈狀之C1-C16烷基之直鏈狀或支鏈狀之C2-C16烷基中包含1個以上的雙鍵之基即可，例如可列舉(Z)-丁-2-烯基、(Z)-戊-2-烯基、(Z)-己-2-烯基、(Z)-庚-2-烯基、(Z)-辛-2-烯基、(Z)-壬-2-烯基、(Z)-壬-3-烯基、(E)-壬-2-烯基、壬-8-烯基、(Z)-十二碳-2-烯基、(Z)-十二碳-2-烯基及(Z)-十三碳-2-烯基等，較佳為(Z)-庚-2-烯基、(Z)-壬-2-烯基、(Z)-壬-3-烯基、壬-8-烯基、(Z)-十二碳-2-烯基或(Z)-十三碳-2-烯基。

於作為直鏈狀或支鏈狀之C2-C16之烯基之記載中，若以(Z)-丁-2-烯為例進行說明，則表示取代基之取代位置之-2-係將鏈結至M¹及M²之B¹及B²的碳原子設為1位。

於本發明中，具有於直鏈狀或支鏈狀之C8-C20伸烯基之雙鍵上形式性地加成有亞甲基雙自由基之環丙基環的基亦包含於C8-C20直鏈狀或支鏈狀之伸烯基。進而，於C6-C18伸烯氧基C1-C3伸烷基之C6-C18伸烯基部分及直鏈狀或支鏈狀之C2-C16烯基之情形時亦相同。

若以(Z)-壬-2-烯為例進行說明，則具有環丙基環之以下之基亦包含於本發明之直鏈或支鏈狀的C8-C20伸烯基。

[化12]



A¹與A²較佳為相同或不同，為直鏈狀或支鏈狀之C8-C20伸烷基或C8-C20伸烯基，較佳為相同或不同，為直鏈狀之C8-C20之伸烷基。A¹與A²較佳為相同，為直鏈狀或支鏈狀之C8-C20伸烷基或C8-C20伸烯基，A¹與A²更佳為相同，為直鏈狀之C8-C20伸烷基。

M¹與M²較佳為相同或不同，為-OC(O)-、-C(O)O-、-C(S)O-、-SS-、-N(R⁶)C(O)-、-C(O)N(R⁶)-、-C(S)(NR⁶)-、-N(R⁶)C(O)N(R⁷)-、-N(R⁶)C(O)O-、-OC(O)N(R⁶)-或-OC(O)O-，更佳為-OC(O)-、-C(O)O-、-N(R⁶)C(O)-、-C(O)N(R⁶)-、-N(R⁶)C(O)N(R⁷)-、-N(R⁶)C(O)O-、-OC(O)N(R⁶)-或-OC(O)O-，進而較佳為-OC(O)-、-C(O)O-、-N(R⁶)C(O)-或-C(O)N(R⁶)-，進而更佳為-OC(O)-或-C(O)O-。

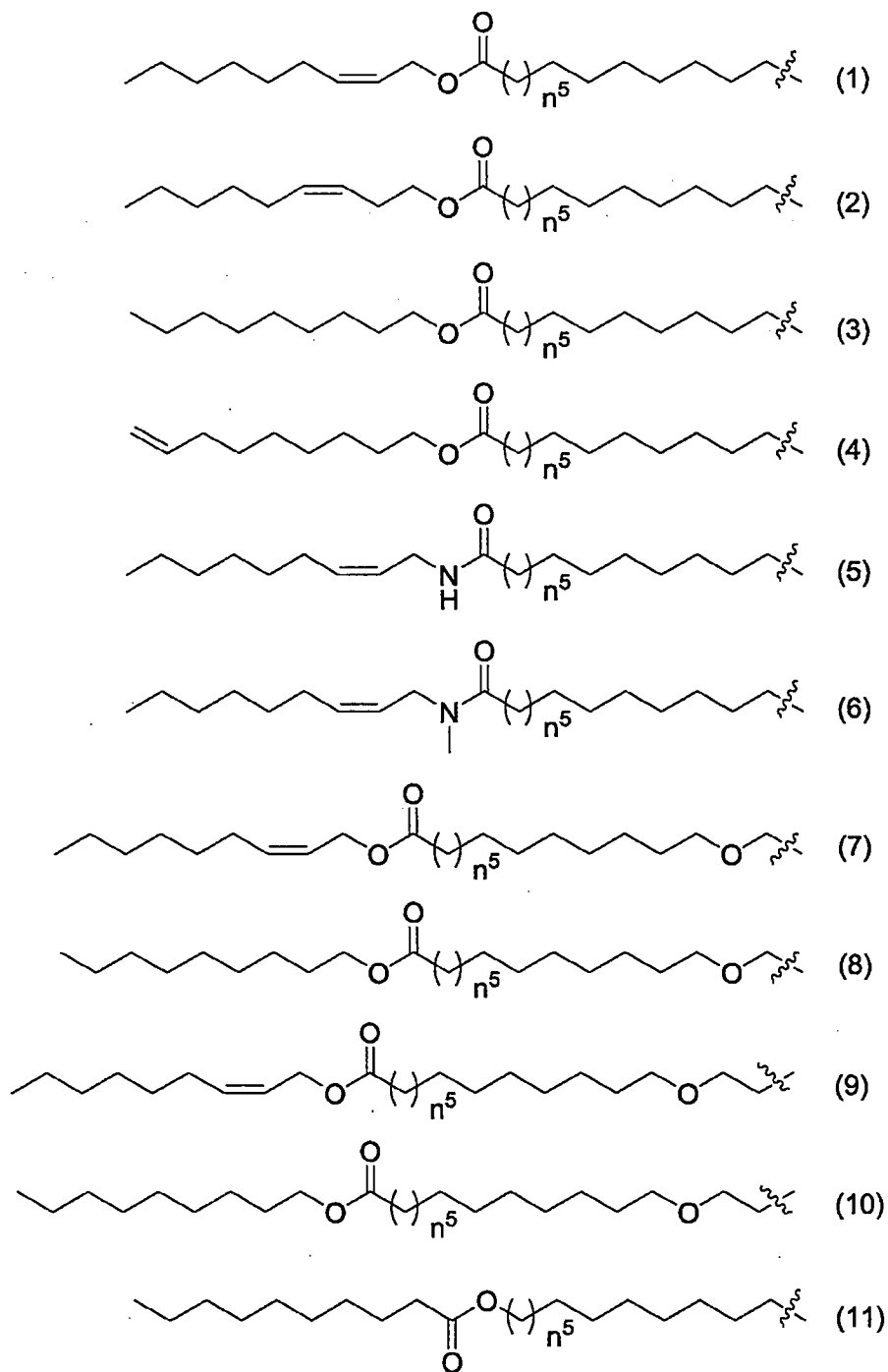
於作為M¹及M²之記載中，若以M¹及M²為-OC(O)-之情形為例進行說明，則-OC(O)-係指以B¹-OC(O)-A¹或B²-OC(O)-A²之形式鍵結。

R⁶與R⁷較佳為相同或不同，為氫原子、甲基或乙基，更佳為相同或不同，為氫原子或甲基，進而較佳為相同，為氫原子或甲基，進而更佳為氫原子。

B^1 及 B^2 較佳為相同或不同，為直鏈狀之C1-C16烷基或C2-C16烯基，更佳為相同，為直鏈狀之C1-C16烷基或C2-C16烯基，進而較佳為相同，為直鏈狀之C2-C16烯基。

$B^1-M^1-A^1$ 與 $B^2-M^2-A^2$ 較佳為相同。 $B^1-M^1-A^1$ 與 $B^2-M^2-A^2$ 較佳為相同或不同，為以下之結構(1)~(11)，更佳為相同，為以下之(1)~(11)結構，進而較佳為以下之(1)~(4)結構。

[化13]



於上述(1)~(11)結構中，波浪線之鍵為式(I)中之含氮雜環向碳原子之鍵結鍵。

n^5 較佳為1~10之整數，更佳為1~5之整數，進而較佳為2~4之整數，進而更佳為2或4。

R^1 較佳為C1-C3烷基、上述式(A)或上述式(B)，更佳為C1-C3烷基或上述式(A)，進而更佳為C1-C3烷基。

於 R^1 為C1-C3烷基之情形時、較佳為甲基、乙基、丙基或環丙基，更佳為甲基或乙基，進而較佳為甲基。

於 R^1 為式(A)之情形時、 R^2 與 R^3 較佳為相同或不同，為氫原子或C1-C3烷基，於 R^1 為式(B)之情形時， R^4 與 R^5 較佳為相同或不同，為氫原子或C1-C3烷基。

於 R^2 及 R^3 與鍵結之氮原子一起形成C2-C6含氮雜環之情形時， R^2 及 R^3 較佳為與鍵結之氮原子一起為吡啶環、吡咯啉環、哌啶環或氮雜環庚烷環，更佳為吡咯啉環或哌啶環。

於 R^2 與 R^3 相同或不同，為C1-C3烷基之情形時， R^3 較佳為甲基或乙基，更佳為甲基。

R^2 與 R^3 較佳為相同，且為甲基。

n^3 較佳為2~4之整數，更佳為3。

於 R^4 及 R^5 與鍵結之氮原子一起形成C2-C6含氮雜環之情形時， R^4 及 R^5 較佳為與鍵結之氮原子一起為吡咯啉環或哌啶環。

於 R^4 與 R^5 相同或不同，為C1-C3烷基之情形時， R^4 及 R^5 較佳為甲基或乙基，更佳為甲基。

R^4 與 R^5 較佳為相同，且為甲基。

n^4 較佳為2~4之整數，更佳為3。

n^1 較佳為1。於 n^1 為1之情形時， n^2 較佳為1~3之整數，更佳為1或2，進而較佳為1。

Z^1 較佳為對應於所鍵結之各碳而分別獨立地為氫原子或甲基，更佳為氫原子。

Z^2 較佳為對應於所鍵結之各碳而分別獨立地為氫原子或C1-C3烷基，

更佳為氫原子或甲基，進而較佳為氫原子。

於本發明中，用語「對應於所鍵結之各碳而分別獨立」係指如下情形：於在式(I)中存在2個以上之 Z^1 之情形時，各個 Z^1 可對應於 Z^1 所鍵結之碳原子而相同或不同，選擇氫原子或C1-C3烷基。例如，於在式(I)中存在2個 Z^1 之情形時，不僅係指各個 Z^1 相同，而且係指亦包含如下情形：一個 Z^1 為氫原子，另一個 Z^1 為C1-C3烷基；或2個 Z^1 為不同之C1-C3烷基。於在式(I)中存在2個以上之 Z^2 之情形時亦相同。

於 n^1 與 n^2 均為1時， Z^1 與 Z^2 較佳為相同或不同，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，進而較佳為 Z^1 與 Z^2 相同，且為氫原子。

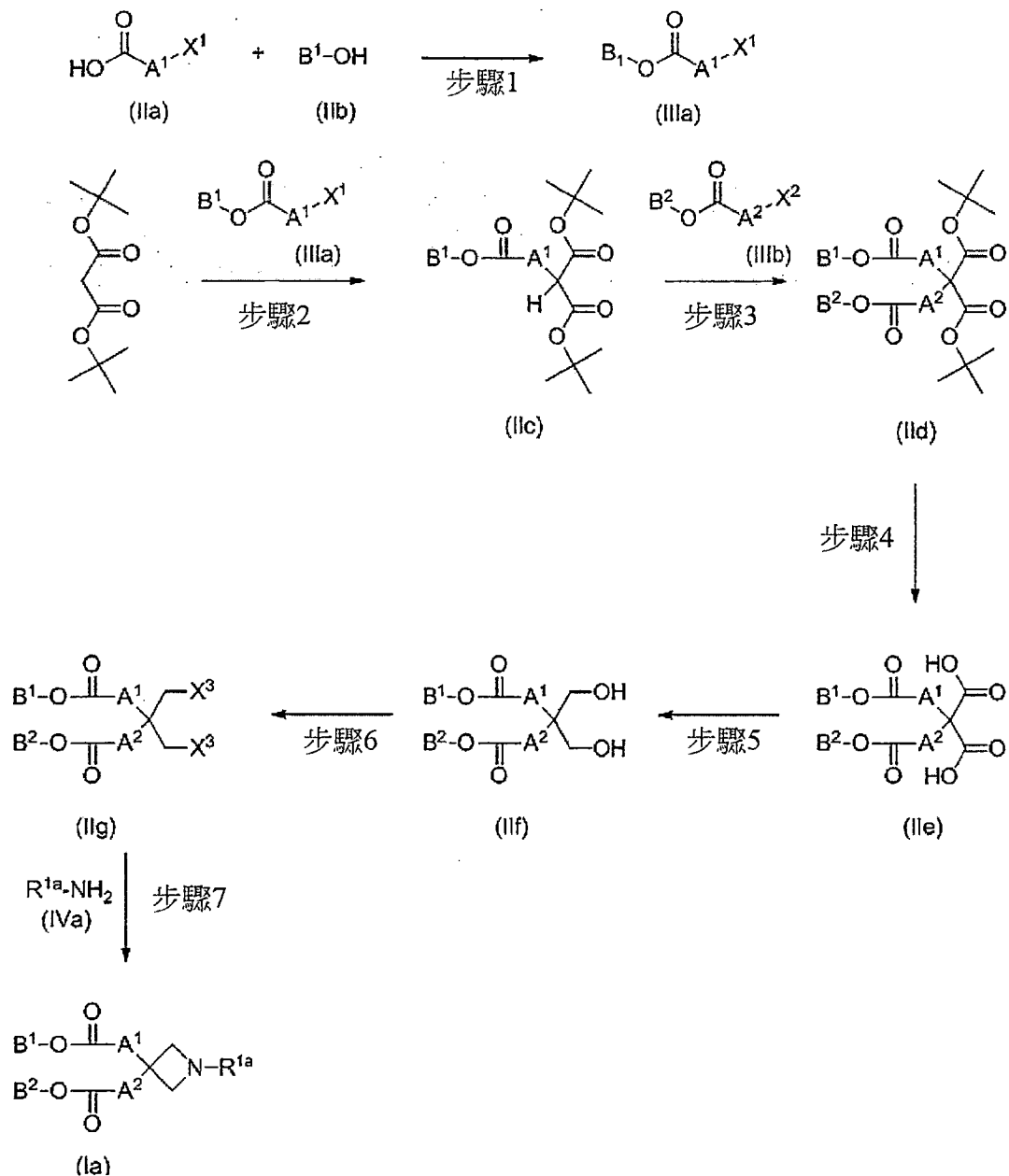
對本發明之以式(I)表示之化合物、或其製藥上可容許之鹽(陽離子性脂質)之製造方法進行說明。

於以下所示之製造方法中，在所定義之基於該製造方法之條件下發生變化或不適於實施該製造方法之情形時，可藉由利用有機合成化學中常用之保護基之導入及去除方法[例如，有機合成中的保護基第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]等而製造目標化合物。又，亦可視需要而改變取代基導入等反應步驟之順序。

