

P 97 01 882

77171
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

63.805/BE

KIVONAT

Lipopoliaminok, mint transzfekeiós ágensek, és ^{ezelet tartalmazó} ~~gyógyszerészeti~~
~~felhasználásuk~~ ^{gyógyászati célra}

RHONE-POULENC RORER S.A., ANTONY, FR

A bejelentés napja: 1995.12.04.

Elsőbbsége: 1994.12.05., FR 94/14596

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/FR95/01595

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/17823

A találmány tárgyát új, (I) általános képletű lipopoliaminok, az ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények, valamint nukleinsavak in vivo és/vagy in vitro transzfekeálására való felhasználásuk képezi.

Az (I) általános képletben m 2 és 6 közötti egész szám; n 1 és 9 közötti egész szám, azzal a feltétellel, hogy a képletben csak egy olyan R csoport van, amely hidrogénatomtól eltérő, és m értéke a különböző csoportokban azonos vagy különböző; R hidrogénatom vagy egy (II) általános képletű csoport, amelyben X és X' oxigénatom, $-(CH_2)_q-$ általános képletű csoport - amelyben q 0, 1, 2 vagy 3 -, vagy $-NH-$ vagy $-NR'-$ képletű aminocsoport, amelyben R' alkilcsoport; Y és Y' jelentése metilén-, karbonil- vagy tiokarbonil-csoport; R_3 , R_4 és R_5 hidrogénatom vagy adott esetben szubsztituált alkilcsoport, és p 0 és 5 közötti szám; R_6 egy koleszterin-származék vagy egy $-NR_1R_2$ általános képletű csoport, amelyben R_1 és R_2 egy telített vagy telítetlen alifás csoport.

A gyógyszerkészítmények legalább egy lipopoliamint és egy

nukleinsavat tartalmaznak.

A találmány szerinti vegyületeket tartalmazó gyógyszerkészítmények a hibás és/vagy abnormális expresszióval kapcsolatos genetikai betegségek kezelésére használhatók.

Jellemző ábra: (I)

Sándor

P 97 01 862

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

33180

A

63.805/BE

Lipopoliaminok, mint transzfekeiós ágensek, és ~~gyógyszerészeti~~
~~felhasználásuk~~ ezeket tartalmazó gyógyszerek készítésére

RHONE-POULENC RORER S.A., ANTONY, FR

Feltalálók:

BYK Gerardo,	CRÉTEIL,	FR
DUBERTRET Catherine,	SÈVRES,	FR
SCHERMAN Daniel,	PARIS CÉDEX,	FR

A bejelentés napja: 1995.12.04.

Elsőbbsége: 1994.12.05., FR 94/14596

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/FR95/01595

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/17823

A találmány tárgya a lipopoliaminok családjába tartozó új vegyületek, az ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények, valamint a vegyületek felhasználása nukleinsavak in vivo és/vagy in vitro transzfektálására.

Sok olyan genetikai betegség van, amely hibás és/vagy abnormalis expresszióval, vagyis egy vagy több nukleinsav hiányos vagy túlzott mértékű expresszáásával kapcsolatos. A génterápia fő célja az ilyen genetikai abnormalitások korrigálása klónozott gének in vivo vagy in vitro sejtexpressziója útján.

Sokféle módszert ajánlanak az ilyen genetikai információ intracelluláris kifejezésére. Közülük az egyik kémiai és biokémiai vektorokat alkalmaz. A szintetikus vektorok két fő funkciója a transzfektálandó DNS komplementációja valamint a sejtben való rögzítésének, és ezáltal a sejtmembránon és adott esetben a két maghártyán való átjutásának elősegítése.

Ebben a transzfektálási módszerben lényeges előrelépést jelentett egy kationos lipid alkalmazásán alapuló technológia kidolgozása. Ennek révén bebizonyosodott, hogy egy pozitív töltésű lipid kation, az N-[2,3-di(oleil-oxi)-propil]-N,N,N-trimetil-amónium-klorid (DOTMA) liposzómák, vagyis apró hólyagocskák alakjában spontán reakcióba lép a negatív töltésű DNS-sel, ily módon lipid-DNS komplex képződik, amely a sejtmembránokkal fuzionálni képes, és így lehetővé teszi a DNS sejten belüli expresszióját. Ez a molekula transzfekció szempontjából hatásos, azonban hátránya, hogy biológiai úton nem bontható le, és a sejtekre mérgező.

A DOTMA után ezen szerkezeti modell alapján – amelyben a lipofil csoport egy "térkitöltő" (spacer) szakasz révén kap-

csolódik egy aminocsoporthoz – más lipid kationokat is kidolgoztak. Ezek között vannak olyanok, amelyek lipofil csoportként két zsírsavat vagy egy koleszterin-származékot, és ezen kívül adott esetben aminocsoportként egy kvaterner ammónium-csoportot tartalmaznak. Az ilyen lipid kationok reprezentatív példáiként említhetjük a DOTAP-ot, a BOBT-t vagy a ChOBT-t. Más vegyületek, például a DOSC és a ChOSC azzal jellemezhetők, hogy a kvaterner ammóniumcsoport helyett egy kolincsoportot tartalmaznak. Általában azonban ezeknek a vegyületeknek elég gyenge a transzfekciós aktivitása.

Ugyancsak leírták már a kationos lipidek egy másik fajtáját, a lipopoliaminokat. Az ilyen vegyületekben a kationos csoportot az L-5-karboxi-spermin képezi, amely négy aminocsoportot tartalmaz, közülük kettő primer, kettő szekunder. Ilyen például a DOGS és a DPPES. Ezek a lipopoliaminok különösen hatásosak a primer endokrin sejtek transzfektálásában.

Egy ideális szintetikus transzfekciós ágens magas szintű transzfekciót nyújt, az alkalmazott dózisokban a sejtek széles körére nézve egyáltalán nem vagy csak nagyon kevésbé mérgező, és biológiai úton lebontható, hogy a kezelt sejtekre semmiféle másodlagos hatást ne fejtsen ki.

A találmány tárgyát közelebbről olyan új vegyületek képezik, amelyek sejtek in vivo és in vitro transzfektálására, nevezetesen a nukleinsavak vektorizálására alkalmazhatók.

A találmány elsődleges tárgyát (I) általános képletű, D, L vagy LD formájú lipopoliaminok képezik, amely képletben

m értéke egy 2 és 6 közötti egész szám;

n értéke egy 1 és 9 közötti, előnyösen 1 és 5 közötti egész szám - az általános képletben csak egy olyan R csoport van, amelynek jelentése hidrogénatomtól eltérő, és m értéke a különböző $-(\text{CH})_m-$ és $-(\text{CH}_2)_m-$ csoportokban

$$\begin{array}{c} | \\ \text{R} \end{array}$$

azonos vagy különböző;

R jelentése hidrogénatom vagy egy (II) általános képletű csoport, amelyben

X és X' jelentése egymástól függetlenül oxigénatom, $-(\text{CH}_2)_q-$ általános képletű csoport - amelyben q értéke 0, 1, 2 vagy 3 -, vagy $-\text{NH}-$ képletű vagy $-\text{NR}'-$ általános képletű aminocsoport, amelyben R' jelentése 1-4 szénatomos alkilcsoport;

Y és Y' jelentése egymástól függetlenül metilén-, karbonil- vagy tiokarbonil-csoport;

R₃, R₄ és R₅ jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom vagy 1-4 szénatomos, szubsztituált vagy szubsztituálatlan alkilcsoport, és p értéke 0 és 5 között változhat;

R₆ jelentése egy koleszterin-származék vagy egy $-\text{NR}_1\text{R}_2$ általános képletű alkil-aminocsoport, amelyben R₁ és R₂ jelentése egymástól függetlenül egy 12-22 szénatomos, telített vagy telítetlen, egyenes vagy elágazó láncú alifás csoport.

