



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **314147**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 07 H 15/18, A 61 K 9/127, 48/00

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19995858	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1998.06.03, PCT/FR98/01112
(22) Inng. dag	1999.11.30	(85) Videreføringsdag	1999.11.30
(24) Løpedag	1998.06.03	(30) Prioritet	1997.06.06, FR, 9707014
(41) Alm. tilgj.	1999.11.30		
(45) Meddelt dato	2003.02.03		
(71) Patenthaver	Rhône-Poulenc Rorer SA, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cédex, FR		
(72) Oppfinner	Michel Bessodes, F-94800 Villejuif, FR Daniel Scherman, F-75012 Paris, FR Jean Herscovici, F-75013 Paris, FR		
(74) Fullmektig	Zacco Norway AS, 0106 Oslo		

(54) Benevnelse **Kationiske nukleinsyre-transfeksjonsmidler, preparater inneholdende midlene samt deres anvendelse og fremstilling**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

En ny klasse kationiske, transfektante midler for nukleinsyrer karakteriseres ved at de transfektante midler omfatter minst et lipofilt område assosiert med et kationisk, hydrofilt område idet det kationiske, hydrofile området består av en heterocykel med 5 eller 6 atomer substituert med aminogrupeer.

Foreliggende oppfinnelse angår en ny klasse kationiske transfeksjonsmidler, farmasøytiske preparater inneholdende disse samt deres anvendelse for transfeksjon in vivo, ex vivo og/eller in vitro av nukleinsyrer, samt fremgangsmåter for deres fremstilling.

5

Med den bioteknologiske utvikling er det nu mulig å overføre nukleinsyrer inn i celler. Effektiviteten ved disse overføringer viser seg nødvendig for korreksjon av ekspresjonsfeil og/eller anormal ekspresjon av nukleinsyrer som er implikert i tallrike genetiske sykdommer. Imidlertid er interessen for overføring av nukleinsyrer ikke begrenset til genterapi. I tillegg kan overføring av nukleinsyrer være nyttig for studium av reguleringen av ekspresjonen av gener, kloningen av gener eller for en hvilken som helst annen manipulering in vitro som implikerer nukleinsyrer, likeledes også for fremstilling av rekombinante proteiner. Det kan likeledes dreie seg om overføring av nukleinsyrer in vivo, for eksempel for å oppnå transgene dyr, fremstilling av vaksiner, studier ved merking av molekyler, og så videre. Videre kan overføring av nukleinsyrer gjennomføres i celler ex vivo ved for eksempel benmargspodinger, immunoterapi eller andre metoder som implikerer overføring av gener inn i celler som er hentet fra en organisme med henblikk på senere readministrering.

20 I dag er det foreslått diverse metoder for intracellulær avlevering av denne type genetisk informasjon. En av disse er særlig basert på anvendelsen av kjemiske eller biologiske vektorer. Disse syntetiske vektorer har to hovedfunksjoner: å kompleksdanne DNA som skal transfekteres og å fremme dens cellulære fiksering samt dens passasje gjennom det plasmidiske membran og eventuelt gjennom de to nukleære membraner. Blant de syntetiske vektorer som er utviklet, har kationiske polymerer av typen polylysin og DEAE-dekstran eller også lipofektanter vist seg som de mest fordelaktige.

Et vesentlig fremskritt er oppnådd ved denne metode for transfeksjon ved utvikling av en teknologi basert på anvendelsen av kationiske transfeksjonsmidler av typen lipofektanter og særlig kationiske lipider. Det er således påvist at et kationisk lipid med positiv ladning, N-[1-(2,3-dioleoyl)propyl]-N,N,N-trimetylammoniumklorid, DOTMA, i form av liposomer eller små vesikler, spontant interfererer med DNA som er negativt ladet, og danner komplekse lipid-DNA som er i stand til å funksjonere med cellemembraner og derved tillate intracellulær avlevering av DNA.

35

Efter DOTMA er andre kationiske lipider utviklet på den samme strukturmodell, det vil si en lipofil gruppe koblet til en aminogruppe via en arm kalt "spacer". Blant disse kan

særlig nevnes de som, som lipofil gruppe omfatter fettsyrer eller et kolesterolderivat og som i tillegg, eventuelt som aminogruppe, bærer en kvaternær aminogruppe. DOTAP, DOBT eller ChOTB kan særlig nevnes som representative for denne kategori kationiske lipider. Andre forbindelser som DOSC og ChOSC karakteriseres ved nærværet av kolin-
5 gruppe i stedet for en kvaternær ammoniumgruppe.

En annen kategori lipofektanter, lipopolyaminene, er også beskrevet. Rent generelt *dreier det seg om et amfifilt molekyl omfattende minst et hydrofilt område bestående av et polyamin som via en "spacer" er koblet til et lipofilt område. Polyamino-området,*
10 *ladet positivt, er i stand til å forbinde seg på reversibel måte med nukleinsyren som er negativt ladet. Denne interaksjon kompakterer nukleinsyren sterkt. Hva angår det lipofile området, gjør dette den ioniske interaksjon ufølsom overfor det eksterne miljø, idet det dannede kompleks dekkes av en lipidisk hud. I denne type forbindelser kan den kationiske gruppe være representert ved resten L-5-karboksyspermin som inneholder*
15 *fire ammoniumgrupper, to primære og to sekundære. DOGS og DPPES hører til her. Disse lipopolyaminer er spesielt effektive for transfeksjon av primære, endokrine celler. Som representativ for denne sistnevnte type forbindelser kan spesielt nevnes de lipopolyaminer som for eksempel er beskrevet i W 96/17823 og WO 97/18185.*

20 Imidlertid kan effektiviteten for disse syntetiske vektorer forbedre vesentlig uttrykt ved ladningsdensitet og stivhet for det transfektante molekyl.

Generelt er det anerkjent at aktiviteten for disse produkter avhenger av ladningsdensiteten de skal intervensere i. Imidlertid er en økning av ladningene på de alifatiske kjeder
25 opprinnelsen for opptredenen av toksisiteten. En stabilisering av ladningsdensiteten for de alifatiske kjeder forhindrer således opptredenen av toksiske faktorer. Videre økes transfeksjonseffektiviteten ved en økning av ladningsdensiteten i et annet område enn de alifatiske kjeder.

30 *Fleksibiliteten for molekylet som benyttes for overføringen av en nukleinsyre kan således være et hinder for en tilstrekkelig snever interaksjon mellom nukleinsyren og transfeksjonsmidlet som forhindrer å oppnå en optimal kompaktering av nukleinsyren idet kompakteringen er en uomgjengelig nødvendig tilstand for enhver transfeksjon. En øket stivhet i transfeksjonsmiddel-molekylet sikrer en mer effektiv interaksjon med*
35 *nukleinsyren og forbedrer derved transfeksjonen.*

Således er det av særlig interesse å kunne ha til disposisjon transfeksjonsmidler som oppviser en forbedret transfeksjonskapasitet, mens det beholdes en redusert toksisitet, helst null toksisitet. Dette er de formål foreliggende oppfinnelse har til hensikt å oppfylle.

5

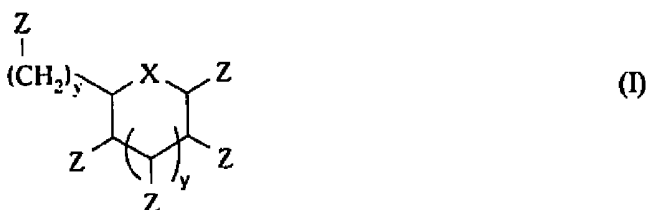
Foreliggende oppfinnelse har således mer spesielt til gjenstand å foreslå en ny klasse transfeksjonsmidler som oppviser et originalt kationisk hydrofilt område som gir transfeksjonsmidlene de ovenfor nevnte spesielle egenskaper.

10 Mer spesielt angår foreliggende oppfinnelse et transfeksjonsmiddel som minst omfatter et kationisk hydrofilt område koblet til et lipofilt område der det kationiske, hydrofile området består av minst en heterocykel med 5 til 6 atomer substituert med amino-grupper.

15 Det positivt ladede, hydrofile området er i stand til på reversibel måte å forbinde seg med en negativt ladet nukleinsyre som så sterkt kompakteres. Videre gir den opprinnelige struktur av den kationiske del molekylet en forbedret stivhet.

I henhold til dette angår foreliggende oppfinnelse et transfeksjonsmiddel omfattende 20 minst et kationisk, hydrofilt område koblet til et lipofilt område, og transfeksjonsmidlet karakteriseres ved at det hydrofile, kationiske området har den generelle formel:

25



30 der

y er et helt tall lik 0 eller 1, idet de forskjellige y er uavhengige av hverandre,

X betyr et oksygen-, nitrogen-, svovel- eller seleniumatom,

35 gruppene Z uavhengig av hverandre betyr

a) et hydrogenatom,

- b) en gruppe OR, der R betyr et hydrogenatom, en metylgruppe eller en gruppe $(\text{CH}_2)_n\text{-NR}_1\text{R}_2$, der n er et helt tall fra og med 1 til og med 6 og R_1 og R_2 uavhengig av hverandre betyr et hydrogenatom eller en gruppe $(\text{CH}_2)_q\text{-NH}_2$, der q kan variere fra og med 1 til og med 6 og der de forskjellige q er uavhengig av hverandre,
- 5 c) en gruppe $(\text{CH}_2)_m\text{-NR}_1\text{R}_2$, der m er et helt tall fra og med 0 til og med 6, og R_1 og R_2 er som angitt ovenfor, eller også
- d) en "spacer"-gruppe som tillater binding av det kationiske hydrofile området til det lipidiske området,
- forutsatt at minst en av substituentene Z bærer en aminogruppe.

10

Transfeksjonsmidlene ifølge oppfinnelsen inneholder minst et kationisk, hydrofilt område med den generelle formel (I). I henhold til en variant av oppfinnelsen omfatter overføringsmidlene to eller flere kationiske, hydrofile områder som er forbundet med hverandre i en av gruppene Z.

15

I henhold til en foretrukken utførelsesform av oppfinnelsen, når en av substituentene Z betyr OR og R betyr en gruppe $(\text{CH}_2)_m\text{-NR}_1\text{R}_2$, er n fortrinnsvis valgt blant 1, 3 eller 4.

I henhold til en fordelaktig variant av oppfinnelsen omfatter transfeksjonsmidlene et kationisk, hydrofilt område med den generelle formel (I) der X betyr et oksygenatom. Den kationiske, hydrofile del består da av et glycosid i pyranose- eller furanoseform. Pyranoseformen er særlig interessant og beskrives på ikke-begrensede måte i eksemplene.

25 I henhold til en andre fordelaktig variant av oppfinnelsen omfatter transfeksjonsmidlene et kationisk, hydrofilt område med den generelle formel (I) bestående av et aminoglycosid med 6 kjedeled (y til stede på cyklen er lik 1), X er et hydrogenatom og minst en av substituentene Z bærer en aminogruppe. Ennu mer foretrukket bærer minst to av substituentene Z en aminogruppe.

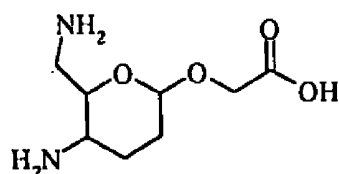
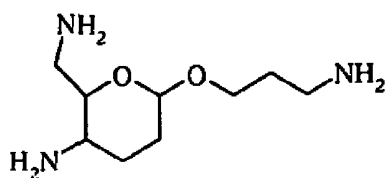
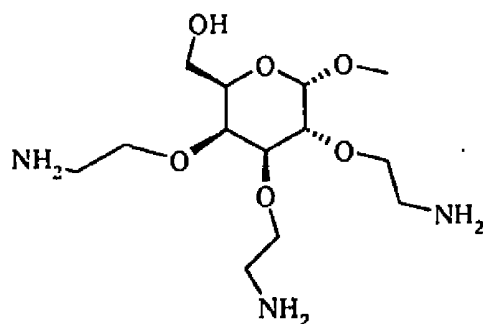
30

I henhold til en andre variant av oppfinnelsen består det kationiske, hydrofile området av et aminert glucosid med formel (I), der de to y er lik 1, X er et oksygenatom, to av gruppene Z betyr hydrogenatomer, to andre grupper Z er nitrogengrupper og fortrinnsvis aminogruupper og siste gruppe Z betyr en gruppe OR, der R er som angitt ovenfor. På foretrukken måte befinner gruppen OR seg i 2-posisjon på heterocykelen som utgjør det kationiske, hydrofile området for transfeksjonsmidlene ifølge oppfinnelsen.