製造方法1

化合物(I)中之 n^1 及 n^2 均為1、 Z^1 及 Z^2 均為氫原子、 R^1 為氫原子、C1-C3烷基、羥基C2-C4烷基或二C1-C3烷基胺基C2-C4烷基、 M^1 與 M^2 相同且為-OC(O)-之化合物(Ia)例如可藉由以下之方法製造。

[化14]



(於式中， A^1 、 A^2 、 B^1 及 B^2 的含義分別與上述內容相同， R^{1a} 為氫原子、C1-C3烷基、羥基C2-C4烷基或二C1-C3烷基胺基C2-C4烷基， X^1 、 X^2 與 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、苯磺醯氧基及對甲苯磺醯氧基等脫離基)

步驟1

化合物(IIIa)可藉由如下方式製造：使化合物(IIa)與化合物(IIb)於無溶劑或溶劑中，在存在1~10當量之縮合劑與1~10當量之鹼之條件下，

以室溫～200℃反應5分鐘～100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-甲基吡咯啉酮及吡啶等，其等可單獨使用或混合使用。

作為縮合劑，例如可列舉1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二醯亞胺鹽酸鹽、N,N'-二環己基碳二醯亞胺、4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三吡啶-2-基)-4-甲基嗎啉鹽酸鹽n水合物、1H-苯并三唑-1-基氧基三(二甲基胺基)磷六氟磷酸鹽及O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N',-四甲基脲六氟磷酸鹽等。

作為鹼，例如可列舉碳酸鉀、碳酸鈉、三乙胺、二異丙基乙基胺、N-甲基咪啉及吡啶等。

化合物(IIa)可使用市售品、或者藉由公知之方法[例如「新實驗化學講座14 有機化合物之合成與反應(II)」，初版，丸善(1977年)]或依據該公知之方法之方法而獲得。

化合物(IIb)能夠以市售品形式獲得。

步驟2及3

化合物(IIc)可藉由如下方式製造：使丙二酸二第三丁酯與化合物(IIIa)於無溶劑或溶劑中，在存在1～10當量之鹼之條件下，以室溫～200℃反應5分鐘～100小時。

化合物(IIId)可藉由如下方式製造：使化合物(IIc)與化合物(IIIb)於無溶劑或溶劑中，在存在1～10當量之鹼之條件下，以室溫～200℃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、1,4-二噁烷、N,N-二甲基甲醯胺、N,N-二甲基乙醯胺、N-甲基吡咯啉酮及吡啶等，其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、甲醇鈉、第三丁醇鉀、氫化鈉、三乙胺、二異丙基乙基胺、N-甲基咪啉、吡啶及1,8-二氮雙環[5.4.0]-7-十一烯(DBU)等。

A¹與A²及B¹與B²相同之情形時之化合物(IIId)可藉由在步驟2中使用2當量以上之化合物(IIIa)而製造。

丙二酸二第三丁酯能夠以市售品形式獲得。

化合物(IIIb)可藉由與化合物(IIIa)相同之方法而製造。

步驟4

化合物(IIe)可藉由如下方式製造：使化合物(IIId)與5~100當量之酸於無溶劑或溶劑中，以-78℃~100℃反應5分鐘~100小時。

作為溶劑，例如可列舉步驟1中所例示者。

作為酸，例如可列舉三氟乙酸、三氯乙酸、鹽酸、硫酸及氫溴酸等。

步驟5

化合物(IIIf)可藉由如下方式製造：使化合物(IIe)與4當量~過量之還原劑於溶劑中，視需要而在存在觸媒量~10當量之添加劑之條件下，以-20℃~150反應5分鐘~72小時。觸媒量係指0.01當量~0.5當量。

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

作為還原劑，例如可列舉硼烷-四氫呋喃錯合物、硼烷-二甲硫醚錯合物、氫化鋁鋰、氫化硼鋰、三乙基氫化硼鋰、二異丁基氫化鋁及雙(2-甲氧基乙氧基)氫化鋁鈉等。

作為添加劑，例如可列舉氯化鋁、氯化銻、四氯化鈦及四異丙醇鈦等。

步驟6

化合物(IIg)可藉由如下方式製造：使化合物(IIf)與2當量以上之鹵化試劑或假鹵化試劑於無溶劑或溶劑中，視需要更佳為於存在1~10當量之鹼及視需要更佳為於存在1~10當量之添加劑之條件下，以-20℃~150℃反應5分鐘~100小時。

作為溶劑，例如可列舉步驟5中所例示者。

作為鹵化試劑或假鹵化試劑，例如可列舉亞硫醯氯、磺醯氯、三氯化磷、五氯化磷、氧氯化磷、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、對甲苯磺醯氯及三氟甲磺酸酐等。

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、三乙胺及N,N-二異丙基乙基胺等。

作為添加劑，例如可列舉氯化鈉、溴化鈉、溴化鋰及氯化鋰等。

步驟7

化合物(Ia)可藉由如下方式製造：使化合物(IIf)與1當量~過量之化合物(IVa)於無溶劑或溶劑中，以室溫~200℃反應5分鐘~100小時。

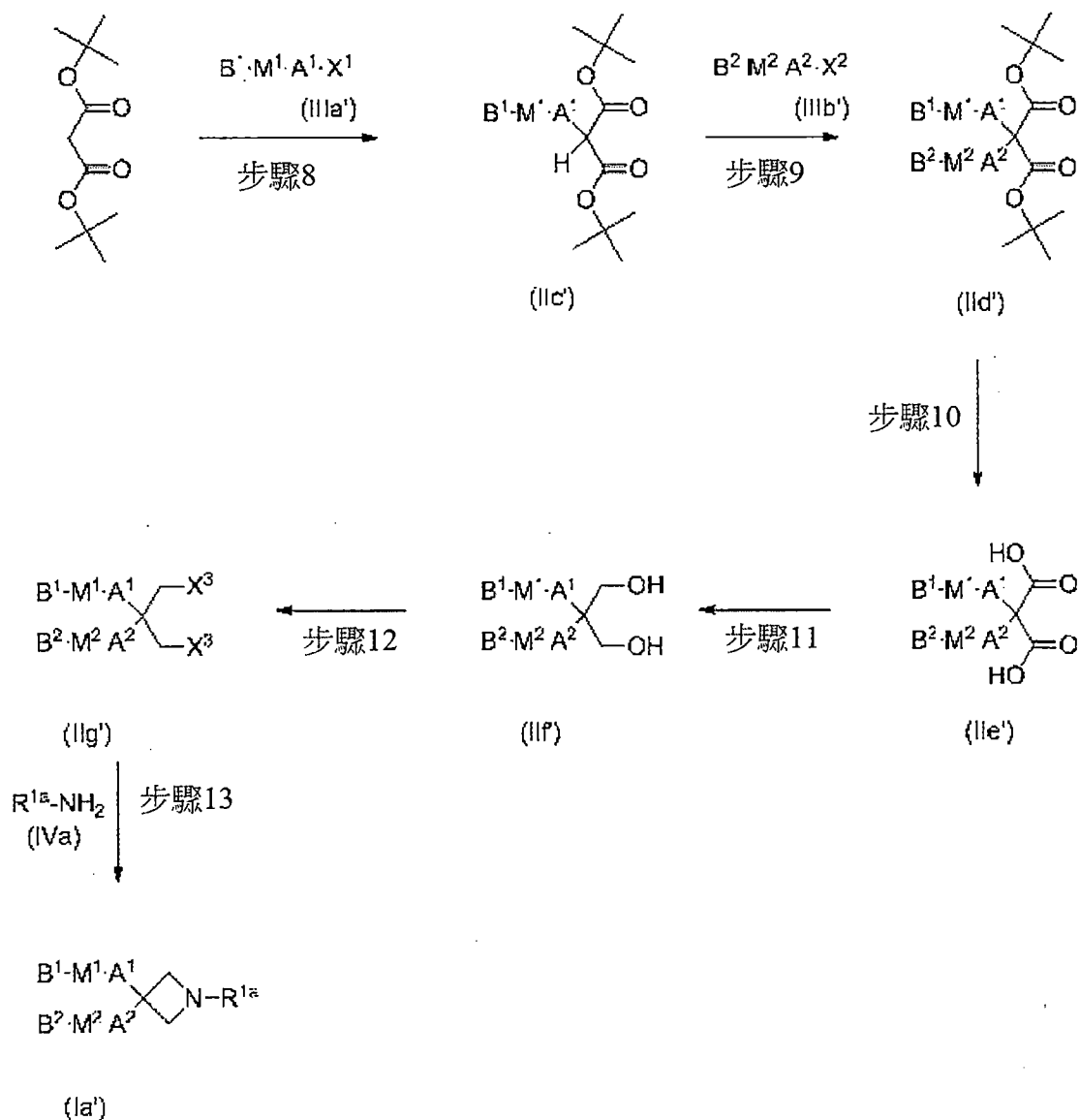
作為溶劑，例如可列舉步驟2及3中所例示者。

化合物(IVa)能夠以市售品形式獲得。

製造方法2

化合物(I)中的 n^1 及 n^2 均為1、 Z^1 及 Z^2 均為氫原子、 R^1 為氫原子、C1-C3烷基、經基C2-C4烷基或二C1-C3烷基胺基C2-C4烷基之化合物(Ia')例如可藉由以下之方法而製造。

[化15]



(於式中， A^1 、 A^2 、 M^1 、 M^2 、 B^1 、 B^2 、 R^{1a} 、 X^1 、 X^2 及 X^3 的含義分別與上述內容相同)

步驟8及步驟9

化合物(IIc')可藉由使用化合物(IIIa')來代替化合物(IIIa)而藉由與步

驟2相同之方法製造。

化合物(II d')可使用化合物(II c')及(III b')來代替化合物(II c)及(III b)而藉由與步驟3相同之方法製造。

化合物(III a')及化合物(III b')中之 M^1 及 M^2 為-OC(O)-者係可藉由製造方法1之步驟1所示之方法而製造。

化合物(III a')及化合物(III b')中之 M^1 及 M^2 為除-OC(O)-以外者亦可藉由使用對應之市售原料而製造。

步驟10

化合物(II e')可藉由使用化合物(II d')來代替化合物(II d)而藉由與步驟4相同之方法製造。

步驟11

化合物(II f')可藉由使用化合物(II e')來代替化合物(II e)而藉由與步驟5相同之方法製造。

步驟12

化合物(II g')可藉由使用化合物(II f')來代替化合物(II f)而藉由與步驟6相同之方法製造。

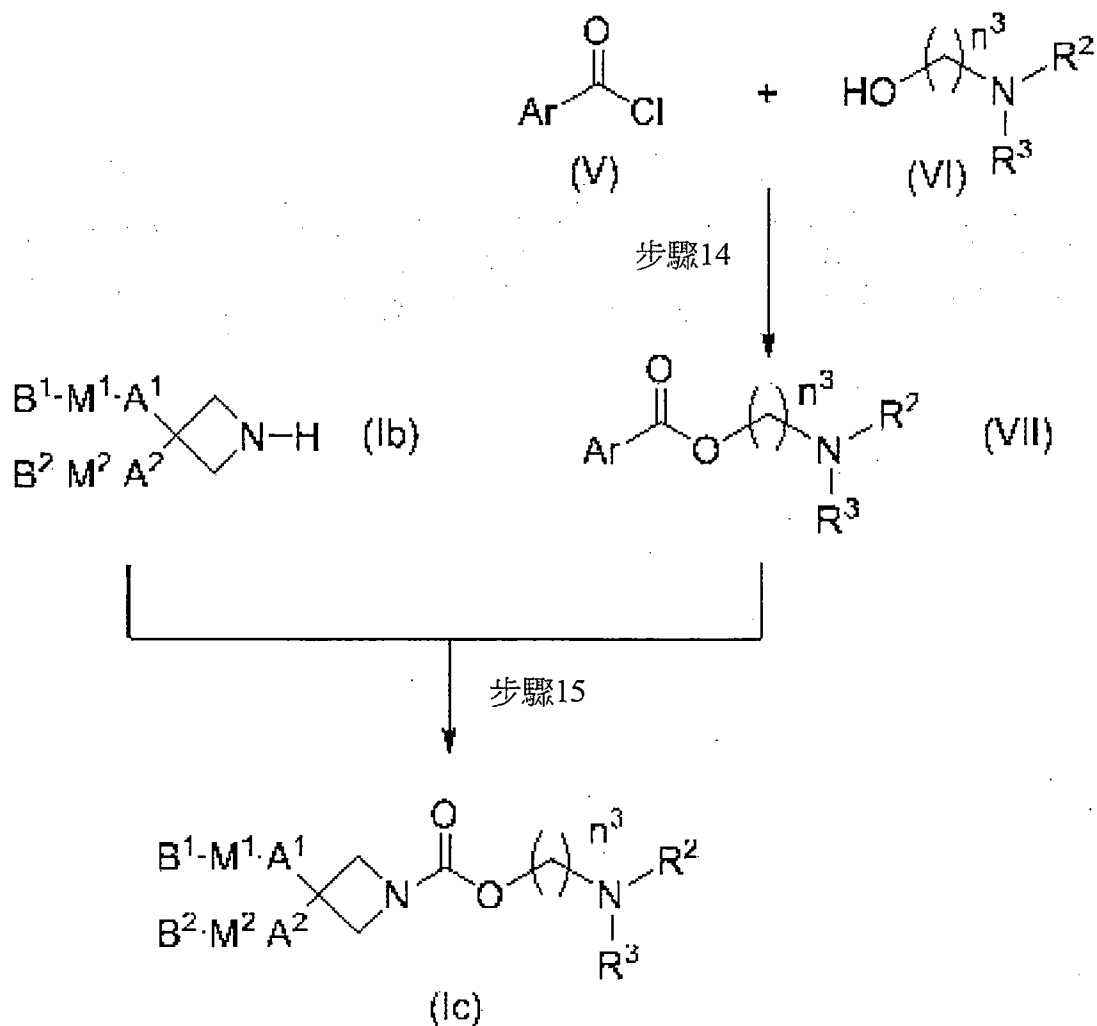
步驟13

化合物(I a')可藉由使用化合物(II g')來代替化合物(II g)而藉由與步驟7相同之方法製造。

製造方法3

化合物(I)中之 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(I c)例如可藉由以下之方法而製造。

[化16]



(於式中， A^1 、 A^2 、 B^1 、 B^2 、 M^1 、 M^2 、 R^2 、 R^3 及 n^3 的含義分別與上述內容相同，Ar表示對硝基苯基、鄰硝基苯基及對氯苯基等經取代之苯基或未經取代之苯基)

步驟14

化合物(VII)可藉由如下方式製造：使化合物(V)與化合物(VI)於無溶劑或溶劑中，視需要更佳為於存在1~10當量之添加劑及/或視需要更佳為於存在1~10當量之鹼之條件下，以 -20°C ~ 150°C 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、二甲基亞砷等，

其等可單獨使用或混合使用。

作為添加劑，例如可列舉1-羥基苯并三唑及4-二甲基胺基吡啶等。

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、二異丙基乙基胺、N-甲基咪啉、吡啶及1,8-二氮雙環[5.4.0]-7-十一烯(DBU)等。

