

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02019/131839

発行日 令和3年1月21日(2021.1.21)

(43) 国際公開日 令和1年7月4日(2019.7.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07C 229/12 (2006.01)	C O 7 C 229/12	4 C O 7 6
A61K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C O 8 4
A61K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C O 8 6
A61K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 H O O 6
A61K 9/16 (2006.01)	A 6 1 K 9/16	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く

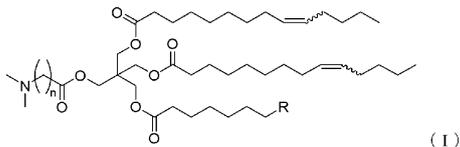
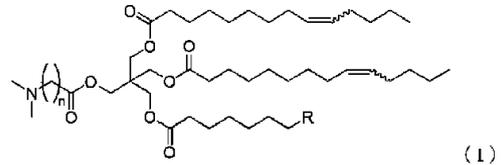
出願番号 特願2019-562145 (P2019-562145)	(71) 出願人 000002934 武田薬品工業株式会社
(21) 国際出願番号 PCT/JP2018/048054	大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22) 国際出願日 平成30年12月27日(2018.12.27)	(74) 代理人 230104019 弁護士 大野 聖二
(31) 優先権主張番号 特願2017-254667 (P2017-254667)	(74) 代理人 100119183 弁理士 松任谷 優子
(32) 優先日 平成29年12月28日(2017.12.28)	(74) 代理人 100149076 弁理士 梅田 慎介
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	(74) 代理人 100162503 弁理士 今野 智介
	(74) 代理人 100144794 弁理士 大木 信人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カチオン性脂質

(57) 【要約】

本発明は、活性成分、特に核酸を、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。本発明に係る化合物又はその塩は、下記式(I)で表される化合物又はその塩であり、式中、nは、2～5の整数を、Rは、直鎖状C₁₋₅アルキル基、直鎖状C₇₋₁₁アルケニル基又は直鎖状C₁₁アルカジエニル基を、波線は、それぞれ独立して、シス型又はトランス型の結合を示す。

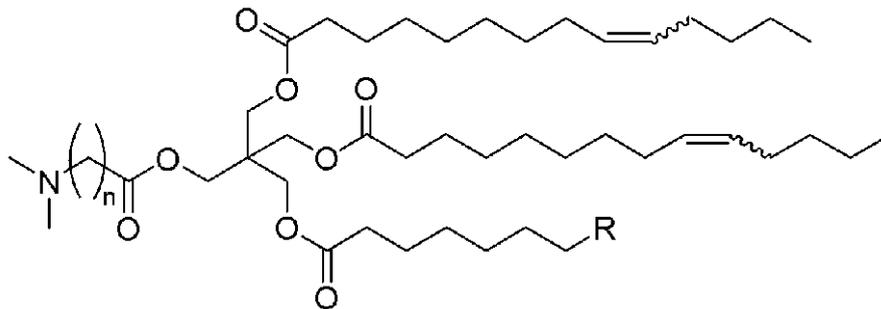


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) :

【化 1】



(I)

10

[式 (I) 中、

n は、2 ~ 5 の整数を、

R は、直鎖状 C₁ - 5 アルキル基、直鎖状 C₇ - 11 アルケニル基又は直鎖状 C₁ - 11 アルカジエニル基を、

波線は、それぞれ独立して、シス型またはトランス型の結合を示す。]

で表される化合物又はその塩。

20

【請求項 2】

3-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-テトラデカ-9-エノアート又はその塩。

【請求項 3】

3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-テトラデカ-9-エノアート又はその塩。

【請求項 4】

3-((6-(ジメチルアミノ)ヘキサノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-テトラデカ-9-エノアート又はその塩。

【請求項 5】

請求項 1 記載の化合物又はその塩を含有する脂質粒子。

30

【請求項 6】

核酸および請求項 5 記載の脂質粒子を含有する核酸導入用組成物。

【請求項 7】

核酸が、RNA である、請求項 6 記載の組成物。

【請求項 8】

RNA が mRNA または siRNA である、請求項 7 記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

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 mimics 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

50

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。

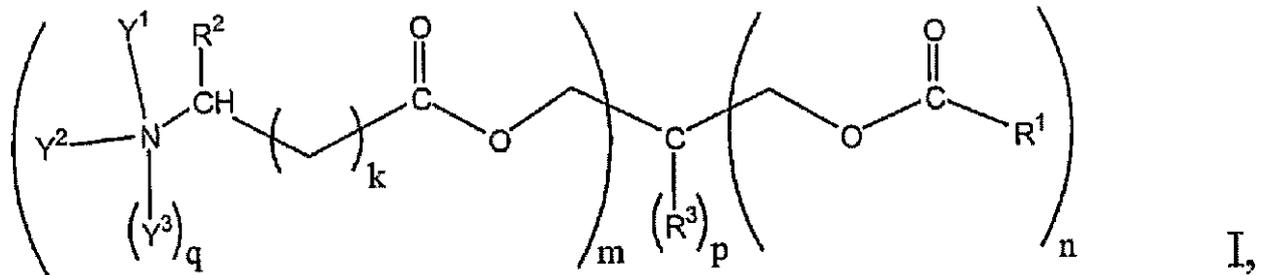
【0004】

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。

10

【0005】

【化1】



20

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。

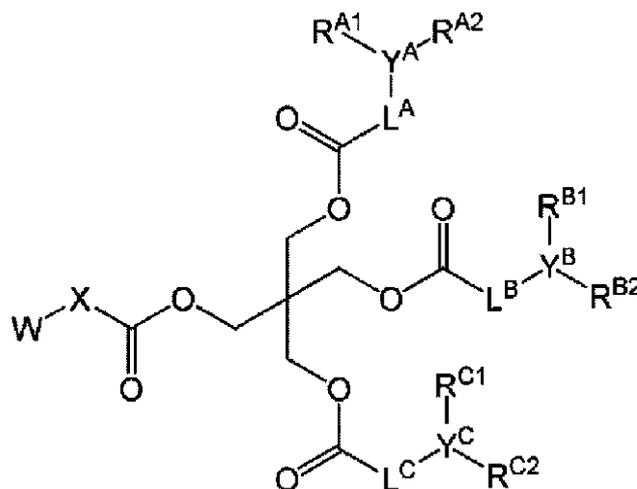
30

【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】



40

50

式中、Wは式 -NR¹R² または式 -N⁺R³R⁴R⁵ (Z⁻) を示し、R¹ および R² はそれぞれ独立して C₁ - 4 アルキル基または水素原子を示し、R³、R⁴ および R⁵ はそれぞれ独立して C₁ - 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 C₁ - 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 C₄ - 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。

