

明 細 書

発明の名称： カチオン性脂質

技術分野

[0001] 本発明は、活性成分としての核酸を、多種類の細胞、組織または臓器に導入することを可能にするカチオン性脂質に関する。さらに本発明は、そのカチオン性脂質を含有する脂質粒子、およびその脂質粒子と核酸とを含有する組成物に関する。

[0002] [発明の背景]

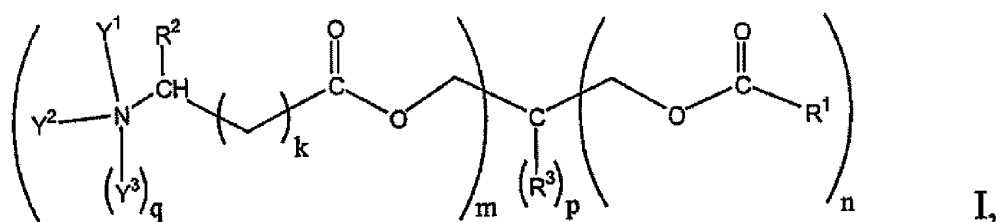
近年、活性成分として核酸を含有する核酸医薬の研究開発が盛んに行われている。例えば、*siRNA*、*miRNA*、*miRNA mimic*またはアンチセンス核酸などの核酸を含む、標的*mRNA*の分解作用や機能抑制作用を有する核酸医薬の研究が多数行われている。また、目的タンパク質をコードする*mRNA*等を含む、目的タンパク質を細胞内で発現させるための核酸医薬の研究も行われている。これらの研究開発に関連して、核酸を高効率で細胞、組織または臓器に導入するための技術が、薬物送達系（DDS）技術として開発されている。

[0003] 上記DDS技術としては、核酸と脂質とを混合し、複合体を形成したあと、上記複合体を介して核酸を細胞に取り込ませる技術が従来から知られている。上記複合体形成に使用される脂質としては、カチオン性脂質、親水性ポリマー脂質、ヘルパー脂質等が従来から知られている。上記カチオン性脂質としては、例えば次のような先行技術文献に記載された化合物が知られている。

[0004] 特許文献1には、下記式で表される化合物又はその塩などが記載されている。

[0005]

[化1]

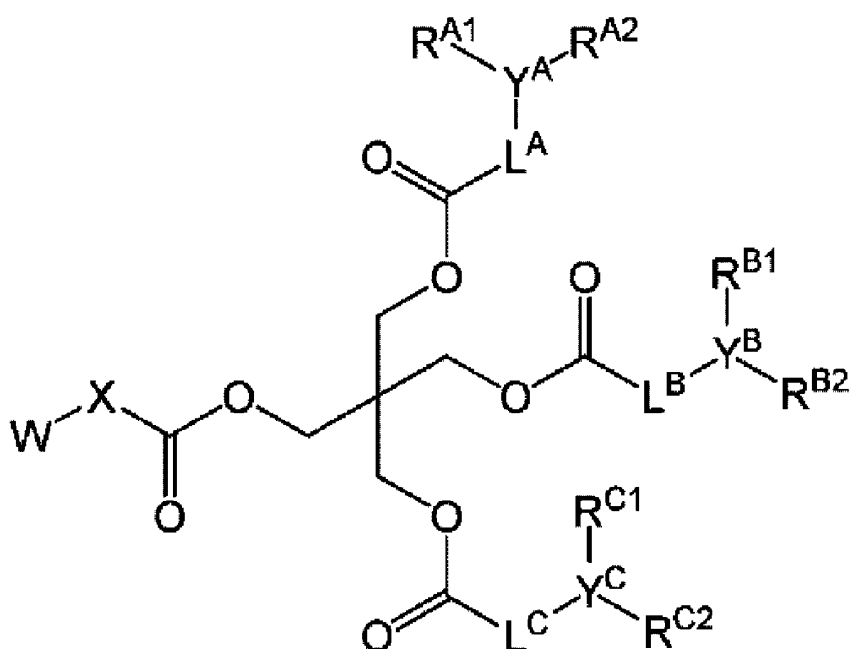


式中、 R^1 はそれぞれ独立して、置換されていてもよい $\text{C}_8 \sim \text{C}_{24}$ アルキルおよび置換されていてもよい $\text{C}_8 \sim \text{C}_{24}$ アルケニルからなる群より選ばれ； R^2 および R^3 はそれぞれ独立して、水素、置換されていてもよい $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、置換されていてもよいアリールアルキル等からなる群より選ばれ； Y^1 および Y^2 はそれぞれ独立して、水素、置換されていてもよい $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル、置換されていてもよいアリールアルキル等からなる群より選ばれ； Y^3 は、存在する場合は、それぞれ独立して、水素、置換されていてもよい $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、置換されていてもよいアリールアルキル等からなる群より選ばれ； m は1～4のいずれかの整数であり、 n は0～3のいずれかの整数であり、 p は0または1であり、 m 、 n および p の合計は4であり； k は1～5のいずれかの整数であり； q は0または1であることなどが規定されている。

[0006] 特許文献2には、下記式で表される化合物又はその塩などが記載されている。

[0007]

[化2]



式中、Wは式 $-NR^1R^2$ または式 $-N^+R^3R^4R^5(Z^-)$ を示し、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立して C_{1-4} アルキル基または水素原子を示し、 R^3 、 R^4 および R^5 はそれぞれ独立して C_{1-4} アルキル基を示し、 Z^- は陰イオンを示し、 X は置換されていてもよい C_{1-6} アルキレン基を示し、 Y^A 、 Y^B および Y^C はそれぞれ独立して置換されていてもよいメチン基を示し、 L^A 、 L^B および L^C はそれぞれ独立して置換されていてもよいメチレン基または結合手を示し、 R^{A1} 、 R^{A2} 、 R^{B1} 、 R^{B2} 、 R^{C1} および R^{C2} はそれぞれ独立して置換されていてもよい C_{4-10} アルキル基を示す。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：WO2003/102150号パンフレット

特許文献2：WO2016/021683号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 核酸を高い効率で細胞に導入することを可能とするカチオン性脂質は、薬効発現、安全性（低毒性）などの面で優れた、治療上優れた効果を有する核酸医薬の創出に貢献することが期待される。また、核酸を種々の細胞に導入することを可能とするカチオン性脂質は、種々の組織で生じる各種疾患に対する核酸医薬の創出を可能とすることが期待される。しかしながら、現状では、これらを十分に満足できるものは見出されていない。

[0010] 本発明の目的は、核酸を、優れた効率で細胞に導入することを可能にする技術およびこれに用いられるカチオン性脂質等を提供することにある。また、別の観点では、本発明の目的は、核酸を、種々の細胞に導入することを可能にする技術およびこれに用いられる化合物等を提供することにある。

課題を解決するための手段

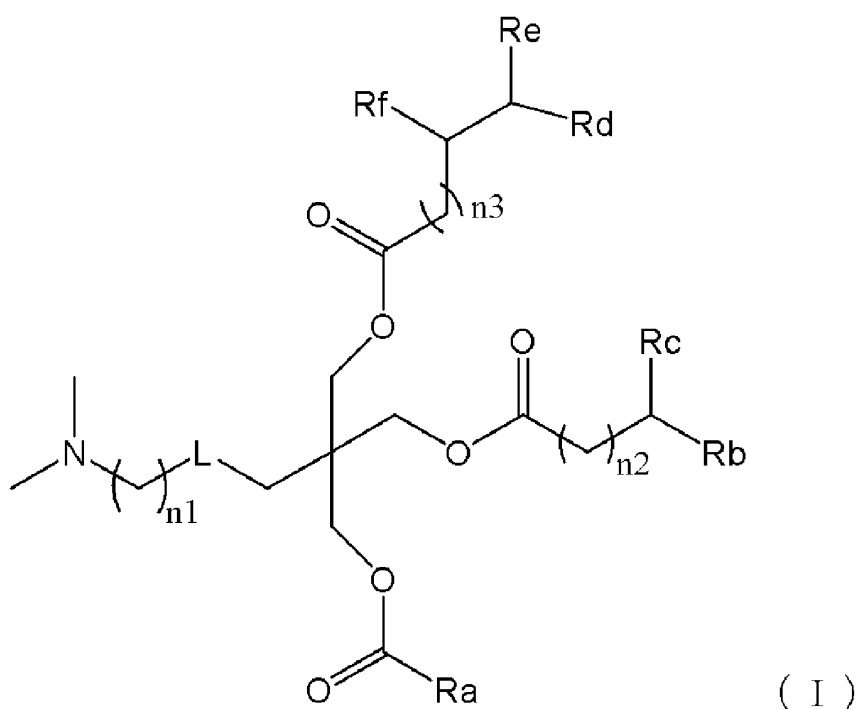
[0011] 本発明者らが上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、下記の式で示される化合物又はその塩を用いることにより上記課題を解決可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0012] すなわち、本発明は少なくとも以下の発明に関する。

[1]

式(1)：

[化3]



[式中、 n_1 は 2 ～ 6 の整数を、 n_2 は 0 ～ 2 の整数を、 n_3 は 0 ～ 2 の整数を、

L は、 $-C(O)O-$ または $-NHC(O)O-$ を、

R_a は、直鎖状 C_{5-13} アルキル基、直鎖状 C_{13-17} アルケニル基または直鎖状 C_{17} アルカジェニル基を、

R_b は、直鎖状 C_{2-9} アルキル基を、

R_c は、水素原子または直鎖状 C_{2-9} アルキル基を、

R_d は、水素原子または直鎖状 C_{2-9} アルキル基を、

R_e は、直鎖状 C_{2-9} アルキル基を、

R_f は、直鎖状 C_{2-9} アルキル基を示す。]

で表される化合物又はその塩。

[2]

3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジブチルノナノアート又はその塩。

[3]

2-(((4,5-ジブチルノナノイル)オキシ)メチル)-2-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイルジデカノアート又はその塩。

[4]

3-((6-(ジメチルアミノ)ヘキサノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジブチルノナノアート又はその塩。

[5]

3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジペンチルデカノアート又はその塩。

[6]

3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4-ヘプチルウンデカノアート又はその塩。

[7]

項1記載の化合物又はその塩を含有する脂質粒子。

[8]

核酸および項7記載の脂質粒子を含有する核酸導入用組成物。

[9]

核酸がRNAである、項8記載の組成物。

[10]

RNAがmRNAまたはsiRNAである、項9記載の組成物。

[0013] なお、本明細書において、「式(1)で表される化合物」を「化合物(1)」と記載することがある。また、「式(1)で表される化合物又はその塩」を「本発明の化合物」と呼ぶことがある。「式(1)で表される化合物又はその塩(本発明の化合物)を含有する脂質粒子」を「本発明の脂質粒子」と呼ぶことがある。「核酸および本発明の脂質粒子を含有する核酸導入用組成物」を「本発明の組成物」と呼ぶことがある。

発明の効果

[0014] 本発明により、核酸を、細胞、組織または臓器に対して優れた効率で導入することが可能となる。また、本発明により、核酸を、多種類の細胞、組織または臓器（例えば、癌細胞）に導入することが可能となる。本発明により、核酸を多種類の細胞、組織または臓器に導入する医薬または研究用試薬を得ることが可能となる。さらに、本発明により、核酸を細胞、組織または臓器に導入する場合、該核酸が有する活性（例えば、薬効）の発現効率が高い。

[0015] （発明の詳細な説明）

[0016] 以下、本明細書中で用いられる各置換基の定義について詳述する。特記しない限り各置換基は以下の定義を有する。

[0017] 本明細書中、「直鎖状 C_{5-13} アルキル基」としては、例えば、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デカニル、ウンデカニル、ドデカニル、トリデカニルが挙げられる。

[0018] 本明細書中、「直鎖状 C_{13-17} アルケニル基」としては、例えば、1-トリデセニル、2-トリデセニル、3-トリデセニル、4-トリデセニル、5-トリデセニル、6-トリデセニル、7-トリデセニル、8-トリデセニル、9-トリデセニル、10-トリデセニル、11-トリデセニル、12-トリデセニル；1-テトラデセニル、2-テトラデセニル、3-テトラデセニル、4-テトラデセニル、5-テトラデセニル、6-テトラデセニル、7-テトラデセニル、8-テトラデセニル、9-テトラデセニル、10-テトラデセニル、11-テトラデセニル、12-テトラデセニル、13-テトラデセニル；1-ペンタデセニル、2-ペンタデセニル、3-ペンタデセニル、4-ペンタデセニル、5-ペンタデセニル、6-ペンタデセニル、7-ペンタデセニル、8-ペンタデセニル、9-ペンタデセニル、10-ペンタデセニル、11-ペンタデセニル、12-ペンタデセニル、13-ペンタデセニル、14-ペンタデセニル；1-ヘキサデセニル、2-ヘキサデセニル、3-ヘキサデセニル、4-ヘキサデセニル、5-ヘキサデセニル、6-ヘキサデセニル、7-ヘキサデセニル、8-ヘキサデセニル、9-ヘキサデセニル、

10-ヘキサデセニル、11-ヘキサデセニル、12-ヘキサデセニル、13-ヘキサデセニル、14-ヘキサデセニル、15-ヘキサデセニル；1-ヘプタデセニル、2-ヘプタデセニル、3-ヘプタデセニル、4-ヘプタデセニル、5-ヘプタデセニル、6-ヘプタデセニル、7-ヘプタデセニル、8-ヘプタデセニル、9-ヘプタデセニル、10-ヘプタデセニル、11-ヘプタデセニル、12-ヘプタデセニル、13-ヘプタデセニル、14-ヘプタデセニル、15-ヘプタデセニル、16-ヘプタデセニルが挙げられる。これらの直鎖状 C_{13-17} アルケニル基は炭素-炭素二重結合を1つ含むためシス型およびトランス型の構造を取り得るが、どちらの構造であってもよい。

[0019] 本明細書中、「直鎖状 C_{17} アルカジエニル基」としては、例えば、1, 3-ヘプタデカジエニル、1, 4-ヘプタデカジエニル、1, 5-ヘプタデカジエニル、1, 6-ヘプタデカジエニル、1, 7-ヘプタデカジエニル、1, 8-ヘプタデカジエニル、1, 9-ヘプタデカジエニル、1, 10-ヘプタデカジエニル、1, 11-ヘプタデカジエニル、1, 12-ヘプタデカジエニル、1, 13-ヘプタデカジエニル、1, 14-ヘプタデカジエニル、1, 15-ヘプタデカジエニル、1, 16-ヘプタデカジエニル、2, 4-ヘプタデカジエニル、2, 5-ヘプタデカジエニル、2, 6-ヘプタデカジエニル、2, 7-ヘプタデカジエニル、2, 8-ヘプタデカジエニル、2, 9-ヘプタデカジエニル、2, 10-ヘプタデカジエニル、2, 11-ヘプタデカジエニル、2, 12-ヘプタデカジエニル、2, 13-ヘプタデカジエニル、2, 14-ヘプタデカジエニル、2, 15-ヘプタデカジエニル、2, 16-ヘプタデカジエニル、3, 5-ヘプタデカジエニル、3, 6-ヘプタデカジエニル、3, 7-ヘプタデカジエニル、3, 8-ヘプタデカジエニル、3, 9-ヘプタデカジエニル、3, 10-ヘプタデカジエニル、3, 11-ヘプタデカジエニル、3, 12-ヘプタデカジエニル、3, 13-ヘプタデカジエニル、3, 14-ヘプタデカジエニル、3, 15-ヘプタデカジエニル、3, 16-ヘプタデカジエニル、4, 6-ヘプタデカジエニル、

4, 7-ヘプタデカジエニル、4, 8-ヘプタデカジエニル、4, 9-ヘプ
タデカジエニル、4, 10-ヘプタデカジエニル、4, 11-ヘプタデカジ
エニル、4, 12-ヘプタデカジエニル、4, 13-ヘプタデカジエニル、
4, 14-ヘプタデカジエニル、4, 15-ヘプタデカジエニル、4, 16
-ヘプタデカジエニル、5, 7-ヘプタデカジエニル、5, 8-ヘプタデカ
ジエニル、5, 9-ヘプタデカジエニル、5, 10-ヘプタデカジエニル、
5, 11-ヘプタデカジエニル、5, 12-ヘプタデカジエニル、5, 13
-ヘプタデカジエニル、5, 14-ヘプタデカジエニル、5, 15-ヘプタ
デカジエニル、5, 16-ヘプタデカジエニル、6, 8-ヘプタデカジエニ
ル、6, 9-ヘプタデカジエニル、6, 10-ヘプタデカジエニル、6, 1
1-ヘプタデカジエニル、6, 12-ヘプタデカジエニル、6, 13-ヘプ
タデカジエニル、6, 14-ヘプタデカジエニル、6, 15-ヘプタデカジ
エニル、6, 16-ヘプタデカジエニル、7, 9-ヘプタデカジエニル、7
, 10-ヘプタデカジエニル、7, 11-ヘプタデカジエニル、7, 12-
ヘプタデカジエニル、7, 13-ヘプタデカジエニル、7, 14-ヘプタデ
カジエニル、7, 15-ヘプタデカジエニル、7, 16-ヘプタデカジエニ
ル、8, 10-ヘプタデカジエニル、8, 11-ヘプタデカジエニル、8,
12-ヘプタデカジエニル、8, 13-ヘプタデカジエニル、8, 14-ヘ
プタデカジエニル、8, 15-ヘプタデカジエニル、8, 16-ヘプタデカ
ジエニル、9, 11-ヘプタデカジエニル、9, 12-ヘプタデカジエニル
、9, 13-ヘプタデカジエニル、9, 14-ヘプタデカジエニル、9, 1
5-ヘプタデカジエニル、9, 16-ヘプタデカジエニル、10, 12-ヘ
プタデカジエニル、10, 13-ヘプタデカジエニル、10, 14-ヘプタ
デカジエニル、10, 15-ヘプタデカジエニル、10, 16-ヘプタデカ
ジエニル、11, 13-ヘプタデカジエニル、11, 14-ヘプタデカジエ
ニル、11, 15-ヘプタデカジエニル、11, 16-ヘプタデカジエニル
、12, 14-ヘプタデカジエニル、12, 15-ヘプタデカジエニル、1
2, 16-ヘプタデカジエニル、13, 15-ヘプタデカジエニル、13,

16-ヘプタデカジエニル、14, 16-ヘプタデカジエニルが挙げられる。これらの直鎖状 C_{11} アルカジエニル基は炭素-炭素二重結合を2つ含むため、それぞれにおいて互いに独立してシス型およびトランス型の構造を取り得るが、それぞれどちらの構造であってもよい。

