



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 33 876 T2** 2007.05.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 044 022 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 33 876.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/23931**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 957 757.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/024077**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.11.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **20.05.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.10.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **15.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.05.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 47/48 (2006.01)**

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

966940	10.11.1997	US
75811 P	24.02.1998	US
86696 P	26.05.1998	US
107455 P	06.11.1998	US

(73) Patentinhaber:

Cytimmune Sciences, Inc., Rockville, Md., US

(74) Vertreter:

Viering, Jentschura & Partner, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**TAMARKIN, Lawrence, Rockville, MD 20854, US;
PACIOTTI, F., Giulio, Baltimore, MD 21075, US**

(54) Bezeichnung: **ZUSAMMENSETZUNGEN UND VERFAHREN FÜR DIE GEZIELTE ABGABE VON FAKTOREN**

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 eingelegt, 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

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Zellabgabesystem für die gezielte Abgabe von biologisch aktiven Faktoren, wie zum Beispiel Cytokine, Wachstumsfaktoren, chemotherapeutische Mittel, Nukleinsäuren und therapeutische Mittel.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Das Einbringen von therapeutischen Mitteln in spezifische Zielzellen ist seit langer Zeit eine Herausforderung für Wissenschaftler gewesen. Die Herausforderung des spezifischen und gezielten Therapierens mit therapeutischen Mitteln war lange ein Thema der Behandlung von Organismen. Die Herausforderung ist es, eine adäquate Menge eines therapeutischen Mittels zu den Zielzellen eines Organismus zu bekommen, ohne eine all zu große Exposition des Restes des Organismus gegenüber dem therapeutischen Mittel bereitzustellen. Eine solche Herausforderung wird in der Arzneimittelabgabe gesehen. Formulierungen von therapeutischen Mitteln nutzen die chemischen Unterschiede bei aktiven Mitteln, wie zum Beispiel die Hydrophobizität oder die Hydrophilizität, aus, um einfach aktive Mittel auszurichten. Zusätzlich haben Überlegungen über die Größe, wie zum Beispiel die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, das Ausrichten von therapeutischen Mitteln beschränkt.

[0003] Ein Verfahren, das mit geringem Erfolg verwendet worden ist, ist das Ausrichten von Zellen, die einen spezifischen Rezeptor tragen, und das Bereitstellen eines Antikörpers für den Rezeptor, der als ein Träger für ein therapeutisches Mittel dient. Das therapeutische Mittel könnte ein pharmazeutisches Mittel das cytotoxisch ist sein oder das therapeutische Mittel könnte eine radioaktive Einheit sein, die den Zelltod verursacht. Die mit diesen Techniken verbundenen Probleme sind die Isolierung des spezifischen Rezeptors, die Herstellung eines Antikörpers mit selektiver Aktivität für diesen Rezeptor und keine Kreuzreaktivitäten mit anderen ähnlichen Epitopen und das radioaktive Markieren oder die Anbringung des therapeutischen Mittels auf den Antikörper. Ein Problem, das mit dieser begrenzten therapeutischen Abgabe verbunden ist, ist, dass das therapeutische Mittel niemals intern in der Zielzelle freigesetzt werden kann, das therapeutische Mittel nicht freisetzbar an den Antikörper gebunden ist und deshalb nicht vollständig aktiv oder in der Lage zu jeglicher Aktivität sein kann, wenn es einmal an diese Stelle abgegeben wurde.

[0004] Ein anderes Beispiel einer beschränkt erfolgreichen Zielabgabe liegt in dem spezifischen Ausrichten von ausgewählten genetischen Sequenzen in Zellen. Viele Techniken zum Einbringen von Genen in Zellen sind erprobt worden. Diese Techniken beinhalten Ausfällungstechniken, virale Techniken, direktes Einbringen mit Mikropipetten und Gen-„Kanonen“, und am einfachsten die Exposition von Nukleinsäure in Zellen. Eine weit verwendete Ausfällungstechnik beinhaltet Calciumphosphat und wird als ein Co-Präzipitat mit DNA verwendet, um unlösliche Teilchen zu bilden. Das Ziel für wenigstens einige dieser Teilchen ist es, innerhalb der Wirtszellen durch generalisierte zelluläre Endocytose internalisiert zu werden. Dies führt zu der Exprimierung der neuen oder exogenen Gene. Diese Technik zeigt eine geringe Effizienz, um exogene Gene in Zellen mit der resultierenden Translation der Gene zu bekommen. Die Internalisierung der Gene ist nicht spezifisch in Bezug darauf, welche Zellen transfiziert werden, da alle ausgesetzten Zellen in der Lage sind, die exogenen Gene zu internalisieren, da es keinen Verlass auf irgendeine besondere Erkennungsstelle für die Endozytose gibt. Diese Technik wird weithin in vitro verwendet, aber aufgrund des Mangels an Spezifität der Zielzellenauswahl und der schlechten Aufnahme durch stark differenzierte Zellen, ist ihre Verwendung in vivo nicht beabsichtigt. Zusätzlich ist ihre Verwendung in vivo durch die unlösliche Natur der ausgefällten Nukleinsäure begrenzt.

[0005] Eine andere ähnliche Technik beinhaltet die Verwendung von DEAE-Dextran für das Transfizieren von Zellen in vitro. DEAE-Dextran ist für Zellen schädlich und führt zu nicht spezifischer Insertion von Nukleinsäuren in Zellen. Dieses Verfahren würde in vivo nicht ratsam sein.

[0006] Andere Techniken zum Transfizieren von Zellen oder dem Bereitstellen für den Eintritt von exogenen Genen in Zellen sind ebenfalls begrenzt. Die Verwendung von Viren als Vektoren hat eine gewisse Anwendbarkeit für in vitro und in vivo Einbringen von exogenen Genen in Zellen. Es gibt immer das Risiko, dass das Vorhandensein von viralen Proteinen unerwünschte Wirkungen bei einer in vivo Verwendung erzeugen wird. Zusätzlich können virale Vektoren aufgrund der Größe von exogenem genetischem Material, das in die Zellen befördert werden kann, beschränkt sein.

[0007] Exogene Genabgabe ist ebenfalls mit Liposomen, die in Nukleinsäuren gefangen sind, verwendet worden. Liposome sind membranhaltige Säcke, die mit einer Vielzahl von Materialien, einschließlich Nukleinsäuren, gefüllt werden können. Liposomabgabe gewährleistet aufgrund von ungleichmäßiger Befüllung der Liposome keine einheitliche Abgabe an Zellen. Des Weiteren können Liposome nicht auf spezifische zelluläre Typen ausgerichtet werden. Liposome leiden unter Bruchproblemen und somit unter Auslaufen der Nukleinsäure an unerwünschten Stellen innerhalb des in vivo oder in vitro Systems.

[0008] Techniken zum Einführen von exogenen Nukleinsäuren mit roher Gewalt beinhalten das Durchstechen von zellulären Membranen mit Mikropipetten oder Genkanonen, um exogene DNA in eine Zellen einzubringen. Diese Techniken arbeiten für einige Hersteller gut, sind aber nicht weithin anwendbar. Sie sind sehr arbeitsintensiv und erfordern eine sehr gekonnte Manipulation der Empfängerzelle. Dies sind keine Techniken, die einfache Verfahren sind, die gut in vivo arbeiten. Es gibt keine Spezifität dafür, welche der besonderen Zellen die Nukleinsäure neben der Auswahl der Zelle oder der Zellen in der Zielzone erhalten. Elektroporation, die elektrische Verfahren verwendet, um die zelluläre Membran zu verändern, war in vitro erfolgreich für die Insertion von Genen in Zellen. Erneut kann diese Technik nicht für in vivo Anwendungen verwendet werden.

[0009] Es gibt einige Versuche der Ziel-Abgabe von DNA für spezifische Zellen, die sich auf das Vorhandensein von Rezeptoren für Glycoproteine beziehen. Das Abgabesystem verwendete Polykationen, wie zum Beispiel Polylysin, die nicht kovalent an DNA gebunden waren und die ebenfalls kovalent an einen Liganden gebunden waren. Die Verwendung einer kovalenten Bindung der Polykationen an einen Liganden ermöglicht nicht den Abbau des Abgabesystems, wenn die zellulären Internalisierungsmechanismen beginnen. Dieses stark komplexierte Abgabesystem, das kovalent aneinander gebunden ist, ist sehr unüblich für die Art wie Nukleinsäuren normalerweise in Zellen gefunden werden.

[0010] Morris, R.E. et al. (J. Histochem. Cytochem. (1992) 40, 711-721) berichten von der Bindung, Internalisierung und dem intrazellulären Steuern von biotinylierten Liganden in Mausfibroblasten, wobei die Transportmuster in den Zellen durch separat aufgebraute Streptavidin-Goldkolloide beobachtet werden.

[0011] Die Veröffentlichung von Peters, D.K. und Norback, D.H. (Blood (1990) 76, 97-104) betrifft das Verfolgen der Internalisierung von Interleukin-2 (IL-2) in aktivierten menschlichen Lymphozyten unter Verwendung von biotinyliertem rekombinantem IL-2, das auf Agarose-Streptavidin absorbiert ist, welches verwendet wird, um Zellen zu markieren. Für die nachfolgende Detektion wird Streptavidin-gebundenes Gold zu den Zellen gegeben.

[0012] Hopkins, C.R. und Boothroyd, B. (Eur. J. Cell Biol. (1981) 24, 259-265) offenbaren ebenfalls die Anwendung von zwei separaten Zusammensetzungen, nämlich einem kolloidalen Gold/Avidin Komplex in Verbindung mit biotinyliertem epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), um EGF-Rezeptoren auf der Oberfläche von Granulosa-Zellen des Eierstocks zu lokalisieren.

[0013] Kang, Y.H. et al. (J. Leukocyte Biol. (1990) 48, 316-332) berichten von dem allgemeinen Mechanismus der bakteriellen Lipopolysaccharid-(LPS)-Aufnahme und der Verteilung in menschlichen Monozyten unter Verwendung eines LPS-spezifischen primären Antikörpers und einer Anti-Maus IgG, die an kolloidales Gold verbunden ist.

[0014] Die Europäische Patentanmeldung EP 0 667 398 betrifft ein Verfahren und einen Apparat für die Detektion einer Ziel DNA-Sequenz ohne das Erfordernis für eine Operation des Markierens der DNAs mit chemischen Substanzen.

[0015] Die Internationale Patentanmeldung WO 94/21288 betrifft Zusammensetzungen zur Verringerung der Toxizität von normal toxischen biologisch aktiven Faktoren durch Zumischen von kolloidalem Metall.

[0016] Schließlich offenbart die Internationale Patentanmeldung WO 96/04313 polyspezifische Immunokongulate, die für die Diagnose und Therapie von Erkrankungen, die durch Multiarzneimittel-resistente Zellen verursacht werden, verwendbar sind.

[0017] Gezielte Abgabe von spezifischen Faktoren an spezifische Zellen würde bei selektiver Aktivierung oder Kontrolle des Immunsystems wichtig sein. Im Moment gibt es nur grobe Techniken für Immununterdrückung oder -aktivierung. Das Immunsystem ist ein komplexes interaktives System des Körpers, das eine große Vielzahl verschiedener Komponenten, einschließlich Zellen, zellulären Faktoren, die sowohl mit Stimuli von innerhalb des Körpers als auch außerhalb des Körpers Wechselwirken, einbezieht. Neben seiner direkten Ar-

beitsweise ist die Antwort des Immunsystems ebenfalls durch andere Systeme des Körpers, einschließlich des Nerven-, Atmungs-, zirkulatorischen und digestiven Systems, beeinflusst.

[0018] Einer der besser bekannten Aspekte des Immunsystems ist seine Fähigkeit auf fremde Antigene, die durch einfallende Organismen, zelluläre Veränderungen innerhalb des Körpers oder durch Impfung präsentiert werden, zu antworten. Eine der ersten Arten von Zellen, die auf eine solche Aktivierung des Immunsystems reagieren, sind Phagozyten und natürliche Killerzellen. Phagozyten beinhalten unter anderem Zellen, Monozyten, Macrophagen und polymorphonukleare Neutrophile. Diese Zellen binden im Allgemeinen an fremdes Antigen, internalisieren es und können es zerstören. Sie erzeugen ebenfalls lösliche Moleküle, die andere Immunantworten, wie zum Beispiel Entzündungsantworten, vermitteln. Natürliche Killerzellen können bestimmte viral infizierte embryonale Zellen und Tumorzellen erkennen und zerstören. Andere Faktoren der Immunantwort beinhalten sowohl ergänzende Wege, die unabhängig auf fremde Antigene antworten können oder zusammen mit Zellen oder Antikörpern agieren können.

[0019] Einer der Aspekte des Immunsystems, der für die Impfung wichtig ist, ist die spezifische Antwort des Immunsystems auf einen bestimmten Erreger oder ein fremdes Antigen. Ein Teil der Antwort beinhaltet die Etablierung einer „Erinnerung“ für das fremde Antigen. Bei einer zweiten Einwirkung ermöglicht die Erinnerungsfunktion eine schnellere und im Allgemeinen bessere Antwort auf das fremde Antigen. Lymphozyten spielen zusammen mit anderen Zellen und Faktoren eine wichtige Rolle sowohl bei der Erinnerungsfunktion als auch bei der Antwort.

[0020] Impfstoffe sind lange verwendet worden, um die Immunantwort zu stimulieren, um den Organismus zu schützen. Aluminiumverbindungen sind verwendet worden, um wasserunlösliche antigene Substanzen für Impfzwecke zu bilden. Metalle sind ebenfalls in gekapselten Polysaccharidmetallkompleximpfstoffen verwendet worden. Diese Verwendungen sind auf die Verwendung der Komplexe zur Prophylaxe und Behandlung von bakteriellen Erkrankungen begrenzt gewesen. Ausgewählte Metalle sind ebenfalls als Komponenten stabiler Hilfsstoffemulsionszusammensetzungen verwendet worden. Es ist im Stand der Technik bekannt, dass Aluminium, als das Monostearat oder in Form von hydrierten Salzen von Fettsäuren, emulgierende Mittel oder Stabilisatoren der Emulsion in der Impfstoffzusammensetzung sind.

[0021] Die gezielte Abgabe von spezifischen therapeutischen Mitteln oder biologisch aktiven Faktoren für die Behandlung von Erkrankungen oder Pathologien ist im Moment nicht erhältlich. Existierende Therapien für die Behandlung von Erkrankungen und pathologischen Bedingungen einschließlich, aber nicht darauf begrenzt, genetischer Erkrankungen, angeborener Erkrankungen und erworbener Erkrankungen, wie zum Beispiel bakterielle Infektionen, virale Infektionen, Krebs, Immunschwächungserkrankungen, Autoimmunerkrankungen, psychiatrische Erkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen, reproduktive Fehlfunktion, somatische Wachstumsfehlfunktion, stressbedingte Erkrankungen, muskuläre Dystrophie, Osteoporose, okuläre Erkrankungen, Allergien und Transplantationsabstoßung, erfordern die Verabreichung von Dosen von biologisch aktiven Faktoren, die ausgedehnte Wirkungen im ganzen Körper haben. Diese Therapien zielen nicht speziell auf die betroffenen Organe zur direkten Abgabe eines biologisch aktiven Faktors ab.

[0022] Zum Beispiel beinhalten gegenwärtige Behandlungen für Krebs die Verabreichung von chemotherapeutischen Mitteln und anderen biologisch aktiven Faktoren, wie zum Beispiel Cytokinen und Immunfaktoren. Die Verabreichung von chemotherapeutischen Mitteln an den gesamten Körper erzeugt toxische und nachteilige Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Organschädigung, Verlust von Sinnen, wie zum Beispiel Tast- und Gefühlssinn, und Haarverlust. Viele chemotherapeutische Mittel werden entworfen, um sich schnell teilende Zellen, die willkürlich das hematopoetische System und das gastrointestinale System beeinflussen, zu zerstören, was zu Veränderungen im Blut und bei Immunzellen, Übelkeit, Magenleiden und Gewichtsverlust führt. Die Verabreichung von Immunfaktoren, wie zum Beispiel Cytokinen, an das gesamte Körpersystem führt zur Aktivierung von unerwünschten Immunantworten und zur Inhibierung von anderen Immunfunktionen. Diese Therapien stellen Behandlung für die Bedingung bereit, gehen aber mit einer großen Anzahl von Nebenwirkungen, die dann behandelt werden müssen, einher. Zusätzlich kann die Bolus-Verabreichung eines Arzneimittels aufgrund einer schnellen Ausscheidung nicht optimal sein.

[0023] Andere Arten der Behandlung von biologischen Bedingungen, einschließlich Erkrankungen, könnten Nukleinsäuren verwenden. Beispiele solcher therapeutischer Behandlungen beinhalten Gensatz, Antisense-Gentherapie, Triplex-Gentherapie und auf Ribozym-basierende Therapie. Um erfolgreich zu sein, ist jedoch ein wirksames Mittel für die Abgabe des therapeutischen Mittels an spezifische Zelltypen und -orte und über zelluläre, nukleäre und andere Membrane erforderlich.

[0024] Die Änderung der Genaktivität kann auf vielen Wegen erreicht werden. Zum Beispiel hat man gezeigt, dass Oligonukleotide, die komplementär zu bestimmten Gennachrichten oder viralen Sequenzen, wie zum Beispiel Antisenseverbindungen, sind, einen inhibitorischen Effekt, zum Beispiel gegenüber Viren, haben. Durch Erzeugen einer Antisense-Nukleinsäurezusammensetzung, die mit der erzielten RNA-Meldung von Zellen oder Viren hybridisiert, kann die Translation der Nachricht in das Protein unterbrochen oder verhindert werden. Auf diese Weise kann Genaktivität moduliert werden.

[0025] Die Fähigkeit spezifische Gene zu deaktivieren, stellt einen großen therapeutischen Nutzen bereit. In Gewebekultur haben Antisense-Oligonukleotide Infektionen durch Herpesviren, Influenzaviren und das menschliche Immunschwächevirus, das AIDS verursacht, inhibiert. Es kann ebenso möglich sein, Antisense-Oligonukleotide gegenüber mutierten Onkogenen auszurichten. Antisense-Technologie besitzt ebenfalls das Potential zur Regulierung von Wachstum und Entwicklung. Um für die Gentherapie zu wirken, müssen Antisense therapeutische Verbindungen jedoch an die Zielstelle abgegeben werden.

[0026] Eine andere Art von gentherapie-modifizierter Genaktivität verwendet Nukleinsäuren. Defekte Gene werden ersetzt oder durch die Verabreichung von Nukleinsäuren, die nicht Gegenstand des Defektes sind, ergänzt. Zum Beispiel könnten die verabreichten normalen Nukleinsäuren ein DNA-Molekül sein, das in ein Chromosom insertiert oder können in extrazellulärer DNA vorhanden sein und erzeugen funktionale RNA, welche im Gegensatz zu dem erwünschten Genprodukt führt. Auf diese Art und Weise können Gendefekte und -mängel bei der Herstellung des Genproduktes korrigiert werden.

[0027] Weiterhin hat Gentherapie noch das Potential, die normale genetische Ergänzung einer Zelle zu steigern. Zum Beispiel ermöglicht die Gentherapietechnik, die als intrazelluläre Immunisierung bekannt ist, das intrazelluläre Vorliegen von gewünschten Genprodukten. Das gewünschte Genprodukt wird dann auf der Oberfläche der Zelle exprimiert, vom Körper als fremdartig erkannt und die Zellen, die das Genprodukt exprimieren, werden durch das körpereigene Immunsystem eliminiert. Dieser Ansatz ist im Moment aufgrund eines Mangels an wirksamen Genabgabesystemen, die die gezielte Abgabe dieses therapeutischen Mittels an eine spezifische Stelle erleichtern, jedoch nicht brauchbar.

[0028] Gentherapie kann ebenfalls als ein Verfahren zur Abgabe von Arzneimitteln in vivo verwendet werden. Zum Beispiel würden die Genprodukte den Zugang zum Blutstrom erleichtern, wenn Gene, die für therapeutische Verbindungen kodieren, an die endothelialen Zellen abgegeben werden können. Im Moment ist ein Verfahren zur Genabgabe an Zellen es, Zellen aus dem Körper zu entfernen, die Zellen ex vivo Nukleinsäuren auszusetzen und dann die Zellen wieder in den Körper einzubringen. Alternativ ist Gentherapie in vivo durch die Injektion von nackter DNA, DNA-haltigen Liposomen und die Injektion von viralen oder bakteriellen DNA-haltigen Vektoren durchgeführt worden. Retrovirale Vektoren können verwendet werden, um Gene ex vivo an isolierte Zellen abzugeben, die dann zurück in den Patienten infundiert werden. Retrovirale Vektoren haben jedoch einige Nachteile, wie zum Beispiel, dass sie Gene nur an sich teilende Zellen abgeben können, die zufällige Integration des abzugebenden Gens, was potentiell unerwünschte genetische Veränderungen verursacht und möglicherweise zu einem infektiösen Wildtyp in retroviraler Form zurückkehrt.

[0029] Triplex DNA-Technologie ist eine andere Form von Gentherapie, die Oligonukleotide und Verbindungen, die speziell an bestimmte Regionen der Duplex-DNA binden, verwenden, wobei dabei die Ziel-Gene inaktiviert werden. Ein Vorteil von Triplex DNA-Technologie ist, dass nur eine einzige Kopie des Oligonukleotids oder der Verbindung benötigt wird, um die Genexpression zu verändern, da das Binden am DNA-Niveau nicht am mRNA-Niveau stattfindet. Ein Nachteil der Triplex DNA-Technologie ist jedoch, dass das Oligonukleotid oder die Verbindung nicht nur durch die zelluläre Membran durchlaufen müssen, sondern ebenfalls durch die mikrobielle Membran im Falle der Behandlung von mikrobiellen Infektionen oder der nuklearen Membran im Falle von sich ändernder eukaryotischer Genfunktion oder Expression von fremder DNA, die in chromosomale DNA integriert ist.

[0030] Eine andere Gentherapietechnologie betrifft die therapeutische Verwendung von Ribozymen für die Behandlung von genetischen Erkrankungen. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle, die aus einer hybridisierenden Region und einer enzymatischen Region bestehen. Ribozyme können in Zukunft hergestellt werden, um spezifisch an eine Zielregion einer Nukleinsäuresequenz gebunden zu werden und die Sequenz zu schneiden oder auf andere Weise enzymatisch zu modifizieren, um ihre Expression oder Translation in das Genprodukt zu verändern.

[0031] Verschiedene biologisch aktive Faktoren, die eine therapeutische Wirkung haben sollen, sind aus Menschen oder Tieren isoliert worden. Diese Verbindungen beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt,

solch wirksame biologisch aktive Moleküle wie Cytokine und Wachstumsfaktoren. Man hat jedoch herausgefunden, wenn diese verschiedenen Faktoren isoliert und aus natürlichen Quellen oder genetisch erzeugtem Material gereinigt werden und dann in einen Menschen oder ein Tier injiziert werden, dass sie oft erhebliche Nebenwirkungen verursachen und unerwünschte Toxizität zeigen. Aufgrund dieser Toxizität ist es schwierig, die Verbindungen therapeutisch zu verwenden. Zusätzlich ist es schwierig, die aktiven Verbindungen als Antigene zu verwenden, um Antikörper gegen Moleküle zu erzeugen. Zusätzlich ist die Toxizität dieser Moleküle, wenn sie bei der Behandlung von Erkrankung verwendet werden, mit ihrer höheren Konzentration oder dem Vorhandensein an Stellen verbunden, bei denen der Faktor im allgemeinen nicht gefunden wird. Wenn solch wirksame Faktoren spezifisch an die Stelle, an der der Faktor benötigt wird, ohne Aussetzen an andere Stellen, wo Nebenwirkungen auftreten würden, ausgerichtet werden könnten, dann wären die Probleme überwunden, die mit ihrer allgemeinen Verabreichung verbunden sind.

[0032] Es gibt einen großen Bedarf für Zusammensetzungen und Verfahren für gezielte Abgabesysteme. Diese Abgabesysteme könnten für die gezielte Abgabe an spezifische Stellen oder Organe von genetischem Material, wie zum Beispiel Gene, Polynukleotide und Antisense-Oligonukleotide, die in Gentherapie verwendet werden können, verwendet werden. Im spezielleren gibt es einen Bedarf für Zusammensetzungen, die den Transport von genetischen Verbindungen und anderen Arzneimitteln und therapeutischen Verbindungen über zelluläre Membrane erleichtern. Was ebenfalls benötigt wird sind Abgabesysteme zur Abgabe an spezifische Zelltypen und Organe von therapeutischen Mitteln und biologische Faktoren, um die Zellen oder die benachbarte Umgebung zu beeinflussen.

[0033] Was benötigt wird sind Zusammensetzungen und Verfahren für die gezielte spezifische Abgabe von therapeutischen Mitteln alleine an die Zielzellen. Es wäre vorteilhaft für einige Verabreichungen und Behandlungen, wenn das therapeutische Mittel durch die Zielzellen internalisiert werden würde. Wenn es einmal innerhalb der Zelle ist, sollte das therapeutische Mittel ausreichend von dem Transportsystem freigegeben werden, so dass das therapeutische Mittel aktiv ist. Zum Beispiel sollte es, wenn das therapeutische Mittel exogene ein Gen umfassende Nukleinsäuren ist, transkribiert werden, wenn notwendig übersetzt und exprimiert. Diese Zusammensetzungen und Verfahren sollten in der Lage sein, therapeutische Mittel effizient an Zielzellen abzugeben.

[0034] Es gibt ebenfalls einen Bedarf für eine therapeutisch wirksame Zusammensetzung mit verringerter Toxizität, die bei Therapien für einen weiten Bereich von Immunerkrankungen, Krebs, viralen Erkrankungen und bakteriellen Erkrankungen verwendet werden kann. Zusätzlich gibt es einen Bedarf für eine Zusammensetzung, die die Toxizität von biologisch aktiven Zusammensetzungen, die toxisch sind, wenn sie in zu großer Konzentration oder am falschen Ort gefunden werden, verringern kann.

Zusammenfassung der Erfindung

[0035] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Zellabgabesystem wie in Anspruch 1 definiert für die gezielte Abgabe von therapeutischen Mitteln an spezifische Zellen. Die therapeutischen Mittel werden von spezifischen Zellen aufgrund spezifischer Rezeptoren auf den Zellen aufgenommen und werden bevorzugt innerhalb der Zellen durch Rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert. Somit werden die therapeutischen Mittel in einer Mischung unterschiedlicher Zelltypen nur durch Zellen mit dem ausgewählten Rezeptor internalisiert und Zellen, denen der Rezeptor fehlt, werden nicht beeinflusst.