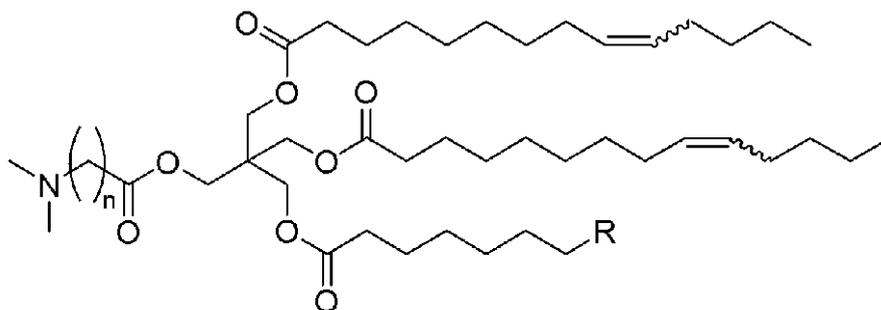
【0012】

すなわち、本発明は少なくとも以下の発明に関する。

[1]

式(I)：

【化3】



[式(I)中、

nは、2～5の整数を、

Rは、直鎖状 C₁ - 5 アルキル基、直鎖状 C₇ - 11 アルケニル基又は直鎖状 C₁ - 1 アルカジエニル基を、

波線は、それぞれ独立して、シス型又はトランス型の結合を示す。]

10

20

30

40

50

[2]

3-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-テトラデカ-9-エノアート又はその塩。

[3]

3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-テトラデカ-9-エ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(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-テトラデカ-9-エノアート又はその塩。

[5]

項 1 記載の化合物又はその塩を含有する脂質粒子。

[6]

核酸および項 5 記載の脂質粒子を含有する核酸導入用組成物。

[7]

核酸が、RNAである、項 6 記載の組成物。

[7 a]

核酸が、DNAである、項 6 記載の組成物。

[8]

RNAがmRNAまたはsiRNAである、項 7 記載の組成物。

【 0 0 1 3 】

なお、本明細書において、「式 (I) で表される化合物」を「化合物 (I) 」と記載することがある。また、「式 (I) 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 (I) 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 】

【 0 0 1 4 】

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) の発現効率が低い。

【 0 0 1 5 】

(発明の詳細な説明)

【 0 0 1 6 】

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。

【 0 0 1 7 】

本明細書中、「直鎖状 C₁₋₅ アルキル基」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチルが挙げられる。

【 0 0 1 8 】

本明細書中、「直鎖状 C₇₋₁₁ アルケニル基」としては、例えば、1-ヘプテニル、2-ヘプテニル、3-ヘプテニル、4-ヘプテニル、5-ヘプテニル、6-ヘプテニル、1-オクテニル、2-オクテニル、3-オクテニル、4-オクテニル、5-オクテニル、6-オクテニル、7-オクテニル、1-ノネニル、2-ノネニル、3-ノネニル、4-ノネニル、5-ノネニル、6-ノネニル、7-ノネニル、8-ノネニル、1-デセニル、2-デセニル、3-デセニル、4-デセニル、5-デセニル、6-デセニル、7-デセニル、8-デセニル、9-デセニル、1-ウンデセニル、2-ウンデセニル、3-ウンデセニル、4-ウンデセニル、5-ウンデセニル、6-ウンデセニル、7-ウンデセニル、8-

10

20

30

40

50

ウンデセニル、9 - ウンデセニル、10 - ウンデセニルが挙げられる。これらの直鎖状 C_{7-11} 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_{1-11} アルカジエニル基」としては、例えば、1, 3 - ウンデカジエニル、1, 4 - ウンデカジエニル、1, 5 - ウンデカジエニル、1, 6 - ウンデカジエニル、1, 7 - ウンデカジエニル、1, 8 - ウンデカジエニル、1, 9 - ウンデカジエニル、1, 10 - ウンデカジエニル、2, 4 - ウンデカジエニル、2, 5 - ウンデカジエニル、2, 6 - ウンデカジエニル、2, 7 - ウンデカジエニル、2, 8 - ウンデカジエニル、2, 9 - ウンデカジエニル、2, 10 - ウンデカジエニル、3, 5 - ウンデカジエニル、3, 6 - ウンデカジエニル、3, 7 - ウンデカジエニル、3, 8 - ウンデカジエニル、3, 9 - ウンデカジエニル、3, 10 - ウンデカジエニル、4, 6 - ウンデカジエニル、4, 7 - ウンデカジエニル、4, 8 - ウンデカジエニル、4, 9 - ウンデカジエニル、4, 10 - ウンデカジエニル、5, 7 - ウンデカジエニル、5, 8 - ウンデカジエニル、5, 9 - ウンデカジエニル、5, 10 - ウンデカジエニル、6, 8 - ウンデカジエニル、6, 9 - ウンデカジエニル、6, 10 - ウンデカジエニル、7, 9 - ウンデカジエニル、7, 10 - ウンデカジエニル、8, 10 - ウンデカジエニルが挙げられる。これらの直鎖状 C_{1-11} 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。

10

20

【0020】

式(I)におけるnおよび波線の好ましい例は次の通りである。

nは、好ましくは3～5の整数であり、より好ましくは3である。

波線は、好ましくは両方ともシス型の結合である。

【0021】

化合物(I)の好適な具体例は次の通りである。

化合物(A)：nが3～5の整数であり、Rがシス型の直鎖状 C_{7-11} アルケニル基であり、波線が両方ともシス型となる結合である化合物。

化合物(B)：nが4であり、Rが、2つの炭素 - 炭素二重結合の両方においてシス型の、直鎖状 C_{1-11} アルカジエニル基であり、波線が両方ともシス型の結合である化合物。

30

化合物(C)：nが2または3であり、Rが直鎖状 C_{1-5} アルキル基であり、波線が両方ともシス型の結合である化合物。

【0022】

化合物(I)のより好適な具体例は次の通りである。

化合物(A1)：nが3～5の整数であり、Rがシス型の5 - ヘプテニル、7 - ノネニルまたは9 - ウンデセニルであり、波線が両方ともシス型となる結合である化合物。

化合物(B1)：nが4であり、Rが、2つの炭素 - 炭素二重結合の両方においてシス型の、2, 5 - ウンデカジエニルであり、波線が両方ともシス型の結合である化合物。

化合物(C1)：nが2または3であり、Rがメチル、プロピル、またはペンチルであり、波線が両方ともシス型の結合である化合物。

40

【0023】

化合物(I)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。

【0024】

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。

【0025】

50

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-ジベンジルエチレンジアミンとの塩が挙げられる。

【0026】

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。

【0027】

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。

【0028】

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。

【0029】

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。

【0030】

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。

【0031】

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、ジリノレオイルホスファチジルコリン、MC-1010(NOF CORPORATION)、MC-2020(NOF CORPORATION)、MC-4040(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)；

