

Kationos DOSPER-viroszómák

K I V O N A T

A találmány tárgyát képezi kationos viroszóma képezi, amely tartalmaz legalább egy fuziogén peptidet, amely egy nem Sendai-vírusból származó hemagglutinin, és amelyben a viroszómamembrán az összes lipid tömegéhez képest legalább 5-30%-os arányban 1,3-dioleoiloxi-2-(6-karboxi-spermil)-propilamidot (DOSPER) tartalmaz más, foszfatidilkolint (PC) vagy annak egy származékát, és adott esetben foszfatidiletanolamint (PE) és/vagy más kationos lipideket tartalmazó lipidekkel kombinálva. A viroszómák hatékonyan visznek be célsejtekbe negatív töltésű anyagokat, különösen nukleinsav-vegyületeket. A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás a viroszómák előállítására, valamint a viroszómák diagnosztikai, kozmetikai, orvosi vagy tudományos célú alkalmazásai.

jelentő alá írt
Zsuzsanna

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

Kationos DOSPER-viroszómák

A találmány a biokémia, gén-biotechnológia és génterápia tárgykörébe tartozik. A találmány tárgyát képezik új viroszómák, azaz a membránban virális glikoproteineket tartalmazó, pozitív töltésű liposzómarészecskék, amelyek a kívánt anyag célhelyekre történő nagyhatékonyságú bevitelére alkalmasak, továbbá hasznos alkalmazásaik. A találmány szerinti kationos viroszómák különösen alkalmasak negatív töltésű anyagok, előnyösen gének célsejtekbe történő specifikus és nem specifikus, nem fertőző bevitelére, *in vitro* és *in vivo*.

A teljes egészében a kitanítás részét képező WO 92/13525 számú irat szerint influenzavírusból származó tüskefehérjével „spike” protein és sejtspecifikus markerekkel irányított, kétrétegű foszfolipidmembránokból készített viroszómák nagyon hatékonyan fuzionálnak modellmembránokkal és állati sejtekkel, a receptorközvetített endocitózis révén történő, vírusszerű penetrációs mechanizmus miatt. Bár e viroszómák sikeresen alkalmazhatók kémiai anyagok és kívánt hatóanyagok célba juttatására, a stabil beépülés és a

töltéssel rendelkező, például negatív töltésű molekulák bevitele szempontjából vannak bizonyos hátrányaik is.

A teljes egészében a kitanítás részét képező WO 97/41834 számú irat kationos viroszómákat ismertet, amelyek genetikai anyagok célsejtekbe történő hatékony és sejtspecifikus bevitelére alkalmazhatók, *in vitro* és *in vivo*. A fenti irat ismerteti továbbá a viroszómák előállításának egy módját, valamint az alkalmazásukra szolgáló eljárásokat.

Az alábbiakban röviden összefoglaljuk a találmányt.

A találmány a WO 97/41834 számú iratban ismertetett találmány továbbfejlesztése. A találmány tárgyát képezik új kationos viroszómák, amelyek specifikus membránösszetételüknek köszönhetően nagyon hatékonyan megtölthetők bármilyen negatív töltésű anyaggal, előnyösen hosszú- és rövidláncú DNS-t vagy RNS-t, oligodezoxinukleotidokat, ribonukleotidokat, peptid-nukleinsavakat (PNS), ribozimeket (enzimaktivitással rendelkező RNS), géneket, plazmidokat és vektorokat tartalmazó genetikai anyaggal. Meglepetésünkre azt tapasztaltuk, hogyha más lipidekkel együtt kationos lipidként DOSPER-t alkalmazunk, akkor olyan nagyhatékonyságú viroszómákat állíthatunk elő, amelyek akár tízszeresen is meghaladhatják a WO 97/41834 számú iratban ismertetett DOTAP-viroszómák amúgy is nagy transzfekciós hatékonyságát. Ezt a meglepő hatást azonban csak akkor tudjuk elérni, ha kationos lipidként DOSPER-t alkalmazunk, valamint ha a DOSPER-t olyan arányban adjuk egyéb lipidekhez, amely eltér

a kationos lipid (DOTAP) és más lipidek ismert arányától, amelyet a WO 97/41834 számú irat kifejezetten ismertet és amire a szabadalmi igénypontokban oltalmat igényel.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz tartozó ábrákat.

1. ábra: A transzfekció időtartamának hatása a felvett DNS-plazmid mennyiségére. 5×10^5 humán transzformált 293T primer embrionális vese sejtvonalból származó sejtet 0,5 ml tápközegben ^3H -jelölt pGreen-Lantern plazmidot tartalmazó DOSPER-viroszómákkal és DOSPER-liposzómákkal transzfektáltunk.

2. ábra: A transzfekció időtartamának hatása a felvett DNS-plazmid mennyiségére. 5×10^5 COS-1 majom fibroblaszt sejtvonalból származó sejtet 0,5 ml tápközegben ^3H -jelölt pGreen-Lantern plazmidot tartalmazó DOSPER-viroszómákkal és DOSPER-liposzómákkal transzfektáltunk.

3. ábra: A transzfekció időtartamának hatása a felvett DNS-plazmid mennyiségére. 5×10^5 HeLa humán epiteloid méhnyakrák sejtvonalból származó sejtet 0,5 ml tápközegben ^3H -jelölt pGreen-Lantern plazmidot tartalmazó DOSPER-viroszómákkal és DOSPER-liposzómákkal transzfektáltunk.

4. ábra: A transzfekció időtartamának hatása a felvett DNS-plazmid mennyiségére. 5×10^5 NIH3T3 egér fibroblaszt sejtvonalból származó sejtet 0,5 ml tápközegben ^3H -jelölt pGreen-Lantern plazmidot tartalmazó DOSPER-viroszómákkal és DOSPER-liposzómákkal transzfektáltunk.

5. ábra: A transzfekció időtartamának hatása a felvett DNS-plazmid mennyiségére. 5×10^5 K562 humán krónikus mielógén leukémia sejtvonalból származó sejtet 0,5 ml tápközegben ^3H -jelölt pGreen-Lantern plazmidot tartalmazó DOSPER-viroszómákkal és DOSPER-liposzómákkal transzfektáltunk.

6. ábra: A transzfekció időtartamának hatása a felvett DNS-plazmid mennyiségére. 5×10^5 P3 egér mielóma sejtvonalból származó sejtet 0,5 ml tápközegben ^3H -jelölt pGreen-Lantern plazmidot tartalmazó DOSPER-viroszómákkal és DOSPER-liposzómákkal transzfektáltunk.

7. ábra: A transzfekció időtartamának hatása a felvett DNS-plazmid mennyiségére. 5×10^5 COS-1, 293T, K562 és P3X63Ag8 sejtet ^3H -jelölt pcDNA3.1/HisB/lacZ plazmidot tartalmazó DOSPER-viroszómákkal transzfektáltunk.

8. ábra: A transzfekció időtartamának hatása a felvett DNS-plazmid mennyiségére. 5×10^5 humán transzformált 293T primer embrionális vese sejtvonalból származó sejtet 0,5 ml tápközegben ^3H -jelölt pcDNA3.1/HisB/lacZ plazmidot tartalmazó DOSPER-viroszómákkal és DOTAP-viroszómákkal transzfektáltunk (0,4 μg DNS; 24'000 dpm = 100%).

9. ábra: A transzfekció időtartamának hatása a felvett DNS-plazmid mennyiségére. 5×10^5 K562 humán krónikus mielógén leukémia sejtvonalból származó sejtet 0,5 ml tápközegben ^3H -jelölt pcDNA3.1/HisB/lacZ plazmidot tartalmazó DOSPER-viroszómákkal és DOTAP-viroszómákkal transzfektáltunk (0,4 μg DNS; 24'000 dpm = 100%).

10. A transzfekció időtartamának hatása a felvett DNS-plazmid mennyiségére. 5×10^5 Sp2 hibrid, nem szekretáló egér sejtvonalból származó sejtet 0,5 ml tápközegben ^3H -jelölt pcDNA3.1/HisB/lacZ plazmidot tartalmazó DOSPER-viroszómákkal és DOTAP-viroszómákkal transzfektáltunk (0,4 μg DNS; 24'000 dpm = 100%).

11. ábra: A transzfekció időtartamának hatása a felvett DNS-plazmid mennyiségére. 5×10^5 HeLa humán epiteloid rákos sejtvonalból származó sejtet ^3H -jelölt pGreen-Lantern plazmidot tartalmazó DOSPER-viroszómákkal és DOTAP-viroszómákkal transzfektáltunk.

12. ábra: β -galaktozidáz expressziója DOSPER-viroszómákkal vagy DOSPER-liposzómákkal transzfektált NIH3T3-sejtekben; az A-, B- és C- kísérletek átlaga.

13. ábra. β -galaktozidáz expressziója különböző koncentrációjú és különböző számú viroszómában elosztott pcDNA3.1/HisB/lacZ plazmidot tartalmazó DOSPER-viroszómákkal transzfektált NIH3T3-sejtekben vagy 293T-sejtekben (A-kísérlet); az értékek a 4. napon mért ng/mg fehérje értékben vannak megadva.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány előnyös megvalósítási módjait.

A találmány szerinti viroszómák lipidrészecskék, amelyek kationos lipidek jelenléte miatt tipikusan nettó pozitív töltésű vezikulamembránt tartalmaznak. Tartalmaznak ezen kívül víruseredetű fuziogén peptideket, elsősorban virális burok-glikoproteineket, így például influenzavírus-

hemagglutininint, amely peptidek segítségével a viroszómák receptorközvetített penetrációs mechanizmus útján beépülnek a célsejtekbe. A viroszómák adott esetben sejtspecifikus markereket is tartalmazhatnak, amelyek *in vivo* elősegítik a kívánt célsejtekhez való preferált kapcsolódást.

A membrán előnyösen tartalmaz foszfatidiletanolamint (PE), amely egy bifunkciós keresztkötő révén a viroszómához horgonyozza a sejtspecifikus markert. Amennyiben a viroszómák nem igényelnek sejtspecifikus irányítást (pl. egy adott sejttenyészetben történő *in vitro* alkalmazás esetén), vagy ha a sejtspecifikus marker nem egy bifunkciós keresztkötő révén kapcsolódik a membránhoz, a PE adott esetben hiányozhat is a viroszómamembránból.

A találmány egy, a viroszómák *in vivo* alkalmazásaihoz előnyös megvalósítási módjában a találmány tárgyát képezi az is, ha a sejtspecifikus markereket irreverzibilisen, kovalens kötéssel kapcsoljuk a kationos viroszómákhoz, amely markerek lehetnek többek között olyan monoklonális antitestek, antitestfragmensek, így például $F(ab')_2$ - és Fab'-fragmensek, citokinek és/vagy növekedési faktorok, amelyek alkalmasak célsejtek szelektív detektálására és vagy megkötésére. A markereket úgy kapcsoljuk a vezikulamembránhoz, hogy annak külső felszínéről lelógva lényegében teljes receptordetektáló és kötő aktivitásukat kifejthessék. Helyorientált keresztkötött sejtspecifikus markert tartalmazó viroszómák előállítására szolgáló előnyös eljárást DOTAP-viroszómákhoz a WO 97/41834 számú irat 1. példája ismertet. Az eljárás szerint a sejtspecifikus markereket detergens

jelenlétében előre kialakított foszfatidiletanolamin-kereszt kötő molekulákhoz, így például N-[4-(p-maleimidobutiril)]-foszfadilietanolaminhoz (MBP.PE) kapcsoljuk.

A lehető legjobb eredmény elérése érdekében hasznos, ha a rekonstitúció előtt óvatosan izoláljuk és megtisztítjuk a virális glikoproteineket, hogy így elkerüljük a proteolitikus emésztés vagy az intramolekuláris S-S kötések redukciója miatti inaktiválódást. Ennek megfelelően előnyös tehát, ha a konjugált markert, pl. marker-MBP.PE-t aktivált agarózmátrix, előnyös redukált Thiopropyl Sepharose 6B segítségével, affinitáskromatográfiás úton elválasztjuk a nem konjugált foszfatidiletanolamin-kereszt kötő molekuláktól (pl. MBP.PE-től). A megtisztított konjugált foszfatidiletanolamin-kereszt kötő-marker molekulakomplexekhez ezután hozzáadjuk a feloldott membránlipideket, fúziós peptideket és egyéb szükséges összetevőket tartalmazó detergens-oldatot, mielőtt kialakítanánk belőlük a kationos viroszómákat.

