



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 30 348 T2** 2005.09.01

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 946 744 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 30 348.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR97/02022**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 945 903.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/022610**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.11.1997**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **28.05.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.10.1999**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **18.08.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.09.2005**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12N 15/88**  
**A61K 48/00**

(30) Unionspriorität:  
**9613990 15.11.1996 FR**

(73) Patentinhaber:  
**I.D.M. Immuno-designed Molecules, Paris, FR**

(74) Vertreter:  
**Buschhoff-Hennicke-Althaus, 50672 Köln**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:  
**MIDOUX, Patrick, F-45100 Orleans, FR;  
MONSIGNY, Michel, F-45590 Saint-Cyr-en-Val, FR**

(54) Bezeichnung: **NEUE POLYMERISCHE KOMPLEXE FÜR DIE TRANSFEKTION VON NUKLEINSAÜREN, MIT RES-  
TEN FÜR DESTABILISIERUNG DER ZELLMEMBRANEN**

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**

**[0001]** Gegenstand der Erfindung sind neuartige Komplexe aus Nukleinsäuren und Polymer, das durch Reste substituiert ist, welche die Destabilisierung von Zellmembranen verursachen.

**[0002]** Die Einschleusung eines Fremdgens in eine Zelle stellt die Grundlage der Gentherapie dar. Der Gentransfer kann entweder durch Einsatz von verändertem Virenmaterial (Vakzine-Virus, Retrovirus, Adenovirus oder Herpesvirus) oder von nichtviralen Vektoren (kationische Lipide, Liposomen) erfolgen. Die Erstgenannten sind zwar wirkungsvoll, doch sie führen zu Sicherheitsproblemen. Die Effizienz der Letztgenannten wird in der Anwesenheit von Serum stark gemindert, weshalb ihr Einsatz auf in vitro oder ex vivo beschränkt ist.

**[0003]** Polylysin, welches stabile elektrostatische Komplexe mit einem DNA-Plasmid bilden kann, ist die Grundlage für die Entwicklung nichtviraler Vektoren zum Transfer von Genen in Tierzellen.

**[0004]** Komplexe aus DNA und unsubstituiertem Polylysin sind aufgrund der extrem hohen Stabilität der Komplexe (daher schwache Dissoziation und Aussalzung der DNA) unter physiologischen Bedingungen infolge der sehr starken Polykation-Polyanion-Interaktionen im allgemeinen für die Transfektion von Zellen nicht effizient.

**[0005]** Die Transfektionseffizienz kann verbessert werden, wenn die Anzahl der auf dem Polypeptid vorhandenen Ladungen verringert wird, um die Interaktionskräfte zwischen der DNA und dem Polylysin zu reduzieren. Wenn beispielsweise 40% der  $\epsilon\text{-NH}_3^+$ -Funktionen der Lysin-Reste des Polylysins mit Polyhydroxyalkanoat-Derivaten wie etwa  $\delta$ -Gluconolacton teilweise neutralisiert werden, sind die Komplexe aus DNA und teilweise gluconyliertem Polylysin zur Transfektion von Zellen effizienter als DNA-Polylysin-Komplexe.

**[0006]** Das Polylysin kann durch spezifische Rezeptor-Liganden substituiert werden, die sich auf der Zelloberfläche befinden und fähig sind, eine spezifische Endozytose von Komplexen mit einem DNA-Plasmid durch Zielzellen einzuleiten.

**[0007]** Konjugate, die mittels Substitution von Polylysin durch Asialoorosomucoid, Transferrin, Insulin, Immunoglobulin und Wachstumsfaktoren erhalten werden, wurden als Plasmidvektoren vorgeschlagen. Doch diese Protein-Liganden führen zu einer hohen Immunogenität der Komplexe.

**[0008]** Das Polylysin kann durch weniger immunogene Liganden mit kleiner Molekülmasse substituiert werden, wie etwa Oside und Oligoside, die durch spezifische Membran-Rezeptoren (Membranlektine) auf der Oberfläche von Zielzellen erkannt werden. Glycolysiertes Polylysin wurde als nichtvirale Vektoren vorgeschlagen, die perfekt für den Gentransfer definiert sind.

**[0009]** Zahlreiche Tierzellen besitzen Membranlektine, die Oligoside verschiedener Strukturen erkennen und die die Endozytose ihrer Liganden einleiten. Das Membranlektin der Zellen des Leberparenchyms beispielsweise erkennt kohlenhydrathaltige Strukturen, die einen Galactose-Rest in der terminalen Position enthalten, was bei den desialylierten Serumglycoproteinen der Fall ist. Die Spezifität der Membranlektine hängt vom Zelltyp und vom Differenzierungsstadium der Zellen ab.

**[0010]** Die Transfektionseffizienz von Komplexen aus DNA und glycolysiertem Polylysin ist abhängig vom Grad der Substitution des Polylysins durch Oside: Die effizientesten Transfektionen werden erreicht, wenn 30 bis 40% der  $\epsilon\text{-NH}_3^+$ -Funktionen der Lysin-Reste des Polylysins durch Mono- oder Disaccharide substituiert werden.

**[0011]** Im französischen Patent Nr. 2.719.316 wurde gezeigt, dass durch die Verwendung von teilweise gluconyliertem Polylysin, das eine bereits reduzierte Anzahl positiver Ladungen enthält, die Anzahl der Oside, die zur Andockung am Polymer und zum Erreichen einer hohen Transfektionseffizienz der Komplexe aus DNA und glycolysiertem sowie gluconyliertem Polylysin erforderlich ist, um einen Faktor von 5 bis 10 gesenkt werden kann. Die Verwendung von teilweise gluconyliertem Polylysin ermöglicht es, die Löslichkeit der Komplexe zu erhöhen und ihre Größe um etwa 50 nm zu reduzieren.

**[0012]** Der Transport von Plasmiden mit nichtviralen Vektoren, die spezifisch von Verbindungen der Plasmamembran von Zellen erkannt werden können, erfolgt auf Basis eines Ansatzes, der den Mechanismus des Eindringens von viralem Genmaterial in eine Zelle imitiert. In allen beschriebenen Fällen werden die Komplexe aus DNA und polykationischem Polymer in Endozytosevesikel, in Endosomen und wahrscheinlich in tiefer liegendere, von der Plasmamembran entfernte intrazelluläre Kompartimente transportiert.

**[0013]** Die transmembrane Passage der Plasmid-DNA ist daher eine kritische Etappe hinsichtlich der Freisetzung besagter DNA im Cytosol für ihre Wanderung in den Kern, wo das Gen exprimiert wird.

**[0014]** In allen beschriebenen Fällen werden transmembrane Transporthilfen verwendet, um die Wanderung der DNA in das Cytosol zu begünstigen. Es handelt sich um:

- Chloroquin
- defektive Adenoviren
- permeabilisierende und/oder fusiogene Peptide

a) Chloroquin ist eine schwache Base, die in einer Menge von 50  $\mu\text{M}$  oder 100  $\mu\text{M}$  für in vitro Kulturen verwendet wird, und für einige Zellen sind diese Konzentrationen toxisch. Chloroquin ist durchdringend, es durchquert die Membran und akkumuliert in den Säurekompartimenten, da es Amine mit einem niedrigen pK enthält, die Protonen fangen; protoniertes Chloroquin ist kationisch und weniger durchdringend. Die Azidifizierung der Endosomen und Lysosomen ist auf ein Membranenzym zurückzuführen, das  $\text{H}^+$  aus Cytosol in Vesikel injiziert; zur Wiederherstellung der Elektroneutralität wird diese Protonenakkumulation von einem Eintritt von Chloridionen  $\text{Cl}^-$  begleitet. Die Protonen und Chloride akkumulieren im gleichen Maße wie das Chloroquin, was eine Erhöhung der intravesikulären Ionenstärke zur Folge hat, die den Eintritt von Wasser bewirkt und somit zur Dehnung der Vesikel und zu ihrer Destabilisierung führt. Die intrazelluläre Konzentration des Chloroquin kann nach einigen Stunden über 100 Mal höher sein als seine Konzentration im Medium. Sie kann daher 10 mM überschreiten. Dieses Phänomen ist vergleichbar mit demjenigen, welches bei Personen auftritt, die eine tägliche Dosis von 300 mg Chloroquin pro Tag einnehmen. Nach einigen Tagen liegt die Plasmakonzentration bei etwa 0,7  $\mu\text{M}$ , die Gewebekonzentration ist 200 bis 700 Mal höher und liegt bei 140 bis 500  $\mu\text{M}$ . Im Inneren der Zellen können die Säurekompartimente Konzentrationen erreichen, die mehrere 10 Mal höher sind. Im übrigen ist bekannt, dass Chloroquin-Konzentrationen von 10 mM (Konzentration, die einige Stunden nach Verwendung einer anfänglichen Chloroquin-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  erreicht wird) die Dissoziation von DNA-Polylysin-Komplexen begünstigen.

Chloroquin in Verbindung mit DNA-Polylysin-Komplexen kann beim Gentransfer aufgrund seiner Toxizität und seiner raschen Verdünnung nach Injektion beim Individuum nur für Applikationen in vitro oder ex vivo verwendet werden. Tatsächlich werden in vivo zum Erreichen der obengenannten hohen Konzentrationen mehrere Tage benötigt. In vitro wurde gezeigt, dass in den mit Chloroquin vorbehandelten Zellen die Expression transferierter Gene sehr schwach war. Zudem ist die Transfektion sehr schwach, wenn das Chloroquin mehr als drei Stunden nach der Inkubation der Zellen in der Anwesenheit der Komplexe zugefügt wird. Aus diesen Gründen ist Chloroquin, welches in vitro ein sehr gutes Hilfsmittel darstellt, in vivo nicht effektiv.

b) Die fusiogenen Eigenschaften von defektiven Adenovirus-Partikeln in saurem Medium werden benutzt, um die Wanderung der DNA aus den Endozytosevesikeln in das Cytosol zu begünstigen. Die Adenoviren besitzen Fusionsproteine, die in leicht saurem Medium aktiv sind. Die defektiven Adenoviren können in freier Form oder an DNA-Polylysin-Komplexe fixiert verwendet werden.

Die Verwendung selbst defektiver viraler Partikel zieht jedoch Sicherheitsprobleme nach sich. Die Adenoviren führen zu einer sehr starken Immunantwort nach Injektion mit den Komplexen.

c) Permeabilisierende und/oder fusiogene Peptide in leicht saurem Medium werden als Hilfsmittel verwendet, um die Wanderung der DNA in das Cytosol zu begünstigen. Es handelt sich hauptsächlich um Peptide mit 20 Aminosäuren, die aus Fusionsproteinen von Viren stammen, wie beispielsweise das N-terminal Peptid der Untereinheit HA2 des Grippevirus-Hämagglutinins, oder um synthetische Peptide wie etwa GALA, ein Oligomer, das mehrere Wiederholungseinheiten Glu-Ala-Leu-Ala enthält. Diese Peptide werden mit den DNA-Polylysin-Komplexen meist in freier Form verwendet (d. h. nicht kovalent fixiert). Die Effizienz der Peptide ist in der Anwesenheit von Serum im Medium der Zellkultur stark eingeschränkt, was ihre Verwendung auf Versuche in vitro oder ex vitro begrenzt. Bestimmte Peptide, die kovalent an DNA-Polylysin-Komplexe fixiert sind, können die transmembrane Wanderung der DNA weiterhin begünstigen; andere verlieren ihre permeabilisierende Wirkung nach der Fixierung.

**[0015]** Zudem ist bekannt, dass es weitere Moleküle gibt, die in der Lage sind, Membranen zu destabilisieren und insbesondere Moleküle, die den Imidazolkern des Histidins ( $\text{pK} = 6,04$ ) enthalten, welcher durch Protonierung in leicht saurem Medium kationisch wird. Polyhistidin besitzt fusiogene und permeabilisierende Eigenschaften gegenüber Lipid-Doppelschichten. Bei  $\text{pH} < 6$  nimmt Polyhistidin eine  $\alpha$ -Helixstruktur an (Norland K. S. et al. (1963) Biopolymers [Biopolymere] 1: 277–278; Beychok S. et al. (1965) J. Amer. Chem. Soc. 87: 3990–3991). Es wurde gezeigt, dass Polyhistidin in leicht saurem Medium ein Polykation ist, welches negativ geladene Liposome aggregiert und ihre Fusion einleitet (Wang C.-Y. und Huang L. (1984) Polyhistidine mediates an aciddependent fusion of negatively charged liposomes [Polyhistidin führt zur säureabhängigen Fusion negativ geladener Liposomen]. Biochemistry 23: 4409–4416; Uster P. S. und Deamer D. W. (1985) pH-dependent fusion of liposomes using titrable polycations [Fusion von Liposomen in Abhängigkeit vom pH unter Ver-

wendung titrierbarer Polykationen]. Biochemistry 24: 8–14).

**[0016]** Es ist bekannt, dass ein synthetisches Polymer (Cetylacetyl(imidazol-4-ylmethyl)-polyethyleneimin) die Fusion von Liposomen bei einem leicht sauren pH einleitet (Oku N. et al.. (1987) Low pH induced membrane fusion of lipid vesicles containing proton-sensitive polymer [Durch niedrigen pH induzierte Membranfusion von Lipidvesikeln, die protosensitives Polymer enthalten]. Biochemistry 26: 8145–8150).

**[0017]** Es ist gleichfalls bekannt, dass ein neutrales wasserlösliches Polymer, das durch Histidyl-Reste (verwendet anstelle von Polyhistidin, welches in wässrigem Medium kaum löslich ist) substituiert ist, mit einem Polyanion wie Polyasparaginsäure nur in leicht saurem Medium interagiert und fähig ist, die Plasmamembran der Zellen im Test mittels Durchfluss-Zytometrie unter Verwendung von Ethidiumbromid als Marker zu permeabilisieren (Midoux et al., 1995).

**[0018]** Vorläufige Resultate haben gezeigt, dass Polyhistidin (kaum löslich in wässrigem Medium bei neutralem pH) zur Transfektion von Zellen nicht verwendet werden kann, denn da es kein Polykation bei neutralem pH ist, ist es nicht in der Lage, mit der DNA stabile Komplexe zu bilden, die eine ausreichende Löslichkeit besitzen, um bei neutralem pH verwendet zu werden, insbesondere bei pH 7,4, dem pH von Plasma.

**[0019]** Die europäische Patentanmeldung EP/0941/123, die unter der Nummer WO98/19710 am 14. Mai 1998 veröffentlicht wurde und die Priorität von GB/97 02 965 vom 6. November 1996 beansprucht, sollte lediglich unter dem Aspekt der Neuheit berücksichtigt werden. Sie behandelt die Bildung eines Komplexes aus DNA und einem modifizierten Polyamin, genauer Polylysin, auf den ein Polyethylenglycol-Molekül gefropft ist mittels einer Disulfid-Bindung, die durch Reaktion mit 3-(2-Pyridyldithio)N-Succinimidyl-Propionsäure eingeleitet wurde. Dieses Dokument beschreibt außerdem die Verwendung dieser Komplexe in der Therapie.

**[0020]** Diese Komplexe, die verwendet wurden, um den Transfer von DNA in Zielzellen zu ermöglichen, enthalten jedoch keine Reste, welche die Destabilisierung von Zellmembranen in schwach saurem Medium verursachen.

**[0021]** Das Dokument "Carrier design Biopolymers", vol. 33, 873–885 (1993) von Mezö et al. betrifft Untersuchungen zur Konformation von Poly(L-Lysin), das durch Aminosäuren und Oligopeptide substituiert ist.

**[0022]** Dieses Dokument behandelt jedoch nicht die Probleme der Destabilisierung von Zellmembranen in leicht saurem Medium zur Ermöglichung des DNA-Transfers in Zielzellen.

**[0023]** Die neuartigen Komplexe aus Nukleinsäure und substituiertem Polymer ermöglichen die Transfektion mehrerer Zelltypen.

**[0024]** Ein neuartiger Typ von kationischem Polymer enthält außer den positiven Ladungen des Polymers Substituenten, welche die transmembrane Wanderung der transportierten Nukleinsäure begünstigen und gegebenenfalls Substituenten, die als Erkennungssignale fungieren. Die Substituenten, welche die transmembrane Wanderung begünstigen, sind an das Polymer fixiert und bestehen aus Derivaten, die in leicht alkalischem Medium nicht kationisch sind, aber es in neutralem und in saurem Medium werden.

**[0025]** Die neuen Komplexe zwischen Nukleinsäure und substituiertem Polymer sind dazu in der Lage, die transmembrane Wanderung der DNA nach Endozytose der zu Komplexe begünstigen. Die neuen Komplexe aus Nukleinsäure und substituiertem Polymer weisen keine Erkennungssignale auf, die durch Membranrezeptoren an der Oberfläche von Zellen erkannt werden.

**[0026]** Die neuen Komplexe zwischen Nukleinsäure und substituiertem Polymer weisen zudem Erkennungssignale auf, die von Membranrezeptoren an der Oberfläche von Zellen erkannt werden und eine selektive Transfektion in Bezug auf verschiedene Zelltypen ermöglichen.

**[0027]** Ein Verfahren zur spezifischen Transfektion in vitro und in vivo wird beschrieben.

**[0028]** Die neuen Konjugate aus substituiertem Polylysin weisen keine Erkennungssignale auf, die von Membranrezeptoren an der Oberfläche von Zellen erkannt werden und die zwecks Transfektion einer Zelle mit einer Nukleinsäure komplexiert werden können.

**[0029]** Die neuen Polylysin-Konjugate weisen zudem Erkennungssignale auf, die von Membranrezeptoren an

der Oberfläche von Zellen erkannt werden und zwecks selektiver Transfektion einer Zelle mit einer Nukleinsäure komplexiert werden können.

**[0030]** Der Reiz der Erfindung besteht darin, dass diese neuen Komplexe aus Nukleinsäure und Polymer die Transfektion der Zellen in der Abwesenheit von transmembranen Transporthilfen (Chloroquin oder permeabilisierende und/oder fusiogene Peptide) ermöglicht. Es sind hier die schwach basischen Gruppen, die in leicht saurem Milieu protonierbar (Kation) und an das Polymer fixiert sind, welche die Rolle der transmembranen Transporthilfen übernehmen.

**[0031]** Der Vorteil der Erfindung besteht weiter darin, dass diese neuen Komplexe aus Nukleinsäure und substituiertem Polymer ohne transmembrane Transporthilfen genauso effizient oder effizienter sind als die Komplexe aus Nukleinsäure und unsubstituiertem Polymer, das nicht oder durch Agenzien substituiert ist, welche die Anzahl der Polymer-Ladungen (daher seine Interaktion mit der Nukleinsäure) in der Anwesenheit von transmembranen Transporthilfen reduziert.

**[0032]** Im Fall von Chloroquin und permeabilisierenden und/oder fusiogenen Peptiden handelt es sich bei letzteren um kleine Moleküle, die schnell diffundieren, wenn sie nicht kovalent an die Komplexe aus Nukleinsäure und substituiertem Polymer gebunden sind.

**[0033]** Der Vorzug der Erfindung besteht auch darin, dass diese neuen Komplexe aus Nukleinsäure und substituiertem Polymer zur Transfektion von Zellen in der Anwesenheit von Serum genauso effizient (oder sogar effizienter) sind als in der Abwesenheit von Serum.

**[0034]** Die Erfindung betrifft einen Komplex zwischen mindestens einer Nukleinsäure (negative Ladung) und mindestens einem positiv geladenen Polymerkonjugat, wobei die Bindung zwischen der Nukleinsäure und dem Polymerkonjugat elektrostatischer Natur ist, das Polymerkonjugat ein Polymer ist, das durch Monomereinheiten gebildet ist, die freie  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen tragen und so ausgestaltet ist, dass:

- die freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der vorher erwähnten Monomereinheiten in einem Anteil von mindestens 10% durch Reste substituiert sind, die in einem Medium, dessen pH geringer ist als der des Plasmas oder des Serums, protonierbar sind, wobei die erwähnten Reste in einem Medium, dessen pH geringer als der des Plasmas oder des Serums ist, eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen, insbesondere der Membran der Endozytosevesikel und/oder der Endosomen,
- wobei die vorher erwähnten Reste unter anderem die folgenden Eigenschaften besitzen:
- sie enthalten eine funktionelle Gruppe, die es ihnen erlaubt, an die vorher erwähnten Polymere fixiert zu sein,
- sie sind nicht als ein Erkennungssignal aktiv, welches durch einen zellulären Membranrezeptor erkannt wurde,
- sie gehören zu der Familie von Verbindungen, die einen Imidazolkern enthalten,
- sie gehören zu der Familie der Chinoline,
- sie gehören zu der Familie der Pterine,
- sie gehören zu der Familie der Pyridine,

unter der Voraussetzung, dass die Gesamtheit der freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen mindestens 30% der Anzahl der Monomereinheiten des Polymerskeletts des vorher erwähnten Polymerkonjugats beträgt, und unter der Voraussetzung, dass das Polymerkonjugat unterschiedlich zu dem Polylysin-(dithiopyridyl)propionat-Konjugat ist.

**[0035]** In einer Ausgestaltung sind die Komplexe der Erfindung so beschaffen, dass die protonierbaren Reste in einem Medium, dessen pH geringer als der des Plasmas oder des Serums ist, mindestens eine freie  $\text{NH}_3^+$ -Funktion beinhalten.

**[0036]** In einer anderen Ausgestaltung sind die Komplexe der Erfindung so beschaffen, dass die Moleküle, die ein Erkennungssignal bilden, das durch einen zellulären Membranrezeptor erkannt wird, wie folgt vorhanden sind:

- entweder durch Substitution bestimmter freier  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der Monomereinheiten,
- oder durch bestimmte Reste, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen,
- oder durch Substitution der freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der Reste, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen.

**[0037]** In einer anderen Ausgestaltung sind die Komplexe der Erfindung so beschaffen, dass die freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der Monomereinheiten in einem Verhältnis von ungefähr 15% bis ungefähr 45% substituiert

sind.

**[0038]** Unter Destabilisierung von Membranen wird eine Modifizierung der Membran verstanden, die entweder zu einer Erhöhung ihrer Permeabilität gegenüber Molekülen der Lösung mit kleiner und möglicherweise großer Molekülmasse (einschließlich Nukleinsäuren, Plasmide oder Komplexe) oder zur Fusion mit einer anderen Membran führen.

