



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 14 133 T2 2005.02.03**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 223 916 B1**

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

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 14 133.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/27974**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 970 729.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/026629**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.10.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **19.04.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.07.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **22.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.02.2005**

(30) Unionspriorität:
158693 P 08.10.1999 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:
Alza Corp., Mountain View, Calif., US

(72) Erfinder:
**HUANG, Kun, Shi, Castro Valley, US; ZALIPSKY,
Samuel, Redwood City, US; ZHANG, Wei-Ming,
San Francisco, US; JIN, Bei, Union City, US;
QUINN, P., Yolanda, Daly City, US**

(74) Vertreter:
Berendt und Kollegen, 81667 München

(54) Bezeichnung: **Lipid zur Verwendung in einer Liposomzusammensetzung zur Abgabe eines Mittels an eine Zelle**

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

Technisches Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Lipid mit einer Einheit, die so auf den pH-Wert reagiert, dass das Lipid bei physiologischem pH-Wert praktisch neutral ist, und bei einem pH-Wert, der niedriger ist als der physiologische pH-Wert, überwiegend positiv geladen ist. Die Erfindung betrifft auch eine mit dem Lipid hergestellte Liposomzusammensetzung.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Abgabe von biologisch aktiven Materialien an Zellen ist eine wesentliche Komponente einer großen Anzahl von Therapien. Solche Therapien umfassen das Einführen eines Proteins mit einer notwendigen biologischen Aktivität in eine Zelle, die Abgabe eines Nukleinsäuremoleküls (d.h. DNA, RNA, cDNA) an eine Zelle (Gentherapie), Immunisieren eines Patienten gegen ein Fremdprotein (Impfung), Immunisieren eines Patienten gegen ein Fremdprotein durch Einführen eines Gens, das das Protein kodiert (Genimpfung) und Inhibieren der Bildung des Proteins in einer Zelle durch Einführen eines Nukleinsäuremoleküls in die Zelle, das Antisense, d.h. komplementär zu der mRNA, die das Protein kodiert, ist, oder durch anderweitiges Hemmen der mRNA, die das Protein kodiert.

[0003] Es gibt jedoch verschiedene Hindernisse bei der Abgabe solcher Mittel an eine Zelle, einschließlich der Tatsache, dass die Phospholipid-Doppelschicht, die die äußere Membran der meisten Zellen enthält, ein wahlloses Eindringen von Materialien in die Zelle verhindert. Veröffentlichte Ansätze, um Wirkstoffe in Zellen einzubringen, umfassen beispielsweise Mikroinjektion oder Elektroporation. Andere Ansätze umfassen virale Vektoren und chemisch vermitteltes Einbringen.

[0004] Ein anderer im Stand der Technik beschriebener Ansatz zur Abgabe von Wirkstoffen an Zellen ist die Abgabe auf Liposombasis. Insbesondere die Abgabe von genetischem Material an Zellen unter Verwendung von Liposomen wurde eingehend untersucht. Man weiß heute allgemein, dass Liposomvesikel durch Endozytose von Zellen aufgenommen werden und in den liposomalen Abbauweg eingehen. Es wurden daher einige Anstrengungen unternommen, Liposome herzustellen, bei denen ein Abbau vermieden wird. Ein Ansatz beinhaltete das Einschließen eines pH-empfindlichen Lipids, wie beispielsweise Palmitoylhomocystein, in das Liposom (Connor et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:1715 (1984); Chu und Szoka, J. Liposome Res., 4(1):361 (1994)). Solche pH-empfindlichen Lipide sind bei neutralem pH-Wert negativ geladen und werden in den Liposom-Lipid-Doppelschichten stabil eingebaut. Bei

schwach saurem pH-Wert (pH von weniger als 6,8) wird das Lipid neutral geladen und ändert seine Struktur in der Weise, dass die Liposom-Doppelschichten destabilisiert werden. Beim Einbringen des Lipids in ein Liposom, das von einem Endosom aufgenommen wurde, wo der pH-Wert bekanntermaßen zwischen etwa 5,0 und etwa 6,0 liegt, bewirkt es eine Destabilisierung und eine Freisetzung der Liposominhalte.

[0005] Die Verwendung von kationischen Lipiden, z.B. Derivate von Glycolipiden mit einer Kopfgruppe, die positiv geladene Ammonium- oder Sulfoniumionen enthält, zur Abgabe von negativ geladenen Biomolekülen, wie beispielsweise Oligonukleotiden und Genfragmenten als Komponenten einer Liposom-Lipid-Doppelschicht wurde auch vielfach veröffentlicht. Die positiv geladene Kopfgruppe des Lipids wechselwirkt mit der negativ geladenen Zelloberfläche, was den Kontakt und die Abgabe des Biomoleküls an die Zelle erleichtert.

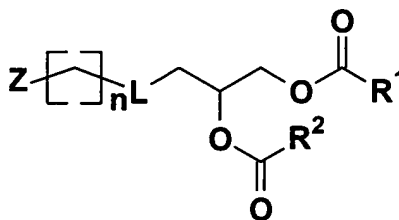
[0006] Trotz dieser Bemühungen fehlt im Stand der Technik die Abgabe von Biomolekülen, wie beispielsweise Oligonukleotiden und anderen Materialien, wie oben beschrieben, an Zellen. Die vorliegende Erfindung stellt Zusammensetzungen und Verfahren zur Verbesserung der Übertragung eines Mittels, wie beispielsweise einer Nukleinsäure, an Zellen zur Verfügung.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Die Erfindung stellt eine Liposomzusammensetzung zur Abgabe eines Mittels an eine Zelle zur Verfügung.

[0008] Die Erfindung stellt weiterhin ein Lipid zur Verwendung in einer Liposomzusammensetzung zur Abgabe eines Mittels an eine Zelle zur Verfügung.

[0009] In einem Aspekt umfasst die Erfindung eine Liposomzusammensetzung, die ein Lipid umfasst, das durch die folgende Formel dargestellt ist:



worin jedes R¹ und R² eine Alkyl- oder Alkenylkette mit etwa 8 bis 24 Kohlenstoffatomen ist, n = 1–20 ist; L ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus (i) -X-(C=O)-Y-, (ii) -X-(C=O)- und (iii) -X- besteht, worin X und Y unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Sauerstoff, NH und einer direkten Bindung; und Z eine Einheit ist, die einen pK von weniger als 7,4 und höher als etwa 4,0 hat, und eine Imidazoleinheit,

ein aromatisches Amin oder ein Aminozucker ist.

[0010] In einer speziellen Ausführungsform ist X NH und Y Sauerstoff. In anderen Ausführungsformen ist L eine Carbamatbindung (NH-(C=O)-O-CH₂), eine Esterbindung oder eine Carbonatbindung. In einer bevorzugten Ausführungsform ist Z ein Imidazol. Vorzugsweise sind R¹ und R² eine unverzweigte Alkyl- oder Alkenylkette mit etwa 8 bis 24 Kohlenstoffatomen, und in einer bevorzugten Ausführungsform sind R¹ und R² jeweils Stearylgruppen (C₁₇H₃₅). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist n 1–10.

[0011] In einer Ausführungsform umfassen die Liposome etwa 1 bis 80 Molprozent des Lipids der oben gezeigten Formel.

[0012] In einer anderen Ausführungsform ist Z eine Einheit mit einem pK-Wert von etwa 5,0 bis etwa 6,5.

[0013] In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Liposome mit dem durch die obige Formel dargestellten Lipid eine therapeutische Verbindung, die in den Liposomen eingeschlossen ist. In einer Ausführungsform ist das therapeutische Mittel eine Nukleinsäure, wie beispielsweise DNA, RNA oder Fragmente davon. Die Liposome können auch einen Liganden enthalten, um die Liposome zu einer Zielstelle zu leiten, wie beispielsweise einen Liganden, der eine Bindungsaffinität für endotheliale Tumorzellen hat und der durch solche Zellen internalisiert wird, wie beispielsweise E-Selectin, Her-2 und FGF.

[0014] In einer anderen Ausführungsform umfassen die Liposome etwa 5 bis etwa 20 Molprozent eines vesikelbildenden Lipids, das mit einer hydrophilen Polymerkette derivatisiert ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die hydrophile Polymerkette Polyethylenglycol (PEG).

