

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4430135号  
(P4430135)

(45) 発行日 平成22年3月10日 (2010. 3. 10)

(24) 登録日 平成21年12月25日 (2009. 12. 25)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 C 217/28 (2006. 01)

C O 7 C 217/28

A 6 1 K 31/70 (2006. 01)

A 6 1 K 31/70

A 6 1 K 47/18 (2006. 01)

A 6 1 K 47/18

A 6 1 K 47/48 (2006. 01)

A 6 1 K 47/48

C O 7 C 229/12 (2006. 01)

C O 7 C 229/12

請求項の数 9 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-520757  
(86) (22) 出願日 平成8年11月27日 (1996. 11. 27)  
(65) 公表番号 特表2000-502061 (P2000-502061A)  
(43) 公表日 平成12年2月22日 (2000. 2. 22)  
(86) 国際出願番号 PCT/US1996/019721  
(87) 国際公開番号 W01997/019675  
(87) 国際公開日 平成9年6月5日 (1997. 6. 5)  
審査請求日 平成15年11月27日 (2003. 11. 27)  
(31) 優先権主張番号 08/565, 756  
(32) 優先日 平成7年11月30日 (1995. 11. 30)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者

バイカル インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国, 9 2 1 2 1 カリフォル  
ニア, サンディエゴ, スイート 1 0 0,  
タウン センター ドライブ 9 3 7 3 番  
地

(74) 代理人

弁理士 青木 篤

(74) 代理人

弁理士 石田 敬

(74) 代理人

弁理士 福本 積

(74) 代理人

弁理士 古賀 哲次

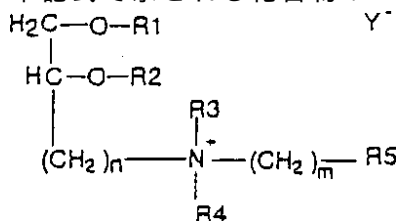
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カチオン脂質複合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式で示される化合物：

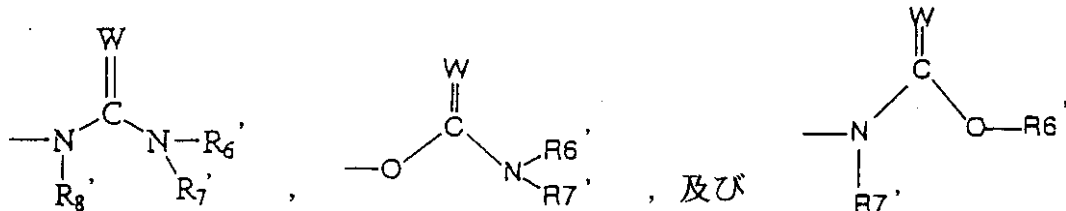
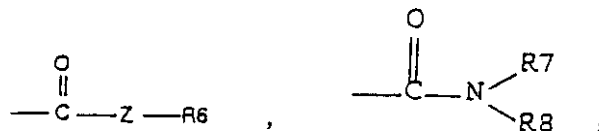


[ 式中、R 1 および R 2 はそれぞれ独立して、H , 0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する C <sub>1-23</sub> アルキル、アシル、アルキレンまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、また、前記置換基は、- O - ( CH <sub>2</sub> ) <sub>k</sub> - CH <sub>3</sub> , - S - ( CH <sub>2</sub> ) <sub>k</sub> - CH <sub>3</sub> , X - ( CH <sub>2</sub> ) <sub>k</sub> - ( 式中において、X はハライドである )、および - N ( ( CH <sub>2</sub> ) <sub>k</sub> - CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> より選択され ( 但し、前記置換基のアルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である )、R 3 および R 4 は、それぞれ独立して、0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する C <sub>1-23</sub> アルキル、アルキレンまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、また、前記置換基は、- O - ( CH <sub>2</sub> ) <sub>k</sub> - CH <sub>3</sub> , - S - ( CH <sub>2</sub> ) <sub>k</sub> - CH <sub>3</sub> , X - ( CH <sub>2</sub> ) <sub>k</sub> - ( 式中において、X はハライドである )、および - N ( ( CH <sub>2</sub> ) <sub>k</sub> - CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> から選択され ( 但し、前記置換基の

10

20

アルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である)、  
R 5 は、



10

から成るグループから選ばれ；式中、Z は O , S , NR 1 , NH , Se、および CR1R2 からなるグループより選択され；

R 6 は、R 1 , R 2 , R 3 および R 4 について定義されるグループから選択されるか、または Z が O であるとき、アミノ酸またはペプチドであり；

R 7 および R 8 は、それぞれ独立して、R 1 , R 2 , R 3 および R 4 について定義されるグループより選択され、また、任意でさらに化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、またはポリサッカライドを含み；

20

R 6 '、または R 7 ' とともに R 6 ' は、R 1 , R 2 , R 3 および R 4 について定義されるグループから選択され、また、任意でさらに化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、またはポリサッカライドを含み；

R 8 ' は不在であるか、または H もしくは R 1 , R 2 , R 3 および R 4 からなるグループから選択されるアルキル基であり、さらに、R 8 ' は環を形成するように R 6 ' または R 7 ' と結合していてもよく；

W は、O , NR 1 , NH , S , Se , CH<sub>2</sub>、または、CR1R2 である（但し、R 1 および R 2 は上記に定義される通りであり；

30

n は 1 ~ 6 であり、

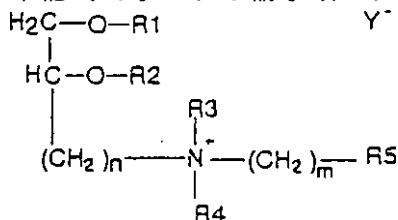
m は 1 ~ 10 であり、および

Y は、薬学的に許容されるアニオンである。

（但し、Z と R 6 は一緒になって OH ではない。）】。

#### 【請求項 2】

下記式で示される請求項 1 に記載の化合物：



40

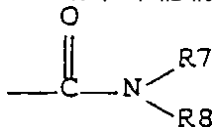
[ 式中、R 1 および R 2 はそれぞれ独立して、H , 0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する C<sub>1-23</sub> アルキル、アシル、アルキレン、またはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、また、前記置換基は、- O - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub> , - S - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub> , X - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - ( 式中において、X はハライドである )、および - N ( (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub> )<sub>2</sub> より選択され（但し、前記置換基のアルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である）、

R 3 および R 4 は、それぞれ独立して、0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、

50

非置換または置換基を有する  $C_{1-23}$  アルキル、アルキレンまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリアル基であり、前記基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、また、前記置換基は、 $-O-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $-S-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $X-(CH_2)_k-$ （式中において、X はハライドである）、および  $-N((CH_2)_k-CH_3)_2$  から選択され（但し、前記置換基のアルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である）、

R 5 は、下記構造を有し：



10

（R 7 および R 8 は、それぞれ独立して、R 1、R 2、R 3 および R 4 について定義されるグループより選択され、また、任意でさらに化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、またはポリサッカライドを含む）、

n は 1 ~ 6 であり、

m は 1 ~ 10 であり、および

Y は薬学的に許容されるアニオンである。】。

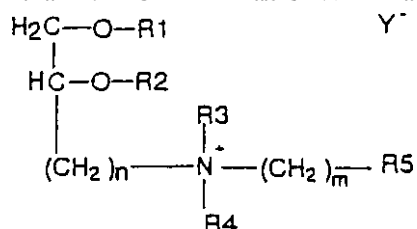
【請求項 3】

R 1 および R 2 が  $C_{10}$  から  $C_{20}$  のアルキルまたはアルケニル基であり、Z が O であり、さらに R 6 がエステルとして Z に結合するアミノ酸またはペプチドである、請求項 1 に記載の化合物。

20

【請求項 4】

下記式で示される請求項 1 に記載の化合物：



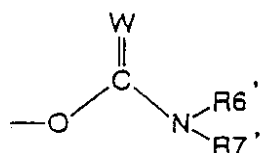
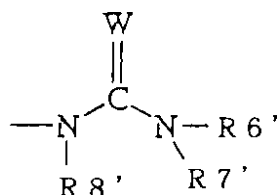
【式中において、R 1 および R 2 はそれぞれ独立して、H、0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する  $C_{1-23}$  アルキル、アシル、アルキレン、またはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリアル基であり、前記基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、また、前記置換基は、 $-O-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $-S-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $X-(CH_2)_k-$ （式中において、X はハライドである）、および  $-N((CH_2)_k-CH_3)_2$  より選択され（但し、前記置換基のアルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である）、

30

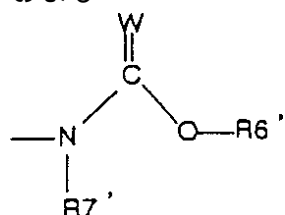
R 3 および R 4 は、それぞれ独立して、0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する  $C_{1-23}$  アルキル、アルキレンまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリアル基であり、前記基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、また、前記置換基は、 $-O-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $-S-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $X-(CH_2)_k-$ （式中において、X はハライドである）、および  $-N((CH_2)_k-CH_3)_2$  から選択され（但し、前記置換基のアルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である）、

40

R 5 は、下記構造式で示される 3 種からなるグループから選択され：



および



(式中、R6'、またはR7'とともにR6'は、R1、R2、R3およびR4について定義されるグループから選択され、また、任意でさらに化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、またはポリサッカライドを含み、

R8'は不在であるか、またはHもしくはR1、R2、R3およびR4からなるグループから選択されるアルキル基であり、さらに、R8'は環を形成するようにR6'またはR7'と結合していてもよく、

Wは、O、NR1、NH、S、Se、CH2、または、CR1R2である(但し、R1およびR2は上記に定義される通りである)、

nは1~6であり、

mは2~10であり、および

Yは薬学的に許容されるアニオンである。]。

【請求項5】

R6、R7、R8、R6'、R7'、及びR8'のいずれかがアミノ酸またはペプチドである場合、これらが非極性、極性で非荷電、および生理学的pHにおいてマイナスに帯電するアミノ酸およびペプチドからなるグループから選択される、請求項1に記載の化合物。

【請求項6】

R6、R7、R8、R6'、R7'、及びR8'のいずれかがアミノ酸またはペプチドである場合、これらが少なくとも1個の一般に天然の生物中には見出されないアミノ酸を含む、請求項1に記載の化合物。

【請求項7】

生理学的または浸透圧上で許容される溶液中に請求項1に記載の化合物を含むチトフェクチン製剤。

【請求項8】

適当な担体溶液中に、請求項1に記載の化合物および、中性脂質、ホスホリピッド、およびコレステロールからなるグループより選択される補助脂質を含むチトフェクチン製剤。

【請求項9】

生物活性薬剤をインビトロにある細胞内に導入するための組成物における、請求項1に記載の化合物の使用。

10

20

30

40

50

## 【発明の詳細な説明】

本発明は、その中で、生物のシステムにより認識される生物活性を有する薬剤がローゼンタールインヒビターの核構造とアルキル連結グループを介して連結される、両親和性脂質複合体を含むチトフェクチンに関する。カルボキシ -、カルバミル -、ウレイル -、チオウレイル -、およびグアニジル - チトフェクチンを含む、いくつかのアルキル連結グループが開示されている。

本発明の第二の態様は、第四窒素の 8 炭素以内に第一アミンを有するチトフェクチンに関する。

本発明の第三の態様は、生物学的に活性な部分が、非極性、極性で非荷電、および生理学的 pH においてマイナスに荷電する部分から選択されるアミノ酸またはペプチドである、チトフェクチンに関する。

10

本発明の第四の態様は、生物学的に活性な部分が、天然の生物中では一般に見出されない代替アミノ酸を含有するチトフェクチンに関する。

## 発明の背景

カチオン脂質とは、一般に一つまたは複数の炭化水素またはアルキルグループを含む脂質親和性領域と、少なくとも一つのプラスに帯電した極性ヘッドグループを含む親水性領域を有する両親和性分子である。カチオン脂質は、総荷電としてプラスに帯電する複合体を形成することにより、巨大分子が細胞の原形質膜を通過して細胞質に入りやすくする上で有用である。インビトロおよびインビボにおいて行うことのできるこのプロセスは、トランスフェクションとして知られ、このような技法において使用されるカチオン脂質は、チトフェクチンとして知られている。

20

裸の DNA の場合と比べて 3 倍しかトランスフェクション効率を増大しないチトフェクチンでも有用であるが、好ましくはトランスフェクション効率は 5 - 10 倍、さらに好ましくはトランスフェクション効率は、10 倍を越えて増大される。

典型的には、チトフェクチンは、ホスホリピッドなどの中性の両性イオン脂質と組み合わせられる。二種類の両親和性の脂質は、組み合わせられて、チトフェクチン単独でのトランスフェクションよりも有効な整列した脂質二重相を含む小胞を形成できることが分かっているからである。これらの小胞、またはリポソームは、表面に多数のプラス荷電を有し、この荷電により、これらがポリヌクレオチドまたはマイナスに帯電したたんぱく質などの他のアニオン分子と複合体を形成できる。ポリヌクレオチド/チトフェクチン/中性脂質複合体の表面上の残りの総カチオン荷電により、細胞膜表面の主にマイナスの電荷と強い相互反応を起こすことが可能である。

30

両親和性の特徴と極性ヘッドグループの基本的な特性はさておき、チトフェクチンは、親脂質性および親水性領域において、かなりの構造的な多様性がある。多くの異なる種類のチトフェクチンが、トランスフェクションに使用するために合成されており、現在市販されている。このようなチトフェクチンには、例えば、Lipofectin<sup>TM</sup>、Lipofectin ACE<sup>TM</sup>、Lipofect AMINE<sup>TM</sup>、Transfectam<sup>TM</sup> および DOTAP<sup>TM</sup> がある。有効なチトフェクチンの構造上の多様性は、チトフェクチンの構造 - 機能 - 認識的側面が、細胞におけるそれぞれの用途に関して異なるという観察を、一部において、反映するものである。DOTMA 化合物に構造の類似するチトフェクチンでの経験から、トランスフェクション活性は、一部、トランスフェクトされる細胞のタイプに依存することが示される (Felgner et al., J. Biol. Chem. 84:7413-7417, 1987; Wheeler et al., Biochem. Biophys. Acta (刊行物))。特に、アンモニウム基にスベルミン置換を有するカチオン脂質が、ある細胞株のトランスフェクションにおいて、DOTMA よりも有効であることが判明した。この現象は、有効なトランスフェクションは、原形質膜の構造脂質二重膜とカチオン脂質複合体との受動的融合のみではなく、特定の細胞の特性および細胞成分と個々のカチオン脂質種の相互作用によることを示唆するものである。チトフェクチン種間の構造上の変種は、したがって、チトフェクチンと細胞の多重かつ複雑な相互作用のより高度な理解、およびこれらの相互作用の一つまたは複数を利用とする一部の研究者の努力を表すものである。

40

50

E p s t e i n の米国特許第 5 , 0 4 9 , 3 8 6 号中で開示される、D O T M A , N - [ 1 - ( 2 , 3 - ジオレイルオキシ ) プロピル ] - N , N , N - トリメチルアンモニウムは、当初に開発されたカチオン脂質のひとつで、このグループの脂質は新たな構造上変種の開発においてチトフェクチン力価を比較評価する参照化合物となった。D O T M A 脂質は、分子にカチオン部位を与える、第四窒素を有するプロパナミニウム基、および分子のプロピルバックボーンにエーテル結合する一対の C<sub>18</sub>炭化水素により特徴付けられる。第四窒素は、メチル基などの比較的短鎖のアルキル鎖で三置換されている。構造上類似のカチオン脂質、1 , 2 - ビス ( オレオイルオキシ ) - 3 - 3 - ( トリメチルアンモニア ) プロパン ( D O T A P ) は、エーテル結合したアルキル基ではなく、アシルを含み、標的細胞によってより容易に代謝されると考えられている。

10

ある種類のカチオン脂質、例えば、アルキルまたはアシル基で直接置換されたアンモニウム塩は、主に経済上の目的のために開発された ( R o s e に対する米国特許第 5 , 2 7 9 , 8 3 3 号 ) 。より毒性作用の低いものを提供する目的で開発されたものもある。例えば、ホスファチジルコリンとスフィンゴミエリンから作成された生体適合性の高いチトフェクチン、1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン ( Avanti Polar Lipids, Inc. Alagbaster, AL, Cat. Nos. 890700-706 ) である。

