



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 20 465 T2 2004.09.16

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 017 365 B1

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: A61K 9/127

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 20 465.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US98/12937

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 930 447.2

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 98/058630

(86) PCT-Anmeldetag: 22.06.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 30.12.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 12.07.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 10.12.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 16.09.2004

(30) Unionspriorität:

50490 P 23.06.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Alza Corp., Mountain View, Calif., US

(72) Erfinder:

ALLEN, M., Theresa, Edmonton, CA; STUART, Darrin, Charleston, US

(74) Vertreter:

Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European Patent Attorneys, 81671 München

(54) Bezeichnung: LIPOSOMEN-UMSCHLOSSENE POLYNUKLEOTIDZUSAMMENSETZUNG SOWIE VERFAHREN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

### Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Lipsomenzusammensetzung, die ein darin eingeschlossenes Polynukleotid aufweist, und ein Verfahren zur Herstellung der Lipsomenzusammensetzung.

### Hintergrund der Erfindung

[0002] In den letzten Jahren wurden Polynukleotide aufgrund ihrer Fähigkeit zur Änderung der Expression spezifischer Gene, als mögliche therapeutische Mittel untersucht. Derzeit wird die Gentherapie zum Hinzufügen einer Genfunktion, die verschwunden ist oder fehlt, und zum Verhindern der Expression eines Gens untersucht. Insbesondere wird die Gentherapie mit Antisense-Oligonukleotiden weitreichend untersucht. Oligonukleotide setzen sich aus einem Strang von Nukleotidresten zusammen, der zur mRNA eines Zielgens zur Hybridisierung durch Watson-Crick-Basenpaarung komplementär sind. Auf diese Weise wird eine Hemmung der Translation häufig durch Mechanismen, wie zum Beispiel Aktivierung von RNase H oder durch Verhinderung der Anordnung oder des Fortschreitens des Translationsmechanismus erreicht (Branch, A. D., Hepatology 24(6): 1517–1529 (1996)).

[0003] Ein Problem bei der Verwendung von Polynukleotiden, DNA, RNA und Oligonukleotiden als therapeutische Mittel ist eine relativ geringe Fähigkeit zur Durchdringung der Zellmembran, um ihren Wirkungsort im Zytoplasma zu erreichen. Polynukleotide tragen eine negative Ladung und durchqueren daher nicht leicht die Zellmembran in freier Form.

[0004] Ein weiteres Problem besteht darin, dass Polynukleotide mit einer Vielzahl extrazellulärer Moleküle wechselwirken können, die die biologische Verfügbarkeit der Polynukleotide verändern können. Weiterhin sind Polynukleotide empfindlich gegenüber Zersetzung in biologischen Flüssigkeiten und zeigen eine Pharmakokinetik, die für manche therapeutischen Anwendungen unvorteilhaft sein kann.

[0005] Eine Methode zur Überwindung dieser Probleme ist die Verabreichung des Polynukleotids in Gegenwart eines Lipid-Vesikels, wie zum Beispiel einem Liposom, und es wurden verschiedene auf Lipsomen basierende Zusammensetzungen vorgeschlagen (Zelphati, O., und Szoka, F. C., J. Control. Res. 41: 99–119 (1996)). Eine vorgeschlagene Zusammensetzung besteht beispielsweise aus einem Polynukleotid, das mit vorgebildeten kationischen Liposomen gemischt ist. Solche Liposomen werden im allgemeinen aus einem kationischen Lipid hergestellt, das mit einer näherungsweise äquimolaren Konzentration eines Membrandestabilisierenden Lipids und/oder einem neutralen Lipid, wie zum Beispiel Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) gemischt ist. Das Polynukleotid wird mit den vorgebildeten kationischen Liposomen unter Bildung von Polynukleotid-Liposom-Komplexen durch Wechselwirkungen zwischen elektrostatischen Ladungen gemischt. Solche Komplexe weisen eine gewisse *in vitro* Fähigkeit zum Vermitteln der zellulären Aufnahme von Polynukleotiden auf, jedoch macht die relativ große Größe (200–2000 nm) und schlechte Stabilität sie für *in vivo* Anwendungen, insbesondere zur Abgabe an andere Organe als Leber und Lungen, ungeeignet (Bennet, C. F., et. al., J. Control. Rel. 41: 121–130 (1996); Litzinger, D. C., et al., Biochim. Biophys. Acta 1281: 139–149 (1996)).

[0006] Eine weitere vorgeschlagene Polynukleotid-Liposomzusammensetzung umfaßt ein Polynukleotid, das in dem wässrigen Inneren neutraler Lipsome, die von neutralen Vesikel-bildenden Lipiden gebildet werden, eingeschlossen ist. Diese Lipsomen werden typischerweise entweder durch Hydratisieren eines getrockneten Lipidfilms mit einer hochkonzentrierten Lösung des Polynukleotids (Juliano, R. L., und Akhtar, S., Antisense Res. Dev. 2: 165–176 (1992)) oder durch das umgekehrte Verdampfungsverfahren (REV) (Ropert, C., et al., Pharm. Res. 10(10): 1427–1433 (1993); Szoka, F. C., und Papahadjopoulos, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75(9): 4194–4198 (1978)) hergestellt. Ein Problem mit den durch diese Verfahren hergestellten Polynukleotid-Liposomzusammensetzungen ist eine geringe Leistungsfähigkeit zum Einschließen des Polynukleotids, insbesondere für kleine unilamellare Vesikel (< 100 nm), bei denen Leistungsfähigkeiten zum Einschließen in der Größenordnung von 2–4% berichtet worden sind (Zelphati, O., et al., Antiviral Res. 25: 13–25 (1994)). Da Polynukleotide teuer sind, sind solche Leistungsfähigkeiten zum Einschließen nicht akzeptabel. Das Problem liegt darin, daß die Rückgewinnung von nicht eingeschlossenem Polynukleotid kostspielig und/oder zeitraubend sein kann.

[0007] Die WO 96/40964 offenbart partikuläre Lipid-Nukleinsäure-Komplexe, die entweder unter Verwendung von Detergens-Dialyseverfahren oder Verfahren, die organische Lösungsmittel verwenden, gebildet wurden. Jedoch ergeben die in der WO 96/40964 offenbarten Verfahren eine gemischte Population von Lipidteilchen, da eine geringe Kontrolle der Anordnung der Lipidkomponenten in jedem Lipidteilchen vorhanden ist.

## Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Dementsprechend ist es ein Ziel der Erfindung, eine Zusammensetzung zur in vivo-Verabreichung eines Polynukleotids zur Verfügung zu stellen, wobei das Polynukleotid in dem zentralen Kern eines Liposoms eingeschlossen ist.

[0009] Ein weiteres Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung einer solchen Zusammensetzung zur Verfügung zu stellen, das eine hohe Leistungsfähigkeit zum Einschließen des Polynukleotids in das Liposom erreicht.

[0010] Ein weiteres Ziel der Erfindung ist es, eine Liposomenzusammensetzung zur Verfügung zu stellen, die in vivo stabil ist, wie durch Abwesenheit einer Aggregation der Liposomen bei der in vivo-Prüfung bewiesen wird.

[0011] Ein weiteres Ziel der Erfindung ist es, eine Liposomzusammensetzung zur Verfügung zu stellen, die eine lange Lebenszeit im Blutkreislauf und ein eingeschlossenes Polynukleotid aufweist.

[0012] In einem Aspekt umfaßt die Erfindung eine Liposomzusammensetzung, die zur in vivo-Verabreichung eines Polynukleotids geeignet ist. Die Zusammensetzung umfaßt eine wässrige Suspension von Liposomen, die hauptsächlich aus Liposomen mit einer Zweischichten-Lipidmembran aufgebaut sind, umfassend kationische Vesikelbildende Lipide, die hauptsächlich in dem inneren Zweischichtenbereich angeordnet sind und das Polynukleotid umgeben, und neutrale Vesikel-bildende Lipide, die hauptsächlich in dem äußeren Zweischichtenbereich angeordnet sind und eine Beschichtung um die kationischen Polynukleotid-Teilchen bilden. Die Liposomen weisen einen zentralen Kern mit einer inneren Oberfläche auf und das Polynukleotid ist in dem Kern eingeschlossen und hauptsächlich auf der inneren Oberfläche lokalisiert.

[0013] In einer Ausführungsform ist das Polynukleotid eine DNA, RNA oder ein Fragment oder ein Analogon davon.

[0014] In einer weiteren Ausführungsform ist das Polynukleotid ein Antisense-Oligonukleotid.

[0015] Das kationische Lipid ist zum Beispiel 1,2-Dioleyloxy-3-(trimethylamino)propan (DOTAP), N-[1-(2,3-Ditetradecyloxy)propyl]-N,N-dimethyl-N-hydroxyethylammoniumbromid (DMRIE), N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N-dimethyl-N-hydroxyethylammoniumbromid (DORIE), N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA), 3 $\beta$ [N-(N',N'-Dimethylaminoethan)carbamoyl]cholesterin (DC-Chol) oder Dimethyldioctadecylammonium (DDAB).

[0016] Das neutrale Vesikel-bildende Lipid ist in einer Ausführungsform ein Phospholipid. In einer anderen Ausführungsform ist das neutrale Lipid mit einem hydrophilen Polymer, wie zum Beispiel Polyethylenglykol derivatisiert.

[0017] Die Liposomen weisen typischerweise Größen von weniger als 300 nm, vorzugsweise zwischen ungefähr 50–300 nm auf.

[0018] In einer weiteren Ausführungsform schließen die Liposomen weiter einen Liganden ein, der die Liposomen auf eine ausgewählte Stelle im Körper, wie zum Beispiel eine spezielle Geweberegion oder Zelle richtet.

[0019] In einem weiteren Aspekt umfaßt die Erfindung ein Verfahren zum Einschließen eines Polynukleotids in Liposomen. Das Verfahren umfaßt das Bilden von Polynukleotid-kationischen Lipidteilchen in einem Lipidlösungsmittel, geeignet zum Lösen des kationischen Lipids, durch (i) Lösen des Polynukleotids in einem nicht-ionischen Lösungsmittel, das mit dem Lipidlösungsmittel nicht mischbar ist, (ii) durch Inkontaktbringen des Polynukleotids mit einer Ladung neutralisierenden Menge an kationischem Lipid, gelöst in dem Lipidlösungsmittel, in Gegenwart eines dritten Lösungsmittels, das wirksam ist, ein Einphasenlösungsmitternsystem zu bilden, (iii) durch Zugeben von zusätzlichem nicht-ionischen Lösungsmittel oder Lipidlösungsmittel zu dem Einphasensystem unter Bedingungen, die wirksam sind, ein Zweiphasensystem zu bilden und (vi) durch Entfernen der nicht-ionischen Lösungsmittelphase. Neutrale Vesikel-bildende Lipide und ein nicht-ionisches wässriges Lösungsmittel werden zu dem die Teilchen enthaltenden Lipidlösungsmittel unter Bildung einer Emulsion gegeben und das Lipidlösungsmittel wird unter Bildung von Liposomen, mit dem darin eingeschlossenen Polynukleotid verdampft.

[0020] In einer Ausführungsform werden die Polynukleotid-kationischen Teilchen durch Lösen des Polynukleotids in einem nicht-ionischen Lösungsmittel, das mit den Lipidlösungsmittel nicht mischbar ist, gebildet. Das gelöste Polynukleotid wird mit einer Ladung neutralisierenden Menge an kationischem Lipid, gelöst in dem Lipidlösungsmittel, in Gegenwart eines dritten Lösungsmittel, das wirksam ist, ein Einphasenlösungsmitternsystem zu bilden, zum Beispiel eine Monophase, in Kontakt gebracht. Zu dem Einphasensystem wird zusätzliches nicht-ionisches Lösungsmittel oder Lipidlösungsmittel unter Bedingungen zugegeben, die wirksam sind, ein Zweiphasensystem zu bilden und die nicht-ionische Lösungsmittelphase wird entfernt.

[0021] In einer Ausführungsform wird das Polynukleotid in Wasser gelöst und mit kationischen Lipiden, gelöst in Chloroform, in Gegenwart von Methanol in Kontakt gebracht.

[0022] In einer Ausführungsform umfaßt das Verdampfen des Lipidlösungsmittels das Hydratisieren mit einem wässrigen Medium.

[0023] In einem weiteren Aspekt umfaßt die Erfindung die Verwendung einer Suspension von Liposomen, wie

vorstehend beschrieben, zur Herstellung eines Medikaments.

[0024] Diese und andere Ziele und Merkmale der Erfindung werden mit dem Lesen der folgenden genauen Beschreibung der Erfindung in Verbindung mit den begleitenden Zeichnungen klarer.

#### Kurze Beschreibung der Figuren

[0025] **Fig. 1** ist eine schematische Abbildung, die die Bildung von erfindungsgemäßen Liposomen durch ein Extraktions- und Verdampfungsverfahren zeigt,

[0026] **Fig. 2** ist eine graphische Darstellung, die die zurückgewonnene Oligonukleotidmenge in µg nach Extraktion in eine organische Phase zeigt, die varierende Mengen des kationischen Lipids Dioleoyltrimethylammoniumpropan (DOTAP) enthält, wobei die plus-Symbole/durchgezogene Linie die Oligonukleotidmenge in der wässrigen Phase anzeigt und die nicht gefüllten Dreiecke/gestrichelte Linie die Oligonukleotidmenge in der organischen Phase zeigt,

[0027] **Fig. 3** ist ein Dichtegradientenprofil für kationisch markiertes Lipid (durchgezogene Linie) und Polynukleotid (gestrichelte Linie), gezeigt als Prozentsatz der Gesamtzählungen gegen die Fraktionsnummer,

[0028] Die 4A-4B sind Fraktionierungsprofile nach Trennung einer erfindungsgemäßen Liposom-Zusammensetzung mit einem eingeschlossenen Polynukleotid (**Fig. 4A**) und einer Vergleichs-Liposom-Zusammensetzung, die aus neutralen Vesikelbildenden Lipiden gebildet wurde (**Fig. 4B**), auf einer Sepharosesäule,

[0029] **Fig. 5** ist eine graphische Darstellung, die den Prozentsatz der injizierten Dosis im Blut als Funktion der Zeit nach intravenöser Injektion von freiem Oligonukleotid (nicht gefüllte Kreise), Oligonukleotid, eingeschlossen in neutrale Liposomen (gefüllte Dreiecke) und in erfindungsgemäß hergestellte kationische Liposomen (plus-Symbole), in Mäuse zeigt,

[0030] Die **Fig. 6A-6C** sind graphische Darstellungen, die die biologische Verteilung eines Oligonukleotids nach intravenöser Verabreichung an Mäuse in der freien Form (**Fig. 6A**), eingeschlossen in neutrale Liposomen (**Fig. 6B**) und eingeschlossen in erfindungsgemäße Liposomen (**Fig. 6C**) zeigt, und

[0031] **Fig. 7** ist eine graphische Darstellung, die die Aufnahme durch das retikuloendotheliale System von verschiedenen Mengen an Oligonukleotid, eingeschlossen in erfindungsgemäße Liposomen, nach intravenöser Verabreichung an Mäuse zeigt.