Különösen előnyösek azok a vegyületek, amelyek képletében R jelentése (II') általános képletű csoport, amelyben R₃, R₄, R₅, R₆, és p jelentése a fenti, és X jelentése oxigénatom vagy egy

$-(CH_2)_q-$ általános képletű csoport, amelyben q értéke 0.

A vegyületeknek ezt a családját egy belső észterkötés jelenléte jellemzi, ami a biológiai lebonthatóság szempontjából fontos.

A találmány szerinti előnyös lipopoliaminok közé tartozik a (III), (IV), (V) és (VI) képletű vegyület D, L vagy DL alakban, valamint ezek sói.

A találmány további tárgyát képezi a találmány szerinti lipopoliaminok bármiféle terápiás felhasználása, akár közvetlenül, akár gyógyszerkészítményekben.

Mint mondtuk, az (I) általános képletű vegyületek különösen jól használhatók nukleinsavak in vivo és in vitro transzfektálására. Hatásosan komplementálják a DNS-t, és a kezelt sejtekkel szemben toxicitásuk nagyon csekély vagy nulla. Ezenkívül észterkötésük hidrolízise útján biológiailag lebonthatók.

A találmány szerinti vegyületek maximális hatásának eléréséhez az (I) általános képletű vegyület és a nukleinsav arányát előnyösen úgy határozzuk meg, hogy az R arány, vagyis a szóbanforgó lipopoliamin pozitív töltéseinek a nukleinsav negatív töltéseihez viszonyított aránya optimális legyen. Ez az arány erősen függ a felhasználási módtól – tehát hogy in vivo vagy in vitro alkalmazzuk – és a transzfektálandó sejttípustól, ezért minden esetben külön kell optimalizálni. Az optimalizálás az átlagosan művelt szakember ismereteinek körébe tartozik.

A találmány szerinti vegyületekben a polinukleotid lehet dezoxiribonukleinsav vagy ribonukleinsav. Szekvenciája lehet eredeti természetes vagy mesterséges, éspedig DNS genom, cDNS,

mRNS, tRNS, rRNS, hibrid szekvencia, szintetikus vagy félszintetikus szekvencia. Ezek a nukleinsavak lehetnek emberi, állati, növényi, bakteriális, virális vagy hasonló eredetűek. Bármilyen, az átlagosan művelt szakember előtt ismert úton megkaphatók, és pedig beszerezhetők bankokból, előállíthatók kémiai szintézissel vagy vegyes módszerekkel, tehát a bankból beszerezett szekvenciák kémiai vagy enzimatisz módosításával. Továbbá be lehetnek építve vektorokba, például plazmid vektorokba.

A dezoxiribonukleinsavak lehetnek egy- vagy kétszálalak. Ezek a dezoxiribonukleinsavak hordozhatnak terápiás géneket, a transzkripciót vagy replikációt szabályozó szekvenciákat, adott esetben modifikált antiszensz szekvenciákat, az egyéb sejtkomponensekhez kötő régiókat és hasonló elemeket.

A találmány szempontjából terápiás génnek tekintünk minden olyan gént, amely valamilyen terápiás hatású fehérje-típusú anyagot kódol. Az így kódolt fehérje-típusú anyagok lehetnek fehérjék, peptidek és hasonló vegyületek. Ezek a fehérje-típusú anyagok lehetnek a cél-sejttel homológok, vagyis olyan vegyületek, amelyeket a célsejt normális, betegségtől mentes állapotában expresszál. Ebben az esetben a fehérje expresszálása lehetővé teheti például a sejt valamilyen nem kielégítő expressziójának enyhítését, egy inaktív vagy kevésbé aktív fehérje expresszálását valamilyen modifikáció céljából, vagy a szóban forgó fehérje expressziójának fokozását. Továbbá a terápiás gén kódolhatja egy sejtféhrjének valamilyen megnövelt stabilitású vagy megváltozott aktivitású mutánsát. A fehérje-típusú anyag a célsejttel szemben heterológ is lehet. Ez esetben az expresszált

fehérje kiegészíthet vagy létrehozhat egy meghatározott aktivitást a sejtben, amely lehetővé teszi a sejt számára, hogy valamilyen betegséggel szemben fellépjen, vagy egy immunválaszt stimuláljon.

A találmány szerinti terápiás anyagok közé tartoznak például az enzimek, vérből származó anyagok, hormonok, limfokinok – mint az interleukinok, interferonok, TNF és hasonló anyagok, amelyeknek ismertetése megtalálható például az FR 9203120 számú francia szabadalmi leírásban –, felismerési faktorok, neurotranszmitterek vagy prekursoraik vagy a szintézisükhöz szükséges enzimek, trofikus (táplálkozási) faktorok – mint a BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pleiotrofin és hasonló –, a disztrofin vagy egy minidisztrofin, amit az FR 9111947 számú francia szabadalmi leírás ismertet, a mukoviszcidózzal összekapcsolt CFTR fehérje, a daganatszuppresszor gének – mint p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev és hasonló –, amelyeknek ismertetése megtalálható például az FR 9304745 számú francia szabadalmi leírásban –, a koagulációban szerepet játszó VII, VIII és IX faktorokat kódoló gének, a DNS javításában résztvevő gének, az öngyilkos gének (timidin-kináz, citozin-dezamináz), a hemoglobin-gének vagy más néven fehérjetranszportáló gének, az apolipoprotein típusú (lipoproteinből származó) A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J és apo(a) lipidek metabolizálásában résztvevő fehérjéknek megfelelő gének, az anyagcsere enzimek, például a lipoprotein lipáz, a lipáz májenzim, a lecitin-koleszterin-aciltranszferáz, a 7- α -koleszterin-hidroxiláz, a savas foszfatidil foszfataz, továbbá lipidtranszfer-fehérjék –

például a koleszterin-észtereket transzferáló és a foszfo-lipideket transzferáló fehérje -, egy HDL-kötő fehérje, egy receptor, például LDL-receptorok, chylomicron-maradék receptorok, scavenger (gyökfogó) receptorok és hasonlóak.

A terápiás nukleinsav lehet továbbá egy gén vagy egy antiszensz szekvencia, amelynek a célsejten belüli expressziója lehetővé teszi a génexpresszió szabályozását vagy a celluláris mRNS transzkripcióját. Például az ilyen szekvenciák a célsejtben az EP 140308 számú európai szabadalmi leírásban ismertett módon átírhatók a celluláris mRNS-sel komplementer RNS-sé, és így a fehérjévé történő lefordításuk blokkolható. Terápiás gének továbbá a riboszómákat kódoló szekvenciák, amelyek az EP 321201 számú európai szabadalmi leírás szerint szelektíve képesek roncsolni a megcélzott RNS-eket.

