

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

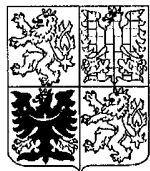
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:
1999 -2380

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:
A 61 K 9/127

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15.10.1997**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **15.10.1996**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1996/028557**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.01.2000**
(Věstník č. 1/2000)
(86) PCT číslo: **PCT/US97/18112**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/16199**

(71) Přihlašovatel:
THE LIPOSOME COMPANY, INC., Princeton,
NJ, US;

(72) Původce:
Meers Paul R., Princeton Junction, NJ, US;
Shangguan Tong, Princeton, NJ, US;
Ali Shaukat, Monmouth Junction, NJ, US;
Janoff Andrew S., Yardley, PA, US;
Pak Charles, Plainsboro, NJ, US;

(74) Zástupce:
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
140 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Farmaceutický prostředek, lipozóm a způsob
dopravování bioaktivní látky do buňky**

(57) Anotace:
Toto řešení poskytuje lipozómy, obsahující jeden nebo více N-acylovaných fosfatidylethanolaminů, které jsou užitečné pro dopravování bioaktivních látek do buněk na stanoveném místě.

CZ 1999 - 2380 A3

Farmaceutický prostředek, lipozóm a způsob dopravování bioaktivní látky do buňky.

Oblast techniky

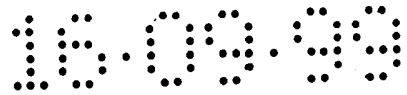
Tento vynález se týká způsobů dopravování léků do buněk pomocí začlenění léků do, nebo spojení léků s lipozómy, obsahujícími nějaký N-acyl-fosfatidylethanolamin („NAPE“), a poté setkání se buněk s těmito lipozómy.

Dosavadní stav techniky

Fosfatidylethanolaminy („PE“) jsou přirozeně se objevující fosfolipidy, které mají typicky dva acylové řetězce a fosforyletanolaminovou skupinu, vázané na glycerolovou páteř lipidů. N-acylované fosfatidylethanolaminy („NAPE“) jsou PE, na které je vázán další, třetí acylový řetězec, přes aminoskupinu, obsaženou ve fosforyletanolaminové skupině. Některé NAPE se také v malých množstvích nachází v biologických membránách.

Většina PE normálně nevytváří dvojvrstvy při neutrální hodnotě pH. Místo toho vytváří ve vodném prostředí šestistěnné (H_{II}) struktury. Tato schopnost může být spojena se zvýšenou schopností fúzí lipozómů, když jsou tyto lipidy začleněny do lipozomálních dvojvrstev za vhodných podmínek (Verkleij A. J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta.* 799, 43-63; Cullis P. R. & de Kruijff B. (1979) *Biochim. Biophys.* 559, 399-420; Ellens H., Siegel, D. P., Alford A., Yeagle P. L., Boni L., Lis L. J., Quinn P. & Bentz J., (1989) *Biochemistry* 28, 3692-3703). NAPE naopak ve vodných disperzích, v nepřítomnosti přidávaných dvojmocných kationtů, spontánně vytváří dvojvrstvy (Newman J. L., Stiers D. L., Anderson W. H. & Schmid H. H. O., (1986) *Chem. Phys. Lipids* 42, 249-260.; Akota S., Tellier C., Le Roux C. & Marion D. (1988), *Chem. Phys. Lipids* 46, 43-50; Lafrance D., Marion D & Pezolet M. (1990), *Biochemistry* 29, 4592-2599; Domingo J. C., Mora M. & De Madariaga M. A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1148, 308-316.

Žádný z výše uvedených dokumentů nepopisuje studii NAPE s ohledem na jejich schopnost usnadňovat fúzi nebo destabilizovat dvojvrstvu v požadovaném místě dopravení, avšak při zachování si schopnosti tvořit lipozómy, které mohou stabilně obalovat materiál. Žádná z



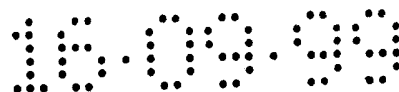
předcházejících studií nepopisuje použití, kde mohou být zahrnuty NAPE, pro řízené dopravování lipozomálních léčiv, a žádný nepopisuje vytváření NAPE, za účelem vylepšování takového dopravování, zejména in vivo. Navíc, žádný z nich ani nevytvářel ani nestudoval NAPE N-dodekanoyl-diolejoylfosfatidylethanolamin.

Podstata vynálezu

Tento vynález poskytuje lipozómy, které obsahují destabilizaceschopné množství N-acyl-fosfatidylethanolaminu („NAPE“). Tyto lipozómy jsou užitečné pro fúzi s buněčnými membránami v přítomnosti vhodných koncentrací kationtů, když jsou umístěny v blízkosti těchto buněk. NAPE jsou fosfolipidy, založené na glycerolu, které mají na první a druhé pozici glycerolové páteře vázané nasycené nebo nenasycené, 14-24 uhlíků dlouhé acylové řetězce. Třetí pozice je obsazena fosforylethanolaminem, na jehož aminoskupině je vázán třetí acylový řetězec, který je dlouhý 4-24 uhlíkových atomů a je nasycený nebo nenasycený. V současné době je upřednostňovaným NAPE N-C12 DOPE (N-dodekanoyl-diolejoylfosfatidylethanolamin).

Destabilizaceschopné množství NAPE, obsažené v lipidické složce lipozómu je obvykle od asi 10 molárních procent lipidické složky do asi 90 molárních procent. Lipozóm, do kterého je NAPE začleněn, může být jednovrstevný, několikavrstevný nebo mnohovrstevný, ale přednostně je jednovrstevný. Lipidická složka lipozómu zahrnuje, vedle NAPE, alespoň jeden další lipid. Takovýmito lipidy mohou být, ale ne pouze, jakékoliv druhy lipidů jako jsou např. fosfolipidy, glykolipidy a steroly, které mohou být použity při přípravě lipozómů. Přednostně zahrnuje tento přídatný lipid jeden nebo více fosfolipidů. Ještě lépe, tyto zahrnují fosfatidylcholin („PC“), jako je diolejoylfosfatidylcholin („DOPC“) nebo fosfatidylethanolamin („PE“), jako např. PE, vybraný ze skupiny, obsahující transesterifikovaný fosfatidylethanolamin, dipalmitoylfosfatidylethanolamin, palmitoyl-olejoylfosfatidylethanolamin a diolejoylfosfatidylethanolamin; nebo PE, spojený s látkou, vybranou ze skupiny, obsahující dikarboxylové kyseliny, polyethylenglykoly, polyalkylethery a gangliosidy.

Lipozómy mohou mít připojenou naváděcí látku a mohou obsahovat, buď v dvojrvtvě nebo ve vodné části, jednu nebo více bioaktivních látek. Připojení naváděcí látky k lipozómu je zde upřednostňováno, za účelem umístění lipozómů do blízkosti buněk, které jsou cílem dopravení obsahů lipozómů, kde mohou být lipozómy v přítomnosti vhodné koncentrace

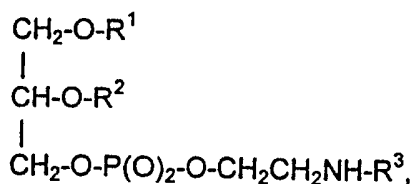


kationtů lokálně destabilizovány nebo fúzovány s buňkami.

Lipozómy tohoto vynálezu mohou tedy dopravovat aktivní látky do buněk pomocí setkání se těchto buněk s lipozómy za podmínek, ve kterých NAPE destabilizují lipozomální dvojvrstvu, za účelem indukce lokálního uvolnění aktivní látky lipozómu a/nebo fúze lipozómu s buňkami. Takovéto dopravení může být prováděno in vitro nebo v těle savce a může být použito např. pro ex vivo transfekci kmenových buněk nebo dopravení protirakovinné léčebné látky.

Následují zkratky a plná jména jimi představovaných sloučenin, které se nacházejí v popisu : PE, fosfatidylethanolamin; PC fosfatidylcholin; PG, fosfatidylglycerol; PS, fosfatidylserin; DO-, diolejoyl-; NAPE N-acyl-fosfatidylethanolamin; NAE, N-acyl-ethanolamin; N-C12-DOPE, N-dodekanoyl-diolejoylfosfatidylethanolamin; NBD-PE, N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)fosfatidylethanolamin (transesterifikovaný fosfatidylcholin z vejce); Rh-PE, N-(lissamin-rhodamin B-sulfonyl)fosfatidylethanolamin (transesterifikovaný fosfatidylcholin z vejce); TMR, tetramethylrhodamin; TMR-70kD dextran, s tetramethylrhodaminem spojený 70kD dextran; C₁₂E₈, oktaethylenglykolmonododecylether; RET, rezonanční přenos energie; LUV, velký jednovrstevný lipozóm; TES, N-[tris(hydroxymethyl)-2-aminoethansulfonová kyselina; ¹H-NMR, protonová nukleární magnetická rezonance; H_{II}, šestistěnná II; TLC, chromatografie na tenké vrstvě; BSA, hovězí sérový albumin.

Tento vynález poskytuje lipozóm, jehož lipidická složka obsahuje N-acyl-fosfatidylethanolamin („NAPE“). NAPE jsou fosfatidylethanolaminy, které mají tři acylové řetězce, dva přímo vázané na glycerolovou páteř a třetí, vázaný přes aminoskupinu fosforylethanolaminové skupiny. NAPE mají tedy následující obecnou strukturu

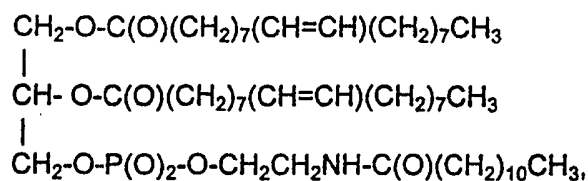


kde každý z R^1 , R^2 a R^3 je acylový řetězec, který má strukturu : - $C(O)(CH_2)_{n1}(CH=CH)_{n2}(CH_2)_{n3}(CH=CH)_{n4}(CH_2)_{n5}(CH=CH)_{n6}(CH_2)_{n7}(CH=CH)_{n8}(CH_2)_{n9}CH_3$. $n1$ je celé číslo, rovné od 1 do 22; $n3$ je celé číslo, rovné od 1 do 19; $n5$ je celé číslo, rovné od 1 do 16; $n7$ je celé číslo, rovné od 1 do 13 a $n9$ je celé číslo, rovné od 1 do 10. Acylové řetězce mohou být nasycené nebo nenasycené; to znamená, že každý z $n2$, $n4$, $n6$ a $n8$ je nezávisle roven 0 nebo 1.

Acylové řetězce, vázané přímo na glycerolovou páteř NAPE, to jest R^1 a R^2 , mají vhodnou délku pro tvorbu stabilní dvojvrstvy. Podle toho je součet $n1+2n2+n3+2n4+n5+2n6+n7+2n8+n9$, určující délku acylového řetězce v počtu uhlíkových atomů, celé číslo od 12 do 22 a R^1 a R^2 mají do délky nezávisle od 14 do 24 uhlíkových atomů. Přednostně mají R^1 a R^2 do délky nezávisle od 16 do 18 uhlíků. Alespoň jeden z R^1 a R^2 je nenasycený, což napomáhá přechodu NAPE z fáze upřednostňující dvojvrstvu do fáze, která dvojvrstvu destabilizuje, a alespoň jeden z $n2$, $n4$, $n6$ a $n8$ je tudíž roven 1. Více upřednostňováno je, když jsou oba, R^1 i R^2 , nenasycené, to znamená, že pro R^1 i R^2 je alespoň jeden z $n2$, $n4$, $n6$ a $n8$ roven 1. Nejvíce upřednostňováno je, když jsou oba, R^1 i R^2 , kyselina olejová, to znamená, že jsou oba dlouhé 18 uhlíků, obsahují jednoduché i dvojné vazby a mají strukturu $C(O)(CH_2)_7(CH=CH)(CH_2)_7CH_3$.

