

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4175667号  
(P4175667)

(45) 発行日 平成20年11月5日(2008.11.5)

(24) 登録日 平成20年8月29日(2008.8.29)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 9/127	(2006.01)	A 61 K 9/127
A 61 K 47/48	(2006.01)	A 61 K 47/48
A 61 K 48/00	(2006.01)	A 61 K 48/00
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A

請求項の数 15 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願平10-520843
(86) (22) 出願日	平成9年11月3日(1997.11.3)
(65) 公表番号	特表2001-503751(P2001-503751A)
(43) 公表日	平成13年3月21日(2001.3.21)
(86) 国際出願番号	PCT/EP1997/006035
(87) 国際公開番号	W01998/019709
(87) 国際公開日	平成10年5月14日(1998.5.14)
審査請求日	平成16年6月7日(2004.6.7)
(31) 優先権主張番号	60/030,315
(32) 優先日	平成8年11月4日(1996.11.4)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	キアゲン ゲゼルシャフト ミット ベシ ュレンクテル ハフツング ドイツ連邦国、ビルテン D—40724 、マックス—フォルマー—シュトラーゼ 4
(74) 代理人	弁理士 特許業務法人特許事務所サイクス
(74) 代理人	弁理士 塩澤 寿夫
(74) 代理人	弁理士 今村 正純
(74) 代理人	弁理士 釜田 淳爾

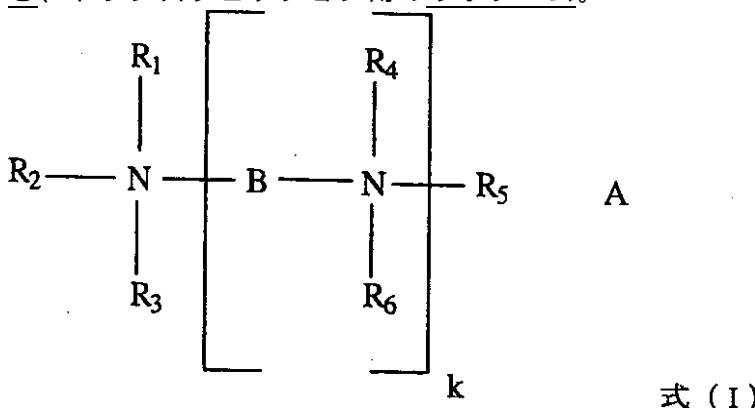
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスフェクションのためのカチオン試薬

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式(I)で表される化合物及びジオレイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)を含む、トランスフェクション用のリポソーム。



式中、

Aは塩素、臭素、ヨウ素、リン酸水素( $\text{HPO}_4^{2-}$ )、リン酸2水素( $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ )、スルフェート、チオスルフェート、水酸、及び/又はオキサレートからなる群から選ばれるアニオンを示し、

kは整数1、2、3、4又は5を示し、

20

Bはアルカンジイル架橋( $\text{CH}_2$ )<sub>n</sub>を示し、但し、nは整数1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10を示し、

R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>は、互いに同一でも異なってもよく、水素、直鎖または分岐C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルケニル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキニルを示し、

R<sub>2</sub>は直鎖または分岐C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルケニル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキニルを示し、

R<sub>5</sub>は、k=1の場合、直鎖または分岐C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルケニル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキニルを示し、k>1の場合、水素、直鎖または分岐C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルケニル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキニルを示し、

R<sub>6</sub>は、k=1の場合、水素、直鎖または分岐C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルケニル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキニルを示し、k>1の場合、直鎖または分岐C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルケニル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキニルを示し、かつ繰り返し単位-B-NR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>は互いに同一でも異なってもよい。 10

#### 【請求項 2】

Aは塩素、臭素、ヨウ素、リン酸水素(HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)、リン酸2水素(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)、スルフェート、チオスルフェート、水酸、及び/又はオキサレートからなる群から選ばれるアニオンを示し、

kは整数1、2又は3を示し、

Bはアルカンジイル架橋(-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-を示し、かつnは整数1、2、3、4、5又は6を示し、

R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>は、互いに同一でも異なってもよく、水素、直鎖または分岐C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキルを示し、

R<sub>2</sub>は直鎖または分岐C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルケニル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキニルを示し、 20

R<sub>5</sub>は、k=1の場合、直鎖または分岐C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルケニル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキニルを示し、k>1の場合、水素、直鎖または分岐C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキルを示し、

R<sub>6</sub>は、k=1の場合、水素、直鎖または分岐C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルケニル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキニルを示し、k>1の場合、直鎖または分岐C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルケニル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキニルを示し、かつ繰り返し単位-B-NR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>は好ましくは互いに同一である請求項1に記載のリポソーム。

#### 【請求項 3】

Aは臭素、ヨウ素、リン酸水素(HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)、及び/又はチオスルフェートからなる群から選ばれるアニオンを示し、

kは整数1又は2を示し、 30

Bは、k=1の場合、アルカンジイル架橋-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>を示し、但し、nは整数2、3又は4を示し、

Bは、k=2の場合、エチレン架橋-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)-を示し、

R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>は、互いに同一である、CH<sub>3</sub>を示し、

R<sub>2</sub>は直鎖C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>-アルキルを示し、

R<sub>5</sub>は、k=1の場合、直鎖C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>-アルキルを示し、かつR<sub>2</sub>と同一であり、k=2の場合、CH<sub>3</sub>を示し、

R<sub>6</sub>は、k=1の場合、CH<sub>3</sub>を示し、k=2の場合、直鎖C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>-アルキルを示し、かつR<sub>2</sub>と同一である請求項1または2に記載のリポソーム。

#### 【請求項 4】

前記化合物は細胞ターゲッティング化合物を含む請求項1～3のいずれか1項に記載のリポソーム。 40

#### 【請求項 5】

前記細胞ターゲッティング化合物は、特異的な細胞表面レセプター又は核レセプターのためのリガンドまたはリガンド様化合物である請求項4に記載のリポソーム。

#### 【請求項 6】

DNA / リポソーム比が0.01 μg ~ 10 μg DNA / μg リポソームである、細胞培養のインビトロトランスフェクションのための請求項1～5のいずれか1項に記載のリポソーム。

#### 【請求項 7】

DNA / リポソーム比が0.01 μg ~ 1 μg DNA / μg リポソームである請求項6に 50

記載のリポソーム。**【請求項 8】**

D N A / リポソーム比がD N A / リポソーム(w / w) 2 : 1 ~ 1 : 3 / k g 体重当たり 1 μ g ~ 1 0 0 m g の範囲である、インビトロトランスフェクションのための請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

**【請求項 9】**

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のリポソームを含むことを特徴とするトランスフェクション用キット。

**【請求項 10】**

1 つの適当な緩衝液をさらに含むことを特徴とする請求項 9 に記載のキット。 10

**【請求項 11】**

核酸またはその誘導体のターゲット細胞への輸送のための請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

**【請求項 12】**

核酸が単鎖または 2 本鎖 D N A 及び / 又は R N A 及び / 又は D N A / R N A ハイブリッド、またはそれらの誘導体であることを特徴とする請求項 1 1 に記載のリポソーム。

**【請求項 13】**

D N A がプラスミド、ベクター、c D N A 、C p G モチーフ、及び / 又はオリゴヌクレオチドからなる群から選ばれ、かつ R N A がm R N A 、オリゴヌクレオチド又はリボザイムからなる群から選ばれることを特徴とする請求項 1 1 又は 1 2 に記載のリポソーム。 20

**【請求項 14】**

医薬物質の配送のための請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

**【請求項 15】**

予防及び / 又は治療ワクチンの配送のための請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

**【発明の詳細な説明】****発明の技術分野**

本発明は、in vitro 及び in vivo で外因性化合物を細胞内に輸送するために有用なトランスフェクションのためのカチオン性試薬に関する。

**発明の背景**

近年、核酸を真核細胞に導入するための4つの主な方法が使用されている。(1)電気穿孔法、(2)カルシウム-リン酸に基づくトランスフェクション(calcium-phosphate-based transfection)、(3)DEAE-デキストランに基づくトランスフェクション、及び(4)リポソームに仲介されるトランスフェクションである。

