明　細　書

発明の名称 ： 脂質ナノ粒子

技術分野

[0001]　本発明は、薬物を細胞に効率的に導入可能な脂質ナノ粒子、および、当該脂質ナノ粒子の構成脂質に関する。

背景技術

[0002]　脂溶性薬物や、ｓｉＲＮＡ（small interfering RNA）、ｍＲＮＡ等の核酸を封入し、標的細胞へ送達するためのキャリアとして、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）が利用されている。例えば、ｓｉＲＮＡなどの核酸を効率的に標的細胞内へ送達するためのキャリアとなる脂質ナノ粒子として、生理的ｐＨでは電気的に中性であり、エンドソームなどの弱酸性ｐＨ環境下ではカチオン性に変化するｐＨ感受性カチオン性脂質を構成脂質として含む脂質ナノ粒子が報告されている。

[0003]　本願出願人らにより、ＣＬ４Ｆ６およびＣＬ１５Ｆ６を脂質として使用する場合と比較して、高いｉｎ　ｖｉｖｏ遺伝子発現活性を示す、ｐＨ感受性カチオン性脂質を含有する脂質ナノ粒子が開示されている（特許文献１）。また、本願出願人は、イオン化可能なカチオン性脂質を有するｓｉＲＮＡ含有リポソームの形成に際し、レチノイドにリンカーを介して構成脂質を結合させたレチノイドコンジュゲートを使用している（特許文献２）。しかしながら、薬物送達用の脂質ナノ粒子に用いることができる脂質は限られており、薬物を細胞に効率的に導入可能な新たな脂質の開発が求められていた。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第２０２２／０７１５８２号

特許文献2：特表２０１５－５２３９９０

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、薬物を細胞に効率的に導入可能な脂質ナノ粒子、および、当該脂質ナノ粒子の構成脂質を提供することを目的とする。

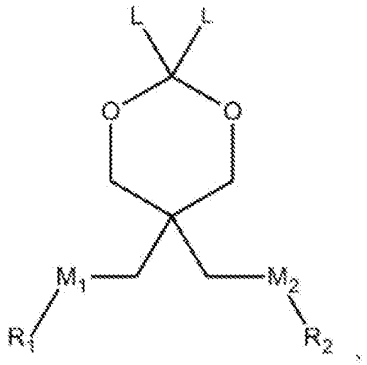
課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、１，３－ジオキサンなどのジオキサン構造、または、１，３－ジオキソランなどのジオキソラン構造を備えるｐＨ感受性カチオン性脂質を構成脂質として含む脂質ナノ粒子が、薬物を細胞に効率的に導入可能であることを見出し、本発明を完成させた。

[0007] すなわち、本発明は、以下の脂質ナノ粒子およびその構成脂質を提供するものである。

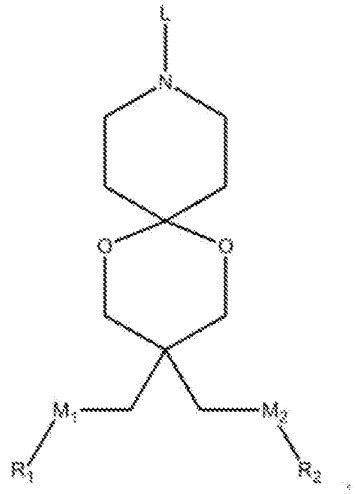
［１］一般式Ｉ：

[化1]



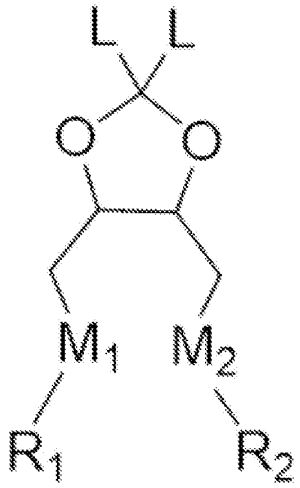
一般式ＩＩ：

[化2]



又は、一般式ＩＩＩ：

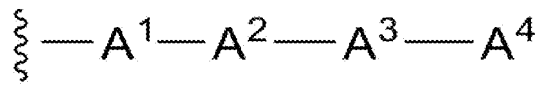
[化3]



〔式中、

Ｌは、独立して、Ｈ、直鎖のＣ$_{1-10}$アルキル又は分岐のＣ$_{3-10}$アルキル、あるいは、

[化4]



であり、A^1は、C_{1-6}アルキレンまたはフェニレンであり、

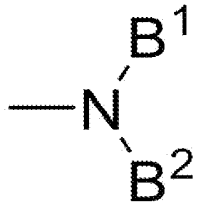
A^2は、－ＯＣ（＝Ｏ）－、－ＯＣ（＝Ｏ）－Ｏ－もしくは－ＯＣ（＝Ｏ）－ＮＨ－であるか、または存在せず、

A^3は、C_{1-6}アルキレンであるか、または存在せず、

A^4は、4～15員の含窒素ヘテロシクリルであり、ここで前記含窒素ヘテロシクリルは、無置換であるか、または、 C_{1-4}アルキル、ヒドロキシおよびオキソからなる群から選択される少なくとも１つで置換されており、

あるいはA^4は、

[化5]



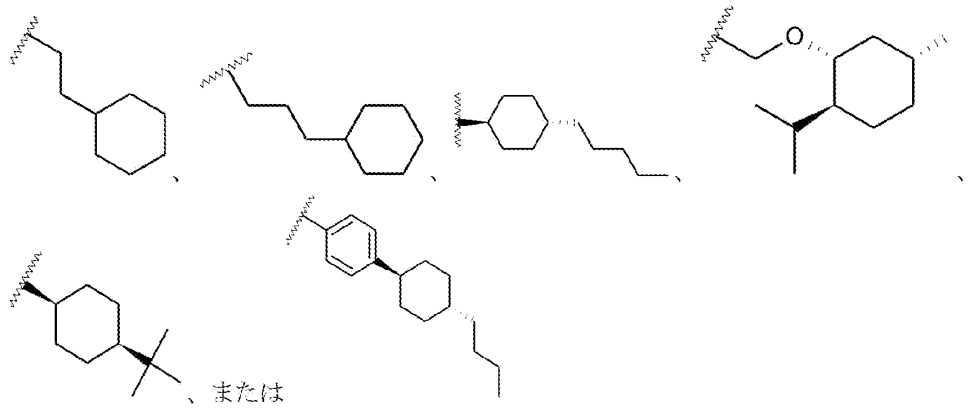
であり、ここでB^1およびB^2はそれぞれ独立して、C_{1-4}アルキル、ヒドロキシC_{1-4}アルキル、C_{1-4}アルコキシC_{1-4}アルキル、または４～６員のヘテロシクリルであり、ここで前記４～６員のヘテロシクリルは、無置換であるか、または、C_{1-4}アルキル、ヒドロキシおよびオキソからなる群から選択される少なくとも１つで置換されており、

M_1およびM_2は、独立して、－Ｏ－、－Ｏ－CH_2－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－CH_2－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－CH_2－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－CH_2－CH_2－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－CH_2－CH_2－CH_2－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－CH_2－CH_2－CH_2－CH_2－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｃ－Ｃ－Ｃ（Ｏ）－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－CH_2－CH_2－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－CH_2－CH_2－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－CH_2－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｃ

Ｈ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｃ（Ｏ）－ＮＨ－、－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－、－Ｃ－ＣＨ$_2$－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－、－Ｓ－Ｓ－ＣＨ$_2$－、または、－Ｓ－ＣＨ$_2$－Ｃ－Ｃ－Ｓ－Ｓ－ＣＨ$_2$－であり、

ＲおよびＲ$_2$は、独立して、直鎖のＣ$_{1-30}$のアルキル、分岐のＣ$_{3-30}$アルキル、直鎖のＣ$_{2-30}$のアルケニル、分岐のＣ$_{3-30}$アルケニル、アダマンチル、ステロール基、

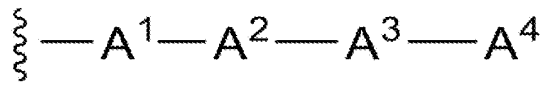
[化6]



であり、

ただし、一般式IおよびIIIにおいて、少なくとも一方のLは

[化7]



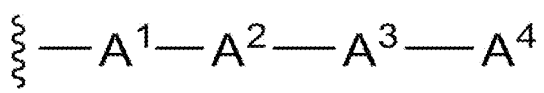
である〕

で表される化合物、その塩または立体異性体。

[0008] ［２］化合物が一般式Ｉで表され、

一方のＬはＨであり、他方のＬは、

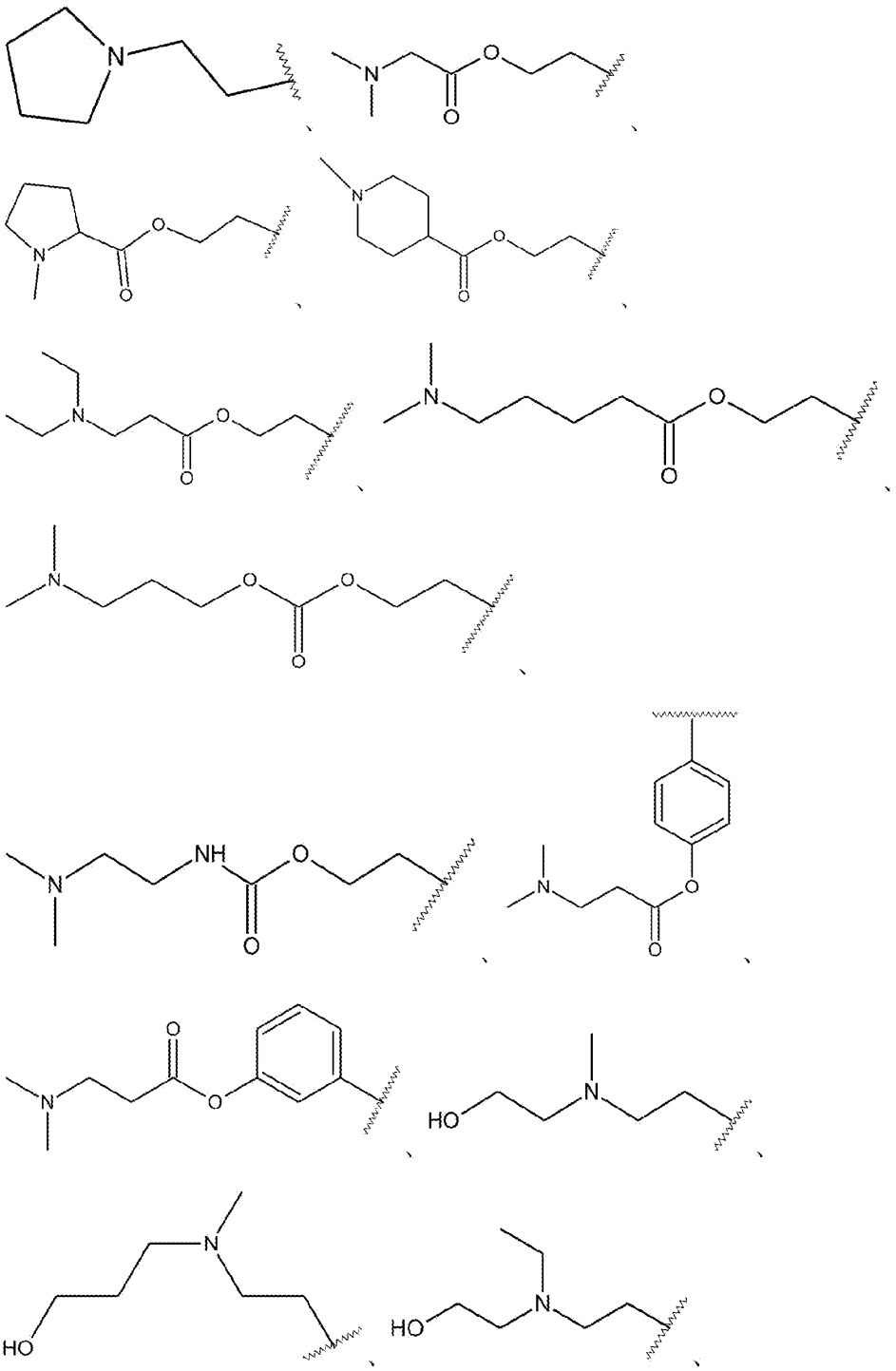
[化8]



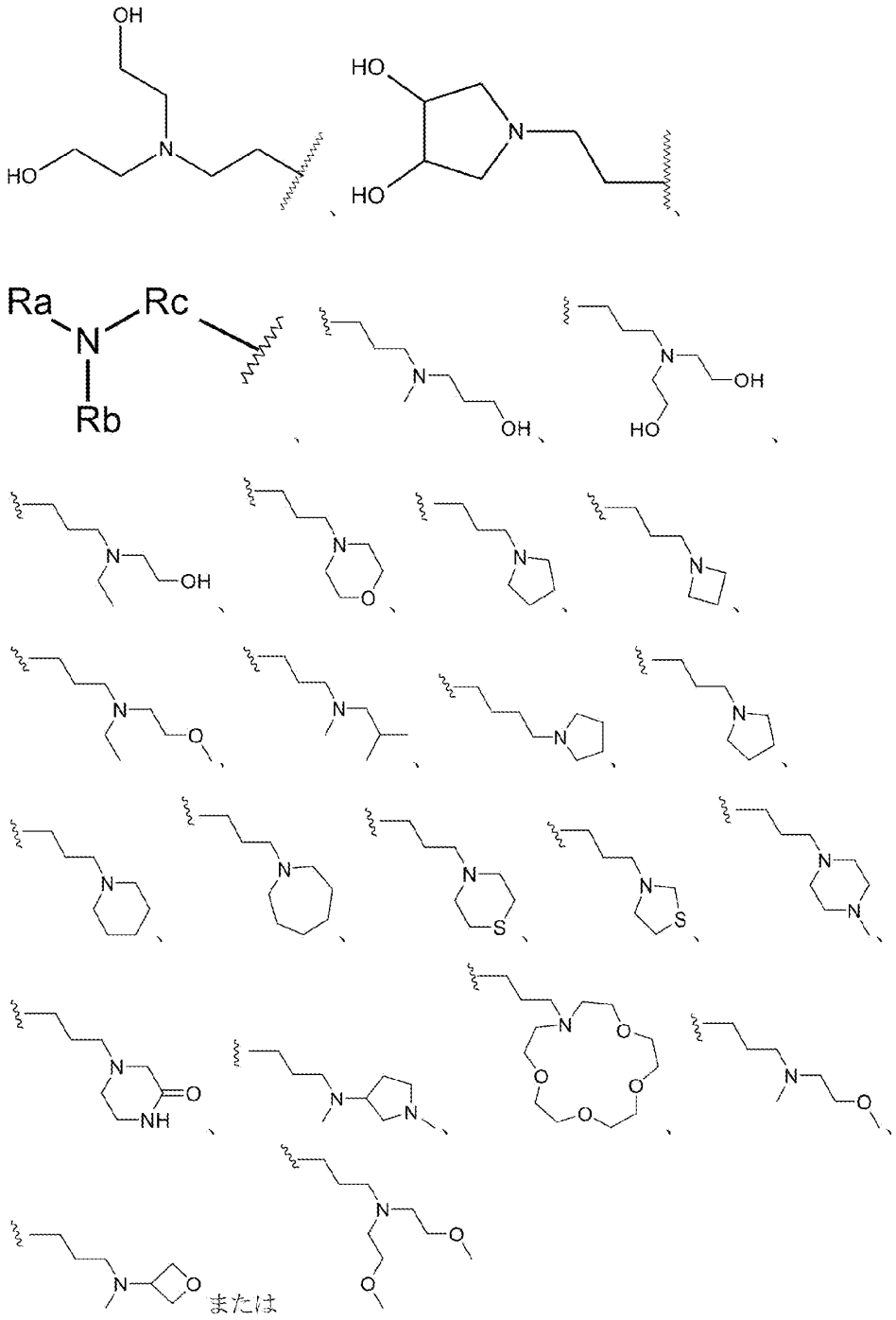
である、［１］に記載の化合物、その塩または立体異性体。

［３］一方のＬはＨであり、他方のＬは、

[化9-1]



[化9-2]



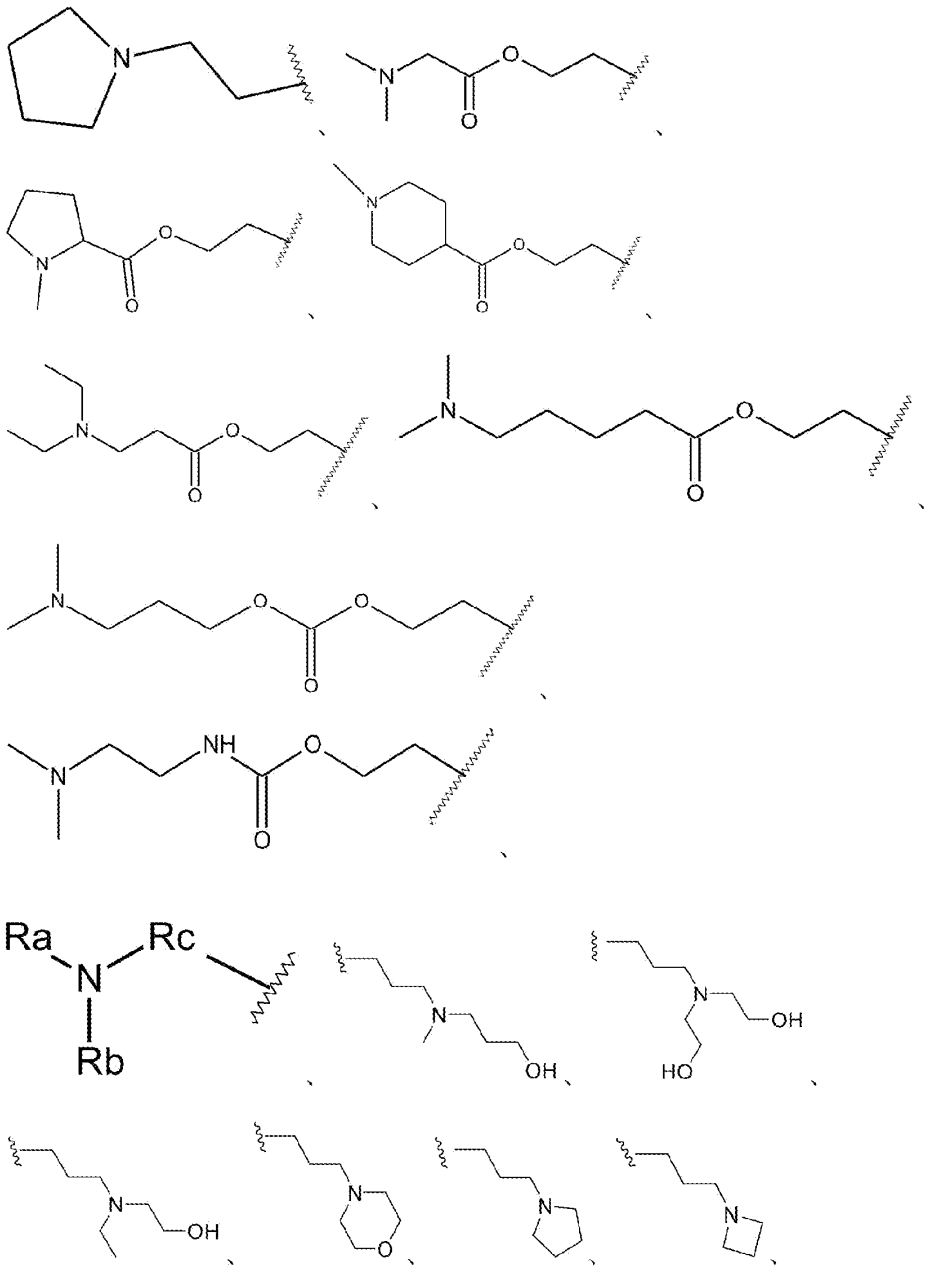
（式中、R_aおよびR_bは独立してメチル、エチル、n-プロピルまたはイソプ

ロピルであり、R_cは直鎖のC_{1-6}アルキレンである）である、

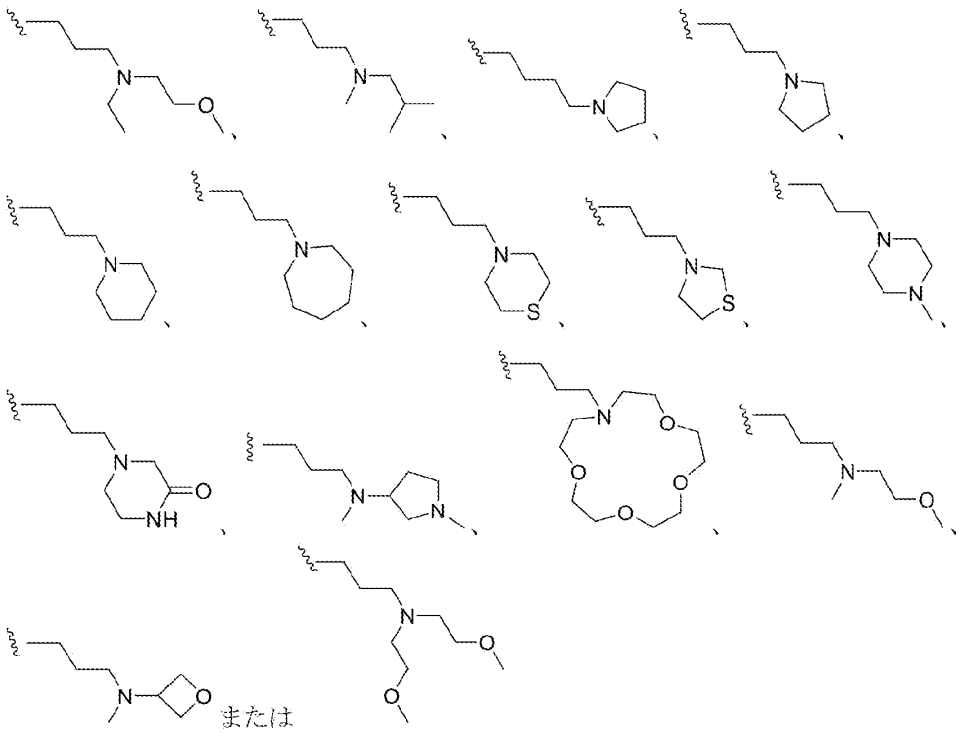
［１］または［２］に記載の化合物、その塩または立体異性体。

[0009] ［４］一方のＬはＨであり、他方のＬは、

[化10-1]



[化10-2]



（式中、R_aおよびR_bは独立してメチル、エチル、n-プロピルまたはイソプロピルであり、R_cは直鎖のC_{1-6}アルキレンである）である、

［１］～［３］のいずれかに記載の化合物、その塩または立体異性体。

[0010] ［５］M_1およびM_2は同一である、

［１］～［４］に記載の化合物、その塩または立体異性体。

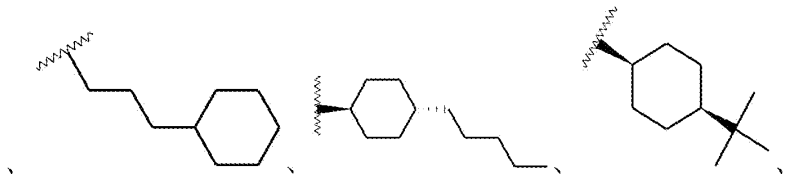
［６］M_1およびM_2は、

－Ｏ－、－Ｏ－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－または－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－である、

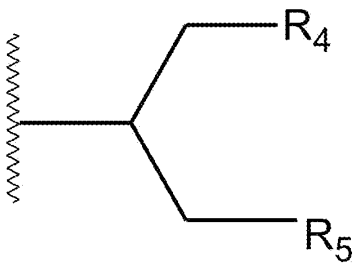
［５］に記載の化合物、その塩または立体異性体。

［７］R_1およびR_2は、独立して、直鎖のC_{1-30}アルキル、直鎖のC_{2-30}アルケニル、分岐のC_{3-30}アルケニル、アダマンチル、

[化11]



または、



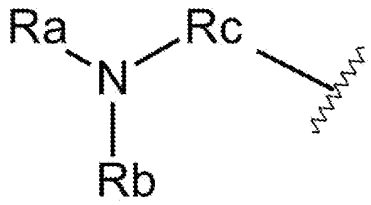
であり、

R_4およびR_5は、独立して直鎖のC_{1-16}アルキルである、

［１］～［６］に記載の化合物、その塩または立体異性体。

[0011] ［８］一方のＬはＨであり、他方のＬは、

[化12]



であり、

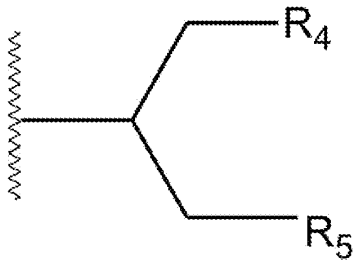
R_aおよびR_bは独立してメチル、エチル、n-プロピルまたはイソプロピルであり、ただしR_aおよびR_bの炭素数の合計が４以下であり、

R_cは直鎖のC_{2-6}アルキレンである、

［１］～［７］に記載の化合物、その塩または立体異性体。

［９］R_1およびR_2は、独立して

[化13]



であり、

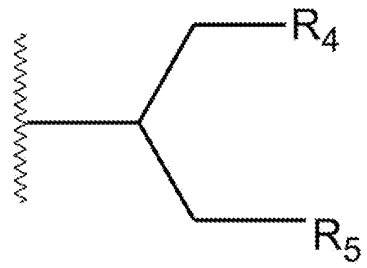
R_4およびR_5は、独立して直鎖のC_{1-11}アルキルであり、

ただしR_4およびR_5の炭素数の合計が１０～２２である、

［１］～［７］に記載の化合物、その塩または立体異性体。

［１０］R_1およびR_2は、独立して

[化14]



であり、

R_4およびR_5は、独立して直鎖のC_{5-11}アルキルであり、

ただしR_4およびR_5の炭素数の差が０～３である、

［１］～［７］に記載の化合物、その塩または立体異性体。

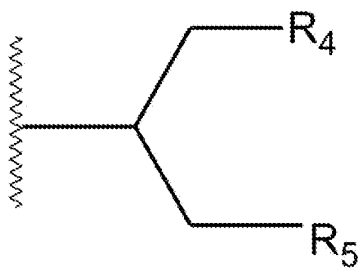
[0012] ［１１］化合物が一般式IIで表され、

Lは、直鎖のC_{1-5}アルキルであり、

M_1およびM_2は－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－であり、

R_1およびR_2は、同一であって、直鎖のC_{1-30}アルキル、直鎖のC_{2-30}アルケニル、または

[化15]



であり、

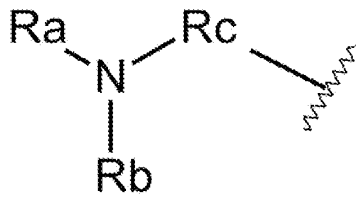
R_4およびR_5は、独立して直鎖のC_{1-16}アルキルである、

［１］に記載の化合物、その塩または立体異性体。

［１２］化合物が一般式IIIで表され、

一方のＬはＨであり、他方のＬは、

[化16]

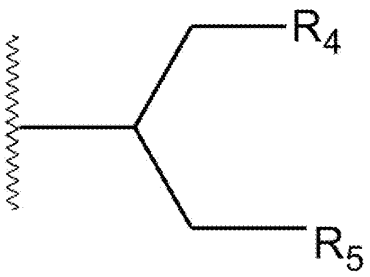


（式中、R_aおよびR_bは独立してメチル、エチル、n-プロピルまたはイソプロピルであり、R_cは直鎖のC_{1-6}アルキレンである）であり、

M_1およびM_2は－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－であり、

R_1およびR_2は、同一であって、直鎖のC_{1-30}アルキル、直鎖のC_{2-30}アルケニル、または

[化17]



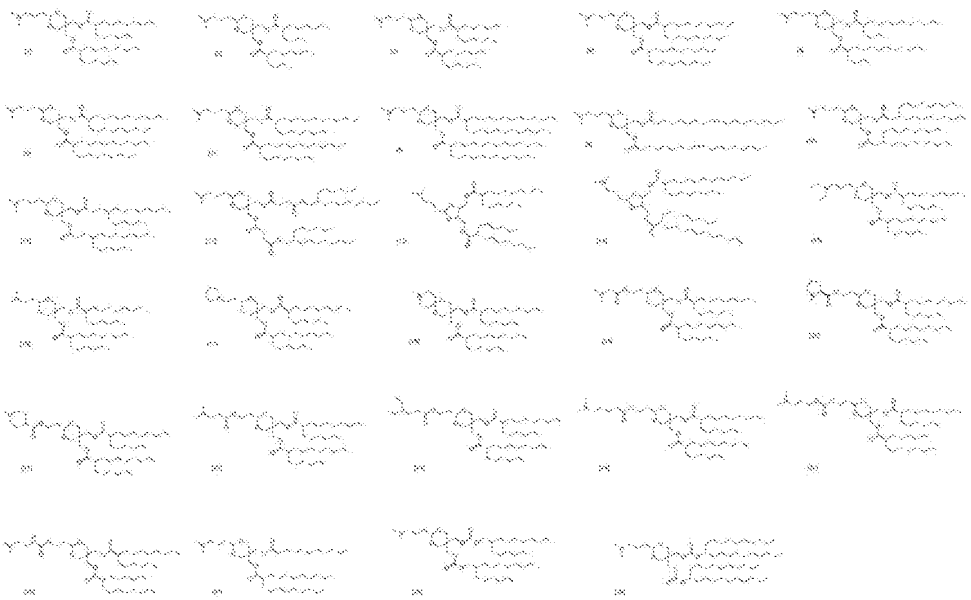
であり、

R_4およびR_5は、独立して直鎖のC_{1-16}アルキルである、

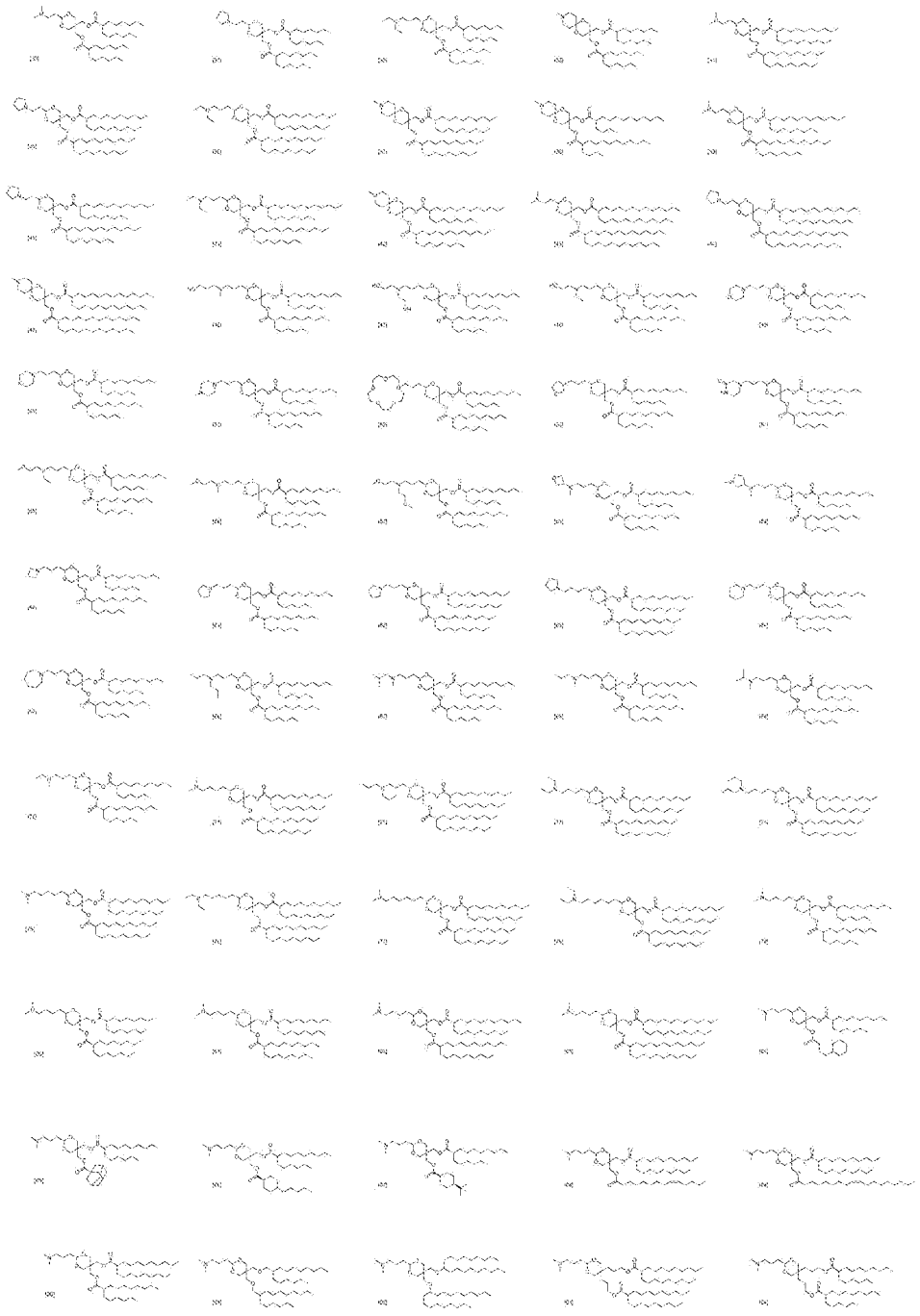
［１］に記載の化合物、その塩または立体異性体。

[0013] ［１３］化合物が以下のいずれかで表される、［１］に記載の化合物、その塩または立体異性体。

[化18-1]



[化18-2]



[0014] ［１４］［１］～［１３］に記載の化合物、その塩または立体異性体を含有する、脂質ナノ粒子。

［１５］さらに、ステロール及びポリアルキレングリコール修飾脂質を含有している、［１４］に記載の脂質ナノ粒子。

［１６］核酸を含有する、［１４］または［１５］に記載の脂質ナノ粒子。

［１７］前記核酸が、ｍＲＮＡ又はｓｉＲＮＡである、［１６］に記載の脂質ナノ粒子。

［１８］［１４］～［１７］に記載の脂質ナノ粒子を含む、医薬用組成物。

［１９］遺伝子治療に用いられる、［１８］に記載の医薬用組成物。

［２０］［１４］～［１７］に記載の脂質ナノ粒子であって、細胞内で発現させる目的の外来遺伝子を封入した脂質ナノ粒子を、被験動物（但し、ヒトを除く）へ投与し、前記被験動物の細胞内で前記外来遺伝子を発現させる、外来遺伝子の発現方法。

発明の効果

[0015] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、薬物を細胞に効率的に導入することができる。このため、当該脂質ナノ粒子は、遺伝子治療に用いられる遺伝子送達キャリアとして有用である。

発明を実施するための形態

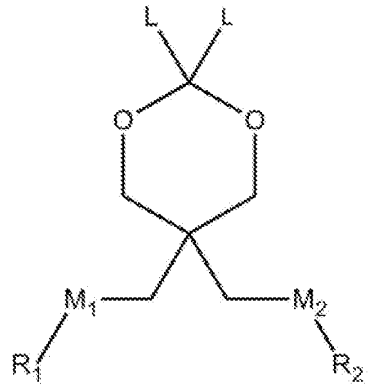
[0016] 以下、本発明の実施態様について具体的に説明する。

[0017] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、下記一般式（Ｉ）、（ＩＩ）または（ＩＩＩ）で表される、ジオキサン構造またはジオキソラン構造を備える、ｐＨ感受性カチオン性脂質（以下、「本発明のｐＨ感受性カチオン性脂質」ということがある。）を含有する、脂質ナノ粒子である。

脂質ナノ粒子の構成脂質として、一般式（Ｉ）、（ＩＩ）または（ＩＩＩ）で表される化合物、その塩または立体異性体である、ｐＨ感受性カチオン性脂質を備えることにより、本発明に係る脂質ナノ粒子は、薬物を細胞に効率的に導入することができる。

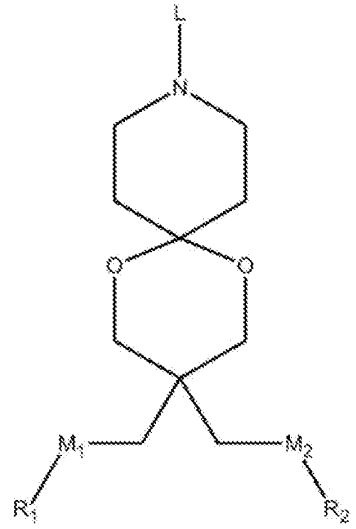
[0018] 一般式（Ｉ）

[化19]



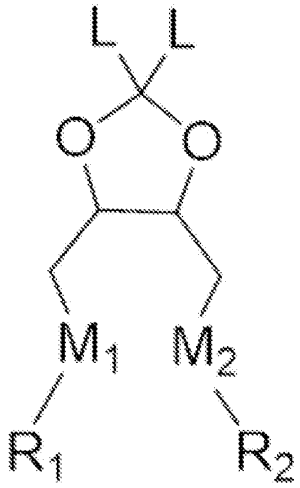
[0019] 一般式（ＩＩ）

[化20]



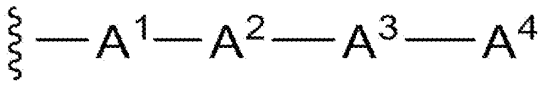
[0020] 一般式（ＩＩＩ）

[化21]



[0021] 一般式（Ｉ）～（ＩＩＩ）において、Ｌは、独立して、Ｈ、直鎖のC_{1-10}アルキル又は分岐のC_{3-10}アルキル、あるいは、

[化22]



であり、A^1は、C_{1-6}アルキレンまたはフェニレンであり、

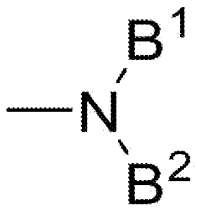
A^2は、－ＯＣ（＝Ｏ）－、－ＯＣ（＝Ｏ）－Ｏ－もしくは－ＯＣ（＝Ｏ）－ＮＨ－であるか、または存在せず、

A^3は、C_{1-6}アルキレンであるか、または存在せず、

A^4は、4～15員の含窒素ヘテロシクリルであり、ここで前記含窒素ヘテロシクリルは、無置換であるか、または、 C_{1-4}アルキル、ヒドロキシおよびオキソからなる群から選択される少なくとも１つで置換されており、

あるいはA^4は、

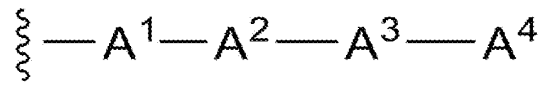
[化23]



であり、ここでB^1およびB^2はそれぞれ独立して、C_{1-4}アルキル、ヒドロキシC_{1-4}アルキル、C_{1-4}アルコキシC_{1-4}アルキル、または４～６員のヘテロシクリルであり、ここで前記４～６員のヘテロシクリルは、無置換であるか、または、 C_{1-4}アルキル、ヒドロキシおよびオキソからなる群から選択される少なくとも１つで置換されている。

[0022] 一般式（ＩＩＩ）において、少なくとも一方のＬは

[化24]

