

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Oktober 2005 (13.10.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/094783 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 9/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2005/000589

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. März 2005 (29.03.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 016 020.1 28. März 2004 (28.03.2004) DE
10 2004 054 730.0
5. November 2004 (05.11.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **NOVOSOM AG** [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120
Halle (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ENDERT, Gerold**
[DE/DE]; Seebener Str. 20, 06114 Halle (DE). **KER-
WITZ, Yvonne** [DE/DE]; Feuerbachstr. 75, 06114 Halle
(DE). **FELLERMEIER, Monika** [DE/DE]; Eichenweg
6, 83556 Griesstätt/Inn (DE).

(74) Anwälte: **GULDE, Klaus W.** usw.; GULDE HENGEL-
HAUPT ZIEBIG & SCHNEIDER, Wallstrasse 58, 10179
Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SERUM-STABLE AMPHOTERIC LIPOSOMES

(54) Bezeichnung: SERUMSTABILE AMPHOTERE LIPOSOMEN

(57) Abstract: The invention relates to amphoteric liposomal formulations which are provided with great serum stability and are suitable for the intracellular delivery of oligonucleotides.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft amphotere liposomale Formulierungen, die besondere Serumstabilität zeigen und sich zum intrazellulären Delivery von Oligonukleotiden eignen.



WO 2005/094783 A2

Serumstabile amphotere Liposomen

Die Erfindung betrifft amphotere liposomale Formulierungen, die besondere Serumstabilität zeigen und sich zum intrazellulären Delivery von Oligonukleotiden eignen.

Eine recht neue Klasse von potentiellen pharmazeutischen Wirkstoffen stellen die so genannten kurzen interferierenden Ribonukleinsäuren (siRNA) dar, die als Doppelstrang eingesetzt werden, um einzelne Gene gezielt in ihrer Aktivität herunterzuregulieren oder auszuschalten. Ihr großes Potential in Therapie und Diagnostik ist leider mit dem Nachteil der starken Instabilität gegenüber Körperflüssigkeiten verbunden. Insbesondere im Blut werden kleine Nukleinsäuren sehr rasch abgebaut. Durch chemische Modifizierung der Nukleinsäuren wird versucht die Empfindlichkeit dieser Moleküle herabzusetzen, was als Nachteil oft eine verringerte bis fehlende biologische Aktivität zur Folge haben kann.

Ein anderer Ansatz ist die Verwendung eines Trägers, der die siRNA vor Angriffen von Enzymen schützt und zum Wirkort transportieren kann. Liposomen werden schon seit einiger Zeit als pharmazeutische Träger für Arzneistoffe eingesetzt.

Zahlreiche Publikationen beschäftigen sich mit der Anwendung von meist kationischen liposomalen Systemen zum intrazellulären Delivery von Oligonukleotiden in vivo (z.B. Molecular Membrane Biology, 16, 129-140, (1999); BBA 1464, 251-261, (2000); Reviews in Biology and Biotechnology, 1(2), 27-33, (2001). All diesen Systemen gemein ist jedoch die Tatsache, dass die verwendeten Lipid-Mischungen aus ungesättigten und kationischen Lipiden wie z.B. DOTAP und/oder DOPE aufgebaut sind und aus diesem Grund nicht serumstabil sind. Dadurch bedingt setzen diese Liposomen eingeschlossenen Wirkstoff sehr schnell nach einer parenteralen Applikation frei. Häufig werden für die oben genannten Anwendungen auch Komplexe aus vorgeformten Liposomen und Nukleinsäuren hergestellt (z.B. Lipoplexe). Die Komplexbildung bzw. die meist nicht im Serum stabilen liposomalen Formulierungen führen dazu, dass die Stabilität der Oligonukleotide über einen längeren Zeitraum nicht gewährleistet ist.

Amphotere Liposomen sind eine neue Klasse von Liposomen, die vorteilhafte Eigenschaften gegenüber konventionellen Liposomen und rein kationischen Systemen für ein intrazelluläres Delivery bieten. Negativ geladene Wirkstoffe, wie die

Nukleinsäuren lassen sich effektiv in das Innere dieser Liposomen verpacken, obwohl die Gesamtladung der Liposomen bei physiologischem pH negativ bleibt. Durch Änderung des Umgebungs-pH, wie er bei der endosomalen Aufnahme von Liposomen in Zellen vorkommt, von neutral nach leicht sauer, ändert sich auch die Ladung der amphoteren Liposomen von anionisch nach leicht kationisch und die Vorteile eines kationischen Transfektionsreagenzes werden ausgenutzt. In der WO 02/66012 A2 sind diese Liposomen erstmals beschrieben. Die WO 02/66490 und WO 02/66489 (WO 03/070220 und WO 03/070735) stellen pH-sensitive Lipide vor, die sich zum Aufbau von amphoteren Liposomen eignen.

Hafez et al. (Biophysical Journal 2000 (79), 1438-46) und Shi et al. (Journal of Controlled Release 2002 (80), 309-319) beschreiben die Herstellung pH-sensitiver Liposomen, die ohne Neutrallipid formuliert werden. Diese Liposomen sind bei physiologischen pH-Werten negativ geladen und enthalten pH-sensitive Komponenten, welche schwach anionische oder schwach kationische Amphiphile enthalten. Die Lipide bilden stabile Liposomen bei neutralem oder basischem pH. Im sauren Milieu werden die anionischen bzw. kationischen Lipide protoniert und dadurch entladen bzw. umgeladen. Durch die elektrostatische Destabilisierung aggregieren die Liposomen schneller, was die Membranfusion fördert. Jedoch sind Liposomen, die ausschließlich aus geladenen Komponenten bestehen aufgrund ihrer geringen Stabilität im Serum nicht für in vivo Anwendungen geeignet.

Bei systemischer Applikation ist neben den üblichen Bedingungen für parenterale Applikation, wie Sterilität, Isoosmolarität, Reinheits- und Toxizitätsanforderungen, die Stabilität und Aggregationsfreiheit einer liposomalen Formulierung in humanem Serum eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung. So sehen auch die Richtlinien der US-amerikanischen Aufsichtsbehörde FDA für liposomale Formulierungen (<http://www.fda.gov/cder/guigance/index.htm>, Liposome Drug Products) besondere Prüfungen vor. Dabei wird verlangt, dass das Verhältnis verkapselter zu freiem Arzneistoff in vitro, sowie in vivo über den Zeitraum der Zirkulation zu bestimmen ist. Serumkomponenten können die liposomale Membran permeabilisieren und Wirkstoff freisetzen. Ob ein Wirkstoff schnell, langsam oder nicht freigesetzt wird, hängt auch von den molekularen Dimensionen des Wirkstoffes ab. So verbleibt ein Plasmid mit mehreren tausend Basenpaaren eher im Liposom als kleine Oligonucleotide. Für ein intrazelluläres Delivery ist es wesentlich, dass die Freisetzung möglichst gering ist.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass die in der WO 02/66012 A2 offenbarten amphoteren Liposomen sich stark in ihrer Serumstabilität bei Verwendung von kleinen Oligonukleotiden unterscheiden. Ziel der vorliegenden Erfindung ist es daher, Formulierungen von amphoteren Liposomen bereitzustellen, die kleine Oligonukleotide, wie siRNA und/oder Antisense-Moleküle, in ihren Innenraum einschließen und unter Serumbedingung nicht, oder nur zu einem kleinen Teil freisetzen und sich somit zur parenteralen Gabe eignen.

