

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

293 269

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1997-2592
(22) Přihlášeno: 15.02.1996
(30) Právo přednosti: 17.02.1995 FR 1995/9501865
(40) Zveřejněno: 12.11.1997
(Věstník č: 11/1997)
(47) Uděleno: 23.01.04
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: 17.03.2004
(Věstník č: 3/2004)
(86) PCT číslo: PCT/FR1996/000248
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 1996/025508

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.:⁷
C 12 N 15/87
A 61 K 48/00

(73) Majitel patentu:

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

(72) Původce:

Byk Gerardo, Créteil, FR
Scherman Daniel, Paris, FR
Schwartz Bertrand, Maisons-Alfort, FR

(74) Zástupce:

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

(54) Název vynálezu:

**Farmaceutická kompozice vhodná pro
transfekci nukleové kyseliny a použití této
kompozice pro přenos nukleové kyseliny**

(57) Anotace:

Řešení se týká kompozice užitečné pro transfekci nukleové kyseliny, která obsahuje transfekční činidlo a sloučeninu působící na úrovni kondenzace nukleových kyselin, přičemž sloučenina obsahuje peptidové jednotky, které se souvisle nebo nesouvisle opakují, a počet peptidových jednotek je mezi 2 a 10, nebo sloučenina obsahuje oligopeptid. Sloučenina je přitom odvozena z histonu, nukleolinu nebo jejich derivátů. Dále se týká použití kompozice podle vynálezu pro in vitro přenos nukleových kyselin, a také použití kompozice pro výrobu léku k léčení nemocí, které jsou způsobeny nedostatkem proteinu nebo produktu nukleové kyseliny.

CZ 293269 B6

Farmaceutická kompozice vhodná pro transfekci nukleové kyseliny a použití této kompozice pro přenos nukleové kyseliny

5 Oblast techniky

Vynález se týká oblasti genové terapie a zajímá se zejména o přenos in vitro, ex vivo nebo/a in vivo genetického materiálu. Vynález poskytuje novou farmaceutickou kompozici vhodnou pro účinnou transfekci buněk. Vynález se rovněž týká použití uvedené farmaceutické kompozice.

10

Dosavadní stav techniky

Chromosomální nedostatečnosti nebo anomálie (mutace, aberantní exprese, a podobně) představují původ četných nemocí dědičného nebo nedědičného charakteru. V tomto ohledu bylo konvenční lékařství dlouho bezmocné. V současné době, kdy dochází k rozvoji genové terapie, je naděje, že bude napříště možné korigovat uvedený typ chromosomální aberace nebo mu dokonce předcházet. Tato nová medikace spočívá v zavedení genetické informace do zasažené buňky nebo do zasaženého orgánu s cílem korigovat výše uvedenou nedostatečnost nebo anomálii anebo zde exprimovat protein zainteresovaného genu.

20

Hlavní překážkou při pronikání nukleové kyseliny do cílové buňky nebo do cílového orgánu je velikost a polyaniontový charakter této nukleové kyseliny, které jsou na závalu uspokojivého průchodu nukleové kyseliny skrze buněčné membrány.

25

Za účelem odstranění těchto překážek byly v současné době navrženy různé techniky, z nichž lze zejména uvést transfekci holé DNA skrze plasmovou membránu in vivo (WO90/11092) a transfekci DNA pomocí transfekčního vektoru.

Pokud jde o transfekci holé DNA, je účinnost takové transfekce stále ještě nízká. Holé nukleové kyseliny mají krátkou dobu životnosti vzhledem k jejich degradaci enzymy a jejich vylučování močovými cestami.

30

Z toho důvodu technika navrhuje dvě principiálně rozdílné strategie:

35

První používá přírodní vektory transfekce, kterými jsou viry. Je také navrženo používání adenovirů, oparových virů, retrovirů a sdružených adenovirů. Tyto vektory se jeví jako výhodné v samotné transfekci, ale naneštěstí se nemůže úplně vyloučit jisté patogenní riziko, replikace nebo/a riziko imunogenní vlastní jejich virové povaze.

40

Druhá strategie výhodně spočívá v použití nevirových činitelů schopných podporovat přenos a expresi DNA v buňce eukariontů.

Předložený vynález se věnuje zejména této druhé metodě.

45

Podstata vynálezu

Chemické nebo biochemické vektory znamenají výhodnou alternativu přírodních virů zvláště pro absenci imunologické odezvy nebo virové rekombinování. Tyto vektory nemají patogenní schopnost, riziko multiplikace DNA uprostřed těchto vektorů není žádné. Vektor není omezen žádnou teoretickou hranicí, co se týče velikost DNA k transfekci.

50

Tyto syntetické vektory mají dvě základní funkce, kondenzovat transfekční DNA a podporovat buněčné vázání, stejně jako přechod skrze plazmovou membránu, případně dvě jaderné membrány.

- 5 Polyanionické části DNA přirozeně nemají žádnou afinitu pro plazmovou membránu buněk, také polyanionických. Z tohoto důvodu pro odstranění této nevýhody mají nevirové vektory všeobecně náboje polykationické.

10 Mezi vyvinuté syntetické vektory patří kationické polymery typu polylysin a DEAE dextran nebo ještě kationické lipidy nebo lipofektanty, které jsou nejvíce vhodné. Mají vlastnosti kondenzované DNA a podporují svou vazbu s buněčnou membránou. Tato technika dává základ principu kondenzace DNA. Díky kationickému polymeru se komplex fixuje k membráně pomocí chemické vazby mezi polymerem kationickým a ligandem receptoru membrány, který je přítomný na povrchu buňky, a který se roubuje. Jsou také popsány receptory transferrinu, 15 insulínu a receptory asialoglykoproteinů hepatocytů. Syntetické vektory dnes navrhované jsou ještě daleko, aby byly známy stejně jako virové vektory. Tyto mají za důsledek nedostatečnou kondenzaci DNA. S obtížnostmi se můžeme znovu setkat při penetraci DNA do buněčného jádra. Další nevýhody jsou přímo spojené s povahou kationických polymerů použitých lipofektantů.

- 20 Předložený vynález navrhuje řešení těchto problémů. Přesněji, předložený vynález se vztahuje k farmaceutické kompozici použité pro transfekci nukleové kyseliny. Tato kompozice se vyznačuje tím, že obsahuje výše uvedenou nukleovou kyselinu, činitel transfekce a sloučeninu účinkující na úrovni kondenzace výše uvedené nukleové kyseliny. Výše uvedená sloučenina může být odvozená zcela nebo částečně od histonu, nukleolinu, protaminu nebo/a jejich derivátů.

25 Neočekávaně se ukázalo, že přítomnost takovýchto sloučenin v kompozici značně dovolí snížit množství transfekčního činitele s příznivým důsledkem, z toho vyplývajícím, bez jakéhokoli snížení aktivity transfekce výše uvedené sloučeniny. Naopak, tyto látky dokonale umožňují transfekci.

30 Ve smyslu vynálezu sloučeniny působící na úrovni kondenzace nukleové kyseliny zahrnují sloučeniny zhušťující nukleovou kyselinu, přímo nebo nepřímo. Tyto sloučeniny mohou působit přímo na úrovni transfektní nukleové kyseliny nebo působit na úrovni přidaných sloučenin, které jsou přímo dodávány při kondenzaci této nukleové kyseliny. Přednostně působí na úrovni 35 nukleové kyseliny. Podle realizačního modelu vynálezu, sloučenina účinkující na úrovni kondenzace nukleové kyseliny je tvořena zcela nebo částečně peptidovými motivy (KTPKKAKKP) SEQ ID NO: 1 nebo/a (ATPAKKAA) SEQ NO: 2 nebo jejich deriváty, počet motivů se může pohybovat mezi 2 a 10. Ve struktuře látek podle vynálezu tyto motivy mohou být opakovány 40 kontinuálně nebo nekontinuálně. Mohou být mezi sebou odděleny vazbami biochemické povahy, např. vazby tvořené jednou nebo několika aminokyselinami nebo vazbami chemické povahy.

Podle vynálezu je zvláště výhodný výběr sloučenin jako jsou peptidy nebo pseudopeptidy (mající převážně aminokyseliny bazického charakteru jako je lysin, histidin nebo arginin) v rámci 45 předloženého vynálezu. Tyto sloučeniny mohou mít strukturu skládaného listu β . Bazické aminokyseliny jsou specificky zahrnuty ve vazbě peptid – nukleová kyselina. Tyto aminokyseliny mají podíl na vybudování ionických vodíkových můstků mezi dvěma postranními řetězce příznivými pro kondenzaci nukleové kyseliny. Pokud se týká struktury skládaného listu β , tato struktura je charakterizována snadnější přístupností k majoritním svazkům karboxylů 50 a atomů vodíků, které z části svého charakteru akceptoru a donoru přednostně podporují tvorbu vazeb se zahuštěnou nukleovou kyselinou. Jedná se zvláště o histon, nukleolin, protamin nebo/a jejich deriváty nebo jen o jejich část.