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0015] Fig. 1 zeigt ein Syntheschema zur Herstellung eines Lipids mit einer Carbamatbindung und einer Imidazolgruppe Z;

[0016] Fig. 2A–2D zeigen Synthesereaktionsschemata zur Herstellung von pH-empfindlichen Lipiden;

[0017] Fig. 3A–3D zeigen verschiedene Strukturen von pH-empfindlichen Lipiden;

[0018] Fig. 4 ist ein Diagramm, welches das Zeta-Potenzial, in mV, als Funktion des Medium-pH-Werts von Liposomen zeigt, die mit dem Lipid der Erfindung (weiße Dreiecke), einem kationischen Lipid (schwarze Rauten) und einem neutralen Lipid (schwarze Quadrate) hergestellt wurden;

[0019] Fig. 5 ist eine mikrographische Darstellung

eines Gelelektrophorese-Assays von Liposomen, die mit dem pH-empfindlichen Lipid der Erfindung hergestellt wurden und DNA eingeschlossen haben, wobei die Liposome 30 Minuten lang DNase I ausgesetzt wurden (Spur 1); Liposomen, die mit dem pH-empfindlichen Lipid der Erfindung hergestellt wurden und eingeschlossenes DNA enthielten (Spur 2); DNA, die 30 Minuten lang DNase I ausgesetzt wurde (Spur 3); DNA (Spur 4); und 1 kB DNA-Leiter-Standard (Spur 5); und

[0020] Fig. 6A–6D sind Bilder von mikrographischen Darstellungen von menschlichen Lungentumorzellen in vitro nach Transfektion mit Liposomen, die mit dem pH-empfindlichen Lipid der Erfindung und einem Zielantikörper hergestellt wurden. Die Liposome enthalten ein eingeschlossenes Plasmid, das ein grünes Lumineszenzprotein kodiert, wobei Fig. 6A die transfizierten Zellen bei Beobachtung unter einem Fluoreszenzmikroskop zeigt, und Fig. 6B die transfizierten Zellen bei Beobachtung unter einem Lichtmikroskop zeigt. Fig. 6C–6D sind mikrographische Darstellungen der Zellen nach Transfektion mit ähnlichen Liposomen, die nicht den Zielantikörper enthalten, wobei die Zellen nach Inkubation mit den Liposomen unter dem Fluoreszenzmikroskop in Fig. 6C und unter dem Lichtmikroskop in Fig. 6D gezeigt sind.

Genaue Beschreibung der Erfindung

[0021] I. Bei der Beschreibung der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Begriffe gemäß den nachstehend aufgeführten Definitionen verwendet.

[0022] "Nukleinsäure", wie hier verwendet, bezeichnet eine lineare polymere Form von Nukleotiden beliebiger Länge, entweder Ribonukleotide oder Desoxynukleotide, und umfasst sowohl doppel- als auch einzelsträngige DNA und RNA. Eine Nukleinsäure kann sowohl kodierende als auch nicht-kodierende Regionen umfassen, und kann direkt aus einer natürlichen Quelle (z.B. einem Mikroorganismus) erhalten werden, oder mit Hilfe von rekombinanten oder synthetischen Techniken hergestellt werden. Ein Nukleinsäuremolekül kann einem Nukleinsäurefragment äquivalent sein, oder es kann ein Nukleinsäurefragment zusätzlich zu einem oder mehreren anderen Nukleotiden, Oligonukleotiden oder Polynukleotiden sein. Beispielsweise kann das Nukleinsäuremolekül der Erfindung ein Vektor oder Plasmid sein, wie beispielsweise ein Expressions- oder Kloniervektor oder Plasmid.

[0023] Wie hier verwendet, ist ein "neutrales" Lipid ungeladen, d.h. es hat keinen ionischen Charakter.

[0024] Ein "geladenes" Lipid hat eine positive oder negative Ladung, d.h. es hat einen ionischen Charakter.

[0025] Ein "vesikelbildendes" Lipid bezeichnet ein amphipathisches Lipid, das hydrophobe und polare Kopfgruppeneinheiten enthält, und welches spontan in Wasser Doppelschichtvesikel bilden kann, beispielsweise ein Phospholipid, oder das in Lipid-Doppelschichten stabil eingebaut werden kann, wobei die hydrophobe Einheit mit der inneren hydrophoben Region der Doppelschichtmembran in Kontakt steht und die polare Kopfgruppeneinheit gegen die äußere polare Oberfläche der Membran gerichtet ist. Das vesikelbildende Lipid dieses Typs umfasst üblicherweise eine oder zwei hydrophobe Acylkohlenwasserstoffketten oder eine Steroidgruppe und kann eine chemisch reaktive Gruppe, wie beispielsweise ein Amin, eine Säure, einen Ester, einen Aldehyd oder einen Alkohol an der polaren Kopfgruppe enthalten. Zu dieser Klasse gehören die Phospholipide, wie beispielsweise Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylinosit (PI) und Sphingomyelin (SM), worin die zwei Kohlenwasserstoffketten üblicherweise etwa 14 bis 22 Kohlenstoffatome lang sind und verschiedene Grade an Ungesättigtheit aufweisen. Unter den Begriff "vesikelbildendes Lipid" fällt auch ein Glycolipid, wie beispielsweise ein Cerebrosid und ein Gangliosid, sowie ein Sterin, wie beispielsweise Cholesterin.

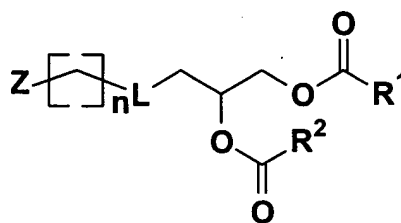
[0026] "Alkyl" bezeichnet ein vollständig gesättigtes, einwertiges Radikal, das Kohlenstoff und Wasserstoff enthält und verzweigt oder geradkettig sein kann. Beispiele für Alkylgruppen sind Methyl, Ethyl, n-Butyl, t-Butyl, n-Heptyl und Isopropyl. "Niederes Alkyl" bezeichnet ein Alkylradikal mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, wie beispielsweise Methyl, Ethyl, n-Butyl, i-Butyl, t-Butyl, Isoamyl, n-Pentyl und Isopentyl.

[0027] "Alkenyl" bezeichnet ein einwertiges Radikal, das Kohlenstoff und Wasserstoff enthält und verzweigt oder geradkettig sein kann und eine oder mehrere Doppelbindungen enthält.

[0028] Abkürzungen: PEG: Polyethylenglycol; mPEG: Methoxy-terminiertes Polyethylenglycol; Chol: Cholesterin; PC: Phosphatidylcholin; PHPC: partiell hydriertes Phosphatidylcholin; PHEPC: partiell hydriertes Ei-Phosphatidylcholin; HSPEC: hydriertes Soja-Phosphatidylcholin; DSPE: Distearoylphosphatidylethanolamin; APD: 1-Amino-2,3-propandiol; DTPA: Diethylentetramin-pentaessigsäure; BN: Benzyl.

II. Kationisch-neutrales Lipid

[0029] In einem Aspekt umfasst die Erfindung Lipide, die durch die nachstehend gezeigte Struktur dargestellt sind:



worin jedes R^1 und R^2 eine Alkyl- oder Alkenylkette mit etwa 8 bis 24 Kohlenstoffatomen ist; $n = 1-20$ und in einer bevorzugten Ausführungsform $1-10$ ist; L ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus (i) $-X-(C=O)-Y-$, (ii) $-X-(C=O)-$ und (iii) $-X-$ besteht, worin X und Y unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Sauerstoff, NH und einer direkten Bindung; und Z eine Einheit ist, die einen pK-Wert von weniger als etwa 7,4 und höher als etwa 4,0 hat, und eine Imidazoleinheit, ein aromatisches Amin oder ein Aminozucker ist.

[0030] Die schwach basische Einheit Z führt zu einem Lipid, das bei einem physiologischen pH-Wert von etwa 7,4 überwiegend, beispielsweise in einer Menge von mindestens 50%, neutral geladen ist, aber bei einem ausgewählten oder genauer bezeichneten pH-Wert einen Wert von weniger als dem physiologischen pH-Wert hat und leicht eine positive Ladung hat. In einer Ausführungsform ist Z beispielsweise eine Imidazoleinheit, die einen pK-Wert von etwa 6,0 hat. Bei einem physiologischem pH-Wert von 7,4 ist diese Einheit überwiegend neutral, aber bei pH-Werten von weniger als 6,0 wird die Einheit überwiegend positiv geladen. Wie nachstehend erläutert, wurde ein Lipid mit einer Imidazoleinheit hergestellt und zur Herstellung von Liposomen verwendet.

[0031] In einer anderen Ausführungsform ist Z eine Einheit mit einem pK-Wert von etwa 4,5 bis etwa 7,0, noch bevorzugter etwa 4,8 bis etwa 6,5, und am bevorzugtesten etwa 5,0 bis etwa 6,0.