35

I henhold til en annen foretrukken utførelsesform av oppfinnelsen består det kationiske, hydrofile området av et aminert glycosid med den generelle formel (I), der hver y som er til stede på cyklusen er lik 1, X er et oksygenatom, minst to grupper Z tilsvarer gruppene $O-(CH_2)_q-NH_2$ der q er som angitt ovenfor, og minst en av gruppene Z betyr en gruppe OR, der R er som angitt ovenfor.

Som representativt for de kationiske, hydrofile områder med den generelle formel (I), som utgjør mellomprodukter som er anvendelige ved syntese av transfeksjonsmidler ifølge oppfinnelsen, kan man mer spesielt nevne de følgende forbindelser:



30 Rent generelt omfatter transfeksjonsmidlene ifølge oppfinnelsen minst et kationisk, hydrofilt område som definert ovenfor forbundet med et lipofilt område.

Molekylene som utgjør det lipofile området innenfor oppfinnelsens ramme velges blant lipofile molekyler som kjent av fagmannen. Fortrinnsvis består det lipofile området av en eller flere rette eller forgrenede, eventuelt mettede, eventuelt halogenerte, alifatiske kjeder. Det lipofile området kan likeledes med fordel velges blant steroidderivater.

35

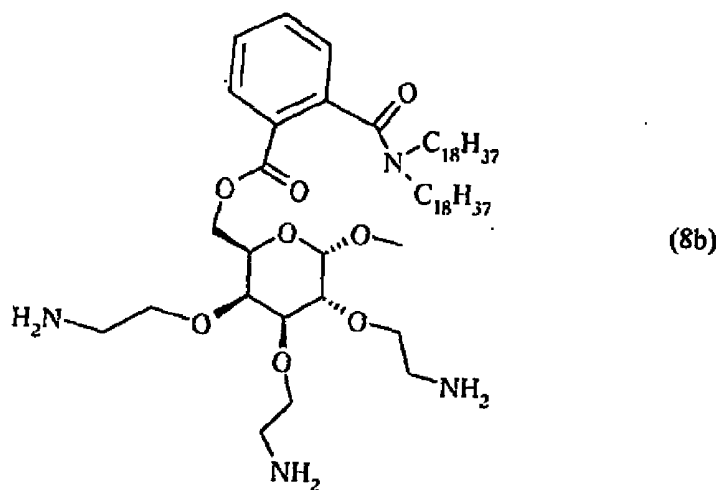
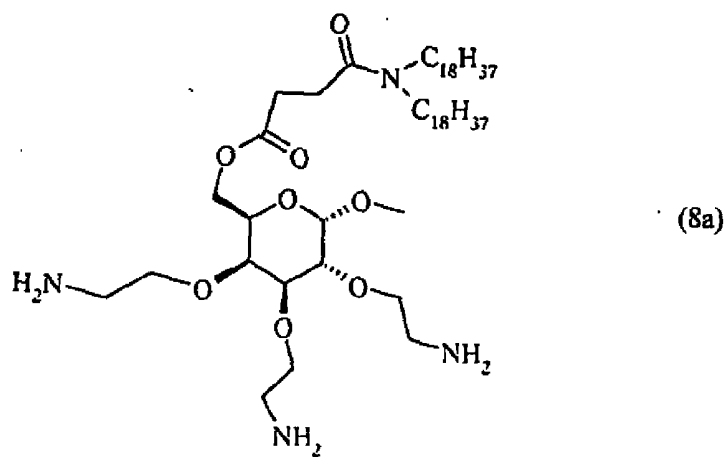
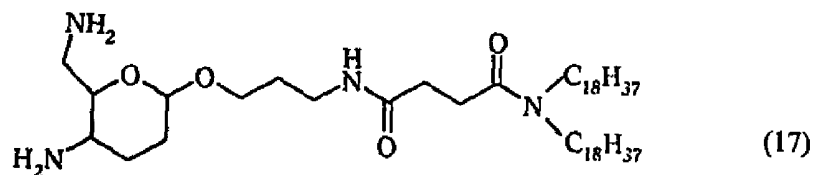
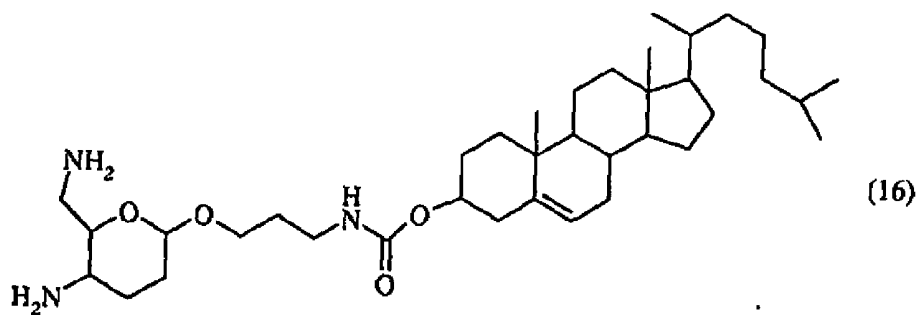
I henhold til en foretrukken variant av oppfinnelsen består det lipofile området av en eller flere alifatiske C₁₀₋₂₂-kjeder og spesielt C₁₂₋₂₂-kjeder. Som eksempel kan man nevne de alifatiske kjeder inneholdende 14, 16, 17, 18 eller 19 karbonatomer og særlig
 5 (CH₂)₁₃CH₃, (CH₂)₁₅CH₃, (CH₂)₁₆CH₃, (CH₂)₁₇CH₃ og (CH₂)₁₈CH₃.

Den lipofile del av transfeksjonsmidlene ifølge oppfinnelsen kan med fordel velges blant steroidderivater som for eksempel kolesterol, kolestanol, 3 α -5-cyklo-5 α -kolestan-6 β -ol, kolinsyre, kolesterylformat, kolestanylformat, 3 α ,5-cyklo-5 α -kolestan-6 β -ylformat, kolesterylamin, 6-(1,5-dimetylheksyl)-3 α ,5 α -
 10 dimetylheksadecahydrocyklopenta[a]cyklopropa[2,3]cyklopenta[1,2-f]naftalen-10-ylamin eller kolestanylamin.

I henhold til en foretrukken utførelsesform er det kationiske, hydrofile området koblet til
 15 det lipofile området via et mellommolekyl kalt "spacer". Innenfor oppfinnelsens ramme menes med "spacer" en hvilken som helst syre- eller aminosubstituent som bærer hydrolyserbare funksjoner som tillater å oppnå amid-, karbamat-, ester-, eterbinding eller via en aromatisk cyklus mellom den kationiske, hydrofile del og den lipofile del, som kjent av fagmannen. Koblingen mellom den hydrofile del og den lipofile del skjer fortrinnsvis
 20 i en av gruppene Z som er til stede på det kationiske, hydrofile intermediat med formel (I) og anvendelig for syntese av overføringsmidler ifølge oppfinnelsen. Fortrinnsvis skjer koblingen mellom det hydrofile og lipofile området i posisjon 2 eller i posisjon 5 eller 6 (i henhold til om y som er til stede på cyklusen er lik 0 eller 1) på cyklusen av den kationiske, hydrofile del med den generelle formel (I), via en "spacer"-gruppe.

25 På foretrukken måte omfatter "spacer"-gruppen en aromatisk eller alifatisk kjede. Videre omfatter "spaceren" med fordel en eller flere grupper valgt blant amid-, karbamat-, ester-, eter- eller cykliske, aromatiske grupper. "Spacerene" er fortrinnsvis slike med formlene -O-CO-(CH₂)_x-COOH, -O-(CH₂)_x-COOH, -O-CO-(CH₂)_x-NH₂, -O-(CH₂)_x-NH₂, -NH-(CH₂)_x-NH₂, der x betyr et helt tall fra og med 1 til og med 6.

Som representative transfeksjonsmidler ifølge oppfinnelsen kan mer spesielt nevnes forbindelsene (16), (17), (8a) og (8b) med formlene:



Foreliggende oppfinnelse angår likeledes fremgangsmåter for fremstilling av denne nye klasse midler for transfeksjon av nukleinsyrer som definert ovenfor. Således angår oppfinnelsen også en fremgangsmåte for fremstilling av transfeksjonsmidler som beskrevet ovenfor og fremgangsmåten karakteriseres ved at man kobler det lipofile område ved hjelp av en "spacer" til heterocyklen med den generelle formel som definert ovenfor.

Det kationiske, hydrofile området med den generelle formel (I) kan fremstilles på forskjellige måter i henhold til den relative posisjon av aminofunksjonene på ringen og deres antall.

Når man ønsker å oppnå et kationisk, hydrofilt område med den generelle formel (I) der minst en av substituentene Z er en "spacer" som tillater binding til den lipofile del og minst en av gruppene Z er en OR-gruppe, der R betyr en gruppe $(\text{CH}_2)_n\text{-NR}_1\text{R}_2$, arbeider man ut fra et tilsvarende derivat der alle substituentene $\text{O}-(\text{CH}_2)_n\text{-NR}_1\text{R}_2$ er hydroksyfunksjoner.

I et første trinn blir derivatet som bærer hydroksyfunksjonene underkastet en O-alkylering i henhold til klassiske metoder som kjent av fagmannen. Særlig arbeider man ved hjelp av et alkyleringsmiddel i basisk medium i klassiske alkyleringsoppløsningsmidler i nærvær av en krone-eter og ved en temperatur mellom 10 og 60°C.

Som alkyleringsmiddel benyttes særlig alkylaminer, halogenerte esterderivater som for eksempel alkylhalogenacetat, eller halogenerte alkoholderivater. Fortrinnsvis benytter man alkylbromacetat. Alkylfunksjonene velges som funksjon av den verdi man ønsker å ha for n. For, for eksempel n lik 2, benyttes fortrinnsvis etylbromacetat.

De benyttede oppløsningsmidler er klassiske oppløsningsmidler for O-alkylering, for eksempel dimetylformamid, dimetylacetamid, dimetylsulfoksyd, acetonitril, tetrahydrofuran (THF), og så videre. Fortrinnsvis benyttes THF.

Reaksjonen gjennomføres i nærvær av en base, for eksempel kaliumhydroksyd eller natriumhydrid.

I et andre trinn blir karboksyfunksjonene i det oppnådde derivat redusert til alkohol i henhold til metoder som kjent av fagmannen. Man arbeider særlig under innvirkning av et reduksjonsmiddel i klassiske, kompatible oppløsningsmidler.

Som reduksjonsmiddel kan man for eksempel nevne borandimetylsulfid (BMS), litium-aluminiumhydrid eller natriumborhydrid.

- 5 Kompatiblene oppløsningsmidler er for eksempel etere eller alkoholer. Fortrinnsvis benyttes tetrahydrofuran (THF).

I et tredje trinn blir de oppnådde hydroksyfunksjoner azidert ved klassiske metoder som kjent av fagmannen.

10

Man arbeider her særlig ved innvirkning av hydrazosyre i nærvær av trifenyfosfin og dietylazodikarboksylat i et oppløsningsmiddel som er forenelig med reaksjonen.

- 15 Oppløsningsmidlene som kan benyttes er klassiske azideringsoppløsningsmidler som for eksempel tetrahydrofuran, benzen, toluen, kloroform, diklormetan, og så videre og er fortrinnsvis tetrahydrofuran (THF).

Til slutt blir azidfunksjonene overført til aminofunksjoner ved klassiske metoder som kjent av fagmannen.