Hasznos, ha a viroszómák előállítására előtt a bifunkciós kereszt kötőt külön lépésben kapcsoljuk össze a foszfolipiddel és a sejtspecifikus markerrel. Így jobban kontrollálhatjuk és optimalizálhatjuk a viroszómamembránok felszíni sűrűségét, különös tekintettel a hozzákapcsolt sejtspecifikus markerek számára. Fontos, hogy fokozottan kontrollálni tudjuk a membránba ágyazott vagy a membránhoz kapcsolt fehérjemolekulák koncentrációját, mivel ha felborul a fúziós peptidek (pl. hemagglutinin) és a sejtspecifikus markerek (pl. antitest Fab'-fragmensek) aránya a

viroszómamembránban, akkor csökkenthetnek vagy el is tűnhetnek a szelektív tulajdonságok és ez - extrém esetben - a vezikulák összetapadásához és kicsapódásához is vezethet.

A WO 97/41834 számú irat részletesen tárgyalja, hogy miért hasznosabb sejtspecifikus markerként teljes antitestmolekulák helyett F(ab')₂- vagy Fab'-fragmenseket alkalmazni. A találmány szerinti sejtspecifikus viroszómák a membránban lévő sejtspecifikus markereknek köszönhetően szelektíven viselkednek a különböző sejttípusokkal szemben, és a virális fuziogén peptid, pl. hemagglutinin miatt erőteljesen képesek az endocitózisos sejtpenetrációra. A tumorasszociált antigéneket, így például TAG72-t, CEA-t, 17-1A-t, CA 19-9-et, vagy a leukémiaasszociált antigéneket, így például CD10-et (CALLA = Common Acute Lymphocytic Leukemia Antigen; "közös akut limfocitikus leukémia-antigén") és CD20-at felismerő Fab'-fragmenseket tartalmazó viroszómák szelektíven, azaz preferenciát mutatva kötődnek a fenti antigéneket felszínükön hordozó tumoros vagy leukémiás sejtekhez.

Az új vezikulák vagy viroszómák különösen alkalmasak bármilyen negatív töltésű anyag, előnyösen genetikai anyag célhelyekre, különösen állati és humán sejtekbe és szövetekbe történő bevitelére, *in vitro* és *in vivo*. Ki kell hangsúlyozni, hogy az új viroszómák nem csak proliferáló, azaz replikálódó sejtekbe képesek bejutni, hanem nem proliferáló, nyugvó sejtekbe is, így széles körben használhatók a biokémia, a gyógyszerészet és az orvostudományok területén, akár kutatási és/vagy diagnosztikai eszközként,

akár gyógyszerként. A találmány szerinti viroszómák kompként történő alkalmazása citotoxikus anyagok vagy nukleinsavak bevitelére alkalmassá teszi őket sokféle patológiás állapotban történő alkalmazásra, így például vírusfertőzések, rákbetegségek, tumorok, leukémiák vagy más betegségek esetében, ezen belül olyan betegségek esetében, amelyeket genetikai hibák okoznak és amelyeket a találmány szerinti viroszómákat alkalmazó génterápiás eljárásokkal esetleg kezelni lehet.

A találmány szerinti viroszómák alkalmazhatók *in vitro* és *in vivo* is. Számos neuroplazma, így például akut és krónikus leukémiák kezelésénél például csontvelőtisztítást végeznek. A csontvelőt jelenleg többféle hatóanyag, így például immunológiai reagensek és kemoterápiás szerek segítségével tisztítják meg a leukémiás sejtektől. Egy, leukémiás sejteknek növekedési előnyt biztosító onkogén ellen irányított és viroszómákba csomagolt ODN terápiásan hasznosnak fog bizonyulni és ami még fontosabb, szelektívebben fogja eltávolítani a leukémiás sejteket, mint a hagyományos kemoterápiás szerek, miközben kíméli a normál progenitorsejteket.

Gyógyszerként való alkalmazáshoz a találmány szerinti viroszómákat beépíthetjük gyógyászati készítményekbe, amelyek tartalmaznak még szokásos adalékokat és gyógyászatban alkalmazható hordozókat. A gyógyászati készítményt előnyösen injekciós oldat formájában készítjük el, de bizonyos alkalmazásokhoz más típusú készítmények, pl. tópiikus vagy

szisztémás alkalmazású emulziók, krémek, zselék vagy kenőcsök is hasznosak lehetnek.

A találmány tárgyát képezi tehát a találmány szerinti viroszómák gyógyászati készítmények előállítására történő alkalmazása is, amely gyógyászati készítmények olyan állatok vagy emberek profilaktikus és/vagy terápiás kezelésére alkalmasak, akikre az ilyen kezelés jó hatással lehet. A találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti viroszómák alkalmazása *in vitro* és *in vivo* diagnosztikai reagenskészlet előállítására.

A találmány szerinti vezikulákat előnyösen egy olyan eljárással állítjuk elő, amely analóg a WO 97/41834 számú irat 1-3. és 6. példájában ismertetett, DOTAP-viroszómák előállítására szolgáló eljárással, azzal a kivétellel, hogy a DOTAP helyett DOSPER-t alkalmazunk, és hogy a DOSPER koncentrációját a végleges viroszómamembránban a későbbiekben ismertetettek szerint megfelelően be kell állítani, különös tekintettel arra, hogy ne haladja meg a viroszóma összlipidtartalmának 30 tömeg%-át. A találmány szerinti viroszómák előállítására szolgáló eljárás alapvetően az alábbi lépésekből áll:

a) előállítunk egy pufferoldatot, amely tartalmaz egy nemionos detergenst, továbbá DOSPER-t és egyéb lipideket, és legalább egy aktív fuziogén peptidet, amely nem Sendai-vírusból származó hemagglutinin, és amelynek hatására a célsejt receptorközvetített fagocitózis vagy endocitózis révén internalizálja a vezikulákat;

b) úgy állítjuk be a lipidkoncentrációt, hogy a DOSPER koncentrációja az összes membránlipid tömegéhez viszonyítva 5-30% legyen, az említett egyéb lipidek - foszfatidilkolin (PC) vagy annak egy származéka és adott esetben foszfatidiletanolamin (PE) és/vagy a DOSPER-től eltérő kationos lipidek - aránya pedig 95-70 tömeg% legyen; és

c) dialízissel vagy mikrohordozó gyöngyöket tartalmazó oldattal való kezeléssel eltávolítjuk a detergenst, amelynek eredményeként kialakulnak az említett pozitív töltésű lipid-kettősréteg vezikulák; és előnyösen

d) beépítjük a vezikulákba egy célsejtekbe bejuttatni kívánt hatóanyag vagy anyag egy adott mennyiségét, amelyben a kérdéses hatóanyag vagy anyag előnyösen negatív töltésű és különösen az alábbiak bármelyike: egy festék, egy nyomkövető anyag, egy kozmetikai hatóanyag, egy gyógyászatiilag vagy biológiailag aktív anyag és egy nukleinsavanyag.

A találmány egy másik megvalósítási módjában, amely a viroszómák *in vivo* alkalmazásaihoz előnyös, egy megfelelő bifunkciós keresztkötőt alkalmazunk arra, hogy a vezikulamembránhoz irreverzibilisen hozzákapcsoljunk egy sejtspecifikus markert. A sejtspecifikus marker egy olyan sejtreceptorra specifikus, amely a viroszóma adott sejthez való szelektív kötődéséért felelős, és olyan módon kapcsoljuk hozzá a keresztkötőhöz, hogy biológiailag teljesen aktív maradjon. A keresztkötőt előnyösen egy előre kialakított molekulakomplex formájában alkalmazzuk, amelyben a keresztkötőt kovalensen foszfatidiletanolaminhoz és egy

sejtspecifikus markerhez kapcsoljuk, amint ezt a bejelentéskor benyújtott a szabadalmi igénypontokban definiáltuk.

A leírás szerinti értelemben a "fuziogén peptid" olyan peptid vagy fehérje, amely fúziós reakciót indukál és/vagy segít elő a viroszómamembrán és a célsejt egy lipidmembránja között. A találmány legtöbb megvalósítási módjában ez egy, a fúziós peptidet tartalmazó virális tüske-glikoprotein, előnyösen a virális felszíni tüskék teljes hemagglutinin-trimerje, annak egy monomerje, vagy egy vagy mindkét elhasított alegység, a HA1- és HA2-glikoproteinek, amelyek tartalmazzák a funkcióképes fúziós peptidet. A találmány egy másik megvalósítási módjában a fuziogén peptid magát a tiszta fúziós peptidet jelenti, akár természetes forrásból izolálva, akár szintetikus úton előállítva. A találmány egy különösen előnyös megvalósítási módjában a fúziós peptidet tartalmazó polipeptidek influenzavírus hemagglutininek, pl. az A-H1N1 altípusú hemagglutinin.

A találmány szerinti viroszómákhoz influenzavírusból származó hemagglutinin helyett vagy mellett más vírusokból származó hemagglutinineket is alkalmazhatunk fúziós peptidként (fehérjeként), feltéve hogy lényegében ugyanolyan pH-közvetített sejtpenetrációs mechanizmussal működnek, mint az influenzavírus hemagglutinin. Az ilyen hemagglutininek származhatnak például rhabdovírusból, III. típusú parainfluenzavírusból, Semliki Forest vírusból és togavírusból, ahogy azt a WO 97/41834 számú irat feltárja.

A "keresztköttő" olyan heterobifunkciós szerves molekula, amely hozzá tud kapcsolódni a találmány szerint előállított vezikulákhoz és polipeptideket tud kötni. A találmány egy előnyös megvalósítási módjában a molekula tartalmaz egy N-hidroxiszukcinimid-csoportot, amellyel a foszfatidiletanolamin aminocsoportjához kapcsolódik, és egy maleimidocsoportot egy sejtspecifikus marker, így például egy monoklonális antitestfragmens konjugálásához. Megfelelő keresztköttők például a szukcinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciklohexán-1-karboxilát, az m-maleimidobenzoil-N-hidroxiszukcinimidészter, az m-maleimidobenzoil-N-hidroxiszulfoszukcinimidészter, a szukcinimidil-4(p-maleimidofenil)-butirát, a szulfoszukcinimidil-4(p-maleimidofenil)-butirát; a keresztköttő lehet továbbá olyan molekula is, amely tartalmaz egy N-hidroxiszukcinimid-csoportot és a markerekhez, pl. citokinekhez való kapcsoláshoz egy fotoaktiválható azidocsoportot - ilyen molekulák például az N-hidroxiszukcinimidilszuberát (NHS-SA), az N-hidroxiszukcinimidil-4-azidobenzoát (HASAB), az N-hidroxiszukcinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)-hexanoát (SANPAH), és az N-szulfoszukcinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)-hexanoát. A keresztköttőt előnyösen egy előre kialakított, lipidet és keresztköttőt és sejtspecifikus markert tartalmazó molekulakomplex formájában alkalmazzuk.

A "sejtspecifikus fehérje" vagy "sejtspecifikus marker" olyan fehérje, amely képes a keresztköttőhöz, illetve a keresztköttő-lipid komplexhez kapcsolódni, továbbá képes célsejtek receptorához is kötődni. A találmány egy elő-

nyös megvalósítási módjában ez a molekula egy monoklonális antitest, egy antitestfragmens, egy citokin vagy egy növekedési faktor. A sejtspecifikus marker a célsejtek szelektív detektálására és megkötésére szolgál és ezáltal fokozza a viroszómamembránban egyidejűleg jelenlévő fuziogén peptid hatását. Előnyös antitestfragmensek az F(ab')₂- és Fab'-fragmensek, a sejtspecifikus markerek pedig lehetnek interleukinek és más citokinek is, különösen az alábbi táblázatban felsoroltak.