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。

【0032】

10

20

30

40

50

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。

【0033】

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。

【0034】

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。

【0035】

「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ентな条件でハイブリダイズする二本鎖核酸も含まれる。

【0036】

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。

【0037】

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' - O - 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

10

20

30

40

50

びエチレン架橋構造型人工核酸 (Ethylene bridged nucleic acid) (E N A) [Nucleic Acid Research, 32, e175(2004)] が挙げられ、さらにペプチド核酸 (P N A) [Acc. Chem. Res., 32, 624(1999)]、オキシペプチド核酸 (O P N A) [J. Am. Chem. Soc., 123, 4653 (2001)]、およびペプチドリボ核酸 (P R N A) [J. Am. Chem. Soc., 122, 6900 (2000)] 等を挙げることができる。

【0038】

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、ホスフォ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' ホスフォ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)]。

10

【0039】

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。

20

【0040】

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。

【0041】

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) 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。

30

【0042】

本発明における核酸の具体例としては、例えば siRNA、shRNA、miRNA、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、プラスミドDNA、Cosmid DNA、BAC DNA 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。

40

【0043】

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。

【0044】

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

50

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 s i R N A 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 s i R N A を用いることもできる。

【 0 0 4 5 】

本発明において、「 m R N A 」とは、タンパク質に翻訳可能な塩基配列を含む R N A を意味する。本発明における m R N A 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 m R N A であれば、特に限定されない。上記 m R N A 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 m R N A が好ましく、そのような m R N A 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 m R N A が挙げられる。

10

【 0 0 4 6 】

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 (C D A N 1、C D A 1、R P S 1 9、D B A、P K L R、P K 1、N T 5 C 3、U M P H 1、P S N 1、R H A G、R H 5 0 A、N R A M P 2、S P T B、A L A S 2、A N H 1、A S B、A B C B 7、A B C 7、A S A T)、不全リンパ球症候群 (T A P B P、T P S N、T A P 2、A B C B 3、P S F 2、R I N G 1 1、M H C 2 T A、C 2 T A、R F X 5)、出血性疾患 (T B X A 2 R、P 2 R X 1、P 2 X 1)、H 因子および H 因子様 1 因子欠損症 (H F 1、C F H、H U S)、V 因子および V I I I 因子欠損症 (M C F D 2)、V I I 因子欠損症 (F 7)、X 因子欠損症 (F 1 0)、X I 因子欠損症 (F 1 1)、X I I 因子欠損症 (F 1 2、H A F)、X I I I A 因子欠損症 (F 1 3 A 1、F 1 3 A)、X I I I B 因子欠損症 (F 1 3 B)、ファンconi 貧血 (F A N C A、F A C A、F A 1、F A、F A A、F A A P 9 5、F A A P 9 0、F L J 3 4 0 6 4、F A N C B、F A N C C、F A C C、B R C A 2、F A N C D 1、F A N C D 2、F A N C D、F A C D、F A D、F A C E、F A C E、F A N C F、X R C C 9、F A N C G、B R I P 1、B A C H 1、F A N C J、P H F 9、F A N C L、F A N C M、K I A A 1 5 9 6)、血球貪食性リンパ組織球症 (P R F 1、H P L H 2、U N C 1 3 D、M U N C 1 3 - 4、H P L H 3、H L H 3、F H L 3)、血友病 A (F 8、F 8 C、H E M A)、血友病 B (F 9、H E M B)、出血性障害 (P I、A T T、F 5)、白血球欠損 (I T G B 2、C D 1 8、L C A M B、L A D、E I F 2 B 1、E I F 2 B A、E I F 2 B 2、E I F 2 B 3、E I F 2 B 5、L V W M、C A C H、C L E、E I F 2 B 4)、鎌状赤血球貧血 (H B B)、サラセミア (H B A 2、H B B、H B D、L C R B、H B A 1) など〕；

20

30

(2) 炎症性・免疫性疾患〔 A I D S (K I R 3 D L 1、N K A T 3、N K B 1、A M B 1 1、K I R 3 D S 1、I F N G、C X C L 1 2、S D F 1)、自己免疫リンパ球増殖性症候群 (T N F R S F 6、A P T 1、F A S、C D 9 5、A L P S 1 A)、複合型免疫不全症 (I L 2 R G、S C I D X 1、S C I D X、I M D 4)、H I V 感染症 (C C L 5、S C Y A 5、D 1 7 S 1 3 5 E、T C P 2 2 8、I L 1 0、C S I F、C M K B R 2、C C R 2、D M K B R 5、C C C K R 5、C C R 5)、免疫不全症 (C D 3 E、C D 3 G、A I C D A、A I D、H I G M 2、T N F R S F 5、C D 4 0、U N G、D G U、H I G M 4、T N F S F 5、C D 4 0 L G、H I G M 1、I G M、F O X P 3、I P E X、A I I D、X P I D、P I D X、T N F R S F 1 4 B、T A C I)、炎症 (I L 1 0、I L - 1、I L - 1 3、I L - 1 7、I L - 2 3、C T L A 4)、重症複合型免疫不全症 (J A K 3、J A K L、D C L R E 1 C、A T R E M I S、S C I D A、R A G 1、R A G 2、A D A、P T P R C、C D 4 5、L C A、I L 7 R、C D 3 D、T 3 D、I L 2 R G、S C I D X 1、S C I D X、I M D 4)、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

40

50

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、PRIIP、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、CP47、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、M1S1、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)

10

20

30

40

50

、黄斑ジストロフィー（E L O V L 4、A D M D、S T G D 2、S T G D 3、R D S、R P 7、P R P H 2、P R P H、A V M D、A O F M D、V M D 2）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、カポジ肉腫、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、甲状腺髄様癌など）、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）。

10

20

【0047】

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。

【0048】

本発明の組成物は、多数の種類細胞、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、間葉系幹細胞、神経幹細胞、皮膚幹細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓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、平滑筋細胞）、脂肪細胞、血球細胞（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、白血球、好中球、好塩基球、好酸球、単球、巨核球、造血幹細胞）、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）、始原生殖細胞、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、扁頭核、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、脳染、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、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、胎盤、子宮、骨、関節及び筋肉（例、骨格筋、平滑筋、心筋）等が挙げられる。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。

30

40

【0049】

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。

【0050】

50

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（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。

