

(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 1
C07J 41/00 (2006.01)	C07J 41/00
A61K 47/28 (2006.01)	A61K 47/28
A61K 9/127 (2006.01)	A61K 9/127
A61K 48/00 (2006.01)	A61K 48/00
C07C 271/60 (2006.01)	C07C 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・ドゥ・ラ・ルシエルシユ・シアンティifik フランス国、エフー75016・パリ、リュ・ミシエル-アンジユ、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、ジヤン-マリ フランス国、エフー67000・ストラスブール、リュ・デ・ポンティエ、6

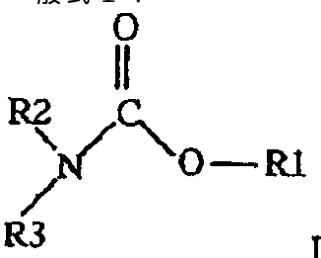
最終頁に続く

(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 :

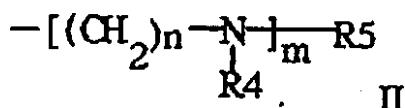


10

{ 式中、

R 1 はコレステリル基を表し、

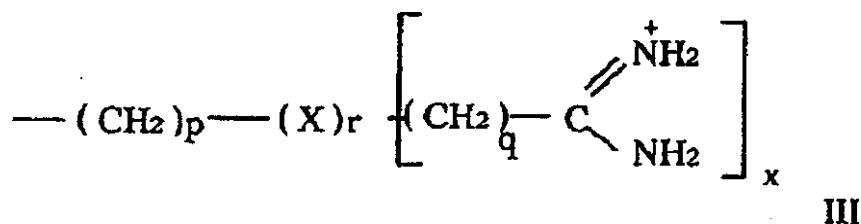
R 2 及び R 3 は相互に独立して水素原子又は一般式 II :



[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 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 R 4 及び R 5 基間で独立して変化し得る)

10

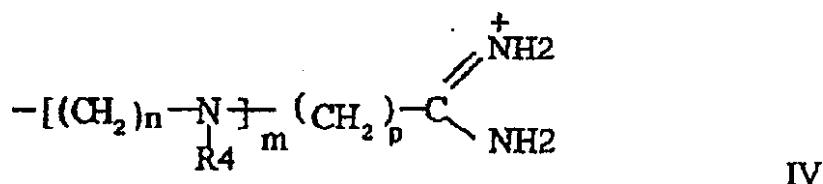
の基を表す] の基を表し、

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。

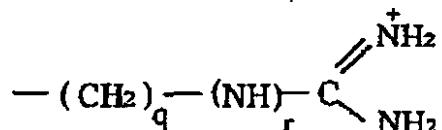
【請求項 2】

R 2 および R 3 が相互に独立して水素原子又は一般式 IV :



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、

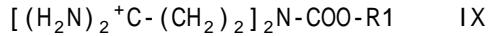
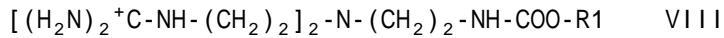
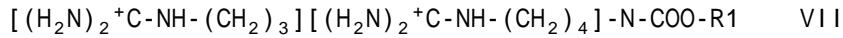
m、n、p、q 及び r は種々の R 2 及び R 3 基間で独立して変化し得る] の基を表すこと

30

を特徴とする請求項 1 に記載の化合物。

【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】

ビスグアニジノスペ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ペ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 (B G T 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。

【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 (B G T C) とビスグアニジノスペルミジンコレステロール (B G S C) 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 D O P E であることを特徴とする請求項 13 に記載の医薬組成物。

10

【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】

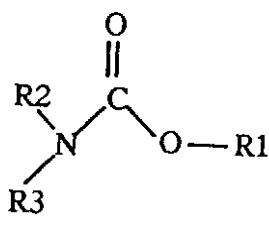
20

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】

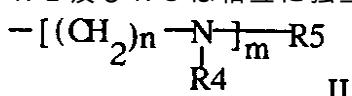
本発明はアミジニウムファミリーに属する新規化合物、特にグアニジニウム、該化合物を含有する医薬組成物及びその使用に関する。

