

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4271260号
(P4271260)

(45) 発行日 平成21年6月3日 (2009.6.3)

(24) 登録日 平成21年3月6日 (2009.3.6)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 J 41/00 (2006.01)

C O 7 J 41/00

A 6 1 K 47/28 (2006.01)

A 6 1 K 47/28

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

C O 7 C 271/60 (2006.01)

C O 7 C 271/60

請求項の数 20 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-530677

(86) (22) 出願日 平成9年2月28日 (1997.2.28)

(65) 公表番号 特表2000-506136 (P2000-506136A)

(43) 公表日 平成12年5月23日 (2000.5.23)

(86) 国際出願番号 PCT/FR1997/000364

(87) 国際公開番号 W01997/031935

(87) 国際公開日 平成9年9月4日 (1997.9.4)

審査請求日 平成15年12月4日 (2003.12.4)

(31) 優先権主張番号 96/02604

(32) 優先日 平成8年3月1日 (1996.3.1)

(33) 優先権主張国 フランス (FR)

(31) 優先権主張番号 96/09557

(32) 優先日 平成8年7月30日 (1996.7.30)

(33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者

サントル・ナシオナル・ドウ・ラ・ルシエ
ルシユ・シアンテイフイク
フランス国、エフー75016・パリ、リ
ユ・ミシエール・アンジュ、3

(74) 代理人

弁理士 川口 義雄

(74) 代理人

弁理士 伏見 直哉

(74) 代理人

弁理士 田中 夏夫

(72) 発明者

レン、ジャン・マリ
フランス国、エフー67000・ストラス
ブール、リュ・デ・ポントニエ、6

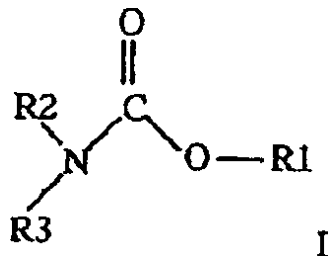
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミジニウムファミリーに属する化合物、該化合物を含有する医薬組成物及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

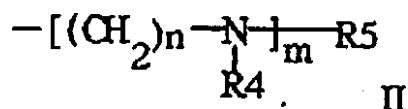
一般式 I :



{ 式中、

R 1 はコレステリル基を表し、

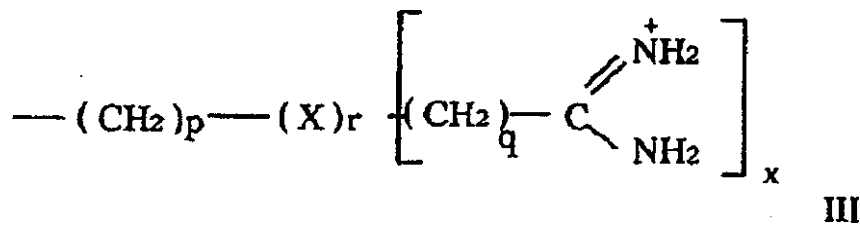
R 2 及び R 3 は相互に独立して水素原子又は一般式 II :



[式中、

n 及び m は相互に独立し且つ R 2 及び R 3 基間で異なる 0 ~ 4 の整数を表し、

R 4 及び R 5 は相互に独立して水素原子又は式 I I I :



(式中、

p 及び q は相互に独立して 0 ~ 4 の整数を表し、r は 0 又は 1 であり、r が 1 のとき、X は NH 基を表し且つ x は 1 であるか、又は X は窒素原子を表し且つ x は 2 であり、p、q 及び r は R 4 及び R 5 基間で独立して変化し得る)

10

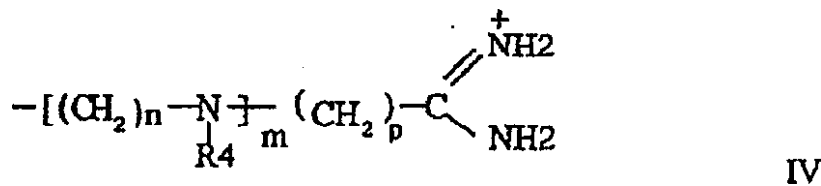
の基を表す]の基を表し、

R 2 及び R 3 のうちの少なくとも一方は水素原子以外のものであり、

R 4 及び R 5 のうちの少なくとも一方は水素原子以外のものである}の化合物またはその塩。

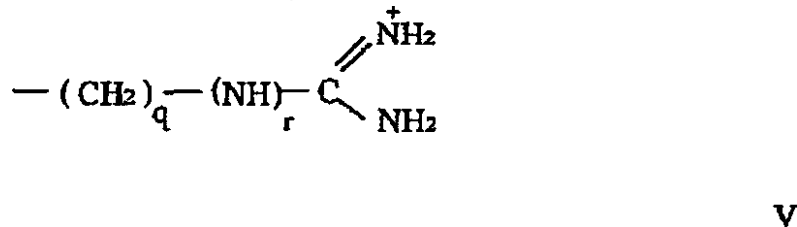
【請求項 2】

R 2 および R 3 が相互に独立して水素原子又は一般式 I V :



20

[式中、n、m 及び p は請求項 1 と同義であり、R 4 は水素原子又は式 V :



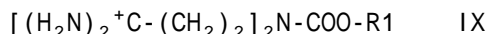
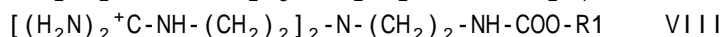
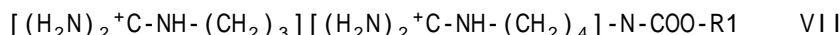
(式中、q 及び r は請求項 1 と同義である) の基を表し、

m、n、p、q 及び r は種々の R 2 及び R 3 基間で独立して変化し得る]の基を表すことを特徴とする請求項 1 に記載の化合物。

30

【請求項 3】

下記一般式 :



(式中、R 1 は請求項 1 と同義である) の 1 種により表される化合物であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

ビスグアニジノスぺルミジンコレステロール (B G S C) であることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の化合物。

40

【請求項 5】

ビスグアニジノトレンコレステロール (B G T C) であることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種の化合物を含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 7】

化合物がビスグアニジノスぺルミジンコレステロール (B G S C) であることを特徴とする請求項 6 に記載の医薬組成物。

50

【請求項 8】

化合物がビスグアニジノトレンコレステロール（BGTC）であることを特徴とする請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

更に核酸を含むことを特徴とする請求項 6 から 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

核酸がデオキシリボ核酸であることを特徴とする請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

核酸がリボ核酸であることを特徴とする請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 12】

核酸が治療遺伝子を含むことを特徴とする請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

請求項 1 に記載の化合物と、中性脂質と、核酸を含む医薬組成物。

【請求項 14】

化合物がビスグアニジノトレンコレステロール（BGTC）とビスグアニジノスベルミンコレステロール（BGSC）から選択されることを特徴とする請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

中性脂質がDOPEであることを特徴とする請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

核酸がデオキシリボ核酸であることを特徴とする請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

核酸がリボ核酸であることを特徴とする請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

核酸が治療遺伝子を含むことを特徴とする請求項 16 又は 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

注射用製剤に医薬的に許容可能なビヒクルを含むことを特徴とする請求項 6 から 18 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

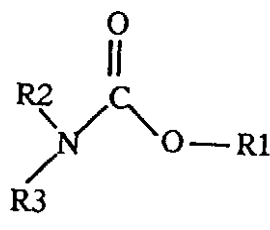
【請求項 20】

皮膚及び / 又は粘膜に施用するのに医薬的に許容可能なビヒクルを含むことを特徴とする請求項 6 から 18 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

本発明はアミジニウムファミリーに属する新規化合物、特にグアニジニウム、該化合物を含有する医薬組成物及びその使用に関する。

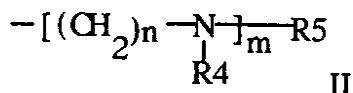
より詳細には、本発明は一般式 I :



{ 式中、

R1 はコレステロール誘導体又はアルキルアミノ基 - NR' R'' (式中、R' 及び R'' は相互に独立して飽和又は不飽和の直鎖又は分枝鎖 C₁₂ ~ C₂₂ 脂肪族基を表す) を表し、

R2 及び R3 は相互に独立して水素原子又は一般式 II :



[式中、

10

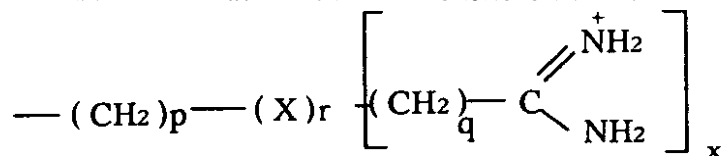
20

30

40

50

n 及び m は相互に独立し且つ R₂ 及び R₃ 基間で異なる 0 ~ 4 の整数を表し、
R₄ 及び R₅ は相互に独立して水素原子又は式 I I I :