#### Genaue Beschreibung der Erfindung

[0032] Die Liposom-Zusammensetzung der Erfindung setzt sich aus Liposomen, typischerweise in Suspensionsform zusammen, die ein in dem zentralen Kern eingeschlossenes Polynukleotid aufweisen. Wie nachstehend beschrieben wird und aus dem Herstellungsverfahren offensichtlich wird, weisen die Liposomen eine Lipid-Doppelschicht auf, die sich aus einem kationischen Vesikel-bildenden Lipid und einem neutralen Vesikel-bildenden Lipid zusammensetzt. Das eingeschlossene Polynukleotid wird mit dem kationischen Vesikel-bildenden Lipid verbunden und ist hauptsächlich auf der inneren Oberfläche der zentralen Kernkammer von jedem Liposom lokalisiert.

[0033] Unter Bezugnahme auf **Fig. 1** wird ein Verfahren zur Herstellung der Liposomen-Zusammensetzung der Erfindung erläutert. In dem Verfahren wird ein Polynukleotidkationisches Lipidteilchen durch Extrahieren des Polynukleotids durch eine Bligh und Dyer Monophase gebildet (Bligh, E. G. und Dyer, W. J., Can. J. Biochem. Physiol. 37(8): 911-917 (1959)). Das Polynukleotid wird in einem ersten Lösungsmittel, typischerweise einem nicht-ionischen Lösungsmittel, mit einer ausgewählten Konzentration gelöst. Beispielhafte erste Lösungsmittel umfassen entionisiertes Wasser und nicht-wässrige hydrophile Lösungsmittel. Das nicht-ionische Lösungsmittel kann einen gelösten Stoff enthalten, der kein Elektrolyt ist, wie zum Beispiel Sucrose, Glucose, Dextran und dergleichen.

[0034] Ein kationisches Lipid der Wahl wird in einem geeigneten zweiten Lösungsmittel gelöst, das hier ebenfalls als ein Lipidlösungsmittel bezeichnet wird und das mit dem ersten Lösungsmittel, in dem das Polynukleotid gelöst ist, nicht mischbar ist. Das Lipidlösungsmittel kann zum Beispiel Chloroform, Tetrachlormethan, Trichlorethylen, Trichlorethan, Benzol, Hexan, Pentan, Toluol und dergleichen sein.

[0035] Das gelöste Polynukleotid und das kationische Lipid werden in Gegenwart eines dritten Lösungsmittels, das wirksam ist, eine Monophase, zum Beispiel ein Einphasenlösungsmittelsystem (Röhrchen #2 in **Fig. 1**) zu bilden, in Kontakt gebracht. Ein solches drittes Lösungsmittel kann ein Alkohol, wie zum Beispiel Methanol oder Ethanol, ein Keton, wie zum Beispiel Aceton oder ein Ether sein. Lösungsmittel, die als drittes Lösungsmittel geeignet sind, zum Beispiel ein Lösungsmittel, das wirksam ist, eine Monophase in Gegenwart des ersten Lösungsmittels und des zweiten Lipidlösungsmittels zu bilden, können durch Löslichkeitsexperimente bestimmt werden, die vom Fachmann ohne weiteres durchgeführt werden.

[0036] Unter weiterer Bezugnahme auf **Fig. 1** wird die Monophase inkubiert und eine Menge des ersten Lösungsmittels und/oder des Lipidlösungsmittels wird zur Trennung der Monophase in ein Zweiphasenlösungsmittelsystem (Röhrchen #3 in **Fig. 1**) zugegeben. Das weniger dichte Lösungsmittel wird aus dem System

durch Absaugen oder Dekantieren entfernt. Es ist klar, dass zu diesem Zeitpunkt jede Phase bezüglich des Polynukleotidgehalts zur Bestimmung der Leistungsfähigkeit der Extraktion, die die Leistungsfähigkeit der Liposombeladung anzeigt, analysiert werden kann.

[0037] Zu diesem Zeitpunkt wird im Herstellungsverfahren ein Teilchen gebildet, das hier als ein Polynukleotid-kationisches Lipidteilchen bezeichnet wird. Es ist klar, dass die Mengen an Polynukleotid und kationischem Lipid ausgewählt werden können, um ein Ladungs-neutralisiertes Polynukleotid-kationisches Lipidteilchen oder ein geladenes Teilchen zu erreichen. Wie nachstehend diskutiert wird, zeigen Untersuchungen zur Unterstützung der Erfindung, dass die Aufnahme der Liposomen durch das retikuloendotheliale System durch den Grad der Ladungswechselwirkung zwischen dem kationischen Lipid und dem anionischen Polynukleotid beeinflusst wird.

[0038] Wie im Röhrchen #4 von **Fig. 1** erläutert wird, werden neutrale Vesikel-bildende Lipide zu der organischen Phase gegeben, die die Polynukleotid-kationischen Lipidteilchen enthält. Eine Menge an nicht-ionschem Lösungsmittel wird zugegeben und die Mischung wird kurz durch Verwirbeln und/oder Beschallung gemischt. Die organische Phase wird dann unter Rotationsverdampfung unter Bildung einer Gelphase verdampft (Röhrchen #5 **Fig. 1**). Nach ausreichender Verdampfung der organischen Phase kehrt das System in die wässrige Phase zurück unter Bildung von Liposomen, die eine Zweischicht-Lipidmembran aus den neutralen Vesikel-bildenden Lipiden und den kationischen Lipiden aufweisen, wobei das Polynukleotid in dem zentralen Kern der Liposomen eingeschlossen ist. Die neutralen Vesikel-bildenden Lipide sind hauptsächlich in den äußeren Lipid-Doppelschichten, wobei die kationischen Lipide in den inneren Lipid-Doppelschichten am nächsten zu dem zentralen Kern der Liposomen sind. Das Polynukleotid, das mit den kationischen Lipiden verbunden ist, ist hauptsächlich auf den inneren Oberflächenbereichen der zentralen Kernkammer.

[0039] In Untersuchungen zur Unterstützung der Erfindung wurde ein Polynukleotidkationischer Lipidkomplex unter Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden mit 18 bis 21 Resten hergestellt. Beispiel 1 beschreibt die Herstellung von Polynukleotidkationischen Lipidteilchen, die aus einem Oligonukleotid mit 18 Resten und dem kationischen Lipid Dioleoyltrimethylammoniumpropan (DOTAP) zusammengesetzt sind. In dieser Untersuchung wurde die DPTAP-Menge bestimmt, die erforderlich ist, um die Ladung des 18-mer Oligonukleotids auszugleichen. Wie in Beispiel 1 beschrieben ist, wurde eine festgelegte Menge des Oligonukleotids, einschließlich einer Spur von <sup>125</sup>I-Oligonukleotid in einem nicht-ionschen Lösungsmittel (entionisiertes Wasser) gelöst und mit variierenden Mengen an DOTAP, gelöst in Chloroform, gemischt. Es wurde eine Menge an Methanol zugegeben, die zur Bildung einer Monophase ausreichte. Nach Inkubation wurde die Monphasen-Mischung unter Bildung eines Zweiphasenlösungsmittelesystems durch Zugabe von Wasser und Chloroform zerrissen.

[0040] Die wässrige Phase und die organische Phase wurde bezüglich markiertem Oligonukleotid analysiert und die Ergebnisse sind in **Fig. 2** gezeigt, die die Menge an <sup>125</sup>I-Oligonukleotid in der organischen Phase (nicht gefüllte Dreiecke/gestrichelte Linie) und in der wässrigen Phase (plus-Symbol/durchgezogene Linie) als Funktion des kationischen Lipids DOTAP in nmol zeigt. Wie ersichtlich ist, blieb bei niedrigen kationischen Lipidkonzentrationen das meiste Oligonukleotid in der nicht-ionschen wässrigen Phase. Mit zunehmender Konzentration an kationischem Lipid wurde mehr Lipid aus der Lipid organischen Phase gewonnen und bei ungefähr 80 nmol DOTAP war im wesentlichen das gesamte Oligonukleotid in das organische Lipidlösungsmittel extrahiert worden. An dieser Stelle beträgt das molare Verhältnis von Oligonukleotid zu kationischem Lipid ungefähr 1 : 50 und das +/- Ladungsverhältnis 3 : 1.

[0041] Andere Untersuchungen, die zur Unterstützung der Erfindung durchgeführt wurden, wurden zur Erläuterung der Wirkung der Lösungsmittel auf das Extraktionsverfahren zur Bildung der Polynukleotid-kationischen Lipidteilchen durchgeführt. In diesen Untersuchungen wurde das in Beispiel 1 beschriebene Verfahren unter Verwendung eines ionischen wässrigen Lösungsmittels, Hepespuffer (25 mM Hepes, 140 mM NaCl, pH-Wert 7,4) durchgeführt. In Gegenwart des ionischen Puffers wurde das Oligonukleotid vermutlich aufgrund einer Ladungs-Abschirmungs-Wechselwirkung nicht in die organische Phase extrahiert. In anderen Untersuchungen wurde eine 10% wässrige Sucroselösung zur Extraktion verwendet, wobei die Ergebnisse zu den in **Fig. 2** beschriebenen ähnlich waren.

[0042] Es ist klar, dass das für ein Oligonukleotid mit 18 Resten und das kationische Lipid DOTAP vorstehend beschriebene Verfahren für jede ausgewählte Kombination von Polynukleotid und kationischem Lipid verwendet werden kann. Beispielhafte Polynukleotide umfassen DNA, RNA und Fragmente und Analoga davon, Oligonukleotide mit bis zu 100 Nukleotidresten, einschließlich Oligonukleotide mit Nucleasebeständigen chemischen Bindungen, wie zum Beispiel Phosphorthioat und Methylphosphonat.

[0043] Es ist klar, dass in Ausführungsformen, in denen das Polynukleotid zum Beispiel eine DNA ist, das Polynukleotid unter Verwendung eines polykationischen Kondensationsmittel zusätzlich oder anstelle des kationischen Lipids kondensiert werden kann. Zum Beispiel sind Spermin, Spermidin, Histone, Polylysin und Protaminsulfat polykationische Mittel, die zum Kondensieren eines großen Polynukleotids zum Erleichtern seines Einschlusses in die Liposomen der Erfindung geeignet sind.

[0044] Kationische Lipide, wie sie hier verwendet werden, beziehen sich auf ein Vesikelbildendes Lipid, das eine positive Netto-Ladung aufweist. Das kationische Lipid kann ein Monokation oder ein Polykation sein. Wie

hier definiert ist, beabsichtigt „Vesikelbildendes Lipid“ jedes amphiphatische Lipid zu umfassen, das hydrophobe und polare Kopfgruppeneinheiten aufweist und das selbst spontan Zweischichtvesikel in Wasser bilden kann, wie beispielhaft durch Phospholipide erläutert wurde. Derartige Vesikel-bildende Lipide sind typischerweise Diacylketten-Lipide, wie zum Beispiel ein Phospholipid, dessen Acylketten typischerweise eine Länge von ungefähr 14–22 Kohlenstoffatome aufweisen und die variierende Grade an Ungesättigtheit aufweisen.

[0045] Beispielhafte kationische Vesikel-bildende Lipide umfassen Phospholipide, wie zum Beispiel Phosphatidylethanolamin, dessen polare Kopfgruppen mit einer positiven Einheit derivatisiert sind, zum Beispiel Lysin, wie zum Beispiel für das mit L-Lysin (LYS-DOPE) derivatisierte Lipid DOPE erläutert wurde (Guo, L., et al., Journal of Liposom Research 3(1): 51–70 (1993)). Ebenfalls in dieser Klasse enthalten sind die Glycolipide, die eine kationische polare Kopfgruppe aufweisen. Ein weiteres kationisches Vesikel-bildendes Lipid, das verwendet werden kann, ist Cholesterinamin und verwandte kationische Sterole.

[0046] Andere Beispiele umfassen 1,2-Dioleyloxy-3-(trimethylamino)propan (DOTAP), N-[1-(2,3-Ditetradecyloxy)propyl]-N,N-dimethyl-N-hydroxyethylammoniumbromid (DMRIE), N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N-dimethyl-N-hydroxyethylammoniumbromid (DORIE), N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA), 3β[N-(N',N'-Dimethylaminoethan)carbamoyl]cholesterol (DC-Chol) und Dimethyldioctadecylammonium (DDAB).

[0047] Die vorstehend erwähnten Lipide können kommerziell erhalten werden oder gemäß veröffentlichten Verfahren hergestellt werden.

[0048] Eine Vielzahl neutraler Lipide sind zu Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet. Neutrale Vesikel-bildende Lipide, die Vesikel-bildende Lipide bezeichnen, die keine Netto-Ladung aufweisen, umfassen Phospholipide, wie zum Beispiel Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol und Sphingomyelin. Negativ geladene Lipide werden ebenfalls zur alleinigen Verwendung oder in Kombination mit einem neutralen Lipid betrachtet. Beispielhafte negative Vesikel-bildende Lipide umfassen Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol und Phosphatidsäure. Es ist klar, dass andere Lipide, wie zum Beispiel Cholesterin und andere ungeladenen Sterole zu dem neutralen oder negativ geladenen Vesikel-bildenden Lipid zugegeben werden können und, dass verschiedene Kombinationen zur Verwendung geeignet sind.

[0049] Beispiel 2 beschreibt die Bildung von Liposomen nach der Bildung von Oligonukleotid-kationischen Lipidteilchen durch das vorstehend in Beispiel 1 diskutierte Extraktionsverfahren. Kationische Lipid-Oligonukleotidteilchen wurden unter Verwendung des kationischen Lipids DOTAP und einem Oligonukleotid mit 21 Resten durch Auflösen von 50 µg Oligonukleotid in einer nicht-ionischen wässrigen Phase und 0,5 µmol DOTAP in einer Lipid organischen Phase hergestellt. Das Oligonukleotid wurde aus der wässrigen Phase unter Bildung Oligonukleotid-kationischer Lipidteilchen extrahiert.