[0036] Das Zellabgabesystem der vorliegenden Erfindung stellt einen neuen und fruchtbaren Ansatz für gezielte Zellabgabesysteme bereit. Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst eine Abgabestruktur oder Plattform, an die Zusammensetzungen, die abgegeben werden sollen, oder zellspezifische Zielmoleküle angebracht werden. Zum Beispiel wird in einer Ausführungsform ein Element einer Bindungsgruppe an die Abgabepattform gebunden und das komplementäre Element der Bindungsgruppe wird an ein therapeutisches Mittel oder Effektormolekül gebunden oder wird an einen ausgewählten zellspezifischen Liganden oder ein Zielmolekül gebunden. In einer bevorzugteren Ausführungsform ist eines der komplementären Elemente der Bindungsgruppe an einen zellspezifischen Liganden, das Zielmolekül, gebunden und ein anderes der komplementären Elemente der Bindungsgruppe ist an ein therapeutisches Mittel oder Effektormolekül gebunden.

[0037] Das Abgabesystem der vorliegenden Erfindung stellt neue Behandlungen bereit, die gezielte kombinatorische Therapie umfasst. Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen und Verfahren für die gezielte Arzneimittelabgabe an spezifische Zellen. Die Abgabestruktur oder Plattform stellt eine Oberfläche für das Binden, bevorzugt reversibel, bereit, obwohl Anwendungen irreversibles Binden von Elementen, die an

den Organismus oder die Zellen abgegeben werden sollen, umfassen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das gebundene Element ein Element einer Bindungsgruppe. Die Elemente der Bindungsgruppe können aus allen bekannten gepaarten Bindungsgruppen einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, Antikörper/Antigen, Enzym/Substrat und Streptavidin/Biotin ausgewählt werden. Die Elemente der Bindungsgruppe können dann an einen zellspezifischen Liganden oder ein therapeutisches Mittel gebunden werden. Der zellspezifische Ligand oder das Zielmolekül umfassen irgendeinen zellspezifischen Marker, einschließlich derer, die für einen oder eine kleine Anzahl zellulärer Typen oder Marker, die weithin durch einen zellulären Typ, Organ oder System exprimiert werden, spezifisch sind. Die therapeutischen Mittel umfassen Mittel, wie zum Beispiel biologisch aktive Mittel, pharmazeutische Mittel, radioaktive oder zellschädigende Mittel, Nukleinsäuren oder andere Verbindungen, die die zelluläre Aktivität beeinflussen können.

[0038] Eine Ausführungsform einer solchen Zusammensetzung umfasst eine Abgabestruktur oder -plattform mit einem Element einer Bindungsgruppe, das reversibel daran gebunden ist. Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst kolloidales Gold als eine Plattform, die ein Element einer Bindungsgruppe binden kann, an welches Zielmoleküle und Effektormoleküle gebunden sind, um ein gezieltes Genabgabesystem zu erzeugen, das bevorzugt rezeptor-vermittelte Endozytose von Zellen verwendet, um eine interne Abgabe des therapeutischen Mittels bereitzustellen. In einer bevorzugteren Ausführungsform ist die Bindungsgruppe Streptavidin/Biotin und das Zielmolekül ist ein Cytokin und das Effektormolekül ist ein therapeutisches Mittel. Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können ebenfalls das Binden der Effektormoleküle oder Zielmoleküle in einem weniger spezifischen Verfahren, wie zum Beispiel unter Verwendung von Polykationen, umfassen.

[0039] Im Zusammenhang mit dem Zellabgabesystem beinhaltet die vorliegende Erfindung ebenfalls die Herstellung des Zielabgabesystems und die Verabreichung und die Abgabe des Zielabgabesystems an die ausgewählten Zellen. Es ist in der vorliegenden Erfindung beabsichtigt, dass die therapeutischen Mittel der Zusammensetzung am Zellort aktiv oder wirksam sein werden. Eine solche Aktivität kann in irgendeiner Form sein, die dem Durchschnittsfachmann bekannt ist und beinhaltet zellulären Tod, Herstellung von funktionierenden Proteinen, Herstellung von zellulären Produkten, enzymatische Aktivität, Export von zellulären Produkten, Herstellung von zellulären Membrankomponenten oder nukleare Komponenten. Die Abgabe an die Zielzellen kann durch Verfahren erreicht werden, wie die, die für in vitro Techniken verwendeten werden, wie zum Beispiel die Zugabe zu zellulären Strukturen oder Medien.

[0040] Eine andere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst ein Zellabgabesystem, bei dem ein biologisch aktiver Faktor oder ein therapeutisches Mittel direkt mit der Abgabepattform verbunden ist, zum Beispiel mit dem Binden einer Cytokinzusammensetzung an kolloidales Gold. Diese Zusammensetzungen können verwendet werden, um die Toxizität, die mit der Verabreichung von therapeutischen Mitteln verbunden ist, zu verringern oder können in Impfstoffformulierungen verwendet werden. Eine Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung umfasst eine Mischung eines kolloidalen Metalls, wie zum Beispiel Goldchlorid (HAuCl_4) zusammen mit einer Substanz, die normalerweise für einen Menschen oder ein Tier toxisch ist oder einer Substanz, die eine Immunantwort erzeugen kann, wobei die Zusammensetzung weniger oder gar nicht toxisch ist, wenn sie einem Menschen oder einem Tier verabreicht wird. Diese Verfahren und Zusammensetzungen können bei der Behandlung von bakteriellen Infektionen, viralen Infektionen, Krebs und Immunerkrankungstherapien, einschließlich Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis und erworbene Immunschwäche, verwendet werden. Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass kleinere Mengen eines biologisch aktiven Faktors verabreicht werden können als bei bisher bekannten Systemen, da der Faktor direkt zu einer Stelle zielt oder der Faktor aufgrund der Assoziation mit der Abgabepattform für die allgemeine Verabreichung weniger toxisch ist. Der Plattform-gebundene, biologisch aktive Faktor kann ebenfalls als eine immobilisierte Quelle eines freisetzbaren biologisch aktiven Faktors – einem konstanten Abgabedepot – dienen.

[0041] Die gezielte Abgabe der vorliegenden Erfindung kann für die gleichzeitige und/oder die sequentielle gezielte Stimulierung von spezifischen Komponenten des Immunsystems verwendet werden. Komponenten des Immunsystems beinhalten Zellen, wie zum Beispiel B-Zellen, T-Zellen, Antigen präsentierende Zellen, Phagozyten, Makrophagen und andere Immunzellen. Da verschiedene zelluläre Typen des Immunsystems alle denselben Zellmarker haben können, kann ein „Komponenten spezifisches Zielmolekül“ verschiedene Zell- oder Gewebetypen erreichen.

[0042] Die Erfindung kann ebenfalls zur Steigerung der Effizienz mit der Antigene und Impfstoffe eine Immunantwort induzieren verwendet werden, d.h. für die Stimulierung einer spezifischen einzelnen Komponente des Immunsystems mit einer Zusammensetzung durch die gleichzeitige Präsentation eines Antigens mit einem Im-

munkomponenten-spezifischen Zielmolekül.

[0043] Die vorliegende Erfindung kann ebenfalls für die gleichzeitige Stimulierung verschiedener unterschiedlicher einzelner Immunkomponenten durch die Präsentation spezifischer Komponenten-stimulierenden Zusammensetzungen verwendet werden. Eine Ausführungsform einer solchen Zusammensetzung umfasst eine Abgabepattform mit einem Antigen zusammen mit einem komponentenspezifischen immunostimulierenden Mittel. Die vorliegende Erfindung kann ebenfalls für die sequentielle Stimulierung der Immunzellen durch Bereitstellen von komponentenstimulierenden Zusammensetzungen in einem oder mehreren Schritten in einer Immunantwortkaskade von interagierenden Faktoren und Zellen verwendet werden.

[0044] Zusätzlich ist es in der vorliegenden Erfindung beabsichtigt, dass das Zellabgabesystem, das hier beschrieben wird, für die Stimulierung einer Immunantwort oder die Unterdrückung einer Immunantwort verwendet werden kann. Die Verabreichung von komponentenspezifischen immunostimulierenden Mitteln für die Unterdrückung von Immunantworten kann verwendet werden, um Autoimmunerkrankungen oder Organabstoßung zu kontrollieren.

[0045] Deshalb ist es ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung, ein vielseitiges Zellabgabesystem zur Beeinflussung von Zellen mit therapeutischen Mitteln bereitzustellen.

[0046] Es ist ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung, ein Zellabgabesystem für die gezielte Abgabe von therapeutischen Mitteln in vitro bereitzustellen.

[0047] Ein noch anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es, ein Zellabgabesystem für die gezielte Abgabe von therapeutischen Mitteln an Zellen mit einem spezifischen Rezeptor bereitzustellen.

[0048] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es, ein Zellabgabesystem zur Abgabe von therapeutischen Mitteln in Zellen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose bereitzustellen.

[0049] Ein weiterer anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es, ein gezieltes Zellabgabesystem bereitzustellen, das ein ausgewähltes therapeutisches Mittel unter Verwendung eines spezifischen Zielmoleküls binden und abgeben kann.

[0050] Es ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Zellabgabesystem bereitzustellen, das die toxischen Wirkungen von biologisch aktiven Faktoren verringern kann.

[0051] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es, ein Zellabgabesystem bereitzustellen, das für die langsame Freisetzung von biologisch aktiven Faktoren verwendbar ist.

[0052] Ein noch weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es ein verlässliches und leichtes Zellabgabesystem bereitzustellen, das für die Steigerung der Immunantwort verwendbar ist.

[0053] Es ist ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung, ein Zellabgabesystem bereitzustellen, das für die Verbesserung der Impfstoffeffizienz verwendbar ist.

[0054] Ein noch anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es, ein Zellabgabesystem bereitzustellen, das für die gezielte Stimulierung von einzelnen Immunkomponenten auf spezifische Art und Weise verwendbar ist.

[0055] Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es, ein Zellabgabesystem bereitzustellen, das komponentenspezifische Immuno-stimulierende Mittel umfasst, die eine bestimmte Komponente des Immunsystems beeinflussen können.

[0056] Ein noch weiterer anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es, ein Zellabgabesystem bereitzustellen, das zur Unterdrückung der Immunantwort verwendbar ist.

[0057] Diese und andere Gegenstände, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden nach einem Überblick der folgenden detaillierten Beschreibung der bevorzugten Ausführungsform offensichtlich werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0058] Dieses Patent enthält wenigstens eine farbige Photographie. Kopien dieses Patentes mit der farbigen Photographie werden vom Patent- und Markenamt auf Wunsch und Zahlung der notwendigen Gebühr bereitgestellt.

[0059] [Fig. 1](#) ist eine schematische Zeichnung einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung.

[0060] [Fig. 2](#) ist eine Kurve, die die saturierenden Bindungskinetiken der Abgabepattform mit TNF- α zeigt.

[0061] [Fig. 3](#) veranschaulicht die Wirkung von kolloidalem Gold bei der Bildung einer Maus-Anti-Maus IL-6 Antikörperantwort.

[0062] [Fig. 4](#) veranschaulicht den Anstieg in der Immunoreaktivität der Maus-Anti-Maus IL-6-Antikörperantwort bei Zellen, die mit IL-6, das an kolloidales Gold gebunden ist, aktiviert sind, gegenüber denen, die mit IL-6 oder kolloidalem Gold alleine aktiviert sind.

[0063] [Fig. 5](#) veranschaulicht die Effizienz, mit der Gold IL-6 bindet.

[0064] [Fig. 6](#) veranschaulicht die Retention von biologischer Aktivität von IL-1 nach der Behandlung mit Gold.

[0065] [Fig. 7](#) veranschaulicht die Wirkung der Zeit auf die Freisetzung von IL-2 von kolloidalem Gold.

[0066] [Fig. 8](#) veranschaulicht die Wirkung der Verdünnung bei der Freisetzung von TNF- α von kolloidalem Gold.

[0067] [Fig. 9](#) veranschaulicht die in vivo Freisetzung von IL-2, das an kolloidales Gold gebunden ist.

[0068] [Fig. 10a-d](#) veranschaulichen die Internalisierung von an kolloidales Gold gebundenem IL-1 β durch MCF-7 Zellen.

[0069] [Fig. 11](#) veranschaulicht die Wirkung auf die Immunoreaktivität von kolloidalem Gold, das mit TNF α , IL-6 und IL-1 β gekoppelt ist.

[0070] [Fig. 12](#) veranschaulicht die in vitro Internalisierung von EGF/CG/IL-1 β Komplex durch Macrophagen.

[0071] [Fig. 13](#) veranschaulicht die in vitro Internalisierung von EGF/CG/TNF- α Komplex durch dendritische Zellen.

[0072] [Fig. 14](#) veranschaulicht die in vitro Internalisierung von EGF/CG/IL-6 Komplex durch B-Zellen.

[0073] [Fig. 15](#) veranschaulicht die in vitro Internalisierung von EGF/CG/IL-2 Komplex durch T-Zellen.

[0074] [Fig. 16](#) veranschaulicht die in vitro Internalisierung von EGG/Histon/DNA/kolloidalem Goldchimera durch die menschlichen Brustkrebszellen MCF-7.

[0075] [Fig. 17](#) veranschaulicht die Kontrolltransfektion unter Verwendung des EGF/Histon/DNA/kolloidalen Goldchimera und der menschlichen Brustkrebszellen HS-578-T.

Detaillierte Beschreibung

[0076] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Zellabgabesystem wie in Anspruch 1 definiert für die gezielte Abgabe von therapeutischen Mitteln in Zellen. Im Besonderen umfasst die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen einer Abgabestruktur oder -plattform mit anderen Elementen, die daran gebunden sind. Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst ein kolloidales Metall als eine Plattform, die ein Element einer Bindungsgruppe, an welche Zielmoleküle und Effektormoleküle gebunden sind, um ein Zielgen-Abgabesystem zu erzeugen, binden kann. Ein solches System verwendet bevorzugt Rezeptor-vermittelte Endozytose von Zellen, um die interne Abgabe eines therapeutischen Mittels zu erreichen. In einer bevorzugtesten Ausführungsform ist die Bindungsgruppe Streptavidin/Biotin und das Zielmolekül ist ein Cytokin und das

Effektormolekül ist ein therapeutisches Mittel. Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können ebenfalls das Binden der Effektormoleküle oder Zielmoleküle in einem weniger spezifischen Verfahren ohne die Verwendung von Bindungspartnern, wie zum Beispiel unter Verwendung von Polykationen oder Proteinen, umfassen. Andere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfassen das Binden oder die Assoziierung eines Effektormoleküls oder eines Zielmoleküls direkt an die Abgabestruktur oder -plattform.

[0077] Die vorliegende Erfindung umfasst ein Zellabgabesystem für die gezielte Abgabe von therapeutischen Mitteln, das kolloidale Metalle als eine Plattform verwendet. Diese kolloidalen Metalle können Moleküle, die entweder mit therapeutischen Mitteln oder mit Zielmolekülen wechselwirken, reversibel oder irreversibel binden. Die integrierenden Moleküle können entweder spezifische Bindungsmoleküle, wie zum Beispiel Elemente eines Bindungspaares, sein oder können eher nicht spezifische integrierende Moleküle sein, die weniger spezifisch binden. Ein Beispiel einer solchen weniger spezifischen Bindung ist die Bindung von Nukleinsäuren durch polykationische Moleküle, wie zum Beispiel Polylysin oder Histone. Die vorliegende Erfindung beabsichtigt die Verwendung von integrierenden Molekülen, wie zum Beispiel polykationischen Elementen, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, einschließlich Polylysin, Protaminsulfat, Histone oder Asialoglycoproteine.

[0078] Die Elemente des Bindungspaares umfassen irgendwelche Bindungspare, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, einschließlich Antikörper-Antigenpaare, Enzym-Substratpaare, Rezeptor-Ligandpaare und Streptavidin-Biotin. Neue Bindungspartner können spezifisch entwickelt werden. Eine essentielle Charakteristik der Bindungspartner ist die spezifische Bindung zwischen einem Bindungspaar mit dem anderen Element des Bindungspaares, so dass die Bindungspartner spezifisch verbunden werden können. Eine andere erwünschte Charakteristik der Bindungselemente ist, dass ein Element des Paares ebenfalls entweder an ein Effektormolekül oder ein Zielmolekül gebunden werden kann oder gebunden ist und das andere Element an die Abgabepattform gebunden ist.

[0079] Obwohl man nicht auf irgendeine bestimmte Theorie beschränkt sein möchte, wird theorisiert, dass Veränderungen im pH, die bei der endosomen Bildung in Rezeptor-vermittelter Endozytose auftreten, für eine interne zelluläre Abgabe von therapeutischen Mitteln verwendet werden können. Wenn kolloidale Metallzusammensetzungen bei neutralen pHs sind, ist die Zusammensetzung ein Sol. Wenn der pH erniedrigt ist, fällt die kolloidale Metallzusammensetzung aus und aggregiert. Ein erniedrigter pH beinhaltet einen Bereich von pH-Werten von ungefähr weniger als 7 bis ungefähr 2. Ein bevorzugter erniedrigter pH ist der, der in einem Endosom gefunden wird, welcher ungefähr pH 4 bis ungefähr pH 6, am bevorzugtesten pH 5.6 ist. Die Aggregation der Metallteilchen in dem Endosom verringert wirksam die Oberfläche der Metallteilchen für die Bindung, was zu der Freisetzung von gebundenen Materialien aus dem Metallträger führt.

[0080] Die Abgabepattform ist bevorzugt eine kolloidale Metallzusammensetzung. Zum Beispiel ist in einer bevorzugten Ausführungsform die Abgabepattform ein kolloidales Goldteilchen, das eine negative Ladung bei einem ungefähr neutralen pH hat. Diese negative Ladung verhindert die Anziehung und Anlagerung von anderen negativ geladenen Molekülen. Im Gegensatz dazu werden positiv geladene Moleküle von den kolloidalen Goldteilchen angezogen und binden daran. Diese positiv geladenen Moleküle umfassen Polykationen, einschließlich Polylysin, Histone, Protaminsulfat und Asialoglycoproteine. Die in der vorliegenden Erfindung beabsichtigten Histone können eine Mischung verschiedener Histone, eines spezifischen Typs von Histon oder eine Kombination von spezifischen Histonen sein. Die positiv geladenen Moleküle können ebenfalls Elemente eines Bindungspaares, wie zum Beispiel Antikörper-Antigen oder Streptavidin/Biotin umfassen. Nach dem Binden der positiv geladenen Moleküle an die Abgabepattform können das komplementäre Bindungselement oder die Effektormoleküle gebunden werden.

[0081] Die Effektormoleküle umfassen sowohl Moleküle für Zell- oder Zielselektion, die hier als Zielmoleküle bekannt sind, und Moleküle, die einen Effekt bereitstellen, wenn sie einmal an das Ziel, die therapeutischen Mittel oder biologisch aktiven Faktoren abgegeben werden. Die Assoziierung der Effektormoleküle mit der metallischen Plattform kann entweder mittels spezifischer Mittel unter Verwendung der Elemente der Bindungspare und ihrer spezifischen Bindung oder durch weniger spezifische Mittel sein. Zum Beispiel beinhalten weniger spezifische Mittel ionische Wechselwirkungen.

[0082] Die Verwendung der spezifischen Bindungscharakteristik der Bindungselemente umfasst das Binden von einem der Elemente des Bindungspaares an das therapeutische Mittel und des komplementäre Bindungselements an die Metallplattform. Die Anbringung von einem Bindungselement an ein therapeutisches Mittel wird durch Mittel erreicht, die im Stand der Technik gut bekannt sind und wird in der Bindung von biotinylierten therapeutischen Mitteln veranschaulicht. Das Biotin kann durch diese Verfahren als Proteinbindung gebunden

werden oder kann in Nukleinsäuren durch Synthese unter Verwendung von biotinylierten Nukleosiden eingefügt werden. Das Binden von Biotin an therapeutische Mittel kann unter Verwendung von chemischer Bindungen, wie zum Beispiel durch Bereitstellen von spezifischen Linkern oder die Zugabe von aktiven Gruppen zu dem therapeutischen Mittel oder den Zielmolekülen, erreicht werden.

[0083] Es ist die Verwendung solcher Bindungselemente, die einen Aspekt der Flexibilität der vorliegenden Erfindung gewährleisten. Jedes gewünschte therapeutische Mittel kann an eines der Elemente des Bindungspaares gebunden werden. Das komplementäre Bindungselement wird dann mit der metallischen Plattform assoziiert. Somit kann jedes therapeutische Mittel unter Verwendung der metallischen Plattform der vorliegenden Erfindung abgegeben werden. Des Weiteren kann jedes Zielmolekül an eines der Elemente der Bindungsgruppe gebunden werden.

[0084] Um die Spezifität für die Zell- oder Zielauswahl für die Abgabe des therapeutischen Mittels bereitzustellen, werden zellspezifische Zielmoleküle ebenfalls an die Metallplattform angebracht. Diese zellspezifischen Zielmoleküle beinhalten irgendein Molekül, das an die Strukturen bei Zellrezeptoren, die in zellularen Membranen gefunden werden, bindet. Diese zellspezifischen Zielmoleküle beinhalten ebenfalls Rezeptoren oder Teile von Rezeptoren, die an Moleküle, die in den zellularen Membranen gefunden werden oder frei von zellularen Membranen sind, binden können. Beispiele dieser zellspezifischen Zielmoleküle beinhalten Interleukin-1 („IL-1“), Interleukin-2 („IL-2“), Interleukin-3 („IL-3“), Interleukin-4 („IL-4“), Interleukin-5 („IL-5“), Interleukin-6 („IL-6“), Interleukin-7 („IL-7“), Interleukin-8 („IL-8“), Interleukin-10 („IL-10“), Interleukin-11 („IL-11“), Interleukin-12 („IL-12“), Interleukin-13 („IL-13“), Interleukin-15 („IL-15“), Interleukin-16 („IL-16“), Interleukin-17 („IL-17“), Interleukin-18 („IL-18“), Lipid A, Phospholipase A2, Endotoxine, Staphylocokkenenterotoxin B und andere Toxine, Typ I Interferon, Typ II Interferon, Tumor Necrose Faktor („TNF α “), Transformierender Wachstumsfaktor- β („TGF- β “), Lymphotoxin, Migrations-Inhibierungsfaktor, Granulocyt-Macrophage koloniestimulierender Faktor („CSF“), Monocyt-Macrophage CSF, Granulocyt CSF, vaskulärer Epithelial-Wachstumsfaktor („VEGF“), Angiogenin, transformierender Wachstumsfaktor („TGF α “), Wärmeschockproteine, Kohlenhydrateinheiten von Blutgruppen, Rh-Faktoren, Fibroblastwachstumsfaktor und andere entzündliche und immunregulatorische Proteine, Hormone, wie zum Beispiel Wachstumshormone, Insulin, Glucagon, Parathyroidhormon, luetinisierendes Hormon, Follikel stimulierende Hormone und luetinisierendes Hormon, die Hormone freisetzen, Zelloberflächenrezeptoren, Antikörper, Nukleinsäuren, Nukleotide, DNA, RNA, Sense-Nukleinsäuren, Antisense-Nukleinsäuren, Krebszellen spezifische Antigene, wie zum Beispiel MART, MAGE, BAGE und HSPs, Mutant p53; Tyrosinase, Autoimmunantigene, Rezeptorproteine, Glukose, Glykogen, Phospholipide und monoklonale und/oder polyklonale Antikörper und basische Fibroblastwachstumsfaktoren.

[0085] Die Elemente, die an die Abgabevorrichtung oder -plattform binden, können durch irgendein Verfahren gebunden werden. Diese Elemente umfassen die integrierenden Moleküle, spezifischen Zielmoleküle, therapeutischen Mittel oder biologisch aktiven Faktoren. Das folgende Beispiel veranschaulicht ein Bindungsverfahren für die integrierenden Moleküle, aber das vorliegende Verfahren ist nicht nur auf dieses Element beschränkt und jede Elemente, die in der vorliegenden Erfindung beabsichtigt sind, können in diesem Verfahren gebunden werden. Die integrierenden Moleküle, entweder die weniger spezifischen Bindungsmoleküle, wie zum Beispiel die polykationischen Komponenten, oder die spezifischen Bindungsmoleküle, die Elemente des Bindungspaares, können an das kolloidale Metall durch irgendein Verfahren gebunden werden. Ein bevorzugtes Verfahren ist es, die integrierenden Moleküle in Wasser bei ungefähr einem pH von 1-3 pH-Einheiten oberhalb des isoelektrischen Punktes pI der integrierenden Moleküle wiederherzustellen. Ungefähr 100 bis 1000 μg , bevorzugt 150 bis 800 μg und am bevorzugtesten 200-500 μg der integrierenden Moleküle werden dann mit dem kolloidalen Metall inkubiert. Die Dauer der Inkubation ist nicht kritisch, aber sie ist bevorzugt ungefähr 2 bis 48 Stunden, bevorzugt 18 bis 36 Stunden.

[0086] Im Anschluss an die Inkubation wird die kolloidale Metallplattform, die mit dem integrierenden Molekül verbunden ist, optional durch Inkubieren über Nacht mit 1 Vol.-% einer 1-100% Lösung von Polyethylenglykol (PEG) stabilisiert. Alternativ können Cystein, Phospholipide, Brij 58 oder sulfhydrylhaltige Verbindungen verwendet werden, um die kolloidale Metallplattform zu stabilisieren. Die Lösung wird dann zentrifugiert, gefolgt von optionaler Stabilisierung des resultierenden Pellets durch Inkubation mit Cystein, Phospholipiden, sulfhydrylhaltigen Verbindungen oder einer 1%-igen Lösung eines menschlichem Albuminserum (HSA) in Proteinrekonstitutionspuffer. Typischerweise ist zwischen 90 und 95% der Komponente durch dieses Verfahren, wie durch Immunoassaymessung des ungebundenen biologisch aktiven Faktors in dem Überstand bestimmt, gebunden.

[0087] Das Binden eines Elementes auf diese Art und Weise verändert die physikalischen Eigenschaften des kolloidalen Metalls. Vor dem Binden kann das kolloidale Metall nicht durch einen 0.22 Mikrometerfilter filtriert

werden. Nach dem Binden kann der kolloidale Komplex leicht gefiltert werden. Dieser Unterschied zeigt auf, dass das Metall nicht länger, als ein Kolloid vorliegt, sondern als eine ionische Lösung.

[0088] Die Menge an kolloidalem Metall, die in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, liegt ungefähr zwischen 0.001 mg/ml und 1.0 mg/ml, wobei die bevorzugtere Menge an kolloidalem Metall ungefähr zwischen 0.01 mg/ml und 0.1 mg/ml liegt. Die Menge der Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung, die in vivo oder in vitro verabreicht werden soll, variiert gemäß der gewünschten Anwendung, dem abzugebenden Molekül, der Zielzellen für die Abgabe und der Art der Verabreichung.

[0089] Andere Verfahren der Herstellung von kolloidalen Zusammensetzungen und Verwendungen werden zum Beispiel in dem betreffenden US-Patent 6,274,552 gefunden.