[0032] Die Lipide der Erfindung umfassen eine neutrale Verknüpfung L, die die Z-Einheit mit dem Schwanzteil des Lipids verbindet. Die Verknüpfung L kann variieren, ist aber in einer Ausführungsform ausgewählt aus einem Carbamat, einem Ester, einem Amid, einem Carbonat, einem Harnstoff, einem Amin und einem Ether. In einem bevorzugt hergestellten Lipid wird eine Carbamat-Verknüpfung verwendet, worin $L -X-(C=O)-Y-$, X NH und Y Sauerstoff ist.

[0033] R^1 und R^2 im Schwanzteil des Lipids sind gleich oder verschieden. R^1 und R^2 können unverzweigte Alkyl- oder Alkenylketten mit etwa 8 bis 24 Kohlenstoffatomen sein. Vorzugsweise sind die R^1 - und R^2 -Gruppen etwa 12 bis etwa 22 Kohlenstoffatome lang, wobei $R^1 = R^2 = C_{17}H_{35}$ (so dass die Gruppe eine Stearylgruppe ist) und $R^1 = R^2 = C_{17}H_{33}$ (so dass die Gruppe eine Oleoylgruppe ist) bevorzugt sind.

[0034] Das Lipid der Erfindung kann unter Verwendung von Standard-Syntheseverfahren hergestellt werden. Es wurde ein Lipid mit der oben gezeigten Struktur hergestellt, worin Z ein Imidazol, N = 2, L ein Carbamat und $R^1 = R^2 = C_{17}H_{35}$ ist. Ein Reaktionsschema zur Herstellung dieses Lipids ist in **Fig. 1** gezeigt. Genaue Einzelheiten der Synthese sind auch in Beispiel 1 angegeben. Kurz gesagt, wird das para-Nitrophenylcarbonat des 1,2-Distearoylglycerins (Verbindung III) aus 1,2-Distearoylsn-glycerin (Verbindung I) und para-Nitrophenylchlorformiat (Verbindung II) hergestellt, und mit Histamin (Verbindung IV) umgesetzt, um ein Lipid zu erhalten (Verbindung VI), das eine Imidazoleinheit aufweist, die über eine Carbamatverknüpfung mit einem Distearoylschwanz verbunden ist. Unter Verwendung von Glycerin anstelle von 1-Amino-2,3-propandiol kann eine ähnliche Synthese auch verwendet werden, um ein carbonat-verknüpftes Produkt (L = $-O-(C=O)-O-CH_2-$ oder $-O-(C=O)-CH_2-$) zu erhalten.

[0035] Gemäß der Vorschrift und den hier enthaltenen Beispielen können Fachleute auf dem Gebiet leicht eine andere Synthese eines Lipids mit anderen Verknüpfungen durchführen. Andere Verknüpfungen umfassen beispielsweise Ether-(L = $O-CH_2-$) und Esterverknüpfungen (L = $-O-(C=O)-$), sowie Harnstoff-, Amid- und Aminverknüpfungen (d.h. in denen L = $-NH-(C=O)-NH-$, $-NH-(C=O)-$ oder $-NH-$ ist). Eine Ketoverknüpfung, worin X eine direkte Verbindung ist, kann auch hergestellt werden. Die **Fig. 2A–2B** veranschaulichen die Herstellung eines amino-verknüpften Lipids (**Fig. 2A**) bzw. eines Lipids mit einer NH-enthaltenden Verknüpfung (**Fig. 2B**). In **Fig. 2A** wird das endständige Amin von Histamin mit Glycidylchlorid umgesetzt, das erhaltene Epoxid hydrolysiert und das erhaltene Diol acyliert.

[0036] In **Fig. 2B** wird ein Lipid mit einer NH-enthaltenden Verknüpfung hergestellt, indem beispielsweise Histamin mit einem aktivierten Derivat von Glycerinsäureacetonid (2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-carbonsäure) oder dem 4-Kohlenstoffhomologen, 2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-essigsäure umgesetzt wird. Das Diol wird anschließend entschützt und acyliert.

[0037] Die **Fig. 2C** und **2D** zeigen weitere Reaktionsschemata zur Herstellung von pH-empfindlichen Lipiden gemäß der vorliegenden Erfindung.

[0038] Die **Fig. 3A–3D** zeigen verschiedene Strukturen von pH-empfindlichen Lipiden, worin die **Fig. 3A–3B** Lipide mit einem aromatischen Amin als "Z"-Einheit zeigen. Die **Fig. 3C–3D** zeigen Lipide, bei denen ein Aminozucker mit einem Lipid verbunden ist.

III. Liposomzusammensetzung

A. Liposomkomponenten

[0039] Liposome, die das oben beschriebene Lipid enthalten, können nach zahlreichen Verfahren hergestellt werden, wie beispielsweise denen, die in Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9:467 (1980) beschrieben sind, und spezielle Beispiele für hergestellte Liposome sind nachstehend genau beschrieben. Die Liposome sind üblicherweise multilamellare Vesikel (MLVs), die durch einfache Lipidfilm-Hydratisierungsverfahren hergestellt werden können. In diesem Verfahren wird ein Gemisch aus liposombildenden Lipiden des nachstehend erläuterten Typs in einem geeigneten organischen Lösungsmittel aufgelöst, welches dann in einem Behälter verdampft wird, um einen dünnen Film zu bilden. Der Lipidfilm wird anschließend mit einem wässrigen Medium bedeckt, wobei er unter Bildung von MLVs hydratisiert, die üblicherweise Abmessungen von etwa 0,1 bis etwa 10 μm haben.

[0040] Liposome, die in der vorliegenden Erfindung hergestellt wurden, umfassen beispielsweise Liposome mit etwa 1 bis etwa 80 Molprozent des Lipids und der oben gezeigten Struktur. In bevorzugten Ausführungsformen umfassen die Liposome etwa 5 bis etwa 50 Molprozent des Lipids. Der Rest der Liposom-Lipidbestandteile kann weiterhin beispielsweise eine Vielzahl vesikelbildender Lipide umfassen, d.h. Lipide, die in Wasser spontan Doppelschichtvesikel bilden, wie beispielsweise die Phospholipide. Die vesikelbildenden Lipide dieses Typs sind vorzugsweise solche, die zwei Kohlenwasserstoffketten, üblicherweise Acylketten, haben, sowie eine Kopfgruppe, die entweder polar oder unpolar sein kann. Es gibt eine Vielzahl von synthetischen, vesikelbildenden Lipiden und natürlich vorkommenden vesikelbildenden Lipiden, einschließlich den Phospholipiden, wie beispielsweise Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylserin, Phosphatidsäure, Phosphatidylinosit und Sphingomyelin, in denen die zwei Kohlenwasserstoffketten üblicherweise etwa 12 bis etwa 22 Kohlenstoffatome lang sind und verschiedene Grade an Ungesättigtheit aufweisen.

[0041] Die Liposome können weiterhin ein Lipid, das stabil in die Liposom-Lipid-Doppelschicht eingebaut ist, wie beispielsweise Diacylglycerine, Lyso-Phospholipide, Fettsäuren, Glycolipide, Cerebroside und Sterine, wie beispielsweise Cholesterin.

[0042] In einer Ausführungsform umfassen die Liposome der Erfindung eine Oberflächenbeschichtung aus einer hydrophilen Polymerkette. "Oberflächenbeschichtung", wie hier verwendet, bezeichnet die Beschichtung der Oberfläche von Liposomen mit einem

hydrophilen Polymer. Das hydrophile Polymer wird in die Liposome eingebracht, indem ein oder mehrere vesikelbildenden Lipide, die mit einer hydrophilen Polymerkette derivatisiert sind, in eine Liposomzusammensetzung eingebracht werden.

[0043] Liposome mit einer solchen Beschichtung sind aus dem Stand der Technik bekannt und wurden beispielsweise im US-Patent Nr. 5 013 556 beschrieben. Die Oberflächenbeschichtung aus hydrophilen Polymerketten bewirkt eine effektive Erhöhung der in vivo-Blutzirkulations-Lebensdauer der Liposome im Vergleich zu Liposomen, denen eine solche Beschichtung fehlt.

[0044] Vesikelbildende Lipide, die sich zur Derivatisierung mit einem hydrophilen Polymer eignen, umfassen beispielsweise alle oben aufgeführten Lipide, und insbesondere Phospholipide, wie beispielsweise Distearoylphosphatidylethanolamin (DSPE).

[0045] Hydrophile Polymere, die sich zur Derivatisierung mit einem vesikelbildenden Lipid eignen, umfassen beispielsweise Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylmethylether, Polymethyloxazolin, Polyethyloxazolin, Polyhydroxypropyloxazolin, Polyhydroxypropylmethacrylamid, Polymethacrylamid, Polydimethylacrylamid, Polyhydroxypropylmethacrylat, Polyhydroxyethylacrylat, Hydroxymethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Polyethylenglycol, Polyaspartamid und hydrophile Peptidsequenzen. Diese Polymere können als Homopolymere oder als Blockcopolymere oder statistische Copolymere verwendet werden.