55 Histony a protaminy jsou proteiny kationické povahy. Jsou odpovědné za kondenzaci DNA in vivo, netranskribují DNA určitého viru. Histony mohou být použity v rámci předloženého

vynálezu. Jedná se zvláště o histony H1, H2a, H3 a H4. Co se týče nukleolinu, jedná se o nukleární protein, u kterého se předpokládá, že má synergický účinek během kondenzace DNA ve srovnání s histonem H1. V rámci předloženého vynálezu se může výhodně jednat o sloučeninu s peptidovou sekvencí odvozenou od N-koncové oblasti nukleolinu se sekvencí (ATPAKKAA)₂(COOH) (SEQ ID NO:3).

Sloučenina podle vynálezu je odvozena od histonu H1, zvláště od C-koncové oblasti a odpovídá sekvenci (KTPKKAKKP)₂(COOH) (SEQ ID NO:4).

Z těchto sloučenin podle vynálezu se mohou citovat následující oligopeptidy: ATPKKS-AKKTTPKKAKKP(COOH) (SEQ ID NO:5) a KKAQSPKKAKAAKPKKAPKSPAKAKA-(COOH) (SEQ ID NO:6) jako výhodné.

Co se týče sekvencí odvozených od protaminů mohou se v rámci předloženého vynálezu citovat zejména následující oligopeptidy: SESEYYRQRQRSSRRRRR(COOH) (SEQ ID NO:7) a RRRLHRIHRRQHRSCHRRRKRR(COOH) (SEQ ID NO:8).

Ve smyslu předloženého vynálezu termín odvozený popisuje všechny peptidy, pseudopeptidy (peptidy zahrnující části nebiochemické) nebo proteiny odlišné od proteinů nebo peptidů braných v úvahu, získaných jedním nebo více modifikacemi povahy genetické nebo/a chemické. Modifikacemi genetické povahy nebo chemické povahy se mohou chápat všechny mutace, substituce, vynechání, přídavek nebo/a modifikace jednoho nebo více residuí určitého proteinu. Modifikace chemická zahrnuje všechny modifikace peptidu tvořené chemickou reakcí nebo chemickým roubováním molekuly biochemické nebo nebiochemické na jakémkoliv počtu residuí proteinu.

Genetická modifikace zahrnuje všechny peptidové sekvence, jejichž hybrid DNA s těmito sekvencemi nebo fragmenty má naznačenou aktivitu. Tyto deriváty mohou být tvořeny různě. Zvětšováním afinity polypeptidu k ligandům, zlepšováním úrovně jejich produkce, zvětšováním jejich resistance k proteázám, zlepšováním nebo/a přímo vložením nových farmakologických vlastností nebo/a biochemických. Mezi výslednými deriváty adice se mohou citovat např. peptidické sekvence obsahující heterologickou část vázanou na konec. Termín odvozený zahrnuje také homologickou sekvenci proteinu, produkty dalších zdrojů buněk zejména buněk lidského původu nebo jiných organismů majících aktivitu stejného typu. Homologické sekvence mohou být získány hybridizací odpovídající DNA. Hybridizace může být uskutečněna z banky nukleových kyselin, které se používají jako sonda nativní sekvence nebo fragmenty v konvenčních podmínkách (Maniatis a ostatní), (všeobecná technika molekulární biologie).

V realizačním modelu kompozice předloženého vynálezu zvláště výhodně zahrnují dále sloučeninu, dovolující orientovat se na přenos nukleové kyseliny. Tato složka může být složkou extracelulární, která dovoluje orientovat přenos kyseliny nukleové skrze určitý typ buněk nebo určitou požadovanou tkáň (nádorové buňky, hepatické buňky, buňky hematopoetické). Může se také jednat o složky intracelulární, dovolující orientovat přenos nukleové kyseliny skrz určitá oddělení buněk (mitochondrie, jádro atd.).

Sloučenina je vázána kovalentním způsobem nebo způsobem nekovalentním v kompozici podle vynálezu. Sloučenina může být také vázána k nukleové kyselině. Podle modelu vynálezu výše uvedená sloučenina je vázána přes doplňkovou heterogenní část vázanou k jednomu z jeho konců. Tyto části mohou být zejména peptidy typu fusogen pro uskutečnění buněčné transfekce, může se říci, pro uskutečnění průchodu transfekčního prostředku nebo jeho různých složek skrz membrány. Může se jednat o ligand buněčného receptoru, který je přítomný na povrchu buňky jako např. cukr, transferrin, insulin nebo protein asialo-orosomukoid. Může se také jednat o ligand intracelulárního typu, jako označení buněčného umístění, který přednostně shromažďuje transfektovou DNA uprostřed jádra.

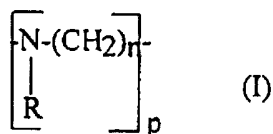
Mezi cílovými složkami použitými v rámci vynálezu se mohou citovat cukry, peptidy, hormony, vitaminy, cytokiny, oligonukleotidy, lipidy nebo sekvence nebo části jatečního odpadu, dovolující specifické vázání s odpovídajícími receptory. Jedná se o cukry nebo/a peptidy takové jako jsou protilátky nebo části protilátek, buněčné receptorové ligandy nebo jejich části, receptory nebo části receptorů atd. Může se také jednat o ligandy receptoru faktorů vývoje, receptorů cytokinas, receptorů buněčných nebo receptorů proteinů adheze. Mohou se také citovat receptory transferrinu, HDL a LDL. Cílové složky mohou také být cukry dovolující vázat lecitin jako receptor asialoglykoproteinových nebo část fragmentu Fab protilátek, dovolující vázat receptor fragmentu Fc imunoglobulinu.

Jako příklad tohoto typu vázání se může uvést v rámci předloženého vynálezu sloučenina typu H1-nls a zvláště peptid mající sekvenci PKKKRKV-βAla-(KTPKKAKKP)₂(COOH) (SEQ ID NO:9). Sloučeniny podle vynálezu a zvláště všechny odvozené od histonu, protaminu nebo nukleolinu mohou být dále polyglykosylované, sulfonované nebo fosforylované nebo/a roubované na komplexní cukry nebo na liofilní činidlo jako je např. polyuhlíkový řetězec nebo deriváty cholesterolu.

Kompozice podle vynálezu mohou samozřejmě zahrnovat zhuštěnou kyselinu nukleovou různé povahy. Mohou být také spojovány sloučeniny typu histonu ke sloučeninám typu nukleolinu.

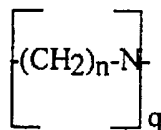
Sloučenina podle vynálezu je přítomna v dostatečném množství pro zhuštění nukleové kyseliny podle vynálezu. Poměr látka : nukleová kyselina (vyjádřeno hmotnostně) může se pohybovat v hodnotách mezi 0,1 a 10 a zejména mezi 0,3 a 3. Co se týče činitele transfekce přítomného v kompozici podle vynálezu, tento je zvláště vybrán mezi kationickými polymery a lipofektanty.

Podle předloženého vynálezu kationtový polymer je sloučeninou všeobecného vzorce I:



ve kterém

R může znamenat atom vodíku nebo skupinu obecného vzorce:



n znamená celý počet, pohybující se mezi 2 a 10

p a q jsou celá čísla

se součtem p a q takovým, že molekulová hmotnost polymeru se pohybuje mezi 100 a 10⁷.

Je pochopitelné, že ve vzorci I hodnota n se může pohybovat mezi různými motivy p. Vzorec I seskupuje zároveň homopolymery a heteropolymery.

Ve vzorci I n se pohybuje v hodnotách 2 a 5. Zvláště polymery polyethyleniminu (PEI) a polypropyleniminu (PPI) vykazují vynikající vlastnosti. Polymery podle předloženého vynálezu jsou ty, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje mezi 10³ a 5×10⁶. Jako příklad můžeme uvést

polyethylenimin se střední molekulovou hmotností 50 000 (PEI50K) nebo polyethylenimin se střední molekulovou hmotností 800 000 (PEI800K).

PEI50K nebo PEI800K jsou obchodně dostupné. Jiné polymery obecného vzorce I mohou být popsány v FR 9408735. Optimální podmínky vynálezu, tj. optimálního poměru polymer : nukleová kyselina jsou určeny druhem jednotlivých zastoupených látek, tak např. molární poměr $R = \text{aminy polymeru} : \text{fosfáty nukleové kyseliny}$. Tento poměr se pohybuje v hodnotách mezi 0,5 a 50, přesněji mezi 5 a 30. Zvláště výhodné výsledky jsou získány za použití 5 až 25 ekvivalentů aminů polymeru k množství fosfátů nukleové kyseliny.

Co se týče zvláště lipofektantu, jako lipofektant se chápe sloučenina ve smyslu vynálezu lipidového charakteru která je aktivní vzhledem k transfekci nukleové kyseliny do buněk. Všeobecně jde o molekuly, obsahující alespoň jednu lipofilní oblast vázanou nebo nevázanou v hydrofilní oblasti. V této skupině sloučenin mohou být lipidy schopné tvořit liposomy jako je POPC, fosfatidilserin, fosfatidilcholin, cholesterol, maleimimidofenylbutyrylfosfatidylethanolamin, laktosylceramid v přítomnosti nebo nepřítomnosti polyethylenglykolu tvoří latentní liposomy nebo v přítomnosti nebo nepřítomnosti protilátek nebo ligandů tvoří imunoliposomy nebo cílové liposomy.

