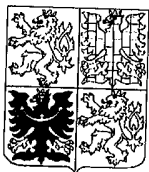


# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 15.10.1997

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 15.10.1996

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1996/027544

(33) Země priority: US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 12.01.2000  
(Věstník č. 1/2000)

(86) PCT číslo: PCT/US97/18538

(87) PCT číslo zveřejnění: WO98/16240

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 2376

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

A 61 K 38/00

A 61 K 9/127

A 61 P 35/00

A 61 P 29/00

A 61 P 31/04

(71) Přihlašovatel:

THE LIPOSOME COMPANY, INC., Princeton,  
NJ, US;

(72) Původce:

Meers Paul R., Princeton Junction, NJ, US;

Pak Charles, Plainsboro, NJ, US;

Ali Shaukat, Monmouth Junction, NJ, US;

Janoff Andrew S., Yardley, PA, US;

Franklin Craig J., Skillman, NJ, US;

Erukulla Ravi K., Plainsboro, NJ, US;

Cabral-Lilly Donna, Lawrenceville, NJ, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,  
140 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Konjugáty peptidu s lipidem, lipozómy,  
přípravky a způsob jejich směrování**

(57) Anotace:

Konjugáty peptidu s lipidem jsou vestavěny do lipozómů tak, aby selektivně destabilizovali lipozómy v blízkosti cílových buněk sekretujících peptidázy, a také doručit lipozómy do blízkosti cílových buněk, nebo přímo do buněk. Lipozómy mohou být použity k léčbě savců v případě nemoci, poruch nebo příznaků, tzn. nádorové bujení, mikrobiální infekce a záněty, charakteristické přítomností sekretujících peptidázy.

CZ 1999 - 2376 A3

# KONJUGÁTY PEPTIDU S LIPIDEM, LIPOZÓMY, PŘÍPRAVKY A ZPŮSOB JEJICH SMĚROVÁNÍ

## OBLAST TECHNIKY

Konjugáty lipidů s peptidy jsou inkorporovány do lipozómů, tak aby umožnily směrování lipozómů a doručení jejich obsahu do blízkosti cílové buňky.

## DOSAVADNÍ STAV TECHNIKY

Lipozómy jsou běžně používány jako nosiče zajišťující přepravu celé řady látek určených pro terapeutické nebo diagnostické účely do cílových buněk. Uzavření těchto aktivních látek do lipozómů je chrání před předčasnou degradací a zároveň zabraňuje nežádoucím postranním efektům těchto látek na organismus, kterému byly podány (např. A. Bangham, 1992, M. Ostro, 1987 a M. Ostro and P. Cullis, 1989). Bohužel účinnost dopravování pomocí lipozómů, byla až dosud značně omezena nedostatkem způsobů, jak donutit lipozómy aby svůj obsah uvolnili v blízkosti, nebo přímo uvnitř, cílových buněk. Navrhovaný vynález popisuje způsoby jak je možné pomocí vestavění konjugátů lipidů s peptidy do lipozómů uvést tyto lipozómy do kontaktu s cílovými buňkami.

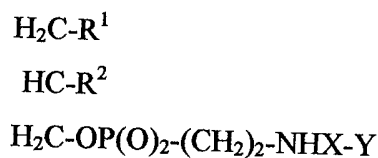
Lipidickou část konjugátu lipid – peptid tvoří fosfatidylethanolamin ("PE"). Tento lipid za normálních okolností a při neutrálním pH netvoří lipidickou dvojvrstvu a namísto toho vytváří ve vodném prostředí hexagonální ( $H_{II}$ )-fázové struktury, které mají tendenci destabilizovat dvojvrstvu lipozómů do jejichž stěny byly tyto lipidy vestavěny. Stejně struktury však naopak zvyšují schopnost lipozómů fúzovat (Verkleij, 1984, Cullis & de Kruijff, 1979, Ellens et al, 1989). Konjugace peptidů s PE stabilizuje PE ve struktuře membrány a navíc umožní aby byl konjugát stabilně vestavěn do lipozómů. Jakmile je však peptid odstraněn, například enzymaticky odštěpen v blízkosti buněk sekretujících peptidázy, začne se lipid v membráně chovat nestabilně, vytvářet hexagonální konformace, což vede k destabilizaci membrány celého lipozómu.

Peptidovou část konjugátu může tvořit jakýkoliv peptid jehož aminokyselinová sekvence je rozeznávána a štěpena některou z mnoha peptidáz sekretovaných savčími buňkami, např v místech zánětu nebo nádorové metastázy (viz Aimes and Quigley, 1995, Fosang et al, 1994, Froelich et al, 1993, Knauper et al, 1996, Liotta et al, 1991, Moehrle et al, 1995, Nagase et al, 1994, Nakajima et al, 1979, Otake et al, 1991, Palmieri et al, 1989, Pei et al, 1994, Prechel et al, 1995, Yamashita et al, 1994). Ani připojení peptidů odštěpitelných peptidázami ani inkorporace

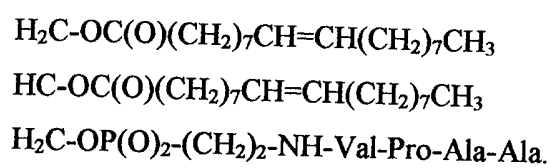
těchto peptidů do lipozómů za účelem umožnění jejich kontrolovatelné destabilizace, nebylo dosud popsáno.

Voegel et al, a Subbaro et al, navazovali peptidy na PE, avšak tyto peptidy nebyly nikdy popisovány jako peptidy štěpitelné peptidázami sekretovanými buňkami. Peptidy modifikované lipidy popisované v tomto dokumentu byly spíše citlivé na změny pH, když při nízkém pH uvnitř endozómů vytvářely  $\alpha$  helikální struktury. Kirpotin et al, modifikoval distearoyl fosfatidylcholin ("DSPE") připojením methoxypoly(ethylen glykol) skupiny ("mPEG") na aminoskupinu DSPE. Lipozómy obsahující mPEG – modifikované DSPE byly v roztoku stabilní dokud nebyla thiolýtický odštěpena skupina mPEG. Kirpotin nikdy nepopisoval modifikace PE pomocí peptidů štěpitelných peptidázami.

Navrhovaný vynález popisuje způsob doručování obsahu lipozómů na konkrétní místo, do blízkosti cílových buněk, a to kontrolovatelným způsobem, pomocí konjugace daných peptidů s fosfatidylethanolaminem a vestavěním takových konjugátů do lipozómu. Vzniklé lipozómy jsou pak stabilní dokud je peptid napojen na lipid. Tedy, jakmile je peptidová část konjugátu odštěpena od lipidu pomocí peptidáz sekretovaných buňkou, lipozómy se stávají nestabilními a jejich obsah je uvolněn buď v blízkosti, nebo přímo uvnitř buněk sekretujícími patřičný enzym. Směrování takových lipozómů je tedy namířeno proti buňkám sekretujícími patřičný enzym. Konjugát peptidu s lipidem podle navrhovaného vynálezu má mít tento obecný vzorec:



kde každé  $\text{R}^1$  a  $\text{R}^2$  je alkylový řetězec, X je jednoduchá vazba, nebo acylový řetězec a Y je peptid štěpitelný peptidázou. Acylový řetězec je většinou řetězec kyseliny olejové, X je většinou jednoduchá vazba a peptid většinou obsahuje aminokyselinovou sekvenci Ala-Ala-Pro-Val, lépe pak N-methoxysukcinyl- Ala-Ala-Pro-Val. Potom preferovanou variantou je konjugát peptidu s lipidem mající tento obecný vzorec:

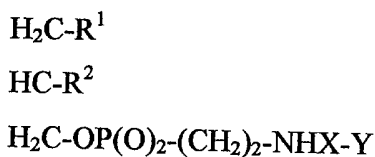


Lipidická část lipozómů může být složena buď pouze z konjugátu, nebo může obsahovat jeden či více dalších lipidů. Může se jednat o jakýkoliv z následujících typů lipidů, např. Fosfolipidy, glykolipidy a steroly, které mohou být použity pro výrobu lipozómů. Je s výhodou, aby lipozómy dle navrhovaného vynálezu obsahovaly konjugát lipidu s peptidem a pozitivně nabitý syntetický lipid DODAP.

Kontrolované směřování pomocí lipozómů popisovaných navrhovaným vynálezem, může být použito pro doručování látek obsažených v lipozómech in vitro i in vivo, například při léčbě savců postižených různými chorobami, poruchami nebo příznaky jako je například rakovina, které mohou být léčitelné pomocí bioaktivních látek které je možné inkorporovat do lipozómu.

### PODSTATA VYNÁLEZU

Navrhovaný vynález popisuje konjugáty peptidu s lipidem podle následujícího obecného vzorce :



kde každé  $R^1$  a  $R^2$  je nezávisle skupina se vzorcem  $\text{OC(O)(CH}_2\text{)}_{n1}\text{(CH=CH)}_{n2}\text{(CH}_2\text{)}_{n3}\text{(CH=CH)}_{n4}\text{(CH}_2\text{)}_{n5}\text{(CH=CH)}_{n6}\text{(CH}_2\text{)}_{n7}\text{(CH=CH)}_{n8}\text{(CH}_2\text{)}_{n9}\text{CH}_3$  a X je spojovací skupina mající jednoduchou vazbu a acylový řetězec podle vzorce  $\text{OC(O)(CH}_2\text{)}_{n1}\text{(CH=CH)}_{n2}\text{(CH}_2\text{)}_{n3}\text{(CH=CH)}_{n4}\text{(CH}_2\text{)}_{n5}\text{(CH=CH)}_{n6}\text{(CH}_2\text{)}_{n7}\text{(CH=CH)}_{n8}\text{(CH}_2\text{)}_{n9}$ .

Hodnota  $n1$  odpovídá nule nebo zapadá do rozmezí 1 až 22,  $n3$  je nula nebo zapadá do rozmezí 1 až 19,  $n5$  je nula nebo zapadá do rozmezí 1 až 16,  $n7$  je nula nebo zapadá do rozmezí 0 až 13,  $n9$  je nula nebo zapadá do rozmezí 1 až 10 a každá hodnota  $n2$ ,  $n4$ ,  $n6$  a  $n8$  je nezávisle nula nebo 1. Pro  $R^1$  a  $R^2$  je součet  $n1 + 2n2 + n3 + 2n4 + n5 + 2n6 + n7 + 2n8 + n9$  v intervalu od 10 do 22.

X je většinou jednoduchá vazba, v případě pokud je X něco jiného než jednoduchá vazba pak součet  $n1 + 2n2 + n3 + 2n4 + n5 + 2n6 + n7 + 2n8 + n9$  pro X odpovídá intervalu od 1 do 22. X je tedy většinou satureované, lépe pak  $-\text{C(O)(CH}_2\text{)}_{11}-$ .

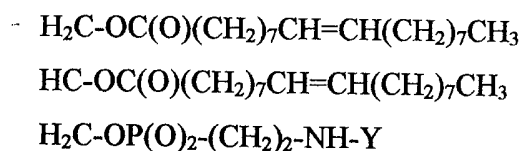
Je vhodné aby alespoň jedna skupina  $R^1$  nebo  $R^2$  obsahovala alespoň jednu dvojnou vazbu a konjugát lipidu s peptidem byl tedy částečně nebo zcela nenasycený. Lépe pak pokud oba  $R^1$  a  $R^2$  budou obsahovat jednu dvojnou vazbu a konjugát bude pak zcela nenasycený. Nejlépe pak, pokud obě skupiny  $R^1$  a  $R^2$  mají vzorec  $-\text{OC(O)(CH}_2\text{)}_7\text{(CH=CH)(CH}_2\text{)}_7\text{CH}_3$ , tzn. že konjugát lipidu s peptidem je dioleoyl fosfatidylethanolamin od ("DOPE") odvozený konjugát. Tedy každá skupina  $R^1$  a  $R^2$  může být také nasyčený nebo nenasycený acylový řetězec dle vzorců (ne

však výhradně) :  $-\text{OC}(\text{O})(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ ,  $-\text{OC}(\text{O})(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ ,  $-\text{OC}(\text{O})(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$ , nebo  $\text{OC}(\text{O})(\text{CH}_2)_8(\text{CH}=\text{CH})(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ .

Y je pak "enzymem štěpitelný peptid", kdy tento peptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci rozeznávanou peptidázami přítomnými na savčích buňkách a okolních tkáních, nebo produkovaných mikroorganismy schopnými vyvolat chorobu u savce. Enzymaticky štěpitelný peptid může, ale nemusí, obsahovat jednu nebo více aminokyselin navíc k sekvenci aminokyselin rozeznávané enzymem. Tyto aminokyseliny pak mohou být připojeny k aminokonci, karboxy-konci i k oběma koncům peptidické sekvence rozeznávané štěpícím enzymem. Způsoby přidání aminokyselin k aminokyselinové sekvenci rozeznávané enzymem, například pomocí automatického syntetizátoru peptidů, stejně jako způsob detekce štěpení peptidu peptidázou, např. pomocí chromatografické analýzy produktů tohoto štěpení, jsou dobře známy každému odborníkovi v oboru, který se bude zabývat tímto vynálezem.

Enzymaticky štěpitelné peptidy, většinou dlouhé v rozmezí 2 až 20 aminokyselin, mají dostatečnou délku aby pronikly na povrch nosiče založeného na bázi lipidu, dovnitř kterého byly vestavěny. Tyto peptidy jsou každému odborníkovi v oboru dobře známé, jedná se například, ne však výhradně, o tyto sekvence: Ala-Ala-, Ala-Ala-Pro-Val-, Ala-Ala-Met-, Ala-Ala-Pro-Phe-, Ala-Ala-Pro-Met-, Ala-Ala-Arg-, Ser-Ala-Ala-Arg-, Ser-Ser-Ala-Ala-Arg-, Ser-S-karboxy cukr-Ala-Ala-Arg-, Ala-Ala-Asp-, Ser-Ala-Ala-Asp-, Ser-Ser-Ala-Ala-Asp-, Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-, Ser-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-, Ser-Ser-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-, Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH<sub>2</sub>, Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>, Pro-Cha-Gly-Nva-, Pro-Leu-Gly-Leu-, Gly-Pro-Arg-, Leu-Pro-Arg-, Glu-Gly-Arg-, Pro-Leu-Gly-Leu- a Gly-Pro-Gln-Gly-Ile. V současné době jsou preferovány peptidy obsahující aminokyselinovou sekvenci Ala-Ala-, lépe pak N-methoxysukcinyl-Ala-Ala-Pro-Val-.

Z toho vyplývá, že nejvýhodnější konjugát peptidu s lipidem dle navrhovaného vynálezu bude mít obecný vzorec :



kde peptid bude obsahovat aminokyselinovou sekvenci N-methoxysukcinyl-Ala-Ala-Pro-Val-. Enzymaticky štěpitelný protein může být modifikován na svém aminokonci, například pro zvýšení jeho hydrofility. Zvýšená hydrofilita zlepšuje interakci peptidu na povrchu lipidického nosiče do kterého byl mateřský konjugát peptidu s lipidem vestavěn. Polární skupiny vhodné pro

nápojení peptidu tak aby tento zvýšil jejich hydrofilitu, jsou dobře známé a zahrnují například, ne však výhradně: acetyl (Ac), 3-cyklohexylalanin (Cha), acetylserin (Ac-Ser), acetylseryl-serin (Ac-Ser-Ser), sukcinyl (Suc), sukcinylserin (Suc-Ser), sukcinylseryl-serin (Suc-Ser-Ser), methoxysukcinyl (MeO-Suc), methoxysukcinyl-serin (MeO-Suc-Ser), methoxysukcinyl-seryl-serin (MeO-Suc-Ser-Ser), serylserin (Ser-Ser), polyethylen glykol (PEG), polyakrylamid, polyakrylomorfolin, polyvinylpirrolidin, polyhydroxylové skupiny a karboxy cukry, např. laktobióza, N-acetyl neuraminová a sialová kyselina. Karboxy skupiny těchto cukrů jsou napojené na N-konec peptidu pomocí amidové vazby. V současné době je preferovanou N-terminální modifikací napojení methoxysukcinylu.

Buňky sekretující peptidázy které rozeznávají příslušné aminokyselinové sekvence jsou rovněž velmi dobře známé všem odborníkům v oboru. Jedná se například, ne však výhradně o tyto peptidázy: metaloproteázy mezibuněčné hmoty, serinové proteázy, cysteinové proteázy, elastázu, plasmin, aktivátor plasminogenu, stromelysin, lidské kolagenázy, kathepsin, lysozym, granzymy, dipeptidyl peptidázy, peptidové hormon – inaktivační enzymy, kinázy, bakteriální peptidázy a virové proteázy. Elastáza, například je zapojena do přetváření tkání v případě zhoubného bujení. Tkáňová linie MCF-7 odvozená z karcinomu prsu produkuje elastázu, přičemž míra sekrece je nepřímo úměrná celkovému přežívání pacientů s nádorem prsu (Yamashita et al.). Navíc metaloproteáza mezibuněčné hmoty stromelysin-3 (ST3), byla nalezena v stromální oblasti nádorových buněk (Pei et al.), štěpí specificky  $\alpha_1$  proteinázový inhibitor mezi aminokyselinami 350 a 351 (Ala-Met). Stromelysin-1 (MMP-3) se také nachází v oblastech přetváření tkání, včetně míst zánětů a stromatu nádorů (Nagase et al.).