化合物(V)能夠以市售品形式獲得。

化合物(VI)能夠以市售品形式獲得，或者藉由公知之方法(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))或依據該公知之方法之方法而獲得。

步驟15

化合物(Ic)可藉由如下方式製造：使化合物(Ib)與化合物(VII)於無溶劑或溶劑中，視需要於存在1~10當量之添加劑及/或視需要於存在1~10當量之鹼之條件下，以-20℃~150℃反應5分鐘~72小時。

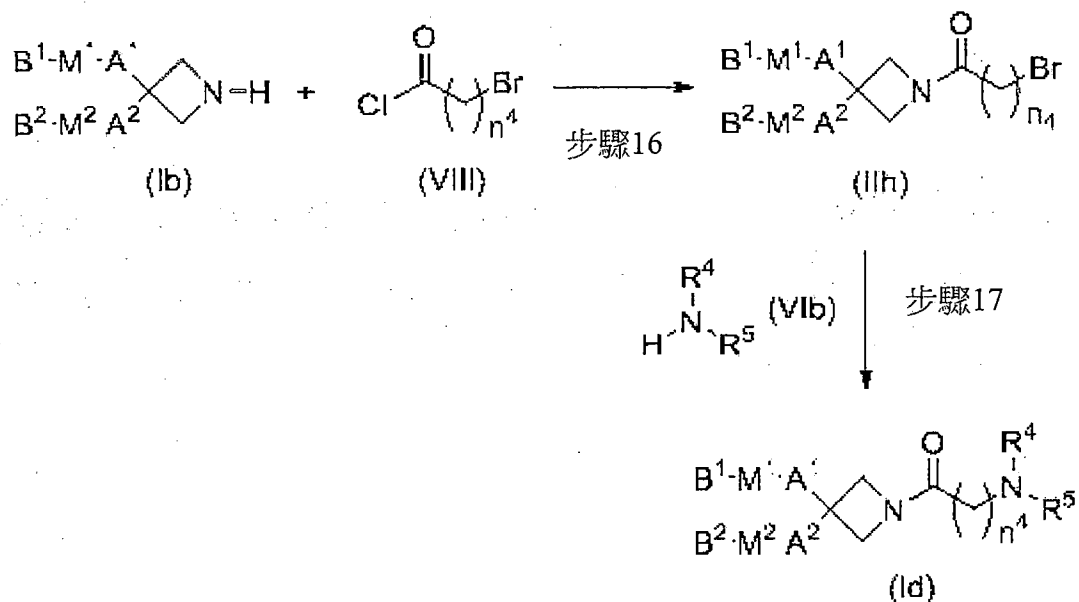
化合物(Ib)可藉由在製造方法2之步驟13中使用氨作為化合物(IVa)而製造。

作為溶劑、添加劑及鹼，例如可分別列舉步驟14中所例示者。

製造方法4

化合物(I)中之 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(Id)例如可藉由以下之方法而製造。

[化17]



(於式中， A^1 、 A^2 、 M^1 、 M^2 、 B^1 、 B^2 、 R^4 、 R^5 及 n^4 的含義分別與上述內容相同)

步驟16

化合物(IIh)可藉由如下方式製造：使化合物(Ib)與化合物(VIII)於無溶劑或溶劑中，視需要更佳為於存在1~10當量之鹼之條件下，以 $-20^{\circ}C$ ~ $150^{\circ}C$ 反應5分鐘~72小時。

作為溶劑，例如可列舉步驟14中所例示者。

作為鹼，例如可列舉步驟6中所例示者。

化合物(VIII)能夠以市售品形式獲得。

步驟17

化合物(Id)可藉由如下方式製造：使化合物(IIh)與1~20當量之化合物(VIb)於無溶劑或溶劑中，視需要於存在1~10當量之鹼之條件下，以室溫~ $200^{\circ}C$ 反應5分鐘~100小時。

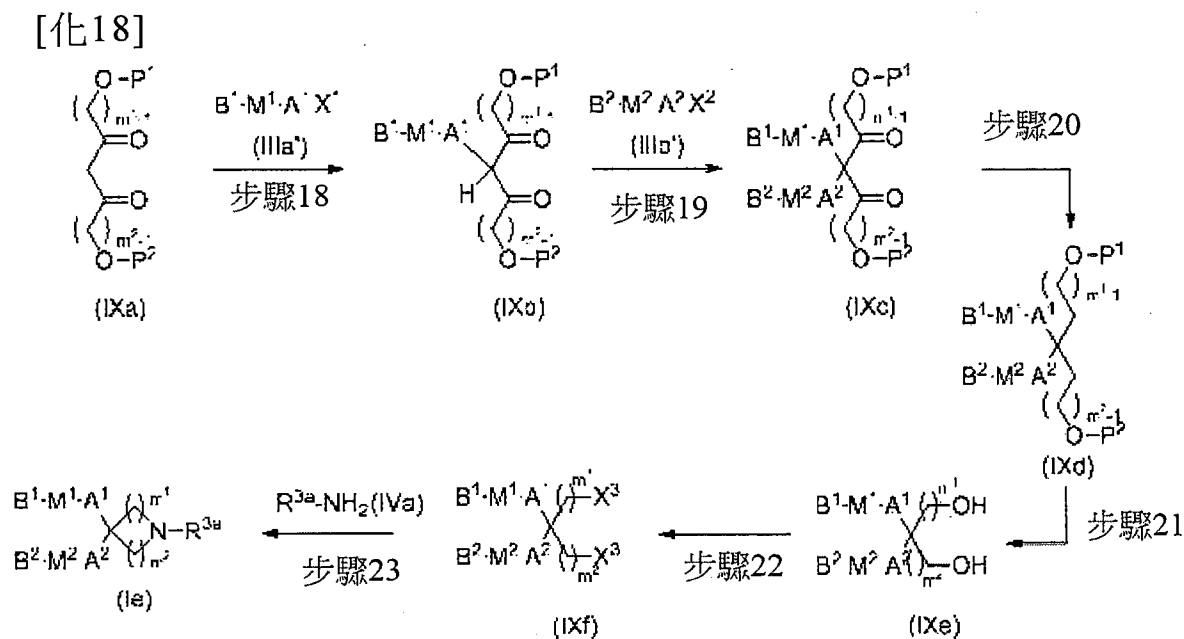
作為溶劑，例如可列舉步驟2及3中所例示者。

作為鹼，例如可列舉步驟14中所例示者。

化合物(VIb)能夠以市售品形式獲得。

製造方法5

化合物(I)中之 n^1 與 n^2 相同或不同而為1~4之整數(其中, n^1 及 n^2 均為1之情形除外)、 R^1 為氫原子、C1-C3之烷基、羥基C2-C4烷基或C1-C3二烷基胺基C2-C4烷基、 Z^1 及 Z^2 為氫原子之化合物(Ie)例如可藉由以下之方法而製造。



[於式中, A^1 、 A^2 、 M^1 、 M^2 、 B^1 、 B^2 、 R^{3a} 、 X^1 、 X^2 及 X^3 的含義分別與上述內容相同, m^1 與 m^2 相同或不同, 為1~4之整數(其中, m^1 及 m^2 均為1之情形除外), P^1 與 P^2 相同或不同, 表示保護基]

步驟18及步驟19

化合物(IXb)可使用化合物(IXa)來代替丙二酸二第三丁酯而藉由與步驟2相同之方法製造。

化合物(IXc)可使用化合物(IXb)來代替化合物(IIc)而藉由與步驟3相同之方法製造。

$B^1 \cdot M^1 \cdot A^1$ 與 $B^2 \cdot M^2 \cdot A^2$ 相同之情形時之化合物(IXc)可藉由在步驟18中使用2當量以上之化合物(IIIa')而製造。

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，有機合成中的保護基第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]。

化合物(IXa)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)]或依據該公知之方法之方法而獲得。

步驟20

化合物(IXd)可藉由如下方式製造：藉由公知之方法[例如，「新實驗化學講座15 氧化與還原(II)」，初版，丸善(1977年)]或依據該公知之方法之方法還原化合物(IXc)。

步驟21

化合物(IXe)可藉由如下方式製造：分別藉由適當之方法去除化合物(IXd)之保護基 P^1 及 P^2 。

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，有機合成中的保護基第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]，藉此可製造作為目標之化合物。

步驟22

化合物(IXf)可使用化合物(IXe)來代替化合物(IIe)而藉由與步驟6相同之方法製造。

步驟23

化合物(Ie)係使用化合物(IXf)來代替化合物(IIg)而藉由與步驟7相同

之方法製造。

化合物(I)中之除化合物(Ia)~(Ie)以外之化合物可藉由如下方式製造：藉由採用適於作為目標之化合物之結構之原料或試劑等，依據上述製造方法、或應用有機合成化學中常用之普通之製造方法而製造。

上述各製造方法之中間物及目標化合物可藉由有機合成化學中常用之分離精製法、例如過濾、提取、洗淨、乾燥、濃縮、再結晶及/或各種層析法等而單離精製。亦可不特別精製中間物而提供至下一反應。

於本發明之化合物(I)中，亦可於結構中之氮原子上之孤電子對配位氫離子，於該情形時，亦可形成於製藥上可容許之陰離子與鹽，於本發明中，作為以式(I)表示之化合物、或其製藥上可容許之鹽，亦包含於結構中之氮原子上之孤電子對配位有氫離子之陽離子性脂質。

於本發明中，作為於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、硝酸根離子、硫酸根離子及磷酸根離子等無機離子以及乙酸根離子、草酸根離子、馬來酸根離子、富馬酸根離子、檸檬酸根離子、苯甲酸根離子及甲磺酸根離子等有機酸根離子等。

作為本發明之以式(I)表示之化合物之於製藥上可容許的鹽，例如可列舉鹽酸鹽、氫溴酸鹽、硝酸鹽、硫酸鹽、磷酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、馬來酸鹽、富馬酸鹽、檸檬酸鹽、苯甲酸鹽及甲磺酸鹽等。

於本發明之化合物(I)中，亦有可存在幾何異構物或光學異構物等立體異構物或者互變異構物等者，本發明之化合物(I)包含該等異構物在內而包含所有可實現之異構物及其等之混合物。

本發明之化合物(I)中之各原子之一部分或全部可分別由對應之同位素原子取代，化合物(I)亦包含由該等同位素原子取代而成之化合物。例

如，化合物(I)中之氫原子之一部分或全部亦可為原子量為2之氫原子(氘原子)。

本發明之化合物(I)中之各原子之一部分或全部分別由對應的同位素原子取代而成之化合物可使用市售之基本組份而藉由與上述各製造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由氘原子取代而成之化合物例如可使用鈹錯合物作為觸媒、使用重水作為氘源而利用將醇、羧酸等氘化之方法[參照美國化學學會會志(J.Am.Chem.Soc.)，Vol.124，No.10,2092(2002)]等製造。

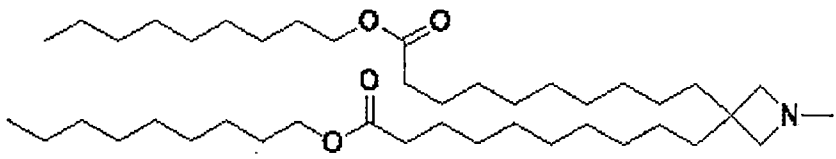
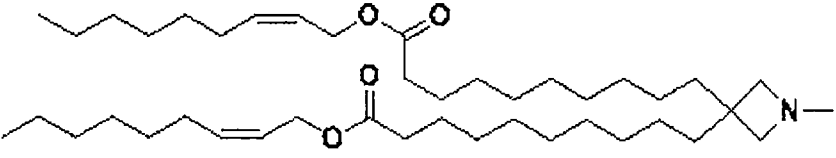
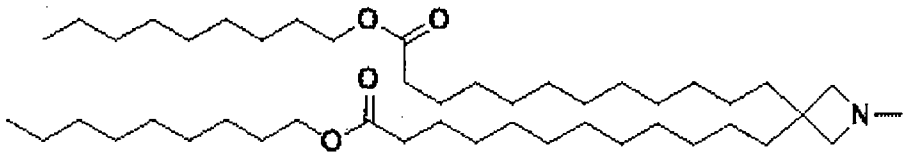
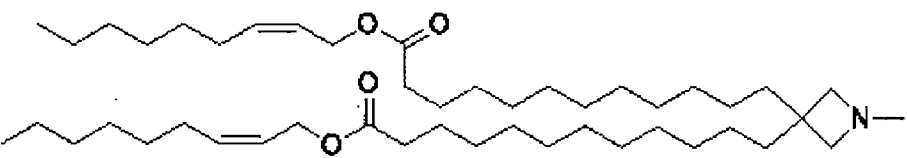
將本發明之化合物(I)之具體例示於表1~表3。然而，本發明之化合物(I)並不限定於該等具體例。

[表1]

表1

化合物編號

結構式

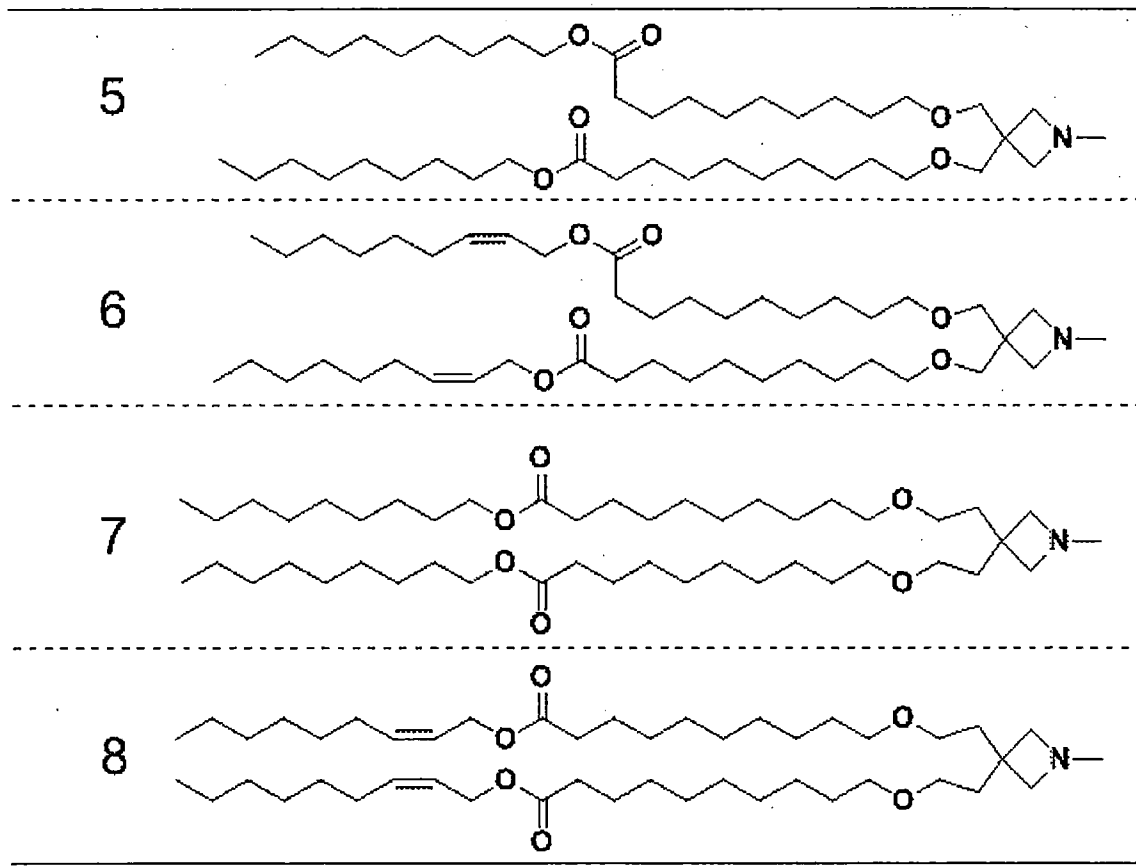
1	
2	
3	
4	

[表2]