[0090] Die Effektmoleküle werden dann über die integrierenden Moleküle an die Metallplattform gebunden. Die Effektmoleküle können entweder zellspezifische Zielmoleküle oder das therapeutische Mittel sein. Die Effektmoleküle können direkt an die integrierenden Moleküle, wie zum Beispiel Histone, gebunden sein oder können über spezifische Wechselwirkung der Bindungselemente binden. Wenn die Verfahren spezifische Wechselwirkungen unter Verwendung der Bindungselemente umfassen, wirkt eines der Bindungselemente als das integrierende Molekül, das an die Plattform gebunden ist und das komplementäre Bindungselement ist an das Effektmolekül gebunden. Zum Beispiel umfasst eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Bindungselemente von Streptavidin und Biotin und das Streptavidin wirkt als das integrierende Molekül und ist mit der kolloidalen Metallform verbunden. Das Biotin ist an die Effektmoleküle gebunden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Biotin an das zellspezifische Zielmolekül, zum Beispiel TNF- α , gebunden. Das Biotin ist ebenfalls an das therapeutische Mittel gebunden, wie zum Beispiel als abgeschnittene Formen von Toxinen, die ohne extra zelluläre Bindungsdomains sind.

[0091] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst die Verwendung von Streptavidin, das an kolloidales Gold gebunden ist, als eine Plattform zur Entwicklung und Anpassung von gezielten kombinatorischen Therapeutika. Die vorliegende Erfindung beinhaltet das Ausrichten von therapeutischen Mitteln, unter Verwendung von Ligand-Rezeptorbindung und das Verfahren der Rezeptor-vermittelten Endozytose (RME). Die Ausführungsform verwendet Streptavidin, das an kolloidales Gold gebunden ist, um biotinylierte Liganden und Therapeutika zu co-lokalisieren. Im Wesentlichen werden durch Verwenden von Streptavidin, das an kolloidales Gold gebunden ist, die Probleme des Bindens zweier chemisch unterschiedlicher Einheiten an ein einzelnes kolloidales Goldteilchen eliminiert. Stattdessen basiert die Chemie des Ziels und der Therapeutika nun auf der gut charakterisierten Bindung von Biotin an Streptavidin. Eine schematische Veranschaulichung dieser Ausführungsform ist in [Fig. 1](#) dargestellt.

Verschiedene Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung

[0092] Das Zellabgabesystem der vorliegenden Erfindung umfasst die Variationen und Kombinationen von Mischungen der Elemente, die hier offenbart sind, und ihre Bindungsfähigkeiten und Verfahren der Aktivität. Zum Beispiel umfasst eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die zellspezifischen Zielmoleküle, die direkt an die Metallplattform gebunden sind und das therapeutische Mittel, das an die Metallplattform entweder über spezifische oder weniger spezifische Bindung durch integrierende Moleküle gebunden ist. Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das therapeutische Mittel, das direkt an die kolloide Metallplattform gebunden ist und die zellspezifischen Zielmoleküle, die entweder über spezifisches oder weniger spezifisches Binden durch integrierende Moleküle gebunden sind. Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst sowohl das Binden der zellspezifischen Zielmoleküle als auch des therapeutischen Mittels an die Metallplattform durch spezifisches oder weniger spezifisches Binden mittels integrierender Moleküle oder das direkte Binden der zellspezifischen Zielmoleküle und des therapeutischen Mittels an die Metallplattform. Eine noch weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst die zellspezifischen Zielmoleküle, die an die Metallplattform durch Binden mittels der Bindungselemente gebunden sind und das therapeutische Mittel, das an die Metallplattform über weniger spezifische Bindungsmittel gebunden ist. Eine gegensätzliche Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Binden der zellspezifischen Zielmoleküle, die an die Metallplattform durch Binden mittels weniger spezifischer integrierender Molekülbindungen gebunden ist und das therapeutische Mittel, das an die Metallplattform durch Binden komplementären Bindungselemente gebunden ist. Andere Kombinationen und Variationen dieser Ausführungsformen sind als Teil der vorliegenden Erfindung beabsichtigt.

[0093] Die Elemente, die an die Abgabepattform gebunden sind, einschließlich von Zielmolekülen, integrierenden Molekülen und Effektmolekülen, wie zum Beispiel therapeutische Mittel und biologisch aktive Fakto-

ren, können an die Plattform in irgendeiner Kombination gebunden sein. Zum Beispiel können zwei Effektormoleküle an die Plattform gebunden sein, so dass ein Ziel- und Effektor-Komplex durch Binden eines Cytokins und eines Cytokinrezeptors an ein kolloidales Metallteilchen erzeugt werden kann. Alternativ kann ein Genabgabesystem durch Binden einer Nukleinsäurekomponente und eines Cytokinrezeptors an ein kolloidales Metallteilchen erzeugt werden. Ein therapeutisches System kann durch Binden eines chemotherapeutischen Mittels und eines Cytokinrezeptors an das kolloidale Metallteilchen erzeugt werden. Zusätzlich kann ein Antikörper für ein Krebsantigen das Zielmolekül sein und kann an das kolloidale Metall zusammen mit einem chemotherapeutischen Mittel gebunden sein. Bei der Abgabe des chemotherapeutischen Mittels an eine Zielzelle, wie zum Beispiel eine Krebszelle, können niedrige Konzentrationen des chemotherapeutischen Mittels verwendet werden, wobei dabei die systemische Toxizität des chemotherapeutischen Mittels reduziert wird.

[0094] Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist es, das Binden von zwei oder mehreren biologisch aktiven Faktoren an das gleiche kolloidale Metallteilchen als ein Verfahren zum Binden eines Moleküls an einen Zelloberflächenrezeptor zu verwenden, während das zweite Molekül in den extrazellulären Zwischenraum, der proximal der Zielzelle liegt, freigesetzt wird. Ein solches langsames Freisetzungsdepot dient dazu, die biologisch aktiven Moleküle an ihre spezifische Wirkungsstelle abzugeben.

[0095] Eine noch andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist es, das Binden von zwei oder mehreren Elementen an die gleiche Abgabepattform, wie zum Beispiel ein kolloidales Metallteilchen, als ein Verfahren zur Verwendung von spezifischen molekularen Transportmechanismen für eine dieser Komponenten zu verwenden, um biologische Barrieren zu überbrücken, welche dann die zweite Komponente oder Gruppe zusammen mit der ersten trägt. Zum Beispiel kann eine der Komponenten, die an die Abgabepattform gebunden ist, Glukose sein. Glukose, das ein spezifisches Bluthirnschranke-Transportsystem hat, ist an ein kolloidales Metall zusammen mit einem Effektormolekül, wie zum Beispiel ein biologisch aktives Molekül, gebunden. Der aktive Transport von Glukose über die Bluthirnschranke dient als ein Zeichen für irgendwelche verbundenen biologisch aktiven Faktoren, welche selbst unfähig sind die biologische Schranke zu überbrücken. Diese Zusammensetzungen dienen dann als Vehikel für die Abgabe von therapeutischen Molekülen an Gebiete, die gewöhnlich für den Abgabefaktor unerreichbar sind, wie zum Beispiel das Gehirn.

Eine bevorzugte Abgabepattform

[0096] Kolloidale Metalle sind bevorzugte Abgabepattformen, obwohl andere Materialien, die auf eine ähnliche Art und Weise arbeiten, als in der vorliegenden Erfindung offenbart beabsichtigt sind. Obwohl man nicht auf irgendeine besondere Theorie beschränkt sein möchte, ist die Rolle von kolloidalem Metall und bevorzugter kolloidalem Gold in der vorliegenden Erfindung nicht nur, um als Docking-Stelle für die verbundenen Elemente zu dienen. Im Gegensatz dazu kann dessen Rolle so wichtig sein, wie die der gebundenen Elemente. Zum Beispiel werden einige Arzneimittel nur aktiv, nachdem sie in eine Zelle internalisiert wurden. Arzneimittel, die RME als das Verfahren für die Internalisierung verwenden, bleiben oft gefangen und werden sofort in der Membranorganelle, dem Endosom, zerstört. Die Inaktivierung des Arzneimittels ist oft das Resultat eines Abfalls im endosomalen pH. Es ist dieser physiologische Wechsel im pH des Endosoms, der den Wert des kolloidalen Golds bevorzugt macht. Wir haben beobachtet, dass Protein gebundenes kolloidales Gold physikalische Änderungen durchmacht, wenn es einer sauren, d.h. endosomalähnlichen Umgebung, ausgesetzt wird. In einem sehr einfachen Experiment wurde kolloidales Gold, das mit gesättigten Konzentrationen von BSA gebunden war, gegenüber einem MES-Puffer bei zwei verschiedenen pH (7.4 und 5.6) dialysiert. Die Ergebnisse dieses Experimentes zeigen, dass kolloidales Gold, das gegenüber physiologischem (d.h. 7.4) pH dialysiert wurde, seinen kolloidalen Zustand beibehielt. Die gleiche Zubereitung, die gegenüber dem sauren pH dialysiert wurde, bildete jedoch sehr große Aggregate. Durch Bildung solcher Aggregate erleichtert das kolloidale Gold die intrazelluläre Freisetzung eines vermeintlichen Arzneimittels durch Lysieren des Endosoms.

Verwendung des Zellabgabesystems

[0097] Das Zellabgabesystem der Erfindung kann für die Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung einer medizinischen Bedingung verwendet werden, die aus der Gruppe, die aus bakteriellen Infektionen, viralen Infektionen, Krebs und Autoimmunerkrankungen besteht, ausgewählt wird. Die Verabreichung des Medikamentes kann direkte Applikation an die Zielzellen oder solche Verabreichungsarten wie bei Pharmazeutika verwendet beinhalten, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, Formulierungen, einschließlich denen, die für orale, rektale, transdermale, ophthalmische (einschließlich intravitreal oder intrakameral) nasale, topikale (einschließlich bucale und sublinguale), vaginale oder parenterale (einschließlich subkutane, intramuskuläre, intravenöse, intradermale, intratracheale und epidurale) Verabreichung. Die Formulierungen können gewöhnlich in Einheitsdosierungsformen vorliegen und können durch herkömmliche pharmazeutische Techniken herge-

stellt werden. Solche Techniken beinhalten den Schritt des Zusammenführens des aktiven Inhaltsstoffes und des pharmazeutischen Trägers oder Austauschstoffes. Im Allgemeinen werden die Formulierungen durch einheitliche und inniges Zusammenbringen der Zusammensetzungen mit flüssigen Trägern oder fein verteilten festen Trägern oder beiden und dann, wenn notwendig, Formen des Produktes hergestellt.

Definitionen

[0098] Der Begriff „toxische Reaktion“ und „Toxizität“, wie hier verwendet, beinhaltet die folgenden zellulären Antworten: Fieber, Ödem, einschließlich zerebralem Ödem, Psychose, Autoimmunerkrankungen, Blutsturz, Schock, einschließlich hämorrhagischem Schock, Sepsis, Abmagerung oder Tod.

[0099] Die Begriffe „biologisch aktive Faktoren“ und „therapeutische Mittel“ beinhalten Interleukin-1 („IL-1“), Interleukin-2 („IL-2“), Interleukin-3 („IL-3“), Interleukin-4 („IL-4“), Interleukin-5 („IL-5“), Interleukin-6 („IL-6“), Interleukin-7 („IL-7“), Interleukin-8 („IL-8“), Interleukin-10 („IL-10“), Interleukin-11 („IL-11“), Interleukin-12 („IL-12“), Interleukin-13 („IL-13“), Interleukin-15 („IL-15“), Interleukin-16 („IL-16“), Interleukin-17 („IL-17“), Interleukin-18 („IL-18“), Lipid A, Phospholipase A2, Endotoxin, Staphylokokkenenterotoxin B und andere Toxine, Typ I Interferon, Typ II Interferon, Tumor Necrose Faktor („TNF α “), transformierender Wachstumsfaktor- β („TGF- β “), Lymphotoxin, Migrationsinhibierungsfaktor, Granulozyt-Macrophage, Kolonie stimulierender Faktor („CSF“), Monocyt-Macrophage CSF, Granulocyte CSF, vaskulärer Epithelialwachstumsfaktor („VEGF“), Angiogenin, transformierender Wachstumsfaktor („TGF α “), Wärmeschockproteine, Kohlenhydrateinheiten von Blutgruppen, Rh-Faktoren, Fibroblastwachstumsfaktor, Hormone, wie zum Beispiel Wachstumshormone, Insulin, Glukogen, Parathyroidhormon, luetinisierendes Hormon, Follikel stimulierendes Hormon und luetinisierendes Hormon, das Hormon freisetzt, Zelloberflächenrezeptoren, Antikörper, chemotherapeutische Mittel und andere entzündliche und immunregulatorische Proteine, Nukleinsäuren, Nukleotide, DNA, RNA, Sense-Nukleinsäuren, Antisense-Nukleinsäuren, Krebszellen spezifische Antigene, wie zum Beispiel MART, MAGE, BAGE und HSP und Immunotherapeutika, wie zum Beispiel AZT, Pharmazeutika und andere therapeutische Arzneimittel.

[0100] Beispiele therapeutischer Mittel und Organismen, die behandelt werden sollen, werden in der folgenden Tabelle gefunden.

Tabelle 1: Organismen und ausgewählte therapeutische Mittel Bakterien

Mycobacterium tuberculosis	Isoniazid, Rifampin, Ethambutol, Pyrazinamid, Streptomycin, Clofazimin, Rifabutin, Fluorchinolone, wie z.B. Ofloxacin und Sparfloxacin
Mycobacterium avium	Rifabutin, Rifampin, Azithromycin, Clarithromycin, Fluorchinolone
Mycobacterium leprae	Dapson
Chlamydia trachomatis	Tetracyclin, Doxycyclin, Erythromycin, Ciprofloxacin
Chlamydia pneumoniae	Doxycyclin, Erythromycin
Listeria monocytogenes	Ampicillin

Pilze

Candida albicans	Amphotericin B, Ketoconazol, Fluconazol
Cryptococcus neoformans	Amphotericin B, Ketoconazol, Fluconazol

Protozoen

Toxoplasma gondii	Pyrimethamin, Sulfadiazin, Clindamycin, Azithromycin, Clarithromycin, Atovaquon
Pneumocystis carinii	Pentamidin, Atovaquon
Cryptosporidium sp.	Paromomycin, Diclazaril

Virus

Herpes simplex virus Typ 1	Acyclovir, Trifluoruridin und andere und Typ 2 antivirale Nucleosidanaloge, Foscarnat, Antisense-Oligonucleotide und triplex-spezifische DNA-Sequenzen
Cytomegalovirus	Foscarnet, Ganciclovir
HIV	AZT, DDI, DDC, Foscarnat, Viralproteaseinhibitoren, Peptide, Antisense-Oligonucleotide, triplex und andere Nucleinsäuresequenzen
Influenza Virus Typ A und B	Ribavirin
Respiratorischer Virus	Synzytial Ribavirin
Varizellen Virus	Acyclovir

[0101] Der Begriff "zellspezifisches Zielmolekül" beinhaltet Interleukin-1 („IL-1“), Interleukin-2 („IL-2“), Interleukin-3 („IL-3“), Interleukin-4 („IL-4“), Interleukin-5 („IL-5“), Interleukin-6 („IL-6“), Interleukin-7 („IL-7“), Interleukin-8 („IL-8“), Interleukin-10 („IL-10“), Interleukin-11 („IL-11“), Interleukin-12 („IL-12“), Interleukin-13 („IL-13“), Interleukin-15 („IL-15“), Interleukin-16 („IL-16“), Interleukin-17 („IL-17“), Interleukin-18 („IL-18“), Lipid A, Phospholipase A2, Endotoxin, Staphylokokkenenterotoxin B und andere Toxine, Typ I Interferon, Typ II Interferon, Tumor Necrose Faktor („TNF α “), transformierender Wachstumsfaktor- β („TGF- β “), Lymphotoxin, Migrationsinhibierungsfaktor, Granulozyt-Macrophage, Kolonie stimulierender Faktor („CSF“), Monocyt-Macrophage CSF, Granulocyt CSF, vaskulärer Epithelialwachstumsfaktor („VEGF“), Angiogenin, transformierender Wachstumsfaktor („TGF α “), Wärmeschockproteine, Kohlenhydrateinheiten von Blutgruppen, Rh-Faktoren, Fibroblastwachstumsfaktoren und andere entzündliche und immunregulatorische Proteine, Hormone, wie zum Beispiel Wachstumshormone, Insulin, Glukagon, Parathyroidhormone, luetinisierende Hormone, Follikel stimulierendes Hormon und luetinisierendes Hormon, das Hormon freisetzt, Zelloberflächenrezeptoren, Antikörper, Nukleinsäuren, Nukleotide, DNA, RNA, Sense-Nukleinsäuren, Antisense-Nukleinsäuren, Krebszellen spezifische Antigene, wie zum Beispiel MART, MAGE, BAGE und HSP, Mutant p53, Tyrosinase, Autoimmunantigene, Rezeptorproteine, Glukose, Glukogen, Phospholipide und monoklonale und/oder polyklonale Antikörper und basischen Fibroblastwachstumsfaktor.

[0102] Der Begriff „kolloidales Metall“, wie hier verwendet, beinhaltet jedes wasserunlösliche Metallteilchen oder jede metallische Verbindung, die in flüssigem Wasser (ein Hydrosol) dispergiert ist. Das kolloidale Metall kann aus Metallen der Gruppen IA, IB, IIB und IIIB des Periodensystems als auch aus Übergangsmetallen, insbesondere denen der Gruppe VIII, ausgewählt werden. Bevorzugte Metalle beinhalten Gold, Silber, Aluminium, Ruthenium, Zink, Eisen, Nickel und Calcium. Andere geeignete Metalle können ebenfalls die folgenden in all ihren verschiedenen Oxidationszuständen beinhalten: Lithium, Natrium, Magnesium, Kalium, Scandium, Titan, Vanadium, Chrom, Mangan, Kobalt, Kupfer, Gallium, Strontium, Niob, Molybdän, Palladium, Indium, Zinn, Wolfram, Rhenium, Platin und Gadolinium. Die Metalle werden bevorzugt in ionischer Form (bevorzugt von einer geeigneten Metallverbindung abgeleitet), zum Beispiel den Al³⁺, Ru³⁺, Zn²⁺, Fe³⁺, Ni²⁺ und Ca²⁺-Ionen, bereitgestellt. Ein bevorzugtes Metall ist Gold, insbesondere in der Form von Au³⁺. Eine besonders bevorzugte Form von kolloidalem Gold ist HAuCl₄ (E-Y Laboratories, Inc., San Mateo, Kalifornien). Ein anderes bevorzugtes Metall ist Silber, insbesondere in einem Natriumboratpuffer mit der Konzentration ungefähr zwischen 0.1% und 0.001 und am bevorzugtesten ungefähr eine 0.01%ige Lösung. Bevorzugt ist die Farbe einer solchen kolloidalen Silberlösung gelb und die kolloidalen Teilchen reichen von 1 bis 40 Nanometern. Diese Metallionen können in dem Komplex alleine oder mit anderen anorganischen Ionen vorliegen.

Einige Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung Zellabgabesystem für Gentherapie

[0103] Die vorliegende Erfindung umfasst ein Zellabgabesystem für die gezielte Abgabe von exogenen Nukleinsäuren oder genetischer Information in spezifische Zellen. Die exogene genetische Information wird von spezifischen Zellen aufgrund von spezifischen Rezeptoren auf den Zellen aufgenommen und wird bevorzugt innerhalb der Zellen durch Rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert. Somit werden in einer Mischung von unterschiedlichen Zelltypen die exogenen Nukleinsäuren nur durch Zellen mit dem ausgewählten Rezeptor internalisiert und Zellen, denen der Rezeptor fehlt, werden nicht beeinflusst.

[0104] Die vorliegende Erfindung umfasst ein Zellabgabesystem für die Transfektion von spezifischen Zellen. Eine Ausführungsform eines solchen Zellabgabesystems umfasst Nukleinsäuren, die an Polykationen gebunden sind, die an kolloidale Metalle gebunden sind. Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst kolloidales Gold als eine Plattform, die Zielmoleküle und Effektormoleküle binden kann, um ein gezieltes Genabgabesystem zu erzeugen, das Rezeptor-vermittelte Endozytosen von Zellen verwendet, um

Transfektion zu erreichen. In einer bevorzugteren Ausführungsform ist das Zielmolekül ein Cytokin und das Effektormolekül ist exogenes genetisches Material, wie zum Beispiel DNA oder RNA. Diese Ausführungsform kann ebenfalls integrierende Moleküle, wie zum Beispiel Polykationen, umfassen.

[0105] Im Zusammenhang mit dem Zellabgabesystem beinhaltet die vorliegende Erfindung ebenfalls die Herstellung des gezielten Genabgabesystems und die Abgabe des gezielten Genabgabesystems an die Zellen zur Transfektion. Es ist in der vorliegenden Erfindung beabsichtigt, dass die Nukleinsäuren des Zellabgabesystems eventuell durch die Zelle übersetzt und exprimiert werden. Diese Expressierung kann in irgendeiner Form sein, die dem Durchschnittsfachmann bekannt ist, und beinhaltet funktionsfähige Proteine, die Herstellung von zellularen Produkten, enzymatische Aktivität, Export zellulärer Produkte, Herstellung von zellularen Membrankomponenten oder nuklearer Komponenten. Die Verfahren zur Abgabe an die gezielten Zellen können solche Verfahren sein, wie die, die für in vitro Techniken, wie zum Beispiel Zugabe zu zellularen Kulturen, verwendet werden.

[0106] Die [Fig. 16](#) und [Fig. 17](#) zeigen Experimente, die Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung verwenden. [Fig. 16](#) zeigt erfolgreiche rezeptorgezielte Genabgabe an die menschlichen Brustkrebszellen MCF-7. Ein EGF/Histon Chimera wurde auf 40 nm kolloidalem Gold hergestellt. Nach Ausfällung und Resuspendierung wurde Plasmid-DNA, die für das pSV beta-Galaktosidasegen kodiert, inkubiert und wie oben beschrieben re-zentrifugiert. Das Vorhandensein des Enzyms (Beta-Galaktosidase) wurde durch Inkubieren der Zellen mit dem Substrat X-gal detektiert. Blau-grüne Flecken deuten Zellen mit Vorhandensein des Genprodukts an, wobei pinkfarbene Flecken das Vorhandensein von EGF/Histon/DNA/kolloidalem Gold-Chimera anzeigt.

[0107] [Fig. 17](#) zeigt eine Kontrolltransfektion, die das EGF/Histon/DNA/kolloidales Gold Chimera verwendet. Menschliche Brustkrebszellen, HS-578-T, wurden zur selben Zeit wie MCF-7 Zellen mit dem identischen Chimera wie oben für [Fig. 16](#) beschrieben behandelt. Die Zellen wurden dann mit X-gal behandelt, um das Vorhandensein des transfizierten Gens zu detektieren. [Fig. 17](#) zeigt klar, dass HS-578-T Zellen, obwohl sie das Chimera binden können, wie durch den schwarzen Flecken zu sehen, nicht in der Lage waren internalisiert zu werden. Konsequenterweise wird keine blaugrüne Farbe gesehen, was ein Fehlen von Transfektion anzeigt.

Immunstimulation

[0108] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Zellabgabesystem, das für die Steigerung einer Immunantwort und für die Verbesserung der Impfstoffeffizienz durch das simultane oder sequentielle Ausrichten von spezifischen Immunkomponenten verwendbar ist. Insbesondere werden spezifische Immunkomponenten, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, Antigen präsentierende Zellen (APC) wie zum Beispiel Macrophagen und dendritische Zellen, und Lymphozyten, wie zum Beispiel B-Zellen und T-Zellen, durch ein oder mehrere Komponenten-spezifische immunostimulierenden Mittel individuell beeinflusst. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung gewährleistet die Aktivierung der Immunantwort unter Verwendung eines spezifischen Antigens zusammen mit den Komponentenspezifischen immunostimulierenden Mitteln. Wie hier verwendet, bedeutet Komponentenspezifisches immunostimulierendes Mittel ein Mittel, das spezifisch für eine Komponente des Immunsystems ist und das diese Komponente beeinflussen kann, so dass die Komponente eine Aktivität bei der Immunantwort hat. Das Mittel kann verschiedene unterschiedliche Komponenten des Immunsystems beeinflussen und diese Fähigkeit kann bei den Verfahren und den Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Das Mittel kann natürlich auftreten oder kann durch molekular biologische Techniken oder Proteinrezeptormanipulation hergestellt oder manipuliert sein.

[0109] Die Aktivierung der Komponente in der Immunantwort kann in einer Stimulierung oder Unterdrückung anderer Komponenten der Immunantwort resultieren, was zu einer Gesamtstimulierung oder Unterdrückung der Immunantwort führt. Zur Erleichterung der Expressierung wird die Stimulierung von Immunkomponenten hier beschrieben, aber es ist verständlich, dass alle Antworten von Immunkomponenten durch den Begriff Stimulierung beabsichtigt sind, einschließlich Stimulierung, Unterdrückung, Abstoßung und Feed-Back-Aktivitäten.

[0110] Die Immunkomponente, die beeinflusst wird, kann mehrfache Aktivitäten haben, die sowohl zur Unterdrückung als auch zur Stimulierung oder Initiation oder Unterdrückung des Feedback-Mechanismus führen. Die vorliegende Erfindung ist nicht durch die Beispiele von immunologischen Antworten, die hier detailliert beschrieben sind, beschränkt, sondern beabsichtigt komponentenspezifische Wirkungen in allen Aspekten des Immunsystems.

[0111] Die Aktivierung jeder der Komponenten des Immunsystems kann gleichzeitig, nacheinander oder ir-

gendeine Kombination davon sein. In einer Ausführungsform eines Verfahrens der vorliegenden Erfindung werden multiple Komponent-spezifische immunostimulierende Agenzien gleichzeitig verabreicht. Bei diesem Verfahren wird das Immunsystem gleichzeitig mit vier unterschiedlichen Zubereitungen stimuliert, wobei jede eine Zusammensetzung enthält, die ein Komponent-spezifisches immunostimulierendes Mittel umfasst. Bevorzugt umfasst die Zusammensetzung das Komponent-spezifische immunostimulierende Mittel, das mit kolloidalem Metall verbunden ist. Bevorzugter umfasst die Zusammensetzung das Komponent-spezifische immunostimulierende Mittel, das mit kolloidalem Metall mit einer Teilchengröße oder unterschiedlichen Teilchengrößen und einem Antigen verbunden ist. Am bevorzugtesten umfasst die Zusammensetzung das Komponent-spezifische immunostimulierende Mittel, das mit kolloidalem Metall einer Teilchengröße und Antigen oder unterschiedlicher Teilchengrößen und Antigen verbunden ist.

