

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4504559号  
(P4504559)

(45) 発行日 平成22年7月14日(2010.7.14)

(24) 登録日 平成22年4月30日(2010.4.30)

(51) Int.Cl.

F I

**C O 7 C 211/14** (2006.01) C O 7 C 211/14  
**A 6 1 K 47/18** (2006.01) A 6 1 K 47/18  
**A 6 1 K 47/24** (2006.01) A 6 1 K 47/24  
**A 6 1 K 47/28** (2006.01) A 6 1 K 47/28  
**C O 7 C 229/16** (2006.01) C O 7 C 229/16

請求項の数 17 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-509683 (P2000-509683)  
 (86) (22) 出願日 平成10年8月13日(1998.8.13)  
 (65) 公表番号 特表2001-515060 (P2001-515060A)  
 (43) 公表日 平成13年9月18日(2001.9.18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP1998/005156  
 (87) 国際公開番号 W01999/008997  
 (87) 国際公開日 平成11年2月25日(1999.2.25)  
 審査請求日 平成17年7月26日(2005.7.26)  
 (31) 優先権主張番号 197 35 125.5  
 (32) 優先日 平成9年8月13日(1997.8.13)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)  
 (31) 優先権主張番号 198 34 683.2  
 (32) 優先日 平成10年7月31日(1998.7.31)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 500057917  
 ビオンテックス ラボラトリーズ ゲーエ  
 ムペーハー  
 ドイツ連邦共和国 D-80807 ミュ  
 ンヘン、フランクフルテル リング 19  
 3 a  
 (74) 代理人 100102842  
 弁理士 葛和 清司  
 (72) 発明者 クレーゼル, ローラント  
 ドイツ連邦共和国 D-80933 ミュ  
 ンヘン、デュルファーシュトラッセ 26  
 a

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新リポポリアミン、その調製および適用

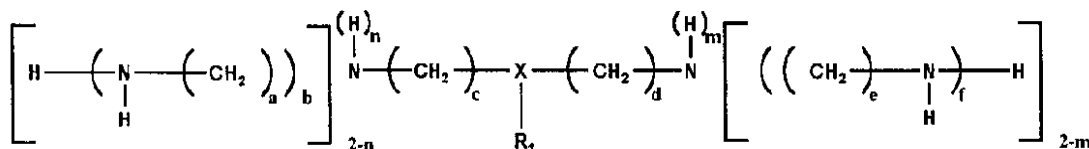
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 I の化合物またはその塩：

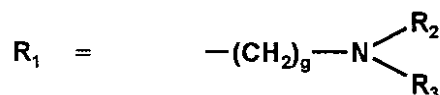
式 I：

【化 1】



不斉中心が存在する時に D -、L - または D L - 形態で存在し、ここで  $\text{R}_1$  は次の一般式の脂肪親和性の残基であり：

【化 2】



式中  $\text{R}_2$  および  $\text{R}_3$  が互いに独立してドデシル、ドデセニル、テトラデシル、テトラデセニル、ヘキサデシル、ヘキサデセニル、オクタデシル、オクタデセニルであるか、又は飽和若しくは不飽和であってもよく、分枝若しくは非分枝又はフッ素化若しくは非フッ素

化されていてもよい、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個の炭素原子からなる他のアルキル残基であり、

かつXは次の基の1つであり：

【化3】



式中  $m = 0$  かつ  $n = 0$  であり、この場合には  $g = 5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、または

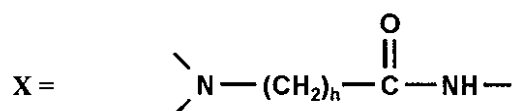
式中  $m = 0$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、または

式中  $m = 1$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、または

式中  $m = 1$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、または

式中  $m = 2$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、または

【化4】



式中  $m = 0$  かつ  $n = 0$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  および  $h = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、

または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  および  $h = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、

または

10

20

30

40

50

式中  $m = 0$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

または

式中  $m = 1$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

10

または

式中  $m = 1$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

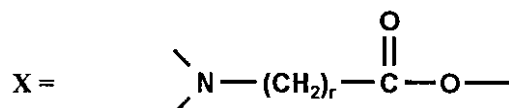
または

式中  $m = 2$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

20

または

【化 5】



30

式中  $m = 0$  かつ  $n = 0$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

40

または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

または

式中  $m = 1$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

50

、 1、 2、 3、 4、 5 または 6、  $d = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $e = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $f = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6 および  $r = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6 とすることができ、

または

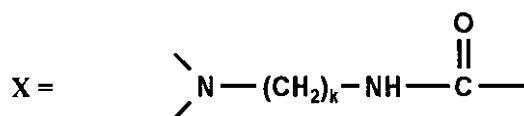
式中  $m = 1$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7$  または 8、  $a = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $b = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $c = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $d = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $e = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $f = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6 および  $r = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6 とすることができ、

または

式中  $m = 2$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7$  または 8、  $a = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $b = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $c = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $d = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $e = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $f = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6 および  $r = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6 とすることができ、

または

【化 6】



式中  $m = 0$  かつ  $n = 0$  であり、この場合には  $g = 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7$  または 8、  $a = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $b = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $c = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $d = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $e = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $f = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $k = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6 とすることができ、

または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7$  または 8、  $a = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $b = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $c = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $d = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $e = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $f = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $k = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6 とすることができ、

または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7$  または 8、  $a = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $b = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $c = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $d = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $e = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $f = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $k = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6 とすることができ、

または

式中  $m = 1$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7$  または 8、  $a = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $b = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $c = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $d = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $e = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $f = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $k = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6 とすることができ、

または

式中  $m = 1$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7$  または 8、  $a = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $b = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $c = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $d = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $e = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $f = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6、  $k = 0、 1、 2、 3、 4、 5$  または 6 とすることができ、

10

20

30

40

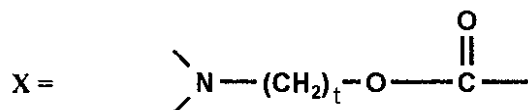
50

または

式中  $m = 2$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

または

【化 7】



10

式中  $m = 0$  かつ  $n = 0$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

20

または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

30

または

式中  $m = 1$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

または

式中  $m = 1$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

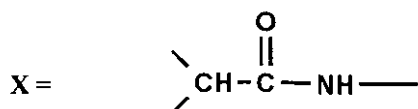
40

または

式中  $m = 2$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

または

## 【化 8】



式中  $m = 0$  かつ  $n = 0$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、  
または

10

式中  $m = 0$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、  
または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、  
または

20

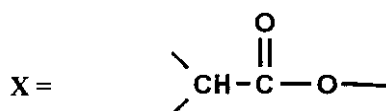
式中  $m = 1$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、  
または

式中  $m = 1$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、  
または

30

式中  $m = 2$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、  
または

## 【化 9】



40

式中  $m = 0$  かつ  $n = 0$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、  
または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、  
または

50

または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、

または

式中  $m = 1$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、

10

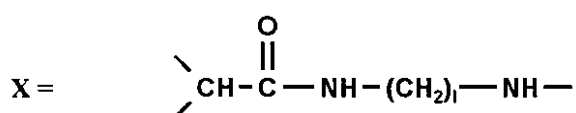
または

式中  $m = 1$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、または  
 式中  $m = 2$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、

または

20

【化 10】



式中  $m = 0$  かつ  $n = 0$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  および  $l = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、

30

または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  および  $l = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、

または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  および  $l = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、

40

または

式中  $m = 1$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$ 、 $a = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $b = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $c = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $d = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $e = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$ 、 $f = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  および  $l = 0、1、2、3、4、5$  または  $6$  とすることができ、

または

式中  $m = 1$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$

50

、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

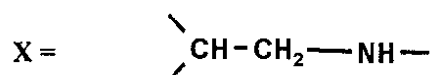
または

式中  $m = 2$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

10

または

【化 1 1】



式中  $m = 0$  かつ  $n = 0$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

または

20

式中  $m = 0$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

または

30

式中  $m = 1$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

または

式中  $m = 1$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

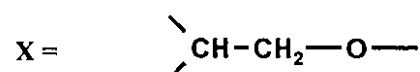
または

40

式中  $m = 2$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

または

【化 1 2】



50



式中  $m = 0$  および  $n = 0$  であり、かつこの場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、または

式中  $m = 0$  および  $n = 1$  であり、かつこの場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、または

10

式中  $m = 0$  および  $n = 2$  であり、かつこの場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、または

式中  $m = 1$  および  $n = 1$  であり、かつこの場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、または

20

式中  $m = 1$  および  $n = 2$  であり、かつこの場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、または

式中  $m = 2$  および  $n = 2$  であり、かつこの場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

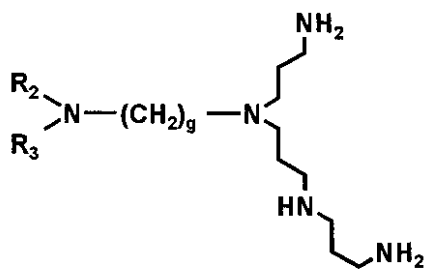
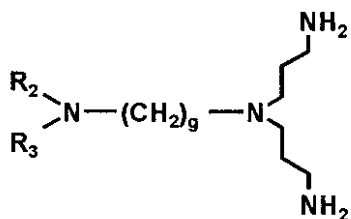
ただし、上記の全ての場合において、 $a = 0$  のとき、 $b$  は  $1$  より小さいか、もしくは  $1$  と等しく、 $e = 0$  のとき、 $f$  は  $1$  より小さいか、もしくは  $1$  と等しく、かつ  $a = b = c = d = e = f = 0$  の場合が除外される。

30

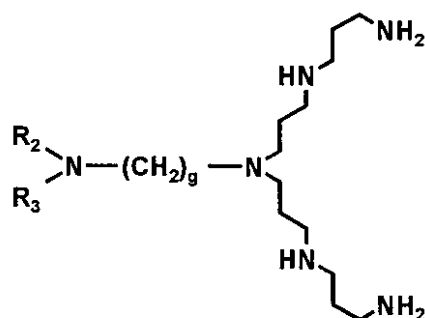
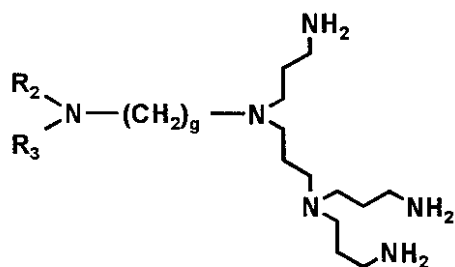
#### 【請求項 2】

次の構造を有する請求項 1 に記載の化合物またはその塩：

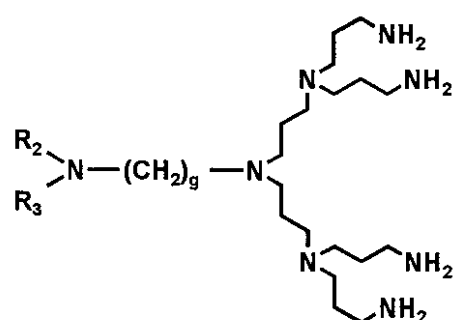
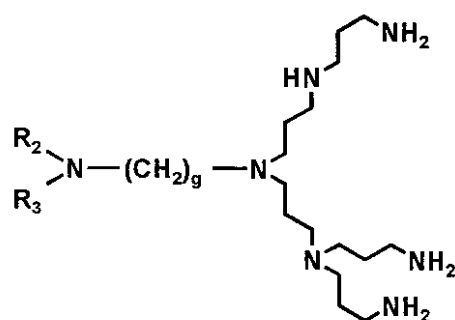
## 【化 1 3】



10



20



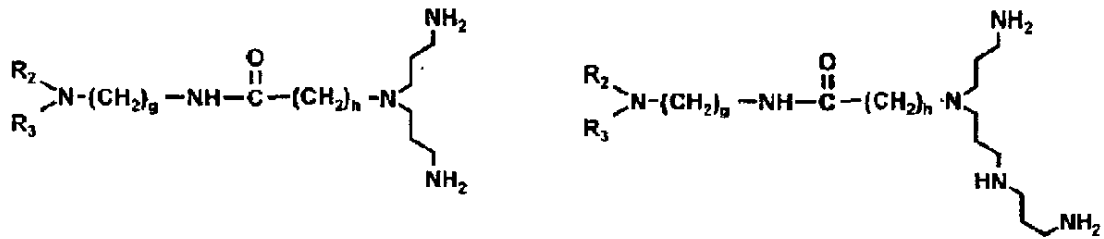
30

式中  $g = 5$ 、 $6$ 、 $7$  または  $8$  とすることができ、かつ  $R_2$  および  $R_3$  が互いに独立してドデシル、ドデセニル、テトラデシル、テトラデセニル、ヘキサデシル、ヘキサデセニル、オクタデシルまたはオクタデセニルとすることができる。

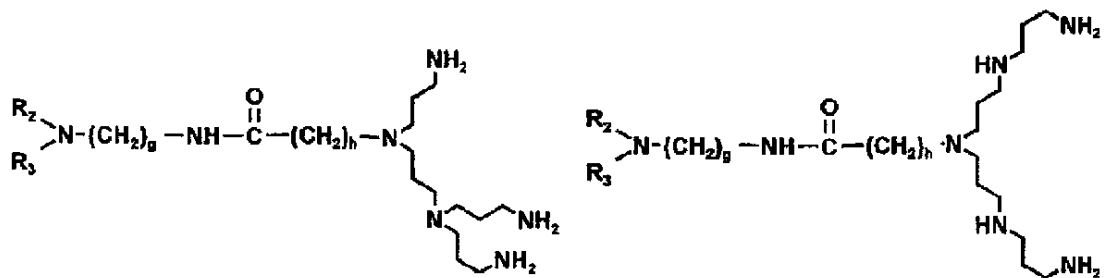
## 【請求項 3】

次の構造を有する請求項 1 に記載の化合物またはその塩：

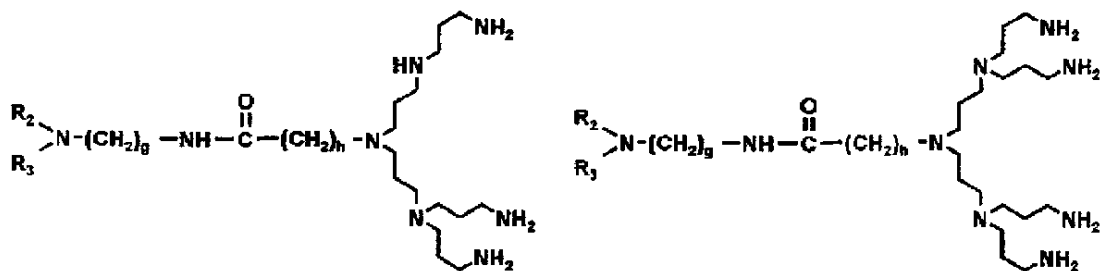
## 【化 1 4】



10



20



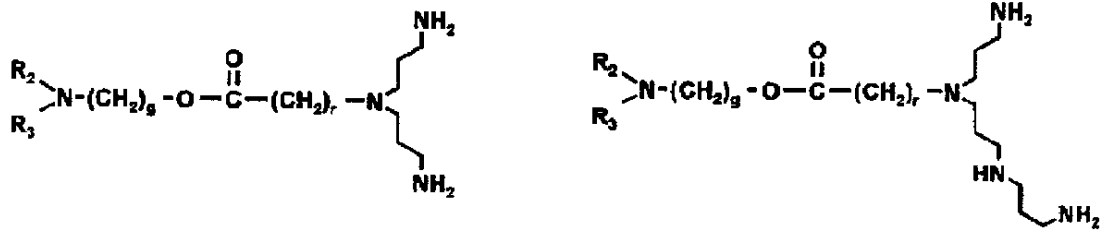
30

式中  $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$  とすることができ、かつ  $R_2$  および  $R_3$  が互いに独立してドデシル、ドデセニル、テトラデシル、テトラデセニル、ヘキサデシル、ヘキサデセニル、オクタデシルまたはオクタデセニルとすることができる。

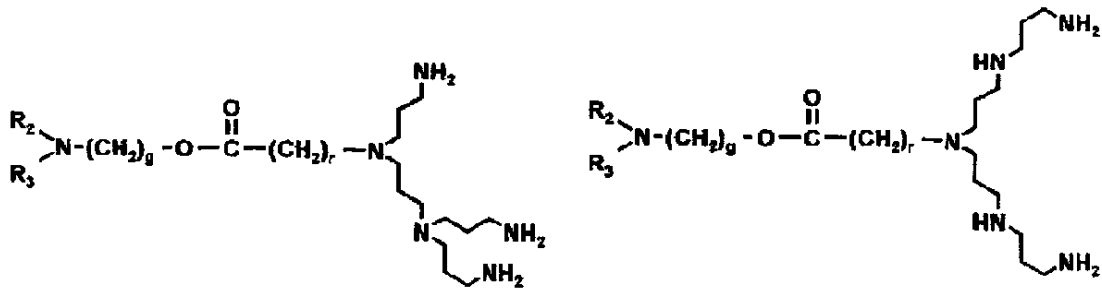
## 【請求項 4】

次の構造を有する請求項 1 に記載の化合物またはその塩：

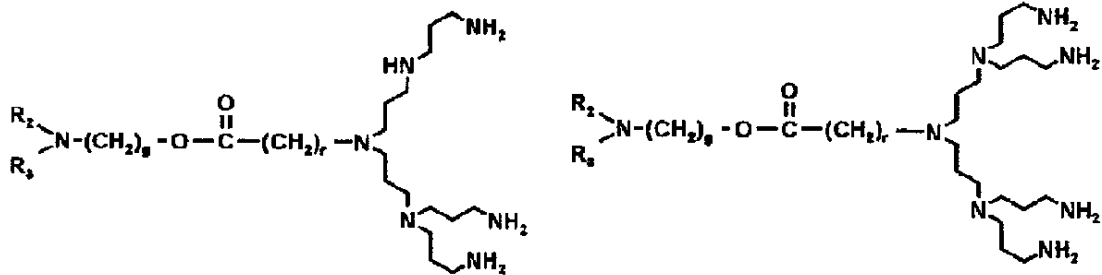
## 【化 15】



10



20



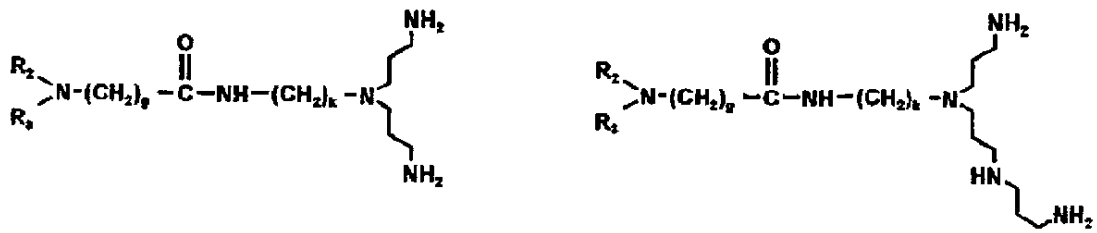
30

式中  $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$  とすることができ、かつ  $R_2$  および  $R_3$  が互いに独立してドデシル、ドデセニル、テトラデシル、テトラデセニル、ヘキサデシル、ヘキサデセニル、オクタデシルまたはオクタデセニルとすることができる。