表2

化合物編號

結構式



[表3]

表3

化合物編號

結構式

9	
10	
11	
12	

作為本發明中所使用之核酸，例如只要為聚合核苷酸及/或具有與核苷酸等同之功能之分子而成之分子，則可為任一分子。

作為核酸，例如可列舉作為核糖核苷酸之聚合物之核糖核酸(RNA)、作為脫氧核糖核苷酸之聚合物之脫氧核糖核酸(DNA)、包含RNA與DNA之嵌合核酸、及該等核酸之至少一個核苷酸由具有與該核苷酸等同之功能之分子取代而成的核苷酸聚合物等。

於至少一部分包含聚合核苷酸及/或具有與核苷酸等同之功能之分子而成的分子之結構的衍生物亦包含於本發明中所使用之核酸。

於本發明中，尿嘧啶U與胸腺嘧啶T可分別替換。

作為具有與核苷酸等同之功能之分子，例如可列舉核苷酸衍生物等。

作為核苷酸衍生物，例如只要為對核苷酸實施修飾所得的分子，則可為任一分子，例如可較佳地使用如下等分子：為了較RNA或DNA更提高核酸酶耐性或者進行穩定化而免受其他分解因子的影響、為了提高與互補鏈核酸之親和性、為了提高細胞透過性、或為了實現可視化，對核糖核苷酸或脫氧核糖核苷酸實施修飾所得的分子等。

作為核苷酸衍生物，例如可列舉糖基修飾核苷酸、磷酸二酯鍵修飾核苷酸及鹼基修飾核苷酸等。

作為糖基修飾核苷酸，例如只要為核苷酸之糖之化學結構之一部分或全部由任意之取代基修飾或取代而成者、或者由任意之原子取代而成者，則可為任一者，但較佳為使用2'-修飾核苷酸。

作為糖基修飾核苷酸之修飾基，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'-鹵基、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(自胺基酸之羧酸去除羥基而成者)及2'-O-胺基酸殘基(與上述胺基酸殘基的含義相同)等。

作為糖基修飾核苷酸，例如可列舉藉由在糖基上導入交聯結構而具有2個環狀結構之交聯結構型人工核酸(Bridged Nucleic Acid)(BNA)。

作為交聯結構型人工核酸，例如可列舉2'位之氧原子與4'位之碳原子經由亞甲基交聯而成的鎖人工核酸(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]以及伸乙基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。

作為糖基修飾核苷酸，亦可列舉肽核酸(PNA)[Acc.Chem.Res., 32, 624(1999)]、氧肽核酸(OPNA)[J.Am.Chem. Soc., 123, 4653(2001)]、肽核糖核酸(PRNA)[J.Am.Chem. Soc., 122, 6900(2000)]等。

作為糖基修飾核苷酸之修飾基，較佳為2'-氰基、2'-鹵基、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，更佳為2'-氰基、2'-氟基、2'-氯代基、2'-溴基、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-二甲基胺基氧基)乙基]、2'-O-[3-(N,N-二甲基胺基)丙基]、2'-O-{2-[2-(N,N-二甲基胺基)乙氧基]乙基}、2'-O-[2-(甲基胺基)-2-側氧基乙基]、2'-Se-甲基，進而較佳為2'-O-甲基、2'-O-乙基、2'-氟基，進而更佳為2'-O-甲基及2'-O-乙基。

糖基修飾核苷酸之修飾基可根據修飾基之尺寸而定義較佳之範圍，較佳為相當於自氟基至-O-丁基為止之尺寸之修飾基，更佳為相當於自-O-甲基至-O-乙基為止之尺寸之修飾基。

作為糖基修飾核苷酸之修飾基之烷基，例如可列舉C1-C6烷基等，具體而言，可列舉甲基、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、新戊基及己基等。

作為糖基修飾核苷酸之修飾基之烯基，例如可列舉C3-C6之烯基等，

具體而言，可列舉烯丙基、1-丙烯基、丁烯基、戊烯基及己烯基等。

作為糖基修飾核苷酸之修飾基之鹵基，例如可列舉氟原子、氯原子、溴原子及碘原子等。

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、白胺酸及異白胺酸等)、羥基胺基酸(具體而言，絲胺酸及蘇胺酸等)、酸性胺基酸(具體而言，天冬胺酸及麩胺酸等)、酸性胺基酸醯胺(具體而言，天冬醯胺及麩醯胺等)、鹼性胺基酸(具體而言，離胺酸、羥基離胺酸、精胺酸及鳥胺酸等)、含硫胺基酸(具體而言，半胱胺酸、胱胺酸及甲硫胺酸等)以及亞胺基酸(具體而言，脯胺酸及4-羥基脯胺酸等)等。

作為糖基修飾核苷酸之修飾基之取代烷基及取代烯基之取代基，例如可列舉鹵基(含義與上述內容相同)、羥基、巯基、胺基、側氧基、-O-烷基(-O-烷基之烷基部分的含義與上述C1-C6烷基相同)、-S-烷基(-S-烷基之烷基部分的含義與上述C1-C6烷基相同)、-NH-烷基(-NH-烷基之烷基部分的含義與上述C1-C6烷基相同)、二烷基胺基氧基(二烷基胺基氧基之2個烷基部分相同或不同，含義與上述C1-C6烷基相同)、二烷基胺基(二烷基胺基之2個烷基部分相同或不同，含義與上述C1-C6烷基相同)及二烷基胺基伸烷氧基(二烷基胺基伸烷氧基之烷基部分相同或不同，含義與上述C1-C6烷基相同，伸烷基部分係指自上述C1-C6烷基去除1個氫原子而成者)等，取代數量較佳為1~3。

作為磷酸二酯鍵修飾核苷酸，只要為核苷酸之磷酸二酯鍵之化學結構之一部分或全部由任意之取代基修飾或取代而成者、或者由任意之原子取代而成者，則可為任一者。

作為磷酸二酯鍵修飾核苷酸，例如可列舉磷酸二酯鍵被取代為硫代磷酸酯鍵而成的核苷酸、磷酸二酯鍵被取代為二硫代磷酸酯鍵而成的核苷酸、磷酸二酯鍵被取代為烷基磷酸酯鍵而成的核苷酸及磷酸二酯鍵被取代為亞磷醯胺鍵而成的核苷酸等。

作為鹼基修飾核苷酸，只要為核苷酸之鹼基之化學結構之一部分或全部由任意之取代基修飾或取代而成者、或者由任意之原子取代而成者，則可為任一者。

作為鹼基修飾核苷酸，例如可列舉鹼基中之氧原子由硫原子取代而成者、氫原子由C1-C6烷基取代而成者、甲基由氫原子或C2-C6烷基取代而成者及胺基由C1-C6烷基或C1-C6烷醯基等保護基保護而成者等。

作為核苷酸衍生物，亦可列舉對核苷酸或修飾糖基、磷酸二酯鍵或鹼基之至少一者而成之核苷酸衍生物加成脂質、磷脂質、啡啉、葉酸酯、啡啶、蔥醌、吡啶、螢光素、若丹明、香豆素及色素等其他化學物質而成者，例如可列舉5'-聚胺加成核苷酸衍生物、膽固醇加成核苷酸衍生物、類固醇加成核苷酸衍生物、膽汁酸加成核苷酸衍生物、維生素加成核苷酸衍生物、綠色螢光色素(Cy3)加成核苷酸衍生物、紅色螢光色素(Cy5)加成核苷酸衍生物、螢光素(6-FAM)加成核苷酸衍生物及生物素加成核苷酸衍生物等。

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中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、醚結構及酯結構以及組合2個以上之該等結構而成的結構等交聯結構。

作為本發明中所使用之核酸，較佳為抑制靶基因之表現之核酸，更佳為具有利用RNA干涉(RNAi)之靶基因之表現抑制作用之核酸。

作為本發明之靶基因，只要為產生mRNA而表現之基因，則無特別限定，例如可列舉與腫瘤或炎症相關之基因。

作為成為靶基因之與腫瘤或炎症相關之基因，具體而言可列舉血管內皮生長因子受體(vascular endothelial growth factor receptor)、纖維芽細胞生長因子、纖維芽細胞生長因子受體、血小板源性生長因子、血小板源性生長因子受體、肝細胞生長因子、肝細胞生長因子受體、克呂佩爾樣因子(Kruppel-like factor)、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、生長訊號路徑相關因子、生長相關轉錄因子及細胞凋亡相關因子等對蛋白質進行編碼的基因等，具體而言可列舉血管內皮生長因子基因、血管內皮生長因子受體基因、纖維芽細胞生長因子基因、纖維芽細胞生長因子受體基因、血小板源性生長因子基因、血小板源性生長因子受體基因、肝細胞生長因子基因、肝細胞生長因子受體基因、克呂佩爾樣因子基因、表現序列標籤(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(Cytoskeleton Associated Protein 5，細胞骨架相關蛋白)基因等)、生長訊號路徑相關因子基因(例如，KRAS(Kirsten Rat Sarcoma Viral，鼠類肉瘤病毒癌)基因等)、生長相關轉錄因子基因及細胞凋亡相關因子(例如，BCL-2(B cell lymphoma-2，B細胞淋巴瘤因子-2)基因等)等。

作為本發明之靶基因，較佳為於肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟中表現之基因，例如可列舉與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、載脂蛋白質(APO)、羥甲基戊二

醯(HMG)CoA還原酶、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、白三烯素受體、凝血脂素A2受體、組胺H1受體、碳酸脫水酶、血管緊張素轉化酶、腎素、p53、酪胺酸磷酸酶(PTP(Protein Tyrosine Phosphatase, 蛋白酪胺酸磷酸酶))、鈉依賴性葡萄糖傳輸載體、腫瘤壞死因子、介白素、鐵調素、甲狀腺素運載蛋白、抗凝血酶、蛋白質(protein)C及間質蛋白酶(例如, TMPRSS6 (Transmembrane Serine Protease 6, 跨膜絲胺酸蛋白酶)基因等)等對蛋白質進行編碼之基因等。

作為抑制靶基因之表現之核酸, 例如只要為包含相對於對蛋白質等進行編碼之基因(靶基因)之mRNA之一部分鹼基序列而互補之鹼基序列且抑制靶基因之表現之核酸, 則例如可使用siRNA(short interference RNA, 短小干涉RNA)及miRNA(micro RNA, 微型RNA)等雙鏈核酸、shRNA(short hairpin RNA, 短髮夾RNA)、反義核酸及核酶等單鏈核酸等任一種核酸, 但較佳為雙鏈核酸。

將包含相對於靶基因之mRNA之一部分鹼基序列而互補之鹼基序列之核酸稱為反義鏈核酸, 亦將包含相對於反義鏈核酸之鹼基序列而互補之鹼基序列之核酸稱為正義鏈核酸。正義鏈核酸係指包含靶基因之一部分之鹼基序列之核酸其本身等、與反義鏈核酸對合而形成雙鏈形成部之核酸。

所謂雙鏈核酸係指兩個鏈對合而具有雙鏈形成部之核酸。所謂雙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鏈之部分(二十鏈形成部)。

構成雙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, 進而更

佳為15~19個鹼基對。

作為雙鏈形成部之反義鏈核酸，例如可較佳地使用包含靶基因之mRNA之一部分序列之核酸、或於該核酸中1~3個鹼基、較佳為1~2個鹼基、更佳為1個鹼基被取代、缺失或加成且具有靶蛋白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)之鏈，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，進而更佳為17~23個鹼基，特佳為19~21個鹼基。

構成雙鏈核酸之反義鏈、正義鏈中之任一者或兩者之核酸亦可繼雙鏈形成部之後於3'側或5'側具有未形成雙鏈的部分。將未形成該雙鏈之部分亦稱為突出部(懸突)。

作為具有突出部之雙鏈核酸，例如可列舉於至少一鏈之3'末端或5'末端具有包含1~4個鹼基、通常1~3個鹼基之突出部之雙鏈核酸。

於具有突出部之雙鏈核酸中，突出部較佳為包含2個鹼基之突出部，更佳為包含dTdT或UU之突出部。

突出部可僅存在於反義鏈、僅存在於正義鏈、及存在於反義鏈與正義鏈之兩者，但較佳為於反義鏈與正義鏈之兩者具有突出部之雙鏈核酸。

亦可使用繼雙鏈形成部之後一部分或全部與靶基因之mRNA之鹼基序列一致的序列、或繼雙鏈形成部之後一部分或全部與靶基因之mRNA之互補鏈的鹼基序列一致之序列。

作為抑制靶基因之表現之核酸，例如亦可使用藉由Dicer等核糖核酸酶之作用而生成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'末端之突出部之雙鏈核酸等。

於雙鏈核酸為siRNA之情形時，較佳為反義鏈係自5'末端側朝向3'末

端側而至少第1~17號之鹼基(核苷)之序列為與靶基因之mRNA的連續之17個鹼基之序列互補之鹼基之序列，更佳為反義鏈係自5'末端側朝向3'末端側而第1~19號之鹼基之序列為與靶基因之mRNA的連續之19個鹼基之序列互補之鹼基之序列、自5'末端側朝向3'末端側而第1~21號之鹼基之序列為與靶基因之mRNA的連續之21個鹼基之序列互補之鹼基之序列、或自5'末端側朝向3'末端側而第1~25號之鹼基之序列為與靶基因之mRNA的連續之25個鹼基之序列互補之鹼基之序列。

於本發明中所使用之核酸為siRNA之情形時，較佳為核酸中之糖之10~70%、更佳為15~60%、進而較佳為20~50%為於2'位由修飾基取代而成之核糖。本發明之於2'位由修飾基取代而成之核糖係指核糖之2'位之羥基由修飾基取代而成者，核糖之2'位之羥基可與立體組態相同亦可不同，較佳為核糖之2'位之羥基與立體組態相同。作為於2'位由修飾基取代而成之核糖之修飾基，可列舉作為糖基修飾核苷酸之2'-修飾核苷酸之修飾基而例示者及氫原子，較佳為2'-氰基、2'-鹵基、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-烷基或2'-Se-取代烷基，更佳為2'-氰基、2'-氟基、2'-氯代基、2'-溴基、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)胺基氧基]乙基、2'-O-[3-(N,N-二甲基胺基)丙基]、2'-O-{2-[2-(N,N-二甲基胺基)乙氧基]乙基}、2'-O-[2-(甲基胺基)-2-側氧基乙基]、2'-Se-甲基、氫原子，進而較佳為2'-O-甲基、2'-O-乙基、2'-氟基或氫原子，進而更佳為2'-O-甲基或2'-O-氟基。

