

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3961601号

(P3961601)

(45) 発行日 平成19年8月22日(2007.8.22)

(24) 登録日 平成19年5月25日(2007.5.25)

(51) Int. Cl.		F I	
CO7K	14/47	(2006.01)	CO7K 14/47
CO7F	9/10	(2006.01)	CO7F 9/10 B
CO7H	21/04	(2006.01)	CO7H 21/04 B
C12N	15/09	(2006.01)	C12N 15/00 Z N A A

請求項の数 6 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願平9-6195	(73) 特許権者	591003013
(22) 出願日	平成9年1月17日(1997.1.17)		エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公開番号	特開平9-202799		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公開日	平成9年8月5日(1997.8.5)		E AKTIENGESELLSCHAFT
審査請求日	平成15年12月16日(2003.12.16)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(31) 優先権主張番号	96100603.8		グレンツアーヘルストラツセ124
(32) 優先日	平成8年1月17日(1996.1.17)	(74) 代理人	100078662
(33) 優先権主張国	スイス(CH)		弁理士 津国 肇
		(74) 代理人	100072279
			弁理士 渡邊 睦雄
		(72) 発明者	ジャン-イブ・レジャンドル
			フランス国、エフ-75013 パリ、リ
			ユ・デ・コルドリエール 34

最終頁に続く

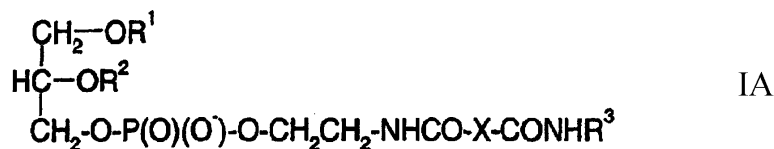
(54) 【発明の名称】 トランスフェクション能を有する分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(IA) :

【化10】

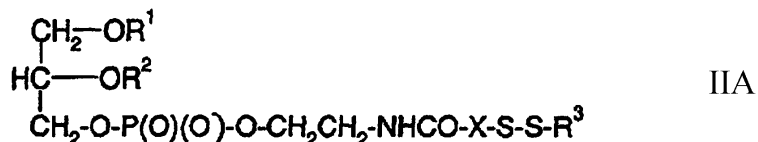


〔式中、Xは、C₂₋₁₀アルキレンであり；R¹及びR²は、独立に、C₁₂₋₂₀脂肪族カルボン酸のアシル残基であり；そしてR³は、- (CH₂) - CH(NH₂) - CO - Ile - Gly - Ala - Val - Leu - Lys - Val - Leu - Thr - Thr - Gly - Leu - Pro - Ala - Leu - Ile - Ser - Trp - Ile - Lys - Arg - Lys - Arg - Gln - Gln - NH₂基である〕で示される、複合体。

【請求項2】

式(IIA) :

【化3】



〔式中、Xは、 C_{2-10} アルキレンであり； R^1 及び R^2 は、オレオイルであり；そして R^3 は、-(CH₂)-CH(NH₂)-CO-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂基である〕で示される、複合体。

10

【請求項3】

ペプチドCys-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂、又はアミノ基が保護されているその誘導体。

【請求項4】

1) 請求項1又は2記載の少なくとも1つの複合体及びポリヌクレオチドを含む、あるいは、

2) 請求項1又は2記載の少なくとも1つの複合体、ポリヌクレオチド、並びに、ヘルパー脂質及び/又は短鎖リン脂質及び/又はカチオン性脂質若しくは前記複合体以外のトランスフェクション能を有する分子を含む、細胞をトランスフェクションするための組成物。

20

【請求項5】

1) 請求項1又は2記載の少なくとも1つの複合体を含む、あるいは、

2) 請求項1又は2記載の少なくとも1つの複合体、並びに、ヘルパー脂質及び/又は短鎖リン脂質及び/又はカチオン性脂質若しくは前記複合体以外のトランスフェクション能を有する分子を含む、細胞をトランスフェクションするための組成物。

【請求項6】

ポリヌクレオチドで細胞株をトランスフェクションするためのベクターとしての請求項1又は2記載の複合体、並びに場合により、ヘルパー脂質及び/又は短鎖リン脂質及び/又はカチオン性脂質若しくは前記複合体以外のトランスフェクション能を有する分子の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

遺伝子導入技術(Gene transfer technology)は、相当重要な分野になってきている。外因性遺伝子の細胞への導入(即ち、トランスフェクション)は、遺伝子調節及び組換えタンパク質の産生から遺伝子治療にわたる、多くの重要な科学的及び医学的な応用を産んでいる。