**[0039]** Die Permeabilität der Membran kann durch Fluoreszenzmikroskopie nach folgender Methode gemessen werden:

**[0040]** Die anhaftenden Zellen werden bei 37°C für 15 bis 30 Minuten inkubiert mit 0,5 ml DMEM-Kulturmedium mit Serum, das 5 mg/ml Dextran (Mw 4.000) enthält, welches mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC-Dextran) und einem Komplex aus DNA und histidylisiertem Polylysin markiert ist. Anschließend werden die Zellen gewaschen und 15 bis 30 Minuten lang bei 37°C mit einem Kulturmedium inkubiert, welches 10% fötales Rinderserum enthält. Danach werden die Zellen für 5 Minuten in einer phosphatgepufferte Salzlösung fixiert, die 4% p-Formaldehyd enthält, und die Fluoreszenz wird mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (MRC600 BioRad) analysiert. Bei nicht vorhandener Permeabilität der Membran wird die vom FITC-Dextran stammende Fluoreszenz ausschließlich in Vesikeln lokalisiert. In der Anwesenheit eines Agens zur Permeabilisierung der Membran wird beobachtet, dass die vom FITC-Dextran stammende Fluoreszenz unter anderem im Cytosol und im Kern der Zellen diffundiert.

**[0041]** Die Fusion von Membranen in der Anwesenheit von Komplexen aus DNA und histidylisiertem Polylysin ist leicht in Modellsystemen wie etwa Liposomen zu messen unter Verwendung einer Methode der Lipidmischung, wie sie in Struck D. K. et al. (Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion [Resonanzenergietransfer zur Überwachung der Membranfusion]. (1981) Biochemistry 20: 4093–4099) beschrieben wurde. Kurzgefasst werden Liposome verwendet, die aus Dioleoyl-Phosphatidylcholin (DPOC) bestehen und in deren Membran N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Phosphatidylethanolamin (NBD-PE) und Octadecylrhodamin (R18) als fluoreszenter Marker inseriert wurde, sowie Liposomen ohne fluoreszente Marker. Die Fluoreszenz des NBD ( $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ ) wird in Abwesenheit und Anwesenheit von Komplexen aus DNA und histidylisiertem Polylysin bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Die Fusion der Liposome führt zu einer Verringerung der Fluoreszenz des NBD infolge einer Verringerung des Energietransfers zwischen dem Rhodamin und dem NBD.

**[0042]** Diese neuen Komplexe aus Nukleinsäure und substituiertem Polymer, die schwach basische Gruppen enthalten und in leicht saurem Medium in der Anwesenheit von Serum protonierbar (Kation) sind, eignen sich somit besser für einen Gentransfer in vivo als DNA-Polylysin-Komplexe oder Komplexe aus DNA und glucosyliertem Polylysin, die nur in Anwesenheit von Hilfsmitteln wie etwa Chloroquin oder fusiogenen und/oder permeabilisierenden Peptiden aktiv sind.

**[0043]** Die Reste führen dank ihrer Eigenschaft, in saurem Medium protonierbar zu sein, zur Destabilisierung der Zellmembranen.

**[0044]** Die Reste, die zur Destabilisierung der Zellmembranen führen, sind Protonenfänger, welche die Azidifizierung der Endosomen beschränken und als Folge davon die Fusion zwischen den späten Endosomen und den Liposomen behindern. Es sei daran erinnert, dass es sich bei Lysosomen um Vesikel handelt, die eine große Anzahl von Hydrolasen enthalten, und dass diese Lysosome sehr effizient in der Degradation von biologischen Makromolekülen im allgemeinen und Nukleinsäuren im besonderen sind.

**[0045]** Der Begriff „schwach saures Medium“ bezeichnet ein Medium, dessen pH geringer ist als der des Plasmas oder Serums, beispielsweise ein pH unter 7,4.

**[0046]** Die Beschreibung, der zufolge die Reste „nicht als ein durch einen zellulären Membranrezeptor erkanntes Erkennungssignal aktiv sind“ bedeutet, dass einerseits bis heute keine Rezeptoren bekannt sind, die spezifisch für diese Reste sind und dass andererseits diese Reste nicht als Liganden verwendet werden.

**[0047]** Ein Molekül oder Molekülkomplex ist als Erkennungssignal aktiv, wenn es bzw. er selektiv durch einen Rezeptor erkannt werden kann, also die Rolle eines Liganden, Agonisten oder Antagonisten hat.

**[0048]** Als Erkennungssignal, das durch einen zellulären Membranrezeptor erkannt wird, wird im allgemeinen ein Ligand (Molekül oder Molekülkomplex) bezeichnet, der von dem erwähnten Rezeptor selektiv erkannt wer-

den kann (Affinität Ligand-Rezeptor  $\geq 10^3$  l/mol).

**[0049]** Die Erfindung betrifft insbesondere einen Komplex zwischen mindestens einer (negativ geladenen) Nukleinsäure und mindestens einem positiv geladenen Polymerkonjugat, wobei die Bindung zwischen der Nukleinsäure und dem Polymerkonjugat elektrostatischer Natur ist, das Polymerkonjugat ein Polymer ist, das durch Monomereinheiten gebildet ist, die freie  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen tragen und so beschaffen ist, dass:

- die freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der vorher erwähnten Monomereinheiten in einem Anteil von mindestens 10%, vorteilhaft von ungefähr 15% bis ungefähr 45%, insbesondere von 35%, wobei dieser Anteil beispielsweise durch nukleare Magnetresonanz bestimmt wird, durch Reste substituiert sind, die in einem schwach sauren Medium protonierbar sind und die in einem schwach sauren Medium eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen, insbesondere der Membran der Endozytosevesikel und/oder der Endosomen,
- wobei die vorher erwähnten Reste unter anderem die folgenden Eigenschaften besitzen:
- sie sind Basen, deren pK in einem wässrigen Medium niedriger als 8 ist, so dass ein größerer Anteil als 50% dieser Basen, der an ein kationisches Polymer gebunden ist, in einem neutralen Medium von pH 7,4 nicht protoniert wird,
- sie enthalten eine funktionelle Gruppe, die es ihnen erlaubt, an die vorher erwähnten Polymere fixiert zu sein, sie sind nicht als ein Erkennungssignal aktiv, welches durch einen zellulären Membranrezeptor erkannt wurde,
- sie können mindestens eine freie  $\text{NH}_3^+$ -Funktion enthalten,
- sie gehören zu der Familie von Verbindungen, die einen Imidazolkern enthalten,
- sie gehören zu der Familie der Chinoline,
- sie gehören zu der Familie der Pterine,
- sie gehören zu der Familie der Pyridine,
- die freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der vorher erwähnten Monomereinheiten können gleichermaßen durch Reste ohne Ladung substituiert werden, die zu einer Reduzierung der positiven Ladungen in Bezug zum gleichen unsubstituierten Polymer-Konjugat führen und die Aussalzung der Nukleinsäure während der Dissoziation des Komplexes erleichtern,
- wobei die vorher erwähnten Reste ohne Ladung unter anderem die folgenden Eigenschaften besitzen:
- sie enthalten mindestens eine Hydroxylgruppe,
- sie sind nicht als ein Erkennungssignal aktiv, welches durch einen zellulären Membranrezeptor erkannt wurde,
- wobei die Moleküle, welche ein Erkennungssignal bilden, das durch einen zellulären Membranrezeptor erkannt wird, wie folgt vorhanden sind:
- entweder durch Substitution bestimmter freier  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der vorher genannten Monomereinheiten (beispielsweise  $\epsilon\text{-NH}_3^+$  von Lysin),
- oder auf bestimmten der genannten Reste ohne Ladung, die zu einer Reduzierung der Ladung führen (beispielsweise Gluconyl), und insbesondere auf den Hydroxylgruppen der genannten Reste ohne Ladung, die zu einer Reduzierung der Ladung führen,
- oder auf bestimmten der genannten Reste, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen (beispielsweise Acetylimidazol),
- oder durch Substitution der optionalen freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion der vorher genannten Reste, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen (beispielsweise Histidin),

unter der Voraussetzung, dass die Gesamtheit der freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen mindestens 30% der Anzahl der Monomereinheiten des Polymerskeletts des vorher erwähnten Polymerkonjugats beträgt.

**[0050]** Die Erfindung betrifft gleichfalls einen Komplex zwischen mindestens einer (negativ geladenen) Nukleinsäure und mindestens einem positiv geladenen Polymerkonjugat, wobei die Bindung zwischen der Nukleinsäure und dem Polymerkonjugat elektrostatischer Natur ist, das Polymerkonjugat ein Polymer ist, das durch Monomereinheiten gebildet ist, die freie  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen tragen und so ist, dass:

- die freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der vorher erwähnten Monomereinheiten in einem Anteil von mindestens 10%, vorteilhaft von ungefähr 15% bis ungefähr 45%, insbesondere von 35%, wobei dieser Anteil beispielsweise durch nukleare Magnetresonanz bestimmt wird, durch die Reste substituiert sind, die in einem schwach sauren Medium protonierbar sind und die in einem schwach sauren Medium eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen, insbesondere der Membran der Endozytosevesikel,
- wobei die vorher erwähnten Reste zudem die folgenden Eigenschaften besitzen:
- sie gehören zu der Familie von Verbindungen, die einen Imidazolkern enthalten,
- sie gehören zu der Familie der Chinoline,
- sie gehören zu der Familie der Pterine,
- sie gehören zu der Familie der Pyridine,

- sie einhalten eine funktionelle Gruppe, die es ihnen erlaubt, an die vorher erwähnten Polymere fixiert zu sein,
- sie können mindestens eine freie  $\text{NH}_3^+$ -Funktion enthalten,
- sie sind nicht als Erkennungssignal aktiv, welches durch einen zellulären Membranrezeptor erkannt wurde
- wobei die freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der vorher erwähnten Monomereinheiten ebenso durch mindestens ein Molekül substituiert sein können, das ein Erkennungssignal bildet, welches durch einen zellulären Membranrezeptor erkannt wird, und/oder durch Reste ohne Ladung, die zu einer Reduzierung der positiven Ladungen im Vergleich zum gleichen unsubstituierten Polymerkonjugat führen und die Aussalzung der Nukleinsäure während der Dissoziation des Komplexes erleichtern, unter der Voraussetzung, dass die Gesamtheit der vorher genannten Reste mindestens 30% der freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion enthält,
- wobei die freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der vorher genannten Monomereinheiten ebenso durch mindestens ein Molekül substituiert sein können, das ein Erkennungssignal bildet, welches durch einen zellulären Membranrezeptor erkannt wird, und/oder durch Reste ohne Ladung, die zu einer Reduzierung der positiven Ladungen im Vergleich zum gleichen nicht-substituierten Polymerkonjugat führen und die Aussalzung der Nukleinsäure während der Dissoziation des Komplexes erleichtern,
- wobei die vorher genannten Reste ohne Ladung unter anderem die folgenden Eigenschaften besitzen:
- sie enthalten mindestens eine Hydroxylgruppe,
- sie sind nicht als Erkennungssignal aktiv, welches durch einen zellulären Membranrezeptor erkannt wurde
- wobei die Moleküle, die ein Erkennungssignal bilden, welches durch einen zellulären Membranrezeptor erkannt wird, optional wie folgt vorhanden sind:
- entweder durch Substitution bestimmter freier  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der vorher genannten Monomereinheiten (beispielsweise  $\epsilon\text{-NH}_3^+$  von Lysin),
- oder auf bestimmten der vorher genannten Reste ohne Ladung, die zu einer Reduzierung der Ladung führen (beispielsweise Gluconyl), und insbesondere auf den Hydroxylgruppen der vorher genannten Reste ohne Ladung, die zu einer Reduzierung der Ladung führen,
- oder auf bestimmten der genannten Reste, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen (beispielsweise Acetylimidazol),
- oder durch Substitution der optionalen freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion der vorher genannten Reste, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen (beispielsweise Histidin),

**[0051]** unter der Voraussetzung, dass die Gesamtheit der freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen mindestens 30% der Anzahl der Monomereinheiten des Polymerskeletts des vorher genannten Polymerkonjugats beträgt.

**[0052]** Die Erkennungssignale können ebenso zu einer Reduzierung der positiven Ladungen des Polymerkonjugats führen, wenn sie selbst neutral oder sauer sind und durch Substitution einer  $\text{NH}_3^+$ -Funktion, die zum Verlust der + Ladung führt, am Polymer fixiert sind.

**[0053]** Die Erkennungssignale sind Moleküle mit kleiner Molekülmasse ( $< 5.000$  Daltons).

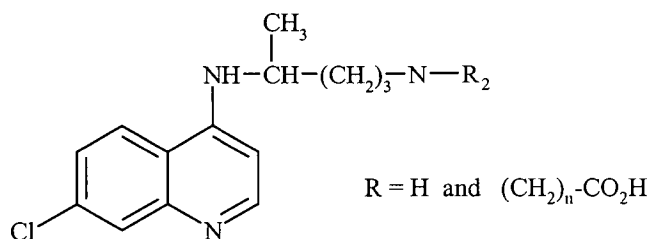
**[0054]** Die Anzahl der Moleküle des Erkennungssignals, welches an das modifizierte Polymer fixiert ist, kann:

- bei einem Signalmolekül mit sehr hoher Affinität gegenüber seinem Rezeptor ( $K_a > 10^7$  l/Mol), ungefähr 0,5 bis 5 betragen, vorteilhaft 1 Molekül für ungefähr 10.000 Monomereinheiten des substituierten Polymers oder 1 Molekül für ungefähr 50 Moleküle des substituierten Polymers;
- bei einem Signalmolekül mit hoher Affinität gegenüber seinem Rezeptor ( $K_a$  zwischen  $10^5$  l/Mol und  $10^7$  l/Mol), ungefähr 0,5 bis 10 betragen, vorteilhaft 1 Molekül für ungefähr 200 Monomereinheiten des substituierten Polymers oder 1 Molekül für ungefähr 1 Molekül des substituierten Polymers;
- bei einem Signalmolekül mit mittlerer Affinität gegenüber seinem Rezeptor ( $K_a < 10^5$  l/Mol), ungefähr 10 bis 100 betragen, vorteilhaft 50 Moleküle für ungefähr 200

**[0055]** Monomereinheiten des substituierten Polymers oder 50 Moleküle für ungefähr 1 Molekül des substituierten Polymers.

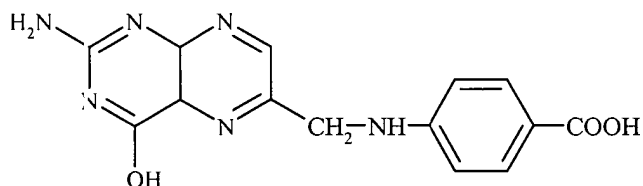
**[0056]** Die Familie der Chinoline wird durch die folgende Formel dargestellt:





[Übersetzung der letzten Formelzeile:]  $R = H$  und  $(CH_2)_n-CO_2H$   
wobei  $n$  gleich 1 bis 10 ist, vorzugsweise 1 bis 3.

**[0057]** Die Familie der Pterine wird durch die folgende Formel dargestellt:

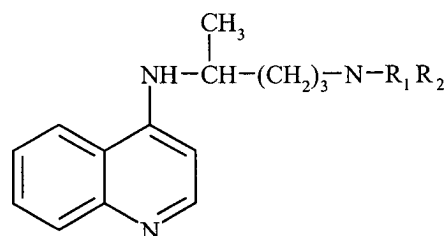


**[0058]** Die Familie der Pyridine wird durch die folgenden Formeln dargestellt:



**[0059]** Die Erfindung betrifft gleichfalls einen Komplex, in welchem die Reste, die in einem schwach sauren Medium zu einer Destabilisierung der Zellmembranen führen, sich wie folgt zusammensetzen:

- aus Alkylimidazolen, in denen das Alkyl-Radikal 1 bis 10, insbesondere 2 bis 6 Kohlenstoff-Atome enthält und in denen nur eines der Stickstoff-Atome des Imidazolkerns substituiert ist,
- oder aus Chinolinen der Formel:



wobei  $R_1$  für  $H$  steht und  $R_2$  für  $(CH_2)_n-CO_2H$ ; dabei ist  $n$  eine ganze Zahl zwischen 1 und 10, und vorzugsweise zwischen 1 und 3.

**[0060]** Die Erfindung betrifft gleichfalls einen Komplex, in welchem die Reste, die eine Destabilisierung der Zellmembranen herbeiführen, ausgewählt werden aus: Histidin, 4-Carboxymethyl-imidazol, 3-(1-Methyl-imidazol-4-yl)-alanin, 3-(3-Methyl-imidazol-4-yl)-alanin, 2-Carboxy-imidazol, Histamin, 3-(Imidazol-4-yl)-L-Milchsäure, 2-(1-Methyl-imidazol-4-yl)ethylamin, 2-(3-Methyl-imidazol-4-yl)ethylamin,  $\beta$ -Alanyl-histidin-(carnosin), 7-Chlor-4(amino-1-methylbutylamin)-chinolin,  $N^4$ -(7-Chlor-4-chinolinyl)-1,4-pentanediamin, 8-(4-Amino-1-methylbutylamin)-6-methoxychinolin (Primachin),  $N^4$ -(6-Methoxy-8-Chinolinyl)-1,4-pentandiamin, Chininsäure, Chinolincarbonsäure, Pteroinsäure, Nikotinsäure, Chinolinsäure, und in welchem

- die optionale  $NH_3^+$ -Funktion frei von den vorher genannten Resten (beispielsweise Histidin) auch durch ein Molekül substituiert werden kann, das ein durch einen zellulären Membranrezeptor erkanntes Erkennungssignal bildet,

unter der Voraussetzung, dass die Gesamtheit der freien  $NH_3^+$ -Funktionen mindestens 30% der Anzahl der Monomereinheiten des Polymerskeletts des vorher genannten Polymerkonjugats beträgt.

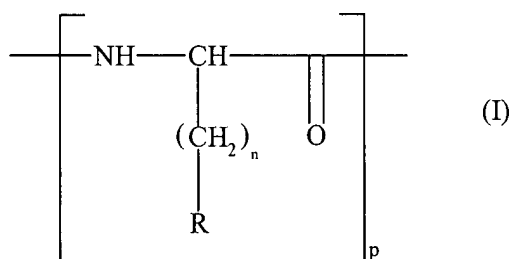
**[0061]** Die Erfindung betrifft einen Komplex zwischen mindestens einer (negativ geladenen) Nukleinsäure und mindestens einem positiv geladenen Polymerkonjugat, wobei die Bindung zwischen der Nukleinsäure und

dem Polymerkonjugat elektrostatischer Natur ist, das Polymerkonjugat ein Polymer ist, das durch Monomereinheiten gebildet ist, die freie  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen tragen, insbesondere Lysin- oder Ornithin-Reste, und so ist, dass:

- die freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der vorher erwähnten Monomereinheiten in einem Anteil von mindestens 10%, vorteilhaft von ungefähr 15% bis ungefähr 45%, insbesondere von 35%, durch Reste substituiert sind, die in einem schwach sauren Medium eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen,
- wobei die vorher genannten Reste zudem die folgenden Eigenschaften besitzen:
- sie enthalten einen Imidazolkern,
- sie können mindestens eine freie  $\text{NH}_3^+$ -Funktion enthalten,
- sie sind nicht als Erkennungssignal aktiv,
- wobei die verbleibenden freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der vorher erwähnten Monomereinheiten gleichmäßig entsprechend zu etwa 1% bis etwa 60% auf ein Molekül substituiert sind, welches ein durch einen zellulären Membranrezeptor erkanntes Erkennungssignal bildet, wobei dieses Erkennungssignal eine Molekülmasse unter 5000 hat und wobei dieses Erkennungssignal in einer Menge von einem Molekül für ungefähr 200 Polymerkonjugate oder in einer Menge von 60 Molekülen für ungefähr 200 Polymerkonjugate vorhanden sein kann, unter der Voraussetzung, dass die Gesamtheit der freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen mindestens 30% der Anzahl der Monomereinheiten des Polymerskeletts des vorher genannten Polymerkonjugats beträgt.

**[0062]** Der Ausdruck „nicht als Erkennungssignal aktiv“ bedeutet, dass einerseits bis heute keine Rezeptoren bekannt sind, die für diese Reste spezifisch sind und dass andererseits diese Reste nicht als Liganden verwendet werden.

**[0063]** Die Erfindung betrifft gleichfalls einen Komplex, in welchem das Polymer eine polymere Gruppe mit folgender Formel (I) enthält:



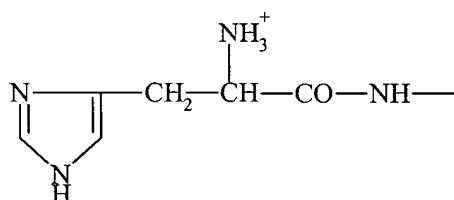
in welcher:

**[0064]** – p eine ganze Zahl zwischen 15 und 900, vorzugsweise zwischen 100 und 300 ist,

**[0065]** – n eine ganze Zahl zwischen 1 und 6, und vorzugsweise gleich 4 ist,

**[0066]** – die polymere Gruppe Radikale R enthält, unter denen:

**[0067]** – 10% bis 45% der Anzahl der Radikale R einen Rest darstellen, der einen Imidazolkern und optional eine freie  $\text{NH}_3^+$ -Funktion umfasst, insbesondere einen Histidyl-Rest, wobei R durch folgende Formel dargestellt werden kann:



wobei die optionale  $\text{NH}_3^+$ -Funktion der vorher genannten Reste auch durch ein Molekül substituiert werden kann, welches ein Erkennungssignal bildet,

**[0068]** – wobei 10% bis 90% der Anzahl der Radikale R freie  $\omega$ -amino  $\text{NH}_3^+$  darstellen und optional zu 0 bis 50% durch ein Molekül substituiert sind, welches ein Erkennungssignal bildet, insbesondere in einer Menge von 0 bis 60, vorteilhaft 1 Molekül für ungefähr 200 Einheiten, oder in einer Menge 2 bis 100, vorteilhaft 50 Molekülen für ungefähr 200 Einheiten, und/oder

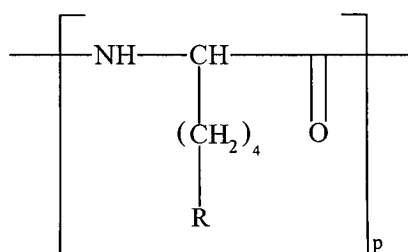
**[0069]** – wobei R unter anderem zu 0 bis 45% aus einer Gruppe  $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$  gebildet werden kann, insbesondere aus einem Rest Dihydroxypropionylamid, Erythrionylamid, Threonylamid, Ribonylamid, Arabinylamid, Xylonylamid, Lyxonylamid, Gluconylamid, Galactonylamid, Mannonylamid, Glycoheptonylamid oder Glycooctonylamid; m ist eine ganze Zahl von 2 bis 15, vorzugsweise von 2 bis 7,  $\text{R}_1$  stellt H dar oder ein Alkyl-Radikal mit 1 bis 15 Kohlenstoff-Atomen, insbesondere  $\text{CH}_3$ , wobei diese Radikale durch ein Molekül substituiert werden können, welches ein Erkennungssignal bildet, unter der Voraussetzung, dass die Gesamtheit der freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen mindestens 30% der Anzahl der Monomereinheiten des Polymerskeletts des vorher erwähnten Polymerkonjugats ist.