1. táblázat

Citokinek (nemzetközi rövidítések)			
BDNF	IFN α	MIP-1 α	PDGF
CNTF	IFN β	MIP-1 β	PF-4
EGF	IFN γ	MIP-2	RANTES
Epo	IL-1 - IL-5	NGF	SCF
FGF	LIF	NT-3	TGF α
G-CSF	LT (TNF β)	NT-4	TGF β
GM-CSF	MCP-1 - MCP-3	OSM	TNF α
1-309/TCA-3	M-CSF	PBP	Tpo
γ IP-10	MIF	PBSF	jVEGF

A leírás szerinti értelemben a "kationos lipidek" olyan szerves molekulák, amelyek tartalmazznak egy kationos komponenst és egy apoláris farkat - úgynevezett fej-farok amfifilek; ilyen például az N-[(1,2,3-dioleoiloxi)-propil]-

N,N,N-trimetilammóniummetilklorid (DOTMA) [Felgner és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417 (1987)], az N-[(1,2,3-dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilammónium-metilszulfát (DOTAP); vagy az N-t-acetil-N'-tetradecil-3-tetradecilaminopropionamid [Ruysschaert és mtsai., Biochem. Biophys. Res. Commun. 203, 1622-1628 (1994)]. Ellenkező értelmű utalás hiányában idetartoznak az alábbiakban definiált polikationos lipidek is.

A "polikationos lipidek" olyan szerves molekulák, amelyek tartalmazznak egy polikationos komponenst és egy apoláris farkat - ilyen például lipospermin: 1,3-dipalmitoil-2-foszfatidiletanolamido-spermin (DPPEs) és dioktadecilamidoglicil-spermin (DOGS) [Behr és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6986 (1989)]; 2,3-dioleoiloxi-N-[2(sperminkarboxamido)-etil]-N,N-dimetil-1-propánamínium-trifluoracetát (DOSPA); 1,3-dioleoiloxi-2-(6-karboxi-seprmil)-propilamid (DOSPER); N,N,N',N'-tetrametil-N,N'-bisz(2-hidroxietil)-2,3-dioleoiloxi-1,4-butándiammónium-jodid (THDOB).

Fontos, hogy minden találmány szerinti virooszóma tartalmazzon DOSPER-t, valamint egy vagy több olyan természetes vagy szintetikus lipidet, amelyek pozitív töltésűek vagy semlegesek. A "pozitív töltésű" azt jelenti, hogy a lipidnek fiziológiás pH-n nettó pozitív töltése van. A "pozitív töltésű" lipidek, membránok vagy virooszómák tehát olyan lipidek, membránok vagy virooszómák, amelyeknek fiziológiás pH-n nettó pozitív töltésük van. A "semleges lipidek" fiziológiás pH-n nem mutatnak semmilyen nettó töl-

tést; ide tartoznak például a koleszterin és származékai és/vagy az ikerionos típusú foszfolipidek, amelyekben a molekulán belül vannak pozitív és negatív töltésű részek, amelyek sztöchiometrikusan semlegesítik egymás töltését.

A leírás szerinti értelemben a "negatív töltésű anyag" bármilyen kívánt hatóanyag vagy anyag lehet, amelynek fiziológiás pH-n nettó negatív töltése van.

A leírás szerinti értelemben a "kívánt hatóanyag vagy anyag" lehet bármilyen kémiai anyag, vegyület vagy vegyületelegy, amely kozmetikai, diagnosztikai, orvosi vagy egyéb tudományos célra alkalmazható. Ilyen anyagok például az *in vitro* és *in vivo* analitikailag mérhető anyagok, így például festékek, fluoreszcens festékek, radioaktívan vagy egyéb módon jelölt vegyületek, nyomkövető vagy marker molekulák; ide tartoznak még fehérje vagy nem fehérje típusú hatóanyagok, vagy bármely egyéb, gyógyászatilag vagy biológiailag aktív anyagok, különösen hagyományos vírusellenes vagy rákellenes szerek, továbbá a leírásban definiált nukleinsavanyagok is. Mivel a találmány szerinti viroszómák fiziológiás pH-n pozitív töltésűek, előnyös ha semleges vagy negatív töltésű kívánt hatóanyagokat vagy anyagokat töltünk beléjük, mivel ezek esetében lesz a leghatékonyabb és a legstabilabb a viroszómába épülés.

A leírás szerinti értelemben a "nukleinsavak" vagy "genetikai anyagok" lehetnek rövidláncú DNS-ek vagy RNS-ek, dezoxiribonukleotidok, oligodezoxiribonukleotidok, oligodezoxiribonukleotid-szelenoátok, oligodezoxiribonukleotid-foszforotioátok (OPT), oligodezoxiribonukleotid-foszforami-

dátok, oligodezoxiribonukleotid-metilfoszfónátok, peptid-nukleinsavak (PNS), ribonukleotidok, oligoribonukleotidok, oligoribonukleotid-foszfotioátok, 2'-Ome-oligoribonukleotid-foszfátok, 2'-Ome-oligoribonukleotid-foszfotioátok, ribozimek (enzimaktivitású RNS-molekulák), gének, plazmidok és vektorok (klónozó vektorok).

A leírás szerinti értelemben a "viroszómák" - legegyszerűbb formájukban - kettősrétegű membránból álló liposzóma-vezikulák, amelyek kationos lipidekből és egy belső - előnyösen vizes - térből állnak, amely vezikulákban a membrán virális fehérjét, előnyösen virális glikoproteineket is tartalmaz. A találmány egy előnyös megvalósítási módjában a virális fehérjék tartalmaznak legalább egy fuziogén peptidet vagy fehérjét, amely teljes biológiai fúziós aktivitással rendelkezik - ilyenek különösen az influenza-A (pl. A/Singapore) vírus hemagglutinin és/vagy neuraminidáz nevű tüske-glikoproteinjei. Nyilvánvaló, hogy a vírusfehérjék közé tartoznak az influenzavírus fúziós peptidjének megfelelő, vagy azzal egyező, szintetikus úton előállított és a leírásban ismertetett aminosavszekvenciák is. A membránlipidek a fentiekben definiált kationos lipidekből állnak, de adott esetben más természetes és/vagy szintetikus lipideket, előnyösen foszfolipideket, így például foszfatidilkolint (PC) és foszfatidiletanolamint (PE) is tartalmazhatnak.

Bár a találmány szerinti kationos viroszómák sok esetben - különösen *in vitro* sejttenyésztési kísérletekben - sikeresen alkalmazhatók anélkül is, hogy a membrán

sejtspecifikus markereket tartalmazna, *in vivo* alkalmazások esetén különösen előnyös, ha a fentiekén kívül a membránban tartalmazznak még legalább egy, fent definiált sejt-specifikus markert is. Elektronmikroszkóppal és dinamikus fényszórás alapján meghatároztuk a vezikulák átlagos átmérőjét, amely 120 és 180 nm között mozog.

Ha a találmány szerinti kationos viroszómákat hordozóként alkalmazzuk kívánt hatóanyagokhoz vagy anyagokhoz, ezen belül genetikai anyagokhoz, megelőzhetjük vagy legalábbis nagy mértékben csökkenthetjük a toxicitás okozta nemkívánatos mellékhatásokat. Ez a jótékony hatás annak köszönhető, hogy a találmány szerinti kationos viroszómák az eddig ismert liposzómákkal vagy viroszómákkal összehasonlítva sokkal nagyobb aktivitással rendelkeznek és sokkal nagyobb hatásfokkal juttatják be a bennük lévő anyagot, különösen negatív töltésű anyagot, így például antiszensz oligonukleotidokat a célsejtekbe, és ami még fontosabb, a célsejt jóval nagyobb mértékben expresszálja a transzfektált nukleinsavanyagot.

A találmány tárgyát képezik tehát az 1. szabadalmi igénypontban definiált DOSPER-viroszómák és a 2-11. szabadalmi igénypontokban további megvalósítási módokként definiált változatok. A találmány tárgyát képezi továbbá az új viroszómákat és megfelelő hordozót tartalmazó készítmény a például a 12. szabadalmi igénypontban definiált különböző alkalmazásokra.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás az új viroszómák előállítására, ahogy azt a 13. szabadalmi igénypont definiálja, valamint az eljárás 14-24. szabadalmi igénypontokban definiált változatai.

A találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti viroszómák alkalmazásaira szolgáló, egyes még konkrétabb eljárásokra vonatkozó kitanítás és szabadalmi igény, ahogy azt a 25-29. szabadalmi igénypontok definiálják.

A találmány jobb megértése érdekében az alábbiakban példákat ismertetünk. A példák csak a szemléltetést szolgálják, és semmilyen módon nem korlátozzák a találmány oldalmi körét.

PÉLDÁK

1. példa

DOSPER-viroszómák előállítása teljes fúziós aktivitású, influenzavírusból származó virális hemagglutinin-trimerekkel

Az influenzavírus A/Singapore/6/86-os törzséből származó hemagglutinin (HA) a Skehel és Schild [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 968-972 (1971)] által leírt eljárás szerint izoláltuk. Röviden a következőképpen jártunk el. A vírust tyúktojások allantoinüregében szaporítottuk, majd szacharózgradiensben kétszeri ultracentrifugálással tisztítottuk. A tisztított vírust 7,9 mg/ml NaCl-ot, 4,4 mg/ml trinátriumcitrát-2H₂O-t, 2,1 mg/ml 2-morfolino-etánszulfonsavat és 1,2 mg/ml N-hidroxietil-piperazin-N'-2-etánszulfonsavat tartalmazó pufferben (pH 7,3) stabilizáltuk. 53 ml, 345 µg/ml HA-t tartalmazó vírusszuspenziót

ultracentrifugálással (100 000 × g, 10 perc) kiülepítettünk. Az influenzavírus-pellethez 145 mM NaCl-ot, 2,5 mM HEPES-t és 54 mg/ml nemionos detergenst [oktaetilénglikolmonododeciléter (OEG = C12E8)] tartalmazó puffert (pH 7,4) (7,7 ml) adtunk. A pelletet ultraszonikálással (2 perc, szobahőmérséklet) teljesen feloldottuk. Az oldatot 100 000 × g-n 1 órán át ultracentrifugáltuk. A kapott felülúszó szolubilizált HA-trimert (1,635 mg HA/ml) és nyomokban neuraminidázt tartalmazott. 3,7 ml felülúszóhoz (6 mg HA) 0,5-2 mg DOSPER-t és 5,5-4 mg dioleoilfoszfadilikolint (DOPC) (összesen 6 mg lipidet) adtunk, majd feloldottuk. Az oldatot 0,2 µm-es szűrőn sterilizáltuk, majd 1,15 g steril mikrohordozó gyöngyöt, előnyösen Biobeads SM-2-t tartalmazó üvegedénybe pipettáztuk. Az edényt REAX2 rázógépben (gyártó: Heidolph; Kelheim, Németország) 1 órán át rázattuk. Ezt a lépést szükség esetén akár háromszor is megismételtük 0,58 mg Biobeads-gyönggyel. Ezt követően egy kissé átlátszó DOSPER-viroszóma oldatot kaptunk.

A legjobb eredményeket azokkal a viroszómakészítésekkel értük el, amelyekben a lipidek aránya a következő volt: 4,5 mg DOPC : 1,5 mg DOSPER (a DOSPER aránya az összes lipid tömegéhez képest 25%). Ha a DOSPER-t magasabb koncentrációkban, pl. 30-35 tömeg%-ot meghaladó mennyiségben alkalmaztuk, a detergens eltávolítása után nem képződtek megfelelő viroszómák.

A DOPC-ot részben helyettesíthetjük PE-ve. (foszfatidiletanolamin) és/vagy más kationos lipidekkel, így például DOTAP-pal vagy DOSPÁ-val anélkül, hogy a transzfekciós aktivitás lényegesen csökkenne.

Foszforotioát oligodezoxiribonukleotidok beépítése DOSPER-viroszómákba:

Példaként az L-myc gén antiszensz vagy szensz oligodezoxiribonukleotid-foszforotioátjait (OPT) alkalmaztuk a kationos viroszómák nagy transzfekciós hatékonyságának demonstrálására. Foszforamidát-reakció (Microsynth GmbH; Balgach, Svájc) segítségével 5'-FITC-OPT-eket állítottunk elő. Antiszensz OPT-ként az 5'-FITC-GTAGTCCATGTCCGC-3' pentadekamert, szensz OPT-ként pedig az 5'-FITC-GCGGACATGGACTAC-3' pentadekamert alkalmaztuk. Megszintetizáltunk egy kevert szekvenciakontroll (msc) OPT-t is, amely ugyanolyan hosszúságú volt, mint az antiszensz és szensz OPT-k.