Die Erfindung löst die Aufgabe durch Bereitstellung von liposomalen Formulierungen mit einem wässrigen Innenraum umfassend

- neutrale Lipide mit einem Membrananteil von 10 - 60 mol%,
 - Cholesterol mit einem Anteil von 30 – 50 mol%,
- als ladungstragende Lipide entweder

- amphotere Lipide mit einem Anteil von 5 – 30mol%,

oder

- Mischungen von kationischen und anionischen Lipiden mit einem Gesamtanteil von höchstens 50 mol%,

wobei die Formulierung als einen Wirkstoff im wässrigen Innenraum mindestens ein Oligonukleotid umfasst.

Die für diese Ausführung der Erfindung relevanten Oligonukleotide sind aus 5-100, bevorzugt aus 5-40 und besonders bevorzugt aus 10-25 Nukleotiden oder Basenpaaren aufgebaut. Darüber hinaus können die Oligonukleotide als Einzelstrang (z.B. Antisense-Oligonukleotide), als Doppelstrang (z.B. small-interfering RNA, Decoy-Oligonukleotide) oder in komplexer Faltung (z.B. Aptamere, Spiegelmer, Ribozyme) vorliegen. Alle für diese Erfindung relevanten Oligonukleotide sind aus Desoxyribonukleotiden oder aus Ribonukleotiden sowie aus deren chemisch-modifizierten Derivaten aufgebaut, wie beispielsweise Phosphorothioate DNA (PS), 2'-O-methyl RNA (OMe), 2'-O-methoxy-ethyl RNA (MOE), Peptide nucleic acid (PNA), N3'-P5' Phosphoroamidate (NP), 2'-fluoro-arabino nucleic acid (FANA), Locked nucleic acid (LNA), Morpholino phosphoroamidate (MF), Cyclohexene nucleic acid (CeNA), Tricyclo-DNA (tcDNA)). Darüber können Copolymere und Block-Copolymere verschiedener Nukleotide und sogenannte Gapmere in die Liposomen eingeschlossen werden.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung werden Aptamere oder Spiegelmer in die Liposomen eingeschlossen.

Aptamere sind DNA- oder RNA-basierte Oligonukleotide mit komplexer dreidimensionaler Struktur. Aufgrund dieser Struktur können Aptamere sehr spezifisch und hochaffin an Proteintargets binden und wirken somit therapeutisch, meist extrazellulär. Ihre Funktionalität ist nahezu identisch zu monoklonalen Antikörpern.

- 5 Spiegelmere sind im Gegensatz zu D-Oligonukleotiden aus L-Ribose- und L-2'-Desoxyribose-Einheiten aufgebaut. Genau wie Aptamere binden diese spiegelbildlichen Nukleinsäuren spezifisch an Proteintargets. Aufgrund der chiralen Inversion besitzen Spiegelmere im Gegensatz zu herkömmlichen D-Oligonukleotiden eine erhöhte Stabilität gegenüber einem enzymatischen Abbau.

10

Das Grundgerüst der erfindungsgemäßen amphoteren Liposomen wird von neutralen Gerüstlipiden gebildet, die einen Anteil an der Membran von 5 bis 65 mol%, bevorzugt von 10 bis 60 mol% besitzen. Geeignete Lipide sind Phosphatidylcholine, wie DMPC, DPPC, DSPC, DOPC und POPC, die sowohl synthetischen als auch natürlichen oder

15

Es ist dem Fachmann bekannt, dass sich die Serumstabilität von Liposomen durch Zusatz von Cholesterol in der Membran erhöhen lässt. Dies wurde auch für amphotere Liposomen gefunden. Die erfindungsgemäßen Liposomen besitzen vorzugsweise

20

einen Gehalt von 30 bis 50 mol%, bevorzugt von 35 – 45 mol% Cholesterol in der Membran. Viele Lipide, die als Ladungsträger für amphotere Liposomen verwendet werden können, leiten sich von der chemischen Grundstruktur des Cholesterol ab (beispielsweise die offenbarten Verbindungen in WO 02/66490 und WO 02/6648).

25

Überraschenderweise wurde gefunden, dass diese Cholesterolderivate im Allgemeinen, besonders MoChol, HisChol, Chems, HistChol nicht die stabilisierende Wirkung des nativen Cholesterols besitzen, daher ist es von Vorteil, wenn die Summe aller sterolbasierenden Lipide 60 mol% nicht übersteigt.

30

Das amphotere Ladungsverhalten kann auf zwei Weisen gebildet werden: durch Verwendung von amphoteren Lipiden oder durch geeignete Mischungen von pH-sensitiven kationischen und anionischen Lipiden, wie sie in der WO 02/066012 offenbart werden. Werden amphotere Lipide verwendet, so beträgt der Membranteil zwischen 5 und 30 mol%, weiter bevorzugt zwischen 5 und 20 mol%, bei Mischungen beträgt der Gesamtladungsträgeranteil bevorzugt nicht mehr als 50 mol%, weiter

35

bevorzugt zwischen 15 und 45 mol%.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden amphotere Formulierungen wie folgt zusammengesetzt:

- Grundlipid ausgewählt aus der Gruppe DMPC, DPPC, DSPC mit 10 bis 60 mol%
- Cholesterol, mit 35 – 45 mol%
- 5 - amphoter Lipid, ausgewählt aus der Gruppe HistChol, HistDG, isoHistSuccDG, Acylcarnosin, HCChol mit 5 - 20 mol%.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Formulierungen wie folgt zusammengesetzt:

- 10 - Grundlipid ausgewählt aus der Gruppe DMPC, DPPC, DSPC mit 10 bis 50 mol%
 - Cholesterol, mit 35 – 45 mol%
 - Mischung kationischer und anionischer Lipide, davon mindestens eines pH-sensitiv, ausgewählt aus den Gruppen
 - a) kationisch: DMTAP, DPTAP, DOTAP, DC-Chol, MoChol, HisChol, DPIM, CHIM, DORIE, DDAB, DAC-Chol, TC-Chol, DOTMA, DOGS, C(18)2Gly+N,N-dioctadecylamidoglycin, CTAP, CpyC, DODAP, und DOEPC mit 5 bis 40 mol%.
 - 15 b) anionisch: DGSucc, DMPS, DPPS, DOPS, POPS, DMPG, DPPG, DOPG, POPG, DMPA, DPPA, DOPA, POPA, Chems und CetylP mit 5 bis 40 mol%
- mit einem Anteil an der liposomalen Membran von insgesamt 15-45 mol%.

