

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

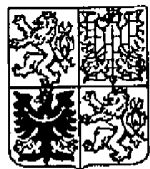
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2821-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **06. 02. 98**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.02.97**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **97/9701467**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13. 10. 99**
(Věstník č. 10/99)

(86) PCT číslo: **PCT/FR98/00222**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/34648**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 48/00
A 61 K 9/127

(71) Přihlášovatel:

RHONE-POULENC RORER S. A., Antony,
FR;

(72) Původce:

Crouzet Joel, Sceaux, FR;
Pitard Bruno, Sceaux, FR;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Formulace tvořená stabilizovanými
částicemi obsahujícími transfekční
činnidlo nebo činnidla a nukleovou kyselí-
nou

(57) Anotace:

Řešení se týká kompozice obsahující stabilizované částice komplexů kationtového transfekčního činnidla nebo činnidel s nukleovou kyselinou, jejíž podstata spočívá v tom, že kompozice kromě uvedeného transfekčního činnidla a nukleové kyseliny obsahuje neionogenní povrchově aktivní činnidlo v množství, které je dostatečné k zabránění agregace uvedených částic v průběhu času. Ve výhodném provedení je povrchově aktivním činnidlem polyoxyalkylen nebo jeho derivát.

CZ 2821-99 A3

177122/HK

Formulace tvořená stabilizovanými částicemi obsahujícími transfekční činidlo nebo činidla a nukleovou kyselinu

Oblast techniky

Vynález se týká kombinací, tvořených transfekčním činidlem nebo činidly a DNA, jejichž velikost částic je stabilizována pomocí neionogenního povrchově aktivního činidla, a použití těchto kombinací v genové terapii.

Dosavadní stav techniky

Četná genetická onemocnění jsou způsobena chybnou expresí nebo/a abnormální expresí, tj. nedostatečnou nebo nadměrnou expresí jedné nebo několika nukleových kyselin. Základním úkolem genové terapie je napravit tento typ genetické abnormality expresí in vivo nebo in vitro klonovaných genů v buňce.

V současné době je navrženo několik způsobů pro nitrobuněčnou dodávku uvedeného typu genetické informace. Jedním z těchto způsobů je způsob založený na použití chemických nebo biologických vektorů. Syntetické vektory mají dvě hlavní funkce: uvedení do komplexu DNA, která má být transfekována, a podpoření jejího uchycení v buňce, jakož i jejího průchodu skrze plazmovou membránu a případně skrze obě jádrové membrány. Z vyvinutých syntetických vektorů jsou nejvýhodnější kationtové polymery typu polylysinu a DEAE-dextranu nebo alternativně lipofekční činidla.

Při uvedeném typu transfekce bylo podstatného pokroku dosaženo vyvinutím technologie založené na použití kationtových transfekčních činidel typu lipofekčních činidel a přesnější kationtových lipidů. Takto bylo prokázáno, že pozitivně nabitý

kationtový lipid, kterým je N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylamoniumchlorid (DOTMA), spontánně interferuje ve formě liposomů nebo malých měchýřků s DNA, která je negativně nabitá, za vzniku komplexů lipid/DNA, které jsou schopné spojit se s buněčnými membránami a takto umožnit nitrobuněčnou dodávku DNA.

Na základě uvedené struktury byly později vedle produktu DOTMA vyvinuty i další kationtové lipidy, obsahující lipofilní skupinu kombinovanou s amino-skupinou přes distanční rameno ("spacer"). Jakožto příklady takových struktur je možné zejména uvést struktury obsahující jako lipofilní skupinu dvě mastné kyseliny nebo cholesterolový derivát a obsahující kromě toho v případě, že je to žádoucí, jako amino-skupinu kvartérní amoniovou skupinu. Jakožto zástupci této kategorie kationtových lipidů mohou být zejména uvedeny DOTAP, DOBT nebo ChOTB. Další sloučeniny, jako například DOSC a ChOSC, jsou charakterizovány přítomností cholinové skupiny namísto kvartérní amoniové skupiny.

Rovněž byla popsána další skupina lipofekčních činidel, která zahrnuje lipopolyaminy. Obecně se jedná o amfifilní molekulu obsahující alespoň jednu hydrofilní polyaminovou oblast, která je kombinována prostřednictvím tak zv. distanční oblasti (spacer) s lipofilní oblastí. Polyaminová oblast lipopolyaminů, která je kationtově nabitá, je schopna reversibilní kombinace s nukleovou kyselinou, která je negativně nabitá. Tato interakce výrazně zkompaktnuje nukleovou kyselinu. Lipofilní oblast činí tuto iontovou interakci necitlivou vůči vnějšímu prostředí potažením vytvořené nukleolipidové částice lipidovým filmem. V tomto typu sloučenin může být kationtová skupina reprezentována L-5-karboxysperminovým radikálem, který obsahuje čtyři amoniové skupiny, z nichž dvě jsou primárními amoniovými skupinami a dvě zbývající jsou sekundárními amoniovými skupinami. Mezi tyto sloučeniny patří DOGS a DPPES. Tyto lipopolyaminy jsou nejúčinnější pro transfekci primárních endokrinních buněk.

Jakožto příklady sloučenin náležejících k této posledně uvedené skupině lze zejména uvést lipopolyaminy popsané v patentových přihláškách WO 96/17823 a WO 97/18185.

Nicméně je žádoucí zlepšit kvalitu těchto syntetických vektorů a to zejména pokud jde o tvorbu komplexu s nukleovou kyselinou a stabilitu částic uvedených nukleolipidových komplexů. Ve skutečnosti při použití konvenčních formulací, tvořených nukleovou kyselinou a kationtovým transfekčním činidlem, lze pozorovat častou a rychlou tvorbu agregátů částic nukleolipidového komplexu. Rezultující agregáty mají potom velikost, která je jen stěží slučitelná s terapeutickou transfekcí. Jedno z řešení, která byla až dosud navržena za účelem eliminace uvedeného agregačního jevu, spočívá v tom, že se do formulace zavede kationtové transfekční činidlo, jakým je například lipofekční činidlo, v nadměrném množství, t.j. v nábojovém poměru lipofekční činidlo/nukleová kyselina asi 10 nebo ještě vyšším. Kromě skutečnosti, že takové řešení není vždy účinné, není toto řešení zcela uspokojivé z hlediska bezpečnosti. Kationtová transfekční činidla, jakými jsou lipofekční činidla a kationtové polymery, jsou totiž sama o sobě sloučeninami, u kterých je v případě jejich použití ve velkém množství riziko, že budou relativně toxické pro buňky, do kterých jsou tyto sloučeniny inkorporovány.

Bylo by proto velmi výhodné mít z terapeutického hlediska k dispozici formulace na bázi kationtového transfekčního činidla a nukleové kyseliny, které by měly redukováný nábojový poměr, a které by i přesto byly stabilní v průběhu času ve formě neagregovaných částic. Jak již však bylo uvedeno výše, jsou koncentrační zóny nukleová kyselina/lipofekční činidlo, odpovídající takovým nábojovým poměrům, sdruženy s nestabilním fyzikálním stavem. Velmi rychle takto dochází k agregaci nukleolipidových částic. Kromě toho je rovněž známo, že přítomnost soli typu NaCl, která se konvenčně používá ve formulacích obsahujících kationtové transfekční činidlo a nukleovou kyselinu, může indukovat při určitých koncentracích

precipitaci nukleolipidových částic. Čím vyšší je takto koncentrace soli, tím větší bude koncentrační rozmezí transfekčního činidla, ve kterém dochází k uvedené precipitaci.

Cílem vynálezu je zlepšit hodnotu uvedených koncentračních zón komplexů kationtové transfekční činidlo/nukleová kyselina, které jsou výhodné z bezpečnostního hlediska vzhledem k redukovaným množstvím vektoru a také z hlediska interference s ostatními proteiny beroucí v úvahu jejich redukovaný náboj. Je totiž známo, že v případě, že komplexy mají relativně nízký náboj, je významně snížena i jejich interference se sérovými proteiny *in vivo*. To je samozřejmě obzvláště výhodné v případě přenosu nukleových kyselin *in vivo* (Remy, J.S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995; 92, 1744-1748). O interakci tohoto typu interakce mezi sérovými proteiny a liposomy pojednávají četné články (Senior, J.H. a kol., Biochim. Biophys. Acta 1991, 1070, 173-179; Hernandez-Caselles, T. a kol., Molecular and cellular Biochemistry 1993, 120, 119-126; Oku, N. a kol. Biochim. Biophys. Acta 1996, 1280, 149-154). Rovněž byly publikovány údaje o aktivaci systému komplementu komplexy na bázi DNA používanými v genové terapii. Stupeň aktivace komplementu závisí na nábojovém poměru kationt/DNA. Posledně uvedený jev se zejména uplatňuje u polykationtů, jakými jsou polylysiny a liposperminy (například DOGS). Uvedená aktivace komplementu je méně citlivá na nábojový poměr v případě kvartérních amoniových sloučenin, jakými jsou DOTAP, DC-Chol nebo DOTMA (Plank, C. a kol., Human Gene Therapy 1996, 7, 1437-1446).

Vzhledem k výše uvedenému by tedy bylo výhodné z terapeutického hlediska mít k dispozici formulace obsahující komplexy kationtového transfekčního činidla a nukleové kyseliny s vysokou koncentrací nukleových kyselin nebo/a redukovaným nebo dokonce téměř neutrálním nábojovým poměrem, které jsou navíc stabilizované v tekuté formě koloidního typu, tj. které jsou v neagregované formě, přičemž tyto dva znaky jsou zjevně přirozeně neslučitelné.

Podstata vynálezu

Nyní přihlašovatel s překvapením prokázal, že přidávek neionogenního povrchově aktivního činidla k částicím komplexů kationtového transfekčního činidla nebo činidel a nukleové kyseliny, které jsou přirozeně nestabilní, tj. které mají sklon k rychlé tvorbě agregátů, umožňuje účinně blokovat uvedený agregační jev a tudíž stabilizovat částice komplexu tak, že jejich velikost je menší nebo rovná asi 160 nm.

Prvním předmětem vynálezu je kompozice použitelná pro genovou terapii a obsahující částice komplexu kationtového transfekčního činidla nebo činidel a nukleové kyseliny, jejíž podstata spočívá v tom, že navíc obsahuje alespoň jedno neionogenní povrchově aktivní činidlo v množství, které je dostatečné ke stabilizaci velikosti částic menší nebo rovné 160 nm.

V rámci vynálezu se stabilizovanými částicemi nebo částicemi se stabilizovanou velikostí rozumí částice, jejichž velikost není náchylná ke změně v průběhu času, zejména když jsou tyto částice udržovány v disperzi nebo v roztoku. Oproti konvenčním formulacím, tj. formulacím neobsahujícím neionogenní povrchově aktivní činidlo, mohou být nárokové kompozice skladovány po dlouhou dobu, aniž by u nich docházelo v uvedené disperzi k jakékoliv modifikaci, zejména k modifikaci agragačního typu. Velikost takto stabilizovaných částic se obecně pohybuje mezi 50 a 160 nm, výhodně mezi 75 a 150 nm.

