



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 31 156 T2 2006.06.08**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 003 898 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 31 156.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB98/01577**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 924 478.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/054347**

(86) PCT-Anmeldetag: **29.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **03.12.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.05.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **10.08.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.06.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/88 (2006.01)**
A61K 48/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9711115 29.05.1997 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

ICH Productions Ltd., London, GB

(72) Erfinder:

HART, Lewis, Stephen, London WC1N 1EH, GB

(74) Vertreter:

**Luderschmidt, Schüler & Partner, 65189
Wiesbaden**

(54) Bezeichnung: **INTEGRIN-ZIELVEKTOREN MIT TRANSFEKTIONAKTIVITÄT**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen verbesserten Integrin-Zielvektor, der erhöhte Transfektions-Aktivität besitzt.

[0002] Gentherapie und Genimpfung sind Techniken, die interessante Möglichkeiten für die Behandlung von und/oder Prophylaxe vor einer Vielzahl von Zuständen bieten, genauso wie die Antisense-Therapie. Derartige Techniken erfordern das Einbringen der DNA von Interesse in Zielzellen. Die Fähigkeit, genügend DNA in spezifische Zielzellen zu transferieren, bleibt eine der hauptsächlichen Beschränkungen für die Entwicklung von Gentherapie, Antisense-Therapie und Genimpfung. Sowohl virale als auch nicht-virale DNA-Transfer-Systeme wurden vorgeschlagen. In manchen Fällen wird RNA anstelle von DNA verwendet.

[0003] Der Rezeptor-vermittelte Gentransfer ist ein nicht-virales Verfahren des Gentransfers, das den physiologischen, zellulären Prozess der Rezeptor-vermittelten Endozytose ausnutzt, um DNA zu internalisieren. Rezeptor-vermittelte nicht-virale Vektoren weisen mehrere Vorteile gegenüber viralen Vektoren auf. Insbesondere besitzen sie kein pathogenes Potential; sie ermöglichen zielgerichteten Gentransfer in spezifische Zelltypen und sie sind nicht beschränkt in der Größe der Nukleinsäure-Moleküle, die verpackt werden können. Genexpression wird nur dann erreicht, wenn die Nukleinsäure-Komponente des Komplexes intakt vom Endosom in das Cytoplasma freigesetzt wird, und anschließend die Kernmembran durchquert, um Zugang zur im Zellkern befindlichen Transkriptions-Maschinerie zu erhalten. Allerdings ist die Transfektions-Effizienz im Vergleich zu viralen Vektoren in der Regel schlecht, aufgrund von endosomalem Abbau der Nukleinsäure-Komponente, dem Scheitern der Nukleinsäure in den Zellkern zu gelangen, und dem Ausschluss von Aggregaten, die größer als 150 nm sind, von mit Clathrin-beschichteten Vesikeln.

[0004] Integrine sind eine Super-Familie von heterodimeren Membranproteinen, die aus mehreren unterschiedlichen α - und β -Untereinheiten bestehen. Sie sind wichtig für die Anhaftung von Zellen an die extrazelluläre Matrix, Zell-Zell-Interaktionen und Signaltransduktion. Integrin-vermittelter Zelleintritt wird für die Zellanhaltung und den Zell-Eintritt von einer Reihe von intrazellulären Pathogenen, einschließlich *Trypanosoma cruzi* (Fernandez et al., 1993), Adenovirus (Wickham et al., 1993), Echovirus (Bergelson et al., 1992) und dem „Maul-und-Klaubenseuchen“-Virus (Logan et al., 1993) sowie vom Enteropathogen *Y. pseudotuberculosis* (Isberg, 1991) ausgenutzt. Ei-Sperma-Fusion wird ebenfalls von Integrin vermittelt. Die gründliche Untersuchung des Invasin-Integrin-vermittelten Internalisierungs-Prozesses von *Yersinia pseudotuberculosis* zeigten, dass Integrin-bindende Liganden für einen effizienten Zelleintritt eine hohe Bindungs-Affinität und eine unpolare Verteilung aufweisen sollten (Isberg, 1991). Die Integrin-vermittelte Internalisierung schreitet durch einen Phagozytose-ähnlichen Prozess voran, der die Internalisierung von Bakterienzellen, die einen Durchmesser von einem bis zwei Mikrometer aufweisen, ermöglicht (Isberg, 1991). Daher besitzt die Zielsteuerung von nicht-viralen Vektoren auf Integrine das Potential Zellen in einem Prozess, der die Infektion von Zellen durch Pathogene nachahmt, zu transfizieren, und umgeht die Größen-Beschränkung, die durch die mit Clathrin beschichteten Vesikel bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose auferlegt ist.

[0005] Ein weiterer Vorteil von Integrin-vermittelten Vektoren ist der, dass eine große Zahl von Peptid-Liganden für Integrin-Rezeptoren beschrieben wurden, darunter Sequenzen, die sich von natürlichen Protein-Liganden ableiten [Verfaille, 1994 #635; Wang, 1995 #645; Staatz, 1991 #539; Pierschbacher, 1984 #314; Massia, 1992 #86, Clements et al. 1994 & Lu et al., 1993] oder die aus Phage-Banken ausgewählt wurden (Koivunen et al. 1995; 1993; 1994; O'Neil et al. 1992; Healy et al. 1995; Pasqualani et al. 1995).

[0006] Die konservierte Aminosäure-Sequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) ist ein evolutionär konserviertes Merkmal von vielen, aber nicht allen natürlichen Integrin-bindenden Liganden, wie von extrazellulären Matrixproteinen und viralen Kapsiden. Peptide, insbesondere solche, die cyclische RGD-Domänen enthalten, können ebenfalls Integrine binden. Peptide, die cyklische RGD-Domänen enthalten, sind besonders geeignete Liganden für Vektoren, da sie an Integrine mit höheren Affinitäten binden als lineare Peptide (Koivunen et al. 1995). Hart et al. haben kürzlich gezeigt, dass mehrere Kopien eines cyclischen RGD-Peptids, die sich in der Haupt-Hüllprotein-Untereinheit von fd filamentösen Phage-Partikeln zeigen, mit einer Länge von etwa 900 nm, von Zellen in Gewebekultur auf eine Integrin-vermittelte Weise effizient internalisiert werden (Hart et al., 1994). Die Phage-Partikel wurden vermutlich in einem Phagozytose-ähnlichen Prozess internalisiert, da ihre Größe sie von endocytosierte Vesikeln ausschließen würde (Hart et al., 1994).

[0007] Das cyclische RGD enthaltende Peptid GGCRGDMFGCGG[K]₁₆ [SEQ ID NO: 1] wurde mit einem Schwanz aus sechzehn Lysinresten zur Komplexbildung mit Plasmid-DNA synthetisiert (Hart et al., 1995). Beachtliche Mengen an Integrin-vermittelter Genexpression wurden in Epithel-Zelllinien mit dem Vektor GG-

CRGDMFGCG[K]₁₆ [SEQ ID NO: 2] (Hart et al., 1995) und den Vektoren GGCRGDMFGC[K]₁₆ [SEQ ID NO: 3] (WO96/15811) erreicht. Ein ähnliches Peptid [K]₁₆GACRGDMFGCA [SEQ ID NO: 4], das die Domäne aus sechzehn Lysinresten am N-Terminus aufweist, und das leichter zu synthetisieren ist als das Prototyp-Peptid (WO96/15811 und Hart et al., 1997), generierte bessere Transfektions-Raten. Integrin-vermittelte Genexpression wurde im Allgemeinen mit Raten von etwa 1 bis 10% erreicht. Die Gegenwart von Chloroquin im Transfektions-Medium führte in einigen, aber nicht allen getesteten Zelllinien zu einer gewissen Erhöhung der Transfektion.

[0008] Der vorliegenden Erfindung liegt die überraschenden Beobachtung zugrunde, das der Einschluss einer Lipid-Komponente in den Oligolysin/Peptid/DNA-Komplex die Transfektions-Rate von DNA von etwa 1 bis 10% auf etwa 50 bis nahezu 100% erhöht. Dabei wird nicht nur die Transfektions-Rate dramatisch erhöht, sondern im Gegensatz zur bisherigen Erfahrung wird die Erhöhung in allen getesteten Zelllinien, einschließlich Endothel-, Epithel-, und Tumorzelllinien beobachtet.

[0009] Die vorliegende Erfindung sieht einen Komplex vor, der

- (i) eine Nukleinsäure, insbesondere eine Nukleinsäure, die für eine Sequenz von Interesse kodiert,
- (ii) eine Integrin-bindende Komponente,
- (iii) eine polykationische, Nukleinsäure-bindende Komponente, und
- (iv) eine Lipid-Komponente

umfasst.

[0010] Der Komplex ist ein Transfektions-Vektor.

[0011] Die Nukleinsäure kann aus natürlichen Quellen erhalten werden, oder kann rekombinant oder durch chemische Synthese hergestellt werden. Sie kann modifiziert sein, zum Beispiel um ein Molekül zu umfassen, das eine spezifische Funktion aufweist, zum Beispiel ein nukleäres Zielmolekül. Die Nukleinsäure kann DNA oder RNA sein. Die DNA kann einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegen. Die Nukleinsäure kann für den Einsatz in der Gentherapie, in der Genimpfung oder in der Antisense-Therapie geeignet sein. Die Nukleinsäure kann das Gen sein, das das Ziel für die spezifische Gentherapie ist, oder sich darauf beziehen, oder kann ein Molekül sein, das als ein Gen-Impfstoff oder als ein therapeutisches Antisense-Mittel fungiert. Die Nukleinsäure kann eine vollständige kodierende Sequenz sein oder sich darauf beziehen, oder kann Teil einer kodierenden Sequenz sein.

[0012] Alternativ kann die Nukleinsäure für ein Protein kodieren, das kommerziell nützlich ist, zum Beispiel industriell oder wissenschaftlich nützlich, zum Beispiel ein Enzym; pharmazeutisch nützlich ist, zum Beispiel ein Protein, das therapeutisch oder prophylaktisch als ein Medikament oder Impfstoff verwendet werden kann; oder diagnostisch nützlich ist, zum Beispiel ein Antigen für die Verwendung in einem ELISA. Wirtszellen, die in der Lage sind, kommerziell nützliche Proteine herzustellen, werden manchmal als „Zellfabriken“ bezeichnet.

[0013] Im Allgemeinen sind geeignete transkriptionelle oder translationelle Kontroll-Elemente vorgesehen. Für die Gentherapie liegt die Nukleinsäure-Komponente im Allgemeinen in der Form eines Nukleinsäure-Inserts in einem Plasmid oder Vektor vor. In manchen Fällen ist es jedoch nicht notwendig die Nukleinsäure-Komponente in einen Vektor einzubauen, um Expression zu erhalten. Zum Beispiel können Genimpfung und Antisense-Therapie unter Verwendung einer nackten Nukleinsäure erreicht werden.

[0014] Die Nukleinsäure ist im Allgemeinen DNA, allerdings kann in manchen Fällen RNA verwendet werden, zum Beispiel bei der Krebs-Impfung. Die Nukleinsäure-Komponente wird nachstehend als die Plasmid-Komponente oder Komponente „D“ bezeichnet.

[0015] Die Integrin-bindende Komponente ist jede Komponente, die in der Lage ist, spezifisch Integrine zu binden, die an der Oberfläche von Zellen zu finden sind. Die Integrin-bindende Komponente kann ein natürlich vorkommender Integrin-bindender Ligand sein, zum Beispiel ein extrazelluläres Matrixprotein, ein virales Capsidprotein, das bakterielle Protein Invasin, ein Schlangengift-Protein Disintegrin, oder irgendein Integrin-bindendes Fragment eines dieser Proteine. Diese Integrin-bindenden Proteine und Fragmente davon können von natürlichen Quellen oder durch rekombinante Techniken erhalten werden, sie sind jedoch schwierig in großen Mengen herzustellen und zu reinigen, sie erfordern die Konjugation direkt mit DNA oder RNA oder mit polykationischen Elementen für die Bindung von DNA oder RNA, und sind immunogen in vivo.

[0016] Es ist bevorzugt, Integrin-bindende Peptide zu verwenden, insbesondere aufgrund ihrer einfachen

Synthese, Reinigung und Lagerung, ihrem Potential für chemische Modifizierung, und ihrer potentiell niedrigen Immunogenizität in vivo. Beispiele für Integrin-bindende Peptide sind in Verfaille, 1994 #635; Wang, 1995 #645; Staatz, 1991 #539; Pierschbacher, 1984 #314; Massia, 1992 #86; Clements et al. 1994 & Lu et al. 1993; und in Koivunen et al. 1995; 1993; 1994; O'Neil et al. 1992; Healy et al. 1995; und Pasqualani et al. 1995 gegeben.

[0017] Wie oben angedeutet binden Peptide, die die konservierte Aminosäure-Sequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) enthalten, mit hoher Affinität an Integrine. Dementsprechend sind Peptide, die die RGD-Sequenz umfassen, besonders vorteilhaft. Die Affinität zwischen Integrin und Peptid-Liganden wird durch die Aminosäure-Sequenz beeinflusst, die die RGD-Domäne flankiert. Peptide, die eine cyclische Region aufweisen, in der die konformationelle Freiheit der RGD-Sequenz eingeschränkt ist, besitzen im Allgemeinen eine höhere Affinität für Integrin-Rezeptoren als ihre lineare Gegenstücke. Derartige cyclische Peptide sind besonders bevorzugt. Cyclische Peptide können gebildet werden, indem man zwei Cysteinreste in dem Peptid zur Verfügung stellt, um so die Bildung einer Disulfid-Bindung zu ermöglichen. Ein Cysteinrest kann von der RGD-Sequenz durch einen oder mehrere Reste, zum Beispiel bis zu sechs Reste getrennt sein, oder kann der RGD-Sequenz unmittelbar benachbart sein, obwohl bevorzugt beide Cysteine nicht unmittelbar den Enden der RGD-Sequenz benachbart sind.

[0018] Ein Beispiel für eine Aminosäure-Sequenz, die die Cyclisierung durch die Bildung einer Disulfid-Bindung ermöglicht, ist CRGDMFGC [SEQ ID NO: 5]. Ein Peptid, das aus der Sequenz CRGDMFGC besteht, oder diese umfasst, kann vorzugsweise als ein Integrin-bindendes Peptid entsprechend der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Beispiele für Peptide, die die Sequenz CRGDMFGC umfassen, und die effektive Integrin-bindende Liganden sind, sind die Peptide GGCRGDMFGC [SEQ ID NO: 6], GGCRGDMFGCG [SEQ ID NO: 7], GGCRGDMFGCA [SEQ ID NO: 8] und GACRGDMFGCA [SEQ ID NO: 9].

[0019] Das Peptid GACDCRGDCFCA [SEQ ID NO: 10] besitzt das Potential, zwei Disulfid-Bindungen zur Stabilisierung der RGD-Schleife zu bilden. Dieses Peptid und andere, die das Potential besitzen, zwei RGD-stabilisierende Disulfid-Bindungen zu bilden, können besonders vorteilhaft als Integrin-bindende Liganden entsprechend der vorliegenden Erfindung sein.

[0020] Allerdings enthalten nicht alle Integrin-bindenden Peptide die konservierte RGD-Sequenz. Zum Beispiel sind die Peptide GACRRETAWACA [SEQ ID NO: 11] und GACRRETAWACG [SEQ ID NO: 12] Integrin-spezifische Peptide. Weitere Peptide, die die Sequenz CRRETTAWAC [SEQ ID NO: 13] umfassen, können verwendet werden, genauso wie andere nicht RGD enthaltende Peptide, insbesondere solche, die das Potential zur Bildung von Disulfid-Bindungen besitzen.

[0021] Peptid-Sequenzen können auf der Grundlage von bekannten Liganden, zum Beispiel auf der Grundlage von Integrin-bindenden Domänen von natürlich vorkommenden Integrin-bindenden Liganden, oder auf der Grundlage von bekannten Peptiden, die an Integrine binden, entwickelt werden.

[0022] Wie oben dargelegt sind Integrine eine Familie von heterodimeren Proteinen, die an der Oberfläche von Zellen gefunden werden. Sie bestehen aus mehreren unterschiedlichen α - und β -Untereinheiten. Manche Integrine werden auf vielen Zelltypen gefunden, andere sind spezifischer, zum Beispiel sind $\alpha 5$ - und αv -Integrine weitverbreitet und werden auf einer großen Bandbreite von Zellen gefunden. Integrin-bindende Liganden können sich in ihrer Affinität für verschiedene Integrine unterscheiden. Zum Beispiel besitzt GACRGDMFGCA [SEQ ID NO: 9] (Peptid 1) Affinität für $\alpha 5$ - und αv -Integrine, ist aber nicht-spezifisch (O'Neil et al. 1992, Hart et al. 1997). GACDCRGDCFCA [SEQ ID NO: 10] (Peptid 5) weist hohe Affinität für Integrin αv auf, ist jedoch nicht αv -spezifisch (Koivunen et al. 1995; Hart et al. 1997). GACRRETAWACG [SEQ ID NO: 11] (Peptid 6) jedoch, das nicht die konservierte RGD-Region enthält, ist $\alpha 5\beta 1$ -spezifisch (Koivunen et al. 1995). Verschiedene Integrin-bindende Peptide und ihre Integrin-Spezifität sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt:

TABELLE

<u>Peptid-Nummer und Integrin-Spezifität</u>	<u>Sequenz</u>	<u>SEQ ID NO</u>
Peptid 1 (αv , $\alpha 5\beta 1$)	GACRGDMFGCA	SEQ ID NO: 9
Peptid 2 (αv , $\alpha 5\beta 1$)	GACRGDMFGCGG	SEQ ID NO: 12
Peptid 5 (αv)	GACDCRGDCFCA	SEQ ID NO: 10
Peptid 6 ($\alpha 5\beta 1$)	GACRRETAWACG	SEQ ID NO: 11
Peptid 7 ($\alpha 4\beta 1$)	GAGPEILDVPST	SEQ ID NO: 13
Peptid 8 ($\alpha 4\beta 1$)	GACQIDSPCA	SEQ ID NO: 14
Peptid 9 ($\alpha 5\beta 1$)	GACRRETAWACGKGACRRETAWACG	SEQ ID NO: 15

[0023] Es sollte angemerkt sein, dass die Verwendung einer Lipid-Komponente entsprechend der vorliegenden Erfindung die Transfektion für alle getesteten Peptide und alle getesteten Zelltypen stark erhöht, anders als andere Techniken zur Erhöhung, die ausprobiert wurden, wie zum Beispiel Chloroquin, das die Transfektion in geringem Maße in manchen, aber nicht allen getesteten Zelltypen erhöhen.