【0051】

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。

10

【0052】

以下、本発明の化合物の製造方法について説明する。

【0053】

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。

20

【0054】

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。

【0055】

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。

【0056】

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。

30

【0057】

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。

【0058】

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 ～ 300、好ましくは -78 ～ 150 である。

【0059】

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。

40

【0060】

各工程の反応において、例えば、Biotage社製 Initiator などの Microwave 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。

【0061】

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

50

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。

【0062】

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。

【0063】

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、tert-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。

【0064】

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。

【0065】

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、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、ペペリジンなど；

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。

【0066】

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。

【0067】

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。

10

20

30

40

50

【0068】

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. Tietze, 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。

10

【0069】

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。

20

【0070】

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；t-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。

30

【0071】

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-ジオキサンの環状アセタール型保護基などが挙げられる。

【0072】

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；O-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。

【0073】

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。

40

【0074】

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。

【0075】

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。

50

【0076】

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ジド、トリメチルシリルプロミド）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。

【0077】

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。

10

【0078】

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 - プ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。

20

【0079】

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。

30

【0080】

各工程において、W i t t i g 反応を行う場合、使用される W i t t i g 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。

【0081】

各工程において、H o r n e r - E m m o n s 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。

40

【0082】

各工程において、F r i e d e l - C r a f t s 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。

【0083】

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。

【0084】

50

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。

【0085】

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ー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ールと、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。

10

【0086】

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。

【0087】

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。

【0088】

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。

20

【0089】

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。

30

【0090】

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。

【0091】

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)-

40

50

N, 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。

【0092】

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。

10

【0093】

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。

20

【0094】

各工程において、Wohl - 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 - プロモコハク酸イミド (NBS)、N - クロロコハク酸イミド (NCS)、臭素、塩化スルフルルなどが挙げられる。さらに、熱、光、過酸化ベンゾイル、アゾビスイソプロ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。

【0095】

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。

30

【0096】

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、プ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。

40

【0097】

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。

【0098】

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。

50

【 0 0 9 9 】

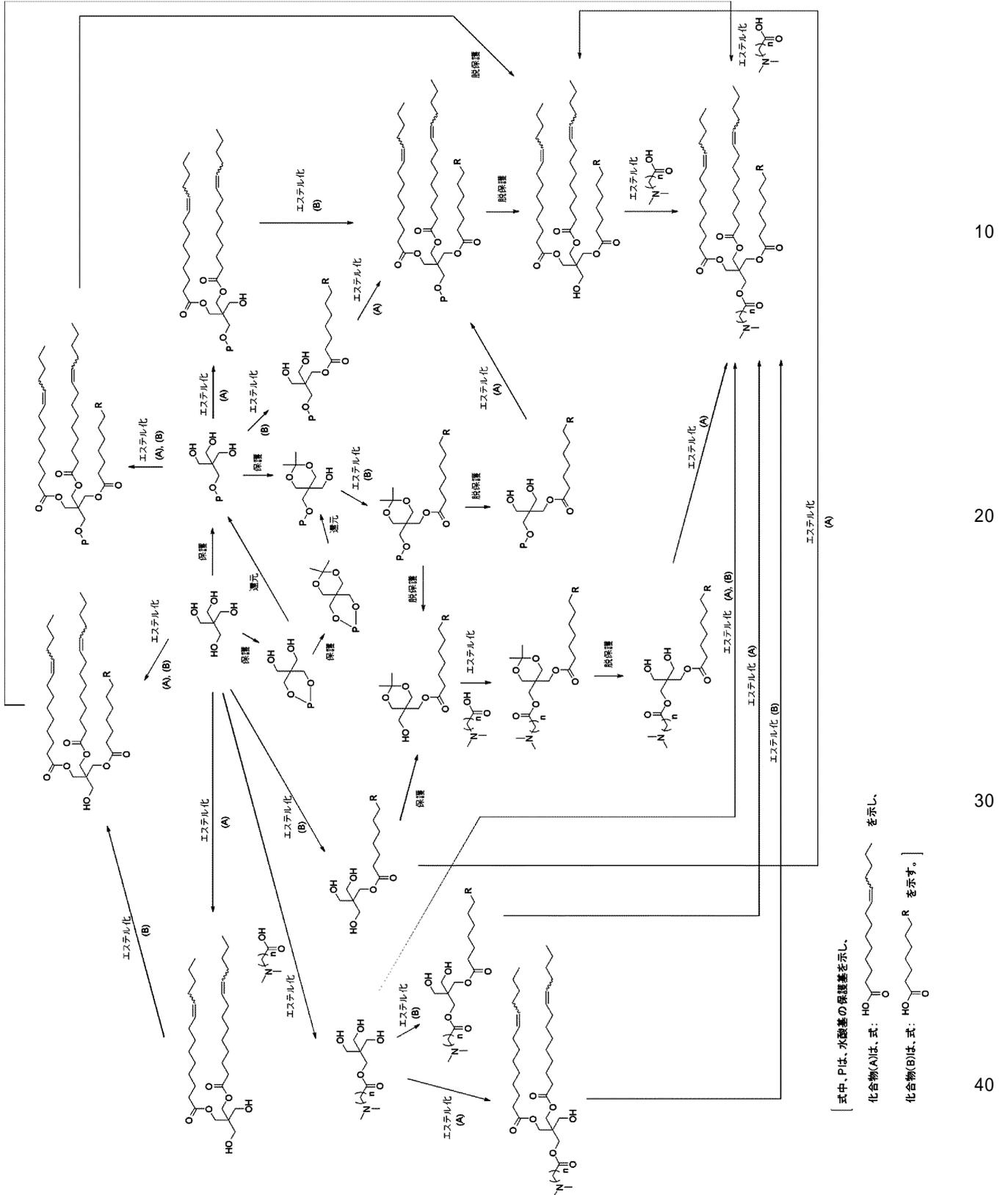
各工程において、脱水反応を行う場合、使用される脱水剤としては、硫酸、五酸化二リン、オキシ塩化リン、N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド、アルミナ、ポリリン酸などが挙げられる。

【 0 1 0 0 】

化合物 (I) は、例えば、以下の製法によって製造することができる。化合物 (I) のうち、波線の両方がシス型となる結合である化合物、および、波線の一方または両方がトランス型となる結合である化合物のいずれも以下に示す製法と同様の製法で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 (I) 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 (I) を合成することが可能である。また、化合物 (I) 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。

【 0 1 0 1 】

【化4】



【0102】

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核酸を含有する核酸導入用組成物の製造方法について記載する。

【0103】

本発明の脂質粒子は、本発明の化合物（カチオン性脂質）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過程に付してもよい。また、必要に応じてpH調整、浸透圧調整を行ってもよい。