Mint mondtuk, a nukleinsav hordozhat egy vagy több gént, amelyek egy - embernél vagy állatnál immunválaszt generáló antigén peptidet kódolnak. Tehát ebben a megvalósítási módban a tálmány lehetővé teszi vakcinák készítését, vagy azt, hogy embernél vagy állatoknál mikroorganizmusokkal, vírusokkal vagy rákkal szembeni immunterápiás kezeléseket hajtsunk végre. E célból szóba jöhetnek az Epstein Barr vírusra, a HIV vírusra, a hepatitis B vírusra (EP 185573), az álveszettség vírusára, a "Syncytia forming virus"-ra továbbá más vírusokra vagy tumorokra (EP 259212) nézve specifikus antigén peptidek.

A nukleinsav előnyösen olyan szekvenciákat is tartalmaz, amelyek a kívánt sejtben vagy szervezetben terápiás gének és/vagy antigén peptideket kódoló gének expresszióját teszik le-

hetővé. Ezek lehetnek olyan szekvenciák, amelyek a természetben az adott gén kódolásáért felelősek, ha feltételezhető, hogy ezek a szekvenciák a fertőzött sejtben működőképesek lesznek. De másféle eredetű (más fehérjék kódolásáért felelős vagy akár szintetikus) szekvenciák is szóba jöhetnek. Lehetnek ezek eukarióta vagy virális gének promoter szekvenciái, például a megfertőzendő sejt genomjából származó promoter szekvenciák. Ugyanakkor lehetnek egy vírus genomjából származó promoter szekvenciák is. E tekintetben megemlíthetjük az E1A, MLP, CMV, RSV gének promotorait. Ezen kívül ezek az expressziós szekvenciák aktiváló, szabályozó és hasonló szekvenciák hozzáadásával módosíthatók is. Végül a szóban forgó szekvenciák lehetnek indukálható vagy represszálható promoterek.

A nukleinsavak a terápiás gén előtti szakaszon egy szignál szekvenciát is hordozhatnak, amely a szintetizált terápiás anyagot a célsejt kiválasztási útvonalaira irányítja. Ez lehet a terápiás anyag természetes szignál szekvenciája, de lehet egészen más funkcionális szignál szekvencia vagy akár egy mesterséges szignál szekvencia is. A nukleinsav egy olyan szignál szekvenciát is hordozhat, amely a szintetizált terápiás anyagot a sejtnél egy meghatározott részébe vezérli.

A találmány további tárgyát képezik olyan készítmények, amelyek egy nukleinsavat, valamilyen – például a találmány szerinti – lipopoliamint és egy olyan adalékanyagot tartalmaznak, amely a sejtmag lipopoliamin/nukleinsav-komplexéhez kötődik, és ezáltal a transzfektáló képességet fokozza. Ténylegesen kimutattuk, hogy a lipopoliaminok transzfektáló képessége váratlan mér-

tékben megnövekszik bizonyos adalékanyagok – például lipidek vagy fehérjék – jelenlétében, amelyek a sejtmag lipopoliamin/nukleinsav-komplexéhez kötődni képesek.

A találmány szerinti készítmények adalékanyagként előnyösen egy vagy több neutrális lipidet tartalmaznak. Ezek a készítmények különösen előnyösek akkor, ha az R arány kicsi. Ténylegesen kimutattuk, hogy egy neutrális lipid hozzáadása fokozza a nukleolipid részecskék képződését, és meglepő módon a sejtmembrán destabilizálása révén elősegíti a részecskék behatolását a sejtbe.

A találmány szerinti eljárásban még előnyösebben 2 zsírsavláncot tartalmazó lipideket alkalmazunk.

Különösen előnyös, ha természetes vagy szintetikus ikererionos vagy iontöltés nélküli lipideket alkalmazunk fiziológias körülmények között. Ezeket még előnyösebben a dioleoil-foszfátidil-etanol-amin (DOPE), az oleoil-palmitoil-foszfátidil-etanol-amin (POPE), a disztearoil-, -palmitoil- vagy -mirisztoil-foszfátidil-etanol-amin vagy ezek egy-háromszorosan N-metilezett származékai; a foszfátidil-glicerinek, a diacil-glicerinek, a glükózil-diacil-glicerinek, a cerebrozidok (például galakto-cerebrozidok), a szfingolipidek (például a szfingomielinek) vagy az asialogan-glikozidok (például az asialoGM1 és GM2) közül választjuk.

Ezen különböző lipideket hagyományos, az átlagosan művelt szakember számára ismert módszerekkel előállíthatjuk szintetikus úton, vagy extrakcióval kinyerhetjük szervekből (például az agyból) vagy tojásokból. A természetes lipidek extrahálását végez-

hetjük szerves oldószerekkel, amint azt például Lehninger [Biochemistry] leírja.

A találmány szerinti készítmények egy ekvivalensnyi (I) általános képletű vegyületre számítva előnyösen 0,1 - 20, még előnyösebben 1 - 5 ekvivalens adalékanyagot tartalmaznak.

A beadás szempontjából formulálhatunk lokális, bőrbe beadandó, orális, rektális, vaginális, parenterális, intravénás, intramuszkuláris, szubkután, intraokuláris vagy transzdermális találmány szerinti készítményeket. A találmány szerinti injektálható, nevezetesen a közvetlenül a kívánt szervbe beadható és a helyileg (a bőrön és/vagy nyálkahártyán) alkalmazható gyógyszerkészítmények előnyösen tartalmaznak egy gyógyászatilag elfogadható hordozóanyagot. Ezek a készítmények lehetnek steril, izotóniás oldatok vagy száraz, liofilizált készítmények, amelyekből az esettől függően steril víz vagy fiziológiás szérum hozzáadásával injektálható oldatokat készíthetünk. Az injekció céljára használandó nukleinsav-dózist valamint a beadások számát különböző tényezők - mint az alkalmazott beadási mód, a szóban forgó betegség, az expresszálandó gén, illetve a kezelés alkalmazásának időtartama - függvényében kell meghatározni. Ami a beadást illeti, az történhet közvetlenül a szövetekbe, vagy oly módon, hogy a sejteket tenyészetben kezeljük, majd injekció vagy beültetés révén visszajuttatjuk az élő szervezetbe.

A találmány további tárgya egy különösen előnyös módszer betegségek kezelésére. Ez abból áll, hogy a fenti körülmények között in vivo vagy in vitro beadunk egy, a betegség gyógyítására alkalmas nukleinsavat egy találmány szerinti (I) általános

képletű vegyülettel együtt. Ez a módszer közelebbről fehérje- vagy nukleinsav-típusú anyag hiányából eredő betegségeknel alkalmazható, és a beadott nukleinsav ezt a fehérje-típusú anyagot kódolja vagy a szóban forgó nukleinsavat tartalmazza.

A találmány oltalmi köre a találmány szerinti lipopoliaminoknak minden olyan alkalmazására kiterjed, amelynek célja sejtek in vivo vagy in vitro transzfektálása.