[0046] Eine bevorzugte hydrophile Polymerkette ist Polyethylenglycol (PEG), vorzugsweise mit einer Molmasse von etwa 500 bis etwa 10000 Dalton, und noch bevorzugter etwa 1000 bis etwa 5000 Dalton. Methoxy- oder ethoxy-überkappte Analoge von PEG sind auch bevorzugte hydrophile Polymere. Diese Polymere sind in einer Vielzahl von Polymergrößen, beispielsweise etwa 120 bis etwa 20000 Dalton, kommerziell erhältlich.

[0047] Die Herstellung von vesikelbildenden Lipiden, die mit hydrophilen Polymeren derivatisiert sind, wurde beispielsweise im US-Patent Nr. 5 395 619 und bei Zalipsky STEALTH LIPOSOMES, (D. Lasic und F. Martin, Herausg., CRC Press, Kapitel 9 (1995)) beschrieben.

[0048] Liposome mit einer solchen Beschichtung enthalten vorzugsweise etwa 1 bis 20 Molprozent des derivatisierten Lipids, zusammen mit den restlichen liposombildenden Komponenten, z.B. vesikelbildenden Lipiden. Beispielhafte Verfahren zur Herstellung derivatisierter Lipide und zur Bildung polymerbeschichteter Liposome wurden in den US-Patenten Nr. 5 013 556, 5 631 018 und 5 395 619 beschrieben, die in gemeinschaftlichem Besitz sind. Das hydrophile

Polymer kann stabil an das Lipid gebunden werden, oder durch eine instabile Verbindung gebunden sein, die es ermöglicht, dass die beschichteten Liposome die Beschichtung aus Polymerketten abwerten, wenn sie im Blutkreislauf zirkulieren, oder als Reaktion auf einen Reiz.

[0049] Die Liposome können auch ein eingeschlossenes Mittel enthalten, wobei der Begriff "eingeschlossen" die Einkapselung eines Mittels in den wässrigen Kern und die wässrigen Zwischenräume der Liposome, sowie auch den Einschluss eines Mittels in der Lipid-Doppelschicht oder den Lipid-Doppelschichten der Liposome umfasst.

[0050] Mittel, die in der Zusammensetzung der Erfindung verwendbar sind, sind sehr vielfältig und umfassen beispielsweise Mittel für therapeutische Anwendungen sowie auch diagnostische Anwendungen. Das ausgewählte therapeutische oder diagnostische Mittel kann nach Standardverfahren in die Liposome eingebracht werden, einschließlich: (i) passives Einschließen einer wasserlöslichen Verbindung durch Hydratisieren eines Lipidfilms mit einer wässrigen Lösung des Mittels; (ii) passives Einschließen einer lipophilen Verbindung durch Hydratisieren eines Lipidfilms, das das Mittel enthält; und (iii) Beladen mit einem ionisierbaren Medikament gegen einen pH-Gradienten von der Innenseite zur Außenseite der Liposome. Andere geeignete Verfahren umfassen die Liposomherstellung durch Reversphasenverdampfung.

[0051] In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Liposome eine Nukleinsäure, ausgewählt aus einer Vielzahl von DNA- und RNA-basierten Nukleinsäuren, einschließlich Fragmenten, d.h. Abschnitten, Mutationen und deren Analogen. Eine Vielzahl von Genen zur Behandlung verschiedenartiger Zustände wurde im Stand der Technik beschrieben, und Kodierungssequenzen und/oder ORFs für spezifische Gene von Interesse können leicht aus DNA-Datenbanken, wie beispielsweise Gen-Bank oder EMBL, erhalten werden. Beispielsweise wurden Polynukleotide zur Behandlung von viralen, bösartigen und entzündlichen Erkrankungen und Zuständen, wie beispielsweise zystischer Fibrose, Adenosindeaminasemangel und AIDS, beschrieben. Die Behandlung von Krebs durch Verabreichung von Tumorsuppressorgenen, wie beispielsweise APC, DPC4, NF-1, NF-2, MTS1, RB, p53, WT1, BRCA1, BRCA2 und VHL wird erwogen.

[0052] Beispiele für spezielle Nukleinsäuren zur Behandlung eines speziellen Zustands umfassen beispielsweise: HLA-B7 bei Tumoren, kolorektalem Karzinom, Melanom; IL-2 bei Krebsarten, speziell Brustkrebs, Lungenkrebs und Tumoren; IL-4 bei Krebs; TNF bei Krebs; IGF-1-Antisense bei Gehirntumoren; IFN bei Neuroblastom; GM-CSF bei Nierenzellkarzi-

nomen; MDR-1 bei Krebs, insbesondere bei fortgeschrittenem Krebs, Brust- und Eierstockkrebsarten; und HSV-Thymidinkinase bei Gehirntumoren, Kopf- und Halstumoren, Mesotheliomen und Eierstockkrebs.

[0053] Nukleinsäuren der Erfindung können "Antisense"-Nukleinsäuren sein, zusammengesetzt aus Sequenzen, die zu ihrem Ziel komplementär sind, üblicherweise einer Messenger-RNA (mRNA) oder einem mRNA-Vorläufer. Die mRNA enthält üblicherweise genetische Information in der funktionellen oder Sense-Orientierung, und die Bindung des Antisense-Polynukleotids kann die beabsichtigte mRNA unwirksam machen und die Translation zu einem Protein verhindern. Solche Antisense-Nukleinsäuren werden auf der Grundlage von biochemischen Experimenten bestimmt, die zeigen, dass Proteine aus spezifischen RNAs übertragen werden. Wenn die Sequenz der RNA einmal bekannt ist, kann eine Antisense-Nukleinsäure, die an die RNA bindet, durch komplementäre Watson-Crick-Basenpaare konstruiert werden. Solche Antisense-Nukleinsäuren enthalten üblicherweise etwa 10 bis 40 Basenpaare, noch bevorzugter etwa 10 bis 25 Basenpaare, und am bevorzugtesten etwa 15 bis 20 Basenpaare.

[0054] Die Antisense-Nukleinsäure kann für verbesserte Widerstandsfähigkeit gegenüber Nukleasehydrolyse modifiziert werden. Solche Analogen umfassen beispielsweise Phosphothioat-, Methylphosphonat-, Phosphodiester- und p-Ethoxyoligonukleotide (siehe beispielsweise WO 97/07784). Das eingeschlossene Mittel kann also ein Ribozym oder katalytische RNA sein.

[0055] Die Nukleinsäure kann auch in ein Plasmid oder einen Vektor eingeführt werden, vorzugsweise ein kreisförmiges oder geschlossenes doppelsträngiges Molekül mit bevorzugten Größen im Bereich von 5–40 Kbp (Kilo-Basenpaare). Solche Plasmide oder Vektoren werden nach gut bekannten Verfahren konstruiert und umfassen eine therapeutische Nukleinsäure oder ein Gen, d.h. das Gen oder die Nukleinsäure, die bei der Genterapie exprimiert werden sollen, unter der Kontrolle eines geeigneten Promoters und Verstärkers, sowie andere Elemente, die für die Replikation innerhalb der Wirtszelle und/oder die Integration in das Wirts-Zellgenom notwendig sind. Verfahren zur Herstellung von Plasmiden und Vektoren, die für die Genterapie nützlich sind, sind gut bekannt und im Stand der Technik veröffentlicht.

[0056] Nukleinsäuren, wie beispielsweise ein DNA-Plasmid, können durch passives Einschließen während der Hydratisierung des Liposom-Lipidfilms in ein Liposom eingeschlossen werden. Andere Verfahren zum Einschließen von Nukleinsäuren umfassen beispielsweise das Kondensieren der Nukleinsäure zu einer Einzelmolekülform, wobei die Nuklein-

säure in einem wässrigen Medium suspendiert wird, das Mittel wie Protaminsulfat, Spermin, Spermidin, Histon, Lysin oder deren Gemische enthält, oder andere geeignete polykationische Kondensierungsmittel, unter Bedingungen, die wirksam sind, um die Nukleinsäure zu kleineren Partikeln zu kondensieren. Die Lösung der kondensierten Nukleinsäuremoleküle wird verwendet, um einen getrockneten Lipidfilm zu rehydratisieren, um Liposome mit der kondensierten Nukleinsäure in eingeschlossener Form zu bilden.

