



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111164068 B

(45) 授权公告日 2023.11.14

(21) 申请号 201980004207.7 *A61K 31/711* (2006.01)

(22) 申请日 2019.03.14 *C07D 233/02* (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号 *C07D 243/08* (2006.01)
申请公布号 CN 111164068 A *C07D 251/04* (2006.01)
C07D 295/13 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.05.15 *C07D 295/15* (2006.01)

(30) 优先权数据 *A61K 9/127* (2006.01)
2018-154955 2018.08.21 JP *A61K 47/18* (2006.01)
A61K 47/22 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日 *A61K 47/24* (2006.01)
2020.02.28 *A61K 47/28* (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据 *A61K 47/10* (2006.01)
PCT/JP2019/010681 2019.03.14 *A61K 47/42* (2017.01)

(87) PCT国际申请的公布数据 *A61K 48/00* (2006.01)
W02020/039631 JA 2020.02.27 *A61K 45/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(73) 专利权人 株式会社东芝
地址 日本东京都

(72) 发明人 石原美津子 赤星英一 内藤胜之
野崎绘美 猿渡冴子

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038
专利代理人 何杨

(51) Int.Cl.
C07C 229/24 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2013086354 A1, 2013.06.13
JP 2002529439 A, 2002.09.10
JP 2013533224 A, 2013.08.22
WO 2016124765 A1, 2016.08.11
WO 2016210190 A1, 2016.12.29
CN 103096875 A, 2013.05.08

审查员 曹梦姣

权利要求书5页 说明书32页
序列表1页 附图6页

(54) 发明名称

生物降解性化合物、脂质粒子、含有脂质粒子的组合物、及试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种用下述式(1)表示的化合物。 $Q-CHR_2$ (1) (式中, Q为含有2个以上叔氮、不含氧的含氮脂肪族基团, R为含有生物降解性基团的脂肪族基团)。该化合物可以与其他脂质、可减少聚集的脂质组合而制成脂质粒子。进一步地, 该脂质粒子可以应用于向细胞递送活性剂的药物组合物。

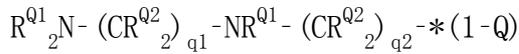
CN 111164068 B

1. 一种化合物,其特征在于,用下述式(1)表示,



式中,

Q用下述式(1-Q)表示:



式中,

R^{Q1} 分别独立地为烷基,

R^{Q2} 分别独立地为氢或烷基,

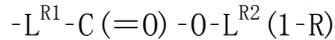
R^{Q1} 及 R^{Q2} 中的任意两个可以键合而形成含氮脂环,

$q1$ 为1~4的数,

$q2$ 为0~4的数,

*表示与 $-CHR_2$ 的键合位置,

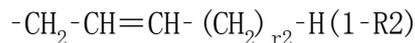
R分别独立地为 $C_{12} \sim C_{24}$ 的脂肪族基团,用下述式(1-R)表示:



式中,

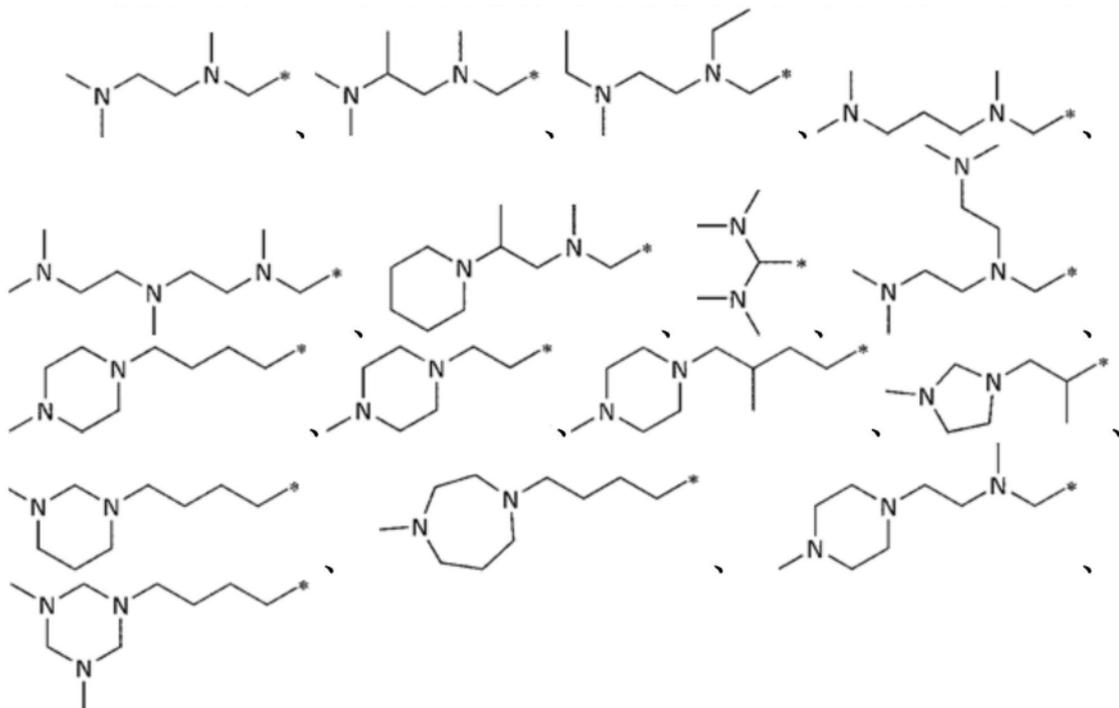
L^{R1} 为亚烷基,

L^{R2} 用下述式(1-R2)表示:



式中, $r2$ 为1~10的数。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其中,所述Q为下述所示的结构中的任一者:



式中,*表示与 $-CHR_2$ 的键合位置。

3. 根据权利要求1所述的化合物,其中,所述 L^{R1} 用下述式(1-R1)表示,

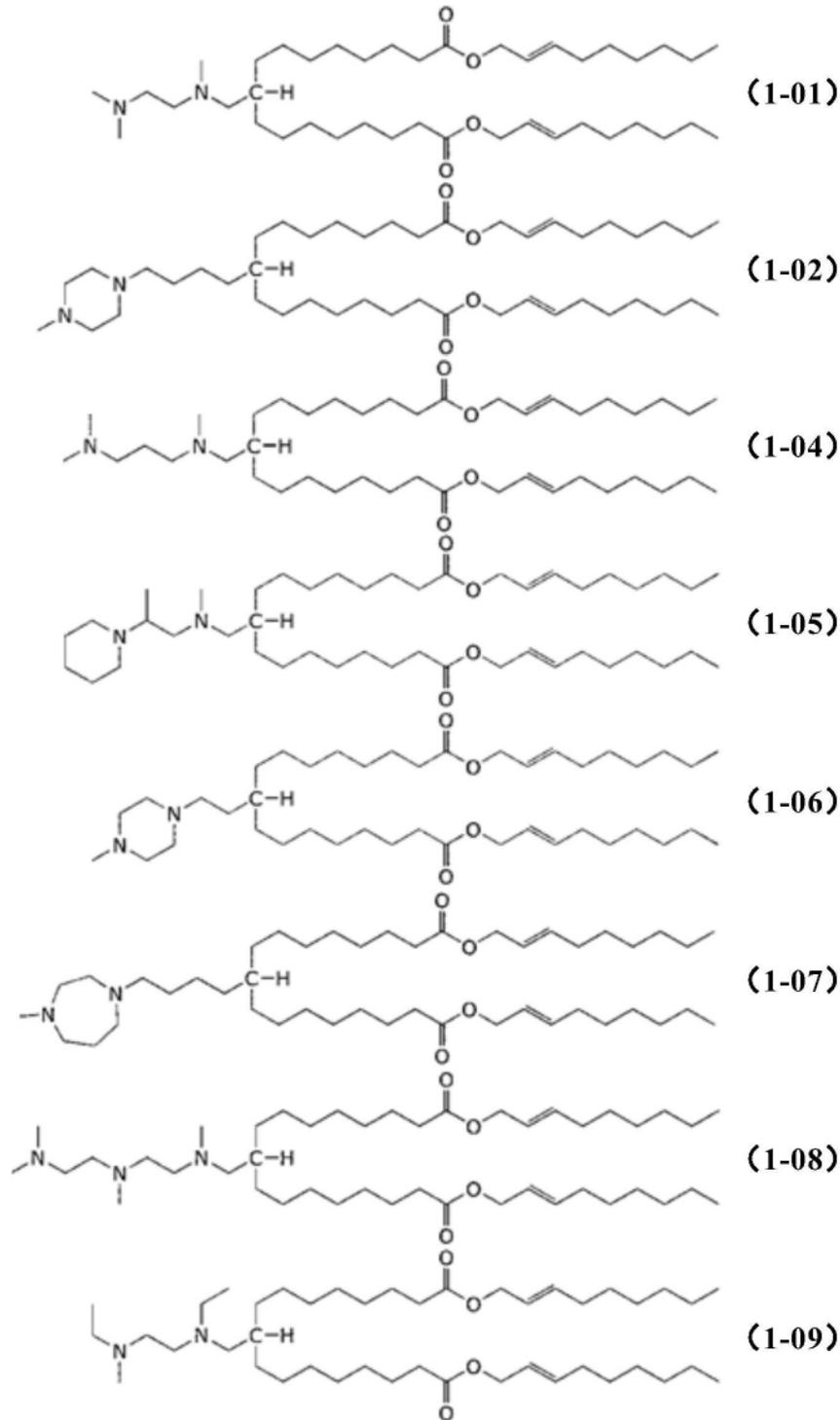


式中, r_1 为1~10的数。

4. 根据权利要求3所述的化合物, 其中, 所述 r_1 为4~8的数。

5. 根据权利要求1所述的化合物, 其中, 所述R中所含的、最长的分子链为8个原子以上。

6. 根据权利要求1所述的化合物, 其用下述式(1-01)、(1-02)、(1-04)~(1-14)、(1-16)及(1-18)~(1-21)表示:



- X分别独立地为含有叔胺结构的2价连接基，
- W分别独立地为C₁~C₆亚烷基，
- Y分别独立地为选自由单键、醚键、羧酸酯键、硫代羧酸酯键、硫代酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键及脲键组成的组中的2价连接基，
- W'分别独立为单键或C₁~C₆亚烷基，
- Z分别独立地为脂溶性维生素残基、甾醇残基或C₁₂~C₂₂脂肪族烃基。
9. 根据权利要求8所述的脂质粒子，其中，所述P含有3~8个碳及1~2个氧。
10. 根据权利要求7或8所述的脂质粒子，其中，所述X分别独立地选自由甲基亚氨基、1,2-吡咯烷二基及1,3-吡咯烷二基组成的组。
11. 根据权利要求7或8所述的脂质粒子，其中，所述Z为脂溶性维生素残基或甾醇残基。
12. 根据权利要求7或8所述的脂质粒子，其还含有形成膜的脂质和能减少聚集的脂质。
13. 根据权利要求12所述的脂质粒子，其中，所述形成膜的脂质选自由下列组成的组：
- 1,2-二油酰基-sn-丙三醇-3-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、
- 1,2-硬脂酰基-sn-丙三醇-3-磷脂酰乙醇胺(DSPE)、
- 1,2-二棕榈酰基-sn-丙三醇-3-磷脂酰胆碱(DPPC)、
- 1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-丙三醇-3-磷脂酰胆碱(POPC)、
- 1,2-二-O-十八烷基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)、
- 1,2-二油酰基-3-二甲基铵丙烷(DODAP)、
- 1,2-二肉豆蔻酰基-3-二甲基铵丙烷(14:0DAP)、
- 1,2-二棕榈酰基-3-二甲基铵丙烷(16:0DAP)、
- 1,2-二硬脂酰基-3-二甲基铵丙烷(18:0DAP)、
- N-(4-羧基苄基)-N,N-二甲基-2,3-双(油酰氧基)丙烷(DOBAQ)、
- 1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)、
- 1,2-二油酰基-sn-丙三醇-3-磷酸胆碱(DOPC)、
- 1,2-二亚油酰基-sn-丙三醇-3-磷酸胆碱(DLPC)、
- 1,2-二油酰基-sn-丙三醇-3-磷脂酰-L-丝氨酸(DOPS)、及胆甾醇，
- 所述能减少聚集的脂质为聚乙二醇(PEG)修饰脂质。
14. 根据权利要求7或8所述的脂质粒子，其还含有活性剂。
15. 根据权利要求14所述的脂质粒子，其中，所述活性剂为选自由质粒、寡核苷酸、多核苷酸、siRNA、微小RNA、DNA、mRNA、适体及核酶组成的组中的核酸。
16. 根据权利要求14所述的脂质粒子，其中，所述活性剂含有至少一种DNA与至少一种RNA的组合。
17. 根据权利要求15所述的脂质粒子，其中，还含有与核酸结合的化合物。
18. 根据权利要求17所述的脂质粒子，其中，所述与核酸结合的化合物为碱性蛋白质或碱性肽。
19. 根据权利要求17所述的脂质粒子，其中，所述与核酸结合的化合物为鱼精蛋白或组蛋白。

20. 根据权利要求17所述的脂质粒子, 还含有调控细胞内的核酸表达的化合物。
21. 一种组合物, 其特征在于, 含有权利要求7~20中任一项所述的脂质粒子和载体。
22. 一种用于向细胞递送活性剂的组合物, 其特征在于, 含有权利要求7~20中任一项所述的脂质粒子和载体。
23. 根据权利要求22所述的组合物, 其中, 所述脂质粒子含有式(1)的化合物和式(2)的化合物这两者。
24. 根据权利要求23所述的组合物, 其中, 式(2)的化合物的含量相对于式(1)的化合物的含量的摩尔比小于1。
25. 根据权利要求22或23所述的组合物, 其中, 所述细胞为肿瘤细胞。
26. 根据权利要求7~20中任一项所述的脂质粒子, 其用于向细胞递送活性剂。
27. 根据权利要求26所述的脂质粒子, 其含有式(1)的化合物和式(2)的化合物这两者。
28. 根据权利要求27所述的脂质粒子, 其中, 式(2)的化合物的含量相对于式(1)的化合物的含量的摩尔比小于1。
29. 根据权利要求26或27所述的脂质粒子, 其中, 所述细胞为肿瘤细胞。
30. 一种用于向人之外的对象的细胞递送活性剂的非诊断且非治疗方法, 其中, 包括: 使含有该活性剂的权利要求7~20中任一项所述的脂质粒子与细胞接触。
31. 根据权利要求30所述的方法, 其中, 所述脂质粒子含有式(1)的化合物和式(2)的化合物这两者。
32. 根据权利要求31所述的方法, 其中, 式(2)的化合物的含量相对于式(1)的化合物的含量的摩尔比小于1。
33. 根据权利要求30所述的方法, 其中, 所述细胞为肿瘤细胞。
34. 权利要求7~20中任一项所述的脂质粒子在制造用于向细胞递送活性剂的组合物中的应用。
35. 根据权利要求34所述的应用, 其中, 所述脂质粒子含有式(1)的化合物和式(2)的化合物这两者。
36. 根据权利要求35所述的应用, 其中, 式(2)的化合物的含量相对于式(1)的化合物的含量的摩尔比小于1。
37. 根据权利要求34或35所述的应用, 其中, 所述细胞为肿瘤细胞。

生物降解性化合物、脂质粒子、含有脂质粒子的组合物、及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及具有在细胞内降解的结构生物降解性化合物、和含有其的脂质粒子。另外，本发明还涉及含有该脂质粒子的、用于递送核酸之类的活性剂的组合物及试剂盒。

背景技术

[0002] 正在研究各种用于疾病治疗的脂质体。脂质体为由脂质构成的具有纳米级粒径的微胶囊，其内部可以内包各种化合物等，另外生物适合性等也优异，因此对于将治疗药、活性剂选择性递送到生物体内的目标部位而言为理想的材料。在这种目的之下，通常使用平均粒径为100nm以上的大单室脂质体(LUV)，关于构成其膜的材料，已开发出各种材料。

[0003] 这种脂质体可由单一脂质构成。这种情况下，例如脂质使用的是具有头部和键合于头部的疏水部的磷脂，该脂质缔合而形成膜，构成可以内包活性剂等的微胶囊。但是，为了对脂质体赋予优异特性，通常使用脂质混合物来构成脂质体。并且，该脂质混合物含有生物降解性优异的脂质、抑制所形成的脂质体的聚集的脂质、具有抑制内包物漏出的效果的脂质、具有膜融合效果的脂质等的组合。

[0004] 并且，为了进一步提高脂质体的特性，对各脂质进行了研究。例如，对于专门用于基因导入的面向医疗的脂质体而言，优选满足高生物降解性、高生物适合性、高活性剂导入性及低细胞毒性，期望可以构成这种脂质体的脂质。

[0005] 作为这种脂质，已开发了各种化合物，所适用的生物体的状态、想要治疗的疾病也多种多样。希望根据这些条件增加可选择的脂质种类。另外，寻求可以构成具有超过以往脂质体的特性的脂质体的脂质。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1：日本专利第5893611号

[0009] 专利文献2：日本专利第6093710号

发明内容

[0010] 发明要解决的课题

[0011] 针对上述问题，本实施方式提供作为可构成脂质体的脂质的新颖的化合物、使用其的脂质粒子、以及组合物及试剂盒。

[0012] 用于解决问题的手段

[0013] 本实施方式的化合物，其特征在于，如下述式(1)所示，

[0014] $Q-CHR_2$ (1)

[0015] (式中，

[0016] Q为含有2个以上叔氮、不含氧的含氮脂肪族基团，

[0017] R分别独立地为 $C_{12} \sim C_{24}$ 的脂肪族基团,至少一个R在其主链中或侧链中含有选自自由 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-O-C(=O)-O-$ 、 $-S-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-S-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 及 $-NH-C(=O)-$ 组成的组中的连接基团 L^R 。

[0018] 另外,实施方式的脂质粒子的特征在于,其含有上述化合物。

[0019] 另外,实施方式的组合物的特征在于,其含有上述脂质粒子和载体。

[0020] 另外,实施方式的试剂盒含有包含上述脂质粒子、和将上述脂质粒子导入细胞的导入剂的组合物。

附图说明

[0021] 图1为示出实施例及比较例的、对Jurkat细胞使用脂质粒子时的酶活性的图。

[0022] 图2为示出实施例及比较例的、对MCF-7细胞使用脂质粒子时的酶活性的图。

[0023] 图3为示出实施例及比较例的、对Huh-7细胞使用脂质粒子时的酶活性的图。

[0024] 图4为示出实施例的、对Jurkat细胞使用脂质粒子时的酶活性的图。

[0025] 图5为示出实施例的、对外周血单个核细胞(PBMC)使用脂质粒子时的酶活性的图。

[0026] 图6为示出实施例及比较例的、使用脂质粒子对Jurkat细胞导入RNA时的RNA表达量的图。

[0027] 图7为示出用于比较实施例4-1和实施例4-2的、对MCF-7细胞使用脂质粒子时的酶活性的图。

[0028] 图8为示出用于比较实施例4-1和实施例4-2的、对Huh-7细胞使用脂质粒子时的酶活性的图。

[0029] 图9为示出用于比较实施例4-1和实施例4-2的、对Jurkat细胞使用脂质粒子时的酶活性的图。

[0030] 图10为示出用于比较实施例4-2和实施例4-3的、对MCF-7细胞使用脂质粒子时的酶活性的图。

[0031] 图11为示出用于比较实施例4-2和实施例4-3的、对Huh-7细胞使用脂质粒子时的酶活性的图。

具体实施方式

[0032] [定义]

