

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4456438号
(P4456438)

(45) 発行日 平成22年4月28日(2010.4.28)

(24) 登録日 平成22年2月12日(2010.2.12)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 0 7 K	5/11	(2006.01)	C 0 7 K	5/11	
C 0 7 K	7/04	(2006.01)	C 0 7 K	7/04	
A 6 1 K	9/127	(2006.01)	A 6 1 K	9/127	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	

請求項の数 6 (全 21 頁)

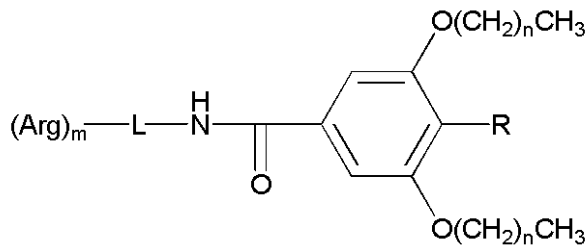
(21) 出願番号	特願2004-237111 (P2004-237111)	(73) 特許権者	000173924
(22) 出願日	平成16年8月17日(2004.8.17)		財団法人野口研究所
(65) 公開番号	特開2005-278630 (P2005-278630A)		東京都板橋区加賀1-8-1
(43) 公開日	平成17年10月13日(2005.10.13)	(72) 発明者	川上 宏子
審査請求日	平成18年12月7日(2006.12.7)		神奈川県川崎市多摩区登戸3192-301
(31) 優先権主張番号	特願2004-61060 (P2004-61060)	(72) 発明者	戸潤 一孔
(32) 優先日	平成16年3月4日(2004.3.4)		神奈川県相模原市陽光台4-8-36
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	古幡 昌彦
			東京都品川区小山台1-18-6-202
		(72) 発明者	服部 喜之
			神奈川県川崎市高津区新作6-6-13-401
		(72) 発明者	米谷 芳枝
			東京都世田谷区中町3-24-8-409
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴアルギニン脂質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(2)で示される化合物。



(2)

(ただし、式中で、Argはアルギニンを、LはX(CH₂)_yまたはXC(H₂OC(H₂)_zCH₂)_zCH₂を、RはHまたはO(CH₂)_nCH₃を、mは4から12の整数を、nは1から17の整数を表し、XはN、OまたはSを、yは2から6までの整数を、zは1から100までの整数を表す。)

【請求項2】

請求項1記載の化合物を有効成分とするナノパーティクル。

【請求項3】

請求項1記載の化合物を有効成分とするリポソーム。

【請求項 4】

請求項 1 記載の化合物を有効成分とするミセル。

【請求項 5】

請求項 1 記載の化合物、または、請求項 2 記載のナノパーティクル、または、請求項 3 記載のリボソーム、または、請求項 4 記載のミセルを構成要素とする遺伝子導入ベクター。

【請求項 6】

請求項 5 記載の遺伝子導入ベクターを用いた細胞内への遺伝子導入法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、アルギニンのオリゴマーが脂質に結合した化合物、および、それを有効成分とするナノパーティクルまたはリボソームまたはミセル、および、それらを用いた遺伝子導入法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、遺伝子の異常に起因する疾患、あるいは癌等の治療法として、遺伝子治療が検討されている。遺伝子治療を行うには、治療を目的として調製した遺伝子を細胞内に導入する必要がある。遺伝子を細胞内に導入する代表的な方法として、ウイルスを改良したベクターが用いられているが、免疫原性があること、安全性に問題があること等が指摘されている。そこで、人工の遺伝子導入ベクターとして、ポリリジン、ポリエチレンジアミン、D E A E - デキストラン、ポリアミン dendrimer 等のカチオン性のポリマー、あるいは、カチオン性の界面活性剤を含有するリボソームやミセル等の会合体が提案されている。しかし、これらの人工の遺伝子導入ベクターにも、遺伝子導入効率が必ずしも高くないこと、細胞毒性が高いこと等の問題点が指摘されており、さらなる改良が期待されている。（例えば、非特許文献 1 参照）。

20

最近、塩基性ペプチドを用いた蛋白質等の細胞内導入法が注目されている。H I V - 1 T a t 蛋白質やショウジョウバエ A n t e n n a p e d i a 蛋白質由来の十数残基の塩基性ペプチドを、導入しようとする蛋白質等に結合させ、細胞内に導入する方法である。この方法を用いて、蛋白質ばかりでなく、オリゴ核酸、微小磁石、リボソーム等も細胞内に導入できることが報告されている。さらに、塩基性ペプチドの配列は自由度が高いものの、アルギニンのクラスターが重要であることが指摘されている。また、この塩基性ペプチドによる細胞内導入のメカニズムは、これまでに報告されている人工遺伝子導入ベクターの細胞内導入のメカニズムであるエンドサイトーシスとは異なった経路であることも知られている（非特許文献 2 参照）。

30

しかし、H I V - 1 T a t 由来ペプチドを表面に結合したリボソームを細胞内に導入した報告では、リボソームの形態を保ったまま細胞内に導入できたことが示されているだけで、遺伝子導入には用いられていない（非特許文献 3 参照）。また、アルギニンオリゴマーを 1 本の長鎖アルキル基を持つカルボン酸あるいはコレステロール等と結合させ、遺伝子導入に用いた例が報告されている（非特許文献 4 参照）が、一般に、1 本の長鎖アルキル基を持つ脂質構造は、それ自体の水溶性が高い、会合体が不安定である等の問題を有することが知られている。

40

【0003】

我々はこれまでに、様々なペプチドを人工脂質に結合させた化合物を合成し、それらのペプチド脂質が細胞培養等に利用できることを示してきた。（特許文献 1、非特許文献 5 参照）。また、エチレングリコールのオリゴマーまたはポリマーが結合した人工脂質が生体適合性付与剤として利用できることを示した（特願 2004 - 42011）。しかし、遺伝子の細胞内導入に用いるためには、新たな化合物を合成する必要があった。

【特許文献 1】特開 2002 - 265427

【非特許文献 1】アンゲバンテ・ヘミー・インターナショナル・エディション (Angew. C

50

hem. Int. Ed.)、2003年、42巻、p. 1448 - 1457

【非特許文献2】蛋白質核酸酵素、2002年、47巻、p. 1415 - 1419

【非特許文献3】アメリカ国立科学会紀要 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、2001年、98巻、p. 8786 - 8791

【非特許文献4】バイオコンジュゲイト・ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、2001年、12巻、p. 1005 - 1011

【非特許文献5】サイトテクノロジー (Cytotechnology)、2003年、42巻、p. 13 - 20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0004】

本発明の目的は、新規な化合物を有効成分とする遺伝子導入ベクター、および、それを用いた遺伝子の細胞内導入法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

上記課題を鋭意検討した結果、本発明者らは、オリゴアルギニンが2本以上の長鎖アルキル基を有する脂質に結合した化合物を合成し、まず、合成した化合物を有効成分とする蛍光標識リポソーム調製して、そのリポソームが細胞内に導入されることを確認し、次に、合成した化合物を有効成分とするナノパーティクルまたはミセルを調製し、そのナノパーティクルまたはミセルがDNAと複合体を作ることを確認し、さらに、そのDNAとの複合体が細胞内に導入され、蛋白質を発現することを、フローサイトメトリー、共焦点レーザー顕微鏡解析、ルシフェラーゼ活性測定により確認して、本発明を完成するに至った。

20

【0006】

すなわち、式(1)で示される化合物、または、式(2)で示される化合物、および、これらの化合物を有効成分とするナノパーティクル、リポソーム、または、ミセル、および、これらを構成要素とする遺伝子導入ベクター、および、その遺伝子導入ベクターを用いた細胞内への遺伝子導入法、および、この遺伝子導入法によって遺伝子導入された細胞である。

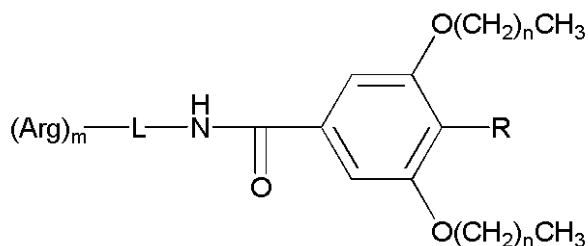
30

A-B

(1)

(ただし、式中で、Aはアルギニンを連続して4残基以上含んだ20残基以下のペプチドを表し、そのN端またはC端でBと結合しており、Bは2本以上の長鎖アルキル基を有する天然または人工の脂質構造、または、それらの脂質構造とAを結ぶリンカー構造を含んだ構造を表している。)