[0024] Die polykationische Nukleinsäure-bindende Komponente ist jedes Polykation, das in der Lage ist, DNA oder RNA zu binden. Das Polykation kann jede Anzahl an kationischen Monomeren aufweisen, vorausgesetzt, dass die Fähigkeit DNA oder RNA zu binden, erhalten bleibt. Zum Beispiel können von 3 bis 100 kationische Monomere vorhanden sein, zum Beispiel von 10 bis 20, insbesondere etwa 16. Ein Oligolysin ist besonders bevorzugt, zum Beispiel aufweisend von 10 bis 20 Lysinreste, zum Beispiel von 15 bis 17 Reste, insbesondere 16 Reste, d. h. $[K]_{16}$.

[0025] Die polykationische DNA- oder RNA-bindende Komponente kann vorzugsweise mit der Integrin-bindenden Komponente verknüpft oder auf andere Weise verbunden sein. Eine kombinierte Integrin-bindende Komponente/polykationische DNA- oder RNA-bindende Komponente kann nachstehend als Komponente „I“ bezeichnet sein. Zum Beispiel kann eine polykationische DNA- oder RNA-bindende Komponente chemisch mit einer Integrin-bindenden Komponente verknüpft sein, zum Beispiel durch eine Peptid-Bindung im Fall eines Oligolysins. Die polykationische Komponente kann an jeder Position der Integrin-bindenden Komponente verknüpft sein. Bevorzugte Kombinationen von Integrin-bindender Komponente und polykationischer DNA- oder RNA-bindender Komponente sind ein Oligolysin, insbesondere $[K]_{16}$, das mit einem Peptid, zum Beispiel einem wie oben beschriebenen Peptid, über eine Peptid-Bindung verknüpft ist.

[0026] Die Lipid-Komponente kann ein kationisches Liposom sein oder bilden. Die Lipid-Komponente kann eine oder mehrere Lipide, die ausgewählt werden aus kationischen Lipiden und Lipiden, die Membran-destabilisierende oder fusogene Eigenschaften besitzen, insbesondere eine Kombination aus einem kationischen Lipid und einem Lipid, das Membran-destabilisierende Eigenschaften besitzt, sein oder umfassen.

[0027] Eine bevorzugte Lipid-Komponente („L“) ist oder umfasst das neutrale Lipid Dioleyl-Phosphatidylethanolamin, hierin als „DOPE“ bezeichnet. DOPE besitzt Membran-destabilisierende Eigenschaften, die manchmal als „fusogene“ Eigenschaften bezeichnet werden (Farhood et al. 1995). Andere Lipide, zum Beispiel neutrale Lipide, die Membran-destabilisierende Eigenschaften aufweisen, insbesondere Membran-destabilisierende Eigenschaften wie diejenigen von DOPE, können anstelle von oder genauso wie DOPE verwendet werden.

[0028] Weitere Phospholipide, die wenigstens eine langkettige Alkylgruppe aufweisen, zum Beispiel Di(lange Alkylkette)phospholipide, können verwendet werden. Das Phospholipid kann eine Phosphatidyl-Gruppe, zum Beispiel eine Phosphatidylalkanolamin-Gruppe, zum Beispiel eine Phosphatidylethanolamin-Gruppe umfas-

sen.

[0029] Eine weitere bevorzugte Lipid-Komponente ist oder umfasst das kationische Lipid N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid, das hierin als „DOTMA“ bezeichnet wird. DOTMA besitzt kationische Eigenschaften. Weitere kationische Lipide können zusätzlich zu oder als eine Alternative zu DOTMA verwendet werden, insbesondere kationische Lipide, die ähnliche Eigenschaften wie die von DOTMA aufweisen. Derartige Lipide sind zum Beispiel quarternäre Ammoniumsalze, die mit drei kurzkettigen Alkylgruppen und einer langkettigen Alkylgruppe substituiert sind. Die kurzkettigen Alkylgruppen können die gleichen oder unterschiedlich sein, und können ausgewählt werden aus Methyl- und Ethylgruppen. Wenigstens eine und bis zu drei der kurzkettigen Alkylgruppen können eine Methylgruppe sein. Die lange Alkylkettengruppe kann eine gerade oder verzweigte Kette, zum Beispiel eine Di(langkettige Alkyl)alkyl-Gruppe besitzen.

[0030] Eine weitere bevorzugte Lipid-Komponente ist oder umfasst das Lipid 2,3-Dioleyloxy-N-[2-(spermidin-carboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminiumtrifluoroacetat, das hierin als „DOSPA“ bezeichnet wird. Analoge Lipide können zusätzlich zu oder als Alternative zu DOSPA verwendet werden, insbesondere Lipide, die ähnliche Eigenschaften wie die von DOSPA aufweisen. Derartige Lipide besitzen zum Beispiel kurzkettige Alkylgruppen, die sich von denen in DOSPA unterscheiden.

[0031] Eine bevorzugte Lipid-Komponente umfasst DOPE und eine oder mehrere weitere Lipid-Komponenten, zum Beispiel die oben beschriebenen. Besonders bevorzugt ist eine Lipid-Komponente, die eine Mischung von DOPE und DOTMA umfasst. Derartige Mischungen bilden kationische Liposomen. Eine äquimolare Mischung von DOPE und DOTMA wird als besonders effektiv gefunden. Eine derartige Mischung ist allgemein als „Lipofectin“ bekannt, und ist kommerziell unter dem Namen „Lipofectin“ erhältlich. Die Bezeichnung „Lipofectin“ wird hierin allgemein verwendet, um eine äquimolare Mischung von DOPE und DOTMA zu bezeichnen. Andere Mischungen von Lipiden, die kationische Liposomen mit Eigenschaften ähnlich denen von Lipofectin sind, können verwendet werden. Lipofectin ist besonders vorteilhaft, da es in allen getesteten Zelltypen wirksam ist.

[0032] Eine weitere bevorzugte Lipid-Komponente umfasst eine Mischung von DOPE und DOSPA. Derartige Mischungen bilden ebenfalls kationische Liposomen. Eine Mischung von DOPE und DOSPA in einem Gewichtsverhältnis DOSPA:DOPE von 3:1 ist besonders wirksam. Eine derartige Mischung in Membran-gefiltertem Wasser ist kommerziell unter dem Namen „Lipofectamine“ erhältlich. Mischungen, die DOPE, DOTMA und DOSPA umfassen können verwendet werden, zum Beispiel Mischungen von Lipofectin und Lipofectamine.

[0033] Weitere kationische Lipide sind kommerziell erhältlich, zum Beispiel DOTAP (Boehringer Mannheim) und Lipide der Tfx-Reihe (Promega). DOTAP ist N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat. Die Tfx-Reagenzien sind Mischungen eines synthetischen kationischen Lipids [N,N,N',N'-tetramethyl-N,N'-bis(2-hydroxyethyl)-2,3-di(oleoyloxy)-1,4-butandiammoniumiodid und DOPE. Alle diese Reagenzien enthalten die gleiche Menge der kationischen Lipid-Komponente, enthalten jedoch unterschiedliche molare Mengen des fusogenen Lipids DOPE.

[0034] Allerdings scheinen Lipofectin und Lipofectamine als die Lipid-Komponente in LID-Komplexen der vorliegenden Erfindung deutlich effektiver zu sein als es DOTPA und Tfx-Reagenzien sind.

[0035] Die Effektivität einer putativen Integrin-bindenden Komponente, polykationischen DNA- oder RNA-bindenden Komponente oder Lipid-Komponente kann ohne weiteres unter Verwendung der hierin beschriebenen Verfahren bestimmt werden.

[0036] Die Effizienz der Transfektion unter Einsatz eines Komplexes der Erfindung wird durch das Verhältnis von Lipid-Komponente zu Integrin-bindender-Komponente zu DNA oder RNA beeinflusst. Für jede ausgewählte Kombination von Komponenten können für jeden speziellen zu transfizierenden Zelltyp die optimalen Verhältnisse einfach durch Vermischen der Komponenten in verschiedenen Verhältnissen und Messen der Transfektionsrate für diesen Zelltyp, zum Beispiel wie hierin beschrieben, bestimmt werden.

[0037] Zum Beispiel wurde eine Kombination bestehend aus einem pGL2-Plasmid, das ein für Luciferase (ein Reporter-Gen) kodierendes Plasmid unter einem SV40-Promotor als DNA-Komponente (D) ist, $[K]_{16}$ GACRGDMFGCA [SEQ ID NO: 17] ($[K]_{16}$ -Peptid 1) als eine kombinierte Integrin-bindende Komponente/polykationische DNA-bindende Komponente (I) und Lipofectin (molares Verhältnis DOPE:DOTMA von 1:1) als die Lipid-Komponente (L) untersucht, um das optimale Verhältnis der Komponenten herauszufinden. Komplexe, die mit 1 μ g Lipofectin (L) und 4 μ g $[K]_{16}$ -Peptid (I) pro 1 μ g Plasmid (D) gebildet wurden, waren 100-mal

aktiver als Komplexe ohne Lipofectin. Die Zugabe von größeren Mengen an Lipofectin senkte die Transfektions-Aktivität auf eine von der Dosierung von Lipofectin abhängigen Weise.

[0038] Ein optimales Transfektions-Verhältnis von 0,75 µg Lipofectin (L) pro 4 µg der $[K]_{16}$ -Peptid Integrin-bindenden Komponente/polykationischen DNA- oder RNA-bindenden Komponente (I) pro 1 µg Plasmid-DNA oder RNA (Nukleinsäure-Komponente, D) wurde für drei verschiedene Zelllinien, und zwar Melanomzellen, Endothelzellen und Epithelzellen gefunden. Dieses Verhältnis wurde später als effektiv für andere unterschiedliche Zelllinien und für andere Oligolysin-Peptide gefunden. Ein Gewichtsverhältnis L:I:D von 0,75:4:1 entspricht einem molaren Verhältnis von 0,5 nmol Lipofectin zu 1,25 nmol $[K]_{16}$ -Peptid 6 zu 0,25 pmol Kontrollplasmid pGL2. Ein Gewichtsverhältnis L:I:D von 0,75:4:1 oder das entsprechende molare Verhältnis sind bevorzugt, wenn Lipofectin als Lipid-Komponente eingesetzt wird.

[0039] Für eine Kombination von Komponenten in der Lipofectin durch Lipofectamine (DOPE/DOSPA) ersetzt wird, wurde ein optimales Verhältnis von 12 µg Lipofectamin zu 4 µg $[K]_{16}$ -Peptid 6 zu 1 µg Plasmid-DNA oder RNA gefunden. Ein Gewichtsverhältnis L:I:D von 12:4:1 oder das entsprechende molare Verhältnis ist für Lipofectamine-enthaltende Komplexe geeignet. Optimale Verhältnisse für andere Systeme können analog bestimmt werden.

[0040] Lipofectin und Lipofectamine scheinen besonders effektiv zur Verbesserung der Transfektion zu sein. Lipofectin besitzt den Vorteil, dass nur sehr geringe Mengen benötigt werden. Jegliche Nebeneffekte, die auftreten können, werden somit minimiert. Wie oben angedeutet beträgt das optimale Gewichtsverhältnis der Komponenten L:I:D wenn Lipofectamine verwendet wird, 12:4:1. Mit Lipofectin beträgt das optimale Verhältnis nur 0,75:4:1.

[0041] Die vorliegende Erfindung sieht ein Verfahren zur Herstellung eines Transfektions-Komplexes der vorliegenden Erfindung vor, der das Vermischen der Komponenten (i), (ii), (iii) und (iv) umfasst.

[0042] Obwohl die Komponenten in jeder beliebigen Reihenfolge vermischt werden können, ist es allgemein bevorzugt, dass die Lipid-Komponente nicht zuletzt zugegeben wird. Für den Fall, dass es eine kombinierte Integrin-bindende Komponente/polykationische DNA- oder RNA-bindende Komponente gibt, ist es im Allgemeinen bevorzugt, die Komponenten in der folgenden Reihenfolge zu vereinigen: Lipid-Komponente; kombinierte Integrin-bindende/polykationische DNA- oder RNA-bindende Komponente; DNA- oder RNA-Komponente, zum Beispiel in der Reihenfolge: Lipofectin, Oligolysin-Peptid-Komponente, DNA- oder RNA-Komponente.

[0043] Die vorliegende Erfindung sieht auch eine Mischung vor, die eine Integrin-bindende Komponente, eine polykationische Nukleinsäure-bindende Komponente und eine Lipid-Komponente umfasst.

[0044] Eine derartige Mischung kann verwendet werden, um einen Nukleinsäure-enthaltenden Transfektions-Komplex der Erfindung durch das Einbringen einer Nukleinsäure in die Mischung, zum Beispiel durch Vermischen, herzustellen. Alternativ kann die Mischung der Erfindung für die Herstellung eines Komplexes verwendet werden, der anstelle der Nukleinsäure irgendeine andere Komponente umfasst, die in der Lage ist, an die polykationische Nukleinsäure-bindende Komponente zu binden, wie zum Beispiel ein Protein.

[0045] Die vorliegende Erfindung sieht ferner ein Verfahren zur Herstellung eines Komplexes der vorliegenden Erfindung vor, das das Vermischen einer Nukleinsäure mit einer Mischung der vorliegenden Erfindung umfasst.

[0046] Die einzelnen Komponenten einer Mischung der Erfindung sind die jeweils oben in Bezug auf den Komplex der Erfindung beschriebenen. Die bevorzugten Komponenten, bevorzugte Kombinationen von Komponenten, bevorzugte Verhältnisse von Komponenten und bevorzugte Mischungs-Reihenfolge, beide in Bezug auf die Mischung und die Herstellung eines Komplexes, sind die oben in Bezug auf den Komplex der Erfindung beschriebenen.

[0047] Eine Mischung der vorliegenden Erfindung umfasst bevorzugt eine äquimolare Mischung von DOPE und DOTMA (Lipofectin) als die Lipid-Komponente und ein Oligolysin-Peptid, insbesondere ein $[K]_{16}$ -Peptid als eine kombinierte Integrin-bindende/Nukleinsäure-bindende Komponente. Das bevorzugte molare Verhältnis von Lipofectin zu Oligolysin-Peptid beträgt 0,75:4.

[0048] Die vorliegende Erfindung sieht ein Verfahren zur Transfektion einer Zelle mit einer Nukleinsäure vor, bei dem man die Zelle in vitro oder in vivo mit einem Komplex der vorliegenden Erfindung in Kontakt bringt.

[0049] Die vorliegende Erfindung sieht auch ein Verfahren zur Expression einer Nukleinsäure in einer Wirtszelle vor, bei dem man die Zelle mit einem Komplex der vorliegenden Erfindung in Kontakt bringt. Die Wirtszelle wird dann unter Bedingungen kultiviert, die der Zelle die Expression der Nukleinsäure ermöglichen.

[0050] Die vorliegende Erfindung sieht ferner ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins vor, bei dem man eine Wirtszelle in vitro oder in vivo mit einem Komplex der vorliegenden Erfindung in Kontakt bringt, der Zelle die Expression des Proteins ermöglicht, und das Protein erhält. Die Wirtszelle kann in vitro mit einer Nukleinsäure mit Hilfe eines Komplexes der vorliegenden Erfindung transfiziert und kultiviert werden, wobei das Protein entweder von der Wirtszelle oder vom Kulturmedium erhalten wird.

[0051] Die vorliegende Erfindung sieht ferner eine Zelle vor, die mit einem Komplex der vorliegenden Erfindung transfiziert worden ist, sowie die Abkömmlinge einer derartigen Zelle.

[0052] Die vorliegende Erfindung sieht auch eine pharmazeutische Zusammensetzung vor, die einen Komplex der vorliegenden Erfindung in Beimischung oder Verbindung mit einem pharmazeutisch geeigneten Träger umfasst. Die Kombination kann ein Impfstoff sein.

[0053] Die vorliegende Erfindung sieht auch ein Verfahren zur Behandlung von oder Prophylaxe vor einem Zustand vor, der in einem Menschen oder in einem nicht-menschlichen Tier durch einen Defekt und/oder eine Defizienz in einem Gen verursacht wird, bei dem man einem Menschen oder einem nicht-menschlichen Tier einen Komplex der vorliegenden Erfindung verabreicht.

[0054] Die vorliegende Erfindung sieht auch ein Verfahren zur therapeutischen oder prophylaktischen Immunisierung eines Menschen oder eines nicht-menschlichen Tieres vor, bei dem man einem Menschen oder einem nicht-menschlichen Tier einen Komplex der vorliegenden Erfindung verabreicht.

[0055] Die vorliegende Erfindung sieht auch ein Verfahren der Antisense-Therapie eines Menschen oder eines nicht-menschlichen Tieres vor, wobei ein Komplex der vorliegenden Erfindung, der Antisense-DNA umfasst, dem Menschen oder dem nicht-menschlichen Tier verabreicht wird.