[0020] 本明細書中、「直鎖状 C_{2-9} アルキル基」としては、例えば、エチル、ブチル、プロピル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニルが挙げられる。

[0021] 式(1)における n_1 、 n_2 、 n_3 、 L 、 R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_e 、および R_f の各々の好ましい例は次の通りである。

n_1 は、好ましくは3~5の整数である。

n_2 は、好ましくは0~2の整数である。

n_3 は、好ましくは0~2の整数である。

L は、好ましくは $-C(O)O-$ である。

R_a は、好ましくは直鎖状 C_{5-9} アルキル基、直鎖状 C_{13-17} アルケニル基または直鎖状 C_{17} アルカジエニル基である。

R_b は、好ましくは直鎖状 C_{4-8} アルキル基である。

R_c は、好ましくは水素原子または直鎖状 C_{4-7} アルキル基である。

R_d は、好ましくは水素原子または直鎖状 C_{3-6} アルキル基である。

R_e は、好ましくは直鎖状 C_{3-6} アルキル基である。

R_f は、好ましくは直鎖状 C_{3-7} アルキル基である。

[0022] 化合物(1)の好適な具体例は次の通りである。

化合物(1-A)： n_1 が3~5の整数であり、 n_2 が0であり、 n_3 が0~2の整数であり、 L が $-C(O)O-$ であり、 R_a が直鎖状 C_{5-9} アルキル基であり、 R_b が直鎖状 C_{4-8} アルキル基であり、 R_c が水素原子であり、 R_d が水素原子であり、 R_e が直鎖状 C_{3-6} アルキル基であり、 R_f が直鎖状 C_{3-7} アルキル基である化合物。

化合物(1-B)： n_1 が3~5の整数であり、 n_2 が0または1であり、 n_3 が0または1であり、 L が $-C(O)O-$ であり、 R_a が直鎖状 C_{5-9}

アルキル基であり、R bが直鎖状C₄₋₈アルキル基であり、R cが直鎖状C₅₋₇アルキル基であり、R dが水素原子であり、R eが直鎖状C₃₋₆アルキル基であり、R fが直鎖状C₃₋₇アルキル基である化合物。

化合物 (I-C) : n₁ が3～5の整数であり、n₂ が0または1であり、n₃ が0～2の整数であり、L が-C (O) O-であり、R aが直鎖状C₅₋₉アルキル基であり、R bが直鎖状C₄₋₈アルキル基であり、R cが水素原子であり、R dが直鎖状C₃₋₆アルキル基であり、R eが直鎖状C₃₋₆アルキル基であり、R fが直鎖状C₃₋₇アルキル基である化合物。

化合物 (I-D) : n₁ が3～5の整数であり、n₂ が0または1であり、n₃ が0～2の整数であり、L が-C (O) O-であり、R aが、直鎖状C₁₃₋₁₇アルケニル基または直鎖状C₁₇アルカジエニル基であり、R bが直鎖状C₃₋₆アルキル基であり、R cが直鎖状C₃₋₆アルキル基であり、R dが水素原子であり、R eが直鎖状C₂₋₆アルキル基であり、R fが直鎖状C₂₋₇アルキル基である化合物。

[0023] 化合物 (I) のより好適な具体例は次の通りである。

化合物 (a) : n₁ が3または4であり、n₂ が0であり、n₃ が0または2であり、L が-C (O) O-であり、R aが直鎖状C₇アルキル基であり、R bが直鎖状C₆アルキル基であり、R cが水素原子であり、R dが水素原子であり、R eが直鎖状C₅₋₆アルキル基であり、R fが直鎖状C₆₋₇アルキル基である化合物。

化合物 (b) : n₁ が3～5の整数であり、n₂ が0または1であり、n₃ が0または1であり、L が-C (O) O-であり、R aが直鎖状C₆₋₇アルキル基であり、R bが直鎖状C₅₋₆アルキル基であり、R cが直鎖状C₅₋₆アルキル基であり、R dが水素原子であり、R eが直鎖状C₄₋₅アルキル基であり、R fが直鎖状C₅₋₆アルキル基である化合物。

化合物 (c) : n₁ が3～5の整数であり、n₂ が0であり、n₃ が2であり、L が-C (O) O-であり、R aが直鎖状C₅₋₉アルキル基であり、R bが直鎖状C₄₋₈アルキル基であり、R cが水素原子であり、R dが直鎖状C₃₋

₅アルキル基であり、R_eが直鎖状C₃₋₅アルキル基であり、R_fが直鎖状C₃₋₅アルキル基である化合物。

化合物 (d) : n₁ が 3 ~ 5 の整数であり、n₂ が 0 または 1 であり、n₃ が 0 ~ 2 の整数であり、L が -C(O)-O- であり、R_a が、直鎖状C₁₃₋₁₇アルケニル基または直鎖状C₁₇アルカジエニル基であり、R_b が直鎖状C₃₋₅アルキル基であり、R_c が直鎖状C₃₋₅アルキル基であり、R_d が水素原子であり、R_e が直鎖状C₃₋₆アルキル基であり、R_f が直鎖状C₃₋₇アルキル基である化合物。

[0024] 化合物 (1) の特に好適な具体例は次の通りである :

3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジブチルノナノアート ;

2-(((4,5-ジブチルノナノイル)オキシ)メチル)-2-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル ジデカノアート ;

3-((6-(ジメチルアミノ)ヘキサノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジブチルノナノアート ;

3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジペンチルデカノアート ;

3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4-ヘプチルウンデカノアート。

[0025] 化合物 (1) の塩としては、薬理学的に許容される塩が好ましく、例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩が挙げられる。

[0026] 無機塩基との塩の好適な例としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩 ; カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩 ; アルミニウム塩、アンモニウム塩が挙げられる。好ましくは、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩であり、より好ましくは、ナトリウム塩、カリウム塩である。

[0027] 有機塩基との塩の好適な例としては、トリメチルアミン、トリエチルアミ

ン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン [トリス (ヒドロキシメチル) メチルアミン]、tert-ブチルアミン、シクロヘキシルアミン、ベンジルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N-ジベンジリエチレンジアミンとの塩が挙げられる。

[0028] 無機酸との塩の好適な例としては、フッ化水素酸、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸との塩が挙げられる。好ましくは、塩酸との塩、リン酸との塩である。

[0029] 有機酸との塩の好適な例としては、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸との塩が挙げられる。

[0030] 塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、アルギニン、リジン、オルニチンとの塩が挙げられる。

[0031] 酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、アスパラギン酸、グルタミン酸との塩が挙げられる。

[0032] 本発明において、本発明の化合物はカチオン性脂質として使用することができる。カチオン性脂質は、溶媒または分散媒中において、複数の分子と共に複合体を形成しうる。上記複合体には本発明の化合物に加えて、他の成分が含まれていてもよい。上記他の成分の例としては、他の脂質成分および核酸が挙げられる。

[0033] 上記他の脂質成分としては、脂質粒子を構成することのできる構造脂質が挙げられる。そのような構造脂質としては、例えば、

ステロール類（例えば、コレステロール、コレステロールエステル、コレステロールヘミコハク酸など）；

リン脂質（例えば、ホスファチジルコリン（例えば、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、リソホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジリノレノ

イルホスファチジルコリン、MC-1010 (NOF CORPORATION)、MC-2020 (NOF CORPORATION)、MC-4040 (NOF CORPORATION)、MC-6060 (NOF CORPORATION)、MC-8080 (NOF CORPORATION) など)、ホスファチジルセリン (例えば、ジパルミトイルホスファチジルセリン、ジステアロイルホスファチジルセリン、ジオレオイルホスファチジルセリン、パルミトイルオレオイルホスファチジルセリンなど)、ホスファチジルエタノールアミン (例えば、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン、リソホスファチジルエタノールアミンなど)、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸など) ; および

ポリエチレングリコール脂質 (PEG脂質) (例えば、PEG-DAA、PEG-DAG、PEG-phospholipid conjugate、PEG-Cer、PEG-cholesterol、PEG-C-DOMG、2KPEG-CMG、GM-020 (NOF CORPORATION)、GS-020 (NOF CORPORATION)、GS-050 (NOF CORPORATION) など)

からなる群より選ばれる少なくとも1種を用いることができる。本発明では、構造脂質として、ステロール類 (特に、コレステロール)、リン脂質 (特に、ホスファチジルコリン) およびポリエチレングリコール脂質の3種全てを用いることが好ましい。

[0034] 本発明の脂質粒子を形成する混合脂質成分における、本発明の化合物と構造脂質との割合は、目的や用途に応じて適宜調節することができる。例えば、本発明の化合物1モルに対して、構造脂質は通常0.008~4モルの割合であり、好ましくは0.4~1.5モルの割合である。また、別の規定の仕方をすれば、混合脂質成分中、本発明の化合物は通常1~4モル、ステロール類は通常0~3モル、リン脂質は通常0~2モル、ポリエチレングリコ

ール脂質は通常 0 ～ 1 モルの比率である。本発明の化合物と他の脂質成分とを混合して用いる場合のより好ましい態様は、本発明の化合物 1 ～ 1.5 モル、ステロール類 0 ～ 1.25 モル、リン脂質 0 ～ 0.5 モルおよびポリエチレングリコール脂質 0 ～ 0.125 モルの比率である。

[0035] 本発明の化合物は、本発明の脂質粒子を製造するために使用することができる。本発明の脂質粒子は、上記複合体のうち、核酸を含まない複合体を意味する。本発明の脂質粒子の形状は特に限定されず、例えば、本発明の化合物などが球形を構成するように集合した複合体、特定の形状を構成せずに集合した複合体、溶媒に溶解した複合体、分散媒中に均一もしくは不均一に分散した複合体などを含む。

[0036] 本発明の脂質粒子（例えば、本発明の化合物およびそれ以外の構造脂質によって構成される脂質粒子）は、例えば、当該脂質粒子と、核酸（特に、医薬的用途または研究目的用途に有用な物質である核酸）とを含有する本発明の組成物を製造するために使用することができる。本発明の組成物は、医薬または試薬として用いることができる。本発明の組成物においては、なるべく多くの割合の核酸が脂質粒子に内封されている（つまり内封率が高い）ことが好ましい。

[0037] 「核酸」とは、ヌクレオチドおよび該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子が重合した分子であればいかなるものでもよく、例えば、リボヌクレオチドの重合体である RNA、デオキシリボヌクレオチドの重合体である DNA、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドが混合した重合体、および、ヌクレオチド類似体を含むヌクレオチド重合体を挙げることができ、さらに、核酸誘導体を含むヌクレオチド重合体であってもよい。また、核酸は、一本鎖核酸または二本鎖核酸であってもよい。また二本鎖核酸には、一方の鎖に対し、他方の鎖がストリンジントな条件でハイブリダイズする二本鎖核酸も含まれる。

[0038] ヌクレオチド類似体としては、RNA または DNA と比較して、ヌクレアーゼ耐性の向上または、安定化させるため、相補鎖核酸とのアフィニティー

を上げるため、あるいは細胞透過性を上げるため、あるいは可視化させるために、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、RNAまたはDNAに修飾を施した分子であればいかなる分子でもよい。ヌクレオチド類似体としては、天然に存在する分子でも非天然の分子でもよく、例えば、糖部修飾ヌクレオチド類似体やリン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチド類似体等が挙げられる。

[0039] 糖部修飾ヌクレオチド類似体としては、ヌクレオチドの糖の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の化学構造物質を付加あるいは置換したものであればいかなるものでもよく、その具体例としては、2'-O-メチルリボースで置換されたヌクレオチド類似体、2'-O-プロピルリボースで置換されたヌクレオチド類似体、2'-メトキシエトキシリボースで置換されたヌクレオチド類似体、2'-O-メトキシエチルリボースで置換されたヌクレオチド類似体、2'-O-[2-(グアニジウム)エチル]リボースで置換されたヌクレオチド類似体、2'-フルオロリボースで置換されたヌクレオチド類似体、糖部をモルフォリノ環に置換した核酸類縁体（モルフォリノ核酸）、糖部に架橋構造を導入することにより2つの環状構造を有する架橋構造型人工核酸（Bridged Nucleic Acid）（BNA）、より具体的には、2'位の酸素原子と4'位の炭素原子がメチレンを介して架橋したロックド人工核酸（Locked Nucleic Acid）（LNA）、およびエチレン架橋構造型人工核酸（Ethylene bridged nucleic acid）（ENA）[Nucleic Acid Research, 32, e175(2004)]、2'位の炭素原子と4'位の炭素原子がアミド結合を介して架橋したアミド架橋構造型人工核酸（Amide - Bridged Nucleic Acids）（AmNA）が挙げられ、さらにペプチド核酸（PNA）[Acc. Chem. Res., 32, 624(1999)]、オキシペプチド核酸（OPNA）[J. Am. Chem. Soc., 123, 4653 (2001)]、およびペプチドリボ核酸（PRNA）[J. Am. Chem. Soc., 122, 6900 (2000)]等を挙げることができる。

[0040] リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチド類似体としては、ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の化学物

質を付加あるいは置換したものであればいかなるものでもよく、その具体例としては、ホスホロチオエート結合に置換されたヌクレオチド類似体、N 3' - P 5' ホスホアミデート結合に置換されたヌクレオチド類似体等を挙げることができる〔細胞工学, 16, 1463-1473 (1997)〕〔RNAi法とアンチセンス法、講談社(2005)〕。

[0041] 核酸誘導体としては、核酸に比べ、ヌクレアーゼ耐性を向上させるため、安定化させるため、相補鎖核酸とのアフィニティーを上げるため、細胞透過性を上げるため、あるいは可視化させるために、該核酸に別の化学物質を付加した分子であればいかなる分子でもよく、その具体例としては、5' - ポリアミン付加誘導体、コレステロール付加誘導体、ステロイド付加誘導体、胆汁酸付加誘導体、ビタミン付加誘導体、Cy 5 付加誘導体、Cy 3 付加誘導体、6 - F A M 付加誘導体、およびビオチン付加誘導体等を挙げることができる。

[0042] 本発明における核酸としては、特に限定されず、例えば、疾患、症状、障害、または病的状態の改善、および、疾患、症状、障害または病態の軽減またはその発症の予防など（本明細書において、「疾患の治療等」と称することがある）を目的とした核酸であってもよく、疾患の治療等には寄与しないものの研究用として有用な所望のタンパク質の発現を調節するための核酸であってもよい。

[0043] 疾患に関連する遺伝子もしくはポリヌクレオチド（本明細書中、「疾患関連遺伝子」と称することがある）の情報は、例えば、McKusick - Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.) およびNational Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.) などから入手可能である。

[0044] 本発明における核酸の具体例としては、例えばs i R N A、m i R N A、

miRNA mimic、アンチセンス核酸、リボザイム、mRNA、デコイ核酸、アプタマーが挙げられる。核酸としては、siRNA、mRNAなどのRNAまたはこれらに人工的な修飾が施された類似体もしくは誘導体が好ましい。

[0045] 本発明において、「siRNA」とは、10～30塩基、好ましくは15～25塩基の二本鎖RNAまたはその類縁体であって、相補的配列を含むものを意味する。siRNAは、好ましくは、3'末端に1～3塩基、より好ましくは2塩基の突出塩基を有する。相補的配列部分は、完全に相補的であってもよく、または相補的でない塩基を含んでいてもよいが、好ましくは完全に相補的である。

[0046] 本発明におけるsiRNAは特に限定されず、例えば、疾患関連遺伝子に対して遺伝子発現をノックダウンするためのsiRNAを用いることができる。疾患関連遺伝子は、非疾患対照の組織または細胞と比較して患部組織に由来する細胞中で異常なレベルにおいてまたは異常な形態で転写または翻訳産物を生じさせている任意の遺伝子またはポリヌクレオチドを指す。また、本発明におけるsiRNAとしては、研究用に有用な所望のタンパク質の発現を調節するためのsiRNAを用いることもできる。

[0047] 本発明において、「mRNA」とは、タンパク質に翻訳可能な塩基配列を含むRNAを意味する。本発明におけるmRNAとしては、細胞内で所望のタンパク質を発現させることができるmRNAであれば、特に限定されない。上記mRNAとしては、医薬的用途（例えば、疾患治療用途）および／または研究目的用途に有用であるmRNAが好ましく、そのようなmRNAとしては、例えば、ルシフェラーゼのようなマーカータンパク質を細胞内で発現させるためのmRNAが挙げられる。

[0048] 上記の疾患としては、特に限定されず、例えば、以下に記載の疾患が挙げられる。「()」内は、具体的な疾患例を記載する場合を除き、疾患関連遺伝子の例を示す。本発明における核酸としては、これらの疾患関連遺伝子（または、それらがコードするたんぱく質）の発現量を調節する核酸も挙げら

れる。

(1) 血液系疾患〔貧血 (CDAN1、CDA1、RPS19、DBA、PKLR、PK1、NT5C3、UMPH1、PSN1、RHAG、RH50A、NRAMP2、SPTB、ALAS2、ANH1、ASB、ABCB7、ABC7、ASAT)、不全リンパ球症候群 (TAPBP、TPSN、TAP2、ABCB3、PSF2、RING11、MHC2TA、C2TA、RFX5)、出血性疾患 (TBXA2R、P2RX1、P2X1)、H因子およびH因子様1因子欠損症 (HF1、CFH、HUS)、V因子およびV因子欠損症 (MCFD2)、V因子欠損症 (F7)、X因子欠損症 (F10)、XI因子欠損症 (F11)、XII因子欠損症 (F12、HAF)、XIII因子欠損症 (F13A1、F13A)、XIII因子欠損症 (F13B)、ファンコニ貧血 (FANCA、FACA、FA1、FAA、FAAP95、FAAP90、FLJ34064、FANCB、FANCC、FACC、BRCA2、FANCD1、FANCD2、FANCD、FACD、FAD、FACE、FACE、FANCF、XRCC9、FANCG、BRIP1、BACH1、FANCI、PHF9、FANCL、FANCM、KIAA1596)、血球貪食性リンパ組織球症 (PRF1、HPLH2、UNC13D、MUNC13-4、HPLH3、HLH3、FHL3)、血友病A (F8、F8C、HEMA)、血友病B (F9、HEMB)、出血性障害 (PI、ATT、F5)、白血球欠損 (ITGB2、CD18、LCAMB、LAD、EIF2B1、EIF2BA、EIF2B2、EIF2B3、EIF2B5、LVWM、CACH、CLE、EIF2B4)、鎌状赤血球貧血 (HBB)、サラセミア (HBA2、HBB、HBD、LCRB、HBA1) など〕；