[0050] Zu den Oligonukleotid-kationischen Lipidteilchen wurde eine ausgewählte Menge Phosphatidylcholin (Iodzahl 40) und Cholesterin in einem Verhältnis von 2 : 1 (PC : Chol) zugegeben. Eine kleine Menge an entionisiertem Wasser wurde hinzugefügt, die Mischung wurde kurz zum Emulgieren der Phasen beschallt und die organische Phase wurde verdampft. Die Liposomen bildeten sich, sobald das System in die wässrige Phase zurückkehrte. Wie vorstehend beschrieben, sind die eingeschlossenen Oligonukleotide hauptsächlich an die innere Oberfläche des zentralen Kernbereichs aufgrund der Ladungswechselwirkung zwischen kationischem Lipid und den Oligonukleotiden gebunden. Die neutralen Lipide beschichten die Teilchen unter Bildung einer liposomalen Doppelschicht, die aus sowohl den kationischen Lipiden, die hauptsächlich in dem inneren Zweischichtenbereich der Liposomen angeordnet sind, und den neutralen Lipiden, die in den äußeren Zweischichtenbereichen der Liposomen angeordnet sind, besteht und eine Beschichtung um die kationischen Polynukleotidteilchen bildet.

[0051] Liposomen mit eingeschlossenen Oligonukleotiden, die entsprechend der Beschreibung in Beispiel 2 hergestellt wurden, wurden durch dynamische Lichtstreuung und auf einer Metrizamid Dichtegradient-Säule zur Bestimmung der Leistungsfähigkeit zum Einschließen charakterisiert. Wie in Beispiel 3 beschrieben ist, wurde die Suspension der Liposomen auf eine Metrizamidgradientensäule gegeben, um Liposomen, die eingeschlossenes Oligonukleotid enthielten von nicht eingeschlossenem Oligonukleotid zu trennen. Nicht eingeschlossenes Oligonukleotid äquilibriert in einer niedrigeren, dichteren Säulenfraktion, zum Beispiel die 20% Metrizamidfraktion, wohingegen die Liposomen in einer weniger dichten Fraktion äquilibrieren. Nachdem die Liposomen auf die Säule gegeben worden waren wurde die Gradientensäule zentrifugiert. Nach Zentrifugation hatte die Liposomenfraktion der Probe an der 10% Metrizamid/Wasser-Grenzfläche äquilibriert mit einer schwach sichtbaren Lipidbande an der 20%/10% Metrizamid-Grenzfläche. Das Lipid wurde von der 10% Metrizamid/Wasser-Grenzfläche zum Zählen in einem Gammazähler und zum Untersuchen des Phosphatgehalts gesammelt.

Tabelle 1

| Phosphatidylcholin<br>( $\mu$ mol) | Größe* (nm)   | Leistungs-<br>fähigkeit zum<br>Einschließen*<br>(%) | Polynukleotid/Phospholipid-<br>Verhältnis* (nmol/ $\mu$ mol) |
|------------------------------------|---------------|---|--|
| 0,5                                | 360 $\pm$ 60  | 72 $\pm$ 10   | 7,9 $\pm$ 2,1  |
| 1,0                                | 530 $\pm$ 170 | 74 $\pm$ 4  | 5,4 $\pm$ 0,4  |
| 2,0                                | 510 $\pm$ 200 | 73 $\pm$ 10   | 3,4 $\pm$ 0,5  |

[0052] Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse für drei liposomale Zusammensetzungen, die verschiedene Mengen an Phosphatidylcholin enthalten. Die Leistungsfähigkeit zum Einschließen, die als Zählungen der Liposomgebundenen Oligonukleotidfraktion über die Gesamtzahl der in der Säule gemessenen Zählungen genommen wird, beträgt ungefähr 73%, was eine signifikante Verbesserung im Vergleich zu derjenigen ist, die durch passiven Einschluß erreicht wird.

[0053] In Tabelle 1 sind ebenfalls die liposomalen Teilchen Größenmessungen, die durch dynamische Lichtstreuung bestimmt wurden, gezeigt. Die Liposomen wiesen einen Durchmesser von 360–530 nm auf, der etwas größer ist, als wie für die in vivo-Verabreichung bevorzugt wird, für die Liposomen mit Größen von weniger als ungefähr 300 nm bevorzugt werden. Die Dimensionierung der Liposomen bis hinunter zu der bevorzugten Größe wurde durch Extrudieren durch 100 nm oder gestapelte 200 nm Filter gezeigt. Diese Extrusionen zeigten, dass die Liposomen erfolgreich herunter dimensioniert werden können, während sie das eingeschlossene Oligonukleotid behalten. Die Extrusionsexperimente bestimmten ebenfalls, dass das neutrale Lipid die Liposomen stabilisiert, wie durch Liposomen offenbar wurde, die mit ungefähr 2  $\mu$ mol neutralem Lipid während der Extrusion stabiler waren.

[0054] In einer Ausführungsform der Erfindung umfassen die Liposomen eine Oberflächenbeschichtung von hydrophilen Polymerketten, die wirksam sind, die Blutzirkulationsdauer der Liposomen zu verlängern. Geeignete hydrophile Polymere umfassen Polyethylenglycol (PEG), Polymilchsäure, Polyglycolsäure, Polyvinylpyrrolidon, Polymethyloxazolin, Polyethyloxazolin, Polyhydroxypropylmethacrylamid, Polymethacrylamid, Polydimethylacrylamid und derivatisierte Cellulosen, wie zum Beispiel Hydroxymethylcellulose oder Hydroxyethylcellulose. Eine bevorzugte hydrophile Polymerkette ist Polyethylenglycol (PEG), vorzugsweise als eine PEG-Kette, die ein Molekulargewicht zwischen 500–10000 Dalton, bevorzugter zwischen 1000–5000 Dalton aufweist.

[0055] Die Beschichtung wird vorzugsweise hergestellt, indem in die neutralen Vesikelbildenden Lipide, die die Liposomen bilden, zwischen 1–20 Mol-% eines Vesikelbildenden Lipids, vorzugsweise ein Phospholipid oder ein anderes Diacylketten-Lipid, das mit der Polymerkette an dessen Kopfgruppe derivatisiert ist, eingeschlossen wird. Beispielhafte Verfahren zur Herstellung derartiger Lipide und damit zur Bildung Polymerbeschichteter Liposomen wurden in den U.S. Patenten mit den Nummern 5,013,556, 5,631,018 und 5,395,619, die mehreren Inhabern gehören beschrieben. Das Polymer kann stabil an das Lipid gekoppelt sein oder durch eine instabile Verbindung gekoppelt sein, die es den beschichteten Teilchen gestattet ihre Beschichtung abzuwerfen, wenn sie im Blutstrom zirkulieren.

[0056] Liposomen, die eine derartige Oberflächenbeschichtung aufwiesen und ein eingeschlossenes Polynukleotid enthielten, wurden unter Verwendung von Methoxypolyethylenglycol (mPEG), derivatisiert mit Distearoylphosphatidylethanamin (DSPE), hergestellt. Entsprechend der Beschreibung in Beispiel 3 wurden Oligonukleotidkationische Lipidteilchen gebildet und Liposomen durch Zugabe von neutralen Lipiden, die sich aus Phosphatidylcholin, Cholesterin und mPEG2000, das kovalent an die polare Kopfgruppe von DSPE gebunden war, mPEG-DSPE, in einem molaren Verhältnis von 2 : 1 : 0,1 zusammensetzten, zu den Teilchen hergestellt. Die resultierende Liposomsuspension wurde durch Polycarbonatfilter auf Durchmesser von weniger als 200 nm extrudiert.

[0057] Die Leistungsfähigkeit zum Einschließen des Oligonukleotids in die PEG-beschichteten Liposomen wurde durch Trennen der Liposomen von nicht eingeschlossenem Oligonukleotid auf einem Metrizamidgradienten, entsprechend der Beschreibung in Beispiel 3, bestimmt. Das Trennprofil der Liposomsuspension ist in **Fig. 3** gezeigt, wobei der Prozentsatz an Gesamtzählungen auf der Gradientsäule als Funktion der Fraktionsnummer gezeigt ist. Wie in der Figur ersichtlich ist, wanderte nahezu das gesamte Lipid zur 10% Metrizamid/entionisiertes  $H_2O$ -Grenzfläche und, abgesehen von einer sehr kleinen Menge in den ersten zwei Fraktionen, wanderte das gesamte Oligonukleotid mit dem Lipid. Tabelle 2 faßt die Ergebnisse aus den zwei getrennten Experimenten zusammen.

Tabelle 2

| Zugegebenes neutrales Lipid ( $\mu$ mol) | Größe (nm) | Leistungsfähigkeit zum Einschließen* (%) | Verhältnis* von Oligonukleotid/Phospholipid (nmol/ $\mu$ mol) |
|--|------------|--|---|
| 3  | 174        | 86                                       | 2,1   |
| 3  | 176        | 91                                       | 2,2   |

\* Die Berechnung basiert auf dem Anfangsverhältnis von Oligonukleotid : Phospholipid und anschließender Korrektur für den Prozentsatz an Oligonukleotid, das nicht mit Lipid gebunden war.

[0058] Die Daten in Tabelle 2 zeigen, dass für ein Liposom mit einer Größe von ungefähr 175 nm, eine zur in vivo-Verabreichung geeignete Größe, die Leistungsfähigkeit zum Einschließen ungefähr 90% betrug, was eine beträchtliche Verbesserung gegenüber der Leistungsfähigkeit von 10% ist, die in der Literatur für Liposomen berichtet wird, die durch andere Verfahren hergestellt werden (Ropert, et al., 1993). Das Verhältnis von Oligonukleotid zu Phospholipid beträgt ungefähr 2 nmol/ $\mu$ mol.

[0059] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung umfassen die Liposomen einen Liganden oder eine Affinitätseinheit, die wirksam ist, spezifisch an eine gewünschte Geweberegion oder Zielzelle zu binden. Derartige Einheiten können an die Oberfläche des Liposoms oder an die distalen Enden der hydrophilen Polymerketten gebunden werden. Beispielhafte Einheiten umfassen Antikörper, Liganden zum spezifischen Binden an Oberflächenrezeptoren von Zielzellen und dergleichen, wie zum Beispiel in der PCT Anmeldung Nr. WO US94/03103, die mehreren Inhabern gehört, beschrieben ist.

#### A. Liposomenstabilität

[0060] Die Stabilität der Liposomen in 25% fötalem Rinderserum wurde durch Herstellung von Liposomen, die ein eingeschlossenes Oligonukleotid aufweisen, und durch Messung der Liposomengröße als Funktion der Zeit, nachdem sie in das Serum gegeben wurden, bestimmt.

[0061] In dieser Untersuchung wurde die Liposomen gemäß dem Verfahren der Erfindung hergestellt und setzten sich aus einem Oligodesoxynukleotid mit 21 Resten, dem kationischen Lipid DOTAP und neutralen Lipiden zusammen, die aus 5 Mol-% mPEG-DSPE, 2  $\mu$ mol Phosphatidylcholin und 1,25  $\mu$ mol Cholesterin (PC : Chol : mPEG-DSPE mit einem molaren Verhältnis von 2 : 1 : 0,1) bestanden.

[0062] Unter Verwendung dieser Komponenten wurden zwei Liposomensuspensionen hergestellt. In der ersten Liposomensuspension wurde zur Bildung der kationischen Lipid-Oligonukleotidteilchen und als Hydratationsmedium zur Liposomenbildung während der Lösungsmittelverdampfung entionisiertes Wasser verwendet. In der zweiten Suspension wurde eher eine 5% wässrige Sucroselösung als Wasser verwendet.

[0063] Die Größe der Liposomen nach Extrusion betrug 174 nm für die in entionisiertem Wasser hergestellten Liposomen und 172 nm für die in 5% Sucrose hergestellten Liposomen, wie in Tabelle 3 ersichtlich ist.

[0064] Eine Probe von jeder Liposomensuspension wurde in Puffer (25 mM Hepes, 140 mM NaCl, pH-Wert 7,4) gegeben und die Teilchengröße wurde wiederum gemessen, wie in Tabelle 3 ersichtlich ist. In beiden Suspensionen wurden die Liposomen in der Größe auf ungefähr 156 nm und 157 nm für die auf Wasser beziehungsweise für die auf 5% Sucrose basierenden Suspensionen verringert.

[0065] Von jeder Liposomensuspension wurde eine Probe in eine Lösung von 25% fötalem Rinderserum in Puffer gegeben und die Liposomenteilchengröße wurde sofort und in Zeitabschnitten von 24 Stunden nach Lagerung bei 37°C gemessen. Wie in Tabelle 3 ersichtlich ist, erleiden die Liposomen in jeder Suspension eine gewisse Veränderung in der Teilchengröße, wenn die Teilchen zum Ausgleichen ihrer inneren und äußeren Osmosestärken äquilibrieren. Bedeutenderweise wurde keine Aggregatbildung der Liposomen beobachtet, was darauf hinweist, dass die Liposomen nach in vivo-Verabreichung stabil sein sollten.

Tabelle 3

| Röhrchen<br># | Neutrales<br>Lipid<br>( $\mu$ mol) | Wässrige<br>Phase        | Größe<br>nach<br>Extrusion<br>(nm) | Größe<br>in He-<br>pes 7,4<br>(nm) | Größe in 25 % FBS (nm) |            |            |
|---------------|------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------|------------|------------|
|               |                                    |                          |                                    |                                    | 0 Std.                 | 24<br>Std. | 48<br>Std. |
| 1             | 2                                  | entionisiertes<br>$H_2O$ | 174                                | 156                                | 171                    | 160        | 165        |
| 2             | 2                                  | 5 % Sucrose              | 172                                | 157                                | 226                    | 166        | 198        |

## II. In vivo-Charakterisierung der Liposomen

[0066] Liposomen wurde erfindungsgemäß unter Einschließen eines 18-mer Phosphorthioat-Oligonukleotids, das zum MDRI-Gen komplementär ist, hergestellt. Die für die in vivo-Untersuchungen verwendeten Liposomen umfassten eine Oberflächenbeschichtung aus Polyethylenglycol (PEG) hydrophilen Polymerketten, indem die neutrale Liposomenzusammensetzung Distearoylphosphatidylethanolamin, das mit PEG (mPEG<sub>2000</sub>-DSPE) derivatisiert war, beinhaltete, wie in Beispiel 5B beschrieben ist. Zum Vergleich wurden neutrale Liposomen durch eine herkömmliche Lipidfilmhydratation in Gegenwart des Oligonukleotids (Beispiel 5A) hergestellt.