[0033] 本实施方式中,在使用 \sim 表示数值范围时,只要没有特别限定则这些含有两个端点、并且单位相同。例如,10 \sim 25摩尔%表示10摩尔%以上且25摩尔%以下。

[0034] 本实施方式中,“ $C_x \sim C_y$ ”及“ C_x ”等记载表示分子或取代基中的碳数。例如, $C_1 \sim C_6$ 烷基表示具有1以上且6以下的碳的烷基。另外,本实施方式中,卤代烷基是指烷基中的1个以上的氢被氟等卤素取代而成的基团,例如,氟代芳基是指芳基中的1个以上的氢被氟取代而成的基团。

[0035] 本实施方式中,只要没有特别限定则烷基是指:从烷烃的任意的碳上除去一个氢而成的一价基团。并且,烷基这一术语包括直链状或支链状烷基。另外,环烷基是指含有环状结构的烷基。将环状结构上取代有直链状或支链状烷基的基团也称为环烷基。

[0036] 另外,烯基是指:从烯烃的任意的碳上除去一个氢而成的一价基团。

[0037] 另外,烃基是指:1价或2价以上的含有碳及氢、且根据需要含有氧或氮的基团。并且,脂肪族基团为不含芳香环的烃基,可以取链状、支链状或环状中的任一种结构,另外可以为它们的组合。另外,只要没有特别限定则脂肪族基团可以含有不饱和键。进一步地,只要没有特别限定则脂肪族基团可以含有氮、氧、硫、硒、氟、氯、溴等杂原子。另外,脂肪族基团可以为1价基团,也可以为多价基团。另外,芳香族烃基含有芳香环,且根据需要具有脂肪族烃基作为取代基。

[0038] 另外,叔氮是指键合有3个碳的氮。因此,叔氮构成具有供电子性的叔胺结构。

[0039] [生物降解性脂质化合物]

[0040] 实施方式的化合物为适合作为构成脂质体的脂质的化合物。并且,其疏水部具有生物降解性基团,作为生物降解性脂质化合物起作用。并且,其头部不含阳离子性基团,具有在应用于生物体时可抑制与细胞内的蛋白质结合、毒性低的特征。另外,当脂质体由该脂质化合物构成时,脂质体的表面不为阳离子性,因此对细胞的损伤性降低,核酸等活性剂的导入率提高。

[0041] 这种脂质化合物如下述通式(1)所示。以下有时将式中的Q称为头部、将R称为疏水性基团。

[0042] $Q-CHR_2$ (1)

[0043] (式中,Q为含有2个以上叔氮、不含氧的含氮脂肪族基团,

[0044] R分别独立地为 $C_{12} \sim C_{24}$ 的脂肪族基团,至少一个R在其主链中或侧链中含有选自自由 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-O-C(=O)-O-$ 、 $-S-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-S-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 及 $-NH-C(=O)-$ 组成的组中的连接基团 L^R)

[0045] 实施方式的化合物的一个特征是头部Q含有2个以上叔氮且不含氧。

[0046] 可以在不损害实施方式的效果的范围内还含有构成未取代氨基、季铵等的氮,优选不含该叔氮以外的氮。另外,头部Q不含氧。因此,头部Q中不含氧基、羟基、羧基、烷氧基、羧化物(carboxylato)等结构。另外,头部Q也可以含有离子性基团,但优选不含极性基团的中性基团。

[0047] 优选的Q的一例可以用下述通式(1-Q)表示。

[0048] $R^{Q1}_2N-(CR^{Q2}_2)_{q1}-NR^{Q1}-(CR^{Q2}_2)_{q2}-*$ (1-Q)

[0049] (式中,

[0050] R^{Q1} 分别独立地为烷基,

[0051] R^{Q2} 分别独立地为氢或烷基,

[0052] R^{Q1} 及 R^{Q2} 中的任意两个可以键合而形成含氮脂环, $q1$ 为1~4的数,

[0053] $q2$ 为0~4的数,

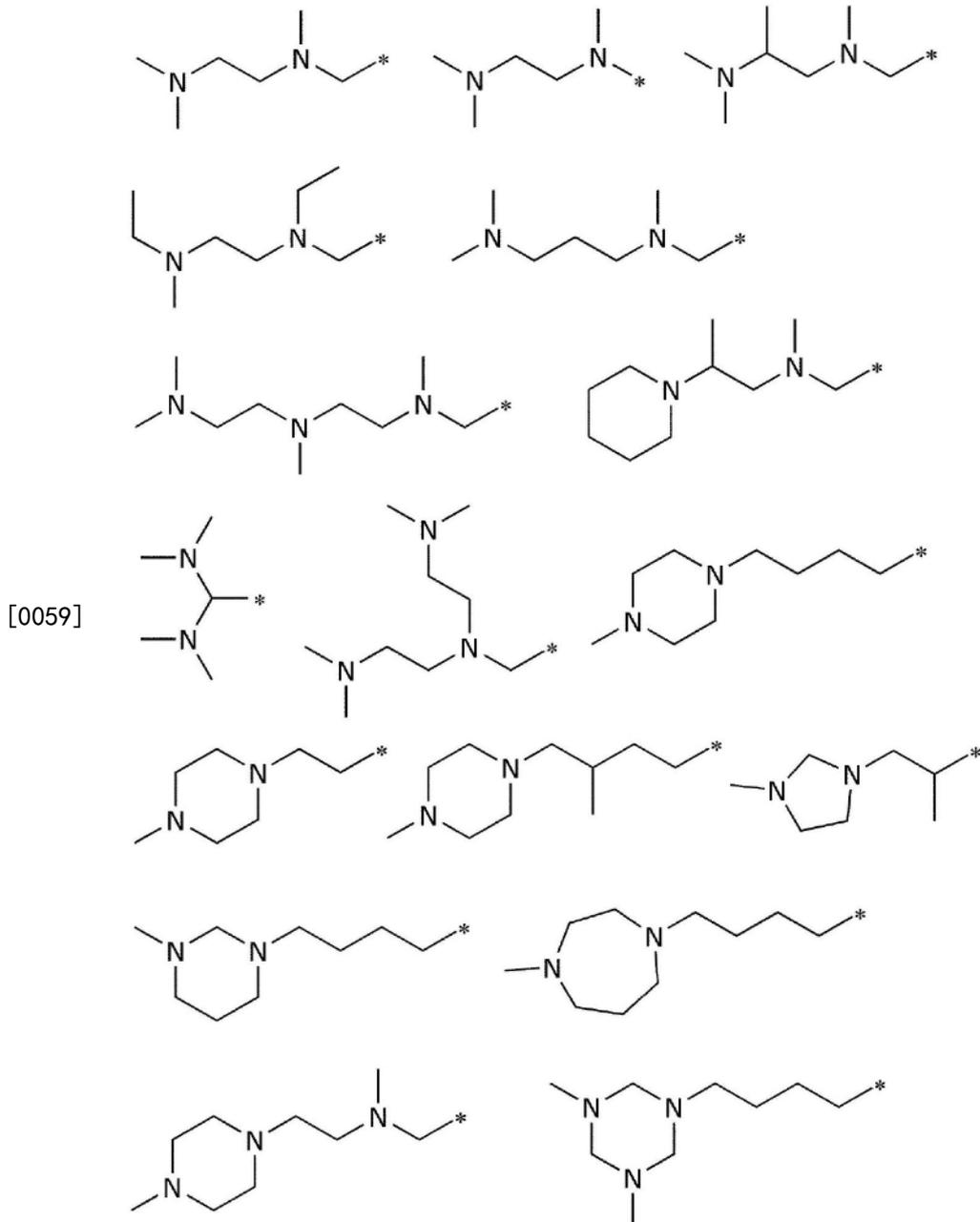
[0054] *表示与 $-CHR_2$ 的键合位置)

[0055] 这里,烷基优选为 $C_1 \sim C_3$ 烷基。

[0056] 另外, R^{Q1} 及 R^{Q2} 中的任意两个可以键合而形成含氮脂环。含氮脂环的构成元数没有特别限定,优选为4~10,优选为5~8。典型情况下,所构成的含氮脂环可列举哌啶、哌嗪、吡咯烷、咪唑烷、六亚甲基亚胺、高哌嗪、七亚甲基亚胺等。

[0057] 这种Q可以具有例如以下的结构。

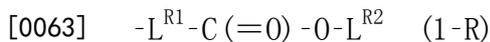
[0058] [化1]



[0060] (式中,*表示与-CHR₂的键合位置)

[0061] 实施方式的化合物具有键合于头部的-CHR₂。这里,R表示疏水性基团,两个R可以相同或不同。疏水性基团通常含有比较长的烃链。并且,其一部分中含有包含羧化物等的连接基团,具体而言含有选自由-C(=O)-O-、-O-C(=O)-、-O-C(=O)-O-、-S-C(=O)-、-C(=O)-S-、-C(=O)-NH-及-NH-C(=O)-组成的组中的连接基团。在将实施方式的化合物用于脂质体时,这些连接基团作为生物降解性基团起作用。

[0062] 优选的疏水性基团R的一例可以用下述式(1-R)表示。



[0064] (式中,

[0065] L^{R1}为亚烷基,

[0066] L^{R2}为烯基)

[0067] L^{R1} 及 L^{R2} 可以具有支链结构、环状结构,在具有支链结构的情况下,优选侧链少,最优选为直链状。

[0068] 更具体而言, L^{R1} 及 L^{R2} 分别优选下述式(1-R1)及(1-R2)表示。

[0069] $-(CH_2)_{r1}-$ (1-R1)

[0070] $-CH_2-CH=CH-(CH_2)_{r2}-H$ (1-R2)

[0071] (式中,

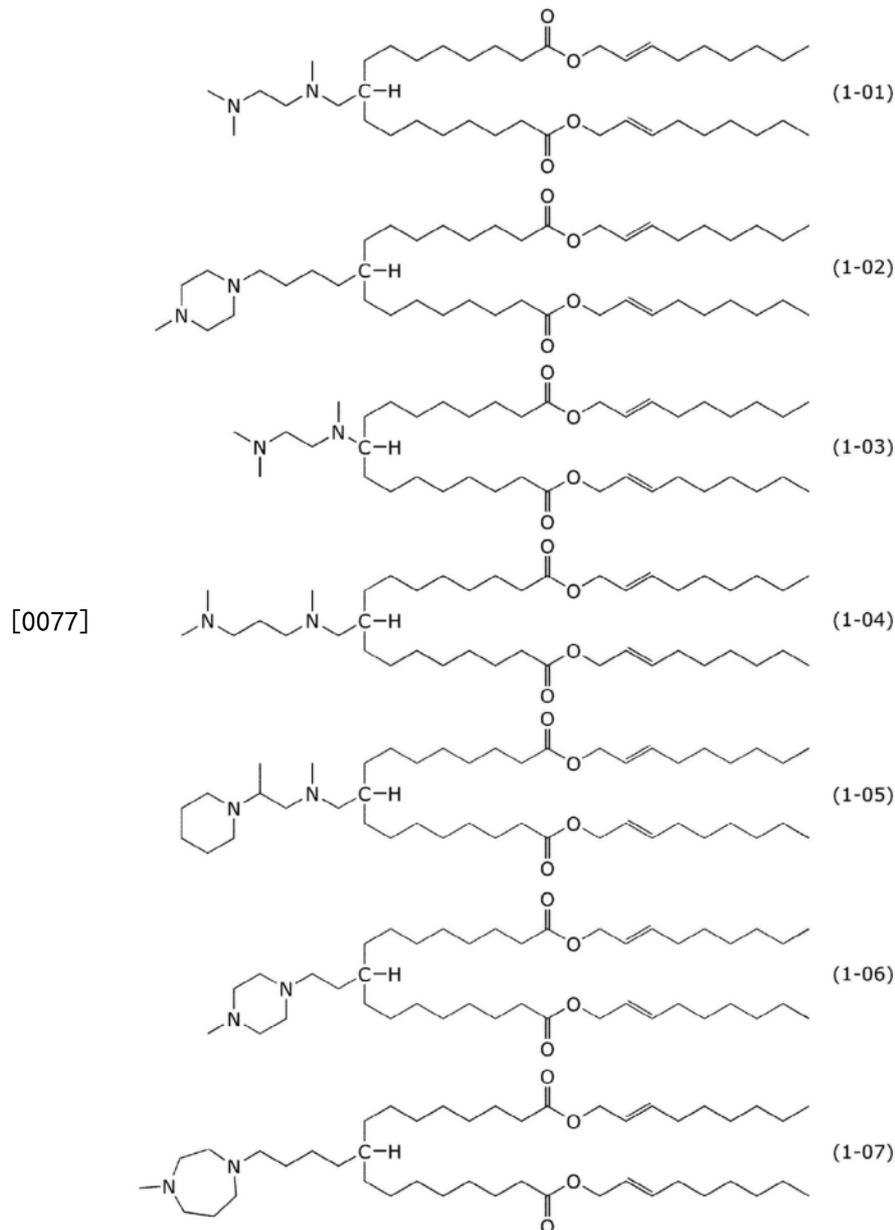
[0072] $r1$ 为1~10的数,

[0073] $r2$ 为1~10的数)

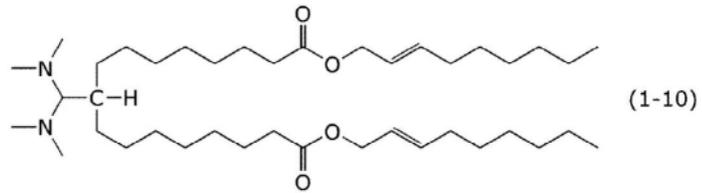
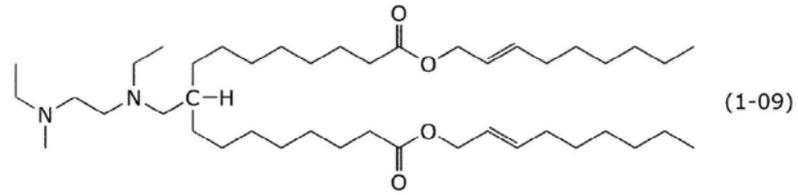
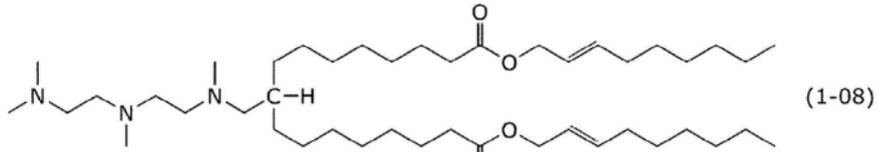
[0074] 这里,为了使疏水性基团发挥充分的疏水性,优选 $r1$ 为4~8的数,另外优选疏水性基团R中含有的、最长的分子链为8个原子上。

[0075] 实施方式的化合物的各部位具有如上所述的结构,实施方式的化合物优选具有下述式(1-01)~(1-21)所示的结构。

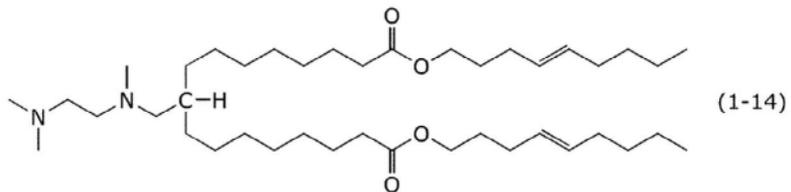
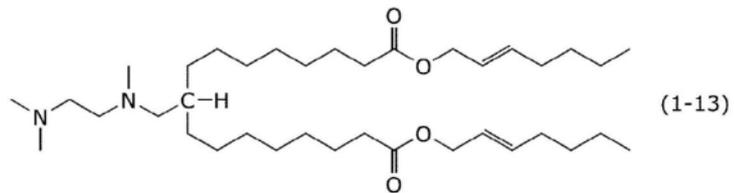
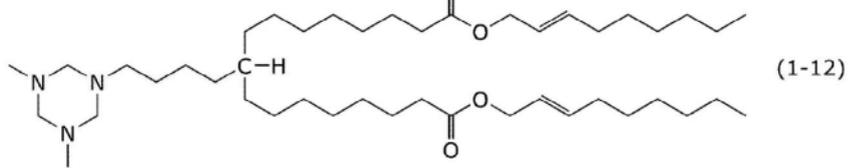
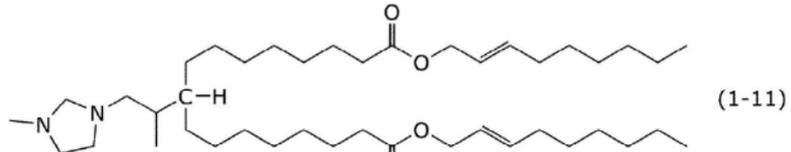
[0076] [化2-1]



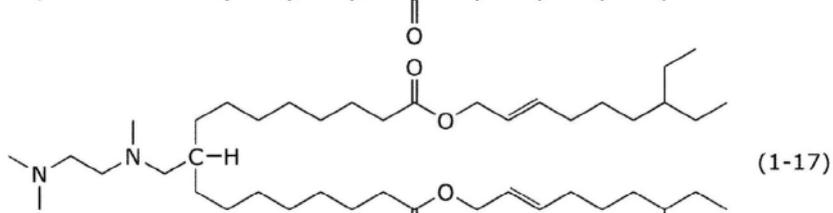
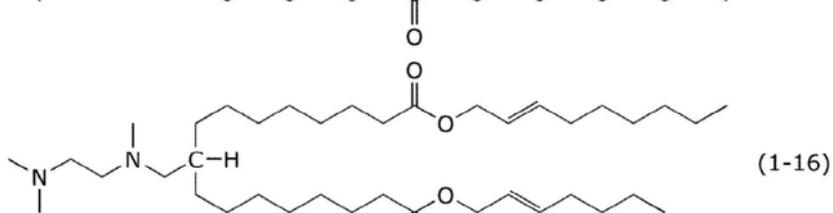
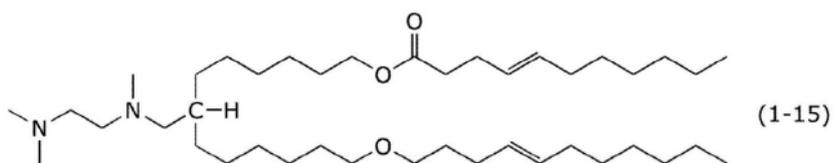
[0078] [化2-2]



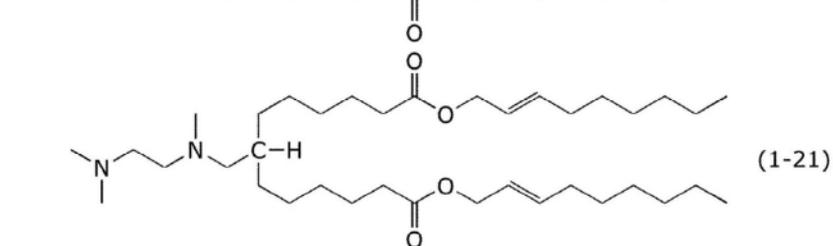
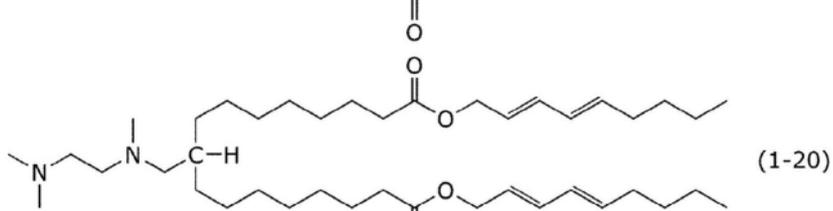
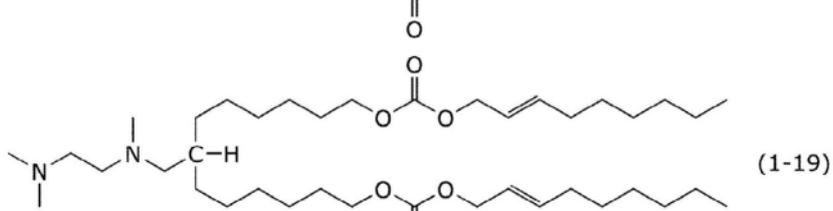
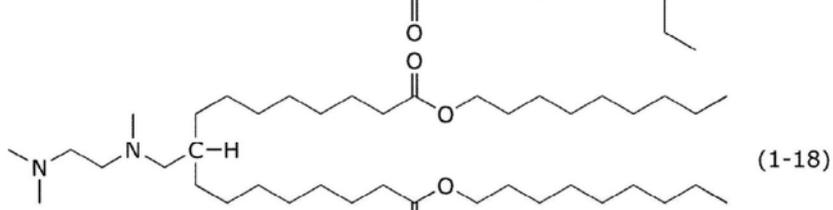
[0079]



