

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

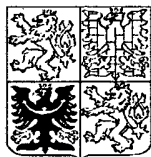
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1711-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04. 12. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **05.12.94**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/9414596**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18. 03. 98**
(Věstník č. 3/98)

(86) PCT číslo: **PCT/FR95/01595**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/17823**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 C	235/06
C 07 C	233/05
C 07 J	9/00
A 61 K	47/48
A 61 K	48/00
C 12 N	15/88

(71) Přihlašovatel:

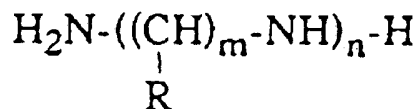
**RHONE-POULENC RORER S. A., Antony,
FR;**

(72) Původce:

**Byk Gerardo, Créteil, FR;
Dubertret Catherine, Sévres, FR;
Scherman Daniel, Paris, FR;**

(74) Zástupce:

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



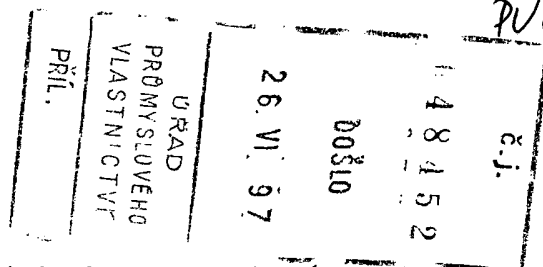
(54) Název přihlášky vynálezu:

Nová transfekční činidla a jejich farmaceutické aplikace

(57) Anotace:

Kationtové lipidy obecného vzorce I, farmaceutické kompozice obsahující tyto lipidy a jejich použití pro transfekci nukleových kyselin in vitro nebo in vivo do buněk.

CZ 1711-97 A3



Nová transfekční činidla a jejich farmaceutické aplikace

Oblast techniky

Vynález se týká nových sloučenin náležejících do skupiny lipopolyaminů, farmaceutických kompozic, které tyto sloučeniny obsahují, a jejich aplikace pro transfekci in vivo nebo/a in vitro nukleových kyselin.

Dosavadní stav techniky

Četná genetická onemocnění jsou spojena s chybnou nebo/a abnormální expresí (tj. deficitní nebo nadměrnou expresí) jedné nebo několika nukleových kyselin. Základním cílem genové terapie je korigovat tento typ genetických anomálií nepřímo buněčnou expresí in vivo nebo in vitro klonovaných genů.

V současné době existuje několik způsobů navržených pro intracelulární poskytnutí tohoto typu genetické informace. Jeden z těchto způsobů spočívá v použití chemických nebo biochemických vektorů. Syntetické vektory mají dvě základní funkce, a sice vázat DNA určenou k transfekci a podpořit její celulární fixaci, jakož i její průchod plasmovou membránou a případně oběma jádrovými membránami.

Významného pokroku v rámci tohoto transfekčního způsobu bylo dosaženo vývojem technologie založené na použití kationtového lipidu. Takto bylo prokázáno, že pozitivně nabitý kationtový lipid, kterým je N-/1-(2,3-dioleyloxy)propyl-/N,N,N-trimethylamoniumchlorid (DOTMA), spontánně interferuje ve formě liposomů nebo ve formě malých váčků s DNA, která je nabita záporně, za vzniku komplexů lipid-DNA, které jsou schopné sloučení s buněčnými membránami, a umožňuje tak intracelulární uvolnění DNA. Jakkoliv je však tato molekula účinná v úrovni transfekce, má nevýhodu spočívající v tom, že není biologicky odbouratelná a má vůči buňkám toxický charakter.

Po lipidu DOTMA byly vyvinuty další kationtové lipidy na bázi tohoto strukturního modelů: lipofilní skupina spojená s amino-skupinou prostřednictvím ramene, které bývá označováno jako "distanční člen". Z těchto kationtových lipidů lze obzvláště citovat lipidy obsahující jako lipofilní skupinu dvě mastné kyseliny nebo derivát cholesterolu a zahrnující kromě toho případně jako amino-skupinu kvartérní amoniovou skupinu. Jako reprezentativní zástupci této kategorie kationtových lipidů mohou být zejména citovány DOTAP, DOBT nebo ChOTB. Další sloučeniny, jako například DOSC a ChOSC, jsou charakterizovány přítomností cholinové skupiny namísto kvartérní amoniové skupiny. Obecně však zůstává transfekční účinnost těchto sloučenin dosti nízká.

Rovněž byla popsána další kategorie kationtových lipidů, kterými jsou lipopolyaminy. V tomto typu sloučenin je kationtová skupina reprezentována L-5-karboxysperminovým radikálem, který obsahuje čtyři amoniové skupiny, z nichž dvě jsou primárními skupinami a dvě sekundárními skupinami. Součástí této skupiny sloučenin jsou zejména DOGS a DPES. Tyto lipopolyaminy jsou zejména účinné pro transfekci primárních endokrinních buněk.

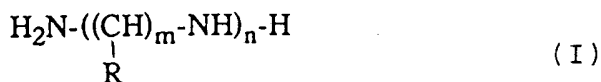
Ve skutečnosti by ideální syntetické transfekční činidlo mělo vykazovat vysokou míru transfekce a současně by mělo mít pro široké spektrum buněk nulovou toxicitu nebo alespoň velmi minimalizovanou toxicitu při aplikačních dávkách, přičemž takové ideální transfekční činidlo by mělo být biologicky odbouratelné za účelem eliminace všech sekundárních účinků v úrovni ošetřených buněk.

Cílem vynálezu je navrhnout nové sloučeniny, které by byly schopné účinného použití při transfekci in vitro nebo in vivo buněk a zejména pro vektorizaci nukleových kyselin.

Podstata vynálezu

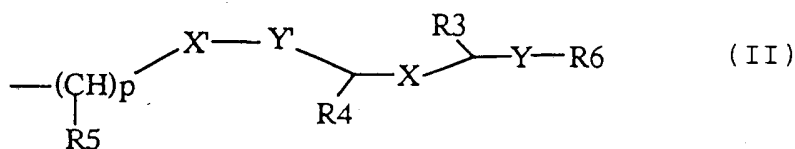
Prvním předmětem vynálezu jsou lipopolyaminy ve formě

D, L nebo DL a jejich soli, reprezentované obecným vzorcem I



ve kterém

- m znamená celé číslo od 2 do 6,
 n znamená celé číslo od 1 do 9 a výhodněji od 1 do 5,
 přičemž v případě, že n znamená celé číslo od 2 do 9,
 potom v obecném vzorci je přítomna jediná skupina R
 odlišná od vodíku, a m má proměnné nebo identické hodnoty
 ve skupinách $-(\text{CH})_m-$ nebo $-(\text{CH}_2)_m-$,
 $\begin{array}{c} | \\ \text{R} \end{array}$
 R znamená atom vodíku nebo skupinu obecného vzorce II

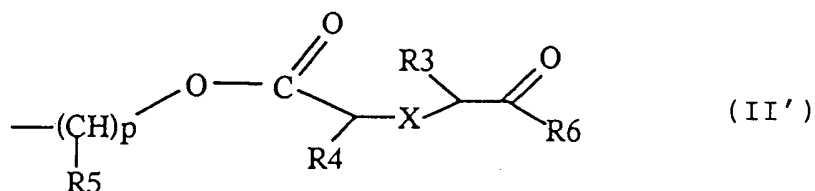


ve kterém

- X a X' znamenají nezávisle jeden na druhém atom kyslíku,
 methylenovou skupinu $-(\text{CH}_2)_q-$, kde q znamená 0, 1, 2
 nebo 3, nebo amino-skupinu $-\text{NH}-$ nebo $\text{NR}'-$, kde R' zna-
 mená alkylovou skupinu obsahující 1 až 4 uhlíkové ato-
 my,
 Y a Y' znamenají nezávisle jeden na druhém methylenovou sku-
 pinu, karbonylovou skupinu nebo skupinu C=S,
 R₃, R₄ a R₅ znamenají nezávisle jeden na druhém atom vodíku
 nebo substituovanou nebo nesubstituovanou alkylovou
 skupinu obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy,
 p znamená číslo od 0 do 5 a
 R₆ znamená cholesterolový derivát nebo alkylamino-skupinu

$-NR_1R_2$, ve které R_1 a R_2 znamenají nezávisle jeden na druhém nasycenou nebo nenasycenou, lineární nebo rozvětvenou alifatickou skupinu obsahující 12 až 22 uhlíkových atomů.