[0067] Die **Fig. 4A–4B** sind Fraktionierungsprofile für die kationischen Liposomen (**Fig. 4A**) und neutralen Liposomen (**Fig. 4B**), die für Tierversuche hergestellt wurden. Die Profile wurde durch Probennahme der Fraktionen während Trennung des freien Oligonukleotids von dem Lipid-gebundenen Oligonukleotid durch Filtration durch einer Sepharose CL-4B-Säule (Beispiel 5B) erhalten. Wie in **Fig. 4A** ersichtlich ist, wurden praktisch 100% des Oligonukleotids mit der Lipidfraktion gebunden, wie durch den einzelnen Elutionspeak über die Fraktionen 5–12 offensichtlich wird. Wie in **Fig. 4B** ersichtlich ist, wurden im Gegensatz dazu nur 20% des Oligonukleotids an die neutralen Liposomen gebunden.

[0068] Die Größe der Liposomen wurde durch dynamische Lichtstreuung bestimmt und die herkömmlichen Liposomen wiesen einen mittleren Durchmesser von  $197 \pm 2$  nm (Polydispersität  $0,032 \pm 0,012$ ) auf, während die kationischen Liposomen der Erfindung einen mittleren Durchmesser von  $188 \pm 1$  nm (Polydispersität  $0,138 \pm 0,018$ ) aufwiesen.

[0069] Beide Liposomenzusammensetzungen wurden Mäusen entsprechend dem Verfahren von Beispiel 6 verabreicht. Es wurde ebenfalls freies Oligonukleotid einer Gruppe von Versuchstieren verabreicht. Die Zusammensetzungen wurden intravenös in einer einzelnen Bolusinjektion über die Schwanzvene mit einer Lipid (Phosphatidylcholin)-dosis von  $0,5 \mu$ mol verabreicht. Zu spezifischen Zeitpunkten wurden jeweils drei Mäuse von jeder Versuchsgruppe geopfert und die Organe und eine Blutprobe wurden auf das Vorhandensein von Oligonukleotid analysiert.

[0070] **Fig. 5** zeigt die Blutzirkulationslebensdauer des freien Oligonukleotids (nicht gefüllte Kreise) und des von einem Liposom eingeschlossenen Oligonukleotids, wobei die Liposomen der Erfindung durch plus-Symbole und die neutralen Vergleichsliposomen durch gefüllte Dreiecke dargestellt sind. Wie in der Figur ersichtlich ist, weist das freie <sup>125</sup>I-markierte Oligonukleotid anfangs eine schnelle Verteilungsphase auf und näherungsweise 50% der injizierten Dosis sind aus dem Körper 2 Stunden nach Verabreichung eliminiert worden.

[0071] Im Gegensatz dazu zeigt das <sup>125</sup>I-markierte Oligonukleotid, das innerhalb des Liposoms eingekapselt ist, ein sehr unterschiedliches pharmakokinetisches Profil im Blut.

[0072] Eingekapselt innerhalb neutraler Liposomen (gefüllte Dreiecke) weist das Oligonukleotid unmittelbar nach der Injektion eine kurze Anfangsphase der Eliminierung auf, die ungefähr 10% der injizierten Dosis ausmacht. Die restlichen 90% der Dosis weisen eine viel kleinere Eliminierungsgeschwindigkeit auf, so dass 24 Stunden nach Injektion ungefähr 20% der injizierten Dosis im Blut bleiben.

[0073] Innerhalb der kationischen Liposomen der Erfindung eingeschlossenes <sup>125</sup>I-markiertes Oligonukleotid zeigte ein ähnliches Profil, jedoch machte die Anfangsphase der Eliminierung näherungsweise 30% der injizierten Dosis aus. Vierundzwanzig Stunden nach Injektion blieben über 10% der injizierten Dosis im Blut.

[0074] Tabelle 4 gibt die für jede Behandlung berechneten pharmakokinetischen Parameter an. Die Verweilzeit entspricht der Zeit, die erforderlich ist, um 66% der verabreichten Dosis aus dem Blut zu eliminieren und die Liposomenformulierungen führen zu einer signifikanten Verbesserung in der Verweilzeit. Die Fläche unter den Kurven (AUC)-Werten sind für die Liposomenformulierungen ebenfalls signifikant größer, als für das freie Oligonukleotid. Die AUC für ein innerhalb der Liposomen der Erfindung eingeschlossenes Oligonukleotid ist aufgrund der größeren verabreichten Dosis (52,4  $\mu$ g gegen 6,5  $\mu$ g) größer als für neutrale Liposomen. Wie vor-

stehend diskutiert ist, basierte die verabreichte Dosis eher auf der Lipidmenge als auf der Oligonukleotidmenge, da die Lipiddosis eine signifikante Wirkung auf die liposomale Pharmakokinetik aufweisen kann (Allen, T. M. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1068: 133–141 (1991)), wenn das eingeschlossene Mittel eine langsame Auslaufgeschwindigkeit aus dem Liposom aufweist. Die Menge an Oligonukleotid, das mit den kationischen Liposomen gebunden ist, ist für neutrale Liposomen signifikant größer, wie durch die Leistungsfähigkeit zum Einschließen (**Fig. 4A** und **4B**) gezeigt wird, und daher ist die Menge an Oligonukleotid, die pro  $\mu\text{mol}$  Phospholipid injiziert wird, viel größer für die kationischen Liposomen, was zu einer größeren AUC führt. Werden die Dosen auf 30  $\mu\text{g}$  Oligonukleotid/Maus (unter Annahme linearer Pharmakokinetik) normiert, so ist die AUC für neutrale Liposomen (199,9) größer als für kationische Liposomen (128,1) oder freies Oligonukleotid (19,4). Es ist klar, dass die verbesserte Beladungsfähigkeit des Oligonukleotids in den kationischen Liposomen der Erfindung die Verabreichung einer kleineren Lipiddosis erlaubt, um eine gegebene Oligonukleotiddosis zu erreichen, im Vergleich zu herkömmlichen neutralen Liposomen.

[0075] Unter weiterer Bezugnahme auf Tabelle 4 spiegelt sich die schnelle Lösung von freiem Oligonukleotid aus dem Blut ebenfalls in der Eliminierungsgeschwindigkeitskonstante ( $k$ ), die mehr als 10 mal so groß ist, wie für die beiden liposomalen Behandlungen. Das Verteilungsvolumen ( $V_D$ ) für beide liposomalen Behandlungen liegt nahe bei dem Blutvolumen der verwendeten Tiere, jedoch war das Verteilungsvolumen für das freie Oligonukleotid ungefähr 5 mal größer, was darauf hinweist, dass es innerhalb der Gewebe breit verteilt war.

[0076] Die Halbwertszeiten im Blutkreislauf ( $T_{1/2}$ ) für die Anfangsphase der Eliminierung ( $T_{1/2\alpha}$ ) und für die Eliminierung der Restdosis ( $T_{1/2\beta}$ ) sind ebenfalls in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4

Pharmakokinetische Parameter, berechnet für das Oligonukleotid in verschiedenen Formulierungen

| Gruppe  | Verweilzeit<br>(h) | AUC ( $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$ ) | $V_D$ (ml) | $k$ ( $\text{h}^{-1}$ ) | $T_{1/2\alpha}$ (h) | $T_{1/2\beta}$ (h) |
|---|--------------------|---|------------|-------------------------|---------------------|--------------------|
| Neutrale<br>Liposomen<br>(6,5 $\mu\text{g}$ )     | 17,6               | 43,4                                    | 1,96       | 0,08                    | 0,39                | 12,4               |
| Kationische<br>Liposomen<br>(52,4 $\mu\text{g}$ ) | 15,0               | 226,9                                   | 2,39       | 0,10                    | 0,26                | 10,6               |
| Freies Oli-<br>gonukleotid<br>(30 $\mu\text{g}$ ) | 4,7                | 5,7                                     | 13,77      | 0,38                    | 0,26                | 3,5                |

[0077] Die **Fig. 6A–6C** sind graphische Darstellungen, die die biologische Verteilung des Oligonukleotids in den Tieren zeigt, wobei **Fig. 6A** der Verteilung nach Verabreichung des Oligonukleotids in freier Form entspricht, **Fig. 6B** dem in neutralen Liposomen eingeschlossenen Oligonukleotid entspricht und **Fig. 6C** dem erfindungsgemäß in kationischen Liposomen eingeschlossenen Oligonukleotid entspricht.

[0078] **Fig. 6A** zeigt, daß zu jeder Zeit nach 15 Minuten sehr wenig freies Oligonukleotid im Blut übrig bleibt. Der größte Anteil der Dosis verteilt sich in der Karkasse, die die gesamten übrig gebliebenen nicht sezierten Gewebe umfaßt. Die Leber und Niere enthielten ebenfalls signifikante Mengen an radioaktiven Zählungen.

[0079] **Fig. 6B** zeigt, dass zu allen Zeiten der größte Oligonukleotidanteil im Blut vorkommt, wenn es in Form neutraler Liposomen verabreicht wird. Die Blutgehalte stellen nahezu die gesamte Dosis dar, besonders zu den früheren Zeitpunkten. Zu allen Zeitpunkten gibt es eine relativ konstante Menge in der Leber und Milz, jedoch scheinen die Gehalte in der Karkasse zu späteren Zeitpunkten zuzunehmen und dies würde mit der Verteilung und Eliminierung des freien Oligonukleotids nach Freisetzung von den Liposomen oder möglicherweise mit der Ansammlung von liposomalen Oligonukleotid innerhalb der Gewebe übereinstimmen.

[0080] **Fig. 6C** zeigt, dass bei einem Oligonukleotid, das in kationische Liposomen eingeschlossen ist, das Nukleotid hauptsächlich im Blut bleibt. Es gibt eine Zunahme in den Gehalten der Karkasse mit der Zeit, die mit der Eliminierung von freiem Oligonukleotid oder mit der Ansammlung von liposomalem Oligonukleotid in den Geweben übereinstimmt.

[0081] In einer weiteren Untersuchung wurde die Wirkung des Verhältnisses von Oligonukleotid : kationischem Lipid auf die Aufnahme der Liposomen durch das retikuloendotheliale System untersucht. Liposomen wurden durch das Verfahren der Erfindung (Beispiel 5B) mit Verhältnissen von Oligonukleotid : kationischem Lipid (DOTAP) von 0 (kein Oligonukleotid in der Formulierung), 44,4 µg/mol (+/- Verhältnis von 2,6 : 1) und 104,8 µg/mol (+/- Verhältnis von 1,1 : 1) hergestellt. In der Formulierung, in der die Liposomen kein Oligonukleotid enthielten, wurden die Liposomen in Gegenwart von <sup>125</sup>I-markiertem Tyraminylinulin hydratisiert, das entsprechend der Beschreibung in Sommerman (Sommerman E. F. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 122: 319-324 (1984)) hergestellt worden war. Die Liposomenformulierung wurde intravenös in Mäuse injiziert und Leber und Milz wurde 15 Minuten nach Verabreichung bezüglich <sup>125</sup>I-markiertem Tyraminylinulin und <sup>125</sup>I-markiertem Oligonukleotid analysiert.

[0082] Die Ergebnisse sind in **Fig. 7** gezeigt, wobei der Prozentsatz der Restdosis im retikuloendothelialen System als Funktion des Verhältnisses von Oligonukleotid/kationischem Lipid gezeigt wird. Für die Dosis ohne Oligonukleotid verteilten sich 15 Minuten nach Injektion nahezu 50% der Dosis auf die Leber und Milz. Betrug das Verhältnis von Oligonukleotid/kationischem Lipid 44,4 µg/µmol, verteilten sich 15 Minuten nach Injektion näherungsweise 40% der Dosis auf Leber und Milz. Betrug das Verhältnis 104,8 µg/µmol (+/- Verhältnis 1,1 : 1) verteilte sich näherungsweise 30 der Dosis auf Leber und Milz. Die Aufnahme bei 104,8 µg/µmol unterschied sich signifikant von der Aufnahme bei 44,4 µg/µmol und 0 µg/µmol ( $p < 0,05$ ).

### III. Verabreichungsverfahren

[0083] Das Polynukleotid, das wie vorstehend in kationische Liposomen eingeschlossen ist, kann an einen Patienten, der einer Behandlung bedarf, verabreicht werden.

[0084] Das in die Liposomen eingeschlossene Polynukleotid kann aus einer Vielzahl von auf DNA und RNA basierenden Polynukleotiden, einschließlich deren Fragmente und Analoga, ausgewählt werden. In einer Ausführungsform ist das Polynukleotid ein Antisense-DNA-Oligonukleotid, bestehend aus Sequenzen, die zu ihrem Ziel komplementär sind und ist üblicherweise eine Boten-RNA (mRNA) oder ein mRNA-Vorläufer. Die mRNA enthält die genetische Information in der funktionalen oder Sense-Ausrichtung und das Binden des Antisense-Oligonukleotids inaktiviert die dafür bestimmte mRNA und verhindert deren Translation in ein Protein. Derartige Antisense-Moleküle werden, basierend auf biochemischen Experimenten, bestimmt, die zeigen, dass Proteine von spezifischen RNAs translatiert werden und, dass sobald die Sequenz der RNA bekannt ist, ein Antisense-Molekül konstruiert werden kann, das daran durch komplementäre Watson-Crick-Basenpaarung bindet. Derartige Antisense-Moleküle enthalten typischerweise zwischen 10-30 Basenpaare, bevorzugter zwischen 10-25 und besonders bevorzugt zwischen 15-20 Basenpaare.

[0085] In einer Ausführungsform der Erfindung wird das Antisense-Oligonukleotid für eine verbesserte Beständigkeit gegen Nukleasehydrolyse modifiziert. Solche Analoga umfassen Phosphorthioat, Methylphosphonat, Phosphodiester und p-Ethoxyoligonukleotide (WO 97/07784, veröffentlicht am 6. März 1997).

[0086] Die Zusammensetzung der Erfindung soll in einer Vielzahl von Therapien, einschließlich, aber nicht eingeschränkt auf die Behandlung viraler, bösartiger und entzündlicher Erkrankungen und Zustände, wie zum Beispiel zystische Fibrose, Adenosindeaminasemangel und AIDS, verwendet werden. Es wird die Behandlung von Karzinomen durch Verabreichung von Tumorunterdrückungsgenen, wie zum Beispiel APC, DPC4, NF-1, NF-2, MTS1, RB, p53, WT1, BRCA1, BRCA2, VHL oder die Verabreichung von Onkogenen, wie zum Beispiel PDGF, erb-B, erb-B2, RET, ras (einschließlich Ki-ras, N-ras), c-myc, N-myc, L-myc, Bcl-1, Bcl-2 und MDM2 betrachtet.