[0080] [化2-3]



[0081]



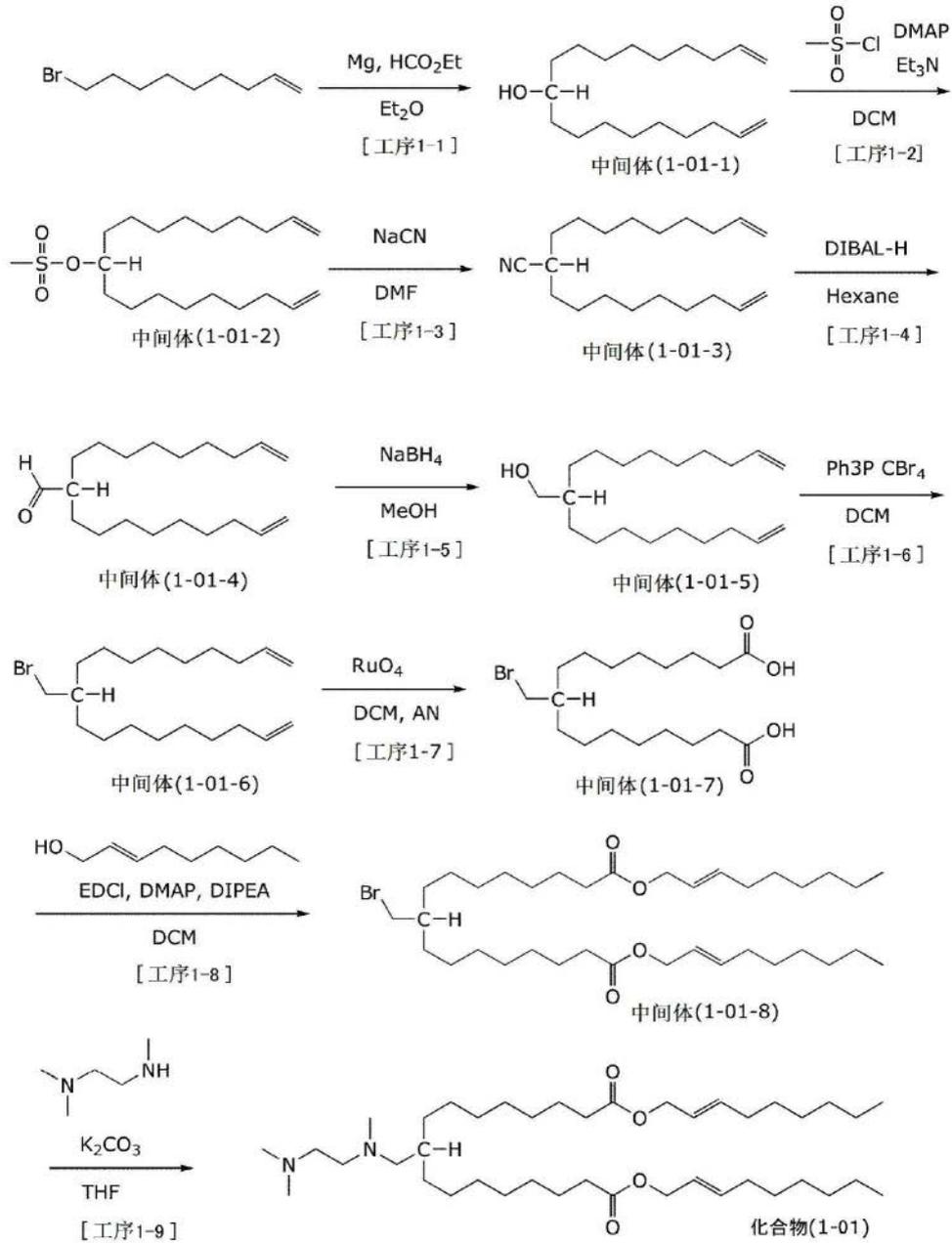
[0082] 这些中, (1-01) 及 (1-02) 在被用于脂质体时可发挥优异的特性, 因此是特别优选的。

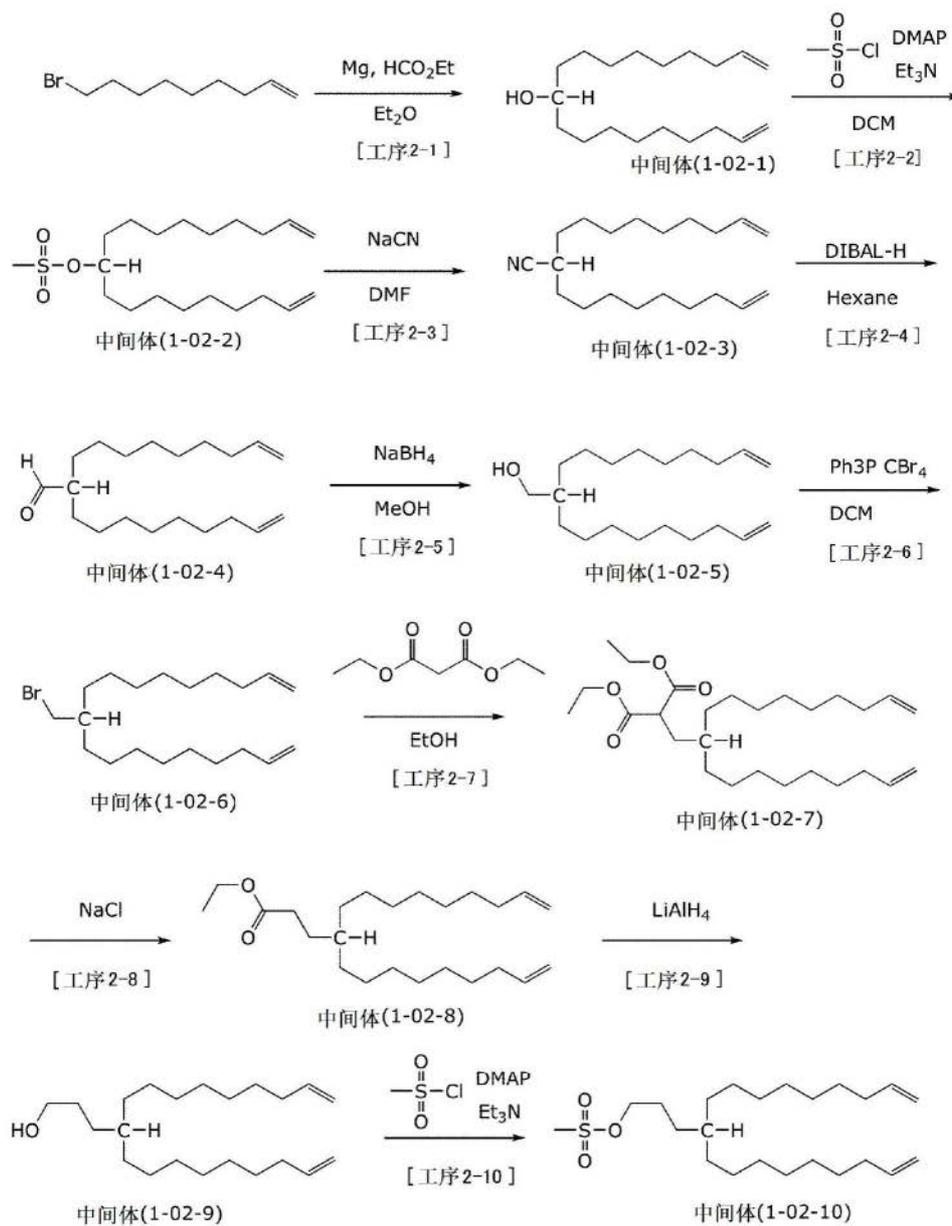
[0083] [化合物的制造方法]

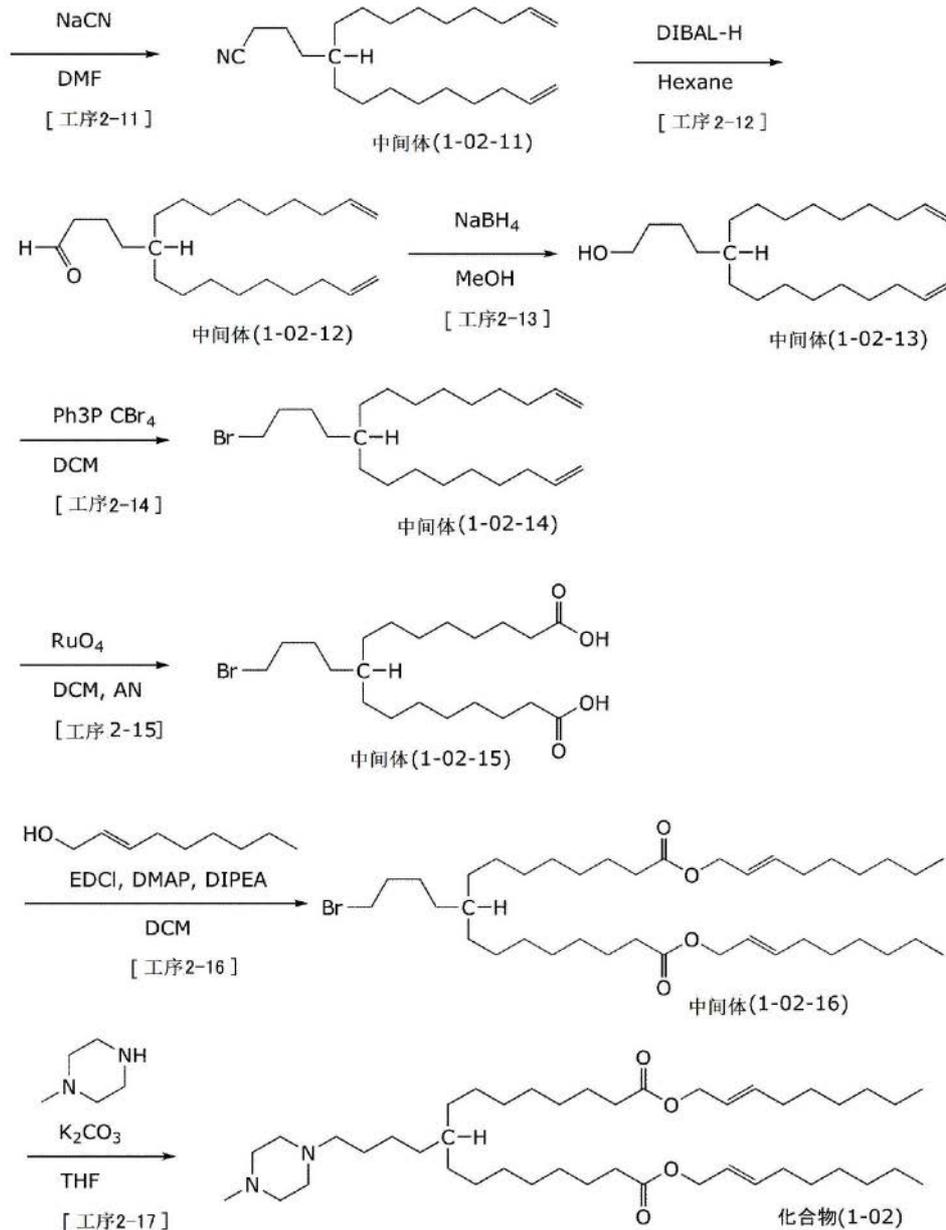
[0084] 本发明的化合物可以用任意的方法来制造。例如, 化合物 (1-01) 及 (1-02) 可以按照例如下述的工序图来制造。

[0085] [化3]

[0086] 化合物 (1-01) 的合成







[0094] [脂质粒子]

[0095] 根据实施方式,提供一种脂质粒子。该脂质粒子的代表例为脂质体,但不限于此,也包括与核酸等复合而成的脂质复合物等。另外,脂质体可以为单室脂质体、多层膜脂质体中的任一者。

[0096] 实施方式的脂质粒子含有上述的式(1)所示的化合物。另外,期望还含有形成膜的脂质和可减少聚集的脂质。

[0097] 形成膜的脂质只要是通常用于脂质体的脂质就可以任意使用。该脂质优选生物降解性优异的脂质。

[0098] 这种形成膜的脂质的具体例为二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、二氢鞘磷脂、脑磷脂及脑苷脂等。实施方式中,用于脂质粒子的形成膜的脂质可考虑目标脂质体的尺寸、脂质体在生物体中的稳定性等适当选择。这些中,优选二酰基磷脂酰胆碱及二酰基磷脂酰乙醇胺。这里,脂质中含有的酰基的烃链的长度优选为10~20。该烃

链可以为饱和烃基或不饱和烃基。

[0099] 就这种形成膜的脂质而言,已知有各种物质,作为优选的例子,可列举例如1,2-二油酰基-sn-丙三醇-3-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、1,2-硬脂酰基-sn-丙三醇-3-磷脂酰乙醇胺(DSPE)、1,2-二棕榈酰基-sn-丙三醇-3-磷脂酰胆碱(DPPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-丙三醇-3-磷脂酰胆碱(POPC)、1,2-二-0-十八烷基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵丙烷(DODAP)、1,2-二肉豆蔻酰基-3-二甲基铵丙烷(14:0DAP)、1,2-二棕榈酰基-3-二甲基铵丙烷(16:0DAP)、1,2-二硬脂酰基-3-二甲基铵丙烷(18:0DAP)、N-(4-羧基苄基)-N,N-二甲基-2,3-双(油酰氧基)丙烷(DOBAQ)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)、1,2-二油酰基-sn-丙三醇-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二亚油酰基-sn-丙三醇-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二油酰基-sn-丙三醇-3-磷酸-L-丝氨酸(DOPS)及胆甾醇等。另外,这些中更优选DOPE、DOTAP或胆甾醇,特别优选DOPE与胆甾醇的组合、DOTAP与胆甾醇的组合、DOPE与DOTAP与胆甾醇的组合。这些除了可以发挥形成脂质体等的膜的功能以外,还可以发挥膜融合效果。

[0100] 实施方式中使用的可减少聚集的脂质在脂质粒子的制备中发挥含有粒子彼此的聚集的功能。作为这种脂质,已知有各种物质,在实施方式的脂质粒子中可以选择使用任意的此种物质。作为这种脂质的例子,可列举聚乙二醇(PEG)修饰脂质、由 ω -氨基(低聚乙二醇)烷酸单体衍生的聚酰胺低聚物(美国专利第6,320,017号)、单唾液酸神经节苷酯等。更具体而言,可以使用美国专利第6,320,017号中列举的ATTA8-DPSE等ATTA脂质以及美国专利第5,820,873号、第5,534,499号及第5,885,613号中记载的聚乙二醇脂质缀合物。

[0101] 在形成脂质粒子时,PEG修饰脂质可以在脂质粒子的表面形成锚定脂质部分。作为这种PEG修饰脂质的例子,可列举PEG修饰磷脂酰乙醇胺、PEG修饰磷脂酸、PEG-神经酰胺缀合物(例如日本专利第3920330号说明书中记载的C14 PEG-Cer或C20 PEG-Cer)、PEG修饰二烷基胺、PEG修饰1,2-二酰氧基丙烷-3-胺、PEG修饰二酰基甘油(例如1,2-二肉豆蔻酰基-sn-丙三醇-甲氧基聚乙二醇;PEG-DMG)及PEG修饰二烷基甘油。其中,特别优选PEG修饰二酰基甘油及PEG修饰二烷基甘油。

[0102] 当PEG等体积庞大的修饰基团结合到脂质表面时,修饰基团与脂质粒子的键合会影响脂质粒子或脂质体的稳定性。例如,美国专利第5,820,873号公开了PEG修饰脂质中的酰基链的长度、酰基链的饱和度及位阻头部基团的尺寸等特性会影响脂质粒子的稳定性。因此,可以通过调整这些特性来得到符合目的的脂质粒子。例如,可以通过使PEG修饰脂质中的修饰基团缩短而使脂质粒子更快地消失、或者可以通过将修饰基团加长而延长血浆中的停留时间等。其结果是,有时可以改善脂质粒子向靶组织的递送。

[0103] 脂质粒子还可以还含有其他脂质。这种其他脂质可以从通常用于脂质粒子的物质中任意选择、使用。例如,为了调整毒性,则可以组合毒性相对低的脂质。另外,为了向脂质粒子中导入用于结合配体的官能团,也可以组合具有特定结构的脂质。

[0104] 进一步地,在将脂质粒子作为脂质体使用时,作为用于抑制其内包物漏出的脂质,还可以含有甾醇、例如胆甾醇。进一步地,还可以在脂质粒子上偶联靶向作用物质。这种情况下的偶联方法可以采用以往已知的任意方法。

[0105] 另外,实施方式的脂质粒子优选还含有下述化合物,所述化合物用下述式(2)表示,并且在结构中含有至少一个选自由羧酸酯键、硫代羧酸酯键、二硫代羧酸键、酰胺键、氨

基甲酸酯键、羧基二氧键及脲键组成的组中的生物降解性基团，

[0106] $P-[X-W-Y-W'-Z]_2$ (2)

[0107] (式中，

[0108] P为在主链中含有1个以上醚键的亚烷基氧基，

[0109] X分别独立地为含有叔胺结构的2价连接基，

[0110] W分别独立地为 $C_1\sim C_6$ 亚烷基，

[0111] Y分别独立地为选自单键、醚键、羧酸酯键、硫代羧酸酯键、硫代酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键及脲键组成的组中的2价连接基，

[0112] W' 分别独立为单键或 $C_1\sim C_6$ 亚烷基，Z分别独立地为脂溶性维生素残基、甾醇残基或 $C_{12}\sim C_{22}$ 脂肪族烃基)。

[0113] 式(2)所示的化合物也为具有生物降解性的脂质化合物。通过将式(2)的化合物与式(1)的化合物组合，从而能够表现出新的功能。例如，在将式(2)的化合物应用于脂质体时，可以提高核酸的内包量，在将式(1)的化合物和式(2)的化合物应用于脂质体时，更容易应用于基因治疗、核酸医疗、基因组诊断等。

[0114] 式(2)的化合物的一个特征是式(2)中的P含有醚键。即，P至少含有一个氧、且该氧与两个碳键合。

[0115] P含有的氧数没有特别限定，优选含有1~2个氧。另外，P含有的碳数也没有特别限定，P中含有的烃链的碳数优选为1~3，P中含有的碳的总数优选为3~8个。作为优选的P，可列举以下的物质。