(2) 炎症性・免疫性疾患〔AIDS (KIR3DL1、NKAT3、NK1、AMB11、KIR3DS1、IFNG、CXCL12、SDF1)、自己免疫リンパ球増殖性症候群 (TNFRSF6、APT1、FAS、CD95、ALPS1A)、複合型免疫不全症 (IL2RG、SCIDX1、

SCIDX、IMD4)、HIV感染症(CCL5、SCYA5、D17S135E、TCP228、IL10、CSIF、CMKBR2、CCR2、DMKBR5、CCCKR5、CCR5)、免疫不全症(CD3E、CD3G、AICDA、AID、HIGM2、TNFRSF5、CD40、UNG、DGU、HIGM4、TNFSF5、CD40LG、HIGM1、IGM、FOXP3、IPEX、AIIID、XPID、PIDX、TNFRSF14B、TACI)、炎症(IL10、IL-1、IL-13、IL-17、IL-23、CTLA4)、重症複合型免疫不全症(JAK3、JAKL、DCLRE1C、ATREMIS、SCIDA、RAG1、RAG2、ADA、PTPRC、CD45、LCA、IL7R、CD3D、T3D、IL2RG、SCIDX1、SCIDX、IMD4)、関節リウマチ、乾癬、炎症性腸疾患(例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎等)、シェーグレン症候群、ベーチェット病、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、円板状紅斑性狼瘡、キャッスルマン病、強直性脊椎炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、結節性多発性動脈炎、混合性結合性組織症、強皮症、深在性紅斑性狼瘡、慢性甲状腺炎、グレーブス病、自己免疫性胃炎、I型およびII型糖尿病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性好中球減少症、血小板減少症、アトピー性皮膚炎、慢性活動性肝炎、重症筋無力症、移植片対宿主疾患、アジソン病、異常免疫応答、関節炎、皮膚炎、放射線皮膚炎、原発性胆汁性肝硬変など];

(3) 代謝・肝臓・腎臓疾患〔アミロイドニューロパシー(TTR、PALB)、アミロイドーシス(APOA1、APP、AAA、CVAP、AD1、GSN、FGA、LYZ、TTR、PALB)、非アルコール性脂肪肝炎および肝線維症(COL1A1)、肝硬変(KRT18、KRT8、CIRH1A、NAIC、TEX292、KIAA1988)、嚢胞性線維症(CFTR、ABCC7、CF、MRP7)、グリコーゲン蓄積症(SLC2A2、GLUT2、G6PC、G6PT、G6PT1、GAA、LAMP2、LAMPB、AGL、GDE、GBE1、GYS2、PYGL、PFKM)

、肝細胞腺腫（TCF1、HFN1A、MODY3、）、肝不全（SCOD1、SCO1）、肝性リパーゼ欠損症（LIPC）、肝芽腫（CTNNB1、PDFGRL、PDGRL、PRLTS、AXIN1、AXIN、TP53、P53、LFS1、IGF2R、MPRI、MET、CASP8、MCH5）、髄質嚢胞腎疾患（UMOD、HNFJ、FJHN、MCKD2、ADMCKD2）、フェニルケトン尿症（PAH、PKU1、QDPR、DHPR、PTS）、多嚢胞性腎および肝疾患（FCYT、PKHD1、APRKD、PDK1、PDK2、PDK4、PDKTS、PRKCSH、G19P1、PCLD、SEC63）など〕；

（4）神経系疾患〔ALS（SOD1、ALS2、STEX、FUS、TARDBP、VEGF）、アルツハイマー病（APP、AAA、CVAP、AD1、APOE、AD2、PSEN2、AD4、STM2、APBB2、FE65L1、NOS3、PLAU、URK、ACE、DCP1、ACE1、MPO、PACIP1、PAXIP1L、PTIP、A2M、BLMH、BMH、PSEN1、AD3）、自閉症（BZRAP1、MDGA2、GLO1、MECP2、RTT、PPMX、MRX16、MRX79、NLGN3、NLGN4、KIAA1260、AUTSX2）、脆弱性X症候群（FMR2、FXR1、FXR2、mGLUR5）、ハンチントン病（HD、IT15、PRNP、PRIP、JPH3、JP3、HDL2、TBP、SCA17）、パーキンソン病（NR4A2、NURR1、NOT、TINUR、SNCAIP、TBP、SCA17、SNCA、NACP、PARK1、PARK4、DJ1、DBH、NDUFV2）、レット症候群（MECP2、RTT、PPMX、MRX16、MRX79、CDKL5、STK9）、統合失調症（GSK3、5-HTT、COMT、DRD、SLC6A3、DAOA、DTNBP1）、セクレターゼ関連障害（APH-1）など〕；

（5）眼疾患〔加齢黄斑変性症（Abcr、Ccl2、cp、Timp3、カテプシンD、Vldlr、Ccr2）、白内障（CRYAA、CRYA1、CRYBB2、CRYB2、PITX3、BFSP2、CP49、CP4

7、PAX6、AN2、MGDA、CRYBA1、CRYB1、CRYGC、CRYG3、CCL、LIM2、MP19、CRYGD、CRYG4、BSFP2、CP49、CP47、HSF4、CTM、MIP、AQPO、CRYAB、CRYA2、CTPP2、CRYBB1、CRYGD、CRYG4、CRYA1、GJA8、CX50、CAE1、GJA3、CX46、CZP3、CAE3、CCM1、CAM、KRIT1)、角膜混濁(APOA1、TGFB1、CSD2、CDGG1、CSD、BIGH3、CDG2、TASTD2、TROP2、MIS1、VSX1、RINX、PPCD、PPD、KTCN、COL8A2、FECD、PPCD2、PIP5K3、CFD)、先天性遺伝性扁平角膜(KERA、CNA2)、緑内障(MYOC、TIGR、GLC1A、JOAG、GPOA、OPTN、GLC1E、FIP2、HYPL、NRP、CYP1B1、GLC3A、OPA1、NTG、NPG、CYP1B1、GLC3A)、レーバー先天性黒内障(CRB1、RP12、CRX、CORD2、CRD、RPGRIP1、LCA6、CORD9、RPE65、RP20、AIPL1、LCA4、GUCY2D、GUC2D、LCA1、CORD6、RDH12、LCA3)、黄斑ジストロフィー(ELOVL4、ADMD、STGD2、STGD3、RDS、RP7、PRPH2、PRPH、AVMD、AOFMD、VMD2)など]；

(6) 腫瘍性疾患〔悪性腫瘍、血管新生緑内障、幼児性血管腫、多発性骨髄腫、慢性肉腫、転移黒色腫、カボジ肉腫、血管増殖、悪液質、乳癌の転移等、癌(例えば、大腸癌(例えば、家族性大腸癌、遺伝性非ポリポーシス大腸癌、消化管間質腫瘍など)、肺癌(例えば、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、悪性中皮腫など)、中皮腫、膵臓癌(例えば、膵管癌など)、胃癌(例えば、乳頭腺癌、粘液性腺癌、腺扁平上皮癌など)、乳癌(例えば、浸潤性乳管癌、非浸潤性乳管癌、炎症性乳癌など)、卵巣癌(例えば、上皮性卵巣癌、性腺外胚細胞腫瘍、卵巣性胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍など)、前立腺癌(例えば、ホルモン依存性前立腺癌、ホルモン非依存性前立腺癌など)、肝臓癌(例えば、原発性肝癌、肝外胆管癌など)、甲状腺癌(例えば、甲状腺髓

様癌など）、腎臓癌（例えば、腎細胞癌、腎盂と尿管の移行上皮癌など）、子宮癌、脳腫瘍（例えば、松果体星細胞腫瘍、毛様細胞性星細胞腫、びまん性星細胞腫、退形成性星細胞腫など）、黒色腫、肉腫、膀胱癌、多発性骨髄腫を含む血液癌等、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、網膜肉腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、食道癌、十二指腸癌、結腸癌、直腸癌、肝細胞癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、尿管癌、精巣腫瘍、外陰癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、膣癌、皮膚癌、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髄異形成症候群、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、線維性組織球腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、原発不明癌など）、白血病（例えば、急性白血病（例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病など）、慢性白血病（例えば、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病など）、骨髄形成症候群など）、子宮肉腫（例えば、子宮中胚葉性混合腫瘍、子宮平滑筋肉腫、子宮内膜間質腫瘍など）、骨髄線維症など）。

[0049] 医薬としての本発明の組成物は、薬学的に許容される担体を用いて、製剤技術分野において公知の方法により製造することができる。上記医薬の剤型として、例えば、緩衝剤および／または安定剤等の慣用の助剤を配合した非経口投与用製剤（例えば、注射剤などの液剤）、慣用の医薬用担体が配合された軟膏、クリーム、液剤または膏薬等の局所用製剤を挙げることができる。

[0050] 本発明の組成物は、多数の種類の細胞、組織または臓器に活性成分を導入するために使用することができる。本発明の組成物を適用することができる細胞としては、例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓B細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞（例、骨格筋細胞、心筋細胞、筋芽細胞、筋衛星細胞）、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、巨核球）、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞

、肝細胞もしくは間質細胞、卵細胞、精細胞、またはこれら細胞に分化誘導可能な前駆細胞、幹細胞（例えば、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）を含む）、血球系細胞、卵母細胞、受精卵が挙げられる。また、本発明の組成物を適用することができる組織または臓器としては、上記の細胞が存在するあらゆる組織もしくは臓器、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節及び骨格筋が挙げられる。これら細胞、組織または臓器は、癌化した癌細胞や癌組織等であってもよい。

[0051] 本発明の一つの実施形態では、本発明の組成物は、心筋細胞以外の細胞、心臓以外の組織または臓器に活性成分として核酸を導入するために使用される。

[0052] 本発明の組成物は、特に、癌細胞に核酸を導入する効率に優れる。

[0053] 本発明の化合物、脂質粒子および組成物は、安定かつ低毒性で安全に使用することができる。本発明の組成物をin vivoで用いる場合、ないし医薬として用いる場合、投与対象（例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル）（好ましくは、ヒト））に対して、核酸の有効量が標的とする細胞に送達されるように、該組成物を投与すればよい。

[0054] 本発明の組成物をin vivoで用いる場合、ないし医薬として用いる場合、例えば、錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠、舌下錠、口腔内崩壊錠を含む）、散剤、顆粒剤、カプセル剤（ソフトカプセル、マイクロカプセルを含む）、液剤、トローチ剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、注射剤（例、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤等）、外用剤（例、経鼻投与製剤、経皮製剤、軟膏剤）坐剤（例、直腸坐剤、膣坐剤）、ペレット、

経鼻剤、経肺剤（吸入剤）、点滴剤等の医薬製剤とすることにより、経口的又は非経口的（例、局所、直腸、静脈投与等）に安全に投与することができる。これらの製剤は、速放性製剤又は徐放性製剤等の放出制御製剤（例、徐放性マイクロカプセル）であってもよい。

- [0055] 以下、本発明の化合物の製造方法について説明する。
- [0056] 以下の製造方法における各工程で用いられた原料や試薬、ならびに得られた化合物は、それぞれ塩を形成していてもよい。このような塩としては、例えば、前述の本発明の化合物における塩と同様のものが挙げられる。
- [0057] 各工程で得られた化合物が遊離化合物である場合には、公知の方法により、目的とする塩に変換することができる。逆に各工程で得られた化合物が塩である場合には、公知の方法により、遊離体または目的とする他の種類の塩に変換することができる。
- [0058] 各工程で得られた化合物は反応液のままか、または粗生成物として得た後に、次反応に用いることもできる、あるいは、各工程で得られた化合物を、常法に従って、反応混合物から濃縮、晶出、再結晶、蒸留、溶媒抽出、分溜、クロマトグラフィーなどの分離手段により単離および／または精製することができる。
- [0059] 各工程の原料や試薬の化合物が市販されている場合には、市販品をそのまま用いることができる。
- [0060] 各工程の反応において、反応時間は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、特に記載の無い場合、通常1分～48時間、好ましくは10分～8時間である。
- [0061] 各工程の反応において、反応温度は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、特に記載が無い場合、通常 -78°C ～ 300°C 、好ましくは -78°C ～ 150°C である。
- [0062] 各工程の反応において、圧力は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、特に記載が無い場合、通常1気圧～20気圧、好ましくは1気圧～3気圧である。

- [0063] 各工程の反応において、例えば、B i o t a g e 社製 I n i t i a t o r などの M i c r o w a v e 合成装置を用いることがある。反応温度は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、特に記載がない場合、通常室温～300℃、好ましくは室温～250℃、より好ましくは50℃～250℃である。反応時間は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、特に記載の無い場合、通常1分～48時間、好ましくは1分～8時間である。
- [0064] 各工程の反応において、試薬は、特に記載が無い場合、基質に対して0.5当量～20当量、好ましくは0.8当量～5当量が用いられる。試薬を触媒として使用する場合、試薬は基質に対して0.001当量～1当量、好ましくは0.01当量～0.2当量が用いられる。試薬が反応溶媒を兼ねる場合、試薬は溶媒量が用いられる。
- [0065] 各工程の反応において、特に記載が無い場合、これらの反応は、無溶媒、あるいは適当な溶媒に溶解または懸濁して行われる。溶媒の具体例としては、実施例に記載されている溶媒、あるいは以下が挙げられる。
- [0066] アルコール類：メタノール、エタノール、イソプロパノール、イソブタノール、t e r t -ブチルアルコール、2-メトキシエタノールなど；
エーテル類：ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジフェニルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、シクロペンチルメチルエーテルなど；
芳香族炭化水素類：クロロベンゼン、トルエン、キシレンなど；
飽和炭化水素類：シクロヘキサン、ヘキサン、ヘプタンなど；
アミド類：N,N-ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドンなど；
ハロゲン化炭化水素類：ジクロロメタン、四塩化炭素など；
ニトリル類：アセトニトリルなど；
スルホキシド類：ジメチルスルホキシドなど；
芳香族有機塩基類：ピリジンなど；
酸無水物類：無水酢酸など；
有機酸類：ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸など；

無機酸類：塩酸、硫酸など；

エステル類：酢酸エチル、酢酸イソプロピルエステルなど；

ケトン類：アセトン、メチルエチルケトンなど；

水。

上記溶媒は、二種以上を適宜の割合で混合して用いてもよい。

[0067] 各工程の反応において塩基を用いる場合、例えば、以下に示す塩基、あるいは実施例に記載されている塩基が用いられる。

[0068] 無機塩基類：水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化マグネシウムなど；

塩基性塩類：炭酸ナトリウム、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウムなど；

有機塩基類：トリエチルアミン、ジエチルアミン、N，N-ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジン、N，N-ジメチルアニリン、1，4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン、1，8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン、イミダゾール、ピペリジンなど；

金属アルコキシド類：ナトリウムエトキシド、カリウムtert-ブトキシド、ナトリウムtert-ブトキシドなど；

アルカリ金属水素化物類：水素化ナトリウムなど；

金属アミド類：ナトリウムアミド、リチウムジイソプロピルアミド、リチウムヘキサメチルジシラジドなど；

有機リチウム類：n-ブチルリチウム、sec-ブチルリチウムなど。

[0069] 各工程の反応において酸または酸性触媒を用いる場合、例えば、以下に示す酸や酸性触媒、あるいは実施例に記載されている酸や酸性触媒が用いられる。

[0070] 無機酸類：塩酸、硫酸、硝酸、臭化水素酸、リン酸など；

有機酸類：酢酸、トリフルオロ酢酸、クエン酸、p-トルエンスルホン酸、10-カンファースルホン酸など；

ルイス酸：三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体、ヨウ化亜鉛、無水塩化アルミニウム、無水塩化亜鉛、無水塩化鉄など。

[0071] 各工程の反応は、特に記載の無い限り、公知の方法、例えば、第5版実験化学講座、13巻～19巻（日本化学会編）；新実験化学講座、14巻～15巻（日本化学会編）；精密有機化学 改定第2版（L. F. Fieser, Th. Eicher、南江堂）；改訂 有機人名反応 そのしくみとポイント（東郷秀雄著、講談社）；ORGANIC SYNTHESIS Collective Volume I～VII（John Wiley & Sons Inc）；Modern Organic Synthesis in the Laboratory A Collection of Standard Experimental Procedures（Jie Jack Li著、OXFORD UNIVERSITY出版）；Comprehensive Heterocyclic Chemistry III、Vol. 1～Vol. 14（エルゼビア・ジャパン株式会社）；人名反応に学ぶ有機合成戦略（富岡清監訳、化学同人発行）；コンプリヘンシブ・オーガニック・トランスフォーメーションズ（VCH Publishers Inc.）1989年刊などに記載された方法、あるいは実施例に記載された方法に準じて行われる。

[0072] 各工程において、官能基の保護または脱保護反応は、公知の方法、例えば、Wiley-Interscience社2007年刊「Protective Groups in Organic Synthesis, 4th Ed.」（Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts著）；Thieme社2004年刊「Protecting Groups 3rd Ed.」（P. J. Kocienski著）などに記載された方法、あるいは実施例に記載された方法に準じて行われる。

[0073] アルコールなどの水酸基やフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、メトキシメチルエーテル、ベンジルエーテル、p-メトキシベンジルエーテル、t-ブチルジメチルシリルエーテル、t-ブチルジフェニルシリルエー

ーテル、テトラヒドロピラニルエーテルなどのエーテル型保護基；酢酸エステルなどのカルボン酸エステル型保護基；メタンスルホン酸エステルなどのスルホン酸エステル型保護基； α -ブチルカルボネートなどの炭酸エステル型保護基などが挙げられる。

[0074] アルデヒドのカルボニル基の保護基としては、例えば、ジメチルアセタールなどのアセタール型保護基；環状1, 3-ジオキサンなどの環状アセタール型保護基などが挙げられる。

[0075] ケトンのカルボニル基の保護基としては、例えば、ジメチルケタールなどのケタール型保護基；環状1, 3-ジオキサンなどの環状ケタール型保護基； α -メチルオキシムなどのオキシム型保護基；N, N-ジメチルヒドラゾンなどのヒドラゾン型保護基などが挙げられる。