[0087] Es wird ebenfalls die Verabreichung der folgenden Nukleinsäuren zur Behandlung der angezeigten Zustände betrachtet: HLA-B7, Tumore, kolorektales Karzinom, Melanom; IL-2, Karzinome, besonders Brustkrebs, Lungenkrebs und Tumore; IL-4, Karzinom, TNF, Karzinom, IGF-1 Antisense, Gehirntumore; IFN, Neuroblastom, GM-CSF, renales Zellkarzinom; MDR-1, Karzinom, besonders fortgeschrittenes Karzinom, Brust- und Eiserstockkrebs und HSV-Thymidinkinase, Gehirntumore, Kopf- und Halstumore, Mesotheliom, Eiserstockkrebs.

[0088] Es ist klar, dass die Zusammensetzung der Erfindung ebenfalls in ex vivo-Verfahren verwendbar ist.

[0089] Die Liposomen sind typischerweise in Suspensionsform zur parenteralen Verabreichung, vorzugsweise zur intravenösen Verabreichung. Andere Verabreichungswege, umfassend subkutane, intramuskuläre, interlesionale (gegen Tumore), intertracheale durch Inhalation, topische, internasale, intraoculare, Verabreichung über direkte Injektion in Organe oder intravenöse Verabreichung sind geeignet.

[0090] Aus dem vorstehenden ist klar, wie verschiedene Merkmale und Ziele der Erfindung getroffen werden. Die vorliegende Erfindung stellt eine Liposomenzusammensetzung zur Verfügung, die im zentralen Kern ein Polynukleotid eingeschlossen hat, wobei aufgrund des Herstellungsverfahrens das Polynukleotid hauptsächlich an dem inneren Oberflächenbereich der kationischen Lipide, die den zentralen Kern bilden, gebunden ist. Eine Beschichtung neutraler Lipide umgibt den kationischen Lipidkern, wobei die neutralen Lipide zur Stabilisierung der Vesikel dienen.

[0091] In der Ausführungsform, in der die Liposomen eine Oberflächenbeschichtung aus hydrophilen Polymerketten umfassen, erreichten die Liposomen eine lange Lebensdauer im Blutkreislauf mit wenig Aufnahme durch das RES.

[0092] Weiterhin führt das Verfahren zur Herstellung der Liposomen zu einer hohen Leistungsfähigkeit zum Einschließen des Polynukleotids, wobei mindestens ungefähr 80% des Polynukleotids in den Liposomen eingeschlossen ist. In den vorstehend beschriebenen Untersuchungen wurden bei einem Ladungsverhältnis von Oligonukleotid : kationischem Lipid mit 1 : 1 näherungsweise 95% des Oligonukleotids aus der wässrigen Phase in die organische Phase extrahiert. Nach Zugabe des neutralen Lipids und Liposomenbildung blieb das gesamte Oligonukleotid mit dem Lipid gebunden (wie durch **Fig. 4A** gezeigt wird).

[0093] Die Liposomen können bei Bedarf durch Extrusion dimensioniert werden, um die Liposomengröße in einen Bereich von typischerweise weniger als ungefähr 300 nm, bevorzugter zwischen 50–300 nm, besonders bevorzugt zwischen 100–200 nm zu bringen, der für die in vivo-Verabreichung geeignet ist. Die Liposomen sind stabil, wie durch die nicht vorhandene Aggregation oder deutliche Größenänderung offensichtlich wird, wenn sie in fötales Rinderserum gegeben werden, und durch die geringe Lungen- und RES-Aufnahme in vivo offensichtlich wird.

#### IV. BEISPIELE

[0094] Die folgenden Beispiele erläutern die Liposomenzusammensetzung und das Herstellungsverfahren der vorliegenden Erfindung.

##### Beispiel 1

###### Bildung von Polynukleotid-kationischen Lipidteilchen

###### A. Herstellung von $^{125}\text{I}$ -markiertem Oligonukleotid

[0095]  $^{125}\text{I}$ -markiertes Oligonukleotid wurde auf die folgende Art hergestellt: ein 1 ml konisches Reaktionsfläschchen wurde mit näherungsweise 200  $\mu\text{g}$  Iodogen (Pierce, Rockford, IL) beschichtet und dann wurden 500  $\mu\text{g}$  Oligonukleotid zusammen mit 2400 pmol  $^{125}\text{I}$  (185 Mbq) zugegeben und 300  $\mu\text{g}$  Oligonukleotid wurden zusammen mit 2400 pmol  $^{125}\text{I}$  (185 Mbq) und 300  $\mu\text{l}$  0,35 M Natriumacetat, pH-Wert 4,0 mit einem Gesamtvolumen von 400  $\mu\text{l}$  (Piatyszek, M. A., *Ana. Biochem.* 172: 356–359 (1988) zugegeben. Die Mischung wurde für eine Stunde bei 40°C unter häufigem Rühren inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Mischung aus dem Reaktionsfläschchen entfernt und freies  $^{125}\text{I}$  wurde durch Trennung auf einer Sephadex G-25-Säule entfernt. Zur Entfernung des restlichen freien  $^{125}\text{I}$  wurde die Probe in 0,3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen 95% Ethanol gefällt. Im Überstand wurde freies Iod verworfen, während markiertes Oligonukleotid von dem Pellet rehydratisiert wurde und auf einer Sephadex G-25-Säule (Pharmacia, Sweden), die in zweifach destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  äquilibriert worden war, entsalzt. Dies führt zu weniger als 5% an freiem  $^{125}\text{I}$ , entsprechend der Bestimmung durch Dünnschichtchromatographie auf PE1-Cellulose (J. T. Baker, Inc., Phillipsburg, NJ).

###### B. Extraktionsverfahren zur Herstellung von Teilchen

[0096] Es wurden sieben Glasfläschchen hergestellt, die 10  $\mu\text{g}$  eines Oligonukleotids mit 18 Resten mit einer Spur  $^{125}\text{I}$ -Oligonukleotid in 0,25 ml destilliertem entionisiertem Wasser enthielten.

[0097] Das kationische Lipid 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama) wurde in Chloroform mit einer Konzentration im Bereich von ungefähr 1,8 bis 1889 nmol/ml gelöst.

[0098] Zu jedem Glasfläschchen mit Oligonukleotid wurden 0,25 ml von jeder Chloroformkationischen Lipidlösung und 0,51 ml Methanol gegeben und jedes Glasfläschchen wurden zur Bildung einer Monophase verwirbelt.

[0099] Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,25 ml destilliertes entionisiertes  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,25 ml  $\text{CHCl}_3$  zu jedem Glasfläschchen gegeben, um die Monophase unter Bildung eines Zweiphasensystems in jedem Glasfläschchen zuzerreißen. Die Glasfläschchen wurden gemischt und dann während 7 Minuten bei  $800 \times g$  zentrifugiert. Die wässrige Methanolschicht wurde von jedem Glasfläschchen abgesaugt und in einem gesonderten Röhrchen sicher verwahrt, und dann wurden die Oligonukleotidmenge in beiden Phasen durch Zählen in einem Gamma-Zähler gemessen. Die Ergebnisse sind in **Fig. 1** gezeigt.

## Beispiel 2

## Herstellung von Liposomen

[0100] Kationische Lipid-Oligonukleotidteilchen wurden unter Verwendung des Verfahrens von Beispiel 1 durch Lösen von 50 µg eines Oligonukleotids mit 21 Resten in destilliertem entionisierten Wasser hergestellt. 0,5 µmol DOTAP wurde in Chloroform gelöst und das Oligonukleotid wurde in das Chloroform entsprechend Beispiel 1 extrahiert.

[0101] Nach Extraktion wurden Phosphatidylcholin (PC, Iodzahl 40) und Cholesterin in einem Verhältnis von 2 : 1 (PC : Chol) zu der organischen Chloroformphase, die die Oligonukleotid-kationischen Lipidteilchen enthielt, gegeben. Typischerweise betrug die zugegebene PC-Menge 0,5 µmol, 1,0 µmol oder 2,0 µmol. Nach Zufügung der neutralen Lipide wurde 0,2 ml destilliertes entionisiertes H<sub>2</sub>O zugegeben und die Mischung wurde zum Emulgieren der Mischung kurz beschallt. Die organische Phase wurde in einem Rotationsverdampfer unter Vakuum mit 500–700 mm Hg verdampft. Liposomen bildeten sich, sobald das System in die wässrige Phase zurückkehrte. Die Liposomen wiesen typischerweise einen Durchmesser zwischen 200 und 400 nm auf.

## Beispiel 3

## Leistungsfähigkeit zum Einschließen von Polynukleotid

[0102] Eine Liposomensuspension wurde entsprechend Beispiel 2 hergestellt, wobei eine Spur einer Menge von <sup>125</sup>I-markiertem Oligonukleotid (hergestellt wie in Beispiel 1) zugegeben wurde. Die Leistungsfähigkeit zum Einschließen und das Verhältnis von Oligonukleotid : Phospholipid wurden folgendermaßen bestimmt.

[0103] Die Leistungsfähigkeit zum Einschließen wurde durch Trennen des nicht eingeschlossenen 21-mer Oligonukleotids von dem Liposom-gebundenen Oligonukleotid auf einem Metrizamidgradienten und durch Messen der Oligonukleotidmenge in jeder Fraktion durch einen Gamma-Zähler bestimmt. Die Leistungsfähigkeit zum Einschließen wurde als Zählungen in der Liposom-gebundenen Oligonukleotidfraktion über die Gesamtzahl der gemessenen Zählungen genommen.

[0104] Der Metrizamidgradient wurde folgendermaßen durchgeführt. Ein 20% Metrizamid/10% Metrizamid/entionisiertes H<sub>2</sub>O-Gradient wurde in 12 ml Zentrifugenröhren durch aufeinanderfolgendes Beschichten von 1,5 ml 20% Metrizamid, 8 ml 10 Metrizamid und 2 ml entionisiertem H<sub>2</sub>O festgesetzt. Ein Kontrollexperiment mit freiem Oligonukleotid bestätigte, dass 100% freies, nicht Lipid-gebundenes Oligonukleotid in der 20% Metrizamidfraktion zurückblieb.

[0105] Die Liposomenproben wurden auf die Gradientensäule gegeben und die Gradienten wurden dann mit 240000 × g während 4 Stunden bei 4°C zentrifugiert. Nach Zentrifugation war eine Lipidbande an der 10% Metrizamid/entionisiertes H<sub>2</sub>O-Grenzfläche sichtbar. Das Lipid wurde von der 10% Metrizamid/H<sub>2</sub>O-Grenzfläche durch Absaugen mit einer Pipette gesammelt und in einem Gamma-Zähler gezählt und dann bezüglich des Phosphatgehalts geprüft. Tabelle 1 gibt die Ergebnisse von drei liposomalen Formulierungen an, die 0,5, 1,0 oder 2,0 µmol Phosphatidylcholin enthielten.

## Beispiel 4

## Liposomen mit einer Oberflächenbeschichtung aus Polyethylenglycol

[0106] Liposomen mit einer Oberflächenbeschichtung aus Polyethylenglycol (PEG) wurden entsprechend dem in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren durch Extrahieren von 50 µg Oligonukleotid mit einer Spur <sup>125</sup>I-Oligonukleotid in entionisiertem Wasser mit 0,5 µmol DOTAP in Chloroform hergestellt. Dann wurden 3 µmol Phosphatidylcholin (PC40), 1,75 µmol Cholesterin und 0,175 µmol Distearoylphosphatidylethanolamin, das mit PEG derivatisiert war (mPEG<sub>2000</sub>-DSPE), (molares Verhältnis PC : Chol : mPEG von 2 : 1 : 0,1) zu der organischen Lipidphase gegeben, die 0,5 µmol DOTAP und das extrahierte Oligonukleotid enthielt. Eine Spur <sup>3</sup>H-Chol wurde ebenfalls zu der organischen Phase gegeben.

[0107] Aus dieser Mischung wurden Liposomen durch Verdampfung des Chloroforms hergestellt und 200 µl entionisiertes H<sub>2</sub>O wurde zugegeben, um das Volumen für die Extrusion zu erhöhen. Die Liposomensuspension wurde durch 400 nm und 200 nm Polycarbonatfilter auf Durchmesser von weniger als 200 nm extrudiert.

[0108] Die Liposomensuspension wurde durch Trennung des nicht eingeschlossenen Oligonukleotids von dem Lipid-gebundenen Oligonukleotid auf einem Metrizamidgradienten, entsprechend der Beschreibung in Beispiel 3, abgesehen von einer Zentrifugationszeitdauer von 12 Stunden, charakterisiert. Nach Zentrifugation wurden die Gradienten vorsichtig fraktioniert, indem in den Boden des Zentrifugenröhrens ein kleines Loch gemacht wurde und die Phasen in gleichen Tropfenfraktionen in Szintillationsfläschchen gesammelt wurden. Es wurden sowohl  $\gamma$ - (für <sup>125</sup>I-Oligonukleotid) als auch  $\beta$ -Zählungen (für <sup>3</sup>H-Chol) gemessen, dann wurden für

jede Fraktion die  $\beta$ -Zählungen bezüglich dem  $\gamma$ -Signal korrigiert. **Fig. 3** gibt ein repräsentatives Gradientprofil an und die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

### Beispiel 5

#### Herstellung von Liposomen für in vivo-Untersuchungen

##### A. Herstellung von neutralen Vergleichsliposomen

[0109] Neutrale Liposomen, die ein 18-mer Antisense-Oligodesoxynukleotid einschlossen, wurden durch Hydratisieren eines Lipidfilms in einer konzentrierten Lösung des Oligonukleotids hergestellt. Teilweise hydriertes Soja-Phosphatidylcholin (PC40), Cholesterin und Polyethylenglycoldistearoylphosphatidylethanolamin (PEG<sub>2000</sub>-DSPE) wurden in Chloroform bei einem molaren Verhältnis von 2 : 1 : 0,1 gemischt. Die Mischung wurde durch Rotationsverdampfen zu einem dünnen Film getrocknet und dann wurden Spuren von Chloroform über Nacht unter Vakuum entfernt. Eine Lösung mit 1,7 mM Oligonukleotid wurde zu dem Lipidfilm gegeben, woraus sich eine Phospholipidkonzentration von näherungsweise 300 mM ergab, man ließ den Film sechs Stunden bei Raumtemperatur hydratisieren. Ein gleiches Volumen der Oligonukleotidlösung wurde dann dazugegeben und das Röhrchen wurde für näherungsweise für eine Minute verwirbelt. Als nächstes wurde die Mischung auf 75 mM Phospholipid mit Hepespuffer (25 mM Hepes, 140 mM NaCl, pH-Wert 7,4) verdünnt und während 2 Minuten beschallt. Die Liposomen wurden dann unter N<sub>2</sub>-Druck durch einen 200 nm Nucleopore Polycarbonatfilter in Hepespuffer entsprechend Olson et al. (Olson, F., Biochim. Biophys. Acta 557: 9–23 (1979)) extrudiert. Die Größe der Liposomen wurde durch dynamische Lichtstreuung unter Verwendung einer Brookhaven B190 Teilchengrößenbestimmungsvorrichtung (Brookhaven Instrument, Holtsville, NY) bestimmt. Freies Oligonukleotid wurde von Lipid-gebundenem Oligonukleotid durch Filtration durch eine Sepharose CL-4B (Pharmacia, Sweden)-Säule getrennt, die mit Hepespuffer äquilibriert worden war.