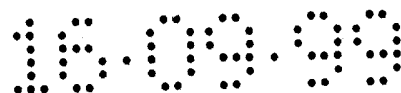
Acylový řetězec, vázaný na aminoskupinu fosforylethanolaminu NAPE, může být dlouhý 4 až 24 uhlíků. To znamená, že pro R^3 je součet $n1+2n2+n3+2n4+n5+2n6+n7+2n8+n9$ roven celému číslu od 2 do 22; přednostně je tento součet roven celému číslu od 6 do 20. Přednostně je tento acylový řetězec nasycený. Lépe je R^3 nasycený a dlouhý 12 uhlíků.

Nejlépe obsahuje NAPE, který je začleněn do lipozómu, dva řetězce kyseliny olejové a 12-ti uhlíkový řetězec, vázaný na aminoskupinu, a má takovouto strukturu :



to jest N-dodekanoyl-diolejoylfosfatidylethanolamin; („N-C12-DOPE“).

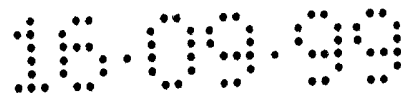
NAPE jsou přirozeně se objevující lipidy, které se izolují z rostlin, mikroorganismů a živočichů (Bombstain R. A. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21, 49-54; Clarke N. G., Hazlewood G. P. & Dawson R. M. C. (1976) *Chem. Phys. Lipids* 17, 222-232; Dawson R. M. C., Clarke N. G. & Quarles R. H. (1969) *Biochem. J.* 114, 265-270; Ellingson J. S. (1980) *Biochemistry* 19, 6176-6182; Epps D. E., Schmid P. C., Natarajan V. & Schmid H. H. O (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 628-633; Epps D. E., Natarajan V., Schmid P. C. & Schmid H. H. O (1980), *Biochem. Biophys. Acta* 618, 420-430; Ganley O. H., Graessle O. E. & Robinson H.J. (1958) *J. Lab. Clin. Med.* 51, 709-714; Gray G. M. & Yardley H. J. (1975) *J. Lipids. Res.* 16, 441-447; Hargin K. D. & Morrison W. R. (1980) *J. Sci. Food. Agric.* 31, 877-888; Hazlewood G. P. & Dawson R. M. C. (1975), *Biochem. J.* 150, 521-525; Kuehl Jr., F. A., Jacob T. A., Ganley O.H., Ormond R. E. & Meisinger M. A. P. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79, 5577-5578; MacMurray T. A & Morrison W. R. (1970) *J. Sci. Food. Agric.* 21, 520-528; Matsumoto M. & Miwa M (1973) *Biochem. Biophys. Acta* 296, 350-364; Morrison W. R., Mann D. L., Wong S. & Coventry A. M. (1975) *J. Sci. Food. Agric.* 26, 507-521; Natarajan V., Reddy P. V., Schmid P. C. & Schmid H. H. O. (1982), *Biochem. Biophys. Acta* 712, 342-355; Natarajan V., Schmid P. C., Schmid H. H. O., Reddy P. V. & Zuzarte-Augustin M. L. (1985), *Biochem. Biophys. Acta* 835, 426-433; Reddy P. V., Schmid P. C., Natarajan V., Muramatsu T. & Schmid H. H. O. (1984), *Biochem. Biophys. Acta* 795, 130-136; Schmid P. C., Reddy P. V., Natarajan V. & Schmid H. H. O. (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 9302-9306; Schmid H. H. O., Schmid P. C. & Natarajan V., (1990), *Prog. Lipid. Res.* 29, 1-43; Somerhaju P. & Renkonen O. (1979), *Biochem. Biophys. Acta* 573, 83-89; jejichž obsahy jsou zde zahrnuty odkazem). NAPE mohou být také vytvořeny synteticky, například tak, jak je popsáno dále, v příkladu 1. Stručně, tato syntetická příprava zahrnuje rozpuštění fosfatidylethanolaminu („PE“), např. DOPE, v organickém rozpouštědle, např. methylenchloridu. Poté je k roztoku přidán anhydrid mastné kyseliny, která má být navázána na aminoskupinu PE, např. anhydrid kyseliny laurové. Po chromatografické purifikaci je výsledná sloučenina shromážděna a zakoncentrována ve vakuu; může být charakterizována řadou způsobů, včetně protonové nukleární magnetické rezonance. Lipidická složka lipozómu obsahuje „destabilizaceschopné“ množství NAPE, což je takové množství NAPE, které, když je začleněno do lipozómové dvojvrstvy, je dostatečné k destabilizaci této dvojvrstvy v přítomnosti vhodné, např. fyziologické, koncentrace kationtů. Zde použitý termín



„destabilizace dvojvrstvy“ znamená porušení nebo rozpad lipidického uspořádání lipozomální lipidické dvojvrstvy, za účelem umožnění lokálního uvolnění lipozomálního obsahu a/nebo indukce fúze lipozómu s jinými lipidickými vrstvami, např. buněčnými membránami, když tyto jsou ve spojení s lipozómem. Destabilizaceschopné množství NAPE je takové množství NAPE, které indukuje vyšší stupeň nestability dvojvrstvy za vhodných podmínek, než jaká by byla v případě, když dvojvrstva NAPE neobsahuje. Destabilizaceschopné množství NAPE typicky představují alespoň asi 10 molárních procent lipidické složky lipozómu. Přednostně je toto množství od asi 10 molárních procent do asi 90 molárních procent lipidické složky, lépe od 20 molárních procent do asi 80 molárních procent lipidické složky. Nejlépe, v současné době, představuje NAPE asi 70 molárních procent lipidické složky.

Má se za to, acylace PE, čímž vznikají NAPE, vytváří na PE náboj, který potlačuje sklon PE k vzniku nedvojvrstevných fází; má se tedy za to, že tento náboj umožňuje, aby NAPE vytvářely stabilní dvojvrstvy. Přítomnost dostatečné koncentrace, např. fyziologické úrovně, různých kationtů, např. H^+ , Ca^{2+} nebo Mg^{2+} , vyrovná tento protipůsobící náboj třetího acylového řetězce a samotné NAPE jsou tedy poté nestabilní v konformaci dvojvrstvy. Podle toho zahrnují „vhodné podmínky“, zde popsane pro destabilizaci dvojvrstvy obsahující NAPE, přítomnost dostatečných koncentrací jednoho nebo více kationtů, které se mohou nacházet v biologických tekutinách nebo mohou být vytvořeny v kulturách. Měření dodání lipozomálních obsahů je snadné pro běžného odborníka, který má k dispozici popis tohoto vynálezu, za použití rutinních technik. Odborník může například do lipozómů, obsahujících/neobsahujících NAPE, vložit detekovatelný marker, inkubovat tyto lipozómy ve vhodném buněčném kultivačním mediu a poté určit procento detekovatelného markeru, dopraveného do buněk po inkubaci. Po takovýchto pokusech by odborník pozoroval, že buňky, inkubované s lipozómy obsahujícími NAPE, by obsahovaly větší množství detekovatelného markeru než buňky, inkubované s lipozómy neobsahujícími NAPE.

Měření dopravování lipozomálních obsahů může být snadné pro odborníka v oboru, který má k dispozici popis tohoto vynálezu, za použití rutinních technik. Odborník může například uzavřít detekovatelný marker do lipozómů, které obsahují/neobsahují NAPE, inkubovat tyto lipozómy ve vhodném buněčném kultivačním mediu a poté určit procento detekovatelného markeru, dopraveného do buněk po inkubaci. Po provedení takovýchto pokusů by odborník pozoroval, že buňky inkubované s lipozómy obsahujícími NAPE obsahují větší množství detekovatelného markeru než buňky inkubované s lipozómy neobsahujícími NAPE.



Lipidická složka lipozómu zahrnuje, vedle NAPE, další lipid. Takovými lipidy mohou být jakékoliv z řady druhů lipidů, např. fosfolipidy, glykolipidy či steroly, běžně používaných v lipozómech.

Přednostně zahrnuje tento přídatný lipid jeden nebo více fosfolipidů, např. fosfatidylcholin („PC“), jako je diolejoylfosfatidylcholin („DOPC“). Například, v některých provedeních tohoto vynálezu je přídatným lipidem DOPC; lipidická složka lipozómu obsahuje asi 30 molárních procent DOPC a asi 70 molárních procent NAPE, N-dodekanoyl-diolejoylfosfatidylethanolaminu.

Přídatným lipidem může také být fosfatidylethanolamin („PE“), jako je např. transesterifikovaný PE („tPE“), dipalmitoyl PE („DPPE“), palmitoyl-olejoyl PE („POPE“), diolejoyl PE („DOPE“); nebo PE, jehož hlavní skupina je spojena s látkou, vybranou ze skupiny, obsahující dikarboxylové kyseliny, polyethylenglykoly, polyalkyletery a gangliosidy. Takovéto látky jsou schopné bránit vazbě sérových proteinů na lipozómy, do kterých byly tyto lipidy začleněny. Podle toho, PE, obsahující takovéto modifikace hlavní skupiny, „lipidy s modifikovanou hlavní skupinou“ mění farmakokinetické chování lipozómů, prodlužují jejich poločasy života a zvyšují poměr původních lipozómů, které dosáhnou určených míst terapeutického nebo diagnostického účinku (viz Blume et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1149 : 180 (1993); Gabizon et al., *Pharm. Res.* 10(5) : 703 (1993); Park et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1108 : 257 (1992); Woodle et al., U.S. Patent No. 5 013 556; a Allen et al., U.S. Patent No. 4 837 028 a 4 920 016, jejichž obsahy jsou zde zahrnuty odkazem).

Mezi upřednostňované lipidy s modifikovanou hlavní skupinou patří fosfatidylethanolaminy-dikarboxylové kyseliny („PE-DCA“) nebo polyethylenglykolové konjugáty. V současné době je upřednostňovaným lipidem s modifikovanou hlavní skupinou diolejoylfosfatidylethanolamin („DOPE-GA“). Množství lipidu s modifikovanou hlavní skupinou, začleněné do lipozómu, záleží na řadě faktorů, které jsou běžnému odborníkovi v oboru dobře známé, nebo které jsou zjistitelné bez nutnosti děláním neobvyklých pokusů. Mezi ně patří, ale ne pouze, : typ modifikace hlavní skupiny, typ a velikost lipozómu a požadované terapeutické použití přípravku. Přednostně jsou lipidy s modifikovanou hlavní skupinou začleňovány do lipozómů v koncentraci alespoň 5 molárních procent lipidické složky lipozómu, lépe asi 10 molárních procent lipidické složky lipozómu.

„Lipozómy“ jsou samostatně se skládající struktury, obsahující jednu nebo více lipidických dvojrstev, z nichž každá obklopuje vodný prostor, a obsahuje dvě opačně položené vrstvy

amfipatických lipidických molekul. Amfipatické lipidy obsahují polární (hydrofilní) hlavní část, kovalentně spojenou s jedním nebo dvěma nepolárními (hydrofobními) acylovými řetězci. Obecně se má za to, že energeticky nevýhodné kontakty mezi hydrofobními acylovými řetězci a vodným médiem indukují u lipidických molekul změnu uspořádání do takové stavu, že jsou jejich polární hlavní skupiny orientovány směrem k vodnému mediu, zatímco acylové řetězce směřují směrem do vnitřku dvojvrstvy. Je tedy vytvořena stabilní struktura, ve které jsou acylové řetězce účinně chráněny před kontaktem s okolním vodným médiem.