[0056] Die vorliegende Erfindung sieht ferner einen Komplex der vorliegenden Erfindung zur Verwendung als ein Medikament und/oder Impfstoff vor, zum Beispiel für die Prophylaxe vor einem Zustand, der in einem Menschen oder in einem nicht-menschlichen Tier durch einen Defekt und/oder eine Defizienz in einem Gen verursacht wird, für die therapeutische oder prophylaktische Immunisierung eines Menschen oder eines nicht-menschlichen Tieres, oder für die Antisense-Therapie eines Menschen oder eines nicht-menschlichen Tieres.

[0057] Die vorliegende Erfindung sieht auch die Verwendung eines Komplexes der vorliegenden Erfindung zur Herstellung eines Medikaments für die Prophylaxe vor einem Zustand, der in einem Menschen oder in einem nicht-menschlichen Tier durch einen Defekt und/oder einer Defizienz in einem Gen verursacht wird, für die therapeutische oder prophylaktische Immunisierung eines Menschen oder eines nicht-menschlichen Tieres, oder für die Antisense-Therapie eines Menschen oder eines nicht-menschlichen Tieres vor.

[0058] Ein nicht-menschliches Tier ist zum Beispiel ein Säugetier, Vogel oder Fisch, und ist insbesondere ein kommerziell aufgezogenes Tier.

[0059] Die DNA oder RNA in dem Komplex der Erfindung ist für die beabsichtigte Gentherapie, Genimpfung oder Antisense-Therapie geeignet. Die DNA oder RNA und damit der Komplex wird in einer Menge verabreicht, die für den beabsichtigten Zweck wirksam ist.

[0060] In einer weiteren Ausführungsform sieht die vorliegende Erfindung einen Kit vor, der für die Herstellung einer Mischung der vorliegenden Erfindung geeignet ist. Ein derartiger Kit umfasst die folgenden Komponenten: (i) eine Integrin-bindende Komponente; (ii) eine polykationische Nukleinsäure-bindende Komponente, und (iii) eine Lipid-Komponente.

[0061] Ein Kit, der für die Herstellung eines Komplexes der vorliegenden Erfindung geeignet ist, kann die obigen Komponenten (i) bis (iii) umfassen, sowie (iv) entweder eine Nukleinsäure oder ein Plasmid oder Vektor, der für die Expression einer Nukleinsäure geeignet ist, wobei das Plasmid oder der Vektor entweder leer ist oder eine Nukleinsäure umfasst.

[0062] Die Komponenten eines Kits sind zum Beispiel die oben in Bezug auf einen Komplex oder eine Mischung der vorliegenden Erfindung beschriebenen. Bevorzugte Komponenten sind die oben beschriebenen.

[0063] Ein Kit umfasst im Allgemeinen Anleitungen für die Herstellung eines Komplexes oder einer Mischung der vorliegenden Erfindung. Bevorzugterweise geben die Anleitungen die bevorzugten Verhältnisse der Komponenten und die bevorzugte Reihenfolge der Beimischung der Komponenten an, wie zum Beispiel oben beschrieben. Ein Kit kann zur Herstellung eines Komplexes, der für Gentherapie, Genimpfung oder Antisense-Therapie geeignet ist, verwendet werden. Alternativ kann er für die Herstellung eines Komplexes verwendet werden, der für die Transfektion einer Wirtszelle mit einer Nukleinsäure, die für ein kommerziell nutzbares Protein kodiert, geeignet ist, d. h. um sogenannte „Zellfabriken“ herzustellen.

[0064] Der Kit der vorliegenden Erfindung ermöglicht es dem Benutzer, schnell und einfach einen hocheffizienten Transfektions-Komplex der vorliegenden Erfindung unter Verwendung irgendeiner DNA oder RNA nach Wahl herzustellen.

[0065] Ein Kit der Erfindung kann die folgenden Komponenten umfassen: (a) eine Integrin-bindende Komponente, (b) eine polykationische Nukleinsäure-bindende Komponente, (c) eine Lipid-Komponente und (d) eine Nukleinsäure.

[0066] Ein derartiger Kit ist für die Herstellung eines Komplexes zur Verwendung, zum Beispiel bei der Genimpfung oder Antisense-Therapie geeignet.

[0067] In einem Kit der Erfindung sind die Komponenten einschließlich der bevorzugten Komponenten, zum Beispiel die oben in Bezug auf einen Komplex der vorliegenden Erfindung beschriebenen.

[0068] Die vorliegende Erfindung sieht auch eine wie oben beschriebene Lipid-Komponente zur Verwendung bei der Erhöhung der Transfektions-Effizienz einer Zelle mit einer Nukleinsäure, entweder DNA oder RNA, vor, wobei die Lipid-Komponente in Verbindung mit einer Integrin-bindenden Komponente und einer polykationischen Nukleinsäure-bindenden Komponente verwendet wird.

[0069] Die vorliegende Erfindung sieht auch die Verwendung einer wie oben beschriebenen Lipid-Komponente zur Herstellung eines Medikaments vor, umfassend

- (i) eine Nukleinsäure, insbesondere eine Nukleinsäure, die für eine Sequenz von Interesse kodiert,
- (ii) eine Integrin-bindende Komponente,
- (iii) eine polykationische Nukleinsäure-bindende Komponente und
- (iv) die Lipid-Komponente.

[0070] Das Medikament kann für die Gentherapie, Genimpfung oder Antisense-Therapie bestimmt sein.

[0071] Die vorliegende Erfindung sieht auch einen Transfektions-Komplex vor, der

- (i) eine Nukleinsäure, insbesondere eine Nukleinsäure, die für eine Sequenz von Interesse kodiert,
- (ii) eine Integrin-bindende Komponente und
- (iii) eine polykationische Nukleinsäure-bindende Komponente, die dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Lipid-Komponente, zum Beispiel eine wie oben beschriebene, eine zusätzliche Komponente des Komplexes ist,

umfasst.

[0072] Die vorliegende Erfindung sieht auch ein Verfahren zur Erhöhung der Effizienz eines Transfektions-Vektors vor, das

- (i) eine Nukleinsäure, insbesondere eine Nukleinsäure, die für eine Sequenz von Interesse kodiert,
- (ii) eine Integrin-bindende Komponente und
- (iii) eine polykationische Nukleinsäure-bindende Komponente, die dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Lipid-Komponente, zum Beispiel eine wie oben beschriebene, als eine zusätzliche Komponente des Komplexes enthalten ist,

umfasst.

[0073] In jedem Fall sind die verschiedenen Komponenten die oben beschriebenen. Die Lipid-Komponente ist zum Beispiel eine Mischung von DOPE und DOSPA oder insbesondere eine Mischung von DOPE und DOT-

MA, insbesondere eine äquimolare Mischung von DOPE und DOTMA (Lipofectin).

[0074] Targets für die Gentherapie sind wohlbekannt und umfassen monogene Störungen, wie zum Beispiel cystische Fibrose, verschiedene Krebsarten und Infektionen, wie zum Beispiel virale Infektionen, zum Beispiel mit HIV. Zum Beispiel bietet die Transfektion mit dem p53-Gen ein großes Potential zur Behandlung von Krebs. Targets für die Genimpfung sind ebenfalls wohlbekannt und umfassen Impfung gegen Pathogene, für die Impfstoffe, die von natürlichen Quellen abgeleitet sind, zu gefährlich für die Verwendung beim Menschen sind, und rekombinante Impfstoffe nicht immer wirksam sind, wie zum Beispiel Hepatitis B-Virus, HIV, HCV und Herpes-Simplex-Virus. Targets für Antisense-Therapie sind ebenfalls bekannt. Weitere Targets für Gentherapie und Antisense-Therapie werden mit zunehmendem Wissen um die genetischen Grundlagen von Krankheiten vorgeschlagen, genauso wie weitere Targets für die Genimpfung.

[0075] Für Transfektions-Komplexe der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, dass sie verschiedene unterschiedliche Zelltypen, darunter Endothel- und Epithelzellen, sowie Tumorzellen, transfizieren. Die Transfektion von allen getesteten Zelltypen, darunter Zelltypen, die besonders resistent gegenüber Transfektion mit den meisten Plasmid-Transfektions-Vektoren sind, wie zum Beispiel Neuroblastoma-Zellen, primäre glatte Muskelzellen, kardiale Myozyten und hämatopoietische Zellen, wurde mit hoher Effizienz unter Verwendung von Transfektions-Komplexen der vorliegenden Erfindung erzielt. Dies ermöglicht die wirksame Gentherapie, Genimpfung und Antisense-Therapie ohne die vorherigen Einschränkungen wie bezüglich des Zelltyps. Zum Beispiel besitzt die Transfektion mit dem p53-Gen großes Potential für die Krebstherapie, ist jedoch zur Zeit durch die Auswahl an Zelltypen, in denen effektive Transfektion erreicht werden kann, beschränkt.

[0076] Die effektive Transfektion von Neuroblastomzellen zeigt, dass die Komplexe der Erfindung als Impfstoff oder zur Therapie von Neuroblastom, einer bedeutenden malignen Erkrankung bei Kindern, verwendet werden können. Die effektive Transfektion von primären glatten Muskelzellen und kardialen Myozyten, die besonders resistent gegenüber Plasmid-vermittelter Transfektion sind, zeigt, dass Krankheiten und andere pathologische Zustände, die Muskeln und das kardiovaskuläre System betreffen, nun mit der Gentherapie behandelt werden können. Eine dieser Zustände ist Restenose. Nach Ballonangioplastie bilden sich Plaques in 30–50% der Fälle zurück. Ein Gen, das die Proliferation von Zellen in Blutgefäßwänden verhindert, kann unter Verwendung eines Komplexes der vorliegenden Erfindung eingeführt werden, um Restenose zu vermindern.

[0077] Hämatopoietische Zellen sind ein weiterer Zelltyp, der besonders resistent gegenüber Plasmid-vermittelter Transfektion ist. Die Effektivität der Transfektion mittels eines Komplexes der vorliegenden Erfindung, die 60% überschreiten kann, ermöglicht nun Gentherapie, Genimpfung und Antisense-Therapie von Krankheiten, die hämatopoietische Zellen betreffen, einschließlich Leukämie, und Fehlsteuerungen von Knochenmarks-Stammzellen. Zum Beispiel kann die Transfektion eines Cytokingens für die adjuvante Immuntherapie eingesetzt werden.

[0078] Es konnte gezeigt werden, dass Komplexe der vorliegenden Erfindung wirksame Vektoren für den intrazellulären Transport und die intrazelluläre Bereitstellung von Antisense-Oligonukleotiden sind, was antivirale Therapie und Krebstherapie ermöglicht.

[0079] Ferner konnte gezeigt werden, dass Komplexe der vorliegenden Erfindung wirksam für den intrazellulären Transport von sehr großen DNA-Molekülen, wie zum Beispiel DNA mit einer Größe von mehr als 125 kb, sind, was mit herkömmlichen Vektoren besonders schwierig ist. Dies ermöglicht die Einführung von künstlichen Chromosomen in Zellen.

[0080] In vivo konnte Transfektion in hohen Raten gezeigt werden, was den Nutzen der Komplexe der vorliegenden Erfindung für die Gentherapie, Antisense-Therapie und Genimpfung bestätigt. Die Transfektion der Atemwege, wie zum Beispiel des bronchialen Epithels, zeigt den Nutzen für die Gentherapie von zum Beispiel cystischer Fibrose und Asthma. Transfektion des cornealen Endothels zeigt den Nutzen für die Behandlung von Augenerkrankungen, die die Cornea oder corneale Organtransplantate in Mitleidenschaft ziehen, wie zum Beispiel beim Glaukom.

[0081] Die hohen Transfektionsraten machen den Komplex der Erfindung besonders geeignet für die Herstellung von Wirtszellen, die in der Lage sind, ein gewünschtes Protein herzustellen, den sogenannten „Zellfabriken“. Für die Herstellung über einen langen Zeitraum ist es wünschenswert, dass die eingeführte Nukleinsäure in das Genom der Wirtszelle integriert oder auf andere Weise stabil darin behalten wird. Dies kann ohne weiteres festgestellt werden. Wie oben angeführt ist die Bandbreite von Proteinen, die auf diese Weise hergestellt werden, groß, darunter Enzyme für den wissenschaftlichen oder industriellen Einsatz, Proteine für die Verwen-

dung in der Gentherapie und Prophylaxe, Immunogene für die Verwendung in Impfstoffen und Antigene für die Verwendung in der Diagnostik.

[0082] Die vorliegende Erfindung sieht einen nicht-viralen Vektor vor, der zu hocheffizienter Transfektion in der Lage ist. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der Vektor vier modulare Elemente; ein Oligolysin, insbesondere $[K]_{16}$, DNA- oder RNA-bindendes Element; ein Integrin-bindendes Peptid mit hoher Affinität, wie zum Beispiel ein hierin beschriebenes Peptid, eine DNA- oder RNA-Sequenz, wahlweise in einem Plasmid, und wahlweise unter Kontrolle eines viralen Promoters und eines Enhancer-Elements; das kationische Liposom DOTMA/DOPE (Lipofectin). Die Kombination von Oligolysin-Peptid/DNA- oder RNA-Komplex mit der kationischen Liposom-Formulierung DOTMA/DOPE stellt eine potente Kombination dar. Alternativ kann eine DOPE/DOSPA-Formulierung anstelle von oder zusätzlich zu einer DOTMA/DOPE-Formulierung verwendet werden. Es konnte die Optimierung der Variablen, die mit der Komplex-Bildung in Zusammenhang stehen, und das Verfahren der Transfektion durch LID-Komplexe gezeigt werden. Zusätzlich dazu wurde Atomkraft-Mikroskopie durchgeführt, um die Struktur der Komplexe aufzudecken.

[0083] Die wichtigsten Variablen bei der Bildung von optimalen LID-Transfektions-Komplexen scheint das Verhältnis der drei Komponenten und die Reihenfolge ihrer Mischung zu sein. Die gleiche Zusammensetzung scheint optimal für alle getesteten Zelllinien zu sein.

[0084] Der Funktionsmechanismus des Komplexes der vorliegenden Erfindung, der Grund für die unerwartet hohen Transfektionsraten und die überraschend große Vielfalt an Zellen, die mit hoher Effizienz transfiziert werden können, sind bisher noch nicht verstanden.

[0085] Allerdings weisen die folgenden Beobachtungen, die als ein Ergebnis der vorliegenden Erfindung gemacht wurden, darauf hin, dass es die Rolle der Lipid-Komponente ist, die Effizienz der Transfektion, die durch Oligolysin-Peptid/DNA- oder RNA-Komplexe vermittelt wird, zu erhöhen:

[0086] Die Transfektionsrate ist mit LID (Lipofectin/ $[K]_{16}$ -Peptid/Plasmid)-Komplexen drei- bis sechsfach höher als die mit LKD (Lipofectin/ $[K]_{16}$ /Plasmid)-Komplexen, die mit den gleichen Ladungsverhältnissen hergestellt wurden, oder mit LD (Lipofectin/Plasmid)-Komplexen. Dies deutet darauf hin, dass der Integrin-steuernde Teil, d. h. das Peptid, ein bedeutender Faktor bei der Transfektions-Effizienz dieser Komplexe ist.

[0087] Optimierte LID-Transfektions-Komplexe enthalten nur ein Siebtel des Gehalts an Lipofectin, der für die optimale Transfektion mit LD-Komplexen benötigt wird. Transfektionen mit LD-Komplexen mit niedrigem Lipofectin-Gehalt, die das gleiche Verhältnis von Lipofectin zu $[K]_{16}$ -Peptid/Plasmid wie in optimalen LID-Komplexen, jedoch kein $[K]_{16}$ -Peptid enthielten, waren überhaupt nicht in der Lage Zellen zu transfizieren. Dies weist darauf hin, dass die Rolle von Lipofectin in LID-Komplexen darin besteht, die Transfektion, die durch das Integrin-Rezeptor-bindende Peptid vermittelt wird, zu erhöhen.

[0088] Ferner konnten wir zeigen, dass sowohl LID- als auch ID-Komplexe sphärische Teilchen mit ähnlichen Größen bilden. Optimale LD-Komplexe bildeten dagegen ein tubuläres Netzwerk mit einigen Tubuli-assoziierten Teilchen, was auf eine andere Art von zellulärem Interaktions- und Transfektions-Mechanismus als bei LID- und ID-Transfektionen hinweist.

[0089] Es ist möglich, dass die Kondensation von Plasmid-DNA oder RNA durch das Oligolysin-Element des Integrin-gerichteten Oligolysin-Peptids und die kationische Ladung der Komplexe bei Assoziation mit Lipofectin zu hohen Expressionsraten führen kann, und die Integrin-gerichtete Gruppe, d. h. das Peptid, irrelevant ist. Transfektions-Experimente mit LKD-Komplexen, die in der gleichen Reihenfolge und den gleichen Ladungsverhältnissen gemischt wurden wie die LID-Komplexe, waren wirksamer als LD- oder KD-Komplexe. Zur Beurteilung des Beitrags der relativen Bedeutung des Oligolysin-Elements und der Integrin-gerichteten Peptid-Domäne der kombinierten Integrin-bindenden Komponente/polykationischen DNA- oder RNA-bindenden Komponente I wurden Transfektionen mittels LID-Komplexen durchgeführt, die einen Bereich von Verhältnissen von $[K]_{16}$ und $[K]_{16}$ -Integrin-gerichtetem Peptid 6, $[K]_{16}$ -GACRRETAWACG [SEQ ID NO: 18] enthielten. Die Transfektions-Expressions-Daten weisen auf höhere Effizienz mit Komplexen hin, in denen steigende Mengen von $[K]_{16}$ -Peptid 6 $[K]_{16}$ ersetzen, und auf eine Dosis-Abhängigkeit von der Menge der Integrin-gerichteten (Liganden-bindenden) Domäne, d. h. Peptid 6.

