

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-529959

(P2005-529959A)

(43) 公表日 平成17年10月6日(2005.10.6)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 C O 8 4
// A 6 1 K 38/44	A 6 1 K 37/50	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 1 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁)

(21) 出願番号	特願2004-513449 (P2004-513449)	(71) 出願人	504074983 マイラス コーポレーション アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53 719 マディソン サウス・ローザ・ロ ード 505
(86) (22) 出願日	平成15年6月16日 (2003. 6. 16)	(74) 代理人	100070150 弁理士 伊東 忠彦
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月17日 (2004. 9. 17)	(74) 代理人	100091214 弁理士 大貫 進介
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/018759	(74) 代理人	100107766 弁理士 伊東 忠重
(87) 国際公開番号	W02003/106636	(72) 発明者	ショーン, モナハン アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53 711 マディソン トルマン・テラス 5610
(87) 国際公開日	平成15年12月24日 (2003. 12. 24)		
(31) 優先権主張番号	60/388, 685		
(32) 優先日	平成14年6月14日 (2002. 6. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	10/462, 138		
(32) 優先日	平成15年6月16日 (2003. 6. 16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR) , JP		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞へのポリヌクレオチドの伝達をするための新規な方法

(57) 【要約】

細胞にポリヌクレオチドを伝達するためのプロセスが記載される。プロセスは、ポリヌクレオチドとカチオンの界面活性剤との間の塩に安定な複合体の形成を含む。3倍の複合体はさらに、2倍の複合体に両親媒性の化合物を関連づけることによって成される。結果となる複合体は、生体内及び試験管内で細胞へのポリヌクレオチドの伝達に適している。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体内で細胞にポリヌクレオチドを伝達するためのプロセスであって、2倍の複合体を形成するためにカチオンの界面活性剤と該ポリヌクレオチドを関連づけること、該複合体を安定化すること、該複合体を動物の細胞に伝達すること、とからなることを特徴とするプロセス。

【請求項 2】

前記カチオンの界面活性剤は洗剤から構成されることを特徴とする請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 3】

前記複合体を安定化することは、高温で前記複合体をインキュベートすることと、前記複合体を乾燥することとからなるリストから選択されることを特徴とする請求項 1 に記載のプロセス。

10

【請求項 4】

前記複合体を哺乳類の細胞に伝達することは、溶液内の前記複合体を哺乳類の組織に注入することからなることを特徴とする請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 5】

前記複合体を哺乳類の細胞に伝達することは、溶液内の前記複合体を哺乳類の脈管に送ることからなることを特徴とする請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 6】

前記脈管は、門脈、肝臓の静脈、下大静脈、尾部静脈、肝臓の動脈及び胆管から構成されるリストから選択されることを特徴とする請求項 6 に記載のプロセス。

20

【請求項 7】

前記ポリヌクレオチドは DNA から構成されることを特徴とする請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 8】

前記ポリヌクレオチドは、18乃至30のヌクレオチドのモノマーのサブユニットを含むポリヌクレオチドから構成されることを特徴とする請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 9】

前記ポリヌクレオチドは、RNA 干渉を引き起こすポリヌクレオチドから構成されることを特徴とする請求項 1 3 に記載のプロセス。

30

【請求項 10】

細胞にポリヌクレオチドを伝達するためのプロセスであって、2倍の複合体を形成するためにカチオンの界面活性剤と該ポリヌクレオチドを関連づけること、該2倍の複合体を安定化すること、3倍の複合体を形成するために両親媒性の化合物と前記2倍の複合体を関連づけること、該複合体を前記細胞に伝達すること、とからなることを特徴とするプロセス。

【請求項 11】

前記カチオンの界面活性剤は洗剤と脂質から構成されるリストから選択されることを特徴とする請求項 1 5 に記載のプロセス。

40

【請求項 12】

前記複合体を安定化することは、高温で前記複合体をインキュベートすることと、前記複合体を乾燥することとからなるリストから選択されることを特徴とする請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 13】

前記両親媒性の化合物は、一つ以上の疎水性部位を含むポリマー、一つ以上の疎水性部位を含むペプチド、一つ以上の疎水性部位を含むターゲットとする基、一つ以上の疎水性部位を含む立体の安定剤、界面活性剤及び脂質から構成されるリストから選択されることを特徴とする請求項 1 5 に記載のプロセス。

【請求項 14】

50

前記複合体を哺乳類の細胞に伝達することは、溶液内の前記複合体を哺乳類の組織に注入することからなることを特徴とする請求項 15 に記載のプロセス。

【請求項 15】

前記複合体を哺乳類の細胞に伝達することは、溶液内の前記複合体を哺乳類の脈管に送ることからなることを特徴とする請求項 15 に記載のプロセス。

【請求項 16】

前記脈管は、門脈、肝臓の静脈、下大静脈、尾部静脈、肝臓の動脈及び胆管から構成されるリストから選択されることを特徴とする請求項 22 に記載のプロセス。

【請求項 17】

前記細胞は肝臓細胞を含むことを特徴とする請求項 15 に記載のプロセス。

10

【請求項 18】

前記ポリヌクレオチドは DNA から構成されることを特徴とする請求項 15 に記載のプロセス。

【請求項 19】

前記 DNA は発現カセットからなることを特徴とする請求項 26 に記載のプロセス。

【請求項 20】

前記ポリヌクレオチドは、18乃至30のヌクレオチドのモノマーのサブユニットを含むポリヌクレオチドから構成されることを特徴とする請求項 15 に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

20

【0001】

関連出願のクロス・リファレンス

本願は、2002年6月14日に出願された、先の仮特許出願番号米国第60/388,685に関する。

【0002】

技術分野

本発明の技術分野は、ポリヌクレオチド、両親媒性の化合物及びポリマーからなる化合物であり、さらに動物細胞にポリペプチドを伝達するためのそのような組成の使用である。

【0003】

30

背景技術

遺伝子及び核酸に基づく伝達

細胞に遺伝子又はポリヌクレオチドを転移することは、潜在的な治療の適用と同様に生物学的かつ医学的な研究において重要な技術である。ポリヌクレオチドは、細胞膜を越えて細胞内に転移されることを必要とする。発現できる遺伝子をコード化したポリヌクレオチドにおいて、ポリヌクレオチドは、遺伝子が転写できる細胞核に伝達されるべきである。現在探索されている遺伝子転移方法は、ウィルスベクター及び非ウィルスの方法を含んでいる。

【0004】

哺乳類の細胞へウィルスの遺伝子を転移するために、ウィルスは何百万もの年月にわたって発展してきた。ウィルスは所望の遺伝子を運ぶために修正でき、遺伝子を運ぶための“ベクター”となる。組換え技術を利用して、有害で余分のウィルスの遺伝子を取り除くことができ、所望の遺伝子と置き換えできる。この技術は、マウス・レトロウィルスで最初に達成された。レトロウィルスベクターの発展は、遺伝子治療の適用のために追求されている。しかしながら、それらのベクターは、特に生体内ですべてのタイプの細胞に対して効率的に感染しない。したがって、ヘルペスウィルス、アデノウィルス、アデノ関連のウィルスなどを含む数多のウィルスベクターが、脳や肺を含む異なる種類の細胞に対して、より効率よく遺伝子転移をできるように発展している。

40

【0005】

さらに、非ウィルスベクターは、哺乳類の細胞にポリヌクレオチドを転移するように発

50

展している。それらの非ウィルスベクターにおいて、典型的には、発現可能な遺伝子は、通常は大腸菌である細菌において複製可能なプラスミドにクローニングされる。所望の遺伝子は、遺伝子が哺乳類の細胞で発現されることを可能にする、哺乳類のプロモータ、エンハンサー、又は他の配列を伴ってバクテリアのプラスミドに対して組換え技術で挿入される。ミリグラム単位のプラスミドDNAは、細菌の培養液から精製されて調製できる。代替として、細胞に伝達するためのポリヌクレオチドは、PCRなどによって酵素的に成されるか、又は化学的に合成できる。ポリヌクレオチドは、ターゲットの哺乳類の細胞にポリヌクレオチドを転移する、脂質小胞（リポフェクチンなどのカチオンの脂質を含むリポソーム）内に組み込むことができる。ポリヌクレオチドはまた、ポリリジン、ポリエチレンイミン及びタンパク質などのポリマーと複合体となることができる。細胞に対してポリヌクレオチドを伝達する他の方法は、エレクトロポレーション及び“ジーンラン（gene run）”技術を含む。

10

【0006】

遺伝子を運ぶアプローチは、直接的及び間接的な方法に分類できる。組織スペースに直接注入された場合、それらの遺伝子の転移方法の幾つかは最も効果的である。上述した遺伝子の転移技術の多くを使用する直接的な方法は、腫瘍、筋肉、肝臓、肺及び脳をターゲットとするために使用されている。他の方法は、身体から取り除かれた細胞又は組織及び遺伝子工学的に改変された細胞に適用し、次いで身体に移植して戻される場合に最も効果的である。レトロウィルスベクターと組み合わせた間接的なアプローチは、骨髄細胞、リンパ細胞、肝細胞、筋芽細胞及び皮膚細胞に対して遺伝子を転移するために発展している。

20

【0007】

遺伝子治療及び核酸に基づく治療

遺伝子治療は疾病の処置において革命的な進展をもたらすと約束されている。遺伝子治療で、疾病状態は、矯正的なポリヌクレオチドを細胞に挿入することによって直接的に処置できる。対照的に、従来薬剤に基づくアプローチは、遺伝子の下流産物（タンパク質、酵素、酵素の基質及び酵素産物）に作用する。遺伝子治療の初期の動機づけが遺伝子疾患の治療であったが、遺伝子治療は癌、感染症、心臓病、関節炎及び精神障害（パーキンソン病及びアルツハイマーなど）のような広範囲の後天性疾病の治療に役立つであろうことがますます明白になっている。

30

【0008】

外来遺伝子の提供に加えて、遺伝子治療はまた外来遺伝子を阻害する潜在性を有する。特に、外来遺伝子の発現を阻害する数多の機能が存在する。それらは、アンチセンスの核酸、リボザイム、RNA干渉（RNAi）を仲介するスモールインヒビトリー（small inhibitory）RNA（siRNA）を含む。アンチセンスの阻害は、ターゲットのmRNAに対して相補的な一本鎖のポリヌクレオチドを含む。リボザイムは、ターゲットのmRNAを特異的に切断することができる触媒的なRNAである。siRNAは、細胞性タンパク質と共にターゲットRNAの分解を引き起こす、発現されるターゲット遺伝子のセグメント配列に同一な短い二本鎖RNAである。外来性遺伝子発現の特異的な阻害は、主要な遺伝子障害、ウィルス感染及び癌の治療で多大な可能性を有する。

40

【0009】

遺伝子の転移はまた、感染症及び癌に対する予防接種として使用できる。外部の遺伝子が細胞に転移されて発現した場合、合成されたタンパク質は免疫システムに対して現される。この現われは、身体に対して単にタンパク質を注入して生じる抗原の現われとは異なり、細胞を介した免疫反応を引き起こす。細胞内のウィルス遺伝子の発現は、実際のウィルスの感染の危険性がないウィルス感染を刺激し、より効果的な免疫反応を誘発する。このアプローチは、ヒト免疫不全ウィルス、ヘルペス及びサイトメガロウィルスなどの潜在しているウィルス感染と戦うためにより効果的である。

【0010】

核酸を運ぶためのポリマー

50

ポリマーは、細胞にポリヌクレオチドを運ぶための研究で使用されている。細胞にポリヌクレオチドを伝達する数多の方法の一つは、ポリヌクレオチド/ポリカチオンの複合体の使用である。ヒストン及びプロタミンなどのカチオン性タンパク質並びにポリリジン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、D E A E デキストラン、ポリブレン及びポリエチレンジアミンなどの合成ポリマーは、効果的な細胞間のポリヌクレオチド伝達剤であることが示されている。下記は、ポリカチオンがポリヌクレオチドの取り込みを促進する機能を含む数多の重要な原理である。

【0011】

ポリカチオンは核酸の凝縮を容易にする。一つのポリヌクレオチド分子がポリカチオンを有する複合体で占有する容積は、自由なポリヌクレオチド分子の容積よりも相当に少ない。ポリヌクレオチド/ポリマーの複合体のサイズは、試験管内で可能であると同様に生体内の遺伝子伝達において、おそらく重要である。血管内伝達において、ポリヌクレオチドは関心のある柔組織的な細胞に到着するために内皮の障壁と交差する必要がある。最大の内皮の穿孔（内皮障壁の孔）は肝臓に生じ、100 nmの平均直径を有する。他の組織のトランス-上皮孔は、より小さい。例えば、筋肉内皮は、半径4 nmの多数の小さな孔と、半径20乃至30 nmの非常にわずかな大きな孔を有する構造として記載することができる。ポリヌクレオチド複合体のサイズはまた、細胞の取り込み処理のために重要である。細胞に結合した後、ポリヌクレオチド/ポリカチオンの複合体は、エンドサイトーシスによっておそらく取り込まれる。エンドサイトーシス小胞が約100 nmの典型的な内部直径を有するので、100 nm未満のポリヌクレオチドの複合体が好まれる。

10

20

【0012】

ポリカチオンは細胞表面に対するポリヌクレオチドの付加を提供する。ポリマーは、ポリアニオンのポリヌクレオチドと細胞のポリアニオンの表面との間でクロスブリッジを形成する。結果として、細胞内の空間へのポリヌクレオチド転置の機能は、非特異性の吸着性のエンドサイトーシスであってよい。このプロセスは、流体位相のエンドサイトーシス又はレセプターを介するエンドサイトーシスのいずれかよりも、さらに効果的であってよい。さらに、ポリカチオンは複合体に特異的なリガンドを付加するための便利なリンカーを提供する。次いで、ポリヌクレオチド/ポリカチオンの複合体は、特定の細胞のタイプに対してターゲットとされる。

【0013】

ポリカチオンの複合体のポリヌクレオチドは、ヌクレアーゼの分解に対して保護される。ヌクレアーゼが血清及びエンドソーム/リゾソームに存在するので、この保護はポリヌクレオチドの細胞外及び細胞内保護の両保護において重要である。エンドソーム/リゾソームでの分解からの保護は、細胞小器官の酸性化を回避することによって増大される。酸性化を回避する方法の一つは、 NH_4Cl 又はクロロキンの使用である。ポリエチレンジアミンなどの他のポリマーは、追加的な処理なしでエンドソーム/リゾソームの機能をおそらく分裂させる。エンドソーム/リゾソームの機能の分裂は、融合ペプチド又はアデノウィルスのような、エンドソーム又は膜の破壊性の作因をポリカチオン又は複合体にリンクすることにより達成される。

30

【0014】

核酸の凝縮

幅広く異なる分子構造の相当数の多価の陽イオンは核酸の凝縮を引き起こすことが示されている。3以上の電荷を有する多価の陽イオンはDNAを凝縮するために示される。それらは、スペルミジン、スペルミン、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 、 Fe^{3+} 、並びにヒストンH1、プロタミン、ポリリジン、及びポリエチレンジアミンなどの天然又は合成ポリマーを含む。分析は、糖とリン酸の骨組みに沿った90%以上の電荷が中性の場合にDNA凝縮が好ましいことを示す。天然でアニオンのポリマーは、DNAとその周辺との間の反発作用を増大でき、したがって、DNAを圧縮する。最も重要なこととして、自発的なDNAの自己アセンブリ及び集合プロセスは、除外された容積効力による大量のDNAの制限に起因すると示されている。

40

50

【0015】

ポリヌクレオチドの凝縮の機能は明らかでない。平静な螺旋間の静電気力は、第一に多価の陽イオンを要求する反イオン変動機能から発生し、ポリヌクレオチド凝縮に主な役割をする。核酸の螺旋がわずかな水の直径より接近してアプローチする場合、水和力は静電気力を抑える。DNA/ポリマー状のポリカチオンの相互作用の場合、DNAの凝縮は、低分子量のポリカチオンの場合よりも複雑なプロセスである。異なるポリカチオンのタンパク質は、2乃至5の正対負の電荷の比率で異なるサイズのDNAで環状及び棒状の形成物を生成することができる。ポリアルギニン又はヒストンを有するDNA複合体は、2種類の構造を形成でき、約350nmの長さの長軸を有する拡張された構造（自由なDNAなど）と凝縮した球状の粒子である。両形態は、同一の溶液中に同時に存在する。2形態の共に存在する理由は、DNA分子内のポリカチオン鎖の不均一な分配として説明できる。不均一な分配は、2つの熱力学的に好ましい構成を生成する。

10

【0016】

ポリペプチド/ポリカチオンの複合体の電気泳動の移動度は、超過のポリカチオンで負から正に変化できる。大型のポリカチオンはポリヌクレオチドに沿って完全に整列しないが、他のポリヌクレオチド分子と相互作用するポリマーループを形成する可能性がある。異なる核酸分子間の迅速な集合と強力な分子間力は、堅く詰め込まれた順序正しい粒子を形成するために必要とされる螺旋間の遅い調節を防ぐ。

【0017】

表面の電荷

前述したように、ポリカチオンは細胞表面に対するポリヌクレオチドの複合体の付着を支援できる。しかしながら、負の表面の電荷は、多くの実際上の適用、つまり生体内の伝達において、より望ましい。表面の電荷の現象は、コロイド化学において周知であり、疎液性/親液性システム（つまり、ハロゲン化銀ヒドロゾル）において詳細に記載される。反対に電荷された表面を有するラテックス粒子の懸濁液へのポリイオンの追加は、表面上に対するポリイオンの永久的な吸収に結びつく。適切な化学量論に達する際、表面は反対の電荷に課される。

20

【0018】

pHに対する感受性を有する脂質、両親媒性の合成物、及び核酸を運ぶためのリポソームの使用

30

カチオニック・リポソームは、プラズマ膜を越えて直接的にDNAを伝達するか、又はエンドソームのコンパートメントを介してDNAを伝達する。その正確なエントリーポイントに関係なく、カチオニック・リポソーム内の多くのDNAは、エンドソームのコンパートメントで蓄積する。数多のアプローチは、加水分解から外来DNAを保護するか、又は細胞質へ外来DNAの回避を可能にすることによって、エンドソームのコンパートメントでの外来DNAの損失を防ぐために調査されている。それらのアプローチは、エンドソームの酸性化を阻害することによって推測上DNA分解を防止するクロロキンなどのアシッドトロピック（acidotropic）（リソモトロフィック（lysotrophic））の弱アミンの使用を含む（Legendre et al., 1992）。代替として、ウィルス及びウィルスの融合ペプチドは、エンドソームを分裂させるか、又はエンドソームを有するリポソームの融合を促進し、細胞質へDNAの放出を促進するように含まれている（Kamata et al., 1994; Wagner et al., 1994）。

40

【0019】

脂質相及び膜融合の知識は、潜在的にエンドソームの膜を有する融合を促進するためにエンドソームの酸性化を展開する、より用途の広いリポソームを設計するために使用されている。そのようなアプローチは、酸性のpHにおいてエンドソームの膜で不安定にするか又は融合することを目指した、陰イオンで、pHに感受性であるリポソームによって最も例証される（Duzgunes et al., 1991）。陰イオンで、pHに感受性のあるリポソームはすべて、カルボン酸基を含んでいる脂質の追加によって非酸性pH

50

で安定させられるホスファチジルエタノールアミン (P E) 二層を利用した。単に P E を含んでいるリポソームは逆の六角形の相 (H_II) になりやすい。p H に感受性な陰イオンのリポソームでは、カルボン酸の負の電荷が、カルボン酸の p K_a より大きな p H で脂質の頭部の基のサイズを増加させて、それによってホスファチジルエタノールアミン二層を安定させる。エンドソーム内で見られる酸性 p H 条件では、荷電していない電荷種又は縮小された電荷種がホスファチジルエタノールアミンに富んだ二層を安定させることができない。陰イオンで、p H に感受性のリポソームは、D N A を含む様々な膜を通さない化合物を伝達する。しかしながら、これらの p H に感受性なリポソームの負の電荷は、それらが効率的に D N A を取り込み、かつ細胞と作用するのを防ぎ、したがってトランスフェクションのための細胞の効用を減少させる。我々は、培養中の様々な細胞へ D N A の効率的な転移を仲介させるためにカチオンで、p H に感受性なリポソームの使用について記述した (例えば、特許文献 1 及び 2 を参照) 。

10

【 0 0 2 0 】

核酸を伝達するための p H に感受性なポリマーの使用

p H に感受性なポリマーは、薬剤の制御された放出の目的で様々な生理学的かつ細胞内の p H 勾配を展開するポリマーの性能のためにドラッグデリバリーの分野で広い応用を見出した。p H 感度は、ポリマーの p H 範囲にわたる物理化学的な特性の如何なる変化として広く定義することができる。より狭い定義は、生理学上許容された p H 範囲 (典型的には、p H 5 . 5 乃至 8) における生体に影響する物質を保持するか又は放出するポリマーの性能の著しい変更を要求する。すべてのポリイオンは、水溶液での陽子を与えるか又は受け取るポリイオンの性能に基づいて 3 つのカテゴリーに分類することができ、ポリ酸、ポリ塩基及びポリ両性電解質である。ドラッグデリバリーの応用での p H に感受性なポリ酸の使用は、通常、a) p H 上昇 (酸 / 塩転換) で可溶になるか、b) p H の変化に関して他のポリマーで複合体を形成するか、又は c) 疎水性 / 親水性のバランスの重要な変化を受ける、ポリ酸の性能に依存する。さらに、前述の 3 つすべての要素の組み合わせは可能である。

20

【特許文献 1】U S 0 8 / 5 3 0 , 5 9 8

【特許文献 2】U S 0 9 / 0 2 0 , 5 6 6 発明の概要 好ましい実施態様において、我々は、複合体を形成するために水溶液でカチオンの界面活性剤にポリヌクレオチドを関連させること、複合体を安定させること、及び細胞と複合体を接触させることからなる、細胞にポリヌクレオチドを伝達するための生体内プロセスを記載する。複合体を安定化させることは、高温で水性溶液において複合体をインキュベートすることを含む。インキュベーションは、温度に依存して、数分から数時間であってよい。代替として、複合体を安定化させることは、複合体を乾燥させること、適切な有機溶媒で複合体を溶解すること、及び適切な水性溶液で希釈することを含む。安定した粒子は、複合体が生理的濃度で塩にさらされる場合、複合体のサイズが急速に増加せず、また、ポリヌクレオチドも急速に非凝縮しない、凝縮したポリヌクレオチドを含む。細胞と複合体を接触させることは、組織に直接的に水溶液中の複合体を注入するか、又は脈管が体液を供給するか、若しくは排水する、組織中の細胞への伝達のための哺乳動物における脈管へ水溶液の複合体を送入することを含む。

30

40

【 0 0 2 1 】

好ましい実施態様において、我々は、水溶液でカチオンの界面活性剤にポリヌクレオチドを関連させて、かつ、高温で溶液をインキュベーションすることを含む安定したポリヌクレオチド / カチオンの界面活性剤の複合体の形成過程について記述する。インキュベーションは、温度に依存して数分から数時間であってよい。高温度は、3 0 乃至 1 0 0 又はそれ以上であってよい。より好ましくは、高温度は 3 5 乃至 5 0 である。安定した粒子は、複合体が生理的濃度で塩にさらされる場合、複合体のサイズが急速に増加せず、また、ポリヌクレオチドも急速に非凝縮しない、凝縮したポリヌクレオチドを含む。

【 0 0 2 2 】

好ましい実施態様において、我々は、2 倍の複合体を形成するためにカチオンの界面活

50

性剤にポリヌクレオチドを関連させること、3倍の複合体を形成するために両親媒性の化合物に複合体を関連させること、及び細胞に複合体を関連させることからなる、ポリヌクレオチドを細胞に伝達するためのプロセスについて記述する。両親媒性の化合物は、疎水性部分を含むポリマー、疎水性部分を含むペプチド、疎水性部分を含むターゲットとする基、疎水性部分を含む立体の安定剤、界面活性剤及び脂質からなるリストから選択されてよい。両親媒性の化合物は、カチオンか、陰イオンか、中立か、あるいは両性イオンであってよい。結果として生じる3倍の複合体は、正、負又は中性である正味の表面電荷を有することができる。両親媒性の化合物はまた、トランスフェクション効率を高める一つ以上の官能基を含むように修飾されてよい。両親媒性の化合物は、3倍の複合体の形成後の3倍の複合体の形成に先立って修飾されてよい。2倍の複合体は、3倍の複合体の形成に先立って安定化されてよい。2倍の複合体を安定化することは、高温において水性溶液中の複合体をインキュベーションすることを含む。インキュベーションは、温度に依存して数分から数時間であってよい。代替として、複合体を安定化させることは、複合体を乾燥させること、適切な有機溶媒で複合体を溶解すること、及び適切な水性溶液で希釈することを含む。安定した粒子は、複合体が生理的濃度で塩にさらされる場合、複合体のサイズが急速に増加せず、また、ポリヌクレオチドも急速に非凝縮しない、凝縮したポリヌクレオチドを含む。3倍の複合体は、生体内又は試験管内で細胞に伝達されてよい。生体内で細胞に3倍の複合体を伝達することは、組織に直接的に水溶液中の複合体を注入するか、又は脈管が体液を供給するか、若しくは排水する、組織中の細胞への伝達のための哺乳動物における脈管へ水溶液の複合体を送入することを含んでよい。

10

20

【0023】

好ましい実施態様において、我々は、2倍の複合体を形成するためにカチオンの界面活性剤にポリヌクレオチドを関連させること、2倍の複合体を安定化させること、及び3倍の複合体を形成するために両親媒性の化合物に2倍の複合体を関連させることからなる、小型で直径が50nm未満のポリヌクレオチドを含んでいる複合体について記述する。2倍の複合体を安定化させることは、高温で水溶液中の複合体をインキュベーションすることを含む。インキュベーションは、温度に依存して数分から数時間であってよい。代替として、複合体を安定化させることは、複合体を乾燥させること、適切な有機溶媒で複合体を溶解すること、及び適切な水性溶液で希釈することを含む。安定した粒子は、複合体が生理的濃度で塩にさらされる場合、複合体のサイズが急速に増加せず、また、ポリヌクレオチドも急速に非凝縮しない、凝縮したポリヌクレオチドを含む。両親媒性の化合物は、疎水性部分を含むポリマー、疎水性部分を含むペプチド、疎水性部分を含む目的とする基、疎水性部分を含む立体の安定剤、界面活性剤及び脂質からなるリストから選択されてよい。両親媒性の化合物は、カチオンか、陰イオンか、中立か、あるいは両性イオンであってよい。結果として生じる3倍の複合体は、正、負又は中性である正味の表面電荷を有することができる。両親媒性の化合物はまた、トランスフェクション効率を高める一つ以上の官能基を含むように修飾されてよい。両親媒性の化合物は、3倍の複合体の形成後の3倍の複合体の形成に先立って修飾されてよい。