【0002】

ウイルスは、遺伝子の導入に対する種々の細胞性障壁を迂回すべく進化しており、実際トランスフェクションのために選択されるベクターになっている。レトロウイルス、アデノウイルス又はヘルペスウイルスを含む多くのウイルスは、今や治療用遺伝子を運搬するように改変されて、遺伝子治療のヒトの臨床試験に使用されている。しかし感染及び免疫反応の危険性は依然として残っており、ウイルスの大規模な産生は、困難であり時間がかかる。

40

【0003】

これら種々の理由により、DNAを細胞中に運搬するための非ウイルス系が開発されている。例えば、リポフェクチン(Lipofectin)(登録商標)として商品化された、カチオン性脂質であるジオレオイルオキシプロピルトリメチルアンモニウム(Felgner et al., Pr

50

oc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417, 1987)に基づくトランスフェクション法がある。このトランスフェクション法の発見により、更に多くのカチオン性脂質が合成され、幾つかは、実験室用のトランスフェクション試薬として市販されている：D O G S (トランスフェクタム (Transfectam) (登録商標))、D O S P A (リポフェクタミン (Lipofectamine) (登録商標))、D O T A P (D O T A P (登録商標))。

【0004】

しかし非ウイルス性遺伝子送達系 (non-viral gene delivery systems) の処方 of 重要な進歩にもかかわらず、合成系のトランスフェクション効率は通常ウイルス性ベクターより低いいため、より効率的な方法の必要性が今も存在する。更には、未だインビボで多くの問題が発生し、生体液中の非ウイルス系の安定性が低いため、インビボのトランスフェクションを高レベルで再現性よく行うことができない。

10

【0005】

D N A のようなオリゴヌクレオチドによる細胞のトランスフェクションは、例えば、宿主細胞又は生物で、通常ならその細胞又は生物で発現しないタンパク質を発現させるために使用することができる。例えば、プラスミドと呼ばれる自己複製 D N A 分子を、通常ならそのプラスミドを含まない細胞中に、その細胞でマーカー遺伝子産物を発現させるために、又は後でその細胞から回収される組換えタンパク質のような目的のタンパク質を発現させるために、導入することができる (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, 1989) ch. 1. を参照)。細胞へのオリゴヌクレオチドのトランスフェクションは治療にも使用することができる。例えば、ひとたび細胞又は細胞核に入ったアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ワトソン・クリック型塩基対形成により標的の一本鎖核酸分子に結合するか、又はフーグスティーン型塩基対形成により二本鎖核酸に結合し、こうして幾つかの機作 (正常の転写、スプライシング、若しくは翻訳に必要な因子の結合を妨害すること; R N A s e H による m R N A の酵素的分解を誘発すること; 又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに直接結合した反応性基により標的を破壊すること) の1つにより標的の機能を破壊する (Zamecnic et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75: 280-284参照)。その他の治療的応用には、遺伝子治療又は D N A に基づくワクチン接種がある。

20

【0006】

タンパク質及び他のアニオン性高分子は、治療及びスクリーニングの目的で細胞中に導入される。例えば、免疫原性タンパク質を細胞中に導入することにより免疫化は増強され、そのため、タンパク質はより効率的なプロセスにより細胞の表面に提示され、こうして免疫原性応答は増強されることとなる。細胞の内側で作用する負に荷電したアニオン性高分子は、疎水性細胞膜を通して、その作用を発揮する細胞質中に輸送される。D N A の転写を増強又は妨害する因子は、目的の遺伝子の転写を確認するためのスクリーニング試験に使用することができる。これらの転写アッセイを、特定の高分子 (例えば、細胞レセプター) に対する化合物の作用を測定するためのスクリーニングに使用することは非常によく知られている。

30

【0007】

本発明により、塩基性の膜障害性ペプチドに脂質との複合体を形成させると、ポリヌクレオチド及びアニオン性高分子に結合し、細胞のトランスフェクションに使用することができる、新規な化合物が生じることが判った。したがって、1つの局面で本発明は、脂質と塩基性の膜障害性ペプチドとの複合体であり、かつトランスフェクション能を有する (transfection competent) 分子である、新規な化合物に関する。

40

【0008】

「複合体」という用語は、ペプチドに化学結合した (例えば、脂質に存在するか若しくは結合している硫黄原子と、ペプチドに存在するか若しくは結合している硫黄原子との間に形成されるジスルフィド結合; 又は脂質に存在するか若しくは結合しているカルボキシル基と、ペプチドのアミノ基との間に形成されるアミド結合による) 脂質よりなる化合物を意味する。

50

【0009】

本明細書で使用される「脂質」という用語は、直鎖、分岐鎖、飽和又は不飽和の脂肪族カルボン酸及びリン脂質を含む。脂肪族カルボン酸の例としては、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸及び $(\text{C}_n\text{H}_{2n-1}\text{COOH})_2$ (式中、nは、3～19の整数である)がある。リン脂質の例としては、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンのようなホスファチジルエタノールアミン類がある。