40



(2)

(ただし、式中で、Lは $X(\text{CH}_2)_y$ または $X\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_z\text{CH}_2$ を、RはH

50

または $O(CH_2)_nCH_3$ を、 m は 4 から 12 の整数を、 n は 11 から 17 の整数を表し、 X は N 、 O または S を、 y は 2 から 6 までの整数を、 z は 1 から 100 までの整数を表す。)

【発明の効果】

【0007】

本発明は、これまでの遺伝子導入ベクターとは、化学構造も細胞内導入機構も異なる、遺伝子の細胞内導入のための新規化合物、および、それを用いた遺伝子導入法を与える。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明の化合物の合成は如何なる方法によっても構わない。

10

式(1)で示される化合物のペプチド部分は、4残基以上のアルギニンが連続する配列を含み、全体が20残基以下であれば、如何なる配列であっても構わないが、連続したアルギニン部分が必須であるので、経済的には4残基以上20残基以下のアルギニンオリゴマーが好ましく、6残基以上12残基以下のアルギニンオリゴマーがさらに好ましい。ペプチドの合成法には、一般的に用いられる手法(「ペプチド合成の基礎と実験」、泉屋他著、丸善株式会社)を用いることができる。

式(1)で示される化合物の脂質部分は、天然由来の脂質でも、人工の脂質でも構わない。天然の脂質としては、例えば、グリセロリン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴリン脂質、スフィンゴ糖脂質等の2本以上の長鎖アルキル基を持つ脂質が挙げられ、人工の脂質としては、天然の脂質構造に類似した化合物を始めとして、2本以上の長鎖アルキル基を有する疎水性の部分と親水性の部分を持った化合物一般を挙げることができる。また、それらの脂質構造に、アルキル鎖、オリゴまたはポリエチレングリコール鎖等、ペプチド部分との間に介在するリンカー構造を結合した構造であっても構わない。

20

式(1)で示される化合物のペプチド部分と脂質部分を結ぶ結合は、共有結合であれば、如何なる結合であっても構わない。例えば、エステル結合、アミド結合、エーテル結合、尿素結合、チオエステル結合、チオアミド結合、チオエーテル結合、チオ尿素結合、ジスルフィド結合等を挙げることができ、その生成には、それぞれの結合形成に通常使用される反応を用いることができる。

式(2)で示される化合物の合成手順は、如何なるものであっても構わない。例えば、実施例に示すように、人工脂質を出発原料に、アミノ酸を1残基ずつ、逐次伸長することもできるし、ペプチド部分を予め合成してから脂質部分と結合させることもできるし、それらを組合せた手法を用いることもできる。脂質部分の末端の官能基を、アミノ基、水酸基、チオール基とすることで、ペプチド部分との結合を、それぞれ、アミド結合、エステル結合、チオエステル結合とすることができる。

30

【0009】

本発明の化合物を有効成分とするナノパーティクル、リポソーム、または、ミセルは、その組成の一部として本発明の化合物を含んでいれば、他の成分は如何なるものであっても構わない。

ナノパーティクルは、ナノスケール(1~1000nm)の微粒子を総称する用語であり、ナノスフェア等と称されることもある。また、その構成要素として、無機化合物、有機化合物、あるいは無機-有機ハイブリッド化合物を含み、さらに、有機化合物としては低分子からポリマーまで含んでいる(「Nanoparticles」、Vincent Rotello編、Kluwer Academic Publishers)。本発明のナノパーティクルは、本発明の化合物を有効成分として含んでいれば、上記のナノパーティクルの如何なるものであっても構わない。

40

リポソームの調製には、多くの方法が知られ、また、その形状も一重膜、多重膜、巨大リポソーム等が知られている(「ライフサイエンスにおけるリポソーム」、寺田弘、吉村哲郎編、シュプリンガー・フェアラーク東京)が、本発明のリポソームは、本発明の化合物を有効成分として含んでいれば、如何なる方法を用いて調製しても、如何なる形状をとっていても構わない。

ミセルは、通常、限界ミセル濃度を越える濃度の化合物の水溶液中で形成されるが、化

50

化合物を水に分散させるために、攪拌、加熱、超音波処理等の手段が必要な場合があるし、必要に応じて、化合物の有機溶媒溶液を水に加えた後、有機溶媒を蒸発させることにより調製される場合もある。本発明のミセルは、本発明の化合物を有効成分として含んでいれば、如何なる方法によって調製しても構わない。

本発明の化合物、あるいは、本発明の化合物を有効成分とするナノパーティクル、リポソーム、または、ミセルを構成要素とする遺伝子導入ベクターの調製は如何なる方法によっても構わない。例えば、実施例に示す様に、導入遺伝子と本発明のナノパーティクル、リポソーム、または、ミセルを混合して複合体を形成することによって調製できる。また、ナノパーティクル、リポソーム、または、ミセルに、導入遺伝子を含む成分を内包させることによって調製することもできる。

本発明の遺伝子導入ベクターを用いた細胞内への遺伝子導入法は、遺伝子導入ベクターと遺伝子を導入したい細胞が直接接触することができれば、如何なる方法によっても構わない。また、この遺伝子導入法により、目的遺伝子が導入された細胞を調製することができる。

【0010】

以下に、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。なお、DMFはジメチルホルムアミド、Argはアルギニン、Fmocは9-fluorenylmethoxycarbonyl、Pmcは2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl、Pbfは2,2,4,6,7-pentamethylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl、PyBOPはbenzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate、HBUTUは2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate、PEG1000、PEG2000は、それぞれ、東京化成から購入した平均分子量1000、2000のポリエチレングリコールまたはその末端誘導体、EPCは卵由来フォスファチジルコリン、Cholはコレステロール、DSPeはdistearoylphosphoethanolamine、DiIは1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocycamine、FITCはfluorescein isothiocyanate、PBSはリン酸緩衝塩溶液、MEMは最小必須培地、GFPはgreen fluorescent proteinの略号である。

【実施例1】

【0011】

(N-(N-Arg₄-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(配列番号1)の合成)

Fmoc-Arg(Pmc)-OH(1.02g, 1.54mmol)、HBUTU(584mg, 1.54mmol)、ジメチルアミノピリジン(20.0mg, 0.164mmol)をDMFに溶解し、室温で1時間攪拌した後、N-(6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(600mg, 1.02mmol)を加え、更に室温で一夜攪拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムを別し、溶媒を減圧下留去した。残渣をSephadex LH-20(ジクロロメタン:メタノール=2:1)で精製し、N-(N-(Fmoc-Arg(Pmc))-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(1.20g, 0.969mmol, 95%)を得た。

N-(N-(Fmoc-Arg(Pmc))-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(1.15g, 0.933mmol)をジクロロメタン(2ml)に溶解し、ピペリジン(1ml)を加えて、30分攪拌した。反応溶液を、直接、Sephadex LH-20(ジクロロメタン:メタノール=2:1)で精製し、N-(N-Arg(Pmc))-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(905mg, 0.896mmol, 95%)を得た。

【0012】

Fmoc-Arg(Pmc)-OH(690mg, 1.04mmol)、HBUTU(394mg, 1.04mmol)、ジメチルアミノピリジン(15.0mg, 0.123mmol)をDMFに溶解し、室温で1時間攪拌した後、N-(N-Arg(Pmc))-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシ

10

20

30

40

50

ロキシ)ベンズアミド(700mg, 0.693mmol)を加え、更に室温で一夜攪拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルN60(クロロホルム:メタノール=98:2)で精製し、N-(N-(Fmoc-(Arg(Pmc))₂)-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(1.06g, 0.638mmol, 92%)を得た。

N-(N-(Fmoc-(Arg(Pmc))₂)-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(1.00g, 0.604mmol)をジクロロメタン(2ml)に溶解し、ピペリジン(1ml)を加えて、30分攪拌した。反応溶液を、直接、Sephadex LH-20(ジクロロメタン:メタノール=2:1)で精製し、N-(N-(Arg(Pmc))₂-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(860mg, 0.600mmol, 99%)を得た。

【0013】

Fmoc-Arg(Pmc)-OH(520mg, 0.785mmol)、HBTU(298mg, 0.785mmol)、ジメチルアミノピリジン(15.0mg, 0.123mmol)をDMFに溶解し、室温で1時間攪拌した後、N-(N-(Arg(Pmc))₂-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(750mg, 0.523mmol)を加え、更に室温で一夜攪拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ別し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルN60(クロロホルム:メタノール=98:2)で精製し、N-(N-(Fmoc-(Arg(Pmc))₃)-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(1.03g, 0.496mmol, 95%)を得た。