1-1 ml DOSPER-viroszómát adtunk a következőkhöz:

- a) 2 mg antiszensz FITC-OPT (1,3 μ mol)
- b) 3,4 mg szensz FITC-OPT (1,3 μ mol) és
- c) 3,1 mg msc FITC-OPT (1,3 μ mol).

A FITC-OPT-eket feloldottuk, majd az oldatokat 2 percig 26°C-on szonikáltuk. A be nem csomagolt FITC-OPT-eket High Load Superdex 200 oszlopon (Pharmacia, Svédország), gélfiltrálással választottuk el a viroszómáktól. Az oszlopot steril PBS-sel ekvilibráltuk. A DOSPER-viroszómákat és a becsomagolt FITC-OPT-eket tartalmazó holtterfogatfrakciókat PBS-sel eluáltuk, majd összegyűjtöttük. A

viroszómába csomagolt FITC-OPT koncentrációját úgy határoztuk meg, hogy a viroszómákat először teljesen feloldottuk 0,1% (térfogat%) Triton-X-100-at tartalmazó 0,1 M NaOH-ban, majd fluorometriával mértünk. A mérést úgy kalibráltuk, hogy a fenti detergensoldatban feloldott üres DOSPER-viroszómák fluoreszcenciáját nullának vettük.

Fab'-fragmensek viroszómákhoz kapcsolása előre kialakított foszfatidiletanolamin - bifunkciós keresztkötő molekulakomplexek segítségével

3 mg, egér monoklonális anti-CD10 (AntiCALLA) antitestből származó, frissen redukált Fab'-t feloldottunk 2,8 ml citrátpuffer-oldatban (100 mM NaCl, 40 mM citromsav, 35 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 2 mM EDTA, pH 5,5), majd hozzáadtuk a következő oldathoz: 0,524 mg N-[4-(p-maleimido-fenil)butiril]-foszfatidiletanolamin (MBP.PE), 0,5% n-oktil-oligo-oxietilént tartalmazó citrátpufferben (215 µl). Az elegyet óvatos kevertetés mellett 16 órán át, 4°C-on, nitrogénatmoszférában inkubáltuk. Az inkubálás után az MBP.PE-t 400 µl frissen redukált, duzzasztott Thiopropyl Sepharose 6B (Pharmacia, Svédország) alkalmazásával távolítottuk el. Az elegyet ezután 4 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd centrifugálással eltávolítottuk a Thiopropyl Sepharose 6B-t és a kapott oldat pH-ját 7,0-ra állítottuk. A semlegesített oldathoz OEG-et adtunk (54 mg/ml).

A fentiek szerint elkészített oldatokat hozzáadtuk a DOSPER-viroszómák előállításához alkalmazandó oldatokhoz. A Fab'-MBP.PE molekulák a viroszómák képződése során épülnek be a lipid-kettősrétegbe.

A DOSPER-viroszómákról készített mikrofényképek igazolják, hogy a vezikulák az előnyös egylamellás szerkezetet veszik fel, átlagos átmérőjük pedig a lézerfényszórás alapján körülbelül 120 és 180 nm közötti. Tisztán láthatók továbbá az influenzavírus HA-fehérje-tüskéi.

A találmány szerinti DOSPER-viroszómák teljes fuziogén aktivitását fluoreszcencia-kioltáson alapuló kvantitatív eljárással [Hoekstra és mtsai., *Biochemistry* 23, 5675-5681 (1984) és L. Lüscher és mtsai., *Arch. Virol.* 130, 317-326 (1993)] igazoltuk. DOSPER-viroszómák membránjába nagy sűrűségben oktadecil-rhodamin-B-klorid (R18) (gyártó: Molecular Probes Inc.; Eugene, Egyesült Államok) nevű fluoreszcens próbát vittünk be. Ezt úgy végeztük, hogy a fluoreszcens próbát tartalmazó vékony, száraz filmhez DOSPER-t és HA-t tartalmazó OEG ($C_{12}E_8$) pufferoldatot adtunk, majd a fluoreszcens próba feloldódása érdekében 5-10 percen át rázattuk. Ezt követően úgy folytattuk, ahogy az a "DOSPER-viroszómák előállítása..." című részben szerepel. A kioltó hatású rhodamin hígulását úgy mértük, hogy a rhodaminnal jelölt DOSPER-viroszómákat modell liposzómákkal inkubáltuk (DOSPER/DOPC : liposzóma-foszfolipid arány = 1:20). A fluoreszcenciát Perkin-Elmer 1000 típusú spektrofluoriméterben mértük, 560 nm gerjesztési és 590 nm emissziós hullámhossznál.

2. példa

A viroszómák sejtek általi felvétele

³H-jelölt plazmidok beépülése DOSPER-viroszómákba:

A nukleinsavanyagok viroszómákba történő bevitelét alapvetően háromféle eljárással végeztük:

1. Dialízis: A nukleinsavanyagokat a viroszómák képződése során csomagoljuk be, amikor dialízissel eltávolítjuk az Oktil-POE (gyártó: Alexis Corp.; Laeufelfingen, Svájc) detergenst.

2. Biobeads-gyöngyök: A nukleinsavanyagokat a viroszómák képződése során csomagoljuk be, amikor mikrohordozók, pl. Biobeads SM-2 gyöngyök segítségével eltávolítjuk az OEG detergenst.

3. Ultrasonikálás: A nukleinsavanyagokat kationos lipidekbe, előnyösen DOSPER-be csomagoljuk, majd a kapott, nukleinsavval töltött liposzómákat vagy lipidkomplexekeket, előnyösen DOSPER-liposzómákat vagy DOSPER-lipidkomplexekeket ultrasonikálással DOSPER-viroszómákhoz fuzionáltatjuk.

Mivel a legnagyobb mértékű beépülést a harmadik eljárás esetében tapasztaltuk, a legtöbb kísérlet esetében ezt a fúziós eljárást alkalmaztuk a nukleinsavanyagok viroszómákba csomagolásához.

A pGREEN-LANTERNTM-I (GIBCO-BRL) plazmidot ³H-metiltimidin jelenlétében termeltettük *E. coli*-ban, amelynek eredményeként radioaktívan jelölt plazmidokat kaptunk a transzfekciós hatékonyság pontos meghatározásához. A plazmid specifikus aktivitása $6,625 \times 10^{10}$ dpm/g volt (=29,84 mCi/g).

11,6 μg ^3H -jelölt plazmidot (17,5 μl) feloldottunk 480 μl HEPES-NaCl pufferben. 116 μg DOSPER-t (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) adtunk hozzá, majd a kapott elegyet 30 másodpercig ultraszonikáltuk, majd 15 percig pihentettük. A kezelés eredményeként plazmidot tartalmazó DOSPER-lipidkomplexek képződnek. A lipidkomplexek helyett hagyományos eljárásokkal előállíthatunk DOSPER-liposzómákat is, pl. úgy, hogy DOSPER-t és a plazmidot tartalmazó OEG-pufferoldatból dialízissel vagy detergenskötő mikrohordozókkal eltávolítjuk a detergenst, majd adott esetben szonikáljuk az elegyet, végül megkapjuk a plazmidokkal töltött DOSPER-liposzómákat.

A plazmiddal töltött lipidkomplexeket vagy liposzómákat tartalmazó oldathoz 93 μl (pl. az 1. példa szerint) előre előállított üres DOSPER-viroszómát adunk. Az elegyet 1 percig ultraszonikáljuk, amelynek révén a DOSPER-viroszómák fúzióra lépnek a liposzómákkal vagy lipidkomplexekkel és így a plazmidok bekerülnek a viroszómákba. A kívánt anyagok viroszómákba építésére szolgáló fenti eljárás alkalmazható nem nukleinsav típusú hatóanyagok vagy anyagok, előnyösen negatív töltésű anyagok beépítésére is.

^3H -jelölt plazmid transzfekciós hatékonyságának összehasonlítása DOSPER-viroszómákban és DOSPER-liposzómákban:

33 μg jelölt plazmid-DNS-t DOSPER-viroszómákba csomagoltunk, 11,7 μg -ot pedig előre kialakított DOSPER-liposzómákba. A DOSPER-viroszómákkal és DOSPER-liposzómákkal négy különböző adherens sejtet - HeLa, 293T, COS-1 és NIH3T3 -, valamint szuszpenziós tenyészetben szá-

porított sejteket - K562 és P3/NSI/1-Ag4-1 sejt vonalak - transzfektáltunk.

Mindegyik sejttípus esetében a következőképpen jártunk el. 5×10^5 sejtet 2, 4, 6 és 24 órán át, 37°C-on, 500 μ l (=0,5 ml) tápközegben, 25 μ l plazmidtartalmú DOSPER-viroszómával vagy plazmidtartalmú DOSPER-liposzómával inkubáltunk. A DOSPER-viroszómák és DOSPER-liposzómák hozzáadott mennyiségei 400-400 ng jelölt plazmidot tartalmaztak, amely 26 500 dpm radioaktivitásnak felelt meg (=100%). Az inkubálást követően a sejteket mostuk, lizáltuk, a felvett radioaktivitást pedig béta-számlálóban mértük.

Megvizsgáltuk, hogy a transzfekció időtartama (inkubálási idő) milyen hatással van a felvett plazmid-DNS mennyiségére. Az eredmények az 1-6. ábrákon láthatók. Az egyes ábrák esetében alkalmazott sejt vonalakat az ábrák rövid ismertetésénél foglaltuk össze. Az 1-6. ábrákon világosan látható, hogy a DOSPER-viroszómák a transzfekció szempontjából minden sejttípus esetében és mindegyik inkubálási idő vonatkozásában jobbak, mint a DOSPER-liposzómák. A DOSPER-liposzómák esetében a hosszabb, 6 órás és 24 órás inkubálás esetében csak minimális mértékben nőtt a DNS-felvétel, míg a DOSPER-viroszómák esetében az inkubálás időtartamának növelése jóval nagyobb DNS-felvételt eredményezett. Az eredmények arra utalnak, hogy a viroszómák HA-közvetített felvétele jóval hatékonyabb, mint a DOSPER-liposzómák felvétele, amelyet nem segítenek elő sejtreceptorokra specifikus virális kötőligandok. Érdekes, hogy a DOSPER-viroszómák esetében a 6-24 órás inkubálás nem eredményezett telítést a

DNS-beépülésben, hanem tovább emelkedett a DNS-felvétel, amely talán annak köszönhető, hogy a viroszómák receptorközvetített endocitózisakor a sejt felszínéről eltávolított membránreceptorok gyorsan pótlódnak. Általában azt tapasztaltuk, hogy az (egyrétegekben növő) adherens sejtvonalak transzfekciója nagyobb hatékonysággal történt, mint a szuszpenziós tenyészetben növő sejtvonalaké.

3. példa

Plazmidok időfüggő felvétele eukarióta sejtekben

A 2. példát egy másik ^3H -jelölt plazmiddal, a pcDNA3.1/HisB/lacZ-vel (gyártó: Invitrogen; Gronigen, Hollandia) is megismételtük. COS-1, K562, 293T és P3X63Ag8 sejtvonalakat a fenti plazmiddal töltött DOSPER-viroszómákkal transzfektáltunk, majd 2, 4 és 72 órán át inkubáltuk őket. Ebben a kísérletben nem végeztünk DOSPER-liposzómákkal való összehasonlítást.

Az eredmények a 7. ábrán láthatók. Ez alapján megállapítható, hogy az inkubálási idő növelése még tovább növelheti a jelölt plazmid sejtek általi felvételét, ha ehhez a találmány szerinti viroszómákat alkalmazzuk. Sőt, ha nukleinsavanyagok nagyhatékonyságú beviteléhez a találmány szerinti DOSPER-viroszómákat alkalmazzuk, az össze nukleinsav (pl. plazmid) 60-80%-át is bejuttathatjuk a kívánt célsejtekbe. Minden vizsgált sejtvonal összehasonlítható mértékben hajlamos volt a viroszómák, és így a plazmidok felvételére.

4. példa

DOSPER-viroszómák és DOTAP-viroszómák összehasonlítása

sa

A viroszómák az A-típusú influenzavírusnál már ismert, HA-indukált, receptorközvetített mechanizmus segítségével jutnak be az emlőssejtekbe. Korábban nem feltételeztük, hogy a viroszómamembrán lipid-kettősrétegének kémiai tulajdonságai fontos szerepet játszhatnak, ha a HA natív állapota és fuziogén aktivitása megfelelő szinten van tartva. Úgy hittük tehát, hogy a DOSPER-viroszómák és a DOTAP-viroszómák ugyanolyan transzfekciós hatékonysággal viszik be a nukleinsavanyagokat az emlőssejtekbe.