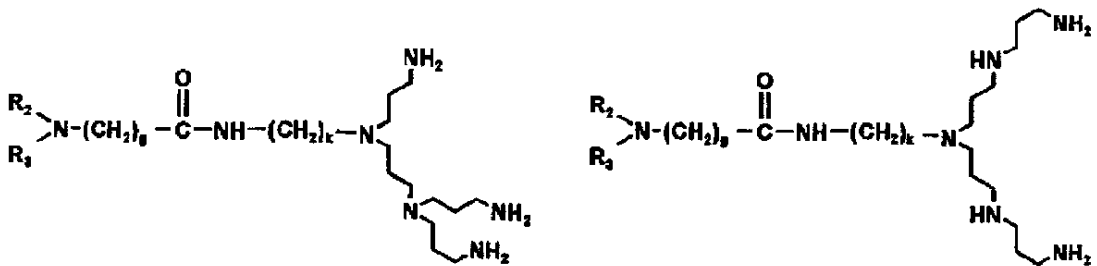
## 【請求項 5】

次の構造を有する請求項 1 に記載の化合物またはその塩：

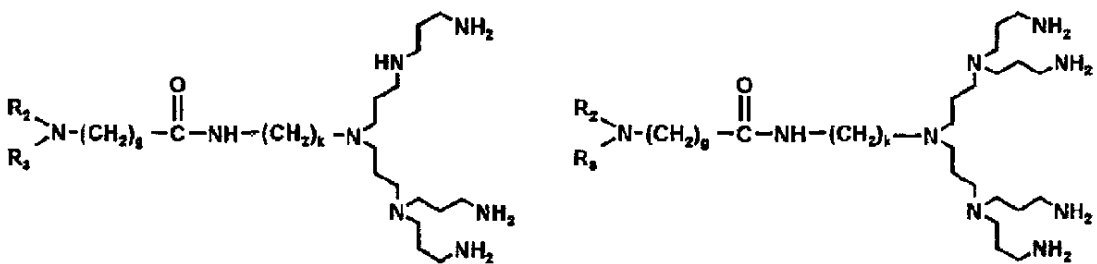
【化 16】



10



20



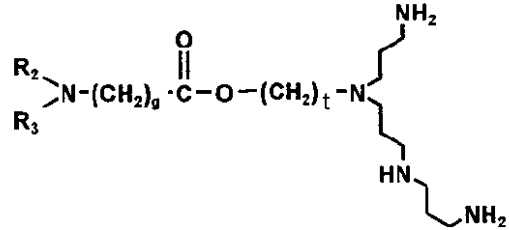
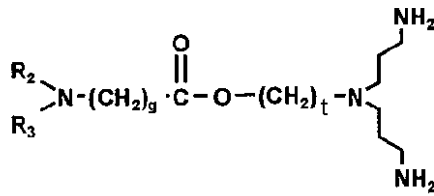
30

式中  $k = 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$  とすることができ、かつ  $R_2$  および  $R_3$  が互いに独立してドデシル、ドデセニル、テトラデシル、テトラデセニル、ヘキサデシル、ヘキサデセニル、オクタデシルまたはオクタデセニルとすることができる。

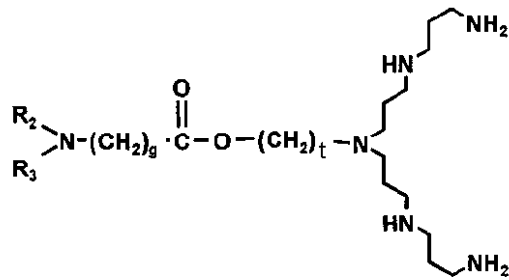
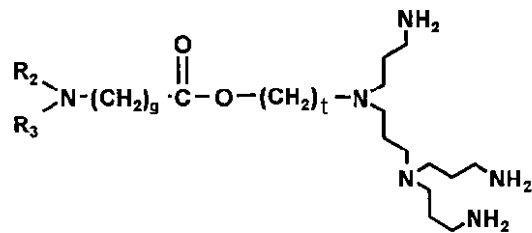
【請求項 6】

次の構造を有する請求項 1 に記載の化合物またはその塩：

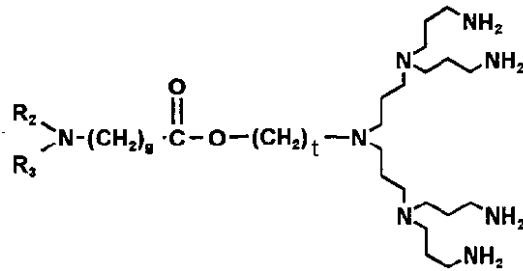
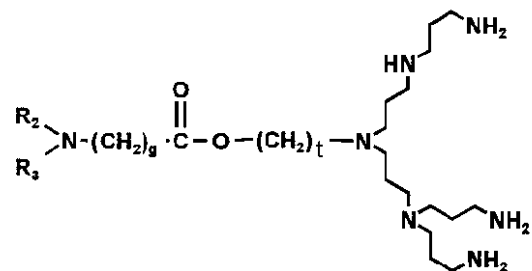
## 【化 17】



10



20



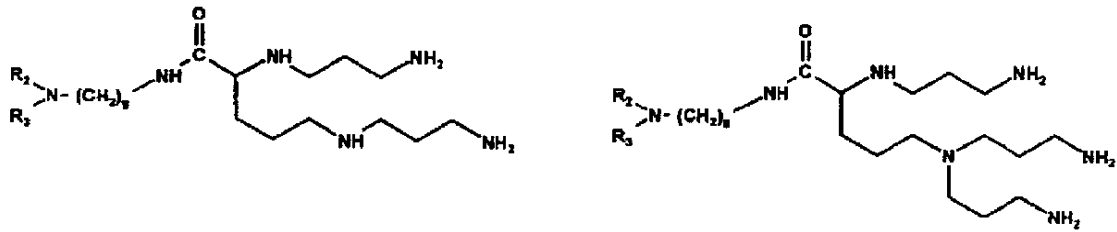
30

式中  $t = 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$  とすることができ、かつ  $\text{R}_2$  および  $\text{R}_3$  が互いに独立してドデシル、ドデセニル、テトラデシル、テトラデセニル、ヘキサデシル、ヘキサデセニル、オクタデシルまたはオクタデセニルとすることができる。

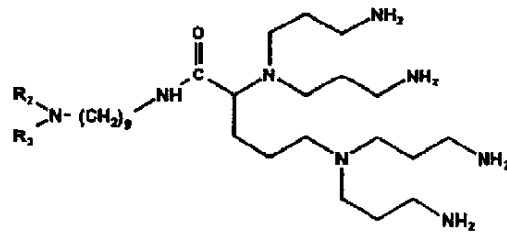
## 【請求項 7】

次の構造を有する請求項 1 に記載の化合物またはその塩：

## 【化 18】



10



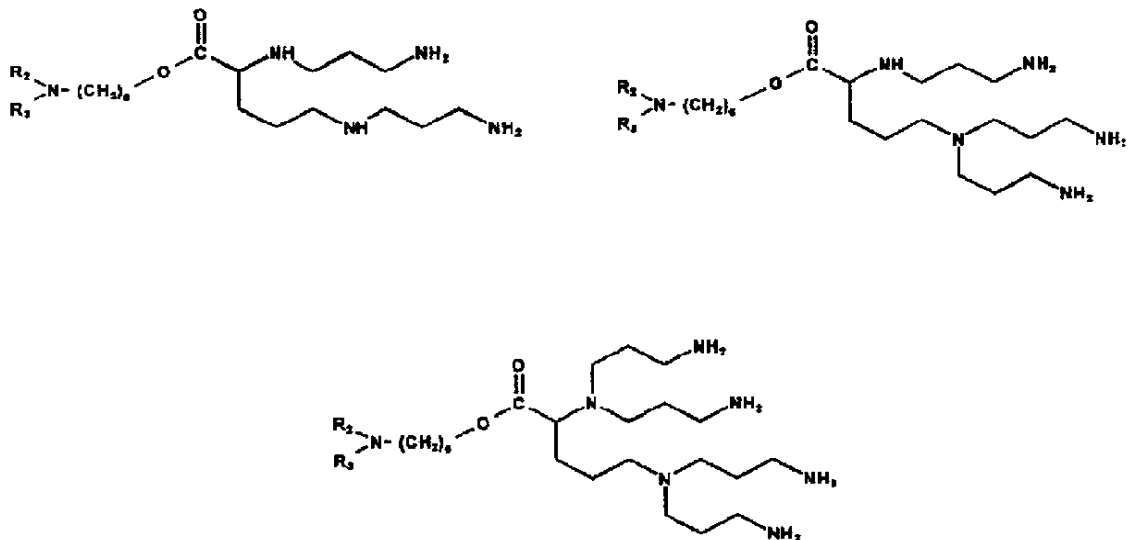
20

式中  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$  とすることができ、かつ  $R_2$  および  $R_3$  が互いに独立してドデシル、ドデセニル、テトラデシル、テトラデセニル、ヘキサデシル、ヘキサデセニル、オクタデシルまたはオクタデセニルとすることができる。

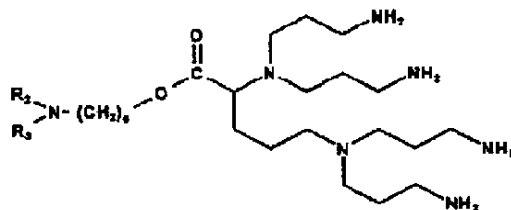
## 【請求項 8】

次の構造を有する請求項 1 に記載の化合物またはその塩：

## 【化 19】



30



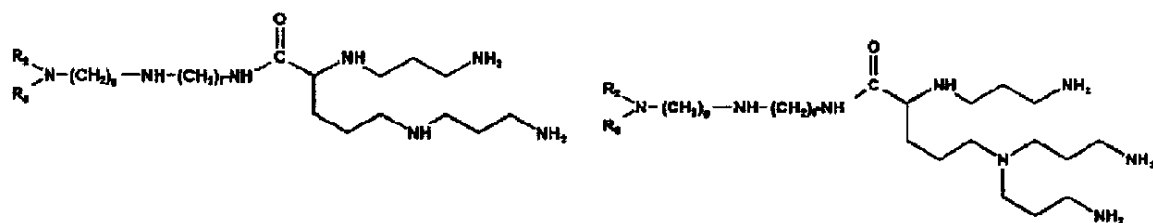
40

式中  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$  とすることができ、かつ  $R_2$  および  $R_3$  が互いに独立してドデシル、ドデセニル、テトラデシル、テトラデセニル、ヘキサデシル、ヘキサデセニル、オクタデシルまたはオクタデセニルとすることができる。

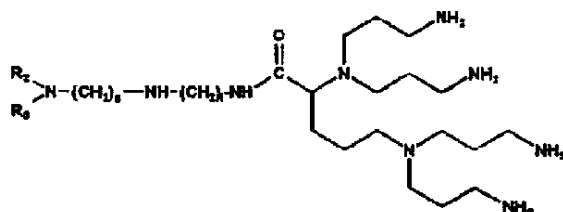
## 【請求項 9】

次の構造を有する請求項 1 に記載の化合物またはその塩：

【化 2 0】



10



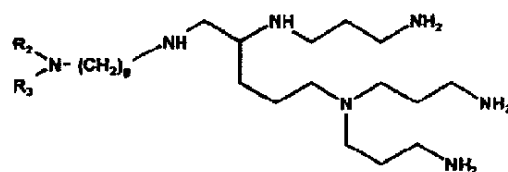
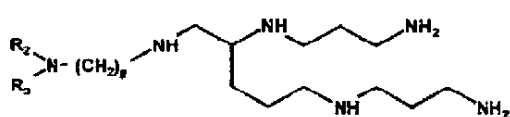
式中  $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$  とすることができ、かつ  $R_2$  および  $R_3$  が互いに独立してドデシル、ドデセニル、テトラデシル、テトラデセニル、ヘキサデシル、ヘキサデセニル、オクタデシルまたはオクタデセニルとすることができる。

20

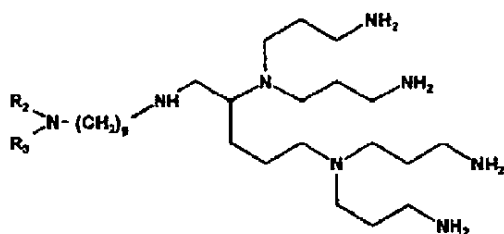
【請求項 1 0】

次の構造を有する請求項 1 に記載の化合物またはその塩：

【化 2 1】



30



40

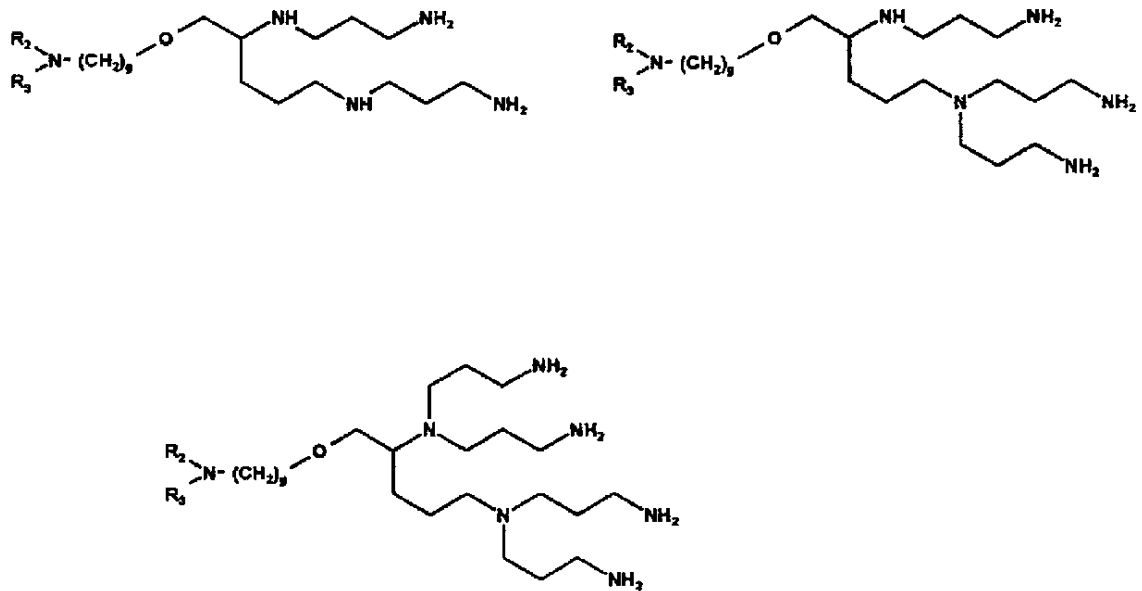
式中  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$  とすることができ、かつ  $R_2$  および  $R_3$  が互いに独立してドデシル、ドデセニル、テトラデシル、テトラデセニル、ヘキサデシル、ヘキサデセニル、オクタデシルまたはオクタデセニルとすることができる。