Jednovrstevné lipozómy jsou lipozómy, které mají jednu lipidickou dvojvrstvu. Mohou to být buď malé jednovrstevné lipozómy („SUV“), které mají průměrný průměr 25-50 nm, nebo velké jednovrstevné lipozómy („LUV“), které mají průměrný průměr větší než 50 nm. Několikavrstevné lipozómy mají od 1 do několika lipidických dvojvrstev a mnohovrstevné lipozómy („MLV“) mají mnoho dvojvrstev. Lipozóm tohoto vynálezu může být jednovrstevný, několikavrstevný nebo mnohovrstevný, ale přednostně je jednovrstevný a lépe velký jednovrstevný lipozóm.

Lipozómy mohou být vytvořeny řadou způsobů (souhrn např. viz Deamer a Uster (1983)). Mnohovrstevné lipozómy mohou být vytvořeny například metodou Banghema et al., (1965) a metodou Lenka, Fountaina nebo Cullise pro přípravu MLV s v podstatě rovnoměrným rozdělením rozpuštěné látky mezi lamelami (to jest „SPLV“; viz U.S. Patent No. 4 522 803, 4 588 578, 5 030 453, 5 169 637 a 4 975 282). Několikavrstevné lipozómy mohou být vytvořeny např. Boniho metodou pro přípravu „IF“ lipozómů (interdigitation-fusion liposom) (viz EP Patent No. 510 086), nebo Papahadjopoulou technikou odpaření převrácené fáze (U. S. Patent No. 4 235 871). Jednovrstevné lipozómy mohou být vytvořeny metodami, jako je vstříknutí ethanolu (viz např. Batzri a Kron 1973), nebo z MLV technikami jako je sonikace (Papahadjopoulos et al., (1968) nebo protlačování (U. S. Patent No. 5 008 050 a U. S. Patent No. 5 059 421). Lipozómy tohoto vynálezu mohou být připraveny kteroukoliv z v oboru obecně přijímaných metod pro přípravu lipozómů, včetně metod, uvedených ve výše citovaných dokumentech (jejichž obsahy jsou zde zahrnuty odkazem).

Lipozómy tohoto vynálezu mohou být dehydratovány, uskladněny a poté znovu složeny tak, že podstatná část obsahů lipozómů zůstane během procesu dehydratace/rehydratace obsažena uvnitř. Dehydratace lipozómu obecně vyžaduje použití hydrofilních vysoušecích ochranných látek na vnitřním i vnějším povrchu lipozomální dvojvrstvy (viz U. S. Patent 4

880 635 jehož obsah je zde zahrnut odkazem). Obecně se má za to, že tyto hydrofilní látky brání změně uspořádání lipidů v lipozómu, takže velikost i obsah zůstane během vysušecího postupu a následné rehydratace zachována. Nejvíce upřednostňovanými vysušovacími ochrannými látkami jsou disacharidy, např. laktóza, maltóza, trehalóza nebo sacharóza.

Lipozómy tohoto vynálezu mohou obsahovat „naváděcí látku“, to jest nějakou látku, která může být vázána na lipozóm a která poté směřuje lipozóm do specifického místa v těle savce. Má se za to, že takovéto směřované dopravení je výsledkem rozpoznání nějaké látky na povrchu cílové buňky naváděcí látkou. Typicky mezi takovéto naváděcí látky patří, ale ne pouze, protilátky, ligandy buněčných receptorů, lektiny apod. Naváděcí látky mohou být na lipozóm vázány jakýmkoliv v oboru obecně přijímaným způsobem pro kovalentní nebo nekovalentní vazbu takových látek a lipozómů. Mezi takovéto způsoby patří například ty, popsané v následujících dokumentech, jejichž obsahy jsou zde zahrnuty odkazem, : U. S. Patent No. 5 399 331 popisuje vázání proteinů na lipozómy za použití vazebných činidel, které mají alespoň jednu maleimidoskupinu a reaktivní amin; v U. S. Patent No. 4 885 172, 5 059 421 a 5 171 578 se proteiny na lipozómy váží za použití glykoproteinu streptavidinu; Sato a Sunamoto popisují obalování směřovaných lipozómů polysacharidy.

Předkládány jsou zde i prostředky, obsahující lipozómy tohoto vynálezu. Mezi takovéto prostředky patří farmaceutické prostředky, které také obsahují „farmaceuticky přijatelný nosič“, kterým je nějaké medium, obecně přijatelné pro použití ve spojení s podáváním lipozómů živočichům, včetně lidí. Příprava farmaceuticky přijatelných nosičů záleží na řadě faktorů, které jsou v rámci znalostí běžného odborníka,. Záleží, ale ne pouze, na konkrétní použité bioaktivní látce, její koncentraci, stabilitě a zamýšlené dostupnosti; nemoci, poruše nebo stavu léčeného prostředkem; léčeném, jeho věku, velikosti a obecném stavu; zamýšleném způsobu podávání prostředku, např. nosním, ústním, očním, místním, transdermálním, vaginálním, podkožním, intraperitoneálním, vnitřililním nebo intramuskulárním (viz například, Nairn (1985), jehož obsah je zde zahrnut odkazem). Typické farmaceuticky přijatelné nosiče, použité pro parenterální podávání bioaktivní látky, zahrnují například D5W, vodný roztok obsahující 5 % w/v dextrózy, fyziologický solný roztok. Farmaceuticky přijatelné nosiče mohou obsahovat další přídavné složky, jako například ty, které zvyšují stabilitu lipozómů.

Dále je zde předkládán způsob dopravování bioaktivní látky do buňky. „Bioaktivní látka“, která může být do buněk dopravena lipozómy, je kterákoliv látka nebo skladba látky, která

může být připravena v lipozómech a být podávána živočichům, přednostně člověku. Lipozómy mohou naplněny bioaktivními látkami pomocí rozpuštění této látky v lipidu nebo vodné fázi, použité pro přípravu vezikulů. Jinou možností je naplnění lipozómů ionizovatelnými bioaktivními látkami tak, že jsou nejdříve vytvořeny lipozómy, je ustaven elektrochemický potenciál, např. pomocí pH gradientu, na nejkrajnější lipozomální dvojrůstvě a poté je k vodnému mediu obklopujícímu lipozómy přidána ionizovatelná látka (viz Ball et al., U. S. Patent No. 5 077 056, jehož obsah je zde zahrnut odkazem).

Bioaktivní látky mohou mít léčebnou aktivitu u živočichů a mohou být také podávány pro diagnostické účely. Bioaktivní látky, které mohou být spojeny s lipozómy tohoto vynálezu, zahrnují, ale ne pouze, : antivirální látky jako jsou acylovir, zidovudin a interferony; antibakteriální látky jako jsou aminoglykosidy, cefalosporiny a tetracykliny; antifungální látky jako jsou polyenová antibiotika, imidazoly a triazoly; antimetabolické látky jako jsou kyselina listová a analoga purinu a pyrimidinu; antineoplastické látky jako jsou anthracyklinová antibiotika a rostlinné alkaloidy; steroly jako je cholesterol; uhlohydráty, např. cukry a škroby; aminokyseliny, peptidy, proteiny jako jsou buněčné receptorové proteiny, imunoglobuliny, enzymy, hormony, neurotransmitery a glykoproteiny; barviva; radioaktivní značky jako jsou radioizotopy a radioizotopy značené látky; látky nepropouštějící záření; fluorescenční látky; mydriatické sloučeniny; bronchodilatátory; lokální anestetika; sekvence nukleových kyselin jako jsou mRNA, cDNA, genomová DNA a plazmidy; bioaktivní lipidy jako jsou etherlipidy a ceramidy; apod.

Způsob dopravení bioaktivní látky tohoto vynálezu zahrnuje setkání se buňky s prostředkem, obsahujícím lipozóm tohoto vynálezu. Takovéto setkání je přednostně prováděno v přítomnosti vhodné koncentrace například, ale ne pouze, 1-3 mM kationtu, např. Ca^{2+} , Mg^{2+} nebo kombinaci $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$; toto setkání může být také provedeno při kyselém pH za nepřítomnosti přídavných kationtů.

Toto dopravení může být prováděno in vitro, jako např. pro diagnostické účely nebo ex vivo dopravení léčebné látky nebo nukleové kyseliny do buněk kostní dřeně, kde v tomto případě prostředek obsahující lipozóm obsahuje také dvojmocné kationty. Druhou možností je provedení setkání in vivo, kde dané buňky jsou přednostně savčí, je použit farmaceuticky přijatelný nosič a lipozómy přednostně obsahují naváděcí látku. Při lipozomálním dopravování bioaktivní látky in vivo, podle provedení tohoto vynálezu, může být dopravováno terapeuticky nebo diagnosticky účinné množství léčebných nebo diagnostických látek do buňky savce, postiženého nemocí, poruchou nebo stavem,

umožňujícím diagnózu nebo léčení danou látkou. Od této doby může být takovéto dopravování použito pro diagnózu nebo léčení nemocí, poruch nebo stavů u savců. Savci mohou být například postiženi infekční mikrobiální nemocí, např. virálními nebo bakteriálními infekcemi; rakovinou, např. rakovinou mozku, prsu, tlustého střeva, plic, vaječnicků, prostaty či žaludku; záněty, např. artritidou nebo autoimunitními onemocněními jako je revmatoidní artritida nebo juvenilní diabetes; a do buněk těchto savců může být dopraveno terapeuticky účinné množství antibakteriální, protirakovinné nebo protizánětlivé látky.

Dopravení obsahů lipozómů může být usnadněno tím, že se do lipozómů začlení NAPE, jelikož NAPE destabilizují lipozomální dvojvrstvu v přítomnosti vhodných koncentrací, např. fyziologické, kationtů, nebo při kyselém pH za nepřítomnosti dalších složek. Destabilizace, zprostředkovaná NAPE, může dokonce vést k fúzi lipozómů s buněčnými membránami a tedy k přímému dopravení lipozomálních obsahů do buněk.

Fúze zahrnuje jak vazbu lipozóm-buňka tak i promíchání lipidů lipozómu a membrány, což je možno stanovit řadou způsobů, které jsou známé běžnému odborníkovi v oboru, který má k dispozici popis tohoto vynálezu. Mezi ně patří například, ale ne pouze, pokusy založené na fluorescenci, detailněji popsané dále v příkladu 4. Stručně, lipozómy jsou značeny fluorescenčními markery, jako je N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)fosfatidyethanolamin („NBD-PE“) a N-(lissamin-rhodamin B-sulfonyl)fosfatidyethanolamin („Rh-PE“) a poté se spojí s bezbarvými erytrocyty, to jest erytrocyty, zbavenými hemoglobinového obsahu; bezbarvé erytrocyty jsou obzvláště vhodné pro použití při měření fúze lipozóm-buňka, jelikož tyto buňky nejsou schopny endocytózy lipozómů a začleňují lipozomální lipidy do svých buněčných membrán pouze pomocí fúze. Bezbarvé erytrocyty mohou být připraveny tak, jak již bylo dříve popsáno (viz Williamson P., Algarin L., Bateman J., Choe H. R. & Schlegel R. A. (1985) *J. Cell Physiol.* 123, 209-214; Clague M. J., Schod C., Zech L. & Blumenthal R (1990) *Biochemistry* 29, 1303-1309, jejichž obsahy jsou zde zahrnuty odkazem), např. pomocí bobtnání erytrocytů v hypotonickém roztoku, za účelem jejich prasknutí a uvolnění jejich hemoglobinu, a následného uzavření erytrocytů pomocí jejich inkubace ve vhodném pufru.