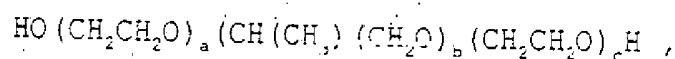
V nepřítomnosti nárokového neionogenního povrchově aktivního činidla dochází u částic komplexu přítomných v nárokové kompozici ke spontánní tvorbě agregátů, jejichž velikost je větší než 160 nm.

Kromě toho přihlašovatel prokázal, že kompozice podle vynálezu má lamelární strukturu mající alternativně dvouvrstvy lipidů s mezilehlými vrstvami DNA.

Neionogenní povrchově aktivní činidlo podle vynálezu má výhodně alespoň jeden hydrofobní segment a alespoň jeden hydrofilní segment. Hydrofobní částí může být alifatický řetěz, polyoxyalkylen, alkylidenpolyester, polyethylenglykol s dentritovou benzylpolyetherovou hlavou nebo cholesterol. Pokud jde o hydrofilní část, může být touto částí polyoxyalkylen, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon nebo sacharid.

Výhodně je povrchově aktivní činidlo, použité v rámci vynálezu, tvořeno nebo odvozeno od neionogenního polyolu a zejména od polyoxyalkylenů s alkylenovými skupinami odlišné nebo neodlišné délky nebo/a struktury v polymeru.

Výhodněji toto neionogenní povrchově aktivní činidlo odpovídá následujícímu obecnému vzorci:



ve kterém a, b a c znamenají nezávisle jeden na druhém celé číslo 20 až 100.

Uvedené neionogenní povrchově aktivní činidlo je výhodně přítomné v kompozicích podle vynálezu v koncentraci mezi 0,01 a 10 % hmotn./obj., výhodně mezi 0,02 a 5 % hmotn./obj., vztaženo na hmotnost uvedené kompozice.

Přítomnost takového neionogenního povrchově aktivního činidla v kombinaci s uvedenými komplexy je výhodná z několika důvodů:

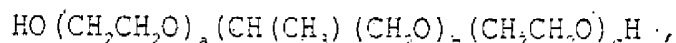
V rámci vynálezu jsou kationtové transfekční činidlo nebo činidla a nukleové kyseliny přítomné v kompozici v nábojovém poměru, který je samozřejmě příznivý pro rozvoj uvedeného agragačního jevu. To vede k tomu, že pozitivní náboje nesené kationtovým transfekčním činidlem nebo činidly jsou pouze v mírném přebytku vzhledem k negativním nábojům neseným nukleovou kyselinou v komplexu nebo nejlépe jsou s uvedenými negativními náboji v rovnováze. Takový nábojový poměr je obzvláště výhodný

z hlediska in vivo, pomněvadž je méně škodlivý pokud jde o interakci se sérovými nebo jinými proteiny, jakým je například albumin, a výhodnější z hlediska bezpečnosti. Pro ilustraci lze uvést, že tento nábojový poměr se výhodně pohybuje mezi 1 a 6 a je výhodně nižší než 4.

Navíc je uvedené neionogenní povrchově aktivní činidlo zcela kompatibilní s podáním in vivo. V případě formulace podle vynálezu není ve skutečnosti nezbytné odstranit toto neionogenní povrchově aktivní činidlo z kompozice ještě před injekcí kompozice do buněk určených k ošetření.

Konečně lze uvést, že kompozice podle vynálezu mohou být výhodně skladovány. Přítomnost neionogenního povrchově aktivního činidla účinně blokuje jakýkoliv precipitační jev v uvedené kompozici.

Jakožto výhodné neionogenní povrchově aktivní činidlo podle vynálezu lze obzvláště uvést sloučeninu obecného vzorce:



ve kterém a je rovno 75, b je rovno 30 a c je rovno 75.

Dalšími výhodnými neionogenními povrchově aktivními činidly jsou polyethylenglykol s dentritovou benzylpolyetherovou hlavou, polyoxyethylenalkoholy nebo polyoxyethylennonylfenylether.

Kationtové transfekční činidlo výhodně v rámci vynálezu zahrnuje kationtové polymery a lipofekční činidla.

Pokud jde zejména o lipofekční činidla, rozumí se pod tímto označením v rámci vynálezu libovolná sloučenina nebo směs, mající lipidový charakter a jsoucí pozitivně nabitá, která již byla navržena jako aktivní činidlo v souvislosti s buněčnou transfekcí nukleových kyselin.

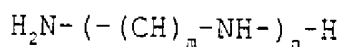
Obecně jde o amfifilní molekuly obsahující alespoň jednu lipofilní oblast kombinovanou nebo nekombinovanou s hydrofilní oblastí.

Jakožto zástupce první skupiny sloučenin je možné zejména navrhnout lipidové směsi schopné tvořit kationtové liposomy. Tyto formulace mohou takto obsahovat POPC, fosfatidylserin, fosfatidylcholin, cholesterol, lipofektamid nebo maleinimidofenylbutyrylfosfatidylethanolamin kombinovaný s kationtovým lipidem, který byl definován výše.

V rámci specifického provedení vynálezu má použité lipofekční činidlo kationtovou oblast.

Jakožto příklad tohoto typu kationtových lipidů konstruovaných na základě strukturního modelu: lipofilní skupina kombinovaná s amino-skupinou přes tak zvané distanční rameno ("spacer") lze zejména uvést produkt DOTMA a rovněž kationtové lipidy, které jako lipofilní skupinu obsahují dvě mastné kyseliny nebo cholesterolové deriváty, a které navíc obsahují v případě, že je to žádoucí, jako amino-skupinu kvartérní amoniovou skupinu. Jakožto zástupci této kategorie kationtových lipidů lze zejména uvést lipidy DOTAP, DOBT nebo ChOTB. Jiné sloučeniny, jakými jsou například DOSC a ChOSC, jsou charakterizovány přítomností cholinové skupiny namísto kvartérní amoniové skupiny.

Výhodně mohou být také lipofekční činidla vhodná pro použití v rámci vynálezu zvolena z lipopolyaminů, jejichž polyaminová oblast odpovídá obecnému vzorci:

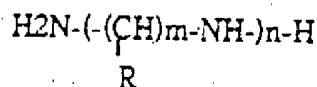


ve kterém m znamená celé číslo větší nebo rovné 2 a n znamená celé číslo větší nebo rovné 1, přičemž je možné, že se m mění v případě různých uhlikatých skupin mezi dvěma aminovými skupinami, přičemž tato polyaminová oblast je kovalentně vázána s lipofilní oblastí nasyceného nebo nenasyceného uhlovodíkového řetězce cholesterolového typu nebo s přírodním nebo syntetickým lipidem schopným tvořit lamelární nebo hexagonální fáze. Tato polyaminová oblast je výhodněji reprezentována sperminem nebo

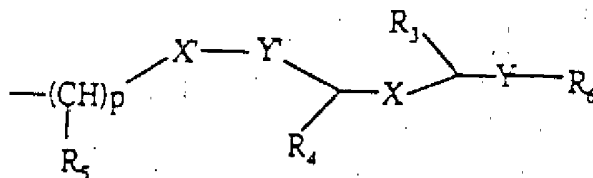
některým z jeho analogů, který si zachoval schopnost vázat nukleovou kyselinu.

Patentová přihláška EP 394 111 popisuje lipopolyaminy této skupiny, které jsou schopné použití v rámci vynálezu. Jakožto zástupce těchto lipopolyaminů lze zejména uvést dioktadecylamidoglycylspermin (DOGS) a palmitoylfosfatidylethanolamin-5-karboxyspermylamid (DPPES).

V rámci vynálezu mohou být rovněž použity lipopolyaminy popsané v patentové přihlášce WO 96/17823. Tyto lipopolyaminy mají obecný vzorec:



ve kterém R znamená skupinu

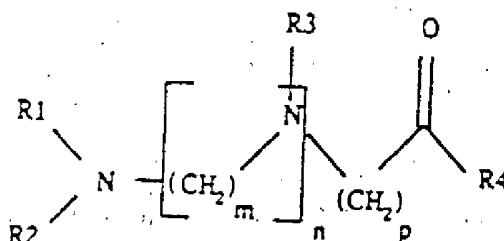


příčemž X a X' znamenají nezávisle jeden na druhém atom kyslíku, methylenovou skupinu $-(\text{CH}_2)_q$, kde q znamená 0, 1, 2 nebo 3, nebo amino-skupinu $-\text{NH}-$ nebo $-\text{NR}'-$, kde R' znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy, Y a Y' znamenají nezávisle jeden na druhém methylenovou skupinu, karbonylovou skupinu nebo skupinu $\text{C}=\text{S}$, R₃, R₄ a R₅ znamenají nezávisle jeden na druhém atom vodíku nebo substituovanou nebo nesubstituovanou alkylovou skupinu obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy, p se může měnit mezi 0 a 5, R₆ znamená cholesterolový

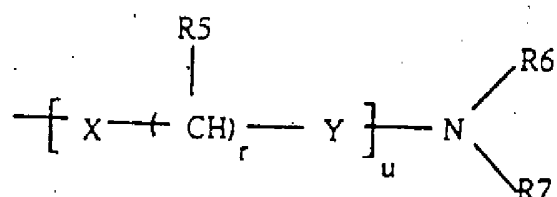
derivát nebo dialkylamino-skupinu vzorce $-NR_1R_2$, kde R_1 a R_2 znamenají nezávisle jeden na druhém nasycenou nebo nenasycenou, přímou nebo rozvětvenou alifatickou skupinu obsahující 12 až 22 uhlíkových atomů.

Jakožto zástupci těchto lipopolyaminů zde mohou být zejména uvedeny 2,5-bis(3-aminopropylamino)pentyl (dioktadecylkarbamoylmethoxy)acetát a 1,3-bis(3-aminopropylamino)-2-propyl (dioktadecylkarbamoylmethoxy)acetát.