30

【0024】

本発明のさらなる目的、特徴、及び利点は、添付図と共に下記の詳細な記載から明らかとなるであろう。

40

【0025】

発明を実施するための最良の形態

数多くの報告が、DNAとカチオンの界面活性剤との複合体の形成を記載する文献に表わされている(Melnikov et al. 1995a; Sergeyev et al. 1999a; Sergeyev et al. 1999b; Sukhorukov et al. 2000; Tanaka et al. 1996; Ijiri et al. 1992; Melnikoz et al. 1995b)。例えば、Melnikov et al. は、臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)の追加におけるDNAのための任意のコイルと小型の小球状態との間の相転移を

50

示した。この複合体の形成物は、競合するポリアニオン（ポリアクリル酸）の追加で可逆的なことをさらに示した。複合体は、複合体を沈殿させるような方法で調製することができる。完全に乾燥する際、複合体は、エタノール、クロロホルム、THF及びシクロヘキサンのような有機溶剤で可溶性になることができる。幾つかの報告で提案されたが、遺伝子転移は、DNA/カチオンの界面活性剤の複合体で実証されていない。実際に、DNA/CTABの複合体は、プラズマ膜の外面上にトラップされ、それによって、効率的なトランスフェクションにおける主要な制限を構成することをClamme et al. (Clamme et al., 2000)は実証した。

【0026】

使用した濃度に依存して、沈殿は形成しても、又はしなくてもよい。文献は、固体の沈殿を分離し、有機溶液でサンプルを溶解することを記述している。沈殿した複合体（DNA/カチオンの界面活性剤）及び沈殿しない複合体は、本質的に異なる複合体を形成することを我々は見出した。両複合体は、凝縮したDNA（Trubetskoy et al., 1999）及び同様の粒子サイズを表す。しかしながら、複合体は、生理的な塩濃度の存在において粒子のサイズ化と蛍光の非凝縮アッセイに基づいて、幅広く異なる安定性を示す。乾燥されて、有機溶液で得られる複合体は、粒子サイズの増加のない150mMの塩化ナトリウムに安定性を示す。しかしながら、沈殿しない複合体は、粒子サイズの増加及び非凝縮を示し、150mMの塩化ナトリウムに対して安定ではない。本発明は、安定した複合体が、DNA及びカチオンの界面活性剤の沈殿しない濃度から形成できる（塩安定性アッセイ、DNA凝縮及び粒子サイズの安定性によって示される）ことによるプロセスを提供する。DNA/カチオンの界面活性剤の複合体は水溶液で形成でき、数分から数時間で様々な温度において加熱でき、結果として塩に安定な複合体の形成を生じる。DNA/カチオンの界面活性剤の複合体は、水溶液で形成でき、凍結乾燥でき、適切な有機溶媒で溶解でき、適切な水溶液で希釈できて、塩に安定な複合体を結果として生じる。

【0027】

本発明は、生体内及び試験管内で細胞へのポリヌクレオチドの転移を提供する。生体内でDNA/カチオンの界面活性剤の複合体の調製及び伝達のためのプロセスが記載される。加えて、本発明は、生体内及び試験管内でDNA/カチオンの界面活性剤/第三の化合物の複合体の調製及び伝達を提供される。

【0028】

DNA/カチオンの界面活性剤の複合体は試験管内で細胞にトランスフェクションしないことが文献に示されているが、我々は複合体が生体内でDNAを伝達できることを見出した。血管注入法は、有機溶媒で複合体を溶解、かつ注入に先立って適切な水性の緩衝液でサンプルを希釈することによって達成できる。複合体が溶液中で粒子を維持し、粒子は細胞にトランスフェクションできることを研究は示している。マウスの尾の静脈注入は、水性の緩衝液でDNA/カチオンの界面活性剤の複合体を形成すること、サンプルを十分な時間において加熱すること、及び注入に先立って適切な水性の緩衝液でサンプルを希釈することによって達成できる。複合体が溶液中で粒子を維持し、粒子は細胞にトランスフェクションできることを研究は示している。

【0029】

加えて、DNA/カチオンの界面活性剤の複合体は、新しい複合体を形成するために疎水性部位を含むポリマーと混合できる。新しい3倍の複合体は、DNA/カチオンの界面活性剤の複合体と相関して、生体内のトランスフェクションを高め、さらに試験管内で細胞に対するDNAのトランスフェクションにおいて機能的である。疎水的に修飾されたポリマーを有する複合体の形成物は、ポリマーの臨界のミセル濃度（cmc）の下で生じることができる。ポリマーはポリカチオン又はポリアニオンのいずれかであり、かつターゲットとする基を含むことができる。下記に限定されないが、例えば、（電荷修正型ポリマーをも含む）追加的なポリマー、ペプチド、疎水的に修正されたペプチド、電荷修正型ペプチド、両親媒性の化合物、アニオンの界面活性剤、膜活性化化合物及び塩類などの追加的な化合物は、3倍の複合体に加えることができる。

10

20

30

40

50

【0030】

加えて、DNA / カチオンの界面活性剤の複合体は、新しい複合体を形成するために疎水性部位を含むペプチドと混合できる。新しい3倍の複合体は、生体内及び試験管内での細胞のトランスフェクションのために使用できる。疎水的に修飾されたペプチドを有する複合体の形成物は、疎水的に修飾されたペプチドの臨界のミセル濃度 (cmc) の下で生じることができる。ペプチドは、正味のカチオン、正味のアニオン、あるいは正味の中性の電荷となる。下記に限定されないが、例えば、(電荷修正型ポリマーをも含む)ポリマー、ペプチド、疎水的に修飾されたペプチド、電荷修正型ペプチド、両親媒性の化合物、アニオンの界面活性剤、膜活性化合物及び塩類などの追加的な化合物は、3倍の複合体に加えることができる。

10

【0031】

加えて、DNA / カチオンの界面活性剤の複合体は、新しい複合体を形成するために疎水性部位を含むターゲットとする基と混合できる。新しい3倍の複合体は、生体内及び試験管内での細胞のトランスフェクションのために使用できる。疎水的に修正された目的とする基を有する複合体の形成物は、疎水的に修飾されたターゲットとする基の臨界のミセル濃度 (cmc) の下で生じることができる。疎水的に修飾されたターゲットとする基は、正味のカチオン、正味のアニオン、あるいは正味の中性の電荷となる。下記に限定されないが、例えば、(電荷修正型ポリマーをも含む)ポリマー、ペプチド、疎水的に修正されたペプチド、電荷修正型ペプチド、両親媒性の化合物、アニオンの界面活性剤、膜活性化合物及び塩類などの追加的な化合物は、3倍の複合体に加えることができる。

20

【0032】

加えて、DNA / カチオンの界面活性剤の複合体は、新しい複合体を形成するために疎水性部位を含む立体安定剤と混合できる。新しい3倍の複合体は、生体内及び試験管内での細胞のトランスフェクションのために使用できる。疎水的に修飾された立体安定剤を有する複合体の形成物は、疎水的に修飾された立体安定剤の臨界のミセル濃度 (cmc) の下で生じることができる。疎水的に修飾されたターゲットとする基は、正味のカチオン、正味のアニオン、あるいは正味の中性の電荷となる。下記に限定されないが、例えば、(電荷修正型ポリマーをも含む)ポリマー、ペプチド、疎水的に修飾されたペプチド、電荷修正型ペプチド、両親媒性の化合物、アニオンの界面活性剤、膜活性化合物及び塩類などの追加的な化合物は、3倍の複合体に加えることができる。

30

【0033】

加えて、DNA / カチオンの界面活性剤の複合体は、新しい複合体を形成するためにアニオンの界面活性剤と混合できる。新しい3倍の複合体は、生体内及び試験管内での細胞のトランスフェクションのために使用できる。アニオンの界面活性剤を有する複合体の形成物は、アニオンの界面活性剤の臨界のミセル濃度 (cmc) の下で生じることができる。下記に限定されないが、例えば、(電荷修正型ポリマーをも含む)ポリマー、ペプチド、疎水的に修飾されたペプチド、電荷修正型ペプチド、両親媒性の化合物、アニオンの界面活性剤、膜活性化合物及び塩類などの追加的な化合物は、3倍の複合体に加えることができる。

【0034】

別の好ましい実施態様において、DNA / カチオンの界面活性剤の複合体が両親媒性の化合物と組合せでき、フィルムに蒸発でき、リポソームを含んでいる複合体から水和できるプロセスが記述される。複合体は、下記に限定されないが、例えば、(電荷修正型ポリマー、疎水的に修飾されたポリマーをも含む)ポリマー、ペプチド、疎水的に修飾されたペプチド、電荷修正型ペプチド、両親媒性の化合物、アニオンの界面活性剤、膜活性化合物及び塩類などの追加的な化合物を含むことができる。

40

【0035】

定義

複合体

2つの分子が、静電の相互作用、水素結合の相互作用、あるいは疎水性の相互作用など

50

の共有結合でない相互作用により互いに接触しない場合、コンプレキシエーション (c o m p l e x a t i o n) 又は複合体形成と呼ばれるプロセスを通じて複合体を形成するために組み合わせられる。

【 0 0 3 6 】

2 倍の複合体

2 倍の複合体は、ポリヌクレオチドとカチオンの界面活性剤との間に形成された複合体を含むことを意味する。カチオンの界面活性剤は、単一の界面活性剤、正の正味の全体の電荷を有する界面活性剤 (正、負及び中性) の混合物、塩などの一つ以上の他の化合物を有する一つ以上の界面活性剤となる。

【 0 0 3 7 】

3 倍の複合体

3 倍の複合体は、一つ以上の化合物が 2 倍の複合体に加えられた場合に形成される複合体である。

【 0 0 3 8 】

高温度

用語としての高温度は、25 よりも高く 100 よりも低い温度を意味する。高温度はまた、2 倍の複合体に塩の安定性を与える、温度と時間の組合せを意味する。

【 0 0 3 9 】

ポリヌクレオチド

用語としてのポリヌクレオチド、又は核酸あるいはポリ核酸は、少なくとも 2 つのヌクレオチドを含んでいるポリマーを意味する技術用語である。ヌクレオチドは、ポリヌクレオチドポリマーのモノマーの単位である。120 のモノマーの単位より少ないポリヌクレオチドは、頻繁にオリゴヌクレオチドと呼ばれる。天然の核酸は、デオキシリボース又はリボースとリン酸のバックボーンを有する。人工的又は合成のポリヌクレオチドは、試験管内で重合されたか、又は細胞がないシステムで同一若しくは同様の塩基を含むが天然のリボースとリン酸のバックボーン以外の別のタイプのバックボーンを含んでよい、任意のポリヌクレオチドである。それらのバックボーンは、P N A s (ペプチド核酸)、フォスフォロチオエート (p h o s p h o r o t h i o a t e s)、フォスフォロジアミダイト (p h o s p h o r o d i a m i d a t e s)、モルフォリノ (m o r p h o l i n o s)、及び天然の核酸のリン酸のバックボーンの別の変形を含む。塩基は、天然化合物のアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン及び天然のアナログをさらに含む、プリン及びピリミジンを含む。プリン及びピリミジンの合成の変形物は、下記に限定しないが、新しい反応基を位置する修飾物を含み、それらは、下記に限定されないが、アミン、アルコール、チオール、カルボン酸塩及びアルキルハライドである。用語としての塩基は、下記に限定されないが、4 - アセチルシトシン、8 - ヒドロキシ - N 6 - メチルアデノシン、アジニジニルシトシン、シュードイソシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシルメチル) ウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウラシル、5 - カルボキシメチル - アミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N 6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルアデニン、1 - メチルシュード - ウラシル、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2 , 2 - ジメチル - グアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチル - シトシン、5 - メチルシトシン、N 6 - メチルアデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシ - アミノ - メチル - 2 - チオウラシル、ベータ - D - マノシルキノシン、5 ' - メトキシカルボニルメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N 6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、オキシプトキソシン、シュードウラシル、キノシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、N - ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、シュードウラシル、キノシン、2 - チオシトシン、及び 2 , 6 - ジアミノプリンを含む D N A 及び R N A の任意の既知の塩基のアナログを包含する。用語としてのポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチドは、デオキシリボ核酸 (DNA)、リボ核酸 (RNA)、DNA と RNA の組合せ、並びに他の天然及び合成のヌクレオチドを含む。

【0040】

DNA は、cDNA、試験管内で重合された DNA、プラスミド DNA、プラスミド DNA の一部、ウィルス由来の遺伝子物質、線形の DNA、ベクター (P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体)、発現カセット、キメラの配列、組換え DNA、染色体 DNA、オリゴヌクレオチド、アンチセンス DNA、又は前述して列記した群の変形であってよい。RNA は、オリゴヌクレオチド RNA、tRNA (トランスファー RNA)、snRNA (核内低分子 RNA)、rRNA (リボソーム RNA)、mRNA (メッセンジャー RNA)、試験管内で重合した RNA、組換え RNA、キメラの配列、アンチセンス RNA、siRNA (小型の干渉 RNA)、リボザイム、又は前述して列記した群の変形であってよい。アンチセンスのポリヌクレオチドは、DNA 及び / 又は RNA の機能を干渉するポリヌクレオチドである。アンチセンスのポリヌクレオチドは、下記に限定されないが、モルホリノ、2'-O-メチルポリヌクレオチド、DNA、RNA などを含む。siRNA は、典型的には 15 乃至 50 塩基対で、好ましくは 21 乃至 25 塩基対を含み、細胞内で発現される目的とする遺伝子又は RNA と同一であるか若しくはほぼ同一であるヌクレオチド配列を有する二本鎖構造を含む。干渉は、発現の抑制となる。ポリヌクレオチドは、細胞中の存在又は発現が、細胞の遺伝子又は RNA の発現若しくは機能を変化させる配列となる。加えて、DNA 及び RNA は、一本、二本、三本又は四本鎖であってよい。二本、三本及び四本鎖のポリヌクレオチドは、DNA と RNA の両者、又は天然及び / 若しくは合成の核酸の他の組合せを含んでよい。

10

20

【0041】

変形したポリヌクレオチドは、内因性の遺伝物質とは別に細胞質又は核内にとどまることができる。あるいは、DNA は内因性の遺伝物質と組換え (一部分になる) できる。組換えは、相同性又は非相同性の組換えのいずれかによって、染色体 DNA に DNA を挿入させることができる。

【0042】

ポリヌクレオチドは、外来のヌクレオチド配列を発現するため、内因性のヌクレオチド配列の発現を阻害、除去、増大あるいは変化するため、又は細胞と当然関連しない特定の生理的な特性に影響するために細胞に伝達できる。ポリヌクレオチドは、タンパク質又は RNA の全体若しくは一部を発現するためにコードされた発現カセットを含んでよい。発現カセットは、遺伝子を発現できる、天然又は組換えで生成されたポリヌクレオチドを意味する。ここで使用される用語としての組換えは、分子生物学的な技術によって共に結合されたポリヌクレオチドのセグメントから構成される、ポリヌクレオチド分子を意味する。カセットは、遺伝子の発現に影響する任意の他の配列に沿う関心のある遺伝子のコード領域を含む。DNA 発現カセットは、プロモーター (転写の開始を可能にする) 及び一つ以上のタンパク質をコード化する配列を典型的に含む。発現カセットは、下記に限定しないが、任意的に、転写のエンハンサー、非コード配列、スプライシング信号、転写停止信号及びポリアデニレーション信号を含んでよい。RNA 発現カセットは、翻訳開始コドン (翻訳を開始する)、及び一つ以上のタンパク質をコード化する配列を典型的に含む。発現カセットは、下記に限定しないが、任意的に、翻訳停止信号、ポリアデノシン配列、内部のリボソームのエントリー部位 (IRES)、及び非コード配列を含んでよい。

30

40

【0043】

ポリペプチドは、ターゲットの細胞で特定の機能に役立たないが、ポリヌクレオチドの生成に使用される配列を含んでよい。そのような配列は、下記に限定しないが、宿主生物におけるポリヌクレオチドの複製又は選択に必要とされる配列を含む。

【0044】

ポリヌクレオチドは、ゲノムの又は余分な染色体 DNA 配列を修飾するために使用できる。これは、発現されるポリヌクレオチドを伝達することによって達成できる。代わりに、ポリヌクレオチドは、ターゲットとなる細胞の DNA 又は RNA 配列の変化をもたらす

50

ことができる。これは、ハイブリダイゼーション、多重鎖のポリヌクレオチドの形成、相同性の組換え、遺伝子転換又はさらに記載される他の機能によって達成できる。

【0045】

用語としての遺伝子は、治療のポリヌクレオチド（例えば、リボザイム）又はポリペプチドあるいはプレカーサーの生成に必要なコード配列を含むポリヌクレオチド配列を意味する。ポリヌクレオチドは、完全長のポリペプチドか断片の所望の活性若しくは機能的な特性（例えば、酵素活性、リガンドの結合、信号の形質導入）が保持される限り、完全長のコード配列又はコード配列の任意の部分によってポリペプチドをコード化することができる。その用語はまた、遺伝子のコード領域を包含し、遺伝子が、完全長のmRNAの長さに対応するように、いずれかの末端で約1 kb以上の距離における5'及び3'の両末端でコード領域に隣接した位置の配列を含んでいる。mRNAに存在し、コード領域の5'に位置する配列は、5'の非翻訳配列として呼ばれる。mRNAに存在し、コード領域の3'又は下流に位置する配列は、3'の非翻訳配列として呼ばれる。用語としての遺伝子は、遺伝子のcDNA及びゲノム形態の両者を包含する。遺伝子のゲノム形態又はクローンは、介在領域又は介在配列である、イントロンと定義される非コード配列で妨害されるコード領域を含む。イントロンは、核RNAに転写される、遺伝子のセグメントである。イントロンは、エンハンサーなどの調節要素を含んでよい。イントロンは、核又は主要な転写から除去又はスプライシングされ、したがって、メッセンジャーRNA（mRNA）の転写ではイントロンは存在しない。初期のポリペプチドでアミノ酸の配列又は順番を特定するために、mRNAは翻訳段階で機能する。用語としての非コード配列はまた、遺伝子のゲノム形態の他の領域を意味し、下記に限定されないが、プロモーター、エンハンサー、転写因子結合部位、ポリアデニレーション信号、内部のリボソームが入る部位、サイレンサー、乖離配列、マトリックス付加領域を含む。それらの配列は、遺伝子のコード領域に近接して存在するか（10,000ヌクレオチド内）、又は離れた部位で存在（10,000ヌクレオチド以上）してよい。それらの非コード配列は、遺伝子の転写及び翻訳のレベル又は速度に影響する。遺伝子の共有結合の修正は、転写率（例えば、ゲノミックDNAのメチル化）、mRNAの安定性（例えば、3'ポリアデニレーション尾部の長さ、）翻訳率（例えば、5'のキャッピング）、核酸の修復、及び免疫性に影響する。核酸の共有結合の修正の一つの例は、LabelIT試薬（Mirus Corporation, Madison, WI）の作用を含む。

【0046】

ここで使用されるように、用語としての遺伝子発現は、遺伝子にコード化された遺伝情報をデオキシリボ核酸の遺伝子の転写を介して（例えば、RNAポリメラーゼの酵素作用を介して）RNA（例えば、mRNA、rRNA、tRNA、又はsnRNA）に変換し、タンパク質をコード化する遺伝子においてmRNAの翻訳を介してタンパク質に変換する過程を意味する。遺伝子発現は、この過程の多くの段階において制御できる。上方調節又は活性化は、遺伝子発現産物（つまり、RNA又はタンパク質）の産物を増大する調節を意味し、一方で、下方調節又は抑制は産物を減じる調節を意味する。上方調節又は下方調節に含まれる分子（例えば、転写因子）は、それぞれ、アクチベーター及びリプレッサーとそれぞれ呼ばれる。

【0047】

RNA機能の阻害剤は、細胞の存在又は発現が、配列に特異的な手法で、通常はmRNAである、特定の細胞のRNAを分解させるか、又は特定の細胞のRNAの機能若しくはは翻訳を抑制する、如何なるポリヌクレオチド又は核酸アナログを含む。したがって、RNAの抑制は、RNAが転写される遺伝子の発現を効果的に抑制する。RNAの機能の抑制剤は、siRNA、干渉RNA又はRNAi、dsRNA、siRNA若しくはアンチセンス遺伝子をエンコードするDNAを転写するRNAポリメラーゼIII、リボザイム及びRNA、DNAあるいは人工的な核酸であってよいアンチセンス核酸からなる群から選択される。siRNAは、典型的には、15乃至50塩基対、好ましくは21-25塩基対を含み、細胞内の発現される目的とする遺伝子又はRNAに対して同一であるか、若し

10

20

30

40

50

くはほとんど同一であるヌクレオチド配列を有する二本鎖構造を含む。アンチセンスのポリヌクレオチドは、下記に限定しないが、モルホリノ、2'-O-メチルポリヌクレオチド、DNA、RNAなどを含む。RNAポリメラーゼIIIは、U6プロモーターなどのプロモーターを含むDNAを転写する。それらのDNAは、アンチセンスRNAとして機能できるsiRNA又は線形RNAとして機能できる、細胞中で小型のヘアピンRNAを生成するように転写できる。RNA機能の阻害剤は、試験管内で組換えRNAを重合され、キメラの配列又はそれら群の派生物をふくんでよい。RNAの機能の阻害剤は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、合成ヌクレオチド、又はターゲットとなるRNA及び/若しくは遺伝子が阻害されるような任意の適切な組合せを含んでよい。加えて、核酸のそれらの形態は、一本、二本、三本又は四本鎖であってよい。

10

【0048】

トランスフェクション

ポリヌクレオチドを細胞に伝達するためのプロセスは、一般に、トランスフェクション又はトランスフェクションのプロセスとして定義され、さらに、形質転換と定義される。ここで使用されるような用語としてのトランスフェクションは、細胞内へのポリヌクレオチド又は他の生物学的に活性な化合物の導入を意味する。ポリヌクレオチドは、研究の目的のために使用されてよく、又は治療が可能な細胞に変化を生成するように使用されてもよい。治療目的のためのポリヌクレオチドの伝達は、一般的に、遺伝子治療と呼ばれる。ポリヌクレオチドの伝達は、目的となる細胞に存在する遺伝子物質の修正を導くことができる。用語としての安定可能なトランスフェクション又は安定してトランスフェクションされたことは、一般的に、トランスフェクションされた細胞のゲノムに外来性のポリヌクレオチドを導入し、且つ、統合することを意味する。用語としての安定したトランスフェクタントは、ゲノムDNAにポリヌクレオチドを安定して統合した細胞を意味する。安定したトランスフェクションは、真核細胞の分割段階において複製されるエピソームベクター（例えば、乳頭腫ウイルスの複製起点、人工染色体を含むプラスミドDNAベクター）を使用することによって得ることができる。用語としての一時的なトランスフェクション又は一時的にトランスフェクションされたことは、ポリヌクレオチドがトランスフェクションされた細胞のゲノムに統合されない、細胞へのポリヌクレオチドの導入を意味する。ポリヌクレオチドが発現できる遺伝子を含む場合、発現カセットは、染色体の内因性の遺伝子の発現を支配する、調節的な制御を受ける。用語としての一時的なトランスフェクタントは、ポリヌクレオチドがもたらされたが、ポリヌクレオチドがゲノムDNAに統合されていない細胞を意味する。

20

30

【0049】

脈管内及び脈管

用語としての脈管内は、直接的な注入よりも、より均一に分配して細胞にポリマー、オリゴヌクレオチド、あるいはポリヌクレオチドの伝達を可能にする、投与の脈管内ルートの意味する。ここでの脈管内は、哺乳類を含む動物の身体内の組織又は器官に結合される脈管と呼ばれる内部の管状構造内を意味する。脈管は、身体内で組織又は器官に結合される内部の中空の管状構造を含む。体液は、管状構造の孔内の身体部分の内外へ流れる。体液の例は、血液、リンパ液、あるいは胆汁を含む。脈管の例は、動脈、小動脈、毛細管、小静脈、シヌソイド、静脈、リンパ管及び胆管を含む。器官の導入性の血管は、器官又は組織に向かって導かれ、正常な生理的な条件下で器官又は組織に向かって血液が流れる脈管として定義される。反対に、器官の輸出性の血管は、器官又は組織から遠ざかって導かれ、正常な生理的な条件下で器官又は組織から遠ざかって血液が流れる脈管として定義される。肝臓において、下大静脈へ肝臓から通常血液を運び去るので、肝臓の静脈は輸出性の血管である。さらに、肝臓では、門脈及び肝臓の動脈は、通常肝臓への血液を保持するので、門脈及び肝臓の動脈は肝臓に関して導入性の血管である。直接の柔組織的な注入と比較して、脈管の中への抑制剤又は抑制剤の複合体の挿入は、抑制剤を柔組織的な細胞に対して、より効率的により均衡のとれた分配で伝達することができる。

40

【0050】

50

修飾

修飾と呼ばれるプロセスを介して修飾が形成されるように、2つの分子が共有結合によって結合される場合、分子は第二の分子によって修飾される。すなわち、2つの分子は、新しい単一の分子の形成物に帰着する1つの分子からの原子と、第2の分子からの原子との間で共有結合を形成する。化学的な共有結合は、電子密度を共有している2つの原子間の相互作用又は結合である。修飾はまた、非共有結合を介する2つの分子間の相互作用を意味する。例えば、クラウンエーテルは、あるアミノ基で非共有結合を形成できる。

【0051】

塩

塩は、イオン結合、つまり、一個以上の電子がある原子から別の原子まで完全に移動される、を含む如何なる化合物である。塩は、溶液で溶解された場合、陽イオンと陰イオンに分離して、したがって、溶液のイオン強度を強める、イオン化合物である。

【0052】

薬学的に受容可能な塩

薬学的に受容可能な塩は、酸と塩基の両者の追加的な塩を意味する。

【0053】

薬学的に受容可能な酸性の追加塩

薬学的に受容可能な酸性の追加塩は、生物学的な有効性及び遊離塩基の特性を保持し、生物学的でないか、あるいはそうでなければ不適當でない、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸及びその他同種のもの、さらに酢酸、プロピオン酸、ピルビン酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、マンデル酸、メタンサルホン酸、エタンサルホン酸、p-トルエンサルホン酸、サリチル酸のような有機酸、トリフルオロ酢酸及び同種のものなどの無機酸で形成される塩である。

【0054】

薬学的に受容可能な塩基の追加塩

薬学的に受容可能な塩基の追加塩は、生物学的な有効性及び遊離酸の特性を保持し、生物学的でなくあるいはそうでなければ不適當でない、無機有機の塩基から遊離酸まで調製される塩である。無機塩基から派生する塩は、下記に限定されないが、ナトリウム、カリウム、カルシウム、リチウム、アンモニア、マグネシウム、亜鉛、及びアルミニウム塩類並びにその他同種のものである。有機塩基から派生する塩は、下記に限定されないが、メチルアミン、トリエチルアミン及びその他同種のものなどの一次、二次及び三次のアミンの塩類である。