Značené lipozómy mohou být inkubovány s bezbarvými erytrocyty v přítomnosti dvojmocných kationtů, např. Ca^{2+} , Mg^{2+} nebo $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, v různých koncentracích, např. 1-3 mM. Po odstranění nenavázaných lipozómů je stupeň vazby lipozóm-bezbarvý erytrocyt stanoven pomocí měření množství fluorescence spojené s bezbarvými erytrocyty.

Promíchání lipidů je měřeno řadou způsobů, které dobře známé běžnému odborníkovi v oboru, včetně např. rezonančního přenosu energie („RET“), uvedenému dále v příkladu 4 (a popsanému detailněji v Struck D. K., Hoekstra D. & Pagano R. E. (1981) *Biochemistry* 20, 4093-4099, jehož obsah je zde zahrnut odkazem).

Jak ukazuje obrázek 2, výsledkem inkubace N-C12-DOPE/DOPC lipozómů (70 molárních procent/30 molárních procent) s bezbarvými erytrocyty v přítomnosti 3 mM Ca^{2+} bylo vázání lipozóm-erytrocyt i promíchání lipidů. Obrázky 4 a 5 navíc jasně ukazují, že přítomnost NAPE, např. N-C12-DOPE, v lipozómech byla pro fúzi lipozómů s buňkami nutná. Výsledky (viz obrázek 8) dále ukazují, že k vázání i promíchání, a tedy fúzi lipozóm-buňka, může docházet v nepřítomnosti dvojmocných kationtů, avšak v kyselém pH.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1.

Kinetika vazby a promíchávání lipidů mezi lipozómy N-C12-DOPE/DOPC (70 : 30) a bezbarvými erytrocyty při 37 °C, měřeno pomocí NBD/Rh RET. Lipozómy a erytrocyty byly inkubovány při 37 °C po uvedené časové úseky v přítomnosti 3 mM Ca^{2+} ; NBD a Rh fluorescence byly měřeny poté, co byly centrifugací odstraněny nenavázané lipozómy. Promíchání lipidů a vázání bylo vyjádřeno v procentech hodnot při použití detergentu, jak jest popsáno dále. Horní křivka : vázání lipozómů; spodní křivka : promíchání lipidů. Osa X : Čas (min); Osa Y % maximální vázání lipozómů a promíchání lipidů.

Obrázek 2.

Závislost vázání lipozómů (A) a promíchání lipidů (B) mezi N-C12-DOPE/DOPC (70 : 30) a bezbarvými erytrocyty na dvojmocných kationtech, měřená pomocí NBD/Rh RET. NBD/Rh-značené lipozómy a neznačené erytrocyty byly inkubovány při 37 °C po dobu 1 hodiny v přítomnosti uvedených koncentrací kationtů. (A) a (B) : plné čtverečky : $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$; plné trojúhelníčky : Ca^{2+} , plná kolečka : Mg^{2+} . Osa X : Koncentrace kationtů (mM); Osa Y : (A) : % maximální vázání lipozómů; (B) : % maximální promíchání lipidů.

Obrázek 3

Závislost vázání lipozómů (A) a promíchání lipidů (B) na N-C12-DOPE, měřená pomocí NBD/Rh RET. Značené lipozómy a neznačené erytrocyty byly inkubovány při 37 °C po dobu

1 hodiny v přítomnosti 3 mM Ca^{2+} . Osa X : Molární poměr N-C12-DOPE : DOPC; Osa Y : (A) : % maximální vázání lipozómů; (B) : % maximální promíchání lipidů.

Obrázek 4

Porovnání lipozómů obsahujících DOPG/DOPC -(80:20), mozkový PS/DOPC -(80:20) a N-C12-DOPE/DOPC -(80:20), co do vázání lipozómů (A) a promíchání lipidů (B) s bezbarvými erytrocyty, měřené pomocí NBD/Rh RET. Lipozómy a erytrocyty byly inkubovány při 37 °C po dobu 1 hodiny v přítomnosti 3 mM Ca^{2+} . Osa Y : (A) : % maximální vázání lipozómů; (B) : % maximální promíchání lipidů.

Obrázek 5

Fluorescenční mikrofotografie promíchání lipidů mezi N-C12-DOPE/DOPC - (70:30) a bezbarvými erytrocyty. NBD/Rh značené lipozómy byly inkubovány s erytrocyty po dobu 30 minut s (A) nebo bez (B) 1,25 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Po inkubaci byly erytrocyty promyty, za účelem odstranění nenavázaných lipozómů. Celkové zvětšení je 1000x pro každou fotografii.

Obrázek 6

Fluorescenční mikrofotografie dopravení obsahu z N-C12-DOPE/DOPC - (70:30) lipozómů do bezbarvých erytrocytů při 37 °C. TMR-70kD dextran obalující lipozómy byly inkubovány s erytrocyty po dobu 30 minut s (A) nebo bez (B+C) 1,25 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Na fotografii D byly erytrocyty inkubovány po dobu 30 minut volným TMR-70kD dextranem v přítomnosti 1,25 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Po inkubaci byly erytrocyty promyty, za účelem odstranění nenavázaných lipozómů. Celkové zvětšení je 400x pro A, B a D a 1000x pro C.

Obrázek 7

Vázání a promíchání lipidů mezi lipozómy obsahujícími N-C12-DOPE/DOPC - (70:30) a buňkami U-937, měřené pomocí NBD/Rh RET. Lipozómy a buňky U-937 byly inkubovány při 37 °C po dobu 1 hodiny v přítomnosti 3 mM Ca^{2+} . Osa Y : (A) : % maximální vázání lipozómů (levé sloupce); (B) : % maximální promíchání lipidů (pravé sloupce).

Obrázek 8

pH-závislost vázání a promíchání lipidů mezi lipozómy obsahujícími N-C12-DOPE/DOPC -

(70:30) a bezbarvými erytrocyty, měřena pomocí NBD/Rh RET. Lipozómy a erytrocyty byly inkubovány při uvedených hodnotách pH po dobu 1 hodiny v nepřítomnosti dvojmocných kationtů. Osa Y : (A) : % maximální vázání lipozómů; (B) : % maximální promíchání lipidů.

Tento vynález bude lépe vysvětlen v následující příkladech. Avšak odborníci v oboru snadno pochopí, že tyto příklady pouze objasňují tento vynález, jak je definován v po nich následujících nárocích.

Příklady provedení vynálezu

Materiál : DOPC, mozkový PS, dioleoylfosfatidylethanolamin (DOPE), dioleoylfosfatidylglycerol (DOPG) byly zakoupeny od Avanti Polar Lipids (Alebaster, AL). N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)fosfatidylethanolamin (vejce) (NBD-PE), N-(lissamin-rhodamin B-sulfonyl)fosfatidylethanolamin (vejce) (Rh-PE), s tetramethylrhodaminem spojený 70kD dextran (TMR-70D) byly zakoupeny od Molecular Probes (Eugene, OR). Oktaethylenglykolmonododecylether ($C_{12}E_8$) a triethylamin byly zakoupeny od Fluka (Roukonkoma, NY). N-[tris(hydroxymethyl)-2-aminoethansulfonová kyselina (TES) byla zakoupena od Calbiochem (La Jolla, CA). Anhydrid kyseliny laurové byla zakoupena od Aldrich (Milwaukee, WI). Lidský protrombin, faktor V/Va a faktor Xa byly zakoupeny od Enzyme Research Laboratories Inc. (South Bend, IN). Sarkosin-Pro-Arg-p-nitroanilid byl zakoupen od Sigma (St. Louis, MO). Buňky U-937 byly zakoupeny od American Type Culture Collection (Rockville, MD).

Příklad 1

Syntéza a charakterizace NAPE

DOPE, rozpuštěný v $CHCl_3$ (500 mg, 0,67 mmol) byl míchán po dobu 24 hodin při pokojové teplotě s anhydridem kyseliny laurové (513 mg, 1,34 mmol) a triethylaminem (726 mg, 7,2 mmol). Chromatografie na tenké vrstvě ukázala, že zmizely všechny výchozí látky. Rozpouštědlo bylo odpařeno a zbytek byl vyčištěn kolonovou chromatografií (flash) na silikagelu (230-400 mesh, Aldrich, Milwaukee, WI), za použití gradientů rozpouštědel $CHCl_3/MeOH$, 100:0, 98:2, 95:5, 90:10 a 80:20. Žádaná látka byla shromážděna a zakonzentrována ve vakuu. Získaný produkt byl rozpuštěn v minimálním množství $CHCl_3$ a

tento roztok byl protlačen přes stříkačkový filtr Acrodisc® CR (0,2 µm, Fischer Scientific, Malvern, PA), za účelem odstranění silikagelu. Po odstranění chloroformu byl produkt lyofilizován z cyklohexanu a byl charakterizován pomocí protonové nukleární magnetické rezonance (H^1 NMR, Bruker Instrument Inc., Manning MA, 300 MHz, $CDCl_3$) a TLC. Větší množství N-C12-DOPE bylo zakoupeno od Avanti Polar Lipids.

Příklad 2

Příprava lipozómu

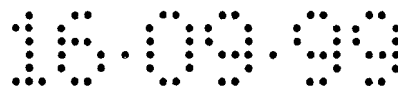
Velké jednovrstevné vezikuly (LUV), značené NBD/Rh, byly připraveny tak, jak bylo popsáno dříve (Mayer L. D., Hope M. J. & Cullis P. R. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 858, 161-168, jehož obsah je zde zahrnut odkazem) Stručně, směs 70 molárních procent N-dodekanoyl-diolejoylfosfatidylethanolaminu a 30 molárních procent diolejoylfosfatidylcholinu v chloroformu byla vysušena pomocí dusíku na tenkou vrstvičku, která se poté nechala přes noc ve vakuu, za účelem odstranění rozpouštědla. Lipidická vrstvička byla poté hydratována roztokem NaCl pufovaným TES (10 mM TES, 0,1 mM EDTA, 154 mM NaCl, pH 7,4); pro zajištění úplné hydratace bylo použito lehké zatřepání. Po deseti cyklech zmrazení/rozmrazení v tekutém dusíku/vodní lázni pokojové teploty byl vzorek desetkrát protlačen přes 0,1 µm polykarbonátový membránový filtr (Poretics Corp., Livermore, CA). Výsledné lipozomy byly uloženy při 4 °C.

Pro LUV obalující dextran nebyly použity žádné fluorescenčně značené lipidy. Suchá lipidická vrstvička byla hydratována 50 mg/ml TMR-70D v roztoku pufovaném 10 mM TES. Po zmrazení/rozmrazení a protlačení byly LUV odděleny od nezabaleného dextranu pomocí 45 x 1,3 kolony Biogel-A50 pro gelovou filtraci (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Lipozomy byly uskladněny při 4 °C a byly použity do jednoho týdne od přípravy. Koncentrace pro každou přípravu lipozómů byla určena pomocí fosfátového pokusu (Bartlett G. R. (1959) *J. Biol. Chem.*, 234, 466-468. Přibližně 1µm velikost lipozómů byla potvrzena na Nicomp submicron particle sizer (Nicomp Instruments Inc., Goleta, CA) za použití quasidelektrického rozptylu světla.