本發明中所使用之核酸包含核酸之結構中之磷酸部、酯部等中所包

含的氧原子等由例如硫原子等其他原子取代而成之衍生物。

鍵結至反義鏈及正義鏈之5'末端之鹼基之糖係5'位之羥基亦可分別由磷酸基或上述修飾基、或者藉由活體內之核酸分解酶等而轉化成磷酸基或上述修飾基之基修飾。

鍵結至反義鏈及正義鏈之3'末端之鹼基之糖係3'位之羥基亦可分別由磷酸基或上述修飾基、或者藉由活體內之核酸分解酶等轉化成磷酸基或上述修飾基之基修飾。

作為單鏈核酸，例如只要為如下之核酸即可：包括包含靶基因之連續之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、進而更佳為15~19個鹼基之序列之互補序列；或者於該核酸中，1~3個鹼基、較佳為1~2個鹼基、更佳為1個鹼基被取代、缺失或加成且具有靶蛋白之表現抑制活性。

單鏈核酸較佳為包含15~30個鹼基(核苷)、更佳為15~27個鹼基、進而較佳為15~25個鹼基、進而更佳為15~23個鹼基之鏈。

作為單鏈核酸，亦可使用經由間隔序列(間隔寡核苷酸)連結構成雙鏈核酸之反義鏈及正義鏈而成者。作為間隔寡核苷酸，較佳為6~12個鹼基之單鏈核酸，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之序列之單鏈核酸。由間隔寡核苷酸連接之反義鏈及正義鏈之順序係任一者均可為5'側。

作為構成雙鏈核酸之反義鏈及正義鏈經由間隔寡核苷酸連結而成之單鏈核酸，例如較佳為因莖環結構而具有雙鏈形成部之shRNA等單鏈核酸。shRNA等單鏈核酸通常為50~70個鹼基長度。

亦可使用如下之核酸：以藉由核糖核酸酶等之作用而生成單鏈核酸

或雙鏈核酸之方式設計，且為70個鹼基長度以下、較佳為50個鹼基長度以下、進而較佳為30個鹼基長度以下。

本發明中所使用之核酸係可使用既知之RNA或DNA合成法、及RNA或DNA修飾法製造。

本發明之組合物含有本發明之以式(I)表示之化合物、或其製藥上可容許之鹽(陽離子性脂質)及核酸。

本發明之組合物例如亦可為本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體。

本發明之組合物係含有本發明之陽離子性脂質、中性脂質及/或高分子與核酸之組合物，例如亦可為本發明之陽離子性脂質、中性脂質及/或高分子與核酸之複合體。

本發明之組合物亦可含有脂質膜，由脂質膜封入複合體。

脂質膜可為脂質單膜(脂質1分子膜)，亦可為脂質雙膜(脂質2分子膜)。於脂質膜中，亦可含有本發明之陽離子性脂質、中性脂質及/或高分子。

於複合體及/或脂質膜中，亦可含有除作為本發明之以式(I)表示之化合物、或其製藥上可容許之鹽之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質。

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、或除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質與中性脂質及/或高分子與核酸之複合體、以及封入複合體之脂質膜，且於脂質膜中含有本發明之陽離子性脂質之組合物等。該情形時之脂質膜可為脂質單膜(脂質1分子膜)，亦可為脂質雙膜(脂質2分子膜)。又，亦可於脂質膜中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，較佳為含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體之組合物、含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體及封入複合體之脂質膜且於脂質膜中含有本發明之陽離子性脂質之組合物、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複合體之脂質膜且於脂質膜中含有本發明之陽離子性脂質之組合物，更佳為含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體之組合物、以及含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體及封入複合體之脂質膜且於脂質膜中含有本發明之陽離子性脂質之組合物。

於任一組合物中，均可於脂質膜中含有中性脂質及/或高分子。又，亦可於複合體及/或脂質膜中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(一分子)層之膜(反微胞)之複合體、核酸與脂質體之複合體及核酸與微胞之複合體等，較佳為核酸與包含脂質單層之膜之複合體或核酸與脂質體之複合體。

作為含有封入複合體之脂質膜之組合物，例如可列舉以任意數量之脂質膜封入複合體之脂質體及脂質奈米粒子等。

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

作為除作為本發明之以式(I)表示之化合物、或其製藥上可容許之鹽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-(2,3-二油醯

氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)及N-(2,3-二-(9-(Z)-十八碳烯醯基氧基))-丙-1-基-N,N,N-三甲基氯化銨(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-(2,3-二油醯氧基丙基)]-N,N-二甲基-N-羥基乙基溴化銨(DORIE)及2,3-二油醯氧基-N-[2-(精胺甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙銨三氟乙酸酯(DOSPA)等、國際公開第2005/121348號中所揭示之DLinDMA(1,2-Dilinoleyloxy-N,N-dimethylaminopropane, 1,2-二亞油基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷)等、國際公開第2009/086558號中所揭示之DLin-K-DMA(2,2-Dilinoleyl-4-dimethylaminomethyl-[1,3]-dioxolane, 2,2-二亞油基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧雜環戊烷)等、國際公開第2011/136368號中所揭示之(3R2R)-3,4-雙((Z)-十六碳-9-烯基氧基)-1-甲基吡咯啉、及N-甲基-N,N-雙(2-((Z)-十八碳-6-烯基氧基)乙基)胺等。

作為除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質，較佳為DOTMA、DOTAP、DORIE、DOSPA、1,2-二亞油基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA)、2,2-二亞油基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-K-DMA)等含有具有2個非取代烷基之三級胺部位或具有3個非取代烷基之四級銨部位之陽離子性脂質，更佳為具有三級胺部位之陽離子性脂質。

三級胺部位及四級銨部位之非取代烷基較佳為甲基。

本發明之組合物除核酸以外，亦可含有與核酸化學性地近似之化合物。

本發明之組合物可藉由公知之製造方法或依據該公知之製造方法而製造，可為藉由任一製造方法而製造者。例如，於製造組合物中之一種之

含有脂質體之組合物時，可應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“歐洲生物學化學會聯盟通訊(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“美國國家科學院學報(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)”，1978年，第75卷，p.4194-4198]及pH值梯度法(例如，參照日本專利第2572554號公報、日本專利第2659136號公報等)等。

作為於製造脂質體時分散脂質體之溶液，例如可列舉水、酸、鹼、各種緩衝液、生理鹽水及胺基酸輸液等。

於製造脂質體時，亦可添加例如檸檬酸、抗壞血酸、半胱胺酸及乙二胺四乙酸(EDTA)等抗氧化劑、例如甘油、葡萄糖及氯化鈉等等張劑等。

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至例如乙醇等有機溶劑，蒸餾去除溶劑，之後添加生理鹽水等進行搖動攪拌，藉此可形成脂質體。

本發明之組合物可藉由如下等方法製造：例如，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至氯仿，接著加入核酸之水溶液與甲醇進行混

合而形成陽離子性脂質/核酸之複合體，進而取出氯仿層，於所取出之氯仿層中加入聚乙二醇化磷脂質、中性脂質與水而形成油包水型(W/O)乳液，藉由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)；或將核酸溶解至酸性之電解質水溶液，例如加入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)，將乙醇濃度降至20 v/v%為止而製備核酸內包脂質體，過濾上漿，藉由透析去除過量之乙醇，之後進一步提高pH值而透析試樣來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)。

本發明之組合物中，含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體、或本發明之陽離子性脂質與中性脂質及/或高分子與核酸之複合體、以及封入有複合體之脂質膜的含有脂質奈米粒子之組合物例如可根據國際公開第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。

於根據國際公開第02/28367號及國際公開第2006/080118號等中所記載之製造方法製造本發明之組合物之情形時，可藉由如下方式製造本發明之組合物：使用本發明之陽離子性脂質、核酸、中性脂質及/或高分子、以及自除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質適當地選擇之成分製造複合體，不使複合體溶解而分散至水或0~40%乙醇水溶液中(A液體)，另外，將封入複合體之脂質膜成分溶解至例如乙醇水溶液中(B液體)，混合體積比為1：1~10：1之A液體與B液體，進而適當地加入水。

作為A液體及B液體中之陽離子性脂質，可使用一種或複數種之本發

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，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進行混合而使用。

於本發明中，在含有本發明之陽離子性脂質與核酸之複合體、或本發明之陽離子性脂質與中性脂質及/或高分子與核酸之複合體以及封入有複合體之脂質膜的組合物，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、或除本發明之陽離子性脂質以外之陽離子性脂質與中性脂質及/或高分子與核酸之複合體以及封入複合體之脂質膜且於脂質膜中含有本發明之陽離子性脂質之組合物等之製造中及製造後，因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之融合而使複合體及膜之結構變異所成者亦包含於本發明之組合物。

亦可根據國際公開第02/28367號及國際公開第2006/080118號等中所記載之製造方法，藉由如下方式製造含有本發明之組合物與核酸之組合物：製造核酸、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的脂質體之複合體，不使複合體溶解而分散至水或0~40%乙醇水溶液中(A液體)，另外，將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至乙醇水溶液中(B液體)，混合體積比為1:1~10:1之A液體與B液體、或進而適當地加入水。

藉由本製造方法而獲得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複合體之脂質膜的組合物、或含有核酸與含有陽離子性脂質之由脂質單層構成之膜(反微胞)之複合體及封入複合體之脂質膜的組合

物。該組合物之脂質膜可為脂質單膜(脂質1分子膜)、脂質雙膜(脂質2分子膜)或多重膜中之任一種。

較佳為將本發明之核酸與脂質體之複合體中之脂質體的尺寸作為平均粒徑而預先調節成較佳為10 nm~400 nm、更佳為20 nm~110 nm、進而較佳為20 nm~80 nm。亦可於複合體及/或脂質膜中含有中性脂質及/或高分子。

A液體只要可形成脂質體與核酸之複合體，則乙醇濃度亦可為20~70%。

亦可以成為如下之乙醇濃度之比混合A液體與B液體來代替混合等量之A液體與B液體，於為該乙醇濃度時，混合A液體與B液體後不溶解複合體且不溶解B液體中之陽離子性脂質。較佳為亦可代替為以如下之比混合A液體與B液體，於為該比時，不溶解複合體，不溶解B液體中之陽離子性脂質且形成乙醇濃度為20~60%之乙醇水溶液，或者以成為混合A液體與B液體後不溶解複合體之乙醇濃度之比混合A液體與B液體，進而加入水，藉此設為不溶解B液體中之陽離子性脂質之乙醇濃度。

藉由本製造方法而獲得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複合體之脂質膜的組合物、或含有包含陽離子性脂質之由脂質單層構成之膜(反微胞)與核酸之複合體及封入複合體之脂質膜且於脂質膜中含有陽離子性脂質之組合物，本製造方法之製造性(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的總數較佳為相對於核酸之磷原子之數量為0.5~4倍，更佳為1.5~3.5倍，進而較佳為2~3倍。

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的陽離子性脂質之分子之總數較佳為相對於核酸之磷原子的數量為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之總數較佳為相對於核酸之磷原子之數量為1~10倍，更佳為2.5~9倍，進而較佳為3.5~8倍。

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的陽離子性脂質之分子之總數較佳為相對於核酸之磷原子的數量為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，可為單純脂質、複合脂質或誘導脂質中之任一種，例如可列舉磷脂質、甘油糖脂質、鞘糖脂質、神經鞘胺醇類及固醇等。

於在本發明之組合物中含有中性脂質之情形時，中性脂質之分子之總數較佳為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之總數為0.1~2倍，更佳為0.2~1.5倍，進而較佳為0.3~1.2倍。

本發明之組合物可於複合體中含有中性脂質，亦可於封入複合體之脂質膜中含有中性脂質。

較佳為於封入複合體之脂質膜中含有中性脂質，更佳為於複合體及封入複合體之脂質膜中均含有中性脂質。

作為中性脂質之磷脂質，例如可列舉磷脂醯膽鹼(具體而言，大豆磷脂醯膽鹼、蛋黃磷脂醯膽鹼(EPC)、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)、二軟脂醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、棕櫚醯油醯基磷脂醯膽鹼(POPC)、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)及二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPC)等)、磷脂醯乙醇

胺(具體而言，二硬脂醯基磷脂醯乙醇胺(DSPE)、二軟脂醯基磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺(DMPE)、16-0-單甲基磷脂醯乙醇胺、16-0-二甲基磷脂醯乙醇胺、18-1-反式磷脂醯乙醇胺、棕櫚醯油醯基磷脂醯乙醇胺(POPE)及1-硬脂醯基-2-油醯基-磷脂醯乙醇胺(SOPE)等)、甘油磷脂質(具體而言，磷脂醯絲胺酸、磷脂酸、磷脂醯甘油、磷脂醯肌醇、棕櫚醯油醯基磷脂醯甘油(POPG)及溶血磷脂醯膽鹼等)、鞘磷脂質(具體而言，神經鞘磷脂、腦醯胺磷酸乙醇胺、腦醯胺磷酸甘油及腦醯胺磷酸甘油磷酸等)、甘油磷酸脂質、鞘磷酸脂質、天然卵磷脂(具體而言，蛋黃卵磷脂及大豆卵磷脂等)以及氫化磷脂質(具體而言，氫化大豆磷脂醯膽鹼等)等天然或合成之磷脂質。

作為中性脂質之甘油糖脂質，例如可列舉磺醯基核糖甘油酯、二糖基甘油二酯、二半乳糖基甘油二酯、半乳糖基甘油二酯及糖基甘油二酯等。

作為中性脂質之鞘糖脂質，例如可列舉半乳糖基腦苷脂、乳糖基腦苷脂及神經節苷脂等。

作為中性脂質之神經鞘胺醇類，例如可列舉鞘胺醇、二十碳鞘胺醇及神經鞘胺醇以及其等之衍生物等。

作為衍生物，例如可列舉將鞘胺醇、二十碳鞘胺醇或神經鞘胺醇等之-NH₂轉化為-NHCO(CH₂)_xCH₃(於式中，x為0~18之整數，其中較佳為6、12或18)而成者。

作為中性脂質之固醇，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、海藻固醇及

3 β -[N-(N',N'-二甲基胺基乙基)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、聚葡萄糖胺糖、葡聚糖硫酸、聚-L-離胺酸、聚伸乙基亞胺、聚天冬胺酸、苯乙烯馬來酸共聚物、異丙基丙烯醯胺-丙烯醯基吡咯烷酮共聚物、聚乙二醇修飾樹枝狀聚合物、聚乳酸、聚乳酸聚乙醇酸及聚乙二醇化聚乳酸等。