F e l g n e r 他 の米国特許第 5 , 2 6 4 , 6 1 8 号、および W O 9 1 / 1 7 4 2 4 は、ホスホリパーゼ A のローゼンタールインヒビター ( R I ) ( Rosenthal et al., J.Biol.Chem.235:2202-2206, 1960 ) およびこのジアシル - またはアルキル / アシル - 種に構造的に類似するチトフェクチンを開示している。R I を基にする一連の化合物は、パターン : D O R I E ( C<sub>18</sub> ) ; D P R I E ( C<sub>16</sub> ) ; および D M R I E ( C<sub>14</sub> ) を有する頭文字により知られている。これらの頭文字は、共通の基本的な化学構造を示唆し、例えば、D M R I E は、1 - プロパナミニウム、N - ( 2 - ヒドロキシエチル ) - N , N - ジメチル - 2 , 3 - ビス ( テトラデシルオキシ ) - 、プロミド、( + ) ・ ( C A S レジストリー : 1 4 6 6 5 9 ) であり、その他は置換アルキル基が異なる。第四アンモニウム基上に極性ヒドロキシエチル置換基を有するこれらのチトフェクチンは、多くの場合 D O T M A タイプの化合物よりもより有効なトランスフェクションを与える。ヒドロキシルアルキル部分の様々な置換基および、アルキル鎖長の変化の、R I チトフェクチンのトランスフェクション有効性への影響についての研究が、F e l g n e r 他によって提示された ( J.Biol.Chem.269:2550-2561, 1994 ) 。ここでも、研究により、最適なヒドロキシルアルキル鎖長は、細胞のタイプによって異なることが示された。

20

30

D M R I E から A E - D M R I E への変換が ( Wheeler et al., Biochem. Biophys. Acta ( 刊行物 ) ) 、チトフェクチン活性に重要な作用を与えることが示された。第一アルコールに隣接する第四窒素を有し、これにより pH に依存しないプラス荷電を与えられている D M R I E は、現在知られている最も活性なチトフェクチンのひとつである。しかしながら、D M R I E 上のアルコールを第一アミン基に置換して A E - D M R I E を得ると、D M R I E のものと構造的に明らかに異なる DNA 複合体が形成されることが判明しており、A E - D M R I E はヘルパー補助脂質がなくとも有効に多くの細胞株にトランスフェクトすることができる。チトフェクチン骨格の一か所の置換により、トランスフェクションの性質を著しく変化させることができるというこの観察は、他の修飾でも遺伝子の送達において同様の改良を行える可能性を示唆するものである。

40

トランスフェクション事象の継続的な研究は、カチオン脂質が、機能性分子の細胞の細胞質内への進入を助けるだけでなく、例えば機能性分子のリソゾームによる分解を防止する、核コンパートメントへの進入を助ける、または細胞質酵素による RNA 転写産物の分解の防止など、さらなる有用な能力を提供する可能性を示している。これらのカチオン分子の機能は、特異的な構造特性に関連するものと考えられている。このように、特定のタイプの細胞内への外来分子のトランスフェクションに特に適当なチトフェクチンが必要とされている。また、特定の細胞内機能を行うことのできるチトフェクチンの開発も必要とされている。

発明の概要

50

本発明は、代謝系により認識される生物活性を有する薬剤とローゼンタールインヒビターの核構造を有するチトフェクチンとをカップリングさせるいくつかのリンケージグループに関する。

本発明の第二の態様は、第四窒素の 8 炭素以内に第一アミンを有するチトフェクチンに関する。

本発明の第三の態様は、非極性、極性かつ非荷電、および生理学的 pH においてマイナスに荷電する部分から選択されるアミノ酸またはペプチドと結合したチトフェクチンに関する。極性で非荷電のアミノ酸の例は、セリンおよびスレオニンなどのような極性部分を有する側鎖を有するアミノ酸である。非極性アミノ酸の例は、直鎖のアルキルまたは環状アルキルまたはヘテロアルキル側鎖を有する、グリシン、バリン、フェニルアラニン、およびロイシンである。マイナスに荷電したアミノ酸の例は、マイナスに荷電した酸性の側鎖を有するグルタミン酸またはアスパラギン酸などのアミノ酸である。

本発明の第四の態様は、天然の生物内には一般に見出されない代替アミノ酸を含有するアミノ酸またはペプチドと結合したチトフェクチンに関する。このようなアミノ酸には、これに限定されるものではないが、37 C. F. R § 1.822 に掲載される修飾された通常にはないアミノ酸が含まれる。さらにこのようなアミノ酸は、天然には見出されない合成アミノ酸であってもよい。

本発明のある実施態様は、

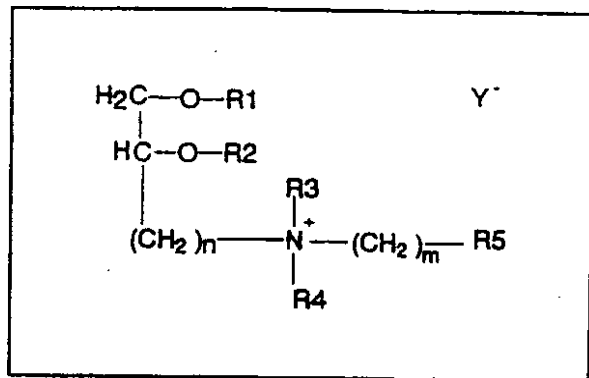
第四窒素基を含むローゼンタールインヒビター核構造；

カルボキシ、カルバミル、ウレイル、チオウレイル、またはグアニジル基を含む、第四窒素に結合するアルキルリンカー；および

リンカーに結合した代謝系により認識される生物活性を有する薬剤；

を含むカチオン両親和性脂質である。

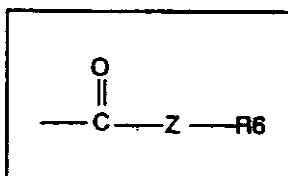
本発明の他の実施態様は、下記式の化合物である。



[ 式中において、R 1 および R 2 はそれぞれ独立して、H、0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する C<sub>1-23</sub> アルキル、アシル、アルキレン、ヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、前記置換基は - O - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、- S - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、X - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - ( 式中において、X はハライドである )、および - N ( (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub> )<sub>2</sub> であり ( 但し、置換基のアルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である )、

R 3 および R 4 は、それぞれ独立して、0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する C<sub>1-23</sub> アルキル、アルキレンまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、前記置換基は - O - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、- S - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、X - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - ( 式中において、X はハライドである )、および - N ( (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub> )<sub>2</sub> であり ( 但し、置換基のアルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である )、

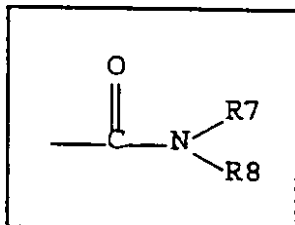
R 5 は、下記構造を有し：



(式中、ZはO、S、N、Se、Cからなるグループより選択され、R6は不在であるか、またはR1、R2、R3およびR4について定義されるグループから選択される)、  
Yは、薬学的に許容されるアニオンであり、  
nは1～6であり、  
mは2～10である。]

10

また好ましくは、上記の構造中、ZはNであり、かつR5は下記構造を有し：



(式中、R7およびR8はそれぞれ独立して、R1、R2、R3、およびR4について定義されるグループから選択され、また任意でさらに化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、ポリサッカライド、または、他の生物活性を有するもしくは医薬用の薬剤を含む)、

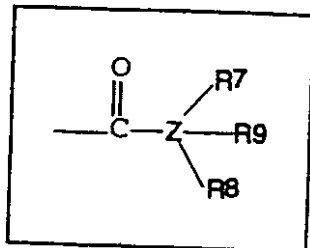
20

nは1～6であり、

mは1～10であり、および

Yは、薬学的に許容されるアニオンである。

さらに有効には、ZはCであり、かつR5は下記構造を有し：



30

(式中、R7、R8およびR9は、それぞれ独立してR1、R2、R3、およびR4について定義されるグループから選択され、また任意でさらに化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、ポリサッカライド、または、他の生物活性を有するもしくは医薬用の薬剤を含む)、

nは1～6であり、

mは2～10であり、および

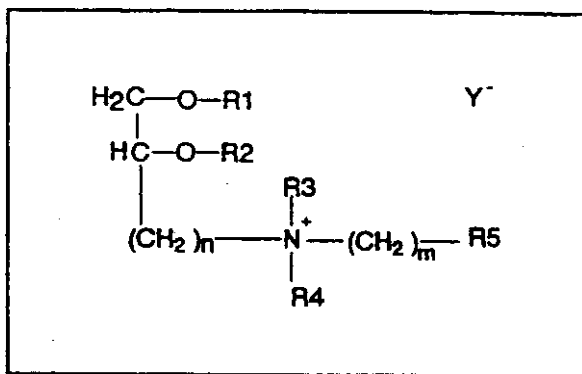
40

Yは、薬学的に許容されるアニオンである。

この好ましい実施態様の別の態様によれば、R1およびR2は、C<sub>8</sub>からC<sub>20</sub>アルキルまたはアルケニル基、ZはO、並びにR6は化学的に結合したアミノ酸またはペプチドである。

本発明はまた、下記式の化合物を提供する。

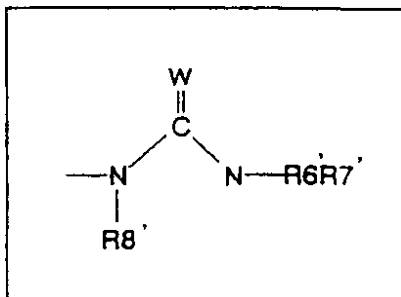




10

[ 式中において、R 1 および R 2 はそれぞれ独立して、H、0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する  $C_{1-23}$  アルキル、アシル、アルキレン、またはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、さらに、R 1 および R 2 はそれぞれ独立して H であってもよく、また、前記置換基は、 $-O-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $-S-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $X-(CH_2)_k-$  ( 式中において、X はハライドである )、および  $-N((CH_2)_k-CH_3)_2$  から選択され ( 但し、前記置換基のアルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である )、R 3 および R 4 は、それぞれ独立して、0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する  $C_{1-23}$  アルキル、アルキレンまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、さらに、R 1 および R 2 はそれぞれ独立して H であってもよく、また、前記置換基は、 $-O-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $-S-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $X-(CH_2)_k-$  ( 式中において、X はハライドである )、および  $-N((CH_2)_k-CH_3)_2$  から選択され ( 但し、前記置換基のアルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である )、R 5 は、 $N-C(O)-$  または R 5 は下記構造を有し :

20



30

( 式中、R 6'、または R 7' とともに R 6' は、R 1 , R 2 , R 3 および R 4 について定義されるグループから選択され、また任意でさらに化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、ポリサッカライド、または、他の生物活性を有するもしくは医薬用の薬剤を含み、

R 8' は不在か、または H もしくは R 1 , R 2 , R 3 および R 4 からなるグループより選択されるアルキル基であり、また、R 8' は環を形成するように R 6' または R 7' と結合していてもよく、

40

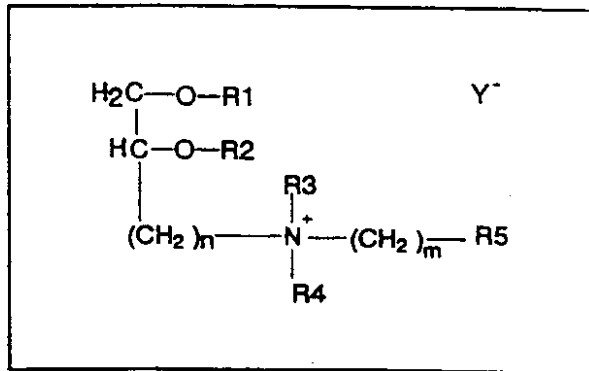
W は、O、N、NH、S、Se、C、CH、または  $CR_1R_2$  である ( 但し、 $R_1$  および  $R_2$  は上記に定義されるとおりである )、

n は、1 ~ 6 であり、

m は、2 ~ 10 であり、および

Y は薬学的に許容されるアニオンである。]

本発明の別の実施態様は、下記式の化合物である。



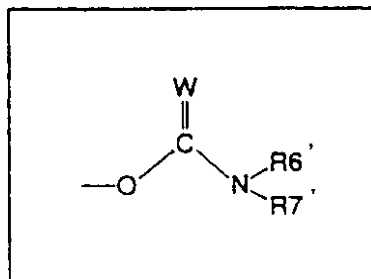
10

[ 式中において、R 1 と R 2 はそれぞれ独立して、H、0 ～ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する  $C_{1-23}$  アルキル、アシル、アルキレンまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ～ 5 のヘテロ原子を含み、また、前記置換基は、 $-O-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $-S-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $X-(CH_2)_k-$ （式中において、X はハライドである）、および  $-N((CH_2)_k-CH_3)_2$  から選択され（但し、置換基のアルキル基は 0 ～ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ～ 4 である）、

R 3 および R 4 は、それぞれ独立して、0 ～ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する  $C_{1-23}$  アルキルまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ～ 5 のヘテロ原子を含み、また前記置換基は、 $-O-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $-S-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $X-(CH_2)_k-$ （式中において、X はハライドである）、および  $-N((CH_2)_k-CH_3)_2$  から選択され（但し、前記置換基のアルキル基は 0 ～ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ～ 4 である）、

20

また式中、R 5 は下記構造を有し：



30

（式中、R 6'、または、R 7'とともにR 6'は、R 1 , R 2 , R 3 および R 4 について定義されるグループから選択され、また任意でさらに化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、ポリサッカライド、または、他の生物活性を有するもしくは医薬用の薬剤を含み、

W は、O、N、NH、S、Se、C、CH、または  $CR_1R_2$  である）、

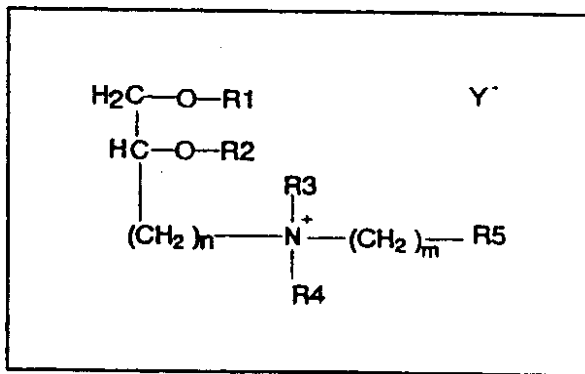
n は 1 ～ 6 であり、

m は 2 ～ 10 であり、および

40

Y は薬学的に許容されるアニオンである。]

本発明のさらに別の実施態様は、下記式を有する化合物である。



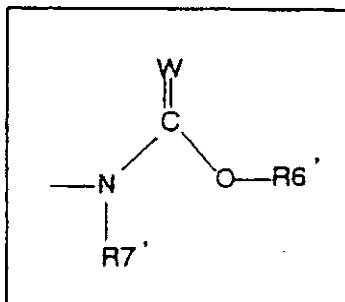
10

[ 式中において、R 1 と R 2 はそれぞれ独立して、H、0 ～ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する C<sub>1-23</sub> アルキル、アシル、アルキレンまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ～ 5 のヘテロ原子を含み、また、前記置換基は、- O - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、- S - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、X - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - ( 式中において、X はハライドである )、および - N ( (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub> )<sub>2</sub> から選択され ( 但し、前記置換基のアルキル基は 0 ～ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ～ 4 である )、

R 3 および R 4 は、それぞれ独立して、0 ～ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する C<sub>1-23</sub> アルキルまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ～ 5 のヘテロ原子を含み、また、前記置換基は、- O - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、- S - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、X - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - ( 式中において、X はハライドである )、および - N ( (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub> )<sub>2</sub> から選択され ( 但し、前記置換基のアルキル基は 0 ～ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ～ 4 である )、

20

また、式中 R 5 は、下記構造を有し：



30

( 式中、R 6 '、または、R 7 'とともにR 6 'は、R 1 , R 2 , R 3 および R 4 について定義されるグループから選択され、また、任意でさらに化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、ポリサッカライド、または、他の生物活性を有するもしくは医薬用の薬剤を含み、

W は、O、N、NH、S、Se、C、CH、または C R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> である )、

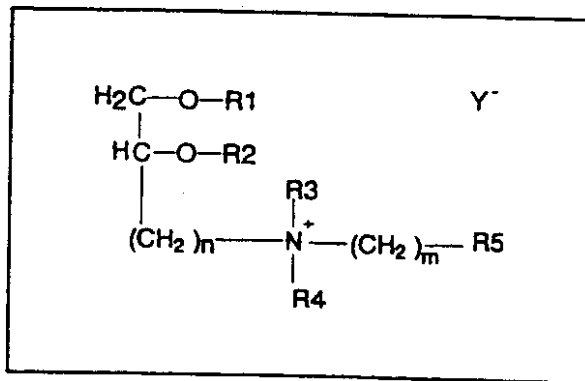
n は、1 ～ 6 であり、

m は、2 ～ 10 であり、および

40

Y は薬学的に許容されるアニオンである。]

本発明はまた、下記式の化合物を提供する。



10

[ 式中において、R 1 および R 2 はそれぞれ独立して、H、0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する C<sub>1-23</sub> アルキル、アシル、アルキレンまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、また、前記置換基は - O - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、- S - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、X - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - ( 式中において、X はハライドである )、および - N ( (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub> )<sub>2</sub> から選択され ( 但し、前記置換基のアルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である )、