[0116] $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$

[0117] $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$

[0118] $-(CH_2)_2-O-O-(CH_2)_2-$

[0119] $-(CH_2)_3-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$

[0120] $-(CH_2)_2-O-CH_2-O-(CH_2)_2-$

[0121] 通过具有这种结构，立体结构的自由度提高。在将该化合物用在脂质体的构成时，醚键中含有的氧与所组合的核酸等形成氢键，因此核酸等的内包量增多。

[0122] 另外，X为含有叔胺结构的2价连接基，优选从由甲基亚氨基、1,2-吡咯烷二基及1,3-吡咯烷二基组成的组中选择。在将该化合物用于脂质体的构成时，可通过叔胺结构发挥高的细胞膜透过性。

[0123] 式(2)中， $-W-Y-W'-Z$ 构成疏水部。该疏水部含有生物降解性基团。这里，生物降解性基团从由羧酸酯键($-C(=O)-O-$)、硫代羧酸酯键($-C(=O)-S-$)、二硫代羧酸酯键($-C(=S)-S-$)、酰胺键($-C(=O)-NH-$)、氨基甲酸酯键($-NH-C(=O)-O-$)、羧基二氧键($-O-C(=O)-O-$)及脲键($-NH-C(=O)-NH-$)组成的组中选择。

[0124] 该生物降解性基团除了作为Y而存在于结构中以外，也有时含有在Z中。即，Z为来自脂溶性维生素、甾醇的基团，其结构中可以有羧酸酯基等。另外，生物降解性基团可以含有在Z和Y这两者中，另外也可以任一者含有2个以上的生物降解性基团。

[0125] Y及 W' 为连结W和Z的2价基团。

[0126] Y为选自单键、醚键、羧酸酯键、硫代羧酸酯键、硫代酯键、酰胺键、氨基甲酸酯键及脲键组成的组中的2价连接基。另外， W' 为单键或 $C_1\sim C_6$ 亚烷基。

[0127] 这些可以是不含元素的单键。另一方面,在Z不含生物降解性基团时,Y含有生物降解性基团。

[0128] Z为脂溶性维生素残基、甾醇残基或 $C_{12}\sim C_{22}$ 脂肪族烃基。这些中,优选脂溶性维生素残基或甾醇残基,更优选为脂溶性维生素残基。

[0129] 脂溶性维生素残基为由脂溶性维生素衍生的基团。作为脂溶性维生素,可列举例如视黄醇、视黄醛、麦角固醇、7-脱氢胆甾醇、麦角钙化醇、胆钙化醇、二氢麦角钙化醇、二氢速甾醇、生育酚及生育三烯酚。这些脂溶性维生素在末端具有羟基。脂溶性维生素残基的一例为从这些的羟基脱除了氢而成的基团。另外,也可以使用来自脂溶性维生素衍生物的基团。该脂溶性维生素衍生物是指脂溶性维生素中含有的羟基被硫代羟基、羧基、硫代羧基或二硫代羧基置换而成的化合物。这些脂溶性维生素残基在末端具有-S-、-C(=O)-O-、-C(=O)-S-或-C(=S)-S-。在脂溶性维生素残基中,特别优选来自视黄醇(维生素A)、生育酚(维生素E)或它们的羧酸衍生物的基团。

[0130] 甾醇残基是由甾醇衍生的基团。作为甾醇,可列举例如胆固醇、豆甾醇、 β -谷甾醇、羊毛甾醇及麦角甾醇。甾醇残基的一例是从这些甾醇的羟基脱除了氢而成的基团。另外,甾醇残基可以具有与来自上述脂溶性维生素衍生物的基团同样的末端基团。特别优选的甾醇残基为来自甾醇、胆甾醇或它们的羧酸衍生物的基团。

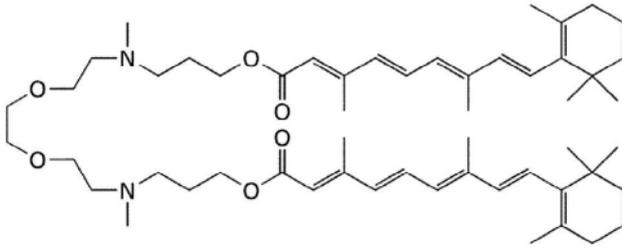
[0131] $C_{12}\sim C_{22}$ 脂肪族烃基可以为直链状、支链状中的任一种,另外也可以具有环状结构。另外,脂族烃基可以含有不饱和键,在含有的情况下,通常含有6个以下、优选3个以下的饱和键。脂族烃基的碳数优选为12~18,更优选为13~17。

[0132] 这些Z中,优选含有吸收紫外线的结构的类型。具体而言,优选含有环己烯结构。这样,通过含有吸收紫外线的结构,可以减轻含有该化合物作为成分的脂质粒子由于光而劣化,另外,在需要分析脂质粒子的行为时,能容易地进行该分析。

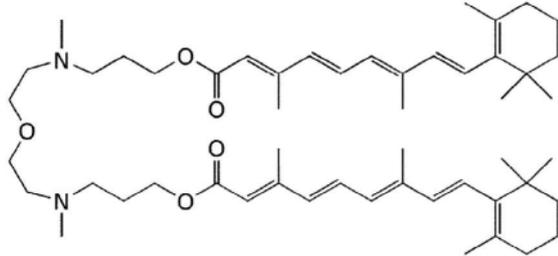
[0133] 需要说明的是,式(2)的化合物含有两个[X-W-Y-W'-Z],各自的X、W、Y、W'、Z是独立的,可以相同或不同,优选相同且化合物的结构对称。

[0134] 实施方式的化合物的各部位具有如上所述的结构,实施方式的化合物优选具有下述式(2-01)~(2-12)所示的结构。

[0135] [化5-1]

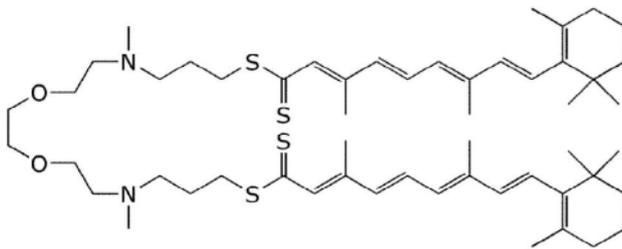


(2-01)

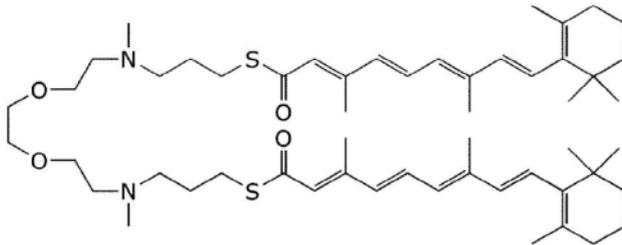


(2-02)

[0136]

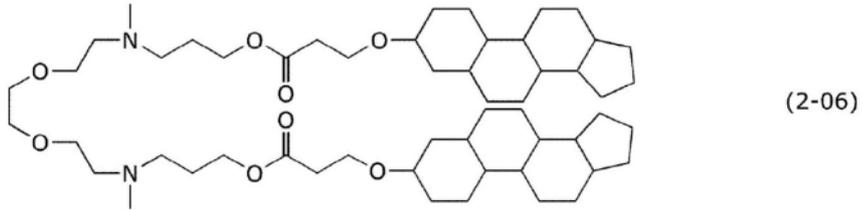
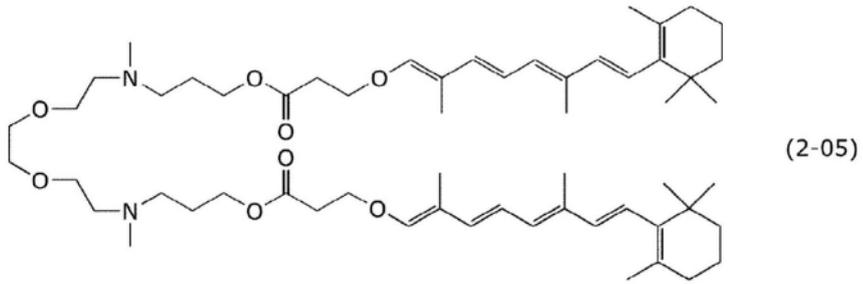


(2-03)

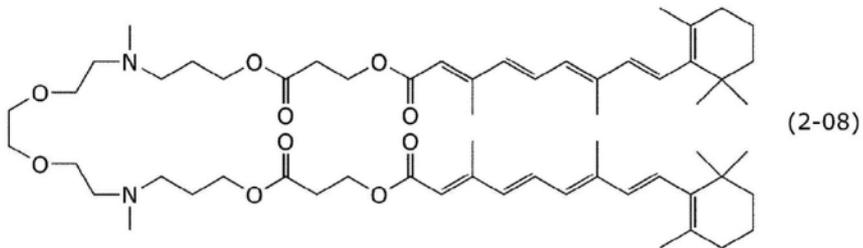
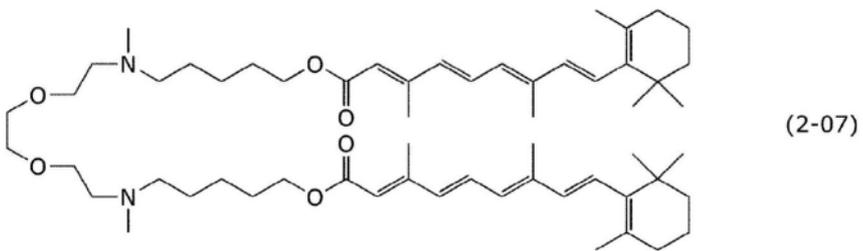


(2-04)

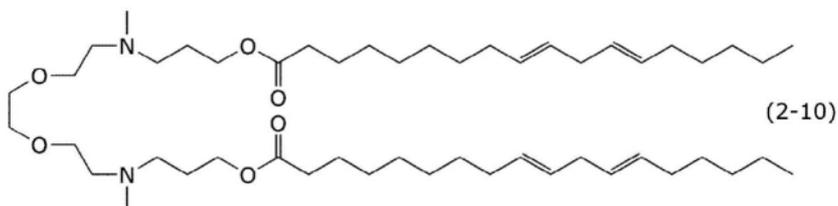
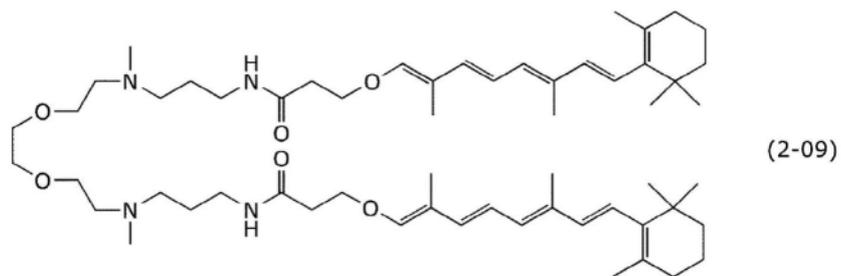
[0137] [化5-2]



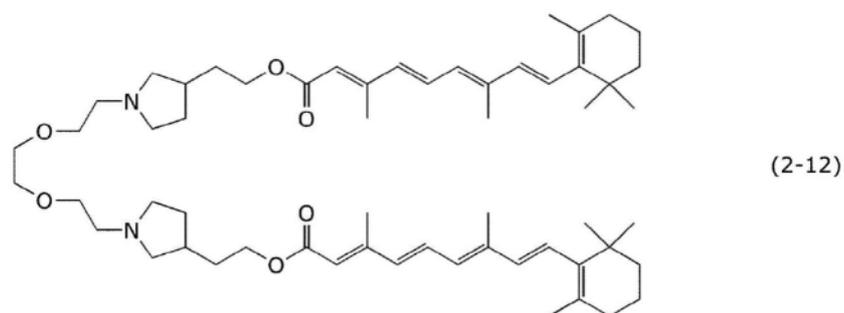
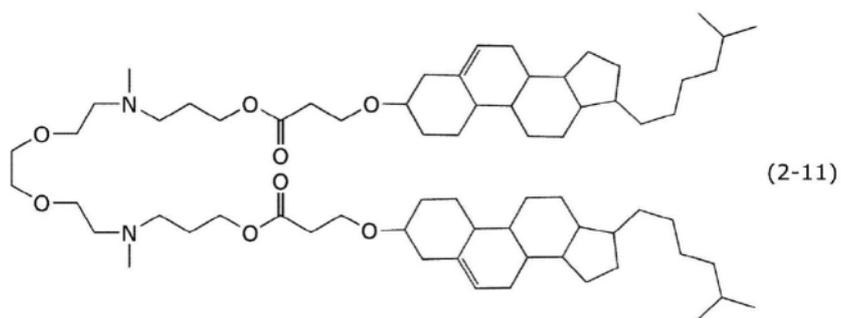
[0138]



[0139] [化5-3]



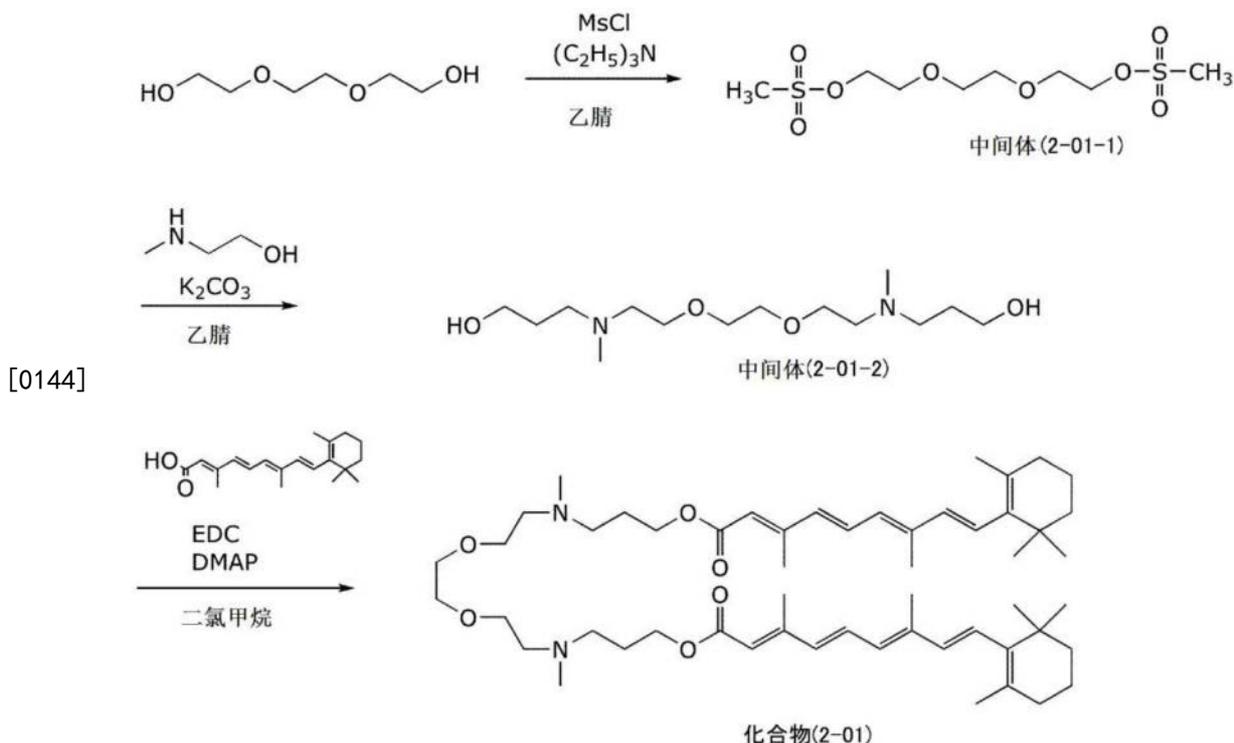
[0140]



[0141] 这些中, (2-01) ~ (2-04) 由于在与式(1)的化合物组合而用于脂质体时可以发挥优异的特性, 因此是特别优选的。

[0142] 式(2)的化合物可以按照例如下述的工序图来制造。

[0143] [化6]



[0145] 将这些脂质组合则可构成脂质粒子,构成该脂质粒子的各脂质的配合比可根据目的来调整,因此没有限制。但是,以脂质粒子所使用的脂质的总摩尔数为基准,通常情况下,一般以式(1)及(2)所示的脂质化合物合计25~75摩尔%、形成膜的脂质25~75摩尔%、可减少聚集的脂质1~10摩尔%进行配合,优选式(1)及(2)所示的脂质化合物合计为30~60摩尔%、形成膜的脂质为30~65摩尔%、可减少聚集的脂质1~10摩尔%、例如2.5摩尔%。这里,式(1)的化合物与形成膜的脂质的平衡是重要的,仅存在一者则活性剂的导入率无法充分提高。因此,式(1)或(2)的化合物与形成膜的脂质的配合比以摩尔数基准计优选为1:0.5~1:3,更优选为1:0.75~1:2.1。

[0146] 需要说明的是,式(1)或(2)所示的化合物也都作为形成膜的脂质起作用,但在实施方式中,“形成膜的脂质”不包括式(1)或(2)的化合物。

[0147] 实施方式的脂质粒子可以还含有活性剂。在实施方式中,活性剂是指可以对细胞、组织、器官或受试者赋予特定效果的物质。特定效果可以是生物学的、生理学的或美容的效果中的任一种。通过使用实施方式的脂质粒子,可以向生物体内的目标部位递送各种活性剂。该活性剂既可以包封在脂质粒子的内部,也可以结合到外侧或内侧的脂质表面,另外还可以配置在脂质层的内部。

[0148] 活性剂的典型的例子为核酸,可列举例如选自由质粒、寡核苷酸、多核苷酸、小干扰RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)、DNA、适体及核酶组成的组中的核酸。另外,也可以使用反义寡核苷酸、Antago-mir、aDNA、质粒、核糖体RNA(rRNA)、转运RNA(tRNA)、核内低分子RNA(snRNA)、mRNA等。可以将不同种类的DNA、RNA组合使用。

[0149] 作为miRNA,可以使用17~25个核苷酸单元连接而成的miRNA。在一个更优选的实施方式中,核酸是15~50个或20~30个核苷酸单元连接而成的寡核苷酸。siRNA例如含有16~30个核苷酸单元,可以具有双链区。在另一实施方式中,核酸是免疫刺激性寡核苷酸、诱饵寡核苷酸、超级mir、miRNA模拟物或miRNA抑制剂。超级mir是指RNA或脱氧核糖核酸DNA或

这两者或者它们的改性体的单链、双链或部分双链的低聚物或聚合物,具有与miRNA基本相同的核苷酸序列,并且是与其靶标反义的低聚物或聚合物。miRNA模拟物表示可用于模拟1种以上miRNA的基因沉默能力的目的分子组。因此,“miRNA模拟物”这一术语是指可以进入RNAi途径并调控基因表达的合成非编码RNA(即,miRNA模拟物不能通过从内源性miRNA的供给源纯化而得)。

[0150] 在将核酸与脂质粒子组合时,核酸的形态没有特别限定。该核酸例如可以为单链DNA或RNA、双链DNA或RNA、或者DNA-RNA杂合体。作为双链RNA的例子,可列举siRNA。作为单链核酸,可列举例如反义寡核苷酸、核酶、miRNA及形成三链的寡核苷酸。

[0151] 当实施方式的脂质粒子含有核酸时,可以还含有与核酸结合的化合物。作为这样的化合物,可列举碱性蛋白质或碱性肽,可优选列举鱼精蛋白、组蛋白及它们的盐。例如,组蛋白及其盐具有与核酸结合、并折叠核酸分子的性质。另外,鱼精蛋白具有与核酸结合、并且卷入该核酸的性质。因此,这些化合物对于将核酸包封于脂质粒子都是有效的。

