



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 27 669 T2** 2006.07.20

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 049 793 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 27 669.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR99/00162**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 901 639.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/038821**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.01.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **05.08.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.11.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **12.10.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.07.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/87** (2006.01)

C07C 323/60 (2006.01)

C07K 5/062 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9801065	30.01.1998	FR
77026 P	06.03.1998	US

(73) Patentinhaber:

Aventis Pharma S.A., Antony, FR

(74) Vertreter:

**Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**BYK, Gerardo, 55513 Qyriat Ono, IL; DUBERTRET,
Catherine, F-92310 Sèvres, FR; PITARD, Bruno,
F-92330 Sceaux, FR; SCHERMAN, Daniel, F-75012
Paris, FR**

(54) Bezeichnung: **FÜR REDUZIERENDE BEDINGUNGEN EMPFINDLICHE TRANSFEKTIONS-VERBINDUNGEN,
PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNGEN DIE DIESE ENTHALTEN UND DEREN VERWENDUNG.**

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 eingelegt, 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

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein neues Mittel für die Übertragung von Nucleinsäuren in Zellen. Dieses Übertragungsmittel ist insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass es eine oder mehrere Disulfidbrücken umfasst, die empfindlich gegenüber reduzierenden Bedingungen sind. Dieses neue Mittel kann verwendet werden, um interessierende Nucleinsäuren in vitro wie auch in vivo oder ex vivo in verschiedene Zelltypen zu übertragen.

[0002] Mit der Entwicklung der Biotechnologie ist die Möglichkeit zur effektiven Übertragung von Nucleinsäuren in Zellen zu einer Notwendigkeit geworden. Es kann sich um die Übertragung von Nucleinsäuren in Zellen in vitro handeln, zum Beispiel zur Herstellung von rekombinanten Proteinen, oder im Labor zum Studium der Regulierung der Genexpression, zur Klonierung von Genen oder für jede andere Manipulation mit DNA. Es kann sich auch um die Übertragung von Nucleinsäuren in Zellen in vivo handeln, zum Beispiel zur Schaffung von transgenen Tieren, zur Herstellung von Impfstoffen, Markierungsstudien oder auch therapeutische Ansätze. Es kann sich aber auch um die Übertragung von Nucleinsäuren in Zellen ex vivo handeln, bei Ansätzen zur Knochenmarkstransplantation, bei der Immuntherapie oder anderen Verfahren, die die Übertragung von Genen in Zellen, die aus einem Organismus entnommen wurden, im Hinblick auf ihre spätere Rückverabreichung beinhalten.

[0003] Die verschiedenen synthetischen Vektoren, die bisher entwickelt wurden, um die Übertragung von Nucleinsäuren in Zellen zu verbessern, besitzen eine beträchtliche strukturelle Vielfalt, die die Beobachtung der Tatsache widerspiegelt, dass sich ihre Wirksamkeit je nach der gewünschten Anwendung und den ins Auge gefassten Zelltypen unterscheidet. Diese Wirksamkeit hängt größtenteils von ihrer Struktur ab.

[0004] Unter den bisher entwickelten synthetischen Vektoren nehmen die kationischen Lipide einen wichtigen Platz ein. Diese Vektoren bestehen aus einem polaren kationischen Teil, der in Wechselwirkung mit den Nucleinsäuren tritt, und einem hydrophoben Lipidteil, der es erlaubt, den gebildeten Komplex vor der äußeren Umgebung zu schützen. Genannt seien beispielsweise monokationische Lipide (DOTMA: Lipofectin®), Lipopolyamine, insbesondere Dioctadecylamidoglycylspermin (DOGS) oder das 5-Carboxyspermylamid von Palmitoylphosphatidylethanolamin (DPPES), dessen Herstellung in der Patentanmeldung EP 394 111 beschrieben ist, oder auch die kationischen Lipide, die in den Anmeldungen WO 96/17823 und WO 97/18185 (auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird) genannt sind.

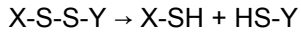
[0005] Zahlreiche Studien haben eindeutig ergeben, dass kationische Lipide Eigenschaften besitzen, die es erlauben, die Transfektion zu fördern. Dennoch erscheint es heutzutage notwendig, kationische Lipide mit neuen Strukturen zu entwickeln, die es ermöglichen, zusätzliche günstige Eigenschaften zu erhalten. So besteht ein Bedürfnis nach kationischen Lipiden, die insbesondere geeignet sind, Membranbarrieren zu durchdringen. Tatsächlich stellen sich einer wirklichen Effizienz der Transfektion zahlreiche Hindernisse entgegen, darunter die Tatsache, dass es für eine Nucleinsäure schwierig ist, biologische Membranen zu überwinden und in Zellkompartimente einzudringen ("Cellular and Molecular Barriers to Gene Transfer by a Cationic Lipid", Zabner, J. et al., J. Biol. Chem., 1995, Nr. 32, 18997-19007). Die vorliegende Erfindung möchte dieses technische Problem lösen.

[0006] So betrifft die vorliegende Erfindung neue Übertragungsmittel für Nucleinsäuren, die wenigstens einen kationischen hydrophilen Bereich, der sich nichtkovalent an Nucleinsäuren anlagern kann, und wenigstens einen lipophilen Bereich umfassen, wobei diese Bereiche über eine Brücke, die "Spacer" genannt wird, miteinander verbunden sind und außerdem wenigstens eine Disulfidbrücke umfassen, die so positioniert ist, dass ihre Reduktion zu einem partiellen Abbau des lipophilen Bereichs führt, oder aber so positioniert ist, dass ihre Reduktion zur Halbierung des Übertragungsmittels führt, wenn dieses symmetrisch ist.

[0007] Diese Übertragungsmittel können aufgrund ihres kationischen hydrophilen Teils wirksam Nucleinsäuren komplexieren, wobei diese Wechselwirkung die Nucleinsäure stark kompaktiert, und aufgrund des lipophilen Bereichs ist diese ionische Wechselwirkung unempfindlich gegenüber der äußeren Umgebung, da der lipophile Bereich das gebildete Teilchen mit einer Lipidhaut bedeckt.

[0008] Aber neben diesen Eigenschaften, die für die Übertragungsfunktion gewünscht werden, besitzen die Übertragungsmittel gemäß der Erfindung auch eine äußerst vorteilhafte Tenseigenschaft, indem sie im reduzierenden Zellmilieu aufgrund der Anwesenheit der Disulfidbrücke(n) Moleküle des Typs polyaminierte Alkylketten bilden, die Membranen destabilisieren. Tatsächlich sind die Disulfidbrücken in der Lage, in oxidierendem Milieu stabile kovalente Bindungen zu bilden und in reduzierendem Milieu entweizubrechen, nach dem fol-

genden Schema:



[0009] Diese Art von Struktur findet sich zum Beispiel bei bestimmten Proteinen, die Cystein-Aminosäuren besitzen, und trägt zu deren dreidimensionaler Struktur und somit zu ihrer biologischen Aktivität bei. Disulfidbrücken wurden übrigens bereits in bestimmte chimäre Proteine, insbesondere in Immunotoxine, eingeführt, um die Zielfindungsdomäne mit der aktiven Domäne zu verbinden.

[0010] Unter "reduzierendem Milieu" wird im Sinne der Erfindung ein natürliches reduzierendes Milieu verstanden, zum Beispiel das intrazelluläre Milieu, insbesondere Cytoplasma und vor allem Endosomen. Ein künstliches reduzierendes Milieu, das natürliche Bedingungen widerspiegelt, ist zum Beispiel ein Milieu, das 0,1% bis 20% Dithiothreitol (DTT) umfasst.

[0011] Dagegen wird unter "oxidierendem Milieu" jedes Milieu verstanden, das sich in Kontakt mit Luftsauerstoff befindet und kein Reduktionsmittel enthält, insbesondere das extrazelluläre Milieu. Ein repräsentatives oxidierendes Milieu wird zum Beispiel von einer isotonischen Lösung von 150 mM Natriumchlorid gebildet, oder von einer Lösung, die 5% Glucose enthält.

[0012] Die Anmelderin hat somit gezeigt, dass völlig unerwarteterweise eine oder mehrere Disulfidbrücken in einen synthetischen Nucleinsäureübertragungsvektor, insbesondere des Typs kationisches Lipid, eingeführt werden können und dass dies nicht seine Fähigkeit beeinflusst, in nichtreduzierendem Milieu Nucleinsäuren zu komplexieren. Sie zeigt auch, dass die Eigenschaften der Nucleinsäureübertragung dieser Mittel erhalten bleiben oder sogar verbessert werden. Außerdem werden die gebildeten Komplexe in reduzierendem Milieu und daher insbesondere innerhalb der Zelle abgebaut, was es ermöglicht, Tensidmoleküle zu erzeugen, die somit eine größere Menge Nucleinsäure für die zelluläre Transcriptionsmaschinerie zugänglich machen.

[0013] Im Sinne der Erfindung wird unter "Tensid" jedes amphiphile Molekül verstanden, das die Eigenschaft hat, sich in biologische Membranen einzufügen und diese zu destabilisieren. Dies resultiert aus der Fähigkeit von amphiphilen Tensidmolekülen, Membranen aufzureißen, indem sie sich in die Phospholipid-Doppelschichten einfügen und die Lipide und Proteine löslich machen (La Cellule, Hrsg. Vigot et Decarie, 1988, S. 581-583).

[0014] Ein weiterer Vorteil der Übertragungsmittel gemäß der Erfindung liegt in ihrer reduzierten intrinsischen Toxizität. Da das Übertragungsmittel in der Zelle an den gegenüber reduzierenden Bedingungen empfindlichen Disulfidbrücken abgebaut wird, übt es tatsächlich nicht die toxische Wirkung aus, die man bei den klassischen Übertragungsvektoren beobachtet. Außerdem ermöglicht die Verbesserung des Durchtritts durch die Membranen die Verwendung von niedrigeren Dosen des Nucleinsäure/Übertragungsmittel-Komplexes, mit den günstigen Folgen für dessen Toxizität.

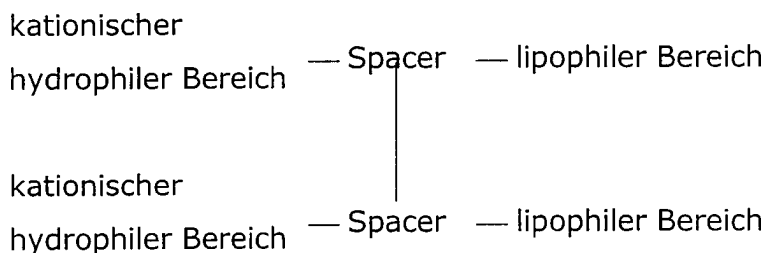
[0015] Schließlich hat die Anmelderin auch nachgewiesen, dass die Übertragungseigenschaften erheblich verbessert werden, wenn die Lipophilie der Übertragungsmittel ausreichend ist und sie in ausreichender Menge verwendet werden. Insbesondere wurde gezeigt, dass einer der hauptsächlichen Vorteile bei der Erhöhung der Lipophilie dieser Mittel oder auch bei der Einführung einer von einem Steroid abgeleiteten Kette die Einführung einer verbesserten Resistenz gegen Serum ist.

[0016] Die Übertragungsmittel gemäß der Erfindung können zweierlei Arten von Struktur haben, ohne dass dies einen Einfluss auf ihre technische Wirkung hätte. Im ersten Fall kann diese Struktur in folgender Weise dargestellt werden:

kationischer
hydrophiler Bereich — Spacer — lipophiler Bereich

[0017] In einer solchen Struktur befindet sich die Disulfidbrücke oder befinden sich die Disulfidbrücken im lipophilen Bereich, so dass ein amphiphiles Tensidmolekül entsteht, wenn sie reduziert werden.

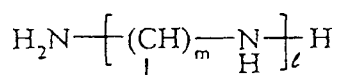
[0018] Der zweite Strukturtyp kann wie folgt dargestellt werden:



[0019] In diesem Fall ist die Disulfidbrücke oder sind die Disulfidbrücken so angeordnet, dass ihre Reduktion zur Trennung der beiden symmetrischen Hälften des Übertragungsmittels, d.h. zwischen den beiden Spacer-teilen, führt.

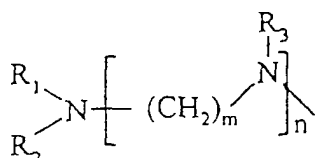
[0020] Im Sinne der Erfindung wird unter "kationischer hydrophiler Bereich" jedes hydrophile Molekül verstanden, dessen Gesamtladung bei physiologischem pH-Wert, d.h. zwischen pH 5 und 8, positiv ist und das außerdem Eigenschaften der Bindung mit Nucleinsäuren besitzt. Diese Bindung ist insbesondere vom Typ nicht-kovalente Bindung, wie zum Beispiel ionische Wechselwirkungen. Vorzugsweise ist der kationische hydrophile Bereich, der in den Übertragungsmitteln gemäß der Erfindung vorhanden ist, ein Polyamin oder Polyaminoguanidin.

[0021] Gemäß einer vorteilhaften Variante entspricht der kationische hydrophile Bereich der folgenden allgemeinen Formel:



wobei m eine ganze Zahl größer oder gleich 2 ist und I eine ganze Zahl größer oder gleich 1 ist, wobei m zwischen den verschiedenen Kohlenstoffgruppen, die sich zwischen zwei Aminen befinden, variieren kann. Vorzugsweise liegt m zwischen 2 und 6 einschließlich, und I liegt zwischen 1 und 5 einschließlich. Besonders bevorzugt wird der Polyaminbereich durch Spermin dargestellt.