【0055】

乾燥

乾燥は、サンプルから溶媒を除去すること、例えば、減圧下の複合体から溶媒を除去することを意味する。乾燥はまた、サンプルの脱水又はサンプルの凍結乾燥を意味する。

【0056】

塩が安定した複合体

塩が安定した複合体は、150 mMの塩化ナトリウム溶液にさらされた場合に安定性を示す複合体である。この場合における安定性は、150 mMの塩化ナトリウム溶液の複合体において安定した粒子サイズを読む(60分間にわたって20%未満の変化)ことによって示される。この場合の安定性はまた、150 mMの塩化ナトリウム溶液の複合体において複体内でDNAの非凝縮がない(60分間にわたって20%未満の変化)ことによって示される。

【0057】

高分子電解質間の複合体

高分子電解質間の複合体は、相反する電荷の高分子電解質間の非共有の相互作用である。

【0058】

電荷、極性及びサイン

10

20

30

40

50

合成物の電荷、極性若しくはサインは、合成物が一個以上の電子（正の電荷、極性あるいはサイン）を失ったか又は一個以上の電子（負の電荷、極性あるいはサイン）を獲得したかどうかを意味する。

【0059】

官能基

官能基は、細胞をターゲットとするシグナル、核の局所化シグナル、エンドソーム若しくは他の細胞内小胞（シグナルを放出する）からの内容物の放出を増強する化合物、及び化合物又は複合体が付加される、化合物又は複合体の挙動若しくは相互作用を変更する他の化合物を含む。

【0060】

細胞をターゲットとするシグナル

細胞をターゲットとするシグナルは、細胞と生物学的に活性な化合物との関連を増大する、任意のシグナルである。それらのシグナルは、培養又は生物体のいずれかにおいて、細胞位置（組織など）若しくは細胞内の位置（核など）に直接的に導くことができる、薬剤や核酸などの生物学的に活性な化合物を修飾できる。シグナルは、細胞表面及び/又は細胞内部分と細胞表面との関連に対する化合物の結合を高める。外来遺伝子の細胞又は組織の位置を修飾することによって、生物学的な活性物質の機能は増大することができる。細胞をターゲットとするシグナルは、下記に限定しないが、タンパク質、ペプチド、脂質、ステロイド、糖、炭水化物、（発現しない）ポリ核酸又は合成化合物である。リガンドなどの細胞をターゲットとするシグナルは、レセプターへの細胞の結合を増強する。様々なリガンドは、細胞及び特定の細胞のレセプターに対する薬剤や遺伝子をターゲットとするために使用されている。リガンドは、細胞膜上又は細胞に近い細胞膜内のターゲットを探索する。レセプターに対するリガンドの結合は、典型的には、エンドサイトーシスを開始する。リガンドは、アシオログリコプロテイン（*asialoglycoproteins*）又はガラクトース残基の使用により、アシアログリコプロテイン（*asialoglycoproteins*）レセプターに対してターゲットとする薬剤を含む。インスリン、EGF、又はトランスフェリンなどの他のタンパク質は、ターゲットのために使用できる。RGD配列を含むペプチドは、多数の細胞をターゲットとするように使用できる。細胞のチオール、メルカプト基又は二硫化物の基で反応する、化学基も、多種の細胞をターゲットとするために使用することができる。フォラシンと他のビタミンもターゲットとするために使用することができる。他のターゲットとする群は、脂質、脂肪酸、コレステロール、ダンシル化合物及びアンホテリシン派生物のような薄膜と相互作用する分子を含む。さらに、細胞を結合するためにウィルスのタンパク質を使用することができる。

【0061】

細胞と化合物又は複合体との相互作用の後、他のターゲットとする群は、生物学的に有効な化合物の伝達を細胞のある部分に増加させるために使用することができる。

【0062】

核局所化シグナル

核局所化シグナルは、核に近接する製薬剤及び/又は細胞周期の分裂期中での核への製薬剤のエントリーをターゲットとすることを増強する。そのような核輸送シグナルは、シミアンウイルス40の大型T抗原NLS又はヌクレオプラスミン（*nucleoplasm*）NLSのようなタンパク質若しくはペプチドである。それら核局所化シグナルは、カルヨフェリン（*karyopherin*）ベータと相互作用するNLSレセプター（カルヨフェリンアルファ）のような様々な核輸送因子と相互作用する。核輸送タンパク質自体が核孔及び核に対してターゲットとされるので、核輸送タンパク質自体はさらに、NLSの機能として機能することができる。例えば、カルヨフェリンベータ自体は、核孔の複合体に対するDNAをターゲットとし得る。幾つかのペプチドは、シミアンウイルス40のT抗原から派生される。他のNLSペプチドは、hnRNP A1 タンパク質、ヌクレオプラスミン、*c-myc*などから派生する。それらは、短いNLS（H-CGYG

10

20

30

40

50

P K K K R K V G G - O H、 S E Q I D 1) 又は長い N L S (H - C K K K S S S D
D E A T A D S Q H S T - P P K K K R K V E D P K D F P S E L L S - O H、 S E Q
I D 2 及び H - C K K K W D D E A T A D S Q H S T P P K K K - R K V E D P K D
F P S E L L S - O H、 S E Q I D 3) を含む。他の N L S ペプチドは、 M 9 タン
パク質 (C Y N D F G N Y N N Q S S N F G P M K Q G N F G G R S S G P Y、 S E Q

I D 4)、 E 1 A (H - C K R G P K R P R P - O H、 S E Q I D 5)、ヌクレ
オプラスミン (H - C K K A V K R P A A T K K A G Q A K K K K L - O H、 S E Q
I D 6)、及び c - m y c (H - C K K K G P A A K R V K L D - O H、 S E Q I
D 7) から派生する。

10

【 0 0 6 3 】

膜の活性化化合物

多数の生物学的に活性化化合物、特に、大型及び / 又は電荷された化合物は、生物学的な膜と交差することができない。細胞にそれらの化合物を入れるために、細胞はエンドサイトーシスによって、つまりエンドソームに取られなければならないか、又は化合物が交差することを可能にする細胞の膜の混乱があるに違いない、いずれかである。エンドソームの入り込む場合、エンドソームの膜は、エンドソームからの、及び細胞質内へ移動させるように分裂しなければならない。細胞へのいずれかのエンターゲート経路は、細胞の膜の混乱か又は変更を要求する。膜を分裂させるか、又は膜融合を促進する化合物は、膜の活性化化合物と呼ばれる。それらの膜を活性化する化合物又はシグナルの放出は、エンドソーム (初期及び終期) のような細胞内のコンパートメント、リゾソーム、ファゴソーム、小胞、小胞体、ゴルジ体、トランスゴルジネットワーク (T G N) 及び筋小胞体からエンドサイトーシスされた物質の放出を増強する。放出は、細胞内のコンパートメントから細胞質への、又は核などの細胞小器官への移動を含む。放出するシグナルは、クロロキン、バフィロマイシン (b a f i l o m y c i n) 又は B r e f e l d i n A 1、及び E R を保持するシグナル (K D E L シーケンス) のような化学薬品、インフルエンザウイルスの赤血球凝集素サブユニット H A - 2 ペプチドのようなウイルスの構成部分並びに他のタイプの両親媒性のペプチドを含む。膜の活性化化合物が活性化時と場所の制御は、効果的な輸送にとって重要である。膜の活性化剤がある時間と場所において作用する場合、生物学的な膜を越える生物学的に活性化化合物の輸送は容易になる。膜の活性化化合物があまりにも活発であるか、又は間違った時間において活発である場合、輸送は生じないか、若しくは輸送は細胞の破壊と細胞死に関連する。自然は、膜の膜融合及び使用を含む生物学上活性化化合物の膜輸送を許容する様々な戦略を進展させ、膜の活性化化合物の使用の活動は、毒性を有せずに輸送を支援するように調整される。多数の脂質に基づく形態は、膜癒合に依存し、幾つかの膜の活性化ペプチドの活動は、p H によって調整される。特に、ウイルスの外殻タンパク質は、p H に感受性であり、中性又は塩基の p H で不活性で、エンドソームに見られる酸性条件下では活性である。

20

30

【 0 0 6 4 】

細胞を通過する化合物

カチオンの輸入ペプチド (また、ペプチド転置領域、細胞膜転置ペプチド、アルギニンに富んだモチーフ、細胞を通過するペプチド及びペプチド (p e p t o i d) の分子のトランスポーター) を含む細胞を通過する化合物は、一般的にアルギニン及びリジン残基に富んでおり、生物学的な膜と交差できる。加えて、膜を越えて付着される分子を輸送できる。例は、T A T (G R K K R R Q R R R、 S E Q I D 9)、V P 2 2 ペプチド、及び A N T p ペプチド (R Q I K I W F Q N R R M K W K K、 S E Q I D 1 0) を含む。細胞を通過する化合物は、厳密にはペプチドではない。さらに、アミン又はグアニジニウム (g u a n i d i n i u m) 基に富んだ、短い、非ペプチドポリマーは、生物学的な膜と交差する分子を保持することができる。膜の活性化ペプチドと同様に、カチオンの輸入ペプチドは、厳密なアミノ酸配列の要求よりも、むしろそれらの活性によって定義される。

40

50

【0065】

相互作用の修飾因子

相互作用の修飾因子は、分子がそれ自体と相互作用するか、又は相互作用の修飾因子を含まない分子に関する他の分子と相互作用する方法を変更する。この修飾の結果は、自己の相互作用又は他の分子との相互作用は、増大又は減少のいずれかである。例えば、細胞をターゲットする信号は、分子と細胞又は細胞の部分との間の相互作用を変化する相互作用の修飾因子である。ポリエチレングリコールは、他の分子を備えて分子とそれら分子自体との間の相互作用を減少する相互作用の修飾因子である。

【0066】

リンケージ

2つの他の基（化学的な部分）間に共有結合又はスペーサーを提供する付加。リンケージは、電気的に中性であって、又は正又は負の電荷を保持する。化学的な部分は、親水性又は疎水性である。好ましいスペーサーの基は、下記に限定しないが、C1 - C12アルキル、C1 - C12アルケニル、C1 - C12アルキニル、C6 - C18アラルケル（aralkyl）、C6 - C18アラルケニル（aralkenyl）、C6 - C18アラルケニル（aralkynyl）、エステル、エーテル、ケトン、アルコール、多価アルコール、アミド、アミン、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、ポリアミン、チオール、チオールエーテル、チオエステル、リン含有、及び複素環を含む。リンケージは、一つ以上の不安定な結合を含んでもよく、含まなくてもよい。

10

【0067】

二官能

クロスリンカーとして一般的に呼ばれる二官能分子は、2つの分子が共に結合される、つまり、2つの分子間にリンケージが形成するように使用される。二官能分子は、ホモ又はヘテロの二官能性を含むことができる。

20

【0068】

不安定な結合

不安定な結合は、選択的に破壊されることができ共有結合である。すなわち、不安定な結合は、他の共有結合の破壊を伴わずに、他の共有結合の存在下で破壊されてよい。例えば、二硫化物の結合は、さらに分子に存在する、炭素と炭素、炭素と酸素、炭素と硫黄、炭素と窒素の結合などの他の分子との切断を伴わずに、チオールの存在下で破壊可能である。不安定は切断をも意味する。

30

【0069】

不安定なリンケージ

不安定なリンケージは、不安定な結合を含み、2つの他の基の間にリンク又はスペーサーを提供する、化学的な化合物である。リンクされる基は、生物学的に活性な化合物、膜の活性な化合物、膜の活性を阻害する化合物、官能活性基、モノマー及び細胞をターゲットとする信号などの化合物から選択されてよい。スペーサー基は、アルカン、アルケン、エステル、エーテル、グリセリン、アミド、蔗糖エステル、多糖、及び酸素、硫黄又は窒素のようなヘテロ原子を含む基から選択される化学的な部分を含んでよい。スペーサーは電気的に中性であってよく、正又は負の電荷を保持してよく、中性、正若しくは負の全体の電荷を備える正又は負の両電荷を保持してよい。

40

【0070】

pHの不安定なリンケージ及び結合

pHの不安定は、酸性条件（ $pH < 7$ ）下の共有結合の選択的な破壊を意味する。すなわち、pHの不安定な結合は、破壊されない他の共有結合の存在下の酸性条件で破壊される。

【0071】

両親媒性化合物

両親媒性化合物は、親水性（水に可溶性）及び疎水性（水に不溶性）部分の両部分を有する。

50

【0072】

ポリマー

ポリマーは、モノマーと呼ばれる小さなユニットを共に繰り返して結合することによって構成される分子である。この適用において、用語としてのポリマーは、2乃至約80モノマーを有するオリゴマーと80以上のモノマーを有するポリマーの両者を含む。ポリマーは、線形、枝分かれしたネットワーク、星型、くし型、又はポリマーのラダータイプである。ポリマーは、単一のモノマーが使用されるホモポリマーであるか、又は2つ以上のモノマーが使用されるコポリマーである。コポリマーの種類は、交替、ランダム、ブロック及びグラフトを含む。

【0073】

ポリマーの主鎖は、結合がポリマーの長さの拡張のために必要とされる原子から構成される。ポリマーの側鎖は、結合がポリマーの長さの拡張のために必要とされない原子から構成される。

10

【0074】

ポリマー重合の当業者にとって、記載されたプロセスで活用されることができる幾つかの分類のポリマー重合がある。ポリマー重合は、連鎖又は段階である。この分類の記載は、追加及び凝縮ポリマーの以前の用語がかなり頻繁に使用される。“Most step-reaction polymerizations are condensation processes and most chain-reaction polymerizations are addition processes” (M. P. Stevens Polymer Chemistry: An Introduction New York Oxford University Press 1990). テンプレートのポリマー重合は、娘ポリマーからポリマーを形成するために使用することができる。

20

【0075】

ポリマー重合の段階

ポリマー重合の段階において、ポリマー重合は段階ごとに生じる。ポリマー成長は、モノマー、オリゴマー、及びポリマーとの間の反応によって生じる。全体を通して同一の反応であり、末端の基が反応性であるように、終了段階がないので、イニシエータは必要としない。ポリマー重合速度は、官能基が消費されるにつれて減少する。

30

【0076】

典型的には、ポリマー重合の段階は、2つの異なる手法のいずれかでなされる。一つの手法は、モノマーが、A-Bが-[A-B]-を生じるように、同一分子で(A及びBの)反応性の両官能基を有する。

【0077】

または、他のアプローチは、2つの二官能モノマーを有することである。

【0078】

A-A+B-Bが-[A-A-B-B]-を生じる。

【0079】

さらに別のアプローチは、A-Aに別の薬剤を添加して-[A-A]-を生じるように、一つの二官能基を有することである。

40

【0080】

ポリマー重合の連鎖

連鎖反応において、ポリマーのポリマー重合の成長は、成長する鎖の限定された数に対してモノマーユニットの連続的な追加によって生じる。開始及び伸長メカニズムは異なり、通常は、連鎖停止段階がある。ポリマー重合率は、モノマーが無くなるまで一定を維持する。

【0081】

モノマー及びポリマーの他の化合物

ポリマーは、ポリマーの活用性を高める他の基を有する。それらの基は、ポリマー形成

50

に先立ってモノマーに組み入れられることができるか、又はポリマー形成後にポリマーに付加される。それらの基は、ターゲットとなる基を含み、かかる基は、特定の細胞又は組織に対してポリマーと核酸の複合体をターゲットとするために使用される。それらのターゲットとなる物質の例は、アシアログライコプロテイン又はガラクトース残基の使用によって、アシアログライコプロテインレセプターにターゲットとなる薬剤を含む。インスリン、EGF、あるいはトランスフェリンなどの他のタンパク質は、ターゲットとするために使用できる。タンパク質は、ポリペプチドとして互いに接続される2つ以上のアミノ酸残基からなる分子を意味する。アミノ酸は、天然に生じるか、又は合成であってよい。RGD配列を含むペプチドは、多数の細胞をターゲットとするように使用できる。細胞上でチオール、メルカプト基あるいは二硫化物基と反応する化学基も、多数の種類の細胞をターゲットとするために使用することができる。フォラシンと他のビタミンもターゲットとするために使用することができる。他のターゲットとする基は、脂肪酸、コレステロール、ダンシル化合物及びアンホテリシン派生物のような膜と相互作用する分子を含む。

10

【0082】

細胞と超分子の複合体との相互作用の後に、他のターゲットとする基は薬剤又は核酸の伝達を細胞のある部分に増加させるために使用することができる。例えば、作用薬は、エンドソームを分裂させるために使用することができ、核をターゲットとするために核の局所化する信号(NLS)を使用することができる。

【0083】

様々なリガンドは細胞への、及び特定の細胞のレセプターへの薬剤や遺伝子をターゲットとするために使用された。リガンドは、細胞膜内の、細胞膜上の、あるいは細胞の近くのターゲットを求めてよい。リガンドのレセプターへの結合は、一般的には、エンドサイトーシスを開始する。エンドサイトーシスされないレセプターに結合するDNA伝達のためにリガンドを使用することができ得る。例えば、インテグリン(integrin)レセプターを結合するRGDペプチド配列を含むペプチドが使用されうる。加えて、ウィルスタンパク質は、細胞に複合体を結合するように使用され得る。脂質及びステロイドは、細胞の膜に複合体を直接的に挿入するように使用され得る。

20

【0084】

ポリマーはまた、ポリマー内の切断可能な群を含むことができる。ターゲットとする基に付加された場合、切断は、ターゲットとなる基において複合体とレセプターとの間の相互作用を減少するように導く。切断可能な群は、下記に限定されないが、ジスルフィド結合、ジオール、ジアゾ基を含んだ結合、エステル結合、スルホン結合、アセタール、ケタール(ketals)、エノール・エーテル、エノール・エステル、エナミン及びイミンを含む。

30

【0085】

高分子電解質

高分子電解質、又はポリイオンは、一つ以上の電荷を有するポリマーであり、つまり、ポリマーは、一つ以上の電子を得るか失ういずれかの基を含む。ポリカチオンは、正味の正の電荷を有する高分子電解質であり、例えば、臭化水素ポリ-L-リジンである。ポリカチオンは、正、中性、あるいは負に電荷するモノマーユニットを含むことができるが、しかしながら、ポリマーの正味電荷は正であるべきである。ポリカチオンはまた、2つ以上の正電荷を含む、非ポリマー分子を意味することもできる。ポリアニオンは負、中性、あるいは正に電荷するモノマーユニットを含むことができるが、しかしながら、ポリマーの正味電荷は負であるべきである。ポリアニオンはまた、2つ以上の負電荷を含む、非ポリマー分子を意味することもできる。用語としての高分子電解質は、ポリカチオン、ポリアニオン、両性イオンのポリマー、及び中性ポリマーを含む。用語としての両性イオンは、同一分子の部分である酸性基と塩基との間の反応の産物を意味する。

40

【0086】

立体安定剤

立体安定剤は、粒子から粒子への又はポリマーからポリマーへの静電気の相互作用を立

50

体的に妨害することによって凝集を防ぐ長鎖の親水性の基である。例は、アルキル基、PEG鎖、多糖類、アルキルアミンを含む。静電気の相互作用は、正電荷と負電荷との間の引き合う力により2つ以上の物質の非共有関係である。

【0087】

緩衝液

緩衝液は弱酸又は弱塩基及びそれらの塩からなる。緩衝溶液は、追加的な酸又は塩基が溶液に添加された場合、pHの変化に耐える。

【0088】

生物学的、化学的又は生化学的な反応

生物学的、化学的又は生化学的な反応は、イオン及び/若しくは共有結合の形成又は切断を含む。 10

【0089】

反応的

化合物は、他の化合物とイオン又は共有結合のいずれかが形成可能である場合に反応的である。共有結合を形成できる反応的な化合物の部分は、反応的な官能基又は反応的な基として意味する。

【0090】

ステロイド

ステロイドの派生物はステロール、ヒドロキシ部位が修飾された(例えば、アシル化された)ステロール、ステロイドホルモン、又はそれらのアナログを意味する。修飾は、スパーサー基、リンカー、又は反応基を含むことができる。 20

【0091】

立体化学

立体障害、又は立体化学は、同一分子の隣接する基による化学反応の防止又は妨害である。

【0092】

脂質

水に不溶であるが、クロロホルム及びベンゼンのような有機溶媒に可溶の有機化合物の如何なる種々の群である。脂質は、親水性及び疎水性部分の両部分を含む。用語としての脂質は、複合の脂質、単一の脂質、及び合成の脂質を含むことを意味する。 30

【0093】

複合体の脂質

複合体の脂質は、脂肪酸のエステルで、グリセリド(油脂)、糖脂質、リン脂質及びろうを含む。

【0094】

単一の脂質

単一の脂質は、ステロイド及びテルペンを含む。

【0095】

合成の脂質

合成の脂質は、カルボン酸がアミドに変換された脂肪酸から調製されたアミド、1つ以上の酸素原子が別のヘテロ原子窒素または硫黄など)によって置換された複合の脂質の合成の変形、及び追加の親水基が化学的に付加された単一の脂質の派生物を含む。合成の脂質は、一つ以上の不安定な基を含んでよい。 40

【0096】

脂肪

脂肪は、長鎖のカルボン酸のグリセリン・エステルである。脂肪の加水分解は、グリセリン及びカルボン酸-脂肪酸を生成する。脂肪酸は、飽和又は不飽和(一つ以上の二重結合を含む)であってよい。

【0097】

油

油は、カルボン酸のエステル、又は脂肪酸のグリセリドである。

【0098】

糖脂質

糖脂質は脂質を含んでいる砂糖である。砂糖は典型的にガラクトース、グルコースあるいはイノシトールである。

【0099】

リン脂質

リン脂質は燐酸基及び1つ以上の脂肪酸（脂肪酸のエステルとして）の両方がある脂質である。燐酸基は、1つ以上の追加の有機の基に結合されてよい。

【0100】

ろう

ろうは、一般に脂肪酸のエステルである、様々な固体か半固体の物質のいずれかである。

【0101】

脂肪酸

脂肪酸は、脂質（脂肪、ろう、及びホスホグリセリド）の加水分解産物と考えられる。

【0102】

界面活性剤

界面活性剤は、洗剤又は脂質（それはその表面張力の減少によりその拡張特性あるいは湿る特性を増加させるために液体に加えられる）のような界面活性剤である。界面活性剤は、同一分子の極性の基（親水性）及び非極性の（疎水性）基を含む合成物を意味する。切断された界面活性剤は、極性基が2つの基の間に位置した化学結合の破損か切断によって、非極性基から分離されてもよい界面活性剤か、あるいは極性基若しくは非極性基又は両方の基が、界面活性剤の洗剤特性が破壊されるように化学的に修飾されてよい界面活性剤である。

【0103】

洗剤

洗剤は、水に可溶で、非極性物質を水の溶液に入らせる化合物である。洗剤は、疎水基と親水基を有する。

【0104】

ミセル

ミセルは両親媒性の分子を含んでいるが、膜によって完全に包含される水の容積を含んでいない、微視的な小胞である。ミセルでは、両親媒性化合物の親水性の部分が、外部（小胞の表面上の）上にある。逆のミセルでは、両親媒性化合物の疎水性の部分が外部上にある。したがって、逆のミセルは、逆のミセル内の水及び巨大分子の両方を可溶化できる、極の芯を含む。

【0105】

リポソーム

リポソームは、両親媒性分子を含んでおり、膜によって完全に包含される水の容積を含んでいる、微視的な小胞である。

【0106】

ミクロの乳剤

ミクロの乳剤は、単一の界面活性剤又は界面活性剤の混合により、単一の位相へ2つの混ざらない液体（水と油）の実質的な量をもたらされる、等方性で、熱力学的に安定した溶液である。自然に形成されたコロイド粒子は、界面活性剤分子の単分子層によって囲まれた、主要でない溶剤の球状の小滴である。自発的な屈曲、油/水の界面で1分子層の界面活性剤のH₀は、小胞の位相の振る舞い及び微構造を指令する。親水性の界面活性剤は、水の中の油（O/W）のミクロの乳剤（H₀ > 0）を生成し、一方で、脂肪親和性の強い界面活性剤は、油の中の水（W/O）のミクロの乳剤を生成する。

【0107】

10

20

30

40

50

疎水基

疎水基は、化学的な部位が水を避けることを意味する、性質の用語を示す。典型的には、そのような化学基は可溶性でなく、水素結合を形成しない傾向がある。

【0108】

親水基

親水基は、化学的な部位が水を好むことを意味する、性質の用語を示す。典型的には、そのような化学基は可溶性であり、水との水素結合のドナー又はアクセプターである。

【0109】

実施例

実施例1．ドデシルアミン塩酸塩の調製

ドデシルアミン(113 mg、0.610 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)は、メタノール(500 μ L)に溶解し、塩化水素(7 mL、1 Mのジエチルエーテル、アルドリッチ)を加えることによりその塩酸塩の塩に変換された。生じた沈殿は、ジエチルエーテルで洗浄され、白い固体としてドデシルアミン塩酸塩(115 mg、収率85%)を与えるために真空乾燥された。

10

【0110】

実施例2．pDNAとドデシルアミン塩酸塩との複合体の調製

水(50 μ L)に、pDNA(0.30 μ molのリン酸塩100 μ g、2 mg/mLの50 μ Lの水溶液)の溶液が混合して加えられた。ドデシルアミン塩酸塩の水溶液(13.4 μ L、134 μ g、0.60 μ mol)が、混合して加えられた。10分後に、沈殿は遠心分離でスピンドウンされた。また、ペレットは水(2 x 100 μ L)で洗浄された。生じたペレットは、P₂O₅で3日間凍結乾燥装置にて乾燥された。

20

【0111】

実施例3．pDNAと臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)との複合体の調製

水(50 μ L)に、pDNA(0.30 μ molのリン酸塩100 μ g、2 mg/mLの50 μ Lの水溶液)の溶液が混合して加えられた。ドデシルアミン塩酸塩の水溶液(13.4 μ L、134 μ g、0.60 μ mol)が、混合して加えられた。10分後に、沈殿は遠心分離でスピンドウンされた。また、ペレットは水(2 x 100 μ L)で洗浄された。生じたペレットは、P₂O₅で3日間凍結乾燥装置にて乾燥された。

30

【0112】

実施例4．Cy3-DNA-NC₁₂の調製

H₂O(15 μ L)にCy3(0.30 μ molのリン酸塩、1.17 μ g/ μ Lの85 μ LのH₂O、100 μ g)が添加されて、穏やかに混合された。NC₁₂(0.61 μ mol、10 μ g/ μ Lの13.4 μ LのH₂O、134 μ g)が添加されて、穏やかに混合された。ピンク色の沈殿が形成された。室温で10分間反応されて、ペレットを形成するために遠心分離によってスピンドウンされた。上澄みが捨てられ、ペレットは水で2回洗浄された。ペレットは、P₂O₅で数日間凍結乾燥された。

【0113】

実施例5．キトサンが修飾されたオレイン酸の調製

オレイン酸(4.15 μ L、13.2 mmol、アルドリッチ)がDMF(342 μ L)に溶解された。生じた溶液に、スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド(13.2 μ mol、100 mg/mLの29 μ Lの水溶液、ピアスケミカルカンパニー)と、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(13.2 μ mol、20 mg/mLの125 μ Lの水溶液、アルドリッチ)が添加され、生じた溶液は室温で攪拌された。1時間後に溶液はDMF(3.5 mL)のキトサン(終濃度を10 mg/mLとなるように試薬は1%塩酸水に溶解された。500 μ Lの濃縮が500 μ Lの水に溶解されて、1 N水酸化ナトリウムでpH 6.5に調節された。5.0 mgのポリマー(85%デアシル化)、31 μ molのアミン、フルカケミカルカンパニー)に添加された。生じた溶液は、80%DMF/水の1 mg/mL溶液としてキトサンが修飾されたオレイン