20

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Formulierung und ihre Zusammensetzung ausgewählt aus Tabelle 3.

- 25 Für eine Verwendung der erfindungsgemäßen Formulierungen als Arzneimittelträger kann es zweckmäßig sein, Substanzen, die die Haltbarkeit erhöhen, die zur Regulierung des osmotischen Drucks dienen, zuzusetzen.

- 30 Die Herstellung der erfindungsgemäßen Liposomen kann durch Verfahren nach dem Stand der Technik erfolgen, wie beispielsweise Extrusion durch Membranen definierter Porengröße, Ethanolinjektion oder Hochdruckhomogenisation. Beispielhafte Ausführungen sind in den Beispielen gegeben.

- 35 Nicht eingeschlossener Wirkstoff wird abgetrennt. Dazu werden geeignete Trennverfahren verwendet, so dass der Wirkstoff zu mindestens 90% im Liposom eingeschlossen ist und weniger als 10% des Wirkstoffes sich ausserhalb des Liposoms befinden. Hierfür können chromatographische Verfahren, Zentrifugation, Dialyse oder Ultrafiltration verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen liposomalen Formulierungen können zur therapeutischen Behandlung eines Säugetieres verwendet werden. Auch zur therapeutischen Behandlung von Menschen können sie verwendet werden.

Insbesondere zur parenteralen Applikation, bevorzugt zur intravenösen Applikation sind die erfindungsgemäßen liposomalen Formulierungen geeignet. Die Erfindung betrifft demgemäß auch einen Kit, der die erfindungsgemäße liposomale Formulierung gegebenenfalls zusammen mit einem geeigneten Träger umfasst, sowie die Verwendung des Kits in Diagnose und Therapie.

Tabelle 1

Nr	Lipidmischung	Verhältnis	Serumst- abilität	Nr	Lipidmischung	Verhältnis	Serumst- abilität
26	DMPC/MoChol/DMPS/Cho	40:10:10:40	+	HC10A	DPPC/HcChol/Chol	50:15:35	+
12	DMPC/AC/Chol	50:10:40	+	SC1Ea	POPC/HisChol/Chems	60:20:20	-
13	DMPC/HisChol/DPPS/Chol	35:10:15:40	+	SC1E	POPC/HisChol/Chems	50:15:35	-
15	DMPC/IsohistsuccDG/Cho	50:10:40	+	HC1Eb	DPPC/HisChol/Chems	60:20:20	-
09	DMPC/MOChol/DGSucc/Cho	35:10:15:40	+	HC39	DPPC/DGSucc/Chems	50:15:35	-
10	DMPC/MoChol/DGSucc/Cho	40:10:10:40	+	SC7B	POPC/HistPS/Chol	50:15:35	+
11	POPC/MoChol/DGSucc/Cho	35:10:15:40	+	S7B	POPC/HistPS	60:40	-
05	DMPC/HistChol/Chol	50:10:40	+	HC7B	DPPC/HistPS/Chol	50:15:35	+
07	POPC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40	+	H7B	DPPC/HistPS	60:40	-
02	DMPC/Hist-DG/Chol/	50:10:40	+	SC3C	POPC/MoChol/Chems	50:15:35	-
03	DMPC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40	+	HC3C	DPPC/MoChol/Chems	50:15:35	-
06	POPC/MoChol/DPPS/Cho	40:10:10:40	+	SC19B	DPPC/DOTAP/Chems	50:15:35	-
2a	DPPC/DOTAP/DG-Succ/Chol	20:10:30:40	+	SC6	POPC/AC/Chol	50:15:35	+
3a	DPPC/HistChol/Chol	50:10:40	+	S6	POPC/AC	60:40	-
4a	DPPC/HistDG/Chol	40:20:40	+	HC6	DPPC/AC/Chol	50:15:35	+
7a	DPPC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40	+	H6	DPPC/AC	60:40	-
4	DMPC/DOTAP/DG-Succ/Chol	29:14:43:14	-	HC12	DPPC/CHIM/Chems	50:15:35	-
1	DPPC/DOTAP/Chems/Cho	50:10:30:10	-	SC12	POPC/CHIM/Chems	50:15:35	-
X	DPPC/DOTAP/Chems	60:10:30	-	H34	DPPC/HistSuccDG	60:40	-
Y	POPC/DOTAP/Chems	60:10:30	-	S5	POPC/HistChol	60:40	-
6	DPPC/MoChol/Chems/Chol	50:10:30:10	-	SC34	POPC/HistSuccDG/Cho	50:15:35	+
SC10A	POPC/HcChol/Chol	50:15:35	+	HC35	DPPC/IsoHistSuccDG/Cho	50:15:35	+
HC5	DPPC/HistChol/Chol	50:15:35	+	SC35	POPC/IsoHistSuccDG/Cho	50:15:35	+
SC5	POPC/HistChol/Chol	50:15:35	+	HC34	DPPC/HistSucc/Chol	50:15:35	+

Tabelle 3

Zusammensetzung	Molare Verhältnisse
DMPC/MoChol/DMPS/Chol	40:10:10:40
DMPC/AC/Chol	50:10:40
DMPC/HisChol/DPPS/Chol	35:10:15:40
DMPC/IsohistsuccDG/Chol	50:10:40
DMPC/MoChol/DG-Succ/Chol	35:10:15:40
DMPC/MoChol/DG-Succ/Chol	40:10:10:40
POPC/MoChol/DG-Succ/Chol	35:10:15:40
DMPC/HistChol/Chol	50:10:40
POPC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40
DMPC/HistSuccDG/Chol/	50:10:40
DMPC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40
POPC/MoChol/DPPS/Chol	40:10:10:40
DPPC/DOTAP/DG-Succ/Chol	20:10:30:40
DPPC/HistChol/Chol	50:10:40
DPPC/HistSuccDG/Chol	40:20:40
DPPC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40
POPC/HcChol/Chol	50:15:35
DPPC/HcChol/Chol	50:15:35
POPC/AC/Chol	50:15:35
DPPC/AC/Chol	50:15:35
DPPC/HistChol/Chol	50:15:35
POPC/HistChol/Chol	50:15:35
POPC/HistSuccDG/Chol	50:15:35
DPPC/IsoHistSuccDG/Chol	50:15:35
POPC/IsoHistSuccDG/Chol	50:15:35
DPPC/HistSuccDG/Chol	50:15:35
POPC/MoChol/Chems/Chol	40:10:10:40
POPC/DOTAP/Chems/Chol	30:10:20:40
DMPC/HisChol/DG-Succ/Chol	40:10:10:40
POPC/HisChol/Chems/Chol	40:10:10:40
DMPC/MoChol/Chems/Chol	40:10:10:40
POPC/MoChol/DG-Succ/Chol	30:20:10:40

Anschließend wird die Erfindung anhand von Beispielen weiter erläutert, ohne auf diese Beispiele begrenzt zu sein.

