

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4276439号
(P4276439)

(45) 発行日 平成21年6月10日 (2009. 6. 10)

(24) 登録日 平成21年3月13日 (2009. 3. 13)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 C 335/08 (2006. 01)

C O 7 C 335/08

A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 47/20 (2006. 01)

A 6 1 K 47/20

A 6 1 K 47/24 (2006. 01)

A 6 1 K 47/24

A 6 1 K 47/26 (2006. 01)

A 6 1 K 47/26

請求項の数 28 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-589444 (P2002-589444)
 (86) (22) 出願日 平成14年5月14日 (2002. 5. 14)
 (65) 公表番号 特表2005-511484 (P2005-511484A)
 (43) 公表日 平成17年4月28日 (2005. 4. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2002/001626
 (87) 国際公開番号 W02002/092558
 (87) 国際公開日 平成14年11月21日 (2002. 11. 21)
 審査請求日 平成17年5月10日 (2005. 5. 10)
 (31) 優先権主張番号 01/06330
 (32) 優先日 平成13年5月14日 (2001. 5. 14)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)
 (31) 優先権主張番号 60/297, 482
 (32) 優先日 平成13年6月13日 (2001. 6. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 305011824
 サントリオン
 フランス国、9 4 4 0 0 ・ ビ ト リ ー ・ シ ュ
 ー ル ・ セ ー ヌ 、 リ ュ ・ レ オ ン ・ ジ ェ フ ロ ア
 ・ 7 2 - 8 2
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100113332
 弁理士 一入 章夫
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100103920
 弁理士 大崎 勝真
 (74) 代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

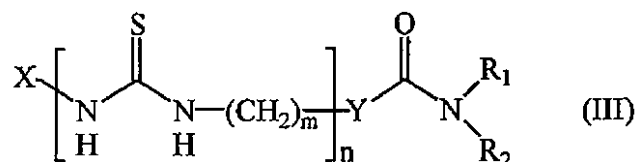
(54) 【発明の名称】 ポリチオ尿素の脂質誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I I I) :

【化 1】



10

〔式中、

n は、2、3、4、5、又は6であり、

m は、2、3、又は4であり、各々のm値は、各々の基－[NH－C S－NH－(CH)_m]－について独立して選択され、X は、1個から8個の炭素原子を含む飽和又は不飽和直鎖又は環状脂肪族基、メルカプトメチル(－CH₂SH)基、又は－(CH₂)_x－(CHOH)_u－H〔式中、xは1～10から選択される整数であり、uは1、2、3、4、5又は6である〕もしくは－(OCH₂CH₂O)_v－H〔式中、vは、1、2又は3である〕で表される親水鎖であり、

20

Yは1個から6個の炭素原子を有するアルキル、ケトン、エステル、エーテル、アミド、アミジン、カルバメート又はチオカルバメート官能基、グリセロール、尿素、チオ尿素、又は芳香環から選択される少なくとも1個の化学官能基を含むスペーサーであって、

R₁とR₂は、互いに独立して、水素原子又は脂肪族鎖であり、該脂肪族鎖は10個から22個の炭素原子及び任意に少なくとも1つの不飽和を含むアルキル基から選択され、R₁及びR₂の少なくとも1個は水素原子ではない]

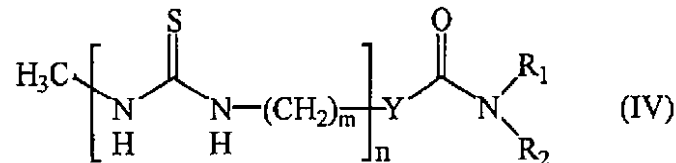
の化合物、又はその異性体、又はそれらの混合物。

【請求項2】

式(IV)：

【化2】

10



[式中、m、n及びYは、請求項1で定義したとおりである]

を含む、請求項1に記載の化合物、又はその異性体、又はそれらの混合物。

【請求項3】

前記スペーサーが、式(V)又は式(VI)：

20

—NH—C(O)—CH₂—CH₂— (V)

又は—(CH₂)_i—W—(CH₂)_j— (VI)

[式中、i及びjは、1から6までの整数であり、及びWは、ケトン、エステル、エーテル、アミド、アミジン、カルバメート又はチオカルバメート官能基、グリセロール、尿素、チオ尿素、又は選択的に芳香環である]

の基である、請求項1又は2に記載の化合物。

【請求項4】

脂肪族鎖が、脂肪族基(CH₂)₁₁CH₃、(CH₂)₁₃CH₃、(CH₂)₁₅CH₃及び(CH₂)₁₇CH₃から選択される、請求項1に記載の化合物。

【請求項5】

30

請求項1～4のいずれか一項に記載の化合物と核酸とを含む核酸を細胞に導入するための組成物。

【請求項6】

前記核酸が、デオキシリボ核酸又はリボ核酸である、請求項5に記載の核酸を細胞に導入するための組成物。

【請求項7】

前記核酸が、少なくとも1つの調節配列の制御下の少なくとも1個の治療的重要性を持つ遺伝子を含む、請求項5又は6に記載の核酸を細胞に導入するための組成物。

【請求項8】

前記核酸が、遺伝子、アンチセンス配列又はリボザイム機能を有するRNAをコードするDNAである、請求項5～7のいずれか一項に記載の核酸を細胞に導入するための組成物。

40

【請求項9】

少なくとも1個のアジュバントをさらに含有する、請求項5～8のいずれか一項に記載の核酸を細胞に導入するための組成物。

【請求項10】

前記アジュバントが、脂質、ペプチド、タンパク質、又はポリマーである、請求項9に記載の核酸を細胞に導入するための組成物。

【請求項11】

前記ポリマーがポリエチレングリコールである、請求項10に記載の核酸を細胞に導入

50

するための組成物。

【請求項 1 2】

前記ポリマーが、コレステロールに共有結合されたポリエチレングリコールである、請求項 1 0 に記載の核酸を細胞に導入するための組成物。

【請求項 1 3】

前記アジュバントが中性脂質から選択される、請求項 1 0 に記載の核酸を細胞に導入するための組成物。

【請求項 1 4】

前記中性脂質が、天然脂質又は合成脂質であり、前記脂質が、生理的条件下で両性イオン性であるか又はイオン電荷を持たない、請求項 1 3 に記載の核酸を細胞に導入するための組成物。

10

【請求項 1 5】

前記中性脂質が、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)、ジーステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジーパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、又は 1、2 又は 3 回 N-メチル化されている、前記ホスファチジルエタノールアミンのいずれかの誘導体、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 (特にガラクトセレブロシドなど)、スフィンゴ脂質 (特にスフィンゴミエリンなど)、又はアシアロガングリオシド (特にアシアロ G M 1 又はアシアロ G M 2 など) である、請求項 1 4 に記載の核酸を細胞に導入するための組成物。

20

【請求項 1 6】

少なくとも 1 つの細胞外標的エレメント又は少なくとも 1 つの細胞内標的エレメントをさらに含有する、請求項 5 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の核酸を細胞に導入するための組成物。

【請求項 1 7】

前記標的エレメントが、糖、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、脂質、神経伝達物質、ホルモン、ビタミン、又はそれらの誘導体である、請求項 1 6 に記載の核酸を細胞に導入するための組成物。

【請求項 1 8】

前記標的エレメントが、少なくとも 1 0 個の炭素原子を含む脂肪アルキル鎖又はポリエチレングリコールに共有結合されている、請求項 1 6 に記載の核酸を細胞に導入するための組成物。

30

【請求項 1 9】

前記標的エレメントが、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物及び前記核酸に共有結合されている、請求項 1 6 に記載の核酸を細胞に導入するための組成物。

【請求項 2 0】

注射用製剤のための医薬適合性の賦形剤をさらに含有する、請求項 5 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の核酸を細胞に導入するための組成物。

【請求項 2 1】

皮膚及び／又は粘膜への投与のための医薬適合性の賦形剤をさらに含有する、請求項 5 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の核酸を細胞に導入するための組成物。

40

【請求項 2 2】

i n v i t r o における核酸の導入のための請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物の使用。

【請求項 2 3】

疾病の治療のための医薬を製造するための、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物の使用。

【請求項 2 4】

i n v i t r o において核酸を細胞に導入するための方法であって、(1) 核酸を請

50

請求項1～4で定義した化合物と接触させることによって複合体を形成すること；及び（2）細胞を前記複合体と接触させること、を含む、核酸を前記細胞に導入するための方法。

【請求項25】

前記複合体を形成する前に、前記化合物及び／又は前記核酸を、請求項9～19で定義した少なくとも1つのアジュバント及び／又は標的エレメントと混合することをさらに含む、請求項24に記載の、*in vitro*において核酸を細胞に導入するための方法。

【請求項26】

前記細胞を前記複合体と接触させる前に、請求項9～15で定義した少なくとも1つのアジュバントを該細胞に投与する、請求項24に記載の、*in vitro*において核酸を細胞に導入するための方法。

10

【請求項27】

該細胞を、少なくとも1つの化学的処理又は少なくとも1つの物理的処理又はそれらの組合せに供することをさらに含む、請求項24～26のいずれか一項に記載の、*in vitro*において核酸を細胞に導入するための方法。

【請求項28】

少なくとも1つの請求項1～4のいずれか一項に記載の化合物及び／又はその混合物を含む、トランスフェクションキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本出願は、2001年6月13日出願の米国特許仮出願第60/297,482号の利益を主張し、また2001年5月14日出願のフランス特許仮出願第0106330号に基づく優先権を主張するものであって、これら2つの出願の内容は参照してここに組み込まれる。

本発明は、核酸を細胞に導入することを可能にする新規化合物に関する。それらは、インビトロ、半ビボ又はインビボでの様々な細胞型への核酸のトランスフェクションのために有用である。

【背景技術】

【0002】

バイオテクノロジーの発達と共に、核酸を細胞内に有効に導入することが必要となってきた。それは、例えば組換えタンパク質の生産のために、又は遺伝子の発現の調節、遺伝子のクローニング又はDNAに関わる他の何らかの操作を検討するために研究室において、インビトロで細胞内に核酸を導入することを含みうる。また、例えばトランスジェニック動物の創造、ワクチンの生産、標識試験あるいはまた治療アプローチのために、インビボで細胞内に核酸を導入することも含みうる。また、骨髄移植、免疫療法又はその後の再投与のために生物から採集した細胞への遺伝子の導入に関わる他の方法を含むアプローチにおいて、半ビボで細胞内に核酸を導入することも含みうる。

30

【0003】

外来性遺伝物質の細胞内送達のためにいくつかの方法が提案されてきた。それらの1つは、特に、全く危険性がないとは言えないウイルス法に対して極めて好都合な代替法を構成する、非ウイルスベクターの使用に基づく。これらの合成ベクターは2つの主要な機能を有する：導入される核酸と複合して核酸を緊密化すること、及び形質膜及びおそらくは核エンベロープを横切る核酸の通過を促進すること。

40

【0004】

例えばポリマー又は選択的に生化学的ベクター（細胞受容体リガンドと結合したカチオンタンパク質から成る）のように、いくつかのファミリーの合成ベクターが開発されてきたが、重要な進歩は、特にリポフェクタントの開発、より特定するとカチオン脂質の開発によって為された。カチオン脂質は、それらの全体的な正電荷のために、全体として負であるDNAに自発的に干渉して、ヌクレアーゼからDNAを保護すること及びDNAの細胞内放出のために細胞膜に結合することができるヌクレオ脂質複合体を形成することが明

50

らかにされた。

【0005】

これまでに様々なタイプのカチオン脂質が合成されている：第四級アンモニウム基を含む脂質（例えばDOTMA、DOTAP、DMRIE、DLRIE等）、例えばDOGS、DC-Chol又は選択的に特許願WO97/18185号に開示されているリポポリアミンのようなりポポリアミン、第四級アンモニウム基とDOSPAのようなポリアミンの両方を含む脂質、又は選択的に様々な他のカチオン単位、特にアミジニウム基を含む脂質（例えばADPDE、ADODE又は特許願WO97/31935号の脂質）。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0006】

しかし、これらのカチオン脂質をトランスフェクション剤として使用することにはまだ数多くの問題があり、それらの効率も改善の余地がある。特に、効率的で安定なヌクレオ脂質複合体を得るためには、一般に、これらの複合体が高度に陽イオン性である必要があることが認められた。しかし、核酸と共に、全体として中性又は陰性である粒子を形成するためには、陽イオン性でないベクターが利用可能であることが望ましいであろう。実際に、核酸とカチオン脂質の間で形成される全体として陽イオン性の複合体は、それらの排出を誘導する細網内皮系によって捕獲される傾向があることが認められている。さらに、形成される複合体の全体的正電荷のために、血漿タンパク質がそれらの表面に吸着する傾向があり、これはトランスフェクション力の低下をもたらす。さらに、局所注入に関して、大きな全体的正電荷の存在は、複合体が細胞外マトリックスに吸着するため、核酸複合体が投与部位から遠くへと拡散するのを妨げる；複合体は、それ故、標的細胞に到達することができず、結果として注入された複合体の量に比べて導入効率の低下を生じさせる。最後に、多くの場合、カチオン脂質は炎症作用を有することも認められている。

20

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の目的は、明白に、そのポリチオ尿素官能基の故に革新的であり、インビトロ、半ビボ又はインビボでの核酸のトランスフェクションのために効率的に使用することができる新規トランスフェクション化合物を提供することである。これらの新規化合物は、

－それらの構造から正電荷が存在しないことにより、上記で論じたカチオンベクターの使用によって引き起こされる多くの問題を解決することが可能になり、

30

－カチオン脂質と同じように、核酸と複合して核酸を緊密化することができ、且つそれらのトランスフェクションを促進することができるので、特に有益である。

【0008】

本発明の第一の対象は、従って、スペーサーによって脂質に結合されたポリチオ尿素部分から成ることを特徴とするトランスフェクション化合物である。

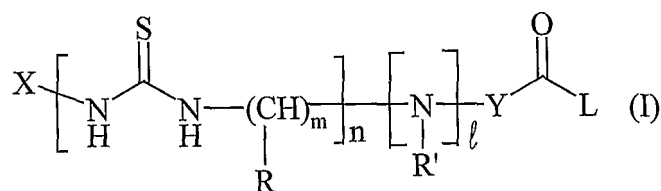
【0009】

特に、本発明の対象は、一般式（I）：

【0010】

40

【化1】

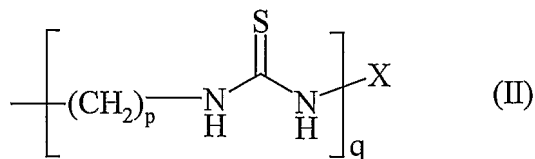


[式中、

・ 1 は、0 及び 1 から選択される整数であり、

50

- ・ n は、1、2、3、4、5 及び 6 から選択される整数であり、
- ・ m は、2、3 及び 4 から選択される整数であり、m は、種々の基 $[\text{NH}-\text{CS}-\text{NH}-\text{(CH)}_m]$ ーの中で異なる値をとることが可能であり、
- ・ R' は、一般式 (I I) :
【0011】
【化2】



10

[式中、q は、1、2、3、4、5 及び 6 から選択される整数であり、及び p は、2、3 及び 4 から選択される整数であり、p は、種々の基 $[(\text{CH}_2)_p - \text{NH}-\text{CS}-\text{NH}]$ ーの中で異なる値をとることが可能である]

の基を表わし、

- ・ R は、水素原子又は上記で定義した一般式 (I I) の基のいずれかを表わし、n が 1 であり、及び l が 0 であるとき、少なくとも 1 個の R 基は式 (I I) であることは明白であり、

20

- ・ X は、式 (I) 及び (I I) において、1 個から 8 個の炭素原子を含む飽和又は不飽和直鎖又は環状脂肪族基、メルカプトメチル $(-\text{CH}_2\text{SH})$ 基、又は選択的に次の群：

$-(\text{CH}_2)_x - (\text{CHOH})_u - \text{H}$ [式中、x は 1 ~ 10 から選択される整数であり、及び u は 1、2、3、4、5 及び 6 から選択される整数である]、又は選択的に、

$-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_v - \text{H}$ [式中、v は、1、2 及び 3 から選択される整数である]

から選択される親水鎖を表わし、1 個以下の置換基 X は、式 (I) 及び (I I) の両方において、親水鎖を表わすことは明白であり、

- ・ Y はスペーサーを表わし、
- ・ 及び L は、

30

$-\text{N}(\text{R}_1)\text{R}_2$ 基 [式中、 R_1 と R_2 は、互いに独立して、水素原子又は選択的に脂肪族鎖を表わす]、又は選択的に式 $-(\text{CH}_2)_t - \text{OZ}$ の基 [式中、t は、11、12、13、14 又は 15 から選択される整数を表わし、及び Z は、糖、ポリオール又は PEG を表わす]、但し、 R_1 及び R_2 の少なくとも 1 個は水素原子でないことは明白である、

- ・ 若しくは $-\text{OR}_3$ 基 [式中、 R_3 はステロイド誘導体を表わす] を表わす]