[0076] カルボキシル基の保護基としては、例えば、メチルエステルなどのエステル型保護基；N, N-ジメチルアミドなどのアミド型保護基などが挙げられる。

[0077] チオールの保護基としては、例えば、ベンジルチオエーテルなどのエーテル型保護基；チオ酢酸エステル、チオカルボネート、チオカルバメートなどのエステル型保護基などが挙げられる。

[0078] アミノ基や、イミダゾール、ピロール、インドールなどの芳香族ヘテロ環の保護基としては、例えば、ベンジルカルバメートなどのカルバメート型保護基；アセトアミドなどのアミド型保護基；N-トリフェニルメチルアミンなどのアルキルアミン型保護基、メタンスルホンアミドなどのスルホンアミド型保護基などが挙げられる。

[0079] 保護基の除去は、公知の方法、例えば、酸、塩基、紫外光、ヒドラジン、フェニルヒドラジン、N-メチルジチオカルバミン酸ナトリウム、テトラブチルアンモニウムフルオリド、酢酸パラジウム、トリアルキルシリルハライド（例えば、トリメチルシリルヨード、トリメチルシリルブロミド）を使用する方法や還元法などを用いて行うことができる。

[0080] 各工程において、還元反応を行う場合、使用される還元剤としては、水素

化アルミニウムリチウム、水素化トリアセトキシホウ素ナトリウム、水素化シアノホウ素ナトリウム、水素化ジイソブチルアルミニウム（D I B A L - H）、水素化ホウ素ナトリウム、水素化トリアセトキシホウ素テトラメチルアンモニウムなどの金属水素化物類；ボランテトラヒドロフラン錯体などのボラン類；ラネーニッケル；ラネーコバルト；水素；ギ酸などが挙げられる。例えば、水素またはギ酸存在下で、ラネーニッケルまたはラネーコバルトを用いることができる。炭素－炭素二重結合あるいは三重結合を還元する場合は、パラジウム－カーボンやL i n d l a r触媒などの触媒を用いる方法がある。

[0081] 各工程において、酸化反応を行う場合、使用される酸化剤としては、m－クロロ過安息香酸（M C P B A）、過酸化水素、t－ブチルヒドロペルオキシドなどの過酸類；過塩素酸テトラブチルアンモニウムなどの過塩素酸塩類；塩素酸ナトリウムなどの塩素酸塩類；亜塩素酸ナトリウムなどの亜塩素酸塩類；過ヨウ素酸ナトリウムなどの過ヨウ素酸類；ヨードシルベンゼンなどの高原子価ヨウ素試薬；二酸化マンガン、過マンガン酸カリウムなどのマンガンを有する試薬；四酢酸鉛などの鉛類；クロロクロム酸ピリジニウム（P C C）、ニクロム酸ピリジニウム（P D C）、ジョーンズ試薬などのクロムを有する試薬；N－ブロモスクシンイミド（N B S）などのハロゲン化合物類；酸素；オゾン；三酸化硫黄・ピリジン錯体；四酸化オスミウム；二酸化ゼレン；2，3－ジクロロ－5，6－ジシアノ－1，4－ベンゾキノン（D D Q）などが挙げられる。

[0082] 各工程において、ラジカル環化反応を行う場合、使用されるラジカル開始剤としては、アゾビスイソブチロニトリル（A I B N）などのアゾ化合物；4－4’－アゾビス－4－シアノペンタン酸（A C P A）などの水溶性ラジカル開始剤；空気あるいは酸素存在下でのトリエチルホウ素；過酸化ベンゾイルなどが挙げられる。また、使用されるラジカル反応試剤としては、トリブチルスタナン、トリストリメチルシリルシラン、1，1，2，2－テトラフェニルジシラン、ジフェニルシラン、ヨウ化サマリウムなどが挙げられる。

。

- [0083] 各工程において、Wittig反応を行う場合、使用されるWittig試薬としては、アルキリデンホスホラン類などが挙げられる。アルキリデンホスホラン類は、公知の方法、例えば、ホスホニウム塩と強塩基を反応させることで調製することができる。
- [0084] 各工程において、Horner-Emmons反応を行う場合、使用される試薬としては、ジメチルホスホノ酢酸メチル、ジエチルホスホノ酢酸エチルなどのホスホノ酢酸エステル類；アルカリ金属水素化物類、有機リチウム類などの塩基が挙げられる。
- [0085] 各工程において、Friedel-Crafts反応を行う場合、使用される試薬としては、ルイス酸と、酸クロリドあるいはアルキル化剤（例、ハロゲン化アルキル類、アルコール、オレフィン類など）が挙げられる。あるいは、ルイス酸の代わりに、有機酸や無機酸を用いることもでき、酸クロリドの代わりに、無水酢酸などの酸無水物を用いることもできる。
- [0086] 各工程において、芳香族求核置換反応を行う場合、試薬としては、求核剤（例、アミン類、イミダゾールなど）と塩基（例、塩基性塩類、有機塩基類など）が用いられる。
- [0087] 各工程において、カルボアニオンによる求核付加反応、カルボアニオンによる求核1,4-付加反応（Michael付加反応）、あるいはカルボアニオンによる求核置換反応を行う場合、カルボアニオンを発生するために用いる塩基としては、有機リチウム類、金属アルコキシド類、無機塩基類、有機塩基類などが挙げられる。
- [0088] 各工程において、Grignard反応を行う場合、Grignard試薬としては、フェニルマグネシウムブロミドなどのアリアルマグネシウムハライド類；メチルマグネシウムブロミド、イソプロピルマグネシウムブロミドなどのアルキルマグネシウムハライド類が挙げられる。Grignard試薬は、公知の方法、例えばエーテルあるいはテトラヒドロフランを溶媒として、ハロゲン化アルキルまたはハロゲン化アリアルと、金属マグネシウム

とを反応させることにより調製することができる。

- [0089] 各工程において、Knoevenagel縮合反応を行う場合、試薬としては、二つの電子求引基に挟まれた活性メチレン化合物（例、マロン酸、マロン酸ジエチル、マロノニトリルなど）および塩基（例、有機塩基類、金属アルコキシド類、無機塩基類）が用いられる。
- [0090] 各工程において、Vilsmeier-Haack反応を行う場合、試薬としては、塩化ホスホリルとアミド誘導体（例、N，N-ジメチルホルムアミドなど）が用いられる。
- [0091] 各工程において、アルコール類、アルキルハライド類、スルホン酸エステル類のアジド化反応を行う場合、使用されるアジド化剤としては、ジフェニルホスホリルアジド（DPPA）、トリメチルシリルアジド、アジ化ナトリウムなどが挙げられる。例えば、アルコール類をアジド化する場合、ジフェニルホスホリルアジドと1，8-ジアザビシクロ[5，4，0]ウンデカ-7-エン（DBU）を用いる方法やトリメチルシリルアジドとルイス酸を用いる方法などがある。
- [0092] 各工程において、還元的アミノ化反応を行う場合、使用される還元剤としては、水素化トリアセトキシホウ素ナトリウム、水素化シアノホウ素ナトリウム、水素、ギ酸などが挙げられる。基質がアミン化合物の場合は、使用されるカルボニル化合物としては、パラホルムアルデヒドの他、アセトアルデヒドなどのアルデヒド類、シクロヘキサノンなどのケトン類が挙げられる。基質がカルボニル化合物の場合は、使用されるアミン類としては、アンモニア、メチルアミンなどの1級アミン；ジメチルアミンなどの2級アミンなどが挙げられる。
- [0093] 各工程において、光延反応を行う場合、試薬としては、アゾジカルボン酸エステル類（例、アゾジカルボン酸ジエチル（DEAD）、アゾジカルボン酸ジイソプロピル（DIAD）など）およびトリフェニルホスフィンが用いられる。
- [0094] 各工程において、エステル化反応、アミド化反応、あるいはウレア化反応

を行う場合、使用される試薬としては、酸クロリド、酸ブロミドなどのハロゲン化アシル体；酸無水物、活性エステル体、硫酸エステル体など活性化されたカルボン酸類が挙げられる。カルボン酸の活性化剤としては、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(WSCD)などのカルボジイミド系縮合剤；4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロライド-n-ハイドレート(DMT-MM)などのトリアジン系縮合剤；1,1-カルボニルジイミダゾール(CDI)などの炭酸エステル系縮合剤；ジフェニルリン酸アジド(DPPA)；ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスジメチルアミノホスホニウム塩(BOP試薬)；ヨウ化2-クロロ-1-メチル-ピリジニウム(向山試薬)；塩化チオニル；クロロギ酸エチルなどのハロギ酸低級アルキル；O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩(HATU)；硫酸；あるいはこれらの組み合わせなどが挙げられる。カルボジイミド系縮合剤を用いる場合、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、N-ヒドロキシコハク酸イミド(HOSu)、ジメチルアミノピリジン(DMAP)などの添加剤をさらに反応に加えてもよい。

[0095] 各工程において、カップリング反応を行う場合、使用される金属触媒としては、酢酸パラジウム(II)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)、ジクロロビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)、ジクロロビス(トリエチルホスフィン)パラジウム(II)、トリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム(0)、塩化1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセンパラジウム(II)、酢酸パラジウム(II)などのパラジウム化合物；テトラキス(トリフェニルホスフィン)ニッケル(0)などのニッケル化合物；塩化トリス(トリフェニルホスフィン)ロジウム(III)などのロジウム化合物；コバルト化合物；酸化銅、ヨウ化銅(I)などの銅化合物；白金化合物などが挙げられる。さらに反応に塩基を加えてもよく、このような塩基としては、無機塩基類、塩基性塩類など

が挙げられる。

- [0096] 各工程において、チオカルボニル化反応を行う場合、チオカルボニル化剤としては、代表的には五硫化ニリンが用いられるが、五硫化ニリンの他に、2, 4-ビス(4-メトキシフェニル)-1, 3, 2, 4-ジチアジホスフェタン-2, 4-ジスルフィド(Lowesson試薬)などの1, 3, 2, 4-ジチアジホスフェタン-2, 4-ジスルフィド構造を持つ試薬を用いてもよい。
- [0097] 各工程において、Wohler-Ziegler反応を行う場合、使用されるハロゲン化剤としては、N-ヨードコハク酸イミド、N-ブロモコハク酸イミド(NBS)、N-クロロコハク酸イミド(NCS)、臭素、塩化スルフリルなどが挙げられる。さらに、熱、光、過酸化ベンゾイル、アゾビスイソブチロニトリルなどのラジカル開始剤を反応に加えることで、反応を加速させることができる。
- [0098] 各工程において、ヒドロキシ基のハロゲン化反応を行う場合、使用されるハロゲン化剤としては、ハロゲン化水素酸と無機酸の酸ハロゲン化物、具体的には、塩素化では、塩酸、塩化チオニル、オキシ塩化リンなど、臭素化では、48%臭化水素酸などが挙げられる。また、トリフェニルホスフィンと四塩化炭素または四臭化炭素などとの作用により、アルコールからハロゲン化アルキル体を得る方法を用いてもよい。あるいは、アルコールをスルホン酸エステルに変換の後、臭化リチウム、塩化リチウムまたはヨウ化ナトリウムと反応させるような2段階の反応を経てハロゲン化アルキル体を合成する方法を用いてもよい。
- [0099] 各工程において、Arbuzov反応を行う場合、使用される試薬としては、ブロモ酢酸エチルなどのハロゲン化アルキル類；トリエチルフォスファイトやトリ(イソプロピル)ホスファイトなどのホスファイト類が挙げられる。
- [0100] 各工程において、スルホンエステル化反応を行う場合、使用されるスルホン化剤としては、メタンスルホニルクロリド、p-トルエンスルホニルクロ

リド、メタンスルホン酸無水物、p-トルエンスルホン酸無水物、トリフルオロメタンスルホン酸無水物などが挙げられる。

[0101] 各工程において、加水分解反応を行う場合、試薬としては、酸または塩基が用いられる。また、t-ブチルエステルの酸加水分解反応を行う場合、副生するt-ブチルカチオンを還元的にトラップするためにギ酸やトリエチルシランなどを加えることがある。

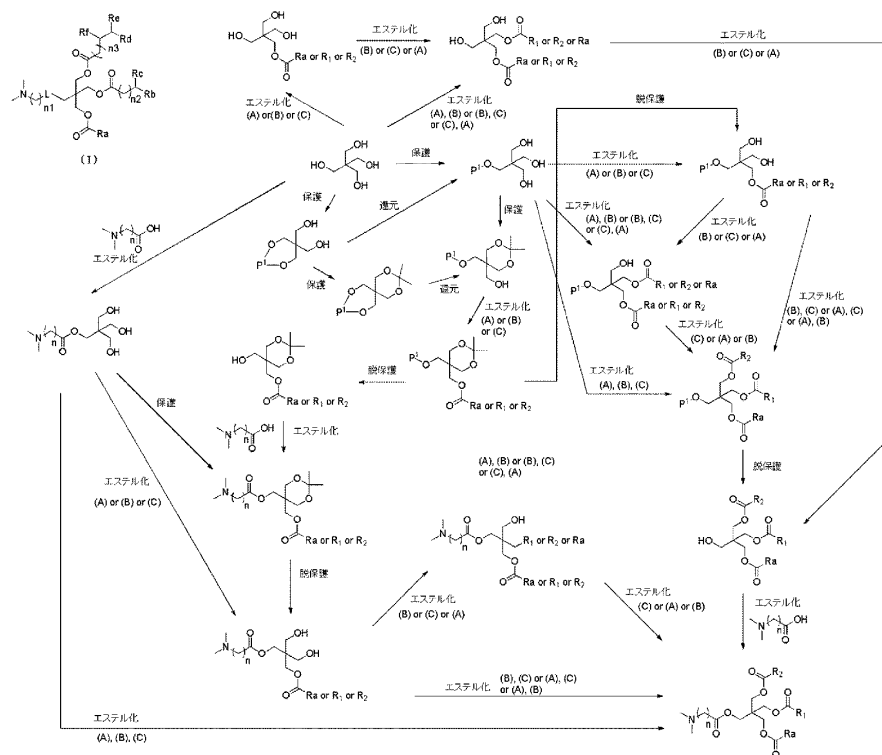
[0102] 各工程において、脱水反応を行う場合、使用される脱水剤としては、硫酸、五酸化ニリン、オキシ塩化リン、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、アルミナ、ポリリン酸などが挙げられる。

[0103] 化合物(1)は、例えば、以下の製法によって製造することができる。本発明では、特にエステル化の際に、目的とする化合物(1)の構造に応じた適切な原料を用いることにより、所望の構造の化合物(1)を合成することが可能である。また、化合物(1)の塩は、無機塩基、有機塩基、有機酸、塩基性または酸性アミノ酸との適切な混合により得ることができる。

[0104]

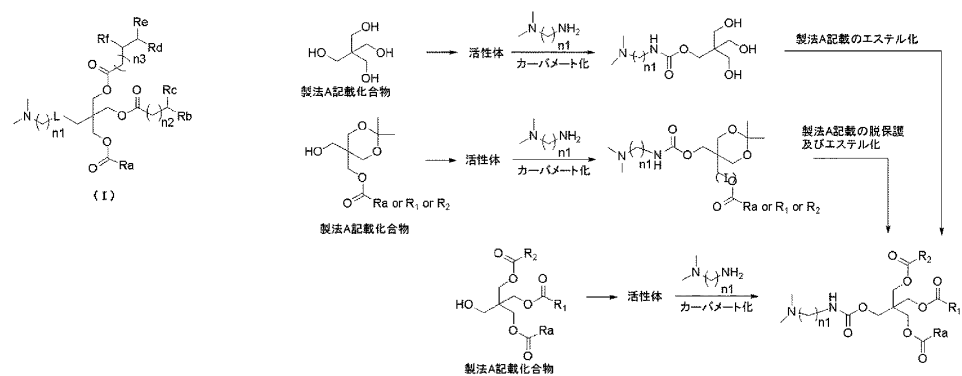
[化4-1]

製法A (Lが-O(O)O-の場合)

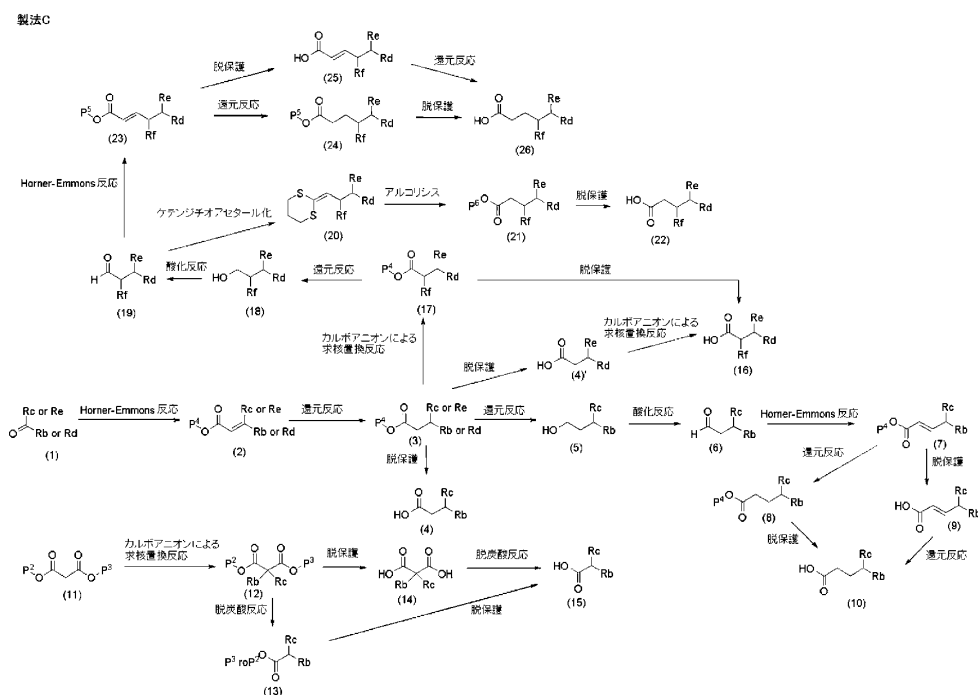


[化4-2]

製法B (Lが-NHC(O)O-の場合)



[化4-3]



[化4-4]

以上の式中、 P^1 , P^2 , P^3 , P^4 , P^5 および P^6 は、それぞれ独立して、保護基を示し、

化合物(A)は、式： $\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{Ra}$ を示し、

化合物(B)は、式： $\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{Rb}$ を、 $R1$ は Rb を示し、

化合物(C)は、式： $\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{Rf}$ を、 $R2$ は Rf を示し、