Příklad 3

Příprava znovu uzavřených a otevřených lidských bezbarvých erytrocytů

Znovu uzavřené bezbarvé erytrocyty se nazývají bezbarvé erytrocyty, pokud není uvedeno jinak, a byly připraveny tak, jak bylo dříve popsáno (Williamson P., Algarin L., Bateman J.;



Clague M. J., Schod C., Zech L. & Blumenthal R (1990) *Biochemistry* 29, 1303-1309. Stručně, čerstvá lidská krev byla několikrát promyta studeným roztokem NaCl pufrovaným 10 mM TES, za účelem odstranění plazmy a bílých krvinek. 2 ml promytých erytrocytů (50% hematokrit) se nechaly nabobtnat v studeném hypotonickém roztoku, obsahujícím 8 ml H₂O a 9,6 ml roztok NaCl pufrovaného 10 mM TES. Tyto erytrocyty byly centrifugovány při 850xg po dobu 5 minut. Pelet byl resuspendován ve 40 ml studeného lyzačního pufru (10 mM Tris, 0,1% BSA, 2 mM MgCl₂ a 0,1 mM EGTA) a byl inkubován v ledu po dobu alespoň 2 minut. Po přidání 5,5 ml 10 x pufru pro znovuuzavření (1,22 M NaCl, 30 mM KCl, 0,15 M Na₂HPO₄, 50 mM KH₂PO₄, a 2 mM MgCl₂) byl vzorek inkubován při 37 °C po dobu 40 minut. Znovu uzavřené bezbarvé erytrocyty byly centrifugovány při 1750xg po dobu 10 minut a byly několikrát promyty dokud nebyl v supernatantu pozorován žádný hemoglobin. Znovu uzavřené bezbarvé erytrocyty byly uskladněny při 4 °C a byly použity do jednoho týdne.

Otevřené bezbarvé erytrocyty byly připraveny tak, jak bylo popsáno dříve (Steck T. L. & Kant J. A. (1974) *Methods Enzymol.* 31, 4231-4241, jehož obsah je zde zahrnut odkazem). Stručně, erytrocyty byly několikrát promyty roztokem NaCl pufrovaným 10 mM TES, za účelem odstranění plazmy a bílých krvinek. Pelet byl resuspendován ve studeném 5 mM Na₂HPO₄ a byl centrifugován při 14000xg po dobu 15 minut. Výsledný pelet byl promýván stejným pufrem do pročištění supernatantu. Otevřené bezbarvé erytrocyty byly uskladněny ve stejném pufru při 4 °C a byly použity do jednoho týdne.

Příklad 4

Fluorescenční pokusy s vázáním a promícháváním lipidů

V každém pokusu bylo smícháno buď 10 nmol lipozómů a 5×10^8 bezbarvých erytrocytů nebo 10 nmol lipozómů a 1×10^7 buněk U-937. Celkový objem byl doplněn na 100 μ l roztokem NaCl pufrovaným 10 mM TES. Pro pokusy při nízkém pH byl smíchán stejný objem roztoku NaCl pufrovaného 10 mM citrátem (50 mM citrát, 90 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 4,7) a směsi lipozómy-erytrocyty a tak bylo získána konečná hodnota pH 4,9 a konečný objem 106 μ l. Směs byla inkubována při 37 °C po uvedené časové intervaly s nebo bez dvojmocných kationtů. Směs byla centrifugována po dobu 5 minut při 3500xg, v případě bezbarvých krvinek, nebo 300xg, v případě buněk U-937. Nenavázané lipozómy byly odstraněny se supernatantem, pelet byl resuspendován v 100 μ l roztoku NaCl pufrovaném TES a poté byl přenesen do kyvety obsahující stejný pufr, při pokojové teplotě. Celkový

objem květy byl 2 ml. Všechny údaje jsou průměry tří stejných pokusů, pokud není uvedeno jinak.

Promíchání lipidů mezi lipozómy značenými NBD/Rd a neznačenými bezbarvými erytrocyty nebo buňkami U-937 bylo měřeno v roztoku NaCl pufovaném 10 mM TES pomocí rezonančního přenosu energie NBD/Rd (Struck D. H., Hoekstra D. & Pagano R. E. (1981) *Biochemistry* 20, 4093-4241. Fluorescence NBD byla měřena při pokojové teplotě na PTI AlphascanTM fluolometru (South Brunswick, NJ) v květu za stálého míchání. Excitační vlnová délka byla 450 nm s 450±20 nm filtrem (Griot, Irvine, CA) pro další pročištění světelných paprsků. Emisní vlnová délka byla 530 nm s a > 500 nm hornofrekvenčním filtrem (Schott Glass Technologies, Duryea, PA). Fluorescence NBD čerstvě připravených směsí lipozóm-buňka, to jest bez inkubace a točení, byla také měřena s nebo bez 0,2% C₁₂E₈, za účelem získání 0% respektive 100% promíchání lipidů. Fluorescence Rh v přítomnosti 0,2% C₁₂E₈ byla použita pro měření vázání lipozómů. Excitační vlnová délka byla 560 nm s 550±20 nm filtrem (Griot, Irvine, CA) pro další pročištění světelných paprsků. Emisní vlnová délka byla 600 nm s a > 570 nm hornofrekvenčním filtrem (Schott Glass Technologies, Duryea, PA). Rh fluorescence samotných buněk v přítomnosti 0,2% C₁₂E₈ byla vzata jako 0% vázání. Rh fluorescence čerstvě připravených směsí lipozóm-buňka byla měřena v přítomnosti 0,2% C₁₂E₈, za účelem získání 100% vázání. Rozsahy promíchání lipidů a vázání byly vypočítány tak, jak uvedeno dále

$$\% \text{ promíchání lipidů} = \frac{100 \times [(N_S - N_C) \times R_{OD} / R_{SD}] + N_C - N_0}{[(N_{SD} - N_{CD}) \times R_{OD} / R_{SD}] + N_{CD} - N_0 ;}$$

a

$$\% \text{ vázání} = \frac{100 \times R_{SD} - R_{CD}}{R_{OD} - R_{CD} ,}$$

kde : N_S: NBD fluorescence vzorku; N_C: NBD fluorescence samotných buněk; N₀: NBD fluorescence čerstvě připravené směsi lipozóm-buňka; N_{SD}: NBD fluorescence vzorku v přítomnosti detergentu; N_{CD}: NBD fluorescence samotných buněk v přítomnosti detergentu; R_{OD}: Rh fluorescence čerstvě připravené směsi lipozóm-buňka v přítomnosti detergentu; R_{SD}: Rh fluorescence vzorku v přítomnosti detergentu; R_{CD} : Rh fluorescence samotných buněk v přítomnosti detergentu.

Procento vázání v případě bezbarvých krvinek bylo upraveno na zbytkovou nenavázanou fluorescenci předpokládaného 10% supernatantu, který zůstal v každém peletu. Tudíž :



% vázání (uprav.) = 1,11(měřené procento) -11,1

Obdobné úpravy pro promíchání lipidů kterýchkoliv vzorků s významným vázáním byly zanedbatelné.

Příklad 5

Fluorescenční mikroskopie

25 nmol N-C12-DOPE/DOPC (70/30) lipozómů, obalujících TMR-70kD dextran nebo značených pomocí NBD/Rh, a 5×10^8 bezbarvých erytrocytů bylo inkubováno při 37 °C po dobu 30 minut s nebo bez 1,25 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Na konci inkubace byl ke každému vzorku přidán ledový roztok NaCl pufrovaný 10 mM TES s nebo bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ do konečného objemu 1 ml.. Vzorek byl centrifugován po dobu 5 minut při 3500xg a výsledný pelet byl jednou promyt stejným pufrem, za účelem odstranění nnavázaných lipozómů. Pelet byl poté resuspendován ve stejném pufru a byl pozorován na fluorescenčním mikroskopu Olympus BH-2 (Olympus Corp., Lake Success, NY), který byl vybaven 545 nm excitačním filtrem (Olympus Corp) a >580 dichroickým zrcadlem (Olympus Corp.).

Příklad 6

Vázání a promíchávání s bezbarvými erytrocyty závislé na pH

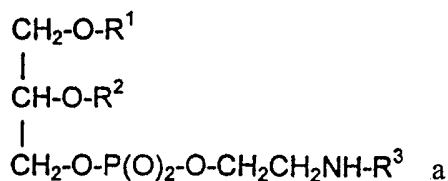
Bezbarvé erytrocyty, připravené podle výše popsaného postupu, byly inkubovány při 30 °C po dobu 1 hodiny buď v mediu s pH 7,4 nebo pH 4,9 v nepřítomnosti dvojmocných kationtů, s N-C12-DOPE/DOPC (70/30) lipozómy, připravenými podle výše popsaných postupů. Rozsahy vázání lipozómů a promíchání lipidů byly poté určeny podle uvedených výše postupů.

Výsledky těchto pokusů jsou uvedeny na obrázku 8.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutický prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje

- (a) farmaceuticky přijatelný nosič; a
- (b) lipozóm, mající lipidickou složku, která obsahuje
 - (i) N-acylfosfatidylethanolamin, který má vzorec :



(ii) přídatný lipid

kde:

kde každý z R^1 , R^2 a R^3 je nezávisle skupinou, která má vzorec : -
 $\text{C(O)(CH}_2\text{)}_{n1}\text{(CH=CH)}_{n2}\text{(CH}_2\text{)}_{n3}\text{(CH=CH)}_{n4}\text{(CH}_2\text{)}_{n5}\text{(CH=CH)}_{n6}\text{(CH}_2\text{)}_{n7}\text{(CH=CH)}_{n8}\text{(CH}_2\text{)}_{n9}$
 CH_3 ;

$n1$ je nula nebo celé číslo, rovné od 1 do 22;

$n3$ je nula nebo celé číslo, rovné od 1 do 19;

$n5$ je nula nebo celé číslo, rovné od 1 do 16;

$n7$ je nula nebo celé číslo, rovné od 1 do 13;

$n9$ je nula nebo celé číslo, rovné od 1 do 10;

pro každé R^1 a R^2 nezávisle, je součet $n1+2n2+n3+2n4+n5+2n6+n7+2n8+n9$ celé číslo, rovné od 12 do 22;

pro R^3 je součet $n1+2n2+n3+2n4+n5+2n6+n7+2n8+n9$ celé číslo, rovné od 2 do 22;

každý z $n2$, $n4$, $n6$ a $n8$ je nezávisle roven 0 nebo 1;

alespoň jeden z $n2$, $n4$, $n6$ a $n8$ je roven 1;

tato lipidická složka obsahuje destabilizaceschopné množství N-acylfosfatidylethanolaminu a tento lipozóm je mnohovrstevný nebo velký jednovrstevný lipozóm.

2. Lipozóm podle nároku 1, kde pro jeden nebo oba z R^1 a R^2 je alespoň jeden z $n2$, $n4$, $n6$ nebo $n8$ roven 1.

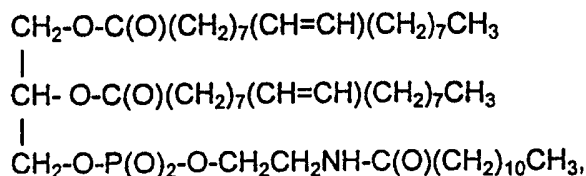
3. Lipozóm podle nároku 2, kde pro oba z R^1 a R^2 je alespoň jeden z n_2 , n_4 , n_6 nebo n_8 roven 1.

4. Lipozóm podle nároku 3, kde jsou oba R^1 i R^2 $-C(O)(CH_2)_7(CH=CH)(CH_2)_7CH_3$.

5. Lipozóm podle nároku 1, kde R^3 je $-C(O)(CH_2)_4CH_3$, $-C(O)(CH_2)_{10}CH_3$ nebo $C(O)(CH_2)_{14}CH_3$.

6. Lipozóm podle nároku 5, kde R^3 je $-C(O)(CH_2)_{10}CH_3$.

7. Lipozóm podle nároku 1, kde N-acylfosfatidylethanolamin je



8. Lipozóm podle nároku 1, kde N-acylfosfatidylethanolamin představuje alespoň asi 10 molárních procent lipidické složky.

9. Lipozóm podle nároku 8, kde N-acylfosfatidylethanolamin představuje od asi 10 molárních procent do asi 90 molárních procent lipidické složky.