のトランスフェクション化合物である。

【0012】

本発明によれば、「スペーサー」の語は、分子のポリチオ尿素部分と脂質部分の間の結合を提供すること、及びこれら 2 つの部分の間の望ましくない切断を減弱させるためにそれらを離して保持することの両方を可能にする化学基を意味すると理解される。好ましいスペーサーは、例えば、1 個から 6 個の炭素原子を有するアルキル、ケトン、エステル、エーテル、アミド、アミジン、カルバメート又はチオカルバメート官能基、グリセロール、尿素、チオ尿素、又は芳香環から選択される 1 個又はそれ以上の化学官能基で構成される。例えば、スペーサーは、式：

$-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

又は、 $-(\text{CH}_2)_i - \text{W} - (\text{CH}_2)_j -$

[式中、i 及び j は、1 から 6 まで (両端を含む) から選択される整数であり、及び W は、ケトン、エステル、エーテル、アミド、アミジン、カルバメート又はチオカルバメート

40

50

官能基、グリセロール、尿素、チオ尿素、又は選択的に芳香環から選択される基である]の群から選択されうる。

【0013】

本発明のために、「脂肪族鎖」の表現は、脂質特性を示すことを条件として、飽和又は不飽和で、任意に1個又はそれ以上のヘテロ原子を含む、10個から22個の炭素原子を有するアルキル基を意味すると理解される。好ましくは、それらは、10個から22個の炭素原子及び1、2又は3個の不飽和を含む直鎖又は分枝アルキル基である。好ましくは、前記アルキル基は、10、12、14、16、18、20又は22個の炭素原子を含む。より特定すると、脂肪族基、 $-(CH_2)_{11}CH_3$ 、 $-(CH_2)_{13}CH_3$ 、 $-(CH_2)_{15}CH_3$ 及び $-(CH_2)_{17}CH_3$ が挙げられよう。

10

【0014】

「糖」の語は、本発明のために、1個又はそれ以上のサッカリドから成る分子を意味すると理解される。例として、ピラノース及びフラノースなどの糖類、例えばグルコース、マンノース、ラムノース、ガラクトース、フルクトース又は選択的にマルトース、ラクトース、サッカロース、スクロース、フコース、セロビオース、アロース、ラミナラビオース、ゲンチオビオース、ソフォロース、メリビオース等が挙げられるであろう。好ましくは、糖（類）は、グルコース、マンノース、ラムノース、ガラクトース、フルクトース、ラクトース、サッカロース及びセロビオースから選択される。さらに、この語は、いわゆる「複合」糖質、すなわち互いに共有結合しているいくつかの糖も包含し、各々の糖は、好ましくは上記に列挙したリストから選択される。適切な多糖類として、デキストラン、 α -アミロース、アミロペクチン、フルクタン、マンナン、キシラン及びアラビナンが挙げられよう。一部の好ましい糖は、さらに、例えばある種のレクチンのように、細胞受容体と相互作用しうる。

20

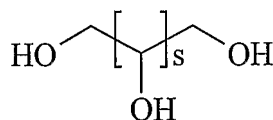
【0015】

本発明によれば、「ポリオール」の語も、少なくとも2個のヒドロキシル官能基を含む直鎖、分枝又は環状炭化水素分子を意味すると理解される。例として、グリセロール、エチレングリコール、プロピレングリコール、テトリトール、ペンチトール、環状ペンチトール（又はケルシトール）、マンニトール、ソルビトール、ダルシトール、環状ヘキシトール又はイノシトールなどのヘキシトール等が挙げられるであろう（Staneckら、The Monosaccharides Academic Press, 621-655 ページ及び778-855 ページ）。好ましい態様に従えば、ポリオールは、一般式：

30

【0016】

【化3】



[式中、sは2、3、4、5及び6から選択される]のアルコールから選択される。

40

【0017】

本発明による一般式(I)の化合物がポリエチレングリコール(PEG)基を含むとき、後者は一般に2個から120個、好ましくは2個から80個の $-OCH_2CH_2O-$ 単位を含む。これは、単純PEG、すなわちその鎖がヒドロキシル基で終わるもの、又はその末端基がアルキルから選択される、例えばメチルである、PEGを包含しうる。

【0018】

本発明のために、「ステロイド誘導体」の表現は、コレスタン型の多環式化合物を意味すると理解される。これらの化合物は、天然であるか又はそうでなくてもよく、より好ましくはコレステロール、コレスタノール、3- α -5-シクロ-5- α -コレスタン-6

50

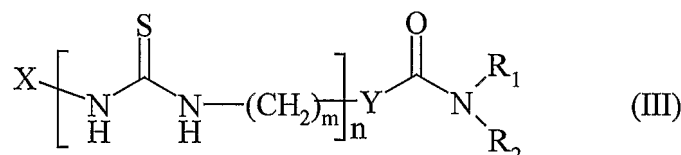
ーβーオール、コール酸、ギ酸コレステリル、ギ酸コレスタニル、3α、5ーシクロー5αーコレスタンー6βーイルギ酸塩、コレステリルアミン、6ー(1, 5ージメチルヘキシル)ー3α, 5αージメチルヘキサデカヒドロシクロペンタ[a]シクロプロパ[2, 3]ーシクロペンタ[1, 2ーf]ナフタレンー10ーイルアミン、又はコレスタニルアミンから選択される。

【0019】

本発明の好ましい変法に従えば、トランスフェクション化合物は、一般式(III)：

【0020】

【化4】



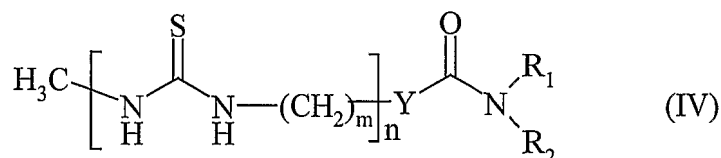
[式中、X、m、n及びYは、nが1ではないこと、及びR₁とR₂が、互いに独立して、水素原子又は脂肪族鎖を表わすことを除いて、一般式(I)において定義したとおりであり、R₁及びR₂の少なくとも1個が水素ではないことは明白である]
を有する。

【0021】

より好ましくは、本発明のトランスフェクション化合物は、一般式(IV)：

【0022】

【化5】



[式中、m、n及びYは、nが1ではないこと、及びR₁とR₂が、互いに独立して、水素原子又は脂肪族鎖を表わすことを除いて、一般式(I)において定義したとおりであり、R₁及びR₂の少なくとも1個が水素ではないことは明白である]
を有する。

【0023】

本発明がまた、一般式(I)の生成物の異性体が存在するときには一般式(I)の生成物の異性体、ならびにそれらの混合物も対象とすることは明白である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

本発明による一般式(I)の化合物の製造は、次の段階を提示されている順序で又は他の何らかの既知の変法及び等しく適切な変法に従って使用して、当業者に周知である、溶液中又は保持体上での従来の有機合成手法を用いて、実施される。

【0025】

1) 脂質部分Lの製造

一般式(I)の化合物の脂質部分LがーN(R₁)R₂基[式中、R₁及び／又はR₂は脂肪族鎖を表わす]によって表わされるときは、最初に、式HN(R₁)R₂のアミンを生成する。前記アミンは、一方が置換基R₁を含み、他方が置換基R₂を含む、カルボン酸とアミンを縮合して、対応するアミドを生成し、次にそのようにして得た前記アミドを還元することによって入手しうる。

10

20

30

40

50

【0026】

アミドの生成は、成分を混合し、当該物質の融点より高い温度、一般には20℃から200℃に加熱して融解し、その後媒質を脱水して生成された水を除去することによって、又はより好都合には、例えば五酸化リンのような乾燥剤又は水分を吸収することができる他の何らかの物質の存在下で、好都合に実施される。この中間体アミドの生成はまた、この方法の変法を使用して、若しくはカルボン酸又はそれらの誘導体を含む、アミド（例えばペプチド共役型のような）を生成するためのもう1つ別の方法を使用して、及び当業者に周知の条件及び試薬を変化させて[R. C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers]実施しうる。

10

【0027】

前記で得たアミドの、式 $\text{HN}(\text{R}_1)\text{R}_2$ のアミンへの還元は、例えば水素化アルミニウムウリチウムなどの還元剤、若しくはこの場合に有効な他の何らかの水素化物又は還元剤を使用して実施しうる。その手順は、好ましくは、溶媒の沸点より低い温度で又は無水及び／又は不活性ガス体下に、非プロトン性溶媒（例えばテトラヒドロフラン又はエーテル）中で実施する。

【0028】

もう1つの変法に従えば、 $\text{HN}(\text{R}_1)\text{R}_2$ と称される脂質部分は、市販のものを入手してもよい。

【0029】

R_1 及び／又は R_2 が式 $-(\text{CH}_2)_t-\text{OZ}$ の基を表わすとき、手順は、アルキル部分を生成するために上述したように実施し、その後、当業者に既知の従来の手法に従って市販のPEG、ポリオール又は糖と単純カップリングする。

20

【0030】

一般式(I)の化合物の脂質部分Lが $-\text{OR}_3$ 基で表わされるとき、後者は、好ましくは市販の製品から選択される。

【0031】

2) スペーサーYの連結

次に、先の段階で得た脂質部分Lに、当業者に既知の従来の手法に従ってスペーサーLを結合する。好ましい変法に従えば、ジクロロメタン、クロロホルム、テトラヒドロフラン又は他の何らかのエーテルのような適切な溶媒中、溶媒の沸点より低い温度で、及び無水及び／又は不活性ガス体下に、脂質部分LをN-アシル化してアミド結合を形成する。この反応は、好ましくは、N, N-ジメチルアミノピリジンのようなアミン含有塩基の存在下で、若しくはトリエチルアミン又はエチルジイソプロピルアミンのような非求核アミン含有塩基と混合したこの塩基の存在下で実施する。ピリジンも、単独で又はもう1つ別の塩基と混合して使用するか、上述した溶媒の1つで希釈してもよく、若しくはそれ自体を溶媒として使用してもよい。

30

【0032】

3) ポリチオ尿素鎖の形成

一般式(I)の化合物の合成の第三の部分は、チオ尿素単位の連続的な導入である。これは、所望ポリチオ尿素部分を得るために必要な回数だけ反復しうる一連の反応において実施する。好ましい方法によれば、その手順は次のような実施する：

40

A) 最初に、先の段階で得た $\text{Y}-\text{C}(\text{O})-\text{L}$ に、 $-\text{HN}-(\text{CHR})_m-$ 基の成員の形態で単位の最初の部分を連結する。そのために、手順は、カップリング剤、例えば、保持されているか又は保持されていない、1-ベンゾトリアゾリルオキシトリス（ピロリジノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（PyBOP）、1-ベンゾトリアゾリルオキシトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（BOP）、 $\text{O}-(1\text{H-ベンゾトリアゾール-1-イル})-\text{N}, \text{N}, \text{N}', \text{N}'$ -テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート又はテトラフルオロボレート（HBTU又はTBTU）、ジクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、1-(3-ジメチルアミノプロピル)

50

ー3-エチルカルボジイミドヒドロクロリド(EDC)、又は1-(3-トリメチルアンモニオプロピル)-3-エチルカルボジイミドヨージドの存在下に、ジアミンを含有する、式 $H_2N-(CHR)_m-NH_2$ の成員から出発して好都合に実施される。このカップリングは、ジクロロメタン、クロロホルム、テトラヒドロフラン又は他の何らかのエーテルのような適切な溶媒中、溶媒の沸点より低い温度で、及び無水及び／又は不活性ガス体下で実施する。この手順はまた、非求核アミン含有塩基、例えばエチルジイソプロピルアミン、トリエチルアミン又はトリイソプロピルアミンの存在下でも実施される。脂質部分とスペーサーの性質が適合性であれば、 $SCN-(CHR)_m$ -型の配列又は前駆体を連結することができ、それによって、下記のC)で述べるような段階を通して合成を継続することが可能となる。

10

【0033】

B) 次に、先の段階で得た生成物を、好ましい手法に従って、二硫化炭素(CS_2)で又はそのような官能性を得るための当業者に既知の他の試薬で処理することによってイソチオシアネートに変換する[H. Ulrich, イソシアネートの化学と技術(Chemistry and Technology of Isocyanates), Wiley (1996)、イソシアネートの化学とそのチオ誘導体(The Chemistry of Cyanates and their Thio Derivatives), S. Patai 編集, Wiley (1977)、S. Ozaki, イソシアネート化学の近年の進歩(Recent Advances in Isocyanate Chemistry), Chem. Rev. 72, 457 (1972)]。この反応は、例えばテトラヒドロフラン又は他の適合性エーテル溶媒のような溶媒中、冷却混合物の温度から約20℃までの間の温度で好都合に実施される。この手順はまた、反応を促進する及び／又は反応中に放出される硫化水素を捕獲することができる試薬、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)の存在下でも実施される。

20

【0034】

C) 次に、適切な場合には、式 $-(CHR)_m-$ のもう1つのセグメントを導入できるように、先の段階で得たイソチオシアネートからチオ尿素単位を生成する。好都合には、任意に保護された、式 $H_2N-(CHR)_m-NH_2$ のジアミンを、その中性形態又は酸性塩の形態で、先の形態で得たイソチオシアネートと反応させる。この反応は、任意に、非求核アミン含有基、例えばトリエチルアミン、エチルジイソプロピルアミン、トリイソプロピルアミン又は1, 8-ジアザビシクロ[5. 4. 0]ウンデクーフーエン(DBU)の存在下で実施する。その手順は、好ましくは、ジクロロメタン、クロロホルム、テトラヒドロフラン又は他の適合性のエーテル又は溶媒のような適切な溶媒中、冷却混合物の温度から溶媒の還流温度までの間でありうる温度で実施する。

30

【0035】

所望単位をnコピー数分導入できるように、所望構造が得られるまで連続的に必要なだけ上述した段階B)及びC)を反復する。分枝構造を得るには、前記の手順を、適切な時点で、式(I I)で述べた置換基Rを得るために必要な分子を導入することによって同様に実施する。

【0036】

4) 置換基Xを導入することによるポリチオ尿素部分の末端

ポリチオ尿素型の鎖の末端を生成する最後の段階は、置換基Xを導入することである。そのために、置換基Xの性質に従って選択される、当業者に既知である従来の連結方法を使用する。例えば、Xがアルキルを表わすときは、必要であれば、例えばトリエチルアミン、エチルジイソプロピルアミン、トリイソプロピルアミン又は1, 8-ジアザビシクロ[5. 4. 0]ウンデクーフーエン(DBU)のような非求核アミン含有塩基の存在下で、アルキルイソチオシアネートを反応させることによって手順を実施する。その反応は、適切な溶媒中、例えばジクロロメタン、クロロホルム、テトラヒドロフラン又は他の適合性エーテル中、冷却混合物の温度から溶媒の還流温度までの温度で実施する。

40

【0037】

50

当然ながら、様々な置換基が反応に干渉しうるときには、分子の残りの部分に影響を及ぼすことなく配置し、除去することができる適合性の基であらかじめ保護することが好ましい。そのために、当業者に既知の従来の方法に従って、特に T. W. Greene, 有機合成における保護基 (Protective Groups in Organic Synthesis), Wiley-Interscience, McOmie, 有機化学における保護基 (Protective Groups in Organic Chemistry), Plenum Press、又は P. J. Kocienski, 保護基 (Protecting Groups), Thieme の中で述べられている方法に従って、手順を実施する。

【0038】

10

さらに、製造方法の各々の段階のあとに、適切な場合には、当業者に既知の何らかの方法に従って得た化合物を分離し、精製するための段階を実施してもよい。

【0039】

本発明による好ましい化合物は：

ここでは DTU 又は DT-3TU と称する、 $3 - (2 - \{3 - [2 - (3 - \{2 - [3 - (\text{ジテトラデシルカルバモイル}) \text{プロピオニルアミノ}] \text{エチル}\} \text{チオウレイド}) \text{エチル}] \text{チオウレイド}\} \text{エチル}) - 1 - \text{メチルチオ尿素}$ は、一般式 (I) [式中、 $X = -CH_3$; $m = 2$; $R = H$; $n = 3$; $l = 0$; $Y = NH-CO-CH_2-CH_2$; 及び $L = -N(R_1)R_2$ [式中、 $R_1 = R_2 = C_{14}H_{29}$] である] に対応する。この化合物の DT-3TU という名称は、その中に含まれる 3 個のチオ尿素基を指す；さらに、この命名法の例は、4 個のチオ尿素を含む DT-4TU、2 個のチオ尿素を含む DT-2TU 等々を含む。

20

【0040】

$3 - (2 - \{3 - [2 - (3 - \{2 - [3 - (2 - \{3 - [\text{ジテトラデシルカルバモイル}] \text{プロピオニルアミノ}\} - \text{エチル}) - \text{チオウレイド}] - \text{エチル}\} - \text{チオウレイド}) - \text{エチル}] \text{チオウレイド}\} - \text{エチル}) - 1 - \text{メチルチオ尿素}$ 又は DT-4TU は、一般式 (I) [式中、 $X = -CH_3$; $m = 2$; $R = H$; $n = 4$; $l = 0$; $Y = NH-CO-CH_2-CH_2$; 及び $L = -N(R_1)R_2$ [式中、 $R_1 = R_2 = C_{14}H_{29}$] である] に一致する。

【0041】

30

DT-3TU ジオール又は $[2 - (3 - \{2 - [3 - (2 - \{3 - [2 - (3 - (\text{ジテトラデシルカルバモイル}) \text{プロピオニルアミノ}) - \text{エチル}] - \text{チオウレイド}\} - \text{エチル}) - \text{チオウレイド}] - \text{エチル}\} - \text{チオウレイド}) - \text{エチル}] - \text{プロパン}-1, 2\text{-ジオール}$ の合成は、一般式 (I) [式中、