[0090] Das Verhältnis der Komponenten, die zusammengemischt den optimalen Transfektions-Komplex bilden, ist auch informativ hinsichtlich des möglichen Mechanismus von Lipofectin-vermittelter Erhöhung der Transfektion. Das DOTMA-Element von Lipofectin ist kationisch, was die Aktivität des Komplexes erhöhen

kann, während DOPE die Fähigkeit aufweisen kann, die endosomale Membran zu destabilisieren (Farhood et al., 1995), was die endosomale Freisetzung von Plasmid-DNA oder RNA erhöht. Die Komponenten der LID-Komplexe werden in gleichbleibenden optimalen Verhältnissen zusammengemischt. Es ist anzunehmen, dass die gebildeten Teilchen ebenfalls diese Elemente in den gleichen Verhältnissen enthalten. Daher sind 3 nmol negativer Ladung von Plasmid-DNA oder RNA mit etwa 21 nmol positiver Ladung vom $[K]_{16}$ -Peptid assoziiert. Lipofectin stellt dagegen nur weitere 0,25 nmol positiver Ladung zur Verfügung. Dies deutet darauf hin, dass entgegen der Erwartungen, der erhöhende Einfluss von Lipofectin in LID-Komplexen nicht auf die Ladung zurückzuführen ist, sondern mit dem membrandestabilisierenden Effekt der DOPE-Komponente in Verbindung steht.

[0091] Obwohl nicht auf die folgende Theorie für den Funktionsmechanismus beschränkt, wird das folgende Modell der frühen Phasen des Transfektions-Prozesses, das auf den hierin beschriebenen Beobachtungen basiert, vorgeschlagen, um die überraschende und unerwartet hohe Effizienz der Transfektions durch LID-Komplexe, deren hohe Effizienz in allen untersuchten Zelltypen gefunden wird, zu erklären.

[0092] Die Komplexe werden elektrostatisch durch zufällige Assoziation von Lipofectin, Oligolysin-Peptid und Plasmid-DNA oder RNA gebildet. Der relativ hohe Anteil an Oligolysin-Peptid gewährleistet einen hohen Anteil an Integrin-gerichteten Liganden pro Plasmid-Molekül. Teilchen werden gebildet, die ein oder mehrere Plasmide, assoziiert mit tausenden Oligolysin-Peptiden, und daher eine sehr hohe Konzentration an Integrin-gerichteten Liganden enthalten. Durch das Mischen von Lipofectin mit dem Oligolysin-Peptid, und anschließender Zugabe von Plasmid-DNA oder RNA, werden Komplexe gebildet, die alle drei Komponenten enthalten. Die Teilchen weisen aufgrund der hohen Dichte an Liganden eine hohe Affinität zu Integrinen auf Zelloberflächen auf, und werden durch einen phagozytischen Prozess gebunden und aufgenommen (Hart et al., 1994). Die Vesikel fusionieren unter Bildung von Endosomen, wobei das in den Teilchen enthaltene DOPE-Element unter sauren Bedingungen die Destabilisierung der endosomalen Membran und die anschließende Freisetzung in das Cytoplasma vermittelt. Phagozytierte Teilchen, die kein Lipofectin aufweisen, werden in den Endosomen abgebaut. Teilchen, die keine Integrin-gerichtete Gruppe aufweisen, werden weniger effizient an Zellen gebunden und von diesen aufgenommen. Sowohl Lipofectin als auch das Oligolysin ($[K]_{16}$)-Element der Oligolysin-Peptide tragen wahrscheinlich zur allgemeinen Effizienz der LID-Komplexe bei, jedoch scheint das Integrin-Zielsteuerungs-Vermögen der Oligolysin/Peptid-Komponente wichtig für die optimale Zielsteuerung und Aufnahme der Komplexe zu sein.

[0093] Die folgenden, nicht einschränkenden Beispiele verdeutlichen die vorliegende Erfindung. Die Beispiele beziehen sich auf die begleitenden Zeichnungen, in denen:

[0094] [Fig. 1](#) den Einfluss von verschiedenen Mengen von Lipofectin (DOTMA:DOPE) auf die Erhöhung der Transfektion von ECV304-Zellen unter Verwendung eines Komplexes, der aus Lipofectin, Oligolysin-Peptid 1 ($[K]_{16}$ GACRGDMFGCA [SEQ ID NO: 19]) und dem Plasmid pGL2 besteht, zeigt.

[0095] [Fig. 2](#) den Einfluss von verschiedenen Mengen von Lipofectin auf die Erhöhung der Transfektion von A375M, COS-7 und ECV-40-Zellen unter Verwendung eines Komplexes, der aus Lipofectin, Oligolysin-Peptid 1 ($[K]_{16}$ GACRGDMFGCA) und dem Plasmid pGL2 besteht, zeigt.

[0096] [Fig. 3](#) den Einfluss der Mischungs-Reihenfolge der Komponenten eines Komplexes, der aus Lipofectin (L), Oligolysin-Peptid 1 ($[K]_{16}$ GACRGDMFGCA) (I) und dem Plasmid pGL2 (D) besteht, auf die Erhöhung der Transfektion von ECV40-Zellen zeigt.

[0097] [Fig. 4](#) einen Vergleich der Erhöhung der Transfektion durch Lipofectin von Komplexen, die das Plasmid pGL2 und Oligolysin-Peptid 1 ($[K]_{16}$ GACRGDMFGCA, pep 1) oder Oligolysin-Peptid 5 ($[K]_{16}$ GACDCRGDCFCA) [SEQ ID NO: 20, pep 5] oder Oligolysin-Peptid 6 ($[K]_{16}$ GACRRETAWACG [SEQ ID NO: 21], pep 6) oder $[K]_{16}$ (K16) mit Lipofectin (lip) und ohne Lipofectin enthalten, und einem Komplex, der das Plasmid pGL2 mit Lipofectin: $[K]_{16}$ -Lysin-Peptid 1 in einem Gewichtsverhältnis von 4:1 (Lipo 4 to 1) enthält, zeigt.

[0098] [Fig. 5](#) die Dosis-Abhängigkeit eines Komplexes, der Lipofectin, Oligolysin-Peptid 6 ($[K]_{16}$ GACRRETAWACG) und das Plasmid pGL2 enthält, von der Verfügbarkeit von Integrin-bindenden Liganden zeigt.

[0099] [Fig. 6](#) die Struktur verschiedener Komplexe, wie durch Atomkraft-Mikroskopie ermittelt, zeigt, wobei die Komplexe mit folgenden unterschiedlichen Kombinationen von Plasmid-DNA (Plasmid pGL2), Oligoly-

sin-Peptid ($[K]_{16}$ -Peptid 6) und Lipofectin gebildet wurden: A: $[K]_{16}$ -Peptid 6 und Plasmid pGL2; B: $[K]_{16}$ -Peptid 6, Lipofectin und Plasmid pGL2; C: Lipofectin und Plasmid pGL2, optimales Verhältnis; D: Lipofectin und Plasmid pGL2, suboptimales Verhältnis.

[0100] [Fig. 7](#) die Expressions-Level von IL-12 48 Stunden nach der Transfektion von COS-7-Zellen und den Neuroblastom-Zelllinien IMR-32, KELLY und SHSY-5Y mit einem Komplex, enthaltend Lipofectin, Oligolysin-Peptid 6 ($[K]_{16}$ GACRRETAWACG) und entweder zwei retrovirale Plasmid-Konstrukte, die für die zwei Domänen von IL-12 kodieren (MFGS-IL12), oder ein Plasmid, das ein Fusionsgen, Flexi-12, unter einem CMV-Promotor enthält, zeigt.

[0101] [Fig. 8](#) den Einfluss der Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden (AS) gegen den Thrombin-Rezeptor (PAR-1) auf die durch Thrombin induzierte Proliferation von humanen fötalen Lungen-Fibroblasten (HFL-1-Zellen), zeigt.

[0102] [Fig. 9](#) den Effekt der Transfektion der hämatopoietischen Zelllinien HL60, PLB985, TF1 und U937 mit LID-Komplexen, die Lipofectin, das Reporteren pEGFP-N1 und entweder $[K]_{16}$ -Peptid 6 (pep 6) oder $[K]_{16}$ -Peptid 8 (GGCRGDMFGCA [SEQ ID NO: 8], pep 8) enthalten, im Vergleich mit unbehandelten Zellen zeigt. Der prozentuale Anteil an GFP-positiven Zellen wurde mittels eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierers bestimmt.

BEISPIELE

MATERIALIEN & METHODEN

Zelllinien

[0103] Die Zelllinie COS-7 (Nieren-Epithelzellen vom Affen) wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Life Technologies, Paisley, Großbritannien), das mit 10% fötalem Kälberserum (foetal calf serum, FCS), L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin supplementiert wurde, kultiviert. ECV304 (spontan transformierte humane Nabelvenen-Endothelzellen) wurden in 199-Medium (Life Technologies, Paisley, Großbritannien) gezüchtet. HT1080 Fibrosarkom-Zellen und A375M-Melanomzellen wurden in DMEM und 10% FCS kultiviert. IMR2-Neuroblastomzellen wurden in DMEM F12 Nutrient Mix (Life Technologies) gezüchtet. Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 -Gehalt in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre gezüchtet.

Peptid-Synthese

[0104] Die Sequenz von Peptid 6, GACRRETAWACG basiert auf einem $\alpha 5\beta 1$ -spezifischen Peptid aus einer Phagen-Bank (Koivunen et al., 1995). Das Oligolysin-Peptid $[K]_{16}$ GACRRETAWACG wurde wie folgt synthetisiert:

Geschützte Aminosäuren und vorbeladene Gly-Wang-Harze wurden von Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Großbritannien) erhalten. Lösungsmittel und HBTU [2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat] wurden von Perkin-Elmer Applied Biosystems, Großbritannien, erhalten. Das Peptid wurde mit einem Model 431A updated Applied Biosystems Solid Phase Synthesiser auf 0,1 mmol vorbeladenen Gly-Wang-Harzen (Calbiochem-Novabiochem, Nottingham, Großbritannien) unter Verwendung von „Basic Feedback Monitoring Cycles“ und HBTU als Kopplungsreagenz synthetisiert. 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl wurde für den temporären Schutz von α -Aminogruppen verwendet. Schutzgruppen für Seitenketten waren tert-Butyloxycarbonyl für Lys und Trp, Trityl für Cys, 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl für Arg, tert-Butylester für Glu und tert-Butylether für Thr. Die Spaltung vom Harz und die Entfernung der Schutzgruppen vom Peptid wurde durch Behandlung des Peptidyl-Harzes mit 10 ml einer Mischung, die 10 ml Trifluoressigsäure, 0,25 ml Ethandithiol, 0,25 ml Triisopropylsilan enthielt, bei 20°C für zwei Stunden erreicht. Das Peptid wurde mittels eiskaltem Diethylether präzipitiert, und anschließend durch einen feinen gesinterten Glassfiltertrichter unter leicht vermindertem Druck filtriert. Das Peptid-Präzipitat wurde in 10% Essigsäure/Wasser-Lösung gelöst und gefriergetrocknet. Das Rohpeptid wurde durch Umkehrphasen-HPLC und Matrix-gestützte Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektroskopie analysiert. Die Reinheit des Rohpeptids betrug bei der Umkehrphasen-HPLC etwa 70%, und die Massen-Analyse mittels eines Finnegan LazerMat ergab ein Molekulargewicht von 3331,5 für das MH^+ -Ion, was in ausgezeichneter Übereinstimmung mit dem berechneten Gewicht für das MH^+ -Ion von 3331,46 war.

[0105] Oligolysin-Peptid 1: $[K]_{16}$ GACRGDMFGCA und Oligolysin-Peptid 5: $[K]_{16}$ GACDCRGDCFCA wurden

von Zinsser Analytic (Maidenhead, Großbritannien) erhalten.

Plasmid-DNA

[0106] Die Plasmide pGL2, das ein Luciferase-Reportergen enthält (Promega, Madison, WI, USA) und pCMV β , das ein β -Galactosidase-Reportergen enthält (Clontech, Palo Alto, Kalifornien, USA), wurden in *Escherichia coli* DH5 α gezüchtet und nach alkalischer Lyse der Bakterien über Qiagen-Harzsäulen (Qiagen Ltd., Crawley, Großbritannien) nach den Angaben des Herstellers gereinigt. Die mit Isopropanol präzipitierten DNA-Pellets wurden mit 70% Ethanol gewaschen und danach in Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 1 mM EDTA) gelöst.

[0107] Spektrophotometrische Messungen der Plasmid-Lösungen dienten dazu, die Konzentration (A_{260}) und Reinheit (Verhältnis A_{260}/A_{280}) der Plasmide zu berechnen. Die Plasmid-Lösungen wurden auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und bei 4°C gelagert.

Bildung von Transfektions-Komplexen

[0108] Die Zellen wurden in 24-Well-Schalen zu 5×10^4 Zellen pro Well ausgesät und anschließend über Nacht bei 37°C in komplettem Wachstumsmedium inkubiert. Am folgenden Tag wurden Transfektions-Komplexe aus den folgenden Stammlösungen, die alle in OptiMEM (Life Technologies, Paisley, Großbritannien) hergestellt wurden, hergestellt: Lipofectin (eine äquimolare Mischung des kationischen Lipids N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) und des neutralen Lipids Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE), das als „Lipofectin“ von Life Technologies, Paisley, Großbritannien, erhalten wurde, 1 mg/ml), pGL2-Kontrolle (1 mg/100 ml) und $[K]_{16}$ -/Integrin-gerichtetes Peptid 1, 5 oder 6 (0,1 mg/ml).

[0109] Die Komplexe wurden üblicherweise mit drei Komponenten hergestellt: Oligolysin-Peptid (I), Plasmid-DNA oder RNA (D) und Lipofectin (L), durch Zusammenmischen der verschiedenen Komponenten mit einer automatischen Pipette. Die Mischung LID wurde auf gleiche Weise mit dem optimalen Gewichtsverhältnis 0,75:4:1 (L:I:D) hergestellt. Beide Arten von Mischungen wurden für wenigstens 30 Minuten aggregieren gelassen und danach auf eine Konzentration von 1 μ g DNA pro 0,5 ml mit OptiMEM verdünnt. Das Wachstumsmedium wurde aus jedem Well entfernt und anschließend 0,5 ml des Transfektions-Komplexes zugegeben. Die Schale wurde danach für vier bis sechs Stunden in den Brutschrank zurück gestellt. Im Anschluss wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch 1 ml komplettes Wachstumsmedium ersetzt. Die transfizierten Zellen wurden für 48 bis 72 Stunden inkubiert und anschließend auf Reportergen-Aktivität hin ausgewertet.

Luciferase-Assays

[0110] Die mit pGL2 transformierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, um Serum zu entfernen, danach wurden 100 μ l Reporter-Lysispuffer (Promega, Madison, WI, USA) in jedes Well gegeben und bei 40°C für 15 bis 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Abschaben mit einer gelben Mikropipettenspitze abgelöst. Danach wurden zellfreie Lysate hergestellt und mit einem Luciferase-Assay-Kit (Promega, Madison, WI, USA) nach Angaben des Herstellers untersucht. Die gesamte Lichtemission wurde für 60 Sekunden mit Hilfe eines LKB 1251 Luminometers (Labtech, Uckfield, Großbritannien) gemessen. Die Protein-Konzentration jeder Probe wurde im Anschluss mit Protein Assay Reagent (BioRad, Hercules, CA, USA) bestimmt, und die Aktivität des Luciferase-Enzyms als relative Lichteinheiten (relative light units) pro Milligram Protein (RLU/mg) ausgedrückt.

LacZ-Assays

[0111] Die β -Galactosidase-Aktivität wurde durch Färbung mit X-gal detektiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen durch Zugabe von 0,5% Glutaraldehyd in PBS für 20 Minuten bei 40°C auf den Plastikschenlen fixiert. Die Wells wurden mit PBS gewaschen und die Zellen mit X-gal bei 37°C für bis zu sechs Stunden gefärbt.

Atomkraft-Mikroskopie (Atomic Forces Microscopy, AFM)

[0112] Die Analyse von Transfektions-Komplexen mit Atomkraft-Mikroskopie wurde wie kürzlich beschrieben (Wolpert & Seymour, 1996) mittels eines AFM-2, Teil des NanoScope II (Digital Instruments, Santa Barbara, USA), durchgeführt. Die Transfektions-Komplexe von $[K]_{16}$ -Peptid 6/pGL2, mit und ohne Lipofectin, wurden wie oben beschrieben hergestellt, mit der Ausnahme, dass Wasser anstelle von OptiMEM zur Verdünnung für alle

Komponenten verwendet wurde.

Beispiel 1: Einfluss von verschiedenen Mengen von Lipofectin (DOTMA/DOPE) auf die Transfektion

[0113] Die Transfektions-Komplexe wurden wie oben in dem Materialien & Methoden-Teil beschrieben hergestellt. Die Komplexe wurden durch Mischen von Lösungen von Oligolysin-Peptid 1 ($[K]_{16}$ GACRGDMFGCA) zu 0,1 mg/ml in OptiMEM Gewebekulturmedium mit niedrigem Serumgehalt mit einer Lösung von Lipofectin (DOTMA/DOPE kationisches Liposom, wie oben) in einer Konzentrationsreihe von 1 bis 10 μ g/100 μ l in Opti-MEM hergestellt. Schließlich wurde die geeignete Menge der pGL2 Kontrollplasmid-DNA (0,1 mg/ml) zugegeben und durch wiederholtes Pipettieren gemischt. Das Mischungsverhältnis jeder Komponente war eine konstante Menge des Oligolysin-Peptids von 4 μ g pro μ g DNA, während der Anteil an Lipofectin von 1 bis 10 μ g pro μ g DNA variierte. ECV304-Zellen wurden mit den Komplexen wie oben beschrieben transfiziert, für 48 Stunden inkubiert und anschließend auf Luciferase-Expression hin wie oben beschrieben untersucht. Die Ergebnisse sind in [Fig. 1](#) gezeigt.