【0104】

化合物(I)は、式(I)のn、Rおよび波線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

10

【0105】

「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。

20

【0106】

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。

【0107】

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。

30

【0108】

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-メ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。

【0109】

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、好ましくは0.1~10mL/minであり、温度は、好ましくは15~45℃である。

40

【0110】

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活性成分としての核酸を添加しておくことにより、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。活性成分は、水もしくは緩衝液における活性成分の濃度が0.05~2.0mg/mLとなるように添加することが好ましい。

【0111】

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、活性成分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

50

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。

【0112】

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、好ましくは、40～70重量%である。

【0113】

分散媒および溶媒を除いた本発明の組成物における活性成分の含量は、好ましくは、1～20重量%である。

【0114】

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。

10

【0115】

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。

【0116】

(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、NIBS(非接触後方散乱)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、好ましくは10～200nmである。

20

【0117】

本発明の組成物における活性成分としての核酸(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-iTTM 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。

30

【実施例】

【0118】

本発明は、更に以下の実施例、試験例および製剤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。

【0119】

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。

40

【0120】

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60F₂₅₄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-

50

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。

【0121】

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。

【0122】

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。

10

【0123】

以下の実施例においては下記の略号を使用する。

MS: マススペクトル

M: モル濃度

N: 規定度

CDCl₃: 重クロロホルム

20

DMSO-d₆: 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: 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

30

THF: テトラヒドロフラン

DMAPI: 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

【0124】

[実施例1] 3-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-テトラデカ-9-エノアート

A) 2-(((tert-ブチルジメチルシリル)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(5.45 g)、1H-イミダゾール(2.72 g)およびDMF(190 mL)の混合物に、tert-ブチルクロロジメチルシラン(3.01 g)のDMF(10 mL)溶液を室温で加えた。24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(2.25 g)を得た。

40

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) ppm 0.08 (6H, s), 0.90 (9H, s), 2.53 (3H, t, J = 5.5 Hz), 3.66 (2H, s), 3.73 (6H, d, J = 5.5 Hz)

【0125】

B) 3-(((tert-ブチル(ジメチル)シリル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-テトラデカ-9-エノアート

2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-1,3

50

-ジオール(258 mg)、(9Z)-テトラデカ-9-エン酸(769 mg) および DMAP (126 mg)のDMF(3 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(790 mg)を室温で加えた。18時間攪拌後、反応混合物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(NH、酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物(860 mg)を得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ppm 0.03 (6H, s), 0.81-0.96 (18H, m), 1.18-1.41 (36H, m), 1.53-1.67 (6H, m), 1.91-2.10 (12H, m), 2.29 (6H, t, $J = 7.6$ Hz), 3.58 (2H, s), 4.08 (6H, s), 5.27-5.43 (6H, m)

【0126】

10

C) 3-ヒドロキシ-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-テトラデカ-9-エノアート

3-((tert-ブチル(ジメチル)シリル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-テトラデカ-9-エノアート(5.91 g)のTHF(120 mL)溶液に、TBAFのTHF溶液(1 M, 14.85 mL)と酢酸(4.91 mL)の混合物を室温で加えた。3日間攪拌後、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、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(4.96 g)を得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ppm 0.82-0.97 (9H, m), 1.16-1.42 (36H, m), 1.52-1.68 (6H, m), 1.90-2.12 (12H, m), 2.32 (6H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.52 (1H, t, $J = 7.0$ Hz), 3.49 (2H, d, $J = 7.0$ Hz), 4.11 (6H, s), 5.26-5.42 (6H, m)

20

【0127】

D) 3-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-テトラデカ-9-エノアート

3-ヒドロキシ-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-テトラデカ-9-エノアート(4.96 g)、DMAP (796 mg)および4-(ジメチルアミノ)ブタン酸塩(2.19 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(2.50 g)を室温で加えた。18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(NH、酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物(5.31 g)を得た。

30

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ppm 0.82-0.94 (9H, m), 1.20-1.42 (36H, m), 1.50-1.66 (6H, m), 1.69-1.83 (2H, m), 1.90-2.10 (12H, m), 2.20 (6H, s), 2.23-2.41 (10H, m), 4.11 (8H, s), 5.23-5.44 (6H, m)

【0128】

[実施例4] 3-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-ヘキサデカ-9-エノアート

A) 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

40

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)溶液を室温で加えた。18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) ppm 1.07 (9H, s), 2.34 (3H, t, $J = 5.5$ Hz), 3.67 (2H, s), 3.74 (6H, d, $J = 5.5$ Hz), 7.39-7.48 (6 H, m), 7.63-7.67 (4H, m)

【0129】

B) (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

50

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 (88.9 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。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) ppm 1.07 (9H, s), 1.27 (3H, s), 1.41 (3H, s), 2.12-2.18 (1 H, m), 3.69-3.78 (8H, m), 7.38-7.47 (6H, m), 7.65-7.69 (4H, m)

【0130】

C) (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

(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(910 mg)、DMAP(215 mg)および(9Z)-ヘキサデカ-9-エン酸(838 mg)のDMF(10 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(1.43 g)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) ppm 0.84 - 0.91 (3 H, m), 1.03 - 1.07 (9 H, m), 1.22 - 1.35 (16 H, m), 1.40 (6 H, d, $J = 17.0$ Hz), 1.49 - 1.63 (2 H, m), 2.01 (4 H, q, $J=6.5$ Hz), 2.24 (2 H, t, $J=7.6$ Hz), 3.65 (2 H, s), 3.73 (2 H, d, $J=11.7$ Hz), 3.80 (2 H, d, $J=12.0$ Hz), 4.17 (2 H, s), 5.29 - 5.39 (2 H, m), 7.35 - 7.46 (6 H, m), 7.65 (4 H, d, $J=6.9$ Hz)

【0131】

D) (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(9Z)-ヘキサデカ-9-エノアート

(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)メチル(9Z)-ヘキサデカ-9-エノアート(1.43 g)のTHF(4 mL)溶液に、TBAFのTHF溶液(1M, 2.64 mL)を室温で加えた。3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、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(0.82 g)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) ppm 0.85 - 0.91 (3 H, m), 1.24 - 1.36 (16 H, m), 1.42 (6 H, s), 1.58 - 1.66 (2 H, m), 2.01 (4 H, q, $J=6.5$ Hz), 2.30 (1 H, t, $J=6.6$ Hz), 2.35 (2 H, t, $J=7.6$ Hz), 3.48 (2 H, d, $J=6.6$ Hz), 3.69 - 3.75 (4 H, m), 4.25 (2 H, s), 5.31 - 5.38 (2 H, m)

【0132】

E) (5-(((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)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(9Z)-ヘキサデカ-9-エノアート