[0112] Die Erfinder haben herausgefunden, dass sie bestimmte Komponent-spezifische immunostimulierende Mittel verwenden können, die eine spezifische stimulatorische Wirkung auf einzelne Immunkomponenten nach der Regulierung haben. Zum Beispiel stimuliert Interleukin-1 β (IL-1 β) insbesondere Macrophagen, während TNF- α (Tumor Nekrosefaktor Alpha) und Flt-3 Ligand spezifisch dendritische Zellen stimuliert. Durch Wärme abgetötetes Mycobakterium butyricum und Interleukin-6 (IL-6) sind spezifische Stimulatoren von B-Zellen und Interleukin-2 (IL-2) ist ein spezifischer Stimulator von T-Zellen. Zusammensetzungen, die diese Komponent-spezifischen immunostimulierenden Mittel umfassen, gewährleisten spezifische Aktivierung von Macrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen bzw. T-Zellen. Zum Beispiel werden Macrophagen aktiviert, wenn eine Zusammensetzung, die Komponent-spezifisches immunostimulierendes Mittel IL-1 β umfasst, verabreicht wird. Eine bevorzugte Zusammensetzung ist IL-1 β zusammen mit kolloidalem Metall und eine bevorzugteste Zusammensetzung ist IL-1 β zusammen mit kolloidalem Metall und einem Antigen, um eine spezifische Macrophageantwort für das Antigen bereitzustellen.

[0113] Viele Elemente der Immunantwort sind für eine wirksame Impfung notwendig. Eine Ausführungsform eines Verfahrens von gleichzeitiger Stimulierung ist es, vier unterschiedliche Zubereitungen von Zusammensetzungen von Komponent-spezifischen immunostimulierenden Mitteln zu verabreichen, die 1) IL-1 β für Macrophagen, 2) TNF- α und Flt-3 Ligand für dendritische Zellen, 3) IL-6 für B-Zellen und 4) IL-2 für T-Zellen umfassen. Die Zusammensetzungen der Komponent-spezifischen immunostimulierenden Mittel können auf jede Art und Weise, die dem Durchschnittsfachmann bekannt ist, verabreicht werden und können dieselbe oder verschiedene Arten, abhängig von der erwünschten Immunantwort, verwenden.

[0114] In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die einzelnen Immunkomponenten nacheinander aktiviert. Zum Beispiel kann die sequentielle Aktivierung in zwei Phasen aufgeteilt werden, die Primerphase und die Immunisierungsphase. Die Primerphase umfasst die Stimulierung von APCs, bevorzugt Macrophagen und dendritischen Zellen, während die Immunisierungsphase das Stimulieren von Lymphozyten, bevorzugt B-Zellen und T-Zellen, umfasst. Innerhalb jeder der zwei Phasen kann die Aktivierung der einzelnen Immunkomponenten gleichzeitig oder nacheinander erfolgen. Für die aufeinander folgende Aktivierung ist ein bevorzugtes Verfahren der Aktivierung die Aktivierung von Macrophagen, gefolgt von dendritischen Zellen, gefolgt von B-Zellen, gefolgt von T-Zellen. Ein bevorzugtes Verfahren ist eine kombinierte aufeinander folgende Aktivierung, wobei es simultane Aktivierung der Macrophagen und dendritischen Zellen gibt, gefolgt von der gleichzeitigen Aktivierung von B-Zellen und T-Zellen. Dies ist ein Beispiel von Verfahren und Zusammensetzungen von mehrfachen Komponent-spezifischen immunostimulierenden Mitteln, um verschiedene Wege des Immunsystems zu initiieren.

[0115] Das Zellabgabesystem der vorliegenden Erfindung kann ebenfalls verwendet werden, um die Wirksamkeit jedes Impfstofftyps zu steigern. Die vorliegenden Verfahren steigern die Impfstoffwirksamkeit durch Ausrichten spezifischer Immunkomponenten zur Aktivierung. Zusammensetzungen, die Komponent-spezifische immunostimulierende Mittel zusammen mit kolloidalem Metall und Antigen umfassen, werden zur Steigerung des Kontaktes zwischen Antigen und spezifischer Immunkomponente verwendet. Beispiele von Erkrankungen, für welche Impfstoffe im Moment erhältlich sind, beinhalten Cholera, Diphtherie, Haemophilus, Hepatitis A, Hepatitis B, Influenza, Masern, Meningitis, Mumps, Keuchhusten, kleine Pocken, Pneumokokkenpneumonie, Polio, Tollwut, Röteln, Tetanus, Tuberkulose, Typhus, Windpocken, Keuchhusten und Gelbfieber.

[0116] Die Kombination der Verabreichungsart und des Verpackens, das verwendet wird, um das Antigen an das Immunsystem abzugeben, ist ein wichtiges Werkzeug beim Entwerfen der gewünschten Immunantwort. Verschiedene Packverfahren, wie zum Beispiel Liposome, Mikrokapseln oder Mikrokügelchen, die eine Langzeit-Freisetzung von immunostimulierenden Zusammensetzungen bereitstellen können, können im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Diese Packsysteme wirken wie interne Depots zum Festhalten des Antigens und langsamer Freisetzung des Antigens für die Immunsystemaktivierung. Zum

Beispiel kann ein Liposom mit einer Zusammensetzung gefüllt werden, die ein Antigen und Komponentenspezifische immunstimulierende Mittel, die mit kolloidalem Metall verbunden sind, umfasst. Zusätzliche Kombinationen sind kolloidale Goldteilchen, die mit viralen Partikeln bedeckt sind, welche die aktiven Impfstoffkandidaten sind oder werden gepackt, um DNA für einen wirksamen Impfstoff zu enthalten. Das Goldteilchen würde ebenfalls ein Cytokin enthalten, welches dann verwendet werden könnte, um den Virus für spezifische Immunzellen auszurichten. Des Weiteren könnte man einen Fusionsproteinimpfstoff erzeugen, welcher zwei oder mehr potentielle Impfstoffkandidaten ausrichtet und einen Impfstoff für zwei oder mehrere Anwendungen erzeugen. Die Teilchen können ebenfalls Immunogene enthalten, welche durch die Zugaben von Polyethylenglykol, welches das Material langsam freisetzt, chemisch modifiziert worden sind.

[0117] Der Antigen/Komponentenspezifisches immunstimulierendes Mittel/Metallkomplex wird langsam von dem Liposom freigesetzt und wird durch das Immunsystem als fremdartig erkannt und die spezifische Komponente, an welche das Komponentenspezifische immunstimulierende Mittel sich richtet, aktiviert das Immunsystem. Die Kaskade der Immunantwort wird schneller durch das Vorhandensein des Komponentenspezifischen immunstimulierenden Mittels aktiviert und die Immunantwort wird schneller und spezifischer generiert.

[0118] Andere Zellabgabesysteme, die in der vorliegenden Erfindung beabsichtigt sind, beinhalten die Verwendung von Antigen-Komponentenspezifisches immunstimulierendes Mittel/kolloidaler Metallkomplex, bei dem die kolloidalen Metallteilchen unterschiedliche Größen haben. Die aufeinander folgende Verabreichung von Komponentenspezifischen immunstimulierenden Mitteln kann in einer Dosisverabreichung durch die Verwendung dieser kolloidalen Metallteilchen mit unterschiedlicher Größe erreicht werden. Eine Dosis würde vier unabhängige Komponentenspezifische immunstimulierende Mittel beinhalten, die ein Antigen komplexieren und jedes mit einem kolloidalen Metallteilchen unterschiedlicher Größe. Somit würde die gleichzeitige Verabreichung die aufeinander folgende Aktivierung der Immunkomponenten bereitstellen, um einen effektiveren Impfstoff und mehr Schutz für die Population zu erhalten. Andere Arten von Einzeldosisverabreichungen mit aufeinander folgender Aktivierung könnten für Kombinationen von kolloidalen Metallteilchen mit unterschiedlicher Größe und Liposomen oder Liposomen, die mit kolloidalen Metallteilchen unterschiedlicher Größe gefüllt sind, bereitstellen.

[0119] Die Verwendung dieser Systeme wie oben beschrieben ist sehr wichtig bei der Bereitstellung von Impfstoffen, die in einer Dosis verabreicht werden können. Einzeldosisverabreichung ist wichtig bei der Behandlung von Tierpopulationen, wie zum Beispiel Vieh oder Wildpopulationen von Tieren. Einzeldosisverabreichung ist wirksam bei der Behandlung von Populationen, die sich der medizinischen Versorgung widersetzen, wie zum Beispiel die Armen, die Heimatlosen, die Landbevölkerung oder Personen in Entwicklungsländern, die eine inadäquate medizinische Versorgung haben. Viele Personen in allen Ländern haben keinen Zugang zu präventiven Maßnahmen der medizinischen Versorgung, wie zum Beispiel Impfung. Die Rückkehr von Infektionskrankheiten, wie zum Beispiel Tuberkulose, hat das Erfordernis nach Impfstoffen, die einmal verabreicht werden und weiterhin einen lang andauernden, wirksamen Schutz bereitstellen, gesteigert. Die Zellabgabesysteme der vorliegenden Erfindung stellen einen solch wirksamen Schutz bereit.

[0120] Das Zellabgabesystem der vorliegenden Erfindung kann ebenfalls verwendet werden, um Erkrankungen, bei denen eine Immunantwort auftritt, durch stimulieren oder unterdrücken von Komponenten, die Teil der Immunantwort sind, zu behandeln. Beispiele solcher Krankheiten beinhalten Addison Krankheit, Allergien, Anaphylaxen, Bruton's Syndrom, Krebs, einschließlich feste und durch Blut übertragene Tumore, Ekzeme, Hashimotos Thyroiditis, Polymyositis, Dermatomyositis, Typ 1 Diabetes Mellitus, erworbene Immunschwäche, Transplantatabstoßung, wie z.B. Nieren-, Herz-Pankreas-, Lungen-, Knochen- und Lebertransplantate, Graves Krankheit, polyendokrine Autoimmunkrankheit, Hepatitis, mikroskopische Polyarthrit, Polyarthrit nodosa, Pemphigus, primäre Hanot-Krankheit, schädliche Anämie, Zöliakie-Krankheit, Antikörper vermittelte Nephritis, Glomerulonephritis, rheumatische Erkrankungen, systemische Lupus Erythematosus, rheumatoide Arthritis, Serologie negative Spondylarthritiden, Rhinitis, Sjogrens Syndrom, systemische Sklerose, sklerotische Cholangitis, Wegeners Granulomatose, Dermatitis Herpetiformis, Psoriasis, Vitiligo, multiple Sklerose, Encephalomyelitis, Guillain-Barre Syndrom, Myasthenia Gravis, Lambert-Eaton-Syndrom, Sklera, Episklera, Uveitis, chronische mucokutane Kandidiasis, Nesselfieber, transiente Hypogammaglobulinämie der Kindheit, Myelom, X-gebundenes Hyper IgM Syndrom, Wiskott-Aldrich-Syndrom, Ataxie Telangiectasia, autoimmune hämolytische Anämie, Autoimmunthrombocytopenie, autoimmune Neutropenie, Waldenströms Macroglobulinämie, Amyloidosis, chronische lymphocytische Leukämie und Non-Hodgkin-Lymphom.

[0121] Das Zellabgabesystem der vorliegenden Erfindung kann Komponentenspezifische immunstimulierende Mittel umfassen. Ein System kann ein Komponentenspezifisches immunstimulierendes Mittel oder mehrere Komponentenspezifische immunstimulierende Mittel umfassen. Bevorzugte Ausführungsformen des Systems

umfassen Komponent-spezifische immunostimulierende Mittel zusammen mit kolloidalen Metallen. Bevorzugtere Ausführungsformen umfassen Systeme, die Komponent-spezifische immunostimulierende Mittel zusammen mit kolloidalen Metallen und anderen Elementen für das spezielle Ausrichten der Wirkung der Komponent-spezifischen immunostimulierenden Mittel umfassen, einschließlich Antigenen, Rezeptormolekülen, Nukleinsäuren, Arzneimitteln, chemotherapeutischen Mitteln und Trägerstoffen. Das System der vorliegenden Erfindung kann zu der Immunkomponente auf irgendeine Art und Weise abgegeben werden. In einer Ausführungsform werden ein Antigen und ein Komponent-spezifisches immunostimulierendes Mittel an ein kolloidales Metall auf eine solche Art und Weise gebunden, dass ein einziges kolloidales Metallteilchen sowohl an das Antigen als auch an das immunostimulierende Mittel gebunden ist.

Zusammenfassung

[0122] Bei einer offenbarten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die stimulierten spezifischen Immunkomponenten Macrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen und T-Zellen. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Zellabgabesystem Komponent-spezifische immunostimulierende Mittel. In einer bevorzugteren Ausführungsform umfassen die Zusammensetzungen Komponent-spezifische immunostimulierende Mittel zusammen mit kolloidalem Metall. In einer anderen offenbarten Ausführungsform sind ein Antigen und ein Komponent-spezifisches immunostimulierendes Mittel an ein kolloidales Metall, wie zum Beispiel kolloidales Gold, gebunden und das resultierende chimere Molekül wird der Immunkomponente vorgelegt.

[0123] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls das Vorlegen eines Antigens und eines Komponent-spezifischen immunostimulierenden Mittels in einer Vielzahl unterschiedlicher Abgabepattformen oder Trägerkombinationen. Zum Beispiel beinhaltet eine bevorzugte Ausführungsform die Verabreichung eines Antigens zusammen mit Komponent-spezifischen immunostimulierenden Mitteln und kolloidalem Gold in einem Liposomenträger. Zusätzliche Kombinationen sind kolloidale Goldteilchen, die mit viralen Teilchen, die der aktive Impfstoffkandidat sind, bedeckt werden oder verpackt werden, um DNA für einen wirksamen Impfstoff zu erhalten. Das Goldteilchen würde ebenfalls ein Cytokin enthalten, welches dann verwendet werden könnte, um den Virus an den spezifischen Immunzellen auszurichten. Diese Ausführungsformen gewährleisten eine interne Impfstoffherstellung, die langsam Antigen an das Immunsystem für eine langandauernde Antwort freisetzt. Diese Art von Impfstoff ist besonders nützlich für einmalige Verabreichung von Impfstoffen. Alle Arten von Trägern, einschließlich Liposome und Mikrokapseln, sind in der vorliegenden Erfindung beabsichtigt.

Toxizitätsverringern und Impfstoffverabreichung

[0124] Die vorliegende Erfindung umfasst ein Zellabgabesystem für die in vitro Verabreichung von normal toxischen biologisch aktiven Faktoren. Im Allgemeinen umfassen die Systeme gemäß der vorliegenden Erfindung eine Mischung eines kolloidalen Metalls zusammen mit einer Substanz, die normalerweise toxisch ist, wobei das System weniger toxisch oder nicht toxisch ist. Die Zusammensetzungen beinhalten optional einen pharmazeutisch geeigneten Träger, wie zum Beispiel eine wässrige Lösung, oder Hilfsstoffe, Puffer, Antigenstabilisatoren oder sterilisierte Träger. Öle, wie zum Beispiel Paraffinöl, können ebenfalls optional in der Zusammensetzung beinhaltet sein.

[0125] Das Zellabgabesystem der vorliegenden Erfindung kann verwendet werden, um bestimmte Erkrankungen mit Cytokinen oder Wachstumsfaktoren zu behandeln. Durch Mischen der biologisch aktiven Faktoren mit dem kolloidalem Metall wird die Toxizität des biologisch aktiven Faktors verringert oder eliminiert, wobei es dabei dem Faktor ermöglicht wird, seinen therapeutischen Effekt auszuüben. Die Kombination eines kolloidalen Metalls mit solchen biologisch aktiven Faktoren verringert die Toxizität, während die therapeutischen Ergebnisse aufrecht erhalten oder verbessert werden, wobei dabei die Effizienz erhöht wird, da höhere Konzentrationen von biologisch aktiven Faktoren verabreicht werden können oder die Verwendung von Kombinationen von biologisch aktiven Faktoren ermöglicht wird. Die Verwendung von kolloidalen Metallen zusammen mit biologisch aktiven Faktoren ermöglicht deshalb die Verwendung von höheren Konzentrationen von biologisch aktiven Faktoren oder vormals unbrauchbaren toxischen Substanzen.

[0126] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist es, einen biologisch aktiven Faktor, der mit dem kolloidalen Metall verbunden ist, als eine Impfstoffzubereitung zu verwenden. Unter den vielen Vorteilen eines solchen Impfstoffs ist die Verringerung der Toxizität der normaltoxischen Faktoren. Der Impfstoff gegen biologisch aktive Faktoren kann durch irgendein Verfahren hergestellt werden. Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes gegen biologisch aktive Faktoren ist, den ausgewählten biologisch aktiven Faktor mit dem kolloidalen Metall in einem salzfreien Medium, bevorzugt deionisiertes Wasser, zu mischen. Das salzfreie Medium kann optional mit zum Beispiel Tris-Puffer gepuffert sein. In einer Ausführungsform der Erfindung wird

die kolloidale Metalllösung 1:1 mit der Lösung der biologisch aktiven Faktoren verdünnt.

[0127] Das Medium sollte bevorzugt keine Natriumionen enthalten. Eine kolloidale Goldlösung hat einen leicht pinkfarbenen Farbton, wobei dieser Farbton sich nicht ändern sollte, wenn die Lösung, die die biologisch aktiven Faktoren enthält, hinzugegeben wird. Wenn die kolloidale Goldlösung sich von pink nach lila verfärbt, zeigt dies an, dass das Gold ausgefallen ist und nicht wieder für eine wirksame Immunisierung eingesetzt werden kann. Die Lebensdauer einer Mischung von kolloidalem Gold und biologisch aktiven Faktoren ist ungefähr 24 Stunden.

[0128] Der Impfstoff kann des Weiteren einen pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoff umfassen, einschließlich Freund's vollständiger Hilfsstoff ("Freund's complete adjuvant"), Freund's unvollständiger Hilfsstoff ("Freund's incomplete adjuvant"), Lipopolysaccharid, Monophosphoryl Lipid A, Muramylidipeptid, Liposome, die Lipid A enthalten, Alaun, Muramyltripeptidphosphatidylethanolamin, Keyhole und Limpet Hemocyanin. Ein bevorzugter Hilfsstoff ist Freund's unvollständiger Hilfsstoff, der bevorzugt 1:1 mit der Mischung von kolloidalem Metall und biologisch aktivem Faktor verdünnt ist.

[0129] Eine Menge an biologisch aktivem Faktor, die in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, liegt ungefähr zwischen 200 µg und 500 µg an gebundenem Protein in 25 ml Gold, was dann sequentiell auf 200 µl aufkonzentriert wird. Ideale Konzentrationen, die verabreicht werden sollen, sind ungefähr 6.5 mg Protein/kg Körpergewicht. Die tatsächliche Menge wird variieren, abhängig von dem besonderen Patienten und der zu behandelnden Bedingung. Die Menge an gebundenem biologisch aktivem Faktor, der in dem Körper freigesetzt wird, hängt von der Menge an Protein, das anfänglich an das kolloidale Metall gebunden ist, und der Gesamtkonzentration an verabreichtem Protein ab.

[0130] Das Zellabgabesystem der Erfindung kann für die Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von bakteriellen Infektionen, viraler Infektion, Krebs oder Autoimmunerkrankungen verwendet werden, wobei es eine wirksame Menge eines kolloidalen Metalls, das mit einem biologisch aktiven Faktor oder Faktoren gemischt ist, umfasst, wobei die Zusammensetzung weniger oder nicht toxisch ist. Das verwendete Medikament kann als ein Impfstoff gegen eine normal toxische Substanz verabreicht werden oder kann ein therapeutisches Mittel sein, wobei die Toxizität des normal toxischen Mittels dabei verringert wird, was die Verabreichung von höheren Quantitäten des Mittels über längere Zeiträume ermöglicht.

[0131] Das Verfahren, durch das das Medikament verabreicht wird, wird nicht als kritisch angesehen. Die Arten, wie das Medikament verabreicht werden kann, beinhalten subkutane, intramuskuläre, intraperitoneale, orale und intravenöse Arten. Eine bevorzugte Verabreichungsart ist intravenös. Eine andere bevorzugte Verabreichungsart ist intramuskulär.

[0132] Es ist bekannt, dass Interleukin-2 (IL-2) signifikante therapeutische Ergebnisse bei der Behandlung von Nierenkrebs zeigt. Die toxischen Nebenwirkungen resultieren jedoch im Tod einer signifikanten Anzahl von Patienten. Im Gegensatz wird, wenn IL-2 mit kolloidalem Gold gemischt wird, wenig oder keine Toxizität beobachtet und eine starke Immunantwort tritt auf. Die Dosen, die bisher für IL-2 Therapie verwendet worden sind, liegen in der Größenordnung von 21×10^6 Einheiten IL-2 pro 70 kg Person pro Tag (7×10^6 Einheiten IL-2 pro 70 kg Person TID). Eine Einheit entspricht ungefähr 50 Pikogramm, 2 Einheiten entsprechen ungefähr 0.1 Nanogramm, so dass 20×10^6 Einheiten ein Milligramm entsprechen. In einem Beispiel ist die Menge an IL-2, das an Kaninchen abgegeben worden ist, ungefähr 1 mg pro 3 kg Kaninchen. In der Tat haben die Studien der Wirkungen der Verabreichung von biologisch aktiven Faktoren, die hier beschrieben sind, mehr als 20 Mal höhere Dosen als die, die zuvor an Menschen gegeben wurden, beinhaltet.

[0133] In einem anderen Beispiel, bei dem IL-2 (1 mg pro 3 kg Tier) an 3 Hasen alle 3 Tage über 2 Wochen verabreicht wurde, machten alle Tiere den Anschein klinisch krank zu sein und zwei der Tiere starben von den scheinbar toxischen Wirkungen des IL-2. Wenn die gleiche Dosis IL-2 mit kolloidalem Gold kombiniert wurde und dann an drei Hasen über denselben Zweiwochenzeitraum verabreicht wurde, wurde keine Toxizität beobachtet und eine signifikante Antikörperantwort resultierte bei allen drei Tieren. Eine „positive Antikörperantwort“, wie hier verwendet, ist als drei- bis vierfacher Anstieg in der spezifischen Antikörperreaktivität definiert, wie durch direktes ELISA bestimmt, im Vergleich von Postimmunisierungsbluten ("post-immunization bleed") mit Preimmunisierungsbluten ("pre-immunization bleed"). Ein direktes ELISA wird durch Binden von IL-2 auf einer Mikrotiterplatte und Bestimmen der Quantität von IgG, das an IL-2 an der Platte gebunden ist, durch Ziege Anti-Kaninchen IgG, das an Alkaliphosphatase konjugiert ist, durchgeführt. Deshalb wird angenommen, dass die biologischen Wirkungen des IL-2 bleiben. Da die Toxizitätswirkungen minimiert worden sind, können größere Konzentrationen von IL-2 verabreicht werden, wenn notwendig, dort wo eine größere, wirksamere Im-

munantwort erforderlich ist.

[0134] Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung des Zellabgabesystems für die Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung einer Erkrankung, die ein oder mehrere biologisch aktive Faktoren, die an ein kolloidales Metall gebunden sind, umfasst. Nach der Verabreichung wird der biologisch aktive Faktor von dem kolloidalen Metall freigesetzt. Obwohl man nicht an irgendeine Theorie gebunden sein möchte, wird angenommen, dass die Freisetzung nicht einfach eine Funktion der Zirkulationszeit des verwendeten Medikamentes ist, sondern durch Gleichgewichtskinetik kontrolliert wird.

[0135] Wenn der kolloidales Metall biologisch aktive Faktorkomplex („Komplex“) mit Zellen für 25 Tage inkubiert wurde, wurde herausgefunden, dass nur 5% des biologisch aktiven Faktors von dem kolloidalen Metall freigesetzt wurden. Somit erklärt die Zirkulationszeit nicht alleine den Mechanismus, durch welchen der biologisch aktive Faktor von dem Komplex in vivo freigesetzt wird. Man hat jedoch herausgefunden, dass die Menge an freigesetztem biologisch aktiven Faktor teilweise von der Konzentration des Komplexes abhängt. Wenn verschiedene Verdünnungen des Komplexes analysiert wurden (CytELIZA Assaysystem CytImmune Sciences, Inc., College Park, MD), wurde herausgefunden, dass mehr Verdünnungslösungen des Komplexes eine signifikant größere Menge an biologisch aktivem Faktor freisetzen. Zum Beispiel gab es im wesentlichen keine Freisetzung an biologisch aktivem Faktor in einer 1:100 Verdünnung des Komplexes, wohingegen über 35.000 pg an biologisch aktivem Faktor in einer 1:100.000 Verdünnung derselben Probe des Komplexes freigesetzt wurden.

[0136] Je geringer deshalb die Konzentration des Komplexes ist, desto größer die Menge an freigesetztem biologisch aktivem Faktor. Je höher die Konzentration des Komplexes, desto niedriger die Menge an freigesetztem biologisch aktivem Faktor. Somit ist es aufgrund der kontinuierlichen Verdünnung des Komplexes nach der Verabreichung des verwendeten Medikamentes möglich, die gleiche therapeutische Wirkung durch Verabreichung einer niedrigeren Dosis an biologisch aktivem Faktor an einen Patienten zu erreichen, als durch vorher bekannte Verfahren verabreicht werden kann.

[0137] Man hat ebenfalls herausgefunden, dass die Menge an biologisch aktivem Faktor, der von dem kolloidalen Metall biologisch aktivem Faktorkomplex freigesetzt wird, von der Menge an biologisch aktivem Faktor, der anfänglich an das kolloidale Metall gebunden ist, abhängt. Mehr biologisch aktiver Faktor wird von dem Komplex mit einer größeren Menge an anfänglich gebundenem biologisch aktivem Faktor freigesetzt. Somit ist der Durchschnittsfachmann in der Lage, die Menge an biologisch aktivem Faktor zu kontrollieren, die durch Variieren der Menge an biologisch aktivem Faktor, der anfänglich an das kolloidale Metall gebunden ist, abgegeben wird.

[0138] Diese kombinierten Eigenschaften stellen ein Verfahren bereit, durch welches eine große Menge an biologisch aktivem Faktor an ein kolloidales Metall gebunden werden kann, wobei dabei der biologisch aktive Faktor weniger toxisch gemacht wird, als wenn er alleine verabreicht wird. Dann kann eine kleine Menge an kolloidalem Metall biologisch aktivem Komplex verabreicht werden, was in einer langsamen Freisetzung des biologisch aktiven Faktors von dem Komplex resultiert. Dieses Verfahren stellt eine erweiterte, niedrige Dosis des biologisch aktiven/therapeutischen Faktors für die Behandlung von Erkrankungen, wie zum Beispiel Krebs und Immunerkrankungen, bereit.

[0139] Das Zellabgabesystem der vorliegenden Erfindung ist für die Behandlung einer Anzahl von Erkrankungen, einschließlich sowohl fester Tumore als auch Blutkrebs, wie z.B. Leukämie oder Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis, verwendbar.