20

Man arbeider særlig ved reduksjon i surt medium, for eksempel ved hydrogenering i surt medium i nærvær av palladium-på-karbon eller ved å benytte en Staudinger-reaksjon, eller også ved innvirkning av et reduksjonsmiddel som litiumaluminiumhydrid, natriumborhydrid, tinn(II)klorid, og så videre.

25

Man oppnår på denne måte en kationisk, hydrofil forbindelse med den generelle formel (I) der minst en av substituentene Z er en "spacer" som tillater binding til den lipofile del og der minst en av gruppene Z er en gruppe OR, der R betyr en $-(CH_2)_n-NR_1R_2$.

- 30 Koblingen til den lipofile del gjennomføres derefter ved klassiske metoder som kjent av fagmannen og særlig ved peptidisk kobling (M. Bodanski, "Principles and Practices of Peptides Synthesis", utg. Springer Verlag). Koblingen skjer på nivå med den gruppe Z som er en "spacer".

- 35 Når en av disse Z er en "spacer"-gruppe, blir denne eventuelt beskyttet på forhånd. Det samme gjelder aminofunksjonene som bæres av den kationiske, hydrofile del som

fortrinnsvis beskyttes før peptidkoblingen. Beskyttelsen og fjerning av de beskyttende rester skjer i henhold til i og for seg kjente metoder.

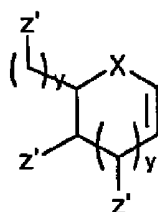
Beskyttelsen kan gjennomføres ved hjelp av en hvilken som helst kompatibel gruppe og
 5 hvis innføring og fjerning ikke endrer resten av molekylet. Særlig arbeider man i henhold til de metoder som er beskrevet av T.W. Greene i "Protective Groups in Organic Synthesis", A. Wiley-Interscience Publication (1981) eller av Mc Omie i "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press (1973).

10 Som eksempel kan de beskyttende grupper velges blant restene trimetylsilyl, benzhydryl, tetrahydropyranyl, formyl, acetyl, kloracetyl, trikloracetyl, trifluoracetyl, etoksykarbonyl, tert-butoksykarbonyl, trikloretoxy-karbonyl, og så videre.

En annen syntesevei tillater å komme frem til en andre serie kationiske, hydrofile forbindelser. Denne andre utførelsesform skiller seg fra den første idet det glucidiske skelett
 15 transformeres.

Således er utgangsforbindelsen en glycal med den generelle formel (II):

20



(II)

25

der substituentene Z' er acetoksyfunksjoner. Glycalene som benyttes er kommersielt tilgjengelige eller kan oppnås ved en hvilken som helst kjent metode fra kommersielle glucider og særlig ved omsetning av de tilsvarende acetobromsukkere med paret sink:kobber.

30

I et første trinn blir den acetylerede glycal alkyleret i henhold til klassiske metoder som velkjente for fagmannen.

Særlig benytter man her en Ferrier-reaksjon ved innvirkning, i nærvær av en Lewis-syre,
 35 på en aminoalkohol, en alkylalkoxykarbonylalkohol, en karboksyalkohol eller en hvilken som helst annen alkohol som er funksjonalisert med en gruppe som tillater kobling til et lipofilt område.

Fortrinnsvis gjennomføres reaksjonen i nærvær av bortrifluorid i et forenelig oppløsningsmiddel, for eksempel en eter som etyleter.

- 5 I et andre trinn blir det oppnådde, umettede glycosid redusert i henhold til klassiske metoder som velkjente for fagmannen.

Særlig gjennomfører man en reduksjon i surt medium, for eksempel ved hydrogenering i surt medium i nærvær av palladium-på-karbon.

10

Derefter blir, i et tredje trinn, acetoksyfunksjonene som er til stede på ringen, transformert til hydroksyfunksjoner ved hjelp av en hvilken som helst kjent metode.

- 15 Særlig arbeider man ved transforestring ved hjelp av et alkoholat, for eksempel natriummetanoat.

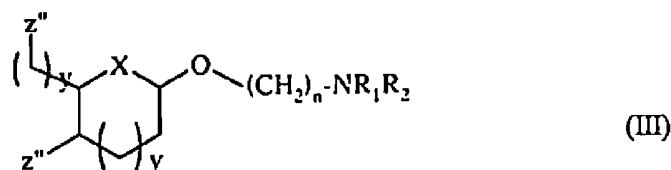
I et fjerde trinn blir hydroksyfunksjonene som er til stede på ringen transformert til azidfunksjoner ved hjelp av en hvilken som helst kjent metode.

- 20 Særlig arbeider man for eksempel ved innvirkning av hydrazosyre i nærvær av trifenyfosfin og dietylazodikarboksylat i et oppløsningsmiddel som er kompatibelt med reaksjonen.

- 25 De benyttede oppløsningsmidler er klassiske azideringsoppløsningsmidler og er fortrinnsvis tetrahydrofuran, THF.

Man oppnår på denne måte et kationisk, hydrofilt område med den generelle formel (III):

30



35

der Z'' enten er et hydrogenatom eller en azidgruppe og der minst en Z'' er forskjellig fra hydrogen.

Den lipofile del kan kobles til aminofunksjonen $-NR_1R_2$ i henhold til velkjente metoder, særlig ved peptidisk kobling (M. Bodanski, "Principles and Practices of Peptides Synthesis", utg. Springer Verlag) eller også ved kondensasjon.

5

Alkoholen som benyttes under det første trinn omfatter en amino-, ester- eller en hvilken som helst annen funksjon som tillater kobling til et lipofilt område og bør fortrinnsvis beskyttes på forhånd. Beskyttelsen og fjerningen av den beskyttende rest etter kobling med det lipofile området gjennomføres i henhold til kjente metoder.

10

Beskyttelsen kan gjennomføres ved hjelp av en hvilken som helst gruppe som er kompatibel og hvis anbringelse og fjerning ikke endrer resten av molekylet. Særlig arbeider man i henhold til de metoder som er beskrevet av T.W. Greene i "Protective Groups in Organic Synthesis", A. Wiley-Interscience Publication (1981) eller av Mc Omie i

15

"Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press (1973).

Som eksempel kan de beskyttende grupper velges blant restene trimetylsilyl, benzhydryl, tetrahydropyranyl, formyl, acetyl, kloracetyl, trikloracetyl, trifluoracetyl, etoksykarbonyl, tert-butoksykarbonyl, trikloretoksy-karbonyl, ftalimido, og så videre.

20

Til slutt blir i et siste trinn azidfunksjonene som bæres av ringen med 5- eller 6-kjede-ledd omdannet til aminofunksjoner ved klassiske metoder som velkjente av fagmannen og som ikke endrer resten av molekylet. Fortrinnsvis arbeider man ved innvirkning av trifenyfosfin i nærvær av vann.

25

En hvilken som helst annet metode som kjent av fagmannen og som fører til nukleinsyreoverføringsmidlene ifølge oppfinnelsen, ligger likeledes innenfor rammen av oppfinnelsen.

30

Som ikke-begrensede eksempel fører den første utførelsesform av oppfinnelsen til overføringsmidler med formlene (8a) og (8b), mens den andre utførelsesform fører til overføringsmidler med formlene (16) og (17) slik at det angitt i eksempeldelen i foreliggende beskrivelse.

35

Interessen for den andre syntesevei for kationiske, hydrofile områder ligger prinsipielt i de få trinn som er nødvendige for syntesen og i versatiliteten av det oppnådde, aminerte

synton. Et slikt kationisk hode kan så kondenseres med forskjellige hydrofobe substituentter.

Som nevnt innledningsvis angår oppfinnelsen også et preparat og dette preparat
5 karakteriseres ved at det omfatter et transfeksjonsmiddel som beskrevet ovenfor og minst en nukleinsyre.

Fortrinnsvis omfatter preparatet et forhold på 0,1 til 50 nanomol vektor pr. μg
nukleinsyre. Fortrinnsvis ligger forholdet mellom 2 og 20 nanomol vektor pr. μg
10 nukleinsyre og aller helst ligger forholdet mellom 4 og 12 nanomol vektor pr. μg
nukleinsyre. Helt spesielt foretrukket er det at nukleinsyre-overføringsmidlet er til stede i et forhold på 8 til 12 nanomol vektor pr. μg nukleinsyre.

Innenfor rammen av oppfinnelsen menes med "nukleinsyre" også en
15 desoksyribonukleinsyre og en ribonukleinsyre. Det kan dreie seg om naturlige eller kunstige sekvenser og særlig genomisk DNA eller gDNA, komplementær DNA eller cDNA, meddeler RNA eller mRNA, overførings-RNA eller tRNA, ribosomisk RNA eller rRNA, hybridsekvenser eller syntetiske eller semisyntetiske sekvenser, eventuelt modifiserte oligonukleotider. Disse nukleinsyrer kan være av human, animalsk,
20 vegetabilsk, bakteriell eller viral opprinnelse. De kan oppnås på enhver måte som er velkjent for fagmannen og særlig ved avsøking av banker, ved kjemisk syntese eller også ved blandede metoder som inkluderer kjemisk eller enzymatisk modifikasjon av sekvenser oppnådd ved avsøking av banker. De kan modifiseres kjemisk.

25 Hva mer spesielt angår desoksyribonukleinsyrene, kan disse være enkelt- eller dobbeltstrenget med korte oligonukleotider eller meget lengre sekvenser. Særlig består nukleinsyrene med fordel av plasmider, vektorer, episomer, ekspresjonskassetter, og så videre. Disse desoksyribonukleinsyrer kan bære en eventuelt funksjonell replikasjonsopprinnelse i målcellen, eller ett eller flere markørgener, regulatorsekvenser
30 for transkripsjon eller replikasjon, terapeutisk interessante gener, eventuelt modifiserte antiretningssekvenser, bindingsområder til andre cellulære komponenter, og så videre.

Fortrinnsvis omfatter nukleinsyren en ekspresjonskassett bestående av ett eller flere gener av interesse under kontroll av en eller flere promotere og en transkripsjonell
35 terminator som er aktiv i målcellene.

Innenfor rammen av oppfinnelsen menes med gen av terapeutisk interesse særlig et hvilket som helst gen som koder for et proteinprodukt som har en terapeutisk virkning. Proteinproduktet som kodes på denne måte kan særlig være et protein eller et peptid. Proteinproduktet kan være eksogent homolog eller endogent vis á vis målcellen, det vil si et produkt som normal uttrykkes i målcellen når denne ikke oppviser noen patologi. I dette tilfellet tillater ekspresjonen av et protein, for eksempel å bøte på en utilstrekkelig ekspresjon i cellen eller ekspresjon av et inaktivt protein eller et lite aktivt protein på grunn av en modifikasjon, eller også å overeksprimere proteinet. Genet av terapeutisk interesse kan også kode for en mutant av et cellulært protein, med øket stabilitet, modifisert aktivitet, og så videre. Proteinproduktet kan likeledes være heterologt vis á vis målcellen. I dette tilfellet kan for eksempel et uttrykt protein komplettere eller tilveiebringe en aktivitet som er defektiv i cellen og derved tillate den å kjempe mot en patologi, eller å stimulere en immunrespons.

Blant de terapeutiske produkter innenfor rammen av oppfinnelsen kan man mer spesielt nevne enzymer, blodderivater, hormoner, lymfokiner: interleukiner, interferoner, TNF, og så videre (FR 92/03120), vekstfaktorer, neurotransmittere eller deres forløpere eller synteseenzymer, trofiske faktorer (BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HAP/pleiotrofin, og så videre), apolipoproteiner (ApoAI, ApoAIV, ApoE, og så videre, FR93/05125), dystrofin eller et minidystrofin (FR 91/11947), protein CFTR-assosiert til mucoviskidose, suppressorgener for tumorer (p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, og så videre, FR 93/04745), gener som koder for faktorer implikert i koagulering (faktorene VII, VIII, IX), gener som intervenserer i fordelingen av DNA, selvmordsgener (thymidinkinase, cytosindeaminase), gener for hemoglobin eller andre proteintransportører, metabolismeenzymer, katabolismeenzymer, og så videre.