【0010】

「塩基性ペプチド」という用語は、少なくとも1つの塩基性アミノ酸を含有するペプチドを意味する。このような塩基性アミノ酸の例としては、 γ -ジアミノプロピオン酸、 ϵ -ジアミノ酪酸、リシン、アルギニン、オルニチン及びp-アミノフェニルアラニンのような、天然及び非天然のジアミノ-モノカルボン酸がある。

10

【0011】

「膜障害性ペプチド」という用語は、膜の障壁機能を乱す細胞溶解性又は抗菌性ペプチドを意味する (G. Saberwal and R. Nagaraj, BBA 1197: 109-131, 1994)。塩基性の細胞溶解性ペプチドの例としては、メリチン (melittin)、溶血素 (hemolysin)、マストパラン (mastoparan)、ボンポリチン (bombolitin)、クラブロリン (crabrolin)及びこれらの誘導体がある。塩基性の抗菌性ペプチドの例としては、セクロピン (cecropins)、マガイニン (magainins)、グラミシジン S (gramicidin S) 及びチロシジン (tyrocidine) 並びにこれらの誘導体又は類似体がある。「類似体」という用語は、元のペプチドが関与する生物学的活性を実質的に変化させることなく、1以上のアミノ酸残基が、欠失しているか、又は別のアミノ酸で置換されているペプチドのことをいう。「誘導体」という用語は、末端カルボキシル基が、エステル化されて、特にメチルエステル及びエチルエステルのような低級アルキルエステルを形成するか；又はアミド (低級アルキルアミド又はジ-低級アルキルアミド) 若しくはヒドラジドに変換されているペプチドのことをいう。「低級」という用語は、1～6個の炭素原子を含有する基を意味する。

20

【0012】

したがって、1つの局面で本発明の新規な化合物は、式 (I) :

【0013】

【化4】



30

【0014】

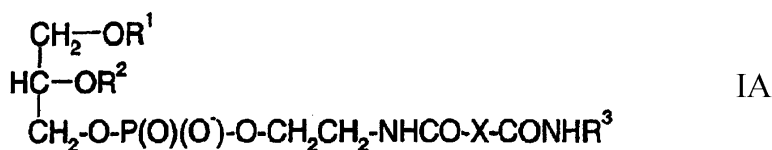
〔式中、Rは、直鎖若しくは分岐鎖の、飽和若しくは不飽和脂肪族カルボン酸の炭化水素部分、又は自由原子価結合を有するリン脂質部分であり；R³は、1個又は2個の炭素原子で自由原子価結合を有する塩基性膜障害性ペプチドであり；そしてnは、1又は2である〕で示される化合物である。

【0015】

好適には、nは1である。特に好適な化合物は、式 (IA) :

【0016】

【化5】



40

【0017】

〔式中、Xは、C₂₋₁₀アルキレンであり；R¹及びR²は、独立に、C₁₂₋₂₀脂肪族カルボン酸のアシル残基であり；そしてR³は、上記と同義である〕で示される複合体である。

50

【0018】

「C₁₂₋₂₀」という用語は、12～20個の炭素原子の数を意味する。アシル残基R¹及びR²は、直鎖又は分岐鎖の、飽和又は不飽和残基であってよい。このような残基の例としては、ラウロイル、パルミトイル、ステアロイル及びオレオイルがある。好適には、R¹及びR²はオレオイルである。Xは、好適には、エチレン、プロピレン又はデカメチレンである。

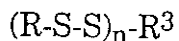
【0019】

別の好適な局面としては、本発明は、式(II)：

【0020】

【化6】

10



II

【0021】

〔式中、R、R³及びnは、上記と同義である〕で示される新規な化合物に関する。

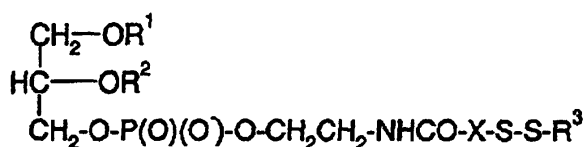
【0022】

式(II)の化合物において、nは、好適には1である。最も好適な化合物は、式(IIA)：

【0023】

【化7】

20



IIA

【0024】

〔式中、R¹、R²、R³及びXは、上記と同義である〕で示される化合物である。

【0025】

最も好適には、R³は、-(CH₂)-CH(NH₂)-CO-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂基である。