[0140] Diese Erfindung wird weiter durch die folgenden Beispiele veranschaulicht, welche auf keinen Fall als Beschränkungen dessen Bereichs angesehen werden sollen. Auf der anderen Seite sollte klar verständlich sein, dass auf verschiedene andere Ausführungsformen, Modifikationen und Äquivalenten davon zurückgegriffen werden kann, welche nach Lesen der Beschreibung, dem Durchschnittsfachmann selbst nahe liegen werden.

Beispiel I

[0141] Dieses Beispiel zeigt, dass kolloidales Gold andere toxische Substanzen neutralisiert und eine Antikörperantwort ermöglicht. Wenn IL-2 (1 mg pro 3 kg Tier) jeden dritten Tag an drei Kaninchen über einen Zeitraum von zwei Wochen verabreicht wird, machten alle Tiere den Anschein klinisch krank zu sein und zwei der Tiere starben von den scheinbaren toxischen Wirkungen des IL-2. Wenn dieselbe Dosis IL-2 mit kolloidalem

Gold kombiniert wird und dann drei Hasen über denselben Zeitraum von zwei Wochen verabreicht wird, wird keine Toxizität beobachtet und eine signifikante Antikörperantwort resultiert bei allen drei Tieren. Eine positive Antikörperantwort ist definiert als ein drei- bis vierfacher Anstieg der spezifischen Antikörperreaktivität, wie durch direktes ELISA bestimmt, im Vergleich zur Post-Immunsierungsbluten mit Pre-Immunsierungsbluten. Ein direktes ELISA wird durch Binden von IL-2 auf eine Mikrotiterplatte und Bestimmen der Quantität des an das IL-2 auf der Platte gebundenen IgG, durch Ziege Anti-Kaninchen IgG, das mit Alkaliphosphatase konjugiert ist, durchgeführt.

Beispiel II

[0142] Dieses Beispiel zeigt weiter, dass kolloidales Gold anderenfalls toxische Substanzen neutralisiert und eine Antikörperantwort ermöglicht. Endotoxin oder Lipid A (25, 50 und 100 µg pro 35 mg Maus) werden durch subkutane Injektion jeden vierten Tag über einen Zeitraum von zwei Wochen verabreicht. Für zehn Mäuse wird Endotoxin „rein“ gegeben und für die restlichen zehn wird das Endotoxin 1:1 mit kolloidalem Gold gemischt. Das Injektionsvolumen wird durch Hinzufügen von Kaliumcarbonat/Natriumcitratpuffer, pH 6.5, bei einer 1:1 Verdünnung hergestellt. Dasselbe Protokoll wird ebenfalls verwendet, wenn Lipid A das Testarzneimittel ist.

[0143] Die Tiere werden nach 15, 30 und 60 Minuten im Anschluss an jede Injektion und dann stündlich und täglich überprüft. Die überlebenden Tiere werden für eine spezifische Antikörperantwort auf die toxischen Substanzen mit denen sie geimpft wurden, entweder Endotoxin oder Lipid A, getestet. Die meisten der Tiere, die mit Endotoxin oder Lipid A zusammen mit kolloidalem Gold geimpft wurden, überlebten, während die, die mit dem reinen Endotoxin oder Lipid A geimpft wurden, während des zweiwöchigen Testzeitraums starben. Zusätzlich zeigten die Tiere, die überlebten, eine Antikörperantwort auf das spezifische Toxin, wie durch direktes ELISA bestimmt.

Beispiel III

[0144] Dieses Beispiel veranschaulicht die Wirkung von kolloidalem Gold auf Cytokinaktivität in vivo. Einer Gruppe von Mäusen wird IL-2 in einer Dosis gegeben, die nahe an der ist, die Krebspatienten, die sich einer Immunotherapie unterziehen, gegeben wird. In vorherigen Experimenten reduzierten 18 µg IL-2 Tabletten, die nackten Mäusen gegeben wurden, die implantierte Tumorgroße, aber töteten die Tiere innerhalb von zwei Wochen. Siehe Paciotti, G.F. und Tamarkin, L., Interleukin-2 Differentially Effects the Proliferation of a Hormone-Dependent and a Hormone-Independent Human Breast Cancer Cell Line In Vitro and In Vivo, Anti-Cancer Research, 8:1233-1240 (1988), welches hier unter Bezugnahme angegeben ist.

[0145] Die Wirksamkeit von Gold in einem Mausmodellsystem wird durch das folgende Verfahren getestet: eine Gruppe von Mäusen wird alleine mit IL-2, mit IL-2, gemischt mit kolloidalem Gold, mit kolloidalem Gold alleine oder mit Kochsalzlösungen, die durch eine osmotische Minipumpe abgegeben werden, behandelt. Die Mäuse werden sieben Tage behandelt, wobei sie danach geopfert und ihre Lymphozyten geerntet werden. Die Zellen werden unter Verwendung spezifischer Maus monoklonaler Antikörper für cytometrische Flussanalyse für T-Zellen oder B-Zellen Marker eingefärbt. Aktivierte T- und B-Zellen werden durch Bewerten der Anzahl der T-Zellen, des Verhältnisses Helfer-T-Zellen zu Unterdrücker-T-Zellen, des aktivierten zellularen IL-2 Rezeptors, der Anzahl der B-Zellen und der Anzahl natürlicher Killerzellen („NK“) bestimmt.

[0146] Die wenigen Tiere die überlebten, wenn sie mit IL-2 alleine behandelt wurden, zeigten einen Anstieg in der Anzahl und der Aktivität der T-Zellen (wie durch IL-2 Rezeptoren bestimmt). Nahezu alle Tiere überlebten die IL-2 Behandlung zusammen mit kolloidalem Gold und diese Tiere zeigten sowohl einen Anstieg der B-Zellenfunktion (wie durch aktivierte B-Zellen und Gesamt IgG bestimmt, gemessen durch direktes ELISA), einen Anstieg der T-Zellenfunktion (wie durch Anzahl und Aktivität der T-Zellen unter Verwendung von IL-2 Rezeptoranzahlen als ein Index der Aktivität bestimmt) als auch einen Anstieg der NK-Aktivität.

Beispiel IV

[0147] Das folgende biologische Experiment zeigt, das kolloidales Gold die Toxizität von Lipopolysaccharid (LPS) reduziert. LPS ist die Lipid-/Zuckereinheit von bakteriellen Zellwänden. Wenn es in Tiere injiziert wird, initiiert es viele der klinischen Antworten eines septischen Schocks. Somit werden Mäuse mit variierenden Mengen an LPS in Gegenwart oder Abwesenheit von kolloidalem Gold geimpft. Insbesondere Balbic Mäuse werden entweder mit 100 oder 400 µg LPS (Stamm W.E. coli 055:B5; 10 mg/ml in Wasser; Difco Labs) mit oder ohne kolloidalem Gold geimpft. Der pH der 15 nm kolloidalen Goldmischung (E.Y. Labs) wurde auf ungefähr 10 angepasst, während der pH des LPS mit 0.1 N NaOH auf 8 angepasst wurde. Im Anschluss wurden dann

angemessene Volumina (d.h. 10 µl für die 100 µg Dosis und 40 µl für die 400 µg Dosis) zu 500 µl kolloidalem Gold dazugegeben. Der Mischung wurde es ermöglicht für 30 Minuten zu stehen und im Anschluss in die Mäuse injiziert (i.p.).

[0148] Innerhalb von 12 Stunden nach den Injektionen zeigten alle Mäuse klinische Anzeichen von Depression und Anergasia. Innerhalb von 24 Stunden nach der Injektion begannen die Kontrollmäuse der 400 µg Dosis zu sterben. Nach 72 Stunden starben alle Kontrollmäuse der 400 µg Dosis, während 75% der mit Gold behandelten Mäuse am Leben waren und begannen Zeichen von klinischer Verbesserung (d.h. Bewegung) zu zeigen. Obwohl subjektiv, waren des Weiteren die Mäuse der 100 µg Dosis, die mit Gold behandelt wurden, während der 36 Stunden der Beobachtung aktiver.

Beispiel V

[0149] Das folgende Experiment beschreibt die Verwendung von kolloidalem Gold als ein wirksames Hilfsmittel zur Herstellung von Maus-Antikörpern gegen Maus IL-6. Dieses Experiment wurde mit zwei Zielen im Hinterkopf durchgeführt: Zuerst, um zu bestimmen, ob kolloidales Gold als Hilfsmittel bei der Erzeugung einer Immunantwort auf „Selbstantigene“ (d.h. Erzeugen einer Immunantwort auf ein Mausprotein unter Verwendung eines Mausmodells) verwendet werden könnte; zweitens, dass, da IL-6 eines der Cytokine ist, von dem angenommen wird, dass es beim Cachexia Krebs, Metastase und Sepsis involviert ist, dann die Fähigkeit, Antikörper in einem autologen System zu erzeugen, Vorteile bei der Erzeugung eines Impfstoffes für die IL-6 und ähnliche endogene Verbindungen beweisen kann.

[0150] Kürzlich beschrieben, ist das Experiment wie folgt. Mehrere Mäuse wurden mit kolloidaler Gold/Maus IL-6 Mischung wie oben beschrieben immunisiert. Ungefähr 3 Wochen später wurden die Mäuse geopfert und Schwanzblut wurde gesammelt und auf das Vorhandensein von Antikörpern aus Maus-IL-6 durch ein direktes ELISA, wie oben beschrieben, analysiert. Die Ergebnisse des direkten ELISA, die Bestimmung des Serum Antikörper-Titers bei Mäusen, die mit murinen IL-6 kombiniert mit kolloidalem Gold immunisiert wurden, sind in [Fig. 3](#) veranschaulicht. [Fig. 3](#) zeigt, dass die Mäuse eine Antikörperantwort auf Maus IL-6 entwickelt haben, was somit anzeigt, dass das Gold bei der Erzeugung von Antikörpern auf endogene (d.h. selbst) Toxine als auch auf Cytokine, von denen angenommen wird, dass sie in Sepsis, Cachexia Krebs und Metastasen involviert sind, verwendbar ist.

[0151] Basierend auf diesen Ergebnissen kann kolloidales Gold ebenfalls verwendet werden, um monoklonale Antikörper bei transgenen Mäusen durch eine Immunantwort auf „Selbstantigene“ herzustellen. Jedes an kolloidales Gold gebundenes Antigen kann verwendet werden, um die transgenen Mäuse zu immunisieren, was in der in vivo Bildung von Mabs resultiert.

Beispiel VI

[0152] Das folgende Experiment zeigt, dass Cytokine, die mit kolloidalem Gold gemischt sind, ihre biologische Aktivität behalten. Das für diese Experimente verwendete Modell ist eines, das im Stand der Technik gut bekannt ist. Siehe Paciotti, G.F., und L. Tamarkin, Interleukin I directly regulates hormone-dependent human breast cancer cell proliferation in vitro, Mol, Endocrinol., 2:459-464, 1988; und Paciotti, G.F., und L. Tamarkin, Interleukin-1 differentially synchronizes estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer cells in the G₀G₁-phase of the cell cycle, AntiCancer Research, 11:25-32, 1991. Das Modell basiert auf der Fähigkeit des Cytokins, IL-1, direkt das Wachstum von Östrogen-verantwortlichen menschlichen Brustkrebszellen MCF-7 zu inhibieren. Kürzlich beschrieben, inhibiert IL-1 alleine das Wachstum dieser Zellen durch einen gut charakterisierten IL-1 Rezeptor auf der Oberfläche dieser Brustkrebszellen.

[0153] Das folgende Experiment zeigt die Fähigkeit von IL-1, wenn es mit kolloidalem Gold gemischt wird, seine biologische Aktivität durch Bestimmung seiner Fähigkeit, das Wachstum dieser Zellen zu inhibieren, zu behalten. Ungefähr 8000 MCF-7 Zellen wurden in Gewebekulturplatten mit 24 Vertiefungen plattiert. Am nächsten Tag wurden 15 nm Goldteilchen bei 14.000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert und in sterilem Wasser resuspendiert. Menschliches IL-1 α wurde in Wasser wieder hergestellt, um eine anfängliche Stammlösung von 5×10^{-5} M in Wasser zu erhalten. Der pH des Goldes und IL-1 wurde auf ungefähr 8.0 mit 0.1 M NaOH angepasst. Vor dem Vermischen wurde das IL-1 auf eine Arbeitsstammlösung von 2×10^{-6} , 2×10^{-8} M und 2×10^{-10} M verdünnt, welche 250 µl des Goldes enthielten (Endvolumen = 0.5 ml). Die Goldkontrollen enthielten 250 µl Gold und 250 µl steriles Wasser. Im Anschluss wurde jede Arbeitsstammlösung weiter in Gewebesmedium 1/20 verdünnt, was in Endkonzentrationen von 10^{-7} , 10^{-9} und 10^{-11} M resultierte. Diese Lösungen wurden zusammen mit den entsprechenden Kontrollen dann direkt zu den MCF-7 Zellen gegeben. Die Daten, die in [Fig. 6](#) prä-

sentiert werden, sind die Anzahl der Zellen, die bei verschiedenen Tagen nach der Zugabe von IL-1 ohne oder mit dem Gold vorliegen.

Beispiel VII

[0154] Das folgende Experiment zeigt die Effizienz mit der Gold Cytokine bindet. Dieses Experiment zeigt, dass das Protein aus der Lösung entfernt wird, wenn es mit Gold kombiniert und dann zentrifugiert wird. Das Experiment verwendete den IL-6 Standard von ARI's Cytokit-6. Vor dem Vermischen wurde der pH des Goldes und der Cytokinlösungen auf pH 9 mit 0.1 N NaOH angepasst. Dieses Protein wurde entweder mit Gold oder Wasser vorinkubiert, bevor es in ARI's Diagnostic Kit für IL-6 verwendet wird. Im Anschluss an diese Inkubation wurde die kolloidale Gold IL-6 Mischung zentrifugiert und die Überstände wurden verwendet, um eine Standardkurve zu bilden. Wie aus [Fig. 3](#) gesehen werden kann, war das Gold sehr wirksam bei der Bindung von nahezu allem IL-6 im Dosisbereich des Assays, wobei das IL-6 von dem Überstand entfernt wurde. Sogar bei den höchsten Endkonzentrationen (1000 ng/ml) von IL-6 entfernte das Gold ungefähr 90% des IL-6 in den Lösungen. Diese Menge basiert auf dem OD des 1000 ng/ml IL-6/Goldüberstandes, welcher dem alleinigen 100 ng/ml IL-6 Standard ähnlich ist.

Beispiel VIII

[0155] Das folgende Experiment zeigt die physikalischen Veränderungen in der Gold-Kolloidlösung nach dessen Mischung mit IL-6, einem potentiellen Antigen für einen Impfstoff. Obwohl die Goldteilchen eine Größe von ungefähr 15 nm haben, können sie nicht durch einen 0.22 µm Spritzenfilter filtriert werden. Wir führen dies auf die Natur der Goldteilchen in dieser kolloidalen Mischung zurück. Es wird theorisiert, dass das Gold als eine kolloidale Mischung Aggregate bildet, die größer als die einzelnen Kugeln sind. Obwohl die einzelnen Teilchen kleiner als die Porengröße des Filters sind, sind die Aggregate viel größer und somit nicht filtrierbar. Wir haben jedoch beobachtet, dass wenn das kolloidale Gold einmal mit Protein inkubiert wird, es leicht durch den 0.22 µm Filter filtriert. Somit scheint das Binden eines Cytokins die physikalischen Wechselwirkungen der Goldteilchen untereinander zu verändern, was die Goldteilchen als einzelne 15 nm Teilchen wirken lässt und es den Goldteilchen ermöglicht, schnell gefiltert zu werden. Dieses Experiment definiert die Natur des Bindens eines Antigens an das kolloidale Metall.

Beispiel IX

[0156] Menschliches IL-2 wurde in Wasser bei einem pH von 11 wieder hergestellt. 200 µg IL-2 wurden mit 25 ml kolloidalem Gold für 24 Stunden inkubiert. Die an kolloidales Gold gebundene IL-2 Lösung wurde dann bei 14.000 U/min für 20 Minuten in einer Mikrozentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde dann von dem Pellet entfernt. Der IL-2 Komplex wurde dann in jede Vertiefung der Platte mit 24 Vertiefungen gegeben und bei 37°C für 25 Tage inkubiert. Die Proben wurden aus den Vertiefungen an den Tagen 4, 5, 7, 8, 9, 11, 13, 17, 21, 23 und 25 entfernt. Die Proben wurden zentrifugiert, um den kolloidalen Gold:IL-2 Komplex zu entfernen. Die Überstände wurden eingefroren. Nachdem die letzte Probe gesammelt und eingefroren wurde, wurden alle Proben chargenweise in CytImmune Science, Inc.'s CytELISA-2 Sandwich EIA für IL-2 analysiert. Die Ergebnisse dieses Assays sind in [Fig. 7](#).

Beispiel X

[0157] Menschliches TNFα wurde in Wasser bei einem pH von 11 wieder hergestellt. 200 µg des TNFα wurden mit dem kolloidalen Gold für 24 Stunden inkubiert. Die TNFα:kolloidale Goldlösung wurde dann bei 14.000 U/min für 20 Minuten in einer Mikrozentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde dann von dem Pellet entfernt. Das Pellet wurde wieder in 1 ml Wasser eingesetzt und in Milchpuffer verdünnt, um Endkonzentrationen von 1:100, 1:1000, 1:10.000 und 1:100.000 zu erreichen, und für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden dann einer Analyse unterzogen unter Verwendung von CytImmune Sciences, Inc.'s CytELISA TNFα Assay. Die Ergebnisse dieses Assays sind in [Fig. 8](#).

[0158] Dieses Experiment zeigt, dass als ein Ergebnis der Verdünnung das Kolloid mehr von dem Cytokin, welches daran gebunden ist, freisetzt. Somit zeigt die Cytokinbindung und Freisetzung durch kolloidales Gold Gleichgewichtskinetik, die auf in vivo Situationen anwendbar ist, was die kontinuierliche Verdünnung des kolloidalen Goldes durch Blut und extrazelluläre Flüssigkeiten beinhaltet.

Beispiel XI

[0159] 500 µg rekombinantes IL-2 wurde in 0.5 ml pH=11 Wasser aufgelöst. Die Lösung wurde dann zu 25 ml kolloidalem Gold durch das in Beispiel 9 beschriebene Verfahren hinzugegeben. Balb/C-Mäuse wurden geimpft (i.p.), entweder mit 0.1 ml des an kolloidales Gold gebundenen IL-2 oder 100 µg reinem IL-2. Die Mäuse (4 Mäuse/Gruppe/Zeitpunkt) wurden bei verschiedenen Zeitpunkten (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 und 24 Stunden) nach der Injektion geopfert und Schwanzblut wurde gesammelt. Die resultierenden Sera wurden in Cytimmune Sciences, Inc.'s vergleichbarem EIA für IL-2 analysiert. Über die getesteten Zeitpunkte schien die Freisetzung von IL-2 aus dem kolloidalen Gold ein bimodales Muster zu haben ([Fig. 7](#)). Eine Erklärung für dies kann das Gleichgewicht von IL-2 sein, das von dem kolloidalen Gold in das Abdomen freigesetzt wird, welches nachfolgend mit den Blutpools freigesetzt wird.

Beispiel XII

[0160] 50.000 MCF-7 Zellen wurden in jeder Vertiefung einer Platte mit 6 Vertiefungen in 2 ml Phenolrot-freiem IMEM mit 10% CSS plattiert. Man ließ die Zellen wachsen bis sie zu 70-80% flüssig waren. 200 µg IL-1β wurden an kolloidales Gold gebunden unter Verwendung des in Beispiel 9 beschriebenen Verfahrens. Nach dem Binden wurde das komplexierte Material zentrifugiert und mit 1% HSA-Lösung blockiert. 100 µl des an kolloidales Gold gebundenen IL-1β Komplex wurde in jede Vertiefung gegeben und für 1 bis 5 Tage inkubiert. Die Zellen wurden dann mit Phenolrot-freiem IMEM mit 10% Kohle/stripped fötalem Rinderserum (FBS) gewaschen. Das Binden des kolloidalen Gold:IL-1β Komplexes an die MCF-7 Zellen wurde durch Visualisierung des kolloidalen Goldes auf der Zelloberfläche unter Verwendung von heller Feld- und Phasenkontrastmikroskopie detektiert. Das kolloidale Gold/IL-1β, das auf der Zelloberfläche blieb, wurde durch Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung von Kaninchen Antimenschlichem IL-1β, welches in die Zellen internalisiert wurde, visualisiert und als ein negatives Signal zwischen den Fluoreszenz- und den Hellfeldbildern bestimmt. Die Ergebnisse dieses Assays sind in [Fig. 10](#) veranschaulicht.

[0161] [Fig. 10a](#) ist die Ansicht des hellen Feldes von unbehandelten MCF-7 Zellen (Kontrolle) und [Fig. 10b](#) zeigt die Hintergrundfluoreszenz des nicht-spezifischen Bindens von FITC konjugierten Antikörpern. [Fig. 10b](#) veranschaulicht die Ansicht des hellen Feldes für MCF-7 Zellen, die mit an kolloidales Gold gebundenem IL-1β behandelt sind, und [Fig. 10d](#) veranschaulicht FITC Fluoreszenz für MCF-7 Zellen, die mit an kolloidales Gold gebundenem IL-1β Komplex und Internalisierung des Komplexes behandelt sind. Etwas des kolloidalen Gold:IL-1β Komplexes in diesen Figuren ist an Zellmembran gebunden, die durch die hellen Spots angezeigt wird und einige sind innerhalb der Zellen, wie durch dunkle Spots angezeigt, internalisiert.

[0162] Dieses Beispiel zeigt, dass man kolloidales Metall biologisch aktiver Faktorkomplex an Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden kann und dass der Komplex anschließend innerhalb der Zelle internalisiert wird.

Beispiel XIII

[0163] 50.000 MCF-7 Zellen wurden in jeder Vertiefung einer Platte mit 6 Vertiefungen in 2 ml Phenolrot-freiem IMEM mit 10% CSS plattiert. Man ließ die Zellen wachsen bis sie zu 70-80% flüssig waren. Die Zellen wurden dann entweder mit Medium, 0.5 µg/ml TNFα, 5.0 µg/ml TNFα oder 50 µg/ml TNFα, 0.5 µg/ml IL-1β, 5.0 µg/ml IL-1β oder 50 µg/ml IL-1β, behandelt.

[0164] 100 µg IL-1β wurde an kolloidales Gold durch das in Beispiel 9 beschriebene Verfahren gebunden. Nach dem Binden wurde das komplexierte Material zentrifugiert und mit 1% HSA-Lösung blockiert. 100 µl des an kolloidales Gold gebundenen IL-1β Komplexes wurde in jede Vertiefung gegeben und für 24-48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden dann mit Phenolrotfreiem IMEM mit 10% CSS gewaschen. Das Binden des IL-1β:kolloidales Gold:TNFα Di-Cytokins an die MCF-7 Zellen wurden durch Visualisierung des kolloidalen Goldes auf der Zelloberfläche unter Verwendung von Hellfeld- oder Fluoreszenzmikroskopie detektiert.

[0165] Diese Daten zeigen an, dass kolloidales Gold simultan zwei oder mehr biologisch aktive Faktoren binden kann, was die Erzeugung von gewöhnlichen Komplexen, die an die Zellmembran binden können, ermöglicht und ein gezieltes Arzneimittelabgabesystem bereitstellt.

Beispiel XIV

[0166] 100 µg von IL-6, IL-1β und TNFα wurden gleichzeitig an die gleiche kolloidale Goldlösung unter Verwendung des in Beispiel 9 beschriebenen Verfahrens gebunden. Nach Zentrifugieren und Blockieren mit

HSA-Lösung wurden die Proben als unbekannte im CytImmune Sciences, Inc's Sandwich Assay für TNF- α verwendet. In diesem Assay wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, um TNF- α in der Probe zu fangen. Das an monoklonalen Antikörper gebundene TNF- α wurde dann mit Kaninchen-Anti-Mensch TNF- α Antikörper gefolgt von einem Enzym markierten Kaninchen Anti-Kaninchen-Antikörper detektiert.

[0167] Um zu zeigen, dass dasselbe kolloidale Goldteilchen alle IL-6, IL-1 β und TNF- α gebunden hat, wurde der monoklonale Antikörper für TNF- α verwendet, um 3 Sets von vervierfachen Proben, die kolloidale Goldteilchen enthalten, welche gleichzeitig mit TNF- α , IL-6 und IL-1 β beschichtet wurden, verwendet. Um das Tri-Cytokinteilchen zu zeigen, wurde ein Set der Proben mit dem TNF- α polyklonalen Antikörper, ein anderes mit dem IL-6 polyklonalen Antikörper und das andere mit dem IL-1 β polyklonalen Antikörper detektiert. Alle der Proben wurden nacheinander mit Ziege-Anti-Kaninchen Antikörpern detektiert. Wie vorhergesehen, wurde das an kolloidales Gold gebundene TNF- α leicht gefangen und mit dem TNF- α monoklonal/polyklonal Antikörperbindungspaar detektiert. Zusätzlich zeigten dieselben Proben eine signifikante Menge von Immunoreaktivität für IL-6 und IL-1 β , was nur möglich war, wenn die drei Cytokine an dasselbe Teilchen gebunden waren. Die Ergebnisse dieses Assays sind in [Fig. 11](#) veranschaulicht.

[0168] Diese Daten zeigen an, dass kolloidales Gold gleichzeitig zwei oder mehr biologisch aktive Faktoren binden kann, was die Erzeugung von gewöhnlichen Komplexen, die an die Zellmembran binden können und ein gezieltes Arzneimittelabgabesystem bereitstellen, ermöglicht. Diese gewöhnlichen Komplexe können ebenfalls verwendet werden, um transgene Mäuse zu immunisieren, eine Immunantwort auf „Selbst-Antigen“ zu erzeugen und die für Herstellung von multiplen Mabs. Zum Beispiel könnten die gewöhnlichen Komplexe aus diesem Experiment verwendet werden, um die gleichzeitige Generierung von TNF- α , IL-6 und IL-1 β Mabs zu beginnen.

Beispiel XV

[0169] Das folgende ist ein allgemeines experimentelles Protokoll, das für das Binden eines Moleküls an kolloidales Gold befolgt wurde. Das Molekül wurde in Wasser wiederhergestellt. 200 μ g des Moleküls wurden mit 25 ml kolloidalem Gold für 24 Stunden inkubiert. Der Molekül/kolloidale Goldkomplex wurde dann bei 14.000 U/min für 20 Minuten in einer Mikrozentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde dann von dem Pellet entfernt.