Meglepő módon azonban a DOSPER- és DOTAP-viroszómák transzfekciós hatékonyságának összehasonlítása céljából végzett kísérletek más eredményre vezettek, azaz nagymértékben eltértek attól, amit vártunk. A kísérleteket az 1. és 2. példában leírtak szerint végeztük azzal a kivétellel, hogy itt tríciummal jelölt pcDNA3.1/HisB/lacZ-plazmidot csomagoltunk be a transzfekcióhoz. A DOTAP-viroszómákat a WO 97/41834 számú irat 1. példájában foglaltaknak megfelelően állítottuk elő, a plazmid beépítését pedig a fentiek szerint végeztük, ugyanúgy, mint a DOSPER-viroszómák esetében. A DOTAP-viroszómákba ugyanolyan mennyiségű ^3H -jelölt plazmidot csomagoltunk be, mint a 2. példában a DOSPER-viroszómákba. A 293T, K562, Sp2 és HeLa sejtvonalakat ugyanolyan körülmények között inkubáltuk a DOSPER- és DOTAP-viroszómákkal, mint ahogy az a 2. példánál szerepel.

Az eredmények a 8-11. ábrákon láthatók. Tisztán látszik, hogy a DOSPER-viroszómák transzfekciós hatékonysága legalább kétszerese, sőt akár tízszerese is lehet a DOTAP-viroszómákénak. Különösen a szuszpenziós tenyészetekben növesztett sejtek, így például az Sp2 sejtvonal esetében (10. ábra) látható a legnagyobb mértékű különbség a transzfekciós hatékonyságban. Ennek oka egyelőre nem teljesen tisztázott, de legalábbis részben a két lipid különböző kémiai tulajdonságai okozhatják. A DOSPER-molekula poláris feje ugyanis négy szabad aminocsoportot tartalmaz, a DOTAP-molekula poláris feje viszont csak egy szabad aminocsoportot. Anélkül hogy ragaszkodnánk ehhez az elmélethez, feltételezzük tehát, hogy a negatív töltésű anyagok, így például plazmidok DOSPER-tartalmú viroszómákba történő csomagolása esetén több használható viroszóma keletkezik. A plazmid DOTAP-viroszómákba csomagolása esetén viszont esetleg nagyszámú defektív, és alacsony transzfekciós hatékonyságú vezikula képződhet. Egy másik hipotézis szerint - amelyet ugyancsak nem zárhatunk ki - a DOSPER a viroszómáknak a célsejtek sejtmembránhoz való kötődésekor fejthet ki segítő hatást.

Az eredmények tehát alátámasztják, hogy a leggyakrabban használt kationos lipiddel, a DOTAP-pal összehasonlítva a DOSPER nevű polikationos lipid alkalmazásakor meglepő módon megnő a transzfekciós hatékonyság.

5. példaGénexpresszió a találmány szerinti viroszómákkal történő transzfekció után

A 3. példában ismertetett kísérletekben szereplő célsejtekben, amelyekbe viroszómás transzfekció útján pcDNA3.1/HisB/lacZ plazmidot juttattunk, β -Gal ELISA reagenskészlet (gyártó: Boehringer Mannheim) segítségével elvégeztük a β -galaktozidáz expressziójának kvantitatív meghatározását. Ennek eredményei megerősítették, hogy nemcsak a transzfekciós hatékonyság volt nagyobb a viroszómákkal bejuttatott plazmidok esetében, mint a liposzómákkal bejuttatott plazmidok esetében, hanem a célsejtek általi expresszió is. Ha a plazmid célsejtekbe történő bejuttatásához DOSPER-liposzómák helyett DOSPER-viroszómákat alkalmaztunk, a β -galaktozidáz expressziójának mértéke húsz-negyvenszeresére nőtt (12. ábra).

Megfigyeltük azonban azt is, hogy a β -galaktozidáz expressziója nagymértékben függött a viroszómákban kialakuló plazmid koncentrációtól:

2. táblázatViroszóma-preparátumok összehasonlítása

	a viroszóma- csomagolt plaz- mid összmenyi- sége [μ g]	a DOSPER össz- mennyisége a viroszóma- csomagban [μ g]	a viroszóma- relatív száma [mesterséges egység]	plazmid/DOSPER arány [μ g/ μ g]
1. preparátum	0,4	6,45	100	0,062
2. preparátum	0,2	4,45	100	0,045
3. preparátum	0,4	8,9	200	0,045
4. preparátum	0,13	3,78	100	0,034
5. preparátum	0,4	11,35	300	0,035

A 2. preparátumban a viroszómák csak fele annyi plazmidot tartalmaznak, mint az 1. preparátumban, bár a viroszómák összmennyisége azonos.

Az 1. preparátum felel meg az előnyös viroszóma-preparátumnak, amelyet a legtöbb itt ismertetett kísérletben alkalmaztunk.

A 3. preparátum ugyanannyi plazmidot tartalmaz, azonban ez kétszerannyi viroszómában van elosztva.

A 4. preparátum azonos számú viroszómában még kevesebb plazmidot tartalmaz, mint az 1. és 2. preparátum.

Az 5. preparátum ugyanannyi plazmidot tartalmaz, mint az 1. és 3. preparátum, azonban ez a mennyiség háromszor annyi viroszómába van becsomagolva, mint az 1. preparátum esetében.

A 13. ábrán látható grafikonok igazolják, hogy a tapasztalati úton meghatározott előnyös DOSPER-viroszóma-készítmények meglehetősen optimálisnak bizonyultak. Az is látható továbbá, hogy a készítmények plazmidkoncentrációjának csökkentése (2., 3. és 4. preparátum) nem eredményezett nagyobb mértékű expressziót. Nem volt tehát tartható tovább az a hipotézis, hogyha a célsejteket az 1. preparátumhoz hasonló viroszóma-preparátumokkal transzfektálva töltöttjük, az esetleg gátolhatta volna az expressziót.

A leírásban alkalmazott rövidítések:

2'-OMe 2'-O-metil

CALLA közös akut limfocitikus leukémiaantigén

CAT klóramfenikol-acetiltranszferáz

dpm	dezintergrációs esemény per perc
DOSPER	1,3-dioleoiloxi-2-(6-karboxi-spermil)-propilamid
DOTAP	N-[(1,2,3-dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilammóniummetil-szulfát
FITC-OPT	fluoreszcein-izotiocianáttal jelölt oligodezoxiribonukleotid-foszforotioát
G418	Geneticin®-diszulfát (antibiotikus G418)
HA	hemagglutinin
MBP.PE	N-[4-(p-maleimido)-fenilbutiril]-foszfatidiletanolamin (egy keresztkötő-foszfolipid komplex)
msc	kevert szekvenciakontroll
NA	neuraminidáz
Oktil-POE	n-oktil-oligo-oxietilén
ODN	oligodezoxinukleotid
OEG	oktaetilénglikol-monododeciléter (C12E8)
OPT	oligodezoxiribonukleotid-foszforotioát
PC	foszfatidilkolin
PE	foszfatidiletanolamin
PNS	peptid-nukleinsav
SCLC	kissejtes tüdőrák
SV40	40-es majomvírus

SZEKVENCIALISTA

(210) 1

(211) 15

(212) DNS

(213) *Mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: az L-myc gén
antiszensz oligodezoxinukleotidja

(400) 1

gtagtccatg tccgc 15

(210) 2

(211) 15

(212) DNS

(213) *Mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A mesterséges szekvencia leírása: az L-myc gén
antiszensz oligodezoxinukleotidja

(400) 2

gcggacatgg actac 15

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Lipidvezikula, amely fiziológiás pH-n nettó pozitív töltéssel rendelkező, kétrétegű membránt tartalmaz, amely vezikula tartalmaz még legalább egy fuziogén peptidet, amely nem Sendai-vírusból származó hemagglutinin, amelynek hatására a célsejt receptorközvetített fagocitózis vagy endocitózis révén internalizálja a vezikulát, azzal jellemezve, hogy a vezikulamembrán a összes membránlipid tömegéhez viszonyítva 5-30%-ban 1,3-dioleoiloxi-2-(6-karboxi-spermil)-propilamidot (DOSPER) tartalmaz, 95-70 tömeg%-ban pedig egyéb lipideket, ezen belül foszfatidilkolint (PC) vagy annak egy származékát és adott esetben foszfatidiletanolamint (PE) és/vagy a DOSPER-től eltérő kationos lipideket.

2. Az 1. igénypont szerinti vezikula, amely tartalmaz még egy célsejtekbe bejuttatni kívánt hatóanyagot vagy anyagot, amely hatóanyag vagy anyag előnyösen negatív töltésű és különösen az alábbiak bármelyike: egy festék, egy nyomkövető anyag, egy kozmetikai hatóanyag, egy gyógyszer-tilag vagy biológiailag aktív anyag és egy nukleinsavanyag.

3. A 2. igénypont szerinti vezikula, amelyben a kívánt hatóanyag vagy anyag egy nukleinsavanyag, amely az alábbiak bármelyike: rövidláncú DNS vagy RNS, dezoxiribonukleotidok, oligodezoxiribonukleotidok, oligodezoxiribonukleotid-szelenoátok, oligodezoxiribonukleotid-foszforatioátok, oligodezoxiribonukleotid-foszforamidátok, oligodezoxiribonukleotid-metilfoszfónátok, peptid-nukleinsavak,

ribonukleotidok, oligoribonukleotidok, oligoribonukleotid-foszfotioátok, 2'-Ome-oligoribonukleotid-foszfátok, 2'-Ome-oligoribonukleotid-foszfotioátok, ribozimek, gének, plazmidok és vektorok.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti vezikula, amelyben a kívánt hatóanyag vagy anyag egy nukleinsavanyag, és a vezikula 1 μg DOSPER-enként 0,03-0,01, előnyösen 0,045-0,065 μg nukleinsavanyag mennyiségben tartalmazza a nukleinsavanyagot.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vezikula, amelynek átlagos átmérője 120-180 nm.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti vezikula, amely tartalmaz még legalább egy, a vezikulamembránhoz kapcsoltsó sejtspecifikus markert.

7. A 6. igénypont szerinti vezikula, amelyben a vezikulamembrán tartalmaz még foszfatidiletanolamint (PE) és egy bifunkciós keresztkötőt, amely egyik kötőhelyével a PE egy szabad aminocsoportjához kapcsolódik, másik kötőhelyével pedig a sejtspecifikus markerhez.

8. A 6. vagy 7. igénypont szerinti vezikula, amelyben a sejtspecifikus marker egy biológiailag aktív fehérje, amely célsejtek receptoraihoz kötődik és az alábbiak bármelyike: egy antitest, egy antitestfragmens, egy citokin és egy növekedési faktor.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti vezikula, amelyben a hemagglutinin az alábbi vírusok bármelyikéből származik: rhabdovírus, III. típusú parainfluenzavírus, Semliki Forest vírus és togavírus.

10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti vezikula, amelyben a vezikulamembrán az összes membránlipid tömegéhez viszonyítva 10-30, előnyösen 20-25%-os koncentrációban DOSPER-t tartalmaz.

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti vezikula, amelyben a vezikulamembrán az összes membránlipid tömegéhez viszonyítva 25%-os mennyiségben DOSPER-t tartalmaz és 75%-os mennyiségben PC-t, előnyösen dioleoil-foszfátidilkolint (DOPC).

12. Készítmény, amely az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti, egynél több vezikulát tartalmaz egy megfelelő hordozóban, kozmetikai, gyógyászati vagy diagnosztikai alkalmazásokra.