【0026】

別の局面で本発明は、上記に定義した新規な化合物、即ち、脂質と塩基性の膜障害性ペプチドとの複合体、並びに少なくとも1つのこのような化合物、ポリヌクレオチド又は任意の他のアニオン性高分子、及び、場合により、ヘルパー脂質及び/又は短鎖リン脂質、及び/又はカチオン性脂質若しくは本発明の複合体(即ち、式(I)又は(II)の化合物)以外の別の公知のトランスフェクション能を有する分子を含む組成物の製造方法に関する。更に別の局面で本発明は、脂質と塩基性の膜障害性ペプチドとの複合体、並びにヘルパー脂質及び/又は短鎖リン脂質、及び/又はカチオン性脂質若しくは本発明の複合体(例えば、式(I)又は(II)の化合物)以外の別の公知のトランスフェクション能を有する分子を含む組成物に関する。本発明は更に、ポリヌクレオチド又は他の任意のアニオン性高分子で細胞をトランスフェクションするための担体としての、この新規な化合物の用途に関する。本発明の複合体化合物と、場合により、ヘルパー脂質及び/又は短鎖リン脂質及び/又はカチオン性脂質若しくは本発明の複合体以外のトランスフェクション能を有する分子はポリヌクレオチド又は他のいかなるものであってもよいアニオン性高分子で細胞をトランスフェクションするためのベクターとして使用される。

40

【0027】

本発明により提供される化合物は、式R³NH₂のペプチドを、式R-COOHの脂質と

50

反応させるか、又は式 R^3-SH のペプチドを、式 $R-SY$ (式中、 Y は、2-ピリジンチオのような脱離基である) の脂質と反応させることにより、調製することができる。これらの反応は、それ自体既知の方法で行うことができる。

【0028】

したがって、式 R^3-NH_2 のペプチドと、式 $R-COOH$ の脂質とのカップリングは、ペプチド結合を生成するための既知の方法と同様に、ジシクロヘキシルカルボジイミドのような縮合試薬の存在下で適切な溶媒中で上記化合物を反応させることにより行うことができる。

【0029】

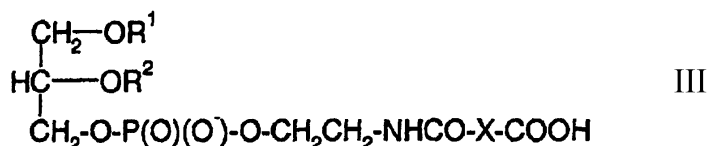
式 R^3-SH のペプチドと、式 $R-SY$ の化合物との反応は、両方の反応物を可溶化する適切な溶媒又は溶媒混合物中で行うことができる。式 $R-SY$ の化合物は、有機溶媒(例えば、クロロホルム)に溶解することができる。ペプチド R^3-SH は、単一相の反応系の形成を達成するために、適切には、アセトニトリルのような適量の水混和性有機溶媒を含有する水性緩衝液(例えば、リン酸緩衝液)に溶解する。

【0030】

式 $R-COOH$ 及び $R-SY$ の化合物は、既知であるか、又は既知の方法(例えば、*Biochim. Biophys. Acta* 862, 435-439 (1986)に記載されるような)により調製することができる。例えば、式(III):

【0031】

【化8】

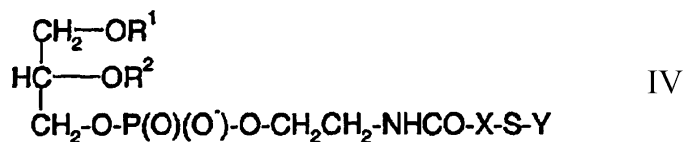


【0032】

[式中、 R^1 及び R^2 は、オレオイルであり；そして X は、エチレン、プロピレン又はデカメチレンである]で示される化合物、及び式(IV):

【0033】

【化9】



【0034】

[式中、 R^1 及び R^2 は、オレオイルであり； X は、エチレンであり；そして Y は、2-ピリジンチオである]で示される化合物は、*N*-スクシニル-*PE*、*N*-グルタリル-*PE*、*N*-ドデカニル-*PE* 及び *N*-*PDP*-*PE* (*Avanti Polar Lipids*, *Alabaster*, *Alabama*, *USA*)として市販されている。

【0035】

式(I)又は(II)の化合物を使用して、任意のアニオン性高分子を細胞中にトランスフェクションすることができる。アニオン性高分子は、1分子当たり少なくとも1つの負の電荷を含有する高分子である。本発明によりトランスフェクションすることができるアニオン性高分子の例としては、デオキシリボ核酸(DNA)及びリボ核酸(RNA)のような、ポリヌクレオチド；及びリボ核タンパク質及び免疫化に使用されるタンパク質(例えば、ウイルス性タンパク質)のようなタンパク質を含む。本発明の用途のためのDNAの例としては、プラスミド及び遺伝子(特に、囊胞性繊維症トランスメンブランレギュレー