Nukleinsyren av terapeutisk interesse kan likeledes være et gen eller en antigenretningssekvens hvis ekspresjon i den innsiktede celle tillater å kontrollere ekspresjonen av gener eller transkripsjon av cellulær mRNA. Slike sekvenser kan for eksempel transkriberes i målcellen til RNA som er komplementær cellulær mRNA og derved blokkere transkripsjonen til protein, i henhold til den teknikk som er beskrevet i EP 140 308. De terapeutiske gener omfatter likeledes sekvenser som koder for ribozyper og som er i stand til selektivt å destruere mål-RNA (EP 321 201).

Som antydnet tidligere kan nukleinsyren likeledes omfatte ett eller flere gener som koder for et antigenisk peptid, i stand til hos mennesker eller dyr å generere en immunrespons. I den spesielle utførelsesform tillater oppfinnelsen realisering enten av vaksiner eller av

immunoterapeutiske behandlinger som anvendes på mennesker eller dyr, særlig mot mikroorganismer, viruser eller cancere. Det kan særlig dreie seg om antigeniske peptider som er spesifikke for Epstein-Barr-virusen, HIV-virusen, hepatitt-B-virusen (EP 185 573), pseudo-hundegalskapsvirusen, "syncytia forming virus", andre viruser eller
5 også antigeniske peptider som er spesifikke for tumorer (EP 259 212).

Fortrinnsvis omfatter nukleinsyren likeledes sekvenser som tillater ekspresjon av et gen av interesse og/eller gen som koder for et antigenisk peptid i den ønskede celle eller det ønskede organ. Det kan dreie seg om sekvenser som naturlig er ansvarlige for ekspresjonen av det angjeldende gen når sekvensene er i stand til å funksjonere i den infektete
10 celle. Det kan likeledes dreie seg om sekvenser av en annen opprinnelse (ansvarlig for ekspresjonen av andre proteiner, eller også syntetiske slike). Særlig kan det dreie seg om promotersekvenser for eukaryotiske eller virale gener. For eksempel kan det dreie seg om promotersekvenser fra genomet av cellen man ønsker å infektete. Videre kan det
15 dreie seg om promotersekvenser som stammer fra genomet av en virus. I denne forbindelse kan man nevne promoterene for genene E1A, MLP, CMV, RSV, osv. Særlig kan det dreie seg om promotersekvenser for eukaryotiske eller virale gener. For eksempel kan det dreie seg om promotersekvenser fra genomet av cellen man ønsker å infektete. Videre kan det dreie seg om promotersekvenser som stammer fra genomet av
20 en virus. I denne forbindelse kan man nevne promoterene for genene E1A, MLP, CMV, RSV, og så videre. Videre kan disse sekvenser modifiseres ved tilsetning av sekvenser for aktivering, regulering, og så videre. Det kan likeledes dreie seg om en induktibel eller repressibel promoter.

25 Videre kan nukleinsyrene likeledes, særlig oppstrøms genet av terapeutisk interesse, bære en signalsekvens som styrer det syntetiserte, terapeutiske produkt inn i målcellens sekresjonsveier. Denne signalsekvens kan være den naturlige signalsekvens for det terapeutiske produkt, men det kan også dreie seg om en hvilken som helst annen funksjonal sekvens eller en kunstig signalsekvens. Nukleinsyren kan likeledes omfatte
30 en signalsekvens som styrer det syntetiserte, terapeutiske produkt mot et spesielt rom i cellen.

Preparatene ifølge oppfinnelsen kan videre omfatte adjuvanter i stand til å forbinde seg med kompleksene av overføringsmidler og nukleinsyrer og å forbedre transfeksjons-
35 kraften. I en annen utførelsesform angår oppfinnelsen således preparater som omfatter en nukleinsyre, et transfeksjonsmiddel som definert ovenfor og en eller flere adjuvanter

i stand til å assosiere seg med de nukleolipidiske komplekser og forbedre deres transfeksjonskraft.

I denne forbindelse kan preparatene ifølge oppfinnelsen som adjuvant inneholde ett eller
5 flere nøytrale lipider. Slike preparater er særlig fordelaktige, spesielt når ladningsforholdet mellom transfeksjonsmiddel og nukleinsyre er lavt. Søker har kunnet påvise at tilsetning av et nøytralt lipid tillater å forbedre dannelsen av nukleolipidiske partikler og favoriserer penetrering av partikkelen inn i cellen under destabilisering av membranen.

- 10 Mer spesielt er de nøytrale lipider som benyttes innenfor rammen av oppfinnelsen lipider med to fettkjeder. På spesielt fordelaktig måte benytter man naturlige eller syntetiske lipider av zwitterioniske type eller berøvet for ioneladning under fysiologiske betingelser. De kan mer spesielt velges blant de dioleoylfosfatidyletanolamin (DOPE), oleoylpalmitoylfosfatidyletanolamin (POPE), di-stearoyl-, -palmitoyl-, eller -
15 mirystoylfosfatidyletanolaminer samt deres 1 til 3 ganger N-metylerede derivater, fosfatidylglyceroler, diacylglyceroler, glycosyldiacylglyceroler, cerebrosider (som særlig galactocerebrosider), sfingolipider (som særlig sfingomyeliner) eller også asialogangliosider (som særlig asialoGM1 og -GM2).
- 20 De forskjellige lipider kan oppnås enten ved syntese eller ved ekstrahering fra organer (som hjernen) eller egg, ved teknikker som er velkjente for fagmannen. Særlig kan ekstraheringen av naturlige lipider realiseres ved hjelp av organiske oppløsningsmidler (se også Lehninger, "Biochemistry").
- 25 I den senere tid har søkerne kunnet påvise at det likeledes er spesielt fordelaktig som adjuvant å benytte en forbindelse som eventuelt intervenserer direkte i kondensasjonen av nukleinsyren (WO 96/25508). Nærværet av en slik forbindelse i et preparat ifølge oppfinnelsen tillater å redusere mengden transfeksjonsmiddel med de fordelaktige konsekvenser dette har på det toksikologiske plan, uten at det fører til noen ugunstig
30 konsekvens for transfeksjonsaktiviteten. Med forbindelse som intervenserer i kondensasjonen av nukleinsyren, menes en forbindelse som eventuelt direkte kompakterer nukleinsyren. Mer spesielt kan denne forbindelse enten virke direkte på nukleinsyren som skal transfekteres eller intervensere på en anneksert forbindelse som i sin tur direkte er implikert i kondensasjonen av nukleinsyren. Fortrinnsvis virker den
35 direkte på nukleinsyren. For eksempel kan prekompakteringsmidlet være et hvilket som helst polykation som polylysin. I henhold til en foretrukket utførelsesform stammer dette middel som intervenserer i kondensasjonen av nukleinsyren helt eller delvis et

protamin, et histon eller et nukleolin og/eller et derivat derav. Et slikt middel kan likeledes helt eller delvis bestå av peptidiske deler (KTPKKAKKP) og/eller (ATPAKKA), der antallet deler kan variere mellom 2 og 10. I strukturen for forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan disse deler være repetert eventuelt kontinuerlig.

5 Videre kan de være separert ved forbindelser av biokjemisk art, for eksempel ett eller flere aminosyrer, eller av kjemisk art.

I en spesielt foretrukken utførelsesform omfatter preparatene ifølge oppfinnelsen i tillegg et målsøkingselement som tillater å orientere overføringen av nukleinsyren. Dette

10 målsøkingselement kan være et ekstracellulært målsøkingselement som tillater å orientere overføringen av DNA mot visse cellulære typer eller visse ønskede vev (tumorable, hepatiske, hematopoietiske celler, og så videre). Det kan likeledes dreie seg om et intracellulært målsøkingselement som tillater å orientere overføringen av nukleinsyre mot visse privilegerte, cellulære rom (mitokondrier, kjerne, og så videre).

15 Målsøkingselementet kan være forbundet med overføringsmidlet for nukleinsyrene ifølge oppfinnelsen eller også nukleinsyren slik det er presisert tidligere.

Blant målsøkingselementer som kan benyttes innenfor rammen av oppfinnelsen, kan nevnes sukkere, peptider, proteiner, oligonukleotider, lipider, neuromediatorer, hor-

20 moner, vitaminer eller derivater derav. Fortrinnsvis dreier det seg om sukkere, peptider eller proteiner som antistoffer eller antistoff-fragmenter, cellulære reseptorligander eller fragmenter derav, reseptorer eller fragmenter av reseptorer, og så videre. Særlig kan det dreie seg om reseptorligander for vekstfaktorer, cytokinreseptorer, reseptorer for typen cellulært lektin eller ligander med RGD-sekvens med en affinitet for adhesjonsprotein-

25 reseptorer som integriner. Man kan likeledes nevne reseptorer for transferrin, HDL eller LDL, eller folat-transportøren. Målsøkingselementet kan likeledes være et sukker som tillater å sikre på lektiner som reseptorer for asialoglycoproteiner eller syalyderte forbindelser som sialyde Lewis X, eller et Fab-fragment av antistoff, eller et enkeltkjede-

30 antistoff (ScFv). I den senere tid er det likeledes beskrevet naturlige eller syntetiske ligandpeptider som særlig er interessante på grunn av selektiviteten vis à vis spesifikke celler og i stand til effektivt å fremme internaliseringen i cellene (Bary et al., "Nature Medicine", 2, 1996, 299-305).

Assosiasjonen av målsøkingselementer til de nukleolipidiske komplekser kan gjennom-

35 føres ved enhver teknikk av kjent type, for eksempel ved kobling til en hydrofob del eller til en del som interagerer med nukleinsyren av overføringsmidlet ifølge oppfinnelsen, eller også med en gruppe som interagerer med overføringsmidlet ifølge

oppfinnelsen eller med nukleinsyren. De angjeldende interaksjoner kan i henhold til en foretrukken utførelsesform være av ionisk eller kovalent art.

I henhold til en annen variant kan preparatene ifølge oppfinnelsen også eventuelt inne-
5 holde minst et ikke-ionisk overflateaktivt middel i en mengde tilstrekkelig til å stabilisere størrelsen av de nukleolipidiske komplekspartikler. Innføringen av ikke-ioniske overflateaktive midler forhindrer dannelsen av aggregater, noe som gjør preparatet spesielt egnet for administrering in vivo. Preparatene ifølge oppfinnelsen omfattende slike overflateaktive midler oppviser en fordel på innokuitetsplanet. De
10 oppviser likeledes en ytterligere fordel dithen at de reduserer risikoen for interferens med andre proteiner, tatt i betraktning reduksjonen av den totale ladning av preparatene av de nukleolipidiske komplekser.

De overflateaktive midler består fordelaktig av minst et hydrofobt segment og minst et
15 hydrofilt segment. Fortrinnsvis er det hydrofobe segment valgt blant alifatiske kjeder, hydrofobe polyoksyalkylener, alkylidenpolyestere, glycolpolyetylen med benzyrisk polyeterhode og kolesterol, mens det hydrofile segment fortrinnsvis er valgt blant hydrofile polyoksyalkylener, polyvinylalkoholer, polyvinylpyrrolidoner eller sakkarider. Slike ikke-ioniske overflateaktive midler er beskrevet i PCT/FR98/00222.

20 Som nevnt innledningsvis angår oppfinnelsen også anvendelsen av transfeksjonsmidlene ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament inneholdende minst en nukleinsyre som skal overføres.

25 Slik anvendelse er særlig fordelaktig fordi disse transfeksjonsmidlene øker effektiviteten for transfeksjonen, mens det hele tiden oppvises en cellulær toksisitet som er helt fraværende eller meget redusert.