R 3 および R 4 は、それぞれ独立して、0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する C<sub>1-23</sub> アルキルまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、また、前記置換基は - O - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、- S - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、X - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - ( 式中において、X はハライドである )、および - N ( (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub> )<sub>2</sub> から選択され ( 但し、前記置換基のアルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である )、

20

式中、R 5 は不在であるか、または - O - R 6 - R 7 または、- NH - R 6 - R 7 であり ( 但し、式中、R 6、または R 7 をともなう R 6 は、R 1、R 2、R 3 および R 4 について定義されるグループより選択され、また任意でさらに化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、ポリサッカライド、または、他の生物活性を有するもしくは医薬用の薬剤を含む )、

n は、1 ~ 6 であり、

30

m は、2 ~ 10 であり、および

Y は薬学的に許容されるアニオンである。]

好ましくは、この化合物は、ジアルキル - ローゼンタールインヒビターエステルおよびジアルケニル - ローゼンタールインヒビターエステルと化学的に結合したアミノ酸またはペプチドからなるグループより選択され、最も好ましくは、化合物は両機能性リンカーを介して生物活性を有する部分と共有結合しているジアルキル - およびジアルケニル - ローゼンタールインヒビターエステルからなるグループから選択される。有効には、R 5 は - O - R 6 - R 7 - であり、かつ R 6 はアミノ酸またはポリペプチドである。別の好ましい実施態様において、R 5 はグリシンである。

本発明は、R 1 が H、または C<sub>1-24</sub> アルキルまたはアルケニルであって、R 2 が C<sub>1</sub> から C<sub>24</sub> アルキルまたはアルケニルであり、かつ R 3 と R 4 が同じかまたは異なる C<sub>1-24</sub> アルキルもしくは H であり、R 5 が O - R 6 - R 7 であり、さらに R 6 が不在あるいは、- C ( O ) - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - NH ; アルキル、アリール、もしくはアラルキルのジアミノカルボキシレートエステル基 ; またはジアミノカルボキシレートエステル基に結合した - C ( O ) - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - NH ( 但し、p は 1 ~ 18 である ) であり、かつ R 7 が H、スペルミン、スペルミジン、ヒストン、DNA 結合特異性を有するたんぱく質であるか、または R 7 部分のアミン基が H または C<sub>1</sub> から C<sub>24</sub> の直鎖もしくは分岐アルキル鎖によって第四化合物化されている先述の基である化合物、または、

40

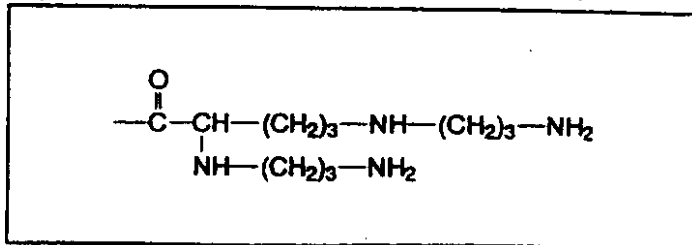
側鎖にプラスに帯電した基を有する L - または D - アルファアミノ酸であって、該アミノ酸がアルギニン、ヒスチジン、リジンもしくはオルニチンまたはこれらのアナログを含む

50

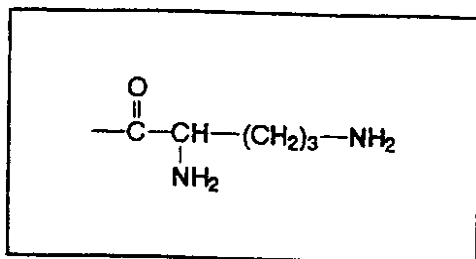
か、または R 7 部分のアミンが H または C<sub>1</sub> から C<sub>24</sub> の直鎖もしくは分岐アルキル鎖によって第四化合物化されている L - または D - アルファアミノ酸、または L - または D - アルファアミノ酸からなるグループから選択されるポリペプチドで、アミノ酸残基の少なくともひとつがアルギニン、ヒスチジン、リジンまたはオルニチンもしくはこれらのアナログを含むポリペプチド、を含まない。

本発明に含まれないさらなる化合物は、n が 1 であり、かつ m が 2 ~ 6 であり、さらに R 1 および R 2 が別々にまたは共に C<sub>1</sub> - C<sub>23</sub> アルキルまたは C ( O ) - C<sub>1</sub> - C<sub>23</sub> であり、また R 3 および R 4 が別々にまたは共に H または側鎖のないアルキル C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> であり、および R 5 が NH - R 6 - R 7 であって、さらに R 6 - R 7 が、 - ( CH<sub>2</sub> )<sub>z</sub> NH<sub>2</sub> ( 式中 z は 2 ~ 6 ) 、または - ( CH<sub>2</sub> )<sub>3</sub> - NH - ( CH<sub>2</sub> )<sub>4</sub> - NH<sub>2</sub>、または - NH - ( CH<sub>2</sub> )<sub>3</sub> - NH - ( CH<sub>2</sub> )<sub>4</sub> - NH - ( CH<sub>2</sub> )<sub>3</sub> - NH<sub>2</sub>、C ( O ) - フルオレセイン、または

10

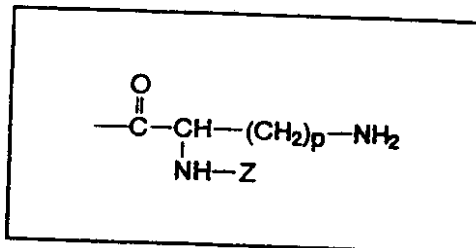


または



20

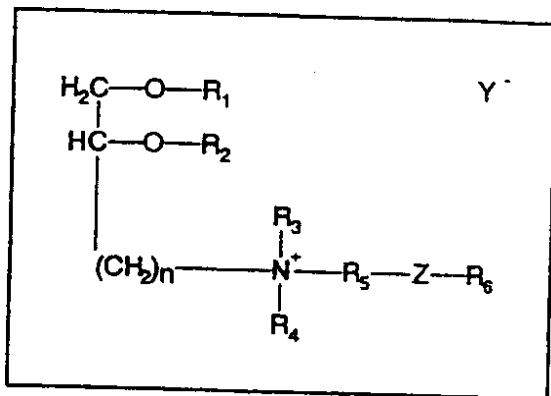
または



30

( 式中、p は 2 ~ 5 であり、Z は H またはアミドまたはアルキルアミノ基によって結合する他の基である ) である化合物である。

本発明の別の実施態様は、下記構造を有する化合物である。



40

[ 式中、R 1 および R 2 はそれぞれ独立して、H、0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する C<sub>1-23</sub> アルキル、アシル、アルキレンまたはヘテ

50

ロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、また、前記置換基は、 $-O-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $-S-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $X-(CH_2)_k-$ （式中において、X はハライドである）、および  $-N((CH_2)_k-CH_3)_2$  から選択され（但し、前記置換基のアルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である）、

R 3 および R 4 は、それぞれ独立して、0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する  $C_{1-23}$  アルキルまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、また、前記置換基は、 $-O-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $-S-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $X-(CH_2)_k-$ （式中において、X はハライドである）、および  $-N((CH_2)_k-CH_3)_2$  から選択され（但し、前記置換基のアルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である）、

10

式中、R 5 は不在であるか、または  $-O-R 6-R 7$  もしくは、 $-NH-R 6-R 7$  であり（式中、R 6、または R 7 をともなう R 6 は、R 1、R 2、R 3 および R 4 について定義されるグループより選択され、また任意でさらに化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、ポリサッカライド、または、他の生物活性を有するもしくは医薬用の薬剤を含む）、

n は、1 ~ 6 であり、

m は、2 ~ 10 であり、および

Y は薬学的に許容されるアニオンであり、さらに

20

Z は、O、NH、または S である。]

好ましくは、R 5 はヘテロエチレン基で、X は O であり、かつ R 7 をともなう R 6 がエステル結合を介してヘテロエチレン基と結合したアミノ酸またはペプチドである。

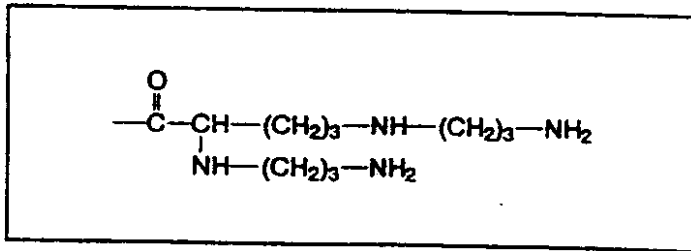
本発明は、上記の構造にあたるある特定の化合物を含まない。例えば、Z が O であり、R 1 が H か、または  $C_1-C_4$  アルキルまたはアルケニルであり、かつ R 2 が  $C_1$  から  $C_4$  アルキルまたはアルケニルであり、さらに R 3 と R 4 が同じかまたは異なる  $C_1-C_4$  アルキルまたは H であり、R 6 が不在あるいは、 $-C(O)-(CH_2)_p-NH$ ；アルキル、アリール、もしくはアラルキルであるジアミノカルボキシレートエステル基；またはジアミノカルボキシレートエステル基に結合する  $-C(O)-(CH_2)_p-NH$ （但し、p は 1 ~ 18 である）であり、かつ R 7 が H、スペルミン、スペルミジン、ヒストン、DNA 結合能を有するたんぱく質であるか、または R 7 部分のアミン基が H もしくは  $C_1$  から  $C_{24}$  の直鎖または分岐アルキル鎖で第四化合物化された先述の基である場合、または

30

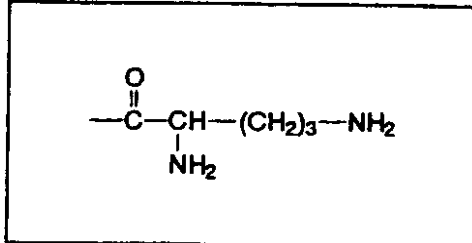
側鎖にプラスに帯電した基を有する L - または D - アルファアミノ酸であって、該アミノ酸がアルギニン、ヒスチジン、リジンもしくはオルニチンまたはこれらのアナログを含むか、または、R 7 部分のアミンが H または  $C_1$  から  $C_{24}$  の直鎖もしくは分岐アルキル鎖によって第四化合物化されている L - または D - アルファアミノ酸である場合、または L - または D - アルファアミノ酸からなるグループから選択されるポリペプチドで、アミノ酸残基の少なくともひとつがアルギニン、ヒスチジン、リジンまたはオルニチンもしくはこれらのアナログを含むポリペプチドである場合。

40

本発明に含まれないさらなる化合物は、Z が NH であり、n が 1 であり、かつ m が 2 ~ 6 であり、さらに R 1 および R 2 が別々にまたは共に  $C_1-C_{23}$  アルキルまたは  $C(O)-C_1-C_{23}$  であり、また R 3 および R 4 が別々にまたは共に H または側鎖のないアルキル  $C_1-C_6$  であり、および R 5 が  $NH-R 6-R 7$  であって、さらに R 6 - R 7 が、 $-(CH_2)_zNH_2$ （但し、式中、z は 2 ~ 6 である）、または  $-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH_2$ 、または  $-NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$ 、 $C(O)-フルオレセイン$ 、または

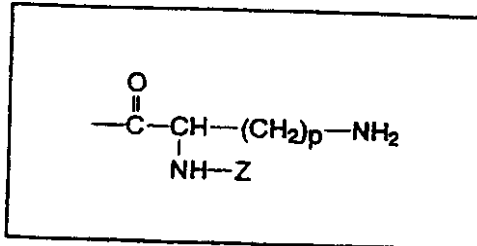


または



10

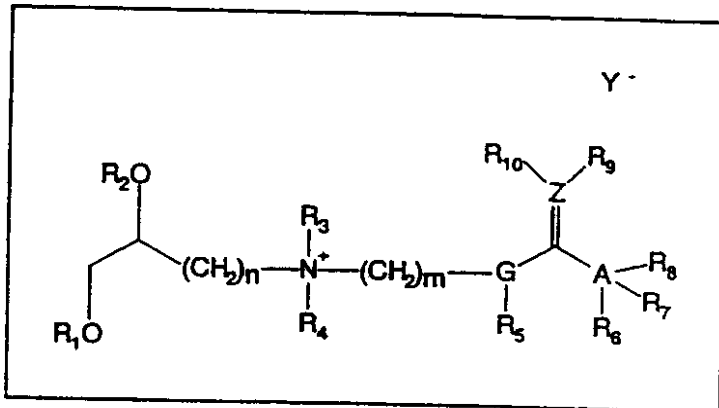
または



20

(式中、 $p$  は 2 ~ 5 であり、 $Z$  は H または アミド または アルキルアミノ基によって結合する他の基である) である化合物である。

本発明は、また、下記式の化合物を提供する。



30

(式 1)

40

[ 式中において、 $R_1$  および  $R_2$  はそれぞれ独立して、0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する  $C_{1-23}$  アルキル、アシル、アルキレンまたはヘテロアルキル基、またはサイクリックもしくはアリール基であり (該サイクリックもしくはアリール基は 5 個までのヘテロ原子を含み、また、前記置換基は、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_k-\text{CH}_3$ 、 $-\text{S}-(\text{CH}_2)_k-\text{CH}_3$ 、 $\text{X}-(\text{CH}_2)_k-$  (式中において、 $\text{X}$  はハライド)、および  $-\text{N}((\text{CH}_2)_k-\text{CH}_3)_2$  からなるグループから選択される (式中  $k$  は 0 ~ 4 であり、該置換基のアルキル基は 0 ~ 2 個のヘテロ原子を含む))、および  $R_1$  または  $R_2$  は H であってもよく； $R_3$  および  $R_4$  は、 $R_3$  または  $R_4$  が H ではないということを除いて、 $R_1$  および  $R_2$  と同様に定義され； $R_5$  は不在であるか、H、または  $R_1$  および  $R_2$  の定義と同じアルキル基であり； $R_5$  から  $R_{10}$  はそれぞれ独立して、または組合わさって不在であ

50

るか、H、または $R_1$ および $R_2$ について定義されるアルキル基であって、また、任意でさらに化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、ポリサッカライド、または、他の生物活性を有するもしくは医薬用の薬剤を含み；Gは不在であるか、O、N、SまたはSeであり；ZはO、N、S、SeまたはCであり；AはO、N、S、SeまたはCであり；nは1～6であり；mは2～10であり；およびYは薬学的に許容されるアニオンである。]

本発明は、GがNであり、ZがOであり、かつAがCである式1の化合物、または、GがOであり、ZがOであり、かつAがCである式1の化合物を含まない。

本発明はまた、上記のカチオン脂質のいずれか、および適当な担体溶液中に含有される中性脂質、ホスホリピッド、およびコレステロールからなるグループから選択される補助脂質を含むチトフェクチン製剤を提供するものである。

本発明のさらに別の実施態様は、アニオン分子を細胞内に送達する下記工程を含む方法であって、これにより生物学的に有効な量のアニオン分子を細胞中に導入する方法である：

(a) アニオン分子を上記カチオン脂質のいずれかの有効量を含む製剤と接触させて脂質との複合体を作製するステップ；及び

(b) ステップ(a)で作製した脂質複合体と細胞を接触させるステップ。

好ましくは、該細胞はインビトロであり、最も好ましくは、該細胞はインビボである。本発明の別の態様は、細胞に生物活性を有する薬剤を導入するための組成物に、上記の式1の化合物を使用することである。好ましくは、細胞はインビボである。ある実施態様において、細胞はインビトロである。

使用の一つの実施態様において、生物活性を有する薬剤はアニオンで、DNAまたはRNAであってもよい。

様々な化合物の活性は、例えば、インビトロ細胞培養アッセイ、げっ歯類肺トランスフェクション、げっ歯類腹腔内腫瘍、および、げっ歯類筋肉内およびブタまたはウサギ動脈内アッセイなどのアッセイで示すことができる。このようなアッセイは、特許を請求する化合物のスクリーニング技法として本明細書中に説明される。