[0057] In einer anderen Ausführungsform können Liposome so hergestellt werden, dass sie Oberflächengruppen enthalten, wie beispielsweise Antikörper oder Antikörperfragmente, kleine Effektormoleküle zur Wechselwirkung mit Zelloberflächenrezeptoren, Antigene oder andere vergleichbare Verbindungen, um die gewünschten Ziel-Bindungseigenschaften für spezifische Zellpopulationen zu erreichen. Solche Liganden können in die Liposome eingeführt werden, indem ein Lipid, das mit dem Zielmolekül derivatisiert ist, in die liposomalen Lipide eingeführt wird, oder indem ein Lipid, das eine polare chemische Kopfgruppe enthält, die mit dem Zielmolekül derivatisiert werden kann, in vorgeformte Liposome eingeführt wird.

[0058] Lipide können mit einem Zielliganden derivatisiert werden, indem der Ligand kovalent an das freie distale Ende einer hydrophilen Polymerkette gebunden wird, welche an ihrem proximalen Ende an das vesikelbildende Lipid gebunden ist. Es gibt eine große Vielzahl von Verfahren zum Anbinden eines ausgewählten hydrophilen Polymers an ein ausgewähltes Lipid und zum Aktivieren des freien, ungebundenen Endes des Polymers zur Reaktion mit einem ausgewählten Liganden. Insbesondere wurde das hydrophile Polymer PEG vielfach untersucht (Allen, T.M., et al., *Biochemica et Biophysica Acta* 1237:99–108 (1995); Zalipsky, S., *Bioconjugate Chem.*, 4(4):296–299 (1993); Zalipsky, S., et al., *FEBS Lett.* 353:71–74 (1994); Zalipsky, S. et al., *Bioconjugate Chemistry*, 705–708 (1995); Zalipsky, S., in *STEALTH LIPOSOMES* (D. Lasic und F. Martin, Herausg.), Kapitel 9, CRC Press, Boca Raton, FL 1995).

[0059] Zielliganden sind den Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt, und in einer bevorzugten Ausführungsform ist der Zielligand einer, der eine Bindungsaffinität zu endothelialen Tumorzellen aufweist und vorzugsweise durch die Zellen internalisiert wird. Solche Liganden binden oft an eine extrazelluläre Domäne eines Wachstumsfaktorrezeptors. Beispielhafte Rezeptoren umfassen das c-erbB-2-Proteinprodukt des HER2/neu-Onkogens, den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptor, den basischen Fibroblastenwachstumsrezeptor (basischen FGF)-Rezeptor und den gefäß-endothelialen Wachstumsfaktorrezeptor, E-, L- und P-Selectin-Rezeptoren, Folatrezeptor, CD4-Rezeptor, CD19-Rezeptor, $\alpha\beta$ -Integrin-

rezeptoren und Chemokinrezeptoren.

[0060] Gemäß der Erfindung können die hergestellten Liposome nach Größe sortiert werden, so dass sie praktisch homogene Größen in einem ausgewählten Größenbereich haben, üblicherweise zwischen etwa 0,01 und 0,5 µm (Mikrometer) und noch bevorzugter zwischen etwa 0,03 und 0,40 µm (Mikrometer). Ein wirksames Verfahren, um REVs und MLVs nach Größe zu sortieren, beinhaltet das Extrudieren einer wässrigen Suspension der Liposome durch eine Serie von Polycarbonatmembranen, die eine ausgewählte einheitliche Porengröße im Bereich von etwa 0,03 bis 0,20 µm (Mikrometer) besitzen, üblicherweise etwa 0,05, 0,08, 0,10 oder 0,20 µm (Mikrometer). Die Porengröße der Membran entspricht ungefähr den größten Liposomgrößen, die durch Extrusion durch diese Membran erzeugt werden, insbesondere dann, wenn das Präparat zweimal oder öfter durch die gleiche Membran extrudiert wird. Homogenisierungsverfahren sind ebenfalls nützlich, um die Liposome auf Größen von 100 nm oder weniger zu verkleinern (Martin, F.J., in SPECIALIZED DRUG DELIVERY SYSTEMS-MANUFACTURING AND PRODUCTION TECHNOLOGY, (P. Tyle, Herausg.), Marcel Dekker, New York, S. 267–316 (1990)).

B. Herstellung und Charakterisierung von Beispielzusammensetzungen

[0061] Die in Beispiel 1 beschriebenen Liposome, bei denen eine Imidazoleinheit über eine Carbamatbindung mit einem Distearoylschwanz verbunden ist, wurden wie in Beispiel 2 beschrieben hergestellt. Die Liposome waren zusammengesetzt aus 60 Molprozent partiell hydriertem Sojabohnen-Phosphatidylcholin (PHSPC) und 40 Molprozent des Imidazol-Carbamat-Distearoyllipids. Die Liposome in der Zusammensetzung hatten eine mittlere Partikelgröße von 80 Nanometer (nm) nach Beschallung.

[0062] Das Zeta-Potential dieser Liposome wurde als Funktion des pH-Werts gemessen, und die Ergebnisse sind in **Fig. 4** gezeigt (weiße Dreiecke). Zum Vergleich wurden zwei Liposomzusammensetzungen hergestellt, die das Lipid der Erfindung nicht enthielten. Eine Zusammensetzung enthielt ein kationisches Lipid, während die andere Zusammensetzung aus einem einzigen neutralen Lipid, PHSPC, bestand. Die kationische Liposomzusammensetzung bestand aus 55 Molprozent Dimethyldioctadecylammonium (DDAB) und 45 Molprozent Cholesterin.

[0063] Die Zeta-Potentialwerte sind ein Maß für die scheinbare Ladung auf der Außenfläche der Liposome. Noch spezieller ist das Zeta-Potential ein Maß für das Potential, das entlang der Grenzfläche zwischen einer Flüssigkeitsgrenzfläche in Kontakt mit einem Feststoff und der beweglichen, diffusen Schicht im

Flüssigkeitskörper, d.h. der Gleitfläche auftritt. Zeta-Potentialwerte wurden unter Verwendung einer kommerziell erhältlichen Apparatur gemessen, wie nachstehend im Methodenabschnitt beschrieben ist.

[0064] In **Fig. 4** zeigte ein Liposom, das mit dem Imidazol-Carbamat-Distearoyllipid hergestellt worden war (weiße Dreiecke), eine starke Abhängigkeit des Zeta-Potentials vom pH-Wert der umgebenden Medien. Wie beobachtet, war das Zeta-Potential bei pH-Werten von weniger als 5,0 relativ konstant bei etwa 65 Millivolt (mV). Wenn der pH-Wert der Medien anstieg, nahm das Zeta-Potential schnell ab. Im Gegensatz dazu zeigten kationische Liposome (z.B. Liposome aus DDAB-Cholesterin, schwarze Rauten) und die neutrale Liposomformulierung (schwarze Quadrate) eine geringere Veränderung des Zeta-Potentials, wenn der pH-Wert der Suspensionsmedien zunahm.

[0065] Die schnelle Änderung des Zeta-Potentials der Liposome, die die Imidazol-Carbamat-Distearoyllipide enthielten, wenn der pH-Wert der Suspensionsmedien zunahm, ist auf die pK-Eigenschaft der Imidazoleinheit zurückzuführen. Der pK-Wert von Imidazol beträgt etwa pH 6,0. Bei einem pH-Wert von weniger als 6,0 ist die Imidazoleinheit überwiegend, d.h. mehr als 50%, positiv geladen, und das Zeta-Potential der Imidazol-Carbamat-Distearoyllipid-enthaltenden Liposome wird positiv. Bei einem pH-Wert von mehr als 6,0 wird die Ladung des Imidazols neutral, d.h. mehr als 50% neutral, und das positive Zeta-Potential der Imidazol-Carbamat-Distearoyllipid-enthaltenden Liposome nimmt ab oder wird neutral.

[0066] In einem anderen Experiment wurden Liposome hergestellt, die das Imidazol-Carbamat-Distearoyllipid (hergestellt wie in Beispiel 1 beschrieben) und eingeschlossene DNA enthielten. Wie in Beispiel 3A beschrieben, wurde kondensierte Plasmid-DNA mit Liposomen in Kontakt gebracht, die ein 60/40-Molverhältnis von PHSPC und dem Imidazol-Carbamat-Distearoyllipid enthielten. Vor dem Inkontaktbringen mit der kondensierten DNA wurde der pH-Wert der Liposomlösung auf etwa 4,0 eingestellt. Bei einem pH-Wert von etwa 4,0 ist die Imidazol-Kopfgruppe am Lipid positiv geladen, so dass die negativ geladene DNA elektrostatisch an das Lipid gebunden wird. Bei fortgesetztem Rühren bildeten sich die Liposome um die DNA, wobei die DNA in der Lipid-Doppelschicht eingeschlossen wurde. Demgemäß stellt die Verbindung ein Verfahren zum effizienten Einschließen eines negativ geladenen Mittels zur Verfügung, bei dem Liposome mit einem pH-empfindlichen Lipid hergestellt werden und das Mittel mit den Liposomen unter Bedingungen in Kontakt gebracht wird, bei denen das pH-empfindliche Lipid leicht positiv geladen wird.