他の方法と比較して、リポソームに仲介されるトランスフェクションは高い再現性、低い細胞毒性及び簡便な操作により特徴付けられる。しかし、リポソームに仲介されるトランスフェクションに有用な多くのカチオン性化合物は、エステル結合を基礎にしており、加水分解により急激に分解される。感染性薬剤と比較すると、カチオン性リポソームは、しばしば低い総合(overall)効率を示す。更に、市販のカチオン性リポソームは使用することができず、また、in vitro 又は in vivo での細胞の特定の亜集団(subpopulation)のトランスフェクションのために適用することができない。 40

**既存の技術における発明の利点**

本発明の化合物は、安価な試薬から簡単に調製することができ、且つ、そのため、大量使用のためのリポソームの調製に非常に適している。式(I)で表される化合物はエステル結合に基づいておらず、そのため、加水分解により分解されることはない。本発明の化合物を使用するトランスフェクションにおいては、高い総計(overall)トランスフェクション効率が得られる。特異的な細胞のトランスフェクションへの適用は、本発明の化合物の構造的变化及び共用するカウンターイオンの選択により簡単に行うことができる。本発明の化合物は、簡単で再現可能な、好ましくは音波処理の必要のないリポソーム調製の操作を提供する。 50

発明の要約

本発明は、in vitro及びin vivoで外因性化合物を細胞内に輸送するために有用な式(I)で表される化合物に関する。

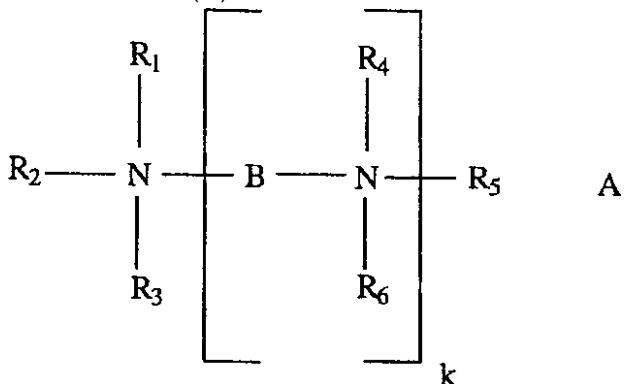
本発明は更に、(a)中性脂質、例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)又は同様の脂質様(lipid)化合物、例えば、1,2-ジオレオイルオキシホスファチジルエタノールアミン又は他の脂質様構造、及び(b)1以上の式(I)で表される化合物を含むリポソームを提供する。本発明は、また、本発明の化合物を用いて外因性化合物、例えば、マクロ分子及び薬剤学的組成物の細胞内へのin vivo及びin vitroでの輸送の方法に関する。

この発明の範囲内には、本発明の化合物を含むトランスフェクションのキットも含まれる。

本発明によればターゲット細胞への、所望の外因性化合物の輸送は、他の事の中で、以下を変化させることにより調節することができる；(1)式(I)で表される化合物の構造、(2)式(I)で表される化合物に対する中性脂質の比率、(3)リポソームの調製方法、又は(4)本発明の化合物を用いて調製されるカウンターイオン。

詳細な説明

本発明は、式(I)で表される化合物を提供する。



式中、

Aは塩素、臭素、ヨウ素、リン酸水素( $\text{HPO}_4^{2-}$ )、リン酸2水素( $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ )、スルフェート、チオスルフェート、水酸、及び/又はオキサレートからなる群から選ばれるアニオンを示し、

kは整数1、2、3、4又は5を示し、

Bはアルカンジイル架橋( $\text{CH}_2)_n$ を示し、但し、

nは整数1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10を示し、

$\text{R}_1$ 、 $\text{R}_3$ 及び $\text{R}_4$ は、互いに同一でも異なってもよく、水素、直鎖または分岐 $\text{C}_1-\text{C}_6$ -アルキル、 $\text{C}_1-\text{C}_6$ -アルケニル、 $\text{C}_1-\text{C}_6$ -アルキニルを示し、

$\text{R}_2$ は直鎖または分岐 $\text{C}_8-\text{C}_{20}$ -アルキル、 $\text{C}_8-\text{C}_{20}$ -アルケニル、 $\text{C}_8-\text{C}_{20}$ -アルキニルを示し、

$\text{R}_5$ は、k=1の場合、直鎖または分岐 $\text{C}_8-\text{C}_{20}$ -アルキル、 $\text{C}_8-\text{C}_{20}$ -アルケニル、 $\text{C}_8-\text{C}_{20}$ -アルキニルを示し、k>1の場合、水素、直鎖または分岐 $\text{C}_1-\text{C}_6$ -アルキル、 $\text{C}_1-\text{C}_6$ -アルケニル、 $\text{C}_1-\text{C}_6$ -アルキニルを示し、

$\text{R}_6$ は、k=1の場合、水素、直鎖または分岐 $\text{C}_1-\text{C}_6$ -アルキル、 $\text{C}_1-\text{C}_6$ -アルケニル、 $\text{C}_1-\text{C}_6$ -アルキニルを示し、k>1の場合、直鎖または分岐 $\text{C}_8-\text{C}_{20}$ -アルキル、 $\text{C}_8-\text{C}_{20}$ -アルケニル、 $\text{C}_8-\text{C}_{20}$ -アルキニルを示し、かつ繰り返し単位-B-N $\text{R}_4$ R $_6$ は互いに同一でも異なってもよい。

好みしいのは、一般式(I)で表される化合物であって、

式中、Aは塩素、臭素、ヨウ素、リン酸水素( $\text{HPO}_4^{2-}$ )、リン酸2水素( $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ )、スルフェート、チオスルフェート、水酸、及び/又はオキサレートからなる群から選ばれるアニオノンを示し、

kは整数1、2又は3を示し、

Bはアルカンジイル架橋(- $\text{CH}_2$ ) $_n$ を示し、かつ

nは整数1、2、3、4、5又は6を示し、

10

20

30

40

50

R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>は、互いに同一でも異なってもよく、水素、直鎖または分岐C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキルを示し、

R<sub>2</sub>は直鎖または分岐C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルケニル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキニルを示し、R<sub>5</sub>は、k=1の場合、直鎖または分岐C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルケニル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキニルを示し、k>1の場合、水素、直鎖または分岐C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキルを示し、

R<sub>6</sub>は、k=1の場合、水素、直鎖または分岐C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルケニル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキニルを示し、k>1の場合、直鎖または分岐C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルケニル、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキニルを示し、かつ繰り返し単位-B-NR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>は好ましくは互いに同一である化合物である。

特に好ましいのは、一般式(I)で表される化合物であって、

10

式中、Aは臭素、ヨウ素、リン酸水素(HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)、及び/又はチオスルフェートからなる群から選ばれるアニオンを示し、

kは整数1又は2を示し、

Bは、k=1の場合、アルカンジイル架橋-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>を示し、但し、nは整数2、3又は4を示し、

Bは、k=2の場合、エチレン架橋-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)-を示し、

R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>は、互いに同一である、CH<sub>3</sub>を示し、

R<sub>2</sub>は直鎖C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>-アルキルを示し、

R<sub>5</sub>は、k=1の場合、直鎖C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>-アルキルを示し、かつR<sub>2</sub>と同一であり、k=2の場合、CH<sub>3</sub>を示し、

R<sub>6</sub>は、k=1の場合、CH<sub>3</sub>を示し、k=2の場合、直鎖C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>-アルキルを示し、かつR<sub>2</sub>と同一である化合物である。

20

薬剤学的に適用可能なイオンは、1価、2価、又は多価の、好ましくは細胞毒性でないイオンである。異なる塩は、従来技術からそれ自身公知の方法、特にイオン交換法を用いて合成することができる。

C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキルは、一般的に、互いに同一でも異なってもよい1つ又は幾つかのハロゲン原子、好ましくはフッ素により任意に置換される1から6の炭素原子を有する直鎖又は分岐炭化水素基を示す。以下の基は例として挙げられる。

メチル、エチル、プロピル、1-メチルエチル(イソプロピル)、ブチル、1-メチルプロピル、2-メチルプロピル、1,1-ジメチルエチル、n-ペンチル、1-メチルブチル、2-メチルブチル、3-メチルブチル、1,1-ジメチルプロピル、1,2-ジメチルプロピル、2,2-ジメチルプロピル、1-エチルプロピル、ヘキシル、1-メチルペンチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、1,1-ジメチルブチル、1,2-ジメチルブチル、1,3-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、2,3-ジメチルブチル、3,3-ジメチルブチル、1-エチルブチル、2-エチルブチル、1,1,2-トリメチルプロピル、1,2,2-トリメチルプロピル、1-エチル-1-メチルプロピル及び1-エチル-2メチル-プロピル。