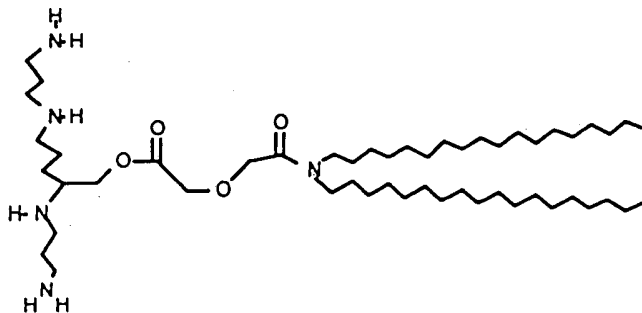
Obzvláště zajímavé jsou sloučeniny, ve kterých R znamená skupinu obecného vzorce II'

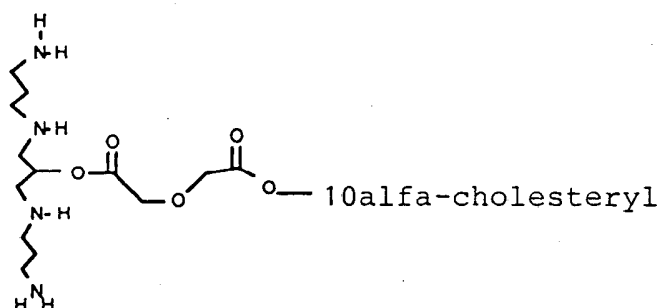
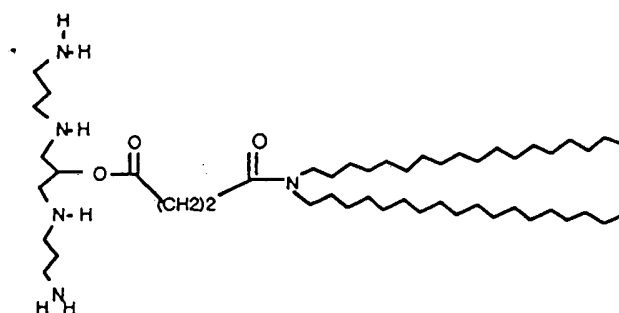
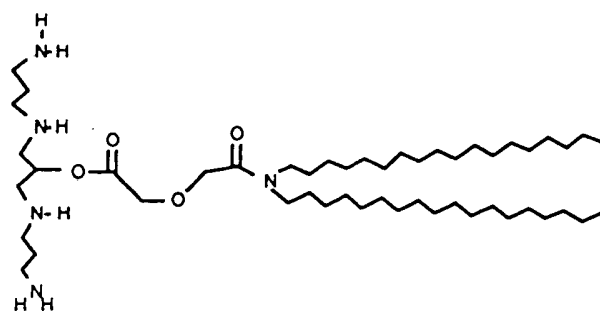


ve kterém R_3 , R_4 , R_5 , R_6 a p mají výše uvedené významy a X znamená atom kyslíku nebo skupinu $-(\text{CH}_2)_q-$, ve které q znamená nulu.

Tato skupina sloučenin je zejména charakterizovaná přítomností vnitřní esterové vazby, která je zajímavá s ohledem na biologickou odbouratelnost uvedených sloučenin.

Jako výhodné lipopolyaminy podle vynálezu lze zejména uvést následující sloučeniny:





ve formě D, L nebo DL nebo ve formě některé z jejich solí.

Předmětem vynálezu je rovněž terapeutické použití lipopolyaminů podle vynálezu a to buď přímo nebo v rámci farmaceutických kompozic.

Jak již bylo vysvětleno výše, ukázalo se, že sloučeniny obecného vzorce I jsou obzvláště zajímavé pro transfekci in vitro a in vivo nukleových kyselin. Tyto sloučeniny pevně váží DNA a výhodně vykazují velmi nízkou, ba i nulovou toxicitu vůči ošetřeným buňkám. Kromě toho jsou uvedené slou-

čeniny biologicky odbouratelné a to zejména hydrolýzou jejich esterové vazby.

Pro dosažení maximálního účinku kompozic podle vynálezu se příslušná množství sloučeniny obecného vzorce I a nukleové kyseliny výhodně určí tak, aby bylo dosaženo optimálního poměru R, vyjádřeného pozitivními náboji uvažovaného lipopolyaminu na negativní náboje uvedené nukleové kyseliny. Tento optimální poměr, který se mění zejména podle způsobu použití (in vivo nebo in vitro) a podle transfekovaného buněčného typu, se optimalizuje případ od případu. Tato optimalizace je zcela v kompetenci příslušného odborného pracovníka.

V kompozicích podle vynálezu může být polynukleotidem jak kyselina desoxyribonukleová, tak i kyselina ribonukleová. Může se jednat o sekvence přírodního nebo umělého původu a zejména o genomovou DNA, DNAC, RNAM, RNAt, RNAr, o hybridní sekvence nebo o syntetické nebo polosyntetické sekvence. Tyto nukleové kyseliny mohou být lidského, zvířecího, rostlinného, bakteriálního, virálního nebo jiného původu. Sekvence mohou být získány libovolnou známou technikou, zejména vytríděním bank, chemickou syntézou nebo také komplexními metodami zahrnujícími chemickou nebo enzymatickou modifikaci sekvencí získaných vytríděním bank. Sekvence mohou být jinak zabudovány do vektorů, jakými jsou plasmidové vektory.

Pokud jde o desoxyribonukleové kyseliny, mohou mít tyto kyseliny jednoduchý nebo dvojitý řetězec. Uvedené desoxyribonukleové kyseliny mohou nést terapeutické geny, regulační sekvence transkripce nebo replikace, modifikované nebo nemodifikované antimediatorové sekvence, vazebné oblasti k dalším buněčným složkám, atd..

Terapeutickým genem se v rámci vynálezu zejména rozumí každý gen kódující proteinový produkt mající terapeutický účinek. Takto kódovaným proteinovým produktem může být protein, peptid, atd.. Tento proteinový produkt může mít homologový

charakter vůči cílové buňce (tj. produkt, který je normálně exprimován v cílové buňce v případě, že tato buňka nevykazuje žádnou patologii). V tomto případě, uvedená exprese proteinu například umožňuje léčit nedostatečnou expresi uvedeného proteinu v buňce nebo expresi neaktivního proteinu nebo málo aktivního proteinu nebo také exprimovat nadměrnou tvorbu uvedeného proteinu. Uvedený terapeutický gen může také kódovat mutant buněčného proteinu mající zvýšenou stabilitu, modifikovanou aktivitu, atd.. Proteinový produkt může mít také heterogenní charakter vůči cílové buňce. V tomto případě může exprimovaný protein například doplňovat nebo poskytovat deficitní aktivitu v buňce, v důsledku čehož je buňka schopna bojovat proti uvažované patologii nebo je tímto mechanismes stimulována její imunitní odezva.