N-(N-(Fmoc-(Arg(Pmc))₃)-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(1.00g, 0.481mmol)をジクロロメタン(2ml)に溶解し、ピペリジン(1ml)を加えて、30分攪拌した。反応溶液を、直接、Sephadex LH-20(ジクロロメタン:メタノール=2:1)で精製し、N-(N-(Arg(Pmc))₃-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(899mg, 0.484mmol, quant)を得た。

【0014】

Fmoc-Arg(Pmc)-OH(450mg, 0.679mmol)、HBTU(258mg, 0.679mmol)、ジメチルアミノピリジン(15.0mg, 0.123mmol)をDMFに溶解し、室温で1時間攪拌した後、N-(N-(Arg(Pmc))₃-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(840mg, 0.452mmol)を加え、更に室温で一夜攪拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶媒を減圧下留去した。残渣をSephadex LH-20(ジクロロメタン:メタノール=2:1)で精製し、N-(N-(Fmoc-(Arg(Pmc))₄)-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(1.08g, 0.433mmol, 96%)を得た。

N-(N-(Fmoc-(Arg(Pmc))₄)-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(1.00g, 0.400mmol)をジクロロメタン(2ml)に溶解し、ピペリジン(1ml)を加えて、30分攪拌した。反応溶液を、直接、Sephadex LH-20(ジクロロメタン:メタノール=2:1)で精製し、N-(N-(Arg(Pmc))₄-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(909mg, 0.399mmol, quant)を得た。

MALDI-TOFMS (-cyano-4-hydroxycinnamic acid) 2280.24 ([M+H]⁺).

【0015】

N-(N-(Arg(Pmc))₄-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(88.0mg, 0.0386mmol)にトリフルオロ酢酸:水=9:1(1ml)を加えて、3時間攪拌した。反応終了後、反応溶液を濃縮し、ジメチルスルホキシドを加えて溶解し、さらにメタノールを加えた。生じた白色沈澱をろ取り、メタノールで洗浄して

10

20

30

40

50

、N - (N - A r g ₄ - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (55.0mg, 0.0455mmol, 86%) を得た (配列番号 1) 。

MALDI-TOFMS (-cyano-4-hydroxycinnamic acid) 1214.99 ([M+H]⁺)。

【実施例 2】

【0016】

(N - (N - A r g ₆ - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (配列番号 2) の合成)

F m o c - A r g (P m c) - O H (387mg, 0.584mmol)、H B T U (221mg, 0.584mmol)、ジメチルアミノピリジン (15.0mg, 0.123mmol) を D M F に溶解し、室温で 1 時間 10
 攪拌した後、N - (N - (A r g (P m c)) ₄ - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (887 mg, 0.389 mmol) を加え、更に室温で一夜攪拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲル N 6 0 (クロロホルム : メタノール = 9 8 : 2) で精製し、N - (N - (F m o c - (A r g (P m c)) ₅) - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (1.08g, 0.371mmol, 95%) を得た。

N - (N - (F m o c - (A r g (P m c)) ₅) - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (1.00g, 0.342mmol) をジクロロメタン (2ml) に溶解し、ピペリジン (1ml) を加えて、30分攪拌した。反応溶液を、直接、S e p h a d e x 20
 L H - 2 0 (ジクロロメタン : メタノール = 2 : 1) で精製し、N - (N - (A r g (P m c)) ₅ - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (903mg, 0.334mmol, 98%) を得た。

【0017】

F m o c - A r g (P m c) - O H (325mg, 0.490mmol)、H B T U (338mg, 0.890mmol)、ジメチルアミノピリジン (15.0mg, 0.123mmol) を D M F に溶解し、室温で 1 時間 30
 攪拌した後、N - (N - (A r g (P m c)) ₅ - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (882mg, 0.326mmol) を加え、更に室温で3時間攪拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲル N 6 0 (クロロホルム : メタノール = 9 8 : 2) で精製し、N - (N - (F m o c - (A r g (P m c)) ₆) - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (1.04g, 0.311mmol, 95%) を得た。 30

N - (N - (F m o c - (A r g (P m c)) ₆) - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (1.00g, 0.299mmol) をジクロロメタン (2ml) に溶解し、ピペリジン (1ml) を加えて、30分攪拌した。反応溶液を、直接、S e p h a d e x 40
 L H - 2 0 (ジクロロメタン : メタノール = 2 : 1) で精製し、N - (N - (A r g (P m c)) ₆ - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (906mg, 0.290mmol, 97%) を得た。

MALDI-TOFMS (-cyano-4-hydroxycinnamic acid) 2123.75 ([M+H]⁺)。

【0018】

N - (N - (A r g (P m c)) ₆ - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (500mg, 0.160mmol) にトリフルオロ酢酸 : 水 = 9 : 1 (1ml) を加えて、3時間攪拌した。反応終了後、反応溶液を濃縮し、ジメチルスルホキシドを加えて溶解し、さらにメタノールを加えた。生じた白色沈澱をろ取し、メタノールで洗浄し、N - (N - A r g ₆ - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (208mg, 0.136mmol, 85%) を得た (配列番号 2) 。

【実施例 3】

【0019】

(N - (N - A r g ₈ - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (配列番号 3) の合成)

10

20

30

40

50

Fmoc-Arg(Pmc)-OH (286mg, 0.432mmol)、PyBOP (225mg, 0.432mmol) を DMF に溶解し、室温で時間攪拌した後、N-(N-(Arg(Pmc))₆-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド (900mg, 0.288mmol) を加え、更に室温で一夜攪拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶媒を減圧下留去し、未精製の N-(N-(Fmoc-(Arg(Pmc)))₇-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドを得た。

未精製の N-(N-(Fmoc-(Arg(Pmc)))₇-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドをジクロロメタン (3ml) に溶解し、ピペリジン (2ml) を加えて、30分攪拌した。反応溶液を、直接、Sephadex LH-20 (ジクロロメタン：メタノール = 2 : 1) で精製し、N-(N-(Arg(Pmc))₇-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド (950mg, 0.268mmol, 93% (2工程での収率)) を得た。

【0020】

Fmoc-Arg(Pmc)-OH (266 mg, 0.402 mmol)、PyBOP (210mg, 0.402mmol) を DMF に溶解し、室温で1時間攪拌した後、N-(N-(Arg(Pmc))₇-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド (950mg, 0.268mmol) を加え、更に室温で一夜攪拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲル N60 (クロロホルム：メタノール = 98 : 2) で精製し、N-(N-(Fmoc-(Arg(Pmc)))₈-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド (1.01g, 0.241mmol, 90%) を得た。

MALDI-TOFMS (Dithranol) 4192.80 ([M+H]⁺)。

【0021】

N-(N-(Fmoc-(Arg(Pmc)))₈-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド (350mg, 0.0835mmol) にトリフルオロ酢酸：水 = 9 : 1 (2ml) を加えて、3時間攪拌した。反応終了後、反応溶液を減圧下濃縮し、未精製の N-(N-(Fmoc-Arg)₈-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドを得た。

未精製の N-(N-(Fmoc-Arg)₈-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドをジクロロメタン (1ml) に溶解し、ピペリジン (0.5ml) を加えて、30分攪拌した。反応溶液にメタノールを加え、生じた白色沈澱をろ取し、メタノールで洗浄し、N-(N-Arg)₈-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド (152mg, 0.0825mmol, 99% (2工程での収率)) を得た (配列番号 3)。

【実施例 4】

【0022】

(N-(N-Arg)₁₀-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド (配列番号 4) の合成)

N-(N-(Fmoc-(Arg(Pmc)))₈-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド (1.00g, 0.239mmol) をジクロロメタン (3ml) に溶解し、ピペリジン (2ml) を加えて、30分攪拌した。反応溶液を、直接、Sephadex LH-20 (ジクロロメタン：メタノール = 2 : 1) で精製し N-(N-(Arg(Pmc))₈-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド (926mg, 0.233mmol, 98%) を得た。

Fmoc-Arg(Pmc)-OH (230mg, 0.348mmol)、PyBOP (181mg, 0.348mmol) を DMF に溶解し、室温で1時間攪拌した後、N-(N-(Arg(Pmc))₈-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド (920mg, 0.232mmol) を加え、更に室温で一夜攪拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶

媒を減圧下留去し、未精製の N - (N - (F m o c - A r g (P m c))₉) - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドを得た。

未精製の N - (N - (F m o c - (A r g (P m c))₉) - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドをジクロロメタン(2ml)に溶解し、ピペリジン(1ml)を加えて、30分撹拌した。反応溶液を、直接、Sephadex LH-20(ジクロロメタン:メタノール=2:1)で精製し、N - (N - (A r g (P m c))₉ - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(922mg, 0.209mmol, 90%(2工程での収率))を得た。

F m o c - A r g (P m c) - O H (204mg, 0.307mmol)、P y B O P (160mg, 0.307mmol)をDMFに溶解し、室温で1時間撹拌した後、N - (N - (A r g (P m c))₉ - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(900mg, 0.205mmol)を加え、更に室温で5時間撹拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルN60(クロロホルム:メタノール=98:2)で精製し、N - (N - (F m o c - (A r g (P m c))₁₀) - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(982mg, 0.195mmol, 95%)を得た。

MALDI-TOFMS (-cyano-4-hydroxycinnamic acid) 5036.4092 ([M+H]⁺)。

【0023】

N - (N - (F m o c - (A r g (P m c))₁₀) - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(200mg, 0.0397mmol)をジクロロメタン(2ml)に溶解し、ピペリジン(1ml)を加えて、30分撹拌した。反応溶液はSephadex LH-20(ジクロロメタン:メタノール=2:1)により、ピペリジンを除去し、未精製の N - (N - (A r g (P m c))₁₀ - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドを得た。

未精製の N - (N - (A r g (P m c))₁₀ - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドに、トリフルオロ酢酸:水=9:1(1ml)を加えて、5時間撹拌した。反応終了後、反応溶液を濃縮し、ジメチルスルホキシドを加えて溶解し、さらにメタノールを加えた。生じた白色沈澱をろ取し、メタノールで洗浄し、N - (N - A r g₁₀ - 6 - アミノヘキシル) - 3 , 5 - ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(51.2 mg, 0.0238 mmol, 60% 2工程での収率)を得た(配列番号4)。

【実施例5】

【0024】

(N - (N - A r g₄ - アミノPEG2000) - 3 , 5 - ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(配列番号1)の合成)

3 , 5 - ビス(ドデシロキシ)安息香酸(1.00g, 2.04mmol)、水溶性カルボジイミド(480mg, 2.50mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(383mg, 2.50mmol)をDMFに溶解し、室温で1時間撹拌した後、ジアミノポリエチレングリコール(ジアミノPEG2000)(5.00g, 2.50mmol)を加え、更に室温で一夜撹拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルN60(クロロホルム:メタノール=98:2)で精製し、N - アミノPEG2000 - 3 , 5 - ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(2.16g, 1.02mmol, 50%)を得た。

【0025】

F m o c - A r g (P m c) - O H (1.07g, 1.62mmol)、P y B O P (842mg, 1.62mmol)をDMFに溶解し、室温で1時間撹拌した後、N - アミノPEG2000 - 3 , 5 - ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(2.00g, 0.808mmol)を加え、更に室温で一夜撹拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルN60(クロロホルム:メタノール=98:2)で精製し、N - (N - (F m o c - A r g (P m c)) - アミノPEG2000) - 3 , 5 - ビス(ドデシロキシ)ベンズア

10

20

30

40

50

ミド (2.46g, 0.789mmol, 98%) を得た。

N - (N - (F m o c - A r g (P m c)) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (2.45g, 0.785mmol) をジクロロメタン (3ml) に溶解し、ピペリジン (2ml) を加えて、30分攪拌した。反応溶液を、直接、S e p h a d e x L H - 2 0 (ジクロロメタン : メタノール = 2 : 1) で精製し、N - (N - A r g (P m c) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (2.23g, 0.770mmol, 98%) を得た。

【 0 0 2 6 】

F m o c - A r g (P m c) - O H (1.01g, 1.52mmol)、P y B O P (790mg, 1.52mmol) をDMFに溶解し、室温で1時間攪拌した後、N - (N - A r g (P m c) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (2.20g, 0.759mmol) を加え、更に室温で3時間攪拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルN60 (クロロホルム : メタノール = 98 : 2) で精製し、N - (N - (F m o c - (A r g (P m c)))) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (2.47g, 0.698mmol, 92%) を得た。

N - (N - (F m o c - (A r g (P m c)))) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (2.40g, 0.678mmol) をジクロロメタン (3ml) に溶解し、ピペリジン (2ml) を加えて、30分攪拌した。反応溶液を、直接、S e p h a d e x L H - 2 0 (ジクロロメタン : メタノール = 2 : 1) で精製し、N - (N - (A r g (P m c))) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (2.26g, 0.678mmol, quant) を得た。

【 0 0 2 7 】

F m o c - A r g (P m c) - O H (880mg, 1.33mmol)、P y B O P (690mg, 1.33mmol) をDMFに溶解し、室温で1時間攪拌した後、N - (N - (A r g (P m c))) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (2.20mg, 0.663mmol) を加え、更に室温で5時間攪拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶媒を減圧下留去し、未精製のN - (N - (F m o c - (A r g (P m c)))) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミドを得た。

未精製のN - (N - (F m o c - (A r g (P m c)))) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (3ml) に溶解し、ピペリジン (2ml) を加えて、30分攪拌した。反応溶液を、直接、S e p h a d e x L H - 2 0 (ジクロロメタン : メタノール = 2 : 1) で精製し、N - (N - (A r g (P m c))) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (2.28g, 0.610mmol, 92% (2工程での収率)) を得た。

【 0 0 2 8 】

F m o c - A r g (P m c) - O H (709mg, 1.07mmol)、P y B O P (557mg, 1.07mmol) をDMFに溶解し、室温で1時間攪拌した後、N - (N - (A r g (P m c))) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (2.00g, 0.535mmol) を加え、更に室温で3時間攪拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶媒を減圧下留去し、N - (N - (F m o c - (A r g (P m c)))) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (1.95g, 0.446mmol, 83%) を粗生成物として得た。

N - (N - (F m o c - (A r g (P m c)))) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (200mg, 0.0456mmol) にトリフルオロ酢酸 : 水 = 9 : 1 (1ml) を加えて、3時間攪拌した。反応終了後、反応溶液を減圧下濃縮し、未精製のN - (N - (F m o c - A r g)) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミドを得た。

未精製の N - (N - (F m o c - A r g ₄) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミドをジクロロメタン (2ml) に溶解し、ピペリジン (1ml) を加えて、30分攪拌した。反応溶液を、直接、Sephadex LH-20 (ジクロロメタン：メタノール = 2 : 1) で精製し N - (N - A r g ₄ - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (102mg, 0.0326mmol, 68% (2工程での収率)) を得た (配列番号 1)。

MALDI-TOFMS (-cyano-4-hydroxycinnamic acid) m/z 3096.13, 3140.03, 3184.71 ([M+H]⁺)。

【実施例 6】

【0029】

(N - (N - A r g ₆ - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (配列番号 2)) の合成

ペプチド研究所から購入した F m o c - (A r g (P b f))₆ - O H (100mg, 0.0372mmol)、PyBOP (19.0mg, 0.0372mmol) を DMF に溶解し、室温で1時間攪拌した後、N - アミノ P E G 2 0 0 0 - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (77.0mg, 0.0310mmol) を加え、更に室温で2時間攪拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲル N 6 0 (クロロホルム：メタノール = 98 : 2) で精製し、N - (N - (F m o c - (A r g (P b f))₆) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (112mg, 0.0218mmol, 70%) を得た。

N - (N - (F m o c - (A r g (P b f))₆) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (110mg, 0.0214mmol) にトリフルオロ酢酸：水 = 9 : 1 (1ml) を加えて、5時間攪拌した。反応終了後、反応溶液を減圧下濃縮し、未精製の N - (N - (F m o c - A r g ₆) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミドを得た。

未精製の N - (N - (F m o c - A r g ₆) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミドをジクロロメタン (2ml) に溶解し、ピペリジン (1ml) を加えて、30分攪拌した。反応溶液を、直接、Sephadex LH-20 (ジクロロメタン：メタノール = 2 : 1) で精製し、N - (N - A r g ₆ - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (70.2mg, 0.0205mmol, 96% (2工程での収率)) を得た (配列番号 2)。