Az alábbi példák a találmány részletes ismertetésére szolgálnak, annak oltalmi körét nem korlátozzák.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A. A felhasznált anyagok

A diaoktadecil-amint (DODA), a trietil-amint, az L-ornitint, a tetrametil-ammónium-hidroxidot, a Raney-nikkelt és a diglikolanhidridet a Fluka; a benzotriazol-1-oxi-trisz(dimetil-amino)-foszfónium-hexafluoro-foszfátot (BOP) a Propeptid France; a 4-(dimetil-amino)-piridint (DMAP), az izobutil-klór-formiátot és az N-metil-morfolint az Aldrich cégtől szereztük be. A tetrahidrofurán a Merck, minden más felhasznált oldószer az RP Prolabo terméke. Nátrium-kloridból és vizes nátrium-hidrogén-karbonátból telített, kálium-hidrogén-szulfátból pedig 0,5 M oldatot használtunk.

B. Fizikai mérések

A protonmágneses rezonancia-spektrumot (^1H NMR) Bruker spektrométerrel vettük fel.

C. Szilikagél-kromatográfia

A vékonyréteg-kromatográfiát 0,2 mm vastagságú Merck szili-

kagél lemezeken hajtottuk végre.

Előhívási módok:

- ultraibolya (UV) fénnnyel (254 nm)
- ninhidrinnel oly módon, hogy 100 ml etanolban 40 mg ninhidrint tartalmazó oldattal a lemezt enyhén bepermetezzük, így 150°C-ra felmelegítve az aminosok illetve amidok előhívódnak;
- fluoreszkaminos módszer: a primer aminosok előhívására a lemezt 100 ml acetonaiban 40 mg anyagot tartalmazó oldattal bepermetezzük;
- jódos módszer: a lemezt por alakú jóds gőzeibe helyezzük.

A szilikagél-oszlopkromatográfiát Merck szilikagél 60-on hajtottuk végre, amelynek részecskemérete 0,063 és 0,200 mm közé esik.

1. Példa

2,5-bisz[(3-Amino-propil)-amino]-pentil-(dioktadecil-karbamoil-metoxi)-acetát [(III) képletű vegyület] előállítás

1.a) (Tetrametil-ammónium)-2,5-bisz[(2-ciano-etil)-amino]-pentanoát (1.a vegyület) előállítása

6,74 g (80 mmol) 2,5-diamino-pentánsavat (L-ornitin) és 14,48 g (80 mmol) (tetrametil-ammónium)-hidroxid-penthidrátot 20 ml metanolban oldunk. A képződött vizet és a metanolt olajszivattyúval létesített csökkentett nyomáson száraz maradékig elpárologtatjuk.

Az így kapott sóhoz 30 ml dimetil-formamidot adunk. A reakcióelegyet nitrogénnel gáztalanítjuk, azután 10 percig erőteljesen keverjük, ezáltal a 2,5-diamino-pentanoát feloldódik (a

tetrametil-ammónium-klorid szuszpenzióban marad a dimetil-formamidban).

A reakcióelegyhez cseppenként hozzáadunk 6 ml (85,6 mol) acetonitrilt, 1 órán át szobahőmérsékleten, nitrogén atmoszférában állni hagyjuk, majd a tetrametil-ammónium-klorid eltávolítására leszűrjük, és a dimetil-formamidot csökkentett nyomáson elpárologtatjuk. Az így kapott olajszerű folyadék a rotációs bepárlóból kiöntve megszilárdul. 100 ml acetonitrilt adunk hozzá, és az oldat kitisztulásáig enyhén melegítjük, majd addig adunk hozzá tetrahidrofuránt, míg zavarossá nem válik. A lombikot 2 napig fagyasztószekrényben tároljuk, majd szűrőssel kinyerjük a 2,5-bisz[(2-ciano-etil)-amino]-pentanoát (tetrametil-ammónium)-sóját fehér szilárd anyag alakjában. Ezt zsugorított üvegszűrőn tetrahidrofuránnal leöblítjük, majd foszfor-pentoxid felett szárítjuk. Ily módon 6,06 g anyagot kapunk, ami 49 %-os (nyers) kihozatalnak felel meg.

1.b) (Tetrametil-ammónium)-2,5-bisz[(3-amino-propil)-amino]-pentanoát (1.b vegyület) előállítása

Az 1.a vegyületet 18 ml etanol, 2 ml víz és 5 ml 2M kálium-hidroxid elegyében oldjuk. Az oldatot argon átbuborékoltatásával tisztítjuk, és hozzáadunk 2 ml Fluka Raney-nikkel-szuszpenziót. A hidrogénezést nitrogénnel átfúvatott autoklávban, 26°C-on végezzük. A nyomás 3 óra alatt 50,6 bar-ról 44,7 bar-ra csökken, majd több mint egy órán át stabil marad. Az autokláv 250 ml-es, a reakcióelegy 30 ml. A kapott szuszpenziót leszűrjük, vízzel leöblítjük, és rotációs bepárlóban bepároljuk, így egy sárga olajat kapunk. A fluoreszkaminos vizsgálat eredménye pozitív.

1.c) 2,5-bisz[(terc-Butoxi-karbonil)-3-[(terc-butoxi-karbonil)-amino]-propil-amino]-pentánsav (1.c vegyület)

előállítása

Az 1.b vegyületet 30 ml dioxánban oldjuk, cseppenként hozzáadunk 17,46 g (80 mmol) di(terc-butyl)-dikarbonátot, és a reakcióelegyet egy éjszakán át keverjük. Ezután kálium-hidrogén-szulfátot adunk hozzá, és háromszor 100 ml kloroformmal extraháljuk. A szerves fázist 7,5 pH-jú nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd nátrium-klorid-oldattal mossuk, magnézium-szulfáton szárítjuk, és csökkentett nyomáson bepároljuk. Ily módon 10 g anyagot kapunk; az ornitinre számított kihozatal 39 %.

Nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC): acetonitril/víz: 0-3 perc 50 % acetonitril; 3-20 perc 50-100 % acetonitril; 20-40 perc 100 % acetonitril; $K' = 7,96$ (Rp-18 oszlop, sebesség = 1 ml/perc).

Vékonyréteg-kromatográfia (TLC): R_f (kloroform és etil-acetát 95:5 térfogatarányú elegyében) = 0,28.

NMR (ppm): 1,3 (m, 8H, $N+CH_2-CH_2-CH_2-CHN+COO$ / $2 \times N+CH_2CH_2CH_2-CHN+$); 2,7-3,0 (m, 10H $5 \times N+CH_2$); 3,8 (t, 1H, $N+CHCOO$).

MS: $MH^+ = 647$, ($M = 646$).