Z uvedených terapeutických produktů lze zejména uvést: enzymy, krevní deriváty, hormony, lymfokiny: interleukiny, interferony, TNF, atd. (FR 9203120), růstové faktory, neurotransmitory nebo jejich prekurzory nebo syntézní enzymy, trofické faktory: BDNF, CNTF, NGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pleiotrophin, ats., dystrophin nebo minidystrophin (FR 9111947), protein CFTR sdružený s mukoviscidosou, geny suprimující nádory: p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, atd. (FR 93 04745), geny kódující faktory uplatňující se při koagulaci: faktory VII, VIII, IX, geny intervenující v reparaci DNA, sebevražděné geny (thymidin-kináza, cytosin-deamináza), geny hemoglobinu a další proteinové transportéry, geny odpovídající proteinům uplatňujícím se při metabolismu lipidů apolipoproteinového typu zvolené z množiny zahrnující apolipoproteiny A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J, metabolické enzymy, jako například lipoprotein-lipáza, hepatická lipáza, lecitin-cholesterol-acyltransferáza, 7alfa-cholesterol-hydroxyláza, kyselina fosfatidová-fosfatáza, nebo také transferové proteiny lipidů, jako transferový protein esterů cholesterolu a transferový protein fosfolipidů, vazebný protein HDL, nebo ještě receptor zvolený například z množiny zahrnující receptory LDL, receptory chylomikrons-remnantů a scavenger-

vé receptory, atd..

Terapeutickou nukleovou kyselinou může být rovněž gen nebo antimediatorová sekvence, jejichž exprese v cílové buňce umožňuje regulovat expresi genů nebo transkripci buněčných RNAM. Takové sekvence mohou být například přepsány v cílové buňce na komplementární RNA od buněčných RNAM a blokovat takto jejich translaci na protein technikou popsanou v evropském patentovém dokumentu EP 140 308. Uvedené terapeutické geny rovněž obsahují sekvence kódující ribozomy, které jsou schopné selektivně rozložit RNA cílových buněk (EP 321 201).

Jak již bylo uvedeno výše, může nukleová kyselina rovněž zahrnovat jeden nebo několik genů kódujících antigenový peptid, který je schopný generovat u člověka nebo zvířete imunitní odezvu. V rámci tohoto specifického způsobu provedení vynálezu vynález tudíž umožňuje realizaci buď vakcín nebo imunoterapeutického ošetření u člověka nebo zvířete, zejména proti mikroorganismům, virům nebo rakovinám. Může se zejména jednat o specifické antigenové peptidy Epstein-Barrova viru, viru HIV, viru hepatitidy B (EP 185 573), viru pseudo-vztekliny, syncytia-tvorného viru a ostatních virů nebo také specifických nádorových virů (EP 259 212).

Nukleová kyselina rovněž výhodně obsahuje sekvence umožňující expresi terapeutického genu nebo/a genu kódujícího antigenový peptid v buňce nebo požadovaném orgánu. Může se jednat o sekvence, které jsou přirozeně zodpovědné za expresi uvažovaného genu v případě, že jsou tyto sekvence schopné funkce v infikované buňce. Může se rovněž jednat o sekvence odlišného původu (sekvence zodpovědné za expresi dalších proteinů nebo dokonce syntetické sekvence). Zejména se může jednat o promoční sekvence eukaryotických nebo virálních genů. Může se například jednat o promoční sekvence pocházející z genomu buňky, která má být infikována. Stejně tak se může jednat o promoční sekvence pocházející z genomu viru. V tomto ohledu lze například citovat promotory genů E1A, MLP, CMV,

RSv, atd.. Kromě toho mohou být tyto expresní sekvence modifikovány přidáním aktivačních sekvencí, regulačních sekvencí, atd.. Může se také jednat o induktibilní nebo represibilní promotor.

Jinak může nukleová kyselina rovněž obsahovat, a to zejména před terapeutickým genem, signální sekvenci řídící syntetizovaný terapeutický produkt do sekrečních cest cílové buňky. Touto signální sekvencí může být přirozená signální sekvence terapeutického produktu, i když se rovněž může jednat o libovolnou jinou funkční signální sekvenci nebo o umělou signální sekvenci. Nukleová kyselina může rovněž zahrnovat signální sekvenci řídící syntetizovaný terapeutický produkt do specifické oblasti buňky.

V rámci další formy provedení se vynález týká kompozic obsahujících nukleovou kyselinu, lipopolyamin, který je nárokován a přísadu schopnou spojit se s komplexem lipopolyamin-nukleová kyselina a zlepšit tak transfekční potenci uvedeného komplexu. Přihlašovatel ve skutečnosti prokázal, že transfekční potence lipopolyaminů může být neočekávaně zvýšena v přítomnosti některých přísad (například v přítomnosti lipidů nebo proteinů), které jsou schopné přidružit se k uvedenému komplexu tvořeného lipopolyaminem a nukleovou kyselinou.

Výhodněji kompozice podle vynálezu obsahují jako přísadu jeden nebo několik neutrálních lipidů. Takové kompozice jsou obzvláště výhodné zejména v případech, kdy je poměr R nízký. Přihlašovatel skutečně prokázal, že přidavek neutrálního lipidu umožňuje zlepšit tvorbu nukleolipidových částic a překvapivě příznivě ovlivnit proniknutí takové částice do buňky po destabilizaci její membrány.

Výhodněji jsou neutrálními lipidy použitými v rámci vynálezu lipidy se dvěma mastnými řetězci.

Obzvláště výhodně se používají přírodní nebo syntetické lipidy, mající zwiterionový charakter nebo jsoucí zbaveny

za fyziologických podmínek iontového náboje. Takový lipid může být například zvolen z množiny zahrnující diolelylfosfatidylethanolamin (DOPE), oleoyl-palmitoylfosfatidylethanolamin (POPE), di-stearoyl, -palmitoyl nebo -mirystoylfosfatidylethanolaminy, jakož i jejich 1 až 3 krát N-methylované deriváty, fosfatidylglyceroly, diacylglyceroly, glykosyldiacylglyceroly, cerebrosidy (zejména galaktocerebrosidy), sfingolipidy (zejména sfingomyeliny) nebo také asialogangliosidy (zejména asialoGM1 a GM2).

Tyto jednotlivé lipidy mohou být získány buď syntézou nebo extrakcí z orgánů (například z mozku) nebo z vajec klasickými a odborníkům dobře známými metodami. Extrakce lipidů může být zejména provedena za použití organických rozpouštědel (viz rovněž Lehninger, Biochemistry).

Kompozice podle vynálezu výhodně obsahují 0,1 až 20 ekvivalentů přísady na jeden ekvivalent sloučeniny obecného vzorce I a výhodně 1 až 5 ekvivalentů přísady na jeden ekvivalent sloučeniny obecného vzorce I.

Kompozice podle vynálezu mohou být formulovány způsobem vhodným pro topickou, kutánní, perorální, rektální, vaginální, parenterální, intranasální, intravenózní, intramuskulární, subkutánní, intraokulární, transdermální a jinou aplikaci. Výhodně farmaceutické kompozice podle vynálezu obsahují nosič, který je farmaceuticky přijatelný pro injikovatelnou formuaci, zejména pro přímou injekci v úrovni požadovaného orgánu nebo pro podání topickou cestou (na kůži nebo/a na sliznici. Může se jednat zejména o sterilní isotonické roztoky nebo o suché kompozice, zejména o lyofilizované kompozice, které po přidání buď sterilizované vody nebo fyziologického roztoku poskytují injikovatelné roztoky. Dávky nukleové kyseliny použité pro takovou injekci a počet podání mohou být zvoleny v závislosti na různých faktorech, zejména na použitém způsobu podání, na ošetřovaném patologickém stavu, na genu,

který má být exprimován nebo také na požadované délce léčení. Pokud jde o způsob podání, může se jednat buď o přímou injekci do tkáně nebo o ošetření buněk v kultuře a následnou re-implantaci těchto buněk in vivo, injekcí nebo roubem.