作為高分子，亦可為包含1個以上之所例示之高分子之鹽的微胞。

高分子之鹽例如可列舉金屬鹽、銨鹽、酸加成鹽、有機胺加成鹽及胺基酸加成鹽等。

作為金屬鹽，例如可列舉鋰鹽、鈉鹽及鉀鹽等鹼金屬鹽、鎂鹽及鈣鹽等鹼土類金屬鹽、鋁鹽以及鋅鹽等。

作為銨鹽，例如可列舉銨及四甲基銨等之鹽。

作為酸加成鹽，例如可列舉鹽酸鹽、硫酸鹽、硝酸鹽及磷酸鹽等無機酸鹽、以及乙酸鹽、馬來酸鹽、富馬酸鹽及檸檬酸鹽等有機酸鹽。

作為有機胺加成鹽，例如可列舉味啉及哌啶等加成鹽。

作為胺基酸加成鹽，例如可列舉甘胺酸、苯丙胺酸、天冬胺酸、麩胺酸及離胺酸等加成鹽。

本發明之組合物較佳為例如含有選自糖、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、或者界面活性劑等，可含有於複合體中，亦可含有於封入複合體之脂質膜中，更佳為於複合體及封入複合體之脂質膜中均含有。

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種以上之物質之脂質衍生物及脂肪酸衍生物的分子之總

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的陽離子性脂質之分子之總數為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種以上之物質之脂質衍生物或脂肪酸衍生物、或者界面活性劑，較佳為糖脂質、或者水溶性高分子之脂質衍生物或脂肪酸衍生物，更佳為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種以上之物質之脂質衍生物或脂肪酸衍生物、或者界面活性劑較佳為如下之物質：具有分子之一部分藉由例如疎水性親和力或靜電性相互作用等而與本發明之組合物中之其他構成成分結合的性質，具有其他部分藉由例如親水性親和力或靜電性相互作用等而與製造組合物時之溶劑結合之性質，且具有2面性。

作為糖、肽或核酸之脂質衍生物或脂肪酸衍生物，可列舉例如蔗糖、山梨糖醇及乳糖等糖、例如來自酪蛋白之肽、來自卵白之肽、來自大豆之肽及麩胱甘肽等肽、或例如DNA、RNA、質體、siRNA及寡脫氧核苷酸(ODN)等核酸與中性脂質或本發明之陽離子性脂質、或者例如硬脂酸、棕櫚酸、肉豆蔻酸及月桂酸等脂肪酸鍵結而成之化合物等。

作為糖之脂質衍生物或脂肪酸衍生物，例如亦包含甘油糖脂質或鞘糖脂質等。

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、硫酸軟骨素、聚甘油、聚葡萄糖胺、聚乙烯吡咯啉酮、聚天冬胺酸醯胺、聚-L-離胺酸、甘露聚糖、支鏈澱粉

(pullulan)或寡甘油等或其等之衍生物、與中性脂質或本發明之陽離子性脂質、或者例如硬脂酸、棕櫚酸、肉豆蔻酸及月桂酸等脂肪酸鍵結而成之化合物等，較佳為聚乙二醇或者聚甘油之脂質衍生物或脂肪酸衍生物，更佳為聚乙二醇之脂質衍生物或脂肪酸衍生物。

水溶性高分子之脂質衍生物或脂肪酸衍生物亦可為鹽。

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)及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)、聚氧乙烯氫化蓖麻油60、聚氧乙烯蓖麻油(CREMOPHOR EL)等]、聚乙二醇山梨糖醇酐脂肪酸酯類(具體而言，聚氧乙烯山梨糖醇酐單油酸酯等)以及聚乙二醇脂肪酸酯類等，較佳為聚乙二醇化脂質。

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，較佳為聚甘油化脂質。

作為界面活性劑，例如可列舉聚氧乙烯山梨糖醇酐單油酸酯(具體而言，聚山梨糖醇酯80等)、聚氧乙烯聚丙二醇(具體而言，Pluronic(註冊商標)F68等)、山梨糖醇酐脂肪酸酯(具體而言，山梨糖醇酐單月桂酸酯及山梨糖醇酐單月桂酸酯等)、聚氧乙烯衍生物(具體而言，聚氧乙烯氫化蓖麻油60及聚氧乙烯月桂醇等)、甘油脂肪酸酯及聚乙二醇烷基醚等，較佳為聚氧乙烯聚丙二醇、甘油脂肪酸酯或聚乙二醇烷基醚。

亦可對本發明之組合物中之複合體及脂質膜任意地進行例如利用水溶性高分子等進行之表面改質[參照拉西克(D.D.Lasic)、馬丁(F.Martin)

編， “隱形脂質體(Stealth Liposomes)” (美國)，CRC出版公司(CRC Press Inc)，1995年，p.93-102]。

作為可使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、硫酸軟骨素、聚甘油、聚葡萄糖胺糖、聚乙烯吡咯啉酮、聚天冬胺酸醯胺、聚-L-離胺酸、甘露聚糖、支鏈澱粉及寡甘油等，較佳為葡聚糖、支鏈澱粉、甘露聚糖、支鏈澱粉或羥乙基澱粉。

於表面改質中，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等。表面改質係使本發明之組合物中之複合體及脂質膜含有選自糖、肽、核酸及水溶性高分子中之1種以上的物質之脂質衍生物或脂肪酸衍生物、或者界面活性劑之方法之一。

亦可藉由將靶配體共價鍵結至本發明之組合物之脂質成分之極性頭殘基而使靶配體直接鍵結至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的平均粒徑可根據所需而自由選擇。

作為調節平均粒徑之方法，例如可列舉擠出法、機械地粉碎(具體而言，使用Manton Gaulin或微噴均質機等)較大之多重膜脂質體(MLV)等之方法[參照穆勒(R.H.Muller)、貝妮塔(S.Benita)、貝姆(B.Bohm)編著，“利用乳液與奈米懸浮液的難溶性藥品製劑(Emulsion and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs)”，德國，斯圖加特科學出版社(Scientific Publishers Stuttgart)，1998年，p.267-294]等。

本發明之組合物中之複合體之尺寸係平均粒徑較佳為約5 nm~200 nm，更佳為約20 nm~150 nm，進而較佳為約20 nm~80 nm。

本發明之組合物(封入複合體之脂質膜)之尺寸係平均粒徑較佳為約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的平均粒徑例如可藉由動態光散射法而測定。

可藉由將本發明之組合物導入至哺乳動物之細胞而將本發明之組合物中的核酸導入至細胞內。

體內之本發明之組合物向哺乳動物之細胞的導入係根據可於體內進行之公知之轉染之順序進行即可。例如，可藉由將本發明之組合物靜脈內投予至包含人在內的哺乳動物而傳遞至例如產生腫瘤或炎症之器官或部位，將本發明之組合物中之核酸導入至傳遞器官或部位之細胞內。作為產生腫瘤或炎症之器官或部位，並無特別限定，例如可列舉胃及大腸等消化道、肝臟、肺、脾臟、胰腺、腎臟、膀胱、腦及脊髓等中樞神經系統、皮膚、血管以及眼球等。又，可藉由將本發明之組合物靜脈內投予至包含人在內的哺乳動物而將上述組合物傳遞至例如肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統及/或脾臟，將本發明之組合物中之核酸導入至傳遞器官或部位之細胞內。肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟之細胞可為正常細胞、與腫瘤或炎症相關之細胞或者與其他疾病相關之細胞中之任一種。

本發明之組合物中之核酸只要為具有利用RNA干涉(RNAi)之靶基因之表現抑制作用之核酸，則可於體內將抑制靶基因之表現之核酸等導入至

哺乳動物之細胞內，從而可抑制靶基因之表現。

投予對象較佳為人。

於本發明之靶基因為於例如肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟中表現之基因之情形時，可將本發明之組合物用作與肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟相關之疾病之治療劑或預防劑。

本發明亦提供一種將本發明之組合物投予至與哺乳動物之肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟相關之疾病之治療方法。投予對象較佳為人，更佳為患有與肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟相關之疾病之患者。

本發明之組合物亦可用作如下之工具：用以於關於與肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟相關之疾病之治療劑或預防劑的體內之藥效評估模型中，驗證抑制靶基因之有效性。

本發明之組合物亦可用作以核酸於例如血液成分等活體成分(例如血液及消化道等)中之穩定化、減少副作用或增大藥劑向包含靶基因之表現部位之組織或器官的集聚性等為目的之製劑。

於將本發明之組合物用作醫藥品之與肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟相關之疾病等的治療劑或預防劑之情形時，作為投予路徑，較理想的是使用於治療時最有效之投予路徑，例如可列舉口腔內、氣管內、直腸內、皮下、肌內或靜脈內等非經口投予或經口投予，較佳為靜脈內投予或肌內投予，更佳為靜脈內投予。

本發明之組合物之投予量係根據投予對象之症狀、年齡或投予路徑等而不同，例如以換算成核酸之1天投予量成為約0.1 μg ~1000 mg之方式投予即可。

作為適於靜脈內投予或肌內投予之製劑，例如可列舉注射劑，可列舉將所製備之本發明之組合物之分散液直接設為注射劑等形態者。

作為適當之製劑，較佳為例如藉由過濾或離心分離等而自分散液去除溶劑所得之製劑、將分散液凍結乾燥所得之製劑、以及將加入有例如甘露醇、乳糖、海藻糖、麥芽糖及甘胺酸等賦形劑之分散液凍結乾燥所得之製劑。

於注射劑之情形時，較佳為於去除或凍結乾燥本發明之組合物之分散液或溶劑所得之組合物中混合例如水、酸、鹼、各種緩衝液、生理鹽水或胺基酸輸液等而製備注射劑。亦可添加例如檸檬酸、抗壞血酸、半胱胺酸及EDTA等抗氧化劑或甘油、葡萄糖及氯化鈉等等張劑等而製備注射劑。亦可加入例如甘油等凍結保存劑而凍結保存。

其次，根據實施例、參考例及試驗例，具體地對本發明進行說明。然而，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譜(^1H NMR)係以400 MHz測定到者，存在根據化合物及測定條件而無法明確地觀察到交換性質子之情形。再者，作為訊號之多重性之表記，使用通常使用者。

參考例1

11,11-雙(羥基甲基)二十一烷二酸二壬酯(化合物IIIf-1)

步驟1

將壬烷-1-醇(東京化成工業公司製造，6.03 g，41.8 mmol)溶解至二氯甲烷(30 mL)，依序加入10-溴癸酸(東京化成工業公司製造，7.00 g，27.9 mmol)、1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二醯亞胺鹽酸鹽(東京化成工業公司製造，8.01 g，41.8 mmol)及二甲基胺基吡啶(3.40 g，27.9

mmol)而以室溫反應整夜。減壓濃縮反應混合物，利用矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=98/2)精製所獲得之殘渣，藉此獲得10-溴癸酸壬酯(5.75 g，產率為55%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 0.88(t, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.23-1.37(m, 20H), 1.37-1.45(m, 2H), 1.57-1.66(m, 4H), 1.80-1.89(m, 2H), 2.29(t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.40(t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 4.06(t, $J = 6.8$ Hz, 2H)。

步驟2

將丙二酸二第三丁酯(東京化成工業公司製造，1.03 mL，4.62 mmol)溶解至四氫呋喃(15 mL)，於0°C下加入氫化鈉(Nacalai Tesque公司製造，油性60%，0.555 g，11.4 mmol)而長時間進行攪拌直至發泡復原為止。於在0°C下加入於步驟1中所獲得之10-溴癸酸壬酯(5.24 g，13.9 mmol)之四氫呋喃溶液(5 mL)後，於70°C下攪拌2小時。於反應混合物中加入飽和鹽化銨水溶液而以乙酸乙酯提取。利用飽和鹽水洗淨有機層，利用無水硫酸鎂進行乾燥，之後進行過濾而減壓濃縮，藉此獲得十九烷-1,10,10,19-四羧酸10,10-二-第三丁酯1,19-二壬酯之粗產物。

將所獲得之粗產物溶解至二氯甲烷(20 mL)，於0°C下加入三氟乙酸(10 mL，130 mmol)而於室溫下攪拌2小時。減壓濃縮反應混合物，利用矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇=99/1~90/10)精製所獲得之殘渣，藉此獲得2,2-雙(10-(壬氧基)-10-側氧基癸基)丙二酸(1.89 g，產率為37%)。

ESI-MS(Electrospray Ionization Mass Spectrometry，電噴霧電離質譜法) m/z : 695(M - H)⁻

步驟3

將於步驟2中所獲得之2,2-雙(10-(壬氧基)-10-側氧基癸基)丙二酸

(1.84 g, 2.64 mmol)溶解至四氫呋喃(10 mL)，於0°C下加入硼烷-四氫呋喃錯合物(西格瑪奧德里奇(Sigma-Aldrich)公司製造，1 mol/L，7.92 mL，7.92 mmol)而以室溫攪拌整夜。於反應混合物中加入水而以乙酸乙酯提取。利用飽和鹽水洗淨有機層，利用無水硫酸鎂進行乾燥而過濾。減壓濃縮濾液，利用矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯=90/10~40/60)精製所獲得之殘渣，藉此獲得化合物IIf-1(0.400 g，產率為23%)。

ESI-MS m/z: 670(M + H)⁺

實施例1

10,10'-(1-甲基吡啶-3,3-二基)雙(癸酸)二壬酯(化合物1)

步驟1

將於參考例1中所獲得之化合物IIf-1(0.400 g，0.598 mmol)溶解至二氯甲烷(4 mL)，加入吡啶(0.484 mL，5.98 mmol)。於0°C下加入三氟甲磺酸酐(Nacalai Tesque公司製造，0.303 mL，1.79 mmol)，攪拌30分鐘。於反應混合物中加入水而以乙酸乙酯提取。利用飽和鹽水洗淨有機層，利用無水硫酸鎂進行乾燥而過濾。減壓濃縮濾液，藉此獲得11,11-雙(((三氟甲基)磺醯基)氧基)甲基)二十一烷二酸二壬酯之粗產物(0.558 g)。

將所獲得之粗產物(0.558 g)溶解至N,N-二甲基乙醯胺(4 mL)，加入甲基胺(東京化成工業公司製造，約9.8 mol/L之甲醇溶液，0.35 mL，2.99 mmol)而於60°C下攪拌1小時。於冷卻至室溫後，在反應混合物中加入水而以乙酸乙酯提取。利用飽和鹽水洗淨有機層，利用無水硫酸鎂進行乾燥而過濾。減壓濃縮濾液，利用矽膠管柱層析法(NH矽膠，己烷/乙酸乙酯=99/1~70/30)精製所獲得之殘渣，藉此獲得化合物1(0.220 g，產率為55%)。

ESI-MS m/z : 664(M + H)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.88(t, J = 6.8 Hz, 6H), 1.09-1.20(m, 4H), 1.20-1.38(m, 44H), 1.46-1.54(m, 4H), 1.56-1.72(m, 8H); 2.29(t, J = 7.7 Hz, 4H), 2.31(s, 3H), 2.93(s, 4H), 4.06(t, J = 6.7 Hz, 4H)。

實施例2

10,10'-(1-甲基吡啶-3,3-二基)雙(癸酸)二((Z)-2-壬烯-1-基)酯(化合物2)