Abkürzungen:

DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DSPC	Distearoylphosphatidylcholin
POPC	Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholin
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
DOPG	Dioleoylphosphatidylglycerol
POPG	Palmitoyl-oleoylphosphatidylglycerol
DMPG	Dimyristoylphosphatidylglycerol
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerol
DMPS	Dimyristoylphosphatidylserin
DPPS	Dipalmitoylphosphatidylserin
DOPS	Dioleoylphosphatidylserin
POPS	Palmitoyl-oleoylphosphatidylserin
DMPA	Dimyristoylphosphatidic acid
DPPA	Dipalmitoylphosphatidic acid
DOPA	Dioleoylphosphatidic acid
POPA	Palmitoyl-oleoylphosphatidic acid
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
Chems	Cholesterolhemisuccinat
DC-Chol	3- β -[N-(N',N'-dimethylethane) carbamoyl]cholesterol
CetylP	Cetylphosphat
DODAP	(1,2)-dioleoyloxypropyl)-N,N-dimethylammonium chloride
DOEPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholin

DAC-Chol	3-β-[N-(N,N'-dimethylethane) carbamoyl]cholesterol
TC-Chol	3-β-[N-(N',N', N'-trimethylaminoethane) carbamoyl] cholesterol
DOTMA	(1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammoniumchlorid) (Lipofectin®)
DOGS	((C18) ₂ GlySper3 ⁺) N,N-dioctadecylamido-glycyl-spermin (Transfectam®)
CTAB	Cetyl-trimethylammoniumbromid,
CPyC	Cetyl-pyridiniumchlorid

DOTAP	(1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium Salz
DMTAP	(1,2-dimyristoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium Salz
DPTAP	(1,2-dipalmitoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium Salz
DOTMA	(1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium chlorid)
DORIE	(1,2-dioleoyloxypropyl)-3 dimethylhydroxyethyl ammoniumbromid)
DDAB	Dimethyldioctadecylammonium bromid
DPIM	Dipalmitoyl-oxypropyl-methylimidazol
CHIM	Histaminyl-Cholesterolcarbamate
MoChol	4-(2-Aminoethyl)-Morpholino-Cholesterolhemisuccinat
HisChol	Histaminyl-Cholesterolhemisuccinat
HCChol	Nα-Histidiny-Cholesterolcarbamate
HistChol	Nα-Histidiny-Cholesterol-hemisuccinat.
AC	Acylcarnosin, Stearyl- & Palmitoylcarnosin
HistSuccDG	1,2—Dipalmitoylglycerol-hemisuccinat-Nα-Histidiny-hemisuccinat, & Distearoyl-, Dimyristoyl, Dioleoyl or palmitoyl-oleoylderivatives
IsoHistSuccDG	1,2—Dipalmitoylglycerol-Oα-Histidiny-Nα-hemisuccinat, & Distearoyl-, Dimyristoyl, Dioleoyl or palmitoyl-oleoylderivatives
DGSucc	1,2—Dipalmitoylglycerol-3-hemisuccinat & Distearoyl-, dimyristoyl- Dioleoyl or palmitoyl-oleoylderivatives

Abbildungen

Abbildung 1: Chemische Formeln von Lipiden

Abbildung 2: Belegung einer 96-well Mikrotiterplatte für den Serumsstabilitätstest, gemessen wird die Freisetzung des Fluoreszenzmarkers CF

Abbildung 3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme neben einer Phasenkontrastaufnahme zur Zelllokalisierung.

Beispiel 1

Herstellung von amphoteren Liposomen

Ein Gemisch aus den in Tabelle 1 benannten Lipiden wird in den angegebenen molaren Verhältnissen in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet.

Der Lipidfilm wird mit 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 versetzt, dass eine 100 mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Rotieren hydratisiert und für weitere 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wird die Lösung eingefroren.

Nach dem Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 400 nm extrudiert.

CF - (Carboxyfluorescein) - gefüllte Liposomen

Die Herstellung erfolgt analog dem Voranstehenden, nur wird zur Hydratation des Lipidfilms eine Lösung des Farbstoffes verwendet, nach: 500 mg CF werden in 130 µl 5 M NaCl, 12,5 ml 10 mM Hepes pH 7,5 und 630 µl 5 N NaOH gelöst. Der pH-Wert wird kontrolliert und gegebenenfalls nachgestellt (auf pH 7,5).

Die Abtrennung des nicht eingeschlossenen CF erfolgt über Gelfiltration.

Beispiel 2:

Einschluss von Cy5.5 anti CD40 ODN (fluoreszenzmarkiertes Antisense-Oligonukleotid) in amphotere Liposomen

Eine Lipidmischung folgender Zusammensetzung DMPC/MoChol/DG-Succ/Chol 40:10:10:40 (mol%) wird bei 50°C in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet.

Der Lipidfilm wird mit soviel Cy5.5-anti-CD40-ODN (Antisense-Oligonukleotid) (150 µg/ml in 10 mM NaAcetat, 300 mM Sucrose, pH 4,5) versetzt, dass eine 15 mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Schwenken hydratisiert und für weitere 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wird die Suspension eingefroren. Es folgen 3

Einfrier- und Auftauprozesse, wobei nach dem Auftauen jeweils eine 5-minütige Behandlung im Ultraschallbad erfolgt.

Nach dem letzten Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 200 nm oder 400 nm extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite von 200 oder 400nm). Nach der Extrusion wird durch Zugabe einer 1mol/L HEPES-Stammlösung ein pH von 7,5 eingestellt.

Der Anteil des eingeschlossenen Cy5.5-anti-CD40-ODN (Antisense-Oligonukleotid) wird nach Abtrennung des frei vorliegenden Wirkstoffes durch dreimalige Sedimentation in der Ultrazentrifuge bei 60000 x g über 45 min fluoreszenzspektroskopisch ermittelt.

Die Einschlusseffizienz des Oligonukleotids wird durch Bestimmung des Lipidgehaltes und der fluorimetrischen Cy5.5-Bestimmung im Verhältnis zu zum Materialeinsatz von Lipid und ODN gesehen und beträgt für die Formulierung 53%.