Kódující cDNA pro lidskou kolagenázu-3 nebo další metaloproteázu MMP-13 byly izolovány z knihovny nádorů prsu (Knauper et al.). Tyto enzymy štěpí sekvenci aminokyselin Pro-Cha-Gly-Nva-His a Pro-Leu-Gly-Leu. Navíc 72 kDa gelatináza (MMP-2) ovlivňuje invazivitu nádorů a štěpí aminokyselinovou sekvenci Gly-Pro-Gln-Gly-Ile- mezi Gly a Ile aminokyselinami (Aimes a Quigley, Liotta et al.). Lidské neutrofilny také sekretují kolagenázu v místě zánětu a to především MMP-8 (neutrofilová kolagenáza a MMP-9 (kolagenáza typu IV, 92 kDa gelatináza) (Fosang et al.). Kathepsin G je také sekretován lidskými neutrofilny v místě zánětu, přičemž je specifický především pro peptidy obsahující aminokyselinovou sekvenci Suc-Ala-Ala-Pro-Phe nebo pro MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Met (Nakajima et al.). Dalšími enzymy sekretovanými neutrofilny v místě zánětu jsou kathepsiny B a D a také lysozym. Granzymy A a B jsou sekretované cytotoxickými lymfocyty v synoviální tekutině pacientů trpících rheumatoidní artritidou (Froehlich et al.). Granzym A štěpí neefektivněji peptidy obsahující sekvenci Gly-Arg, nebo

Ala-Ala-Arg, zatímco granzym B štěpí peptidy obsahující aminokyselinovou sekvenci Ala-Ala-Asp (Otake et al.)

Peptidázy hydrolizující enzymaticky štěpitelné peptidy také zahrnují skupinu enzymů inaktivujících peptidické hormony, např. aminopeptidázu P a angiotensin konvertující enzym, lokalizované na povrchu epitelálních buněk. Aminopeptidáza P štěpí vazbu mezi Agr-Pro v bradykininu a je umístěna na povrchu epitelálních buněk v plicích (Prechel et al.).

Konjugáty lipidů s peptidy mohou být připraveny celou řadou způsobů určených pro vytváření amidové vazby mezi aminoskupinou fosfatidylethanolaminu a karboxy koncem aminokyselinové sekvence. Tyto způsoby zahrnují, ne však pouze, ty které jsou dále uvedeny v příkladu 1. Obecně, enzymaticky štěpitelný peptid obsahující N-terminální blokující skupinu je připraven jako anhydrit, fosfatidylethanolamin jako je DOPE je pak ponechán aby reagoval s anhydritem v přítomnosti příslušných reagensů, jako je triethylamin.

Navrhovaný vynález také popisuje lipozómy složené z lipidických komponent včetně konjugátů lipidů s peptidem podle navrhovaného vynálezu. „Lipozómy“ jsou spontánně se tvořící struktury složené z jedné nebo více lipidických dvojvrstev, z nichž každá obklopuje vodný kompartment a je složena ze dvou protilehlých vrstev amfipatických molekul lipidů. Amfipatické lipidy obsahují polární (hydrofilní) oblast kovalentně navázanou na jeden nebo dva nepolární (hydrofóbní) acylové řetězce. Energeticky nevýhodný kontakt mezi hydrofóbními acylovými řetězci a vodným prostředím je pravděpodobně tím důvodem, kvůli kterému se molekuly lipidů sami nastaví do takové polohy aby polární oblasti byly orientovány směrem do vodného prostředí, zatímco acylové řetězce se ukryjí uvnitř vzniklé struktury. Tak vznikne energeticky stabilní dvojvrstva ve které jsou acylové řetězce účinně ochráněny polárními oblastmi od styku s vodným prostředím.

Lipozómy podle navrhovaného vynálezu mohou být složeny buď z jedné lipidické dvojvrstvy (unilamelární lipozómy, ULV), nebo z několika dvojvrstev (multilamelární lipozómy, MLV) a připraveny mohou být celou řadou způsobů dobře známých v oboru. Příkladem mohou být tyto metody: Banghamova metoda přípravy multilamelárních lipozómů (MLV), způsob podle Lenka, Fountainy a Cullise pro přípravu MLV s rovnoměrnou interlamelární distribucí obsahu (viz. US Patent No. 4,522,803, 4,588,578, 5,030,453, 5,169,637 a 4,975,282) a Papahadjopoulova metoda přípravy oligolamelárních lipozómů pomocí odpařování reversní fáze (US Patent No. 4,235,871). ULV pak mohou být připraveny z MLV pomocí takové metody jako je sonikace nebo protlačování (US Patent No. 5,008,050, a US Patent No. 5,059,421). Lipozómy podle navrhovaného vynálezu mohou být připraveny jakýmkoliv z výše uvedených způsobů, které jsou zde uvedeny jako reference.

Celá řada způsobů, jako je například sonikace, homogenizace, použití French Pressu a mletí, může být použita pro přípravu lipozómů menší velikosti v lipozómů větších. Protlačování (viz. US Patent No. 5,008,050) může být použito pro redukci velikosti lipozómů, tak aby vznikly lipozómy s požadovanou velikostí tak, že směs lipozómů je silou protažena přes filtr s definovanou a požadovanou velikostí otvorů. Tangenciální průtoková filtrace (viz. WO89/008846) může být také použita pro přípravu populace lipozómů s menšími rozdíly ve velikosti a s homogenní definovanou distribucí velikosti lipozómů. Obsah těchto dokumentů je zde uveden jako reference. Pro stanovení velikosti lipozómů může být použita celá řada technik, jako je například quasi-elastický světelný rozptyl, nebo pomocí přístroje např. Nicomp® se kterým musí pracovat jen vyškolený odborník.

Lipozómy podle navrhovaného vynálezu mohou obsahovat pouze konjugáty peptidu s lipidem. Je však vhodné aby tyto lipozómy, kromě konjugátu obsahovaly ještě jeden či více dalších lipidů, včetně takových lipidů jako jsou fosfolipidy, glykolipidy a steroly, které jsou pro přípravu lipozómů běžně použitelné. Je s výhodou pokud tyto lipidy jsou pozitivně nabitě lipidy, ještě lepší je pak aby byly vybrány ze skupiny do které patří DOTAP, 1-N,N-dimethylaminodioleoyl propan (DODAP), 1-oleoyl-2-hydroxy-3N,N-dimethylamino propan, 1,2-diacyl-3-N,N-dimethylamino propan a 1,2-didecanoyl-1-N,N-dimethylamino propan, DC-Chol, DMRIE a DORI.

Nejvýhodnější je aby tento kladně nabitý lipid byl DODAP. Pozitivně nabitě lipidy jsou vestavěny do lipozómů, nejlépe maximálně v equimolární koncentraci vzhledem ke konjugátu peptidu s lipidem, tak aby zajistily zesíťování nosiče. Zvýšením pozitivního náboje na nosiči založeném na bázi lipidu se zlepší elektrostatické interakce mezi nosičem a bio membránou a tím se usnadní i jejich vzájemná fúze.

Těmito přídatnými lipidy mohou být také některé fosfolipidy jako je fosfatidylcholin (PC), který je obecně přidáván do lipidického nosiče pro zvýšení stability struktury, nebo fosfatidyethanolamin (PE). PE může být jeden ze skupiny do které patří transesterifikovaný fosfatidylethanolamin (tPE), dipalmitoyl fosfatidylethanolamin (DPPE), palmitoyloleoyl fosfatidylethanolamin (POPE) a DOPE, přičemž tyto přídatné PE mohou být fúzogenní neboť jejich hydrofobní „hlavová“ skupina je relativně dehydratovaná.

Další možností je, že použité PE je PE na jehož hydrofilní část je připojena skupina typu dikarboxylové kyseliny, polyethylen glykolu, polyalkyl etheru a gangliosidů. Tyto modifikované PE, známé také jako lipidy s modifikovanou hydrofóbní skupinou, mohou inhibovat vazbu sérových proteinů na lipidický nosič a tím pozmění farmakokinetické chování nosiče v oběhové soustavě živočichů (viz. Blume et al., Gabizon et al., Park et al., Woodle et al. a Allen et al., jsou

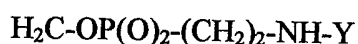
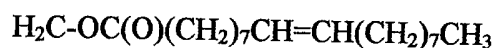
zde uvedeny dále jako reference). Množství lipidů s modifikovanými hydrofóbními skupinami, které jsou vestavěné do lipozómu, závisí na množství faktorů dobře známých každému odborníkovi v oboru, nebo stanovitelných bez většího experimentování. Jedná se zejména o typ lipidu a modifikaci jeho hydrofóbní skupiny, o typu a velikosti lipozómů a nezávisle pak na terapeutickém použití léčiva. Koncentrace lipidů s modifikovanými hydrofóbními skupinami v lipozómu musí být dostatečná pro prodloužení poločasu cirkulace lipozómu ve zvířeti, zároveň však nesmí být příliš vysoká aby neindukovala nežádoucí postranní efekty u zvířat a typicky je to alespoň pět molárních procent lipidu přítomného v lipozómu. Preferovanými lipidy s pozměněnými hydrofóbními skupinami jsou fosfatidylethanolamin-dikarboxylové kyseliny (PE-DCA) a PEGylované lipidy (popis viz. Woodle et al. a Allen et al.).

Lipozómy podle navrhovaného vynálezu mohou také obsahovat „směrovací strukturu“, tzn. skupinu která může být připojena na lipozóm a která bude směřovat lipozóm na specifické místo v těle savce. Toto směřování je založeno na rozeznání některé struktury na povrchu buňky proti které je směřování namířeno pomocí příslušné směrovací struktury. Typickým, ale nelimitujícím, příkladem takové struktury může být například protilátka, ligand buněčného receptoru, lektin apod. Směrovací struktura může být připojena na lipozóm jakýmkoliv způsobem známým v současném stavu techniky, a to jak kovalentní tak nekovalentní vazbou této skupiny na lipozóm. Může se jednat o jakýkoliv způsob popsáný v dále uvedených dokumentech, které jsou zde uvedeny jako reference: US Patent No. 5,399,331 popisuje navázání proteinu na lipozóm prostřednictvím spojovacího agens obsahujícího alespoň jednu maleimidovou skupinu a aminovou reaktivní skupinu, US Patent No. 4,885,172, 5,059,421 a 5,171,578 popisují navázání proteinů na lipozóm za použití glykoproteinu streptavidinu, Sato a Sunamoto popisují navázání polysacharidů na povrch směrovaného lipozómu.

Lipozómy podle navrhovaného vynálezu obsahují jedno nebo více „bioaktivních agens“, které obsahují nebo představují látky s biologickou funkcí, včetně terapeutické nebo diagnostické aktivity. Toto bioaktivní agens může být například antivirové agens jako je acyclovir, zidovudin a interferony, antibakteriální agens jako jsou aminoglykosidy, cephalosporiny a tetracykliny, antifungální agens jako jsou polyenová antibiotika, imidazoly a triazoly, antimetabolika jako jsou foláty, purinové a pyrimidinové analogy, antineoplastická agens jako jsou anthracyklinová antibiotika a rostlinné alkaloidy, steroly jako je cholesterol, sacharidy, tzn. cukry a škroby, aminokyseliny, peptidy, proteiny jako jsou proteiny buněčných receptorů, imunoglobuliny, enzymy, hormony, neurotransmitery a glykoproteiny, barviva, radioaktivně značené sondy jako jsou radioisotopy a radioaktivně značené látky, kontrastní látky, fluorescentní próby, bronchodilatátory, lokální anestetika, sekvence nukleových kyselin jako je mRNA, cDNA,

genomová DNA a plasmidy, bioaktivní lipidy jako jsou etherové lipidy a ceramidy a podobně. Preferovaným bioaktivním agens je například nukleotidová sekvence, antimikrobiální agens, protinádorové léčivo a protizánětlivé léčivo.

Je vhodné aby se lipozóm skládal z lipidických komponent představovaných pozitivně nabitými lipidy a konjugátem peptidu s lipidem podle obecného vzorce:



kde peptid bude obsahovat aminokyselinovou sekvenci N-methoxysukcinyln-Ala-Ala-Pro-Val- a pozitivně nabitý lipid je DODAP. Ještě vhodnější je aby lipidovou komponentou byl DODAP a konjugát peptidu s lipidem byl přítomný v molárním poměru 50:50.

Dále je v navrhovaném vynálezu popisován přípravek obsahující lipozómy a farmaceuticky přijatelný nosič, což je přípravek přijatelný pro použití v kombinaci s podáním lipozómů savcům, včetně lidí. Farmaceuticky přijatelný nosič je připraven v souladu s celou řadou faktorů zcela závislých na rozhodnutí odborníka v oboru a bude obsahovat například: konkrétní použitý lipozomální bioaktivní agens, jeho koncentraci, stabilitu a požadovanou biodostupnost, typ choroby, poruchy nebo komplikace která má být pomocí lipozomálního přípravku léčena, pacient, jeho věk, velikost a celkový stav a zamýšlený způsob podání léčivého přípravku, např. nasálně, orálně, ophthalmickou cestou, povrchově, transdermálně, vaginálně, subkutálně, intramamárně, intraperitoneálně, intravenózně nebo intramuskulárně (viz. např. Nairn 1985).

Typickým farmaceuticky přijatelným nosičem použitým pro parenterální podání bioaktivního agens je například D5W, vodný roztok obsahující 5 % váhy dextransu a fyziologický roztok. Farmaceuticky přijatelný nosič může obsahovat další složky, jako jsou látky zvyšující stabilitu použitých aktivních složek, například ochranné příměsi a antioxidanty.

Dále je v navrhovaném vynálezu popisován způsob směřování obsahu lipozómů do požadovaných buněk, což vyžaduje kontakt dané buňky s lipozómem dle navrhovaného vynálezu a přítomnost proteázy schopné rozštěpit konjugát lipidů s peptidem. Směřování může být využíváno jak in vitro např. pro diagnostické účely, tak pro ex vivo doručování terapeutického agens nebo nukleové kyseliny k buňkám kostní dřeně. In vitro kontakt biomembrány s nosičem založeným na bázi lipidů, představuje přidání směsi obsahující nosič podle navrhovaného vynálezu do kultury buněk sekretujících proteázy, jako je řada různých

nádorových buněčných linií např. MCF-7 linie, nebo je možné přidat endogenní proteázy do kultivačního média obsahujícího membrány a nosiče.

Alternativou je kontakt *in vivo*, kde se jedná především o savčí buňky, je použit farmaceuticky přijatelný nosič a směrovací struktura. Podání *in vivo* představuje aplikaci přípravku dle navrhovaného vynálezu savci jedním ze způsobů, např. intravenózně, což je v současném stavu techniky přijatelná metoda pro podávání farmaceutických přípravků savcům. Nosič pak cirkuluje v oběhové soustavě savce a v přítomnosti dostatečného množství peptidázy, která je schopna rozštěpit v nosiči konjugát peptidu s lipidem, se stane fuzogenní. Jak je popsáno výše, tato peptidáza se nachází u savců například v místě zánětu, mikrobiální infekce nebo nádoru. Navíc inkorporací lipidů s modifikovanou hydrofóbní skupinou do lipidického nosiče, prodlouží dobu po kterou nosič obíhá v oběhové soustavě a tím proporcionálně zvýší množství nosiče který dosáhne požadovaného místa v těle savce. Nádory mají vyšší stupeň vaskularizace než okolní tkáň a cévy procházející nádorem jsou značně propustnější pro struktury typu popisovaných lipidických nosičů. Proto se nosič akumuluje v nádoru a zvýšená míra kumulace v požadovaném místě zlepšuje terapeutický účinek. Nosič pak může fúzovat jak s buňkami tvořícími proteázu, tak se sousedními buňkami v okolní tkáni.

V *in vivo* systému je schopen popisovaný lipozomální nosič doručit bioaktivní agens na požadované místo. Může se jednat o terapeuticky nebo diagnosticky aktivní množství terapeutické nebo diagnostické látky doručené do savčích buněk postižených chorobou, poruchou nebo příznakem který je pomocí příslušné látky detekovat nebo léčit. To znamená, že tento způsob doručování může být použit pro diagnostiku nebo léčbu savců v případě choroby, poruchy nebo poškození.