【請求項 1 1】

次の構造を有する請求項 1 に記載の化合物またはその塩：



## 【化 2 2】



10

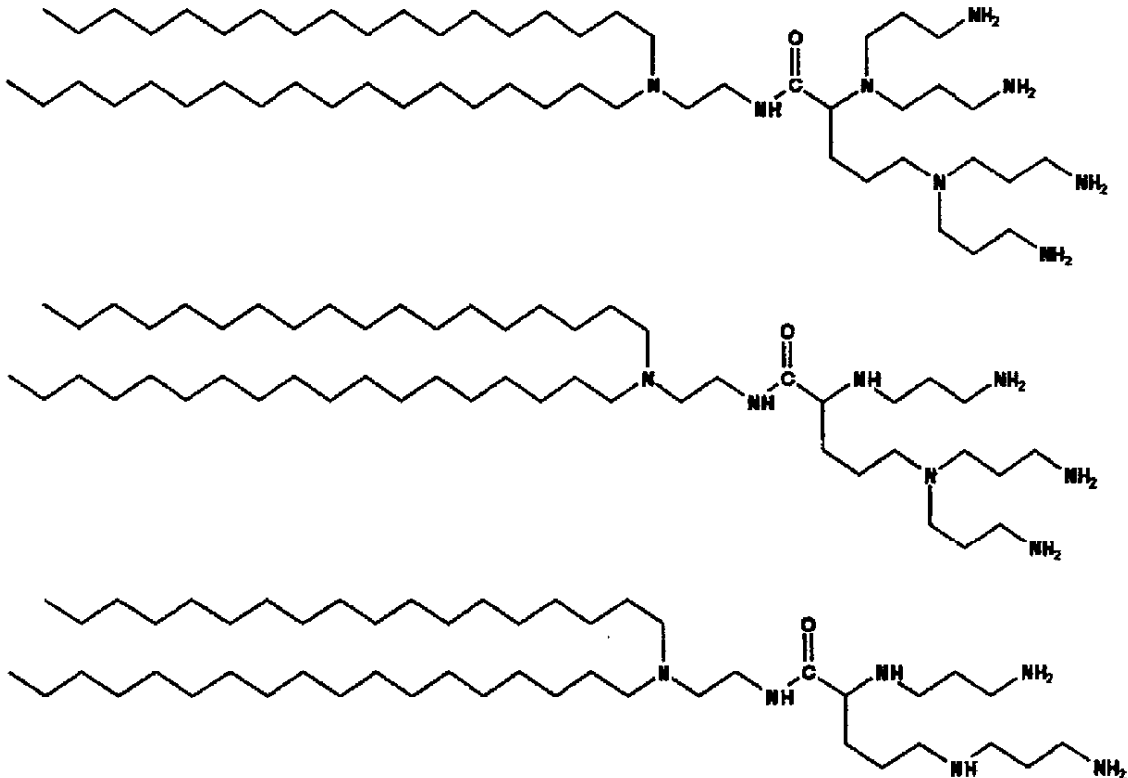
式中  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または  $8$  とすることができ、かつ  $R_2$  および  $R_3$  が互いに独立してドデシル、ドデセニル、テトラデシル、テトラデセニル、ヘキサデシル、ヘキサデセニル、オクタデシルまたはオクタデセニルとすることができる。

20

## 【請求項 1 2】

次の構造を有する請求項 1 に記載の化合物またはその塩：

## 【化 2 3】



30

40

## 【請求項 1 3】

ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、ジオレオイルホスファチジルコリン、コレステロールまたはコレステリルアミンからなる群から選択されるコリピ

50

ドを含むまたは含まない、請求項 1 - 1 2 のいずれかに記載の化合物またはその塩の少なくとも 1 つを含有する組成物。

【請求項 1 4】

請求項 1 ないし 1 2 のいずれか 1 項記載の少なくとも 1 つの化合物もしくはその塩または請求項 1 3 記載の組成物を含有する医学的または診断的な組成物。

【請求項 1 5】

請求項 1 - 1 2 のいずれか 1 項記載の化合物またはその塩が組入れる化合物と複合体を形成し、かつ発生した複合体が真核細胞と試験管内で接触させられる DNA、RNA、リボザイム、アンチセンス DNA、PNA、ペプチド類、ペプチド類およびタンパク質類からなる群から選択される生物学的に実効のある化合物を真核細胞内に組入れる方法。

10

【請求項 1 6】

生体内または試験管内で DNA、RNA、リボザイム、アンチセンス DNA、PNA、ペプチド類、ペプチド類およびタンパク質類からなる群から選択される、生物学的に実効のある化合物を真核細胞内に組入れるための薬剤または試薬を製造するための請求項 1 - 1 2 のいずれか 1 項記載の化合物もしくはその塩または請求項 1 3 もしくは 1 4 記載の組成物の使用。

【請求項 1 7】

請求項 1 - 1 2 のいずれか 1 項記載の化合物またはその塩がエンハンサーと組合せて使用される請求項 1 6 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

20

【0001】

正に帯電した脂質 (J. P. Behr、生物複合化学第 5 号、382 - 389 頁、1994 年) は、リポソーム、ミセルの形態で、またはこのような形態としてペプチド類、ペプチド類、タンパク質類、PNA、抗ウィルス作用物質、しかし特に DNA、RNA、アンチセンス DNA / RNA またはリボザイムのような生物学的に活性の物質を真核細胞 (たとえば哺乳動物-、植物-、または昆虫細胞) 内へ組入れるために使用される。リポポリアミンは比較的卓越したトランスフェクション性質を示す陽イオン脂質の特殊の種類である。トランスフェクションのもとに真核細胞内への遺伝物質の組入れが理解されている。

【0002】

たとえば成功裡に遺伝子治療を営むことができるようにするために DNA (たとえばプラスミド、コスミド、一本鎖または二本鎖)、RNA または、アンチセンス DNA / RNA またはリボザイムのような同類の物質の種類を真核細胞内に導入する必然性が多数のトランスフェクション方法の開発をもたらした。真核細胞および特に哺乳動物細胞内へ核酸を導入するために、たとえば CaPO<sub>4</sub> 共沈法、DEAE デキストラン処理法、合成ポリアミン (ポリエチレニミン、ポリリシン、PAMAM デンドリマー) のような多数の処理法、レセプタ仲介の細胞内取込を利用する方法、電気穿孔法、微小衝撃法、微量注入法および DNA キャリヤとしてのウィルス性キャプシドを利用する方法が知られている。もう 1 つ別の方法はリポフェクション (P. L. Felgner ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 米国 74、7413 1987 年) と呼ばれる。この方法は、合成陽イオン脂質がリポソーム、ミセルの形態でまたはこのような形態として負に帯電した DNA 複合体と共に形成する事実を利用する。発生する複合体が正の正味帯電を帯びるように DNA および陽イオン脂質の量比が調整される場合、これらの複合体は負に帯電した真核細胞の膜表面と高い親和性を有する。このような DNA / 脂質複合体が細胞に達すると、細胞内への遺伝物質の組入れが生じる。DNA が細胞内へどのように達するかについて、正確な機構はまだ十分に知られていないが、これは細胞内への DNA の同時振出時に陰イオン細胞膜と陽イオン脂質の融合を生じるか、または DNA / 脂質複合体が全体として細胞の自然の輸送機構、いわゆる細胞内取込を介して細胞内へ達し、かつその後で DNA が遊離されるか、そのいずれかである。

30

40

【0003】

リポソームは通常 '二重層構造' を有する水溶液中の脂質の球状の配列であり、かつ典型

50

的には3種類に分類される(ニューヨークアカデミーサイエンス会議: 'リポソームとその生物学および医学への使用' 1977年12月): 多層小泡(MLV、10000nmまで)、小さい単層小泡(SUV、20-50nm)および大きい単層小泡(LUV、600-30000nm)。一連のリポソーム製造方法が知られており、かつ'リポソーム技術'(Gregoriadis、CFCプレス、ニューヨーク1984年)、'リポソーム'(Ostro、Marcel Dekker、ニューヨーク1987年)またはLichtenbergらの一覧表論文(生化学分析方法第33号、337-462頁、1988年)、PaganoおよびWeinstein(生物物理学、生物工学年報、第7号、435-68頁、1978年)またはSzokaおよびPapahadjopoulos(生物物理学、生物工学年報、第9号、467-508頁、1980年)に記述されている。公知の方法は、たとえば脂質溶液が多孔膜により加圧される'逆相蒸発'法および押出法がある。

10

#### 【0004】

リポソームは典型的に次の方法で製造される: 脂質は有機溶剤の中に取込まれる。室素流のもとでこの溶剤の蒸発によりガラス容器壁に脂質薄膜が作られる。水または水性緩衝剤を添加してこの膜を水和する。得られた溶液は最後に超音波で処理される。

#### 【0005】

陽イオン脂質は遺伝子治療でますます重要性を獲得している。その際、複合体がキャリアおよびDNAから皮内、筋内、腹膜内、静脈内、皮下、鼻腔内、脳脊髄洞内または腫瘍に直接投薬され、または体細胞が抽出、導入および再び植付けられることにより、生体内で種々の方法により体細胞が導入される。これに関連する好ましい方法は、つい先頃までウィルス性キャリアによる遺伝物質の組入れであった。しかしこの方法は病原体ウィルスへ逆突然変異の危険を有する。さらに導入されたDNAは安定して遺伝物質の中に組み込まれ、この結果、治療の管理または細胞の回復はその本来の状態ではもはや不可能である。特にウィルス性キャリアは導入されるDNAに対する制限を有する。修飾されたDNAまたはRNAはウィルスにより伝染しない。さらに自己分裂する細胞のみがこの方法で感染することができる。

20

#### 【0006】

ウィルス性キャリア系を適用する際に考慮すべきその他の危険は、腫瘍形成遺伝子の活性化の可能性および処理された有機体の免疫反応である。

30

陽イオン脂質によるトランスフェクションは逆にこの制限を受けない。トランスフェクションは通常過渡的に経過する。すなわち導入されたDNAまたはRNAは、これが遺伝物質の中に組み込まれ、かつヌクレアーゼにより時間と共に分解されるので、極く一定の時間でのみ発現される。この方法により遺伝子治療を処方し、かつ可逆的にすることができる。DNAの大きさに対する制限は無く、かつ修飾されたDNAまたはRNA(たとえばアンチセンスDNA/RNAまたは修飾されたヌクレオチドの組み込みにより安定化されたりボザイム)も陽イオン脂質を利用して細胞内に導入することができる。また、たとえば神経細胞のような自己分裂しない細胞も陽イオン脂質により導入することができる。さらに、これまで生体内での試験ではまったく陽イオン脂質の免疫抗原性の反応は見出されなかった。

40

#### 【0007】

微量注入および電気穿孔法の生体内適用が方法上の理由から不可能と受けとめられているのに対し、CaPO<sub>4</sub>-およびDEAE法はリポフェクションに比べより悪いトランスフェクション効率を有する。

#### 【0008】

陽イオン脂質の中には、トランスフェクションに対してポリアミン類(たとえばスペルミン、スペルミジン)とDNAとの間で公知の高い親和性を利用する種類、いわゆるリポポリアミンがある。その際このポリアミンは直鎖または分枝して形成されており、かつエチレン基; プロピレン基; またはアミノ官能基間のブチレン基を含む。ポリアミンは様々な方法で脂肪親和性の残基と結合する。

50

## 【0009】

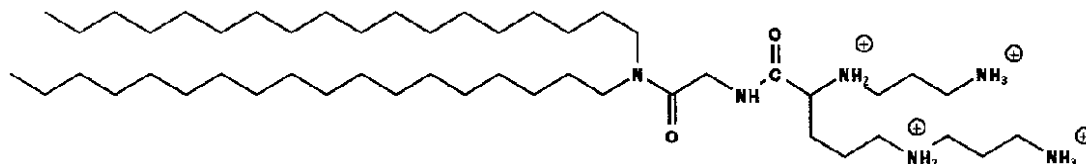
たとえば生理学的 pH 値で正に帯電したスperlミンは、多くの場合スペーサを介して、親水性の残基と結合する。スperlミンは、水素橋結合を介してDNAの溝の中に結合することにより、DNAおよび類似の化合物と共に安定した複合体を形成する。

## 【0010】

第1のこのようなりボスperlミン誘導体は、Behr, J. P. ら (Proc. Natl. Acad. Sci. 米国 86、6982-6986; 1989; EP0394111) により合成された。その際この誘導体は2つの異なる親水性の残基を有するスペーサを介してカルボキシルスperlミンと結合した。その際に得られた5-カルボキシルスperlミルグリシンジオクタデシルアミド (DOGS) の構造:

10

## 【化24】



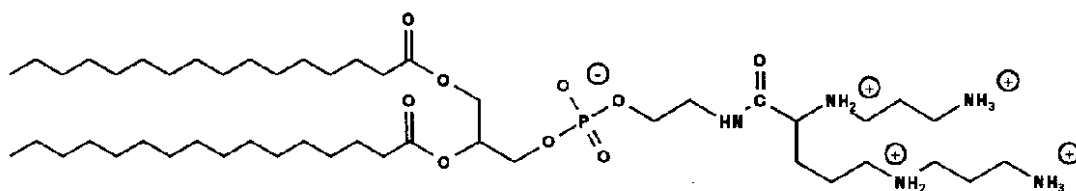
## 【0011】

DOGSはトランスフェクタム<sup>TM</sup> (プロメガ) として市販されている。

第2のBehrらにより開発された化合物はジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン-5-カルボキシルスperlミルアミド (DPPEs) である:

20

## 【化25】

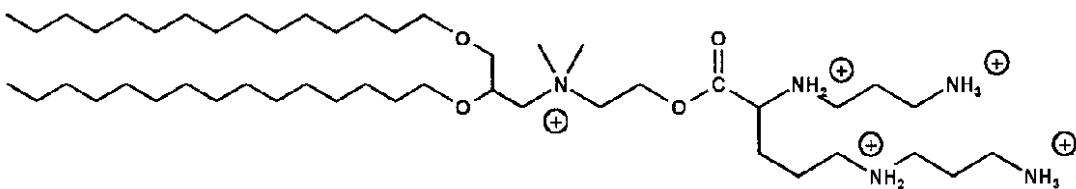


## 【0012】

もう1つ別のリボスperlミン誘導体は、P. L. FelgnerらによりWO9116024で名称L-スperlミン-5-カルボキシル-3-(DL-1, 2-ジオレオイルジメチルアミノプロピル-1-ヒドロキシエチルアミン)のもとに請求されている。しかしこの特許公報にはL-スperlミン-5-カルボキシル-3-(DL-1, 2-ジパルミトイル-ジメチルアミノプロピル-1-ヒドロキシエチルアミン)が記述されている:

30

## 【化26】

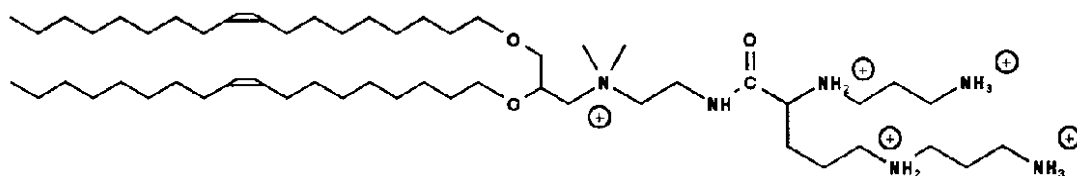


40

## 【0013】

Gebe y e h u, G. らは、WO9405624で化合物N-[N-(5-カルボキシルスperlミル)アミノエチル]N,N-ジメチル-2,3-ビス(9-オクタデセニロキシ)1-プロパンアンモニウム テトラ(トリフルオロアセテート)を記述しており、これはリボフェクタミン<sup>TM</sup> (ジブコ-BRL: ライフテクノロジーインコーポレーテッド) として市販されている。

## 【化27】

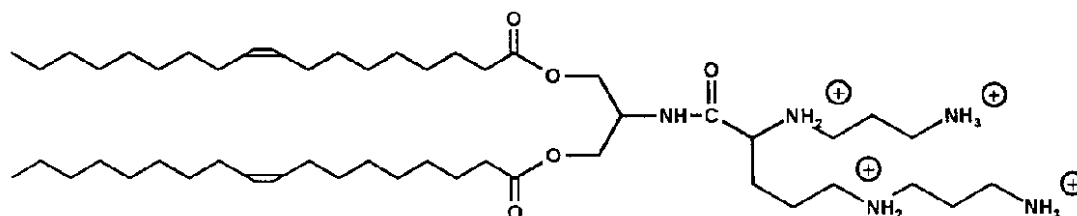


## 【0014】

Von Der Eltzらは、WO9700241に化合物2-(6-カルボキシ-スperlミル)-1,3-ジオレオイロキシ-プロピルアミドを記述しており、これは名称ドスperlのもとに市場に提供された(ベーリンガー マンハイム ゲーエムベーハー)。

## 【化28】

10



## 【0015】

上述の化合物は、全て側鎖としてカルボキシ官能基を持つ直鎖ポリアミンのアミドまたはエステル結合を介して、すなわちカルボキシスperlミンから脂肪親和性の残基に製造された。最後により後の出版物は、たとえば直鎖ポリアミンの末端アミノ官能基(直鎖構造)または内部アミノ官能基(‘T型構造’)へアミドまたはカルバミン酸結合により、直鎖ポリアミンから脂肪親和性の残基へのその他の結合方法も示す。例は刊行物DE1963189、WO9640726、WO9640725、WO9618372、WO9746223、WO9802190およびWO9802191にみられる。

20

また分枝したポリアミンが記述された(G. Bykら、J. Med. Chem、41、224-235、1998)。

刊行物WO-A-97/03939には陽イオン脂質がアミド基で開示されており、この脂質は脂質凝集物で細胞内の巨大分子の導入に適している。

## 【0016】

陽イオン脂質を利用したトランスフェクションの分野での大きな進歩にもかかわらず、需要はこのような脂質のより大きな選択にとどまっている。その理由は、今日まですべての細胞タイプを満足する結果を提供する陽イオン脂質が見出されていないことにある。種々の細胞タイプは、自体その膜組成で異なるので、種々の脂質の複合物および種々の脂質タイプが異なる細胞の実効のあるトランスフェクションのために必要とされることは驚くにあたらない。

30

## 【0017】

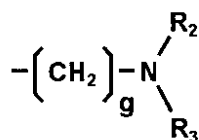
本来のトランスフェクション工程については今日までまだあまり知られていないので、新たな陽イオン脂質の開発は広範囲に経験的である。従ってこのような脂質の構成にとり注意すべき重要な観点ハリポソームまたはミセル類の形成に対する該脂質の物理的性質、形成されたりポソームまたはミセルの性質、導入する標的細胞に対する毒性、さらに脂質の安定性、その代謝性および生体内適用における可能性としなければならない。

40

## 【0018】

従って本発明に基づき解決されるべき課題は、高い実効と可能な限り幅の広い実効多様性とを有する新しい陽イオン脂質を良好な安定性および低毒性との組合せで見出すことであった。本発明では驚くべきことに、特殊の脂肪親和性の残基と頭基としてのポリアミンの組合せが効率および安定性に関し特に良好な性質をもたらすことが見出された。