1.d) 2,5-bisz[(terc-Butoxi-karbonil)-(3-[(terc-butoxi-karbonil)-amino]-propil)-amino]-pentanol (1.d vegyület)

előállítása

1,94 g (3 mmol) L-5-karboxi-tetra-(terc-butoxi-karbonil)-spermint 30 ml tetrahidrofuránban oldunk, és mikropipettából hozzáadunk 370 μ l (3,1 mmol) N-metil-morfolint. A reakcióelegyet nitrogén atmoszférában, szénsavhó és etilén-glikol keverékéből

álló fürdőben -15°C -ra hűtjük, és hozzáadunk $390\ \mu\text{l}$ ($3,1\ \text{mmol}$) izobutil-klór-formiátot. 3 perc elteltével a reakcióelegyet főzőpohárba öntjük, amely $2\ \text{g}$ nátrium-[tetrahydro-borát]-ot tartalmaz $20\ \text{ml}$ 4°C -os vízben oldva. Ezután $\text{pH} = 7$ eléréséig kálium-hidrogén-szulfátot adunk hozzá. A terméket etil-acetáttal extraháljuk, nátrium-hidrogén-karbonát-, majd nátrium-klorid-oldattal mossuk, magnézium-szulfáton szárítjuk, leszűrjük, és bepároljuk. Ily módon $1,15\ \text{g}$ anyagot kapunk, ami $61\ \%$ -os kihozatalnak felel meg.

A vékonyréteg-kromatográfiát (TLC) két lépésben hajtjuk végre: ugyanazon eluenssel szilikagél oszlopon is végzünk elválasztást, így $0,97\ \text{g}$ vegyületet kapunk sárga olaj alakjában. Az elválasztás kihozatala $84\ \%$.

A redukció kihozatala $51\ \%$.

TLC: R_f (petroléter és etil-acetát $1:1$ térfogatarányú elegyében) = $0,24$.

NMR (ppm): $1,42$ (s, $4 \times \text{Boc}$); $1,5-1,7$ (m, 8H , $\text{N}+\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CHN}$ / $2 \times \text{N}+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); $2,85-3,2$ (m, 10H $5 \times \text{NCH}_2$); $3,4$ (m, 1H , $\text{NCH}-\text{CH}_2\text{OH}$); $3,7$ (d, 2H , CH_2OH); $6,8$ (m, 2H : NH).

MS: $\text{MH}^+ = 633$, $\text{M} = 632$.

**1.e) 2,5-bisz{3-[(terc-Butoxi-karbonil)-amino]-propil}-
-[(terc-butoxi-karbonil)-amino]-pentil-oxi-karbonil-
-metoxi-ecetsav (1.e vegyület) előállítása**

$0,51\ \text{g}$ ($0,806\ \text{mmol}$) 1.d vegyületet metilén-dikloridban oldunk, és hozzáadunk 2 ekvivalens ($0,178\ \text{g}$, $1,535\ \text{mmol}$) diglikolanhidridet, 2,2 ekvivalens ($235\ \mu\text{l}$, $687\ \text{mmol}$) trietil-amint és $5\ \text{mg}$ 4-(dimetil-amino)-piridint. Egy óra múlva a TLC azt mutat-

ja, hogy az alkohol a reakcióban elfogyott; ekkor a reakcielegyhez metilén-dikloridot adunk, háromszor 50 ml kálium-hidrogén-szulfát-oldattal, majd háromszor 50 ml nátrium-klorid-oldattal mossuk, magnézium-szulfáton szárítjuk, leszűrjük, azután bepároljuk. Ily módon 0,26 g szilárd anyagot kapunk, ami 43 %-os kihozatalnak felel meg.

TLC: R_f (kloroform, metanol és ecetsav 90:8:2 térfogatarányú elegyében) = 0,75.

MS: MH^+ = 749, M = 748.

1.f) 2,5-bisz[(terc-Butoxi-karbonil)-(3-[(terc-butoxi-karbonil)-amino]-propil)-amino]-pentil-(dioktadecil-karbamoil-metoxi)-acetát (1.f vegyület) előállítása

A fenti vegyületből 0,123 g-ot (0,164 mmol), továbbá 1 ekvivalens (0,0856 g) dioktadecil-amint, 3 ekvivalens (68,4 ml) trietil-amint és 1,1 ekvivalens (0,0798 g) benzotriazol-1-oxi-trisz(dimetil-amino)-foszfónium-hexafluoro-foszfátot (BOP) kloroformban oldunk, és a reakcióelegyet szobahőmérsékleten keverjük. Két óra múlva hozzáadunk 100 ml metilén-dikloridot, azután háromszor 100 ml kálium-hidrogén-szulfát-oldattal, nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal és pH = 7-es nátrium-klorid-oldattal mossuk, szárítjuk, leszűrjük, majd bepároljuk. Ily módon 0,13 g szilárd anyagot kapunk, ami 63 %-os kihozatalnak felel meg.

TLC: R_f (petroléter és etil-acetát 1:1 térfogatarányú elegyében) = 0,62; előhívás: jóddal, ninhidrinnel és fluoreszkaminnal.

NMR (ppm): 0,90 (t, J = 7,5 Hz, 6H; CH_3); 1,20-1,75 (m, 108H: $CH_2/C(CH_3)_3$); 3,05-3,35 (m, 14H: CH_2N); 4,15-4,35 (m, 3H: $NCHCH_2OCO$); 4,23-4,27 (2s, 2x 2H: OCH_2CO); 4,5-5,5 (elnyúlt m,

2H, NH).

MS: $MH^+ = 1252$, $M = 1251$.

Az elemanalízis eredményei a $C_{71}H_{137}N_5O_{12}$ összegképletre:

	C %	H %	N %
számított	68,06	11,02	5,59
mért	67,14	11,93	5,86

**1.g) 2,5-bisz[(3-Amino-propil)-amino]-pentil-(dioktadecil-
-karbamoil-metoxi)-acetát [(III) képletű vegyület]
előállítása**

1,5 ml-es Eppendorf® kémcsőben 0,025 g (0,02 mmol) 1.f vegyülethez 1 ml trifluor-ecetsavat adunk, és 1 órán át szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd a trifluor-ecetsavat elpárologtatjuk.

500 µl etanol hozzáadásával megkapjuk a biológiai vizsgálatokhoz szükséges 40 mM oldatot.

MS: $MH^+ = 852$, $M = 851$.

2. Példa

1,3-bisz[(3-Amino-propil)-amino]-2-propil-(dioktadecil-karbamoil-metoxi)-acetát [(IV) képletű vegyület] előállítása

2.a) 1,3-bisz[(2-Ciano-etil)-amino]-2-propanol (2.a vegyület) előállítása

3,6 g (40 mmol) 1,3-diamino-2-propanolt 75 ml metanolban oldunk, és 15 perc alatt hozzáadunk 5,76 ml (80 mmol) acetónitrilt. A fluoreszkaminos vizsgálat eredménye pozitív.

2.b) 1,3-bisz[(3-Amino-propil)-amino]-2-propanol (2.b vegyület) előállítása

A hidrogénezést nitrogénnel átfúvatott autoklávban, 27°C-on végezzük.

A 2.a vegyületet 15 ml metanol, 10 ml etanol és 5 ml 2M kálium-hidroxid-oldat elegyében oldjuk. Az oldatot argonnal tisztítjuk, és az autoklávban hozzáadunk 4 ml-t a Raney-nikkel-szuszpenzióból.