Vynález takto poskytuje obzvláště výhodný způsob léčení nemocí spočívající v podání in vivo nebo in vitro nukleové kyseliny schopné korigovat uvedenou nemoc a sdružené se sloučeninou obecného vzorce I za výše definovaných podmínek. Tento způsob je zejména použitelný v souvislosti s nemocemi, ke kterým dochází v důsledku nedostatku proteinového nebo nukleového produktu, přičemž podaná nukleová kyselina kóduje uvedený proteinový produkt nebo obsahuje uvedený nukleový produkt.

Vynález se vztahuje na jakékoliv použití lipopolyaminu podle vynálezu pro transfekci in vivo nebo in vitro buněk.

V následující části popisu bude vynález blíže popsán pomocí příkladů jeho konkrétních provedení, přičemž tyto příklady mají pouze ilustrační charakter a nikterak neomezují rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen definicí patentových nároků.

Příklady provedení vynálezu

Zkratky a symboly

AcOEt	:	ethylacetát
BOP	:	benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)fosfonium-hexafluorofosfát
DCC	:	dicyklohexylkarbodiimid
DCU	:	dicyklohexylmočovina
DMAP	:	4-dimethylaminopyridin
DMF	:	dimethylformamid
DMSO	:	dimethylsulfoxid

DODA	:	dioktadecylamin
EP	:	petrolether
EtOH	:	ethanol
NEt ₃	:	triethylamin
R _f	:	retenční koeficient
TFA	:	kyselina trifluoroctová
THF	:	tetrahydrofuran
TMS	:	tetramethylsilan

Látky a metody

A) Použité produkty

DODA, NEt₃, TFA, ornitin, tetramethylamoniumhydroxid, Raneyův nikl a diglykolanhydrid pochází od firmy Fluka; BOP pochází od firmy Propeptide France; DMAP, isobutylchlorformiát a N-methylmorfolin pocházejí od firmy Aldrich, zatímco THF pochází od firmy Merck. Všechna ostatní použitá rozpouštědla jsou produkty firmy RP Prolabo. Roztoky chloridu sodného a hydrogenuhlíčitanu sodného jsou nasycenými roztoky, zatímco v případě roztoku hydrogensíranu draselného se jedná o 0,5M roztok.

B) Fyzikální měření

Protonová nukleární magnetickorezonanční spektra (¹H-NMR) byla získána za použití spektrometru Bruker. Chemické posuny jsou vyjádřeny v ppm vzhledem k TMS.

C) Chromatografie na silikagelu

a) Chromatografie na tenké vrstvě (CCM) se provádí na deskách silikagelu Merck o tloušťce 0,2 mm.

Vyvolání:

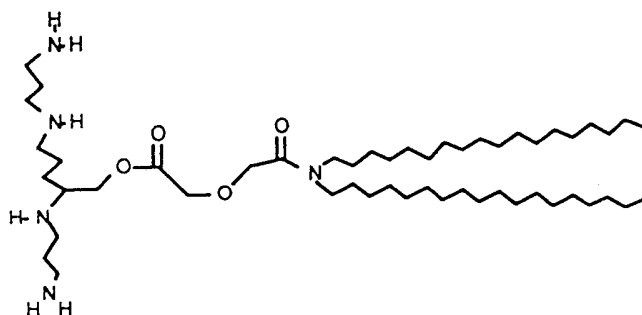
- v ultrafialovém světle při použití vlnové délky 254 nm,
- ninhydrinem: odpařuje se (lehký sprej) ethanolický roztok ninhydrinu (40 mg/100 ml EtOH) za účelem vyvolání aminů nebo amidů při zahřívání na teplotu 150 °C,

- fluorescaminem: odpařuje se acetonový roztok (40 mg/100 ml acetonu) za účelem vyvolání primárních aminů,
- jodem: deska se popráší práškovým jode..

b) Chromatografie v koloně se provádí na silikagelu 60 Merck majícím granulometrii 0,063-0,200 mm.

Příklad 1

Syntéza 2,5-bis-(3-aminopropylamino)pentyl-(dioktadecylkarbamoylmethoxy)acetátu



1.a Příprava tetramethylamonium-2,5-bis-(2-kyanoethylamino)-pentanoátu

Monohydrochlorid kyseliny 2,5-diaminopentanové (L-ornitin) (6,74 g, 40 mmolů) a pentahydrát tetramethylamoniumhydroxidu (14,48 g, 80 mmolů) se uvedou do roztoku v methanolu (20 ml). Vytvořená voda a methanol se odpaří za sníženého tlaku (za použití olejového čerpadla) do té míry, že se získá suchý zbytek.

K získaným solím se přidá N,N-dimethylformamid (30 ml). Získaná směs se odplyní za použití dusíku, načež se intenzivně míchá po dobu deseti minut, což má za následek rozpuštění tetramethylamonium-2,5-diaminopentanoátu (zatímco tetramethylamoniumchlorid zůstane suspendován v DMF).

Potom se přidá akrylonitril (6 ml, 85,6 molu), přičemž tento přírůstek se provede po kapkách. Baňka se mírně zahřeje. Reakční směs se potom ponechá po dobu jedné hodiny pod dusíkovou atmosférou při okolní teplotě. Směs se potom zfiltruje za účelem odstranění tetramethylamoniumchloridu. DMF se po-

tom odpaří za sníženého tlaku. Získaný zbytek je tvořen olejovitou tekutinou, která po odvedení z rotační odparky ztuhne. Přidá se acetonitril (100 ml) a baňka se mírně zahřívá až k získání průsvitného roztoku. Potom se přidá THF až k získání zakaleného roztoku. Baňka se potom přechovává po dobu dvou dnů v mrazničce, načež se tetramethylamoniová sůl kyseliny L-2,5-bis-(2-kyanoethylamino)pentanové izoluje filtrací ve formě bílého pevného produktu. Tento produkt se na fritě promyje THF a potom vysuší nas oxidem fosforečným. Získá se 6,06 g produktu, což představuje výtěžek surového produktu 49 %.

1.b Příprava tetramethylamoniové soli kyseliny 2,5-bis-(3-aminopropylamino)pentanové (1.b)

Produkt získaný ve stupni 1.a se rozpustí ve směsi ethanolu (18 ml), vody (2 ml) a 2M hydroxidu draselného (5 ml). Získaný roztok se propláchne argonem. Potom se přidá Raneyův nikl (2 ml suspenze od firmy Fluka). Hydrogenace se provede v autoklávu vypláchnutém dusíkem při teplotě 26 °C. Po 3 hodinách klesne tlak z 5,06 na 4,47 MPa, načež se tlak stabilizuje po dobu delší než 1 hodina. Autokláv má obsah 250 ml a objem reakční směsi činí 30 ml. Získaná suspenze se zfiltruje, promyje vodou a zavede do rotační odparky. Získá se žlutý olej. Test na fluorescamin je pozitivní.

1.c Příprava kyseliny 2,5-bis-/terc.butoxykarbonyl-/3-(terc.butoxykarbonylamino)propyl/amino/pentanové (1.c)

Produkt získaný ve stupni 1.b se rozpustí v dioxanu (30 ml). K získanému roztoku se přidá di-terc.butyldikarbonát (17,46 g, 80 mmolů). Získaná směs se míchá přes noc. Dioxan se potom odpaří. Přidá se hydrogensíran draselný. Produkt se potom extrahuje CHCl_3 (3 x 100 ml). Organická fáze se potom postupně promyje roztokem hydrogenuhličitanu sodného (pH = 7,5) a roztokem chloridu sodného, načež se vysuší nad síranem hořečnatým a odpaří za sníženého tlaku. Získá se

10 g produktu (15,4 mmolu, což odpovídá výtěžku 39 %, vztaženo na ornitin.