For anvendelser in vivo, for eksempel for studium av regulering av gener, tildannelse av
30 dyremodeller for patologi eller terapi, kan preparatene ifølge oppfinnelsen formuleres med henblikk på administrering ad topisk, kutan, oral, rektal, vaginal, parenteral, intranasal, intravenøs, intramuskulær, subkutan, intraokulær, transdermal, intratrakeal, intraperitoneal vei eller andre. Fortrinnsvis inneholder de farmasøytiske preparater ifølge oppfinnelsen en farmasøytisk akseptabel bærer for en injiserbar formulering, særlig for
35 en direkte injeksjon i det ønskede organ eller for en administrering ad topisk vei (på huden og/eller en slimhinne). Det kan særlig dreie seg om sterile, isotoniske oppløsninger eller tørkede preparater, særlig lyofiliserte slike, som ved tilsetning av for

eksempel sterilisert vann eller fysiologisk serum tillater konstituering av injiserbare preparater. Nukleinsyredosene som benyttes for injeksjon så vel som antallet administreringer kan tilpasses som funksjon av forskjellige parametere og særlig som funksjon av den benyttede administreringsvei, den angjeldende patologi, genet som skal uttrykkes eller også den tilsiktede behandlingsvarighet. Hva mer spesielt angår administreringsmåten, kan det dreie seg enten om en injeksjon direkte inn i vevet, for eksempel i tumorer, eller i sirkulasjonsveiene, eller om en behandling av celler kultur fulgt av deres reimplantering in vivo ved injeksjon eller poding. Det angjeldende vev er for eksempel innenfor rammen av oppfinnelsen muskler, hud, hjerne, lunger, lever, milt, benmarg, thymus, hjerte, lymfen, blodet, knoklene, brusk, nyrene, blæren, maven, tarmene, testiklene, ovariene, rektum, nervesystemet, øynene, kjertlene, bindevev, og så videre.

Foreliggende oppfinnelse angår i tillegg en fremgangsmåte for overføring av nukleinsyrer til celler og som karakteriseres ved følgende trinn:

- (1) å bringe nukleinsyren i kontakt med et transfeksjonsmiddel som definert ovenfor for å danne et nukleolipidisk kompleks, og
- (2) å bringe cellene i kontakt med komplekset dannet under (1).

Kontakten mellom cellene og komplekset kan realiseres ved inkubering av cellene med det nukleolipidiske kompleks (for anvendelse in vitro eller ex vivo) eller ved injeksjon av komplekset i en organisme (for anvendelse in vivo). Inkuberingen gjennomføres fortrinnsvis i nærvær av for eksempel 0,01 til 1000 μg nukleinsyre pr. 10^6 celler. For en administrering in vivo kan for eksempel nukleinsyredoser mellom 0,01 og 10 mg benyttes.

I det tilfellet der preparatene ifølge oppfinnelsen inneholder et eller flere ytterligere adjuvanter som definert tidligere, kan det eller disse blandes på forhånd med lipidet ifølge oppfinnelsen eller med nukleinsyren.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer således en fremgangsmåte som er spesielt fordelaktig for overføring av nukleinsyrer, særlig for behandling av sykdommer, omfattende administrering in vivo, ex vivo eller in vitro av en nukleinsyre som koder for et protein eller som kan transkriberes til en nukleinsyre egnet for å korrigere denne syren, idet nukleinsyren forbindes med en forbindelse med den generelle formel (I) under de tidligere gitte betingelser. Mer spesielt er denne metode anvendelig på sykdommer som stammer fra en defekt ved et protein- eller nukleinprodukt, idet

nukleinsyren som administreres koder for dette proteinprodukt eller transkriberes til et nukleinprodukt eller også utgjør nukleinproduktet.

Foreliggende oppfinnelse angår enhver anvendelse av et transfeksjonsmiddel for
5 nukleinsyrer ifølge oppfinnelsen for transfeksjon av celler.

Transfeksjonsmidlene for nukleinsyrer ifølge oppfinnelsen er særlig anvendelige for
overføring av nukleinsyrer i primærceller eller i et etablerte linjer. Det kan dreie seg om
fibroblastiske, muskulære, nerve- (neuroner, astrocytter, glialceller), hepatiske celler,
10 videre den hematopoietiske linje (lymfocytter, CD34, dendrittiske, og så videre),
epitelialceller, og så videre, i differensiert eller pluripotent (forløpere) form.

I tillegg til det som er sagt ovenfor omfatter oppfinnelsen likeledes andre karakteristika
og fordeler som fremgår fra de eksempler og figurer som beskrives nedenfor og som
15 skal illustrere oppfinnelsen nærmere.

Figurliste

Figur 1/5: Skjema for syntese av forbindelsene (1) til (5).

20 Figur 2/5: Skjema for syntese av forbindelsene (5) til (8a) og (8b).

Figur 3/5: Skjema for syntese av forbindelsene (9) til (16).

Figur 4/5: Måling av effektiviteten av transfeksjonen in vitro for forbindelsene (8a) og
25 (8b) ved hjelp av måling av luciferaseaktiviteten i HeLa-celler i fravær av
serum. Målingene gjennomføres ved forskjellige forhold mellom antall
nanomol vektor og μg DNA og er representert ved stolper. Proteindosene
for hvert av preparatene er også bestemt og representeres ved kurve i
heltrukken linje i de samme diagram.

30

Figur 5/5: Måling av effektiviteten av transfeksjonen in vitro for forbindelsene (8a) og
(8b) ved hjelp av måling av luciferaseaktiviteten i NIH 3T3-celler i fravær
av serum. Målingene skjer ved forskjellige forhold mellom antall nanomol
vektor og μg DNA og er representert ved stolper.

35

Materiale og metoder

Rensing ved HPLC (High Performance Liquid Chromatography) gjennomføres en Waters LC 4000-apparatur på en Vydac C4-kolonne, eluert med en gradient av acetonitril i vann.

5

Målingene av fluorescensen gjennomføres på Perkin Elmer LS50B under anvendelse av eksiterings- og emisjonsbølgelengder på respektivt 260 nm og 590 nm. Portstørrelsen for eksitasjonen og emisjonen reguleres til 5 nm. Fluorescensverdiene registreres etter tilsetning av 5 µg etidiumbromid pr. ml sluttkonsentrasjon.

10

De kjernemagnetiske resonansspektre, NMR, registreres ved 300,13 MHz for proton-NMR og 75,47 MHz for karbon-NMR, på en Bruker MSL 300-apparatur i deuterert kloroform.

15 **EKSEMPLER****Eksempel 1: Syntese av overføringsmidlet (8a) fra metylbenzyloksy-6-galactopyranose.**

De forskjellige reaksjonstrinn er vist skjematisk i figurene 1/5 og 2/5.

20

a) Syntese av metyl-benzyloksy-6-tri-O-(karboksy-2'-etyl)-2,3,4-β-D-galactopyranosid (2)

28,4 g (0,1 mol) metyl-benzyloksy-6-b-D-galactopyranosid (1) oppløses i 400 ml THF og anbringes ved 0°C under omrøring. Man tilsetter 32 g (5,7 ekv.) finoppmalt kalium, 0,5 g (2%) krone-eter 18-Cr-6 og 32,5 ml (1,5 ekv.) etylbromacetat. Etter 2 timer dampes det hele inn til tørr tilstand og man gjenoppløser det hele i vann og nøytraliserer den oppnådde oppløsning med 2N saltsyre. Man oppnår på denne måte 32 g forbindelse (2) (utbytte: 70%) som ekstraheres med diklormetan.

30 ¹³C-NMR: δ 172,94, 136,87, 127,93, 127,21, 98,89, 97,22, 78,74, 76,17, 72,97, 69,52, 67,93, 65,39, 54,75.

b) Syntese av metyl-benzyloksy-6-tri-O-(hydroksey-2'-etyl)-2,3,4-β-D-galactopyranosid (3)

35 30 g (0,065 mol) av den ovenfor nevnte trisyre (2) oppløses i 400 ml THF og anbringes ved 0°C under nitrogen. Man tilsetter dråpevis og under omrøring 40 ml borandimetylsulfid. Det omrøres i ytterligere 2 timer ved omgivelsestemperatur og derefter tilsettes

forsiktig metanol i overskudd. Oppløsningen fordampes derefter til tørr tilstand og man gjenoppløser det således oppnådde faststoff flere ganger i metanol. Man oppnår på denne måte 24,5 g av sluttproduktet (3) (utbytte: 90%) som renses på en silisiumkolonne og elueres med etylacetat.

5

c) Syntese av metyl-benzyløksy-6-tri-O-(azido-2'-etyl)-2,3,4-β-D-galactopyranosid (4)

20 g (0,048 mol) av triolet (3), oppnådd i det forutgående trinn, oppløses i 500 ml THF. Man tilsetter 40 g (3,2 ekv.) trifenyfosfin, 160 ml (3,7 ekv.) av en 1,1M toluenoppløsning av hydrazosyre og derefter 24,2 ml (3,2 ekv.) dietylazodikarboksylat. Etter en time fordampes oppløsningen og renses på en silikagelkolonne og elueres med heptan:etylacetat 6:4. Man oppnår på denne måte 17,6 g produkt (4) (utbytte: 90%).

¹³C-NMR: δ 128,47, 127,80, 98,23, 79,05, 76,27, 73,55, 71,92, 70,15, 69,96, 68,77, 68,14, 55,37, 51,41, 51,11, 50,87.

15

d) Syntese av metyl-tri-O-(amino-2'-etyl)-2'3'4'-β-D-galactopyranosid.trisklorhydrat (5)

15 g (0,03 mol) trazid (4) bringes i oppløsning i 200 ml etanol. Man tilsetter 7,5 ml 12N saltsyre og behandler det hele med hydrogen i nærvær av palladium-på-karbon i 3 timer. Etter filtrering fordampes oppløsningsmidlet og den oppnådde rest 85) (12,5 g, utbytte: 95%) benyttes direkte i det etterfølgende trinn.

20

e) Syntese av metyl-tri-O-(tert-butyl-karbamid-2'-etyl)-2-3-4-β-D-galactopyranosid (6)

25

12 g (0,028 mol) klorhydrat (5) bringes i oppløsning i en blanding av 100 ml dioksan og 85 ml 1N natriumhydroksyd. Man tilsetter 18,7 g (3,3 ekv.) di-tert-butyldikarbonat og omrører ved omgivelsestemperatur i 2 timer. Reaksjonsblandingen fordampes og ekstraheres så med 3 x 50 ml diklormetan. De organiske faser slås sammen og tørkes over natriumsulfat og fordampes. Man oppnår på denne måte 15,56 g (utbytte: 90%) av resten (6) som renses på en silikagelkolonne og elueres med etylacetat.

30

f) Syntese av metyl-dioctadecylamido-succinyl-6-tri-O-(tert-butyl-karbamido-2'-etyl)-2,3,4-β-D-galactopyranosid (7a).

10 g (0,016 mol) av det ovenfor nevnte produkt (6) oppløses i 300 ml diklormetan. Man tilsetter suksessivt 14,6 g (1,5 ekv.) dioctadecylamidorsyre, 1,95 g (1 ekv.) dimetylaminopyridin og 6,5 g (2 ekv.) dicykloheksylkarbodiimid. Dioctadecylamidorsyren

35

oppnås ved omsetning av dioctadecylamin og ravsyreanhydrid. Etter en natt tilsettes forsiktig 10 ml (1,7 g) av en oppløsning av oksalsyre i metanol og det hele omrøres i 1 time (utvikling av karbonmonoksyd). Oppløsningen filtreres og fordampes til tørr tilstand og man renser det oppnådde produkt på en silikagelkolonne ved eluering med
 5 heptan:etylacetat 7:3. Man oppnår på denne måte 12,8 g av produkt (7a) (utbytte: 65%).

g) Syntese av metyl-dioctadecylamido-succinyl-6-tri-O-(amino-2'-etyl)-2,3,4-β-D-galactopyranosid.tristrifluoracetat (8a)

10 g (0,008 mol) av produkt (7a) oppløses i 20 ml trifluoreddiksyre ved 90°C. Etter en halv time fordampes oppløsningen og tas opp med 3 x 20 ml toluen. Den oppnådde rest (8a) renses ved HPLC (RP4; vann:acetonitril; 0 → 100%; 20 minutter). Man oppnår på denne måte 9,7 g produkt (8a) (utbytte: 95%).

$MH^+ = 1304$.

15 **Eksempel 2: Syntese av forbindelse (8b) fra metyl-benzyloksy-6-galactopyranose.** De forskjellige reaksjonstrinn er vist skjematisk i figurene 1/5 og 2/5.