## 【化29】



## 【 0 0 1 9 】

その際、残基 R は飽和または不飽和の直鎖または分枝した、好ましくは 10 個 ~ 20 個の炭素原子を含有するアルキル鎖である。

## 【 0 0 2 0 】

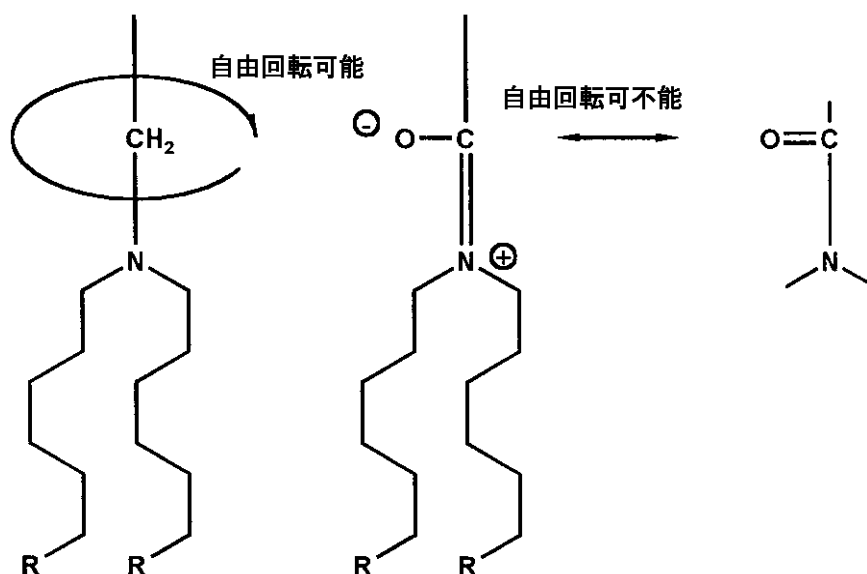
説明として次の仮説を利用することができる。いわゆる DNA 脂質複合体の形成が証明されたことは、成功を収めたトランスフェクションにとって特別重要な定義をもつ。リボソームまたはミセル製剤として使用される DNA および陽イオン脂質が一致する場合、陽イオン脂質のリボソームまたはミセル状の有機体構造の破壊下で DNA の自発的な凝集を生じる。DNA が前記脂質から成る“二重層構造”を有する多層複合体に植込まれた DNA 脂質複合体が形成される (J. O. Raedler ら、科学、第 275 号、810 頁、1997 年)。たとえばスぺルミン基が DNA 親和性の頭基として最初に 1 回 DNA に結合すると、その結果ファンデルワールス力を介して安定した“二重層構造”を形成できるようにするため、アルキル基が可能な限り平行に配向できるようにしなければならないので、残留分子部 (親和性の残基) の弾性および対称性が特に重要になる。

## 【 0 0 2 1 】

これまで提案してきた化合物は通常あまり対称性がないように構成され、これがアルキル残基の平行の配向を困難にし、かつ全てがエステル、エーテル、またはアルキル残基と基本骨格もしくはスペーサとの間にアミド結合を含む。従ってこれらの化合物は指定された結合角度に基づきその弾性において、かつアミド結合の場合 (たとえば G. Byk ら、医化学誌、第 41 号、224 - 235 頁、1998 年、EP 0394111、WO 9618372、WO 9746223、WO 9802190 および WO 9802191 からの化合物の場合) に存在する共振構造に基づき大幅に制限されている。

## 【 0 0 2 2 】

## 【 化 3 0 】



## 【 0 0 2 3 】

アミド類の共鳴構造では O 原子が負にかつアミド-N-原子が正に帯電する。アミド結合に参加する原子の平面配列が生じる。カルボニル、炭素および窒素原子間のアミド結合の自由回転は不可能である。この性質は、たとえばまったく特別の方法でタンパク質の構造に影響を及ぼす (第 2、第 3 および第 4 構造)。そのペプチド結合はアミド結合以外のものではない。剛性の、非弾性のアミド結合が初めてタンパク質にその生物学的に必要な構造

を提供する。

【 0 0 2 4 】

本発明に基づく化合物（下記も参照）はアルキル残基  $R_2$  および  $R_3$  を第3窒素原子（アミン）を介して結合する。それにより高い対称性と、自由電子対（疑似回転）の回転（Durchschwingens）の可能性により窒素原子に最大の弾性とが保証される。それにより前記化合物では（DNAに固定された頭基にもかかわらず）アルキル残基の平行配向と、それにより安定したDNA脂質複合体を形成するための最適の前提条件がある。この安定性は特にアルキル基のファンデルワールス力が大きく重なり合うことにより生じる。

【 0 0 2 5 】

特に良好な、請求された化合物の性質のためのもう1つ別の説明の可能性は、これらの化合物がDNA複合体形成に参加していないアルキル残基をもつ塩基性の窒素原子に基づき、生理学的pH領域内での緩衝能力を有することである。この性質はエンドサイトーシスの方法でエンドソームの浸透圧破壊を促進するため、この結果DNAがますます良好にサイトソルの中に遊離される（J. P. Behr、遺伝子治療、第3号、1010 - 1017頁、1996年）。

10

特に、脂肪親和性の残基  $R_1$  に結合している頭基のポリアミンが少なくとも3個の窒素原子を有する本発明に基づく化合物が特に良好な性質を有することが明らかになった。従ってこれらの化合物が特に好ましい。

【 0 0 2 6 】

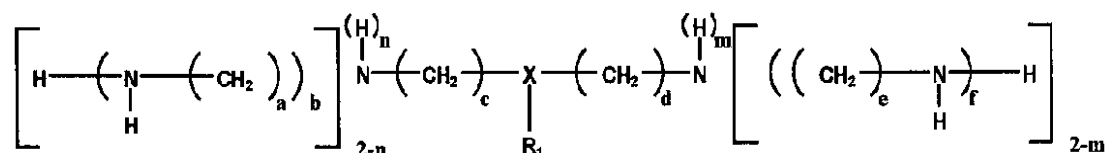
従って本発明は生物学的な活性分子を真核細胞の中に輸送することのできる一般式Iの新リポポリアミンに関する。

20

【 0 0 2 7 】

式I：

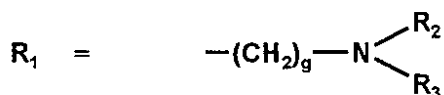
【化31】



不斉中心が存在する時にD-、L-またはDL-形態で存在し、その塩を含み、ここで  $R_1$  は次の一般式の脂肪親和性の残基であり：

30

【化32】



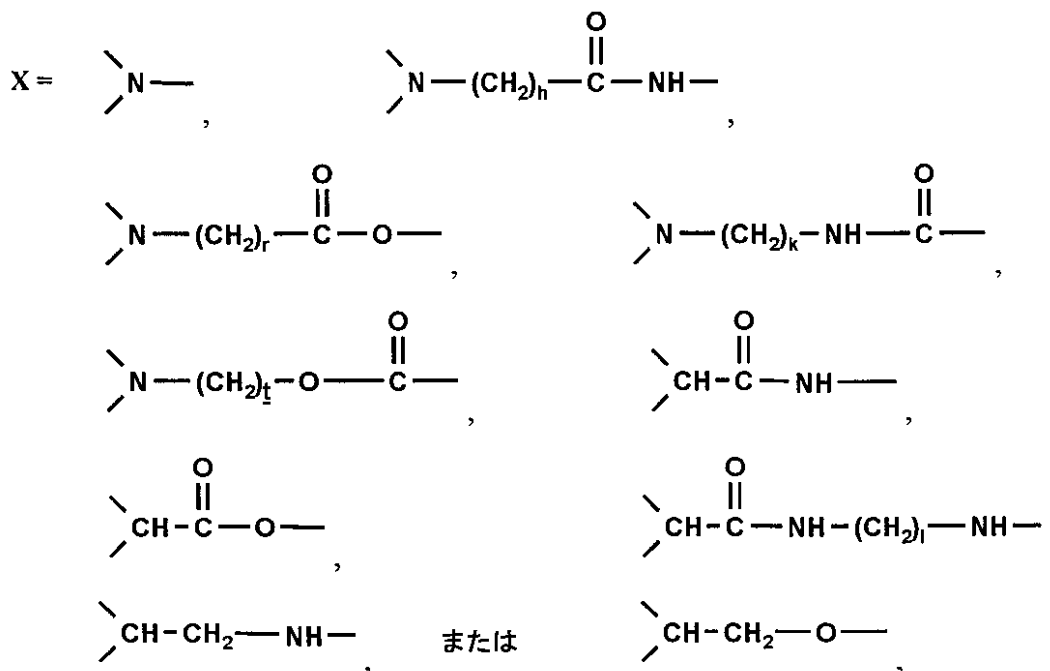
【 0 0 2 8 】

式中  $R_2$  および  $R_3$  が互いに独立してドデシル、ドデセニル、テトラデシル、テトラデセニル、ヘキサデシル、ヘキサデセニル、オクタデシル、オクタデセニル、または全ての可能な組合せで飽和若しくは不飽和であってもよく、分枝若しくは非分枝又はフッ素化もしくは非フッ素化されていてもよい、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個の炭素原子からなる他のアルキル残基であり、かつXは次の基の1つであり：

40

【 0 0 2 9 】

【化33】



10

## 【 0 0 3 0 】

式中  $m = 0$  かつ  $n = 0$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

20

## 【 0 0 3 1 】

または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、

30

## 【 0 0 3 2 】

または

式中  $m = 0$  かつ  $n = 2$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、または

40

## 【 0 0 3 3 】

式中  $m = 1$  かつ  $n = 1$  であり、この場合には  $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  または  $8$ 、 $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  および  $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$  とすることができ、または

50



は6、 $t = 0、1、2、3、4、5$ または6および $l = 0、1、2、3、4、5$ または6とすることができ、

【0034】

または

式中 $m = 1$ および $n = 2$ であり、かつこの場合には $g = 1、2、3、4、5、6、7$ または8、 $a = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $b = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $c = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $d = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $e = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $f = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $h = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $r = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $k = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $t = 0、1、2、3、4、5$ または6および $l = 0、1、2、3、4、5$ または6とすることができ、

【0035】

または

式中 $m = 2$ かつ $n = 2$ であり、この場合には $g = 1、2、3、4、5、6、7$ または8、 $a = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $b = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $c = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $d = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $e = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $f = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $h = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $r = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $k = 0、1、2、3、4、5$ または6、 $t = 0、1、2、3、4、5$ または6および $l = 0、1、2、3、4、5$ または6とすることができ、その際好ましくはH原子の最大50%、特に好ましくはその30%がF原子により置換される。

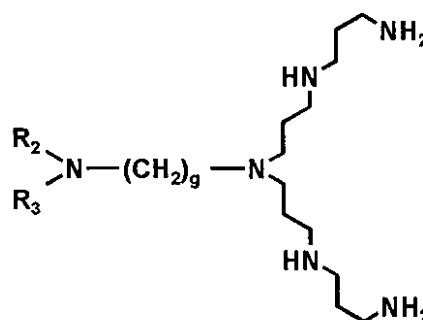
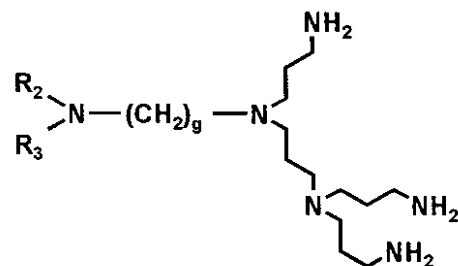
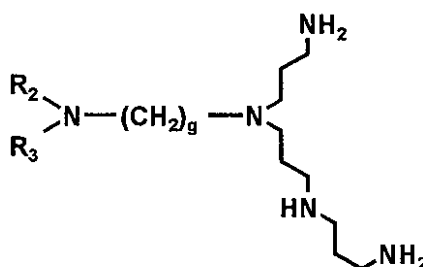
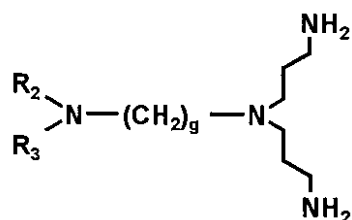
【0036】

好ましくは $g > 1$ である。好ましい化合物では $c = 3$ および/または $d = 3$ である。特に好ましい化合物では $a = 0$ または3および/または $e = 0$ または3および/または $b = 0$ または1および/または $f = 0$ または1である。

【0037】

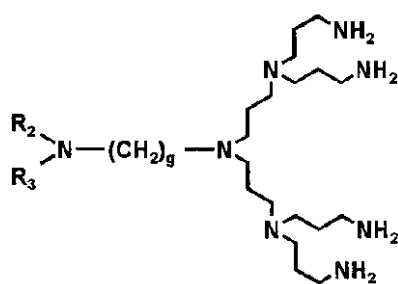
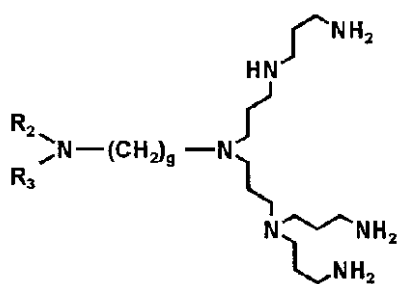
その際特に重要なものは次の構造を有する化合物とその塩である：

【化34】

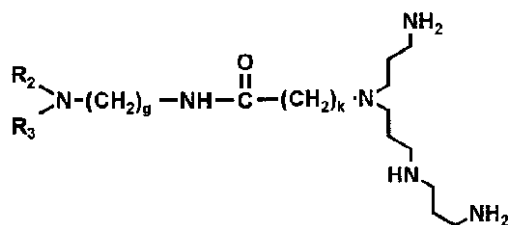
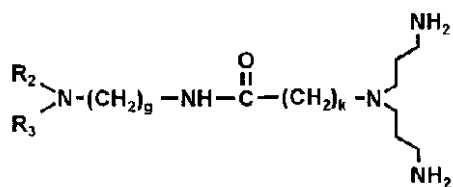


【0038】

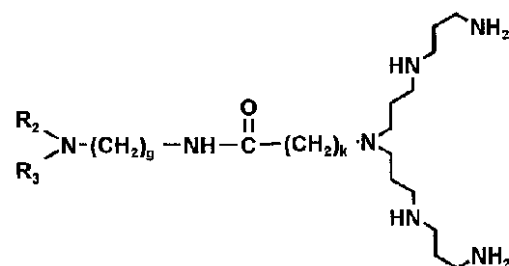
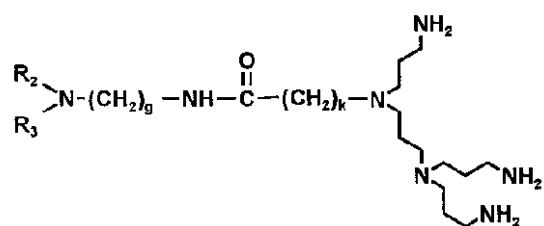
【化35】



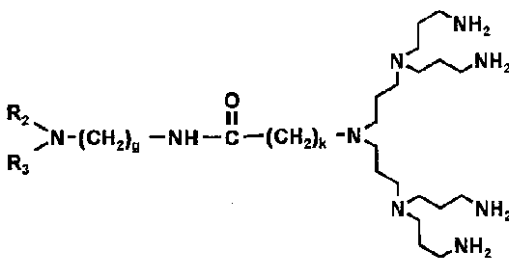
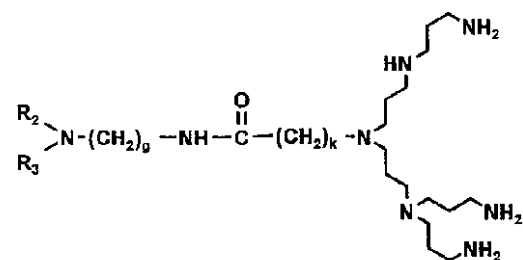
10



20

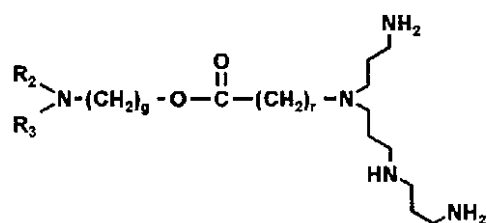
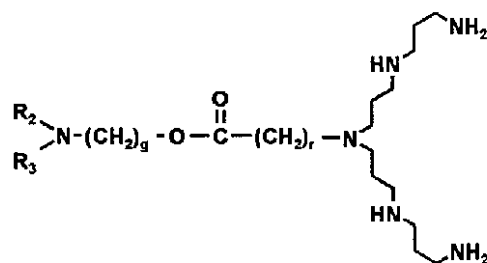
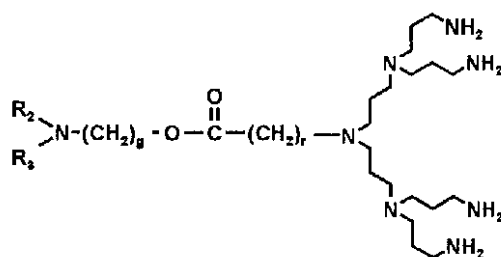
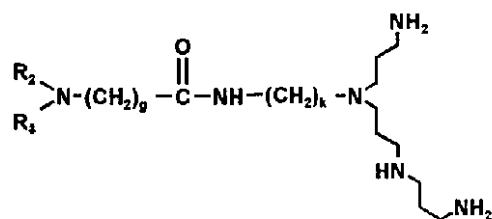
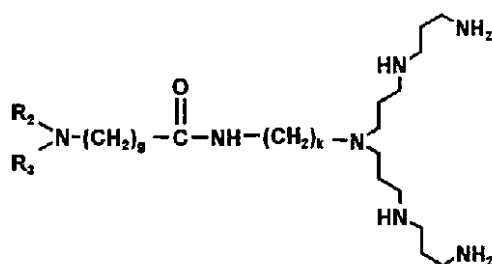