13. Eljárás az 1. igénypont szerinti lipidvezikula előállítására, *azzal jellemezve, hogy:*

a) előállítunk egy pufferoldatot, amely tartalmaz egy nemionos detergenst, továbbá DOSPER-t és egyéb lipideket, és legalább egy aktív fuziogén peptidet, amely nem-Sendai-vírusból származó hemagglutinin, és amelynek hatására a célsejt receptorközvetített fagocitózis vagy endocitózis révén internalizálja a vezikulákat;

b) úgy állítjuk be a lipidkoncentrációt, hogy a DOSPER koncentrációja az összes membránlipid tömegéhez viszonyítva 5-30% legyen, az egyéb lipidek - foszfátidilkolin (PC) vagy annak egy származéka és adott esetben foszfátidiletanolamin (PE) és/vagy a DOSPER-től eltérő kationos lipidek - aránya pedig 95-70 tömeg% legyen; és

c) dialízissal vagy mikrohordozó gyöngyöket tartalmazó oldattal való kezeléssel eltávolítjuk a detergenst, miáltal kialakítjuk a pozitív töltésű lipid-kettősréteg vezikulákat.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy beépítjük a vezikulákba egy célsejtekbe bejuttatni kívánt hatóanyag vagy anyag egy adott mennyiségét, amelyben a kérdéses hatóanyag vagy anyag előnyösen negatív töltésű és különösen az alábbiak bármelyike: egy festék, egy nyomkövető anyag, egy kozmetikai hatóanyag, egy gyógyászatilag vagy biológiailag aktív anyag és egy nukleinsavanyag.

15. A 13. vagy 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy előállítunk foszfatidiletanolaminból, egy bifunkciós keresztkötőből és egy sejtspecifikus markerből álló konjugált molekulakomplexeket oly módon, hogy a bifunkciós keresztkötő egyik kötőhelyével a PE egy szabad aminocsoportjához kapcsolódik, másik kötőhelyével pedig a sejtspecifikus marker egy tiolcsoportjához kapcsolódik, eltávolítjuk a nem konjugált anyagot és hozzáadjuk a molekulakomplexeket az a) lépésben előállított oldathoz.

16. A 14. vagy 15. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kívánt hatóanyag vagy anyag beépítését úgy végezzük, hogy a kívánt hatóanyagot vagy anyagot hozzáadjuk az a) lépésben előállított oldathoz, majd a c) lépésben kialakítjuk a hatóanyagot vagy anyagot tartalmazó vezikulákat.

17. A 14. vagy 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kívánt hatóanyag vagy anyag beépítését a vezikulákba úgy végezzük, hogy a c) lépésben előállított vezikulákhoz hozzáadjuk a kívánt hatóanyagot vagy anyagot, majd az így kapott elegyet szonikáljuk, hogy így beépítsük a hatóanyagot vagy anyagot a vezikulákba, majd a be nem épült anyagot - előnyösen gélfiltrálással - eltávolítjuk.

17. A 14. vagy 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kívánt hatóanyag vagy anyag beépítését a vezikulákba úgy végezzük, hogy a c) lépésben előállított vezikulákhoz a kívánt hatóanyagot vagy anyagot tartalmazó pozitív töltésű lipidkomplexeket vagy liposzómákat adunk, majd az így kapott elegyet szonikáljuk, hogy így összefuzionáljuk a lipidkomplexeket vagy liposzómákat a vezikulákkal és bevigyük a hatóanyagot vagy anyagot a vezikulákba.

19. A 18. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a pozitív töltésű lipidkomplexei vagy liposzómák teljes lipitartalmukhoz viszonyítva 50-100 tömeg%-ban DOSPER-lipidet tartalmaznak.

20. A 15-19. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy sejtspecifikus markerként az alábbiak bármelyikét alkalmazzuk: egy antitest, egy antitest-fragmens, egy citokin és egy növekedési faktor.

21. A 14-20. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kívánt hatóanyagként vagy anyagként egy nukleinsavanyagot alkalmazunk, amely az alábbiak bármelyike: rövidláncú DNS vagy RNS, dezoxiribonukleotidok, oligodezoxiribonukleotidok, oligodezoxiribonukleotid-

szelenoátok, oligodezoxiribonukleotid-foszforotioátok, oligodezoxiribonukleotid-foszforamidátok, oligodezoxiribonukleotid-metilfoszfónátok, peptid-nukleinsavak, ribonukleotidok, oligoribonukleotidok, oligoribonukleotid-foszforotioátok, 2'-OMe-oligoribonukleotid-foszfátok, 2'-OMe-oligoribonukleotid-foszforotioátok, ribozimek, gének, plazmidok és vektorok.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a nukleinsavanyagot 0,03-0,01, előnyösen 0,045-0,065 µg nukleinsavanyag per 1 µg DOSPER-lipid koncentrációban építjük be a viroszómákba.

23. A 13-22. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy nemionos detergensként oktaetilén-glikol-monododecilétert ($C_{12}E_8$) () vagy n-oktil-oligooxietilént alkalmazunk.

24. A 15-23. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy keresztkötő szerként egy heterobifunkciós szerves molekulát alkalmazunk, amely tartalmaz legalább egy maleimido- és legalább egy karboxicsoportot, és előnyösen az alábbiak bármelyike: bisz-N-szukcinimidil-származékok és fotoaktiválható szukcinimidil-származékok.

25. Az 1. igénypont szerinti vezikula alkalmazása egy készítmény előállítására kozmetikai, diagnosztikai vagy orvosi felhasználásokhoz, különösen egy kívánt hatóanyag vagy anyag nyugvó vagy proliferáló célsejtekbe történő bevitelére.

26. A 25. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a célsejteket *in vitro* a vezikulákkal inkubáljuk és az inkubált célsejteket adott esetben beviszünk egy élő szervezetbe *in vivo*.

27. A 25. vagy 26. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a célsejt az alábbiak bármelyike: rákos sejtek, leukémiás sejtek és vírusfertőzött sejtek.

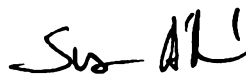
28. A 27. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a vezikulákkal történő inkubálás során csökken a célsejtek metabolikus vagy proliferatív aktivitása.

29. A 25-28. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a kívánt hatóanyag vagy anyag egy nukleinsavanyag, amely tartalmaz legalább egy antiszensz oligonukleotidot, előnyösen egy olyan antiszensz oligonukleotidot, amely protoonkogén- vagy onkogén-kódolt mRNS-re specifikus.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



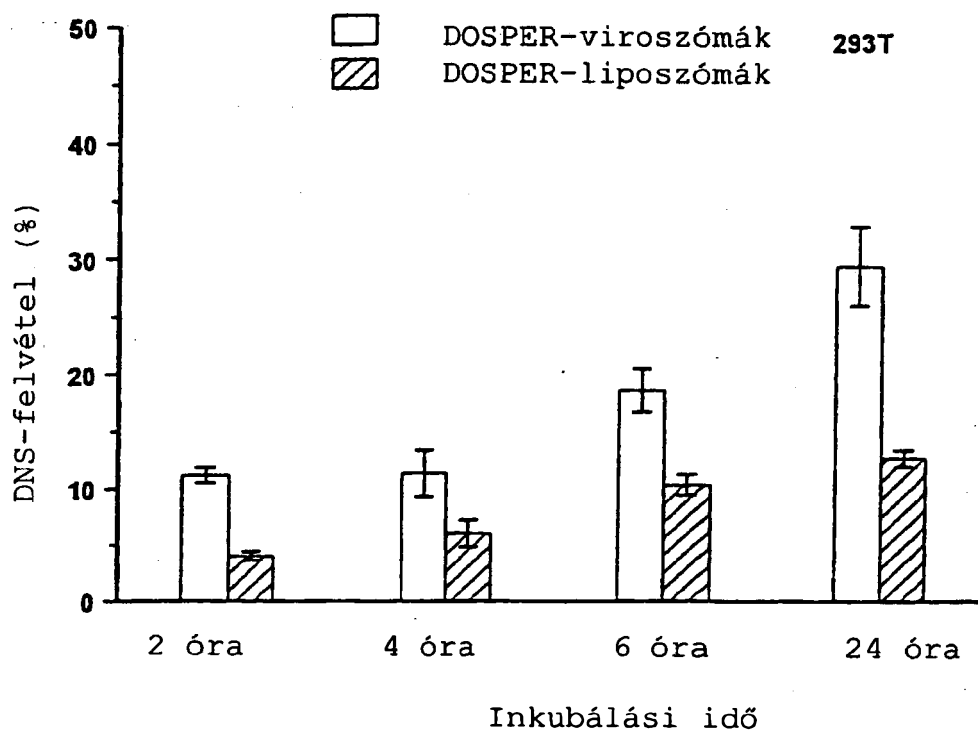
Dr. Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivő

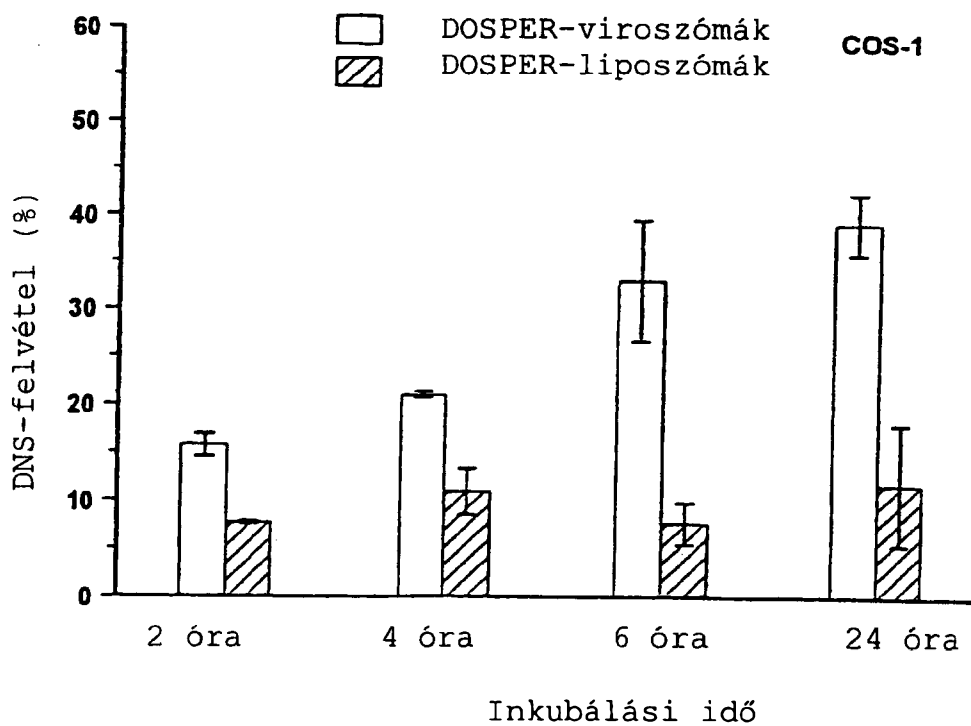
40 oldal
7 oldal oldal
47 oldal
Jelentés