30

同様の定義付けがアルカンジイル基にも適用される。

C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキルは、具体的には8から20の炭素原子、例えば、オクチル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、ドデカデシル、ノナデシル、及びエイコシルを有する直鎖又は分岐炭化水素基を示す。

40

特に記載されていない場合には、1から3の炭素原子を有するアルキル基は、例えば、メチル、エチル、n-プロピル又はイソプロピルが好ましい。同様の定義付けがアルカンジイル基にも適用される。

アルケニルは、一般的に、3から6の炭素原子及び1以上の二重結合、好ましくは1つの二重結合を有し、互いに同一又は異なっていても良い1以上のハロゲン原子、好ましくはフッ素により任意に置換されることができる直鎖又は分岐炭化水素基を示す。C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルケニルは、具体的には、8から20の炭素原子及び1以上の二重結合を有する直鎖又は分岐炭化水素基(radical)を示す。

例としては、2-プロペニル(アリル)、2-ブテニル、3-ブテニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-2-プロペニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、4-ペンテニル、1-メチル-2-ブ

50

テニル、2-メチル-2-ブテニル、3-メチル-2-ブテニル、1-メチル-3-ブテニル、2-メチル-3-ブテニル、3-メチル-3-ブテニル、1,1-ジメチル-2-プロペニル、1,2-ジメチル-2-プロペニル、1-エチル-2-プロペニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、4-ヘキセニル、5-ヘキセニル、1-メチル-2-ペンテニル、2-メチル-2-ペンテニル、3-メチル-2-ペンテニル、4-メチル-2-ペンテニル、1-メチル-3-ペンテニル、2-メチル-3-ペンテニル、3-メチル-3-ペンテニル、4-メチル-3-ペンテニル、1-メチル-4-ペンテニル、3-メチル-4-ペンテニル、4-メチル-4-ペンテニル、1,1-ジメチル-2-ブテニル、1,1-ジメチル-2-ブテニル、1,1-ジメチル-3-ブテニル、1,2-ジメチル-2-ブテニル、1,2-ジメチル-3-ブテニル、1,3-ジメチル-2-ブテニル、1,3-ジメチル-3-ブテニル、2,2-ジメチル-3-ブテニル、2,3-ジメチル-2-ブテニル、2,3-ジメチル-3-ブテニル、1-エチル-2-ブテニル、1-エチル-3-ブテニル、2-エチル-1-ブテニル、2-エチル-2-ブテニル、2-エチル-3-ブテニル、1,1,2-トリメチル-2-プロペニル、1-エチル-1-メチル-2-プロペニル及び1-エチル-2-メチル-2-プロペニルを挙げることができる。  
10  
アリル基が好ましい。

一般的には、アルキニルは、3から6の炭素原子及び1以上の三重結合又は二重結合を有する直鎖又は分岐炭化水素基を示す。C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキニルは、具体的には、8から20の炭素原子及び1以上の二重又は三重結合を有する直鎖又は分岐炭化水素基を示す。

例としては、2-プロピニル(プロパルギル)、2-ブチニル、3-ブチニル、2-ペンチニル、3-ペンチニル、4-ペンチニル、3-メチル-2-ブチニル、2-ヘキシニル、3-ヘキシニル、4-ヘキシニル、5-ヘキシニル、3-メチル-2-ペンチニル、4-メチル-2-ペンチニル、2-メチル-3-ペンチニル、4-メチル-3-ペンチニル、1-メチル-4-ペンチニル、1,1-ジメチル-2-ブチニル、1,1-ジメチル-3-ブチニル、1,1,1-ジメチル-2-ブチニル、1,1-ジメチル-3-ブチニル、1,2-ジメチル-3-ブチニル、1,3-ジメチル-2-ブチニル、2,2-ジメチル-3-ブチニル、1-エチル-2-ブチニル、1-エチル-3-ブチニル、2-エチル-1-ブチニル、2-エチル-2-ブチニル、2-エチル-3-ブチニル、1,1,2-トリメチル-2-ブチニル、1-エチル-1-メチル-2-プロピニル及び1-エチル-2-メチル-2-プロピニルを挙げができる。  
20

3つの炭素原子及び三重結合を有し、互いに同一又は異なってもよい1以上のハロゲン原子、好ましくはフッ素で任意に置換されてもよい低級アルキニル基(プロパルギル)が好ましい。

細胞内への外因性化合物の輸送に有用なりポソームは、この発明の対象である。本発明の説明において、「リポソーム」という言葉は、(a)中性脂質又は脂質様分子及び(b)1以上の式(I)で表される化合物を含むいずれの構造をも示す。前記構造は、二重層、凝集体(aggregates)、及びミセル等を含む。本発明のリポソームを調製するのに有用な中性脂質又は脂質様分子は、ジオレオイルホスファチジル-エタノールアミン(DOPE)及び/又は1,2-ジオレオイルオキシホスファチジルエタノールアミン及び/又はコレステロール及び/又はジオレイルホスファチジルコリン(DOPC)であることができる。  
30

本発明の1つの態様においては、好ましくは異なる細胞に特異的である2以上の式(I)で表される化合物は、リポソーム調製のためのヘルパー脂質又は脂質と似た構造体と結合することができる。

本発明の他の態様においては、エステル結合が高い加水分解安定度のために加水分解的により安定な結合に置換されている脂質様分子が調製され、ヘルパー脂質としてリポソームの調製に使用されることができる。  
40

本発明の他の態様においては、非対称疎水性側鎖が含まれている。

本発明の好ましい態様においては、中性脂質はDOPEである。本発明の共通脂質(co-lipid)は、単独で又は他の脂質成分との組み合わせで、安定なリポソームを形成することができる化合物である。限定するものではないが、共通脂質は以下の群から選択される。リン酸様脂質化合物、例えば、レシチン、ホスファチジルコリン、ジオレイル-ホスファチジルコリン(DOPC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレオロシド(cereoroside)、ジアセチルホスフェート(diacetylphosphate)、リゾホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスフ  
50

アチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、ジパルミトイールホスファチジルグリセロール、パルミトイールオレオイルホスファチジルコリン、パルミトイールオレオイルホスファジチルエタノールアミン、ジヘプタデカノイルホスファチジルエタノールアミン、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ベータ-リノレオイル-ガンマパルミトイール-ホスファチジルエタノールアミン及びベータ-オレオイル-ガンマパルミトイールホスファチジルエタノールアミン等、リンを含まない脂質、限定するのではないか、例えば、ステロイド、テルペン、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、アセチルパルミテート、オレイン酸グリセリン-リシン、ステアリン酸ヘキサデシル、ミリスチン酸イソプロピル、ジオクタデシルアンモニウム臭化物、両性ポリマー、例えば、トリエタノールアミン-ラウリルスルフェート(triechanolamine-laurylsulfate)、リゾレシチン、及び同様の化合物を挙げることができる。  
10

本発明の説明において、「本発明の化合物」という言葉は、式(I)で表される化合物又は式(I)で表される化合物を含む上記に開示されたリポソームを示す。

1つの態様においては、本発明の化合物は、以下に記載されている「トランスフェクション」における特定の外因性化合物の所望の細胞内輸送を達成するための細胞又は亜細胞(sub-cellular)標的系(targeting system)を含む。細胞内輸送は、細胞質及び/又は核及び/又は他の細胞小器官へ行うことができる。

本発明の説明において「トランスフェクション」という言葉は、より具体的には、外因性化合物、例えば、マクロ分子、好ましくは生物学的に活性である化合物を標的細胞へin vivo又はin vitroで導入することを示す。好ましくは、細胞表面又は細胞下の区画(compartment)に結合したタンパク質又はペプチドである化学化合物は、本発明のリポソームに含まれる。1つの態様においては、リポソーム内の細胞標的成分は、特定の細胞表面レセプター又は核レセプターについてのリガンド又はリガンド様成分とすることができます。好ましくは、ホルモン、炭水化物リガンド、成長因子、ニューロトランスマッター、又はそれらのフラグメントのようなリガンド、又は核局在性(localization)シグナルは、リポソームによる細胞又は細胞下認識を促進させるために含むことができる。他の態様においては、細胞又は細胞下標的成分は変性される。好ましくは、細胞又は細胞下標的成分は、以下に説明されているマクロ分子と共有結合することができる。  
20