30

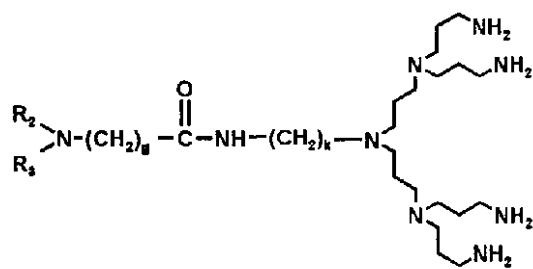
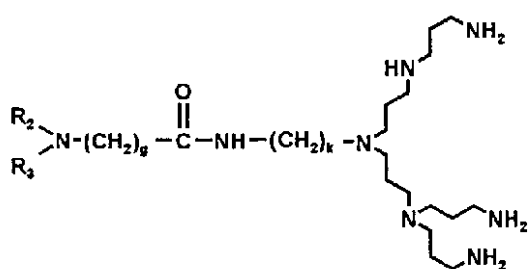


【 0 0 3 9 】

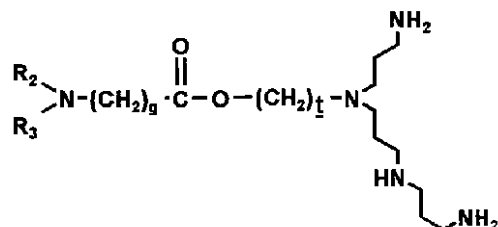
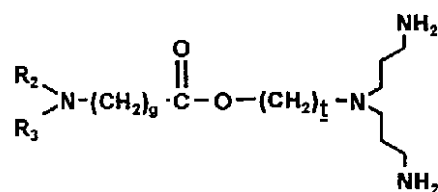
【 化 3 6 】


$$\begin{array}{c} \text{R}_2 \\ \diagup \\ \text{N}-(\text{CH}_2)_9-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_r-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{NH}_2 \\ \diagdown \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{NH}_2 \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array} \end{array} \\ \diagdown \\ \text{R}_3 \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \text{R}_2 \\ \diagdown \\ \text{N}-(\text{CH}_2)_g-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_f-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{HN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \\ \diagdown \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \end{array} \\ \diagup \\ \text{R}_3 \end{array}$$

$$\begin{array}{c} R_2 \\ \diagdown \\ N-(CH_2)_9-C(=O)-NH-(CH_2)_k-N \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{l} NH_2 \\ NH_2 \end{array} \\ \diagup \\ R_1 \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \text{R}_2 \\ \diagup \\ \text{N}-(\text{CH}_2)_g-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_k-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{NH}_2 \\ \diagdown \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{NH}_2 \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array} \end{array} \\ \diagdown \\ \text{R}_3 \end{array}$$


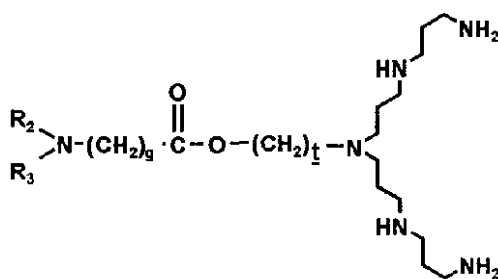
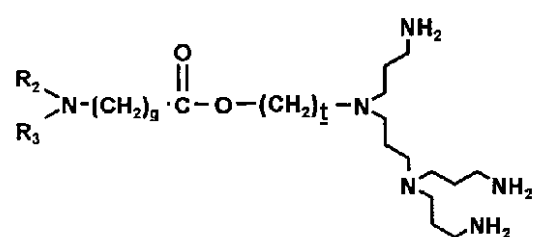
【化 3 7】



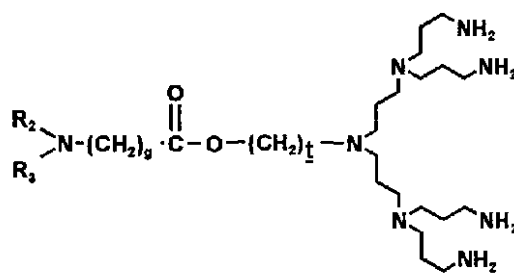
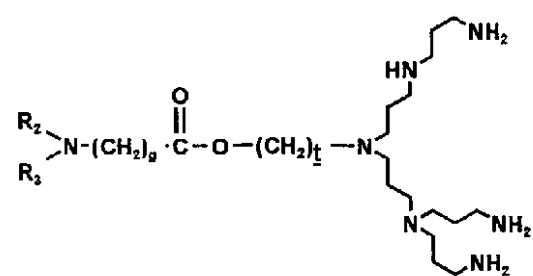
10



20



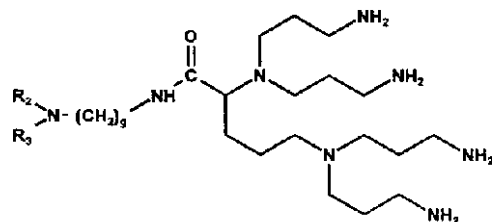
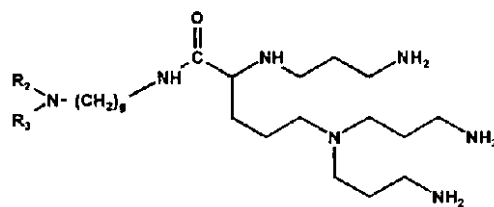
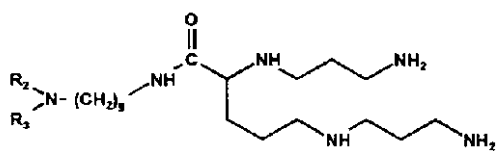
30



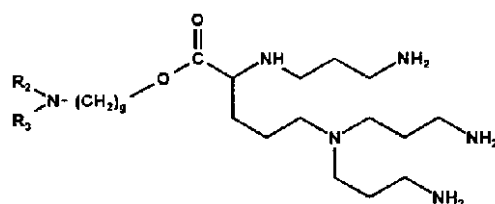
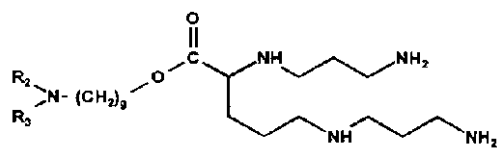
40

【 0 0 4 1 】

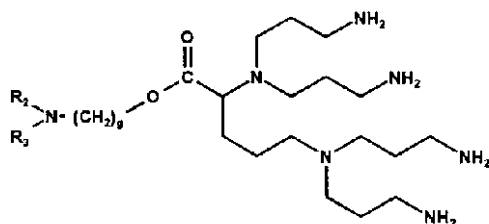
【 化 3 8 】



10



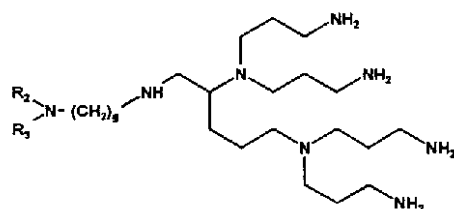
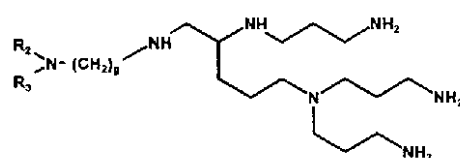
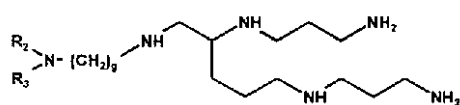
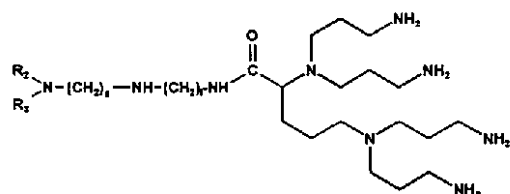
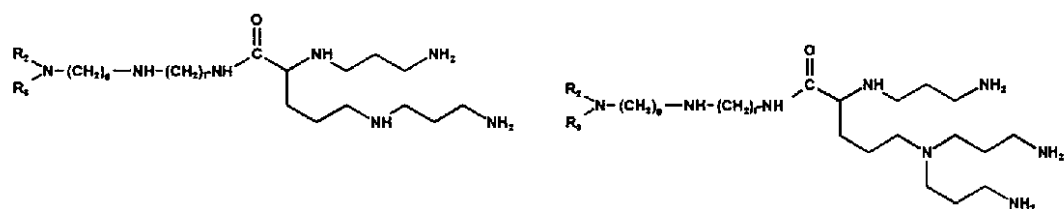
20



30

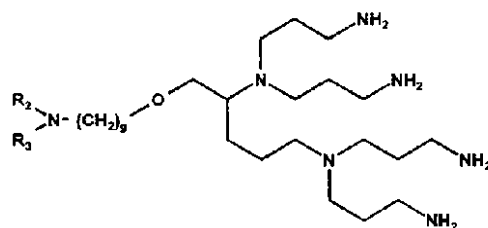
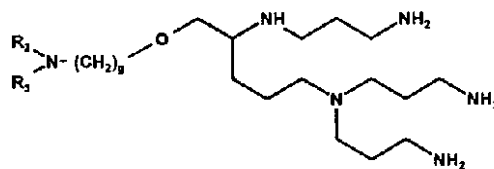
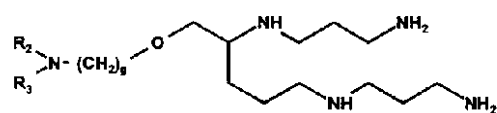
【 0 0 4 2 】

【 化 3 9 】



【 0 0 4 3 】

【 化 4 0 】



【 0 0 4 4 】

式中  $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5$  または  $6$ 、 $l = 0, 1$

10

20

30

40

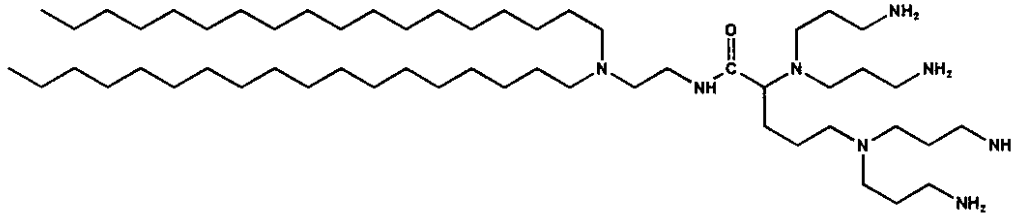
50

、2、3、4、5または6、およびその際  $g = 1、2、3、4、5、6、7$  または8とすることができ、 $R_2$  および  $R_3$  が互いに独立してドデシル、ドデセニル、テトラデシル、テトラデセニル、ヘキサデシル、ヘキサデセニル、オクタデシルまたはオクタデセニルとすることができる。

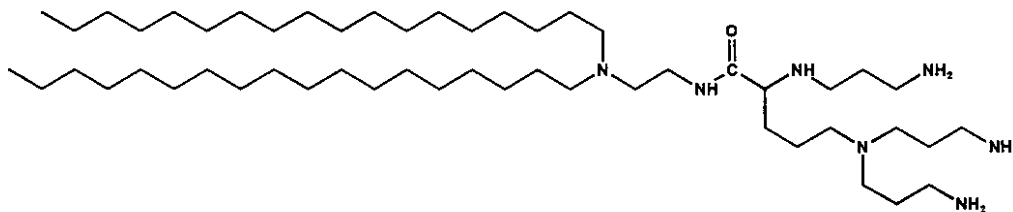
【0045】

その際、批判の余地なく特に重要なものは次の化合物とその塩である：

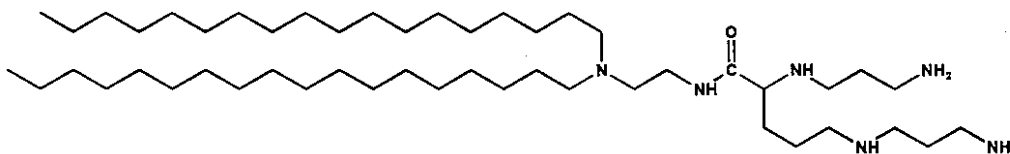
【化41】



10



20



【0046】

30

さらに特に重要なものは、たとえばジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、ジオレオイルホスファチジルコリン、コレステロールまたはコレステリルアミンのようなコリピドを含むまたは含まない本発明に基づく化合物の少なくとも1つを含有する組成物または製剤（リボソームまたはミセル類を含有）である。この組成物または製剤（リボソームまたはミセル類を含有）は通常添加物、担体、佐剤などを含有することができる。

【0047】

さらに特に重要なものは、DNA、RNA、リボザイム、アンチセンスDNA、PNA、ペプチド類、ペプチド類およびタンパク質類のような生物学的に実効のある化合物を組入れるための方法であって、その際本発明に基づく化合物、組成物または製剤が組入

40

る（生物学的に活性の）化合物と複合体を形成し、かつ発生した複合体が真核細胞と生体内または試験管内で接触させられる。

【0048】

さらに特に重要なものは、DNA、RNA、リボザイム、アンチセンスDNA、PNA、ペプチド類、ペプチド類およびタンパク質類のような生物学的に実効のある化合物を真核細胞の中に生体内または試験管内で組入れるための本発明に基づく化合物、組成物または製剤（薬剤または試薬を製造するため）の使用である。

さらに特に重要なものは、本発明の化合物の作用を補強する、いわゆる‘エンハンサー’と組合せた、DNA、RNA、リボザイム、アンチセンスDNA、PNA、ペプチド類、ペプチド類およびタンパク質類のような生物学的に実効のある化合物を真核細胞の中

50

に生体内または試験管内で組入れるための本発明に基づく化合物、組成物または製剤（薬剤または試薬を製造するため）の使用である。

【0049】

すなわち本発明に基づく脂質は、必要がある場合にスペーサを介して特異の脂肪親和性の残基に結合されたDNA親和性の頭基としてポリアミンを含有する。本発明に基づく脂質の特別の価値は、非常に良好なトランスフェクション性質と組合せて同時に細胞にとり低毒性で溶液中で安定性があることである。

【0050】

このように本発明に基づく化合物は、現在まで専門分野で知られている最も実効のあるリポポリアミンから成るトランスフェクション試薬であるリポフェクタミン<sup>TM</sup>（ジブコBR L：ライフテクノロジーインコーポレーテッド）に比べ、前記化合物が同一の頭基をもつ場合、より良好なトランスフェクション性質を有することを示すことができた。その際このトランスフェクション効率はそれぞれ血清を含まないおよび血清を含む環境でより高くなるのみならず、トランスフェクション効率の高い水準が本質的により幅の広いDNA脂質比にわたり達成できることも示している。

10

【0051】

本発明に基づく化合物は、ジアミンのアミノ基が必要のある場合塩基の存在中でアルキル化試薬と変換され、かつ他のアミノ基は必要がある場合BOC保護されたカルボキシポリアルキルアミンと結合することにより製造できる。その際他のアミノ基は好ましくは第1反応段階で、たとえばカルボキシポリアルキルアミンと変換する前に除去されるBOC基により保護されている。アルキル化試薬としては臭化ステアリルのような臭化アルキルを使用し、かつ塩基としてたとえばトリエチルアミンまたは4-メチルモルフォリンを使用することができる。

20

【0052】

以下、批判の余地なく特に重要な化合物、すなわちN-[2,5-ビス[(3-アミノプロピル)アミノ]-1-オキソベンチル]-N', N'-ジオクタデシルエチレンジアミンを例にとり対応する合成方法を説明する。