40

50

酸を与えるために、16時間室温で攪拌された。

【0114】

実施例6．オレイン酸とキトサンが修飾されたラクトバイオン酸(Lactobionic Acid)の調製

DMFのラクトバイオン酸のストック溶液は、100mg/mlの終濃度に調製された。9.45μLのラクトバイオン酸のストック溶液(945μg、2.64μmol、アルドリッチ)にDMF(437μL)、スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド(573μg、2.64μmol、20mg/mLの28.7μLの水溶液、ピアスケミカルカンパニー)と、1-(3-ジメチル-アミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(505μg、2.64μmol、20mg/mLの25.3μLのDMF溶液、アルドリッチ)が添加された。生じた溶液は周辺温度で1時間攪拌されて、キトサンが修飾されたオレイン酸(80%DMF/水の1mg/ml溶液の1mL)が添加された。生じた溶液は、0.667mg/ml溶液としてオレイン酸及びラクトバイオン酸を与えるために、16時間周辺温度で攪拌された。

10

【0115】

実施例7．キトサンが修飾されたデオキシコール酸の調製

デオキシコール酸(カルビオケム)は、100mg/mLの終濃度まで水に溶解された。デオキシコール酸の水溶液(11μL、2.7μmol)に、DMF(407μL)が加えられ、続けて、スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド(2.7μmol、10mg/mLの57μLの水溶液、ピアスケミカルカンパニー)と、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(20mg/mLの25μLのDMF溶液、アルドリッチ)が添加され、生じた溶液は室温で攪拌された。1時間後にキトサン(終濃度を10mg/mLとなるように試薬は1%塩酸水に溶解された。1mLの濃縮が5mLの水に溶解されて、3N水酸化ナトリウムでpH6.5に調節された。10mgのポリマー(85%デアシル化)、53μmolのアミン、フルカケミカルカンパニー)が添加され、生じた溶液は、キトサンが修飾されたデオキシコール酸を与えるために、16時間室温で攪拌された。

20

【0116】

実施例8．キトサンが修飾されたコール酸の調製

コール酸(カルビオケム)は、100mg/mLの終濃度まで水に溶解された。コール酸の水溶液(11μL、2.7μmol)に、DMF(407μL)が加えられ、続けて、スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド(2.7μmol、10mg/mLの57μLの水溶液、ピアスケミカルカンパニー)と、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(20mg/mLの25μLのDMF溶液、アルドリッチ)が添加され、生じた溶液は室温で攪拌された。1時間後にキトサン(終濃度を10mg/mLとなるように試薬は1%塩酸水に溶解された。1mLの濃縮が5mLの水に溶解されて、3N水酸化ナトリウムでpH6.5に調節された。10mgのポリマー(85%デアシル化)、53μmolのアミン、フルカケミカルカンパニー)が添加され、生じた溶液は、キトサンが修飾されたコール酸を与えるために、16時間室温で攪拌された。

30

【0117】

実施例9．2-プロピオン-3-メチルマレイン無水物(カルボキシジメチルマレイン無水物又はCDM)

50mLの無水のテトラヒドロフランの水素化ナトリウム(0.58g、25mmol)の懸濁液に、トリエチル-2-ホスホプロピオン酸エステル(7.1g、30mmol)が添加された。水素の泡が停止した後、10mLの無水のテトラヒドロフランのジメチル-2-オキソグルタル酸(3.5g、20mmol)が添加されて30分間攪拌された。次いで、10mLの水が添加されて、回転式の蒸発によってテトラヒドロフランが除去された。生じた固体と水の混合は、50mLのエチルエーテルで3回抽出された。エーテルの抽出物はいっしょにされて、硫酸マグネシウムで乾燥されて、明るい黄色のオイルに濃縮された。4gm(82%収率)の純粋なトリエステルを生じるように2:1のエー

40

50

テル：ヘキサンのシリカゲルの溶離クロマトグラフィーでオイルが精製された。次いで、2-プロピオン-3-メチルマレインの無水物は、このトリエステルを、4.5g(5等価物)の水酸化カリウムを含有する水とエタノールの50mLの50/50の混合液に溶解することによって形成される。この溶液は1時間逆流に熱せられた。次いで、エタノールは回転式蒸発によって除去され、溶液は塩酸でpH2まで酸性化された。次いで、この水溶液は200mLの酢酸エチルで抽出され、分離されて、硫酸マグネシウムで乾燥されて、白色の固体に濃縮された。次いで、2g(80%の収率)の2-プロピオン-3-メチルマレインの無水物を生じるために、この固体はジクロロメタンとヘキサンから再結晶された。

【0118】

10

実施例10. 2-(ドデシルプロピオンアミド)-3-メチルマレインの無水物(CDMNC₁₂)の調製

2-(ドデシルプロピオンアミド)-3-メチルマレインの無水物(100mg、0.543mmol)はジクロロメタン(3mL)で溶解された。生じた溶液はアイスバスで0℃まで冷却され、塩化オキサリル(49.7μL、0.57mmol、アルドリッチ)はシリンジで滴下して添加された。生じた溶液は室温まで温められて、ドデシルアミン(206mg、1.11mmol、アルドリッチ)が添加され、続いて、ジイソプロピルエチルアミン(94.6μL、0.543mmol、アルドリッチ)が添加された。16時間後、溶液は減圧下(アスピレータ)で濃縮され、酢酸エチルと水に分割された。179mg(94%)の2-(ドデシルプロピオンアミド)-3-メチルマレインの無水物(CDMNC₁₂)を与えるために、有機層は1N塩酸(3X)、塩水で洗浄され、乾燥(Na₂SO₄)され、濾過されて、濃縮された。

20

【0119】

実施例11. キトサン-CDMNC₁₂(Chit-CDMNC₁₂)の調製

キトサン(200μg、10μg/μLの1%塩酸の20μL、1.06μmolのアミン、フルカケミカルカンパニー)にエタノール(20μL)と数mgのジイソプロピルアミノメチル-ポリスチレンの固体の支持塩基(フルカケミカルカンパニー)が添加された。CDMNC₁₂(185μg、1.85μLの100μg/μLのDMF、0.53μmol)が添加され、反応は室温で30分間攪拌されて、固体の支持塩基が遠心分離によって除去された。

30

【0120】

実施例12. キトサン-CDMC12-CDM(Chit-CDMC12-CDM)の調製

Chit-CDMC12(200μg、100μLの2μg/μLのエタノール、0.53μmolのアミン)に数mgのジイソプロピルアミノメチル-ポリスチレンの固体の支持塩基(フルカケミカルカンパニー)が添加された。2-プロピオン-3-メチルマレインの無水物(CDM)(97μg、10μLの10μg/μLのDMF、0.53μmol)が添加され、反応は室温で30分間攪拌されて、固体の支持塩基が遠心分離によって除去された。

【0121】

40

実施例13. キトサン-オレイン-CDM(Chit-O1-CDM)の調製

Chit-O1(500μg、100μLの5μg/μLの80%DMF、1.3μmol)に数mgのジイソプロピルアミノメチル-ポリスチレンの固体の支持塩基(フルカケミカルカンパニー)が添加されて十分に混合された。CDM(244μg、2.4μLの100μg/μLのDMF、1.3μmol)が添加され、反応は室温で30分間攪拌されて、固体の支持塩基が遠心分離によって除去された。

【0122】

実施例14. キトサン-オレイン-無水コハク酸(Chit-O1-SA)の調製

Chit-O1(500μg、100μLの5μg/μLの80%DMF、1.3μmol)に数mgのジイソプロピルアミノメチル-ポリスチレンの固体の支持塩基(フルカ

50

ケミカルカンパニー)が添加されて十分に混合された。無水コハク酸(132 μg、1.3 μLの100 μg/μLのDMF、1.3 μmol)が添加され、反応は室温で30分間攪拌されて、固体の支持塩基が遠心分離によって除去された。

【0123】**実施例15. MC791-CDMの調製**

MC791は、ビニルエーテルの重合から調製されるポリマーである。MC791における重合供給率(モル比)は、47%エチルビニルエーテル、3%オクタデシルビニルエーテル、及び50%1-アミノエチルビニルエーテル(フタルイミドの派生物として重合反応中に保護された)である。MC791(200 μg、20 μLの10 μg/μLのH₂O、3.2 μmolのアミン)に、エタノール(80 μL)及び数mgのジイソプロピルアミノメチル-ポリスチレンの固体の支持塩基(フルカケミカルカンパニー)が添加された。溶液が十分に混合された。CDM(200 μg、2.0 μLの100 μg/μLのDMF、1.1 μmol)が添加され、反応は室温で30分間攪拌された。固体の支持塩基が遠心分離によって除去された。

10

【0124】**実施例16. MC791-CDMC12-CDMの調製**

MC791は、ビニルエーテルの重合から調製されるポリマーである。MC791における重合供給率(モル比)は、47%エチルビニルエーテル、3%オクタデシルビニルエーテル、及び50%1-アミノエチルビニルエーテル(フタルイミドの派生物として重合反応中に保護された)である。MC791(200 μg、20 μLの10 μg/μLのH₂O、3.2 μmolのアミン)に、エタノール(80 μL)及び数mgのジイソプロピルアミノメチル-ポリスチレンの固体の支持塩基(フルカケミカルカンパニー)が添加された。溶液が十分に混合された。CDMC12(200 μg、2.0 μLの100 μg/μLのDMF、0.57 μmol)が添加され、反応は室温で30分間攪拌された。CDM(200 μg、2.0 μLの100 μg/μLのDMF、1.1 μmol)が添加され、反応は室温でさらに30分間攪拌された。固体の支持塩基が遠心分離によって除去された。

20

【0125】**実施例17. MC787-CDMの調製**

MC787は、ビニルエーテルの重合から調製されるポリマーである。MC787における重合供給率(モル比)は、47%n-プロピルビニルエーテル、3%オクタデシルビニルエーテル、及び50%1-アミノエチルビニルエーテル(フタルイミドの派生物として重合反応中に保護された)である。MC787(200 μg、20 μLの10 μg/μLのH₂O、3.2 μmolのアミン)に、エタノール(80 μL)及び数mgのジイソプロピルアミノメチル-ポリスチレンの固体の支持塩基(フルカケミカルカンパニー)が添加された。溶液が十分に混合された。CDM(200 μg、2.0 μLの100 μg/μLのDMF、1.1 μmol)が添加され、反応は室温で30分間攪拌された。固体の支持塩基が遠心分離によって除去された。

30

【0126】**実施例18. MC787-CDMC12-CDMの調製**

MC787は、ビニルエーテルの重合から調製されるポリマーである。MC787における重合供給率(モル比)は、47%n-プロピルビニルエーテル、3%オクタデシルビニルエーテル、及び50%1-アミノエチルビニルエーテル(フタルイミドの派生物として重合反応中に保護された)である。MC787(200 μg、20 μLの10 μg/μLのH₂O、3.2 μmolのアミン)に、エタノール(80 μL)及び数mgのジイソプロピルアミノメチル-ポリスチレンの固体の支持塩基(フルカケミカルカンパニー)が添加された。溶液が十分に混合された。CDMC12(200 μg、2.0 μLの100 μg/μLのDMF、0.57 μmol)が添加され、反応は室温で30分間攪拌された。CDM(200 μg、2.0 μLの100 μg/μLのDMF、1.1 μmol)が添加され、反応は室温でさらに30分間攪拌された。固体の支持塩基が遠心分離によって除

40

50

去された。

【0127】

実施例19. カチオンの界面活性剤でpDNAの凝縮

部分A. 臭化セチルトリメチル-アンモニウム(CTAB)でローダミン標識DNAの凝縮の決定

PCILuc DNA (pDNA [Zhang et al. 1997])は、MirusのLabel IT(R) Rhodamine kit (Rhodamine Containing DNA Labeling Reagent, Mirus Corporation)を使用して100塩基ごとに1つのローダミンを標識するように修飾された。修飾されたpDNA (10 µg)は、水で標識(90 µg)されておらず、水で1 µg / µLの終濃度に希釈されたpDNAと混合された。修飾されたpDNA / pDNAの混合物(5 µg)は、500 µLの終量まで水で希釈された。CTABの異なる量が溶液に添加されて、溶液の蛍光強度がCary Eclipse蛍光分光光度計(励起 = 555、放射 = 585、Varian, Inc.)を使用して測定された。Trubetskoy et alは、pDNAが凝縮されるようにローダミン標識したpDNAが、蛍光のクエンチングを受けることを照明した [Trubetskoy, 1999]。

10

【0128】

【表1】

N/P	µg CTAB	mM CTAB	Fluor Int
0	0	0.000	230.896
0.4	2	0.011	201.540
0.7	4	0.022	159.277
1.1	6	0.033	85.253
1.4	8	0.044	81.625
1.8	10	0.055	78.471
2.2	12	0.066	74.722
2.5	14	0.077	67.267
2.9	16	0.088	62.799

20

30

結果は、CTABが、CTABの文献のcmc (1 mM) [Calbiochem, 2000 - 2001]よりも低い0.33 mMのCTAB濃度でpDNAを凝縮することを示す。

40

【0129】

部分B. ドデシルアミン塩酸塩でローダミン標識DNAの凝縮の決定

PCILuc DNA (pDNA) [Zhang et al. 1997]は、MirusのLabel IT(R) Rhodamine kit (DNA標識試薬を含有するローダミン、Mirus Corporation)を使用して100塩基ごとに1つのローダミンを標識するように修飾された。修飾されたpDNA (10 µg)は、水で標識(90 µg)されておらず、水で1 µg / µLの終濃度に希釈されたpDNAと混合された。修飾されたpDNA / pDNAの混合物(5 µg)は、500 µLの終量まで水で希釈された。ドデシルアミン塩酸塩の異なる量が溶液に添加されて、溶液の蛍光強度がCary Eclipse蛍光分光光度計(励起 = 555、放射 = 585、Vari

50

an, Inc.) を使用して測定された。Trubetskoy et al は、pDNA が凝縮されるようにローダミン標識した pDNA が、蛍光のクエンチングを受けることを照明した [Trubetskoy, 1999]。

【0130】

【表2】

N/P	μg NC12	mM NC12	Fluor Int
0	0	0.000	264.039
0.6	2	0.018	183.656
1.2	4	0.036	106.095
1.8	6	0.054	95.586
2.4	8	0.072	86.119
3.0	10	0.090	77.670
3.6	12	0.108	68.208
4.2	14	0.126	62.115
4.8	16	0.144	60.158
5.4	18	0.162	53.467
6.0	20	0.180	46.790
6.5	22	0.198	43.375
7.1	24	0.216	45.000

結果は、pDNA が 0.036 乃至 0.054 mM のドデシルアミン塩酸塩の濃度に凝縮されることを示した。

【0131】

実施例 20. 修飾されたキトサンポリマーを有する pDNA - NC12 (pCILuc) のマウスの尾部の静脈注入

15 の複合体が下記のように調製された。

【0132】

複合体 I : H₂O (2 mL) 中の pDNA (pCILuc, 40 μg)。リンゲル液 (10 mL) は、注入に先立って添加される。

【0133】

複合体 II : pDNA - NC₁₂ (pCILuc, 40 μg, 40 μL の 1 μg / μL のエタノール) が H₂O (2 mL) に添加されて、ボルテックスされた。リンゲル液 (10 mL) は、注入に先立って添加されて十分に混合された。

【0134】

複合体 III : pDNA - NC₁₂ (pCILuc, 40 μg, 40 μL の 1 μg / μL のエタノール) が H₂O (2 mL) の Chit - Ol (84 μg, 0.22 μmol) 溶液に添加されて、ボルテックスされた。リンゲル液 (10 mL) は、注入に先立って添加されて十分に混合された。

【0135】

複合体 IV : pDNA - NC₁₂ (pCILuc, 40 μg, 40 μL の 1 μg / μL のエタノール) が H₂O (2 mL) の Chit - Ol - LBA (84 μg, 0.22 μmol) 溶液に添加されて、ボルテックスされた。リンゲル液 (10 mL) は、注入に先立

って添加されて十分に混合された。

【0136】

複合体V：pDNA - NC₁₂ (pCILLuc、40 μg、40 μLの1 μg / μLのエタノール)がH₂O (2 mL)のChit - CDMC12 (84 μg、0.22 μmol)溶液に添加されて、ボルテックスされた。リンゲル液 (10 mL)は、注入に先立って添加されて十分に混合された。

【0137】

複合体VI：pDNA - NC₁₂ (pCILLuc、40 μg、40 μLの1 μg / μLのエタノール)がH₂O (2 mL)のChit - Ol - SA (84 μg、0.22 μmol)溶液に添加されて、ボルテックスされた。リンゲル液 (10 mL)は、注入に先立って添加されて十分に混合された。 10

【0138】

複合体VII：pDNA - NC₁₂ (pCILLuc、40 μg、40 μLの1 μg / μLのエタノール)がH₂O (2 mL)のChit - Ol - CDM (84 μg、0.22 μmol)溶液に添加されて、ボルテックスされた。リンゲル液 (10 mL)は、注入に先立って添加されて十分に混合された。

【0139】

複合体VIII：pDNA - NC₁₂ (pCILLuc、40 μg、40 μLの1 μg / μLのエタノール)がH₂O (2 mL)のChit - CDM (84 μg、0.22 μmol)溶液に添加されて、ボルテックスされた。リンゲル液 (10 mL)は、注入に先立って添加されて十分に混合された。 20

【0140】

複合体IX：pDNA - NC₁₂ (pCILLuc、40 μg、40 μLの1 μg / μLのエタノール)がH₂O (2 mL)のChit - CDMC12 - CDM (84 μg、0.22 μmol)溶液に添加されて、ボルテックスされた。リンゲル液 (10 mL)は、注入に先立って添加されて十分に混合された。

【0141】

複合体X：pDNA - NC₁₂ (pCILLuc、40 μg、40 μLの1 μg / μLのエタノール)がH₂O (2 mL)のChit - LBA - CDMC12 (84 μg、0.22 μmol)溶液に添加されて、ボルテックスされた。リンゲル液 (10 mL)は、注入に先立って添加されて十分に混合された。 30

【0142】

複合体XI：pDNA - NC₁₂ (pCILLuc、40 μg、40 μLの1 μg / μLのエタノール)がH₂O (2 mL)のChit - Chol (84 μg、0.22 μmol)溶液に添加されて、ボルテックスされた。リンゲル液 (10 mL)は、注入に先立って添加されて十分に混合された。

【0143】

複合体XII：pDNA - NC₁₂ (pCILLuc、40 μg、40 μLの1 μg / μLのエタノール)がH₂O (2 mL)のChit - Chol - CDMC12 (84 μg、0.22 μmol)溶液に添加されて、ボルテックスされた。リンゲル液 (10 mL)は、注入に先立って添加されて十分に混合された。 40

【0144】

複合体XIII：pDNA - NC₁₂ (pCILLuc、40 μg、40 μLの1 μg / μLのエタノール)がH₂O (2 mL)のChit - Chol - CDMC12 - CDM (84 μg、0.22 μmol)溶液に添加されて、ボルテックスされた。リンゲル液 (10 mL)は、注入に先立って添加されて十分に混合された。

【0145】

複合体XIV：pDNA - NC₁₂ (pCILLuc、40 μg、40 μLの1 μg / μLのエタノール)がH₂O (2 mL)のChit (84 μg、0.22 μmol)溶液に添加されて、ボルテックスされた。リンゲル液 (10 mL)は、注入に先立って添加され 50

て十分に混合された。

【0146】

複合体XV：pDNA（pCILuc、40 μ g）がH₂O（2mL）のChit（84 μ g、0.22 μ mol）溶液に添加されて、ボルテックスされた。リングル液（10mL）は、注入に先立って添加されて十分に混合された。

【0147】

体重10gにつき1.0mLの尾部の静脈注入（～2.5mL）は、30ゲージの0.5インチ注射針を使用してICRマウス（n=2）で行われた。注入は、4乃至5秒の注入時間で手動式に成された[Zhang et al. 1999; Liu et al. 1999]。注入の一日後、肝臓を取り出し、分解バッファー（0.1%のTriton X 100、0.1Mリン酸カリウム、1mM DTT、pH7.8）で均一化した。不溶解物質は遠心分離で取り除かれ、10 μ lの細胞の抽出物又は10倍に希釈された抽出物は、すでに報告したようにルシフェラーゼ活性において分析された[Wolff et al. 1990]。

【0148】

結果：2.5mLの注入

【0149】

【表3】

複合体I :	11,348,425	複合体IX :	206,866
複合体II :	10,106,551	複合体X :	48,860
複合体III :	17,994,604	複合体XI :	84,423
複合体IV :	13,645,295	複合体XII :	61,295
複合体V :	6,880,568	複合体XIII :	451,827
複合体VI :	87,746	複合体XIV :	268,552
複合体VII :	301,174	複合体XV :	984,729
複合体VIII :	98,434		

結果は、pDNA - NC₁₂でのpCILuc DNA発現の増大したレベル/pCILuc DNAにわたる修飾されたキトサン複合体/キトサン複合体を示す。さらに、結果は、pDNAがpDNA - NC₁₂/修飾されたキトサン複合体から放出され、転写のためにアクセス可能であることを示す。

【0150】

実施例21. 修飾されたキトサンポリマーを有するpDNA - NC12（pCILuc）のマウスの尾部の静脈注入。

【0151】

7つの複合体が下記のように調製された。

【0152】

複合体I：H₂O（750 μ L）内のpDNA（pCILuc、30 μ g）

複合体II：pDNA - NC₁₂（pCILuc、30 μ g、30 μ Lの1 μ g/ μ Lエタノール）がH₂O（750 μ L）に添加されて、ボルテックスされた。

【0153】

複合体III：pDNA - NC₁₂（pCILuc、30 μ g、30 μ Lの1 μ g/ μ Lエタノール）がH₂O（750 μ L）内のChit-O1（63 μ g、0.17 μ mol）溶液に添加されて、ボルテックスされた。

【0154】

複合体IV：pDNA-NC₁₂（pCILLuc、30μg、30μLの1μg/μLエタノール）がH₂O（750μL）内のChit-CDM12（63μg、0.17μmol）溶液に添加されて、ボルテックスされた。

【0155】

複合体V：pDNA-NC₁₂（pCILLuc、30μg、30μLの1μg/μLエタノール）がH₂O（750μL）内のChit-OL-LBA（63μg、0.17μmol）溶液に添加されて、ボルテックスされた。

【0156】

複合体VI：pDNA-NC₁₂（pCILLuc、30μg、30μLの1μg/μLエタノール）がH₂O（750μL）内のChit（63μg、0.17μmol）溶液に添加されて、ボルテックスされた。

10

【0157】

複合体VII：pDNA（pCILLuc、30μg）がH₂O（750μL）内のChit（63μg、0.17μmol）溶液に添加されて、ボルテックスされた。

【0158】

250μLの複合体の250μLの尾部静脈注入が、10秒以内の手による総溶液で30ゲージの0.5インチ針を使用してICRハツカネズミ（n=2）で実行された。注入の1日後に、動物は犠牲にされて、ルシフェラーゼ分析は肝臓、脾臓、肺、心臓及び腎臓上で導かれた。ルシフェラーゼの発現は、既に報告したように決定された（Wolf et al., 1990.）。ALumat LB 9507（EG&G Bert hold, Bad-Wildbad, Germany）ルミノメーターが使用された。

20

【0159】

結果：250μL注入

【0160】

【表4】

複合体I :	266	複合体V :	1,094
複合体II :	75	複合体VI :	154
複合体III :	5,439	複合体VII :	207
複合体IV :	194		

30

結果は、pCILLucDNA/キトサン複合体にわたってpDNA-NC₁₂/修飾されたキトサン複合体でのpCILLucDNA発現の増大したレベルを示す。それらの結果はまた、pDNAがpDNA-NC₁₂/修飾されたキトサン複合体から放出され、転写のためにアクセス可能である。

【0161】

40

実施例22. 修飾されたキトサンポリマーを有するCy3-pDNA-NC₁₂（pCILLuc）のマウスの尾部の静脈注入。

【0162】

3つの複合体が下記のように調製された。

【0163】

複合体I：Cy3-pDNA-NC₁₂（pCILLuc、40μg、40μLの1μg/μLエタノール）がH₂O（500μL）に添加されて、ボルテックスされた。

【0164】

複合体II：Cy3-pDNA-NC₁₂（pCILLuc、40μg、40μLの1μg/μLエタノール）がH₂O（500μL）内のChit-OL（84μg、0.22

50

μmol) 溶液に添加されて、ボルテックスされた。

【0165】

複合体 III : Cy3 - pDNA - NC₁₂ (pCILLuc、40 μg 、40 μL の 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ エタノール) が H₂O (500 μL) 内の Chit-O1-LBA (84 μg 、0.22 μmol) 溶液に添加されて、ボルテックスされた。

【0166】

250 μL の複合体の 250 μL の尾部静脈注入が、10 秒以内の手による総溶液で 30 ゲージの 0.5 インチ針を使用して ICR ハツカネズミ ($n = 2$) で実行された。注入の 1 日後に、動物は犠牲にされて、ルシフェラーゼ分析は肝臓、脾臓、肺、心臓及び腎臓上で導かれた。ルシフェラーゼの発現は、既に報告したように決定された (Wolff et al., 1990.)。ALumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad-Wilbad, Germany) ルミノメーターが使用された。

10

【0167】

実施例 23 . pCILLucDNA - NC₁₂ を有しない複合体の粒子サイズ

H₂O (500 μL) の溶液に、修飾されたポリマー (容量は下記に示す) が添加されて攪拌された。複合体のサイズは、Zeta Plus Particle Sizer (Brookhaven Instrument Corporation) で測定された。

【0168】

20

【表 5】

ポリマー	量 (μg)	サイズ (nm)	カウント (kcps)
Chit-CDM12	10.5	160	312
Chit-CDM12-CDM	10.5	137	538
Chit-O1	10.5	offscale	41
Chit-O1-SA	10.5	141	143
Chit-O1-CDM	10.5	offscale	109
Chit-LBA-CDM12	10.0	2865	417
MC791-CDM12	10.0	359	42
MC791-CDM12-CDM	10.0	231	58
MC787-CDM12	10.0	87	221
MC787-CDM12-CDM	10.0	13686	55

30

40

粒子サイズのデータは、粒子が、重合体のミセルとして、この濃度の数多のポリマーの式で存在することを示す。

【0169】

実施例 24 . pCILLucDNA - NC₁₂ を有する複合体の粒子サイズ

H₂O (500 μL) の溶液に、修飾されたポリマー (容量は下記に示す) が添加されて攪拌された。DNA - NC₁₂ (5 μg 、5 μL の 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ エタノール、0.015 μmol リン酸塩) が溶液に添加されて攪拌され、複合体のサイズは、Zeta Plus Particle Sizer (Brookhaven Instrument Corporation) で測定された。