**[0070]** In dieser Klasse von Komplexen der Erfindung besteht das Polymer aus Polylysin oder Polyornithin.

**[0071]** Wie die Beispiele zeigen, erfolgt eine effiziente Transfektion der HepG2-Zellen (menschliches Leberkarzinom) durch Polylysin, das durch 70 Histidyl-Reste substituiert ist.

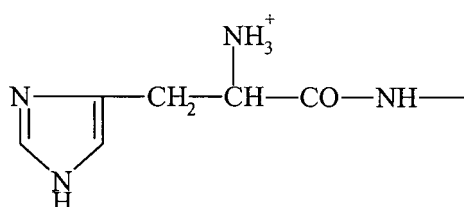
**[0072]** Polylysin, das durch  $30 \pm 10\%$  Histidin substituiert wurde, hat eine hocheffiziente Transfektion verschiedener Zellen (vom Menschen und von Mäusen) ermöglicht, wobei es nach dem Zelltyp und dem verwendeten Promotor moduliert wurde.

**[0073]** Gegenstand der Erfindung ist gleichfalls ein Komplex, in welchem das Polymer eine polymerische Gruppe der folgenden Formel (II) enthält:



in welcher:

- p die oben angegebenen Bedeutungen hat,
- 10% bis 45% der Anzahl der Radikale R einen Rest darstellen, der einen Imidazolkern enthält und optional eine freie  $\text{NH}_3^+$ -Funktion, insbesondere einen Histidyl-Rest, wobei R durch folgende Formel dargestellt werden kann:



wobei die  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der vorher genannten Reste auch durch ein Molekül substituiert werden können, welches ein Erkennungssignal darstellt,

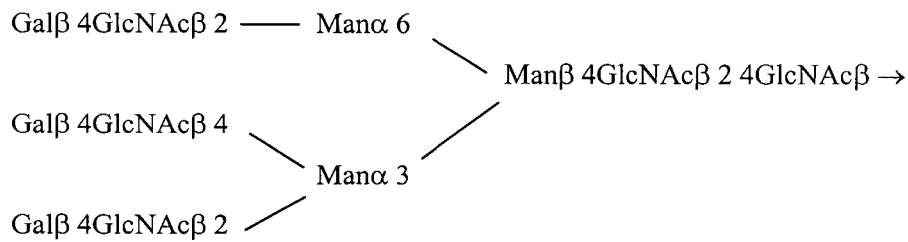
- wobei die verbleibenden Radikale, das heißt 30% bis 90% der Anzahl der Radikale R,  $\omega$ -amino  $\text{NH}_3^+$  darstellen und 0 bis 45% der Radikale R durch ein Molekül substituiert werden können, welches ein durch einen zellulären Membranrezeptor erkanntes Erkennungssignal bildet,

unter der Voraussetzung, dass die Gesamtheit der freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen mindestens 30% der Anzahl der Monomereinheiten des Polymerskeletts des vorher erwähnten Polymerkonjugats ist.

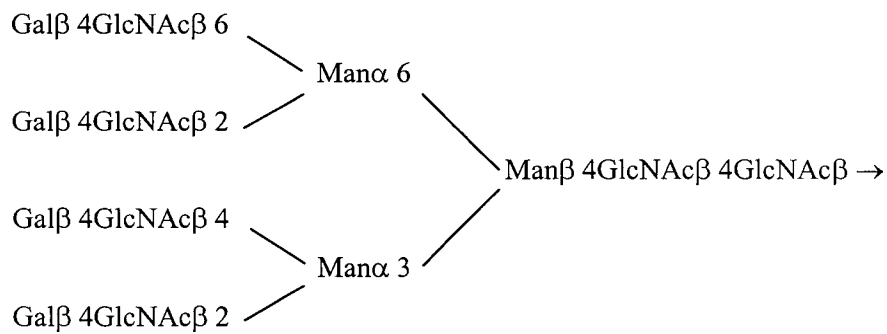
**[0074]** Gegenstand der Erfindung ist gleichfalls ein Komplex, der dadurch gekennzeichnet ist, dass das Erkennungssignal ausgewählt wird aus:

- A) – einfachen oder komplexen Osiden, welche durch die Membranlektine erkannt werden und ausgewählt werden aus:

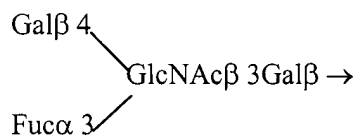
a. Asialooligosid des Triantennenlactosamin-Typs: Asialoglykoprotein-Rezeptor



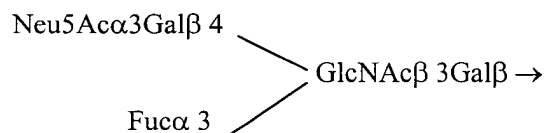
b. Asialooligosid des Tetraantennenlactosamin-Typs: Asialoglykoprotein-Rezeptor



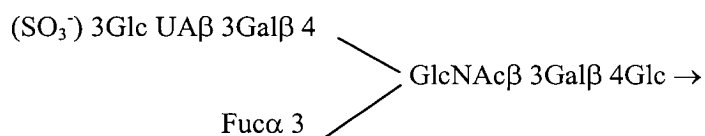
c. Lewis x:



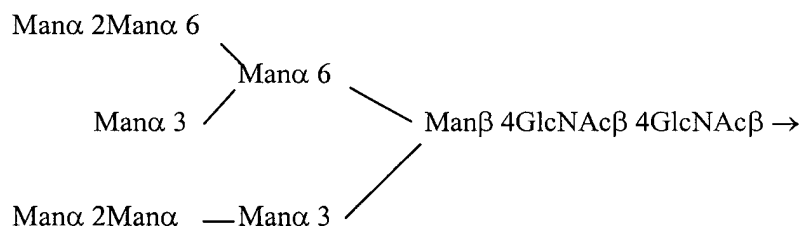
d. Lewis x Sialyl: LECAM 3/2



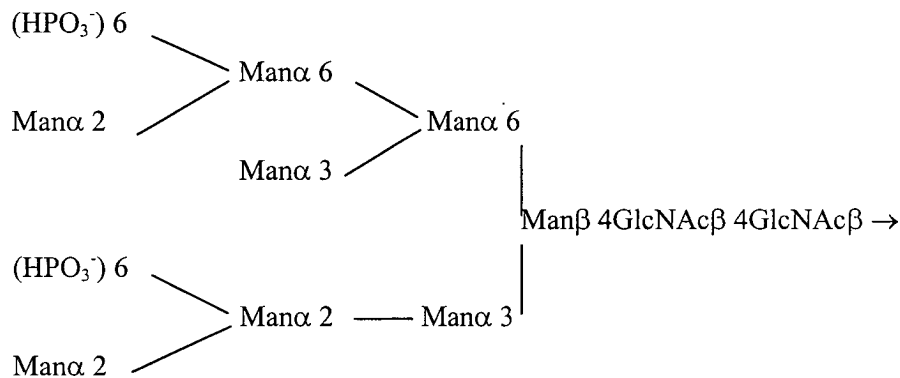
e. Derivate des Lewis-x-Sulfats (HNK1)



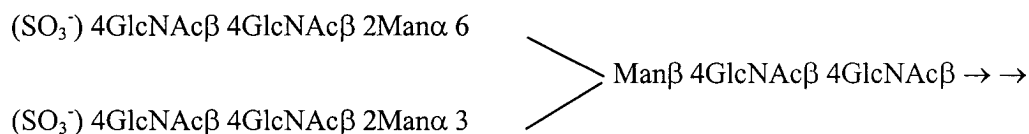
f. Oligomannosid: Mannose-Rezeptor



## g. Phosphoryliertes Oligomannosid: Mannose 6-Phosphat-Rezeptor



## h. Oligosaccharid vom sulfatierten Lactosamin-Typ: Rezeptor des sulfatierten GalNAc 4



## B) Peptide

a. Anti-inflammatorische Peptide oder bestimmte ihrer Fragmente, die durch die Rezeptoren der Gefäßwand erkannt werden, wie etwa

– vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP)  
 $\text{HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH}_2$

– atriales natriuretisches Polypeptid (ANP)  
 $\text{SLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLGCSFRY}$

– Lipocortin  
 $\text{HDMNKVLDL}$

– Bradykinin  
 $\text{RPPGFSPFR}$ ;

b. Ligandpeptide der Integrine, wie etwa Peptide, welche die Sequenz RGD enthalten, Fibronectin-Ligand;

c. Chemotaktische Faktoren, wie etwa Formylpeptide und ihre Antagonisten: FMLP, (N-formyl-Met-Leu-Phe);

d. Peptidhormone, wie etwa  
 $\alpha\text{-MSH}$ :  $\text{Ac-SYSMEHFRWGKPV-NH}_2$  und ihre Antagonisten.

## C) Natürliche Metabolite, wie etwa:

– Biotin,

– Carnitin,

– Tetrahydrofolate und Folsäure, welche sowohl ein Erkennungssignal sein können in Bezug auf besondere Zellen, die passende Rezeptoren haben, als auch ein Destabilisator von Zellmembranen.

**[0075]** Die Erfindung betrifft gleichfalls einen Komplex, der dadurch gekennzeichnet ist, dass die Nukleinsäure ausgewählt werden kann aus:

## a) Markergenen, wie etwa

- Gene, die Luciferase enthalten,
- grünes Protein der Meduse *Aequorea victoria*,
- Gene, die  $\beta$ -Galactosidase enthalten,
- Gene, die Chloramphenicolacetyltransferase enthalten,
- Gene, die eine Resistenz gegen Antibiotika wie Hygromycin, Neomycin usw. vermitteln;

## b) therapeutischen Zielgenen, wie etwa

- Rezeptoren von Lipoproteinen geringer Dichte, die im Fall der Hypercholesterolemie defekt sind,
- Gerinnungsfaktoren: Faktoren VIII und IX,
- Phenylalanin-Hydroxylase (Phenylketonurie),
- Adenosindesaminase (Immundefizienz ADA),
- Lysosomenzyme, wie die  $\beta$ -Glucosidase im Fall der Gaucher-Krankheit,
- Dystrophin und Minidystrophin (Myopathie),
- Tyrosinhydroxylase (Parkinson),
- Kreuzfaktoren der Neuronen (Alzheimer),

- CFTR zystisch fibrotischer Transmembranleitfähigkeitsregulator (Mukoviszidose),
- Alpha 1-Antitrypsin,
- Zytokine (Interleukine, TNF Tumornekrosefaktor),
- Thymidinkinase des Herpes-simplex-Virus,
- Proteine des MHC, Haupthistokompatibilitätssystems, insbesondere die HLA-B7,
- Zytosindesaminase,
- Gene, die für Sense- und Antisense-RNA kodieren,
- Gene, die für Ribozyme kodieren

c) Vakzine-Zielgene

- Gene, die für virale Antigene kodieren (Vakzination), beispielsweise: das Gen, das für das Nucleoprotein des Grippevirus kodiert.

**[0076]** Gegenstand der Erfindung ist gleichfalls ein Komplex, in welchem:

- das Polymer, insbesondere Polylysin, einen Polymerisationsgrad von etwa 15 bis 900, vorzugsweise 200 aufweist,
- die freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der Lysine in einem Anteil von mindestens 35% durch Histidyl-Reste substituiert sind und optional durch ein Molekül, welches ein Erkennungssignal für 1 bis 50 Lysin-Reste bildet, wobei das genannte Signalmolekül eine Affinität von mindestens  $10^5 \text{ l mol}^{-1}$  gegenüber dem Rezeptor der Zelle besitzt, auf die der Komplex abzielt, oder optional durch 20 bis 100 Erkennungssignal-Moleküle für 200 Lysin-Reste, wenn das genannte Signalmolekül eine Affinität von unter  $10^5 \text{ l mol}^{-1}$  gegenüber dem oben erwähnten Rezeptor besitzt,
- die Nukleinsäure eine Molekülmasse von etwa  $10^6$  bis etwa  $10^8$ , insbesondere 3,106 bis 30,106 aufweist,
- die Beziehung zwischen der mittleren Anzahl der Basenpaare der Nukleinsäure pro Molekül der Monomereinheit, insbesondere des Lysins, liegt etwa zwischen 0,6 bis etwa 6, vorzugsweise etwa zwischen 0,4 bis etwa 0,6.

**[0077]** Die Affinitäten sind wie folgt:

- bei einem Signalmolekül mit sehr hoher Affinität gegenüber seinem Rezeptor ( $K_a > 10^7 \text{ l/mol}$ ) ungefähr 0,5 bis 5, vorteilhaft 1 Molekül für ungefähr 10.000 Monomereinheiten des substituierten Polymers oder 1 Molekül für ungefähr 50 Moleküle des substituierten Polymers;
- bei einem Signalmolekül mit hoher Affinität gegenüber seinem Rezeptor ( $K_a$  zwischen  $10^5 \text{ l/mol}$  und  $10^7 \text{ l/mol}$ ) ungefähr 0,5 bis 10, vorteilhaft 1 Molekül für ungefähr 200 Monomereinheiten des substituierten Polymers oder 1 Molekül für ungefähr 1 Molekül des substituierten Polymers;
- bei einem Signalmolekül mit mittlerer Affinität gegenüber seinem Rezeptor ( $K_a < 10^5 \text{ l/mol}$ ) ungefähr 10 bis 100, vorteilhaft 50 Moleküle für ungefähr 200 Monomereinheiten des substituierten Polymers oder 50 Moleküle für ungefähr 1 Molekül des substituierten Polymers.

**[0078]** Gegenstand der Erfindung ist gleichfalls ein Polymerkonjugat mit positiver Ladung, welches Einheiten enthält, die freie  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen tragen und so beschaffen sind, dass:

- die freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der vorher genannten Monomereinheiten in einem Anteil von mindestens 10%, vorteilhaft etwa 15% bis etwa 45%, insbesondere 35%, wobei dieser Anteil beispielsweise durch Nuklearmagnetresonanz bestimmt wird, durch Reste substituiert sind, die in leicht saurem Medium protonierbar sind und die in leicht saurem Medium eine Destabilisierung der Zellmembranen, insbesondere der Membran der Endozytosevesikel, herbeiführen,
- die vorher genannten Reste unter anderem die folgenden Eigenschaften besitzen:
- sie enthalten eine funktionelle Gruppe, die es ihnen erlaubt, an das vorher erwähnte Polymer fixiert zu sein,
- sie sind nicht als Erkennungssignal aktiv, welches durch einen zellulären Membranrezeptor erkannt wurde
- sie können mindestens eine freie  $\text{NH}_3^+$ -Funktion enthalten,
- sie gehören zu der Familie von Verbindungen, die einen Imidazolkern enthalten,
- sie gehören zu der Familie der Chinoline,
- sie gehören zu der Familie der Pterine,
- sie gehören zu der Familie der Pyridine,
- wobei die freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der vorher erwähnten Monomereinheiten gleichermaßen durch Reste ohne Ladung substituiert werden können, die zu einer Reduzierung der positiven Ladungen in Bezug zum gleichen unsubstituierten Polymer-Konjugat führen und die Aussalzung der Nukleinsäure durch die Dissoziation des Komplexes erleichtern,
- wobei die vorher genannten Reste ohne Ladung auch die folgenden Eigenschaften besitzen:
- sie enthalten mindestens eine Hydroxylgruppe,
- sie sind nicht als Erkennungssignal aktiv, welches durch einen zellulären Membranrezeptor erkannt wurde

- die Hydroxylgruppen der vorher genannten Reste ohne Ladung können durch mindestens ein Molekül substituiert sein, welches ein durch einen zellulären Membranrezeptor erkanntes Erkennungssignal darstellt,
- wobei die Moleküle, welche ein durch einen zellulären Membranrezeptor erkanntes Erkennungssignal darstellen, optional wie folgt dargestellt sein können:
  - entweder durch Substitution bestimmter  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der vorher genannten Monomereinheiten (beispielsweise  $\epsilon\text{-NH}_3^+$  von Lysinen),
  - oder auf bestimmten der vorher erwähnten Reste ohne Ladung, welche eine Reduzierung der Ladung (beispielsweise Gluconyl) herbeiführen, und insbesondere auf den Hydroxylgruppen der vorher erwähnten Reste ohne Ladung, welche eine Reduzierung der Ladung herbeiführen,
  - oder auf bestimmten der vorher erwähnten Reste, welche eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen (beispielsweise Acetylimidazol),
  - oder durch Substitution der optionalen freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion der vorher genannten Reste, welche eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen (beispielsweise Histidin),

unter der Voraussetzung, dass die Gesamtheit der freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion mindestens 30% der Anzahl der Monomereinheiten des Polymerskeletts des vorher erwähnten Polymerkonjugats beträgt–

**[0079]** Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Polymerkonjugat, welches wie oben beschrieben beschaffen ist oder eine polymere Gruppe wie oben beschrieben enthält.

**[0080]** In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung wird das Polymerkonjugat ausgewählt zwischen histidyliertem Polylysin, das durch Lactose substituiert ist, histidyliertem Polylysin, das durch einen Oligosidkomplex wie etwa Lewis<sup>b</sup> substituiert ist, histidyliertem Polylysin, das durch das Peptid ANP substituiert ist oder histidyliertem Polylysin, das durch Biotin substituiert ist.

**[0081]** Die Herstellung der Polymerkonjugate der Erfindung kann nach einer der Methoden erfolgen, die in den folgenden Tabellen beschrieben sind:

Tabelle I

Methode zur Herstellung von Polymerkonjugaten mit Erkennungssignalen, die an bestimmte Monomereinheiten des Polymers fixiert sind.			
Die entsprechende Reihenfolge des Einsetzens der Reste, die für die Destabilisierung bzw. für die Reduzierung der Ladung verantwortlich sind, sowie der Erkennungssignale auf dem Polymer ist mit 1, 2 und 3 angegeben.			
POLYMER			
Methode	Reste		
	zuständig für Destabilisierung	zuständig für Verringerung d. Ladung	Erkennungssignal
I	1	-	2
II	2	-	1
III	1	2	3
IV	1	3	2
V	2	1	3
VI	3	1	2
VII	2	3	1
VIII	3	2	1

Tabelle II

Methode zur Herstellung von Polymerkonjugaten mit Erkennungssignalen, die an bestimmte, für die Destabilisierung der Membranen zuständige Reste fixiert sind.			
Die entsprechende Reihenfolge des Einsetzens der Reste, die für die Destabilisierung bzw. für die Reduzierung der Ladung verantwortlich sind, sowie der Erkennungssignale auf dem Polymer ist mit 1, 2 und 3 angegeben.			
POLYMER			
Methode	Reste		
	zuständig für Destabilisierung	zuständig für Verringerung d. Ladung	Erkennungssignal
IX	1	-	2
X	1	2	3
XI	1	3	2
XII	2	1	3

Tabelle III

Methode zur Herstellung von Polymerkonjugaten mit Erkennungssignalen, die an bestimmte, für die Reduzierung der Ladung zuständige Reste fixiert sind.			
Die entsprechende Reihenfolge des Einsetzens der Reste, die für die Destabilisierung bzw. für die Reduzierung der Ladung verantwortlich sind, sowie der Erkennungssignale auf dem Polymer ist mit 1, 2 und 3 angegeben.			
POLYMER			
Methode	Reste		
	zuständig für Destabilisierung	zuständig für Verringerung d. Ladung	Erkennungssignal
XIII	2	1	3
XIV	3	1	2
XV	1	2	3

**[0082]** Die für die Destabilisierung der Membranen verantwortlichen Reste werden ausgewählt aus: Histidin, 4-Carboxymethyl-imidazol, 3-(1-Methyl-imidazol-4-yl)-alanin, 3-(1-Methyl-imidazol-4-yl)-alanin, 2-Carboxy-imidazol, Histamin, 3-(Imidazol-4-yl)-L-Milchsäure, 2-(1-Methyl-imidazol-4-yl)ethylamin, 2-(3-Methyl-imidazol-4-yl)ethylamin,  $\beta$ -Alanyl-histidin-(carnosin), 7-Chlor-4(amino-1-methylbutylamin)-chinolin, N<sup>4</sup>-(7-Chlor-4-chinolinyl)-1,4-pentanediamin, 8-(4-Amino-1-methylbutylamin)-6-methoxychinolin (Primachin), N<sup>4</sup>-(6-Methoxy-8-Chinolinyl)-1,4-pentandiamin, Chininsäure, Chinolincarbonsäure, Pteroinsäure, Nikotinsäure, Chinolinsäure.

**[0083]** Die für die Reduzierung der Ladung verantwortlichen Reste werden ausgewählt aus: Dihydroxypropionyl, Erythranyl, Threonyl, Ribonyl, Arabinyl, Xylonyl, Lyxonyl, Gluconyl, Galactonyl, Mannonyl, Glycoheptonyl,



Glycooctonyl.

**[0084]** Die Erkennungssignale werden ausgewählt aus: Osiden, Oligosiden, Peptiden, Metaboliten, Agonisten, Antagonisten.

**[0085]** Als Beispiel werden die verschiedenen Methoden der Tabellen beschrieben:

**[0086]** I) Die Erkennungssignale werden an bestimmte Monomereinheiten des Polymers nach Einsetzen der Reste, die eine Destabilisierung der Zellmembranen herbeiführen, wie folgt fixiert:

#### A) Methode I

##### Nicotinyliertes Polylysin

a) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion sind teilweise durch Reste substituiert, die eine Destabilisierung der Zellmembranen herbeiführen. Beispielsweise wird Polylysin (insbesondere in der Form von p-Toluensulfonat) in einem organischen Lösemittel (insbesondere Dimethylsulphoxid) in der Anwesenheit von einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin), von Molekülen, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen (insbesondere Nikotinsäure) und von einem Kopplungsagenz (insbesondere Benzotriazolyl-N-oxytris-dimethylamino-phosphonium-hexafluorophosphat) aufgelöst.

b) Die Erkennungssignale sind an bestimmte  $\epsilon$ -amino-Gruppen von Lysyl-Resten des Polymers gebunden.

**[0087]** Als Beispiel für die Fixierung der Erkennungssignale an nicotinyliertes Polylysin wird nachfolgend die Fixierung von Osiden oder Oligosiden beschrieben.

#### 1) Fixierung von Osiden

**[0088]** Einfache Oside in Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten werden an bestimmte  $\epsilon$ -amino-Funktionen von freien Lysyl-Resten des Polylysins fixiert, wie zuvor in Midoux et al., (Nucleic Acids Res. 1993 21: 871–878) beschrieben.