[0105] 以下、本発明の化合物を含有する脂質粒子、および当該脂質粒子と活性成分として核酸を含有する核酸導入（トランスフェクション）用組成物の製造方法について記載する。

[0106] 本発明の脂質粒子は、カチオン性脂質として本発明の化合物を、必要によりその他の脂質成分と混合した後、脂質成分から脂質粒子を調製するための公知の方法により製造することができる。例えば、上記の（混合）脂質成分

を有機溶媒に溶解し、得られる有機溶媒溶液を水もしくは緩衝液と混合すること（例えば、乳化法）により、脂質粒子分散液として製造することができる。上記混合は、微小流体混合システム（例えば、NanoAssembler装置（Precision NanoSystems社））を用いて行うことができる。得られた脂質粒子は、脱塩もしくは透析および滅菌ろ過に付してもよい。また、必要に応じてpH調整、浸透圧調整を行ってもよい。

[0107] 化合物（I）は、式（I）の n_1 、 n_2 、 n_3 、L、Ra、Rb、Rc、Rd、Re、およびRfの定義の組み合わせによって、複数の構造を取り得る。脂質粒子の製造には、化合物（I）として、特定の構造を有する1種類の化合物を単独で使用してもよいし、構造の異なる複数の種類の化合物の混合物として使用してもよい。

[0108] 「他の脂質成分」としては、前述したような構造脂質、例えば、ステロール類、リン脂質、ポリエチレングリコール脂質が挙げられる。「他の脂質成分」は、例えば、本発明の化合物1モルに対して、0.008～4モル用いられる。本発明の化合物は、他の脂質成分（特に、コレステロール、ホスファチジルコリンおよびポリエチレングリコール脂質）と混合して用いることが好ましい。本発明の化合物と他の脂質成分とを混合して用いる場合の好ましい態様は、本発明の化合物1～4モル、ステロール類0～3モル、リン脂質0～2モルおよびポリエチレングリコール脂質0～1モルの混合物である。本発明の化合物と他の脂質成分とを混合して用いる場合のより好ましい態様は、本発明の化合物1～1.5モル、ステロール類0～1.25モル、リン脂質0～0.5モルおよびポリエチレングリコール脂質0～0.125モルの混合物である。

[0109] 前記した有機溶媒溶液中の本発明の化合物、あるいは本発明の化合物と他の脂質成分との混合物の濃度は、好ましくは0.5～100mg/mLである。

[0110] 有機溶媒としては、例えば、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、tert-ブタノール、アセトン、アセ

トニトリル、N，N－ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、またはこれらの混合物が挙げられる。有機溶媒は、0～20%の水もしくは緩衝液を含有してもよい。

[0111] 緩衝液としては、酸性緩衝液（例えば、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、2－モルホリノエタンスルホン酸（MES）緩衝液、リン酸緩衝液）や、中性緩衝液（例えば、4－（2－ヒドロキシエチル）－1－ピペラジニエタンスルホン酸（HEPES）緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Tris）緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水（PBS））が挙げられる。

[0112] 微小流体混合システムを用いて混合を行う場合、有機溶媒溶液1容積部に対して水もしくは緩衝液1～5容積部を混合することが好ましい。また、該システムにおいて、混合液（有機溶媒溶液と水もしくは緩衝液との混合液）流速は、例えば0.01～20 mL/min、好ましくは0.1～10 mL/minであり、温度は、例えば5～60℃、好ましくは15～45℃である。

[0113] 本発明の組成物は、脂質粒子または脂質粒子分散液を製造する際、水もしくは緩衝液に核酸を添加しておくことにより、核酸を含む脂質粒子分散液として製造することができる。核酸は、水もしくは緩衝液における核酸の濃度が、例えば0.01～20 mg/mL、好ましくは0.05～2.0 mg/mLとなるように添加することが好ましい。

[0114] また、本発明の組成物は、脂質粒子または脂質粒子分散液と、核酸またはその水溶液とを、公知の方法で混和することによっても、活性成分を含む脂質粒子分散液として製造することができる。脂質粒子分散液は、脂質粒子を適当な分散媒に分散させることにより調製することができる。また、活性成分の水溶液は、活性成分を適当な溶媒に溶解させることにより調製することができる。

[0115] 分散媒および溶媒を除いた本発明の組成物における本発明の化合物の含量は、通常10～70重量%、好ましくは40～70重量%である。

- [0116] 分散媒および溶媒を除いた本発明の組成物における核酸の含量は、通常0.1～25重量%、好ましくは1～20重量%である。
- [0117] 脂質粒子分散液または組成物を含む分散液の分散媒は、透析することで水または緩衝液に置換することができる。透析には、分画分子量10～20Kの限外ろ過膜を用い、4℃～室温にて実施する。繰り返し透析を行ってもよい。分散媒の置換には、タンジェンシャルフロー・フィルトレーション（TFF）を使用してもよい。また、分散媒の置換後、必要に応じてpH調整、浸透圧調整を行ってもよい。pH調整剤としては、例えば水酸化ナトリウム、クエン酸、酢酸、トリエタノールアミン、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素カリウムなどが挙げられる。また、浸透圧調整剤としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸水素カリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素カリウムなどの無機塩類、グリセロール、マンニトール、ソルビトールなどのポリオール類、グルコース、フルクトース、ラクトース、スクロースなどの糖類が挙げられる。pHは、通常6.5～8.0、好ましくは7.0～7.8に調整される。浸透圧は、好ましくは250～3500sm/kgに調整される。
- [0118] 本発明の組成物には、必要に応じて、脂質粒子および核酸以外の成分を含んでいてもよい。そのような成分としては、例えば、適量の安定化剤および酸化防止剤が挙げられる。
- [0119] 安定化剤としては、特に限定されないが、例えば、グリセロール、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、またはスクロースのような糖類が挙げられる。
- [0120] 酸化防止剤としては、例えばアスコルビン酸、尿酸、システイン、トコフェロール同族体（ビタミンE、トコフェロール α 、 β 、 γ 、 δ の4つの異性体など）、EDTA、システインなどが挙げられる。
- [0121] 以下、本発明の化合物を含有する脂質粒子、および当該脂質粒子と活性成分としての核酸を含有する組成物の分析方法について記載する。

- [0122] (組成物中の)脂質粒子の粒子径は、公知の手段により測定することができる。例えば、動的光散乱測定技術に基づく粒子径測定装置、Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)を用い、自己相関関数のキュムラント解析によりZ平均粒子径として算出することができる。(組成物中の)脂質粒子の粒子径(平均粒子径)は、例えば10~200nm、好ましくは60~170nmである。
- [0123] 本発明の組成物における核酸(例えばsiRNA、mRNA)の濃度および内封率は、公知の手段により測定することができる。例えば、Quant-iT™ Ribogreen(登録商標)(Invitrogen)を用いて核酸を蛍光標識し、その蛍光強度を測定することによって濃度および内封率を求めることができる。組成物中の核酸の濃度は、濃度が既知の核酸水溶液から作成される標準曲線を用いて算出することができ、内封率は、Triton-X100(脂質粒子を崩壊させるための界面活性剤)の添加の有無による蛍光強度の違いを元に算出することができる。なお、組成物中の核酸の濃度は、脂質粒子に内封されている核酸および内封されていない核酸の合計の濃度を指し、内封率は組成物中の核酸全体のうち脂質粒子に内封されているものの割合を指す。

実施例

- [0124] 本発明は、更に以下の実施例、製造例および試験例によって詳しく説明されるが、これらは本発明を限定するものではなく、また本発明の範囲を逸脱しない範囲で変化させてもよい。
- [0125] 以下の実施例中の「室温」は通常約10℃ないし約35℃を示す。混合溶媒において示した比は、特に断らない限り容量比を示す。％は、特に断らない限り重量％を示す。
- [0126] 実施例のカラムクロマトグラフィーにおける溶出は、特に言及しない限り、TLC(Thin Layer Chromatography, 薄層クロマトグラフィー)による観察下に行った。TLC観察においては、TLCプレートとしてメルク(Merck)社製の60 F₂₅₄を用い、展開溶媒と

して、カラムクロマトグラフィーで溶出溶媒として用いた溶媒を用いた。また、検出にはUV検出器を採用し、必要に応じてTLC発色試薬を用いて観察した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいて、NHと記載した場合はアミノプロピルシラン結合シリカゲルを、Diolと記載した場合は3-(2,3-ジヒドロキシプロポキシ)プロピルシラン結合シリカゲルを用いた。分取HPLC（高速液体クロマトグラフィー）において、C18と記載した場合はオクタデシル結合シリカゲルを用いた。溶出溶媒において示した比は、特に断らない限り容量比を示す。

[0127] ^1H NMRはフーリエ変換型NMRで測定した。 ^1H NMRの解析にはACD/SpecManager（商品名）ソフトウェアなどを用いた。水酸基やアミノ基などのプロトンピークが非常に緩やかなピークについては記載していないことがある。

[0128] MSは、LC/MSおよびMALDI/TOFMSにより測定した。イオン化法としては、ESI法、APCI法または、MALDI法を用いた。マトリックスとしてはCHCAを用いた。データは実測値（found）を記載した。通常、分子イオンピークが観測されるがフラグメントイオンとして観測されることがある。塩の場合は、通常、フリー体の分子イオンピーク、カチオン種、アニオン種もしくはフラグメントイオンピークが観測される。

[0129] 以下の実施例においては下記の略号を使用する。

MS：マスペクトル

M：モル濃度

N：規定度

CDCl_3 ：重クロロホルム

$\text{DMSO}-d_6$ ：重ジメチルスルホキシド

^1H NMR：プロトン核磁気共鳴

LC/MS：液体クロマトグラフ質量分析計

ESI：electrospray ionization、エレクトロスプレーイオン化

APCI：atmospheric pressure chemical ionization、大気圧化学イオン

化

MALDI : Matrix-assisted laser desorption/ionization、マトリックス

支援レーザー脱離イオン化

TOFMS : Time-of-flight mass spectrometry、飛行時間型質量分析

CHCA : α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸

DMF : N,N-ジメチルホルムアミド

THF : テトラヒドロフラン

DMA P : 4-ジメチルアミノピリジン

TBAF : テトラブチルアンモニウムフルオリド

DIBAL-H : 水素化ジイソブチルアルミニウム

DBU : 1, 8-ジアザビシクロ [5, 4, 0] ウンデカ-7-エン

[0130] [実施例 1] 3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス((
オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4-ヘプチルウンデカノアート

A) 2-ヘプチルノナン酸メチルエステル

窒素気流氷冷下、60% 水素化ナトリウム(ミネラルオイル含有) (3.78 g) の脱水DMF (100 mL) 懸濁液を10分間攪拌した。その後、マロン酸ジメチル (5.0 g) を10℃以下で滴下した。同温度で10分間攪拌した後、1-ヨードヘプタン (18.3 mL) を滴下し、室温まで昇温した。4時間後、反応混合物に6N 塩酸で中和した後、酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水で2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣をDMSO (75 mL) に溶解し、水 (0.68 mL)、塩化リチウム (3.21 g) 添加し、165℃に昇温した。同温度で16時間攪拌した後、水を加え、酢酸エチルで希釈した。飽和食塩水で2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (8.14 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.84 - 0.90 (6 H, m), 1.20 - 1.32 (20 H, m), 1.36 - 1.47 (2 H, m), 1.54 - 1.62 (2 H, m), 2.33 (1 H, tt, J = 9.0, 5.4 Hz), 3.67 (3 H, s)

[0131] B) 2-ヘプチルノナン-1-オール

窒素気流氷冷下、水素化アルミニウムリチウム (2.15 g) の脱水THF (92 mL) 懸濁液に、2-ヘプチルノナン酸メチルエステル (7.67 g) の脱水THF (50 mL) 溶液を滴下し、10℃以下で1時間攪拌した。その後室温に昇温し、3時間攪拌した。再度10℃以下に冷却した後、硫酸ナトリウム・10水和物を少しずつ添加した。酢酸エチルで希釈した後、不溶物をセライトろ過し、溶媒を減圧留去して、標題化合物 (6.91 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.86 – 0.91 (6 H, m), 1.16 – 1.34 (25 H, m), 1.41 – 1.49 (1 H, m), 3.54 (2 H, t, $J = 5.2$ Hz)

[0132] C) 2-ヘプチルノナナール

窒素気流下、塩化オキザリル (4.9 mL) のジクロロメタン (30 mL) 溶液を-70℃に冷却し、ジメチルスルホキシド (6.1 mL) のジクロロメタン (30 mL) 溶液を-60℃以下を保持しながら滴下した。-70℃で15分攪拌後、2-ヘプチルノナン-1-オール (6.9 g) のジクロロメタン (25 mL) 溶液を-60℃以下を保持しながら滴下した。-70℃で2時間攪拌後、トリエチルアミン (23.8 mL) を加え室温まで昇温した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて分液操作を行った後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (6.06 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.85 – 0.92 (6 H, m), 1.19 – 1.33 (20 H, m), 1.37 – 1.47 (2 H, m), 1.56 – 1.65 (2 H, m), 2.18 – 2.25 (1 H, m), 9.55 (1 H, d, $J = 3.2$ Hz)

[0133] D) エチル-4-ヘプチルウンデカ-2-エノアート

窒素気流氷冷下、60% 水素化ナトリウム (ミネラルオイル含有) (1.4 g) の脱水THF (70mL) 懸濁液を10分間攪拌した。その後、エチル(ジエトキシフオスフォリル)アセタート (16.8 g) を10℃以下で滴下した。同温度で10分間攪拌した後、2-ヘプチルノナナール (6.0 g) の脱水THF (60 mL) 溶液を滴下し、室温まで昇温した。しばらく攪拌した後、50℃に昇温した。6時間攪拌後、

反応混合物を5℃以下にして水を添加した後、酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水で2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル/ヘキサン）で精製して標題化合物（5.4 g）を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.87 (6 H, t, $J=6.0$ Hz), 1.16 – 1.34 (25 H, m), 1.37 – 1.45 (2 H, m) 2.07 – 2.15 (1 H, m), 4.19 (2 H, q, $J = 7.5$ Hz), 5.75 (1 H, d, $J = 16.0$ Hz), 6.75 (1 H, dd, $J=16.0, 10.0$ Hz)

[0134] E) 4-ヘプチルウンデカン酸

エチル-4-ヘプチルウンデカ-2-エノアート (5.40 g) のエタノール (100 mL) 溶液に、10%Pd炭素 (1.08 g) を室温に加え、水素雰囲気下、20時間撹拌した。反応後、Pd炭素をろ過除去した後、溶媒を減圧下留去した。得られた残渣に8N 水酸化ナトリウム水溶液 (6.38 mL) のエタノール (20 mL) 溶液を加え、60℃で5時間撹拌した。溶媒を減圧下留去した後、6N塩酸で酸性にした。残渣をヘキサンで希釈し、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去して標題化合物 (4.73 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (6 H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.17 – 1.41 (25 H, m), 1.16 – 1.34 (2 H, m), 2.22 – 2.34 (2 H, m)

[0135] F) 2-(((tert-ブチル(ジフェニル)シリル)オキシ)メチル)-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-1,3-ジオール

2, 2-ビス (ヒドロキシメチル) プロパン-1,3-ジオール (5.0 g)、1H-イミダゾール (2.5 g) およびDMF (200 mL) の混合物に、tert-ブチルクロロジフェニルシラン (5.1 g) のDMF (10 mL) 溶液を室温に加えた。18時間撹拌後、反応混合物を減圧下濃縮した。残渣を酢酸エチルで希釈し、水で3回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル/ヘキサン）で精製して標題化合物 (6.4 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.07 (9 H, s), 2.34 (3 H, t, $J = 5.5$ Hz), 3.67 (2H,s), 3.74 (6 H, d, $J = 5.7$ Hz), 7.39 – 7.48 (6 H, m), 7.63

- 7.67 (4 H, m)

[0136] G) (5-(((tert-ブチル(ジフェニル)シリル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メタノール

2-(((tert-ブチル(ジフェニル)シリル)オキシ)メチル)-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-1,3-ジオール (3.5 g)、2,2-ジメトキシプロパン (1.5 g) のアセトン (35 mL) 溶液に、p-トルエンスルホン酸一水和物 (89 mg) を室温で加えた。2時間攪拌後、反応混合物に希アンモニア水を加え中和した後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (2.7 g) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.07 (9 H, s), 1.27 (3 H, s), 1.41 (3 H, s), 2.12 - 2.18 (1 H, m), 3.69 - 3.78 (8 H, m), 7.38 - 7.47 (6 H, m), 7.65 - 7.69 (4 H, m)

[0137] H) (5-(ヒドロキシメチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メチル 4-ヘプチルウンデカノアート

(5-(((tert-ブチル(ジフェニル)シリル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メタノール (3.56 g)、DMAP (1.37 g) および4-ヘプチルウンデカン酸 (3.18 g) のDMF (30 mL) 溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (2.47 g) を50℃で加えた。6時間攪拌後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水で1回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。得られた残渣 (6.15 g) のTHF (20mL) 溶液に、TBAFのTHF溶液 (1M, 10.3 mL) を室温で加えた。4時間攪拌後、反応混合物を減圧下濃縮した。残渣を酢酸エチルで希釈し、水で1回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (2.34 g) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (6 H, t, J = 6.9 Hz), 1.22 - 1.32 (25 H, m), 1.42 (6 H, s), 1.57 - 1.62 (2 H, m), 2.30 - 2.35 (2 H, m), 3.48 (2 H, d, J = 6.6 Hz), 3.71 - 3.73 (4 H, m), 4.25 (2 H, s)

[0138] I) (5-(((5-ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メチル 4-ヘプチルウンデカノアート

(5-(ヒドロキシメチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メチル 4-ヘプチルウンデカノアート (1.2 g)、DMAP (0.94 g) および5-(ジメチルアミノ)ペンタン酸塩酸塩 (0.74 g) のDMF (30 mL) 溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (0.94 g) を40℃で加えた。4時間攪拌後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水で1回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (1.37 g) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (6 H, t, J = 6.9 Hz), 1.20 - 1.32 (25 H, m), 1.42 (6 H, s), 1.45 - 1.52 (2 H, m), 1.54 - 1.67 (4 H, m), 2.21 (6 H, s), 2.23 - 2.31 (4 H, m), 2.35 (2 H, t, J = 7.5 Hz), 3.75 (4 H, s), 4.11 (2 H, s), 4.12 (2 H, s)