III

(式中、

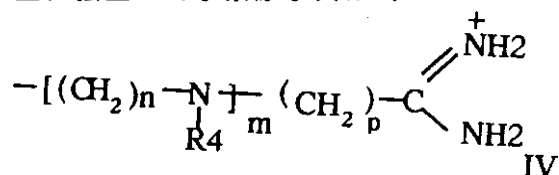
p 及び q は相互に独立して 0 ~ 4 の整数を表し、r は 0 又は 1 であり、r が 1 のとき、X は NH 基を表し且つ x は 1 であるか、又は X は窒素原子を表し且つ x は 2 であり、p、q 及び r は R₄ 及び R₅ 基間で独立して変化し得る)

の基を表す]の基を表し、

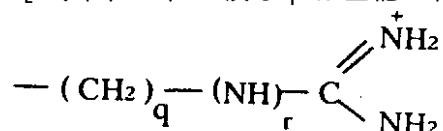
R₂ 及び R₃ のうちの少なくとも一方は水素原子以外のものである}

の化合物とその塩に関する。

好ましいサブファミリーとしては、特に本発明の範囲では一般式 I 中、R₂ 又は R₃ が相互に独立して水素原子又は式 I V :



[式中、n、m 及び p は上記と同義であり、R₄ は水素原子又は式 V :



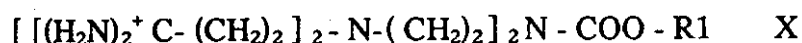
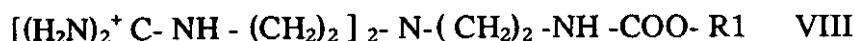
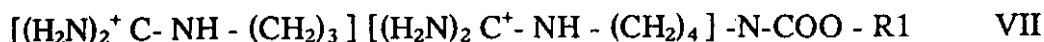
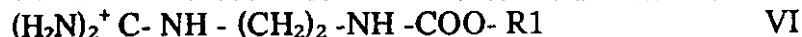
V

(式中、q 及び r は上記と同義である)の基を表し、

m、n、p、q 及び r は種々の R₂ 及び R₃ 基間で独立して変化し得る]の基を表す化合物が挙げられる。

これらの一般式 (I) の新規生成物は医薬的に許容可能な非毒性塩の形態をとることができる。これらの非毒性塩は無機酸 (塩酸、硫酸、臭化水素酸、リン酸、硝酸)、有機酸 (酢酸、プロピオン酸、コハク酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、安息香酸、フマル酸、メタンスルホン酸又は蔞酸)、無機塩基 (水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化カルシウム) 又は有機塩基 (トリエチルアミン等の第 3 級アミン、ピペリジン、ベンジルアミン) との塩を含む。

本発明による化合物の例としては、特に下記一般垂式:



(式中、R₁は上記と同義である)の化合物を特に挙げることができる。

本発明のグアニジニウム及びアミジニウムの例としては、上記垂式V I I、V I I I及びI X中、R₁がコレステリル基である化合物を特に挙げることができる。これらの3種の化合物を以下の文中では夫々B G S C(ビスグアニジノスペルミジンコレステロール)、B G T C(ビスグアニジノトレンコレステロール)及びB A D C(二塩酸ビスアミジニウムジエチレントリアミンコレステロール)と呼ぶ。

本発明の化合物は非毒性と両親媒性により治療上特に有用である。これらの品質により、前記化合物は核酸の細胞トランスフェクションを想定した核酸の複合体形成に特に使用することができる。従って、これらの化合物は遺伝子治療で有利に使用できる。

化合物V I I(B G S C)及びV I I I(B G T C)は*in vivo*遺伝子導入に特に有利である。これらの2種の化合物はDNAと複合体を形成し、治療しようとする細胞への輸送時にpH変動による分解からDNAを保護する。

従って、本発明は本発明による少なくとも1種の化合物を含有する医薬組成物に関する。本発明の好ましい実施態様において、化合物はビスグアニジノスペルミジンコレステロール(B G S C)であり、別の好ましい態様において化合物はビスグアニジノトレンコレステロール(B G T C)である。

遺伝子治療は発現不足及び/又は異常発現即ち1種以上の核酸の欠損又は過剰発現に関連する遺伝病を治療することを主たる目的とする。クローン化遺伝子の*in vivo*又は*in vitro*細胞発現によりこの種の遺伝子異常を補う試みがなされている。

今日、この種の遺伝情報の細胞内送達方法として数種の方法が提案されている。実際に利用されている技術の1つは明確に化学的又は生化学的ベクターを利用するものである。これらの合成ベクターはトランスフェクトしようとするDNAを圧縮する機能と、その細胞固定及び細胞膜通過、場合によっては2つの核膜の通過を助長する機能との2つの主機能をもつ。N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(D O T M A)等の正電荷をもつカチオン脂質も提案されている。これらのカチオン脂質は負電荷をもつDNAとリボソーム又は小ベジクルの形態で自発的に相互作用し、細胞膜と融合可能な脂質-DNA複合体を形成し、こうしてDNAの細胞内送達を可能にするという利点がある。しかし、特にD O T M Aの場合には、トランスフェクションレベルの良好な効率は生分解性の不足と細胞に対する毒性に結び付けられる。D O T M A以来、所謂「スパーサー」アームを介してアミノ基に結合した親油基というこの構造モデルで他のカチオン脂質も提案されている。これらのうちでは特に親油基として2種の脂肪酸又はコレステロール誘導体を含み、更に場合によりアミノ基として第4級アンモニウム基を含むものを挙げることができる。この分類のカチオン脂質の例としてはD O T A P、D O B T又はC h O T Bを特に挙げることができる。

本発明の化合物はその化学構造と生分解性に加え、核酸トランスフェクションベクターに必要な要件を明確に満たす。

従って、本発明は*in vitro*、*ex vivo*及び/又は*in vivo*細胞トランスフェクション、特に核酸のベクター輸送のための前記新規化合物の任意使用も目的とする。本発明は特に、少なくとも1種の本発明による化合物に加え、核酸を含む任意の医薬組成物に関する。

本発明の組成物において、少なくとも1種の本発明の化合物に結合した核酸はデオキシリボ核酸でリボ核酸でもよい。また、オリゴヌクレオチド配列でもポリヌクレオチド配列でもよく、天然起源でも人工起源でもよく、特にゲノムDNA、cDNA、mRNA、tRNA、rRNA、ハイブリッド配列又は合成もしくは半合成配列が挙げられる。これらの核酸はヒト、動物、植物、細菌、ウイルス等の起源であり得る。核酸は治療遺伝子を含むことが好ましい。

従って、本発明の別の目的は、更に核酸を含む医薬組成物を提供することである。好ましくはこの核酸はデオキシリボ核酸又はリボ核酸である。本発明の好ましい実施態様では、核酸は治療遺伝子を含む。

本発明の意味では、治療遺伝子とは特に治療効果をもつタンパク産物をコードする任意の

10

20

30

40

50

遺伝子を意味する。このようにコードされるタンパク産物はタンパク質、ペプチド等であり得る。このタンパク産物は標的細胞に対して同種であり得る（即ち標的細胞が疾病を示さないときに標的細胞で通常発現される産物）。この場合、タンパク質の発現は例えば、細胞における不十分な発現や、改変による不活性又は低活性のタンパク質の発現を緩和することができ、あるいは前記タンパク質を過剰発現させることができる。治療遺伝子は安定性を増加したり活性を改変するなどした細胞タンパク質の突然変異体をコードするものでもよい。タンパク産物は更に標的細胞に対して異種でもよい。この場合には、発現されるタンパク質は例えば細胞に欠損する活性を補ったり付加したりして細胞が疾病に対抗できるようにし、あるいは免疫応答を刺激することができる。

本発明の意味での治療産物としては、特に酵素、血液誘導体、ホルモン、リンホカイン（インターロイキン、インターフェロン、TNF等（FR9203120））、成長因子、神経伝達物質又はその前駆物質もしくは合成酵素、栄養因子（BDNF、CNTF、NGF、IGF、GMF、FGF、FGF、NT3、NT5、HARP/プレイオトロフィン等、ジストロフィン又はミニジストロフィン（FR9111947））、膀胱胞性線維症に関連するCFTRタンパク質、腫瘍抑制遺伝子（p53、Rb、Rap1A、DCC、k-rev等（FR9304745））、VII、VII、IX因子等の血液凝固に関与する因子をコードする遺伝子、DNAの修復に関与する遺伝子、自殺遺伝子（チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ）、ヘモグロビン又は他のタンパク質輸送体の遺伝子、アポリポタンパク質A-I、A-II、A-IV、B、C-I、C-II、C-III、D、E、F、G、H、J及びアポ（a）から選択されるアポリポタンパク質型の脂質の代謝に関与するタンパク質に対応する遺伝子、代謝酵素（例えばリポタンパク質リパーゼ、肝性リパーゼ、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ、7-コレステロールヒドロキシラーゼ、ホスファチジン酸ホスファターゼ）、脂質輸送タンパク質（例えばコレステロールエステルの輸送タンパク質及びリン脂質の輸送タンパク質）、HDL結合タンパク質、又はLDL受容体、キロミクロンレムナント受容体及びスカベンジャー受容体等から選択される受容体を挙げることができる。