#### 【図面の簡単な説明】

図1Aは、COS7細胞において、異なるGMU-DMRIE:DOPE比率により得られた総-gal発現レベルを示すグラフである。

図1Bは、COS7細胞において、異なるGMU-DMRIE:DOPE比率により得られたピーク-gal発現を示すグラフである。

図1Cは、C2C12細胞において、異なるGMU-DMRIE:DOPE比率により得られた総-gal発現を示すグラフである。

図1Dは、C2C12細胞において、異なるGMU-DMRIE:DOPE比率により得られたピーク-gal発現を示すグラフである。

図2は、トランスフェクションが、異なる鎖長のアルキルアミン部分を有するチトフェクチンに介在された場合の、マウス肺でのCATの肺発現に関するグラフである。

図3は、トランスフェクションが、 $C_{10-14}$ のアルキル鎖を有するチトフェクチンに介在された場合の、マウス肺でのCATの肺発現に関するグラフである。

図4は、げっ歯類肺アッセイにおける、アミノ酸の結合した化合物Gly-G-DLRIEおよびLys-G-DLRIEのGAP-DLRIEに相対的な活性を示す。

図5は、マウス腫瘍モデルにおける三種類のチトフェクチンの腹腔内トランスフェクション活性を比較するグラフである。

#### 反応スキームの簡単な説明

明細書の本文に続いて、いくつかの代表的な反応スキームが示される。これら番号付与された反応スキームは、以下を説明するものである。

スキームIは、本発明のチトフェクチンの基本骨格の合成経路を説明するものである。

スキームIIは、本発明のチトフェクチンの合成における市販の出発材料からの中間体の作成経路を説明するものである。



スキームIIIは、中間化合物からのカルボキシチトフェクチンの合成経路を説明するものである。

スキームIVは、中間化合物からのカルバミルチトフェクチンの合成経路を説明するものである。

スキームVは、中間化合物からの尿素様官能基を有するチトフェクチンの合成経路を説明するものである。

#### 発明の詳細な説明

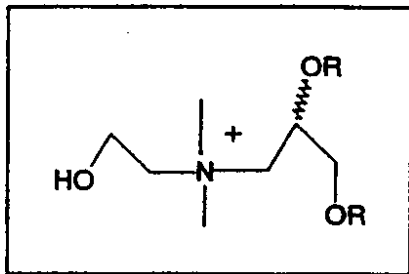
ローゼンタールインヒビター（R I）系列が実例であるようなチトフェクチンの第四アンモニウムクラスの両親和性脂質を、誘導体化することにより、より高い特異性で細胞膜と相互反応し、より高いレベルのトランスフェクションを行うことのできるより有効性の高いトランスフェクション剤を作成できることが見出された。これらは、標的とするキレセプターおよび細胞表面酵素に適応できる構造を提供し、これにより、分子認識における重要な要素を発見及び利用するのに適当である。これらのカチオン脂質の一部は、細胞内に送達される物質に結合して特定の生物学的目的を達成することができる。

本発明のカチオン脂質は、先に記載される通り、DOTMAまたはR I特性を含む化学構造を有するが、リンキングスパーサーを介して、たとえばケトン、エステル、ウレイル、またはカルバミル部分などの官能基を有利に有する構造と結合されている。これらの官能基は、（１）細胞標的部分に結合する、または（２）治療用分子をチトフェクチンに結合させるために使用することができる。付加的に、または代替的に、官能基は、チトフェクチンの極性荷電密度を増大する基と結合し、これによりトランスフェクションを促進するためのリンカーとして使用することができる。例えば、第四窒素の８炭素以内に第一アミン基が存在すると、トランスフェクション効率が増大することを見出した。第四窒素の８炭素以内に第一アミンを有する有効なチトフェクチンの例は、実施例７および９、および図２、３、４、および５に示される結果において開示される。

プラスに帯電するアミノ酸またはペプチドのみがチトフェクチンの有効性を増大できるとした最初の予想に反して（米国特許第５，２６４，６１８号参照）、非極性、極性で非荷電、または生理学的pHにおいてマイナスに帯電するペプチドまたはアミノ酸をローゼンタールインヒビター骨格に結合することによっても、トランスフェクション効率を増大することができる。例えば、非荷電のアミノ酸であるグリシンは、DLRIEと結合すると、荷電アミノ酸リジンの場合よりもトランスフェクション活性をより増大させる。

#### 用語

本発明のチトフェクチンは、R I，DL-2，3-ジアシルオキシプロピル（ジメチル）-ヒドロキシエチルアンモニウムの核構造を有するカチオン脂質類である。



チトフェクチンのR Iクラスの頭文字の例は、次の通りである。

DORI：ジオレイルローゼンタールインヒビター（DiOleylRosenthalInhibitor） $R = CO(CH_2)_7[CH=CH(CH_2)_7CH_3]$

DORIE：ジオレイルローゼンタールインヒビターエーテル（DiOleylRosenthalInhibitorEther） $R = (CH_2)_8[CH=CH(CH_2)_7CH_3]$

DDRIE：ジデシルローゼンタールインヒビターエーテル（DiDecylRosenthalInhibitorEther） $R = (CH_2)_9CH_3$

DLRIE：ジラウリルローゼンタールインヒビターエーテル（DiLaurylRosenthalInhibitorEther） $R = (CH_2)_{11}CH_3$

D M R I E : ジミリスチルローゼンタールインヒビターエーテル (DiMyristylRosenthalInhibitorEther)  $R = (CH_2)_{13}CH_3$

D P R I E : ジパルミチルローゼンタールインヒビターエーテル (DiPalmitylRosenthalInhibitorEther)  $R = (CH_2)_{15}CH_3$

D S R I E : ジステアシルローゼンタールインヒビターエーテル (DiStearylRosenthalInhibitorEther)  $R = (CH_2)_{17}CH_3$

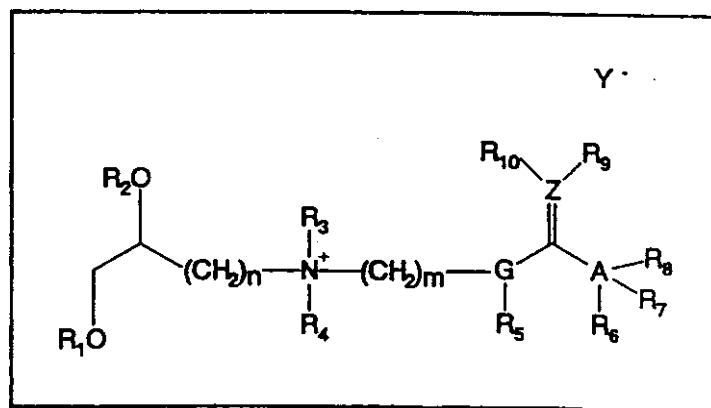
A E - D M R I E : - アミノエチルジミリスチルローゼンタールインヒビターエーテル (-AminoEhylDiMyristylRosenthalInhibitorEther)

D M R I E - O x : ジミリスチルローゼンタールインヒビターエーテルカルボキシレート (DiMyristylRosenthalInhibitorEtherCarboxylate)、

また、例えば、D O P E : ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DiOleoylPhosphatidylEthanolamine) など、類似の頭文字でリボソーム製剤中に含まれる中性脂質を表す。

#### 本発明のチトフェクチン：構造

一実施態様において、本発明の脂質は、以下の一般式を有する。



(式 1)

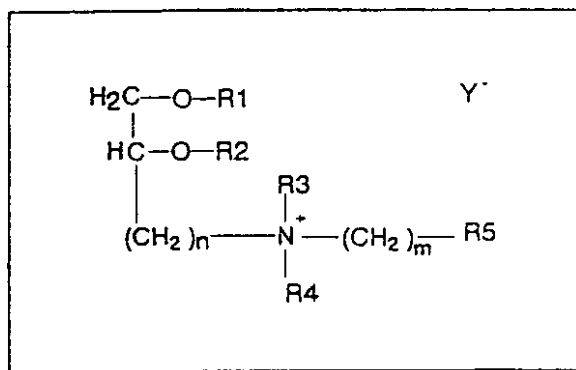
[ 式中において、 $R_1$ および $R_2$ はそれぞれ独立して、0～6個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する $C_{1-23}$ アルキル、アシル、アルキレンまたはヘテロアルキル基、またはサイクリックもしくはアリール基であり(該サイクリックもしくはアリール基は5個までのヘテロ原子を含み、また、前記置換基は、 $-O-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $-S-(CH_2)_k-CH_3$ 、 $X-(CH_2)_k-$ (式中において、 $X$ はハライド)、および $-N((CH_2)_k-CH_3)_2$ からなるグループから選択される(式中、該置換基のアルキル基は0～2個のヘテロ原子を含み、 $k$ は0～4である))、および $R_1$ または $R_2$ はHであってもよく； $R_3$ および $R_4$ は、 $R_3$ または $R_4$ がHではないということを除いて、 $R_1$ および $R_2$ と同様に定義され； $R_5$ は不在であるか、H、または $R_1$ および $R_2$ の定義と同じアルキル基であり； $R_5$ から $R_{10}$ はそれぞれ独立して、または組合わさって不在であるか、H、または $R_1$ および $R_2$ について定義されるアルキル基であって、また、任意でさらに、これらに化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、ポリサッカライド、または、他の生物活性を有するもしくは医薬用の薬剤を含み； $G$ は不在であるか、O、N、SまたはSeであり； $Z$ はO、N、S、SeまたはCであり； $A$ はO、N、S、SeまたはCであり； $n$ は1～6であり； $m$ は2～10であり；および $Y$ は薬学的に許容されるアニオンである。]

本発明は、 $G$ がNであり、 $Z$ がOであり、かつ $A$ がCである式1の化合物、または、 $G$ がOであり、 $Z$ がOであり、かつ $A$ がCである式1の化合物、または、 $G$ 、 $Z$ および $A$ がCである化合物を含まない。

この構造の好ましい実施態様において、 $n = 1 \sim 2$ である。別の好ましい実施態様においては、 $m = 2 \sim 4$ である。更に好ましい実施態様においては、 $k = 0 \sim 4$ である。好まし

くは、R 3 - 1 0、アルキルの場合は、C 1 0 - 1 5である。

好ましい実施態様において、本発明のチトフェクチンは、以下の式を有する。



10

## (式2)

[ 式中において、R 1、R 2、R 3、およびR 4はそれぞれ独立して、0～6個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有するC<sub>1-23</sub>アルキル、アシル、アルキレンまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であって、0～5個のヘテロ原子を含み、前記置換基は、-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-CH<sub>3</sub>、-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-CH<sub>3</sub>、X-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>- (式中においてXはハライド)、および-N((CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>から選択され (式中においてアルキル基は0～2個のヘテロ原子を含む) ; nは1～6で

20

あり ; mは2～10であり ; また、R 5は式2の種を定義する官能基を有する化学構造である。]

R 5は、好ましくはこれもまたヘテロ原子を含有するアルキルリンカ-を介してアンモニウム窒素と結合している。

本発明のカチオン脂質は、生理学的に許容される非毒性アニオン、Yを伴う。製薬に一般に使用されるアニオンは、B e r g eらによって開示されている (J.Pharm.Sci.66:1-19, 1977)。

30

好ましい実施態様において、nは1であり、かつmは2～4であって、本発明の好ましいチトフェクチン種は、したがってキーとなる以下の中間体、式1-3中に示されるR I骨格を有する。本発明の他のチトフェクチン種は、R Iを基にするグループと相同であり、

これらのチトフェクチンは同じ一般式1を有するが、しかし、nは3～6であり、mは2～10である。

本発明のチトフェクチンは、下記A～Eを含むモジュラーアレンジメント中の機能性パーツのアセンブリと見なすことができる。

A . 脂肪族鎖の間でなくその中にサイクリック構造を含有することのできる脂肪族鎖であり得る、疎水性構造

40

B . ジアルコキシ、ジアシルオキシ、およびアルキル基で置換された第4 N原子を含み、式1中において上および下に付加された基を含む環の一部でもあり得る、分子の最も特徴的な部分

C . 通常は脂肪族鎖であるが、ひとつまたは複数のヘテロ原子を含有してもよい、スペーサー、(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>

D . しばしば、通常は酸素と二重結合した中央炭素原子を有する3つの原子のバックボーンであるリンカー基 (リンカー基は、カルボキシ、カルバミル、ウレイル、またはグアニジルであり、以下で考察されるように、共通のキーとなる合成中間体を有する場合もある。本発明の分子において、この基がシンメトリカルでない場合は、その左右を反転することができる。)

E . アミノ酸、ペプチド、たんぱく質、炭水化物、核酸、薬剤、リガンド、または細胞成分と反応して所望の反応を引き起こすことのできる全ての他の分子種を含む、分子の " カーゴ " 部分 (これらの分子は、両機能性スペーサーにより分子のリンカー基に結合することができる。)

50

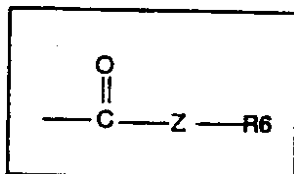
上記のクラスの化合物は、多様な化学的部分、特に生理学的に活性と考えられるものを有する基本的なジオキシプロパニミニウム骨格の有効な誘導体を与えるように設計された。このクラスの各チトフェクチンは、本明細書に開示される合成方法を使用した多様な化学的な機能性の一般的な導入の模範例として作成された。"リンカー"として本明細書に記載されるユニークな官能基もまた、本発明のチトフェクチンの有効性および/または特異性という特性を増大させるものである。

それぞれ尿素およびチオ尿素中に導入された特定の生物活性ペプチドおよびサッカライドは、レセプターの介在するプロセスによる標的の選択またはインターナリゼーションの増大を可能とするであろう。尿素グループの導入は、チトフェクチンとDNAのリン酸バックボーンとの相互作用を増大し、これによりトランスフェクションをより有効にするであろう。開示された方法を一般化する能力により、より簡単に、チトフェクチン基本骨格に当業者に既知である多様な生物活性分子で機能を付与できるようになる。

本発明のチトフェクチンの種は、以下のように、一般式 1 における特徴的な R 5 置換に基づいて分類される。

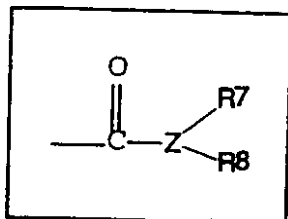
#### 1. カルボキシチトフェクチン

本発明のカチオン脂質の種類の一つは、式 1 のアンモニウム基上の置換リンカー基中にカルボキシ基があることを特徴とする。このクラスの化合物は、式 1 の一般構造を有するが、カルボキシ種 R 5 は、下記構造を有するものである。

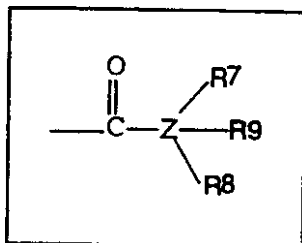


[ 式中において、Z は O、N、S、Se、C または H であり、R 6 は R 1、R 2、R 3 または R 4 について定義される基である。 ]

Z が N の場合、R 5 は下記構造を有し、



また Z が C の場合、R 5 は下記構造を有する。



[ 式中、R 7、R 8 および R 9 は、それぞれ独立して、H であるか、または R 1、R 2、R 3 および R 4 について定義される基より選択される。 ]

この種の全ての化合物において、R 6、R 7、R 8、および R 9 は、任意でさらに、化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、ポリサッカライド、または、他の生物活性を有するもしくは医療用の薬剤を含む。

#### 2. カルバミルチトフェクチン

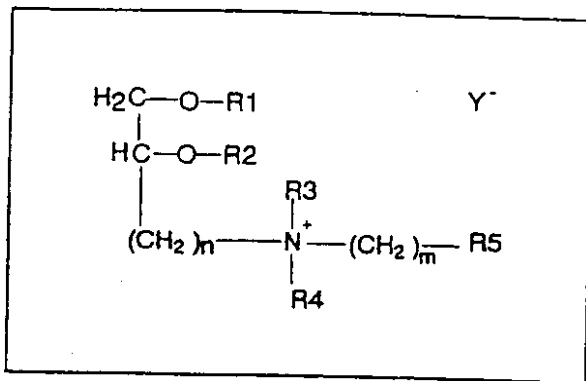
本発明の別の種のカチオン脂質は、式 1 のアンモニウム基上の置換基のひとつにカルバミル基があることを特徴とし、このクラスの化合物は、下記一般構造を有する。

10

20

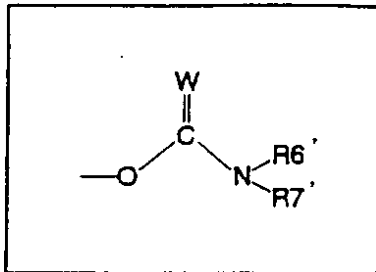
30

40



10

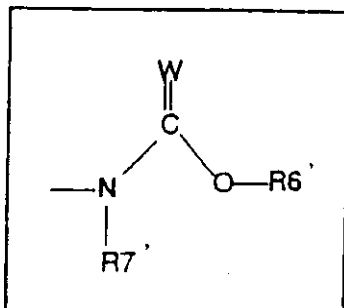
[ 式中において、R 5 は下記構造を有する：



( 式中、WはO、N、NH、S、Se、C、CH、CR1またはCR1R2であり、R 6 ' および R 7 ' は上記に定義される通りである )。]