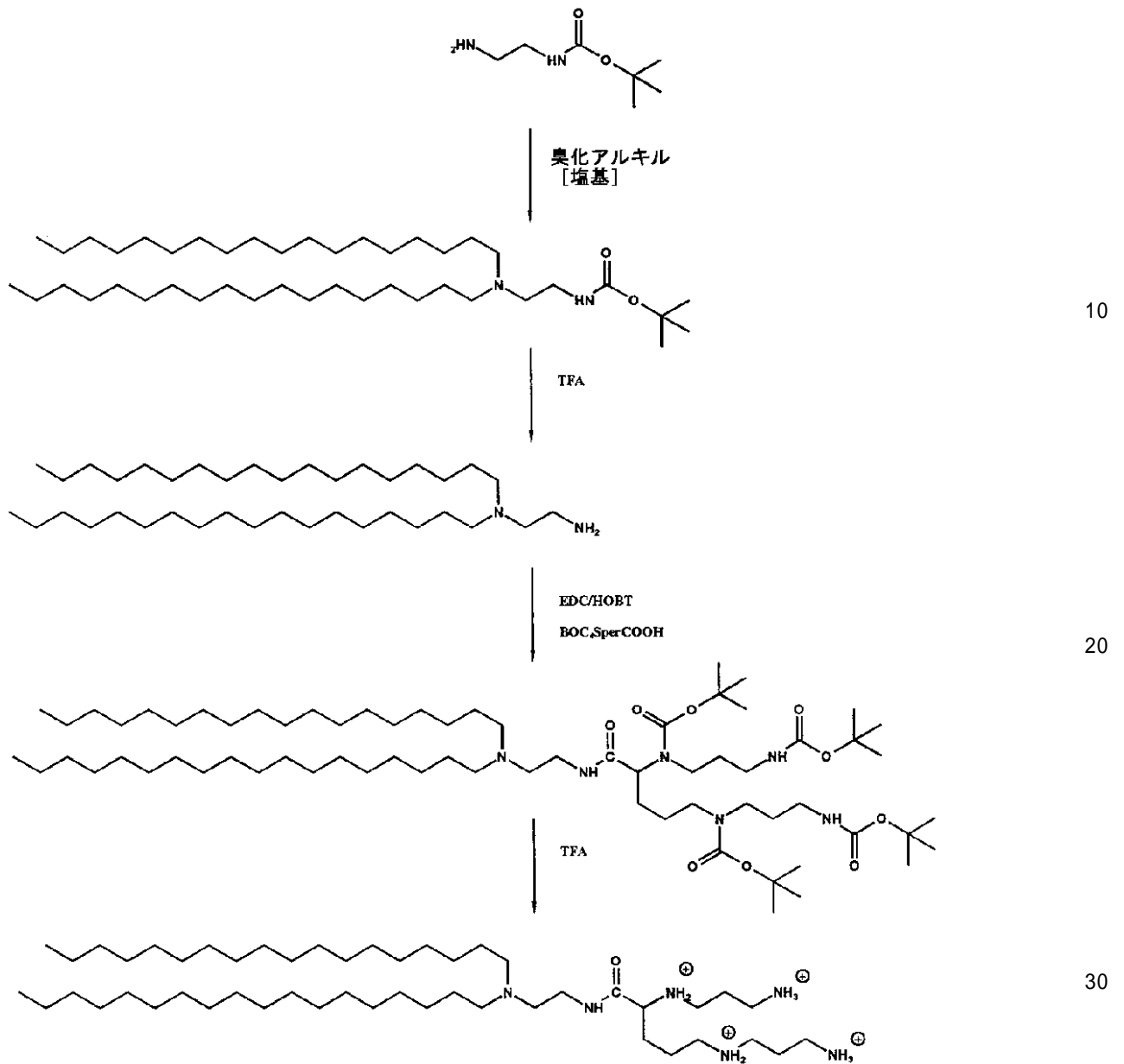
その際アミノ基がN-tert-ブチルオキシカルボニルで保護（BOC保護）されたアルキレンジアミンから出発する。自由アミノ基は、たとえば臭化ステアリルのような臭化アルキルにより塩基の存在中で誘導される。それに続き保護されたアミノ官能基が自体通例の方法で除去され、かつ自体通例の方法で全ての（反応性の）アミノ官能基にBOC保護されたカルボキシポリアルキルアミン（ここではBOC保護されたカルボキシスベルミン）に結合される。自体通例の方法で行われる前記頭基の除去後、自由アミンとしてまたはその塩の形態で各処理に応じて所望の化合物が得られる。

30

【0053】

【化42】





## 【 0 0 5 4 】

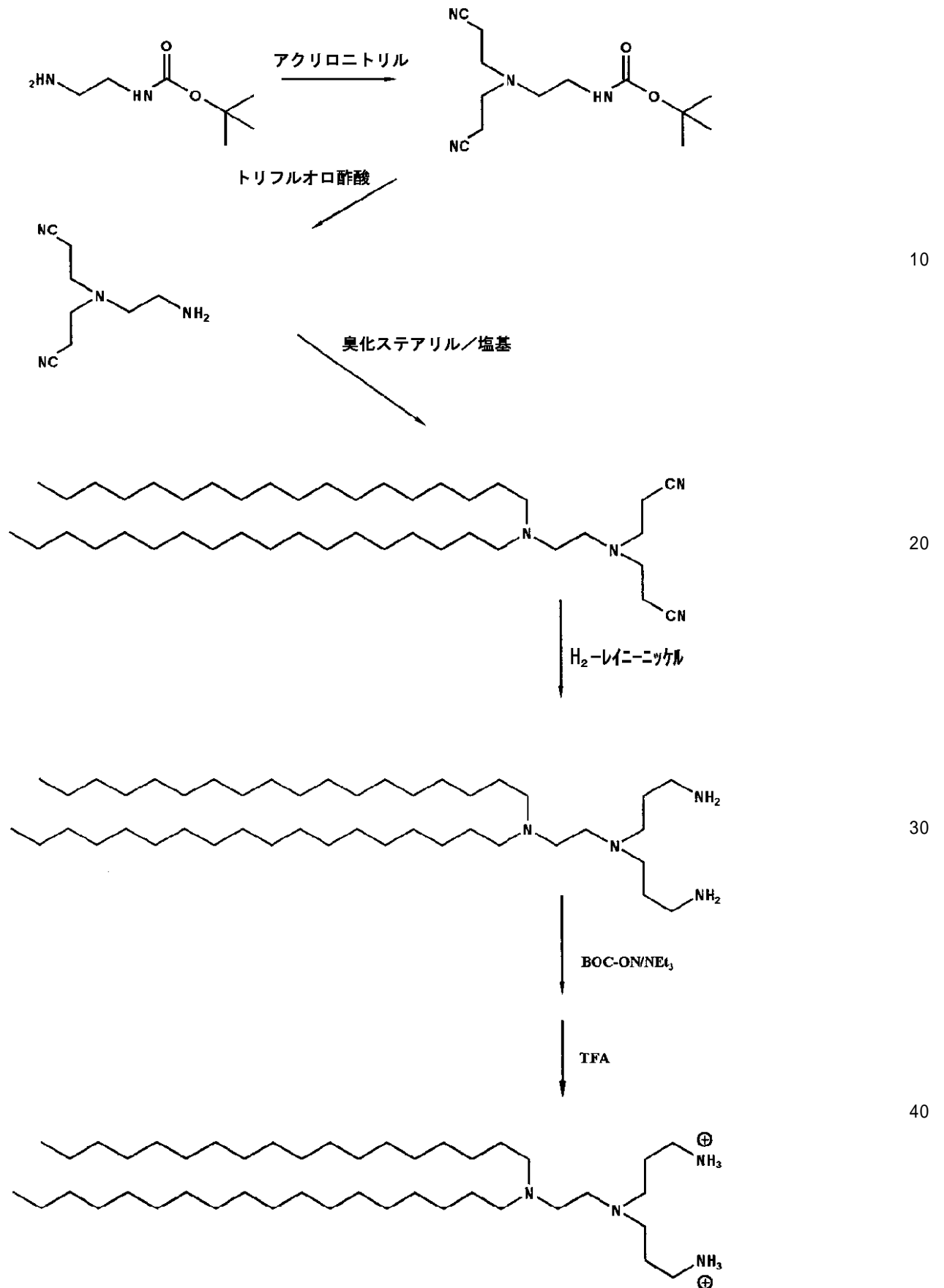
もう1つ別の実施態様において必要がある場合にアミノ基に保護されたジアミンがアクリロニトリルと変換され、かつこの生成物が臭化ステアルのようなアルキル化試薬と、必要がある場合塩基の存在中で変換される。次いでこの生成物は水素化することができる。

## 【 0 0 5 5 】

このようにして、もう1つ別の好ましい化合物、すなわちN, N'-ビス(3-アミノプロピル)-N', N'-ジオクタデシルエチレンジアミンを製造することができる。この化合物は、N-tert.-ブチルオキシカルボニルエチレンジアミン(BOC-エチレンジアミン)から出発して、アクリロニトリルによる変換と、臭化アルキルによるアルキル化と、それに続く水素化とにより得られる。それに続く段階は洗浄に利用される。

## 【 0 0 5 6 】

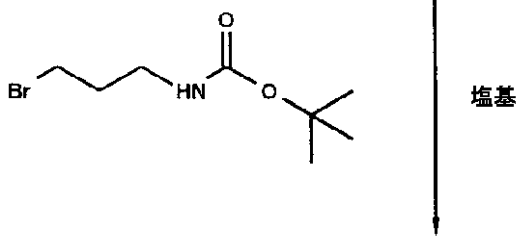
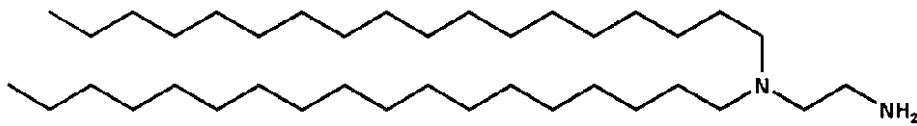
## 【 化 4 3 】



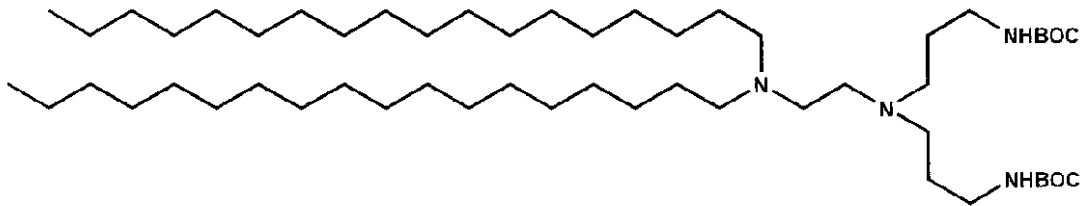
【 0 0 5 7 】

同一分子に対する選択的な方法は、N - B O C - 3 - ブロムプロピルアミンによる N , N - ジオクタデシルエチレンジアミンのアルキル化である。

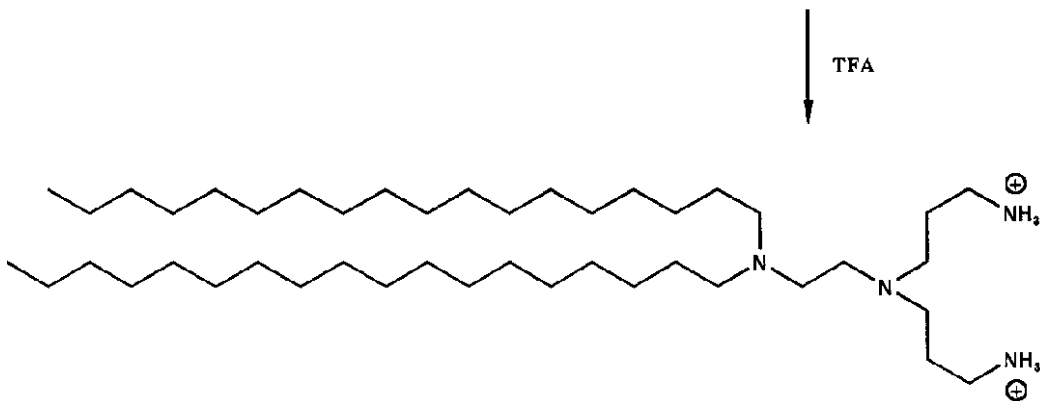
【 化 4 4 】



10



20



30

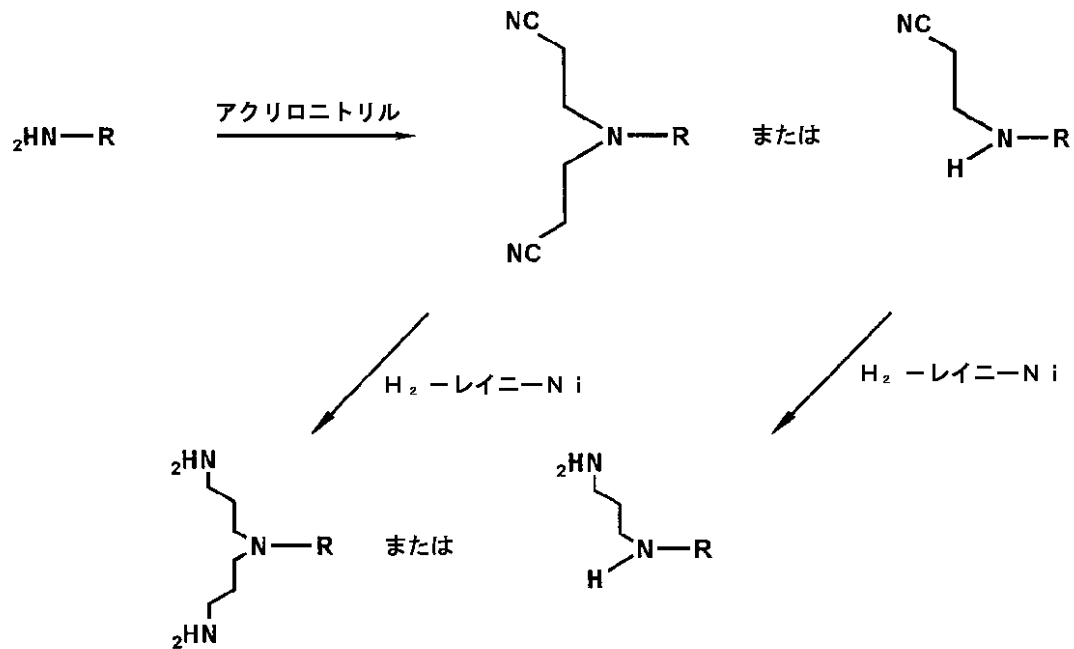
## 【 0 0 5 8 】

専門家に自体公知の適切な温度、時間、化学量論比などのような条件を選択することにより、ポリアミン頭基を延長し、または分枝したポリアミン頭基を作ることができる。その際この頭基を個別的に製造し、かつそれに続き脂肪親和性の残基に結合し、またはすでに分子に結合した頭基を拡大する可能性がある。たとえば次の自体公知の、その他の点で本例にも含まれている反応図式に従って処理することができる：

40

## 【 0 0 5 9 】

## 【 化 4 5 】



10

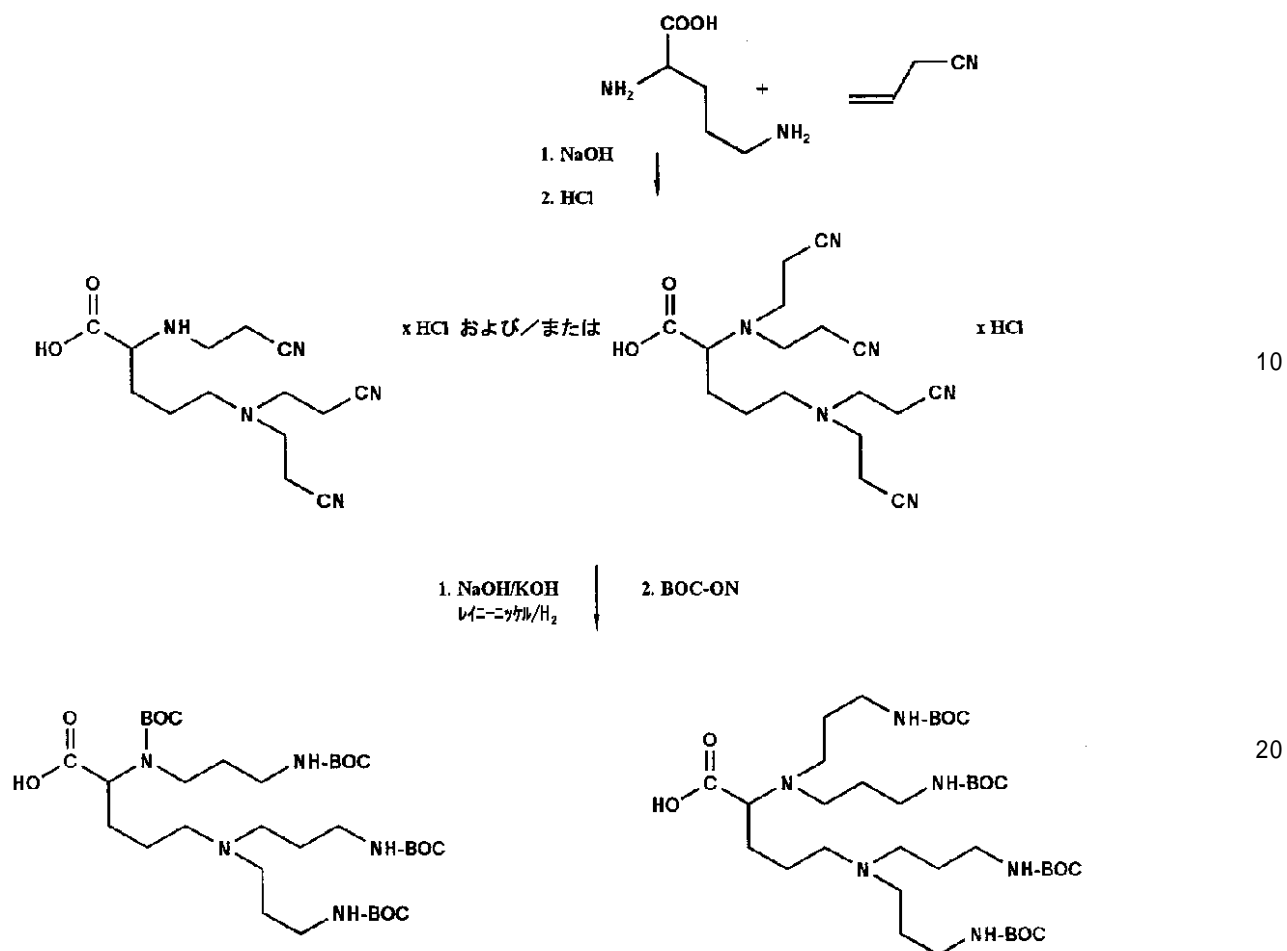
【 0 0 6 0 】

明示的な例としてアクリロニトリルによるオルニチンの変換に利用するものとする。アクリロニトリルの量および反応温度の適正な選択により所望の生成物を主要量として得ることができる。アミン類とニトリルの水素化およびBOC保護基によるその保護は、J. P. BehrらProc. Natl. Acad. Sci.、米国第86号、6982-6986頁以降、1989年により、テトラ-BOC-カルボキシスペルミンの合成と同様に実施される。