MALDI-TOFMS (-cyano-4-hydroxycinnamic acid) m/z 3584.62, 3628.17, 3672.29 ([M+H]⁺)。

【実施例 7】

【0030】

(N - (N - A r g ₈ - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (配列番号 3)) の合成

ペプチド研究所から購入した F m o c - (A r g (P b f))₆ - O H (100mg, 0.0372mmol)、PyBOP (19.0mg, 0.0372mmol) を DMF に溶解し、室温で1時間攪拌した後、N - (N - (A r g (P m c))₂ - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (103mg, 0.0310mmol) を加え、更に室温で2時間攪拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲル N 6 0 (クロロホルム：メタノール = 98 : 2) で精製し、N - (N - (F m o c - (A r g (P b f))₆ - (A r g (P m c))₂) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (97.0mg, 0.0161mmol, 52%) を得た。

N - (N - (F m o c - (A r g (P b f))₆ - (A r g (P m c))₂) - アミノ P E G 2 0 0 0) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド (95.0mg, 0.0158mmol) にトリフルオロ酢酸：水 = 9 : 1 (1ml) を加えて、3時間攪拌した。反応終了後、反応溶

10

20

30

40

50

液を減圧下濃縮し、未精製のN-(N-(Fmoc-Arg₈)-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドを得た。

未精製のN-(N-(Fmoc-Arg₈)-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドをジクロロメタン(1ml)に溶解し、ピペリジン(0.5ml)を加えて、30分撹拌した。反応溶液を、直接、Sephadex LH-20(ジクロロメタン:メタノール=2:1)で精製し、N-(N-Arg₈-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(55.2mg, 0.0147mmol, 93%(2工程での収率))を得た(配列番号3)。

MALDI-TOFMS (-cyano-4-hydroxycinnamic acid) m/z 3670.02, 3714.17, 3757.87 ([M+H]⁺)。 10

【実施例8】

【0031】

(N-(N-Arg₁₀-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(配列番号4)の合成)

ペプチド研究所から購入したFmoc-(Arg(Pbf))₆-OH(100mg, 0.0372mmol)、PyBOP(23.0mg, 0.0442mmol)をDMFに溶解し、室温で1時間撹拌した後、N-(N-(Arg(Pmc))₄-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(129mg, 0.0310mmol)を加え、更に室温で3時間撹拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、有機層を分離した。有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルN60(クロロホルム:メタノール=98:2)で精製し、N-(N-(Fmoc-(Arg(Pbf))₆-(Arg(Pmc))₄)-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(148mg, 0.0220mmol, 71%)を得た。 20

N-(N-(Fmoc-(Arg(Pbf))₆-(Arg(Pmc))₄)-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(140mg, 0.0208mmol)にトリフルオロ酢酸:水=9:1(1ml)を加えて、5時間撹拌した。反応終了後、反応溶液を減圧下濃縮し、未精製のN-(N-(Fmoc-Arg₁₀)-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドを得た。

未精製のN-(N-(Fmoc-Arg₁₀)-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドをジクロロメタン(1ml)に溶解し、ピペリジン(0.5ml)を加えて、30分撹拌した。反応溶液を、直接、Sephadex LH-20(ジクロロメタン:メタノール=2:1)で精製し、N-(N-Arg₁₀-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(70.0mg, 0.0166mmol, 80%(2工程での収率))を得た(配列番号4)。 30

MALDI-TOFMS (-cyano-4-hydroxycinnamic acid) m/z 4123.36, 4166.18, 4209.92 ([M+H]⁺)。 40

【実施例9】

【0032】

(オリゴアルギニン脂質含有リポソームの細胞膜透過性)

リポソームの調製は、ドライフィルム法によって行った。N-(N-Arg₆-6-アミノヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドを、EPC:Chol:オリゴアルギニン脂質=7:3:0.05(モル比)となるように、クロロホルム溶液とし、ロータリーエバポレーターで溶媒を蒸発させて、乾燥したフィルムを作成した。これに20mMカルセイン水溶液を加えて水和し、超音波処理によって、リポソームを作成した(L-Arg6と略記する)。対照として、オリゴアルギニン脂質を含まないリポソームを、EPC:Chol=7:3(モル比)を用いて同様に調製した(L-NonArgと略記する)。 40

レーザーゼータ電位計(ELS-800、大塚電子製)を用いて平均粒子径およびポテンシャルを測定すると、L-NonArgは、それぞれ、483nm、-12.8mV、L-Arg6は、それぞれ、116nm、-7.51mVであった。 50

【0033】

各リポソームの細胞内への取り込みは、総脂質量0.25~2.5mg/mlのリポソーム溶液をHeLa細胞と1時間接触させた後、水洗してから共焦点レーザー顕微鏡で観察した。対照のL-NonArgにはほとんど蛍光が観察されなかったのに対し、L-Arg6では、全ての濃度で、また、37でも4でも、ほぼ全ての細胞で蛍光が観察され、L-Arg6が細胞膜を透過することが確認された。また、4でも膜透過が観察されることから、その膜透過機構はエンドサイトーシスによらないものであることが示唆された。

【実施例10】

【0034】

(フローサイトメトリーを用いた細胞膜透過性の解析)

実施例9と同様の方法によって、L-Arg6、L-NonArg、および、N-(N-Arg₆-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド、または、N-(N-Arg₈-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドを含有するリポソーム(それぞれ、L-PEG-Arg6、L-PEG-Arg8と略記する。)を調製した。さらに、赤色蛍光色素DiIを含むエタノール溶液を全脂質量に対し、0.04mol%となるように添加して、カルセインとDiIで2重に染色されたりポソームとした。

平均粒子径は、L-NonArgが129nm、L-Arg6が291nm、L-PEG-Arg6が579nm、L-PEG-Arg8が223nmであった。

各リポソームの総脂質量2μg/mlの濃度の溶液を、1ml/ウエルずつHeLa細胞と接触させた。3時間の接触の後、リポソーム溶液を除き、リン酸バッファーで洗浄した。細胞を0.5ml/ウエルのフローサイトメトリー用バッファーに懸濁させ、フローサイトメトリーで解析した結果を図1に示す。この結果から、L-Arg6>L-PEG-Arg8>L-PEG-Arg6の順に取り込み効率が高くなり、L-Arg6が最も高い取り込み効率を示すことが判った。

【実施例11】

【0035】

(オリゴアルギニン脂質含有ナノパーティクルの細胞膜透過性)

N-(N-Arg₆-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド、または、N-(N-Arg₈-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド、または、PEG2000-DSPPEを含有するナノパーティクルを、Chol:Tween80:PEG脂質誘導体=90:5:5(モル比)として、改良エタノール注入法によって調製した(それぞれ、NP-PEG-Arg6、NP-PEG-Arg8、NP-PEGと略記する。)。例えば、NP-PEG-Arg6は、10mgのChol、1.9mgのTween80、4.9mgのN-(N-Arg₆-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドを、NP-PEG-Arg8は、10mgのChol、1.9mgのTween80、5.4mgのN-(N-Arg₈-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドを、NP-PEGは10mgのChol、1.9mgのTween80、3.9mgのPEG2000-DSPPEをエタノールに溶解後、改良エタノール注入法によって10mlの溶液として調製する。

調製直後および6日後の平均粒子径は、NP-PEG-Arg6が、それぞれ、136.7nm、162.8nm、NP-PEG-Arg8が、それぞれ、123.1nm、144.1nm、NP-PEGが、それぞれ、174.6nm、136.6nmであった。

それぞれのナノパーティクル溶液10μlあたり2μgのプラスミドDNAを混合して、ナノパーティクルとDNAの複合体を形成させた。DNA混合後の平均粒子径は、NP-PEG-Arg6が396.3nm、NP-PEG-Arg8が641.1nm、NP-PEGが114.2nmであり、NP-PEG-Arg6とNP-PEG-Arg8はDNAとの複合体を形成したが、NP-PEGはDNAとの複合体を形成しないことが明

10

20

30

40

50

らかになった。

【0036】

次に、フローサイトメトリーを用いて、遺伝子の細胞への取り込みを見るために、4 μ gのFITC標識オリゴDNA(30mer)と各ナノパーティクル溶液20 μ lを混合して、10分間放置した。この溶液に1mlの無血清MEM培地を加え、35mmディッシュに培養したHeLa細胞に添加した。添加後、1時間後あるいは3時間後に、トリプシン/EDTAを用いて細胞を回収し、洗浄の後、フローサイトメトリーによってFITC標識オリゴDNAの細胞内取り込みを調べた結果を図2に示した。