Konečně nové lipopolyaminy, jejichž hodnota může být zlepšena v rámci vynálezu, byly nedávno popsány v patentové přihlášce WO 97/18185. Tyto sloučeniny mají obecný vzorec:

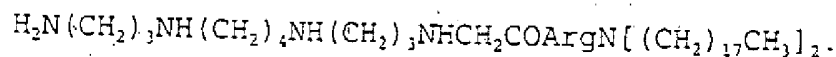
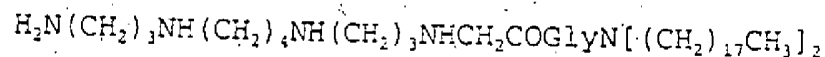
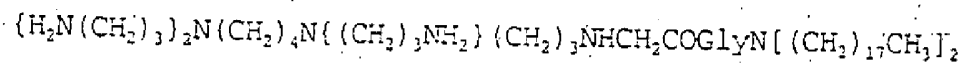


ve kterém R_1 , R_2 a R_3 znamenají nezávisle jeden na druhém atom vodíku nebo skupinu $-(CH_2)_q-NRR'$, kde q se může měnit mezi 1, 2, 3, 4, 5 a 6 a to nezávisle mezi různými skupinami R_1 , R_2 a R_3 , a R a R' znamenají nezávisle jeden na druhém atom vodíku nebo skupinu $-(CH_2)_q-NH_2$, kde q se může měnit mezi 1, 2, 3, 4, 5 a 6 a to nezávisle mezi různými skupinami R a R' , m , n a p znamenají nezávisle jeden na druhém celé číslo, které se může měnit mezi 0 a 6, přičemž když n je větší než 1, m může mít různé hodnoty a R_3 může mít různé významy v rámci uvedeného obecného vzorce, a R_4 znamená skupinu obecného vzorce

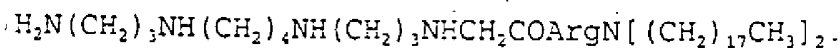
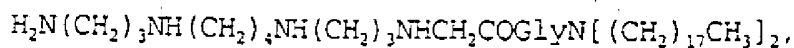
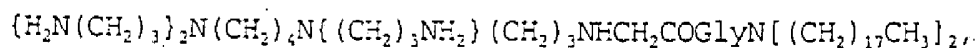


ve kterém R_1 a R_2 znamenají nezávisle jeden na druhém atom vodíku nebo nasycenou nebo nenasycenou alifatickou skupinu obsahující 10 až 22 uhlíkových atomů, přičemž alespoň jeden z uvedených dvou obecných symbolů má význam jiný než atom vodíku, u znamená celé číslo mezi 0 a 10, přičemž když je u větší než 1, mohou mít R_1 , X, Y a r různé významy v rámci různých jednotek $[X-(CHR_u)_r-Y]$, X znamená atom kyslíku nebo atom síry nebo aminovou skupinu, která je nebo není monoalkylována, Y znamená karbonylovou skupinu nebo methylenovou skupinu, R_1 znamená atom vodíku nebo boční řetězec přírodní aminokyseliny, který je případně substituován, a r znamená celé číslo 1 až 10, přičemž když r je rovné 1, R_1 znamená substituovaný nebo nesubstituovaný boční řetězec přírodní aminokyseliny a když r je větší než 1, R_1 znamená atom vodíku.

Jakožto příklady těchto lipopolyaminů lze zejména uvést následující lipopolyaminy:



Obzvláště výhodně lze v rámci vynálezu použít lipofektamin, dioktadecylamidoglycylspermin (DOGS), palmitoylfosfatidylethanolamin-5-karboxyspermylamid (DPPES), 2,5-bis(3-aminopropylamino)pentyl-(dioktadecylkarbamoylmetoxy)acetát, 1,3-bis(3-aminopropylamino)-2-propyl(dioktadecylkarbamoylmetoxy)acetát a

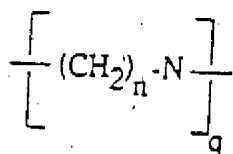


Rovněž mohou být takto použity kationtové lipidy obsahující jednu nebo několik guanidiniových nebo/a amidiniových skupin, jakými jsou zejména kationtové lipidy popsané J.M. Lehn-ém a kol. (Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1996,93,9682-9686).

Kationtovým polymerem, který může být v rámci vynálezu použit jako kationtové transfekční činidlo, je výhodně sloučenina následujícího obecného vzorce I



ve kterém R znamená atom vodíku nebo skupinu obecného vzorce



ve kterém n je celé číslo 2 až 10 a p a q jsou celá čísla, přičemž součet p+q má takovou hodnotu, že střední molekulová hmotnost polymeru se pohybuje mezi 100 a 10⁷ Da.

Je třeba uvést, že hodnota n se v obecném vzorci I může měnit v rámci různých jednotek p. Takto obecný vzorec I zahrnuje jak homopolymery, tak i heteropolymery.

Výhodněji v obecném vzorci n znamená 2 až 5. Velmi výhodné vlastnosti vykazují zejména polymery polyethyleniminu (PEI) a polypropyleniminu (PPI). Výhodnými polymery pro provádění vynálezu jsou polymery, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje mezi 10³ a 5 x 10⁶. Jakožto příklady takových polymerů je možné uvést polyethylenimin se střední molekulovou hmotností 50 000 Da (PEI50K), polyethylenimin se střední molekulovou hmotností 22 000 Da (PEI22K) nebo polyethylenimin se střední molekulovou hmotností 800 000 Da (PEI800K).



Polymery PEI50K, PEI22K a PEI800K jsou komerčně dostupné. Pokud jde o ostatní polymery obecného vzorce I, mohou být tyto polymery připraveny způsobem popsáním v patentové přihlášce FR 94/08735.

V kompozicích podle vynálezu může být nukleovou kyselinou, která je v komplexu s kationtovým transfekčním činidlem, jak deoxyribonukleová kyselina tak i ribonukleová kyselina. Tyto kyseliny mohou být tvořeny sekvencemi přírodního nebo umělého původu, přičemž se zejména jedná o genomovou DNA, cDNA, mRNA, tRNA, rRNA a o modifikované nebo nemodifikované hybridní sekvence nebo syntetické nebo semisyntetické sekvence oligonukleotidů. Uvedené nukleové kyseliny mohou být lidského, zvířecího, rostlinného, bakteriálního nebo virálního původu. Mohou být získány libovolnou o sobě známou technikou a zejména vytríděním z bank.

chemickou syntézou nebo alternativně směsnými postupy zahrnujícími chemickou a enzymatickou modifikaci sekvencí získaných vytríděním z bank. Tyto sekvence mohou být chemicky modifikované.

Pokud jde jmenovitě o deoxyribonukleové kyseliny, mohou být tyto kyseliny jedno- nebo dvouvláknové nebo se může jednat o krátké oligonukleotidy nebo o delší sekvence. Tyto deoxyribonukleové kyseliny mohou nést terapeutické geny, sekvence pro regulaci přepisu nebo replikace, modifikované nebo nemodifikované antimediatorové sekvence, oblasti pro vázání k jiným buněčným složkám a podobně.

V rámci vynálezu se pod pojmem terapeutický gen rozumí zejména libovolný gen kódující proteinový produkt mající terapeutický účinek. Takto kódovaným proteinovým produktem může být protein, peptid a podobně. Tento proteinový produkt může být homologní s cílovou buňkou (což znamená, že se jedná o produkt, který je normálně exprimován v cílové buňce v případě, kdy tato cílová buňka nevykazuje žádnou patologii). V tomto případě umožňuje exprese proteinu kompenzovat v cílové buňce nedostatečnou expresi proteinu, který je inaktivní nebo omezeně

aktivní v důsledku modifikace, nebo nadměrnou expresi uvedeného proteinu. Uvedený terapeutický gen může rovněž kódovat mutant buněčného proteinu mající zvýšenou stabilitu, modifikovanou aktivitu a podobně. Uvedený proteinový produkt může být rovněž heterologní s cílovou buňkou. V tomto případě může exprimovaný protein například posilovat nebo poskytovat aktivitu, která je v cílové buňce nedostatečná, čímž jí umožňuje bojovat s patologií nebo stimulovat imunitní odezvu.

Jakožto příklady terapeutických produktů použitelných v rámci vynálezu lze uvést zejména enzymy, krevní deriváty, hormony, lymfokiny: interleukiny, interferony, TNF a podobně (FR 92/03120), růstové faktory, neurotransmitory nebo jejich prekurzory nebo syntézní enzymy, trofinové faktory: BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT33, NT5, HARP/pleiotrofin a podobně, dystrofin nebo minidystrofin (FR 91/11947), protein CFTR sdružený s cystickou fibrosou, nádorové supresní geny: p53, Rb, Rap1A, DCC, k-ras a podobně (FR 93/04745), geny kódující faktory uplatňující se při koagulaci: faktory VII, VIII a IX, geny uplatňující se při nápravě DNA, sebevražedné geny (thymidin-kináza, cytosin-deamináza), geny pro hemoglobin nebo jiné nosičové proteiny, geny odpovídající proteinům uplatňujícím se při metabolismu lipidů apolipoproteinového typu zvolené z množiny zahrnující apolipoproteiny A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J a apo(a), metabolické enzymy, jakými jsou například lipoprotein-lipáza, hepatická lipáza, lecitincholesterolacyl-transferáza, 7-alfa-cholesterol-hydroxyláza, kyselina fosfatidová-fosfatáza, nebo alternativně proteiny pro přenos lipidů, jako například protein pro přenos cholesterolu a protein pro přenos fosfolipidů, protein pro vázání HDL nebo alternativně receptor zvolený například z množiny zahrnující receptory LDL, receptory pro remnantní chylomikrony, skavenžerové receptory a podobně.

Terapeutickou nukleovou kyselinou může být rovněž gen nebo antimediatorová sekvence, jejichž exprese v cílové buňce umožňuje regulovat expresi genů nebo přepis buněčných mRNA.

Takové sekvence mohou být například přepsány v cílové buňce do RNA komplementárních k buněčným mRNA a tím blokovat jejich translaci na protein a to v souladu s technikou popsanou v patentu EP 140 308. Terapeutické geny rovněž obsahují sekvence kódující ribozomy, které jsou schopné selektivně rozrušit cílové RNA (EP 321 201).

Jak již bylo uvedeno výše, může nukleová kyselina rovněž obsahovat jeden nebo několik genů kódujících antigenní peptid schopný generovat u člověka nebo u zvířat imunitní odezvu. V rámci tohoto specifického provedení vynález proto umožňuje buď výrobu vakcín nebo imunoterapeutické ošetření lidí nebo zvířat, namířené zejména proti mikroorganismům, virům nebo rakovině. Může se zejména jednat o antigenní peptidy, které jsou specifické pro vir Epstein-Barrové, vir HIV, vir hepatitidy B (EP 185 573), vir pseudovztekliny, syncytium-tvorný vir nebo jiné viry nebo alternativně specifické pro nádory (EP 259 212).

Výhodně nukleová kyselina rovněž obsahuje sekvence umožňující expresi terapeutického genu nebo/a genu kódujícího antigenní peptid v buňce nebo v požadovaném orgánu. Může se jednat o sekvence, které jsou přirozeně zodpovědné za expresi uvažovaného genu v případě, kdy jsou takové sekvence schopné funkce v infikované buňce. Může se rovněž jednat o sekvence různého původu (zodpovědné za expresi jiných proteinů nebo dokonce o syntetické sekvence). Zejména se může jednat o promotorové sekvence eukaryotických nebo virálních genů. Může jít například o promotorové sekvence odvozené z genomu buňky, která má být infikována. Podobně se může jednat o promotorové sekvence odvozené z genomu viru. V tomto ohledu lze například uvést promotory genů E1A, MLP, CMV a RSV a podobně. Kromě toho mohou být tyto expresní sekvence modifikovány přidáním aktivačních nebo regulačních sekvencí a podobně. Uvedený promotor může být indukovatelný nebo potlačitelný.