A nyomás 3,5 óra alatt 51,6 bar-ról 37,6 bar-ra csökken, majd több mint egy órán át stabil marad. Az autokláv 250 ml-es, a reakcióelegy 30 ml. A kapott szuszpenziót leszűrjük, vízzel leöblítjük, és rotációs bepárlóba töltjük át. Ily módon egy sárga olajat kapunk. A fluoreszkaminos vizsgálat eredménye pozitív.

2.c) 1,3-bisz[3-[(terc-Butoxi-karbonil)-amino]-2-[[(terc-butoxi-karbonil)-amino]-propil]]2-propanol (2.c vegyület) előállítása

A 2.b vegyületet az 1.c vegyületnél leírt módon védőcsoporttal látjuk el. 100 ml metilén-dikloridot adunk hozzá, majd cseppenként hozzáadunk 100 ml dioxánban oldott 39,2 g (179 mmol) di(terc-butyl)-dikarbonátot, és az így kapott oldatot 72 órán át keverjük. Ezután az oldószert elpárologtatjuk, és kálium-hidrogén-szulfátot adunk hozzá. A terméket háromszor 100 ml etil-acetáttal extraháljuk, a szerves fázisokat egyesítjük, kálium-hidrogén-szulfát-, nátrium-hidrogén-karbonát-, majd nátrium-klorid-oldattal mossuk, magnézium-szulfáton szárítjuk, és bepároljuk. Ily módon 20 g anyagot kapunk; a kiindulási vegyületre számított kihozatal 83 %.

A vegyületet petroléterből átkristályosítjuk.

TLC: R_f (petroléter és etil-acetát 1:1 térfogatarányú elegyében)

= 0,23.

R_f (petroléter és etil-acetát 1:2 térfogatarányú elegyében)
= 0,63.

NMR (ppm): 1,4 (m, 36H, 4x (CH₃)₃); 1,65 (qt, 4H: 2x NCH₂CH₂CH₂NH);
2,95 (q, 4H: 2x NHCH₂CH₂); 3,1 (2d, 4H: NCH₂CHCH₂N); 3,2 (t, 4H:
NCH₂CH₂); 3,85 (m, 1H: OH); 5,9 (s, 2H: NH).

MS: MH⁺ = 605, M = 604.

2.d) 1,3-bisz[3-[(terc-Butoxi-karbonil)-amino]-2-[[[(terc-butoxi-karbonil)-amino]-propil]]-2-propil-(etoxi-karbonil)-metoxi-ecetsav (2.d vegyület) előállítása

604 mg (1 mmol) 2.c vegyületet 20 ml metilén-dikloridban oldunk, és 2 ekvivalens (0,232 g, 2 mmol) anhidridet, 2,2 ekvivalens (307 µl, majd 100 µl) trietil-amint és 6,5 g 4-(dimetil-amino-piridint adunk hozzá. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 24 órán át keverjük, azután metilén-dikloridot adunk hozzá, kálium-hidrogén-szulfát-, majd nátrium-klorid-oldattal mossuk, magnézium-szulfáton szárítjuk, leszűrjük, és bepároljuk. Ily módon 0,156 g anyagot kapunk; kihozatal: 22 %.

TLC: R_f (kloroform, metanol és ecetsav 90:8:2 térfogatarányú elegyében) = 0,71.

NMR (ppm): 1,2-1,4 (m, 36H, 4x (CH₃)₃); 1,5 (m, 4H: 2x NHCH₂CH₂-CH₂N);
2,85 (q, 4H: 2x NHCH₂CH₂); 3,1 (m, 8H: 4x NCH₂); 3,9-4,2 (2s,
4H: 2x OCH₂COO); 5,25 (m, 1H: CH₂CHCH₂); 6,7 (2H: NH).

MS: MH⁺ = 721, M = 720.

2.e) 1,3-bisz{3-[(terc-Butoxi-karbonil)-amino]-2-[(terc-butoxi-karbonil)-amino]-propil]-propil}-(dioktadecil-karbamoil-metoxi)-acetát (2.e vegyület) előállítása

A 2.d savból 0,216 mmol-t 3 ml kloroformban oldunk, és 1 ekvivalens (0,113 g) dioktadecil-amint, 3 ekvivalens (100 μ l) trietil-amint és 1,1 ekvivalens (0,11 g) BOP-t adunk hozzá. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 24 órán át keverjük, majd a kloroformot elpárologtatjuk, és 100 ml etil-acetátot adunk hozzá. A szerves fázist 0,5M sósav-oldattal, nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd pH = 7 eléréséig nátrium-klorid-oldattal mossuk, magnézium-szulfáton szárítjuk, és bepároljuk. Ily módon 0,185 g anyagot kapunk; kihozatal: 70 %. Szilikagél-oszlopon végzett tisztítással 110 mg terméket kapunk (kihozatal: 42 %). TLC: R_f (kloroform, metanol és ecetsav 90:8:2 térfogatarányú elegyében) = 0,81;

R_f (petroléter és etil-acetát 1:1 térfogatarányú elegyében) = 0,67.

NMR (ppm): 0,85 (t, 6H: 2x (CH₃); 1,20-1,55 (m, 100H, CH₂/C(CH₃)₃); 1,6 (m, 4H: 2x NH-CH₂CH₂CH₂N); 3,05-3,4 (m, 16H: 2x NH-CH₂CH₂CH₂N / N-CH₂CH₂CH₂N / 2x -CH₂N); 4,1 (s, 2H: NCOCH₂O); 4,15 (s, 2H: OCH₂COO); 5,25 (m, 1H: CH₂CHCH₂); 6,15 (2H: NH).

MS: MH⁺ = 1224, M = 1223.

2.f) 1,3-bisz[(3-Amino-propil)-amino]-2-propil-(dioktadecil-karbamoil-metoxi)-acetát [(IV) képletű vegyület] előállítása

1,5 ml-es Eppendorf® kémcsőben 0,0247 g (0,021 mmol) 2.e vegyülethez 1 ml trifluor-ecetsavat adunk, és 1 órán át szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd a trifluor-ecetsavat elpárologtatjuk.

505 μ l etanol hozzáadásával megkapjuk a biológiai vizsgálatokhoz szükséges 40 mM oldatot.

MS: $MH^+ = 824$, $M = 823$.

3. Példa

2-[3-(Amino-propil)-amino]-1-[3-(amino-propil)-metil]-etil-(N,N-dioktatadecil)-szukcinamát [(V) képletű vegyület] előállítása

Ezt a vegyületet a 2. példában leírtak szerint állítjuk előn oly módon, hogy a diglikolsavat borostyánkőssavval helyettesítjük.

Az így kapott vegyület tömegspektrometriás elemzése egy $MH^+ = 808$ -as fragmentumot mutat, ami a számított molekulatömegnek megfelel.

Az alábbiakban ismertetjük a találmány szerinti lipopoliaminok felhasználását genetikai anyagok in vitro transzfektálására.

A. A gének in vitro transzfektálására használt plazmidok

Erre a célra pCMV-LUC plazmidot használjuk. Ez olyan szerkezet, amely luciferázt expresszál, és a pGL2-Basic Vector-ből (Promega) vagy a pGL2-Control Vector-ből (Promega) kapható egy, a pCDNA3 (Invitrogen) plazmidból kinyert humán Cytomegalovirus (CMV) promoterét tartalmazó MluI-Hind III fragmentum inszertálása révén.