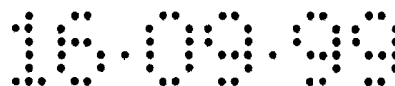
10. Lipozóm podle nároku 9, kde N-acylfosfatidylethanolamin představuje od asi 20 molárních procent do asi 80 molárních procent lipidické složky.

11. Lipozóm podle nároku 10, kde N-acylfosfatidylethanolamin představuje asi 70 molárních procent lipidické složky.

12. Lipozóm podle nároku 1, kde přídatným lipidem je fosfolipid.

13. Lipozóm podle nároku 12, kde tímto fosfolipidem je fosfatidylcholin.

14. Lipozóm podle nároku 13, kde fosfatidylcholinem je diolejoylfosfatidylcholin.



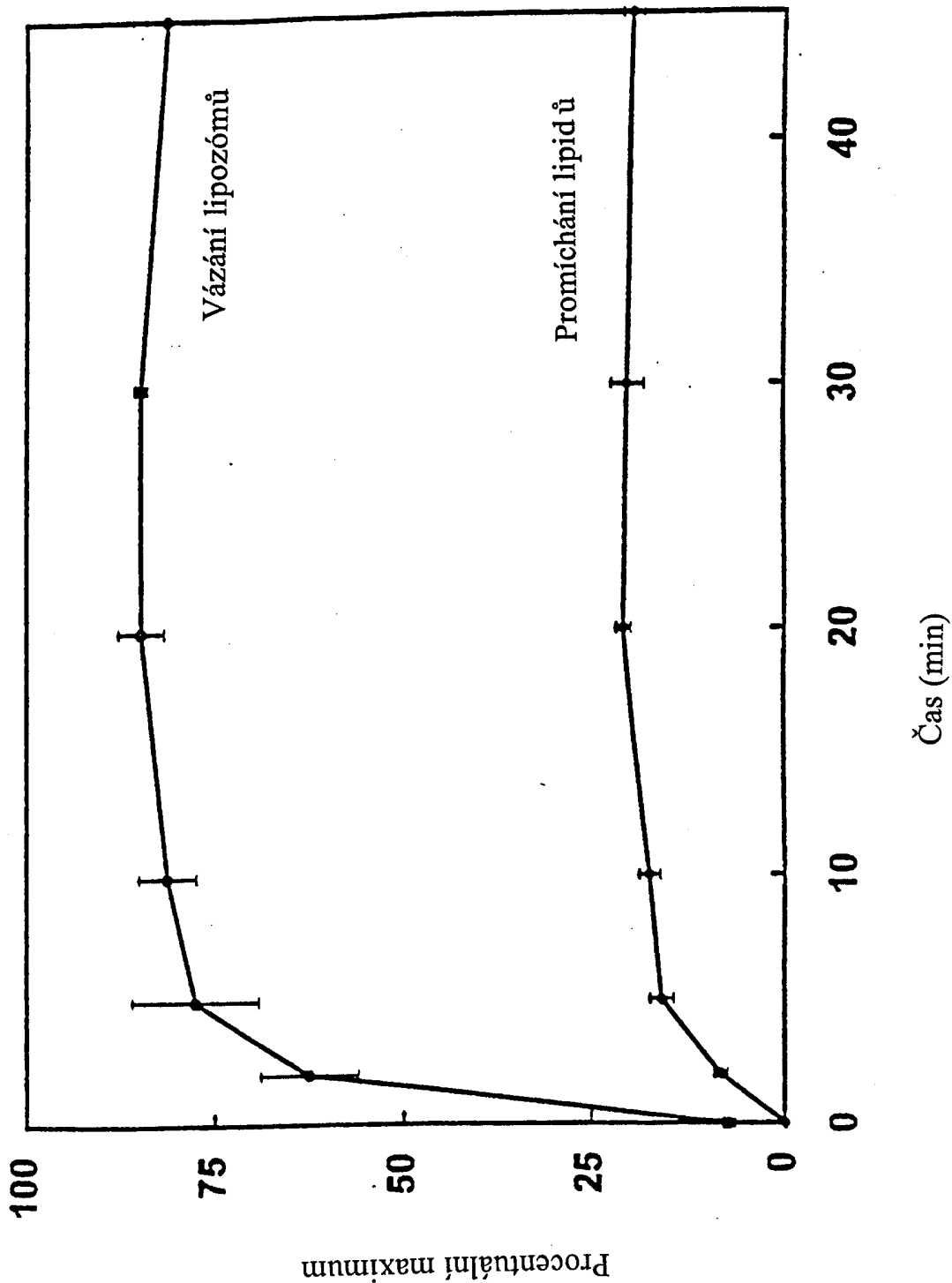
15. Lipozóm podle nároku 1, kde lipidická složka zahrnuje N-dodekanoylfosfatidylethanolamin a diolejoylfosfatidylcholin.
16. Lipozóm podle nároku 15, kde N-dodekanoylfosfatidylethanolamin představuje asi 70 molárních procent lipidické složky lipozómů a diolejoylfosfatidylcholin představuje asi 30 molárních procent lipidické složky .
17. Lipozóm podle nároku 1, kde přídatným lipidem je fosfatidylethanolamin.
18. Lipozóm podle nároku 17, kde je fosfatidylethanolamin vybrán ze skupiny, obsahující transesterifikovaný fosfatidylethanolamin, dipalmitoylfosfatidylethanolamin, palmitoyl-olejoylfosfatidylethanolamin a diolejoylfosfatidylethanolamin.
19. Lipozóm podle nároku 17, kde fosfatidylethanolamin je fosfatidylethanolamin spojený s látkou, vybranou ze skupiny obsahující dikarboxylové kyseliny, polyethylenglykoly, polyalkylethery a gangliosidy.
20. Lipozóm podle nároku 1, obsahující naváděcí látku, vybranou ze skupiny obsahující protilátky, ligandy buněčných receptorů a lektiny.
21. Lipozóm podle nároku 1, obsahující bioaktivní látku, vybranou ze skupiny obsahující antivirální látky, antibakteriální látky, antifungální látky, antineoplastické látky, protizánětlivé látky, radioaktivní značky, látky nepropouštějící záření, fluorescenční látky; mydriatické látky, bronchodilatátory; lokální anestetika; sekvence nukleových a bioaktivní lipidy.
22. Způsob dopravy bioaktivní látky do buňky, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje setkání se buňky s prostředkem nároku 1.
23. Způsob podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že k tomuto setkání dochází in vitro a tím, že k tomuto setkání dochází v přítomnosti fyziologické koncentrace kationtu nebo při kyselém pH.

24. Způsob podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že touto buňkou je buňka savčí a tato buňka se setká s prostředkem v těle savce.

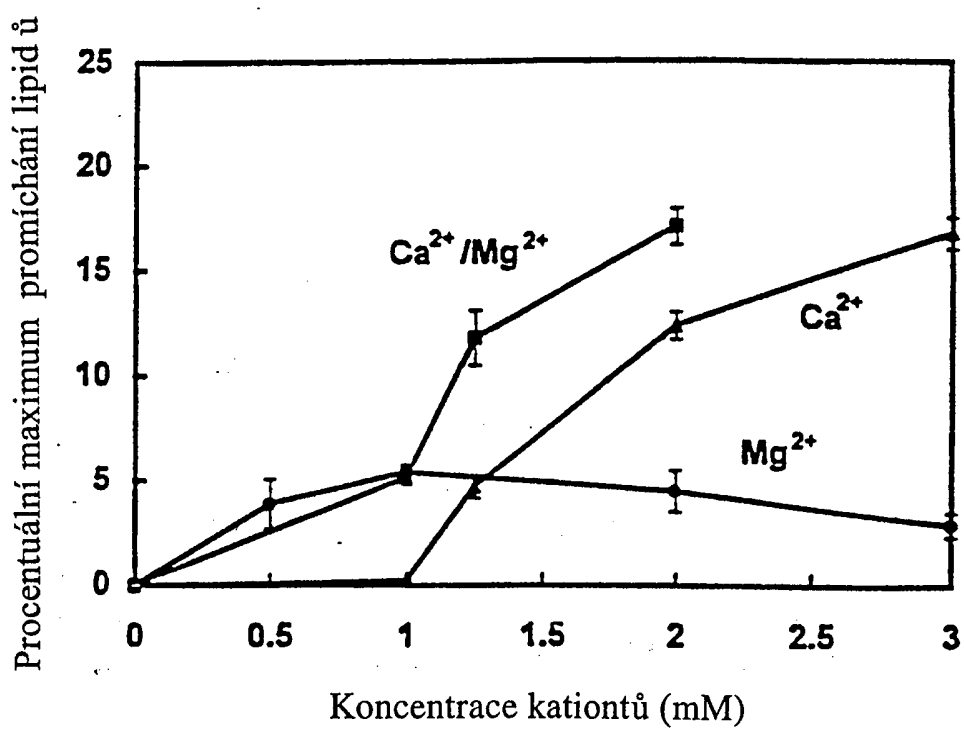
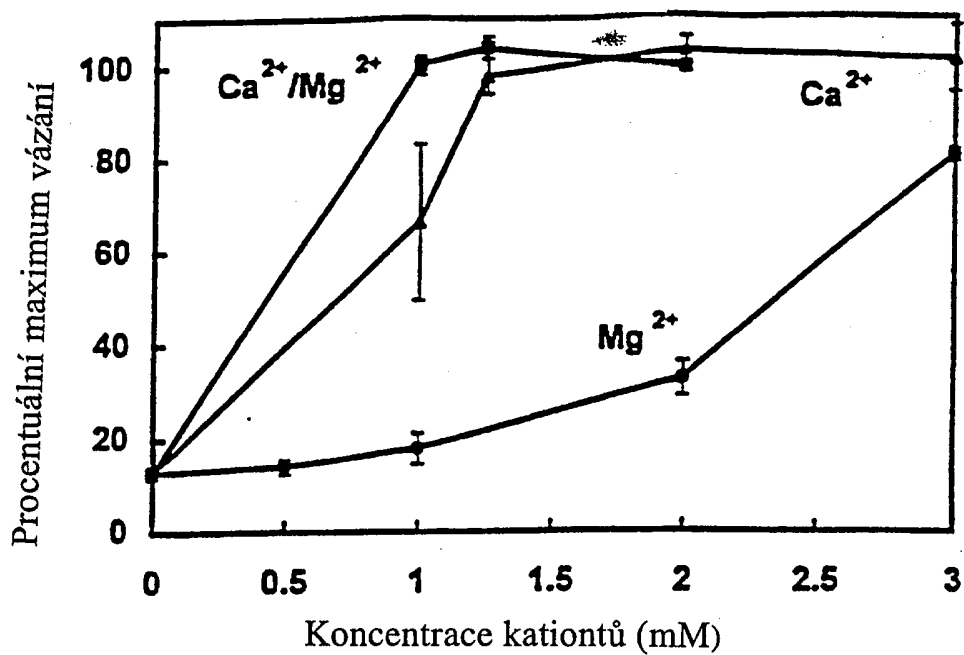
25. Způsob podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že lipozóm dále obsahuje naváděcí látku.

26. Způsob podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tento savec je postižen rakovinou a lipozóm obsahuje protirakovinně účinné množství protirakovinné látky.