10

20

30

40

50

ター (CFTR)、アデノシンデアミナーゼ (ADA)、チミジンキナーゼ (tk) 及び HLAB7 のような遺伝子治療プロトコールが既に着手されているもの) ; 並びに、
 - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ及び
 - 1 アンチトリプシンのようなリポーター遺伝子がある。DNA の他の例としては、アンチ
 センス、アプタマー (aptamer) 又は「三重らせん」試薬として使用される、オリゴデオキ
 シヌクレオチド及びこれらの類似体がある。RNA の例としては、リボザイム又はオリゴ
 リボヌクレオチドアンチセンス分子がある。

【0036】

トランスフェクションされる細胞の性質は、厳密に限定されるものではない。この細胞は
 、原核又は真核細胞、哺乳動物又は植物細胞であってよい。

10

【0037】

本発明の複合体 (例えば、式 (I) 又は (II) の化合物) を使用する細胞のトランスフェ
 クションにおいて、細胞を、適量のこのような化合物の存在下でアニオン性高分子に接触
 させる。所定量のアニオン性高分子に対する適量の複合体 (例えば、式 (I) 又は (II)
 の化合物) は、これらの各電荷に依存する。複合体とトランスフェクションする分子との
 間の + / - 電荷比は、一般に 0.1 ~ 10、好適には 0.5 ~ 5 の間で変化する。「+ /
 - 電荷比」の値は、R³ 基のアミノ酸上の正に荷電した基の数を、トランスフェクション
 する分子の負の電荷の数で割ることにより計算される。トランスフェクションする分子が
 、例えばポリヌクレオチドである時、負の電荷の数は、基本骨格中の負に荷電したリン酸
 の数を意味する。これらの範囲内の最適比は、トランスフェクションされる細胞に依存し
 、本発明が属する分野の当業者には容易に確認することができる。

20

【0038】

細胞の数に対するアニオン性高分子の量は、10⁴ 個の細胞をトランスフェクションする
 ためのアニオン性高分子の量が、0.1 ng ~ 10 µg、好適には 0.2 µg ~ 2 µg であ
 る。アニオン性高分子が DNA である時、インビトロで 10⁴ 個の細胞をトランスフェク
 ションするのに好適な DNA の量は、0.1 µg ~ 10 µg である。インビボで細胞をト
 ランスフェクションする場合、DNA の好適な量は、0.1 µg ~ 1 g である。

【0039】

本発明の好適な局面において、トランスフェクションは更に、ヘルパー脂質及び / 又は短
 鎖リン脂質、及び / 又はカチオン性脂質若しくは本発明の複合体以外の別の公知のラン
 スフェクション能を有する任意の分子の存在下で行われる。任意の従来のヘルパー脂質を
 使用することができる。ヘルパー脂質は、トランスフェクション能を有する分子と一緒に
 使用されると、細胞への高分子の送達を増加させることが知られているリン脂質である。
 ヘルパー脂質の例としては、ホスファチジルコリン若しくはホスファチジエタノールア
 ミン又はその混合物のような、リン脂質がある。好適なヘルパー脂質は、ジオレオイルホ
 スファチジエタノールアミンのような、ホスファチジエタノールアミン類である。任
 意の従来の短鎖リン脂質を使用することができる。短鎖リン脂質は、脂肪酸残基を含有し
 、その脂肪酸残基が、6 ~ 12 個の炭素原子をその基本骨格に含有する、リン脂質である
 。短鎖リン脂質の例としては、2 個の C₆₋₁₂ 脂肪酸残基を有するホスファチジルコリンが
 ある。好適な短鎖リン脂質は、ジカプリル - 及びジカプリロイルホスファチジルコリンで
 ある。

30

40

【0040】

トランスフェクション能を有する分子の例としては、J.B. Behr (Bioconjugate Chem. 5:
 382-389 (1994)) 並びに X. Gao 及び L. Huang (Gene Ther. 2:710-722 (1995)) に記載され
 たようなカチオン性脂質 ; A.V. Kabanov 及び V.A. Kabanov (Bioconjugate Chem. 6:7-2
 0 (1995)) に記載されたようなポリカチオン ; ペプチド及びポリマー並びに F.D. Ledley
 (Human Gene Therapy 6:1129-1144 (1995)) に記載されたような他の非ウイルス性遺伝子
 送達系を含む。

【0041】

ヘルパー脂質及び / 又は短鎖リン脂質及び / 又はカチオン性脂質若しくは本発明の複合体

50

以外のトランスフェクション能を有する任意の分子は、適切にはリポソーム、ミセル、有機性若しくは水性分散液、又は有機性若しくは水性溶液の形である。式(I)の化合物とヘルパー脂質との間の最適分子比は、0.1~50、好適には1~10である。ヘルパー脂質と短鎖リン脂質との間の最適分子比は、2~20である。式(I)又は(II)の化合物と追加するトランスフェクション能を有する分子との間の最適分子比は、0.1~10である。本発明の複合体化合物は、その化合物を少なくとも1つ含む組成物、あるいは、それと、ヘルパー脂質及び/又は短鎖リン脂質及び/又はカチオン性脂質若しくは本発明の複合体以外の別の公知のトランスフェクション能を有する分子を含む組成物とすることができる。この組成物は、その成分が、水性若しくは有機性溶液、水性若しくは有機性分散液、又はリポソーム若しくはミセルの形態である。この組成物は、固体、液体、半固体又はエーロゾルの形態であってよい。