[0114] Komplexe, die mit 1 μ g Lipofectin und 4 μ g Oligolysin-Peptid pro Mikrogramm Plasmid gebildet wurden, waren fast 100mal aktiver als Komplexe ohne Lipofectin. Die Zugabe größerer Mengen von Lipofectin senkte die Transfektions-Aktivität auf eine von der Lipofectin-Dosis abhängigen Weise.

[0115] Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem $[K]_{16}$ -Peptid 6 erhalten.

Beispiel 2: Einfluss von verschiedenen Mengen von Lipofectin auf die Transformation in drei verschiedenen Zelllinien.

[0116] Im Anschluss wurden Experimente durchgeführt, um die optimalen Mengen an Lipofectin in LID-Transfektions-Komplexen mit Hilfe der drei verschiedenen Zelllinien A375M (Melanomzellen), COS-7 (Nieren-Epithelzellen vom Affen) und ECV304 (humane Nabelschnur-Endothelzellen) zu verfeinern.

[0117] Die Transfektions-Komplexe wurden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt, jedoch wurde ein engerer Bereich an Lipofectin-Menge verwendet. Lipofectin/Oligolysin-Peptid/DNA-Komplexe wurden mit gleichbleibenden Mengen von $[K]_{16}$ -Peptid 1 ($[K]_{16}$ GACRGDMFGCA) (4 μ g) und pGL2 (1 μ g) Plasmid-DNA und einem Bereich an Lipofectin-Menge (1 bis 2,5 μ g) hergestellt. Die Komplexe wurden verwendet, um A375M-, COS-7- und ECV304-Zellen zu transfizieren, die dann zwei Tage später für die Analyse der Luciferase-Expression geerntet wurden.

[0118] Die Ergebnisse sind in [Fig. 2](#) gezeigt. In jedem Fall erreichte das optimale Transfektions-Verhältnis bei 0,75 μ g Lipofectin pro Mikrogramm Plasmid-DNA einen Höhepunkt. Diese Kombination der Komponenten-Mengen wurde in allen folgenden Beispielen beibehalten.

[0119] Ein Mischungsverhältnis L:I:D von 0,75:4:1, bezogen auf das Gewicht, entspricht einem molaren Verhältnis von 0,5 nmol Lipofectin zu 1,25 nmol Oligolysin-Peptid 1 zu 0,25 pmol pGL2-Kontrolle. Die molare Ladung jeder Komponente beträgt 0,5 Mol positive Ladung pro mol Lipofectin, siebzehn Mol positive Ladung pro Mol $[K]_{16}$ -Peptid 1 und 12.000 Mol negative Ladung pro Mol pGL2 (6 kb). Daher werden im optimalen Transfektions-Komplex 3 nmol negativer Ladung vom Plasmid mit 21 nmol positiver Ladung vom Oligolysin-Peptid 1 und 0,25 nmol positiver Ladung von Lipofectin gemischt. Somit wird das Ladungsverhältnis von etwa 7:1 von positiven zu negativen Ladungen in ID-Komplexen durch die Einführung von 0,25 nmol positiver Ladung von Lipofectin in hocheffiziente LID-Transfektions-Komplexe nur geringfügig verändert. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Erhöhung der Transfektionseffizienz von LID-Komplexen nicht mit der Ladung in Verbindung steht.

Beispiel 3: Einfluss der Reihenfolge, in der die Komponenten des Komplexes gemischt werden.

[0120] Um das Verfahren zur Herstellung von optimalen LID-Transfektions-Komplexen ermitteln zu können, wurden Transfektionen mit Komplexen durchgeführt, die durch Zugabe der Komponenten in unterschiedlichen Reihenfolgen hergestellt wurden. Sämtliche Kombinationen wurden mit den gleichen Mengen und Konzentrationen der Komponenten (1 μ g pGL2 Plasmid-DNA, 0,75 μ g Lipofectin und 4 μ g Oligolysin-Peptid 1 ($[K]_{16}$ GACRGDMFGCA)) hergestellt. Die Transfektionen wurden in ECV304-Zellen durchgeführt und die Luciferase-Aktivität wurde wie oben beschrieben untersucht.

[0121] Die Ergebnisse sind in [Fig. 3](#) gezeigt, in der D für den Plasmid-Vektor pGL2, I für das $[K]_{16}$ -Peptid 1

und L für Lipofectin steht. Die Expressionsdaten weisen darauf hin, dass die Mischungsreihenfolge LID optimal war. Es ist deutlich zu erkennen, dass Kombinationen, in denen Lipofectin die letzte zugegebene Komponente war, am wenigsten effizient waren. Die Mischungsreihenfolge LID wurde in allen folgenden Transfektions-Experimenten angewandt.

Beispiel 4: Transfektionsraten

[0122] Die Zellen wurden wie in den Beispielen 1 und 2 beschrieben mit optimierten Oligolysin-Peptid/Lipofectin/pCMV β -Komplexen, die in der Mischungsreihenfolge LID hergestellt wurden, jedoch unter Verwendung von pCMV β als Plasmid-Vektor (Komponente D) anstelle von pGL2, transfiziert. Die Zellen wurden auf β -Galactosidase-Aktivität hin, wie oben beschrieben, mit X-gal gefärbt. Eine Reihe von Zelltypen, A375M, COS-7 und ECV304 zeigten Transfektionsraten von 50 bis 100%, verglichen mit 1 bis 10%, die mit Oligolysin-Peptid/DNA-Komplexen alleine erreicht wurden. Dies spiegelt eine deutlich signifikante Erhöhung der Transfektions-Effizienz wider.

Beispiel 5: Vergleich der Erhöhung mit Lipofectin und mit verschiedenen Oligolysin-Peptiden

[0123] Um den Einfluss von verschiedenen Integrin-gerichteten Oligolysin-Peptiden zu vergleichen, wurden Duplikate der Komplexe mit pGL2 und einem der folgenden gebildet: Oligolysin-Peptid 1 ($[K]_{16}$ GACRGDMFGCA, pep 1), Oligolysin-Peptid 5 ($[K]_{16}$ GACDCRGDCFCA, pep 5), Oligolysin-Peptid 6 ($[K]_{16}$ GACRRETAWCAG, pep 6) und $[K]_{16}$. Ein Satz von Komplexen enthielt auch Lipofectin (lip), der andere enthielt kein Lipofectin. Ein Kontroll-Komplex wurde hergestellt, der das Plasmid pGL2 mit Lipofectin und dem $[K]_{16}$ -Lysin-Peptid 1 in einem Gewichtsverhältnis von 4:1 enthielt.

[0124] Jeder Komplex wurde verwendet, um Zelllinien zu transfizieren und die Luciferase-Expression wurde bestimmt. Die Komplexe wurden mit (lip) und ohne Lipofectin hergestellt. Ein optimierter Komplex wurde zu Vergleichszwecken hergestellt. Alle Oligolysin-Peptide wurden mit Lipofectin und Plasmid-DNA (KLD) in den gleichen optimierten Ladungsverhältnissen und der gleichen Mischungsreihenfolge gemischt.

[0125] Die Ergebnisse sind in [Fig. 4](#) gezeigt. Obwohl KLD-Komplexe für gewöhnlich bessere Transfektions-Reagenzien waren als KD- oder LD-Komplexe, generierten LID-Komplexe drei- bis sechsmal höhere Luciferase-Expressions-Level als KLD-Komplexe. Die Expressions-Level von LID-Komplexen, die das Oligolysin-Peptid 5 enthielten, waren zweimal niedriger als von denen, die das Oligolysin-Peptid 1 oder das Oligolysin-Peptid 6 enthielten, was möglicherweise die sich unterscheidenden Affinitäten der Peptide zu den Integrin-Rezeptoren widerspiegelt. Die Erhöhung der Transfektion der LID-Komplexe wurde mit allen getesteten Peptiden beobachtet, wobei zwei davon (Peptide 1 und 5) die konservierte RGD-Sequenz enthalten, und einer davon (Peptid 6) nicht.

Beispiel 6: Spezifität

[0126] Um die Integrin-Spezifität zu zeigen, wurden LID-Komplexe mit gleichbleibenden Mengen des Kontrollplasmids pGL2 und Lipofectin, sowie einer Reihe von Kombinationen von $[K]_{16}$ -Peptid 6 und $[K]_{16}$ hergestellt. Eine Gesamtmenge von 40 μ g $[K]_{16}$ -Peptid wurde verwendet, bestehend aus 1, 5, 10, 20, 35, 39 μ g $[K]_{16}$ -Peptid 6, und der Differenz zu 40 μ g aus $[K]_{16}$.

[0127] Die Transfektionen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben, und die Luciferase-Assays nach 48 Stunden durchgeführt. Die Ergebnisse sind in [Fig. 5](#) gezeigt. Die Transfektions-Effizienz zeigte eine offensichtlich exponentielle Erhöhung mit steigenden Mengen an Oligolysin-Peptid 6, und daher eine Dosis-abhängige Antwort auf die Menge an verfügbaren Integrin-bindenden Liganden. Dementsprechend ist die höchste Transfektions-Effizienz, während sowohl die sechzehn Lysinreste enthaltende Domäne als auch die Lipofectin-Komponente selbst, sowohl einzeln als auch in $[K]_{16}$ /Lipofectin-Kombinations-Komplexen in der Lage sind, Transfektion zu vermitteln, direkt proportional zu der Menge an verfügbaren Integrin-bindenden Liganden.

Beispiel 7: Atomkraft-Mikroskopie

[0128] Atomkraft-Mikroskopie-Experimente wurden durchgeführt, um die Strukturen, die durch Mischen von 4 μ g $[K]_{16}$ -Peptid 6 und 1 μ g pGL2 Kontrollplasmid-DNA gebildet wurden (ID-Komplexe), zu bestimmen und zu vergleichen. LID-Komplexe wurden aus $[K]_{16}$ -Peptid 6 (4 μ g)/Lipofectin (0,75 μ g)/DNA (1 μ g) in der Reihenfolge LID, von der gezeigt werden konnte, dass sie zu optimalen Transfektions-Ergebnissen führt, gebildet. Lipofectin/DNA-Komplexe (LD) wurden in zwei unterschiedlichen Verhältnissen gebildet; einem optimalen Transfektions-

ons-Verhältnis von 5 µg Lipofectin pro Mikrogramm pGL2, und dem gleichen Verhältnis, das in LID-Komplexen verwendet wurde, nämlich 0,75 µg Lipofectin pro Mikrogramm Plasmid.

[0129] Die Ergebnisse sind in [Fig. 6](#) gezeigt. ID-Komplexe, die sich aus Oligolysin-Peptid 6 und Plasmid-DNA zusammensetzten, wurden zunächst mittels AFM innerhalb von fünfzehn Minuten nach dem Mischen der beiden Komponenten untersucht. Die Komplexe bildeten Teilchen geringerer Polydispersität, die auf den Mica-Deckgläschchen einen Durchmesser von etwa 200 nm aufwiesen. Eine Computer-generierte Konturzeichnung enthüllte, dass die ausgebildeten Teilchen von unregelmäßiger konischer Form waren. Mittels AFM wurde ermittelt, dass die LID-Komplexe Teilchen von einer ähnlichen Größe und Form bildeten wie ID-Komplexe. Das zusätzliche Lipofectin führte augenscheinlich nicht zur Zerstörung der Teilchen. Die LD-Komplexe, die in dem 5:1-Verhältnis gebildet wurden, traten dagegen als ein Netzwerk von Röhren auf, wobei mit diesen Röhren gelegentlich Teilchen assoziiert waren. Allerdings kamen LD-Komplexe, die in dem niedrigeren Verhältnis (0,75:1) gebildet wurden, als kurze tubuläre Strukturen zum Vorschein. Die LD-Komplexe, die in diesem niedrigeren Verhältnis gebildet wurden, waren in den Transfektions-Experimenten unwirksam. Die LID-Komplexe, die wie oben gebildet wurden, wurden auch mittels AFM analysiert, nachdem sie über Nacht stehen gelassen wurden. Die Teilchen wiesen nun eine geringere Größe mit Durchmessern von etwa 50–100 nm auf, was darauf hinweist, dass sich die Teilchen verdichtet hatten. Computer-generierte Konturzeichnungen stellten diese Teilchen als gleichmäßige konische Struktur dar. Diese Kegel wurden vermessen und ihre Volumina berechnet. Die sphärische Form, deren Bildung für diese Teilchen in freier Lösung vorausgesagt wurde, wurde anschließend als Durchmesser von 20 bis 60 nm aufweisend berechnet. In Transfektions-Experimenten mit pGL2 lieferten die kompakten Teilchen, die sich über Nacht in Wasser ausbildeten, Luciferase-Expressions-Ergebnisse, die etwa zweimal so hoch waren als mit den frisch hergestellten Komplexen.

Beispiel 8: Transfektion von Neuroblastom-Zellen

[0130] Die Transfektion von drei unterschiedlichen humanen Neuroblastom-Zelllinien, SHSY-5Y, KELLY und IMR-32, und einer Neuroblastom-Zelllinie aus der Maus, Nb2A, wurde mittels eines LID-Komplexes optimiert, der das $[K]_{16}$ -Peptid 6, Lipofectin und entweder Luciferase oder GFP als Reporter gen, wie oben in dem Materialien- und Methodenteil und in den Beispielen beschrieben, enthielt.

[0131] Die drei humanen Neuroblastom-Zelllinien und COS-7-Zellen wurden anschließend unter Verwendung des gleichen LID-Komplexes mit einem oder zwei IL-12 exprimierenden Vektoren anstelle des Reportergens transfiziert. Ein Vektor exprimiert ein Fusionsprotein der zwei Ketten von IL-12, p35 und p40 (Flexi-12; Anderson et al. 1997). Dieses Fusionskonstrukt wird durch einen CMV-Promotor reguliert. Das zweite IL-12-Expressionssystem besteht aus den zwei retrovirkalen Konstrukten MFGS-p35 und MFGS-p40, die retrovirale Plasmid-Konstrukte sind, die für die zwei separaten Ketten von Interleukin-12 (IL-12) kodieren. Beide Gene werden durch die retrovirkalen „Long Terminal Repeats“ (LTRs) reguliert. Die Vektoren wurden von Professor Mary Collins, UCL, London, erhalten.

[0132] Die abgesonderte IL-12 Expression wurde 48 Stunden nach der Transfektion durch ELISA verfolgt. Es wurde festgestellt, dass die transfizierten Zellen hohe Mengen des Cytokins ausschütteten (siehe [Fig. 7](#)). Das Flexi-12-Konstrukt war am effizientesten. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Transfektions-System der vorliegenden Erfindung für die Verwendung in einem Impfstoff gegen Neuroblastom, einer bedeutenden malignen Erkrankung bei Kindern, und gleichfalls für Impfstoffe gegen andere Krebsarten geeignet ist.

Beispiel 9: Transfektion von Lungen-Bronchial-Epithel in vivo

[0133] LID-Komplexe, die $[K]_{16}$ -Peptid 6 und Lipofectin in dem optimalen Verhältnis L:I:D von 0,75:4:1, gemischt in der Reihenfolge LID, umfassten, wurden, wie oben im Materialien- und Methodenteil beschrieben, hergestellt, jedoch wurde eine Lösung des Oligolysin-Peptids in Phosphat-gepufferter Saline (phosphate buffered saline, PBS) in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Die anderen Komponenten waren in Wasser gelöst, Lipofectin in einer Konzentration von 1 mg/ml und DNA, die für ein im Zellkern lokalisiertes beta-Galactosidase-Reporter gen pAB11 kodierte, in einer Konzentration von 1 mg/ml. Das Oligolysin-Peptid wurde in hohen Konzentrationen verwendet, um das Endvolumen des Komplexes zu minimieren, und PBS wurde anstelle von OptiMEM aus Gründen der biologischen Verträglichkeit verwendet.

[0134] Lewis-Ratten wurden narkotisiert und anschließend wurden 287,5 µl des Komplexes, der 37,5 µl Lipofectin, 200 µg $[K]_{16}$ -Peptid 6 in 200 µl PBS und 50 µg pAB11 in 50 µl Wasser umfasste, durch die Luftröhre in die Atemwege injiziert. Die Tiere wurden nach 24 Stunden geopfert, die Lungen entfernt, fixiert und mit X-gal gefärbt, danach seziert und untersucht. Extensive Färbung wurde im bronchialen Epithel im oberen Atemweg

beobachtet.

[0135] Dieses Ergebnis zeigt den Nutzen des Transfektions-Komplexes der vorliegenden Erfindung für die Gentherapie von Erkrankungen, die die Lungen und die Atemwege betreffen, wie zum Beispiel cystische Fibrose und Asthma.

Beispiel 10: Transfektion von cornealem Endothel in vivo

[0136] LID-Komplexe wurden, wie in Beispiel 9 für Lungen-Transfektionen beschrieben, hergestellt. Die die LID-Komplexe enthaltende Lösung wurde in die vordere Kammer des Auges von Mäusen injiziert. Das Volumen der injizierten Lösungen betrug in jedem Fall 2 μ l, so dass etwa 0,2 μ g pAB11 Plasmid-DNA verabreicht wurden. Effizienter Gentransfer in das corneale Endothel wurde durch Färbung mit X-gal gezeigt.