Navíc může nukleová kyselina rovněž obsahovat, zejména před terapeutickým genem, signální sekvenci vedoucí syntetizovaný

terapeutický produkt do sekrečních cest cílové buňky. Tato signální sekvence může být přirozenou signální sekvencí terapeutického produktu, i když se může jednat i o jiné funkční signální sekvence nebo o umělé signální sekvence. Uvedená nukleová kyselina může rovněž obsahovat signální sekvenci vedoucí syntetizovaný terapeutický produkt do určité specifické oblasti buňky.

V rámci jiného provedení může nárokováná kompozice navíc obsahovat přísadu typu zahrnujícího diolelylfosfatidylethanolamin (DOPE), oleoylpalmitoylfosfatidylethanolamin (POPE), di-stearoyl-, -palmitoyl a -myristoylfosfatidylethanolaminy, jakož i jejich deriváty, které jsou 1 až 3 krát N-methylované, fosfatidylglyceroly, diacylglyceroly, glykosyldiacylglyceroly, cerebrosidy (zejména galaktocerebrosidy), sfingolipidy (zejména sfingomyeliny) nebo alternativně asialogangliosidy (zejména asialoGM1 a GM2).

V nedávné době přihlašovatel prokázal, že je obzvláště výhodné použít jako přísadu v transfekčních kompozicích sloučeninu uplatňující se přímo nebo nepřímo při kondenzaci nukleových kyselin. Tato sloučenina je zcela nebo částečně tvořena peptidovými jednotkami (KTPKKAKKP) nebo/a (ATPAKKAA), přičemž se počet jednotek může měnit od 2 do 10. Takové činidlo může být rovněž odvozeno z části histonu, nukleolinu, protaminu nebo/a některého z jejich derivátů (WO 96/25508). Taková sloučenina může být výhodně zabudována do nárokové kompozice.

Kompozice podle vynálezu mohou rovněž využívat jeden nebo několik usměrňovacích prvků, které umožňují zacílit nukleové komplexy do receptorů nebo ligandů nacházejících se na povrchu buňky. Jakožto příklad lze uvést, že kompozice podle vynálezu může obsahovat jednu nebo několik protilátek řízených proti molekulám na buněčném povrchu nebo alternativně jeden nebo několik ligandů membránových receptorů, jako například insulin, transferrin, kyselina listová nebo libovolný další růstový faktor, cytokiny nebo vitaminy. Výhodně může kompozice využívat modifikované nebo nemodifikované lektiny k zacílení

specifických polysacharidů na povrchu buňky nebo na sousední extracelulární matrici. Rovněž mohou být použity proteiny s jednotkou RGD, cyklické nebo necyklické peptidy obsahující tandemové seskupení jednotek RGD, jakož i polylysinové peptidy. Nedávno byly rovněž popsány přírodní nebo syntetické ligandové peptidy, které jsou výhodné zejména pro jejich selektivitu ke specifickým buňkám a které jsou schopné účinně podpořit internalizaci v těchto buňkách (Bary a kol., Nature Medicine, 2, 1996, 299-305). Tato usměrňující činidla jsou obecně konjugována s uvažovaným kationtovým transfekčním činidlem.

Vynález se rovněž týká způsobu přípravy nárokovaných kompozic. Blíže specifikováno, týká se vynález způsobu přípravy kompozice obsahující částice komplexu kationtového transfekčního činidla nebo činidel a nukleové kyseliny, jejichž velikost je stabilizována, jehož podstata spočívá v tom, že se kationtové transfekční činidlo a nukleová kyselina uvedou do styku v přítomnosti neionogenního povrchově aktivního činidla použitého v množství dostatečném ke stabilizaci velikosti takto vytvořených částic nukleového komplexu rovné nebo menší než 160 nm.

Blíže specifikováno, nejdříve se smísí jedna ze složek, tj. nukleová kyselina nebo kationtové lipofekční činidlo, s neionogenním povrchově aktivním činidlem, načež se získaná směs uvede do styku s druhou z uvedených dvou složek. Takto se zabráni agregačnímu jevu, ke kterému by jinak spontánně došlo v případě, kdy by nebylo přítomno neionogenní povrchově aktivní činidlo.

Kompozice podle vynálezu mohou být formulovány pro topické, dermální, perorální, rektální, vaginální, parenterální, intranasální, intravenózní, intramuskulární, subkutánní, intraokulární nebo transdermální anebo i jiné podání. Výhodně farmaceutické kompozice podle vynálezu obsahují farmaceuticky přijatelné vehikulum pro injikovatelnou formulaci, zejména pro přímou injekci v úrovni požadovaného orgánu, nebo pro podání topickou cestou (na pokožku nebo/a na sliznicovou membránu).



Tyto kompozice mohou mít zejména formu isotonických sterilních roztoků nebo mohou mít formu suchých lyofilizovaných kompozic, které po přidání sterilizované vody nebo fyziologického roztoku umožňují opětovné vytvoření injikovatelných roztoků. Dávky použité nukleové kyseliny pro injekční podání, jakož i počet podání mohou být stanoveny v závislosti na různých faktorech, mezi které zejména patří použitý způsob podání, relevantní patologie, gen, který má být exprimován nebo požadovaná doba léčení. Pokud jde o způsob podání, může se jednat buď o přímou injekci do tkání nebo oběhových cest anebo o ošetření buněk v buněčné kultuře a následnou reimplantaci ošetřených buněk in vivo buď injekcí nebo transplantací.

Kompozice podle vynálezu jsou obzvláště výhodné z terapeutického hlediska. Pomocí těchto kompozic bude napříště možné účinně podávat komplexy nukleových kyselin mající vhodnou velikost a redukováný nábojový poměr, což je obzvláště prospěšné z hlediska aplikace in vivo. Při použití kompozic podle vynálezu dochází k výraznému omezení interakce mezi sérem a nukleovým komplexem.

V následující části popisu bude vynález blíže objasněn pomocí konkrétních příkladů jeho provedení, přičemž tyto příklady mají pouze ilustrační charakter a nikterak neomezují vlastní rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen definicí patentových nároků.

Stručný popis obrázků

Na připojených výkresech

obr.1 znázorňuje vliv poloxalkolu na změnu velikostí komplexů RPR 120535/DNA při nábojovém poměru (+/-) 2,5 v závislosti na čase,

obr.2 znázorňuje vliv poloxalkolu na změnu velikostí komplexů RPR 120531/DNA při nábojovém poměru (+/-) 2,5 v závislosti na čase,

obr.3 znázorňuje vliv poloxalkolu na kombinace RPR 120535,

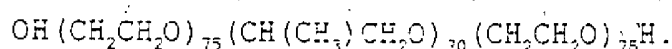
obr.4 znázorňuje vliv poloxalkolu na aktivitu luciferázy (RLU/5μl lyzátu) komplexů RPR 120535/DNA při nábojovém poměru (+/-) 2,5 a

obr.5 v části A schematicky znázorňuje strukturu komplexů RPR 120535/DNA v nepřítomnosti nebo v přítomnosti poloxalkolu a v části B schematicky znázorňuje strukturu komplexů BGTC/DNA v nepřítomnosti a přítomnosti poloxalkolu.

Příklady provedení vynálezu

Materiály

Povrchově aktivním činidlem použitým v následujících příkladech je poloxalkol vzorce



Tato sloučenina je uváděna pod obchodním označením Pluronic F68. Zásobní roztok poloxalkolu, který byl použit v následujících příkladech, je 10% (hmotn./obj.) vodným roztokem poloxalkolu.

Nukleovou kyselinou použitou k přípravě vzorků je plasmid pXL2774 popsáný v mezinárodní patentové přihlášce PCT/FR 96/01414. Tento plasmid je použit v koncentraci 0,7 mg/ml v pufru Tris/EDTA (10 mM/0,1 mM) s pH 7,5.

V příkladech byly použity následující kationtové lipidy:

$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$ (RPR 120535)
(acetátová sůl) a

$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COArgN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]$ (RPR 120531)
(sůl kyseliny trifluorooctové),

přičemž oba tyto kationtové lipidy jsou popsány v mezinárodní patentové přihlášce PCT/FR 96/01774 a jsou použity ve formě

vodného roztoku v koncentraci 5 mM po jejich solubilizaci zahříváním na teplotu 50°C po dobu 25 minut a následném ochlazení na okolní teplotu.

Metody

Měření hydrodynamického průměru se provádí za použití zařízení Coulter N4Plus s komůrkou z plastické hmoty (čtyři transparentní stěny) naplněnou 800 μ l různých roztoků, přičemž měření se provádí při teplotě 90 °C v monomodálním modu.

Měření fluorescence se provádí v zařízení Perkin Elmer LS50B za použití excitační a emisní vlnové délky 260 nm resp. 590 nm. Šířky štěrbin při excitaci a emisi jsou nastaveny na 5 nm. Hodnota fluorescence se zaznamená po přidání ethidiumbromidu k dosažení finální koncentrace 5 μ g ethidiumbromidu/ml.

Experimenty metodou kryotransmisní elektronové mikroskopie (cryo-TEM) byly provedeny za použití 7 μ l vzorků obsahujících 0,5 mg DNA/ml, které jsou umístěny na uhlíkem povlečené měděné mřížce pokryté membránou s otvory. Tyto mřížky jsou potom ponořeny do kapalného ethanu za účelem převedení kapalné vody do stavu sklovité vody. Mřížka se potom uloží do držáku vzorků chlazeného kapalným dusíkem a vloží do mikroskopu (Philips CM12) za účelem vizuálního pozorování.

Rentgenografické experimenty při malých úhlech se provádí v synchrotronu (LURE) v Orsay (Francie) na čáře D43. Připraví se vzorky mající koncentraci 0,5 mg DNA/ml, načež se tyto vzorky odstředí. Získané pelety se uloží do komůrky, ve které jsou vytvořena dvě okénka z kaptonu. Germanium-obsahující monochromátor (reflexe 111) umožňuje selekci vlnové délky 0,138 nm.

Transfekce in vivo se provádí injekcí 200 μ l roztoku obsahujícího 0,2 mg DNA/ml kombinované s kationtovým lipidovým vektorem do ocasní žíly 30-dnů starých myši. 24 hodin po této

injekci se šetrným způsobem utratí, načež se jim vyjmou jednotlivé orgány (plíce, játra, srdce, ledviny, slezina). Tyto orgány se potom desintegrují v pufru používaném pro lyzi za použití zařízení Ultraturax. Takto získané desintegrované produkty se potom odstředí a ze supernatantů se odebere 10 μ l vzorek pro stanovení aktivity luciferázy.

Příklad 1

Vliv poloxalkolu na velikost komplexů RPR 120535/DNA

Plasmid (10 μ g/ml) se zavede do roztoku obsahujícího 150 mM chloridu sodného a různé koncentrace poloxalkolu. Potom se přidá lipofekční činidlo RPR 120535 k dosažení nábojového poměru (+/-) 2,5. Následně se měří velikost komplexů fotonovou korelační spektroskopií popsanou výše v odstavci věnovanému použitým metodám. Výsledky jsou znázorněny na obr.1.