[0139] J) 3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4-ヘプチルウンデカノアート

(5-(((5-ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メチル 4-ヘプチルウンデカノアート (1.37 g) に酢酸 (6.85 mL)、水 (3.43 mL) を加えて、70℃で2時間攪拌後、溶媒を減圧下留去した。残渣に酢酸エチル、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて、2時間攪拌した。水で2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。得られた残渣 (400 mg) に、DMAP (478 mg) およびオクタン酸 (327 mg) のDMF (4 mL) 溶液を加えた後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (478 mg) を50℃で加えた。4時間攪拌後、反応混合物に酢酸エチルを加え、飽和炭酸ナトリウム水溶液で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (300 mg) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.86 – 0.91 (12 H, m), 1.15 – 1.34 (45 H, m), 1.45 – 1.52 (2 H, m), 1.53 – 1.66 (4 H, m), 2.20 (6 H, s), 2.23 – 2.36 (10 H, m), 4.11 (8 H, s)

[0140] [実施例 8] 2-(((6-(ジメチルアミノ)ヘキサノイル)オキシ)メチル-2-(オクタノイルオキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル
ビス (2-ヘキシルオクタノアート)

A) 2-ヘキシルオクタン酸

窒素気流氷冷下、60% 水素化ナトリウム (ミネラルオイル含有) (3.78 g) の脱水DMF (90 mL) 懸濁液を10分間攪拌した。その後、マロン酸ジメチル (5.0 g) を10℃以下で滴下した。同温度で10分間攪拌した後、1-ヨードヘキサン (16.8 mL) を滴下し、室温まで昇温した。8時間後、反応混合物に酢酸 (1 mL) 添加した後、酢酸エチルで希釈し、水で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣をEtOH (80 mL) に溶解し、8N 水酸化ナトリウム水溶液 (25 mL) 加えて、60℃で6時間攪拌した。6N 塩酸で中和した後、酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣を160℃で1.5時間加熱し、室温に冷却後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (7.45 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.83 – 0.92 (6 H, m), 1.22 – 1.35 (16 H, m), 1.38 – 1.52 (2 H, m), 1.56 – 1.67 (2 H, m), 2.34 (1 H, ddd, $J = 8.7, 5.4, 3.3$ Hz)

[0141] B) (2-(4-メトキシフェニル)-1,3-ジオキサン-5,5-ジイル)ジメタノール

2, 2-ビス(ヒドロキシメチル)プロパン-1,3-ジオール (506 g) の水 (2.0 L) 溶液を50℃で攪拌した。濃塩酸 (18 mL) を加え、p-メトキシベンズアルデヒド (474 mL) を30℃付近で3時間かけて滴下した。その後、反応液を25℃にし、5時間攪拌した。2N水酸化ナトリウム水溶液 (120 mL) を加え、1時間攪拌した。結晶をろ過し、水で洗浄した後、酢酸エチル/ヘキサンで再結晶して標題化合物 (769 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3.24 (2 H, d, $J = 5.0$ Hz), 3.67 (2 H, d, $J = 5.4$ Hz), 3.74 (3 H, s), 3.77 (2 H, d, $J = 11.3$ Hz), 3.88 (2 H, t, $J = 11.3$ Hz), 4.53 (1 H, t, $J = 5.4$ Hz), 4.62 (1 H, t, $J = 5.0$ Hz), 5.34 (1 H, s), 6.90 (2 H, d, $J = 8.9$ Hz), 7.33 (2 H, d, $J = 8.9$ Hz)

[0142] C) 9-(4-メトキシフェニル)-3,3-ジメチル-2,4,8,10-テトラオキサスピロ[5.5]ウンデカン

(2-(4-メトキシフェニル)-1,3-ジオキサン-5,5-ジイル)ジメタノール (2.00 g)、2,2-ジメトキシプロパン (2.46 g) のDMF (8 mL) 溶液に、ピリジニウム *p*-トルエンスルホナート (20 mg) を室温で加えた。4時間攪拌後、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、飽和食塩水で2回洗浄後、無水硫酸マウネシウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣を酢酸エチル/ヘキサンで再結晶して標題化合物 (1.62 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1.34 (6 H, s), 3.33 (2 H, s), 3.63 (2 H, d, $J = 11.7$ Hz), 3.74 (3 H, s), 3.99 (2 H, s), 4.12 (2 H, d, $J = 11.7$ Hz), 5.37 (1 H, s), 6.90 (2 H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.34 (2 H, d, $J = 8.8$ Hz)

[0143] D) (5-(((4-メトキシベンジル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メタノール

9-(4-メトキシフェニル)-3,3-ジメチル-2,4,8,10-テトラオキサスピロ[5.5]ウンデカン (22.0 g) のトルエン (200 mL) 懸濁溶液に1.5M DIBAL-H溶液 (60 mL) を5~20°Cで滴下し、15°Cで3時間攪拌した。メタノール (22 mL) を添加した後、2N 水酸化ナトリウム水溶液 (100 mL)、4N 水酸化ナトリウム水溶液 (200 mL) を順に滴下した。1.5時間攪拌した後、トルエン層を分取し、5%食塩水で洗浄した。溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (14.7 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1.29 (3 H, s), 1.29 (3 H, s), 3.35 (2

H, s), 3.39 (2 H, d, J = 5.1 Hz), 3.61 (4 H, s), 3.74 (3 H, s), 4.38 (2 H, s), 4.59 (1 H, t, J = 5.1 Hz), 6.90 (2 H, d like, J = 7.5 Hz), 7.24 (2 H, d like, J = 7.5 Hz)

[0144] E) (5-(((4-メトキシベンジル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メチルオクタノアート

(5-(((4-メトキシベンジル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メタノール (2.00 g)、DMAP (412 mg) およびオクタン酸 (1.27 g) のDMF (20 mL) 溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (1.94 g) を50℃で加えた。4時間攪拌後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (2.78 g) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.84 - 0.91 (3 H, m), 1.22 - 1.33 (8 H, m), 1.40 (6 H, s), 1.53 - 1.61 (2 H, m), 2.26 (2 H, t, J = 7.6 Hz), 3.39 (2 H, s), 3.68 - 3.74 (2 H, m), 3.76 - 3.80 (2 H, m), 3.80 (3 H, s), 4.15 (2 H, s), 4.42 (2 H, s), 6.87 (2 H, d, J = 7.8 Hz), 7.20 - 7.24 (2 H, m)

[0145] F) 3-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)-2-(((4-メトキシベンジル)オキシ)メチル)プロピル オクタノアート

(5-(((4-メトキシベンジル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メチルオクタノアート (754 mg) のTHF (6 mL) 溶液に1 N 塩酸 (6 mL) を加え、室温で6時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液または2N 水酸化ナトリウム水溶液 (4 mL) 加えた後、酢酸エチルで抽出し、水および飽和食塩水で洗浄した。この一連の操作を、脱保護が完了するまで4回繰り返した。反応完結後、溶媒を減圧下留去し、標題化合物 (608 mg) を得た。

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0.85 (3 H, t, J = 7.3 Hz), 1.15 - 1.30 (9 H, m), 1.40 - 1.50 (2 H, m), 2.22 (2 H, t, J = 7.5 Hz), 3.31 (2 H, s), 3.39 (4 H, d, J = 5.4 Hz), 3.76 (3 H, s), 3.95 (2 H, s), 4.35

(2 H, s), 4.43 (2 H, t, J = 5.4 Hz), 6.89 (2 H, d, J = 6.6 Hz), 7.21 (2 H, d, J = 6.6 Hz)

[0146] G) 2-(((4-メトキシベンジル)オキシ)メチル)-2-((オクタノイルオキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル ビス (2-ヘキシルオクタノアート)

3-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)-2-(((4-メトキシベンジル)オキシ)メチル)プロピル オクタノアート (2.0 g)、DMAP (0.64 g) および2-ヘキシルオクタン酸 (2.63 g) のDMF (20 mL) 溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (2.41 g) を室温で加えた。室温で15時間攪拌した後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (3.48 g) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.83 - 0.91 (15 H, m), 1.19 - 1.33 (42 H, m), 1.37 - 1.47 (4 H, m), 1.51 - 1.61 (4 H, m), 2.24 (2 H, t, J = 7.6 Hz), 2.32 (2 H, br t, J = 5.4 Hz), 3.41 (2 H, s), 3.80 (3 H, s), 4.08 - 4.16 (6 H, m), 4.39 (2 H, s), 6.86 (2 H, d, J = 7.6 Hz), 7.19 (2 H, d, J = 8.8 Hz)

[0147] H) 2-(ヒドロキシメチル)-2-((オクタノイルオキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル ビス (2-ヘキシルオクタノアート)

2-(((4-メトキシベンジル)オキシ)メチル)-2-((オクタノイルオキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル ビス(2-ヘキシルオクタノアート) (3.48 g) のエタノール (30 mL) 溶液に、10%Pd炭素 (280 mg) を室温で加え、水素雰囲気下で7時間攪拌した。反応後、Pd炭素をろ過除去した後、溶媒を減圧下留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (1.68 g) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.84 - 0.91 (15 H, m), 1.19 - 1.33 (42 H, m), 1.41 - 1.51 (4 H, m), 1.54 - 1.63 (4 H, m), 2.30 - 2.38 (4 H, m), 2.61 - 2.64 (1 H, m), 3.48 (2 H, d, J = 7.3 Hz), 4.08 - 4.14 (6 H

, m)

[0148] I) 2-(((6-(ジメチルアミノ)ヘキサノイル)オキシ)メチル)-2-((オクタノイルオキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル ビス (2-ヘキシルオクタノアート) 2-(ヒドロキシメチル)-2-((オクタノイルオキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル ビス(2-ヘキシルオクタノアート) (600 mg)、DMAP (54 mg) および6-(ジメチルアミノ)ヘキサン酸 (280 mg) のDMF (6 mL) 溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (303 mg) を室温に加えた。40℃で15時間攪拌した後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH, 酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (513 mg) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.83 – 0.92 (15 H, m), 1.19 – 1.34 (42 H, m), 1.39 – 1.50 (6 H, m), 1.52 – 1.73 (8 H, m), 2.21 (6 H, s), 2.21 – 2.35 (8 H, m), 4.10 (8 H, s)

[0149] [実施例 10] 3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス ((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジブチルノナノアート

A) エチル 3-ブチルヘプタ-2-エノアート

窒素気流氷冷下、60% 水素化ナトリウム (ミネラルオイル含有) (3.94 g) の脱水THF (100 mL) 懸濁液を10分間攪拌した。その後、エチル(ジエトキシフオスフォルル)アセタート (23.7 g) を10℃以下で滴下した。同温度で10分間攪拌した後、ノナン-5-オン (10.0 g) を添加し室温まで昇温した。しばらく攪拌した後、50℃に昇温した。10時間攪拌後、反応混合物を5℃以下にして水を添加した後、酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水で2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (4.47 g) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.92 (6 H, td, J = 7.3, 3.2 Hz), 1.25 – 1.47 (11 H, m), 2.14 (2 H, td, J = 7.6, 1.1 Hz), 2.57 – 2.62 (2 H, m)

), 4.14 (2 H, q, J = 7.1 Hz), 5.62 (1 H, s)

[0150] B) エチル 3-ブチルヘプタノアート

エチル 3-ブチルヘプタ-2-エノアート (5.80 g) のエタノール (25 mL) 溶液に、10%Pd炭素 (1.50 g) を室温に加え、水素雰囲気下、5時間攪拌した。反応後、Pd炭素をろ過除去した後、溶媒を減圧下留去し標題化合物 (5.49 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.84 - 0.93 (6 H, m), 1.21 - 1.33 (15 H, m), 1.80 - 1.88 (1 H, m), 2.22 (2 H, d, J = 6.9 Hz), 4.12 (2 H, q, J = 7.1 Hz)

[0151] C) エチル 2,3-ジブチルヘプタノアート

窒素気流下、ジイソプロピルアミン (11.8 mL) の脱水THF (59 mL) 溶液を -10°C に冷却し、1.6M n-BuLiヘキサン溶液 (35.2 mL) をゆっくり滴下した。滴下終了後、反応液を 0°C にして10分間攪拌した。再度 -10°C に冷却し、エチル 3-ブチルヘプタノアート (5.49 g) の脱水THF (16 mL) 溶液を滴下し、 -5°C 付近で30分間攪拌する。その後、1-ヨードブタン (9.43 g) を滴下し、しばらく攪拌した後室温にした。3時間攪拌後、6N塩酸で中和した後、酢酸エチルで希釈し、10%チオ硫酸ナトリウム水溶液で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (5.57 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.84 - 0.93 (9 H, m), 1.17 - 1.41 (20 H, m), 1.51 - 1.65 (2 H, m), 2.34 (1 H, ddd, J = 10.6, 6.5, 3.8 Hz), 4.07 - 4.19 (2 H, m)

[0152] D) 2,3-ジブチルヘプタン-1-オール

窒素気流水冷下、水素化リチウムアルミニウム (1.54 g) の脱水THF (66 mL) 懸濁液に、エチル 2,3-ジブチルヘプタノアート (5.50 g) の脱水THF (10 mL) 溶液を滴下した。滴下終了後、10分攪拌し室温に戻した。2時間攪拌後、 5°C 以下に冷却し、硫酸ナトリウム・10水和物を少量ずつ添加した。発泡が

見られなくなった後、酢酸エチルで希釈して不溶物をセライトろ過した。溶媒を減圧下留去して標題化合物 (4.67 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.86 – 0.93 (9 H, m), 1.12 – 1.34 (19 H, m), 1.37 – 1.46 (1 H, m), 1.47 – 1.61 (1 H, m), 3.49 – 3.62 (2 H, m)

[0153] E) 2,3-ジブチルヘプタナール

窒素気流下、2,3-ジブチルヘプタン-1-オール (4.60 g) およびDBU (6.02 mL) のジクロロメタン (46 mL) 溶液を -10°C に冷却し、N-tert-ブチルベンゼンスルフィンイミドイル クロリド (6.52 g) のジクロロメタン (20 mL) 溶液を -5°C 以下を保持しながら滴下した。 -10°C で3時間攪拌後、1N塩酸で酸性にした。分液操作を行った後、溶媒を減圧下留去した。残渣を酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (4.11 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.83 – 0.96 (9 H, m), 1.15 – 1.39 (16 H, m), 1.52 – 1.60 (1 H, m), 1.62 – 1.74 (2 H, m), 2.22 – 2.27 (1 H, m), 9.64 (1 H, d, $J = 2.8$ Hz)

[0154] F) エチル 4,5-ジブチルノン-2-エノアート

窒素気流氷冷下、60% 水素化ナトリウム (ミネラルオイル含有) (1.0 g) の脱水THF (41 mL) 懸濁液を10分間攪拌した。その後、エチル(ジエトキシフオスフォリル)アセタート (6.10 g) を 10°C 以下で滴下した。同温度で10分間攪拌した後、2,3-ジブチルヘプタナール (4.10 g) の脱水THF (8 mL) 溶液を滴下し、室温まで昇温した。しばらく攪拌した後、 50°C に昇温した。5時間攪拌後、反応混合物を 5°C 以下にして水を添加した後、酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水で2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (4.14 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.83 – 0.97 (9 H, m), 1.14 – 1.38 (22 H

, m), 2.16 - 2.30 (1 H, m), 4.10 - 4.22 (2 H, m), 5.72 - 5.78 (1 H, m), 6.80 (1 H, dd, J = 15.6, 9.6 Hz)

[0155] G) 4,5-ジブチルノン-2-エノン酸

エチル 4,5-ジブチルノン-2-エノアート (4.10 g) および8N 水酸化ナトリウム水溶液 (6.1 mL) のエタノール (30 mL) 溶液を60℃で2時間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、1N塩酸で酸性にした。残渣を酢酸エチルで希釈し、水で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (2.80 g) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.81 - 0.93 (9 H, m), 1.06 - 1.47 (19 H, m), 2.16 - 2.33 (1 H, m), 5.75 - 5.80 (1 H, m), 6.92 (1 H, dd, J = 15.8, 9.8 Hz)

[0156] H) 3-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)-2-(((4-メトキシベンジル)オキシ)メチル)プロピル-4,5-ジブチルノン-2-エノアート

(5-(((4-メトキシベンジル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサノ-5-イル)メタノール (600 mg)、DMAP (240 mg) および4,5-ジブチルノン-2-エノン酸 (706 mg) のDMF (4 mL) 溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (582 mg) を室温に加えた。一晩攪拌後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。得られた残渣をTHF (12 mL) に溶解させた後、1N塩酸 (6 mL) を加えて3日間攪拌した。反応混合物に酢酸エチルを加え、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (870 mg) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.84 - 0.93 (9 H, m), 1.13 - 1.36 (18 H, m), 1.40 - 1.47 (1 H, m), 2.21 (1 H, dt, J = 9.3, 4.8 Hz), 2.69 (2 H, td, J = 6.6, 2.5 Hz), 3.48 (2 H, s), 3.55 - 3.67 (4 H, m), 3.80 -

3.82 (3 H, m), 4.23 - 4.32 (2 H, m), 4.45 (2 H, s), 5.74 - 5.79 (1 H, m), 6.82 - 6.91 (3 H, m), 7.21 - 7.25 (2 H, m)

[0157] I) 3-((4-メトキシベンジル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル -4,5-ジブチルノン-2-エノアート

3-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)-2-(((4-メトキシベンジル)オキシ)メチル)プロピル-4,5-ジブチルノン-2-エノアート (870 mg)、DMAP (210 mg) およびオクタン酸 (545 mg) のDMF (6 mL) 溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (757 mg) を室温に加えた。60℃で4時間攪拌した後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (1.26 g) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.83 - 0.93 (15 H, m), 1.13 - 1.45 (35 H, m), 1.52 - 1.61 (4 H, m), 2.17 - 2.31 (5 H, m), 3.43 (2 H, s), 3.80 (3 H, s), 4.10 - 4.22 (6 H, m), 4.40 (2 H, s), 5.73 (1 H, d, J = 15.4 Hz), 6.78 - 6.90 (3 H, m), 7.19 (2 H, d, J = 7.9 Hz)

[0158] J) 3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジブチルノナノアート

3-((4-メトキシベンジル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル -4,5-ジブチルノン-2-エノアート (1.26 g) のエタノール (10 mL) と酢酸エチル (10 mL) の混合溶液に、10%Pd炭素 (110 mg) を室温に加えて、水素雰囲気下で一晩攪拌した。反応後、Pd炭素をろ過除去した後、溶媒を減圧下留去した。残渣 (500 mg)、DMAP (95 mg) および5-(ジメチルアミノ)ペンタン酸塩酸塩 (170 mg) のDMF (4 mL) 溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (194 mg) を室温に加えた。50℃で7時間攪拌後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題