Způsob podle navrhovaného vynálezu může být také použit pro léčení savců postižených zánětlivým onemocněním, podáním lipozómů obsahujících efektivního množství protizánětlivého léčiva savci. Léčitelné zánětlivé choroby mohou být například artritické poruchy, autoimunní poruchy, atherosklerotický plak, akutní respirační stresový syndrom, vnitřní zánětlivý syndrom, akutní nefritida, nebo dna. Vhodným protizánětlivým léčivem mohou být například nesteroidní protizánětlivé látky, glukokortikoidy, bioaktivní lipidy jako jsou ceramidy a etherové lipidy, a prostaglandiny. Peptidázy přítomné v místě zánětu mohou být například elastáza rozeznávající Ala-Ala- a štěpící peptidy jako jsou např. Ala-Ala-, Ala-Ala-Ala-, Ala-Ala-Pro-Val-, Ala-Ala-Pro-Met-, Ala-Ala-Pro-Ala-, stromelysin-1 rozeznávající peptidy obsahující aminokyselinové sekvence Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-, jako jsou např. Ac-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-, MeOSuc-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-, karboxy cukr-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-Suc-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-, Ser-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-

, Ac-Ser-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-, MeOSuc-Ser-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-, Ser-Ser-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-, Ac-Ser-Ser-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva- a MeOSuc-Ser-Ser-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva- a který štěpí peptidy ve vazbě Ala-Nva- a katepsin G sekretovaný lidskými neutrofily v místě zánětu a štěpí peptidy jako jsou Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-, karboxy cukr-Ala-Ala-Pro-Phe-, MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Met-, Suc-Ala-Ala-Pro-Met- a karboxy cukr-Ala-Ala-Pro-Met-.

Peptidové substráty pro enzymy granzym A a granzym B sekretované cytotoxickými lymfocyty v synoviální tekutině pacientů s rheumatoidní artritidou jsou například Ac-Ala-Ala-Arg-, MeOSuc-Ala-Ala-Arg-, Ala-Ala-Arg-, Setr-Ala-Ala-Arg-, Ac-Ser-Ala-Ala-Arg-, MeOSuc-Ser-Ala-Ala-Arg-, Ser-Ser-Ala-Ala-Arg-, Ac-Ser-Ser-Ala-Ala-Arg-, MeOSuc-Ser-Ser-Ala-Ala-Arg-, karboxylový cukr-Ala-Ala-Arg-, apod. Ac-Ala-Ala-Asp-, MeOSuc-Ala-Ala-Asp-, Ala-Ala-Asp-, Setr-Ala-Ala-Asp-, Ac-Ser-Ala-Ala-Asp-, MeOSuc-Ser-Ala-Ala-Asp-, Ser-Ser-Ala-Ala-Asp-, Ac-Ser-Ser-Ala-Ala-Asp-, MeOSuc-Ser-Ser-Ala-Ala-Asp-, karboxylový cukr-Ala-Ala-Asp-. Dipeptidylaminopeptidáza IV (DAP IV, EC 3.4.14.5), patřící do rodiny dipeptyl peptidáz, se nachází ve zvýšené míře na buňkách cév procházejících hladkým svalstvem u prasat (Palmieri et al.). Poškození stěny cév například angioplastií, nebo během jiných zánětlivých stavů, zvyšuje tvorbu peptidázy. Například zánětlivý edém je spojen s porušením endoteliální vrstvy a odkrytí buněk hladkého svalstva. Pro směrování lipozómů na takové místa pak musí být použity odpovídající substráty.

Způsob popisovaný navrhovaným vynálezem může být také použit pro léčbu savců postižených rakovinou, podáním lipozómů obsahujících efektivní množství protinádorového léčiva. Léčitelné typy rakoviny jsou rakovina mozku, prsu, střeva, plic, vaječníků, prostaty a žaludku, stejně jako karcinomy, sarkomy, leukemie, lymfomy a melanomy. Použitelným protinádorovým léčivem mohou být například, anthracyklinová antibiotika, bioaktivní lipidy jako jsou ceramidy a etherové lipidy, taxany a vinca alkaloidy. Peptidázy přítomné v blízkosti nádorů mohou být například elastáza štěpící peptidy se sekvencí Ala-Ala-, Ala-Ala-Pro-Val-, (Nakajima et al., Castillo et al.), stromelysin-3 štěpící peptidy které obsahují sekvenci Ala-Met, stromelysin-1 štěpící peptidy se sekvencí Ala-Nva-, lidská kolagenáza-3 rozeznávající sekvence jako jsou MeOSuc-Pro-Cha-Gly-Nva-, Suc-Pro-Cha-Gly-Nva-, Pro-Cha-Gly-Nva-, Pro-Leu-Gly-Leu-, MeOSuc-Pro-Leu-Gly-Leu- a Suc-Pro-Leu-Gly-Leu-, 72 kDa gelatináza štěpící peptidy obsahující sekvenci Gly-Pro-Gln-Gly-Ile- (viz. Pei et al., Knauper et al., Boyd, Unden et al. a Kossakowska et al.), urokinázový aktivátor plasminogenu štěpící Glu-Gly-Arg- a Ac-Lys (Wohl et al., Johnson et al., Petkov et al., Ascenzi et al.) a katepsin B rozeznávající a štěpící sekvenci aminokyselin Arg-Arg- (Knight, Barrett & Kirschke, Kirschke et al.).

Specifické peptidázy se nacházejí i v nervové tkáni (viz. O`Leary a O`Connor) což ukazuje, že lipozómy mohou být připraveny tak aby se daly použít i k léčbě některých neuropatií. Specifické aminopeptidázy jsou přítomné na membráně placentární tkáně a později jsou sekretovány což naznačuje jejich primární lokalizaci v placentě (Rogi et al.). Některé kinázy jsou specificky přítomné v ledvinách. Například renin se nachází v zóna glomerulosa a/nebo v adrenální medule (Berka et al.). Některé peptidázy byly nalezeny i v kosterním svalstvu (Ward et al.).

Zjištění vysoké aktivity alanylaminopeptidázy v stromatu bazálního karcinomu a DAP IV v nádorových buňkách (Moehrle et al.) ukazuje, že alanyl-fosfolipid nebo odpovídající dipeptidy jsou použitelné pro spuštění lipozomální fúze s rakovinnou buňkou.

Způsob podle navrhovaného vynálezu může být také použit pro léčbu savců postižených mikrobiální infekcí, podáním lipozómů obsahujících anti-infekční agens, což může být řada antibiotik, v efektivním množství infikovanému savci. Celá řada peptidáz specifických pro konkrétní bakterie může být použita pro směrování obsahu lipozómů na místo infekce (viz. Spratt et al.). HIV virus obsahuje proteázy s konkrétní specifitou (viz Hoog et al.), které mohou být exprimované na infikovaných buňkách a mohou být použity pro směrování fúzogenních lipozómů jako terapie.

Obsah výše uvedených dokumentů, s popisy sekretovaných enzymů a jejich cílových peptidů, je zde uveden jako reference.

Směrování léčiv pomocí lipozómů může, podle navrhovaného vynálezu, doručit obsah lipozómů do blízkosti cílových buněk. Je také možné doručit obsah lipozómů přímo do buněk a to prostřednictvím fúze lipozómů a buněk. Fúzi buněk s lipozómy se rozumí jak navázání lipozómu na buňku, tak smíchání lipozomálních a buněčných membránových lipidů. Navázání a promíchání lipidů může být dosaženo celou řadou způsobů, velmi dobře známých zkušenému odborníkovi v oboru, včetně těch které jsou zde uvedeny dále.

Zkráceně, lipozómy jsou označeny fluorescenční značkou uzavřenou uvnitř lipozómu a poté jsou smíchány s buněčnými stíny červených krvinek, které jsou připraveny tak, jak je uvedeno dále. Buněčné stíny červených krvinek jsou neschopny endocytózy a tedy jakýkoliv přenos fluorescence do zbytku buňky musí být dán fúzí. Stanovením míry fluorescence buněčných stínů se tedy stanoví míra fúze lipozómů se stíny. Štěpení konjugátu lipidů s peptidem tedy přemění nefúzogenní lipozóm na fúzogenní. Lipozóm může také obsahovat jeden nebo více dalších fúzogenních lipidů, typu PE jako jsou například DOPE a syntetické lipidy jako např. DOTAP a DODAP. Tyto lipidy usnadňují fúzi mateřského lipozómu s přilehlou lipidickou membránou díky struktuře narušující dvojvrstevné uspořádání lipidů ve vodném prostředí.

Konjugát peptidu mohou také obsahovat „blokové skupiny“ např. karboxy cukry jako jsou kyselina laktobiózová a kyselina N-acetyl neuraminová, nebo polymerní složky jako jsou malé deriváty polyethylen glykolu, polyhydroxylové polymery anebo řada dalších aminokyselin v rozmezí 1-10 ve směsi obsahující aminokyseliny s hydrofilním postranním řetězcem jako je serin nebo threonin. Tyto blokové skupiny jsou napojeny na N-konec peptidu a inhibují nebo znemožňují lipozómu aby se přiblížil natolik k lipidické membráně aby mohl splynout. Odštěpení peptidu proteázou odstraní tyto blokové skupiny z peptidu a tím umožní fúzi lipozómu s lipidickou membránou. Peptidázou mediované odštěpení peptidové části konjugátu vede tedy ke vzniku fúzogenního lipidu.

Navrhovaný vynález bude jasnější ve světle následujících příkladů. Samozřejmě však každému odborníkovi v oboru bude zcela jasné příklady jsou pouze ilustrativní a vynález je definován až následnými nároky.

#### PŘEHLED OBRÁZKŮ NA VÝKRESECH

Obr. 1 : Struktura konjugátu N-Ac-AA-DOPE a znázornění rozpadu na DOPE pomocí štěpení enzymem.

Obr. 2 : Štěpení N-Ac-AA-DOPE proteázou stanovené pomocí TLC. N-Ac-AA-DOPE SUV byly inkubovány s A) elastázou nebo B) proteinázou K (1mg enzymu / 100 nmol lipidu / 0,1 ml pufru) přes noc při 37 °C. Lipid byl izolován a separován pomocí TLC. Proužky lipidu byly vyvolávány pomocí metody uvedené dále. Dráha 1, N-Ac-AA-DOPE bez enzymu, dráha 2, N-Ac-AA-DOPE po inkubaci s enzymem, dráha 3, kontrolní vzorek DOPE.

Obr. 3 : Štěpení N-Ac-AA-DOPE pomocí proteinázy K. DOTAP / N-Ac-AA-DOPE (1:1) SUV byly inkubovány jak s tak bez elastázy, proteinázy K, nebo tepelně inaktivované proteinázy K (95 °C, 1 hodina) při 1 mg proteázy / 0,1 nmol / 0,1 ml pufru koncentrace lipidu a inkubaci přes noc při 37 °C. Lipid byl izolován a analyzován pomocí HPLC. Peak N-Ac-AA-DOPE byl kvantifikován a míra štěpení byla stanovena jako procenta výchozího lipidu.

Obr. 4 : Stanovení ideálního složení lipozómu. Lipozómy byly připraveny v daných molárních poměrech DOTAP, N-Ac-AA-DOPE, PE. Ve všech případech přípravy lipozómů byly použity fluorescenční značky 1 mol % N-NBD-PE a N-Rho-PE. Lipozómy byly míchány s A) neznačeným PE / PS nebo PC / PS (80/20 mol %, 1:10 poměr efektoru a akceptoru, 60 µmol celkové množství lipidu) nebo B)  $2 \times 10^8$  RBC buněčných stínů při 37 °C po dobu 1 hodiny.

Směs lipidů byla spočtena jako procenta N-NBD-PE FDQ v poměru k maximálnímu FDQ, stanovenému pomocí přidání detergentu. Vazba lipozómů na buněčné stíny RBC byla kvantifikována po promytí buněk pufrém, srovnáním množství N-Rho-PE fluorescence navázané na buněčnou peletu vzhledem k celkové přidané míře fluorescence.

Obr. 5 : Lipozomální fúze aktivovaná elastázou a proteinázou K. DOTAP / N-Ac-AA-DOPE / PE (15/15/70 mol %) lipozómy obsahující fluorescenční membránové značky byly předem inkubovány s lidskou leukocytární elastázou nebo proteinázou K (1 mg proteinu / 100 nmol lipidu / 0,1 ml pufru) přes noc. 10 nmol alikvoty byly inkubovány s neznačeným PE/PS akceptorovým lipozómem (80/20 mol %, 1:10 poměr efektor : akceptor) po dobu 60 min při 37 °C. Lipidická směs byla stanovena určením N-NBD-PE FDQ.

Obr. 6 : Podmínky nezbytné pro aktivaci DOTAP / N-Ac-AA-DOPE / PE lipozómů proteinázou K pro fúzi s PS / PE lipozómy. DOTAP / N-Ac-AA-DOPE / PE (15/15/70 mol %) lipozómy (100 nmol) obsahující fluorescenční membránové značky byly předem inkubovány s i bez 1 mg proteinázy K nebo tepelně inaktivované proteinázy K (1 hod., 95 °C) při 37 °C v 0,1 ml pufru. 10 nmol alikvoty byly inkubovány s neznačeným PE/PS akceptorovým lipozómem (80/20 mol %, 1:10 poměr efektor : akceptor), po této době byla stanovena míra smíchání lipidů. Zbytková aktivita proteinázy K = efekt zbytku proteinázy K přeneseného k inkubační směsi s PE/PS akceptorovými lipozómy byl testován pomocí inkubace nemodifikovaných DOTAP / N-Ac-AA-DOPE / PE (15/15/70 mol %) lipozómů s PE/PS lipozómy v přítomnosti čerstvě přidaného ekvivalentu proteinázy K k předpokládanému přenesenému množství.

Obr. 7 : Koncentrace a časová závislost aktivity proteinázy K. Aktivace fúze : DOTAP / N-Ac-AA-DOPE / PE (15/15/70 mol %) lipozómy (100 nmol) obsahující fluorescenční membránové značky byly inkubovány přes noc při 37 °C buď A) přes noc s daným množstvím proteinázy K nebo B) s 1 mg proteinázy K po danou dobu. 10 nmol alikvoty byly inkubovány s neznačenými PE/PS akceptorovými lipozómy (80/20 mol %, 1:10 poměr efektor akceptor), a poté bylo stanoveno složení směsi lipidů. N-Ac-AA-DOPE odštěpování : neznačené DOTAP / N-Ac-AA-DOPE (1:1 molární poměr) lipozómy byly inkubovány stejně jak bylo uvedeno pro aktivaci fúze, a poté byl lipidický extrakt byl extrahován pomocí HPLC.

Obr. 8 : Aktivace DOTAP / N-Ac-AA-DOPE / PE lipozómů pomocí proteinázy K pro fúzi s RBC buněčnými stíny. DOTAP / N-Ac-AA-DOPE / PE (20/10/70 mol %) lipozómy (100 nmol)

obsahující fluorescenční membránové značky byly inkubovány přes noc při 37 °C s a nebo bez 1 mg proteinázy K v 0,1 ml pufru. 10 nmol alikvoty DOTAP / N-Ac-AA-DOPE / PE lipozómů, stejně tak jako DOTAP/PE (20/80 mol %) lipozómy byly inkubovány s  $1 \times 10^8$  RBC buněčnými stíny v pufru obsahujícím 0,5 mM PMSF po dobu 30 minut při 37 °C, načež byla stanovena složení směsi lipidů. Vliv přidané proteinázy K na složení směsi lipidů byl sledován pomocí inkubace neovlivněných lipozómů s RBC buněčnými stíny v přítomnosti odpovídajícího množství proteinázy K (prot. K, kontrola).

Obr. 9 : DOTAP / N-Ac-AA-DOPE / PE lipozómy s RBC buněčnými stíny : kontinuální kinetika vzniku lipidické směsi. 10 nmol DOTAP / N-Ac-AA-DOPE / PE (20/10/70 mol %) lipozómů inkubovaných (a) s a nebo (b) bez proteinázy K přes noc při 37 °C bylo přidáno do kyvety obsahující 2 ml pufru s 0,5 mM PMSF za stálého míchání a při 37 °C. Změny N-NBD-PE fluorescence byly měřeny od okamžiku kdy bylo přidáno  $1 \times 10^8$  RBC buněčných stínů po 30 sec. Zbytková aktivita proteinázy K na směs lipidů byl testován pomocí inkubace nemodifikovaných lipozómů s RBC buněčnými stíny v přítomnosti čerstvě ekvivalentního množství proteinázy K.

Obr. 10 : Dextranem naplněné DOTAP / N-Ac-AA-DOPE / PE lipozómy fúzí s RBC buněčnými stíny. DOTAP / N-Ac-AA-DOPE / PE (20/10/70 mol %) lipozómy byly naplněny 10 kD dextranem konjugovaným s Tx-red. Lipozómy byly inkubovány s proteinázou K přes noc při 37 °C. 40 nmol alikvoty lipozómů naplněných dextranem (A,C) nebo prázdné lipozómy + volný dextran (B,D) byly inkubovány s  $1 \times 10^8$  RBC buněčnými stíny v 1 ml pufru po dobu 30 minut při 37 °C, poté byly buňky promyty a pozorovány pomocí fluorescenční mikroskopie (A,B) nebo pomocí Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu (C,D).