【0170】

50

【表 6】

ポリマー	量 (μg)	サイズ (nm)	カウント (kcps)
Chit-CDM12	10.5	182	325
Chit-CDM12-CDM	10.5	160	210
Chit-OI	10.5	252	147
Chit-OI-SA	10.5	152	264
Chit-OI-CDM	10.5	875	12
Chit-LBA-CDM12	10.0	258	393
MC791-CDM12	10.0	183	344
MC791-CDM12-CDM	10.0	170	248
MC787-CDM12	10.0	293	2400
MC787-CDM12-CDM	10.0	160	556

10

粒子サイズのデータは、粒子が、ポリマーと修飾 DNA の両者が存在する場合に存在することを示す。

20

【0171】

実施例 25 : 3 - ジメチルアミノプロピル - 1 - ジメチルオクタデシルシリルエーテルの合成

2 mL クロロホルムの 3 - ジメチルアミノ - 1 - プロパノール (90.0 mg、0.873 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) 溶液に、ジメチルオクタデシルクロロシラン (378 mg、1.09 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) 及びイミダゾール (74.2 mg、1.09 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加された。周辺温度で 16 時間後、溶液は、10% の重炭酸ナトリウムで EtOAc / H₂O に分割された。有機層は水と塩水で洗浄された。クリーム色の固体として 328 mg (91%) の 3 - ジメチルアミノプロピル - 1 - ジメチルオクタデシルシリルエーテルを与えるために溶液が除去 (アスピレータ) された。

30

【0172】

実施例 26 : 3 - (ジメチルアミノプロピル) - 1, 2 - ジメチルオクタデシルシリルエーテルの合成

2 mL クロロホルムの 3 - (ジメチルアミノ) - 1, 2 - プロペンジオール (50.0 mg、0.419 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) 溶液に、ジメチルオクタデシルクロロシラン (328 mg、0.944 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) 及びイミダゾール (68.1 mg、0.944 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加された。周辺温度で 16 時間後、溶液は、10% の重炭酸ナトリウムで EtOAc / H₂O に分割された。有機層は水と塩水で洗浄された。白色固体として 266 mg (86%) の 3 - (ジメチルアミノプロピル) - 1, 2 - ジメチルオクタデシルシリルエーテルを与えるために溶液が除去 (アスピレータ) された。

40

【0173】

実施例 27 : 1 - (3 - ラウロイルアミノプロピル)、4 - (3 - オレオイルアミノプロピル) ピペラジン (MC763)、1, 4 - ビス (3 - ラウロイルアミノプロピル) ピペラジン (MC762)、及び 1, 4 - ビス (3 - オレオイルアミノプロピル) ピペラジン (MC798) の合成

25 mL のフレイムドライのフラスコに、塩化オレオイル (新鮮な蒸留、1.0 mL、3.0 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) と窒素下の 15 mL のジクロロメタン内の塩化ラウロイル (0.70 mL、3.0 mmol、アルドリッチケミカルカンパニ

50

ー)が添加された。生じた溶液は、アイスバスで0℃まで冷却された。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(1.1 ml、6.1 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)が、1,4-ビス(3-アミノプロピル)ピペラジン(0.50 ml、2.4 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)に続いて添加された。アイスバスが除去され、溶液は周辺温度で15時間攪拌された。溶液は、1Nの水酸化ナトリウム(10 ml)で2回洗浄されて、水(10 ml)で2回洗浄されて、減圧下で濃縮された。

【0174】

生じた残存物のほぼ30%は、アセトニトリル/H₂O/トリフルオロ酢酸の溶離液でBeta Basic Cyanoカラム(150、250 x 21 mm、Key Stone Scientific, Inc.)の半調製型HPLCによって精製された。3つの化合物は、カラムから分離されて、質量分光法(Sciex API 150 EX)によって照明された。

10

【0175】

MC763 1-(3-ラウロイルアミノプロピル)、4-(3-オレオイルアミノプロピル)ピペラジン(MW = 647)

MC762 1,4-ビス(3-ラウロイルアミノプロピル)ピペラジン(MW = 564)

MC798 1,4-ビス(3-オレオイルアミノプロピル)ピペラジン(MW = 729.25)

実施例28: 1-(3-ミリストイル(myristoyl)アミノプロピル)、4-(3-オレオイルアミノプロピル)ピペラジン(MC765)、1,4-ビス(3-ミリストイルアミノプロピル)ピペラジン(MC764)、及び1,4-ビス(3-オレオイルアミノプロピル)ピペラジン(MC798)

20

25 mLのフレイムドライのフラスコに、塩化オレオイル(新鮮な蒸留、1.0 ml、3.0 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)と窒素下の15 mLのジクロロメタン内の塩化ミリストイル(0.83 ml、3.0 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)が添加された。生じた溶液はアイスバスで0℃まで冷却された。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(1.1 ml、6.1 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)が、1,4-ビス(3-アミノプロピル)ピペラジン(0.50 ml、2.4 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)に続いて添加された。アイスバスが除去され、溶液は周辺温度で15時間攪拌された。溶液は、1Nの水酸化ナトリウム(10 ml)で2回洗浄されて、水(10 ml)で2回洗浄されて、減圧下で濃縮された。

30

【0176】

生じた残存物のほぼ30%は、アセトニトリル/H₂O/トリフルオロ酢酸の溶離液でBeta Basic Cyanoカラムの半調製型HPLCによって精製された。3つの化合物は、カラムから分離されて、質量分光法によって照明された。

【0177】

MC765 1-(3-ミリストイルアミノプロピル)、4-(3-オレオイルアミノプロピル)ピペラジン(MW = 647)

MC764 1,4-ビス(3-ミリストイルアミノプロピル)ピペラジン(MW = 620)

40

MC798 1,4-ビス(3-オレオイルアミノプロピル)ピペラジン(MW = 729.25)

実施例29: 1,4-ビス(3-デカノイルアミノプロピル)ピペラジンMC774の合成

0℃まで冷却されたジクロロメタン(1 ml)の1,4-ビス(3-アミノプロピル)ピペラジン(10 µl、0.049 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)溶液に塩化デカノイル(25 µl、0.12 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)とN,N-ジイソプロピルエチルアミン(21 µl、0.12 mmol)が添加された。30分後、溶液は周辺温度まで暖められた。12時間後、溶液は水(2 x 2 ml)で洗浄され

50

、TLCによって十分な精製度の1,4-ビス(3-デカノイルアミノプロピル)ピペラジン(MC774)(21.6mg、87%)を与えるために減圧下で濃縮された。

【0178】

実施例30:1,4-ビス(3-パルミトイルアミノプロピル)ピペラジン(MC775)の合成

ジクロロメタン(1ml)の1,4-ビス(3-アミノプロピル)ピペラジン(10 μ l、0.049mmol)の溶液にパルミトレイン酸(30.8mg、0.12mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)と、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(21 μ l、0.12mmol)と、ジシクロヘキシルカルボジイミド(25mg、0.12mmol)が添加された。12時間後、溶液は濾過され、水で洗浄(2 \times 2ml)されて、TLCによって十分な精製度の1,4-ビス(3-パルミトイルアミノプロピル)ピペラジン(MC775)(26.5mg、81%)を与えるために減圧下で濃縮された。

10

【0179】

実施例31:1,4-ビス(3-チオシトイル(thioctoyl)アミノプロピル)ピペラジン(MC777)、1-(3-リノレノイルアミノプロピル)、4-(3-チオシトイルアミノプロピル)ピペラジン(MC778)、1,4-ビス(3-リノレノイルアミノプロピル)ピペラジン(MC779)の合成

ジクロロメタン(8ml)のベンゾトリアゾール-1-イル-オキソ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフロロリン酸塩(PyBOP、1.300g、2.500mmol、NovaBiochem)に、チオクト酸(0.248g、1.20mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)及びリノール酸(365 μ l、1.20mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)を添加した。生じた溶液に、N,N-ジイソプロピルエチレンアミン(610 μ l、3.5mmol)に続いて、1,4-ビス(3-アミノプロピル)-ピペラジン(206 μ l、1.00mmol)が添加された。周辺温度で16時間後、溶液は水(2 \times 20ml)で洗浄され、1.800gの粗物質を与えるために減圧下で濃縮された。85mgの粗物質は、2mlのアセトニトリル(0.1%トリフロロ酢酸)/1mlの水(0.1%トリフロロ酢酸)で溶解され、31.8mgのMC777、1.3mgのMC778、及び1.5mgのMC779を与えるためにBeta Basic Cyanoカラムの逆相HPLC(40分間にわたる10-90%B)によって精製された。

20

30

【0180】

実施例32:1,4-ビス(3-(トランス)-レチノイル(retinoyl)アミノプロピル)ピペラジン(MC780)、1-(3-(シス-11)-エイコセノイル(eicosenoyl)アミノプロピル)、4-(3-(トランス)-レチノイルアミノプロピル)ピペラジン(MC781)、1,4-ビス(3-(シス-11)-エイコセノイルアミノプロピル)ピペラジン(MC782)の合成

化合物MC780、MC781、及びMC782は、化合物MC777、MC778、及びMC779と同様の合成を使用して成された。合成からの粗物質は、2mlのアセトニトリル(0.1%トリフロロ酢酸)/1mlの水(0.1%トリフロロ酢酸)で溶解され、7.1mgのMC780、13.0mgのMC781、及び18.0mgのMC782を与えるためにBeta Basic Cyanoカラムの逆相HPLC(40分間にわたる10-90%B)によって精製された。

40

【0181】

実施例33:ビス(2-アミノエチル)-(2-オレオイルアミノエチル)アミン(MC753)、2-アミノエチル-ビス-(2-オレオイルアミノエチル)アミン(MC754)、及びトリス-(2-オレオイルアミノエチル)アミン(MC755)の合成

ジクロロメタン(3mL、0.5M)でトリス(2-アミノエチル)アミン(0.2mL、1.4mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)が溶解され、ドライアイス/アセトン槽で冷却された。生じた溶液に、窒素のブランケットの下で、塩化オレオイル(0.18mL、0.45mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)が滴下で添加された

50

。反応は、攪拌して室温になるまで温められた。反応は室温で1時間攪拌されて、反応が完全に停止したことを照明するために、TLC及び質量分析法(Sciex API 150EX)によって分析された。ページュのフィルム(330mg)を与えるために、反応は減圧下で濃縮された。物質の一部は、20分間にわたる40-90%Bのジフェニルカラム(Vydac)の逆相HPLCによって精製された(A=0.1%TFA/水、B=0.1%TFA/アセトニトリル)。4回のHPLCが行われた。分画は、210nmで収集され、質量分析法(Sciex API 150EX)によって分析された。MC753(5, 6, 15-17, 25-31, 42-44)、MC754(7, 18, 19, 32, 33, 45, 46)及びMC755(8-10, 20-3, 34-7, 47-50)における分画は共にプールされ、減圧下で濃縮されて、凍結されて、さらに凍結乾燥された。MC753(26mg)、MC754(8.6mg)及びMC755(150mg)を産出した。

10

【0182】

実施例34：S-オレオイル-N-アセチル-L-システイン-3-(ジメチルアミノプロピルアミン)-アミド(MC909)の合成

ジ-(ジメチルアミノ)プロピルアミノ-シスチンの調製。フレイム乾燥させた丸底フラスコ(25mL)にN,N-ジ-Boc-L-シスチン(500mg、1.1mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)が添加され、攪拌してTHF(6mL、0.2M)で溶解された。生じた溶液に、N-ヒドロキシスクシンイミド(260mg、2.3mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)及びジシクロヘキシルカルボジイミド(520mg、2.5mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)が添加された。2分後、3-(ジメチルアミノ)プロピルアミン(0.28mL、230mg、1.1mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)が反応混合液に添加された。反応は30分間室温で攪拌されて、反応が完全に停止したことを照明するために、TLC及び質量分析法(Sciex API 150EX)によって分析された。反応はDCUを除去するために濾過されて、減圧下で濃縮された。生じた残存物は、冷エーテル(10mL)で沈殿させて、エーテル(2x10mL)で洗浄された。沈殿は窒素下で乾燥されて、次いで、白い粉末としてジ-(ジメチルアミノ)プロピルアミノ-ジ-Boc-シスチン(670mg、97%)を与えるために高い真空に位置した。

20

【0183】

ジ-(ジメチルアミノ)プロピルアミノ-ジ-Boc-L-シスチン(670mg、1.1mmol)は窒素で覆われたTIPS/水/TFA(0.5/4.5/95%容量、5mL、0.2M)で得られ、室温で1時間攪拌された。物質のデプロテクションは、TLC及び質量分析法(Sciex API 150EX)によって証明された。白い粉末(670mg、100%)としてジ-(ジメチルアミノ)プロピルアミノ-シスチンを与えるために、物質は、冷エーテル(10mL)で沈殿させて、エーテル(2x10mL)で洗浄されて、窒素下で乾燥されて、真空下に置かれた。

30

【0184】

1-メチル-2-ピロリジノン(8mL、0.2M、VWR)のジ-(ジメチルアミノ)プロピルアミノ-シスチン(670mg、1.6mmol)の溶液に、ジソプロピルエチルアミン(0.58mL、430mg、3.3mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)を攪拌して添加された。反応はアイスバス(0)で冷却されて、無水酢酸(1.5mL、1.7g、16mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)はゆっくりと添加された。反応混合物は、周辺温度にまるまで自然に温められ、1時間攪拌を続けた。アミンのキャッピングは、TLC及び質量分析法(Sciex API 150EX)によって証明された。反応溶液は冷エーテル(25mL)に滴下して添加され、白い沈殿を形成した。沈殿はエーテル(2x25mL)で洗浄され、窒素下で乾燥され、次いで、真空下に置かれた。暗い黄色の油(200mg、25%)を産出した。

40

【0185】

黄色の油(83mg、0.17mmol)は、攪拌しながらTHF(2mL、0.2M

50

)で溶解された。ジチオールトレイトール(35 mg、0.23 mmol、0.1 M、シグマケミカルカンパニー)が攪拌されて添加された。反応は室温で16時間攪拌された。ジスルフィド切断が完全に行われたことを証明するために、物質はTLC及び質量分析法(Sciex API 150EX)によって分析された。物質の一部(54 mg)は、Aquasil C18カラム(Keystone Scientific Inc.)、10-40%B、0-10分間、4-60%B 10-20分間、60-90%B、20-30分間(A=水中の0.1% TFA、B=アセトニトリル中の0.1% TFA)の逆相HPLCによって精製された。分画は210 nmで収集されて、質量分析法(Sciex API 150EX)によって分析された。2回のHPLCからの所望の産物を含む分画(3、4、30、31)は、共にプールされ、減圧下で濃縮され、凍結され、凍結乾燥された。透明な油として32 mg(60%)が与えられた。オイル(32 mg、0.13 mmol)が攪拌してTHF(1 mL、0.13 M)で溶解された。生じた溶液にジイソプロピルエチルアミン(0.02 mL、17 mg、0.13 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)が添加された。反応溶液はアイスバス(0)で冷却され、塩化オレオイル(39 mg、0.13 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)はシリンジによって攪拌しながら滴下して添加された。反応は、自然と周辺温度になるまで温められた。反応は、反応が完全に停止したことを証明するためにTLC及び質量分析法(Sciex API 150EX)によって分析された。反応溶液は冷エーテル(5 mL)で沈殿され、エーテル(2 x 5 mL)で洗浄され、窒素下で乾燥され、高い真空に置かれた。TLC及び質量分析法(Sciex API 150EX)は十分な精製度を示した。黄色の油(45.3 mg、68%)としてS-オレオイル-N-アセチル-L-システイン-3-(ジメチルアミノプロピルアミン)-アミド(MC909)が産出された。

10

20

30

40

50

【0186】

実施例35：S-オレオイル、N-アセチル、3-(ジメチルアミノプロピルアミン)-L-システインアミド(MC909)塩酸塩の調製

MC909(9 mg、0.018 mmol)がエタノール(0.09 mL)で溶解され、冷塩酸/エーテル(1 Nの1 mL、アルドリッチケミカルカンパニー)に滴下して添加された。沈殿は、遠心分離によってスピンドウンされ、エーテル(2 x 1 mL)で洗浄され、窒素下で乾燥され、高い真空に配置された。白い結晶物質(6 mg、62%)が産出された。

【0187】

実施例36：-D-グルコピラノシルデカンジスルフィド及びO-グリシン-D-グルコピラノシルデカンジスルフィド(MC749)の合成

クロロホルム(11 mL)のデカンチオール(0.59 mL、2.9 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)の溶液に、塩化スルフルル(0.46 mL、5.7 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)が添加され、生じた混合物は室温で18時間攪拌された。溶媒を除去し(アスピレータ)、塩化デカンスルフェニルが与えられた。

【0188】

4 mLのアセトニトリルの塩化デカンスルフェニル(190 mg、0.92 mmol)の溶液に、1-チオ-D-グルコースナトリウム塩の水和物(200 mg、0.92 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)及び15-クラウン-5(0.18 mL、0.899 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)が添加された。生じた混合物は、周辺温度で16時間攪拌され、濾過され、さらにエタノールで沈殿された。残存物は、エタノールでトリチュレートされ(triturated)、逆相HPLC(Aquasil C18カラム(Keystone Scientific Inc.)、10-90%B、20分間(A=水中の0.1% TFA、B=アセトニトリル中の0.1% TFA)で精製された。凍結乾燥し、細かい白い固体として、10 mg(3%)の-D-グルコピラノシルデカンジスルフィドが与えられた。

【0189】

80 µL THFの-D-グルコピラノシルデカンジスルフィド(8 mg、0.02 m

mol)の溶液に、N-Bocグリシン(15mg、0.09mmol、シグマケミカルカンパニー)、DCC(18mg、0.09mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)、ジメチルアミノピリジン(アルドリッチケミカルカンパニー)の触媒量が添加された。生じた溶液は、周辺温度で12時間攪拌されて、固体を除去するように遠心分離された。生じた溶液は、減圧下で濃縮され、ジクロロメタンで再懸濁され、シリカゲルのプラグを介して濾過され、濃縮された(アスピレータ)。Boc保護基は、200 μ Lの2.5%TIPS/50%TFA/ジクロロメタンで残存物を12時間処理することによって除去された。溶媒の除去(アスピレータ)に続いて、逆相HPLC(Aquasil C18カラム(KeyStone Scientific Inc.))、10-90%B、20分間(A=水中の0.1%TFA、B=アセトニトリル中の0.1%TFA)によって精製して、凍結乾燥後に細かい白い固体として0.7mg(5%)のO-グリシン-D-グルコピラノシルデカンジスルフィド(MC749)が与えられた。

【0190】

実施例37: -D-グルコピラノシルコレステロールジスルフィドの合成

実施例36に記載したような同様の方法論によって、-D-グルコピラノシルコレステロールジスルフィドが分離された(収率12%)。

【0191】

実施例38: 2つのテーリングされた-D-グルコピラノシルジスルフィド派生物の合成。-D-グルコピラノシルN-ドデカノイル-システイン-ドデカノアートジスルフィド及びO-グリシン-D-グルコピラノシルN-ドデカノイル-システイン-ドデカノアートジスルフィド

ジクロロメタン(4mL)のN-Fmoc-S-Trt-システイン(585mg、1.0mmol、ノババイオケム)の溶液に、1-ドデカノール(240mg、1.3mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)、DCC(260mg、1.3mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)、及びジメチルアミノピリジン(アルドリッチケミカルカンパニー)の触媒量が添加された。生じた溶液は、周辺温度で30分間攪拌され、濾過され、シリカゲルのフラッシュクロマトグラフィー(10-20%の酢酸エタノール/ヘキサンの溶離剤)によって精製された。溶媒を除去(アスピレータ)し、572mg(76%)の保護されたシステイン-ドデカノアートが与えられた。

【0192】

保護されたシステイン-ドデカノアート(572mg、0.76mmol)の溶液に、3mLのDMF中の20%ピペリジンが添加された。生じた溶液は周辺温度で1時間攪拌されて、酢酸エタノール/水に分割された。水層は2回の酢酸エタノールで抽出された。有機層の組み合わせは、2回の1N塩酸、乾燥した(硫酸ナトリウム)で洗浄され、S-Trt-システイン-ドデカノアートが与えられるように濃縮された。残存物はジクロロメタン(2mL)で懸濁され、-20 $^{\circ}$ Cまで冷却された。ジイソプロピルエチルアミン(0.16mL、0.92mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)は、塩化ドデカノール(0.26mL、1.1mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)に続いて添加され、溶液は周辺温度までゆっくりと温められた。1時間後、溶媒は除去され(アスピレータ)、残存物は酢酸エタノール/水に分割される。有機層は、2回の1N塩酸、1回の塩水、乾燥した(硫酸ナトリウム)で洗浄されて、溶媒は除去される(アスピレータ)。生じた残存物は、トリチル保護基を除去するために2%TIPS/50%TFA/ジクロロメタンで懸濁される。4時間後、溶液は濃縮され、生じた残存物は、180mg(42%)のN-ドデカノイル-システイン-ドデカノアート(M+1=472.2)が与えられるようにシリカゲル(10-20%酢酸エタノール/ヘキサンの溶離剤)のフラッシュカラムクロマトグラフィーによって精製された。

【0193】

0.5mLクロロホルムのN-ドデカノイル-システイン-ドデカノアート(180mg、0.38mmol)の溶液に塩化スルフルル(62 μ L、0.76mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)が添加された。生じた溶液は、周辺温度で2時間攪拌され、

溶媒が除去された（アスピレータ）。生じた残存物は 1 mL のアセトニトリルで懸濁され、1 - チオ - β - D - グルコースナトリウム塩の水和物（85 mg、0.39 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー）及び 15 - クラウン - 5（76 μ g、0.38 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー）が添加された。1 時間後、周辺温度で溶媒が除去され（アスピレータ）、残存物が酢酸エタノール/水に分割された。有機層は濃縮され、生じた残存物は、19 mg（8%）の β - D - グルコピラノシル N - ドデカノイル - システイン - ドデカノアートジスルフィドが与えられるようにシリカゲル（10 - 20% メタノール/0.1% TFA /ジクロロメタンの溶離剤）のフラッシュカラムクロマトグラフィーによって精製された。

【0194】

100 μ L のジクロロメタンの β - D - グルコピラノシル N - ドデカノイル - システイン - ドデカノアートジスルフィド（3.9 mg、0.0045 mmol）の溶液に、N - Boc グリシン（3.2 mg、0.018 mmol、シグマケミカルカンパニー）、DC C（3.8 mg、0.018 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー）、及びジメチルアミノピリジンの触媒量（アルドリッチケミカルカンパニー）が添加される。生じた溶液は、周辺温度で 4 時間攪拌されて、濾過された。Boc 保護基は、2 mL の 1% TIPS / 50% TFA /ジクロロメタンで残存物を 2 時間処理することによって除去された。溶媒を除去し（アスピレータ）、続いて逆相 HPLC（ジフェニルカラム（Vydaq）、20 - 90% B、20 - 90% B、20 分間（A = 水中の 0.1% TFA、B = アセトニトリル中の 0.1% TFA））による精製によって、凍結乾燥に続いて細かい白い固体としての 3.6 mg（90%）の O - グリシン - β - D - グルコピラノシルデカンジスルフィドが与えられた。

【0195】

実施例 39 . ペプチドの一般的な調製

ペプチドは、FastMoc 化学を採用する ABI 433A Peptide Synthesizer（アブライドバイオシステムズ）を使用して、標準の固相ペプチド合成によって調製された。ペプチドは、0.1 又は 1.0 mmol スケールで合成された。樹脂の脱保護及び切断は、標準的な脱保護技術を活用して達成された。ペプチドは、少なくとも 90% の純度レベルまで逆相 HPLC によって精製されて、質量分析法（Sciex API 150EX）によって証明された。

【0196】

実施例 40 . $H_2N - CRRRRRRRRR - OH$ （SEQ ID 11）及び N - ドデカノイル - システイン - ドデカノアート（MC756）の混合されたジスルフィドの合成

ペプチド $H_2N - CRRRRRRRRR - OH$ （LH168-100）（5.0 mg、0.0033 mmol）は、イソプロピルアルコール（0.5 mL）及びトリフルオロ酢酸（0.5 mL）と溶解された。生じた溶液に、アルドリチオール（0.79 mg、0.0036 mmol）の 10 mg/mL イソプロピルアルコール、アルドリッチケミカルカンパニー）が添加された。反応は室温で 2 時間攪拌され、形成された産物は、質量分析法（Sciex API 150EX）によって証明された。物質は冷エーテル（2 mL）で沈殿され、エーテル（2 x 2 mL）で洗浄され、窒素下で乾燥された。乾燥された沈殿は、イソプロピルアルコール（0.25 mL）及びトリフルオロ酢酸（0.25 mL）と溶解された。生じた溶液に、N - ドデカノイル - システイン - ドデカノアート（0.15 mL、1.5 mg の 10 mg/mL のエーテル、0.0033 mmol）が添加された。反応は室温で 2 時間攪拌されて、形成された産物は、質量分析法（Sciex API 150EX）によって証明された。物質は冷ジエチルエーテル（4 mL）で沈殿され、ジエチルエーテル（2 x 4 mL）で洗浄された。沈殿は、20 分間にわたって、逆相 HPLC（Aquasil C18 カラム（Keystone Scientific Inc）、5 - 90% B（A = 0.1% TFA / H_2O 、B = 0.1% TFA / アセトニトリル））によって精製された。分画は 210 nm で収集され、質量分析法（Sciex API

10

20

30

40

50

150EX)によって分析された。分画(9及び18)は、2つのHPLCのランから共にプールされ、濃縮、凍結され、白いふかふかした結晶物質としてMC756(0.5mg)を与えるために、凍結乾燥された。

【0197】

実施例41：1-デカンチオクロリドの調製

1-デカンチオール(0.59mL、500mg、2.9mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)は、フレイム乾燥の丸底フラスコに移され、クロロホルム(11mL、0.25M)と溶解された。生じた溶液に、塩化スルフルル(0.46mL、770mg、アルドリッチケミカルカンパニー)を5分間にわたって攪拌しながら滴下して添加された。反応は、窒素下で16時間にわたって室温で攪拌された。反応混合物は、反応が停止したことを証明するためにTLCによって分析された。反応は、窒素下で濃縮されて、真空速度で置かれた。物質は使用されるまで-20℃に保存された。