更に、選択性は、特定の分子、例えば、抗体、レクチン、ペプチド又はタンパク質、炭水化物、糖タンパク質等をリポソーム小胞表面上に組み込む(incorporating)ことにより達成され、その後、小胞表面に結合したリガンドに対応する適当なレセプター又は結合サイトを持っている所望の組織へ本発明の化合物を用いて調剤された薬剤を「標的」としてトランスフェクトするための役割を果たす。更なる選択性は、前記標的リガンドの添加の前に、(細胞への非特異的吸着を除去するために)中性又は負に帯電された任意共通脂質によりリポソーム小胞を被覆することにより達成することができる。  
30

他の態様においては、本発明の外因性化合物は、単鎖若しくは2本鎖の天然若しくは合成核酸、又はそれらの誘導体、好ましくはゲノムDNA、cDNA、プラズミドDNA、DNAベクター(適するベクターは、例えば、1997年5月14日に公表されたEP773295に開示されており、その開示は全て参照として本明細書に取り込まれる)、オリゴヌクレオチド、若しくはヌクレオシド、又はRNA、例えば、mRNA(センスまたはアンチセンス)若しくはリボザイム、又はDNA/RNAハイブリッドとすることができる。このようなDNAオリゴヌクレオチドは、遺伝子のコーディング領域、3'非翻訳領域、又は転写制御配列と相補的であることは評価されるべきことである。本発明の1つの態様においては、DNAオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの生物分解性を増加又は低減させるために変性される。1つの態様においては、ヌクレオチド間のリン酸ジエステル結合は、ホスホロチオエート(phosphorothioate)結合又はホスホロアミドート(phosphoroamidate)結合等の代替結合により置換することができる。  
40

従って、(1)本発明の化合物及び(2)プロモーター、エンハンサー及び所望しないもの等を含む適当なプラズミド内のDNA又は相補的DNA(cDNA)を含む調剤は、細胞のトランスフェク  
50

ションを達成するために、かつ、対応する発現生成物(例えば、タンパク質及びペプチド)を得るための、種々の所望配列のクローニング工程(当業者には良く知られている組換えDNA技術を介する)の一部としての安定な導入物(transfector)を得るために使用することができます。

効率的なトランスフェクションを達成するため、かつ、所望のDNA配列を有する安定な導入物を得るために本発明の化合物を使用する技術は、クローニング操作の所望の最終結果を達成する能力を顕著に増強することができる。この技術は、より毒性が低く、且つ、現在使用されている他の技術、例えば、リン酸カルシウム沈殿より効率的な細胞へのポリヌクレオチド輸送経路を提供する。

本発明の他の態様においては、外因性化合物は、天然若しくは合成ペプチド又はタンパク質、又はそれらの誘導体であり得る。好ましくは、抗原性を有するペプチド若しくはタンパク質、又はそれらの誘導体である。ペプチド又はタンパク質の誘導体は、例えば、非天然アミノ酸及び/又は個々のアミノ酸間の非天然結合を含む環状ペプチド又は擬似ペプチド(peptidomimetics)である。他の本発明の外因性化合物は、生理学的に活性を有する化合物、例えば、ホルモン、即ちステロイド等、炭水化物、又は薬剤学的化合物である。

特別に興味深いことは、薬剤学的調剤、特に局所的な調剤、例えば、軟膏、ゲル、ペースト、及びクリーム等、更に、特に、リポソームを含む薬剤学的な調剤の調製のための本発明の化合物の使用である。調剤の軟度(consistency)は、調剤に使用された水溶液の分量に依存している。上記のような本発明の化合物を含む調剤においては、水溶液に溶解しない又はほんの少し溶解する調剤を可溶化して、より高濃度の薬剤を体内に存在させよう 10 20 200

にすることができる。

薬剤学的な調剤において、本発明の化合物は、カチオン脂質がクリーム、ペースト、ゲル、及びコロイド状分散等の調剤に適用することができる状態において使用することができる。更なる情報のために、レミングトン薬剤学協会(Remington's Pharmaceutical Society), 第17版, Mark Publishing Company, Easton, Pa(1985)又はその他の薬剤学的調剤についての論文を参照することができる。

他の態様では、本発明の化合物は、治療的に及び/又は予防的な使用、好ましくは、予防及び/治療ワクチンとしての使用のための生物学的に活性な分子の輸送において有用である。好ましい態様において、本発明の化合物は、遺伝子治療及びアンチセンス治療、好ましくはヒト又はヒト以外の動物の予防及び/又は治療において有用である。本発明の化合物は、薬剤学的化合物の調製のために使用することができる。本発明の化合物は、ヒト及びヒト以外の治療のために使用することができる。

本発明の1つの態様においては、オリゴヌクレオチドは、免疫系を活性化することを示す(A. クレイグ(Kreig)ら、"バクテリアDNAのCpGモチーフに誘引されるB細胞の活性化(CpG motifs in Bacterial DNA Trigger Directed B Cell Activation)" Nature 374 : 546-549 (1995))メチル化されていないCpGジヌクレオチドを含む。側面にある配列によって、あるCpGモチーフは、B細胞又はT細胞反応に対してより免疫刺激性になり、且つ、あるスピーカーを優先的に刺激する。DNA発現ベクター内のCpGモチーフのコピーは、発現されたタンパク質に対する免疫反応の誘導を機能させるアジュバントとしての役目を果たす。明らかにされている配列内のCpGジヌクレオチドを含むDNAのストレッチであるCpGモチーフは、長さを5から40塩基対と短くすることができる。多数のCpGモチーフは、発現ベクターの非コーディング領域に導入することができる。体液性反応が必要とされる場合、好ましいCpGモチーフはB細胞反応を優先的に刺激するものである。細胞を介する免疫が必要とされる場合、好ましいCpGモチーフは、CD8+T細胞反応を機能させることができるとされているサイトカインの分泌を刺激するものである。

他の態様では、CpGモチーフはプラズミドベクターに挿入され、前記ベクターはその後バクテリア細胞内で複製され、CpGモチーフがその非メチル化形態を保つようにされる。前記ベクター又はその一部分は回収され、免疫刺激性物質としての、又はワクチンと共にアジュバントとしての本発明のリポソームにより標的細胞に輸送される。

本発明の化合物を使用した細胞内輸送は、生物全体において達成することもでき、幾つか 50

の異なる(diverse)応用において有用である。好ましくは、酵素置換治療は、所望の酵素の直接細胞内導入又は十分な遺伝子発現を行うために適当なプロモーター等を有する所望タンパク質をコードするDNA配列による細胞の適当なトランスフェクションにより行うことができる。必要であれば、導入可能なプロモーターは、興味のある遺伝子の起動又は停止を制御するために使用することができる。DNAトランスフェクションのために本発明の化合物を使用して達成することができる細胞内輸送の他の応用は、これらに限定されないが、ホルモン置換治療(例えば、インシュリン、成長因子等)、血液凝固因子置換治療、血液障害、例えば、-サラセミア又は他のヘモグロビン障害、アデノシンジアミナーゼ障害のための置換治療、及びニューロトランズミッター置換治療等である。細胞内輸送を増強のための調剤を使用する他の態様は、あるタンパク質の発現を選択的に停止するための「アンチセンス」RNAオリゴマーの輸送を含む。本発明の化合物は、生物学的活性物質を血液脳関門を通して輸送するために使用することもできる。

*in vivo*輸送系で使用するため的好ましいDNA / リポソーム比は、2 : 1から1 : 3、体重kg当たり1 μ gから100mgの範囲内のDNA / リポソーム比を含む。即ち、囊胞性纖維症の場合には

マウス：DNA / 脂質(W/W) 2 : 1、5mgから100mg、即ち体重kg当たりDNA 10mgから80mg；  
ヒト：DNA / 脂質(W/W) 1 : 5、100 μ gから8mg、即ち体重kg当たりDNA 125 μ gから7.5mg；  
冠状動脈障害の場合には、