#### 2) Fixierung von Oligos

**[0089]** Komplexe Oligoside wie etwa die Asialo-Oligoside des Bi-, Tri- oder Tetraantennen-Typs oder Lewis werden in Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten von Glycopeptiden nach einer Methode erhalten, die in Monsigny et al., (Französisches Patent 9407738, Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. und Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neuartige Oligosid-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendungen]) und Sdiqui et al. (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates [Neuartige Synthese von Glyco-Aminosäure-Konjugaten], Carbohydr. Letters 1, 269–275) beschrieben wurde. Glycopeptide in Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten werden an bestimmte  $\epsilon$ -amino-Funktionen von freien Lysyl-Resten des Polylysins fixiert, wie zuvor in Midoux et al., (Nucleic Acids Res. 1993 21: 871–878) beschrieben.

##### Histidylisiertes Polylysin

a) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion werden teilweise durch Reste mit einer Funktion substituiert, welche die nachträgliche Fixierung anderer Moleküle wie etwa jener, die beispielsweise nach einer Reaktion in organischem Medium mit einem N-Hydroxysuccinimid-Ester von Dithiopyridin-Propionsäure oder seinen Derivaten ein Erkennungssignal bilden werden.

b) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion werden anschließend teilweise durch Reste substituiert, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen, beispielsweise nach Reaktion in einem organischen Medium mit Histidin, in welchem die  $\alpha\text{NH}_3^+$ -Gruppe und die NH-Gruppe des Imidazolkerns, in der Anwesenheit eines Kopplungsagenz wie Benzotriazolyl-N-oxy-tris-dimethylamino-phosphonium-hexafluorophosphat durch tert-Butyloxycarbonyl geschützt werden. Nach Reaktion und Reinigung werden die Aminofunktionen der Histidyl-Reste des erhaltenen Polymers entschützt.

c) Die Erkennungssignale sind an Dithiopyridyl-Gruppen des Polymers gebunden.

**[0090]** Als Beispiel für die Fixierung von Erkennungssignalen an histidylisiertes Polylysin wird nachfolgend die Fixierung von Oxiden oder Oligosiden beschrieben.

## 1) Fixierung von Oxiden

**[0091]** Einfache Oside, die mit einer Dithiopyridyl-Funktion (pyroglutamyl-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S-S-pyridin) aus Glycopeptiden durch eine Methode gewonnen werden, die in Monsigny et al., (Französisches Patent 9407738, Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. und Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neuartige Oligosid-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendungen]) und Sdiqui et al. (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates [Neuartige Synthese von Glyco-Aminosäure-Konjugaten], Carbohydr. Letters 1: 269–275) beschrieben ist, werden reduziert und in einem auf einen neutralen pH gepufferten wässrigen Medium an die Dithiopyridyl-Funktionen des Polymers fixiert.

## 2) Fixierung von Oligosiden

**[0092]** Komplexe Oligoside wie etwa die Asialooligoside des Bi-, Tri- oder Tetraantennen-Typs oder Lewis, die mit einer Dithiopyridyl-Funktion (pyroglutamyl-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S-S-pyridin) aus Glycopeptiden nach einer Methode erhalten werden, die in Monsigny et al., (Französisches Patent 9407738, Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. und Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neuartige Oligosid-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendungen]) und Sdiqui et al. (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates [Neuartige Synthese von Glyco-Aminosäure-Konjugaten], Carbohydr. Letters 1: 269–275) beschrieben ist, werden reduziert und in einem auf einen neutralen pH gepufferten wässrigen Medium an die Dithiopyridyl-Funktionen des Polymers fixiert.

## B) Methode III

## Nicotinyliertes und gluconyliertes Polylysin

a) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer freien NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Funktion werden teilweise durch Reste substituiert, welche eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen. So wird beispielsweise gluconyliertes Polylysin in einem organischen Lösemittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit von einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin), von Molekülen, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen (insbesondere Nikotinsäure) und von einem Kopplungsagens (insbesondere Benzotriazolyl-N-oxy-tris-dimethylaminophosphonium-hexafluorophosphat) aufgelöst.

b) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer noch freien NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Funktion werden anschließend teilweise durch Reste ohne Ladung substituiert, die eine Reduzierung der Ladung verursachen. Zur Fixierung der Reste, die eine Reduzierung der Ladung verursachen, wird beispielsweise ein Polylysin-Salz (insbesondere in der Form von p-Toluensulfonat) in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin) und einer aktivierten hydroxylierten organischen Säure (insbesondere δ-Gluconolacton) aufgelöst.

c) Die Erkennungssignale sind an bestimmte ε-amino-Gruppen der Lysyl-Reste des Polymers gebunden.

**[0093]** Als Beispiel für die Fixierung von Erkennungssignalen an histidylisiertes Polylysin wird nachfolgend die Fixierung von Oxiden oder Oligosiden beschrieben.

## 1) Fixierung von Oxiden

**[0094]** Einfache Oside in Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten werden an bestimmte ε-amino-Funktionen von freien Lysyl-Resten des Polylysins fixiert, wie zuvor in Midoux et al., (Nucleic Acids Res. 1993 21: 871–878) beschrieben.

## 2) Fixierung von Oligosiden

**[0095]** Komplexe Oligoside wie etwa die Asialo-Oligoside des Bi-, Tri- oder Tetraantennen-Typs oder Lewis werden in Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten von Glycopeptiden nach einer Methode erhalten, die in Monsigny et al., (Französisches Patent 9407738, Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. und Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neuartige Oligosid-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendungen]) und Sdiqui et al. (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates [Neuartige Synthese von Glyco-Aminosäure-Konjugaten], Carbohydr. Letters 1: 69–275) beschrieben ist. Die Glycopeptide in Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten werden an bestimmte ε-amino-Funktionen von freien Lysyl-Resten des Polylysins fixiert, wie zuvor in Midoux et al., (Nucleic Acids Res. 1993 21: 871–878) beschrieben.

## C) Methode V

## Gluconylierte und histidylierte Polylysin

- a) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion werden teilweise durch Reste mit einer Funktion substituiert, welche die nachträgliche Fixierung anderer Moleküle erlaubt. Zur Fixierung von Erkennungssignalen wird beispielsweise ein Polylysin-Salz (insbesondere in Form von p-Toluensulfonat) in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin) und des N-Hydroxysuccinimid-Ester von Dithiopyridin-Propionsäure oder seinen Derivaten aufgelöst.
- b) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer noch freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion werden anschließend teilweise durch Reste ohne Ladung substituiert, welche eine Reduzierung der Ladung verursachen. Zur Fixierung der Reste, welche die Reduzierung der Ladung verursachen, wird beispielsweise ein Polylysin-Salz (insbesondere in Form von p-Toluensulfonat) in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin) und einer aktivierten hydroxylierten organischen Säure (insbesondere  $\delta$ -Gluconolacton) aufgelöst.
- c) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer noch freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion werden anschließend teilweise durch Reste substituiert, welche eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen. Zur Fixierung der Reste, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen, wird beispielsweise ein Polylysin-Salz (insbesondere in Form von p-Toluensulfonat) in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit von einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin), von Molekülen, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen (insbesondere Histidin, bei dem die  $\alpha\text{NH}_3^+$ -Gruppe und die NH-Gruppe des Imidazolkerns durch tert-Butyloxycarbonyl geschützt werden), und eines Kopplungsagens, wie etwa Benzotriazolyl-N-oxy-tris-dimethylamino-phosphonium-hexafluorophosphat, aufgelöst. Nach Reaktion und Reinigung werden die Aminofunktionen der Histidyl-Reste des erhaltenen Polymers entschützt.
- d) Die Erkennungssignale sind an Dithiopyridyl-Gruppen des Polymers gebunden.

**[0096]** Als Beispiel für die Fixierung von Erkennungssignalen an histidyliertes Polylysin wird nachfolgend die Fixierung von Osiden oder Oligosiden beschrieben.

## 1) Fixierung von Osiden

**[0097]** Einfache Oside, die mit einer Dithiopyridyl-Funktion (pyroglutamyl-NH-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-S-S-pyridin) aus Glycopeptiden durch eine Methode gewonnen werden, die in Monsigny et al., (Französisches Patent 9407738, Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. und Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neuartige Oligosid-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendungen]) und Sdiqui et al. (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates [Neuartige Synthese von Glyco-Aminosäure-Konjugaten], Carbohydr. Letters 1: 269–275) beschrieben ist, werden reduziert und in einem auf einen neutralen pH gepufferten wässrigen Medium an die Dithiopyridyl-Funktionen des Polymers fixiert.

## 2) Fixierung von Oligosiden

**[0098]** Komplexe Oligoside wie etwa die Asialooligoside des Bi-, Tri- oder Tetraantennen-Typs oder Lewis, die mit einer Dithiopyridyl-Funktion (pyroglutamyl-NH-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-S-S-pyridin) aus Glycopeptiden nach einer Methode erhalten werden, die in Monsigny et al., (Französisches Patent 9407738, Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. und Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neuartige Oligosid-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendungen]) und Sdiqui et al. (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates [Neuartige Synthese von Glyco-Aminosäure-Konjugaten], Carbohydr. Letters 1: 269–275) beschrieben wurde, werden reduziert und in einem auf einen neutralen pH gepufferten wässrigen Medium an die Dithiopyridyl-Funktionen des Polymers fixiert.

## Gluconyliertes und nicotinyliertes Polylysin

- a) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer noch freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion werden teilweise durch Reste ohne Ladung substituiert, welche eine Reduzierung der Ladung verursachen. Zur Fixierung von Resten, welche die Reduzierung der Ladung verursachen, wird beispielsweise ein Polylysin-Salz (insbesondere in Form von p-Toluensulfonat) in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin) und einer aktivierten hydroxylierten organischen Säure (insbesondere  $\delta$ -Gluconolacton) gelöst.
- b) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion werden anschließend teilweise

durch Reste substituiert, welche eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen. So wird beispielsweise gluconyliertes Polylysyl in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit von einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin), von Molekülen, die eine Destabilisierung der Zellmembranen (insbesondere Nikotinsäure) verursachen, und von einem Kopplungsagens (insbesondere Benzotriazolyl-N-oxy-tris-dimethylamino-phosphonium-hexafluoro-phosphat) aufgelöst.

c) Die Erkennungssignale sind an bestimmte  $\epsilon$ -amino-Gruppen des Polymers gebunden.

**[0099]** Als Beispiel für die Fixierung von Erkennungssignalen an histidylisiertes Polylysins wird nachfolgend die Fixierung von Osiden oder Oligosiden beschrieben.

#### 1) Fixierung von Osiden

**[0100]** Einfache Oside in Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten werden an bestimmte  $\epsilon$ -amino-Funktionen der Lysyl-Reste des Polylysins fixiert, wie zuvor in Midoux et al., (Nucleic Acids Res. 1993, 21: 871–878) beschrieben.

#### 2) Fixierung von Oligosiden

**[0101]** Komplexe Oligoside wie etwa die Asialooligoside des Bi-, Tri- oder Tetraantennen-Typs oder Lewis, werden in Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten aus Glycopeptiden nach einer Methode erhalten, die in Monsigny et al (Französisches Patent 9407738, Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. und Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neuartige Oligosid-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendungen]) und Sdiqui et al. (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates [Neuartige Synthese von Glyco-Aminosäure-Konjugaten], Carbohydr. Letters 1: 269–275) beschrieben wird. Die Glycopeptide in Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten werden an bestimmte  $\epsilon$ -amino-Funktionen der freien Lysyl-Reste des Polylysins fixiert, wie zuvor in Midoux et al., (Nucleic Acids Res. 1993, 21: 871–878) beschrieben.

**[0102]** II) Die Erkennungssignale werden vor dem Einsetzen von Resten, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen, an bestimmte Monomereinheiten des Polymers wie folgt fixiert:

#### A) Methode II

##### Nicotinyliertes Polylysins

**[0103]** Diese Substitutionen erfolgen gemäß irgendeinem der Protokolle, welche den Fachleuten bekannt sind.

a) Als Beispiel für die Fixierung von Erkennungssignalen an das Polylysins (insbesondere in Form von p-Toluensulfonat), welches in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in der Anwesenheit einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin) aufgelöst ist, wird nachfolgend die Fixierung von Osiden oder Oligosiden beschrieben.

#### 1) Fixierung von Osiden

**[0104]** Einfache Oside in Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten werden an bestimmte  $\epsilon$ -amino-Funktionen der freien Lysyl-Reste des Polylysins fixiert, wie zuvor in Midoux et al., (Nucleic Acids Res. 1993 21: 871–878) beschrieben.

#### 2) Fixierung von Oligosiden

**[0105]** Komplexe Oligoside, wie etwa die Asialooligoside des Bi-, Tri- oder Tetraantennen-Typs oder Lewis, werden in der Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten von Glycopeptiden nach einer Methode erhalten, die in Monsigny et al., (Französisches Patent 9407738, Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. und Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neuartige Oligosid-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendungen]) und Sdiqui et al. (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates [Neuartige Synthese von Glyco-Aminosäure-Konjugaten], Carbohydr. Letters 1: 269–275) beschrieben wird. Die Glycopeptide in Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten werden an bestimmte  $\epsilon$ -amino-Funktionen der freien Lysyl-Reste des Polylysins fixiert, wie zuvor in Midoux et al., (Nucleic Acids Res. 1993, 21: 871–878) beschrieben.

b) Zur Fixierung von Resten, welche eine Destabilisierung der Membranen verursachen, wird beispielsweise

se Polylysin, welches durch Oside oder Oligoside substituiert ist, in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in der Anwesenheit von einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin), von Molekülen, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen (insbesondere Nikotinsäure) und von einem Kopplungsagenz (insbesondere Benzotriazolyl-N-oxy-tris-dimethylamino-phosphonium-hexafluoro-phosphat) aufgelöst.

#### B) Methode VI

##### Gluconyliertes und nicotinyliertes Polylysin

**[0106]** Diese Substitutionen erfolgen gemäß irgendeinem der Protokolle, welche den Fachleuten bekannt sind.

a) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer noch freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion werden teilweise durch Reste ohne Ladung substituiert, welche eine Reduzierung der Ladung verursachen. Zur Fixierung von Resten, welche die Reduzierung der Ladung verursachen, wird beispielsweise ein Polylysin-Salz (insbesondere in Form von p-Toluensulfonat) in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin) und einer aktivierten hydroxylierten organischen Säure (insbesondere  $\delta$ -Gluconolacton) aufgelöst.

b) Als Beispiel für die Fixierung von Erkennungssignalen an das gluconylierte Polylysin, welches in einer organischen Lösung (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin) aufgelöst ist, wird nachfolgend die Fixierung von Osiden oder Oligosiden beschrieben.

#### 1) Fixierung von Osiden

**[0107]** Einfache Oside in Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten werden an bestimmte  $\epsilon$ -amino-Funktionen der freien Lysyl-Reste des Polylysins fixiert, wie zuvor in Midoux et al., (Nucleic Acids Res. 1993 21: 871–878) beschrieben.

#### 2) Fixierung von Oligosiden

**[0108]** Komplexe Oligoside, wie etwa die Asialooligoside des Bi-, Tri- oder Tetraantennen-Typs oder Lewis, werden in der Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten von Glycopeptiden nach einer Methode erhalten, die in Monsigny et al., (Französisches Patent 9407738, Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. und Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neuartige Oligosid-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendungen]) und Sdiqui et al. (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates [Neuartige Synthese von Glyco-Aminosäure-Konjugaten], Carbohydr. Letters 1: 269–275) beschrieben wird. Glycopeptide in der Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten werden an bestimmte  $\epsilon$ -amino-Funktionen der freien Lysyl-Reste des Polylysins fixiert, wie zuvor in Midoux et al., (Nucleic Acids Res. 1993, 21: 871–878) beschrieben.

c) Zur Fixierung von Resten, welche die Destabilisierung der Membranen verursachen, wird beispielsweise das durch Oside oder Oligoside substituierte Polylysin in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit von einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin), von Molekülen, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen (insbesondere Nikotinsäure) und von einem Kopplungsagenz (insbesondere Benzotriazolyl-N-oxy-tris-dimethylamino-phosphonium-hexafluoro-phosphat) aufgelöst.

**[0109]** III) Die Erkennungssignale sind an bestimmte destabilisierende Reste fixiert.

#### A) Methode IX

##### Histidyliertes Polylysin

a) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion sind teilweise durch Reste substituiert, welche eine Destabilisierung von Zellmembranen verursachen. Beispielsweise nach Reaktion in einem organischem Medium mit Histidin, bei dem die  $\text{NH}_3^+$ -Gruppe und die NH-Gruppe des Imidazolkerns durch tert-Butyloxycarbonyl in Anwesenheit eines Kopplungsagenz wie z. B. Benzotriazolyl-N-oxy-tris-dimethylamino-phosphonium-hexafluoro-phosphat geschützt ist. Nach Reaktion und Reinigung werden die Aminofunktionen der Histidyl-Reste des erhaltenen Polymers entschützt.

b) Die Erkennungssignale sind an bestimmte  $\text{NH}_3^+$ -Gruppen der Reste fixiert, welche eine Destabilisierung der Membranen verursachen.

**[0110]** Als Beispiel für die Fixierung der Erkennungssignale an das histidylierte Polylysin wird nachfolgend die Fixierung von Oligosiden beschrieben.

**[0111]** Komplexe Oligoside, wie etwa die Asialooligoside des Tri- oder Tetraantennen-Typs oder Lewis, werden in Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten von Glycopeptiden nach einer Methode erhalten, die in Monsigny et al., (Französisches Patent 9407738, Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. und Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neuartige Oligosid-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendungen]) und Sdiqui et al. (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates [Neuartige Synthese von Glyco-Aminosäure-Konjugaten], Carbohydr. Letters 1: 269–275) beschrieben ist. Glycopeptide in der Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten werden in einem auf einen neutral pH gepufferten wässrigen Medium an bestimmte  $\text{NH}_2$ -Funktionen der Histidyl-Reste fixiert. Bei diesem pH ist die Fixierung an die  $\text{NH}_3^+$ -Lysine sehr schwach, wenn nicht sogar unmöglich.

## B) Methode XII

### Gluconyliertes und histidyliertes Polylysin

a) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion werden teilweise durch Reste ohne Ladung substituiert, welche eine Reduzierung der Ladung verursachen. Zur Fixierung von Resten, welche die Reduzierung der Ladung verursachen, wird beispielsweise ein Polylysin-Salz (insbesondere in Form von p-Toluensulfonat) in einer organischen Lösung (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin) und einer aktivierten hydroxylierten organischen Säure (insbesondere  $\delta$ -Gluconolacton) gelöst.

b) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer noch freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion werden anschließend teilweise durch Reste substituiert, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen. Zur Fixierung von Resten, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen, wird beispielsweise ein Polylysin-Salz (insbesondere in Form von p-Toluensulfonat) in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit von einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin), von Molekülen, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen (insbesondere Histidin, bei dem die  $\alpha\text{NH}_3^+$ -Gruppe und die  $\text{NH}$ -Gruppe des Imidazolkerns durch tert-Butyloxycarbonyl geschützt sind) und von einem Kopplungsagens (insbesondere Benzotriazolyl-N-oxy-tris-dimethylamino-phosphonium-hexafluoro-phosphat) aufgelöst. Nach Reinigung werden die geschützten Amino-Funktionen der Histidyl-Reste entschützt.

c) Die Erkennungssignale sind an bestimmte  $\text{NH}_3^+$ -Gruppen von Resten gebunden, die eine Destabilisierung der Membranen verursachen.

**[0112]** Als Beispiel für die Fixierung der Erkennungssignale an das histidylierte Polylysin wird nachfolgend die Fixierung von Oligosiden beschrieben.

**[0113]** Komplexe Oligoside, wie etwa die Asialooligoside des Bi-, Tri- oder Tetraantennen-Typs oder Lewis, werden in der Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten von Glycopeptiden nach einer Methode erhalten, die in Monsigny et al., (Französisches Patent 9407738, Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. und Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neuartige Oligosid-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendungen]) und Sdiqui et al. (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates [Neuartige Synthese von Glyco-Aminosäure-Konjugaten], Carbohydr. Letters 1: 269–275) beschrieben ist. Glycopeptide in der Form von Phenylisothiocyanat-Derivaten werden in einem auf einen neutralen pH gepufferten wässrigen Medium an bestimmte  $\alpha\text{NH}_2$ -Funktionen der Histidyl-Reste fixiert; bei diesem pH ist die Fixierung an die  $\text{NH}_3^+$ -Lysine sehr schwach, wenn nicht sogar unmöglich.

## C) Methode IX

### Imidazoliertes Polylysin

a) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion werden teilweise durch Reste substituiert, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen. Zur Fixierung von Resten, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen, wird beispielsweise ein Polylysin-Salz (insbesondere in Form von p-Toluensulfonat) in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit von einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin), von Molekülen, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen (insbesondere 4-Carboxymethyl-imidazol) und von einem Kopplungsagens (insbesondere Benzotriazolyl-N-oxy-tris-dimethylamino-phosphonium-hexafluoro-phosphat) aufgelöst.

b) Die Erkennungssignale sind an bestimmte Imidazolkern der Reste gebunden, die eine Destabilisierung

der Membranen verursachen.

**[0114]** Als Beispiel für die Fixierung von Erkennungssignalen an das imidazolierte Polylysin wird nachfolgend die Fixierung von Peptiden oder Glycopeptiden beschrieben.

**[0115]** Die Imidazol-Reste können leicht in neutralem Medium durch Verbindungen alkyliert werden, die eine aktivierte Gruppe enthalten, wie beispielsweise Iodoacetamid oder dessen Derivate; dies ist seit den Arbeiten von Korman S. und Clarke H. T. im Jahre 1956 bekannt (J. Biol. Chem. 113: 133). Die Alkylierung von Imidazolen durch ein Iodoacetamid-Derivat erfolgt bei einem fast neutralen pH, beispielsweise 7,0. Bei diesem pH werden die  $\epsilon$ -amino-Gruppen des Lysins nicht betroffen, wären es jedoch bei einem pH, der weitaus alkalischer ist, wie 9 oder höher. Die Erkennungssignale vom Peptid- oder Glycopeptid-Typ (Monsigny et al., Französisches Patent 9407738. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neuartige Oligosid-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendungen]) und Sdiqui et al. (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates [Neuartige Synthese von Glyco-Aminosäure-Konjugaten], Carbohydr. Letters 1: 269–275) können leicht durch eine Iodoacetamid-Gruppe substituiert werden. Die Derivate des Typs  $\text{ICH}_2\text{CONHR}$ :  $\text{I-CH}_2\text{-CO-NH-Peptid}$  oder  $\text{I-CH}_2\text{-CO-NH-Glycopeptid}$  werden in einem auf einen neutralen pH gepufferten wässrigen Medium an Stickstoff 3 und mit geringerer Effizienz an Stickstoff 1 fixiert, was zu stabilen N-Carboxymethyl-Derivaten führt. Ebenso können Bromoacetamid-Derivate verwendet werden, die gleichfalls exzellente Reagenzien zur Alkylierung der Imidazol-Reste sind (siehe beispielsweise Henrikson et al., 1965 J. Biol. Chem. 240: 2921). Unter der Voraussetzung, dass eine geringe Anzahl von Imidazol-Resten durch Erkennungssignale mit einer ausreichend hohen Affinität für ihren Rezeptor substituiert wird, stellt dieser Substitutionstyp sicher, dass das durch Imidazol-Reste substituierte Polymer seine Fähigkeit zur Destabilisierung von Membranen bei einem leicht saurem pH nicht verliert.