治療核酸は、標的細胞で発現すると遺伝子の発現又は細胞mRNAの転写を制御することができる遺伝子又はアンチセンス配列でもよい。このような配列は例えば特許EP140308に記載されている技術に従い、標的細胞で細胞mRNAの相補的RNAに転写され、そのタンパク質翻訳を阻止することができる。治療遺伝子は標的RNAを選択的に破壊することが可能なりボザイムをコードする配列を含むものでもよい（EP321201）。

上述のように、核酸はヒト又は動物で免疫応答を発生することが可能な抗原ペプチドをコードする1個以上の遺伝子を含むものでもよい。従って、この実施態様によると本発明は特に微生物、ウイルス又は癌に対してヒト又は動物に施用されるワクチン又は免疫治療処置を提供することができる。特に、エプスタイン・バーウイルス、HIVウイルス、B型肝炎ウイルス（EP185573）、偽狂犬病ウイルス、シンシチウム形成ウイルス、他のウイルス又は腫瘍（EP259212）の特異的抗原ペプチドを挙げることができる。

好ましくは、核酸は更に所望細胞又は臓器で治療遺伝子及び/又は抗原ペプチドをコードする遺伝子の発現を可能にする配列も含む。このような配列としては、これらの配列が感染細胞で機能できるときに該当遺伝子の発現に天然に関与する配列を挙げることができる。（他のタンパク質又は合成タンパク質の発現に関与する）別の起源の配列でもよい。特に、真核細胞又はウイルス遺伝子のプロモーター配列が挙げられる。例えば、感染させたい細胞のゲノムに由来するプロモーター配列が挙げられる。また、ウイルスのゲノムに由来するプロモーター配列でもよい。この点では、例えばE1A、MLP、CMV、RSV等の遺伝子のプロモーターを挙げることができる。更に、活性化配列、調節配列等を付加してこれらの発現配列を修飾してもよい。また、プロモーターは誘導プロモーターでも抑制プロモーターでもよい。

更に、核酸は合成された治療産物を標的細胞の分泌経路に指向させるシグナル配列も特に

治療遺伝子の上流に含んでいてもよい。このシグナル配列は治療産物の天然シグナル配列でもよいし、他の任意の機能的シグナル配列又は人工シグナル配列でもよい。核酸は更に合成された治療産物を細胞の特定区画に指向させるシグナル配列も含んでいてもよい。

本発明に記載するカチオン脂質、特にBGT C及びBGS CはDNAと複合体を形成することができ、該当治療核酸の*in vitro*、*ex vivo*又は*in vivo*導入用ウイルスベクターに代わる有利な代用品である。グアニジニウム基の化学的性質、特にその高いpKaにより、これらのカチオン脂質はpH変動による分解からDNA分子を保護することができる。実施例に記載する結果によると、これらの化合物は高い効率で多数の細胞型のトランスフェクションを可能にする。トランスフェクション効率は形成される複合体中のカチオン脂質/DNA比に特に依存する。トランスフェクションに特に好ましい2種の化合物の比はDNA上のリン酸基1個につきグアニジニウム基6～8個に相当する。

カチオン脂質/DNA複合体のトランスフェクション効率は中性脂質の付加とカチオンリポソームの形成により更に改善することができる。これらのリポソームはカチオン脂質と中性脂質の複合体により形成される。中性脂質はジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、オレオイルパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(POPE)、ジステアロイル、-パルミトイル、-ミリストイルホスファチジルエタノールアミン、それらの1～3倍N-メチル化誘導体、ホスファチジルグリセロール、ジアシルグリセロール、グリコシルジアシルグリセロール、セレブロシド(例えば特にガラクトセレブロシド)、スフィンゴ脂質(例えば特にスフィンゴミエリン)及びアシアロガングリオシド(例えば特にアシアロGM1及びGM2)から選択することができる。

DOPEを使用するのが好ましい。

好ましくは、本発明の化合物と中性脂質は1～5、より好ましくは2～4の比で存在する。更に、DNAに対する合計脂質比(本発明の化合物と中性脂質の和)は、正電荷の純比が2～5となるように選択すると有利である。この比は約3にすると特に有利である。

従って、本発明は本発明による化合物と中性脂質と核酸を含む任意の医薬組成物にも関する。好ましくは、本発明による化合物はBGT CとBGS Cから選択される。同様に、中性脂質はDOPEが好ましい。核酸はデオキシリボ核酸でもリボ核酸でもよい。核酸は治療遺伝子を含むものが好ましい。

本発明のアミジニウム誘導体は前記適用以外に、核酸又はタンパク質間の相互作用レベルに介入して例えば遺伝子発現又は酵素活性(ポリメラーゼ、転写酵素等)の調節の所定のプロセスを阻害又は刺激したり、例えば膜プローブ/電極による抽出、除去又は検出のためにアニオン種を選択的に錯化したり、*in vitro*トランスフェクション操作を実施するための実験室試薬として使用する等の用途における利用も考えられる。

従って、本発明は上記のようなアミジニウム誘導体の直接又は医薬組成物の成分としての任意の治療的使用にも関する。

好ましくは、本発明の医薬組成物は、特に所望臓器のレベルの直接注射に用いる注射用製剤又は局所投与(皮膚及び/又は粘膜)に医薬的に許容可能なビヒクルを更に含む。ビヒクルとしては特に滅菌等張溶液、又は場合に応じて滅菌水もしくは生理的食塩水を加えることにより注射用溶質を構成することが可能な乾燥組成物、特に凍結乾燥組成物を挙げる

ことができる。

以下、実施例と図面により本発明を更に詳しく説明するが、以下の実施例及び図面は例示に過ぎず、本発明を制限するものではない。

図面

図1：BGS C及びBGT Cの製造操作プロトコルの模式図。

図2：BAD Cの製造操作プロトコルの模式図。

図3：脂質化合物/DNA比の関数としてのトランスフェクション効率の測定。

図4：合計脂質/DNA比の関数としてのトランスフェクション効率の測定。

図5：He p G 2 (5A)、He L a (5B)、NI H 3 T 3 (5C)及び293 (5D)細胞のトランスフェクション効率に及ぼす血清効果の測定。陰影付きの棒：血清の存在

10

20

30

40

50

；陰影なしの棒：血清の不在下で2時間トランスフェクション。

図6：B G T C / D O P E リポソームによる *in vivo* トランスフェクション後に呼吸器の上皮でレポーター遺伝子の発現を示すマウス気管の凍結切片の写真。(6A)及び(6B)：上皮表面(6A)及び粘膜下腺(6B)に局在したトランスフェクトした細胞における - ガラクトシダーゼの発現の検出；(6C)：抗 - ガラクトシダーゼモノクローナル抗体を使用して免疫ペルオキシダーゼ標識により検出した粘膜下腺で - ガラクトシダーゼを発現する細胞；(6D)：抗ルシフェラーゼポリクローナル抗体を使用して免疫ペルオキシダーゼ標識により検出した粘膜下腺でルシフェラーゼを発現する細胞；(6E)：免疫ペルオキシダーゼ着色：抗体の不在下で行われた負の調節。

図7：DNA / リポソーム B G T C 複合体の静脈内注射による *in vivo* 遺伝子導入効率の測定。

10

図8：DNA / リポソーム B G T C 複合体の腹腔内注射による *in vivo* 遺伝子導入効率の測定。

A - 本発明による誘導体の製造

材料と方法

1. 物理的測定

陽子核磁気共鳴スペクトル(^1H NMR)はスペクトロメーターBruker AC200で記録した。化学シフトはTMSを基準としてppmで表す。

2. シリカクロマトグラフィー

・薄層クロマトグラフィー(TLC)は厚さ0.2mmのMerck シリカゲルプレート上で実施した。

20

・カラムクロマトグラフィーは粒度0.040~0.063mmの60 Merck シリカゲル上で実施した。

実施例 1

グアニジノスペルミジンコレステロール B G S C の製造

1. ジ - B o c カルバメート (1) の製造

クロロギ酸コレステリル(0.9g, 2mmol)とEt₃N(0.214g, 2mmol)のCH₂Cl₂(40ml)溶液を1N, 8N - B o c 2 - スペルミジン(0.690g, 2mmol)のCH₂Cl₂(20ml)溶液に加える。5時間還流後、混合物を水洗(2×50ml)し、Na₂SO₄で乾燥し、溶媒を蒸発させる。95/5 CH₂Cl₂/MeOHを溶離剤として使用して粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製すると、純カルバメート(1.3g, 86%)が得られる。