より詳細には、本発明は一般式 I :



{式中、

R 1 はコレステロール誘導体又はアルキルアミノ基 - N R ' 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、R 2 及び R 3 は相互に独立して水素原子又は一般式 II :

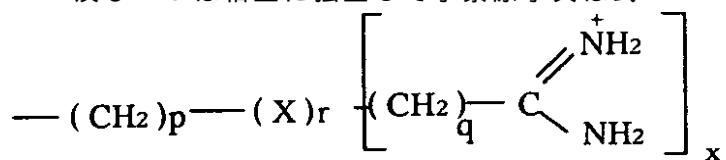


[式中、

40

50

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 :



III

(式中、

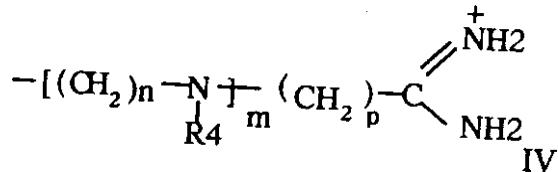
10

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)

の基を表す] の基を表し、

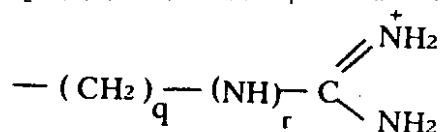
R 2 及び R 3 のうちの少なくとも一方は水素原子以外のものである} の化合物とその塩に関する。

好み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、R 2 又は R 3 が相互に独立して水素原子又は式 I V :



20

[式中、n、m 及び p は上記と同義であり、R 4 は水素原子又は式 V :



V

30

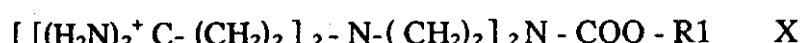
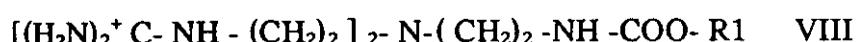
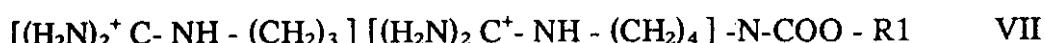
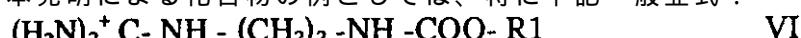
(式中、q 及び r は上記と同義である) の基を表し、

m、n、p、q 及び r は種々の R 2 及び R 3 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。

これら的一般式 (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蔥酸)、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、ビペリジン、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、特に下記一般式 :

40



50

(式中、R 1 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、上記式VII、VIII及びIX中、R 1 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BGSC(ビスグアニジノスペルミジンコレステロール)、BGTC(ビスグアニジノトレンコレステロール)及びBADC(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VII(BGSC)及びVIII(BGTC)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(BGSC)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(BGTC)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(DOTMA)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とリポ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DOTMA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。DOTMA以来、所謂「スペーサー」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DOTAP、DOBTA又はChOTB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（F R 9 2 0 3 1 2 0））、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、NT3、NT5、HARP/ブ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（F R 9 1 1 1 9 4 7））、脛囊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（F R 9 3 0 4 7 4 5））、VII、VIII、IX因子等の血液凝固に関する因子をコードする遺伝子、DNAの修復に関する遺伝子、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バーゼ、肝性リバーゼ、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E P 1 4 0 3 0 8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できなりボザイムをコードする配列を含むものでもよい（E P 3 2 1 2 0 1）。

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・バールウイルス、HIVウイルス、B型肝炎ウイルス（E P 1 8 5 5 7 3）、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（E P 2 5 9 2 1 2）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E 1 A、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

10

20

30

40

50

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 B G T C 及び B G S C は D N A 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 p K a により、これらのカチオン脂質は pH 変動による分解から D N A 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 / D N A 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 D N A 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 / D N A 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 (D O P E)、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 (P O P E)、ジーステアロイル、-パルミトイール、-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 (例えは特にガラクトセレブロシド)、スフィンゴ脂質 (例えは特にスフィンゴミエリン) 及びアシアロガングリオシド (例えは特にアシアロ G M 1 及び G M 2) から選択することができる。