Z výsledků je zřejmé, že při nepřítomnosti poloxalkolu ($\square$) se velikost částic mění v průběhu několika hodin z 274 nm na nejvýše 1000 nm. Po několika hodinách inkubace lze pozorovat vznik sraženiny.

Naopak v přítomnosti 0,1 % poloxalkolu (+) lze pozorovat zmenšení velikosti částic komplexu, přičemž tato velikost zůstává stabilní při koncentraci 0,8 % (O) a 1 % (Δ) poloxalkolu a nemění se za hranici 150 nm.

Při inkubaci samotného lipofekčního činidla s 1 % (hmotn./obj.) poloxalkolu nedochází k vytvoření částic, které by byly detekovatelné metodou kvasi-elastické diffuse světla (Quasi-Elastic Diffusion). Stejně tak při inkubaci DNA s 1 % poloxalkolu nelze detekovat tvorbu částic.

Příklad 2

Vliv poloxalkolu na velikost komplexů RPR 120531/DNA

V rámci tohoto příkladu se opakuje postup popsáný v příkladu 1 s výjimkou spočívající v tom, že se použije kationtový lipid RPR 120531.

Plasmid (10 μ l) se zavede do roztoku obsahujícího 150 mM chloridu sodného s různými koncentracemi poloxalkolu. Potom se přidá RPR 120531 k dosažení nábojového poměru (+/-) 2,5. Následně se měří velikost komplexů za použití fotonové korelační spektroskopie (Coulter N4Plus). Získané výsledky jsou znázorněny na obr.2.

Ze získaných výsledků je zřejmé, že v nepřítomnosti poloxalkolu se velikost komplexů RPR 120531/DNA mění v průběhu několika hodin z 234 nm na 590 nm, zatímco tato velikost zůstává stabilní v přítomnosti 0,5 % (Δ) a 0,9 % (O) poloxalkolu.

Příklad 3

Kontrola stupně kondenzace DNA s lipofekčním činidlem v přítomnosti a nepřítomnosti poloxalkolu

V rámci tohoto příkladu se určuje, zda částice získané v přítomnosti poloxalkolu jsou skutečně částice odvozené z kombinace (kondenzace) DNA s kationtovým lipidem. Za tímto účelem byly provedeny experimenty, při kterých byla zavedena sonda, která fluoreskuje v případě, že se nachází v přítomnosti volné DNA. Míra uvedené fluorescence je vysoká v případě, kdy je DNA k dispozici ve volném stavu, ale naopak nízká, kdy je DNA nedostupná vzhledem k tomu, že je kondenzována s kationtovým lipidem. Získané výsledky jsou znázorněny na obr.3.

Jsou pozorovány míry fluorescence získané po kombinaci DNA s kationtovým lipidem v přítomnosti a v nepřítomnosti poloxalkolu. Především je zřejmé, že fluorescence ethidiumbromidu zavedeného do DNA není modifikována přítomností nebo nepřítomností 1 % poloxalkolu. Míry fluorescence komplexů kationtový lipid/DNA (nábojový poměr (+/-) 2,5) v přítomnosti nebo nepřítomnosti 1 % poloxalkolu jsou ve skutečnosti stejného řádu. Reziduální hodnota fluorescence ukazuje, že DNA není pro uvedenou fluorescenční sondou dostupná.

Závěrem lze tedy konstatovat, že poloxalkohol takto nebrání tomu, aby kombinace DNA s kationtovým lipidem proběhla normální způsobem

Příklad 4

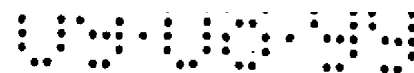
Transfekce in vitro za použití DNA nebo RPR 120535 obsahujících 1 % poloxalkolu

V rámci tohoto příkladu je snaha určit vliv poloxalkolu v případě, že je smíšen se samotnou DNA nebo se samotným kationtovým lipidem. Za tím účelem byly připraveny následující vzorky:

Vzorek 1: 10 μg DNA/ml v prostředí obsahujícím 300 nM NaCl a 1 % (hmotn./obj.) poloxalkolu.

Vzorek 2: 60 μM RPR 120535 v prostředí obsahujícím 300 mM NaCl a 1 % poloxalkolu.

Tyto vzorky se připraví tak, že se smísí v uvedeném pořadí v případě vzorku 1: voda, NaCl, DNA a poloxalkol a v případě vzorku 2: voda, NaCl, poloxalkol a RPR 120535 a to v množstvích uvedených v následující tabulce I.



Tabulka I

Test	H ₂ O	NaCl (5 M)	DNA (0,7 mg/ml)	Poloxalkol (10 %)	RPR120535 (5 mmol)
1 (μl)	413	30	7,1	50	0
2 (μl)	414	30	0	50	6

Biologická aktivita těchto dvou vzorků se testuje na buňkách NIH 4T3. Do jamek 24 jamkové plotny se zavede vždy objem 50 μl vzorku.

Transfekce se provádí v nepřítomnosti fetálního telecího séra. Fetální telecí sérum se přidá 2 hodiny po přidání komplexů.

Získané výsledky ukazují, že k přenosu genů nedochází u nekomplexované DNA v přítomnosti 1 % poloxalkolu a v nepřítomnosti 10% fetálního telecího séra.

Kromě toho stanovení celkových proteinů ukazuje, že zde neexistuje zjevná toxicita.

Příklad 5

Transfekce in vitro za použití roztoků komplexů RPR 120535-lipofekčního činidla s DNA stabilizovaných různými koncentracemi poloxalkolu

V rámci tohoto příkladu je snaha vyhodnotit vliv stabilizace částic poloxalkolem na účinnost transfekce za použití uvedených částic v přítomnosti poloxalkolu. Za tímto účelem byly připraveny vzorky obsahující různé koncentrace poloxalkolu.

Byly připraveny čtyři vzorky s nábojovým poměrem (+/-) 2,5 v prostředí obsahujícím 300 mM NaCl a různé koncentrace poloxalkolu (0, 0,5 %, 0,8 % a 1 % hmotn./obj.):

vzorek 1: nábojový poměr (+/-) 2,5, 300 mM NaCl,

vzorek 2: nábojový poměr (+/-) 2,5, 300 mM NaCl a 0,5 % poloxalkolu,

vzorek 3: nábojový poměr (+/-) 2,5, 300 mM NaCl a 0,8 % poloxalkolu a

vzorek 4: nábojový poměr (+/-) 2,5, 300 mM NaCl a 1 % poloxalkolu.

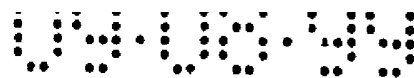
Tyto vzorky byly připraveny míšením v následujícím pořadí: voda, NaCl, DNA, poloxalkol a RPR 120535 a za použití množství uvedených v následující tabulce II:

Tabulka II

Test	H ₂ O	NaCl (5 M)	DNA (0,7 mg/ml)	Poloxalkol (10 %)	RPR120535 (5 mmol)
1 (μl)	737	48	11,4	0	4
2 (μl)	697	48	11,4	40	4
3 (μl)	672	48	11,4	64	4
4 (μl)	657	48	11,4	80	4

* Vzorek 1 náleží do koncentračního rozmezí kationtového lipidu, kde nedochází ke stabilizaci částic v roztoku, t.j. že částice vzájemně vytváří agregáty a velké shluky agregátů, které mají velký hydrodynamický průměr (větší než 1000 nm),

* Vzorek 2 má stejný nábojový poměr kationtový lipid/DNA jako vzorek 1, přičemž se však tato směs připraví v přítomnosti 0,5 % (hmotn./obj.) poloxalkolu; nicméně tato koncentrace poloxalkolu je nedostatečná pro zajištění úplné stabilizace částic (viz příklad 1: vliv neionogenního polymeru na velikost komplexů RPR 120535/DNA),



* vzorky 3 a 4 jsou stabilní, přičemž hydrodynamický průměr částic zůstává v tomto případě rovný asi 150 nm.

Biologická aktivita jednotlivých formulací se testuje na buňkách NIH 3T3. Do jamek plotny se zavede objem 50 μ l jednotlivých vzorků (obsahujících 10 μ g DNA/ml). Transfekce se provádí v nepřítomnosti fetálního telecího séra. Telecí fetální sérum se přidá 2 hodiny po přidání komplexů. Získání výsledky jsou uvedeny na obr.4.

Z výsledků uvedených na obr.4 je zřejmé, že poloxalkol a to bez ohledu na jeho koncentraci nezhoršuje in vitro transfekci v buňkách NIH 3T3. Poloxalkol nemodifikuje transfekční vlastnosti komplexů RPR 120535/DNA při nábojovém poměru (+/-) 2,5 v nepřítomnosti fetálního telecího séra.

Příklad 6

Stanovení struktury komplexů RPR 120535/DNA, BGTC/DNA a BGTC/DOPE/DNA stabilizovaných poloxalkolem

V rámci tohoto příkladu byla stanovena struktura komplexů kationtového lipidového transfekčního činidla za použití rentgenoskopie s malými úhly a transmisní elektronové mikroskopie.

Obr. 5A se vztahuje ke komplexům RPR 120535/DNA. Strukturou získanou v nepřítomnosti a přítomnosti poloxalkolu je lamelární struktura, ve které je DNA uložena mezi lipidovými dvouvrstvami, jejichž periodičnost je 8 nm. Přítomnost poloxalkolu umožňuje získat komplexy s malou velikostí, zatímco v nepřítomnosti poloxalkolu se vytvoří sraženinové částice, jejichž velikost je větší než 1000 nm.

Obr.5B znázorňuje struktury získané pro kationtový lipid BGTC (popsaný v mezinárodní patentové přihlášce WO 97/31935). V tomto případě se rovněž získá v přítomnosti nebo nepřítomnosti

poloxalkolu lamelární struktura, jejíž periodičnost je 6,5 nm. Přítomnost poloxalkolu rovněž umožňuje v tomto případě získat komplexy s malou velikostí. Stejně výsledky se získají pro komplexy obsahující nebo neobsahující jako přísadu produkt DOPE.

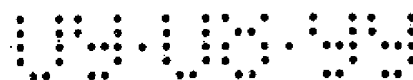
Závěrem lze tedy uvést, že přidavek poloxalkolu nebrání normálnímu vytvoření kombinace DNA s kationtovým lipidem, nýbrž pouze modifikuje koloidní stav tohoto komplexu.

Příklad 7

Transfekce in vivo za použití systemické injekce komplexů kationtového lipidu s DNA stabilizovaných poloxalkolem.