30

^1H NMR (CDCl₃, 200MHz): 0.5 - 2.5 (m, コレステリル構造、シグナルBoc及びスぺルミジンからの中心CH₂基), 3.1 - 3.3 (m, 8H, N - CH₂), 4.50 (m, 1H, H₃), 5.37 (d, 1H, H₆)。

2. アミノカルバメート (2) の製造

化合物(1)(1.3g)をCH₂Cl₂ 20mlに溶かし、冷却(氷床)したこの溶液に、新たに蒸留したCF₃CO₂H 2mlを加え、Boc保護基を遊離させる。周囲温度で3時間攪拌後、1N NaOH 50mlを加え、混合物をCH₂Cl₂で抽出する。有機層を水洗し、Na₂SO₄で乾燥し、蒸発させると、粗アミノカルバメート(2)(0.945g, 98%)が得られる。

40

^1H NMR (CDCl₃, 200MHz): 0.5 - 2.5 (m, コレステリル構造及びスぺルミジンからの中心基), 2.7 (m, 4H, CH₂ - N - CO -), 3.25 (広幅m, 4H, N - CH₂), 4.49 (m, 1H, H₃), 5.35 (d, 1H, H₆)。

3. B G S C の合成

粗カルバメート(2)(0.94g)を85/15 THF/MeOH 30mlに溶かす。次いで1H - ピラゾールカルボキサミジン(0.495g, 3.4mmol)とジイソプロピルエチルアミン(0.436, 3.4mmol)を85/15 THF/MeOH 30mlに加える。周囲温度で18時間攪拌後、ジエチルエーテル250mlをゆっ

50

くりと加え、得られた沈殿をデカンテーションにより分離する。粗化合物をジエチルエーテルに3回懸濁し、デカンテーションにより分離すると、純GSC(0.570g, 47%)が得られる。

^1H NMR (DMSO-d_6 , 200 MHz): 0.5 - 2.5 (m, コレステリル構造及び中心 CH_2), 3.1 (m, 8H, N- CH_2), 4.3 (m, 1H, H_3), 5.3 (d, 1H, H_6), 7.2 (広幅s, 8H, NH_2 +), 7.8 (s, 2H, NH)。元素分析: $\text{C}_{37}\text{H}_{67}\text{N}_7\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$ の計算値: C 62.15; H 9.67; N 13.71。

元素分析結果: C 62.28; H 9.81; N 13.15。

実施例 2

グアニジノトレノコレステロールBGT Cの製造

1. アミノカルバメート(5)の製造

クロロギ酸コレステリル(1.8g, 4mmol)の CH_2Cl_2 (100ml)溶液をトリス(2-アミノエチル)アミン(TREN)(11.68g, 80mmol)の飽和 CH_2Cl_2 (400ml)溶液にゆっくりと加える。周囲温度で2時間攪拌後、水洗($3 \times 100\text{ml}$)により不活性アミンを遊離させ、 Na_2SO_4 で乾燥後、溶媒を蒸発させる。次のように(5)を三塩酸塩として単離する。粗生成物をMeOH 10mlに溶かし、HClの飽和メタノール溶液(5ml)を滴下し、得られた沈殿をデカンテーションにより分離し、純化合物を得るためにMeOHに3回懸濁し、デカンテーションにより分離する。減圧乾燥後、純三塩酸塩(6)が得られる(1.71g, 64%)。

^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, 200 MHz): 0.5 - 2.4 (m, コレステリル構造), 2.5 (m, 2H, CH_2NHCO), 2.8 (広幅s, 4H, +N H- CH_2), 3.06 (広幅s, 4H, CH_2NH_3 +), 3.20 (m, 2H, +NH- CH_2), 4.4 (m, 1H, H_3), 5.3 (d, 1H, H_6)。元素分析: $\text{C}_{34}\text{H}_{62}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot 3\text{HCl}$ の計算値: C 61.10; H 9.80; N 8.38。結果: C 61.25; H 9.96; N 8.22。

2. B. GTCの製造

クロロギ酸コレステリル(2.24g, 5mmol)の CH_2Cl_2 (100ml)溶液をトリス(2-アミノエチル)アミン(TREN)(29.2g, 200mmol)の高飽和 CH_2Cl_2 (250ml)溶液にゆっくりと加える。周囲温度で2時間攪拌後、水洗($3 \times 100\text{ml}$)により不活性アミンを遊離させ、 Na_2SO_4 で乾燥後、溶媒を蒸発させる。粗生成物(3.2g)を50/50 THF/MeOH(20ml)に溶かした後、 ^1H -ピラゾール-1-カルボキシイミジン(1.465g, 10mmol)とジイソプロピルアミン(1.3g, 10mmol)の混合物に加える。周囲温度で18時間攪拌後、ジエチルエーテルを加え、得られた沈殿をデカンテーションにより分離する。純サンプルを得るために粗化合物をジエチルエーテルに3回懸濁し、デカンテーションにより分離し、減圧乾燥後に生成物(2.15g, 60%)が得られる。

^1H NMR (DMSO-d_6 , 200 MHz): 0.5 - 2 (m, コレステリル構造), 2.2 (m, 2H, N- CH_2), 2.6 (広幅s, 4H, N- CH_2), 3.0 (d, 2H, N- CH_2), 3.2 (広幅s, 4H), 4.3 (m, 1H, H_3), 5.3 (d, 1H, H_6), 7.3 (広幅s, 8H, NH_2 +), 7.8 (広幅s, 2H, NH)。元素分析: $\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{N}_8\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$ の計算値: C 60.39; H 9.57; N 15.65。結果: C 60.38; H 9.67; N 15.56。

実施例 3

二塩酸ビスアミジニウムBACDの製造

1. ジニトリルの製造

クロロギ酸コレステリル(8.97g, 20mmol)の CH_2Cl_2 (100ml)溶液をイミノプロピオニトリル(2.46g, 20mmol)とEt₃N(2.02g, 20mmol)の CH_2Cl_2 (100ml)溶液に滴下する。周囲温度で6時間攪拌後、水洗($2 \times 100\text{ml}$)し、 Na_2SO_4 で乾燥する。溶媒を蒸発させ、粗生成物(10.5g

10

20

30

40

50

をメタノールから再結晶させる (8 . 5 9 g , 8 0 %) 。

^1H NMR (CDCl_3 , 2 0 0 M H z) : 0 . 5 - 2 . 5 (m , コレステリル構造) , 2 . 7 (m , 4 H , - CH_2CN) , 3 . 6 2 (m , 4 H , $\text{CH}_2 - \text{N} -$) , 4 . 5 0 (m , 1 H , H_3) , 5 . 3 9 (d , 1 H , H_6) 。

2 . ジチオアミドの製造

上記のように調製したジニトリル (0 . 3 2 4 g , 6 m m o l) とジエチルアミン (0 . 8 8 4 g , 1 2 m m o l) の DMF (3 0 m l) 溶液を 5 0 に維持し、これに弱い H_2S 流を 2 時間バブリングする。青色溶液を氷上に注下し、こうして得られた沈殿を濾別する。この粗生成物を CH_2Cl_2 に溶かし、水洗する ($2 \times 5 0 \text{ m l}$) 。 Na_2SO_4 で乾燥後に、溶媒を蒸発させ、得られた生成物をメタノールから 2 回再結晶させる (1 . 8 6 g , 5 1 . 5 %) 。

^1H NMR (DMSO-d_6 , 2 0 0 M H z) : 0 . 5 - 2 . 5 (m , コレステリル構造) , 2 . 6 7 (t , 4 H , $\text{N} - \text{CH}_2$) , 3 . 5 0 (t , 4 H , $\text{S} = \text{C} - \text{CH}_2$) , 4 . 3 (m , 1 H , H_3) , 5 . 3 3 (d , 1 H , H_6) 。

3 . ニヨウ化ジチオアミデートの製造

ジチオアミド (0 . 6 0 3 g , 1 m m o l) のアセトン (2 0 m l) 溶液にヨウ化メチル (2 m l) を加え、周囲温度で 4 8 時間放置する。得られた沈殿を濾過する (0 . 7 4 1 g , 8 3 . 5 %) 。この生成物をそれ以上精製せずに直接使用する。

4 . 二塩酸ビスアミジニウム B A D C の製造

上記のように得られたニヨウ化物 (0 . 7 4 1 g , 0 . 8 3 m m o l) のイソプロパノール (1 0 m l) 懸濁液を還流しながら NH_3 流を 2 時間バブリングした後、更に 4 時間加熱還流を続ける。イソプロパノールを蒸発させ、残渣をメタノール (1 0 m l) にとる。この溶液を塩基性イオン交換樹脂に通した後、溶離剤に塩酸流を通し、蒸発乾涸させる。こうして得られた二塩酸塩を最少量のエタノール (約 5 m l) に溶かす。僅かな不溶分を濾過し、濾液に著しく過剰のジエチルエーテルを加える。得られた粉末を濾過し、乾燥する (3 2 0 m g , 6 0 %) 。イソプロパノールから再結晶させると、分析的に純粋な形態の所期生成物を単離することができる。