D O P E 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、 D N A 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 B G T C と B G S C から選択される。同様に、中性脂質は D O P E 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は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、例えは膜プローブ / 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 : B G S C 及び B G T C の製造操作プロトコールの模式図。

図 2 : B A D C の製造操作プロトコールの模式図。

図 3 : 脂質化合物 / D N A 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 / D N A 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 : H e p G 2 (5 A) 、 H e L a (5 B) 、 N I H 3 T 3 (5 C) 及び 2 9 3 (5 D) 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。
- 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。 20

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-Boc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-Boc2-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lesteryl構造、シグナルBoc及びスペ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lesteryl構造及びスペ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-d₆) 200MHz: 0.5-2.5 (m, コレステリル構造及び中心CH₂), 3.1 (m, 8H, N-CH₂), 4.3 (m, 1H, H₃), 5.3 (d, 1H, H₆), 7.2 (広幅s, 8H, NH₂), 7.8 (s, 2H, NH)。元素分析: C₃₇H₆₇N₇O₂・2HCl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

10

グアニジノトレンコレステロールB GTC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CH₂Cl₂(100ml)溶液をトリス(2-アミノエチル)アミン(TREN)(11.68g, 80mmol)の飽和CH₂Cl₂(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(3×100ml)により不活性アミンを遊離させ、Na₂SO₄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%)。

20

¹H NMR (CDCl₃+CD₃OD, 200MHz): 0.5-2.4 (m, コレステリル構造), 2.5 (m, 2H, CH₂NHCO), 2.8 (広幅s, 4H, +NH-CH₂), 3.06 (広幅s, 4H, CH₂NH₃), 3.20 (m, 2H, +NH-CH₂), 4.4 (m, 1H, H₃), 5.3 (d, 1H, H₆)。元素分析: C₃₄H₆₂N₄O₂・3HCl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CH₂Cl₂(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CH₂Cl₂(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(3×100ml)により不活性アミンを遊離させ、Na₂SO₄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-カルボキシミジン(1.465g, 10mmol)とジイソブロピルアミン(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。

30

¹H NMR (DMSO-d₆, 200MHz): 0.5-2 (m, コレステリル構造), 2.2 (m, 2H, N-CH₂), 2.6 (広幅s, 4H, N-CH₂), 3.0 (d, 2H, N-CH₂), 3.2 (広幅s, 4H), 4.3 (m, 1H, H₃), 5.3 (d, 1H, H₆), 7.3 (広幅s, 8H, NH₂), 7.8 (広幅s, 2H, NH)。元素分析: C₃₆H₆₆N₈O₂・2HClの計算値: C 60.39; H 9.57; N 15.65。結果: C 60.38; H 9.67; N 15.56。

40

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CH₂Cl₂(100ml)溶液をイミノプロピオニトリル(2.46g, 20mmol)とEt₃N(2.02g, 20mmol)のCH₂Cl₂(100ml)溶液に滴下する。周囲温度で6時間攪拌後、水洗(2×100ml)し、Na₂SO₄で乾燥する。溶媒を蒸発させ、粗生成物(10.5g)

50

)をメタノールから再結晶させる(8.59g, 80%)。

¹H NMR (CDCl₃, 200MHz) : 0.5-2.5 (m, コレスチリル構造), 2.7 (m, 4H, -CH₂CN), 3.62 (m, 4H, CH₂-N-), 4.50 (m, 1H, H₃), 5.39 (d, 1H, H₆)。

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(0.324g, 6mmol)とジエチルアミン(0.884g, 12mmol)のDMF(30ml)溶液を50℃に維持し、これに弱いH₂S流を2時間バーリングする。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CH₂Cl₂に溶かし、水洗する(2×50ml)。Na₂SO₄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(1.86g, 51.5%)。

¹H NMR (DMSO-d₆, 200MHz) : 0.5-2.5 (m, コレスチリル構造), 2.67 (t, 4H, N-CH₂), 3.50 (t, 4H, S=C-CH₂), 4.3 (m, 1H, H₃), 5.33 (d, 1H, H₆)。

3. ニヨウ化ジチオアミデートの製造

ジチオアミド(0.603g, 1mmol)のアセトン(20ml)溶液にヨウ化メチル(2ml)を加え、周囲温度で48時間放置する。得られた沈殿を濾過する(0.741g, 83.5%)。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BADCの製造

上記のように得られたニヨウ化物(0.741g, 0.83mmol)のイソプロパノール(10ml)懸濁液を還流しながらNH₃流を2時間バーリングした後、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(10ml)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5ml)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(320mg, 60%)。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-d₆, 200MHz) : 0.5-2.6 (m, コレスチリル構造及び-CH₂-アミジニウム), 3.57 (広幅s, 4H, N-CH₂), 4.3 (m, 1H, H₃), 5.3 (d, 1H, H₆), 8.64 (広幅s, 2H, NH₂), 9.07 (広幅s, 1H, NH), 9.18 (広幅s, 2H)。元素分析: C₃₄H₅₆N₄O₂・2HClの計算値: C 65.25; H 9.32; N 8.94。結果: C 65.40; H 9.87; N 9.55。

B: in vitro 及び in vivo 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BGSC及びBGTCを用いて実施する。

2 - リポソームの調製

クロロホルム(CHCl₃)中のカチオン脂質とDOPE(モル比3/2)の混合物を減圧蒸発させ、N₂雰囲気下にpH 7.4の20mM HEPES緩衝液に再懸濁する。最終脂質濃度は1.2mg/mlである。

混合物を5分間渦形成した後、超音波発生器(Branson Ultrasonic 2210)を使用して5分間「超音波処理」し、最終的に+4℃で24時間保存して水和する。

得られた分散液を再び5~10分間「超音波処理」(Sonifier Branson 450)し、リポソームを形成する。

遠心分離後、溶液を細孔直径0.22μのフィルター(Millipore GS, Millipore)で濾過し、+4℃で保存する。

レーザー回折装置(Autosizer 4700, Malvern Instrument)によりBGSC又はBGTCを含むリポ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) はマウス纖維芽細胞である。

NB2A 細胞系 (C. Gougeot, 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-nlsLacZ 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-nlsLacZ 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 pXLT2774 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 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

10

20

30

40

50

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pH7、8.8 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。
10
 - 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, Naschua, 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10⁴~10⁷ RLU(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。
20

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BGTC/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(pH7.4)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ー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。
30

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%で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 μ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。
40

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pH7.8、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(Polylabo、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
50

ノクローナル抗体 (Genzyme, Cambridge, MA) 又は 1:400 希釀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

10

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、マウス纖維芽細胞 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 μg が負電荷をもつリシン酸 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。

20

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。

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		
			B G T C	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	胰 島 腫 瘤 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 瘤	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 ≥ 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B G S CはB G T Cよりも水性媒体に溶けにくいので、B G S Cは中性脂質D O P E（ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン）の存在下にリポ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。B G T C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 / D N A 比の決定

本願出願人はまず最初にH e L a細胞でのトランスフェクション実験中に脂質 / D N A 比を決定した。得られた曲線を図4に示す。リポソームB G S C / D N A 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p Hで陽子化されるので、最良の凝集物B G S C - D O P E / D N Aは約3の正電荷をもつ（図4）。

従って、最良のB G S C - D O P E / D N A 比はB G T C / D N A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B G S C - D O P E及びB G T C - 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 / D N Aのリン酸電荷比は約2.5（~3）である。L i p o f e c t i n（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L i p o f e c t i n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：リポソーム BGSC/DOPE、リポソーム 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RLU		
	B G S C リポソーム	B G T C リポソーム	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	7×10^6	1.9×10^6
ROS	N D	9×10^6	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 μ g / 500 μ g 合計溶解液でのルシフェラーゼ活性の平均測定値(RLU) ($n \geq 4$)。

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) D O P E の存在下で次のように「リポソーム」溶液を得る。クロロホルムに溶かしたD O P E (A V A N T I)を脂質のエタノール溶液に3/2のカチオン脂質 / D O P E 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) D O P E 溶液の代わりにクロロホルムを使用する以外は「リポソーム」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 2774である。

7.3 - サイトフェクタント混合物(即時調合調製物)

D N Aを150 mM NaClで20 μ g / 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 μ Mに希釈する。D N A溶液と脂質溶液を徐々に混合し、夫々濃度2、4、6及び8 nmol / μ g D N Aとし、塩濃度は75 mMとする。

7.4 - トランスフェクション

10

20

30

40

50

細胞を適当な条件で 24 穴マイクロプレート (2 cm² / ウェル) で培養し、集密の 50 ~ 70 % で指數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 500 μl 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 50 μl (0.5 μg DNA / 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。

7.5 - 結果 (図 5)

4 種の細胞型 (NIH3T3、293、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 BGTc 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 BGTc / DOPe によるマウス気道における導入遺伝子の in vivo 発現

このために、カチオンリポソーム BGTc / DOPe 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 BGTc / DOPe 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 6 A)。これらのデータから明らかのように、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 6 B)。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 6 C)。 BGTc / DOPe 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 6 D)。

陰性対照群は、抗体不在下で実施した (図 6 E)。

以上の結果は肺囊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、この疾病的治療には、ヒト気管支における CFTTR 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。

実施例 9

BGTc / DOPe 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 BGTc / DOPe 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。結果を下表 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 リポソーム</u>	
p R S V - L u c	2.8×10^5 (平均: 3×10^4 - 8×10^5)
p R S V - L a c Z	0
<u>裸の DNA</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-gal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LacZを含む対照では活性を全く検出することができなかつたので、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ポソームBGTC / DOPE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 μlを5週齢BalbC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Heidolph DIAX600で均質化する。組織抽出物の14000g上清でルシフェラーゼ活性を調べる。

静脈内注射

30

DNA 50 μgと「リポソーム」形態の種々の濃度のBGTC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/μg DNAの最適比は9であり(図7)、900nmolまでのBGTC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「リポソーム」形態のBGTCをDNA 100 μgと共に注射した。肝臓(図8B)と脾臓(図8A)のいずれでも最大発現は1.5nmol BGTC/μg 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「リポソーム」BGTC / DNA混合物200 μl(DNA 50 μg及び9nmol BGTC / μg DNA)を5週齢BalbC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0.5~1pg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0.5ngの比率で得られる。

【 四 1 】

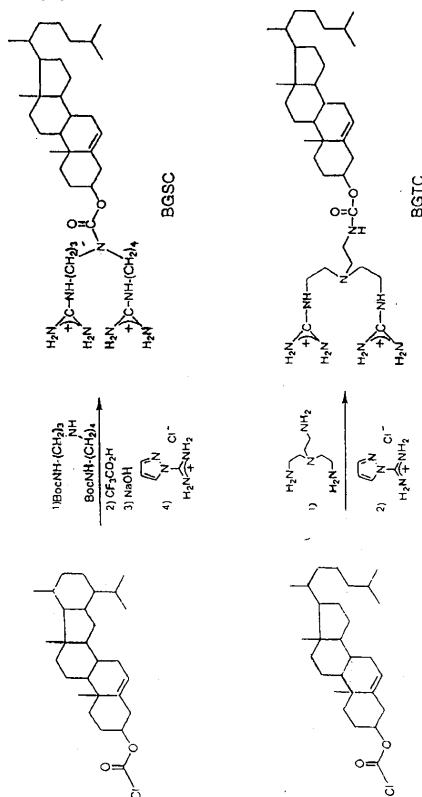


Figure 1

【 义 3 】

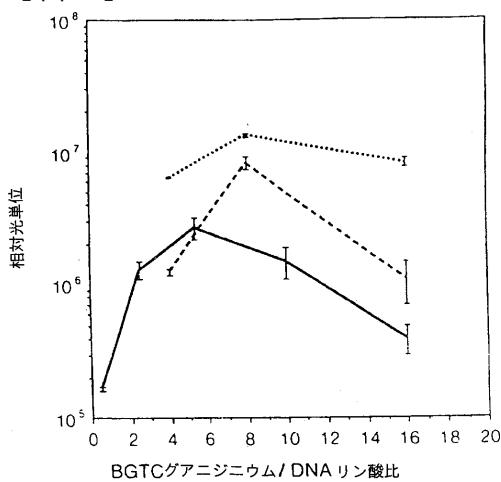


Figure 3

【 図 2 】

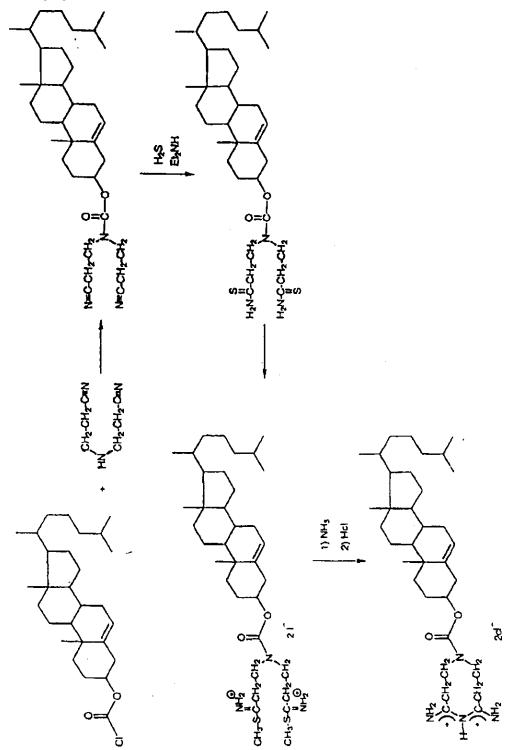


Figure 2

【 四 4 】

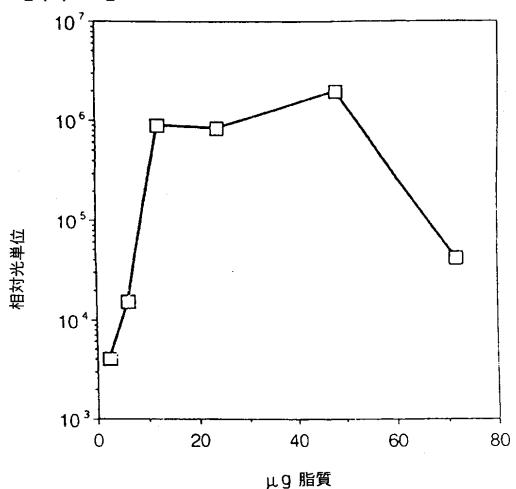


Figure 4

【図5A】

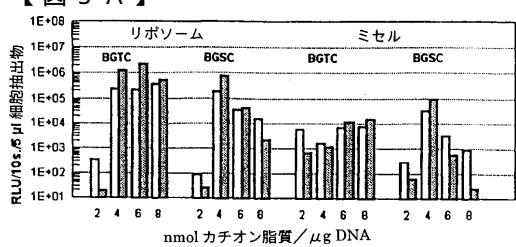


Figure 5A

【図 5 B】

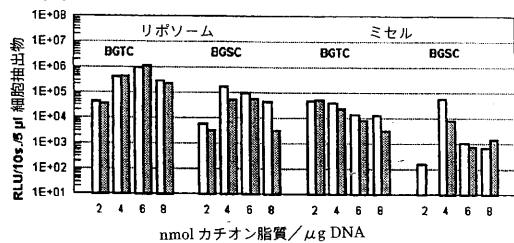


Figure 5B

【図 5 D】

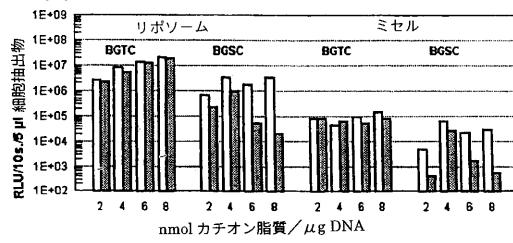


Figure 5D

【図 5 C】

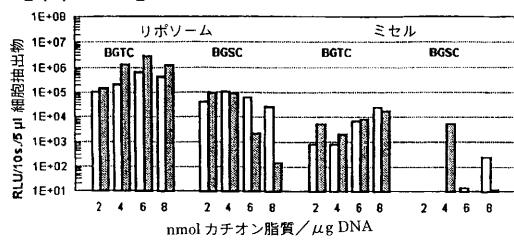


Figure 5C

【図 6】

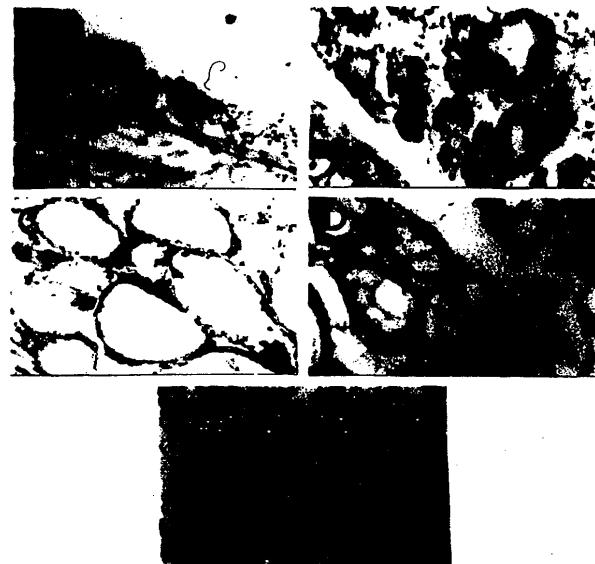