[0067] Liposome mit eingeschlossener DNA wur-

den mit einer Probe verglichen, die nur DNA enthielt. Diese zwei Proben wurden 30 Minuten lang mit DNase I behandelt (siehe Beispiel 3B). Nach dem Behandlungszeitraum wurde ein Aliquot einer jeden Probe auf ein Agarosegel, das Ethidiumbromid enthielt, aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Proben der gleichen Liposome und von DNA, die nicht mit DNase I behandelt worden war, wurden auch auf das Agarosegel aufgetragen.

[0068] Fig. 5 ist eine mikrographische Darstellung der Gelelektrophoreseanalyse dieser Proben. Spur 1 sind die DNase-behandelten Liposome; Spur 2 sind die Liposome (nicht mit DNase I behandelt); Spur 3 ist die mit DNase I behandelte DNA; Spur 4 ist die DNA; und Spur 5 ist ein 1 kB-DNA-Leiter-Standard.

[0069] Fig. 5 zeigt, dass die in den Liposomen eingeschlossene DNA vor Digestion durch DNase I geschützt war (durch Vergleich von Spur 1 mit Spur 3, wo DNA allein durch die DNase I abgebaut wurde).

[0070] In einer anderen Untersuchung wurden Liposome hergestellt, die ein pH-empfindliches Lipid und einen Zielantikörper enthielten. Diese Liposome wurden zur in vitro-Transfektion von menschlichen Lungentumorzellen verwendet.

[0071] Speziell wurde ein DNA-Reporter-Plasmidvektor, pEGFP-C1 (Clontech, Palo Alto, CA), der ein grünes Fluoreszenzprotein enthielt, nach dem Verfahren aus Beispiel 3A in den Liposomen eingeschlossen. Das Verhältnis von Gesamtlipiden zu DNA in den Liposomen betrug etwa 14 Nanomol Lipide pro 1 Mikrogramm (μg) DNA. Nach dem Einschließen der DNA in den Liposomen wurde ein Anti-Integrin-Antikörper, 1F11 Fab', in die Lipid-Doppelschicht eingebracht, indem die Liposome mit Mizellen aus 1F11-Fab', konjugiert mit Polyethylenglycol-DSPE (PEG-DSPE), inkubiert wurden. Das 1F11-Fab'-PEG-DSPE-Konjugat wurde nach einer herkömmlichen Technik durch Anbinden des Antikörpers an das N-terminale Maleimid von PEG-DSPE hergestellt, wie beispielsweise beschrieben bei Zalipsky, STEALTH LIPOSOMES, (D. Lasic und F. Martin, Herausg., CRC Press, Kapitel 9 (1995)).

[0072] Die Antikörper-enthaltenden Mizellen und die Liposome wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die menschliche Lungentumorzelllinie 2E9 mit Integrinrezeptor wurde mit den Liposomen in vitro inkubiert. Liposome, die das 1 F11-PEG-DSPE-Konjugat enthielten und Kontrollliposome, denen der Antikörper fehlte (die PDG-DSPE ohne den Antikörper enthielten), wurden 4 Stunden lang bei 37°C mit den Zellen bei einer Konzentration von 5 μg DNA/70 nmol Lipid pro ml inkubiert. Nach dem Inkubationszeitraum wurde das Medium ausgetauscht, um die Liposome abzutrennen.

[0073] 24 Stunden nach der Transfektion wurde die grüne Fluoreszenz gemessen, und die Ergebnisse sind in den Fig. 6A–6D gezeigt. Die Fig. 6A–6B sind mikrographische Darstellungen der Zellen, die mit den 1F11-konjugierten Liposomen transfiziert waren. Fig. 6A zeigt die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop, und Fig. 6B zeigt die Zellen unter einem Lichtmikroskop: Fig. 6A zeigt, dass die Zellen transfiziert waren, was sich durch die hellen Regionen zeigt, die fluoreszierenden Zellen entsprechen. Die Fig. 6C–6D sind Bilder von Zellen, die mit der Kontrollformulierung ohne Zielantikörper transfiziert wurden. Es trat keine Transfektion auf, was durch die fehlende Fluoreszenz deutlich wird, wenn die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet wurden (Fig. 6C).

[0074] Das Lipid der Erfindung umfasst eine Einheit, die in der Weise gegenüber dem pH-Wert empfindlich ist, dass das Lipid bei einem pH-Wert von etwa 7,4 praktisch neutral ist. Wenn also die Lipide an einen Patienten, wie beispielsweise ein Säugetier, speziell einen Menschen verabreicht werden, sind sie ungeladen, was eine längere Blutzirkulation ermöglicht, als man sie mit geladenen Liposomen erhalten kann. Liposome, die von Endozyten eingeschlossen sind oder die einen speziellen in vivo-Bereich erreichen, wo der pH-Wert niedriger ist, werden geladen, da die Lipide positiv geladen werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Liposome eine pH-empfindliche Einheit enthalten. Das kann beispielsweise in einer Tumorregion oder in einem Lysosom auftreten. Ein Lipid mit einer Imidazoleinheit, welche einen pK von etwa 6,0 hat, wird also bei pH-Werten von weniger als 6,0 überwiegend positiv geladen werden. In einem Endosom, wo der pH-Wert etwa 5,0 bis etwa 6,0 beträgt, wird das Lipid somit protoniert, was die Aufnahme und Freisetzung der eingeschlossenen DNA in das Zytoplasma der Zelle erleichtert (Xu und Szoka, Biochemistry 35:5616–5623 (1996)). Dieses Prinzip wird anhand der nachstehenden Beispiele weiter erläutert.

Beispiele

[0075] Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung veranschaulichen.

[0076] Materialien: Die folgenden Materialien wurden von den angegebenen Quellen erhalten: partiell hydriertes Soja-Phosphatidylcholin (Vernon Walden Inc., Green Village, NJ); Cholesterin (Solvay Pharmaceuticals, Niederlande); Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) und Dimethyldioctadecylammonium (DDAB) (Avanti Polar Lipids, Inc., Birmingham, AL).

[0077] Verfahren: Dynamische Lichtstreuung wurde unter Verwendung eines Coulter N4-MD-Geräts (Coulter, Miami FL) durchgeführt.

[0078] Zeta-Potential: Das Zeta-Potential wurde unter Verwendung eines ZETASIZER 2000 von Malver Instruments, Inc. (Southborough MA) gemessen. Das Gerät wurde folgendermaßen betrieben: Anzahl der Messungen: 3; Abstand zwischen den Messungen: 5 Sekunden; Temperatur: 25°C; Viskosität: 0,89 cP; Dielektrizitätskonstante: 79; Zelltyp: Kapillarfluss; Zetagrenzen: -150 mV bis 150 mV.

BEISPIEL 1

Herstellung eines beispielhaften Lipids

A. Herstellung des para-Nitrophenylcarbonats von Distearoylglycerin

[0079] Wie in Fig. 1 veranschaulicht, wurde 1,2-Distearoyl-sn-glycerin (500 mg, 0,8 mmol; Verbindung I) azeotrop mit Benzol getrocknet (dreimal unter Verwendung eines Rotationsverdampfers). para-Nitrophenylchlorformiat (242 mg, 1,2 mmol, 1,5 Äquivalente; Verbindung II), 4-Dimethylaminopyridin (10 mg, 0,08 mmol, 0,1 Äquivalente) und Triethylamin (334 µl, 204 mmol, 3 Äquivalente) wurden zu 1,2-Distearoylglycerin in CHCl₃ (5 ml) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Dünnschichtchromatographie zeigte, dass die Reaktion vollständig war. Das Gemisch wurde mit CHCl₃ (50 ml) verdünnt und mit 10%-iger Zitronensäure (3 × 15 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet (MgSO₄) und eingedampft, um einen Feststoff zu ergeben. Der Feststoff (hellorange) wurde mit Acetonitril (4 × 3 ml) gewaschen, um überschüssiges p-Nitrophenylchlorformiat abzutrennen. Das Produkt, das para-Nitrophenylcarbonat, des Distearoylglycerins (Verbindung III), wurde im Vakuum über P₂O₅ getrocknet. Ausbeute: 557 mg (88%). ¹H-NMR (360 MHz, DMSO-D₆): δ 0,88 (t, CH₃, 6H); 1,26 (s, CH₂, 58H); 1,62 (m, CH₂CH₂CO, 4H); 2,4 (2xt, CH₂CO, 4H); 4,2 (dd, trans-CH₂OCO, 1H); 4,35 (m, CH₂OCOO, 2H); 4,5 (dd, cis-CH₂OCO, 1H); 5,38 (m, CH₂CHCH₂, 1H); 7,4 (d, C₆H₅, 2H); 8,3 (d, C₆N₅, 2H).