^1H NMR (DMSO-d_6 , 2 0 0 M H z) : 0 . 5 - 2 . 6 (m , コレステリル構造及び - $\text{CH}_2 -$ アミジニウム) , 3 . 5 7 (広幅 s , 4 H , $\text{N} - \text{CH}_2$) , 4 . 3 (m , 1 H , H_3) , 5 . 3 (d , 1 H , H_6) , 8 . 6 4 (広幅 s , 2 H , NH_2) , 9 . 0 7 (広幅 s , 1 H , NH) , 9 . 1 8 (広幅 s , 2 H) 。元素分析 : $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot 2 \text{HCl}$ の計算値 : C 6 5 . 2 5 ; H 9 . 3 2 ; N 8 . 9 4 。結果 : C 6 5 . 4 0 ; H 9 . 8 7 ; N 9 . 5 5 。

B : i n v i t r o 及び i n v i v o 遺伝子導入のための本発明による誘導体の使用材料と方法

1 - 以下のトランスフェクション実験は実施例 1 及び 2 に記載したプロトコールに従って製造した B G S C 及び B G T C を用いて実施する。

2 - リボソームの調製

クロロホルム (CHCl_3) 中のカチオン脂質と D O P E (モル比 3 / 2) の混合物を減圧蒸発させ、 N_2 雰囲気下に pH 7 . 4 の 2 0 m M H E P E S 緩衝液に再懸濁する。最終脂質濃度は 1 . 2 m g / m l である。

混合物を 5 分間渦形成した後、超音波発生器 (B r a n s o n U l t r a s o n i c 2 2 1 0) を使用して 5 分間「超音波処理」し、最終的に + 4 で 2 4 時間保存して水和する。

得られた分散液を再び 5 ~ 1 0 分間「超音波処理」 (S o n i f i e r B r a n s o n 4 5 0) し、リボソームを形成する。

遠心分離後、溶液を細孔直径 0 . 2 2 μ のフィルター (M i l l e x G S , M i l l e p o r e) で濾過し、+ 4 で保存する。

レーザー回折装置 (A u t o s i z e r 4 7 0 0 , M a l v e r n I n s t r u m e n t s) により B G S C 又は B G T C を含むリボソームの寸法を調べた。この試験は、多

10

20

30

40

50

モード数値分析で平均直径 50 nm に対応する単一ピークを示す。

3 - 細胞培養

トランスフェクション実験に使用した細胞系の大部分の起源（種及び組織）は表 I に示す。

HeLa 細胞系の細胞（P Briand, ICGM, パリ）は頸上皮由来ヒト癌に由来する。

NIH3T3 細胞（C Lagrou, Institut Pasteur, リール）はマウス繊維芽細胞である。

NB2A 細胞系（C. Gouget, パリ）はマウス神経芽腫に由来する。

AtT-20 及び PC12 細胞以外の全細胞は、10% ウシ胎児血清（FCS; GIBCO）
100 単位/ml ペニシリン（GIBCO）及び 100 µg/ml ストレプトマイシン（GIBCO）を補充した変形ダルベッコ培地（DMEM, GIBCO）中で培養した。

AtT-20 細胞は 10% ウシ胎児血清を補充した DMEM/F12（GIBCO）中で培養した。

PC12 細胞は 10% FCS と 5% ウマ血清を補充した DMEM 中で培養した。

全細胞は 5% CO₂ の湿潤大気下でプラスチックびん（Falcon）に培養保存した。

4 - プラスミド

プラスミド pRSV-Luc（O. Bensaude, ENS, パリ）及び pRSV-nls LacZ は標準技術により大腸菌で増幅し、CsCl 勾配上で精製した。プラスミド
pRSV-nls LacZ 及びプラスミド pRSV-Luc において大腸菌の LacZ 遺伝子とその核局在シグナル配列及びルシフェラーゼ遺伝子は夫々 LTR/RSV（ラウス肉腫ウイルス）の転写調節下にある。プラスミド pXL2774 はサイトメガロウイルス（CMV）のプロモーターの制御下にルシフェラーゼをコードする遺伝子を含む。

5 - in vitro トランスフェクションプロトコール

トランスフェクションの前日に各ウェル 2 × 10⁵ 個の細胞を接種する（Falcon 6 穴プレート）。

各ウェルに異なる細胞系を接種する。

従って、トランスフェクション当日に細胞は半集密になる。

FCS を含まない DMEM 250 µl でプラスミド DNA（5 µg）と所望量のビスグアニジニウム脂質を各々希釈し、渦形成した。約 5 分後に 2 種の溶液を周囲温度で 15 分間インキュベートした。次に、無血清培地で洗浄した細胞にトランスフェクション混合物を加える（0.5 ml/ウェル）。37 °C で 4 ~ 6 時間インキュベーション後、トランスフェクション混合物を取り出さずに血清を含む培地 1 ml を各ウェルに加える。トランスフェクションから 24 時間後に培地を新鮮な培地 1 ml に交換する。トランスフェクションから 2 日後に細胞を回収し、ルシフェラーゼの発現を測定する。

対照トランスフェクションは次の市販トランスフェクション剤を使用して実施した。

- リポポリアミン Transfectam（登録商標）（JP Behr, ストラスブール, フランス）は 6 ~ 8 の Transfectam（登録商標）/DNA イオン電荷最適比でアルコール溶液として使用した。

- Lipofectin（登録商標）（Life Technologies Inc., Cergy Pontoise, フランス）は、中性脂質 DOPE と、カチオン脂質 DOTMA（N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド）を含むリポソーム製剤である。

DNA/リポソーム複合体は製造業者に推奨されている標準条件で得た。

- リン酸カルシウム沈殿により細胞にトランスフェクトした。（Keown, W.A., Campbell, C.R., Kucherlapati, R.S. (1990) Methods in Enzymology; Academic Press: New York, 185, 527-537）。

6 - in vitro で実施したトランスフェクションのルシフェラーゼ測定

ルシフェラーゼ活性はトランスフェクションから48時間後にDe Wetら(De Wet, J. R., Wood, K. V., De Luca, M., Helinski, D. R. & Subramani, S. (1987) Mol. Cell. Biol. 7, 725-737)の方法の変法を使用して測定する。

- 培地を除去する。

- 冷リン酸緩衝塩類溶液で細胞を洗浄する。

- 次に、溶解用緩衝液(25 mM 三リン酸塩 pH 7、8 mM MgCl₂、1 mM ジチオトレイトール、15%グリセロール及び1% Triton X-100) 250 µl 中でインキュベートして細胞を溶解させる。

- マイクロ遠心機で遠心分離(15分、+4℃)により不溶分を除去後に透明溶解液を得る。

- 25 mM ATP (Sigma) 9 µl と 25 mM ルシフェリン (Sigma) 20 µl を加えた溶解用緩衝液 100 µl で細胞抽出物のアリコート(20 µl)を希釈する。

- サンプルをルミノメーター(Lurmet LB9501 Berthold, Nashua, NH)に入れ、発光を10秒間測定する。

精製ホタルルシフェラーゼ(Sigma)の種々の希釈液を使用することによりRLU/ルシフェラーゼ曲線を校正した処、曲線の直線部分は10⁴~10⁷RLU(相対光単位)に相当することが判明した。

タンパク濃度は対照としてウシ血清アルブミンを使用してBCA(ビシンコニン酸)試験により測定した。

ルシフェラーゼ活性のデータはRLU/mgタンパク質で表す。

7 - マウス気道レベルの *in vivo* 注入プロトコール

使用したマウスはIffa-Credo(リヨン、フランス)から入手したOF1雄マウス(体重30g)である。カチオンリポソームBGT C/DOPE(モル比3:2)を使用する。トランスフェクション混合物はプラスミドDNA 10 µg(水10 µl中)、20 mM HEPES 溶媒(pH 7.4)中カチオンリポソーム20 µl(合計脂質濃度5 mg/ml)から得る。こうして形成されたDNA/脂質凝集物は約6の電荷比をもつ。マウスをペントバルビタールで麻酔後、気管内腔に挿入したカニュレを介して気管内点滴注入によりトランスフェクション混合物(30 µl)を気道に注入する。点滴注入から48時間後にペントバルビタールの過剰投与により動物を殺し、肺と気管を取り出して分析する。

8 - X-gal 着色

一次培養物における大腸菌 - ガラクトシダーゼの発現を定量するために、細胞に4%パラホルムアルデヒド溶液を15分間含浸させた後、色原体 - ガラクトシダーゼ基質のX-gal (Sigma)と共にインキュベートする。トランスフェクトした細胞の核の青色着色をルミネセンスにより顕微鏡で定量する。