De første syntesefaser er identiske med syntesetrinnene a) til e) som beskrevet i eksempel 1. Derefter fortsetter man på følgende måte:

20

f) Syntese av metyl-dioctadecylamido-ftalyl-6-tri-O-(tert-butyl-karbamido-2'-etyl)-2,3,4-β-D-galactopyranosid (7b)

Denne forbindelse oppnås på samme måte som forbindelse (7a), men ved å bruke dioctadecylamidofaltsyre i stedet for dioctadecylamidoravsyre.

25

g) Syntese av metyl-dioctadecylamido-ftalyl-6-tri-O-(amino-2'-etyl)-2,3,4-β-D-galactopyranosid.tristrifluoracetat (8b)

Man oppnår forbindelsen (8b) fra produktet (7b), oppnådd ved det foregående trinn, på samme måte som produktet (8a).

30 $MH^+ = 1317$.

Eksempel 3: Syntese av overføringsmidlet (16) fra triacetylglycal.

35 **a) Syntese av ftalimidopropyl-di-O-acetyl-4,6-bisdesoksy-2,3-b-D-erythrohekseno-2-pyranosid (10)**

De forskjellige reaksjonstrinn er vist i figur 3/5.

13,17 g (0,048 mol) triacetyl-D-glucal (9) oppløses i 250 ml diklormetan. Man tilsetter 11 g (1,1 ekv.) ftalimidopropanol og 1,56 ml (0,26 ekv.) bortrifluoreterat. Etter en time ved omgivelsestemperatur nøytraliseres blandingen med en mettet natriumbikarbonat-oppløsning, dekanteres, tørkes og fordampes. Man oppnår på denne måte 16 g av produktet (10) (utbytte: 80%), renses ved kolonnekromatografi på silikagel og eluert med heptan:etylacetat 5:5.

b) Syntese av ftalimidopropyl-di-O-acetyl-4,6-bisdesoksy-2,3-β-D-glucopyranosid (11)

16 g (0,038 mol) glycosid (10) oppløses i 200 ml etanol. Man tilsetter 0,16 g 10 vekt-%ig palladium-på-karbon og behandler det hele med hydrogen i 2 timer. Etter filtrering fordampes oppløsningen. Man oppnår på denne måte 15,78 g produkt (11) (utbytte: 99%).

c) Syntese av ftalimidopropyl-bisdesoksy-2,3-β-D-glucopyranosid (12)

15 g (0,036 mol) av det ovenfor nevnte produkt (11) oppløses i 250 ml metanol og deretter tilsettes 3,5 ml (0,1 ekv.) 1N natriummetylal. Etter 2 timer nøytraliseres det hele med amberlite IR120-harpiks. Etter filtrering og fordampning oppnås 11,5 g produkt (12) (utbytte 96%).

d) Syntese av ftalimidopropyl-diazido-4,6-tetra-desoksy-2,3,4,6-β-D-glucopyranosid (13)

11 g (0,033 mol) av det desacetylerede produkt (12) oppløses i 250 ml THF. Under omrøring tilsettes suksessivt 21,5 g (2,5 ekv.) trifenyfosfin og 110,5 ml (3,7 ekv.) 1,1M hydrazosyre i toluen. 12,88 ml (2,5 ekv.) dietylazodikarboksylylat tilsettes i en hastighet slik at temperaturen i blandingen ikke overskrider 30°C. Etter en time fordampes oppløsningen til tørr tilstand og det oppnådde produkt renses på en silikagelkolonne og elueres med heptan:etylacetat 8:2. Man oppnår på denne måte 7,2 g produkt (13) (utbytte: 57%).

e) Syntese av aminopropyl-diazido-4,6-tetra-desoksy-2,3,4,6-β-D-glucopyranosid (14)

7 g (0,018 mol) av produkt (13) oppløses i 500 ml etanol, hvorefter man tilsettes 2,6 ml hydrazinhydrat og omrører ved 40°C i 2 timer. Etter fordampning gjenoppløses det hele i diklormetan og man tillater utkrystallisering av det dannede ftalyldiazid. Dette filtreres og man fordamper oppløsningen. På denne måte oppnås 4,17 g produkt (14) (utbytte: 90 %).

f) Syntese av (kolesteryl-O-formamidopropyl)-diazido-4,6-tetra-desoksy-2,3,4,6- β -D-glucopyranosid (15)

6,34 g (0,9 ekv.) kolesterylchlorformat og 4 g (0,016 mol) av produkt (14) bringes i oppløsning i 200 ml etyleter. Det dannes umiddelbart et precipitat og man tilsetter så 50 ml 1N soda. Etter noen minutter blir oppløsningen klar igjen. Man omrører det hele ytterligere 30 minutter, dekanterer, vasker med 2 x 50 ml vann og fordamper oppløsningen til tørr tilstand. Man oppnår på denne måte 9,4 g produkt (15), renses på en kolonne og eluert med heptan:etylacetat 6:4 (utbytte: 90%).

10

g) Syntese av (kolesteryl-O-formamidopropyl)-diamino-4,6-tetra-desoksy-2,3,4,6- β -D-glucopyranosid (16)

9 g (0,013 mol) diazid (15) oppløses i 150 ml 80 %-ig THF og derefter tilsettes 14,2 g (4 ekv.) trifenyfosfin og det hele oppvarmet til 50°C i 1 time. Etter avkjøling bringes det hele på en kolonne med anionisk IRC-50 COOH-harpiks og vasker med 80 %-ig THF. Produktet elueres derefter i form av acetat med THF:vann:eddiksyre 64:16:10. Man oppnår på denne måte 8,9 g produkt (16) (utbytte:90%).

20

$^{13}\text{C-NMR}$: δ 176,55, 156,65, 139,84, 132,02, 128,46, 125,46, 122,44, 97,11, 74,28, 56,66, 56,12, 50,02, 43,70, 42,30, 39,51, 38,57, 36,98, 36,55, 36,16, 35,76, 31,87, 30,30, 28,89, 28,18, 23,82, 22,78, 22,53, 21,03, 19,31, 18,70, 11,84.

Eksempel 4: Syntese av forbindelse (17).

25

a) Syntese av benzyl-(5-O-acetyl-6-acetoksymetyl-5,6-dihydro-2H-pyrazn-2-yl-oksyl)acetat

2,8 g triacetyl-D-glucal (0,01 mol) og 1,6 ml benzylglycolat (1,1 ekv.) bringes i oppløsning i 80 ml kloroform. Man avkjøler det hele i et isbad og tilsetter 0,651 ml bortrifluoreterat (0,5 ekv.) Etter 45 minutter nøytraliseres det hele med en mettet, vandig natriumbikarbonatoppløsning og man tørker over natriumsulfat, filtrerer og konsentrerer. Det hele renses ved kolonnekromatografi på silikagel, eluert med heptan:etylacetat 6:4. Utbyttet er 96%.

35

b) Syntese av (5-O-acetyl-6-acetoksymetyl-tetrahydro-pyran-2-yloksyl)eddiksyre
3,5 g av produktet ovenfor (0,0093 mol) hydrogeneres ved atmosfærisk trykk og omgivelsestemperatur i nærvær av 0,35 g 10 vekt-%-ig palladium-på-karbon i 10 timer.

Man filtrerer over Celite, konsentrerer og renser ved kromatografi på en silikagelkolonne og eluerer med etylacetat. Utbyttet er 90%.

**c) Syntese av N,N-dioctadecyl-(5-O-acetyl-6-acetoksymetyl-tetrahydro-pyran-2-yl-
5 oksy)-acetamid**

0,675 g av det foregående produkt (0,0017 mol) oppløses i 8,6 ml kloroform. Man tilsetter 0,9 ml diisopropyletylamin, 0,899 g dioctadecylamin (1 ekv.) og 0,426 g dicykloheksylkarbodiimid (1,2 ekv.). Etter en natt ved omgivelsestemperatur konsentreres det hele og produktet ekstraheres med heptan. Man renser ved kromatografi på en silikagelkolonne og eluerer med heptan:etylacetat 8:2. Utbyttet er 70%.

**d) Syntese av N,N-dioctadecyl-(5-hydroksy-6-hydroksymetyl-tetrahydro-pyran-2-yl-
15 yloksy)-acetamid**

1,57 g av det forutgående produkt (0,00198 mol) bringes i oppløsning i 10 ml metanol. Man tilsetter 0,197 ml natriummetylat (0,2 ekv.; 2M metanol). Etter 2 timer ved omgivelsestemperatur nøytraliseres og konsentreres det hele. Man renser det hele ved kromatografi på en silikagelkolonne, eluerer med heptan:etylacetat 8:2. Utbyttet er 92%.

**e) Syntese av N,N-dioctadecyl-(5-azido-6-azidometyl-tetrahydro-pyran-2-yl-
20 oksy)-acetamid (17)**

0,6 g av det foregående produkt (0,00087 mol) oppløses i 15 ml THF. Man tilsetter 0,48 g trifenyfosfin (2,1 ekv.) og derefter 0,288 ml DEAD (2,1 ekv.). Når den eksoterme reaksjon er ferdig, tilsettes 1,588 ml av en 1,38M hydrazosyreoppløsning i toluen (2,5 ekv.). Ved slutten av reaksjonen konsentreres massen, tas opp i heptan, filtreres og konsentreres. Derefter renser man det hele ved kromatografi på en silikagelkolonne og eluerer med heptan:etylacetat 8:2. Utbyttet er 72%.

¹³C-NMR: δ 173,21, 172,07, 162,22, 161,77, 118,34, 114,49, 110,65, 108,34, 96,88,
65,18, 64,50, 48,27, 46,54, 40,69, 35,86, 31,78, 30,94, 28,63, 27,56,
26,92, 22,54, 21,84, 13,94.

**Eksempel 5: Assosiasjon av oppfinnelsens transfeksjonsmidler (8a) og (8b) med
DNA.**

Dette eksempel viser arten av assosiasjonen mellom transfeksjonsmidlene ifølge oppfinnelsen og DNA samt dannelsen av kompleksene.

Transfeksjonsmidlene ifølge oppfinnelsen bringes i oppløsning i vann i en konsentrasjon av 10 mM. De således oppnådde oppløsninger er transparente og tilsvarer en organisasjon i form av miceller av kationisk lipid.

- 5 Kompleksene transfeksjonsmiddel/DNA tilveiebringes i henhold til et forhold på 6 nanomol transfeksjonsmiddel pr. μg DNA.

Assosiasjonen av transfeksjonsmidlet (8b) med DNA gir et kompleks med en størrelse lik $92 \text{ nm} \pm 27 \text{ nm}$, en fluorescens på 7% i vann og 60% i 300 mM NaCl.

10

Transfeksjonsmiddelet (8a) ifølge oppfinnelsen, assosiert med DNA, tillater dannelse av et kompleks med størrelse nær $98 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$, en fluorescens på 6% i vann og 55% i 300 mM NaCl.

- 15 Disse resultater viser at transfeksjonsmidlene ifølge oppfinnelsen er i stand til å assosiere seg med DNA og danne partikler hvis midlere diameter er rundt 100 nm, noe som utgjør en størrelse som er spesielt tilpasset passasje gjennom cellemembraner. Denne assosiasjon forblir relativt stabil når man øker mediets ionekraft. Ved 300 mM forblir således mer enn 50% DNA assosiert med oppfinnelsens midler.

20

Eksempel 6: Transfeksjon av DNA in vitro med transfeksjonsmidler (8a) og (8b) ifølge oppfinnelsen.

Effektiviteten for transfeksjonen bedømmes in vitro ved forskjellige doser vektorer: μg DNA.

25

Det genetiske materialet som benyttes for disse forsøk er en konstruksjon av plasmidet pCMV-Luc omfattende rapportørgenet "luciferase", avledet fra plasmidet pGL2-basic Vector [Promega] ved innskyting av et fragment MluI-HindIII inneholdende promoteren av human cytomegalovirus (CMV), hentet fra plasmid pcDNA3 [Invitrogen].

30

Nukleinsyreoppløsninger fortynnet til $40 \mu\text{g/ml}$ i fysiologisk serum (0,15M NaCl) benyttes også.