Obr. 11 : TLC stanovení štěpení OMe-suc-ala-ala-pro-val-DOPE. A) titrace dávky HLE : 1/0  $\mu$ g HLE / 100 nmol lipidu, 2/5  $\mu$ g HLE / 100 nmol lipidu, 3/10  $\mu$ g HLE / 100 nmol lipidu, 4/čistý DOPE, 20  $\mu$ g, 5/20  $\mu$ g HLE / 100 nmol lipidu, 6/40  $\mu$ g HLE / 100 nmol lipidu, 7/40 proteinázy K / 100 nmol lipidu, 8/čistý DOPE, 20  $\mu$ g, B) Štěpení OMe-suc-ala-ala-pro-val-DOPE proteinem pocházejícím z granulí lidských neutrofilů : 1/ w/o proteáza, 2/5  $\mu$ g HLE / 50 nmol lipidu, 3 2,5  $\mu$ g proteinu z granulí neutrofilů / 100 nmol lipidu, 4/čistý DOPE, 20  $\mu$ g, 5/5  $\mu$ g proteinu z granulí neutrofilů / 100 nmol lipidu, 6/10  $\mu$ g proteinu z granulí neutrofilů / 100 nmol lipidu, 7/20  $\mu$ g proteinu z granulí neutrofilů / 100 nmol lipidu, 8/čistý DOPE, 20  $\mu$ g. Kinetika štěpení HLE : 1/ w/o proteáza, 2/1 hodiny, 5  $\mu$ g HLE/50 nmol lipidu, 6/ přes noc, 5 Mg HLE/50 nmol lipidu, 7/čistý DOPE, 20 $\mu$ g.

## PŘÍKLADY PROVEDENÍ VYNÁLEZU

### PŘÍKLAD 1.

#### A) Chemická syntéza N-Ac-Ala-Ala-DOPE

N-acetyl-alanyl-alanyl-dioleoyl fosfatidylethanolamin (N-Ac-Ala-Ala-DOPE) byl syntetizován z dříve připraveného anhydridu peptidu N-Ac-Ala-Ala-OH, nebo za pomoci jiného vhodně blokovaného karboxylem končícího peptidu. Výchozí materiál byl inkubován s N,N-dicyklohexyl carbodiimidem (DCC) v přítomnosti chloroformu několik hodin při pokojové teplotě. Vzniklý anhydrit je rozpustný v chloroformu, zatímco mezireakční produkt (dicyklohexyl močovina) není. Anhydrit je tedy snadno oddělitelný od nežádoucího mezireakčního produktu sebráním chloroformu a odstraněním precipitátu.

K anhydridu je přidáno DOPE v přítomnosti triethylaminu, který katalizuje acylační reakci, směs je pak inkubována přes noc při pokojové teplotě. Reakční směs je nanášena na preparativní desku chromatografie v tenké vrstvě, tak aby byl přečištěn N-Ac-Ala-Ala-DOPE, separací v roztoku chloroform/methanol/voda (65/25/4). Lipidový band je identifikovatelný po postříkání desky vodou. Poté je band seškrábán a rozpuštěn v chloroform/methanol (2/1). Lipid je skladován v atmosféře dusíku při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### B) Chemická syntéza 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamido-Val-Pro-Ala-Ala-SucMeO (OMe-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-DOPE):

- i) p-Nitrofenyl-Val-Pro-Ala-Ala-SucMeO ester: k roztoku H-Val-Pro-Ala-Ala-SucMeO peptidu (540 mg, 1,015 mmol), bylo přidáno 142 mg (1,38 mmol) p-nitrofenolu, 175 mg (1,38 mmol) 1,3-dicyklohexylkarbodiimidu a katalytické množství (pár krystalů) 4-dimethylaminopyridinu v 10 ml suchého chloroformu. Reakční směs byla ponechána za stálého míchání přes noc při pokojové teplotě. V tuto chvíli TLC analýza ukazuje že reakce již končí. Precipitát (DCU) vzniklý v reakční směsi byl filtrován za pomoci G-2 trychtýře a filtrát byl zakonzentrován při sníženém tlaku. Vzniklý produkt byl použit v následujícím kroku bez jakékoliv purifikace,  $R_f$  0,43 ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH, 9:1 v/v).
- ii) 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamido-Val-Pro-Ala-Ala-SucMeO: k roztoku p-Nitrofenyl-Val-Pro-Ala-Ala-SucMeO esteru (600 mg, 1,01 mmol), bylo přidáno 604 mg (0,81 mmol) 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolaminu a 82 mg (113  $\mu\text{l}$ , 0,81 mmol) triethylaminu ve 20 ml směsi rozpouštědel chloroform : tetrahydrofuran (1:4 v/v). Reakční směs byla ponechána za stálého míchání přes noc při pokojové teplotě. V tuto chvíli TLC

analýza ukazuje že reakce již končí. Reakční směs byla zakoncentrována za sníženého tlaku a puštěna přes aktivovanou TMD-8 iontoměničovou pryskyřici v směsi THF : H<sub>2</sub>O (9:1 v/v). Frakce pozitivní na fosfor byly smíchány a zakoncentrovány tak aby vznikl požadovaný produkt. Získaný materiál byl přečištěn na silikagelové koloně kapalinovou chromatografií (kolona byla promyta 5 % methanolem v chloroformu, a poté vypláchnuta pomocí směsi CH<sub>3</sub>Cl:MeOH:NH<sub>4</sub>OH 65:25:4 v/v/v), tak aby vzniklo 915 mg produktu (95 % výtěžek vzhledem k DOPE), který lyofilizací poskytne pevnou bílou látku: R<sub>f</sub> 0,76 (CH<sub>3</sub>Cl:MeOH:NH<sub>4</sub>OH 65:25:4 v/v/v) a R<sub>f</sub> 0,43 (CH<sub>3</sub>Cl:MeOH:H<sub>2</sub>O 65:25:4 v/v/v).

Molekula lipopeptidu vykazuje pozitivní reakci pro molybdenové reagens a negativní test pro ninhydrinové reagens. Identita lipopeptidové molekuly byla ověřena pomocí TLC ve dvou systémech rozpouštědel: ((i) CH<sub>3</sub>Cl:MeOH:NH<sub>4</sub>OH 65:25:4 v/v/v a (ii) CH<sub>3</sub>Cl:MeOH:H<sub>2</sub>O 65:25:4 v/v/v). V obou systémech vytvořil lipopeptid jediný bod a jeho čistota je vyšší než 99 %. Lipopeptid byl charakterizován pomocí NMR a FAB hmotnostní analýzy. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) jsou charakteristické signály na: δ 0,87 (t, 3H, J=7,15 Hz), 1,27 (40H), 1,56 (4H), 2,0 (8H), 2,23 (t, 4H, J=7,15 Hz), 5,17 (1H), 5,32 (4H, J=3,12 Hz). <sup>31</sup>P-NMR spektrum dalo jediný signál. FAB (MH<sup>+</sup>) vypočteno pro C<sub>62</sub>H<sub>109</sub>N<sub>5</sub>O<sub>15</sub>P 1195,55, bylo 1196,8 (MH<sup>+</sup>) a 1234,9 (MK<sup>+</sup>).

## PŘÍKLAD 2. Štěpení N-Ac-Ala-Ala-DOPE

Štěpení N-Ac-Ala-Ala-DOPE na DOPE pomocí elastázy bylo monitorováno pomocí chromatografie v tenké vrstvě (TLC). 100-200 nmol N-Ac-AA-DOPE SUV bylo inkubováno s 1 mg enzymu přes noc při 37 °C. Lipid byl extrahován pomocí separace organickou fází (19) dvakrát. Získaný lipid byl vysušen pod proudem N<sub>2</sub> a ponechán ve vakuu po dobu 4 hodin až přes noc. Vzorky byly poté rozpuštěny v chloroformu a naneseny na desky TLC. TLC běželo v směsi CH<sub>3</sub>Cl:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (65:25:4), vysušeno na vzduchu, postříkáno molybdenovou modří a vypáleno na horké desce. Inkubace N-Ac-AA-DOPE lipozómů s elastázou dá vzniknout produktu odpovídajícímu DOPE, zatímco neinkubovaný N-Ac-AA-DOPE nevykazuje žádné změny (Obr. 2A). Z toho vyplývá, že elastáza rozeznává N-Ac-AA-DOPE a odštěpuje dipeptid tak že vzniká DOPE.

Některé proteázy byly testovány, zda enzym s podobnou substrátovou specifitou může být použit jako model pro štěpení N-Ac-AA-DOPE elastázou. Proteináza K je serinová proteáza, která stejně jako elastáza, dokáže štěpit peptidovou vazbu v C-terminální pozici k alifatickému reziduu. Inkubací N-Ac-AA-DOPE s proteinázou K je konjugát štěpen a vzniká DOPE. (Obr. 2B).

Štěpení N-Ac-AA-DOPE na DOPE je monitorováno také pomocí  $^{31}\text{P}$ -NMR analýzy. N-Ac-AA-DOPE LUV byly připraveny a inkubovány s proteinázou K (1,5 mg proteinu / 100 nmol lipidu) přes noc při 37 °C. Vzorky byly smíchány s pufrům (10 % deoxycholát, 100 mM EDTA, 20 mM HEPES) a deuterium oxidem (Cambridge Isotope Laboratories, Woburn, MA) (1:4:2) a přeneseny do 5 mm NMR kyvet. Vzorky byly monitorovány při pokojové teplotě na spektrometru Bruker AC300 pracujícím na 121,5 Mhz, se 110 ms 90° radiové frekvence pulsu pro odštěpení protonu a nastaveno byly 2 sekundové intervaly aby se zamezilo saturaci signálu. Šířka pásma byla zvolena na 50 Hz. 1 Hz hraniční linie byla aplikována pro celé spektrum. N-Ac-AA-DOPE lipozómy s proteinázou K (1,5 mg proteinu / 100 nmol lipidu) vykazují peak 0,3 ppm narozdíl od N-Ac-AA-DOPE, což odpovídá čistému DOPE.

Štěpení N-Ac-AA-DOPE pomocí elastázy a proteinázy K bylo kvantifikováno pomocí lipozómů vytvořených ze směsi N-Ac-AA-DOPE a DOTAP. DOTAP byl použit aby vyvážil pozitivní náboj a je používán jako standart podle kterého mohou být různé vzorky přepočteny a porovnány. Po inkubaci s elastázou nebo proteinázou K byl úbytek N-Ac-AA-DOPE monitorován pomocí HPLC. Lipozómy obsahující DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE (1:1) nebo DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/PE (15/15/70 mol%) byly inkubovány s enzymem za daných podmínek. Lipid byl dvakrát extrahován pomocí procedury podle Blight-Dyera.

Z9skaný lipid byl vysušen v dusíkové atmosféře a přenesen do vakua na dobu 4 hodin až přes noc. Vzorky byly resuspendovány v 100 % ethanolu a naneseny na Spherisorb silika kolonu (150 x 4,6 mm, 0,3 um, Keystone scientific). HPLC proběhlo za použití vodné fáze hexan:isopropanol:voda:TFA. Hexan a TFA byly drženy konstantně na 37 % a 0,2 %. N-Ac-AA-DOPE peak byl detekovatelný za použití gradientu 59-55 % isopropanol : 4-8 % voda. Průtok byl 1,5 ml/min, teplota kolony byla 45 °C a peak byl detekován UV detektorem nastaveným na 205 nm. Lipidické peaky byly kvantifikovány vzhledem ke standartním křivkám získaným nanesením 5-200 nmol DOTAP nebo N-Ac-AA-DOPE a monitorováním 205 nm signálu. % štěpení byla přepočtena vzhledem k normálnímu peaku DOTAP, a poté byl stanoven úbytek N-Ac-AA-DOPE vzhledem k vstupnímu množství.

Jak elastáza tak proteináza K štěpí N-Ac-AA-DOPE se stejnou měrou (Obr. 3). Pro ověření, že štěpení N-Ac-AA-DOPE je dáno aktivitou proteinázy K, byly lipozómy inkubovány s tepelně inaktivovanou proteinázou K. Proteináza K byla tepelně inaktivována inkubací 1 hod. v 95 °C. Enzym poté nebyl schopen štěpit barevný substrát N-Ac-AAA-pNA. Inkubace DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE lipozómů s tepelně inaktivovaným enzymem, nevede k štěpení N-Ac-AA-DOPE (Obr. 3), což dokazuje že aktivní proteináza K je nezbytná. Jelikož bylo zjištěno, že proteináza K

je schopna štěpit stejný substrát jako elastáza, a je značně levnější než lidská elastáza z leukocytů, většina následných experimentů proběhla s proteinázou K.

### PŘÍKLAD 3. Štěpení OMe-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-DOPE elastázou z lidských leukocytů (HLE)

#### A) titrace dávky HLE

Pro zjištění zda peptid OMe-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-DOPE je také vhodným substrátem pro štěpení elastázou, bylo 50 nmol OMe-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-DOPE lipozómů (SUV) inkubováno s 20 ug HLE (Calbiochem, 20 u/ mg proteinu, 1 u = množství enzymu schopné hydrolyzovat 1,0 umol OMe-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-DOPE za minutu při 25 °C a pH=8) přes noc při 37°C v 50ul objemu 10 mM TES/154 mM NaCl/ 0,1 mM EDTA, pH 7,4 obsahující 1,5 mM Ca a 1,5 mM Mg.

Lipid byl extrahován pomocí techniky podle Blight-Dyera (chloroform/methanol/voda : 2/1,7/1), vysušen v dusíkové atmosféře a umístěno do vysokého vakua na asi 3 hodiny. Vzorky byly resuspendovány v 5 ul chloroformu a nanášeny na desky TLC. 20 ug čistého DOPE bylo také nanášeno jako kontrola. Mobilní fázi byla směs chloroform/ methanol/ hydroxid amonný (65/25/2). Desky byly vysušeny na vzduchu, postříkány molybdenovou modří a vypáleny při 180 °C.

#### B) Štěpení OMe-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-DOPE proteinem z granulí lidských neutrofilů

Jelikož elastáza je produkována aktivovanými neutrofilů, štěpení OMe-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-DOPE nepřechištěným enzymem z granulí lymfocytů, bylo testováno také, neboť napodobuje lépe in vivo situaci. Neutrofilů byly získány z celkové lidské krve standartním postupem představujícím denzitní centrifugaci. Granule byly izolovány z těchto neutrofilů centrifugací po kavitaci buněk, opět následovanou procedurami stanovení. Koncentrace proteinu získaného z granulí neutrofilů byla stanovena po opakovaném zamražení a roztavení granulí tak aby uvolnili proteázy.

50 nmol OMe-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-DOPE lipozómů(SUV) bylo inkubováno s 0, 2,5, 5, 10, nebo 20 ug proteinů z granulí neutrofilů přes noc při 37 °C v 50ul objemu 10 mM Mg. Vzorky byly ošetřeny stejně jako je popsáno výše. Výsledky ukazují, že 2,5 µg proteinu z granulí neutrofilů je dostatečných pro detekovatelné štěpení OMe-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-DOPE na DOPE, což naznačuje, že surový protein z granulí lymfocytů může štěpit konjugát na DOPE a tedy lipozómy obsahující peptid-lipid mohou být aktivovány pro fúzi za fyziologických podmínek.

#### C) Kinetika štěpení OMe-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-DOPE pomocí HLE

OMe-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-DOPE lipozómy byly inkubovány s 0 nebo 5  $\mu\text{g}$  HLE po dobu 1, 2, 4 hodiny, nebo přes noc a dále ošetřeny stejně jak je uvedeno výše. Peptid je odštěpen pomocí HLE za méně než 1 hodinu při 37 °C, což ukazuje, že štěpení OMe-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-DOPE probíhá ve fyziologicky relevantním časovém rámci

Výsledky těchto pokusů jsou uvedeny na Obr. 11.

#### PŘÍKLAD 4. Příprava lipozómů

NBD/Rh značené, nebo neznačené velké jednovrstevné lipozómy (LUV) byly připraveny tak jak bylo popsáno již dříve (Mayer et al.). Zkráceně, směs lipidů v chloroformu byla vysušena v proudu dusíku tak aby vznikl tenký film, který je poté ponechán přes noc ve vakuu, aby bylo odstraněno reziduální rozpouštědlo. Lipidický film byl hydratován TES pufrovaným roztokem (10 mM TES, 0,1 mM EDTA, 154 mM NaCl, pH=7,4). Směs je lehce protřepána aby došlo ke kompletní hydrataci. Po deseti cyklech zamražení a zatavení v kapalném dusíku / vodní lázni o pokojové teplotě, byl vzorek protlačen desetkrát přes 0,1  $\mu\text{m}$  polykarbonátový membránový filtr (Poretics Corp., Livermore, CA). Lipozómy byly skladovány při 4 °C. Multilamelární lipozómy byly připraveny hydratacím suchého lipidického filmu.

Koncentrace fosfolipidu při každé přípravě byla stanovena fosfátovou metodou (Bartlett). Že se jedná o lipozómy o velikosti přibližně 0,1  $\mu\text{m}$  bylo stanoveno na Nicomp submicron particle sizer (Nicomp Instruments, Inc., Goleta, CA) za použití quasi-elastického rozptylu světla.