ブタ：DNA / 脂質(W/W) 1 : 3、1 μ gから10 μ g、即ち体重kg当たりのDNA 2 μ gから8 μ gである。

本発明の1つの態様において、転移された細胞(標的細胞)は、好ましくは真核、細胞又は細胞系、より好ましくは動物細胞、好ましくは魚類細胞、即ち、真骨上目類、即ち、鮭、鱈、及び鰐等；齧歯動物細胞、即ち、ラット、マウス、及びハムスター等；偶蹄目類細胞、即ち、ブタ及びウシ等；奇蹄目類細胞、即ち、ウマ等；サル類細胞、即ち、ヒト及びアフリカ緑猿等とすることができます。好ましい細胞の種類は、上皮細胞、即ち、皮膚、肺、及び動脈等；筋細胞等；神経細胞等；及び生殖系細胞である。

*in vivo*応用、好ましくは魚類ワクチンのために好ましいリポソームは、式(I)で表される化合物及びDOPEを含む。特に好ましいのは、Q203、Q205、Q206、Q208、及びQ817である(表1参照)。

本発明の化合物は、そのトランスフェクションの能力を見るために、第一に細胞系及び初代(primary)細胞でのDNAプラズミドによるトランスフェクションで試験され、次に動物細胞でのトランスフェクションで試験される。

本発明の1つの態様は、本発明の化合物を用いた外因性化合物の全身、局所的又は局部的投与を含む。全身投与の方法は、筋内、静脈内、腹腔内、又は皮下投与を含むことができる。好ましくは、本発明の化合物は患者に投与することができる。本発明の他の態様は、経口手段、経皮手段又は経口吸入若しくは鼻腔内吸入による本発明の化合物の投与を含む。

外因性化合物を含むリポソーム、例えば、生物学的に活性のある物質は、投与に適する組成物に調剤することができる。例えば、経口投与のために本発明の化合物をカプセル、タブレット、又はゲルの形態とすることができます。他の態様においては、本発明の化合物は、軟膏、膏薬、ゲル、クリーム、パッチ、又は座薬とすることができます。

式(I)で表される化合物は、リポソームの調製に特に有用であるが、カチオン性脂質の応用法があれば、そのための多くのどのような用途にも使用することができる。例えば、それらは、工業的応用、食物又は試料、薬剤学的な調剤、化粧品組成物、又は脂質が用いられる他の分野において使用することができる。

本発明の化合物は、化粧品、例えば、メーキャップ、口紅、アイシャドウの材料、指の爪の研磨剤、ボディーローション、及び保湿剤クリーム等に使用することができる。また、それらは、単独で又は他の材料との組み合わせで、例えば、シャンプー、髪のコンディショナー、パーマウェーブ調剤、又は髪をまっすぐにするもの、又はヘアクリーム及びゲル等の成分のような髪の毛への応用に使用することができる。

10

20

30

40

50

本発明の1つの態様は、本発明の化合物は、*in vitro*での実験室内での使用における外因性化合物、例えば、マクロ分子の輸送に有用である。本発明の化合物を含む調剤は、生物全体へトランスフォームされた細胞の移植の前に、所望の特色を導入するための*in vivo*での細胞のトランスフェクト又は形質転換するために使用することができる。この応用の例は、-サラセミア、アデノシンデアミナーゼ障害、及び鎌状赤血球貧血等の障害を持つ患者の疾患を矯正するための所望の遺伝子、例えば、標準成人へモグロビン配列をコードするものを有する骨髄細胞を移入するためのものである。骨髄細胞は、*in vitro*でトランスフェクトすることができ、適切にトランスフェクトされた細胞は患者の髄に移植することができる。代わりに、細胞は、説明されたように*in vivo*でトランスフェクトすることができる。リン酸カルシウム沈殿等の操作は、このようなトランスフェクションで効果がより少なく、実用的な使用には適当ではない。トランスフェクションを達成する*in vitro*で応用される他の達成手段は、ウイルスベクター(例えば、SV-40及びレトロウイルス)の使用を含む。しかし、これらのウイルスは、発癌性であり、従って*in vivo*又は*in vitro*で細胞をトランスフェクトするために安全に使用することができない。本発明の化合物の調剤を使用する*in vivo*での細胞内輸送のための輸液の処方(formulate)も、抗ウイルス化合物(例えば、タンパク分解酵素阻害剤、ヌクレオシド誘導体、ヌクレオチド、又はポリヌクレオチド)；及び癌化合物(限定されるわけではないが、ヌクレオシド／ヌクレオチド、例えば、5-蛍光ウラシル、アデノシンアナログ、シトシンアナログ、及びプリンアナログ等)、アンスラシリジン(anthracyclines)(例えば、アドリアマイシン及びダウノマイシン(daunomycin))及びブレオマイシン(bleomycin)のような抗体；ヌオカルジノスタチン(nucarzinostatin)、マルコモマイシン(marcomomycin)及びアウロモマイシン(auromomycin)のようなタンパク質抗体；クロランブシル(chlorambucil)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、ニトロソ尿素(nitrosoureas)、メルファラン、アジリジン、アルキルアルカンスルフォネートのようなアルキル化剤；白金配位化合物；メトトレキセートのような葉酸塩アナログ；放射線感受剤(radiation sensitizers)；ビンクリスチニン及びビンプラストチンのようなアルカロイド；細胞骨格破壊試薬；分化性試薬；及び他の抗ガン剤の輸送のために有用である。本発明のこの点は、例えば、細胞による薬剤の低減した取り込み機構等により発生する薬剤耐性を回復するために特に有用である。

細胞培養の*in vitro*トランスフェクションのための好ましいDNA／リポソーム比は、0.01 μgから10 μg DNA / μgリポソームである。特に好ましいのは、0.1 μgから1 μg DNA / μgリポソームである。

本発明の1つの態様は、本発明の化合物を含むトランスフェクション用キット、好ましくは適した緩衝液と共に含むキットを提供する。

本発明をより詳しい理解のために、以下の実施例を記載する。これらの実施例は、例示の目的であり、本発明の範囲を限定するものではない。

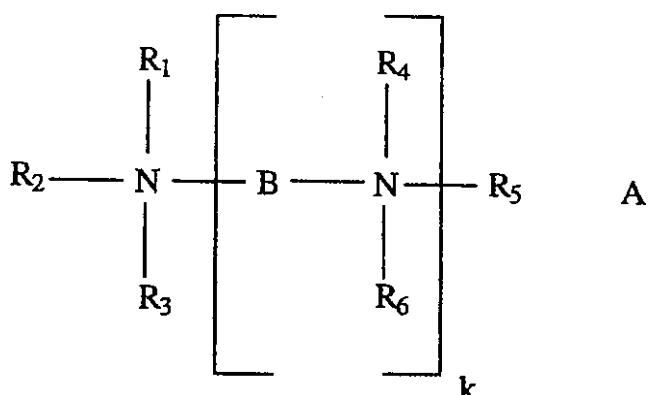
#### 実施例

##### 実施例1 - カチオン性シトフェクチン(cytotfectins)

以下全ての反応は、アルゴン保護をして、40時間から43時間還流下で、無水アセトニトリル又はエタノール中で行われた。固体生成物は、濾過により反応混合物から分離され、冷たいジエチルエステルで洗浄され、ジエチルエステル／メタノール及び他の溶媒混合物で再結晶された。ビス(第四級アンモニウム)表面活性剤の純度は、TLCによりオクタデシルシリカプレートの上で移動相クロロホルム／メタノール／n-プロパンール／エチルエステル／0.25% KCl水溶液25 / 13 / 25 / 25 / 9(v / v / v / v / v)を用いて確認された。これらの生成物内で出発原料は見つからなかった。

##### A. アルカンジイル- , -ビス(ジメチルアルキルアンモニウム臭化物)

アルカンジイル- , -ビス(ジメチルアルキルアンモニウム臭化物)の調製には2つの方法が使用された。その様な化合物は、以下の構造を持つものを含む。



10

式中、A = 臭化物( $\text{Br}^-$ )、k = 1 ; Bは、アルカンジイル架橋( $\text{CH}_2$ )<sub>n</sub>、式中、n = 2,3又は4を示す。

R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、及びR<sub>6</sub>は、メチル-(CH<sub>3</sub>)を示し、；