Obr. 1



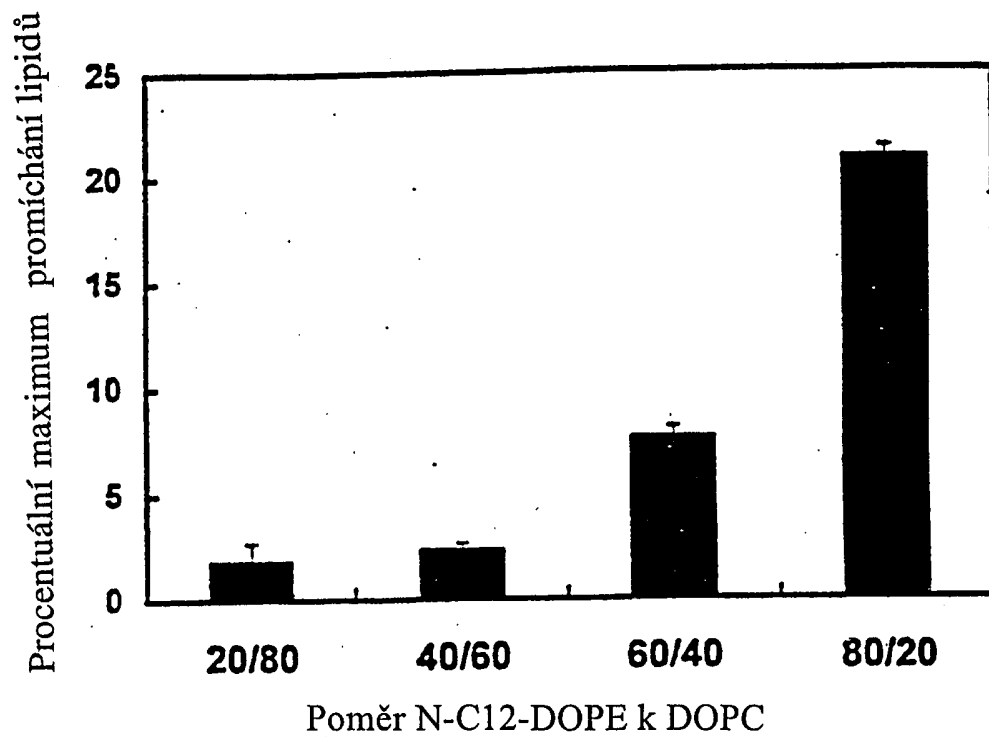
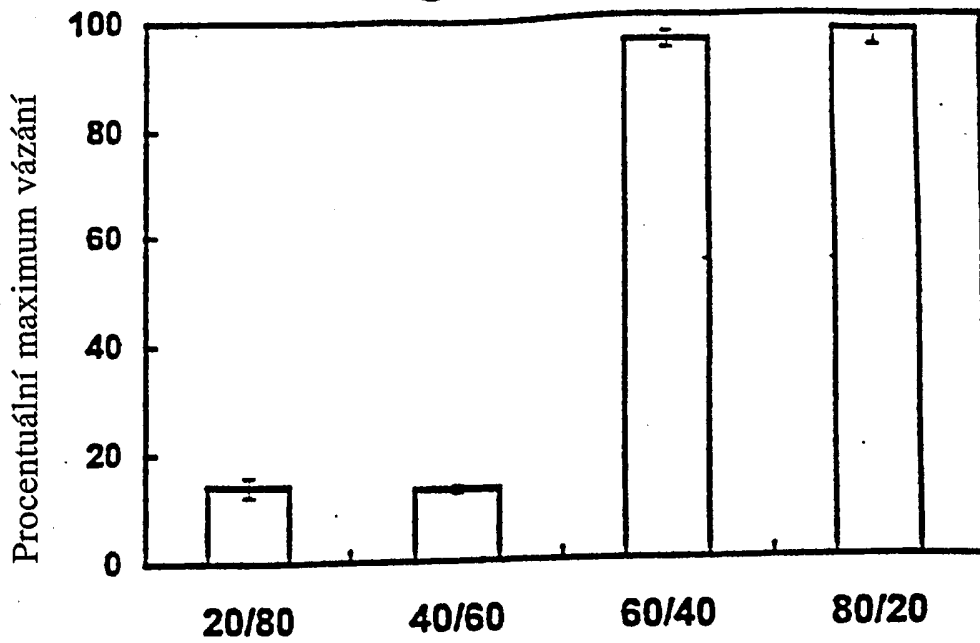
Obr. 2a