Podle vynálezu lipidový činitel vytváří kationickou oblast. Tato kationická oblast, oblast kationického náboje, je schopná vázat se reversibilním způsobem na nukleovou kyselinu, s negativním nábojem. Tato interakce pevně zhušťuje nukleovou kyselinu. Lipofilní oblast počítá tyto ionické interakce v prostředí externí vody, když se znovu pokryje nukleofilními částmi tvořícími lipidovou vrstvu.

Bylo také zjištěno, že kationický lipid s pozitivním nábojem, $N-[1-(2,3\text{-diolelyloxy})\text{propyl}]-N,N,N\text{-trimethylamonium chlorid}$ (DOTMA), interferuje ve formě liposomu nebo peptidových kapes, spontánně s DNA, která má negativní náboj za vzniku komplexu lipid-DNA. Tento komplex je schopný vázat se k buněčné membráně a umožňuje také intracelulární odevzdání DNA. Od DOTMA jsou navrženy další kationické lipidy. Lipofilní skupina je připojená k aminoskupině prostřednictvím ramene nazvaného „spacer“. Mezi těmito sloučeninami se mohou uvést zvláště ty, které obsahují lipofilní skupinu dvou mastných kyselin nebo jsou odvozeny od cholesterolu, obsahující v případě potřeby amino skupinu nebo kvartérní amoniovou skupinu. DOTAP, DOBT nebo ChOTB mohou být uvedeny jako reprezentanty této kategorie kationických lipidů. Další látky jako DOSC a ChSC se vyznačují přítomností cholinové skupiny na místo kvartérní amoniové skupiny. Byla také popsána kategorie kationických lipidů jako jsou lipopolyaminy. V tomto typu sloučenin kationická skupina je reprezentována zbytkem L-5karboxysperminu, který obsahuje čtyři amoniové skupiny, dvě primární a dvě sekundární.

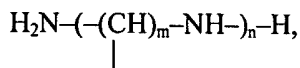
Lipofektanty jsou účinné zejména pro transfekci endokrinních primárních buněk. Lipofektanty, které vyhovují vynálezu mohou také být vybrány z množiny lipopolyaminů, jejichž oblast polyaminu odpovídá všeobecnému vzorci II,



45

ve kterém m je celý počet vyšší nebo rovný 1 a n je celý počet vyšší nebo rovný 1, m se může měnit pro různé uhlíkaté skupiny obsažené mezi dvěma aminovými skupinami, jeho hodnota se pohybuje mezi 2 a 6 včetně a n se pohybuje v hodnotách 1 a 5 včetně. Oblast polyaminová je tvořena sperminem, therminem nebo jejich analogy, u kterých jsou zachované vazebné vlastnosti k DNA. Je-li lipofilní oblast tvořena uhlovodíkovým řetězcem nasyceným nebo nenasyceným, cholesterolem, přírodním lipidem nebo lipidem syntetickým je schopná tvořit lamelární fáze nebo hexagonální, vázané kovalentním způsobem v hydrofilní oblasti.

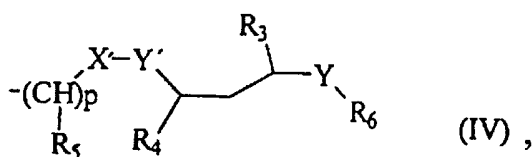
EP 394 111 popisuje další lipopolyaminy všeobecného vzorce III v rámci předloženého vynálezu,



- 5 ve kterém R je zejména zbytek všeobecného vzorce $(\text{R}_1\text{R}_2)\text{N-CO-CH-NH-CO-}$.

Jako příklad těchto lipopolyaminů se může uvést dioktadekylamidoglycylspermin (DOGS) a 5-karboxysperminamid palmitoylfosfatidylethanolaminu (DPPEs).

- 10 Lipopolyaminy popsané v FR 94 14596 mohou také být výhodně použity jako činitel transfekce podle vynálezu. Tyto sloučeniny jsou představeny všeobecným vzorcem IV, ve kterém R představuje



kde

- 15 - X a X' znamenají, nezávisle jeden na druhém, atom kyslíku, methylenovou skupinu $\text{-(CH}_2)_q\text{-}$, kde q odpovídá hodnotám 0, 1, 2 nebo 3, nebo amino-skupinu -NH- nebo -NR'- , kde R' znamená alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku
- 20 - Y a Y' znamenají, nezávisle jeden na druhém, methylenovou skupinu, karbonylovou skupinu nebo skupinu C=S ,
- R₃, R₄ a R₅ znamenají, nezávisle jeden na druhém, atom vodíku nebo alkylovou skupinu, případně substituovanou nebo nesubstituovanou, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, p se může
- 25 pohybovat mezi 0 a 5
- R₆ představuje derivát cholesterolu nebo alkylamino skupinu NR_1R_2 , kde R₁ a R₂ znamenají, nezávisle jeden na druhém, alifatickou skupinu, nasycenou nebo nenasycenou, lineární nebo
- 30 rozvětvenou, obsahující 12 až 22 atomů uhlíku.

Může se jednat o sloučeniny např. 2,5-bis(3-aminopropylamino)pentyl(dioktadekylkarbamoyl-methoxy)acetát a 1,3-bis(3-aminopropylamino)-2-propyl(dioktadekylkarbamoylmethoxy)acetát (řečeno viz dále lipopolyamin A). EP 394 111 a FR 94 145 96 popisují také postup použitelný pro

35 přípravu odpovídajících lipopolyaminů.

Nové lipopolyaminy, zhodnocené také v oblasti předloženého vynálezu, byly popsány v FR 95/134 90. Jako představitelé této skupiny lipopolyaminů se mohou uvést tyto následující lipopolyaminy:

- 40 lipopolyamin B:
 $\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\{(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2\}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COglyN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{-CH}_3]_2$ (RP120525)

lipopolyamin C:
 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COglyN}[(\text{CH}_2)_{18}]_2$ (RP120535)

- 45 lipopolyamin D:
 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COArgN}[(\text{CH}_2)_{18}]$ (RP120535)

V rámci předloženého vynálezu se s výhodou také mohou použít dooktadecylamido-glycylspermin (DOGS), 5-karboxyspermylamid palmitoylfosfatidylethanolaminu (DPPE), 2,5-bis(3-aminopropylamino)-pentyl(dioktadecylkarbamoylmethoxy)acetát $\{H_2N(CH_2)_3\}_2N-(CH_2)_4\{(CH_2)_3NH\}(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}-CH_3]_2$, $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH-CH_2COGlyN[(CH_2)_{18}]_2$ nebo $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COArgN[(CH_2)_{18}]$.

Pro získání optimálního účinku přípravků podle vynálezu poměry polyaminu a nukleové kyseliny jsou přednostně určeny druhem, kde poměr R pozitivních nábojů činitele transfekce k negativním nábojům nukleové kyseliny se pohybuje v hodnotách mezi 0,1 a 1, zvláště mezi 0,5 a 6.

Přítomnost sloučenin podle vynálezu v kompozici transfekce výhodně dovoluje značně snížit množství činitele transfekce. Snížila se také sledovaná toxicita při použití lipopolyaminů podle vynálezu, např. to bylo pozorováno u transfekce buněk citlivých na původ činitele transfekce jako jsou např. krvetvorné buňky. Jak ukazují příklady dále uvedené, schopnost transfektovat kompozice podle vynálezu je vyšší k těm, které jsou transfektované klasickými činiteli.

V kompozici podle předloženého vynálezu nukleová kyselina může být stejně tak i ribonukleová. Může se jednat o sekvence přírodního původu nebo uměle připravenou genomickou DNA, cDNA, mRNA, tRNA, rRNA, hybridové sekvence nebo syntetické sekvence nebo semi-syntetické. Tyto nukleové kyseliny mohou být původu lidského, zvířecího, rostlinného bakteriálního, virového atd. Mohou být také získány všemi odborníky známými technikami, zejména tříděním bank, chemickou syntézou nebo metodami smíšenými zahrnujícími modifikaci chemickou nebo enzymovou. Mohou být inkorporovány do vektorů jako je plazmidový vektor.

Deoxyribonukleové kyseliny mohou být jednoduché nebo dvojitě vláknové. Tyto deoxyribonukleové kyseliny mohou kódovat terapeutické geny řídící sekvenci transkripce nebo replikace, sekvence antimediatorové a vazebné oblasti k dalším částem buněk atd.

Ve smyslu vynálezu se nazývají terapeutickými geny všechny geny obsahující proteiny, které mají terapeutický účinek. Kódované proteinové produkty mohou být proteiny, peptidy atd. Tyto proteinové produkty mohou být homologické vůči cílové buňce (může se říci, že produkt je vyjádřen v cílové buňce, v případě, že není přítomna žádná patologie). V tom případě exprese proteinu dovoluje např. zmírnit nedostatečnou expresi v buňce nebo expresi neaktivního proteinu nebo slabě aktivního z důvodu modifikace nebo ještě přeexprimování uvedeného proteinu. Terapeutický gen může být také kódován mutací buněčného proteinu mající stabilní modifikovanou aktivitu. Proteinové produkty mohou být také heterologické vůči cílové buňce. V tom případě exprimovaný protein může být např. doplněn nebo vnesen nedostatečnou aktivitou v buňce, která nedovoluje bojovat proti patologii nebo stimulovat imunitní odpověď.