20

【 0 0 6 1 】

【 化 4 6 】



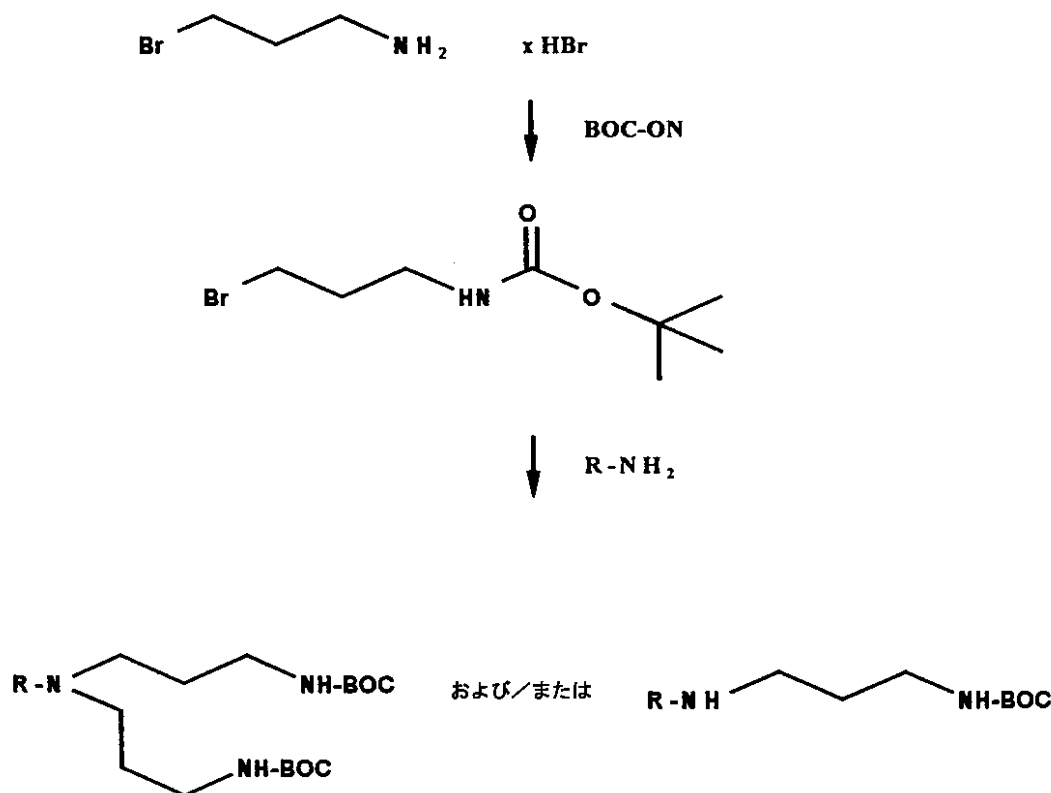
【 0 0 6 2 】

ポリアミン頭基を延長および分枝するもう1つ別の可能性は、N-(tert.-ブチルオキシカルボニル)-3-ブロムプロピルアミンによるアミン類のアルキル化にある。

【 0 0 6 3 】

【 化 4 7 】

30



10

20

## 【 0 0 6 4 】

一般に、記載された全ての脂質類は前記および下記の例に記載された方法（BOC保護基によるアミノ官能基の阻止および除去、臭化アルキルによるアミノ官能基のアルキル化、公知のペプチド化学と同様のアミド結合の結合、アクリロニトリルを経由したアミノ官能基のシアノエチル化、シアノ官能基からアミン類への水素化）により、または有機化学者に信頼されている、一般に周知の方法（アルコールのアルキル化、エステル結合の結合、水酸化アルミニウムリチウムを経由したエステルからエーテルへもしくはアミド類からアミン類への還元）により製造することができる。

30

## 【 0 0 6 5 】

2つの最後に挙げたスペーサを含有する化合物の製造に関しては、WO9802191の参照を指示する。ここではBOC保護基を反応させずに、エステルおよびアミドを水酸化アルミニウムリチウムによりどのようにエーテルおよびアミン類に還元できるかが記載されている。この方法により適切な前駆体からこのような化合物が生じる。

## 【 0 0 6 6 】

本発明に基づく化合物は、このような化合物として水溶液または水性緩衝溶液またはエタノール溶液に適用することができる。ただしリボソーム（またはミセル）も上記脂質単独で、またはたとえばコレステロール、コレステリルアミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）またはジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）の

40

## 【 0 0 6 7 】

本発明に基づく脂質のトランスフェクション効率を向上させるために、リソソーム内の酵素活性を禁止する物質、たとえばクロロキンまたはウィルスから派生したリソソームアトロプ作用のタンパク質のような、いわゆるリソソームアトロプ物質の存在中で細胞を導入する可能性がある。

## 【 0 0 6 8 】

さらに陽イオン脂質と組合せた、いわゆるエンハンサーを使用する可能性がある。エンハンサーは陽イオン脂質の作用を強化する。その際、それ自体まったく転移性質をもたないエンハンサーがあり、かつ陽イオン脂質なしでもトランスフェクションに使用できるエン

50

ハンサーがある。前者の場合は陽イオン脂質のトランスフェクション効率の簡単な強化（増幅）が生ずる。後者の場合は、組合せ適用において個別適用の場合よりも大きいトランスフェクション効率が現われる。従って組合せ効率は相乗効果により生じる。エンハンサーはその作用を通常は転移DNAの前凝縮により、またはエンハンサーは浸透する細胞膜の浸透性を高める。エンハンサーの例はポリエチレンジアミン、トランスフェリン、硫酸プロタミン、ポリヒストン、紡錘遺伝子ペプチド、ウィルス皮膜、ウィルス性表面ペプチド、複製欠陥のあるウィルスなどである。

#### 【0069】

本発明に基づくリポポリアミンは生理学的pHで正に帯電されており、かつこのため負に帯電した巨大分子、特にDNAおよび同種の物質類により安定した凝集物を形成することができる。リポポリアミンにより被覆および陽性にされた巨大分子は細胞内に巨大分子を導入させる方法で負に帯電した細胞膜と相互作用をする。その際生体内にも試験管内にも適用することができる。

#### 【0070】

DNA結合剤とも呼ばれる（たとえばポリリシンなどの）ポリ陽イオンが標的に向けて特定の細胞の表面レセプタに結合する、いわゆる内部化因子（たとえば特定の糖タンパク質）に結合する標的に合せてレセプタを仲介した細胞内取込（Wuら、化学誌、第262号、4429-4432頁、1987年）に比べ、本発明に基づく脂質もしくはそのリボソーム製剤は細胞特異性がない。本発明に基づく脂質もしくはそのリボソーム製剤による標的に合せた供給は、脂質および輸送する生物分子の帯電が調整され、かつ生物分子と脂質間の凝集物に追加して内部化因子が取込まれることにより達成することができる。これはコリピドが頭基としてこのような内部化因子をもつ場合、コリピドによるリボソーム製剤により達成することができる。もう1つ別の可能性は生物分子、脂質および内部化因子から成る中性の帯電に調整された凝集物である。いわゆる内部化因子はトランスフェリン、ガラクトース、マンノース、マンノース-6-ホスフェート、アシアलगリコプロテイン、コンアルブミン、レクチン、トランスコバラミン、 $\alpha$ -2-マクログロブリン、ビオチン、葉酸、マンノース化グリコプロテインである。その他の因子はEP0535576、EP0544292、WO9421808で取出すものとし、この中に引用して採録されている。内部化因子と同様に細胞特異性の抗体も使用することができる。

#### 【0071】

本発明に基づく化合物は治療目的に使用することができる。特にこのような化合物は、たとえば嚢胞性線維症、筋ジストロフィ症、フェニルケトン尿症、カエデシロップ病、プロピオン酸血症、メチルマロン酸血症、アデノシンデアミナーゼ欠乏症、高コレステリン血症、血友病および $\beta$ -サラセミアの遺伝子治療に使用することができる。遺伝子治療上の治療方法は、ホルモン、成長因子、細胞毒または免疫調節作用タンパク質が生体内で合成されるべき場合、さらに重要になる。上述の目的のためにDNA断片はこれらの脂質を利用し、これらのDNAが所望の効果を発揮する細胞内に組入れることができる。この所望の効果は欠乏または欠失したDNA領域の補充または罹病した細胞タイプ内で疾病を誘発するDNA領域（たとえばアンチセンスDNA/RNA）の禁止剤とすることができる。この方法により抗腫瘍遺伝子を癌治療に使用することができ、またはコレステロール調整遺伝子の導入により心臓および血管疾患の予防に貢献することができる。さらにリボザイムに遺伝暗号を指定するDNA、またはリボザイム自体を罹病した細胞内に導入することができる。このようなDNAの翻訳は特異的部位でm-RNAを触媒的に分裂させ、かつこの方法で転移を阻止する活性リボザイムを作る。この方法により、たとえばウィルスm-RNAは、他の細胞m-RNAを交換疼痛させずに特異的に分裂させることができる。ウィルス（たとえばHIV、ヘルペス、肝炎）の増殖サイクルはこの方法で遮断することができる。

#### 【0072】

また癌治療でも癌ワクチンを製造するトランスフェクションがますます重要な役割を演じている。従ってこの分野は本発明に基づく化合物に可能な適用範囲でもある。

もう1つ別の適用は、たとえば免疫遺伝子ペプチドに遺伝暗号を指定するDNAの発現に基づき、人間および動物の体内に作用するような脂質を接種法で見出すことができる。そのために脂質/DNA複合体が接種素として使用される。体細胞内へのDNAの導入は免疫遺伝子ペプチドの発現をもたらし、かつそれにより免疫反応が引き起こされる。

#### 【0073】

DNAを除き、たとえばPNA、ペプチド、ペプチドまたはタンパク質のような他の巨大分子も細胞内に導入することができる。この目的のために、これらの巨大分子は本発明に基づくリポポリアミンをそのものとして被覆させることができ、または成分として本発明に基づくリポポリアミンを含有するリポソームに封入または負の正味帯電が存在する場合、表面に吸着させることができる。このような凝集物を細胞と接触させると、細胞壁を通してこれらの分子の輸送が行われる。治療用のペプチドは多数の疾病に好ましい影響を及ぼす。このようなペプチドまたはタンパク質は、たとえばリンフォカイン、インターロイキン、腫瘍壊死因子またはインターフェロン、さらに成長因子、組織プラスミノゲン活性因子、第VIII:c因子、顆粒球マクロファージ刺激因子、赤血球生成促進因子、インスリン、カルシトニン、チミジンキナーゼおよびその他がある。またリシン、ジフテリアトキシンおよびその他のような毒性ペプチドは、治療上この方法で利益をもたらすように使用することができる。ペプチドは体内での急速な酵素分解を阻止するためのペプチド類似物として成功裡に使用するとができる。

10

#### 【0074】

本発明に基づく脂質はその正帯電のため主として負に帯電した分子をその負帯電のために複合体を形成し、かつ細胞内への導入に使用される。しかしいわゆる‘自己集合系’により、初めに負に帯電したリポソームが前記の正に帯電した分子と複合体を形成する正に帯電した分子も輸送することができる。負の正味帯電が残留するようにこの関係を選択すると、この複合体は本発明に基づくリポポリアミンによりそれ自体としてまたは逆に帯電した成分が接触されるリポソームの形態で陽性に行うことができる。発生する正に帯電した全複合体は細胞によって吸収される。

20

#### 【0075】

陽イオン脂質のためのその他の適用可能性は出版物WO 90 11092、WO 91 16024、WO 93 03768、科学、第258号、744-746頁、1992年から取出すことができ、この中に引用して収録されている。

30

目下治療上有望と見なされている遺伝物質の配列の例は、F. W. Anderson、科学、第256号、808頁、1992年の一覧表に読取ることができ、同様にこの中に引用して収録されている。

#### 【0076】

例

購入先：

1. プラスミド：pCMV<スポーツ>-ガル；ジブコBRL、ライフテクノロジー
2. -ガラクトシダーゼ定量キット、ストラタゲネ
3. テトラ-BOC-カルボキシスペルミンは、J. P. Behrら、Proc. Natl. Acad. Sci. 米国86、6982-6986頁以降、(1989年)、により合成された。
4. リポフェクタミン<sup>TM</sup>；ジブコ-BRL；ライフテクノロジーインコーポレーテッド
5. N-tert.-ブチルオキシカルボニルエチレンジアミン、アルドリッチ
6. O-(N-tert.-ブトキシカルボニル)-フェニルグリオキシル-アシッドニトリロキシム(BOC-ON)；アルドリッチ
7. N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-N-エチルカルボジイミド メトヨードイド(EDC)、アルドリッチ
8. 1-ヒドロキシ-1H-ベンゾトリアゾール(HOBT)、アルドリッチ
9. 4-メチルモルフォリン、ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)、トリエチルアミン、アルドリッチ。

40

50



10. トリフルオロ酢酸 (TFA)、アルドリッヒ

11. ダルベッコ修飾イーグル培養液 (DMEM)、ジブコ-BRL: ライフテクノロジ  
ーインコーポレーテッド

12. 胎内凝乳血清 (FCS)、バイオクロム

13. ペニシリン、ストレプトマイシン、SIGMA

# 【0077】

例1: トランスフェクション試薬1

N-tert.-ブチルオキシカルボニル-N', N'-ジオクタデシルエチレンジアミンの  
合成

646 mg (1.94 mmol, MG333.4) 臭化オクタデシル、135 mg (0.84 mmol, MG160.22) N-tert.-ブチルオキシカルボニルエチレンジアミン (BOC-エチレンジアミン) および 332  $\mu$ l (1.94 mmol, MG129.25, d0.755) ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) が 10 ml アセトニトリルに溶解され、かつ夜通し還流しながら煮沸される。100 ml エーテルを添加して水で洗浄される。有機相は硫酸マグネシウムで乾燥され、かつ溶剤が引抜かれる。すでに比較的清浄な生成物はフラッシュクロマトグラフィで洗浄される。

# 【0078】

$C_{43}H_{88}O_2N_2$

MG664.12

$R_f = 0.44$  (9:1 v/v クロロホルム/メタノール)

MS (FAB): 665.7 (M+1)

$^1H$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>):

0.88 (tr, 6H, CH<sub>3</sub>); 1.26 ("s", 60H, CH<sub>2</sub>); 1.40 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1.44 (s, 9H, CH<sub>3</sub>BOC); 2.40 (tr, 4H, N-CH<sub>2</sub>); 2.50 (tr, 2H, N-CH<sub>2</sub>); 3.15 (m, 2H, OCO-N-CH<sub>2</sub>)

$^{13}C$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>):

13.1 (CH<sub>3</sub>); 22.7, 27.0, 25.5 (CH<sub>2</sub>); 28.5 (CH<sub>3</sub>BOC); 29.4, 29.6, 29.7, 29.7 (CH<sub>2</sub>); 53.2 (N-CH<sub>2</sub>); 54.0 (N-CH<sub>2</sub>); 78.9 (C<sub>q</sub>BOC); 156.1 (OCO)

収率: 390 mg (69%)

# 【0079】

N-[テトラ-tert.-ブチルオキシカルボニル-[(2, 5-ビス(3-アミノプロピル)アミノ)-1-オキソペンチル]]-N', N'-ジオクタデシルエチレンジアミンの合成  
157 mg (0.236 mmol, MG665.12) N-tert.-ブチルオキシカルボニル-N', N'-ジオクタデシルエチレンジアミンがトリフルオロ酢酸 (TFA) と塩化メチレンとから成る混合物 1:3 v/v 4 ml に入れられる。2-3 時間後に回出され、かつ 0.5 時間高真空で乾燥される。それに続き DMF と塩化メチレンとから成る混合物 1:1 v/v 6 ml に入れられ、かつ 300  $\mu$ l 4-メチルモルフォリンで置換される。それに続き 152.6 mg (0.236 mmol, MG646.8) テトラ-BOC-カルボキシスベルミンがジメチルホルムアミド (DMF) と塩化メチレンとから成る混合物 1:1 v/v 2 ml に溶解され、かつ添加される。さらに 45 mg (0.330 mmol) 1-ヒドロキシ-1H-ベンゾトリアゾール (HOBt) および 98 mg (0.330 mmol) N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-N-エチルカルボジイミド メトヨードイド (EDC) が添加され、かつ 50 時間室温で攪拌される。この溶剤が回出され、かつ残渣が塩化メチレンに入れられる。その後、水で洗浄され、有機相が硫酸ナトリウムで乾燥され、かつ回出される。粗生成物がフラッシュクロマトグラフィを介して洗浄される。

# 【0080】

$C_{51}H_{136}N_6O_9$

MG977.65

$R_f = 0.40$  (9 : 1 v/v 塩化メチレン/メタノール)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :

0.88 (tr, 6H,  $\text{CH}_3$ ) ; 1.25 ("s", 64H,  $\text{CH}_2$ ) ; 1.44 (m, 36H,  $\text{CH}_3$  Boc) ; 1.67 (m, 8H, スペルミン :  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ) ; 2.36 (mr, 4H, ステアリル :  $\text{N-CH}_2$ ) ; 2.51 (m, 2H, エチレンジアミン :  $\text{N-CH}_2$ ) ; 3.1-3.25 (m, 10H,  $\text{OC-N-CH}_2$ )

収率 : 135 mg (59%)

【0081】

N-[2, 5-ビス((3-アミノプロピル)アミノ)-1-オキソペンチル]-N', N'-ジオクタデシルエチレン-ジアミン (TFA 塩) の合成

70 mg N-[テトラ-tert.-ブチルオキシカルボニル-(2, 5-ビス(3-アミノプロピル)アミノ)-1-オキソペンチル]-N', N'-ジオクタデシルエチレンジアミンが塩化メチレンとトリフルオロ酢酸 (3 : 1 v/v) とから成る混合物 2 ml に溶解され、かつ 1.5 時間室温で攪拌される。その後、回出され、水/tert.-ブタノール (1 : 1 v/v) から成る混合物 10 ml に入れられかつ凍結真空乾燥される。

$\text{C}_{53}\text{H}_{104}\text{O}_4\text{N}_6$  ( $\times 4 \text{CF}_3\text{COOH}$ )

MG 793.52 (+ 4  $\times$  114 = 1249.52)