Beispiel XVI

[0170] 50 μ g von epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) wurde an 25 ml 40 nm kolloidaler Goldteilchen bei pH 11.0 gebunden. Die Lösung wurde auf einer Schüttelplattform für 24 Stunden geschüttelt. 50 μ g (zugefügt als 50 μ l) ausgerichtetes Cytokin (d.h. IL-1 β , um Makrophagen zu erzielen, IL-2, um T-Zellen zu erzielen, IL-6, um B-Zellen zu erzielen, und entweder TNF Alpha oder Flt-3 Ligand um dendritische Zellen zu erzielen), wurde zu der EGF/Au-Lösung hinzugegeben und für weitere 24 Stunden geschüttelt. Um an kolloidales Gold gebundenes und ungebundenes Material zu trennen, wurde die Lösung dann bei 14.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde in 1 ml Wasser, das 1% menschliches Albumin Serum enthält, wiederhergestellt.

Beispiel XVII

[0171] EGF wurde an kolloidales Gold (CG) unter Verwendung des Verfahrens von Beispiel 2 gebunden. Tumor-Nekrose Faktor- α (TNF- α) wurde dann an den EGF/CG-Komplex unter Verwendung des Verfahrens von Beispiel 1 gebunden, um ein EGF/CG/TNF- α Chimera herzustellen.

Beispiel XVIII

[0172] EGF wurde an kolloidales Gold (CG) unter Verwendung des Verfahrens von Beispiel 2 gebunden. Interleukin-6 (IL-6) wurde dann an den EGF/CG-Komplex unter Verwendung des Verfahrens von Beispiel 1 gebunden, um ein EGF/CG/IL-6 Chimera herzustellen.

Beispiel XIX

[0173] EGF wurde an kolloidales Gold (CG) unter Verwendung des Verfahrens von Beispiel 2 gebunden. Interleukin-2 (IL-2) wurde dann an den EGF-CG Komplex unter Verwendung des Verfahrens von Beispiel 1 gebunden, um ein EGF/CG/IL-2 Chimera herzustellen.

Beispiel XX

[0174] Die lockere Beschichtung wurde von einer Probe von reinem Blut, wie es im Stand der Technik gut bekannt ist, getrennt. 100-500 ml reines Blut wurden auf Heparin gesammelt. Das Blut wurde sorgfältig auf eine 50% (v/v) Ficoll-Hypaque-Lösung geschichtet und bei 2700 U/min für 7 Minuten zentrifugiert. Die lockere Beschichtung, die Sammlung der weißen Blutzellen auf dem Serum/Ficoll Interface, wurde mit einer Pasteurpipette gesammelt und in 10 ml PBS, das 0.5 mg/ml Heparin enthält, platziert. Sie wurden bei 1500 U/min zentrifugiert und das Pellet gewaschen und rezentrifugiert. Die Zellen wurden 2× in der PBS-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert.

[0175] Die Zellen wurden in RPMI, das entweder 10% fötales Rinder- oder normales menschliches Serum enthält, wieder suspendiert und in Platten mit 6 Vertiefungen bei einer Zelldichte von 10^6 Zellen/Vertiefung kultiviert. Die Zellen wurden dann mit 50-100 µl einer oder aller Antigen-Cytokinmischungen stimuliert.

[0176] Wie in [Fig. 12](#) gezeigt, internalisierten nur Macrophagen das EGF/CG/IL-1β Chimera, während nur dendritische Zellen das EGF/CG/TNF-α Chimera internalisierten ([Fig. 13](#)). Gleichzeitig internalisierten nur B-Zellen das EGF/CG/IL-6 Chimera ([Fig. 14](#)) und nur T-Zellen internalisierten das EGF/CG/IL-2 Chimera ([Fig. 15](#)).

[0177] Wie durch dieses Experiment gezeigt, sind bestimmte Komponentenspezifische immunstimulierende Mittel für einzelne Immunkomponenten spezifisch. Somit ist es möglich, spezifische Immunkomponenten mit Komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien zu erzielen, wobei dabei ihre Immunantwort, die in einer gesteigerten Aktivität in der gesamten Immunantwort resultiert, gesteigert wird.

Beispiel XXI

[0178] Für dieses Beispiel wurden Staphylokokken Enterotoxin B als das wirksame Antigen/Impfstoffmolekül verwendet, da es Anzeichen gibt, dass das Binden des Toxins an kolloidales Gold dessen Toxizität verringert. 500 µg des Toxins wurden anfänglich an 250 ml 40 nm kolloidale Goldteilchen gebunden. Die kolloidale Lösung wurde dann aufgeteilt. 50 µg eines ausgerichteten Cytokins (IL-1β, IL-2, IL-6 und TNFα) wurden zu einem der Teile hinzugegeben und für 24 Stunden wieder inkubiert. Das Toxin-AU-Cytokinkolloid wurde bei 14.000 U/min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 1 ml Wasser wiederhergestellt. Das Pellet wurde für Cytokinkonzentration entweder durch Sandwich oder vergleichendes ELISA untersucht. Dies wurde durchgeführt, um die Menge an reinem Cytokin (ungebunden) zu bestimmen, dass in die Kontrolltiere, die Kochsalzlösung oder Toxin alleine erhielten, injiziert werden sollte.

[0179] Die Immunisierungsstrategie beinhaltete simultane oder aufeinander folgende Verabreichung der sauberen Toxin-/Cytokinmischung (als Zusammensetzungskontrollen) oder des Toxin-AU-Cytokin Chimeras. 5 Mäuse/Gruppe wurden an den Tagen 1, 5 & 9 entweder mit 2.5 µg reinem Toxin oder derselben Dosis Toxin/Cytokinmischung, die an kolloidales Gold gebunden ist, geimpft. Während der 14-tägigen Immunisierungsperiode erhielten zwei zusätzliche Gruppen von Mäusen das reine Toxin/Cytokin oder Toxin-AU-Cytokin, infolge des in Tabelle 1 bereitgestellten Zeitplans.

Tabelle 1

Tag	Art der Gruppe	geimpfte Behandlung
1	Kontrolle	reines Toxin + reines IL-1β + reines TNFα
	Gold	Toxin-Au-IL-1β + Toxin-Au- TNFα
5	Kontrolle	reines Toxin + reines IL-6
	Gold	Toxin-AU-IL-6
9	Kontrolle	reines Toxin + reines IL-2
	Gold	Toxin-AU-IL-2

[0180] Alle Gruppen wurden mit 1 µg des reinen Toxins an Tag 30 alleine herausgefordert. Schützende Immunisierung wurde durch die verringerte oder den Mangel an Fähigkeit des reinen Toxins Morbidität zu induzieren gezeigt. Die Schlüsselbeobachtung ist, dass das Toxin, das an kolloidales Gold gebunden ist, die Toxizität des Toxins stark verringerte. Zum zweiten waren Serum-Antikörpertiter für das Toxin 10× höher als die, die die reine Behandlung alleine erhielten. Die Serum-Antikörper der Tiere, die die aufeinander folgende Behandlung erhielten, waren jedoch 100-mal größer als die der Tiere, die die reine Behandlung erhielten. Schließlich starben aufgrund der Herausforderung mit dem reinen Toxin 100% der mit dem Toxin behandelten Tiere, wohingegen nur 20% Sterblichkeit bei der simultanen Gruppe beobachtet wurde.

[0181] Somit können die Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um die Effizienz eines Impfstoffs zu verbessern.

Beispiel XXII

[0182] Dieses Experiment zeigt die Abgabe des bakteriellen Gens, Beta-Galactosidase (b-gal), an menschliche Brustkrebszellen MCF-7 unter Verwendung von kolloidalem Gold, das mit EGF verbunden ist. Für dieses Experiment wurde die β-gal Plasmid-DNA direkt an 40 nm-EGF gekoppelte kolloidale Goldteilchen gebunden. 25 µ durch die Verfahren, die in betroffenen Patentanmeldungen offenbart sind. Wenn das freie EGF einmal von der gebundenen Fraktion getrennt ist, wurden 5 µg des pSV Betagalactosidase Plasmids über Nacht mit dem EGF/Au auf einer Schüttelplattform inkubiert. Das Material wurde zentrifugiert und das Pellet wurde mit 1 ml Wasser bei pH=11 wiederhergestellt. 100 µl wurden zu den MCF-7 Zellen hinzugegeben, welche in Kulturplatten mit 6 Vertiefungen gezüchtet wurden.

[0183] Das EGF/DNA Au wurde mit den Zellen für 48 Stunden inkubiert, um die Rezeptor vermittelte Endozytose des molekularen Chimera zu ermöglichen. Im Anschluss wurden die Zellen 2× mit serumfreiem Medium, 2× mit PBS gewaschen und dann mit 0.25% Glutaraldehydlösung (in PBS) für 15 Minuten fixiert. Die fixierten Zellen wurden 4-mal mit PBS gewaschen. Das Beta-Galaktosidasesubstrat (X-gal) wurde zu den Zellen als eine 0.2% Lösung in einem Puffer, der 2 mM MgCl₂, 5 mM K₄Fe (CN)₆·3H₂O und 5 mM K₃Fe(CN)₆ enthielt, gegeben. Die Zellen und die Substratlösungen wurden über Nacht inkubiert.

[0184] Erfolgreiche zelluläre Gentransfektion und -exprimierung wird durch die Umwandlung des X-gal Substrats zu einem grün gefärbten Produkt aufgezeigt. Transfektion wird durch die Gegenwart eines grünen Fleckes auf den Zellen bekräftigt. Im Endeffekt zeigt das Vorhandensein des Fleckes an, das das Gen abgegeben, transkribiert und das biologisch aktive Enzym übersetzt wurde.

[0185] Es wurde beobachtet, dass sehr wenige Zellen für die β-gal Enzymaktivität positiv befleckt waren. Dies hat mit mehreren Faktoren zu tun, einschließlich der schlechten Bindungseffizienz zwischen der DNA und kolloidalem Gold, lysosomaler Falle und/oder schlechter Transkriptionseffizienz.

Beispiel XXIII

[0186] Dieses Experiment wurde entworfen, um zu untersuchen, ob der Mangel an Transfektion von Beispiel 2 aufgrund der schlechten Bindung der Plasmid-DNA an das Gold auftritt. Für diesen Test wurde Gold-Chimera unter Verwendung von EGF als Ziel-Protein und der DNA-Bindungsproteine, wie zum Beispiel Histone (zugegeben entweder als heterogene Mischung aller Isotypen oder der einzelnen Isotypen), Polylysin oder Protaminsulfat, um die DNA zu adsorbieren, hergestellt. 25 µg EGF wurde an 40 nm kolloidale Goldteilchen, wie oben beschrieben, gebunden. Anschließend wurden Histone, Polylysin oder Protaminsulfat zu der EGF Au Lösung in verschiedenen Konzentrationen, die von 0.1 bis 100 µg/ml reichen, hinzugegeben.

[0187] Aufgrund der Zugabe der DNA-Bindungseinheit beobachteten wir, dass die kolloidale Gold EGF Lösung flockig wurde und anschließend ausfiel. Das ausgefallene Material wurde beschallt und zentrifugiert und auf ein Endvolumen von 1 ml in Wasser wieder suspendiert. 15 µg des pSV Beta-Galactosidase Plasmids wurde über Nacht auf einer Schüttelplattform inkubiert. Das Material wurde wieder zentrifugiert, der Überstand entfernt und 0.5 ml Wasser wurden zu dem Pellet hinzugegeben. Das Pellet wurde wieder beschallt und 0.1 ml der Lösung wurden entweder zu MCF-7 oder HS-578-T menschlichen Brustkrebszellen zugegeben, welche in Platten mit 24 Vertiefungen unter Verwendung von phenolrotfreiem IMEM, das mit 10% Aktivkohle-stripped fötalem Rinderserum ergänzt ist, hinzugegeben. Die Zellen und das Gold/Protein/DNA Chimera wurde miteinander für 48 Stunden, während dessen es von den Zellen aufgenommen wurde, inkubiert.

[0188] Wie in [Fig. 16](#) gesehen werden kann, wurde das Beta-Galactosidasegen wirksam in MCF-7 Zellen

transfiziert, da der grüne Fleck in fast jeder Zelle zu sehen ist. Interessanterweise zeigten nur die HS578-T Zellen, von denen bekannt ist, dass sie EGF-Rezeptoren besitzen, das extrazelluläre Binden des Chimeras, siehe [Fig. 17](#). Dies deutet an, dass sich das EGF-Rezeptorsystem in dieser Zelllinie keiner Internalisierung unterzieht.

Beispiel XXIV

[0189] Dialysekassetten wurden verwendet, um die Wirkungen der pH-Veränderung auf kolloidale Goldteilchen zu zeigen. Dialysekassetten (Pierce; Slide-A-Lyzer™; abgeschnittenes Molekulargewicht von 2000) wurden mit kolloidalen Goldteilchen, die in der vorliegenden Erfindung beschrieben sind, beladen. Die Kassetten wurden dann in einer oder zwei MES gepufferten Lösungen platziert. MES ist 2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure. Der pH der ersten Lösung war 7.4, während der pH der zweiten Lösung 5.6 war. Die Kassetten wurden für 24 Stunden dialysiert. Anschließend wurden die kolloidalen Goldlösungen in den Kassetten gesammelt, in Kulturlplatten mit 6 Vertiefungen platziert und photographiert. Nach 24 Stunden bei pH 7.4 waren die kolloidalen Goldteilchen unverändert und blieben in dem MES-Puffer suspendiert. In Kassetten, wo der pH des MES-Puffers auf 5.6 verändert wurde, gab es nach 24 Stunden schwarzen Niederschlag in den Kassetten, der die Ausfällung der kolloidalen Goldteilchen anzeigte. Dieses Beispiel beschreibt die möglichen Veränderungen im Zustand des kolloidalen Goldes, wenn der pH der Umgebung sauer wird. Dies ist analog zu der Ansäuerung des Endosoms nach Internalisierung.

Beispiel XXV

[0190] An kolloidales Gold gebundenes Streptavidin zeigte saturierende Bindungskinetik. Für dieses Experiment wurde 500 µg Streptavidin an 50 ml 32 nm kolloidales Gold für 1 Stunde gebunden. Im Anschluss wurden 5 ml einer stabilisierenden Lösung (5% PEG 1450, 0.1% BSA) zu dem Röhrchen hinzugegeben und für zusätzliche 30 min gemischt. Das Sol wurde zentrifugiert, um ungebundenes Streptavidin zu entfernen, und zweimal mit 5 ml der stabilisierenden Lösung gewaschen. Nach einem letzten Drehen wurden das Pellet zu einem Volumen von 5 ml mit der stabilisierenden Lösung wiederhergestellt. 1 ml Aliquots wurde auf Mikroröhrchen verteilt. Zu diesen Röhrchen wurden ansteigende Mengen von biotinyliertem menschlichem TNF Alpha hinzugegeben. Das biotinylierte Cytokin wurde mit dem Streptavidin-Gold für 1 Stunde inkubiert. Das Material wurde bei 10.000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde gesammelt und für TNF-Bestimmungen gesichert. Die Pellets aus jedem Röhrchen wurden einmal mit stabilisierender Lösung gewaschen und wieder zentrifugiert. Der Überstand aus dieser Drehung wurde verworfen. Das Pellet wurde auf 1 ml mit stabilisierender Lösung wiederhergestellt und sowohl das Pellet als auch der anfängliche Überstand wurden auf TNF-Konzentrationen unter Verwendung unseres CYTELISA™ TNF-Kits untersucht. Man kann sehen, dass mehr als 90% der biotinylierten TNF-Immunoreaktivität in dem Pellet gefunden wurde ([Fig. 2](#)), was anzeigt, dass das biotinylierte TNF durch das Streptavidin gebundene Gold eingefangen wurde.

Beispiel XXVI

[0191] Dieses Experiment sollte die Durchführbarkeit des Streptavidin Goldkomplexes als ein gezieltes Arzneimittelabgabesystem beurteilen. Damit dies geschieht, muss das Streptavidin konjugierte kolloidale Gold sowohl einen biotinylierten Zielliganden als auch ein biotinyliertes Therapeutika binden. Um dies zu untersuchen, führten wir das folgende Experiment durch.

[0192] 100 ml 32 nm kolloidale Goldlösung wurde mit einer gesättigten Konzentration von Streptavidin gebunden. Nach 1 Stunde wurde das Sol zentrifugiert und wie oben beschrieben gewaschen. Das an kolloidales Gold gebundene Streptavidin wurde dann mit untergesättigten Konzentrationen von biotinyliertem Cytokin gebunden. Das Material wurde geschüttelt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Sol zentrifugiert und das Pellet mit einer Lösung von biotinyliertem Polylysin inkubiert. Nach 1 Stunde Inkubation wurde das Sol wieder zentrifugiert und gewaschen. Nach einer letzten Drehung und erneuten Suspension (das Endvolumen des Sols war ungefähr 1 ml) wurden 50 µg des β-Galactosidase-Reportergels mit dem konzentrierten Streptavidin/biotinyliertem Cytokin/Polylysin Chimera für 1 Stunde inkubiert. Das Material wurde zentrifugiert, um ungebundene Plasmid-DNA zu entfernen. Das Endkonstrukt (Biotin EGF-SAP-Au-Biotin Polylysin-DNA) wurde bei 14.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf das Vorhandensein von DNA durch Bestimmen von dessen OD bei 260 nm untersucht. Wir beobachteten einen Abfall in dem Überstand-OD @ 260 nm von 0.95 bis 0.25 nach der Inkubation der Plasmid-DNA mit dem Biotin EGF-SAP-Au-Biotin Polylysin Konstrukt. Die DNA wurde durch die Biotin EGF-SAP-Au-Biotin Polylysin DNA gebunden und wurde aus dem Sol in das Pellet zentrifugiert. Diese Daten zeigen, dass ein neues Arzneimittelabgabesystem entwickelt wurde unter Verwendung von Avidin, das an kolloidales Gold bindet. Biotinylierung des ausgerichteten und Abga-

be-Payloads wurde dann als das Verfahren zum Binden dieser Moleküle an das auf kolloidales Gold basierende Arzneimittel/Genabgabesystem verwendet.

Patentansprüche

1. Ein Zellabgabesystem für die gezielte Abgabe von biologisch aktiven Faktoren an spezifische Zellen, das eine kolloidale Metallplattform umfasst, an die wenigstens ein biologisch aktiver Faktor und wenigstens ein zellspezifisches Zielmolekül gebunden sind, wobei das Binden des wenigstens einen biologisch aktiven Faktors und/oder das Binden des wenigstens einen zellspezifischen Zielmoleküls an die kolloidale Metallplattform durch ein oder mehrere integrierende Moleküle vermittelt wird.
2. Das Abgabesystem nach Anspruch 1, wobei das Binden des wenigstens einen biologisch aktiven Faktors und/oder das Binden des wenigstens einen zellspezifischen Zielmoleküls an die kolloidale Metallplattform reversibel ist.
3. Das Abgabesystem nach Anspruch 1 oder 2, wobei der wenigstens eine biologisch aktive Faktor und ein integrierendes Molekül ein spezifisches Bindungspaar bilden.
4. Das Abgabesystem nach Anspruch 1 oder 2, wobei das wenigstens eine zellspezifische Zielmolekül und ein integrierendes Molekül ein spezifisches Bindungspaar bilden.
5. Das Abgabesystem nach Anspruch 3 oder 4, wobei das spezifische Bindungspaar aus der Gruppe, die aus Antikörper-Antigen, Rezeptor-Ligand, Enzymsubstrat und Streptavidin-Biotin besteht, ausgewählt wird.
6. Das Abgabesystem nach Anspruch 1 oder 2, wobei das integrierende Molekül ein polykationisches Molekül ist.
7. Das Abgabesystem nach Anspruch 6, wobei das polykationische Molekül aus der Gruppe, die aus Polylysin, Histonen, Asialoglycoproteinen und Protaminsulfat besteht, ausgewählt wird.
8. Das Abgabesystem nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die kolloidale Metallplattform kolloidales Gold ist.
9. Das Abgabesystem nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der wenigstens eine biologisch aktive Faktor aus der Gruppe, die aus Interleukin-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -10, -11, -12, -13, -15, -16, -17 und -18, Lipid A, Phospholipase A2, Endotoxinen, Staphylokokken-Enterotoxin B, Typ-I Interferon, Typ-II Interferon, Tumornekrosefaktor- α , Umwandlungswachstumsfaktor- α , Umwandlungswachstumsfaktor- β , Lymphotoxin, Migrationinhibierungsfaktor, Granulocyt-Makrophage-Koloniestimulierungsfaktor (CSF), Monocyt-Makrophage CSF, Granulocyt CSF, vaskulärer Epithelialwachstumsfaktor, Fibroblast-Grundwachstumsfaktor, Angiogenin, Wärmeschockproteinen, Kohlenhydrateinheiten von Blutgruppen, Rh-Faktoren, Fibroblastwachstumsfaktoren, Hormonen, Zelloberflächenrezeptoren, Antikörpern, Nukleinsäuren, Nukleotiden, für Krebszellen spezifischen Antigenen, Autoimmun-Antigenen, Mutant p53, Tyrosinase, Glucose, Glycogen und Phospholipiden besteht, ausgewählt wird.
10. Das Abgabesystem nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das wenigstens eine zellspezifische Zielmolekül aus der Gruppe, die aus Interleukin-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -10, -11, -12, -13, -15, -16, -17 und -18, Lipid A, Phospholipase A2, Endotoxinen, Staphylokokken-Enterotoxin B, Typ-I Interferon, Typ-II Interferon, Tumornekrosefaktor- α , Umwandlungswachstumsfaktor- α , Umwandlungswachstumsfaktor- β , Lymphotoxin, Migrationinhibierungsfaktor, Granulocyt-Makrophage-Koloniestimulierungsfaktor (CSF), Monocyt-Makrophage CSF, Granulocyt CSF, vaskulärer Epithelialwachstumsfaktor, Fibroblast-Grundwachstumsfaktor, Angiogenin, Wärmeschockproteinen, Kohlenhydrateinheiten von Blutgruppen, Rh-Faktoren, Fibroblastwachstumsfaktoren, Hormonen, Zelloberflächenrezeptoren, Antikörpern, Nukleinsäuren, Nukleotiden, für Krebszellen spezifischen Antigenen, Autoimmun-Antigenen, Mutant p53, Tyrosinase, Glucose, Glycogen und Phospholipiden besteht, ausgewählt wird.
11. Verwendung des Abgabesystems nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung einer Krankheit, die aus der Gruppe, die aus bakteriellen Infektionen, viralen Infektionen, Krebs und Autoimmunerkrankungen besteht, ausgewählt wird.