PCT/EP00/09540

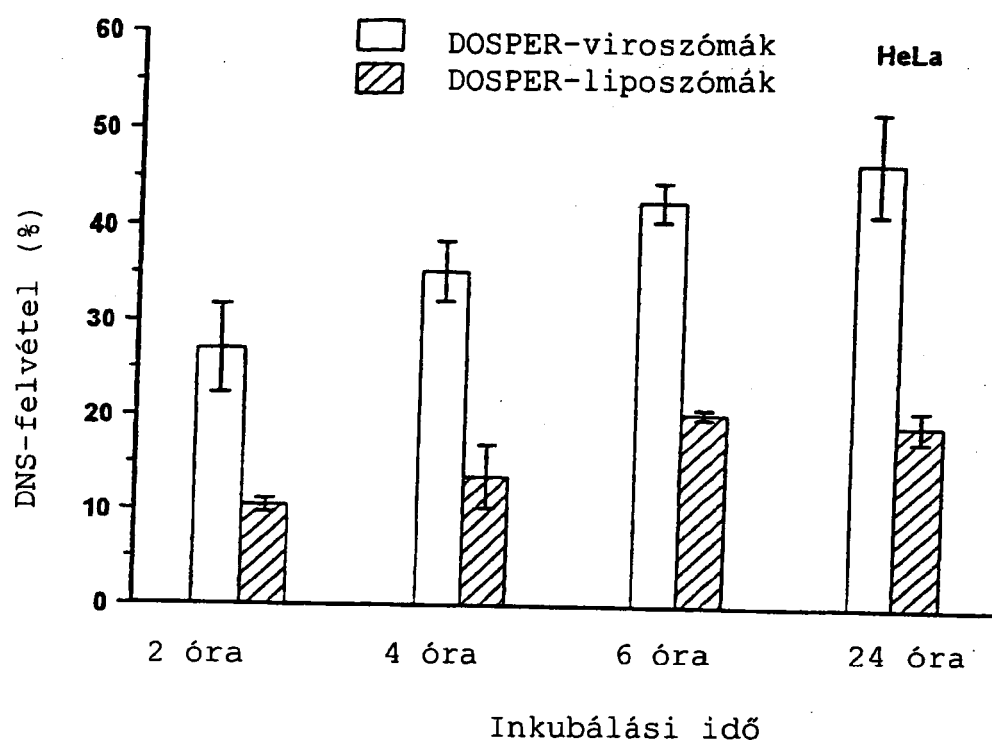
1/7



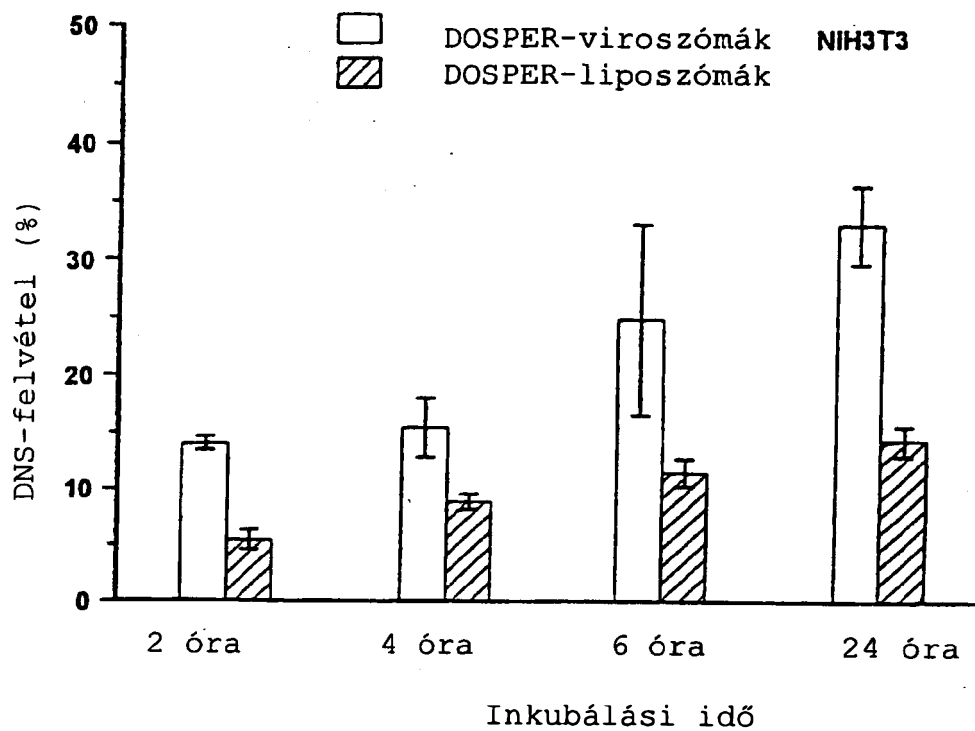
1. ábra



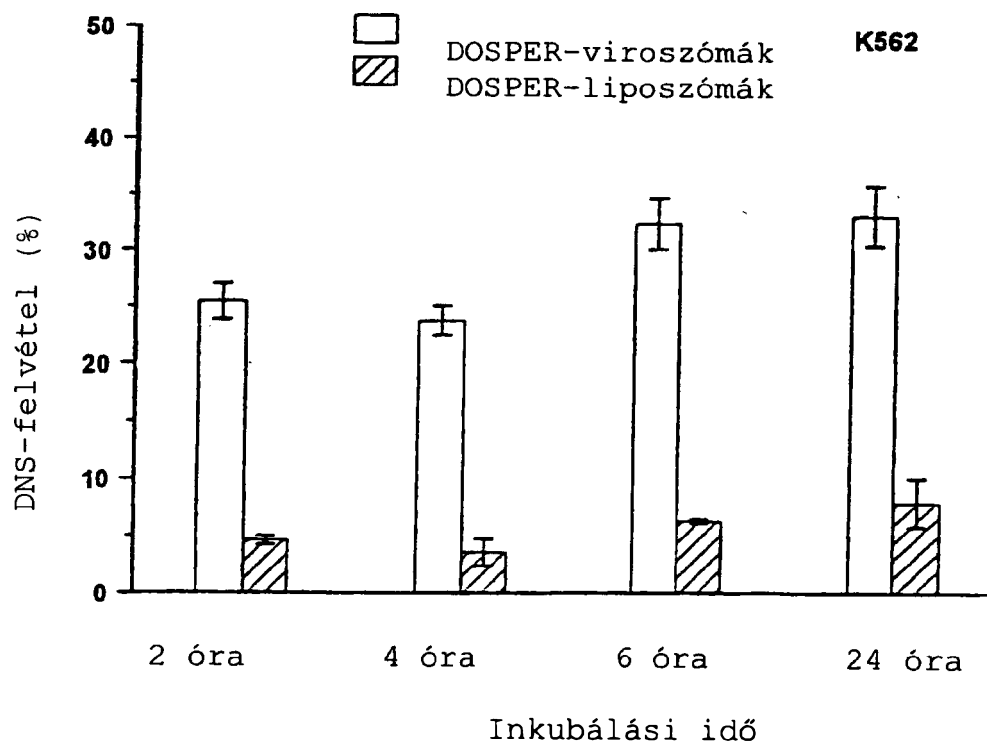
2. ábra



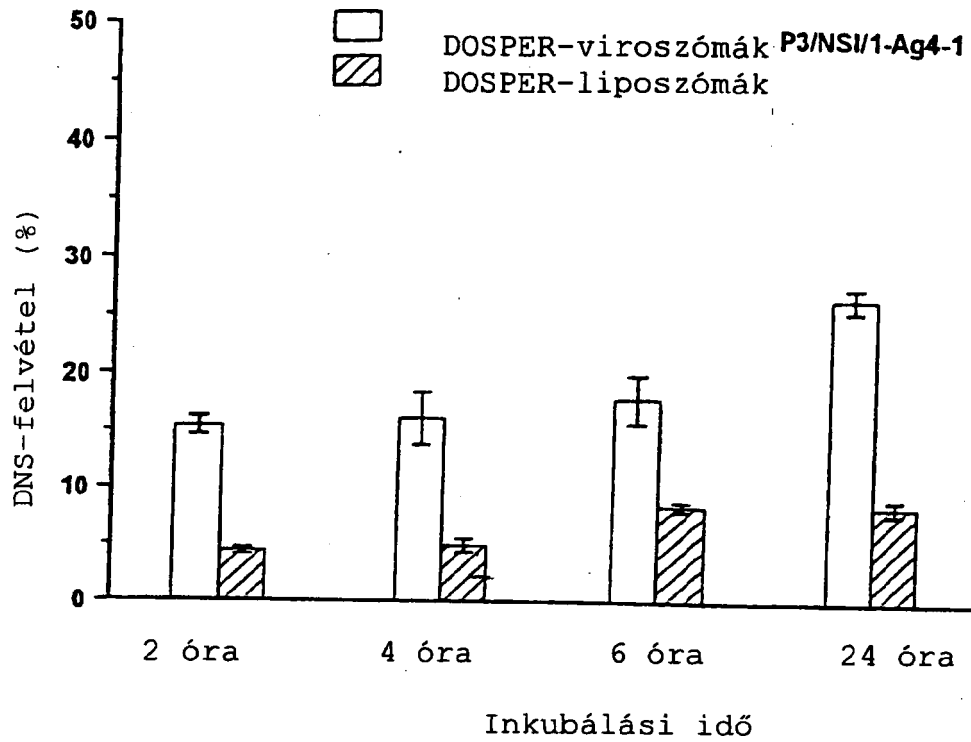
3. ábra



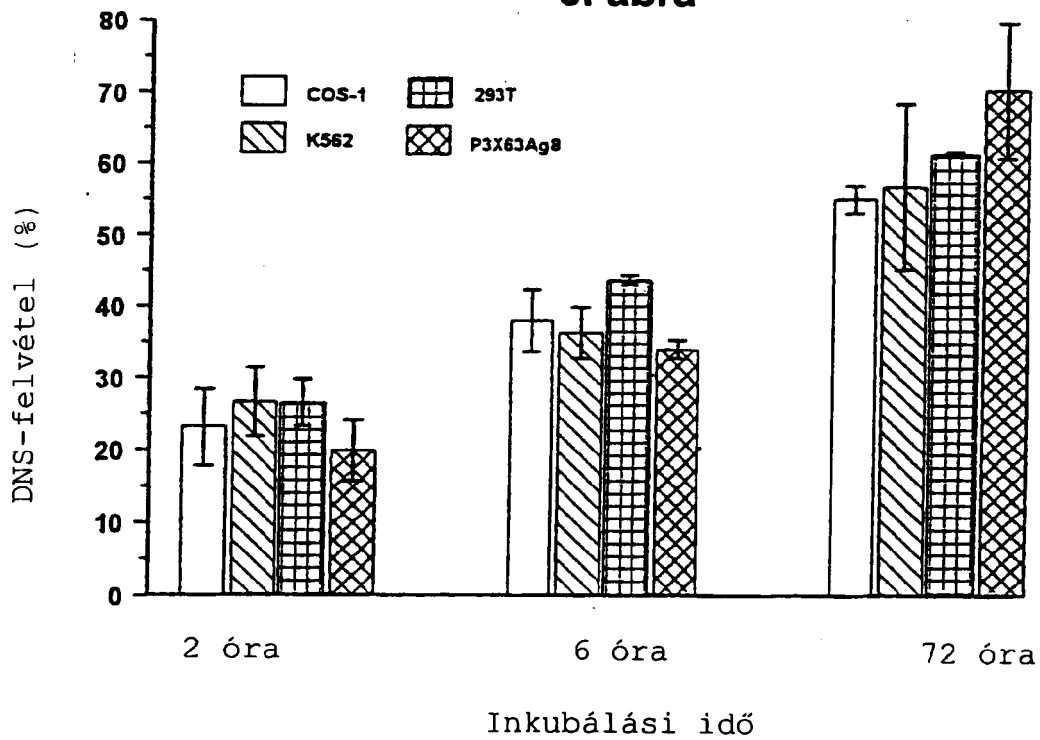
4. ábra



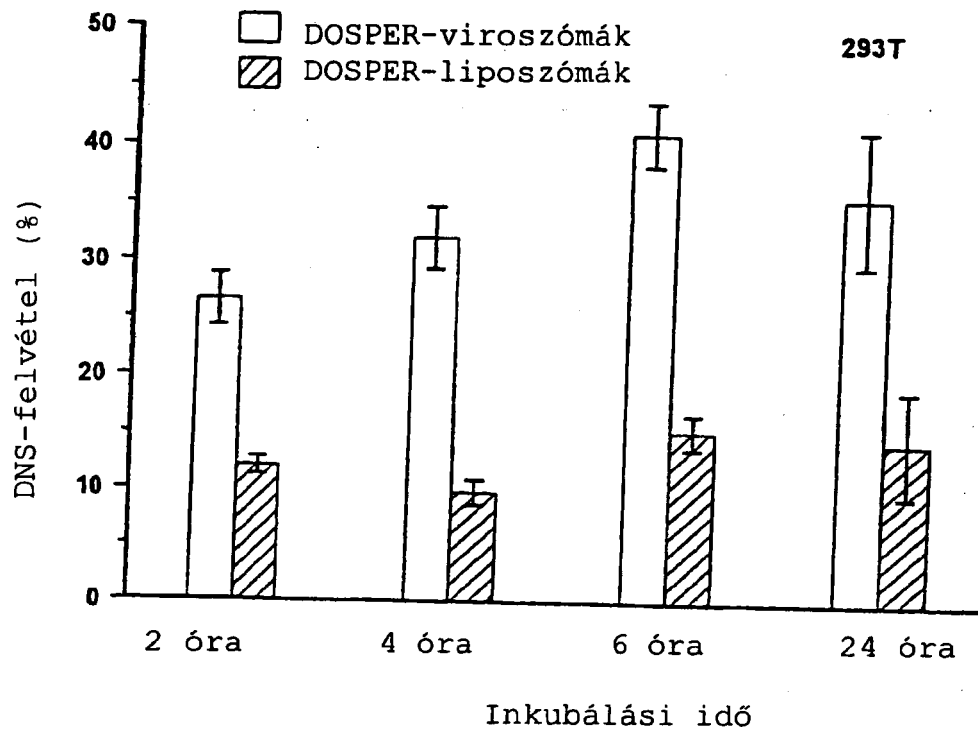