1) RPR 120535/DNA/F68

V rámci tohoto příkladu byly srovnány účinnosti přenosu genů po systemických injekcích precipitovaných komplexů RPR 120535/DNA a stejných takových komplexů stabilizovaných přidáním produktu Pluronic F68. Níže uvedená tabulka ukazuje, že když jsou komplexy vytvořeny v nepřítomnosti produktu F68, lze pozorovat expresi pouze v plicích. Naopak v případě, kdy jsou částice komplexů koloidně stabilizovány přidáním produktu F68, zvýší se aktivita luciferázy o jeden řád v plicích, přičemž expresi lze pozorovat i v ostatních tkáních (játra, srdce)



Tabulka III

Lipid			RPR 120535	
Formulace	0 % F68		10 % F68	
myši	balbc		balbc	
plíce	2 ± 0,9		14 ± 0,9	
játra	0		2 ± 3	
ledviny	0		0	
srdce	0		1 ± 0,4	

2) BGTC/DOPE/DNA/F68

Experimenty shodné s experimenty, které byly popsány výše, byly provedeny za použití jiného lipidu, kterým je v tomto případě lipid BGTC. I v tomto případě byly získány stejné výsledky, a to zlepšení přenosu genů v plicích a měřitelná exprese v játrech, srdci a ledvinách. Tyto výsledky byly získány za použití různých kmenů myši (balbc, C57B16 a C57B16, které jsou nedostatečné na Apolipoprotein E). Je pozoruhodné, že stejné transfekční úrovně byly získány jak pro myši C57B16, které jsou normální, tak i pro myši C57B16, které jsou nedostatečné na Apolipoprotein E, a které mají velmi vysokou hladinu lipidů, tj. desetkrát vyšší než normální myši. Vzhledem k tomu, že se zde používají nevirální lipidové vektory, dalo by se totiž očekávat, že tyto komplexy by mohly být destabilizovány přítomností velkého množství jiných endogenních lipidů. Výsledky transfekce komplexů BGTC/DOPE/DNA in vivo provedené v nepřítomnosti nebo v přítomnosti poloxalkolu jsou uvedeny v následující tabulce IV:

Tabulka IV

Lipid		BGTC/DOPE		
Formulace		0 % F68		4 % F68
Myši		balbc	balbc	C57B16 C57B16 KoApoE
plíce		6,7±2,8	86,5±65,4	220±99 201±12
játra		0	11,4±11,5	47± 26 47±23
ledviny		0	0,34±0,16	1,8±0,9 2,2±0,1
srdce		0	0,74±1,05	0,73±0,7 0,6±0,0

Příklad 8

Použití jiných neionogenních povrchově aktivních činidel

V rámci tohoto příkladu byla testována i další neionogenní povrchově aktivní činidla, kterými jsou polyethylenglykoldendrimer, polyoxyethylenalkohol a polyoxyethylennonylfenylether. Tato neionogenní povrchově aktivní činidla mají stejnou schopnost jako produkt F68 stabilizovat komplexy kationtový lipid/DNA. Použitým kationtovým lipidem zde byl lipid RPR 120535.

1) Polyethylenglykoldendrimery

Byl použit dendrimer obsahující 1 benzylpolyetherovou hlavu generace 2, na kterou je naroubován polyethylenglykol (PEG) s molekulovou hmotností 5000 Da (označovaný jako SAS11), a jiný dendrimer stejného typu, který však obsahuje 2 benzylpolyetherové hlavy naroubované na PEG s molekulovou hmotností 11 000 Da (označovaný jako SAS9). Z dále zařazené tabulky IV je zřejmé, že při použití těchto dendrimerů od

koncentrace 0,02 % (hmotn./obj.) a při koncentracích vyšších již nedochází k vytvoření sraženin mikronové velikosti transfekčních komplexů, nýbrž dochází ke vzniku částic majících průměr rovný nebo menší než 100 nm.

2) Polyoxyethylenalkohol

Tento produkt, který je rovněž označován jako "Brij" a obsahující 100 oxyethylenů v hydrofilní části, umožňuje získat po jedné hodině komplexy RPR 120535/DNA mající průměr menší než 100 nm.

3) Polyoxyethylennonylfenylether

Tento produkt rovněž umožňuje koloidně stabilizovat transfekční komplexy RPR 120535/DNA. Průměr částic uvedeného komplexu je rovněž rovný asi 100 nm.

Následující tabulka uvádí průměr v nm komplexů RPR 120535/DNA majících nábojový poměr 2,75 (+/-) a obsahujících 0,25 mg DNA/ml ve 150mM NaCl, které jsou stabilizovány různými neionogenními povrchově aktivními činidly.

Tabulka V

Polymer (hmotn./obj.)	0,05 %	0,1 %	0,2 %
Brij 700	114 nm	69 nm	74 nm
SAS11	152 nm	99 nm	71 nm
SAS9	104 nm	85 nm	75 nm
Polyoxyethylen- nonylphenylether	142 nm	132 nm	111 nm

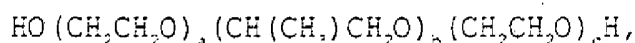
U všech formulací stabilizovaných uvedenými různými neionogenními povrchově aktivními činidly byla stanovena míra kondenzace DNA s kationtovým lipidem za použití fluorescenčních měření. Výsledky těchto měření ukazují, že přítomnost těchto neionogenních povrchově aktivních činidel na povrchu komplexů kationtový lipid/DNA nemodifikují míru kondenzace DNA s kationtovými lipidy (výsledky nejsou uvedeny).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kompozice vhodná pro genovou terapii a obsahující stabilizované částice komplexů kationtového transfekčního činidla nebo činidel a nukleové kyseliny, v y z n a č e n á t í m, že navíc obsahuje alespoň jedno neionogenní povrchově aktivní činidlo v množství dostatečném ke stabilizaci velikosti uvedených částic na hodnotě menší nebo rovné 160 nm.
2. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č e n á t í m, že kationtové transfekční činidlo a nukleová kyselina jsou přítomné v nábojovém poměru 1 až 6.
3. Kompozice podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č e n á t í m, že kationtové transfekční činidlo a nukleová kyselina jsou přítomné v nábojovém poměru menším než 4.
4. Kompozice podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m, že neionogenní povrchově aktivní činidlo obsahuje alespoň jeden hydrofobní segment a alespoň jeden hydrofilní segment.
5. Kompozice podle nároku 4, v y z n a č e n á t í m, že hydrofobní segment je zvolen z množiny zahrnující alifatické řetězce, polyoxyalkyleny, alkyldenpolyestery, polyethylenglykoly s benzympolyetherovou hlavou a cholesterol.
6. Kompozice podle nároku 4 nebo 5, v y z n a č e n á t í m, že hydrofilní segment je zvolen z množiny zahrnující

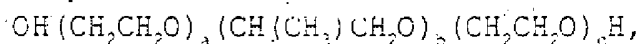
polyoxyalkyleny, polyvinylalkoholy, polyvinylpyrrolidony, a sacharidy.

7. Kompozice podle některého z předcházejících nároků, v y - z n a ě n á t í m, že povrchově aktivním činidlem je polyoxyalkylen obecného vzorce:



ve kterém a, b a c znamenají nezávisle jeden na druhém celá čísla 20 až 100.

8. Kompozice podle některého z předcházejících nároků, v y - z n a ě n á t í m, že jako povrchově aktivní činidlo obsahuje sloučeninu obecného vzorce:



ve kterém a znamená celé číslo 75, b znamená celé číslo 30 a c znamená celé číslo 75.

9. Kompozice podle některého z předcházejících nároků, v y - z n a ě n á t í m, že jako povrchově aktivní činidlo obsahuje sloučeninu ze skupiny polyethylenglykolů s dentritickou benzylpolyetherovou hlavou.

10. Kompozice podle některého z předcházejících nároků, v y - z n a ě n á t í m, že jako povrchově aktivní činidlo obsahuje sloučeninu ze skupiny polyoxyethylenalkoholů.

11. Kompozice podle některého z předcházejících nároků, v y - z n a ě n á t í m, že jako povrchově aktivní činidlo obsahuje polyoxyethylenononylfenylether.

12. Kompozice podle některého z předcházejících nároků, v y - z n a č e n á t í m, že povrchově aktivní činidlo je v kompozici přítomno v koncentraci 0,01 až 10 % hmotn./obj..

13. Kompozice podle některého z předcházejících nároků, v y - z n a č e n á t í m, že povrchově aktivní činidlo je v kompozici obsaženo v koncentraci 0,02 až 5 % hmotn./obj..

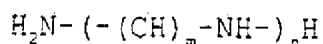
14. Kompozice podle některého z předcházejících nároků, v y - z n a č e n á t í m, že kationtovým transfekčním činidlem je lipofekční činidlo.

15. Kompozice podle nároku 14, v y z n a č e n á t í m, že lipofekčním činidlem je amfifilní molekula obsahující alespoň jednu lipofilní oblast sdruženou nebo nesdruženou s hydrofilní oblastí.

16. Kompozice podle nároku 14, v y z n a č e n á t í m, že se jedná o lipidovou směs schopnou tvořit kationtové liposomy.

17. Kompozice podle nároku 14 nebo 15, v y z n a č e n á t í m, že se jedná o kationtový lipid.

18. Kompozice podle nároku 14 nebo 15, v y z n a č e n á t í m, že se jedná o lipofekční činidlo obsahující alespoň jednu polyaminovou oblast obecného vzorce:

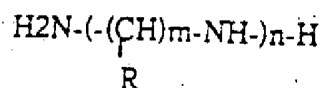


ve kterém m znamená celé číslo větší nebo rovné 2 a n znamená celé číslo větší nebo rovné 1, přičemž m se může měnit v různých skupinách uhlíku mezi dvěma aminy a uvedená polyaminová oblast je kovalentně sdružena s lipofilní oblastí typu nasyceného nebo nenasyceného uhlovodíkového řetězce

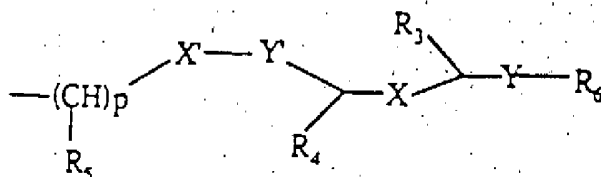
cholesterolu nebo přírodního nebo syntetického lipidu schopného tvořit lamelární nebo hexagonální fáze.

19. Kompozice podle nároku 18, v y z n a č e n á t í m, že polyaminová oblast je reprezentována sperminem nebo některým z jeho analogů, který si zachoval schopnost vázat nukleovou kyselinu.