[0022] Ein anderer bevorzugter Polyaminbereich entspricht der folgenden allgemeinen Formel, die in der Anmeldung WO 97/18185 beschrieben ist:



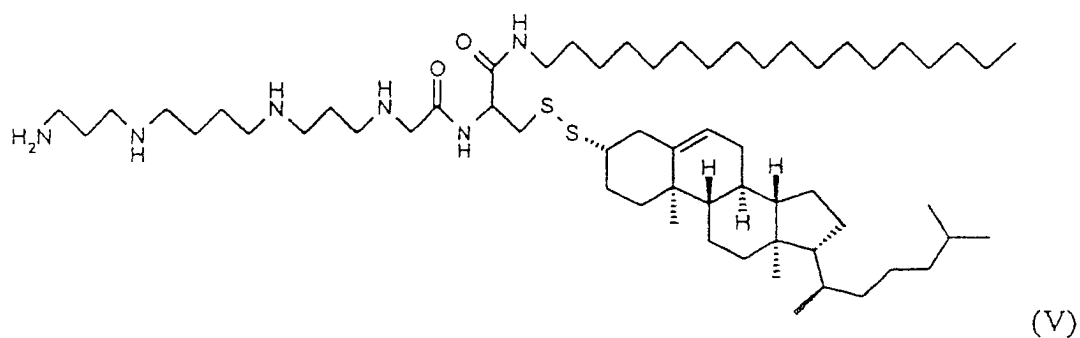
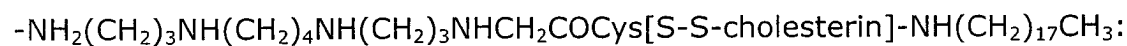
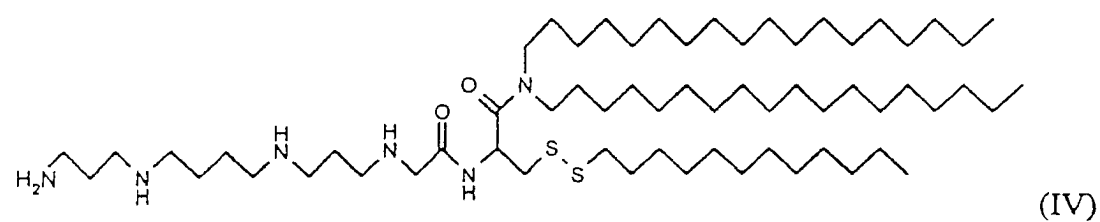
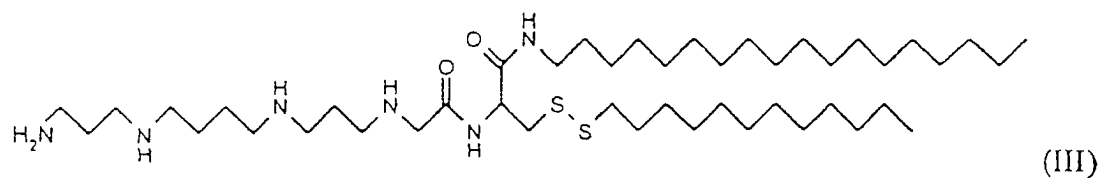
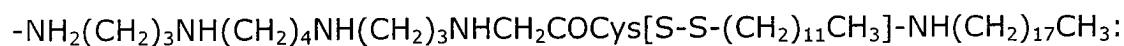
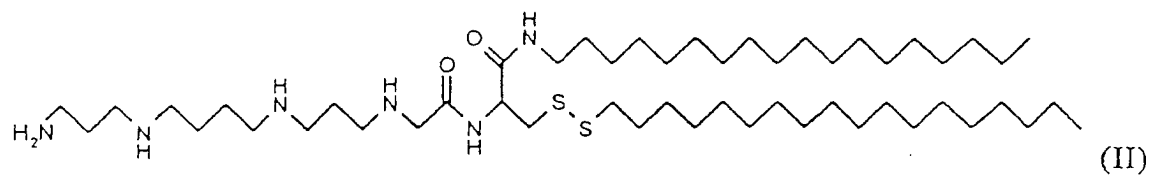
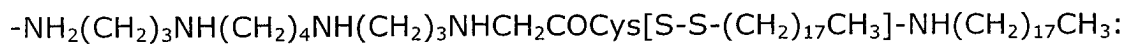
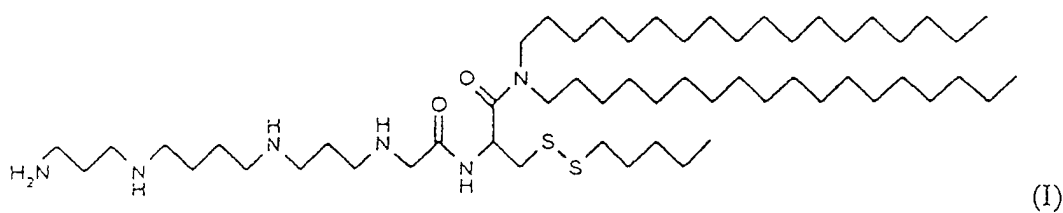
wobei R₁, R₂ und R₃ unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom oder eine Gruppe -(CH₂)_q-NRR' darstellen, wobei q zwischen 1, 2, 3, 4, 5 und 6 variieren kann, und zwar unabhängig zwischen den verschiedenen Gruppen R₁, R₂ und R₃, und R und R' unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom oder eine Gruppe -(CH₂)_q-NH₂ darstellen, wobei q wie oben definiert ist, und m und n unabhängig voneinander eine ganze Zahl darstellen, die zwischen 0 und 6 variieren kann, wobei, wenn n größer als 1 ist, m verschiedene Werte und R₃ verschiedene Bedeutungen innerhalb der obigen allgemeinen Formel annehmen können.

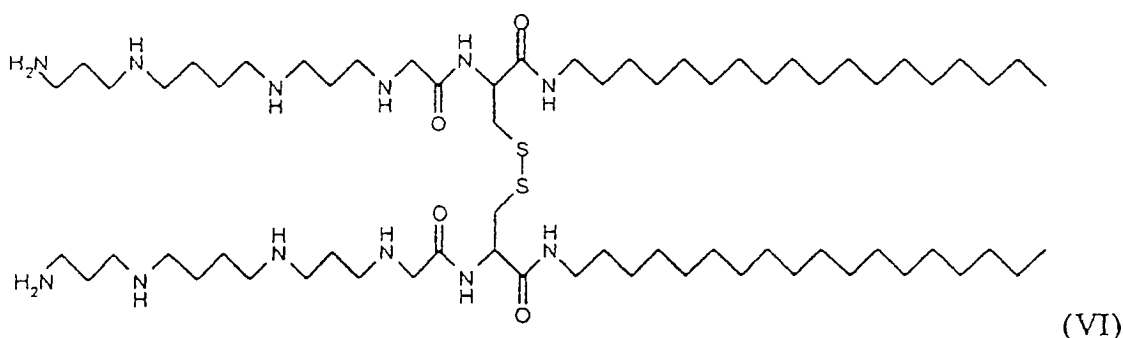
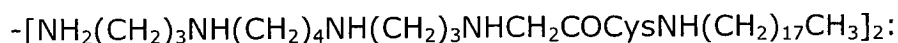
[0023] Der in den Übertragungsmitteln gemäß der Erfindung vorhandene lipophile Bereich besteht aus wenigstens einer aliphatischen Fettkette und einer oder mehreren anderen aliphatischen Ketten, einem oder mehreren Steroidderivaten, einem natürlichen oder synthetischen Lipid oder gegebenenfalls einer Kombination derselben, die vorzugsweise in der Lage ist, lamellare oder hexagonale Phasen zu bilden. Diese Strukturen sind durch die Abstände zwischen den Lamellen oder den Röhren gekennzeichnet, welche von der Länge der aliphatischen Fettkette oder dem polaren Teil des Lipids abhängen.

[0024] Der Ausdruck "aliphatische Fettkette" bezeichnet im Sinne der Erfindung eine verzweigte oder lineare Alkylkette, die 10 bis 22 Kohlenstoffatome umfasst und gegebenenfalls gesättigt und/oder fluoriert ist. Vorzugsweise umfasst sie 12 bis 22 Kohlenstoffatome. Genannt seien insbesondere aliphatische C₁₂-, C₁₃-, C₁₄-, C₁₆-, C₁₈-, C₁₉- usw. Gruppen und insbesondere die Gruppen (CH₂)₁₁CH₃, (CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₃CH₃ und (CH₂)₁₇CH₃.

[0025] Wenn der lipophile Bereich ein Steroidderivat umfasst, wird dieses vorzugsweise aus Cholesterin, Cholsäure oder Cholesterylamin ausgewählt.

- [0026]** In einer bevorzugten Ausführungsform besteht der lipophile Bereich aus wenigstens zwei aliphatischen Fettketten. Besonders bevorzugt besteht er aus zwei oder drei aliphatischen Fettketten.
- [0027]** Gemäß einer anderen vorteilhaften Variante der Erfindung besteht der lipophile Teil aus einer aliphatischen Fettkette und einem Steroidderivat.
- [0028]** Wenn das Übertragungsmittel gemäß der Erfindung eine symmetrische Struktur hat, enthält jede asymmetrische Einheit des Moleküls wenigstens eine aliphatische Fettkette.
- [0029]** Der kationische hydrophile Bereich und der lipophile Bereich können über eine "Spacer" genannte Brücke miteinander verbunden sein. Der Spacer kann, ohne darauf beschränkt zu sein, beschrieben werden als irgendeine dem Fachmann bekannte Säure- oder Aminogruppe, die hydrolysierbare Funktionen umfasst. Vorzugsweise umfasst der "Spacer" genannte Bereich eine aliphatische oder aromatische Kette. Vorzugsweise kann der Spacerbereich zum Beispiel aus Amid-, Carbamat-, Ester-, Ethergruppen oder aromatischen Cyclen ausgewählt sein.
- [0030]** Die Übertragungsmittel gemäß der Erfindung umfassen eine oder mehrere Disulfidbrücken. Die Zahl dieser Brücken wird vom Fachmann in Abhängigkeit von der Struktur des Übertragungsmittels und der gewünschten Eigenschaften gewählt. Vorteilhafterweise umfasst das Übertragungsmittel eine oder zwei Disulfidbrücken und vorzugsweise eine Disulfidbrücke. Im Übertragungsmittel kann sich die Disulfidbrücke bzw. können sich die Disulfidbrücken an unterschiedlichen Stellen befinden. Die Position hängt von der Anzahl der Brücken und der Struktur des Mittels ab.
- [0031]** Gemäß einer ersten Ausführungsform ist die Disulfidbrücke so positioniert, dass ihre Reduktion zu einem partiellen Abbau des lipophilen Bereichs führt, so dass innerhalb der Zelle ein amphiphiles Tensidmolekül entsteht. Dieser partielle Abbau kann insbesondere dem Verlust einer aliphatischen Kette, wenn der lipophile Bereich mehrere davon aufweist, oder aber dem Verlust einer von einem Steroid abgeleiteten Kette, wenn der lipophile Bereich eine solche enthält, entsprechen. Unter "Verlust einer aliphatischen Fettkette" versteht man entweder den vollständigen Verlust derselben oder einen partiellen Verlust, wobei der verbleibende Teil dann zu kurz ist, um eine Fettkette zu bilden (Länge von wenigstens 10 Kohlenstoffatomen). Ein solcher Bruch zerstört die Integrität des Komplexes, der anschließend immer weiter zerlegt wird und schließlich dissoziierte Elemente ergibt, von denen wenigstens eines ein amphiphiles Tensidmolekül ist. Der Abbau des Komplexes kann leicht durch Mikroskopie oder Elektrophorese überprüft werden.
- [0032]** Gemäß einer anderen Variante befindet sich die Disulfidbrücke zwischen den beiden Spacerbrücken eines Übertragungsmittels mit symmetrischer Struktur, so dass seine Reduktion zur Halbierung des Übertragungsmittels führt.
- [0033]** Bevorzugte Übertragungsmittel gemäß der Erfindung umfassen:
- als kationischen hydrophilen Bereich ein Polyamin oder Polyaminoguanidin;
 - als lipophilen Bereich wenigstens zwei aliphatische Fettketten oder aber wenigstens eine von einem Steroid abgeleitete Kette und eine aliphatische Fettkette; und
 - eine Disulfidbrücke, deren Reduktion zum Verlust einer aliphatischen Fettkette oder aber einer von einem Steroid abgeleiteten Kette, wenn das Übertragungsmittel eine solche enthält, führt.
- [0034]** Besonders vorteilhaft umfassen die Übertragungsmittel der Erfindung einen Polyaminbereich, drei aliphatische Ketten, von denen wenigstens zwei Fettketten sind, und eine Disulfidbrücke, die in reduzierendem Milieu zum Verlust einer aliphatischen Kette führt.
- [0035]** Andere besonders vorteilhafte Übertragungsmittel umfassen einen Polyaminbereich, eine aliphatische Fettkette und eine von einem Steroid abgeleitete Kette sowie eine Disulfidbrücke, die in reduzierendem Milieu zum Verlust der von dem Steroid abgeleiteten Kette führt.
- [0036]** Andere besonders vorteilhafte Übertragungsmittel bestehen aus zwei symmetrischen Lipopolyaminen und aus einer Disulfidbrücke, die in reduzierendem Milieu zu deren Halbierung führt.
- [0037]** Solche Mittel sind in den Beispielen veranschaulicht. In nicht einschränkender Weise seien die folgenden Verbindungen genannt:





[0038] Die Erfindung betrifft weiterhin eine Zusammensetzung, die ein Übertragungsmittel, wie es oben definiert wurde, sowie wenigstens eine Nucleinsäure umfasst. Vorzugsweise sind das Übertragungsmittel und die Nucleinsäure in solchen Mengen vorhanden, dass das Verhältnis der positiven Ladungen des Mittels zu den negativen Ladungen der Nucleinsäure zwischen 0,1 und 50 liegt. Dieses Verhältnis kann vom Fachmann leicht in Abhängigkeit vom verwendeten Mittel, der Nucleinsäure und der Art der zu transfizierenden Zellen angepasst werden. Vorteilhafterweise liegt dieses Verhältnis zwischen 3 und 12 Nanomol Mittel gemäß der Erfindung pro µg Nucleinsäure und vorzugsweise zwischen 3 und 9 Nanomol Übertragungsmittel pro µg Nucleinsäure.

[0039] Unter "Nucleinsäure" wird im Sinne der Erfindung sowohl eine Desoxyribonucleinsäure als auch eine Ribonucleinsäure verstanden. Es kann sich um natürliche oder künstliche Sequenzen handeln, und insbesondere um genomische DNA (gDNA), komplementäre DNA (cDNA), Messenger-RNA (mRNA), Transfer-RNA (tRNA), ribosomale RNA (rRNA), Hybridsequenzen oder synthetische oder halbsynthetische Sequenzen, modifizierte oder unmodifizierte Oligonucleotide. Diese Nucleinsäuren können menschlichen, tierischen, pflanzlichen, bakteriellen, viralen usw. Ursprungs sein. Sie können durch jede dem Fachmann bekannte Technik und insbesondere durch Screening von Banken, durch chemische Synthese oder aber durch gemischte Methoden, die die chemische oder enzymatische Modifikation von durch Screening von Banken erhaltenen Sequenzen beinhalten, erhalten werden. Sie können chemisch modifiziert sein, d.h. es kann sich um Pseudonucleinsäuren (PNA), um Oligonucleotide, die durch verschiedene chemische Bindungen (zum Beispiel Phosphorothioat oder Methylphosphonat) modifiziert sind, oder aber um funktionalisierte Oligonucleotide handeln, d.h. solche, die mit einem oder mehreren Molekülen mit unterschiedlichen charakteristischen Eigenschaften gekoppelt sind.

[0040] Was insbesondere die Desoxyribonucleinsäuren betrifft, so können diese einzel- oder doppelsträngig sein, und es kann sich um kurze Oligonucleotide oder längere Sequenzen handeln. Insbesondere bestehen die Nucleinsäuren vorteilhafterweise aus Plasmiden, Vektoren, Episomen, Expressionscassetten usw. Diese Desoxyribonucleinsäuren können Gene von therapeutischem Nutzen, regulatorische Sequenzen der Transcription oder der Replikation, modifizierte oder unmodifizierte Antisense-Sequenzen, Bereiche zur Bindung an andere Zellbestandteile usw. tragen.

[0041] Vorzugsweise umfasst die Nucleinsäure eine Expressionskassette, die aus einem oder mehreren Genen von therapeutischem Nutzen unter der Kontrolle von einem oder mehreren Promotoren und einem Transcriptionsterminator, die in den Zielzellen aktiv sind, besteht.

[0042] Im Sinne der Erfindung versteht man unter "Gen von therapeutischem Nutzen" insbesondere jedes Gen, das für ein Proteinprodukt mit therapeutischer Wirkung codiert. Das so codierte Proteinprodukt kann ein Protein, ein Peptid usw. sein. Dieses Proteinprodukt kann homolog bezüglich der Zielzelle sein (d.h. ein Produkt, das normalerweise in der Zielzelle exprimiert wird, wenn diese keinerlei Pathologie aufweist). In diesem Fall erlaubt die Expression eines Proteins zum Beispiel, eine unzureichende Expression in der Zelle oder die Expression eines aufgrund einer Modifikation inaktiven oder nur schwach aktiven Proteins zu kompensieren oder aber das Protein zu überexprimieren. Das therapeutische Gen kann auch für eine Mutante eines zellulären Proteins codieren, die eine höhere Stabilität, eine modifizierte Aktivität usw. hat. Das Proteinprodukt kann auch heterolog bezüglich der Zielzelle sein. In diesem Fall kann ein exprimiertes Protein zum Beispiel eine mangelhafte Aktivität in der Zelle ergänzen oder hinzufügen, was es dieser ermöglicht, gegen eine Pathologie zu kämpfen oder eine Immunantwort zu stimulieren.