Vysokotlaká sloupcová chromatografie: MeCN/H₂O: 0,3 min 50% MeCN, 3-20 min 50-100% MeCN, 20-40 min 100% MeCN, K'=7,96 (kolona RP-18, průtok = 1 ml/min),

chromatografie na tenké vrstvě: R_f (CHCl₃:AcOEt = 95:5 objemově) = 0,28,

¹H-NMR (ppm): 1,3(m, 8H, N+CH₂-CH₂-CH₂-CHN+COO/2x N+CH₂CH₂-CH₂N+),
2,7-3,0(m.10 H 5x N+CH₂),
3,8(t,1H,N+CHCOO),

hmotové spektrum: MH⁺ = 647 (m.hm.=646).

1.d Příprava 2,5-bis-/terc.butoxykarbonyl-/3-(terc.butoxykarbonylamino)propyl/amino/pentan-1-olu (1.d)

L-5-Karboxytetra-terc.butoxykarbonylspermin (1,94 g, 3 mmoly) se rozpustí ve 30 ml THF. Potom se do získaného roztoku zavede mikropipetou 370 ml (3,1 mmolu) N-methylmorfolinu. Reakční směs se pod dusíkovou atmosférou ochladí na teplotu 15 °C (v lázni suchého ledu a ethylenglykolu). Potom se přidá 390 ml (3,1 mmolu) isobutylchlorformiátu. Po třech minutách se reakční směs nalije do kádinky obsahující natriumborohydrid (2 g) rozpuštěný ve 20 ml vody teplé 4 °C. THF se potom odpaří. Přidá se roztok hydrogensíranu draselného (až do pH 7). Produkt se extrahuje AcOEt, promyje roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a potom roztokem chloridu sodného, načež se vysuší nad síranem hořečnatým, zfiltruje a odpaří.

Získá se 1,15 g produktu, což odpovídá výtěžku 61 %.

Chromatografie na tenké vrstvě vede ke dvěma skvrnám. Proveďte se tedy separace na sloupci silikagelu za použití téhož elučního činidla, čímž se získá 0,97 g produktu (ve formě žlutého oleje). Výtěžek separace činí 84 %.

Výtěžek redukce je 51 %.

Chromatografie na tenké vrstvě: R_f (EP:AcOEt = 1:1 objemově) = 0,24,

$^1\text{H-NMR}$ (ppm): 1,42 (s, 4xBoc),
1,5-1,7(m, 8H $\text{N+CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHN/ 2x N+CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{N}$),
2,85-3,2 (m, 10H 5x NCH_2),
3,4(m, 1H, NCHCH_2OH),
3,7 (d, 2H, CH_2OH),
6,8 (m, 2H, **NH**),

hmotové spektrum: $\text{MH}^+ = 633$ (m.hm.=632).

1.e Příprava kyseliny 2,5-bis-/3-(terc.butoxykarbonylamino)propyl/-/terc.butoxykarbonylamino/pentyloxykarbonylmethoxyoctové (1.e)

0,51 g (0,806 mmolu) produktu získaného ve stupni 1.d se rozpustí v 10 ml CH_2Cl_2 . K získanému roztoku se přidají dva ekvivalenty diglykolanhydridu (1,535 mmolu, 0,178 g), 2,2 ekvivalentu triethylaminu (1,687 mmolu, 235 μl) a 5 mg DMAP. Po jedné hodině chromatografie na tenké vrstvě reakční směsi ukazuje, že alkohol zreagoval. Ke směsi se přidá CH_2Cl_2 , načež se směs promyje 3 x 50 ml roztoku hydrogen-síranu draselného, 3 x 50 ml roztoku chloridu sodného a vysuší nad síranem hořečnatým a potom odpaří. Získá se 0,26 g pevného produktu, což odpovídá výtěžku 43 %.

Chromatografie na tenké vrstvě: Rf ($\text{CHCl}_3\text{:MeOH:AcOH} = 90\text{:}8\text{:}2$ objemově) = 0,75,

hmotové spektrum: $\text{MH}^+ = 749$ (m.hm.=748).

1.f. Příprava 2,5-bis-/terc.butoxykarbonyl-/3-(terc.butoxykarbonylamino)propyl/amino/pentyl-(dioktadecylkarbamoylmethoxy)acetátu

0,123 g produktu získaného v předcházejícím reakčním stupni (0,164 mmolu), 1 ekvivalent (0,0856 g) dioktadecylaminu, 3 ekvivalenty triethylaminu (68,4 ml), 1,1 ekvivalent (0,0798 g) BOP se rozpustí v CHCl_3 . Reakční směs se potom míchá při okolní teplotě. Po dvou hodinách se k reakční smě-

si přidá 100 ml CH_2Cl_2 a směs se promyje 3 x 100 ml roztoku hydrogensíranu draselného, roztoku hydrogenuhličitanu sodného a roztoku chloridu sodného (až do pH 7), načež se vysuší a potom odpaří. Získá se 0,13 produktu, což odpovídá výtěžku 63 %.

Chromatografie na tenké vrstvě: R_f (EP:AcOEt = 1:1 objemově) = 0,62; vyvolání jodem, ninhydrinem a fluorescaminem.

$^1\text{H-NMR}$ (ppm): 0,90 (t, $J=7,5$ Hz, 6H:CH₃),
1,20-1,75 (m, 108 H:CH₂/C(CH₃)₃),
3,05-3,35 (m, 14 H:CH₂N),
4,15-4,35 (m, 3H:NCHCH₂OCO),
4,23-4,27 (2s, 2x 2H:OCH₂CO),
4,5-5,5 (m, rozpr., 2H:NH),

hmotové spektrum: $\text{MH}^+ = 1252$ (m.hm.=1251),

elementární analýza:

(C ₇₁ H ₁₃₇ N ₅ O ₁₂)	C(%)	H(%)	N(%)
vypočteno	68,06	11,02	5,59
nalezeno	67,14	11,93	5,86.

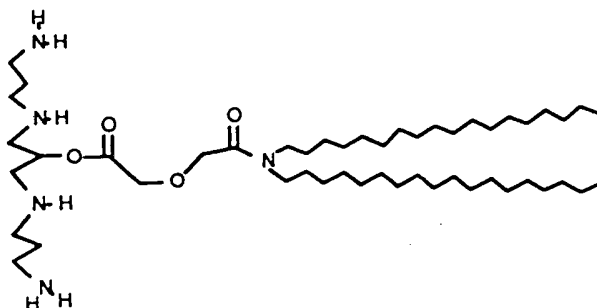
1.g Příprava 2,5-bis-(3-aminopropylamino)pentyl-(dioktadecylkarbamoylmethoxy)acetátu

1 ml TFA se přidá k 0,025 g produktu získaného ve stupni 1.f (0,02 mmolu) v tribici "Eppendorf"^R o obsahu 1,5 ml a směs se zde ponechá po dobu jedné hodiny při okolní teplotě. TFA se potom odpaří. Potom se přidá 500 μl ethanolu tak, aby byl získán 40mM roztok potřebný pro biologické testy.

Hmotové spektrum: $\text{MH}^+ = 852$ (m.hm. = 851).

Příklad 2

Příprava 1,3-bis-(3-aminopropylamino)-2-propyl-(dioktadecylkarbamoylmethoxy)acetátu (2.f)



2.a Příprava 1,3-bis-(2-kyanoethylamino)-2-propanolu (2.a)

3,6 g (40 mmolů) 1,3-diamino-2-propanolu se rozpustí v 75 ml methanolu. Potom se k získanému roztoku přidá v průběhu 15 minut 5,76 ml (80 mmolů) akrylonitrilu. Zkouška na fluorescamin je pozitivní. Reakční směs zůstane bezbarvá. Reakční směs se potom míchá při okolní teplotě přes noc. Zkouška na fluorescamin je poto negativní- Methanol se odpaří. Izoluje se 7,9 g produktu (100% výtěžek surového produktu).