10

【0042】

トランスフェクションのため、適量の本発明の複合体(例えば、式(I)又は(II)の化合物)を、適切には水溶液中で、トランスフェクションする分子(例えば、プラスミドDNA)に添加する。場合により、ヘルパー脂質、及び所望であれば、次に、リポソーム、混合ミセルの形で、又は水性若しくは有機性溶液、若しくは水性若しくは有機性分散液として、短鎖リン脂質及び/又はカチオン性脂質若しくは本発明の複合体以外の別の公知のトランスフェクション能を有する任意の分子を添加する。あるいは、トランスフェクションする分子である、ポリヌクレオチド又は任意の他のアニオン性高分子は、本発明の複合体化合物、ヘルパー脂質、及び所望であれば、短鎖リン脂質及び/又はカチオン性脂質若しくは本発明の複合体以外の別の公知のトランスフェクション能を有する任意の分子を含む組成物に添加することができる。この組成物は、固体、液体、半固体又はエーロゾルの形であってよく、好ましくはリポソーム、ミセルの形で、又は水性若しくは有機性溶液、若しくは水性若しくは有機性分散液として存在してよい。

20

【0043】

動物又はヒトの患者の細胞をトランスフェクションするために、この組成物は、経口、非経口(静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内)、経皮、肺内、鼻内、直腸内、眼内、心室内、血管内(カテーテル)及び腫瘍内(intratatumoral)経路により投与することができる。更にこの組成物は、皮膚表面への高速密着投与(high velocity impaction administration)により投与することができる。トランスフェクションの進行は、当業者に知られている適切な試験プロトコールにより測定することができる。

30

【0044】

ペプチドCys-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂は新規であり、また、本発明の一部である。これは、例えば以下に記載されるように固相ペプチド合成により、当該分野で既知の方法により調製することができる。

【0045】

下記の実施例により、更に本発明を説明するが、これにより本発明を限定するものではない。

40

【0046】

【実施例】

実施例1

a) ペプチドR³SHの調製

Atherton and Sheppard, Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press Oxford 1989)に記載される方法により、Tenta Gel SRAM樹脂(0.22 mmol/g) [Rapp Polymere GmbH, Tübingen, Germany]から出発して、Milligen 9050合成機で連続フロー固相合成を行った。アミノ保護には、塩基不安定Fmoc基を使用した。側鎖は、以下の保護基で保護した: Arg(Pmc)、Cys(Trt)、Gln(Trt)、Lys(Boc)、Ser(But)及びTrp(Boc)。1当量のTPTU

50

(Knorr et al., Tetrahedron Lett. 1989, 30, 1927-1930)及びD I P E AでF m o c - アミノ酸 (2 . 5 当量) を活性化した。D M F 中の 2 0 % ピペリジンでF m o c 脱保護を行った。C y s (T r t) - I l e - G l y - A l a - V a l - L e u - L y s - V a l - L e u - T h r (B u t) - T h r (B u t) - G l y - L e u - P r o - A l a - L e u - I l e - S e r (B u t) - T r p (B o c) - I l e - L y s (B o c) - A r g (P m c) - L y s (B o c) - A r g (P m c) - G l n (T r t) - G l n (T r t) - アミド Tenta Gel S 樹脂 (1 . 1 g) を、8 6 % T F E、1 0 % E D T、4 % H₂ O の混合物 (2 0 ml) で3 時間処理した。この反応混合物を濃縮して、ジエチルエーテル中に注ぎ入れて、濾過により沈殿物を回収し、水から凍結乾燥した。粗生成ペプチドを分取用H P L C により精製した。均質なC y s - I l e - G l y - A l a - V a l - L e u - L y s - V a l - L e u - T h r - T h r - G l y - L e u - P r o - A l a - L e u - I l e - S e r - T r p - I l e - L y s - A r g - L y s - A r g - G l n - G l n - N H₂ · 5 T F A を得た。