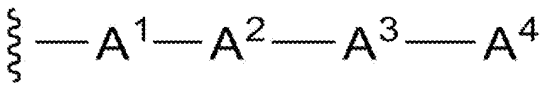


である。

[0023] 化合物が一般式（Ｉ）で表される場合、

一方のＬはＨであり、他方のＬは、

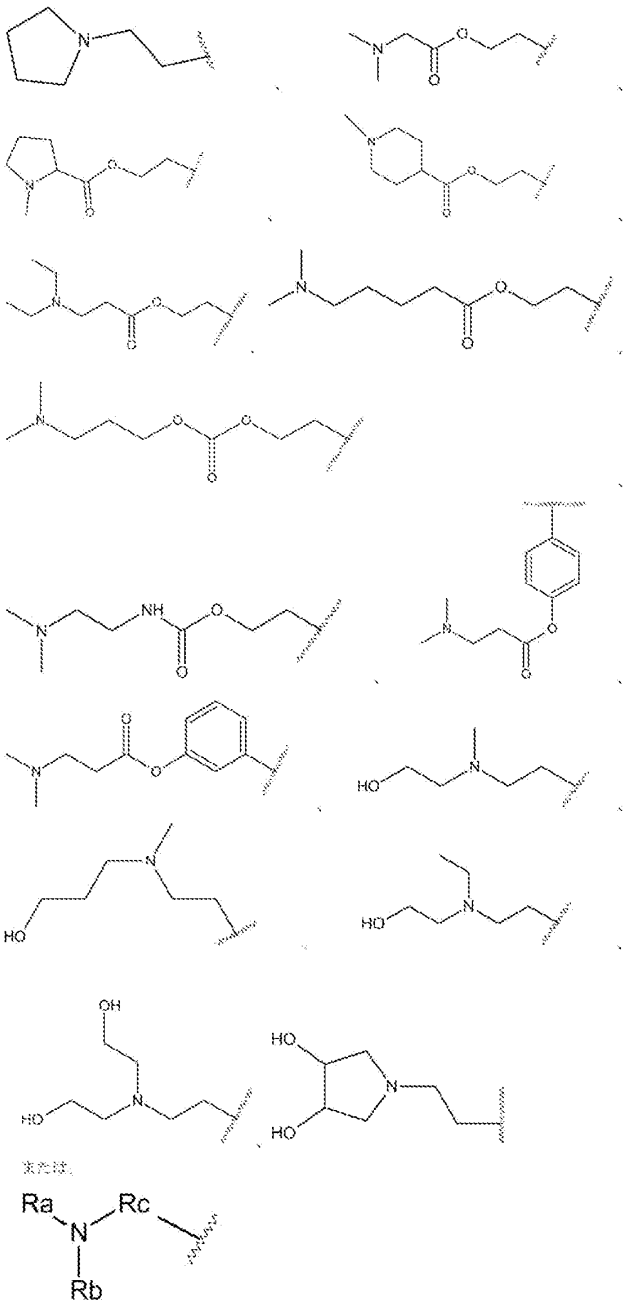
[化25]



であることが好ましい。

[0024] 一般式（Ｉ）～（ＩＩＩ）の一態様において、Ｌは、独立して、Ｈ、直鎖又は分岐のC_{1-10}アルキル、

[化26]

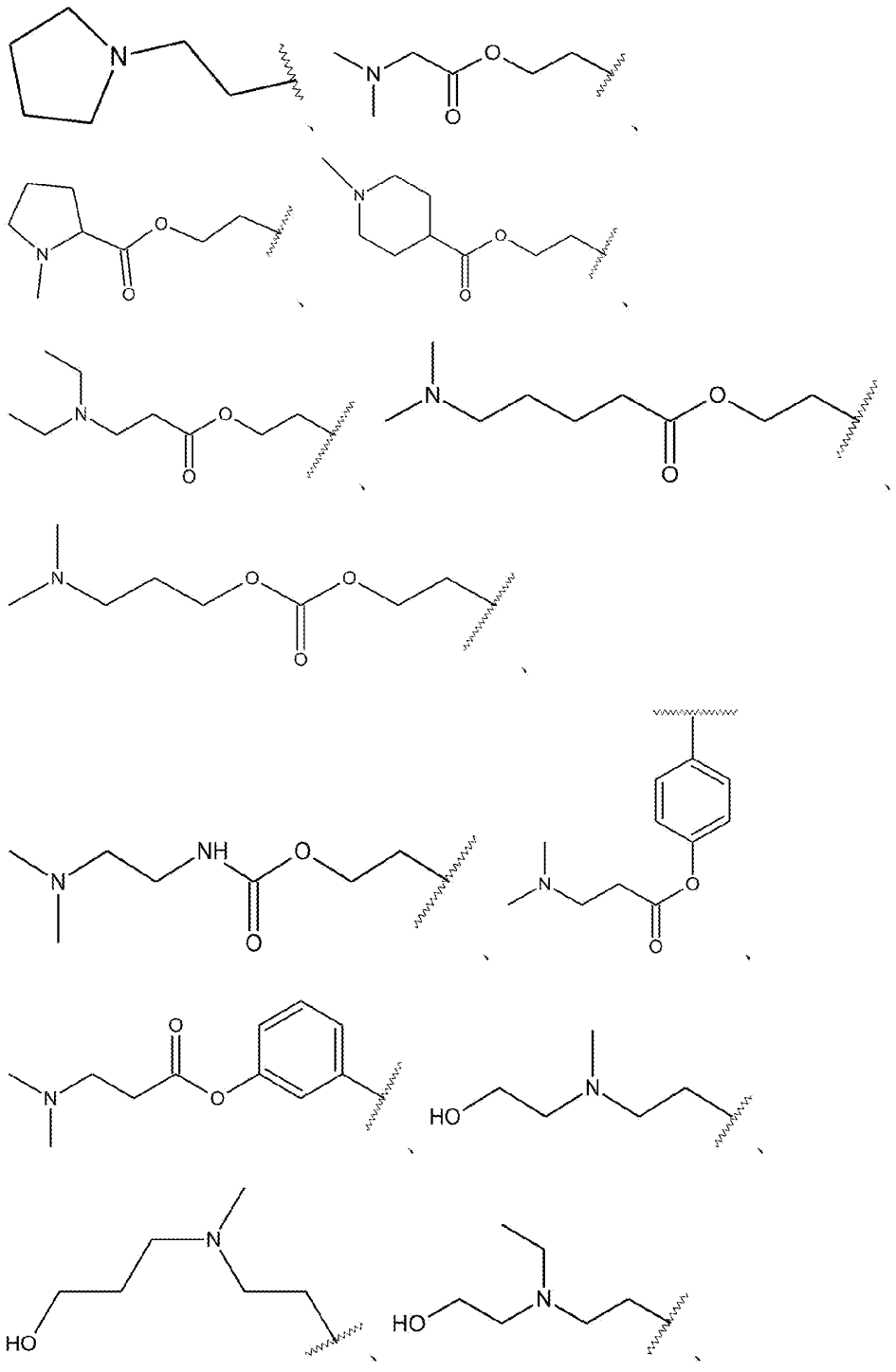


（式中、R_aおよびR_bは独立して直鎖又は分岐のC_{1-3}アルキルであり、R_cは直鎖又は分岐のC_{1-6}アルキレンである）である。

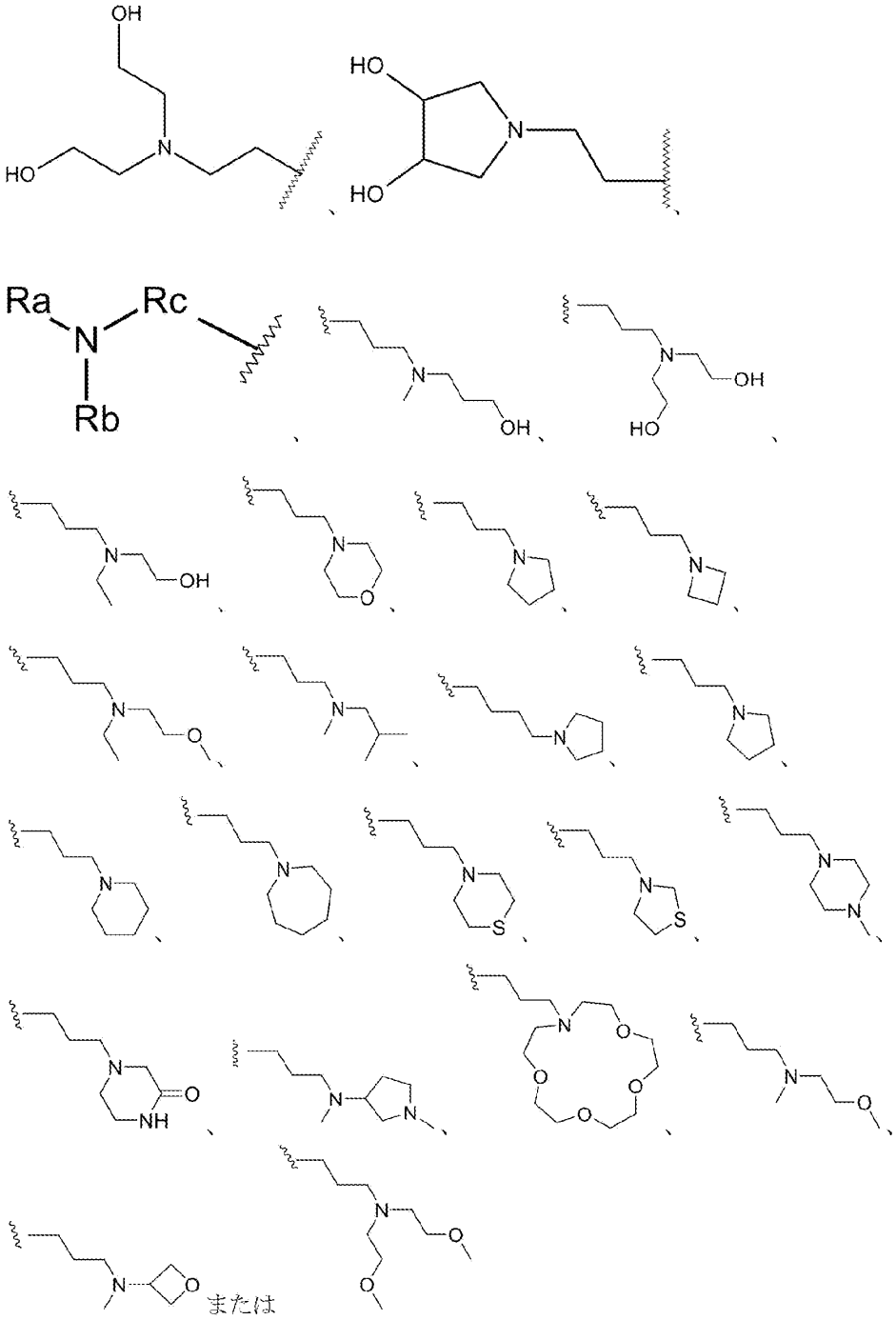
[0025] 化合物が一般式（Ｉ）で表される場合、

より好ましくは、一方のＬはＨであり、他方のＬは、

[化27-1]



[化27-2]

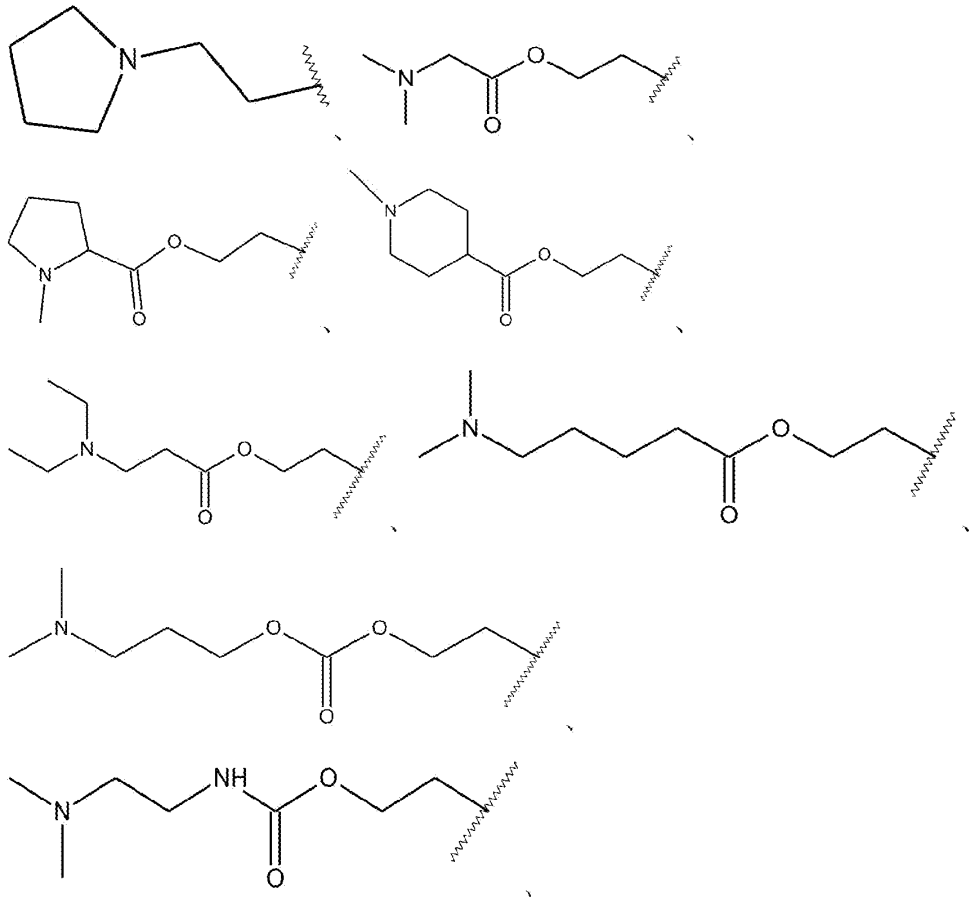


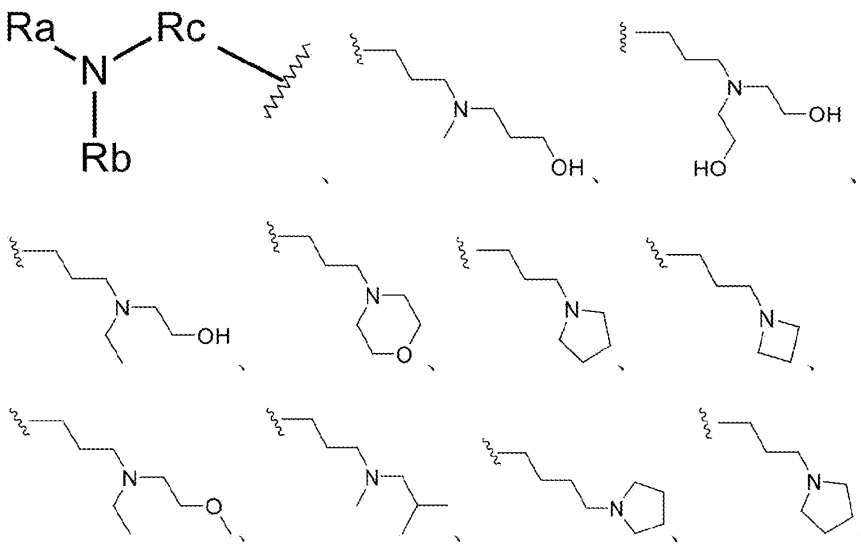
（式中、R_aおよびR_bは独立してメチル、エチル、n-プロピルまたはイソプロピルであり、R_cは直鎖のC_{1-6}アルキレンである）である。

[0026] 化合物が一般式（Ｉ）で表される場合、

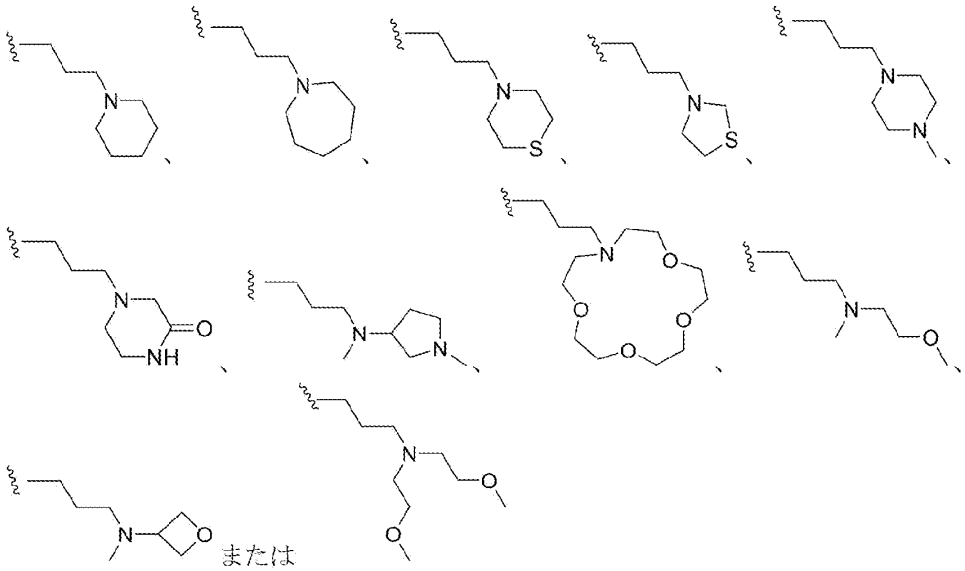
さらに好ましくは、一方のＬはＨであり、他方のＬは、

[化28-1]





[化28-2]



（式中、R_aおよびR_bは独立してメチル、エチル、n-プロピルまたはイソプロピルであり、R_cは直鎖のC_{1-6}アルキレンである）である。

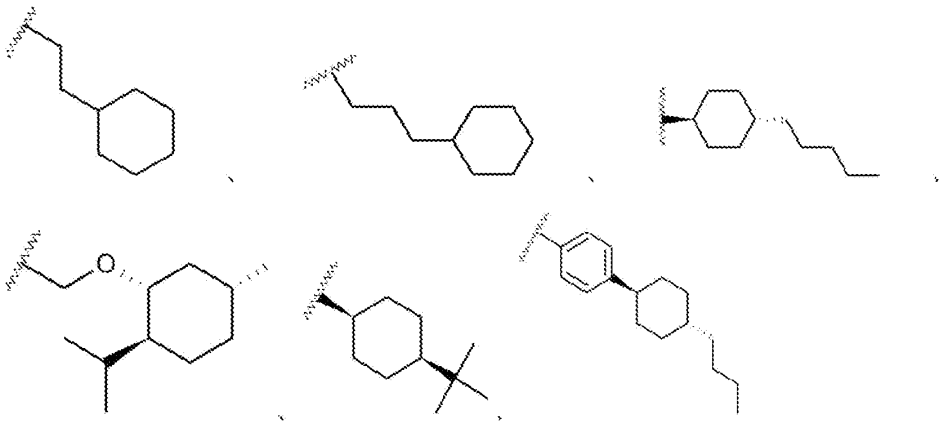
[0027] 一般式（I）～（III）において、M_1およびM_2は、独立して、－O－、－O－CH_2－、－O－C（O）－、－O－C（O）－O－、－O－C（O）－O－CH_2－、－O－C（O）－CH_2－、－O－C（O）－CH_2－CH_2－、－O－C（O）－CH_2－CH_2－CH_2－、－O－C（O）－CH_2－CH_2－CH_2－CH_2－、－O－C（O）－C－C－C（O）－、－O－C（O）－CH_2－CH_2－C（O）－O－、－O－C（O）－CH_2－CH_2－C（O）－O－CH_2－、－O－C（O）－CH_2－CH_2－C（O）－NH－、－O－CH_2－CH_2－CH_2－O－C（O）－、－C－C（O）－O－、－CH_2－C（O）－O－CH_2－、－C－CH_2－O－C（O）－、－S－S－CH_2－、または、－S－CH_2－C－C－S－S－CH_2－である。本発明の一態様において、M_1およびM_2は、同一である。

[0028] 一般式（I）において、M_1およびM_2は、同一であることが好ましい。M_1およびM_2が同一のとき、M_1およびM_2は、－O－、－O－CH_2－、－O－C（O）－、－O－C（O）－O－、－O－C（O）－O－CH_2－、－O－

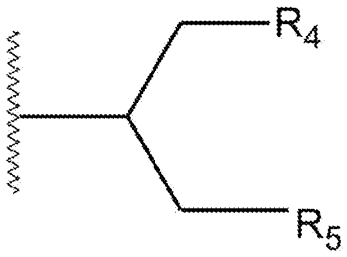
C（O）－CH_2－、－O－C（O）－CH_2－CH_2－、－O－C（O）－CH_2－CH_2－C（O）－O－CH_2－または－CH_2－CH_2－O－C（O）－である。

[0029] 一般式（I）～（III）において、R_1およびR_2は、独立して、直鎖又は分岐のC_{1-30}のアルキル、直鎖又は分岐のC_{2-30}のアルケニル、アダマンチル、ステロール基、

[化29]



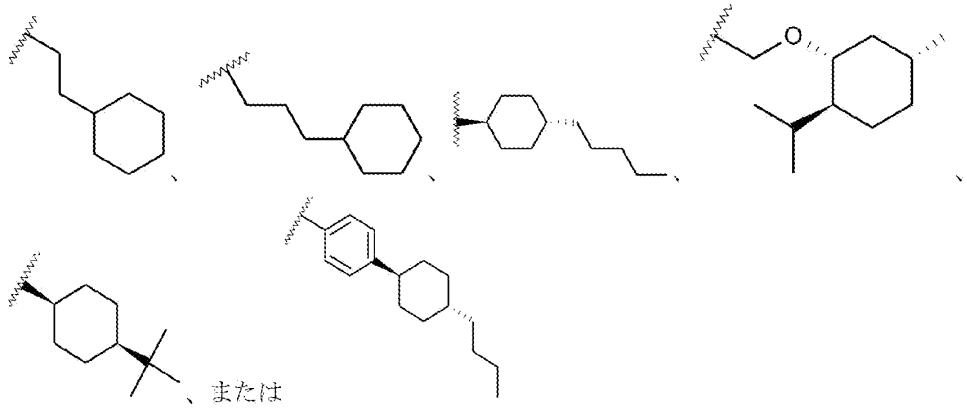
または、



（式中、R_4およびR_5は、独立して直鎖又は分岐のC_{1-16}アルキル）である。本発明の一態様において、R_1およびR_2は、同一である。

[0030] 一般式（I）～（III）の別の態様において、R_1およびR_2は、独立して、直鎖のC_{1-30}のアルキル、分岐のC_{3-30}アルキル、直鎖のC_{2-30}のアルケニル、分岐のC_{3-30}アルケニル、アダマンチル、ステロール基、

[化30]

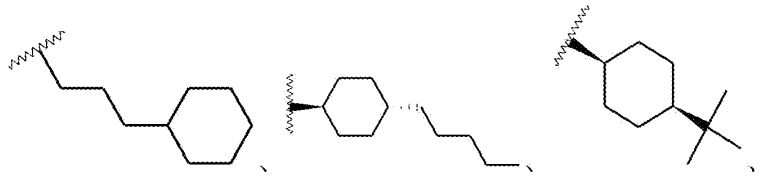


、または

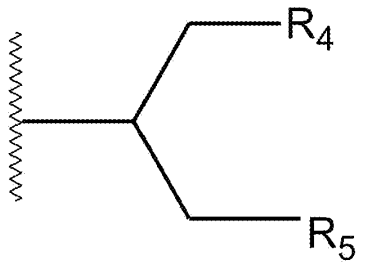
である。

[0031] 一般式（Ｉ）において、好ましくは、R_1およびR_2は、独立して、直鎖のC_{1-30}アルキル、直鎖のC_{2-30}アルケニル、分岐のC_{3-30}アルケニル、アダマンチル、

[化31]



または、

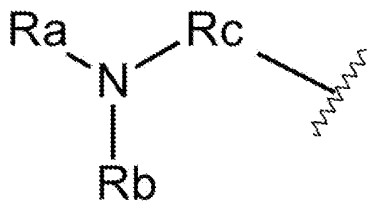


であり、

R_4およびR_5は、独立して直鎖のC_{1-16}アルキルである。

[0032] 一般式（Ｉ）の一態様において、一方のＬはＨであり、他方のＬは、

[化32]



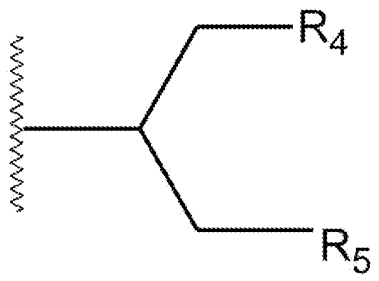
であり、

R_aおよびR_bは独立してメチル、エチル、n-プロピルまたはイソプロピルであり、ただしR_aおよびR_bの炭素数の合計が４以下であり、

R_cは直鎖のC_{2-6}アルキレンであり、

ここで、好ましくは、R_1およびR_2は、独立して

[化33]



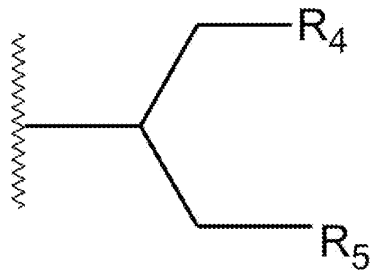
であり、

R_4およびR_5は、独立して直鎖のC_{1-11}アルキルであり、

ただしR_4およびR_5の炭素数の合計が１０～２２であることが好ましく、

さらに好ましくは、R_1およびR_2は、独立して

[化34]



であり、

R_4およびR_5は、独立して直鎖のC_{5-11}アルキルであり、

ただしR_4およびR_5の炭素数の差が０～３である。

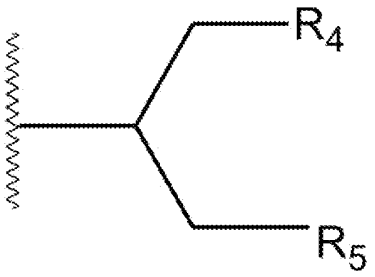
[0033] 一般式（ＩＩ）の一態様において、

Lは、直鎖のC_{1-5}アルキルであり、

M_1およびM_2は－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－であり、

R_1およびR_2は、同一であって、直鎖のC_{1-30}アルキル、直鎖のC_{2-30}アルケニル、または

[化35]



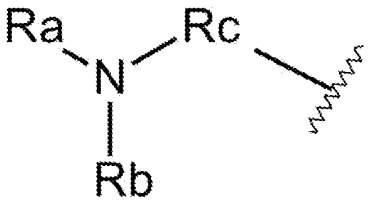
であり、

R_4およびR_5は、独立して直鎖のC_{1-16}アルキルである。

[0034] 一般式（ＩＩＩ）の一態様において、

一方のＬはＨであり、他方のＬは、

[化36]



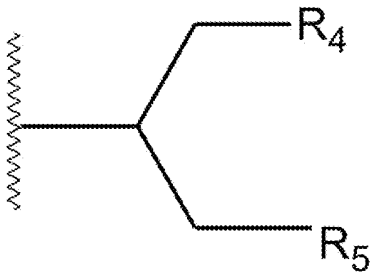
（式中、R_aおよびR_bは独立してメチル、エチル、n-プロピルまたはイソプロピルであり、R_cは直鎖のC_{1-6}アルキレンである）であり、

M_1およびM_2は－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－であり、

R_1およびR_2は、同一であって、直鎖のC_{1-30}アルキル、直鎖のC_{2-30}アル

ケニル、または

[化37]



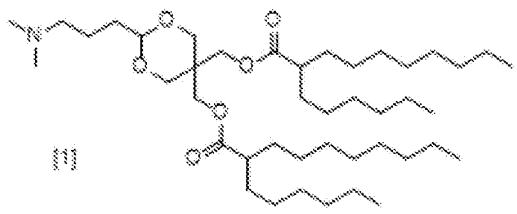
であり、

R_4およびR_5は、独立して直鎖のC_{1-16}アルキルである。

[0035] 本発明のｐＨ感受性カチオン性脂質としては、例えば、ジオキサン構造またはジオキソラン構造を備える、下記の構造を有するｐＨ感受性カチオン性脂質、その塩または立体異性体である：

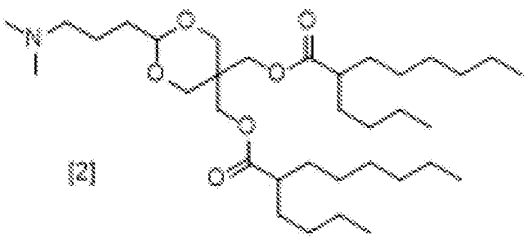
[0036] 化合物１：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

[化38]



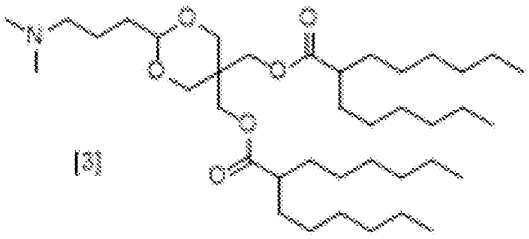
[0037] 化合物２：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-butyloctanoate)

[化39]



[0038] 化合物３：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyloctanoate)

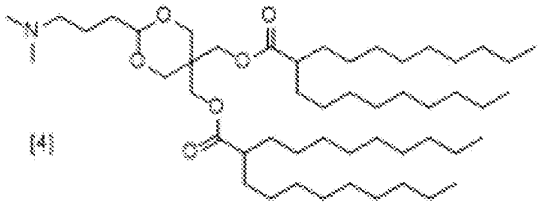
[化40]



[3]

[0039] 化合物４：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

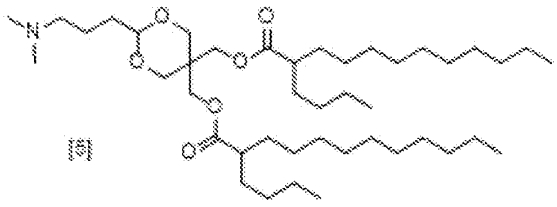
[化41]



[4]

[0040] 化合物５：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-butyldodecanoate)

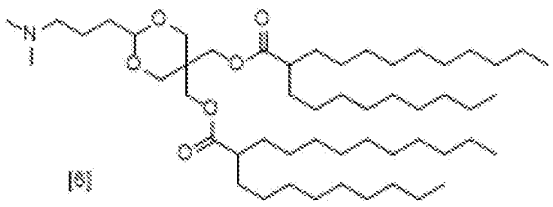
[化42]



[5]

[0041] 化合物６：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonyldodecanoate)

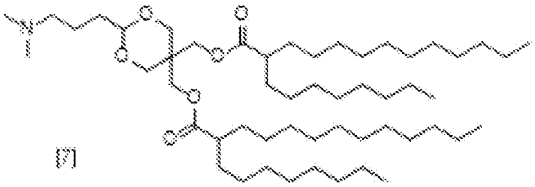
[化43]



[6]

[0042] 化合物７：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyltridecanoate)

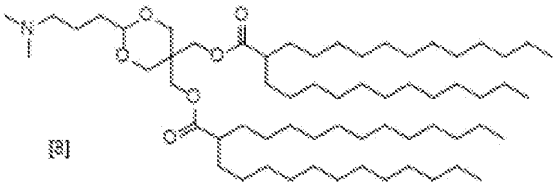
[化44]



[7]

[0043] 化合物８：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-dodecyltetradecanoate)

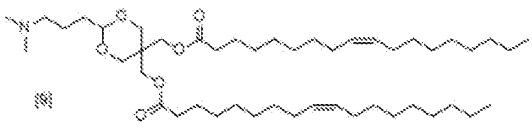
[化45]



[8]

[0044] 化合物９：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) dioleate

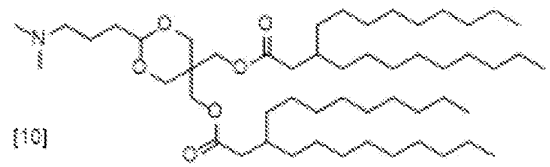
[化46]



[9]

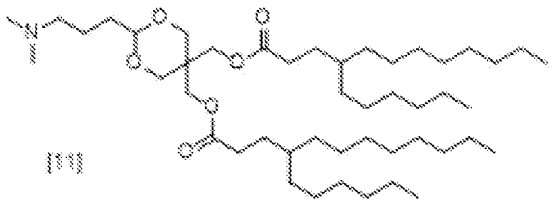
[0045] 化合物１０：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(3-nonyldodecanoate)

[化47]



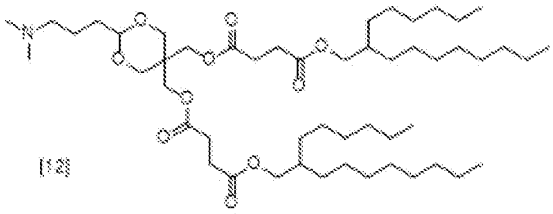
[0046] 化合物１１：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(4-hexyldodecanoate)

[化48]



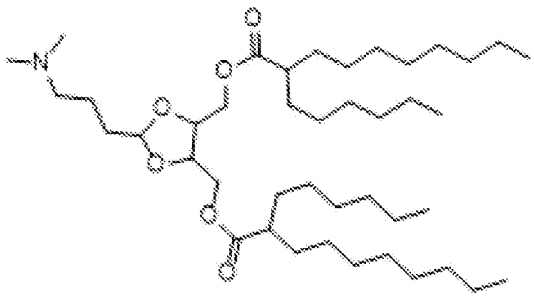
[0047] 化合物１２：0,0'-((2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene)) bis(2-hexyldecyl) disuccinate

[化49]



[0048] 化合物１３：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxolane-4,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

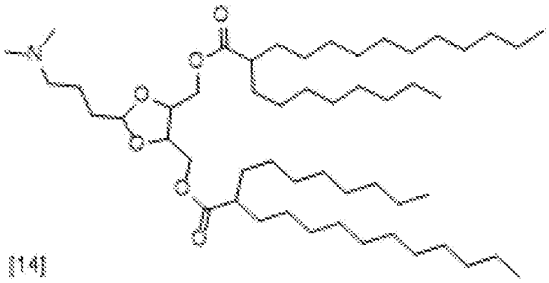
[化50]



[13]

[0049] 化合物１４：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxolane-4,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyltridecanoate)

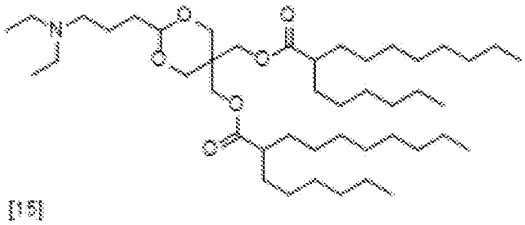
[化51]



[14]

[0050] 化合物１５：(2-(3-(diethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

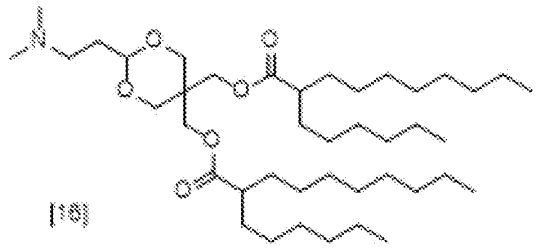
[化52]



[15]

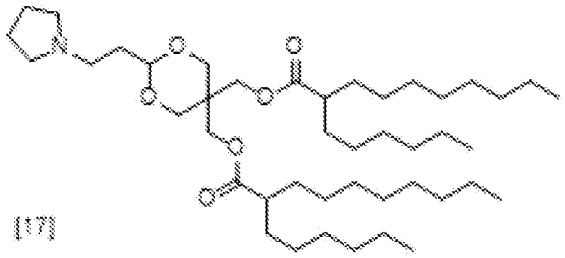
[0051] 化合物１６：(2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

[化53]



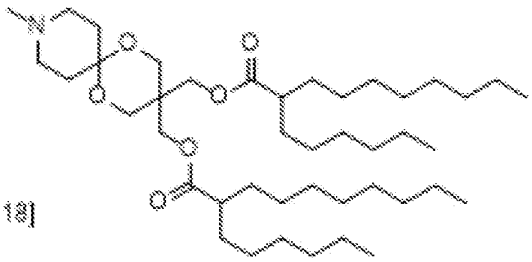
[0052] 化合物１７：(2-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

[化54]



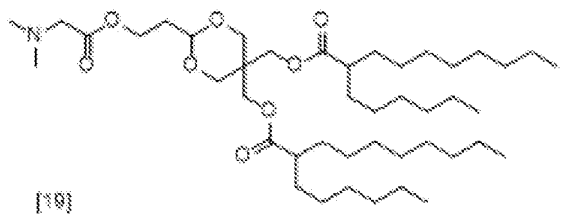
[0053] 化合物１８：(9-methyl-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecane-3,3-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

[化55]



[0054] 化合物１９：(2-(2-((dimethylglycyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

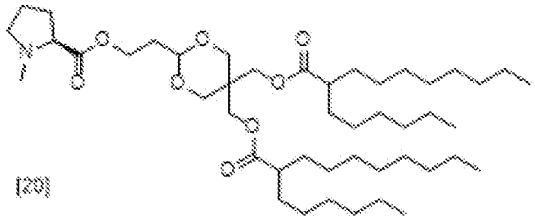
[化56]



[19]

[0055] 化合物２０：(2-(2-((methyl-L-prolyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

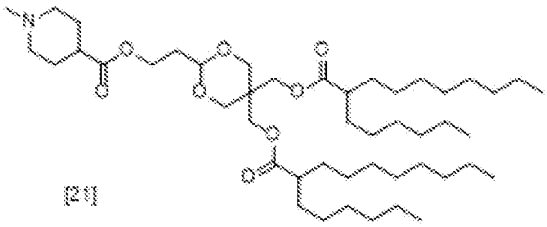
[化57]



[20]

[0056] 化合物２１：(2-(2-((1-methylpiperidine-4-carbonyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

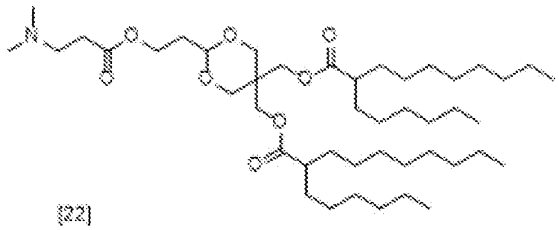
[化58]



[21]

[0057] 化合物２２：(2-(2-((3-(dimethylamino)propanoyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

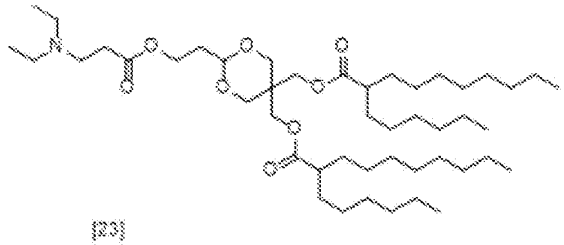
[化59]



[22]

[0058] 化合物２３：(2-(2-((3-(diethylamino)propanoyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

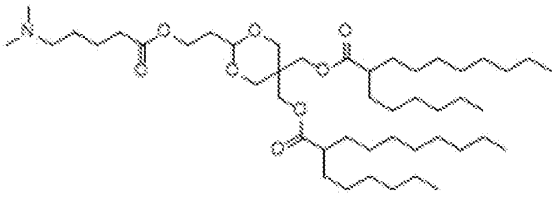
[化60]



[23]

[0059] 化合物２４：(2-(2-((5-(dimethylamino)pentanoyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

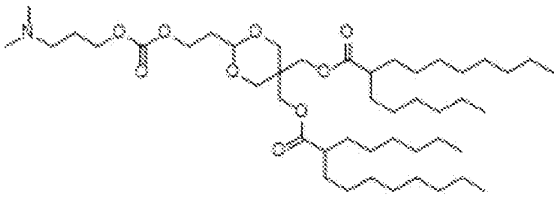
[化61]



[24]

[0060] 化合物２５：(2-(2-(((3-(dimethylamino)propoxy)carbonyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

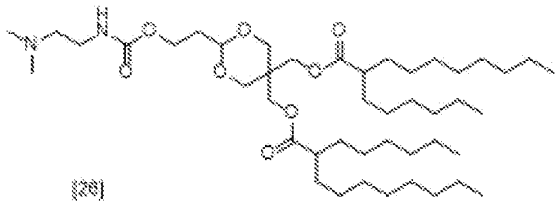
[化62]



[25]

[0061] 化合物２６：(2-(2-(((3-(dimethylamino)propoxy)carbonyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

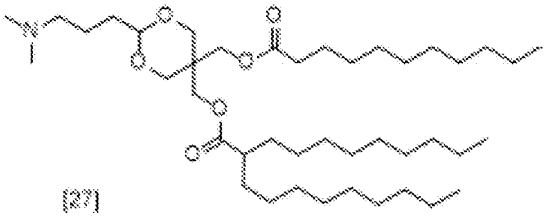
[化63]



[26]

[0062] 化合物２７：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-5-((undecanoyloxy)methyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl 2-nonylundecanoate