Beispiel 3

Bestimmung der Serumstabilität

Als Modellwirkstoff wird Carboxyfluorescein (CF) eingesetzt, der wie Oligonukleotide bei physiologischem pH negativ geladen ist. Die Serumstabilität der CF-gefüllten Liposomen wird über den Zeitraum von insgesamt 24 h bei 37°C beobachtet. Es wird dabei die Freisetzung des CF aus den Liposomen über die Zeit per Fluoreszenzmessung beobachtet. Es können 3 verschiedene Liposomenformulierungen pro 96-well-Platte getestet werden. Zur Bestimmung der prozentual freigesetzten Menge an CF wird die in Puffer inkubierte Probe sowohl direkt vermessen (Basiswert) als auch nach Öffnung der Liposomen durch Zugabe von Triton (Tritonwert oder 100%-Wert).

In einem Gesamtvolumen von 500 µl werden sterilfiltriertes Serum und 1 mM Liposomen zusammengegeben. Derselbe Ansatz wird als Kontrolle mit Puffer anstelle des Serums vorbereitet.

Eine 96-well-Platte wird folgendermaßen vor den jeweiligen Probennahmen vorbereitet: in die Wells einer Zeile, Spalten 1, 3, 5, 7, 9 und 11 werden jeweils 5 µl Puffer (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,5) vorgelegt. In die Spalten 2, 4, 6, 8, 10 und 12 jeweils 5 µl 10 % Triton X-100.

Die 96-well-Platte wird wie in Figur 2 dargestellt belegt. In die Spalten 1-6 werden je 5 µl der in Puffer inkubierten Liposomen gegeben, in die Spalten 7-12 die in Serum

inkubierten. Zu den 5 µl Probe plus 5 µl Puffer bzw. Triton werden 290 µl Puffer gegeben. Es wird jeweils wieder ein Basis- und ein Triton-Wert genommen. Auf diese Weise kann man drei Formulierungen über 8 Zeitpunkte pro Platte testen. Die Zeitpunkte sind die folgenden: null, null, 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 5 h, 24 h.

Für die Messungen der Fluoreszenz wird ein Plattenreader mit 485/530 nm Filtern verwendet. Aus den gemessenen Fluoreszenzdaten werden die relativen Freisetzungswerte errechnet, indem der Tritonwert 100% Freisetzung entspricht. Tabelle 1 zeigt eine Reihe von getesteten Formulierungen. Es zeigt sich, dass nur erfindungsgemäße Zusammensetzungen eine hohe Serumstabilität besitzen.

Beispiel 4

Einschluß von FITC-ODN (fluoreszenzmarkierte Antisense-DNA)

Das verwendete Antisense-Oligonukleotid (ODN) ist ein 18-mer Phosphorothioat mit einer FITC-Markierung am 5'-Ende (Fluorescein-isothiocyanat). Liposomen mit FITC-ODN wurden hergestellt: 0,5 ml einer 1 mM Lipidlösung mit 9 µg ODN. Zwei Ansätze mit unterschiedlichem molaren Verhältnis der kationischen Lipid-Ladungen zu anionischen ODN-Ladungen 3:1 und 4,5:1

- Jeweils DPPC/DOTAP/DG-Succ/Chol 20/10/30/40
- Hydratisierungs- bzw. ODN-Lösung: 10 mM NaAc pH 4,5, 300 mM Sucrose
- Zur Abtrennung nicht eingeschlossenen ODNs wurden die Liposomen in einem diskontinuierlichen Sucrosegradienten mit 0, 0,8 und 1,2 M Sucrose in Hep¹⁰, NaCl¹⁵⁰ floriert (10mM Hepes, 150 mM NaCl).

Bestimmung des Einbaus an FITC-ODN aus der Summe der gemessenen FITC-ODN - Fluoreszenzen (100 %) bzw. des Input und daraus abgeleitet dem Verhältnis von freier zu eingebauter Fluoreszenz:

%	Liposomen	Lipo-Reste	Puffer/Sucr.	freie ODN	gesamt
3:1	43,3	14,7	5,4	36,6	100,0
4,5:1	46,3	10,7	4,5	38,5	100,0

Beispiel 5

Einschluß von siRNA (anti GFP) in amphotere Liposomen

Als Ladungsverhältnis von kationischem Lipid zu anionischer siRNA wird 5:1 bis 10:1 gewählt. Die siRNA (in 10 mM Hepes, 10 mM NaCl pH 7,2) wird mit dem Hydratisierungspuffer (10 mM NaAcetat, 10 mM NaCl, 280 mM Sucrose, pH 4,5) vermischt und auf den Lipidfilm gegeben, sodass eine 5-10 mM Lipidsuspension entsteht. Die Lipide werden durch Ultraschallbehandlung von der Kolbenwand gelöst (max. 10 min). Hydratisiert wird für 15 min bei Raumtemperatur (POPC als Trägerlipid) bzw. bei 50 °C (bei DMPC, DPPC als Trägerlipid). Es folgt ein mindestens dreimaliges Einfrieren bei -70 °C (10 min für 1 ml Volumen, 30 min für Volumina bis 15 ml) und wieder Auftauen im Wasserbad (Temperatur wie beim Hydratisieren).

Der Kolben wird aufgetaut und bei größeren Volumina werden 3 ml der Lösung entnommen (in 8 ml Glasröhrchen). Der restliche Ansatz wird wieder bei -70 °C eingefroren. Die Extrusion erfolgt durch 100 nm-Filter. Anschließend wird der pH Wert mit 1/10 Volumen 1 M Hepes auf pH 8,0 eingestellt.

Flotation der Liposomen:

Die Liposomen Fraktionen werden mit dem selben Volumen 2,4 M Sucrose in H₂O versetzt (d.h. es entsteht eine 1,2 M Lösung). Den Gradienten schichtet man mit Puffer (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,5), darunter 0,8 M Sucrose in Puffer und zuunterst die Liposomen in 1,2 M Sucrose in H₂O. Das Volumen des Gradienten beträgt maximal 4,5 ml. Die Flotation erfolgt bei Raumtemperatur für 45 min bei 50.000 rpm in einer Ultrazentrifuge. Die Liposomen, welche sich zwischen der 0,8 M Sucrose- und der Pufferschicht befinden, werden abgenommen.

RNA-Mengenbestimmung mit Ribo Green RNA Quantitation Reagent

Der Assay wird im Endvolumen von 200 µl durchgeführt. Zuerst fertigt man eine Eichreihe der siRNA zwischen 1 ng und 10 ng an (10-100 µl 100 ng/ml siRNA).

Das Ribo Green verdünnt man 1:2000 in TE-Puffer. Zu jedem Ansatz werden 100 µl Ribo Green zugegeben, dann inkubiert man 5 min bei Raumtemperatur und misst die Fluoreszenz bei 485/520 nm. Die Ansätze werden mit je 4 µl 10 % Triton (Endkonzentration 0,2 mM) versetzt. Diese Eichkurve dient später für die Bestimmung der in Liposomen eingeschlossenen Menge an siRNA. Nach ca. 15 min misst man noch einmal die Fluoreszenz. Die Ergebnisse werden graphisch in ein Diagramm eingetragen (je eine Kurve mit und ohne Triton) und Eichgeraden mit den dazu gehörigen Gleichungen aus den Werten generiert.