(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(9Z)-ヘキサデカ-9-エノアート(410 mg)、DMAP(97 mg)および4-(ジメチルアミノ)酪酸塩酸塩(250 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(343 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、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(430 mg)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) ppm 0.86 - 0.91 (3 H, m), 1.24 - 1.36 (16 H, m), 1.42 (6 H, s), 1.53 - 1.69 (2 H, m), 1.78 (2 H, m), 1.98 - 2.04 (4 H, m), 2.21 (6 H, s), 2.29 (4 H, m), 2.37 (2 H, t, $J=7.6$ Hz), 3.74 (4 H, s), 4.11 (4 H, d, $J=5.7$ Hz), 5.31 - 5.38 (2 H, m)

10

20

30

40

50

【 0 1 3 3 】

F) 3-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-ヘキサデカ-9-エノアート

(5-(((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)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(9Z)-ヘキサデカ-9-エノアート(430 mg)に酢酸(2 mL)、水(1 mL)を加えて、75 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。得られた残渣に、DMAP(201 mg)および(9Z)-テトラデカ-9-エン酸(466 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(458 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、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(604 mg)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) ppm 0.85 - 0.92 (9 H, m), 1.24 - 1.36 (40 H, m), 1.55 - 1.64 (6 H, m), 1.73 - 1.80 (2 H, m), 1.98 - 2.05 (12 H, m), 2.20 (6 H, s), 2.24 - 2.33 (8 H, m), 2.36 (2 H, t, $J=7.6$ Hz), 4.09 - 4.13 (8 H, m), 5.31 - 5.38 (6 H, m)

【 0 1 3 4 】

[実施例 8] 2-((N,N-ジメチル- -アラニル)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(9Z,9'Z)ビス-テトラデカ-9-エノアート

A) (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。

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

【 0 1 3 5 】

B-1) 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)プロパン-1,3-ジオール

(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(10.0 g)のトルエン(100 mL)懸濁溶液に1.5M DIBAL-H溶液(105 mL)を室温で滴下し、5時間攪拌した。メタノール(30 mL)を添加した後、2N 塩酸 (20 mL)と4N 水酸化ナトリウム水溶液 (240 mL)を加えて2時間攪拌した後、トルエン層を除去した。水層を塩酸で中和した後、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で2回洗浄後、セライトろ過した。溶媒を減圧下留去し、残渣を酢酸エチル/ヘキサンで再結晶し標題化合物(6.6 g)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) ppm 3.32 (2H, s), 3.39 (6H, d, $J = 5.4$ Hz), 3.74 (3H, s), 4.21 (3H, t, $J = 5.4$ Hz), 4.36 (2H, s), 6.90 (2H, d like, $J = 7.8$ Hz), 7.23 (2H, d like, $J = 7.8$ Hz)

【 0 1 3 6 】

C-1) (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-(ヒドロキシメチル)-2-(((4-メトキシベンジル)オキシ)メチル)プロパン-1,3-ジオール(1.00 g)、2,2-ジメトキシプロパン (1.22 g)のDMF(5 mL)溶液に、ピリジニウム p-トルエンスルホナート(10 mg)を室温に加えた。2時間攪拌後、反応混合物に酢酸エチルを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で1回、5%食塩水で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。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(426 mg)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) ppm 1.29 (3H, s), 1.29 (3H, s), 3.35 (2H, s), 3.39 (2H, d, $J = 5.1$ Hz), 3.61 (4H, s), 3.74 (3H, s), 4.38 (2H, s), 4.59 (1H, t, $J = 5.1$ Hz), 6.90 (2H, d like, $J = 7.5$ Hz), 7.24 (2H, d like, $J = 7.5$ Hz)

【0137】

B-2) 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)を室温に加えた。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。

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

【0138】

C-2) (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 で滴下し、15 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。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) ppm 1.29 (3H, s), 1.29 (3H, s), 3.35 (2H, s), 3.39 (2H, d, $J = 5.1$ Hz), 3.61 (4H, s), 3.74 (3H, s), 4.38 (2H, s), 4.59 (1H, t, $J = 5.1$ Hz), 6.90 (2H, d like, $J = 7.5$ Hz), 7.24 (2H, d like, $J = 7.5$ Hz)

【0139】

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)およびオクタノ酸(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。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 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)

【0140】

E) (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(2.78 g)のエタノール(30 mL)溶液に、Pd炭素(840 mg)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(1.35 g)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 0.85 - 0.91 (3 H, m), 1.23 - 1.34 (8 H, m), 1.38 - 1.44 (6 H, m), 1.63 (2 H, m), 2.30 - 2.38 (3 H, m), 3.48 (2 H, d, $J = 6.6$ Hz), 3.68

10

20

30

40

50

- 3.75 (4 H, m), 4.25 (2 H, s)

【0141】

F) (5-(((N,N-ジメチル- -アラニル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサソ-5-イル)メチルオクタノアート

(5-(ヒドロキシメチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサソ-5-イル)メチルオクタノアート(400 mg)、DMAP(129 mg)および3-(ジメチルアミノ)プロパン酸塩(305 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(456 mg)を室温で加えた。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(NH、酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物(320 mg)を得た。

10

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 0.84 - 0.92 (3 H, m), 1.21 - 1.33 (8 H, m), 1.42 (6 H, s), 1.61 (2 H, br), 2.23 (6 H, s), 2.32 (2 H, t, J = 7.6 Hz), 2.47 - 2.51 (2 H, m), 2.57 - 2.61 (2 H, m), 3.75 (4 H, s), 4.13 (4 H, d, J = 11.7 Hz)

【0142】

G) 2-(((N,N-ジメチル- -アラニル)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(9Z,9'Z)ビス-テトラデカ-9-エノアート

(5-(((N,N-ジメチル- -アラニル)オキシ)メチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキサソ-5-イル)メチルオクタノアート(320 mg)に酢酸(1.6 mL)、水(0.8 mL)を加えて、65 °Cで3.5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、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(150 mg)、DMAP(101 mg)および(9Z)-テトラデカ-9-エン酸(235 mg)のDMF(4.5 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(231 mg)を50 °C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(230 mg)を得た。

20

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 0.84 - 0.93 (9 H, m), 1.24 - 1.36 (30 H, m), 1.53 - 1.65 (8 H, m), 1.98 - 2.05 (8 H, m), 2.22 (6 H, s), 2.30 (6 H, t, J = 7.6 Hz), 2.48 (2 H, t, J = 6.9 Hz), 2.58 (2 H, t, J = 6.8 Hz), 4.06 - 4.22 (8 H, m), 5.31 - 5.38 (4 H, m)