#### PŘÍKLAD 5. Příprava znovu uzavřených a neuzavřených buněčných stínů lidských erytrocytů

Znovu uzavřené buněčné stíny popisují v podstatě stíny erytrocytů, pokud není specifikováno jinak, a byly připraveny způsobem uvedeným výše (viz. Williamson et al., Clague et al., které zde jsou uvedeny jako reference). Zkráceně, čerstvá lidská krev je promyta několikrát studeným 10 mM TES solným roztokem, aby byla odstraněna plasma a bílé krvinky. Poté byly 2 ml promytých erytrocytů (50 % hematokrit) byly svraštěny v ledovém hypotonickém roztoku obsahujícím 8 ml  $\text{H}_2\text{O}$  a 9,6 ml 10 mM TES solného roztoku a poté centrifugovány 850 x g po dobu 5 minut. Peleta byla resuspendována v 40 ml ledového lyzačního pufru (10 mM Tris, 0,1 % BSA, 2 mM  $\text{MgCl}_2$  a 0,1 mM EGTA) a inkubována na ledu alespoň 2 minuty. Po přidání 4,5 ml 10x koncentrovaného obnovovacího pufru (1,22 M  $\text{MnCl}$ , 30 mM KCl, 0,15 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ) a vzorky byly inkubovány 40 minut při 37 °C. Znovu uzavřené buněčné stíny byly centrifugovány při 1750 x g po dobu 10 minut a promyty tolikrát dokud je hemoglobin patrný v supernatantu. Buněčné stíny jsou skladovány při 4 °C do použití po dobu 1 týdne.

**PŘÍKLAD 6.** Vytvoření lipozómu obsahujícího N-Ac-AA-DOPE s regulovatelnou fuzogenitou. Míra fuzogenicity byla určena přípravou lipozómů se zvýšeným obsahem PE taransesterifikovaného z vaječného PC. Tento PE je vhodnější než DOPE díky své vyšší  $H_{II}$  přechodové teplotě ( $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$  oproti  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), což umožňuje přípravu stabilních lipozómů, ale neinhibuje fúzi. DOTAP byl zvolen jako pozitivně nabitý lipid. Fúzní technika byla testována pro DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/PE lipozómy obsahující membránovou fluorescenční proubu N-NBD-PE a N-Rho-PE a opačně odpovídající množství N-Ac-AA-DOPE a PE. Tyto lipozómy byly testovány pro smíchání lipidů s buď jinými neznačenými lipozómy, nebo promíchání a navázání na RBC buněčné stíny. Promíchání lipidů mezi NBD/Rh značenými lipozómy a neznačenými buněčnými stíny bylo měřeno v 10 mM TES solném roztoku pomocí NBD/Rh rezonančního energetického transferu (RET) technika (Struck et al., uvedeno zde jako citace).

Lipozómy byly připraveny s 1 mol % N-NBD-PE a 1 mol % N-Rho-PE, což vede ke zhášení fluorescenčního signálu N-NBD-PE. Fúze membrán vede k difúzi prouby a potlačení samozhášení, což se projeví nárůstem fluorescence N-NBD-PE. Promíchání lipidů mezi sebou je iniciováno přidáním 10 nmol fluorescenčně značených lipozómů k 90 nmol neznačených lipozómů v mikrocentrifugační zkumavce obsahující 1 ml TES/NaCl/EDTA pufru s 1,5 mM  $\text{Ca}^{++}$ /1,5 mM  $\text{Mg}^{++}$ . Pro fúzi s buňkami nahradilo neznačené lipozómy  $1 \times 10^8$  RBC buněčných stínů. Všechny vzorky byly míchány v Eppendorf Thermomixeru (Brinkman Instruments, Inc., Westbury, NY), 700 rpm/min po dobu 30 minut při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Fluorescence N-NBD-PE byla měřena na T-formát PTI Alphascan spectrafluorometer (Princeton, NJ) s xenonovou obloukovou lampou za použití vlnových délek 450 nm excitace/530 nm emise a 5 nm štěrbin. 450 nm band pasové a 500 nm redukční filtry byly použity pro úpravu excitačních a emisních paprsků, pro redukci zbloudilého světla. Maximální fluorescence byla stanovena přidáním 0,1 % C12E8 detergentu.

Je jasné že míra fuzogenity závisí i na cíli. Lipozómy vyrobené z DOTAP a PE fúzují jak s cílovými lipozómy tak s RBC buněčnými stíny. Přidáním 10 mol % N-Ac-AA-DOPE a odpovídající nárůst PE na 70 mol % dá vzniknout lipozómům které jsou schopny fúzovat s PE/PS lipozómy, ale už ne s PC/PS lipozómy (Obr. 4A). Požadavky pro fúzi membrán s RBC buněčnými stíny se zdají být poněkud přísnější, příměs 5 mol % N-Ac-AA-DOPE inhibuje značně jak míchání lipidů, tak vazbu (Obr. 4B). Definováním různé míry fúze pro odlišné cíle, vznikne gradient citlivosti pro fúzi, který může být použit pro určení optimálních podmínek pro aktivaci lipozómů obsahujících N-Ac-AA-DOPE k fúzi. Jelikož PE/PS lipozómy jsou nejcitlivější cíl pro fúzi, zaměřili jsme se na přípravu DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/PE lipozómů, které mohou být aktivovatelné k fúzi. Míra obsahu PE se zdá být mezi 65-70 mol %. Za účelem

vytvořit lipozómy, které nejsou od počátku silně pozitivně nabity, byly DOTAP a N-Ac-AA-DOPE přidány v odpovídajícím množství, tak aby vznikly lipozómy složené z DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/PE v poměru mol 15/15/70.

**PŘÍKLAD 8:** Aktivace promíchání lipidů mezi lipozómy pomocí enzymatického štěpení

Jelikož elastáza a proteináza K jsou schopny štěpit N-Ac-AA-DOPE na DOPE (Obr. 2,3), byly oba enzymy testovány na schopnost aktivovat DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/ PE (15/15/70 mol %) lipozómy k fúzi. Tyto lipozómy byly inkubovány přes noc při 37 °C s elastázou nebo proteinázou K, nebo bez patřičných enzymů, a poté byly lipozómy inkubovány s PE/PS lipozómy a míchání lipidů bylo pozorováno potlačením zhášení fluorescence N-NBD-PE. Lipozómy byly inkubovány s 1 mg proteázy/ 100 nmol lipidu/ 0,1 ml pufru, pokud není uvedeno jinak. Tato koncentrace proteinázy K, jak bylo zjištěno, má porovnatelnou aktivitu, co se průběhu a maxima týče, jako elastáza v synoviální tekutině pacientů s rheumatoidní artritidou (21, nepublikovaná data). Směsi byly inkubovány při 37 °C v mikrocentrifugačních zkumavkách za stálého míchání v Eppendorf Thermomixeru, 700 rpm/min. Inkubované lipozómy byly poté testovány na štěpení N-Ac-AA-DOPE pomocí HPLC. Pro fúzní experimenty lipozómy obsahující fluorescenční membránové próby byly inkubovány s proteázou a poté byla koncentrace lipozómů stanovena pomocí přímého měření fluorescence N-Rho-PE (550 ex/ 590 em) a srovnáno se známým množstvím kontrolních lipozómů. Alikvoty těchto fluorescenčně značených lipozómů inkubovaných s proteázou byly smíchány s neznačenými cílovými lipozómy nebo buňkami a promíchání lipidů bylo stanoveno stejně jako bylo uvedeno výše.

Inkubace s jakýmkoliv enzymem byla charakterizována daleko vyšší mírou promíchání lipidů, než v případě neštěpených lipozómů (Obr. 5). Tento výsledek, zároveň se sdílenou substrátovou specifitou proteinázy K a elastázy, naznačuje že aktivace proteinázou K může sloužit jako vhodná náhrada za elastázu, pro aktivaci fúze lipozómů obsahujících N-Ac-AA-DOPE.

Závislost štěpení N-Ac-AA-DOPE konjugátu a aktivace fúze lipozómů obsahujících DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/ PE (15/15/70 mol %) byla testována pomocí tepelně inaktivované proteinázy K. DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/ PE (15/15/70 mol %) lipozómy obsahující fluorescenční membránové próby N-NBD-PE a N-Rho-PE byly inkubovány přes noc v 37 °C s aktivní i neaktivní proteinázou K, načež alikvoty lipozómů byly inkubovány s neznačenými PS/PE akceptorovými lipozómy aby bylo možné monitorovat průběh míchání lipidů. Inkubace DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/ PE lipozómů s aktivní proteinázou K vedlo k přibližně 30 % nárůstu fluorescence, tedy asi šestinásobnému nárůstu promíchání lipozómů oproti kontrolním lipozómům (Obr. 6). Inkubace se stejným množstvím tepelně inaktivovaného enzymu neaktivuje

lipozómy k fúzi (Obr. 6). Je tedy zřejmé že pro aktivaci fuzogenity lipozómů je třeba enzymatická aktivita a z toho vyplývá že štěpení N-Ac-AA-DOPE je nezbytné pro spuštění fúzogenního potenciálu.

Jelikož experimentální protokol zahrnuje přenos malého množství aktivní proteinázy K (10 ug proteázy/ 100 nmol lipidu, 100 krát ředěno) zároveň s předem inkubovanými lipozómy k následné inkubaci lipozóm – lipozóm, je možné, že toto množství enzymu způsobuje pozorované promíchání lipidů nespecifickým efektem proteinu. Tato možnost byla testována přidáním předpokládaného zbytkového množství proteinázy K k předem neštěpené inkubační směsi DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/ PE + PE/PS. Promíchání lipidů bylo v tomto případě stejné jako u lipozómů inkubovaných bez proteinázy K (Obr. 6). Navíc, kontinuální fúzní kinetika vykazuje okamžitý nárůst intenzity fluorescence po smíchání DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/ PE lipozómů inkubovaných s proteinázou K s PS/PE lipozómy (nepublikovaná data). Enzymem spuštěný nárůst nebude dosažen okamžitě, což naznačuje, že nespecifické enzymatické štěpení cílových lipozómů není příčinou fúze. Další přítomnost proteinu nemůže být zodpovědná za nárůst fluorescence, neboť tepelně inaktivovaná proteináza K nevyvolává podobný efekt. Naopak proteináza K fyzicky nepreventuje fúzi, a exogenní proteináza K přidaná ke směsi fúzogenních DOTAP/PE lipozómů s cílovými lipozómy nemůže inhibovat promíchání lipidů (nepublikovaná data). Z toho vyplývá, že pouze předchozí inkubace s enzymaticky aktivní proteinázou K spustí fúzi N-Ac-AA-DOPE lipozómů.

Spolehlivost aktivace fúze pomocí enzymatického štěpení N-Ac-AA-DOPE byla dále stanovena pomocí testování koncentrací a časových závislostí obou jevů. DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/ PE lipozómu byly inkubovány s 0, 0,1, 0,25, 0,5 a 1 mg proteinázy K/100 nmol lipidu přes noc, nebo s 1 mg proteinázy K/ 100 nmol lipidu po dobu 1, 2, 4 hodin nebo přes noc. Pomocí HPLC bylo poté měřeno štěpení N-Ac-AA-DOPE, nebo pomocí nárůstu intenzity fluorescence N-NBD-PE bylo testováno promíchání lipidů. V obou případech, jak pro N-Ac-AA-DOPE štěpení tak pro fúzi lipozómů, byly zjištěny podobné koncentrační závislosti (Obr. 7A). Inkubace s 0,5 nebo 1 mg proteinázy K vykazuje maximální účinnost štěpení a aktivaci fúze. Pouze nízká úroveň obou aktivit byla pozorována při použití 0 nebo 0,1 mg enzymu. Kinetika štěpení proteinázou K a aktivace fúze byla také porovnána. Inkubace přes noc vykazuje nejvyšší množství štěpení a promíchání lipidů (Obr. 7B). Tyto závěry podporují tvrzení, že aktivace fúze DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/ PE lipozómů je dáno enzymatickým štěpením N-Ac-AA-DOPE.

**PŘÍKLAD 9:** Aktivace fúze DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/ PE lipozómů s RBC buněčnými stíny

Jelikož DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/ PE lipozómy mohou být aktivovány k fúzi s cílovými lipozómy enzymatickým štěpením, zjišťovalo jsme zda aktivovaná fúze N-Ac-AA-DOPE lipozómů bude pozorována i s buňkami. Jelikož fúze s RBC buněčnými stíny (Obr. 4B) vykazuje jiné parametry než fúze s lipozómy (Obr. 4A), připravili jsme DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/ PE lipozómy v molárním poměru 20/10/70. Celkový pozitivní náboj těchto lipozómů zlepšuje vazbu na buňky, v poměru ke směsi 15/15/70, ale neumožní lipozómu fúzovat s buňkou v nepřítomnosti aktivčního signálu (Obr. 4B). Po inkubaci těchto lipozómů s proteinázou K přes noc při 37 °C, byly lipozómy smíchány s RBC buněčnými stíny v přítomnosti proteázového inhibitoru PMSF (Obr. 8). Aktivita reziduální proteinázy K přenesené z první inkubace je zanedbatelná (Obr. 8). Specifická aktivace fúze DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/ PE (20/10/70 mol %) s RBC buněčnými stíny byla také pozorována za kontinuálních kinetických podmínek. Pouze lipozómy předem inkubované s proteinázou K byly schopné fúzovat s RBC buněčnými stíny, zatímco neštěpené lipozómy nikoliv (Obr. 9). Přidání aktivní proteinázy K k neštěpeným lipozómům také neindukuje nárůst fluorescence (Obr. 9, křivka c), což ukazuje, že pozorovaný nárůst po inkubaci DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/ PE lipozómů s proteinázou K je dán specifickou aktivací fúze.

Pro určení, zda promíchání lipidů pozorované po aktivaci proteinázou K bylo dáno skutečně fúzí lipozómů s buňkami a ne artificiálním promícháním lipidů v membránách, jako je membránová výměna próby nebo hemifúze mezi vnějšími vrstvami membrán, byly DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/ PE (20/10/70 mol %) lipozómy naplněny 10 000 MW fluorescenční hydrofilní proubou TX-red dextranem. Poté byly lipozómy inkubovány s proteinázou K a inkubovány s RBC buněčnými stíny. Po důkladném promytí buněk, aby byly odstraněny nenasazené lipozómy, byly RBC buněčné stíny pozorovány fluorescenčním mikroskopem. Buněčná peleta byla resuspendována v 0,1 ml pufru a pozorována na fluorescenčním mikroskopu Olympus BH-2 (Olympus Corp., Lake Success, NY) za použití apochromního objektivu 40x (N.A. 1.00) v olejové imerzi. TX-red fluorescence byla excitována pomocí xenonové lampy a paprsek procházel skrz zelenou excitační kostku (580 nm dichroické zrcadlo, 545nm excitační filtr). Ne fluorescenční obrázky byly pořízeny pomocí Nomarského diferenciální interferenční kontrastní mikroskopické techniky.

Jasná difúzní fluorescence byla pozorována v část buněk (Obr. 10), což dokazuje, že došlo ke kompletní fúzi mezi lipozómem a buňkou, čímž došlo k přenosu hydrofilní próby. Rozdíly v míře fluorescence mohou být dány množstvím lipozómů fúzovaných s jednotlivými buňkami. Pozorovaná fluorescence není způsobena nespecifickým pozřením dextranu z prasklých lipozómů, neboť po inkubaci RBC buněčných stínů s neznačenými lipozómy a volným TX-red

dextranem není patrná uvnitř buněk žádná fluorescenční próba (Obr.10). Tedy DOTAP/ N-Ac-AA-DOPE/ PE lipozómy mohou být aktivovány enzymatickým štěpením konjugátu peptid-lipid aby mohly fúzovat s cílovými buňkami a doručit dovnitř svůj hydrofóbní obsah.

**Příklad 10:** Aktivace lipozómů obsahujících OMe-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-DOPE pomocí HLE pro zvýšení vazby a fúze

100 nmol DOTAP/ AAPV-PE (3:1, 1:1, 1:3) bylo inkubováno +/- HLE (5 ug/ 100 nmol lipidu) ve 100 ul po dobu 2 hodin při 37 °C, pH 7,4 za neustálého míchání. Poté bylo 10 nmol lipozómů předem inkubovaných s +/- HLE smícháno s 1-2 x 10<sup>6</sup> buňkami HL60 (lidská leukemie) při pH 7,4 nebo 4. Vzorky byly inkubovány 2 hodiny za stálého míchání. Po inkubaci byly buňky dvakrát promyty , resuspendovány v 0,5 ml a přeneseny do 24 jamkové Falcon destičky (primaria). Fluorescence byla měřena +/- detergent v cytofluoru. Kontrolní lipozómy (bez buněk) nebyly promyty a byly přeneseny přímo na 24 jamkovou destičku.