Mezi terapeutickými produkty ve smyslu předloženého vynálezu se mohou citovat zejména enzymy, krevní deriváty, hormony, lymfokiny: interleukiny, interferony TNF atd. (FR 9203120), faktory růstu, jejich prekurzory, enzymy syntézy, trofické faktory: BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, VEGF, NT3, NT5, HARP/pleiotrofin odpovídající proteinům obsaženým v metabolismu lipidů typu apolipoprotein vybranými mezi apolipoproteiny A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J a enzymy metabolismu jako např. lipoproteinová lipasa, jaterní lipasa, lecitin cholesterol acyltransferáza, 7 alpha cholesterol hydroxyláza, fosfatáza nebo ještě proteiny přenosu lipidů jako je protein přenosu esterů cholesterolu a protein přenosu fosfolipidů proteinu vazeb HDL nebo receptor vybraný např. mezi receptory LDL, receptory chylomikron-remnantu a receptory skavengeru, dystrofínu nebo minidystrofínu (FR 9111947) protein GAX, protein CRTTR spojený s geny potlačujícím nádory: p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev atd. (FR 93 04745) geny kódující faktory implikované do koadulace: Faktory VII, VIII, IX, geny účinkující při opravě DNA, sebevražedné geny (thymid kináza, cytosin deamináza) atd.

Terapeutický gen může také být gen nebo sekvence antimediatorová, jehož/jejíž exprese v cílové buňce dovoluje kontrolovat expresi genu nebo transkripci buněčné mRNA. Tato sekvence může

být transkribována v cílové buňce komplementární RNA. Může blokovat jejich transdukcii v proteinu podle popsané techniky v EP 140 308. Antimediátorová sekvence obsahuje také sekvence kódující ribosomy, které jsou schopné výběrově zničit RNA (EP 321 201).

- 5 Jak se uvádí výše, nukleová kyselina může obsahovat jeden nebo více genů kódujících antigenový peptid, schopný generovat u člověka nebo zvířete imunitní odpověď. Pro tento model jsou charakteristické vakcíny, imunoterapeutická léčba aplikovaná na člověka nebo na zvíře, zejména proti mikroorganismům, virům nebo rakovinám. Může se jednat zejména o specifické antigenové peptidy viru Epstein Barr, viru HIV, viru hepatitidy B (EP 185 573), viru pseudo-
10 vztekliny a specifické nádory (EP 259 212).

- Nukleová kyselina obsahuje zejména sekvence dovolující expresi terapeutického genu nebo/a genu obsahujícího gen kódující antigenový peptid v buňce nebo požadovaném orgánu. Může se jednat o sekvence, které jsou přirozeně odpovědné za expresi zkoumaného genu, jsou-li sekvence
15 schopné fungovat v infikované buňce. Může se také jednat o sekvenci různého původu (odpovědnou za expresi dalších proteinů nebo stejných syntetických). Zejména se může jednat o sekvenci iniciátoru eukariontních genů nebo virů. Např. může se jednat o iniciátory sekvencí buněčného genomu nebo genomu viru. V tom ohledu lze citovat např. iniciátory genů E1A, MLP, CMV, RSV atd. Tyto sekvence exprese mohou být modifikovány adicí aktivačních sekvencí, regulačních sekvencí atd.
20

- Z jiného hlediska nukleové kyseliny mohou také zahrnovat zvláště proti toku terapeutického genu, signál sekvence řídící syntézu terapeutického produktu sekrečním způsobem cílové
25 buňky. Tento signál sekvence může být signál sekvence přirodně terapeutického produktu, ale může se také jednat o všechny další sekvence základního signálu nebo signálu umělého.

- Kompozice podle vynálezu obsahují dále jeden nebo více neutrálních lipidů. Tyto látky jsou zvláště výhodné, zejména, v případě kdy poměr R je slabý. Přídavek neutrálního lipidu dovoluje zlepšovat tvorbu nukleolipidových částí a překvapivě podporuje penetraci částí do buňky za
30 destabilizace membrány. Použité neutrální lipidy v rámci předloženého vynálezu jsou lipidy se dvěma mastnými řetězci.

- Zvláště výhodné je použití přírodních lipidů nebo syntetických zwiterionového typu nebo bez náboje za fyziologických podmínek. Může se jednat o lipidy zvolené z množiny zahrnující
35 dioleoylfosfatidylethanolamin (DOPE), oleoylpalmitoylfosfatidylethanolamin (POPE), di-stearoyl, palmitoyl, mirystoylfosfatidylethanolamin a jejich 1 až 3násobné N-methylované deriváty, fosfatidylglyceroly, diglyceroly, diacylglyceroly, glykosyldiacylglyceroly, cerebrosidy (zejména galaktocerebrosidy), sfingolipidy (zejména sfingomyeliny) nebo ještě asialogangliosidy (zejména asialoGM1 a GM2).
40

- Tyto různé lipidy mohou být získány, jak syntézou, tak extrakcí např. z orgánů (např. mozek) nebo vajec dobře známými klasickými technikami. Zvláště extrakce přírodních lipidů může být prováděna prostřednictvím organických rozpouštědel (viz Lehninger, Biochemie).

- 45 Kompozice podle vynálezu jsou uvedeny v činnosti činitelem transfekce: lipofektantem, který obsahuje 0,1 až 20 ekvivalentů neutrálních lipidů pro jeden ekvivalent lipopolyaminu. Nejvýhodnější je ekvivalent 1 až 5. V případě, že transfekční činitel je kationický polymer, kompozice podle vynálezu obsahují kromě kationického polymeru (ve dříve citovaném poměru: 0,1 až 20 molárních ekvivalentů) neutrální lipid pro jeden molární ekvivalent fosfátu nukleové kyseliny.
50 Nejvýhodnější je opět ekvivalent 1 až 5.

- Kompozice podle vynálezu se mohou dělit na skupiny z pohledu podávání léku. Kompozice se podávají topikálně, rektálně, vaginálně, parenterálně, transskárově, orálně, kůží, podkožně, nitrožilně, intramuskulárně, intraokulárně, intranazálně atd. Farmaceutické kompozice podle
55 vynálezu obsahují farmaceuticky přijatelné vehikulum pro injektování, zejména pro přímé

injektování na úrovni požadovaného orgánu nebo pro podávání topikální (na kůži nebo sliznici).
Může se jednat zvláště o sterilní izotonické roztoky nebo suché přípravky zejména lyofilizované.
Jako roztok se používá sterilovaná voda nebo fyziologické sérum dovolující injektovat
farmaceutické kompozice. Dávka použití nukleové kyseliny pro injektaci, stejně jako počet
5 podávání může být upraveno v závislosti na úloze a způsobu podávání. Kompozice mohou být
výhodně použity pro transfekci velkého počtu typu buněk jako např. krvetvorných buněk, buněk
melanomů, karcinomů a sarkomů, buněk hladkého svalstva, neuronů a astrocytů.

Předložený vynález předkládá také metodu zvláště výhodnou pro léčení nemocí používající
10 transfekci in vitro, ex vivo nebo in vivo kyselinu nukleovou hodicí se k opravě výše jmenované
nemoci ve spojení s činitelem transfekce typu kationického polymeru nebo lipofektantu. Taková
kompozice je předem definována. Kompozice podle vynálezu jsou zvláště zajímavé svojí
biodisponibilitou a svojí vysokou úrovní transfekce.

Předložený vynález se týká také použití kompozicí tvořených zcela nebo částečně peptidovými
15 motivy (KTPKKAKKP) nebo/a (ATPAKKAA). Počet těchto motivů se může měnit mezi 2 a 10.

Předložený vynález pokrývá také všechna použití oligopeptidů vybraných ze skupiny
(ATPAKKAA)₂(COOH), (KTPKKAKKP)₂(COOH), ATPKKSAKKTPKKAKKP (COOH),
20 KKAQSPKKAQAAKPKKAPKSPAKAKA (COOH), SRSRYRQRQSRRRRRR (COOH),
a RRLHRIHRQHRSCRRRKRR (COOH) pro uskutečnění přenosu in vitro, ex vivo a nebo
in vivo nukleové kyseliny výše uvedeného oligonukleotidu.

Následující příklady blíže ilustrují vynález, aniž by však v jakémkoli směru omezovaly jeho
25 rozsah.

Příklady provedení vynálezu

30 Materiál a metody

1. Plazmidy použité pro přenos genu in vivo

Aktivita kompozice je určena plazmidy, které obsahují gen kódující luciferázu (Luc).

35 Jedná se zejména o plazmidy pCMVluc, pXL 2621, pXL 2622, které obsahují gen kódující
luciferázu (vektor pGL2, Promega) pod aktivátorem cytomegaloviru (CMV) výtažek pCDNA3
(Invitrogen). pCMV luc a pXL2622 se odvozují od vektoru pGL2, pXL 2622 vektoru pGL2,
a v těchto vektore iniciátor SV40 byl umístěn aktivátorem CMV. Plazmidy jsou všeobecně
40 získávány technickým srážením v PEG (Ausubel) a skladovány v Tris 10 mM EDTA 1 mM pH 8
při 4 °C a při koncentraci prostředí 10 µg ADN na µl.