[0152] 另外,实施方式的脂质粒子可以还含有调控细胞内的核酸表达的化合物。通过调控细胞内的核酸的表达,可以使被递送脂质体的细胞得到可视化及细胞凋亡的效果,因此是优选的。作为这样的化合物,可列举视黄酸、环腺苷酸(cAMP)、抗坏血酸等。

[0153] 另外,实施方式的脂质粒子可以含有脂蛋白、载脂蛋白等。

[0154] 作为活性剂,还可以使用其他治疗剂。作为可使用的治疗剂的具体例,可列举肽、多肽、细胞因子、生长因子、致凋亡因子、分化诱导因子、细胞表面受体及其配体、激素等。更具体地,治疗剂可列举抗炎化合物、抗抑郁药、兴奋剂、镇痛药、抗生素、避孕药、退热药、血管扩张剂、血管新生抑制剂、细胞血管作用药(cytovascular agents)、信号转导抑制剂、心血管药、抗肿瘤药、激素及类固醇。

[0155] 当将活性剂与脂质粒子组合时,优选将活性剂以更高的导入率导入到脂质粒子中。另外,还优选由取决于脂质特性的细胞毒性引起的细胞死亡率低。在使用以往已知的脂质粒子导入核酸时,通常导入率低,并且由细胞毒性引起的细胞死亡的比例也高。与此相对,在使用本实施方式的脂质粒子的情况下,可以提高核酸的导入率,并且减少细胞死亡。具体而言,以往的脂质粒子的导入率为10%左右,由电穿孔导致的细胞死亡为60~70%,与此相对,在使用实施方式的脂质粒子的情况下,导入率为70%以上,由电穿孔导致的细胞死亡则降低至30%以下。

[0156] 实施方式的脂质粒子可以根据目的而形成任意的大小。但是,在欲将实施方式的脂质粒子用于药物用途的情况下,通常将脂质粒子制成纳米级尺寸的粒子。具体而言,实施方式的脂质粒子的平均粒径通常为50nm~300nm,优选为50nm~200nm。脂质粒子的尺寸可以采用任意方法调节。例如,可以通过超声波处理来缩小脂质粒子。另外,也可以通过透过聚碳酸酯膜、陶瓷膜,将脂质粒子进行分级来调节尺寸。需要说明的是,在实施方式中,脂质粒子的平均粒径例如可以通过使用动态光散射法的Zetasizer来测定。

[0157] 另外,实施方式的脂质粒子的体内半衰期($t_{1/2}$)通常小于3小时,优选小于2小时,特别优选小于1小时。在此,体内半衰期是指例如肝脏中、脾脏中或血浆中的半衰期。在实施方式中,由于构成脂质的式(1)化合物具有生物降解性基团,因此与由不含生物降解性基团的脂质构成的脂质粒子相比,半衰期例如不到10%。

[0158] [脂质粒子的制造方法]

[0159] 实施方式的脂质粒子可以通过以往已知的任意方法制造。作为制造脂质粒子、脂质体的方法,已知有バンガム (Bangham) 法、有机溶剂提取法、表面活性剂除去法、冻融法等,可以采用这些方法。另外,例如,通过向醇等有机溶剂中导入式(1)所示的化合物、以及形成膜的脂质、可减少聚集的脂质,添加水性缓冲液,由此也可自发地形成脂质粒子。通过在该水性缓冲液中预先组合活性剂,可以向脂质粒子中导入活性剂。

[0160] [脂质粒子的用途]

[0161] 本实施方式的脂质粒子可用于向细胞递送活性剂。特别是将核酸等活性剂向细胞的递送在基因工程、重组蛋白的生产、及作为基因治疗、细胞诊断所已知的医疗技术等所有的领域中被使用。在一实施方式中,提供一种用于向细胞递送活性剂的组合物,其特征在于,含有实施方式的脂质粒子和载体。在另一实施方式中,提供一种用于向细胞递送活性剂的、实施方式的脂质粒子。在另一实施方式中,提供一种用于向细胞递送活性剂的方法,其包括:使含有该活性剂的实施方式的脂质粒子与细胞接触(例如,将上述脂质粒子给药于受试体)。在另一实施方式中,提供一种权利要求9~22中任一项所述的脂质粒子的应用,其用于向细胞递送活性剂。在一实施方式中,上述脂质粒子含有式(1)的化合物和式(2)的化合物这两者,优选式(2)的化合物的含量相对于式(1)的化合物的含量的摩尔比小于1。在一实施方式中,上述细胞为肿瘤细胞。上述受试体优选为需要这种处置的动物,更优选为哺乳动物,最优选为人。关于这些用途,后文将具体进行说明。

[0162] [组合物]

[0163] 本实施方式的脂质粒子可以以组合物形式使用。例如,提供含有本实施方式的脂质粒子及载体的组合物。这样的组合物也可用于药物用途。

[0164] 作为载体,可以从往已知的载体中任选使用,可列举例如水、生理盐水之类的盐水、甘氨酸水溶液、缓冲液等。除了这些载体以外,还可以为了改善稳定性等而组合白蛋白、脂蛋白、载脂蛋白、球蛋白等糖蛋白。

[0165] 实施方式的组合物可以通过标准的方法制备。作为载体,通常使用生理盐水。对于含有盐水或其他含盐载体的组合物而言,优选在脂质粒子形成后加入载体。因此,通常,在组合脂质粒子及核酸等活性剂后,将该组合物用生理盐水之类的药学可接受的载体置换或稀释。

[0166] 实施方式的组合物可根据需要含有助剂。例如,在药物用途的情况下,通过含有药学上可接受的助剂,例如pH调节剂、缓冲剂、张度调节剂等作为助剂,可以使药物组合物更接近生理状态。作为起这种作用的助剂,可列举醋酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)等。另外,实施方式的组合物也可以含有用于改善贮存稳定性的脂质保护剂。作为这样的保护剂,可列举抑制自由基引起的损伤的 α -生育酚之类的亲脂性自由基淬灭剂、抑制脂质的过氧化损伤的铁草胺之类的水溶性螯合剂。

[0167] 此外,也可以将上述的活性剂等添加到组合物中。该活性剂可以与组合在脂质粒子中的活性剂相同或不同。另外,还可以向组合物中添加与核酸结合的化合物、调节核酸表达的化合物。

[0168] 实施方式的组合物中含有的脂质粒子的浓度没有特别限定,组合物中含有的脂质粒子的含有率通常为0.01~30质量%、优选为0.05~10质量%。脂质粒子的浓度可根据目的适当选择。

[0169] 实施方式的组合物可以通过以往周知的方法灭菌。灭菌后的组合物可以作为可直接给药的制剂进行包装,也可以干燥后包装。干燥后的组合物可以通过在临给药前与灭菌水溶液组合来制成可给药的制剂。

[0170] 实施方式的组合物也可以是试剂盒形态。实施方式的试剂盒含有上述脂质粒子及用于向细胞导入上述脂质粒子的导入剂,但其形态是任意的。可列举例如:将不含活性剂的脂质粒子分散在载体中的分散物及活性剂分别收容在不同的容器中的试剂盒,以及将干燥的脂质粒子、活性剂及载体分别收容在不同的容器中的试剂盒等。进而,也可以将干燥的脂质粒子或脂质粒子分散物与活性剂分别制成独立的制品,使使用者根据目的来选用各制品。

[0171] 该试剂盒中可以组合在导入核酸时使用的试剂。

[0172] [药物组合物的利用方法]

[0173] 在将实施方式的脂质粒子用于药物用途时,组合物可用于治疗或诊断人或动物的各种疾病。例如,通过采用治疗剂来作为与脂质粒子组合的活性剂,可以将治疗剂递送至靶细胞,从而进行治疗。

[0174] 例如,可以将各种核酸递送给细胞而与其接触来进行疾病的预防或治疗。作为这样的核酸,可列举寡核苷酸、siRNA、质粒、反义核酸或核酶。这些实施方式的脂质化合物可以高效且迅速地摄入这些核酸。例如,在短时间内安全地将RNA导入到脂质粒子中在以往较为困难,但通过使用实施方式的脂质化合物则能够容易地进行该导入。

[0175] 通过将用于制备脂质粒子的脂质化合物、形成膜的化合物适当组合,能够进行更有效的细胞打靶。具体而言,化合物(1-01)、化合物(2-01)、DOPE及胆甾醇的组合可适用于向肝癌细胞的递送,化合物(1-01)或化合物(1-02)、DOTAP及胆甾醇的组合可适用于向T细胞性白血病细胞的递送,化合物(1-01)、化合物(2-01)、DOTAP、DOPE及胆甾醇的组合可适用于向乳腺癌细胞的递送。

[0176] 另外,通过将用于制备脂质粒子的脂质化合物、形成膜的化合物适当组合,也能够更有效地进行诊断、治疗及预防。具体而言,化合物(1-01)、化合物(2-01)、DOPE及胆甾醇的组合可适用于肝癌的诊断、治疗及预防,化合物(1-01)或化合物(1-02)、DOTAP及胆甾醇的组合可适用于T细胞性白血病的诊断、治疗及预防,化合物(1-01)、化合物(2-01)、DOTAP、DOPE及胆甾醇的组合可适用于乳腺癌的诊断、治疗及预防。

[0177] 另外,核酸的递送在体外或体内进行均可。作为体内给药的方法,药物组合物优选采用非口服给药,即,关节内给药、静脉内给药、腹膜内给药、皮下给药或肌肉内给药。药物组合物的静脉内给药或腹膜内给药可以通过团注法来进行。

[0178] 另外,也可以向靶组织直接涂布实施方式的药物制剂,从而使药物组合物与靶组织接触。另外,也可以通过滴注向脑膜等给药、使用内窥镜器具给药。

[0179] 在特定的实施方式中,用药物组合物的处理通常在生理温度(约37℃)下进行1~24小时、优选为2~8小时的时间。在体外的应用中,作为对象的细胞没有特别限定。例如可以为脊椎动物的细胞、非脊椎动物的细胞或植物细胞。但是,在优选的实施方式中,细胞为动物细胞,更优选为哺乳动物细胞,最优选为人细胞。

[0180] 实施例

[0181] [合成例1]化合物(1-01)的合成

[0182] 按照上述的制造工艺进行化合物(1-01)的合成。具体而言,进行以下所述的操作。

[0183] 第1工序

[0184] 在氩气氛下,向500mL烧瓶中加入镁(17.38g、714.96mmol、4.4eq.)、乙醚(165mL)和碘(7mg)。在室温下滴加数滴9-溴壬-1-烯(100.00g、487.47mmol、3eq.)后,一边回流一边滴加2小时。在室温下熟化一晚,一边用乙醚(40mL)洗涤一边将格氏试剂移到滴液漏斗中。在0℃以下用1.5小时将格氏试剂滴加到加入了甲酸乙酯(12.04g、162.49mmol、1eq.)和乙醚(165mL)的1000mL的四口烧瓶中。

[0185] 在室温下反应1小时后,加入丙酮(100mL),依次添加水(200mL)和10%硫酸水溶液(267mL),进行分液。用乙醚(300mL)对水层进行萃取,用硫酸钠干燥有机层。将过滤、浓缩而得到的粗产物(72.1g)用柱色谱(硅胶721g、展开:己烷→3%乙酸乙酯/97%己烷)纯化,以白色固体形式得到中间体(1-01-1)41.1g(收率98%)。

[0186] 第2工序

[0187] 在氩气氛下,将中间体(1-01-1)(41.1g、146.53mmol、1eq.)溶解于二氯甲烷(330mL)后投入到1000mL烧瓶中,加入三乙胺(59.31g、586.12mmol、4eq.)、4-二甲基氨基吡啶(1.79g、14.65mmol、0.1eq.)。在-5℃下滴加甲磺酰氯(33.57g、293.06mmol、2eq.)。在室温下搅拌1小时后,冰水(17.6mL)淬灭。接着,用1N盐酸(30mL)和水(300mL)、饱和食盐水(300mL)洗涤,用硫酸钠干燥。过滤,浓缩,以橙色油形式得到中间体(1-01-2)49.6g(收率94%)。

[0188] 第3工序

[0189] 在氩气氛下,向1000mL烧瓶中加入DMF(300mL)和氰化钠(13.56g、276.65mmol、2eq.)。添加溶解于DMF(200mL)的中间体(1-01-2)(49.6g、138.32mmol、1eq.) ,升温到55℃并反应过夜。使反应液恢复至室温,用水(500mL)稀释,用乙酸乙酯(800mL)反复萃取3次。将萃取后的有机层用水(500mL)、饱和食盐水(500mL)洗涤,用硫酸钠干燥。将过滤、浓缩而得到的粗产物(84.3g)用柱色谱(硅胶1012g展开:己烷→5%乙酸乙酯/95%己烷)纯化,以淡黄色油形式得到中间体3 28.1g(收率70%)。

[0190] 第4工序

[0191] 在氩气氛下,向2000mL烧瓶中加入中间体(1-01-3)(28.1g、97.06mmol、1eq.)和己烷(280mL)。在-70℃下滴加1M二异丁基氢化铝(DIBAL-H)的正己烷溶液(194.13mL、194.13mmol、2eq.) ,在室温下搅拌30分钟。用冰冷却到0℃,用甲醇(14mL)淬灭。向该反应液中加入饱和氯化铵水溶液(1200mL),搅拌20分钟,加入10%硫酸(450mL),进行分液。接着,用乙醚(500mL)萃取2次。将萃取后的有机层用碳酸氢钠饱和水溶液(500mL)、饱和食盐水(500mL)洗涤,用硫酸钠干燥。过滤,浓缩,以黄色油形式得到中间体(1-01-4)25.3g(收率89%)。

[0192] 第5工序

[0193] 向1000mL烧瓶中加入中间体(1-01-4)(25.3g、86.5mmol、1eq.)和甲醇(253mL)。在0℃下一点一点地加入硼氢化钠(1.16g、30.27mmol、0.35eq.) ,在室温下搅拌过夜。向反应液中加入乙酸(7mL)直至达到pH4为止。加入水(160mL),用二氯甲烷(400mL)萃取3次,将有机层用硫酸钠干燥。将过滤、浓缩而得到的粗产物(30.3g)用柱色谱(硅胶304g展开:5%乙酸乙酯/95%己烷)纯化,以淡黄色油形式得到中间体(1-01-5)22.13g(收率87%)。

[0194] 第6工序

[0195] 在氩气气氛下,在1000mL烧瓶中用二氯甲烷(220mL)溶解中间体(1-01-5)(22.13g、75.14mmol、1eq.),加入四溴甲烷(29.90g、90.17mmol、1.2eq.)。在0℃下滴加溶解于二氯甲烷(63mL)的三苯基膦(29.56g、112.71mmol、1.5eq.)。在室温下搅拌1小时后,将反应液浓缩,将得到的粗产物(21.3g)用柱色谱(硅胶200g展开:己烷)纯化,以无色透明油形式得到中间体(1-01-6)14.5g(收率54%)。

[0196] 第7工序

[0197] 向1000mL烧瓶中加入中间体(1-01-6)(5g、13.99mmol、1eq.),使其溶解于氯甲烷(230mL)和乙腈(230mL),添加氯化钌(III)(145mg、0.69mmol、Ru=40%)。在10℃以下滴加溶解于水(115mL)的高碘酸钠(29.92g、139.89mmol、10eq.),在室温下搅拌过夜。反应结束后,加入水(230mL),分液。将水层用二氯甲烷(100mL×2次)萃取,向合并而得的有机层中加入饱和食盐水(230mL),滴加3%硫化钠直至变色为止。加入1M盐酸直至呈酸性为止,分液。将有机层用硫酸钠干燥。将过滤、浓缩而得到的粗产物(14.7g)用柱色谱(硅胶300g展开:氯仿→2%甲醇/98%氯仿)纯化,以淡黄色油形式得到中间体(1-01-7)2.73g(收率49%)。

[0198] 第8工序

[0199] 在100mL烧瓶中,将中间体(1-01-7)(2.73g、6.94mmol、1eq.)溶解于二氯甲烷(45mL),加入顺式-2-壬烯-1-醇(2.41g、16.93mmol、2.44eq.)、4-二甲基氨基吡啶(85mg、0.69mmol、0.1eq.)、N,N-二异丙基乙基胺(4.39g、34.01mmol、4.9eq.)。然后,加入1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基-碳二亚胺盐酸盐(3.25g、16.93mmol、2.44eq.)。在室温下搅拌过夜。反应结束后,用二氯甲烷(45mL)稀释,用水(45mL)、1M盐酸(90mL)、碳酸氢钠饱和水溶液(90mL)、饱和食盐水(90mL)依次洗涤,将有机层用硫酸钠干燥。将过滤、浓缩而得到的粗产物(3.7g)用柱色谱(硅胶37g展开:己烷→5%乙酸乙酯/95%己烷)纯化,以微黄色油形式得到中间体(1-01-8)1.62g(收率36%)。

[0200] 第9工序

[0201] 在50mL的高压釜中用THF(30mL)溶解中间体(1-01-8)(1.62g、2.52mmol、1eq.),加入N,N,N'-三甲基乙二胺(5.16g、50.48mmol、20eq.)和碳酸钾(1.26g、9.09mmol、3.6eq.)。升温到55℃,反应6天。反应结束后,使反应液恢复至室温,用二氯甲烷(60mL)稀释,加入水(30mL),分液。将水层用二氯甲烷(20mL)萃取3次,将合并而得的有机层用硫酸钠干燥。将过滤、浓缩而得到的粗产物(2.3g)用柱色谱(硅胶25g展开:氯仿→5%甲醇/95%氯仿)纯化,以微黄色油形式得到目标化合物(1-01)1.21g(收率72%)。

[0202] [合成例2]化合物(2-01)的合成

[0203] 按照上述的制造工艺进行化合物(2-01)的合成。具体而言,进行以下所述的操作。

[0204] 在氩气气氛下,向200mL烧瓶中导入三乙二醇5.00g(33mmol)、三乙胺14.39mL(112mmol)及乙腈(50mL)。在0℃下滴加甲磺酰氯7.97mL(103mmol)后,在室温下搅拌1小时。接着,滴加乙醇10mL,处理未反应的甲磺酰氯后,过滤。将过滤后的反应液用50mL二氯甲烷洗涤4次,用Na₂SO₄干燥。将干燥后的反应液过滤后,浓缩,得到橙色油状的中间体(2-01-1)8.21g(收率81%)。

[0205] 接着,向100mL烧瓶中导入中间体(2-01-1)842mg(2.75mmol)、K₂CO₃ 950mg(6.87mmol)及乙腈15mL。在室温下搅拌15分钟后,滴加3-(甲基氨基)-1-丙醇735mg

(8.258mmol)。在保持于70℃的温度的同时搅拌过夜。将反应液放冷后,通过过滤除去不溶物。将滤液浓缩,得到粗制物720mg。将该粗制物用柱色谱(NH硅胶15g,展开液50%己烷/氯仿)纯化,得到微黄色透明油状的中间体(2-01-2)348mg(收率43%)。

[0206] 向30mL茄形烧瓶中导入中间体(2-01-2)300mg(1.03mmol)及二氯甲烷10mL,加入视黄酸770mg(2.56mmol)、4-二甲氨基吡啶50mg(0.41mmol)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐590mg(3.08mmol),在室温下搅拌过夜。接着,将反应液用10mL水洗涤2次,用Na₂SO₄干燥。将干燥后的反应液过滤后,浓缩,得到粗制物2.1g。将该粗制物用柱色谱(硅胶40g,展开液50%己烷/氯仿及氯仿)纯化,得到深橙色油状的化合物(2-01)262mg(收率29%)。

[0207] (含有脂质化合物的内包DNA/肽·芯复合体的脂质体的制备)