20. Kompozice podle nároku 14 nebo 15, v y z n a č e n á t í m, že obsahuje lipofekční činidlo obecného vzorce:



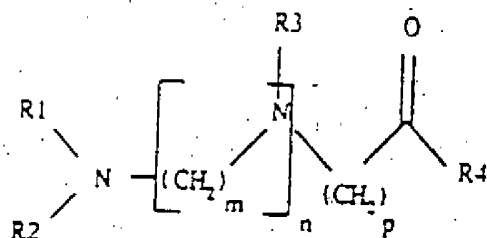
ve kterém R uvádějící lipofilní oblast znamená skupinu obecného vzorce:



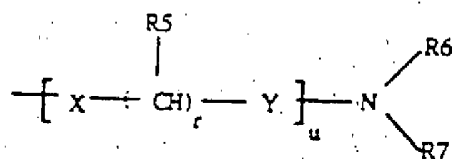
ve kterém X a X' znamenají nezávisle jeden na druhém atom kyslíku, methylenovou skupinu $-(\text{CH}_2)_q-$, kde q znamená 0, 1, 2 nebo 3, nebo aminovou skupinu $-\text{NH}-$ nebo $-\text{NR}'-$, kde R' znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy, Y a Y' znamenají nezávisle jeden na druhém methylenovou skupinu, karbonylovou skupinu nebo skupinu $\text{C}=\text{S}$, R_3 , R_4 a R_5 znamenají nezávisle jeden na druhém atom vodíku nebo substituovanou nebo nesubstituovanou alkylovou skupinu obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy, přičemž význam p se pohybuje od 0 do 5, R_6 znamená cholesterolový derivát nebo alkylamino-skupinu vzorce $-\text{NR}_1\text{R}_2$, kde R_1 a R_2 znamenají nezávisle jeden na druhém přímou nebo rozvětvenou alifatickou skupinu obsahující 12 až 22 uhlíkových

atomů.

21. Kompozice podle nároku 14. nebo 15, v y z n a č e n á
t í m, že obsahuje lipofekční činidlo obecného vzorce:



ve kterém R_1 , R_2 a R_3 znamenají nezávisle jeden na druhém atom vodíku nebo skupinu $-(\text{CH}_2)_q-\text{NRR}'$, kde q se může měnit od 1 do 6 a to vzájemně nezávisle v jednotlivých skupinách R_1 , R_2 a R_3 , a R a R' znamenají nezávisle jeden na druhém atom vodíku nebo skupinu $-(\text{CH}_2)_q-\text{NH}_2$, přičemž q se může měnit od 1 do 6 a to vzájemně nezávisle v jednotlivých skupinách R a R' , m , n a p znamenají nezávisle jeden na druhém celé číslo, které se může měnit od 0 do 6, přičemž v případě, že n je větší než 1, potom m může mít různé hodnoty a R_3 může mít různé významy v rámci předcházejícího obecného vzorce, a R_4 znamená skupinu obecného vzorce:



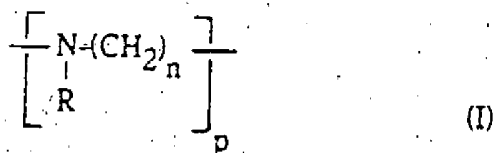
ve kterém R_6 a R_7 znamenají nezávisle jeden na druhém atom vodíku nebo nasycenou nebo nenasycenou alifatickou skupinu obsahující 10 až 22 uhlíkových atomů, přičemž alespoň jedna ze skupin R_6 nebo R_7 neznamená atom vodíku, u znamená celé číslo 0 až 10, přičemž v případě, že u znamená celé číslo větší než 1, potom R_5 , X , Y a r mohou mít odlišné významy v různých

jednotkách $[X-(CHR_r)_r-Y]$, X znamená atom kyslíku nebo atom síry nebo aminovou skupinu, která je nebo není monoalkylována, Y znamená karbonylovou skupinu nebo methylenovou skupinu, R_r znamená atom vodíku nebo boční řetězec přírodní aminokyseliny, který je případně substituován, a r znamená celé číslo od 1 do 10, přičemž v případě, že r je rovno 1, R_r znamená substituovaný nebo nesubstituovaný boční řetězec přírodní aminokyseliny, a v případě, že r je větší než 1, potom R_r znamená atom vodíku.

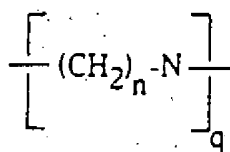
22. Kompozice podle některého z nároků 14 nebo 15, v y z n a -
č e n á t í m, že obsahuje kationtový lipid nesoucí jednu
nebo více guanidiniových nebo/a amidiniových skupin.

23. Kompozice podle některého z nároků 1 až 13, v y z n a č e -
n á t í m, že kationtovým transfekčním činidlem je kationtový
polymer.

24. Kompozice podle nároku 23, v y z n a č e n á t í m, že
kationtovým polymerem je sloučenina obecného vzorce I:



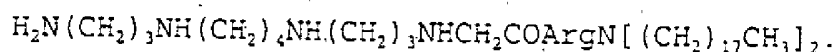
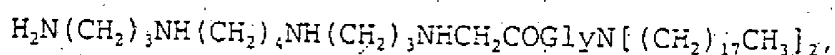
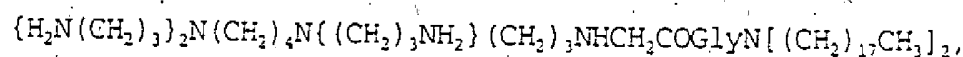
ve kterém R může znamenat atom vodíku nebo skupinu obecného
vzorce:



ve kterém n znamená celé číslo 1 až 10 a p a q jsou celá čísla, přičemž platí, že součet $p+q$ má takovou hodnotu, že střední molekulová hmotnost polymeru se pohybuje mezi 100 a 10^7 Da.

25. Kompozice podle nároku 23 nebo 24, v y z n a č e n á t í m, že obsahuje polyethylenimin mající střední molekulovou hmotnost 50 000 Da (PEI50K), polyethylenimin mající střední molekulovou hmotnost 22 000 Da (PEI22K) nebo polyethylenimin mající střední molekulovou hmotnost 800 000 Da (PEI800K).

26. Kompozice podle některého z nároků 1 až 14, v y z n a č e n á t í m, že kationtové transfekční činidlo je výhodně zvoleno z množiny zahrnující lipofektamin, dioktadecylamino-spermin (DOGS), palmitoylfosfatidyethanolamin-5-karboxyspermyl-amid (DPPES), 2,5-bis(3-aminopropylamino)pentyl (dioktadecylkarbamoylmethoxy)-acetát nebo 1,3-bis(3-aminopropylamino)-2-propyl (dioktadecylkarbamoylmethoxy)acetát,



27. Kompozice podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m, že nukleovou kyselinou je deoxyribonukleová kyselina.

28. Kompozice podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m, že nukleovou kyselinou je ribonukleová kyselina.

29. Kompozice podle nároku 27 nebo 28, v y z n a č e n á t í m, že nukleová kyselina je chemicky modifikována.

30. Kompozice podle některého z nároků 1 až 26, v y z n a č e n á t í m, že nukleovou kyselinou je antimediatorová nukleová kyselina.

31. Kompozice podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m, že nukleová kyselina obsahuje terapeutický gen.

32. Kompozice podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m, že navíc obsahuje přísadu typu zahrnujícího dioleoylfosfatidylethanolamin (DOPE), oleoylpalmitoylfosfatidylethanolamin (POPE), di-stearoyl-, -palmitoyl- a -myristoylfosfatidylethanolamin, jakož i jejich deriváty, které jsou 1 až 3 krát N-methylovány, fosfatidylglyceroly, diacylglyceroly, glykosyldiacylglyceroly, cerebrosidy (jakými jsou zejména galaktocerebrosidy), sfingolipidy (jakými jsou zejména sfingomyeliny) nebo alternativně asialogangliosidy.

33. Kompozice podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m, že navíc je v ní ke kationtovému transfekčnímu činidlu přidružen usměrňující prvek.

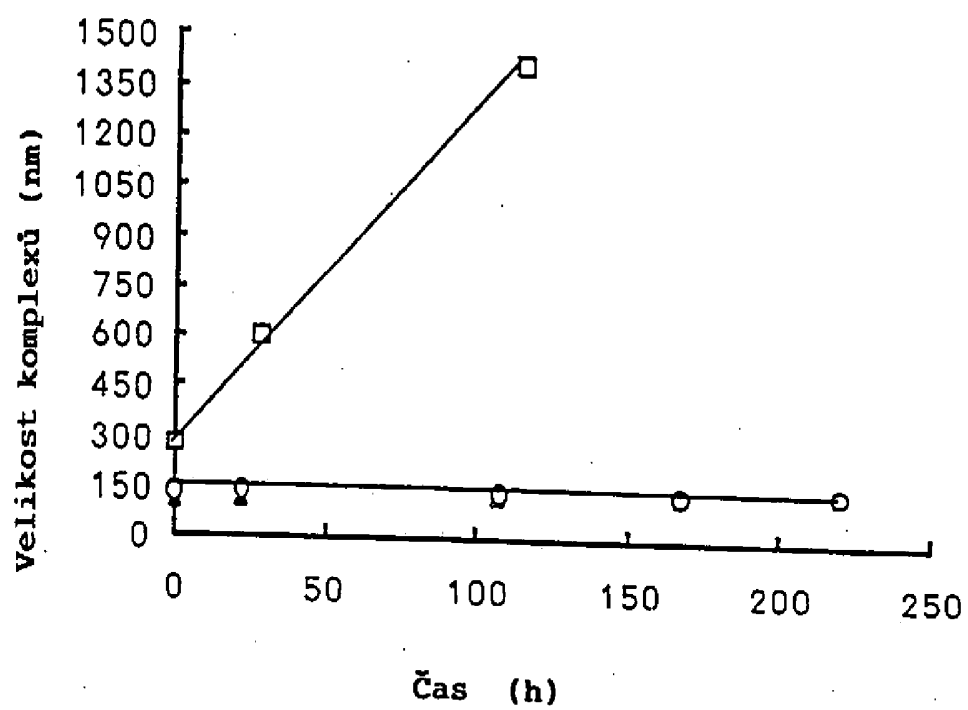
34. Kompozice podle nároku 33, v y z n a č e n á t í m, že usměrňující prvek je zvolen z množiny zahrnující protilátky řízené proti molekulám buněčného povrchu, ligandy membránových receptorů, jakými jsou insulin, transferrin, kyselina listová nebo jakýkoliv další růstový faktor, cytokiny nebo vitaminy, modifikované nebo nemodifikované lektiny, proteiny s jednotkou RGD, cyklické nebo necyklické peptidy obsahující tandemové uspořádání jednotek RGD, polylysinpeptidy, jakož i přírodní nebo syntetické ligandové peptidy.