9 - *in vivo* トランスフェクトした気道のレベルの X-gal 細胞の定量

気道のレベルのX-gal細胞の検出のために、肺と気管を4%パラホルムアルデヒドで1時間処理した後、30%スクロースを含有するPBSに一晩浸漬し、次いで冷凍用媒体に入れ、液体窒素で冷凍する。次に5 µmのクリオスタット切片をX-gal試薬(Sigma)と共に一晩インキュベートして着色し、- ガラクトシダーゼ活性を試験する。

10 - *in vivo* トランスフェクトした気道のレベルのルシフェラーゼの定量

in vivo トランスフェクション後のルシフェラーゼ活性を定量するために、組織フラグメントを溶解用緩衝液(25 mM Tris-リン酸 pH 7.8、1 mM ジチオトレイトール(DTT)、15%グリセロール及び1% Triton X-100) 30 µlの存在下におき、ホモジナイザー(Poly labo、ストラスブール、フランス)で約1分間溶解し、氷上で保存する。遠心分離後、溶解液20 µlを定量に使用する。ルシフェラーゼ活性はRLU/mgタンパク質として表す。

11 - 免疫組織化学分析プロトコール

肺と気管のサンプルの冷凍切片を5 µg/mlの抗大腸菌 - ガラクトシダーゼマウスモ

10

20

30

40

50

ノクローナル抗体 (Genzyme, Cambridge, MA) 又は 1 : 400 希釈ウサギポリクローナル抗体 (Promega) と共に 1 時間インキュベートする。

大腸菌 - ガラクトシダーゼタンパク質はビオチンで標識したマウス抗 Ig 二次抗体 (Boehringer) とストレプトアビジン - POD 結合体 (Boehringer) を使用して免疫ペルオキシダーゼ着色により定量する。ルシフェラーゼタンパク質は抗ウサギヤギ抗体 (ICN Biomedicals, Inc) とウサギペルオキシダーゼ - 抗ペルオキシダーゼ系 (PAP) (Dako Glostrup, デンマーク) を使用して免疫ペルオキシダーゼ着色により定量する。切片をルミネセンスにより顕微鏡で試験する。抗体なしで負の調節を行う。

実施例 4

種々のトランスフェクション剤 / DNA 比での *in vitro* トランスフェクション

BGTC / DNA 凝集物を用いて得られるトランスフェクション効率を最適化するために、本願出願人は慣用トランスフェクション法に比較的感受性であることが知られている 3 種の異なる哺乳動物細胞で BGTC / DNA 比がトランスフェクション率に及ぼす影響を試験した。結果を図 3 に示す。

即ち、マウス繊維芽細胞 3T3、ヒト上皮細胞 HeLa 及びマウス神経芽腫 NB2A を用いてトランスフェクション実験を実施した。これらの実験中に一定量のプラスミド pRSV - Luc を溶液中の可変量の BGTC と接触させた。被験比範囲の決定にあたり、本願出願人は DNA 1 μ g が負電荷をもつリン酸 3 nm に等しく、2 個のグアニジニウム基のみが凝集物形成及びトランスフェクションの中性 pH で正電荷をもつという前提に立った。トランスフェクションから 48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定する。ルシフェラーゼの発現は DNA のリン酸基 1 個につき 6 (HeLa 細胞) ~ 8 個 (3T3、NB2A 細胞) のグアニジニウム基を含む凝集物即ち大きい正電荷をもつ凝集物で最大である。

実施例 5

種々の細胞型による *in vitro* トランスフェクション

カチオン脂質による遺伝子導入は、仲介を必要としないだけでなく、異なる組織及び生物の非常に多種多様の細胞にトランスフェクトできるという点で魅力的なトランスフェクション技術である。トランスフェクション剤としての BGTC の効力の範囲を調べるために、異なる起源の数種の細胞系を試験した。結果を下表 1 に示す。最大効率にするために電荷比は 6 ~ 8 に選択した。比較のために、リポポリアミンとリン酸カルシウムを使用して同一系の細胞に同様にトランスフェクトした。その結果、BGTC は一般に Transfectam よりも有効であり、リン酸カルシウムよりも 2 倍有効である。

10

20

30

表 1 : B G T C、リン酸カルシウム又は Transfectam (登録商標) によりトランスフェクトした種々の哺乳動物細胞系におけるルシフェラーゼ活性

種	細胞系	組 織	細胞タンパク質mgあたりのRLU		
			BGTC	リン酸カルシウム	Transfectam
ヒト	A 549	肺 癌	4×10^5	7×10^3	3.1×10^5
サル	COS-7	SV40 で形質転換した肝臓	2.1×10^7	3.7×10^5	8.4×10^6
イヌ	MDCK-1	腎 臓	3×10^6	4.5×10^5	2.2×10^6
ラット	RIN-m5F	膵 島 腫 瘍 細 胞	2×10^7	2×10^5	3.3×10^5
	ROS	骨 肉 腫	4.0×10^6	4.5×10^5	2.3×10^6
	PC12	褐色細胞腫	3×10^7	1.7×10^5	6×10^6
マウス	AtT-20	下垂体腫瘍	2×10^7	8×10^5	3×10^7

全トランスフェクションは少なくとも2回 ($n \geq 2$) 行った。

実施例 6

中性脂質の存在下の *in vitro* トランスフェクション

化合物 BGSC は BGTC よりも水性媒体に溶けにくいので、BGSC は中性脂質 DOP E (ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン) の存在下にリボソームの形態で使用した。配合物はモル比 3 / 2 で調製する。BGTC を含む第 2 の調製物も同一条件で D O P E の存在下に調製した。

6 . 1 - 合計脂質 / DNA 比の決定

本願出願人はまず最初に HeLa 細胞でのトランスフェクション実験中に脂質 / DNA 比を決定した。得られた曲線を図 4 に示す。リボソーム BGSC / DNA 比が 2 . 5 ~ 3 を中心に 1 . 5 ~ 5 であるときに最適トランスフェクションが得られる。グアニジニウム基は中性 pH で陽子化されるので、最良の凝集物 BGSC - D O P E / DNA は約 3 の正電荷をもつ (図 4)。

従って、最良の BGSC - D O P E / DNA 比は BGTC / DNA 型の凝集物で得られる比 (6 ~ 8) よりも小さい。カチオン脂質の存在下のトランスフェクションは D O P E の存在とその紡錘生成性質により助長される。

6 . 2 - カチオン脂質による種々の細胞系のトランスフェクション

本願出願人はモル比 3 / 2 のカチオン脂質配合物 BGSC - D O P E 及び BGTC - D O P E を使用することにより種々の細胞系でトランスフェクション実験を行った。これらの 2 種の遺伝子導入系で脂質のグアニジニウム / DNA のリン酸電荷比は約 2 . 5 (~ 3) である。Lipofectin (登録商標) によるトランスフェクションを対照として用いる。結果を下表 2 に示す。

これらの結果から明らかなように、カチオン脂質の形態のグアニジニウム基をもつコレステロールの誘導体は Lipofectin と少なくとも同等にトランスフェクションに有効である。これらの結果は当然、各細胞系毎に最適化することができる。

表 2 : リボソーム BGSC / DOPE、リボソーム BGTC / DOPE 及び
Lipofectin(登録商標)によりトランスフェクトした種々
の真核細胞系におけるルシフェラーゼの発現

細胞系	細胞タンパク質 mg あたりの R L U		
	B G S C リボソーム	B G T C リボソーム	Lipofectin [®]
HeLa	4.6×10^6	7.7×10^6	3.3×10^6
A549	6×10^5	2×10^5	4×10^6
COS-7	N D	1.4×10^7	9.5×10^6
MDCK-1	1×10^6	7×10^4	1.9×10^6
ROS	N D	9×10^4	6×10^6
NB2A ^a	1.5×10^7	1.4×10^7	N D
NIH 3T3 ^a	7×10^6	1.5×10^6	N D

全トランスフェクションは少なくとも 3 回行った ($n \geq 3$)。

a : $100 \mu\text{g} / 500 \mu\text{g}$ 合計溶解液でのルシフェラーゼ活

性の平均測定値 (R L U) ($n \geq 4$)。

実施例 7

in vitro 遺伝子導入効率に及ぼす血清タンパク質の存在の効果の検討

カチオン脂質をベースとするトランスフェクション組成物の大部分は血清の存在下で効率が低下する。本実施例は、血清効果に対する本発明の化合物の感受性を試験することを目的とする。