[0208] 使用载体DNA溶液和DNA缩合肽,制备由载体DNA-DNA缩合肽形成的芯复合体。作为载体DNA,使用整合有巨细胞病毒早期启动子/增强子、Nluc基因、转录终止信号的质粒。作为DNA缩合肽,使用将mHP-1(RQRQR-YY-RQRQR-GG-RRRRRR:序列号1)和mHP-2(RRRRRR-YY-RQRQR-GG-RRRRRR:序列号2)以1:3的比例混合而成的混合物。

[0209] 向微型管(Proteo Save SS(商品名)1.5ml、住友电木株式会社制)中分注DNA缩合肽溶液(0.24mg/ml、10mM HEPES、pH7.3)100μl。一边将分注的肽溶液用涡旋混合器(1,500rpm)(MSV-3500(商品名)、BIOSAN公司制)搅拌一边滴加载体DNA溶液(0.15mg/ml、10mM HEPES、pH7.3)200μl而混合。

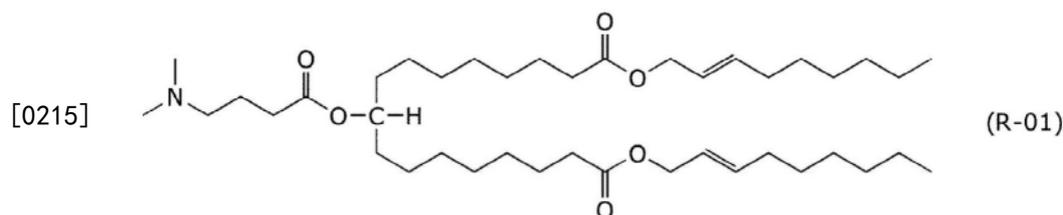
[0210] 用乙醇注入法制备内包芯复合体的脂质体。向微型管(Proteo Save SS(商品名)1.5ml、住友电木株式会社制)中分别分注50μl表1所示的配合比的脂质溶液。这里,作为用于比较的化合物,使用式(R-01)所示的化合物。

[0211] [表1]

[0212] 表1

	配合量(摩尔比)						
	化合物(1-01)	化合物(2-01)	化合物(R-01)	DOPE	DOTAP	胆甾醇	DMG-PEG
实施例1-1	73	0	0	44	0	59	4
实施例1-2	73	0	0	0	44	59	4
[0213] 实施例1-3	73	0	0	22	22	59	4
实施例1-4	73	30	0	44	0	59	4
实施例1-5	73	30	0	0	44	59	4
实施例1-6	73	30	0	22	22	59	4
比较例R-1	0	0	73	44	0	59	4
比较例R-2	0	0	73	0	44	59	4

[0214] [化7]



[0216] 一边用涡旋混合器搅拌所分注的脂质溶液,一边滴加芯复合体50μl而混合。滴加后,温和地添加10mM HEPES(pH7.3)400μl,从而制备内包载体DNA的脂质体。再加入10mM

HEPES (pH7.3) 400 μ l, 温和地混合后, 用超滤旋转柱 (PT-1014 (商品名)、株式会社 AproScience制) 通过离心而进行缓冲液更换和浓缩, 制备100 μ L的内包芯复合体的脂质体 (10mM HEPES、pH7.3)。

[0217] [内包DNA量的评价]

[0218] 对于得到的脂质体, 进行内包DNA量的测定。用Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific公司) 进行测定。向含有0.1% Triton-X100 (商品名) 的 Tris-EDTA缓冲液95 μ L中加入脂质体溶液5.0 μ L, 温和地使其悬浮。在室温下静置30分钟后, 向溶液中加入用Tris-EDTA缓冲液稀释200倍的PicoGreen溶液100 μ L, 充分混合。在室温下静置5分钟后, 用酶标仪: Mithras LB-940 (商品名、Berthold公司制) 测定溶液的荧光强度 (激发波长: 485nm、荧光波长: 530nm)。

[0219] 使用用已知浓度的 λ DNA制作的标准曲线来定量DNA浓度。由得到的数值计算脂质体内包DNA量作为每1mL溶液的DNA量 (μ g DNA/mL)。结果如表2所示。

[0220] 可知, 含有式 (1-01) 的化合物的脂质体的内包DNA量高于含有式 (R-01) 的化合物的脂质体。另外还确认, 在组合式 (2) 的化合物作为脂质化合物时, 内包DNA量变多。

[0221] [脂质体表面电荷的测定]

[0222] 用Zetasizer (Zetasizer Nano ZS (商品名)、Malvern Panalytical公司制) 测定脂质体的表面电荷 (zeta电位)。向zeta电位测定用池 (DTS-1070 (商品名)、Malvern Panalytical公司制) 中分注脂质体溶液30 μ l, 加入蒸馏水870 μ l并混合后, 将测定池设置在Zetasizer中, 测定zeta电位。得到的结果如表2所示。

[0223] 若对比仅使用中性脂质即DOPE作为形成膜的脂质时 (实施例1-4) 与将DOPE和阳离子性脂质即DOTAP组合作为形成膜的脂质时 (实施例1-6), 可知后者的情况下可以使zeta电位进一步向正向侧移动。

[0224] [利用脂质体的载体DNA导入量的测定]

[0225] 利用脂质体将载体DNA向细胞的导入可通过载体DNA上的NLuc基因的表达来量化。NLuc基因的表达可通过用酶标仪: infinite F200 (制品名、Tecan公司制) 测定其发光量来进行评价。细胞使用人T细胞性白血病细胞株Jurkat、人乳腺癌来源的细胞株MCF-7、人肝癌来源的细胞株Huh-7 (购自American Type Culture Collection)。向96孔培养板中播种 1×10^6 细胞/mL的细胞悬浮液100 μ L后, 添加表1所示的脂质体溶液1 μ L。添加后, 将细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂气氛的培养箱内培养48小时后, 测定NLuc的酶活性。使用NanoGlo Luciferase Assay System (制品名、Promega公司), 按照试剂盒附带的手册, 用照度计测定NLuc的酶活性。得到的结果如图1 (Jurkat)、图2 (MCF-7)、图3 (Huh-7) 所示。

[0226] 可以确认, 对于式 (1) 的脂质化合物而言, 通过选择形成膜的脂质化合物而显示出高于用于比较的 (R-01) 的NLuc基因表达效率。

[0227] 另外显示, 就通过脂质体而被摄入细胞内的NLuc基因表达效率而言, 通过将式 (2) 的化合物与式 (1) 的脂质化合物组合, 相较于悬浮细胞而更容易被摄入粘附性细胞中。还获知, 通过是否用DOTAP来控制表面电荷而对增殖模式不同的细胞有指向性。

[0228] [表2]

[0229] 表2

[0230]

	内包 DNA量	平均 zeta电位
实施例1-1	15.7	30.8
实施例1-2	19.9	47.5
实施例1-3	19.8	42.0
实施例1-4	21.2	21.4
实施例1-5	25.5	50.1
实施例1-6	23.9	39.3
实施例R-1	2.0	44.9
实施例R-2	17.5	42.4

[0231] [合成例3]化合物(1-02)的合成

[0232] 按照上述的制造工艺进行化合物(1-02)的合成。具体而言,进行以下所述的操作。

[0233] 第1工序

[0234] 在氩气气氛下,向500mL烧瓶中加入镁(17.38g,714.96mmol,4.40eq.)、乙醚(165mL)和碘(7mg)。在室温下滴加数滴9-溴壬-1-烯(100.00g,487.47mol,3.00eq.)后,一边回流一边滴加2小时。在室温下熟化一晚,一边用乙醚(40mL)洗涤一边将格氏试剂移到滴液漏斗中。在0℃以下用1.5小时将格氏试剂滴加到加入了甲酸乙酯(12.04g,162.49mmol,1.00eq.)和乙醚(165mL)的1000mL四口烧瓶。在室温下反应1小时后,加入丙酮(100mL),依次添加水(200mL)和10%硫酸(267mL),分液。将水层用乙醚(300mL)萃取,用Na₂SO₄干燥有机层。将过滤、浓缩而得到的粗产物(72.1g)用柱色谱(硅胶721g,展开:己烷→3%乙酸乙酯/97%己烷)纯化,以白色固体形式得到中间体(1-02-1)41.1g(收率98%)。

[0235] 第2工序

[0236] 在氩气气氛下,将中间体(1-02-1)(41.1g,146.53mmol,1.00eq.)用二氯甲烷(330mL)溶解后投入到1000mL烧瓶中,加入三乙胺(59.31g,586.12mmol,4.00eq.)、4-二甲基氨基吡啶(1.79g,14.65mmol,0.10eq.)。在-5℃下滴加甲磺酰氯(33.57g,293.06mmol,2.00eq.)。在室温下搅拌1小时后,用冰水(17.6mL)淬灭。接着,用1N盐酸(30mL)和水(300mL)、饱和食盐水(300mL)洗涤,用Na₂SO₄干燥。过滤,浓缩,以橙色油形式得到中间体(1-02-2)49.6g(收率94%)。

[0237] 第3工序

[0238] 在氩气气氛下,向1000mL烧瓶中加入DMF(300mL)和氰化钠(13.56g,276.65mmol,2.00eq.)。添加溶解于DMF(200mL)的中间体(1-02-2)49.6g,138.32mmol,1.00eq.,升温到55℃并反应过夜。使反应液恢复至室温,用水(500mL)稀释,用乙酸乙酯(800mL×3次)萃取。将萃取后的有机层用水(500mL)、饱和食盐水(500mL)洗涤,用Na₂SO₄干燥。将过滤、浓缩而得到的粗产物(84.3g)用柱色谱(硅胶1012g,展开:己烷→5%乙酸乙酯/95%己烷)纯化,以淡黄色油形式得到中间体(1-02-3)28.1g(收率70%)。

[0239] 第4工序

[0240] 在氩气气氛下,向2000mL烧瓶中加入中间体(1-02-3)(28.1g,97.06mmol,1.00eq.)和己烷(280mL)。在-70℃下滴加1M DIBAL-正己烷(194.13mL,194.13mmol,2.00eq.),在室温下搅拌30分钟。用冰冷冻到0℃,用甲醇(14mL)淬灭。向该反应液中加入饱

和 NH_4Cl 水溶液(1200mL),搅拌20分钟,加入10% H_2SO_4 (450mL),分液。接着,用乙醚(500mL \times 2次)萃取。将萃取后的有机层用饱和 NaHCO_3 水溶液(500mL)、饱和食盐水(500mL)洗涤,用 Na_2SO_4 干燥。过滤,浓缩,以黄色油形式得到中间体(1-02-4)25.3g(收率89%)。

[0241] 第5工序

[0242] 向1000mL烧瓶中加入中间体(1-02-4)(25.3g,86.5mmol,1.00eq.)和甲醇(253mL)。在0℃下一点一点地加入硼氢化钠(1.16g,30.27mmol,0.35eq.),在室温下搅拌过夜。向反应液中加入乙酸(7mL)直至达到pH4。加入水(160mL),用二氯甲烷(400mL \times 3次)萃取,将有机层用 Na_2SO_4 干燥。将过滤、浓缩而得到的粗产物(30.3g)用柱色谱(硅胶304g、展开:5%乙酸乙酯/95%己烷)纯化,以淡黄色油形式得到中间体(1-02-5)22.13g(收率87%)。

[0243] 第6工序

[0244] 在氩气气氛下,在1000mL烧瓶中,用二氯甲烷(220mL)溶解中间体(1-02-5)(22.13g,75.14mmol,1.00eq.),加入四溴甲烷(29.90g,90.17mmol,1.20eq.)。在0℃下滴加溶解于二氯甲烷(63mL)的三苯基膦(29.56g,112.71mmol,1.50eq.)。在室温下搅拌1小时后,将反应液浓缩,将得到的粗产物(21.3g)用柱色谱(硅胶200g、展开:己烷)纯化,以无色透明油形式得到中间体(1-02-6)14.5g(收率54%)。

[0245] 第7工序

[0246] 在氩气气氛下,向200mL烧瓶中加入乙醇(90mL)、20%乙醇钠(溶剂:乙醇)(50.55g,148.57mmol,5.90eq.),加热到65℃。接着,加入丙二酸二乙酯(24.20g,151.09mmol,6.00eq.)、中间体(1-02-6)(9g,25.18mmol,1.00eq.),加热回流过夜。反应结束后,在10℃以下加入1N盐酸(90mL),骤冷。将反应液用乙酸乙酯(200mL \times 3次)萃取,用饱和 NaHCO_3 水溶液(90mL)、饱和食盐水(90mL)依次洗涤,将有机层用 Na_2SO_4 干燥。过滤,浓缩,以橙色油形式得到中间体(1-02-7)7.31g(收率66%)。

[0247] 第8工序

[0248] 向200mL烧瓶中加入中间体(1-02-7)(7.31g,16.74mmol,1.00eq.)、二甲基亚砜(70mL)、氯化钠(9.78g,167.40mmol),加热回流过夜。反应结束后,反应液浓缩,将得到的粗产物(21.3g)用柱色谱(硅胶200g展开:己烷 \rightarrow 2%乙酸乙酯/98%己烷)纯化,以淡黄色油形式得到中间体(1-02-8)4.7g(收率51%)。

[0249] 第9工序

[0250] 在氩气气氛下,向200mL四口烧瓶中加入氢化铝锂(734mg,19.34mmol,1.5eq.)和THF(40mL)。在0℃下滴加溶解于THF(40mL)的中间体(1-02-8)(4.7g,34.54mmol,1.00eq.),在室温下反应过夜。用冰冷却到0℃,用水(3.3mL)、15%氢氧化钠(0.8mL)淬灭。向该反应液中加入乙酸乙酯(50mL),进行氟镁石过滤,用乙酸乙酯(100mL)洗涤氟镁石。将滤液浓缩,将得到的粗产物(4.9g)用柱色谱(硅胶50g、展开:5%乙酸乙酯/95%己烷)纯化,以无色油形式得到中间体(1-02-9)3.86g(收率93%)。

[0251] 第10工序

[0252] 在氩气气氛下,用二氯甲烷(30mL)溶解中间体(1-02-9)(3.86g,11.97mmol,1.00eq.)后投入100mL烧瓶中,加入三乙胺(4.84g,47.87mmol,4.00eq.)、4-二甲基氨基吡啶(146mg,1.20mmol,0.10eq.)。在-5℃下滴加甲磺酰氯(2.74g,23.93mmol,2.00eq.)。在室

温下搅拌1小时后,用冰水(17.6mL)淬灭。接着,用1N盐酸(10mL)和水(30mL)、饱和食盐水(30mL)洗涤,用 Na_2SO_4 干燥。过滤,浓缩,以褐色油形式得到中间体(1-02-10)4.79g(收率99%)。

[0253] 第11工序

[0254] 在氩气气氛下,向100mL烧瓶中加入DMF(28mL)和氰化钾(1.17g,23.94mmol,2.00eq.)。添加溶解于DMF(20mL)的中间体(1-02-10)(4.79g,11.97mmol,1.00eq.) ,升温到55℃并反应过夜。使反应液恢复至室温,用水(50mL)稀释,用乙酸乙酯(100mL×3次)萃取。将萃取后的有机层用水(50mL)、饱和食盐水(50mL)洗涤,用 Na_2SO_4 干燥。将过滤、浓缩而得到的粗产物(11.4g)用柱色谱(硅胶100g、展开:己烷→5%乙酸乙酯/95%己烷)纯化,以无色油形式得到中间体(1-02-11)3.6g(收率90%)。

[0255] 第12工序

[0256] 在氩气气氛下,向100mL烧瓶中加入中间体(1-02-11)(3.6g,10.86mmol,1.00eq.)和己烷(36mL)。在-70℃下滴加1M DIBAL-正己烷(21.71mL,21.71mmol,2.00eq.) ,在室温下搅拌30分钟。用冰冷却到0℃,用甲醇(1.6mL)淬灭。向该反应液中加入饱和 NH_4Cl 水溶液(150mL),搅拌20分钟,加入10%硫酸(50mL),分液。接着,用乙醚(50mL×2次)萃取。将萃取后的有机层用饱和 NaHCO_3 水(50mL)、饱和食盐水(50mL)洗涤,用 Na_2SO_4 干燥。过滤,浓缩,以黄色油形式得到中间体(1-02-12)3.2g(收率88%)。

[0257] 第13工序

[0258] 向100mL烧瓶中加入中间体(1-02-12)(3.2g,9.56mmol,1.00eq.)和甲醇(32mL)。在0℃下一点一点地加入硼氢化钠(127mg,3.35mmol,0.35eq.) ,在室温下搅拌过夜。向反应液中加入乙酸(1mL)直至达到pH4。加入水(30mL),用二氯甲烷(30mL×3次)萃取,将有机层用 Na_2SO_4 干燥。将过滤、浓缩而得到的粗产物(3.17g)用柱色谱(硅胶32g、展开:5%乙酸乙酯/95%己烷)纯化,以淡黄色油形式得到中间体(1-02-13)1.12g(收率35%)。

[0259] 第14工序

[0260] 在氩气气氛下,在30mL烧瓶中用二氯甲烷(10mL)溶解中间体(1-02-13)(1g,2.97mmol,1.00eq.) ,加入四溴甲烷(1.18g,3.57mmol,1.20eq.)。在0℃下滴加溶解于二氯甲烷(5mL)的三苯基膦(1.17g,4.46mmol,1.50eq.)。在室温下搅拌1小时后,将反应液过滤、浓缩,将得到的粗产物(7g)用柱色谱(硅胶70g、展开:己烷)纯化,以无色透明油形式得到中间体(1-02-14)1.12g(收率94%)。

[0261] 第15工序

[0262] 向200mL烧瓶中加入中间体(1-02-14)(1.12g,2.80mmol,1.00eq.) ,使其溶解于二氯甲烷(51mL)和乙腈(51mL),添加氯化钌(III)(29mg,0.14mmol,Ru=40%)。在10℃以下滴加溶解于水(51mL)的高碘酸钠(5.99g,28.0mmol,10.00eq.) ,在10℃以下搅拌过夜。反应结束后,加入水51mL,分液。向有机层加入饱和食盐水(50mL),滴加3% Na_2S 水溶液直至变色。加入1N盐酸至呈酸性,分液。将有机层用 Na_2SO_4 干燥,将过滤、浓缩而得到的粗产物(5.24g)用柱色谱(硅胶50g、展开:氯仿→5%甲醇/95%氯仿)纯化,以微黄色油形式得到中间体(1-02-15)1.05g(收率86%)。

[0263] 第16工序

[0264] 在100mL烧瓶中,使中间体(1-02-15)(1.00g,2.30mmol,1.00eq.)溶解于二氯甲烷

(30mL), 加入顺式-2-壬烯-1-醇 (797mg, 5.60mmol, 2.44eq.)、4-二甲基氨基吡啶 (28mg, 0.23mmol, 0.10eq.)、N,N-二异丙基乙基胺 (1.45g, 11.25mmol, 4.90eq.)。然后, 加入1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基-碳二亚胺盐酸盐 (1.07g, 5.603mmol, 2.44eq.), 在室温下搅拌过夜。反应结束后, 用二氯甲烷 (30mL) 稀释, 用水 (30mL)、1N盐酸 (30mL)、饱和NaHCO₃水 (30mL)、饱和食盐水 (30mL) 依次洗涤, 将有机层用Na₂SO₄干燥。将过滤、浓缩而得到的粗产物 (1.92g) 用柱色谱 (硅胶20g、展开: 己烷→2%乙酸乙酯/98%己烷) 纯化, 以微黄色油形式得到中间体(1-02-16) 77mg (收率5%)。