- 35 Produktene som er beskrevet ifølge oppfinnelsen bringes i oppløsning i vann i en konsentrasjon av $80 \mu\text{M}$ til $800 \mu\text{M}$, og blandes volum for volum med DNA-oppløsning. Den endelige saltkonsentrasjon av 75 mM for umiddelbart å fremstille cytofektante oppløsninger.

For transfeksjonen blir cellene dyrket under egnede betingelser på mikroplater med 24 brønner (2 cm²/brønn) og transfekteres når de er i eksponentiell vektfase og ved 50-70% konfluens.

5

Cellene vaskes med 2 x 500 µl medium berøvet seriske proteiner og bringes tilbake i vekst i medium uten serum. 50 µl cytofektant blanding [1 µg DNA/brønner] settes til cellene [3 brønner/tilstandsvektor-DNA]. Vekstmedium suppleres med den egnede mengde serum 2 timer etter transfeksjon.

10

Transfeksjonseffektiviteten bedømmes 48 timer etter transfeksjon ved hjelp av målingen av ekspresjonen av luciferase i henhold til de anbefalinger som gies for anvendelse av en Promega-kit [Luciferase Assay System]. Toksisiteten for de cytofektante blandinger bedømmes ved målinger av proteinkonsentrasjonene i cellelysatenene.

15

Resultatene som oppnås for transfeksjon av HeLa-celler er samlet i figur 4/5 og de som ble oppnådd for NIH 3T3-celler er antydnet i figur 5/5.

Disse to figurer samt de resultater som er oppnådd for forholdene vektorer:DNA over 20 nmol/µg DNA (ikke vist), muliggjør å dedusere at transfeksjonen er spesielt effektiv når forholdet vektor:DNA ligger mellom 2 og 20 nanomol vektor pr. µg DNA.

De viste resultater viser at for de to typer celler som benyttes, er transfeksjonseffektiviteten optimal for et forhold mellom 4 og 12 nanomol vektor pr. µg DNA og mer spesielt mellom 8 og 12 nanomol vektor pr. µg DNA.

Videre fastslår man at histogrammene som tar hensyn til virkningen av dosen av vektorene kan legges på hverandre når det gjelder produktene (8a) og (8b) uansett type celler som betraktes.

30

De to produkter ifølge oppfinnelsen er ikke toksiske ved de vektordoser som er studert for cellene NIH 3T3. Søker har ikke observert mer enn et maksimalt tap på 20% cellulære proteiner for doser over 8 nanomol vektor pr. prøve transfektete celler.

35

P a t e n t k r a v

1.

Transfeksjonsmiddel omfattende minst et kationisk, hydrofilt område koblet til et
 5 lipofilt område, k a r a k t e r i s e r t v e d at det kationiske, hydrofile området har den generelle formel:



15 der

y er et helt tall lik 0 eller 1, idet de forskjellige y er uavhengige av hverandre,

X betyr et oksygen-, nitrogen-, svovel- eller seleniumatom,

20 gruppene Z uavhengig av hverandre betyr

a) et hydrogenatom,

b) en gruppe OR, der R betyr et hydrogenatom, en metylgruppe eller en gruppe
 (CH₂)_n-NR₁R₂, der n er et helt tall fra og med 1 til og med 6 og R₁ og R₂ uavhengig
 av hverandre betyr et hydrogenatom eller en gruppe (CH₂)_q-NH₂, der q kan variere
 25 fra og med 1 til og med 6 og der de forskjellige q er uavhengig av hverandre,

c) en gruppe (CH₂)_m-NR₁R₂, der m er et helt tall fra og med 0 til og med 6, og R₁ og R₂
 er som angitt ovenfor, eller også

d) en "spacer"-gruppe som tillater binding av det kationiske, hydrofile området til det
 lipofile området,

30 forutsatt at minst en av substituentene Z er en "spacer"-gruppe og minst to av substituentene Z bærer en aminogruppe.

2.

Middel ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den
 35 generelle formel som definerer det kationiske, hydrofile området, er n et helt tall valgt
 blant 2, 3 og 4 i gruppen (CH₂)_n-NR₁R₂.

3.

Middel ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den generelle formel definerer det kationiske, hydrofile området til et glycosid i pyranose- eller furanoseform.

5

4.

Middel ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at i den generelle formel som definerer det kationiske, hydrofile området er y lik 1 og X er et oksygenatom.

10

5.

Middel ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det lipofile området består av en eller flere rette eller forgrenede, eventuelt mettede og eventuelt halogenerte alifatiske kjeder og/eller av et steroidderivat.

15

6.

Middel ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at de alifatiske kjeder inneholder 10 til 22 karbonatomer, særlig 14, 16, 17, 18 og/eller 19 karbonatomer.

20

7.

Middel ifølge krav 5 og 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at de alifatiske kjeder er valgt blant $(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ og $(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$.

25

8.

Middel ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at steroidderivatet er valgt blant kolesterol, kolestanol, 3α -5-cyklo- 5α -kolestan- 6β -ol, kolinsyre, kolesterylformat, kolestanylformat, 3α ,5-cyklo- 5α -kolestan- 6β -ylformat, kolesterylamin, 6-(1,5-dimetylheksyl)- 3α ,5a-dimetylheksadecahydrocyklopenta[a]cyklopropa[2,3]cyklopenta[1,2-f]naftalen-10-ylamin eller kolestanylamin.

30

9.

Middel ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at "spacer"-gruppen som tillater binding av det kationiske, hydrofile området til det lipofile området består av en syre- eller aminogruppe som bærer hydrolyserbare funksjoner.

35

10.

Middel ifølge krav 9, karakterisert ved at "spacer"-gruppen består av en alifatisk eller aromatisk kjede og omfatter en eller flere grupper valgt blant amider, estere, etere, karbamater og aromatiske sykler.

5

11.

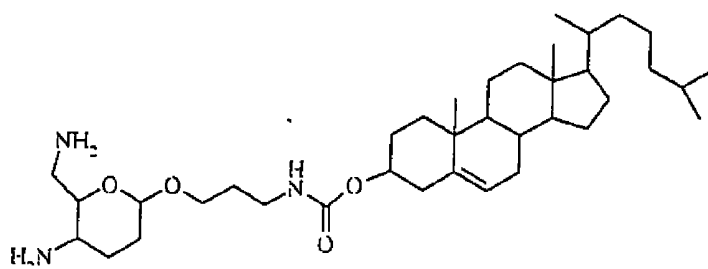
Middel ifølge krav 9, karakterisert ved at "spaceren" er valgt $-O-CO-(CH_2)_x-COOH$, $-O-(CH_2)_x-COOH$, $-O-CO-(CH_2)_x-NH_2$, $-O-(CH_2)_x-NH_2$, $-NH-(CH_2)_x-NH_2$, der x betyr et helt tall fra og med 1 til og med 6.

10

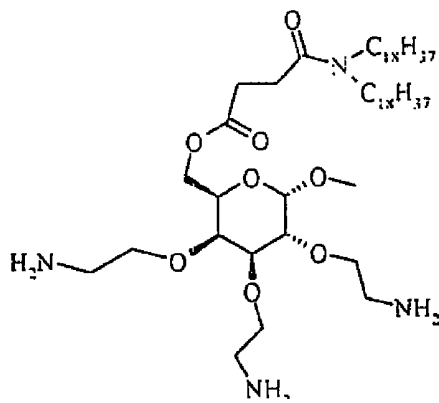
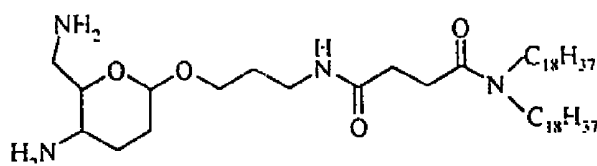
12.

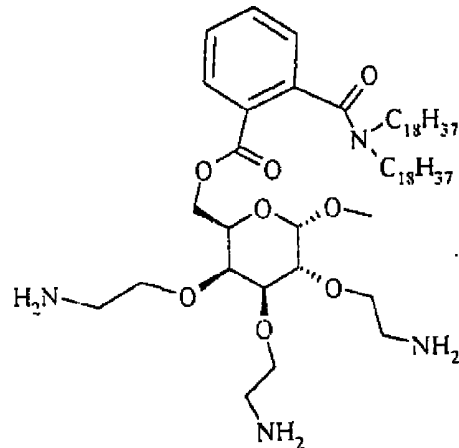
Middel ifølge krav 1, karakterisert ved at det representeres ved en av forbindelsene med formelen:

15



20





13.

Fremgangsmåte for fremstilling av et transfeksjonsmiddel ifølge kravene 1 til 12,
 15 k a r a k t e r i s e r t v e d a t m a n k o b l e r d e t l i p o f i l e o m r å d e t v e d
 h j e l p a v e n "s p a c e r" t i l h e t e r o c y k e l e n m e d d e n g e n e r e l l e f o r m e l s o m d e f i n e r t i k r a v 1.

14.

Preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e t o m f a t t e r e t t r a n s -
 20 f e k s j o n s m i d d e l i f ø l g e e t t a v k r a v e n e 1 t i l 12, o g m i n s t e n n u k l e i n s y r e.

15.

Preparat ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d a t f o r h o l d e t
 t r a n s f e k s j o n s m i d d e l : n u k l e i n s y r e l i g g e r m e l l o m 0,1 o g 50 n a n o m o l m i d d e l p r. µg D N A.

25

16.

Preparat ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e t i
 t i l l e g g i n n e h o l d e r e n e l l e r f l e r e a d j u v a n t e r.

30 17.

Preparat ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d a t a d j u -
 v a n t e n (e) e r n ø y t r a l e l i p i d e r.

18.

35 P r e p a r a t i f ø l g e k r a v 16, k a r a k t e r i s e r t v e d a t a d j u -
 v a n t e n (e) e r f o r b i n d e l s e r s o m e v e n t u e l l t i n t e r v e n e r e r d i r e k t e v e d k o n d e n s a s j o n e n a v
 n u k l e i n s y r e.

19.

Preparat ifølge kravene 14 til 18, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer for en injiserbar formulering.

5

20.

Preparat ifølge kravene 14 til 18, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer for en anvendelse på huden og/eller slimhinnene.

10

21.

Fremgangsmåte for overføring av nukleinsyrer til celler, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter trinnene:

- (1) å bringe nukleinsyren i kontakt med et transfeksjonsmiddel som definert i kravene 1
15 til 19 og, eventuelt med adjuvant(er), for å danne et nukleolipidisk kompleks, og
(2) å bringe cellene i kontakt med komplekset dannet under (1).

22.

20 Transfeksjonsmiddel ifølge kravene 1 til 13 for anvendelse ved overføring av nukleinsyrer i celler.

23.

Anvendelse av et transfeksjonsmiddel som definert ifølge ett av de ovenfor angitte krav for fremstilling av et medikament inneholdende minst en nukleinsyre som skal
25 overføres.