Obr. 2b

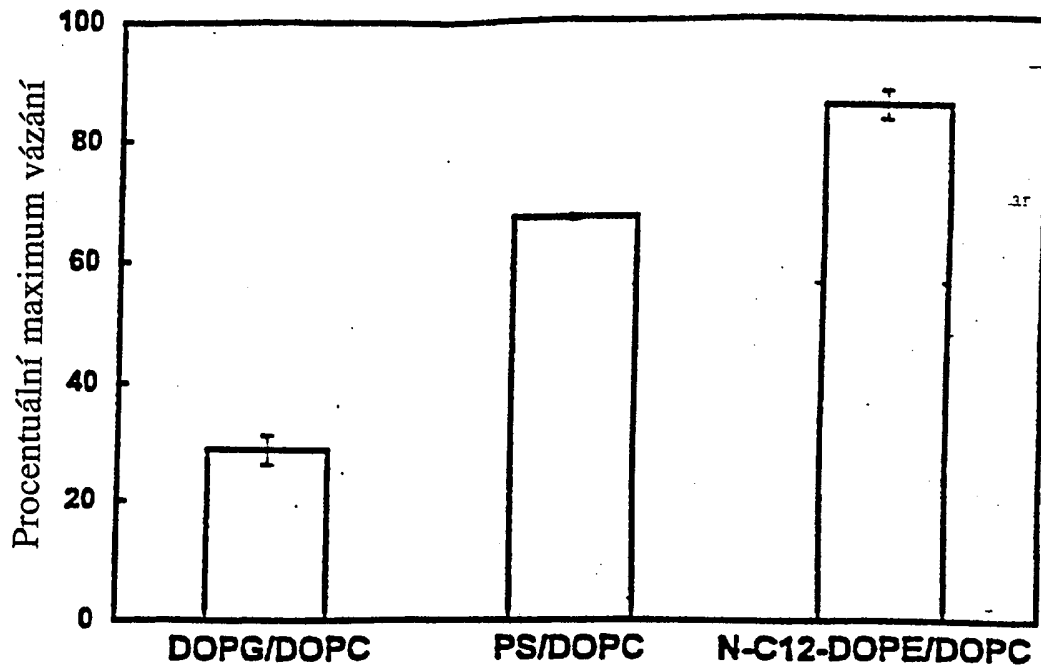
3/9

Obr. 3a

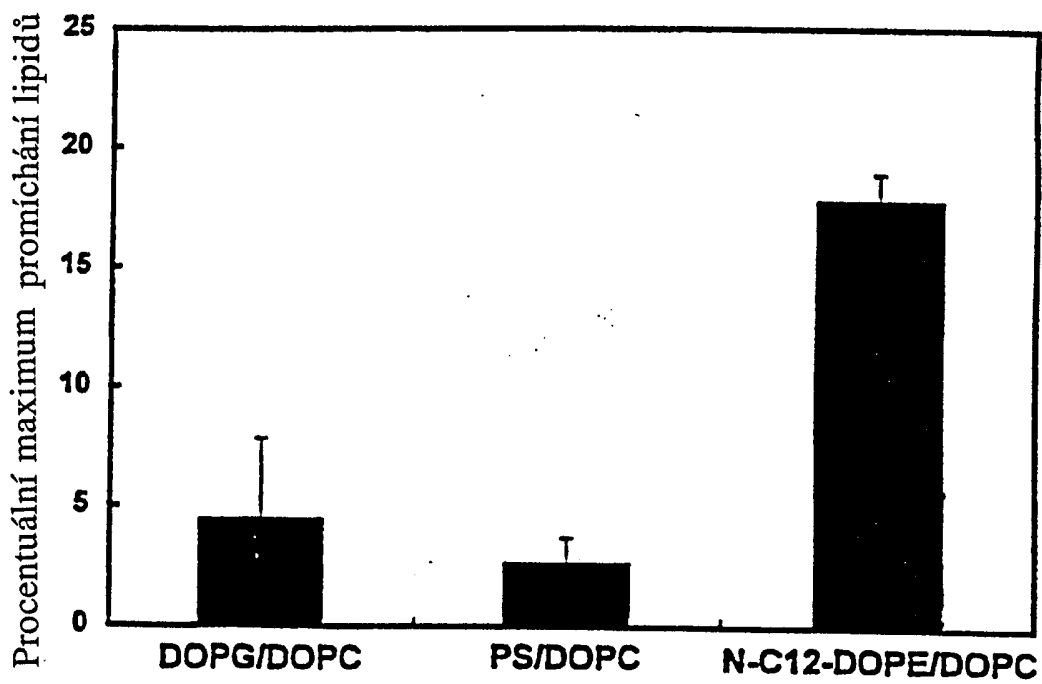


Poměr N-C12-DOPE k DOPC

Obr. 3b



Obr. 4a



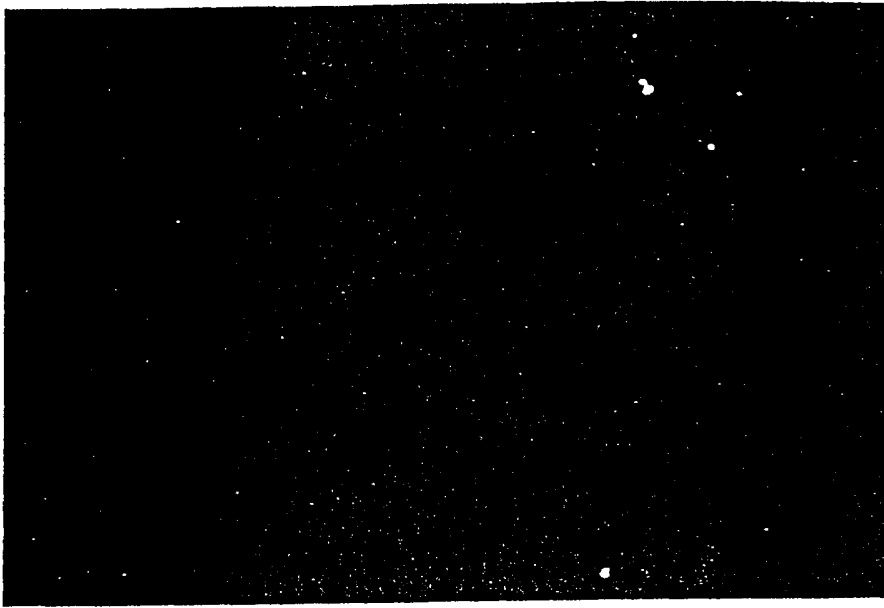
Obr. 4b

15.09.99

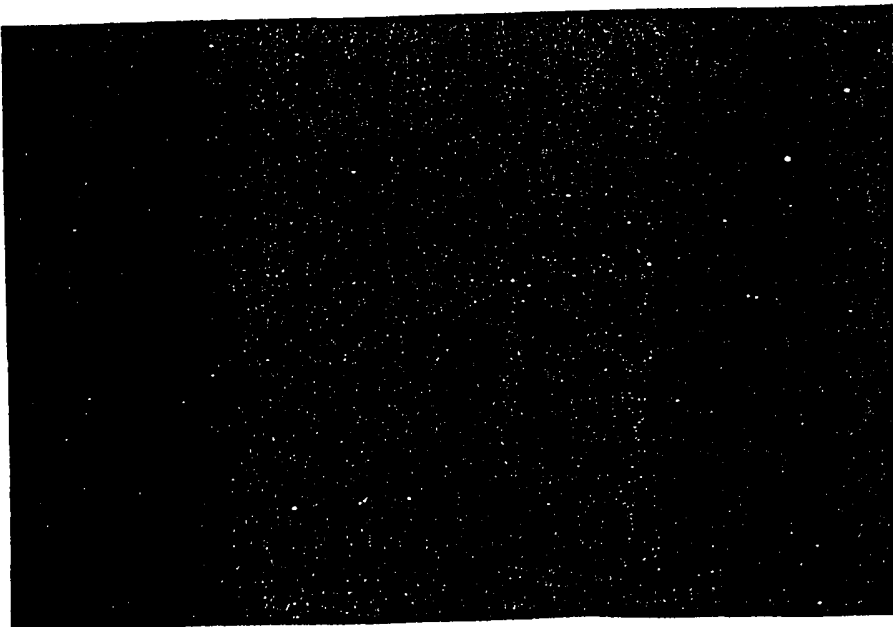
2380-99

5/9

Obr. 5a



Obr. 5b

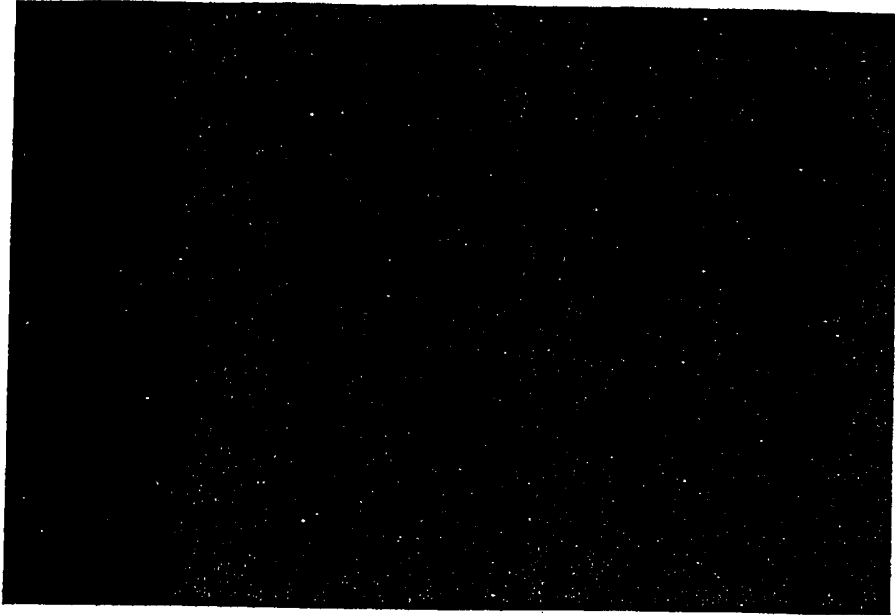


15.09.99

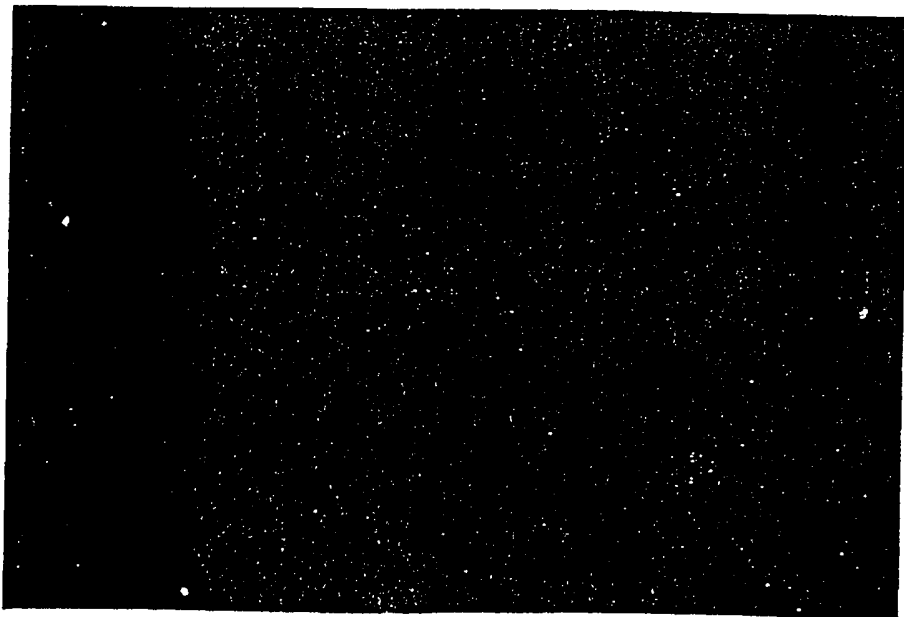
2380-99

6/9

Obr. 6a



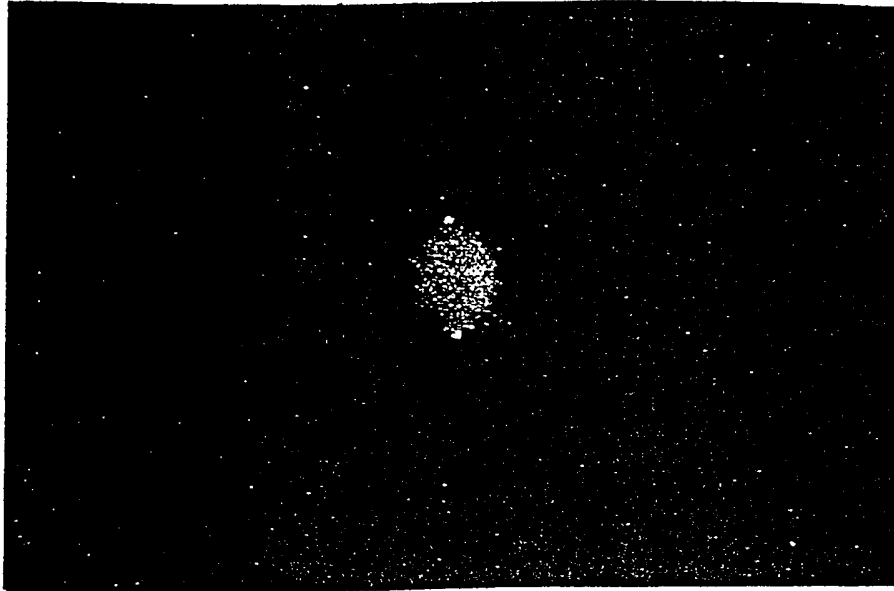
Obr. 6b



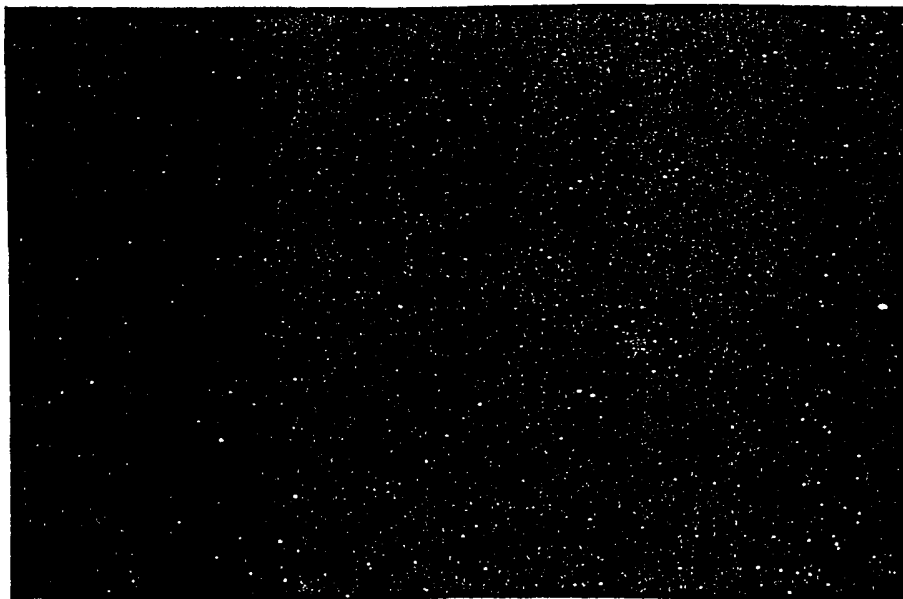
15.09.99
2380-99

7/9

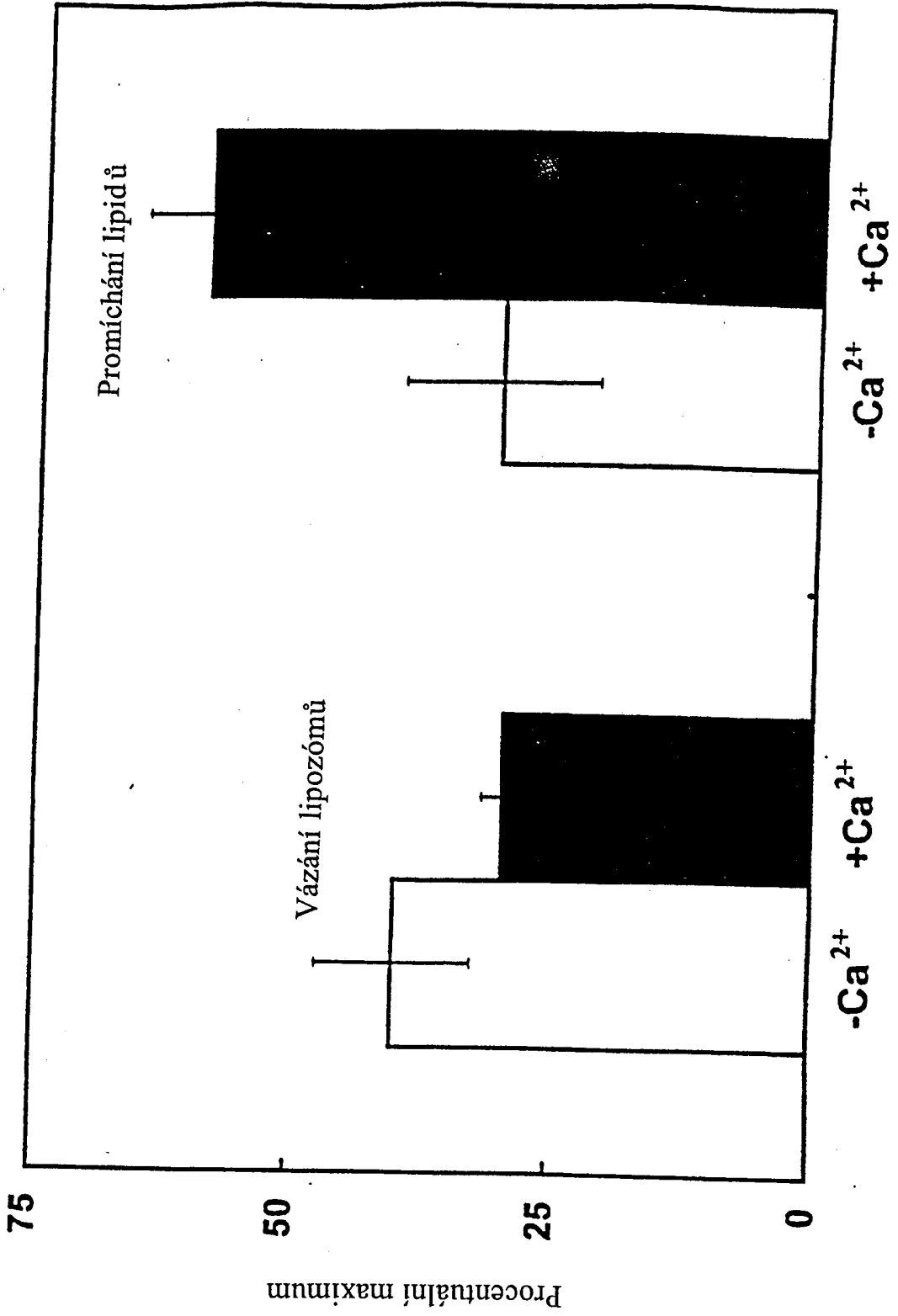
Obr. 6c



Obr. 6d



Obr. 7



Obr. 8