[0265] 第17工序

[0266] 在50mL的高压釜中, 用THF (3mL) 溶解中间体(1-02-16) (77mg, 0.11mmol, 1.00eq.), 加入1-甲基哌嗪 (225mg, 2.25mmol, 20.00eq.) 和碳酸钾 (56mg, 0.41mmol, 3.6eq.)。升温到55°C, 反应6天。反应结束后, 使反应液恢复至室温, 用二氯甲烷 (6mL) 稀释, 加入水 (5mL), 分液。对水层用二氯甲烷 (6mL×3次) 进行萃取, 将合并而得的有机层用Na₂SO₄干燥。将过滤、浓缩而得到的粗产物 (108mg) 用柱色谱 (硅胶1g、展开: 氯仿→10%甲醇/90%氯仿) 纯化, 以深黄色油形式得到化合物(1-02) 54mg (收率68%)。

[0267] [含有脂质化合物的内包DNA/肽·芯复合体的脂质体的制备]

[0268] 使用载体DNA溶液和DNA缩合肽, 制备由载体DNA-DNA缩合肽形成的芯复合体。作为载体DNA, 使用整合有巨细胞病毒早期启动子/增强子、Nluc基因、转录终止信号的质粒。作为DNA缩合肽, 使用将mHP-1 (RQRQR-YY-RQRQR-GG-RRRRRR: 序列号1) 和mHP-2 (RRRRRR-YY-RQRQR-GG-RRRRRR: 序列号2) 以4:1的比例混合而成的混合物。

[0269] 向微型管 (Proteo Save SS (商品名) 1.5ml、住友电木株式会社制) 中分注DNA缩合肽溶液 (0.255mg/ml、10mM HEPES、pH7.3) 100μl。一边将分注的肽溶液用涡旋混合器 (1, 500rpm) (MSV-3500 (商品名)、BIOSAN公司制) 搅拌一边滴加载体DNA溶液 (0.15mg/ml、10mM HEPES、pH7.3) 200μl而混合。

[0270] 用乙醇注入法制备内包芯复合体的脂质体。向微型管 (Proteo Save SS (商品名) 1.5ml、住友电木株式会社制) 中分别分注50μl表3所示的配合比的脂质溶液。需要说明的是, 表3中的参照例2-1及2-2为采用与上述的实施例1-2及1-4相同的配方的另行制备物。

[0271] [表3]

[0272] 表3

	配合量(摩尔比)						
	化合物(1-01)	化合物(1-02)	化合物(2-01)	DOPE	DOTAP	胆甾醇	DMG-PEG
[0273] 参照例2-1	73	0	0	0	44	59	4
参照例2-2	73	0	30	44	0	59	4
实施例2-1	0	73	0	0	44	59	4
实施例2-2	0	73	30	44	0	59	4

[0274] 一边用涡旋混合器搅拌所分注的脂质溶液, 一边滴加芯复合体50μl而混合。滴加后, 温和地添加10mM HEPES (pH7.3) 900μl, 从而制备内包芯复合体的脂质体。用超滤过滤器 (CentriprepYM-50 (商品名)、默克株式会社制) 通过离心而进行缓冲液更换和浓缩, 将内包芯复合体的脂质体32ml制备成600μl。

[0275] [内包DNA量的评价]

[0276] 对于得到的脂质体, 进行内包DNA量的测定。用Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay

Kit (Thermo Fisher Scientific公司) 进行测定。向含有0.1% Triton-X100 (商品名) 和肝素钠盐 (Sigma-Aldrich Japan GK) 的Tris-EDTA缓冲液99.5 μ L中加入脂质体溶液0.5 μ L, 温和地使其悬浮。在室温下静置30分钟后, 向溶液中加入用Tris-EDTA缓冲液稀释200倍的PicoGreen溶液100 μ L, 充分混合。在室温下静置5分钟后, 用酶标仪: Mithras LB-940 (商品名、Berthold公司制) 测定溶液的荧光强度 (激发波长: 485nm、荧光波长: 530nm)。

[0277] 使用已知浓度的 λ DNA制作的标准曲线来定量DNA浓度。由得到的数值计算脂质体内包DNA量作为每1mL溶液的DNA量 (μ g DNA/mL)。结果如表4所示。

[0278] 可知, 含有式 (1-02) 的化合物的脂质体与含有式 (1-01) 的化合物的脂质体显示同等的内包DNA量。另外还确认, 若与式 (2-01) 的化合物组合则内包DNA量变多。

[0279] [脂质体表面电荷的测定]

[0280] 用Zetasizer (Zetasizer Nano ZS (商品名)、Malvern Panalytical公司制) 测定脂质体的表面电荷 (zeta电位)。向zeta电位测定用池 (DTS-1070 (商品名)、Malvern Panalytical公司制) 中分注脂质体溶液10 μ l, 加入蒸馏水890 μ l并混合后, 将测定池设置在Zetasizer中, 测定zeta电位。得到的结果如表4所示。若对比使用中性脂质即DOPE作为形成膜的脂质的情况 (参照例2-2及实施例2-2) 与将DOPE和阳离子性脂质即DOTAP作为形成膜的脂质的情况 (参照例2-1及实施例2-1), 可知后者的情况下可以使zeta电位进一步向正向侧移动。

[0281] [利用脂质体的载体DNA导入量的测定]

[0282] 利用脂质体将载体DNA向细胞的导入可通过载体DNA上的Nluc基因的表达来定量化。Nluc基因的表达可通过用酶标仪: infinite F200 (制品名、Tecan公司制) 测定其发光量来进行评价。细胞使用人T细胞性白血病细胞株Jurkat (购自American Type Culture Collection)、人外周血单核球细胞PBMC (购自LONZA JAPAN株式会社)。向96孔培养板中, 播种 1×10^6 细胞/mL的Jurkat的细胞悬浮液100 μ L、 5×10^6 细胞/mL的PBMC的细胞悬浮液100 μ L后, 以DNA量达到0.8 μ g/孔的方式添加表1所示的脂质体溶液。添加后, 将细胞在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂气氛的培养箱内培养48小时后, 测定Nluc的酶活性。使用NanoGlo Luciferase Assay System (制品名、Promega社), 按照试剂盒附带的手册, 用照度计测定Nluc的酶活性。得到的结果如图4 (Jurkat)、图5 (PBMC) 所示。

[0283] 可确认, 就式 (1-02) 的脂质化合物而言, 选择DOTAP作为形成膜的脂质化合物时, 在Jurkat细胞中显示出高于式 (1-01) 的Nluc基因表达效率。另外可以确认, 就式 (1-01) 的脂质化合物而言, 选择式 (2-01) 和DOPE作为形成膜的脂质化合物时, 在PBMC细胞中, 显示出高于式 (1-02) 的Nluc基因表达效率。

[0284] [表4]

[0285] 表4

	内包 DNA 量	平均 zeta电位
[0286] 参照例 2-1	183.9	51.5
参照例 2-2	162.5	34.4
实施例 2-1	188.0	52.6
实施例 2-2	131.4	43.9

[0287] [含有脂质化合物的内包RNA脂质体]

[0288] [内包RNA脂质体的制备]

[0289] 信使RNA (mRNA) 使用作为报告基因的绿色荧光蛋白GFP的mRNA(OZ Biosciences)。内包RNA脂质体如下制备:将GFP mRNA溶液添加到表5所示的配合比的脂质溶液中,通过吹打而悬浮后,温和地添加10mM HEPES (pH7.3),将该溶液用离心式超滤洗涤·浓缩,从而制备。这里,作为用于比较的化合物,使用式(R-01)所示的化合物。需要说明的是,比较例R-3为采取与比较例R-1相同配方的另行制备物。

[0290] [表5]

[0291] 表5

	配合量(摩尔比)						
	化合物 (1-01)	化合物 (1-02)	化合物 (R-01)	DOPE	DOTAP	胆甾醇	DMG- PEG
[0292] 实施例3-1	73	0	0	44	0	59	4
实施例3-2	0	73	0	44	0	59	4
比较例R-3	0	0	73	44	0	59	4

[0293] [内包RNA量的测定]

[0294] 用QuantiFluor RNASystem试剂盒(Promega)测定内包于脂质体的RNA量。按照试剂盒附带的手册进行测定。将RNA内包量的测定结果示于表6。就用表5的配合比的脂质溶液制备的内包RNA脂质体而言,脂质体的内包RNA量方面未见显著的不同。

[0295] [表6]

[0296] 表6

	内包 RNA量	平均 zeta电位
[0297] 实施例 3-1	142.3	27.5
实施例 3-2	135.8	42.5
比较例 R-3	144.0	39.8

[0298] [脂质体表面电荷的测定]

[0299] 用Zetasizer(Zetasizer Nano ZS、Malvern Panalytical公司制)测定内包RNA脂质体的表面电荷(zeta电位)。将脂质体溶液加入到zeta电位测定用池(DTS-1070、Malvern Panalytical公司制),用蒸馏水稀释、混合后,将测定池设置到Zetasizer的规定位置,测定zeta电位。表5中制备的内包RNA脂质体的内包RNA量和平均zeta电位如表6所示。

[0300] [利用脂质体的RNA导入量的测定]

[0301] 利用脂质体的RNA向细胞的导入可通过RNA所编码的GFP基因的表达来定量化。GFP

基因的表达可通过用流式细胞仪 (FACSVerse, BD Biosciences公司制) 测定其荧光量来进行评价。细胞使用人T细胞性白血病细胞株: Jurkat (购自American Type Culture Collection)。通过离心将用TexMACS培养基 (Gibco公司制) 培养的Jurkat回收后, 以成为 0.65×10^7 细胞的方式悬浮于新鲜的TexMACS。向48孔培养板中, 加入细胞悬浮液和TexMACS各150 μ L而使其达到 1.0×10^6 细胞/孔。然后, 用表5中记载的内包RNA脂质体以使GFP RNA量为0.5 μ g/孔的方式添加到孔中, 在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂气氛下培养。这里, 作为用于比较的RNA导入方法, 进行使用Lipofectamine试剂 (Lipofectamine 3000、Invitrogen公司制) 的脂质转染法和利用电穿孔的RNA导入方法。利用脂质转染法的导入按照试剂所附带的手册来进行。关于利用电穿孔的导入, 通过离心将Jurkat回收, 加入OptiMEM (Gibco) 而洗涤后, 再次通过离心回收细胞。将回收的细胞以成为 1.0×10^7 细胞/mL的方式悬浮于OptiMEM后, 向100 μ L的细胞悬浮液中加入0.5 μ g的GFP RNA, 转移到池 (Cuvette) 电极, 进行电穿孔。使用CUY21 EDIT II (BEX), 在以下的条件下进行电穿孔。

[0302] <穿孔脉冲 (Pp) 条件>

[0303] Pp, 225V; Pp on, 2.5ms; Pp off, 50.0ms

[0304] <驱动脉冲 (Pd) 条件>

[0305] Pd, 20V; Pd on, 50.0ms; Pd off, 50.0ms; 5循环; Capacitor, 1416.3 μ F

[0306] 将导入了GFP RNA的细胞培养48小时后, 回收细胞, 悬浮于含有1%BSA (Gibco) 的磷酸缓冲液PBS, 用流式细胞仪测定细胞的GFP荧光强度 (绿色荧光强度)。图6中, 以图来示出测定结果。图的纵轴为相对荧光强度。根据该结果, 使用实施例3-1及3-2的脂质溶液制备的内包RNA脂质体显示出高于其它RNA导入方法、即利用脂质转染法的导入和利用电穿孔的导入的导入量。另外可知, 内包RNA脂质体中, 含有实施例3-1的脂质溶液的脂质体显示出最高的导入量。

[0307] [利用脂质体的载体DNA导入量的测定]

[0308] 按照实施例1-3、1-4及1-6, 制作含有表达NLuc的质粒的内包芯复合体的脂质体 (实施例4-1、4-2及4-3)。将构成该脂质体的脂质溶液的组成和表面电荷的测定结果示于以下的表7。

[0309] [表7]

[0310] 表7

	配合量(摩尔比)						平均 zeta电位 (mV)
	化合物 (1-01)	化合物 (2-01)	DOPE	DOTAP	胆甾醇	DMG- PEG	
[0311] 实施例4-1	73	0	22	22	59	4	42.0
实施例4-2	73	30	22	22	59	4	39.3
实施例4-3	73	30	44	0	59	4	21.4

[0312] 利用脂质体的载体DNA向细胞的导入可通过载体DNA上的NLuc基因的表达来定量。NLuc基因的表达可通过用酶标仪: infinite F200 (制品名、Tecan公司制) 测定其发光量来进行评价。细胞使用人T细胞性白血病细胞株Jurkat、人乳腺癌来源的细胞株MCF-7、人肝癌来源的细胞株Huh-7 (购自American Type Culture Collection)。在96孔培养板中播种 1×10^6 细胞/mL的细胞悬浮液100 μ L后, 添加表7所示的脂质体溶液1 μ L。添加后, 将细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂气氛的培养箱内培养48小时后, 测定NLuc的酶活性。使用NanoGlo Luciferase

Assay System (制品名、Promega公司),按照试剂盒附带的手册,使用照度计测定NLuc的酶活性。得到的结果如图7~11所示。

[0313] 图7~9为对比实施例4-1和实施例4-2的图,图7表示乳腺癌细胞(细胞株MCF-7)中的Nluc基因的表达效率,图8表示肝癌细胞(细胞株Huh-7)中的Nluc基因的表达效率,图9表示白血病细胞(T-淋巴细胞、细胞株Jurkat)中的Nluc基因的表达效率。由图7~9所示的结果所示,通过配合化合物(2-01),相较于悬浮细胞而言,脂质体中所含的载体DNA更容易被摄取到粘附性细胞中。

[0314] 图10及11为对比实施例4-2和实施例4-3的图,图10表示乳腺癌细胞(细胞株MCF-7)中的Nluc基因的表达效率,图11表示肝癌细胞(细胞株Huh-7)中的Nluc基因的表达效率。根据图10及11所示的结果可知,含有化合物(1-01)和化合物(2-01)的组合的脂质体中,通过是否使用DOTAP来控制表面电荷,可以对该脂质体赋予对增殖模式不同的细胞的指向性。

[0315] 如上所述,尽管说明了本发明的几个实施方式,但这些实施方式仅作为例子示出,并不意图限制本发明的范围。这些新的实施方式可以以各种其他方式来实施,在不脱离本发明主旨的范围内,可以进行各种组合、省略、置换、变更等。这些实施方式及其变形包括在本发明的范围和主旨中,也包括在权利要求记载的发明及其等同范围内。