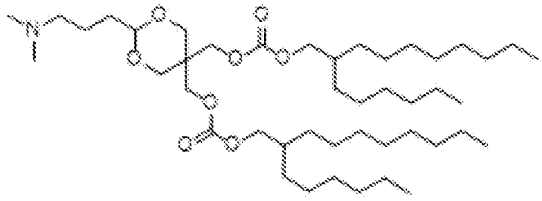
[化64]



[27]

[0063] 化合物２８：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecyl) bis(carbonate)

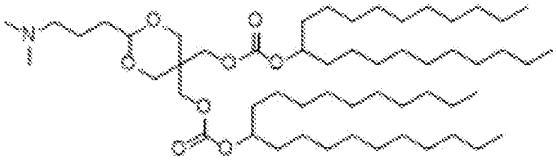
[化65]



[28]

[0064] 化合物２９：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) di(henicosan-11-yl) bis(carbonate)

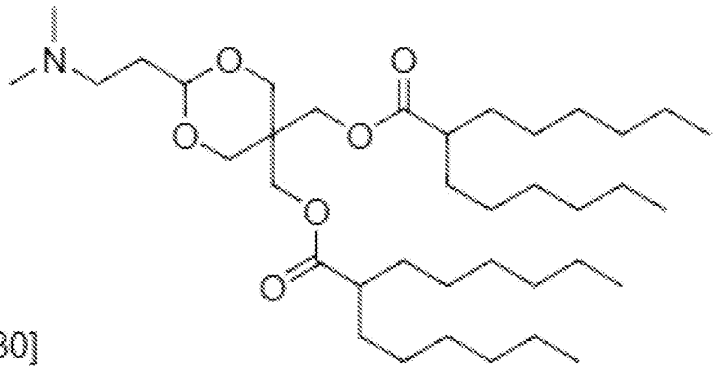
[化66]



[29]

[0065] 化合物３０：(2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyloctanoate)

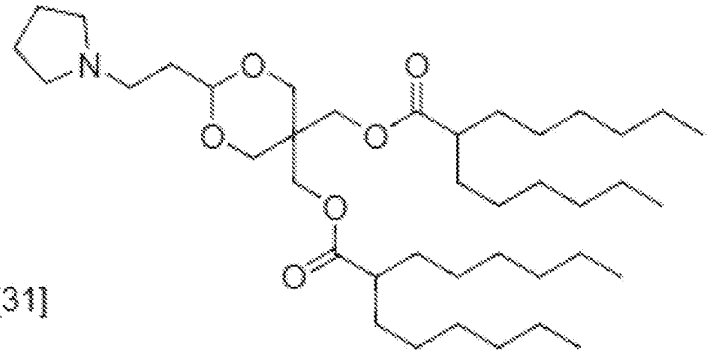
[化67]



[30]

[0066] 化合物３１：(2-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyloctanoate)

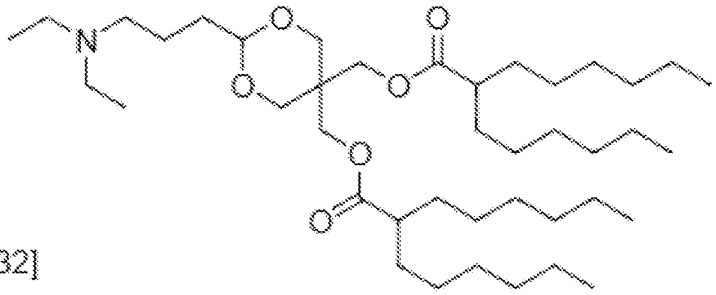
[化68]



[31]

[0067] 化合物３２：(2-(3-(diethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyloctanoate)

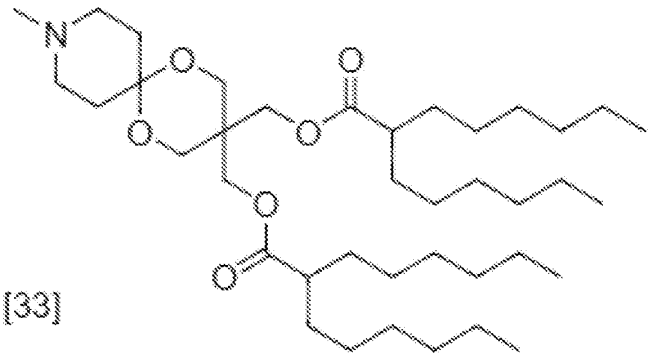
[化69]



[32]

[0068] 化合物３３：(9-methyl-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecane-3,3-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyloctanoate)

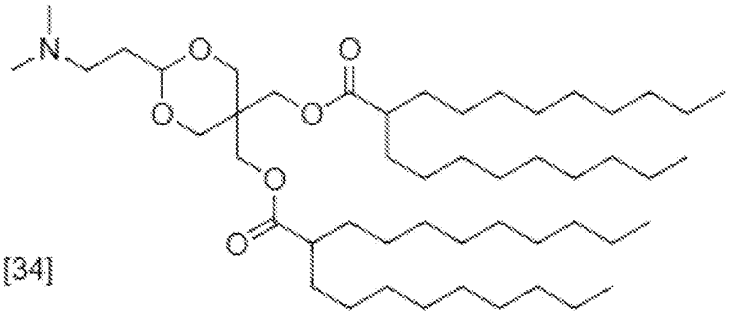
[化70]



[33]

[0069] 化合物３４：(2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

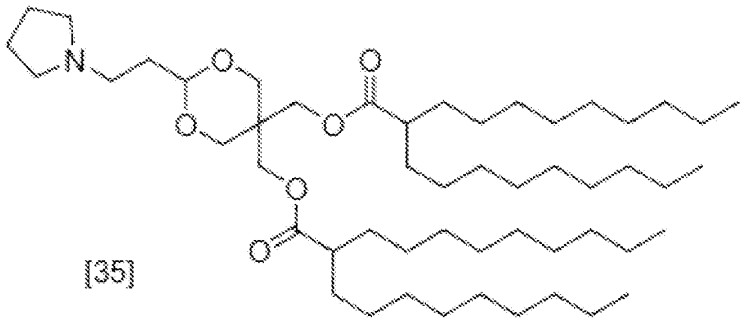
[化71]



[34]

[0070] 化合物３５：(2-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

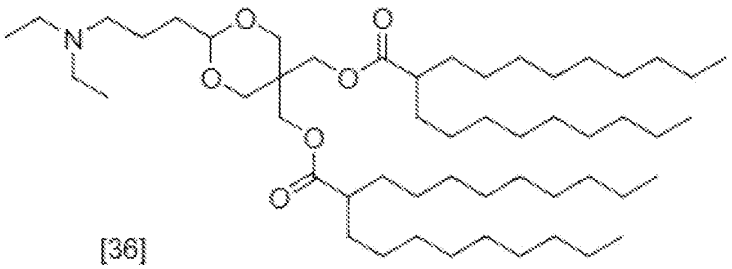
[化72]



[35]

[0071] 化合物３６：(2-(3-(diethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

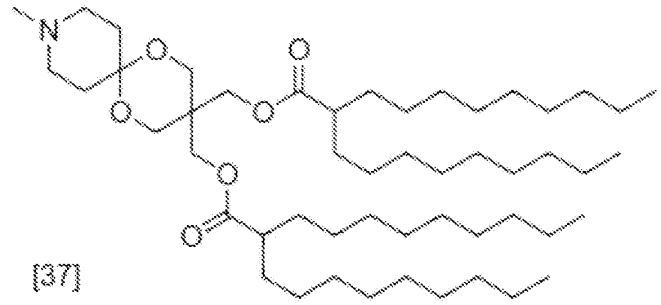
[化73]



[36]

[0072] 化合物３７：(9-methyl-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecane-3,3-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

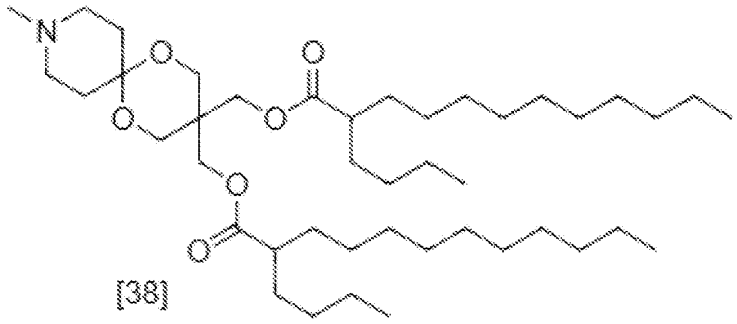
[化74]



[37]

[0073] 化合物３８：(9-methyl-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecane-3,3-diyl)bis(methylene) bis(2-butyldodecanoate)

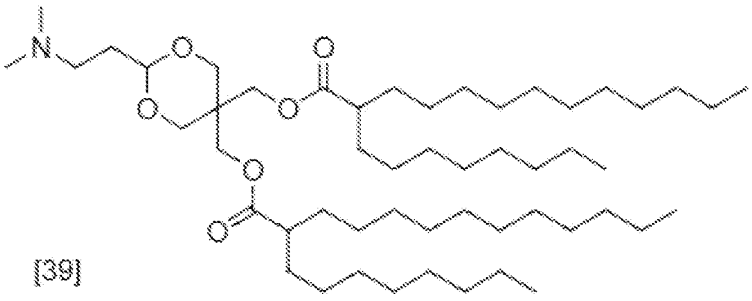
[化75]



[38]

[0074] 化合物３９：(2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyltridecanoate)

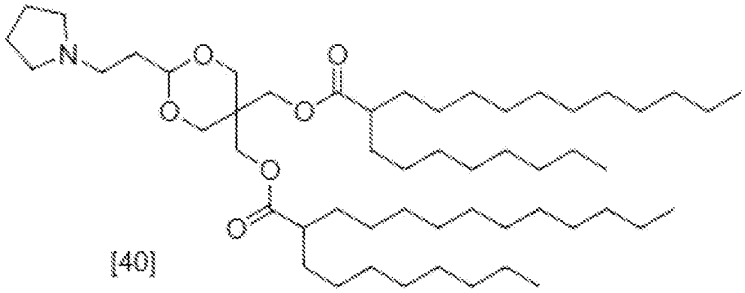
[化76]



[39]

[0075] 化合物４０：(2-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyltridecanoate)

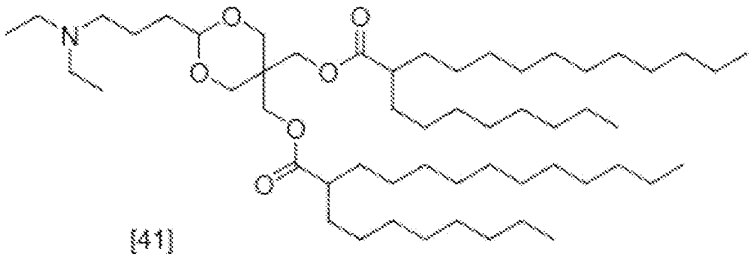
[化77]



[40]

[0076] 化合物４１：(2-(3-(diethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyltridecanoate)

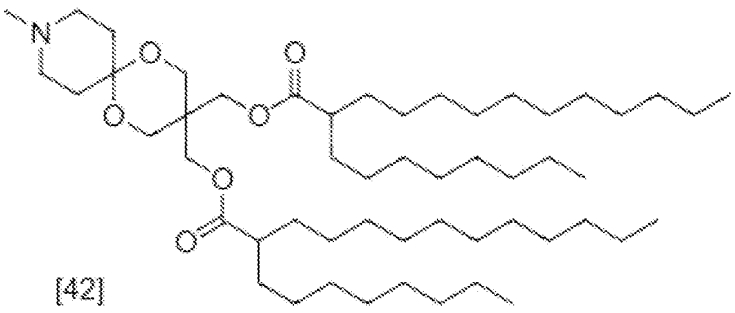
[化78]



[41]

[0077] 化合物４２：(9-methyl-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecane-3,3-diyl)bis(methylene) bis(2-octyltridecanoate)

[化79]

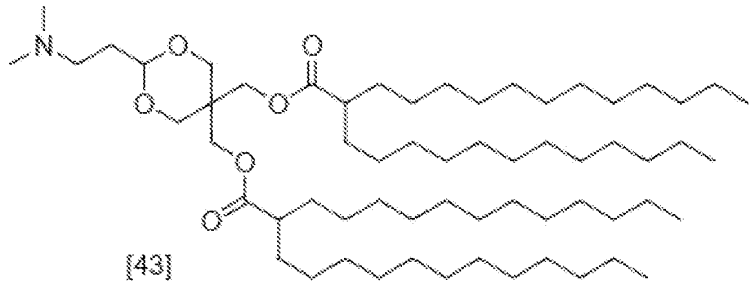


[42]

[0078] 化合物４３：(2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(meth

ylene) bis(2-dodecyltetradecanoate)

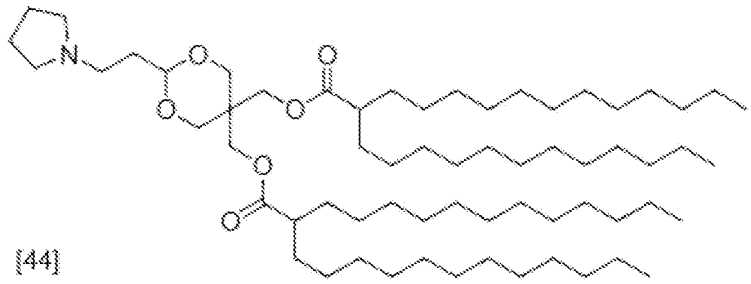
[化80]



[43]

[0079] 化合物４４：(2-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-dodecyltetradecanoate)

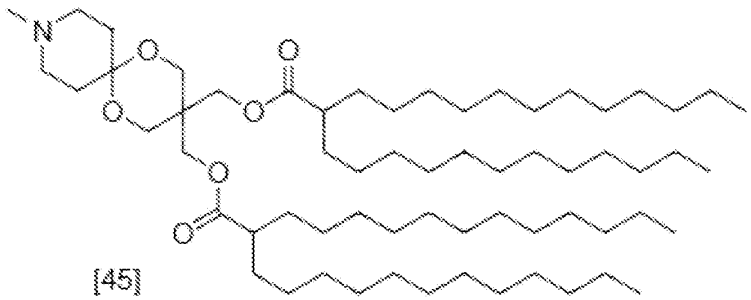
[化81]



[44]

[0080] 化合物４５：(9-methyl-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecane-3,3-diyl)bis(methylene) bis(2-dodecyltetradecanoate)

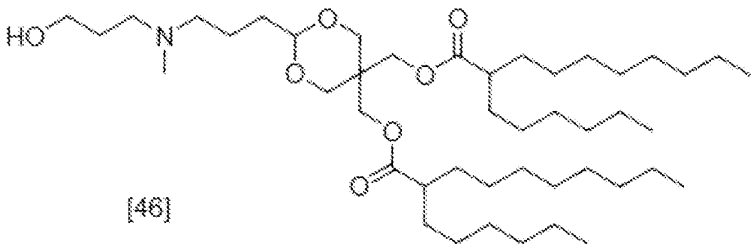
[化82]



[45]

[0081] 化合物４６：(2-(3-((3-hydroxypropyl)(methyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

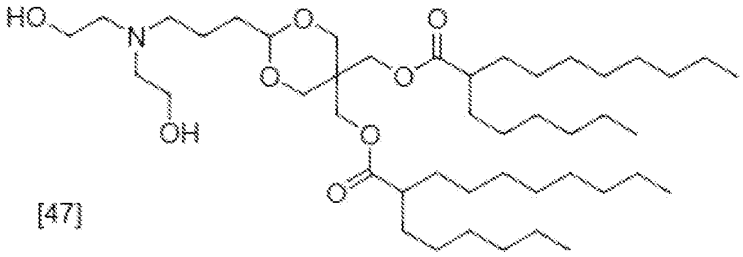
[化83]



[46]

[0082] 化合物４７：(2-(3-(bis(2-hydroxyethyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

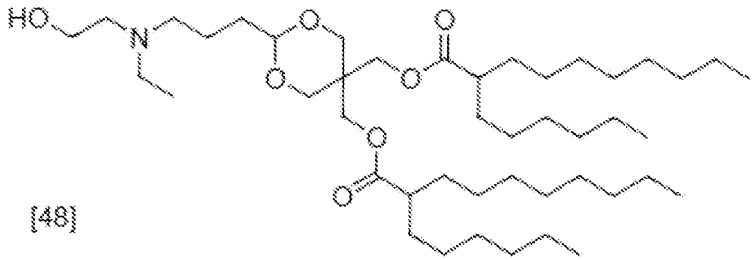
[化84]



[47]

[0083] 化合物４８：(2-(3-(ethyl(2-hydroxyethyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

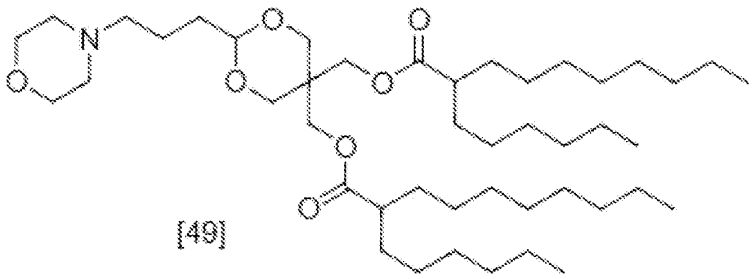
[化85]



[48]

[0084] 化合物４９：(2-(3-morpholinopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

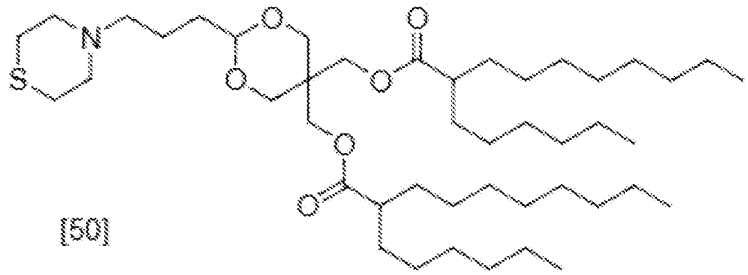
[化86]



[49]

[0085] 化合物５０：(2-(3-thiomorpholinopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

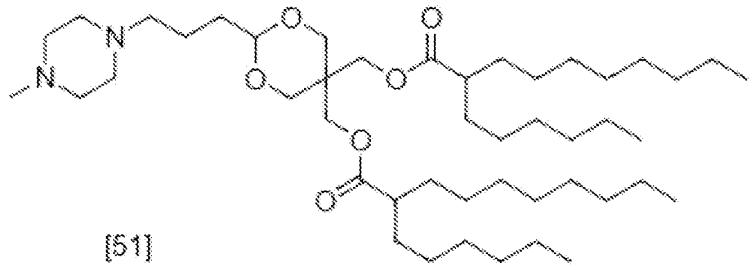
[化87]



[50]

[0086] 化合物５１：(2-(3-(4-methylpilerazin-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

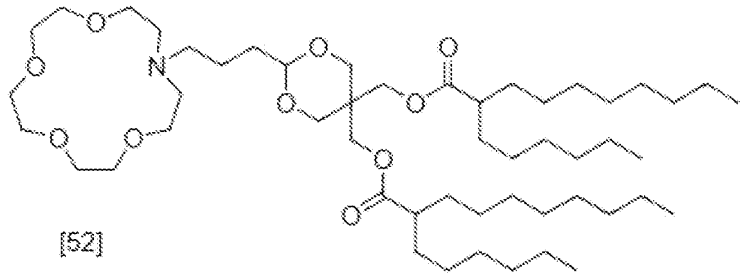
[化88]



[51]

[0087] 化合物５２：(2-(3-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyclopentadecan-13-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

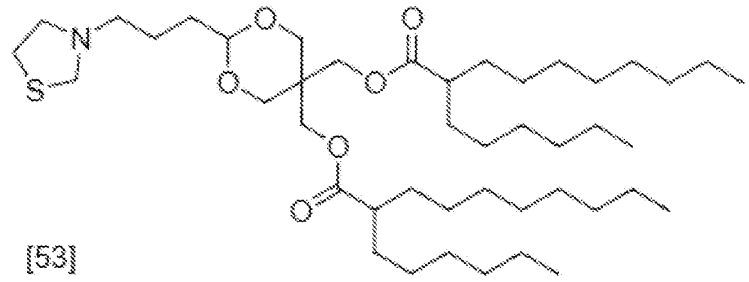
[化89]



[52]

[0088] 化合物５３：(2-(3-(thiazolidin-3-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

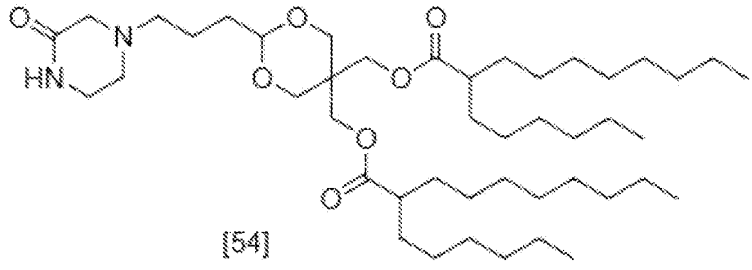
[化90]



[53]

[0089] 化合物５４：(2-(3-(3-oxopiperazin-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

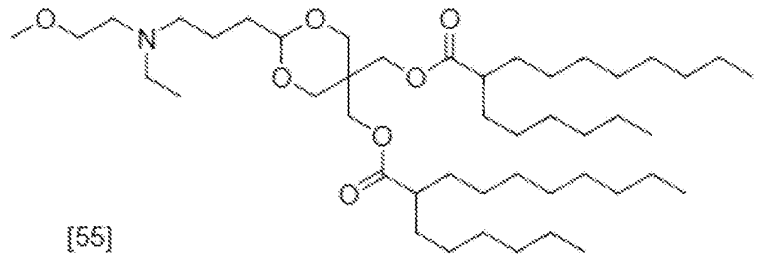
[化91]



[54]

[0090] 化合物５５：(2-(3-(ethyl(2-methoxyethyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

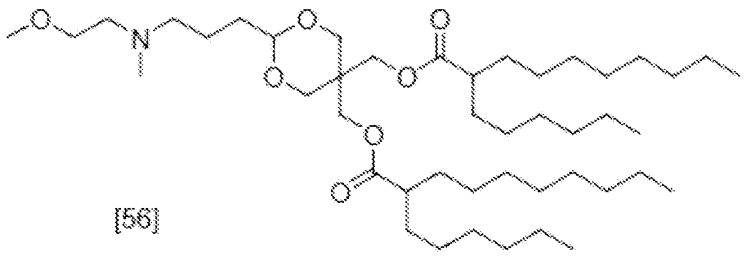
[化92]



[55]

[0091] 化合物５６：(2-(3-((2-methoxyethyl)(methyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

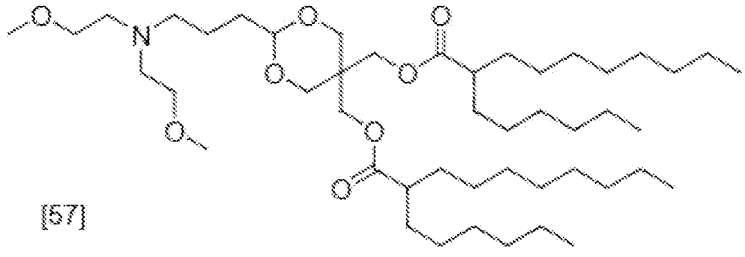
[化93]



[56]

[0092] 化合物５７：(2-(3-(bis(2-methoxyethyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

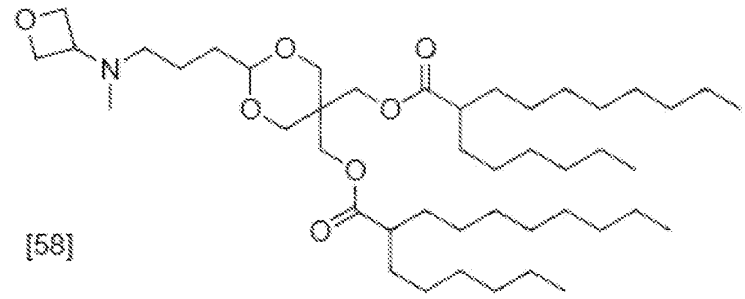
[化94]



[57]

[0093] 化合物５８：(2-(3-(methyl(oxetan-3-yl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

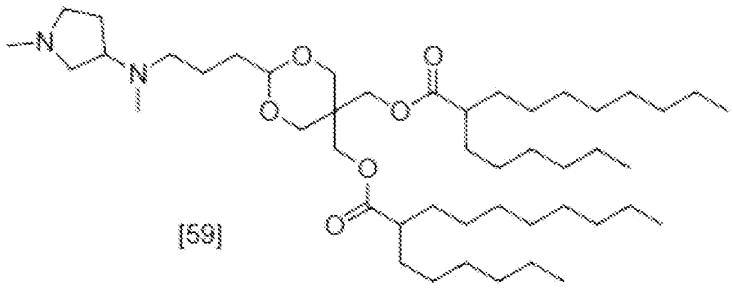
[化95]



[58]

[0094] 化合物５９：(2-(3-(methyl(1-methylpyrrolidin-3-yl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

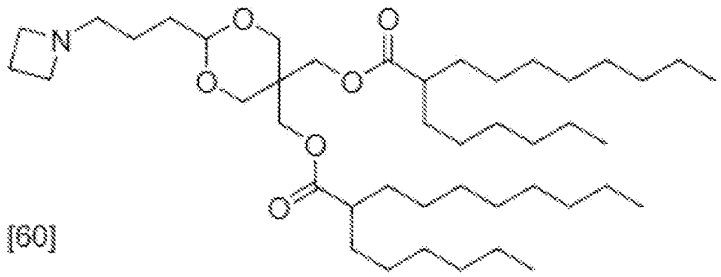
[化96]



[59]

[0095] 化合物６０：(2-(3-(azetidin-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

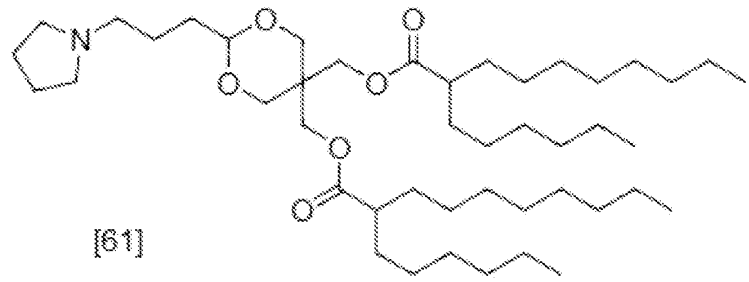
[化97]



[60]

[0096] 化合物６１：(2-(3-(pyrrolidine-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

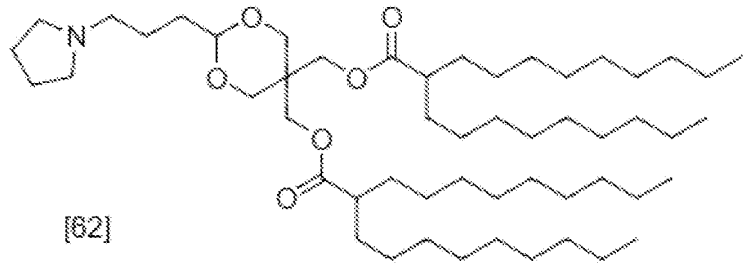
[化98]



[61]

[0097] 化合物６２：(2-(3-(pyrrolidine-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

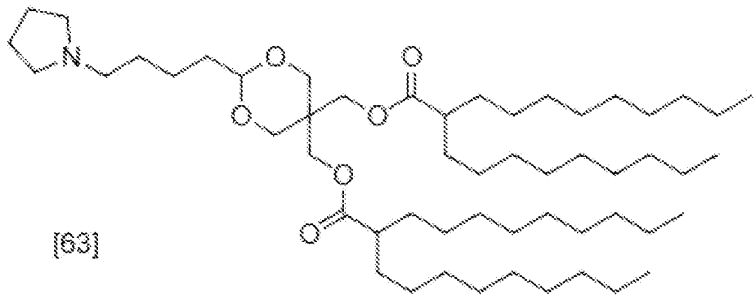
[化99]



[62]

[0098] 化合物６３：(2-(4-(pyrrolidine-1-yl)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

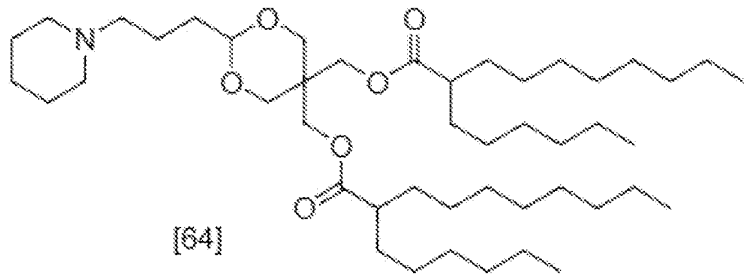
[化100]



[63]

[0099] 化合物６４：(2-(3-(piperidin-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

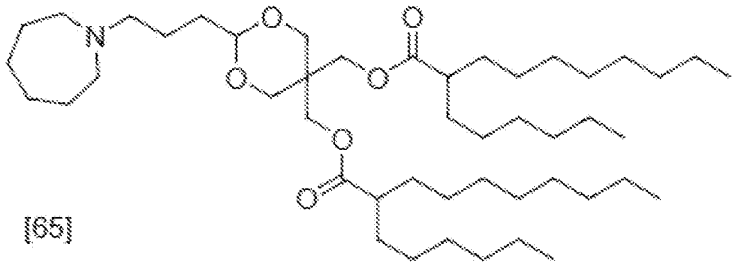
[化101]



[64]

[0100] 化合物６５：(2-(3-(azepan-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

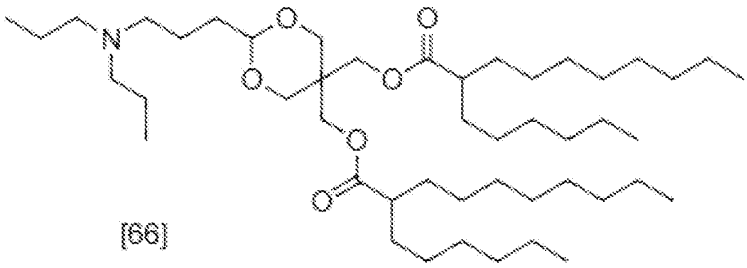
[化102]



[65]

[0101] 化合物６６：(2-(3-(dipropylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

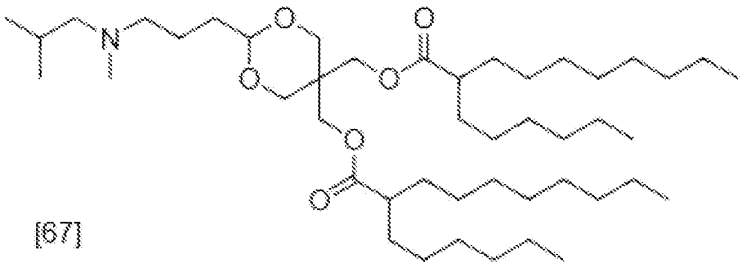
[化103]



[66]

[0102] 化合物６７：(2-(3-(isobutyl(methyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

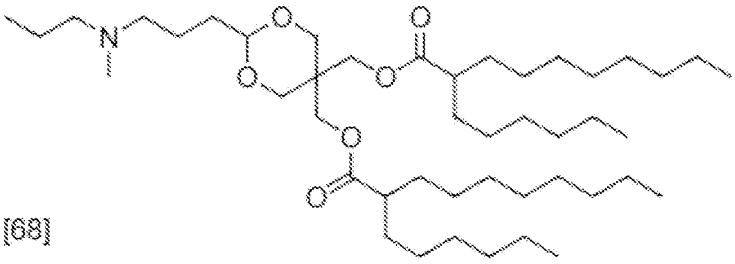
[化104]



[67]

[0103] 化合物６８：(2-(3-(methyl(propyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

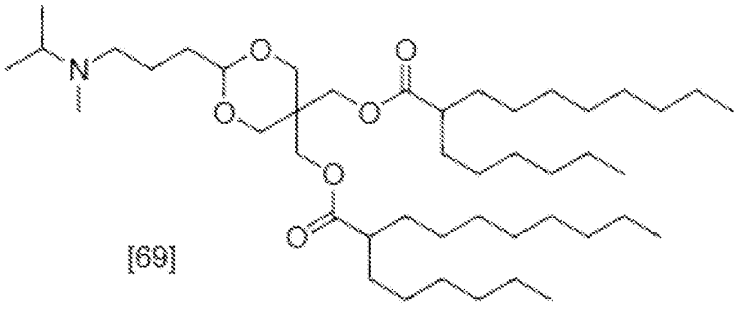
[化105]



[68]

[0104] 化合物６９：(2-(3-(isopropyl(methyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

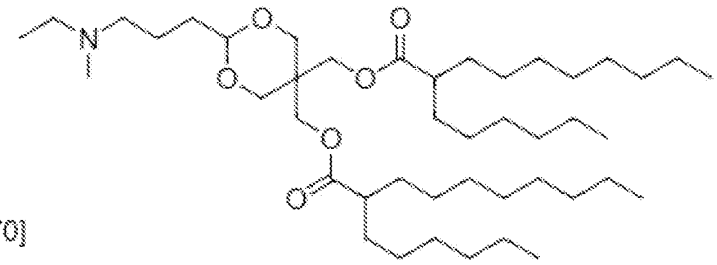
[化106]



[69]

[0105] 化合物７０：(2-(3-(ethyl(methyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

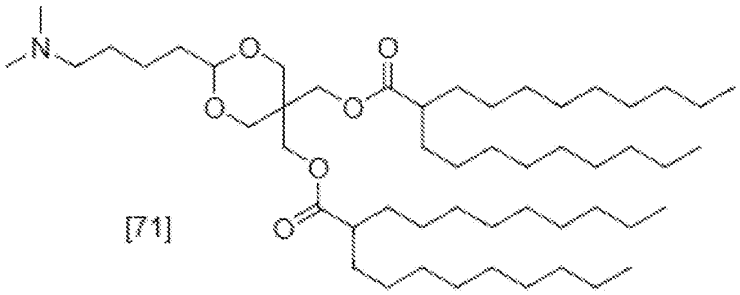
[化107]



[70]

[0106] 化合物７１：(2-(4-(dimethylamino)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

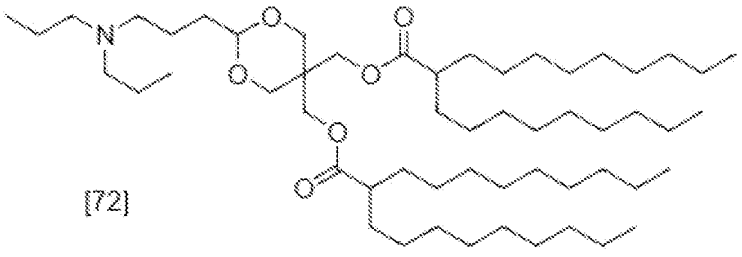
[化108]



[71]

[0107] 化合物７２：(2-(3-(dipropylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

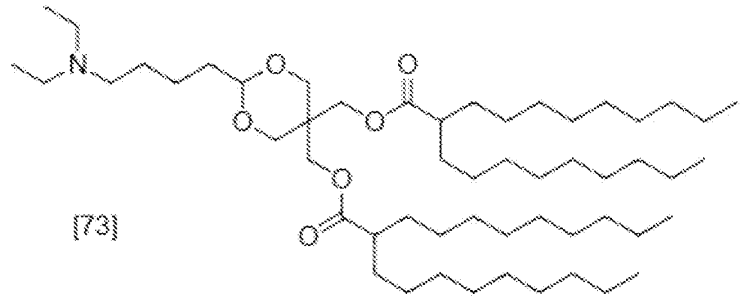
[化109]



[72]

[0108] 化合物７３：(2-(4-(diethylamino)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

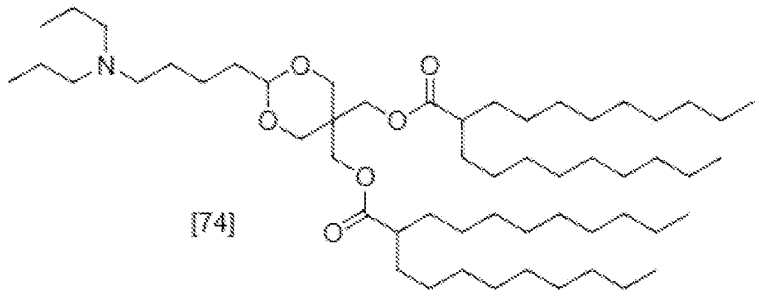
[化110]



[73]

[0109] 化合物７４：(2-(4-(dipropylamino)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

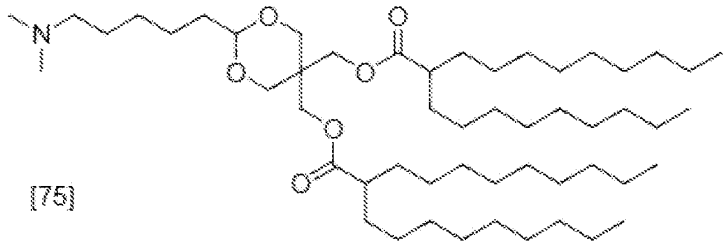
[化111]



[74]

[0110] 化合物７５：(2-(5-(dimethylamino)pentyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

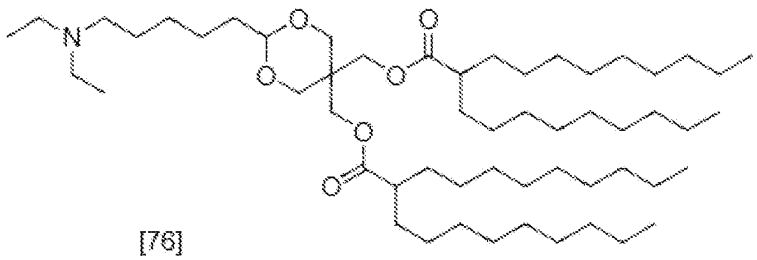
[化112]



[75]

[0111] 化合物７６：(2-(5-(diethylamino)pentyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

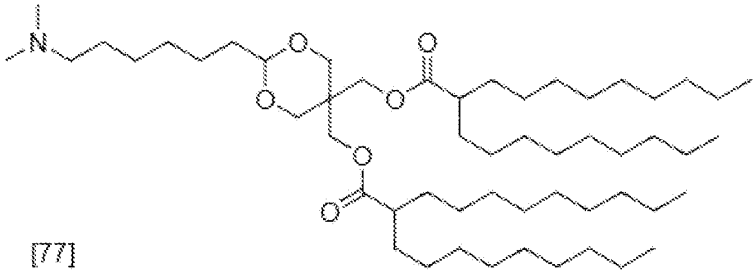
[化113]



[76]

[0112] 化合物７７：(2-(6-(dimethylamino)hexyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

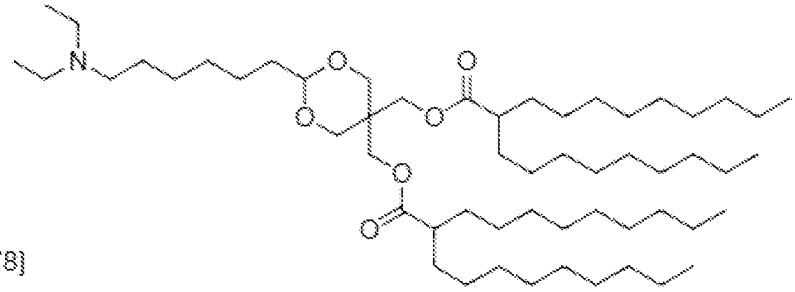
[化114]



[77]

[0113] 化合物７８：(2-(6-(dimethylamino)hexyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

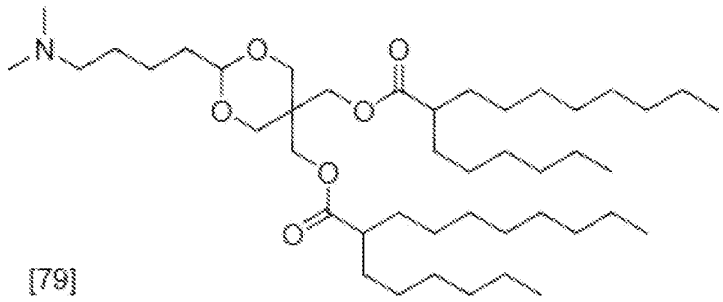
[化115]