[0043] Von den Produkten von therapeutischem Nutzen im Sinne der vorliegenden Erfindung seien insbeson-

dere genannt Enzyme, Blutderivate, Hormone, Lymphokine [Interleukine, Interferone, TNF usw. (FR 92/03120)], Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter oder ihre Vorläufer oder Syntheseeenzyme, trophische Faktoren (BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/Pleiotrophin usw.), Dystrophin oder ein Minidystrophin (FR 91/11947), das mit Mucoviszidose zusammenhängende Protein CFTR, tumorsupprimierende Gene [p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev usw. (FR 93/04745)], Gene, die für Gerinnungsfaktoren (Faktoren VII, VIII, IX) codieren, Gene, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, Suizidgene (Thymin-Kinase, Cytosin-Desaminase), Gene von Hämoglobin oder anderer Transportproteine, Gene, die den am Lipidstoffwechsel beteiligten Proteinen des Typs Apolipoprotein entsprechen, die aus den Apolipoproteinen A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J und apo(a) ausgewählt sind, Enzyme des Stoffwechsels, wie zum Beispiel die Lipoprotein-Lipase, die Leber-Lipase, die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase, die 7 α -Cholesterin-Hydroxylase, die Phosphatidsäure-Phosphatase oder aber Lipid-Übertragungsproteine, wie das Cholesterinester-Übertragungsprotein und das Phospholipid-Übertragungsprotein, ein HDL-Bindungsprotein oder auch ein Rezeptor, der zum Beispiel aus LDL-Rezeptoren, Chylomikron-Restkörper-Rezeptoren und Scavenger-Rezeptoren usw. ausgewählt ist.

[0044] Die Nucleinsäure von therapeutischem Nutzen kann auch ein Antisense-Gen oder eine Antisense-Sequenz sein, deren Expression in der Zielzelle es erlaubt, die Zelluläre Expression von Genen oder die zelluläre Transcription von mRNA zu unterdrücken. Solche Sequenzen können zum Beispiel gemäß der im Patent EP 140 308 beschriebenen Technik in der Zielzelle in RNA transkribiert werden, die zu den zellulären mRNA komplementär sind, und so deren Translation zu einem Protein blockieren. Die therapeutischen Gene umfassen auch Sequenzen, die für Ribozyme codieren, welche Ziel-RNA selektiv zerstören können (EP 321 201).

[0045] Wie bereits angemerkt, kann die Nucleinsäure auch ein oder mehrere Gene umfassen, die für ein antigenes Peptid codieren, das bei Mensch oder Tier eine Immunantwort hervorrufen kann. In dieser besonderen Ausführungsform erlaubt die Erfindung also die Realisierung entweder von Impfstoffen oder von immuntherapeutischen Behandlungen, die auf Mensch oder Tier angeendet werden, insbesondere gegen Mikroorganismen, Viren oder Krebsgeschwülste. Es kann sich insbesondere um antigene Peptide handeln, die spezifisch für das Epstein-Barr-Virus, das HIV, das Hepatitis-B-Virus (EP 185 573), das Pseudorabiesvirus, das Respiratory-Syncytial-Virus, andere Viren oder auch spezifisch für Tumoren sind (EP 259 212).

[0046] Vorzugsweise umfasst die Nucleinsäure auch Sequenzen, die die Expression des Gens von therapeutischem Nutzen und/oder des Gens, das für das antigene Peptid codiert, in der gewünschten Zelle oder dem gewünschten Organ erlauben. Es kann sich um Sequenzen handeln, die natürlicherweise für die Expression des betreffenden Gens verantwortlich sind, wenn diese Sequenzen in der infizierten Zellen funktionieren können. Es kann sich auch um Sequenzen anderen Ursprungs handeln (die für die Expression anderer Proteine verantwortlich sind, oder sogar synthetische). Insbesondere kann es sich um Promotorsequenzen von eukaryontischen oder viralen Genen handeln. Zum Beispiel kann es sich um Promotorsequenzen handeln, die aus dem Genom der Zelle stammen, die man infizieren möchte. Außerdem kann es sich um Promotorsequenzen handeln, die aus dem Genom eines Virus stammen. Dazu seien zum Beispiel die Promotoren der Gene E1A, MLP, CMV, RSV usw. genannt. Außerdem können diese Expressionssequenzen durch Addition von Aktivator-, Regulatorsequenzen usw. modifiziert werden. Es kann sich auch um einen induzierbaren oder reprimierbaren Promotor handeln.

[0047] Außerdem kann die Nucleinsäure auch, insbesondere stromaufwärts des Gens von therapeutischem Nutzen, eine Signalsequenz umfassen, die das synthetisierte therapeutische Produkt auf einen Weg der Sekretion aus der Zielzelle lenkt. Dieses Sequenzsignal kann das natürliche Sequenzsignal des therapeutischen Produkts sein, aber es kann sich auch um jede andere funktionelle Signalsequenz oder um eine künstliche Signalsequenz handeln. Die Nucleinsäure kann auch eine Signalsequenz umfassen, die das synthetisierte therapeutische Produkt zu einem besonderen Kompartiment der Zelle lenkt.

[0048] Die Zusammensetzungen können außerdem Adjuvantien umfassen, die sich an den Übertragungsmittel/Nucleinsäure-Komplex anlagern und seine Transfektionsfähigkeit verbessern können.

[0049] Unter diesem Gesichtspunkt können die Zusammensetzungen gemäß der Erfindung als Adjuvans ein oder mehrere neutrale Lipide umfassen. Solche Zusammensetzungen sind besonders vorteilhaft, insbesondere wenn das Verhältnis von positiven Ladungen des Mittels zu negativen Ladungen der Nucleinsäure gering ist. Es wurde tatsächlich gezeigt, dass die Zugabe eines neutralen Lipids es erlaubt, die Bildung von Nucleolipidteilchen zu verbessern und das Eindringen in die Zelle durch Destabilisierung der Membran zu begünstigen.

[0050] Vorzugsweise sind die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendeten neutralen Lipide Lipide

mit zwei Fettketten.

[0051] Besonders bevorzugt verwendet man natürliche oder synthetische Lipide, die unter physiologischen Bedingungen zwitterionisch oder frei von Ionenladungen sind. Sie können insbesondere aus Diolethylphosphatidylethanolamin (DOPE), Oleylpalmitoylphosphatidylethanolamin (POPE), Distearoyl-, -palmitoyl-, -cholesteroyl-, -myristoylphosphatidylethanolamin sowie ihren ein- bis dreifach N-methylierten Derivaten, Phosphatidylglycerinen, Glycosyldiacylglycerinen, Cerebrosiden (wie insbesondere Galactocerebrosiden), Sphingolipiden (wie insbesondere Sphingomyelinen) oder auch Asialogangliosiden (wie insbesondere Asialo-GM1 und -GM2), ausgewählt sein. Diese unterschiedlichen Lipide können durch dem Fachmann wohlbekannte klassische Techniken entweder durch Synthese oder durch Extraktion aus Organen (zum Beispiel Hirn) oder Eiern erhalten werden. Insbesondere kann die Extraktion der natürlichen Lipide mittels organischer Lösungsmittel (siehe auch Lehninger Biochemistry) realisiert werden.

[0052] Vor kurzem hat die Anmelderin nachgewiesen, dass es auch besonders vorteilhaft ist, als Adjuvans eine Verbindung zu verwenden, die direkt oder indirekt in die Kondensation der Nucleinsäure eingreift, wie diejenigen, die in der Anmeldung WO 96/25508 genannt sind. Die Anwesenheit einer solchen Verbindung in einer Transfektionszusammensetzung auf der Basis eines Lipopolyamins erlaubt es, die Menge dieses Mittels beträchtlich zu reduzieren, mit den günstigen Folgen, die sich daraus in toxikologischer Hinsicht ergaben, ohne die Transfektionsaktivität der Zusammensetzung in irgendeiner Weise zu beeinträchtigen. Unter einer "Verbindung, die in die Kondensation der Nucleinsäure eingreift" wird hier eine Verbindung verstanden, die die Nucleinsäure direkt oder indirekt kompaktiert. Genauer gesagt, diese Verbindung kann entweder direkt auf die zu transfizierende Nucleinsäure oder auf eine angehängte Verbindung, die direkt an der Kondensation dieser Nucleinsäure beteiligt ist, einwirken. Vorzugsweise wirkt sie direkt auf die Nucleinsäure ein. Insbesondere kann das Vorkompaktierungsmittel jedes Polykation sein, zum Beispiel Polylysin. Nach einer bevorzugten Ausführungsform stammt dieses Mittel, das in die Kondensation der Nucleinsäure eingreift, ganz oder teilweise aus einem Protamin, einem Histon, einem Nucleolin und/oder einem ihrer Derivate. Ein solches Mittel kann auch ganz oder teilweise aus Peptidmotiven (KTPKKAKKP) und/oder (ATPAKKAA) bestehen, wobei die Zahl der Motive zwischen 2 und 10 variieren kann. In der Struktur der Verbindung gemäß der Erfindung können diese Motive kontinuierlich oder diskontinuierlich wiederholt werden. So können sie durch Bindungen biochemischer Natur, zum Beispiel durch eine oder mehrere Aminosäuren, oder chemischer Natur voneinander getrennt sein.

[0053] Vorzugsweise umfassen die Zusammensetzungen der Erfindung 0,01 bis 20 Äquivalente Adjuvans auf ein Äquivalent Nucleinsäuren (w/w) und besonders bevorzugt 0,5 zu 5.

[0054] Die Zusammensetzungen gemäß der Erfindung können auch ein oder mehrere Zielsteuerungselemente aufweisen, die es erlauben, die Nucleinsäurekomplexe zu Rezeptoren oder zu Liganden an der Oberfläche der Zellen zu leiten. Zum Beispiel kann die Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung einen oder mehrere Antikörper, die gegen Moleküle der Zelloberfläche gerichtet sind, oder auch einen oder mehrere Liganden von Membranrezeptoren, wie Insulin, Transferrin, Folsäure oder jeden anderen Wachstumsfaktor, Cytokine oder Vitamine, umfassen. Vorteilhafterweise können in der Zusammensetzung modifizierte oder unmodifizierte Lektine verwendet werden, um besondere Polysaccharide zur Oberfläche der Zelle oder in die benachbarte extrazelluläre Matrix zu lenken. So können Proteine mit dem Motiv RGD, cyclische oder acyclische Peptide, die ein Tandem von RGD-Motiven enthalten, sowie Polylysinpeptide verwendet werden. Vor kurzem wurden auch natürliche oder synthetische Ligandenpeptide beschrieben, die insbesondere aufgrund ihrer Selektivität gegenüber spezifischen Zellen interessant sind und die Internalisierung in diese Zellen wirksam fördern können (Bary et al., Nature Medicine, 2, 1996, 299-305). Diese Zielsteuerungsmittel sind im Allgemeinen mit dem betreffenden kationischen Transfektionsmittel konjugiert.

[0055] Die Erfindung erstreckt sich auch auf jede Zusammensetzung, wie sie oben definiert wurde, die außerdem ein oder mehrere andere Mittel umfasst, die dafür bekannt sind, eine Transfektion mit Nucleinsäuren zu bewirken. Insbesondere seien die Produkte genannt, die im Patent EP 394 111 oder in den Patentanmeldungen WO 96/17823 oder WO 97/18185 (auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird) beschrieben sind.

[0056] Die vorliegende Erfindung bezieht sich außerdem auf die Verwendung eines Übertragungsmittels, wie es oben definiert ist, für die Übertragung von Nucleinsäuren in Zellen.

[0057] Die Zusammensetzungen, die das Übertragungsmittel gemäß der Erfindung umfassen, können für die topische, perkutane, orale, rektale, vaginale, parenterale, intranasale, intravenöse, intramuskuläre, subkutane, intraokulare, transdermale, intratracheale, intraperitoneale usw. Verabreichung zubereitet werden. Vorzugsweise enthalten die pharmazeutischen Zusammensetzungen der Erfindung einen pharmazeutisch annehmbar-

ren Träger für eine injizierbare Zubereitung, insbesondere für eine direkte Injektion in das gewünschte Organ, oder für eine topische Verabreichung (auf die Haut und/oder Schleimhaut). Es kann sich insbesondere um sterile, isotonische Lösungen oder trockene, insbesondere lyophilisierte, Zusammensetzungen handeln, die je nachdem durch Zugabe von sterilisiertem Wasser oder physiologischem Serum die Herstellung von injizierbaren Lösungen erlauben. Die für die Injektion verwendeten Nucleinsäuredosen sowie die Zahl der Verabreichungen können in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern und insbesondere in Abhängigkeit von der verwendeten Verabreichungsart, der betroffenen Pathologie, des zu exprimierenden Gens oder auch der gewünschten Dauer der Behandlung angepasst werden. Was insbesondere die Verabreichungsart betrifft, so kann es sich entweder um eine direkte Injektion in Gewebe oder in den Kreislauf oder um eine Behandlung von Zellen in Kultur mit anschließender Reimplantation derselben durch Injektion oder als Implantat handeln.

[0058] Die Erfindung bezieht sich außerdem auf ein Verfahren zur Übertragung von Nucleinsäuren in Zellen, das die folgenden Schritte umfasst:

- (1) In-Kontakt-Bringen der Nucleinsäure mit einem Übertragungsmittel, wie es oben definiert ist, unter Bildung eines Nucleinsäure/Übertragungsmittel-Komplexes;
- (2) In-Kontakt-Bringen der Zellen mit dem unter (1) gebildeten Komplex.

[0059] Im Falle einer Zusammensetzung, die noch ein oder mehrere andere Übertragungsmittel und/oder ein oder mehrere Adjuvantien umfasst, geht dem Schritt (1) ein Schritt, bei dem die anderen Transfektionsmittel in Kontakt gebracht werden, und/oder ein Schritt, bei dem das Transfektionsmittel mit dem oder den Adjuvantien in Kontakt gebracht wird, voraus.

[0060] Die Komplexe aus dem Mittel gemäß der Erfindung und der Nucleinsäure werden gebildet, indem man auf Volumenbasis zwei Lösungen miteinander mischt, von denen die eine das Übertragungsmittel gemäß der Erfindung in Form von Micellen oder einer hexagonalen lamellaren Phase und die andere die für die Transfektion zu verwendende Nucleinsäure enthält. Die Komplexe bilden sich in wenigen Sekunden. Sie können je nach der Lipidmenge, die der Nucleinsäure hinzugefügt wird, negativ, positiv geladen oder neutral sein (Pitard B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94, 5. 14412-14417, Dezember 1997). Die Größen dieser Komplexe variieren zwischen 50 und 300 nm im Durchmesser (gemessen durch quasielastische Streuung des Lichts und durch Transmissionselektronenmikroskopie). Außerdem variiert die Morphologie der Komplexe mit dem Ladungsverhältnis R (Verhältnis der durch das kationische Lipid beigetragenen positiven Ladungen zu den durch die Nucleinsäure beigetragenen negativen Ladungen). Zum Beispiel sind die negativ geladenen Komplexe von Nucleinsäuremolekülen umgeben. Dagegen weisen die positiv geladenen Komplexe auf ihrer Oberfläche kationische Lipide auf. Was die neutralen Komplexe betrifft, so sind sie kolloidal instabil. Somit hat die Anmelderin gezeigt, dass es möglich ist, sie durch Zugabe eines nichtionischen Tensids in ausreichender Menge zu stabilisieren. Bevorzugte Tenside sind insbesondere Poloxamere, Polyoxyethylenalkohole, Polyoxyethylennonylphenylether oder auch PEG (Polyethylenglycol) mit dendritischem benzylischem Polyether als Endgruppe.