30

【0143】

[実施例11] 2-(((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)メチル)-2-((ドデカノイルオキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル(9Z,9'Z)ビス-テトラデカ-9-エノアート

A) 3-ヒドロキシ-2,2-ビス(ヒドロキシメチル)プロピルドデカノアート

2,2-ビス(ヒドロキシメチル)プロパン-1,3-ジオール(5.00 g)、DMAP(2.24 g)およびラウリン酸(3.68 g)のDMF(150 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(7.04 g)を室温で加えた。20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(1.79 g)を得た。

40

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 0.85 - 0.91 (3 H, m), 1.22 - 1.33 (16 H, m), 1.59 - 1.66 (3 H, m), 2.36 (2 H, t, J = 7.6 Hz), 2.51 (2 H, t, J = 5.8 Hz), 3.65 (6 H, d, J = 5.7 Hz), 4.23 (2 H, s)

【0144】

B) 2-((ドデカノイルオキシ)メチル)-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-1,3-ジイル(9Z,9'Z)ビス-テトラデカ-9-エノアート

3-ヒドロキシ-2,2-ビス(ヒドロキシメチル)プロピルドデカノアート(400 mg)、DMAP(153 mg)および(9Z)-テトラデカ-9-エン酸(569 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(602 mg)を室温で加えた。8時間攪拌後、反応混合物に酢酸エチルを加え、水で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾

50

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(230 mg)を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 0.85 - 0.93 (9 H, m), 1.22 - 1.36 (40 H, m), 1.58 - 1.65 (6 H, m), 1.99 - 2.05 (8 H, m), 2.32 (6 H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.52 (1 H, t, $J = 7.1$ Hz), 3.48 (2 H, d, $J = 6.9$ Hz), 4.09 - 4.14 (6 H, m), 5.31 - 5.38 (4 H, m)

【 0 1 4 5 】

C) 2-(((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)メチル)-2-((ドデカノイルオキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル (9Z,9'Z)ビス-テトラデカ-9-エノアート

2-((ドデカノイルオキシ)メチル)-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-1,3-ジイル(9Z,9'Z)ビス-テトラデカ-9-エノアート(230 mg)、DMAP(38 mg)および4-(ジメチルアミノ)酪酸塩酸塩(105 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(150 mg)を室温で加えた。3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(100 mg)を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 0.85 - 0.93 (9 H, m), 1.23 - 1.35 (40 H, m), 1.55 - 1.67 (6 H, m), 1.77 (2 H, m), 1.98 - 2.05 (8 H, m), 2.20 (6 H, s), 2.24 - 2.33 (8 H, m), 2.36 (2 H, t, $J = 7.6$ Hz), 4.09 - 4.13 (8 H, m), 5.31 - 5.38 (4 H, m)

【 0 1 4 6 】

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 ~ 3、5 ~ 7 及び 9 ~ 10 が製造された。これらの実施例について、実施例 1、4、8 及び 11 とともに、化合物の名称、構造式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。

【 0 1 4 7 】

10

20

【表 1】

実施例番号	IUPAC名	構造式	MS:m/z (M+H)
1	3-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル (9Z)-テトラデカ-9-エノアート		874.75
2	3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル (9Z)-テトラデカ-9-エノアート		888.73
3	3-((6-(ジメチルアミノ)ヘキサノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル (9Z)-テトラデカ-9-エノアート		902.74
4	3-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル (9Z)-ヘキサデカ-9-エノアート		902.74
5	3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル (9Z)-ヘキサデカ-9-エノアート		916.76
6	3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z)-オクタデカ-9-エノアート		944.79
7	3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエノアート		942.77
8	2-(((N,N-ジメチル-β-アラニル)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 (9Z,9'Z)ビス-テトラデカ-9-エノアート		778.62
9	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 (9Z,9'Z)ビス-テトラデカ-9-エノアート		792.63
10	2-((デカノイルオキシ)メチル)-2-(((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル (9Z,9'Z)ビス-テトラデカ-9-エノアート		820.67
11	2-(((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)メチル)-2-((ドデカノイルオキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル (9Z,9'Z)ビス-テトラデカ-9-エノアート		848.70

10

20

30

40

【 0 1 4 8 】

[本発明の脂質粒子および核酸を含有する、核酸導入用組成物の製造例および試験例]

[製造例 1]

脂質混合物 (実施例で製造したカチオン性脂質 : DPPC : コレステロール : GM - 0

50

20 = 60 : 10 . 6 : 28 : 1 . 4 , モル比) を、90% EtOH、10% RNase フリー水に溶解して、8.5 mg/mL の脂質溶液を得た。Luciferase mRNA (TriLink BioTechnologies) を10mM 2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES) 緩衝液 pH 4.0 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) によって、流速比 3 mL/min : 6 mL/min で混合し、核酸を内封する脂質粒子を含む分散液を得た。得られた分散液は、Slide-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4 で48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、核酸導入用組成物として調製した後、4 に保存した。脂質粒子の粒子径は Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) を用いて測定した。また、脂質粒子における mRNA 濃度および内封率は Quant-iTTM RiboGreen (登録商標) (Invitrogen) を用いて測定した。分析の結果を表 2 に示す。

【0149】

【表 2】

カチオン性脂質	粒子径 (nm)	mRNA 濃度 (μg/mL)	内封率 (%)
実施例 1	71	136	96
実施例 2	90	73	96
実施例 3	93	87	96
実施例 4	76	113	97
実施例 5	91	96	98
実施例 8	67	84	94
実施例 9	108	129	62
実施例 10	92	86	84
実施例 11	83	85	92

【0150】

[試験例 1] 培養細胞への mRNA トランスフェクション試験

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 を含有する核酸導入用組成物 (製造例 1 で製造したものを、mRNA として 10 ng / 10 μL となるように希釈した液) 10 μL を培地に添加した。mRNA の添加から 24 時間後、HCT116 に発現した luciferase 量は Picagene LT 2.0 キット (東洋紡) を用いて測定した。測定の結果を表 3 及び表 4 に示す。

【 0 1 5 1 】

【 表 3 】

カチオン性脂質	Luminescence (cps) 3 wellの平均値
PBSコントロール	560
実施例1	227720
実施例2	570027
実施例3	412187
実施例4	407547
実施例5	545507
実施例8	3853
実施例10	1203467
実施例11	953520

10

20

【 0 1 5 2 】

【 表 4 】

カチオン性脂質	Luminescence (cps) 3 wellの平均値
PBSコントロール	627
実施例9	549893

30

【 0 1 5 3 】

[本発明の脂質粒子および核酸を含有する、核酸導入用組成物の製造例および試験例]
[製造例 2]