[78]

[0114] 化合物７９：(2-(4-(dimethylamino)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

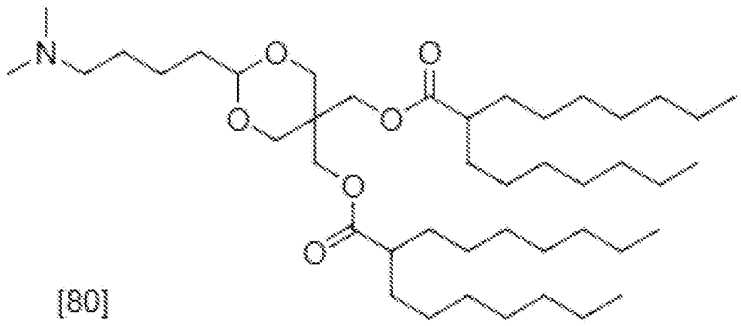
[化116]



[79]

[0115] 化合物８０：(2-(4-(dimethylamino)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-heptylnonanoate)

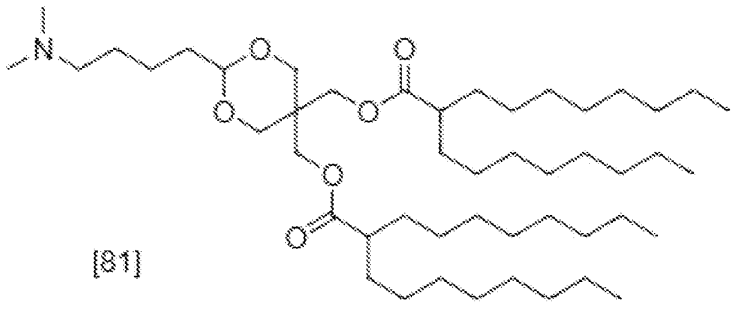
[化117]



[80]

[0116] 化合物８１：(2-(4-(dimethylamino)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyldecanoate)

[化118]

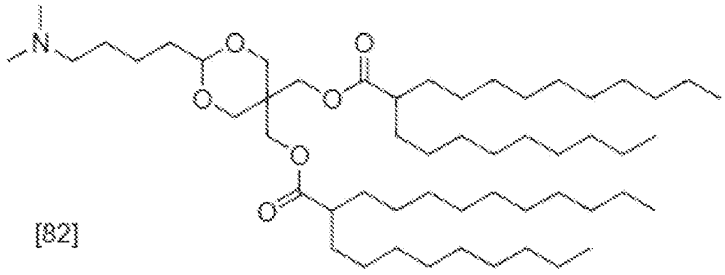


[81]

[0117] 化合物８２：(2-(4-(dimethylamino)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(meth

ylene) bis(2-nonyldodecanoate)

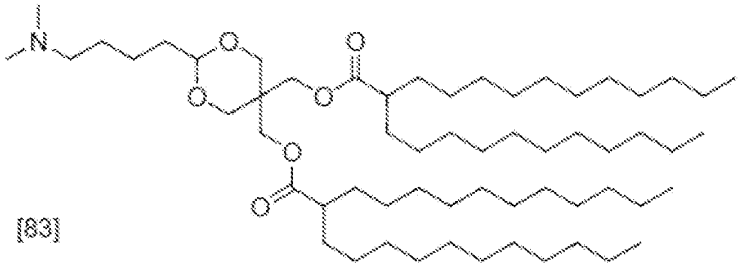
[化119]



[82]

[0118] 化合物８３：(2-(4-(dimethylamino)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-undecyltridecanoate)

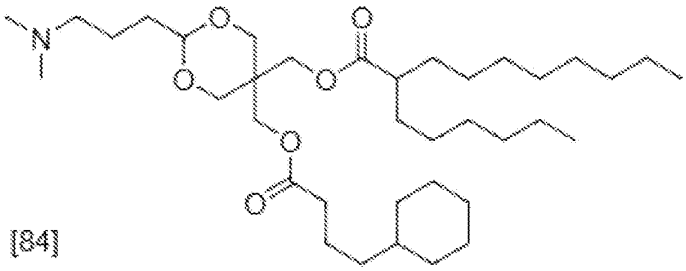
[化120]



[83]

[0119] 化合物８４：(5-(((4-cyclohexylbutanoyl)oxy)methyl)-2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl 2-hexyldecanoate

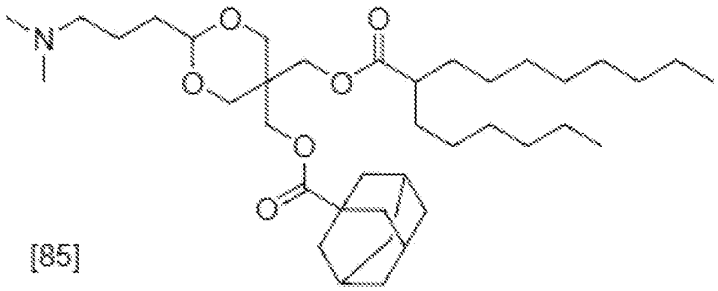
[化121]



[84]

[0120] 化合物８５：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-5-(((2-hexyldecanoyl)oxy)methyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl adamantane-1-carboxylate

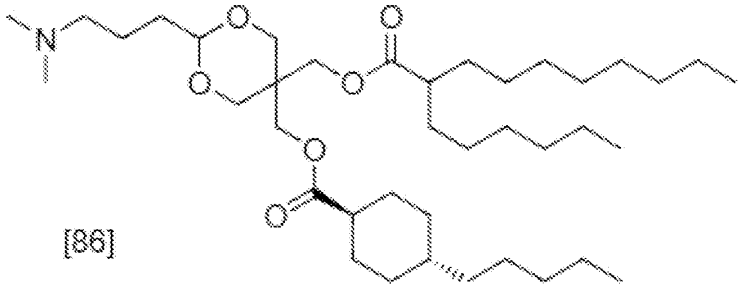
[化122]



[85]

[0121] 化合物８６：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-5-(((2-hexyldecanoyl)oxy)methyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl (1s,4r)-4-pentylcyclohexane-1-carboxylate

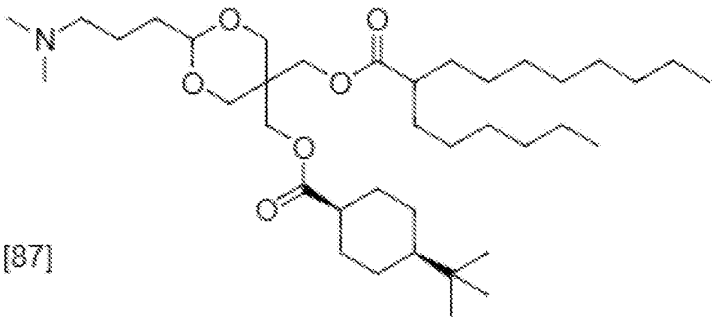
[化123]



[86]

[0122] 化合物８７：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-5-(((2-hexyldecanoyl)oxy)methyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl (1s,4s)-4-(tert-butyl)cyclohexane-1-carboxylate

[化124]

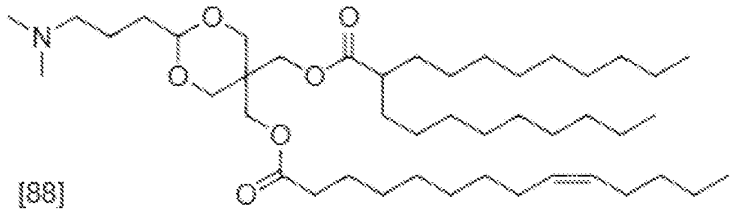


[87]

[0123] 化合物８８：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-5-(((2-nonylundecanoyl)oxy)m

ethyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl (Z)-tetradec-9-enoate

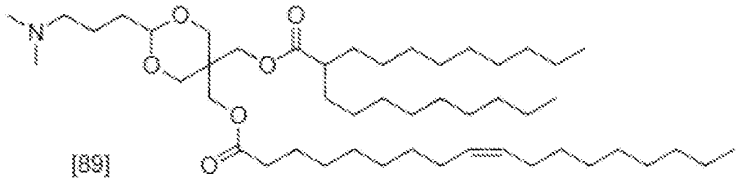
[化125]



[88]

[0124] 化合物８９：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-5-(((2-nonylundecanoyl)oxy)methyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl oleate

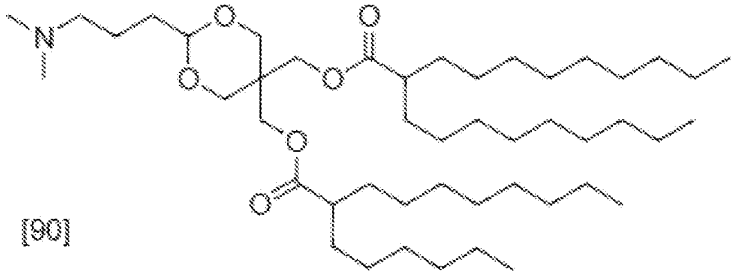
[化126]



[89]

[0125] 化合物９０：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-5-(((2-hexyldecanoyl)oxy)methyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl 2-nonylundecanoate

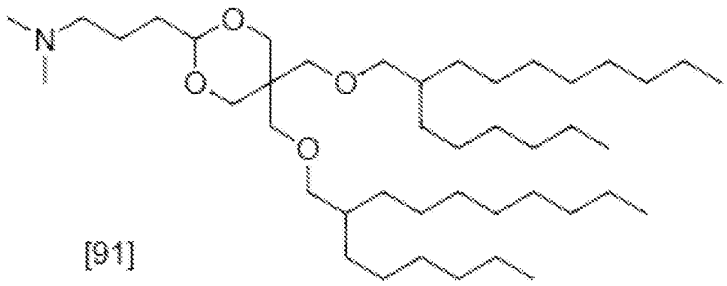
[化127]



[90]

[0126] 化合物９１：3-(5,5-bis(((2-hexyldecyl)oxy)methyl)-1,3-dioxan-2-yl)-N,N-dimethylpropan-1-amine

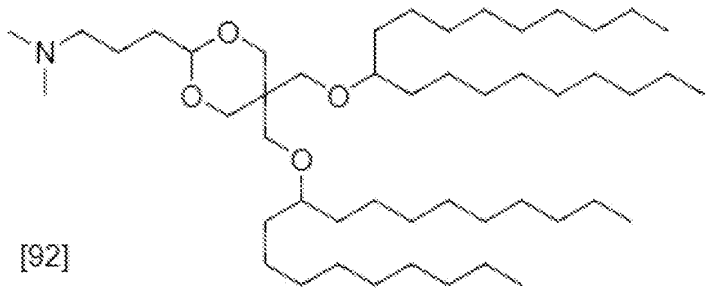
[化128]



[91]

[0127] 化合物９２：3-(5,5-bis((nonadecan-10-yloxy)methyl)-1,3-dioxan-2-yl)-N,N-dimethylpropan-1-amine

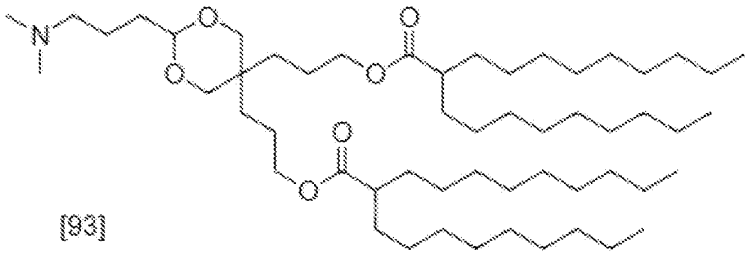
[化129]



[92]

[0128] 化合物９３：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(propane-3,1-diyl) bis(2-nonylundecanoate)

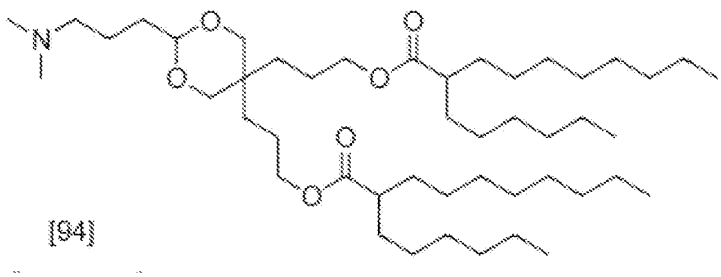
[化130]



[93]

[0129] 化合物９４：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(propane-3,1-diyl) bis(2-hexyldecanoate)

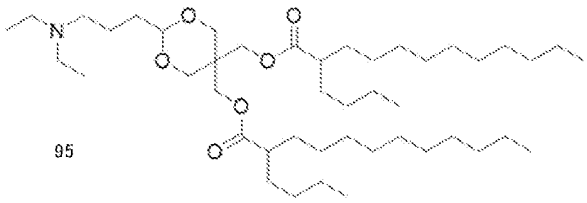
[化131]



[94]

[0130] 化合物９５：(2-(3-(diethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-butyldodecanoate)

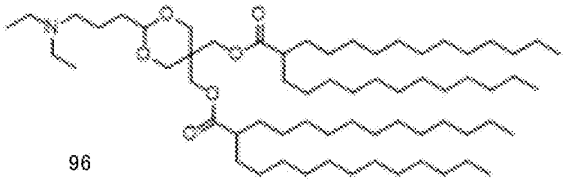
[化132]



95

[0131] 化合物９６：(2-(3-(diethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-dodecyltetradecanoate)

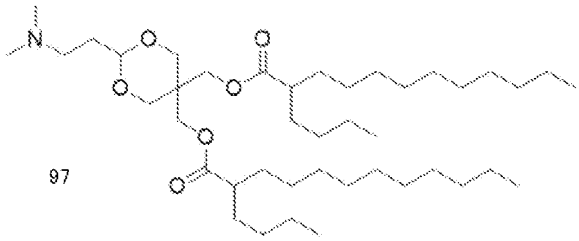
[化133]



96

[0132] 化合物９７：(2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-butyldodecanoate)

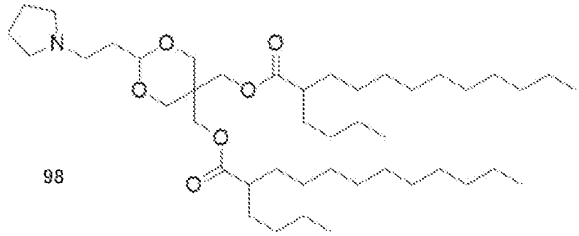
[化134]



97

[0133] 化合物９８：(2-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-butyldodecanoate)

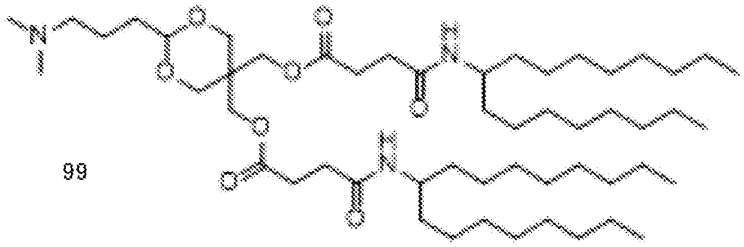
[化135]



98

[0134] 化合物９９：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(4-(heptadecan-9-ylamino)-4-oxobutanoate)

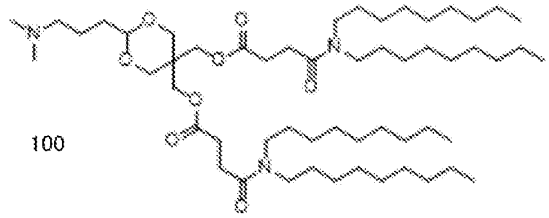
[化136]



99

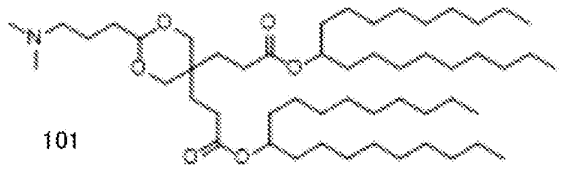
[0135] 化合物１００：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(4-(dinonylamino)-4-oxobutanoate)

[化137]



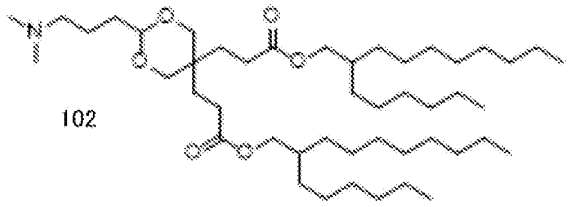
[0136] 化合物１０１：di(nonadecan-10-yl) 3,3'-(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)dipropionate

[化138]



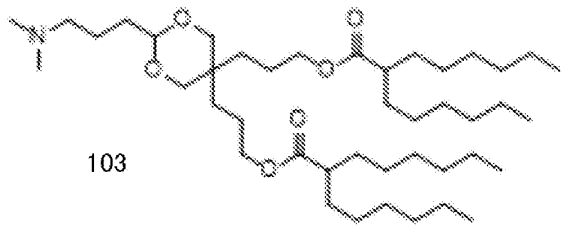
[0137] 化合物１０２：bis(2-hexyldecyl) 3,3'-(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)dipropionate

[化139]



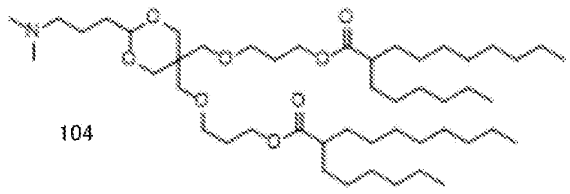
[0138] 化合物１０３：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(propane-3,1-diyl) bis(2-hexyloctanoate)

[化140]



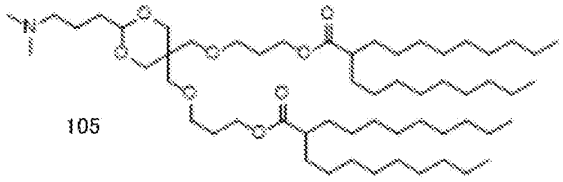
[0139] 化合物１０４：(((2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(propane-3,1-diyl) bis(2-hexyldecanoate)

[化141]



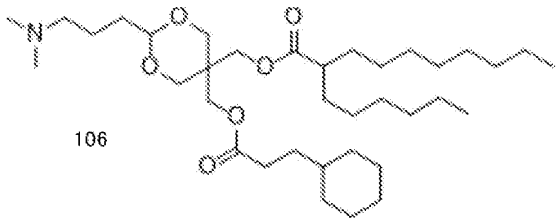
[0140] 化合物１０５：(((2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(propane-3,1-diyl) bis(2-nonylundecanoate)

[化142]



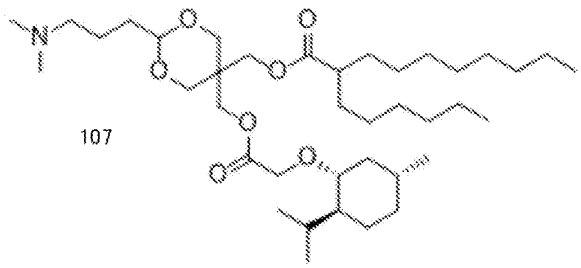
[0141] 化合物１０６：(5-(((3-cyclohexylpropanoyl)oxy)methyl)-2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl 2-hexyldecanoate

[化143]



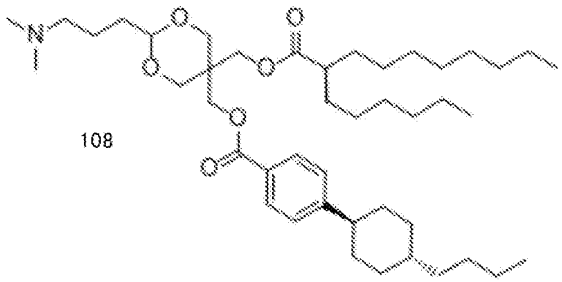
[0142] 化合物１０７：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-5-((2-(((1R,2S,5R)-2-isopropyl-5-methylcyclohexyl)oxy)acetoxy)methyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl 2-hexyldecanoate

[化144]



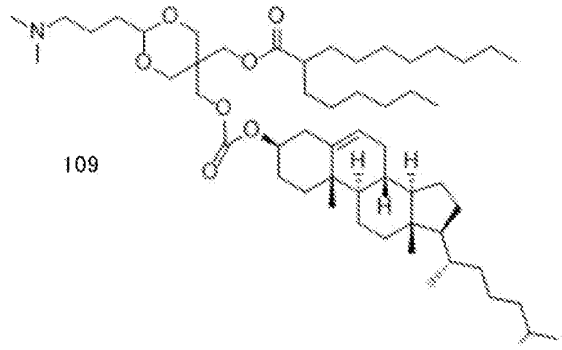
[0143] 化合物１０８：(2-(3-(dimethylamino)propyl)-5-(((2-hexyldecanoyl)oxy)methyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl 4-((1s,4r)-4-butylcyclohexyl)benzoate

[化145]



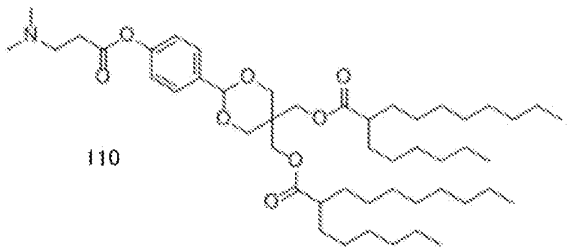
[0144] 化合物１０９：(5-((((((3R,8R,9R,10S,13S,14R,17S)-10,13-dimethyl-17-((S)-6-methylheptan-2-yl)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl)oxy)carbonyl)oxy)methyl)-2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl 2-hexyldecanoate

[化146]



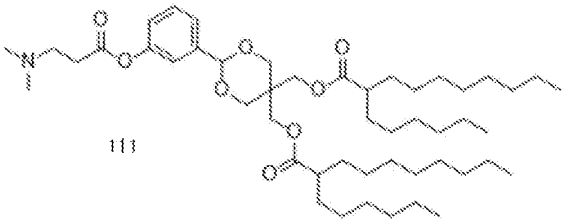
[0145] 化合物１１０：(2-(4-((3-(dimethylamino)propanoyl)oxy)phenyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

[化147]



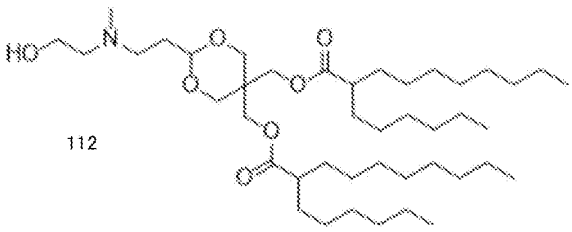
[0146] 化合物１１１：(2-(3-((3-(dimethylamino)propanoyl)oxy)phenyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

[化148]



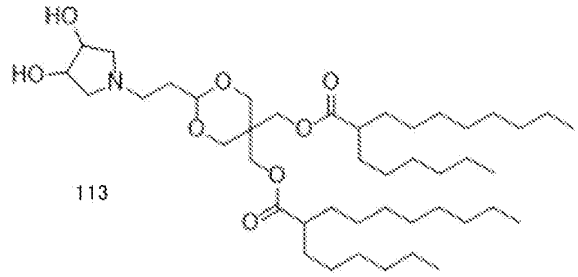
[0147] 化合物１１２：(2-(2-((2-hydroxyethyl)(methyl)amino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

[化149]



[0148] 化合物１１３：(2-(2-(3,4-dihydroxypyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

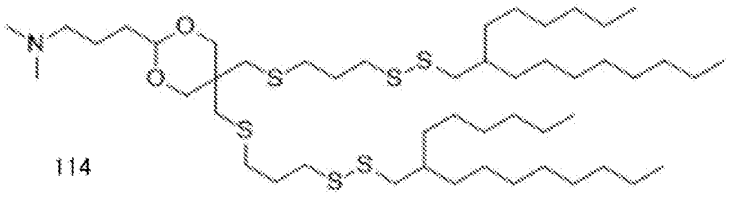
[化150]



113

[0149] 化合物１１４：3-(5,5-bis(((3-((2-hexyldecyl)disulfaneyl)propyl)thio)methyl)-1,3-dioxan-2-yl)-N,N-dimethylpropan-1-amine

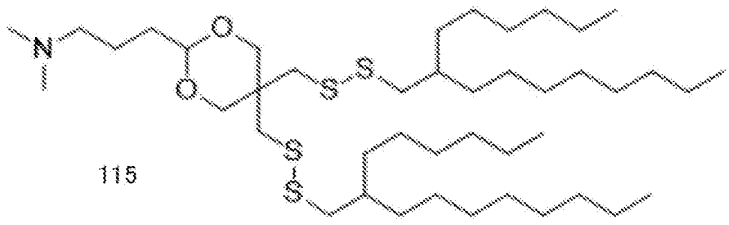
[化151]



114

[0150] 化合物１１５：3-(5,5-bis(((2-hexyldecyl)disulfaneyl)methyl)-1,3-dioxan-2-yl)-N,N-dimethylpropan-1-amine

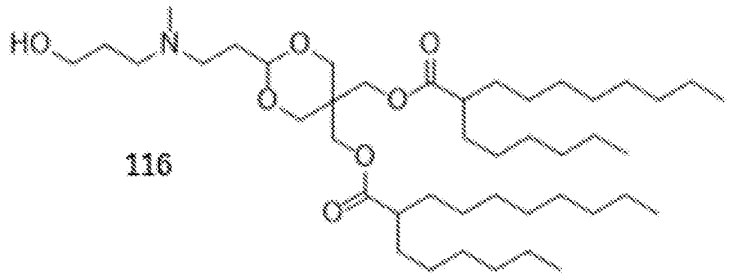
[化152]



115

[0151] 化合物１１６：(2-(2-((3-hydroxypropyl)(methyl)amino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

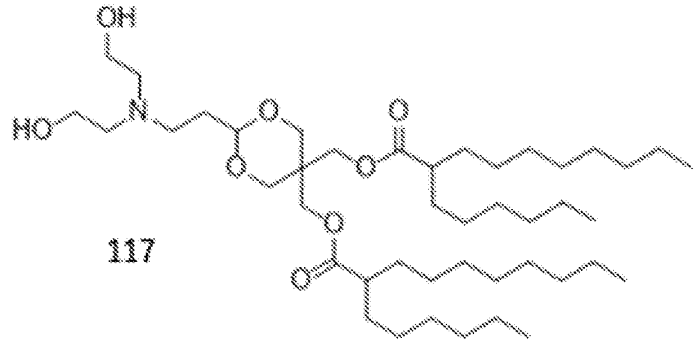
[化153]



116

[0152] 化合物１１７：(2-(2-(bis(2-hydroxyethyl)amino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

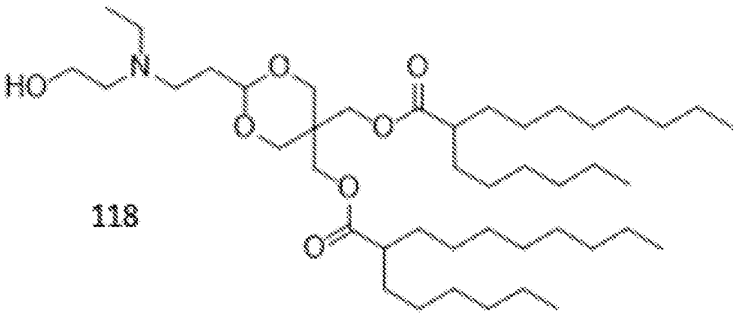
[化154]



117

[0153] 化合物１１８：(2-(2-(ethyl(2-hydroxyethyl)amino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

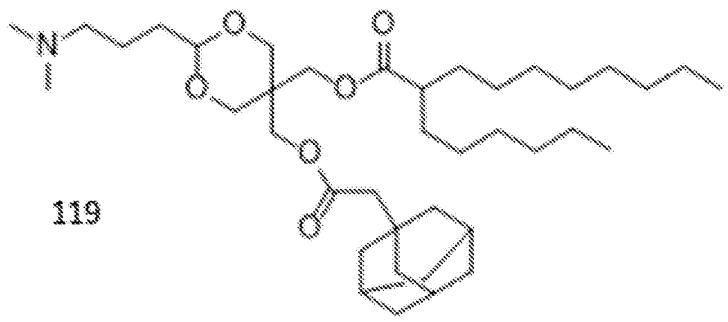
[化155]



118

[0154] 化合物１１９：(5-((2-(adamantan-1-yl)acetoxy)methyl)-2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl 2-hexyldecanoate

[化156]



[0155] 本発明は、一側面において、ｐＨ感受性カチオン性脂質に関する。

[0156] 一般式（Ｉ）で表されるｐＨ感受性カチオン性脂質は、例えば、本明細書の実施例に具体的に示した方法により容易に製造することができる。この製造方法を参照し、原料化合物、試薬、及び反応条件などを適宜選択することにより、当業者は一般式（Ｉ）～（ＩＩＩ）の範囲に包含される任意の脂質を容易に製造することができる。

[0157] 本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する本発明のｐＨ感受性カチオン性脂質は、１種類のみであってもよく、２種類以上であってもよい。本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する本発明のｐＨ感受性カチオン性脂質が２種類以上である場合、本発明のｐＨ感受性カチオン性脂質の量は、脂質ナノ粒子を構成する脂質分子のうち、本発明のｐＨ感受性カチオン性脂質に相当する脂質分子の合計量を意味する。

[0158] 脂質ナノ粒子を構成する脂質分子に占める本発明のｐＨ感受性カチオン性脂質の割合が多いほど、標的細胞への脂質ナノ粒子の取り込み効率が高くなる。このため、本発明に係る脂質ナノ粒子においては、脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する本発明のｐＨ感受性カチオン性脂質の量の割合（［本発明のｐＨ感受性カチオン性脂質の量（ｍｏｌ）］／（［脂質ナノ粒子を構成する全脂質の量（ｍｏｌ）］）×１００％）は、２０モル％以上であることが好ましい。一方で、脂質ナノ粒子を構成する脂質分子に占めるｐＨ感受性カチオン性脂質の割合が多すぎると、粒子径を十分に小さくすることが困難な場合がある。標的細胞への脂質ナノ粒子の取り込み効率が十分であり、

かつ粒子径が十分に小さい脂質ナノ粒子が得られることから、本発明に係る脂質ナノ粒子における脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する本発明のｐＨ感受性カチオン性脂質の量の割合は、３０モル％以上であることがより好ましく、３０～７０モル％がさらに好ましく、４０～６０モル％がよりさらに好ましい。

[0159] 本発明に係る脂質ナノ粒子の構成脂質のうち、本発明のｐＨ感受性カチオン性脂質以外の脂質としては、一般的にリポソームを形成する際に使用される脂質を用いることができる。このような脂質としては、例えば、リン脂質、ステロール若しくはステロール誘導体、糖脂質、又は飽和若しくは不飽和の脂肪酸等が挙げられる。これらは１種又は２種以上を組み合わせて用いることができる。

[0160] リン脂質としては、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファリジルコリン、カルジオリピン、プラスマロゲン、セラミドホスフォリルグリセロールホスファート、ホスファチジン酸等のグリセロリン脂質；スフィンゴミエリン、セラミドホスホリルグリセロール、セラミドホスホリルエタノールアミン等のスフィンゴリン脂質；などを挙げることができる。また、卵黄レシチン、大豆レシチンなどの天然物由来のリン脂質を用いることもできる。グリセロリン脂質及びスフィンゴリン脂質における脂肪酸残基は、特に限定されないが、例えば、炭素数１２～２４の飽和又は不飽和の脂肪酸残基を挙げることができ、炭素数１４～２０の飽和又は不飽和の脂肪酸残基が好ましい。具体的には、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキジン酸、アラキドン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸などの脂肪酸由来のアシル基を挙げることができる。これらのグリセロ脂質又はスフィンゴ脂質が２以上の脂肪酸残基を有する場合、全ての脂肪酸残基が同一の基であってもよく、互いに異なる基であってもよい。

[0161] リン脂質の例は、ジフィタノイルホスファチジルエタノールアミン（diphy

tanoyl phosphatidyl ethanolamine) (DPhPE)、1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine) (DPhPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (DSPC)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (DOPC)、1,2- ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) (DPPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルエタノールアミン (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine) (DSPE)、および 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) (DOPE)を含む。

[0162] ステロール又はステロール誘導体としては、例えば、コレステロール、コレステロールコハク酸、ラノステロール、ジヒドロラノステロール、デスモステロール、ジヒドロコレステロール等の動物由来のステロール；スチグマステロール、シトステロール、β－シトステロール、カンペステロール、ブラシカステロール等の植物由来のステロール（フィトステロール）；チモステロール、エルゴステロール等の微生物由来のステロールなどが挙げられる。糖脂質としては、例えば、例えば、スルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド、グリコシルジグリセリド等のグリセロ糖脂質；ガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシド、ガングリオシド等のスフィンゴ糖脂質；などが挙げられる。飽和又は不飽和の脂肪酸としては、例えば、パルミチン酸、オレイン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、ミリスチン酸などの炭素数１２～２０の飽和又は不飽和の脂肪酸が挙げられる。

[0163] 本発明に係る脂質ナノ粒子の構成脂質としては、本発明のｐＨ感受性カチオン性脂質に加えて、中性脂質を含むことが好ましく、リン脂質又はステロールを含むことがより好ましく、ステロールを含むことがさらに好ましく、

コレステロールを含むことがよりさらに好ましい。

[0164] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、脂質成分としてポリアルキレングリコール修飾脂質を含有することが好ましい。ポリアルキレングリコールは親水性ポリマーであり、ポリアルキレングリコール修飾脂質を脂質膜構成脂質として用いて脂質ナノ粒子を構築することにより、脂質ナノ粒子の表面をポリアルキレングリコールで修飾することができる。ポリアルキレングリコールで表面修飾することにより、脂質ナノ粒子の血中滞留性などの安定性を高めることができる場合がある。

[0165] ポリアルキレングリコールとしては、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリテトラメチレングリコール、ポリヘキサメチレングリコールなどを用いることができる。ポリアルキレングリコールの分子量は、例えば２００～１０，０００程度、例えば３００～１０，０００程度、好ましくは５００～１０，０００程度、さらに好ましくは１，０００～５，０００程度である。本発明の一態様において、ポリアルキレングリコールの分子量は、約２００、約３００、約３５０、約４００、約５００、約５５０、約７５０、約１０００、約１５００、約２０００、約３０００、約３５００、約４０００、約５０００または約１０，０００Ｄａである。

[0166] 例えば、脂質のポリエチレングリコールによる修飾には、ステアリル化ポリエチレングリコール（例えばステアリン酸ＰＥＧ４５（ＳＴＲ－ＰＥＧ４５）など）を用いることができる。その他、Ｎ－［カルボニル－メトキシポリエチレングリコール］－１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスフォエタノールアミン（N-[carbonyl-methoxypolyethylene glycol]-1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine）（DPPE-PEG)、Ｎ－［カルボニル－メトキシポリエチレングリコール］－１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスフォエタノールアミン（N-[carbonyl-methoxypolyethylene glycol]-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine）（DSPE-PEG)、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール（1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene g

lycol）（DMG-PEG）、Ｎ－［カルボニル－メトキシポリエチレングリコール］－１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（N-[carbonyl-methoxypolyethylene glycol]-1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine）（DMPE-PEG)などのポリエチレングリコール誘導体が使用され得る。例えば、Ｎ－［カルボニル－メトキシポリエチレングリコール－２０００]－１,２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスフォエタノールアミン（DPPE-PEG2000）、ｎ－［カルボニル－メトキシポリエチレングリコール－５０００］－１,２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスフォエタノールアミン（DPPE-PEG5000）、Ｎ－［カルボニル-メトキシポリエチレングリコール－７５０］－１,２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスフォエタノールアミン（DSPE-PEG750）、Ｎ－［カルボニル-メトキシポリエチレングリコール－２０００］－１,２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスフォエタノールアミン（DSPE-PEG2000）、Ｎ－［カルボニル－メトキシポリエチレングリコール－５０００]－１,２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスフォエタノールアミン（DSPE-PEG5000）、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール－７５０（DMG-PEG750)、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール－２０００（DMG-PEG2000）、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール－５０００（DMG-PEG5000)、Ｎ－［カルボニル－メトキシポリエチレングリコール－７５０］－１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン(DMPE-PEG750)、Ｎ－［カルボニル－メトキシポリエチレングリコール－２０００］－１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン(DMPE-PEG2000)、Ｎ－［カルボニル－メトキシポリエチレングリコール－５０００］－１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン(DMPE-PEG5000）などのポリエチレングリコール誘導体を用いることもできるが、ポリアルキレングリコール化脂質はこれらに限定されることはない。

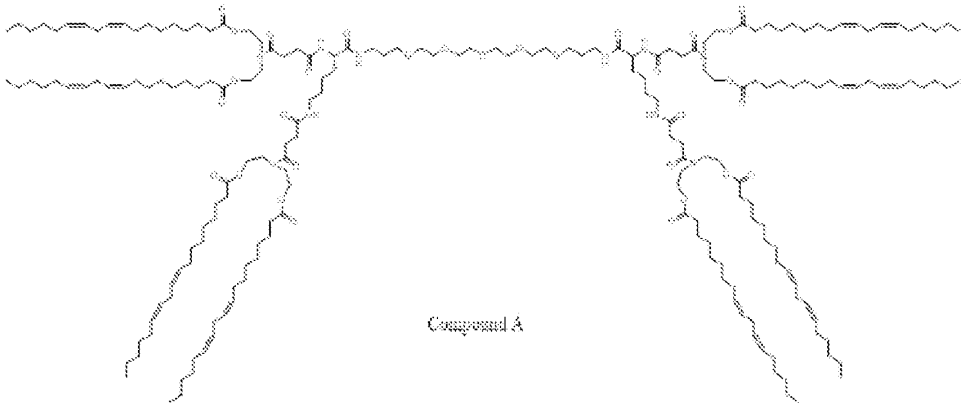
[0167] 本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する、ポリアルキレングリコール修飾脂質の割合は、本発明に係る脂質ナノ粒子を遺伝子キャリアとして用いる場合の遺伝子発現活性を損なわない量であれば特に限定されるものではない。例えば、脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する、ポリアルキレングリコール修飾脂質の割合は、０．５～３モル％とすることが好ましい。

[0168] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、DSPC、DOPCおよびDOPEのいずれか１つをリン脂質として含み、かつDMG-PEGをポリアルキレングリコール修飾脂質として含んでもよい。例えば、本発明に係る脂質ナノ粒子は、脂質ナノ粒子の全脂質量に対して40～60（例えば、40, 40.5, 41, 41.5, 42, 42.5, 43, 43.5, 44, 44.5, 45, 45.5, 46, 46.5, 47, 47.5, 48, 48.5, 49, 49.5, 50, 50.5, 51, 51.5, 52, 52.5, 53, 53.5, 54, 54.5, 55, 55.5, 56, 56.5, 57, 57.5, 58, 58.5, 59, 59.5 または 60）mol%のｐＨ感受性カチオン性脂質；脂質ナノ粒子の全脂質量に対して30-50（例えば30, 30.5, 31, 31.5, 32, 32.5, 33, 33.5, 34, 34.5, 35, 35.5, 36, 36.5, 37, 37.5, 38, 38.5, 39, 39.5, 40, 40.5, 41, 41.5, 42, 42.5, 43, 43.5, 44, 44.5, 45, 45.5, 46, 46.5, 47, 47.5, 48, 48.5, 49, 49.5 または 50）mol% のステロール（例えばコレステロール）; 脂質ナノ粒子の全脂質量に対して5-15（例えば5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5 または 15）mol% の、DSPC、DOPCおよびDOPEのいずれか１つのリン脂質;および脂質ナノ粒子の全脂質量に対して1-5（例えば1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 または 5）mol% の DMG-PEG（例えばDMG-PEG2000)を含んでもよい。本発明に係る脂質ナノ粒子において、ｐＨ感受性カチオン性脂質と、ステロールと、DSPC、DOPCおよびDOPEのいずれか１つのリン脂質と、DMG-PEGとのモル比率（ｐＨ感受性カチオン性脂質／ステロール／リン脂質／DMG-PEG）は、特に限定されないが、例えば、以下を含む：(60/31/8/1), (60/31/7.5/1.5), (60/31/7/2), (60/31/6.5/2.5), (60/31/6/3), (60/31/5.5/3.5), (60/31/5/4), (60/31/4.5/4.5), (60/31/4/5), (60/31.5/7.5/1), (60/30.5/