【0042】

【化6】



40

$$m = 2$$

$$R = H$$

$$n = 3$$

$$l = 0$$

$$Y = \text{NH-CO-CH}_2\text{-CH}_2 ; \text{ and}$$

$$L = -\text{N}(\text{R}_1)\text{R}_2 , \text{ ここで } \text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{C}_{14}\text{H}_{29}$$

10

に従う。

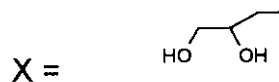
【0043】

D T - 2 T U ジオール又は [2 - (3 - { 2 - [3 - (ジテトラデシルカルバモイル) プロピオニルアミノ] - エチル } - チオウレイド) - エチル] - プロパン - 1 , 2 - ジオールは、一般式 (I) [式中、

【0044】

【化7】

20



$$m = 2$$

$$R = H$$

$$n = 2$$

$$l = 0$$

30

$$Y = \text{NH-CO-CH}_2\text{-CH}_2 ; \text{ and}$$

$$L = -\text{N}(\text{R}_1)\text{R}_2 , \text{ ここで } \text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{C}_{14}\text{H}_{29}$$

に一致する。

【0045】

本発明のもう1つの対象は、本発明によるトランスジェニック化合物と核酸を含有する組成物に関する。各々の成分のそれぞれの量は、使用するトランスフェクション化合物、核酸及び所望適用（特にトランスフェクトする細胞型）に応じて、当業者によって容易に調整されうる。

40

【0046】

本発明のために、「核酸」の表現は、デオキシリボ核酸及びリボ核酸の両方を意味すると理解される。それらは、天然又は人工配列、特にゲノムDNA (gDNA)、相補的DNA (cDNA)、メッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA (tRNA)、リボソームRNA (rRNA)、DNA/RNAキメラプラスト又は合成又は半合成配列のようなハイブリッド配列、及び修飾された又は修飾されていないオリゴヌクレオチドでありうる。これらの核酸は、ヒト、動物、植物、細菌又はウイルス由来等でありうる。それらは、当業者に既知の何らかの手法によって、特にライブラリーのスクリーニングによって、化学合成によって、又はライブラリーのスクリーニングによって得た配列の化学修飾又は酵素的修飾を含む混合方法によって入手しうる。それらは化学修飾されてい

50

てもよい。一般に、それらは少なくとも10、20、50又は100個の連続ヌクレオチド、好ましくは少なくとも200個の連続ヌクレオチドを含む。さらに一層好ましくは、それらは少なくとも500個の連続ヌクレオチドを含む。

【0047】

より特定のデオキシリボ核酸に関して、それらは一本鎖又は二本鎖のいずれでもよく、ならびに短いオリゴヌクレオチド又はより長い配列のいずれでもよい。特に、該核酸は、好都合にはプラスミド、ベクター、エピソーム、発現カセット等から成る。これらのデオキシリボ核酸は、標的細胞において機能性であるか又はそうでない原核生物又は真核生物複製基点、1個又はそれ以上のマーカー遺伝子、転写又は複製を調節するための配列、治療的重要性を持つ遺伝子、修飾されている又は修飾されていないアンチセンス配列、他の細胞成分に結合するための領域等を担いうる。

10

【0048】

好ましくは、該核酸は、調節配列の制御下の1個又はそれ以上の治療的重要性を持つ遺伝子、例えば1個又はそれ以上のプロモーター及び標的細胞において活性な転写終結信号を含む。

【0049】

本発明のために、治療的重要性を持つ遺伝子の表現は、特に治療作用を有するタンパク質産物をコードする遺伝子を意味すると理解される。そのようにコードされるタンパク質産物は、特にタンパク質又はペプチドでありうる。このタンパク質産物は、標的細胞に関して外来性、相同性又は内因性でありうる、すなわち標的細胞が病的状態を有していないとき、標的細胞において正常に発現される産物でありうる。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又は修飾のために不活性であるか又は活性が低いタンパク質の発現を補うこと、若しくは前記タンパク質を過剰発現することを可能にする。治療的重要性を有する遺伝子はまた、高い安定性、変化した活性等を有する、細胞タンパク質の突然変異体をコードしうる。前記タンパク質産物はまた、標的細胞に関して非相同でもよい。この場合、発現されるタンパク質は、例えば、細胞において欠損している活性を補足するか又は提供して、細胞が病的状態に対抗することを可能にするか、若しくは免疫応答を刺激しうる。

20

【0050】

本発明のための治療的生成物の中で、より特定すると、酵素、血液誘導体、ホルモン、リンホカイン及びサイトカインならびにそれらの阻害因子又は拮抗物質：インターロイキン、インターフェロン、TNF、インターロイキン1の拮抗物質、インターロイキン1又はTNF α の可溶性受容体等（FR92/03120号）、成長因子、神経伝達物質又はそれらの前駆体又は合成酵素、栄養因子（BDNF、CNTF、NGF、IGF、GMF、aFGF、bFGF、NT3、NT5、HARP/プレイオトロフィン等）、アポリポタンパク質（ApoA1、ApoAIV、ApoE等、FR93/05125号）、ジストロフィン又はミニジストロフィン（FR91/11947号）、嚢胞性線維症に関連するCFTRタンパク質、癌抑制遺伝子（p53、Rb、RaplA、DCC、k-rv等、FR93/04745号）、凝固に関わる因子（第VII、VIIII、IX因子）をコードする遺伝子、DNA修復に関わる遺伝子、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担体に関する遺伝子、代謝酵素、異化酵素等が挙げられよう。

30

40

【0051】

治療的重要性を持つ核酸はまた、標的細胞におけるその発現が遺伝子の発現又は細胞mRNAの転写を制御することを可能にする、遺伝子又はアンチセンス配列又はリボソーム機能を有するRNAをコードするDNAでありうる。そのような配列は、例えば、欧州特許欧州特許第140308号に述べられている手法に従って、標的細胞内で細胞mRNAに相補的なRNAに転写されて、それらがタンパク質へと翻訳されるのを遮断することができる。治療遺伝子はまた、標的RNAを選択的に破壊することができるリボザイムをコードする配列を含む（欧州特許第321201号）。

50

【0052】

上述したように、該核酸はまた、ヒト又は動物において免疫応答を生じることができる抗原性ペプチドをコードする1個又はそれ以上の遺伝子を含みうる。この特定実施形態において、本発明は、ワクチンの生産又は、特に感染、例えばウイルス又は細菌感染、若しくは癌状態を治療する又は予防するために、ヒト又は動物に適用される免疫療法処置の実施を可能にする。それらは特に、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（欧州特許第185573号）、仮性狂犬病ウイルス、シンシチウム（合胞体）形成ウイルス、他のウイルスに特異的な抗原性ペプチド、又は腫瘍に特異的な抗原性ペプチド（欧州特許第259212号）でありうる。

【0053】

好ましくは、該核酸はまた、所望細胞又は器官において、治療的重要性を持つ遺伝子及び／又は抗原性ペプチドをコードする遺伝子の発現を可能にする配列を含む。それらは本来、これらの配列が感染細胞において機能することができるとき、考慮される遺伝子の発現の責任を担う配列でありうる。それらはまた、異なる由来の（他のタンパク質の発現の責任を担う、又はさらには合成の）配列でありうる。特に、それらは真核生物又はウイルス遺伝子のプロモーター配列でありうる。例えば、それらは、感染を所望する細胞のゲノムから誘導されるプロモーター配列でありうる。同様に、それらはウイルスのゲノムから誘導されるプロモーター配列でありうる。これに関しては、例えば、E1A、MLP、CMV及びRSV遺伝子のプロモーター等が挙げられるであろう。さらに、これらの発現配列は、活性化配列又は調節配列の付加等によって修飾されうる。そのプロモーターはまた、誘導的又は抑制的でありうる。

【0054】

さらに、該核酸はまた、特に治療的重要性を持つ遺伝子の5'に、標的細胞の分泌経路において治療的生成物の合成を指令するシグナル配列を含みうる。このシグナル配列は、治療的生成物の天然シグナル配列でありうるが、他の何らかの機能的シグナル配列又は人工シグナル配列であってもよい。該核酸はまた、合成された治療的生成物を細胞の特定画分へと指令するシグナル配列も含みうる。

【0055】

本発明による組成物は、さらに、トランスフェクション化合物／核酸複合体と組み合わせて、そのトランスフェクション力を改善することができる1つ又はそれ以上のアジュバントを含有しうる。もう1つの実施形態では、本発明はそれ故、核酸、上記で定義したトランスフェクション化合物、及びトランスフェクション化合物／核酸複合体と組み合わせてそのトランスフェクション力を改善することができる少なくとも1つのアジュバントを含有する組成物に関する。この種のアジュバント（例えば脂質、ペプチド、タンパク質又はポリマー）の存在は、好都合にも、前記化合物のトランスフェクション力を高めることを可能にしうる。これに関して、本発明の組成物は、アジュバントとして、特に脂質凝集物を形成する特性を有する1つ又はそれ以上の中性脂質を含有しうる。「脂質凝集物」の語は、あらゆる種類のリポソーム（単層及び多重膜の両方）ならびにミセル又はより無定形の凝集物を包含する総称名である。

【0056】

より好ましくは、本発明の枠内で使用する中性脂質は、2つの脂肪鎖を含む脂質である。特に好都合には、生理的条件下で両性イオン性であるか又はイオン電荷を持たない天然又は合成脂質を使用する。それらは、より特定すると、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）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリスチルホスファチジルエタノールアミンならびに1回から3回N-メチル化されているそれらの誘導體、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（特にガラクトセレブロシドなど）、スフィンゴ脂質（特にスフィンゴミエリンなど）、又はアシアロガングリオシド（特にアシアロGM1及びGM2など）から選択されうる。好都合には、本

発明に関して使用する脂質アジュバントは、D O P E、D O P C又はコレステロールから選択される。

【0057】

これらの様々な脂質は、当業者に周知の従来の手法により、合成によって若しくは器官（例えば脳）又は卵からの抽出によって、入手しうる。特に、天然脂質の抽出は有機溶媒によって実施しうる（Lehninger, Biochemistryも参照のこと）。

【0058】

好ましくは、本発明の組成物は、モル／モルで核酸1当量につき0.01当量から20当量のアジュバント、より好ましくは0.5モル当量から5モル当量を含有する。

【0059】

もう1つの選択法に従えば、本発明による組成物のトランスフェクション力を改善することを可能にする上述したアジュバント、特にペプチド、タンパク質又はポリエチレングリコールのようなある種のポリマーは、本発明によるトランスフェクション化合物と、単に混合するのではなく複合してもよい。この場合、それらは、一般式（I）における置換基Xに、又はアルキル鎖が脂肪族鎖であるときにはアルキル鎖 R_1 及び／又は R_2 の末端に、共有結合される。また、コレステロールに共有結合したポリエチレングリコール（chole-PEG）をアジュバントとして使用することも好都合である。実際に、そのようなアジュバントを本発明によるトランスフェクション組成物と共に使用するとき、生じる粒子はより小さなサイズを有しており、それによってそれらの凝集を低下させ、血液循環におけるそれらの半減期を上昇させる。本発明により使用するトランスフェクタントDT-3TUの量は、粒子が500nm未満の大きさを有するような量である。使用するDT-3TUの好ましい量は、少なくとも40nmolの脂質DT-3TU/ μ gDNAに等しい（下記の実施例11、13及び14参照）。

【0060】

特に好都合な実施形態によれば、本発明の組成物は、さらに、核酸の導入を方向づけることを可能にする標的エレメントを含む。この標的エレメントは、核酸の導入をある種の細胞型又はある種の所望組織（腫瘍細胞、肝細胞、造血細胞等）へと方向づけることを可能にする細胞外標的エレメントでありうる。それはまた、核酸の導入をある種の好ましい細胞画分（ミトコンドリア、核等）へと方向づけることを可能にする細胞内標的エレメントでありうる。標的エレメントは、本発明によるトランスフェクション化合物及び核酸と混合してもよく、この場合、標的エレメントは、好ましくは脂肪アルキル鎖（少なくとも10個の炭素原子）又はポリエチレングリコールに共有結合する。もう1つの選択法に従えば、標的エレメントは、置換基X又はスペーサーYのレベルで、若しくは R_1 及び／又は R_2 が脂肪族鎖を表わすときは R_1 及び／又は R_2 の末端で、本発明によるトランスフェクション化合物に共有結合する。最後に、標的エレメントはまた、上記で規定したとおりである核酸に結合しうる。

【0061】

本発明の枠内で使用しうる標的エレメントの中でも特に、糖、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、脂質、神経伝達物質、ホルモン、ビタミン又はそれらの誘導体が挙げられるであろう。好ましくは、それらは、糖、ペプチド、ビタミン、又は例えば抗体又は抗体フラグメント、細胞受容体のリガンド又はそのフラグメント、受容体又は受容体フラグメントなどのタンパク質である。例えば、それらは、成長因子受容体のリガンド、サイトカイン受容体、細胞レクチン型受容体、葉酸塩受容体、又はインテグリンのような接着タンパク質についての受容体に親和性を有するRGD配列含有リガンドでありうる。また、トランスフェリン、HDL及びLDLについての受容体、又は葉酸輸送体も挙げられよう。標的エレメントはまた、シアリルルイスX、又は選択的に抗体のFabフラグメント、又は一本鎖抗体（ScFv）などの、アシアロ糖タンパク質又はシアリドについての受容体のようなレクチンを標的することを可能にする糖でありうる。

【0062】

本発明の対象はまた、インビトロ、インビボ又は半ビボで核酸を細胞に導入するための

10

20

30

40

50

、上記で定義したトランスフェクション化合物の使用である。より正確には、本発明の対象は、疾患、特にタンパク質又は核生成物の欠損から生じる疾患を治療することを意図した薬剤の製造のための、本発明によるトランスフェクション化合物の使用である。前記薬剤に含有されるポリヌクレオチドは、前記タンパク質又は核生成物をコードするか、若しくはインビボ又は半ビボで前記疾患を矯正することができる前記核生成物を構成する。

【0063】

インビボでの使用のために、例えば治療において、若しくは遺伝子の調節又は病的状態の動物モデルの創造を検討するために、本発明による組成物は、局所、皮膚、経口、直腸、膣、非経口、鼻内、静脈内、筋肉内、皮下、眼内、経皮、気管内又は腹腔内経路等による投与用に製剤することができる。好ましくは、本発明の組成物は、注射用製剤、特に所望器官への直接注射のため、又は局所経路（皮膚及び／又は粘膜上）による投与のための、医薬適合性の賦形剤を含有する。それらは特に等張無菌溶液、又は、場合によって、無菌水又は生理食塩水を添加して注射用溶液に還元することができる乾燥組成物、特に凍結乾燥組成物でありうる。注射のために使用する核酸の用量ならびに投与回数は、様々なパラメータに従って、特に使用する投与様式、該当する病的状態、発現される遺伝子、又は所望治療期間に従って、適合させうる。より特定して投与様式に関しては、組織内への、例えば腫瘍のレベルでの直接注射、又は循環系への注入、又は培養細胞の処理とそれに続く注入又は移植によるインビボでのそれらの再移植のいずれかでありうる。本発明の枠内での該当組織は、例えば、筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、膀胱、胃、腸、精巣、卵巣、直腸、神経系、眼、腺、結合組織等である。

【0064】

本発明のもう1つの対象は、次の段階：

(1) 該核酸を本発明によるトランスフェクション化合物と接触させて複合体を形成すること；及び

(2) 該細胞を(1)で形成された複合体と接触させることを含む、核酸を細胞に導入する方法に関する。

【0065】

本発明は、さらに、次の段階：

(1) 該核酸を本発明によるトランスフェクション化合物と接触させて複合体を形成すること；及び

(2) ヒト又は動物の身体の細胞を(1)で形成された複合体と接触させることを含む、ヒト又は動物の身体を治療する方法に関する。

【0066】

該細胞は、前記複合体と共に細胞をインキュベートすることによって（インビトロ又は半ビボでの使用のため）、又は前記複合体を器官内に注入することによって（インビボでの使用のため）、複合体と接触させうる。一般に、投与を意図する核酸の量は、例えば治療する又は予防する疾患、核酸の実際の性質、プロモーターの強さ、核酸によって発現される産物の生物活性、個人又は動物の生理状態（体重、年齢等）、投与様式及び製剤の種類のような、数多くの因子に依存する。一般に、前記のインキュベーションは、好ましくは、例えば 10^6 細胞につき $0.01\mu\text{g}$ から $1000\mu\text{g}$ の核酸の存在下で実施する。インビボでの投与については、例えば 0.01mg から 50mg の範囲の核酸用量が使用しうる。投与は、単回投与として実施するか又は間隔をおいて反復しうる。

【0067】

本発明の組成物が、さらに、上記で定義した1つ又はそれ以上のアジュバントを含む場合、そのアジュバントは、本発明によるトランスフェクション化合物及び／又は核酸とあらかじめ混合しうる。選択的に、ヌクレオ脂質複合体の投与の前にアジュバントを投与してもよい。