10

【 0 0 4 7 】

b) 式 (I I) の化合物の調製

上記段落 a) で得られた均質なペプチド (3 4 . 6 mg、1 0 μ mol) を、1 0 0 mM リン酸緩衝液 (pH 6 . 5) 1 ml 及びアセトニトリル 1 ml の混合物に溶解した。この溶液に、クロロホルム 2 . 8 ml 中の 1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオナート] 1 0 . 6 mg を添加した。混合物を室温で1 時間静置して、エバポレーションにより有機溶媒を除去した。残った溶液を、2 . 5 ml の体積まで水で希釈して、Pharmacia Biotech P D - 1 0 カラムに通した。水 3 . 5 ml で生成物を溶出して、凍結乾燥した。R¹ 及び R² が、オレオイルであり、そして R³ が、 - (C H₂) - C H (N H₂) - C O - I l e - G l y - A l a - V a l - L e u - L y s - V a l - L e u - T h r - T h r - G l y - L e u - P r o - A l a - L e u - I l e - S e r - T r p - I l e - L y s - A r g - L y s - A r g - G l n - G l n - N H₂ 基である、式 (I I A) の化合物 2 8 . 9 mg を得た。I C P - M S : M = 3 7 2 2 。

20

【 0 0 4 8 】

実施例 2

a) 実施例 1 b) で得られた化合物 1 . 1 mg をトリフルオロエタノールに可溶化して、クロロホルム中のジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (D O P E) 1 . 1 mg と混合した。この混合物を減圧下で乾燥して、残ったフィルム状物を 3 0 mM トリス C l 緩衝液 (pH 8 . 5) 1 ml で再水和した。

30

b) プラスミド D N A (1 0 μ g) を、3 0 mM トリス C l 緩衝液 (pH 8 . 5) 4 0 0 μ l に希釈した。次に段落 a) で得られた生成物 2 0 μ l を添加して穏やかに混合した。次にこの混合物を細胞に添加した。

【 0 0 4 9 】

表 1 は、実施例 2 により処方した実施例 1 b で得られた化合物、並びに 2 つの市販のトランスフェクションベクターである D O T A P 及びリポフェクタミン (Lipofectamine) の、同じトランスフェクション条件を使用した種々の細胞株でのトランスフェクション効率を示す。

40

【 0 0 5 0 】

実施例 2 により処方した実施例 1 b で得られた化合物を使用する、種々の細胞株のトランスフェクション効率に及ぼす D N A 用量の影響を表 2 に示す。データは、高用量の D N A 及び実施例 1 b で得られた化合物が、明らかな毒性なく細胞に適用しうることを示している。

【 0 0 5 1 】

表 1 : 実施例 1 b の化合物と D O P E、又はカチオン性脂質の混合物による種々の細胞株のトランスフェクション。本実施例の始めに記載したとおりに処方した - ガラクトシダーゼをコードするプラスミドで、細胞をトランスフェクションした。トランスフェクションの 4 8 時間後 - ガラクトシダーゼ活性を測定した。結果は、ウェル当たりの μ 単位と

50

して表す。

【 0 0 5 2 】

【 表 1 】

表 1

細胞株	β-ガラクトシダーゼ		
	実施例 1 b の化合物	DOTAP ²⁾	リポフェクタミン ²⁾
293-EBNA	2343658	706718	99050
C2E12	563827	156947	17655
CHO K1	1825019	814133	48457
HeLa	33497	5409	243
LM	31685	68614	35066
LM tk-	1712739	594518	45435

2) DOTAPおよびリポフェクタミントランスフェクション複合体は製造者の指示にしたがって調製した。

【 0 0 5 3 】

表 2 : DNA用量を増加した時の実施例 1 b の化合物と D O P E との混合物による種々の細胞株のトランスフェクション。本実施例の始めに記載したとおり処方した β-ガラクトシダーゼをコードするプラスミドで、細胞をトランスフェクションした。トランスフェクションの 48 時間後 β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。結果は、ウェル当たりの μ 単位として表している。

【 0 0 5 4 】

【 表 2 】

表 2

	β-ガラクトシダーゼ活性			
	COS-1	HepG2	CV-1	3T3
0.2 μg DNA	16325	2533	2700	318
0.5 μg DNA	20545	7944	4440	451
1 μg DNA	16005	8988	9775	1032
2 μg DNA	15740	13816	20434	1301

【 0 0 5 5 】

実施例 3

a) 実施例 1 b) で得られた化合物 1.0 mg をトリフルオロエタノールに溶解して減圧下で乾燥した。次にこのフィルム状物を 10 mM トリスマレイン酸緩衝液 (pH 6) 1 ml で再水和した。

b) プラスミド DNA 溶液 (1 mg/ml) 10 μl を滅菌した純水 190 μl で希釈した。段落 a) で得られた生成物 100 μl を添加して穏やかに混合した。次にこの混合物を細胞に添加した。