10

【0198】

実施例42：3-メルカプトプロピオン酸のトリチル保護

3-メルカプトプロピオン酸(0.41mL、500mg、4.7mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)は、フレイム乾燥の丸底フラスコに移され、ジクロロメタン(18mL、0.26M)と共にされた。生じた溶液に、ジイソプロピルエチルアミン(0.82mL、610mg、4.7mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)が添加され、追加の塩化トリチル(1.4g、4.9mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)が添加された。溶液は、窒素下で16時間にわたって室温で攪拌された。反応混合物は、反応が停止したことを証明するためにTLC及び質量分析法(Sciex API 150EX)によって分析された。反応混合物は減圧下で濃縮され、白い結晶物質を産出した。白い結晶物質は、酢酸エタノール(50mL)でスラリー状にされ、水に(50mL)に分割された。反応は0.1MのNaHCO₃で中性にされた。有機層は、水(2x50mL)及び塩水(50mL)で洗浄された。有機層は移されて、減圧下で濃縮された。結晶は、白い結晶の物質としてトリチルメルカプトプロピオン酸(1.7g)を与えるために高い真空で乾燥された。産物は、質量分析法(Sciex API 150EX)によって証明された。

20

【0199】

実施例43：トリチルメルカプトプロピオン酸で3-(ジメチルアミノ)プロピルアミンのアシル化。3-チオール-プロピオン酸(3-(ジメチルアミノ)プロピルアミン)アミドの合成

30

トリチルメルカプトプロピオン酸(300mg、0.86mmol)は、ジクロロメタン(3.5mL、0.25M)と溶解された。生じた溶液に、PyBOP(450mg、0.86mmol、ノババイオケム)が添加され、室温で5分間攪拌された。3-(ジメチルアミノ)プロピルアミン(0.11mL、0.86mmol、アルドリッチケミカルカンパニー)が攪拌されて添加された。反応混合物は、窒素下の室温で16時間攪拌された。反応混合物は、反応が停止したことを証明するためにTLC及び質量分析法(Sciex API 150EX)によって分析された。反応混合物は、減圧下で濃縮され、酢酸エタノール(4mL)と溶解され、水(4mL)で分割され、水(2x4mL)及び塩水(4mL)で洗浄された。物質はNa₂SO₄で乾燥され、濾過され、減圧下で濃縮された。濃縮された物質は、TIPS/TFA/CH₂Cl₂(2.5/47.5/50%容量、3mL)に溶解され、室温で1時間攪拌された。反応はTLCによってモニターされ、1時間後、脱保護は終了しなかった。TFA(1.5mL)が溶液に加えられ、10分後、溶液は黄色から透明に変わった。脱保護された産物は、TLCによって証明された。反応は減圧下で濃縮され、結晶のスラリーとして3-チオール-プロピオン酸(3-(ジメチルアミノ)プロピルアミン)アミドを産出した。

40

【0200】

実施例44：3-チオールプロピオン酸(3-(ジメチルアミノ)プロピルアミン)アミドとデカンチオール(MC744)の混合されたジスルフィドの合成

50

3 - チオール - プロピオン酸 (3 - (ジメチルアミノ)プロピルアミン)アミド (8 2 mg、0.43 mmol) はジクロロメタン (1.8 mL、0.25 M) に溶解された。生じた溶液に、攪拌しながら 1 - デカンチオクロリド (90 mg、0.43 mmol) が添加された。反応は、窒素下の室温で攪拌され、即座にオレンジ色に変化した。20分後、反応混合物は、反応が停止したことを証明するために TLC 及び質量分析法 (Sciex API 150 EX) によって分析された。物質は、-20 で16時間保存された。形成された結晶 (PyBop 尿素) は、濾過され、ジクロロメタンで洗浄された。生じた溶液は、減圧下で濃縮され、ジクロロメタン (1 mL) に溶解され、フラッシュクロマトグラフィー (10%メタノール / CH₂Cl₂ 溶離剤) によって精製され、分画が収集された。分画は、TLC 及び質量分析法 (Sciex API 150 EX) によって分析された。所望の産物が最終的分画にあり、MC744 (17 mg) が産出した。

10

【0201】

実施例 45 : 1 - ドデカンチオクロリドの調製

1 - ドデカンチオール (0.59 mL、500 mg、2.5 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) がフレイム乾燥した丸底フラスコに移され、クロロホルム (10 mL、0.25 M) で溶解された。生じた溶液に、塩化スルフリル (0.40 mL、670 mg、4.9 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) を攪拌しながら5分間にわたって滴下して添加した。反応は窒素下の室温で3時間攪拌された。反応混合物は、反応が停止したことを証明するために TLC によって分析された。反応は窒素下の真空速度で濃縮された。物質は使用するまで -20 で保存された。

20

【0202】

実施例 46 : トリチル - メルカプトプロピオン酸で 3 - (ジメチルアミノ)プロピルアミンのアシル化。3 - チオール - プロピオン酸 (3 - (ジメチルアミノ)プロピルアミン)アミドの合成

トリチルメルカプトプロピオン酸 (500 mg、1.4 mmol) は、ジクロロメタン (6 mL、0.25 M) に溶解された。生じた溶液に、PyBOP (750 mg、1.4 mmol、ノババイオケム) が添加されて、室温で5分間攪拌された。3 - (ジメチルアミノ)プロピルアミン (0.18 mL、1.4 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) は攪拌しながら添加された。反応混合物は、窒素下の室温で16時間攪拌された。反応混合物は、反応が停止したことを証明するために TLC 及び質量分析法 (Sciex API 150 EX) によって分析された。反応混合物は減圧下で濃縮され、酢酸エタノール (20 mL) に溶解され、水 (20 mL) に分割され、水 (2 x 20 mL) 及び塩水 (20 mL) で洗浄された。物質は Na₂SO₄ で乾燥され、濾過され、減圧下で濃縮された。濃縮された物質は、ジクロロメタン (10 mL) で溶解され、白い沈殿を形成した。物質は遠心分離によってスピンドウンされ、沈殿はジクロロメタン (10 mL) で洗浄された。沈殿された物質は、TIPS / TFA / CH₂Cl₂ (2.5 / 50 / 47% 容量、6 mL) に溶解され、室温で1.5時間攪拌された。直ちに、混合物は、透明から明るい黄色 (トリチル陽イオンの放出) に変化し、透明に戻った。物質の脱保護は、TLC 及び質量分析法 (Sciex API 150 EX) によって証明された。反応混合物は、減圧下で濃縮され、白い結晶の固体 (245 mg、収率 91%) として、3 - チオール - プロピオン酸 (3 - (ジメチルアミノ)プロピルアミン)アミドを産出した。

30

40

【0203】

実施例 47 : 3 - チオール - プロピオン酸 (3 - (ジメチルアミノ)プロピルアミン)アミド及びドデカンチオール (MC745) の混合したジスルフィドの合成

3 - チオール - プロピオン酸 (3 - (ジメチルアミノ)プロピルアミン)アミド (100 mg、0.52 mmol) がジクロロメタン (2 mL、0.25 M) に溶解された。生じた溶液に、攪拌しながら 1 - ドデカンチオクロリド (120 mg、0.52 mmol) が添加された。反応は、窒素下の室温で攪拌されて、瞬時にオレンジ色に変化した。1時間後、反応混合物は、反応が停止したことを証明するために TLC 及び質量分析法 (Sciex API 150 EX) によって分析された。生じた溶液は減圧下で濃縮されて、

50

黄色いオイル (300 mg) を産出した。オイル (160 mg) は、ジクロロメタン (0.5 mL) で溶解され、フラッシュクロマトグラフィー (10% メタノール / CH₂Cl₂、0.1% TFA) によって精製されて、分画が収集された。メタノールの百分率はゆっくりと20%まで上昇し、分画が収集された。分画は、TLC及び質量分析法 (Sciex API 150EX) によって分析された。所望の産物は最終分画にある。最終分画は減圧下で濃縮されて、黄色いオイルとしてMC745 (22.4 mg、収率22%) を産出した。

【0204】

実施例48：BOCで1,12-ジアミノドデカンの単保護

1,12-ジアミノドデカン (1.0 g、10 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) は、ジクロロメタン (25 mL) 及び水 (25 mL) で溶解された。水酸化ナトリウム (2ペレット、Fisher Scientific) が添加され、反応は活発に攪拌された。ジ-tert-ブチルジカルボナート (500 mg、2.3 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) は、ジクロロメタン (10 mL) で溶解され、5分間にわたって攪拌している反応液に滴下して添加された。1時間後、反応は、反応が停止したことを証明するためにTLC及び質量分析法 (Sciex API 150EX) によって分析された。反応液は、分液漏斗に移されて、層は分離された。有機層は減圧下で濃縮された。濃縮された物質の半分は、熱いアセトニトリル (100 mL) にもたらされ、結晶化された。物質は、遠心分離によってスピンドウンされ、アセトニトリル (2 x 25 mL) で洗浄された。物質は高い真空で乾燥されて、結晶物質 (745 mg、収率99%) を産出した。産物、Boc-アミノドデカンアミンは、TLC及び質量分析法 (Sciex API 150EX) によって証明された。

【0205】

実施例49：トリメチルアミノドデカンアミンの調製

Boc-アミノドデカンアミン (745 mg、2.5 mmol) は、アセトニトリル (12 mL、0.2 M) に溶解された。生じた溶液に、ジイソプロピルエチルアミン (0.43 mL、370 mg、2.5 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) 及びヨウ化メチル (0.77 mL、1.8 g、12.4 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加された。反応は、窒素下の室温で16時間攪拌された。反応は、反応が停止したことを証明するためにTLC及び質量分析法 (Sciex API 150EX) によって分析された。反応混合物は、ヒートガンで加熱され、周辺温度まで自然に冷却させた。結晶が形成され、TLC及び質量分析法 (Sciex API 150EX) によって分析された。結晶は、1,12-ドデカンアミンであると決定された。結晶は濾過によって除去され、上澄みは減圧下で濃縮された。濃縮された物質は、TFA/H₂O/TIPS (95/4.5/1.5%容量、10 mL) で溶解され、窒素下の室温で攪拌された。完全な脱保護は、TLCによって証明された。反応溶液は、冷エーテル (25 mL) で沈殿され、遠心分離によってスピンドウンされ、エーテル (2 x 25 mL) で洗浄された。次いで、沈殿は高い真空の窒素下で乾燥された。白色の結晶物質 (370 mg) が産出された。産物は、TLC及び質量分析法 (Sciex API 150EX) によって証明された。

【0206】

実施例50：イミダゾール酢酸のBoc保護

4-イミダゾール酢酸塩酸塩 (250 mg、1.5 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) は、アセトニトリル (5 mL、0.3 M) に溶解された。生じた溶液に、トリエチルアミン (0.22 mL、160 mg、1.5 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加された。ジ-tert-ブチルジカルボナート (400 mg、1.8 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加され、続いて、4-ジメチルアミノピリジン (コダックケミカルカンパニー) の触媒量が添加された。30分後、反応は、反応が停止したことを証明するためにTLC及び質量分析法 (Sciex API 150EX) によって分析された。反応混合物は減圧下で濃縮され、水 (50 mL) で溶解され、pHは、NaOH (1N) でpH5まで調節された。溶液は、酢酸エタノール (50 mL)

で分割され、塩水 (2 x 50 mL) で洗浄された。物質は Na_2SO_4 で乾燥され、濾過され、減圧下で濃縮されて、オイル (82 mg、収率 23%) を産出した。

【0207】

実施例 51: イミダゾール酢酸 (トリメチルアミノドデカンアミン) アミド (MC933) の合成

トリメチルアミノドデカンアミン (53 mg、0.14 mmol) が DMF (0.7 mL、0.2 M) で溶解された。生じた溶液に、Boc-イミダゾール酢酸 (32 mg、0.14 mmol) が添加され、続いてジシクロヘキシルカルボジイミド (30 mg、0.17 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加された。反応は窒素下で 36 時間攪拌された。反応混合物は、-20 まで冷却され、尿素はペレットの形態で遠心分離を介して除去された。上澄みは、産物を含むことを証明するために、TLC 及び質量分析法 (Sciex API 150EX) によって分析された。上澄みは真空速度で濃縮され、TIPS/H₂O/TFA (0.1/97.4/2.5% 容量、1.5 mL) で溶解された。反応は窒素下の室温で 1 時間攪拌された。反応は、脱保護が停止したことを証明するために TLC 及び質量分析法 (Sciex API 150EX) によって分析された。反応混合物は、冷エーテル (10 mL) に滴下して添加され、白い沈殿を形成した。沈殿はエーテル (2 x 10 mL) で洗浄され、窒素下で乾燥され、高い真空に置かれた。結晶物質 (39.2 mg) を産出した。物質は、加熱してアセトニトリル (2 mL) に溶解された。不純物が結晶化し、濾過された。マザーリカーは TLC 及び質量分析法 (Sciex API 150EX) によって分析され、産物があることを証明された。マザーリカーは減圧下で濃縮されて、オイル (20 mg、収率 33%) として MC933 を与えた。

10

20

【0208】

実施例 52: N, N, N-トリメチルアミノプロピルアミンの調製

N-Boc-1,3-ジアミノプロパン (0.25 mL、250 mg、1.4 mmol、Fluka Chemical Company) は、無水のアセトニトリル (7 mL、0.2 M) で溶解される。生じた溶液に、ジソプロピルアミン (0.25 mL、190 mg、1.4 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加され、続いて、ヨウ化メチル (0.31 mL、720 mg、5.0 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加されて、溶液は窒素下で 16 時間加熱 (70) して攪拌された。反応混合物は、反応が停止したことを証明するために TLC 及び質量分析法 (Sciex API 150EX) によって分析された。反応混合物は、冷エーテル (20 mL) で沈殿され、エーテル (2 x 20 mL) で洗浄されて、窒素下で乾燥された。沈殿物は、ジソプロピルエチルアミンの塩 (174 mg) であった。エーテル層は、減圧下で濃縮されて、TFA/H₂O/TIPS (97.5/42/0.5% 容量、10 mL) で溶解された。反応混合物は、窒素下の室温で 16 時間攪拌された。反応混合物は、冷エーテル (20 mL) に滴下して加えられ、白色沈殿を産出する。沈殿はエーテル (2 x 20 mL) で洗浄され、窒素下で乾燥され、高い真空に置かれた。明るいオレンジ色のハイドロスコープの固体 (370 mg、収率 75%) が産出した。産物 N, N, N-トリメチルアミノプロピルアミンは、TLC 及び質量分析法 (Sciex API 150EX) によって分析された。

30

40

【0209】

実施例 53: N, N, N-トリメチルアミノプロピルアミン - CDMNC12 (MC928) の合成

N, N, N-トリメチルアミノプロピルアミン (0.50 mg、25 µL の 20 µg / µL の 75% THF / DMF、4.3 µmol) がジソプロピルエチルアミン (0.55 mg、5.5 µL の 100 µg / µL の THF、アルドリッチケミカルカンパニー) に添加され、掻き混ぜられた。生じた溶液に、CDMNC12 (1.5 mg、15 µL の 100 µg / µL の THF) が添加され、掻き混ぜられた。反応は室温で 30 分間攪拌されて、さらなる精製をせずに N, N, N-トリメチルアミノプロピルアミン - CDMNC1

50

2 (MC928) を与えるために真空速度で濃縮された。生じた残存物は、DMF (100 μ L、20 μ g / μ L) で溶解された。

【0210】

実施例54：N, N, N - トリメチルアミノプロピル - ジメチルオクタデシルシラザン (MC927) の合成

N, N, N - トリメチルアミノプロピルアミン (0.81 mg、41 μ L の20 μ g / μ L の75% THF / DMF、7.0 μ mol) にジイソプロピルジエチルアミン (0.90 mg、9.0 μ L の100 μ g / μ L のTHF、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加された。生じた溶液に、クロロジメチルオクタデシルシラン (1.4 mg、14 μ L の100 μ g / μ L のTHF、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加された。反応は室温で30分間攪拌されて、さらなる精製をせずにN, N, N - トリメチルアミノプロピル - ジメチルオクタデシルシラザン (MC927) を与える真空速度で濃縮された。生じた残存物はDMF (100 μ L、20 μ g / μ L) で溶解された。

10

【0211】

実施例55：チオプロピオン - 3 - ジメチルアミノプロパノアートとデカンチオール (MC746) の混合したジスルフィドの調製

ジクロロメタン (4.0 mL) のS - トリチル - チオプロピオン酸 (0.36 g、1.0 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) の溶液に、PyBOP (0.54 g、1.0 mmol、ノバイオケム) が添加された。ジメチルアミノプロパノール (0.12 mL、1.0 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) の添加前に、混合物は周辺温度で5分間攪拌された。反応は室温で18時間連続して攪拌され、減圧下で濃縮された。残存物は酢酸エタノールでもたらされ、水で分割された。有機層は、2回の水、1回の塩水で洗浄され、乾燥 (Na₂SO₄) されて、溶媒が除去 (アスピレータ) された。生じた残存物は、トリチル保護基を除去するために2% TIPS / 50% TFA / CH₂Cl₂ (3 mL) で懸濁された。2時間後、チオプロピオン - 3 - ジメチルアミノプロパノアートを与えるために溶液が濃縮された。

20

【0212】

ジクロロメタン (2 mL) のチオプロピオン - 3 - ジメチルアミノプロパノアート (0.10 g、0.52 mmol) の溶液に、デカンチオクロリド (0.11 g、0.52 mmol) が添加された。生じた溶液は、周辺温度で20分間攪拌された。溶媒が除去され、生じた残存物の一部 (25 mg) は、デカンチオールとチオプロピオン - 3 - ジメチルアミノプロパノアート (M + 1 = 364.4) との20.9 mg (84%) の混合したジスルフィドを与えるために、シリカゲル (10% メタノール / CH₂Cl₂ 溶離剤) のブラグフィルタレーションによって精製された。

30

【0213】

実施例56：チオプロピオン - 3 - ジメチルアミノプロパノアートとドデカンチオール (MC747) の混合されたジスルフィドの調製

ジクロロメタン (2 mL) のチオプロピオン - 3 - ジメチルアミノプロパノアート (0.10 g、0.52 mmol) の溶液に、ドデカンチオクロリド (0.11 g、0.52 mmol) が添加された。生じた溶液は、周辺温度で20分間攪拌された。溶媒が除去され、生じた残存物の一部 (150 mg) は、デカンチオールとチオプロピオン - 3 - ジメチルアミノプロパノアート (M + 1 = 392.4) との38 mg (25%) の混合したジスルフィドを与えるために、シリカゲル (1% TFA / 10% メタノール / CH₂Cl₂ 溶離剤) のフラッシュフィルタレーションによって精製された。

40

【0214】

実施例57：ラウリルアミンでL - リジンのアミド化

ジ - N - Boc - L - リジンのジシクロヘキシルアンモニウム塩 (1.0 g、1.9 mmol、シグマケミカルカンパニー) は、酢酸エタノール (50 mL) と溶解され、水 (50 mL) で分割され、1Nの塩酸 (3 x 50 mL) 及び塩水 (1 x 50 mL) で洗浄された。有機層はMgSO₄ で乾燥され、減圧下で濾過され濃縮された。物質は、質量分析

50

法 (Sciex API 150EX) ($M+1=347.7$) によって証明された。濃縮された物質は、ジクロロメタン (10 mL) で溶解された。生じた溶液に、ジシクロヘキシルカルボジイミド (0.78 g、3.8 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) 及びラウリルアミン (0.4 g、2.2 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加された。反応は窒素のブランケットでカバーされ、室温で1時間攪拌された。反応は、反応が停止したことを証明するために TLC によって分析された。反応混合物は DCU を除去するために濾過され、減圧下で濃縮された。濃縮された物質は、5%メタノール/CH₂Cl₂ (1 mL) で溶解され、5%メタノール/CH₂Cl₂ (100 mL) でシリカゲルカラムに流した。分画は減圧下で濃縮されて、オイル (410 mg) が産出した。オイルは、TFA/CH₂Cl₂/TIPS (5 mL/2 mL/0.05 mL) で溶解され、窒素下の室温で1時間攪拌された。反応は、反応が停止したことを証明するために TLC によって分析された。物質は減圧下で濃縮され、アセトニトリル (1 mL) で溶解され、水に沈殿された。白色結晶 (77 mg) の L-リジンのラウリルアミンアミドを与えるために、沈殿は真空下で乾燥された。

10

【0215】

実施例 58 : ピレンドデカノン - 3 - トリメチルアミノプロピルアミンカルボキシアミドヨウ素の調製

ピレンドデカノン酸 (10 mg、0.025 mmol、モレキュラープローブ) は、THF (0.13 mL、0.2 M) で溶解された。生じた溶液に、3-ジメチルアミノプロピルアミン (0.004 mL、3.2 mg、0.031 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加されて、続いてジシクロヘキシルカルボジイミド (6.4 mg、0.031 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) が追加された。反応は、窒素下の室温で16時間光から遮断されて攪拌された。反応混合物は、反応が停止したことを証明するために TLC 及び質量分析法 (Sciex API 150EX) によって分析された。反応混合物は、減圧下で濃縮されて、酢酸エタノール (0.5 mL) に溶解され、水 (0.5 mL) で分割され、1Nの塩酸 (2 x 0.5 mL) 及び塩水 (0.5 mL) で洗浄された。ピレンドデカノン - 3 - ジメチルアミノプロピルアミンカルボキシアミドを与えるために、有機層は減圧下で濃縮された。

20

【0216】

ピレンドデカノン - 3 - ジメチルアミノプロピルアミンカルボキシアミドはアセトニトリル (0.1 mL、0.25 M) に溶解された。生じた溶液に、K₂CO₃ の触媒量が添加され、続いてメチルヨウ素 (0.03 mL、7.1 mg、0.050 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加された。反応混合物は窒素でカバーされ、16時間攪拌されて加熱 (55) された。反応混合物は、反応が停止したことを証明するために TLC 及び質量分析法 (Sciex API 150EX) によって分析された。反応混合物は、減圧下で濃縮された。濃縮された物質は、ジクロロメタン (1 mL) で溶解され、シリカ (6 cm、10%メタノール/CH₂Cl₂ (50 mL) 溶離剤) のプラグにより濾過された。オイル (8.7 mg、収率 56%) のピレンドデカノン - 3 - トリメチルアミノプロピルアミンカルボキシアミドヨウ素を与えるために溶液は減圧下で濃縮された。

30

【0217】

実施例 59 : FITC - Chit - O1 の調製

Chit - O1 (10 mg、1 mg/mL の 80% DMF 溶液の 10 mL、0.026 mmol アミン) に pH 9 までになるように Na₂CO₃ (0.1 M、10 mL) が添加された。フルオレセインイソチオシアン酸塩 (2 mg、0.2 mL の 10 mg/mL の DMF 溶液、0.0053 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) が溶液に添加された。溶液は、16時間光から保護されて、室温で攪拌された。反応は、反応が停止したことを証明するために TLC によって分析された。反応は減圧下で濃縮されて、冷エーテル (10 mL) で沈殿されてエーテル (2 x 10 mL) で洗浄された。物質は高い真空で乾燥されて、水 (2 mL、5 mg/mL) で再構成された。物質 (5 mg、1 mL) が Sephadex G50 カラムにロードされ、水で溶出されて分画 (1 mL) が収集された

40

50

。分画は、蛍光 (Varian Cary Eclipse) スペクトロフルオロメーター、励起 495 nm、放射 530 nm) によって分析された。分画 24 ~ 37 は共にプールされて、凍結されて凍結乾燥された。ふわふわした黄色 / オレンジ物質 (5.0 mg) が産出され、水 (0.5 mL、10 mg/mL) に溶解された。

【0218】

実施例 60 : Rh-DNA-NC₁₂-PyrDet の調製

Rh-DNA (100 µg、50 µL の 2 µg/µL の水溶液、0.30 µmol リン酸塩) が水 (50 µL、1 µg/µL の pDNA) に溶解され、穏やかに混合された。個別の試験管において、ドデシルアミン塩酸塩 (13 µg、13 µL の 10 µg/µL 水溶液、0.61 µmol) 及び PyrDet (9.5 µg、9.5 µL の 1 µg/µL の THF、0.015 µmol) が共に混合された。洗剤が Rh-DNA 溶液に添加されて穏やかに混合された。物質が沈殿して、遠心分離によってスピンドウンされた。上澄みが除去され、ペレットが水 (2 x 100 µL) で洗浄された。ペレットが P₂O₅ で 72 時間凍結乾燥されて、THF (100 µL、1 µg/µL) で再構成された。

10

【0219】

実施例 61 : 疎水性の pDNA 複合体の超遠心分離

【0220】

【表 7】

サンプル	量 (µg)	H ₂ O (µL)
Rh-DNA	50	1000
Rh-DNA-NC ₁₂ -PyrDet	50	1000
Rh-DNA/FITC-Chit-OI	50/105	1000
PyrDet	4.7	1000
Rh-DNA-NC ₁₂ -PyrDet/FITC-Chit-OI	50/105	1000
FITC-Chit-OI	105	1000

20

水 (1000 µL) にポリマー又は洗剤が添加され、ボルテックスされた。生じた溶液に RhDNA 又は Ph-DNA-NC₁₂-PyrDet (50 µg) が添加されてボルテックスされた。サンプルは、ショ糖勾配 (18 ~ 54%、10 mM の HEPES、1 mM の EDTA、9.5 mL) 及び塩基 (クッション) としてのトリザミド (trizamide) で調製された試験管にロードされた。サンプルは、真空下の 4 で 20 時間、35 krpm で遠心分離された。各サンプルは、試験管の底部から上部に分画する、750 µL の分画に分離された。各分画に塩化ナトリウム (終濃度が 5 M、1 M の 150 µL) 及びトリトン (終濃度 20%、1% の 37.5 µL) がボルテックスされて添加された。分画は、スペクトロフルオロメーター (Varian Cary Eclipse) のローダミン (励起 555 nm、放射 585 nm)、FITC (励起 495 nm、放射 530 nm)、及びピレン (励起 340 nm、放射 377 nm) チャンネルで分析された。

30

40

【0221】

ローダミンの蛍光の結果 (図 1) は、Ph-DNA-NC₁₂-PyrDet と Rh-DNA/FITC-Chit-OI の両者が最も濃い分画 (分画 12 ~ 14) の観察された蛍光に基づく粒子 / 凝集を形成する。FITC の蛍光の結果は、ほとんどの FITC-Chit-OI が最も薄い分画 (上部の分画) に維持することを示す。少量の FITC の蛍光は、複合体 (Ph-DNA-NC₁₂-PyrDet/FITC-Chit-OI) における分画 7 で観察され、ローダミンの蛍光の複合体と重なり合い、したがって、FITC-Chit-OI と Ph-DNA-NC₁₂-PyrDet との間の相互作用を示す。ピレンの蛍光の結果は、すべてのピレン洗剤が上部の分画に維持することを示す。Ph

50

- DNA - NC₁₂ - Pyrdet と Rh - DNA - NC₁₂ - Pyrdet / FITC - Chit - Ol の強度は、Ph - DNA - NC₁₂ - Pyrdet の形成中に Pyrdet の添加の結果として、より低い傾向にある。Pyrdet が Ph - DNA - NC₁₂ 粒子に組み込まれない場合、形成中の水が洗浄する間に洗い流される。これは、観察されたより低い蛍光強度を説明し得る。