NP-PEG-Arg6およびNP-PEG-Arg8によるFITC標識DNAの細胞内移行量の増加は3時間後において観察された。

10

【実施例12】

【0037】

(オリゴアルギニン脂質ミセルの細胞膜透過性)

N-(N-Arg₆-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド、または、N-(N-Arg₈-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド、または、PEG2000-DSPPEを水に溶解させて20mg/mlのミセル溶液とした(それぞれ、M-PEG-Arg6、M-PEG-Arg8、M-PEGと略記する。)

4 μ gのFITC標識オリゴDNA(30mer)と各ミセル溶液10 μ lを混合して、10分間放置した。この溶液に1mlの無血清MEM培地を加え、35mmディッシュに培養したHeLa細胞に添加した。添加後、1時間後あるいは3時間後に、トリプシン/EDTAを用いて細胞を回収し、洗浄の後、フローサイトメトリーによってFITC標識オリゴDNAの細胞内取り込みを調べた結果を図3に示した。

20

M-PEG-Arg6およびM-PEG-Arg8によるFITC標識DNAの細胞内移行は1時間後には観測され、細胞内移行量は、添加後1時間より3時間後の方が高かった。

【実施例13】

【0038】

(オリゴアルギニン脂質ミセルの細胞膜透過能の共焦点レーザー顕微鏡解析)

実施例12と同様に調製したM-PEG-Arg6またはM-PEG-Arg8の溶液を、4 μ g FITC標識オリゴDNA(30mer)に対して各ミセル溶液10 μ lを混合して、10分間放置することにより、DNAとの複合体を調製した。これに1ml無血清MEM培地を加え、35mmディッシュに培養したHeLa細胞に添加した。添加後3時間目にHeLa細胞をPBS(pH7.4)にて洗浄し、10%ホルマリンにて細胞を固定した後、共焦点レーザー顕微鏡でDNAの細胞内移行を観察した結果を図4に示した。

30

M-PEG-Arg6とM-PEG-Arg8、どちらを用いた場合においても、細胞内に広くDNAの存在を示す蛍光が観察された。

【実施例14】

【0039】

(オリゴアルギニン脂質ミセルの細胞膜透過性)

N-(N-Arg₈-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド、または、N-(N-Arg₁₀-アミノPEG2000)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドを水に溶解させて20mg/mlのミセル溶液とした(それぞれ、M-PEG-Arg8、M-PEG-Arg10と略記する。)

2 μ gのFITC標識オリゴDNA(30mer)と各ミセル溶液5 μ lを混合して、10分間放置した。この溶液に1mlの無血清MEM培地を加え、35mmディッシュに培養したHeLa細胞に添加した。添加後3時間後に、トリプシン/EDTAを用いて細胞を回収し、洗浄の後、フローサイトメトリーによってFITC標識オリゴDNAの細胞内取り込みを調べた結果を図5に示した。

40

50

M - P E G - A r g 8 および M - P E G - A r g 10 による F I T C 標識 D N A の細胞内移行が観測された。

【実施例 15】

【0040】

(オリゴアルギニン脂質ミセルによって細胞内に導入された遺伝子の発現)

N - (N - A r g ₄ - アミノ P E G 2000) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド、N - (N - A r g ₆ - アミノ P E G 2000) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド、N - (N - A r g ₈ - アミノ P E G 2000) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミド、N - (N - A r g ₁₀ - アミノ P E G 2000) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミドを水に溶解させて 20 mg / ml のミセル溶液を調製した。
(それぞれ、M - P E G - A r g 4、M - P E G - A r g 6、M - P E G - A r g 8、M - P E G - A r g 10 と略記する。)

10

サイトメガロウイルスのプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入した pCMV-1uc プラスミドと各ミセル溶液を、プラスミド 2 μg に対し、ミセル溶液 5 μl、チューブ内で混合させ、10 分間室温にて放置した。

その後、チューブに 1 ml 血清不含 MEM 培地を加え混合させた後、6 穴プレートにて培養した HeLa 細胞に添加した。3 時間後に 1 ml の 5 % 血清含有 MEM 培地を添加し、さらに 21 時間放置した。HeLa 細胞を PBS (pH 7.4) にて洗浄後、細胞溶解液にて細胞を溶解させた。その後凍結融解を 1 回行い、15,000 rpm、5 秒間、遠心分離を行った。ルシフェラーゼ遺伝子の発現は、その上清を採取し、ピッカジーン (東洋インキ製造株式会社製) を用いてルシフェラーゼ活性を測定することにより確認した。
各溶液の蛋白質濃度を測定し、ルシフェラーゼ値を、count per sec (cps) / μg 蛋白質に換算した結果を図 6 に示す。

20

M - P E G - A r g 4、M - P E G - A r g 6、M - P E G - A r g 8、M - P E G - A r g 10 のいずれを用いた場合もルシフェラーゼ活性が観測された。特に、M - P E G - A r g 8、M - P E G - A r g 10 を用いた場合に高いルシフェラーゼ活性が得られた。

【実施例 16】

【0041】

(オリゴアルギニン脂質ミセルを用いた GFP の細胞内での発現)

30

N - (N - A r g ₁₀ - アミノ P E G 2000) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミドを水に溶解させて 20 mg / ml のミセル溶液とした (M - P E G - A r g 10 と略記する。)。

サイトメガロウイルスのプロモーターの下流に GFP 遺伝子を挿入した pEGFP プラスミド (Clontech 社製) 2 μg に対し、ミセル溶液 5 μl をチューブ内で混合させ、10 分間室温にて放置した。

その後、チューブに 1 ml 血清不含 MEM 培地を加え混合させた後、6 穴プレートにて培養した HeLa 細胞に添加した。3 時間後に 1 ml の 5 % 血清含有 MEM 培地を添加し、さらに 21 時間放置した。

培地を除いて、HeLa 細胞を PBS (pH 7.4) にて洗浄し、10 % ホルマリンにて細胞を固定した後、共焦点レーザー顕微鏡で GFP の細胞内での発現を観察した結果を図 7 に示した。また、トリプシン / EDTA を用いて細胞を回収し、洗浄の後、フローサイトメトリーによって GFP が発現した細胞を解析した結果を図 8 に示した。

40

上記 2 種の解析手法によって、M - P E G - A r g 10 によって、細胞内に GFP 遺伝子が導入され、蛋白質として発現されることが明らかになった。

【0042】

[参考例 1]

(N - (8 - アミノ - 3 , 6 - ジオキサオクチル) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミドの合成)

3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) 安息香酸 (0.50g , 1.02mmol) をジクロロメタン (20ml)

50

に溶解し、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (0.23g, 1.22mmol) と 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (0.17g, 1.22mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。その後、1, 8 - ジアミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン (0.24ml, 2.04mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、反応液をクロロホルムで抽出した後、有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。硫酸ナトリウムをろ別した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 5 : 1) により精製し、目的物 (0.25g, 39%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600MHz) 6.91 (s, 2H)、6.54 (d, 1H, $J = 2.1\text{Hz}$)、3.94 (t, 4H, $J = 7.2\text{Hz}$)、3.68 (m, 12H)、3.11 (s, 2H)、1.74 (m, 4H)、1.41 (m, 4H)、1.26 (m, 32H)、0.88 (t, 6H, $J = 7.2\text{Hz}$)。 10

MALDI-TOFMS (2,5-Dihydroxybenzoic acid) m/z 622 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。

【 0 0 4 3 】

[参考例 2]

(N - (8 - アミノ - 3 , 6 - ジオキサオクチル) - 3 , 4 , 5 - トリス (ドデシロキシ) ベンズアミドの合成)

3, 4, 5 - トリス (ドデシロキシ) 安息香酸 (1.10g, 1.63mmol) をジクロロメタン (100ml) に溶解し、水溶性カルボジイミド (0.381g, 1.96mmol)、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール (0.261g, 1.96mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。その後、1, 8 - ジアミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン (1.21 g, 8.15 mmol) を加え、室温でさらに 1 時間攪拌した。反応溶液は飽和重曹水、飽和食塩水で順次洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した。硫酸ナトリウムをろ別し、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 5 0 : 1) により精製し、目的物 (922mg, 1.14mmol, 70%) を得た。 20