[0061] Die Erfindung bezieht sich außerdem auf ein Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung, wie sie oben definiert ist, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Nucleinsäure mit einem Übertragungsmittel, wie es oben definiert ist, in Kontakt bringt, so dass sich ein Nucleinsäure/Übertragungsmittel-Komplex bildet, wobei diesem Schritt gegebenenfalls das vorherige In-Kontakt-Bringen des Transfektionsmittels mit einem oder mehreren Adjuvantien vorausgeht.

[0062] Das In-Kontakt-Bringen der Zellen mit dem Komplex kann durch Inkubation der Zellen mit dem Komplex (für Verwendungen in vitro oder ex vivo) oder durch Injektion des Komplexes in einen Organismus (für Verwendungen in vivo) erreicht werden. Die Inkubation erfolgt vorzugsweise in Gegenwart von zum Beispiel 0,01 bis 1000 µg Nucleinsäure pro 10⁶ Zellen. Für eine Verabreichung in vivo können Nucleinsäuredosen im Bereich von 0,01 bis 10 mg verwendet werden.

[0063] Die Übertragungsmittel gemäß der Erfindung sind besonders interessant wegen ihrer Verwendung bei der Übertragung von Nucleinsäuren in primäre Zellen oder in etablierte Linien. Es kann sich um Fibroblasten, Muskelzellen, Nervenzellen (Neuronen, Astrocyten, Gliazellen), Leberzellen, blutbildende Zellen (Lymphocyten, CD34, Dendrocyten usw.), Epithelzellen usw. in ausdifferenzierter oder pluripotenter (Vorläufer) Form handeln.

[0064] Die vorliegende Erfindung liefert also ein besonders vorteilhaftes Verfahren zur Behandlung von Krankheiten, das die in-vivo-, ex-vivo- oder in-vitro-Verabreichung einer Nucleinsäure, die die Krankheit heilen kann, assoziiert an eine Verbindung gemäß der Erfindung umfasst. Insbesondere ist dieses Verfahren auf Krankheiten anwendbar, die sich aus einem Überschuss oder einem Mangel an Protein- oder Nucleinsäure-

produkt ergeben. Die verabreichte Nucleinsäure codiert für das Proteinprodukt oder enthält das Nucleinsäureprodukt.

[0065] Außer den vorstehenden Merkmalen umfasst die vorliegende Erfindung auch andere Merkmale und Vorteile, die aus den folgenden Beispielen und Figuren hervorgehen und die als die Erfindung erläuternd angesehen werden sollen, ohne deren Umfang einzuschränken. Insbesondere schlägt die Anmelderin in nicht-einschränkender Weise verschiedene Arbeitsvorschriften sowie Reaktionszwischenstufen vor, die angewendet werden können, um die Übertragungsmittel gemäß der Erfindung herzustellen. Selbstverständlich liegt es im Ermessen des Fachmanns, sich durch diese Vorschriften oder Zwischenprodukte inspirieren zu lassen, um analoge Verfahren zu entwickeln, die zu denselben Verbindungen führen.

Figuren

[0066] [Fig. 1](#): Kurve, die das Profil der Solubilisierung der Liposomen EPC/EPA (10:1) durch Triton X-100 durch Messung der Trübheit der Lösung mittels eines Spektrophotometers darstellt. Auf der Abszisse ist die zugegebene Menge von Triton X-100 in mM aufgetragen. Auf der Ordinate wird die Extinktion der Lösung gemessen, die die Liposomen enthält.

[0067] [Fig. 2](#): Kurve, die das Profil der Solubilisierung der Liposomen EPC/EPA (10:1) durch Verbindung (VII) durch Messung der Trübheit der Lösung mittels eines Spektrophotometers darstellt. Auf der Abszisse ist die zugegebene Menge der Verbindung (VII) in mM aufgetragen. Auf der Ordinate wird die Extinktion der Lösung gemessen, die die Liposomen enthält.

[0068] [Fig. 3](#): Transfektionsaktivität der Verbindung (VI) in HepG2-Zellen in Abwesenheit von Serum im Vergleich zum kationischen Lipid der Formel $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGly}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$, das als Referenzübertragungsmittel (in der Anmeldung im Folgenden REF genannt) verwendet wird.

[0069] [Fig. 4](#): Transfektionsaktivität der Verbindung (I) und der Verbindung (IV) in HepG2- und HeLa-Zellen in Anwesenheit und in Abwesenheit von Serum im Vergleich zum kationischen Referenzlipid REF.

[0070] [Fig. 5](#): Histogramm, das die Übertragungsaktivität der Verbindung (I) ohne Colipid oder aber in Gegenwart von DOPE oder Cholesterin als Colipid in vitro in HeLa-Zellen darstellt. Die Ordinate stellt die Expression von Luciferase in pg pro Napf dar. Die Abszisse zeigt das Verhältnis von Verbindung (I)/DNA in nmol/μg DNA an.

[0071] [Fig. 6](#): Histogramm, das die Übertragungsaktivität der Verbindung (IV) ohne Colipid oder aber in Gegenwart von DOPE oder Cholesterin als Colipid in vitro in HeLa-Zellen darstellt. Die Ordinate stellt die Expression von Luciferase in pg pro Napf dar. Die Abszisse zeigt das Verhältnis von Verbindung (IV)/DNA in nmol/μg DNA an.

[0072] [Fig. 7](#): Transfektionsaktivität der Verbindung (II) in HepG2-Zellen in Anwesenheit und in Abwesenheit von Serum im Vergleich zum kationischen Referenzlipid REF.

[0073] [Fig. 8](#): Histogramm, das die Übertragungsaktivität der Verbindung (II) ohne Colipid oder aber in Gegenwart von DOPE oder Cholesterin als Colipid in vitro in HeLa-Zellen darstellt. Die Ordinate stellt die Expression von Luciferase in pg pro Napf dar. Die Abszisse zeigt das Verhältnis von Verbindung (II)/DNA in nmol/μg DNA an.

[0074] [Fig. 9](#): Transfektionsaktivität der Verbindung (V) in HepG2- und HeLa-Zellen in Anwesenheit und in Abwesenheit von Serum im Vergleich zum kationischen Referenzlipid REF.

Beispiele

Beispiel 1: Chemische Synthesen der Übertragungsmittel gemäß der Erfindung

A. Material

– Triethylamin, N-Ethyl-diisopropylamin, Dioctadecylamin, $\text{N}_\alpha, \text{N}'_\alpha$ -Di-Boc-cystin und das Reagens BOP sind im Handel erhältlich.

[0075] Dasselbe gilt für Amylamin, Octadecylamin, Pentanthiol, Dodecanthiol, Octadecanthiol und Thiocholesterin.

– $\text{BocNH}(\text{CH}_2)_3\text{NBoc}(\text{CH}_2)_4\text{NBoc}(\text{CH}_2)_3\text{NBocCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ wurde im Labor gemäß der Arbeitsweise synthetisiert, die in der Anmeldung WO 97/18185 und in dem von G. Byk, M. Frederic und D. Scherman veröffentlichten Artikel, Tetrahedron Letters (1997), 38, 5. 3219-3222, beschrieben ist.

B. Verfahren

a) Spektroskopische Analysen

[0076] Die Protonen-NMR-Spektren (kernmagnetische Resonanz) wurden auf Bruker-250- und -400-MHz-Spektrometern aufgenommen.

b) Chromatographietechniken

[0077] Die HPLC-Analysen (high performance liquid chromatography) werden auf einer Hitachi-Apparatur durchgeführt, die mit einem Autosampler A5-2000A, einer Pumpe L-6200A, einem UV-L-4000-Detektor bei 220 nm und einem Integrator D 2500 ausgestattet ist. Die verwendete Säule, die von Applied Biosystems vertrieben wird, besteht aus Edelstahl und ist 3 cm lang und 4,6 mm im Durchmesser. Bei den mobilen Phasen handelt es sich um Wasser und Acetonitril, die mit Trifluoressigsäure versetzt sind, und bei der stationären Phase handelt es sich um Aquapore Butyl 7 μm . Die Fließgeschwindigkeit variiert zwischen 1 und 4 ml/min.

[0078] Dünnschichtchromatographie (DC) wird auf Aluminiumplättchen 20 × 20 durchgeführt, die mit Kieselgel bedeckt sind.

c) Präparative HPLC-Reinigung

– Die verwendete Apparatur ist eine Anordnung für die Gradienten-Flüssigchromatographie, die einen UV-Nachweis erlaubt. Diese präparative Kette ist zusammengesetzt aus:

Pumpe A: Gilson Modell 305, ausgestattet mit einem 50-SC-Kopf.

Pumpe B: Gilson Modell 303, ausgestattet mit einem 50-SC-Kopf.

Einspritzpumpe: Gilson Modell 303, ausgestattet mit einem 25-SC-Kopf.

Druckmodul: Gilson Modell 806.

Mischer: Gilson Modell 811 C, ausgestattet mit einem 23-ml-Kopf.

UV-Detektor: Gilson Modell 119, ausgestattet mit einer präparativen Zelle, geregelt auf 220 nm.

Fraktionensammler: Gilson Modell 202, ausgestattet mit Ständer Nr. 21. Integrator: Shimadzu Modell C-R6A.

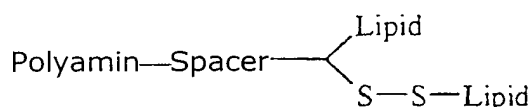
Säule: C4-Säule (10 mm) aus Edelstahl mit 25 cm Länge und 2,2 cm Durchmesser, vertrieben von Vydac, Modell 214 TP 1022.

– Die Lösung des zu reinigenden Produkts wird mit der Einspritzpumpe mit einer Fließgeschwindigkeit von 15 ml/min auf die Säule aufgetragen. Bei den mobilen Phasen handelt es sich um Wasser und Acetonitril.

C. Chemische Synthesen

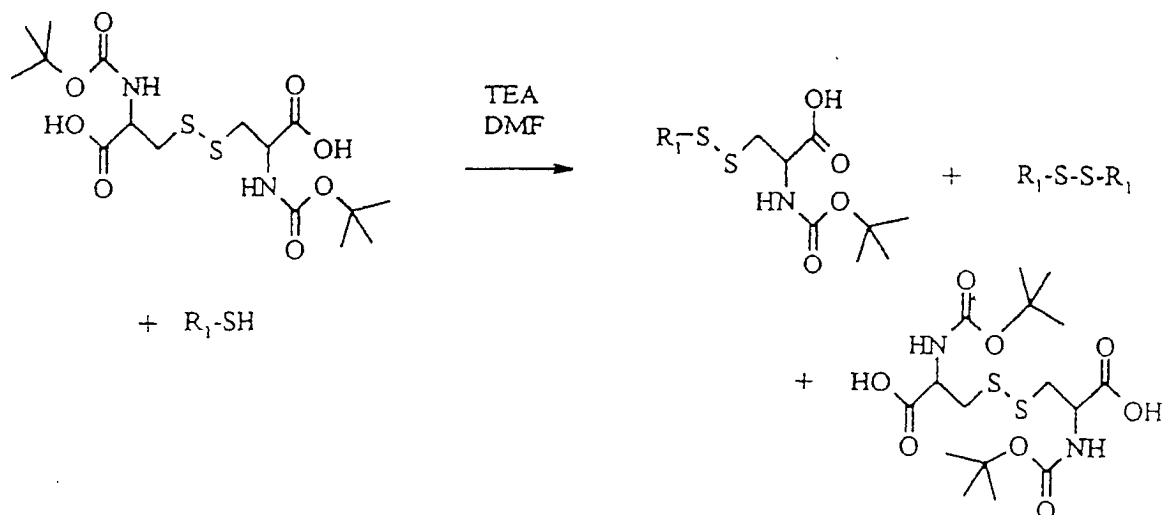
a) Übertragungsmittel mit Fettketten, reduzierbar aufgrund ihrer Disulfidbrücke

[0079] Diese Moleküle haben die allgemeine Struktur:

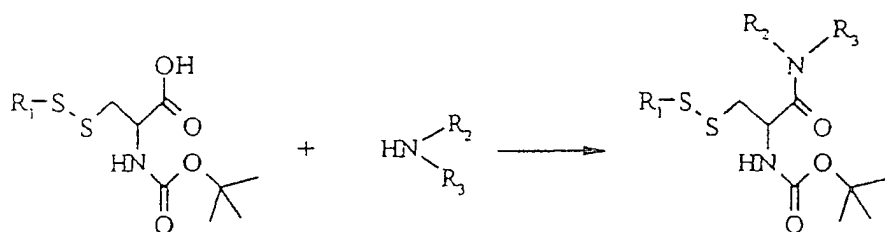


[0080] Sie wurden in der folgenden Weise aufgebaut:

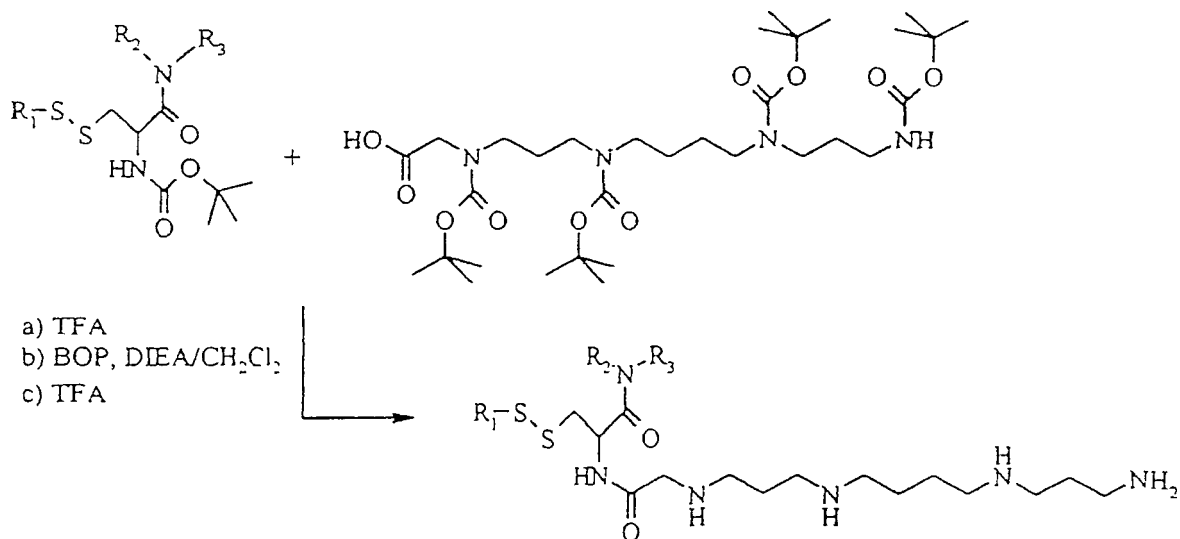
Schritt 1



Schritt 2



Schritt 3



[0081] Die folgenden nichteinschränkenden Beispiele veranschaulichen diese Übertragungsmittel:

Verbindung (I): $R_1 = (CH_2)_4CH_3$; $R_2 = (CH_2)_{17}CH_3$; $R_3 = (CH_2)_{17}CH_3$ [Präparat 3.1]

Verbindung (II): $R_1 = (CH_2)_{17}CH_3$; $R_2 = (CH_2)_{17}CH_3$; $R_3 = H$ [Präparat 3.2]

Verbindung (III): $R_1 = (CH_2)_{11}CH_3$; $R_2 = (CH_2)_{17}CH_3$; $R_3 = H$ [Präparat 3.3]

Verbindung (IV): $R_1 = (CH_2)_{17}CH_3$; $R_2 = (CH_2)_{17}CH_3$; $R_3 = (CH_2)_{17}CH_3$ [Präparat 3.4]

Verbindung (V): $R_1 = \text{Cholesteryl}$; $R_2 = (CH_2)_{17}CH_3$; $R_3 = H$ [Präparat 3.5]

Schritt 1

• Präparat 1.1: NHBocCys[S-S-(CH₂)₄CH₃]-OH

[0082] N_α,N_α'-Di-Boc-cystin (6,81 mmol) wird in Dimethylformamid (20 cm³) gelöst. Zu dieser Lösung werden Triethylamin (58,1 mmol) und dann 1-Pentanthiol (6,81 mmol) gegeben. Das Gemisch wird 2 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Triethylamin wird verdampft, und dann wird das Konzentrat zu einer 0,5 M Lösung von Kaliumsulfat (KHSO₄) (300 cm³) gegeben. Die organischen Phasen werden vereinigt und über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, und dann wird das Chloroform verdampft. Der Trockenextrakt wird mit Diethylether (100 cm³) in Lösung gebracht und dann mit dreimal 50 cm³ einer gesättigten Lösung von Natriumcarbonat (NaHCO₃) extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen werden durch Zugabe einer 0,5 M Lösung von KHSO₄ (350 cm³) bis auf pH = 3 angesäuert. Das ausfallende Produkt wird mit dreimal 100 cm³ Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit zweimal 50 cm³ einer gesättigten Lösung von Natriumchlorid (NaCl) gewaschen und dann über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Das Chloroform wird mit dem Rotationsverdampfer verdampft. Das erhaltene Produkt wird mit einem Gemisch von Chloroform/Methanol (9/1 v/v) auf einer Kieselsäuresäule eluiert.