Es folgen 20 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

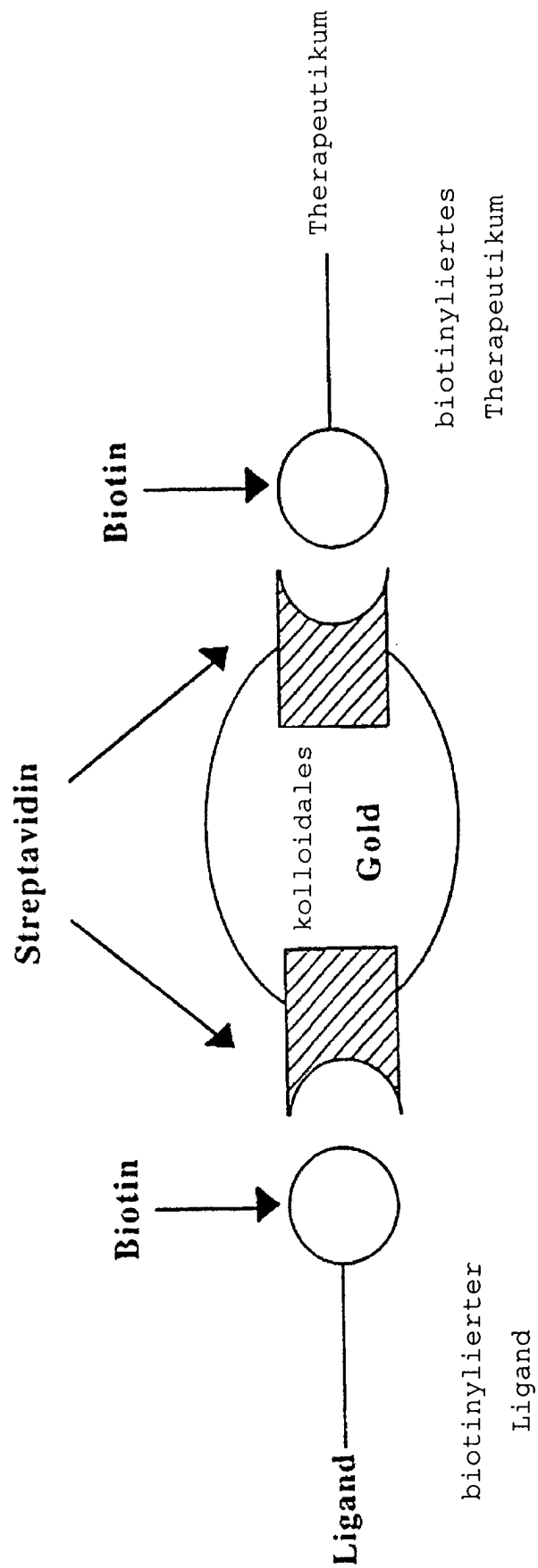


Fig. 1

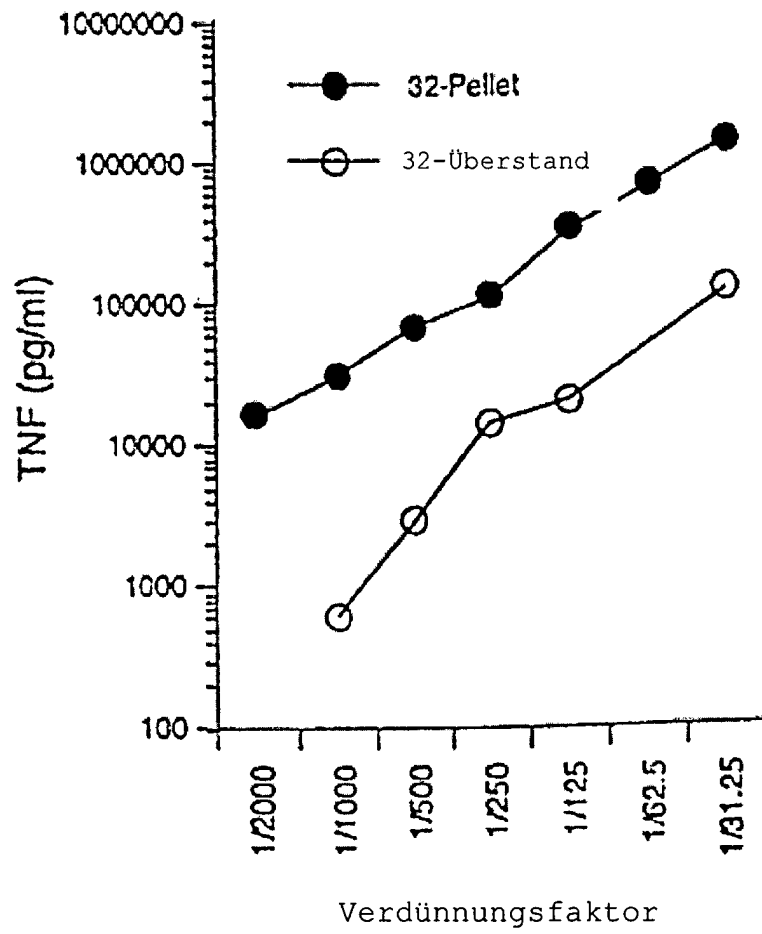


Fig. 2

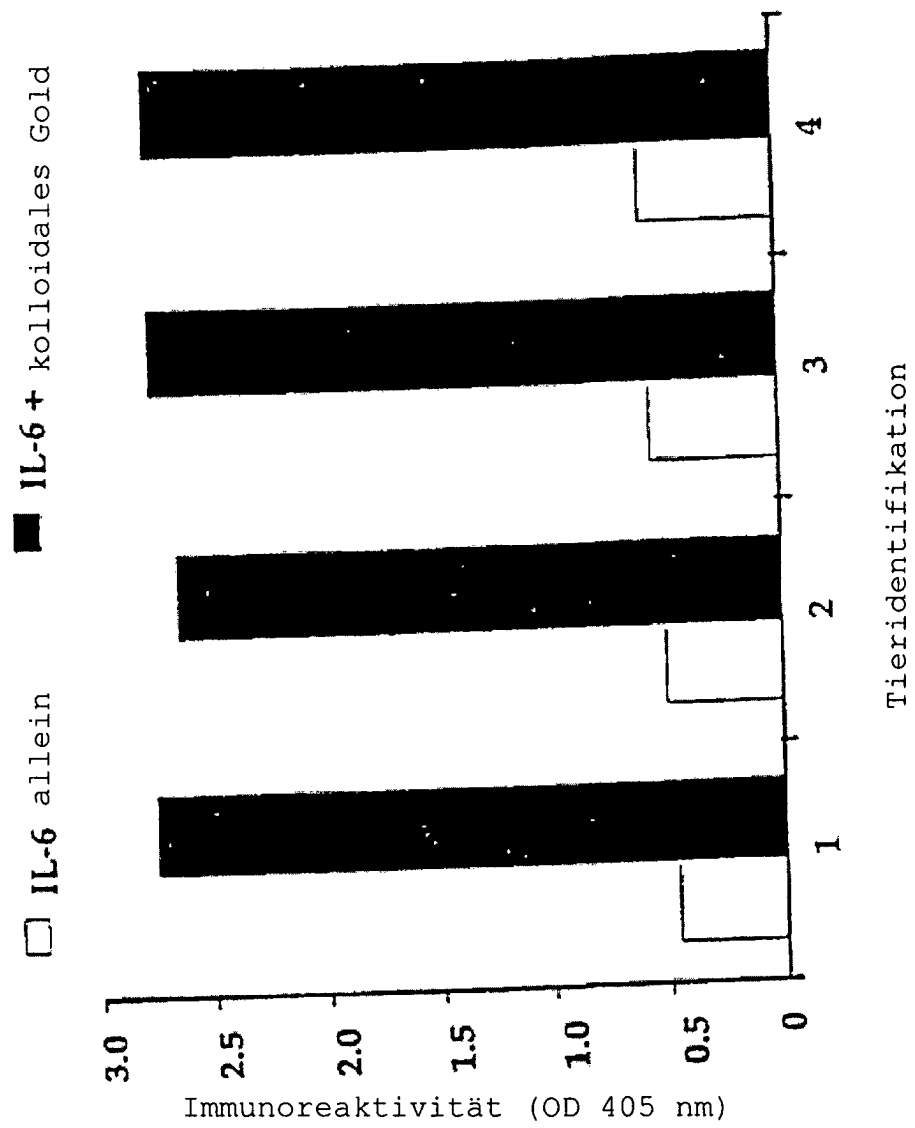


Fig. 3

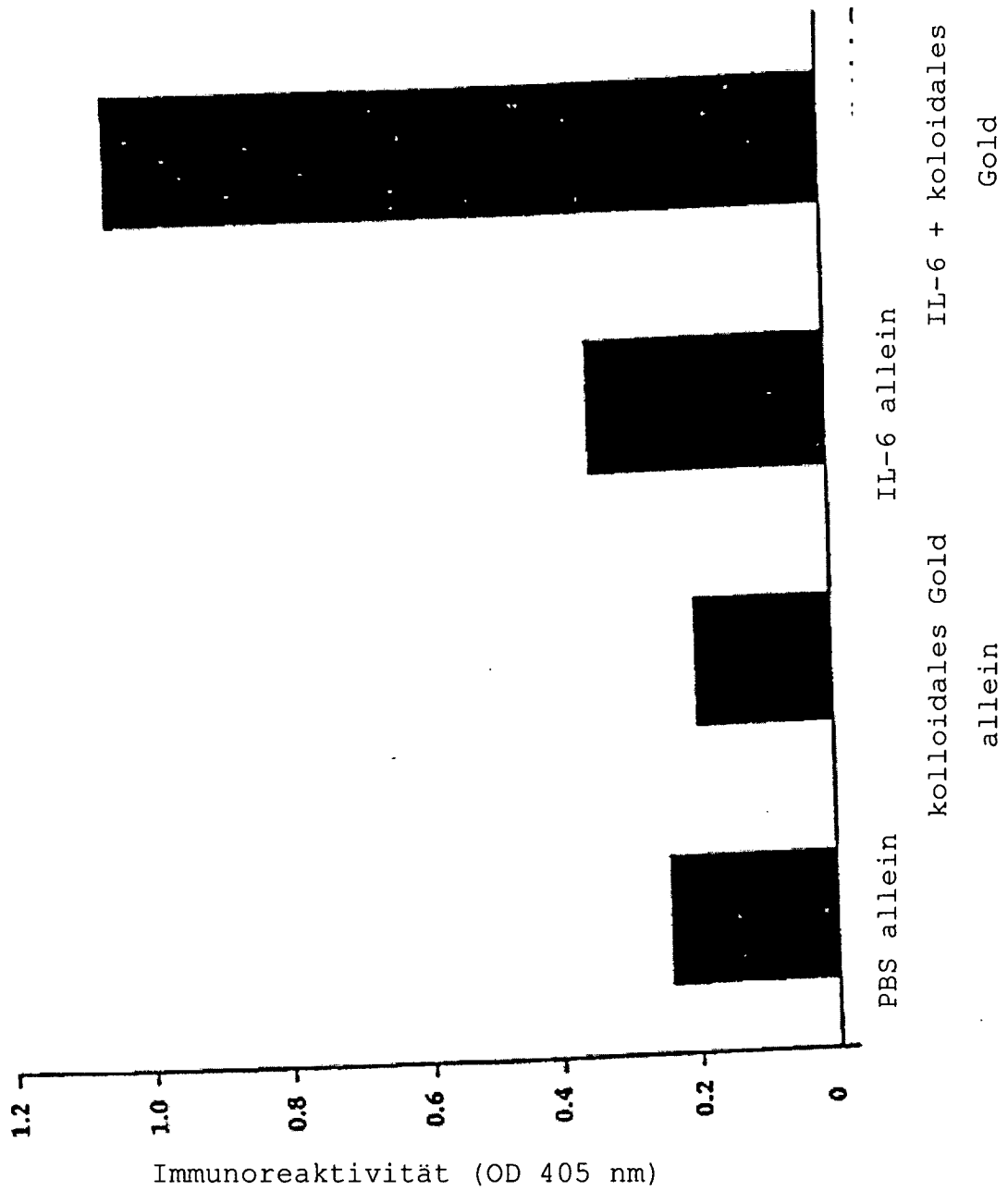


Fig. 4

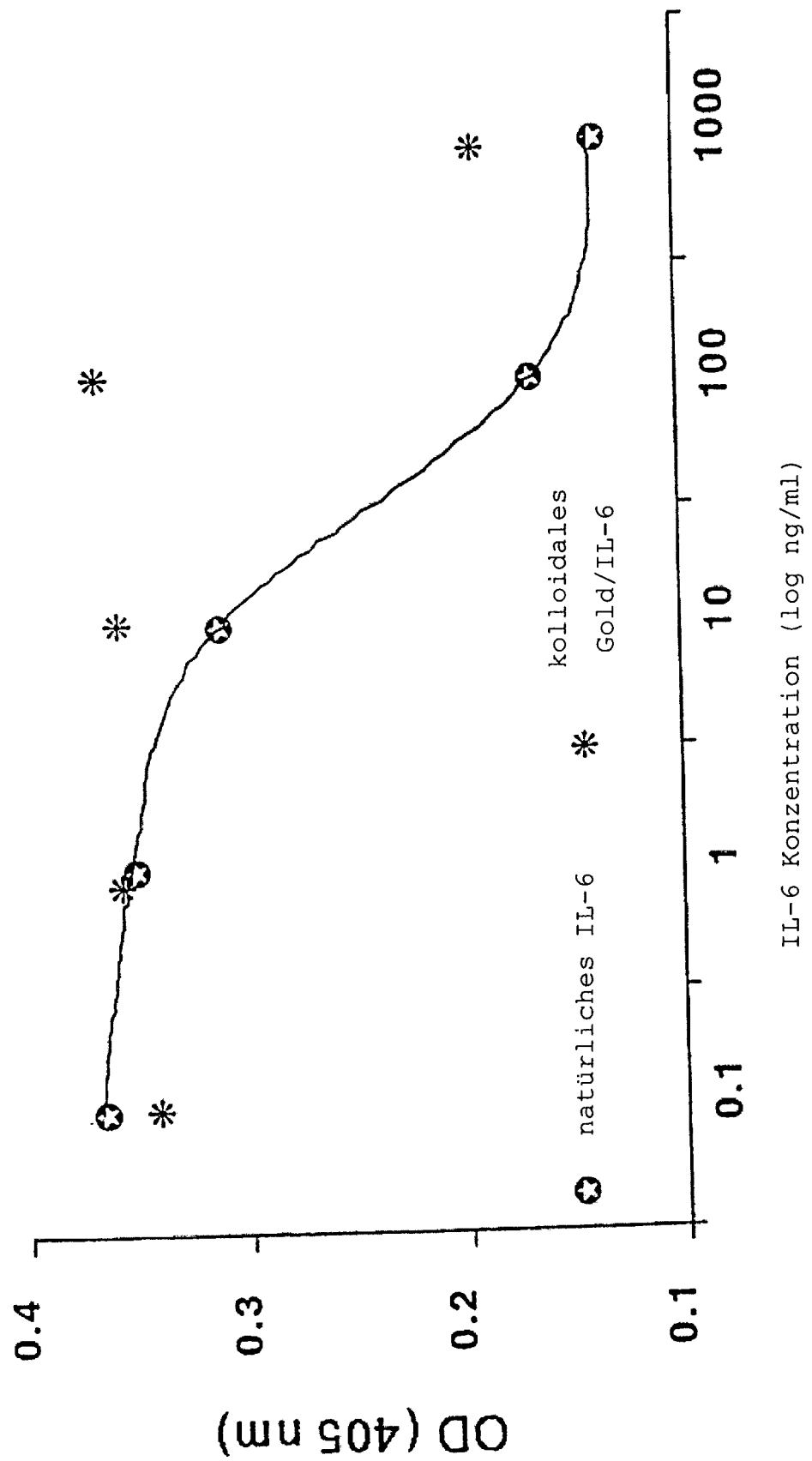


Fig. 5

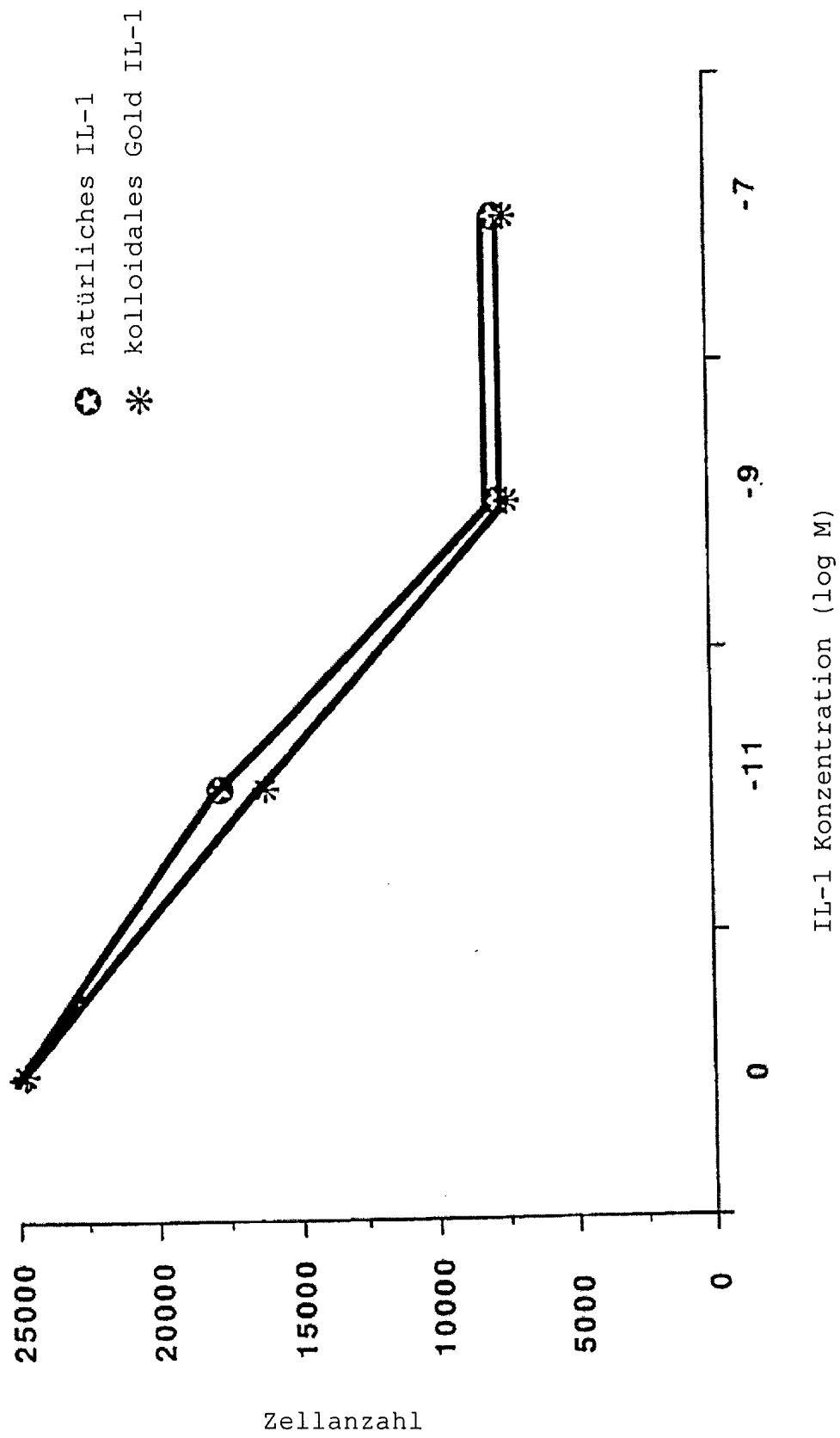


Fig. 6

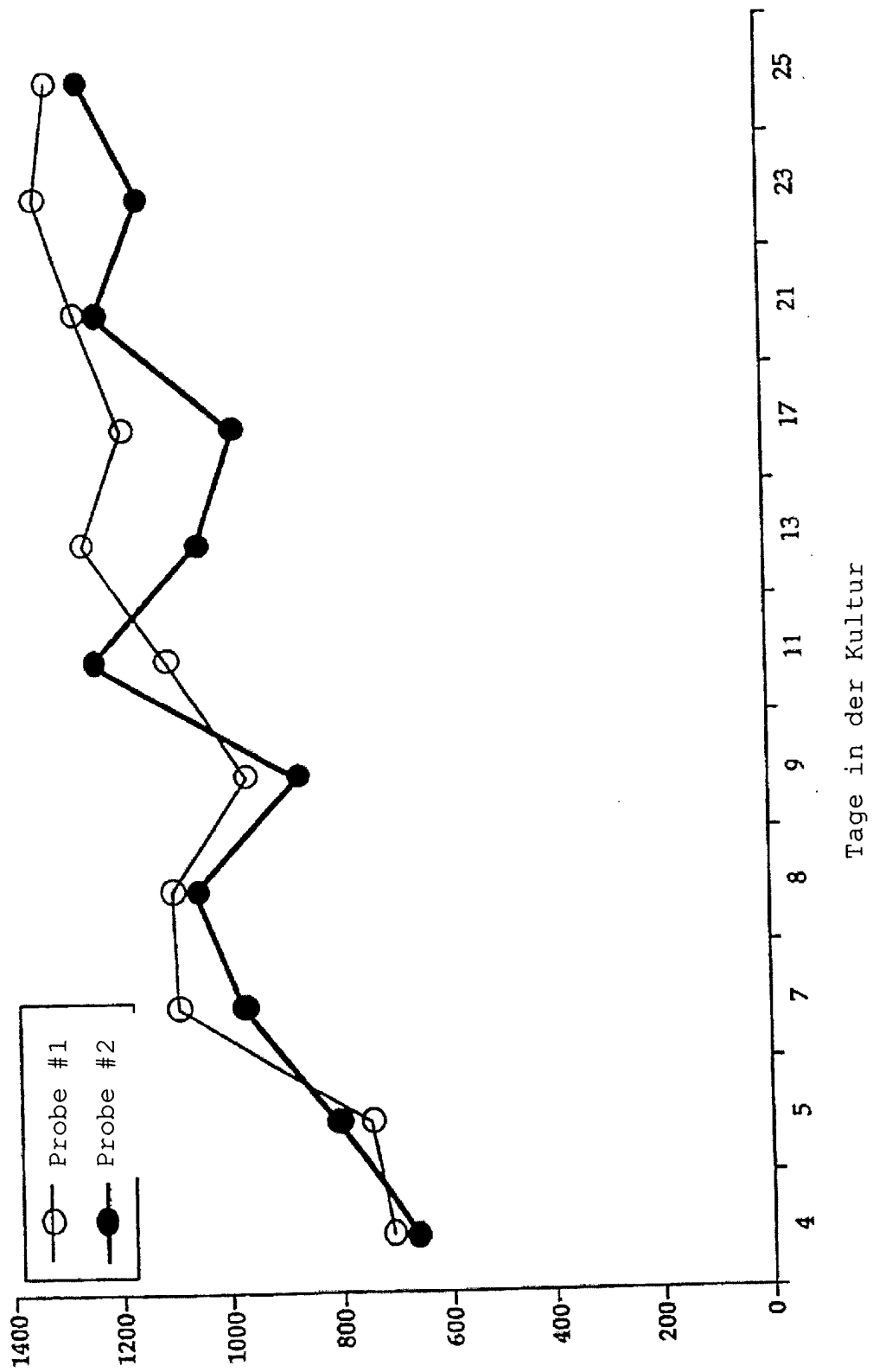


Fig. 7

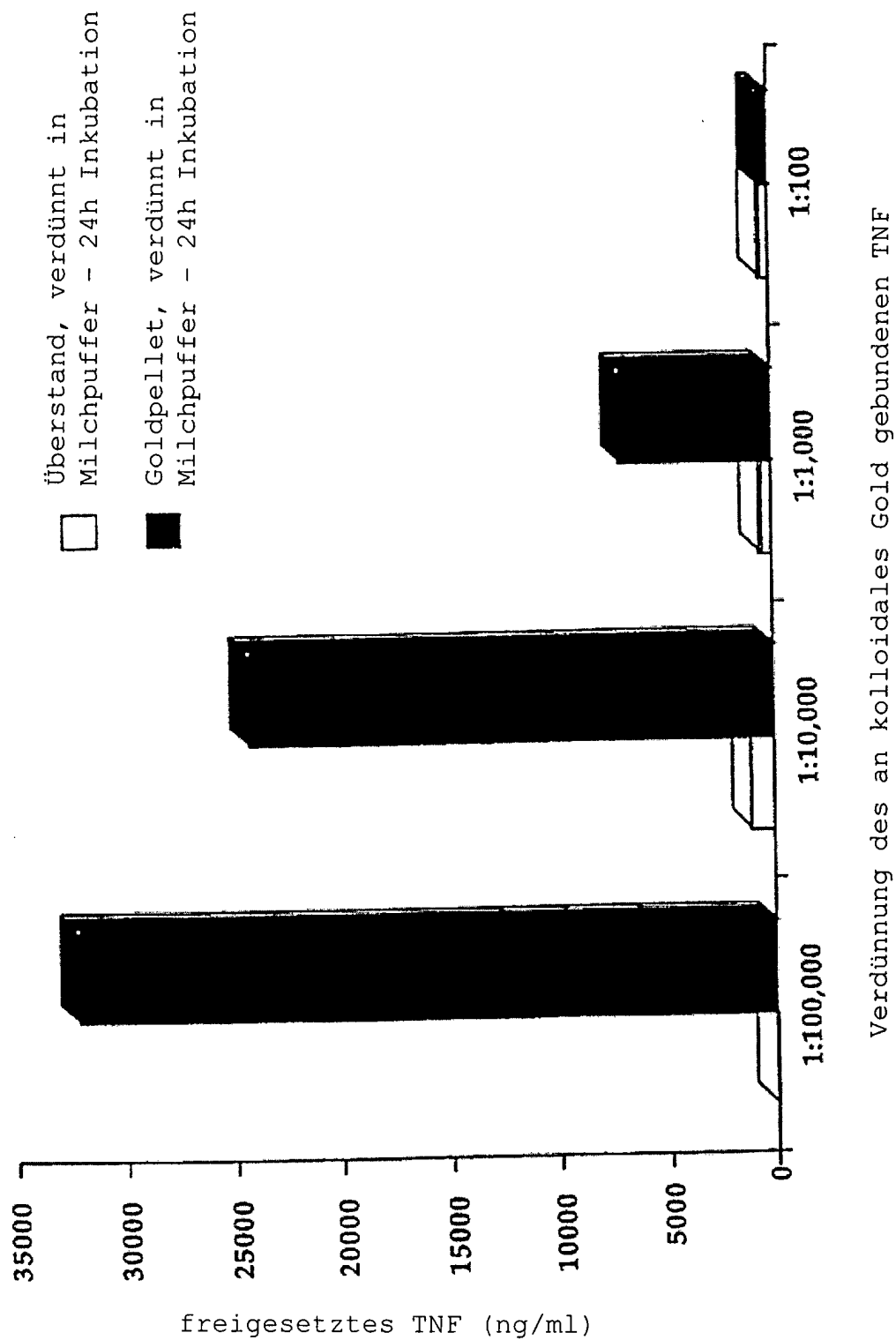


Fig. 8

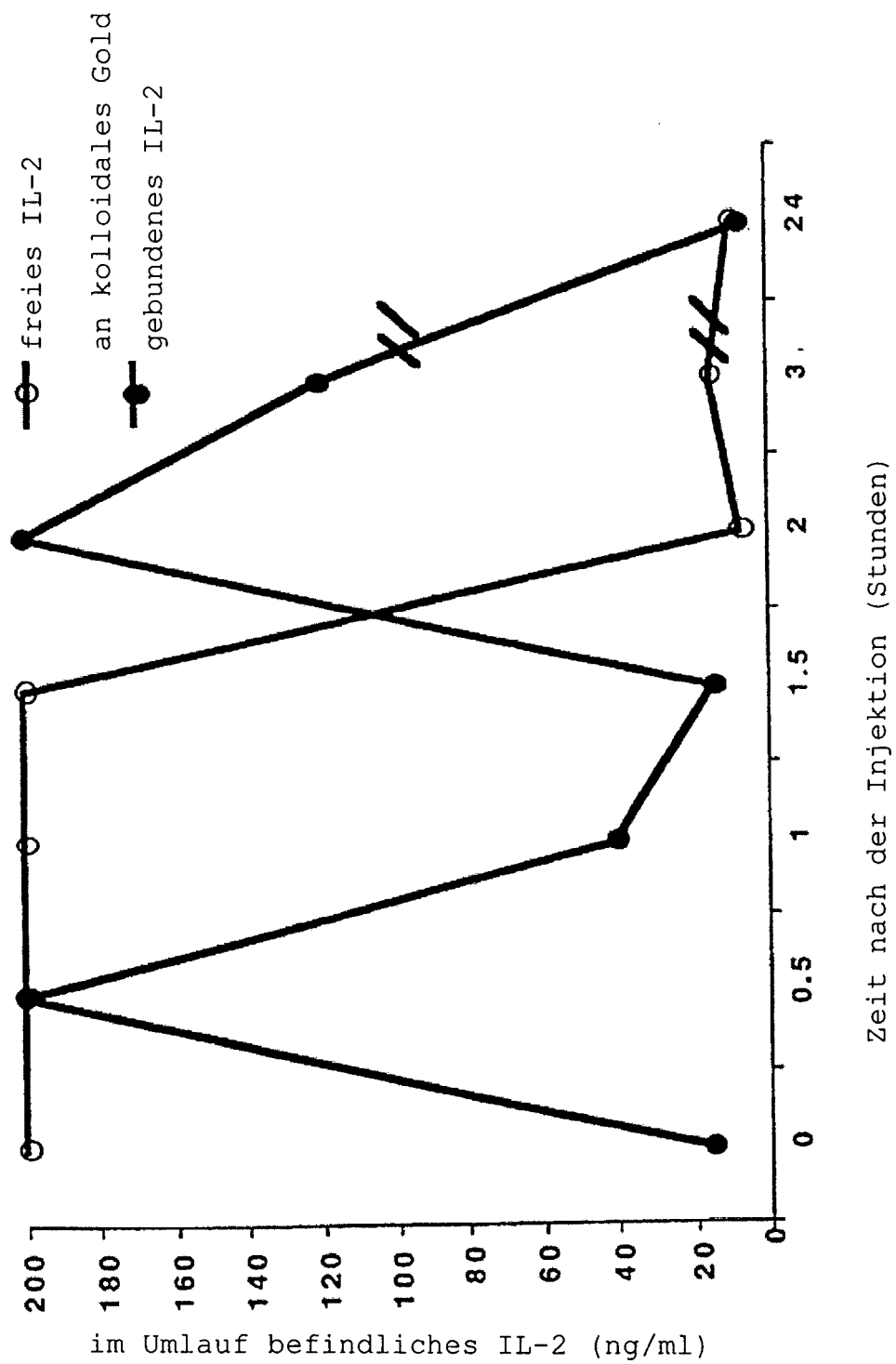


Fig. 9

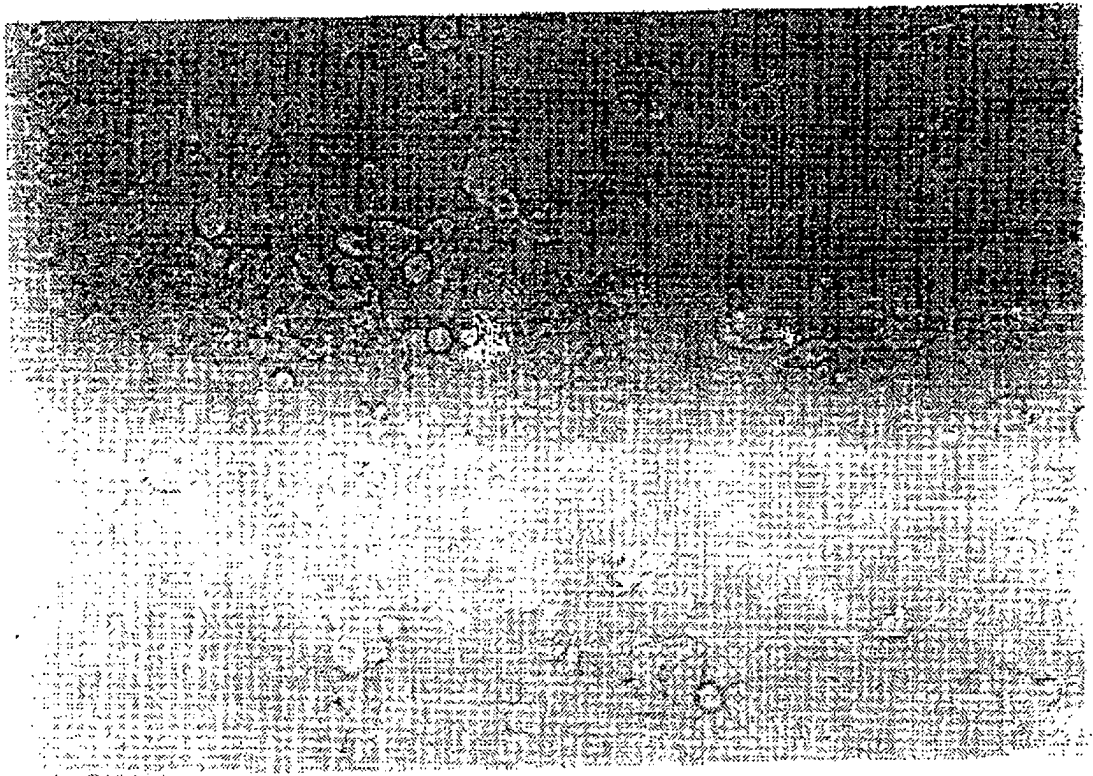