20

本発明のカルボニルカチオン脂質には、また、R 5 が下記構造を有するイソメリックなカルバミル構造を有するものが含まれる。



30

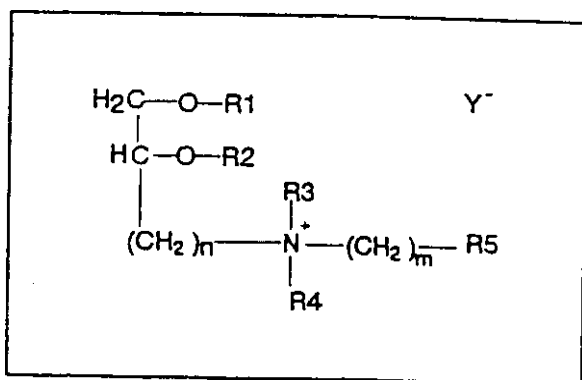
[ 式中Wは、上記に定義される通りであり、R 6 ' はカルボキシ種について定義される通りであり、また、R 7 ' は不在であるか、またはHもしくはカルボキシ種について定義されるようなアルキル基である。]

カルバメイトチトフェクチンの好ましい実施態様には、アルキルリンカー (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> ( 式中において、mは2～4である )、を介して脂質と結合したメチルカルバメイト基を含む。カルバメイト構造により、末端基におけるアミン - アルコールリガンドカップリングが容易に起こる。

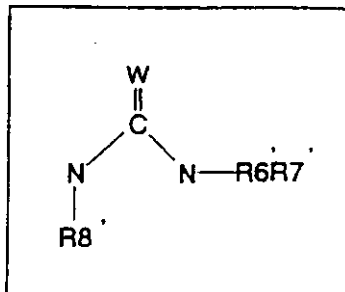
### 3. 尿素様の結合基を有するチトフェクチン

本発明の別のカチオン脂質は、式1のアンモニウム基上の置換基中に尿素様の基があることを特徴とし、このクラスの化合物は下記一般構造を有する。

40



[ 式中において、R 5 は下記構造を有する：



( 式中、WはO、N、NH、S、Se、C、CR1またはCR1R2であり；R 6 ' および R 7 ' はそれぞれ独立して、上記のカルボキシ種について定義される通りであり；R 8 ' は不在であるか、またはHもしくは式1について上記で定義されるようなアルキル基R 1、R 2、R 3、またはR 4であり；また、R 6 '、R 7 ' およびR 8 ' がHでない場合、これらは任意でさらに、化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、ポリサッカライド、または、他の生物活性を有するもしくは医薬用の薬剤を含む)。]

#### ( a ) ウレイルチトフェクチン

このクラスの本発明のカチオン脂質の一種は、このように式1の一般構造を有し、式1のアンモニウム窒素上の置換基中にウレイル基があることを特徴とする。この種においては、R 5 は上記で定義され、その構造式中のWが酸素であるような構造を有する。

#### ( b ) グアニジルチトフェクチン

このクラスによる本発明の別の種のカチオン脂質は、式1のアンモニウム窒素上の置換基中にグアニジル基があることを特徴とし、R 5 が上記で定義され、その構造式中のWがNまたはNHであるような構造を有する式1の一般構造を有する。

#### ( c ) チオ尿素およびセレノウレアチトフェクチン

本発明のカチオン脂質には、また、R 5 が上記で定義され、その構造式中のWがSまたはSeであるような構造を有する式1の一般構造を有する化合物を含む。

#### ( d ) 他の尿素関連チトフェクチン

本発明のカチオン脂質には、また、R 5 が上記で定義される通りで、その構造式中、WがC、CH、CR1、またはCR1R2であり(R 1 およびR 2 は式1について定義される通りである)、R 6、R 7 およびR 8 がR 1、R 2、R 3 およびR 4 について定義されるグループより選択されるところの、式1の一般構造を有する化合物が含まれる。

尿素/チオ尿素合成は、アミン-アミンリガンドカップリングを容易に形成させ、サッカライドおよびアミノ酸の誘導体を調製する手段を提供するものである。チオ尿素結合を通じて調製することのできる好ましいサッカライド誘導体には、グルコース、ガラクトース、ラクトース、およびアラビノース種が含まれる。

#### 4 . N<sup>+</sup>ヘテロエチレン置換チトフェクチン

本発明はまた、カチオン脂質のR I 種に特徴的な - ヒドロキシエチレン置換を含むプロパミニウムグループの第四アンモニウム上のヘテロエチレン置換、およびWheelerらによって、Biochem. Biophys. Acta ( 刊行物 ) に開示されたアミン誘導体を含むカチオン脂質

10

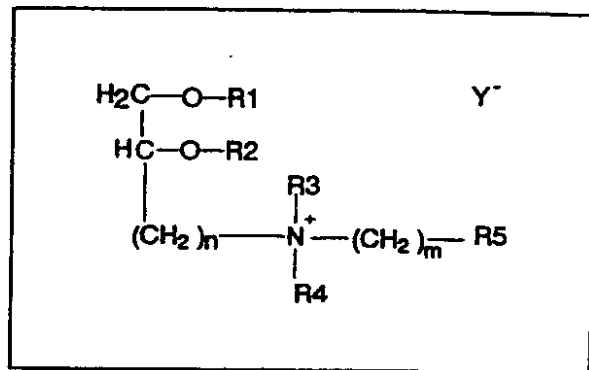
20

30

40

50

の別の主要な種を含む。このグループの化合物は、下記一般構造を有する。



10

[ 式中において、R 1 および R 2 はそれぞれ独立して、H、0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する C<sub>1-23</sub> アルキル、アシル、アルキレンまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、前記基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、また、前記置換基は、- O - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、- S - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、X - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - (式中において、X はハライドである)、および - N((CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> から選択され (但し、前記置換基のアルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である) ; n は 1 ~ 6 であり ; および m は 2 ~ 10 である。

R 3 および R 4 は、それぞれ独立して、0 ~ 6 個の不飽和部位を有する直鎖または分岐、非置換または置換基を有する C<sub>1-23</sub> アルキル、アルキレンまたはヘテロアルキル基、サイクリックおよびアリール基であり、該基は 0 ~ 5 のヘテロ原子を含み、また、前記置換基は、- O - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、- S - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>、X - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - (式中において、X はハライドである)、および - N((CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> から選択され (但し、該置換基のアルキル基は 0 ~ 2 のヘテロ原子を含み、k は 0 ~ 4 である) ;

20

式中、R 5 は H であるか、または - O - R 6 - R 7 もしくは、- NH - R 6 - R 7 であり、式中において R 6、R 7 をともなう R 6 は、R 1、R 2、R 3 および R 4 について定義される基から選択され、また、任意でさらに、化学的に結合したアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、ポリサッカライド、または、他の生物活性を有するもしくは医薬用の薬剤を含み ;

30

さらに、Y は薬学的に許容されるアニオンである。]

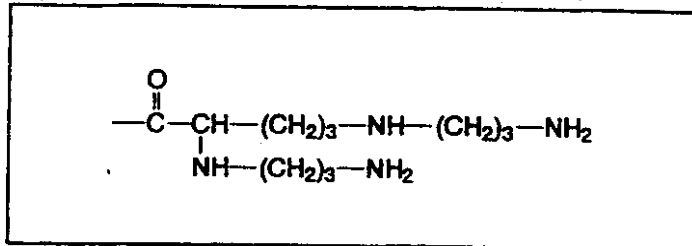
本発明は、上記の一般構造にあたる当業において既知である化合物を包含しない。例えば、本発明は、R 5 が - O - R 6 - R 7 であり、R 1 が H であるか、または C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub> アルキルもしくはアルケニルであり、また R 2 が C<sub>1</sub> から C<sub>24</sub> アルキルもしくはアルケニルであり、さらに R 3 および R 4 は同じまたは異なりかつ C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub> アルキルまたは H であって、R 6 が不在であるか、- C(O) - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - NH、アルキル、アリールもしくはアラルキルであるジアミノカルボキシレートエステル基、またはジアミノカルボキシレートエステル基に結合した - C(O) - (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> - NH (但し、p は 1 ~ 18 である) であり、かつ R 7 が H、スペルミン、スペルミジン、ヒストン、DNA 結合特異性を有するたんぱく質、または、R 7 部分のアミン基が H もしくは C<sub>1</sub> から C<sub>24</sub> の直鎖または分岐アルキル鎖で第四化合物化されている先述の基である化合物、または側鎖にプラスに帯電した基を有する L - または D - アルファアミノ酸であって、該アミノ酸がアルギニン、ヒスチジン、リジンもしくはオルニチンまたはこれらのアナログを含むか、または R 7 部分のアミンが H または C<sub>1</sub> から C<sub>24</sub> の直鎖もしくは分岐アルキル鎖によって第四化合物化されている L - または D - アルファアミノ酸、または L - または D - アルファアミノ酸からなるグループから選択されるポリペプチドで、アミノ酸残基の少なくともひとつがアルギニン、ヒスチジン、リジンまたはオルニチンもしくはこれらのアナログを含むポリペプチド、を含有しない。

40

本発明に含まれないさらなる化合物は、n が 1 であり、かつ m が 2 ~ 6 であり、さらに R 1 および R 2 が別々にまたは共に C<sub>1</sub> - C<sub>23</sub> アルキルまたは C(O) - C<sub>1</sub> - C<sub>23</sub> であり、

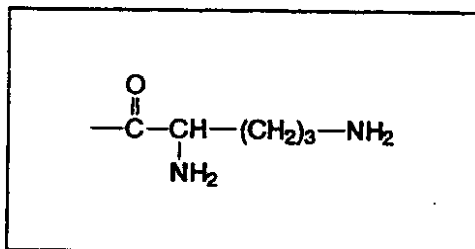
50

また R 3 および R 4 が別々にまたは共に H または側鎖のないアルキル C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> であり、および R 5 が NH - R 6 - R 7 であって、さらに R 6 - R 7 が、- (CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub> NH<sub>2</sub> (式中 z は 2 ~ 6)、または - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> - NH - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - NH<sub>2</sub>、または - NH - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> - NH - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - NH - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> - NH<sub>2</sub>、C (O) - フルオレセイン、または

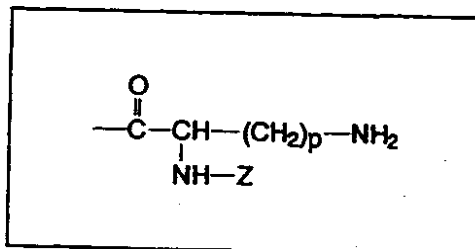


10

または



または



20

(式中、p は 2 ~ 5 であり、Z は H またはアミドまたはアルキルアミノ基によって結合する他の基である) である化合物である。

好ましい実施態様において、R I 脂質部分は、アルキルリンカーを介してアミノ酸またはポリペプチドに結合している。代替的に、チトフェクチンは両機能性リンカー、例えばヒドロキシサクシニル - D O R I E - プロピルアミドを含んでもよい。

30

チトフェクチンの生物活性を有するヘッドグループ

#### (a) 標的種

本発明によるチトフェクチンは、末端基として生物学的な細胞標的活性を有する分子種を含む。このクラスに属するのは、細胞レセプター特異的分子を含むチトフェクチンである。レセプター特異的ペプチドまたはアミノ酸は、典型的には、D M R I E - O X および A P - D M R I E を介するアミドとして結合する。このタイプの好ましい種の例は、走化性ペプチドを含む、D M R I E カルボキシレート (メチオニン - ロイシン - フェニルアラニンメチルエステル) アミド (D O x - M e t - L e u - P h e - O M e)、および p G l u - P r o - H i s - - D M R I E である。本発明のチトフェクチンに結合する他の細胞表面レセプターへのリガンドは、ペプチド様アナログ、多くのウイルスアタッチメントおよびインターナリゼーションペプチド、ラクトースおよび他のジサッカライドおよびポリサッカライド、アセチルコリンアナログ、および葉酸誘導体を含む。

40

#### (b) 治療薬

本発明によるチトフェクチンは、末端基として、生物活性分子種を含むことができる。このタイプの好ましい種の例は、チトロピン放出ホルモンを含む、p グルタメイト - ヒスチジン - プロリン - - D M R I E アミドである。

#### (c) 細胞および細胞内標的

本発明によるチトフェクチンは、細胞膜または細胞内標的に特異的に結合して所望の生理

50



学的反応を与えるリガンドを有する末端基を含むことができる。適当なリガンドには、ウイルスエпитープであるペプチド、ホルモン、酵素基質、モノサッカライド、ジサッカライド、オリゴサッカライド、炭水化物、補助因子、薬剤、レクチン、オリゴヌクレオチド、および核酸を含む。これらのグループのうち、好ましい種は、クロロキンおよび他の向リソソーム剤、核局在性ペプチド、コルチコステロイドおよびウイルスペプチドまたはたんぱく質を含むチトフェクチンである。

#### トランスフェクション効率に影響を与える基

本発明のチトフェクチンは、そのトランスフェクション効率に影響を与える基に結合することができる。このような基は、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、モノサッカライド、ジサッカライド、ポリリッカライドである。さらに、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、または、たんぱく質は、生物中には一般に見られない通常にはないまたは修飾されたアミノ酸を含んでもよい。このような通常にはないまたは修飾されたアミノ酸には、これに限定されないが、37C.F.R. § 1.822に掲載される修飾された通常にないアミノ酸が含まれる。さらに、このようなアミノ酸は、天然には見られない合成アミノ酸であってもよい。

#### トランスフェクション効率

DMRIE系化合物における各クラスの代表的な化合物およびそのDMRIE相対のチトフェクチン活性の測定値を表1に一覧する。表1は、明らかに、本発明の結合基のいくつかを有するDMRIE誘導体が有効なレベルのトランスフェクションを与えることを示している。

10

20

## I : チトフェクチンヘッドグループの変更と活性の概要

官能基	アルキル結合	名称	活性		
			C o s 7	C 2 C 1 2	
メチル尿素	エチル (C 2)	B M U	≥	≤	10
	プロピル (C 3)	G M U	≥	≈	
	ブチル (C 4)	D M U	>	≥	
メチルカルバメート	エチル (C 2)	β M C	≈	≈	
	プロピル (C 3)	γ M C	≈	≈	
	ブチル (C 4)	δ M C	≈	≈	
糖-チオ尿素					
グルコース	プロピル (C 3)	Glc-TU-DMRIE	≥	≤	20
アラビノース	プロピル (C 3)	Ara-TU-DMRIE	≈	<	
ガラクトース	プロピル (C 3)	Gal-TU-DMRIE	≥	≈	
ラクトース	プロピル (C 3)	Lac-TU-DMRIE	検出せず	検出せず	
単一アミノ酸					
セリン	ブチル (C 4)	δ-ser-DMRIE	≈	≈	30
メチオニン	メチレン (C 1)	DOx-Met-OMe	<	<	
ペプチド					
Met-Leu-Phe	メチレン (C 1)	DOX-MLF-OMe	≈	<	
pGlu-His-Pro	プロピル (C 3)	TRH-γ-DMRIE	≈	<	

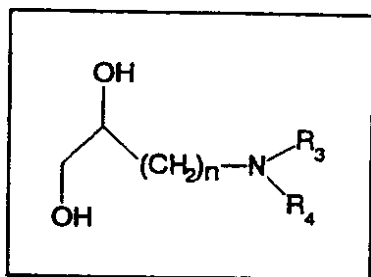
## 反応スキームおよび作成方法

## A . チトフェクチンの合成

本発明の化合物は、いずれかの適当なプロセスにより作製することができる。便宜上、スキーム I I のキー中間体からの本発明のチトフェクチンの合成を可能とするために、これらの誘導体を合成する一般的な方法をダイアグラムを使用して特定の例について提示する。様々なカルボキシチトフェクチン、カルバミルチトフェクチン種および尿素様の官能基を有するチトフェクチンを、スキーム I I I、I V、および V にそれぞれ概略される合成方法により作製することができる。

本発明のチトフェクチンは、下記一般式を有するキー中間体の相同体より適宜作製される。

。



### 化合物 I - 1

$n$  が 1 および  $m$  が 2 である場合の好ましいチトフェクチンは、式中において  $n$  が 1 であるようなスキーム I の化合物 I - 3 から作製される。化合物 I - 3 は、I - 1 からジアルキルアミノプロパンジオールのヒドロキシルをアルキル化して I - 2 を作製し、次いで示されるように  $N$  を  $R$  - 置換エチル基でアルキル化することにより作製される。

スキーム II は、 $n = 1 \sim 6$  である種についてのスキーム I の出発化合物を合成する一般的な方法を説明するものである。例えば、ヒドロキシ - オレフィン II - 3 またはプロモ - オレフィン II - 4 などのような合成経路に沿った様々な化合物が市販されている。 $n = 5$  であるチトフェクチン種のみが、酸 II - 1 より出発する必要がある。 $n$  が 1 および  $m$  が 2 である場合の好ましい種を作製するための、最終ジメチルアミノプロパンジオールが市販されている (Cat. No. 21, 021-8、アルドリッチケミカル社、セントルイス、ミズーリー州)。