2.b Příprava 1,3-bis-(3-aminopropylamino)-2-propanolu (2.b)

Hydrogenace se provede v autoklávu propláchnutém dusíkem při teplotě 27 °C. Produkt získaný v reakčním stupni 2.a se rozpustí ve směsi 15 ml methanolu, 10 ml ethanolu a 5 ml 2M roztoku hydroxidu draselného. Roztok se propláchne argonem, načež se k němu v autoklávu přidají 4 ml suspenze Raneyova niklu. V průběhu 3 hodin klesne tlak v autoklávu z původní hodnoty 5,16 MPa na hodnotu 3,76 MPa, načež se stabilizuje po dobu delší než jedna hodina. Obsah autoklávu činí 250 ml, zatímco objem reakční směsi činí 30 ml. Získaná suspenze se zfiltruje, promyje vodou a zavede do rotační odparky. Získá se žlutý olej. Zkouška na fluorescamin je pozitivní.

2.c Příprava 1,3-bis-/3-terc.butoxykarbonylamino-(terc.butoxykarbonylaminopropyl/-2-propan-2-olu (2.c)

Produkt získaný ve stupni 2.b se chrání stejným způsobem jako ve stupni 1.C. Přidá se 100 ml CH₂Cl₂. 39,2 g (179 mmolů)

di-terc.butyldikarbonátu ve formě roztoku ve 100 ml dioxanu se potom po kapkách přidá k získané směsi. Roztok se míchá po dobu 72 hodin. Rozpouštědlo se odpaří a přidá se roztok hydrogensíranu draselného. Produkt se extrahuje za použití AcOEt (3 x 100 ml). Jednotlivé frakce se sloučí a promyje roztokem hydrogensíranu draselného, hydrogenuhličitanu sodného a chloridu sodného, načež se vysuší nad síranem hořečnatým a odpaří. Získá se 20 g produktu, což odpovídá výtěžku 83 %, vztaženo na výchozí produkt.

Produkt se rekrystalizuje z EP.

Chromatografie na tenké vrstvě:

R_f (EP:AcOEt = 1:1 objemově) = 0,23

R_f (EP:AcOEt = 1:2 objemově) = 0,63,

¹H-NMR (ppm): 1,4 (2s, 36H: 4 x (CH₃)₃),
1,65 (qt, 4H: 2 x NCH₂CH₂CH₂NH),
2,95 (q, 4H: 2 x NHCH₂CH₂),
3,1 (2d, 4H: NCH₂CHCH₂N),
3,2 (t, 4H: NCH₂CH₂),
3,85 (m, 1H:OH),
5,9 (s, 2H:NH),

hmotové spektrum: MH⁺ = 605 (m.hm.=604).

2.d Příprava kyseliny 1,3-bis-/3-terc.butoxykarbonylamino(terc.butoxykarbonylaminopropyl/-2-propyl-2-ethoxykarbonylmethoxyoctové (2.d)

604 mg (1 mmol) produktu získaného ve stupni 2.c se rozpustí ve 20 ml CH₂Cl₂, načež se do získaného roztoku zavedou 2 ekvivalenty anhydridu (2 mmol, 0,232 g), 2,2 ekvivalentu NEt₃ (307 μl, potom 100 μl), 6,5 g DMAP. Po 24 hodinovém míchání při okolní teplotě se ke směsi přidá CH₂Cl₂, a směs se promyje roztokem hydrogensíranu draselného a roztokem chloridu sodného, vysuší nad síranem hořečnatým a potom odpaří. Získá se 0,156 g produktu (výtěžek 22 %).

Chromatografie na tenké vrstvě: R_f (CHCl₃:MeOH:AcOH=90:8:2 objemově) = 0,71,

$^1\text{H-NMR}$ (ppm): 1,2-1,4 (2s, 36H: 4 x $(\text{CH}_3)_3$),
 1,5 (m, 4H: 2x $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$),
 2,85(q, 4H: 2 x NHCH_2CH_2),
 3,1 (m, 8H: 4 x NCH_2),
 3,9-4,2 (2s, 4H: 2 x OCH_2COO),
 5,25 (m, 1H: CH_2CHCH_2),
 6,7 (2H: NH),

hmotové spektrum: $\text{MH}^+ = 721$ (m.hm.=720).

2.e Příprava 1,3-bis-/3-terc.butoxykarbonylamino(terc.butoxykarbonylaminopropyl/-2-propyl-(dioktadecylkarbamoylmethoxy)acetátu

0,216 mmolu kyseliny získané v předcházejícím stupni 2.d se rozpustí ve 3 ml CHCl_3 . K získanému roztoku se potom přidá 1 ekvivalent DODA (0,113 g), 3 ekvivalenty NEt_3 (100 μl) a 1,1 ekvivalentu BOP (0,11 g). Reakční směs se potom míchá při okolní teplotě po dobu 24 hodin. CHCl_3 se odpaří, načež se ke zbytku přidá 100 ml AcOEt . Organická fáze se promyje 0,5M HCl , roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a roztokem chloridu sodného až k dosažení pH 7, načež se vysuší nad síranem hořečnatým a potom odpaří. Získá se 0,185 g produktu (výtěžek 70 %). Proveďte se chromatografie na sloupci silikagelu. Izoluje se 110 mg produktu (42 %).

Chromatografie na tenké vrstvě: R_f (CHCl_3 : MeOH : AcOH =90:8:2
 objemově)= 0,8+,

R_f (EP : AcOEt = 1:1 objemově)
 = 0,67,

$^1\text{H-NMR}$ (ppm): 0,85 (t, 6H: 2 x CH_3),
 1,20-1,55(m, 100H: $\text{CH}_2/\text{C}(\text{CH}_3)_3$),
 1,6 (m, 4H: 2 x $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$),
 3,05-3,4(m, 16H: 2 x $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}/\text{NCH}_2\text{CHCH}_2\text{N}/2\text{x}$
 CH_2N),
 4,1(s, 2H: NCOCH_2O),
 4,15(s, 2H: OCH_2COO),
 5,25(m, 1H: CH_2CHCH_2),

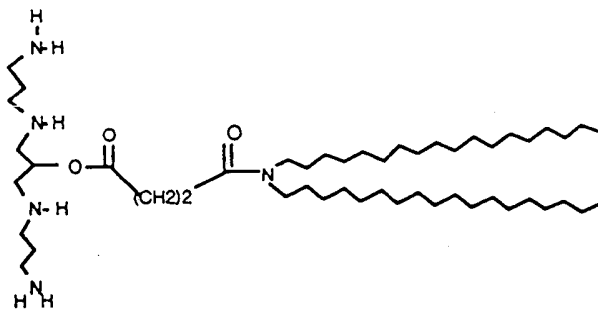
6,15(m,2H:NH),
hmotové spektrum: $MH^+ = 1224$ (m.hm.=1223).

2.f Příprava 1,3-bis-/3-terc.butoxykarbonylamino-(terc.butoxykarbonylamino-(terc.butoxykarbonylaminopropyl/-2-propyl-(dioktadecylkarbamoylmethoxy)acetátu (2.f)

1 ml TFA se přidá k 0,0247 g produktu získaného ve stupni 2.e (0,021 mmolu) v trubici "Eppendorf"^R o obsahu 1,5 ml, kde se ponechá při okolní teplotě po dobu jedné hodiny. TFA se potom odpaří. Potom se přidá 505 μ l ethanolu tak, aby se získal 40mM roztok potřebný pro biologické testy.
Hmotové spektrum: $MH^+ = 824$ (m.hm.=823).

Příklad 3

Příprava 2-(3-aminopropylamino)-1-(3-aminopropylaminomethyl)-ethyl-(N,N-dioktadecyl)sukcinamátu



Tato sloučenina se připraví podle protokolu popsáného výše v příkladu 2, kdy se kyselina diglykolová nahradí kyselinou jantarovou. Analýza provedená hmotovou spektrometrií takto získaného produktu indikuje fragment MH^+ : 808, což je v souladu s očekávanou hmotností.