[0137] Die hohe Transfektionsrate zeigt den Nutzen des Transfektions-Komplexes der Erfindung für die Behandlung von Augenerkrankungen, die die Cornea betreffen, und für die corneale Transplantation.

Beispiel 11: Transfektionen von primären glatten Muskelzellen und kardialen Myozyten

[0138] Gewebekulturen von primären glatten Muskelzellen aus Ratten (aortische glatte Muskelzellen) und kardiale Myozyten wurden nach Standardverfahren hergestellt (Blank et al. 1988). Ein LID-Komplex, der Lipofectin, $[K]_{16}$ -Peptid 6 und GFP als Reporter gen umfasste, wurde im optimalen Mischungsverhältnis und in der optimalen Mischungsreihenfolge wie oben im Materialien- und Methodenteil und in den Beispielen beschrieben, hergestellt. Die Gewebekulturen wurden, wie oben im Materialien- und Methodenteil beschrieben, mit dem LID-Komplex transfiziert. Fluoreszenz-Aufnahmen von GFP-exprimierenden Zellen zeigten Transfektionsraten, die 50% überstiegen.

[0139] Primäre glatte Muskelzellen und kardiale Myozyten sind besonders resistent gegenüber Plasmid-vermittelter Transfektion mit den meisten anderen nicht-viralen Vektoren. Im Gegensatz dazu erreichte der Transfektions-Komplex der vorliegenden Erfindung Transfektionsraten, die 50% überstiegen, was den Nutzen des Komplexes für die Behandlung von Erkrankungen, die Muskeln betreffen, einschließlich glatter Muskel und Herzmuskel.

Beispiel 12: Transfektionen mit Konstrukten, die ein hohes Molekulargewicht aufweisen

[0140] Konstrukte unterschiedlicher Größen können mit dem Transfektions-Komplex der vorliegenden Erfindung transfiziert werden. Eine Fibroblasten-Kultur wurde mit einem LID-Komplex, der das $[K]_{16}$ -Peptid 6, Lipofectin und ein 130 kb großes DNA-Konstrukt umfasste, wie im Materialien- und Methodenteil beschrieben, transfiziert. Der Komplex, der die LID-Komponenten im optimalen Mischungsverhältnis und in der optimalen Mischungsreihenfolge umfasste, wurde wie oben im Materialien- und Methodenteil und in den Beispielen beschrieben, hergestellt. Transfektionen wurden mit einer Effizienz von 2–3% erreicht. Zelluläre Prozesse, die mit der erhöhten Integrin-vermittelten Internalisierung von DNA mittels eines Komplexes der vorliegenden Erfindung in Verbindung stehen, sind näher mit Phagozytose als mit Endozytose verwandt, und sind daher besonders für die Verabreichung von Komplexen geeignet, die sehr große DNA-Moleküle enthalten.

Beispiel 13: Transfektion mit Antisense-DNA

[0141] Thrombin stimuliert die Proliferation von humanen Lungen-Fibroblasten. Mit Thrombin behandelte humane Lungen-Fibroblasten (HFL-1-Zellen) proliferierten zu 53% als Antwort auf Thrombin. 24 Stunden vor der Behandlung mit Thrombin wurden HFL-1-Zellen mit einem LID-Komplex behandelt, der das $[K]_{16}$ -Peptid 6, Lipofectin und ein 20-mer Antisense-Oligonukleotid, das gegen den Thrombin-Rezeptor PAR-1 gerichtet war, umfasste, und im optimalen Mischungsverhältnis und in der optimalen Mischungsreihenfolge, wie oben im Materialien- und Methodenteil und in den Beispielen beschrieben, hergestellt wurde. Der das Antisense-Oligonukleotid enthaltende Komplex wurde mit den Zellen für 4 Stunden in Kontakt gebracht. 24 Stunden nach dem Beginn der Behandlung mit dem Komplex erfolgte die Behandlung mit Thrombin.

[0142] Die durch Thrombin induzierte Proliferation wurde zu 76 +/- 12% durch die Vorbehandlung mit dem LID-Komplex abgeschwächt. Zellen, die mit dem Antisense-enthaltenden Komplex, nicht aber mit Thrombin behandelt wurden, proliferierten nicht.

[0143] Dieses Ergebnis zeigt den Nutzen des Komplexes der Erfindung für den effizienten intrazellulären

Transport von Antisense-Oligonukleotiden, der für die Antisense-Therapie, wie zum Beispiel antivirale und Antikrebs-Therapie, erforderlich ist.

Beispiel 14: Transfektion von hämatopoietischen Zellen

[0144] Hämatopoietische Zellen sind besonders resistent gegenüber der Transfektion mit den meisten Plasmid-Vektoren.

[0145] LID-Komplexe wurden, wie oben im Materialien- und Methodenteil und in den Beispielen beschrieben, unter Verwendung von Lipofectin und $[K]_{16}$ -Peptid 6, das auf $\alpha 5\beta 1$ -Integrine gerichtet ist, und pEGFP-N1 (Promega) als Reportergen, hergestellt. Analog wurden Komplexe hergestellt, bei denen das $[K]_{16}$ -Peptid 6 durch das $[K]_{16}$ -Peptid 8 ($[K]_{16}$ -GACQIDSPCA, SEQ ID NO: 21), das auf $\alpha 4\beta 1$ -Integrine gerichtet ist, ersetzt wurde. Die Komplexe wurden durch Mischen der Komponenten im optimalen Verhältnis und in der optimalen Mischungsreihenfolge, wie oben im Materialien- und Methodenteil und in den Beispielen beschrieben, hergestellt.

[0146] Vier verschiedene hämatopoietische Zelllinien (HL60, PLB985, TF1 und U937) wurden, wie im Materialien- und Methodenteil beschrieben, transfiziert, wobei folgende Änderungen gemacht wurden: Die Zellen wurden mit Gm-CSF (10 ng/ml) für TF1-Zellen oder Phorbolmyristinsäure (phorbol myristic acid) (PMA) für die anderen drei Zelllinien vor der Transfektion behandelt oder nicht behandelt. Die Transfektionen mit den LID-Komplexen, die pEGFP-N1 enthielten, generierten eine Transfektions-Effizienz von mehr als 60% in allen vier Zelllinien, was mit dem Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer (siehe [Fig. 9](#)) gemessen wurde.

[0147] Diese Ergebnisse zeigen den Nutzen des Transfektions-Komplexes der Erfindung für die Gentherapie, die hämatopoietische Zellen betrifft, wie zum Beispiel die Gentherapie von Leukämie oder Fehlsteuerungen von Knochenmarks-Stammzellen. Dies ist besonders nützlich, da, wie oben herausgestellt, hämatopoietische Zellen besonders resistent gegenüber der Transfektion mit den meisten Plasmid-Vektoren sind.

Literaturangaben

1. Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biological Chemistry* 1987; 262(10): 4429–4432.
2. Wagner E, Cotton M, Mechtler K, Kirlappos H, Birnstiel ML. DNA-binding transferrin conjugates as functional gene-delivery agents: Synthesis by linkage of polylysine or ethidium bromide to the transferrin carbohydrate moiety. *Bioconjugate Chemistry* 1991; 2: 226–231.
3. Cotton M, Lange. Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: Stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *PNAS* 1990; 87: 4033–4037.
4. Ferkol T, Perales JC, Eckman E, Kaetzel CS, Hanson RW, Davis PB. Gene transfer into the airway epithelium of animals by targeting the polymeric immunoglobulin receptor. *J Clinical Investigation* 1995; 95: 493–502.
5. Curiel DT, Agarwal S, Wagner E, Cotton M. Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery. *PNAS* 1991; 88: 8850–8854.
6. Fernandez MA, Munoz-Fernandez MA, Fresno M. Involvement of $\beta 1$ integrins in the binding and entry of Trypanosoma cruzi into human microphages. *European J of Immunology* 1993; 23: 552–557.
7. Wickham TJ, Filardo EJ, Cheresh DA, Nemerow GR. Integrin $\alpha v\beta 5$ selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J Cell Biology* 1994; 127(1): 257–264.
8. Bergelson JM, Shepley MP, Chan BMC, Hemler ME, Finberg RW. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science* 1992; 255: 1718–1720.
9. Logan D, Abu-Ghazaleh R, Blakemore W, et al. Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature* 1993; 362: 566–568.
10. Isberg RR. Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. *Science* 1991; 252: 934–938.
11. Almeida EAC, Huovilla A-PJ, Sutherland AE, et al. Mouse egg integrin $\alpha 6\beta 1$ functions as a sperm receptor. *Cell* 1995; 81: 1095–1104.
12. Clements JM, Newham P, Shepherd M, et al. Identification of a key integrin-binding sequence in VCAM-1 homologous to the LDV active site in fibronectin. *J Cell Science* 1994; 107: 2127–2135.
13. Lu X, Deadman JJ, Williams JA, Kakkar VV, Rahman S. Synthetic RGD peptides derived from the adhesive domains of snake-venom proteins: evaluation as inhibitors of platelet aggregation. *Biochemistry J* 1993; 296: 21–24.
14. Koivunen E, Wang B, Ruoslahti E. Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. *Biol/Technology* 1995; 13: 265–270.

15. Koivunen E, Gay DA, Ruoslahti E. Selection of peptides binding to the $\alpha 5\beta 1$ integrin from phage display library. *J Biological Chemistry* 1993; 268(27): 20205–20210.
16. Koivunen E, Wang B, Ruoslahti E. Isolation of a highly specific ligand for the $\alpha 5\beta 1$ integrin from a phage display library. *J Cell Biology* 1994; 124(3): 373–380.
17. O'Neil KT, Hoess RH, Jackson A, Ramachandran NS, Mousa A, DeGrado WF. Identification of novel peptide antagonists for GPIIb/IIIa from a conformationally constrained phage peptide library. *Proteins* 1992; 14: 509–515.
18. Healy JM, Murayama O, Maeda T, Yoshino K, Sekiguchi K, Kikuchi M. Peptide ligands for integrin alpha v beta 3 selected from random phage display libraries. *Biochemistry* 1995; 34: 3948–3955.
19. Pasqualani R, Koivunen E, Ruoslahti E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J Cell Biology* 1995; 130: 1189–1196.
20. Hart SL, Knight AM, Harbottle RP, et al. Cell binding and internalization by filamentous phage displaying a cyclic Arg-Gly-Asp-containing peptide. *J Biological Chemistry* 1994; 269: 12468–12474.
21. Hart SL, Harbottle RP, Cooper R, Miller A, Williamson R, Coutelle C. Gene delivery and expression mediated by an integrin-binding peptide. *Gen Therapy* 1995; 2: 552–554.
22. Wolfert MA, Seymour LW. Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA. *Gene Therapy* 1996; 3: 269–273.
23. Hart SL, Collins L, Gustaffson K, Fabre JW. Integrin-mediated transfection with peptides containing arginine-glycine-aspartic acid domains. *Im Druck* 1997.
24. Farhood H, Sebina A, Huang L. The role of dioleyl phosphatidylethanolamine (DOPE) in cationic liposome-mediated gene transfer. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1235: 289–295.
25. Anderson R, MacDonald I, Corbett T, Hacking G, Lowdell MW, and Prentice HG. *Human Gene Therapy* 1997; 8: 1125–1135.
26. Blank RS, Thompson MM, and Owens GK. *Journal of Cell Biology* 1988; 107: 299.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Institute of Child Health
 - (B) STRASSE: 30 Guildford Street
 - (C) STADT: London
 - (E) LAND: Großbritannien
 - (F) POSTLEITZAHL (ZIP): WC1N 1EH
-
- (A) NAME: Hart, Stephen Lewis
 - (B) STRASSE: c/o Institute of Child Health,
30 Guildford Street
 - (C) STADT: London
 - (E) LAND: Großbritannien
 - (F) POSTLEITZAHL (ZIP): WC1N 1EH

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Integrin-Zielvektoren mit Transfektions-aktivität

(iii) ANZAHL AN SEQUENZEN: 16

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) MEDIUMTYP: Floppy-Diskette
- (B) COMPUTER: IBM, PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
(EPO)

(vi) FRÜHERE ANMELDEDATEN:

- (A) ANMELDENUMMER: GB 9711115.7
- (B) ANMELDETAG: 29. Mai 1997

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 28 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Gly Gly Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

Lys
20 25

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 27 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Gly Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

Lys
20 25

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 26 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
20 25

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 4 :

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 27 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Lys
1 5 10 15

Gly Ala Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Ala
20 25

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 8 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys
1 5

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 10 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys
1 5 10

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 7

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 11 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Gly
1 5 10

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 11 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Ala
1 5 10

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 11 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Gly Ala Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Ala
1 5 10

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 12 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Gly Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Ala
1 5 10

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 12 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11

Gly Ala Cys Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala Cys Ala
1 5 10

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 12

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 12 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Gly Ala Cys Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala Cys Gly
1 5 10

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 9 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Cys Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala Cys
1 5

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 12 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Gly Ala Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
1 5 10

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 10 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Gly Ala Cys Gln Ile Asp Ser Pro Cys Ala
1 5 10

(2) INFORMATIONEN FUER SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 25 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKUELTYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Gly Ala Cys Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala Cys Gly Lys Gly Ala Cys
1 5 10 15

Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala Cys Gly
20 25

Patentansprüche

1. Mischung, bestehend aus (i) einer Integrin bindenden Komponente, die an eine polykationische Nukleinsäure bindende Komponente gebunden ist, und (ii) eine Lipidkomponente, wobei die genannte Mischung erhältlich ist durch Zugabe von Komponente (i) zu der Lipidkomponente (ii) und mischen.
2. Mischung, wie in Anspruch 1 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Integrin bindende Komponente ein Integrin bindendes Peptid ist.
3. Mischung, wie in Anspruch 2 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid alles oder einen Teil des Integrin bindenden Bereichs eines natürlich vorkommenden Integrinliganden aufweist oder daraus besteht.
4. Mischung, wie in Anspruch 3 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass das Integrin bindende Peptid die konservierte Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparginsäure (RGD) aufweist.

5. Mischung, wie in Anspruch 4 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass ein Peptid, das die Sequenz RGD aufweist, eine cyclische Region aufweist, in der die konformative Freiheit der RGD-Sequenz beschränkt ist.

6. Mischung, wie in Anspruch 5 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass ein cyclisches Peptid zwei oder mehr Cysteinreste aufweist, die eine oder mehr Disulfidbindung(en) bilden.

7. Mischung, wie in Anspruch 6 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid die Sequenz CRGDMFGC [SEQ. ID. Nr.:5] aufweist oder daraus besteht.

8. Mischung, wie in Anspruch 7 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid die Sequenz GG-CRGDMFGC [SEQ. ID. Nr.:6], GGCRGDMFGCG [SEQ. ID. Nr.:7], GGCRGDMFGCA [SEQ. ID. Nr.:8] oder GACRGDMFGCA [SEQ. ID. Nr.:9] aufweist oder daraus besteht.

9. Mischung, wie in Anspruch 6 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid die Sequenz GACDCRGDCFCA [SEQ. ID. Nr.:10] aufweist oder daraus besteht.

10. Mischung, wie in Anspruch 2 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid die Sequenz CR-RETAWAC [SEQ. ID. Nr.:13] aufweist oder daraus besteht.

11. Mischung, wie in Anspruch 10 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid die Sequenz GACRRETAWACA [SEQ. ID. Nr.:11] oder GACRRETAWACG [SEQ. ID. Nr.:12] aufweist oder daraus besteht.

12. Mischung, wie in Anspruch 2 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid die Sequenz GAGPEILDVPST [SEQ. ID. Nr.:14], GACQIDSPACA [SEQ. ID. Nr.:15] oder GACRRETAWACGKGACRRETA-WACG [SEQ. ID. Nr.:16] aufweist oder daraus besteht.

13. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 12 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die polykationische Nukleinsäure bindende Komponente von 3 bis 100 kationische Monomere aufweist.

14. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 13 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die polykationische Nukleinsäure bindende Komponente ein Oligolysin ist.

15. Mischung, wie in Anspruch 14 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass das Oligolysin 10 bis 20 Lysinreste aufweist.

16. Mischung, wie in Anspruch 14 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass das Oligolysin 16 Lysinreste aufweist.

17. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 16 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Lipidkomponente ein kationisches Liposom ist oder in der Lage ist, eines zu bilden.

18. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 17 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Lipidkomponente eine oder mehr Lipide, ausgewählt aus kationischen Lipiden und Lipiden mit Membran destabilisierenden oder fusogenen Eigenschaften aufweist oder daraus besteht.

19. Mischung, wie in Anspruch 18 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Lipidkomponente das neutrale Lipid Dioleyl-phosphatidyl-ethanolamin (DOPE) oder ein anderes Lipid mit Membran destabilisierenden oder fusogenen Eigenschaften aufweist oder daraus besteht.

20. Mischung, wie in Anspruch 18 oder Anspruch 19 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Lipidkomponente das kationische Lipid N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) oder ein anderes Lipid mit kationischen Eigenschaften aufweist oder daraus besteht.

21. Mischung, wie in Anspruch 20 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Lipidkomponente eine Mischung aus DOPE und DOTMA, speziell eine äquimolare Mischung daraus, aufweist oder daraus besteht.

22. Mischung, wie in Anspruch 21 beansprucht, die eine äquimolare Mischung aus DOPE und DOTMA als Lipidkomponente, ein Integrin bindendes Peptid als Integrin bindende Komponente und $[K]_{16}$ als polykationische Nukleinsäure bindende Komponente aufweist.

23. Mischung, wie in Anspruch 21 oder Anspruch 22 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis der Lipidkomponente:Integrin bindende/polykationische Nukleinsäure bindende Komponente 0,75:4, bezogen auf das Gewicht, oder 0,5 nmol:1,25 nmol auf einer molaren Basis ist.

24. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 21 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Lipidkomponente 2,3-Dioleyloxy-N-[2-(spermidincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium-trifluoracetat (DOSPA) aufweist oder daraus besteht.

25. Mischung, wie in Anspruch 24 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Lipidkomponente eine Mischung aus DOPE und DOSPA, speziell eine Mischung aus einem Gewichtsteil DOPE zu 3 Gewichtsteilen DOSPA aufweist oder daraus besteht.

26. Mischung, wie in Anspruch 25 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass diese eine Mischung von DOPE und DOSPA als Lipidkomponente, ein Integrin bindendes Peptid als Integrin bindende Komponente und $[K]_{16}$ als polykationische Nukleinsäure bindende Komponente aufweist.

27. Mischung, wie in Anspruch 26 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von Lipidkomponente:polykationischer Nukleinsäure bindender Komponente 12:4, bezogen auf das Gewicht, ist.

28. Prozess zur Herstellung einer Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass man die aneinander gebundene Integrin bindende/polykationische Nukleinsäure bindende Komponente zu der Lipidkomponente zugibt und mischt.

29. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 beansprucht, erhältlich durch ein Prozess, wie in Anspruch 28 beansprucht.

30. Komplex, der (i) eine Integrin bindenden Komponente, die an eine polykationische Nukleinsäure bindende Komponente gebunden ist (ii) eine Lipidkomponente und (iii) eine Nukleinsäure aufweist, wobei der Komplex erhältlich ist durch ein Verfahren, bei dem man die Komponenten in der folgenden Reihenfolge mischt: Lipidkomponente, Integrin bindenden Komponente/polykationische Nukleinsäure bindende Komponente, Nukleinsäure.

31. Komplex, wie in Anspruch 30 beansprucht, der eine Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, und eine Nukleinsäure aufweist.

32. Komplex, wie in Anspruch 30 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Integrin bindenden Komponente in einem der Ansprüche 2 bis 12 definiert ist.

33. Komplex, wie in Anspruch 30 oder Anspruch 32 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die polykationische Nukleinsäure bindende Komponente in einem der Ansprüche 13 bis 16 definiert ist.

34. Komplex, wie in Anspruch 30, 32 und 33 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Lipidkomponente in einem der Ansprüche 17 bis 21, 24 und 25 definiert ist.

35. Komplex, wie in einem der Ansprüche 30 bis 32 beansprucht, der eine äquimolare Mischung aus DOPE und DOTMA als Lipidkomponente, ein Integrin bindendes Peptid als Integrin bindende Komponente und $[K]_{16}$ als polykationische Nukleinsäure bindende Komponente aufweist.

36. Komplex, wie in Anspruch 35 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis der Lipidkomponente:Integrin bindende/polykationische Nukleinsäure bindende Komponente:Nukleinsäurekomponente 0,75:4:1, bezogen auf das Gewicht, oder 0,5 nmol:1,25 nmol:0,25 nmol auf einer molaren Basis ist.

37. Komplex, wie in einem der Ansprüche 30 bis 36 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäurekomponente ein Gen ist oder damit zusammenhängt, das das Target für Gentherapie, Genimpfung oder Antisensetherapie ist.

38. Komplex, wie in einem der Ansprüche 30 bis 37 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass transkriptionale und/oder translationale Steuerelemente für die Nukleinsäuren zur Verfügung gestellt werden und die Nukleinsäure gegebenenfalls in einem Phagen oder Überträger verpackt ist.

39. Komplex, wie in einem der Ansprüche 30 bis 38 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäurekomponente DNA oder RNA ist.

40. Prozess zur Herstellung eines Komplexes, wie in Anspruch 30 beansprucht, bei dem man die Nukleinsäure, die Integrin bindende Komponente, die polykationische Nukleinsäure bindende Komponente, und die Lipidkomponente, in der folgenden Reihenfolge mischt: Lipidkomponente, Integrin bindenden Komponente/polykationische Nukleinsäure bindende Komponente, Nukleinsäure.

41. Prozess, wie in Anspruch 40 beansprucht, zur Herstellung eines Komplexes, wie in Anspruch 31 beansprucht, bei dem man eine Nukleinsäure in die Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, mit einbezieht.

42. Verfahren zur Transfektion einer Zelle mit einer Nukleinsäure, bei dem man die Zelle in vitro mit einem Komplex, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, kontaktiert.

43. Verfahren, wie in Anspruch 42 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle eine Endothelzelle, eine Epithelzelle oder eine Tumorzelle ist.

44. Verfahren, wie in Anspruch 42 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle eine Neuroblastomzelle, eine primäre glatte Muskelzelle, eine kardiale Myocyte oder eine hämatopoietische Zelle ist.

45. Pharmazeutische Zusammensetzung, die einen Komplex, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, als Beimischung oder in Verbindung mit einem pharmazeutisch geeigneten Träger aufweist.

46. Komplex, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, zur Verwendung als Medikament oder Impfstoff.

47. Komplex, wie in Anspruch 46 beansprucht, zur Verwendung als ein Medikament zur Gentherapie oder Antisenstherapie oder als ein Impfstoff zur Genimpfung.

48. Komplex, wie in Anspruch 47 beansprucht, zur Impfung gegen den Hepatitis B Virus, HIV, HCV oder den Herpes simplex Virus.

49. Komplex, wie in Anspruch 46 oder Anspruch 47 beansprucht, zur in vivo Transfektion einer Endothelzelle, einer Epithelzelle oder einer Tumorzelle.

50. Komplex, wie in Anspruch 46 oder Anspruch 47 beansprucht, zur in vivo Transfektion einer Neuroblastomzelle, einer primären glatten Muskelzelle, einer kardiale Myocyte, einer hämatopoietischen Zelle oder einer Zelle des cornealen Endothels.

51. Komplex, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, zur Behandlung von Mukoviszidose oder Asthma.

52. Komplex, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, zur Behandlung von Krebs.

53. Komplex, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, zur Behandlung einer Infektion.

54. Komplex, wie in Anspruch 53 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Infektion eine Virusinfektion ist.

55. Komplex, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, zur Behandlung von Neuroblastom.

56. Komplex, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, zur Behandlung von einer Krankheit oder pathologischer Bedingung von primären glatten Muskelzellen oder von kardialen Myozyten.

57. Komplex, wie in Anspruch 56 beansprucht, zur Behandlung von Restenose oder nach Ballonangioplastie.

58. Komplex, wie in Anspruch 57 beansprucht, zur Behandlung von einer Augenkrankheit, die die Cornea oder ein Corneatransplantat in Mitleidenschaft ziehen, einschließlich Glaukom.

59. Komplex, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, zur Gentherapie, Genimpfung oder Antisenstherapie von einer Krankheit, die hämatopoietische Zellen umfasst.

60. Komplex, wie in Anspruch 59 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheiten, die hämatopoietische Zellen umfasst, Leukämie oder eine Knochenmarks Stammzellenfehlsteuerung ist.

61. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Verwendung, mit einer Nukleinsäure, als Medikament oder Impfstoff

62. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Verwendung, mit einer Nukleinsäure, als ein Medikament zur Gentherapie oder Antisenstherapie oder als ein Impfstoff zur Genimpfung.

63. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Verwendung, mit einer Nukleinsäure, zur Impfung gegen Hepatitis B Virus, HIV, HCV oder Herpes simplex Virus.

64. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Verwendung, mit einer Nukleinsäure, zur in vivo Transfektion einer Endothelzelle, eine Epithelzelle oder eine Tumorzelle.

65. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Verwendung, mit einer Nukleinsäure, zur in vivo Transfektion einer Neuroblastomzelle, einer primären glatten Muskelzelle, einer kardialen Myocyte, einer hämatopoietische Zelle oder einer Zelle des cornealen Endothels.

66. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Verwendung, mit einer Nukleinsäure, zur Behandlung von Mukoviszidose oder Asthma.

67. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Verwendung, mit einer Nukleinsäure, zur Behandlung von Krebs.

68. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Verwendung, mit einer Nukleinsäure, zur Behandlung einer Infektion.

69. Mischung, wie in Anspruch 68 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Infektion eine Virusinfektion ist.

70. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Verwendung, mit einer Nukleinsäure, zur Behandlung von Neuroblastom oder einer Augenkrankheit, die die Cornea oder ein corneales Organtransplantat in Mitleidenschaft ziehen, einschließlich Glaukoma.

71. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Verwendung, mit einer Nukleinsäure, zur Behandlung von einer Krankheit oder pathologischen Bedingung von primären glatten Muskelzellen oder von kardialen Myocytes.

72. Mischung, wie in Anspruch 71 beansprucht, zur Behandlung von Restenose oder zur Verwendung nach Ballonangioplastie.

73. Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Verwendung, mit einer Nukleinsäure, zur Gentherapie, Genimpfung oder Antisenstherapie einer Krankheit, die hämatopoietische Zellen umfasst.

74. Mischung, wie in Anspruch 73 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheit, die hämatopoietische Zellen umfasst, Leukämie oder eine Knochenmarks Stammzellenfehlsteuerung ist.

75. Verwendung einer Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Mukoviszidose oder Asthma.

76. Verwendung einer Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.

77. Verwendung einer Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur

Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Infektion.

78. Verwendung einer Mischung, wie in Anspruch 77 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Infektion eine Virusinfektion ist.

79. Verwendung einer Mischung, wie in Anspruch 76 beansprucht, zur Behandlung von Neuroblastom.

80. Verwendung einer Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Restenose.

81. Verwendung einer Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Leukämie oder einer Knochenmarks Stammzellenfehlsteuerung.

82. Verwendung einer Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht, zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung von einer Augenkrankheit die die Cornea oder ein corneales Organtransplantat in Mitleidenschaft zieht, einschließlich Glaukom.

83. Verwendung eines Komplexes, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung von Mukoviszidose oder Asthma.

84. Verwendung eines Komplexes, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, zur Verwendung bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.

85. Verwendung eines Komplexes, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, zur Verwendung bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung; einer Infektion.

86. Verwendung, wie in Anspruch 85 beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass die Infektion eine Virusinfektion ist.

87. Verwendung, wie in Anspruch 84 beansprucht, zur Behandlung von Neuroblastom.

88. Verwendung eines Komplexes, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Restenose.

89. Verwendung, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, zur Verwendung bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Leukämie oder Knochenmark Stammzellenfehlsteuerung.

90. Verwendung eines Komplexes, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, zur Verwendung bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von einer Augenkrankheit, die die Cornea oder ein corneales Organtransplantat in Mitleidenschaft zieht, einschließlich Glaukom.

91. Satz, aufweisend eine Mischung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 oder Anspruch 29 beansprucht.

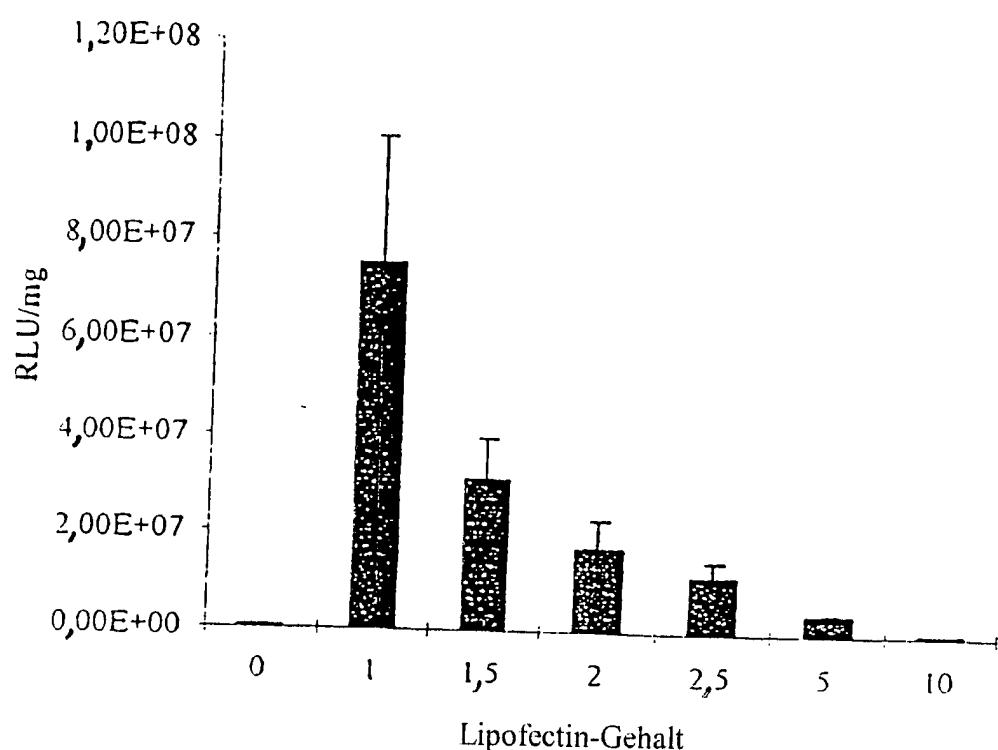
92. Satz, wie in Anspruch 91 beansprucht, der des weiteren (a) ein Plasmid oder Überträger zur Expression einer Nukleinsäure, wobei das Plasmid oder der Überträger entweder leer ist oder die Nukleinsäure enthält, oder (b) eine Nukleinsäure aufweist.

93. Verfahren zur Expression einer Nukleinsäure in eine Gastzelle in vitro, dadurch gekennzeichnet, dass man die Zelle mit einem Komplex, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, in Kontakt bringt.

94. Verfahren zur Herstellung eines Proteins, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Zelle in vitro mit einem Komplex, wie in einem der Ansprüche 30 bis 39 beansprucht, transfektioniert, wobei die Nukleinsäurekomponente des Komplexes das Protein kodiert und zulässt, dass die Zelle das Protein ausprägt, und gegebenenfalls das Protein erlangt.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Figur 1

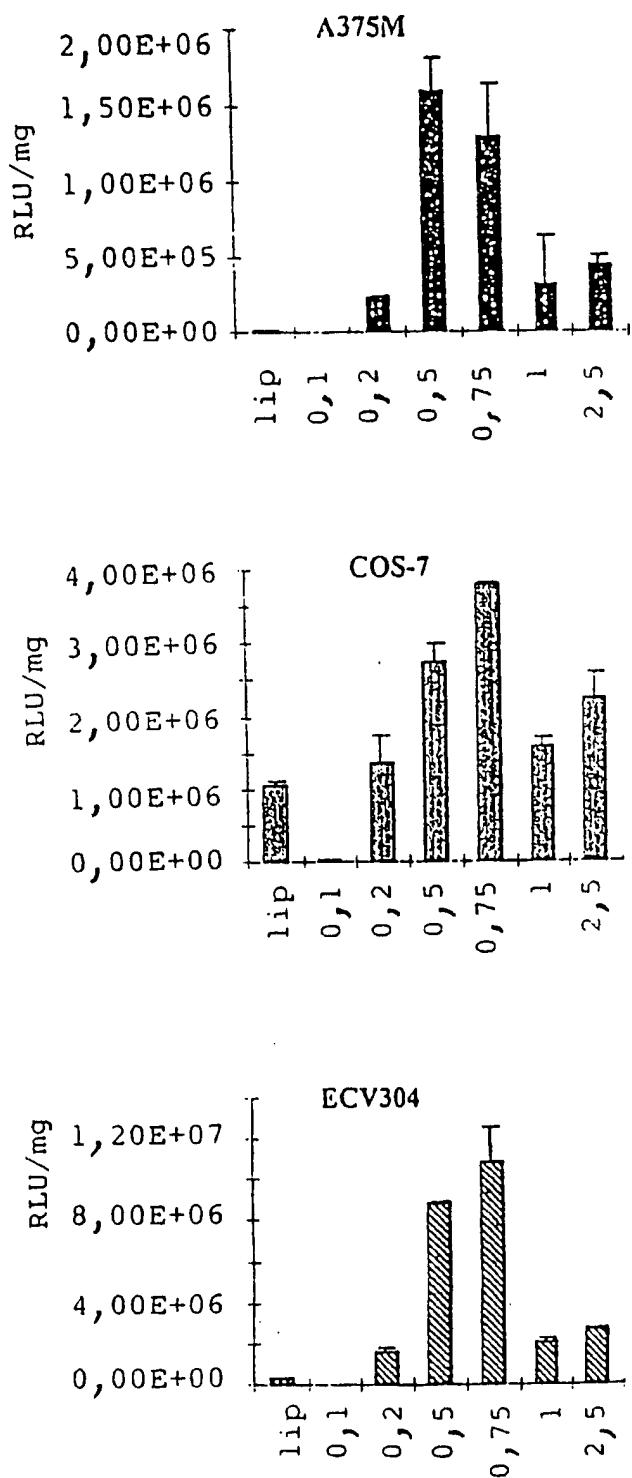
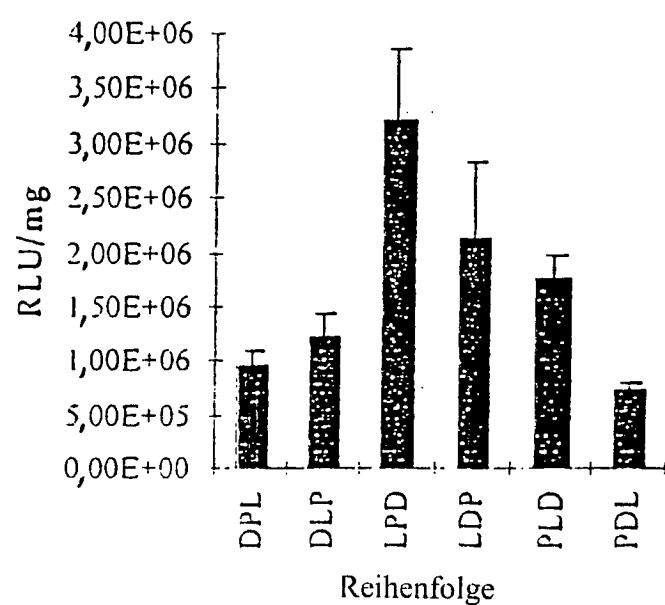
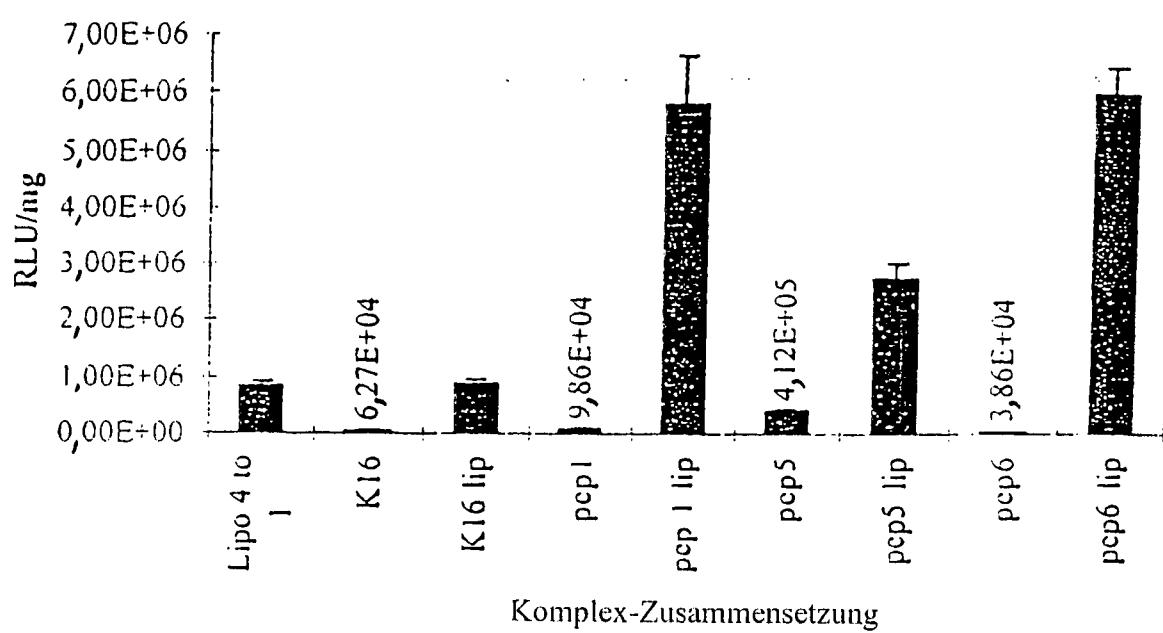