【0068】

もう1つの好都合な選択法に従えば、組織を、トランスフェクションを改善することを

意図した化学的又は物理的処理に供してもよい。物理的処理の場合は、エレクトロトランスファーの場合のような電気パルス、又はソドポレーション (sodoporation) の場合のような機械的力を使用しうる。

【0069】

本発明は、それ故、インビボで核酸を導入するため、特に疾患の治療のための、タンパク質をコードする又は前記疾患を供することができる核酸に転写されうる核酸のインビボ又はインビトロでの投与を含み、前記核酸が上記で定義した条件下で本発明によるトランスフェクション化合物と結合している、特に好都合な方法を提供する。

【0070】

本発明のトランスフェクション化合物は、一次細胞又は樹立細胞系に核酸を導入するために特に有用である。それらは、分化した形態又は多能性形態（前駆体）の、線維芽細胞、筋肉細胞、神経細胞（ニューロン、神経膠星状細胞、グリア細胞）、肝細胞、造血細胞（リンパ球、CD34、樹状細胞等）、上皮細胞等でありうる。

【0071】

本発明のもう1つの対象はまた、本発明による1つ又はそれ以上のトランスフェクション化合物及び／又はそれらの混合物を含むトランスフェクションキットに関する。そのようなキットは、例えばバイアル又はチューブのような様々な容器を収納するように区画分けされた包装の形態で提供されうる。これらの容器の各々は、個別の又は混合された、トランスフェクションを実施するために必要な様々なエレメント：例えば本発明による1つ又はそれ以上のトランスフェクション化合物、1つ又はそれ以上の核酸、1つ又はそれ以上のアジュバント、細胞等を含む。

【0072】

前記の説明に加えて、本発明はまた、本発明の範囲を限定することなく本発明を例示するものとみなされるべきである、下記の実施例及び図面から生じる他の特徴及び利点も包含する。特に、出願人は、限定を伴わずに、本発明によるトランスフェクション化合物を製造するために使用しうる操作プロトコールならびに反応中間体を提示する。言うまでもなく、このプロトコール又は中間生成物から、これらの同じ化合物に到達するための同様の方法を開発する教示を引き出すことは、当業者の能力の範囲内である。

【0073】

（使用する略語）

EtBr：臭化エチジウム

DCC：ジシクロヘキシルカルボジイミド

DPPC：1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン

DTTU：3-（2-（3-（2-（3-（ジテトラデシルカルバモイル）プロピオニルアミノ）エチル）チオウレイド）エチル）チオウレイド）エチル）-1-メチルチオ尿素（DT-3TUとも称する）

EPC：L- α -ホスファチジルコリン95%（卵）

PyBOP：ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート

TBE：トリス-ボレート-EDTA

TFA：トリフルオロ酢酸

THF：テトラヒドロフラン

本発明を下記の非制限的实施例によって例示する。

【0074】

（実施例）

トリエチルアミン、トリフルオロ酢酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（PyBOP）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、二硫化炭素、テトラデシルアミン、ジ-tert-ブチルジカルボネート、4-ジメチルアミノピリジン、又はジイソプロピルエチルアミンなどの慣用試薬及び触媒は、市販のものを入手した。

【0075】

プロトン核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトルは、Bruker 300、400及び600MHz分光計で記録した。化学的変化はppm (parts per million、百万分量単位中の絶対数) で表わし、重複する用語は慣用略語で表わした。

【0076】

下記の文中で、使用した核酸は、サイトメガロウイルスCMV E/Pプロモーターの制御下のルシフェラーゼをコードするluc遺伝子を含む、出版物「遺伝子治療 (Gene Therapy)」(1999)、1482-1488ページに述べられているプラスミドpXL3031であった。このプラスミドは図7に示されている。その大きさは3671塩基対である。使用したプラスミド溶液は、注射用に水中で1.262g/lに希釈した。

10

【実施例1】

【0077】

DT-3TUの合成

ここではDTTU又はDT-3TUと称する、3-(2-{3-[2-(3-{2-[3-(ジテトラデシルカルバモイル)プロピオニルアミノ]エチル}チオウレイド)エチル]チオウレイド}エチル)-1-メチルチオ尿素は、一般式(I) [式中、X=-CH₃; m=2; R=H; n=3; l=0; Y=NH-CO-CH₂-CH₂; 及びL=-N(R₁)R₂又はR₁=R₂=C₁₄H₂₉]に対応する。

【0078】

20

a) ジテトラデシルアミド(1)の合成

テトラデカン酸(30g)131.6mmol及びテトラデシルアミン(30g)140.8mmolを、乾燥剤(P₂O₅)の入った捕集フラスコに接続された磁気攪拌機を備える丸底フラスコ中で混合した。次のその反応混合物を減圧下で(50mmHg)170℃に4時間加熱した。その粗物質をTHF(700ml; 可溶化を助けるためにわずかに加熱した)に可溶化し、その後過剰のアミンに結合するために4当量のAmberlyst-15樹脂(8g)を加えた。20分間攪拌したあと、その溶液をろ過し、ろ液を濃縮して白色固体55.11gを得た(収率: 99%)。

【0079】

【化8】

30

^1H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 0.88 (t, 6H, J=6.5 Hz, -CH₃), 1.25 (m, 42 H, -CH₂-), 1.47 (m, 2H, CO-CH₂-CH₂), 1.60 (m, 2H, N-CH₂-CH₂), 2.15 (t, 2H, J=7.5 Hz, CO-CH₂), 3.23 (dt, 2H, J=7 Hz, N-CH₂), 5.50 (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 14.09 (C₁₄+C'₁₃), 22.71 (C₁₃+C'₁₂), 25.90 (C'₂), 26.99 (C₃), 29.69 (-CH₂-), 31.96 (C₁₂+C'₁₁), 36.97 (C'₁), 39.56 (C₁), 160 (CO).

40

【0080】

b) ジテトラデシルアミン(2)の合成

ジテトラデシルアミド(20g)47mmolを、冷却機と乾燥管を備えた丸底フラスコ中で、窒素下に、無水THF700mlに溶解した。その混合物を0℃に冷却し、その後水素化アルミニウムリチウムLiAlH₄(3.4g)89mmolを加えた。添加後、その混合物を、強く攪拌しながら還流下で5時間加熱した。ひとたび反応が完了すれば、水3.4ml、1N水酸化ナトリウム6.8ml及び水3.4mlを連続的に加えることによって加水分解を実施するために、前記混合物を0℃に冷却した。室温で1時間攪拌した後、粗反応物質をプフナー漏斗でろ過し、ろ液を濃縮した。得られた生成物を、次

50

に、攪拌しながら30分間、THF 300 ml 中1.5当量のA-15樹脂(15 g)で精製した。その樹脂をろ過し、THF 300 ml に再溶解して、2当量のトリエチルアミン(19.2 ml)を加えた。30分間攪拌したあと、その溶液をろ過し、ろ液を濃縮して、白色固体17.72 gを得た(収率: 92%)。

【0081】

【化9】

$^1\text{H NMR (CDCl}_3\text{)}$: δ (ppm) 0.87 (t, 6H, $J=6.5$ Hz, $-\text{CH}_3$), 1.25 (m, 44 H, $-\text{CH}_2-$), 1.46 (m, 4H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.58 (t, 4H, $J=7$ Hz, N-CH_2).

10

$^{13}\text{C NMR (CDCl}_3\text{)}$: δ (ppm) 14.06 (C_{14}), 22.69 (C_{13}), 27.48 (C_3), 28.29 (C_2), 29.69 ($\text{C}_4\text{-C}_{11}$), 31.96 (C_{12}), 50.15 (C_1).

【0082】

c) N, N-ジテトラデシルスクシンアミド酸(3)の合成

無水コハク酸(1.266 g) 12.65 mmol、4-ジメチルアミノピリジン(1.546 g) 12.65 mmol 及びジテトラデシルアミン(4.407 g) 10.75 mmol を、丸底フラスコ中のジクロロメタン125 ml に連続的に添加した。その反応混合物を室温で18時間攪拌した。ひとたび反応が完了すれば、その混合物をジクロロメタンと塩酸(1N)で抽出した。次にその有機相をブラインで洗い、硫酸マグネシウムで乾燥して、ろ過し、濃縮して、生成物(3) 4.21 gを得た(収率: 66%)。

20

【0083】

【化10】

$^1\text{H NMR (CDCl}_3\text{)}$: δ (ppm) 0.85 (t, 6H, $J=6.3$ Hz, $-\text{CH}_3$), 1.23 (m, 44 H, $-\text{CH}_2-$), 1.48 (m, 4H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.64 (s, 4H, $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 3.22 (m, 4H, N-CH_2).

$^{13}\text{C NMR (CDCl}_3\text{)}$: δ (ppm) 14.08 (C_{14}), 22.69 (C_{13}), 27.74 (C_3), 28.10 ($\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 28.92 (C_2), 29.67 ($\text{C}_4\text{-C}_{11}$), 30.07 ($\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 31.95 (C_{12}), 46.21 and 47.98 (C_1), 4171.46 ($\text{CO-NHH(C}_{14}\text{H}_{29})_2$), 173.14 (NH-CO).

30

【0084】

d) 2-アミノエチルカルバミン酸のtert-ブチルエステル(4)の合成

ジ-tert-ブチルジカルボネート(4 g) 18.6 mmol を、窒素下で、クロロホルム(20 ml)中のエチレンジアミン(6.17 g) 102.83 mmol の溶液に滴下した。次にその反応混合物を室温で18時間攪拌した。ひとたび反応が完了すれば、その溶液を濃縮した。生じた油をジクロロメタンに溶解し、飽和炭酸ナトリウム水溶液で洗った。次のその有機相を硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過して、濃縮した。その粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー(ジクロロメタン/メタノール9:1)によって精製し、生成物(4) 2.38 gを得た(収率: 80%)。

40

【0085】

【化 1 1】

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 1.40 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.52 (s, 2H, NH₂), 2.59 (t, 2H, J=5.9 Hz, N-CH₂), 3.12 (q, 2H, ⁴J=5.4 Hz, NHBoc-CH₂), 5.1 (s, 1H, NHBoc)

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 28.15 (CH₃)₃, 41.67 (CH₂-NHBoc), 43.46 (CH₂-NH₂), 78.31 (C-(CH₃)₃), 156.21 (C=O).

【0086】

10

e) 2- [3- (ジテトラデシルカルバモイル) プロピオニルアミノ] エチルカルバミン酸の tert-ブチルエステル (5) の合成

PyBOP (4.601 g) 8.84 mmol、前の段階で得たアミン (4) (1.558 g) 9.72 mmol 及びジイソプロピルエチルアミン (4.24 ml) 24.31 mmol を、ジクロロメタン 88 ml 中の上記で得た酸 (3) (4.5 g) 8.84 mmol の溶液に連続的に添加した。次にその溶液を室温で 4 時間攪拌した。反応終了時に、その反応混合物をろ過し、その生成物をフラッシュクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル 5 : 5 及びその後ヘプタン/酢酸エチル 2 : 8) によって精製した。このようにして該エステル (5) 3.79 g を得た (収率 : 66%)。

【0087】

20

【化 1 2】

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 0.87 (t, 6H, J=6.6 Hz, -CH₃), 1.25 (m, 44H, -CH₂-), 1.43 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.48 (m, 4H, N-CH₂-CH₂), 2.56 (t, 2H, J=6.7 Hz, CH₂3), 2.69 (t, 2H, J=6.2 Hz, CH₂4), 3.28 (m, 4H, N-CH₂), 3.3 (m, 4H, CH₂1 + CH₂2).

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 14.07 (C''₁₄), 22.56 (C''₁₃), 26.99 ((CH₃)₃), 27.73 (C''₃), 28.29 (C'₂), 28.59 (C''₂), 29.27 (C''₄-C''₁₁), 29.55 (C'₃), 31.41 (C''₁₂), 39.85 (C₂), 40.39 (C₁), 46.21 and 47.98 (C''₁), 78.77 (C(IV)-Boc), 156.33 (CO-Boc), 171.46 (CO-NH(C₁₄H₂₉)₂), 173.14 (C'₁).

30

【0088】

f) 2- [3- (ジテトラデシルカルバモイル) プロピオニルアミノ] エチルアミン (6) の合成

蒸留した TFA (0.94 ml) 12.2 mmol を、前の段階で得たエステル (5) (1.59 g) 2.44 ml に加えた。2 時間後、反応が完了した。その生成物を、低温状態で回転蒸発器においてシクロヘキサンと共に 2 回同時蒸発させた。その収率は定量的であった。

40

【0089】

【化 1 3】

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 0.91 (t, 6H, *J*=6.6 Hz, -CH₃), 1.29 (m, 44H, -CH₂-), 1.51 (m, 4H, N-CH₂-CH₂), 2.59 (t, 2H, *J*=6.7 Hz, H'₃), 2.71 (t, 2H, *J*=6.2 Hz, H'₃), 3.29 (m, 4H, N-CH₂), 3.31 (m, 4H, H₁, H₂).

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 14.00 (C''₁₄), 22.67 (C'₁₃), 27.35 (C'₃), 27.95 (C'₂), 28.53 (C₂), 29.65 (C''₄-C''₁₁), 30.70 (C'₃), 31.94 (C''₁₂), 37.83 (C₂), 40.08 (C₂), 47.85 and 49.42 (C''₁), 171.72 (CO-NH(C₁₄H₂₉)₂), 173.26 (C'₁).

10

【0090】

g) ((1, 1-ジメチルエトキシカルボニル) アミノ) エチルイソチオシアネート (7) の合成

DCC (9.015 g) 43.69 mmol、THF 27.5 ml 中の二硫化炭素 (17.9 ml) 297.9 mmol を連続的に丸底フラスコに加えた。その混合物を氷と塩化アンモニウム NH₄Cl (4/1) の浴で -7 °C に冷却した。次に、無水 THF 20.5 ml に溶解した、上記で得たアミン (4) (7 g) 43.69 mmol を 30 分間かけて滴下した。その混合物を室温に戻し、その混合物を 21 時間攪拌し続けた。蒸発後、ジエチルエーテルを加え、形成されたジシクロヘキシル尿素を沈殿させた。その溶液をろ過し、ろ液を濃縮して、その後フラッシュクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル 80 : 20) によって精製し、所望生成物 (7) 6.357 g を得た (収率: 72%)。

20

【0091】

【化 1 4】

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 1.38 (s, 9H, (CH₃)₃), 3.31 (q, 2H, ⁴*J*=5.8 Hz, NHBoc-CH₂), 3.59 (t, 2H, *J*=5.6 Hz, S=C=N-CH₂), 5.16 (s, 1H, NHBoc)

30

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 28.54 ((CH₃)₃), 41.03 (CH₂)-NHBoc), 45.53 (CH₂-N=C=S), 79.71 (C-(CH₃)₃), 132.72 (C=S), 156.21 (C=O).

【0092】

h) 2- (3- {2- [3- (ジテトラデシルカルバモイル) プロピオニルアミノ] エチル} チオウレイド) エチルカルバミン酸の tert-ブチルエステル (8) の合成

トリエチルアミン (1.36 ml) 9.76 mmol を上記で得たアミン (6) (1.62 g) 2.44 mmol に直接加え、その混合物を 15 分間攪拌し続けた。その後、ジクロロメタン 24.4 ml 及び前の段階で得たイソチオシアネート (7) (0.59 g) 2.92 mmol を加えた。その反応混合物を室温で 12 時間攪拌した。次にその混合物を蒸発させ、フラッシュクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘプタン 6 : 4 及びその後酢酸エチル 100%) によって精製した。このようにして所望エステル (8) 1.343 g を得た (収率: 73%)。

40

【0093】

【化 1 5】

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 0.67 (t, 6H, *J*=6.4 Hz, -CH₃), 1.05 (m, 44 H, -CH₂-), 1.26 (s, 9H, CH₃)₃, 1.35 (m, 4H, N-CH₂-CH₂), 2.31 (m, 2H, H³₃), 2.49 (m, 2H, H³₃), 3.06 (m, 4H, N-CH₂), 3.11 (m, 4H, H₁, H²₂), 3.47 (m, 4H, H₂, H¹₁), 7.14 (2H, Hチオ尿素).

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 13.95 (C⁴₁₄), 22.57 (C⁴₁₃), 26.92 ((CH₃)₃), 27.07 (C⁴₃), 27.78 (C³₂), 28.39 (C⁴₂), 28.82 (C³₃), 29.55 (C⁴₄-C⁴₁₁), 31.83 (C⁴₁₂), 39.45 (C²₂), 43.63 (C₂ and C¹₁), 46.39 and 48.16 (C⁴₁), 79.24 (C(IV)-Boc), 156.53 (CO-Boc), 171.72 (CO-NH(C₁₄H₂₉)₂), 173.71 (C³₁), 182.97 (C=S).

10

【0 0 9 4】

i) 2 - { 3 - { 2 - [3 - (ジテトラデシルカルバモイル) プロピオニルアミノ] エチル } チオウレイド) エチルアミン (9) の合成

蒸留した TFA (0 . 7 6 m l) 9 . 8 6 m m o l を前の段階で得た生成物 (8) (1 . 5 g) 1 . 9 8 m m o l に加えた。3 時間後、反応が完了した。その生成物を、低温状態で回転蒸発器を用いてシクロヘキサンと共に 2 回同時蒸発させた。その収率は定量的であった。

20

【0 0 9 5】

【化 1 6】

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 0.67 (t, 6H, *J*=6.4 Hz, -CH₃), 1.05 (m, 44 H, -CH₂-), 1.26 (s, 9H, CH₃)₃, 1.31 (m, 4H, N-CH₂-CH₂), 2.31 (m, 2H, H³₃), 2.49 (m, 2H, H³₃), 3.06 (m, 4H, N-CH₂), 3.11 (m, 4H, H₁, H²₂), 3.44 (m, 4H, H₂, H¹₁), 7.10, (2H, Hチオ尿素).