Použití lipopolyaminů podle vynálezu pro transfekci in vitro genetického materiálu

A) Plasmidy použité pro přenos genů in vitro

Použije se plasmid pCMV-LUC. Jedná se o konstrukci zahrnující reportérový gen "luciferázu" odvozenou buď od plasmidu pGL2-Basic Vector (Promega) nebo od plasmidu pGL2-Control Vector (Promega) inzercí fragmentu Mlu I-Hind III obsahujícího promotor lidského cytomegaloviru (CMV) extrahovaný z plasmidového vektoru pcDNA3 (invitrogen).

B) Protokol přípravy roztoků použitých pro transfekci

Lipopolyaminy připravené podle předcházejících příkladů se rozpustí v ethanolu za vzniku 40mM roztoku, načež se potom zředí směsí ethanolu a vody, přičemž se udržuje koncentrace ethanolu nižší než 10 %. Roztoky kyseliny nukleové určené k transfekci se zředí fyziologickým roztokem (0,15M NaCl), načež se přidají k roztokům lipopolyaminů v poměru 1:1 objemově. Po homogenizaci vířivým míchadlem a 15 minutové inkubaci při okolní teplotě se roztoky DNA/lipopolyaminů distribuují (finální konc. 9 ébj.%) do jamek titrační plotny, kde jsou buňky promyté kultivačním prostředím bez proteinů (sérum).

Příklad 4

Vliv poměru nábojů (aminy/fosfáty) na účinnost transfekce

Vzorky obsahující $1 \cdot 10^5$ buněk NIH 3T3 v exponenciální fázi růstu na 2 cm^2 se zpracují roztoky lipopolyaminy/pCMV-LUC, majícími proměnné nábojové poměry, po dobu 4 hodin při teplotě 37°C v atmosféře obsahující 5 % CO_2 , přičemž každý vzorek pojme $1 \mu\text{g}$ nukleové kyseliny. Studium exprese reportérového genu se provádí po přidání fetálního telecího séra (finální koncentrace 8 %) a po následné 40 hodinové kultivaci v sušárně s atmosférou oxidu uhličitého. Aktivita luciferázy se stanoví světelnou emisí /RLU = relative light unit/ v přítomnosti luciferinu, koenzymu A a ATP po dobu 20 sekund a vyjádří v μg proteinu v supernatantu získaném po lyzi buněk. Získané výsledky jsou uvedeny v dále uvedené tabulce I.

Tabulka I

Poměr nábojů	Lipopolyamin z př.1		Lipopolyamin z př.2	
	luminescence	koef.var.(%)	luminescence	koef.var.(%)
1	69	5	23	34
2	5091	3	252	6
4	3636	30	7890	3
6	21334	3	61401	5
8	40846	3	73224	2
10	55321	1	77633	2
12	53239	5	48634	5
14	36	10	52417	2
ADN samot.	52	5		

Každá hodnota odpovídá průměru ze tří nezávislých pokusů. Tento pokus jednoznačně ukazuje, že lipopolyaminy podle vynálezu umožňují přenos genů za podmínek žádoucích pro jejich expresi.

Příklad 5

Vliv koncentrace kyseliny nukleové ve směsích DNA/lipopolyaminy.

Za použití stejného protokolu, jaký byl popsán v předcházejícím příkladu se buňky NIH 3T3 ošetří směsmi DNA/lipopolyaminy za podmínek, v rámci kterých se použijí různé koncentrace DNA při stejném poměru nábojů. V tomto případě se aktivita luciferázy měří po dobu 20 sekund a vztahuje na $2,5 \cdot 10^3$ ošetřených buněk. Získané výsledky jsou uvedeny následujících tabulkách II a III.

Tabulka II

Lipopolyamin z příkladu 1

μg DNA	Poměr nábojů			
	x 4	x 6	x 8	x 10
0,25	27 (19)	25 (20)	32 (31)	36 (15)
0,5	23 (5)	37 (54)	4476 (4)	4811 (19)
1,0	4945 (12)	19194 (14)	30933 (21)	39357 (3)
2,0	93937 (2)	105533 (1)	111167 (14)	8315 (15)
3,0	106293 (11)	100093 (8)	53475 (12)	
4,0	98553 (10)	69863 (8)		

Tabulka III

Lipopolyamin z příkladu 2

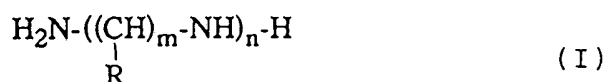
μg DNA	Poměr nábojů			
	x 4	x 6	x 8	x 10
0,25	40 (17)	52 (64)	122 (14)	51 (5)
0,5	28 (10)	204 (25)	36533 (7)	44473 (7)
1,0	3427 ((12)	48167 (13)	49363 (13)	50083 (9)
2,0	33377 (13)	44697 (18)	30670 (16)	9544 (4)
3,0	9686 (3)	31557 (2)	9157 (8)	
4,0	4321 (9)	40105 (10)		

Každá hodnota odpovídá průměru ze tří nezávislých pokusů.

Hodnoty uvede v závorkách odpovídají koeficientu variace vyjádřenému v %.

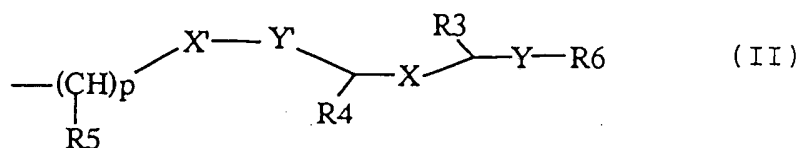
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Lipopolyamin ve formě D, L nebo DL nebo některá z jeho solí obecného vzorce I



ve kterém

- m znamená celé číslo od 2 do 6,
n znamená celé číslo od 1 do 9 a výhodněji od 1 do 5, přičemž v případě, že n znamená celé číslo od 2 do 9, potom v obecném vzorci je přítomna jediná skupina R odlišná od vodíku, a m má proměnné nebo identické hodnoty ve skupinách $-(\text{CH})_m-$ nebo $-(\text{CH}_2)_m-$,
R znamená atom vodíku nebo skupinu obecného vzorce II

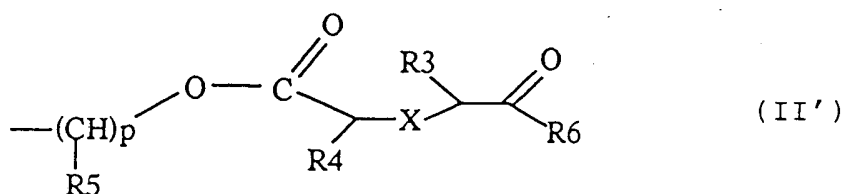


ve kterém

- X a X' znamenají nezávisle jeden na druhém atom kyslíku, methylenovou skupinu $-(\text{CH}_2)_q-$, kde q znamená 0, 1, 2 nebo 3, nebo amino-skupinu $-\text{NH}-$ nebo $\text{NR}'-$, kde R' znamená alkylovou skupinu obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy,
Y a Y' znamenají nezávisle jeden na druhém methylenovou skupinu, karbonylovou skupinu nebo skupinu $\text{C}=\text{S}$,
R₃, R₄ a R₅ znamenají nezávisle jeden na druhém atom vodíku nebo substituovanou nebo nesubstituovanou alkylovou skupinu obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy,

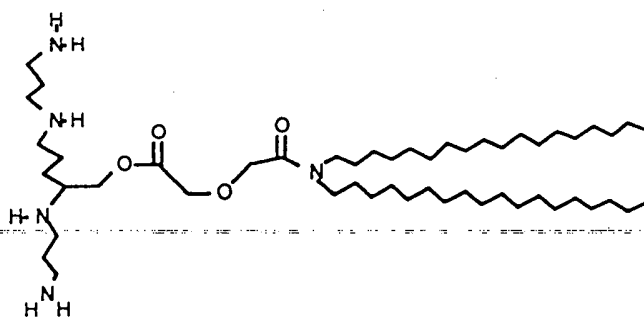
- p znamená číslo od 0 do 5 a
 R_6 znamená cholesterolový derivát nebo alkylamino-skupinu $-NR_1R_2$, ve které R_1 a R_2 znamenají nezávisle jeden na druhém nasycenou nebo nenasycenou, lineární nebo rozvětvenou alifatickou skupinu obsahující 12 až 22 uhlíkových atomů.