2. Kompozice použité podle vynálezu

45 H: KTPKKAKKPKTPKKAKKP (COOH) 18 AA
N: ATPAKKAATPAKKAA (COOH) 16 AA
nls-H: PKKKRKV-bALA-KTPKKAKKPKTKKAKKP (COOH) 26 AA
PR1: RRLHRIHRQHRSCRRRKRR 21AA
PR2: SRSRYRQRYRSRRRRRR

50 jsou připraveny následujícími postupy:

2.1N: ATPAKKAATPAKKAA (COOH)

Tyto oligopeptidy se syntetizují ve formě soli kyseliny trifluoroctové prostřednictvím syntézy peptidů Applied Biosystem 431A na pryskyřici HMP (Applied Biosystem) metodou FMOC. Po syntéze se peptid izoluje z pryskyřice během 90 minut v přítomnosti roztoku voda /TFA v poměru 1/19. Po filtraci, se roztok zahustí na vakuové odparce, pak se peptid dvakrát srazí
 5 přidavkem etheru butylmethylnatého z roztoku v TFA. Usazenina se promývá etherem butylmethylnatým a pak se suší. Peptid se rozpustí v 5 ml vody, filtruje a čistí na nepřímé fázi HPLC na koloně C18 100 A (Biorad RSL). Peptid se čistí pomocí gradientu 0 až 25% acetonitrilu, 0,07% TFA ve vodě 0,07% TFA. Čistota získaného peptidu je 95% a jeho rozpustnost ve vodě je 100 mg/ml.

10 2.2 nsl: PKKKRKV

Tyto oligopeptidy se syntetizují ve formě soli kyseliny trifluoroctové podle protokolu popsaného níže za použití (pro štěpení) roztoku: voda/TFA/fenol/ethandithiol/thioanisol v poměru 2/40/3/1/2
 15 (objem/objem). Čistota získaného peptidu je 90% a jeho rozpustnost ve vodě je 100 mg/ml při pH 2,1.

2.3 H: KTPKKAKKPKTPKKAKKP (COOH) a nls-H: PKKKRKV-bAla-KTPKKAKKPKTKK-AKKP (COOH)

Tyto oligopeptidy se syntetizují ve formě soli kyseliny trifluoroctové podle protokolu popsaného níže. Pro tvorbu těchto oligopeptidů pryskyřice se rozdělila na dvě části. První část je určena pro syntézu H. Štěpení se provádí roztokem: TFA/fenol/ethandithiol/thioanisol/voda v poměru 40/3/1/2/2 (objem/objem). Čistota získaného peptidu je 90% a jeho rozpustnost ve vodě je
 20 10 mg/ml při pH 2,1. Druhá část pryskyřice se použije pro syntézu nls-bAla-H. Roztok pro štěpení je stejný jako při přípravě H. Čistota získaného peptidu je 95% a jeho rozpustnost ve vodě je 10 mg/ml při pH 2,1.

2.4 PR1: RRRLHRIHRRQHRSRRRKRR a PR2: SRSRYRQRQSRRRRRR

Tyto oligopeptidy se syntetizují ve více etapách na pevné fázi podle techniky BocBenzyle. Použije se pryskyřice Boc-L-Arg(Tos)Pam (0,48 meq/g). Odstranění chránicí skupiny a vázání se provádí následujícím způsobem:

35	1 – 55% TFA v dichlormethanu (DCM)	1 × 2 mn
	2 – 55% TFA v dichlormethanu	1 × 30 mn
	3 – dichlormethan	3 × 1 mn
	4 – DMF	3 × 1 mn
	5 – vázání	
40	6 – DMF	2 × 1 mn
	7 – dichlormethan	2 × 1 mn

V každé etapě se použije 10 ml roztoku na jeden gram pryskyřice. Vázání všech aminokyselin (v trojnásobném nadbytku) se provádí v DMF v přítomnosti BOP, Hobt a DIEA. Každá etapa
 45 vázání se kontroluje ninhydrinovým testem.

Konečný peptid je znovu získán z pryskyřice a zcela ochráněn kyselinou fluorovodíkovou. Používá se 10 ml kyseliny fluorovodíkové na gram pryskyřicového peptidu při 0 °C během 45 minut v přítomnosti para- kresolu a ethandithiolu. Po odpaření kyseliny fluorovodíkové se
 50 směs promývá etherem v kyselině fluorovodíkové, pak se sráží etherem a suší.

3. Lipofektanty

Lipopolyamin A:

- 5 1,3-bis-(3-amino-propylamino)-2-propyl-(dioktadekyl-karbamoylmethoxy)-acetát (RP115335)

Lipopolyamin B:

- 10 $\{H_2N(CH_2)_3\}_2N(CH_2)_4\{(CH_2)_3NH_2\}(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}-CH_3]_2$ (RP120525)

Lipopolyamin C:

- 15 $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{18}]_2$ (RP120535)

Lipopolyamin D:

- 20 $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COArgN[(CH_2)_{18}]$ (RP120535)

Příklad 1

Přenos nukleové kyseliny do buněk NIH 3T3 in vitro

- 25 Tento příklad popisuje přenos nukleových kyselin in vitro prostřednictvím kompozice podle vynálezu, který obsahuje nukleovou kyselinu, sloučeninu podle vynálezu a lipopolyamin. Přenos se provádí za různých podmínek, různého pufru a různého pH.

10 µl směsi kompozice se připraví následovně:

- 30 – 0,5 µg plazmové DNA pCMV-luc, 0,25 µg sloučeniny podle vynálezu v roztoku pufru
- 40 mM dioktadekylaminoglycylspermin (DOGS) v poměru X, který je určen v každém pokusu
- 35 – $2-5 \cdot 10^4$ buněk NIH3T3 se inkubuje s předchozí směsí při 37 °C pod atmosférou 5% CO₂ po dobu 4 hodin. Buňky se potom promyjí a opět vloží do kultivačního média po dobu 48 hodin v prostředí 10% séra (DMEM 10% SVF). Buněčná kultura se potom lýzuje v 50 µl pufru (Promega) a znovu získá odstředěním (20 000 g během 5 minut).

40 Aktivita luciferázy se měří ve 4 µl vzorku za přídavku 20 µl substrátu (Promega). Odečítání se provádí na luminometru LKB v jednotkách RLU (relative lights units) za 20 sekund.

Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1 a 2.

- 45 3. Zahušťování ve 150 mM NaCl, 10 mM HEPES (N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethyl)sulfonová kyselina při pH 7,1

Tabulka 1:

DOGS/DNA	bez přípravku (RLU)	s H (RLU)
0,8 X	32	850
1,8 X	220	23 700
3 X	5 400	21 750

4. Zhušťování v 5% D-glukosy, 150 mM NaCl, 10 mM (HEPES) (pH 7,2)

5 Tabulka 2:

DOGS/DNA	bez látky (RLU)	s H (RLU)	s N (RLU)
0,8 X	880	44 000	1 450
1,8 X	6 600	156 500	–
3 X	22 000	297 500	90 300

10 V těchto příkladech jsou uvedeny výsledky, které byly získány při spojení zahuštěné sloučeniny s DOGS podle vynálezu. Ukázalo se, že je možné snížit množství DOGS bez jakéhokoli negativního vlivu na transfekci odpovídajících látek.

Příklad 2

15 Zkouška transfekce v přítomnosti neutrálního lipidu

10 µl směsi kompozice se připraví následovně:

20 – 0,5 µg plazmové DNA pCMV-luc, 0,25 µg látky podle vynálezu v roztoku pufru 150 mM NaCl, 10 mM fosforečnanový pufr pH 7,4

– 40 mM dioktadekylamidoglycylspermin (DOGS) v poměru X, který je určen v každém pokusu v přítomnosti dioleoylfosfatidylethanolaminu (DOPE). Použitý poměr DOGS/DOPE je 1/2.

25 V tomto případě se 40 mM ethanolického roztoku DOGS smíchá se stejným objemem dioleoylfosfatidylethanolaminu (DOPE) připravený ve směsi chloroform/ethanol (1/5). Pro jeden ekvivalent DOGS přípravek obsahuje dva ekvivalenty DOPE.

30 - 10⁵ buněk NIH3T3 se inkubuje s předchozí směsí při 37 °C pod atmosférou 5% CO₂ po dobu 4 hodin. Buňky se potom promyjí a opět vloží do kultivačního média po dobu 48 hodin v prostředí 10% séra (DMEM 10% SVF).

35 Buněčná kultura se potom lýzuje v 50 µl pufru (Promega) a znovu získá odstředěním (20 000 g během 5 minut).

Aktivita luciferázy se měří ve 4 µl vzorku za přídavku 20 µl substrátu (Promega). Odečítání se provádí na luminocetru LKB v jednotkách RLU (relative lights units) za 20 sekund.

40 Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3:

DOGS/DNA	bez látky (RLU)	s H (RLU)	s nls-H (RLU)
0,8 X	24	3 175	760
1,8 X	19	7 410	2 380
3 X	1 800	39 500	52 800

45

Tyto výsledky potvrzují pozorování v příkladu 1. V přítomnosti bazických látek podle vynálezu a zvláště H, je možné snížit o polovíčku množství lipofektantu.

5 Příklad 3

Změna poměru přípravků podle vynálezu/DNA

3.1: V přítomnosti přípravku DOGS

10

1. 10 µl směs přípravku se připraví následovně:

15

– 0,75 µg plazmové DNA pCMV-luc a sloučenina podle vynálezu v roztoku pufru 5% D-glukózy 150 mM NaCl s 10 mM HEPES (pH zahušťovacího roztoku je 7,2)

20

– 40 mM dioktadekylamidoglycylspermin (DOGS) v poměru 1,8 X – 2–4.10⁵ buněk NIH3T3 jsou inkubovány s předchozí směsí při 37 °C pod atmosférou 5% CO₂ po dobu 4 hodin. Buňky se potom promyjí a opět vloží do kultury po dobu 48 hodin v prostředí 10% séra (DNEM 10 % SVF).

45 hodin po transfekci buňky se lýzují, v 100 µl pufru (Promega) a znovu získají odstředěním (20 000 g během 5 minut).

25

Aktivita luciferázy se měří v 5 µl vzorku za přídavku 25 µl substrátu (Promega). Odečítání se provádí na luminometru LKB v jednotkách RLU (relative lights units) za 20 sekund.

Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 4.

30 Tabulka 4:

PEP/ADN hmotnost/objem	s H (RLU)	s H-nls (RLU)	s N (RLU)
0	2150	2150	2150
0,25	3000	38 000	35 000
0,5	45 000	100 000	35 000
1	84 000	105 000	13 000
2	105 000	200 000	20 000

3.2: V přítomnosti DOGS/DOPE 1,8 X

35 Postupuje se stejně jako v protokolu dříve popsaném v 3.1. Pro transfekci se použije 40 mM roztok 1,8X dioktadekylamidoglycylsperminu (DOGS) v přítomnosti dioleoylfosfatidylethanolaminu (DOPE), DOGS/DOPE v poměru 1/2 připravené podle příkladu 2.

Tabulka 5 shrnuje získané výsledky.

40

Tabulka 5:

látka/DNA hmotnost/objem	H (RLU)	H-nls (RLU)	N (RLU)
0	580	580	580
0,25	13 000	5600	7600
0,5	11 000	18 500	1800
1	14 100	36 000	13 600
2	16 500	58 000	14 100

5 Příklad 4

Změna poměru přípravků podle vynálezu / DNA, DOGS je nahrazen jinými látkami

10 3.1: V přítomnosti 1,3-bis-(3-aminopropylamino)-2propyl-(dioktadekyl-karbamoylmethoxy)-acetátu (lipopolyaminu A)

1. 10 µl směs přípravku se připraví následovně:

- 15 – 0,55 µg plazmové DNA pCMV-luc a látka podle vynálezu v roztoku pufru 150 mM NaCl
- 1,3-bis-(3-aminopropylamino)-2propyl-(dioktadekylkarbamoylmethoxy)-acetát v uvedeném poměru
- 20 – 2–5.10⁴ buněk NIH3T3 jsou inkubovány s předchozí směsí při 37 °C pod atmosférou 5% CO₂ po dobu 4 hodin. Buňky se potom promyjí a opět vloží do kultury po dobu 48 hodin v prostředí 10% séra (DMEM 10% SVF).

25 45 hodin po transfekci se buňky lýzují v 100 µl pufru (Promega) a znovu získají odstředěním (20 000 g během 5 minut).

Aktivita luciferázy se měří v 10 µl vzorku za přídavku 50 µl substrátu (Promega). Odečítání se provádí na luminometru Berthold lumat 9501® v jednotkách RLU (relative lights units) za 10 sekund.

30 Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 6.

Tabulka 6:

LIPOFEKTANT	bez látky .10 ⁶ RLU	s H .10 ⁶ RLU			s nls-H .10 ⁶ RLU		
	látka / DNA						
	0	0,5	1	2	0,5	1	2
1,8X	3,9	30,4	32,7	4,1	52,4	58,5	39,3
3X	8,9	41,5	61,3	16,6	64,1	60,4	49,2
6X	6,2	23,6	22,3	15,6			

35

4.2: V přítomnosti PEI 800K

1. Postupuje se podle protokolu popsaného v 4,1 za použití lipofektantu PEI 800K. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 7.

5

Tabulka 7:

PEI 800K	bez látky .10 ⁶ RLU	H .10 ⁶ RLU			nls-H .10 ⁶ RLU		
amin polymeru/ fosfát DNA	látko / DNA						
	0	0,5	1	2	0,5	1	2
6	7,7	4,9	7	12,3	4	7,3	8,8
9	5	8	11,6	4	16,3	11	12,1
12	7,5	11,3	17,1	1,2			

10

Příklad 5

Přenos in vivo do svalových buněk

15 Odpovídající pokusy jsou popsány v následujícím textu: Prostředky se injektují do holenního svalu myši C57 b16 nebo OF1 (starší než 8 týdnů).

20 DNA se zředí na koncentraci 0,5 mg/ml roztokem 150 mM NaCl, obsahujícím 5% D-glukosy. Před injekcí koncentrace peptidu je 1 mg v 1 ml vody. K tomuto roztoku se přidá DNA v dostatečném množství pro dosažení určitého poměru (hmotnost/hmotnost). Doba inkubace před injektací je alespoň 20 minut při okolní teplotě.

25 Vyhodnocení výsledků: Dva dny po injekci se sval odebere, rozseká v 750 µl pufru (Promega E153A), přidá k aprotininu (Sigma). Odebraný vzorek se homogenizuje v drtičce (Heidolf) a 10 µl se odebere na měření aktivity luciferázy. Toto měření se provádí luminometrem Lumat 9501 (Berthold) během 10 sekund po přidavku 50 µl substrátu obsahujícího luciferázu (Promega) k 10 µl vzorku. Šum pozadí před přidavkem substrátu se úplně odečte a aktivita se vyjádří v RLU (relative light units). 40 µl (20 µl ADN) se injektuje v přítomnosti 5 mM HEPES o pH 7,4 roztoku, potom se přidá lipopolyamin C(RPR 120535) v množství 0,01 nmol/µl ADN 20 minut před injektací.

30

Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 8.

35 Tabulka 8:

peptid/DNA hmotnost/hmotnost	(průměr) RLU	(odchylka) RLU	počet zvířat
bez peptidu	15 228 125	14 618 681	6
nsl-H 0,025 hmotnost/hmotnost +lipopolyamin C	42 722 500	66 485 348	6

Tyto výsledky potvrzují příznivý efekt spojení lipopolyaminu se zahuštěnou látkou podle vynálezu na transfekci nukleové kyseliny in vivo ve svaly.

40

Příklad 6

Přenos nárokové kompozice in vivo do nádorových buněk

5

Pokusy se provádějí na dospělých myších samic C57/BL 6 (starších 8 týdnů), které mají nádor typu 3LL (Lewis Lung carcinoma). Tyto objekty jsou získány pasážováním nádoru a jejich implantováním ze zvířete na zvíře pod kůži v úrovni boku.

10

Roztok pro injektaci se připraví následujícím způsobem. DNA je nejdříve rozpuštěna v pufru, potom se přidá peptid a po 20 minutách se přidá silně koncentrovaný roztok kationických lipidů (20 nebo 40 mM) a směs se míchá. Po přidání všech těchto složek směs obsahuje DNA, peptid a kationický lipid, 150 mM NaCl, 5% D-glukosu a 5 mM MES o pH 6,2. V případě dvou posledních sérií s lipopolyaminem C (RPR 120 535), jako vehikulum pro injektování se používá 57 mM NaCl a 150 mM NaCl a 5% D-glukosa. Injektace se provádí po 20 až 30 minutách od

15

přípravy roztoku.

V Tabulkách 9 a 10 je uvedeno složení kompozice, která se injektuje do nádoru 7 dní po implantaci. U myši se provádí anestezie před injektací pomocí směsi 130 mg Ketaminu a 4 mg Xylazinu na jeden kilogram myši.

20

Dva dny po injektaci se tkáň odebere, rozseká v 500 µl pufru (Promega Cell Lysis Buffer E153 A). Po odstředění (20 000 g během 10 minut) se odebere 10 ml vzorku ke stanovení aktivity luciferázy. Toto měření se provádí luminometrem Lumat LB 9501 (Berthold) během 10 sekund po přidavku 50 µl substrátu obsahujícího luciferázu (Promega Luciferáze Assay Substrate).

25

Aktivita se vyjádří v jednotkách RLU (relative light units).

Tabulka 9 uvádí výsledky získané v přítomnosti rozdílných lipopolyaminů A, B, C nebo D a Tabulka 10 uvádí výsledky získané v přítomnosti PEI.