40

脂質混合物（実施例で製造したカチオン性脂質：DPPC：コレステロール：GM-020 = 60：10.6：28：1.4，モル比）を、90% EtOH、10% RNaseフリー水に溶解して、約7 mg/mlの脂質溶液を得た。Col1a1に対する siRNAとFactor VII（FVII）に対する siRNAは等量ずつ混合して25 mM 酢酸緩衝液 pH 4.0 に溶解し、0.2 mg/mlの核酸溶液を得た。なお、各 siRNAの配列情報は下表に示した。得られた脂質溶液および核酸溶液を、室温で、NanoAssembler装置（Precision Nanosystems）によって、流速比3 ml/min：9 ml/minで混合し、核酸を内封する脂質粒子を含む分散液を得た。得られた分散液は、Slide-A-Lyzer（20kの分画分子量、Th

50

ermo scientific)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 μmのsyringe filter (Iwaki)を用いてろ過を行い、核酸導入用組成物として調製した後、4に保存した。脂質粒子の粒子径はZetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)を用いて測定した。また、脂質粒子におけるmRNA濃度および内封率はQuant-iT™ M Ribogreen (登録商標) (Invitrogen)を用いて測定した。分析の結果を表6に示す。

【0154】

【表5】

Col1a1 siRNA (Calvente et al. Hepatology 2015, 62:4より引用)

10

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'

Factor VII siRNA (Landesman et al. Silence 2010, 1:16より引用)

Sense	5' - [mC][mU]A[mC]GAAAG[mC]A[mU][mC][mC][mU][mU][mC]A[mU][ts]t - 3'
Antisense	5' - AUGAAGGAUGCUUUCG[mU]AG[ts]t - 3'

N: RNA

n: DNA

[mN]: 2'-OMe RNA

[ns]: phosphorothioate

20

【0155】

【表6】

化合物	粒子径 (nm)	siRNA濃度 (μg/ml)	内封率 (%)
実施例2	104	251	98
実施例3	117	196	95
実施例10	88	307	90
実施例11	85	402	91
実施例4	90	355	89
実施例5	103	367	94
実施例6	87	333	98
実施例7	102	320	96

30

40

【0156】

【試験例2】四塩化炭素肝障害モデルマウスにおける肝星細胞へのsiRNAデリバリー試験

Col1a1 siRNAおよびFVII siRNAを内封した脂質粒子のPBS分散液は、siRNA濃度が40 μg/mlおよび120 μg/mlとなるようにPBSで希釈し、Balb/cマウスへのsiRNA投与量が0.2 mg/kgおよび0.6 mg/kgとなるように眼窩静脈叢内に投与した。siRNAの投与から3時間後、四塩化炭素を0.1 ml/kgとなるように経口投与を行った。四塩化炭素の投与から4日後、マウスはイソフルラン麻酔下における放血により安楽死させ、肝臓を回収した。得られ

50

た肝臓からはRNeasy Mini Kit (QIAGEN社)によりtotal RNAを抽出し、定量的PCR法によってCOL1A1 mRNA、FVII mRNAおよびGAPDH mRNA量の測定を行った。GAPDH mRNA量に対して標準化を行ったCOL1A1 mRNAおよびFVII mRNAの発現低下率を、siRNA非投与マウスを基準に算出し、下表に示した。

【0157】

【表7】

化合物	COL1A1ノックダウン効率(%)	FVIIノックダウン効率(%)
実施例2	73	0
実施例3	81	0
実施例10	31	0
実施例11	60	0
実施例4	67	19
実施例5	83	14
実施例6	86	27
実施例7	85	24

10

20

【産業上の利用可能性】

【0158】

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。

30

【配列表】

2019131839000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2018/048054
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. C07C229/12 (2006.01) i, A61K9/16 (2006.01) i, A61K31/7088 (2006.01) i, A61K31/7105 (2006.01) i, A61K47/18 (2006.01) i, A61K48/00 (2006.01) i, A61P35/00 (2006.01) i, A61P35/02 (2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int.Cl. C07C229/12, A61K9/16, A61K31/7088, A61K31/7105, A61K47/18, A61K48/00, A61P35/00, A61P35/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Published examined utility model applications of Japan 1922-1996		
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2019		
Registered utility model specifications of Japan 1996-2019		
Published registered utility model applications of Japan 1994-2019		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CAplus/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/102150 A2 (GENTERIC, INC.) 11 December 2003, claims, paragraph [0008] & US 2004/0043952 A1 & AU 2003240978 A	1-8
A	WO 2016/021683 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 11 February 2016, claims, paragraphs [0005]-[0008] & US 2017/0197903 A1 (claims, paragraphs [0005]-[0022]) & EP 3178807 A1 & CN 106573877 A & KR 10-2017-0039722 A	1-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 March 2019 (18.03.2019)		Date of mailing of the international search report 26 March 2019 (26.03.2019)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 4 8 0 5 4	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07C229/12(2006.01)i, A61K9/16(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K47/18(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07C229/12, A61K9/16, A61K31/7088, A61K31/7105, A61K47/18, A61K48/00, A61P35/00, A61P35/02			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2019年 日本国実用新案登録公報 1996-2019年 日本国登録実用新案公報 1994-2019年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
A	WO 03/102150 A2 (GENTERIC, INC.) 2003.12.11, CLAIMS、paragraph [0008] & US 2004/0043952 A1 & AU 2003240978 A	1-8	
A	WO 2016/021683 A1 (武田薬品工業株式会社) 2016.02.11, [特許請求の範囲]、段落 [0005] - [0008] & US 2017/0197903 A1(Claims, paragraphs[0005]-[0022]) & EP 3178807 A1 & CN 106573877 A & KR 10-2017-0039722 A	1-8	
C欄の続きにも文献が列挙されている。		C欄の続きにも文献が列挙されている。	
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの		
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの		
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの		
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献		
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 18.03.2019	国際調査報告の発送日 26.03.2019		
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 三上 晶子 電話番号 03-3581-1101 内線 3443	4H	1151

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

- (72) 発明者 松本 悟
神奈川県藤沢市村岡東二丁目 2 6 番地の 1 武田薬品工業株式会社内
- (72) 発明者 大森 良真
大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目 1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社内
- (72) 発明者 峯野 雅博
大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目 1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社内
- (72) 発明者 帆足 保孝
神奈川県藤沢市村岡東二丁目 2 6 番地の 1 武田薬品工業株式会社内

F ターム (参考) 4C076 AA31 AA65 AA95 DD49 FF34
4C084 AA13 MA41 NA13
4C086 AA01 AA02 EA16 MA05 MA41 NA13
4H006 AA01 AA03 AB20 BS10 BT12

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。