B. A transzfektáláshoz használt oldatok készítése

A példák alapján előállított találmány szerinti lipopolia-

minokból 40 mM etanolos oldatot készítünk, majd ezt etanol és víz elegyével úgy hígítjuk, hogy az etanol koncentrációja 10 %-nál kisebb legyen.

A transzfektálandó nukleinsav oldatát fiziológias szérummal (0,15M nátrium-klorid-oldat) hígítjuk, majd 1:1 térfogatarányban hozzáadjuk a lipopoliamin oldatát. Az így kapott elegyet mágneses keverővel homogenizáljuk, 15 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk majd a DNS/lipopoliamin-oldatot 99 % végkoncentrációban elosztjuk a lyukakba, amelyekbe a sejteket a fehérjementes tápközzel (szérum) belemostuk.

4. Példa

A terhelési arány (aminok/foszfátok) hatása a transzfekció hatékonyságára

10^5 - exponenciális szaporodási fázisban lévő - NIH 3T3 sejtből álló mintákat egy 2 cm^2 -es felületen 37°C -on, 5 % széndioxidot tartalmazó atmoszférában 4 órán át kezelünk változó terhelési arányokat képviselő lipopoliamin/pCMV-LUC-oldatokkal; mindegyik mintához $1\text{ }\mu\text{g}$ nukleinsavat adunk. A riportergén expressziójának vizsgálatát 8 % végkoncentrációjú borjú-magzati szérum hozzáadása és széndioxidos szárítókamrában 40 órán át végzett inkubálás után hajtjuk végre.

A luciferáz-aktivitást a luciferin, koenzim A és ATP (adenozin-5'-trifoszfát) jelenlétében 20 másodperc alatt [RLU]-ban (relatív fényegység) mért fénykibocsátás alapján határozzuk meg, és a sejt bontás után kapott felülúszóban jelenlévő fehérje egy-egynyi tömegére (μg) vonatkoztatva adjuk meg. Az eredmények az

alábbi 1. táblázatban láthatók.

1. táblázat

	Az 1. példa szerinti lipopoliamin		A 2. példa szerinti lipopoliamin	
terhelési arány	fénykibocsátás	var. koeff. (%)	fénykibocsátás	var. koeff. (%)
1	69	5	23	34
2	5091	3	252	6
4	3636	30	7890	3
6	21334	3	61401	5
8	40846	3	73224	2
10	55321	1	77633	2
12	53239	5	48634	5
14	36	10	52417	2
DNS önmagában	52	5		

Mindegyik adat három, egymástól független mérés átlagértékét jelenti.

Ez a kísérlet világosan mutatja, hogy a találmány szerinti lipopoliaminok az expresszióhoz szükséges körülmények között lehetővé teszik a gének transzfektálását.

5. Példa

A DNS/lipopoliamin-keverékek nukleinsav-koncentrációjának hatása

Az NIH 3T3 sejteket az előbbi példa szerinti módon DNS/lipopoliamin-keverékekkel kezeljük, úgy, hogy azonos terhelési

arányok mellett különböző DNS-koncentrációkat alkalmazunk.

A luciferáz-aktivitást itt 20 másodpercen át mérjük, és 2500 kezelt sejtre vonatkoztatva adjuk meg. Az eredmények az alábbi 2. és 3. táblázaton láthatók.

2. táblázat

Az 1. példa szerinti lipopoliamin:

	Terhelési arány			
DNS μ g	4x	6x	8x	10x
0,25	27 (19)	25 (20)	32 (31)	36 (15)
0,5	23 (5)	37 (54)	4476 (4)	4811 (19)
1,0	4945 (12)	19194 (14)	30933 (21)	39357 (3)
2,0	93937 (2)	105533 (1)	111167 (14)	8315 (15)
3,0	106293 (11)	100093 (8)	53475 (12)	
4,0	98533 (10)	68963 (8)		

3. táblázat

A 2. példa szerinti lipopoliamin:

	Terhelési arány			
DNS μ g	4x	6x	8x	10x
0,25	40 (17)	52 (64)	122 (14)	51 (5)
0,5	28 (10)	204 (25)	36533 (7)	44473 (7)
1,0	3427 (12)	48167 (13)	49363 (13)	50083 (9)
2,0	33377 (13)	44697 (18)	30670 (17)	9544 (4)
3,0	9686 (3)	31557 (2)	9157 (8)	
4,0	4321 (9)	40105 (10)		

Mindegyik adat három, egymástól független mérés átlagértékét jelenti.

A zárójelben meagadott számok a variációs koefficiens százalékos értékét jelentik.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. D, L vagy DL formájú lipopoliamin vagy valamely sója, azzal jellemezve, hogy az (I) általános képlettel írható le, amelyben

m értéke egy 2 és 6 közötti egész szám;

n értéke egy 1 és 9 közötti, előnyösen 1 és 5 közötti egész szám, azzal a feltétellel, hogy ha n értéke 2 és 9 közé esik, akkor az általános képletben csak egy olyan R csoport van, amelynek jelentése hidrogénatomtól eltérő, és m értéke a különböző $-(CH)_m-$ és $-(CH_2)_m-$ csoportokban azonos vagy különböző;

R jelentése hidrogénatom vagy egy (II) általános képletű csoport, amelyben

X és X' jelentése egymástól függetlenül oxigénatom, $-(CH_2)_q-$ általános képletű csoport – amelyben q értéke 0, 1, 2 vagy 3 –, vagy $-NH-$ képletű vagy $-NR'-$ általános képletű aminocsoport, amelyben R' jelentése 1-4 szénatomos alkilcsoport;

Y és Y' jelentése egymástól függetlenül metilén-, karbonil- vagy tiokarbonil-csoport;

R₃, R₄ és R₅ jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom vagy 1-4 szénatomos, szubsztituált vagy szubsztituálatlan alkilcsoport, és p értéke 0 és 5 között változhat;

R₆ jelentése egy koleszterin-származék vagy egy $-NR_1R_2$ álta-

lános képletű alkil-aminocsoport, amelyben R_1 és R_2 jelentése egymástól függetlenül egy 12-22 szénatomos, telített vagy telítetlen, egyenes vagy elágazó láncú alifás csoport.

2. Az 1. igénypont szerinti lipopoliamin, amelynek képletében R jelentése egy (II') általános képletű csoport, amelyben R_3 , R_4 , R_5 , R_6 és p jelentése az 1. igénypontban megadott, és X jelentése oxigénatom vagy egy $-(CH_2)_q-$ általános képletű csoport, amelyben q értéke nulla.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti lipopoliamin, amely az (I) általános képletű vegyületek körébe tartozó (III) képletű vegyület D, L vagy DL formában vagy valamely sója alakjában.

4. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti lipopoliamin, amely az (I) általános képletű vegyületek körébe tartozó (IV) képletű vegyület D, L vagy DL formában vagy valamely sója alakjában.

5. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti lipopoliamin, amely az (I) általános képletű vegyületek körébe tartozó (V) képletű vegyület D, L vagy DL formában vagy valamely sója alakjában.

6. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti lipopoliamin, amely az (I) általános képletű vegyületek körébe tartozó (VI) képletű vegyület D, L vagy DL formában vagy valamely sója alakjában.

7. Gyógyszerkészítmény, azzal jellemezve, hogy legalább egy, az 1-6. igénypontok valamelyike szerinti lipopoliamint és legalább egy nukleinsavat tartalmaz.

8. A 7. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy nukleinsavként egy dezoxiribonukleinsavat tartalmaz.

9. A 7. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy nukleinsavként egy ribonukleinsavat tartalmaz.

10. A 7., 8. vagy 9. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy egy kémiai úton módosított nukleinsavat tartalmaz.

11. A 7-10. igénypontok valamelyike szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy egy antiszensz nukleinsavat tartalmaz.

12. A 7-10. igénypontok valamelyike szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy egy terápiás gént hordozó nukleinsavat tartalmaz.

13. A 12. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy olyan terápiás gént tartalmaz, amely egy, a lipidek – például az A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J vagy apo(a) apolipoproteinek – metabolizmusában résztvevő fehérjét, egy enzimet – például lipoprotein lipázt, a máj lipáz enzimét vagy egyéb lipázokat, a lecitin-koleszterin-aciltranszferázt, a 7- α -koleszterin-hidroxilázt, a savas foszfatidil foszfátot –, egy lipidtranszfer-fehérjét – például a koleszterin-észtereket vagy a foszfolipideket transzferáló fehérjét –, egy HDL-kötő fehérjét vagy egy, az LDL-receptorok, a chylomicron-maradék receptorok vagy a scavenger (gyökfogó) receptorok közé tartozó receptort kódol.

14. Gyógyszerkészítmény, amely egy nukleinsavat, egy, az 1-6. igénypontok valamelyike szerinti lipopoliamint és egy olyan adalékanyagot tartalmaz, amely a lipopoliamin/nukleinsav-komplexhez kötődni képes, és annak transzfektáló képességét javítja.

15. A 14. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy adalékanyagként egy vagy több semleges lipidet tartalmaz.

16. A 15. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy semleges lipidként szintetikus vagy természetes, ikerionos

vagy iontöltés nélküli lipid(ek)et tartalmaz fiziológiás körülmények között.

17. A 16. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy 2 zsírsavláncból álló semleges lipide(ke)t tartalmaz.

18. A 17. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy semleges lipideként egyet vagy többet tartalmaz az alábbi lipidek közül: dioleoil-foszfatidil-etanol-amin (DOPE), oleoil-palmitoil-foszfatidil-etanol-amin (POPE), disztearoil-, -palmitoil- vagy -mirisztoil-foszfatidil-etanol-amin vagy ezek egy-háromszorosan N-metilezett származékai, foszfatidil-glicerinek, diacil-glicerinek, glükozil-diacil-glicerinek, cerebrozidok (például galakto-cerebrozidok), szfingolipidek (például szfingomielinek) és asialogan-glikozidok (például asialoGM1 vagy GM2).

19. A 14-18. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy 1 ekvivalens lipopoliaminra vonatkoztatva 0,1 - 20 ekvivalens, előnyösen 1 - 5 ekvivalens adalékanyagot tartalmaz.

20. A 7-19. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy egy injektálható készítmény céljára gyógyászatilag elfogadható hordozóanyagot tartalmaz.

21. A 7-19. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a bőrön vagy nyálkahártyán való alkalmazás céljára gyógyászatilag elfogadható hordozóanyagot tartalmaz.

22. Egy 1-6. igénypont szerinti lipopoliamin felhasználása sejtek in vivo vagy in vitro transzfektálására.

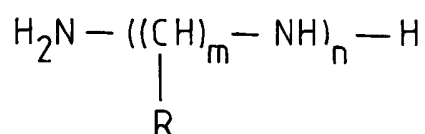
A meghatalmazott:

Beliczay László
szabadalmi képviselő
az S.B.G. és K. Rt. részére
Szabadalmi képviselő
H-1041 Budapest, ...
Tel.: ...

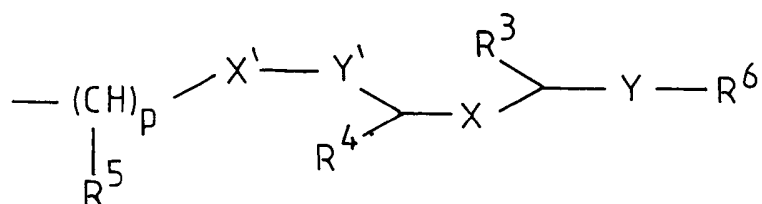
Raft nélkül

Stimul

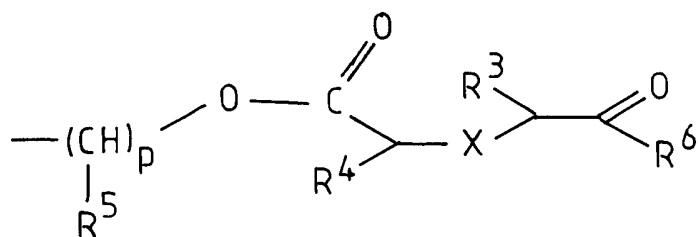
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



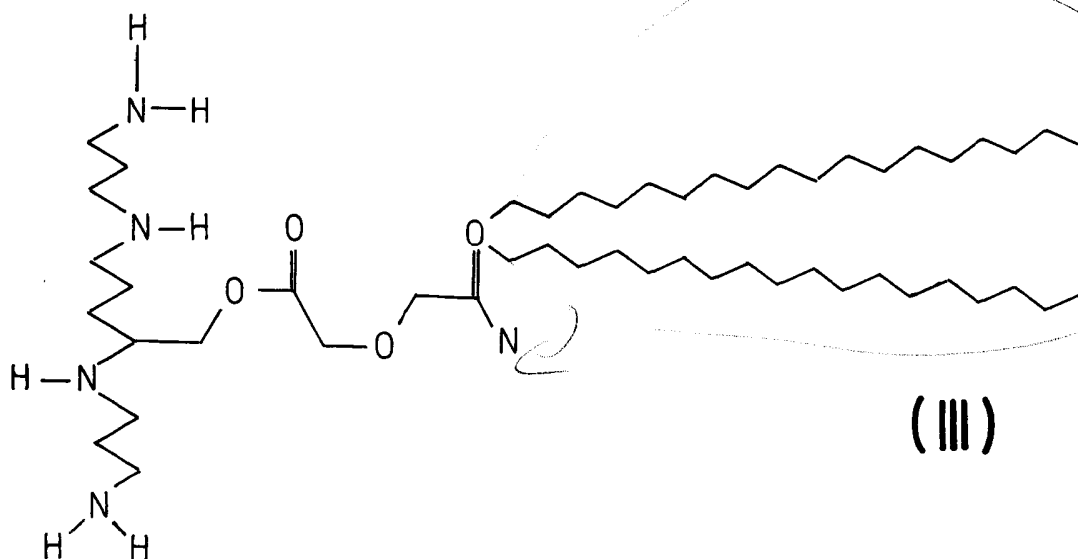
(I)



(II)



(II')



(III)