本発明のチトフェクチンは、反応性の官能基を有する様々な既知の分子をキー中間体の骨格構造に適切な順番で付加することによって作製される。様々な既知の化合物、例えば、置換アルキルアミン、糖、尿素、チオ尿素、アミノ酸、およびペプチドが市販され入手可能である。様々な官能基をキー中間体にカップリングする方法は、当業者によく知られており、例えば学術論文集、Reagents for Organic Synthesis Vol.1-16, John Wiley & Sons, New York, NY などの文献において詳細に記載されている。

### 合成トランスフォーメーションの概要

本出願中において特許請求の範囲にあるタイプのチトフェクチンは、従来の合成化学を使用して作製することもできる。本明細書に開示されるチトフェクチンの全てについての合成方法は、本質的に同一であるが、出発材料として異なるアミノ - アルコールを使用する。骨格は、スキーム I に説明されるように、ジヒドロキシ - ジアルキルアミン化合物を作製することにより形成される。導入したい特定の置換基によって決まる試薬および条件を使用して、ヒドロキシル官能基を疎水性アルキル鎖に結合する。例えば、単純な  $n$  - アルキル鎖には、塩基性触媒を使用して必要なアルキルメタンスルホネートをアルコールとカップリングすることにより、適切に導入することができる。第三アミンを、次いで、官能基を有する、適切に保護されたアルキル化剤で処理して、窒素を第四化合物化する。第四窒素を介して付加された特異的な官能基は、次いで、スキーム III、IV、および V に示されるように、カルボキシ - チトフェクチン、カルバミル - チトフェクチン、および尿素 - チトフェクチンと呼ばれる様々な機能クラスへと変換される。米国特許第 5,334,761 号に開示されるような一般的な合成方法を、本発明において、有効に使用することができる。

スキーム III に従ってカルボキシチトフェクチンを作製するために、第四窒素 (III - 1) に結合した一級アルコール部分を酸化して相当するカルボン酸にする (III - 2)。多くの試薬が、このトランスフォーメーションを起こすが、我々は標準的に、修飾されたクロミニウムトリオキシド酸化を使用する。チトフェクチンカルボキシレートは、様々なアルコール、チオール、およびアミンとカップリングして相当するエステル、チオエステル、およびアミドをそれぞれ与えることができるという点において典型的である。このようにして、適当な求核性を有するいかなる材料も、「塩基性」のカルボキシチトフェクチン骨格に結合して、III - 3 および III - 4 のような化合物を生成することがで

きる。例えば、DMRIEカルボキシレートプロピルアミドは、プロピルアミンとDMRIEカルボキシレートとのDCC-触媒カップリングにより製造した。相当するアミノ酸およびペプチド誘導体が、同様の技術を使用して作製され、このタイプの合成経路および生物学的に活性な部分の導入における応用についてのさらに特定の説明を提供する。

カルバミルチトフェクチンを作製する場合、二種類の「適応」が可能で、双方の適応の合成経路をスキームIVにおいて説明する。第四窒素に結合したアルコール部分(IVA-1)は、適当なイソシアネートによる処理など、幾つかの方法により、相当するカルバメイト(IVA-2)に変換することができる。第四窒素に結合するアミン置換基(IVB-1)もまた、典型的に異なる試薬の使用が必要であるが、類似の方法により、相当するカルバメイト(IVB-2)に変換することができる。例えば、DMRIEのメチルカルバメートの作製では、親チトフェクチンアルコールとメチルイソシアネートのカップリングを使用した。

尿素チトフェクチン(V-2)は、第一または第二アミン官能基(amine function)を有するチトフェクチン(V-1)からスキームVによって作製できる。これは、数種類の方法により行うことができる。例えば、様々なイソシアネートを使用する一段階の変換および、ホスゲンによる第一処理とこれに続くアミンとのカップリングからなる二段階の変換の双方を我々は使用している。あらゆる与えられた化合物についての好ましい方法は、出発チトフェクチン内、およびアミン置換基上の官能基によって決まる。例えば、-アミノプロピルDMRIEをメチルイソシアネートで処理して、一段階で相当するメチル尿素を得ることができる。また、-アミノプロピルDMRIEアルギニンメチルエステル尿素を作製するために、二段階の変換法を使用した。

これらの一般化された方法に従って作製、およびそのトランスフェクション活性が検査されたものに、以下のチトフェクチンがある。

#### 1. RIチトフェクチン

セリン - - DMRIEアミド

アスパルテート - - DMRIEアミド

pグルタメート - ヒスチジン - プロリン - - DMRIEアミド

(チロトロピン放出ホルモン誘導体)

ヒドロキシサクシニル - DORIEプロピルアミド

#### 2. カルボキシチトフェクチン

DORIEカルボキシレート(C18:1アルケニル側鎖)

DMRIEカルボキシレート(C14アルキル側鎖)

DMRIEカルボキシレートプロピルアミド

DMRIEカルボキシレート(メチオニン - メチルエステル)アミド

DMRIEカルボキシレート(メチオニン - ロイシン - メチルエステル)アミド

DMRIEカルボキシレート(メチオニン - ロイシン - フェニルアラニンメチルエステル)アミド〔走化性ペプチド誘導体〕

#### 3. カルバミルチトフェクチン

DMRIEメチルカルバメート

ヒドロキシプロピルDMRIEメチルカルバメート

ヒドロキシブチルDMRIEメチルカルバメート

#### 4. 尿素様チトフェクチン

尿素

- アミノエチル - DMRIE、メチル尿素

- アミノプロピル - DMRIE、メチル尿素

- アミノブチル - DMRIE、メチル尿素

- アミノプロピル - DMRIE、アルギニン - メチルエステル尿素

- アミノプロピル - DMRIE、リジンメチルエステル尿素

- アミノプロピル - DMRIE、リジン内部塩尿素

チオ尿素

- アミノプロピル - D M R I E、      - グルコシルチオ尿素
- アミノプロピル - D M R I E、      - ガラクトシルチオ尿素
- アミノプロピル - D M R I E、      - アラボニシルチオ尿素
- アミノプロピル - D M R I E、      - ラクトシルチオ尿素

D M R I E -      - チオ尿素

上記の方法は、適当な時間内にスクリーニング用の多数のチトフェクチンを作製するのに使用される。スクリーニングを組み合わせる行う合成は、特定の適用に最も有効なチトフェクチンを効率よく選択するために使用することができる。

複数の官能基を有する分子の場合、特定のカップリング反応の対象ではないこれらのひとつまたは複数の基をブロックまたはマスキングする必要があることは、当業者において一般に知られている。

10

#### 製剤

本発明の化合物は、インビトロおよびインビボの双方において、哺乳類細胞にトランスフェクションするために、製剤中において使用することができる。トランスフェクションのための製剤は、当業者においては既知で、その製造法と一緒に、例えば、F e l g n e r の米国特許第 5 , 2 6 4 , 6 1 8 号、G e b e y e h u 他 の米国特許第 5 , 3 3 4 , 7 6 1 号および F e l g n e r 他 ( J . B i o l . C h e m . 2 6 9 : 2 5 5 0 - 2 5 6 1 , 1 9 9 4 ) において開示されている。本発明のカチオン脂質は、ホスホリピッドなどの両親和性脂質やリポソーム、単ラメラ胞、ミセル、または単純フィルムなどである脂質小胞を形成するコレステロールなどの中性脂質と組み合わせることができる。

20

本発明のカチオン脂質は、N a b l e らにより報告された臨床試験 ( Human Gene Therapy 3:399-410, 1992 ) に開示されるように、特に遺伝子療法において有用である。カチオン脂質の使用は、ポリヌクレオチド、マクロ分子、および小分子の血管細胞、全身循環、肺上皮細胞、脳組織およびカエルの胚 ( Xenopus ) への侵入を容易にする上で有用であることが知られている。

本発明のチトフェクチンはまた、インビトロにおける細胞のトランスフェクションにおいて有用であることも、特記される。本発明の範囲にある様々な化合物は、ある程度、インビボにおいて組織特異性を有するが、その大半または全てが、インビトロにおける培養細胞のトランスフェクションに有用である。本発明のチトフェクチンの全ての特定の候補に対して、そのインビトロおよびインビボの様々な組織における相対的トランスフェクション効率は、実施例 8 - 1 2 に開示されるようなスクリーニングアッセイを使用して容易に確認することができる。

30

#### 実験方法

下記の化学反応は、本発明のカチオン脂質の作製のための一般的使用という面において開示されている。時として、反応が開示された範囲内の各分子種に対して、記載されるように適用できない場合もある。このことが起こる化合物は、当業者によって簡単に認識されるであろう。このようなすべてのケースにおいて、当業者の知る従来の修飾、すなわち従来の代替的な試薬への変更、または反応条件のルーチン修飾、によりどの反応も適宜行われる。または、本明細書に記載または従来の他の反応も、本発明の化合物の作製に応用される。全ての製造方法において、全ての出発材料は、既知であるか、または既知の出発材料より容易に作製される。

40

本発明は、以下の実施例を使用することにより以下に詳細に説明されるが、開示される方法は、本発明の請求の範囲により網羅されるすべてのカチオン脂質の作製に使用でき、実施例に限定されるものではない。実施例中において示される全ての温度は摂氏で、補正されていない。

#### 実施例 1

##### カルボキシチトフェクチン : D M R I E - O x の作製

D M R I E B r ( 1 . 1 4 g ) を 1 8 ミリリットルのジメチルホルムアミドに、緩やかに攪拌しながら溶解し、2 . 7 1 g のピリジニウムジクロメートを添加し、反応容器をアルゴンで完全にパージし、しっかりと栓をする。1 8 時間後、溶媒を減圧で除去する。残

50

査をエチルエーテルおよび 0.2 N 水酸化ナトリウム間で分配する。有機層を回収し、水層を繰り返しエーテルで抽出する。合わせた有機層を  $MgSO_4$  で乾燥し、その後濾過して蒸発させ、粗精製物を得る。 $CHCl_3$ ;  $MeOH$ :  $NH_4OH$ :  $H_2O$  (90:10:0.25:0.25) を使用したシリカゲルでのクロマトグラフィーにより、精製物を得る。

実施例 1 A: DPRIE カルボキシレート、および実施例 1 B: DORIE カルボキシレートは、実施例 1 に記載される方法に従って、それぞれ DPRIE Br および DORIE Br を DMRIE Br の代わりに出発物質として用いて、作製された。

#### 実施例 2

カルボキシチトフェクチンエステル: DMRIE - Ox エチルエステルの作製

10

実施例 1 のカルボキシチトフェクチン生成物、DMRIE - Ox (300 mg) を 7 ミリリットルのクロロホルムに溶解して、3 ミリリットルの 1 N HCl で洗浄した。有機相を  $MgSO_4$  で乾燥し、反応容器中に濾過して入れた。無水エタノール (100 マイクロリットル) およびジクロロヘキシルカルボジイミド (ジクロロメタン中の 0.5 M 溶液を 1.3 ミリリットル) を添加し、フラスコに栓をして、室温で一晩攪拌した。反応液を媒体ガラスフットで濾過して、固体の副生成物を全て除去し、その後蒸発を行った。蒸発残渣の、 $CHCl_3$ :  $MeOH$ :  $NH_4OH$ :  $H_2O$  (90:10:0.25:0.25) とシリカゲルを使用したクロマトグラフィーにより、精製物を得た。

#### 実施例 3

カルボキシチトフェクチンアミド: DMRIE - Ox プロピルアミドの作製

20

DMRIE - Ox (300 mg) を 7 ミリリットルのクロロホルムに溶解して、3 ミリリットルの 1 N HCl で洗浄した。有機相を  $MgSO_4$  で乾燥し、反応容器中に濾過して入れた。溶液は、氷水浴中におかれ、N - ヒドロサクシンイド (82 mg)、ついで、ジクロロヘキシルカルボジイミド (ジクロロメタン中の 0.5 M 溶液を 1.3 ミリリットル) を添加し、8 時間温めながら攪拌して反応させた。この時点で、プロピルアミン (40 mg) をニート液 (neat liquid) として添加し、室温で一晩反応させた。反応液を、濾過し、その後蒸発を行った。濾過残渣の  $CHCl_3$ :  $MeOH$ :  $NH_4OH$ :  $H_2O$  (90:10:0.25:0.25) とシリカゲルを使用したクロマトグラフィーにより、精製産物を得た。

実施例 3 A: DMRIE カルボキシレート (メチオニン - メチルエステル) アミド、実施例 3 B: DMRIE カルボキシレート (メチオニン - ロイシン - メチルエステル) アミド、および実施例 3 C: DMRIE カルボキシレート (メチオニン - ロイシン - フェニルアラニン - メチルエステル) アミドを、実施例 3 のプロトコール中のプロピルアミンに相当するアミンを置き換えることにより、同様の方法により作製した。

30

#### 実施例 4

チトフェクチン尿素: DMRIE - - メチル尿素の作製

AE - DMRIE (1 g) を攪拌しながら、20 ミリリットルの無水のクロロホルム中に溶解し、メチルイソシアネート (100 mg) をニート液として添加した。反応液は、一晩攪拌され、その後溶媒および過剰のイソシアネートを蒸発により除去した。残渣を、 $CHCl_3$ :  $MeOH$ :  $NH_4OH$ :  $H_2O$  とシリカゲルを使用してクロマトグラフ処理して、精製物を得た。

40

実施例 4 A: - アミノプロピル - DMRIE, メチル尿素、および実施例 4 B: - アミノブチル - DMRIE, メチル尿素を、それぞれ出発物質を - アミノプロピル - DMRIE および - アミノブチル - DMRIE と置き換えて同様に作製した。

#### 実施例 5

チトフェクチンカルバメート: DMRIE - - メチルカルバメートの作製

DMRIE (1 mg) を、15 ミリリットルの無水クロロホルムに攪拌して溶解し、次いで、トリエチルアミン (1.3 ミリリットル) を加えた。メチルイソシアネート (100 mg) を次いでニート液として加え、反応溶液を一晩攪拌した。反応は、20 ミリリットルのクロロホルムおよび 20 ミリリットルの 0.2 N HCl を順番に加えることにより

50

終了させた。二相の混合物を約 1 時間攪拌し、その後、分液ロートに移して有機相を回収した。溶液は、硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過、濃縮を行い、次いで高真空で処理され、泡として粗精製物を得た。この物質を  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{NH}_4\text{OH} : \text{H}_2\text{O} (90 : 10 : 0.25 : 0.25)$  を使用して溶出を行うシリカゲルによるクロマトグラフで処理して、精製物を得た。

実施例 5 A : ヒドロキシプロピル D M R I E メチルカルバメートおよび実施例 5 B : ヒドロキシブチル D M R I E メチルカルバメートを、替わりの出発材料としてそれぞれヒドロキシプロピル D M R I E とヒドロキシブチル D M R I E を用いて同様の方法により作製した。

#### 実施例 6

##### 尿素様アミノ酸についての一般スキーム

##### D M R I E - U - A r g ( N O <sub>2</sub> ) - O M e の作製 :

マグネティックスターラーを入れた乾いた反応容器をアルゴン雰囲気下に維持し、ついで 12 ミリリットルの無水クロロホルムおよび 3.2 ミリリットルのホスゲンの 1.93 M トルエン溶液を入れる。攪拌しながらフラスコを氷/水浴で冷し、そこに 12 ミリリットルの無水クロロホルム中に 1.40 g の A P D M R I E および 1.2 ミリリットルのトリエチルアミンを含む溶液を約 5 分かけて滴下する。反応液は、氷/水温度で 1 時間攪拌され、次いで冷浴を取り除き、2.5 時間にわたり室温で反応させる。この時点で、温水浴を使用して反応液を緩やかに温める一方、乾燥アルゴン流で約 1 時間処理して、過剰の試薬および溶媒を蒸発させて除去した。残査は、20 ミリリットルのクロロホルム中に再度溶解され、これに 7 ミリリットルのジメチルホルムアミドと 10 ミリリットルのクロロホルム中に 1.20 g の H - A r g ( N O <sub>2</sub> ) - O M e - H C l と 0.6 ミリリットルのトリエチルアミンを含有する溶液を、5 分間かけて室温で攪拌しながら滴下添加し、さらにアルゴン雰囲気下において一晚、攪拌して反応させた。溶媒を蒸発により除去し、次いでクロロホルム : メタノール : アンモニア水溶媒系を使用したシリカゲルでのクロマトグラフィーにより、適当な N M R 、 I R 、 U V および解析力の高いマススペクトルにより検証された、1.47 g の T L C で均一な生成物が得られた。