R<sub>2</sub>及びR<sub>5</sub>は、偶数の直鎖C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-アルキルを示す。

#### 方法(a)

， -ジブロム-プロパン又は-ブタンと10%過剰N,N,N-デシルジメチルアミン又はN,N,N-ドデシルジメチル-アミン又はN,N,N-オクタデシルジメチル-アミンとの反応

#### 方法(b)

アルカンジイル-， -ビス(ジメチルアミン)と10%過剰1-ブロモ-n-オクタン、1-ブロモ-n-デカン、1-ブロモ-n-ドデカン、1-ブロモ-n-テトラデカン、1-ブロモ-n-ヘキサデカン及びブロモ-n-オクタデカンとの反応

20

B. N,N',N - トリアルキル-N,N,N',N ,N - ペンタメチル-ビス-(2-アンモニオエチル)アンモニウム臭化物

N,N',N - トリアルキル-N,N',N - ペンタメチル-ビス-(2-アンモニオエチル)アンモニウム臭化物を得るためのN,N,N',N ,N - ペンタメチルジエチレントリアミンと5%過剰の適當な1-ブロモ-アルカンとの反応

上記方法により、以下のカチオン性シトフェクチンは調製された。

a) N,N',N - トリオクチル-N,N,N',N ,N - ペンタメチル-ビス-(2-アンモニオエチル)-アンモニウム臭化物

b) N,N',N - トリデシル-N,N,N',N ,N - ペンタメチル-ビス-(2-アンモニオエチル)アンモニウム臭化物

c) N,N',N - トリドデシル-N,N,N',N ,N - ペンタメチル-ビス-(2-アンモニオエチル)アンモニウム臭化物

d) N,N',N - トリテトラデシル-N,N,N',N ,N - ペンタメチル-ビス-(2-アンモニオエチル)アンモニウム臭化物

e) N,N',N - トリヘキサデシル-N,N,N',N ,N - ペンタメチル-ビス-(2-アンモニオエチル)アンモニウム臭化物

f) N,N',N - トリオクタデシル-N,N,N',N ,N - ペンタメチル-ビス-(2-アンモニオエチル)アンモニウム臭化物

実施例 2 -- カウンターイオンとしてのリン酸2水素(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)を用いたカチオン性シトフェクチンの調製

40

8gのドエックス(dowex)1×8-400アニオン交換樹脂は、クロマトグラフィックカラム内で50%水溶性メタノールにより極度に洗浄された。カラムは、カラム体積の20倍の1Mリン酸で、蒸留水で中性になるまで洗浄され、且つ、最後にカラム体積の10倍の50%メタノールで洗浄された。

これらの洗浄工程の後、臭化物形態のカチオン性シトフェクチン溶液は、50%メタノールに溶解され、カラムに載せられた。次に、50%メタノールは、ポンプを用いてカラムに流れ、カラム体積の20倍の溶出液が回収された。溶出液のpHは、リン酸2水素又はリン酸水素を調製するためにリン酸を用いて調整された。溶液は、ロータリーエバボレーターで濃縮され、凍結乾燥で粉末とされた。

50

この方法で調製された物質の例は以下を含む。

- 1) エタンジイル-1,2-ビス(ジメチルデシルアンモニウム塩化物)
- 2) エタンジイル-1,2-ビス(ジメチルデシルアンモニウムヨウ化物)
- 3) エタンジイル-1,2-ビス(ジメチルデシルアンモニウムリン酸2水素)
- 4) エタンジイル-1,2-ビス(ジメチルデシルアンモニウムチオスルフェート)
- 5) エタンジイル-1,2-ビス(ジメチルデシルアンモニウムスルフェート)
- 6) エタンジイル-1,2-ビス(ジメチルデシルアンモニウムオキサレート)

#### 実施例 3 --リポソームの調製

以下に提供される方法により、ここに提供されているカチオン性シトフェクチンと中性脂質、DOPEを結合させることによりリポソームを調製することができる。そのようなリポソームは、Q203、Q205、Q206、Q208、及びQ817(表1参照)を含む。10

材料：

クロロホルム(Merk,p.a.)、エンドトキシンを含まないイオン化されていない水、クロロホルム中のDOPE溶液、及びカチオン性シトフェクチン

方法：

簡単には、カチオン性シトフェクチン及び中性脂質をクロロホルム中の最終濃度が2mMになるように混合し、ロータリーエバポレーターで60℃で蒸発した。混合物は、10から15mbarの減圧下で、10分間乾燥された。滅菌状態で、エンドトキシンを含まないイオン化されていない水が混合物に添加され、攪拌しながら60℃で加熱された。

次に、幾つかの溶液は、300秒間60℃で一度音波処理された(例えば、最終生成物はQ203及びQ205である)。他の溶液は、音波処理されずに溶液が透明又はやや蛋白光を発するようになるまで60℃で攪拌された(例えば、最終生成物はQ206、Q208、及びQ817である)。全てのリポソームに対するDOPE+カチオン性シトフェクチンの総濃度は2mMであった。それぞれのリポソームのDOPE濃度は、表1のX(DOPE)値に2mMを掛けることにより計算することができる。従って、例えば、Q203を含むリポソームは、1.7mM DOPE及び0.3mM Q203である。表1(下記)では、本発明の方法に使用されたカチオン性シトフェクチンリポソームがまとめられている。表1は、全体像である。20

表1

カチオン性 シトフェクチン リポソーム 試薬	カチオン性シトフェクチン	X(DOPE)	調製方法
Q203 (18-4-18)	ブタンジイル-1,4-ビス(オクタデシルジメチルアンモニウム臭化物)	0.85	音波処理を行う
Q205 (18-4-18)	ブタンジイル-1,4-ビス(オクタデシルジメチルアンモニウム臭化物)	0.82	音波処理を行う
Q206 (18-4-18)	ブタンジイル-1,4-ビス(オクタデシルジメチルアンモニウム臭化物)	0.78	音波処理を行わない
Q208 (18-4-18)	ブタンジイル-1,4-ビス(オクタデシルジメチルアンモニウム臭化物)	0.75	音波処理を行わない
Q817	N,N',N"-トリヘキサデシル N,N',N"-ペントメチル-ビス-(2-アンモニオエチル) アンモニウム臭化物	0.80	音波処理を行わない

他の例においては、プロパンジイル-1,3-ビス(デシルジメチルアンモニウム臭化物)(10-3-10)及び1,2ジオレオイル-シン-グリセロ3-ホスホエタノールアミン(DOPE)からなるリポソームが作成された(X(DOPE)=0.50)。

#### 材料

クロロホルム(Merck,p.a.)、エンドトキシンを含まないイオン化されていない水、クロロホルム中のDOPE溶液及び10-3-10

#### 方法

85.21mg/mlのDOPE溶液を1.17ml及びクロロホルム中の10-3-10を57.3mg含む第一溶液が調製された。溶媒は、ロータリーエバポレーターにより60℃で除去された。脂質フィルムは、10から15mbarの減圧下で10分間乾燥された。

滅菌条件の下、100mlのエンドトキシンを含まないイオン化されていない水が脂質フィルムを入れたフラスコに添加された。フラスコは、透明又はやや蛋白光を発するようになるまで攪拌しながら60℃に加熱された。このリポソーム溶液のDOPE及び10-3-10の最終総濃度は2mMであった。

音波処理されたサンプルが調製されたら、溶液の更なる超音波処理が300秒間、市販の音波処理装置を用いて行われた。

#### 実施例4--トランスフェクションの実験

##### 音波処理 / 細胞特異的試薬を用いた及び用いないリポソームの調製

リポソームは、音波処理を行い、及び、行わないで、10-3-10(プロパンジイル-1,3-ビス(デシルジメチルアンモニウム臭化物)とDOPEとを結合することにより、60℃で調製された(実施例3に記載と同様)。

リポソームは、レポータープラズミドpCMVを用いてin vitroでHeLaS3及びCOS7細胞をトランスフェクトするために使用された。細胞溶解及び-Gal活性アッセイの後に光学密度(OD)測定により得られたトランスフェクション効率は、市販のリポソーム調製物(リポフェクタミン(Lipofectamine),Gibco LTI)を用いて並行して得られた効率と比較され、リ