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600MHz) 6.99 (2H, s)、6.72 (1H, brs)、4.01 (4H, t, $J = 6.5\text{Hz}$)、3.98 (2H, t, $J = 6.5\text{Hz}$)、3.66 (8H, m)、3.50 (2H, t, $J = 5.5\text{Hz}$)、2.84 (2H, t, $J = 5.5\text{Hz}$)、1.80 (4H, quint, $J = 6.8\text{Hz}$)、1.73 (2H, quint, $J = 6.8\text{Hz}$)、1.34-1.26 (54H, m)、0.88 (9H, t, $J = 6.8\text{Hz}$)。

MALDI-TOFMS (Dithranol) calcd m/z 806.08 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。

【 0 0 4 4 】

[参考例 3]

(N - (1 7 - アミノ - 3 , 6 , 9 , 1 2 , 1 5 - ペンタオキサヘプタデシル) - 3 , 5 - ビス (ドデシロキシ) ベンズアミドの合成)

3, 5 - ビス (ドデシロキシ) 安息香酸 (0.58g, 1.19mmol) をジクロロメタン (30ml) に溶解し、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (0.29g, 1.55mmol) と 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (0.21g, 1.55mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。その後、1, 1 7 - ジアミノ - 3, 6 9, 1 2, 1 5 - ペンタオキサヘプタデカン (2.33g, 3.09mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、反応液をクロロホルムで抽出した後、有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。硫酸ナトリウムをろ別した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 9 : 1) により精製し、目的物 (0.33g, 37%) を得た。 40

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600MHz) 6.96 (d, 2H, $J = 2.1\text{Hz}$)、6.62 (t, 1H, $J = 2.1\text{Hz}$)、3.99 (t, 4H, $J = 6.5\text{Hz}$)、3.70 (t, 2H, $J = 5.2\text{Hz}$)、3.62 (m, 20H)、3.56 (t, 2H, $J = 5.5\text{Hz}$)、3.09 (t, 2H, $J = 5.2\text{Hz}$)、1.77 (m, 4H)、1.48 (m, 4H)、1.34 (m, 32H)、0.89 (t, 6H, $J = 7.2\text{Hz}$)。

MALDI-TOFMS (2,5-Dihydroxybenzoic acid) m/z 754 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。

【 0 0 4 5 】

[参考例 4]

(N - (1 7 - アミノ - 3 , 6 , 9 , 1 2 , 1 5 - ペンタオキサヘプタデシル) - 3 , 4 , 5 - トリス (ドデシロキシ) ベンズアミドの合成)

3, 4, 5 - トリス (ドデシロキシ) 安息香酸 (250mg, 0.371mmol) をジクロロメタン (20ml) に溶解し、水溶性カルボジイミド (84.4mg, 0.440mmol)、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール (60.0mg, 0.440mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。その後、1, 17 - ジアミノ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデカン (415mg, 1.48mmol) を加え、室温でさらに1時間攪拌した。反応溶液は飽和重曹水、飽和食塩水で順次洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した。硫酸ナトリウムをろ別し、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 50 : 1) により精製し、目的物 (184mg, 0.196mmol, 53%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600MHz) 7.01 (2H, s)、6.99 (1H, brs)、4.01 (4H, t, $J = 6.5\text{Hz}$)、3.98 (2H, $J = 6.5\text{Hz}$)、3.75-3.60 (22H, m), 3.49 (2H, t, $J = 5.1\text{Hz}$)、2.84 (2H, t, $J = 5.1\text{Hz}$)、1.80 (4H, quint, $J = 6.8\text{Hz}$)、1.73 (2H, quint, $J = 6.8\text{Hz}$)、1.29 (6H, m)、1.28-1.26 (48H, m)、0.88 (9H, t, $J = 7.2\text{Hz}$)。

MALDI-TOFMS (Dithranol) m/z 938.85 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。

【0046】

[参考例5]

(N - (アミノPEG1000) - 3, 4, 5 - トリス (ドデシロキシ) ベンズアミドの合成)

3, 4, 5 - トリス (ドデシロキシ) 安息香酸 (1.60g, 2.37mmol) をジクロロメタン (100ml) に溶解し、水溶性カルボジイミド (736mg, 38.4mmol)、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール (519mg, 38.4mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。その後、ジアミノPEG1000 (8.29g, 8.31mmol) を加え、室温でさらに1時間攪拌した。反応溶液は飽和重曹水、飽和食塩水で順次洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した。硫酸ナトリウムをろ別し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 50 : 1) により精製し、目的物 (373mg, 0.231mmol, 9%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600MHz) 7.00 (2H, s)、6.73 (1H, brs)、4.01 (4H, t, $J = 6.5\text{Hz}$)、3.98 (2H, t, $J = 6.5\text{Hz}$)、3.72-3.58 (m)、3.23 (2H, brs)、1.80 (4H, quint, $J = 6.8\text{Hz}$)、1.72 (2H, quint, $J = 6.8\text{Hz}$)、1.46 (6H, quint, $J = 6.8\text{Hz}$)、1.35-1.26 (48H, m)、0.88 (9H, t, $J = 6.9\text{Hz}$)。

MALDI-TOFMS (Dithranol) m/z 1333.30、1377.25、1422.30、1466.25、1509.25、1553.20、1598.20、1642.23、1686.18 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。

【産業上の利用可能性】

【0047】

本発明は、新規な遺伝子導入ベクターを提供するものであり、遺伝性疾患、癌等の治療薬、再生医療における細胞治療、細胞を用いた実験用試薬等としての利用が期待される。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】フローサイトメトリーを用いたオリゴアルギニン脂質含有リポソームの細胞膜透過性の解析結果を示す図である。

【図2】フローサイトメトリーを用いたオリゴアルギニン脂質含有ナノパーティクルの細胞膜透過性の解析結果を示す図である。

【図3】フローサイトメトリーを用いたオリゴアルギニン脂質含有ミセルの細胞膜透過性の解析結果を示す図である。

【図4】共焦点レーザー顕微鏡を用いたオリゴアルギニン脂質含有ミセルによるFITC標識オリゴDNAの細胞内導入の解析結果を示す図である。

【図5】フローサイトメトリーを用いたオリゴアルギニン脂質含有ミセルの細胞膜透過性の解析結果を示す図である。

【図6】ルシフェラーゼ活性を用いたオリゴアルギニン脂質含有ミセルによる遺伝子細胞内導入の解析結果を示す図である。

【図7】共焦点レーザー顕微鏡を用いたオリゴアルギニン脂質含有ミセルによるGFPの細胞内発現の解析結果を示す図である。

【図8】フローサイトメトリーを用いたオリゴアルギニン脂質含有ミセルによるGFPの細胞内発現の解析結果を示す図である。

【符号の説明】

【0049】

図1：Aはカルセインの蛍光で測定した結果、BはDiIの蛍光で測定した結果を示す。また、1は細胞の自家蛍光、2はL-NonArg、3はL-PEG-Arg6、4はL-PEG-Arg8、5はL-Arg6と反応させた結果を示す。