**[0116]** IV) Die Erkennungssignale werden an bestimmte neutralisierende Reste fixiert.

#### A) Methode XIII

##### Gluconyliertes und imidazoliertes Polylysin

a) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion werden teilweise durch Reste ohne Ladung substituiert, die eine Reduzierung der Ladung herbeiführen. Zur Fixierung der Reste, welche die Reduzierung der Ladung herbeiführen, wird beispielsweise ein Polylysin-Salz (insbesondere in Form von p-Toluensulfonat) in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin) und zweier aktivierter hydroxylierter organischer Säuren (insbesondere 6-Deoxy-6-Iodo- $\delta$ -Gluconolacton in einem Teil und  $\delta$ -Gluconolactone in 10 bis 50 Teilen) aufgelöst.

b) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion werden teilweise durch Reste substituiert, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen. Zur Fixierung von Resten, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen, wird beispielsweise ein Polylysin-Salz (insbesondere in Form von p-Toluensulfonat) in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit von einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin), von Molekülen, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen (insbesondere 4-Carboxymethyl-imidazol) und von einem Kopplungsagens (insbesondere Benzotriazolyl-N-oxy-tris-dimethylamino-phosphonium-hexafluorophosphat) aufgelöst.

c) Die Erkennungssignale sind an bestimmte neutralisierende Reste gebunden.

**[0117]** Als Beispiel für die Fixierung von Erkennungssignalen an das glucolynierte und histidylierte Polylysin wird nachfolgend die Fixierung von Oligosiden beschrieben.

**[0118]** Komplexe Oligoside, wie etwa die Asialooligoside des Bi-, Tri- oder Tetraantennen-Typs oder Lewis, die von Glycopeptiden nach einer Methode erhalten werden, die in Monsigny et al., (Französisches Patent 9407738, Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. und Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neuartige Oligosid-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendungen]) und Sdiqui et al. (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates [Neuartige Synthese von Glyco-Aminosäure-Konjugaten], Carbohydr. Letters 1: 269–275) beschrieben ist, werden beispielsweise in neutralem Medium (pH etwa 7,0) durch Triscarboxyethylphosphin reduziert und in einem auf einen leicht alkalischen pH (ungefähr pH 8,5) gepufferten wässrigen Medium an die 6-Desoxy-6-Iodo-gluconyl-Reste des Polymers fixiert. Unter der Voraussetzung, dass eine geringe Anzahl von Imidazol-Resten durch Erkennungssignale mit einer ausreichend hohen Affinität für ihren Rezeptor substituiert wird, stellt dieser Substitutionstyp sicher, dass das durch Imidazol-Reste substituierte Polymer seine Fähigkeit zur Destabilisierung von Membranen

nen bei einem leicht saurem pH nicht verliert.

## B) Methode XIII

### Gluconyliertes und imidazoliertes Polylysin

- a) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion werden teilweise durch Reste ohne Ladung substituiert, welche eine Reduzierung der Ladung verursachen. Zur Fixierung von Resten, welche die Reduzierung der Ladung verursachen, wird beispielsweise ein Polylysin-Salz (insbesondere in Form von p-Toluensulfonat) in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin) und zweier aktivierter hydroxylierter organischer Säuren (insbesondere 6-Bromoacetamido-L-gulono-1,5-lacton für einen Teil und  $\delta$ -Gluconolacton für 10 bis 50 Teile) aufgelöst. Das 6-Bromoacetamido-L-gulono-1,5-lacton wird nach Reduzierung durch das Cyanoborhydrid des Imins erhalten, welches durch Mischung einer ammoniakhaltigen Lösung ( $\text{NH}_4\text{OH}$  oder  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ) und einer Lösung einer Uronsäure, beispielsweise Glucuronsäure, und anschließende Acylierung des Amins durch ein aktiviertes Bromacetat, beispielsweise Bromacetat-Anhydrid oder Succinimidyl-Bromacetat, gewonnen wird.
- b) Die Monomereinheiten des Polymers mit einer freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktion werden teilweise durch Reste substituiert, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen. Zur Fixierung von Resten, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen, wird beispielsweise ein Polylysin-Salz (insbesondere in Form von p-Toluensulfonat) in einem organischen Lösungsmittel (insbesondere Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit von einer Base (insbesondere Diisopropylethylamin), von Molekülen, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen (insbesondere 4-Carboxymethyl-imidazol) und von einem Kopplungsagens (insbesondere Benzotriazolyl-N-oxy-tris-dimethylamino-phosphonium-hexafluoro-phosphat) aufgelöst.
- c) Die Erkennungssignale sind an bestimmte neutralisierende Reste gebunden.

**[0119]** Als Beispiel für die Fixierung von Erkennungssignalen an das gluconylierte und hystidylierte Polylysin wird nachfolgend die Fixierung von Oligosiden beschrieben.

**[0120]** Komplexe Oligoside, wie etwa die Asialooligoside des Bi-, Tri- oder Tetraantennen-Typs oder Lewis, die von Glycopeptiden nach einer Methode erhalten werden, die in Monsigny et al., (Französisches Patent 9407738, Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. und Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neuartige Oligosid-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendungen]) und Sdiqui et al. (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates [Neuartige Synthese von Glyco-Aminosäure-Konjugaten], Carbohydr. Letters 1: 269–275) beschrieben ist, werden beispielsweise in neutralem Medium (pH etwa 7,0) durch Triscarboxyethylphosphin reduziert und in einem auf einen leicht alkalischen pH (ungefähr pH 8,5) gepufferten wässrigen Medium an die Bromacetamido-gluconyl-Reste des Polymers fixiert. Unter der Voraussetzung, dass eine geringe Anzahl von Imidazol-Resten durch Erkennungssignale mit einer ausreichend hohen Affinität für ihren Rezeptor substituiert wird, stellt dieser Substitutionstyp sicher, dass das durch Imidazol-Reste substituierte Polymer seine Fähigkeit zur Destabilisierung von Membranen bei einem leicht saurem pH nicht verliert.

**[0121]** Der Nukleinsäure-Polymerkonjugat-Komplex wird durch Mischung einer Lösung der entsprechenden Nukleinsäure und einer Lösung des Polymerkonjugates erhalten. Die genannten Lösungen werden vorzugsweise auf Basis eines physiologischen Serums oder eines Puffers oder eines zytokompatiblen Mediums präpariert.

**[0122]** In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung wird ein wie oben beschriebener Komplex oder ein wie oben beschriebenes Konjugat für die Transfektion in vitro, ex vivo oder irr. vivo von Zellen mithilfe eines Gens, insbesondere der zuvor beschriebenen, verwendet.

**[0123]** In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung wird ein Komplex bzw. Konjugat wie oben beschrieben verwendet, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass die Zellen ausgewählt werden aus:

- hämatopoetischen Stammzellen;
- dendritischen Zellen;
- Leberzellen;
- Skelettmuskelzellen;
- Hautzellen;
- Fibroblasten,
- Keratinozyten,



- dendritischen Zellen,
- Melanozyten;
- Gefäßwandzellen;
- Endothel;
- glatte Muskulatur;
- Epithelzellen der Atmungsorgane;
- Zellen des zentralen Nervensystems;
- Krebszellen;
- Zellen des Immunsystems, wie etwa Lymphozyten, Makrophagen, NK-Zellen usw.

**[0124]** In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung ist die Methode der Transfektion in vitro oder ex vivo dadurch gekennzeichnet, dass ein wie vorher beschriebener Komplex in ein Medium gebracht wird, welches die zu transfizierenden Zellen enthält, unter folgenden Bedingungen:

- Passage des Komplexes vom Medium in das Zytoplasma der Zellen,
- Aussalzung der im vorgenannten Komplex enthaltenen Nukleinsäure im Cytosol und/oder im Kern der Zellen,
- Transkription und Expression der Nukleinsäure in den transfizierten Zellen,
- Expression des zum transfizierten Gen korrespondierenden Proteins.

**[0125]** Die Erfindung betrifft ebenso eine pharmazeutische Zusammensetzung, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie als Wirkstoff wenigstens einen der vorher beschriebenen Komplexe oder wenigstens eines der vorher beschriebenen Konjugate zusammen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger enthält.

**[0126]** In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung wird ein wie oben beschriebener Komplex oder ein wie oben beschriebenes Konjugat für die Herstellung eines Medikaments verwendet, welches beispielsweise die Behandlung vererbter oder erworbener Stoffwechselstörungen oder die Behandlung von Tumoren zum Ziel hat oder zur Herstellung einer Vakzine dienen soll, beispielsweise einer Vakzine gegen die Grippe.

**[0127]** Die Erfindung betrifft ebenso ein Set oder Kit, welches folgendes enthält:

- ein wie vorher beschriebenes Polymerkonjugat wie etwa Polylysin, welches durch einen Rest substituiert wird, der in einem leicht saurem Medium eine Destabilisierung der Zellmembranen verursacht, wobei dieses Polymerkonjugat dazu geeignet ist, optional ein Erkennungssignal zu tragen, welches zuvor an das vorher erwähnte Polymerkonjugat fixiert wurde oder nicht, wobei das genannte Erkennungssignal eine Funktion der Zielzelle ist,
- optional ein Plasmid, welches wenigstens ein zu transfizierendes Gen enthält, sowie optional das System zur Regulierung der Expression des vorgenannten Gens,
- Reagenzien, welche die optionale Fixierung des Erkennungssignals an das vorgenannte Polymerkonjugat erlauben,
- Reagenzien, welche die Bildung eines wie oben beschriebenen Komplexes, oder zwischen dem Polymerkonjugat und dem zu transfizierenden Gen, oder zwischen dem Polymerkonjugat und einem das zu transfizierende Gen enthaltenden Plasmid erlauben,
- Reagenzien, welche die Transfektion der Zelle durch den vorgenannten Komplex ermöglichen.

## BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

### [Fig. 1](#)

**[0128]** Diese zeigt ein Polylysin-Fragment (DP 190), welches teilweise durch Histidyl-Reste substituiert ist.

### [Fig. 2](#)

**[0129]** Sie zeigt das NMR-Spektrum bei 300 MHz in D<sub>2</sub>O von Polylysin (DP 190), welches durch 70 Histidyl-Reste substituiert ist:

- 1,28 bis 1,88 ppm: 6 Protonen von Kohlenstoffen 3, 4 und 5 von substituierten oder unsubstituierten Lysinen.
- 2,39 ppm: Protonen der CH<sub>3</sub>-Gruppe von p-Toluensulfonat
- 2,75 ppm: DMSO Ausläufer
- 2,99 ppm: 2 Protonen des Kohlenstoffs 6 eines nicht substituierten Lysyl-Restes
- 3,15 ppm: 2 Protonen des Kohlenstoffs 6 eines substituierten Lysyl-Restes
- 3,35 ppm: 2 Protonen des Kohlenstoffs 9 eines Histidyl-Restes
- 4,36 ppm: 2 Protonen der Kohlenstoffe 2 und 8

4,78 ppm: Wasserpeak

7,36 ppm: 2 Protonen (Dublette, ortho-Kopplungskonstante = 7,97 Hz) der Protonen der Kohlenstoffe 2 und 6 des aromatischen Rings von p-Toluensulfonat

7,42 ppm: 1 Proton des Kohlenstoffs 11 eines Histidyl-Restes

7,71 ppm: 2 Protonen (Dublette, ortho-Kopplungskonstante = 8,01 Hz) der Protonen der Kohlenstoffe 3 und 5 des aromatischen Rings von p-Toluensulfonat

8,7 ppm: 1 Proton des Kohlenstoffs 12 eines Histidyl-Restes.

**Fig. 3**

**[0130]** Diese betrifft die Zubereitung von Polylysin (DP 190), welches teilweise durch 70 Histidyl-Reste substituiert ist.

**[0131]** Poly-L-Lysin in der Form von Hydrobromid (durchschnittliche Molekülmasse 40.000; durchschnittlicher Polymerisationsgrad 190) (1 g in 200 ml H<sub>2</sub>O), welches von Bachem Feinchemikalien (Budendorf, Schweiz) stammt, wird zunächst über einen Anionenaustauscher (Dowex 2 × 8, OH<sup>-</sup>-Form; 35 × 2,5 cm) geleitet, um das für die Zellen toxische Bromid zu entfernen. Die Polylysin-Lösung wird mit einer 10%-Lösung p-Toluensulfonsäure in Wasser neutralisiert und dann lyophilisiert.

**[0132]** Das Polylysin wird wie folgt teilweise durch Histidyl-Reste substituiert: Das Polylysin in Form von p-Toluensulfonat (50 mg; 0,96 µmol), welches in 3 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) in Anwesenheit von Diisopropylthylamin (42 µl; 288 µmol) gelöst ist, reagiert 24 Stunden lang bei 20°C mit 32 mg (Boc)His(Boc)-OH (96 µmol) in Anwesenheit von 43 mg Benzotriazolyl-N-oxy-tris-dimethylamino-phosphonium-hexafluorophosphat (BOP) (97 µmol). Die Histidyl-Reste werden anschließend in Anwesenheit von 20 ml einer Mischung aus Wasser und Trifluoressigsäure (TFA) (50/50 V/V) 24 Stunden lang bei 20°C entschützt. Das Wasser und die TFA werden durch Evaporation unter reduziertem Druck eliminiert. Das Polymer wird durch Zugabe von 10 Volumen Isopropanol präzipitiert. Nach Zentrifugation (1.800 g × 15 Minuten), wird der Rückstand mit Isopropanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation aufgefangen. Der Rückstand wird in destilliertem Wasser aufgenommen und die Lösung wird lyophilisiert. Die Anzahl x von Histidyl-Resten, die pro Polylysin-Molekül fixiert sind, wird durch Protonen-NMR wie folgt bestimmt:

$$x = 6(h_{8,7}/h_{Lys})DP$$

worin  $h_{8,7}$  das Integral des Peaks bei 8,7 ppm entsprechend dem Proton von Kohlenstoff 12 eines Histidyl-Restes ist,  $h_{Lys}$  das Integral des Peaks zwischen 1,28 und 1,88 ppm entsprechend 6 Protonen der Kohlenstoffe 3, 4 und 5 von Lysin-Resten und DP der Polymerisationsgrad des Polylysins (DP = 190) ist. Die Anzahl der Histidyl-Reste, welche pro Polylysin-Molekül fixiert sind, lautet x, wobei in der oben beschriebenen Zubereitung x = 70 ist.

**Fig. 4**

**[0133]** Diese zeigt den Transfer von Genen in HepG2-Zellen unter Verwendung von Polylysin (DP 190), welches teilweise durch Histidyl-Reste (HisPLK) substituiert ist.

**[0134]** Die DNA-HisPLK-Komplexe werden durch Mischung des Plasmids pCMVLUC (10 µg in 0,7 ml DMEM) und des Polylysins gebildet, welches durch 70 Histidyl-Reste (40 µg in 0,3 ml DMEM) substituiert ist. Nach 30 Minuten bei 20°C wird die Lösung mit den Komplexen ein Mal mit DMEM aufgelöst und mit 5% fötalem Rinderserum komplettiert. Die DNA-pLK-Komplexe werden durch Mischung des Plasmids pCMVLUC (10 µg in 0,7 ml DMEM) und des Polylysins (5 µg in 0,3 ml DMEM) gebildet. Nach 30 Minuten bei 20°C wird die Lösung mit den Komplexen ein Mal mit DMEM aufgelöst und mit 5% fötalem Rinderserum und optional mit 100 µg Chloroquin (+ chloro) oder 20 µg eines fusiogenen Peptids (+ ESCA) (GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCA) komplettiert. Das Medium, in dem die HepG2-Zellen (3 × 10<sup>5</sup> Zellen/4 cm<sup>2</sup>) innerhalb von 24 Stunden gewachsen sind, wird entfernt und durch eine Lösung (1 ml) ersetzt, die einen DNA-Polymer-Komplex (5 µg/ml DNA) enthält. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C wird das Zellmedium wieder entfernt und die Zellen werden in einem Kulturmedium in der Anwesenheit von 10% fötalem Rinderserum inkubiert. Die Expression des Gens der Luciferase wurde 48 Stunden nach der Transfektion bestimmt, indem die in den Zelllysaten abgegebene Lumineszenz (RLU: Relative Werte des abgegebenen Lichtes, ausgedrückt in arbiträren Einheiten) für 4 Sekunden gemessen wurde.

**[0135]** Unter diesen Bedingungen produziert 1 pg/ml Luciferase 2000 RLU.

**[0136]** Von links nach rechts auf der Abzissenachse entspricht das erste Rechteck dem Komplex zwischen DNA und histidylisiertem Polylysin, das zweite Rechteck entspricht dem DNA-Polylysin-Komplex, das dritte Rechteck entspricht dem Komplex zwischen DNA und mit Choroquin angereichertem Polylysin und das vierte Rechteck entspricht dem Komplex zwischen DNA und Polylysin, welches mit dem fusiogenen Peptid ESCA angereichert wurde.

**[0137]** Im Kasten: Veränderung in der Effizienz der Transfektion entsprechend der Plasmid-Menge.

#### Fig. 5

**[0138]** Diese betrifft den Transfer von Genen in HepG2-Zellen unter Verwendung von Polylysin (DP 190), das teilweise durch Histidyl-Reste substituiert ist. Sie zeigt den Einfluss der Anzahl der Histidyl-Reste, die pro Polylysin-Molekül fixiert sind, auf die Effizienz der Transfektion.

**[0139]** Von links nach rechts auf der Abzissenachse entspricht das erste Rechteck dem Komplex zwischen DNA und unsubstituiertem Polylysin, das zweite Rechteck entspricht dem Komplex zwischen DNA und Polylysin, welches durch 19 Histidyl-Reste substituiert ist, das dritte Rechteck entspricht dem Komplex zwischen DNA und Polylysin, welches durch 30 Histidyl-Reste substituiert ist, das vierte Rechteck entspricht dem Komplex zwischen DNA und Polylysin, welches durch 46 Histidyl-Reste substituiert ist, das fünfte Rechteck entspricht dem Komplex zwischen DNA und Polylysin, welches durch 63 Histidyl-Reste substituiert ist, das sechste Rechteck entspricht dem Komplex zwischen DNA und Polylysin, welches durch 70 Histidyl-Reste substituiert ist und das siebte Rechteck entspricht dem Komplex zwischen DNA und Polylysin, welches durch 84 Histidyl-Reste substituiert ist. Die DNA-HisPLK-Komplexe werden durch Mischung des Plasmids pCMVLUC (10 µg in 0,7 ml DMEM) und Polylysin gebildet, welches durch eine unterschiedliche Anzahl von Histidyl-Resten (40 µg in 0,3 ml DMEM) substituiert ist. Nach 30 Minuten bei 20° wird die Lösung mit den Komplexen einmal mit DMEM aufgelöst und mit fötalem Rinderserum (Endkonzentration 10%) komplettiert. Das Medium, in welchem die HepG2-Zellen ( $3 \times 10^5$  Zellen/4 cm<sup>2</sup>) innerhalb von 24 Stunden gewachsen sind, wird entfernt und durch eine Lösung (1 ml) ersetzt, die einen DNA/Polymer-Komplex (5 µg/ml DNA) enthält. Nach 4 Stunden langer Inkubation bei 37°C wird das Zellmedium wieder entfernt und die Zellen werden in einem Kulturmedium in Anwesenheit von 10% fötalem Rinderserum inkubiert. Die Expression des Gens der Luciferase wurde 48 Stunden nach der Transfektion bestimmt, indem die in den Zelllysaten abgegebene Lumineszenz (RLU: Relative Werte des abgegebenen Lichtes, ausgedrückt in arbiträren Einheiten) für 4 Sekunden gemessen wurde.

**[0140]** Unter diesen Bedingungen produziert 1 pg/ml Luciferase 2000 RLU.

#### Fig. 6

**[0141]** Diese betrifft den Transfer von Genen in HOS-Zellen unter Verwendung von Polylysin (DP 190), welches teilweise durch Histidyl-Reste substituiert ist. Sie zeigt den Einfluss des DNA/Polymer-Verhältnisses (auf den Abszissen ausgedrückt in µg Polymer pro 10 µg DNA) in den pCMVLUC/His<sub>84</sub>pLK-Komplexen auf die Effizienz der Transfektion.

**[0142]** Die DNA-HisPLK-Komplexe werden durch Mischung des Plasmids pCMVLUC (10 µg in 0,7 ml DMEM) und verschiedenen Mengen von Polylysin gebildet, welches durch 84 Histidyl-Reste in 0,3 ml DMEM substituiert ist. Nach 30 Minuten bei 20°C wird die Lösung mit den Komplexen ein Mal mit DMEM aufgelöst und mit 1% fötalem Rinderserum komplettiert. Das Medium, in dem die HOS-Zellen ( $2 \times 10^5$  Zellen/4 cm<sup>2</sup>) innerhalb von 24 Stunden gewachsen sind, wird entfernt und durch eine Lösung (1 ml) ersetzt, die einen DNA-Polymer-Komplex (5 µg/ml DNA) enthält. Nach 4 Stunden langer Inkubation bei 37°C wird das Zellmedium erneut entfernt und die Zellen werden in Kulturmedium in Anwesenheit von 10% fötalem Rinderserum inkubiert. Die Expression des Gens der Luciferase wurde 48 Stunden nach der Transfektion bestimmt, indem die in den Zelllysaten abgegebene Lumineszenz (RLU: Relative Werte des abgegebenen Lichtes, ausgedrückt in arbiträren Einheiten) für 4 Sekunden gemessen wurde.