Man erhält 2,31 mmol Produkt (Ausbeute 34%).

DC: R_f = 0,63 (CHCl₃/MeOH, 9:1).

• Präparat 1.2: NHBocCys[S-S-(CH₂CH₂)₁₇CH₃]-OH

[0083] N_α,N_α'-Di-Boc-cystin (6,81 mmol) wird in Dimethylformamid (20 cm³) gelöst. Zu dieser Lösung werden Triethylamin (58,1 mmol) und dann 1-Octadecanthiol (6,81 mmol) gegeben. Das Gemisch wird 2 Stunden lang bei 40 °C gerührt. Das Triethylamin wird mit dem Rotationsverdampfer verdampft, und dann wird das Konzentrat zu einer 0,5 M Lösung von KHSO₄ (300 cm³) gegeben. Das ausfallende Produkt wird mit dreimal 100 cm³ Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, und dann wird das Chloroform verdampft. Der Trockenextrakt wird mit Diethylether (100 cm³) in Lösung gebracht und dann mit dreimal 50 cm³ einer gesättigten Lösung von NaHCO₃ extrahiert. Die Etherphase wird durch Ausschütteln mit zweimal 100 cm³ einer 0,5 M Lösung von KHSO₄ angesäuert und dann mit zweimal 50 cm³ einer gesättigten Lösung von NaCl gewaschen. Die Etherphase wird über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und dann mit dem Rotationsverdampfer mit zur Trockne eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt wird aus Petrolether umkristallisiert.

Man erhält 1,36 mmol Produkt (Ausbeute 20%).

DC: R_f = 0,67 (CHCl₃/MeOH, 9:1); HPLC: Rt = 17,80 min.

• Präparat 1.3: NHBocCys[S-S-cholesterin]-OH

[0084] Die Synthese ist identisch mit Präparat 1.2, aber unter Verwendung von Thiocholesterin.

Man erhält eine Ausbeute von 58%.

DC: R_f = 0,59 (CHCl₃/MeOH, 9:1); HPLC: Rt = 19,16 min.

• Präparat 1.4: NHBocCys[S-S-(CH₂)₁₁CH₃]-OH

[0085] Die Synthese ist identisch mit Präparat 1.2, aber bei Raumtemperatur und unter Verwendung von 1-Dodecanthiol.

Man erhält eine Ausbeute von 40%.

DC: R_f = 0,69 (CHCl₃/MeOH, 9:1); HPLC: Rt = 13,23 min.

Schritt 2

• Präparat 2.1: NHBocCys[S-S-(CH₂CH₂)₄CH₃]-N[(CH₂)₁₇CH₃]₂

[0086] Das in 1.1 erhaltene Produkt (1,15 mmol) wird in Dichlormethan (10 cm³) gelöst, und es werden N-Ethyl-diisopropylamin (2,86 mmol), Dioctadecylamin (1,15 mmol) und BOP (1,27 mmol) hinzugefügt.

[0087] Das Gemisch wird 2 Stunden lang gerührt, und dann werden DC und HPLC durchgeführt.

[0088] Das Dichlormethan wird mit einem Rotationsverdampfer verdampft. Der "rohe Rückstand" wird in Chloroform (100 ml) aufgenommen und dann nacheinander mit dreimal 50 cm³ 0,5 M KHSO₄, dann dreimal 50 cm³ einer gesättigten NaHCO₃-Lösung und schließlich zweimal 50 cm³ einer gesättigten NaCl-Lösung gewa-

schen. Die organische Phase wird über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, und dann wird das Chloroform mit einem Rotationsverdampfer verdampft. Man erhält eine Ausbeute von 64%.
DC: $R_f = 0,90$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1); HPLC: $R_t = 25,96$ min.

Präparat 2.2: $\text{NHBocCys}[\text{S-S-(CH}_2\text{)}_{17}\text{CH}_3\text{]-NH(CH}_2\text{)}_{17}\text{CH}_3$

[0089] Die Synthese ist identisch mit Präparat 2.1, aber unter Verwendung des in Präparat 1.2 erhaltenen Produkts als Ausgangsstoff.

Man erhält eine Ausbeute von 97%.

DC: $R_f = 0,89$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1); HPLC: $R_t = 24,84$ min.

Präparat 2.3: $\text{NHBocCys}[\text{S-S-(CH}_2\text{CH}_2\text{)}_{11}\text{CH}_3\text{]-NH(CH}_2\text{)}_{17}\text{CH}_3$

[0090] Die Synthese ist identisch mit Präparat 2.1, aber unter Verwendung des Produkts von Präparat 1.4 als Ausgangsstoff.

Man erhält eine Ausbeute von 86%.

DC: $R_f = 0,90$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1); HPLC: $R_t = 22,22$ min.

• Präparat 2.4: $\text{NHBocCys}[\text{S-S-(CH}_2\text{CH}_2\text{)}_{11}\text{CH}_3\text{]-N[(CH}_2\text{)}_{17}\text{CH}_3\text{]}_2$

[0091] Die Synthese ist identisch mit Präparat 2.1, aber unter Verwendung von Dioctadecylamin und des Produkts von Präparat 1.4 als Ausgangsstoffe.

Man erhält eine Ausbeute von 85%.

DC: $R_f = 0,90$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1).

• Präparat 2.5: $\text{NHBocCys}[\text{S-S-cholesterin}]\text{-NH(CH}_2\text{)}_{17}\text{CH}_3$

[0092] Die Synthese ist identisch mit Präparat 2.1, aber unter Verwendung von Dioctadecylamin und des Produkts von Präparat 1.3 als Ausgangsstoffe.

Man erhält eine Ausbeute von 90%.

DC: $R_f = 0,88$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1); HPLC: $R_t = 26,98$ min.

Schritt 3

Präparat 3.1 [Verbindung (I)]: $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH(CH}_2\text{)}_4\text{NH(CH}_2\text{)}_3\text{NHCH}_2\text{COCys}[\text{S-S-(CH}_2\text{)}_4\text{CH}_3\text{]-N[(CH}_2\text{)}_{17}\text{CH}_3\text{]}_2$

[0093] Trifluoressigsäure (10 cm^3) wird zu dem Produkt von Präparat 2.1 gegeben. Das Medium wird 1,5 Stunden lang gerührt, und nach der BOC-Abspaltung wird eine HPLC durchgeführt. Die Trifluoressigsäure wird verdampft, und um die Spuren zu vertreiben, wird mit dreimal 5 cm^3 Diethylether abgedampft.

[0094] Der Trockenextrakt wird in 10 cm^3 Dichlormethan gelöst, dann werden N-Ethyl-diisopropylamin ($3,34\text{ mmol}$), $\text{BocNH(CH}_2\text{)}_3\text{NBoc(CH}_2\text{)}_4\text{NBoc(CH}_2\text{)}_3\text{NBocCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ($0,644\text{ mmol}$) und BOP ($0,708\text{ mmol}$) hinzugefügt. Das Gemisch wird 2 Stunden lang gerührt, und die Reaktion wird mit DC und HPLC verfolgt.

[0095] Das Dichlormethan wird mit dem Rotationsverdampfer verdampft. Der rohe Rückstand wird in Chloroform (100 ml) aufgenommen und dann nacheinander mit dreimal 50 cm^3 $0,5\text{ M KHSO}_4$, dann dreimal 50 ml einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung und schließlich zweimal 50 cm^3 einer gesättigten NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, und dann wird das Chloroform mit dem Rotationsverdampfer verdampft.

[0096] Trifluoressigsäure (10 cm^3) wird zu dem Trockenextrakt gegeben. Das Medium wird 1,5 Stunden lang gerührt, und nach der BOC-Abspaltung wird eine HPLC durchgeführt. Die Trifluoressigsäure wird verdampft, und um die Spuren zu vertreiben, wird mit dreimal 5 cm^3 Diethylether abgedampft.

[0097] Das erhaltene Rohprodukt wird durch präparatives HPLC gereinigt. Die interessanten Fraktionen werden gepoolt und lyophilisiert.

Man erhält $0,081\text{ mmol}$ Produkt als Salz (Ausbeute 11%).

HPLC: $R_t = 17,79$ min.

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ ppm): $0,90$ (mt, 9H: CH_3 der beiden Octadecylaminogruppen und CH_3 der Pentyldisulfanylggruppe); $1,15$ bis $1,50$ (mt, 64H: 15 CH_2 von einer der beiden Octadecylaminogruppen

– 15 CH₂ der anderen Octadecylaminogruppe und 2 CH₂ von der Pentyldisulfanylgruppe); 1,47 (mt, 2H: 1 CH₂ von einer der beiden Octadecylaminogruppen); 1,55 bis 1,75 (mt, 4H: 1 CH₂ von einer der beiden Octadecylaminogruppen und 1 CH₂ von der Pentyldisulfanylgruppe); 1,65 (mf, 4H: die 2 zentralen CH₂ der Butylgruppe); 1,85 bis 2,05 (mt, 4H: das zentrale CH₂ der beiden Propylgruppen); 2,70 bis 2,85 (mt, 1H: 1H des CH₂S von Cystein); 2,78 (mt, 2H: SCH₂ der Pentyldisulfanylgruppe), 2,85 bis 3,50 (mt: die beiden NCH₂ der Butylgruppe – die beiden NCH₂ der beiden Propylgruppen – das andere H des CH₂S von Cystein und das NCH₂ der beiden Octadecylaminogruppen); 3,80 (breites s, 2H: NCH₂CON von Glycylamino); 5,07 (mt, 1H: CONCHCON von Cystein); 9,05 (d, J = 8 Hz, 1H: CONH von Cystein); 7,95 bis 8,85 und 8,90 bis 9,15 (jeweils 2 mfs und ein verbreitertes mf: die H, die den NH und NH₂ entsprechen).

MH⁺ = 969

• Präparat 3.2 [Verbindung (II)]: NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COCys[S-S-(CH₂)₁₇CH₃]-NH(CH₂)₁₇CH₃

[0098] Das Verfahren ist mit dem in Präparat 3.1 beschriebenen identisch, aber ausgehend von dem in Präparat 2.2 erhaltenen Produkt.

Man erhält eine Ausbeute von 31% Produkt als Salz.

HPLC: Rt = 15,63 min.

¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 0,89 (t, J = 7,5 Hz, 6H: CH₃ der Octadecylaminogruppe und CH₃ der Octadecyldisulfanylgruppe); 1,15 bis 1,45 (mt, 60H: 15 CH₂ der Octadecylaminogruppe und 15 CH₂ der Octadecyldisulfanylgruppe); 1,42 (mt: eines der CH₂ der Octadecylaminogruppe); 1,55 bis 1,70 (mt, 2H: eines der CH₂ der Octadecyldisulfanylgruppe); 1,66 (mf, 4H: die beiden zentralen CH₂ der Butylgruppe); 1,85 bis 2,05 (mt, 4H: das zentrale CH₂ der beiden Propylgruppen); 2,76 (t, J = 7,5 Hz, 2H: SCH₂ der Octadecyldisulfanylgruppe); 2,85 bis 3,10 (mt, 14H: die beiden NCH₂ der Butylgruppe – die beiden NCH₂ der beiden Propylgruppen – 1H des NCH₂ der Octadecylaminogruppe und 1H des CH₂S von Cystein); 3,10 (dd, J = 13,5 und 6 Hz, 1H: das andere H des CH₂S von Cystein); 3,18 (mt, 1H: das andere H des NCH₂ der Octadecylaminogruppe); 3,82 (AB sehr eingeschränkt, 2H: NCH₂CON der Glycylaminogruppe); 4,60 (mt, 1H: CONCHCON von Cystein); 8,27 (t, J = 5,5 Hz, 1H: CONH der Octadecylaminogruppe); 8,90 (d, J = 8,5 Hz, 1H: CONH von Cystein); 7,95 bis 8,82 und 9,07 (3 mfs: die H, die den NH und NH₂ entsprechen).

MH⁺ = 899

• Präparat 3.3 [Verbindung (III)]: NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COCys[S-S-(CH₂)₁₁CH₃]-NH(CH₂)₁₇CH₃

[0099] Das Verfahren ist mit dem in Präparat 3.1 beschriebenen identisch, aber ausgehend von dem in Präparat 2.3 erhaltenen Produkt.

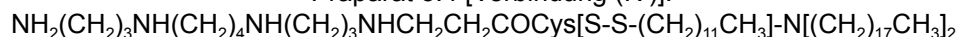
Man erhält eine Ausbeute von 26,5% Produkt als Salz.

HPLC: Rt = 12,36 min.

¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 0,90 (t, J = 7,5 Hz, 6H: CH₃ der Octadecylaminogruppe und CH₃ der Dodecyldisulfanylgruppe); 1,15 bis 1,50 (mt, 48H: 15 CH₂ der Octadecylaminogruppe und 9 CH₂ der Dodecyldisulfanylgruppe); 1,43 (mt: 1 CH₂ der Octadecylaminogruppe); 1,55 bis 1,70 (mt, 2H: 1 CH₂ der Dodecyldisulfanylgruppe); 1,65 (mf, 4H: die beiden zentralen CH₂ der Butylgruppe); 1,85 bis 2,05 (mt, 4H: das zentrale CH₂ der beiden Propylgruppen); 2,76 (t, J = 7,5 Hz, 2H: SCH₂ der Dodecyldisulfanylgruppe); 2,80 bis 3,05 (mt, 14H: die beiden NCH₂ der Butylgruppe – die beiden NCH₂ der beiden Propylgruppen – 1H des NCH₂ der Octadecylaminogruppe und 1H des CH₂S von Cystein); 3,11 (dd, J = 13,5 und 6 Hz, 1H: das andere H des CH₂S von Cystein); 3,17 (mt, 1H: das andere H des NCH₂ der Octadecylaminogruppe); 3,83 (AB eingeschränkt, 2H: NCH₂CON der Glycylaminogruppe); 4,60 (mt, 1H: CONCHCON von Cystein); 8,25 (t, J = 5,5 Hz, 1H: CONH der Octadecylaminogruppe); 8,99 (d, J = 8,5 Hz, 1H: CONH von Cystein); 7,96 bis 8,84 und 9,09 (3 mfs: die H, die den NH und NH₂ entsprechen).