FIG 1/5

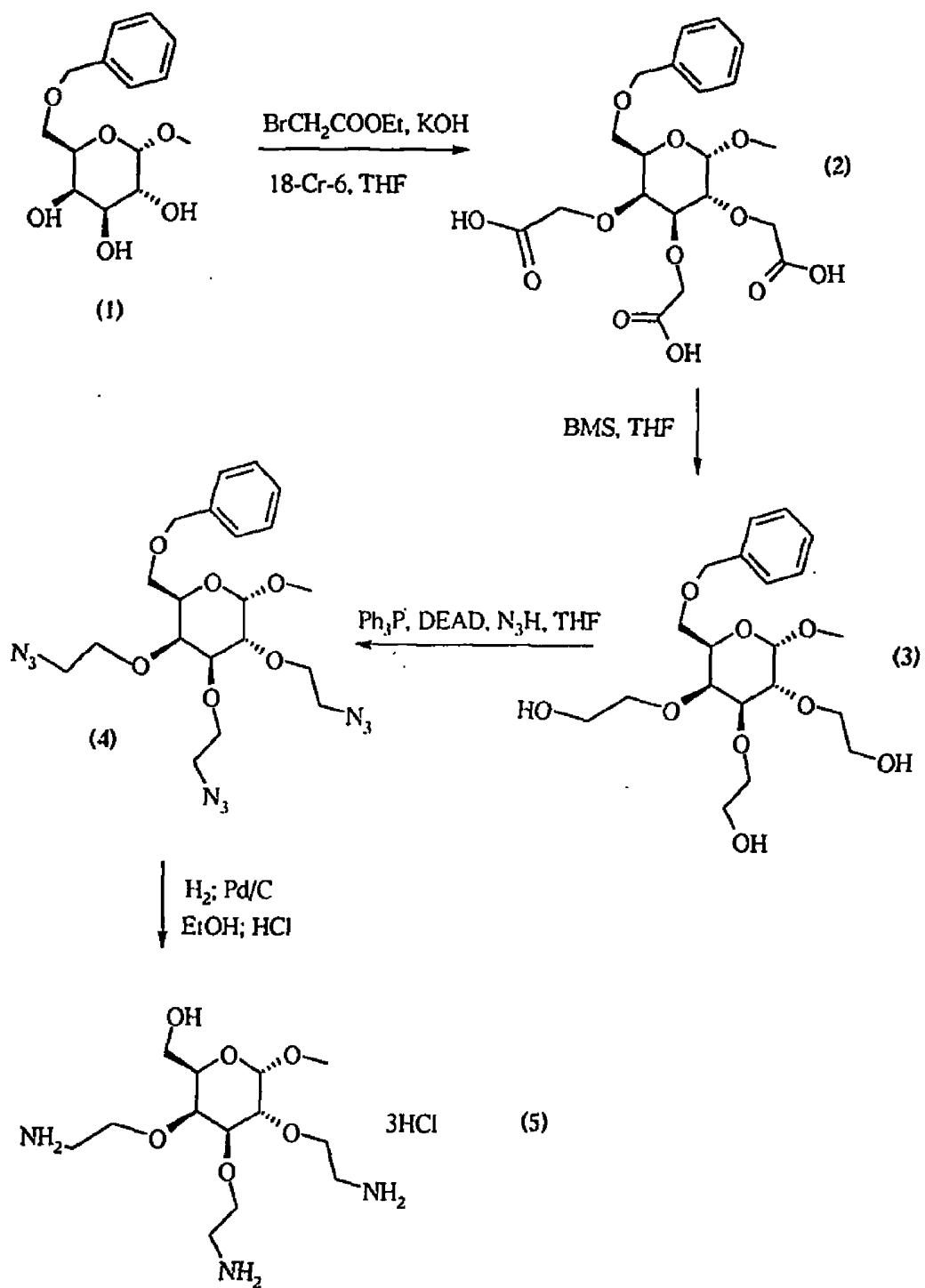


FIG 2/5

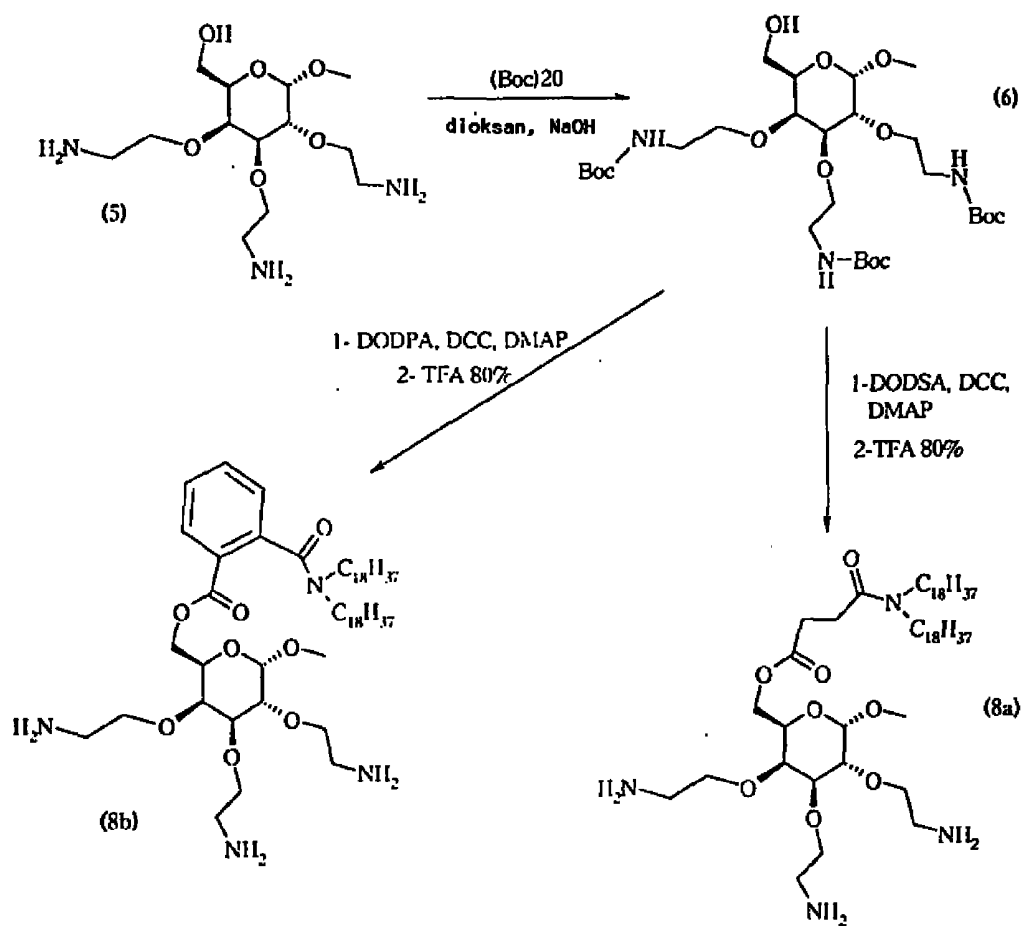


FIG 3/5

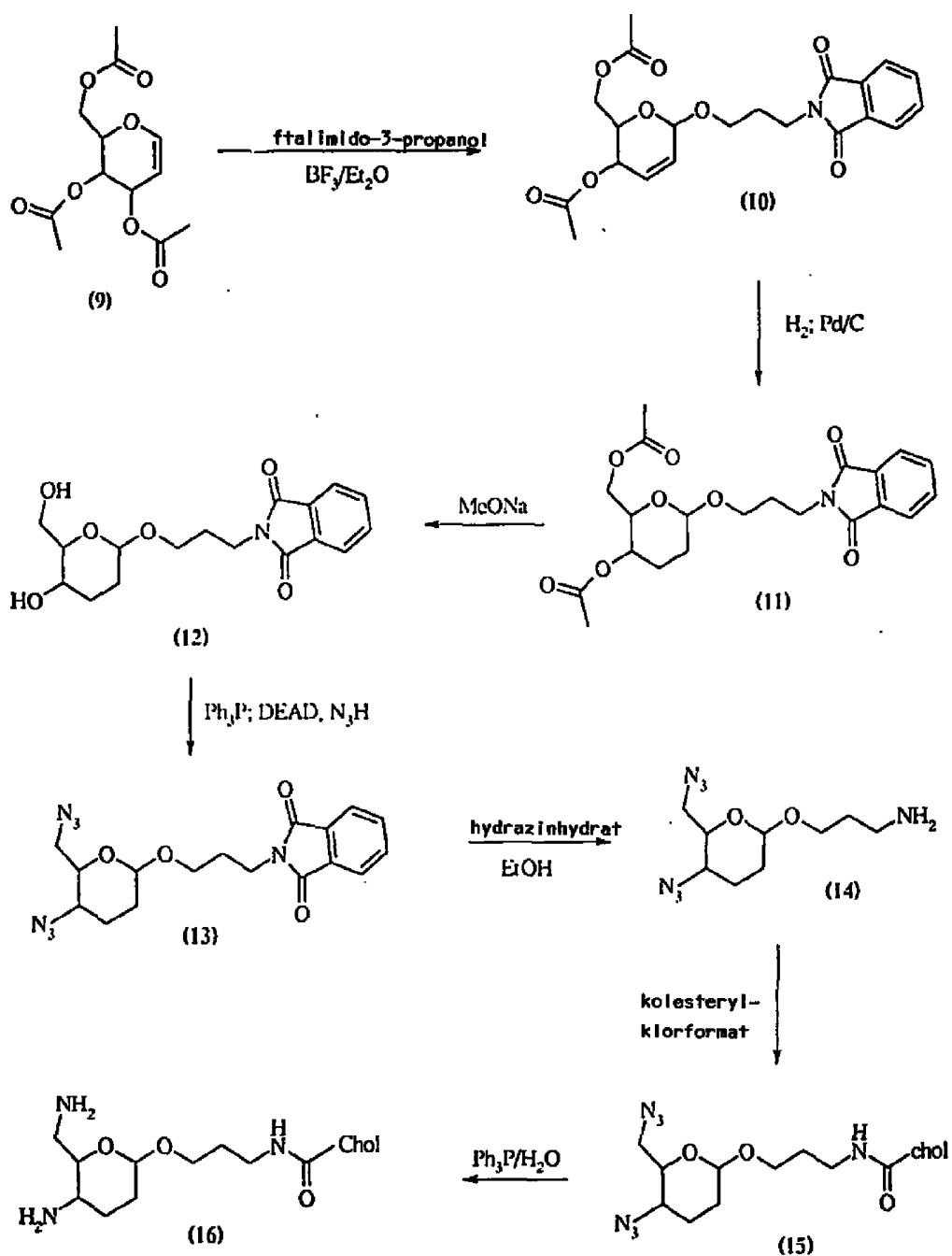


FIG 4/5

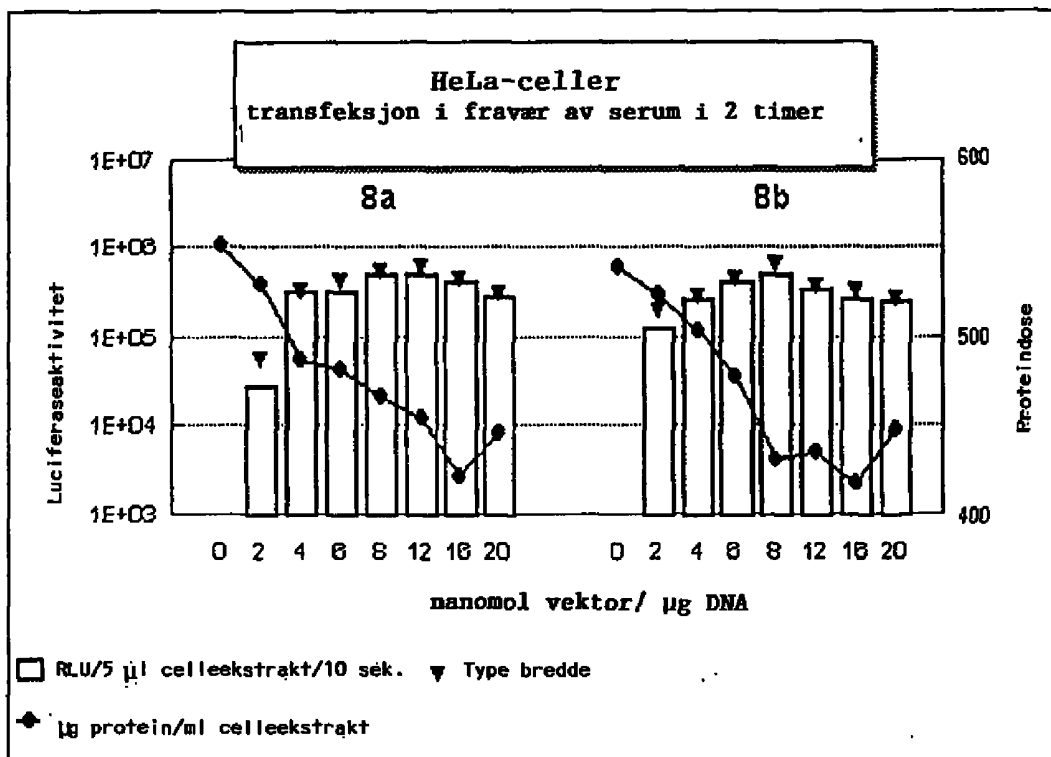


FIG 5/5