**[0143]** Unter diesen Bedingungen produziert 1 pg/ml Luciferase 2000 RLU.

#### Fig. 7

**[0144]** Diese betrifft den Transfer von Genen in HepG2-Zellen unter Verwendung von Polylysin (DP 190), welches teilweise durch Histidyl-Reste substituiert ist. Sie zeigt den Einfluss der Inkubationszeit (auf den Abszissen in Stunden ausgedrückt) der pCMVLUC/His<sub>70</sub>pLK-Komplexe mit den Zellen auf die Effizienz der Transfektion.

tion. Die DNA/HisPLK-Komplexe werden durch Mischung des Plasmids pCMVLUC (10 µg in 0,7 ml DMEM) und Polylysin gebildet, welches durch 70 Histidyl-Reste (40 mg in 0,3 ml DMEM) substituiert ist. Nach 30 Minuten bei 20°C wird die Lösung mit den Komplexen ein Mal mit DMEM aufgelöst und bis zu 10% mit fötalem Rinderserum komplettiert. Das Medium, in dem die HepG2 Zellen ( $3 \times 10^5$  Zellen/4 cm<sup>2</sup>) innerhalb von 24 Stunden gewachsen sind, wird entfernt und durch eine Lösung (1 ml) ersetzt, die einen DNA-Polymer-Komplex (5 µg/ml DNA) enthält. Nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 37°C wird das Zellmedium wieder entfernt und die Zellen werden in Kulturmedium in Anwesenheit von 10% fötalem Rinderserum inkubiert. Die Expression des Gens der Luciferase wurde 48 Stunden nach der Transfektion bestimmt, indem die in den Zelllysaten abgegebene Lumineszenz (RLU: Relative Werte des abgegebenen Lichtes, ausgedrückt in arbiträren Einheiten) für 4 Sekunden gemessen wurde.

**[0145]** Unter diesen Bedingungen produziert 1 pg/ml Luciferase 2000 RLU.

#### Fig. 8

**[0146]** Diese betrifft den Transfer von Genen in HepG2-Zellen unter Verwendung von Polylysin (DP 190), welches teilweise durch Histidyl-Reste substituiert ist. Sie zeigt den Einfluss der Menge an fötalem Rinderserum (auf der Abszissenachse ausgedrückt in % des Serums im verwendeten Medium), das während der Inkubation der pCMVLUC/His<sub>70</sub>PLK-Komplexe mit den Zellen anwesend ist, auf die Effizienz der Transfektion. Die DNA/HisPL-Komplexe werden durch Mischung des Plasmids pCMVLUC (10 µg in 0,7 ml DMEM) und Polylysin gebildet, welches durch 70 Histidyl-Reste (40 µg in 0,3 ml DMEM) substituiert ist. Nach 30 Minuten bei 20°C wird die Lösung mit den Komplexen ein Mal mit DMEM aufgelöst und mit unterschiedlichen Mengen an fötalem Rinderserum komplettiert. Das Medium, in dem die HepG2-Zellen ( $3 \times 10^5$  Zellen/4 cm<sup>2</sup>) innerhalb von 24 Stunden gewachsen sind, wird entfernt und durch eine Lösung (1 ml) ersetzt, die einen DNA-Polymer-Komplex (5 µg/ml DNA) enthält. Nach 4 Stunden langer Inkubation bei 37°C wird das Zellmedium wieder entfernt und die Zellen werden in Kulturmedium in Anwesenheit von 10% fötalem Rinderserum inkubiert. Die Expression des Gens der Luciferase wurde 48 Stunden nach der Transfektion bestimmt, indem die in den Zelllysaten abgegebene Lumineszenz (RLU: Relative Werte des abgegebenen Lichtes, ausgedrückt in arbiträren Einheiten) für 4 Sekunden gemessen wurde.

**[0147]** Unter diesen Bedingungen produziert 1 pg/ml Luciferase 2000 RLU.

#### Fig. 9

**[0148]** Diese betrifft den Transfer von Genen in verschiedenen Zelllinien unter Verwendung von Polylysin (DP 190), welches durch 84 Histidyl-Reste substituiert ist. Die DNA-HisPLK-Komplexe werden durch Mischung des Plasmids pCMVLUC (10 µg in 0,7 ml DMEM) und Polylysin gebildet, welches durch 84 Histidyl-Reste in 0,3 ml DMEM substituiert sind. Nach 30 Minuten bei 20°C wird die Lösung mit den Komplexen ein Mal mit DMEM aufgelöst und bis zu 10% mit fötalem Rinderserum komplettiert. Das Medium, in dem die Zellen ( $2-3 \times 10^5$  Zellen/4 cm<sup>2</sup>) innerhalb von 24 Stunden gewachsen sind, wird entfernt und durch eine Lösung ersetzt, die einen DNA-Polymer-Komplex (5 µg/ml DNA) enthält. Nach 4 Stunden langer Inkubation bei 37°C wird das Zellmedium wieder entfernt und die Zellen werden in Kulturmedium in Anwesenheit von 10% fötalem Rinderserum inkubiert. Die Expression des Gens der Luciferase wurde 48 Stunden nach der Transfektion bestimmt, indem die in den Zelllysaten abgegebene Lumineszenz (RLU: Relative Werte des abgegebenen Lichtes, ausgedrückt in arbiträren Einheiten) für 4 Sekunden gemessen wurde. HepG2 = Zelllinie, die aus einem humanen Leberkarzinom stammt; HOS = Zelllinie, die aus einem humanen Osteosarkom stammt; MCF-7 = Zelllinie, die aus einem humanen Adenokarzinom stammt; B16 = Zelllinie, die aus einem murinen Melanom stammt; COS = Zelllinie, die aus Nierenzellen eines Affen stammt, welche mit SV40 transformiert wurden; Rb1 = Zelllinie, die aus Zellen glatter Muskulatur der Aorta des Kaninchens stammt; HeLa = humane Epitheloid-Zelllinie; 16 HBE = Epithelzelllinie aus normalen menschlichen Atmungsorganen; ΣCFTE = Epithelzelllinie aus menschlichen Atmungsorganen, die von dem für Muskoviszidose (CFTR) verantwortlichen Gendefekt betroffen sind.

Herstellung von histidyliertem Polylysin, welches durch Lactose substituiert wird

– Herstellung von Polylysin, welches durch aktivierte Thiolgruppen substituiert wird

**[0149]** Polylysin in der Form von Hydrobromid (durchschnittliche Molekülmasse 40.000; durchschnittlicher Polymerisationsgrad 190) (1 g in 200 ml H<sub>2</sub>O), das von Bachem Feinchemikalien (Budendorf, Schweiz) stammt, wird zunächst über einen Anionenaustauscher (Dowex 2 × 8, OH<sup>-</sup>-Form; 35 × 2,5 cm) geleitet, um das für Zellen toxische Bromid zu entfernen. Die Polylysin-Lösung wird mit einer 10% Lösung p-Toluenesulfonsäu-

re in Wasser neutralisiert und dann lyophilisiert.

**[0150]** Das Polylysin p-Toluensulfonat (50 mg; 0,91  $\mu\text{mol}$ ) wird in 2 ml DMSO aufgelöst und reagiert bei 20°C 12 Stunden lang mit dem N-Hydroxysuccinimid-Ester von 4-Carbonyl- $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -(2-pyridinyldithio)toluen (SMPT, Pierce, USA) (5,3 mg; 13,6  $\mu\text{mol}$ ). Das durch Carbonyl- $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -(2-pyridinyldithio)toluen-Gruppen (= MPT-pLK) substituierte Polylysin wird durch Zusatz von 10 Volumen Isopropanol präzipitiert. Nach Zentrifugation (1.800 g  $\times$  15 Minuten) wird der Rückstand mit Isopropanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation aufgefangen. Der Rückstand wird in destilliertem Wasser aufgenommen und die Lösung wird lyophilisiert. Die durchschnittliche Anzahl an MPT-Molekülen, die pro Polylysin-Molekül gebunden sind, wird durch Absorbierung bei 343 nm von Pyridinethion ( $\epsilon = 8.080 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) bestimmt, welches durch quantitative Reduzierung der Disulfid-Bindung mithilfe von TCEP (Tris-Carboxyethylphosphin) freigesetzt wird: Die durchschnittliche MPT-Anzahl pro Polylysin-Molekül beträgt 10.

– Herstellung von histidylisiertem Polylysin, welches durch aktivierte Thiolgruppen substituiert wird

**[0151]** Polylysin in der Form von p-Toluenesulfonat, welches durch 10 Reste MPT (50 mg; 0,96  $\mu\text{mol}$ ) substituiert ist, in 3 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) in der Anwesenheit von Diisopropylethylamin (42  $\mu\text{l}$ ; 288  $\mu\text{mol}$ ) gelöst, reagiert 24 Stunden lang bei 20°C mit 32 mg (Boc)His(Boc)-OH (80  $\mu\text{mol}$ ) in Anwesenheit von 43 mg Benzotriazolyl-N-oxy-tris-dimethylaminophosphonium-hexafluorophosphat (BOP) (97  $\mu\text{mol}$ ). Die Histidyl-Reste werden danach in Anwesenheit von 20 ml einer Mischung aus Wasser und Trifluoressigsäure (TFA) (50/50 V/V) bis zu 50% bei 20°C 24 Stunden lang entschützt. Das Wasser und die TFA werden durch Evaporation unter reduziertem Druck entfernt. Das Polymer wird durch Zugabe von 10 Volumen Isopropanol präzipitiert. Nach Zentrifugation (1.800 g  $\times$  15 Minuten) wird der Rückstand mit Isopropanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation aufgefangen. Der Rückstand wird in destilliertem Wasser aufgenommen und die Lösung wird lyophilisiert. Die Anzahl der Histidyl-Reste, die pro Polylysin-Molekül fixiert sind, bestimmt durch Protonen-NMR, beträgt 60.

#### Reduktion des Dithiopyridyl

**[0152]** Zunächst wird das Oligosid nach einer Methode, die im Französischen Patentantrag 9407738 (Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. and Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neue Derivate von Oligosiden, ein Verfahren für ihre Herstellung und ihre Verwendung]) beschrieben ist, in ein Glycopeptid transformiert.

**[0153]** Das Glycopeptid wird über eine Disulfid-Brücke an das teilweise histidylierte Polylysin fixiert.

**[0154]** Das Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ -pyroglutamyl-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S-S-pyridin (3  $\mu\text{mol}$ ) wird mit 3,5  $\mu\text{mol}$  TCEP (Tris-Carboxyethylphosphin) in einem Sodiumphosphat-Puffer, 0,1 M, bei pH 7 (1 ml) 1 Stunde lang bei 20°C behandelt. Diese Lösung wird zum teilweise histidylisiertem Polylysin, welches durch 10 MPT-Reste (10 mg; 0,2  $\mu\text{mol}$ ) substituiert ist, gelöst im Sodiumphosphat-Puffer 0,1 M bei pH 7 (1 ml), hinzugefügt. Nach 1 Stunde bei 20°C wird das Polymer durch Zusatz von 10 Volumen Isopropanol präzipitiert. Das Präzipitat wird nach Zentrifugation (1.800 g, 15 min) aufgefangen, in Isopropanol gewaschen und dann in Wasser gelöst und lyophilisiert.

**[0155]** Das Ergebnis der Kopplungsreaktion unter den angewandten Bedingungen ist gleich oder größer als 90%.

Herstellung von histidylisiertem Polylysin, welches durch ein komplexes Oligosid substituiert ist: Lewis<sup>b</sup>

Beispiel für Lewis<sup>b</sup> = Fuca4(Fuca2Gal $\beta$ 3)GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc

**[0156]** Komplexe Oligoside, die einen Rest von Glucose (Glc) oder N-Acetylglucosamin (GlcNAc) in reduzierender Position haben, werden zunächst nach einer Methode, die im Französischen Patentantrag 9407738 (Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. und Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neue Derivate von Oligosiden, ein Verfahren für ihre Herstellung und ihre Verwendung]) beschrieben ist, in Glycopeptide transformiert.

**[0157]** Die komplexen Oligoside werden an das teilweise histidylierte Polylysin fixiert, indem das Glycopeptid über eine Disulfid-Brücke an das histidylierte Polylysin gebunden wird.

**[0158]** Das Oligosid Fuca4(Fuca2Gal $\beta$ 3)GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc wird in das Glycopeptid-Derivat

Fuca4(Fuca2Galβ3)GlcNAcβ3Galβ4Glcβ-pyroglutamyl-R umgewandelt. Die Carboxyl-Gruppe des Pyroglutamyl wird durch eine Dithiopyridin-Funktion substituiert, wodurch das Glycopeptid: Fuca4(Fuca2Galβ3)GlcNAcβ3Galβ4Glcβ-pyroglutamyl-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S-S-pyridin entsteht (Französischer Patentantrag 9407738: Monsigny M., Sdiqui N., Roche A. C. und Mayer R., 1994, Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications [Neue Derivate von Oligosiden, ein Verfahren für ihre Herstellung und ihre Verwendung]) und Quétard et al., Simple synthesis of novel glycosynthons for glycoconjugate preparation: oligosylpyroglutamyl derivatives [Einfache Synthese von neuartigen Glycosynthonen für die Herstellung von Glyconkonjugaten: Oligosylpyroglutamyl], in Vorbereitung).

– Reduzierung des Glycopeptids

**[0159]** Das Glycopeptid (2 µmol) wird mit 2,2 µmol TCEP (Tris-Carboxyethylphosphin) in einem Natriumphosphat-Puffer 0,1 M bei pH 7 (1 ml) 1 Stunde lang bei 20°C behandelt. Diese Lösung wird dem teilweise histidylisiertem Polylysin zugefügt, welches durch 10 Reste MPT (10 mg; 0,2 µmol) substituiert ist, gelöst in dem Natriumphosphat-Puffer 0,1 M bei pH 7 (1 ml). Nach 1 Stunde bei 20°C wird das Polymer durch Zusatz von 10 Volumen Isopropanol präzipitiert. Das Präzipitat wird nach Zentrifugation (1.800 g, 15 min) aufgefangen, in Isopropanol gewaschen und dann in Wasser gelöst und lyophilisiert.

**[0160]** Das Ergebnis der Kopplungsreaktion unter den angewandten Bedingungen ist gleich oder größer als 90%.

Herstellung von histidylisiertem Polylysin, welches durch das Peptid ANP substituiert ist

– Herstellung von Polylysin, welches durch aktivierte Thiolgruppen substituiert wird

**[0161]** Polylysin in der Form von Hydrobromid (durchschnittliche Molekülmasse 40.000; durchschnittlicher Polymerisationsgrad 190) (1 g in 200 ml H<sub>2</sub>O), das von Bachem Feinchemikalien (Budendorf, Schweiz) stammt, wird zunächst über eine Anionenaustauscher (Dowex 2 × 8, OH<sup>-</sup>-Form; 35 × 2,5 cm) geleitet, um das für Zellen toxische Bromid zu entfernen. Die Polylysin-Lösung wird mit einer 10% Lösung p-Toluenesulfonsäure in Wasser neutralisiert und dann lyophilisiert.

**[0162]** Das Polylysin p-Toluensulfonat (50 mg; 0,91 µmol) wird in 2 ml DMSO aufgelöst und reagiert bei 20°C 12 Stunden lang mit dem N-Hydroxysuccinimid-Ester von 4-Carbonyl-α-methyl-α-(2-pyridinyldithio)toluen (SMPT, Pierce, USA) (5,3 mg; 13,6 µmol). Das Polymer (MPT-pLK) wird durch Zusatz von 10 Volumen Isopropanol präzipitiert. Nach Zentrifugation (1.800 g × 15 Minuten) wird der Rückstand mit Isopropanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation aufgefangen. Der Rückstand wird in destilliertem Wasser aufgenommen und die Lösung wird lyophilisiert. Die durchschnittliche Anzahl an MPT-Molekülen, die pro Polylysin-Molekül gebunden sind, wird durch Absorbierung bei 343 nm Pyridinethion ( $\epsilon = 8.080 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) bestimmt, welches durch quantitative Reduzierung der Disulfid-Bindung mithilfe von TCEP (Tris-Carboxyethylphosphin) freigesetzt wird: Die durchschnittliche MPT-Anzahl beträgt 10.

– Herstellung von histidylisiertem Polylysin, welches durch aktivierte Thiolgruppen substituiert wird

**[0163]** Das Polylysin in Form von p-Toluenesulfonat, welches durch 10 MPT-Reste (50 mg; 0,96 µmol) substituiert ist, wird in 3 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) in der Anwesenheit von Diisopropylethylamin (42 µl; 288 µmol) aufgelöst und reagiert 24 Stunden lang bei 20°C mit 32 mg (Boc)His(Boc)-OH (80 µmol) in Anwesenheit von 43 mg Benzotriazolyl-N-oxy-tris-dimethylaminophosphonium-hexafluorophosphat (BOP) (97 µmol). Die Histidyl-Reste werden dann in Anwesenheit von 20 ml einer 50% Lösung Trifluoressigsäure (TFA) 48 Stunden lang bei 20°C entschützt. Das Wasser und die TFA werden durch Evaporation unter reduziertem Druck entfernt. Das Polymer wird durch Zugabe von 10 Volumen Isopropanol präzipitiert. Nach Zentrifugation (1.800 g × 15 Minuten) wird der Rückstand mit Isopropanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation aufgefangen. Der Rückstand wird in destilliertem Wasser aufgenommen und die Lösung wird lyophilisiert. Die Anzahl x der Histidyl-Reste, die pro Polylysin-Molekül fixiert sind, bestimmt durch Protonen-NMR; beträgt 60.

– Reduzierung des Peptids ANP

**[0164]** Das Peptid ANP (CYSLRRSSAFGGRIDRIGAQSA) mit seinem Cystein in der N-terminal Position geschützt in der Form von Thiopyridinyl (7,5 mg; 2 µmol) reagiert bei 20°C 15 Minuten lang mit TCEP (0,7 mg; 2 µmol) in 1 ml Puffer 0,1 M NaCl, 0,1 M tris/HCl pH 7,6.



– Herstellung des histidylierten Polylysins, welches mit dem Peptid ANP substituiert ist

**[0165]** Das teilweise histidylierte Polylysin, welches durch 10 MPT-Moleküle ( $\text{MPT}_{10^-}$ , His<sub>70</sub>pLK (10 mg; 0,2  $\mu\text{mol}$ ) in 1 ml Puffer 0,1 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl pH 7,6 substituiert ist, reagiert bei 20°C 24 Stunden lang mit 7,5 mg (2  $\mu\text{mol}$ ) des Peptids ANP, dessen Cystein reduziert wurde. Das Polymer (ANP-S-, His<sub>70</sub>-pLK) wird durch Zugabe von 10 Volumen Isopropanol präzipitiert. Nach Zentrifugation (1.800 g  $\times$  15 Minuten) wird der Rückstand mit Isopropanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation aufgefangen. Der Rückstand wird in destilliertem Wasser aufgenommen und die Lösung wird lyophilisiert.

**[0166]** Die durchschnittliche Anzahl von Molekülen des Peptids ANP, die pro Polymer-Molekül fixiert sind, wird durch Analyse der Aminosäuren des Polymers durch Hochdruck-Chromatographie (HPLC) mit einer C<sub>18</sub> Phasenumkehr-Säule (Supelcosil LC-18-DB, Supelco, Bellefonte, PA, USA) nach Hydrolyse des Polymers in HCl 5,6 N bei 105°C 72 Stunden lang und nach Umwandlung der freigesetzten Aminosäuren in Phenylthiohydantoin-Derivate (PTH-aa) bestimmt. Die durchschnittliche Anzahl von ANP pro Polymer-Molekül beträgt 8.

Herstellung von histidylisiertem Polylysin, welches durch Biotin substituiert ist

**[0167]** Polylysin, welches durch 60 Histidyl-Reste (15 mg; 0,28  $\mu\text{mol}$ ) substituiert ist, aufgelöst in 1 ml DMSO in Anwesenheit von DIEA (4  $\mu\text{l}$ ; 28  $\mu\text{mol}$ ) reagiert 7 Stunden lang bei 20°C mit dem N-Hydroxysuccinimid-Ester von 6-(biotinamido)hexanoat (NHS-LC-biotin, Pierce, USA). Das Polymer wird durch Zugabe von 10 Volumen Isopropanol präzipitiert. Das Präzipitat wird nach Zentrifugation (1.800 g, 15 Minuten) aufgefangen, in Isopropanol gewaschen und dann in Wasser gelöst und lyophilisiert.

### Patentansprüche

1. Komplex zwischen mindestens einer Nukleinsäure (negative Ladung) und mindestens einem positiv geladenen Polymerkonjugat, wobei die Bindung zwischen der Nukleinsäure und dem Polymerkonjugat elektrostatischer Natur ist, das Polymerkonjugat ein Polymer ist, das durch Monomere gebildet ist, die freie  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen tragen und so ist, dass:

- die freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der vorher erwähnten Monomere in einem Anteil von mindestens 10% durch Reste substituiert sind, die in einem Medium, dessen pH geringer als der des Plasmas oder des Serums ist, protonierbar sind, wobei die erwähnten Reste in einem Medium, dessen pH geringer als der des Plasmas oder des Serums ist, eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen,
- wobei die vorher erwähnten Reste unter anderem die folgenden Eigenschaften besitzen:
- sie enthalten eine funktionelle Gruppe, die es ihnen erlaubt, an die vorher erwähnten Polymere fixiert zu sein,
- sie sind nicht als ein durch einen zellulären Membranrezeptor erkanntes Erkennungssignal aktiv,
- sie gehören zu der Familie von Verbindungen, welche einen Imidazolkern enthalten,
- sie gehören zu der Familie der Chinoline,
- sie gehören zu der Familie der Ptenne,
- sie gehören zu der Familie der Pyridine,

unter der Voraussetzung, dass die freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen insgesamt mindestens 30% der Anzahl der Monomere des Polymerskeletts des vorher erwähnten Polymerkonjugats sind, und unter der Voraussetzung, dass das Polymerkonjugat unterschiedlich zu dem Polylysin-(dithiopyridyl)propionat-Konjugat ist.

2. Komplex nach Anspruch 1, in dem die Reste, die in einem Medium protonierbar sind, dessen pH niedriger als der des Plasmas oder des Serums ist, mindestens eine freie  $\text{NH}_3^+$ -Funktion enthalten.

3. Komplex nach Anspruch 1 oder 2, in dem Moleküle vorhanden sind, die ein durch einen zellulären Membranrezeptor erkanntes Erkennungssignal bilden, entweder durch Substitution bestimmter freier  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der Monomere, oder durch bestimmte Reste, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen, oder durch Substitution der freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der Reste, die eine Destabilisierung der Zellmembranen verursachen.

4. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der Monomere in einem Anteil von etwa 15% bis etwa 45% substituiert sind.

5. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei darin die Reste, die in einem Medium protonierbar sind, dessen pH niedriger als der des Plasmas oder des Serums ist, Basen sind, deren pK in einem wässrigen Medium niedriger als 8 ist, so dass ein größerer Anteil als 50% dieser Basen, der an ein kationisches Polymer

gebunden ist, in einem neutralen Medium von pH 7,4 nicht protoniert wird.

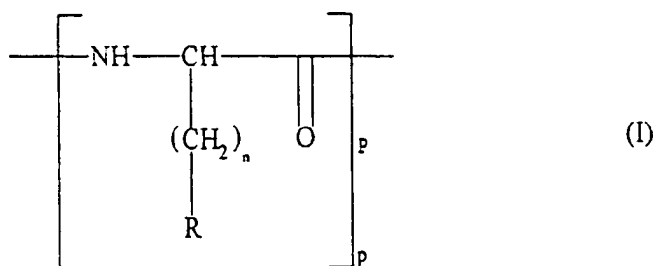
6. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 5, in welchem die in einem Medium protonierbaren Reste, dessen pH niedriger als der des Plasmas oder des Serums ist, die eine Destabilisierung der zellulären Membranen verursachen, ausgewählt sind aus:

Histidin, 4-Carboxymethyl-imidazol, 3-(1-Methyl-imidazol-4yl)-alanin, 3-(3-Methyl-imidazol-4yl)-alanin, 2-Carboxy-imidazol, Histamin, 3-(Imidazol-4yl)-L-Milchsäure, 2-(1-Methyl-imidazol-4yl)ethylamin, 2-(3-Methyl-imidazol-4yl)ethylamin,  $\beta$ -Alanyl-histidin-(carnosin), 7-Chlor-4(amino-1-methylbutylamin)-chinolin, N<sup>4</sup>-(7-Chlor-4-chinolinyl)-1,4-pentandiamin, 8-(4-Amino-1-methylbutylamin)-6-methoxychinolin (Primachin), N<sup>4</sup>-(6-Methoxy-8-chinolinyl)-1,4-pentandiamin, Chininsäure, Chinolincarbonsäure, Pteroinsäure, Nikotinsäure, Chinolinsäure.

7. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die durch die Monomere getragenen NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Funktionen Lysin-Reste oder Ornithin-Reste sind, und dass in ihnen:

– die verbleibenden freien NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Funktionen der vorher erwähnten Monomere gleichmäßig entsprechend zu etwa 1% bis etwa 60% auf ein Molekül substituiert sind, welches ein durch einen zellulären Membranrezeptor erkanntes Erkennungssignal bildet, wobei das Erkennungssignal eine Molekülmasse unter 5000 hat, unter der Voraussetzung, dass die Gesamtheit der freien NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Funktionen wenigstens 30% der Anzahl der Monomere des Polymer skeletts des vorher erwähnten Polymerkonjugats ist.

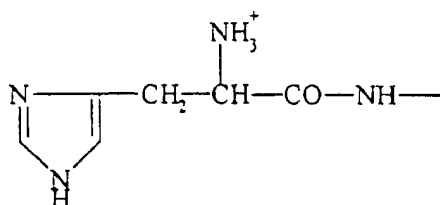
8. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 5, in dem das Polymer eine polymere Gruppe der folgenden Formel (I) enthält:



in der:

- p eine ganze Zahl von 15 bis 900 ist,
- n eine ganze Zahl ist von 1 bis 6 ist,
- die polymere Gruppe Radikale R enthält, unter denen:
- 10% bis 45% der Anzahl der Radikale R einen Rest darstellen, der einen Imidazolkern umfasst,
- 10% bis 90% der Anzahl der Radikale R die freien o-Amino NH<sub>3</sub><sup>+</sup> darstellen.

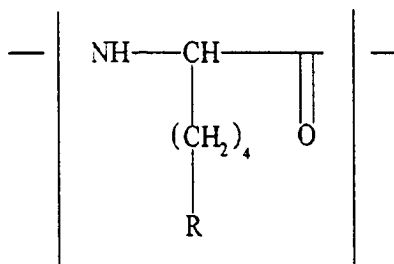
9. Komplex nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass R durch die Formel dargestellt wird:



10. Komplex nach einem der Ansprüche 8 oder 9, in dem 10% bis 90% der Anzahl der Radikale R die freien o-Amino NH<sub>3</sub><sup>+</sup> darstellen, wobei sie zu 0 bis 50% durch ein Molekül substituiert sind, welches ein Erkennungssignal bildet.

11. Komplex nach Anspruch 8 bis 10, in dem das Polymer eine polymere Gruppe der folgenden Formel (II) umfasst:





in der:

- p die im Anspruch 8 angegebene Bedeutung hat,
- 10% bis 45% der Anzahl der Radikale R einen Rest darstellen, der einen Imidazolkern enthält.

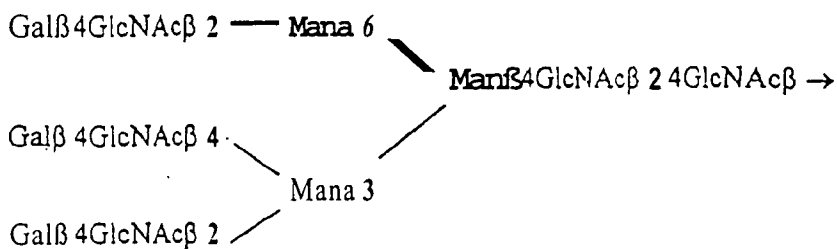
12. Komplex nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die verbleibenden Radikale R das heißt 30% bis 90% der Anzahl der Radikale R, o-Amino  $\text{NH}_3^+$  darstellen.

13. Komplex nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass 0% bis 45% der Radikale R durch ein Molekül substituiert sind, welches ein durch einen zellulären Membranrezeptor erkanntes Erkennungssignal bildet.

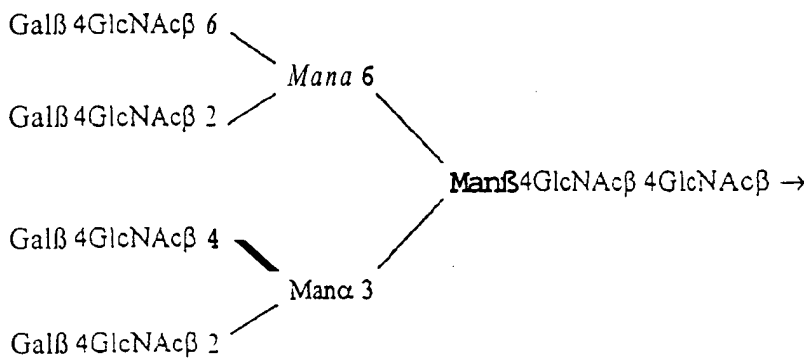
14. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungssignal ausgewählt ist aus:

A) einfache oder komplexe Oside, welche durch die Membranlektine erkannt werden und ausgewählt werden aus:

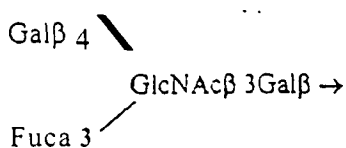
a. Asialooligosid des Triantennenlactosamin-Typs: Asialoglykoprotein-Rezeptor



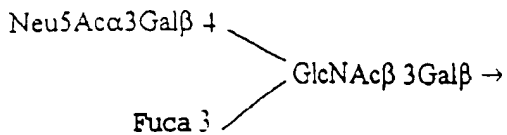
Asialooligosid des Tetraantennenlactosamin-Typs: Asialoglykoprotein-Rezeptor



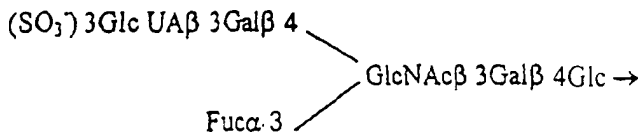
c. Lewis x



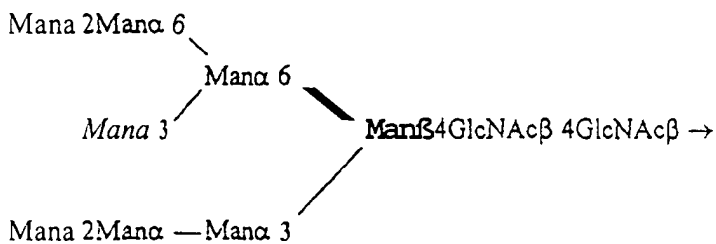
d. Lewis x Sialyl LECAM 3/2



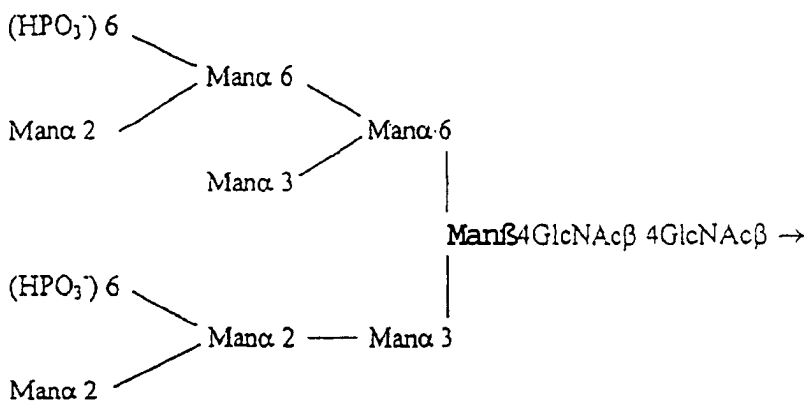
e. Derivate des Lewis-x-Sulfats(HNK1)



f. Oligomannosid: Mannose-Rezeptor

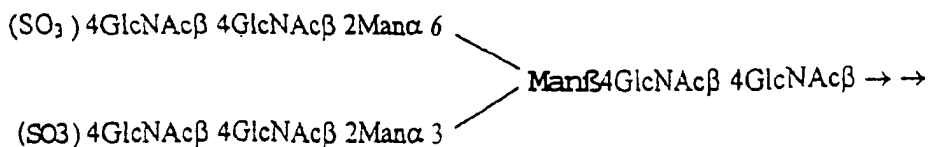


g. Phosphoryliertes Oligomannosid: Mannose-6-Phosphat-Rezeptor



h. Oligosaccharid vom sulfatierten Lactosamin-Typ

Rezeptor des sulfatierten GalNAc-4



B) Peptide

- a) Antiinflammatorische Peptide oder bestimmte ihrer Fragmente, die durch die Rezeptoren der Gefäßwand erkannt werden,
  - b) Ligandpeptide der Integrine,
  - c) Chemotaktische Faktoren,
  - d) Peptidhormone
- C) natürliche Metabolite.

15. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure ausgewählt ist aus:

- a) Markergenen,
- b) therapeutische Zielgene,
- c) Vakzine-Zielgene.

16. Komplex nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Markergene ausgewählt sind aus: den Luciferase-Genen, denen das grüne Protein der Meduse *Aequorea victoria* enthaltenden Genen, den  $\beta$ -Galactosidase enthaltenden Genen, den Chloramphenicolacetyltransferase enthaltenden Genen und den eine Antibiotika-Resistenz vermittelnden Genen.

17. Komplex nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die therapeutischen Zielgene ausgewählt sind aus:

- Rezeptoren von Lipoproteinen geringer Dichte, die im Fall der Hypercholesterolemie defekt sind,
- Gerinnungsfaktoren: Faktoren VIII und IX,
- Phenylalanin-Hydroxylase (Phenylketonurie),
- Adenosindesaminase (Immundefizienz ADA),
- Lysosomenzyme, wie die  $\beta$ -Glucosidase im Fall der Gaucher-Krankheit,
- Dystrophin und Minidystrophin (Myopathie),
- Tyrosinhydroxylase (Parkinson),
- Kreuzfaktoren der Neuronen (Alzheimer),
- CFTR zystisch fibrotischer Transmembranleitfähigkeitsregulator (Mukoviszidose),
- Alpha1-Antitrypsin,
- Zytokine (Interleukine, TNF Tumornekrosefaktor),
- Thymidinkinase des Herpes-Simpler-Virus,
- Proteine des MHC, Haupthistokompatibilitätssystems, und insbesondere die HLA-B7,
- Zytosindesaminase,
- Gene, die für Sense- und Antisense-RNA kodieren,
- Gene, die für Ribozyme kodieren.

18. Komplex nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Vakzine-Zielgene ausgewählt sind aus den Genen, die für virale Antigene kodieren (Vakzination).

19. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 10, in dem:

- das Polymer Polylysin ist und ein Polymerisationsgrad von etwa 15 bis etwa 900 aufweist,
- die freien  $\text{NH}_3^+$ -Funktionen der Lysine in einem Anteil von 35% durch Histidyl-Reste substituiert sind,
- die Nukleinsäure eine Molekülmasse von etwa  $10^6$  bis  $10^3$  aufweist,
- die Beziehung zwischen der mittleren Anzahl der Basenpaare der Nukleinsäure pro Lysinmolekül etwa zwischen 0,6 bis etwa 6 ist.

20. Verwendung eines Komplexes nach einem der Ansprüche 1 bis 19 für die Herstellung eines Medikaments zur Transfektion in vitro, ex vivo oder in vivo von Zellen mit der Hilfe eines Genes, insbesondere den in den Ansprüchen 17 und 13 definierten.

21. Verwendung eines Komplexes nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen ausgewählt sind aus:

- hämatopoetischen Stammzellen,
- dendritischen Zellen,
- Leberzellen,
- Skelettmuskelzellen,
- Hautzellen:
- Fibroblasten,
- Keratinozyten,
- dendritischen Zellen,
- Melanozyten,
- Gefäßwandzellen,
- Endothel,
- glatte Muskulatur,
- Epithelzellen der Atmungsorgane
- Zellen des zentralen Nervensystems,
- Krebszellen,
- Zellen des Immunsystems.

22. Verfahren für die Transfektion in vitro oder ex vivo, dadurch gekennzeichnet, dass es in der Anwesenheit eines Komplexes nach einem der Ansprüche 1 bis 19 durchgeführt wird, in einem Medium, welches zu transfizierende Zellen unter Bedingungen enthält, die wie folgt sind:

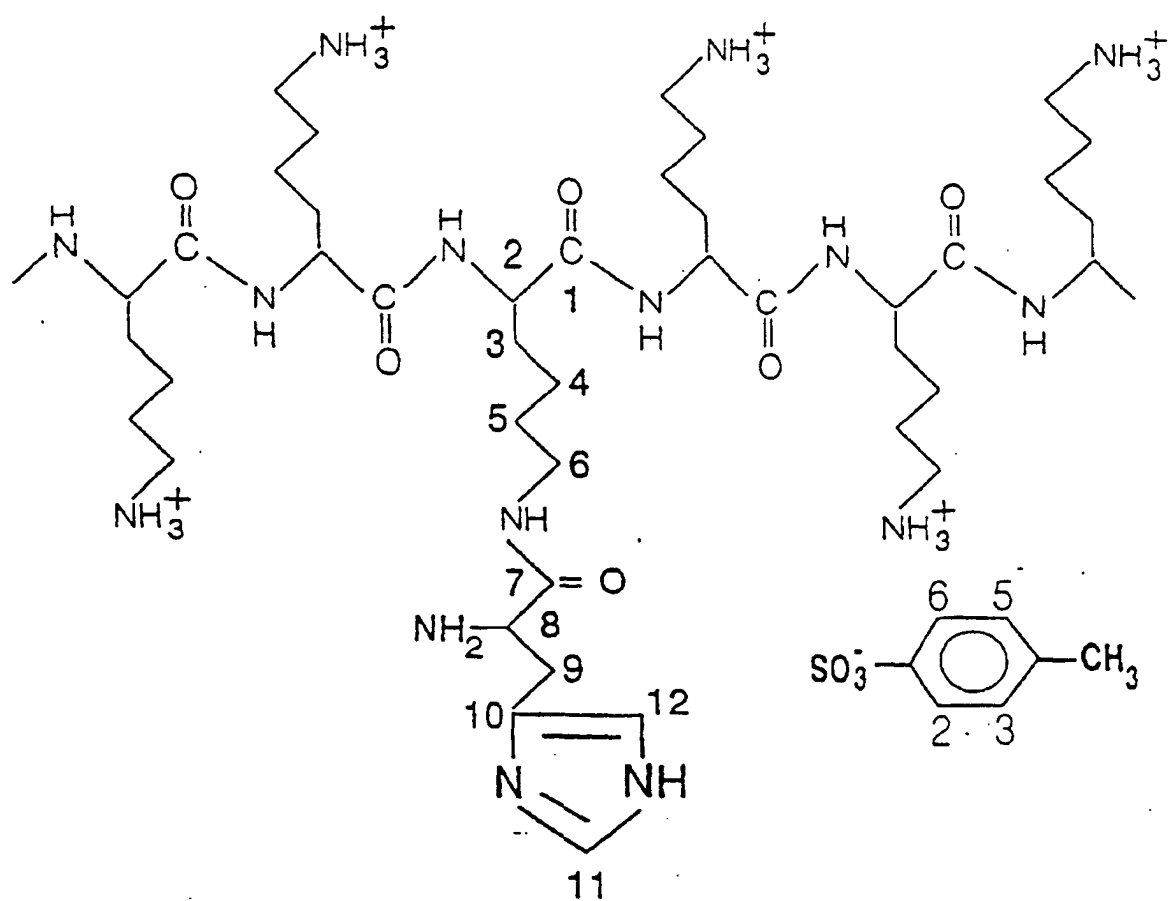
- Passage des Komplexes vom Medium in das Zytoplasma der Zellen,
- Befreien der in dem vorher erwähnten Komplex enthaltenden Nukleinsäure im Cytosol und/oder im Kern der Zellen,
- Transkription und Expression der Nukleinsäure in den transfizierten Zellen.
- Expression der zum transfizierten Gen korrespondierenden Protein.

23. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff wenigstens einen der Komplexe nach einem der Ansprüche 1 bis 19 zusammen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger enthält.

24. Verwendung eines Komplexes nach einem der Ansprüche 1 bis 19 für die Herstellung eines Medikaments, beabsichtigt z. B. für die Behandlung vererbter oder erworbener metabolischer Störungen oder zur Behandlung von Tumoren oder zur Herstellung einer Vakzine, z. B. eine Vakzine gegen die Grippe.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen



# HispLK

Figur 1

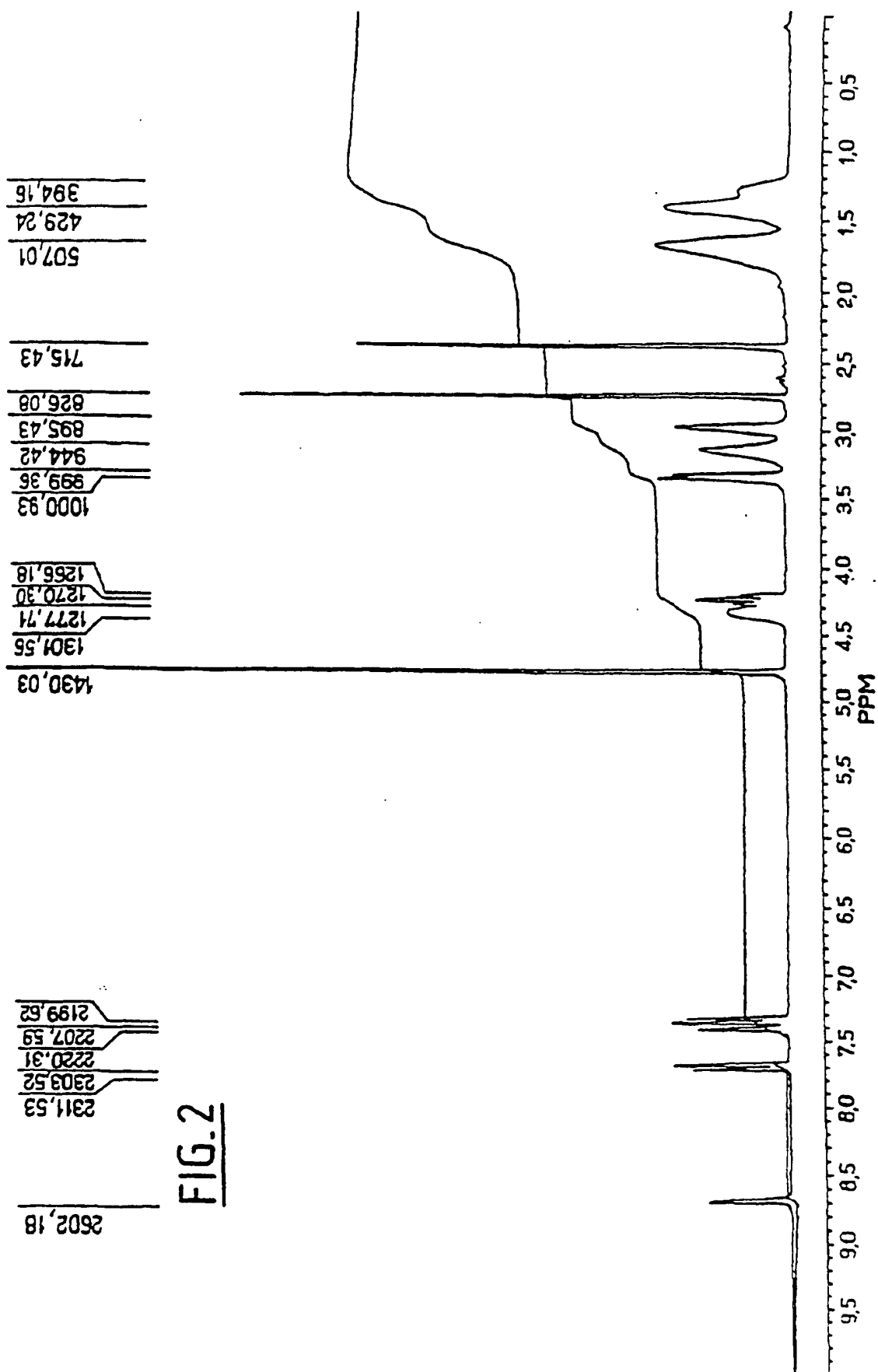
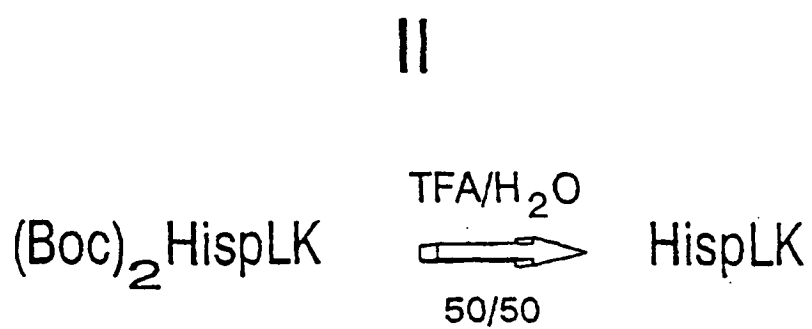
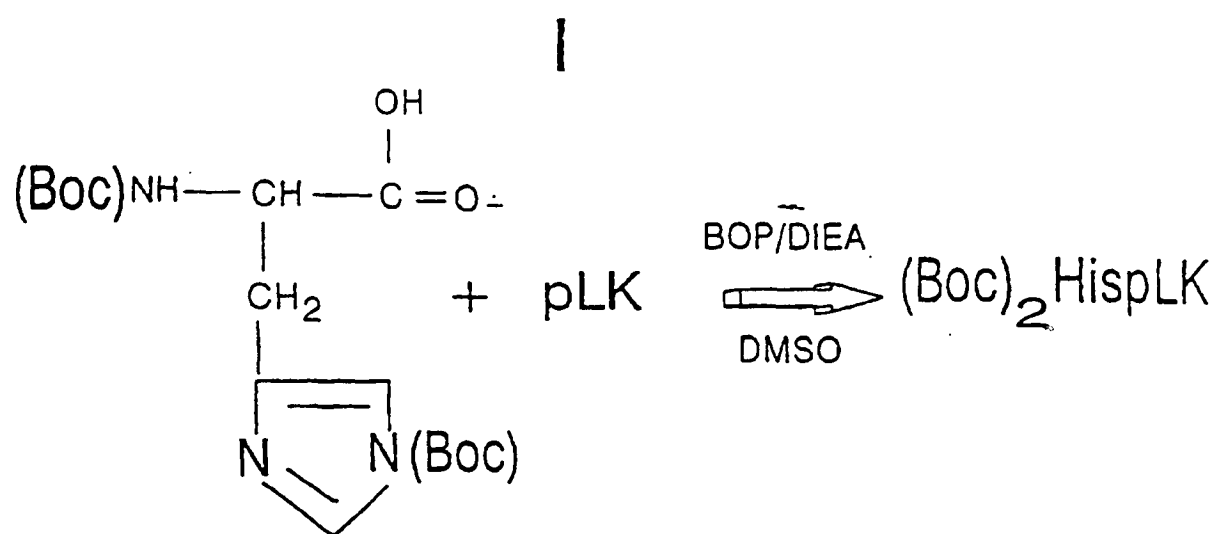
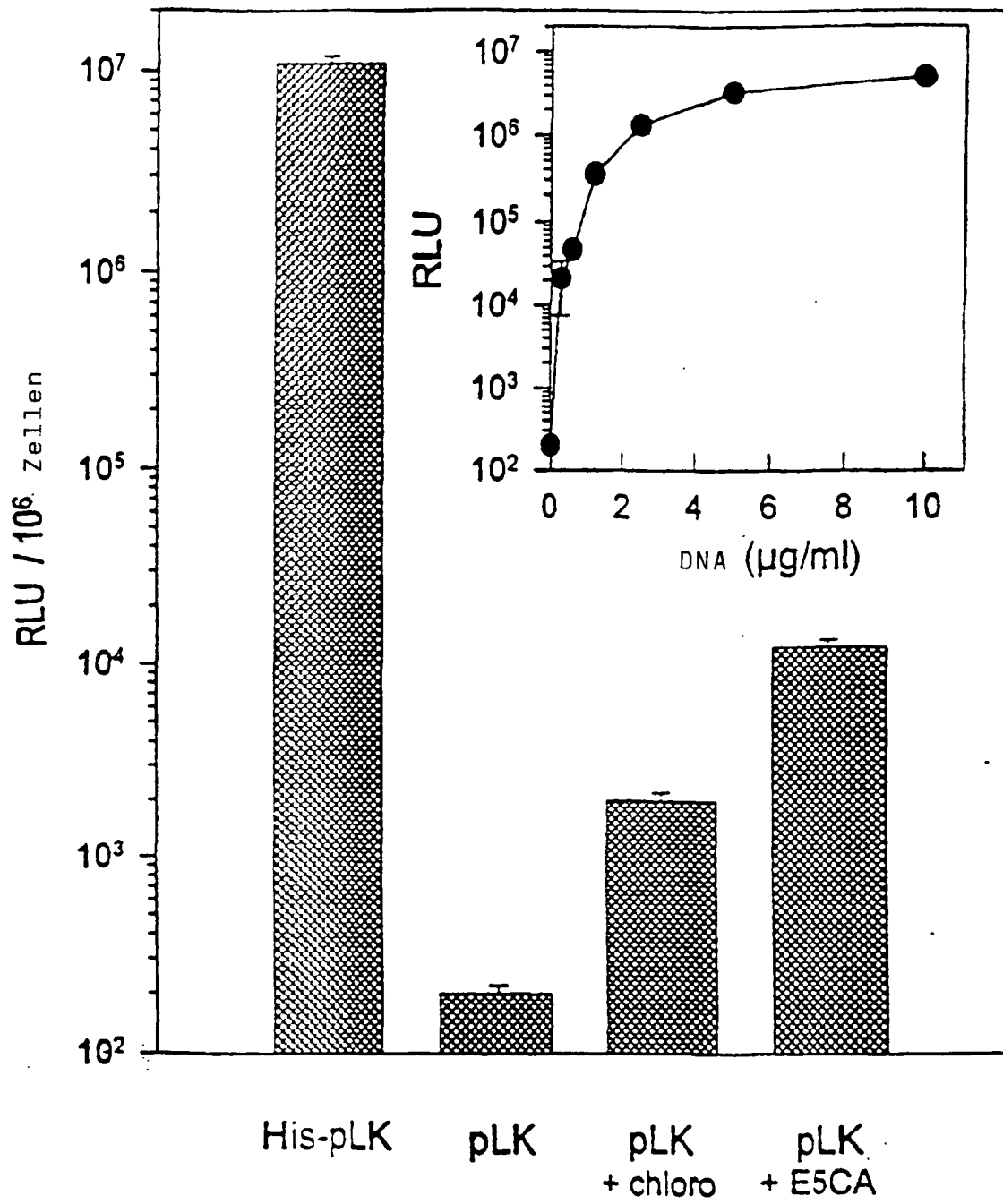


FIG. 2

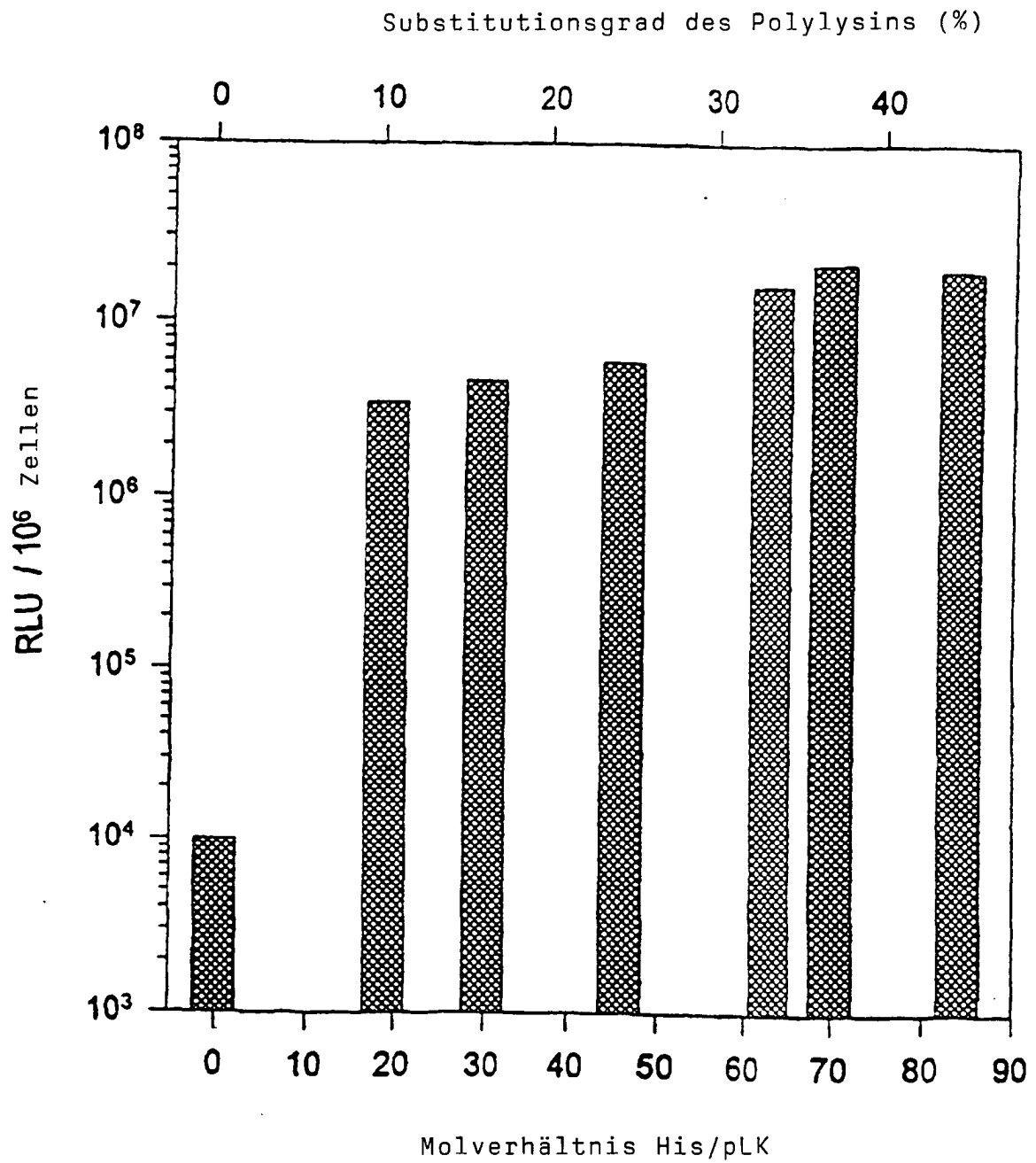


Figur 3

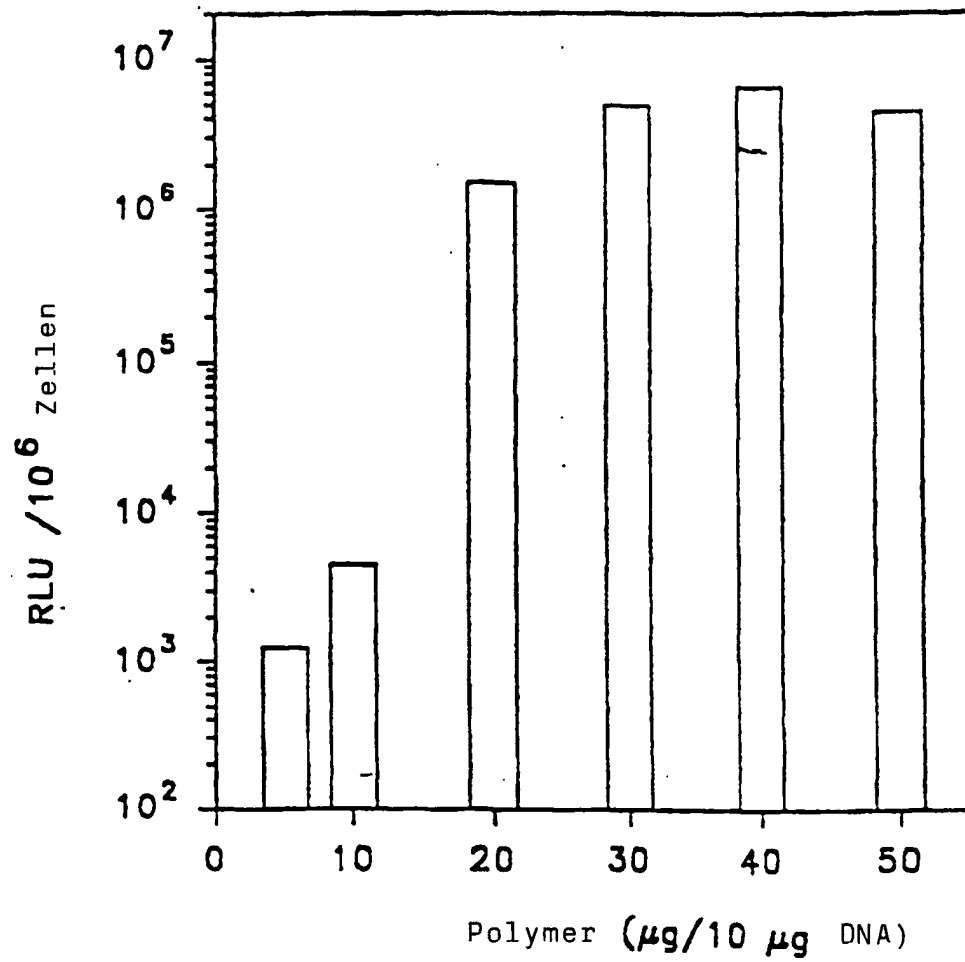


Figur 4

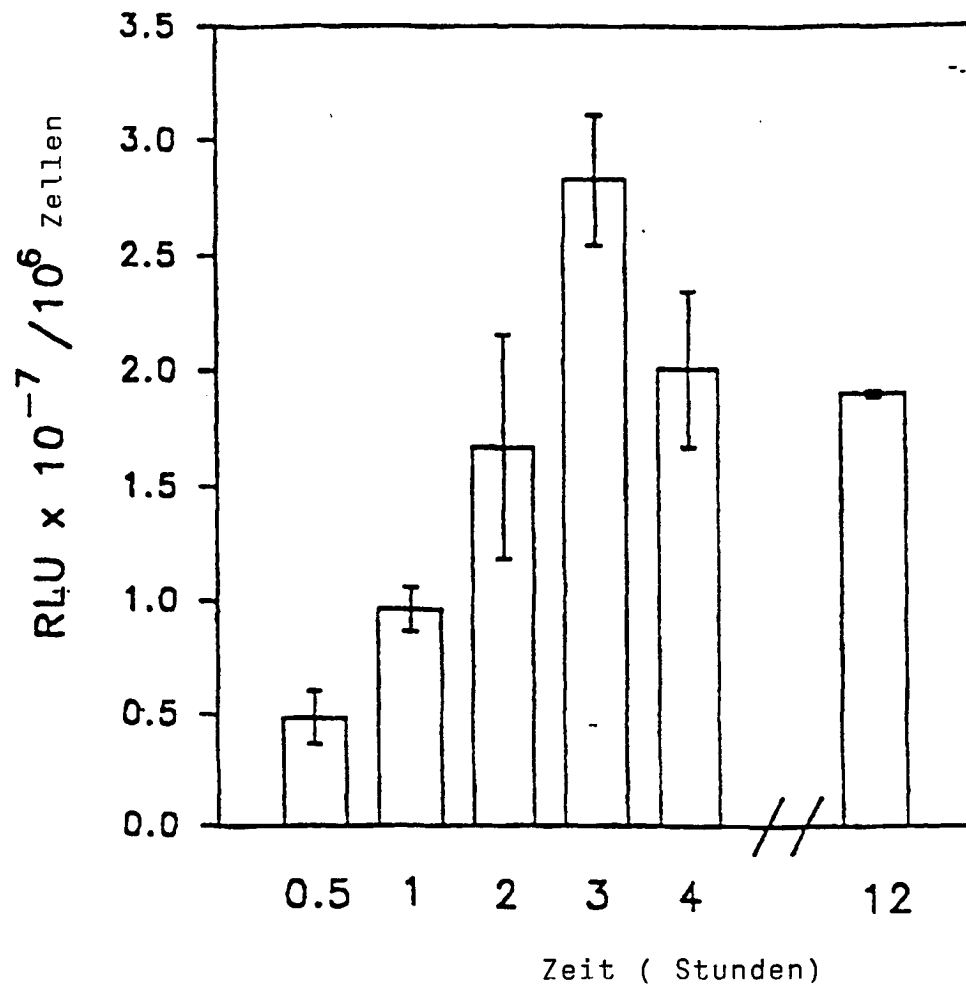




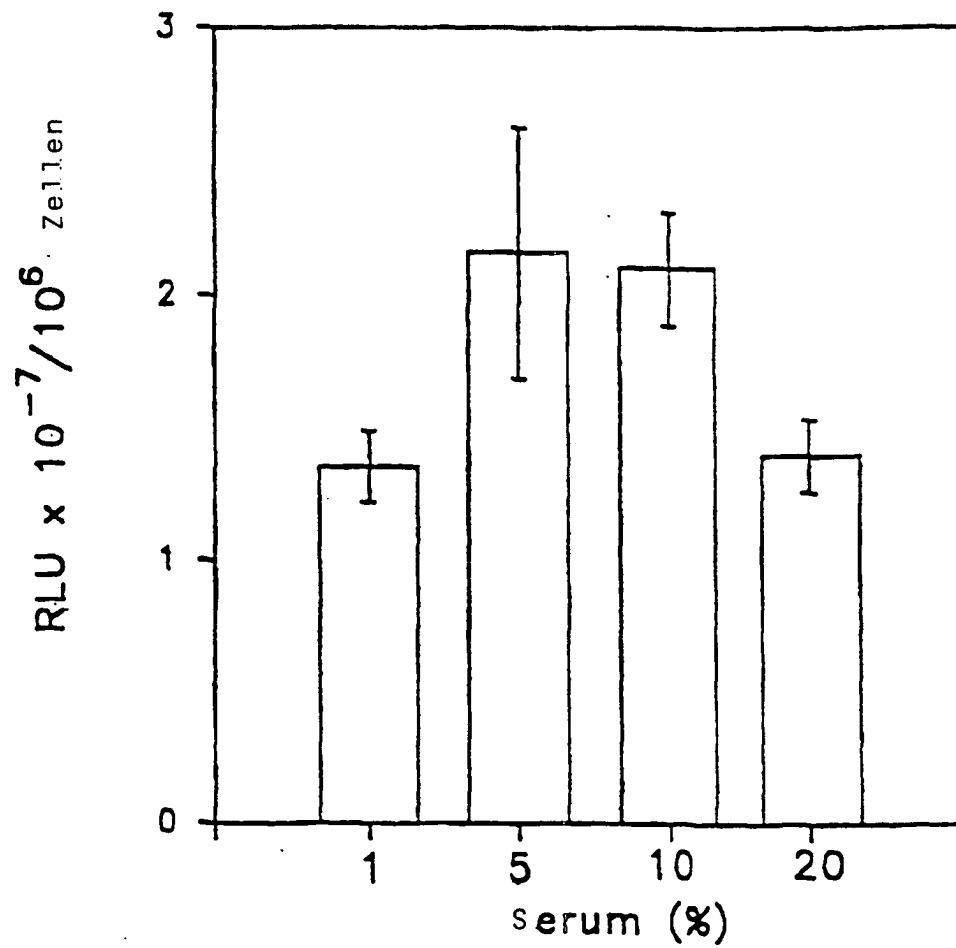
Figur 5



Figur. 6



Figur 7



Figur 8

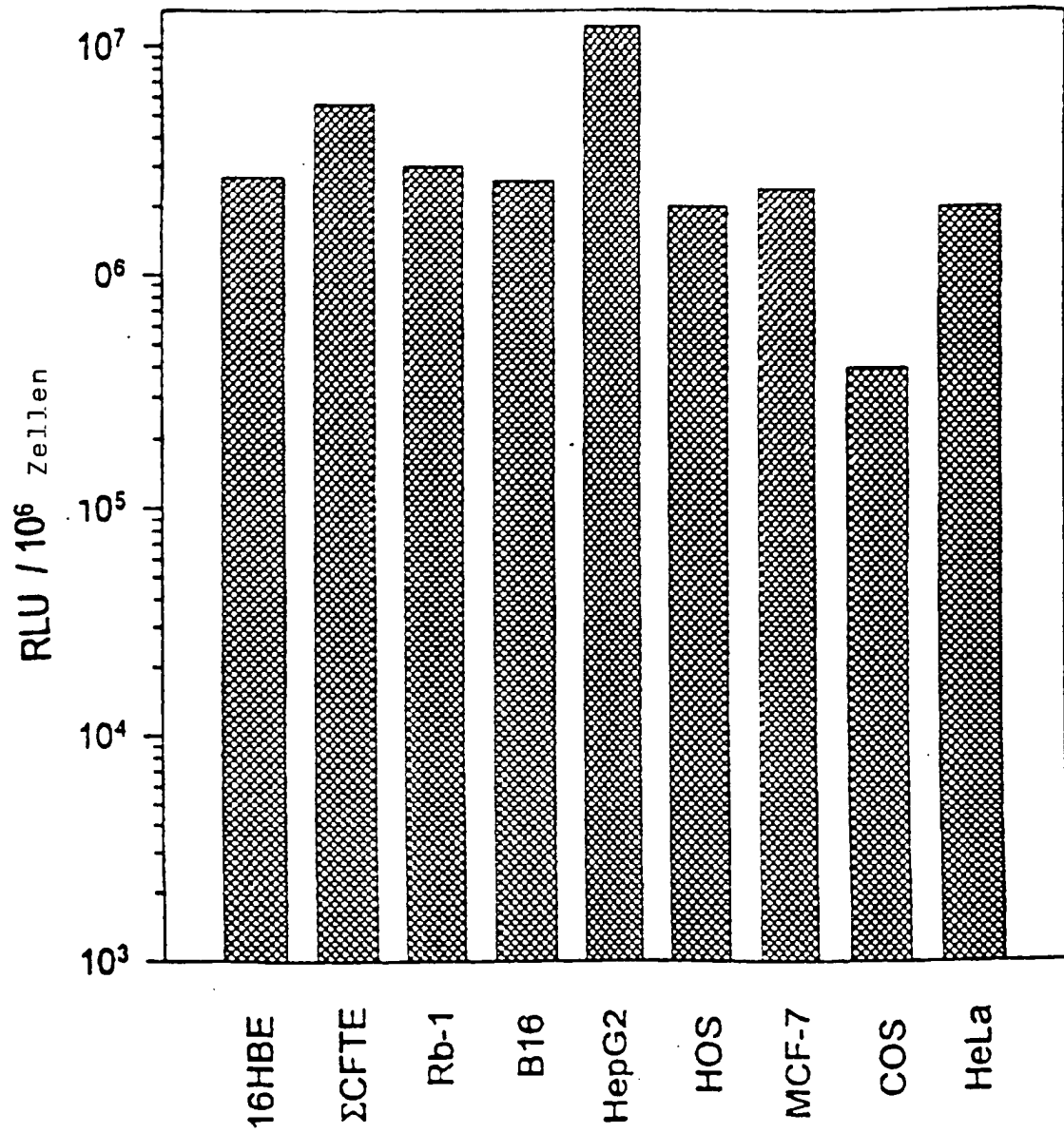


Figure 9