Fig. 10A

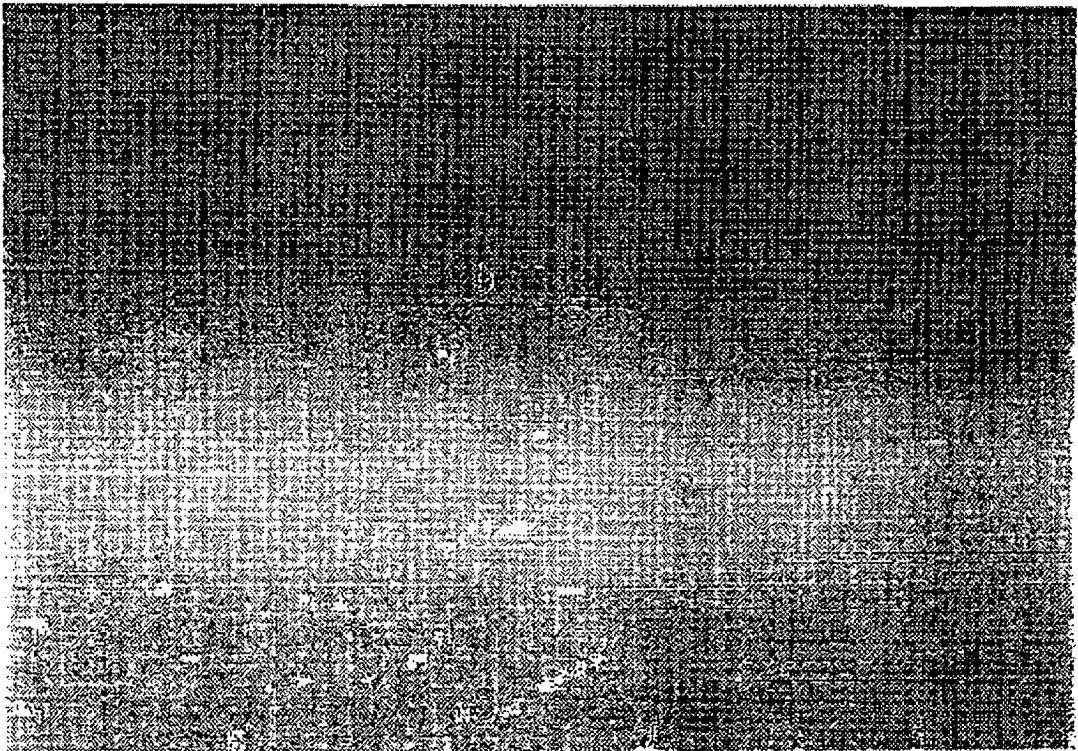


Fig. 10B

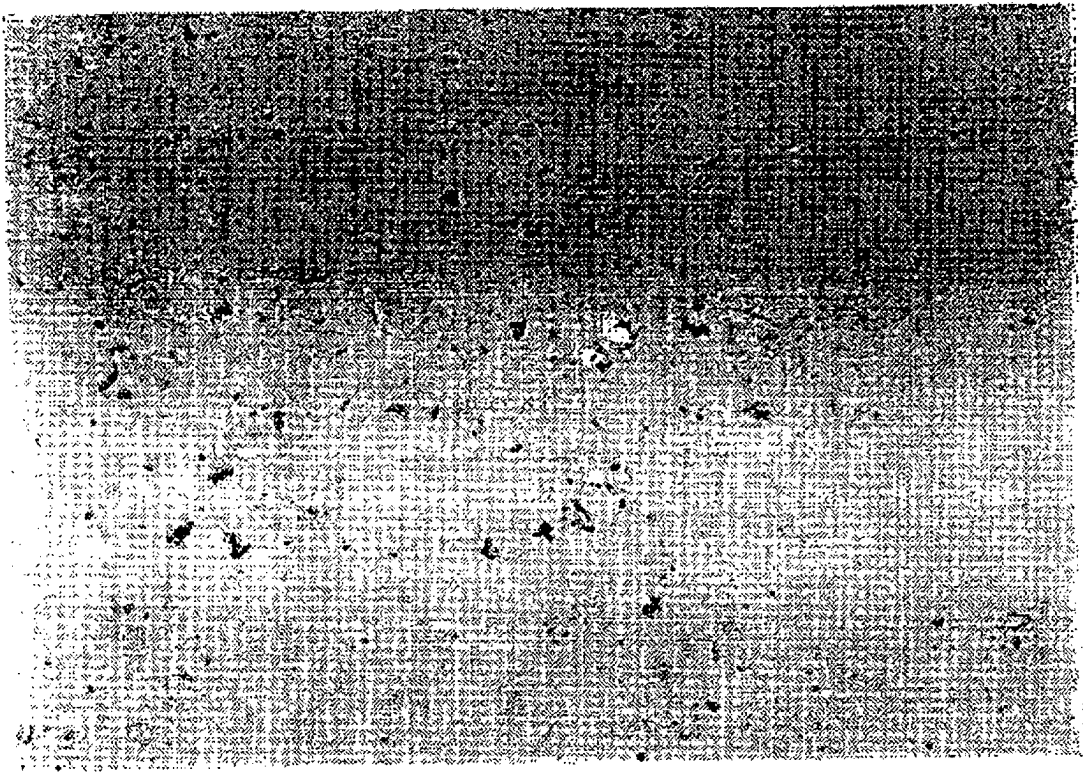


Fig. 10C

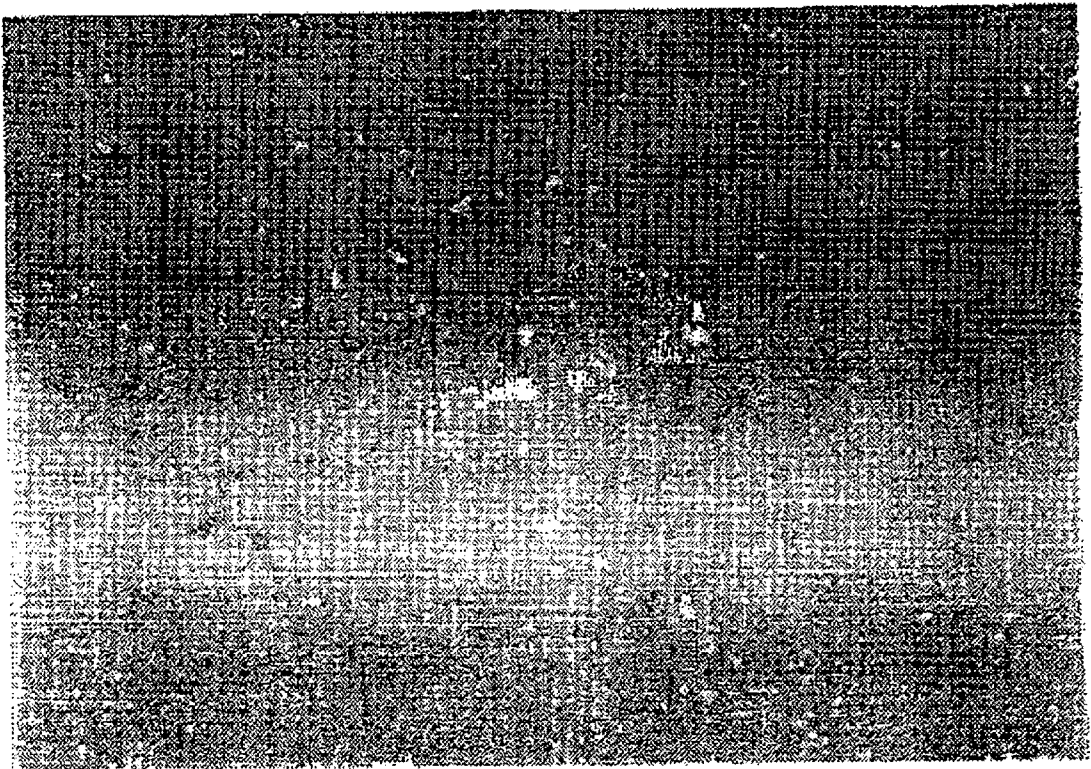
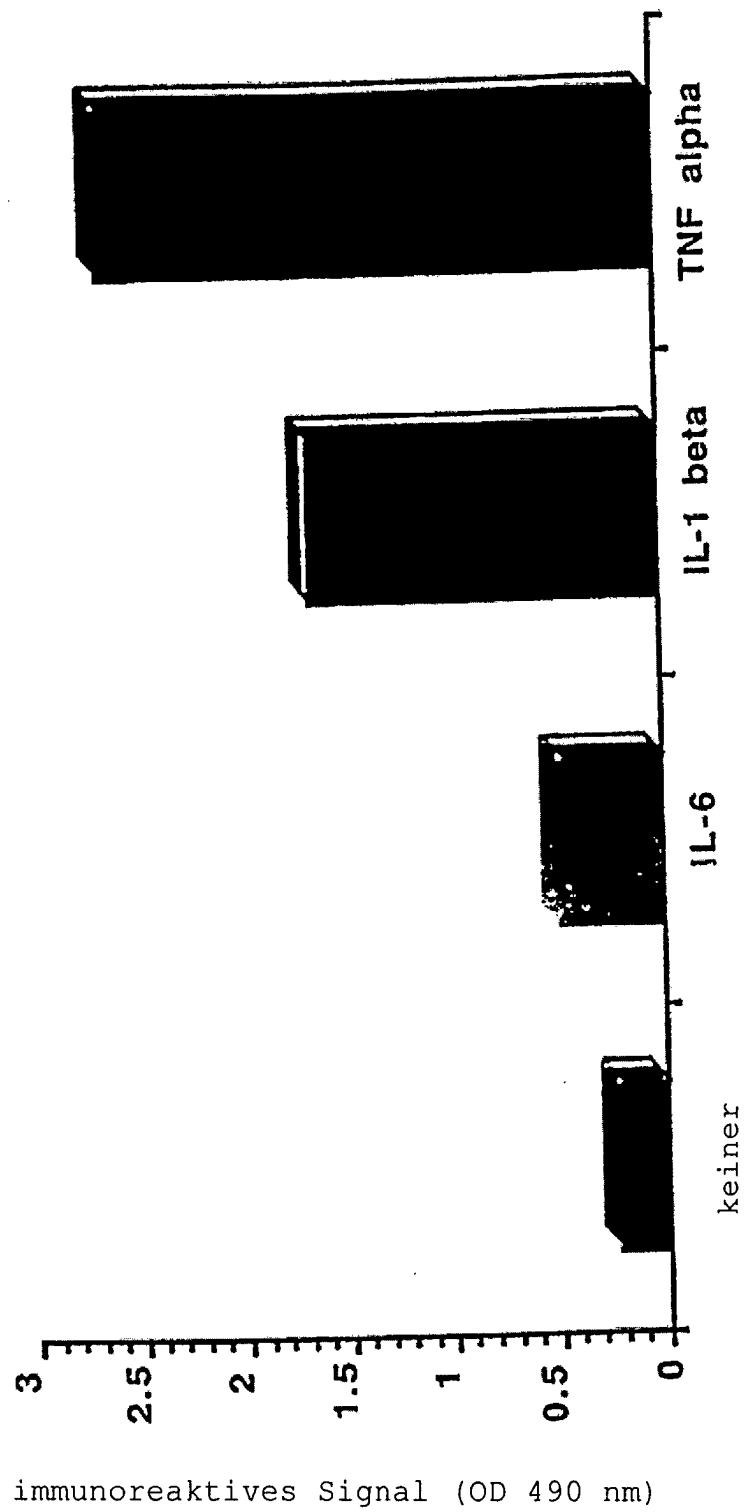


Fig. 10D



für die Detektion verwendeter Antikörper

Fig. 11

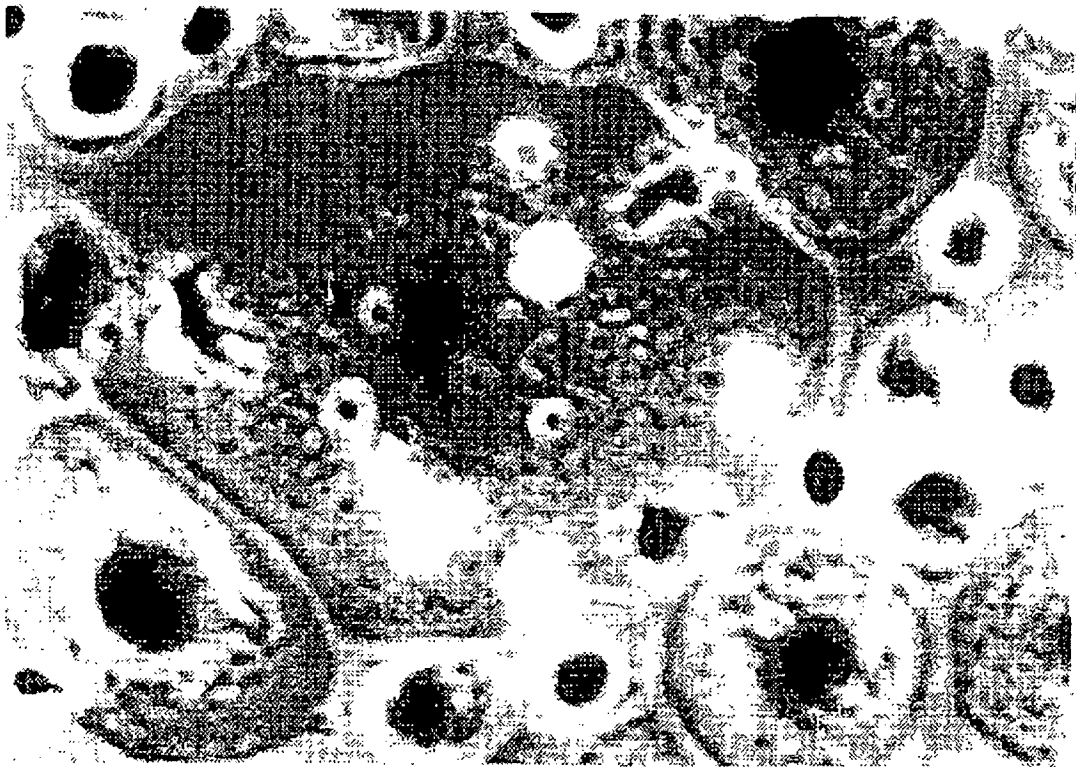


Fig. 12



Fig. 13

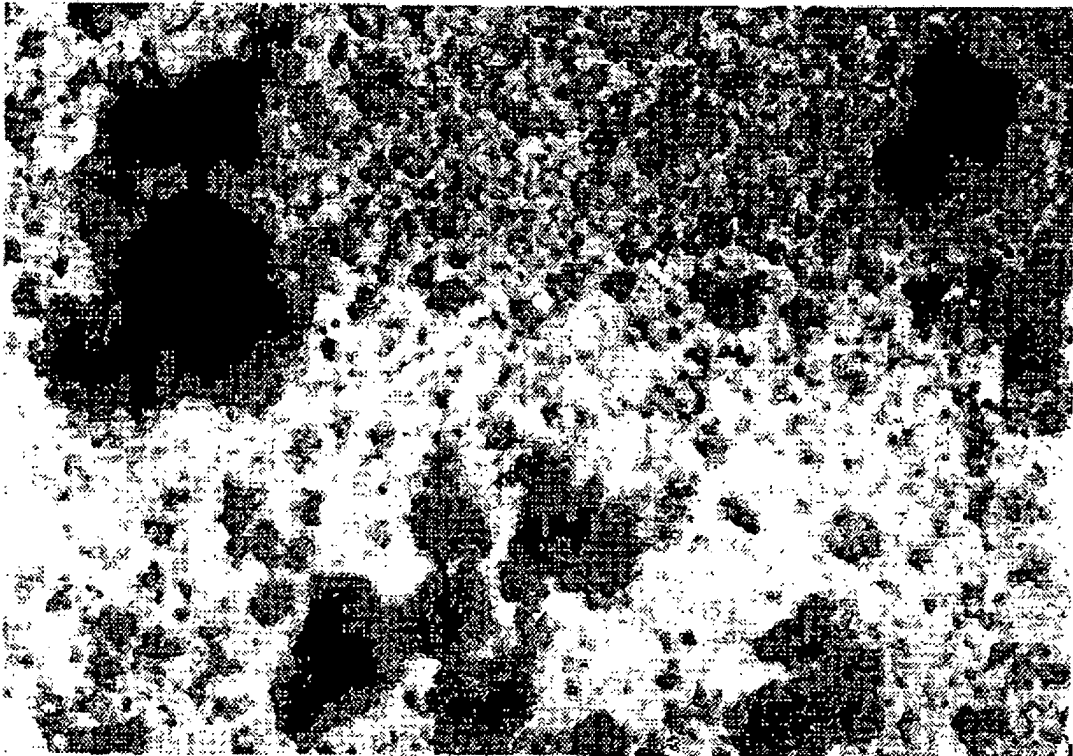


Fig. 14

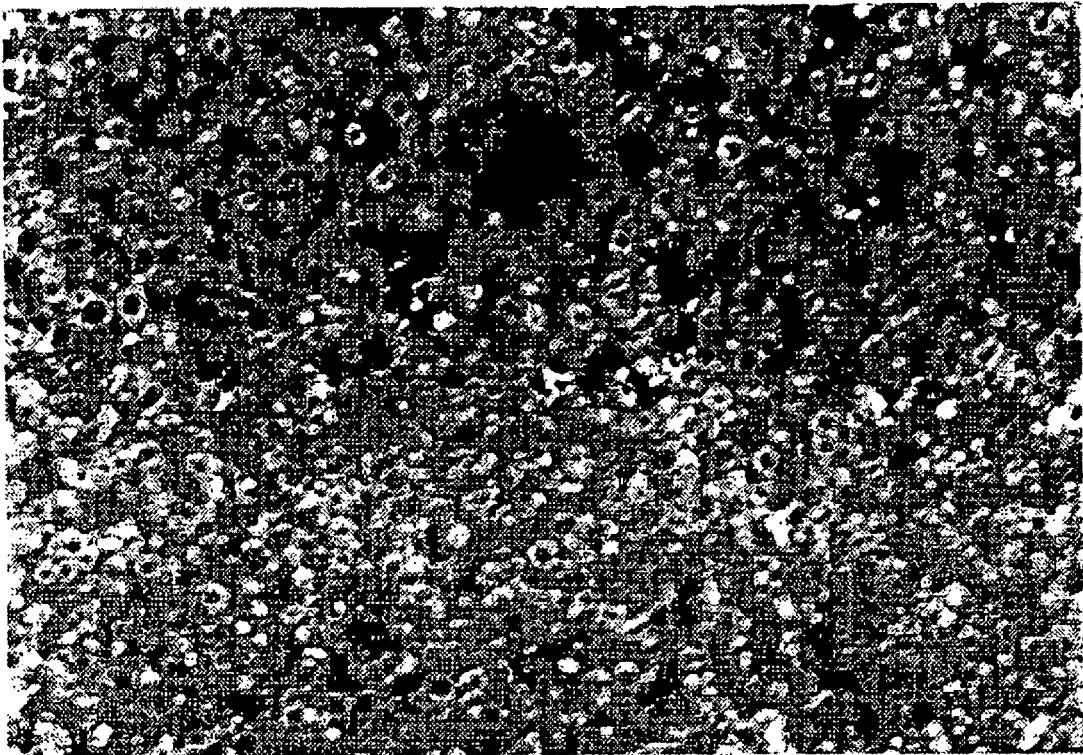


Fig. 15

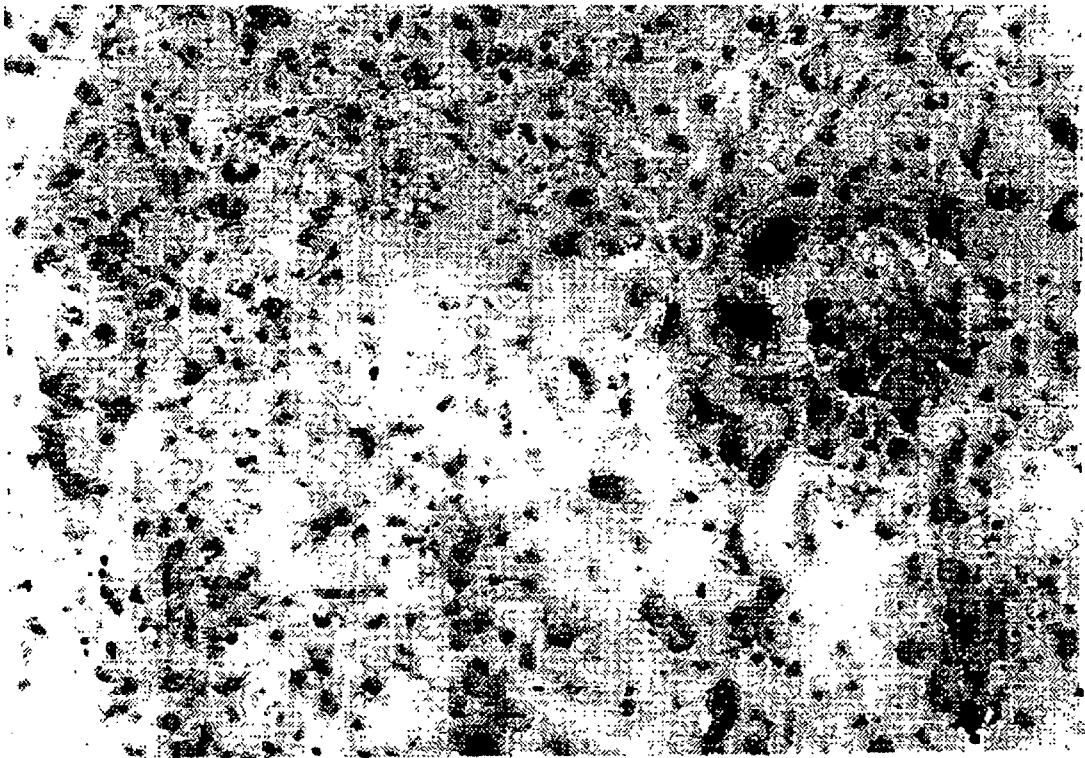


Fig. 16

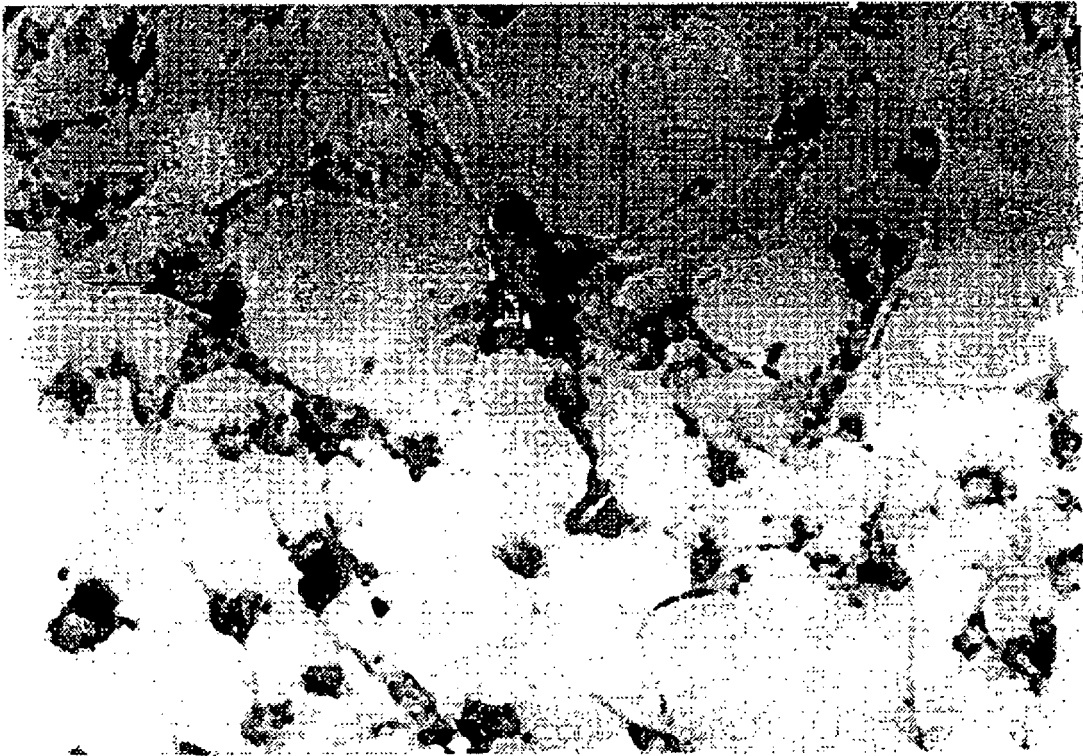


Fig. 17