PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:
1999 - 4303

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C 07 H 15/18
C 07 H 15/04
A 61 K 9/127
A 61 K 48/00
C 12 N 15/88

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA

ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **03.06.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **06.06.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9707014**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.04.2000**
(Věstník č. 4/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/FR98/01112**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/55490**

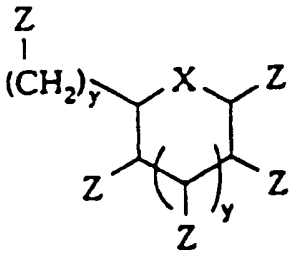
(71) Přihlašovatel:
RHONE-POULENC RORER S. A.,
Antony, FR;

(72) Původce:
Bessodes Michel, Villejuif, FR;
Scherman Daniel, Paris, FR;
Herscovici Jean, Paris, FR;

(74) Zástupce:
Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7,
170 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Nová třída kationtových činidel pro přenos nukleových kyselin a farmaceutické prostředky, které je obsahují



(I)

(57) Anotace:

Transfekční činidlo obsahující nejméně jednu lipofilní oblast spojenou s kationtovou hydrofilní oblastí, kdy se jmenovaná kationtová hydrofilní oblast skládá z heterocyklu s 5 nebo 6 atomy, který je substituovaný aminoskupinami. Kationtová hydrofilní oblast, která je meziproduktem při syntéze činidla pro přenos nukleové kyseliny má obecný vzorec I, kde y je celé číslo 0 nebo 1, různé y jsou na sobě nezávislé; X je atom kyslíku, atom dusíku, atom síry nebo atom selenu; Z jsou nezávisle na sobě atom vodíku, skupina OR, kde R je atom vodíku, methylová skupina nebo skupina $(CH_2)_n$-NR_1R_2, kde n je celé číslo 1 až 6 včetně a R_1 a R_2 jsou nezávisle na sobě atom vodíku nebo skupina $(CH_2)_q$-NH_2, kdy se q může pohybovat mezi 1 až 6 včetně, různá q jsou na sobě nezávislá, skupina $(CH_2)_m$-NR_1R_2, kde m je celé číslo 1 až 6 včetně a R_1 a R_2 jsou definovány výše nebo alternativně ?můstek" umožňující vazbu kationtové hydrofilní skupiny k oblasti lipidu, přičemž nejméně jeden substituent Z nese aminoskupinu.

CZ 1999 - 4303 A3

01.12.99

Nová třída kationtových činidel pro přenos nukleových kyselin a farmaceutické prostředky, které je obsahují

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nové třídy kationtových transfekčních činidel, farmaceutických prostředků, které je obsahují, jejich aplikace při *in vivo*, *ex vivo* a/nebo *in vitro* transfekci nukleových kyselin a způsobů jejich přípravy.

Dosavadní stav techniky

S vývojem biotechnologie je nyní možné přenést nukleové kyseliny do buněk. Ukázalo se, že účinnost těchto přenosů je nezbytná při úpravách poruch exprimace a/nebo při abnormální exprimaci nukleových kyselin, což je příčinou mnoha genetických onemocněních. Význam přenosu nukleových kyselin se však neomezuje pouze na genovou terapii. Přenos nukleových kyselin je dále možné využít při studiu regulace exprimace genů, klonování genů nebo jakýmkoli jiným způsobem při *in vitro* manipulaci zahrnující nukleové kyseliny, a také při přípravě rekombinantních proteinů. Může to být také přenos nukleových kyselin *in vivo*, například při tvoření transgenních živočichů, při výrobě vakcín nebo při studiu značkovacích molekul. Dále se může přenos nukleových kyselin provést *ex vivo*, při přístupech zahrnujících transpalntaci kostní dřeně, imunoterapii nebo další způsoby zahrnující přenos genů do buněk odebraných z organismu pro účely následného zpětného zavedení.

V současné době se nabízí několik způsobů pro zavedení tohoto typu genetické informace do buněk. Jeden z těchto způsobů je založen na použití chemických a biochemických vektorů. Tyto syntetické vektory mají dvě základní funkce: komplexovat DNA, který se má transfekovat a podpořit její připojení a také její průchod přes plazmatickou membránu a, pokud je to vhodné, přes dvě jaderné membrány. Mezi těmito vyvinutými syntetickými

vektory jsou výhodnější kationtové polymery typu polylysinu a DEAE-dextranu nebo alternativně lipofektanty.

Hlavního pokroku bylo dosaženo při tomto způsobu transfekce při vývoji technologie založené na použití kationtových transfekčních činidel lipofektantového typu a přesněji kationtových lipidů. Bylo prokázáno, že kladně nabitý kationtový lipid, N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylamoniumchlorid (DOTMA), interaguje ve formě liposomů nebo malých měchýřků spontánně s DNA, která je záporně nabitá, za vzniku komplexu lipid-DNA schopného splynout s membránou buňky, a tak umožnit dodání DNA do buňky.

Stejně jako DOTMA byly na tomto strukturním modelu, to znamená lipofilní skupina kondenzovaná k aminoskupině přes rameno, které se také nazývá můstek („spacer"), vyvinuty další kationtové lipidy. Mezi tyto skupiny patří zejména skupiny, které jako lipofilní skupinu obsahují mastné kyseliny nebo deriváty cholesterolu, které dále obsahují, pokud je to vhodné, jako aminoskupinu, kvarterní amoniovou skupinu. Jako představitelé této skupiny kationtových lipidů mohou být jmenovány DOTAP, DOBT nebo ChOTB. Další sloučeniny, jako je DOSC a ChOSC, se vyznačují přítomností cholinu místo kvarterní amoniové skupiny.

Byla také popsána další kategorie lipofektantů, kterými jsou lipopolyaminy. Obecně je to amfifilní molekula obsahující nejméně jednu hydrofilní oblast skládající se z polyaminu kondenzovaného přes můstek k lipofilní oblasti. Polyaminová oblast, která je kladně nabitá, je schopna se vratně spojovat s nukleovou kyselinou, která je záporně nabitá. Tato interakce silně spojuje nukleovou kyselinu. Lipofilní oblast způsobuje, že tato interakce není citlivá k vnějšímu prostředí tím, že obaluje komplex lipidovým filmem. V tomto typu sloučeniny může být kationtovou oblastí L-5-karboxysperminový zbytek, který

obsahuje čtyři amoniové skupiny, přičemž dvě z nich jsou primární a dvě jsou sekundární. Do této kategorie patří zejména DOGS a DPPES. Tyto lipopolyaminy jsou účinné zejména při transfekci primárních endokrinních buněk. Jako příklady této poslední skupiny sloučenin je možno uvést zejména lipopolyaminy popsané například v patentové přihlášce WO 96/17823 a WO 97/18185.

Účinnost těchto syntetických vektorů je však třeba zlepšit, zejména pokud jde o hustotu náboje a rigiditu transfekční molekuly.

Je samozřejmě obecně známé, že aktivita těchto produktů závisí na hustotě náboje, která umožňuje jejich použití. Avšak vzrůst nábojů alifatických řetězců způsobuje jejich toxicitu. Stabilizace hustoty náboje na alifatických řetězcích může proto preventivně působit proti výskytu faktorů toxicity. Dále se může transfekční účinnost zlepšit pomocí vzrůstu hustoty náboje v oblasti, která je jiná než alifatický řetězec.

Dále může být flexibilita molekuly použité pro přenos nukleové kyseliny překážkou dostatečné interakce mezi jmenovanou nukleovou kyselinou a transfekčním činidlem, může zabránit dosažení optimálního spojení molekuly nukleové kyseliny, což je důležitá podmínka nutná pro jakoukoli transfekci. Předpokládá se, že zvýšená rigidita molekuly transfekčního činidla zajišťuje účinnější interakci s nukleovou kyselinou a tak zlepšuje transfekci.

Může být tedy zvláště výhodné vlastnit transfekční činidlo, které má zvýšenou transfekční kapacitu, a zároveň má sníženou nebo nulovou toxicitu. Toto jsou předměty, kterých by bylo možné dosáhnout podle předkládaného vynálezu.

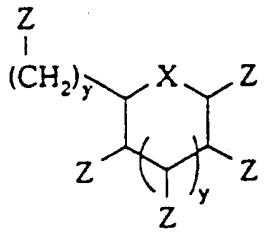
Podstata vynálezu

Předmětem podle předkládaného vynálezu je samozřejmě poskytnout novou třídu transfekčních činidel obsahujících novou kationtovou hydrofilní oblast, která propůjčuje jmenovaným transfekčním činidlům specifické vlastnosti uvedené výše.

Přesněji se předkládaný vynález týká transfekčního činidla obsahujícího nejméně jednu kationtovou hydrofilní oblast kondenzovanou k lipofilní oblasti, kdy jmenovaná kationtová hydrofilní obsahuje nejméně jeden heterocyklus obsahující 5 nebo 6 atomů uhlíku, sustituovaný aminoskupinami.

Kladně nabitá hydrofilní oblast je schopna se vratně vázat k záporně nabité nukleové kyselině, která je vysoce kompaktní. Nová struktura kationtové části dále propůjčuje zvýšenou rigiditu molekuly.

Kationtová hydrofilní oblast, která je meziproduktem při syntéze činidla pro přenos nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu, má přesněji obecný vzorec I:



(I)

kde:

- y je celé číslo 0 nebo 1, různé y jsou na sobě nezávislé,
- X je atom kyslíku, atom dusíku, atom síry nebo atom selenu,
- Z jsou nezávisle na sobě

    - atom vodíku,

    - skupina OR, kde R je atom vodíku, methylová skupina nebo skupina $(CH_2)_n$-NR_1R_2, kde n je celé číslo 1 až 6

včetně a R_1 a R_2 jsou nezávisle na sobě atom vodíku nebo skupina $(CH_2)_q$-NH_2, kdy se q může pohybovat mezi 1 až 6 včetně, různá q jsou na sobě nezávislá,

- skupina $(CH_2)_m$-NR_1R_2, kde m je celé číslo 0 až 6 včetně a R_1 a R_2 jsou definovány výše nebo alternativně
- „můstek" umožňující vazbu kationtové hydrofilní skupiny k oblasti lipidu,

je třeba poznamenat, že nejméně jeden substituent Z nese aminoskupinu.

Přenosová činidla podle předkládaného vynálezu obsahují nejméně jednu kationtovou hydrofilní oblast vzorce I. Podle jednoho provedení podle předkládaného vynálezu přenosové činidlo obsahuje 2 nebo více kationtových hydrofilních oblastí, které jsou vzájemně propojeny v místě jedné ze skupin Z.

Podle výhodného provedení podle předkládaného vynálezu, pokud jeden ze substituentů Z je skupina OR a R je skupina $(CH_2)_n$-NR_1R_2, potom n je s výhodou vybráno ze skupiny, kterou tvoří 2, 3 nebo 4.

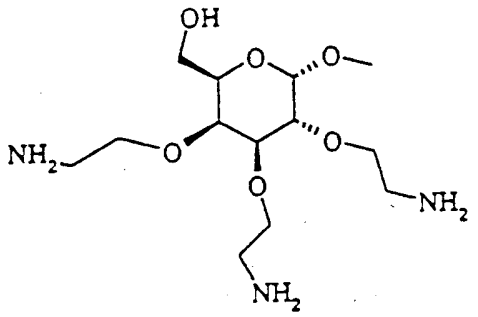
Podle výhodného provedení podle předkládaného vynálezu transfekční činidlo obsahuje kationtovou hydrofilní oblast obecného vzorce I, kde X je atom kyslíku. Kationtová hydrofilní část sestává z glykosidu pyranosové nebo furanosové formy. Pyranosová forma je zvláště výhodná a je popsaná neomezujícím způsobem v příkladech.

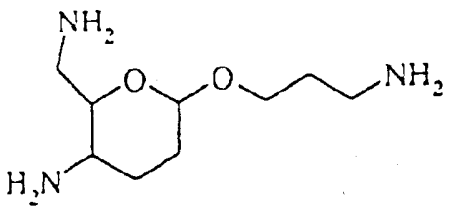
Podle druhého výhodného provedení podle předkládaného vynálezu transfekční činidlo obsahuje kationtovou hydrofilní oblast obecného vzorce I složenou z šestičlenného aminoglykosidu (y, které se vyskytuje na kruhu, je rovno 1), X je atom kyslíku a nejméně jeden ze substituentů Z obsahuje aminoskupinu. Ještě výhodněji obsahují aminoskupinu nejméně dva ze substituentů Z.