MH⁺ = 815

• Präparat 3.4 [Verbindung (IV)]:



[0100] Das in Präparat 2.4 erhaltene Produkt wird in einer mit Präparat 3.1 identischen Synthese verwendet. Man erhält eine Ausbeute von 39% Produkt als Salz.

HPLC: Rt = 19,75 min.

¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 0,87 (t, J = 7,5 Hz, 9H: CH₃ der beiden Octadecylaminogruppen und CH₃ der Dodecyldisulfanylgruppe); 1,15 bis 1,50 (mt, 78H: 15 CH₂ einer der beiden Octadecylaminogruppen – 15 CH₂ der anderen Octadecylaminogruppe und 9 CH₂ der Dodecyldisulfanylgruppe), 1,47 (mt, 2H: 1 CH₂ einer der beiden Octadecylaminogruppen); 1,50 bis 1,70 (mt, 4H: 1 CH₂ einer der beiden Octadecylaminogruppen und 1 CH₂ der Dodecyldisulfanylgruppe); 1,68 (mf, 4H: die beiden zentralen CH₂ der Butylgruppe);

1,85 bis 2,10 (mt, 4H: das zentrale CH₂ der beiden Propylgruppen); 2,77 (t, J = 7,5 Hz, 2H: SCH₂ der Dodecyl-disulfanylgruppe); 2,80 (mt, 1H: 1H des CH₂S von Cystein); 2,70 bis 3,50 (mt: die beiden NCH₂ der Butylgruppe – die beiden NCH₂ der beiden Propylgruppen – das andere H des CH₂S von Cystein und das NCH₂ der beiden Octadecylaminogruppen); 3,80 (breites s, 2H: NCH₂CON der Glycylaminogruppe); 5,05 (mt, 1H: CONCHCON von Cystein); 9,07 (d, J = 8 Hz, 1H: CONH von Cystein); 7,75 bis 8,20 und 8,65 bis 9,25 (2 verbreiterte mfs: die H, die den NH und NH₂ entsprechen).

MH⁺ = 1067

• Präparat 3.5 [Verbindung (V)]: NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COCys[S-S-cholesterin]-NH(CH₂)₁₇CH₃

[0101] Das in Präparat 2.5 erhaltene Produkt wird in einer Synthese verwendet, die mit Präparat 3.1 identisch ist, außer das für die Abspaltung des BOC am Ende das folgende Gemisch verwendet wird: 10 cm³ TFA, 0,5 cm³ Wasser, 0,5 cm³ Thioanisol und 0,75 g Phenol.

Man erhält eine Ausbeute von 5,6% Produkt als Salz.

HPLC: Rt = 16,59 min.

¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, (CD₃)₂SO, bei einer Temperatur von 383 K, δ ppm): 0,74 und 1,05 (2s, jeweils 3H: 18-CH₃ und 19-CH₃ des Cholesterylrests); 0,80 bis 0,95 (mt: die H, die dem CH₃ der Octadecylaminogruppe und dem 26-CH₃, 27-CH₃ und 21-CH₃ des Cholesterylrests entsprechen); 1,77 (mt: die 4H, die den beiden zentralen CH₂ der Butylgruppe entsprechen); 1,85 bis 2,10 (mt: die 4H, die dem zentralen CH₂ der beiden Propylgruppen entsprechen); 2,90 bis 3,25 (mt: die 16H, die den beiden NCH₂ der Butylgruppe, den beiden NCH₂ der beiden Propylgruppen, dem CH₂S von Cystein und dem NCH₂ der Octadecylaminogruppe entsprechen); 3,63 (AB eingeschränkt, 2H: NCH₂CON der Glycylaminogruppe), 4,61 (mt, 1H: CONCHCON von Cystein); 5,39 (mt, 1H: 6-CH des Cholesterylrests); 7,69 (mt, 1H: CONH der Octadecylaminogruppe); 8,25 (mf, 1H: CONH von Cystein). Für alle anderen Protonen der Cholesteryl- und der Octadecylaminogruppe treten die entsprechenden Signale zwischen 0,60 und 3,00 ppm auf.

MH⁺ = 1015

b) Symmetrische Übertragungsmittel, die aufgrund der Disulfidgruppe halbierbar sind

[0102] Diese Moleküle der allgemeinen Struktur

Polyamin—Spacer—Lipid



Polyamin—Spacer—Lipid

wurden in der folgenden Weise hergestellt:

gnesiumsulfat getrocknet, und dann wird das Ethylacetat mit einem Rotationsverdampfer verdampft. Man erhält 0,346 mmol Produkt (Ausbeute 69%).
DC: $R_f = 0,94$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1).

Schritt 2

• Präparat 2 [Verbindung (VI)]: $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COCyNH}-(\text{CN}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$

[0105] Trifluoressigsäure (5 cm^3) wird zu dem in Präparat 1 erhaltenen Produkt gegeben. Das Gemisch wird 1,5 Stunden lang gerührt, und nach der BOC-Abspaltung wird eine HPLC durchgeführt. Die Trifluoressigsäure wird verdampft, und um die Spuren zu vertreiben, wird mit dreimal 5 cm^3 Diethylether abgedampft.

[0106] Der Trockenextrakt wird in Dichlormethan (25 cm^3) gelöst, dann werden N-Ethyldiisopropylamin (3,44 mmol), $\text{BocNH}(\text{CH}_2)_3\text{NBoc}(\text{CH}_2)_4\text{NBoc}(\text{CH}_2)_3\text{NBocCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ (0,697 mmol) und BOP (0,86 mmol) hinzugefügt. Das Gemisch wird 2 Stunden lang gerührt, und die Reaktion wird mit DC und HPLC verfolgt.

[0107] Das Dichlormethan wird mit dem Rotationsverdampfer verdampft. Der "rohe Rückstand" wird in Ethylacetat (100 cm^3) aufgenommen und dann nacheinander mit dreimal 50 cm^3 0,5 M KHSO_4 , dann dreimal 50 cm^3 einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung und schließlich zweimal 50 cm^3 einer gesättigten NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, und dann wird das Ethylacetat mit dem Rotationsverdampfer verdampft.
DC: $R_f = 0,90$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1), HPLC: $R_t = 26,10 \text{ min}$.

[0108] Trifluoressigsäure (5 cm^3) wird zu dem Trockenextrakt gegeben. Das Gemisch wird 1,5 Stunden lang gerührt, und nach der BOC-Abspaltung wird eine HPLC durchgeführt. Die Trifluoressigsäure wird verdampft, und um die Spuren zu vertreiben, wird mit dreimal 5 cm^3 Diethylether abgedampft.

[0109] Das erhaltene Rohprodukt wird durch präparatives HPLC gereinigt. Die interessanten Fraktionen werden gepoolt und lyophilisiert.

Man erhält 0,099 mmol Produkt als Salz (Ausbeute 28,5%).

HPLC: $R_t = 10,55 \text{ min}$.

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, $\delta \text{ ppm}$): 0,91 (t, $J = 7,5 \text{ Hz}$, 6H: CH_3 der beiden Octadecylaminogruppen); 1,10 bis 1,40 (mt, 60H: 15 CH_2 einer der beiden Octadecylaminogruppen und 15 CH_2 der anderen Octadecylaminogruppe); 1,43 (mt, 4H: 1 CH_2 der beiden Octadecylaminogruppen); 1,64 (mf, 8H: die beiden zentralen CH_2 der beiden Butylgruppen), 1,85 bis 2,10 (mt, 8H: das zentrale CH_2 der vier Propylgruppen); 2,80 bis 3,15 (mt, 32H: die beiden NCH_2 der beiden Butylgruppen – die 2 NCH_2 der vier Propylgruppen – das NCH_2 der beiden Octadecylaminogruppen und das CH_2S der beiden Cysteine); 3,84 (mf, 4H: das NCH_2CON der beiden Glycylaminogruppen); 4,60 (mt, 2H: das CONCHCON der beiden Cysteine); 8,27 (mf, 2H: das CONH der beiden Octadecylaminogruppen); 8,95 (mf, 2H: das CONH der beiden Cysteine); 7,97 bis 8,87 und 9,15 (3 mfs: die H, die den NH und NH_2 entsprechen).
 $\text{MH}^+ = 1227$.

Beispiel 2: Bewertung der Tensidwirkung der Übertragungsmittel gemäß der Erfindung

[0110] Es ist das Ziel dieses Beispiels, zu zeigen, dass die Übertragungsmittel gemäß der Erfindung Tensideigenschaften besitzen, d.h. dass sie in der Lage sind, Membranen aufzulösen.

[0111] Dazu verwendet man ein in-vitro-Modell, das biologische Membranen darstellt, nämlich EPC/EPA-Liposomen (Eier-Phosphatidylcholin/Eier-Phosphatidylsäure, 10:1). Ganz wie die biologischen Membranen sind die Wände dieser Liposomen aus Phospholipid-Doppelschichten aufgebaut, und sie zeigen daher ein vergleichbares Verhalten.

[0112] Diese Liposomen werden durch Auflösen verschiedener Bestandteile in Chloroform und anschließendes Verdampfen des Chloroforms in einem Rotationsverdampfer gebildet. Der erhaltene Lipidfilm wird in Wasser redispersiert, und dann werden die Liposomen durch Ultraschallbehandlung und Erhitzen gebildet.

[0113] Die Bewertung der Tensidwirkung des zu den Liposomen gegebenen Produkts erfolgt durch Messung der Trübung mit Hilfe eines Spektrophotometers.

[0114] Zum Vergleich wurde ein erstes Experiment mit Triton X-100 durchgeführt, einem wohlbekannten kom-

merziellen Tensid. Man erhält dabei eine vollständige Auflösung der Liposomen (100% Solubilisierung), wie auf der Kurve von [Fig. 1](#) dargestellt ist.

[0115] Das zweite getestete Produkt ist ein amphiphiles Molekül, das ein Polyamin umfasst, das über einen Spacer mit einer Fettkette verbunden ist, die 18 Kohlenstoffatome enthält (Verbindung (VII)). Es handelt sich also um das Molekül, das durch Reduktion der Disulfidbrücke der Verbindung (II) der vorliegenden Erfindung erhalten wurde. Die in [Fig. 2](#) gezeigte Kurve zeigt die Ergebnisse, die man erhält, wenn man dieses amphiphile Molekül zu den Liposomen gibt: Man beobachtet eine partielle Solubilisierung, die einer Solubilisierung von ungefähr 30% in Bezug auf Triton X-100 entspricht.

[0116] Schließlich wurde dasselbe Experiment mit dem kationischen Referenzlipid REF durchgeführt, nämlich dem Analogon von Verbindung (II), das aber keine Disulfidbrücke enthält. Es wurde keinerlei Solubilisierung der Liposomenmembranen beobachtet.

[0117] Als Ergebnis zeigt dieses Beispiel, dass die Übertragungsmittel gemäß der Erfindung in der Lage sind, in reduzierendem Milieu amphiphile Moleküle zu erzeugen, die eine Tensidwirkung aufweisen, d.h. Membranen auflösen können. Diese Eigenschaft ist äußerst vorteilhaft, da die Übertragungsmittel der Erfindung es erlauben, die Nucleinsäuren in größerer Menge und leichter bis in die Zellkompartimente zu schleusen, was eine Verbesserung der Effizienz der Transfektion erlaubt (wie in den folgenden Transfektionsbeispielen gezeigt wird).

Beispiel 3: Verwendung der Produkte gemäß der Erfindung für die in-vitro-Transfektion von genetischem Material

[0118] Diese Versuche zeigen die Fähigkeit der Übertragungsmittel gemäß der Erfindung, trotz dem Einbringen von Disulfidbrücken in ihre Struktur Zellen in vitro effizient zu transfizieren.

A. Verwendetes genetisches Material

[0119] Das verwendete Plasmid ist im Patent WO 97/10343 beschrieben. Diese Konstruktion pCOR_pXL2774 umfasst das Gen, das für die Luciferase codiert, ohne den Promotor des Immediate-Early-Gens des humanen Cytomegalievirus [hCMV-IE].

[0120] Die Nucleinsäurelösungen werden in physiologischem Serum (NaCl 0,15 M) auf 20 µg/ml verdünnt.

B. Cytofizierende Lösungen (frisch zubereitetes Präparat)

[0121] Die in der Erfindung beschriebenen Produkte werden in Wasser mit von 40 bis 160 µmol variierender Konzentration gegeben und auf Volumenbasis mit der DNA-Lösung gemischt. Die endgültige Salzkonzentration beträgt 75 mmol.

C. Transfektion

[0122] Die Zellen werden unter geeigneten Bedingungen in 24-Napf-Mikroplatten (2 cm²/Napf) kultiviert und transfiziert, wenn sie sich in exponentieller Wachstumsphase mit 50-70% Konfluenz befinden.

[0123] Die Zellen werden mit zweimal 0,5 cm³ Medium ohne Serumproteine gewaschen und entweder in Medium ohne Serum (Transfektion in Abwesenheit von Serum) oder in vollständigem Medium (Transfektion in Anwesenheit von Serum) erneut kultiviert. Zu den Zellen werden 0,05 cm³ cytofizierendes Gemisch (0,5 µg DNA/Napf) gegeben (3 Nöpfe/Vektor-DNA-Bedingung). Wenn die Zellen in Abwesenheit von Serum transfiziert werden, wird das Wachstumsmedium 2 Stunden nach der Transfektion mit der geeigneten Menge Serum ergänzt.

[0124] Die Effizienz der Transfektion wird 48 Stunden nach der Transfektion durch eine Messung der Expression der Luciferase gemäß den für die Verwendung des Promega-Kits (Luciferase Assay System) gegebenen Empfehlungen bewertet. Die Toxizität der cytofizierenden Gemische wird durch eine Messung der Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten abgeschätzt.

D. Ergebnisse

a) Symmetrische Übertragungsmittel, die durch Reduktion einer Disulfidbrücke halbbierbar sind: Verbindung (VI) ([Fig. 3](#))

[0125] Dieses in der Erfindung beschriebene Produkt wurde im Vergleich zum kationischen Referenzlipid REF (das in der Patentanmeldung WO 97/18185 als Verbindung (6) beschrieben ist) als DNA-Vektor verwendet, um die Zelllinie HepG2 zu transfizieren.

[0126] Für diesen Zelltyp liegt die Toxizität der Verbindung (VI) in derselben Größenordnung wie diejenige des kationischen Referenzlipids REF: Wenn die Transfektion in Abwesenheit von Serumproteinen durchgeführt wird, beträgt die Überlebensrate der HepG2-Zellen für Dosen von 160 µM an kationischem Lipid 80%.

[0127] Die maximale Transfektionseffizienz wird für ein Verhältnis von kationischem Lipid/µg DNA von 4 bis 8 Nanomol erhalten. Die bei Verwendung der Verbindung (VI) erhaltene Expression des Transgens im Vergleich zu derjenigen, die man mit dem kationischen Referenzlipid REF erhält, ist für die Transfektionen der HepG2-Zellen größer (viermal so groß).

b) Übertragungsmittel, deren Lipidteil aus zwei C₁₈-Alkylketten und einer dritten Alkylkette, die über eine Disulfidbrücke gebunden ist, besteht: Verbindungen (I) und (IV)

[0128] Diese beiden Produkte, die in der vorliegenden Erfindung beschrieben werden, weisen sowohl bei den HeLa-Zellen als auch bei den HepG2-Zellen bis zu 160 µM an kationischem Lipid keine wesentliche Toxizität auf.