図2：Aは1時間後の、Bは3時間後の結果を示す。

図3：Aは1時間後の、Bは3時間後の結果を示す。

図7：Aはコントロール、BはM-PEG-Arg10を3時間作用させた結果を示す。

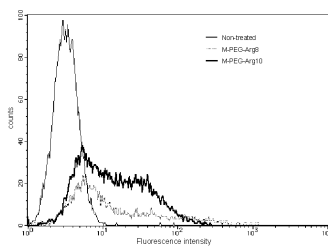
10

【配列表フリーテキスト】

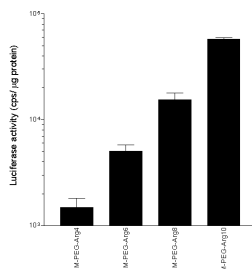
【0050】

配列番号1～4：オリゴアルギニン

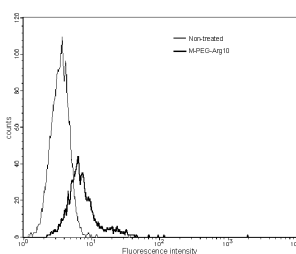
【図5】



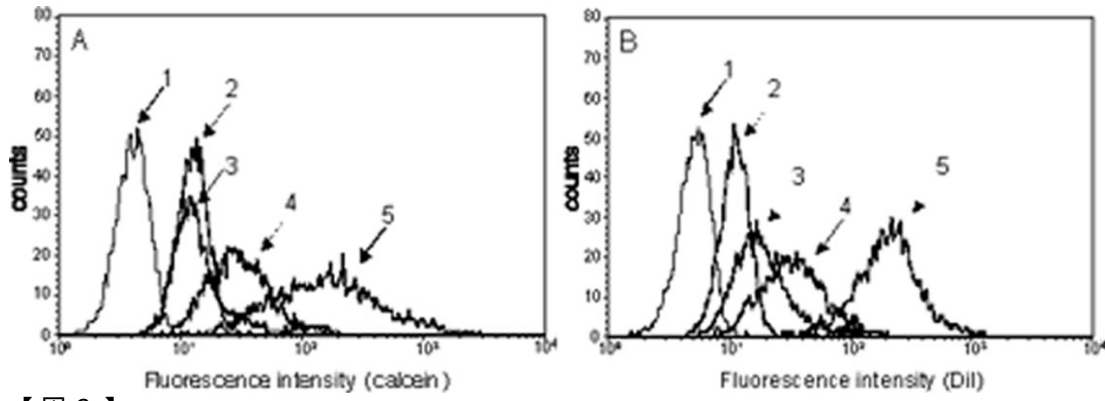
【図6】



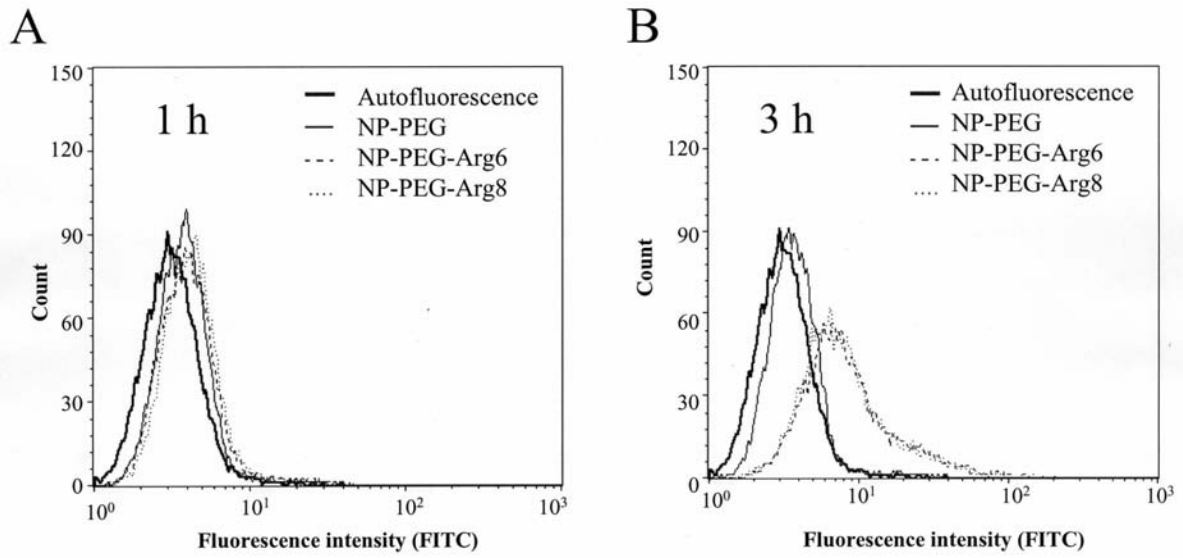
【図8】



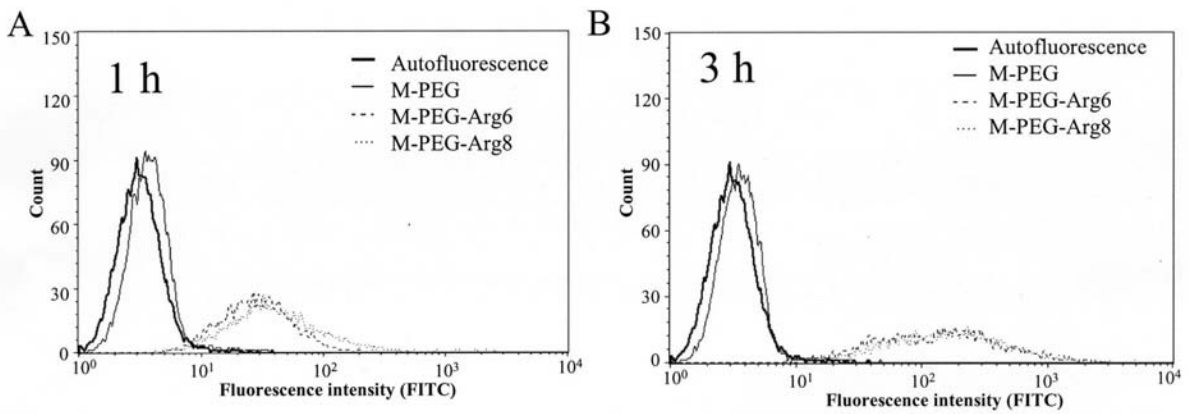
【 図 1 】



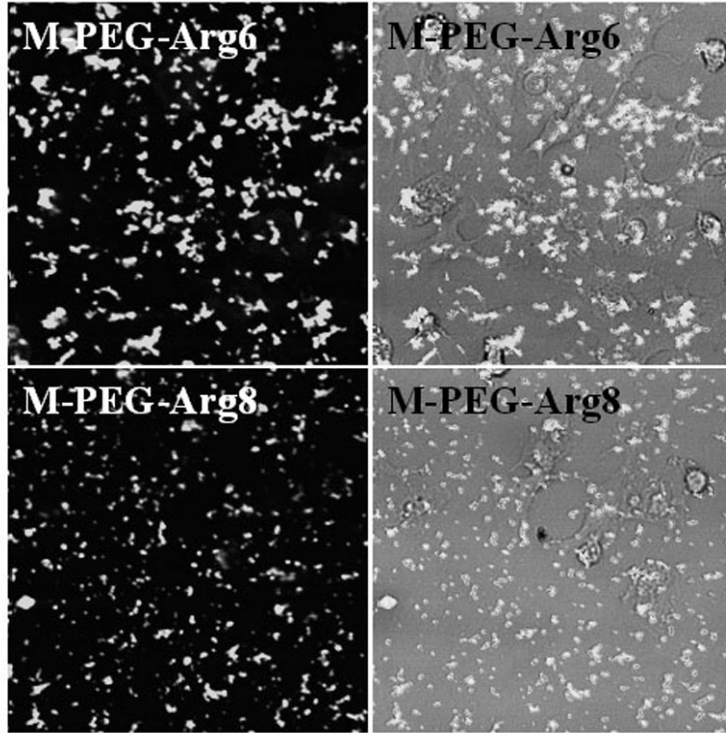
【 図 2 】



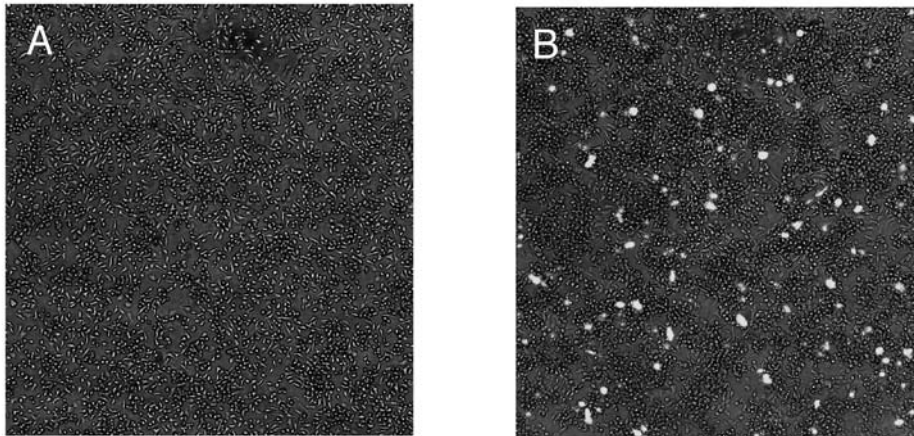
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 7 】



【 配列表 】

0004456438000001.app

フロントページの続き

審査官 鈴木 崇之

- (56)参考文献 特開2002-030091(JP,A)
Bioconjugate Chem., 2001年, Vol.12, P.1005-1011
Int. J. Pharm., 2002年, Vol.245, P.1-7
日薬理誌, 2003年, Vol.121, P.435-439
J. Biol. Chem., 2002年, Vol.277, No.4, P.2437-2443
Cytotechnology, 2003年, Vol.42, P.13-20

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

A61K 9/127

A61K 48/00

C07K 5/11

C07K 7/04

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed