



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 06 977 T2 2004.05.19**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 096 921 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 06 977.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/16166**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 934 114.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/03683**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.07.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **27.01.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.05.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **16.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.05.2004**

(51) Int Cl.7: **A61K 9/127**

A61K 48/00

(30) Unionspriorität:

93481 P 20.07.1998 US

(73) Patentinhaber:

Protiva Biotherapeutics Inc., Burnaby, British Columbia, CA

(74) Vertreter:

Strehl, Schübel-Hopf & Partner, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

BOEY, Anthony, Port Coquitlam, CA; CHEN, Tao, Richmond, CA; LENG, Esther, Surrey, CA; TARD, G., Paul, Surrey, CA; WHEELER, J., Jeffrey, Surrey, CA; SCHERRER, Peter, Vancouver, CA; GRAHAM, Roger, Vancouver, CA

(54) Bezeichnung: **IN LIPOSOMEN VERKAPSELTE NUKLEINSÄUREKOMPLEXE**

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 Erfindung betrifft Liposomen, die sich zum Einführen von Nucleinsäuren in Zellen eignen. Insbesondere umschließen die erfindungsgemäßen Liposomen einen Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplex und eignen sich somit für die klinische Anwendung als Nucleinsäure-Übertragungs-Abgabe-Träger.

[0002] Die Einführung von fremden Genen und anderen Molekülen in Zellen ist für die Molekularbiologen von großem Interesse. Ein Grund für die Einführung von genetischem Material in Zellen besteht in der Expression eines kodierten Proteins. Eine Genübertragung beinhaltet die Abgabe von Nucleinsäuren an Zielzellen und anschließend die Übertragung der Nucleinsäure durch die Zellmembran in einer Form, die auf therapeutische Weise wirken kann. Unter den zahlreichen Verfahren, die zur Erleichterung des Einschleusens von DNA in eukaryontische Zellen herangezogen werden, gehört die Verwendung von Liposomen zu den wirksamsten Verfahren. Liposomen werden in großem Umfang als DNA-Träger bei Transfektionsexperimenten verwendet. Von kationischen Lipiden ist es bekannt, dass sie an Polynucleotide binden und deren intrazelluläre Abgabe an Säugetierzellen erleichtern. Nucleinsäure ist negativ geladen und bildet bei Kombination mit einem positiv geladenen Lipid einen Komplex, der sich zubereiten lässt und sich für die zelluläre Abgabe eignet. Die Verwendung von kationischen Lipidträgern zur Transfektion ist bekannt.

[0003] Zu weiteren, derzeit untersuchten Gen-Transferverfahren gehören virale Vektoren. Obgleich virale Vektoren von Natur aus die Fähigkeit besitzen, Nucleinsäuren durch Zellmembranen zu transportieren und in einigen Fällen exogene DNA in Chromosomen zu integrieren, können sie nur begrenzte Mengen an DNA transportieren und sind mit einigen Risiken behaftet. Ein derartiges Risiko beinhaltet die willkürliche Integration von viralen Gensequenzen in Patientenchromosomen, wodurch möglicherweise das Genom geschädigt wird und eine maligne Transformation eingeleitet wird. Eine weitere Gefahr besteht darin, dass der virale Vektor entweder durch Mutation oder durch Genaustausch mit einem Wildtyp-Virus sich zu einem pathogenen Genotyp verwandeln kann.

[0004] Beschränkungen, die mit viralen Gen-Abgabesystemen verbunden sind, haben zur Entwicklung von nicht-viralen Gen-Transfervektoren geführt. Diese nicht-viralen Systeme bestehen im allgemeinen aus Plasmid-DNA, die mit einem kationischen Mittel, z. B. einem Lipid oder Polymeren, komplexiert ist, um die Nucleinsäure zu kondensieren und deren zelluläre Aufnahme in die Zellmembran zu erleichtern. Eines der Hindernisse für die Genexpression besteht im Abbau der DNA auf dem Weg zum Kern innerhalb des Zytoplasmas. Um dieses Hindernis zu überwinden und um die Genexpression zu verbessern, wurden in breitem Umfang Polykationen eingesetzt. Diese kationischen Polymeren umfassen Antibiotika, wie Gramicidin S, Dendrimere oder Kaskadenpolymere oder kationisch modifiziertes Albumin. Zusätzlich wurde von Spermidin gezeigt, dass es DNA kondensiert und die Transfektion von Zellkulturen verbessert. Diese Kondensationsmittel schützen die DNA vor einem Abbau durch Endonucleasen und Restriktionsenzyme. Ferner wird erwartet, dass die positive Ladung an diesen Polymeren das Transfektionsvermögen der Komplexe fördert.

[0005] Zu weiteren polykationischen Polymeren, die sich aufgrund ihrer Affinität unter elektrostatischer Bindung an Nucleinsäuren als Kondensationsmittel eignen, gehören Polylysin, Polyarginin und Polyornithin. Das Polykation Polyethylenimin (PEI), bei dem es sich um ein stark verzweigtes Polymeres handelt, hat sich als ein hochwirksames Gen-Abgabemittel erwiesen. PEI kondensiert Nucleinsäure in eine hochgradig kompakte Form und bietet einen guten Schutz gegen verschiedene Nucleasen. Es wurde berichtet, dass die Genübertragung mit diesen Komplexen unter bestimmten Bedingungen bis zu 1000-fach verstärkt wird. Klarerweise besitzen Polykationen, wie PEI, diesbezüglich einen eindeutigen Vorteil gegenüber Lipid-Nucleinsäure-Komplexen.

[0006] Ein weiterer wichtiger Nachteil von polykationischen Nucleinsäure-Komplexen, wie PEI-Nucleinsäure-Komplexen, besteht in der Toxizität, die mit der in vivo-Genabgabe über die Verwendung derartiger Komplexe verbunden ist. Wenn PEI mit Nucleinsäure in höheren Anteilen kondensiert wird, werden die Komplexe toxisch. Bei geringeren Verhältnissen (~ 2) vermindert sich die Transfektion erheblich. Wenn diese hochgradig transfizierenden Teilchen in vivo zur Transfektion verwendet werden sollen, muss ihre Toxizität auf ein hinnehmbares Maß verringert werden.

[0007] Somit besteht ein Bedürfnis zur Bereitstellung von Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexen, die eine Erleichterung der intrazellulären Abgabe von genetischem Material bewirken, bei denen aber die damit verbundene zelluläre Toxizität verringert ist.

[0008] WO-95/34647A beschreibt Zusammensetzungen und Verfahren zur Verstärkung der Abgabe von Nucleinsäuren an Zellen, und zwar auf der Basis von Komplexen der neuen Nucleinsäuren, die an nukleare Lokalisationspeptide, z. B. Histone, gebunden sind. Ferner beschreibt WO-98/20857A Lipid-Nucleinsäure-Komplexzubereitungen für die in vivo-Abgabe, wobei diese Zubereitungen durch Kombination eines vorher gebildeten Liposoms mit einer kondensierten Nucleinsäure hergestellt werden.

[0009] Die vorliegende Erfindung stellt Lipid-Nucleinsäure-Komplexe bereit, die, wie nachstehend ausführlich beschrieben wird, sich von den vorstehend beschriebenen Komplexen unterscheiden und gegenüber diesen klare Vorteile bieten.

[0010] Gemäß einem Aspekt stellt die Erfindung ein Liposom bereit, das folgendes aufweist: (a) ein Lipid und

(b) einen eingekapselten Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplex. Gemäß bestimmten bevorzugten Aspekten enthalten die erfindungsgemäßen Liposomen ferner (c) eine Komponente zum Stabilisieren einer Doppelschicht. Die Komponente zum Stabilisieren einer Doppelschicht kann reversibel mit dem Liposom assoziiert sein. Derartige Liposomen erweisen sich als äußerst vorteilhaft, da sie der Nucleinsäure einen guten Schutz gegen verschiedene Nucleasen bieten, die dazu neigen, Nucleinsäure, die nicht durch Einkapselung geschützt ist, abzubauen. Außerdem ist in zahlreichen Fällen die Genübertragung mit diesen Komplexen bis zu 1000-fach erhöht. Ferner wird bei Verwendung der erfindungsgemäßen Einkapselungszubereitungen die Toxizität der Kondensationsmittel auf ein hinnehmbares Maß verringert.

[0011] Zu Kondensationsmitteln, die sich zur erfindungsgemäßen Verwendung eignen, gehören (ohne Beschränkung hierauf) polykationische Polymere, wie Polyethylenimin, Polylysin, Polyarginin und Polyornithin. Zu weiteren Kondensationsmitteln, die eine Affinität für Nucleinsäure aufweisen und die sich zur erfindungsgemäßen Verwendung eignen, gehören (ohne Beschränkung hierauf) natürliche DNA-bindende Proteine von polykationischer Natur, wie Histone und Protamine oder Analoge oder Fragmente davon. Zu weiteren Kondensationsmitteln, die sich für die erfindungsgemäße Verwendung eignen, gehören Spermidin, Spermin, Polykationen mit zwei oder mehr verschiedenen positiv geladenen Aminosäuren oder basische Proteine.

[0012] Obgleich zahlreiche Lipide verwendet werden können, handelt es sich bei den in den erfindungsgemäßen Liposomen verwendeten Lipiden vorzugsweise um nicht-kationische Lipide. Zu derartigen nichtkationischen Lipiden gehören (ohne Beschränkung hierauf) Ceramide, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylserine und Gemische davon. In einer derzeit bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den verwendeten nicht-kationischen Lipiden um Ceramide, Dioleoylphosphatidylethanolamin, Dioleoylphosphatidylserin und Gemische davon.

[0013] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Einkapseln eines Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes in einem Liposom, wobei das Verfahren folgendes umfasst: die Zugabe einer Lösung eines Kondensationsmittels zu einer Nucleinsäurelösung, wobei ein Komplex aus Kondensationsmittel und Nucleinsäure gebildet wird, und die Zugabe dieses Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes zu einer Lipidsuspension unter Bildung eines eingekapselten Komplexes aus Kondensationsmittel und Nucleinsäure.

[0014] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren folgendes:

- (a) Zumischen einer ersten Kondensationsmittellösung zu einer Nucleinsäurelösung unter Bildung einer vorkondensierten Nucleinsäure;
- (b) Zugeben der vorkondensierten Nucleinsäure zu einer zweiten Kondensationsmittellösung unter Bildung eines Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes;
- (c) Dialysieren des Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes unter Bildung eines konzentrierten Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes;
- (d) Zugeben des konzentrierten Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes zu einer Lipidsuspension mit einem Gehalt an einem Detergens und
- (e) Entfernen des Detergens aus der Lipidsuspension unter Bildung eines im Liposom eingekapselten Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes.

[0015] Bei diesem Verfahren können das erste und das zweite Kondensationsmittel gleich oder verschieden sein.

[0016] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum in vitro-Transfizieren einer Zelle mit einer Nucleinsäure, wobei das Verfahren das Kontaktieren der Zelle mit einem Liposom umfasst, das (a) ein Lipid und (b) einen eingekapselten Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplex aufweist. Bei bestimmten bevorzugten Ausführungsformen enthalten die Liposomen dieses Verfahrens ferner (c) eine Komponente zum Stabilisieren einer Doppelschicht. Die Komponente zum Stabilisieren der Doppelschicht kann reversibel mit dem Liposom assoziiert sein.

[0017] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Behandlung einer Krankheit, wobei die Behandlung die Transfektion einer Zelle mit Nucleinsäure und das Einschleusen von antisense-Nucleotiden in die Zelle sowie die stabile Transfektion einer Zelle mit DNA, die so gebaut ist, dass sie in das Genom der lebenden Zelle eingebaut wird, beinhaltet.

[0018] Weitere Merkmale, Ziele und Vorteile der Erfindung und deren bevorzugte Ausführungsformen ergeben sich aus der nachstehenden ausführlichen Beschreibung unter Bezugnahme auf die Zeichnung.

[0019] **Fig. 1** zeigt den Aufbau eines Polyethylenimin-Nucleinsäure-Komplexes von gleichmäßiger geringer Größe;

[0020] **Fig. 2** zeigt den Einfluss von Dextransulfat auf PEI-DNA-Komplexe;

[0021] **Fig. 3** zeigt die Titration von Dextransulfat zur Bestimmung der minimalen Menge an Dextransulfat, die dazu erforderlich ist, DNA vollständig gegenüber Picogreen freizulegen;

[0022] **Fig. 4** zeigt eine Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von DNA. Bei jedem Datenpunkt wird eine standardisierte Menge an Dextransulfat zugegeben, bei der es sich um die gleiche Menge handelt, die zu be-

liebigen Testproben von Komplexen zugesetzt wird;

[0023] **Fig. 5** zeigt, dass die Relaxation oder Dissoziation der Komplexe kein sofortiges Ereignis darstellt;

[0024] **Fig. 6** zeigt das Ausmaß der Einkapselung, wenn Dextransulfat beim Test zur Dissoziation der Nucleinsäure vom PEI verwendet wird;

[0025] **Fig. 7** zeigt eine Titration von DOPS zur Optimierung des Einkapselungswirkungsgrads;

[0026] **Fig. 8** zeigt eine Gauss-Größenverteilung einer Probe von lipideingekapselter PEI-DNA mit einem Gehalt an 8 Mol-% DOPS. Die Liposomen liegen typischerweise bei einem Durchmesser von etwa 75 bis etwa 80 nm;

[0027] **Fig. 9** erläutert die Transfektion von COS-7-Zellen mit Liposomen mit eingekapselter, PEI-kondensierter DNA (Dosis-Reaktion und zeitlicher Verlauf);

[0028] **Fig. 10** erläutert die Transfektion von verschiedenen Zelllinien mit Liposomen mit eingekapselter PEI-kondensierter DNA. LS-180 stammt von einer 58-jährigen Patientin mit Kolon-Adenokarzinom vom Duke-Typ. SK-OV-3 ist ein humaner Ovarialadenokarzinom-Tumor einer 64-jährigen Patientin. U87 ist ein humanes Glioblastom. COS-7 ist eine fibroblastenartige Nieren-Zelllinie von CV-1-Affenzellen, die mit einer Mutante von SV40 mit einem Ursprungsstellendefekt transformiert sind. Lewis Lung ist ein humanes Lungenkarzinom. B16 ist ein Mäusemelanom;

[0029] **Fig. 11** erläutert die in vitro-Toxizität von Liposomen mit eingekapselter, PEI-kondensierter DNA in der Zelllinie COS-7;

[0030] **Fig. 12** erläutert die Konzentrationsabhängigkeit des Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes beim Zelltod;

[0031] **Fig. 13** erläutert die in vivo-Genexpression von Liposomen mit PEI-kondensierter DNA beim Lewis Lung-Tumor;

[0032] **Fig. 14** erläutert die Genexpression von eingekapselter, PEI-kondensierter DNA bei B16-i. p.-Tumor; und

[0033] **Fig. 15** erläutert die in vitro-Toxizität von Liposomen mit eingekapselter, PEI-kondensierter DNA vor und nach der Reinigung.

A. Glossar

[0034] Der Ausdruck "Lipid" bezieht sich auf ein beliebiges Material, das zu einer Doppelschicht in der Weise führt, dass ein hydrophober Teil des Lipidmaterials sich zur Doppelschicht hin orientiert, während sich ein hydrophiler Teil zur wässrigen Phase hin orientiert. Amphipathische Lipide weisen einen hydrophilen Teil und einen hydrophoben Teil auf. Die hydrophilen Eigenschaften stammen von der Anwesenheit von Phosphat-, Carboxyl-, Sulfat-, Amino-, Sulfhydryl-, Nitro- und anderen derartigen Gruppen. Die Hydrophobizität lässt sich durch Aufnahme von Gruppen erreichen, die (ohne Beschränkung hierauf) langkettige gesättigte und ungesättigte aliphatische Kohlenwasserstoffgruppen sowie derartige Gruppen, die durch einen oder mehrere aromatische, cycloaliphatische oder heterocyclische Gruppen substituiert sind, umfassen. Amphipathische Verbindungen umfassen (ohne Beschränkung hierauf) Phosphoglyceride und Sphingolipide, wobei zu repräsentativen Beispielen hierfür Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinosit, Phosphatidinsäure, Phosphatidylcholin, Lysophosphatidylcholin, Lysophosphatidylethanolamin, Dipalmitoylphosphatidylcholin, Dioleoylphosphatidylcholin, Distearoylphosphatidylcholin oder Dilinoleoylphosphatidylcholin gehören. Weitere Verbindungen ohne Phosphor, wie die Sphingolipid- und Glycosphingolipidfamilien fallen ebenfalls unter die als Lipide bezeichnete Gruppe. Ferner können amphipathische Lipide gemäß den vorstehenden Ausführungen mit anderen Lipiden, einschließlich Triglyceriden und Sterolen, vermischt werden.

[0035] Der Ausdruck "neutrales Lipid" bezieht sich auf beliebige Produkte einer Anzahl von Lipiden, die bei einem physiologischen pH-Wert entweder in einer ungeladenen oder einer neutralen, zwitterionischen Form vorliegen. Zu derartigen Lipiden gehören beispielsweise Diacylphosphatidylcholin, Diacylphosphatidylethanolamin, Ceramid, Sphingomyelin, Cephalin und Cerebroside.

[0036] Der Ausdruck "nicht-kationisches Lipid" bezieht sich auf beliebige neutrale Lipide gemäß den vorstehenden Ausführungen sowie auf anionische Lipide. Zu bevorzugten nicht-kationischen Lipiden gehören Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylserine und Ceramide. Zu Beispielen für bevorzugte anionische Lipide gehören Cardiolipin, Diacylphosphatidylserin, Diacylphosphatidinsäure, N-Succinylphosphatidylethanolamin (N-Succinyl-PE), Phosphatidinsäure, Phosphatidylinosit, Phosphatidylglycerin und Phosphatidylethylenglykol.

[0037] Der Ausdruck "kationisches Lipid" bezieht sich auf ein beliebiges Produkt einer Anzahl von Lipiden, die bei einem physiologischen pH-Wert eine positive Nettoladung tragen. Zu derartigen Lipiden gehören (ohne Beschränkung hierauf) DODAC, DOTMA, DDAB, DOTAP, DC-Chol und DMRIE. Ferner gibt es eine Anzahl von handelsüblichen Präparaten von kationischen Lipiden. Hierzu gehören beispielsweise LIPOFECTIN® (handelsübliche kationische Liposomen mit einem Gehalt an DOTMA und DOPE der Fa. GIBCO/BRL, Grand Island, New York, USA); LIPOFECTAMINE® (handelsübliche kationische Liposomen mit einem Gehalt an DO-SPA und DOPE der Fa. GIBCO/BRL); und TRANSFECTAM® (handelsübliche kationische Lipide mit einem Ge-

halt an DOGS in Ethanol der Fa. Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA).