[0129] In Bezug auf die mit dem kationischen Referenzlipid REF erhaltenen Expressionen des Transgens erlaubt es die Zugabe einer C₅-Lipidkette als dritte Kette [Verbindung (I)], in Abwesenheit von Serumproteinen Transfektionsergebnisse in derselben Größenordnung zu erhalten. Wenn dagegen unter denselben Transfektionsbedingungen die dritte Lipidkette eine C₁₂-Kette ist [Verbindung (IV)], steigt die Expression des Transgens um einen Faktor von ungefähr zwei für die HeLa-Zellen und ungefähr 9 für die HepG2-Zellen (siehe [Fig. 4](#)).

[0130] Außerdem wird einer der hauptsächlichen Nutzen der Erhöhung der Lipophilie der kationischen Lipide durch Zugabe einer dritten Alkylkette in den Transfektionsexperimenten in Gegenwart von Serumproteinen nachgewiesen. In diesem Fall gibt es tatsächlich keinerlei wesentliche Hemmung aufgrund der Anwesenheit der Serumproteine, wodurch diese zu Kandidaten der Wahl für die in-vivo-Transfektion werden.

[0131] Die [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) stellen in Form von Histogrammen die Wirksamkeit der Transfektion der Verbindungen (I) und (IV) dar.

c) Übertragungsmittel, deren Lipidteil aus zwei C₁₈-Alkylketten besteht, von denen eine über eine Disulfidbrücke gebunden ist: Verbindung (II)

[0132] Dieses in der Erfindung beschriebene Produkt weist in den Dosen, die gegenüber HepG2-Zellen verwendet werden (160 µM an kationischem Lipid) keine wesentliche Toxizität auf.

[0133] Für die Transfektionen in Abwesenheit von Serumproteinen liegt das Expressionsniveau des Transgens bis zu dreimal höher als bei dem kationischen Referenzlipid REF (siehe [Fig. 7](#)).

[0134] Außerdem wird die Transfektion in Gegenwart von Serumproteinen stark verbessert (auf das bis zu 40fache). Völlig unerwarteterweise gibt es also keinerlei hemmende Wirkung aufgrund der Anwesenheit von Serum.

[0135] [Fig. 8](#) stellt in Form eines Histogramms die Transfektionseffizienz der Verbindung (II) dar.

[0136] d) Übertragungsmittel, deren Lipidteil eine von einem Steroid abgeleitete Kette enthält, die über eine Disulfidbrücke gebunden ist: Verbindung (V) ([Fig. 9](#))

[0137] Diese in der Erfindung beschriebene Verbindung weist in den gegenüber HeLa- oder HepG2-Zellen verwendeten Dosen (160 µM an kationischem Lipid) keine wesentliche Toxizität auf.

[0138] Die Bindung eines Cholesterins anstelle einer Alkylkette bringt einen sehr erheblichen Gewinn bezüglich der Expression des Transgens, und außerdem konnte in diesem Fall keinerlei Hemmung in Gegenwart von Serumproteinen festgestellt werden, wodurch das Produkt sehr attraktiv für eine Verwendung bei der Transfektion in vivo ist.

[0139] Als Ergebnis zeigen die in den Tabellen und Histogrammen der [Fig. 3](#) bis [Fig. 9](#) gezeigten Ergebnisse, dass:

- die Einführung einer oder mehrerer Disulfidbrücken in Übertragungsmittel des Typs kationisches Lipid nicht die Fähigkeit dieser Mittel beeinflusst, DNA in vitro zu übertragen, sondern ganz im Gegenteil zu einer Verbesserung der Transfektionseffizienz führt;
- die Übertragungsmittel gemäß der Erfindung in den verwendeten Dosen nicht toxisch sind;
- und schließlich die Steigerung der Lipophilie der Übertragungsmittel gemäß der Erfindung es erlaubt, sich von wenigstens einem Teil der Hemmung der Transfektion aufgrund von Serum zu befreien.

Patentansprüche

1. Übertragungsmittel für Nucleinsäuren, umfassend:

- wenigstens einen kationischen hydrophilen Bereich, der sich nicht-kovalent an Nucleinsäuren anlagern kann; und
 - wenigstens einen lipophilen Bereich, der aus wenigstens einer aliphatischen Fettkette und einer oder mehreren aliphatischen Ketten, einem oder mehreren Steroidderivaten, einem natürlichen oder synthetischen Lipid und/oder gegebenenfalls einer Kombination derselben besteht;
- wobei diese Bereiche über eine Säure- oder Amingruppe, die hydrolysierbare Funktionen trägt, miteinander verbunden sind und außerdem wenigstens eine Disulfidbrücke umfassen, **dadurch gekennzeichnet**, dass der kationische hydrophile Bereich ein Polyamin oder ein Polyaminoguanidin ist und dass sich die Disulfidbrücke im lipophilen Bereich befindet, so dass bei ihrer Reduktion ein amphiphiles Tensidmolekül entsteht, oder aber so positioniert ist, dass ihre Reduktion zur Halbierung des Übertragungsmittels führt, wenn dieses symmetrisch ist.

2. Übertragungsmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der lipophile Bereich aus wenigstens zwei aliphatischen Fettketten besteht.

3. Übertragungsmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der lipophile Bereich aus einer aliphatischen Fettkette und einem Steroidderivat besteht.

4. Übertragungsmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die aliphatische(n) Fettkette(n) verzweigte oder lineare Alkylketten sind, die 10 bis 22 Kohlenstoffatome umfassen und gegebenenfalls gesättigt und/oder fluoriert sind.

5. Übertragungsmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Steroidderivat aus Cholesterin, Cholsäure und Cholesterylamin ausgewählt ist.

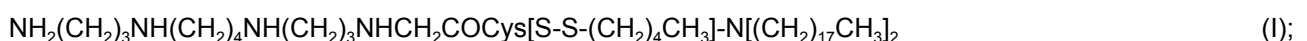
6. Übertragungsmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Säure- oder Amingruppe, die hydrolysierbare Funktionen trägt, aus Amid-, Carbamat-, Ester-, Ethergruppen und/oder aromatischen Cyclen ausgewählt ist.

7. Übertragungsmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es eine oder zwei Disulfidbrücken trägt.

8. Übertragungsmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Disulfidbrücke trägt, die so positioniert ist, dass ihre Reduktion zum Verlust einer aliphatischen Fettkette führt.

9. Übertragungsmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Disulfidbrücke trägt, die so positioniert ist, dass ihre Reduktion zum Verlust einer Kette führt, die von einem Steroid abgeleitet ist und sich im lipophilen Bereich befindet.

10. Übertragungsmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es ausgewählt ist aus:



- $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COCys}[\text{S-S}-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]\text{-NH}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ (II);
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COCys}[\text{S-S}-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3]\text{-NH}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ (III);
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COCys}[\text{S-S}-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3]\text{-N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$ (IV);
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COCys}[\text{S-S-Cholesterin}]\text{-NH}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ (V);
 $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COCysNH}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$ (VI).

11. Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Übertragungsmittel, wie es in den Ansprüchen 1 bis 10 definiert ist, und wenigstens eine Nucleinsäure umfasst.

12. Zusammensetzung gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäure eine Desoxyribonucleinsäure oder eine Ribonucleinsäure ist.

13. Zusammensetzung gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäure chemisch modifiziert ist.

14. Zusammensetzung gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäure eine Antisense-Nucleinsäure ist.

15. Zusammensetzung gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäure ein Gen von therapeutischem Interesse trägt.

16. Zusammensetzung gemäß den Ansprüchen 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass sie außerdem ein Adjuvans umfasst, das aus einem oder mehreren neutralen Lipiden besteht, die aus synthetischen oder natürlichen Lipiden ausgewählt sind, welche unter physiologischen Bedingungen zwitterionisch sind oder keine Ionenladung tragen.

17. Zusammensetzung gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem bzw. den neutralen Lipiden um Cholesterin oder Lipide mit zwei Fettketten des Typs Diolelphosphatidylethanolamin (DOPE), Oleoylpalmitoylphosphatidylethanolamin (POPE), Distearoyl-, -palmitoyl-, -cholesteryl-, -myristoylphosphatidylethanolamine sowie ihre ein- bis dreifach N-methylierten Derivate, Phosphatidylglycerine, Glycosyldiacylglycerine, Cerebroside (wie insbesondere Galactocerebroside), Sphingolipide (wie insbesondere Sphingomyeline) oder aber Asialoganglioside (wie insbesondere Asialo-GM1 und -GM2) handelt.

18. Zusammensetzung gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie außerdem ein Adjuvans umfasst, bei dem es sich um Folgendes handelt bzw. das Folgendes umfasst: eine Verbindung, die von einem Histon, einem Nucleolin und/oder einem Protamin abgeleitet ist, oder eine Verbindung, die aus Peptidmotiven (KTPKKAKKP) und/oder (ATPAKKAA) besteht, die sich kontinuierlich wiederholen oder auch nicht, wobei die Zahl der Motive zwischen 2 und 10 variieren kann.

19. Zusammensetzung gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie außerdem ein Zielsteuerungselement für das Übertragungsmittel umfasst.

20. Zusammensetzung gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Zielsteuerungselement ausgewählt ist aus Antikörpern gegen Moleküle der Zelloberfläche, Liganden von Membranrezeptoren, wie Insulin, Transferrin, Folsäure oder jeder andere Wachstumsfaktor, Cytokinen oder Vitaminen, modifizierten oder unmodifizierten Lectinen, Proteinen mit RGD-Motiv, Peptiden, die ein cyclisches oder nichtcyclisches Tandem von RGD-Motiven enthalten, Polylysin-Peptiden sowie natürlichen oder synthetischen Ligandenpeptiden.

21. Zusammensetzung gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie außerdem wenigstens ein nichtionisches Tensid des Typs Poloxamere, Polyoxyethylenalkohole, Polyoxyethylennonylphenylether oder auch Polyethylenglycol mit einem dendritischen Kopf aus benzylischem Polyether umfassen.

22. Verwendung eines Übertragungsmittels, wie es in den Ansprüchen 1 bis 10 definiert ist, für die in-vitro-Übertragung von Nucleinsäuren in Zellen.

23. Verfahren zur Übertragung von Nucleinsäuren in Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgen-

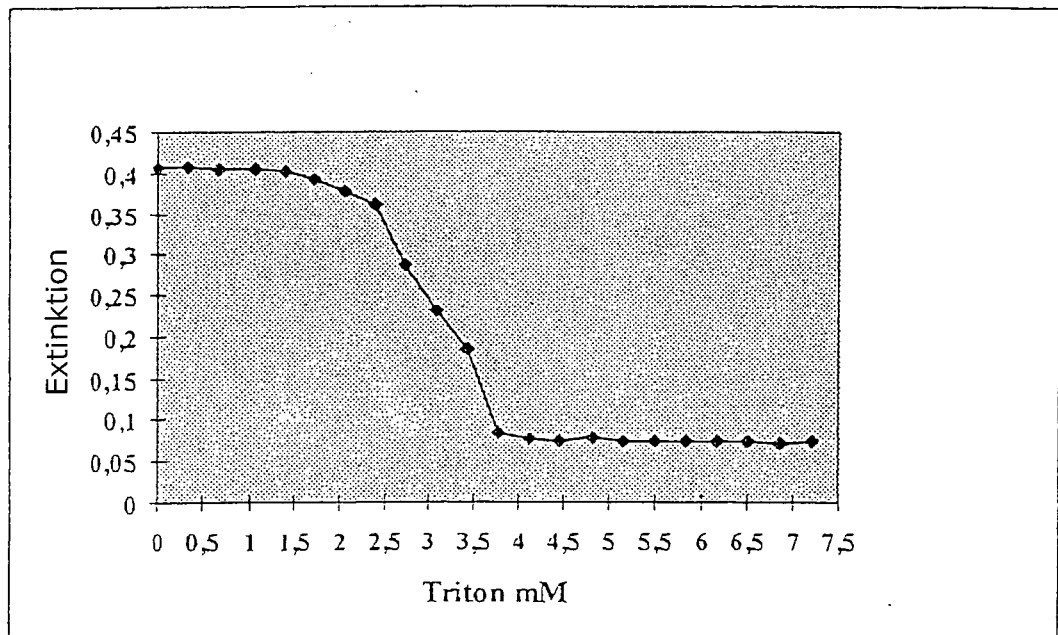
den Schritte umfasst: (1) In-Kontakt-Bringen der Nucleinsäure mit einem Übertragungsmittel, wie es in den Ansprüchen 1 bis 10 definiert ist, unter Bildung eines Nucleinsäure/Übertragungsmittel-Komplexes; (2) In-Kontakt-Bringen der Zellen mit dem unter (1) gebildeten Komplex in vitro.

24. Verfahren zur Übertragung von Nucleinsäuren in Zellen gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass im Falle einer Zusammensetzung, die ein oder mehrere andere Transfektionsmittel und/oder ein oder mehrere Adjuvantien umfasst, dem Schritt (1) ein Schritt, bei dem die anderen Transfektionsmittel in Kontakt gebracht werden, und/oder ein Schritt, bei dem das Transfektionsmittel mit dem oder den Adjuvantien in Kontakt gebracht wird, vorausgeht.

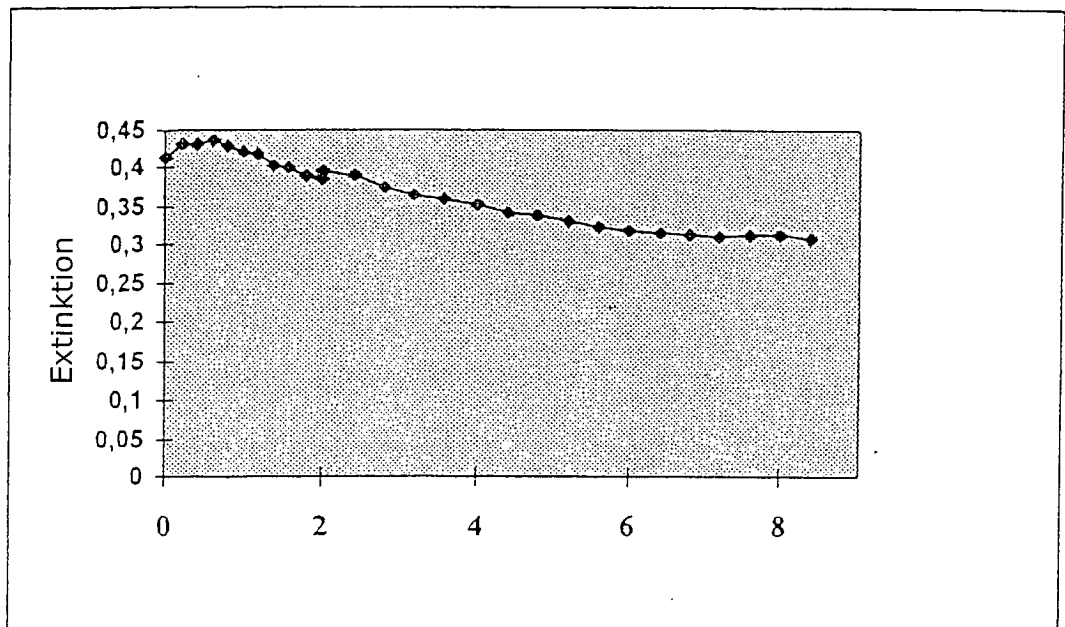
25. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 11 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Nucleinsäure mit einem Übertragungsmittel, wie es in den Ansprüchen 1 bis 10 definiert ist, in Kontakt bringt, so dass sich ein Nucleinsäure/Übertragungsmittel-Komplex bildet, wobei diesem Schritt gegebenenfalls das vorherige In-Kontakt-Bringen des Transfektionsmittels mit einem oder mehreren Adjuvantien vorausgeht.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