Die Liposomen verdünnt man in zwei verschiedenen Konzentrationen (z.B. 1:50 und 1:100) und misst 2-3 verschiedene Volumina der Verdünnungen (z.B. 5, 10 und 15 µl der Verdünnungen ad 100 µl TE plus 100 µl Ribo Green Reagenz) ohne und mit Triton.

Die errechnete Konzentration der siRNA einer Formulierung muss bei den verschiedenen Messungen in etwa übereinstimmen. Ist dies nicht der Fall, lag man mit der siRNA-Menge außerhalb der Eichkurven und sollte diese Werte nicht in die Berechnung der Konzentration einfließen lassen. Die Effizienz, mit der die siRNA in verschiedene Formulierungen eingeschlossen werden konnte zeigt die Tabelle 2.

Tabelle 2: Einschluss siRNA antiGFP in amphotere Liposomen

Formulierung	Zusammensetzungen	Effizienz
POPC/MoChol/Chems/Chol	50:10:30:10	8,7%
DMPC/HistDG/Chol	50:10:40	8,7%
DMPC/MoChol/DGSucc/Chol	20:10:30:40	6,1%
DMPC/DOTAP/DGSucc/Chol	20:10:30:40	20,5%
DMPC/HistChol/Chol	50:10:40	56,4%
POPC/MOChol/DPPS/Chol	40:10:10:40	58,4%
POPC/MoChol/DGSucc/Chol	20:10:30:40	8,1%
DMPC/MOChol/DGSucc/Chol	35:10:15:40	21%
POPC/MoChol/DGSucc/Chol	35:10:15:40	16,8%
DMPC/AC/Chol	50:10:40	30,4%
DMPC/HisChol/DPPS/Chol	35:10:15:40	30,1%
DMPC/isoHistSuccDG/Chol	50:10:40	21,1%
DMPC/MoChol/DG-Succ/Chol	40:10:10:40	49%
DMPC/HisChol/DPPS/Chol	35:10:15:40	46%

Test von siRNA-haltigen Liposomen im Serum

Unmodifizierte siRNA wird im Serum sehr schnell abgebaut. Um den schützenden Effekt der Liposomen auf die siRNA zu untersuchen, wird wie im Folgenden dargestellt vorgegangen.

Die Konzentration der eingeschlossenen siRNA wird vor dem Serumtest bestimmt. Für jeden zu testenden Zeitpunkt werden Liposomen mit je 4 µg siRNA pro Zeitpunkt eingesetzt. Getestete Zeitpunkte: Null, 1 h, 2 h und 4 h.

Die Liposomen mit 4 µg siRNA im Innern werden auf 60 µl Volumen verdünnt mit dem Puffer, in welchem sich die Liposomen befinden (üblicherweise 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5). Zu den Ansätzen werden 60 µl Serum zugegeben und bis zu den

entsprechenden Zeitpunkten bei 37 °C inkubiert. Der Nullzeitpunkt wird separat bestimmt.

Eine Phenol/Chloroform-Extraktion wird mit PLG-Eppis (Phase-Lock-Gel-Eppendorfröhrchen) durchgeführt für eine gute Trennung der Serumbestandteile und der Lipide von der siRNA. Die PLG-Eppis werden für 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert und auf Eis gestellt (im folgenden wird bei max. 4 °C gearbeitet). In die PLG-Eppis gibt man 280 µl Puffer (wie oben) und 45 µl 5 M NaCl.

In diese Lösung kommt der Ansatz der Liposomen im Serum (120 µl). Sofort danach erfolgt die Zugabe von 300 µl Phenol/Chloroform-Gemisch. Für den Nullwert gibt man zum Puffer mit NaCl in das PLG-Eppi auch 60 µl Serum. Alles wird sofort gemischt.

Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 13 000 rpm und 4 °C. die wässrige Phase enthält die freie siRNA. Auf den Gradienten werden weitere 300 µl Chloroform gegeben und kurz gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation wie oben ist die wässrige Phase klar und kann möglichst vollständig abgenommen werden. Die siRNA wird nun aus der wässrigen Phase gefällt. Zur siRNA-Lösung gibt man 1/10 Volumen 3 M NaOAc, pH 5,2 und 2,5 Volumenteile Ethanol. Die Lösung wird gut durchmischt und die siRNA 1 h bei -70 °C ausgefällt. Eine weitere Zentrifugation bei 4°C, 13 000 rpm für 10 min folgt. Dabei pelletiert die siRNA. Der Überstand wird vollständig abgenommen und das Pellet wird mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und für ca. 10 min getrocknet. Die siRNA wird in 5 µl Wasser wieder gelöst.

Die Qualität der siRNA wird im denaturierenden und möglicherweise auch im nativen Acrylamidgel überprüft.

Nachweis der Doppelsträngigkeit von siRNA im nativen Acrylamidgel

Die Qualität von siRNA wird über die vollständige Länge der Einzelstränge und die Doppelsträngigkeit definiert. Mittels eines nativen Acrylamidgels kann man die Doppelsträngigkeit einer siRNA überprüfen, da sich doppelsträngige siRNA langsamer im nativen Gel bewegt, als die Einzelstränge.

Das Gel muss mit TBE-Puffer 30 min vorlaufen (80 V, 100 mA), um die erforderliche Temperatur zu bekommen.

Es werden höchstens 2 µg siRNA pro Slot aufzutragen, da sonst das Gel überladen wird. Die Proben werden in einem Gesamtvolumen von 9 µl aufgenommen. Darauf gibt man 1 µl Blue Juice-Ladepuffer. Die Proben werden auf das vorgelaufene Gel aufgetragen und für 1 h bei 100 mA aufgetrennt.

Färben des Gels:

Das Gel wird nach der Elektrophorese aus der Apparatur entnommen. Auf das Gel werden ca. 200 ml Stains All Gebrauchslösung (20 ml Stammlösung, 180 ml Formamid, 200 ml Wasser gegeben. Das Gel wird im Dunklen für 30 –60 min in der Stains All-Lösung gefärbt. Danach wird die Lösung vom Gel genommen und das Gel wird unter Lichtzutritt im Wasser entfärbt (ca. 30 min-2 h je nach Lichtintensität). Die siRNA bleibt gefärbt, wohingegen der Hintergrund wieder völlig entfärbt wird.

Beispiel 6

In vitro Aufnahme von amphoteren Liposomen mit Cy3-BCL2-Antisense in HepG2 Zellen

HepG2 Zellen werden 2 Tage vor der Transfektion in 96-Wellplatten ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine Zelldichte von 60 – 80% zeigen ($0,02-0,2 \times 10^5$ in 100 μ l, i.d.R. 1×10^4). Es werden 2 Platten (Zentrifugation u. Kontrollinkubation) vorbereitet, die ansonsten identisch behandelt werden.