7.5/2), (60/30/7.5/2.5), (60/29.5/7.5/3), (60/29/7.5/3.5), (60/28.5/7.5/4), (60/28/7.5/4.5), (60/27.5/7.5/5), (59/32/7.5/1.5), (58/33/7.5/1.5), (57/34/7.5/1.5), (56/35/7.5/1.5), (55/36/7.5/1.5), (60/29/10/1), (60/28.5/10/1.5), (60/28/10/2), (60/27.5/10/2.5), (60/27/10/3), (60/26.5/10/3.5), (60/26/10/4), (60/25.5/10/4.5), (60/25/10/5), (60/27/12/1), (60/27/11.5/1.5), (60/27/11/2), (60/27/10.5/2.5), (60/27/9.5/3.5), (60/27/9/4), (60/27/8.5/4.5), (60/27/8/5), (59/28/10/3), (58/29/10/3), (57/30/10/3), (56/31/10/3), (55/32/10/3), (50/39/10/1), (50/38.5/10/1.5), (50/38/10/2), (50/37.5/10/2.5), (50/37/10/3), (50/36.5/10/3.5), (50/36/10/4), (50/35.5/10/4.5), (50/35/10/5), (50/38.5/10.5/1), (50/38.5/9.5/2), (50/38.5/9/2.5), (50/38.5/8.5/3), (50/38.5/8/3.5), (50/38.5/7.5/4), (50/38.5/7/4.5), (50/38.5/6.5/5), (51/37.5/10/1.5), (52/36.5/10/1.5), (53/35.5/10/1.5), (54/34.5/10/1.5), (55/33.5/10/1.5), (49/39.5/10/1.5), (48/40.5/10/1.5), (47/41.5/10/1.5), (46/42.5/10/1.5), (45/43.5/10/1.5), (51/34/10/5), (52/33/10/5), (53/32/10/5), (54/31/10/5), (55/30/10/5), (40/44/15/1), (40/43.5/15/1.5), (40/43/15/2), (40/42.5/15/2.5), (40/42/15/3), (40/41.5/15/3.5), (40/41/15/4), (40/40.5/15/4.5), (40/40/15/5), (41/39/15/5), (42/38/15/5), (43/37/15/5), (44/36/15/5), (45/35/15/5), (41/41/14/4), (42/42/13/3), (43/43/12/2), および(44/44/11/1)。

[0169] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、以下の化合物Ａを含んでも良い。当該化合物Ａは、WO2019090359におけるCompound T3に相当する。当該文献の開示内容のすべてを参照により本明細書に援用する。

[化157]



[0170] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、DOPE, DSPEおよびDPPEのいずれか１つをリン脂質として含み、DPPE-PEG, DMPE-PEG およびDSPE-PEGのいずれか１つをポリアルキレングリコール修飾脂質として含み、かつ化合物Aを含んでも良い。例えば、本発明に係る脂質ナノ粒子は、脂質ナノ粒子の全脂質量に対して20-60（例えば20, 20.5, 21, 21.5, 22, 22.5, 23, 23.5, 24, 24.5, 25, 25.5, 26, 26.5, 27, 27.5, 28, 28.5, 29, 29.5, 30, 30.5, 31, 31.5, 32, 32.5, 33, 33.5, 34, 34.5, 35, 35.5, 36, 36.5, 37, 37.5, 38, 38.5, 39, 39.5, 40, 40.5, 41, 41.5, 42, 42.5, 43, 43.5, 44, 44.5, 45, 45.5, 46, 46.5, 47, 47.5, 48, 48.5, 49, 49.5, 50, 50.5, 51, 51.5, 52, 52.5, 53, 53.5, 54, 54.5, 55, 55.5, 56, 56.5, 57, 57.5, 58, 58.5, 59, 59.5 または 60）mol%のｐＨ感受性カチオン性脂質；脂質ナノ粒子の全脂質量に対して15-50（例えば15, 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, 19.5, 20, 20.5, 21, 21.5, 22, 22.5, 23, 23.5, 24, 24.5, 25, 25.5, 26, 26.5, 27, 27.5, 28, 28.5, 29, 29.5, 30, 30.5, 31, 31.5, 32, 32.5, 33, 33.5, 34, 34.5, 35, 35.5, 36, 36.5, 37, 37.5, 38, 38.5, 39, 39.5, 40, 40.5, 41, 41.5, 42, 42.5, 43, 43.5, 44, 44.5, 45, 45.5, 46, 46.5, 47, 47.5, 48, 48.5, 49, 49.5 または 50）mol%のステロール（例えばコレステロール）；脂質ナノ粒子の全脂質量に対して 5-40（例えば 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5,10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, 15,

15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, 19.5, 20, 20.5, 21, 21.5, 22, 22.5, 23, 23.5, 24, 24.5, 25, 25.5, 26, 26.5, 27, 27.5, 28, 28.5, 29, 29.5, 30, 30.5, 31, 31.5, 32, 32.5, 33, 33.5, 34, 34.5, 35, 35.5, 36, 36.5, 37, 37.5, 38, 38.5, 39, 39.5, または40）mol% の、DOPE, DSPEおよびDPPEのいずれか１つのリン脂質; 脂質ナノ粒子の全脂質量に対して0.5-10（例えば0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 または10）mol%の、DPPE-PEG（例えばDPPE-PEG2000）, DMPE-PEG（例えばDMPE-PEG2000） およびDSPE-PEG（例えばDSPE-PEG2000）のいずれか１つのポリアルキレングリコール修飾脂質；および脂質ナノ粒子の全脂質量に対して 0.5-10（例えば 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 または 10）mol% の Compound A を含んでもよい。本発明に係る脂質ナノ粒子において、ｐＨ感受性カチオン性脂質と、ステロールと、DOPE, DSPEおよびDPPEのいずれか１つのリン脂質と、DPPE-PEG, DMPE-PEG およびDSPE-PEGのいずれか１つのポリアルキレングリコール修飾脂質と、Compound Aとのモル比率（ｐＨ感受性カチオン性脂質／ステロール／リン脂質／ポリアルキレングリコール修飾脂質／Compound A）は、特に限定されないが、例えば、以下を含む：(30/28/30/6/6), (30/29/30/5.5/5.5), (30/30/30/5/5), (30/31/30/4.5/4.5), (30/32/30/4/4), (30/33/30/3.5/3.5), (30/34/30/3/3), (30/35/30/2.5/2.5), (30/36/30/2/2), (30/37/30/1.5/1.5), (30/38/30/1/1), (30/30/31/4.5/4.5), (30/30/32/4/4), (30/30/33/3.5/3.5), (30/30/34/3/3), (30/30/35/2.5/2.5), (30/30/36/2/2), (30/30/37/1.5/1.5), (30/30/38/1/1), (35/25/30/5/5), (34/26/30/5/5), (33/27/30/5/5), (32/28/30/5/5), (31/29/30/5/5), (40/25/25/5/5), (38/26/26/5/5), (36/27/27/5/5), (34/28/28/5/5), (32/29/29/5/5), (50/20/20/5/5), (45/20/25/5/5), (40/25/25/5/5), (35/30/25/5/5), (30/35/25/5/5), (50/21/20/4.5/4.5), (50/22/20/4/4), (50/23/20/3.5/3.5), (50/24/20/3/3), (50/25/20/2.5/2.5), (50/26/20/2/2), (50/27/20/1.5/1.5), (50/28/20/1/1), (30/50/20/1/1), (30/48/20/2/2), (30/46/20/3/3), (30/44/20/

4/4), (30/42/20/5/5), (25/40/25/5/5), (25/40/30/3/2), (25/35/35/3/2), (25/45/25/4/1), (23/35/35/5/2)。

[0171] 本発明に係る脂質ナノ粒子の大きさは、生体内の細胞に高い送達効率が得られやすいことから、平均粒子径が４００ｎｍ以下であることが好ましく、平均粒子径が３００ｎｍ以下であることがより好ましく、平均粒子径が２００ｎｍ以下であることがさらに好ましく、１５０ｎｍ以下であることがよりさらに好ましい。なお、脂質ナノ粒子の平均粒子径とは、動的光散乱法（Dynamic light scattering：ＤＬＳ）により測定されたＺ平均粒子径を意味する。動的光散乱法による測定は、市販のＤＬＳ装置等を用いて常法により行うことができる。

[0172] 本発明に係る脂質ナノ粒子の形態は特に限定されないが、例えば、水系溶媒に分散した形態として一枚膜リポソーム、多重層リポソーム、球状ミセル、又は不定型の層状構造物などを挙げることができる。本発明に係る脂質ナノ粒子としては、一枚膜リポソーム、多重層リポソームであることが好ましい。

[0173] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、脂質膜で覆われた粒子内部に、標的の細胞内に送達する目的の成分を内包していることが好ましい。本発明に係る脂質ナノ粒子が粒子内部に内包する成分としては、内包可能な大きさであれば特に限定されるものではない。本発明に係る脂質ナノ粒子には、核酸、糖類、ペプチド類、低分子化合物、金属化合物など任意の物質を封入することができる。

[0174] 本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる成分としては、核酸が好ましい。核酸としては、ＤＮＡであってもよく、ＲＮＡであってもよく、これらの類似体又は誘導体（例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ）やホスホロチオエートＤＮＡなど）であってもよい。本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる核酸は、１本鎖核酸であってもよく、２本鎖核酸であってもよく、線状であってもよく、環状であってもよい。

本発明の一態様において、本発明に係る脂質ナノ粒子は、本発明のｐＨ感

受性カチオン性脂質、その塩または立体異性体、及び核酸を含む。

[0175] 本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる核酸は、標的細胞内で発現させるための外来遺伝子を含むことが好ましく、細胞内に取り込まれることによって外来遺伝子を細胞内で発現させるために機能する核酸であることがより好ましい。当該外来遺伝子は、標的細胞のゲノムＤＮＡ中に本来含まれている遺伝子であってもよく、ゲノムＤＮＡ中に含まれていない遺伝子であってもよい。このような核酸としては、発現させる目的の遺伝子をコードする塩基配列からなる核酸を含む遺伝子発現ベクターが挙げられる。当該遺伝子発現ベクターは、導入された細胞内において、染色体外遺伝子として存在するものであってもよく、相同組換えによりゲノムＤＮＡ中に取り込まれるものであってもよい。

[0176] 本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる遺伝子発現ベクターとしては、特に限定されるものではなく、一般的に遺伝子治療等で使用されるベクターを用いることができる。本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる遺伝子発現ベクターとしては、プラスミドベクター等の核酸ベクターであることが好ましい。プラスミドベクターは、環状のままであってもよく、予め線状に切断した状態で本発明に係る脂質ナノ粒子に封入させてもよい。遺伝子発現ベクターは、発現させる対象の遺伝子の塩基配列情報に基づいて、一般的に使用される分子生物学的ツールを利用して常法により設計でき、公知の各種の方法で製造することができる。

[0177] 本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる核酸は、標的細胞内に存在する標的遺伝子の発現を制御する機能性核酸であることも好ましい。当該機能性核酸としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスＤＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ、ｍＲＮＡ等が挙げられる。また、細胞内でｓｉＲＮＡを発現させるｓｉＲＮＡ発現ベクターとなるプラスミドＤＮＡ（ｐＤＮＡ）であってもよい。ｓｉＲＮＡ発現ベクターとしては、市販のｓｉＲＮＡ発現ベクターから調製することができ、また、これを適宜改変してもよい。

本発明の一態様において、本発明に係る脂質ナノ粒子は、本発明のｐＨ感受性カチオン性脂質、その塩または立体異性体、及び核酸を含み、ここで前記核酸は、ｓｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ又はプラスミドＤＮＡである。

[0178] 本発明に係る脂質ナノ粒子の製造方法は特に限定されず、当業者に利用可能な任意の方法を採用することができる。例えば、本発明に係る脂質ナノ粒子は、流路を用いたアルコール希釈法により製造することができる。当該方法は、アルコール溶媒に脂質成分を溶解させた溶液と、水系溶媒に脂質ナノ粒子に包含させる水溶性成分を溶解させた溶液とを、別々の流路から導入し、これを合流させることによって脂質ナノ粒子を製造する方法である。アルコール希釈法において用いられる水系溶媒としては、例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩液などの緩衝液、生理食塩水、細胞培養用の培地などを挙げることができる。

[0179] 本発明は、一側面において、本発明のｐＨ感受性カチオン性脂質、その立体異性体又は立体異性体の混合物を含む脂質ナノ粒子製剤に関する。本発明は、別の側面において、（ｉ）ステロール又はステロール誘導体、（ｉｉ）ポリアルキレングリコール修飾脂質、（ｉｉｉ）核酸、（ｉｖ）緩衝剤、（ｖ）DSPC (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 及び（ｖｉ）本発明のｐＨ感受性カチオン性脂質、その塩または立体異性体を含む脂質ナノ粒子製剤に関する。

ステロール又はステロール誘導体としては、例えば、コレステロール、シトステロールなどが挙げられ、好ましくは、コレステロールである。

ポリアルキレングリコール修飾脂質としては、例えば、ポリエチレングリコール修飾脂質、ポリプロピレングリコール修飾脂質などが挙げられ、好ましくは、ポリエチレングリコール修飾脂質である。

核酸としては、例えば、ｓｉＲＮＡ、ｐＤＮＡ、ｍＲＮＡなどが挙げられ、好ましくは、ｓｉＲＮＡ、ｍＲＮＡである。

緩衝剤としては、例えば、ＨＥＰＥＳ緩衝剤、リン酸緩衝剤、トリス緩衝剤などが挙げられる。

[0180] 本発明において、脂質ナノ粒子製剤は、脂質ナノ粒子が、水溶液に懸濁されることによって調製されてもよい。

本発明の脂質ナノ粒子製剤のｐＨは、２５℃において、例えば５．５～８．５であり、好ましくは６．８～８．０である。

本発明は、一側面において、脂質ナノ粒子製剤が、水又は水溶液の添加により再懸濁された再懸濁製剤に関する。

[0181] 本発明に係る脂質ナノ粒子が投与される動物は、特に限定されるものではなく、ヒトであってもよく、ヒト以外の動物であってもよい。非ヒト動物としては、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等の哺乳動物や、ニワトリ、ウズラ、カモ等の鳥類等が挙げられる。

実施例

[0182] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0183] 本実施例において、以下の略称を使用した。

THF：テトラヒドロフラン(超脱水)(安定剤不含)

LDA：ジイソプロピルアミドリチウム溶液(Sigma-Aldrich, 774766-4X25ML)

DMPU：1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinone

DMAP：4-Dimethylaminopyridine

DCM：Dichloromethane

EDCI：1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide Hydrochloride(TCI, D1601)

TBDPSCl：tert-Butyldiphenylchlorosilane

DMSO：ジメチルスルホキシド

TBAF：Tetrabutylammonium fluoride

Pd/C 10%：Palladium 10% on Carbon (TCI, P1785)

DIPEA：N,N-Diisopropylethylamine

DMF：N,N-ジメチルホルムアミド

[0184] Ⅰ．脂質および原料の合成

原料合成例１（αアルキル分岐カルボン酸の合成）

[化158]



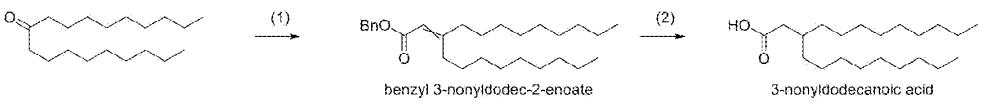
-25℃に冷却したTHF(50 ml)にLDA(1 mol/L)を23ml添加し60min撹拌した。Octanoic Acid (1.42 g)をTHF(20 ml)に溶かし加え、続いてDMPU(1.2 ml)を加えた。反応溶液の温度を-5℃まで昇温しさらに1時間撹拌した。1-Iodohexane (4.88 g)を加え、室温で終夜撹拌した。反応溶液に飽和硫酸水素ナトリウム水溶液と酢酸エチルを加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し目的の2-hexyloctanoic acid(1.75 g)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.41-2.30 (m, 1H), 1.66-1.56 (m, 2H), 1.51-1.42 (m, 2H), 1.28 (brs, 16H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 6H).

2-nonylundecanoic acid, 2-butyldodecanoic acid, 2-nonyldodecanoic acid, 2-octyltridecanoic acid, 2-dodecyltetradecanoic acidも同様の方法で合成した。

[0185] 原料合成例２（βアルキル分岐カルボン酸の合成）

[化159]



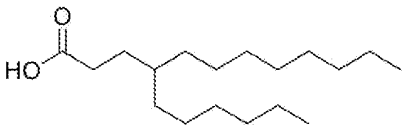
(1)NaH(60%, dispersion in paraffin liquid)(216 mg)をTHF(15 ml)に溶解し、氷冷下10分撹拌した。Benzyl 2-(dimethoxyphosphoryl)acetate(1.13 ml

)を添加し、さらに30分氷冷下攪拌した。10-nonadecanone(1.27 g)をTHF(15 ml)に溶解し、反応液に滴下した。反応液を室温に昇温し、終夜攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄したのち、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し目的のbenzyl 3-nonyldodec-2-enoateと原料の10-nonadecanoneの混合物(928 mg)を得た。

(2)(1)で得た混合物、Pd/C 10%(130 mg)をTHF(4 ml)/MeOH(8 ml)の混合溶液に加えた。トリエチルシラン(796 μl)を続いて滴下し、4時間攪拌した。反応液を濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し目的の3-nonyldodecanoic acid を得た。

[0186] 原料合成例３（γアルキル分岐カルボン酸の合成）

[化160]



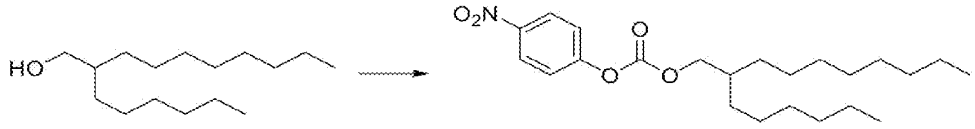
4-hexyldodecanoic acid

原料合成例２(1)の10-nonadecanoneの代わりに2-hexyldecanalを用いた以外は、原料合成例１－２と同様にして目的の4-hexyldodecanoic acidを得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.35-2.30 (m, 2H), 1.64-1.56 (m, 2H), 1.33-1.26 (m, 25H), 0.90-0.86 (m, 6H).

[0187] 原料合成例４ (2-Hexyldecyl (4-nitrophenyl) carbonateの合成)

[化161]



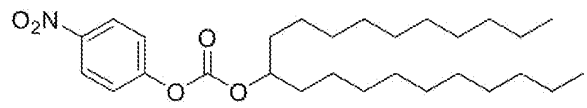
2-hexyldecan-1-ol　　2-hexyldecyl (4-nitrophenyl) carbonate

2-Hexyldecan-1-ol(2.42 g)、4-nitrophenyl carbonochloridate(3.02 g)をDCM(10 ml)に溶解した。ピリジン(2.42 ml)を滴下し、反応溶液を室温下終夜攪拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、DCMで３度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄したのち、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し目的の2-hexyldecyl (4-nitrophenyl) carbonate(3.37 g)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.31-8.26 (m, 2H), 7.41-7.36 (m, 2H), 4.19 (d, J = 5.8 Hz 2H), 1.76-1.71 (m, 1H), 1.33-1.29 (m, 24H), 0.91-0.86 (m, 6H).

[0188] 原料合成例５ (Henicosan-11-yl (4-nitrophenyl) carbonateの合成)

[化162]



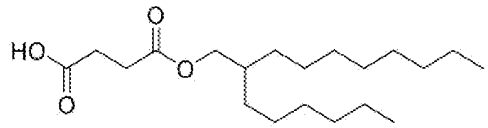
henicosan-11-yl (4-nitrophenyl) carbonate

原料合成例４の2-hexyldecan-1-olの代わりにhenicosan-11-olを用いた以外は、原料合成例４と同様にして目的のhenicosan-11-yl (4-nitrophenyl) carbonateを得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.30-8.25 (m, 2H), 7.41-7.36 (m, 2H), 4.82 (quin, J = 5.6 Hz, 1H), 1.71-1.59 (m, 4H), 1.39-1.26 (m, 32H), 0.88 (t, J = 7.0 Hz, 6H).

[0189] 原料合成例６ (4-((2-Hexyldecyl)oxy)-4-oxobutanoic acidの合成)

[化163]



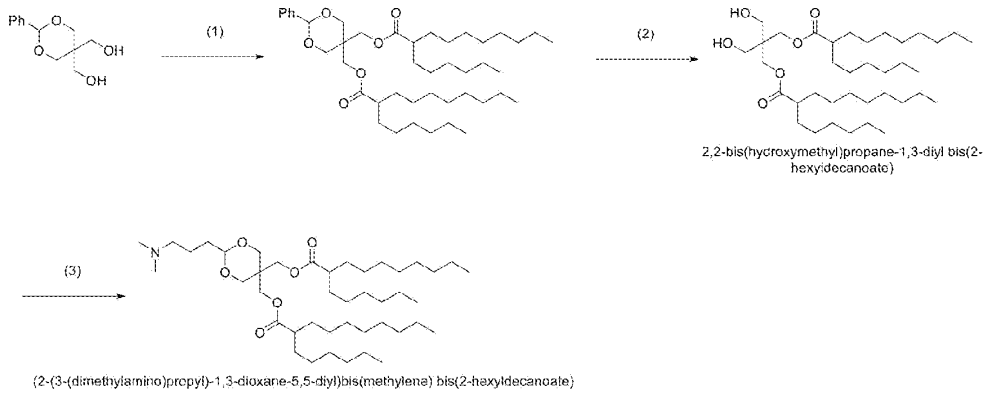
4-((2-hexyldecyl)oxy)-4-oxobutanoic acid

無水コハク酸(304 mg)、2-hexyldecan-1-ol(740 mg)をトルエン(2 ml)に溶解し、6時間100 ℃で攪拌した。反応液を減圧下溶媒留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し目的の4-((2-hexyldecyl)oxy)-4-oxobutanoic acid(931 mg)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.99 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 2.72-2.60 (m, 4H), 1.26 (brs, 24H), 0.90-0.86 (m, 6H).

[0190] 脂質合成例１ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化164]



2,2-bis(hydroxymethyl)propane-1,3-diyl bis(2-hexyldecanoate)

{2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate}

(1)(2-Phenyl-1,3-dioxane-5,5-diyl)dimethanol(1.12 g)、2-hexyldecanoic acid(2.69 g)、および DMAP(61.1 mg)をDCM(6.0 ml)に溶解し、EDCI(2.11 g)を加え室温下終夜攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、DCMで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た

。

(2)得られた粗生成物(2.10 g)にメタノール(32 ml)、DCM(8.0 ml)、HCl (4mol/L in 1,4-Dioxane, 4.0 ml)を加え室温下4時間攪拌した。反応溶液に炭酸水素ナトリウムを過剰量加え、減圧下濃縮した。残渣に水と酢酸エチルを加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し目的の2,2-bis(hydroxymethyl)propane-1,3-diyl bis(2-hexyldecanoate) (1.46 g)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.15 (s, 4H), 3.55 (d, J = 6.1 Hz, 4H), 2.87-2.83 (m, 2H), 2.43-2.33 (m, 2H), 1.61-1.43 (m, 8H), 1.26 (brs, 40H), 0.88 (t, J = 7.0 Hz, 12H)

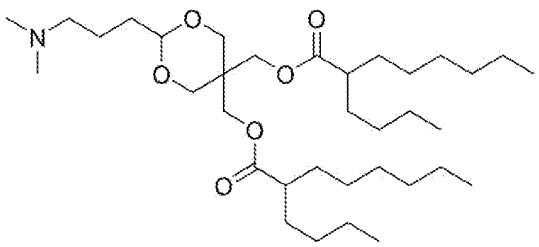
(3)塩化カルシウム管を設置した容器に2,2-bis(hydroxymethyl)propane-1,3-diyl bis(2-hexyldecanoate)(175 mg)、4,4-dimethoxy-N,N-dimethylbutan-1-amine(62.0 mg)、p-トルエンスルホン酸一水和物(65.6 mg)、およびトルエン(1.0 ml)を加え85℃で終夜攪拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を過剰量加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；DCM／メタノール]で精製し目的の(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(131 mg)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.48 (t, J = 4.6 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.92 (d, J = 11.9 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.60 (d, J = 11.9 Hz, 2H), 2.37-2.25 (m, 4H), 2.22 (s, 6H), 1.72-1.40 (m, 12H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 710.6, 実測値m/z = 710.6.

[0191] 脂質合成例２ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-butyloctanoate)の合成)

[化165]



(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-butyloctanoate)

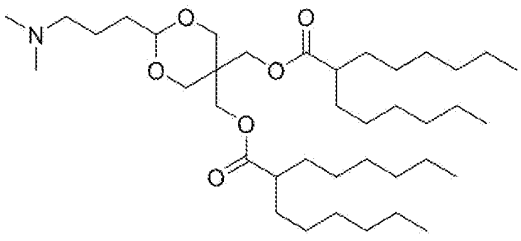
脂質合成例１(1)の2-hexyldecanoic acidの代わりに2-butyloctanoic acidを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-butyloctanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.49 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 4.36 (s 2H), 3.92 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.60 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 2.36-2.25 (m, 4H), 2.22 (s, 6H), 1.67-1.42 (m, 12H), 1.25 (brs, 24H), 0.85-0.90 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 598.5, 実測値m/z = 598.5.

[0192] 脂質合成例３ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyloctanoate)の合成)

[化166]



(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyloctanoate)

脂質合成例１(1)の2-hexyldecanoic acidの代わりに2-hexyloctanoic acidを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(2-(3-(dimethylamino)pr

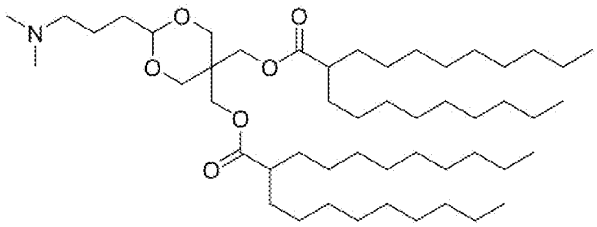
opyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyloctanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.48 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.92 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.60 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 2.38-2.24 (m, 4H), 2.21 (s, 6H), 1.62-1.45 (m, 12H), 1.25 (brs, 32H) 0.90-0.87 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 654.6, 実測値m/z = 654.6.

[0193] 脂質合成例４ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)の合成)

[化167]



(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

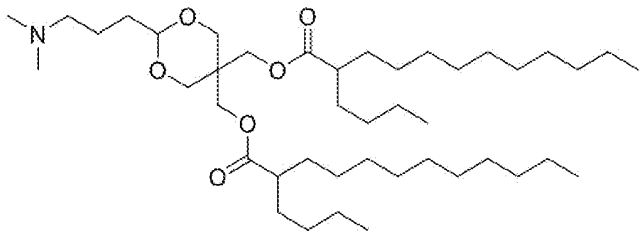
脂質合成例１(1)の2-hexyldecanoic acidの代わりに2-nonylundecanoic acidを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.48 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.92 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.59 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 2.37-2.24 (m, 4H), 2.21 (s, 6H), 1.65-1.40 (m, 12H), 1.25 (brs, 56H), 0.88 (t, J = 6.45 Hz, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 822.8, 実測値m/z = 822.8.

[0194] 脂質合成例５ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-butyldodecanoate)の合成)

[化168]



(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-butyldodecanoate)

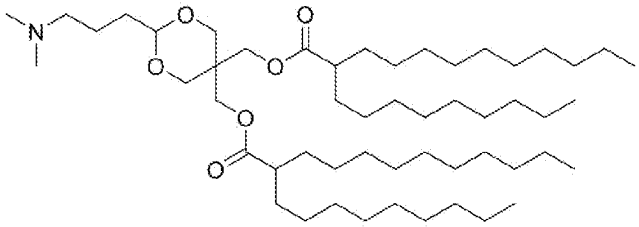
脂質合成例１(1)の2-hexyldecanoic acidの代わりに2-butyldodecanoic acidを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-butyldodecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.48 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.92 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.60 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 2.37-2.24 (m, 4H), 2.21 (s, 6H), 1.66-1.40 (m, 12H), 1.30-1.25 (m, 40H), 0.90-0.86 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 710.6, 実測値m/z = 710.6.

[0195] 脂質合成例６ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonyldodecanoate)の合成)

[化169]



(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonyldodecanoate)

脂質合成例１(1)の2-hexyldecanoic acidの代わりに2-nonyldodecanoic acidを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonyldodecanoate)を

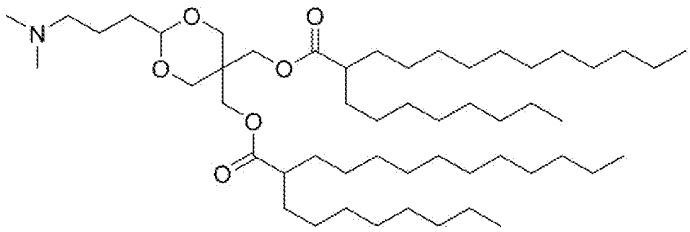
得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.48 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.92 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.59 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 2.35-2.24 (m, 4H), 2.22 (s, 6H), 1.57-1.45 (m, 12H), 1.25 (brs, 60H), 0.90-0.87 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 850.8, 実測値m/z = 850.8.

[0196] 脂質合成例７ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyltridecanoate)の合成)

[化170]



(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyltridecanoate)

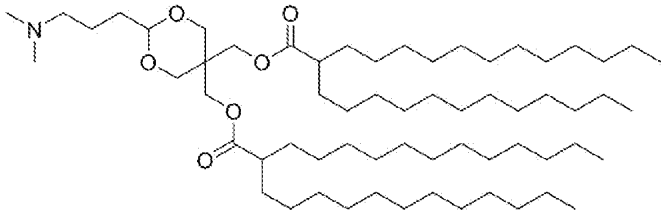
脂質合成例１(1)の2-hexyldecanoic acidの代わりに2-octyltridecanoic acidを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyltridecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.48 (t, J = 4.5Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.92 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.59 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 2.37-2.25 (m, 4H), 2.22 (s, 6H), 1.67-1.43 (m, 12H), 1.25 (brs, 60H), 0.90-0.87 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 850.8, 実測値m/z = 850.8.

[0197] 脂質合成例８ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-dodecyltetradecanoate)の合成)

[化171]



(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-dodecyltetradecanoate)

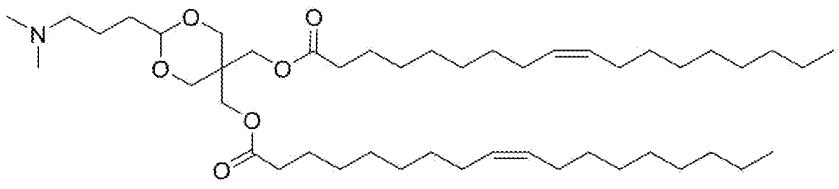
脂質合成例１(1)の2-hexyldecanoic acidの代わりに2-dodecyltetradecanoic acidを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-dodecyltetradecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.48 (t, J = 4.5Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.92 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.59 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 2.39-2.24 (m, 4H), 2.22 (s, 6H), 1.62-1.43 (m, 12H), 1.25 (brs, 80H), 0.90-0.86 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 990.9, 実測値m/z = 990.9.

[0198] 脂質合成例９ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) dioleateの合成)

[化172]



(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) dioleate

脂質合成例１(1)の2-hexyldecanoic acidの代わりにオレイン酸を用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) dioleateを得た。

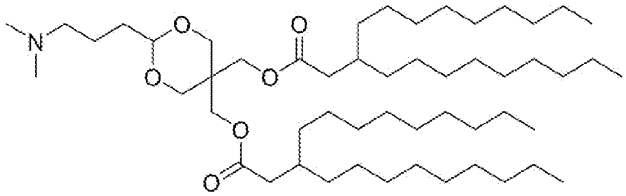
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5.36-5.32 (m, 4H), 4.56 (t, J = 4.0 Hz, 1H), 4.34 (s, 2H), 3.88 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.60 (d, J =

12.0 Hz, 2H), 3.10-3.05 (m, 24H), 2.82 (s, 6H), 2.31 (td, J = 7.3 Hz, 5.9 Hz, 4H), 2.02-1.98 (m, 8H), 1.94-1.86 (m, 2H), 1.72-1.62 (m, 4H), 1.30-1.27 (m, 42H), 0.88 (t, J = 6.5 Hz, 6H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 762.7, 実測値m/z = 762.7.

[0199] 脂質合成例１０ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(3-nonyldodecanoate)の合成)

[化173]



(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(3-nonyldodecanoate)

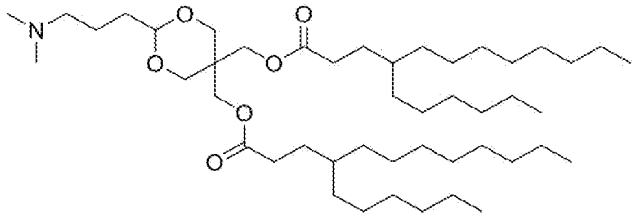
脂質合成例１(1)の2-hexyldecanoic acidの代わりに3-nonyldodecanoic acidを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(3-nonyldodecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.49 (t, J = 4.2 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 3.92 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 3.82 (s, 2H), 3.59 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 2.31-2.22 (m, 12H), 1.81-1.63 (m, 6H), 1.25 (brs, 64H), 0.88 (t, J = 7.0 Hz, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 850.8, 実測値m/z = 850.8.

[0200] 脂質合成例１１ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(4-hexyldodecanoate)の合成)

[化174]



(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(4-hexyldodecanoate)

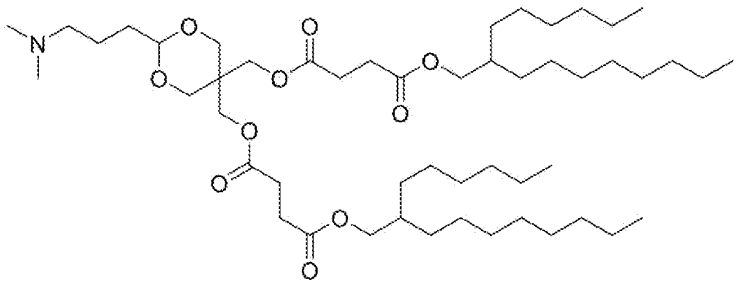
脂質合成例１(1)の2-hexyldecanoic acidの代わりに4-hexyldodecanoic acidを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(4-hexyldodecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.50 (t, J = 4.3 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 3.93 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.60 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 2.36-2.25 (m, 12H), 1.65-1.53 (m, 8H), 1.33-1.24 (m, 50H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 766.7, 実測値m/z = 766.7.

[0201] 脂質合成例１２ (O,O'-((2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene)) bis(2-hexyldecyl) disuccinateの合成)

[化175]



O,O'-((2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene)) bis(2-hexyldecyl) disuccinate

脂質合成例１(1)の2-hexyldecanoic acidの代わりに4-((2-hexyldecyl)oxy)-4-oxobutanoic acidを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的のO,O

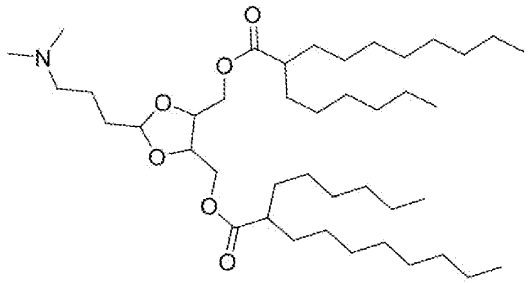
'-((2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene)) bis(2-hexyldecyl) disuccinateを得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.51 (t, J = 4.2 Hz, 1H), 4.39 (s, 2H), 3.98 (dd, J = 5.9 Hz, 2.0 Hz, 4H), 3.91 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.59 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 2.65-2.63 (m, 8H),2.55-2.50 (m, 2H), 2.41 (s, 6H), 1.67-1.62 (m, 6H), 1.27 (brs, 48H), 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 882.7, 実測値m/z = 882.7.

[0202] 脂質合成例１３ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxolane-4,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化176]



(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxolane-4,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

脂質合成例１(1)の(2-phenyl-1,3-dioxane-5,5-diyl)dimethanolの代わりに((4R,5R)-2-phenyl-1,3-dioxolane-4,5-diyl)dimethanolを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxolane-4,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

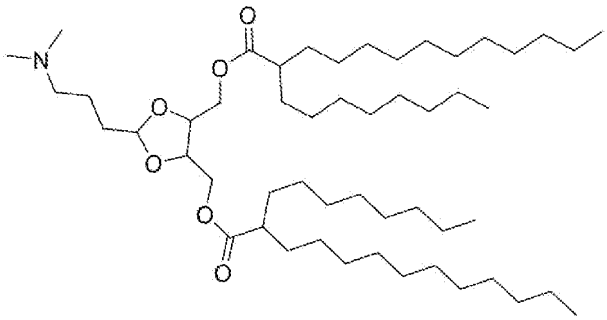
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5.19-5.14 (m, 0.3H), 5.10 (t, J = 4.7 Hz, 0.4H), 5.00 (t, J = 4.7 Hz, 0.15H), 4.90 (t, J = 4.7 Hz, 0.15H), 4.67-4.61 (m, 0.65H), 4.41-4.34 (m, 0.35H), 4.26-4.03 (m, 4H), 3.86-3.61 (m, 1H), 2.49-2.27 (m, 4H), 2.23-2.22 (m, 6H), 1.66-1.42 (m, 12H), 1.25 (brs, 40H), 0.88 (t, J = 7.0 Hz, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 696.6, 実測値m/z = 696.6.

[0203] 脂質合成例１４ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxolane-4,5-diyl)b

is(methylene) bis(2-octyltridecanoate)の合成)

[化177]



(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxolane-4,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyltridecanoate)

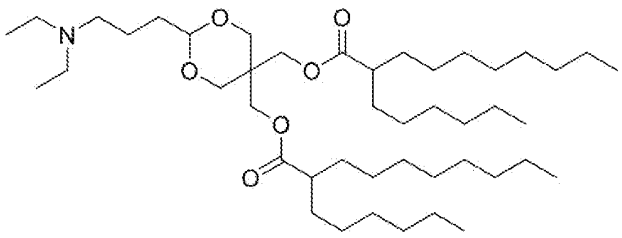
脂質合成例１(1)の(2-phenyl-1,3-dioxane-5,5-diyl)dimethanol の代わりに((4R,5R)-2-phenyl-1,3-dioxolane-4,5-diyl)dimethanolを2-hexyldecanoic acidの代わりに2-octyltridecanoic acidを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxolane-4,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyltridecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5.18-5.14 (m, 0.3H), 5.10 (t, J = 4.6 Hz, 0.4H), 5.02-4.88 (m, 0.3H), 4.67-4.61 (m, 0.65H), 4.41-4.34 (m, 0.35H), 4.26-4.03 (m, 4H), 3.86-3.61 (m, 1H), 2.49-2.27 (m, 4H), 2.23-2.22 (m, 6H), 1.66-1.42 (m, 12H), 1.25 (brs, 60H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 836.8, 実測値m/z = 836.8.

[0204] 脂質合成例１５ ((2-(3-(Diethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化178]



(2-(3-(diethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

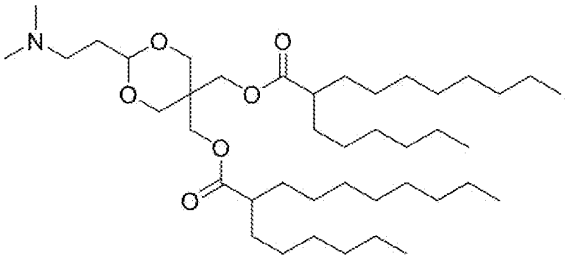
脂質合成例１(3)の4,4-dimethoxy-N,N-dimethylbutan-1-amineの代わりに4,4-diethoxy-N,N-diethylbutan-1-amineを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(2-(3-(diethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.48 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.92 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.60 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 2.51 (q, J = 7.0 Hz, 4H), 2.44 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.37-2.28 (m, 2H), 1.61-1.43 (m, 12H), 1.25 (brs, 40H), 1.04 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 738.7, 実測値m/z = 738.7.