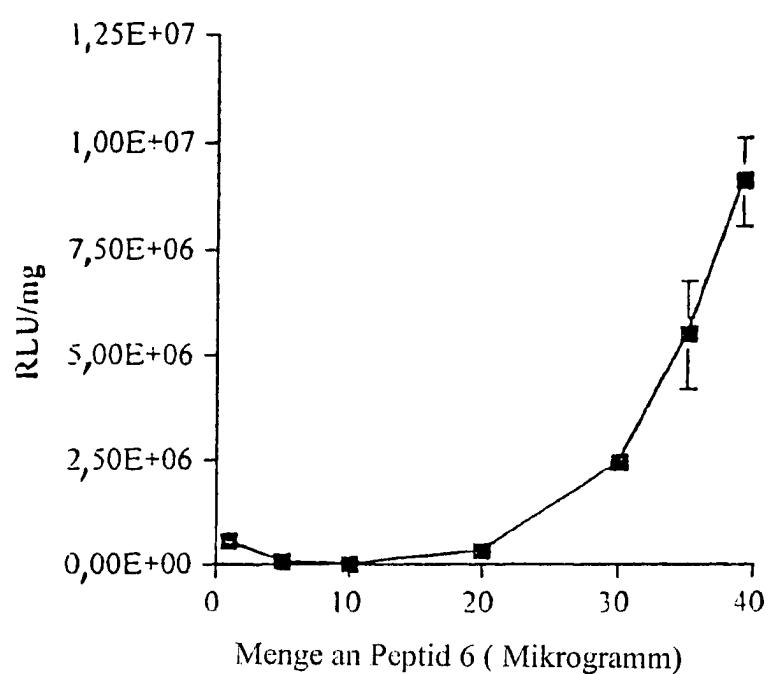
Figure 2



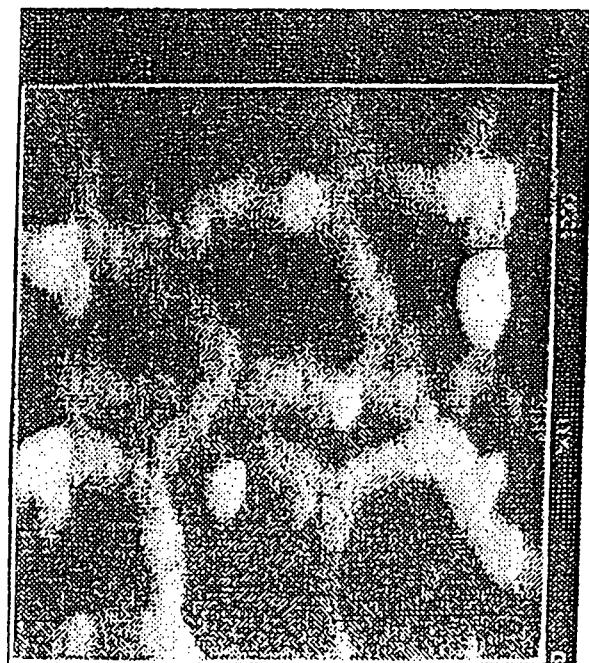
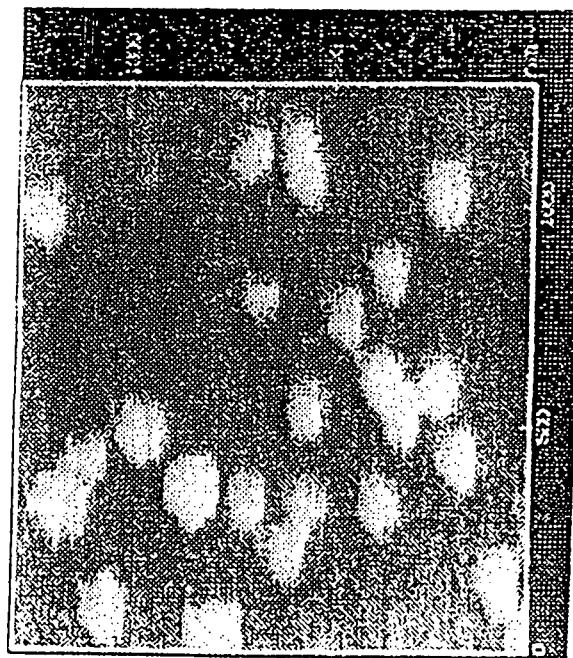
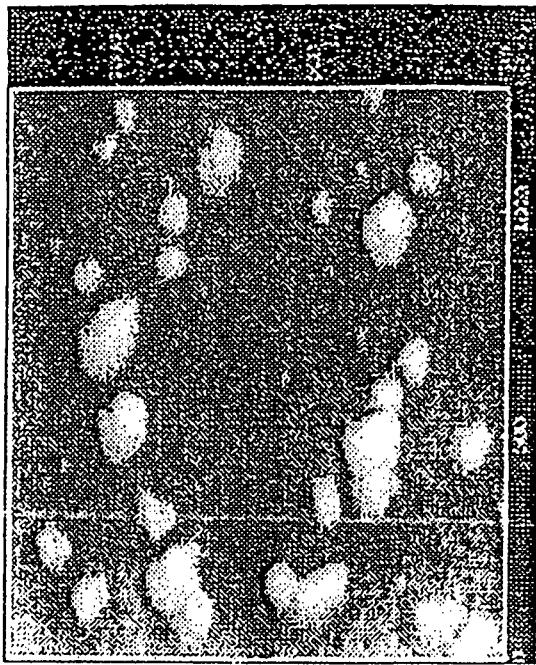
Figur 3



Figur 4



Figur 5



A

C

Figure 6

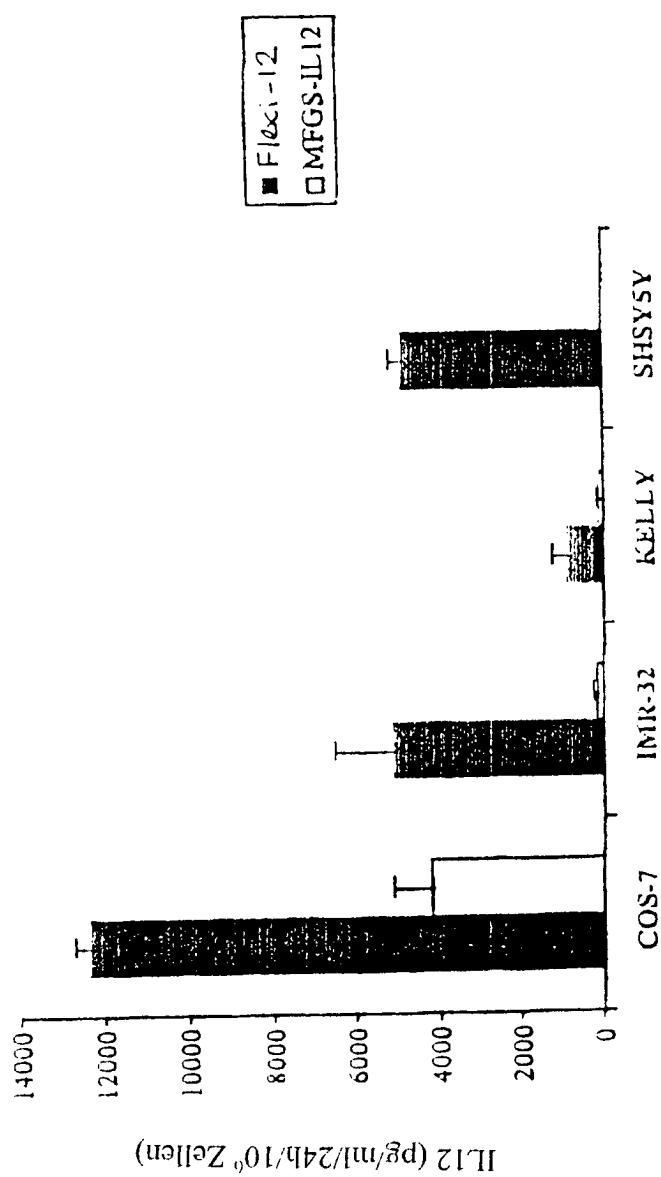
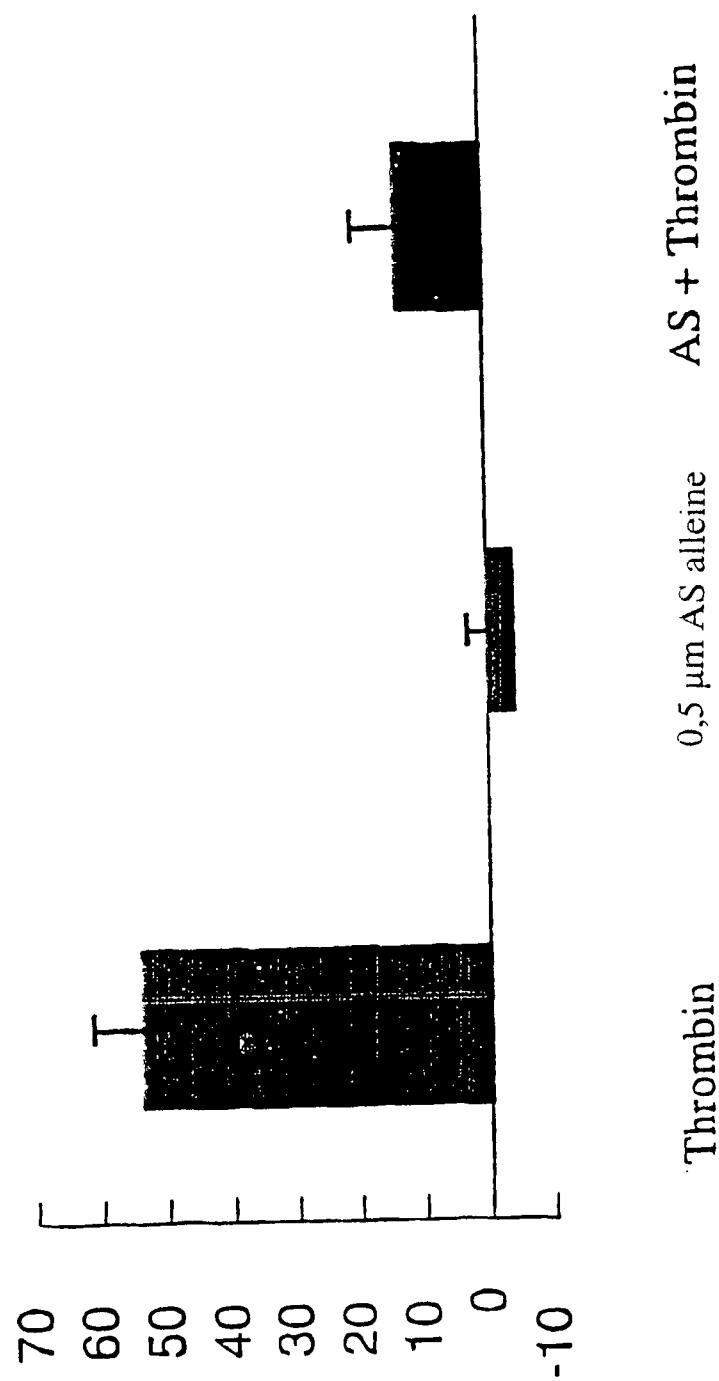


Figure 7



Figur 8

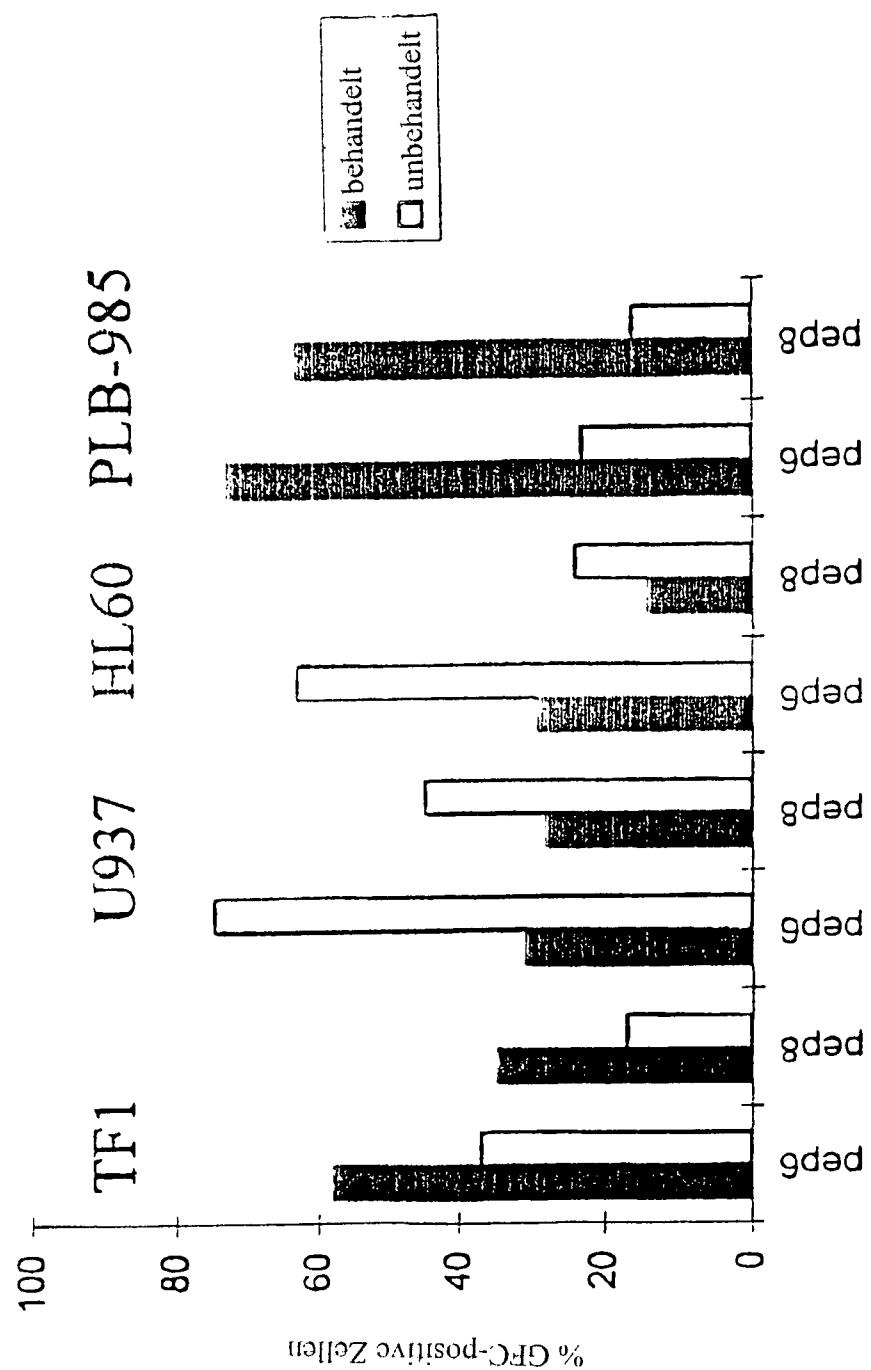


Figure 9