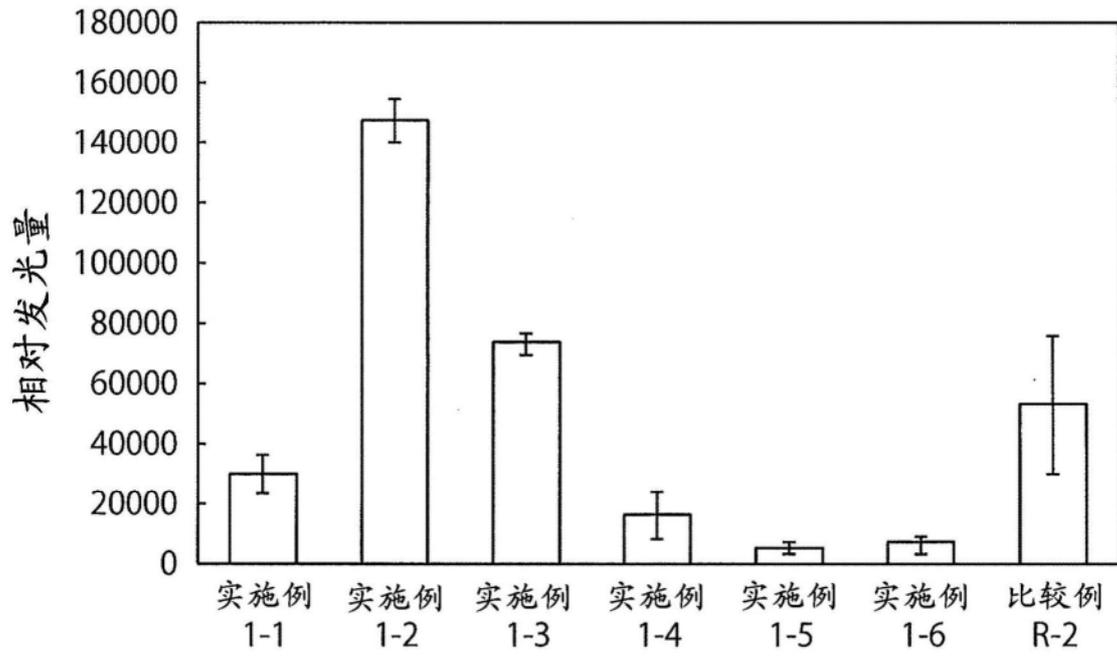


图1

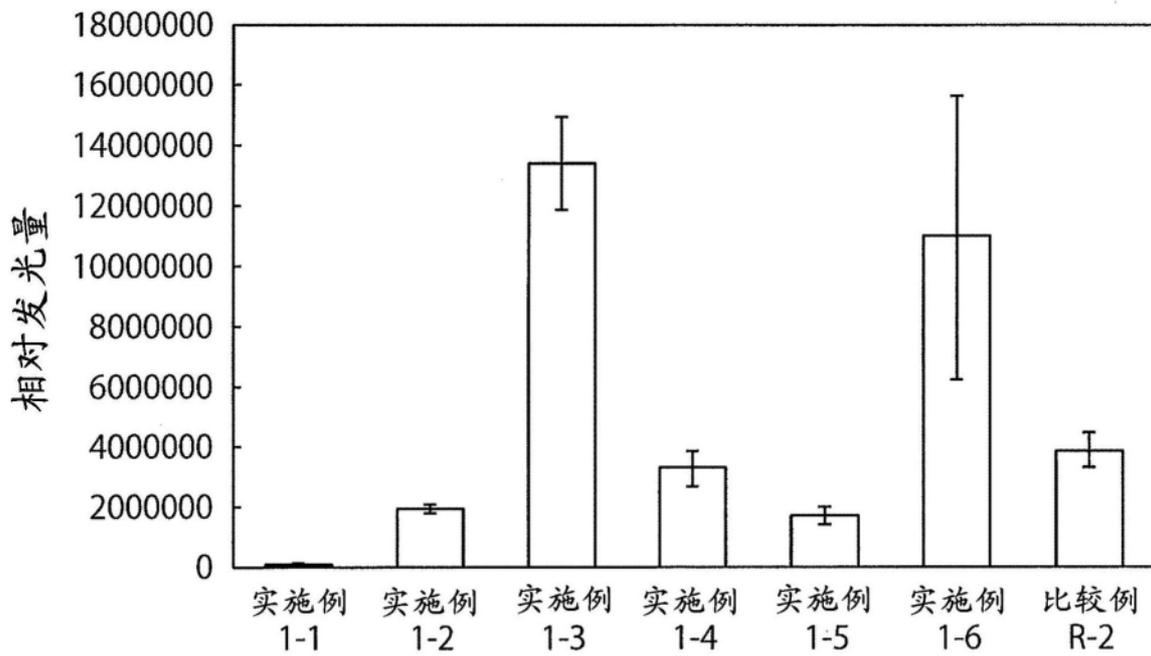


图2

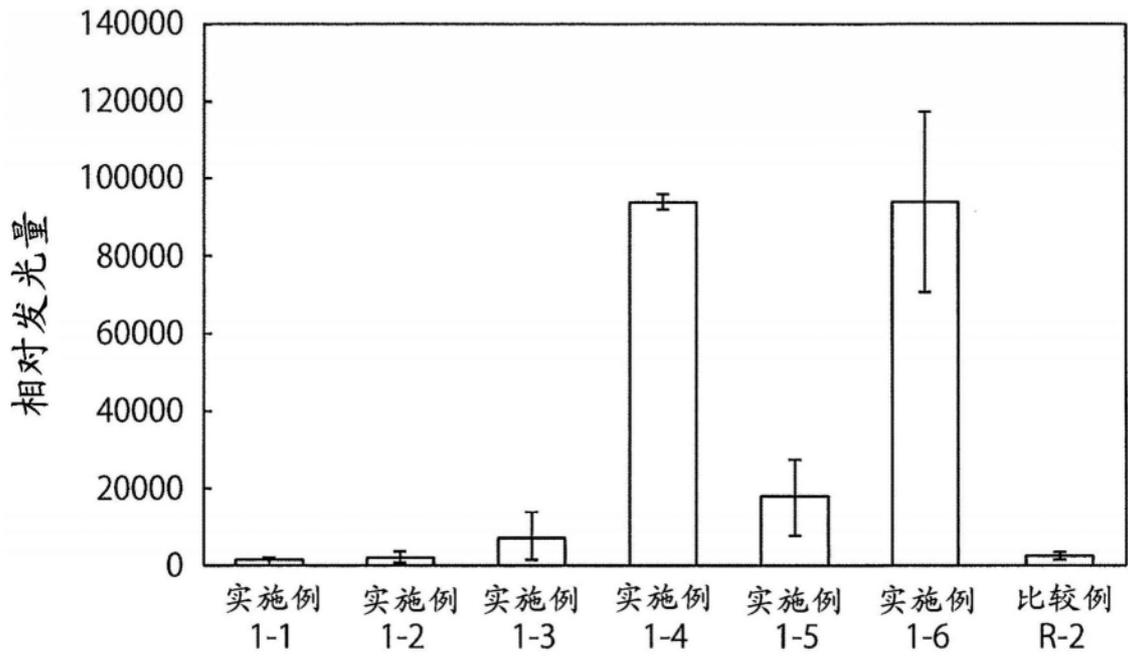


图3

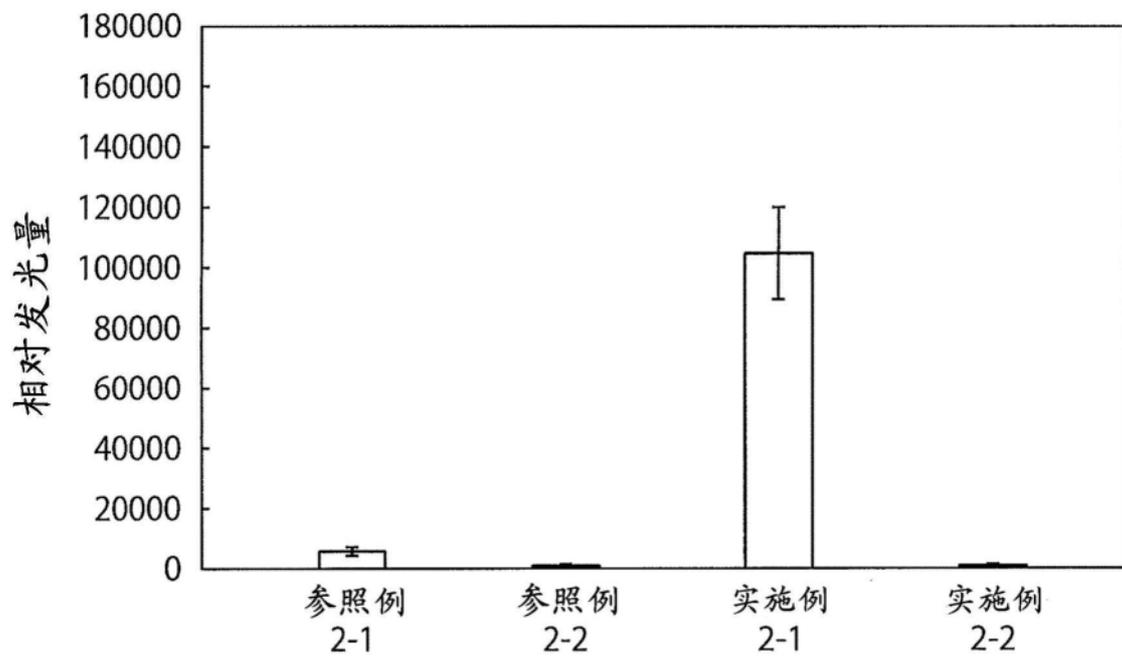


图4

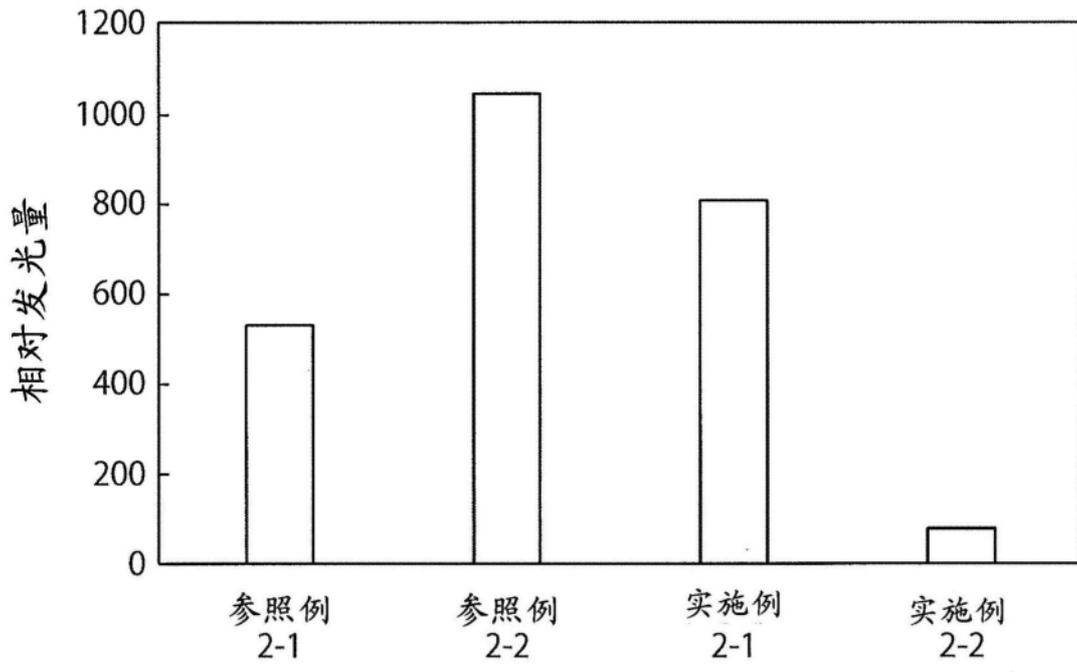


图5

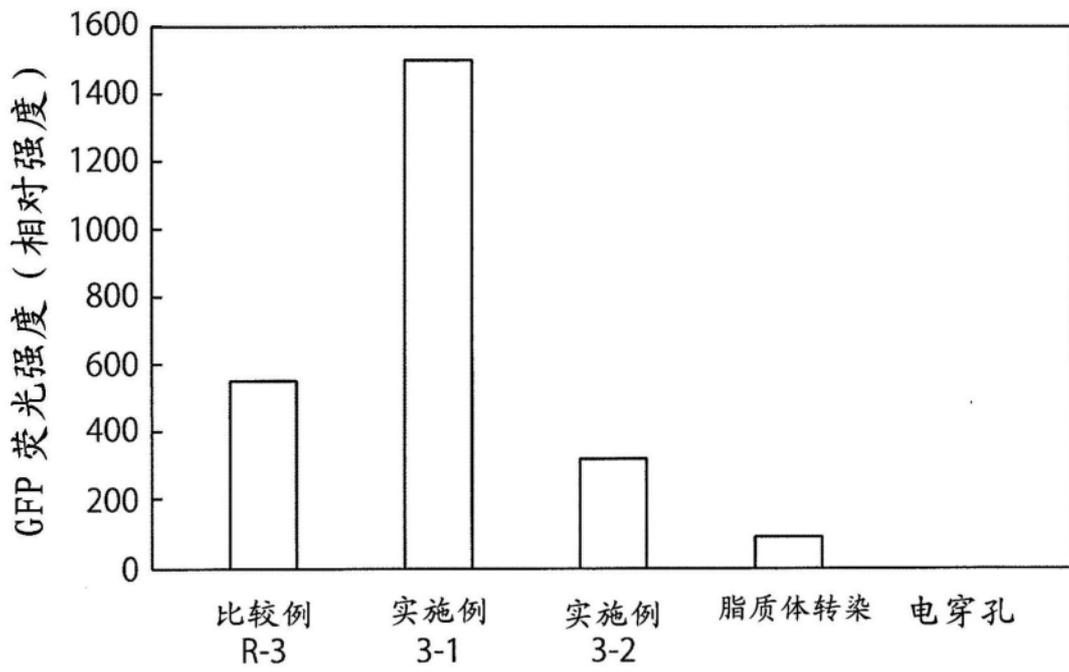


图6

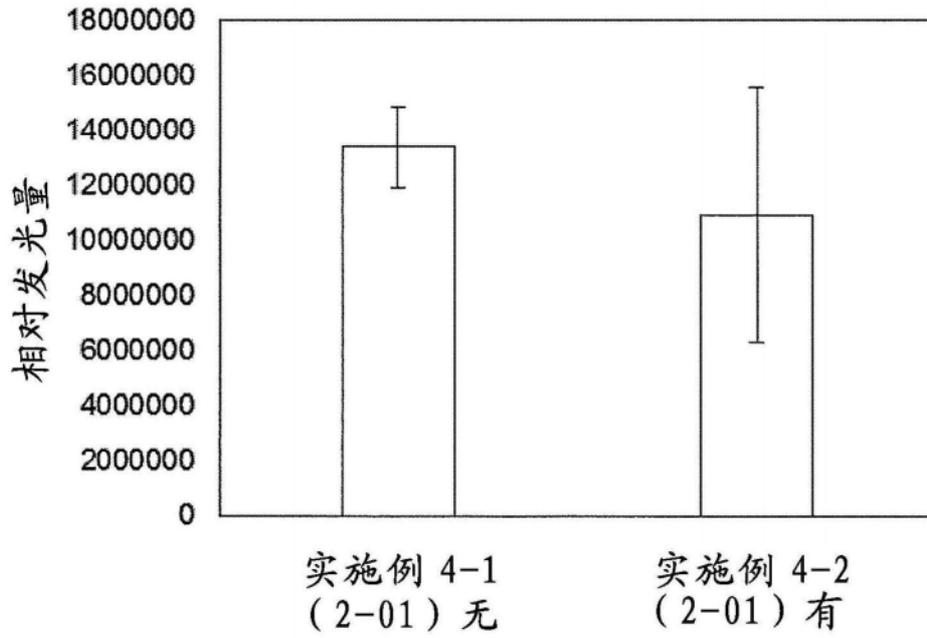


图7

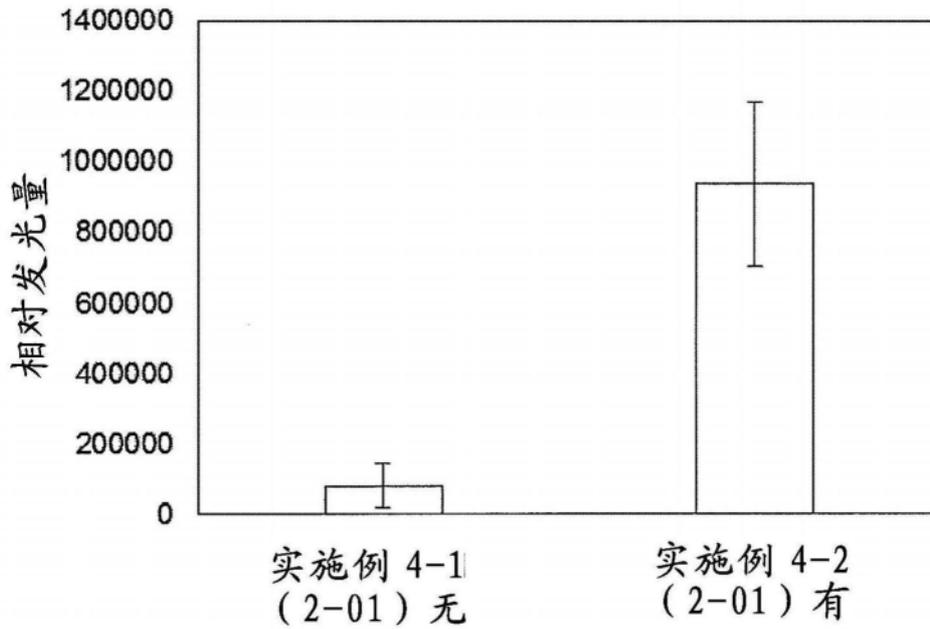


图8

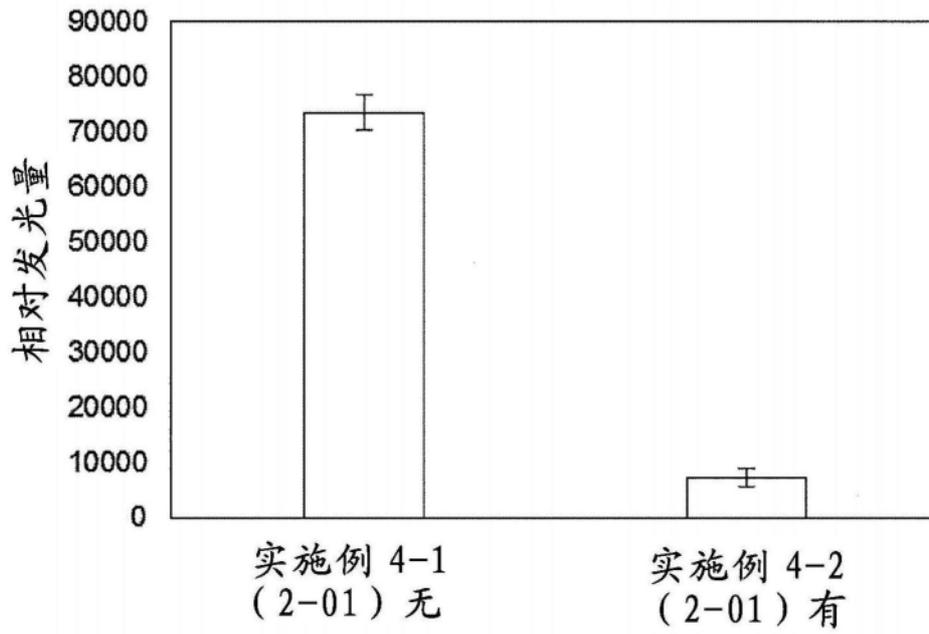


图9

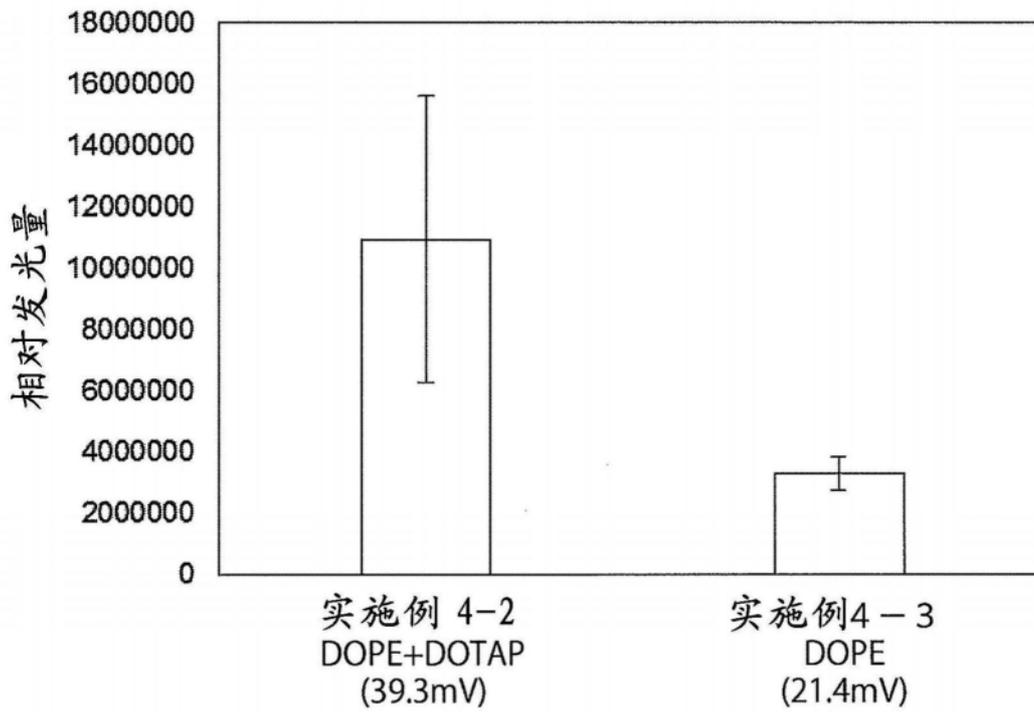


图10

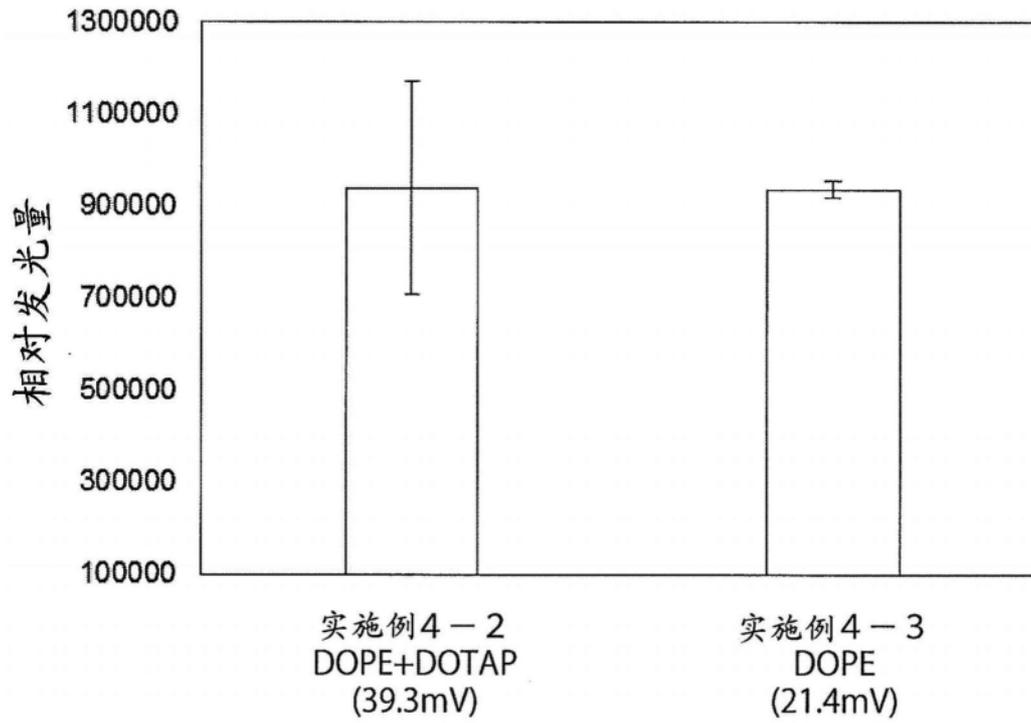


图11