10

20

30

40

50

ポフェクタミン効率のパーセントとして算出した。それぞれのトランスフェクションは、96ウェルプレートの1ウェル当たり1 $\mu$ gのpCMV（エンドフリー(EndoFree, QIAGEN)を用いて単離された）が使用された。DNAはDMEM培地(Gibco LTI)を用いて50 $\mu$ lに希釈され、1、2、3及び4 $\mu$ lのリポソーム調製物と混合され、続いてDMEM培地を用いて50 $\mu$ lに希釈された。DNA及びリポソーム溶液は混合され、6時間37℃で5%CO<sub>2</sub>の下、細胞に添加された。その後、培地は10%のウシ胎児血清を含むDMEMに換えられた。細胞は48時間37℃で5%CO<sub>2</sub>の下、インキュベーションした後、溶解された。

それぞれ2回決定が行われた。値は、列(row)毎に平均化され、最高(最適)効率がリポフェクタミンの最高効率(最適)のパーセント値を算出された。結果を表2に示す。

表2

10

X(DOPE)	調製物	結果(%)	
		HeLaS3	COS7
0.65	300秒間音波処理	83	8
0.50	300秒間音波処理	47	6
0.35	300秒間音波処理	39	6
0.20	300秒間音波処理	39	6
0.65	W/O音波処理	275	26
0.50	W/O音波処理	115	7
0.35	W/O音波処理	61	6
0.20	W/O音波処理	39	6

20

## まとめ：

a) リポソームの調製に音波処理が行われない場合は、HeLaS3及びCOS7細胞のトランスフェクション効率は高い。

30

b) カチオン性成分として10-3-10(プロパンジイル-1,3-ビス(デシルジメチルアンモニウム臭化物)を使用して生成されたリポソームは、リポフェクタミンよりも細胞特異的である。

疎水性側鎖の長さの変化(R)及びトランスフェクション効率/特異性

音波処理を行わずに、リポソームはDOPEを以下の1つと結合することにより60℃で調製された。

1) 10-2-10(エタンジイル-1,2-ビス(デシルジメチルアンモニウム臭化物)

2) 12-2-12(エタンジイル-1,2-ビス(ドデシルジメチルアンモニウム臭化物)

3) 14-2-14(エタンジイル-1,2-ビス(テトラデシルジメチルアンモニウム臭化物)

4) 16-2-16(エタンジイル-1,2-ビス(ヘキサデシルジメチルアンモニウム臭化物)

5) 18-2-18(エタンジイル-1,2-ビス(オクタデシルジメチルアンモニウム臭化物)

40

得られたリポソームは、レポータープラズミドpCMV(Clontech)を用いてin vitroでHuh7細胞をトランスフェクトするために使用された。細胞溶解及び-Gal活性アッセイの後にOD値の測定により得られたトランスフェクション効率は、市販のリポソーム調製物(リポフェクタミン(Lipofectamine), Gibco LTI)を用いて並行して得られた効率と比較され、リポフェクタミン効率のパーセントとして算出された。それぞれのトランスフェクションには、96ウェルプレートの1ウェル当たり0.5 $\mu$ gのpCMV(EndoFree, QIAGEN)を用いて単離されたものが使用された。DNAは、DMEM培地(Gibco LTI)を用いて50 $\mu$ lに希釈され、1、2、3及び4 $\mu$ lのリポソーム調製物と混合され、続いてDMEM培地を用いて50 $\mu$ lに希釈された。DNA及びリポソームの溶液は、混合され、細胞に6時間36℃で5%CO<sub>2</sub>の下、添加された。

50

その後、培地は10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地に換えられた。細胞は48時間37℃で5% CO<sub>2</sub>の下、インキュベーションした後、溶解された。それぞれ、2回決定が行われた。値は列(row)毎に平均化され、最高効率(最適)がリポフェクタミンの最高効率(最適)のパーセントとして算出された。

表3

化合物	X(DOPE)	結果(%)
10-2-10	0.50	142
10-2-10	0.60	127
10-2-10	0.70	111
10-2-10	0.80	115
12-2-12	0.50	70
12-2-12	0.60	127
12-2-12	0.70	138
12-2-12	0.80	89
14-2-14	0.50	48
14-2-14	0.60	74
14-2-14	0.70	98
14-2-14	0.80	157
16-2-16	0.50	104
16-2-16	0.60	124
16-2-16	0.70	126
16-2-16	0.80	169
18-2-18	0.50	82
18-2-18	0.60	68
18-2-18	0.70	105
18-2-18	0.80	115

## まとめ：

これらの結果は、Huh7細胞のトランスフェクションにおいて、

a) 側鎖の長さの増加は、最適X(DOPE)値に変化(shift)を起こすことを示す。10-2-10の場合には、最適X(DOPE)値は0.50より上にはならない。12-2-12の場合には、最適X(DOPE)値は0.70である。14-2-14、16-2-16及び18-2-18の場合には、最適X(DOPE)値は少なくとも0.80である。

b) この列(row)の疎水性側鎖の最適な長さは16である。(データは示されていないが、HeLaS3細胞では、疎水性側鎖の最適な長さは10である。LMH細胞では、疎水性側鎖の最適な長さは16である。COS7細胞では、疎水性側鎖の最適な長さは14である。)

架橋の長さの変化(k)及びトランスフェクション効率 / 特異性

音波処理を行わずに、リポソームはDOPEを下記の1つと結合させることにより60℃で調製された。

- 1) 10-2-10(エタンジイル-1,2-ビス(デシルジメチル-アンモニウム臭化物)
- 2) 10-3-10(プロパンジイル-1,3-ビス(デシルジメチル-アンモニウム臭化物)
- 3) 10-4-10(ブタンジイル-1,4-ビス(デシルジメチル-アンモニウム臭化物)

得られたリポソームは、レポータープラズミドpCMV(Clontech)を用いてin vitroでHeLaS3及びHuh7細胞をトランスフェクトするために使用された。細胞溶解及びβ-Gal活性アッセイの後にOD値を測定することにより得られたトランスフェクション効率値は、市販のリポソーム調製物(リポフェクタミン(Lipofectamine), Gibco LTI)により並行して得られた効率と比較され、リポフェクタミン効率のパーセント値として算出された。それぞれのトランスフェクションは、96ウェルプレートの1ウェル当たり0.5μgのpCMV(エンドフ

10

20

30

40

50

リー(EndoFree, QIAGEN)を用いて単離された)が使用された。DNAはDMEM培地(Gibco LTI)を用いて50 μlに希釈され、1、2、3及び4 μlのリポソーム調製物と混合され、続いてDME M培地を用いて50 μlに希釈された。DNA及びリポソーム溶液は混合され、6時間37 ℃で5% CO<sub>2</sub>の下、細胞に添加された。その後、培地は10%のウシ胎児血清を含むDMEMに換えられた。細胞は48時間37 ℃で5% CO<sub>2</sub>の下、インキュベーションした後、溶解された。それぞれ2回決定が行われた。値は、列(row)毎に平均化され、最高(最適)効率がリポフェクタミンから得られる最高効率(最適)のパーセント値として算出された。結果を表4に示す。

表4

シトフェクチン	X(DOPE)	結果(%)	
		HeLaS3	Huh7
10-2-10	0.50	216	142
10-2-10	0.60	286	127
10-2-10	0.70	165	111
10-2-10	0.80	178	115
10-3-10	0.50	241	80
10-3-10	0.60	293	83
10-3-10	0.70	223	54
10-3-10	0.80	118	39
10-4-10	0.50	200	76
10-4-10	0.60	257	62
10-4-10	0.70	200	54
10-4-10	0.80	123	34

## まとめ：

架橋の長さに関するカチオン性シトフェクチンにおける構造の変化は、

- a) 与えられた細胞系においてトランスフェクション試薬をより効率的にすることができ(Huh7: 架橋の長さが短くなると高率が上がる; HeLaS3細胞においては異なる)、
- b) 与えられた細胞系においてトランスフェクション試薬をより特異的にすることができる(架橋の長さを増加させると、HeLaS3のトランスフェクション効率は一定であるが、Huh7ではトランスフェクション効率が下がり、よって、HeLaS3により特異的なトランスフェクション試薬となる)。