[0038] Der hier verwendete Ausdruck "Komponente zum Stabilisieren einer Doppelschicht" bezieht sich auf Verbindungen (z. B. Lipide, Polymere und dergl.), die es Lipiden erlauben, unter physiologischen Bedingungen eine nicht-lamellare Phase anzunehmen, die in einer Doppelschichtstruktur zu stabilisieren ist. Bei den Komponenten zum Stabilisieren einer Doppelschicht handelt es sich entweder um Produkte, die die Doppelschicht selbst bilden, oder um Produkte, die eine komplementäre dynamische Gestalt aufweisen. Das keine Doppelschicht bildende Lipid wird in der Doppelschichtstruktur stabilisiert, wenn es mit der Komponente zum Stabilisieren der Doppelschicht assoziiert ist, d. h. gemeinsam mit dieser vorliegt. Bei bestimmten Ausführungsformen ist die Komponente zum Stabilisieren der Doppelschicht dazu befähigt, aus dem Liposom auszutreten oder chemisch durch endogene Systeme so modifiziert zu werden, dass sie im Laufe der Zeit die Fähigkeit zur Stabilisierung des Lipids in einer Doppelschichtstruktur verliert. Wenn die liposomale Stabilität verlorengegangen ist, destabilisiert worden ist oder abgenommen hat, kann es zu einer Fusion kommen. Die Fusion kann zur Freisetzung der Liposomenbeladung in die Zielzelle führen. Somit ist bei bestimmten Ausführungsformen die Komponente zum Stabilisieren der Doppelschicht mit dem Lipid "reversibel assoziiert". Bei deren Assoziation mit dem Lipid ist das Lipid gezwungen, die Doppelschichtstruktur unter Bedingungen anzunehmen, bei denen es ansonsten eine nicht-laminare Phase annehmen würde. Somit sind die erfindungsgemäßen Komponenten zum Stabilisieren der Doppelschicht dazu befähigt, das Lipid in einer Doppelschichtstruktur zu stabilisieren und doch einen Austausch aus dem Liposom zu ermöglichen oder chemisch durch endogene Systeme so modifiziert zu werden, dass sie im Laufe der Zeit ihre Fähigkeit zum Stabilisieren des Lipids in einer Doppelschichtstruktur verlieren, wodurch sie es dem Liposom ermöglichen, eine fusogene Beschaffenheit anzunehmen oder die Beladung freizusetzen.

[0039] Bei bestimmten anderen Ausführungsformen tritt die Komponente zum Stabilisieren der Doppelschicht nicht aus dem Liposom aus. Bei diesen Ausführungsformen ist das Liposom nicht-fusogen und die Komponente zum Stabilisieren der Doppelschicht nicht mit dem Lipid "reversibel assoziiert".

[0040] Der hier verwendete Ausdruck "Transfektion" bezieht sich auf die Einführung von polyanionischen Materialien, insbesondere von Nucleinsäuren, in Zellen. Der Ausdruck "Lipofektion" bezieht sich auf die Einführung derartiger Materialien in Assoziation mit Lipiden. Die polyanionischen Materialien können in Form von DNA oder RNA vorliegen, die mit Expressionsvektoren verknüpft sind, um die Genexpression nach dem Eintritt in die Zelle zu erleichtern. Somit ist das erfindungsgemäß verwendete polyanionische Material so zu verstehen, dass es DNA umfasst, die kodierende Sequenzen für strukturelle Proteine, Rezeptoren und Hormone sowie transkriptionale und translationale regulatorische Elemente (d. h. Promotoren, Verstärker, Terminatoren und Signalsequenzen) und Vektorsequenzen aufweist. Verfahren zum Einbauen von speziellen Nucleinsäuren in Expressionsvektoren sind dem Fachmann geläufig und werden beispielsweise ausführlich von Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2. Aufl.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), oder in *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel et al., Hrsg., Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987), beschrieben.

[0041] Bei "Expressionsvektoren", "Klonierungsvektoren" oder "Vektoren" handelt es sich häufig um Plasmide oder andere Nucleinsäuremoleküle, die zur Replikation in einer gewählten Wirtszelle befähigt sind. Expressionsvektoren können autonom replizieren oder sie können durch Einführung in das Genom der Wirtszelle nach bekannten Verfahren replizieren. Vektoren, die autonom replizieren, weisen eine Replikationsursprungsstelle oder eine autonome Replikationssequenz (ARS) auf, die in der oder den gewählten Wirtszellen funktionsfähig sind. Häufig ist es für einen Vektor wünschenswert, dass er in mehr als einer Wirtszelle, z. B. in *E. coli* für die Klonierung und Konstruktion, und in einer Säugetierzelle für die Expression, verwendbar ist.

[0042] Der hier bei der Erörterung der Einkapselungsmenge verwendete Ausdruck "Einkapselung" bezieht sich auf die Menge des Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes, die für die Picogreen-Bindung in einem Picogreen/Dextran-Bindungstest nicht verfügbar ist oder die in einem Nucleasetest gegen Nuclease beständig ist.

B. Allgemeine Ausführungen

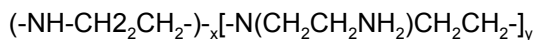
[0043] Es wurde nunmehr festgestellt, dass eine Lipideinkapselung eines Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes einen stärkeren Schutz gegen enzymatischen Verdau bietet und eine beständig höhere Genexpression ermöglicht als nicht-eingekapselte Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexe. Somit betrifft gemäß einem Aspekt die vorliegende Erfindung ein Liposom, das (a) ein Lipid und (b) einen eingekapselten Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplex enthält. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen enthält das Liposom ferner (c) eine Komponente zum Stabilisieren einer Doppelschicht. Die Komponente zum Stabilisieren der Doppelschicht kann reversibel mit dem Liposom assoziiert sein.

[0044] Bei den in den erfindungsgemäßen Liposomen verwendeten Kondensationsmitteln kann es sich um beliebige Verbindungen handeln, die die Fähigkeit haben, Nucleinsäuren zu komplexieren und zu kompaktieren. Der Komplex umfasst im allgemeinen mindestens eine negativ geladene Nucleinsäure und mindestens

ein positiv geladenes Polymeres, wobei die Assoziation zwischen der Nucleinsäure und dem kationischen Polymeren von elektrostatischer Natur sein kann.

[0045] Zu erfindungsgemäß geeigneten Kondensationsmitteln gehören (ohne Beschränkung hierauf) polykationische Polymere, wie Polyethylenimin, Polylysin, Polyarginin und Polyornithin. Zu anderen Kondensationsmitteln, die eine Affinität für Nucleinsäure aufweisen und die sich zur erfindungsgemäßen Verwendung eignen, gehören (ohne Beschränkung hierauf) natürliche DNA-bindende Proteine von polykationischer Natur, wie Histone und Protamine oder Analoge oder Fragmente davon. Zu weiteren erfindungsgemäß geeigneten Kondensationsmitteln gehören Polyamine, die (ohne Beschränkung hierauf) Spermidin und Spermin umfassen, Polykationen mit zwei oder mehr verschiedenen, positiv geladenen Aminosäuren oder basische Proteine. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich beim Kondensationsmittel um ein polykationisches Polymeres. Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden Kondensationsmittel verwendet, die sich von kationischen Lipiden unterscheiden. Dem Fachmann sind weitere Kondensationsmittel, die sich für die erfindungsgemäße Verwendung eignen, geläufig.

[0046] Ein besonders bevorzugtes Beispiel für ein polykationisches Polymeres ist Polyethylenimin. Polyethylenimin, bei dem es sich um eine polymere Substanz handelt, bei der jedes dritte Atom ein Aminostickstoffatom ist, das protoniert sein kann, weist die folgende allgemeine Formel auf:



I

[0047] In der Formel I ist der Wert von x etwa 2-mal so groß wie der Wert von y. Polyethylenimin ist ein hochgradig verzweigtes Material, bei dem das Verhältnis von primären zu sekundären zu tertiären Stickstoffatomen etwa 1 : 2 : 1 beträgt. Die Anzahl der primären Stickstoffatome ist gleich der Anzahl der tertiären Stickstoffatome, da jede Verzweigungsstelle ein Kettenende aufweist. Es können Polyethylenimine mit verschiedenen Molekulargewichten verwendet werden. Vorzugsweise kommen Molekulargewichte von 0,8 bis etwa 800 kDa zur Anwendung. Insbesondere kommt ein Molekulargewicht von etwa 25 kDa zur Anwendung. Für den Fachmann ist es ersichtlich, dass Polymere von Polyethylenimin mit verschiedenen Molekulargewichten sich für die erfindungsgemäße Anwendung eignen. Polyethylenimin verschiedener Molekulargewichte wird von der Fa. Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wisconsin) vertrieben.

[0048] Bei den erfindungsgemäßen Nucleinsäuren handelt es sich typischerweise um Nucleotid-Polymere mit 10 bis 100 000 Nucleotid-Monomeren. Die Nucleinsäuren werden einem Subjekt mit dem Ziel verabreicht, die Expression eines zellulären Proteins zu reparieren oder zu verstärken. Zusätzlich kann die Nucleinsäure eine Markierung, z. B. eine radioaktive Markierung, eine fluoreszierende Markierung oder eine kolorimetrische Markierung tragen, um eine klinische Diagnose bezüglich des Vorliegens oder Fehlens von komplementären Nucleinsäuren zu liefern. Demgemäß kann es sich bei den Nucleinsäuren oder Nucleotid-Polymeren um Polymere von Nucleinsäuren handeln, die genomische DNA, cDNA, mRNA oder Oligonucleotide mit einem Gehalt an Nucleinsäureanalogen enthalten, z. B. die antisense-Derivate, die in einem Übersichtsartikel von Stein et al., Science, Bd. 261 (1993), S. 1004–1011 und in den US-Patenten 5 264 423 und 5 276 019 beschrieben sind.

[0049] Ferner können die Nucleinsäuren für transkriptionale und translationale regulatorische Sequenzen, die Promotorsequenzen und Verstärkersequenzen enthalten, kodieren.

[0050] Bei den Nucleotid-Polymeren kann es sich um einzelsträngige DNA oder RNA oder um doppelsträngige DNA oder DNA-RNA-Hybride handeln. Ferner sind auch Nucleinsäuren mit chemisch modifizierten Phosphodiesterbindungen (z. B. Thiophosphodiester) geeignet. Zu Beispielen für doppelsträngige DNA gehören Strukturgene, Gene mit Kontroll- und Terminationsregionen und selbst-replizierende Systeme, wie Plasmid-DNA. In bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei der Nucleinsäure um ein Plasmid.

[0051] Zu einzelsträngigen Nucleinsäuren gehören antisense-Oligonucleotide (komplementär zu DNA und RNA), Ribozyme und triplexbildende Oligonucleotide sowie Oligonucleotide mit modifizierten chemischen Gerüsten. Bei diesen Modifikationen sind vorzugsweise einige oder sämtliche Nucleotidbindungen durch stabile Nichtphosphodiester-Bindungen substituiert, wozu (ohne Beschränkung hierauf) Phosphorothioat-, Phosphordithioat-, Phosphorselenat- oder O-Alkylphosphotriester-Bindungen gehören.

[0052] Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren umfassen auch Nucleinsäuren, bei denen Modifikationen an einem oder mehreren Zuckerresten und/oder an einer oder mehreren Pyrimidin- oder Purinbasen vorgenommen sind. Zu Beispielen für derartige Zuckermodifikationen gehören der Ersatz von einer oder mehreren Hydroxylgruppen durch Halogene, Alkylgruppen, Amine, Azidogruppen oder eine Funktionalisierung in Form von Ethern oder Estern. Ferner kann der gesamte Zucker durch sterisch und elektronisch ähnliche Strukturen ersetzt sein, einschließlich Azazucker und carbocyclische Zuckeranaloge. Zu Modifikationen im Purin- oder Pyrimidinbasenrest gehören beispielsweise alkylierte Purine und Pyrimidine, acylierte Purine oder Pyrimidine oder andere heterocyclische Ersatzprodukte, die dem Fachmann geläufig sind.

[0053] Bei den vorliegenden Verfahren können auch mehrfache genetische Sequenzen herangezogen werden. So können sich die Sequenzen für verschiedene Proteine an einem Strang oder Plasmid befinden. Promotoren, Verstärker, durch Spannung oder auf chemischem Wege regulierte Promotoren, gegenüber Antibio-

tika empfindliche oder gegenüber Nährstoffen empfindliche Regionen sowie für therapeutische Proteine kodierende Sequenzen können nach Bedarf eingebaut werden. Nicht-kodierende Sequenzen können ebenfalls vorhanden sein, soweit sie zur Erzielung der entsprechenden Expression erforderlich sind.

[0054] Die im vorliegenden Verfahren verwendeten Nucleinsäuren können aus natürlichen Quellen isoliert werden, von Quellen, wie ATCC oder Genbanken, erhalten werden oder durch synthetische Verfahren hergestellt werden. Synthetische Nucleinsäuren lassen sich nach verschiedenen, in Lösung oder fester Phase arbeitenden Verfahren herstellen. Im allgemeinen wird eine Festphasensynthese bevorzugt. Ausführliche Beschreibungen der Vorgehensweisen für die Festphasensynthese von Nucleinsäuren durch chemische Phosphitriester-, Phosphotriester- und H-Phosphonatverfahren sind verfügbar; vergl. z. B. US-4 401 796 (Itakura), US-4 458 066 (Caruthers et al.) und US-4 500 707 (Beaucage et al.), *Tetrahedron Lett.*, Bd. 22 (1981), S. 1859–1862; Matteucci et al., *J. Am. Chem. Soc.*, Bd. 103 (1981), S. 3185–3191; Caruthers et al., *Genetic Engineering*, Bd. 4 (1982), S. 1–17; Jones, Kapitel 2, Atkinson et al., Kapitel 3 und Sproat et al., Kapitel 4, in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Gait (Hrsg.), IRL Press, Washington D. C. (1984); Froehler et al., *Tetrahedron Lett.*, Bd. 27 (1986), S. 469–472; Froehler et al., *Nucleic Acids Res.*, Bd. 14 (1986), S. 5399–5407; Sinha et al., *Tetrahedron Lett.*, Bd. 24 (1983), S. 5843–5846; und Sinha et al., *Nucl. Acids Res.*, Bd. 12 (1984), S. 4539–4557.

[0055] Ferner können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren unter folgenden Bestandteilen ausgewählt werden:

- (a) Genmarker, wie Luciferase-Gen, β -Galactosidase-Gen, Chloramphenicol-acetyltransferase-Gen, Gene, die Resistenz gegenüber einem Antibiotikum, wie Hygromycin und Neomycin, verleihen;
- (b) Gene für therapeutische Zwecke, z. B. Gene, die für Rezeptoren für Lipoprotein geringer Dichte kodieren, die im Fall von Hypercholesterinämie fehlen (Leber), Koagulationsfaktoren: Faktoren VII und IX, Phenylalanin-hydroxylase (Phenylketonurie), Adenosin-desaminase (ADA-Immundefizit), lysosomische Enzyme, wie β -Glucosidase im Fall von Gaucher-Krankheit, Dystrophin und Minidistriphin (Myopathie), Tyrosin-hydroxylase (Parkinson), Neuron-Wachstumsfaktoren (Alzheimer), CFTR-cystische Fibrose-Transmembran-Leitungsregulatoren (Mucoviscidose), alpha-1-Antitrypsin, nukleare Faktoren: NF-KB, CII TA, Cytokine und Interleukine, TNF: Tumornekrosefaktor, Thymidin-kinase des Herpes simplex-Virus, NO-Synthase, Angiotensin II-Rezeptoren, Gensuppressoren von Tumoren, wie das Gen für das p53-Protein, MHC-Proteine, Haupthistokompatibilitätssystem, insbesondere HLA-B7, Antioncogene: p53, RB, Cytosin-desaminase, sense- und antisense-RNA; und
- (c) Gene für Impfpurposes: Gene, die für virale Antigene kodieren, beispielsweise für das Nucleoprotein des Influenza-Virus.

[0056] Weitere geeignete Nucleinsäuren zur erfindungsgemäßen Verwendung sind für den Fachmann leicht ersichtlich.

C. Herstellung des Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes

[0057] Die Kondensation von Nucleinsäure durch Polykationen erfolgt in Abhängigkeit von der Art und der Konzentration sämtlicher Ionen, die im Kondensationsmedium vorhanden sind. Die Komplexbildung ist daher vom pH-Wert, dem Volumen und der Salzkonzentration des Komplexierungsmediums abhängig. Eine kationische Polymerkondensation mit der negativ geladenen Nucleinsäure stellt einen kooperativen Vorgang dar, der in hoher Salzkonzentration moduliert und sogar gehemmt werden kann.

[0058] Ferner wurde von O. Boussif et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Bd. 92 (1995), S. 7297–7301, festgestellt, dass für das kationische Polymere Polyethylenimin die Reihenfolge der Zugabe der Reagenzien die Eigenschaften der erhaltenen Teilchen beeinflusst. Beispielsweise war die tropfenweise Zugabe der PEI-Lösung zur Nucleinsäurelösung, z. B. zur DNA-Lösung, 10-fach wirksamer als die Zugabe von Nucleinsäure zu PEI.

[0059] Das folgende Verfahren erläutert die Herstellung einer kationischen Polymer-Vorratslösung, wobei PEI als Beispiel herangezogen wird. Das kationische Polymere, wie PEI, wird in entionisiertem Wasser gelöst und beispielsweise mit HCl auf den pH-Wert 7,4 neutralisiert. Die neutralisierte Lösung wird sodann unter Verwendung eines Millipore-Filters mit einer Porengröße von etwa 0,2 μm filtriert. Um den PEI-Nucleinsäure-Komplex in einem Liposom (nachstehend beschrieben) einzukapseln, ist eine kleine, gleichmäßige Teilchengröße kritisch. Große und heterogene Aggregate stellen das Ergebnis der Komplexbildung von PEI und Nucleinsäure unter Anwendung entweder einer zu hohen Nucleinsäurekonzentration oder unter Verwendung von anderen Lösungen als Wasser dar.

[0060] Ein wichtiges Kriterium für den Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplex ist die Berechnung des Ladungsverhältnisses. Gemäß einer Ausführungsform trägt der Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplex eine positive Nettoladung. Ein Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Ladungsverhältnis von etwa 10 : 1 bis etwa 2 : 1 wird bevorzugt. Ein Verhältnis von etwa 7 : 1 bis etwa 4 : 1 wird besonders bevorzugt. Für die erfindungsgemäßen PEI-Nucleinsäure-Komplexe wurde eine durchschnittliche Masse pro negativem Ladungsverhältnis

von 325 Dalton für Plasmid-DNA verwendet. Die Masse pro positiver Ladung für PEI wurde zu 258 Dalton berechnet. Dabei ist anzunehmen, dass eines von sechs PEI-Stickstoffatomen unter physiologischen Bedingungen protoniert ist und dass die durchschnittliche Masse pro $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ -Stickstoffeinheit in PEI 43 beträgt.

[0061] Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist der Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplex neutral. Bei dieser Ausführungsform entspricht die positive Ladung des Kondensationsmittels der negativen Ladung der Nucleinsäure. Dies führt zu einem neutralen Komplex.

[0062] Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Kondensation einer Nucleinsäure mit einem Kondensationsmittel unter Bildung von gleichmäßigen Komplexen mit einer typischen Größe von etwa 30 bis etwa 60 nm. Unter Verwendung von PEI als typischem kationischem Polymeren beinhaltet das Verfahren zunächst die Vorkondensation der Nucleinsäure durch tropfenweise Zugabe einer PEI-Lösung (10 µg Vorratslösung von PEI in 250 ml Wasser) zu einer Nucleinsäurelösung (100 µg/250 ml) unter starkem Rühren. Anschließend wird die vorkondensierte Nucleinsäure mit überschüssigem PEI gesättigt. Sodann werden die PEI/Nucleinsäure-Komplexe durch Dialyse eingengt. Schließlich werden die eingengten PEI-Nucleinsäure-Komplexe über Nacht gegen HBS-Puffer dialysiert, um die Salzkonzentration auf 150 mM einzustellen. Bei der letzten Stufe können auch andere Puffer verwendet werden. Zu diesen Puffern gehören (ohne Beschränkung hierauf) PBS, Saccharose, Wasser oder andere organische Lösungsmittel in Ethanol, wobei Ethanol nicht mehr als 60–70% ausmacht.

[0063] Das Polyethylenimin : Nucleinsäure-Verhältnis im Komplex beträgt etwa 10 : 1 (Gew./Gew.) bis etwa 1,5 : 1 (Gew./Gew.), vorzugsweise etwa 6 : 1 (Gew./Gew.) bis etwa 1,5 : 1 (Gew./Gew.) und insbesondere etwa 4 : 1 (Gew./Gew.).

[0064] Es ist möglich, die Menge der mit dem polykationischen Polymeren kondensierten Nucleinsäure quantitativ zu bestimmen. Beispielsweise ist bei einem PEI : Nucleinsäure-Gewichtsverhältnis von 4 : 1 der Komplex fest kondensiert und für Sonden zur quantitativen Nucleinsäurebestimmung, wie Picogreen, nicht leicht zugänglich. Wenn die Nucleinsäure frei vorliegt und nicht mit dem Kondensationsmittel komplexiert ist, bindet Picogreen an die Nucleinsäure und dessen Fluoreszenz ermöglicht die quantitative Bestimmung der Nucleinsäure. Zur Freisetzung der Nucleinsäure wird der Komplex mit einem Polyanionpolymeren, wie Dextransulfat, behandelt. Heparin oder Heparansulfat, die den Komplex "öffnen" oder aus dem kondensierten Zustand relaxieren, können ebenfalls verwendet werden. Diese Reaktion dauert bis zum vollständigen Ablauf typischerweise 10 bis 15 Minuten. Picogreen wird sodann zur quantitativen Bestimmung der freiliegenden Nucleinsäure zugesetzt. Eine Nucleinsäure-Eichkurve wird im Bereich von 0,2 µg bis 1 µg aufgestellt (vergl. **Fig. 4**). An jedem Punkt wird eine Standardmenge Dextransulfat zugegeben. Diese Zugabe wird durch den Auslöscheffekt, den Dextransulfat auf die Fluoreszenzablesungen von Picogreen ausübt, ausgeglichen. Bei dieser Menge handelt es sich um die gleiche Menge, die zur Dissoziation einer PEI-Nucleinsäure-Probe verwendet wird. Auf diese Weise lässt sich die mit dem polykationischen Polymeren assoziierte Nucleinsäure quantitativ bestimmen (vergl. **Fig. 2**). In **Fig. 2** zeigt der leere Balken bei den Proben 1 und 2 die Picogreen-Fluoreszenz, d. h. den Hintergrund.

[0065] **Fig. 3** erläutert die Titration von Dextransulfat zur Bestimmung der Mindestmenge an Dextransulfat, die zur Freisetzung des kondensierten PEI-Nucleinsäure-Komplexes und zur vollständigen Freilegung der komplexierten Nucleinsäure erforderlich ist. Dies ermöglicht eine genaue quantitative Bestimmung der Nucleinsäure unter Verwendung eines DNA-Picogreen-Tests. Mindestens die 3-fache Menge Dextransulfat im Vergleich zu PEI ist erforderlich, um die DNA vollständig für Picogreen freizulegen. Dies bedeutet ein Ladungsverhältnis für PEI-Nucleinsäure von etwa 5 : 1. Verschiedene Ladungsverhältnisse von PEI-Nucleinsäure-Komplexen erfordern unterschiedliche Mengen an Dextransulfat. Auf diese Weise lässt sich das Ladungsverhältnis berechnen.

D. Einkapselung des Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes

[0066] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Einkapseln eines Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes in einem Liposom, wobei das Verfahren folgendes umfasst: Zugabe einer Kondensationsmittellösung zu einer Nucleinsäurelösung unter Bildung eines Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes; und Zugabe dieses Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes zu einer Lipidsuspension unter Bildung eines eingekapselten Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren folgendes:

- (a) Vermischen einer Kondensationsmittellösung mit einer Nucleinsäurelösung unter Bildung einer vorkondensierten Nucleinsäure;
- (b) Zugabe der vorkondensierten Nucleinsäure zu einer Kondensationsmittellösung unter Bildung eines Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes;
- (c) Dialysieren des kondensierten Nucleinsäure-Komplexes unter Bildung eines konzentrierten Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes;
- (d) Zugabe des konzentrierten Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes zu einer Lipidsuspension in

einem Detergens; und

(e) Entfernen des Detergens aus der Lipidsuspension unter Bildung eines im Liposom eingekapselten Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes.

[0067] Eine liposomale Einkapselung des Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes bietet einen Schutz gegen einen enzymatischen Verdau und ermöglicht im Vergleich zu anderen Übertragungsverfahren eine beständig höhere Genexpression. Zur Optimierung des Transfektionsvermögens von Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexen muss die Gesamtladung der Komplexe positiv sein. Ungünstigerweise sind die Komplexe bei hohen positiven Ladungsverhältnissen toxisch und bleiben nicht lange im Kreislauf. Erfindungsgemäß wurde nunmehr festgestellt, dass die Einkapselung der Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexe in Liposomen den Toxizitätsgrad der Komplexe auf annehmbare Werte verringern kann.

[0068] In den erfindungsgemäßen Liposomen können verschiedene Lipide verwendet werden. Vorzugsweise werden nicht-kationische Lipide eingesetzt. Zu derartigen Lipiden gehören (ohne Beschränkung hierauf) Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylserine, Ceramide und Gemische davon. Hierzu gehören beispielsweise Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE), Dioleoylphosphatidylserin (DOPS) und Gemische davon. Zu weiteren Beispielen für bevorzugte anionische Lipide, die sich zur erfindungsgemäßen Verwendung eignen, gehören (ohne Beschränkung hierauf) Cardiolipin, Diacylphosphatidinsäure, N-Succinylphosphatidylethanolamin (N-Succinyl-PE), Phosphatidinsäure, Phosphatidylinosit, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylethylenglykol und Gemische davon. Phosphatidylethanolamine und Phosphatidylserine mit einem Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren mit Kohlenstofflängen im Bereich von etwa C_6 bis C_{24} werden bevorzugt. Fettsäuren mit Kohlenstoffkettenlängen im Bereich von etwa C_{14} bis C_{20} werden besonders bevorzugt. Phosphatidylethanolamine mit einfach oder zweifach ungesättigten Fettsäuren und Gemische von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren können ebenfalls verwendet werden. Zu geeigneten Phosphatidylethanolaminen gehören (ohne Beschränkung hierauf)

Dimyristoylphosphatidylethanolamin (DMPE),

Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (DPPE),

Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) und

Distearoylphosphatidylethanolamin (DSPE). Dioleoylphosphatidylethanolamin stellt ein bevorzugtes Phosphatidylethanolamin dar. Beim bevorzugten Phosphatidylserin handelt es sich um Dioleoylphosphatidylserin.

[0069] Ceramide, die sich zur erfindungsgemäßen Verwendung eignen, sind bei einer Anzahl von Bezugsquellen gewerblich erhältlich. Ferner können Ceramide beispielsweise aus Ei oder Hirn unter Anwendung bekannter Isolationstechniken isoliert werden. Alternativ können sie gemäß den in US-5 820 873 beschriebenen Verfahren und Techniken synthetisiert werden. Unter Anwendung der in der vorgenannten Druckschrift angegebenen Synthesewege lassen sich Ceramide mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren mit Kohlenstoffkettenlängen im Bereich von C_6 bis C_{24} herstellen. Bevorzugte Ceramide weisen Acylkettenlängen von etwa C_{14} bis etwa C_{20} auf.

[0070] Phosphatidylethanolamine mit einer Vielzahl von Acylkettengruppen mit unterschiedlichen Kettenlängen und unterschiedlichen Sättigungsgraden lassen sich mit Polyethylenglykol unter Bildung einer Komponente zum Stabilisieren einer Doppelschicht konjugieren. Derartige Phosphatidylethanolamine sind handelsüblich oder lassen sich gemäß dem Fachmann geläufigen herkömmlichen Techniken isolieren oder synthetisieren.

[0071] Ceramide mit einer Vielzahl von Acylkettengruppen mit verschiedenen Kettenlängen und verschiedenen Sättigungsgraden lassen sich an Polyethylenglykol unter Bildung einer Komponente zum Stabilisieren der Doppelschicht kuppeln. Für den Fachmann ist es ersichtlich, dass im Gegensatz zu Phosphatidylethanolaminen die Ceramide nur eine Acylgruppe aufweisen, die sich leicht in Bezug auf Kettenlänge und Sättigungsgrad variieren lässt.

[0072] Ferner enthält das Liposom eine Komponente zum Stabilisieren einer Doppelschicht. Zu Beispielen für geeignete Komponenten zum Stabilisieren der Doppelschicht gehören (ohne Beschränkung hierauf) Lipide, Lipidderivate, Detergenzien, Polyethylenglykol (PEG), Proteine, Peptide, Polyamidoligomere, (z. B. ATTA) und pH-empfindliche Oligomere (z. B. PEAA). Gemäß einer derzeit bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Komponente zum Stabilisieren der Doppelschicht um Polyethylenglykol, das beispielsweise mit Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylserin konjugiert, d. h. gekuppelt, ist. In einer gleichermaßen bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Komponente zum Stabilisieren der Doppelschicht um an ein Ceramid konjugiertes Polyethylenglykol. Polyethylenglykol kann mit einem Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin oder alternativ mit einem Ceramid unter Anwendung standardmäßiger Kupplungsreaktionen, die dem Fachmann geläufig sind, konjugiert werden. Ferner sind vorgeformte Polyethylenglykol-Phosphatidylethanolamin-Konjugate bei der Fa. Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama) erhältlich.

[0073] Polyethylenglykole mit verschiedenen Molekulargewichten lassen sich zur Bildung der erfindungsgemäßen Doppelschicht-Stabilisierungskomponenten verwenden. Polyethylenglykole mit verschiedenen Molekulargewichten sind bei einer Anzahl von verschiedenen Bezugsquellen gewerblich erhältlich oder lassen sich nach standardmäßigen Polymerisationstechniken, die dem Fachmann geläufig sind, herstellen. Gemäß einer

derzeit bevorzugten Ausführungsform weist das Polyethylenglykol ein Molekulargewicht von etwa 550 bis etwa 8 500 Dalton und insbesondere von etwa 2 000 bis etwa 5 000 Dalton auf. Allgemein wurde festgestellt, dass mit zunehmendem Molekulargewicht des Polyethylenglykols die zur Erzielung der Stabilisierung erforderliche Konzentration der Doppelschicht-Stabilisierungskomponente abnimmt.

[0074] Zusätzlich zu den vorgenannten Bestandteilen können Polyamid-Oligomere (z. B. ATTA), pH-empfindliche Oligomere, (z. B. PEAA), Detergenzien, Proteine und Peptide als Doppelschicht-Stabilisierungskomponenten verwendet werden. Zu Detergenzien, die als Doppelschicht-Stabilisierungskomponenten verwendet werden können, gehören (ohne Beschränkung hierauf) Triton X-100, Desoxycholat, Octylglucosid und Lyso-phosphatidylcholin. Zu Proteinen, die als Doppelschicht-Stabilisierungskomponenten verwendet werden können, gehören (ohne Beschränkung hierauf) Glycophorin und Cytochrom-oxidase. Es ist zu erwarten, dass durch Spaltung des Proteins durch endogene Proteasen, die zu einem Verlust der voluminösen Domäne im Außenbereich der Doppelschicht führt, das Doppelschicht-Stabilisierungsvermögen des Proteins verringert wird. Ferner gehören zu Peptiden, die als Doppelschicht-Stabilisierungskomponenten verwendet werden können, beispielsweise das Pentadecapeptid Alanin-(aminobuttersäure-alanin)₁₄. Dieses Peptid kann beispielsweise an Polyethylenglykol gekuppelt werden, was dessen Übertragung aus der Doppelschicht fördert. Alternativ können Peptide, wie Cardiotoxin und Melittin, von denen man weiß, dass sie nicht-lamellare Phasen in Doppelschichten induzieren, an PEG gekuppelt und dadurch in Doppelschicht-Stabilisatoren umgewandelt werden.

[0075] Typischerweise liegt die Doppelschicht-Stabilisierungskomponente in einer Konzentration im Bereich von etwa 0,05 Mol-% bis etwa 50 Mol-% vor. Gemäß einer derzeit bevorzugten Ausführungsform liegt die Doppelschicht-Stabilisierungskomponente in einer Konzentration im Bereich von 0,05 Mol-% bis etwa 25 Mol-% vor. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform liegt die Doppelschicht-Stabilisierungskomponente in einer Konzentration von 5 Mol-% bis etwa 15 Mol-% vor. Für den Fachmann ist es ersichtlich, dass die Konzentration der Doppelschicht-Stabilisierungskomponente in Abhängigkeit von der verwendeten Doppelschicht-Stabilisierungskomponente variiert werden kann.

[0076] Ein Verfahren zum Einkapseln der erfindungsgemäßen Komplexe besteht in der Anwendung einer Detergens-Dialyse. Typischerweise wird die Einkapselung der Komplexe erreicht, indem man die Lipide in einem Lösungsmittel löst und sodann die Lösung unter einem Stickstoffstrom trocknet. Vorzugsweise handelt es sich bei den Lipiden um nichtkationische Lipide. Insbesondere handelt es sich bei den Lipiden um DOPE, DOPS, PEG-Ceramid und Gemische davon. Das Verhältnis von Lipid zu Nucleinsäure beträgt etwa 5 : 1 (Gew./Gew.) bis etwa 100 : 1 (Gew./Gew.) und vorzugsweise etwa 10 : 1 (Gew./Gew.) bis etwa 50 : 1 (Gew./Gew.). Die angestrebte gesamte Lipidkonzentration beträgt etwa 10 mg/ml. Ein dünner Lipidfilm wird erreicht, indem man eine Mischstufe, z. B. unter starkem Rühren, beim Trocknungsverfahren durchführt. Etwaiges verbleibendes Lösungsmittel wird durch Gefriertrocknen entfernt.

[0077] Sodann wird der Lipidfilm in einem Detergens oder alternativ in Ethanol gelöst. Anschließend wird der Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplex, z. B. ein PEE/Nucleinsäure-Komplex mit einer Nucleinsäurekonzentration von etwa 50 µg/ml bis etwa 1000 µg/ml zugegeben. Eine Nucleinsäurekonzentration von etwa 400 µg/ml wird bevorzugt. Das erhaltene Gemisch wird sodann stark gerührt, bis es klar wird, und anschließend wird es dialysiert. Dieses Verfahren führt zu einer Liposomen-Einkapselung des Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes. Das Verfahren kann zur Anwendung bei größeren Präparationen in einem vergrößerten Maßstab durchgeführt werden.

[0078] Bei den Detergenzien, die zum Einkapseln der erfindungsgemäßen Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexe geeignet sind, handelt es sich typischerweise um eines oder mehrere neutrale Detergenzien oder um Kombinationen von Detergenzien und organischen Lösungsmitteln. Bei den Detergenzien handelt es sich vorzugsweise um N,N'-((Octanoylimino)-bis(trimethylen))-bis-(D-gluconamid) (BIGCHAP); BRIJ 35; Desoxy-BIGCHAP; Dodecylpoly-(ethylenglykol)-ether; Tween 20; Tween 40; Tween 60; Tween 80; Tween 85; Triton X-405; Hexyl-, Heptyl-, Octyl- und Nonyl-β-D-glucopyranosid; wobei Octyl-β-D-glucopyranosid besonders bevorzugt wird.

[0079] Zu organischen Lösungsmitteln, die in Kombination mit einem Detergens geeignet sind, gehören (ohne Beschränkung hierauf) Chloroform, Dichlormethan, Diethylether, Cyclohexan, Cyclopentan, Benzol, Toluol, Aceton, Benzylalkohol, Methanol oder andere aliphatische Alkohole, wie Propanol, Isopropanol, Butanol, tert.-Butanol, Isobutanol, Pentanol und Hexanol. Bei der Wahl eines organischen Lösungsmittels achtet man typischerweise auf die Lösungsmittelpolarität und darauf, dass das Lösungsmittel in einem späteren Stadium der Einkapselung leicht entfernt werden kann. Demgemäß handelt es sich bei den bevorzugten organischen Lösungsmitteln, die in Verbindung mit dem Detergens verwendet werden, um Ethanol, Dichlormethan, Chloroform, Methanol und Diethylether, wobei Chloroform und Methanol besonders bevorzugt werden.

[0080] Bei der Lösung aus nicht-kationischen Lipiden, der Doppelschicht-Stabilisierungskomponente und dem Detergens handelt es sich um eine wässrige Lösung. Das Inkontaktbringen des Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes mit der Lösung von nicht-kationischen Lipiden und dem Detergens wird typischerweise erreicht, indem man eine erste Lösung von Nucleinsäuren und eine zweite Lösung der Lipide und des Deter-

gens miteinander vermischt. Für den Fachmann ist es ersichtlich, dass dieser Mischvorgang auf verschiedene Art und Weise durchgeführt werden kann, beispielsweise durch eine mechanische Einrichtung, z. B. unter Verwendung eines Vortex-Mischers. Vorzugsweise handelt es sich bei der Nucleinsäurelösung auch um eine Detergenzlösung.

[0081] In einer alternativen Ausführungsform kann ein Dehydratisierungs-Rehydratisierungs-Verfahren zur Einkapselung des Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes verwendet werden. Bei diesem Verfahren wird ein Lipidgemisch in einem Lösungsmittel getrocknet und sodann in einem Puffer, der den Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplex enthält, rehydratisiert. Der Rehydratisierungsstufe folgt die Extrusion des Liposoms. Das Dehydratisierungs-Rehydratisierungs-Verfahren ergibt einen geringeren Einkapselungswirkungsgrad als die vorstehend beschriebene Technik unter Detergensdialyse.

[0082] Gemäß einer weiteren Ausführungsform lässt sich zum Einkapseln des Komplexes ein Verfahren unter Umkehrphaseneindampfung anwenden. Bei diesem Verfahren werden zunächst die Lipide in einem Lösungsmittelsystem oder einem gemischten Lösungsmittelsystem gelöst. Der Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplex wird in Wasser gelöst und sodann zum Lipidgemisch gegeben. Das Lösungsmittelsystem wird zugesetzt, bis die Bildung einer einzigen Phase beobachtet wird. Nach Entfernen von überschüssigem Lösungsmittel durch Abdampfen wird die Lösung unter Bildung der eingekapselten Liposomen extrudiert.

[0083] Gemäß einer weiteren Ausführungsform lässt sich zum Einkapseln des Komplexes das Ethanol-Spritzverfahren anwenden. Bei diesem Verfahren werden die Lipide in Ethanol oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel gelöst und sodann in ein Röhrchen, das die Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexe in Wasser enthält, getropft. Die Liposomen bilden sich sofort. Nach Entfernen des Ethanols durch Dialyse erhält man eingekapselte Liposomen.

[0084] Die erfindungsgemäßen Liposomen weisen einen Durchmesser von etwa 20 bis etwa 200 nm auf. Insbesondere weisen die erfindungsgemäßen Liposomen einen Durchmesser von etwa 50 bis etwa 150 nm auf. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen Liposomen einen Durchmesser von etwa 70 bis etwa 80 nm auf.

[0085] Die Größenverteilung der Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexe und der Liposomen lässt sich durch ein quasi elastisches Lichtstreuverfahren unter Verwendung eines Nicomp Submicron-Teilchengrößenmessgeräts (Modell 370) im Festteilchenmodus bzw. im Vesikelmodus messen.

[0086] Zur Messung des Einkapselungswirkungsgrads der Liposomen unter Anwendung der vorstehenden Verfahren werden Picogreen und Dextransulfat verwendet. Die Menge der nicht-eingekapselten Komplexe M_{uncap} (bestimmt aus der Fluoreszenz von Picogreen lässt sich sodann quantitativ durch Kombination von Dextransulfat und Picogreen ermitteln. Durch Zugabe von Triton X-100, das die Liposomen vollständig beseitigt, ist es ferner möglich, die gesamte vorhandene DNA M_{tot} quantitativ zu bestimmen. Der Grad der Einkapselung wird sodann durch die folgende Formel berechnet: % Einkapselung = $(1 - M_{\text{uncap}}/M_{\text{tot}}) \times 100$ Der Einkapselungswirkungsgrad lässt sich am besten unter Bezugnahme auf **Fig. 6** beschreiben. Wie in **Fig. 6** dargestellt ist, findet sich bei Zugabe von Picogreen zu einem nicht-eingekapselten Komplex die Fluoreszenz im Hintergrund. Bei Zugabe von Dextransulfat zu einem nichteingekapselten Komplex erfolgt ein Anstieg der Fluoreszenz auf 3,0. Bei Zugabe von Triton X-100 zum Aufbrechen der Liposomen erfolgt ein weiterer Anstieg der Fluoreszenz (vergl. Probe 1). Das Verhältnis dieser Peaks gibt das Ausmaß der Einkapselung wieder. Zur Entfernung von etwaigem nicht-eingekapselten Komplex kann eine Kationenaustauschersäule verwendet werden. Bei Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, etwa 30 bis etwa 70% des Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexes einzukapseln. Vorzugsweise beträgt die prozentuale Einkapselung etwa 40 bis etwa 70 % und insbesondere etwa 50 bis etwa 70%.

[0087] In **Fig. 7** wird die Titration von DOPS zur Optimierung des Einkapselungswirkungsgrads erläutert. Bei bestimmten Ausführungsformen ergibt eine Konzentration von etwa 8–9 Mol-% DOPS im Liposom das beste Einfangen der Komplexe, in diesem Fall PEI/DNA. Ein Verschieben dieses Werts um mehr als 2% der Konzentration von DOPS führt zu einem drastischen Abfall des Einkapselungswirkungsgrads.

Verabreichung von Liposomen mit eingeschlossenen Komplexen

[0088] Im Anschluss an die Bildung der liposomal eingeschlossenen Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexe können die Liposomen zur Transfektion von Zellen verwendet werden, indem man die zu transfizierenden Zellen mit den Liposomen in Kontakt bringt. Die in Liposomen eingeschlossenen Komplexe können fast von jedem Zelltyp absorbiert werden. Nach der Adsorption können die Liposomen entweder einer Endozytose durch einen Teil der Zellen unterliegen, Lipide mit den Zellmembranen austauschen, destabilisiert werden oder mit den Zellen fusionieren. Eine Übertragung oder ein Einbau des Nucleinsäureteils des Liposoms kann durch einen beliebigen dieser Wege stattfinden. Insbesondere wird bei Stattfinden einer Fusion die Lipid-Doppelschichtmembran in die Zellmembran integriert und der Inhalt der Doppelschicht vereinigt sich mit der intrazellulären Flüssigkeit. Eine Fusion des Liposoms mit der Plasmamembran findet statt, wenn die Doppelschicht-Stabilisierungskomponente aus dem Liposom austritt und die Stabilität der Doppelschicht verloren

geht oder abnimmt. Ohne Festlegung auf eine Theorie wird angenommen, dass bei polykationisch vermittelter Genübertragung eine DNA-Aggregation und eine Bindung des erhaltenen Komplexes an anionische Reste an den Plasmamembranen beteiligt sind. Zur Gewährleistung seiner Wirksamkeit soll der Komplex eine positive Nettoladung tragen.

[0089] Ein Kontakt zwischen den Zellen und den liposomal eingeschlossenen Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexen findet bei in vitro-Durchführung in einem biologisch verträglichen Medium statt.

[0090] Die Behandlung der Zellen mit dem in Liposomen eingeschlossenen Komplex wird im allgemeinen bei physiologischen Temperaturen (etwa 37°C) für Zeitspannen von etwa 1 bis 48 Stunden und vorzugsweise von etwa 2 bis 4 Stunden durchgeführt. Für in vitro-Anwendungen kann die Abgabe von Nucleinsäuren an beliebige, in Kultur gezüchtete Zellen erfolgen, unabhängig davon ob es sich um Zellen pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, von Wirbeltieren oder Nichtwirbeltieren handelt, wobei beliebige Gewebe oder Zelltypen in Frage kommen. Bei bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei den Zellen um tierische Zellen, vorzugsweise um Säugetierzellen und insbesondere um humane Zellen.

[0091] Gemäß **Fig. 9** wurden Cos-7-Zellen mit 1 µg eingekapselter pINEX/L018-Plasmid-DNA unter Komplexierung mit PEI im Verhältnis von 1 : 4 (Gew./Gew.) transfiziert. Analysen des Dosis-Wirkungs-Verlaufs und des zeitlichen Verlaufs gemäß **Fig. 9** zeigen, dass die Transfektionsaktivität mit zunehmender DNA-Dosis zunimmt. Die höchste Transfektionsaktivität wurde bei 5 µg DNA beobachtet. Ein Minimum der Transfektion wurde nach 24 Stunden festgestellt. Die Transfektionsaktivität nahm bis zu 72 Stunden ständig zu.

F. Pharmazeutische Präparate

[0092] Die erfindungsgemäßen, in Liposomen eingeschlossenen Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexe können allein oder im Gemisch mit einem physiologisch verträglichen Träger verabfolgt werden. Zu derartigen Trägern gehören (ohne Beschränkung hierauf) physiologische Kochsalzlösung oder Phosphatpuffer, die je nach dem Verabreichungsweg und gemäß üblicher pharmazeutischer Praxis gewählt werden.

[0093] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die in Liposomen eingeschlossene Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexe enthalten, werden nach standardmäßigen Verfahren hergestellt und enthalten ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Im allgemeinen wird normale Kochsalzlösung als pharmazeutisch verträglicher Träger verwendet. Zu weiteren geeigneten Trägern gehören beispielsweise Wasser, gepuffertes Wasser, 0,4%ige Kochsalzlösung, 0,3%ige Glycinlösung und dergl., die zur Gewährleistung einer erhöhten Stabilität Glycoproteine enthalten, z. B. Albumin, Lipoprotein, Globulin und dergl. In Zusammensetzungen, die Kochsalzlösung oder andere salzhaltige Träger enthalten, wird der Träger vorzugsweise im Anschluss an die Bildung der Liposomen zugegeben. Auf diese Weise kann nach Bildung der in Liposomen eingeschlossenen Komplexe das Liposom in den pharmazeutisch verträglichen Trägern, z. B. normaler Kochsalzlösung, verdünnt werden. Diese Zusammensetzungen können nach herkömmlichen Sterilisationsverfahren sterilisiert werden. Die erhaltenen wässrigen Lösungen können zur Verwendung abgepackt oder unter aseptischen Bedingungen filtriert und lyophilisiert werden. Das lyophilisierte Präparat kann vor der Verabreichung mit einer sterilen wässrigen Lösung vereinigt werden. Die Zusammensetzungen können je nach Bedarf pharmazeutisch verträgliche Hilfssubstanzen enthalten, um eine Annäherung an physiologische Bedingungen zu erreichen, z. B. Mittel zum Einstellen des pH-Werts und Pufferungsmittel, Mittel zur Einstellung der tonischen Beschaffenheit und dergl., wie Natriumacetat, Natriumlactat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchlorid und dergl.

[0094] Die Konzentration der in Liposomen eingeschlossenen Komplexe in den pharmazeutischen Zubereitungen kann stark variieren, d. h. von weniger als etwa 0,05 Gew.-%, (üblicherweise mindestens etwa 2–5 Gew.-%) bis zu 10–30 Gew.-%, und wird vorwiegend aufgrund von Flüssigkeitsvolumina, Viskositätswerten und dergl. gemäß dem gewählten speziellen Verabreichungsweg gewählt. Beispielsweise kann die Konzentration erhöht werden, um die mit der Behandlung verbundene Flüssigkeitsbelastung zu verringern. Für Diagnosezwecke hängt die Menge des in Liposomen eingeschlossenen Komplexes von der speziellen verwendeten Markierung, dem zu diagnostizierenden Krankheitszustand und der Beurteilung des Arztes ab, beträgt aber im allgemeinen etwa 0,01 bis etwa 50 mg pro kg Körpergewicht und vorzugsweise etwa 0,1 bis etwa 5 mg/kg Körpergewicht.

[0095] Gemäß einem weiteren Anwendungsbeispiel können die liposomal eingeschlossenen Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexe einem breiten Bereich von topischen Dosierungsformen einverleibt werden, wozu (ohne Beschränkung hierauf) Gele, Öle, Emulsionen und dergl. gehören. Beispielsweise kann die Suspension, die die liposomal eingeschlossenen Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexe enthält, in Form von topischen Cremes, Pasten, Salben, Gels, Lotionen und dergl. zubereitet und verabreicht werden.

[0096] Erfindungsgemäß werden ferner in Liposomen eingeschlossene Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexe in Kit-Form bereitgestellt. Das Kit umfasst typischerweise einen Behälter, der zur Aufnahme der verschiedenen Elemente des Kits Einteilungen aufweist. Das Kit enthält die erfindungsgemäßen Liposomen zusammen mit Verabreichungshinweisen. Gemäß weiteren Ausführungsformen weisen die liposomal eingeschlossenen Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexe einen am Liposom angebrachten Rest zur zielge-

richteten Abgabe ("targeting moiety") auf. Verfahren zum Anbringen von Resten für die zielgerichtete Abgabe (z. B. Antikörper, Proteine) an Lipiden (z. B. an den erfindungsgemäß verwendeten Lipiden) sind dem Fachmann geläufig.

[0097] Die Dosierung für in Liposomen eingeschlossene Kondensationsmittel-Nucleinsäure-Komplexe hängt vom Verhältnis Nucleinsäure zu Lipid und der Beurteilung des verabreichenden Arztes unter Berücksichtigung von Alter, Gewicht und Zustand des Patienten ab.

[0098] Nachstehend wird die Erfindung anhand von speziellen Beispielen näher beschrieben. Die Beispiele dienen lediglich der Erläuterung.

G. Beispiele

I. Materialien

[0099] Bei dem in sämtlichen Versuchen verwendeten Reporter-Gen-Plasmid handelte es sich um pINEX/L018 (5650 bp), das für Glühwürmchen-Luciferase unter Kontrolle des humanen, sofortig-frühen Zytomegalovirus-Verstärkers/Promotors kodiert. Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* DH5alpha durch alkalische Lysis unter anschließender doppelter Bandenbildung an Cäsiumchlorid-Gradienten hergestellt (vergl. A. R. Thierry, J. Liposome Research, Bd. 7 (1997), S. 143–159). PEI 25 kDa wurde von der Fa. Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) bezogen. Ethidiumbromid-Picogreen wurde von der Fa. Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) bezogen. Gereinigte Glühwürmchen-Luciferase wurde von der Fa. Boehringer Mannheim (Deutschland) bezogen. Sämtliche Lipide mit Ausnahme von PEG-Ceramid (hausintern hergestellt) wurden von der Fa. Avanti Lipids bezogen. Fötale Kälberserum wurde von der Fa. Intergen (New York, USA) bezogen. Sämtliche Kulturmedien wurden von der Fa. Stemcell Technology (Vancouver, BC) bezogen. Weitere Reagenzien bei dieser Untersuchung stammten von der Fa. Sigma Chemical Co. und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

II. Verfahren

a. Verfahren zur Herstellung von PEI/Plasmid-DNA-Komplexen

[0100] 1.) PEI-Lösung (1,6 mg PEI/ml Wasser): 0,1 Volumenteil der PEI-Lösung wurden tropfenweise unter Verwendung einer Spritze mit einer Nadelgröße von 26G3/8 unter starkem Rühren zu einer Plasmid-DNA-Lösung (1 mg Plasmid-DNA/1,25 ml Wasser) gegeben. 2.) Die in Stufe 1 hergestellte vorkondensierte PEI-DNA wurde sodann tropfenweise unter Verwendung einer Spritze mit einer Nadel der Größe 26G3/8 unter starkem Rühren in eine PEI-Lösung (390 g PE2-Vorrat verdünnt in 500 ml Wasser) zur Bildung von PEI/Plasmid-DNA-Komplexen gegeben. Bei der erzielten Oberflächenladung des PEI/DNA-Komplexes handelt es sich um eine positive Nettoladung. 3.) Der PEI/Plasmid-DNA-Komplex wurde sodann in einen Dialysebeutel (Molekulargewichtstrenngrenze (6 000–8 000, Spectra-Por, Spectrum) gegeben und mit einem Trocknungsmittel (Polyethylenglykol, Molekulargewicht 10 000) bedeckt. 4.) Die konzentrierten PEI-Plasmid-DNA-Komplexe wurden über Nacht gegen HBS (150 mM NaCl, 5 mM–25 mM HEPES), pH-Wert 7,45, dialysiert, um die NaCl-Konzentration auf 150 mM einzustellen.

ii. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Plasmid-DNA

[0101] Die PEI/Plasmid-DNA-Komplexe wurden mit einem polyanionischen Polymeren, wie Dextransulfat in Wasser behandelt (andere Polymere, wie Heparin oder Heparansulfat können ebenfalls verwendet werden), wobei für jeweils 4 µg eingesetztes PEI 40 µg Dextransulfat verwendet wurden. Diese Umsetzung dauert bis zur Beendigung typischerweise 10 bis 15 Minuten. 4 µl Picogreen wurden sodann zum PEI/Plasmid-DNA-Komplex gegeben. Eine DNA-Eichkurve im Bereich von 0,2 bis 1,0 µg wurde aufgestellt, wobei an jedem Punkt eine standardisierte Menge an Dextransulfat zugegeben wurde. Dies diente zum Ausgleichen der Auslöschwirkung des Dextransulfats auf die Fluoreszenzablesungen von Picogreen. Diese Menge muss ebenso groß sein wie die zur Dissoziation der PEI-Plasmid-DNA-Probe verwendete Menge.

iii. Verfahren zum Einkapseln der PEI/Plasmid-DNA-Komplexe in Lipide

[0102] Die Lipide DOPE (82 Mol-%), DOPS (8 Mol-%) und Peg-Ceramid(C20) (10 Mol-%), die in Chloroform gelöst waren, wurden zunächst unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die endgültige, angestrebte Gesamtlipidkonzentration betrug 10 mg/ml. Ein dünner Lipidfilm wurde durch starkes Rühren beim Trocknungsverfahren erreicht. Etwaiges verbleibendes Lösungsmittel wurde durch zusätzliches Gefriertrocknen über Nacht entfernt. Der getrocknete Lipidfilm wurde sodann von der Lyophilisiervorrichtung abgenommen und mit 200 µl OGP (200 mM) versetzt. Ein sehr starkes Rühren unter zwischenzeitlichem 5-minütigem Erwärmen auf 65°C

unterstützt die Auflösung der Lipide im Detergens. Sobald offensichtlich kein ungelöstes Lipid mehr sichtbar war, wurden die PEI-DNA-Komplexe in einer DNA-Konzentration von 400 µg/ml zu der Lipidsuspension gegeben. Das Gewichtsverhältnis Lipid : DNA betrug 10 mg : 400 µg. Bei Konzentrationswerten über 500 µg/ml DNA wurde festgestellt, dass eine Fällung oder Ausflockung erfolgte (das Endprodukt wies große Teilchen auf, die beim Schütteln sofort verschwanden). Das erhaltene Gemisch wurde sodann stark gerührt, bis es klar wurde, und sodann zur Dialyse in einen Spectra-Por-Dialysebeutel gegeben. Der Dialysepuffer bestand aus 5 mM HEPES und 150 mM NaCl unter Titration mit entsprechenden NaOH-Mengen zur Erzielung eines pH-Werts von etwa 4,5. Anschließend wurde das Gemisch 24 Stunden dialysiert, wobei der Puffer jeweils nach 4 Stunden ausgewechselt wurde.

iv. Verfahren zur Bestimmung des Einkapselungswirkungsgrads der Lipidzubereitung

[0103] Zur Bestimmung des Einkapselungswirkungsgrads der Lipidteilchen wurden Picogreen und Dextran-sulfat verwendet. Die Menge der nichteingekapselten Komplexe M_{uncap} (bestimmt aus der Fluoreszenz von Picogreen) konnte quantitativ durch Kombination von Dextran-sulfat und Picogreen bestimmt werden. Bei Zugabe von Triton X-100, das die Lipidteilchen vollständig dissoziiert, konnte die gesamte vorhandene DNA M_{tot} bestimmt werden. Der Grad der Einkapselung wird sodann unter Verwendung der folgenden Formel berechnet:

$$\% \text{ Einkapselung} = (1 - M_{\text{uncap}}/M_{\text{tot}}) \times 100$$

v. Verfahren zur Behandlung der eingekapselten PEI/Plasmid-DNA-Lipidteilchen

[0104] Zunächst wurden etwa 100 ml kationisches Gel (Dowex-50 W, Katalog Nr. 50X8-400, Fa. Sigma) in einem Messkolben (Fassungsvermögen 1000 ml), der etwa 500 ml 0,5 M HCl, die als Protonenreservoir diente, enthielt, vorgelegt. Ein Magnetrührstab wurde in den Kolben gegeben. Sodann wurde das Gemisch langsam über Nacht auf einem Magnetrührer gerührt. Am nächsten Tag wurde das Gel auf eine chromatographische Säule (GlassEcono-Säule, Katalog Nr. 737-1012, BioRad) in einer Höhe von etwa 5 cm aufgesetzt. Sodann wurde das Gel mit 10 Volumenteilen destilliertem Wasser zur Normalisierung des pH-Werts des Gels gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurden 100 ml 5 M NaCl verwendet, um etwaige verbleibende Verunreinigungen vom Gel auszuwaschen. Schließlich wurden 10 Säulenvolumina 150 mM NaCl-HBS zur Äquilibrierung der Säule verwendet.

va. Verfahren zur in vitro-Transfektion der PEI/Plasmid-DNA-Lipidteilchen unter Verwendung von verschiedenen Zelllinien

[0105] Die Zellen Lewis Lung, SK-OV-3, LS180, Cos 7, B16 und U87 wurden auf Platten mit 24 Vertiefungen (Falcon 3047) in einer Zelldichte von 4×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 bzw. 4×10^4 Zellen/Vertiefung in 1 ml Medium mit einem Gehalt an 10% fötalem Kälberserum überimpft. B16- und LS180-Zellen wurden in MEM + Earls Salts, Lewis Lung-, Cos 7- und U87-Zellen in DMEM mit hohem Glucosegehalt und SK-OV-3-Zellen in RPMI-1640-Medium gezüchtet. Die Zellen wurden über Nacht bis zu einer Konfluenz von 70-80% zum Transfektionszeitpunkt inkubiert. Die eingekapselten PEI-kondensierten DNA-Lipid-Zubereitungen wurden auf die vorstehend beschriebene Weise hergestellt und in Dreifachansätzen in die entsprechenden Vertiefungen gegeben. Die Platten wurden kurz bewegt und sodann 24 Stunden und 48 Stunden bei 37°C (5% CO₂) inkubiert, bevor ein Test auf Genexpression durchgeführt wurde.

[0106] Die Luciferase-Genexpression wurde mit einem Luminometer (Dynatech Microlite[®] ML3000 Microtiter) unter Verwendung von Platten mit 96 Vertiefungen (Katalog Nr. 011-010-7411, Dynatech) gemessen. Die Zellen wurden 1-mal mit PBS-Puffer gespült und sodann mit 150 µl Lysis-Puffer (0,1% Triton X-100, 250 mM Natriumphosphatpuffer, pH-Wert 8,0) 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur einer Lysis unterzogen. Es wurden Tests in doppelten Ansätzen für 10 µl Zelllysate durchgeführt. Eine Eichkurve wurde unter Verwendung von gereinigtem Luciferase-Protein, das in einem Imitat eines transfizierten Zelllysats verdünnt war, aufgestellt.

vi. Verfahren zur Messung des Gesamtproteins für die einzelnen, in vitro-transfizierten Proben

[0107] Ein Proteintest wurde unter Anwendung des kolorimetrischen Bicinchoninsäure (BCA)-Verfahrens durchgeführt. Bei diesem Test wurden 10 µl Lysat in die einzelnen Vertiefungen der Platte mit 96 Vertiefungen (Katalog Nr. 011-010-7411, Dynatech) gegeben. Jeweils 200 µl Mikro-BCA-Arbeitsreagenz wurden in die Vertiefungen gegeben, wonach gemischt und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert wurde. Die Proteinmenge in jeder Vertiefung wurde durch Vergleich mit BSA-Proteinstandard (1-16 µg/Vertiefung), die auf der gleichen Platte zu einer Reihe von Vertiefungen in doppelten Ansätzen gegeben wurden, bestimmt. Die Platte mit den Proben und

den BSA-Proteinstandards wurde bei 570 nm in einem Mikrotiter-Plattenlesegerät (Dynatech MR5000) nach der Farbentwicklung abgelesen.

vii . Verfahren zur Bewertung des in vitro-Toxizitätsgrads

[0108] 0,1% Kristallviolett-Reagenz wurde mit 20%igem Ethanol auf 0,05% verdünnt. Die Platten wurden 10 Minuten mit 1500 U/min zentrifugiert. Sodann wurden die Platten 2-mal mit PBS-Puffer gespült, indem man den Puffer in den Deckel einer Pipettenspitzenbox goss und die Platten eintauchte. Der PBS-Puffer wurde von Platte zu Platte ausgetauscht. Sodann wurden die Platten auf einen Stapel von Papierhandtüchern gelegt und vorsichtig trocken getupft. Jeweils 50–100 µl 0,05% Kristall violett wurden in jede Vertiefung gegeben. Die Platten wurden sodann 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Sodann wurden die Platten mit Leitungswasser gemäß den Angaben für den Waschvorgang mit PBS gespült. Man ließ die Platten über Nacht auf dem Labortisch trocknen. Sodann wurden in jede Vertiefung 100 µl 100% Methanol gegeben. Die Platten wurden innerhalb von 5 Minuten nach der Zugabe von Methanol unter Verwendung des Plattenlesegeräts bei 570 nm abgelesen. [0109] Cos-7-Zellen wurden in einer Zelldichte von $2,5 \times 10^3$ in 200 µl Komplettmedium auf Platten mit 96 Vertiefungen überimpft und 72 Stunden bis zu 90% Konfluenz inkubiert. Verschiedene Mengen an eingekapselten, PEI-kondensierten DNA-Zubereitungen und an PEI/DNA-Komplex wurden in Dreifachansätzen in die entsprechenden Vertiefungen gegeben. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation mit Kristallviolett gefärbt.

vii. Verfahren zur Abgabe der PEI/Plasmid-DNA-Lipidteilchen im in vivo-System

[0110] Weibliche C57-Mäuse erhielten eine intraperitoneale (i. p.) Injektion von 1×10^5 B16-Tumorzellen. Am 7. Tag des Wachstums des B16-Tumors wurden DNA-Dosen von 75 µg Luciferase-Plasmid/Zubereitung (eingekapselte PEI/DNA-Lipidteilchen) in einem Volumen von 500 µl durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Kontrolltiere erhielten eine Injektion des gleichen Volumens an Kochsalzlösung. Die Tumoren wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen, rasch in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -70°C aufbewahrt. Einzelne Tumoren wurden unter Verwendung eines FastPrep-Homogenisiergeräts (Bio 101 Inc.) 5 Sekunden mit einer Geschwindigkeitseinstellung von 5 homogenisiert, mit einem kleinen Kügelchen (Katalog Nr. 6520-401/404, Bio 101) beladen. Anschließend wurden ein zweites Kügelchen und eine bestimmte Menge an $1 \times \text{CCLR}$ -Reagenz (Cell Culture Lysis Reagent Katalog Nr. E1531, Promega) unter Ergänzung mit 1 mg/ml BSA (Katalog Nr. A-2153, Sigma) zu jedem Röhrchen gegeben. Die Homogenisierung wurde 2-mal im Fast-Prep-Gerät (FastPrep® FP120, Instrument, Bio 101) 5–6 Sekunden bei einer Geschwindigkeitseinstellung der Stufe 5 durchgeführt. Das Homogenisat wurde in frische Eppendorf-Röhrchen übertragen. Große Gewebestücke wurden am Boden des Röhrchens durch kurze Zentrifugation pelletisiert. 20 µl Homogenisat und Standard-Luciferase-Protein, das mit Kontrollgewebe-Homogenisat verdünnt war, wurden in Zweifachansätzen getestet. Die Ergebnisse wurden in pg Luciferase-Protein pro Organ oder pro Gramm Tumor umgerechnet.

ix. Verfahren zur Bewertung der Toxizität im in vivo-System unter Messung des Grads der Aminotransferase-Aktivität (AST/GOT) im Serum

[0111] 1.) 10 ml entionisiertes Wasser wurden in ein Fläschchen gegeben. Sodann wurde sofort durch mehrmaliges Kippen (kein Schütteln) vermischt. Das Reagenz wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur oder 7 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. 2.) Die UV-Lampe wurde mindestens 1/2 Stunde vor der Analyse angeschaltet. Es wurde eine Einstellung auf kinetische Analyse vorgenommen. Innerhalb der Kinetik-Einstellung wurde das Default-Programm verwendet. Das Spektrophotometer wurde auf 340 nm und auf Zeiten von 30, 60, 90 und 120 Sekunden eingestellt. Der Leerwert wurde mit Wasser gemessen. 3.) 500 µl Reagenz wurden in die Küvette gegeben (wobei die Temperatur des Reagenz auf 25°C gehalten wurde). 4.) 50 µl Testserum wurden zugegeben und durch mehrfaches Aufziehen in der Pipette vermischt. 5.) Die Absorption wurde nach 60 Sekunden abgelesen. Dies ergab den Anfangswert (inA). 6.) 30 Sekunden nach der inA-Ablesung wurde die Absorption erneut abgelesen. Diese Ablesung diente zur Sicherstellung einer linearen Reaktion. 7.) 60 Sekunden nach der inA-Ablesung wurde die Absorption erneut abgelesen. Hierbei handelte es sich um die Endablesung (finA). 8.) Der A-Wert pro Minute wurde durch Subtraktion des endgültigen A-Werts vom anfänglichen A-Wert berechnet. Wenn der A-Wert pro Minute über 0,280 lag, wurde 1 Teil Probe mit 1 Teil isotonischer Kochsalzlösung verdünnt und ein erneuter Test durchgeführt. Zum Ausgleich der Verdünnung wurden die Ergebnisse mit dem Faktor 2 multipliziert. 9.) Die Berechnung erfolgte folgendermaßen:

$$\text{AST (U/Liter)} = \frac{\mu\text{A-Wert pro Minute} \times \text{TV} \times 1000}{6,22 \times \text{LP} \times \text{SVTV}} = \text{Gesamtvolumen (0,55 ml)}$$

SV = Probenvolumen (0,55 ml)
 6,22 = millimolarer Absorptionswert von NADH bei 340 nm
 LP = Lichtweg (1,0)
 1000 = Umwandlung von Einheiten pro ml auf Einheiten pro Liter

$$= \frac{\mu\text{A-Wert pro Minute} \times 0,55 \times 1000}{6,22 \times 1,0 \times 0,05}$$

$$= \mu\text{A-Wert pro Minute} \times 1786 \text{ (} \times 1,37, \text{ bei Bestimmung der Werte bei } 25 \text{ }^\circ\text{C)}$$

[0112] 1 Aktivitätseinheit ist als die Enzymmenge definiert, die 1 μmol NAD pro Minute unter den Testbedingungen freisetzt.

Beispiel 1

Dieses Beispiel erläutert den Einfluss von Dextransulfat auf PEI/DNA-Komplexe.

[0113] **Fig. 2** (Probe 1) zeigt, dass bei Zugabe von Picogreen zu einer Probe der Liposomenzubereitung mit einem Gehalt an einem PEI/DNA-Komplex die Fluoreszenzablesung sich deutlich im Hintergrund befindet. Es ist ersichtlich, dass die DNA durch das Kondensationsmittel PEI gut geschützt ist. Bei Zugabe von Dextransulfat erfolgt ein deutlicher sprunghafter Fluoreszenzanstieg. Die DNA befindet sich offensichtlich nicht in der gleichen kondensierten Form, was den Zugang von Picogreen ermöglicht. In der Probe 2 kommt es bei Zugabe von Triton X100 zu keiner signifikanten Veränderung der Fluoreszenzablesung, d. h. die Ableseung ist ähnlich wie der Hintergrund. Dies stellt einen Hinweis dafür dar, dass Triton die Komplexe nicht in signifikanter Weise beeinflusst. Nach Zugabe von Dextransulfat steigt die Fluoreszenz an.

Beispiel 2

Dieses Beispiel erläutert die Verwendung von Dextransulfat und die Menge, die zur Komplexdissoziation erforderlich ist.

[0114] Wie in **Fig. 3** dargestellt ist, nimmt bei steigender Menge des zugesetzten Dextransulfats die Fluoreszenz ebenfalls zu. Dies stellt einen Hinweis dafür dar, dass die DNA für das Picogreen mehr und mehr zugänglich wird. Die Fluoreszenzzunahme flacht schließlich auf einer gewissen Höhe ab. Am Ende wird das Fluoreszenzsignal durch übermäßiges Dextransulfat gelöscht. Das optimale Gewichtsverhältnis Dextransulfat zu PEI beträgt etwa 6 : 1. Es ist darauf hinzuweisen, dass jeder Punkt in **Fig. 3** eine Inkubationsdauer von etwa 15 Minuten umfasst.

Beispiel 3

Dieses Beispiel erläutert die Relaxationszeit der PEI/DNA-Komplexe.

[0115] **Fig. 5** zeigt das seitliche Relaxationsprofil von PEI/DNA-Komplexen unter dem Einfluss von Dextransulfat. Das Diagramm zeigt klar, dass die Relaxation der Komplexe kein sofortiges Ereignis darstellt. Die anfängliche Relaxation ist rasch und verlangsamt sich schließlich zu einem endgültigen Gleichgewicht, wie das Picogreen-Fluoreszenzsignal zeigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass für quantitative Zwecke die erforderliche Menge an Dextransulfat vorher zu der Probe gegeben werden muss und sodann eine mindestens 15-minütige Inkubationszeit einzuhalten ist, um zu gewährleisten, dass der Relaxationsvorgang vollständig ist. Beispiel 4 Dieses Beispiel erläutert den Einkapselungswirkungsgrad von PEI/DNA-Komplexen in Liposomen.

[0116] Wie in **Fig. 7** gezeigt ist, wurde zur Optimierung des Einkapselungswirkungsgrads DOPS titriert. Dabei wurde festgestellt, dass 8–9 Mol-% DOPS die beste Einkapselung bei etwa 55% ergeben. Die prozentuale Einkapselung wurde vor dem Aufsetzen auf die Säule bestimmt. Der Einkapselungswirkungsgrad fällt unterhalb dieser Konzentration drastisch ab, was die hohe Empfindlichkeit des Vorgangs gegenüber der negativen Ober-

flächenladungsdichte anzeigt. Es ist darauf hinzuweisen, dass dieses Ergebnis in einem Puffer mit einer NaCl-Konzentration von 150 mM erzielt wurde. Eine Veränderung der NaCl-Konzentration verändert die Menge an DOPS, die zur Optimierung der Einkapselung erforderlich ist. Für in vitro-Tests ergeben etwa 8 Mol-% DOPS das optimale Ergebnis.

Beispiel 5

Dieses Beispiel erläutert den in vitro-Transfektionswirkungsgrad der PEI/DNA-Komplexe.

[0117] Wie in **Fig. 9** gezeigt ist, wurden Cos-7-Zellen mit 1 µg eingekapseltem pINEX/L018-Plasmid-DNA, die mit PEI in einem Gewichtsverhältnis von 1 : 4 komplexiert war, transfiziert. Bei diesem Versuch wurden die Dosisreaktion und der zeitliche Verlauf analysiert. **Fig. 9** zeigt, dass die Aktivität mit steigender DNA-Dosis zunahm. Die höchste Transfektionsaktivität wurde bei 5 µg DNA beobachtet. Eine minimale Transfektion war nach 24 Stunden festzustellen. Die Transfektionsaktivität stieg bis zu 72 Stunden ständig an.

Beispiel 6

Dieses Beispiel erläutert die Verringerung der Toxizität von eingekapselten PEI/DNA-Komplexen.

[0118] Wie in **Fig. 10** gezeigt ist, wurde eine Toxizitätsuntersuchung für einen eingekapselten PEI/DNA-Komplex unter Prüfung der Dosisreaktion bei einem Komplex-Ladungsverhältnis von 5,3 durchgeführt. Für die Darstellung betrug der gewählte Zeitpunkt 48 Stunden. Bei der Kontrolle handelte es sich um die Zelllinie ohne zugesetzte Komponenten. Das Diagramm zeigt klar, dass die nicht-eingekapselten Komplexe beginnend mit einer Dosis von 1 µg eine signifikante Toxizität zeigen. Die eingekapselten Komplexe zeigten bis zu 2 µg DNA keine relative Toxizität.

[0119] In **Fig. 11** ist der Vergleich der Toxizität zwischen (1) Liposomen, die nicht mit einer Kationenaustauschersäule behandelt worden sind, und (2) solchen, die auf diese Weise behandelt worden sind, dargestellt. Die nicht-eingekapselten Komplexe enthielten 0,75 µg DNA. Dieser Wert wurde so gewählt, dass man genau außerhalb des bekannten Wertes der Liposomenprobe lag. Die Toxizität von (1) ist vergleichbar mit der von nicht-eingekapselten Komplexen. Die Probe (2) zeigt eine drastische Toxizitätsverringerung, was auf die Entfernung der Komplexe durch eine Kationenaustauschersäule zurückgeführt werden kann.

[0120] **Fig. 12** zeigt die in vivo-Toxizität von eingekapselten PEI/DNA-Komplexen. Einkapselte PEI/DNA wurde in einer Dosis von 75 µg DNA vier Mäusen injiziert. Die Enzymwerte (AST) waren vergleichbar mit den Werten der PBS-Kontrolle. Bei einer Dosis mit einem Gewichtsverhältnis von PEI/DNA von etwa 4 : 1 wäre eine nicht eingekapselte Probe für die Mäuse letal. Der Einkapselungswirkungsgrad bei dieser liposomalen Injektion lag nahe bei 90%.

Patentansprüche

1. Liposom, welches enthält:
 - (a) ein Lipid und
 - (b) einen in dem Liposom eingekapselten Komplex aus einem Kondensationsmittel und Nukleinsäure.
2. Liposom nach Anspruch 1, wobei das Lipid ein nichtkationisches Lipid umfaßt.
3. Liposom nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Kondensationsmittel unter Polyethylenimin, Polylysinen, Polyargininen, Polyornithinen, Histonen, Protaminen, Polyaminen, Spermidin und Spermin ausgewählt ist.
4. Liposom nach Anspruch 3, wobei das Kondensationsmittel ein Polyethylenimin mit einem Molekulargewicht von 0,8 bis 800 kDa ist.
5. Liposom nach Anspruch 9, wobei das Gewichtsverhältnis von Polyethylenimin zu Nukleinsäure in dem Komplex von Kondensationsmittel und Nukleinsäure 10 : 1 bis 1,5 : 1 beträgt.
6. Liposom nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Komplex von Kondensationsmittel und Nukleinsäure einen Durchmesser von 30 bis 60 nm hat.
7. Liposom nach einem der Ansprüche 1 bis 6, das einen Durchmesser von 20 bis 200 nm hat.

8. Liposom nach Anspruch 7, das einen Durchmesser von 50 bis 150 nm hat.
9. Liposom nach Anspruch 8, das einen Durchmesser von 70 bis 80 nm hat.
10. Liposom nach einem der Ansprüche 1 bis 9, welches außerdem (c) eine assoziierte Komponente zum Stabilisieren einer Doppelschicht enthält.
11. Liposom nach Anspruch 10, wobei die eine Doppelschicht stabilisierende Komponente unter Lipiden, Lipidderivaten, Detergentien, Polyethylenglycolen, Proteinen, Peptiden, Polyamid-Oligomeren, pH-empfindlichen Polymeren und PEG-Lipiden ausgewählt ist.
12. Liposom nach Anspruch 11, wobei das PEG-Lipid ein PEG-Ceramid ist.
13. Liposom nach Anspruch 12, wobei das PEG ein durchschnittliches Molekulargewicht von 2000 bis 5000 Dalton hat.
14. Liposom nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der eingekapselte Komplex von Kondensationsmittel und Nukleinsäure eine mehr als etwa 30%ige Einkapselungs-Wirksamkeit, bestimmt unter Verwendung von Picogreen und Dextransulfat, darstellt.
15. Verfahren zum Transfizieren einer Zelle mit einer Nukleinsäure in vitro, welches das Inkontaktbringen der Zelle mit einem Liposom nach einem der Ansprüche 1 bis 14 umfaßt.
16. Verfahren zum Einkapseln eines Komplexes von Kondensationsmittel und Nukleinsäure in einem Liposom, welches umfaßt
die Zugabe einer Lösung eines Kondensationsmittels zu einer Nukleinsäure-Lösung, wobei ein Komplex aus Kondensationsmittel und Nukleinsäure gebildet wird, und
die Zugabe des Komplexes von Kondensationsmittel und Nukleinsäure zu einer Lipidsuspension unter Bildung des eingekapselten Komplexes von Kondensationsmittel und Nukleinsäure.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei der Komplex aus Kondensationsmittel und Nukleinsäure gebildet wird, indem zuerst ein Kondensationsmittel zugemischt wird, wobei eine vorkondensierte Nukleinsäure gebildet wird, und danach die vorkondensierte Nukleinsäure zu einer zweiten Lösung eines Kondensationsmittels gegeben wird, wobei der Komplex aus Kondensationsmittel und Nukleinsäure gebildet wird, und wobei das erste und das zweite Kondensationsmittel gleich oder verschieden sind.
18. Verwendung eines Liposoms nach einem der Ansprüche 1 bis 19 für die Herstellung eines Arzneimittels zum Transfizieren einer Zelle.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

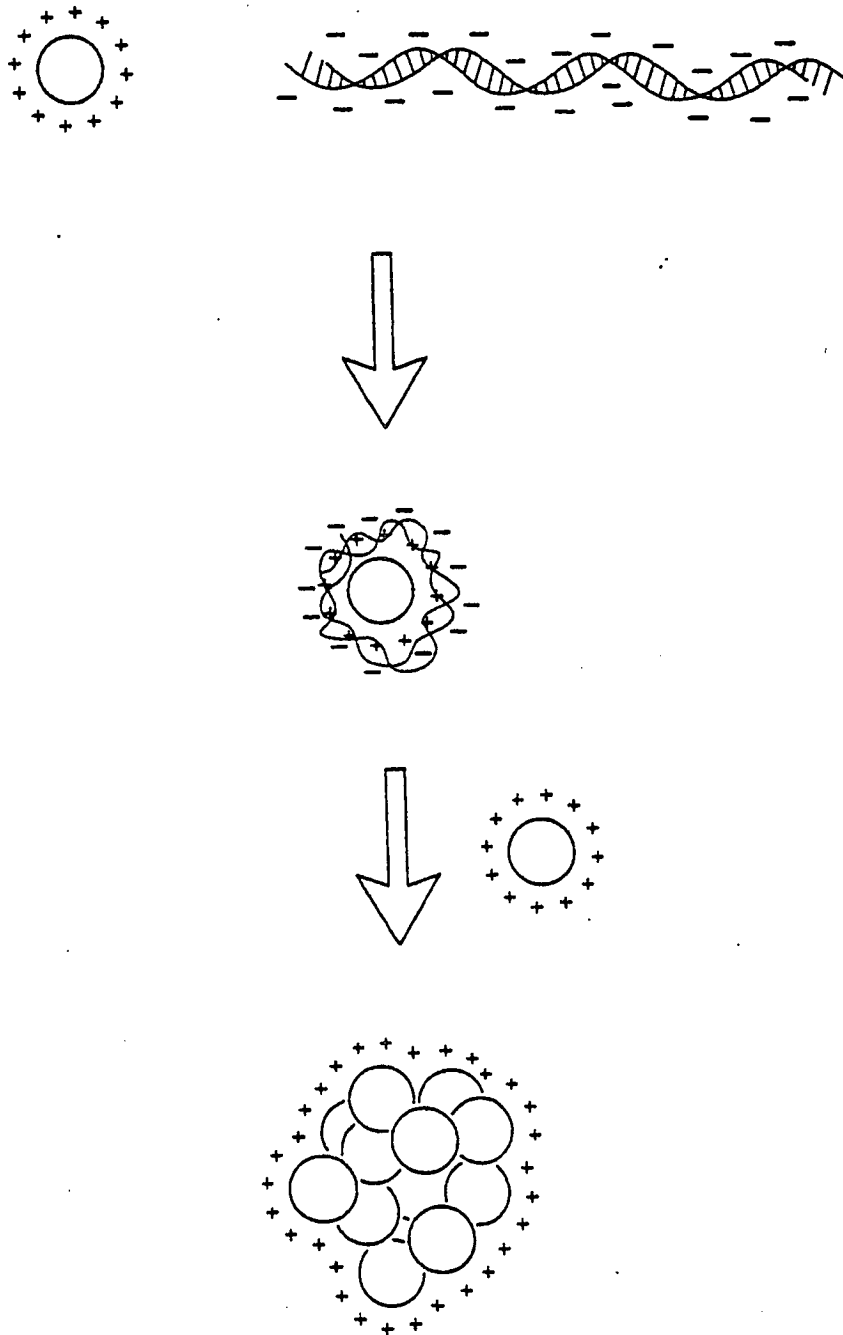
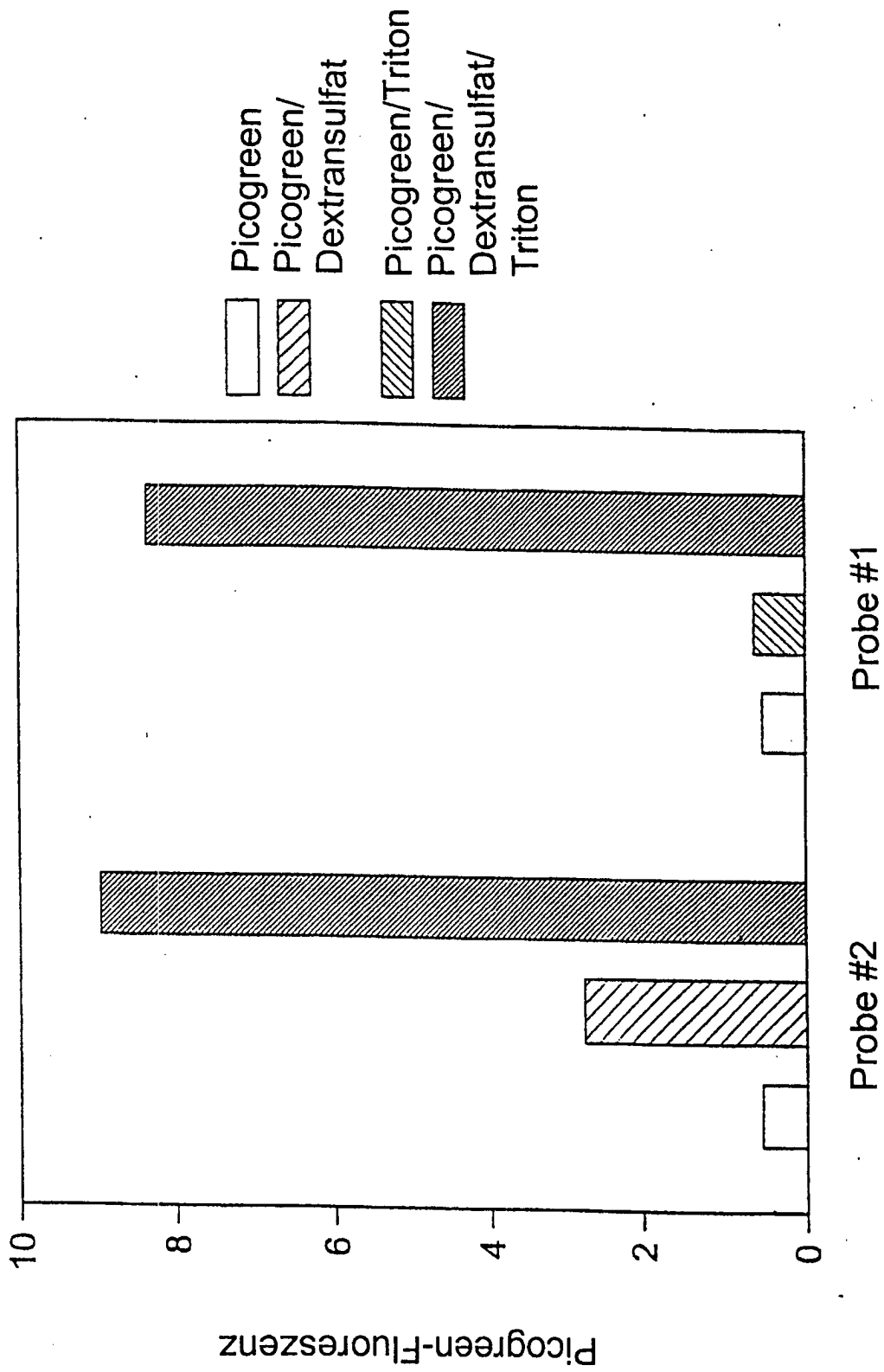


Fig. 2



Liposomen mit eingekapselter, PEI-kondensierter DNA

Fig. 3

Titration von Dextransulfat zur Bestimmung der zum Lösen von PEI-Komplexen erforderlichen Schwellenmenge

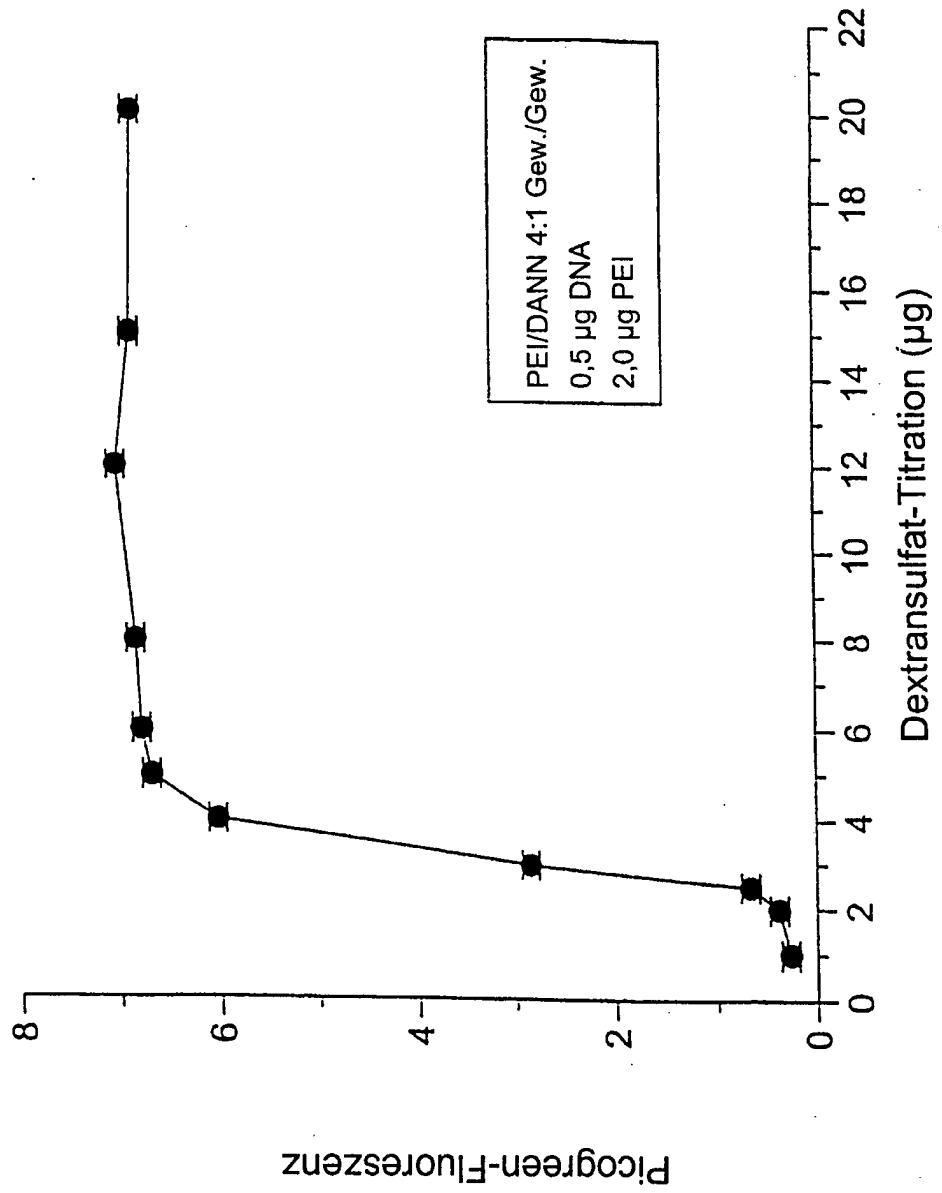


Fig. 4

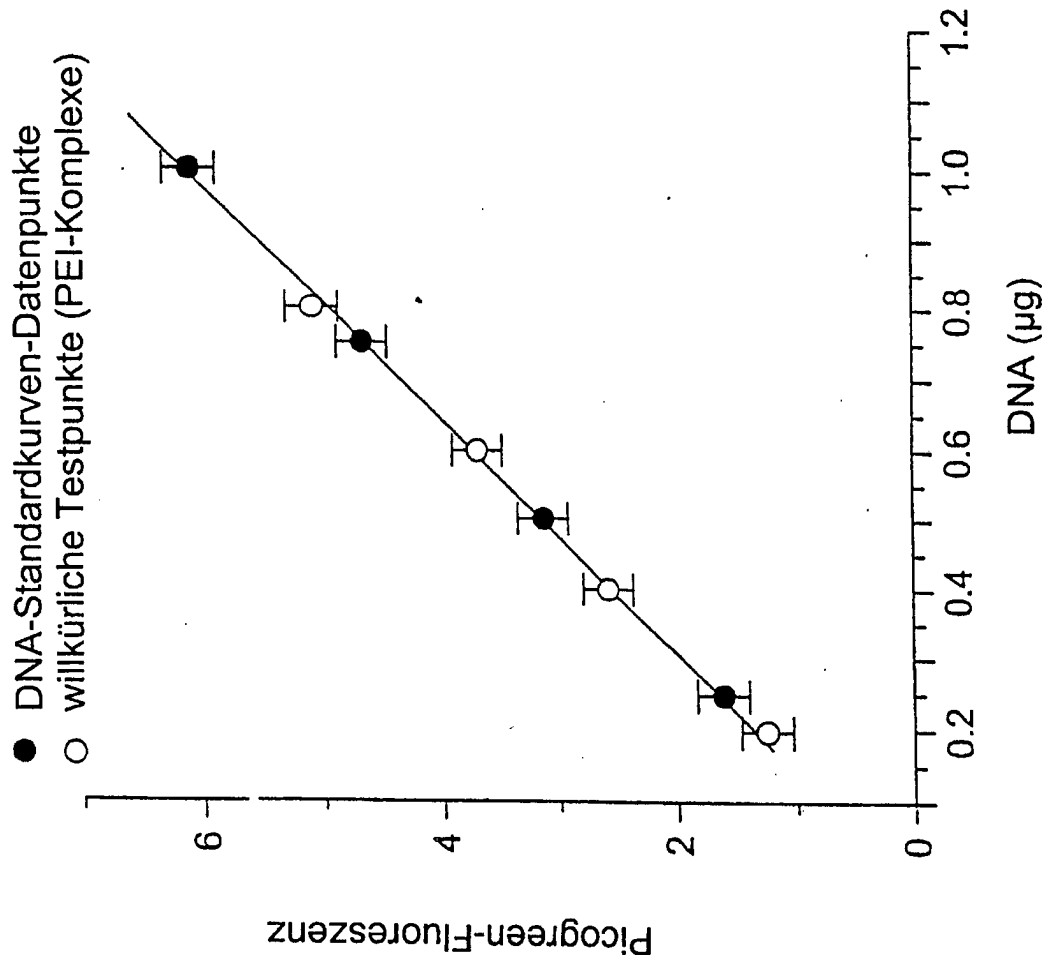


Fig. 5

Typischer zeitlicher Verlauf der Freisetzung von DNA aus PEI bei Zugabe von Dextransulfat