30

Tabulka 9:

plazmid		peptid		kationický lipid		výsledek RLU/nádor		počet zvířat
µ/nádor	[DNA] µg/µl	ref.	pept/DNA w/w	ref.	nmol/µg DNA	průměr	odchylka	
20	2					0	0	5
20	2			A	1,8	142 300	121 418	5
20	2	H	1		1,8	301 730	243 166	5
30	2				3	99 775	128 726	6
30	2	H	1		3	1 340 460	1 771 624	5
7,5	0,5			A	3	88 712	49 314	5
7,5	0,5	H	1		3	383 313	234 713	6
7,5	0,5	H	1,5		3	618 025	530 774	6
15	1	H	1		3	1 017 372	966 141	5
10	0,5	H	1,5	C	3	679 258	414 286	9
10	0,5	H	1,5	D	3	395 433	219 333	10
18,75	0,25			C	2	222 700	126 036	6
18,75	0,25	Pr 2	0,5		2	1 046 050	612 401	6
20	0,5			X	4	806 467	887 206	6
20	0,5	H	1	C	4	1 348 233	1 674 106	6

35

Tabulka 10:

plazmid		peptid		polyethylen imin		výsledek RLU/nádor		počet zvířat
injekt. mn.	[DNA] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	ref.	pept/DNA w/w	vel.	Eq	průměr	odchylka	
20	2					0	0	5
20	2			800 K	9	54 350	52 989	5
50	2			800 K	9	7 783	16 803	6
50	2	H1	1	800 K	9	62 230	71 462	5
50	2			800 K	12	6 733	16 493	6
50	2	H1	1	800 K	12	72 700	150 300	5
40	2			800 K	18	470	1 051	5
40	2	H1	1	800 K	18	82 608	104 443	6
40	2			800 K	24	1 630	3 645	5
40	2	H1		800 K	24	45 750	63 942	5
10	0,5	H1	1,5	D	12	14 152	16 946	11
10	0,5	H1	1,5	C	12	12 942	22 853	11

5

Příklad 7

Přenos nukleové kyseliny in vitro do buněk 3LL

- 10 Tento příklad popisuje přenos nukleových kyselin in vitro (na buněčné kultuře) prostřednictvím kompozice podle vynálezu, které obsahují nukleovou kyselinu, sloučeninu podle vynálezu vybranou z množiny derivátů protaminů a lipopolyaminů v 75 mM roztoku NaCl.

10 μl směsi se připraví následujícím postupem:

15

– 0,5 μg plazmové DNA pCMV-luc, 0,5 μg PR1 nebo PR2 látky podle vynálezu v roztoku 75 mM NaCl

– Lipopolyamin C(RPR 120535), jeho množství se udává v Tabulce 11 pro každý pokus

20

– $1 \cdot 10^5$ buněk 3LL (v 250 μl kultivační pudy DMEM s 10% séra telecího plodu) jsou inkubovány s předchozí směsí při 37 °C pod atmosférou 5% CO_2 po dobu 4 hodin. Přidá se 500 μl kultivační pudy a buňky jsou znovu uvedeny ke kultivaci. Příští den se buňky promyjí a opět vloží na dobu 24 hodin do stejného kultivačního média, které obsahuje 10% séra telecího plodu. Buňky se potom lýžují v 100 μl pufru (Promega).

25

Aktivita luciferázy se měří po přidání 50 μl substrátu (Promega). Odečítá se na luminometru LB v jednotkách RLU (relative lights units) ze 10 sekund.

30

Výsledky pokusů s PR1 a PR2 jsou shrnuty v Tabulce 11 a 12.

Tabulka 11:

Lipopolyamin C/DNA	bez přípravku (RLU)	s PR2 (RLU)
4X	107 289	447 214
6X	77 396	1 182 641
8X	14 512	729 285

Tabulka 12:

Lipopolyamin C/DNA	bez přípravku (RLU)	s PR2 (RLU)
4X	12 037	6304
6X	901	113 113
8X	328	294 743

5

Příklad 8

Injektace zahuštěných peptidů podle vynálezu bez lipopolyfektantu do nádorů in vivo.

- 10 – myši typu Swiss/nude dospělé samice
- experimentální indukované nádory po injekci 10^7 buněk 3T3 HER2 podkožní cestou
- injektování směsi kompozice 7 až 12 dní po injekci buněk. Zahuštěný nebo nezahuštěný
- 15 roztok DNA s peptidem se injektuje přímo do nádoru stříkačkou typu Hamilton.
- dva dny po injekci se odebere nádorová tkáň, která se drtí a homogenizuje v 750 μ l pufru (Promega Cell Lysis Buffer E153 A). Po odstředění (20 000 g během 10 minut), se odebere 10 μ l
- 20 vzorku, který slouží k posouzení aktivity luciferázy měřením luminiscenční emise získané po smísení s 50 μ l reagentu (Promega Luciferáze Assay Substrate) v luminometru Lumat LB 9501 (Berthold), integruje se 10 sekund.

Výsledná aktivita je vyjádřena v jednotkách RLU (Relative Lights Units).

- 25 Protokol: 0,5 mg/ml DNA se rozpustí v roztoku, který obsahuje soli, pufr a glukosu v konečném množství, které je zmíněno v Tabulce výsledků. Před injektací koncentrace peptidů je 1 mg v 1 ml vody. K roztoku se přidá DNA v dostatečném množství pro dosažení určitého poměru hmotnost/hmotnost. Před injektací se roztok inkubuje alespoň 20 minut při teplotě prostředí.
- 30 Dávka pro myš je 20 μ l injekčního roztoku, který obsahuje 10 μ l DNA.

Tabulka 13:

pufr	peptid		Výsledek RLU/nádor		počet zvířat
NaCl/glu/MES nebo HEPES 5 mM	ref.	peptid/DNA w/w	průměr	odchylka	
150/HEPES			1 689 938	1 388 072	6
	nls-H	0,02	6 819 100	5 860 709	6
150/5/HEPES			369 563	577 901	6*
	nls-H1	0,1	1 654 313	2 145 147	6*
	nls-H1	0,02	4 031 000	1 007 896	6*
			931 275	214 229	4
	H	0,1	3 420 432	1 285 704	6

- 35 *: myši uspalé směsí Imalgen + Rompun (130 mg/kg Ketaminu, 4 mg/kg Xylasinu, cestou intraperitoneální).

Seznam sekvencí

5 (1) Všeobecné informace

(i) podavatel:

(A) Jméno: RHONE POULENC RORER S .A.

(B) Ulice: 20, Avenue Raymond Aron

10 (C) Město: Antony

(D) Země: Francie

(E) Směrovací číslo: 92165

(F) Telefon: 40 91 69 22

(H) Fax: (1) 40 91 72 96

15

(ii) název vynálezu: Prostředky obsahující aminové kyseliny, jejich příprava a použití

(iii) počet sekvencí: 9

20 (iv) způsob luštění počítačem:

(A) Typ nosiče: tape

(B) počítač: IBM PC kompatibilní

(C) systém využití: PC-DOS/MS-DOS

(D) logika: Patentr Relase #1.0, Version #1.30 (OEB)

25

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 1:

(i) charakteristika sekvence:

30 (A) délka: 9 aminokyselin

(B) typ: aminokyselina

(D) konfigurace: lineární:

(ii) typ molekuly: protein

35

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

Lys Thr Pro Lys Lys Ala Lys Lys Pro

5

40

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 2:

(i) charakteristika sekvence:

45 (A) délka: 8 aminokyselin

(B) typ: aminokyselina

(D) konfigurace: lineární:

(ii) typ molekuly: protein

50

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

Ala Thr Pro Ala Lys Lys Ala Ala

5

55

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 3:

- (i) charakteristika sekvence:
 (A) délka: 16 aminokyselin
 (B) typ: aminokyselina
 (D) konfigurace: lineární

- (ii) typ molekuly: protein

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

Ala Thr Pro Ala Lys Lys Ala Ala Ala Thr Pro Ala Lys Lys Ala Ala
 5 10 15

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 4:

- (i) charakteristika sekvence:
 (A) délka: 18 aminokyselin
 (B) typ: aminokyselina
 (D) konfigurace: lineární

- (ii) typ molekuly: protein

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

Lys Thr Pro Lys Lys Ala Lys Lys Pro Lys Thr Pro Lys Lys Ala Lys Lys Pro
 5 10 15

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 5:

- (i) charakteristika sekvence:
 (A) délka: 17 aminokyselin
 (B) typ: aminokyselina
 (D) konfigurace: lineární

- (ii) typ molekuly: protein

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

Ala Thr Pro Lys Lys Ser Ala Lys Lys Thr Pro Lys Lys Ala Lys Lys Pro
 5 10 15

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 6:

- (i) charakteristika sekvence:
 (A) délka: 26 aminokyselin
 (B) typ: aminokyselina
 (D) konfigurace: lineární