7.1 - カチオン脂質配合物

本発明に記載する脂質をエタノールに可溶化させる。

i) DOPE の存在下で次のように「リボソーム」溶液を得る。クロロホルムに溶かした DOPE (AVANTI) を脂質のエタノール溶液に 3 / 2 のカチオン脂質 / DOPE モル比で加える。蒸発乾涸後、混合物を水にとり、50 に 30 分間加熱する。

ii) DOPE 溶液の代わりにクロロホルムを使用する以外は「リボソーム」獲得について記載したプロトコールに従って「ミセル」溶液を得る。

溶液はいずれも 10 mM のカチオン脂質濃度に調整する。

7.2 - 核酸

使用した核酸はプラスミド pX L 2 7 7 4 である。

7.3 - サイトフェクタント混合物 (即時調合調製物)

DNA を 150 mM NaCl で $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ に希釈し、種々のカチオン脂質配合物を水で 40、80、120 及び $160 \mu\text{M}$ に希釈する。DNA 溶液と脂質溶液を徐々に混合し、夫々濃度 2、4、6 及び $8 \text{ nmol} / \mu\text{g DNA}$ とし、塩濃度は 75 mM とする。

7.4 - トランスフェクション

細胞を適当な条件で24穴マイクロプレート(2cm²/ウェル)で培養し、集密の50~70%で指数増殖期にトランスフェクトする。血清タンパク質を含まない溶媒500μlで細胞を2回洗浄し、無血清培地(血清の不在下のトランスフェクション)又は完全培地(血清の存在下のトランスフェクション)で再増殖させ、サイトフェクタント混合物50μl(0.5μgDNA/ウェル)を細胞に加える(3ウェル/脂質-DNA条件)。「血清の不在下」で細胞にトランスフェクトする場合には、トランスフェクションから2時間後に適量の血清を増殖培地に補充する。

Promegaキット(Luciferase Assay System)の使用に関する指示に従ってルシフェラーゼの発現を測定することによりトランスフェクション効率を評価する。細胞溶解液中のタンパク質濃度の測定によりサイトフェクタント混合物の毒性を推定する。

10

7.5 - 結果(図5)

4種の細胞型(NIH3T3、293、HepG2、HeLa)で得られた結果によると、試験条件では「リポソーム」形態の配合物のほうが「ミセル」形態の配合物よりも有効である。更に、カチオン脂質を含むサイトフェクタント調製物の大部分で観察される結果に反して、「リポソーム」又は「ミセル」形態のBGT Cで血清の存在に結びつけられる有意な阻害効果は試験トランスフェクション条件では検出されなかった。

実施例 8

リポソームBGT C / D O P Eによるマウス気道における導入遺伝子のin vivo発現

20

このために、カチオンリポソームBGT C / D O P Eを使用した。凝集物DNA / リポソームの獲得と投与プロトコールについては、材料と方法の項に記載した通りに実施する。リポソームBGT C / D O P EによりプラスミドLacZを細胞にトランスフェクションしてから48時間後に処理したマウスの気道の上皮でX-gal細胞を検出する。結果を図6に示す。

トランスフェクトした細胞の大部分は気管に局在しており、数個のX-gal細胞のみが第二分岐気道に観察される。この型の分布は他の細胞トランスフェクションで既に報告されている。

本願出願人は更にレポーター遺伝子の産物を同定するために免疫組織化学分析を行った。上皮表面のレベルにトランスフェクトされた細胞は大半が成熟細胞である(図6A)。これらのデータから明らかなように、カチオンリポソームは非増殖性で完全に分化し終えた気道上皮細胞に遺伝子のトランスフェクションを誘導することができる。導入遺伝子の発現は粘膜下腺でも検出される(図6B)。大腸菌の - ガラクトシダーゼに対するモノクローナル抗体を使用し、トランスフェクトした細胞を免疫標識により検出すると、粘膜下腺と表面上皮でこの発現が確認される(図6C)。BGT C / D O P EによるpRSV-Lucのトランスフェクション後にルシフェラーゼタンパク質に対する抗体を使用して免疫ペルオキシダーゼ着色により試験した場合にも、粘膜下腺に導入遺伝子発現が検出される(図6D)。

30

陰性対照群は、抗体不在下で実施した(図6E)。

以上の結果は肺嚢胞性線維症に対する遺伝子治療に特に有用である。実際に、この疾病の治療には、ヒト気管支におけるCFTRの発現の主要部位である粘膜下腺を標的にすることが必要である。

40

実施例 9

BGT C / D O P Eのin vivoトランスフェクション効率の定量

このために、実施例8に記載した条件でリポソームBGT C / D O P EとプラスミドpRSV-Lucで処理したマウスの肺と気管をトランスフェクションから48時間後に取り出し、材料と方法の項に記載したプロトコールに従ってルシフェラーゼ活性を定量する。結果を表3に示す。

表 3

ベクター	ルシフェラーゼ活性 (RLU/mg 蛋白質)
<u>BGTC / DOPE リボソーム</u>	
p R S V - L u c	2.8×10^5 (平均: $3 \times 10^4 - 8 \times 10^5$)
p R S V - L a c Z	0
<u>裸の D N A</u>	
p R S V - L u c	0

10

ルシフェラーゼ活性は気管のホモジネートでは一貫して検出されるが、肺のホモジネートではそうではない。この結果は X - g a l に陽性の細胞の分布試験時に得られた上述の結果に一致する。プラスミド L a c Z を含む対照では活性を全く検出することができなかった。ルシフェラーゼの発現は発現プラスミドに直接結びつけられると考えられる。対照としてベクターを用いずにプラスミドのトランスフェクションも実施した。この対照試験ではルシフェラーゼの発現は全く観察されない。

以上の結果は、気道の *in vivo* 遺伝子トランスフェクションにリボソーム B G T C / D O P E が有効であることを立証するものである。

実施例 10

静脈内又は腹腔内注射による *in vivo* 遺伝子導入

20

カチオン脂質と DNA の配合物は実施例 7 に記載した通りである。

10.1 - カチオン脂質の用量効果 (図 7 ~ 8)

37.5 mM NaCl、5% グルコースに溶かしたトランスフェクト混合物 200 μ l を 5 週齢 B a l b C マウスに静脈内 (尾静脈) 又は腹腔内経路で注射し、トランスフェクションから 24 時間後に静脈内注射の場合は肺、腹腔内注射の場合は肝臓と脾臓でルシフェラーゼの発現を調べる。プロテアーゼ阻害剤 (Boehringer 1697498) を加えた溶解用緩衝液 (Promega E153A) に臓器を冷却下に取り出し、粉碎機 Heido l p h D I A X 600 で均質化する。組織抽出物の 14000 g 上清でルシフェラーゼ活性を調べる。

静脈内注射

30

DNA 50 μ g と「リボソーム」形態の種々の濃度の B G T C の複合体を各マウスに投与する。検出されたカチオン脂質 nmol / μ g DNA の最適比は 9 であり (図 7)、900 nmol までの B G T C を注射しても毒性は全く検出されなかった。