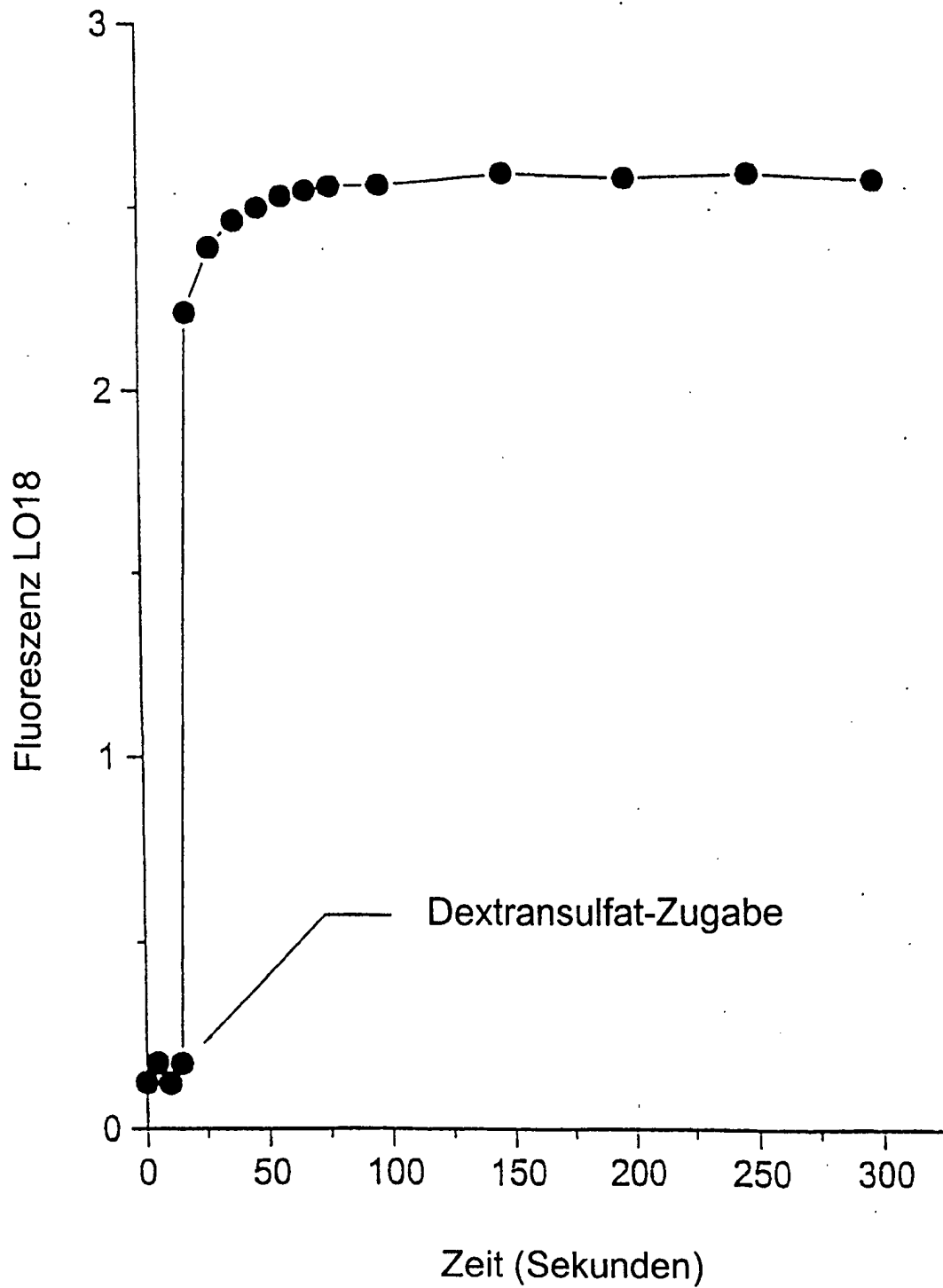
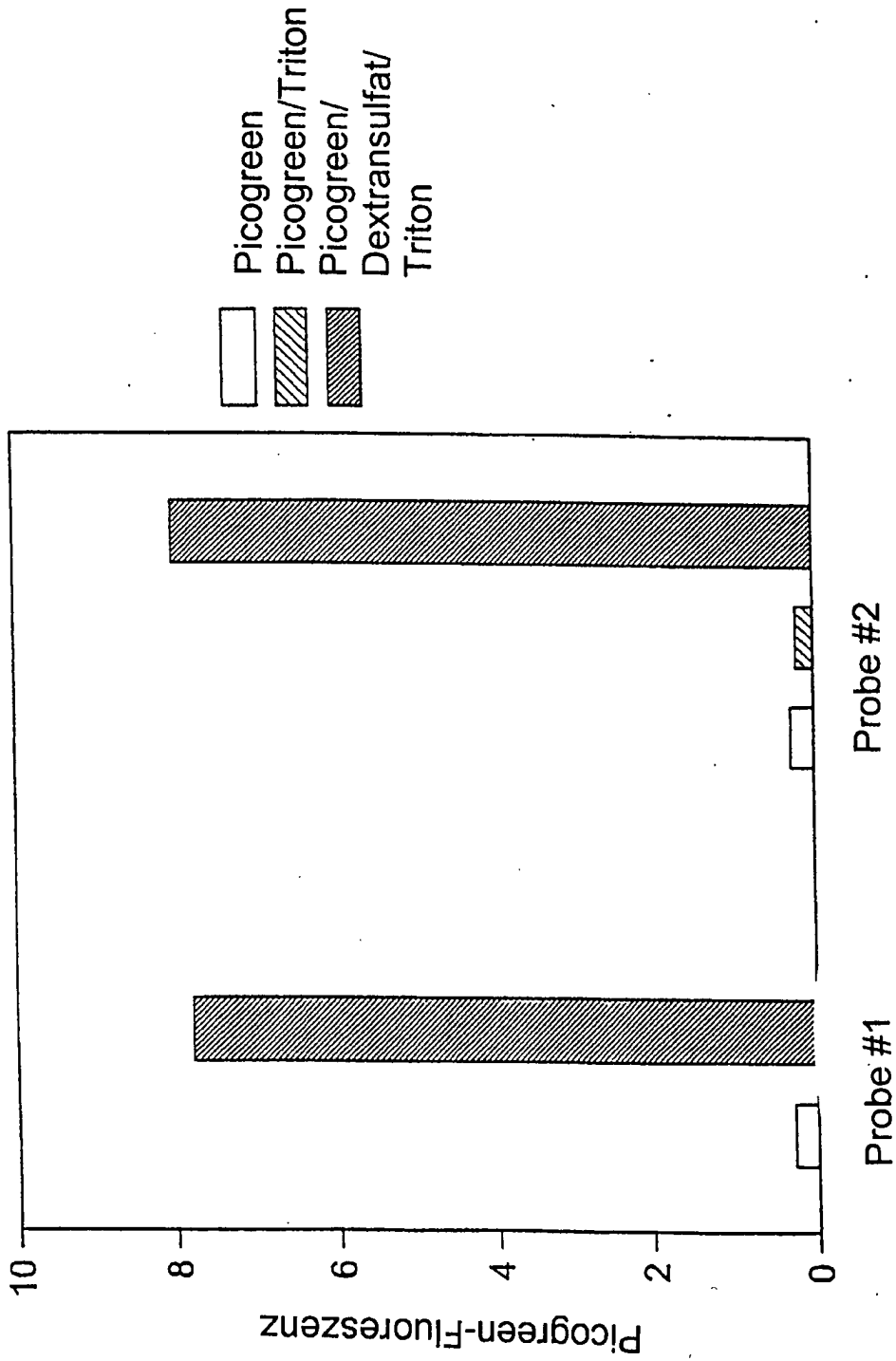


Fig. 6



PEI-kondensierte DNA-Komplexe

Fig. 7
Titration von DOPS zur Bestimmung des optimalen
Einkapselungswirkungsgrads

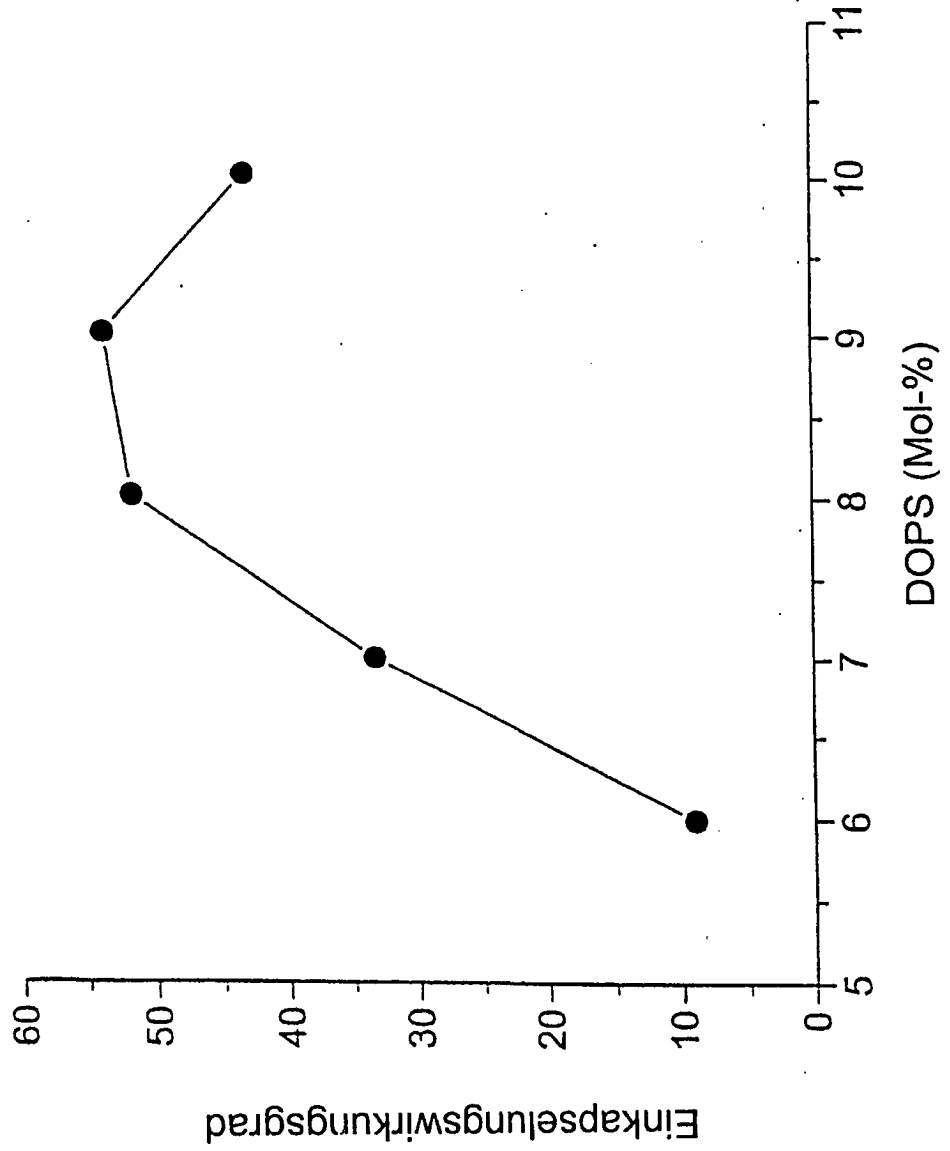


Fig. 8

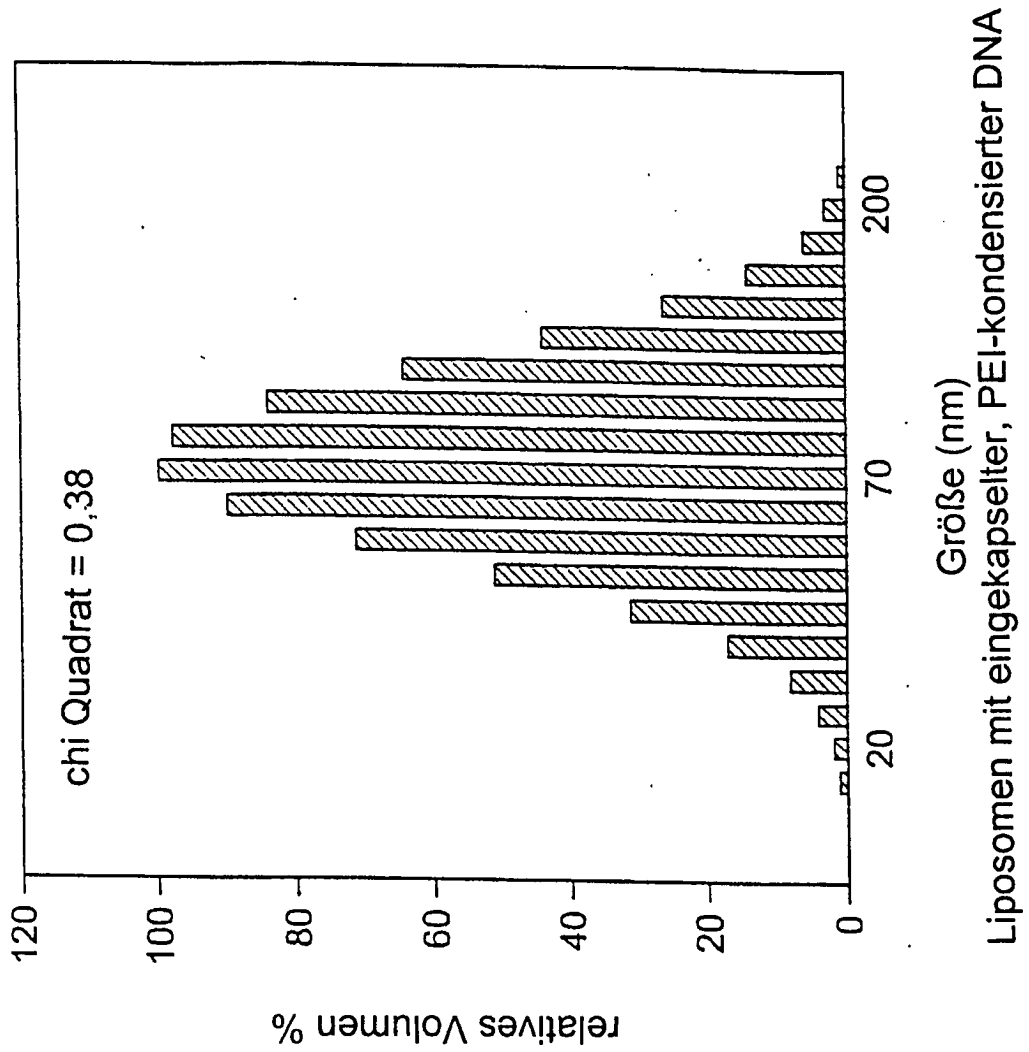


Fig. 9

Transfektion von COS-7-Zellen mit Liposomen mit eingekapselter DNA – Dosis-Reaktion und zeitlicher Verlauf