Transfektion:

Vortemperierung der Zentrifuge (Biofuge Stratos, Heraeus), Rotor # 3048 für Mikrotiterplatten. Cy3-Bcl2-Antisense-haltige Liposomen werden auf eine einheitliche Konzentration mit 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 (HBS) eingestellt (Cy-3 ist ein rot fluoreszierender Marker).

Herstellung der Liposomenverdünnungen (mit und ohne Cargo) sowie Transfektionsmix von kommerziellen Kontrolltransfektionsreagenzien (z.B. Lipofectamine 2000, Oligofecatmine, siPort Amine, siPort Lipid) auf 96-Well Platte mit serumfreiem Medium (ca. 160 ng Antisense/well). Die Liposomenverdünnung wird in einem Volumen von 25 - 50 μ l zu den Zellen gegeben werden.

Die Zellen werden mit serumfreien Medium gewaschen (1x) und mit serumhaltigen oder serumfreien Medium versetzt, z.B. je Well 75 μ l, wenn die Liposomenverdünnungen so hergestellt wurden, dass die entsprechende Menge antisense/Well in 25 μ l enthalten ist.

Eine Multiwellplatte wird bei 1,500 rpm (342 g), 1h, 37°C zentrifugiert, die Kontrollplatte 1 h inkubiert (37°C, 5% CO₂). Anschließend werden beide Platten 3 h inkubiert (37°C, 5% CO₂).

Medium aller Wells komplett entfernen, 1 x mit PBS waschen, 2 x mit serumhaltigen Medium; Zusatz von serumhaltigen Medium zu allen Wells, mikroskopische Kontrolle auf Vitalität, anschließend beide Platten über Nacht inkubieren (37°C, 5% CO₂).

Am Tag nach der Transfektion wird die Aufnahme von Liposomen in die Zellen floureszenzmikroskopisch untersucht. In Abbildung 3 wird Fluoreszenz-aufnahme neben einer Phasenkontrastaufnahme zur Zelllokalisierung gezeigt.

Beispiel 7

Bestimmung der Serumstabilität von amphoteren Liposomen ohne und mit Cholesterol und/oder Matrixlipid

Einschluß von FITC-Dextran in amphotere Liposomen

Folgende Formulierungen wurden mit 15 mg/ml FITC-Dextran hergestellt (in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 3.9 (HAc) wie bei Hafez IM, Ansell S, Cullis PR: Tunable pH-sensitive liposomes composed of mixtures of cationic and anionic lipids. Biophys J. 2000 Sep;79(3):1438-46.).

- E1 DC-Chol / DOPA (66/34)
- E2 DC-Chol / DOPA / Chol (40/20/40)
- E3 DMPC / DC-Chol / DOPA (60/27/13)
- E4 DMPC / DC-Chol / DOPA / Chol (20/27/13/40)
- E5 DMPC / DC-Chol / DOPA / Chol (30/20/10/40)
- E6 DMPC / DC-Chol / DOPA / Chol (40/13/7/40)

Die Liposomen wurden nach der Extrusion flotiert, um das outside FITC-Dextran abzutrennen. Am Zetasizer wurden bei pH 3,9 (10 mM Hepes 150 NaCl HAc) bzw. pH 9.0 (10 mM Tris 150 mM NaCl) folgende Daten gemessen:

Probe	KCps	ZETA	Z ave[nm]	PI
E1(pH=3,9)	1352	27.0 ± 3.4	215.9	0.109
E1(pH=9,0)	1276	-40,2 ± 0	185,2	0,126
E2 (pH=3,9)	2664	28.0 ± 1.0	266.5	0.162
E2 (pH=9,0)	2564	-38,0 ± 2,9	235,5	0,177
E3 (pH=3,9)	1061	24.0 ± 1.6	184.8	0.128

E3 (pH=9,0)	1135	$-11,5 \pm 1,2$	161,6	0,109
E4 (pH=3,9)	1338	$21,3 \pm 3,3$	202,6	0,081
E4 (pH=9,0)	1186	$-24,2 \pm 0,6$	166,6	0,122
E5 (pH=3,9)	1033	$21,9 \pm 3,8$	186,8	0,102
E5 (pH=9,0)	1130	$-14,6 \pm 1,9$	158,1	0,089
E6 (pH=3,9)	1228	$11,2 \pm 3,3$	175,1	0,141
E6 (pH=9,0)	1086	$-10,4 \pm 3,3$	147,3	0,093

Test der FITC-Dextran haltigen Liposomen im Serum

Zum Test der Stabilität dieser Formulierungen in Humanserum wurden ~ 1 mM Liposomen 3 Stunden bei 37°C in Humanserum inkubiert und danach floriert. Sowohl in der nicht florierten Probe als auch in der unteren Schicht (Serum-Schicht) der florierten Probe wurde die Fluoreszenz bestimmt und daraus das cargo release berechnet. Der Anteil outside FITC-Dextran zu Testbeginn wurde durch entsprechende Verdünnung in Puffer pH 3.9 und anschließende Flotation auf die gleiche Weise bestimmt.

	% outside bei Testbeginn	% release nach Serum- Inkubation
E1	$13,2 \pm 1,2$	$37,0 \pm 5,4$
E2	$25,2 \pm 1,1$	$52,2 \pm 4,2$
E3	8,6	$40,4 \pm 1,6$
E4	12,0	$18,1 \pm 0,3$
E5	12,0	$21,2 \pm 1,6$
E6	7,6	$20,0 \pm 0,6$

Alle Formulierungen, die sowohl 40% Cholesterol als auch Matrix-Lipid enthalten (E4, E5, E6) sind stabiler als die Formulierungen, die nur Cholesterol (E2) oder nur Matrix-Lipid (E3) oder keines von beiden (E1) enthalten.

Patentansprüche

1. Serumstabile amphotere liposomale Formulierungen mit mindestens einem Wirkstoff im wässrigen Innenraum, dadurch gekennzeichnet, dass
5 die Liposomen
 - neutrale Lipide mit einem Membrananteil von 10 - 60 mol% umfassen,
 - Cholesterol mit einem Anteil von 30 – 50 mol%,
als ladungstragende Lipide entweder
 - amphotere Lipide mit einem Anteil von 5 – 30mol%,
10 oder
 - Mischungen von kationischen und anionischen Lipiden mit einem Gesamtanteil von höchstens 50 mol%, umfassenund der Wirkstoff mindestens ein Oligonukleotid umfasst.
- 15 2. Liposomale Formulierung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Cholesterol einen Anteil von 35 – 45 mol%, die amphoteren Lipide einen Anteil von 5 – 20 mol% und/oder die Mischungen einen Anteil von 15 – 45 mol% aufweisen.
- 20 3. Liposomalen Formulierung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide aus 5-100, bevorzugt aus 5-40 und besonders bevorzugt aus 10-25 Desoxyribonukleotiden, Ribonukleotiden oder deren chemisch-modifizierten Derivaten aufgebaut sind.
- 25 4. Liposomalen Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide als Einzelstrang, als Doppelstrang oder in komplexer Faltung vorliegen.
- 30 5. Liposomale Formulierung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Einzelstränge als Antisense-Oligonukleotide, die Doppelstränge als small-interfering RNA und/oder Decoy-Oligonukleotide und/oder die komplexen Faltungen als Aptamere und/oder Spiegelmere vorliegen.
- 35 6. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Oligonukleotid ein Aptameres ist.
7. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, dass

das Oligonukleotid ein Spiegelmeres ist.