#### シトフェクチン調製における臭化物以外のカウンターイオンの使用：トランスフェクション効率

本発明によれば、カチオン性シトフェクチンは、実施例2に記載されているように臭化物以外のカウンターイオンを用いて調製することができる。例えば、エタンジイル-1,2-ビス(デシルジメチルアンモニウム)-塩化物、-ヨウ化物、-リン酸塩(phosphate)、-スルフェート、-チオスルフェート、又は-オキサレートを調製することができる。

音波処理を行わずに、リポソームはDOPEを以下のシトフェクチンの1つと結合することにより60 ℃で調製された。

- 1) 10-2-10エタンジイル-1,2-ビス(デシルジメチルアンモニウム)オキサレート
- 2) 10-2-10エタンジイル-1,2-ビス(デシルジメチルアンモニウム)チオスルフェート
- 3) 10-2-10エタンジイル-1,2-ビス(デシルジメチルアンモニウム)ヨウ化物
- 4) 10-2-10エタンジイル-1,2-ビス(デシルジメチルアンモニウム)リン酸2水素

リポソームは、レポータープラズミドpCMV(Clontech)を用いてin vitroでHeLaS3細胞をトランスフェクトするために使用された。細胞溶解及び-Gal活性アッセイの後にOD値を測定することにより得られたトランスフェクション効率値は、市販のリポソーム調製物(リポフェクタミン(Lipofectamine), Gibco LTI)を用いて並行して得られた効率と比較さ

10

20

30

40

50

れ、リポフェクタミン効率のパーセント値として算出された。それぞれのトランスフェクションのために、96ウェルプレートの1ウェル当たり0.5 µgのpCMV（エンドフリー（Endo Free, QIAGEN）を用いて単離された）が使用された。DNAはDMEM培地（Gibco LTI）を用いて50 µlに希釈され、1、2、3及び4 µlのリポソーム調製物と混合され、続いてDMEM培地を用いて50 µlに希釈された。DNA及びリポソーム溶液は混合され、6時間37℃で5% CO<sub>2</sub>の下、細胞に添加された。その後、培地は10%のウシ胎児血清を含むDMEMに換えられた。細胞は48時間37℃で5% CO<sub>2</sub>の下、インキュベーションした後、溶解された。

下記の結果（表5）は、上記リポソームを用いたレポーターブラズミドpCVMVの最適トランスフェクション効率をリポフェクタミンを用いて得られた最高トランスフェクション効率のパーセントとして示している。

10

表5

カウンターイオン	X(DOPE)	結果(%)
スルフェート	0.50	879
スルフェート	0.60	927
スルフェート	0.70	265
スルフェート	0.80	1201
オキサレート	0.50	275
オキサレート	0.60	0
オキサレート	0.70	0
オキサレート	0.80	0
チオスルフェート	0.50	1552
チオスルフェート	0.60	1915
チオスルフェート	0.70	605
チオスルフェート	0.80	844
ヨウ化物	0.50	3230*
ヨウ化物	0.60	3230*
ヨウ化物	0.70	686
ヨウ化物	0.80	457
リン酸2水素	0.50	1966
リン酸2水素	0.60	3230*
リン酸2水素	0.70	580
リン酸2水素	0.80	615

20

\* このパーセント値は、β-Gal アッセイの上限を反映している。実際の値は更に高い。

HeLaS3細胞の同様の研究において、同じベクターは臭化物カウンターイオン及びシトフェクチン、10-2-10エタンジイル-1,2-ビス(デシルジメチルアンモニウム)を含むリポソームによりトランスフェクトされた。結果を以下に示す（表6）。

30

表6

カウンターイオン	X(DOPE)	結果(%)
臭化物	0.50	216
臭化物	0.60	286
臭化物	0.70	165
臭化物	0.80	178

一般的に、上記カウンターイオンを用いて調製されたカチオン性シトフェクチンを含むリポソームは、上記トランスフェクションでのDNAの輸送においてリポフェクタミンと比べ

50

より効果的である。例えば、スルフェート、チオスルフェート、ヨウ化物、及びリン酸2水素カウンターイオンを用いて調製されたシトフェクチンによるトランスフェクションは、リポフェクタミンを用いたトランスフェクションよりも高いトランスフェクション効率値を示した。最高トランスフェクション効率は、ヨウ化物及びリン酸2水素カウンターイオンを用いて調製されたカチオン性シトフェクチンを含むリポソームにより達成された。したがって、カウンターイオンはトランスフェクション効率の調節に有用である。

実施例5-3つの窒素／アンモニウム基を有するカチオン性シトフェクチンを用いたトラン  
スフェクションの実験

N,N',N - トリアルキル-N,N,N',N ,N - ペンタメチル-ビス-(2-アンモニオエチル)アンモニウム臭化物

化合物(3) [実施例1Bによる合成] 及びDOPEを含むリポソームは、60 °CでDOPEを用いて音波処理を行わずに調製された。

得られたリポソームは、レポータープラズミドpCMV (Clontech)を用いてin vitroでHeLa S3細胞及びCOS7細胞をトランスフェクトするために使用された。細胞溶解及び $\beta$ -Gal活性アッセイの後にOD値を測定することにより得られたトランスフェクション効率値は、市販のリポソーム調製物(リポフェクタミン(Lipofectamine), Gibco LTI)により並行して得られた効率と比較され、リポフェクタミン効率のパーセント値として算出された。それぞれのトランスフェクションは、96ウェルプレートの1ウェル当たり0.5 μgの p CMV (エンドフリー(EndoFree, QIAGEN)を用いて単離された)が使用された。DNAはDMEM培地(Gibco LTI)を用いて50 μlに希釈され、1、2、3及び4 μlのリポソーム調製物と混合され、続いてDME M培地を用いて50 μlに希釈された。DNA及びリポソーム溶液は混合され、6時間37 °Cで5% CO<sub>2</sub>の下、細胞に添加された。その後、培地は10%のウシ胎児血清を含むDMEMに換えられた。細胞は48時間37 °Cで5% CO<sub>2</sub>の下、インキュベーションした後、溶解された。

下記の結果(表7)は、上記リポソームを用いたレポータープラズミド p CVMV の最適トランスフェクション効率をリポフェクタミンにより得られた最高トランスフェクション効率のパーセントとして示している。Rはアルキル鎖中の炭素数を示している。それぞれのリポソームのDOPE濃度は、X(DOPE)値に2Mを掛けることにより計算することができる。

10

20

表 7

R=	X(DOPE)	結果	
		HeLaS3 (%)	COS7 (%)
10	0.50	231	11
10	0.6	222	9
10	0.7	52	16
10	0.8	47	20
12	0.5	0	3
12	0.6	9	5
12	0.7	17	8
12	0.8	63	29
14	0.5	7	8
14	0.6	7	9
14	0.7	9	12
14	0.8	35	58
16	0.5	31	18
16	0.6	39	16
16	0.7	70	44
16	0.8	75	38
18	0.5	65	20
18	0.6	61	34
18	0.7	80	79
18	0.8	61	93

A) 化学式、N,N',N - トリアルキル-N,N',N - ペンタメチル-ビス-(2-アンモニオエチル)アンモニウム臭化物を有するカチオン性シトフェクチンは、in vitroで細胞系をトランسفェクトすることができる。

B) 窒素に結合した異なるアルキル基は、異なる細胞系に対する特異性を変化させる。He 30 LaS3細胞は、鎖長10を用いることにより一番良くトランسفェクトされるが、COS7細胞は、鎖長18を最適とする。

---

フロントページの続き

(72)発明者 エルバッヘル クリストフ  
　　ドイツ連邦国、ハーン D 42781、ヒュルスペルグ 8  
(72)発明者 ベーバー マルティン  
　　ドイツ連邦国、ライヒリンゲン D 42799、フリーデルヴェグ 26

審査官 横井 宏理

(56)参考文献 国際公開第96/034109(WO, A1)  
特表平06-505157(JP, A)  
CHEMICAL ABSTRACTS, 1991年12月23日, Vol.115, No.25, p.579, 115:275625w欄  
CHEMICAL ABSTRACTS, 1989年 1月16日, Vol.110, No.3, p.217, 110:20127q欄  
CHEMICAL ABSTRACTS, 1991年 8月19日, Vol.115, No.7, p.259, 115:66241d欄

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 9/00 - 127

A61K 47/00 - 48

A61K 48/00

C12N 15/00 - 09

REGISTRY(STN)

CAplus(STN)

BIOSIS(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(DIALOG)