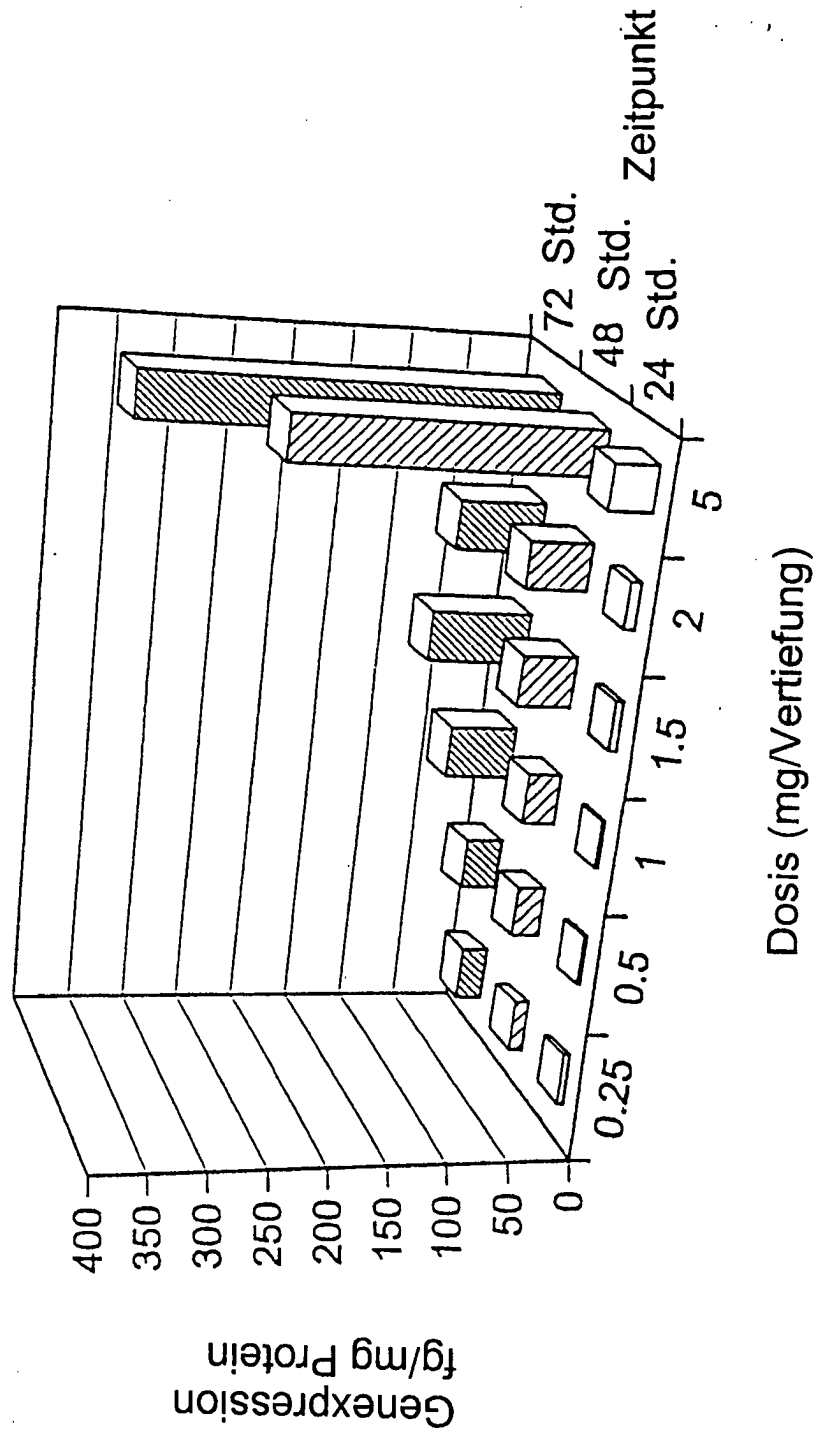


Fig. 10

Transfektion verschiedener Tumorzelllinien mit Liposomen mit eingekapselter DNA

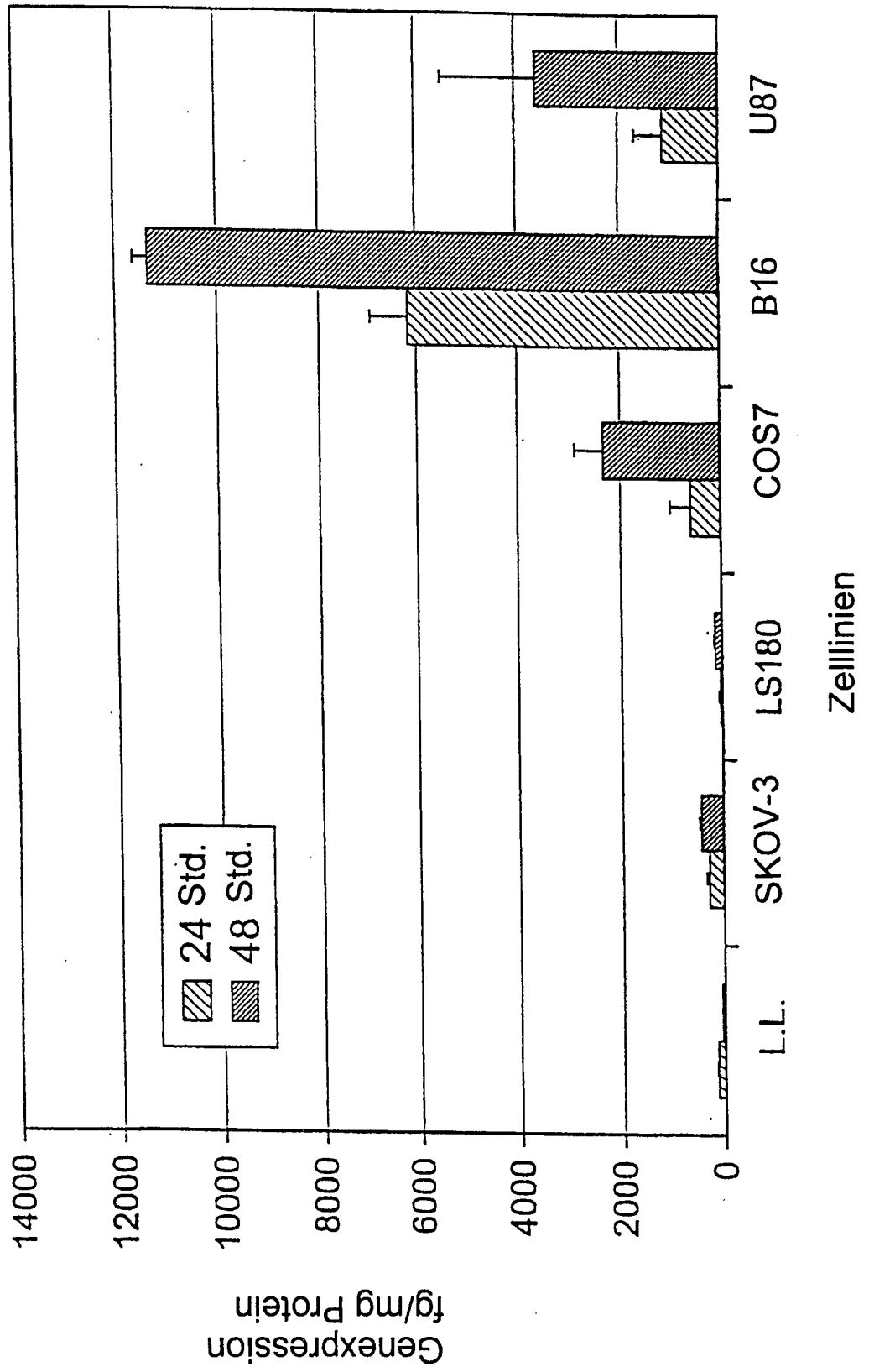


Fig. 11

in vitro-Toxizität von Liposomen mit eingekapselter, PEI-kondensierter DNA bei der Cos-7-Zelllinie

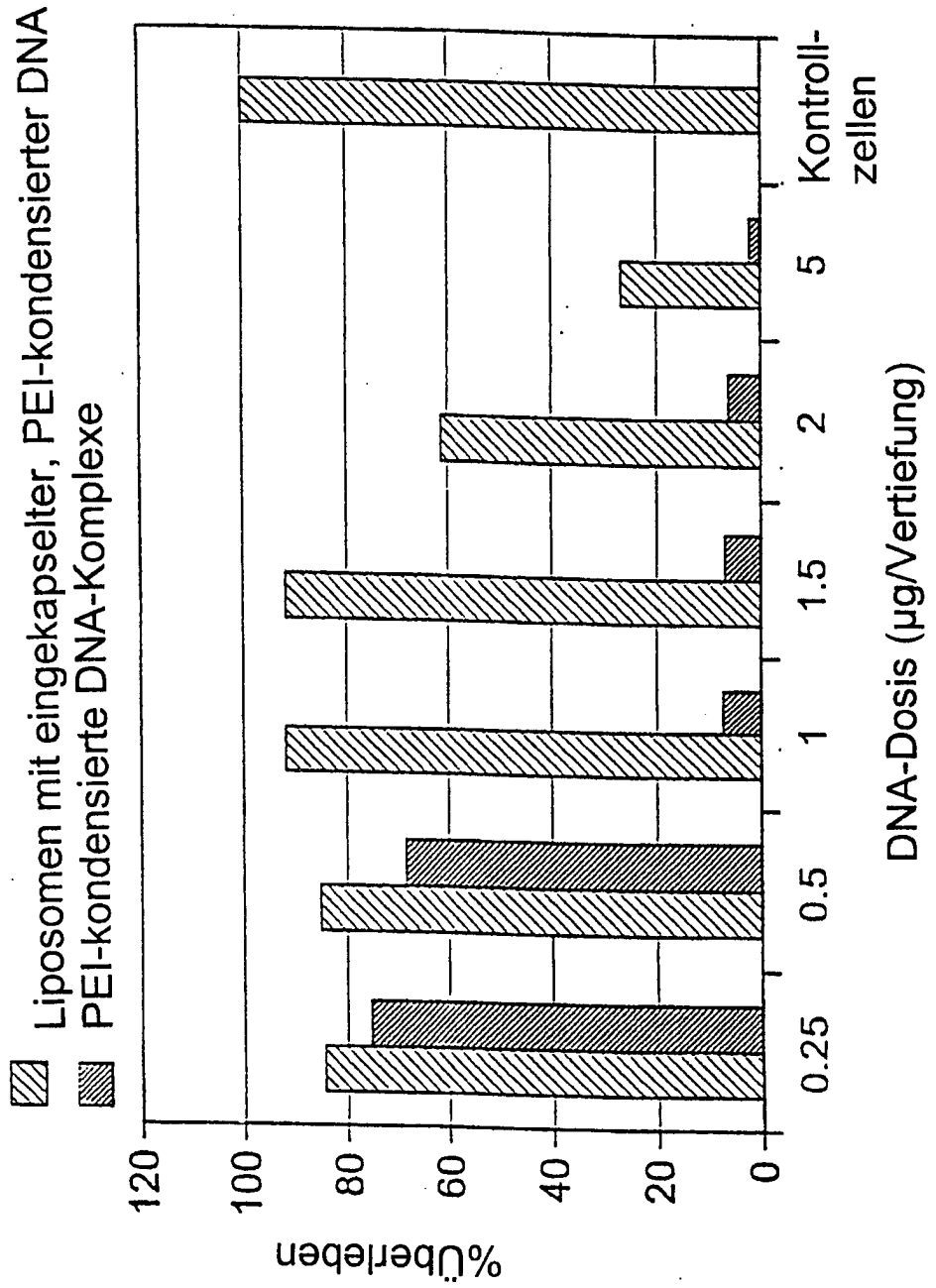


Fig. 12

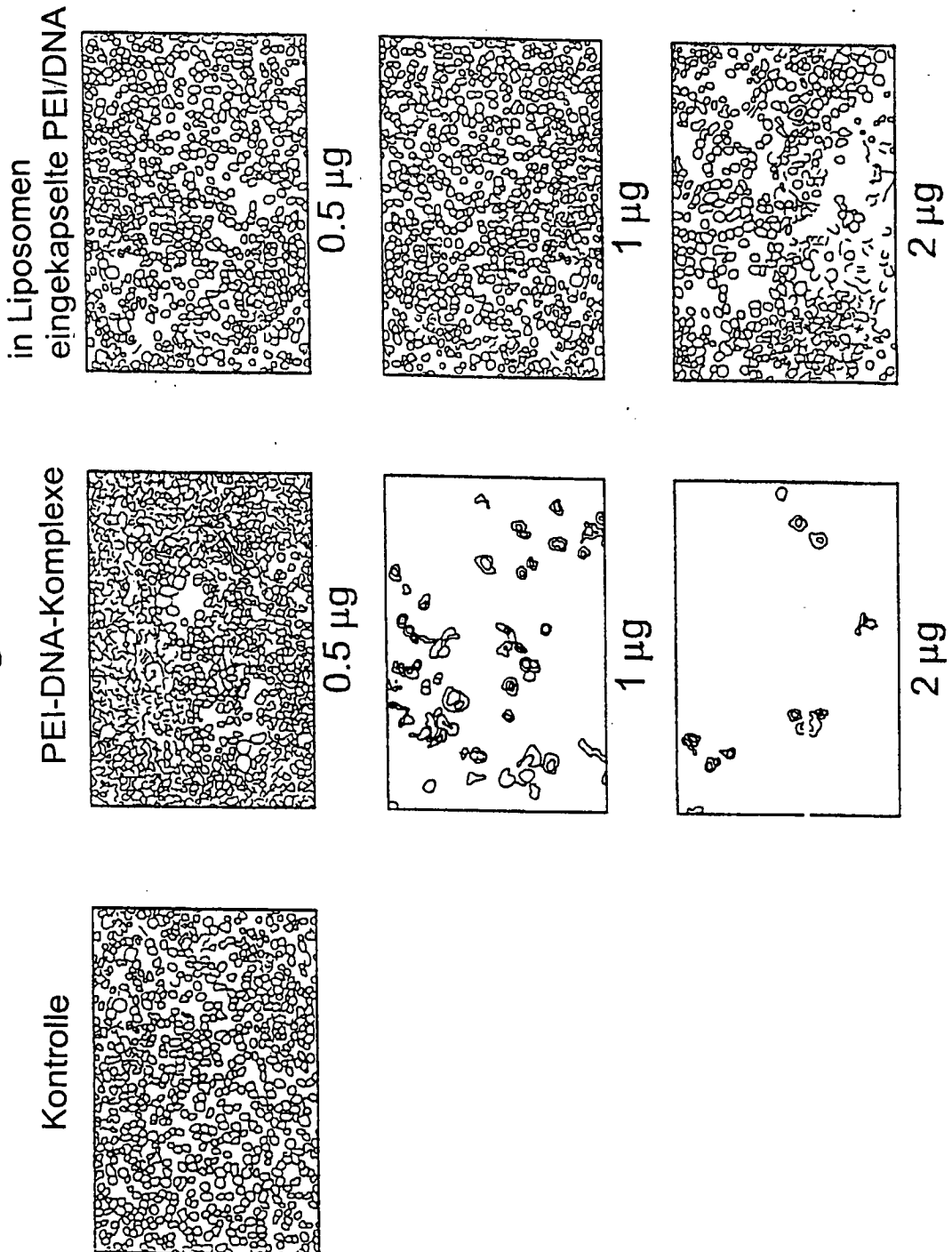
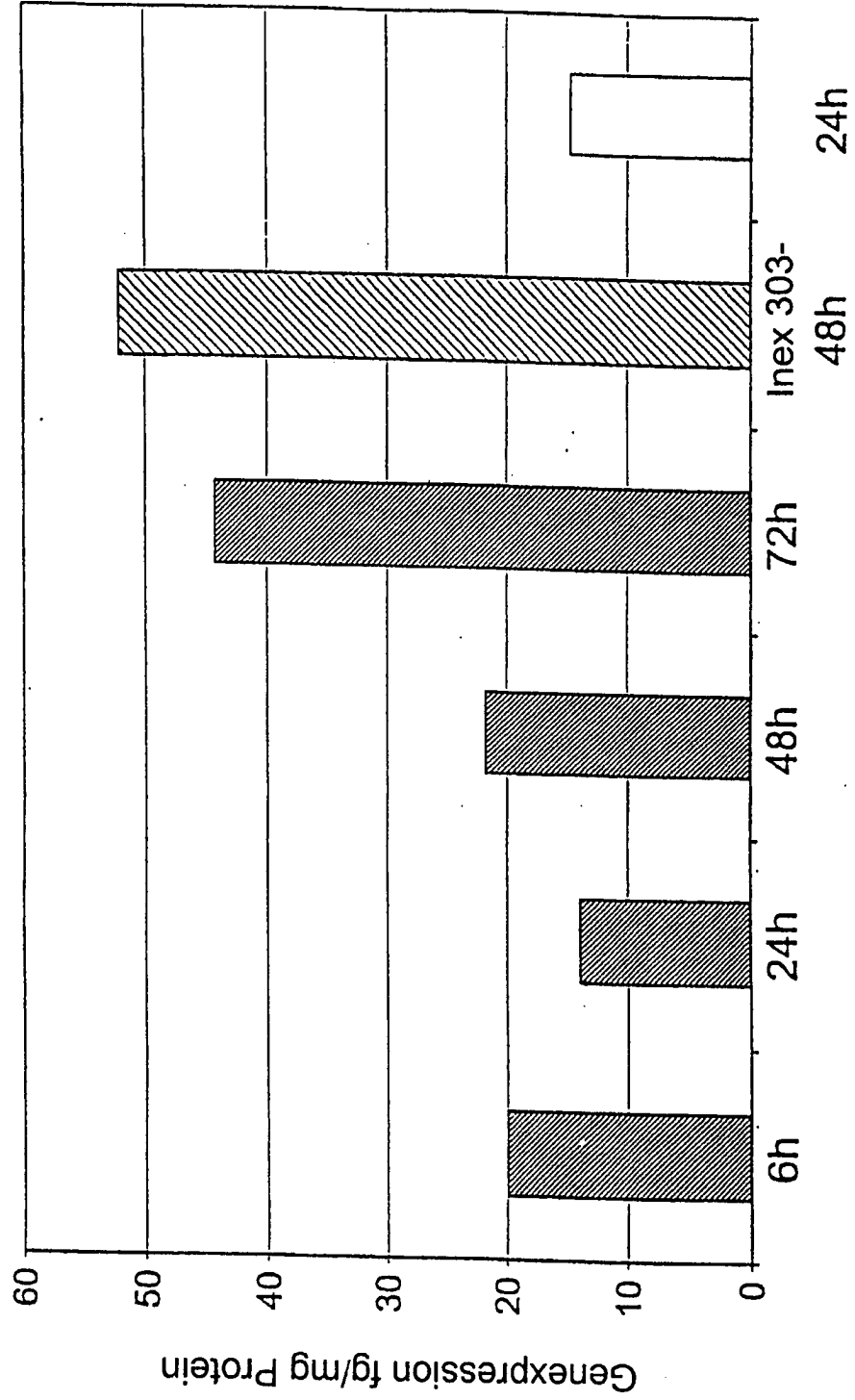


Fig. 13

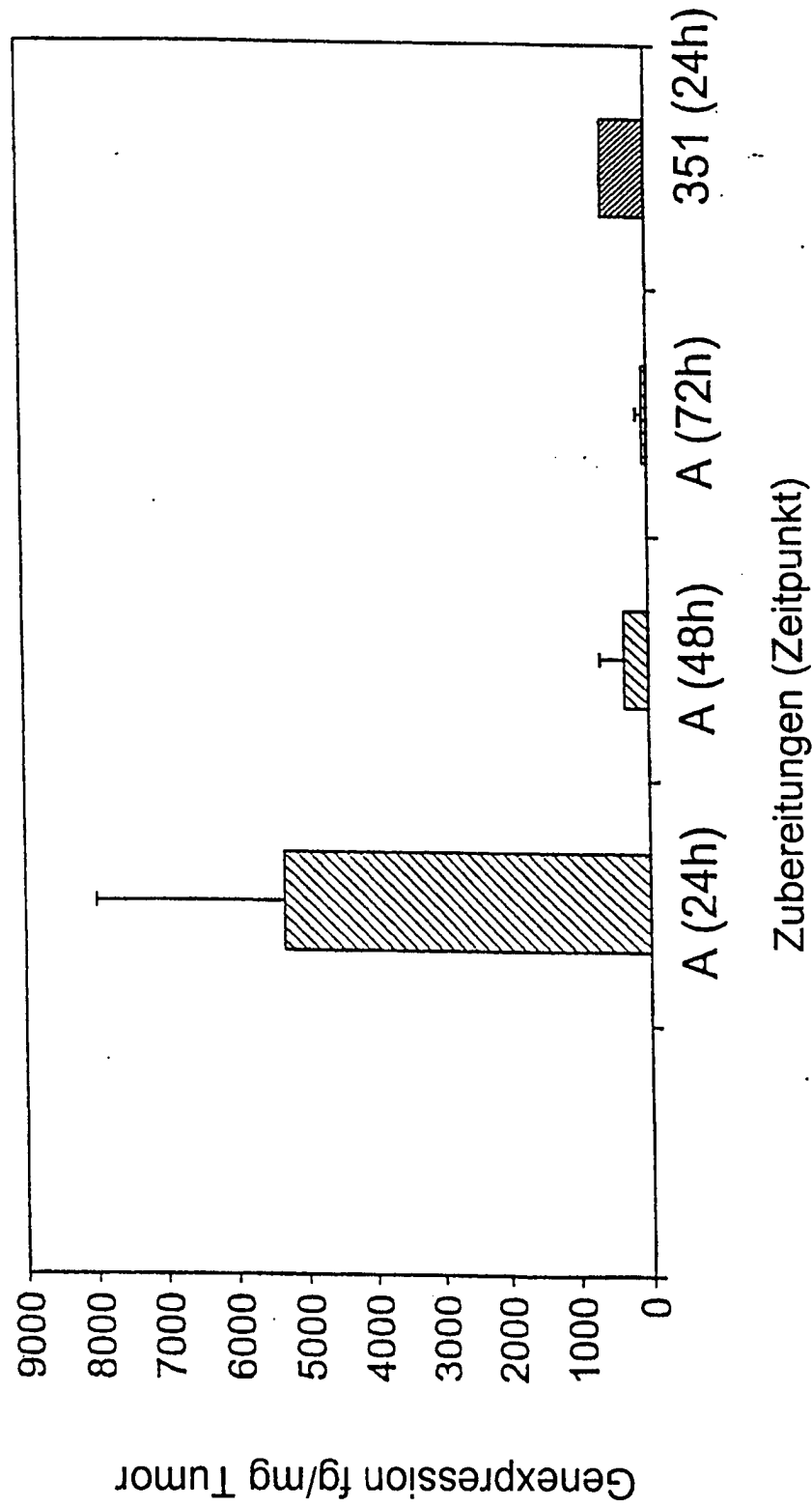
in vivo-Genexpression von Liposomen mit eingekapselter, PEI-kondensierter DNA bei Lewis-Lungentumor



Liposomen mit eingekapselter, PEI-kondensierter DNA

Fig. 14

Genexpression von eingekapselter, PEI-kondensierter DNA bei B16-i.p.-Tumor (i.p. Injektion)



A - Liposomen mit eingekapselter, PEI-kondensierter DNA
 INEX 351 – kationische Liposomen mit eingekapselter DNA, hohe Ladung

Fig. 15