化合物 (250 mg) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.84 – 0.91 (15 H, m), 1.09 – 1.31 (37 H, m), 1.42 – 1.52 (2 H, m), 1.54 – 1.66 (6 H, m), 1.76 – 1.97 (1 H, m), 2.21 (6 H, s), 2.24 – 2.35 (10 H, m), 4.07 – 4.13 (8 H, m)

[0159] [実施例 14] 2-(((4,5-ジブチルノナノイル)オキシ)メチル)-2-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル ジデカノアート

A) エチル 4,5-ジブチルノナノアート

エチル 4,5-ジブチルノン-2-エノアート (2,50 g) のエタノール (20 mL) 溶液に、10%Pd炭素 (0.54 g) を室温に加え、水素雰囲気下、5時間攪拌した。反応後、Pd炭素をろ過除去した後、溶媒を減圧下留去し標題化合物 (2.49 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.82 – 1.00 (9 H, m), 1.10 – 1.33 (23 H, m), 1.46 – 1.63 (2 H, m), 2.19 – 2.36 (2 H, m), 4.06 – 4.19 (2 H, m)

[0160] B) 4,5-ジブチルノナノン酸

エチル 4,5-ジブチルノナノアート (2.49 g) および8N 水酸化ナトリウム水溶液 (3.55 mL) のエタノール (12.5 mL) 溶液を60°Cで7時間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、1N塩酸で酸性にした。残渣を酢酸エチルで希釈し、水で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去して標題化合物 (2.36 g) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.83 – 0.94 (9 H, m), 0.95 – 1.33 (20 H, m), 1.49 (1 H, ddt, J = 13.7, 9.3, 6.8, 6.8 Hz), 1.56 – 1.74 (1 H, m), 2.26 – 2.42 (2 H, m)

[0161] C) (5-(ヒドロキシメチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メチル 4,5-ジブチルノナノアート

(5-(((tert-ブチル(ジフェニル)シリル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メタノール (800 mg)、DMAP (306 mg) および4,5-ジブ

チルノナノン酸 (678 mg) のDMF (8 mL) 溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (555 mg) を室温で加えた。50℃で8時間攪拌後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製した。この化合物のTHF (4 mL) 溶液に、TBAFのTHF溶液 (1M, 2.32 mL) を室温で加えた。室温で一晩攪拌後、反応混合物を減圧下濃縮した。残渣を酢酸エチルで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で1回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (680 mg) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.89 (9 H, t, J = 6.8 Hz), 1.09 – 1.31 (20 H, m), 1.42 (6 H, s), 1.45 – 1.54 (1 H, m), 1.57 – 1.62 (1 H, m), 2.29 – 2.37 (3 H, m), 3.48 (2 H, d, J = 6.6 Hz), 3.70 – 3.75 (4 H, m), 4.25 (2 H, d, J = 1.9 Hz)

[0162] D) (5-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メチル 4,5-ジブチルノナノアート

(5-(ヒドロキシメチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メチル 4,5-ジブチルノナノアート (680 mg)、DMAP (388 mg) および5-(ジメチルアミノ)ペンタン酸塩酸塩 (576 mg) のDMF (7 mL) 溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (669 mg) を室温で加えた。50℃で7時間攪拌後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (740 mg) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.89 (9 H, t, J = 6.9 Hz), 1.09 – 1.31 (21 H, m), 1.42 (6 H, s), 1.48 (3 H, dt, J = 15.1, 7.6 Hz), 1.60 – 1.66 (2 H, m), 2.21 (6 H, s), 2.22 – 2.32 (4 H, m), 2.35 (2 H, t, J = 7

.6 Hz), 3.75 (4 H, s), 4.09 – 4.13 (4 H, m)

[0163] E) 2-(((4,5-ジブチルノナノイル)オキシ)メチル)-2-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル ジデカノアート

(5-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メチル 4,5-ジブチルノナノアート (1.68 g) に酢酸 (8.4 mL) と水 (4.2 mL) を加え 75°C で 2 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、酢酸エチルと飽和水酸化ナトリウム水溶液を加えて 2 時間攪拌した。有機層を飽和水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣 (700 mg)、DMAP (497 mg) およびデカン酸 (701 mg) の DMF (7 mL) 溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (859 mg) を室温で加えた。50°C で 7 時間攪拌後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン、酢酸エチル/メタノール及び NH₃, 酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (405 mg) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.84 – 0.93 (15 H, m), 1.10 – 1.32 (44 H, m), 1.40 – 1.54 (3 H, m), 1.54 – 1.66 (7 H, m), 2.21 (6 H, s), 2.23 – 2.35 (10 H, m), 4.11 (8 H, s)

[0164] [実施例 18] 3-(((4-(ジメチルアミノ)ブチル)カルバモイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジブチルノナノアート

(5-(ヒドロキシメチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メチル 4,5-ジブチルノナノアート (0.50 g) のテトラヒドロフラン溶液 (7.5 mL) に、1-カルボニルジイミダゾール (0.28 g) を室温で加えた。1 時間攪拌後、反応混合物を減圧下濃縮した。残渣をヘキサンで希釈し、不溶物を除いた後、ろ液を減圧下濃縮した。残渣にテトラヒドロフラン (10 mL)、(4-アミノブチル)ジメチルアミン (0.20 g)、トリエチルアミン (0.24 mL) を室温で加えた。20 時間攪拌後、酢酸エチルで希釈し、水、塩化アンモニウム水溶液、炭酸水素ナトリウム水溶液で順次洗浄し、溶媒を減圧下留去した。残渣に酢酸

(3.3 mL)、水 (1.7 mL) を加え、65°Cで5時間攪拌した。室温に冷却後、溶媒を減圧下留去した。残渣を酢酸エチルで希釈し、炭酸水素ナトリウム水溶液、水で順次洗浄し、溶媒を減圧下留去した。残渣に、N, N-ジメチルホルムアミド (4 mL)、DMAP (61 mg)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (288 mg)、オクタン酸 (0.19 mL) を加えた。60°Cで3時間攪拌後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水、食塩水で順次洗浄後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (215 mg) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (15 H, t, J = 7.09 Hz) 1.10 – 1.33 (32 H, m) 1.40 – 1.62 (14 H, m) 2.21 (6 H, s) 2.25 – 2.32 (8 H, m) 3.16 (2 H, m) 4.10 (8 H, s) 5.84 (1 H, m)

[0165] [実施例 20] 3-((3-ブチルヘプタノイル)オキシ)-2-(((3-ブチルヘプタノイル)オキシ)メチル)-2-(((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)メチル)プロピル (9Z)-ヘキサデカ-9-エノアート

A) (5-(((tert-ブチル(ジフェニル)シリル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メチル (9Z)-ヘキサデカ-9-エノアート

窒素雰囲気下、(5-(((tert-ブチル(ジフェニル)シリル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メタノール (1.50 g)、DMAP (0.49 g) およびパルミトレイン酸 (1.01 g) のDMF (15 mL) 溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (0.83 g) を50°Cで加えた。21時間攪拌後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水で1回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (2.11 g) を得た。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.85 – 0.94 (3 H, m), 1.01 – 1.10 (9 H, m), 1.24 – 1.35 (16 H, m), 1.40 (6 H, d, J = 10.3 Hz), 1.52 – 1.61 (2 H, m), 1.97 – 2.07 (4 H, m), 2.25 (2 H, t, J = 7.6 Hz), 3.66 (2 H, s), 3.77 (4 H, q, J = 11.8 Hz), 4.18 (2 H, s), 5.35 (2 H, ddd, J = 5.

8, 3.4, 2.7 Hz), 7.36 - 7.47 (6 H, m), 7.65 - 7.69 (4 H, m)

[0166] B) 3-((tert-ブチル(ジフェニル)シリル)オキシ)-2,2-ビス(((3-ブチルヘプタノイル)オキシ)メチル)プロピル (9Z)-ヘキサデカ-9-エノアート

窒素雰囲気下、5-(((tert-ブチル(ジフェニル)シリル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メチル (9Z)-ヘキサデカ-9-エノアート (2.11 g) に酢酸 (10.6 mL)、水 (5.3 mL) を加え、75°Cで8時間攪拌した。室温に冷却後、溶媒を減圧下留去した。残渣を酢酸エチルで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去し、残渣 (1.95 g) を得た。窒素雰囲気下、残渣 (0.95 g) を秤量し、DMF (9.5 mL) 溶液に溶解した後、DMAP (0.42 g) および3-ブチルヘプタン酸 (0.64 g) を添加してしばらく攪拌した。その後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (0.69 g) を50°Cで加えた。6時間攪拌後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水で1回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (0.71 g) を得た。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.84 - 0.93 (15 H, m), 1.05 (9 H, s), 1.18 - 1.37 (40 H, m), 1.51 - 1.60 (2 H, m), 1.78 (2 H, br d, J = 5.2 Hz), 1.97 - 2.07 (4 H, m), 2.17 - 2.26 (6 H, m), 3.63 (2 H, s), 4.10 - 4.17 (6 H, m), 5.35 (2 H, ddd, J = 5.6, 3.5, 2.2 Hz), 7.35 - 7.48 (6 H, m), 7.60 - 7.65 (4 H, m)

[0167] C) 3-((3-ブチルヘプタノイル)オキシ)-2-(((3-ブチルヘプタノイル)オキシ)メチル)-2-(((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)メチル)プロピル (9Z)-ヘキサデカ-9-エノアート

3-((tert-ブチル(ジフェニル)シリル)オキシ)-2,2-ビス(((3-ブチルヘプタノイル)オキシ)メチル)プロピル (9Z)-ヘキサデカ-9-エノアート (0.71 g) のTHF (2.1 mL) 溶液に、TBAFのTHF溶液 (1M, 0.9 mL) を室温に加えた。室温で一晩攪拌後、反応混合物を減圧下濃縮した。残渣を酢酸エチルで希釈し

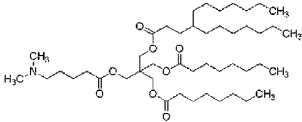
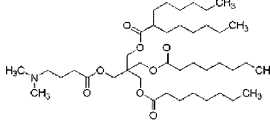
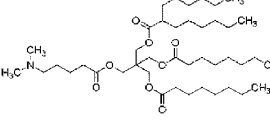
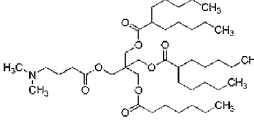
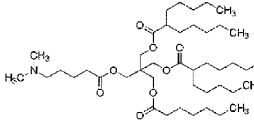
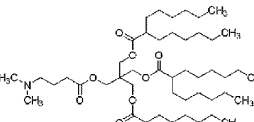
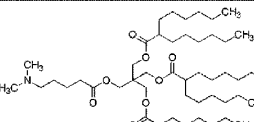
、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で1回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣をDMF (5.3 mL) 溶液に溶解した後、DMAP (0.14 g) および4-(ジメチルアミノ)ブタン酸塩酸塩 (0.19 g) を添加してしばらく攪拌した。その後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (0.24 g) を50℃で加えた。8時間攪拌後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水で1回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH, 酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物 (0.31 g) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.85 – 0.94 (15 H, m), 1.20 – 1.37 (40 H, m), 1.55 – 1.66 (2 H, m), 1.66 – 1.86 (4 H, m), 1.97 – 2.08 (4 H, m), 2.21 (6 H, s), 2.22 – 2.39 (10 H, m), 4.08 – 4.17 (8 H, m), 5.35 (2 H, ddd, $J = 5.6, 3.5, 2.1$ Hz)

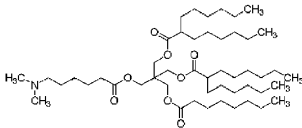
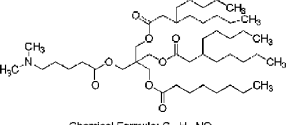
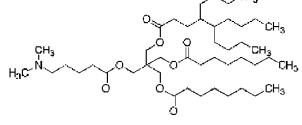
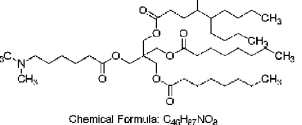
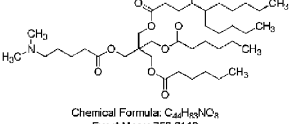
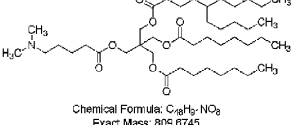
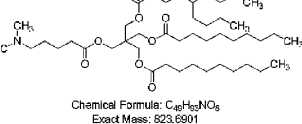
[0168] 上記の各実施例に示した方法、またはそれらに準じた方法のいずれかに従って、以下の表中の実施例2～7、9、11～13、15～17、19及び21が製造された。これらの実施例について、実施例1、8、10、14、18及び20ともに、化合物の名称、構造式、 ^1H NMRケミカルシフト及び製造時に実施された質量数 (表中、MSで示す) を表1に示す。

[0169]

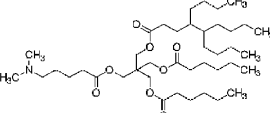
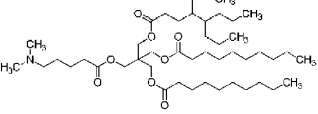
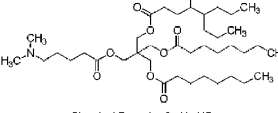
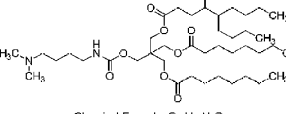
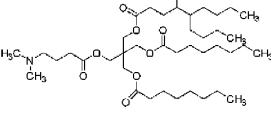
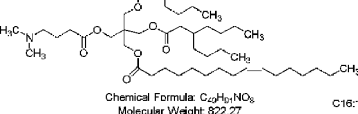
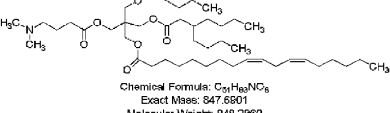
[表1-1]

実施例 番号	IUPAC名	構造式	NMR データ	MS:m/z (M+H)
1	3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4-ヘプチルウンデカノアート	 Chemical Formula: $C_{47}H_{93}NO_6$ Exact Mass: 781.6432 Molecular Weight: 782.1849	1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.86 - 0.91 (12 H, m), 1.15 - 1.34 (45 H, m), 1.45 - 1.52 (2 H, m), 1.53 - 1.66 (4 H, m), 2.20 (6 H, s), 2.23 - 2.36 (10 H, m), 4.11 (8 H, s)	782.18
2	2-(((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)メチル)-2-(((2-ヘキシルオクタノイル)オキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル ジオクタノアート	 Chemical Formula: $C_{41}H_{77}NO_5$ Exact Mass: 711.5849 Molecular Weight: 712.0520	1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.80 - 0.95 (12 H, m), 1.15 - 1.35 (32 H, m), 1.37 - 1.64 (8 H, m), 1.70 - 1.83 (2 H, m), 2.20 (6 H, s), 2.23 - 2.41 (9 H, m), 4.11 (8 H, s)	712.46
3	2-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)メチル)-2-(((2-ヘキシルオクタノイル)オキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル ジオクタノアート	 Chemical Formula: $C_{43}H_{83}NO_5$ Exact Mass: 725.5808 Molecular Weight: 726.0786	1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.81 - 0.93 (12 H, m), 1.14 - 1.36 (32 H, m), 1.39 - 1.66 (12 H, m), 2.20 (6 H, s), 2.22 - 2.38 (9 H, m), 4.11 (8 H, s)	726.48
4	2-(((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)メチル)-2-(((ヘプタノイル)オキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル ビス(2-ペンチルヘプタノアート)	 Chemical Formula: $C_{42}H_{79}NO_5$ Exact Mass: 725.5805 Molecular Weight: 726.0786	1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.78 - 0.95 (15 H, m), 1.14 - 1.35 (30 H, m), 1.37 - 1.57 (10 H, m), 1.68 - 1.83 (2 H, m), 2.20 (6 H, s), 2.23 - 2.42 (8 H, m), 4.10 (8 H, s)	726.53
5	2-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)メチル)-2-(((ヘプタノイル)オキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル ビス(2-ペンチルヘプタノアート)	 Chemical Formula: $C_{43}H_{83}NO_5$ Exact Mass: 739.5962 Molecular Weight: 740.1051	1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.81 - 0.94 (15 H, m), 1.14 - 1.35 (30 H, m), 1.37 - 1.66 (14 H, m), 2.20 (6 H, s), 2.22 - 2.39 (8 H, m), 4.10 (8 H, s)	740.56
6	2-(((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)メチル)-2-(((オクタノイル)オキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル ビス(2-ヘキシルオクタノアート)	 Chemical Formula: $C_{47}H_{93}NO_5$ Exact Mass: 795.6588 Molecular Weight: 796.2115	1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.81 - 0.93 (15 H, m), 1.13 - 1.36 (40 H, m), 1.39 - 1.61 (10 H, m), 1.70 - 1.83 (2 H, m), 2.20 (6 H, s), 2.23 - 2.41 (8 H, m), 4.10 (8 H, s)	796.58
7	2-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)メチル)-2-(((オクタノイル)オキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル ビス(2-ヘキシルオクタノアート)	 Chemical Formula: $C_{49}H_{97}NO_5$ Exact Mass: 809.6745 Molecular Weight: 810.2380	1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.81 - 0.93 (15 H, m), 1.13 - 1.35 (40 H, m), 1.38 - 1.67 (14 H, m), 2.20 (6 H, s), 2.22 - 2.39 (8 H, m), 4.10 (8 H, s)	810.58

[表1-2]