収率 : 100%

【0082】

例 2 : トランスフェクション試薬 2

N', N'-ビス(2-シアノエチル)-N-tert.-ブチルオキシカルボニルエチレンジアミンの合成

500 mg (3.12 mmol, MG 160.22) N-tert.-ブチルオキシカルボニルエチレンジアミンが 5 ml 水に溶解され、かつ 0.65 ml (9.8 mmol, MG 53.06) アクリロニトリルが添加される。その後 7 日間室温で攪拌される。その後、酢酸エステルで層状にされ、振出され、かつ有機相が分離される。硫酸ナトリウムを介して乾燥後、回出される。

$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N}_4$

MG 266.34

$R_f = 0.69$  (9 : 1 v/v クロロホルム/エタノール)

収率 : 660 mg (80%)

【0083】

N', N'-ビス(2-シアノエチル)-N, N'-ジオクタデシルエチレンジアミンの合成

660 mg (2.48 mmol, MG 266.34) N', N'-ビス(2-シアノエチル)-N-tert.-ブチルオキシカルボニルエチレンジアミンがトリフルオロ酢酸と塩化メチレンとから成る混合物 1 : 3 v/v 10 ml に入れられる。2 - 3 時間後に回出され、かつ 0.5 時間高真空で乾燥される。その後、ブタノール/水 (1 : 1 v/v) から凍結真空乾燥される。得られたトリフルオロ酢酸は、2.43 g (7.28 mmol, MG 333.4) 臭化オクタデシルおよび 2.23 ml (1.68 g, 13.02 ml, MG 129.25, d 0.755) ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) と共に乾燥したアセトニトリル 40 ml に溶解され、かつ 24 時間還流しながら煮沸される。粗生成物がフラッシュクロマトグラフィを介して洗浄される。

$\text{C}_{44}\text{H}_{36}\text{N}_4$

MG 671.16

$R_f = 0.42$  (9 : 1 v/v 塩化メチレン/メタノール)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :

0.88 (tr, 6H,  $\text{CH}_3$ ) ; 1.26 ("s", 60H,  $\text{CH}_2$ ) ; 1.42 (m, 4H,  $\text{N-CH}_2\text{CH}_2$ ) ; 2.42 (m, 4H,  $\text{N-CH}_2$ ) ; 2.48 (tr, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CN}$ ) ; 2.50 (m, 2H,  $\text{N-CH}_2$ ) ; 2.50 (m, 2H,  $\text{N-CH}_2$ ) ; 2.92 (tr, 4H,  $\text{N-CH}_2$ )

収率：330 mg (20%)

【0084】

N', N'-ビス(3-アミノプロピル)-N, N-ジオクタデシルエチレンジアミン(TFA塩)の合成

2.5 g レイニーニッケルが20 ml 水に添加される。これに、攪拌しながら、水がちょうど沸騰しすぎず、かつそれに続き30分間攪拌されるように、4.5 g 水酸化ナトリウムが素早く添加される。320 mg (0.48 mmol, MG 671.2) N', N'-ビス-(2-シアノエチル)-N, N-ジオクタデシルエチレンジアミンが0.5 M 水酸化カリウム溶液(EtOH/水 95:5 v/v) 500 ml に入れられる。活性化されたレイニーニッケルが上澄みから傾瀉により分離され、かつ抽出溶液に加えられる。その後24時間水素化装置で水素化される。この溶剤を回転させた後、残渣が塩化メチレン5 ml に溶解される。これに500 mg (2.02 mmol, MG 246.27) O-(tert.-ブトキシカルボニル)-フェニルグリオキシル-アシッドニトリロキシム(BOC-ON)が添加され、かつ室温で24時間攪拌される。その後回転される。粗生成物がフラッシュクロマトグラフィーを介して洗浄される。その後この生成物がトリフルオロ酢酸と塩化メチレンとから成る混合物1:3 v/v 10 ml に入れられる。2-3時間後に回出され、かつ0.5時間高真空で乾燥される。最後にブタノール/水(1:1 v/v)から凍結真空乾燥される。

10

$C_{44}H_{94}N_4 \times 4CF_3COOH$

MG 679.21 (+ 4 x 114 = 1135.21)

20

MS (ESI): 680.2

収率：250 mg (ニトリルに対して58%)

【0085】

例3：分枝した頭基：

N-(tert.-ブチルオキシカルボニル)-3-ブロムプロピルアミンの合成

500 mg (2.28 mmol; MG 218.94) 3-ブロム-1-プロピルアミン ヒドロプロミド(アルドリッヒ)が1.13 (4.59 mmol; MG 246.27) O-(tert.-ブトキシカルボニル)-フェニルグリオキシル-アシッドニトリロキシム(BOC-ON)および0.65 ml (0.46 g; 4.6 mmol) トリエチルアミンと共にアセトンと水(1:1, v/v)とから成る混合物に溶解される。2時間攪拌後、濃縮され、かつ塩化メチレンに入れられる。この有機相が水で洗浄され、硫酸ナトリウムで乾燥され、かつ回転される。粗生成物がフラッシュクロマトグラフィーを介して洗浄される。

30

$C_8H_{16}O_2NBr$

MG 238.31

$R_f = 0.84$  (9:1 v/v 塩化メチレン/メタノール)

$^1H$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>):

1.36 (br s, 9H,  $CH_3$  BOC); 1.98 (m, 2H, C-CH<sub>2</sub>-C); 3.19 (m, 2H, Br-CH<sub>2</sub>); 3.38 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>); 4.90 (br s, 1H, N-H)

$^{13}C$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>):

40

28.2 (CH<sub>3</sub>); 30.6, 32.6, 38.8 (CH<sub>2</sub>); 79.1 (C<sub>q</sub>); 155.8 (C=O)

収率：250 mg (46%)

【0086】

N', N'-ビス(3-アミノプロピル)-N, N-ジオクタデシルエチレンジアミン(TFA塩)の合成

200 mg (0.3 mmol, MG 665.12) N-tert.-ブチルオキシカルボニル-N', N'-ジオクタデシルエチレンジアミンがトリフルオロ酢酸と塩化メチレン(1:3 v/v)とから成る混合物2 ml に溶解される。2時間後、回出され、かつ2時間高真空で乾燥される。その後20 ml クロロホルムに入れられ、かつ1 ml (920 mg、

50

4.5 mmol、MG101.15、 $d = 0.92$ ) 4-メチルモルフォリンが添加される。それに続き640 mg (2.68 mmol、MG238.13) N-(tert.-ブチルオキシカルボニル-3-ブロムプロピルアミンが添加される。48時間の煮沸後に還流しながら回転され、BOC-保護された前駆体生成物がフラッシュクロマトグラフィを介して洗浄される。それに続きトリフルオロ酢酸と塩化メチレン(1:3 v/v)とから成る混合物2 mlに溶解され、回転され、かつ凍結真空乾燥される。

$C_{44}H_{94}N_4 \times 4CF_3COOH$

MG679.21 (+4 x 114 = 1135.21)

MS(ESI): 680.2

収率: 46 mg (13%)

10

#### 【0087】

N, N', N'-トリス(シアノエチル)-オルニチンの合成

950 mg 水酸化ナトリウムが20 ml 水に溶解される。苛性ソーダ溶液に2 g (11.86 mmol、MG168.62) オルニチン塩酸塩が溶解される。その後3 ml (45.57 mmol) アクリロニトリルが滴下され、かつ24時間室温で攪拌される。1.7 ml 25%塩酸の添加後、固形物が沈殿する。これが冷却後に吸引濾過される。

$C_{14}H_{21}O_2N_5 \times HCl$

MG327.82

$R_f = 0.71$  (1:1:1 v/v/v イソプロパノール/エタノール/水)  $^1H-NMR$  (D<sub>2</sub>O):

20

1.58 (m, 2H,  $\underline{CH}_2-CH_{om}$ ); 1.90 (m, 2H,  $CH_{2om}$ ); 2.61 (m, 6H,  $NC-\underline{CH}_2$ ); 2.86 (tr, 4H,  $N-CH_2$ ); 2.98 (tr, 2H,  $N-CH_2-\underline{CH}_2$ ); 3.39 (tr, 2H,  $N-CH_2$ ); 3.68 (tr, 1H,  $CH_{om}$ )

収率: 2.1 g (54%)

#### 【0088】

N, N, N', N'-テトラ(シアノエチル)-オルニチンの合成

980 mg 水酸化ナトリウムが20 ml 水に溶解される。苛性ソーダ溶液に2 g (11.86 mmol、MG168.62) オルニチン塩酸塩が溶解される。その後3.9 ml (59.3 mmol) アクリロニトリルが滴下され、8日間室温で攪拌される。その後もう一度3 ml アクリロニトリルが滴下され、さらに6時間攪拌される。1.7 ml 25%塩酸の添加後、生成物は3回酢酸エステルで振出される。有機相が硫酸ナトリウムを介して乾燥され、かつ回転される。

30

$C_{17}H_{24}O_2N_6 \times HCl$

MG344.4182

$R_f = 0.84$  (1:1:1 v/v/v イソプロパノール/エタノール/水)  $^1H-NMR$  (D<sub>2</sub>O):

1.60 (m, 2H,  $\underline{CH}_2-CH_{om}$ ); 1.92 (m, 2H,  $CH_{2om}$ ); 2.52 (m, 8H,  $NC-\underline{CH}_2$ ); 2.61 (tr, 4H,  $CH_{2om}$ ); 2.87 (tr, 4H,  $N-CH_2$ ); 3.03 (tr, 4H,  $N-CH_2$ ); 3.38 (m, 1H,  $CH_{om}$ )

40

収率: 2.4 g (59%)

#### 【0089】

例4:

リポソーム/ミセル製剤

ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリン、コレステロールまたはコレステリルアミンが有機溶剤(たとえばクロロホルム)に溶解される。例1からの脂質がそれ自体としてまたは塩の形態で、たとえばトリフルオロ酢酸塩の形態で有機溶剤(たとえばクロロホルム)の中に溶解される。異なる溶液を種々の量で組合せることにより、コリピドと触媒脂質とから成る種々の組成物が製造される。ガラス

50

フラスコの中に回転蒸発器を利用して脂質薄膜が作られる。この薄膜が高真空中で溶剤残基から遊離される。この薄膜は溶液 1 ml あたり脂質 2 mg の濃度になるまで水または水性緩衝剤で水素化される。その後、冷却しながら超音波 (3 × 15 分) で処理される。この製剤がフィルタ (孔径 0.2 μm) に殺菌濾過される。

【0090】

例 5 :

脂質溶液

脂質がそれ自体としておよびコリピドを含有するまたは含有しない TFA 塩の形態でエタノールに溶解される。水と混合することにより異なる組成の溶液が得られる。

【0091】

10

例 6 :

細胞培養

細胞株 CV-1、ヘラ S3 および NIH3T3 が 10% 胎内凝乳血清 (FBS)、2 mM L-グルタミン (Glu)、0.1 mM 非必須アミノ酸 (NEAA)、100 U/ml ペニシリンおよび 100 μg/ml ストレプトマイシンを含有する 'ダルベッコ修飾イーグル培養液' (DMEM) で培養器 (5% CO<sub>2</sub>-雰囲気) の中で培養される。

【0092】

例 7 :

トランスフェクション

細胞が密度  $1 \sim 1.5 \times 10^5$  を有する 12-ウェル-微量滴定プレート上で滴出され、かつ夜通し約 60 ~ 80% の合流に培養される。細胞を 'ウェル' に転移させるために、1.5 μg の pCMV<スポーツ>-Gal が 50 μl 血清および抗生物質を含有しない DMEM に溶解される。エタノール溶液またはリポソーム製剤としての陽イオン脂質 (たとえば 3、6、9、12 μl) が同様に 50 μl 血清および抗生物質を含有しない DMEM に溶解される。この両方の溶液がポリスチレン容器の中で混合され、かつ脂質/DNA 複合体の形成を可能にするため、10 ~ 15 分間放置される。

20

【0093】

その間に細胞が一度 PBS (リン酸緩衝サリン) で洗浄される。それぞれ所望の条件 (血清を含有しないまたは血清を含有する環境でのトランスフェクション) に応じて、0.4 ml の抗生物質を含有しない DMEM が血清と一緒にまたはなしで細胞に供与される。DNA/脂質複合体が直接細胞に供与され、かつ孵化器で 6 時間培養される。このため培養液が 10% 血清の最終濃度を有するように、血清および抗生物質を含有する DMEM が 1 ml まで充填される。この細胞がさらに 20 時間培養される。その後、-ガラクトシダーゼ定量キットのメーカーのデータに従って -ガラクトシダーゼが試験される。開発された O-ニトロフェノールが光度計測により 405 nm で測定される。

30

【0094】

結果

下表および以下の棒グラフはヘラ S3 細胞の例を比較したトランスフェクション効率を示す。

トランスフェクション試薬 1 :

40

N-[2,5-ビス((3-アミノプロピル)アミノ)-1-オキソペンチル]-N',N'-ジオクタデシルエチレン-ジアミン (TFA 塩) がリポソーム製剤として 2.5 mol% ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンで水性滅菌溶液の中に使用された。

全脂質量 : 2 mg/ml。

【0095】

トランスフェクション試薬 2 :

N',N'-ビス-(3-アミノプロピル)N,N'-ジオクタデシルエチレン-ジアミン (TFA 塩) がリポソーム製剤として 5.0 mol% ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンで水性滅菌溶液の中に使用された。全脂質量 : 2 mg/ml。

【0096】

50

トランスフェクション試薬 3 :

リポフェクタミン<sup>TM</sup> (ジブコ-BRL : ライフテクノロジーインコーポレーテッド) が  
メーカーから得られた。

【 0 0 9 7 】

吸着値 4 0 5 n m の場合 :

【 表 1 】

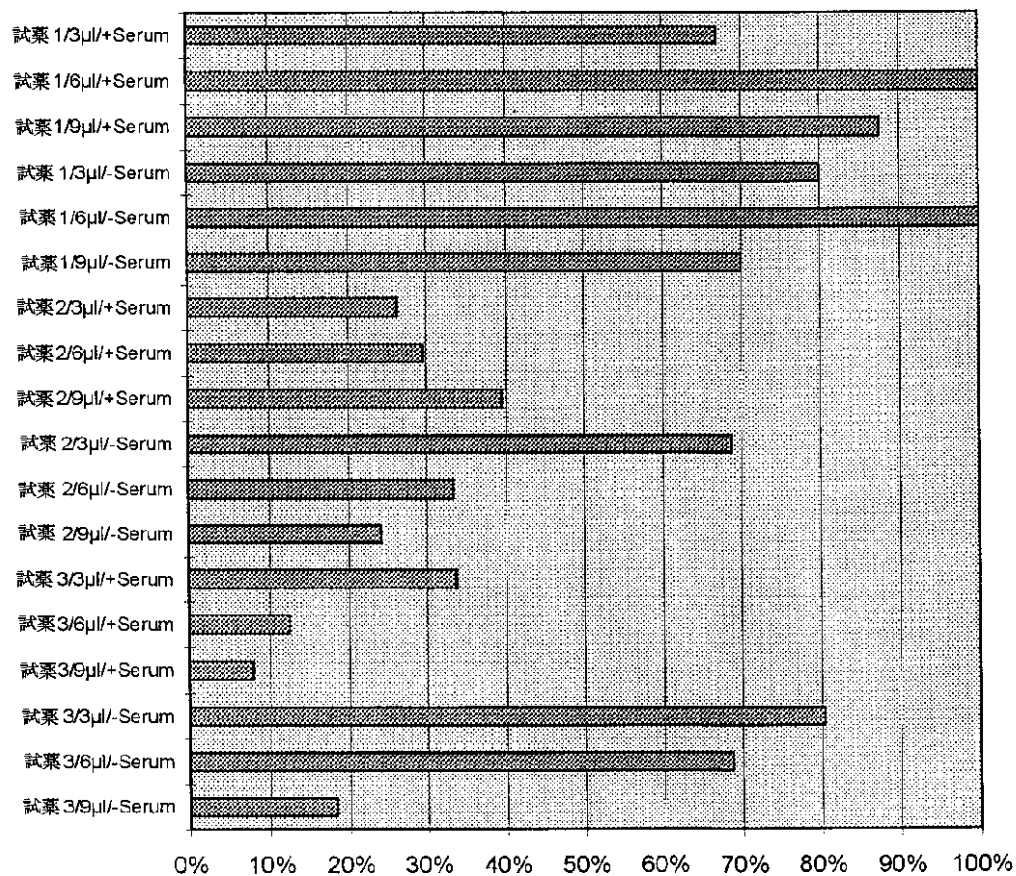
	トランスフェクション試薬 1		トランスフェクション試薬 2		トランスフェクション試薬 3	
	血清あり	血清なし	血清あり	血清なし	血清あり	血清なし
3 $\mu$ l	1.61	1.92	0.63	1.65	0.81	1.93
6 $\mu$ l	2.40	2.40	0.71	0.80	0.30	1.65
9 $\mu$ l	2.10	1.68	0.95	0.58	0.19	0.44

10

【 0 0 9 8 】

【 表 2 】

トランスフェクション効率の比較



20

30

40

---

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<b>C 0 7 C 237/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 C 237/10	
<b>C 1 2 N 15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A
A 6 1 K 9/127	(2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	

(72)発明者 ケーニツヒ, ステファン  
 ドイツ連邦共和国 D - 8 5 5 6 7 グラフィנק バイ ミュンヘン、ヴァルトヴェーク 1 6

審査官 小川 由美

(56)参考文献 米国特許第 0 5 6 5 0 0 9 6 ( U S , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07C 211/14  
 C07C 229/16  
 C07C 237/10  
 C12N 15/09  
 A61K 9/127  
 A61K 48/00  
 A61K 47/18  
 A61K 47/24  
 A61K 47/28  
 CAplus(STN)  
 REGISTRY(STN)