步驟1

將於實施例1中所獲得之化合物1(0.170 g, 0.205 mmol)溶解至四氫呋喃(1.5 mL)，加入氫氧化鋰1水合物(Sigma-Aldrich公司製造，0.086 g, 2.05 mmol)之水(0.5 mL)溶液而攪拌1小時。由於無法確認反應之進展，因此加入乙醇(1 mL)而於60°C下攪拌2小時。於反應混合物中加入水而利用乙酸乙酯對水層進行2次洗淨。於利用1 mol/L之鹽酸將水層之pH值設為4左右後，以乙酸乙酯提取2次，以氯仿/甲醇=9/1之混合溶劑提取1次。利用無水硫酸鎂乾燥所獲得之有機層而進行過濾。減壓濃縮濾液，藉此獲得10,10'-(1-甲基吡啶-3,3-二基)雙(癸酸)之粗產物。

ESI-MS m/z : 410(M - H)⁻

步驟2

將於步驟1中所獲得之10,10'-(1-甲基吡啶-3,3-二基)雙(癸酸)溶解至二氯甲烷(1.5 mL)，依序加入(Z)-2-壬烯-1-醇(東京化成工業公司製造，0.138 g, 0.972 mmol)、1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二醯亞胺鹽酸鹽(0.140 g, 0.729 mmol)、二甲基胺基吡啶(0.0590 g, 0.486 mmol)而以室溫反應整夜。於反應混合物中加入水而以乙酸乙酯提取。利用飽和鹽

水洗淨有機層，利用無水硫酸鎂進行乾燥而過濾。減壓濃縮濾液，利用矽膠管柱層析法(NH矽膠，己烷/乙酸乙酯 = 99/2 ~ 80/20)精製所獲得之殘渣，藉此獲得化合物2(0.0640 g，產率為47%)。

ESI-MS m/z : 660(M + H)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.88(t, J = 7.0 Hz, 6H), 1.12-1.20(m, 4H), 1.22-1.41(m, 32H), 1.50-1.56(m, 4H), 1.56-1.71(m, 8H), 2.10(dd, J = 14.4, 7.2 Hz, 4H), 2.30(t, J = 7.6 Hz, 4H), 2.36(s, 3H), 3.01(s, 4H), 4.62(d, J = 6.8 Hz, 4H), 5.49-5.55(m, 2H), 5.61-5.67(m, 2H)。

參考例2 13,13-雙(羥基甲基)二十五烷二酸二壬酯(化合物IIf-2)

使用12-溴十二烷酸(Sigma-Aldrich公司製造，5.00 g，17.9 mmol)來代替10-溴癸酸而藉由與參考例1相同之方法獲得化合物IIf-2(0.180 g，產率為7%)。

ESI-MS m/z : 726(M + H)⁺;

實施例3

12,12'-(1-甲基吡啶-3,3-二基)二(十二酸)二壬酯(化合物3)

使用於參考例2中所獲得之化合物IIf-2(0.180 g，0.248 mmol)來代替於參考例1中所獲得之化合物IIf-1而藉由與實施例1相同之方法獲得化合物3(0.120 g，產率為67%)。

ESI-MS m/z : 720(M + H)⁺; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.88(t, J = 6.8 Hz, 6H), 1.11-1.20(m, 4H), 1.23-1.35(m, 52H), 1.49-1.55(m, 4H), 1.57-1.66(m, 8H), 2.29(t, J = 7.6 Hz, 4H), 2.31(s, 3H), 2.94(s, 4H), 4.06(t, J = 6.7 Hz, 4H)。

實施例4

12,12'-(1-甲基吡啶-3,3-二基)二(十二酸)二((Z)-2-壬烯-1-基)酯(化合物4)

使用於實施例3中所獲得之化合物3來代替於實施例1中所獲得之化合物1而藉由與實施例2相同之方法獲得化合物4(0.0390 g, 產率為36%)。

ESI-MS m/z : 716($M + H$)⁺; ¹H-NMR($CDCl_3$) δ : 0.88(t, $J = 6.8$ Hz, 6H), 1.10-1.21(m, 4H), 1.21-1.39(m, 44H), 1.51-1.67(m, 8H), 2.10(q, $J = 6.9$ Hz, 4H), 2.30(t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 2.42(s, 3H), 3.11(s, 4H), 4.62(dt, $J = 6.8, 0.6$ Hz, 4H), 5.49-5.56(m, 2H), 5.61-5.67(m, 2H)。

實施例5

使用於實施例1中所獲得之化合物1而如下所述般製備組合物。所使用之核酸係包含正義鏈[5'-rGrCrCrArGrArCrUrUrUrGrUrUrGrGrArUrUrUrGrA-3'(鍵結至附有r之鹼基之糖為核糖)：序列編號1]、與反義鏈[5'-rArAmArUmCrCmArAmCrAmArAmGrUmCrUmGrGmCmUmU-3'(鍵結至附有r、m之鹼基之糖分別為核糖、2'位之羥基由甲氧基取代之核糖)：序列編號2]，且抑制次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶(Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1，以下表示為HPRT1)基因之表現之抗HPRT1 siRNA，自Genedesign公司購得(以下，稱為HPRT1 siRNA)。核酸係利用蒸留水製備成24 mg/mL而使用。

以化合物1/PEG-DMPE Na(日油公司製造)=57.3/5.52(所有數值單位均為mmol/L)之方式稱取各試樣而懸浮至含有鹽酸及乙醇之水溶液，利用旋渦(vortex)攪拌混合機進行攪拌、及反覆加溫而獲得均勻之懸浮液。將所獲得之懸浮液於室溫下通過0.05 μ m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。藉由粒徑測定裝置測定所獲

得之脂質體之平均粒徑，確認處於30 nm至100 nm之範圍內。以脂質體之分散液：HPRT1 siRNA溶液=3：1之比率混合所獲得之脂質體的分散液與HPRT1 siRNA溶液，進而加入29倍量之蒸留水進行混合，藉此製備化合物1/PEG-DMPE Na/HPRT1 siRNA複合體之分散液。

以化合物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(所有數值單位均為mmol/L)之方式稱取各試樣並溶解至乙醇而製備脂質膜構成成分之溶液。

於所獲得之脂質膜構成成分之溶液中添加4倍量之乙醇，以2：3之比率混合所獲得之化合物1/PEG-DMPE Na/HPRT1 siRNA複合體之分散液，進而與數倍量之蒸留水混合而獲得粗製劑。

所獲得之粗製劑係於使用Amicon Ultra(Millipore公司製造)濃縮後，以生理鹽水稀釋，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。測定所獲得之製劑之siRNA濃度，與投予濃度對應地使用生理鹽水進行稀釋，藉此獲得製劑1(含有化合物1及HPRT1 siRNA之組合物)。

實施例6

分別使用於實施例2、3中所獲得之化合物2、3而與實施例5相同地獲得製劑2及3(含有化合物2、3各者、及HPRT1 siRNA之組合物)。

藉由粒徑測定裝置測定於實施例5及6中所獲得之製劑1~3(組合物)之平均粒徑，將其結果示於表4。

[表4]

表4

化合物編號	1	2	3
製劑編號	1	2	3
所獲得之製劑之粒徑(nm)	101	109	114

實施例7

與實施例5相同地製備化合物1/PEG-DMPE Na/HPRT1 siRNA複合體之分散液。

以化合物1/PEG-DMPE Na(日油公司製造)/膽固醇(日油公司製造)=8.947/0.147/20.336(所有數值單位均為mmol/L)之方式稱取各試樣並溶解至乙醇而製備脂質膜構成成分之溶液。

於所獲得之脂質膜構成成分之溶液中添加4倍量之乙醇，以2：3之比率與所獲得之化合物1/PEG-DMPE Na/HPRT1 siRNA複合體之分散液混合，進而與數倍量之蒸留水混合而獲得粗製劑。

所獲得之粗製劑係於使用Amicon Ultra(Millipore公司製造)濃縮後，以生理鹽水稀釋，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。測定所獲得之組合物之siRNA濃度，與投予濃度對應地使用生理鹽水進行稀釋，藉此獲得製劑4(含有化合物1及HPRT1 siRNA之組合物)。

實施例8

分別使用於實施例2~4中所獲得之化合物2~4而與實施例7相同地獲得製劑5~8(含有化合物2~4各者、及HPRT1 siRNA之組合物)。

藉由粒徑測定裝置測定於實施例7及8中所獲得之製劑(組合物)之平均粒徑，將其結果示於表5。

[表5]

表5

化合物編號	1	2	3	4
製劑編號	4	5	6	7
所獲得之製劑之粒徑(nm)	115	118	118	100

試驗例1

為了調查於實施例5及6中所獲得之製劑1~3(含有化合物1~3各者、及HPRT1 siRNA之組合物)之活性，藉由以下所記載之方法進行評估。

將人胰腺癌細胞株MIA-PaCa2以7500細胞數量/80 uL/孔播種至包含10%胎牛血清(FBS)之DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium，杜氏改良伊格爾)培養基(Nacalai Tesque，08458-45)中，又，將人肺癌細胞株NCI-H358以7500細胞數量/80 uL/孔播種至包含10%胎牛血清(FBS)之RPMI(Roswell Park Memorial Institute，洛斯維帕克紀念研究所)1640培養基(Nacalai Tesque，30264-85)中，於37°C、5%CO₂之條件下培養24小時。此後，以作為siRNA濃度而最終濃度成為0.3~100 nM之方式，利用Opti-MEM(Minimum Essential Medium，最低必需培養基)培養基(賽默飛世爾(Thermo Fisher)，11058021)稀釋於實施例5及6中所製備之各種製劑，將20 uL添加至細胞。又，作為陰性對照，將Opti-MEM培養基20 uL添加至細胞。

將進行各種製劑之處理所得之細胞於37°C之5%CO₂培養箱內培養24小時，利用經冰凍之磷酸緩衝生理鹽水(Phosphate buffered saline，PBS)洗淨，使用Thermo Fisher公司之Cells-to-Ct套組(Thermo Fisher，AM1729)根據隨附之使用說明書回收總RNA而作成cDNA(Complementary Deoxyribonucleic Acid，互補脫氧核糖核酸)。

將所獲得之cDNA使用於PCR反應之模板，藉由使用應用生物系統(Applied Biosystems) QuantStudio 12K Flex(ABI公司)之TaqMan-PCR(TaqMan Gene Expression，4331182)分別對HPRT1基因及作為構成性表現基因之GAPDH(D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，

D-甘油醛-3-磷酸脫氫酶)基因進行特異性之PCR擴增而進行mRNA量之定量。PCR反應之條件係依據TaqMan Gene Expression隨附之使用說明書。檢體之mRNA量係算出相對於GAPDH之mRNA量的HPRT1之mRNA量，作為將陰性對照處理群之該值設為1時之相對比率而算出。將關於HPRT1之mRNA量之結果示於圖1及圖2。

試驗例2

為了調查於實施例7及8中所獲得之製劑4~8(含有化合物1~4各者、及HPRT1 siRNA之組合物)之活性，藉由與試驗例1相同之方法進行評估。將關於HPRT1之mRNA量之結果示於圖3及圖4。

根據圖1、圖2、圖3及圖4可知，藉由投予於實施例5~8中所獲得之製劑1~7而HPRT1 mRNA量減少。

藉此，如下情形變明確：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使於體內將核酸傳遞至細胞內之情形變容易。

[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：次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶siRNA正義鏈

序列編號2：次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶siRNA反義鏈

【序列表】

<110> 日商協和醱酵麒麟有限公司

<120> 作為陽離子性脂質之化合物

<130> K1635AIP0009

<150> JP 2015-254113

<151> 2015-12-25

<160> 2

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HPRT1 siRNA正義鏈

<400> 1

gccagacuuu guuggauug a

21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HPRT1 siRNA反義鏈

<220>

<221> 修飾鹼基

<222> (3)..(3)

<223> am

<220>

<221> 修飾鹼基

<222> (5)..(5)

<223> cm

<220>

<221> 修飾鹼基

<222> (7)..(7)

<223> am

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (9)..(9)
<223> cm

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (11)..(11)
<223> am

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (13)..(13)
<223> gm

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (15)..(15)
<223> cm

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (17)..(17)
<223> gm

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (19)..(19)
<223> cm

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> um

<400> 2
aaauccaaca aagucuggcu u

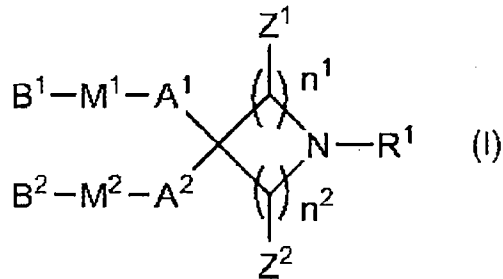
21

【發明申請專利範圍】

【第1項】

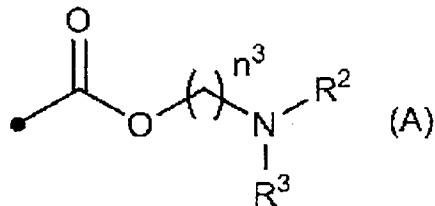
一種化合物、或其製藥上可容許之鹽，其係以如下之式(I)表示：

[化1]



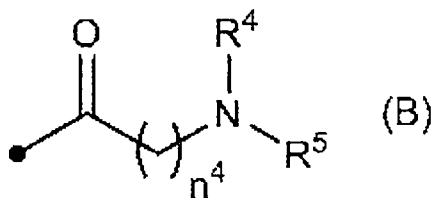
[於式中， R^1 為氫原子、C1-C3烷基、羥基C2-C4烷基、二C1-C3烷基胺基C2-C4烷基、式(A)

[化2]



(於式中， R^2 與 R^3 相同或不同，為氫原子或C1-C3烷基，或者 R^2 及 R^3 亦可與鍵結之氮原子一起形成C2-C6含氮雜環， n^3 為2~6之整數)、或式(B)

[化3]



(於式中， R^4 與 R^5 相同或不同，為氫原子或C1-C3烷基，或者 R^4 及 R^5 亦可與鍵結之氮原子一起形成C2-C6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、 n^2 為1之情形除外)，

Z^1 對應於所鍵結之各碳而分別獨立，為氫原子或C1-C3烷基，

Z^2 對應於所鍵結之各碳而分別獨立，為氫原子或C1-C3烷基，

A^1 與 A^2 相同或不同，為直鏈狀或支鏈狀之C8-C20伸烷基或C8-C20伸烯基、或者C6-C18伸烷氧基C1-C3伸烷基或C6-C18伸烯氧基C1-C3伸烷基，

M^1 與 M^2 相同或不同，選自由-OC(O)-、-C(O)O-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(S)-、-C(S)O-、-SS-、-C(R⁶)=N-、-N=C(R⁶)-、-C(R⁶)=N-O-、-O-N=C(R⁶)-、-N(R⁶)C(O)-、-C(O)N(R⁶)-、-N(R⁶)C(S)-、-C(S)N(R⁶)-、-N(R⁶)C(O)N(R⁷)-、-N(R⁶)C(O)O-、-OC(O)N(R⁶)-及-OC(O)O-所組成之群，