腹腔内注射

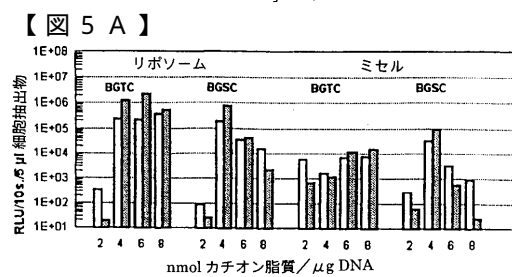
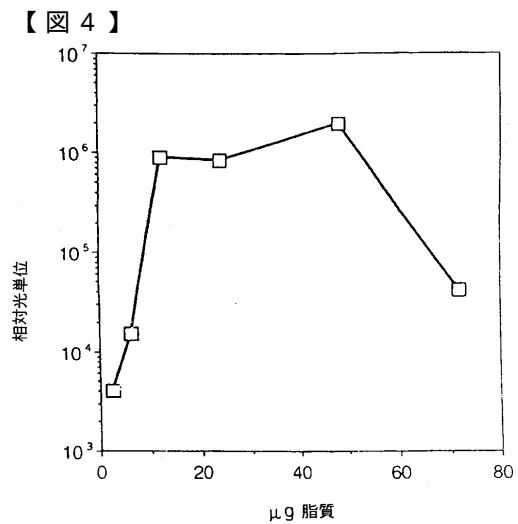
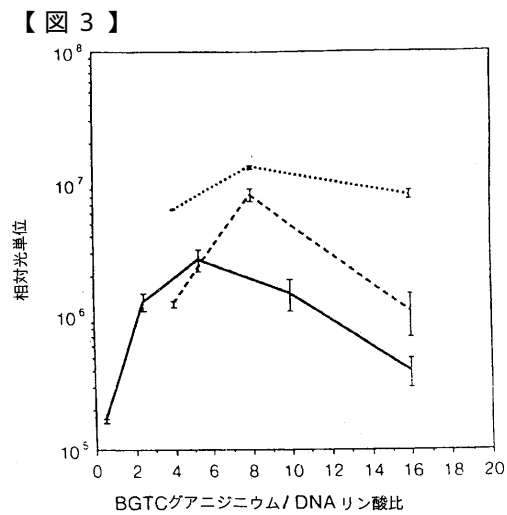
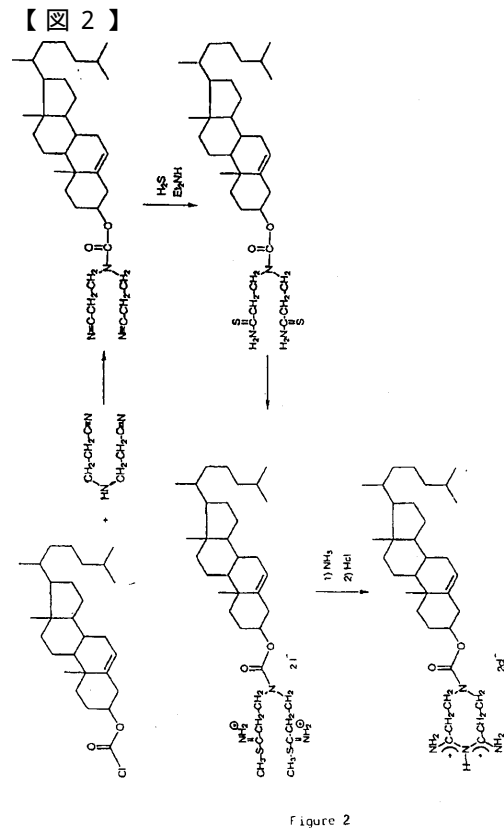
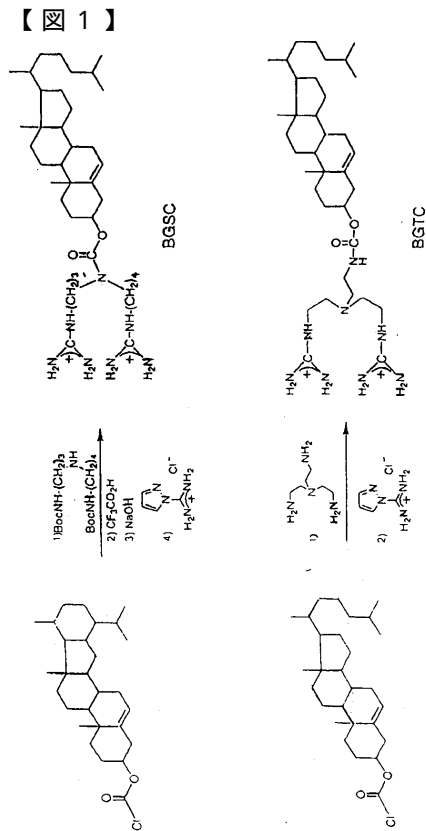
各マウスに「リボソーム」形態の B G T C を DNA 100 μ g と共に注射した。肝臓 (図 8 B) と脾臓 (図 8 A) のいずれでも最大発現は 1.5 nmol B G T C / μ g DNA で得られる。

10.2 - 静脈内注射後の発現動態

37.5 mM NaCl、5% グルコース中の「リボソーム」B G T C / DNA 混合物 200 μ l (DNA 50 μ g 及び 9 nmol B G T C / μ g DNA) を 5 週齢 B a l b C マウスの尾静脈に注射後の時間の関数として 7 種の臓器におけるルシフェラーゼの発現の生体分布を調べた。結晶化形態で市販されているルシフェラーゼによる校正曲線に従い、各臓器毎に抽出されたルシフェラーゼ pg として結果を表す。検出限界はルシフェラーゼ 0.5 ~ 1 pg に位置する。

40

試験条件では、最大発現は試験した 7 種の臓器のうちの 6 種即ち横隔膜、腓腹筋、心臓、肺、腎臓及び脾臓ではトランスフェクションから 23 時間後に得られることが判明した。肝臓レベルでの発現はもっと早いと思われる。最大発現はトランスフェクションから 23 時間後に肺レベルで 0.5 ng の比率で得られる。



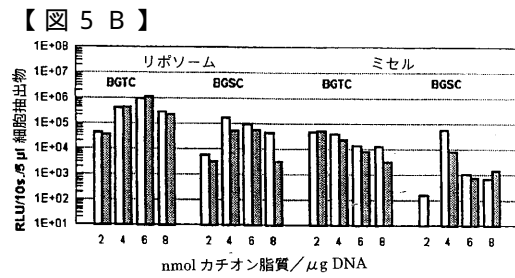


Figure 5B

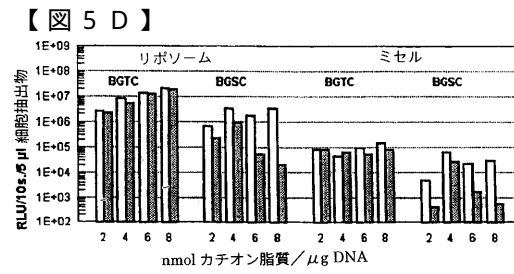


Figure 5D

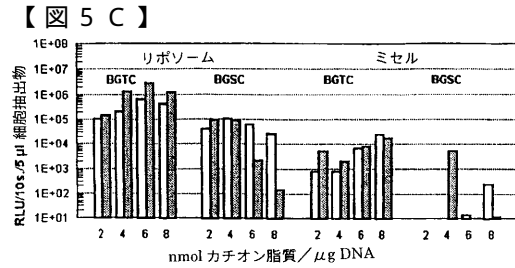


Figure 5C

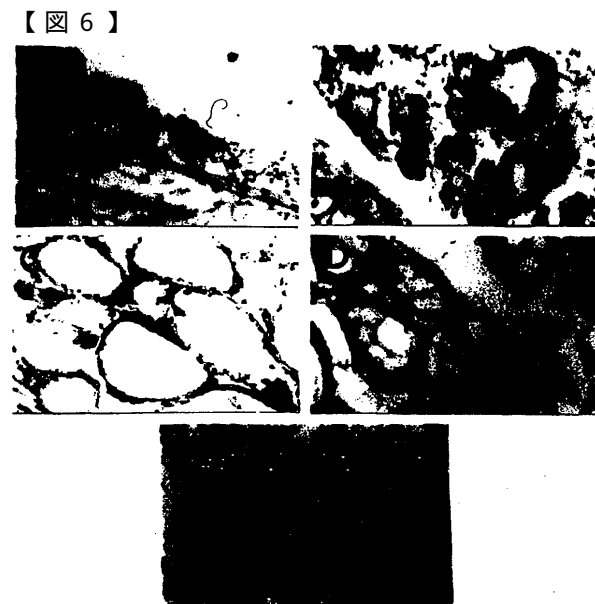


Figure 6

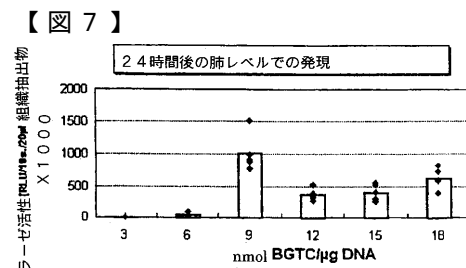


Figure 7

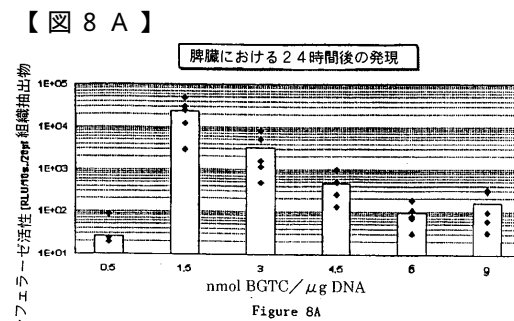
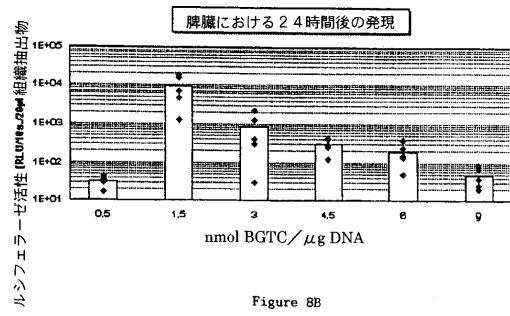


Figure 8A

【図 8 B】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 レン, ピエール
フランス国、エフ 7 5 0 1 9 ・パリ、リュ・ブテイ、8 0

(72)発明者 ビネロン, ジャン ピエール
フランス国、エフ 9 1 7 9 0 ・ボワシー シュール サン ヨン、リュ・デ・クロゾ、9

審査官 齋藤 恵

(56)参考文献 The Journal of Biochemistry, 1 9 9 5 年, Vol.270, No.52, p.31391-31396

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C07J 41/00

A61K 9/00 - 127

A61K 47/00 - 28

A61K 48/00

CA(STN)

REGISTRY(STN)