Lipozómy vykazují vyšší vazbu při pH 4,0. Vazba je také silnější po inkubaci s HLE. Navíc DODAP/ AAPV-PE (1:1) může vykazovat vyšší intenzitu fluorescence po inkubaci s HLE, což ukazuje že dochází k promíchání lipidů mezi lipozómy a buňkami.

DODAP/AAPV-PE	% lipo vazby		%NBD FD	
	pH 7,4	pH 4,0	pH 7,4	pH 4,0
1:3 - HLE	2,68	53,58	104,22	33,13
1:3 + HLE	0,74	70,34	-32,43	32,53
1:1 - HLE	2,37	56,95	59,94	23,86
1:3 + HLE	2,87	85,91	77,42	44,81
3:1 - HLE	6,76	67,88	-5,05	64,52
3:1 + HLE	7,78	80,82	43,43	69,04

Tři nezávislé experimenty také ukazují zvýšenou vazbu DOTAP/ AAPV-PE (1:1) na HL60 buňky. Jeden ukazuje zlepšení ze 64 % na 86 % nárůstu fluorescence. Vzhledem k celkové míře lipozomální fúze, inkubace HLE prokazatelně zlepšuje promíchávání lipidů, což prokázaly všechny tři experimenty.

	W/o HLE	w/ HLE
% vazby	20,29	45,22
# vazby	1.22E + 10	2.72E + 10
% promíchání lipidů	48,6	44,24
# promíchání lipidů	5,87E + 11	1,20E + 12
	W/o HLE	w/ HLE
% vazby	7,72	33,17
# vazby	4,60E + 09	2.00E + 10
% promíchání lipidů	57,12	25,89
# promíchání lipidů	2,65E + 11	5,17E + 11
	W/o HLE	w/ HLE
% vazby	38,09	46,89
# vazby	2,29E + 10	3,08E + 10
% promíchání lipidů	63,74	86,25
# promíchání lipidů	1,46E + 12	2,43E + 12

## Citace:

- Aimes, R. T. and Quigley, J. P. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 5872-5876; Allen, T., et al., U.S. Patent Nos. 4,837,028 and 4,920,016; Ascenzi et al., *Anal. Biochem.*, 103:235 (1980); Barrett & Kirschke, *Meth. Enzymol.* 80:535 (1981); Bartlett, G. R., (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 466-468; Berka, J. L. et al., (1996) *Molecular & Cellular Endocrinology* 119, 175-184; Blume et al., (1993) *Biochim. Biophys. Acta.* 1149:180 (1993); Boyd, D. (1996) *Cancer and Metastasis Reviews* 15, 77-89; Castillo et al., *Anal. Biochem.* 99:53 (1979); Clague, M. J., et al. (1990) *Biochemistry* 29, 1303-1309; Fosang, A. J., et al., (1994) *Biochemical J.* 304, 347-351; Froehlich, et al., (1993) *J. Immunol.* 151, 7161-7171; Gabizon, A., et al., *Pharm. Res.* 10(5):703 (1993); Hoog, S. S., et al., *Biochemistry* 35, 10279-10286; Johnson et al., *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 21:259 (1969); Kirschke et al., *Biochem. J.* 201:367 (1982); Knäuper, V., et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 1544-1550; Knight, *Biochem. J.* 189:447 (1980); Kossakowska, A. E., et al., (1996) *Br. J. Cancer* 73, 1401-1408; Liotta, L. A., et al., (1991) *Cell* 64, 327-336; Mayer, L. D., et al., (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 858, 161-168; Moehrl, M. C., et al., (1995) *J. Cutaneous Path.* 22, 241-247; Nagase, H., et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 20952-20957; Nakajima, K., et al., (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4027-4032; Odake, S., et al., (1991) *Biochemistry* 30, 2217-2227; O'Leary, R. M. and O'Connor, B. (1995) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27, 881-890; Palmieri, F. E. and Ward, P. E. (1989) *Adv. Exp. Med. Biol.* 247A, 305-311; Park et al., (1992) *Biophys Acta.* 1108:257 (1992); Pei, D., et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 25849-25855; Prechel, M. M., et al., (1995) *J. Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 275, 1136-1142; Rogi, T., et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 56-61; Sato and Sunamoto, "Site Specific Liposomes Coated with Polysaccharides," in: *Liposome Technology* (G. Gregoriadis, ed.), CRC Press (Boca Raton, FL), 1993, pp. 179-198; Spratt, D. A., et al., (1995) *Microbiology* 141, 3087-3093; Steck, T.L. & Kant, J.A. (1974) *Methods Enzymol.* 31, 172-180; Struck, D. K., et al., (1981) *Biochemistry* 20, 4093-4099; Subbaro et al., *Biochem.* 26(11): 2964-2969 (1987); Uden, A. B., et al., (1996) *J. Invest. Dermat.* 107, 147-153; Vogel, S.S., Leikina, E. and Chernomordik, *JBC* 268: 25764 (1993); Ward, P. E., Russell, J. S. and Vaghy, P. L. (1995) *Peptides* 16, 1073-1078; Williamson, P., et al., (1985) *J. Cell Physiol.* 123, 209-214; Wilson, M. J., et al., (1993) *Biochemistry* 32, 11302-11310; Wohl et al., *JBC*, 255:2005 (1980); Petkov et al., *Eur. J. Biochem.* 51:25 (1975); Woodle et al., U.S. Patent No. 5,013,556; Yamashita, J. I., et al., (1994) *Br. J. Cancer* 69, 72-76.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Konjugáty peptidu s lipidem podle následujícího obecného vzorce :



Kde X je linker tvořený buď jednoduchou vazbou nebo skupinou  $R^3$ , každé  $R^1$ ,  $R^2$  a  $R^3$  je nezávisle skupina se vzorcem  $C(O)(CH_2)_{n1}(CH=CH)_{n2}(CH_2)_{n3}(CH=CH)_{n4}(CH_2)_{n5}(CH=CH)_{n6}(CH_2)_{n7}(CH=CH)_{n8}(CH_2)_{n9}CH_3$ ,

hodnota  $n1$  v spadá do rozmezí 1 až 22,  $n3$  spadá do rozmezí 1 až 19,  $n5$  spadá do rozmezí 1 až 16,  $n7$  spadá do rozmezí 1 až 13,  $n9$  spadá do rozmezí 1 až 10,

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

pro každé  $R^3$  je součet  $n1 + 2n2 + n3 + 2n4 + n5 + 2n6 + n7 + 2n8 + n9$  v intervalu od 0 do 22,

každé  $n2$ ,  $n4$ ,  $n6$  a  $n8$  je nezávisle 0 nebo 1,

Y je peptid obsahující aminokyselinovou sekvenci, která je substrátem buňkou tvořené peptidázy.

2. Konjugát podle nároku 1, vyznačující se tím, že X je jednoduchá vazba.
3. Konjugát podle nároku 1, vyznačující se tím, že pro každé  $R^1$  a  $R^2$  je nezávisle alespoň jedno z  $n2$ ,  $n4$ ,  $n6$  a  $n8$  celé číslo s hodnotou 1.
4. Konjugát podle nároku 3, vyznačující se tím, že každé  $R^1$  a  $R^2$  je  $OC(O)(CH_2)_7(CH=CH)(CH_2)_7CH_3$
5. Konjugát podle nároku 1, vyznačující se tím, že peptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci Ala-Ala.
6. Konjugát podle nároku 5, vyznačující se tím, že peptid obsahuje jednu z následujících aminokyselinových sekvencí Ala-Ala-, Ala-Ala-Pro-Val-, Ala-Ala-Met-, Ala-Ala-Pro-Phe-, Ala-Ala-Pro-Met-, Ala-Ala-Arg-, Ser-Ala-Ala-Arg-, Ser-Ser-Ala-Ala-Arg-, Ser-S-karboxy cukr- Ala-Ala-Arg-, Ala-Ala-Asp-, Ser-Ala-Ala-Asp-, Ser-Ser-Ala-Ala-Asp-.

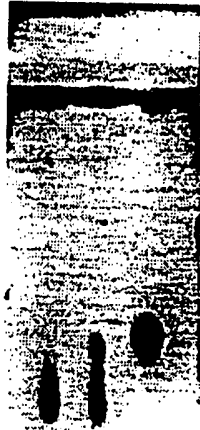
7. Konjugát podle nároku 6, vyznačující se tím, že peptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci Ala-Ala-Pro-Val.
8. Konjugát podle nároku 1, vyznačující se tím, že peptid obsahuje jednu z následujících aminokyselinových sekvencí Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-, Ser-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-, Ser-Ser-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-, Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH<sub>2</sub>, Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>, Pro-Cha-Gly-Nva-, Pro-Leu-Gly-Leu-, Gly-Pro-Arg-, Leu-Pro-Arg-, Glu-Gly-Arg-, Pro-Leu-Gly-Leu- a Gly-Pro-Gln-Gly-Ile.
9. Konjugát podle nároku 1, vyznačující se tím, že peptid je modifikován na svém amino konci jednou ze skupin acetyl, methoxy, karboxy cukr, polyethylen glykol a methoxy substituované modifikace karboxy cukrů.
10. Konjugát podle nároku 9, vyznačující se tím, že modifikace na amino konci je methoxy-sukcinylová skupina.
11. Konjugát podle nároku 10, vyznačující se tím, že peptid obsahuje modifikovanou aminokyselinovou sekvenci N-methoxy-sukcinyl-Ala-Ala-Pro-Val.
12. Konjugát podle nároku 1, vyznačující se tím, že odpovídá vzorci:
 
$$\begin{aligned} & \text{H}_2\text{C-OC(O)(CH}_2\text{)}_7\text{CH=CH(CH}_2\text{)}_7\text{CH}_3 \\ & \text{HC-OC(O)(CH}_2\text{)}_7\text{CH=CH(CH}_2\text{)}_7\text{CH}_3 \\ & \text{H}_2\text{C-OP(O)}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-Val-Pro-Ala-Ala} \end{aligned}$$
13. Lipozóm, vyznačující se tím, že je složený z dvojvrstvy lipidů a obsahuje konjugát peptidu s lipidem podle nároku 1.
14. Lipozóm podle nároku 13, vyznačující se tím, že obsahuje alespoň 20 mol % konjugátu vzhledem ke zbytku lipidických složek v lipozómu.
15. Lipozóm podle nároku 14, vyznačující se tím, že konjugát obsahuje přibližně od 20 mol % od asi 80 mol % lipidické komponenty.
16. Lipozóm podle nároku 15, vyznačující se tím, že konjugát obsahuje přibližně 50 mol % lipidické komponenty.
17. Lipozóm podle nároku 14, vyznačující se tím, že další přídavné lipidy jsou pozitivně nabitě lipidy.

18. Lipozóm podle nároku 17, vyznačující se tím, že pozitivně nabitě lipidy jsou DOTAP, 1-N,N-dimethylaminodioleoyl propan (DODAP), 1-oleoyl-2-hydroxy-3N,N-dimethylamino propan, 1,2-diacyl-3-N,N-dimethylamino propan a 1,2-didecanoyl-1-N,N-dimethylamino propan, DC-Chol, DMRIE a DORI.
19. Lipozóm podle nároku 18, vyznačující se tím, že pozitivně nabitý lipid je DODAP.
20. Lipozóm podle nároku 14, vyznačující se tím, že přídatný lipid je fosfatidylethanolamin.
21. Lipozóm podle nároku 14, vyznačující se tím, že fosfatidylethanolamin je transesterifikovaný fosfatidylethanolamin (tPE), dipalmitoyl fosfatidylethanolamin (DPPE), palmitoyloleoyl fosfatidylethanolamin (POPE) a DOPE.
22. Lipozóm podle nároku 20, vyznačující se tím, že fosfatidylethanolamin je napojen přes svou aminoskupinu ke skupině typu dikarboxylové kyseliny, polyethylen glykolu, polyalkyl etheru a gangliosidu.
23. Lipozóm podle nároku 13, vyznačující se tím, že obsahuje DODAP a DOPE konjugáty s peptidem obsahujícím aminokyselinovou sekvenci N-methoxy-sukcinyl-Ala-Ala-Pro-Val.
24. Lipozóm podle nároku 23, vyznačující se tím, že obsah lipidických komponent je 50 % DODAP a 50 mol % konjugátu lipidů s peptidem.
25. Přípravek, vyznačující se tím, že obsahuje lipozomy podle nároku 13.
26. Přípravek podle nároku 25, vyznačující se tím, že obsahuje také farmaceuticky přijatelný nosič.
27. Způsob doručování obsahu lipozómů do buněk savců, vyznačující se tím, že zahrnuje kontakt buněk s přípravkem podle nároku 26, přičemž savčí buňka je buňka sekretující peptidázu a konjugát peptidu s lipidem obsahuje aminokyselinovou sekvenci rozeznávanou sekretovanou peptidázou.
28. Způsob podle nároku 27, vyznačující se tím, že lipozóm obsahuje bioaktivní agens typu antivirových látek, antibakteriálních látek, antifungálních látek, antineoplastických látek, protizánětlivých látek, radiových značek, kontrastních látek, fluorescenčních značek, látek rozšiřujících zornici, bronchodilatátorů, lokálních anestetik, sekvencí nukleových kyselin a bioaktivních lipidů.

29. Způsob podle nároku 27, vyznačující se tím, že lipozóm je velký unilamelární lipozóm.
30. Způsob podle nároku 27, vyznačující se tím, že konjugát peptidu s lipidem obsahuje aminokyselinovou sekvenci rozeznávanou peptidázou patřící do skupiny metaloproteáz mezibuněčné hmoty, serinových proteáz nebo cysteinových proteáz.
31. Způsob podle nároku 27, vyznačující se tím, že konjugát peptidu s lipidem obsahuje aminokyselinovou sekvenci rozeznávanou peptidázou jako je elastáza, plasmin, aktivátor plasminogenu, stromelysin, lidské kolagenázy, kathepsiny, lysozym, granzymy, dipeptidyl peptidázy, peptidové hormony inaktivující enzymy, kinázy, bakteriální peptidázy a virové proteázy.
32. Způsob podle nároku 31, vyznačující se tím, že peptidáza je elastáza.
33. Způsob podle nároku 31, vyznačující se tím, že peptidáza je stromelysin.
34. Způsob podle nároku 31, vyznačující se tím, že peptidáza je kathepsin.
35. Způsob podle nároku 31, vyznačující se tím, že peptidáza je plasmin nebo aktivátor plasminogenu.
36. Způsob podle nároku 27, vyznačující se tím, že přípravek obsahuje lipozómy složené z lipidických komponent DODAP a N-Ala-Ala-Pro-Val-DOPE.
37. Způsob podle nároku 36, vyznačující se tím, že lipidické složky jsou 50 mol % DODAP a 50 mol % N-Ala-Ala-Pro-Val.
38. Způsob podle nároku 27, vyznačující se tím, že savec trpí rakovinou a lipozóm obsahuje terapeuticky efektivní množství protinádorového léčiva.
39. Způsob podle nároku 28, vyznačující se tím, že savec trpí zánětlivou poruchou a částice nosiče obsahuje terapeuticky efektivní množství protizánětlivého léčiva.
40. Způsob podle nároku 28, vyznačující se tím, že savec trpí genetickou poruchou a částice nosiče obsahuje nukleovou kyselinu kódující protein schopný tuto poruchu napravit.