【0222】

実施例62：ゲラニルアミン塩酸塩の調製

ゲラニルアミン (0.6 mL、500 mg、3.3 mmol、アルドリッチケミカルカンパニー) はメタノール (0.4 mL) に溶解され、ボルテックスしながら穏やかに混合された。溶液は、冷塩酸/エーテル (1 M の 5.5 mL、アルドリッチケミカルカンパニー) に滴下して添加され、白色沈殿が形成された。沈殿は遠心分離でスピンドウンされ、エーテル (2 × 6 mL) で洗浄された。物質は窒素下で乾燥されて、ついで高い真空にされた。白色の結晶物質 (550 mg、89%) が産出された。

10

【0223】

実施例63：pDNA - CPB の調製

pDNA (pCI Luc、50 μL、100 μg の 2 μg / μL の水、0.30 μmol リン酸塩) が臭化セチルピリジニウム (24.4 μL、244 μg の 10 μg / μL の水、0.61 μmol、アルドリッチケミカルカンパニー) に添加されて穏やかに混合された。沈殿は遠心分離によってスピンドウンされ、P₂O₅ で凍結乾燥された。

20

【0224】

実施例64：pDNA - NC₃ (1:1) の調製

3倍にして、pDNA (pCI Luc、50 μg、100 μL の 2 μg / μL の水、0.15 μmol のリン酸塩、pMIR48) は水 (25 μL) に溶解されてボルテックスされた。生じた溶液に NC₃ 塩酸 (1.4 μL、14 μg の 10 μg / μL の水溶液、0.15 μmol、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加されて穏やかに混合された。溶液は凍結され、真空速度で16時間乾燥された。

【0225】

実施例65：pDNA - MC927 (1:1) の調製

乾燥された物質、pDNA - NC₃ (50 μg、0.15 μmol のリン酸塩) は、MC927 (4 μL、40 μg の 10 μg / μL の DMF 溶液、0.15 μmol) で溶解され、ボルテックスされた。生じた溶液に DMF (21 μL、2 μg / μL の pDNA) が添加された。

30

【0226】

実施例66：pDNA - MC927 (1:2) の調製

乾燥された物質、pDNA - NC₃ (50 μg、0.15 μmol のリン酸塩) は、MC927 (9 μL、90 μg の 10 μg / μL の DMF 溶液、0.30 μmol) で溶解され、ボルテックスされた。生じた溶液に DMF (16 μL、2 μg / μL の pDNA) が添加された。

【0227】

実施例67：pDNA - MC927 (1:3) の調製

乾燥された物質、pDNA - NC₃ (50 μg、0.15 μmol のリン酸塩) は、MC927 (13 μL、130 μg の 10 μg / μL の DMF 溶液、0.45 μmol) で溶解され、ボルテックスされた。生じた溶液に DMF (12 μL、2 μg / μL の pDNA) が添加された。

40

【0228】

実施例68：pDNA - MC933 (1:1) の調製

pDNA (pCI Luc、50 μg、25 μL の 2 μg / μL の溶液、0.15 μmol のリン酸塩) は水 (25 μL) に溶解されてボルテックスされた。生じた溶液に MC933 (7 μL、70 μg の 10 μg / μL の水溶液、pH 8、0.15 μmol) が添加されて穏やかに混合された。溶液は凍結され、真空速度で16時間乾燥された。

50

【0229】

実施例69：pDNA-MC933(1:2)の調製

pDNA(pCI Luc、50 μ g、25 μ Lの2 μ g/ μ Lの水、0.15 μ molのリン酸塩)は水(25 μ L)に溶解されてボルテックスされた。生じた溶液にMC933(15 μ L、150 μ gの10 μ g/ μ Lの水溶液、pH8、0.30 μ mol)が添加されて穏やかに混合された。溶液は凍結され、真空速度で16時間乾燥された。

【0230】

MC933(1:2)において記載されるような同様の手順によって、下記の調製が形成された：pDNA-NC₆、pDNA-NC₁₀、pDNA-CHAPS、pDNA-Lys-NC12、pDNA-MC753、pDNA-MC754、pDNA-MC744、pDNA-MC745、pDNA-MC746、pDNA-MC747、pDNA-MC909。

10

【0231】

実施例70：pDNA-MC933(1:3)の調製

pDNA(pCI Luc、50 μ g、25 μ Lの2 μ g/ μ Lの水、0.15 μ molのリン酸塩)は水(25 μ L)に溶解されてボルテックスされた。生じた溶液にMC933(220 μ L、22 μ gの10 μ g/ μ Lの水溶液、pH8、0.45 μ mol)が添加されて穏やかに混合された。溶液は凍結され、真空速度で16時間乾燥された。

【0232】

実施例71：Ol-Mel-CDMの調製

Ol-Mel(40 μ L、400 μ gの10 μ g/ μ LのDMF溶液、0.52 μ molのアミン)は、ジイソプロピルエチルアミン(1.8 μ L、18 μ gの10 μ g/ μ LのDMF溶液、0.14 μ mol、アルドリッチケミカルカンパニー)に添加されてボルテックスされた。CDM(2.6 μ L、26 μ gの10 μ g/ μ LのDMF溶液、0.14 μ mol)が添加されてボルテックスされた。反応混合物は、室温で30分間ボルテックスされた。終濃度は、10 μ g/ μ LのOl-Melであった。

20

【0233】

実施例72：Ol-Mel-CDM(2.5)の調製

Ol-Mel(25 μ L、250 μ gの10 μ g/ μ LのDMF溶液、0.32 μ molのアミン)は、ジイソプロピルエチルアミン(1.1 μ L、11 μ gの10 μ g/ μ LのDMF溶液、0.085 μ mol、アルドリッチケミカルカンパニー)に添加されてボルテックスされた。CDM(3.7 μ L、37 μ gの10 μ g/ μ LのDMF溶液、0.20 μ mol)が添加されてボルテックスされた。反応混合物は、室温で30分間ボルテックスされた。終濃度は、8.4 μ g/ μ LのOl-Melであった。

30

【0234】

実施例73：肝細胞のトランスフェクション

10%FBS及び24時間のハーベスト(開始のコンフルエンスー55%)。17のサンプルが下記のように形成された。

【0235】

1) Opti(300 μ L)にpDNA(pCI Luc、1.5 μ L、3 μ gの2 μ g/ μ Lの水)が添加されボルテックスされた。Lt-1(9 μ L、Mirus Corporation)が添加されボルテックスされた。

40

【0236】

2-7) 水(300 μ L)にpDNA-MC927の形成物(pCI Luc、1.5 μ L、3 μ gの2 μ g/ μ LのDMF溶液)が添加されボルテックスされた。

【0237】

8) 水(300 μ L)にpDNA(pCI Luc、1.5 μ L、3 μ gの2 μ g/ μ Lの水)が添加されボルテックスされた。Ol-Mel-CDM(1.5 μ L、15 μ gの10 μ g/ μ LのDMF溶液)が添加されボルテックスされた。

【0238】

50

9) 水 (300 μ L) に pDNA (pCI Luc、1.5 μ L、3 μ g の 2 μ g / μ L の水) が添加されボルテックスされた。Ol-Mel-CDM (3 μ L、30 μ g の 10 μ g / μ L の DMF 溶液) が添加されボルテックスされた。

【0239】

10-11) 水 (300 μ L) に pDNA - MC927 (pCI Luc、1.5 μ L、3 μ g の 2 μ g / μ L の DMF 溶液) が添加されボルテックスされた。Ol-Mel-CDM (1.5 μ L、15 μ g の 10 μ g / μ L の DMF 溶液) が添加されボルテックスされた。

【0240】

12-13) 水 (300 μ L) に pDNA - MC927 (pCI Luc、1.5 μ L、3 μ g の 2 μ g / μ L の DMF 溶液) が添加されボルテックスされた。Ol-Mel-CDM (3 μ L、30 μ g の 10 μ g / μ L の DMF 溶液) が添加されボルテックスされた。 10

【0241】

14-15) 水 (300 μ L) に pDNA - MC933 (pCI Luc、1.5 μ L、3 μ g の 2 μ g / μ L の DMF 溶液) が添加されボルテックスされた。Ol-Mel-CDM (1.5 μ L、15 μ g の 10 μ g / μ L の DMF 溶液) が添加されボルテックスされた。

【0242】

16-17) 水 (300 μ L) に pDNA - MC933 (pCI Luc、1.5 μ L、3 μ g の 2 μ g / μ L の DMF 溶液) が添加されボルテックスされた。Ol-Mel-CDM (3 μ L、30 μ g の 10 μ g / μ L の DMF 溶液) が添加されボルテックスされた。 20

【0243】

肝細胞は DMEM に保持された。トランスフェクションのおよそ 24 時間前に、細胞は 48 ウェルのプレート適切な濃度で置かれ、オーバーナイトでインキュベートされた。培地は 37 で 5% の二酸化炭素を含有する湿潤な環境で保持された。細胞は、1 mL の培地の細胞と 100 μ L のサンプル (ウェル当たり 1 μ g の pDNA) を組み合わせることによって、73% の開始のコンフルエンスでトランスフェクションされた。細胞は 24 時間後にハーベストされて、Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad-Wildbad, Germany) ルミノメーターを使用するルシフェラーゼ活性において分析された。ルシフェラーゼの発現量は、相対的な光ユニットに記録された。数は、2 つの別個のウェルの平均である。 30

【0244】

【表 8】

肝細胞のトランスフェクションの結果

#	複合体	質量比率(μg)	RLU平均
1	pDNA + Lt-1	1/3μL	16,024,685
2	pDNA-MC927 (1:1)	1	103
3	pDNA-MC927 (1:2)	1	96
4	pDNA-MC927 (1:3)	1	81
5	pDNA-MC933 (1:1)	1	91
6	pDNA-MC933 (1:2)	1	77
7	pDNA-MC933 (1:3)	1	121
8	pDNA+Ol-Mel-CDM	1/5	76,320
9	pDNA+Ol-Mel-CDM	1/10	637,307
10	pDNA-MC927(1:1)+ Ol-Mel-CDM	1/5	56,349
11	pDNA-MC927(1:2)+ Ol-Mel-CDM	1/5	81,021
12	pDNA-MC927(1:1)+ Ol-Mel-CDM	1/10	9,007
13	pDNA-MC927(1:2)+ Ol-Mel-CDM	1/10	29,503
14	pDNA-MC933(1:1)+ Ol-Mel-CDM	1/5	149,091
15	pDNA-MC933(1:2)+ Ol-Mel-CDM	1/5	594,391
16	pDNA-MC933(1:1)+ Ol-Mel-CDM	1/10	213,776
17	pDNA-MC933(1:2)+ Ol-Mel-CDM	1/10	98,898

結果は、pDNA / カチオンの界面活性剤の複合体が、ol-melの派生物と相互作用した場合、生体外で発現可能であることを示す。

【0245】

実施例74：肝細胞のトランスフェクション

10% FBS、24時間のハーベスト。23のサンプルが細胞のトランスフェクションにおいて形成された。

【0246】

1) Opti (200 μL) に pDNA (pCI Luc、1 μL、2 μg の 2 μg / μL の水) が添加されボルテックスされた。Lt-1 (6 μL、Mirus Corporation) が添加され、再度ボルテックスされた。

【0247】

2-25) 水 (200 μL) に pDNA 又は pDNA / カチオンの界面活性剤の複合体 (pCI Luc、1 μL、2 μg の 2 μg / μL の DMF) が添加され、溶液がボルテックスされた。Ol-Mel 又は Ol-Mel-CDM が添加され、溶液が再度ボルテックスされた。

【0248】

肝細胞は DMEM で保持された。トランスフェクションに先立つおよそ24時間前に、細胞は48穴ウェルのプレートに適切な密度でプレートされ、オーバーナイトでインキュベートされた。培地は37 °C で5%の二酸化炭素を含有する湿潤な環境で保持された。細

胞は、1 mLの培地の細胞と100 μ Lのサンプル(ウェル当たり1 μ gのpDNA)を組み合わせることによって、73%の開始のコンフルエンスでトランスフェクションされた。細胞は24時間後にハーベストされて、Lumat LB 9507 (EG & G Berthold, Bad-Wildbad, Germany)ルミノメーターを使用するルシフェラーゼ活性において分析された。ルシフェラーゼの発現量は、相対的な光ユニットに記録された。数は、2つの別個のウェルの平均である。

【0249】

【表9】

#	複合体	質量比率(μ g)	RLU 平均
1	pDNA + Lt-1	1/3 μ L	18,598,949
2	pDNA+OI-Mel	1/5	22,822
3	pDNA+OI-Mel	1/10	68,954
4	pDNA+OI-Mel	1/15	2,686
5	pDNA-MC933(1:2)+ OI-Mel	1/5	481,520
6	pDNA-MC933(1:2)+ OI-Mel	1/10	193,520
7	pDNA-MC933(1:2)+ OI-Mel	1/15	4,876
8	pDNA+OI-Mel-CDM	1/5	12,917
9	pDNA+OI-Mel-CDM	1/10	119,281
10	pDNA+OI-Mel-CDM	1/15	12,310
11	pDNA-MC927(1:2)+OI-Mel-CDM	1/5	64,128
12	pDNA-MC927(1:2)+OI-Mel-CDM	1/10	86,395
13	pDNA-MC927(1:2)+OI-Mel-CDM	1/15	1,409
14	pDNA-MC933(1:2)+OI-Mel-CDM	1/5	424,049
15	pDNA-MC933(1:2)+OI-Mel-CDM	1/10	298,644
16	pDNA-MC933(1:2)+OI-Mel-CDM	1/15	9,358
17	pDNA+OI-Mel-CDM(2.5)	1/5	20,570
18	pDNA+OI-Mel-CDM(2.5)	1/10	78,689
19	pDNA+OI-Mel-CDM(2.5)	1/15	9,137
20	pDNA-MC927(1:2)+OI-Mel-CDM(2.5)	1/5	69,485
21	pDNA-MC927(1:2)+OI-Mel-CDM(2.5)	1/10	111,287
22	pDNA-MC927(1:2)+OI-Mel-CDM(2.5)	1/15	14,218
23	pDNA-MC933(1:2)+OI-Mel-CDM(2.5)	1/5	722,841
24	pDNA-MC933(1:2)+OI-Mel-CDM(2.5)	1/10	129,665
25	pDNA-MC933(1:2)+OI-Mel-CDM(2.5)	1/15	5,611

10

20

30

40

50

結果は、pDNA / カチオンの界面活性剤の複合体が、修飾されたペプチドの派生物と相互作用した場合、生体外で発現可能であることを示す。

【0250】

実施例75：GL3-153-NC₁₂の調製

水(46.2 μL)にGL3-153(3.8 μL、50 μgの13.3 μg/μLの10 mMの塩化ナトリウム、0.16 μmolのリン酸塩、2'-OH-CUUACGCU GAGUACUUCGAdTdT(SEQ ID 12)及びその補体2'-OH-UCG AAGUACUCAGCGUAAGdTdT(SEQ ID 13)、Dharmac on)が添加されてボルテックスされた。生じた溶液にドデシルアミン塩酸(7 μL、70 μgの10 μg/μLの水、0.31 μmol)が添加されて穏やかに混合された。反応混合物は室温で30分間インキュベートされて、凍結されて、P₂O₅で16時間凍結乾燥された。乾燥された物質は、DMF(25 μL、2 μg/μLのGL3-153)で再構成された。

10

【0251】

実施例76：EGFP-64-NC₁₂の調製

水(46.3 μL)にEGFP-64(3.7 μL、50 μgの13.4 μg/μLの10 mMの塩化ナトリウム、0.16 μmolのリン酸塩、2'-OH-GACGUAAA CGGCCACAAGUGCA dTdT(SEQ ID 14)及びその補体2'-OH-CGCU GCAUUUGCCGGUGUUCAGdTdT(SEQ ID 15)、Dharmac on)が添加されてボルテックスされた。生じた溶液にドデシルアミン塩酸(7 μL、70 μgの10 μg/μLの水、0.31 μmol)が添加されて穏やかに混合された。反応混合物は室温で30分間インキュベートされて、凍結されて、P₂O₅で16時間凍結乾燥された。乾燥された物質は、DMF(25 μL、2 μg/μLのEGFP-64)で再構成された。

20

【0252】

実施例77：マウス尾部の静脈注射

HP尾部デュアルルシフェラーゼ：siRNA伝達。5つの複合体が下記のように調製された。

【0253】

複合体I-V：リンゲル液(1倍の10 mL)にpMIR116(pCI Luc、40 μg、20 μLの2 μg/μLの水)が添加されボルテックスされた。pMIR122(pCI Ren、4 μg、2 μLの2 μg/μLの水)が溶液に添加されてボルテックスされた。

30

【0254】

複合体II：プラスミド溶液にGL3-153(20 μg、1.5 μLの13.3 μg/μLの10 mMの塩化ナトリウム、Dharmac on)が添加されてボルテックスされた。

【0255】

複合体III：プラスミド溶液にEGFP-64(20 μg、1.5 μLの13.4 μg/μLの10 mMの塩化ナトリウム、Dharmac on)が添加されてボルテックスされた。

40

【0256】

複合体IV：プラスミド溶液にGL3-153-NC₁₂(20 μg、10 μLの2 μg/μLのDMF)が添加されてボルテックスされた。

【0257】

複合体V：プラスミド溶液にEGFP-153-NC₁₂(20 μg、10 μLの2 μg/μLのDMF)が添加されてボルテックスされた。

【0258】

体重(~2.5 ml)10 gあたり1.0 mLの尾部静脈注射が、30ゲージの0.5 インチ針を使用してICRハツカネズミ(n=2)で実行された。注射は、4乃至5秒の

50

注射時間で手動になされた [Zhang et al. 1999 ; Liu et al. 1999]。注射の一日後、肝臓がハーベストされて溶解バッファー (0.1% のトリトン X - 100、0.1 M の K - リン酸塩、1 mM の DTT、pH 7.8) で均質化された。不溶性物質は遠心分離によって除去され、10 μ l の細胞の抽出物又は 10 倍希釈の抽出物は、すでに報告されたようなルシフェラーゼ活性において分析された [Wolf et al. 1990]。

【 0 2 5 9 】

結果：

【 0 2 6 0 】

【 表 1 0 】

10

複合体#	化学式	Luc RLU	Ren RLU	Luc/Ren
複合体 I	pMIR116/pMIR122	12,986,650	42,206,060	31
複合体 I	pMIR116/pMIR122	56,986,540	153,988,270	37
複合体 II	pMIR116/pMIR122/GL3-153	16,886,310	62,075,320	27
複合体 II	pMIR116/pMIR122/GL3-153	12,171,210	165,623,300	7
複合体 III	pMIR116/pMIR122/EGFP-64	1,730,890	41,515,930	4
複合体 III	pMIR116/pMIR122/EGFP-64	6,513,560	128,718,130	5
複合体 IV	pMIR116/pMIR122/GL3-153-NC12	49,854,070	143,555,100	35
複合体 IV	pMIR116/pMIR122/GL3-153-NC12	13,225,000	26,978,760	49
複合体 V	pMIR116/pMIR122/EGFP-64-NC12	22,132,210	57,071,140	39
複合体 V	pMIR116/pMIR122/EGFP-64-NC12	6,517,230	113,748,060	6

20

30

結果は、疎水性の siRNA (GL3 - 153) がルシフェラーゼ発現を阻害することを示す。

【 0 2 6 1 】

実施例 78 : CDM - Me1 - Si (Me)₂ C₁₈ の調製

メリチン (15 μ L、300 μ g の 20 μ g / μ L の DMF、0.11 μ mol) が DMF (2.5 μ L) に溶解されてボルテックスされた。生じた溶液に、ジイソプロピルエチルアミン (1.5 μ L、15 μ g の 10 μ g / μ L の DMF、0.11 μ mol、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加されて、ボルテックスされた。クロロジメチルオクタデシルシラン (4 μ L、40 μ g の 10 μ g / μ L の THF、0.11 μ mol、アルドリッチケミカルカンパニー) が溶液に添加されて、ボルテックスされた。反応は 5 分間加熱 (70) されて、ジイソプロピルエチルアミン (2 μ L、20 μ g の 10 μ g / μ L の DMF、0.16 μ mol、アルドリッチケミカルカンパニー) が添加されてボルテックスされた。CDM (5 μ L、50 μ g の 10 μ g / μ L の DMF、0.27 μ mol) が添加されてボルテックスされた。反応混合物は、室温で 30 分間浸透して混合された。生じた混合物は、精製なしに使用された。

40

50

【0262】

実施例79：CDM-Me1の調製

メリチン(15 μ L、300 μ gの20 μ g/ μ LのDMF、0.11 μ mol)がDMF(6.5 μ L)に溶解されてボルテックスされた。生じた溶液に、ジイソプロピルエチルアミン(3.5 μ L、35 μ gの10 μ g/ μ LのDMF、0.27 μ mol、アルドリッチケミカルカンパニー)が添加されて、ボルテックスされた。CDM(5 μ L、50 μ gの10 μ g/ μ LのDMF、0.27 μ mol)が添加されてボルテックスされた。反応混合物は、室温で30分間浸透して混合された。生じた混合物は、精製なしに使用された。

【0263】

実施例80：CDM-Me1-CDMNC12の調製

メリチン(15 μ L、300 μ gの20 μ g/ μ LのDMF、0.11 μ mol)がDMF(3.5 μ L)に溶解されてボルテックスされた。生じた溶液に、ジイソプロピルエチルアミン(1.5 μ L、15 μ gの10 μ g/ μ LのDMF、0.11 μ mol、アルドリッチケミカルカンパニー)が添加されて、ボルテックスされた。CDMNC12(4 μ L、40 μ gの10 μ g/ μ LのDMF、0.11 μ mol)が添加されてボルテックスされた。反応混合物は、室温で30分間浸透して混合された。反応混合物にジイソプロピルエチルアミン(2 μ L、20 μ gの10 μ g/ μ LのDMF、0.16 μ mol、アルドリッチケミカルカンパニー)が添加されて、ボルテックスされた。CDM(5 μ L、50 μ gの10 μ g/ μ LのDMF、0.27 μ mol)が添加されてボルテックスされた。反応は、室温で30分間浸透して混合された。生じた混合物は、精製なしに使用された。

【0264】

実施例81：マウス尾部の静脈注射HP

6つの複合体が下記のようになされた。

【0265】

複合体I：水(9.7mL)にpDNA-NC₁₂(pCI Luc、20 μ L、40 μ gの2 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。CDM-Me1-SiMe₂C₁₈(15 μ L、150 μ gの10 μ g/ μ LのDMF)が注射の直前に添加された。

【0266】

複合体II：水(9.7mL)にpDNA-NC₁₂(pCI Luc、20 μ L、40 μ gの2 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。O1-Me1-CDM(15 μ L、150 μ gの10 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。

【0267】

複合体III：水(9.7mL)にpDNA-NC₁₂(pCI Luc、20 μ L、40 μ gの2 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。CDM-Me1-CDMNC12(15 μ L、150 μ gの10 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。

【0268】

複合体IV：水(9.7mL)にpDNA-NC₁₂(pCI Luc、20 μ L、40 μ gの2 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。CDM-Me1(15 μ L、150 μ gの10 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。

【0269】

複合体V：水(9.7mL)にpDNA-NC₁₂(pCI Luc、20 μ L、40 μ gの2 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。

【0270】

複合体VI：水(9.7mL)にpDNA(pCI Luc、20 μ L、40 μ gの2 μ g/ μ Lの水)が添加されてボルテックスされた。

10

20

30

40

50

【0271】

注射前に塩化ナトリウム（5 M、終濃度150 mMの300 μ L）が各複合体に添加された。体重（ \sim 2.5 ml）10 gあたり1.0 mLの尾部静脈注射が、30ゲージの0.5インチ針を使用してICRハツカネズミ（n = 2）で実行された。注射は、4乃至5秒の注射時間で手動になされた [Zhang et al. 1999 ; Liu et al. 1999]。注射の一日後、肝臓がハーベストされて溶解バッファー（0.1%のトリトンX-100、0.1 MのK-リン酸塩、1 mMのDTT、pH 7.8）で均質化された。不溶性物質は遠心分離によって除去され、10 μ Lの細胞の抽出物又は10倍希釈の抽出物は、すでに報告されたようなルシフェラーゼ活性において分析された [Wolff et al 1990]。

10

【0272】

結果：平均RLU（n = 3）

【0273】

【表11】

複合体#	肝臓 10 倍 希釈	脾臓	肺	心臓	腎臓
複合体 I	3,268,842	704,378	1,553,333	216,703	471,391
複合体 II	1,395,436	144,766	176,723	37,294	757,639
複合体 III	6,000,523	646,471	843,741	115,154	579,530
複合体 IV	791,962	197,011	78,403	26,309	74,368
複合体 V	2,425,812	125,634	201,128	65,457	250,216
複合体 VI	1,753,888	140,723	211,857	209,652	599,696

20

実施例 82：低圧の尾部マウス

4つの複合体が下記のようになされた。

30

【0274】

複合体 I：水（600 μ L）に pDNA - NC₁₂（pCI Luc、15 μ L、30 μ gの2 μ g / μ LのDMF）が添加されてボルテックスされた。注射の直前に、CDM - Me1 - SiMe₂ C₁₈（11.2 μ L、112 μ gの10 μ g / μ LのDMF）が添加されてボルテックスされた。

【0275】

複合体 II：水（600 μ L）に pDNA - NC₁₂（pCI Luc、15 μ L、30 μ gの2 μ g / μ LのDMF）が添加されてボルテックスされた。O1 - Me1 - CDM（11.2 μ L、112 μ gの10 μ g / μ LのDMF）が添加されてボルテックスされた。

40

【0276】

複合体 III：水（600 μ L）に pDNA - NC₁₂（pCI Luc、15 μ L、30 μ gの2 μ g / μ LのDMF）が添加されてボルテックスされた。CDM - Me1 - CDMNC12（11.2 μ L、112 μ gの10 μ g / μ LのDMF）が添加されてボルテックスされた。

【0277】

複合体 IV：水（600 μ L）に pDNA - NC₁₂（pCI Luc、15 μ L、30 μ gの2 μ g / μ LのDMF）が添加されてボルテックスされた。CDM - Me1（11.2 μ L、112 μ gの10 μ g / μ LのDMF）が添加されてボルテックスされた。

50

【0278】

200 μ Lの複合体の200 μ Lの尾部静脈注射は、10秒以内の手によって注射された総溶液で30ゲージの0.5インチ針を使用してICRハツカネズミ(n=2)で実行された。注射した一日後、動物は犠牲にされ、ルシフェラーゼアッセイが肝臓、脾臓、肺、心臓及び腎臓で行われた。ルシフェラーゼ発現は、すでに報告されたように決定された(Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felgner, P.L. 「Direct gene transfer into mouse muscle in vivo.」 Science, 1465-1468, 1990.)。Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad-Wildbad, Germany)ルミノメーターが使用された。

【0279】

結果：平均RLU (n=2)

【0280】

【表12】

複合体#	肝臓	脾臓	肺	心臓	腎臓
複合体I	1,155,276	1,879	1,071	1,339	3,733
複合体II	51,508	3,287	474	954	2,400
複合体III	907	2,504	860	274	632
複合体IV	1,685	416	320	247	292