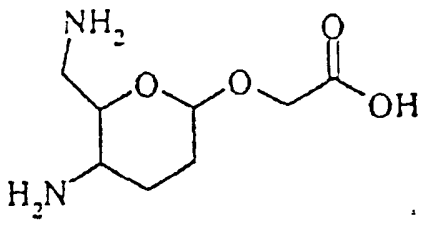
Podle dalšího provedení podle předkládaného vynálezu je kationtová hydrofilní oblast složena z aminoglykosidu obecného vzorce I, kde dvě y jsou rovny 1, X je atom kyslíku, dvě ze skupin Z jsou atomy vodíku, dvě další skupiny Z jsou skupiny obsahující dusík a s výhodou aminoskupiny a poslední skupina Z je skupina OR, kde R je definováno výše. S výhodou se skupina OR nachází v poloze 2 na heterocyklu tvořícím kationtovou hydrofilní oblast transfekčního činidla podle předkládaného vynálezu.

Podle dalšího výhodného provedení podle předkládaného vynálezu je kationtová hydrofilní oblast tvořena aminoglykosidem obecného vzorce I, kde y přítomné na kruhu je rovno 1, X je atom kyslíku, nejméně dvě skupiny Z mají vzorec $O-(CH_2)_q-NH_2$, q je definováno výše a nejméně jedna skupina Z je skupina OR, kde R je definováno výše.

Jako příklady kationtových hydrofilních oblastí obecného vzorce I, které mohou být intermediáty vhodnými při syntéze přenosových činidel podle předkládaného vynálezu, je možno uvést zejména následující sloučeniny:







Obecně transfekční činidla pro účely podle předkládaného vynálezu obsahují nejméně jednu kationtovou hydrofilní oblast, která je definovaná výše, kombinovanou s lipofilní oblastí.

Molekuly tvořící lipofilní oblast podle předkládaného vynálezu jsou vybrány z lipofilních molekul, které jsou odborníkům v této oblasti známé. Lipofilní oblast s výhodou obsahuje jeden nebo více popřípadě halogenovaných nasycených nebo nenasycených, lineárních nebo rozvětvených alifatických řetězců. Lipofilní oblast může být také s výhodou vybraná ze steroidních derivátů.

Podle výhodného provedení podle předkládaného vynálezu lipofilní část obsahuje jeden nebo více alifatických řetězců obsahujících 10 až 22 atomů uhlíku a výhodněji 12 až 22 atomů uhlíku. Jako příklad je možné uvést alifatické řetězce obsahující 14, 16, 17, 18 nebo 19 atomů uhlíku a zejména skupiny $(CH_2)_{13}CH_3$, $(CH_2)_{15}CH_3$, $(CH_2)_{16}CH_3$, $(CH_2)_{17}CH_3$ a $(CH_2)_{18}CH_3$.

Lipofilní část přenosového činidla podle předkládaného vynálezu může být také s výhodou vybrána ze steroidních derivátů, jako je například cholesterol, cholestanol, 3-α-5-cyklo-5-α-cholestan-6-β-ol, kyselina cholová, cholesterylformiát, cholestanylformiát, 3α,5-cyklo-5α-cholestan-6β-ylformiát, cholesterylamin, 6-(1,5-dimethylhexyl)-3a,5a-dimethylhexadekahydrocyklopenta[a]cyklopropa[2,3]cyklo-penta[1,2-f]naftalen-10-ylamin nebo cholestanylamin.

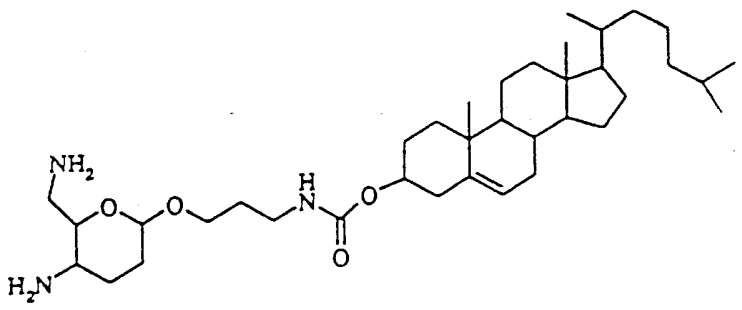
Podle výhodného provedení je kationtová hydrofilní oblast kondenzována k lipofilní oblasti pomocí tak zvané můstkové spoju-

01.12.99

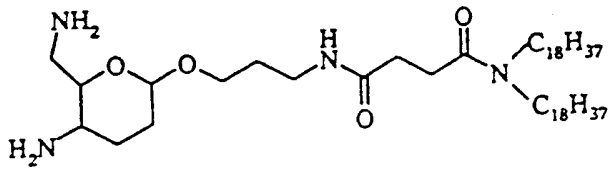
jící molekuly. Termínem „můstek" se pro účely podle předkládaného vynálezu rozumí jakýkoli kyselinový nebo aminosubstituent obsahující hydrolyzovatelné funkční skupiny, který umožňuje vazbu amidového, karbamátového, esterového nebo etherového typu nebo vazbu přes aromatický kruh, mezi kationtovou hydrofilní částí a lipofilní oblastí, který je odborníkům v této oblasti známý. Kondenzace mezi hydrofilní částí a lipofilní částí se s výhodou provede na úrovni jedné ze skupin Z, které jsou přítomny na kationtovém hydrofilním meziproduktu vzorce I a která je využitelná pro syntézu přenosového činidla podle předkládaného vynálezu. S výhodou se kondenzace mezi hydrofilní a lipofilní oblastí provede v poloze 2 nebo v poloze 5 nebo 6 (v závislosti na tom, zda y přítomné na kruhu je rovno 0 nebo 1) na kruhu kationtové hydrofilní části vzorce I přes můstek.

Oblast můstku s výhodou zahrnuje alifatická nebo aromatický řetězec. Můstek s výhodou obsahuje jednu nebo více skupin vybraných ze skupiny, kterou tvoří amidová skupina, karbamátová skupina, esterová skupina nebo etherová skupina nebo aromatické kruhy. Výhodné jsou zejména můstky vzorce $-O-CO-(CH_2)_x-COOH$, $-O-(CH_2)_x-COOH$, $-O-CO-(CH_2)_x-NH_2$, $-O-(CH_2)_x-NH_2$, $-NH-(CH_2)_x-NH_2$, kde x je celé číslo 1 až 6 včetně.

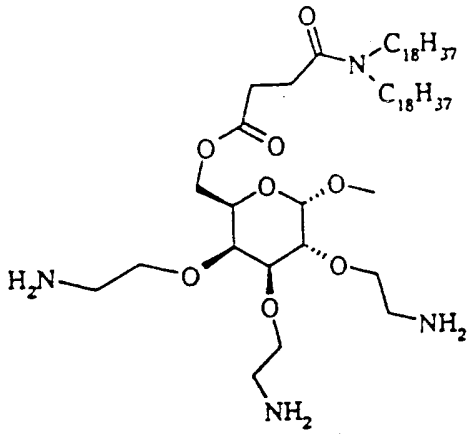
Jako příklady transfekčních činidel podle předkládaného vynálezu je možné uvést sloučeniny 16, 17, 8a a 8b vzorce:



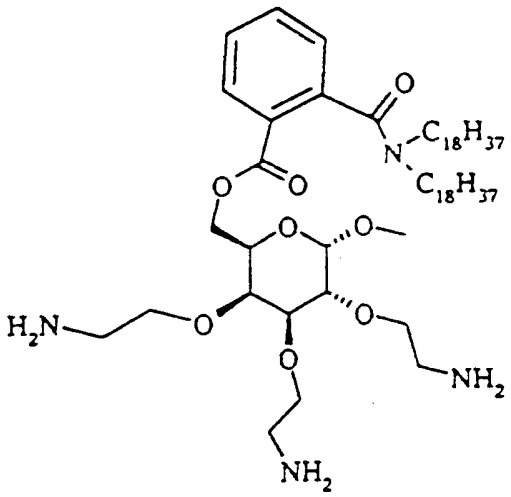
(16)



(17)



(8a)



(8b)

Předkládaný vynález se také týká způsobů přípravy nové třídy transfekčních činidel pro nukleové kyseliny, které jsou definovány výše. Přesněji se vynález týká způsobů přípravy jmenovaných činidel z mono- nebo polysubstituovaného heterocyklu, ke kterému je pomocí můstku kondenzována lipidová oblast.

Kationtová hydrofilní oblast obecného vzorce I se může připravit různými způsoby v závislosti na vzájemné poloze amino funkčních skupin na kruhu a na jejich počtu.

Pokud se požaduje připravit hydrofilní oblast obecného vzorce I, u které je nejméně jeden ze substituentů Z můstek umožňu-

jící vazbu k lipofilní části a nejméně jedna skupina Z je skupina OR, kde R je skupina $(CH_2)_n$-NR_1R_2, postup se provádí tak, že se vyjde z odpovídajícího derivátu, u kterého jsou všechny substituenty O-$(CH_2)_n$-NR_1R_2 hydroxylové funkční skupiny.

V prvním kroku se jmenovaný derivát nesoucí hydroxylové funkční skupiny podrobí O-alkylaci podle běžného postupu, který je odborníkům v této oblasti známý. Postup se s výhodou provádí pomocí alkylačního činidla v bazickém médiu v běžném alkylačním rozpouštědle, v přítomnosti crownetheru a při teplotě 10 až 60 °C.

Jako alkylační činidla se s výhodou použijí alkylaminy, halogenované deriváty esterů, jako jsou například alkylhalogenacetáty nebo halogenované deriváty alkoholů. S výhodou se použije alkylbromacetát. Alkylové funkční skupiny se vyberou podle toho, jakou hodnotu má mít příslušné n. Například pro n rovno 2 se s výhodou použije ethylbromacetát.

Jako rozpouštědla se použijí běžná O-alkylační rozpouštědla, například example dimethylformamid, dimethylacetamid, dimethylsulfoxid, acetonitril, tetrahydrofuran (THF) a podobně. S výhodou se použije tetrahydrofuran.

Reakce se provádí v přítomnosti báze, například hydroxidu draselného nebo hydridu sodného.

V druhém kroku se karboxylové funkční skupiny získaných derivátů redukují na alkohol za použití běžných postupů, které jsou odborníkům v této oblasti známé. Způsob se provádí zejména působením redukčního činidla ve slučitelném běžném rozpouštědle.

Jako příklady vhodných redukčních činidel je možné uvést například borandimethylsulfid (BMS), lithiumaluminiumhydrid nebo tetrahydridoboritan sodný.

Slučitelnými rozpouštědly jsou například ethery nebo alkoholy. S výhodou se použije tetrahydrofuran.

Ve třetím kroku se získané hydroxylové skupiny azidují pomocí běžných postupů, které jsou odborníkům v této oblasti známé.

Způsob se provádí zejména působením kyseliny azidovodíkové v přítomnosti trifenylfosfinu a diethylazodikarboxylátu v rozpouštědle slučitelném s touto reakcí.

Rozpouštědly, která se mohou použít, jsou běžná azidační rozpouštědla, jako je například tetrahydrofuran, benzen, toluen, chloroform, dichloromethan a podobně a s výhodou tetra-hydrofuran (THF).

Nakonec se azidové funkční skupiny pomocí běžných postupů, které jsou odborníkům v této oblasti známé, převedou na amino funkční skupiny.

Způsob se provádí zejména pomocí redukce v kyselém prostředí, například pomocí hydrogenace v kyselém médiu v přítomnosti palladia na uhlí nebo za použití Staudingerovy reakce nebo alternativně působením redukčního činidla, například lithium-aluminiumhydridu, tetrahydridoboritanu sodného, chloridu cínatého a podobně.

Takto se připraví kationtová hydrofilní sloučenina obecného vzorce I, kde nejméně jeden ze substituentů Z je můstek umožňující vazbu k lipofilní části a nejméně jeden ze substituentů Z je skupina OR, kde R je skupina vzorce $-(CH_2)_n-NR_1R_2$.

Kondenzace lipofilní části se potom provede běžnými způsoby, které jsou odborníkům v této oblasti známé a zejména pomocí peptidové kondenzace (Bodanski M., *Principles and Practices of Peptides Synthesis*, Ed. Springe-Verlag). Kondenzace probíhá na úrovni skupiny Z, která představuje můstek.

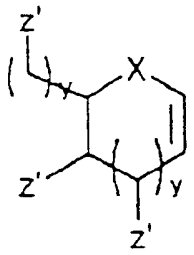
Pokud je jedna ze skupin Z můstek, může se, pokud je to vhodné, předem chránit. Toto se vztahuje i na amino funkční skupiny opatřené kationtovými hydrofilními částmi, které se s výhodou chrání před peptidovou kondenzací. Chránění a odstranění chránících skupin se provádí pomocí známých postupů.

Chránění se může provést pomocí kompatibilních skupin, jejichž použití a odstranění neovlivňuje zbytek molekuly. Postupy se provádějí zejména podle způsobů popsaných v T.W. GREENE, *Protective Groups in Organic Syntheses*, A. Wiley-Interscience Publication (1981), nebo Mc OMIE, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press (1973).

Jako příklady chránících skupin je možné uvést trimethylsilylovou skupinu, benzhydrylovou skupinu, tetra-hydropyranylovou skupinu, formylovou skupinu, acetylovou skupinu, chloracetylovou skupinu, trichloracetylovou skupinu, trifluoroacetylovou skupinu, ethoxykarbonylovou skupinu, terc.butoxykarbonylovou skupinu nebo trichloroethoxykarbonylovou skupinu a podobně.

Jiný způsob syntézy umožňuje připravit druhou sadu kationtových hydrofilních sloučenin. Toto druhé provedení se liší od prvního v tom, že se konvertuje cukerná páteř.

Jako výchozí látka se použije glykal obecného vzorce II:



(II)

kde substituenty Z´ jsou acetoxy funkční skupiny. Použité glykaly jsou komerčně dostupné nebo se alternativně mohou připravit pomocí způsobů, které jsou odborníkům v této oblasti známé

a zejména reakcí odpovídajících acetobromcukrů s párem zinek/měď.

V prvním kroku se jmenovaný acetylovaný glykal alkyluje podle běžných způsobů, které jsou odborníkům v této oblasti známé.

Použije se zejména Ferrierova reakce v přítomnosti Lewisovy kyseliny, kdy se působí aminoalkoholem, alkoxykarbonylalkoholem, karboxyalkoholem nebo jakýmkoli jiným alkoholem, který obsahuje funkční skupiny umožňující kondenzaci k lipofilní oblasti.

S výhodou se reakce provádí v přítomnosti fluoridu boritého v kompatibilním rozpouštědle, například v etheru, jako je ethylether.

V druhém kroku se získaný nenasycený glykosid redukuje podle postupů, které jsou odborníkům v této oblasti známé.

Redukce se zejména provádí v kyselém médiu, například pomocí hydrogenace v kyselém médiu v přítomnosti palladia na uhlí.

V třetím kroku se pomocí postupů, které jsou odborníkům v této oblasti známé, acetoxylové funkční skupiny přítomné na kruhu převedou na hydroxylové funkční skupiny.

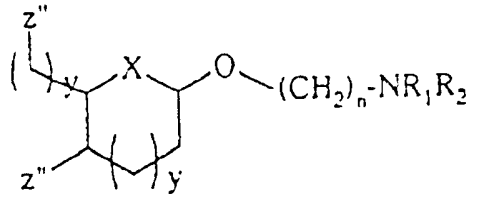
Způsob se provádí zejména pomocí transesterifikace pomocí alkoxidu, například methoxidu sodného.

Ve čtvrtém kroku se pomocí způsobů, které jsou odborníkům v této oblasti známé, hydroxylové funkční skupiny přítomné na kruhu převedou na azidové funkční skupiny.

Způsob se provádí zejména působením například kyseliny azidovodíkové v přítomnosti trifenylfosfinu a diethylazodikarboxylátu v rozpouštědle, které je kompatibilní s reakcí.

Jako rozpouštědla se použijí zejména rozpouštědla vhodná pro azidační reakce, s výhodou tetrahydrofuran.

Takto se získá kationtová hydrofilní oblast obecného vzorce III:



(III)

kde Z´´ je buď atom vodíku nebo azidová skupina, nejméně jedna skupina Z´´ je jiný než atom vodíku.

Lipofilní část se může kondenzovat k amino funkční skupině $-NR_1R_2$ podle postupů, které jsou odborníkům v této oblasti známé, zejména pomocí peptidové kondenzace (Bodanski M., *Principles and Practices of Peptides Synthesis*, Ed. Springe-Verlag) nebo pomocí alternativní kondenzace.

Protože alkohol použitý během prvního kroku obsahuje amino nebo esterovou funkční skupinu nebo jakoukoli jinou skupinu umožňující kondenzaci k lipofilní oblasti, je výhodné ji předem chránit. Chránění a odstranění chránících skupin před kondenzací s lipofilní oblastí se provádí podle známých postupů.

Chránění se může provést pomocí kompatibilních skupin, jejichž použití a odstranění neovlivňuje nežádoucím způsobem zbytek molekuly. Způsob se provádí zejména podle způsobu popsaného v T.W. GREENE, *Protective Groups in Organic Syntheses*, A. Wiley-Interscience Publication (1981) nebo Mc OMIE, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press (1973).

Jako chránící skupiny se mohou například použít trimethylsilylová skupina, benzhydrylová skupina, tetrahydropyranylová

skupina, formylová skupina, acetylová skupina, chloroacetylová skupina, trichloroacetylová skupina, trifluoroacetylová skupina, ethoxykarbonylová skupina, terc.butoxykarbonylová skupina, trichloroethoxykarbonylová skupina nebo ftalimidoskupina a podobně.

Nakonec se azidové funkční skupiny nesené na pětičlenném nebo šestičlenném kruhu převedenou pomocí způsobů, které jsou odborníkům v této oblasti známé, a které nežádoucím způsobem neovlivňují zbytek molekuly, na amino funkční skupiny. Způsob se s výhodou provádí v přítomnosti vody.

Do rozsahu podle předkládaného vynálezu také patří jakékoli jiné způsoby, které jsou odborníkům v této oblasti známé, a které vedenou k činidlům pro přenos nukleových kyselin podle předkládaného vynálezu.

Jako neomezující příklady je možno uvést první provedení podle vynálezu, které vede k přenosovému činidlu vzorce 8a a 8b, zatímco druhé provedení vede k přenosovému činidlu vzorce 16 a 17, což je upřesněno v oddílu příklady provedení vynálezu.

Významnost tohoto druhého způsobu syntézy kationtových hydrofilních oblastí spočívá zejména v tom, že zahrnuje málo kroků potřebných k syntéze a v přizpůsobivosti získaného amino syntonu. Stejná kationtová hlava se tedy může kondenzovat s různými hydrofobními substituenty.

Další předmět podle předkládaného vynálezu se týká prostředku obsahujícího činidlo pro přenos nukleové kyseliny, jak bylo definováno výše a nukleovou kyselinu. Prostředky s výhodou obsahují poměr 0,1 až 50 nanomolů vektoru na µg nukleové kyseliny. S výhodou se tento poměr pohybuje mezi 2 až 20 nanomoly vektoru na µg nukleové kyseliny a výhodněji mezi 4 až 12 nanomoly vektoru na µg nukleové kyseliny. Přesněji jsou

přenosové činidlo a nukleová kyselina přítomny v poměru 8 až 12 nanomolů vektoru na µg nukleové kyseliny.

Pro účely podle předkládaného vynálezu znamená termín „nukleová kyselina" jak deoxyribonukleovou kyselinu, tak ribonukleovou kyselinu. Mohou to být přírodní nebo syntetické sekvence a zejména genomická DNA (gDNA), komplementární DNA (cDNA), mediátorová RNA (mRNA), transferová RNA (tRNA), ribosomální RNA (rRNA), hybridní sekvence nebo polosyntetické sekvence, oligonukleotidy, které jsou modifikované nebo podobně. Tyto nukleové kyseliny mohou být lidského, živočišného, rostlinného, bakteriálního nebo virového původu a podobně. Mohou se získat pomocí postupů, které jsou odborníkům v této oblasti známé a zejména pomocí screeningu knihoven, chemickou syntézou nebo smíšenými postupy, včetně chemických a enzymatických modifikací sekvencí získaných pomocí screeningu knihoven. Mohou se chemicky modifikovat.

Pokud jde o deoxyribonukleové kyseliny, mohou být jedno nebo dvoupramenné, a také to mohou být krátké oligonukleotidy nebo delší sekvence. Nukleové kyseliny mohou zahrnovat plasmidy, vektory, episomy, expresní kazety a podobně. Tyto deoxyribonukleové kyseliny mohou nést replikační počátek, který je funkční nebo jiný v cílové buňce, jeden nebo více markerových genů, sekvence pro regulaci transkripce nebo replikace, geny terapeutického významu, „anti-sense" sekvence, které jsou modifikované nebo jiné.

Nukleové kyseliny s výhodou zahrnují expresní kazety skládající se z jednoho nebo více genů terapeutického významu pod kontrolou jednoho nebo více promotérů a terminátorů transkripce, které jsou aktivní na cílových buňkách.

Pro účely podle předkládaného vynálezu se genem terapeutického významu rozumí zejména gen kódující proteinový produkt, který má terapeutický význam. Takto kódovaný proteinový produkt mů-

že být zejména protein nebo peptid. Tento proteinový produkt může být exogenní, homologní nebo endogenní vzhledem k cílové buňce, to znamená produkt, který je normálně exprimován v cílové buňce, pokud tato buňka nevykazuje onemocnění. V tomto případě umožňuje exprimace proteinu například překonat nedostatečnou exprimaci v buňce nebo exprimaci proteinu, který je neaktivní nebo slabě aktivní, protože je modifikovaný, nebo překonat nadbytečnou exprimaci tohoto proteinu. Gen terapeutického významu může také kódovat mutant buněčného proteinu, který má zvýšenou stabilitu, modifikovanou aktivitu a podobně. Proteinový produkt může být také heterologní vzhledem k cílové buňce. V tomto případě může exprimovaný protein například doplňovat nebo poskytovat aktivitu, která je v buňce nedostatečná, čímž se umožní boj s onemocněním nebo se stimuluje imunitní odpověď.

Mezi terapeutickými produkty podle předkládaného vynálezu je možné uvést zejména enzymy, krevní deriváty, hormony, lymfokiny, interleukiny, interferony, TNF a podobně (FR 92/03120), růstové faktory, neurotransmitéry nebo jejich prekurzory nebo syntetické enzymy, trofní faktory (BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, HARP/pleiotrofin a podobně), apolipoproteiny (ApoAI, ApoAIV, ApoE a podobně, FR 93/05125). dystrofin nebo minidystrofin (FR 91/11947) CFTR protein spojený s cystickou fibrózou, nádorové expresní geny (p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, a podobně, FR 93/04745), geny kódující faktory zahrnuté při koagulaci (faktory VII, VIII, IX), geny zahrnuté při reparaci DNA (thymidinkináza, cytosindeamin——za), geny pro hemoglobin nebo jiné proteinové transportéry, metabolické nebo katabolické enzymy a podobně.

Nukleová kyselina terapeutického významu může být také „antisense" gen nebo sekvence, jejichž exprimace v cílové buňce umožňuje kontrolu exprimace genů nebo transkripce buněčné mRNA. Tyto sekvence se mohou například přepisovat v cílové

buňce na RNA komplementární s buněčnou mRNA a tak blokovat její translaci do proteinu, podle techniky popsané v patentu EP 140,308. Terapeutivké geny také zahrnují sekvence kódující ribozomy, které jsou schopné selektivně zničit cílové RNA (EP 321,201).

Nukleová kyselina může také obsahovat jeden nebo více genů kódujících antigenní peptidy, schopné generovat imunitní odpověď u člověka nebo živočichů. V tomto konkrétním provedení předkládaný vynález umožňuje výrobu buď vakcín nebo imunoterapeutických léčiv podávaných člověku nebo živočichům, zejména proti mikroorganismům, virům nebo rakovině. Může také zahrnovat zejména antigenní peptidy specifické pro Epstein Barrův virus, virus HIV, virus hepatitidy B (EP 185,573), pseudovzteklinové viry, „viry tvořící syncitie", jiné viry nebo antigenní peptidy specifické pro nádory (EP 259,212).

Nukleové kyseliny také s výhodou zahrnují sekvence umožňující exprimaci genu terapeutického významu a/nebo genu kódujícího antigenní peptid v požadované buňce nebo orgánu. Mohou to být sekvence, které jsou přirozeně zodpovědné za exprimaci uvažovaného genu, pokud jsou tyto sekvence schopné fungovat v nakažené buňce. Mohou to být také sekvence jiného původu (zodpovědné za exprimaci jiných proteinů nebo dokonce syntetické sekvence). Zejména to mohou být promotorová sekvence eukaryotických nebo virových genů. Například to mohou být promotorové sekvence odvozené od genomu buňky, který se má infikovat. Podobně to mohou být promotorové sekvence odvozené od genomu viru. V této souvislosti je možné uvést například promotory E1A, MLP, CMV a RSV genů a podobně. Dále mohou být tyto expresní sekvence modifikovány přidáním aktivujících a regulačních sekvencí a podobně. Mohou také obsahovat indukovatelné nebo potlačitelné promotory.

Dále může nukleová kyselina také obsahovat zejména „upstream" genu terapeutického významu, signální sekvenci řídící terapeutický produkt syntetizovaný ve vyměšovacích drahách cílové buňky. Touto signální sekvencí může být přirozená signální sekvence terapeutického produktu, ale může to být také jakákoli jiná funkční signální sekvence nebo umělá signální sekvence. Nukleová kyselina může také obsahovat signální sekvenci řídící syntetizovaný terapeutický produkt směrem k příslušné části buňky.

Prostředky mohou dále obsahovat přísady, které se mohou kombinovat s komplexem přenosové činidlo/nukleová kyselina, a které zlepšují jeho transfekční účinnost. V jiném provedení se předkládaný vynález proto týká prostředků obsahujících nukleovou kyselinu, transfekční činidlo, jak bylo definováno výše, a jednu nebo více přísad schopných kombinace s nukleolipidovými komplexy a zvyšujících jeho transfekční sílu.

V tomto ohledu mohou prostředky podle předkládaného vynálezu jako přísadu obsahovat jeden nebo více neutrálních lipidů. Tyto prostředky jsou zvláště výhodné, zejména pokud poměr náboje přenosového činidla/nukleové kyseliny je nízký. Přihlašovatel skutečně dokázal, že přidání neutrálního lipidu umožňuje zlepšit vznik nukleolipidových částic a zlepšit penetraci částic do buněk pomocí destabilizace jejich membrány.

Výhodněji jsou neutrálními lipidy používanými podle předkládaného vynálezu, lipidy obsahující dva mastné řetězce. Zvláště výhodně se použijí přírodní nebo syntetické lipidy, které jsou za fyziologických podmínek obojetnými ionty nebo nemají iontový náboj. Mohou se zejména vybrat ze skupiny, kterou tvoří dioleylfosfatidylethanolamin (DOPE), oleoylpalmitoylfosfatidylethanolamin (POPE), di-stearoyl, -palmitoyl a -myristoylfosfatidylethanolaminy a také jejich deriváty, které jsou jednou až třikrát N-methylované; fosfatidylglyceroly, diacylgly-

01.12.99

ceroly, glykosyldiacylglyceroly, cerebrosidy (jako jsou zejména galaktocerebrosidy), sfingolipidy (jako jsou například sfingomyeliny) nebo asialogangliosidy (jako jsou zejména asialoGM1 a GM2).

Tyto různé lipidy se mohou připravit buď synteticky nebo pomocí extrakce z orgánů (například z mozku) nebo z vajec, pomocí běžných postupů, které jsou odborníkům v této oblasti známé. Zejména extrakce přírodních lipidů se může provádět pomocí organických rozpouštědel (viz. Lehninger, Biochemistry).

Nedávno přihlašovatelé demonstrovali, že je také zvláště výhodné použít jako přísadu sloučeniny přímo nebo jinak zahrnuté při kondenzaci jmenované nukleové kyseliny (WO 96/25508). Přítomnost těchto sloučenin v prostředku podle předkládaného vynálezu umožňuje snížit množství transfekční sloučeniny, což je zejména výhodné z toxikologického hlediska, bez jakéhokoli poškození účinku na transfekční aktivitu. Sloučenina zahrnutá při kondenzaci nukleové kyseliny by měla přímo nebo nepřímo definovat sloučeninu, která tvoří nukleovou kyselinu. Přesněji může tato sloučenina buď působit přímo na úrovni nukleové kyseliny, která se má transfekovat nebo může být zahrnuta na úrovni další sloučeniny, která je přímo zahrnuta při kondenzaci této nukleové kyseliny. S výhodou působí přímo na úrovni nukleové kyseliny. Tímto činidlem může být jakýkoli polykation, například polylysin. Podle výhodného provedení toto činidlo, které je zahrnuto při kondenzaci nukleové kyseliny, je odvozeno, úplně nebo částečně, od protaminu, od histonu nebo od nukleolinu a/nebo od jednoho z jejich derivátů. Toto činidlo se může také skládat, úplně nebo částečně, z peptidových jednotek (KTPKKAKKP) a/nebo (ATPAKKAA). Počet jednotek se může měnit od 2 do 10. Ve struktuře sloučeniny podle předkládaného vynálezu se tyto jednotky mohou opakovat nepřetržitě nebo jinak. Mohou být tedy odděleny pomocí můstků biochemické

01.12.99

povahy, například jednou nebo více aminokyselinami, nebo chemické povahy.

Ve zvláště výhodném provedení prostředky podle předkládaného vynálezu obsahují dále směrující složky, které umožňují orientovat přenos nukleové kyseliny. Tato směrující složka může být složkou pro extracelulární směrování, která umožňuje orientovat přenos DNA k určitým typům buněk nebo určitým požadovaným tkáním (nádorové buňky, hepatitické buňky, hematopoietické buňky a podobně). Může to být také intracelulární směrující složka, která umožňuje orientovat přenos nukleové kyseliny směrem k výhodným částem buněk (mitochondriím, jádru a podobně). Směrující složka může být připojena k přenosovému činidlu nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu nebo také k nukleové kyselině, která je definovaná výše.

Mezi směrující složky, které se mohou použít podle předkládaného vynálezu, patří například cukry, peptidy, proteiny, oligonukleotidy, lipidy, neuromediátory, hormony, vitaminy nebo jejich deriváty. S výhodou jsou to cukry nebo proteiny, jako jsou protilátky nebo fragmenty protilátek, ligandy buněčných receptorů nebo jejich fragmenty, receptory nebo fragmenty receptorů a podobně. Zejména to mohou být ligandy pro receptory růstových faktorů, receptory cytokinu, receptory buněčného lektinového typu nebo ligandy obsahující RGD sekvenci s afinitou k receptorům adhezních proteinů, jako jsou integriny. Mohou to být také receptory transferinu, HDL a LDL nebo přenašeč folátu. Směrující složkou může být také cukr, který umožňuje zasáhnout lectiny, jako jsou receptory asialoglykoproteinů nebo sialydů, jako je sialyd Lewis X nebo alternativně fragment Fab protilátky nebo jednořetězcová protilátka (ScFv). Nedávno byly také popsány přírodní nebo syntetické ligandy peptidů, které jsou výhodné zejména pro jejich selektivitu ke specifickým buňkám a které jsou schopné účinně

01.12.99

podporovat začlenění do těchto buněk (Bary a kol., Nature Medicine, 2, 1996, 299-305).

Kombinace směrujících složek s nukleolipidovými komplexy se může provést pomocí technik, které jsou odborníkům v této oblasti známé, například pomocí kondenzace k hydrofobní části nebo k části, která interaguje s nukleovou kyselinou přenosového činidla podle předkládaného vynálezu nebo ke skupině, která interaguje s přenosovým činidlem podle předkládaného vynálezu nebo s nukleovou kyselinou. Požadovaná interakce může mít s výhodou iontovou nebo kovalentní povahu.

Podle dalšího provedení mohou prostředky podle předkládaného vynálezu také obsahovat nejméně jednu neionogenní povrchově aktivní látku v množství, které je dostatečné pro stabilizaci velikosti částic nukleolipidových komplexů. Přidáním neionogenních povrchově aktivních látek se předchází vzniku agregátů, čímž se prostředky stávají vhodnějšími pro *in vivo* podávání. Prostředky podle předkládaného vynálezu obsahující takové povrchově aktivní látky jsou výhodné zejména z hlediska bezpečnosti. Mají také další výhody ve smyslu snížení nebezpečí rušení s jinými proteiny, což je dáno snížením celkového náboje prostředků nukleolipidových komplexů.

Povrchově aktivní látky s výhodou obsahují nejméně jednu hydrofobní část a nejméně jednu hydrofilní část. Hydrofobní část je s výhodou vybraná ze skupiny, kterou tvoří alifatické řetězce, hydrofobní polyoxyalkyleny, alkylidenpolyestery, polyethylenglykoly s benzylpolyetherovou hlavou a cholesterol, a hydrofilní část je s výhodou vybraná ze skupiny, kterou tvoří hydrofilní polyoxyalkyleny, polyvinylalkoholy, polyvinylpyrrolidony nebo cukry. Takové neionogenní povrchově aktivní látky jsou popsány v patentové přihlášce PCT/FR 98/00222.

Předmětem podle předkládaného vynálezu je také použití sloučenin definovaných výše pro přenos nukleových kyselin (a obec-

01.12.99

ně polyaniontů) do buněk. Toto použití je zvláště výhodné, protože tato transfekční činidla zvyšují transfekční účinnost zatímco mají nulovou nebo velmi sníženou toxicitu.

Pro použití *in* vivo, například pro studium regulace genů, pro přípravu zvířecích modelů patologických stavů, nebo pro léčení, se mohou prostředky podle předkládaného vynálezu upravit pro podávání místním, kožním, orálním, rektálním, vaginálním, parenterálním, intranásálním, nitrožilním, nitrosvalovým, podkožním, nitroočním, transdermálním, intratracheálním nebo intraperitoneálním způsobem a podobně. Prostředky podle předkládaného vynálezu s výhodou obsahují vehikulum, které je farmaceuticky přijatelné pro injekční prostředky, zejména pro přímé injekční podávání do požadovaného orgánu nebo pro podávání místním způsobem (na pokožku a/nebo na sliznici). Mohou to být zejména isotonické sterilní roztoky nebo suché, zejména sušené za zmrazení, prostředky, které se před podáváním v závislosti na způsobu podávání, zředí sterilizovanou vodou nebo fyziologickým roztokem solanky, čímž vzniknou roztoky vhodné pro injekční podávání. Dávky nukleové kyseliny používané pro injekční prostředky a také počet podávání se mohou upravit podle různých parametrů a zejména podle způsobu podávání, odpovídajícího onemocnění, genu, který se má exprimovat nebo na požadované době léčby. Pokud jde o způsob podávání, může se použít buď přímé injekční podávání do tkáně, například na úrovni nádorů nebo do oběhového systému nebo léčení buněk při kultivaci před jejich zpětnou implantací *in vivo*, pomocí injekce nebo transplantace. Odpovídající tkáně nebo oběhový systém podle předkládaného vynálezu jsou například svaly, kůže, mozek, plíce, játra, slezina, kostní dřeň, brzlík, srdce, míza, krev, kosti, chrupavky, slinivka břišní, ledviny, měchýř, žaludek, střevo, varlata, vaječníky, konečník, nervový systém, oči, žlázy, pojivové tkáně a podobně.

01.12.99

Předkládaný vynález se dále týká způsobu přenosu nukleových kyselin do buněk, který zahrnuje následující kroky:

(1) uvedení nukleové kyseliny do styku s přenosovým činidlem definovaným výše za vzniku komplexu a

(2) uvedení buněk do styku s komplexem vzniklým v (1).

Buňky se mohou uvést do kontaktu s komplexem pomocí inkubace buněk s jmenovaným nukleolipidovým komplexem (při použití *in vitro* nebo *ex vivo*) nebo pomocí injektování komplexu do organismu (pro použití *in vivo*). Inkubace se s výhodou provádí v přítomnosti například 0,01 až 1000 μg nukleové kyseliny na 10^6 buněk. Při *in vivo* podávání se může použít dávka nukleové kyseliny 0,01 až 10 mg.

V případě, že prostředky podle předkládaného vynálezu obsahují dále jednu nebo více přísad, které jsou definovány výše, se přísada(y) smísí předem s lipidem podle předkládaného vynálezu nebo s nukleovou kyselinou.

Předkládaný vynález tedy poskytuje zvláště výhodný způsob přenosu nukleových kyselin (zejména při léčení onemocnění) zahrnující *in vitro*, *in vivo* nebo *ex vivo* podávání nukleové kyseliny kódující protein nebo která se může přepsat do nukleové kyseliny schopné upravit onemocnění, kdy se jmenovaná nukleová kyselina kombinuje s přenosovým činidlem obecného vzorce I za podmínek definovaných výše. Přesněji lze způsob použít pro léčení onemocnění vznikajících z důvodu nedostatku proteinu nebo nukleového produktu, kdy podávaná nukleová kyselina kóduje jmenovaný proteinový produkt nebo se přepisuje do nukleového produktu nebo alternativně tvoří jmenovaný nukleový produkt.

Předkládaný vynález také rozšiřuje jakékoli použití činidla pro přenos nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu pro transfekci buněk.

01.12.99

Činidla pro přenos nukleových kyselin podle předkládaného vynálezu se mohou použít zejména pro přenos nukleových kyselin do primárních buněk nebo do daných kmenů. Mohou to být buňky fibroblastů, svalové buňky, nervové buňky (neurony, astrocyty, buňky glií), jaterní buňky, buňky hematopoietického kmene (lymfocyty, CD34, dendritické buňky a podobně), buňky epitelu a podobně, v diferencované nebo pluripotentní formě (prekurzory).

Kromě výše uvedených rysů předkládaný vynález zahrnuje také další charakteristiky a výhody, které se ozřejmí pomocí příkladů a obrázků, které následují, a které je možné považovat za ilustrativní příklady podle předkládaného vynálezu, které v žádném ohledu neomezují jeho rozsah.

Obrázky

Obrázek 1/5: Schéma syntézy sloučenin 1 až 5

Obrázek 2/5: Schéma syntézy sloučenin 5 až 8a a 8b

Obrázek 3/5: Schéma syntézy sloučenin 9 až 16

Obrázek 4/5: Měření transfekční účinnosti *in vitro* u sloučeniny 8a a 8b pomocí měření aktivity luciferázy v buňkách HeLa, v nepřítomnosti séra. Měření se provádí při různých poměrech nanomolů vektoru/µg DNA a je vyjádřeno pomocí sloupců. Pro každý prostředek se také prováděl proteinový test, který je znázorněn na stejném grafu pomocí křivky ve formě celistvé čáry.

Obrázek 5/5: Měření transfekční účinnosti *in vitro* u sloučeniny 8a a 8b pomocí měření aktivity luciferázy v buňkách NIH 3T3, v nepřítomnosti séra. Měření se provádí při různých poměrech nanomolů vektoru/µg DNA a je vyjádřeno pomocí sloupců.

Látky a způsoby

- HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) čištění se prováděla na zařízení Waters LC 4000, na koloně Vydac C4 za eluce gradientem acetonitrilu ve vodě.

- Fluorescenční měření se prováděla na přístroji Perkin Elmer LS50B, za použití excitačních a emisních vlnových délek 260 nm a 590 nm. Šířka štěrbiny pro excitaci a emisi je nastavena na 5 nm. Hodnota fluorescence se zaznamenává po přidání 5 µg ethidiumbromidu/ml jako konečná koncentrace.

- Spektra nukleární magnetické resonance (NMR) se zaznamenávají při 300,13 MHz pro protony a při 75,47 MHz pro uhlík, na přístroji Bruker MSL 300 v deuterovaném chloroformu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Syntéza přenosového činidla 8a z 6-methylbenzyloxygalaktopyranosy

Různé reakční kroky jsou schématicky znázorněny na obrázcích 1/5 a 2/5.

a) Syntéza 6-methylbenzyloxy-2,3,4-tri-O-(2´-karboxyethyl)-β-D-galactopyranosidu (2)

28,4 g (0,1 mol) 6-methylbenzyloxy-β-D-galaktopyransidu (1) se rozpustí ve 400 ml tetrahydrofuranu míchá se při 0 °C. Přidá se 32 g (5,7 ekvivalentu) jemně rozetřeného hydroxidu draselného, 0,5 g (2 %) 18-Cr-6 crownetheru a 32,5 ml (1,5 ekvivalentu) ethylbromacetátu. Po dvou hodinách se směs odpaří do sucha, rozpustí se ve vodě a získaný roztok se neutralizuje 2N kyselinou chlorovodíkovou. Po extrakci dichlormethanem se získá 32 g produktu (2) ve výtěžku 70 %.

01.12.99

^{13}C NMR: δ, 172,94; 136,87; 127,93; 127,41; 98,89; 97,22; 78,74; 76,17; 72,97; 69,52; 67,93; 63,59; 54,75.

b) Syntéza 6-methylbenzyloxy-2,3,4-tri-O-(2´-hydroxyethyl)-β,D-galaktopyranosidu (3)

30 g (0,065 mol) trikyseliny (2) z předchozího kroku se rozpustí v 400 ml tetrahydrofuranu a umístí se při 0 °C pod dusíkovou atmosféru. Za míchání se přikape 40 ml boran-dimethylsulfidu. Směs se míchá další 2 hodiny při teplotě místnosti a potom se opatrně přidá přebytek methanolu. Roztok se potom odpaří do sucha a získaná pevná látka se několikrát znovu rozpustí v methanolu. Získá se 24,5 g cílového produktu (3) ve výtěžku 90 %, který se čistí na koloně silikagelu za eluce ethylacetátem.

c) Syntéza 6-methylbenzyloxy-2,3,4-tri-O-(2´-azidoethyl)-β-D-galaktopyranosidu (4)

20 g (0,048 mol) triol (3) získaného v předchozím kroku se rozpustí v 500 ml tetrahydrofuranu. Přidá se 40 g (3,2 ekvivalentu) trifenylfosfinu, 160 ml (3,7 ekvivalentu) 1,1M roztoku kyseliny azidovodíkové v toluenu a potom 24,2 ml (3,2 ekvivalentu) diethylazodikarboxylátu. Po jedné hodině se roztok odpaří a čistí se na silikagelu za eluce směsí heptan/ethylacetát (6:4). Získá se 17,6 g produktu (4) ve výtěžku 90 %.

^{13}C NMR: δ, 128,47; 127,80; 98,23; 79,05; 76,27; 73,55; 71,92; 70,15; 69,95; 68,77; 68,14; 55,37; 51,41; 51,11; 50,87.

d) Syntéza trishydrochloridu methyl-2,3,4-tri-O-(2´-amino-ethyl)-β-D-galaktopyranosidu (5)

15 g (0,03 mol) triazidu (4) se rozpustí v 200 ml ethanolu. Přidá se 7,5 ml 12N kyseliny chlorovodíkové a potom se směs

01.12.98

hydrogenuje tři hodiny v přítomnosti palladia na aktivním uhlí. Po filtraci a odpaření rozpouštědla se získá zbytek (5) (12,6 g, výtěžek: 95 %) a použije se rovnou v následujícím kroku.

e) Syntéza methyl-2,3,4-tri-O-(2´-terc.butylkarbamidoethyl)-β-D-galaktopyranosidu (6)

12 g (0,028 mol) hydrochloridu (5) se rozpustí ve směsi 100 ml dioxanu a 85 ml 1N hydroxidu sodného. Přidá se 18,7 g (3,3 ekvivalenty) diterc.butyldikarbonátu a směs se míchá 2 hodiny při teplotě místnosti. Reakční směs se odpaří a extrahuje dichlormethanem (třikrát 50 ml). Organické fáze se spojí a suší se nad síranem sodným a odpaří se. Takto se získá 15,56 g (výtěžek 90 %) zbytku (6), který se čistí na koloně silikagelu za eluce ethylacetátem.

f) Syntéza 6-methyldioktadecylamidosukcinyl-2,3,4-tri-O-(2´-terc.butylkarbamidoethyl)-β-D-galaktopyranosidu (7a)

10 g (0,016 mol) produktu z předchozího kroku (6) se rozpustí v 300 ml dichlormethanu. Postupně se přidá 14,6 g (1,5 ekvivalentu) dioktadecylamidojantarové kyseliny, 1,95 g (1 ekvivalent) dimethylaminopyridinu a 6,5 g (2 ekvivalenty) dicyklohexylkarbodiimidu. Dioktadecylamidojantarová kyselina se získá pomocí reakce dioktadecylaminu s anhydridem kyseliny jantarové. Po míchání přes noc se ke směsi opatrně přidá kyselina šťavelová v methanolu a směs se míchá jednu hodinu (vyvíjí se oxid uhelnatý). Roztok se filtruje a odpaří se do sucha a získaný produkt se čistí na koloně silikagelu za eluce směsí heptan/ethylacetát (7:3). Takto se získá 12,8 g produktu (7a) (výtěžek: 65 %).

g) Syntéza tristrifluoracetátu 6-methyldioktadecylamidosukcinyl-2,3,4-tri-O-(2´-aminoethyl)-β,D-galaktopyranosidu (8a)

10 g (0,008 mol) produktu (7a) se rozpustí v 20 ml 90% kyseliny trifluoroctové. Po půl hodině se roztok odpaří a zbytek se převede třikrát do toluenu a odpaří se. Získaný zbytek 8a se čistí pomocí HPLC (RP4; voda/acetonitril; 0-100 %; 20 minut). Získá se 9,7 g produktu 8a ve výtěžku 95 %.

MH^+ = 1304.

Příklad 2

Syntéza sloučeniny 8b z 6-methylbenzyloxygalaktopyranosy

Různé reakční kroky jsou schématicky znázorněny na obrázcích 1/5 a 2/5.

První fáze syntézy je stejná jako syntetické kroky a) až e) popsané v příkladu 1. Dále se postupuje následujícím způsobem:

f) Syntéza 6-methyldioktadecylamidofthalyl-2,3,4-tri-O-(2´-terc.butylkarbamidoethyl)-β-D-galaktopyranosid (7b)

Tento produkt se získá stejným způsobem, jako produkt 7a, ale za použití dioktyldecylamidoftalové kyseliny místo dioktadecylamidojantarové kyseliny.

g) Syntéza tristrifluoracetátu 6-methyldioktadecylamidofthalyl-2,3,4-tri-O-(2´-aminoethyl)-β-D-galaktopyranosidu (8b)

Sloučenina 8b se získá z produktu 7b z předchozího kroku stejným způsobem, jako produkt 8a.

MH^+ = 1317

Příklad 3

Syntéza přenosového činidla 16 z triacetylglykalu

a) Syntéza ftalimidopropyl-4,6-di-O-acetyl-2,3-bisdeoxy-β-D-erythro-2-hexenopyranosidu (10)

Různé reakční kroky jsou uvedeny na obrázku 3/5.

13,17 g (0,048 mol) triacetyl-D-glukalu (9) se rozpustí v 250 ml dichlormethanu. Přidá se 11 g (1,1 ekvivalentu) ftalimidopropanolu a 1,56 ml (0,26 ekvivalentu) etherátu fluoridu boritého. Po 1 hodině při teplotě místnosti se směs neutralizuje nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, roztok se slije, suší se a odpaří. Získá se 16 g produktu 10 (výtěžek je 80 %), který se čistí pomocí chromatografie na koloně silikagelu za eluce směsíheotan/ethylacetát (5:5).

b) Syntéza ftalimidopropyl-4,6-di-O-acetyl-2,3-bisdeoxy-β-D-glucopyranosidu (11)

16 g (0,038 mol) glykosidu (10) se rozpustí v 200 ml ethanolu. Přidá se 0,16 g 10% palladia na uhlí a směs se 2 hodiny hydrogenuje. Po filtraci se roztok odpaří. Získá se 15,78 g produktu 11 (výtěžek je 99 %).

c) Syntéza fthalimidopropyl-2,3-bisdeoxy-β-D-glukopyranosidu (12)

15 g (0,036 mol) produktu 11 z předchozího kroku se rozpustí v 250 ml methanolu, a potom se přidá 3,5 ml (0,1 ekvivalentu) 1N methoxidu sodného. Po 2 hodinách se směs neutralizuje amberlitovou pryskyřicí IR 120. Po filtraci a odpaření se získá 11,5 g produktu 12 ve výtěžku 96 %.

d) Syntéza ftalimidopropyl-4,6-diazido-2,3,4,6-tetradeoxy-β-D-glucopyranosidu (13)

11 g (0,033 mol) deacetylovaného produktu 12 se rozpustí v 250 ml tetrahydrofuranu. Za míchání se postupně přidá 21,5 g (2,5 ekvivalentu) trifenylfosfinu a 110,5 ml (3,7 ekvivalentu) 1,1M kyseliny azidovodíkové v toluenu. Takovou rychlostí, aby teplota nepřekročila 30 °C se přidá 12,88 ml (2,5 ekvivalentu) diethylazodikarboxylátu. Po jedné hodině se roztok odpaří do

01.12.99

sucha a získaný produkt se čistí na koloně silikagelu za eluce směsí heptan/ethylacetát (8:2). Získá se 7,2 g produktu 13 (výtěžek: 57 %).

e) Syntéza aminopropyl-4,6-diazido-2,3,4,6-tetradeoxy-β-D-glukopyranosidu (14)

7 g (0,018 mol) produktu 13 se rozpustí v 500 ml ethanolu a potom se přidá 2,6 ml hydrátu hydrazinu a směs se míchá 2 hodiny při 40 °C. Po odpaření se zbytek rozpustí v dichlormethanu a vznikající ftalylhydrazid se nechá krystalizovat. Roztok se filtruje a odpaří. Získá se 4,17 g produktu 14 ve výtěžku 90 %.

f) Syntéza cholesteryl-O-formamidopropyl)-4,6-diazido-2,3,4,6-tetradeoxy-β-D-glukopyranosidu (15)

6,34 g (0,9 ekvivalentu) cholesterylchlorformiátu a 4 g (0,016 mol) produktu 14 se rozpustí v 200 ml ethyletheru. Okamžitě vznikne sraženina a přidá se 50 ml 1N roztoku hydroxidu sodného. Po několika minutách je roztok opět čirý. Míchá se dalších 30 minut a potom se slije, promyje se dvakrát 50 ml vody a roztok se odpaří do sucha. Získá se 9,4 g produktu 15, který se čistí na koloně za eluce směsí heptan/ethylacetát (6:4) (výtěžek je 90 %).

g) Syntéza (cholesteryl-O-formamidopropyl)-4,6-diamino-2,3,4,6-tetradeoxy-β-D-glukopyranosidu (16)

9 g (0,013 mol) diazidu 15 se rozpustí v 150 ml 80% tetrahydrofuranu a potom se přidá 14,2 g (4 ekvivalenty) trifenylfosfinu a směs se jednu hodinu zahřívá na 50 °C. Po ochlazení se směs nanese na kolonu aniontové pryskyřice IRC-50 COOH a promyje se 80% tetrahydrofuranem. Produkt se potom eluuje ve formě acetátu směsí tetrahydrofuran/voda/kyselina octová (64:16:10). Získá se 8,9 g produktu 16 ve výtěžku 90 %.

^{13}C NMR: δ, 176,55; 156,65; 139,84; 132,02; 128,46; 125,46; 122,44; 97,11; 74,28; 56,66; 56,12; 50,02; 43,70; 42,30; 39,51; 38,57; 36,98; 36,55; 36,16; 35,76; 31,87; 30,30; 29,89; 28,18; 23,82; 22,78; 22,53; 21,03; 19,31; 18,70; 11,84.

Příklad 4

Syntéza sloučeniny (17)

a) Syntéza benzyl(5-O-acetyl-6-acetoxymethyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yloxy)acetátu

2,8 g triacetyl D-glukalu (0,01 mol) a 1,6 ml benzylglykolátu (1,1 ekvivalentu) se rozpustí v 80 ml chlorformu. Směs se ochladí v ledové lázni a přidá se 0,651 ml etherátu fluoridu boritého. Po 45 minutách se směs neutralizuje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, suší se nad síranem sodným, filtruje se a odpaří se. Směs se čistí pomocí chromatografie na silikagelu za eluce směsí heptan/ethylacetát (6:4). Výtěžek je 96 %.

b) Syntéza (5-O-acetyl-6-acetoxymethyltetra-hydropyran-2-yloxy)octové kyseliny

3,5 g produktu z předchozího kroku (0,0093 mol) se hydrogenuje za atomosférického tlaku při teplotě místnosti v přítomnosti 0,35 g 10% palladia na aktivním uhlí. Směs se filtruje přes křemelinu a čistí se pomocí chromatografie na koloně silikagelu za eluce ethylacetátem. Výtěžek je 90 %.

c) Syntéza N,N-dioktadecyl(5-O-acetyl-6-acetoxymethyltetra-hydropyran-2-yloxy)acetamidu

0,675 g produktu z předchozího kroku (0,0017 mol) se rozpustí v 8,6 ml chloroformu. Přidá se 0,9 ml diisopropylethylaminu, 0,899 g dioktadecylaminu (1 ekvivalent) a 0,426 g dicyklohexylkarbodiimidu (1,2 ekvivalentu). Po jedné noci při teplotě

místnosti se směs odpaří a produkt se extrahuje heptanem. Směs se čistí pomocí chromatografie na koloně silikagelu za eluce směsí heptan/ethylacetát (8:2). Výtěžek 70 %.

d) Syntéza N,N-dioktadecyl(5-hydroxy-6-hydroxy-methyltetrahydropyran-2-yloxy)acetamidu

1,57 g produktu z předchozího kroku (0,00198 mol) se rozpustí v 10 ml methanolu. Přidá se 0,197 ml methoxidu sodného (0,2 ekvivalentu; methanol 2M). Po dvou hodinách při teplotě místnosti se směs neutralizuje a odpaří. Směs se čistí pomocí chromatografie na koloně silikagelu za eluce směsí heptan/ethylacetát (8:2). Výtěžek je 92 %.

e) Syntéza N,N-dioktadecyl(5-azido-6-azido-methyltetrahydropyran-2-yloxy)acetamidu (17):

0,6 g produktu z předchozího kroku (0,00087 mol) se rozpustí v 15 ml tetrahydrofuranu. Přidá se 0,48 g trifenylfosfinu (2,1 ekvivalentu) a potom 0,288 ml DEAD (2,1 ekvivalentu). Když je exotermní reakce dokončená, přidá se 1,588 ml 1,38M roztoku kyseliny azidovodíkové v toluenu (2,5 ekvivalentu). Na konci reakce se médium odpaří, zbytek se převede do heptanu, filtruje se a odpaří. Směs se potom čistí pomocí chromatografie na silikagelu za eluce směsí heptan/ethylacetát (8:2). Výtěžek je 72 %.

^{13}C NMR: δ, 173,21; 172,07; 162,22; 161,77; 118,34; 114,49; 110,65; 108,34; 96,88; 65,18; 64,50; 48,27; 46,54; 40,69; 35,86; 31,78; 30,94; 28,63; 27,56; 26,92; 22,54; 21,84; 13,94.

Příklad 5

Smísení transfekčních činidel podle vynálezu 8a a 8b s DNA

Tento příklad ilustruje povahu spojení mezi transfekčními činidly podle vynálezu a DNA a také vznik komplexů.

Transfekční činidla podle předkládaného vynálezu se rozpustí při 10 mM ve vodě. Tyto roztoky jsou průhledné a odpovídají uspořádání ve formě micel kationtových lipidů.

Komplexy transfekční činidlo/DNA se připraví v poměru 6 nmol tranfekčního činidla/µg DNA.

Kombinace transfekčního činidla 8b s DNA poskytne komplex o velikosti 92 nm ± 27 nm a fluorescenci 7 % ve vodě a 60 % v chloridu sodném při 300 mM.

Transfekční činidlo podle předkládaného vynálezu 8a, kombinované s DNA, umožňuje vznik komplexu o velikosti 98 nm ± 20 nm a fluorescenci 6 % ve vodě a 55 % v chloridu sodném při 300 mM.

Tyto výsledky ukazují, že transfekční činidla podle předkládaného vynálezu jsou schopné spojení s DNA a vzniku částic, jejich střední průměr je asi 100 nm, což je velikost, která je zvláště vhodná pro průchod buněčnou membránou. Toto spojení zůstává relativně stabilní, když se zvyšuje iontová síla média. Samozřejmě při 300 nm zůstává více než 50 % DNA spojeno s transfekčním činidlem podle předkládaného vynálezu.

Příklad 6

Transfekce DNA in vitro s transfekčním činidlem podle předkládaného vynálezu 8a a 8b

Transfekční účinnost se hodnotila *in vitro* při různých dávkách vektorů/µg DNA.

Genetickým materiálem používaným při těchto pokusech je plazmidový konstrukt pCMV-Luc obsahující „luciferázový" reporterový gen, přičemž tento konstrukt je odvozen od plazmidu pGL2-základního vektoru [Promega] pomocí vložení fragmentu MluI-

01.12.99

HindIII obsahujícího promotér lidského cytomegaloviru (CMV) extrahovaný z plazmidu pcDNA3 [Invitrogen].

Použijí se také zředěné roztoky nukleové kyseliny při 40 µg/ml ve fyziologické solance (0,15M roztok chloridu sodného).

Produkty popsané podle předkládaného vynálezu se rozpustí ve vodě při koncentraci měnící se od 80 µg do 800 µg a smísí se objem na objem s roztokem DNA. Konečná koncentrace solanky v čerstvě připraveném roztoku cytofektantu je 75 mM.

Pro transfekci se buňky kultivují za vhodných podmínek v 24-jamkových mikrotitračních destičkách (2 cm^2/jamka) a transfekují se v exponenciální fázi růstu při 50 až 70% konfluenci.

Buňky se dvakrát promyjí 500 µl média bez sérových proteinů a znovu se kultivují v médiu bez séra. K těmto buňkám [3 jamky/vektor DNA] se přidá 50 µl směsi cytofektantu [1 µg DNA/jamka]. Kultivační médium se dvě hodiny po transfekci doplní vhodným množstvím séra.

Účinnost transfekce se hodnotí 48 hodin po transfekci pomocí měření exprimace luciferázy podle doporučení uvedeného pro použití sady Promega [Luciferázový testovací systém]. Toxicita směsí cytofektantů se hodnotí pomocí měření koncentrací proteinu v buněčném lyzátu.

Výsledky získané při transfekci buněk HeLa jsou uvedeny v obrázku 4/5 a výsledky získané pro buňky NIH3T3 jsou uvedeny v obrázku 5/5.

Z těchto výsledků a také z výsledků získaných poměry vektor/DNA vyšší než 20 nmol/µg DNA (neuvedeno) je možné vyvodit, že transfekce je zvláště účinná, když se poměr vektor/DNA pohybuje mezi 2 až 20 nmol vektoru na µg DNA.

01.12.99

Prezentované výsledky ukazují, že pro oba použité typy buněk je transfekční účinnost optimální při poměru 4 až 12 nmol vektoru na μg DNA a přesněji 8 až 12 nmol vektoru na μg DNA.

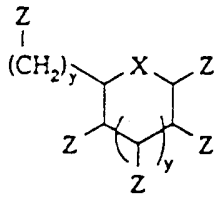
Dále bylo zjištěno, že histogramy představující účinek dávky vektorů se může superponovat pro produkty 8a a 8b bez ohledu na uvažovaný typ buňky.

Oba produkty podle předkládaného vynálezu nejsou toxické při dávkách vektoru testovaných pro NIH 3T3 buňky. Maximální ztráta 20 % buněčných proteinů se pozorovala pouze při dávkách vyšších než 8 nmol vektoru na vzorek transfekovaných buněk.

01.12.99

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Transfekční činidlo obsahující nejméně jednu kationtovou hydrofilní oblast kondenzovanou k lipofilní oblasti, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jmenovaná kationtová hydrofilní oblast má obecný vzorec I:



(I)

kde:

- y je celé číslo 0 nebo 1, různé y jsou na sobě nezávislé,
- X je atom kyslíku, atom dusíku, atom síry nebo atom selenu,
- Z jsou nezávisle na sobě

  - atom vodíku,

  - skupina OR, kde R je atom vodíku, methylová skupina nebo skupina $(CH_2)_n$-NR_1R_2, kde n je celé číslo 1 až 6 včetně a R_1 a R_2 jsou nezávisle na sobě atom vodíku nebo skupina $(CH_2)_q$-NH_2, kdy se q může pohybovat mezi 1 až 6 včetně, různá q jsou na sobě nezávislá,

  - skupina $(CH_2)_m$-NR_1R_2, kde m je celé číslo 0 až 6 včetně a R_1 a R_2 jsou definovány výše nebo alternativně

  - „můstek" umožňující vazbu kationtové hydrofilní oblasti k oblasti lipidu,

je třeba poznamenat, že nejméně jeden substituent Z je „můstek" a že nejméně dva substituenty Z nesou aminoskupinu.

2. Transfekční činidlo podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že v obecném vzorci definujícím kationtovou

hydrofilní oblast je n ve skupině $(CH_2)_n$-NR_1R_2 celé číslo vybrané z 2, 3 a 4.

3. Transfekční činidlo podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že obecný vzorec definujícím kationtovou hydrofilní oblast je glykosid ve formě pyranózy nebo furanózy.

4. Transfekční činidlo podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že v obecném vzorci definujícím kationtovou hydrofilní oblast je y rovno 1 a X je atom kyslíku.

5. Transfekční činidlo podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jmenovaná lipofilní oblast skládá z jednoho nebo více popřípadě halogenovaných, nasycených nebo nenasycených, lineárních nebo rozvětvených alifatických řetězců a/nebo steroidního derivátu.

6. Transfekční činidlo podle nároku 5 v y z n a č u j í c í s e t í m , že jmenované alifatické řetězce obsahují 10 až 22 atomů uhlíku a zejména 14, 16, 17, 18 a/nebo 19 atomů uhlíku.

7. Transfekční činidlo podle nároků 5 a 6 v y z n a č u j í c í s e t í m , že jmenované alifatické řetězce jsou vybrány ze skupiny, kterou tvoří $(CH_2)_{13}CH_3$, $(CH_2)_{15}CH_3$, $(CH_2)_{16}CH_3$, $(CH_2)_{17}CH_3$ and $(CH_2)_{18}CH_3$.

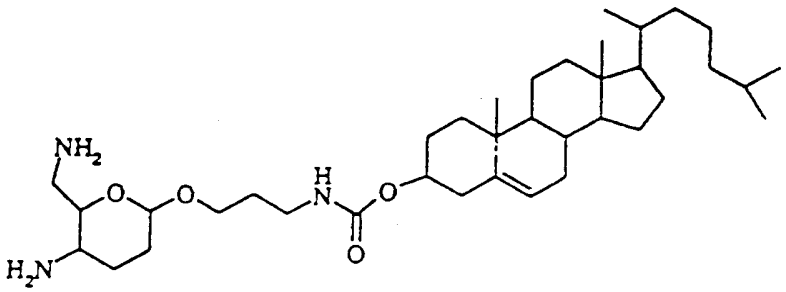
8. Transfekční činidlo podle nároku 5 v y z n a č u j í c í s e t í m , že steroidní derivát je vybrán ze skupiny, kterou tvoří cholesterol, cholestanol, 3α,5-cyklo-5α-cholestan-6β-ylformiát, cholesterylamin, 6-(1,5-dimethylhexyl)-3a,5a-dimethylhexadekahydrocyklopenta[a]cyklopropa-[2,3]-cyklo-penta[1,2-f]-naftalen-10-ylamin nebo cholestanylamin.

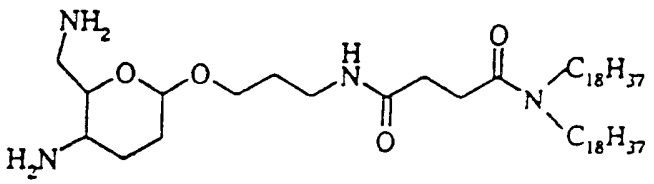
9. Transfekční činidlo podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že se „můstek" umožňující připojení kationtové hydrofilní oblasti k lipofilní oblasti skládá z kyselinové nebo aminoskupiny obsahující hydrolyzovatelné funkční skupiny.

10. Transfekční činidlo podle nároku 9 v y z n a č u j í c í s e t í m , že „můstek" se skládá z alifatického nebo aromatického řetězce a obsahuje jednu nebo více skupin vybraných ze skupiny, kterou tvoří amidy, estery, ethery, karbamáty a aromatické kruhy.

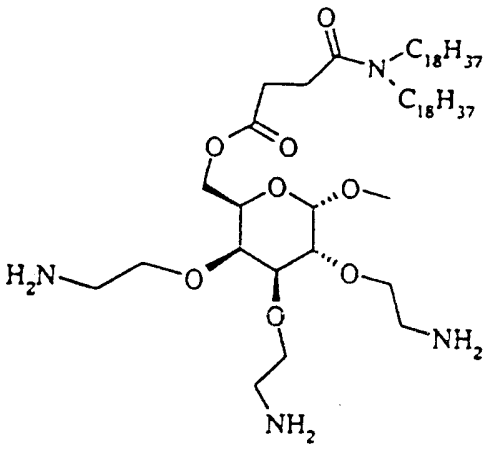
11. Transfekční činidlo podle nároku 9 v y z n a č u j í c í s e t í m , že „můstek" je vybrán ze skupiny kterou tvoří skupina $-O-CO-(CH_2)_x-COOH$, skupina $-O-(CH_2)_x-COOH$, skupina $-O-CO-(CH_2)_x-NH_2$, skupina $-O-(CH_2)_x-NH_2$, skupina $-NH-(CH_2)_x-NH_2$, kde x je celé číslo 1 až 6 včetně.

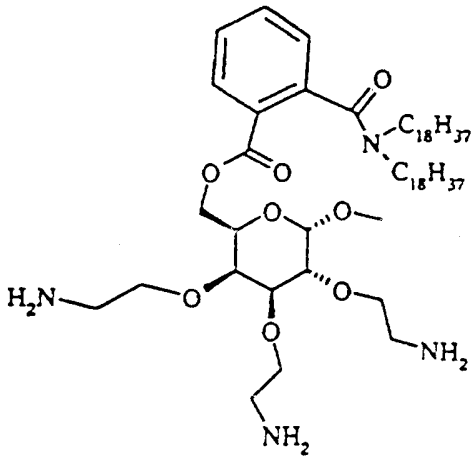
12. Transfekční činidlo podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že je to jedna z následujících sloučenin:





01.12.99





13. Způsob přípravy transfekčního činidla podle kteréhokoli z nároků 1 až 12 vyznačující se tím, že se lipofilní oblast kondenzuje pomocí „můstku" k heterocyklu obecného vzorce definovaného podle nároku 1.

14. Prostředek vyznačující se tím, že obsahuje transfekční činidlo definované podle kteréhokoli z nároků 1 až 12 a nejméně jednu nukleovou kyselinu.

15. Prostředek podle nároku 14 vyznačující se tím, že se poměr transfekční činidlo/nukleová kyselina pohybuje mezi 0,1 až 50 nanomoly činidla na µg DNA.

16. Prostředek podle nároku 14 vyznačující se tím, že dále obsahuje jeden nebo více adjuvantů.

17. Prostředek podle nároku 16 vyznačující se tím, že přísadami jsou neutrální lipidy.

18. Prostředek podle nároku 16 vyznačující se tím, že přísadami jsou sloučeniny, které jsou přímo nebo nepřímo zahrnuty při kondenzaci nukleové kyseliny.

19. Prostředek podle kteréhokoli z nároků 14 až 18 vyznačující se tím, že obsahuje vehikulum farmaceuticky přijatelné pro injekční prostředky.

20. Prostředek podle kteréhokoli z nároků 14 až 18 vyznačující se tím, že obsahuje vehikulum farmaceuticky přijatelné pro aplikaci na kůži a/nebo na sliznici.

21. Způsob přenosu nukleové kyseliny do buněk vyznačující se tím, že zahrnuje následující kroky:

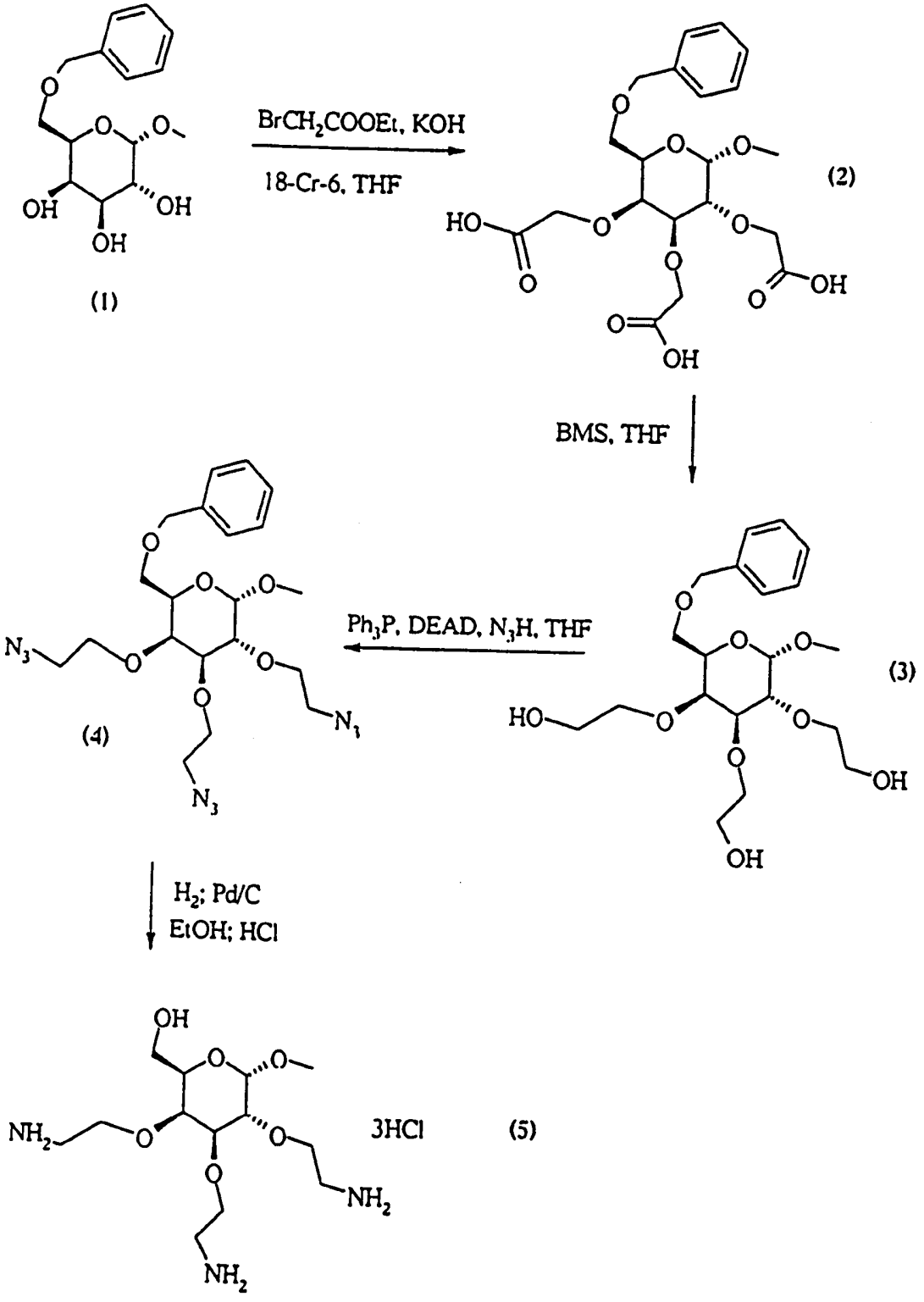
(1) uvedení nukleové kyseliny do styku s přenosovým činidlem definovaným podle nároků 1 až 19 a, pokud je to vhodné, s adjuvantem, za vzniku komplexu a

(2) uvedení buněk do styku s komplexem vzniklým v (1).

22. Transfekční činidlo podle kteréhokoli z nároků 1 až 13 vyznačující se tím, že se použije při transfekci nukleových kyselin do buněk.

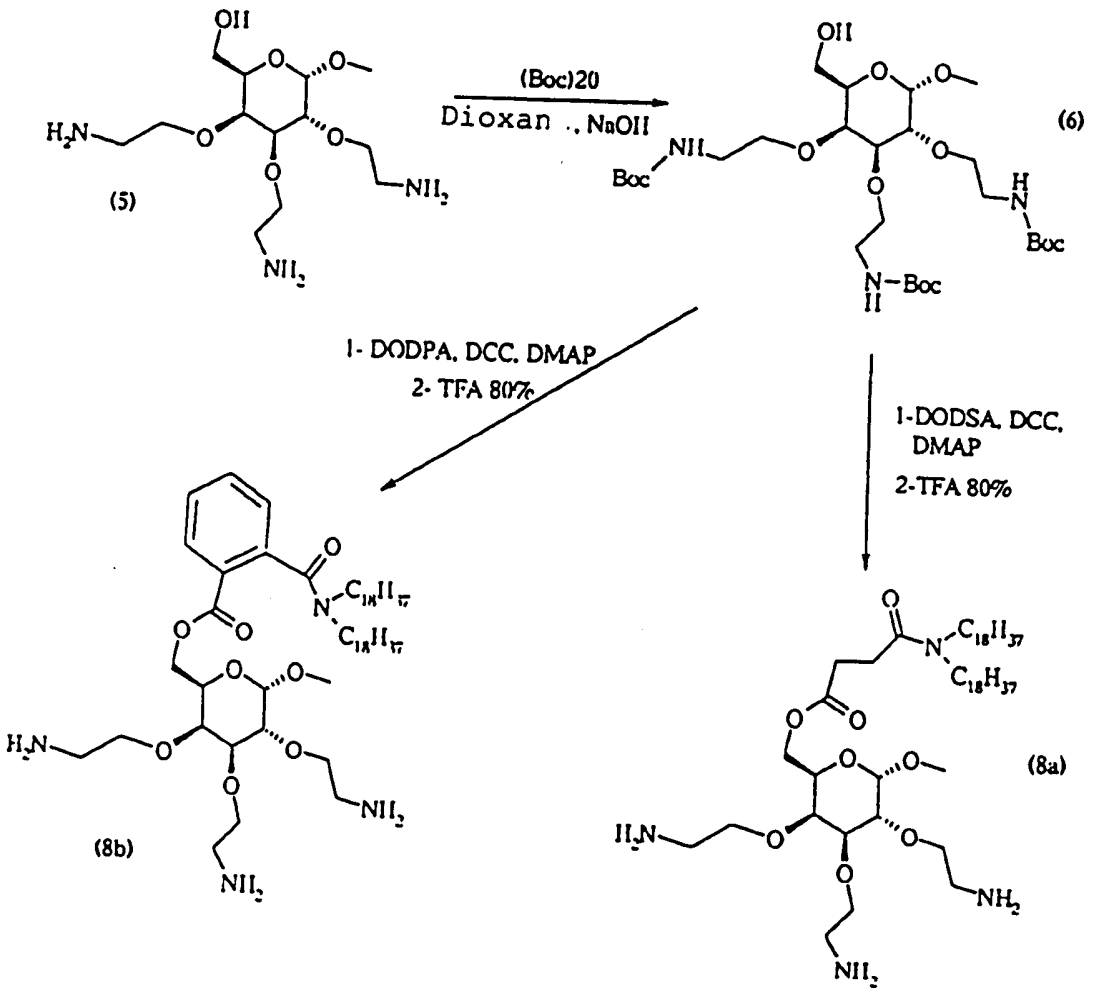
23. Použití transfekčního činidla podle kteréhokoli z předcházejících nároků pro přípravu léčiva obsahujícího nejméně jednu nukleovou kyselinu, která se má transfekovat.