- 5 8. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/MoChol/DMPs/Chol 40:10:10:40 hat.
- 10 9. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/AC/Chol 50:10:40 hat.
- 10 10. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/HisChol/DPPS/Chol 35:10:15:40 hat.
- 15 11. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/Isohist succDG/Chol 50:10:40 hat.
- 20 12. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/MOChol/DGSucc/Chol 35:10:15:40 hat.
- 25 13. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/MoChol/DGSucc/Chol 40:10:10:40 hat.
- 30 14. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/MoChol/DGSucc/Chol 35:10:15:40 hat.
- 30 15. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/HistSuccDG/Chol 50:10:40 hat.
- 35 16. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/MoChol/DPPS/Chol 40:10:10:40 hat.

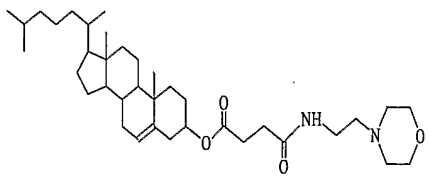
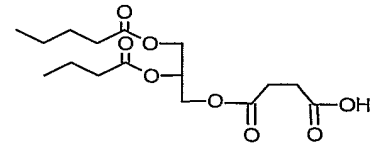
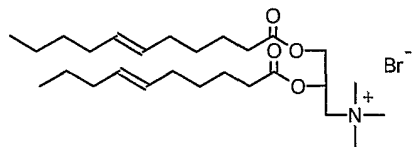
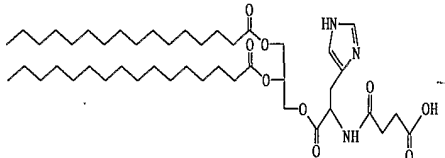
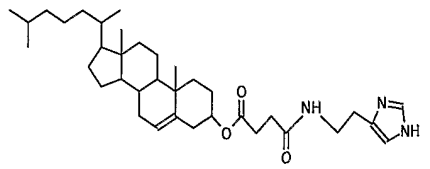
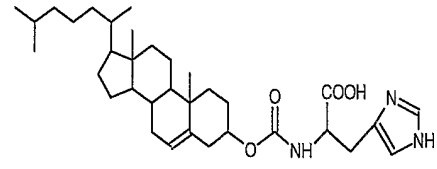
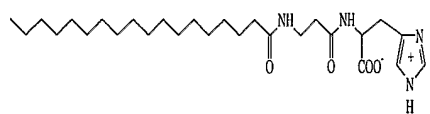
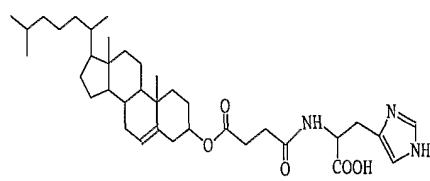
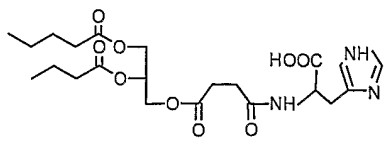
17. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/DOTAP/DG-Succ/Chol 20:10:30:40 hat.
- 5 18. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/HistChol/Chol 50:10:40 hat.
- 10 19. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/HistSuccDG/Chol 40:20:40 hat.
- 15 20. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/MoChol/DG-Succ/Chol 20:10:30:40 hat.
- 20 21. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/HcChol/Chol 50:15:35 hat.
22. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/HcChol/Chol 50:15:35 hat.
- 25 23. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/HistPS/Chol 50:15:35 hat.
- 30 24. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/HistPS/Chol 50:15:35 hat.
- 35 25. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/AC/Chol 50:15:35 hat.
26. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/AC/Chol 50:15:35 hat.

27. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/HistChol/Chol 50:15:35 hat.
- 5
28. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/HistChol/Chol 50:15:35 hat.
- 10
29. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/MoChol/DG-Succ/Chol 20:10:30:40 hat.
- 15
30. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/HistSuccDG/Chol 50:15:35 hat.
- 20
31. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/IsoHistSuccDG/Chol 50:15:35 hat.
- 25
32. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/HistSuccDG/Chol 50:15:35 hat.
- 30
33. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/IsoHistSuccDG/Chol 50:15:35 hat.
- 35
34. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/MoChol/DG-Succ/Chol 20:10:30:40 hat.
- 35
35. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/MoChol/Chems/Chol 40:10:10:40 hat.

36. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/HistChol/Chol 50:10:40 hat.
- 5 37. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/DOTAP/Chems/Chol 30:10:20:40 hat.
- 0 38. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/HisChol/DGSucc/Chol 40:10:10:40 hat.
- 5 39. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/HisChol/Chems/Chol 40:10:10:40 hat.
- 0 40. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/MoChol/Chems/Chol 40:10:10:40 hat.
- 0 41. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/MoChol/DGSucc/Chol 30:20:10:40 hat.
- 5 42. Verwendung einer liposomalen Formulierung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels zur therapeutischen Behandlung eines Säugetieres.
- 0 43. Verwendung einer liposomalen Formulierung nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass das Säugetier ein Mensch ist.
44. Verwendung einer liposomalen Formulierung nach Anspruch 42 oder 43 zur parenteralen Applikation, bevorzugt zur intravenösen Applikation.
- 5 45. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 41, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen oder mehrere Wirkstoffe enthält.

Figur 1

Abkürzungen und chemische Formeln verwendeter Lipide

MoChol 	DG-Succ 
DOTAP 	IsohistsuccDG 
HisChol 	HCChol 
AC 	
Hist-Chol 	
HistSuccDG 	

Figur 2

Pipetierschema für den Serumtest

			A und B (t = null)	C bis G (Analog den anderen Zellen)	H (t = 24 h)
1	Puffer	Basis	Formulierung 1		
2		Triton			
3		Basis	Formulierung 2		
4		Triton			
5		Basis	Formulierung 3		
6		Triton			
7	Serum	Basis	Formulierung 1		
8		Triton			
9		Basis	Formulierung 2		
10		Triton			
11		Basis	Formulierung 3		
12		Triton			

Figur 3

3/3