実施例 番号	IUPAC名	構造式	NMR データ	MS:m/z (M+H)
8	2-(((6-(ジメチルアミノ)ヘキサノイル)オキシ)メチル)-2-((オクタノイルオキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイルビス(2-ヘキシルオクタノアート)	 Chemical Formula: $C_{48}H_{93}NO_3$ Exact Mass: 823.6901 Molecular Weight: 824.2646	1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) d ppm 0.83 - 0.92 (15 H, m), 1.19 - 1.34 (42 H, m), 1.39 - 1.50 (6 H, m), 1.52 - 1.73 (8 H, m), 2.21 (6 H, s), 2.21 - 2.35 (8 H, m), 4.10 (8 H, s)	824.67
9	2-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)メチル)-2-((オクタノイルオキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイルビス(3-ベンチルオクタノアート)	 Chemical Formula: $C_{48}H_{93}NO_3$ Exact Mass: 823.6901 Molecular Weight: 824.2646	1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) d ppm 0.88 (15H, t, J=7.09 Hz), 1.22 - 1.32 (40H, m), 1.45 - 1.53 (2H, m), 1.55 - 1.68 (4H, m), 1.77 - 1.86 (2H, m), 2.22 (6H, s), 2.21 - 2.30 (10H, m), 4.10 (8H, s)	782.65
10	3-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジブチルノナノアート	 Chemical Formula: $C_{48}H_{93}NO_3$ Exact Mass: 797.6275 Molecular Weight: 798.1583	1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) d ppm 0.84 - 0.91 (15 H, m), 1.09 - 1.31 (36 H, m), 1.42 - 1.52 (3 H, m), 1.54 - 1.66 (7 H, m), 2.21 (6 H, s), 2.24 - 2.35 (10 H, m), 4.07 - 4.13 (8 H, m)	768.63
11	3-(((6-(ジメチルアミノ)ヘキサノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジブチルノナノアート	 Chemical Formula: $C_{48}H_{93}NO_3$ Exact Mass: 791.6432 Molecular Weight: 792.1849	1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) d ppm 0.85 - 0.92 (15 H, m), 1.11 - 1.16 (2 H, m), 1.18 - 1.34 (36 H, m), 1.41 - 1.51 (3 H, m), 1.54 - 1.66 (6 H, m), 1.77 (1 H, br s), 2.21 (6 H, s), 2.22 - 2.33 (10 H, m), 4.11 (8 H, s)	782.65
12	3-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス((ヘキサノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジベンチルデカノアート	 Chemical Formula: $C_{48}H_{93}NO_3$ Exact Mass: 753.6119 Molecular Weight: 754.1317	1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) d ppm 0.89 (15 H, td, J=7.1, 4.4 Hz), 1.06 - 1.18 (3 H, m), 1.19 - 1.35 (30 H, m), 1.49 (3 H, dt, J=15.3, 7.5 Hz), 1.54 - 1.68 (8 H, m), 2.22 (6 H, s), 2.24 - 2.36 (10 H, m), 4.11 (8 H, s)	754.62
13	3-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジベンチルデカノアート	 Chemical Formula: $C_{48}H_{93}NO_3$ Exact Mass: 805.6745 Molecular Weight: 810.2380	1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) d ppm 0.86 - 0.91 (15 H, m), 0.98 - 1.18 (2 H, m), 1.19 - 1.33 (40 H, m), 1.48 (3 H, dt, J=15.1, 7.4 Hz), 1.54 - 1.72 (7 H, m), 2.21 (6 H, s), 2.23 - 2.35 (10 H, m), 4.11 (8 H, s)	810.68
14	2-(((4,5-ジブチルノナノイル)オキシ)メチル)-2-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイルジデカノアート	 Chemical Formula: $C_{48}H_{93}NO_3$ Exact Mass: 823.6901 Molecular Weight: 824.2646	1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) d ppm 0.84 - 0.93 (15 H, m), 1.10 - 1.32 (44 H, m), 1.40 - 1.54 (3 H, m), 1.54 - 1.66 (7 H, m), 2.21 (6 H, s), 2.23 - 2.35 (10 H, m), 4.11 (8 H, s)	824.70

[表1-3]

実施例 番号	IUPAC名	構造式	NMR データ	MS:m/z (M+H)
15	3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス((ヘキサノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジブチルノナート	 Chemical Formula: $C_{60}H_{117}NO_8$ Exact Mass: 711.9649 Molecular Weight: 712.0520	1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.85 - 0.93 (15 H, m), 1.11 - 1.35 (29 H, m), 1.41 - 1.52 (3 H, m), 1.55 - 1.66 (6 H, m), 2.21 (6 H, s), 2.23 - 2.36 (10 H, m), 4.12 (8 H, s)	712.57
16	2-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)メチル)-2-(((4,5-ジプロピルオクタノイル)オキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイルジデカノート	 Chemical Formula: $C_{68}H_{127}NO_8$ Exact Mass: 781.6432 Molecular Weight: 782.1849	1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.85 - 0.91 (15 H, m), 1.11 (3 H, dtd, J=12.6, 6.1, 6.1, 2.8 Hz), 1.18 - 1.32 (34 H, m), 1.42 - 1.54 (3 H, m), 1.55 - 1.65 (8 H, m), 2.21 (6 H, s), 2.22 - 2.35 (10 H, m), 4.11 (8 H, s)	782.65
17	3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジプロピルオクタノート	 Chemical Formula: $C_{62}H_{119}NO_8$ Exact Mass: 725.5606 Molecular Weight: 726.0786	1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.85 - 0.91 (15 H, m), 1.07 - 1.15 (3 H, m), 1.18 - 1.33 (26 H, m), 1.42 - 1.51 (3 H, m), 1.55 - 1.66 (8 H, m), 2.20 (6 H, s), 2.22 - 2.35 (10 H, m), 4.11 (8 H, s)	726.59
18	3-(((4-(ジメチルアミノ)ブチル)カルボモイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジブチルノナート	 Chemical Formula: $C_{62}H_{125}N_2O_8$ Exact Mass: 762.6364 Molecular Weight: 763.1728	1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.88 (15H, t, J=7.09 Hz), 1.10 - 1.33 (32H, m), 1.40 - 1.62 (14H, m) 2.21 (6H, s) 2.25 - 2.32 (8H, m) 3.16 (2H, m) 4.10 (8H, s) 5.84 (1H, m)	763.65
19	3-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)-2,2-ビス((オクタノイルオキシ)メチル)プロピル 4,5-ジブチルノナート	 Chemical Formula: $C_{64}H_{133}NO_8$ Molecular Weight: 754.15	1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.89 (15 H, dq, J=6.7, 3.4 Hz), 1.05 - 1.17 (3 H, m), 1.21 - 1.34 (31 H, m), 1.45 - 1.83 (10 H, m), 2.22 (6 H, s), 2.24 - 2.39 (10 H, m), 4.09 - 4.16 (8 H, m)	754.62
20	3-((3-ブチルヘプタノイル)オキシ)-2-(((3-ブチルヘプタノイル)オキシ)メチル)-2-(((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)メチル)プロピル (9Z)-ヘキサデカ-9-エノート	 Chemical Formula: $C_{67}H_{127}NO_8$ Molecular Weight: 822.27	1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.85 - 0.94 (15 H, m), 1.20 - 1.37 (40 H, m), 1.55 - 1.66 (2 H, m), 1.66 - 1.86 (4 H, m), 1.97 - 2.08 (4 H, m), 2.21 (6 H, s), 2.22 - 2.39 (10 H, m), 4.08 - 4.17 (8 H, m), 5.35 (2 H, ddd, J=5.6, 3.5, 2.1 Hz)	822.68
21	3-((3-ブチルヘプタノイル)オキシ)-2-(((3-ブチルヘプタノイル)オキシ)メチル)-2-(((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)メチル)プロピル (9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエノート	 Chemical Formula: $C_{71}H_{143}NO_8$ Exact Mass: 847.6801 Molecular Weight: 848.2960	1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.84 - 0.93 (15 H, m), 1.19 - 1.40 (38 H, m), 1.54 - 1.87 (6 H, m), 2.00 - 2.09 (4 H, m), 2.19 - 2.38 (16 H, m), 2.77 (2 H, t, J=5.9 Hz), 4.10 (8 H, s), 5.28 - 5.43 (4 H, m)	848.70

[0170] [製造例 1] siRNA内封脂質ナノ粒子の製造例

脂質混合物（カチオン性脂質:DPPC:Cholesterol:GS-020 = 60:10.6:28:1.4, モル比）を、90% EtOH、10% 25 mM酢酸緩衝液pH 4.0に溶解して、7.4 mg/mlの脂質溶液を得た。Luciferase (luc) siRNA（表2参照）は25 mM酢酸緩衝液pH4.0に溶解して0.15 mg/mlの核酸溶液を得た。得られた脂質溶液および核酸溶液を、室温でAsia microfluidic system (Syrrix)によって、流速比 1 ml/min : 5 ml/minで混合し、組成物を含む分散液を得た。得られた分散液は、Slyde-A-Lyzer (20Kの分画分子量、Thermo scientific) を用いて水に対して室温で1時間、PBSに対して室温で18時間透析を行った。続いて、0.2 μ mの syringe filter (Iwaki) を用いてろ過を行い、4℃に保存した。分析の結果を表3に示す。以下、組成物中の脂質粒子の粒子径は、動的光散乱測定技術に基づく粒子径測定装置、Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) を用い、自己相関関数のキュムラント解析によりZ平均粒子径として算出した。

[0171] [表2]

Luc siRNAの配列

Sense	5' - [mC][mU][mU]A[mC]G[mC][mU]GAG[mU]A[mC][mU][mU][mC]GA[ts]t - 3'
Antisense	5' - UCGAAGUACUCAGCGUAAG[ts]t - 3'

N: RNA

n: DNA

[mN]: 2'-OMe RNA

[ns]: ホスホロチオエート結合

[0172] [表3]

カチオン性脂質	平均粒子径 (nm)	siRNA 濃度 (μ g/ml)	内封率 (%)
実施例 2	71	415	96
実施例 3	81	445	96
実施例 4	73	121	91
実施例 5	83	120	96
実施例 6	77	389	93
実施例 7	73	376	97

[0173] [製造例 2] mRNA内封脂質ナノ粒子の製造例

脂質混合物（カチオン性脂質:DPPC:Cholesterol:GM-020 = 60:10.6:28:1.4, モル比）を、90% EtOH、10% 水に溶解して、8.5 mg/mlの脂質溶液を得た。Luciferase mRNA (TriLink社) は10mM 2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES) 緩衝液pH4.0に溶解して0.22 mg/mlの核酸溶液を得た。得られた脂質溶液および核酸溶液を、室温で、Nanoassembler装置 (Precision Nanosystems社) によって、流速比 3 ml/min : 6 ml/minで混合し、組成物を含む分散液を得た。得られた分散液は、Slyde-A-Lyzer (20kの分画分子量、Thermo scientific 社) を用いて水に対して室温で1時間、PBSに対して4℃で48時間透析を行った。続いて、0.2 μ mのsyringe filter (Iwaki) を用いてろ過を行い、4℃に保存した。分析の結果を表4に示す。

[0174] [表4]

カチオン性脂質	平均粒子径 (nm)	mRNA 濃度 (μ g/ml)	内封率 (%)
実施例 1	112	145	96
実施例 8	103	97	91
実施例 9	96	77	94
実施例 10	123	83	96
実施例 11	122	78	93
実施例 12	134	160	93
実施例 13	119	155	99
実施例 14	88	134	94
実施例 15	164	127	99
実施例 16	109	134	94
実施例 17	152	116	87
実施例 18	77	103	99

[0175] [試験例 1] 培養細胞へのsiRNAトランスフェクション試験例

ルシフェラーゼを安定発現したヒト肝がん由来細胞株Hep3Bを6000 cells/wellの細胞密度で96-Wellプレートに培養し、24時間後にluciferase siRNAを含有する脂質粒子10 μ lを培地に添加した。siRNAの添加から48時間後、luciferaseの発現低下（ノックダウン）量はPicagene LT2.0キット（東洋紡）を用いて測定した。

測定結果より算出された50%ノックダウンに必要なsiRNA濃度を表5に示す。

[0176] [表5]

カチオン性脂質	50%ノックダウンに必要な siRNA 濃度 (nM)
実施例 2	14
実施例 3	55
実施例 4	190
実施例 5	28
実施例 6	41
実施例 7	1.2

[0177] [試験例2] 培養細胞へのmRNAトランスフェクション試験例

ヒト大腸がん由来細胞株HCT116を6000 cells/wellの細胞密度で96-Wellプレートに培養し、24時間後に10 ngのLuciferase mRNAを含有する脂質粒子10 μ lを培地に添加した。mRNAの添加から24時間後、HCT116の培養プレートにPicagene LT2.0キット（東洋紡）の試薬を添加し、発光プレートリーダーEnVision（Perkin-Elmer）を用いてLuciferase発光量（Luminescence (count per sec (cps)))を測定した。測定の結果を表6～表10に示す。

[0178] [表6]

カチオン性脂質	Luminescence(cps) 3 well の平均値
PBS control	1040
実施例 8	381693

[0179] [表7]

カチオン性脂質	Luminescence(cps) 3 well の平均値
PBS control	413
実施例 9	63493

[0180] [表8]

カチオン性脂質	Luminescence(cps) 3 well の平均値
PBS control	1293
実施例 10	500747
実施例 11	572560

[0181] [表9]

カチオン性脂質	Luminescence(cps) 3 well の平均値
PBS control	80
実施例 10	176813
実施例 12	62587
実施例 13	269467

[0182] [表10]

カチオン性脂質	Luminescence(cps) 3 well の平均値
PBS control	293
実施例 1	110733
実施例 10	112893
実施例 14	178133
実施例 15	3293
実施例 16	141560
実施例 17	7987
実施例 18	12813

[0183] [製造例3] siRNA内封脂質ナノ粒子の製造例

脂質混合物（カチオン性脂質:DPPC:Cholesterol:GS-020 = 60:10.6:28:1.4, モル比）を、90% EtOH、10% 25 mM酢酸緩衝液pH 4.0に溶解して、7.4 mg/mlの脂質溶液を得た。Collagen1a1 (Col1a1) に対するsiRNA、およびFactor V

II (FVII) に対するsiRNAは等重量ずつ25 mM酢酸緩衝液pH 4.0に溶解して0.15 mg/mlの核酸溶液を得た。なお、Col1a1 siRNAとFVII siRNAの配列はそれぞれHepatology, Vol. 672, No. 4, 2015、およびSilence, Vol. 1, No. 16, 2010より引用した。各siRNA配列を表 1 1 に示す。得られた脂質溶液および核酸溶液は、マイクロ流路混合装置Nanoassemblr (Precision Nanosystems Inc) によって、流速比 1 ml/min : 5 ml/minで混合し、組成物を含む分散液を得た。得られた分散液は、Slyde-A-Lyzer (20Kの分画分子量、Thermo scientific) を用いて水に対して室温で1時間、PBSに対して室温で18時間透析を行った。続いて、0.2 μmのsyringe filter (Iwaki) を用いてろ過を行い、4℃に保存した。siRNA内封脂質ナノ粒子の分析結果を表 1 2 に示す。本発明化合物を用いたsiRNA内封脂質ナノ粒子の形成は非常に良好であった。

[0184] [表11]

Col1a1 siRNAの配列	
Sense	5' - G[mU][mC][mU]AGA[mC]A[mU]G[mU][mU][mC]AG[mC][mU][mU][ts]t - 3'
Antisense	5' - AAGCUGAA[mC]AUGUC[mU]AGAC[ts]t - 3'

FVII siRNAの配列	
Sense	5' - GGA[fU][fC]A[fU][fC][fU][fC]AAG[fU][fC][fU]A[fC][ts]t - 3'
Antisense	5' - G[fU]AAGA[fC][fU][fU]GAGA[fU]GA[fU][fC][fC][ts]t - 3'

N: RNA
n: DNA
[mN]: 2'-OMe RNA
[ns]: ホスホロチオエート結合
[fN]: 2'-F RNA

[0185]

[表12]

siRNA内封脂質ナノ粒子の分析結果

カチオン性脂質	粒子径 (nm)	Col1a1 siRNA + FVII siRNA濃度 (μg/ml)	内封率 (%)
実施例1	111	128	98
実施例10	101	137	97
実施例11	91	320	97
実施例13	103	122	97
実施例14	97	126	96
実施例16	103	124	96
実施例19	89	112	96

[0186] [試験例3] CCl₄肝繊維化モデルマウスにおける肝Collagen1a1遺伝子ノックダウン試験例

8週齢雄性Balb/cマウスに0.1 mg/kgのCol1a1 siRNAを内封した脂質ナノ粒子を眼窩静脈叢内投与し、3時間後にコーン油に混和したCCl₄を0.1 mL/kg (10 mL/kg) の用量で単回強制経口投与した (各群n=6)。siRNA内封脂質ナノ粒子の投与4日後、麻酔下にて安楽死させたマウスより肝を採取し、定量的PCRにより遺伝子発現解析を行った。Col1a1遺伝子発現量とFVII遺伝子発現量はGAPDHの発現量によって標準化し、siRNA非投与群に対するCol1a1遺伝子発現低下量をノックダウン率とした。得られた結果を表13に示す。本発明化合物を用いて形成したsiRNA内封脂質ナノ粒子を静脈投与したマウスにおいては、肝実質細胞のマーカー遺伝子であるFVIIのノックダウン率と比較して、活性化星細胞のマーカー遺伝子であるCol1a1遺伝子のノックダウンが強く観察された。

[0187]

[表13]

**CCl4肝繊維化モデルマウスにおける肝Col1a1遺伝子
およびFVII遺伝子のノックダウン試験結果**

カチオン性脂質	Col1a1 siRNA + FVII siRNA (mg/kg)	Col1a1 ノック ダウン率 (%)	FVII ノック ダウン率 (%)
実施例1	0.1 + 0.1	86	0
実施例10	0.1 + 0.1	77	0
実施例11	0.1 + 0.1	77	21
実施例13	0.1 + 0.1	86	15
実施例14	0.1 + 0.1	76	16
実施例16	0.1 + 0.1	74	15
実施例19	0.1 + 0.1	71	31

産業上の利用可能性

[0188] 本発明の化合物、脂質粒子または組成物は、種々の細胞、組織または臓器に対し効率的に核酸を導入することを可能にする。したがって、本発明の化合物、脂質粒子または組成物は、核酸医薬におけるDDS技術として利用可能である。また、本発明の化合物、脂質粒子または組成物は、研究用核酸導入試薬としても利用可能である。

配列表フリーテキスト

[0189] 配列番号1および2：製造例2で用いられている、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を抑制するためのsiRNA（センス鎖およびアンチセンス鎖、表2参照）。配列番号3および4：製造例3で用いられている、コラーゲン1A1遺伝子の発現を抑制するためのsiRNA（センス鎖およびアンチセンス鎖、表11参照）。配列番号5および6：製造例3で用いられている、第VII因子遺伝子の発現を抑制するためのsiRNA（センス鎖およびアンチセンス鎖、表11参照）。