5. ábra



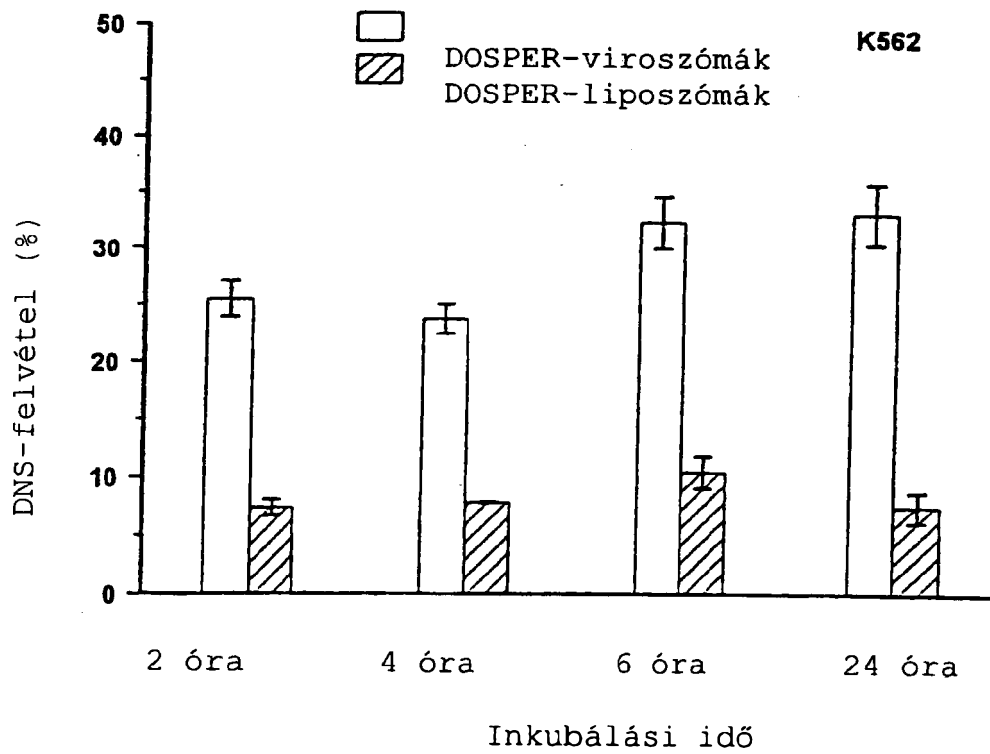
6. ábra



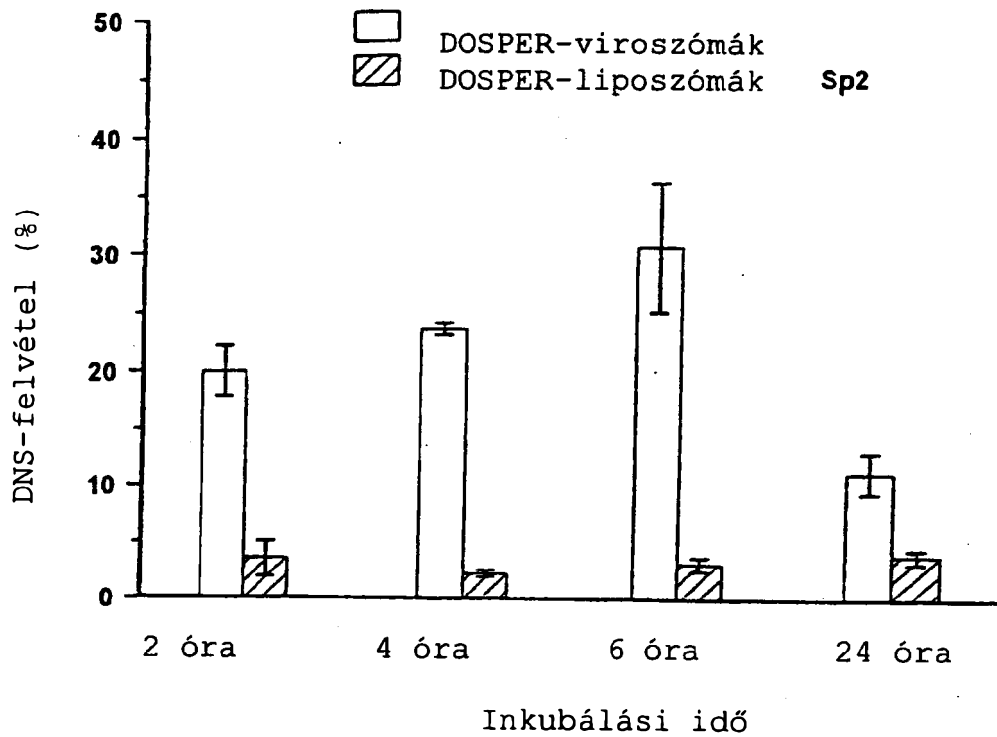
7. ábra



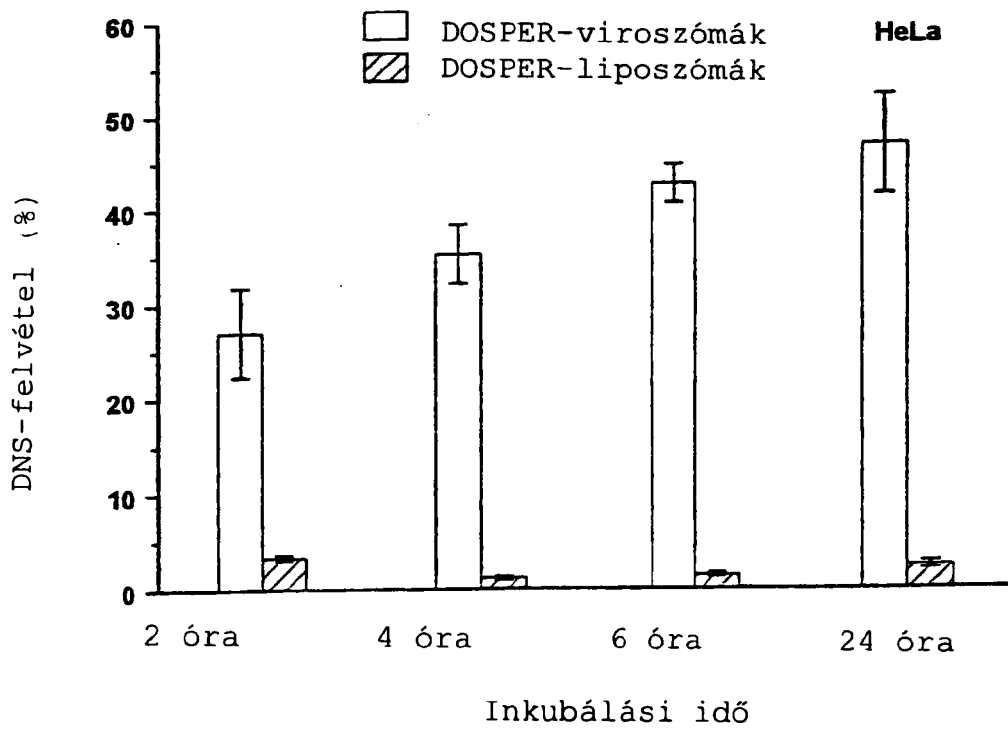
8. ábra



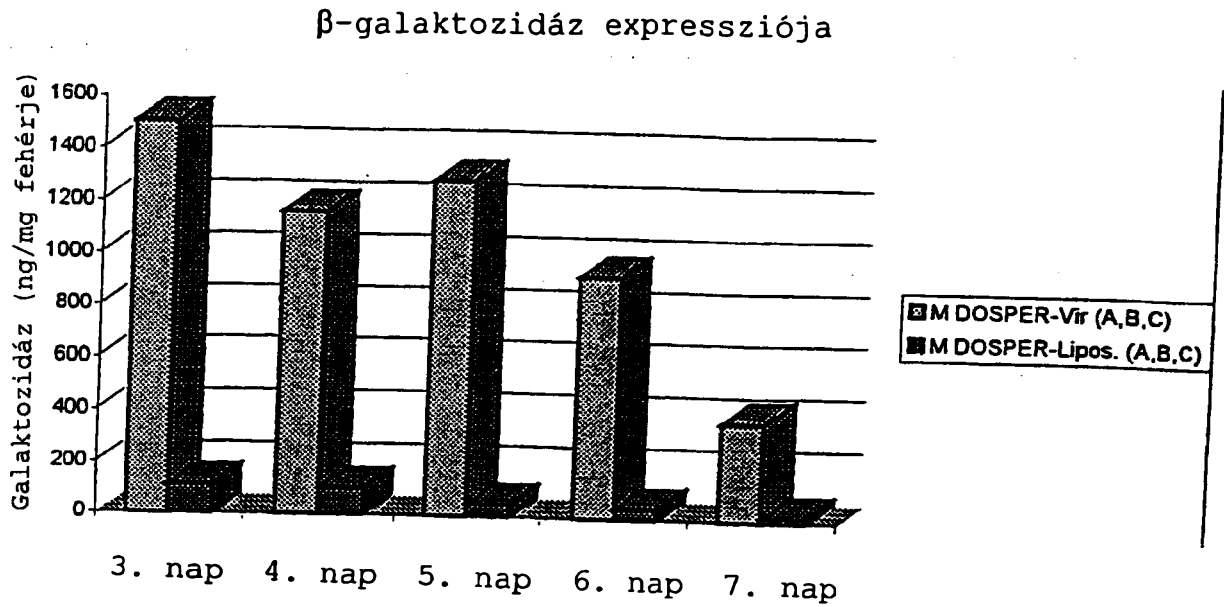
9. ábra



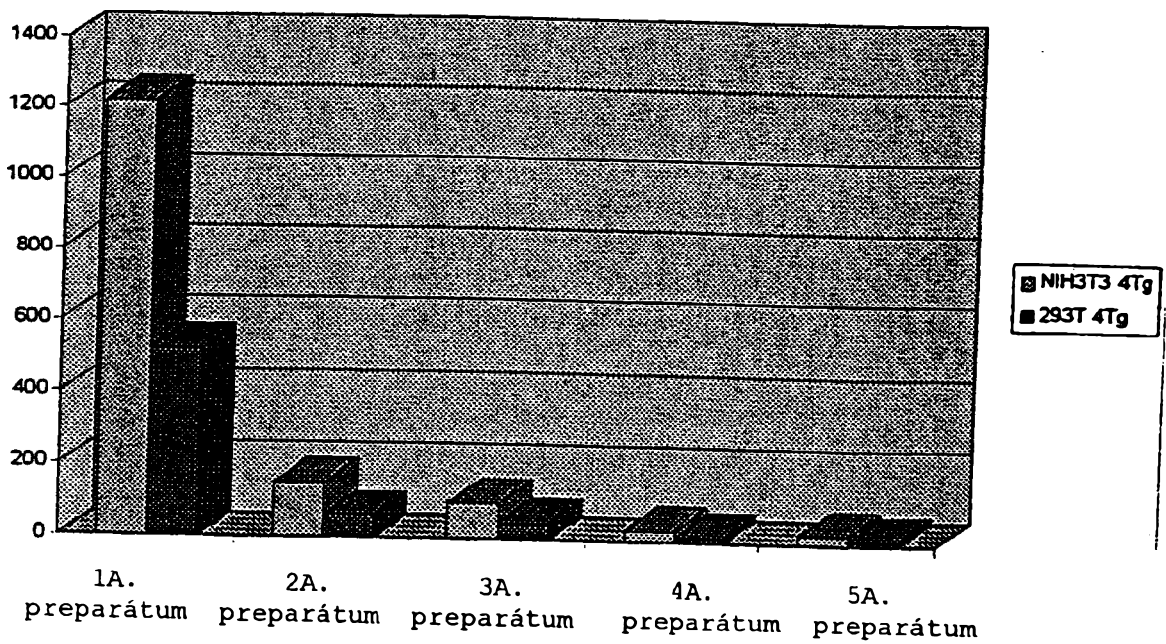
10. ábra



11. ábra



12. ábra



13. ábra