R^6 與 R^7 相同或不同，為氫原子或C1-C4烷基，

B^1 與 B^2 相同或不同，為直鏈狀或支鏈狀之C1-C16烷基或C2-C16烯基]。

【第2項】

如請求項1之化合物、或其製藥上可容許之鹽，其中 M^1 與 M^2 相同或不同，選自由-OC(O)-、-C(O)O-、-N(R⁶)C(O)-及-C(O)N(R⁶)-所組成之群。

【第3項】

如請求項2之化合物、或其製藥上可容許之鹽，其中 M^1 與 M^2 相同或不同，為-OC(O)-或-C(O)O-。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之化合物、或其製藥上可容許之鹽，其中 A^1 與 A^2 相同或不同，為直鏈狀或支鏈狀之C8-C20伸烷基或C8-C20伸烯基。

【第5項】

如請求項1至4中任一項之化合物、或其製藥上可容許之鹽，其中 $B^1-M^1-A^1$ -與 $B^2-M^2-A^2$ -相同。

【第6項】

如請求項1至5中任一項之化合物、或其製藥上可容許之鹽，其中 R^1 為C1-C3烷基。

【第7項】

如請求項1至6中任一項之化合物、或其製藥上可容許之鹽，其中 n^1 為1， n^2 為1~3之整數。

【第8項】

如請求項1至7中任一項之化合物、或其製藥上可容許之鹽，其中 n^1 及 n^2 均為1。

【第9項】

一種組合物，其含有如請求項1至8中任一項之化合物、或其製藥上可容許之鹽及核酸。

【第10項】

如請求項9之組合物，其進而包含中性脂質及/或高分子。

【第11項】

如請求項9或10之組合物，其中核酸為具有利用RNA干涉(RNAi)之靶基因之表現抑制作用之核酸。

【第12項】

如請求項11之組合物，其中靶基因為於肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟中表現之基因。

【第13項】

如請求項9至12中任一項之組合物，其係靜脈內投予用。

【第14項】

一種醫藥，其包含如請求項9至13中任一項之組合物。

【第15項】

一種與肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟相關之疾病之治療劑，其包含如請求項9至13中任一項之組合物。

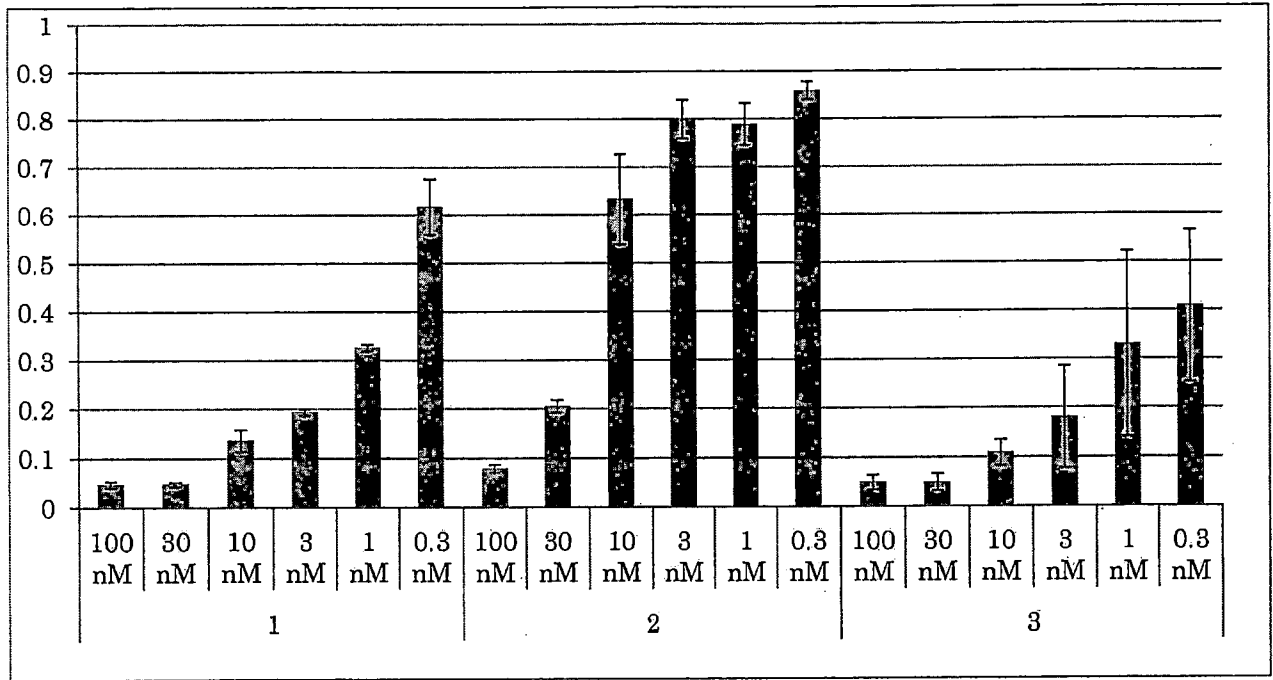
【第16項】

一種與肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟相關之疾病之治療方法，其包含將如請求項9至13中任一項之組合物投予至需要該組合物之患者。

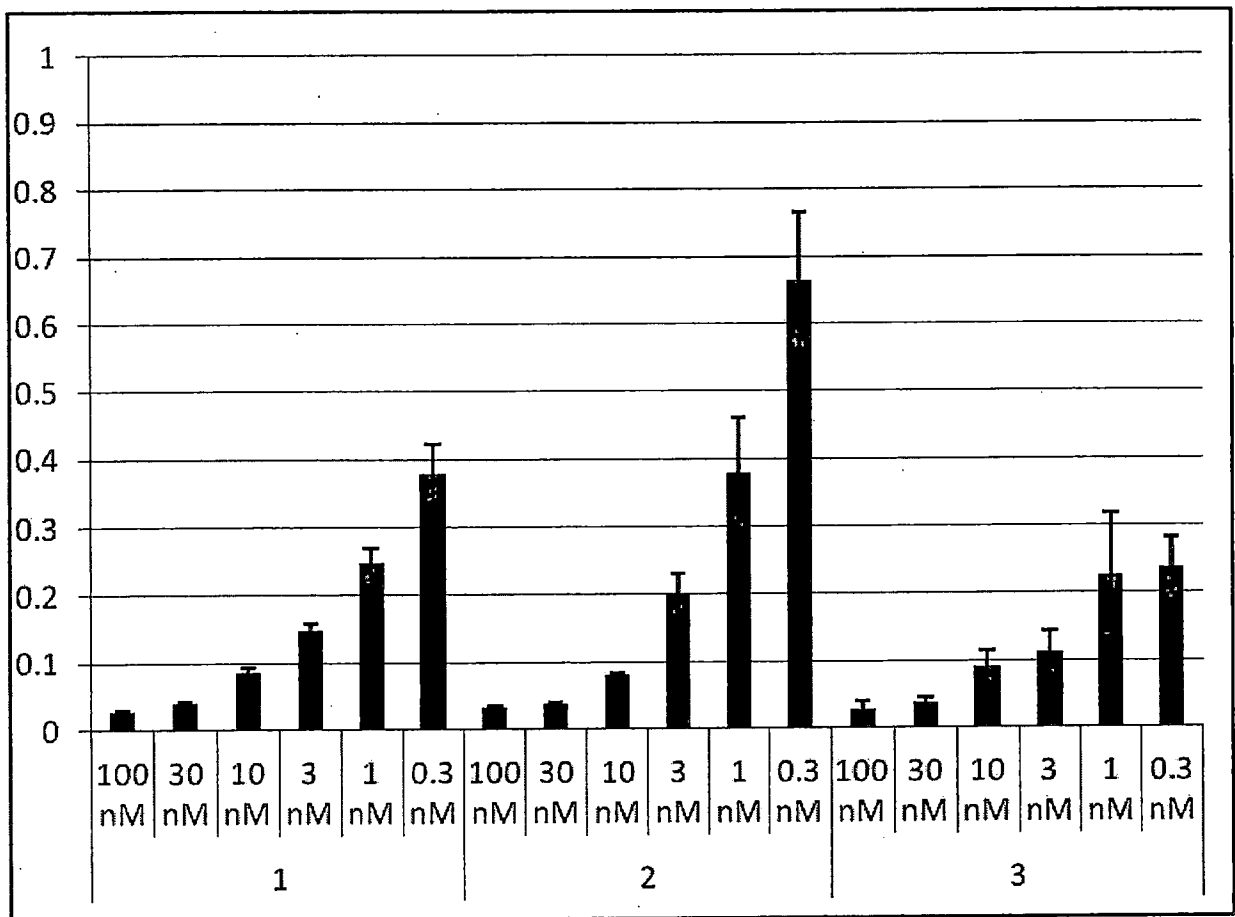
【第17項】

如請求項9至13中任一項之組合物，其係用於治療與肝臟、肺、腎臟、消化道、中樞神經系統或脾臟相關之疾病。

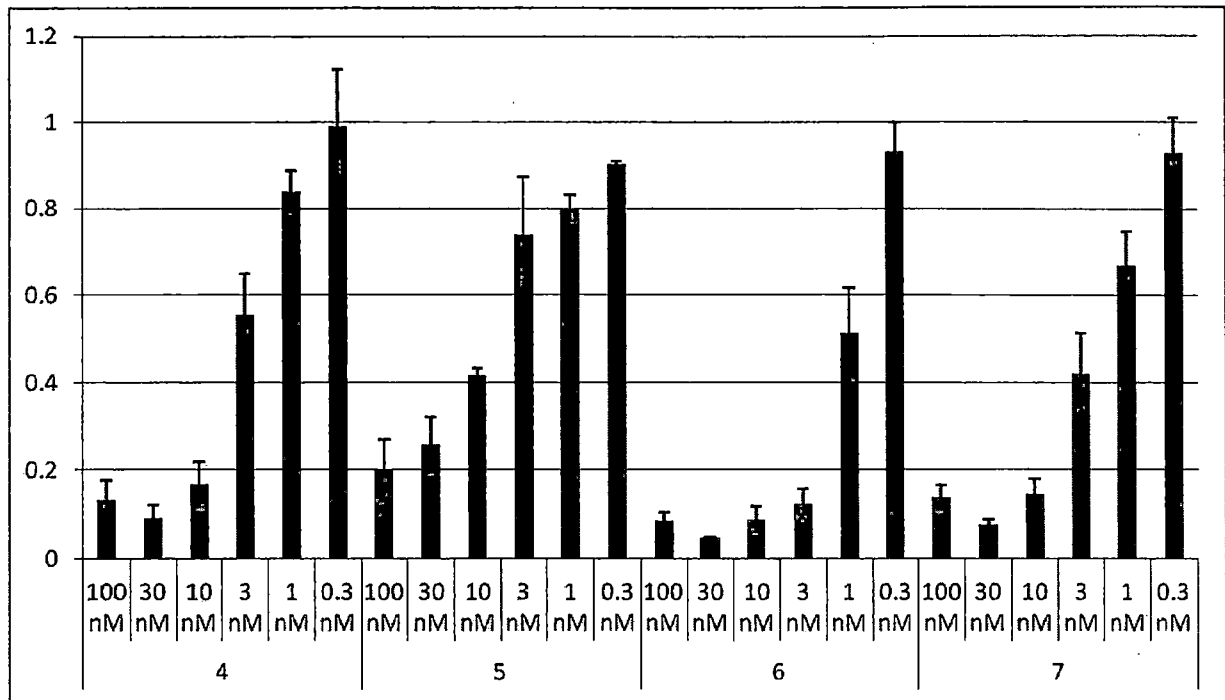
【發明圖式】



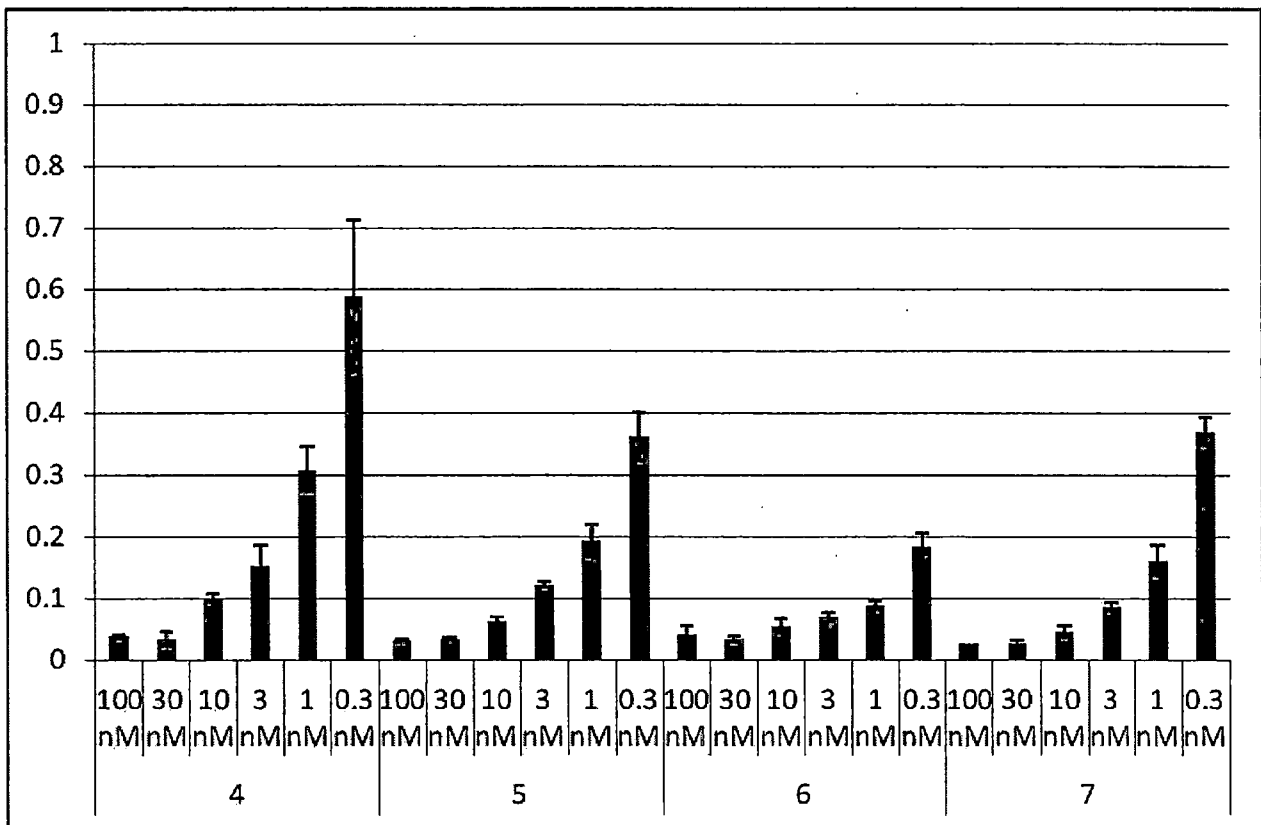
【圖1】



【圖2】



【圖3】



【圖4】