- (ii) typ molekuly: protein

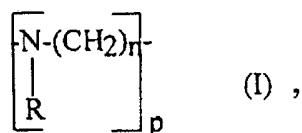
PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Kompozice pro transfekci nukleové kyseliny **vyznačující se tím**, že obsahuje transfekční činidlo a sloučeninu působící na úrovni kondenzace nukleových kyselin, přičemž sloučenina obsahuje peptidové jednotky uvedené v seznamu sekvencí jako SEQ. ID. No. 1 a/nebo SEQ. ID. No. 2, které se souvisle nebo nesouvisle opakují, a počet peptidových jednotek je mezi
10 2 a 10, nebo sloučenina obsahuje oligopeptid vybraný ze skupiny sestávající z oligopeptidů uvedených v seznamu sekvencí jako SEQ. ID. No. 7 a SEQ. ID. No. 8.
- 15 2. Kompozice podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že peptidové jednotky jsou navzájem odděleny spojkami vybranými ze skupiny sestávající z biochemických sloučenin, aminokyselin a chemických sloučenin.
3. Kompozice podle nároku 2 **vyznačující se tím**, že jedna ze spojek obsahuje jednu nebo více aminokyselin.
- 20 4. Kompozice podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že sloučenina je odvozená z histonu H1.
5. Kompozice podle nároku 4 **vyznačující se tím**, že sloučenina je odvozená z C-koncové domény histonu H1.
25
6. Kompozice podle nároku 4 **vyznačující se tím**, že sloučenina je oligopeptid vybraný ze skupiny sestávající z oligopeptidů uvedených v seznamu sekvencí jako SEQ. ID. No. 4, SEQ. ID. N. 5 a SEQ. ID. No. 6.
- 30 7. Kompozice podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že sloučenina je odvozená z N-koncové domény nukleolinu.
8. Kompozice podle nároku 7 **vyznačující se tím**, že sloučenina obsahuje peptid uvedený v seznamu sekvencí jako SEQ. ID. No. 3.
35
9. Kompozice podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že sloučenina má strukturu skládaného β -listu.
10. Kompozice podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že sloučenina je spojena
40 s ligandem buněčného receptoru.
11. Kompozice podle nároku 11 **vyznačující se tím**, že sloučenina sestává zcela nebo z části z histonu H1 spojeného se signální sekvencí jaderné lokalizace.
- 45 12. Kompozice podle nároku 11 **vyznačující se tím**, že obsahuje peptid ProLysLysLysArgLysVal β AlaLysThrProLysLysAlaLysLysProLysThrProLysLysAlaLysLysPro, uvedený v seznamu sekvencí jako SEQ. ID. No. 9.
13. Kompozice podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že sloučenina je také spojena
50 s peptidem typu fusogenu, který podporuje buněčnou transfekci farmaceutického prostředku.
14. Kompozice podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že sloučenina je polyglykosylovaná, sulfonovaná, fosforylovaná a/nebo je roubována na komplexní cukry nebo lipofilní látku.

15. Kompozice podle nároku 1 **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že transfekční činidlo je kationtový polymer nebo lipofektant.

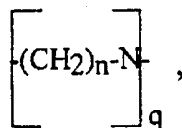
16. Kompozice podle nároku 15 **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že lipofektant je lipid vytvářející liposomy, skryté liposomy, imunoliposomy nebo cílové liposomy.

17. Kompozice podle nároku 15 **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že kationtový polymer je sloučenina obecného vzorce I



10 kde

R představuje atom vodíku nebo skupinu obecného vzorce:



kde

15

n je celé číslo 2 až 10

p a q jsou celá čísla,

20

přičemž součet p + q je takový, že průměrná molekulová hmotnost polymeru je 100 až 10⁷.

18. Kompozice podle nároku 15 **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že kationtový polymer je vybrán ze skupiny zahrnující polyethylenimin PEI, a polypropylenimin, PPI.

25

19. Kompozice podle nároku 18 **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že polymer je vybrán ze skupiny zahrnující polyethylenimin molekulové hmotnosti 50 000 (PEI50K) nebo polyethylenimin molekulové hmotnosti 800 000 (PEI800K).

30

20. Kompozice podle nároku 15 **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že lipofektant obsahuje polyaminovou oblast obecného vzorce II



35 kde

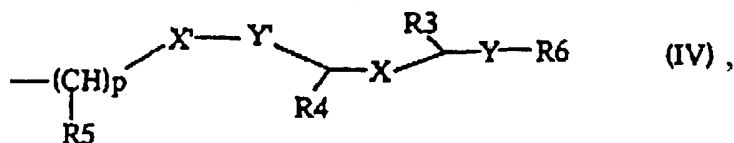
m je celé číslo vyšší nebo rovné 2 a n je celé číslo vyšší nebo rovné 1,

přičemž, když n je vyšší než 1, pak m je shodné nebo odlišné.

40

21. Kompozice podle nároku **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že polyaminová oblast je reprezentována sperminem, therminem nebo jedním z jejich analogů, který se váže na nukleovou kyselinu.

22. Kompozice podle nároku 20 **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že lipofektant obsahuje lipofilní oblast obecného vzorce IV



kde

X a X' představují, nezávisle na sobě, atom kyslíku, methylenovou skupinu $-(\text{CH}_2)_q-$, kde q odpovídá hodnotám 0, 1, 2 nebo 3 nebo aminoskupinu $-\text{NH}-$ nebo $-\text{NR}'-$, kde R' představuje alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku.

Y a Y' představují, nezávisle na sobě, methylenovou skupinu, karbonylovou skupinu nebo skupinu $\text{C}=\text{S}$,

R₃, R₄ a R₅ představují, nezávisle na sobě, atom vodíku nebo alkylovou skupinu obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, substituovanou nebo nesubstituovanou, přičemž p je vyšší nebo rovné 0 a nižší nebo rovné 5

R₆ představuje zbytek derivátu cholesterolu nebo alkylaminoskupinu $-\text{NR}_1\text{R}_2$, kde R₁ a R₂ představují, nezávisle na sobě, nasycenou nebo nenasycenou, lineární nebo rozvětvenou alifatickou skupinu obsahující 12 až 22 atomů uhlíku.

23. Kompozice podle nároku 20 **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že transfekční činidlo obsahuje lipopolyamin vybraný ze skupiny obsahující dioktadecylaminodoglycylspermin (DOGS), (5-karboxyspermylamid palmitoylfosfatidylethanolaminu (DPPEs), 2,5-bis(3-aminopropylamin)pentyl(dioktadecylkarbamoylmethoxy)acetát, 1,3-bis(3-aminopropylamino)-2-propyl(dioktadecylkarbamoylmethoxy)acetát, $\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\{(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2\}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}-[(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3]_2$, $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{18}]_2$ a $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COArgN}[(\text{CH}_2)_{18}]$.

24. Kompozice podle nároku 1 **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že transfekční činidlo je dioktadecylamidoglycylspermin, DOGS.

25. Kompozice podle kteréhokoliv z předchozích nároků **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že nukleová kyselina je deoxyribonukleová kyselina.

26. Kompozice podle nároků 1 až 24 **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že nukleová kyselina je ribonukleová kyselina.

27. Kompozice podle nároku 25 nebo 26 **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že nukleová kyselina je chemicky modifikovaná.

28. Kompozice podle nároků 25, 26 nebo 27 **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že nukleová kyselina je „protismyslová“ nukleová kyselina.

29. Kompozice podle nároků 25 až 27 **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že nukleová kyselina obsahuje terapeutický gen.

30. Kompozice podle nároku 1 **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje jeden nebo více neutrálních lipidů.

31. Kompozice podle nároku 30 **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že neutrální lipid nebo lipidy jsou vybrány ze skupiny zahrnující syntetické lipidy, přírodní lipidy, zwiteriontové lipidy nebo lipidy, které jsou ve fyziologických podmínkách bez náboje.
- 5 32. Kompozice podle nároku 31 **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že neutrální lipid nebo lipidy jsou vybrány ze skupiny sestávající z galaktocerebrosidů, sfingomyelinů, asialoGM1 a asialoGM2.
- 10 33. Kompozice podle nároku 31 **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že neutrální lipid nebo lipidy jsou vybrány ze skupiny zahrnující dioleoylfosfatidylethanolamin (DOPE), oleoylpalmitoyl-fosfatidylethanolamin (POPE), di-stearoylfosfatidylethanolamin, palmitoylfosfatidylethanolamin, mirystoylfosfatidylethanolamin, deriváty di-stearoylfosfatidylethanolaminu N-methylované 1 až 3krát, deriváty palmitoylfosfatidylethanolaminu N-methylované 1 až 3krát, deriváty mirystoylfosfatidylethanolaminu N-methylované 1 až 3krát, fosfatidylglycerol, diacylglycerol, glykosyldiacylglycerol, cerebrosidy, sfingolipidy a asialogangliosidy.
- 15 34. Použití kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 33 pro in vitro přenos nukleových kyselin.
- 20 35. Použití podle nároku 34, kde sloučenina obsahuje peptidové motivy KTPKKAKKP (SEQ. ID. No. 1) a/nebo ATPAKKAA (SEQ. ID. No. 2), přičemž počet těchto motivů je 2 až 10, spojené s ligandem buněčného receptoru, protilátkou nebo derivátem protilátky, a kde in vitro přenos nukleových kyselin je zacílen do buněk exprimujících odpovídající receptory nebo antigeny.
- 25 36. Použití podle nároku 34, kde sloučenina obsahuje oligopeptid vybraný ze skupiny zahrnující (ATPAKKAA)₂(COOH) (SEQ. ID. No. 3), (KTPKKAKKP)₂(COOH) (SEQ. ID. No. 4), ATPKKSAKKTPKKAKKP(COOH) (SEQ. ID. No. 5), KKAkSPKKAKAAKPKKAPKSPAKAKA(COOH) (SEQ. ID. No. 6), SRSRYRQRQSRRRRRR(COOH) (SEQ. ID. No. 7) a RRRLHRIHRRQHRSCRRRKRR(COOH) (SEQ. ID. No. 8),
- 30 přičemž oligopeptid je nebo není spojen s cílícím elementem.
- 35 37. Použití kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 33 pro výrobu léku k léčení nemocí, které jsou způsobeny nedostatkem proteinu nebo produktu nukleové kyseliny.
- 40

Konec dokumentu