結果は、pDNAが転写されることができるとき、疎水性の修飾されたペプチドの3倍の複合体は肝臓にpDNAを優勢的に伝達することを示す。

【0281】

実施例83：胆管注入

2つの複合体が下記のようになされた。

【0282】

複合体I：等張のマニトール(800 μ L)にpDNA-MC933(1:2)(pCI Luc、20 μ L、40 μ gの2 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。

【0283】

複合体II：等張のマニトール(800 μ L)にpDNA-MC933(1:2)(pCI Luc、20 μ L、40 μ gの2 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。Ol-Mel-CDM(15 μ L、150 μ gの10 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。

【0284】

30ゲージの1/2インチ針及び1mlシリンジを備えるHarvard Apparatus PH 2000のプログラム可能なポンプを使用して胆管注入がICRハツカネズミで実行された。ポンプは4秒間にわたって200 μ Lを送入するためにプログラムされた。5x1mmのKleiner Kutzマイクロ管クリップが、肝臓から離れて十二指腸への流れを防ぐために注入のポイントから下流の胆管を塞ぐために使用された。胆嚢の入り口は塞がれなかった。これらの注入では、肝臓の静脈の結合及び尾部の大静脈がクランプされなかった。加えて、門脈及び肝臓の動脈は注入のためにクランプされなかった。

【0285】

結果：平均RLU

【0286】

【表13】

複合体#	n=	肝臓
複合体 I	3	403,002
複合体 II	2	508,318

結果は、記載された2倍及び3倍の複合体が胆管を介して肝臓にpDNAを伝達できることを示す。

【0287】

実施例84：胆管注入

4つの複合体が下記のようになされた。

【0288】

複合体 I：等張のマニトール(800 μ L)にpDNA-NC₁₂(pCI-Luc、20 μ L、40 μ gの2 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。Ol-Me1-CDM(15 μ L、150 μ gの10 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。

10

20

【0289】

複合体 II：等張のマニトール(800 μ L)にpDNA-NC₁₂(pCI-Luc、20 μ L、40 μ gの2 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。Ol-Me1-CDMC12(15 μ L、150 μ gの10 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。

【0290】

複合体 III：等張のマニトール(800 μ L)にpDNA-NC₁₂(pCI-Luc、20 μ L、40 μ gの2 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。CDM-Me1(15 μ L、150 μ gの10 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。

30

【0291】

複合体 IV：等張のマニトール(800 μ L)にpDNA-NC₁₂(pCI-Luc、20 μ L、40 μ gの2 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。Ol-Me1-CDM(15 μ L、150 μ gの10 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。MC894(3.5 μ L、70 μ gの20 μ g/ μ LのDMF)が添加されてボルテックスされた。

【0292】

30ゲージの1/2インチ針及び1mlシリンジを備えるHarvard Apparatus PH 2000のプログラム可能なポンプを使用して胆管注入がICRハツカネズミで実行された。ポンプは4秒間にわたって200 μ Lを送入するためにプログラムされた。5x1mmのKleinerer Kutzマイクロ管クリップが、肝臓から離れて十二指腸への流れを防ぐために注入のポイントから下流の胆管を塞ぐために使用された。胆嚢の入り口は塞がれなかった。これらの注入では、肝臓の静脈の結合及び尾部の大静脈がクランプされなかった。加えて、門脈及び肝臓の動脈は注入のためにクランプされなかった。

40

【0293】

結果：平均RLU(n=3)

【0294】

【表 1 4】

複合体#	肝臓 10 倍希釈
複合体 I	76,485
複合体 II	31,771
複合体 III	91,396
複合体 IV	92,118

10

結果は、記載された 2 倍及び 3 倍の複合体が胆管を介して肝臓に pDNA を伝達できることを示す。

【0295】

実施例 85 : ゲル電気泳動による DNase I での pDNA - NC₁₂ の分解

サンプルは下記に記載 (総容量 10 µL) のように形成 (2 ~ 13) され、37 で 30 分間インキュベーションされた。ローディングバッファーがすべてのサンプルに添加され混合された。サンプルはエチジウムブロミドを含有する 0.8% アガロースゲルにローディングされた。ゲルは 95 V で 45 分間にわたってランされ、紫外線光によって分析された。

20

【0296】

【表 15】

レーン	種類
1	1 kb λ gt ¹⁰ - (500ng)
2	pDNA (500ng)
3	pDNA (500ng) + DNase I (1.25 u)
4	pDNA (500ng) + DNase I (2.5 u)
5	pDNA (500ng) + DNase I (5 u)
6	pDNA (500ng) + pLL (315ng)
7	pDNA (500ng) + pLL (315ng) + DNase I (1.25 u)
8	pDNA (500ng) + pLL (315ng) + DNase I (2.5 u)
9	pDNA (500ng) + pLL (315ng) + DNase I (5 u)
10	pDNA-NC ₁₂ (500ng)
11	pDNA-NC ₁₂ (500ng) + DNase I (1.25 u)
12	pDNA-NC ₁₂ (500ng) + DNase I (2.5 u)
13	pDNA-NC ₁₂ (500ng) + DNase I (5 u)
14	なし

10

20

30

結果 (図 2) は、pDNA-NC₁₂ 複合体の pDNA が DNase I にアクセス可能であることを示す。

【0297】

実施例 86 : NC₁₂ での RhDNA の凝縮、濃度及び温度依存
5 つの複合体が、下記のように 4 倍になされた。

40

【0298】

複合体 I : 水 (500 μ L) に RhDNA (2.5 μ L、5 μ g の 2 μ g / μ L の水、
0.015 μ mol) が添加されてボルテックスされた。ドデシルアミン塩酸塩 (6.7
 μ L、6.7 μ g の 1 μ g / μ L の水、0.030 μ mol) が溶液に添加されてボルテ
ックスされた。RhDNA の終濃度は、0.1 μ g / μ L であった。

【0299】

複合体 II : 水 (468 μ L) に RhDNA (25 μ L、50 μ g の 2 μ g / μ L の水、
0.15 μ mol) が添加されてボルテックスされた。ドデシルアミン塩酸塩 (6.7
 μ L、6.7 μ g の 1 μ g / μ L の水、0.030 μ mol) が溶液に添加されてボルテ
ックスされた。RhDNA の終濃度は、0.1 μ g / μ L であった。

50

【0300】

複合体III：水（218 μ L）にRhDNA（25 μ L、50 μ gの2 μ g/ μ Lの水、0.15 μ mol）が添加されてボルテックスされた。ドデシルアミン塩酸塩（6.7 μ L、67 μ gの1 μ g/ μ Lの水、0.030 μ mol）が溶液に添加されてボルテックスされた。RhDNAの終濃度は、0.2 μ g/ μ Lであった。

【0301】

複合体IV：RhDNA - NC₁₂（2 μ g/ μ LのDMF）

複合体V：RhDNA - NC₁₂（2 μ g/ μ Lのベンジルアルコール）

複合体I - IIIは異なる温度（室温、37、50及び70）でインキュベートされた。それらの蛍光（Varian Cary Eclipseスペクトロフルオロメーター）は、異なる時間のポイント（t = 0、1、2、4及び20時間）でモニターされて、複合体IV及びVと比較された。 10

【0302】

結果：結果は、サンプルが室温のサンプルと比較して加熱された場合に、2倍の複合体のpDNAがより凝縮されることを示す。より希釈したサンプルは、時間に関する最大の凝縮量と、真空下で乾燥された制御する全面的な凝縮に近いことを示す。

【0303】

実施例87：RhDNA + NC₁₂複体の塩化ナトリウムの安定

20時間のインキュベーション後、サンプルは塩化ナトリウムで滴定され、蛍光（Varian Cary Eclipseスペクトロフルオロメーター）によって分析された。図4参照。5つの複合体が下記のように4倍になされた。 20

【0304】

複合体I：水（500 μ L）にRhDNA（2.5 μ L、5 μ gの2 μ g/ μ Lの水、0.015 μ mol）が添加されてボルテックスされた。ドデシルアミン塩酸塩（6.7 μ L、6.7 μ gの1 μ g/ μ Lの水、0.030 μ mol）が溶液に添加されてボルテックスされた。RhDNAの終濃度は、0.1 μ g/ μ Lであった。

【0305】

複合体II：水（468 μ L）にRhDNA（25 μ L、50 μ gの2 μ g/ μ Lの水、0.15 μ mol）が添加されてボルテックスされた。ドデシルアミン塩酸塩（6.7 μ L、67 μ gの10 μ g/ μ Lの水、0.030 μ mol）が溶液に添加されてボルテックスされた。RhDNAの終濃度は、0.1 μ g/ μ Lであった。 30

【0306】

複合体III：水（218 μ L）にRhDNA（25 μ L、50 μ gの2 μ g/ μ Lの水、0.15 μ mol）が添加されてボルテックスされた。ドデシルアミン塩酸塩（6.7 μ L、67 μ gの1 μ g/ μ Lの水、0.030 μ mol）が溶液に添加されてボルテックスされた。RhDNAの終濃度は、0.2 μ g/ μ Lであった。

【0307】

複合体IV：RhDNA - NC₁₂（2 μ g/ μ LのDMF）

複合体V：RhDNA - NC₁₂（2 μ g/ μ Lのベンジルアルコール）

複合体I - IIIは異なる温度（室温、37、50及び70）でインキュベートされた。 40

【0308】

20時間のインキュベーション後、サンプルは塩化ナトリウムで滴定され、蛍光（Varian Cary Eclipseスペクトロフルオロメーター）によって分析された。図4参照。

【0309】

結果。結果は、70まで加熱されたサンプルが塩化ナトリウムの存在下で凝縮しないことを示す。50のサンプルは塩に安定であり、37のサンプルは凝縮しない少量を示し、一方で、室温のサンプルは、さらなる非凝縮を示す。37及び室温のサンプルにおいて、サンプルをさらに希釈すると安定性が高まり、2倍の複合体が時間、温度及び濃 50

度に基づいて安定できることを示している。

【0310】

実施例88：150 mM塩化ナトリウムで37 °CにおけるRhDNA - NC₁₂の安定性

4つの複合体が下記のように2倍になされた。

【0311】

複合体I：水(500 μL)にRhDNA - NC₁₂(2.5 μL、5 μgの2 μg / μLのDMF、0.015 μmol)が添加されてボルテックスされた。

【0312】

複合体II：水(500 μL)にRhDNA(2.5 μL、5 μgの2 μg / μLの水、0.015 μmol)が添加されてボルテックスされた。ドデシルアミン塩酸塩(6.7 μL、6.7 μgの1 μg / μLの水、0.030 μmol)が溶液に添加されてボルテックスされた。 10

【0313】

複合体III：水(500 μL)にRhDNA(2.5 μL、5 μgの2 μg / μLの水、0.015 μmol)が添加されてボルテックスされた。p-L-リジン臭化水素(9.5 μL、9.5 μgの1 μg / μLの水、0.030 μmol、シグマケミカルカンパニー)が溶液に添加されてボルテックスされた。

【0314】

複合体IV：水(500 μL)にRhDNA(2.5 μL、5 μgの2 μg / μLの水、0.015 μmol)が添加されてボルテックスされた。 20

【0315】

複合体の1セットに対して、塩化ナトリウム(5 M、150 mM n15 μL)が各複合体に添加されて溶液がボルテックスされた。複合体の第二セットに対して、塩化ナトリウムは添加されなかった。すべての複合体は37 °Cでインキュベートされた。各サンプルの蛍光は、幾つかの時間(t = 0、4、24時間)で分析された(Varian Cary Eclipseスペクトロフルオロメーター)。図5参照。

【0316】

結果：結果は、塩の存在下で加熱されたサンプルは、塩が存在しないで加熱されたサンプルよりもpDNAの凝縮がわずかであることを示した。 30

【0317】

実施例89：血清でのRhDNA - NC₁₂の安定性

3つの複合体が下記のようになされた。

【0318】

複合体I：水(500 μL)にRhDNA - NC₁₂(2.5 μL、5 μgの2 μg / μLのDMF、0.015 μmol)が添加されてボルテックスされた。

【0319】

複合体II：水(500 μL)にRhDNA(2.5 μL、5 μgの2 μg / μLの水、0.015 μmol)が添加されてボルテックスされた。ドデシルアミン塩酸塩(6.7 μL、6.7 μgの1 μg / μLの水、0.030 μmol)が溶液に添加されてボルテックスされた。 40

【0320】

複合体III：水(500 μL)にRhDNA(2.5 μL、5 μgの2 μg / μLの水、0.015 μmol)が添加されてボルテックスされた。p-L-リジン臭化水素(9.5 μL、9.5 μgの1 μg / μLの水、0.030 μmol、シグマケミカルカンパニー)が溶液に添加されてボルテックスされた。

【0321】

サンプルは、蛍光(Varian Cary Eclipseスペクトロフルオロメーター)によって分析された。血清(5 μL、10%)は、ボルテックスをしながら各複合体に添加された。各サンプルの蛍光は、幾つかの時間(t = 0、0.2、0.3、4、2 50

4時間)にわたって分析された(Varian Cary Eclipseスペクトロフルオロメーター)。図6参照。

【0322】

結果：この結果は、pDNAが時間とともに血清の存在で放出されることを示す、血清が時間とともに凝縮レベルの減少を引き起こすことを示す。

【0323】

実施例90：疎水性DNAの円偏光二色性

pDNA + NC₁₂ + 37C (0.2 μg / μL) の調製：pDNA (pCI Luc、100 μL、200 μg の 2 μg / μL、0.61 μmol) が水に溶解され、ボルテックスされた。生じた溶液にドデシルアミン塩酸塩 (27 μL、270 μg の 10 μg / μL の水、1.2 μmol) が添加された。溶液は37 で16時間インキュベートされた。4つの複合体が下記のようになされた。

10

【0324】

複合体I：水 (1955 μL) に pDNA (pCI Luc、30 μL、60 μg の 2 μg / μL の水) が添加されてボルテックスされた。メタノール (15 μL) が溶液に添加されてボルテックスされた。

【0325】

複合体II：水 (1947 μL) に pDNA (pCI Luc、30 μL、60 μg の 2 μg / μL の水) が添加されてボルテックスされた。溶液にドデシルアミン塩酸塩 (8 μL、80 μg の 10 μg / μL の水) が添加されてボルテックスされた。メタノール (15 μL) が溶液に添加されてボルテックスされた。

20

【0326】

複合体III：水 (1685 μL) に pDNA + NC₁₂ + 37C (300 μL、60 μg の 2 μg / μL の水) が添加されてボルテックスされた。溶液にドデシルアミン塩酸塩 (8 μL、80 μg の 10 μg / μL の水) が添加されてボルテックスされた。メタノール (15 μL) が溶液に添加されてボルテックスされた。

【0327】

複合体IV：水 (1985 μL) に pDNA - NC₁₂ (15 μL、60 μg の 4 μg / μL のメタノール) が添加されてボルテックスされた。

【0328】

結果：この結果は、カチオンの洗剤の存在下でCDスペクトルのシフトが存在することを示す。この結果はまた、乾燥された複合体において低いシグナル強度を示す。

30

【0329】

実施例91：2倍の複合体のリポソームの組み込み

ローダミン標識のpDNA / ラウリルアミン塩酸塩の2倍の複合体 (RhDNA - NC₁₂) が既に記載のように調製されて、乾燥した固体は2 mg / ml 溶液としてのDMFに溶解された。ホスファチジルコリン (Avanti Polar Lipids, Inc.) / ヘミコハク酸コレステロール (シグマケミカルカンパニー) (2 mg、クロロホルムで1:1質量) に、20 μg のRhDNA - NC₁₂ (DNAの質量に基づく) が添加された。溶液は減圧下で乾燥されて、次いで高い真空にされた。生じた残存物は、2 mLの水で水和され、リポソームを形成するために超音波で処理された。溶液は、サイズ排除カラム (sepharose CL-4B-200、150 mMの塩化ナトリウムの溶離剤、1 mLの分画) を通して通過された。

40

【0330】

結果：この結果は、RhDNAがリポソームの分画で溶出し、RhDNAのブランクから分離することを示す。

【0331】

実施例92：ハツカネズミへの生体内の尾部静脈注入

複合体は下記のようになされた。

【0332】

50

複合体 I : 水 (1 6 0 0 μ L) に p D N A - N C _{1 2} (p C I L u c 、 3 2 μ L 、 8 0 μ g の 2 . 5 μ g / μ L のベンジルアルコール) が添加されてボルテックスされた。

【 0 3 3 3 】

複合体 II : 水 (1 6 0 0 μ L) に C h i t - O 1 - L B A (1 6 8 μ g 、 2 5 2 μ L の 0 . 6 7 μ g / μ L の D M F / H ₂) が添加されてボルテックスされた。 p D N A - N C _{1 2} (p C I L u c 、 3 2 μ L 、 8 0 μ g の 2 . 5 μ g / μ L のベンジルアルコール) が添加されてボルテックスされた。

【 0 3 3 4 】

複合体 III : 水 (1 6 0 0 μ L) に C h i t - O 1 - L B A (1 6 8 μ g 、 2 5 2 μ L の 0 . 6 7 μ g / μ L の D M F / H ₂) が添加されてボルテックスされた。 p D N A - N C ₆ (p C I L u c 、 3 2 μ L 、 8 0 μ g の 2 . 5 μ g / μ L のベンジルアルコール) が添加されてボルテックスされた。

【 0 3 3 5 】

2 0 0 μ L の複合体の 2 0 0 μ L の尾部静脈注射は、 1 0 秒以内の手によって注射された総溶液で 3 0 ゲージの 0 . 5 インチ針を使用して I C R ハツカネズミ (n = 4) で実行された。注射した三日後、グループ A からの動物は犠牲にされ、ルシフェラーゼアッセイが肝臓、脾臓、肺、心臓及び腎臓で行われた。注射した七日後、グループ B からの動物は犠牲にされ、ルシフェラーゼアッセイが肝臓、脾臓、肺、心臓及び腎臓で行われた。ルシフェラーゼ発現は、すでに報告されたように決定された (W o l f f e t a l . 1 9 9 0 .) 。 L u m a t L B 9 5 0 7 (E G & G B e r t h o l d , B a d - W i l d b a d , G e r m a n y) ルミノメーターが使用された。

【 0 3 3 6 】

結果 : 平均 R L U (n = 2) ハーベスト日数 3 、グループ A

【 0 3 3 7 】

【表 1 6 】

複合体#	肝臓	脾臓	肺	腎臓
複合体 I	20,599	433	521	512
複合体 II*	5,306	471	449	679
複合体 III*	4,517	336	686	347

* n=1

結果 : 平均 R L U (n = 2) ハーベスト日数 7 、グループ B

【 0 3 3 8 】

【表 1 7 】

複合体#	肝臓	脾臓	肺	腎臓
複合体 I	2,783	3,803	4,068	3,105
複合体 II*	943	1,670	1,299	2,373
複合体 III*	1,597	1,667	1,407	1,507

* n=1

結果は、 p D N A - N C 1 2 複合体の p D N A が転写においてアクセス可能であることを示す。

【 0 3 3 9 】

本発明の原理の例証としてのみ、先の記載が考慮される。さらに、当業者にとって多数

の修正及び変更が容易であるので、本発明は、示されて記載された正確な構成及び操作に制限することは望むところではない。したがって、適切な修正及び等価なものはすべて本発明の範囲以内となる。

【図面の簡単な説明】

【0340】

【図1】超遠心分離後のDNA/カチオンの界面活性剤の複合体の蛍光を示す図である。

【図2】DNAse IでのDNA/カチオンの界面活性剤の複合体の分解を示す図である。

【図3】ドデシルアミン塩酸塩でのRhDNA凝縮を示す図である。

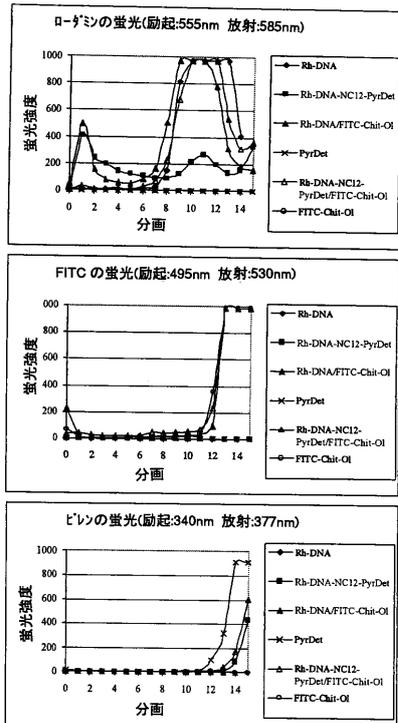
【図4】塩化ナトリウムでのRhDNA/カチオンの界面活性剤の複合体の安定性を示す図である。 10

【図5】37 又は150 mMの塩化ナトリウムにおけるRhDNA - NC12の安定性を示す図である。

【図6】10%の血清でのRhDNA - NC12の安定性を示す図である。

【図7】DNA/カチオンの界面活性剤の複合体の円偏光二色性を示す図である。

【図1】

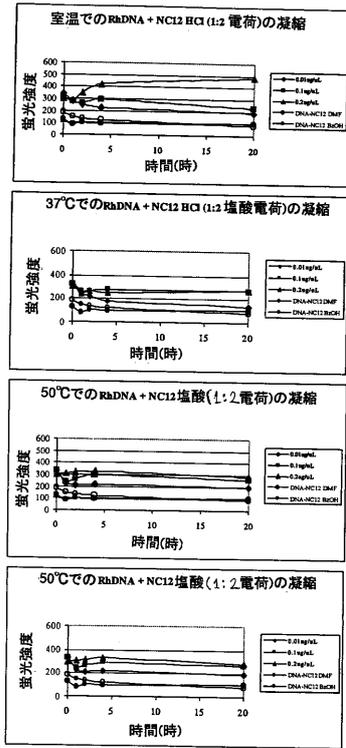


【図2】

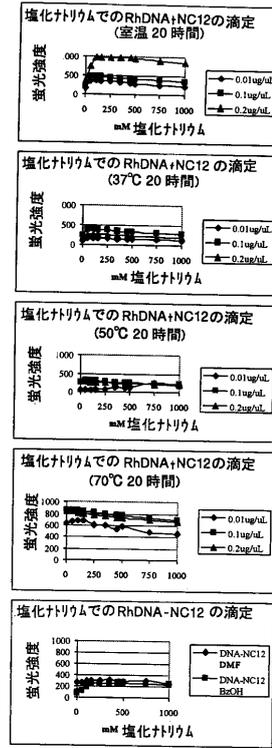


FIG. 2

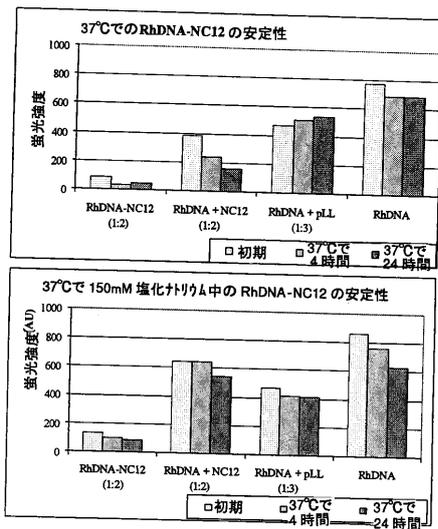
【 図 3 】



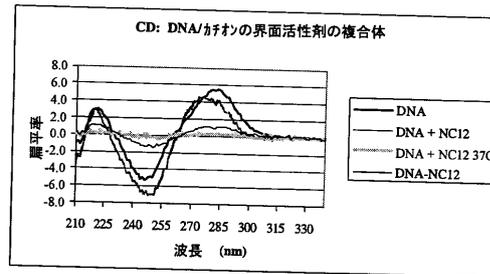
【 図 4 】



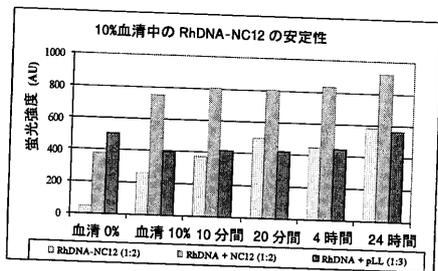
【 図 5 】



【 図 7 】



【 図 6 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/18759
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 31/70; C12N 15/00, 15/63, 15/88; C07H 21/04 US CL : 514/44; 435/320.1, 455, 458; 536/24.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/44; 435/320.1, 455, 458; 536/24.5		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 6,217,900 A (CICCARELLI et al) 17 April 2001, see Summary of the Invention, particularly line 53 of col. 5 continues to line 64 of col. 6; line 18-21 of col. 4; col. 13, lines 23-39; line 65 of col. 15 continues to line 11 of col. 16.	1-2, 4-5, 7 and 10 ----- 3, 12 and 8-9
X --- Y	US 5,965,434 A (WOLFF et al) 12 October 1999, line 40 of col. 15 continues to line 21 of col. 17; lines 43-53 of col. 17; lines 3-10 of col. 18 and example 5.	1-2, 4-5, 7 and 10 ----- 3, 12 and 8-9
X --- Y	US 6,096,335 A (THIERRY, A.R.) 01 August 2000, see Summary of the Invention, particularly, col. 5, lines 3-35, lines 62-67; col.6, lines 60-67.	1-2, 4-5, 7 and 10 ----- 3, 12 and 8-9
X --- Y	US 5,837,283 A (McDONALD et al) 17 November 1998, see Summary of the Invention, particularly cols. 20-21.	1-2, 4-5, 7 and 10 ----- 3, 12 and 8-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
		document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
		document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
		document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 29 November 2003 (29.11.2003)		Date of mailing of the international search report 02 JAN 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Quang Nguyen, Ph.D. Telephone No. (703) 308-2801 <i>Gerry Leffers</i> GERRY LEFFERS PRIMARY EXAMINER

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/18759

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/21591 (AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION) 06 May 1999, see Summary of the Invention, especially page 5, lines 18-21; page 8, lines 14-26; page 13, lines 1-12; pages 27-28.	1-2, 4-5, 7 and 10
---		-----
Y		3, 12 and 8-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/18759

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos.: 6,11 and 13-20
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Please See Continuation Sheet
3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/18759

Continuation of Box I Reason 2:

Claims 6 and 15 are dependent on themselves, whereas claims 16 and 19 are dependent on non-existent claims 22 and 26, respectively. The metes and bounds of these claims and their dependent claims are not clearly determined, and therefore no meaningful search could be conducted.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

APS, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

Search terms: gene delivery, cationic surfactant, CTAB, DNA, oligonucleotide, polynucleotide, vector

フロントページの続き

- (72)発明者 ネイダー, リサ
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン タウヒー・ドライブ 2 4 1 1
2 1 2 号
- (72)発明者 ウォルフ, ジョン エイ
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 0 5 マディソン ユニヴァーシティー・ベイ・ドラ
イヴ 1 1 2 2
- (72)発明者 バドカー, ウラジミール ジー
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 5 6 2 ミドルトン サンライズ・リッジ・トレイル
5 1 4 1
- (72)発明者 ハグストロム, ジェイムズ イー
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 6 5 ミドルトン バーガモット・ウェイ 4 7 0 0
- Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 CA01 DA02 GA11 HA17
4C084 AA13 BA44 DC23 MA66 NA10 ZC192