30

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 13.85 (C⁴₁₄), 22.49 (C⁴₁₃), 27.01 (C⁴₃), 27.72 (C³₂), 28.29 (C⁴₂), 28.79 (C³₃), 29.49 (C⁴₄-C⁴₁₁), 31.77 (C⁴₁₂), 39.42 (C²₂), 43.75 (C₂ and C¹₁), 46.29 and 48.09 (C⁴₁), 171.72 (CO-NH(C₁₄H₂₉)₂), 173.71 (C³₁), 182.97 (C=S).

【0 0 9 6】

j) 2 - { 3 - [2 - (3 - { 2 - [3 - (ジテトラデシルカルバモイル) プロピオニルアミノ] エチル } - チオウレイド) エチル] チオウレイド } エチルカルバミン酸の t e r t - ブチルエステル (1 0) の合成

40

トリエチルアミン (1 . 1 m l) 7 . 9 2 m m o l を前の段階で得たアミン (9) (1 . 4 7 g) 1 . 9 8 m m o l に直接加え、その混合物を 1 5 分間攪拌し続けた。その後、ジクロロメタン 1 9 . 8 m l 及び上記で得たイソチオシアネート (7) (0 . 4 6 1 g) 2 . 3 8 m m o l を加え、攪拌しながら室温で 1 2 時間反応を進行させた。次にその混合物を蒸発させ、フラッシュクロマトグラフィー (酢酸エチル / ヘプタン 6 : 4 及びその後酢酸エチル / メタノール 9 8 : 2) によって精製した。このようにして所望生成物 (1 0) 1 . 1 3 6 g を得た (収率 : 6 7 %) 。

【0 0 9 7】

50

【化 1 7】

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 0.74 (t, 6H, *J*=6.6 Hz, -CH₃), 1.12 (m, 44 H, -CH₂-), 1.30 (s, 9H, CH₃)₃, 1.45 (m, 4H, N-CH₂-CH₂), 2.41 (m, 2H, H⁵₂), 2.58 (m, 2H, H⁵₂), 3.12 (m, 4H, N-CH₂), 3.25 (m, 4H, H₁, H⁴₂), 3.56 (m, 8H, H₂, H¹₁, H²₂, H⁴₁), 7.14 (4H, Hチオ尿素).

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 14.06 (C⁶₁₄), 22.57 (C⁶₁₃), 27.11 (C⁶₃), 26.93 ((CH₃)₃), 27.79 (C⁵₂), 28.38 (C⁶₂), 28.81 (C⁵₃), 29.56 (C⁶₄-C⁶₁₁), 31.83 (C⁶₁₂), 39.55 (C⁴₂), 43.66 (C₂, C¹₁, C²₂, C⁴₁), 46.49 and 48.23 (C⁶₁), 79.28 (C(IV)-Boc), 156.61 (CO-Boc), 171.96 (CO-NH(C₁₄H₂₉)₂), 173.72 (C⁵₁), 182.93 (C=S).

10

【 0 0 9 8】

k) 2 - { 3 - [2 - (3 - { 2 - [3 - (ジテトラデシルカルバモイル) プロピオニルアミノ] エチル} チオウレイド) エチル] チオウレイド } エチルアミン (1 1) の合成
蒸留した TFA (0 . 4 5 m l) 5 . 8 4 m m o l を前の段階で得た生成物 (1 0) (1 g) 1 . 1 5 m m o l に加えた。3時間後、反応が完了した。その生成物を、低温状態で回転蒸発器においてシクロヘキサンと共に2回同時蒸発させた。その収率は定量的であった。

20

【 0 0 9 9】

【化 1 8】

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 0.85 (t, 6H, *J*=6.6 Hz, -CH₃), 1.25 (m, 40 H, -CH₂-), 1.48 (m, 4H, N-CH₂-CH₂), 1.52 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-CH₂), 2.65 (m, 2H, H⁵₂), 2.77 (m, 2H, H⁵₃), 3.26 (m, 4H, N-CH₂), 3.43 (m, 4H, H₁, H⁴₂), 3.85 (m, 8H, H₂, H¹₁, H²₂, H⁴₁), 7.44 (4H, Hチオ尿素).

30

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 14.05 (C⁶₁₄), 22.68 (C⁶₁₃), 27.05 (C⁶₃), 27.58 (C⁵₂), 28.71 (C⁶₂), 29.36 (C⁵₃), 29.67 (C⁶₄-C⁶₁₁), 31.94 (C⁶₁₂), 40.49 (C⁵₁), 43.49 (C in α of C=S), 47.40 and 49.07 (C⁶₁), 172.16 (CO-NH(C₁₄H₂₉)₂), 174.00 (NH-CO), 182.73 (C=S).

40

【 0 1 0 0】

1) DT-3TU (1 2) の合成

トリエチルアミン (0 . 1 6 m l) 1 . 1 2 m m o l を前の段階で得たアミン (1 1) (0 . 2 4 g) 0 . 2 8 m m o l に直接加え、その混合物を15分間攪拌し続けた。その後、ジクロロメタン 2 . 8 m l 及びメチルイソチオシアネート (0 . 0 2 4 g) 0 . 3 4 m m o l を加え、攪拌しながら室温で12時間反応を進行させた。次にその混合物を蒸発させ、次の勾配：最初は水／メタノール 9 5 : 5 混合物からメタノール 1 0 0 % までで、C₄ カラムでの HPLC (高速液体クロマトグラフィー) によって精製した。得られた生

50

【化 2 1】

¹H NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 0,86 (t, 6H, *J*=6 Hz, H-14'), 1,25 (m, 44 H, H-4'-H-11'), 1,42 (s, 9H, (CH₃)₃), 1,45 (m, 4H, H-2'), 2,55 (m, 2H, H-2), 2,69 (m, 2H, H-3), 3,22 (m, 4H, H-1'), 3,31 (m, 4H, H-5 et H-15), 3,74 (m, 12H, H-6, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14), 7,31 (6H, H チオ尿素).

¹³C NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 14,06 (C-14'), 22,66 (C-13'), 27,21 (C-3'), 27,88 (C-2), 28,50 ((CH₃)₃), 28,87 (C-2'), 29,64 (C-4'-C-11'), 31,27 (C-3), 31,92 (C-12'), 39,639 (C-5), 40,44 (C-13), 43,73 (C-6, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14), 46,64 et 48,38 (C-1'), 79,10 (C-17), 156,63 (C-16), 172,35 (C-1), 174,04 (C-4), 182,65 (C-7, C-10, C-13).

10

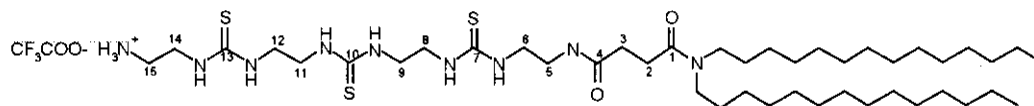
【 0 1 0 7】

b) 2 - (3 - {2 - [3 - (2 - {3 - [2 - (3 - (ジテトラデシルカルバモイル) プロピオニルアミノ) - エチル] - チオウレイド} - エチル) - チオウレイド] - エチル} - チオウレイド) - エチルアミン (14) の合成

20

【 0 1 0 8】

【化 2 2】



蒸留した TFA (0.142 ml, 1.84 mmol) を前の段階で得たアミン boc (13) (0.22 g, 0.23 mmol) に加えた。6 時間後、反応が完了した。その生成物を、低温状態で回転蒸発器を用いてシクロヘキサンと共に 2 回同時蒸発させた。その生成物を一晩デシケター内で水酸化ナトリウム上に置いた。その収率は定量的であった。

30

【 0 1 0 9】

【化 2 3】

$^1\text{H NMR (CDCl}_3\text{)}$: δ (ppm) 0,74 (t, 6H, $J=6,6$ Hz, H-14'), 1,12 (m, 44 H, H-4'-H-11'), 1,45 (m, 4H, H-2'), 2,41 (m, 2H, H-2), 2,58 (m, 2H, H-3), 3,12 (m, 4H, H-1'), 3,25 (m, 4H, H-5 et H-15), 3,56 (m, 12H, H-6, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14), 7,14 (6H, H チオ尿素).

$^{13}\text{C NMR (CDCl}_3\text{)}$: δ (ppm) 14,06 (C-14'), 22,57 (C-13'), 27,11 (C-3'), 27,79 (C-2), 28,38 (C-2'), 28,81 (C-4'-C-11'), 29,56 (C-3), 31,83 (C-12'), 39,55 (C-5, C-9), 43,66 (C-6, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14), 46,49 et 48,23 (C-1'), 171,96 (C-1), 173,72 (C-4), 182,93 (C-7, C-10, C-13).

10

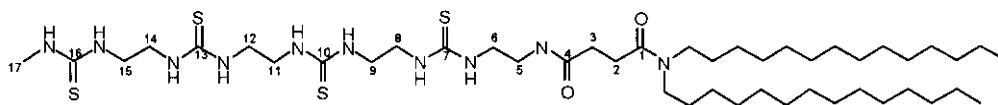
【0 1 1 0】

c) 3 - (2 - {3 - [2 - (3 - {2 - [3 - (2 - {3 - [ジテトラデシルカルバモイル] プロピオニルアミノ} - エチル) - チオウレイド] - エチル} - チオウレイド) - エチル] - チオウレイド} - エチル) - 1 - メチルチオ尿素 (DT-4TU) (15) の合成

20

【0 1 1 1】

【化 2 4】



トリエチルアミン (1.38 mmol, 0.19 ml) を前の段階で得たアミン (14) (0.23 mmol, 0.224 g) に直接加え、その反応混合物を15分間攪拌し続けた。その後、 CH_2Cl_2 (2.3 ml) 及びメチルイソチオシアネート (0.46 mmol, 0.034 g) を加え、その反応混合物を攪拌下に室温で12時間放置した。次にその混合物を蒸発させ、フラッシュクロマトグラフィー (100% 酢酸エチル、次いで酢酸エチル/メタノール 95:5) によって精製した。このようにして DT-4TU 109 mg を得た (収率: 51%)。

【0 1 1 2】

30

【化 2 5】

$^1\text{H NMR (CDCl}_3\text{)} : \delta$ (ppm) 0,88 (t, 6H, $J=6,3\text{Hz}$, H-14'), 1,26 (m, 44 H, H-4'-H-11'),
1,45 1,45 (m, 4H, H-2'), 1,58 (m, 4H, H-3'), 2,57 (m, 2H, H-2), 2,73 (m, 2H, H-3),
3,03 (m, 3H, H-17), 3,23 (m, 4H, H-1'), 3,31 (m, 2H, H-5), 3,73 (m, 14H, H-6, H-8, H-
9, H-11, H-12, H-14, H-15), 7,14 (8H, Hチオ尿素).

$^{13}\text{C NMR (CDCl}_3\text{)} : \delta$ (ppm) 14,09 (C-14'), 22,69 (C-13'), 27,24 (C-3'), 27,89 (C-2),
28,87 (C-2'), 29,38 (C-3), 29,67 (C-4'-C-11'), 31,26 (C-17), 31,94 (C-12'), 39,71 (C-
5), 43,63 (C-6, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14, C-15), 46,67 et 48,40 (C-1'), 172,16 (C-
1), 174,00 (C-4), 182,73 (C-7, C-10, C-13, C-16).

10

【実施例 3】

【0 1 1 3】

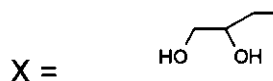
D T-2 T U ジオールの合成

20

D T-2 T U ジオール又は [2 - (3 - { 2 - [3 - (ジテトラデシルカルバモイル)
プロピオニルアミノ] - エチル } - チオウレイド) - エチル] - プロパン-1, 2-ジオ
ールは、一般式 (I) [式中、

【0 1 1 4】

【化 2 6】

 $m = 2$

30

 $R = \text{H}$ $n = 2$ $l = 0;$ $Y = \text{NH-CO-CH}_2\text{-CH}_2;$ $L = -\text{N(R}_1\text{)R}_2$ 、ここで $R_1 = R_2 = \text{C}_{14}\text{H}_{29}$

40

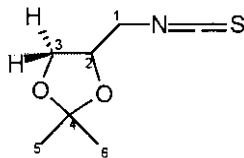
に従って定義される。

【0 1 1 5】

a) 4-イソチオシアナトメチル-2, 2-ジメチル- [1, 3] ジオキサラン (1 6
) の合成

【0 1 1 6】

【化 2 7】



DCC (3.146 g, 15.25 mmol) 及び THF (9.6075 mL) 中の二硫化炭素 (6.253 mL, 104.005 mmol) を連続的に丸底フラスコに加えた。その混合物を、氷 / NH_4Cl (4 : 1) 浴を用いて -7°C に冷却し、無水 THF (7.1675 mL) に溶解した 2, 2-ジメチル-1, 2-ジオキサラン-4-メタンアミン (2 g, 15.25 mmol) を 30 分間かけて滴下した。その反応混合物を室温に戻し、21 時間攪拌し続けた。蒸発後、ジエチルエーテルを加えた。その混合物をろ過し、蒸発させて、クロマトグラフィーによって精製した。

【0117】

【化 2 8】

$^1\text{H NMR (CDCl}_3)$: δ (ppm) 1.33 et 1.44 (s, 3H, H-5, H-6), 3.57 (dd, 1H, $J = 4.8$ Hz, $J = 14.4$ Hz, H-1), 3.69 (dd, 1H, $J = 4.9$ Hz, $J = 14.4$ Hz, H-1'), 3.80 (dd, 1H, $J = 5.4$ Hz et $J = 8.7$ Hz, H-3), 4.09 (dd, 1H, $J = 6.3$ Hz, et $J = 8.7$ Hz, H-3), 4.28 (m, 1H, H-2).

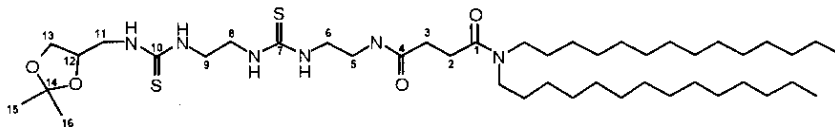
$^{13}\text{C NMR (CDCl}_3)$: δ (ppm) 25.17, 26.77 (C-5, C-6), 47.49 (C-1), 66.55 (C-3), 73.70 (C-2), 110.29 (C-4), 132.76 (N=C=S).

【0118】

b) 2 - { 3 - { 2 - [3 - (ジテトラデシルカルバモイル) プロピオニルアミノ] - エチル } - チオウレイド } - エチル } - 4-イルメチル-2, 2-ジメチル- [1, 3] ジオキサラン (17) の合成

【0119】

【化 2 9】



ジイソプロピルエチルアミン (0.95 mmol, 0.165 mL) を前の段階で得たアミン (9) (0.19 mmol, 0.146 g) に直接加え、その反応混合物を 15 分間攪拌し続けた。その後、 CH_2Cl_2 (1.9 mL) 及びイソチオシアネート (16) (0.209 mmol, 0.027 g) を加え、その反応混合物を攪拌下に室温で 12 時間反応させた。次にその混合物を蒸発させ、100% 水から 100% アセトニトリルまでの勾配で逆相液体クロマトグラフィー C8 によって精製した。49% の収率で生成物 (17) を得た。

【0120】

【化 3 0】

$^1\text{H NMR (CDCl}_3\text{)} : \delta$ (ppm) 0,88 (t, 6H, $J=6,3\text{Hz}$, H-14'), 1,25 (m, 44 H, H-4'-H-11'), 1,34 et 1,43 (s, 3H, H-15, H-16), 1,48 (m, 4H, H-2'), 1,56 (m, 4H, H-3'), 2,52 (m, 2H, H-2), 2,68 (m, 2H, H-3), 3,23 (m, 4H, H-1'), 3,37 (m, 2H, H-5), 3,73 (m, 8H, H-6, H-8, H-9, H-11), 4,05 (m, 2H, H-13), 4,33 (m, 1H, H-12), 7,14 (4H, Hチオ尿素).

$^{13}\text{C NMR (CDCl}_3\text{)} : \delta$ (ppm) 14,06 (C-14'), 22,67 (C-13'), 25,32 (C-3'), 27,00 et 27,17 (C-15, C-16), 27,80 (C-2), 28,56 (C-2'), 28,84 (C-3), 29,66 (C-4'-C-11'), 31,25 (C-17), 31,92 (C-12'), 39,78 (C-5), 43,66 (C-6, C-8, C-9), 44,53 (C-11), 46,73 et 47,13 (C-1'), 66,87 (C-136), 74,62 (C-12), 109,05 (C-14), 172,21 (C-1), 174,14 (C-4), 183,32 (C-7, C-10, C-13, C-16).

10

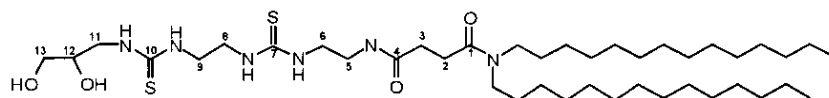
【 0 1 2 1】

20

c) [2 - (3 - {2 - [3 - (ジテトラデシルカルバモイル) プロピオニルアミノ] - エチル} - チオウレイド) - エチル] - プロパン - 1, 2 - ジオール (DT - 2TU ジオール) (18) の合成

【 0 1 2 2】

【化 3 1】



30

保護されたジオール (17) (0.05 g、0.05 mmol) を室温で HCl 1 N / THF (1 / 1) 1 mL に溶解し、その反応混合物を 18 時間攪拌した。次にその反応混合物をジクロロメタン (2 × 5 mL) で抽出し、有機相を一緒に混合して、炭酸水素ナトリウムで中和した。水相をジクロロメタンで抽出した。有機相を硫酸マグネシウムで乾燥し、その後溶媒を蒸発させた。得られた生成物を 100% 水から 100% アセトニトリルまでの勾配で逆相液体クロマトグラフィー C8 によって精製した。49% の収率で生成物 (18) を得た。

【 0 1 2 3】

【化 3 2】

$^1\text{H NMR (CDCl}_3\text{)} : \delta$ (ppm) 0,88 (t, 6H, $J=6,3\text{Hz}$, H-14'), 1,26 (m, 44 H, H-4'-H-11'), 1,43 (m, 4H, H-2'), 1,59 (m, 4H, H-3'), 1,79 (s, 2H, OH), 2,50 (m, 2H, H-2), 2,70 (m, 2H, H-3), 3,24 (m, 4H, H-1'), 3,39 (m, 2H, H-5), 3,72 (m, 6H, H-6, H-8, H-9), 3,9 (m, 2H, H-11), 4,22 (m, 2H, H-13), 4,58 (m, 1H, H-12), 7,14 (4H, Hチオ尿素).

$^{13}\text{C NMR (CDCl}_3\text{)} : \delta$ (ppm) 14,06 (C-14'), 22,67 (C-13'), 25,32 (C-3'), 27,80 (C-2), 28,56 (C-2'), 28,84 (C-3), 29,66 (C-4'-C-11'), 31,25 (C-17), 31,92 (C-12'), 39,78 (C-5), 43,66 (C-6, C-8, C-9), 45,86 (C-11), 46,73 et 47,13 (C-1'), 63,54 (C-13), 70,97 (C-12), 172,21 (C-1), 174,14 (C-4), 183,32 (C-7, C-10).

10

【実施例 4】

【0 1 2 4】

DT-3TUジオールの合成

DT-3TUジオールの合成のために、アミン(11)を出発物質として使用した。

20

【0 1 2 5】

DT-3TUジオール又は {3-[2-(3-{2-[3-(2-{3-[2-(3-(ジテトラデシルカルバモイル)プロピオニルアミノ)-エチル]-チオウレイド}-エチル)-チオウレイド]-エチル]-チオウレイド)-エチル]-プロパン-1,2-ジオールの合成は、一般式(I) [式中、

【0 1 2 6】

【化 3 3】



30

m = 2

R = H

n = 3

l = 0;

40

Y = NH-CO-CH₂-CH₂; andL = -N(R₁)R₂、ここで R₁ = R₂ = C₁₄H₂₉

に従う。

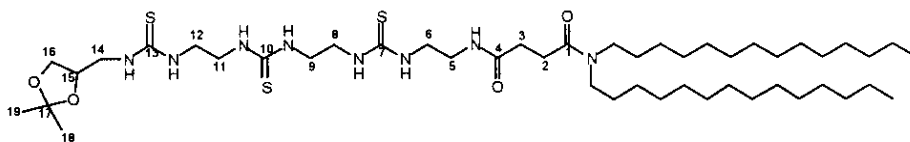
【0 1 2 7】

a) 2-(3-{2-[3-(2-{3-[2-(3-(ジテトラデシルカルバモイル)プロピオニルアミノ)-エチル]-チオウレイド}-エチル)-チオウレイド]-エチル)-チオウレイド)-エチル-4-イルメチル-2,2-ジメチル-[1,3]ジオキサラン(19)の合成

50

【 0 1 2 8 】

【 化 3 4 】



ジイソプロピルエチルアミン（0.95 mmol、0.165 ml）を前の段階で得たアミン（11）（0.19 mmol、0.165 g）に直接加え、その反応混合物を15分間攪拌し続けた。その後、CH₂Cl₂（1.9 ml）及びイソチオシアネート（16）（0.209 mmol、0.027 g）を加え、その反応混合物を攪拌下に室温で12時間反応させた。次にその混合物を蒸発させ、100%水から100%アセトニトリルまでの勾配で逆相液体クロマトグラフィーC8によって精製した。49%の収率で生成物（19）を得た。

【 0 1 2 9 】

【 化 3 5 】

¹H NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 0,88 (t, 6H, J=6,3Hz, H-14'), 1,25 (m, 44 H, H-4'-H-11'), 1,34 et 1,43 (s, 3H, H-18, H-19), 1,48 (m, 4H, H-2'), 1,56 (m, 4H, H-3'), 2,52 (m, 2H, H-2), 2,68 (m, 2H, H-3), 3,23 (m, 4H, H-1'), 3,37 (m, 2H, H-5), 3,73 (m, 12H, H-6, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14), 4,05 (m, 2H, H-16), 4,33 (m, 1H, H-15), 7,14 (6H, H-チオ尿素).

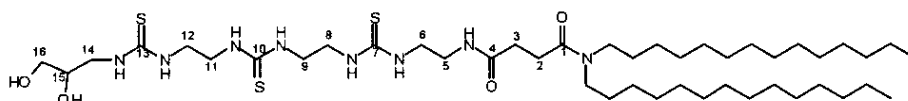
¹³C NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 14,06 (C-14'), 22,67 (C-13'), 25,32 (C-3'), 27,00 et 27,17 (C-18, C-19), 27,80 (C-2), 28,56 (C-2'), 28,84 (C-3), 29,66 (C-4'-C-11'), 31,25 (C-17), 31,92 (C-12'), 39,78 (C-5), 43,66 (C-6, C-8, C-9, C-11), 44,53 (C-14), 46,73 et 47,13 (C-1'), 66,87 (C-16), 74,62 (C-15), 109,05 (C-17), 172,21 (C-1), 174,14 (C-4), 183,32 (C-7, C-10, C-13, C-16).

【 0 1 3 0 】

b) { 3 - [2 - (3 - { 2 - [3 - (2 - { 3 - [2 - (3 - (ジテトラデシルカルバモイル) プロピオニルアミノ) - エチル] - チオウレイド } - エチル) - チオウレイド] - エチル } - チオウレイド) - エチル] - プロパン-1, 2-ジオール (DT-3TU ジオール) (20) の合成

【 0 1 3 1 】

【 化 3 6 】



10

20

30

40

50

保護されたジオール (19) (0.05 g、0.05 mmol) を室温で HCl 1 N / THF (1 / 1) 1 mL に溶解し、その反応混合物を 18 時間攪拌した。次にその反応混合物をジクロロメタン (2 × 5 mL) で抽出し、有機相と一緒に混合して、炭酸水素ナトリウムで中和した。水相をジクロロメタンで抽出した。有機相を硫酸マグネシウムで乾燥し、その後溶媒を蒸発させた。得られた生成物を 100% 水から 100% アセトニトリルまでの勾配で逆相液体クロマトグラフィー C8 によって精製した。55% の収率で生成物 (18) を得た。

【0132】

【化37】

¹H RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 0,88 (t, 6H, J=6,3Hz, H-14'), 1,26 (m, 44 H, H-4'-H-11'), 1,43 (m, 4H, H-2'), 1,59 (m, 4H, H-3'), 1,79 (s, 2H, OH), 2,50 (m, 2H, H-2), 2,70 (m, 2H, H-3), 3,24 (m, 4H, H-1'), 3,39 (m, 2H, H-5), 3,72 (m, 10H, H-6, H-8, H-9, H-11, H-12), 3,9 (m, 2H, H-14), 4,22 (m, 2H, H-16), 4,58 (m, 1H, H-15), 7,14 (6H, H
チオ尿素).

¹³C RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 14,06 (C-14'), 22,67 (C-13'), 25,32 (C-3'), 27,80 (C-2), 28,56 (C-2'), 28,84 (C-3), 29,66 (C-4'-C-11'), 31,25 (C-17), 31,92 (C-12'), 39,78 (C-5), 43,66 (C-6, C-8, C-9, C-11), 44,53 (C-14), 46,73 et 47,13 (C-1'), 63,54 (C-16), 70,97 (C-15), 109,05 (C-17), 172,21 (C-1), 174,14 (C-4), 183,32 (C-7, C-10, C-13, C-16).

【実施例5】

【0133】

DT-3TU の存在下での核酸の緊密化

この実施例の目的は、本発明によるトランスフェクション化合物が核酸と結合する能力を示すことである。

【0134】

これは臭化エチジウムによる蛍光試験によって容易に明らかにすることができる：蛍光が存在しないことは遊離核酸が存在しないことを示唆し、それは核酸がトランスフェクション化合物によって緊密化されたことを意味する。

【0135】

該核酸を、核酸の溶液中での様々な力価の脂質溶液の等容量混合によって、漸増量の DT-3TU (12) と接触させた。0.01 μg/mL の濃度の核酸複合体 800 μl の試料を、漸増量の DT-3TU (12) を含む 150 mM 塩化ナトリウム溶液中で調製した。

【0136】

同様に、該核酸を、核酸の溶液中での様々な力価の脂質溶液の等容量混合によって、漸増量の EPC (図1参照) 又は DPPC (図2参照) と接触させることにより、対照を調製した。このようにして、0.01 μg/mL の濃度の核酸複合体 800 μl の試料を、漸増量の EPC 又は DPPC を含む 150 mM 塩化ナトリウム溶液中で調製した (それぞれ図1及び図2)。

【0137】

臭化エチジウム蛍光を、それぞれ260nmと590nmの励起及び発光波長でFluoromax-2 (Jobin Yvon-Spex) を使用して経時的に測定した(20℃で測定)。励起と発光のためのスリット幅は5nmに設定した。DNA/脂質溶液(0.01mg DNA/ml) 1mlにつき臭化エチジウム(1g/l) 3μlを加えた後、蛍光値を記録した。

【0138】

その結果を図1及び2に要約した。

【0139】

図1において、四角記号の曲線は、固定量の核酸(8μg)に対する漸増量のDT-3TU/EPC脂質混合物(0.75nmolから20nmolのDT-3TU)の添加が、DNAの塩基対の間への臭化エチジウムの挿入の低下に結びつく蛍光の低下を誘導することを示している。これは、DT-3TU/EPCリポソームとDNAの間の結びつきが、その複合体から臭化エチジウムを排除するのに十分なほど強かったことを示唆する。我々はそれ故、90%までの蛍光の排除を得ることができ、これは90%のDNA-DT-3TU/EPC脂質結合であった。この脂質/DNA結合におけるDT-3TU脂質の積極的な役割を示すため、対照を調製した。それは、EPC脂質とDNAの間の相互作用を観察することであり、ダイヤモンド形記号の曲線で表わしている。EPCを、DT-3TU/EPC-DNA複合体の試験で使用したのと同じ条件下でDNAに接触させたとき、蛍光の弱い低下だけが認められ(約5%)、これは混合物の混濁度の上昇によるものと考えられる。この対照は、それ故、上述した実験条件下でEPC単独とDNAの結合が存在しないことを反映している。

【0140】

この実施例は、それ故、核酸に結合するDT-3TU脂質の能力を示している。

【0141】

同様に、図2において、四角記号の曲線は、同一量の臭化エチジウムを様々な試料に加えたとき、固定量の核酸(8μg)に対する漸増量のDT-3TU/DPPC脂質混合物(0.75nmolから20nmolのDT-3TU)の添加が蛍光の低下を誘導することを示している。これは、DT-3TU/DPPCリポソームとDNAの間の結びつきが、その複合体から臭化エチジウムを排除するのに十分なほど強かったことを示唆する。我々はそれ故、90%のDNA-DT-3TU/DPPC結合に当たる、90%までの蛍光の排除を得ることができた。この脂質/DNA結合におけるDT-3TU脂質の積極的な役割を示すため、対照を調製した。それは、DPPC脂質とDNAの間の相互作用を観察することであり、ダイヤモンド形記号の曲線で表わしている。DPPCを、DT-3TU/DPPC-DNA複合体の試験で使用したのと同じ条件下でDNAに接触させたとき、蛍光の弱い低下だけが認められた(約5%)。この対照は、それ故、上述した実験条件下でDPPC単独とDNAの結合が存在しないことを反映している。

【0142】

この実施例は、それ故、DT-3TU脂質の核酸に結合する能力を例示している。

【実施例6】

【0143】

DT-3TU/EPC複合体によるDNAの緊密化

この実施例の目的は、本発明によるトランスフェクション化合物が核酸を緊密化する能力を示すことである。

【0144】

これは、臭化エチジウム(EtBr)を使用して視覚化したDNAのアガロースゲル上での電気泳動遅延試験によって容易に明らかにしうる：ゲル上の核酸の移動が存在しないことは核酸の緊密化を示唆する。遊離核酸については、ゲル上での遅延を生じなかった。

【0145】

DNAに対して漸増量のDT-3TU脂質を含む様々なDNA/DT-3TU試料をアガロースゲル(1N TBE中0.8%アガロース)上に沈着させた。電気泳動によってDN

10

20

30

40

50

Aを移動させるため、そのゲルを1時間半70V及び70mAの電流に供した。バンドをEtBr及び紫外線灯の下での吸収によって明らかにした。その結果を図3に示した。

【0146】

ゲルは、DNAが脂質と結合しなかったときのDNAの電気泳動移動（ウエル1）、及びDNAが脂質と結合したときの保持率の差を示す。ウエル2～6は、漸増量のDTTU/EPCリポソーム：0.75、次いで5、次いで10、次いで15及び最後に20nmolのDTTU脂質と結合したDNA（0.01g/l）を示す。ウエル1と他のウエルとの比較は、DT-3TU脂質の量が高いほど、より多くのDNAがゲル上に保持され、複合体の凝集の範囲である3nmolのDTTU/μgDNAからは全面的に遅滞した。ウエル8～13はそれぞれ、DNA単独（0.1g/l、ゲルについて1μg）、脂質/DNA比：0.75又は5又は10又は15の、0.1g/l DNAの濃度で形成されるリポプレックス及び最後に20nmol/μgDNAに対応する。同様に、インビボ実験と適合性であるDNAのこの濃度では、5nmol脂質/μgDNAの割合からDNAが緊密化された。

10

【0147】

この実施例は、それ故、DT-3TU脂質の核酸を緊密化する能力を示している。

【実施例7】

【0148】

DT-3TU/DNA組成物のζ電位の測定

この実施例の目的は、本発明によるトランスフェクション化合物が、全体的な陰イオン性、中性又は非常に弱い陽イオン性構造を保持しながら核酸を緊密化する能力を示すことである。

20

【0149】

これは、ζ電位の測定によって明らかにしうる；mVで表わした測定値は、試料の電気泳動移動度に対する粒子の表面電荷を示す。

【0150】

該核酸を、核酸の溶液中での様々な力価の脂質溶液の等容量混合によって、漸増量のDT-3TU/EPC脂質混合物と接触させた。0.01g/lの濃度の核酸複合体2mlの試料を、漸増量のDT-3TUを含む20mM塩化ナトリウム溶液中で調製した。

【0151】

ゼータサイズ測定器3000 Hsa (Malvern)を用いてζ電位(mV)の測定を実施した。DT-3TU/EPC-DNA試料2mlに関して電位の値を3回連続して測定した。その結果を図4に要約した。

30

【0152】

DNA μg当り0.75nmolから20nmol脂質の範囲内でDTTU/EPCリポソームをDNAに加えた。脂質量のこの変動範囲内で、ζ電位は-35mVから+15mVまで変動する。負の部分は図1、2及び3に示すものに相当し、すなわちDNAが完全に緊密化されていないときζ電位は負であった。より多くの脂質を加えるほどより多くのDNAが緊密化され、ζ電位はより一層ゼロに近づき、リポプレックスは事実上ゼロの表面電位を示す。その後ζ電位は8nmol脂質/μgDNA付近から正となる。この測定の相対性については、同じ実験の中の様々な試料の比較を考慮に入れるべきである。従って、弱い正の値までの脂質量の増加の関数としてのζ電位の推移に注目することが重要である。

40

【0153】

この実施例は、それ故、本発明によるトランスフェクション化合物、特にDT-3TUによるDNAの緊密化を確認し、形成されるリポプレックスが中性に近い表面電位を示すことを明らかにしている。

【実施例8】

【0154】

DT-3TU/DNA組成物のインビトロでのトランスフェクション

50

この実施例の目的は、本発明によるトランスフェクション化合物がインビトロで細胞をトランスフェクトする能力を示すことである。

【0155】

この試験は、様々な量のDT-3TU：1.5又は5又は10又は15又は20nmolのDT-3TU/ μ gDNAを含むリポプレックスについて実施した。これらの条件の各々を、ウシ胎仔血清と共に及びウシ胎仔血清なしで（「+血清」又は「-血清」）で試験した。

【0156】

細胞培養：ヒト頸部上皮の癌から誘導したHeLa細胞（American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USAを、2mM L-グルタミン、50単位/mlのペニシリン及び50単位/mlのストレプトマイシンを添加したMEM（「最小必須培地」）型培地の存在下で培養した。培地及び添加物は、Gibco-BRL Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA) より入手した。細胞を、インキュベーターにおいて5%二酸化炭素、37℃で、フラスコ内で培養した。

【0157】

トランスフェクション：トランスフェクションの前日に、HeLa細胞を30,000～50,000細胞/穴の細胞数で240穴プレートに移した。これらの希釈度は、24時間後に約80%の集密度を示す。トランスフェクションのために、細胞を2回洗い、血清を含む（10%FCS v/v）又は血清を含まない培地500 μ lと共に37℃でインキュベートした。

【0158】

プラスミドDNA0.5 μ gを含む複合体50 μ lを各々の穴に加えた（複合体は少なくとも穴に添加する30分前に調製した）。37℃で2時間後、血清を含まないプレートに10%（v/v）FCS（「ウシ胎仔血清」）を補足した。

【0159】

すべてのプレートを37℃、5%二酸化炭素で24時間放置した。

【0160】

ルシフェラーゼ活性の定量：簡単に述べると、トランスフェクションした細胞をPBS（リン酸緩衝液）500 μ lで2回洗い、その後、試薬（Luciferase Assay SystemキットのPromega細胞培養溶解試薬）250 μ lで溶解した。4℃で5分間遠心分離した（12,000 $\times$ g）溶解産物の上清10 μ lのアリコートをWallace Victor 2ルミノメーター（1420 Multilabel counter）で測定した。

【0161】

ルシフェラーゼ活性は、ルシフェリン、補酵素A及びATPの存在下で発光によって10秒間検定し、2000処置細胞に関して表わした。次にルシフェラーゼ活性を相対光単位（RLU, relative light units）で表わし、Pierce BCAキット（Rockford, IL, USA）を用いて得られた試料中のタンパク質濃度に関して基準化した。

【0162】

図5に要約する結果は、5又は10nmolのDT-3TU/ μ gDNAを含むリポプレックスについての最適トランスフェクション効率を示している。血清の存在は、すべての場合に、トランスフェクションの弱い阻害を誘導する。

【実施例9】

【0163】

細胞に対するDTTU/DNAリポプレックスの毒性の測定

この実施例の目的は、本発明によるトランスフェクション化合物に毒性がないことを示すことである。

【0164】

トランスフェクション後に該タンパク質レベルを測定した。トランスフェクションのプロトコールは実施例8で述べたのと同じであった。

【0165】

タンパク質レベルの定量：簡単に述べると、トランスフェクションした細胞をPBS（リン酸緩衝液）500 μ lで2回洗い、その後、試薬（Luciferase Assay SystemキットのPromega細胞培養溶解試薬）250 μ lで溶解した。4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心分離した（12,000 $\times$ g）溶解産物の上清50 μ lのアリコートを、0.1Mヨードアセトアミド50 μ l、pH8.2の0.1M塩酸トリスの入った管に移し、37 $^{\circ}$ Cで1時間放置した。前記溶液20 μ lを96穴プレートに入れ、「BCAタンパク質アッセイ」試薬（Pierce, Montlison, France）200 μ lを加えた。次にプレートを2500回転/分で遠心分離し、その後37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。平行して、試料に関して得た吸光度値を試料中に存在するタンパク質の量と相関させるために、ウシ血清アルブミン（BSA）レンジを調製した。

10

【0166】

図6に要約する結果は、0.75又は5又は10又は15又は20nmolのDT-3TU/ μ g DNAを含むリポプレックスという使用条件に関わりなく、同様のタンパク質レベルを示している。DTTU脂質の存在は、それ故、細胞に有害な影響を及ぼさず、使用した条件下で毒性を認めなかった。

【0167】

この実施例は、それ故、本発明によるトランスフェクション化合物の重要な利点の1つ、すなわち、おそらくそれらの構造内に正電荷が存在しないことに結びついた非常に低い毒性を示している。

20

【実施例10】

【0168】

DT-3TU/DPPCナノ乳剤による核酸の緊密化

この実施例の目的は、本発明によるトランスフェクション化合物が核酸と結合する能力を示すことである。

【0169】

これは、臭化エチジウム（EtBr）を使用して視覚化したDNAのアガロースゲル上での電気泳動遅延試験によって容易に明らかにしうる：ゲル上の核酸の移動が存在しないことは核酸の緊密化を示唆する。遊離核酸については、ゲル上での遅延を生じない。

30

【0170】

DNAに対して種々の製剤のDT-3TU脂質を含む様々なDNA/DT-3TU試料をアガロースゲル（1N TBE中0.8%アガロース）上に置いた。電気泳動によってDNAを移動させるため、そのゲルを1時間半70V及び40mAの電流に供した。バンドをTBE及び紫外線灯の下での吸収によって明らかにした。その結果を図8に示した。

【0171】

同様に、アガロースゲル（1N TBE中0.8%アガロース）を使用し、その上に、DNAに対して種々の製剤のDT-3TUジオール脂質を含むDNA/DT-3TUジオールの様々な試料を置いて、DT-3TUジオール化合物がDNAを緊密化する能力を示す。電気泳動によってDNAを移動させるため、ゲルを1時間半70V及び40mAの電流に供した。バンドを臭化エチジウム及び紫外線灯の下での吸収によって明らかにした。

40

【0172】

ゲルは、DNAが脂質と結合しなかったときのDNAの電気泳動移動（ウエル1）、及びDNAが脂質と結合したときの保持率の差を示す。ウエル2～5は、カルシウム及びエタノールを含む又は含まないDT-3TU/DPPC（60nmol DT-3TU/ μ g DNA）ナノ乳剤と結合したDNA（0.01g/l）を示す。ウエル2は、Ca²⁺及びエタノールを含まない60nmol/ μ g DNAを示す。ウエル3には、2%のEtOHを加えた。ウエル4では、60当量のCa²⁺/PO⁻ DNAを加えた。ウエル5には、2%のEtOHと60当量のCa²⁺を加えた。ウエル1と他のウエルとの比較は、

50

検討した種々のDT-3TU製剤がゲル上のDNA移動を遅延させることを示唆している。 Ca^{2+} 及びEtOHの透析後、同じ結果を認めた。

【0173】

この実施例は、それ故、種々の製剤に組み込まれたDT-3TU脂質が核酸を緊密化する能力を示している。

【実施例11】

【0174】

安定化DT-3TU/DPPC複合体による核酸の緊密化

この実施例の目的は、本発明によるトランスフェクション化合物が核酸に結合する能力を示すことである。

【0175】

これは、臭化エチジウム(EtBr)を使用して視覚化したDNAのアガロースゲル上での電気泳動遅延試験によって容易に明らかにしうる：ゲル上の核酸の移動が存在しないことは核酸の緊密化を示唆する。遊離核酸については、ゲル上での遅延を生じない。

【0176】

コレステロール-PEGに結合した又は結合していないDNAに対して漸増量のDT-3TU脂質を含む様々なDNA/DT-3TU/DPPC及びDNA/DT-3TUジオール/DPPC試料をアガロースゲル(1NTBE中0.8%アガロース)上に置いた。電気泳動によってDNAを移動させるため、そのゲルを1時間半70V及び70mAの電流に供した。バンドを臭化エチジウム及び紫外線灯の下での吸収によって明らかにした。その結果を図9に示す。

【0177】

DT-3TU/DPPC製剤においてコレステロール-PEGを使用することは、脂質-PEGが存在しない場合は凝集を導くであろうような脂質の量まで粒子サイズを縮小することを可能にするという利点を持つ。この結果の興味深い点は、インビボで注入するトランスフェクション化合物の量を最適化することである。実際に、血清タンパク質を潜在的対象とするのに必要な粒子の大きさは、血流中での半減期を上昇させるために、主として500nm未満でなければならない。この大きさの粒子を得るためには、少なくとも40nmolの脂質DT-3TU/ μg DNAを使用する必要がある。それ故、脂質DT-3TUの製剤中で脂質-PEGを使用することは、DNAを緊密化し、500nmより小さいサイズの粒子を形成するために必要なDT-3TUの量を低減するという利点を持つ。

【0178】

ゲルは、DNAが脂質と結合しなかったときのDNAの電気泳動移動(ウエル1)、及びDNAが脂質と結合したときの保持率の差を示す。ウエル2~5は、粒子の安定化剤としてコレステロール-PEG(20単位のエチレングリコール)を含む又は含まない、漸増量のDT-3TU/DPPCナノ乳剤と結合したDNA(0.01g/l)を示す。ウエル2は、20nmol/ μg DNA+15%コレステロール-PEGを示す。ウエル3は、20nmol/ μg DNA+20%コレステロール-PEGを含む。ウエル4は、30nmol/ μg DNA+15%コレステロール-PEGを示し、ウエル5は、20nmol/ μg DNA+20%コレステロール-PEGを示す。ウエル1と他のウエルとの比較は、検討した種々のDT-3TU製剤がゲル上のDNA移動を遅延させることを示唆しており、複合体からDNAを遊離させることなく、従って複合体を不安定にすることなく、これらの製剤中にポリエチレングリコールのポリマーが組み込まれている可能性を示している。

この実施例は、それ故、安定化粒子の形態のDT-3TU脂質が核酸を緊密化する能力を示している。

【実施例12】

【0179】

DT-4TU(15)の存在下での核酸の緊密化

この実施例の目的は、本発明によるトランスフェクション化合物が核酸に結合する能力を示すことである。

【0180】

これは臭化エチジウムによる蛍光試験によって容易に明らかにすることができる：蛍光が存在しないことは遊離核酸が存在しないことを示唆し、それは核酸がトランスフェクション化合物によって緊密化されたことを意味する。

【0181】

該核酸を、核酸の溶液中での様々な力価の脂質溶液の等容量混合によって、漸増量のDT-4TUと接触させた。0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の核酸複合体800 μl の試料を、漸増量のDT-4TU (15) を含む150 mM塩化ナトリウム溶液中で調製した。

10

【0182】

同様に、3チオ尿素を含む脂質 (図2参照) と4チオ尿素を含む脂質の複合体形成の効率を比較するために、該核酸を、核酸の溶液中での様々な力価の脂質溶液の等容量混合により漸増量のDT-3TU (12) と接触させることによって対照を調製した。このようにして、0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の核酸複合体800 μl の試料を、漸増量のDPPCを含む5%グルコース溶液中で調製した。

【0183】

臭化エチジウム蛍光を、それぞれ260 nmと590 nmの励起及び発光波長でFluoromax-2 (Jobin Yvon-Spex) を使用して測定した。励起と発光のためのスリット幅は5 nmに設定した。DNA/脂質溶液 (0.01 g/l DNA) 1 mlにつき臭化エチジウム (1 g/l) 3 μl を加えた後、蛍光値を記録した。その結果を図10に要約する。

20

【0184】

四角記号の曲線は、固定量の核酸 (8 μg) に対する漸増量のDT-3TU/DPPC脂質混合物 (0.75 nmolから30 nmolのDT-3TU) の添加が、DNAの塩基対の間への臭化エチジウムの挿入の低下に結びつく蛍光の低下を誘導することを示している。これは、DT-3TU/DPPCリポソームとDNAの間の結びつきが、その複合体から臭化エチジウムを排除するのに十分なほど強かったことを示唆する。我々はそれ故、30 nmolのDT-3TU/DPPC脂質/ μg DNAを使用して70%のDNA緊密化を得ることができた。この脂質/DNA結合におけるDT-3TUの積極的な役割は図1及び2に示されている。同様に、漸増量のDT-4TU/DPPC脂質混合物 (0.75 nmolから30 nmolのDT-3TU) を固定量の核酸 (8 μg) に加えた。この組合せは、DNAの塩基対の間への臭化エチジウムの挿入の低下に結びつく蛍光の低下を誘導する。これは、DT-4TU/DPPCリポソームとDNAの間の結びつきが、その複合体から臭化エチジウムを排除するのに十分なほど強かったことを示唆する。我々はそれ故、30 nmolの脂質/ μg DNAに関して60%のDNA緊密化を得ることができ (図10、丸印記号の曲線)、これは同じ条件を使用したDT-3TU複合体形成の効率と同様であった。

30

【0185】

この実施例は、それ故、DT-4TU脂質が核酸に結合する能力を示している。

40

【実施例13】

【0186】

DT-3TU/DPPC複合体によるデオキシリボヌクレアーゼからのDNAの保護

この実施例の目的は、本発明によるトランスフェクション化合物が酵素加水分解、すなわちデオキシリボヌクレアーゼから核酸を保護する能力を示すことである。

【0187】

これは、臭化エチジウム (EtBr) を使用して視覚化したDNAのアガロースゲル上での電気泳動遅延試験によって容易に明らかにしうる。遊離DNA又は脂質と複合したDNAを適切な量のデオキシリボヌクレアーゼで処理した。そのDNAを酵素消化混合物から抽出し、アガロースゲル上に置いた。その移動を処理しなかった核酸の移動と比較する

50

ことによってDNAの完全性を確認した。

【0188】

あらかじめ 2×10^{-4} Mのデオキシリボヌクレアーゼ (Sigma) で処理した様々なDNA試料をアガロースゲル (1 N TBE中0.8%アガロース) 上に置いた。遊離DNA及びDNAと比較して漸増量のDT-3TU脂質と複合したDNAに関して、デオキシリボヌクレアーゼによる処理を実施した。電気泳動によってDNAを移動させるため、ゲルを1時間半70 V及び40 mAの電流に供した。バンドを臭化エチジウム及び紫外線灯の下での吸収によって明らかにした。その結果を図11に示す。

【0189】

ゲルは、デオキシリボヌクレアーゼで処理しなかったときのDNAの電気泳動移動 (ウエル1)、及び処理後の保持率の差を示す。ウエル2は、 2×10^{-4} Mのデオキシリボヌクレアーゼで処理したときの同じ量のDNA ($3 \mu\text{g}$) を示す。この処理 (2×10^{-4} Mのデオキシリボヌクレアーゼ、30分間、37℃) 後、対応するバンドは認められず、DNAの分解を示唆している。30及び40 nmolのDT-3TU脂質/ μg DNA及び40 nmolのDT-3TU脂質+Chol-PEGと複合した核酸を 2×10^{-4} Mのデオキシリボヌクレアーゼで処理した。フェノール/クロロホルムの混合物を使用してDNAを抽出し、沈殿させたあと、それぞれウエル3、4及び5のアガロースゲル上に置いた。それらのDNAの移動は、あらかじめデオキシリボヌクレアーゼで処理しなかったDNAの移動と同様であった。これは、前記DNAが無傷であり、デオキシリボヌクレアーゼでの処理によって損なわれていなかったこと、従ってDT-3TU脂質がDNAを保護したことを示唆している。DT-3TU脂質複合体中のDNAは、従って、酵素加水分解の影響を受けず、核酸はデオキシリボヌクレアーゼの加水分解から保護された。

【0190】

この実施例は、それ故、DT-3TU脂質が核酸を酵素加水分解から保護する能力を示している。

【実施例14】

【0191】

DT-3TU/DPPC複合体による血清からのDNAの保護

この実施例の目的は、本発明によるトランスフェクション化合物が、血清中での分解から核酸を保護する能力を示すことである。

【0192】

これは、臭化エチジウム (EtBr) を使用して視覚化したDNAのアガロースゲル上での電気泳動遅延試験によって容易に明らかにしうる。遊離DNA又は脂質と複合したDNAを種々の量の血清と共に37℃でインキュベートした。血清から抽出した後、DNAをアガロースゲル上に置き、その移動をインキュベートしなかった核酸の移動と比較することによってDNAの完全性を確認した。

【0193】

あらかじめ150 mMのNaCl、20%及び100%血清中でインキュベートした様々なDNA試料をアガロースゲル (1 N TBE中0.8%アガロース) 上に置いた。遊離DNA及びDNAと比較して漸増量のDT-3TUと複合したDNAに関して、塩類溶液及び血清による処理を実施した。電気泳動によってDNAを移動させるため、ゲルを1時間半70 V及び40 mAの電流に供した。バンドを臭化エチジウム及び紫外線灯の下での吸収によって明らかにした。その結果を図12に示す。

【0194】

ゲルは、処理しなかったDNA (ブランク) の電気泳動移動 (ウエル1)、遊離DNAを塩類溶液 (150 mMのNaCl) 中で処理したとき (ウエル2)、DNAを40 nmolのDT-3TU脂質/ μg DNAと複合したとき (ウエル3) の保持率の差を示す。塩類溶液から抽出したDNAの移動は2つのウエルにおいて同様であった。これは、DNAがこれらの条件下で無傷に保持されたことを示唆する。次のウエルは、同じ順序で、2つの異なる血清条件: ウエル4~5については20%血清及びウエル6~7については1

10

20

30

40

50

00%血清、でのDNA（ウエル4及び6）、DNA+40nmolのDT-3TU脂質（ウエル5及び7）を示す。DNAが遊離しているとき、上述した両方の血清条件下で、37℃で30分後に核酸は完全に分解された（ウエル4及び6）。他方で、DT-3TU/DPPCナノ乳剤とのDNA複合体形成は、DNAに対応する移動バンドが認められたことから、核酸の保護を誘導する（ウエル5及び7）。DT-3TU脂質複合体中のDNAは、それ故、遊離DNAと比較したとき、血清中で分解から保護された。

【0195】

この実施例は、それ故、血清中での分解から核酸を保護するDT-3TU脂質の能力を示している。

【実施例15】

10

【0196】

DT-3TU/DNA組成物のインビボトランスフェクション

この実施例の目的は、本発明によるトランスフェクション化合物がインビボで生体組織をトランスフェクトする能力を示すことである。

【0197】

これは、ルシフェラーゼについてのコードDNA複合体を筋肉内注入することによって明らかにしうる。注入の96時間後に筋肉試料を採取し、ルミノメーター（Wallace）を使用してルシフェラーゼの発現レベルを測定した。

【0198】

漸増量のDT-3TU脂質/μg DNAを含む複合体をマウスの脛骨筋及び頭蓋筋に注入し、それに電気パルスを適用するか又は適用しなかった（Bureau, M. ら、BBA2000）。

20

【0199】

40nmol及び60nmolの漸増量のDT-3TU脂質/μg DNAを含む複合体を、3μg DNA/動物を含有する30μLの容量で脛骨筋及び頭蓋筋に注入した。マウスC57bl/6には、あらかじめケタミン/キシラジンの混合物で麻酔を施した。注入に続いて、筋の両方の末端に設置した電極を使用して経皮的に電気パルスを適用するか又は適用しなかった（Bureau, M. ら、BBA2000）。

【0200】

注入の96時間後、マウスを安楽死させ、筋肉試料を採取して、緩衝溶解溶液1mL中で摩砕した。遠心分離（10分間、12000rpm、4℃）後、上清（10μL）を採取し、96穴プレートに入れて、ルシフェラーゼ基質50μLを加えた後ルシフェラーゼを読み取った。ルミノメーター（Wallace, Victor）を使用して上清中の発光のレベルを読み取った。

30

【0201】

得られた結果を図13に示す。それらの結果は、核酸と結合した脂質の量、20nmol及び40nmolのDT-3TU脂質/μg DNAに対する発現のレベルを表わしている。得られた種々の発現レベルは有意であり、筋を対照としたときに得られたバックグラウンドノイズ（ 5.0×10^4 ）を上回っていた。種々の量のDT-3TU脂質と複合したDNAは、それ故、有意のトランスフェクションレベルで筋肉組織をトランスフェクトすることができた。

40

【0202】

この実施例は、本発明によるトランスフェクション化合物がインビボで組織をトランスフェクトする能力を示している。

【実施例16】

【0203】

DT-3TU/DPPC/DNA複合体のインビボでの生体分布

この実施例の目的は、本発明によるトランスフェクション化合物が、それらの中性特性のゆえにインビボで血流中により長い時間とどまる能力を示すことである。

【0204】

50

これは、蛍光脂質を含むDNAをマウス血流中に注入することによって明らかにしうる。注入後種々の時点で血液試料を採取し、FluoroMax-2 (Jobin Yvon-Spex) を用いて血流中の蛍光のレベルを測定した。

【0205】

40 nmol のDT-3TU脂質/ μ g DNAを含む複合体、1モル当量のDPPC/DT-3TU脂質及び(脂質総量の) 0.7%の脂質-ローダミンを、11 μ g DNA/動物を含有する200 μ Lの容量で尾静脈に注入した。マウスC57bl/6にはケタミン/キシラジンの混合物で麻酔を施した。

【0206】

注入後、30分、1時間及び6時間目に、マウスを麻酔した状態で心臓穿刺によって血液試料を採取した。マウスを安楽死させたあと、直ちに肝臓、脾臓及び肺を摘出し、計量して、PBS (5 μ L/mg組織) 中で均質化した。血液100 μ Lから脂質を抽出し、クロロホルム/メタノール混合物(1/1) 3mLを使用して、30分間強く攪拌し、その後遠心分離することによって器官を均質化した。FluoroMax-2 (Jobin Yvon-Spex) を用いてそれぞれ550 nmと590 nmの励起及び発光波長で、上清中の蛍光を測定した。励起及び発光のためのスリット幅は5 nmに設定した。

【0207】

結果を図14に要約する。それらは、注入後30分、1時間及び6時間目に血液、肺及び細網内皮系(肝臓と脾臓を合わせて) から得た注入用量のパーセンテージを表わしている。30分後の血液中の蛍光の測定値は注入用量の50%であり、カチオン型のDNA界面活性剤に関して得られるものをはるかに上回っていた。1時間後には、注入用量の17%が検出でき、やはりカチオン型複合体と比較して著明な改善を示している。これらの脂質/DNA複合体の中性特性(ζ 電位は非常に弱い正であった: 図4)は、それ故、血清タンパク質に対して潜伏性の(furtive)粒子を得るための事実上の利点である。中性特性はまた、マクロファージ及び肝臓及び脾臓のクップファー細胞との相互作用も制限するはずであり、このことが、注入後30分及び1時間目に血液中で認められたリポソームの量を説明すると考えられる。

【0208】

肺で検出されたりポプレックスの量は、カチオン性リポプレックスを使用したときに認められた量と比較して低かった。リポソームの中性特性は、肺の陰性内皮との非特異的相互作用も低下させるはずである。

【0209】

この実施例は、本発明によるトランスフェクション化合物が血清タンパク質に対して潜伏性である能力を示している。

【図面の簡単な説明】

【0210】

【図1】核酸 μ g当りのEPC/DTTU混合物の量(nmol)の関数として及び核酸 μ g当りのEPC単独の量(nmol) (対照混合物)の関数としての、蛍光のレベルの変化(%)。

【図2】核酸 μ g当りのDPPC/DTTU混合物の量(nmol)の関数として及び核酸 μ g当りのDPPC単独の量(nmol) (対照混合物)の関数としての、蛍光のレベルの変化(%)。

【図3】使用したEPC/DTTUリポソームの量(nmol)の関数としてのプラスミドpXL3031の緊密化(μ g)を示すアガロースゲル(0.8%/TBE)。

【図4】核酸 μ g当りの脂質の量(nmol)の関数としてのDPPC/DTTU-DNAリポソームの表面の電位に対応する ζ (ゼータ) 電位(mV)。

【図5】血清を含む又は含まない、様々な脂質/DNA比(nmol/ μ g)でのDNAとDTTU/DPPC(1:2)リポソームの間で形成される複合体によるHeLa細胞のインビトロトランスフェクションの効率。y軸は、RLU/ μ gタンパク質でのルシフェラーゼの発現を表わす。x軸は、DNA μ g当りのDTTUの量(nmol)を示

10

20

30

40

50

す。

【図6】EPC+様々な脂質/DNA比(nmol/μg)のDTTU/DNAリボソームで処理していない又は処理したHeLa細胞のタンパク質のレベル(吸光度として)。

【図7】プラスミドpXL3031の図式的表示。

【図8】使用したDT-3TU/DPPCナノ乳剤の量(nmol)の関数としてのプラスミドpXL3031の緊密化(μg)を示すアガロースゲル(0.8%/TBE)。

【図9】使用したDT-3TU/DPPC/cholesterol-PEGナノ乳剤の量(nmol)の関数としてのプラスミドpXL3031の緊密化(μg)を示すアガロースゲル(0.8%/TBE)。

【図10】核酸μgにつき様々な量のDT-3TU/DPPC(nmol)と比較した、核酸μg当りのDT-4TU/DPPCの量(nmol)の関数としての緊密化されたDNAのパーセンテージの変化。

10

【図11】デオキシリボヌクレアーゼ分解に対するプラスミドpXL3031のDT-3TU/DPPC混合物(μg)による保護を示すアガロースゲル(0.8%/TBE)。

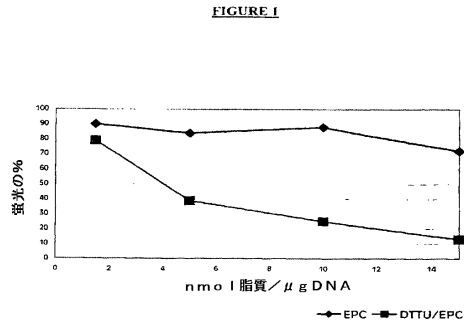
【図12】血清中に入れたときのプラスミドpXL3031のDT-3TU/DPPC混合物(μg)による保護を示すアガロースゲル(0.8%/TBE)。レーン1は、DNAに対応する；レーン2及び3は、DNA単独、又はNaCl 150mM及び20%血清中(レーン4及び5)、及び100%血清中(レーン6及び7)のDT-3TU/DPPCナノ乳剤10nmol/μgの存在下でのDNAに対応する。

【図13】エレクトロトランスファーを伴って又は伴わずに(e⁻/e⁺)様々な量の脂質/nmol DNA/μgで存在する、DNAとDT-3TU/DPPCリボソームの複合体によるインビボ筋肉トランスフェクションの効率。

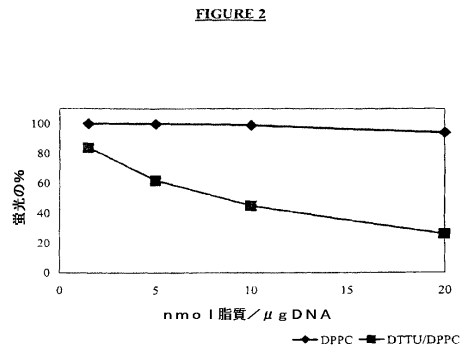
20

【図14】血液、肺及びRES(肝臓及び脾臓)中の、30分、1時間及び6時間後のDT-3TU/DPPC/DOPE-Rh/DNA複合体のマウスにおけるインビボ生体分布。この図は、該粒子が潜伏(furtive)特性を有することを示す：前記複合体の50%が30分後に血液循環中で回収される。

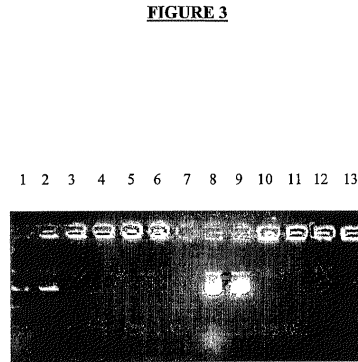
【図 1】



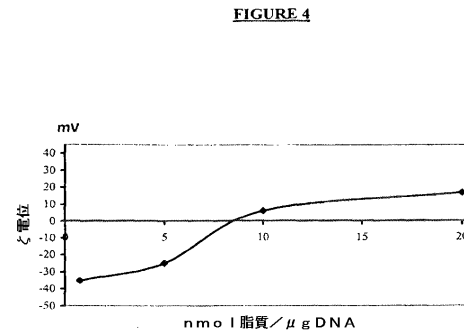
【図 2】



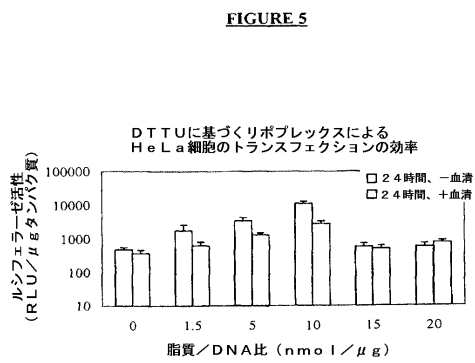
【図 3】



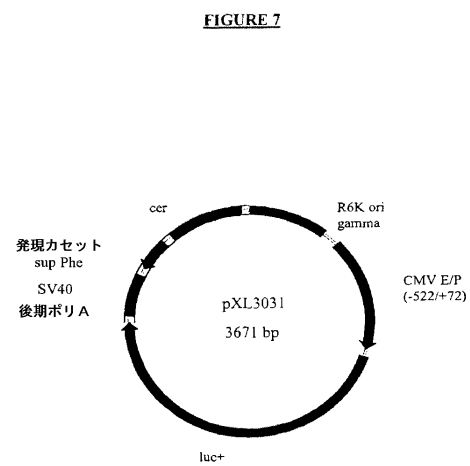
【図 4】



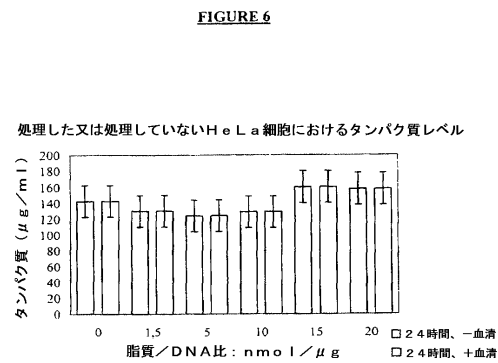
【図 5】



【図 7】

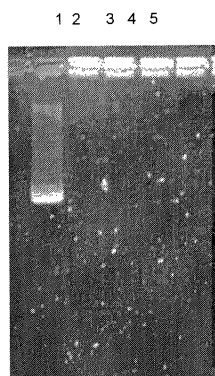


【図 6】



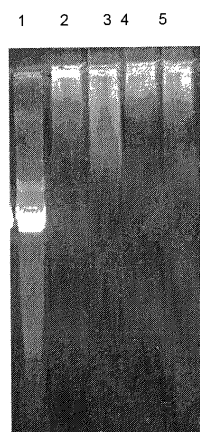
【図 8】

FIGURE 8



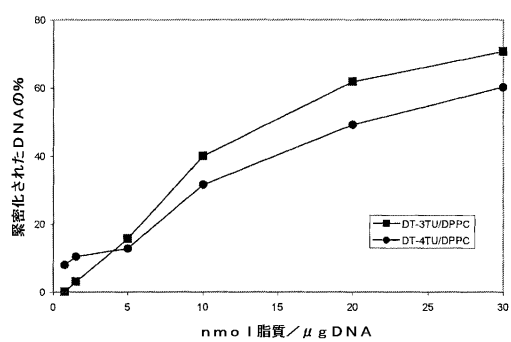
【図 9】

FIGURE 9



【図 10】

FIGURE 10



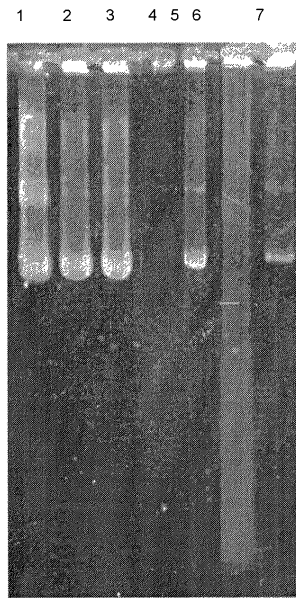
【図 11】

FIGURE 11



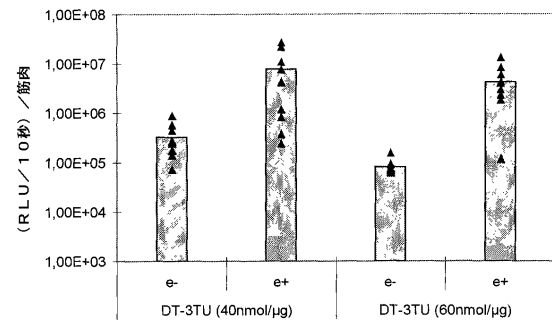
【図 1 2】

FIGURE 12



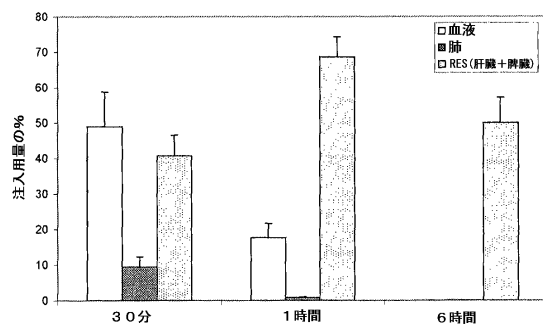
【図 1 3】

FIGURE 13



【図 1 4】

FIGURE 14



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	47/42	(2006.01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 K	47/48	(2006.01)	A 6 1 K 47/48
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/00
A 6 1 P	3/02	(2006.01)	A 6 1 P 3/02
A 6 1 P	5/00	(2006.01)	A 6 1 P 5/00
A 6 1 P	5/02	(2006.01)	A 6 1 P 5/02
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P 7/04
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P 31/18
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

- (72)発明者 エルスコビシー, ジャン
フランス国、エフー７５０１３・パリ、リュ・ドユ・シヤトー・デ・ランチエ、１４
- (72)発明者 シエルマン, ダニエル
フランス国、エフー７５０１２・パリ、リュ・エラル、１０
- (72)発明者 トランシヤン, イザベル
フランス国、エフー７５０１３・パリ、リュ・デ・ゴブラン、１８
- (72)発明者 ミニエ, ナタリー
フランス国、エフー７５０１１・パリ、パサージュ・ドユ・シユマン・ベール、７
- (72)発明者 ジラル、クリスチアン
フランス国、エフー７５００５・パリ、リュ・ドユ・カルデイナル・ルモワンヌ、６２

審査官 前田 憲彦

- (56)参考文献 国際公開第９７／０４２１６６ (WO, A 1)
特表２０００－５０６１３６ (JP, A)
特表２０００－５０１３８３ (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07C 335/00
A61K 31/00
A61K 47/00
A61K 48/00
C12N 15/00
CAplus(STN)
REGISTRY(STN)