2. Lipopolyamin podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém R výhodně znamená skupinu obecného vzorce II'



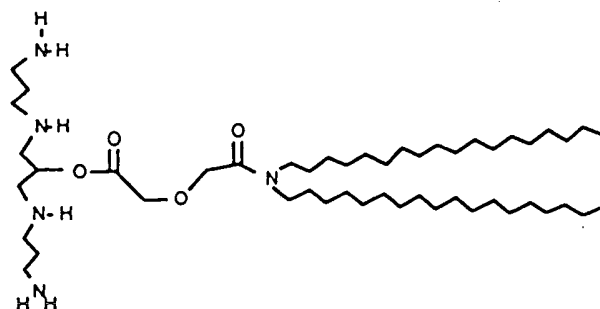
ve kterém R_3 , R_4 , R_5 , R_6 a p mají významy uvedené v nároku 1 a X znamená atom kyslíku nebo skupinu $-(\text{CH}_2)_q-$, kde q znamená nulu.

3. Lipopolyamin podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I, kterým je sloučenina vzorce



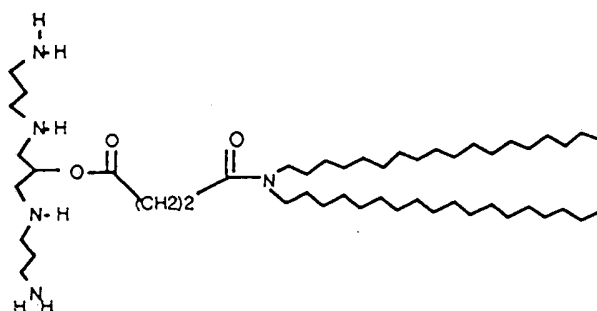
ve formě D, L nebo DL nebo některá z jejích solí.

4. Lipopolyamin podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I, kterým je sloučenina vzorce



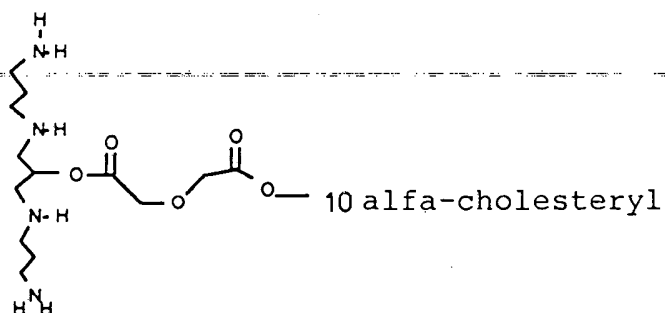
ve formě D, L nebo DL nebo některá z jejích solí.

5. Lipopolyamin podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I, kterým je sloučenina vzorce



ve formě D, L nebo DL nebo některá z jejích solí.

6. Lipopolyamin podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I, kterým je sloučenina vzorce



ve formě D, L nebo DL nebo některá z jejích solí.

7. Farmaceutická kompozice, v y z n a č e n á t í m ,

že obsahuje alespoň jeden lipopolyamin podle některého z nároků 1 až 6 a alespoň jednu nukleovou kyselinu.

8. Farmaceutická kompozice podle nároku 7, v y z n a -
č e n á t í m , že nukleovou kyselinou je kyselina deso-
xyribonukleová.

9. Farmaceutická kompozice podle nároku 7, v y z n a -
č e n á t í m , že nukleovou kyselinou je kyselina ribo-
nukleová.

10. Farmaceutická kompozice podle nároku 7, 8 nebo 9,
v y z n a č e n á t í m , že nukleová kyselina je chemic-
ky modifikovaná.

11. Farmaceutická kompozice podle některého z nároků 7
až 10, v y z n a č e n á t í m , že nukleovou kyselinou
je antimediatorová sekvence.

12. Farmaceutická kompozice podle některého z nároků 7
až 10, v y z n a č e n á t í m , že nukleová kyselina obsa-
huje terapeutický gen.

13. Farmaceutická kompozice podle nároku 12, v y z n a č e -
n á t í m , že terapeutický gen kóduje protein uplatňují-
cí se při metabolismu lipidů, jako apolip^{po}protein zvolený z
množiny zahrnující apoliproteiny A-I, A-II, A-IV, B, C-I,
C-II, C-III, D, E, F, G, H, J a apo(a), enzym, jako lipo-
protein-lipáza, hepatická lipáza nebo další lipázy, lecitin-
cholesterol-acyltransferáza, 7alfa-cholesterol-hydroxyláza
a kyselina fosfatidová-fosfatáza, přenosový protein lipidů,
jako přenosový protein esterů cholesterolu a přenosový pro-
tein fosfolipidů, vazebný protein HDL nebo také receptor
zvolený například z množiny zahrnující receptory LDL, re-
ceptory chylomikrons-remnantů a scavengerové receptory.

14. Farmaceutická kompozice, v y z n a č e n á t í m ,

že obsahuje nukleovou kyselinu, lipopolyamin podle některého z nároků 1 až 6 a přísadu schopnou spojit se s komplexem lipopolyamin/kyselina nukleová a zlepšit jeho transfekční potenci.

15. Farmaceutická kompozice podle nároku 14, v y z n a -
č e n á t í m, že přísadou je jeden nebo několik neutrálních lipidů.

16. Farmaceutická kompozice podle nároku 15, v y z n a -
č e n á t í m, že neutrální lipid nebo neutrální lipidy jsou zvoleny z množiny zahrnující syntetické nebo přírodní lipidy mající zwiterionový charakter nebo prosté iontového náboje za fyziologických podmínek.

17. Farmaceutická kompozice podle nároku 16, v y z n a -
č e n á t í m, že neutrálním lipidem nebo neutrálními lipidy jsou lipidy se dvěma mastnými řetězci.

18. Farmaceutická kompozice podle nároku 17, v y z n a -
č e n á t í m, že neutrální lipid nebo neutrální lipidy jsou zvoleny z množiny zahrnující dioleoylfosfatidylethanolamin (DOPE), oleoyl-palmitoylfosfatidylethanolamin (POPE), di-stearoyl, -palmitoyl, -mirystoylfosfatidylethanolamin, jakož i jejich 1 až 3 krát N-methylované deriváty, fosfatidylglyceroly, diacylglyceroly, glykosyldiacylglyceroly, cerebrosidy, zejména galaktocerebrosidy, sfingolipidy, zejména sfingomyeliny, a asialogangliosidy, zejména asialogangliosidy GM1 a GM2.

19. Farmaceutická kompozice podle některého z nároků 14 až 18, v y z n a č e n á t í m, že obsahuje 0,1 až 20 ekvivalentů přísady na jeden ekvivalent lipopolyaminu, výhodně 1 až 5 ekvivalentů přísady na jeden ekvivalent lipopolyaminu.

20. Farmaceutická kompozice podle některého z nároků 7

až 19, v y z n a ě n á t í m , že obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič pro injikovatelnou formulaci.

21. Farmaceutická kompozice podle některého z nároků 7 až 19, v y z n a ě n á t í m , že obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič pro použití na pokožku nebo/a na sliznici.

22. Použití lipopolyaminu podle některého z nároků 1 až 6 pro transfekci in vivo nebo in vitro buněk.

~~Zastupuje:~~