【0056】

表3は、上述のとおり処方した実施例1bの化合物、並びに2つの市販のカチオン性脂質トランスフェクション試薬であるDOTAP及びDOSPERの、同じトランスフェクション条件を使用した種々の細胞でのトランスフェクション効率を示す。データは、実施例1bの化合物が、DOSPER及びDOTAPよりも、各々3～40及び25～500倍大きくルシフェラーゼ活性を媒介することを示した。更には、懸濁培養細胞株WEHI 231.7を低いレベルながらトランスフェクションできたのは、実施例1bの化合物のみであった。

【0057】

表3：実施例1bの化合物又はカチオン性脂質による種々の細胞株のトランスフェクション。6ウェルプレートで増殖させた細胞を、本実施例の始めに記載したとおり処方したルシフェラーゼをコードするプラスミド（ウェル当たり2 μ g DNA）でトランスフェクションした。48時間後ルシフェラーゼ活性を測定した。結果は、細胞タンパク質1mg当たりの光単位として表した。バックグラウンドは、各測定から差し引いた。

【0058】

【表3】

表3

細胞株	ルシフェラーゼ活性		
	DOTAP*	DOSPER*	実施例1bの化合物
CHO-K1	2.69 10 ⁶	2.50 10 ⁷	5.19 10 ⁸
CV-1	1.14 10 ⁵	1.31 10 ⁶	5.54 10 ⁷
293	7.31 10 ⁶	5.70 10 ⁷	1.71 10 ⁸
WEHI 231.7	0	0	1.85 10 ²

*)DOTAP (Avanti Polar Lipids Inc.) 若しくはDOSPER (Boehringer-Mannheim)トランスフェクション複合体は製造者の指示にしたがって調製し、5/1 (wt/wt) のカチオン性脂質/DNAの比で用いた。

【0059】

実施例4

a) 実施例1b) で得られた化合物1.0mgをトリフルオロエタノールに溶解して減圧下で乾燥した。次にこのフィルム状物を10mMトリスマレイン酸緩衝液(pH6) 1mlで再水和した。

b) プラスミドDNA溶液(1mg/ml) 10 μ lを滅菌した純水200 μ lで希釈した。段落a) で得られた生成物39 μ l及びポリエチレンジアミン水溶液(0.45mg/ml) 14 μ lを添加した。この混合物を水で300 μ lに調整し、穏やかに混合し、次に292EBNA細胞に添加した。

c) プラスミドDNA溶液(1mg/ml) 10 μ lを滅菌した純水200 μ lで希釈した。段落a) で得られた生成物52 μ lを添加して、水で300 μ lに調整した。この混合物を穏やかに混合して、次に292EBNA細胞に添加した。

d) プラスミドDNA溶液(1mg/ml) 10 μ lを滅菌した純水200 μ lで希釈した。ポリエチレンジアミン水溶液(0.45mg/ml) 56 μ lを添加して、水で300 μ lに調整し

た。この混合物を穏やかに混合し、次に292EBNA細胞に添加した。

【0060】

表4は、本実施例の始めに記載したとおりに処方した、実施例1bの化合物、ポリエチレンイミン及びその混合物のトランスフェクション効率を示す。データは、混合物が、実施例1bの化合物及びポリエチレンイミンよりも、各々250及び25倍大きくルシフェラーゼ活性を媒介することを示している。

【0061】

表4：実施例1bの化合物、ポリエチレンイミン又はその混合物による293EBNA細胞のトランスフェクション。6cmシャーレで増殖させた細胞を、本実施例の始めに記載したとおりに処方した、ルシフェラーゼをコードするプラスミド（ウェル当たり1 μ g DNA）でトランスフェクションした。48時間後ルシフェラーゼ活性を測定した。結果は、シャーレ当たりの相対光単位として表した。

【0062】

【表4】

表4

トランスフェクション物質	ルシフェラーゼ活性
実施例1bの化合物	3.9×10^5
ポリエチレンイミン	3.8×10^4
実施例1bの化合物／ポリエチレンイミン	9.8×10^6

10

20

フロントページの続き

- (72)発明者 アンドレアス・ズーベルザクソ
スイス国、ツェーハー - 4 0 5 2 パーゼル、ゲレルトシュトラッセ 3 2
- (72)発明者 アーノルド・トルツェチアク
ドイツ連邦共和国、デー - 7 9 6 5 0 ショップフハイム、タルシュトラッセ 5 4

審査官 新留 豊

- (56)参考文献 国際公開第 9 4 / 0 0 9 8 2 7 (WO, A 1)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1 9 9 3年, Vol.90, pp.893-897
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1 9 9 5年1 2月, Vol.217, No.1, pp.179-185
Nucleic Acids Research, 1 9 9 4年, Vol.22, No.3, pp.536-537

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- C12N 15/00-15/90
 - C07K 14/00-14/825
 - C07F 9/10
 - MEDLINE(STN)
 - SwissProt/PIR/Geneseq