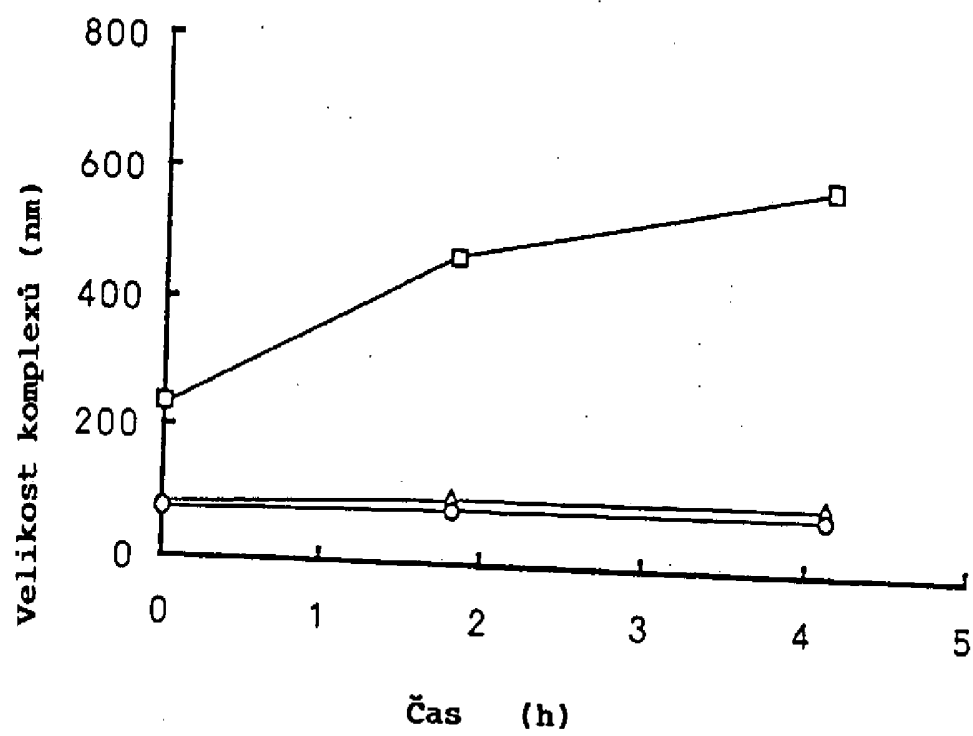
35. Způsob přípravy kompozice obsahující částice komplexů kationtového tranfekčního činidla nebo činidel s nukleovou kyselinou, v y z n a č e n ý t í m, že transfekční činidlo a nukleová kyselina se uvedou do styku v přítomnosti množství neionogenního povrchově aktivního činidla, které je dostatečné ke stabilizaci velikosti takto vytvořených částic komplexů na hodnotě menší než asi 160 nm.

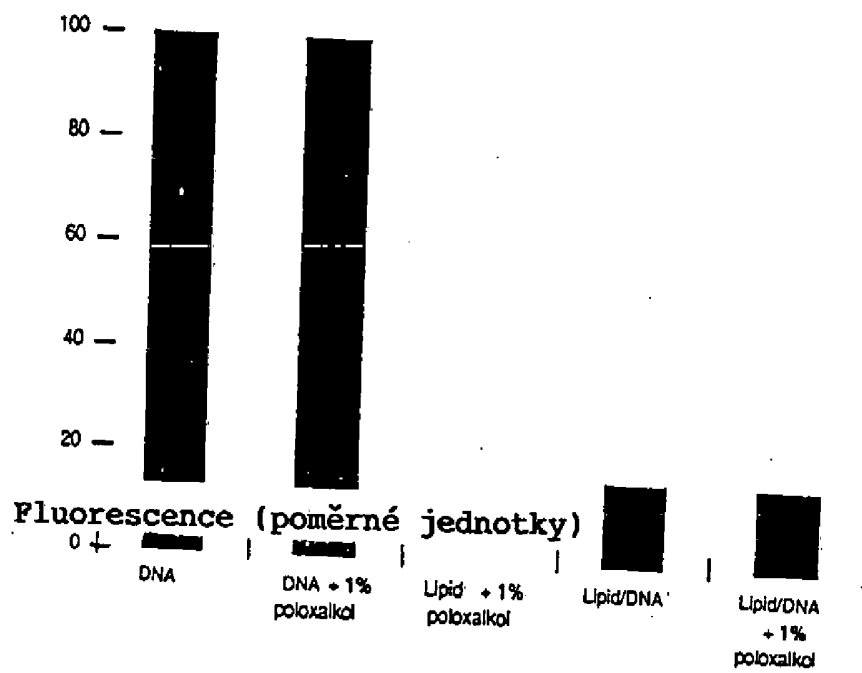
36. Způsob podle nároku 35, v y z n a č e n ý t í m, že jedna ze složek zvolená z množiny, zahrnující nukleovou kyselinu a lipofekční činidlo, se předběžně smísí s neionogenním povrchově aktivním činidlem, načež se k získané směsi přidá druhá ze složek z uvedené množiny.

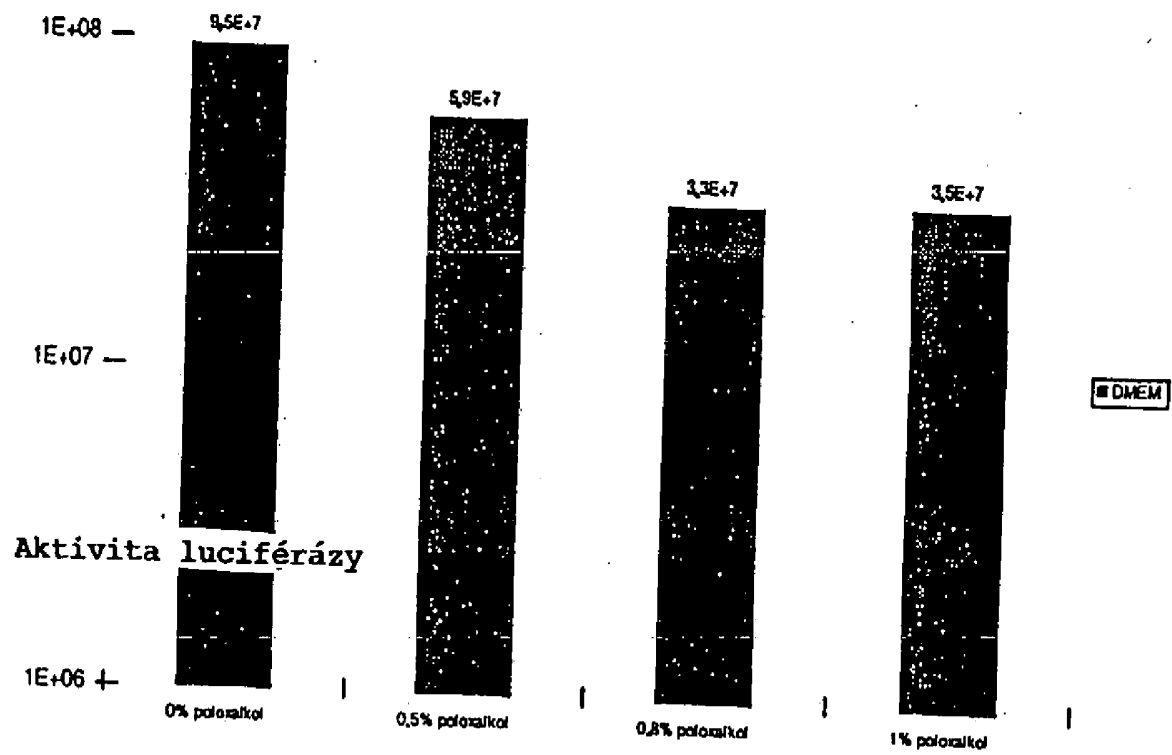
37. Způsob podle nároku 35 nebo 36, v y z n a č e n ý t í m, že se jako povrchově aktivní činidlo použije povrchově aktivní činidlo podle nároků 4 až 13.

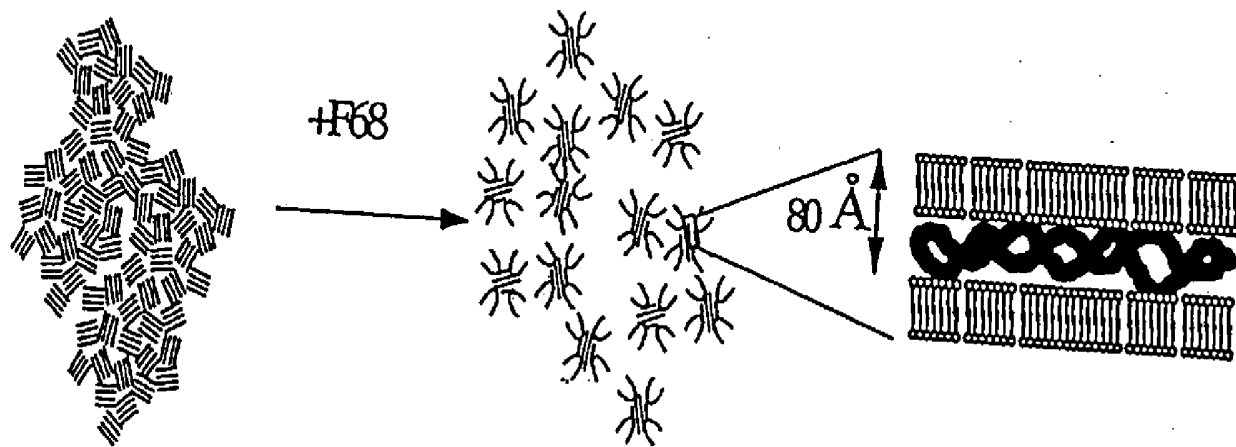
Zastupuje:



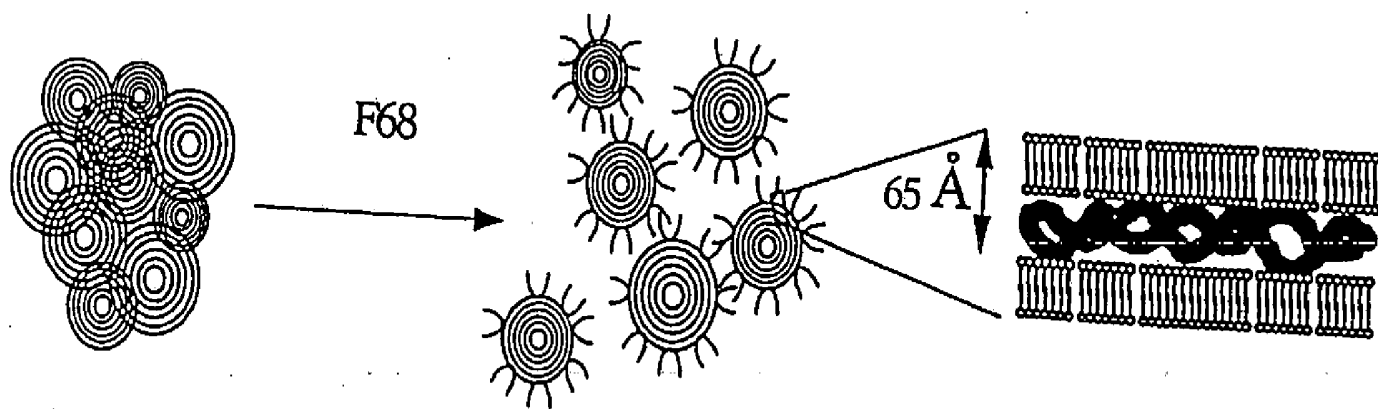








OBR. 5A



OBR. 5B