Obr. 2A



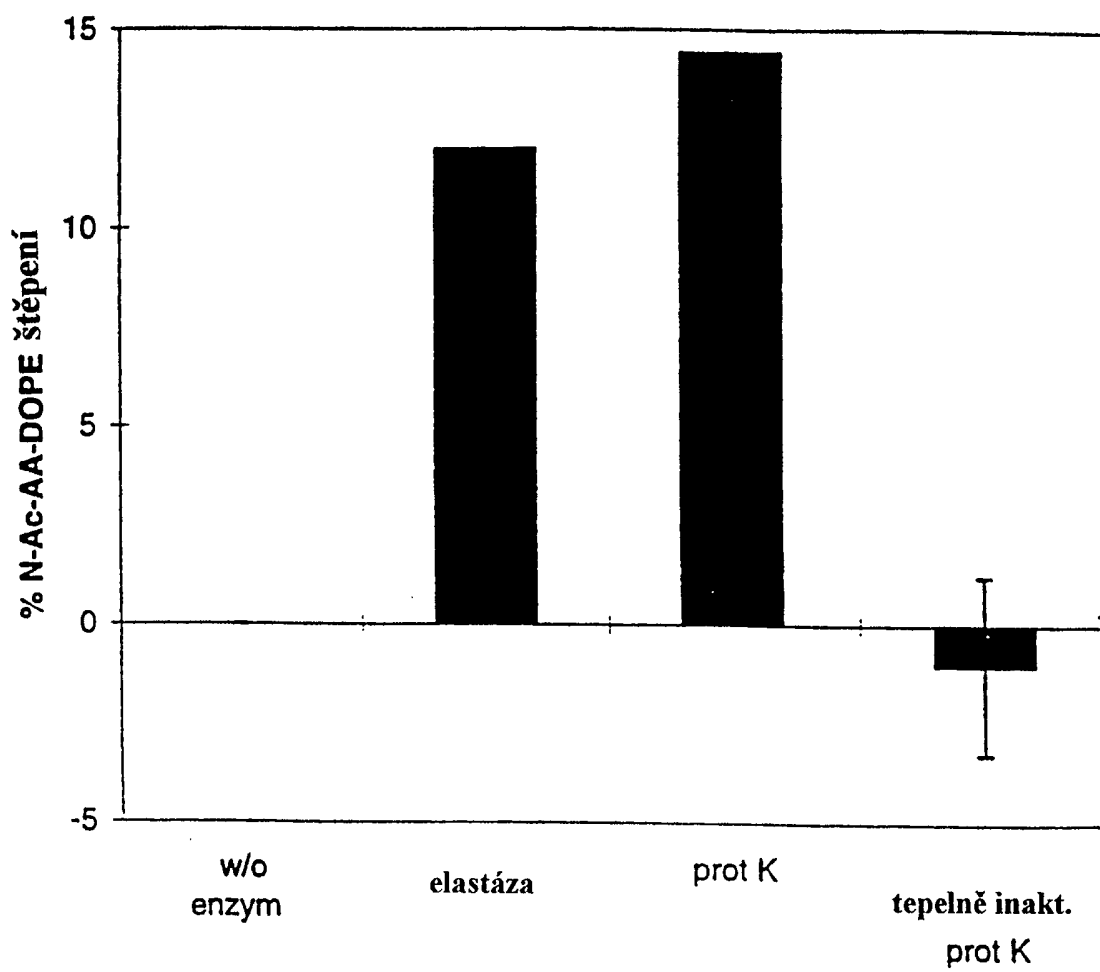
1 2 3

Obr. 2B



1 2 3

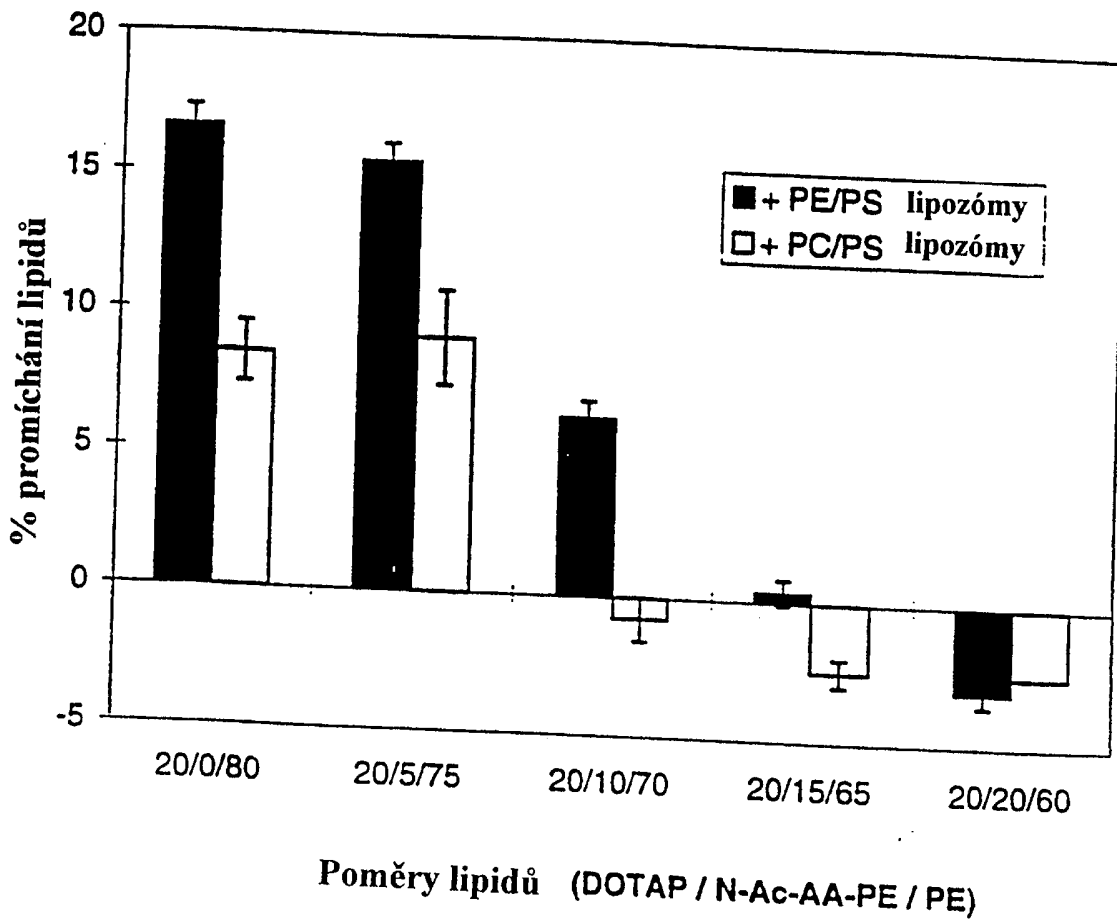
Obr. 3



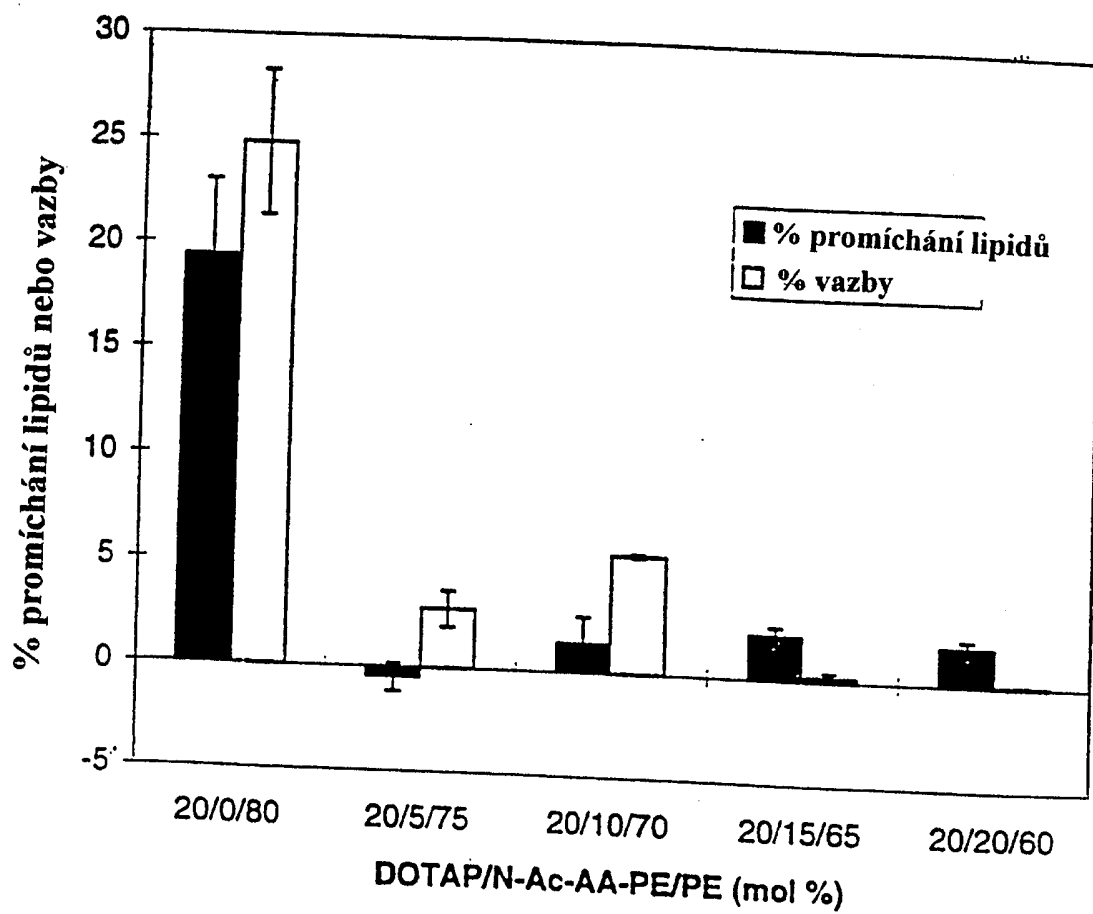
15.09.99

2146-99

Obr. 4A



Obr. 4B



15.09.99

2146-99

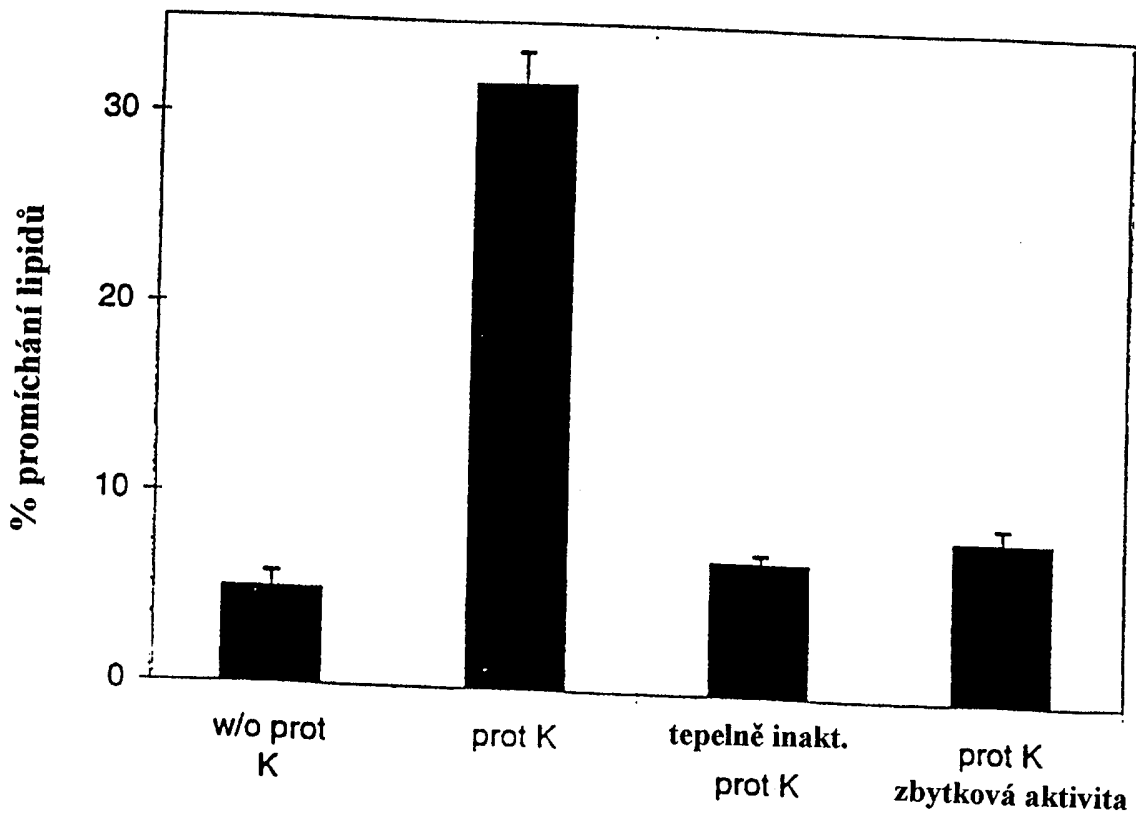
Obr. 5



15.09.99

2146-99

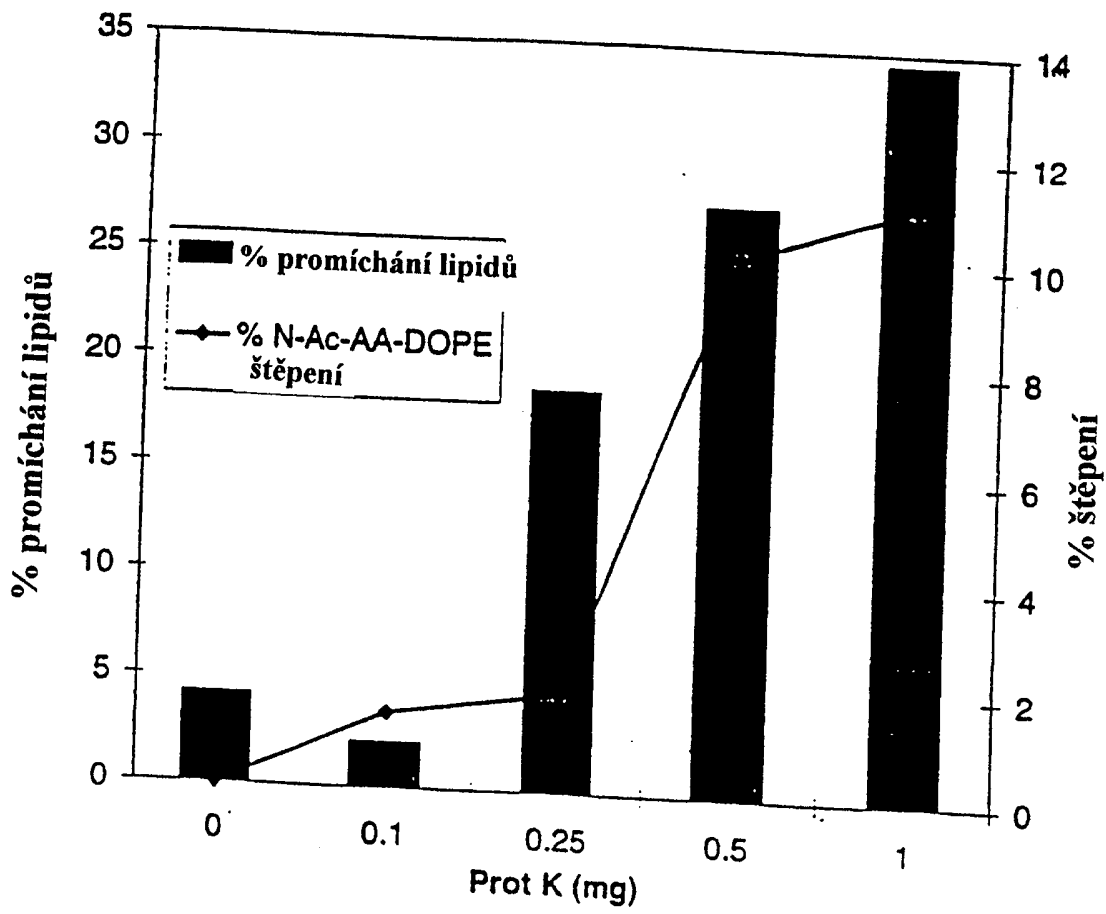
Obr. 6



15.09.99

AJ46-99

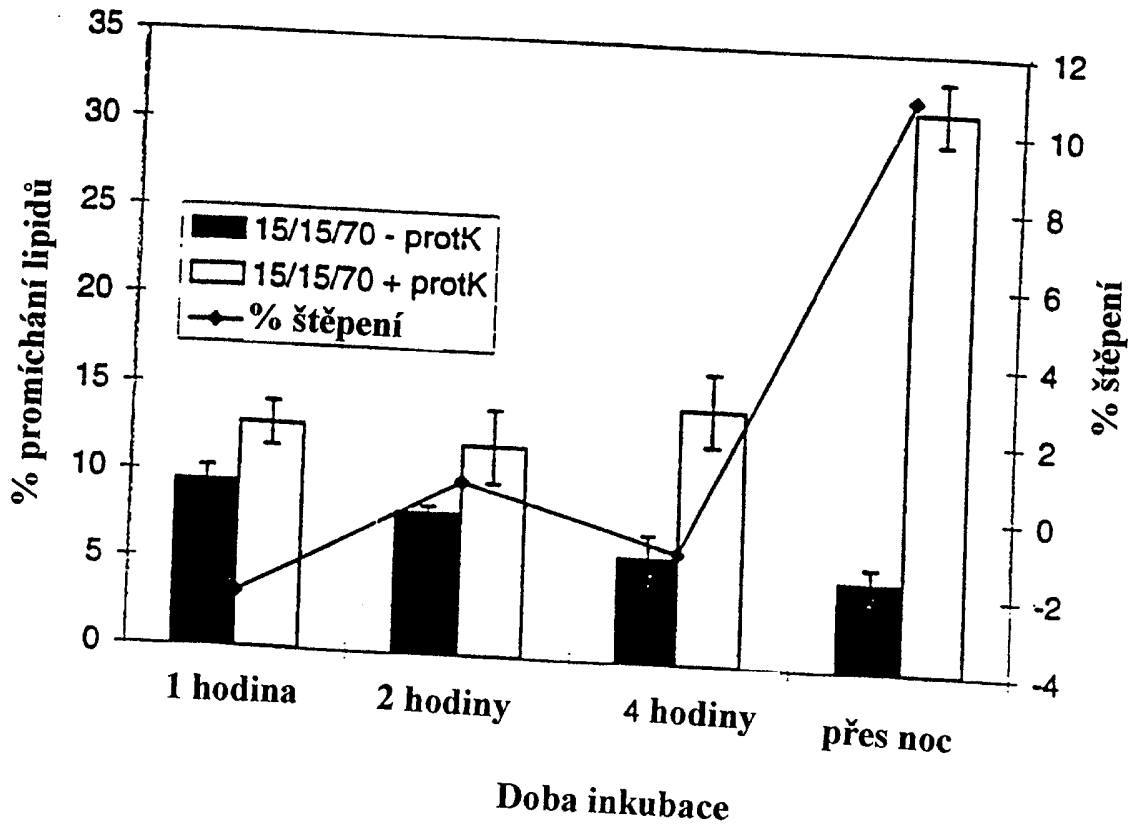
Obr. 7A



15.09.99

2346-99

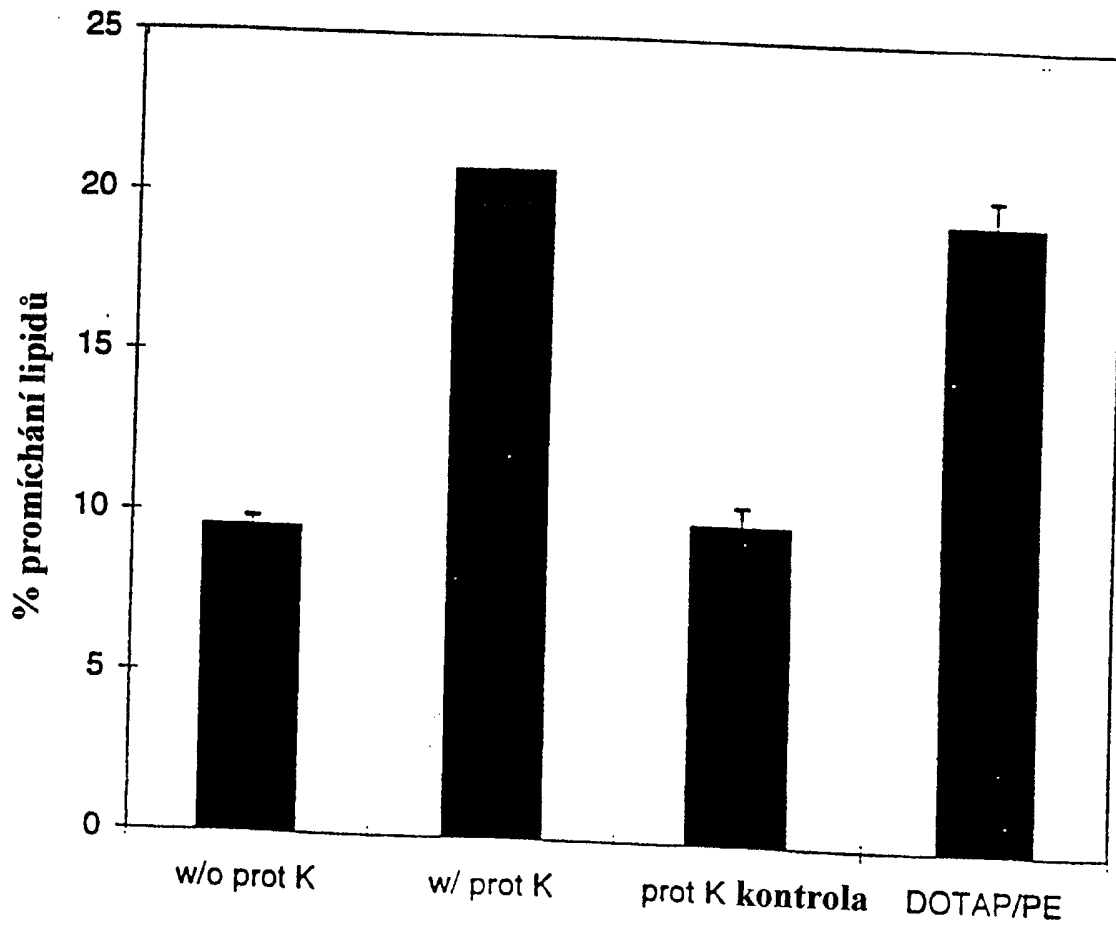
Obr. 7B