##### B. Herstellung von kationischen Liposomen mit einer PEG-Oberflächenbeschichtung

###### 1. Herstellung von <sup>32</sup>P-markiertem Oligonukleotid

[0110] Ein zu dem MDRI-Gen komplementäres 18-mer Phosphorthioat Oligonukleotid wurde von dem University Core DNA Services Lab an der University von Calgary (Calgary, AB) synthetisiert. Ein <sup>32</sup>P-markiertes Oligonukleotid wurde entsprechend dem allgemeinen Verfahren von Sambrook et al. (Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) hergestellt.

[0111] In Kürze, 100 ng Oligonukleotid wurde mit 50  $\mu$ Ci <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP (ICN Pharmaceuticals Inc., Irvine, CA), 5x's Hinreaktionspuffer und 10 Einheiten T4-Kinase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) auf ein Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l gemischt. Die Mischung wurde bei 37°C in einem Wasserbad während 45 Minuten inkubiert. Nach Inkubation wurden 80  $\mu$ l Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) zugegeben und dann wurde das Oligonukleotid unter Verwendung von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) (FisherBiotech, Fair Lawn, NJ) extrahiert. Freies <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP wurde durch Trennung auf einer Sephadex G-50 (Pharmacia, Sweden) Drehsäule entfernt.

###### 2. Liposomenherstellung

[0112] Das kationische Lipid 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama) wurde zum Extrahieren des 18-mer Phosphorthioatoligonukleotids durch eine Bligh und Dyer Monophase verwendet. Bis 700  $\mu$ g (näherungsweise 0,118  $\mu$ mol) 18-mer Oligonukleotid wurde in 250  $\mu$ l zweifach destilliertem H<sub>2</sub>O zuzüglich einer Spur <sup>125</sup>I- oder <sup>32</sup>P-markiertem Oligonukleotid verdünnt. In einem gesonderten Röhrchen wurden bis zu zwei  $\mu$ mol DOTAP auf 250  $\mu$ l in CHCl<sub>3</sub> verdünnt und 510  $\mu$ l MeOH wurden zugegeben. Das Oligonukleotid in zweifach destilliertem H<sub>2</sub>O wurde dann zu der DOTAP-enthaltenden CHCl<sub>3</sub>/MeOH-Mischung gegeben und die Probe wurde zur Bildung einer Monophase gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 250  $\mu$ l CHCl<sub>3</sub>, gefolgt von 250  $\mu$ l zweifach destilliertem H<sub>2</sub>O zugegeben. Das Röhrchen wurde kurz verwirbelt und dann mit 900 x g während 7 Minuten zentrifugiert. Das System bestand dann aus zwei Phasen und die obere wässrige Phase wurde entfernt und die Oligonukleotidmenge wurde entweder durch radioaktive Zählungen oder durch Messen der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Dieses Verfahren führte dazu, dass ~95% des Oligonukleotids in die organische Phase bei Verwendung eines Ladungsverhältnisses von 1 : 1 (+/-) (DOTAP : Oligonukleotid) extrahiert wurde.

[0113] Als nächstes wurde teilweise hydriertes Soja-Phosphatidylcholin (PC40), Cholesterin und mPEG-DSPE (alles in CHCl<sub>3</sub>) zu der organischen Phase gegeben, woraus sich ein molares Verhältnis von PC40 : Chol : DOTAP : mPEG-DSPE von 3 : 2 : 1 : 0,2 ergab. Nach Überführen in ein Glasteströhrchen wurde genügend zweifach destilliertes H<sub>2</sub>O so zugegeben, dass die Phospholipidkonzentration 20–30 mM in H<sub>2</sub>O betragen wür-

de und die Emulsion wurde verwirbelt und dann für annähernd eine Minute beschallt. Die organische Phase wurde dann unter Rotationsverdampfung bei näherungsweise 400 mmHg verdampft. Das System bildete nach Verdampfung des größten Teils der organischen Phase eine Gelphase und nach weiterer Verdampfung (manchmal unter leichtem Rühren) kehrte das System in die wässrige Phase zurück, die kurz verwirbelt wurde und dann weiter verdampft wurde. Die durch dieses Verfahren gebildeten Vesikel wiesen einen Durchmesser im Bereich von 600 bis 800 nm auf, die anschließend durch 400 und dann 200 nm Polycarbonatfilter extrudiert wurden.

[0114] Die Größe der Liposomen wurde durch dynamische Lichtstreuung unter Verwendung einer Brookhaven B190 Teilchengrößenbestimmungsvorrichtung (Brookhaven Instrument, Holtsville, NY) bestimmt. Die neutralen Liposomen wiesen einen mittleren Durchmesser von  $197 \pm 2$  nm (Polydispersität  $0,032 \pm 0,012$ ) auf, während die DOTAP kationischen Liposomen einen mittleren Durchmesser von  $188 \pm 1$  nm (Polydispersität  $0,138 \pm 0,018$ ) aufwiesen. Die Größe war in Puffer bei  $4^{\circ}\text{C}$  sowie in 25% FBS bei  $37^{\circ}\text{C}$  für mindestens drei Tage stabil (Daten sind nicht gezeigt).

[0115] Freies Oligonukleotid wurde von Lipid-gebundenen Oligonukleotid durch Filtration durch eine Sepharose CL-4B (Pharmacia, Sweden)-Säule getrennt, die mit Hepespuffer äquilibriert worden war. Die Fraktionierungsprofile für die kationischen Liposomen und die neutralen Liposomen sind in den **Fig. 4A** beziehungsweise **4B** gezeigt.

#### Beispiel 6

##### In vivo-Verabreichung der Liposomen

[0116] Weibliche ICR herausgezüchtete Mäuse (6–8 Wochen alt) wurden von Charles River bezogen und innerhalb 5 Wochen nach Lieferung verwendet, wobei zu dieser Zeit das Gewicht im Bereich von 24 bis 30 Gramm lag. Den Mäusen wurde eine einzelne Bolusinjektion über die Schwanzvene mit 0,2 ml Liposomen bei einer Lipiddosis von 0,5  $\mu\text{mol}$  Phospholipid pro Maus gegeben. Von jeder Injektion lagen die radioaktiven Zählungen im Bereich von 0,4 bis  $2 \times 10^5$  cpm. Zu spezifischen Zeitpunkten (0,25, 0,5, 1, 4, 12, 24 Stunden) wurden Mäuse (3 pro Gruppe) geopfert und die Organe wurden seziert, gewogen und radioaktive Zählungen wurden in einem Beckman Gamma 8000 Zähler bestimmt. Leber, Milz, Lunge, Herz, Niere, 100  $\mu\text{l}$  Blut und die Schilddrüse wurden seziert und gezählt und der Rest des Tieres (Karkasse) wurde ebenfalls gezählt. Die radioaktiven Zählungen wurden in jedem Gewebe und der Karkasse unter Verwendung von Blutkorrekturfaktoren, die vorher bestimmt worden waren, korrigiert. (Allen, T. M., U. C. L. A. Symposium on Molecular and Cellular Biology in Lopez Berestein, G. und Fidler, I., Herausgeber 89: 405–415, Alan R. Liss, New York). Die Blutzählungen wurden auf das Gesamtblutvolumen der Maus extrapoliert.

[0117] Die Ergebnisse für die in vivo-Verabreichung sind in den **Fig. 5, 6 und 7** gezeigt.

#### Patentansprüche

1. Liposom-Zusammensetzung, geeignet zur in vivo-Verabreichung eines Polynukleotids, umfassend eine wässrige Suspension von Liposomen, die hauptsächlich aus Liposomen mit einer Zweischichten-Lipidmembran aufgebaut sind, umfassend (i) kationische Vesikel-bildende Lipide, welche hauptsächlich in dem inneren Zweischichtenbereich angeordnet sind und das Polynukleotid umgeben, und (ii) neutrale Vesikel-bildende Lipide, welche hauptsächlich in dem äußeren Zweischichtenbereich angeordnet sind und eine Beschichtung um die kationischen Polynukleotid-Teilchen bilden, wobei die Liposome durch Verdampfen eines organischen Lösungsmittels von einer Emulsion, aufgebaut aus Polynukleotid-kationischen Lipidteilchen und neutralen Vesikel-bildenden Lipiden in einem nicht-ionischen wässrigen Lösungsmittel und dem organischen Lösungsmittel, erhältlich sind.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Polynukleotid aus der Gruppe, bestehend aus DNA, RNA und Fragmenten und Analogen davon, ausgewählt ist.

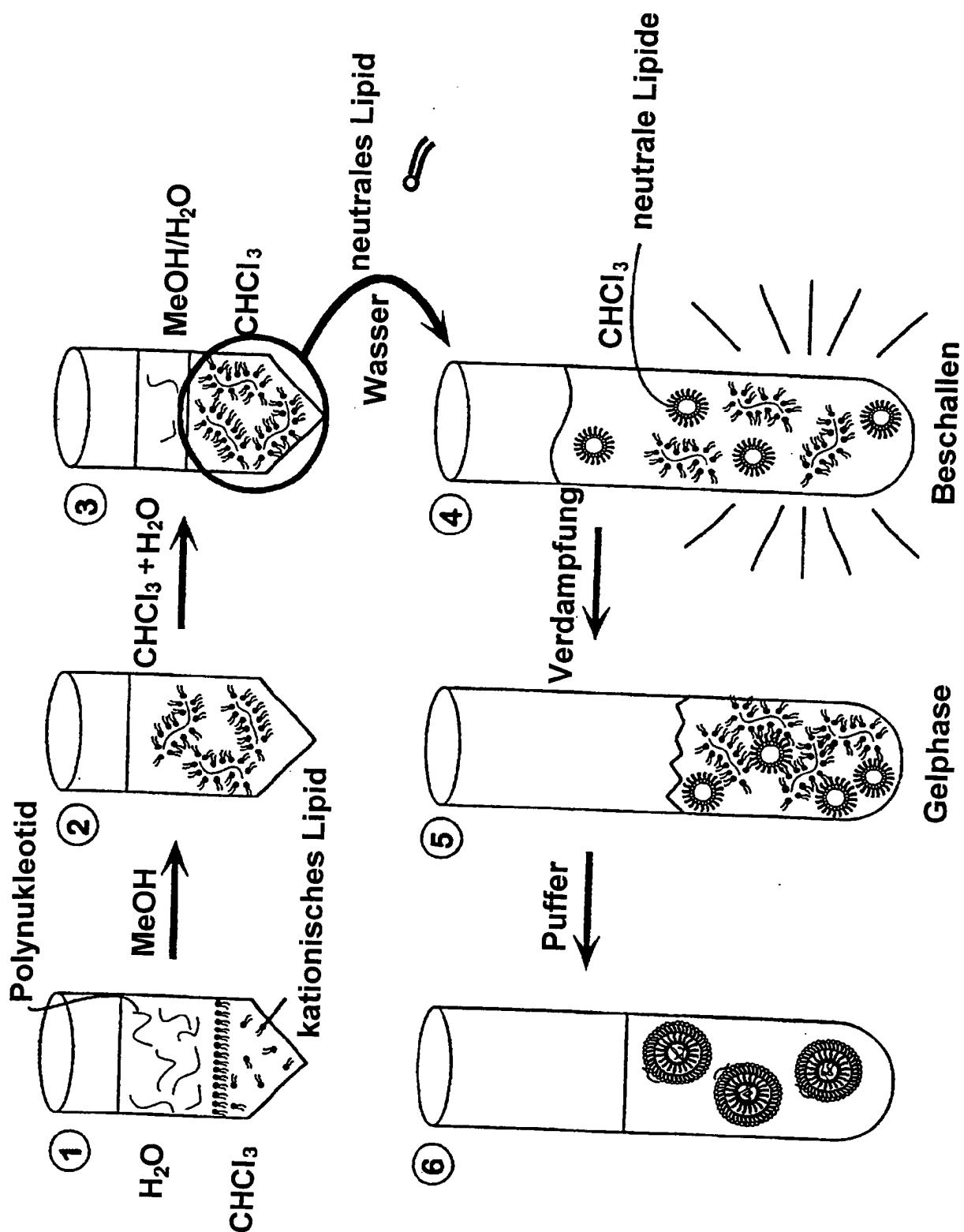
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Polynukleotid ein Antisense-Oligonukleotid ist.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das kationische Lipid aus der Gruppe, bestehend aus 1,2-Dioleyloxy-3-(trimethylamino)propan (DOTAP), N-[1-(2,3-ditetradecyloxy)propyl]-N,N-dimethyl-N-hydroxyethylammoniumbromid (DMRIE), N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N-dimethyl-N-hydroxyethyl-ammoniumbromid (DORIE), N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA), 3 $\beta$ -[N-(N',N'-Dimethylaminoethan)carbamoyl]cholesterin (DC-Chol) und Dimethyldioctadecylammonium (DDAB), ausgewählt ist.

5. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das neutrale Vesikel-bildende Lipid ein Phospholipid ist.

6. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die Liposome weiter ein neutrales Lipid einschließen, das mit einem hydrophilen Polymer derivatisiert ist, um eine Oberflächenbeschichtung von hydrophilen Polymerketten zu bilden.
7. Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei das hydrophile Polymer Polyethylenglykol ist.
8. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die Liposome eine Größe zwischen etwa 50–300 nm aufweisen.
9. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die Liposome weiter einen Liganden einschließen, der auf eine ausgewählte Stelle zielgerichtet ist.
10. Liposom-Zusammensetzung, geeignet zur in vivo-Verabreichung eines Polynukleotids, umfassend eine wäßrige Suspension von Liposomen, erhältlich durch (a) Herstellen von Polynukleotid-kationischen Lipidteilchen in einem organischen Lösungsmittel und (b) Mischen der Teilchen mit einem neutralen Vesikelbildenden Lipid in der Gegenwart eines nicht-ionischen wäßrigen Lösungsmittels unter Bildung einer Emulsion und (c) Verdampfen des organischen Lösungsmittels von der Emulsion unter Bildung von Liposomen mit (i) einer Zweischichten-Lipidmembran, umfassend kationische Vesikel-bildende Lipide, welche hauptsächlich in dem inneren Zweischichtenbereich angeordnet sind, und neutrale Vesikel-bildende Lipide, welche hauptsächlich in dem äußeren Zweischichtenbereich angeordnet sind, (ii) einen zentralen Kern mit einer inneren Oberfläche und (iii) das Polynukleotid, eingeschlossen in dem zentralen Kern und hauptsächlich auf der inneren Oberfläche lokalisiert.
11. Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei das Polynukleotid aus der Gruppe, bestehend aus DNA, RNA und Fragmenten davon, ausgewählt ist.
12. Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei das Polynukleotid ein Antisense-Oligonukleotid ist.
13. Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei die Liposome weiter ein neutrales Lipid einschließen, das mit einem hydrophilen Polymer derivatisiert ist, um eine Oberflächenbeschichtung von hydrophilen Polymerketten zu bilden.
14. Zusammensetzung nach Anspruch 13, wobei das hydrophile Polymer Polyethylenglykol ist.
15. Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei die Liposome eine Größe zwischen etwa 50–300 nm aufweisen.
16. Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei die Liposome weiter einen Liganden einschließen, der auf eine ausgewählte Stelle zielgerichtet ist.
17. Verfahren zum Einschließen eines Polynukleotids in Liposome, umfassend das Bilden von Polynukleotid-kationischen Lipidteilchen in einem Lipidlösungsmittel, geeignet zum Lösen des kationischen Lipids, durch (i) Lösen des Polynukleotids in einem nicht-ionischen Lösungsmittel, welches mit dem Lipidlösungsmittel nicht mischbar ist, (ii) durch Inkontaktbringen des Polynukleotids mit einer die Ladung neutralisierenden Menge an kationischem Lipid, gelöst in dem Lipidlösungsmittel, in der Gegenwart eines dritten Lösungsmittels, das wirksam ist, ein Einphasenlösungsmittelsystem zu bilden, (iii) durch Zugeben von zusätzlichem nicht-ionischen Lösungsmittel oder Lipidlösungsmittel zu dem Einphasensystem unter Bedingungen, die wirksam sind, ein Zweiphasensystem zu bilden, und (iv) durch Entfernen der nicht-ionischen Lösungsmittelphase, das Zugeben von neutralen Vesikel-bildenden Lipiden und einem nichtionischen wäßrigen Lösungsmittel zu dem Lipidlösungsmittel, enthaltend die Teilchen, unter Bildung einer Emulsion und das Verdampfen des Lipidlösungsmittels unter Bildung von Liposomen mit dem Polynukleotid darin eingeschlossen.
18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei das Lösen das Lösen des Polynukleotids in Wasser einschließt und das Inkontaktbringen das Inkontaktbringen mit kationischen Lipiden, gelöst in Chloroform, in der Gegenwart von Methanol einschließt.
19. Verwendung der Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung eines Medikaments.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen



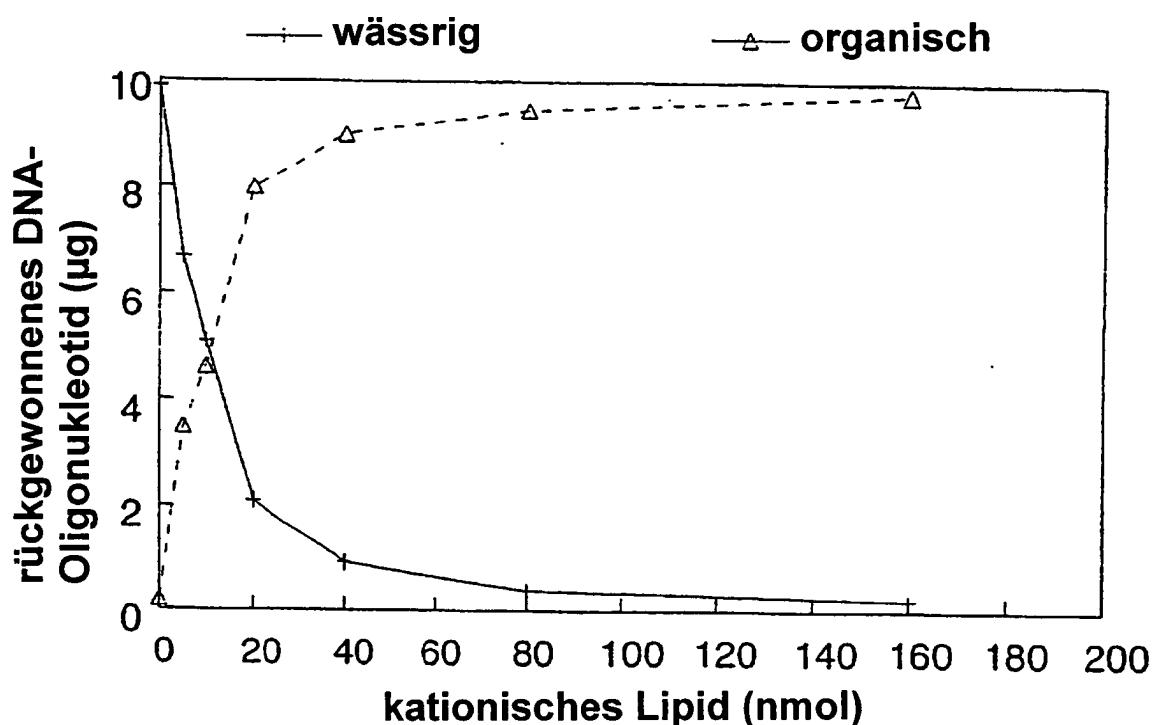


Fig. 2

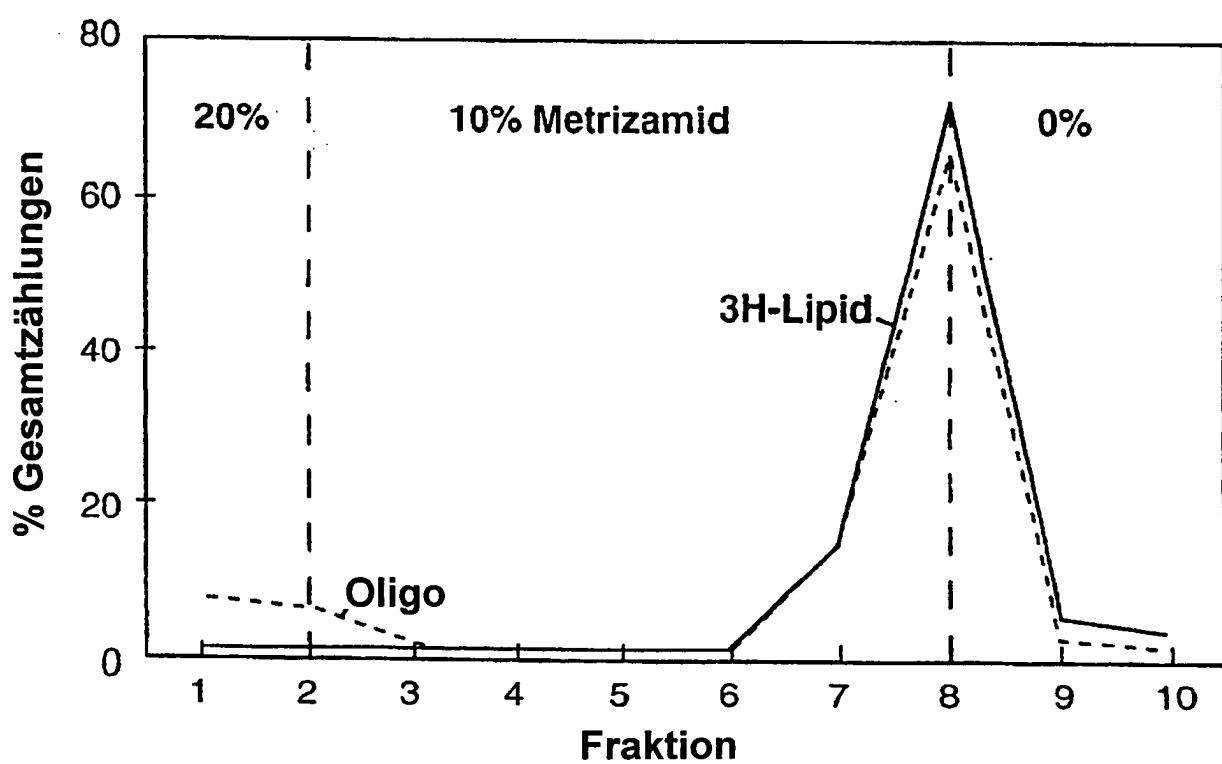
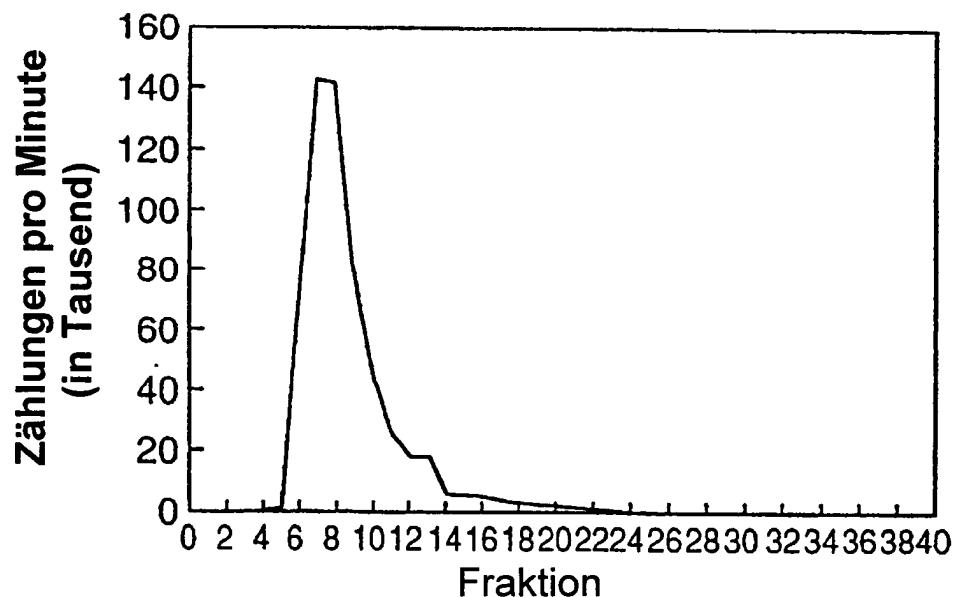
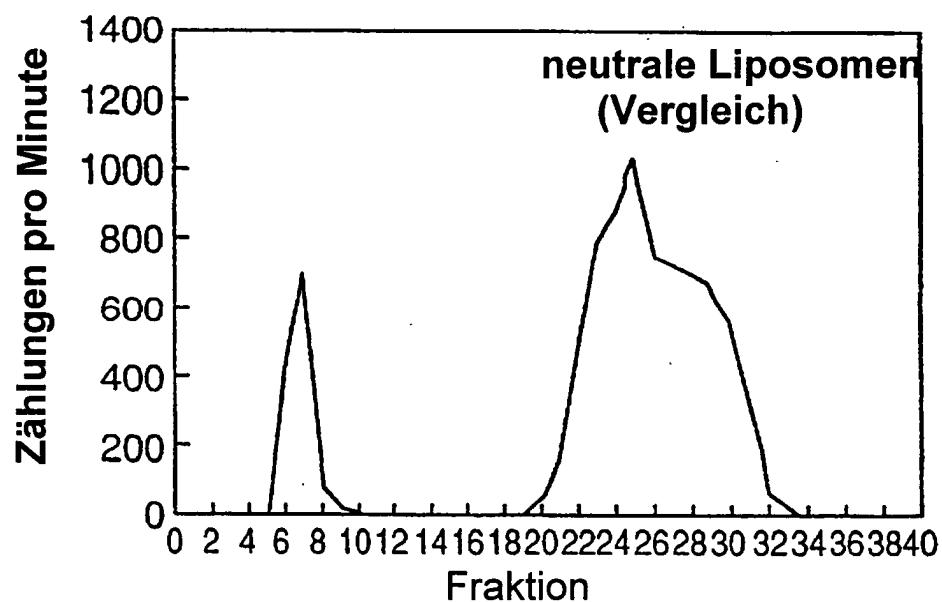