Obr. 1/5

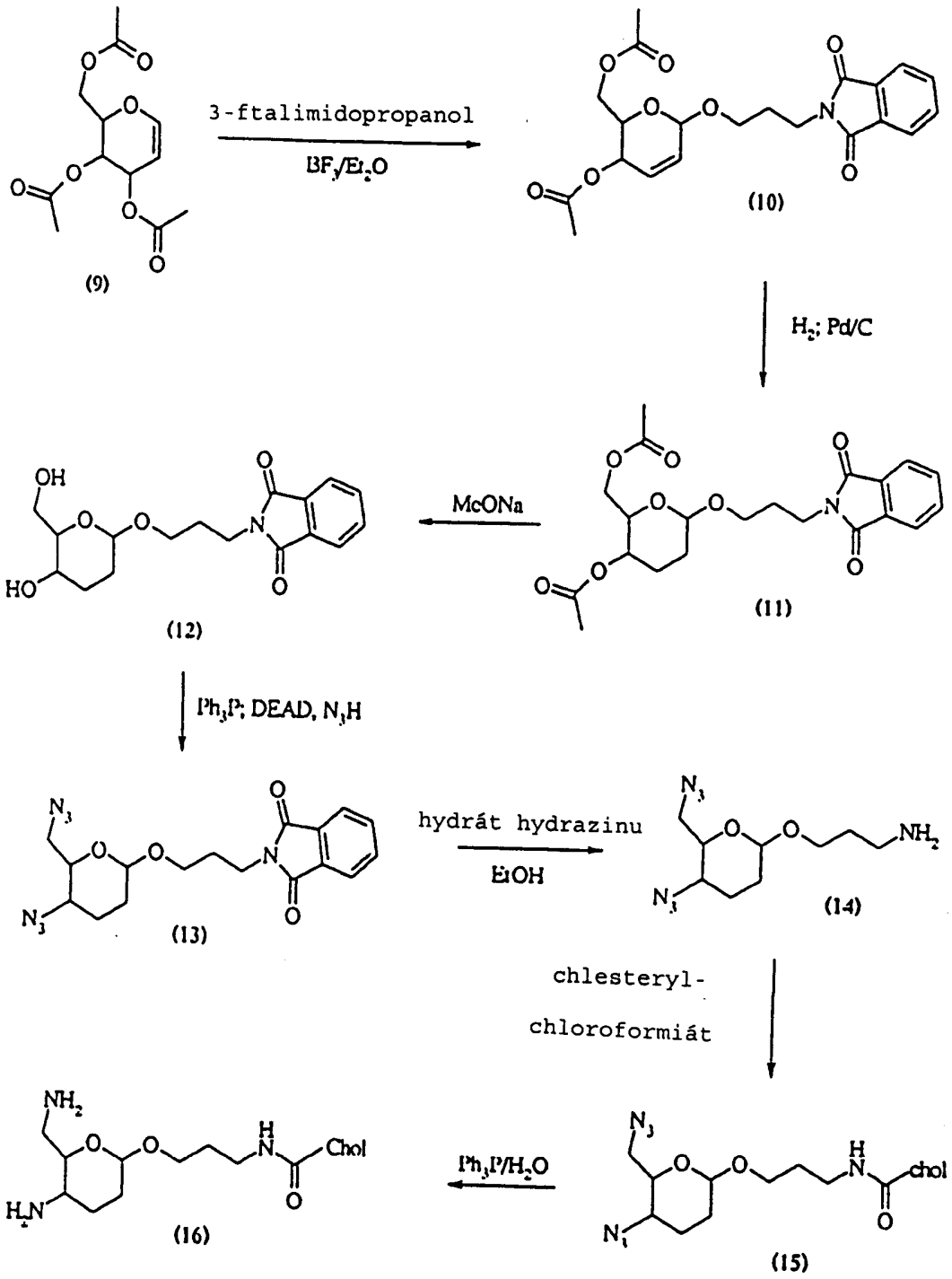

BrCH2COOEt, KOH
18-Cr-6, THF
BMS, THF
Ph3P, DEAD, N3H, THF
H2; Pd/C
EtOH; HCl
3HCl
(1)
(2)
(3)
(4)
(5)

01.12.99

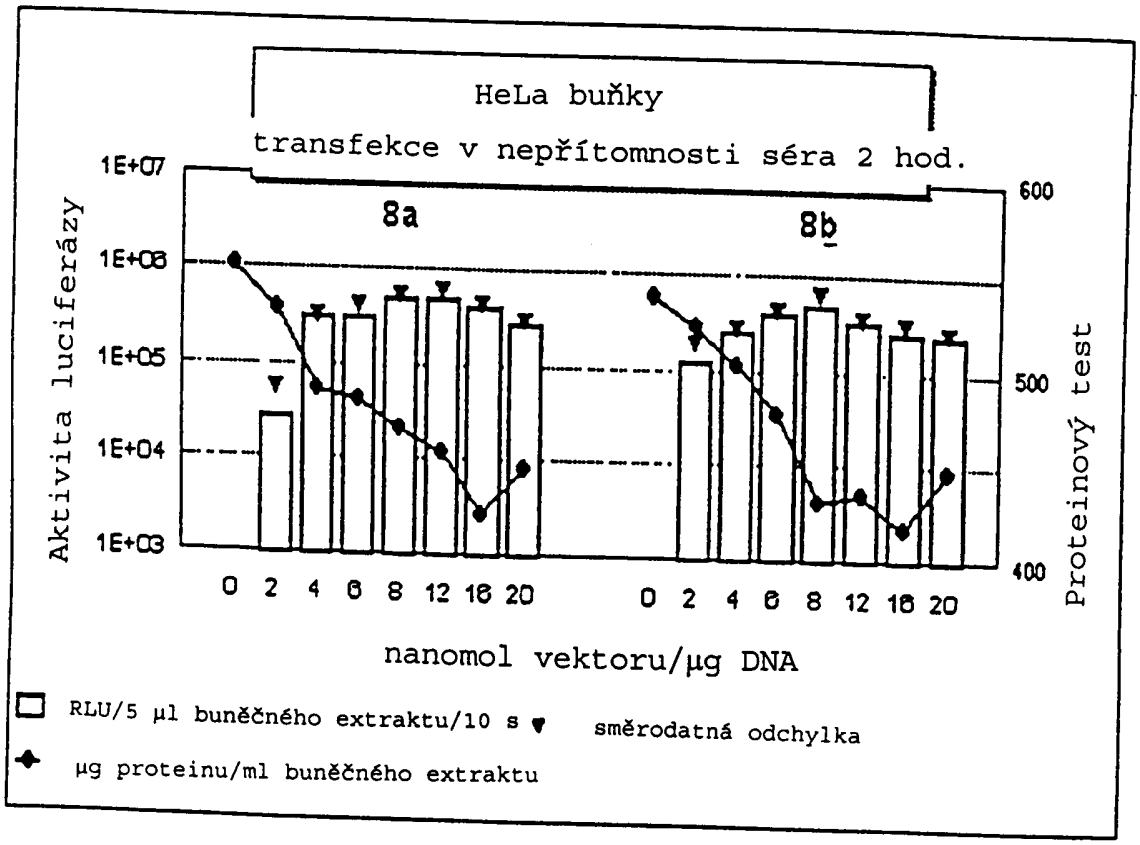
Obr. 2/5



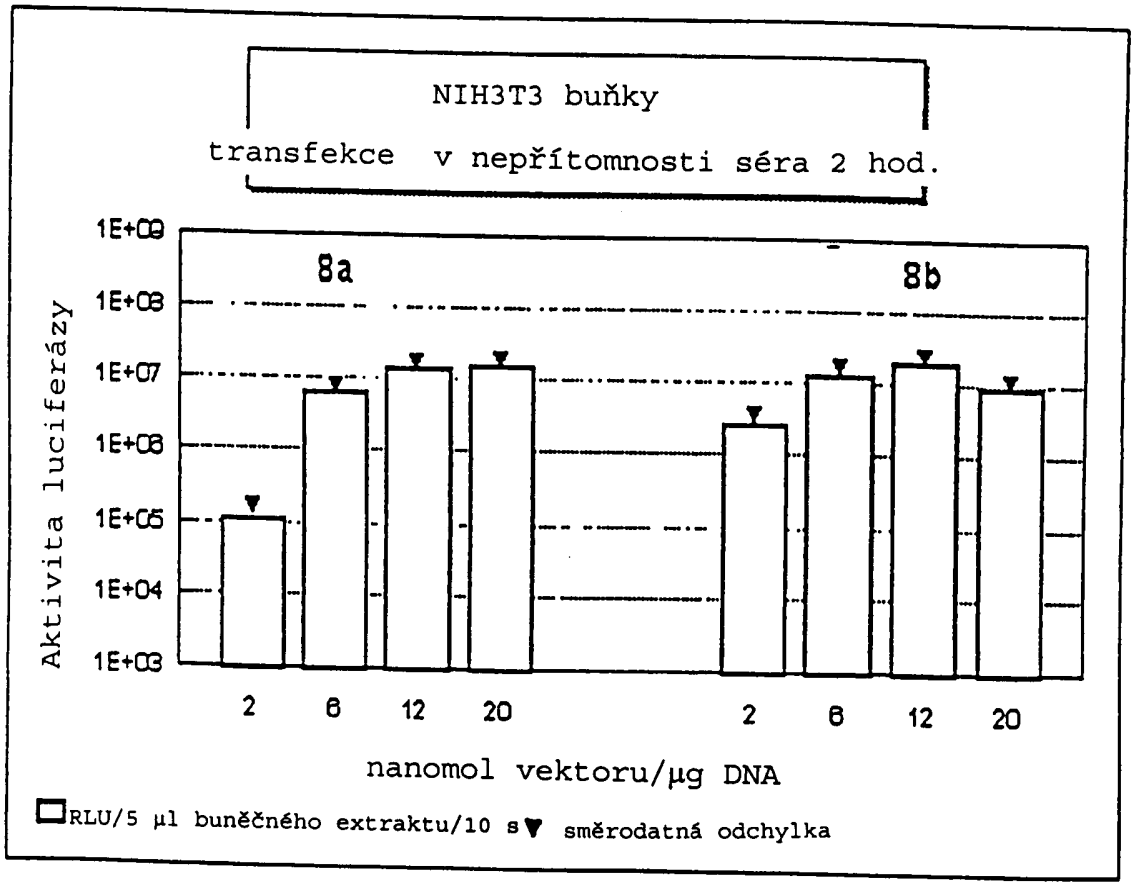
Obr. 3/5


3-ftalimidopropanol
BF3/Et2O
(9)
(10)
H2; Pd/C
McONa
(11)
(12)
Ph3P; DEAD, N3H
(13)
hydrát hydrazinu
EtOH
(14)
chlesteryl-
chloroformiát
Ph3P/H2O
(15)
(16)

Obr. 4/5


HeLa buňky
transfekce v nepřítomnosti séra 2 hod.
8a
8b
Aktivita luciferázy
1E+07
1E+06
1E+05
1E+04
1E+03
600
500
400
Proteinový test
0 2 4 6 8 12 16 20
0 2 4 6 8 12 16 20
nanomol vektoru/µg DNA
RLU/5 µl buněčného extraktu/10 s
směrodatná odchylka
µg proteinu/ml buněčného extraktu

Obr. 5/5


NIH3T3 buňky
transfekce v nepřítomnosti séra 2 hod.
8a
8b
Aktivita luciferázy
1E+09
1E+08
1E+07
1E+06
1E+05
1E+04
1E+03
2
6
12
20
2
6
12
20
nanomol vektoru/µg DNA
RLU/5 µl buněčného extraktu/10 s
směrodatná odchylka