[0205] 脂質合成例１６ ((2-(2-(Dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化179]



(2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

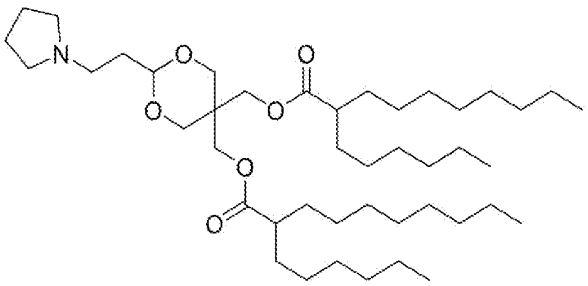
脂質合成例１(3)の4,4-dimethoxy-N,N-dimethylbutan-1-amineの代わりに3,3-diethoxy-N,N-dimethylpropan-1-amineを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.56 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 3.91 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.62 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 2.43-2.30 (m, 4H), 2.25 (s, 6H), 1.85-1.79 (m, 2H), 1.63-1.53 (m, 4H), 1.50-1.40 (m, 4H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 696.6, 実測値m/z = 696.6.

[0206] 脂質合成例１７ ((2-(2-(Pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化180]



(2-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

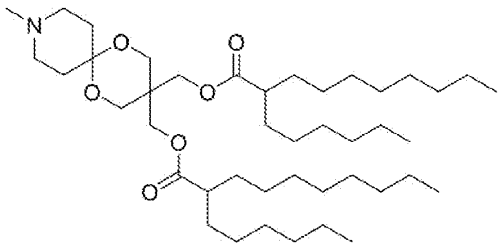
脂質合成例１(3)の4,4-dimethoxy-N,N-dimethylbutan-1-amineの代わりに1-(3,3-diethoxypropyl)pyrrolidineを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(2-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.57 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 3.91 (d, J = 11.6 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.61 (d, J = 11.6 Hz, 2H), 2.61-2.54 (m, 6H), 2.39-2.28 (m, 2H), 1.92-1.85 (m, 2H), 1.82-1.77 (m, 4H), 1.63-1.53 (m, 4H), 1.50-1.40 (m, 4H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 722.6, 実測値m/z = 722.6.

[0207] 脂質合成例１８ ((9-Methyl-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecane-3,3-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化181]



(9-methyl-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecane-3,3-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

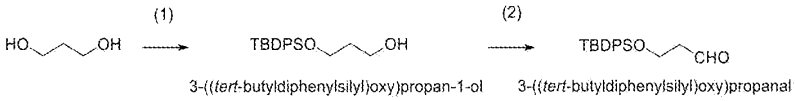
脂質合成例１(3)の4,4-dimethoxy-N,N-dimethylbutan-1-amineの代わりに1-methylpiperidin-4-oneを用いた以外は、脂質合成例１と同様にして目的の(9-methyl-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecane-3,3-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ4.10 (s, 4H), 3.74 (s, 4H), 2.44-2.41 (m, 4H), 2.37-2.31 (m, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.93-1.89 (m, 4H), 1.59-1.41 (m, 8H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 708.6, 実測値m/z = 708.6.

[0208] 原料合成例７ (3-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)propanalの合成)

[化182]



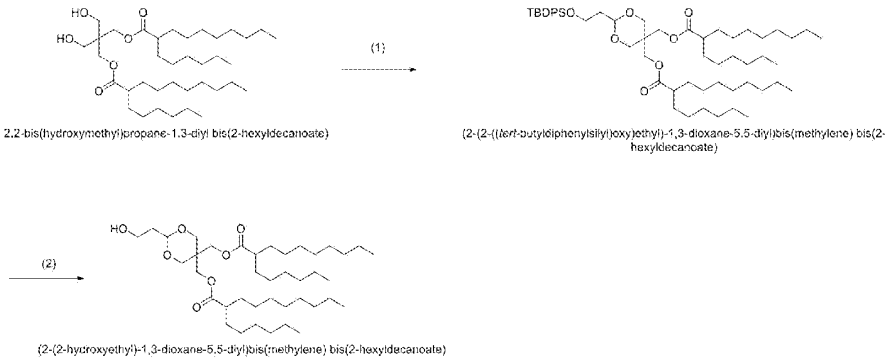
(1)1,3-プロパンジオール(2.28 g)、ピリジン(3.22 ml)をDCM(20 ml)に溶解し、TBDPSCl(5.50 g)を加え室温下終夜攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、DCMで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し3-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)propan-1-ol(6.65 g)を得た。

(2)3-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)propan-1-ol(3.15 g)、DMSO(7.10 ml)、およびトリエチルアミン(6.93 ml)をDCM(30 ml)に溶解し、氷冷下攪拌した。10分後sulfur trioxide pyridine complex (4.77 g)を加え、反応溶液を室温に昇温し終夜攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、DCMで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し3-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)propanal(2.37 g)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.82 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 7.77-7.64 (m, 4H), 7.44-7.36 (m, 6H), 4.02 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.60 (td, J = 6.0 Hz, 2.2 Hz, 2H), 1.04 (s, 9H).

[0209] 原料合成例８ ((2-(2-Hydroxyethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化183]



(1)塩化カルシウム管を設置した容器に2,2-bis(hydroxymethyl)propane-1,3-diyl bis(2-hexyldecanoate)(2.76 g)、3-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)propanal(1.69 g)、p-トルエンスルホン酸一水和物(85.6 mg)、およびトルエン(30 ml)を加え80℃で終夜攪拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を過剰量加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し(2-(2-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(3.02 g)を得た。

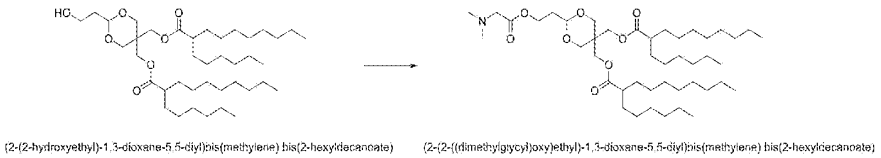
(2)(2-(2-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(1.36 g)、酢酸(2.57 ml)にTBAF(1.0 mol/L in THF, 30 ml)を加え室温下3時間攪拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を過剰量加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後

、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し(2-(2-hydroxyethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(692 mg)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.70 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 4.38 (s, 2H), 3.94 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.78 (q, J = 5.6 Hz, 2H), 3.64 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 2.40-2.29 (m, 2H), 2.19 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 1.91 (q, J = 4.9 Hz, 2H), 1.65-1.41 (m, 8H), 1.25 (brs, 40H), 0.89-0.86 (m, 12H).

[0210] 脂質合成例１９ ((2-(2-((Dimethylglycyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化184]



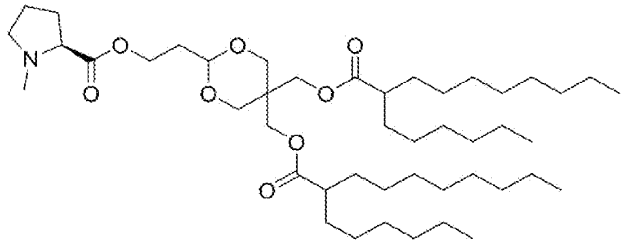
(2-(2-Hydroxyethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(134 mg)、N,N-dimethylglycine(41.3 mg)、およびDMAP(2.44 mg)をDCM(2 ml)に溶解し、EDCI(76.7 mg)を加え室温下終夜攪拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、DCMで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；DCM／メタノール]で精製し(2-(2-((dimethylglycyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(92.0 mg)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ4.58 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 4.24 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.92 (d, J = 11.9 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.60 (d, J = 11.9 Hz, 2H), 3.16 (s, 2H), 2.42-2.28 (m, 8H), 1.98 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 1.63-1.40 (m, 8H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析（ESI）計算値 $[M+H]^+$ m/z = 754.6, 実測値m/z = 754.6.

[0211] 脂質合成例２０（(2-(2-((Methyl-L-prolyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成）

[化185]



(2-(2-((methyl-*L*-prolyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

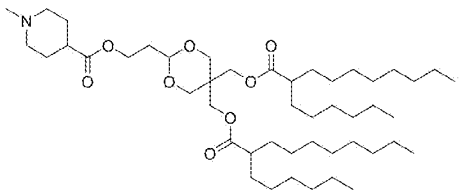
脂質合成例１９のN,N-dimethylglycineの代わりにN-methyl-L-proline monohydrateを用いた以外は、脂質合成例１９と同様にして目的の(2-(2-((methyl-L-prolyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ4.58 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 4.24 (td, J = 6.5 Hz, 1.8 Hz, 2H), 3.92 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.59 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.16-3.10 (m, 1H),2.97-2.92 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.37-2.27 (m, 3H), 2.20-2.10 (m, 1H), 2.02-1.86 (m, 4H), 1.84-1.72 (m, 1H), 1.63-1.40 (m, 8H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析（ESI）計算値 $[M+H]^+$ m/z = 780.6, 実測値m/z = 780.6.

[0212] 脂質合成例２１（(2-(2-((1-Methylpiperidine-4-carbonyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成）

[化186]



(2-(2-((1-methylpiperidine-4-carbonyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

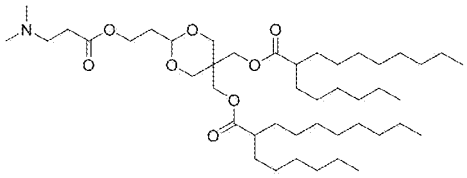
脂質合成例１９のN,N-dimethylglycineの代わりに1-methylpiperidine-4-carboxylic acid hydrochlorideを用いた以外は、脂質合成例１９と同様にして目的の(2-(2-((1-methylpiperidine-4-carbonyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ4.57 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 4.18 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.92 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.59 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 2.85-2.81 (m, 2H), 2.39-2.24 (m, 6H), 2.06-1.93 (m, 6H), 1.85-1.41 (m, 10H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 794.7, 実測値m/z = 794.7.

[0213] 脂質合成例２２ ((2-(2-((3-(Dimethylamino)propanoyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化187]



(2-(2-((3-(dimethylamino)propanoyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

脂質合成例１９のN,N-dimethylglycineの代わりに3-(dimethylamino)propanoic acid hydrochlorideを用いた以外は、脂質合成例１９と同様にして目的の(2-(2-((3-(dimethylamino)propanoyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

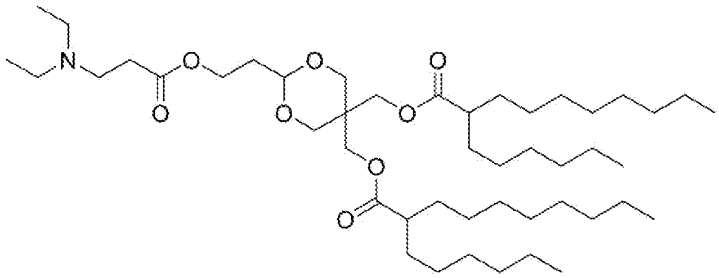
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ4.58 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 4.19 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.92 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.60 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 2.64-2.59 (m, 2H), 2.50-2.45 (m, 2H), 2.39-2.28 (m, 2H), 2.24 (s, 6H), 1.95 (q, J = 5.4 Hz, 2H), 1.66-1.40 (m, 8H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 768.6, 実測値m/z = 768.6.

[0214] 脂質合成例２３ ((2-(2-((3-(Diethylamino)propanoyl)oxy)ethyl)-1,3-diox

ane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成）

[化188]



(2-(2-((3-(diethylamino)propanoyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

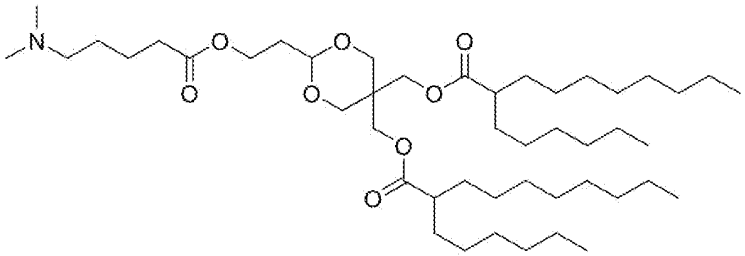
脂質合成例１９のN,N-dimethylglycineの代わりに3-(diethylamino)propionic acid hydrochlorideを用いた以外は、脂質合成例１９と同様にして目的の(2-(2-((3-(diethylamino)propanoyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ4.58 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 4.18 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.92 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.60 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 2.80 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.52 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 2.45 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.36-2.30 (m, 2H), 1.95 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 1.66-1.40 (m, 8H), 1.25 (brs, 40H), 1.03 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 796.7, 実測値m/z = 796.7.

[0215] 脂質合成例２４ ((2-(2-((5-(Dimethylamino)pentanoyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成）

[化189]



(2-(2-((5-(dimethylamino)pentanoyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

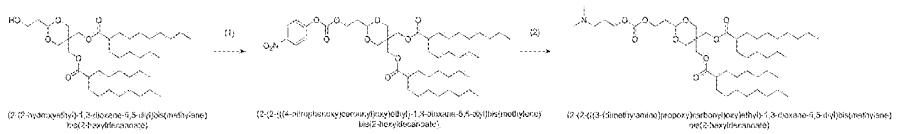
脂質合成例１９のN,N-dimethylglycineの代わりに5-(dimethylamino)pentanoic acid hydrochlorideを用いた以外は、脂質合成例１９と同様にして目的の(2-(2-((5-(dimethylamino)pentanoyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ4.58 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 4.17 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.92 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.61 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 2.51-2.46 (m, 2H), 2.39 (s, 6H), 2.37-2.32 (m, 4H), 1.95 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 1.66-1.40 (m, 12H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 796.7, 実測値m/z = 796.7.

[0216] 脂質合成例２５ ((2-(2-(((3-(Dimethylamino)propoxy)carbonyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化190]



(1)4-Nitrophenyl carbonochloridate(55.6 mg)、トリエチルアミン(41.5 μl)をDCM(2 ml)に溶解した。(2-(2-Hydroxyethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(154 mg)をDCM(1 ml)に溶解し、反応液に滴下した。室温下4時間攪拌し、その後反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、

硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し(2-(2-(((4-nitrophenoxy)carbonyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(87.1 mg)を得た。

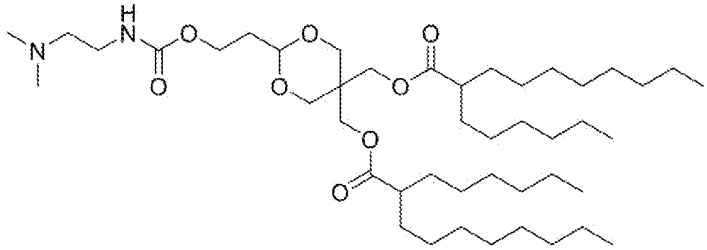
(2)(2-(2-(((4-Nitrophenoxy)carbonyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(41.7 mg)、トリエチルアミン(15.3μl)をDCM(1 ml)に溶解し、3-(dimethylamino)propan-1-ol(18.8 μl)を添加した。室温下終夜攪拌し、その後反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、DCMで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；DCM／メタノール]で精製し(2-(2-(((3-(dimethylamino)propoxy)carbonyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(16.4 mg)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ4.63 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 4.26-4.17 (m, 4H), 3.92 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.61 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 2.43-2.29 (m, 4H), 2.39 (s, 6H), 1.99 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 1.87 (quin, J = 7.2 Hz, 2H), 1.65-1.40 (m, 8H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 798.6, 実測値m/z = 798.6.

[0217] 脂質合成例２６ ((2-(2-(((2-(Dimethylamino)ethyl)carbamoyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化191]



(2-(2-(((2-(dimethylamino)ethyl)carbamoyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

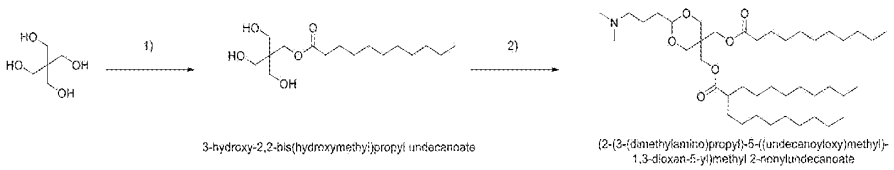
(2-(2-(((4-Nitrophenoxy)carbonyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(41.7 mg)、トリエチルアミン(15.3μl)をDCM(1 ml)に溶解し、N1,N1-dimethylethane-1,2-diamine(6.50 μl)を添加した。室温下終夜攪拌し、その後反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、DCMで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；DCM／メタノール]で精製し(2-(2-(((2-(dimethylamino)ethyl)carbamoyl)oxy)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(22.6 mg)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ5.21 (brs, 1H), 4.59 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 4.15 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.92 (d, J = 11.9 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.60 (d, J = 11.9 Hz, 2H), 3.26 (q, J = 5.6 Hz, 2H), 2.47-2.29 (m, 4H), 2.25 (s, 6H), 1.99 (q, J = 5.8 Hz, 2H), 1.63-1.40 (m, 8H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 783.6, 実測値m/z = 783.6.

[0218] 脂質合成例２７ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-5-((undecanoyloxy)methyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl 2-nonylundecanoateの合成)

[化192]



(1)ペンタエリトリトール(1. 36 g)、undecanoic acid(931 mg)、及びDMAP(30.5 mg)をDMF(20 ml)に加え、反応液を80℃に昇温しペンタエリスリトールを完全に溶解した。室温まで降温したのち、EDCI(1.15 g)を加え、終夜攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、ヘキサン：酢酸エチル(50%, 50%)混合溶媒で3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し、3-hydroxy-2,2-bis(hydroxymethyl)propyl undecanoateを得た。

(2)塩化カルシウム管を設置した容器に3-hydroxy-2,2-bis(hydroxymethyl)propyl undecanoate(183 mg)、4,4-dimethoxy-N,N-dimethylbutan-1-amine(96.8 mg)、p-トルエンスルホン酸一水和物(1.14 mg)、HCl(4.0 mol/L in dioxan, 150 μl)、及びDMF(2 ml)を加え80℃で終夜攪拌した。反応液を室温まで降温したのち2-nonylundecanoic acid(188 mg)、DMAP(7.33 mg)、及びEDCI(138 mg)を加え、さらに終夜攪拌した。反応溶液に水酸化ナトリウム水溶液(5.0 mol/L)を加え、ヘキサン：酢酸エチル(50%, 50%)混合溶媒で3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；DCM／メタノール]で精製し(2-(3-(dimethylamino)propyl)-5-((undecanoyloxy)methyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl 2-nonylundecanoate(74.4 mg)を得た。

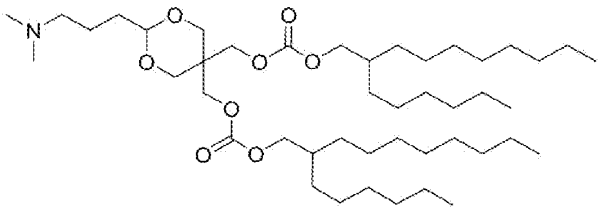
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.56 (t, J = 3.8 Hz, 1H), 4.34 (s, 2H), 3.93-3.85 (m, 4H), 3.60 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 3.12-3.06 (m, 2H), 2.82 (s

, 6H), 2.83-2.28 (m, 3H), 1.95-1.87 (m, 2H), 1.75-1.41 (m, 8H), 1.25 (brs, 42H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 9H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 696.6, 実測値m/z = 696.6.

[0219] 脂質合成例２８ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecyl) bis(carbonate)の合成)

[化193]



(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecyl) bis(carbonate)

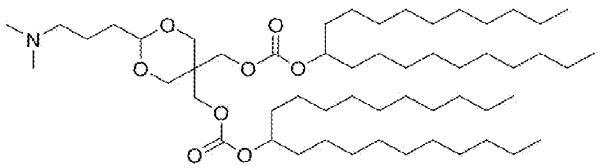
ペンタエリトリトール(136 mg)をDMF(5 ml)に加え、80℃に昇温しペンタエリスリトールを完全に溶解した。反応溶液にHCl(4.0 mol/L in dioxan, 100 μl)、p-トルエンスルホン酸一水和物(1.14 mg)、及び4,4-dimethoxy-N,N-dimethylbutan-1-amine(64.5 mg)を加え、80℃で終夜攪拌した。反応液を室温まで降温したのち、ピリジン(484 μl)、DMAP(48.9 mg)、2-hexyldecyl (4-nitrophenyl) carbonate(1.63 g)を加え、室温下終夜攪拌した。反応溶液に水酸化ナトリウム水溶液(5.0 mol/L)を加え、ヘキサン：酢酸エチル(50%, 50%)混合溶媒で3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；DCM／メタノール]で精製し(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecyl) bis(carbonate)(116 mg)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.55 (t, J = 4.3 Hz, 1H), 4.42 (s, 2H), 4.02 (d, J = 5.7 Hz, 4H), 3.98-3.95 (m, 4H), 3.64 (d, J = 11.9 Hz, 2H),2.81-2.76 (m, 2H), 2.59 (s, 6H), 1.91-1.81 (m, 4H), 1.73-1.64 (m, 2H), 1.27 (brs, 48H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 770.7, 実測値m/z = 770.7.

[0220] 脂質合成例２９ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) di(henicosan-11-yl) bis(carbonate)の合成)

[化194]



(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) di(henicosan-11-yl) bis(carbonate)

脂質合成例２８の2-hexyldecyl (4-nitrophenyl) carbonateの代わりにhenicosan-11-yl (4-nitrophenyl) carbonateを用いた以外は、脂質合成例２８と同様にして目的の(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) di(henicosan-11-yl) bis(carbonate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.68-4.64 (m, 2H), 4.51 (brs, 1H), 4.42 (s, 2H), 3.99-3.95 (m, 4H), 3.65 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 2.43 (brs, 2H), 2.34 (s, 6H), 1.66-1.55 (m, 12H), 1.25 (brs, 64H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 12H).

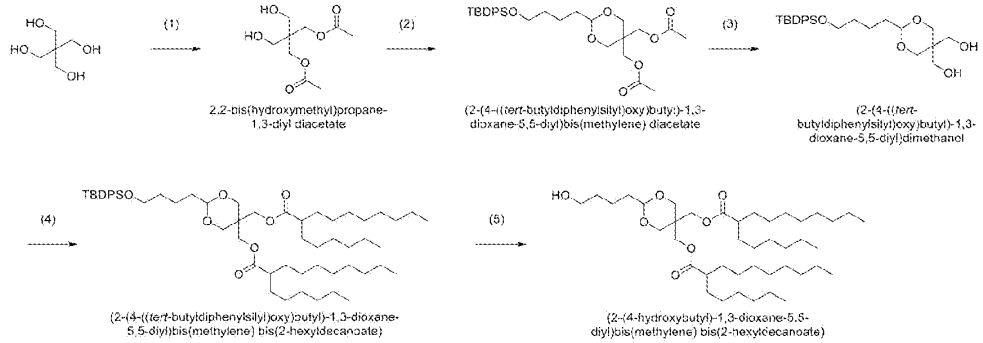
質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 910.8, 実測値m/z = 910.8.

[0221] 原料合成例１と同様にして2-heptylnonanoic acid, 2-octyldecanoic acid, 2-undecyltridecanoic acidも合成した。また、原料合成例７と同様にして4-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)butanal、5-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)pentanal、6-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)hexanal、7-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)heptanalも合成した。また、原料合成例８と同様にして(2-(3-hydroxypropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)、(2-(3-hydroxypropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)、(2-(4-hydroxybutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)、(2-(5-hydroxypentyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)、(2-(6-hydroxyhexyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)も合成した

。

[0222] 原料合成例９（(2-(4-Hydroxybutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成）

[化195]



（１）ペンタエリトリトール(1.04 g)、ピリジン(16 ml)、DMAP(910 mg)をDMF(600 ml)に加え、70℃の湯浴で加熱しペンタエリトリトールを完全に溶解させた。反応溶液に無水酢酸(14 ml)を滴下し、終夜室温で撹拌した。反応溶液を減圧下溶媒留去し、粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；DCM／メタノール]で精製し、2,2-bis(hydroxymethyl)propane-1,3-diyl diacetate及びDMFの約1:1混合物を得た。

（２）2,2-Bis(hydroxymethyl)propane-1,3-diyl diacetate混合物(1.17 g)、5-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)pentanal(1.36 g)と、p-トルエンスルホン酸一水和物(38.0 mg)をトルエン(20 ml)に加え85℃で終夜撹拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を過剰量加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し、(2-(4-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) diacetate(1.32 g)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ7.67-7.64 (m, 4H), 7.45-7.33 (m, 6H), 4.43 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.93 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.83 (s,

2H), 3.67-3.58 (m, 4H), 2.07 (d, J = 1.2 Hz, 6H), 1.64-1.53 (m, 4H), 1.50-1.41 (m, 2H), 1.04 (s, 9H).

(３) (2-(4-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl) bis(methylene) diacetate(1.32 g)と、炭酸カリウム(553 mg)をメタノール(10 ml)に加え、室温下5時間攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を過剰量加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し、(2-(4-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy) butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)dimethanol(1.17 g)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ7.67-7.64 (m, 4H), 7.45-7.33 (m, 6H), 4.43 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 4.03-3.98 (m, 4H), 3.65 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.54-3.48 (m, 4H), 2.12 (brs, 1H), 2.02 (brs, 1H), 1.63-1.53 (m, 4H), 1.50-1.41 (m, 2H), 1.04 (s, 9H).

(４) (2-(4-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl) dimethanol(233 mg)、2-hexyldecanoic acid(356 mg)、トリエチルアミン(169 μL)、およびDMAP(6.22 mg)をDCM(2 ml)に溶解し、EDCI(293 mg)を加え室温下終夜攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、DCMで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し、(2-(4-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(337 mg)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ7.67-7.64 (m, 4H), 7.42-7.35 (m, 6H), 4.42 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 3.91 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.66-3.58 (m, 4H), 2.38-2.28 (m, 2H), 1.63-1.40 (m, 14H), 1.25 (brs, 40H), 1.04 (s, 9H), 0.98-0.85 (m, 12H).

(５) (2-(4-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)

bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(337 mg)をTHF(1 ml)に溶解し、TBAF(1.0 mol/L in THF, 1.5 ml)を加え室温下4時間攪拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を過剰量加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し目的の(2-(4-hydroxybutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(226 mg)を得た。

[0223] (2-(4-Hydroxybutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-heptylnonanoate)、

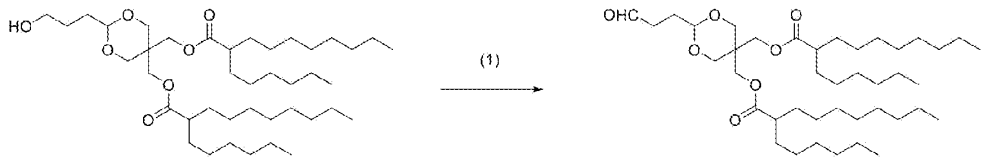
(2-(4-hydroxybutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyldecanoate)、

(2-(4-hydroxybutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonyldodecanoate)、

(2-(4-hydroxybutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-undecyltridecanoate)も同様の方法で合成した。

[0224] 原料合成例１０ ((2-(3-Oxopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化196]



(2-(3-hydroxypropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

(2-(3-oxopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

(2-(3-Hydroxypropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(3.48 g)、DMSO(3.62 ml)、およびトリエチルアミン(3.53 ml)をDCM(25 ml)に溶解し、氷冷下攪拌した。10分後sulfur trioxide pyridine complex (2.44 g)を加え、反応溶液を室温に昇温し4時間攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、DCMで3度抽出した。有機層を飽和食塩

水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し目的の(2-(3-oxopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(2.83 g)を得た。

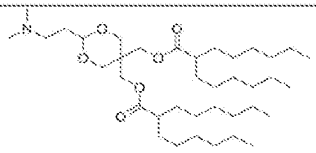
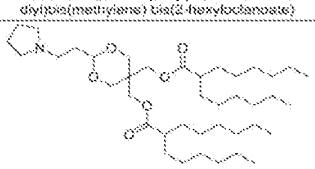
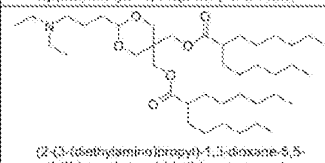
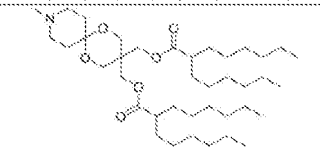
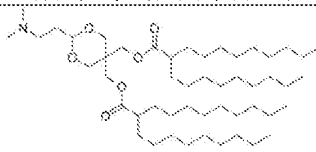
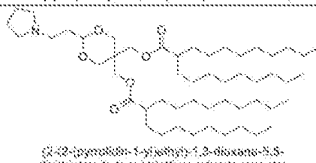
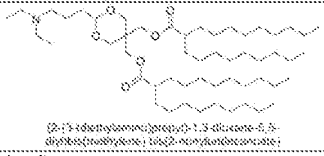
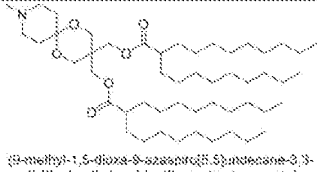
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.76 (t, J = 1.2 Hz, 1H), 4.56 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 4.34 (s, 2H), 3.91 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.60 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 2.58 (dt, J = 9.0 Hz, 1.2 Hz, 2H), 2.37-2.30 (m, 2H), 1.97 (dt, J = 7.2 Hz, 4.5 Hz, 2H), 1.74-1.39 (m, 8H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

[0225] (2-(3-Oxopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)、(2-(4-oxobutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)、(2-(5-oxopentyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)、(2-(6-oxohexyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)、(2-(4-oxobutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)、(2-(4-oxobutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-heptylnonanoate)、(2-(4-oxobutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyldecanoate)、(2-(4-oxobutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonyldodecanoate)、(2-(4-oxobutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-undecyltridecanoate)も同様の方法で合成した。

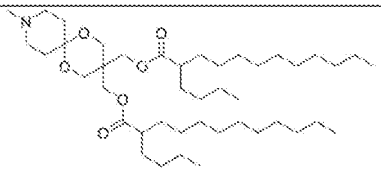
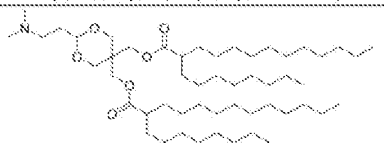
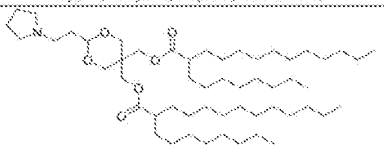
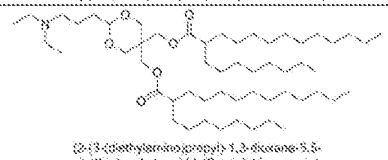
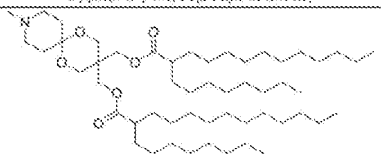
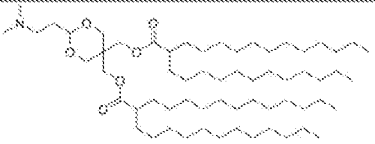
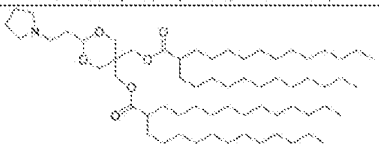
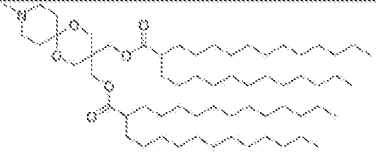
[0226] 脂質合成例３０～４５

脂質合成例１(1)の2-hexyldecanoic acid及び、脂質合成例１(3)の4,4-dimethoxy-N,N-dimethylbutan-1-amineを適宜別の原料に変更することで下記表１の脂質を合成した。

[表1-1]

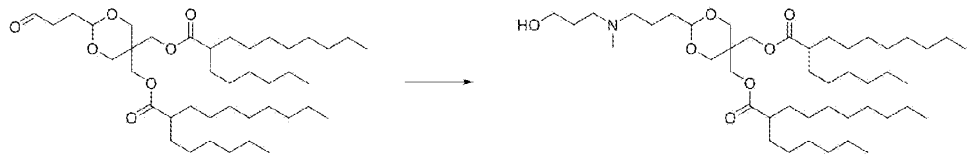
脂質合成例	分子構造	質量分析結果 (m/z)
[30]	 (2-((2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyloctanoate)	640.6
[31]	 (2-((2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyloctanoate)	666.6
[32]	 (2-((3-(diethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyloctanoate)	682.6
[33]	 (9-methyl-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecane-3,3-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyloctanoate)	652.6
[34]	 (2-((2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	808.7
[35]	 (2-((2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	834.8
[36]	 (2-((3-(diethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	850.8
[37]	 (9-methyl-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecane-3,3-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	820.7

[表1-2]

[38]	 (9-methyl-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecane-3,3-diyl)bis(methylene) bis(2-butyldodecanoate)	708.6
[39]	 (2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyltridecanoate)	836.8
[40]	 (2-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyltridecanoate)	861.8
[41]	 (2-(3-(diethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyltridecanoate)	876.8
[42]	 (6-methyl-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecane-3,3-diyl)bis(methylene) bis(2-octyltridecanoate)	848.8
[43]	 (2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-dodecyltetradecanoate)	976.9
[44]	 (2-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-dodecyltetradecanoate)	1002.9
[45]	 (6-methyl-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecane-3,3-diyl)bis(methylene) bis(2-dodecylhexadecanoate)	988.9

[0227] 脂質合成例４６ ((2-(3-((3-Hydroxypropyl)(methyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化197]



(2-(3-oxopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

(2-(3-((3-hydroxypropyl)(methyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

(2-(3-Oxopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)(102 mg)、3-(methylamino)propan-1-ol(14.7 mg)をTHF(1 ml)に溶解し、sodium triacetoxyborohydride(44.5 mg)を続いて加え、4時間室温下攪拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、DCMで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；DCM／メタノール]で精製し目的の(2-(3-((3-hydroxypropyl)(methyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate) (68.7 mg)を得た。

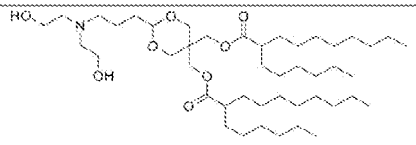
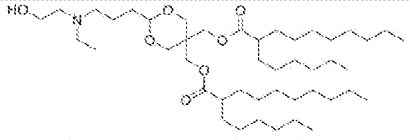
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.48 (t, J = 4.2Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 3.91 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.80 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 3.60 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 2.61 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 2,42-2.30 (m, 4H), 2.26 (s, 3H), 1.72-1.43 (m, 14H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 754.7, 実測値m/z = 754.7.

[0228] 脂質合成例４７、４８

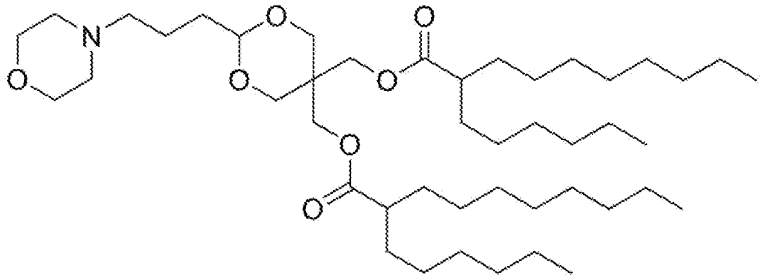
脂質合成例４６の3-(methylamino)propan-1-olを下記表２中のアミノアルコールに変更することで下記表２の脂質を合成した。

[表2]

脂質合成例	原料 アミノアルコール	分子構造	質量分析 結果(m/z)
[47]	2,2'-Azanediylbis(ethan-1-ol)	 (2-(3-bis(2-hydroxyethyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	770.7
[48]	2-(Ethylamino)ethan-1-ol	 (2-(3-(ethyl(2-hydroxyethyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	754.7

[0229] 脂質合成例４９ ((2-(3-morpholinopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化198]



(2-(3-morpholinopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

脂質合成例４６の3-(methylamino)propan-1-olの代わりにmorpholineを用いた以外は、脂質合成例４６と同様にして目的の(2-(3-morpholinopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

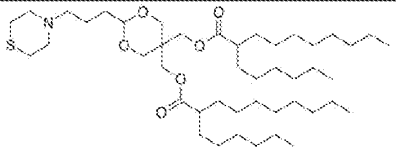
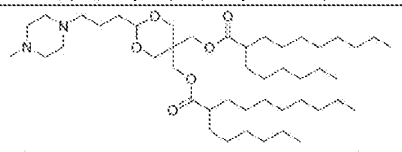
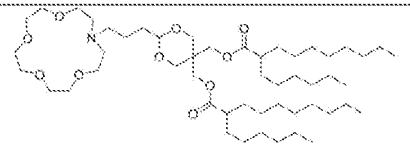
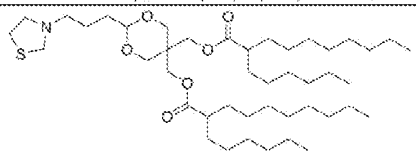
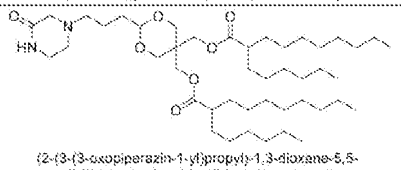
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.48 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 3.92 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.70 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 3.61 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 2.42 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 2.38-2.31 (m, 4H), 1.68-1.39 (m, 12H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 752.6, 実測値m/z = 752.6.

[0230] 脂質合成例５０～５２

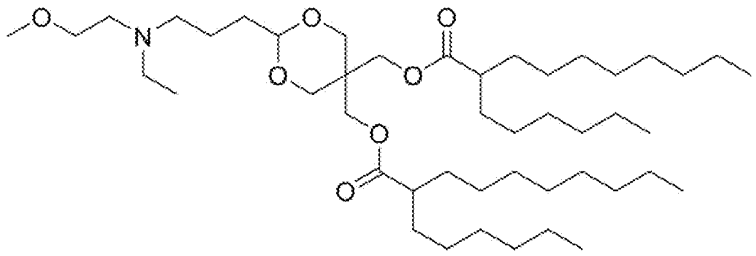
脂質合成例４６の3-(methylamino)propan-1-olを下記表３中の環状アミンに変更することで下記表３の脂質を合成した。

[表3]

脂質合成例	原料 環状アミン	分子構造	質量分析結果(m/z)
[５０]	Thiomorpholine	 (2-(3-thiomorpholinopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	768.6
[５１]	1-Methylpiperazine	 (2-(3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	765.7
[５２]	1,4,7,10-Tetraoxa-13-azacyclopentadecane	 (2-(3-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyclopentadecan-13-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	884.7
[５３]	Thiazolidine	 (2-(3-(thiazolidin-3-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	754.6
[５４]	Piperazin-2-one	 (2-(3-(3-oxopiperazin-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	765.6

[0231] 脂質合成例５５ ((2-(3-(ethyl(2-methoxyethyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化199]



(2-(3-(ethyl(2-methoxyethyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

脂質合成例４６の3-(methylamino)propan-1-olの代わりにN-ethyl-2-methoxyethan-1-amineを用いた以外は、脂質合成例４６と同様にして目的の(2-(3-(ethyl(2-methoxyethyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

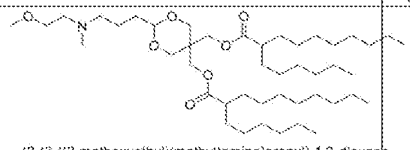
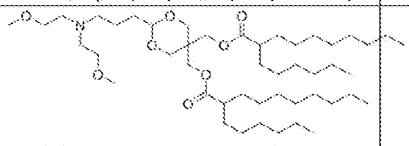
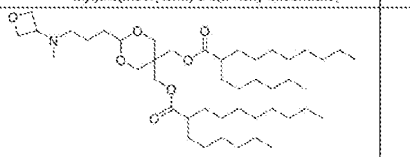
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ4.47 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.92 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.59 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.44 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.43 (s, 3H), 2.63 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.55 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 2.47 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.36-2.30 (m, 2H), 1.62-1.38 (m. 12H), 1.25 (brs, 40H), 1.00 (t, J = 6.9 Hz, 3H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 768.7, 実測値m/z = 768.7.