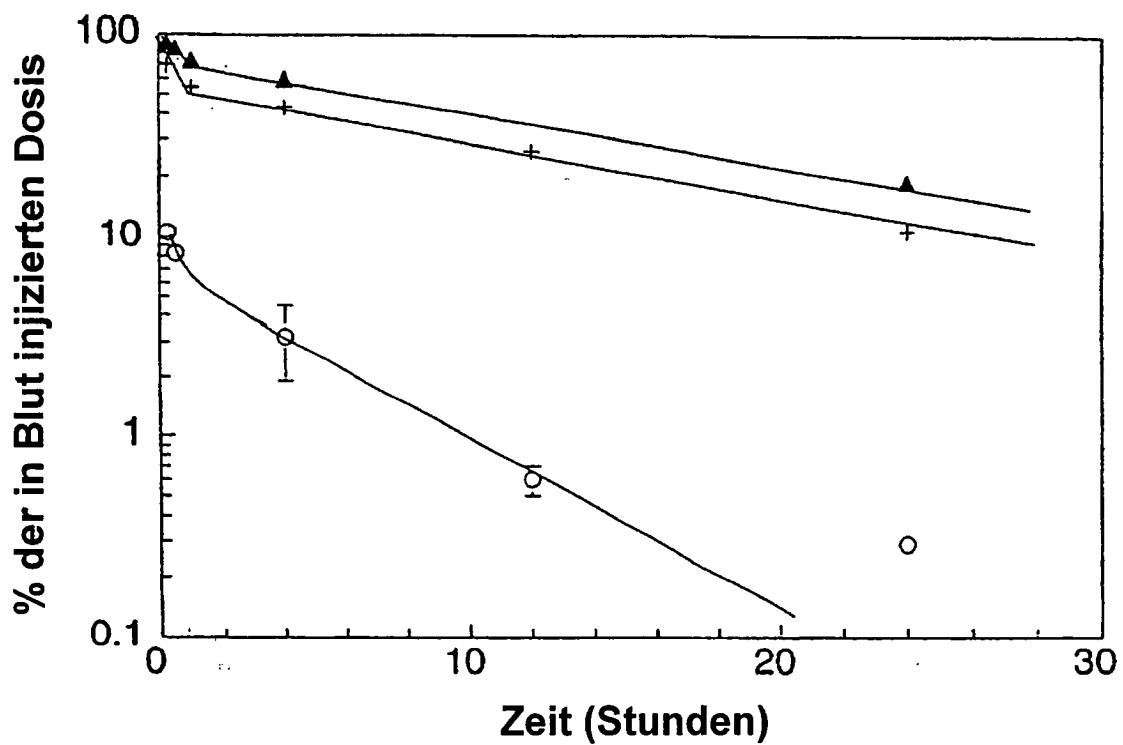
Fig. 3



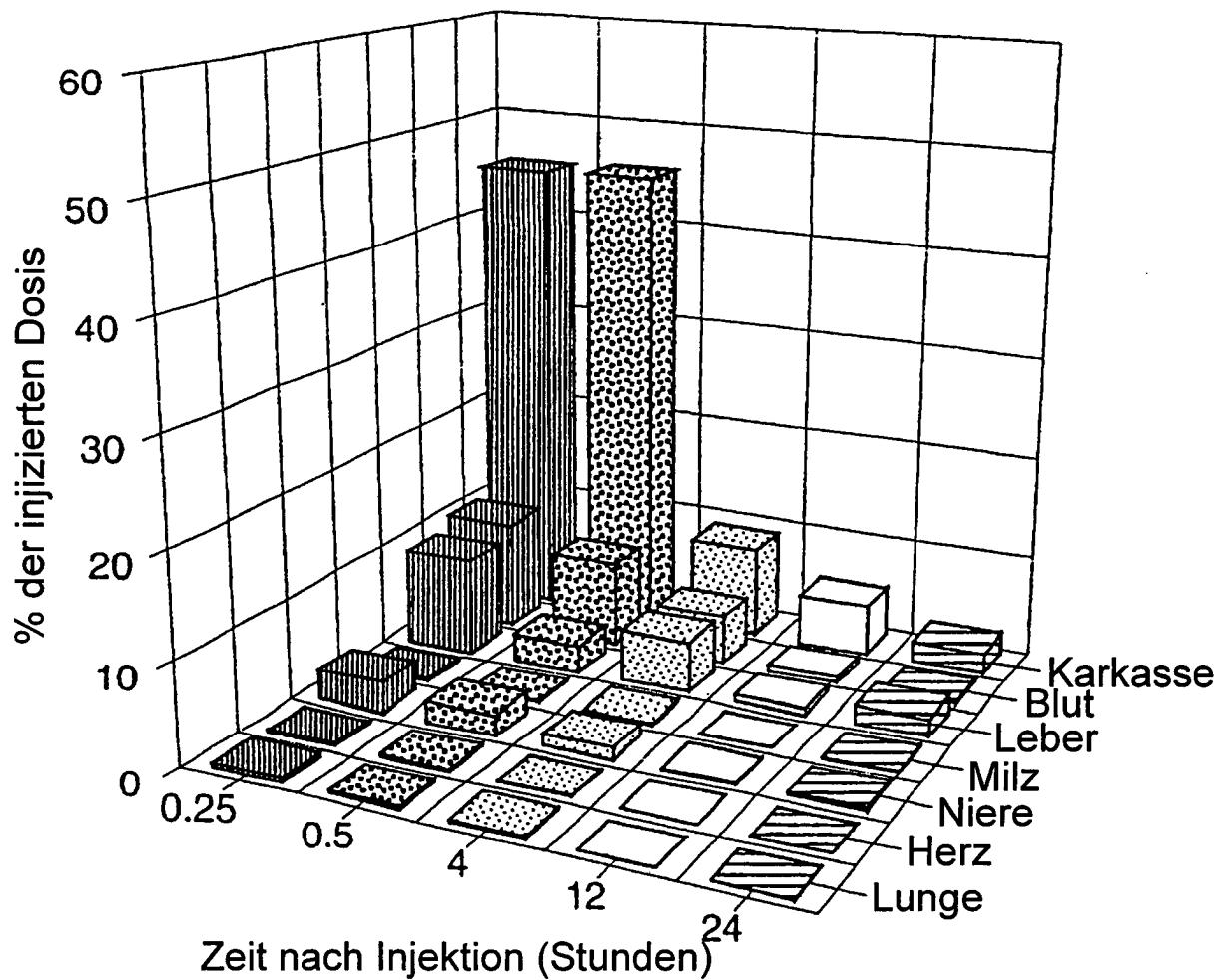
**Fig. 4A**



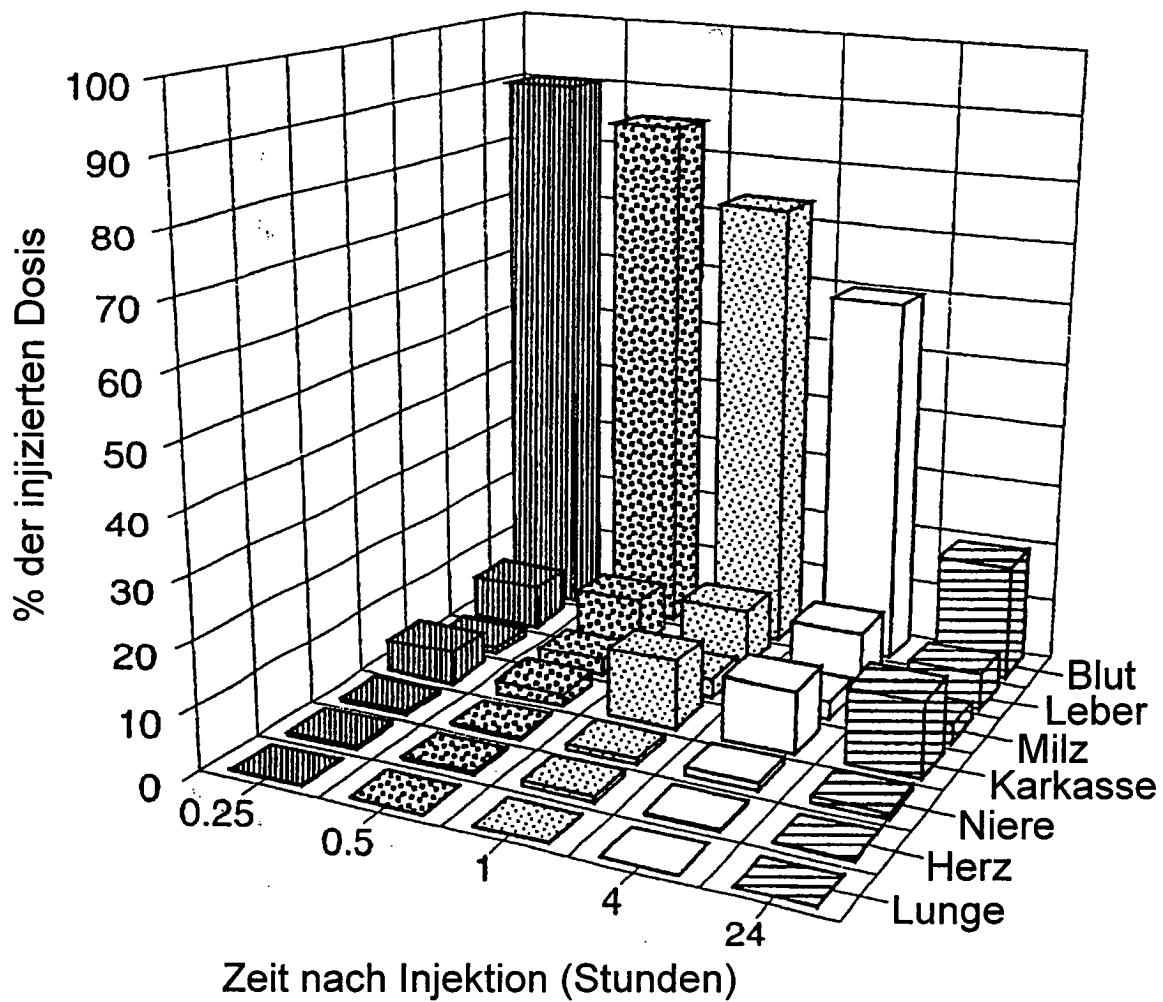
**Fig. 4B**



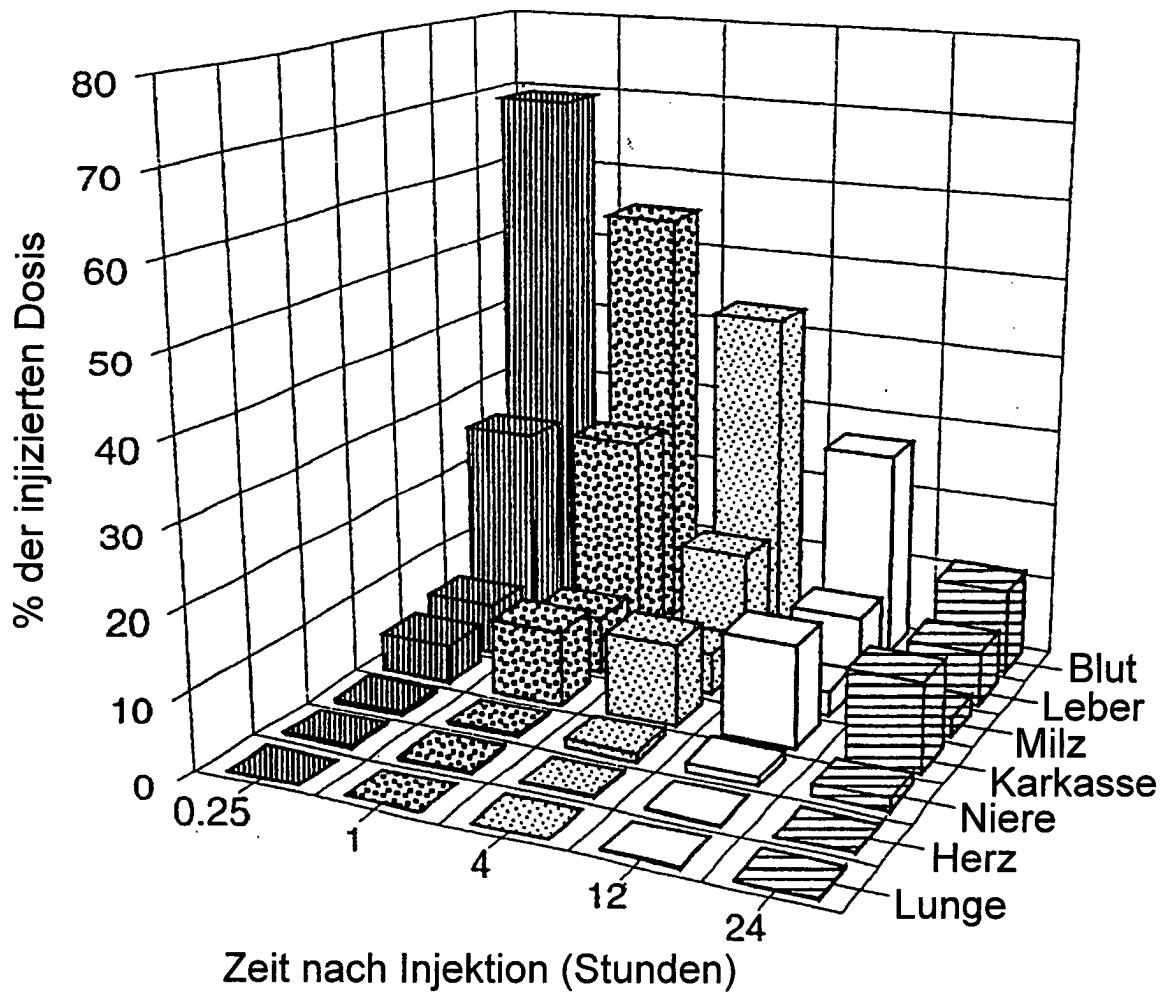
**Fig. 5**



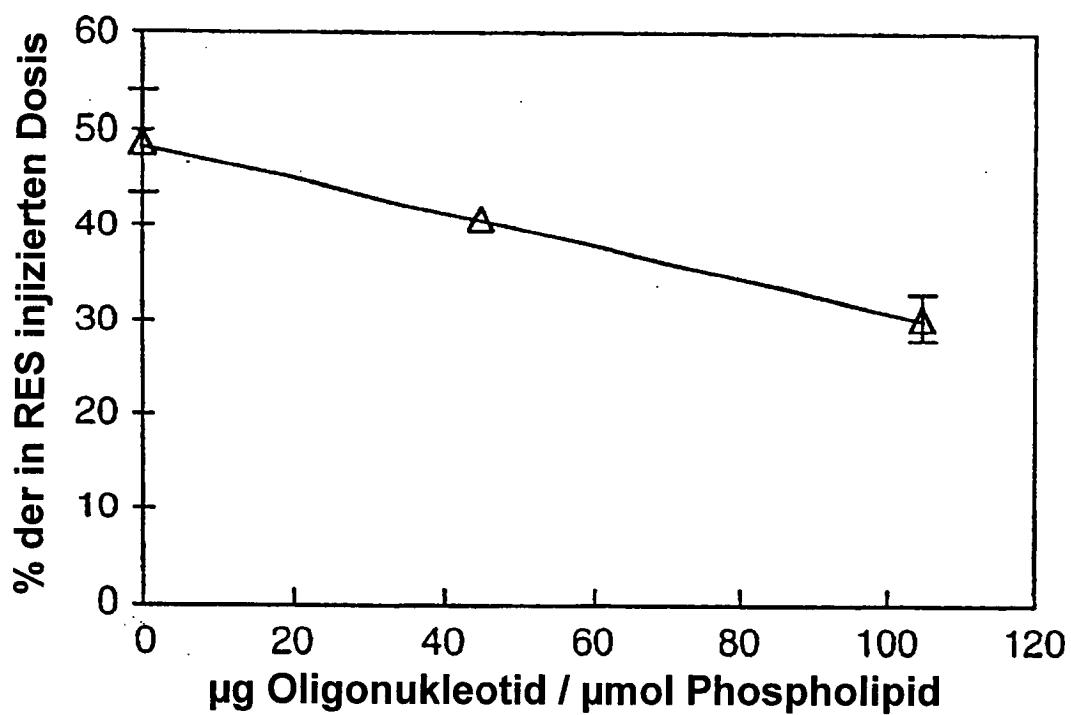
**Fig. 6A**



**Fig. 6B**



**Fig. 6C**



**Fig. 7**