FIGUR 2/9



Figur 3/9

	nmol/ μ g DNA	RLU/5 μ l Zelleextrakt/10 s	RLU/ μ g Protein/10 s
kationisches Referenzlipid REF	2	$2,5 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$
	4	$3,7 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^3$
	6	$2,6 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$
	8	$3,1 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^4$
Mittel (VI)	2	$1,1 \cdot 10^3$	$7,7 \cdot 10^2$
	4	$7,4 \cdot 10^4$	$5,9 \cdot 10^4$
	6	$1,1 \cdot 10^5$	$9,6 \cdot 10^4$
	8	$5,9 \cdot 10^4$	$5,3 \cdot 10^4$

Tests an HepG2-Zellen

Figur 4/9

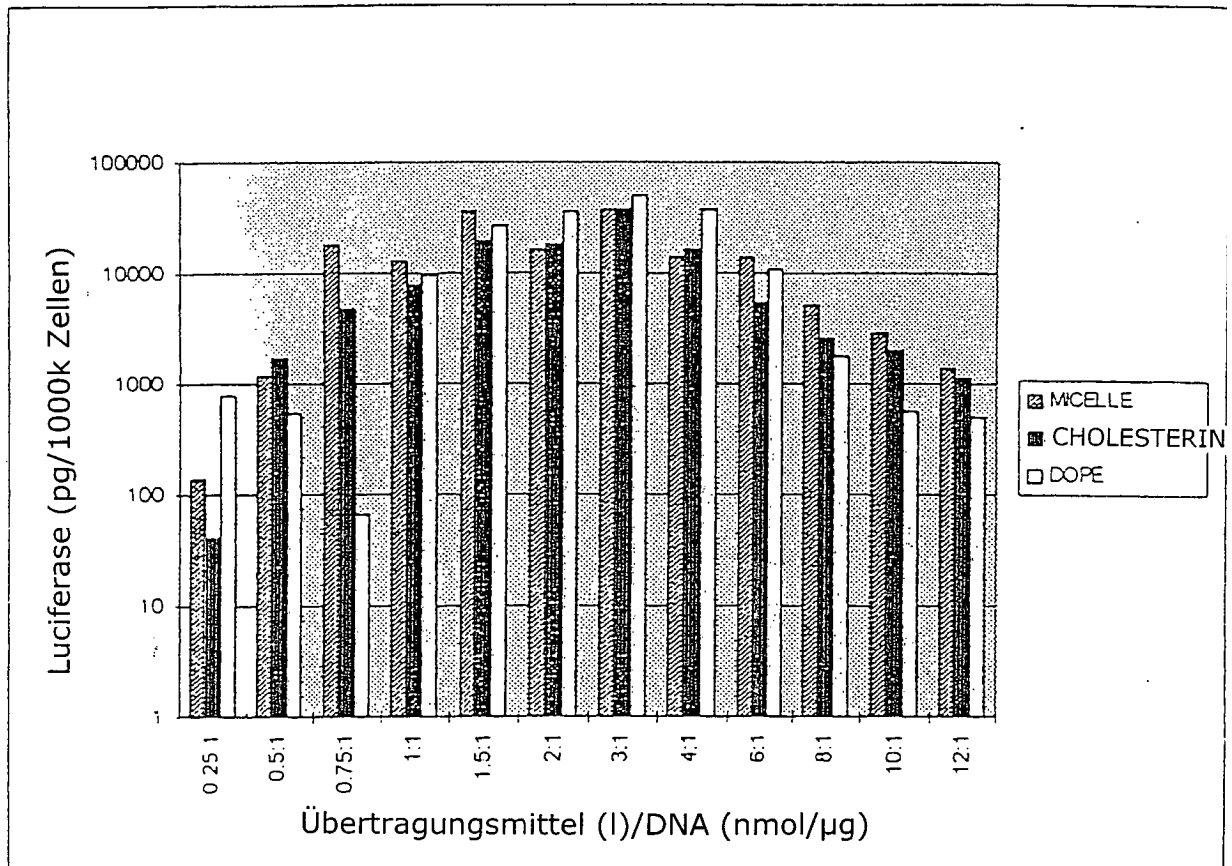
	nmol/ μ g DNA	ohne Serum		mit Serum	
		RLU/5 μ l Zell- extrakt/10 s	RLU/ μ g Protein/10 s	RLU/5 μ l Zell- extrakt/10 s	RLU/ μ g Protein/10 s
kationisches Referenzlipid REF	2	$2,5 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$	$3,1 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^3$
	4	$3,7 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^3$	$5,3 \cdot 10^1$	$4,1 \cdot 10^1$
	6	$2,6 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$	$5,2 \cdot 10^2$	$4,7 \cdot 10^2$
	8	$3,1 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^4$	$5,3 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^2$
Mittel (I)	2	$3,4 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$
	4	$4,7 \cdot 10^3$	$3,7 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^3$
	6	$1,1 \cdot 10^4$	$8,7 \cdot 10^3$	$8,3 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$
	8	$4,4 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^4$
Mittel (IV)	2	$5,9 \cdot 10^3$	$4,4 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^3$
	4	$1,3 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^4$
	6	$2,2 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^5$	$4,4 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^4$
	8	$2,2 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$6,7 \cdot 10^4$	$5,7 \cdot 10^4$

Tests an HepG2-Zellen

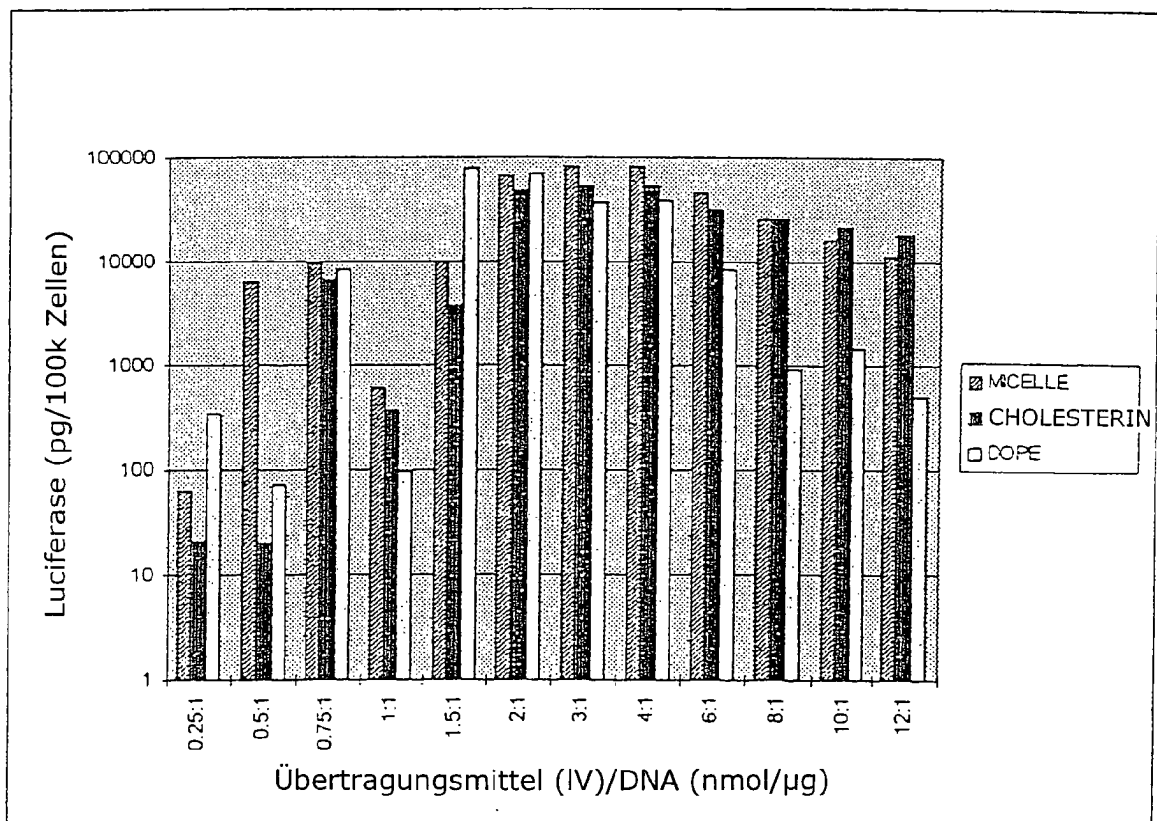
	nmol/ μ g DNA	ohne Serum		mit Serum	
		RLU/5 μ l Zell- extrakt/10 s	RLU/ μ g Protein/10 s	RLU/5 μ l Zell- extrakt/10 s	RLU/ μ g Protein/10 s
kationisches Referenzlipid REF	2	$2,9 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^4$
	4	$2,2 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$	$6,8 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^3$
	6	$3,4 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^4$	$9,2 \cdot 10^3$
	8	$4,3 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$
Mittel (I)	2	$7,0 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^6$	$9,8 \cdot 10^5$
	4	$5,2 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^6$	$7,9 \cdot 10^6$	$4,7 \cdot 10^6$
	6	$3,7 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$
	8	$3,3 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^6$
Mittel (IV)	2	$5,2 \cdot 10^5$	$3,4 \cdot 10^5$	$4,3 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5$
	4	$3,7 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$
	6	$7,1 \cdot 10^6$	$4,7 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^6$
	8	$8,2 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^6$	$6,8 \cdot 10^6$	$5,7 \cdot 10^6$

Tests an HeLa-Zellen

FIGUR 5/9



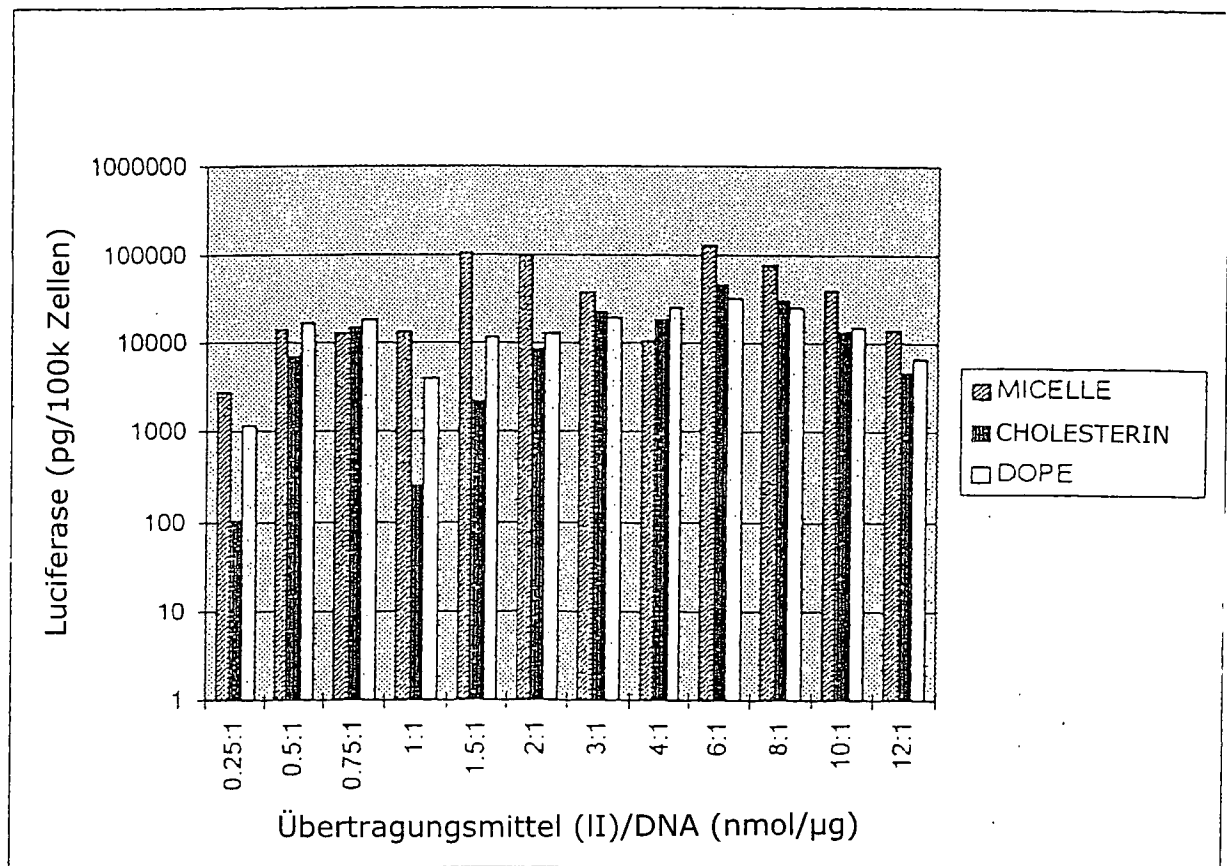
FIGUR 6/9



Figur 7/9

		ohne Serum		mit Serum	
	nmol/ μ g DNA	RLU/5 μ l Zell- extrakt/10 s	RLU/ μ g Protein/10 s	RLU/5 μ l Zell- extrakt/10 s	RLU/ μ g Protein/10 s
kationisches Referenzlipid REF	2	$2,5 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$	$3,1 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^3$
	4	$3,7 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^3$	$5,3 \cdot 10^1$	$4,1 \cdot 10^1$
	6	$2,6 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$	$5,2 \cdot 10^2$	$4,7 \cdot 10^2$
	8	$3,1 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^4$	$5,3 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^2$
Mittel (II)	2	$4,3 \cdot 10^1$	$3,4 \cdot 10^1$	$1,5 \cdot 10^1$	$1,8 \cdot 10^1$
	4	$1,7 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^2$
	6	$1,7 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$
	8	$9,1 \cdot 10^4$	$7,6 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^4$

Tests an HepG2-Zellen

FIGUR 8/9

Figur 9/9

		ohne Serum		mit Serum	
	nmol/ μ g DNA	RLU/5 μ l Zell- extrakt/10 s	RLU/ μ g Protein/10 s	RLU/5 μ l Zell- extrakt/10 s	RLU/ μ g Protein/10 s
kationisches Referenzlipid REF	2	$5,1 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^5$
	4	$1,2 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^4$
	6	$5,8 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^5$	$5,8 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^4$
	8	$2,1 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^3$	$7,3 \cdot 10^3$
Mittel (V)	2	$2,0 \cdot 10^4$	$3,9 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^4$
	4	$1,3 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$	$5,4 \cdot 10^4$	$9,0 \cdot 10^4$
	6	$1,8 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^5$	$6,1 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^5$
	8	$3,2 \cdot 10^5$	$6,0 \cdot 10^5$	$7,1 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^5$

Tests an HepG2-Zellen

		ohne Serum		mit Serum	
	nmol/ μ g DNA	RLU/5 μ l Zell- extrakt/10 s	RLU/ μ g Protein/10 s	RLU/5 μ l Zell- extrakt/10 s	RLU/ μ g Protein/10 s
kationisches Referenzlipid REF	2	$2,2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$
	4	$5,9 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$
	6	$4,0 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$	$9,5 \cdot 10^3$	$3,8 \cdot 10^3$
	8	$1,2 \cdot 10^6$	$6,8 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$
Mittel (V)	2	$1,9 \cdot 10^5$	$8,2 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$
	4	$7,9 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^5$
	6	$1,4 \cdot 10^6$	$6,4 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^6$	$8,4 \cdot 10^5$
	8	$3,0 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$

Tests an HeLa-Zellen