実施例 6 A : - アミノプロピル - D M R I E , リジンメチルエステル尿素、および実施

例 6 B : - アミノプロピル - D M R I E , リジン内部塩尿素が、替わりの出発材料として、それぞれ D M R I E - U - L y s ( N O <sub>2</sub> ) - O M e および D M R I E - U - L y s ( N O <sub>2</sub> ) を用いて同様に作製された。

#### 実施例 7

##### 肺内トランスフェクションアッセイ

成熟 (4 ~ 16 週) メス B A L B / c マウスをメトフェンで浅く麻酔し、100 マイクロリットル U S P 生理食塩水または水中の 132  $\mu\text{g}$  クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T) D N A ± カチオン脂質を、小さなプラスチック製のカテーテルのついたディスポーザブルの滅菌プラスチック製インシュリンシリンジを使用して、経鼻的に送達した。全ての液体およびシリンジは、室温に平衡化し、1回 100 マイクロリットルの容積の D N A の送達が、1 分未満に必要である。送達から 2 ~ 3 日後、マウスはペントバルビツール酸ナトリウムの過剰投与により屠殺され、肺を以下の通りに摘出した。

肺は、即座に冷凍して - 78 °C で保存した。冷凍した肺は、リバーシブルドリルおよび試験管内にちょうど合う大きさのビットを使用して、1.5 ミリリットルの試験管中に入れた 0.4 ミリリットルの凍結した溶解バッファですり合わせて、それぞれ、細かい粉末に粉砕し、粉末は抽出するまで同じ試験管内で、- 78 °C において保存した。凍結された粉末を融解し、それぞれに 100 マイクロリットルのプロメガ (Promega) 社製のレポーターライシスバッファ (Reporter Lysis Buffer : カタログ番号 E 397A) を添加した。サンプルは、15 分間ボルテックス処理し、液体窒素および室温の水浴を交互に使用して、凍結 - 融解を 3 回繰り返し、さらに 10,000 x g において 3 分間遠心分離した。別の 1.5 ミリリットルの試験管に上清を移し、沈殿にさらに 500 マイクロリットルの溶解バッファを添加した後、抽出プロセスを (凍結 - 融解を行わない) 繰り返した。二回

10

20

30

40

50

目の上清を始めの上清と合わせて、-78℃で保存した。

使用したカチオン脂質は、10、12または14炭素原子のいずれかのアルキル鎖を有するDLRIE系 ( $n = 2 \sim 6$ ) およびDOAP系のものであった。DOAP系は、 $R1 = R2 =$  側鎖のないアルキル鎖、 $n = 1$ 、 $R3 = R4 = CH_3$ 、 $m = 3$ 、 $G = N$  および  $R5 = H$  の式2に相当する。

CATアッセイは、Sankaran (Anal. Biochem., 200:180-186, 1992) の放射活性分配法またはCAT ELISAキット (ベーリンガーマンハイム社、インディアナポリス、インディアナ州) を使用して行われた。簡単には、CAT組織ホモジネートを、エタノール/ドライアイス浴中にて凍結-融解を3回繰り返すことによって破壊した。細胞の破片を遠心分離で取り除き、たんぱく質抽出物を $^{14}C$ -クロラムフェニコールおよびアセチルCoAとともにインキュベートした。クロラムフェニコールをエチルアセテートで抽出し、薄層クロマトグラフィーを行って、抽出細胞たんぱく質により変換された $^{14}C$ -クロラムフェニコールのパーセントを測定した。細胞抽出物は、20分間インキュベートした2  $\mu g$  たんぱく質に標準化した。組織抽出物は、4時間インキュベートした200  $\mu g$  たんぱく質に標準化した。

標準曲線は、肺抽出物中に加えた精製酵素 (シグマ社、セントルイス、ミズーリー州) または、ELISAキットに添付の酵素を使用して作成した。二種類のCATアッセイ法は、同じ組の抽出物から得たサンプル当たり、同一のpg CATを与えた。図2および3に結果をまとめる。DLRIE系については、一級アミンをいれる最も有効な第四窒素からの距離は、4炭素 ( $n = 4$ ) であった (図2)。図3は、DOAP系についてのトランスフェクション効率に与えるアルキル鎖長の影響を調べたもので、肺DNAトランスフェクションを媒介するにあたり、C10またはC14化合物に比べてC12化合物が有意に有効であることを示している。図4は、GAP-DLRIEに対して、アミノ酸結合化合物Gly-G-DLRIEおよびLys-G-DLRIEの活性を比較したものである。Gly-G-DLRIEは、げっ歯類肺システムにおいて、特に有効であった。図4は、グリシンのような非荷電、非極性アミノ酸の結合は、チトフェクチン核構造に対して、リジンのような荷電、極性アミノ酸により得られるよりも高いレベルのトランスフェクション効率を与える可能性を示している。

ここで報告されるテストは、本発明の化合物がトランスフェクションにおいて活性であることを示すのみならず、特定の組織のトランスフェクションに対して、チトフェクチンを選択、最適化する方法を示すものである。このアッセイに対して特に最適な構造は、容易に分かるが、これらの結果は組織に対して特異的であること、すなわち、このアッセイにおいては最適でなかったチトフェクチンでも、インビトロトランスフェクションおよび腹腔内トランスフェクションなどの別のアッセイにおいては有効な活性を有することが理解されよう。

#### 実施例 8

##### インビトロトランスフェクションにおける配合の効果：

##### GMU-DMRIEとDMRIEの比較

チトフェクチン：DMRIEまたはGMU-DMRIEのクロロホルム溶液を、重量対容積 ( $w/v$ ) ベースで作製した。1ミリリットルの水性ピヒクルで還元した際に所望の脂質の相対および絶対濃度を与えるように計算された量のカチオン脂質および中性脂質 (使用する場合には) を、無菌的に滅菌バイアルに入れた。大半のクロロホルムを乾燥窒素流により除去し、バイアルを高真空で一晩処理して残存する溶媒を全て除去した。

DNA-脂質複合体：リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中、5 mg/ml のプラスミドDNAおよび乾燥され配合されたチトフェクチン-中性脂質配合混合物をOPTIMEM™ (Gibco BRL) 中に懸濁して、表中に示される通り、96穴プレート中において所望の質量/分子比率で混合した。DNA-脂質複合体は、混合後2時間以内に細胞に添加された。

##### トランスフェクション

細胞株：使用された細胞株は、以下の通りで、American Type Culture Collection (AT

10

20

30

40

50



C C、ロックビル、メリーランド州) から入手した: C O S 7 サル腎臓細胞 (ATCC CRL 1 651)、および C 2 C 1 2 マウス筋芽筋肉細胞 (ATCC CRL 1772)。

全ての細胞は、10%ウシ胎児血清 (F B S) およびダルベコの改良イーグル培地 (Dulb ecco 's Modified Eagles medium; DMEM) 中で 1:5 から 1:10 で継代された。全ての細胞を、受け取った後、10倍加継代を経して増殖させ、一部を凍結保存した。再度増殖させた後、全ての細胞は、さらに10継代する前にトランスフェクションの研究に使用された。

トランスフェクションアッセイ: 0日目に、10% F E B S / 90% D M E M 100マイクロリットル中の20,000個の細胞を、96穴培養プレート (N u n c) の各ウエルに植えつけ、5% C O<sub>2</sub> インキュベーター中37℃で一晩培養した。1日目に、細胞を吸い込まないように気をつけて培地を吸い上げ、100マイクロリットルの、血清を含有しない O P T I M E M<sup>TM</sup> (G i b c o B R L) 中の G M U - D M R I E / p R S V l a c Z / D O P E を添加した。D M R I E は、参照用の標準として使用した。l a c Z 遺伝子は、酵素 ガラクトシダーゼをコードし、比色分析でアッセイできる。カチオン脂質: D O P E 比は、各ウエルによって異なった。培養4時間後、50マイクロリットルの30% F B S / 70% O P T I M E M<sup>TM</sup> を各ウエルに添加した。2日目、各ウエルに100マイクロリットルの10% F E B S / 90% O P T I M E M<sup>TM</sup> を入れた。3日目に、培地を除去し、50マイクロリットルの溶解バッファ (250mM T r i s 中、0.1% T r i t o n - X 100、pH 8.0) を添加し、プレートを70℃で少なくとも20時間保存した。融解後、  
- ガラクトシダーゼ酵素活性の内容について、ウエルの培地を F e l g n e r 他 (J.Biol.Chem.269:2550-2561,1994) によってアッセイした。

結果 (図 1 a - 1 d) は、C O S 7 細胞および C 2 C 1 2 細胞における  $\beta$ -g a l の総発現は、どちらの細胞株においても、G M U - D M R I E / D O P E 比が 50:50 であるときに最適であったことを示している。さらに、C O S 7 細胞において、G M U - D M R I E / D O P E 比が 75:25 である場合も非常に有効であった。 $\beta$ -g a l 発現のピークは、C O S 7 細胞において、G M U - D M R I E / D O P E 比が 75:25 または 50:50 のときに起こった。C 2 C 1 2 細胞においては、同程度の G M U - D M R I E / D O P E 比において、 $\beta$ -g a l 活性のピークが得られた。G M U - D M R I E のみの比率を使用すると、いずれの細胞株においても、総  $\beta$ -g a l 発現は有意に低下した。G M U - D M R I E は、C O S 7 細胞において、D M R I E によるよりも高いレベルの活性を与えた。C 2 C 1 2 細胞において、G M U - D M R I E は、D M R I E によりも有意に高いレベルの総活性を与えた。これらのテストにおいて使用されたスクリーニングアッセイは、トランスフェクション活性を示したり、チトフェクチン/補助脂質の比率を最適化するのに有用である。

#### 実施例 9

##### 腹腔内腫瘍アッセイ

500マイクロリットルの R P M I 中、200,000個のげっ歯類 B 1 6 腫瘍細胞を、0日目に C 5 7 / B 1 6 マウスの腹腔内に注射した。7から14日目において、マウスに10:1のチトフェクチン:DNAモル比でチトフェクチンを含有する1.5ミリリットル生理食塩水中の0.5mgの C A T DNA の腹腔内注射を行った。使用されたカチオン脂質は D M R I E、G A P - D M R I E、G A P - D L R I E、および G M U - D L R I E であった。二日後に、腫瘍を回収し、抽出して実施例 7 に記載されるとおりに C A T 活性を測定した。図 5 では、チトフェクチン配合で見られた C A T 活性を、DNA 単独を投与した対照と比較している。各カチオン脂質は、腫瘍細胞中において有意に C A T 発現を与え、細胞内における C A T DNA の侵入と機能発現を示した。C A T 活性は、D M R I E でトランスフェクションされた細胞において最大であった。G A P - D L R I E は、D M R I E とほぼ同じ効力を示し、G A P - D L R I E および G A P - D M R I E も有意な活性を示した。

図 5 は、第四窒素の 3 炭素以内に第一アミンを有するチトフェクチンは、腹腔内腫瘍アッセイにおいて有効な DNA トランスフェクションを与えることを示している。

## 実施例 10

筋肉内アッセイ

大腿四頭筋を固定された意識のあるマウスに、50 マイクロリットル USP 生理食塩水中の 50  $\mu$ g のルシフェラーゼまたは CAT DNA  $\pm$  チトフェクチンを、28 G 1/2 針（ベックマン - ディキンソン）および黄色いエッペンドルフマイクロピペットのチップから切断したプラスチックカラーを付けたディスポーザブルのプラスチック製インシュリンシリンジを使用して注射する。カラーの長さは、針のオリフィスの侵入が、直径 3 mm の大腿直筋の中央部分内におよそ 2 mm の距離までに制限されるように調整する。注射液およびシリンジは、室温に平衡化し、1 回 50 マイクロリットルの量の生理食塩水 - DNA の注射に数秒をかける。注射後、様々な時間において、完全な大腿四頭筋グループ（湿重量で 140 ~ 180 mg）を各マウスの足から採取する。筋肉は、冷凍し、実施例 7 に記載されるように溶解される。

ルシフェラーゼ活性は、自動マイクロプレートルミノメーター（Dynatech Model ML 2250）を使用して測定した。100 マイクロリットルのルシフェラーゼ基質が、ルミノメーターのインジェクションシステムによって 20 マイクロリットルの抽出物に添加され、サンプル光単位が記録される。サンプルのルシフェラーゼ含有量は、注射を受けない筋肉抽出物の存在下で実施された精製ホタルルシフェラーゼの標準曲線を使用した相対光単位から計算された。注射をした筋肉の抽出物に存在するルシフェラーゼ活性は、注射をしない筋肉の抽出物における活性よりはるかに高い。

このアッセイは、特定の組織中において使用するための特定のチトフェクチンの構造を最適化するための別のスクリーニングアッセイを説明するものである。

## 実施例 11

ブタ動脈中およびアテローム硬化ウサギ動脈中への遺伝子移入

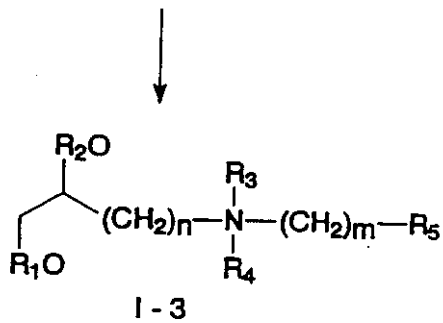
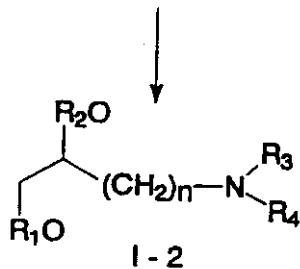
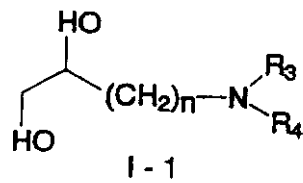
ブタ動脈のリボソームトランスフェクションが、文献に記される通りに、麻酔、挿管、および腸骨大腿骨動脈の無菌的暴露により行われた（Nabel et al., Science, 249: 1285-1288, 1990）。ダブルバルーンカテーテルを腸骨大腿骨動脈に挿入し、基部バルーンを 5 分間にわたり 500 mmHg まで膨らませる。バルーンをしぼませて、基部および遠位末端バルーンの間中央スペースがヘパリン含有生理食塩水で満たされるようにカテーテルを進める。CAT DNA 溶液（CAT DNA  $\pm$  チトフェクチン）を、カテーテルの中央スペースに 20 分間注入する。カテーテルを除去し、反勾配の血流が復活される。動脈は、組換え CAT 発現について、二日後に分析される。カチオン脂質存在下で CAT DNA によるトランスフェクションを受けた動脈は、DNA のみと接触した動脈に比較して CAT 遺伝子発現が有意に増大している。

アテローム硬化ウサギ腸骨動脈のインビボ遺伝子移入は、Faxon 他の記載する（Arteriosclerosis, 4:189-195, 1984）ダブルインジャリーモデルを使用して行われる。二回目の血管形成損傷を行った後、カテーテルのエンドホールドインフュージョンポートが損傷の基部末端にくるように、血管形成バルーンをすこし引く。損傷の遠位末端に結紮を作り、損傷部分をヘパリン含有生理食塩水で洗い流し、CAT DNA  $\pm$  カチオン脂質リボソーム溶液を単離された損傷部分中に 20 分間注入する。カテーテルを抜き、反勾配の血流が復活される。動脈は、組換え CAT 発現について、二日後に分析される。カチオン脂質存在下で CAT DNA によるトランスフェクションを受けた動脈は、DNA のみと接触した動脈に比較して CAT 遺伝子発現が有意に増大している。

アテローム硬化ウサギ腸骨動脈のインビボ遺伝子移入は、Faxon 他の記載する（Arteriosclerosis, 4:189-195, 1984）ダブルインジャリーモデルを使用して行われる。二回目の血管形成損傷を行った後、カテーテルのエンドホールドインフュージョンポートが損傷の基部末端にくるように、血管形成バルーンをすこし引く。損傷の遠位末端に結紮を作り、損傷部分をヘパリン含有生理食塩水で洗い流し、CAT DNA  $\pm$  カチオン脂質リボソーム溶液を単離された損傷部分中に 20 分間注入する。カテーテルを抜き、反勾配の血流が復活される。動脈は、組換え CAT 発現について、二日後に分析される。カチオン脂質存在下で CAT DNA によるトランスフェクションを受けた動脈は、DNA のみと接触

した動脈に比較してC A T遺伝子発現が有意に増大している。  
 さらに労力を要することなく、当業者は、先の記載を使用して、本発明を最大限に利用することができるものと考えられる。本発明は、本質的な特徴の精神から逸脱することなく、他の特定の形態で実施することができる。記載された実施例は、全ての面において、限定的なものではなく、説明するためだけのものであるとみなされ、したがって本発明の範囲は前述の記載によってではなく、添付の請求の範囲により示されるものである。請求の範囲の意味および法律上同等である範囲内にある全ての変更は、その範囲内に含まれるものである。