[0232] 脂質合成例５６～５８

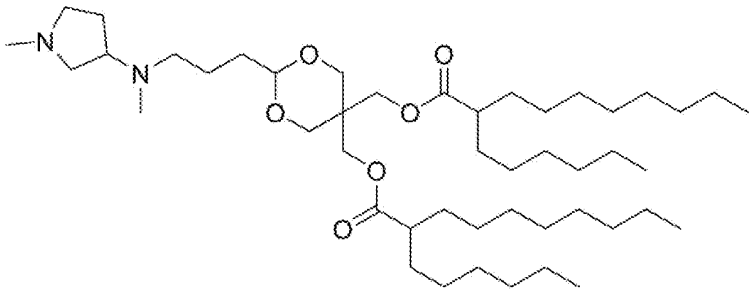
脂質合成例４６の3-(methylamino)propan-1-olを下記表４中のエーテルアミンに変更することで下記表４の脂質を合成した。

[表4]

合成例番号	原料 エーテルアミン	分子構造	質量分析結果(m/z)
[５６]	2-Methoxy-N-methylethan-1-amine	 (2-(3-((2-methoxyethyl)(methyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	754.7
[５７]	bis(2-Methoxyethyl)amine	 (2-(3-(bis(2-methoxyethyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	798.7
[５８]	N-methyloxetan-3-amine	 (2-(3-(methyl(oxetan-3-yl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	752.6

[0233] 脂質合成例５９ ((2-(3-(methyl(1-methylpyrrolidin-3-yl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化200]



(2-(3-(methyl(1-methylpyrrolidin-3-yl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

脂質合成例４６の3-(methylamino)propan-1-olの代わりにN,1-dimethylpyrrolidin-3-amineを用いた以外は、脂質合成例４６と同様にして目的の(2-(3-(methyl(1-methylpyrrolidin-3-yl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

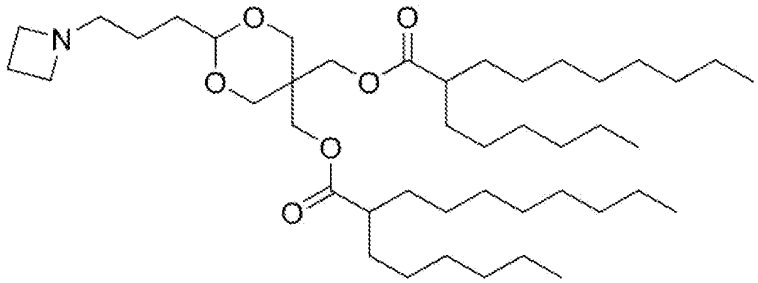
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ4.47 (t, J = 4.2 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.92

(d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.59 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.08-2.98 (m, 1H), 2.79-2.74 (m, 1H), 2.68-2.52 (m, 1H), 2.48-2.27 (m, 9H), 2.18 (s, 3H), 2.02-1.90 (m, 1H), 1.76-1.40 (m, 13H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 779.7, 実測値m/z = 779.7.

[0234] 脂質合成例６０ ((2-(3-(azetidin-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化201]



(2-(3-(azetidin-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

脂質合成例４６の3-(methylamino)propan-1-olの代わりにazetidineを用いた以外は、脂質合成例４６と同様にして目的の(2-(3-(azetidin-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

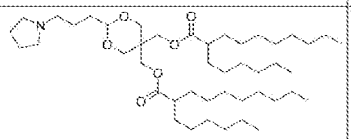
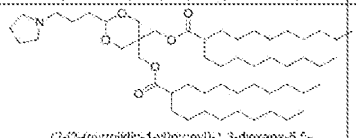
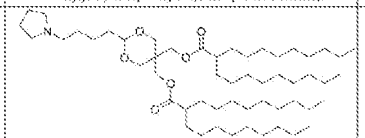
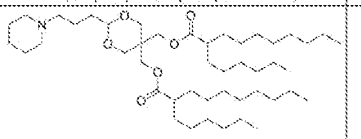
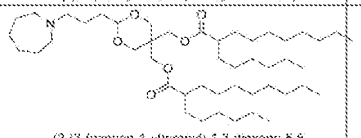
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ4.45 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 3.91 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.59 (d, J = 11.7 Hz. 2H), 3.16 (t, J = 6.9 Hz, 4H), 2.40-2.30 (m, 4H), 2.05 (quin, J = 6.9 Hz, 2H), 1.65-1.40 (m,12H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 723.2, 実測値m/z = 723.2.

[0235] 脂質合成例６１～６５

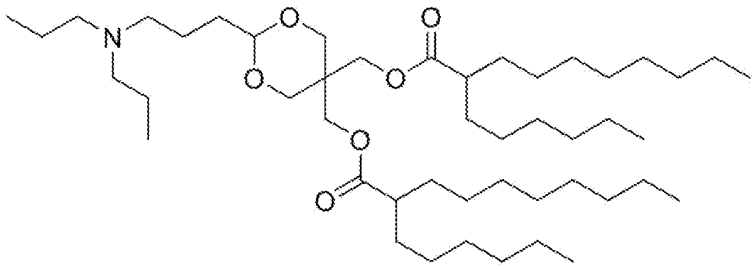
脂質合成例４６の(2-(3-oxopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)と3-(methylamino)propan-1-olを、下記表５中のアルデヒドと環状アミンに変更することで下記表５の脂質を合成した。

[表5]

脂質合成例	原料アルデヒド	原料環状アミン	分子構造	質量分析結果(m/z)
[61]	(2-(3-Oxopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	Pyrrolidine	 (2-(3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	736.7
[62]	(2-(3-Oxopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	Pyrrolidine	 (2-(3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	848.8
[63]	(2-(4-Oxobutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	Pyrrolidine	 (2-(4-(pyrrolidin-1-yl)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	862.8
[64]	(2-(3-Oxopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	Piperidine	 (2-(3-(piperidin-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	750.7
[65]	(2-(3-Oxopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	Azepane	 (2-(3-(azepan-1-yl)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	764.7

[0236] 脂質合成例６６ ((2-(3-(dipropylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化202]



(2-(3-(dipropylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)

脂質合成例４６の3-(methylamino)propan-1-olの代わりにdipropylamineを

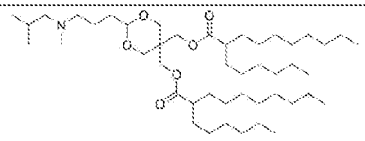
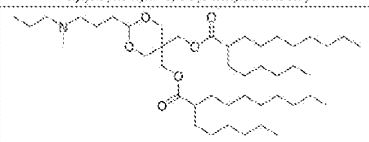
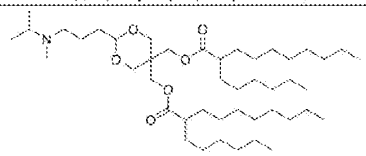
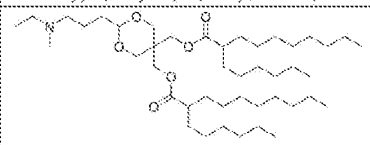
用いた以外は、脂質合成例４６と同様にして目的の(2-(3-(dipropylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ4.47 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.92 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.60 (d, J = 11.7 Hz. 2H),2.43-2.30 (m, 8H), 1.64-1.39 (m, 16H), 1.25 (brs, 40H), 0.90-0.85 (m, 18H).
質量分析（ESI）計算値 $[M+H]^+$ m/z = 766.7, 実測値m/z = 766.7.

[0237] 脂質合成例６７～７０

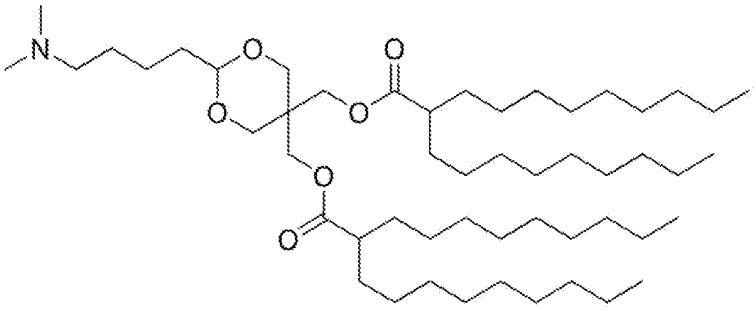
脂質合成例４６の3-(methylamino)propan-1-olを、下記表６中の2級アミンに変更することで下記表６の脂質を合成した。

[表6]

脂質合成例	原料 2級アミン	分子構造	質量分析 結果(m/z)
[６７]	N,2-Dimethylpropan-1-amine	 (2-(3-(isobutyl(methyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	752.7
[６８]	N-methylpropan-1-amine	 (2-(3-(methyl(propyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	738.7
[６９]	N-Methylpropan-2-amine	 (2-(3-isopropyl(methyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	738.7
[７０]	N-Methylethanamine	 (2-(3-(ethyl(methyl)amino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	724.7

[0238] 脂質合成例７１ ((2-(4-(dimethylamino)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)の合成)

[化203]



(2-(4-(dimethylamino)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)

脂質合成例４６の3-(methylamino)propan-1-olの代わりにdimethylamine 2 M solution in THFを用い、(2-(3-oxopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)の代わりに(2-(4-oxobutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)を用いた以外は、脂質合成例４６と同様にして目的の(2-(4-(dimethylamino)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)を得た。

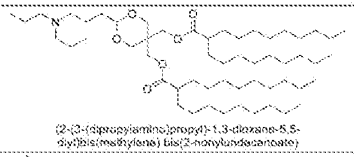
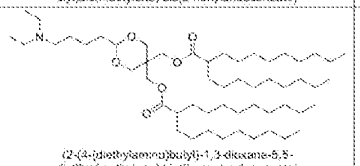
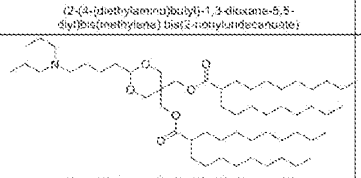
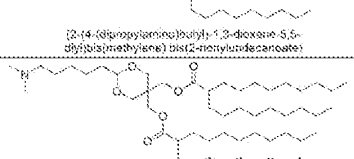
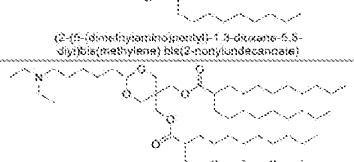
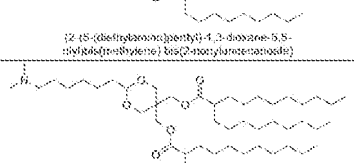
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ4.45 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.91 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.60 (d, J = 11.7 Hz. 2H),2.37-2.25 (m, 10H), 1.68-1.40 (m, 14H), 1.25 (brs, 56H), 0.90-0.86 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 836.8, 実測値m/z = 836.8.

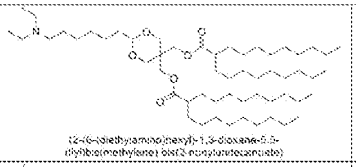
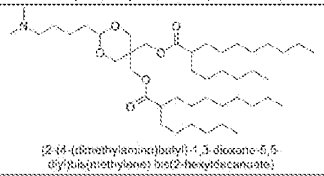
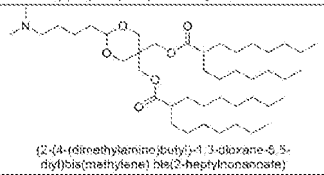
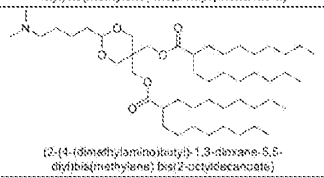
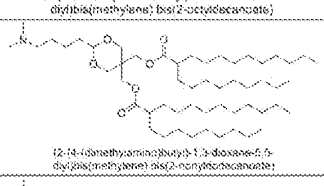
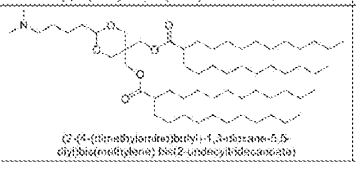
[0239] 脂質合成例７２～８３

脂質合成例４６の(2-(3-oxopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)と3-(methylamino)propan-1-olを、下記表７中のアルデヒドと２級アミンに変更することで下記表７の脂質を合成した。

[表7-1]

脂質合成例	原料アルデヒド	原料2級アミン	分子構造	質量分析結果(m/z)
[72]	(2-(2-(3-Oxopropyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	Dipropylamine	 (2-(2-(dipropylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	878.8
[73]	(2-(4-Oxobutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	Diethylamine	 (2-(4-(diethylamino)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	864.8
[74]	(2-(4-Oxobutyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	Dipropylamine	 (2-(4-(dipropylamino)butyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	892.8
[75]	(2-(5-Oxopentyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	Dimethylamine HF solution	 (2-(5-(dimethylamino)pentyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	850.8
[76]	(2-(5-Oxopentyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	Diethylamine	 (2-(5-(diethylamino)pentyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	878.8
[77]	(2-(6-Oxohexyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	Dimethylamine HF solution	 (2-(6-(dimethylamino)hexyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	864.8

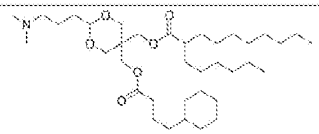
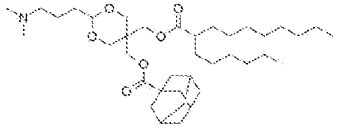
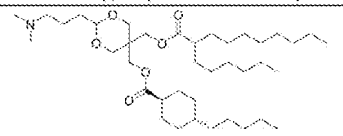
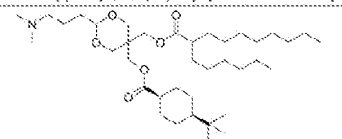
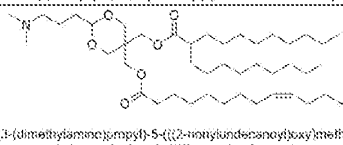
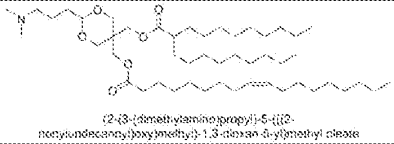
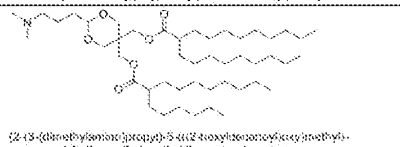
[表7-2]

[78]	(2-(6-Undecyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonylundecanoate)	Diethylamine		882.8
[79]	(2-(4-Undecyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-hexyldecanoate)	Diethylamine THF solution		724.7
[80]	(2-(4-Undecyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-heptylnonanoate)	Diethylamine THF solution		724.7
[81]	(2-(4-Undecyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-octyldecanoate)	Diethylamine THF solution		780.7
[82]	(2-(4-Undecyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-nonyldodecanoate)	Diethylamine THF solution		864.8
[83]	(2-(4-Undecyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(methylene) bis(2-undecyltridecanoate)	Diethylamine THF solution		948.9

[0240] 脂質合成例８４～９０

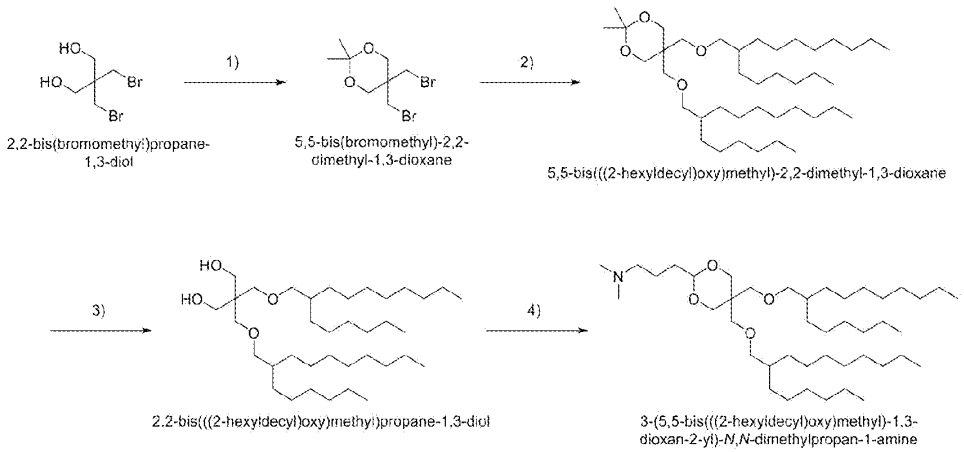
脂質合成例２７-(1)のundecanoic acidおよび、(2)の2-nonylundecanoic acidを、下記表８中のカルボン酸に変更することで、下記表８中の脂質を合成した。

[表8]

脂質合成例	原料カルボン酸1	原料カルボン酸2	分子構造	質量分析結果(m/z)
[84]	2-Hexyldecanoic acid	4-Cyclohexylbutanoic acid	 (5-{[(4-cyclohexylbutanoyl)oxy]methyl}-2-[3-(dimethylamino)propyl]-1,3-dioxan-5-yl)methyl 2-hexyldecanoate	658.5
[85]	2-Hexyldecanoic acid	Adamantane-1-carboxylic acid	 (2-(3-(dimethylamino)propyl)-5-(((2-hexyldecanoyl)oxy)methyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl adamantane-1-carboxylate	634.5
[86]	2-Hexyldecanoic acid	(1s,4r)-4-Pentylcyclohexane-1-carboxylic acid	 (2-(3-(dimethylamino)propyl)-5-(((2-hexyldecanoyl)oxy)methyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl (1s,4r)-4-pentylcyclohexane-1-carboxylate	652.6
[87]	2-Hexyldecanoic acid	(1s,4s)-4-(tert-Butyl)cyclohexane-1-carboxylic	 (2-[3-(dimethylamino)propyl]-5-{[(2-hexyldecanoyl)oxy]methyl}-1,3-dioxan-5-yl)methyl (1s,4s)-4-(tert-butyl)cyclohexane-1-carboxylate	638.5
[88]	2-Nonylundecanoic acid	Myristoleic acid	 (2-(3-(dimethylamino)propyl)-5-{[(2-nonylundecanoyl)oxy]methyl}-1,3-dioxan-5-yl)methyl (Z)-tetradec-9-enoate	736.6
[89]	2-Nonylundecanoic acid	Oleic acid	 (2-(3-(dimethylamino)propyl)-5-{[(2-nonylundecanoyl)oxy]methyl}-1,3-dioxan-5-yl)methyl oleate	792.7
[90]	2-Nonylundecanoic acid	2-Hexyldecanoic acid	 (2-(3-(dimethylamino)propyl)-5-(((2-hexyldecanoyl)oxy)methyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl 2-nonylundecanoate	708.7

[0241] 脂質合成例９１ (3-(5,5-Bis(((2-hexyldecyl)oxy)methyl)-1,3-dioxan-2-yl)-N,N-dimethylpropan-1-amineの合成)

[化204]



2,2-bis(bromomethyl)propane-1,3-diol

5,5-bis(bromomethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane

5,5-bis(((2-hexyldecyl)oxy)methyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane

2,2-bis(((2-hexyldecyl)oxy)methyl)propane-1,3-diol

3-(5,5-bis(((2-hexyldecyl)oxy)methyl)-1,3-dioxan-2-yl)-*N*,*N*-dimethylpropan-1-amine

(1) 2,2-Bis(bromomethyl)propane-1,3-diol(3.93 mg)、2,2-dimethoxypropane(1.84 ml)、p-トルエンスルホン酸一水和物(28.5 mg)をアセトン(15 ml)に溶解し、終夜室温で攪拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、減圧下アセトンを留去した。残渣を酢酸エチルで3度抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し5,5-bis(bromomethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane (3.51 g)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.80 (s, 4H), 3.58 (s, 4H), 1.42 (s, 6H).

(2) 5,5-Bis(bromomethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane(227 mg)、2-hexyldecan-1-ol(476 μl)、NaH(60%, dispersion in paraffin liquid)(66 mg)をDMF(2 ml)に懸濁し、100℃で4日間攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで３度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄したのち、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し5,5-bis(((2-hexyldecyl)oxy)methyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxaneを含む、粗生成物を得た。

(3) 5,5-Bis(((2-hexyldecyl)oxy)methyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxaneを

含む、粗生成物にメタノール(8 ml)、DCM(2.0 ml)、HCl (4mol/L in 1,4-Dioxane, 1.0 ml)を加え室温下4時間攪拌した。反応溶液に炭酸水素ナトリウムを過剰量加え、減圧下濃縮した。残渣に水と酢酸エチルを加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し2,2-bis(((2-hexyldecyl)oxy)methyl)propane-1,3-diol(76.1 mg)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.63 (d, J = 6.1 Hz, 4H), 3.49 (s, 4H), 3.30 (d, J = 5.6 Hz, 4H), 2.78 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 1.58-1.51(m, 2H), 1.26 (brs, 48H), 0.90-0.86 (m, 12H).

(4) 塩化カルシウム管を設置した容器に2,2-bis(((2-hexyldecyl)oxy)methyl)propane-1,3-diol(76.1 mg)、4,4-dimethoxy-N,N-dimethylbutan-1-amine(25.9 μL)、p-トルエンスルホン酸一水和物(29.7 mg)、triethyl orthoformate(26.0 μL)、およびトルエン(1.0 ml)を加え室温下終夜攪拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を過剰量加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；DCM／メタノール]で精製し目的の3-(5,5-bis(((2-hexyldecyl)oxy)methyl)-1,3-dioxan-2-yl)-N,N-dimethylpropan-1-amine(62.6 mg)を得た。

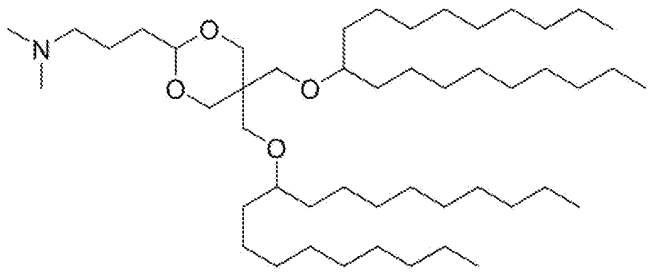
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.45 (t, J = 4.2 Hz, 1H), 3.90 (d, J = 11.6 Hz, 2H), 3.61 (d, J = 11.6Hz, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.29 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.17 (d, J = 5.73 Hz, 2H), 3.12 (s, 2H), 2.28 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.22 (s, 6H), 1.68-1.51 (m, 6H), 1.26 (brs, 48H), 0.90-0.86 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 682.7, 実測値m/z = 682.7.

[0242] 脂質合成例９２ (3-(5,5-bis((nonadecan-10-yloxy)methyl)-1,3-dioxan-2-y

l)-N,N-dimethylpropan-1-amineの合成）

[化205]



3-(5,5-bis((nonadecan-10-yloxy)methyl)-1,3-dioxan-2-yl)-*N*,*N*-dimethylpropan-1-amine

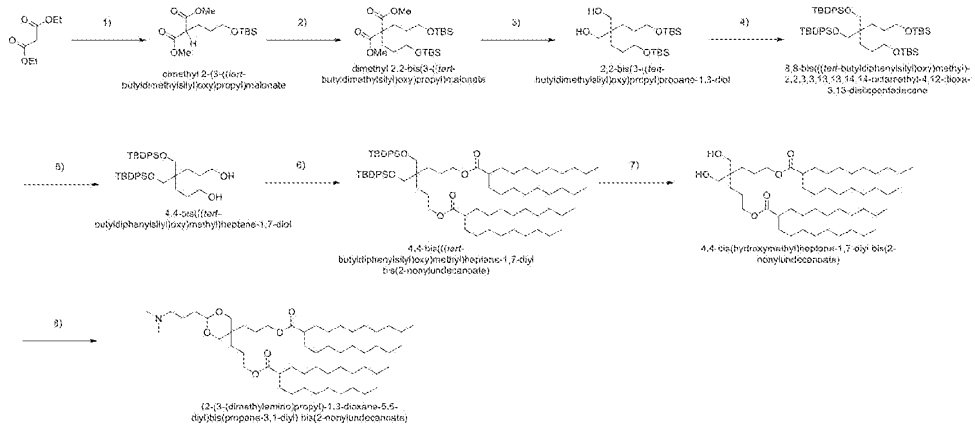
脂質合成例９１－（２）の2-hexyldecan-1-olの代わりにnonadecan-10-olを用いた以外は、脂質合成例８６と同様にして目的の3-(5,5-bis((nonadecan-10-yloxy)methyl)-1,3-dioxan-2-yl)-N,N-dimethylpropan-1-amineを得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.47 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 3.90 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 3.64-3.59 (m, 4H), 3.25-3.21 (m, 1H), 3.14 (s, 2H), 3.10-3.07 (m, 1H), 2.29 (t, J = :6.6 Hz, 2H), 2.23 (s, 6H), 1.61-1.33 (m, 12H), 1.26 (brs, 56H), 0.89-0.87 (m, 12H).

質量分析（ESI）計算値 $[M+H]^+$ m/z = 766.8, 実測値m/z = 766.8.

[0243] 脂質合成例９３（(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(propane-3,1-diyl) bis(2-nonylundecanoate)の合成）

[化206]



(1)Dimethylmalonate(1.32 g)、炭酸カリウム(2.76 g)、TBAB(322 mg)、(3-bromopropoxy)(tert-butyl)dimethylsilane(6.33 g)をトルエン(30 ml)に添加し85℃で終夜攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製しdimethyl 2-(3-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)propyl)malonate(2.55 g)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.74 (s, 6H), 3.63 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.42 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 2.00-1.93 (m, 2H), 1.60-1.49 (m, 2H), 0.89 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).

(2) NaH(60%, dispersion in paraffin liquid)(600 mg)をTHF(20 ml)に懸濁し、氷冷下5分攪拌した。反応液にdimethyl 2-(3-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)propyl)malonate(3.05 g)を添加し、さらに5分攪拌した。(3-bromopropoxy)(tert-butyl)dimethylsilane(3.09 g)を添加し、室温下終夜攪拌後さらに80℃で1日攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製しdimethyl 2,2-bis(3-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)propyl)malonate (939 mg)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.71 (s, 6H), 3.59 (t, J = 6.3 Hz, 4H), 1.96-1.90 (m, 4H), 1.42-1.35 (m, 4H), 0.88 (s, 18H), 0.03 (s, 12H).

(3) Dimethyl 2,2-bis(3-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)propyl)malonate (1.91 g)をTHF(10 mL)に溶解し、氷冷下10分攪拌した。反応溶液に水素化ビス(2-メトキシエトキシ)アルミニウムナトリウム 溶液(≧60 wt. % in toluene)(4.0 ml)を加え、室温でさらに終夜攪拌した。反応溶液に水酸化ナトリウム水溶液氷冷下滴下し、反応をクエンチした。酢酸エチルで3度抽出し、有機

層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し2,2-bis(3-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)propyl)propane-1,3-diol (607 mg)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.60 (t, J = 6.1Hz, 4H), 3.56 (d, J = 5.8 Hz, 4H), 2.61 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 1.52- 1.41 (m, 4H), 1.34-1.26 (m, 4H), 0.89 (s, 18H), 0.05 (s, 12H).

(4) 2,2-Bis(3-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)propyl)propane-1,3-diol(512 mg)、イミダゾール(293 mg)をDCM(4 ml)に溶解し、氷冷下TBDPSCl(835 mg)を加え、さらに室温下3日間攪拌した。反応溶液に塩化アンモニウム水溶液を加え、DCMで3度抽した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し8,8-bis(((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)methyl)-2,2,3,3,13,13,14,14-octamethyl-4,12-dioxa-3,13-disilapentadecane(660 mg)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.64-7.62 (m, 8H), 7.42-7.28 (m, 12H), 3.51-3.46 (m, 8H), 1.28 (brs, 8H), 1.04 (s, 18H), 0.87 (s, 18H), 0.01 (s, 12H).

(5) 8,8-Bis(((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)methyl)-2,2,3,3,13,13,14,14-octamethyl-4,12-dioxa-3,13-disilapentadecane(539 mg)をTHF(12 ml)に溶解し、超純水(1.92 ml)と5M塩酸ジオキサン(480 μl)を加え、30分攪拌した。反応溶液に炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し4,4-bis(((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)methyl)heptane-1,7-diol(338 mg)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.66-7.62 (m, 8H), 7.44-7.31 (m ,12H), 3.52 (s, 4H), 3.46-3.41 (m, 4H), 1.28-1.18 (m, 8H), 1.06 (s, 18H).

(6) 4,4-Bis(((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)methyl)heptane-1,7-diol(134 mg)、2-nonylundecanoic acid(138 mg)、DMAP(2.44 mg)をDCM(1 ml)に溶解し、EDCI(99.7 mg)を加え室温下終夜攪拌した。反応溶液に塩化アンモニウム水溶液を加え、DCMで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し4,4-bis(((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)methyl)heptane-1,7-diyl bis(2-nonylundecanoate)(229 mg)を得た。

(7) 4,4-Bis(((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)methyl)heptane-1,7-diyl bis(2-nonylundecanoate)(229 mg)にTHF(2 ml)、酢酸(343 μl)、TBAF(1.0 mol/L in THF, 4 ml)を加え、室温下2時間攪拌した。反応溶液に炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；ヘキサン／酢酸エチル]で精製し4,4-bis(hydroxymethyl)heptane-1,7-diyl bis(2-nonylundecanoate)(51.3 mg)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.06 (t, J = 6.4 Hz, 4H), 3.58 (s, 4H), 2.35-2.26 (m, 2H), 1.62-1.30 (m, 16H), 1.25 (s, 56H), 0.90-0.86 (m, 12H).

(8) 4,4-Bis(hydroxymethyl)heptane-1,7-diyl bis(2-nonylundecanoate)(34.1 mg)に4,4-dimethoxy-N,N-dimethylbutan-1-amine(10.2 μl)、p-トルエンスルホン酸一水和物(10.7 mg)、およびトルエン(10 ml)を加え85℃で終夜攪拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を過剰量加え、酢酸エチルで3度抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。これを濾過した後、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒；DCM／メタノール]で精

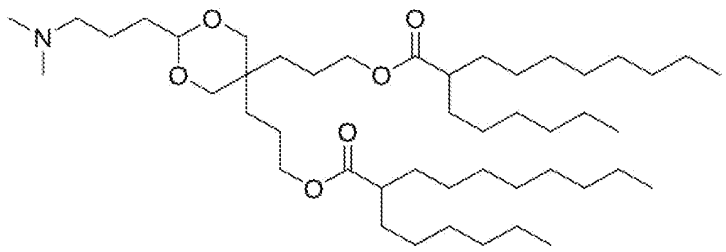
製し目的の(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(propane-3,1-diyl) bis(2-nonylundecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.44 (t, J = 3.8 Hz, 1H), 4.09 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 4.02 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.75 (d, J = 11.4 Hz, 2H), 3.37 (t, J = 11.4 Hz, 2H), 2.34-2.27 (m, 10H), 1.75-1.40 (m, 16H), 1.25 (brs, 58H), 1.10-1.04 (m, 2H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 878.8, 実測値m/z = 878.8.

[0244] 脂質合成例９４ ((2-(3-(Dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(propane-3,1-diyl) bis(2-hexyldecanoate)の合成)

[化207]



(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(propane-3,1-diyl) bis(2-hexyldecanoate)

脂質合成例９３の2-nonylundecanoic acidの代わりに2-hexyldecanoic acidを用いた以外は、脂質合成例８８と同様にして目的の(2-(3-(dimethylamino)propyl)-1,3-dioxane-5,5-diyl)bis(propane-3,1-diyl) bis(2-hexyldecanoate)を得た。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.44 (t, J = 4.1 Hz, 1H), 4.10 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 4.02 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.75 (d, J = 11.4 Hz, 2H), 3.38 (d, J = 11.4 Hz, 2H), 2.36-2.26 (m, 10H), 1.73-1.40 (m, 16H), 1.26 (brs, 42H), 1.10-1.04 (m, 2H), 0.90-0.85 (m, 12H).

質量分析 (ESI) 計算値 $[M+H]^+$ m/z = 766.7, 実測値m/z = 766.7.

[0245] ＩＩ．脂質ナノ粒子の作製および評価

＜緩衝液の調整＞

クエン酸緩衝液

6.90 gのクエン酸(富士フィルム和光、製品コード：030-05525)と、4.15 gのSodium citrate dihydrate(Aldrich、カタログ番号：W302600)に超純水を加え、1 Lのクエン酸緩衝液（pH 3.5）を作成した。

HEPES緩衝液

90.0 gのスクロース(富士フィルム和光、製品コード：196-00015)と、20 mlのHEPES 緩衝液(1mol/L、ナカライテスク、商品コード：17557-94)に超純水を加え、1 LのHEPES緩衝液（pH 7.45）を作成した。

TE緩衝液

TE Buffer (20X), RNase-free(Invitrogen（商標）、製品コード：T11493)をDEPC-Treated Water(ニッポンジーン、製品コード：314-90205)で20倍に希釈し、TE緩衝液（pH 7.5）を調整した。

PBS(-)

ダルベッコりん酸緩衝生理食塩水(ナカライテスク、商品コード：14249-24)を使用した。

[0246] ＜脂質ナノ粒子の調製＞

脂質ナノ粒子はマイクロ流体デバイスを用いたアルコール希釈法により調製した。マイクロ流体デバイスとしてはThe NanoAssemblr（登録商標）Benchtop(PRECISION NANOSYSTEMS社)を使用した。まず、ｐＨ感受性カチオン性脂質、DSPC（1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine）、コレステロール、及びＰＥＧ－ＤＭＧ 2000(日油、SUNBRIGHT GM-020)をモル比50:10:38.5:1.5の割合で混合し、総脂質濃度が８ｍＭとなるエタノール溶液を調整した。核酸溶液はCleanCap FLuc mRNA(TriLink BioTechnologies社、製品番号L-7202-5)を用いた場合は44.1 μg/mlに、siRNAを用いた場合は128 μg/mlになるようそれぞれクエン酸緩衝液で希釈して調整した。調整した脂質溶液0.650 ml、および核酸溶液1.95 mlを合計流速が12 ml/minとなるようにマイクロ流体デバイスで混合し、混合溶液のうち2.20 mlを2.00 mlのHEPES緩衝液が入ったチューブに回収した。回収した脂質ナノ粒子溶液を分画分子量12-14 kDの

透析膜(REPLIGEN社 Spectra/Por（登録商標）4)に入れ、透析液としてHEPES緩衝液を用いて5℃で終夜透析を行った。透析後の脂質ナノ粒子溶液を限外濾過ユニット(Amicon（登録商標）Ultra - 15)で濃縮し、脂質ナノ粒子溶液を回収した。回収した脂質ナノ粒子溶液は核酸濃度が0.01 mg/mlとなるようHEPES緩衝液で希釈し、-80℃で使用時まで保管した。

[0247] ＜脂質ナノ粒子の封入率評価＞

脂質ナノ粒子中の核酸封入率はRibogreen試薬(Quant-it（商標）社、製品番号：R114491)で測定した。核酸濃度がおよそ8 μg/mlなるようＴＥ緩衝液で脂質ナノ粒子溶液を希釈し測定溶液Aを調整した。また、核酸濃度がおよそ1.2 μg/ml、X-triton100(Sigma-Aldrich、T8787-50ML)が1 %(w/w)となるようＴＥ緩衝液で脂質ナノ粒子溶液を希釈した測定溶液Bを調整した。96ウェルマイクロプレート上で測定溶液100μｌとRibogreen試薬100μｌを混合し、室温下５分インキュベートし、励起波長485nm、測定波長528nmにおける蛍光強度を測定した。核酸濃度の算出は核酸濃度が０から2.5μg/mlの範囲で作成した検量線を用いて行った。脂質ナノ粒子の封入率は次の計算式で算出した。

封入率％＝（測定溶液Bの核酸濃度(μg/ml)－測定溶液Aの核酸濃度(μg/ml)）÷測定溶液Bの核酸濃度(μg/ml)×１００

[0248] ＜脂質ナノ粒子の平均粒子径の測定＞

脂質ナノ粒子溶液をPBS(-)で25倍に希釈し、測定溶液を調整した。分析装置「Zetasizer Nano ZSP」(Malvern社)を用いて測定溶液中のナノ粒子の平均粒径(ｚ）及び多分散指数(ＰＤＩ）を測定した。

[0249] ＜In vitro培養細胞へのmRNA導入＞

トランスフェクション24時間前に96-well plate(Corning、#3904)にHepG2細胞もしくはCHO-K1細胞を5,000cells/wellで播種した。使用した培地はそれぞれDMEM, low glucose, pyruvate (Gibco、#11885-084)、DMEM/F-12 (Gibco、11320-033)を終濃度10%FBS及び終濃度1%ペニシリン/ストレプトマイシンに調整したものである。FLuc mRNA (TriLink Bio Technologies社、L-7202-5)

を封入したLNPを1ng/wellとなるようにトランスフェクションし、37℃、5% CO2の環境でインキュベートした。トランスフェクション24時間後に、ONE-Glo（商標）+ Tox Luciferase Reporter and Cell Viability Assay (Promega, E7120)でLuciferase発現を定量し薬物導入指数を求めた。アッセイ条件は製造者のプロトコルにしたがった。GF-AFCを添加し、 37℃、5% CO2の環境で2時間インキュベートしたのちに、蛍光強度を測定し、生細胞の相対的な数を見積もった。続いて、ONE-Glo（商標）Luciferase Assay用の基質を添加して3分後に発光強度を測定した。発光強度を生細胞数によって補正して、薬物導入指数を求めた。薬物導入指数は、生細胞数で補正した発光強度に10^5を掛けた数値とした。薬物導入指数を表９に示す。薬物導入指数が大きいほど、薬物であるmRNAが多く細胞に導入されたことを示す。

[0250] ｐH感受性カチオン性脂質合成例１～２９の各脂質を用いた、脂質ナノ粒子の核酸封入率、平均粒子径、多分散指数（PDI）、in vitroでの薬物導入指数を以下の表９－１にまとめた。また、ｐH感受性カチオン性脂質合成例３０～８９の各脂質を用いた、脂質ナノ粒子の核酸封入率、平均粒子径、多分散指数（PDI）を以下の表９－２および表９－３にまとめた。表９－１中の「HEPES緩衝液」は、合成例のHEPES緩衝液に懸濁した脂質ナノ粒子含有溶液に代えて、脂質ナノ粒子を含まないHEPES緩衝液を用いた実験である。ｐH感受性カチオン性脂質合成例１～２９の各脂質を用いた脂質ナノ粒子は、高いｍRNA封入率を有することが確認され、また薬物導入指数の増加も確認された。ｐH感受性カチオン性脂質合成例１～２９の各脂質を用いた脂質ナノ粒子は内包するmRNAを細胞に導入できたことは明らかである。ｐH感受性カチオン性脂質合成例３０～８９の各脂質を用いた脂質ナノ粒子は、高いｍRNA封入率を有することが確認された。

[0251]

[表9-1]