Figure 6

【図 7】

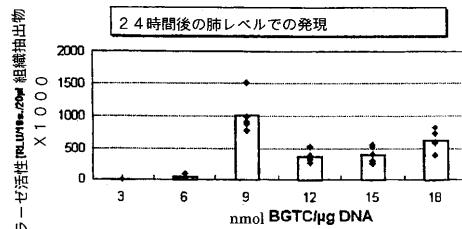


Figure 7

【図 8 A】

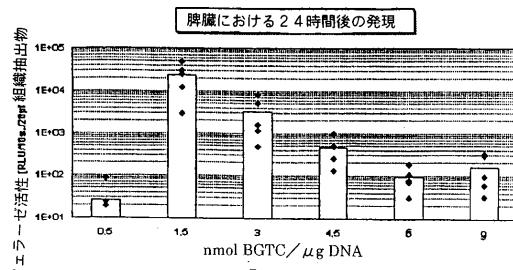
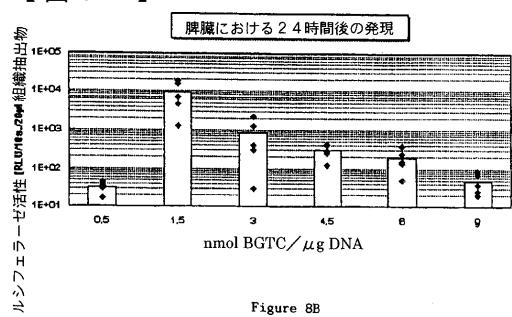


Figure 8A

【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 75019・パリ、リュ・ブティ、80
(72)発明者 ピネロン, ジヤン ピエール
フランス国、エフ 91790・ボワシー シユール サン ヨン、リュ・デ・クロゾ、9

審査官 斎藤 恵

(56)参考文献 The Journal of Biochemistry, 1995年, Vol.270, No.52, p.31391-31396

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07J 41/00
A61K 9/00 - 127
A61K 47/00 - 28
A61K 48/00
CA(STN)
REGISTRY(STN)