スキーム 1

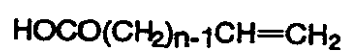


10

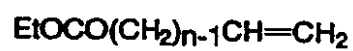
20

30

## スキーム 11



II - 1



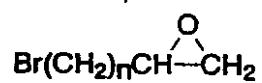
II - 2



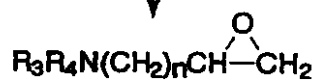
II - 3



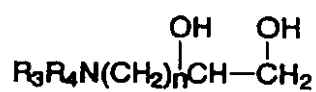
II - 4



II - 5



II - 6



II - 7

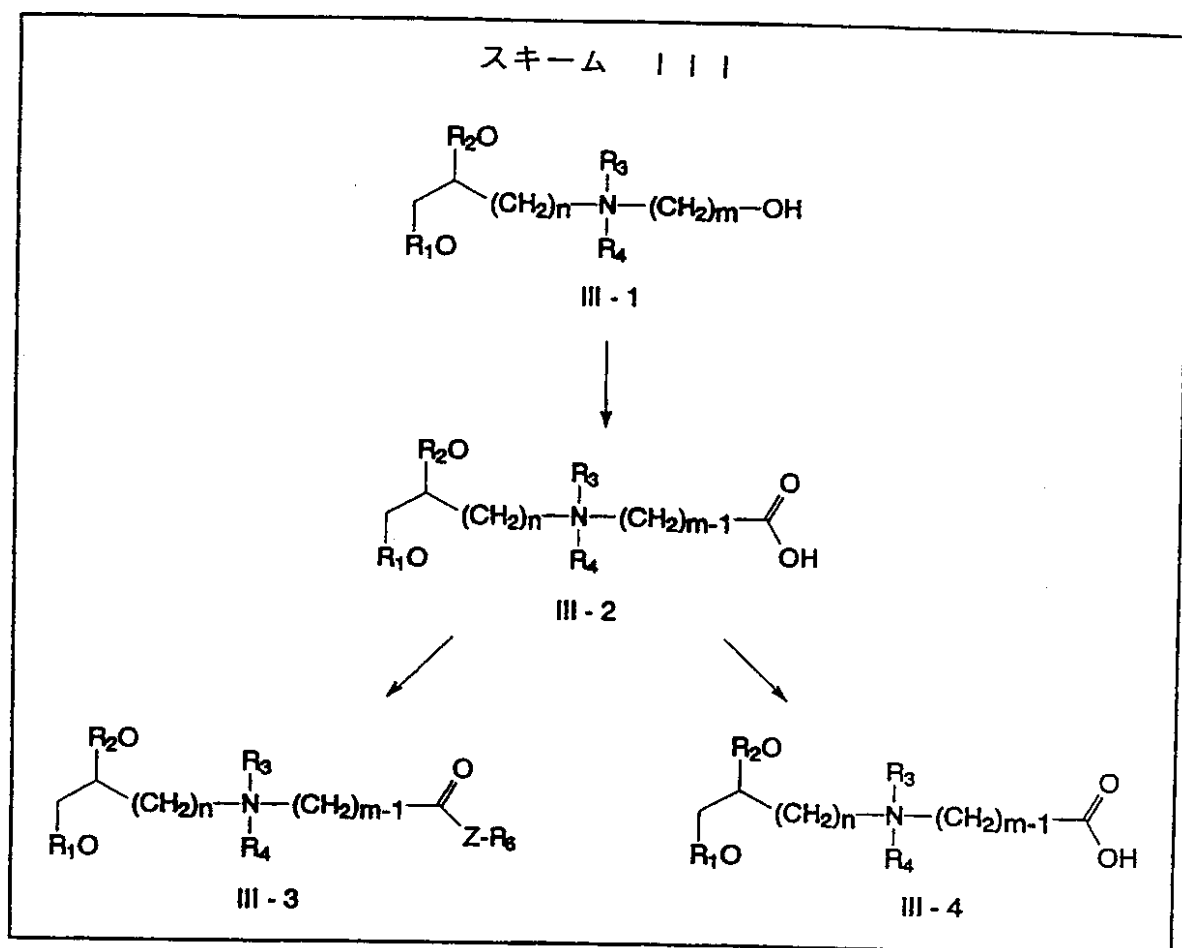
10

20

30

40

## スキーム III

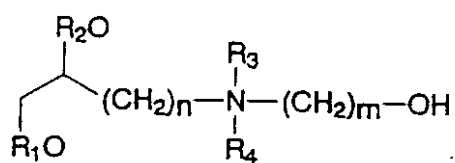


10

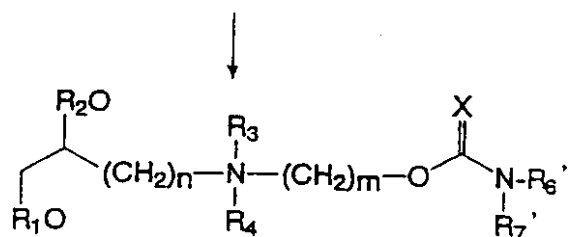
20

## スキーム I V

## 適応 A

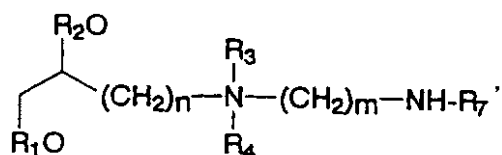


IV A - 1

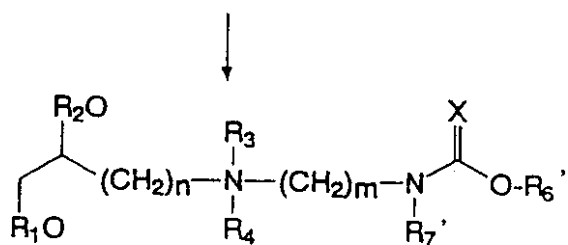


IV A - 2

## 適応 B



IV B - 1



IV B - 2

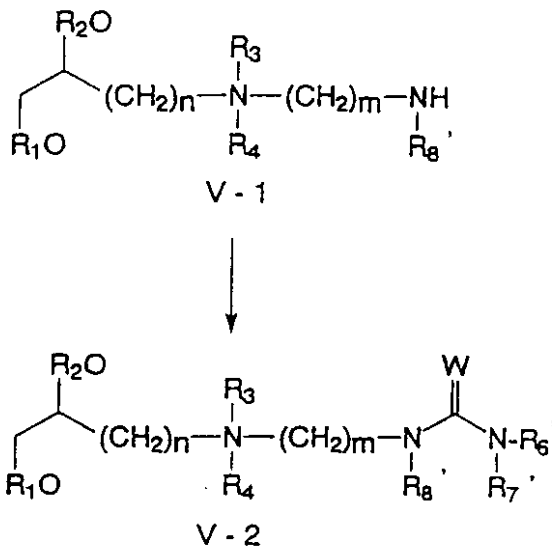
10

20

30

40

## スキーム V



10

20

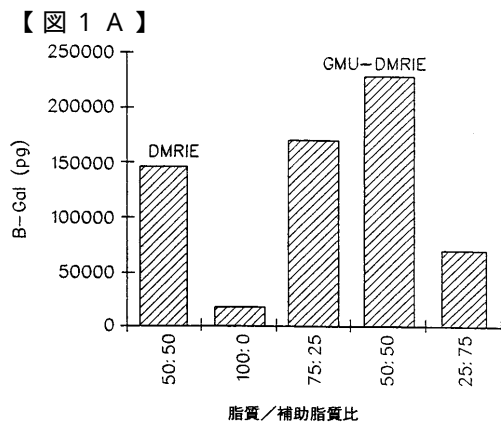


FIG. 1A

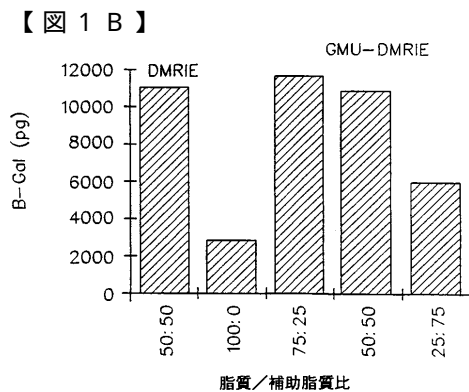


FIG. 1B

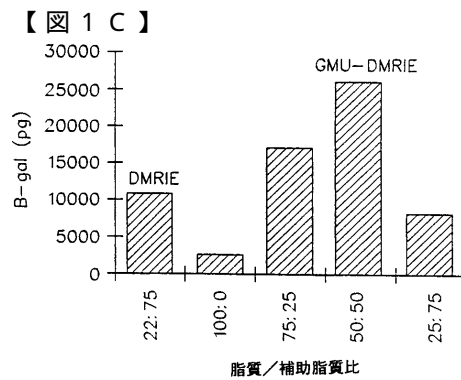


FIG. 1C

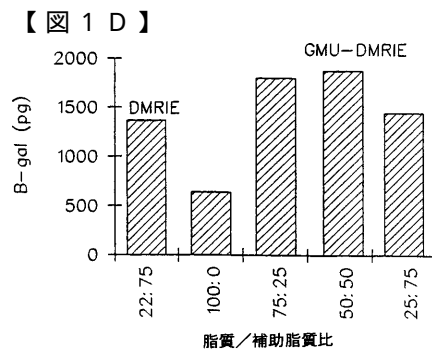
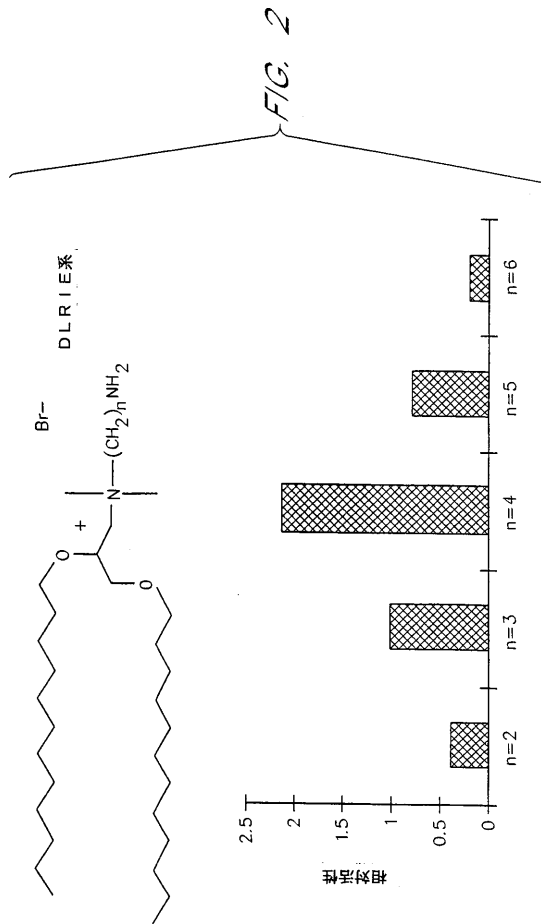
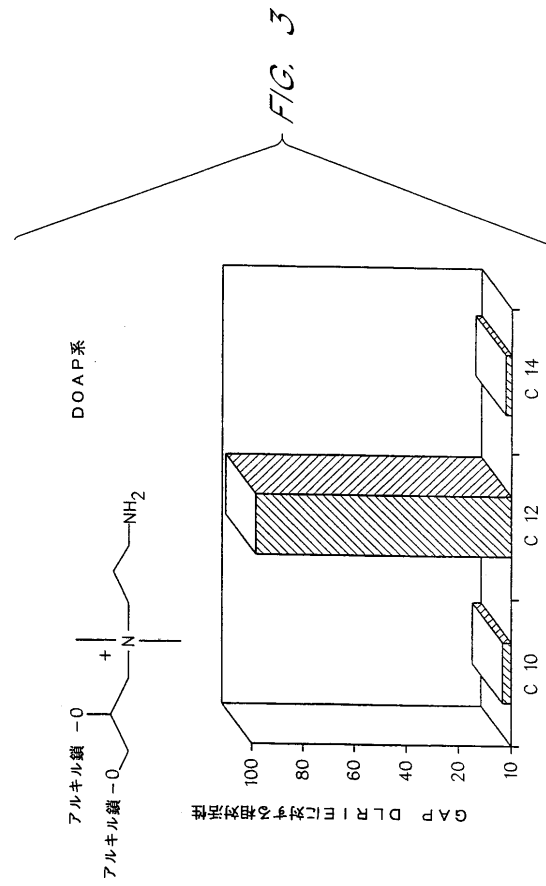


FIG. 1D

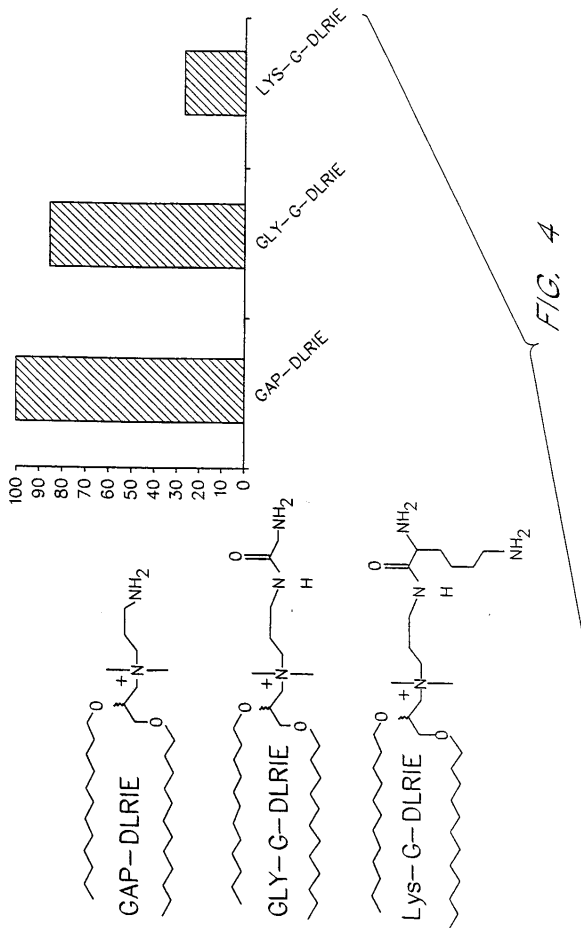
【図 2】



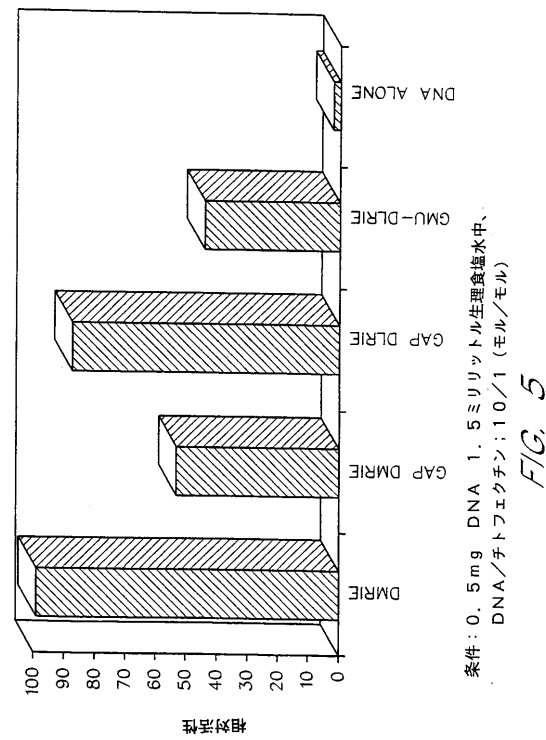
【図 3】



【図 4】



【図 5】





## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
<b>C 0 7 C 237/06</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 C 237/06
<b>C 0 7 C 237/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 C 237/10
<b>C 0 7 C 271/12</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 C 271/12
<b>C 0 7 C 275/14</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 C 275/14
<b>C 0 7 C 279/36</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 C 279/36
<b>A 6 1 K 48/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00

## (74)代理人

弁理士 中村 和広

## (72)発明者 ウィラー, カール, ジェイ.

アメリカ合衆国, 9 2 0 6 4 6 4 3 9 カリフォルニア, ポーウェイ, アーボリトス ドライブ  
1 4 1 0 1 番地

審査官 近藤 政克

(56)参考文献 特表平 1 1 - 5 0 7 0 3 1 ( J P , A )  
国際公開第 9 1 / 0 1 7 4 2 4 ( W O , A 1 )  
特表平 0 5 - 5 0 8 6 2 6 ( J P , A )  
特開平 0 5 - 0 2 5 1 0 6 ( J P , A )

## (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C07C217/28  
A61K 31/70  
A61K 47/18  
A61K 47/48  
C07C229/12  
C07C237/06  
C07C237/10  
C07C271/12  
C07C275/14  
C07C279/36  
A61K 48/00  
CA/REGISTRY(STN)