15.09.99

1146-99

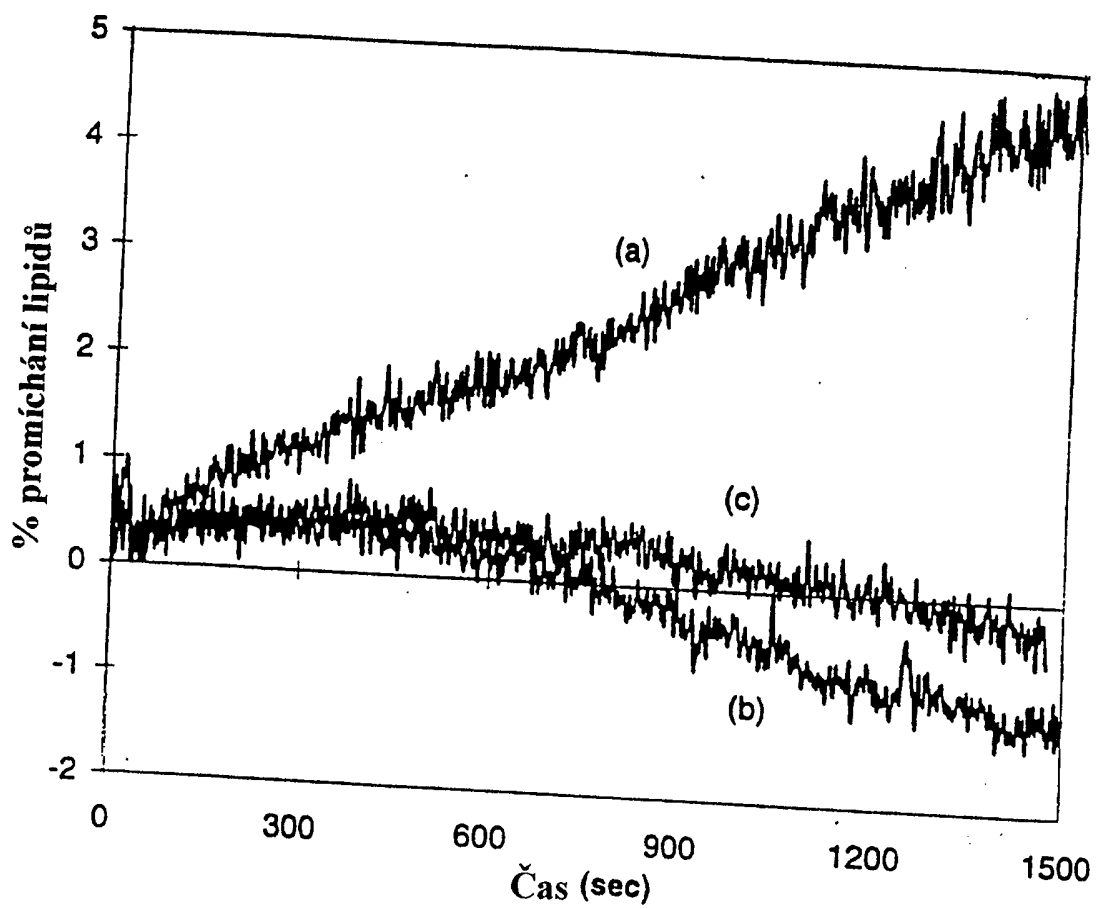
Obr. 8



15.09.99

2346-99

Obr. 9



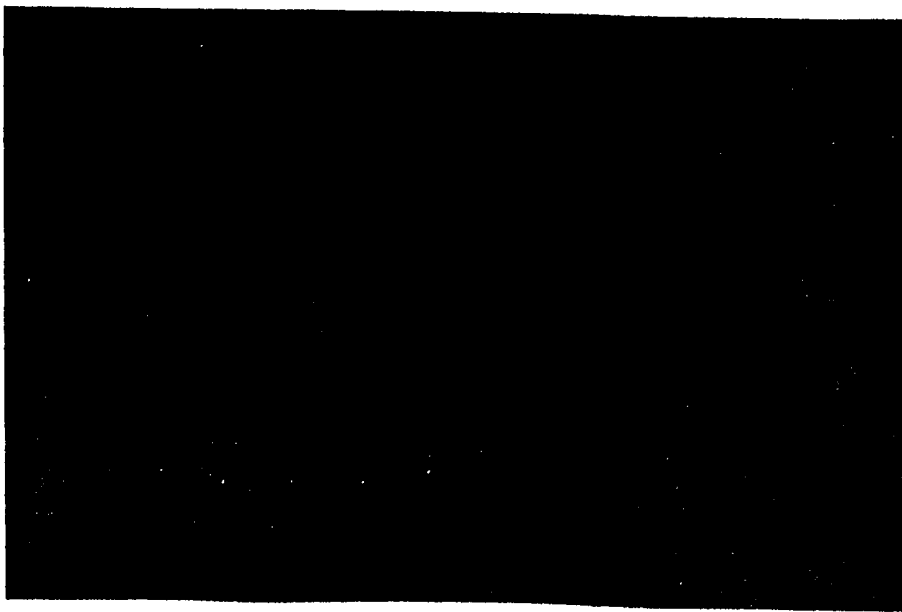
15.09.99

2146-99

Obr. 10A |



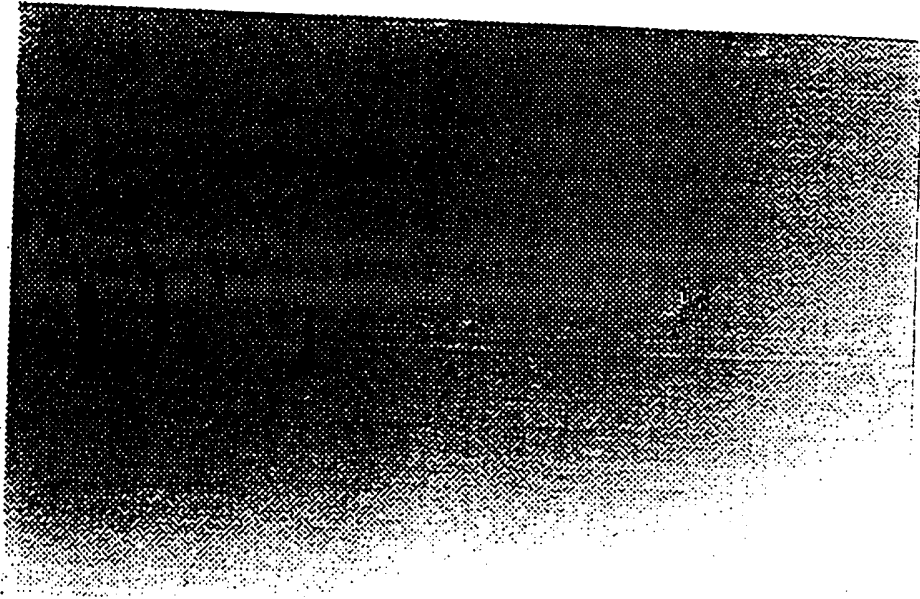
Obr. 10B



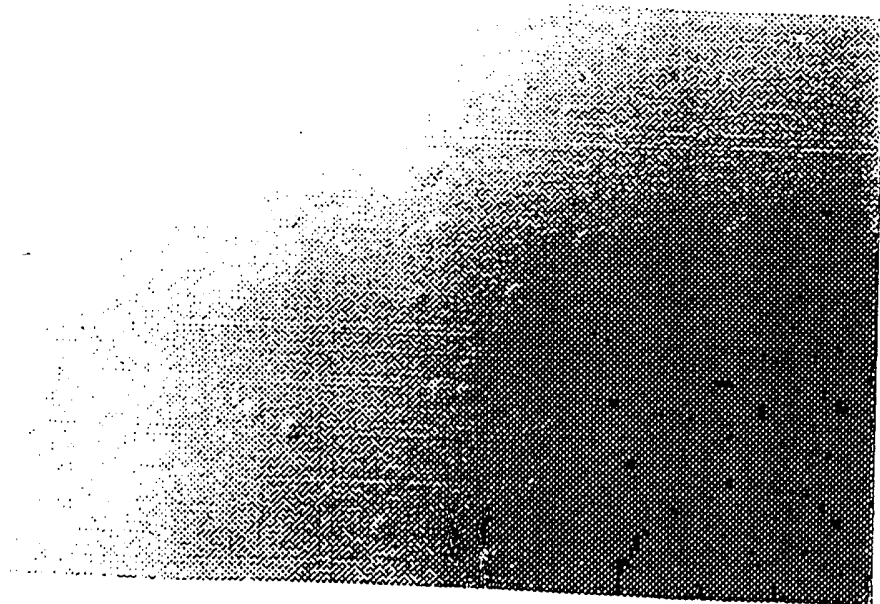
15.09.99

2246-99

Obr. 10C



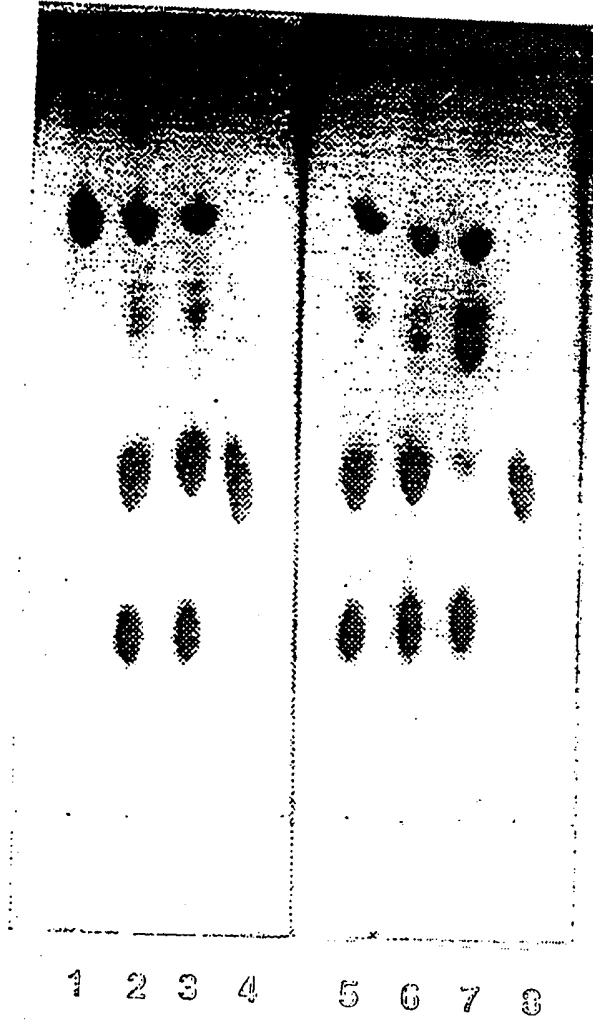
Obr. 10D



15.09.99

2146-99

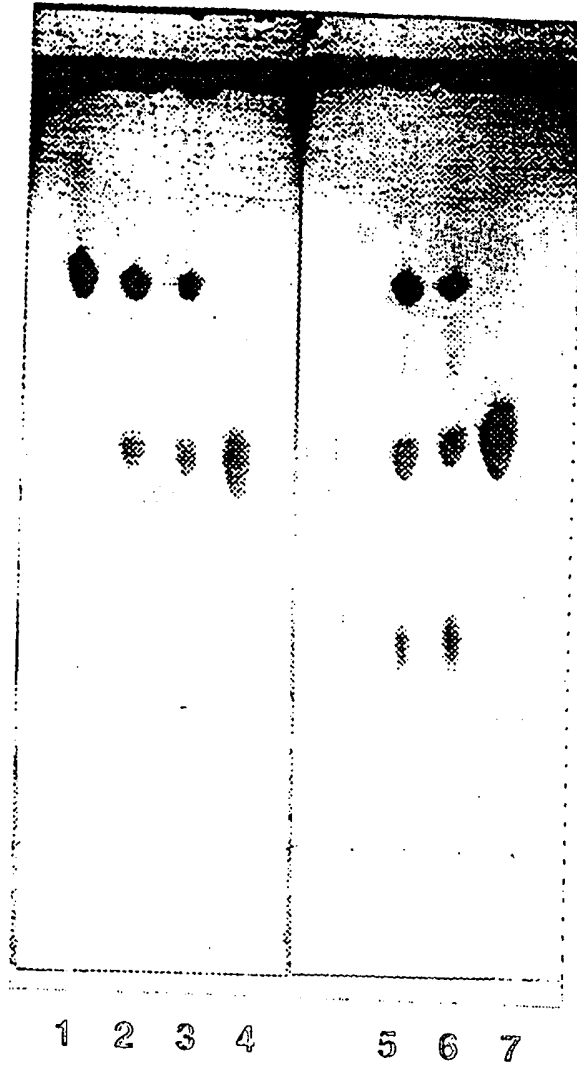
Obr. 11A



15.09.99

2346-99

Obr. 11B



15.09.99

2146-99

Obr. 11C