表９－１

pH 感受性カチオン性脂質合成例	核酸封入率(%)	平均粒子径(nm)	多分散指数	薬物導入指数	
				HepG2 細胞	CHO-K1 細胞
［１］	99.53	95.18	0.060	268.807	227.059
［２］	98.92	143.10	0.128	5.166	2.535
［３］	100.00	122.50	0.100	45.634	14.145
［４］	99.84	80.44	0.064	172.742	80.346
［５］	99.37	84.13	0.102	52.496	57.309
［６］	99.75	77.19	0.080	69.429	31.639
［７］	99.89	80.45	0.049	177.030	51.397
［８］	99.99	89.57	0.066	34.395	12.181
［９］	99.68	101.60	0.229	428.155	60.926
［１０］	100.00	84.81	0.023	442.501	154.324
［１１］	100.00	85.18	0.093	260.508	268.419
［１２］	100.00	108.60	0.098	411.766	222.161
［１３］	99.93	77.69	0.088	85.658	47.090
［１４］	99.88	75.83	0.089	18.042	11.273
［１５］	99.82	87.66	0.076	151.393	81.440
［１６］	99.94	75.77	0.059	57.510	34.329
［１７］	99.97	74.05	0.079	44.172	77.425
［１８］	99.77	73.98	0.077	13.751	6.999
［１９］	97.62	69.12	0.115	3.948	2.367
［２０］	97.86	68.36	0.097	1.260	1.476
［２１］	99.77	82.88	0.067	163.285	78.676
［２２］	99.71	73.16	0.109	22.875	9.624
［２３］	99.06	74.10	0.115	2.610	1.339
［２４］	100.00	86.56	0.089	258.440	185.008
［２５］	99.92	86.68	0.087	71.899	48.106
［２６］	100.00	84.99	0.068	331.264	177.904
［２７］	99.98	73.12	0.092	349.985	245.928
［２８］	100.00	80.02	0.099	346.436	231.826
［２９］	99.96	78.52	0.041	131.171	35.029
HEPES 緩衝液	-	-	-	1.107	0.669

[0252]

[表9-2]

表９－２

pH感受性カチオン性脂質化合物	核酸封入率 (%)	平均粒子径 (nm)	多分散指数
[30]	99.34	129.40	0.09
[31]	99.35	114.59	0.10
[32]	99.20	129.00	0.09
[33]	99.32	94.53	0.12
[34]	99.11	80.00	0.07
[35]	98.92	67.82	0.07
[36]	99.24	77.25	0.05
[37]	98.44	77.39	0.09
[38]	98.69	71.84	0.11
[39]	98.98	76.69	0.05
[40]	99.19	73.36	0.07
[41]	99.26	73.83	0.08
[42]	98.52	79.99	0.11
[43]	98.45	99.75	0.14
[44]	98.56	97.79	0.16
[45]	95.81	110.50	0.11
[46]	99.73	95.71	0.08
[47]	99.54	90.66	0.05
[48]	99.70	97.22	0.07
[49]	96.35	67.83	0.10
[50]	92.78	65.15	0.19
[51]	99.28	91.46	0.04
[52]	95.34	130.80	0.05
[53]	57.85	46.96	0.21
[54]	95.11	65.71	0.15
[55]	97.97	100.00	0.07
[56]	98.85	93.44	0.11
[57]	98.75	87.95	0.07
[58]	94.39	62.01	0.12
[59]	100.00	98.19	0.11
[60]	99.66	86.84	0.06
[61]	99.48	84.07	0.09

[表9-3]

[62]	99.53	82.64	0.04
[63]	99.46	76.98	0.06
[64]	98.76	82.10	0.08
[65]	98.77	65.92	0.27
[66]	98.84	86.48	0.08
[67]	98.01	83.13	0.09
[68]	98.85	89.30	0.06
[69]	99.25	92.55	0.07
[70]	99.42	89.97	0.07
[71]	99.55	79.32	0.04
[72]	98.45	65.25	0.14
[73]	99.36	77.25	0.08
[74]	98.46	72.50	0.07
[75]	99.39	78.19	0.06
[76]	99.41	74.10	0.09
[77]	99.54	76.48	0.07
[78]	99.13	72.52	0.07
[79]	99.63	81.67	0.05
[80]	99.58	85.33	0.05
[81]	99.61	78.03	0.02
[82]	99.63	79.60	0.02
[83]	99.64	81.73	0.03
[84]	99.77	112.60	0.10
[85]	99.08	151.20	0.12
[86]	99.70	86.67	0.11
[87]	99.07	129.30	0.11
[88]	99.51	82.42	0.06
[89]	99.49	81.88	0.09
[90]	99.46	77.89	0.06
[91]	99.80	74.67	0.05
[92]	99.64	78.35	0.10
[93]	99.66	94.27	0.03
[94]	99.71	101.10	0.06

[0253] ＜In vitro培養細胞へのsiRNA導入＞

トランスフェクション24時間前に96-well plate(Corning、#3904)にHepG2細胞を2,500cells/wellで播種した。使用した培地はDMEM, low glucose, pyruvate (Gibco、#11885-084)を終濃度10%FBS及び終濃度1%ペニシリン/ストレプトマイシンに調整したものである。Human PLK1 (polo like kinase) に対するsiRNAまたはLuciferaseに対するsiRNAを封入したLNPを培養液における最終濃度が1nMとなるように添加して、トランスフェクションをし、37℃、5% CO2の環境でインキュベートした。PLK1 は細胞周期の M 期の進行を担うキナーゼであり、その遺伝子ノックダウンにより細胞増殖が抑制されることが知られている。本評価では遺伝子ノックダウンの程度を生細胞割合を指標に評価するため、トランスフェクション72時間後に、CellTiter-Fluor (商標) Cell Viability Assay (Promega, G6080)で生細胞割合を測定した。アッセイ条件は製造者のプロトコルにしたがった。GF-AFCを添加し、 37℃、5% CO2の環境で2時間インキュベートしたのちに、蛍光強度を測定し、生細胞数を測定した。Luciferaseに対するsiRNA (siLuc) を処置したときの生細胞数に対する、Human PLK1に対するsiRNA(siPLK1) を処置したときの生細胞数の割合である生細胞指数を次の計算式で算出した。

計算式：生細胞指数(%) ＝ siPLK1で処置したときの生細胞数 / siLucで処置したときの生細胞数 × 100

siPLK1を含有する脂質ナノ粒子脂質とsiLucを含有する脂質ナノ粒子組成の脂質組成とは同一としておき、siRNAを含有するLNPが細胞と接触することによる影響を排除するために、siLucで処置したときの生細胞数で補正した。

siPLK1が細胞に導入されると細胞増殖は阻害される。そのためsiPLK1を含む脂質ナノ粒子のsiRNA導入能が高いと、生細胞指数は低い数値となる。したがって、生細胞指数 (%) が低い数値であるほど、siPLK1の細胞への導入効率が高いことを示す。

比較例１は、ｐH感受性カチオン性脂質を用いた脂質ナノ粒子を添加する代わりに、siPLK1をLipofectamine（登録商標） RNAiMAX Transfection Reagent(Thermo Fisher Scientific社、製品番号13778-150)のプロトコルに従って、トランスフェクションした以外は、同様に実施した。また、比較例２は、ｐH感受性カチオン性脂質を用いた脂質ナノ粒子について、脂質ナノ粒子を用いずに培養液での終濃度で1nMとなるようにsiRNAを添加した以外は、同様に実施した。

[0254] ｐH感受性カチオン性脂質合成例１、４、１０、１４、１５の各脂質を用いた、脂質ナノ粒子の核酸封入率、平均粒子径、多分散指数（PDI）、および生細胞指数を以下の表１０に示す。また、封入したsiRNAの配列を表１１に示す。

本発明のｐH感受性カチオン性脂質を用いた脂質ナノ粒子は高いsiRNA封入率を有することが確認された。さらに、本発明のｐH感受性カチオン性脂質を用いた脂質ナノ粒子は、いずれも生細胞指数が低いことから、本発明のｐH感受性カチオン性脂質は、siRNAを細胞に導入するのに有用であることが明らかとなった。

[0255]

[表10]

pH 感受性カチオン性脂質合成例	封入した siRNA	核酸封入率(%)	平均粒子径 (nm)	多分散指数	生細胞指数(%) HepG2 細胞
[1]	siPLK1	99.74	81.72	0.075	46.96
	siLuc	99.71	76.74	0.055	
[4]	siPLK1	99.73	76.47	0.034	51.19
	siLuc	99.42	76.92	0.028	
[10]	siPLK1	100.00	81.78	0.042	42.95
	siLuc	99.89	97.72	0.032	
[14]	siPLK1	99.46	82.25	0.04	34.40
	siLuc	99.37	79.15	0.048	
[15]	siPLK1	99.57	80.77	0.083	42.95
	siLuc	99.50	77.69	0.07	
比較例1 (Lipofectamine™ RNAiMAX)	siPLK1	-	-	-	85.70
比較例2 (Naked)	siPLK1	-	-	-	100.8

[0256] [表11]

表11

名称		配列
siLuc	S	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT-3' (配列番号1)
	AS	5'-UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT-3' (配列番号2)
siPLK1	S	5'-AGAuCACCCuCCUuAAAuAUU-3' (配列番号3)
	AS	5'-UAUUUAAgGAGGGUGAuCUUU-3' (配列番号4)

上記配列で、dTはDNAのTを表し、小文字のgおよびaは、2'—OMeのRNAを表す。

[0257] 以上の結果から、本発明のpH感受性カチオン性脂質を用いた脂質ナノ粒子は、高いmRNA封入率を有し、薬物導入指数が増加することから、内包するmRNAを細胞に効率的に導入できる。また、本発明のpH感受性カチオン性脂質は、siRNAを細胞に導入するのに有用である。

[0258] ＜実験動物に対するmRNA送達発現能力評価＞

6から7週齢のBalb/cマウス(n=3)に、作成した脂質ナノ粒子溶液を内包するmRNAが0.1 mg kg-1 となる用量で静脈内投与した。投与6時間後、PBS(-)に溶解

したVivoGlo Luciferin In Vivo Grade (Promega, US)を1.5 mgを尾静脈注射し、3分後放血屠殺をした。マウスから肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓を収集し、IVIS Imaging Systemを使用してルシフェリン発光の撮影を行った。Avg Radiance [p/s/cm2/sr]はROIツールを用いて臓器ごとに関心領域を指定して算出した。ｐH感受性カチオン性脂質合成例１～８９の各脂質を用いた、脂質ナノ粒子の肝臓及び脾臓におけるmRNAの発現量を表１２にまとめた。比較例としてHEPESを投与した場合についても、表１２中に併記した。本発明全てのｐH感受性カチオン性脂質で、HEPES投与時以上の発光が肝臓または脾臓で確認された。実験動物において、mRNA送達能力を有することは明らかである。

[0259]

[表12-1]

表１２

pH感受性カチオン性脂質合成例	Avg Radiance [p/s/cm²/sr]	
	肝臓	脾臓
[1]	8.56.E+07	5.48.E+06
[2]	1.09.E+04	3.45.E+06
[3]	1.72.E+07	2.74.E+07
[4]	1.43.E+08	3.26.E+06
[5]	1.51.E+06	1.93.E+06
[6]	1.72.E+08	2.66.E+06
[7]	1.02.E+08	3.79.E+06
[8]	4.59.E+07	3.05.E+06
[9]	0.00.E+00	0.00.E+00
[10]	5.54.E+07	1.38.E+06
[11]	8.88.E+06	3.56.E+06
[12]	1.52.E+06	2.41.E+06
[13]	8.96.E+07	3.58.E+06
[14]	1.06.E+08	3.69.E+06
[15]	1.48.E+08	1.03.E+07
[16]	4.97.E+07	3.16.E+06
[17]	6.07.E+07	4.44.E+06
[18]	3.87.E+07	1.67.E+06
[21]	4.68.E+07	2.18.E+06
[22]	6.47.E+07	2.20.E+06
[23]	3.07.E+07	1.60.E+06
[24]	1.85.E+06	2.92.E+06
[25]	1.07.E+07	7.84.E+05
[26]	2.25.E+06	2.19.E+06
[28]	7.36.E+06	2.36.E+06
[29]	6.41.E+07	1.12.E+06
[30]	1.35.E+07	2.47.E+07
[31]	1.28.E+07	2.36.E+07
[32]	5.30.E+07	4.01.E+07
[33]	2.21.E+07	5.48.E+06
[34]	4.69.E+07	5.14.E+06
[35]	5.21.E+07	1.37.E+06

[表12-2]

[36]	1.22E+08	4.14E+06
[37]	6.76E+06	7.53E+05
[38]	4.89E+06	2.31E+06
[39]	6.56E+07	3.91E+06
[40]	6.37E+07	1.48E+06
[41]	5.49E+07	2.88E+06
[42]	8.71E+06	9.35E+05
[43]	5.61E+06	4.58E+05
[44]	3.45E+06	3.21E+05
[45]	2.55E+05	9.12E+04
[46]	4.53E+06	8.99E+06
[47]	3.69E+06	9.99E+05
[48]	1.31E+07	2.36E+07
[51]	1.27E+07	1.70E+06
[52]	7.10E+05	1.04E+07
[55]	5.40E+07	5.41E+06
[56]	4.95E+07	6.33E+06
[57]	1.84E+05	2.32E+04
[59]	1.01E+05	3.59E+06
[60]	2.23E+07	2.02E+07
[61]	4.15E+07	1.21E+07
[62]	1.80E+08	1.05E+07
[63]	1.31E+08	4.81E+06
[64]	4.12E+07	6.46E+06
[65]	4.21E+06	9.36E+05
[66]	4.80E+05	1.71E+05
[67]	1.11E+05	1.15E+04
[68]	3.03E+07	4.58E+06
[69]	1.08E+08	1.75E+07
[70]	1.05E+08	1.07E+07
[71]	2.39E+08	3.09E+06
[72]	3.05E+04	8.09E+03

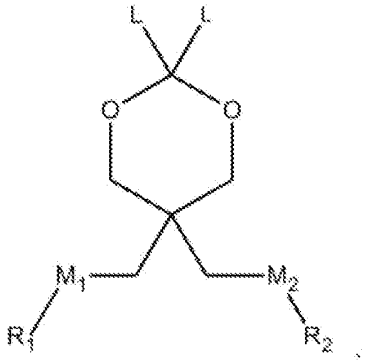
[表12-3]

[73]	1.87.E+08	5.00.E+06
[74]	1.54.E+05	1.00.E+04
[75]	1.85.E+08	2.57.E+06
[76]	1.55.E+08	3.39.E+06
[77]	8.52.E+07	3.63.E+06
[78]	6.27.E+07	2.55.E+06
[79]	8.65.E+07	8.70.E+06
[80]	1.89.E+08	5.49.E+06
[81]	2.23.E+08	3.18.E+06
[82]	2.50.E+08	2.60.E+06
[83]	4.03.E+07	6.52.E+06
[84]	1.78.E+04	7.68.E+05
[85]	1.10.E+04	3.95.E+06
[88]	1.14.E+07	5.39.E+06
[89]	2.03.E+07	6.68.E+06
[90]	1.36.E+08	4.82.E+06
[91]	1.02.E+08	2.23.E+06
[92]	6.71.E+07	2.58.E+06
[93]	1.70.E+08	6.96.E+06
[94]	2.80.E+07	1.67.E+07
HEPES	5.93.E+02	3.18.E+02

請求の範囲

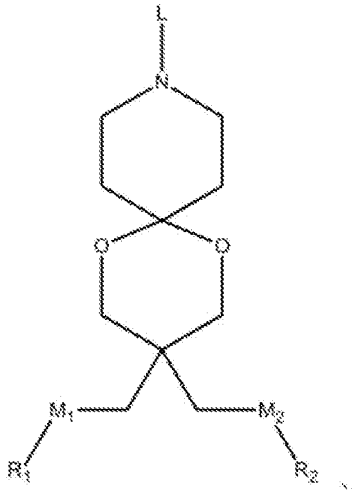
[請求項1] 一般式Ｉ：

[化1]



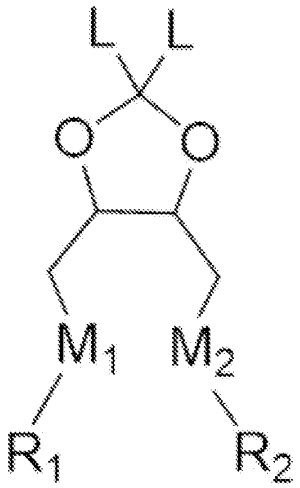
一般式ＩＩ：

[化2]



又は、一般式ＩＩＩ：

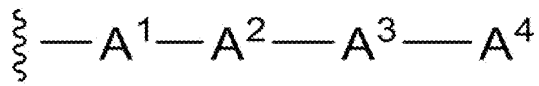
[化3]



〔式中、

Ｌは、独立して、Ｈ、直鎖のＣ$_{1-10}$アルキル又は分岐のＣ$_{3-10}$アルキル、あるいは、

[化4]



であり、Ａ^{1}は、Ｃ$_{1-6}$アルキレンまたはフェニレンであり、

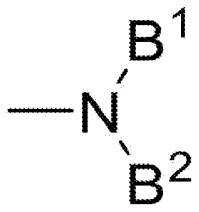
Ａ^{2}は、－ＯＣ（＝Ｏ）－、－ＯＣ（＝Ｏ）－Ｏ－もしくは－ＯＣ（＝Ｏ）－ＮＨ－であるか、または存在せず、

Ａ^{3}は、Ｃ$_{1-6}$アルキレンであるか、または存在せず、

Ａ^{4}は、4～15員の含窒素ヘテロシクリルであり、ここで前記含窒素ヘテロシクリルは、無置換であるか、または、 Ｃ$_{1-4}$アルキル、ヒドロキシおよびオキソからなる群から選択される少なくとも１つで置換されており、

あるいはＡ^{4}は、

[化5]

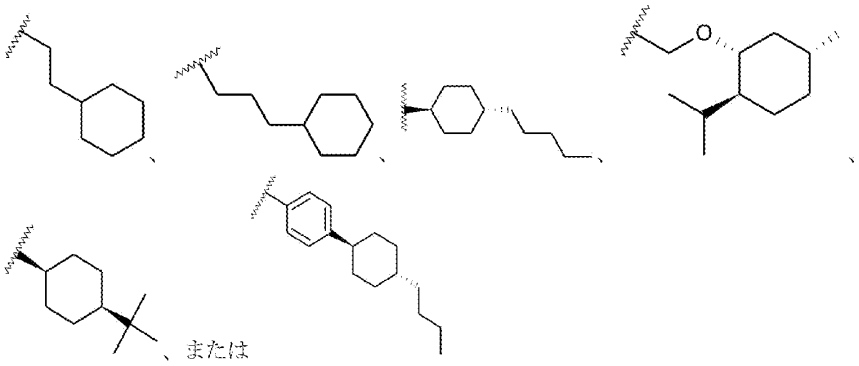


であり、ここでB^1およびB^2はそれぞれ独立して、C_{1-4}アルキル、ヒドロキシC_{1-4}アルキル、C_{1-4}アルコキシC_{1-4}アルキル、または４～６員のヘテロシクリルであり、ここで前記４～６員のヘテロシクリルは、無置換であるか、または、C_{1-4}アルキル、ヒドロキシおよびオキソからなる群から選択される少なくとも１つで置換されており、

M_1およびM_2は、独立して、－Ｏ－、－Ｏ－CH_2－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－CH_2－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－CH_2－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－CH_2－CH_2－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－CH_2－CH_2－CH_2－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－CH_2－CH_2－CH_2－CH_2－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｃ－Ｃ－Ｃ（Ｏ）－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－CH_2－CH_2－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－CH_2－CH_2－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－CH_2－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－CH_2－CH_2－Ｃ（Ｏ）－ＮＨ－、－Ｏ－CH_2－CH_2－CH_2－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－、－CH_2－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－CH_2－、－Ｃ－CH_2－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－、－Ｓ－Ｓ－CH_2－、または、－Ｓ－CH_2－Ｃ－Ｃ－Ｓ－Ｓ－CH_2－であり、

R_1およびR_2は、独立して、直鎖のC_{1-30}のアルキル、分岐のC_{3-30}アルキル、直鎖のC_{2-30}のアルケニル、分岐のC_{3-30}アルケニル、アダマンチル、ステロール基、

[化6]

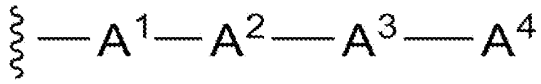


、または

であり、

ただし、一般式IおよびIIIにおいて、少なくとも一方のLは

[化7]



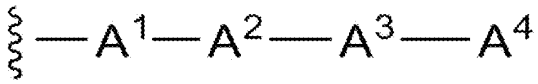
である〕

で表される化合物、その塩または立体異性体。

[請求項2] 化合物が一般式Ｉで表され、

一方のＬはＨであり、他方のＬは、

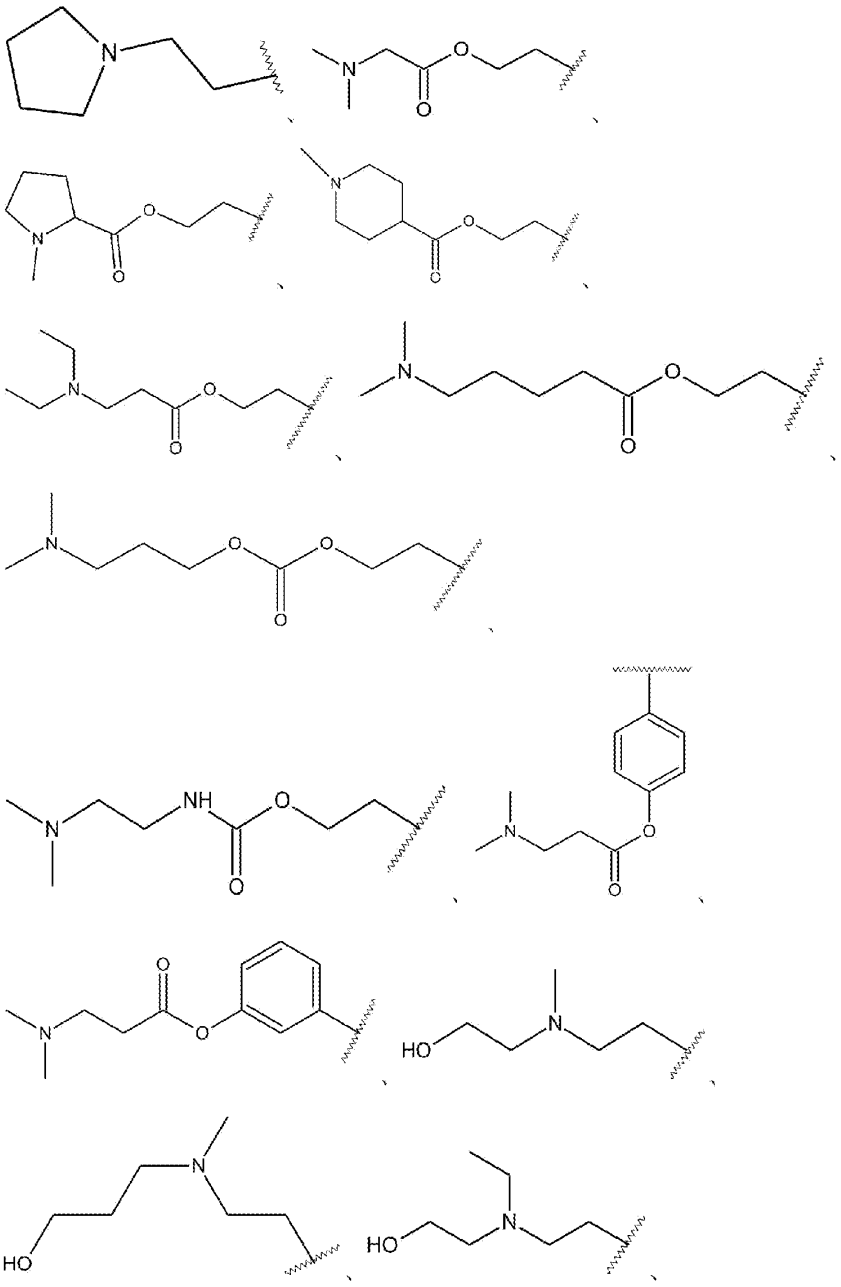
[化8]



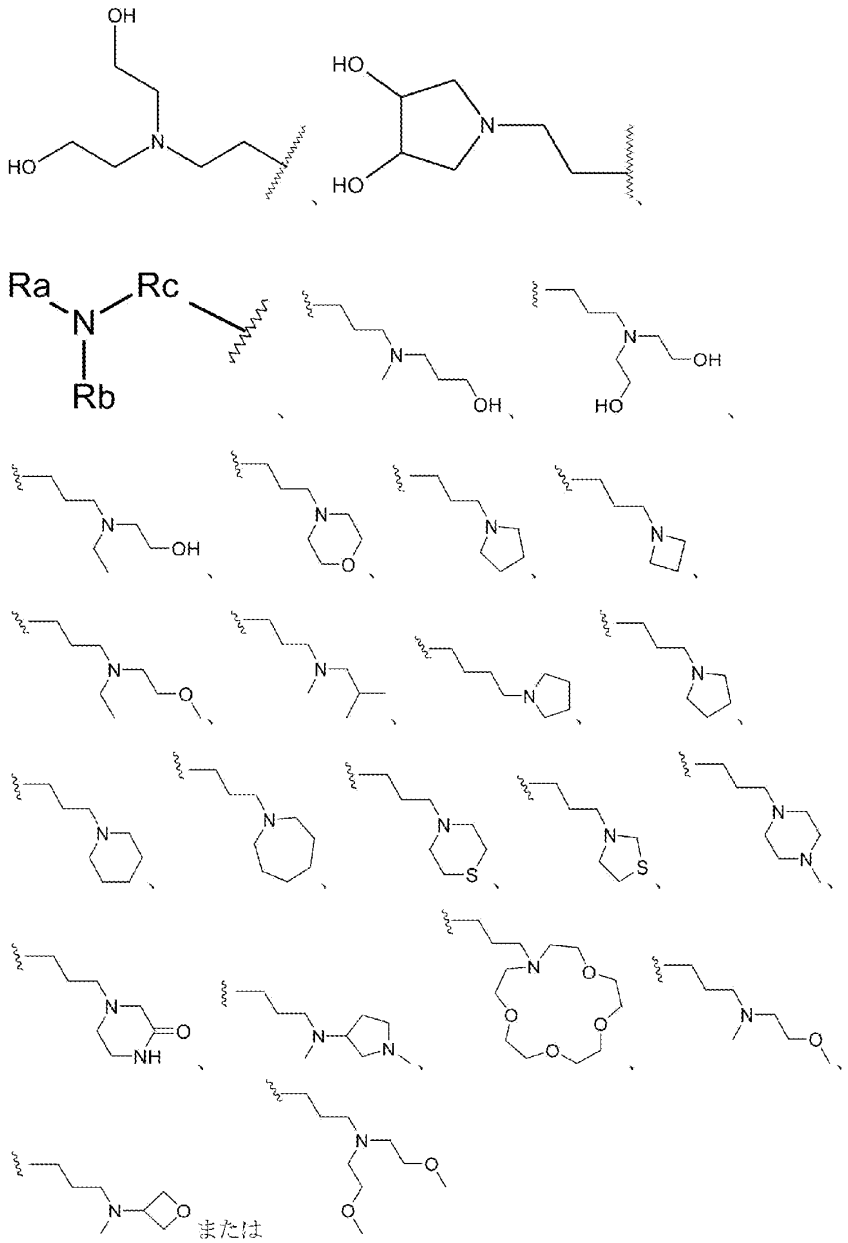
である、請求項１に記載の化合物、その塩または立体異性体。

[請求項3] 一方のＬはＨであり、他方のＬは、

[化9-1]



[化9-2]

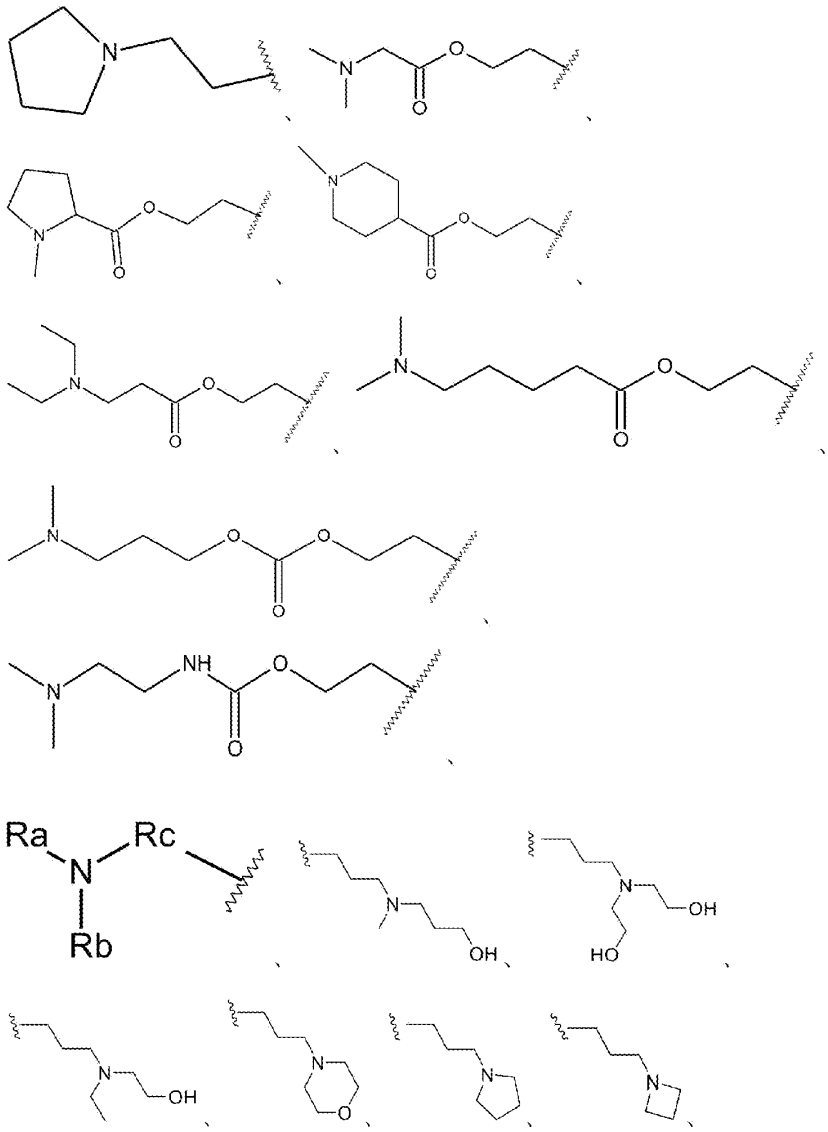


（式中、R_aおよびR_bは独立してメチル、エチル、n-プロピルまたはイソプロピルであり、R_cは直鎖のC_{1-6}アルキレンである）である、

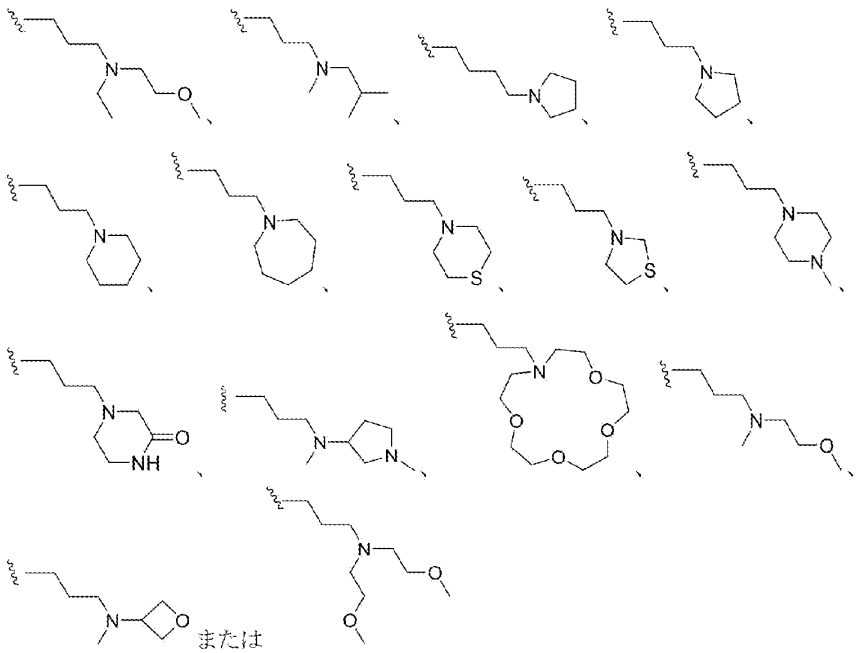
請求項２に記載の化合物、その塩または立体異性体。

[請求項4] 一方のＬはＨであり、他方のＬは、

[化10-1]



[化10-2]



（式中、R_aおよびR_bは独立してメチル、エチル、n-プロピルまたはイソプロピルであり、R_cは直鎖のC_{1-6}アルキレンである）である、

請求項３に記載の化合物、その塩または立体異性体。

[請求項5] M_1およびM_2は同一である、

請求項４に記載の化合物、その塩または立体異性体。

[請求項6] M_1およびM_2は、

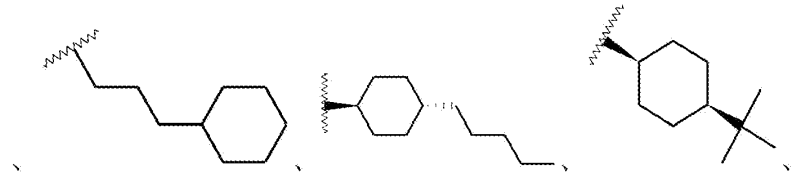
－Ｏ－、－Ｏ－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－または－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－である、

請求項５に記載の化合物、その塩または立体異性体。

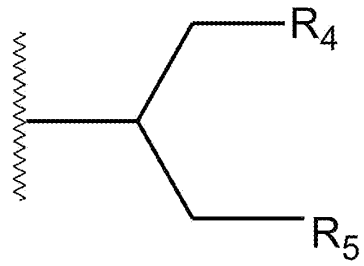
[請求項7] R_1およびR_2は、独立して、直鎖のC_{1-30}アルキル、直鎖のC_{2-30}

アルケニル、分岐のＣ$_{3-30}$アルケニル、アダマンチル、

[化11]



または、



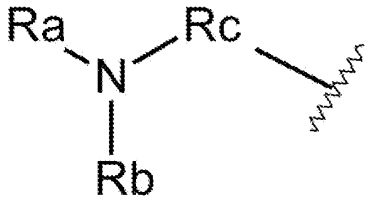
であり、

Ｒ$_4$およびＲ$_5$は、独立して直鎖のＣ$_{1-16}$アルキルである、

請求項６に記載の化合物、その塩または立体異性体。

[請求項8] 一方のＬはＨであり、他方のＬは、

[化12]



であり、

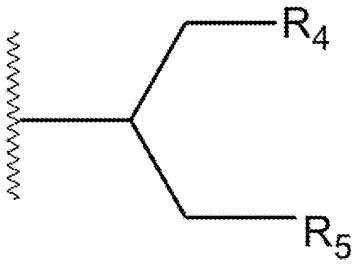
Ｒ$_a$およびＲ$_b$は独立してメチル、エチル、n-プロピルまたはイソプロピルであり、ただしＲ$_a$およびＲ$_b$の炭素数の合計が４以下であり、

Ｒ$_c$は直鎖のＣ$_{2-6}$アルキレンである、

請求項７に記載の化合物、その塩または立体異性体。

[請求項9] Ｒ$_1$およびＲ$_2$は、独立して

[化13]



であり、

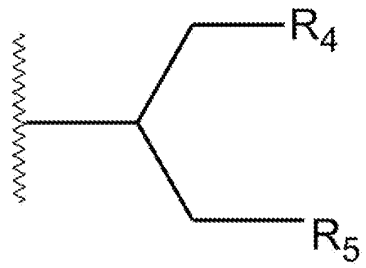
R_4およびR_5は、独立して直鎖のC_{1-11}アルキルであり、

ただしR_4およびR_5の炭素数の合計が１０～２２である、

請求項７に記載の化合物、その塩または立体異性体。

[請求項10] R_1およびR_2は、独立して

[化14]



であり、

R_4およびR_5は、独立して直鎖のC_{5-11}アルキルであり、

ただしR_4およびR_5の炭素数の差が０～３である、

請求項７に記載の化合物、その塩または立体異性体。

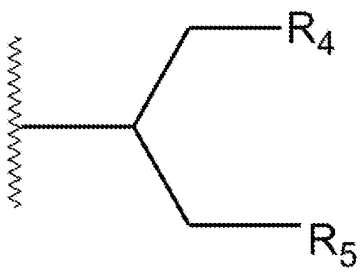
[請求項11] 化合物が一般式IIで表され、

Lは、直鎖のC_{1-5}アルキルであり、

M_1およびM_2は－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－であり、

R_1およびR_2は、同一であって、直鎖のC_{1-30}アルキル、直鎖のC_{2-30}アルケニル、または

[化15]



であり、

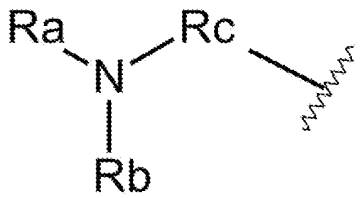
R_4およびR_5は、独立して直鎖のC_{1-16}アルキルである、

請求項１に記載の化合物、その塩または立体異性体。

[請求項12] 化合物が一般式IIIで表され、

一方のＬはＨであり、他方のＬは、

[化16]

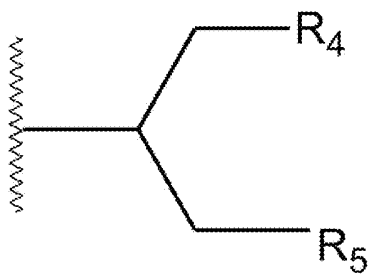


（式中、R_aおよびR_bは独立してメチル、エチル、n-プロピルまたはイソプロピルであり、R_cは直鎖のC_{1-6}アルキレンである）であり、

M_1およびM_2は－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－であり、

R_1およびR_2は、同一であって、直鎖のC_{1-30}アルキル、直鎖のC_{2-30}アルケニル、または

[化17]



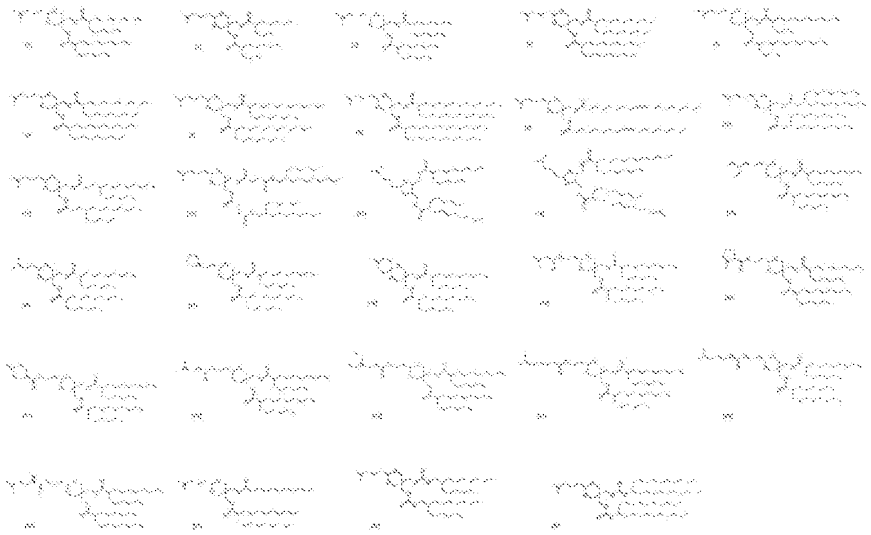
であり、

R_4およびR_5は、独立して直鎖のC_{1-16}アルキルである、

請求項１に記載の化合物、その塩または立体異性体。

[請求項13] 化合物が以下のいずれかで表される、請求項１に記載の化合物、その塩または立体異性体。

[化18-1]



[化18-2]



[請求項14] 請求項１に記載の化合物、その塩または立体異性体を含有する、脂質ナノ粒子。

[請求項15] さらに、ステロール及びポリアルキレングリコール修飾脂質を含有している、請求項１４に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項16] 核酸を含有する、請求項１４に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項17] 前記核酸が、ｍＲＮＡ又はｓｉＲＮＡである、請求項１６に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項18] 請求項１４に記載の脂質ナノ粒子を含む、医薬用組成物。

[請求項19] 遺伝子治療に用いられる、請求項１８に記載の医薬用組成物。

[請求項20] 請求項１４に記載の脂質ナノ粒子であって、細胞内で発現させる目的の外来遺伝子を封入した脂質ナノ粒子を、被験動物（但し、ヒトを除く）へ投与し、前記被験動物の細胞内で前記外来遺伝子を発現させる、外来遺伝子の発現方法。