B. Herstellung des Carbamats von Histamin und Distearoylglycerin

[0080] Das para-Nitrophenylcarbonat des 1,2-Distearoylglycerins (350 mg, 0,44 mmol, Verbindung III) wurde zu Histamin (46 mg, 0,40 mmol, 0,9 Äquivalente; Verbindung IV) in CHCl₃ (1 ml) und DMSO (200 µl) zugegeben. Pyridin (300 µl; Verbindung V) wurde zu der Lösung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde etwa 20 Stunden lang bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Dünnschichtchromatographie (CHCl₃:MeON = 90:10) zeigte, dass die Reaktion vollständig war. Das Lösungsmittel wurde verdampft. Das Produkt (Verbindung VI) wurde in CHCl₃ gelöst, auf eine Kieselgelsäule (Aldrich, 230–400 mesh, 60 A) gegeben und mit den folgenden Lösungsmitteln eluiert: CHCl₃:CH₃COCH₃ = 90:10, 40 ml (oberer

Fleck eluiert); CHCl₃:IPA = 80:20, 40 ml (Produkt eluiert); CHCl₃:IPA = 70:30, 40 ml (mehr Produkt eluiert). Fraktionen, die das reine Produkt enthielten, wurden vereinigt und eingedampft. Das Produkt wurde im Vakuum über P₂O₅ getrocknet und als weißer Feststoff erhalten (236 mg, 80% Ausbeute). ¹H-NMR (360 MHz, CDCl₃/MeOH = 1:1 mit TMS): δ 0,88 (t, CH₃, 6H); 1,28 (s, CH₂, 56H); 1,62 (m, CH₂CH₂CO, 4H); 2,34 (2xt, CH₂CO, 4H); 2,77 (t, CH₂CH₂NH, 2H); 3,18 (t, CH₂CH₂CO, 2H); 4,05–4,2 (dd, cis- und trans-CH₂CH₂, 4H); 5,13 (m, CH₂CHCH₂, 1H); 6,08 (s, Histamin, 1H); 7,53 (s, Histamin, 1H).

Beispiel 2

Placebo-Liposom-Herstellung

[0081] Das Lipid (Verbindung VI), hergestellt wie in Beispiel 1 beschrieben, und partiell hydriertes Soja-Phosphatidylcholin (PHSPC) wurden in einem Rundkolben in einem Molverhältnis von 40/60 in Chloroform und/oder Methanol aufgelöst. Die Lösungsmittel wurden durch Rotationsverdampfung entfernt, und der so erhaltene getrocknete Lipidfilm wurde mit entionisiertem Wasser hydratisiert, um große, multilamellare Vesikel zu bilden.

[0082] Vergleichs-Liposomformulierungen wurden unter Verwendung von 100 Molprozent PHSPC und mit einem 40/60-Molverhältnis von DDAB-Cholesterin nach einem ähnlichen Verfahren hergestellt.

[0083] Die Liposomgröße jeder Formulierung wurde durch dynamische Lichtstreuung bestimmt.

Beispiel 3

Herstellung von Liposomen, die eine Nukleinsäure enthielten

A. Herstellung von Liposomen mit eingeschlossener DNA

[0084] Die Komplexe wurden folgendermaßen bei Raumtemperatur hergestellt. Zunächst wurden 400 µg Luziferase-Reporterplasmid-DNA in 5%-iger Glucoselösung durch Zugabe von 100 µg Histon unter langsamem, kontinuierlichem Rühren über 10 Minuten kondensiert.

[0085] Eine Lösung von PHSPC und dem pH-empfindlichen Lipid aus Beispiel 1 (Verbindung VI) in einem Molverhältnis von 40/60 bei einer Gesamtlipidmenge von 12000 nm in 5%-iger Glucoselösung wurde auf pH = 4 eingestellt. Die kondensierte DNA-Lösung wurde unter kontinuierlichem Rühren über 10 Minuten langsam zu der sauren Liposomlösung zugegeben. Die Endkonzentration an DNA betrug 0,25 mg/ml, und die Gesamtlipidkonzentration betrug 7,5 mM.

[0086] Das Verhältnis von DNA zu Gesamtlipiden betrug 1 µg DNA zu 30 nmol Lipiden.

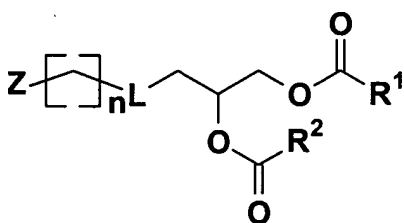
B. DNase I-Assay

[0087] DNA allein und DNA, eingeschlossen in Liposome, wurden mit DNase 30 Minuten lang bei 37°C in Gegenwart von 10 mM MgSO₄ behandelt. Nach der Behandlung wurde das Liposom/DNase-Gemisch mit Phenol/CHCl₃ und CHCl₃ extrahiert, um die Lipide und Proteine von der DNA abzutrennen.

[0088] Aliquots der DNase-behandelten DNA und der DNA-Fraktion aus den DNase-behandelten Liposomen mit eingeschlossener DNA wurden auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen, das Ethidiumbromid enthielt, und elektrophoretisch getrennt, um die Unversehrtheit der DNA zu untersuchen. Als Kontrollproben wurden DNA und Liposome, die nicht mit DNase behandelt waren, auf das Gel aufgetragen, zusammen mit einem 1 Kb-DNA-Standard. Die Ergebnisse sind in **Fig. 5** gezeigt.

Patentansprüche

1. Lipid mit der Formel:



worin jedes R₁ und R₂ unabhängig voneinander eine Alkyl- oder eine Alkenylkette mit 8 bis 24 Kohlenstoffatomen ist;

n = 0–20 ist;

L aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus (i) -X-(C=O)-Y-, (ii) -X-(C=O)- und (iii) -X- besteht, worin X und Y unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Sauerstoff, NH und einer direkten Bindung; und Z eine Einheit ist, die einen pK-Wert von kleiner als 7,4 und größer als 4,0 hat, und eine Imidazoleinheit, ein aromatisches Amin oder ein Aminozucker ist.

2. Lipid nach Anspruch 1, worin L eine Carbamatbindung, eine Esterbindung oder eine Carbonatbindung ist.

3. Lipid nach Anspruch 2, worin X NH und Y Sauerstoff ist.

4. Lipid nach Anspruch 3, worin L NH-(C=O)-O- ist.

5. Lipid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin Z eine Einheit mit einem pK-Wert von 5,0 bis 6,5 ist.

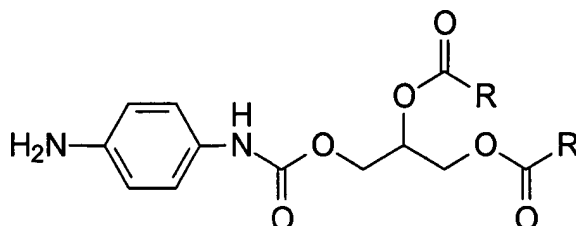
6. Lipid nach Anspruch 5, worin Z ein Imidazol ist.

7. Lipid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin jedes R₁ und R₂ eine unverzweigte Alkyl- oder Alkenylkette mit 8 bis 24 Kohlenstoffatomen ist.

8. Lipid nach Anspruch 7, worin jedes R₁ und R₂ C₁₇H₃₅ ist.

9. Lipid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin n 1–10 ist.

10. Lipid nach Anspruch 1 mit der Formel:



11. Liposomzusammensetzung, die ein Lipid nach einem der vorhergehenden Ansprüche umfasst.

12. Zusammensetzung nach Anspruch 11, die 1 bis 80 Molprozent des Lipids umfasst.

13. Zusammensetzung nach Anspruch 11 oder 12, die weiterhin eine therapeutische Verbindung umfasst, die in den Liposomen eingeschlossen ist.

14. Zusammensetzung nach Anspruch 13, worin der therapeutische Wirkstoff eine Nukleinsäure und/oder ein Protein oder Proteinfragment ist.

15. Zusammensetzung nach Anspruch 14, worin die Nukleinsäure aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus DNA, RNA und ihren Komplementen besteht.

16. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 11 bis 15, die weiterhin einen Liganden umfasst, der die Liposome zur Targetstelle dirigiert.

17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, worin der Ligand eine Bindungsaffinität zu endothelialen Tumorzellen hat und von den Zellen internalisiert wird.

18. Zusammensetzung nach Anspruch 17, worin der Ligand aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus E-Selectin, Her-2 und FGF besteht.

19. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 11 bis 18, worin die Liposome weiterhin 5 bis 20 Molprozent eines vesikelbildenden Lipids umfassen, das mit einer hydrophilen Polymerkette derivatisiert ist.

20. Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin

die hydrophile Polymerkette Polyethylenglycol ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

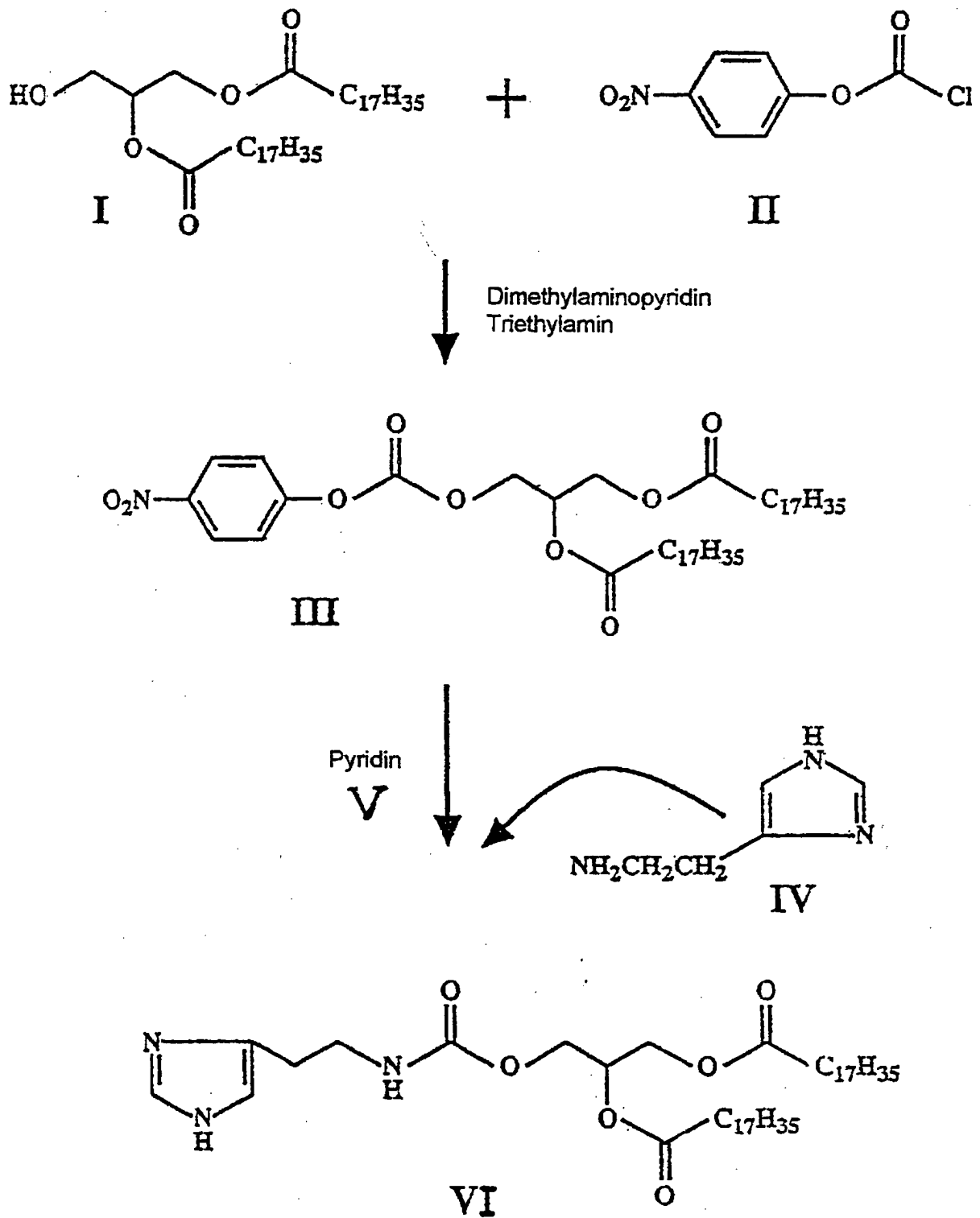


Fig. 1

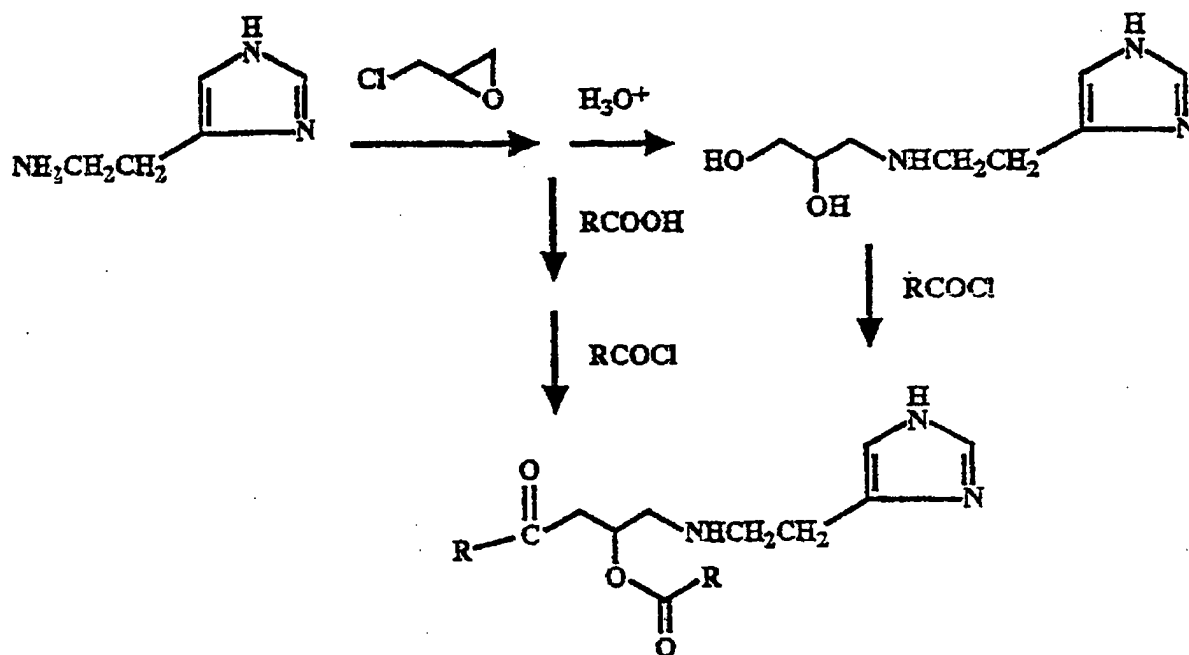


Fig. 2A

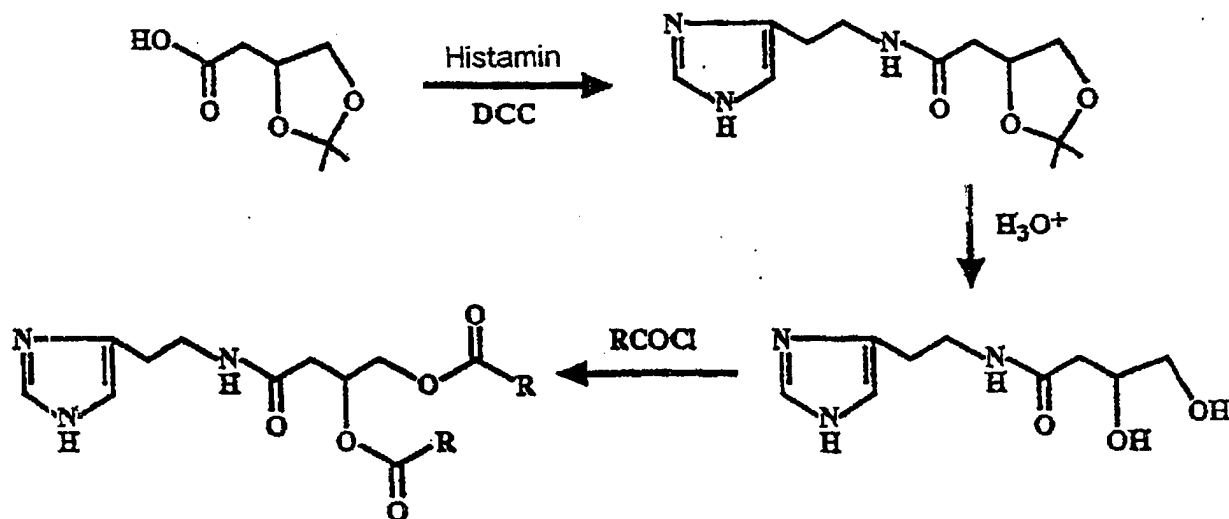


Fig. 2B

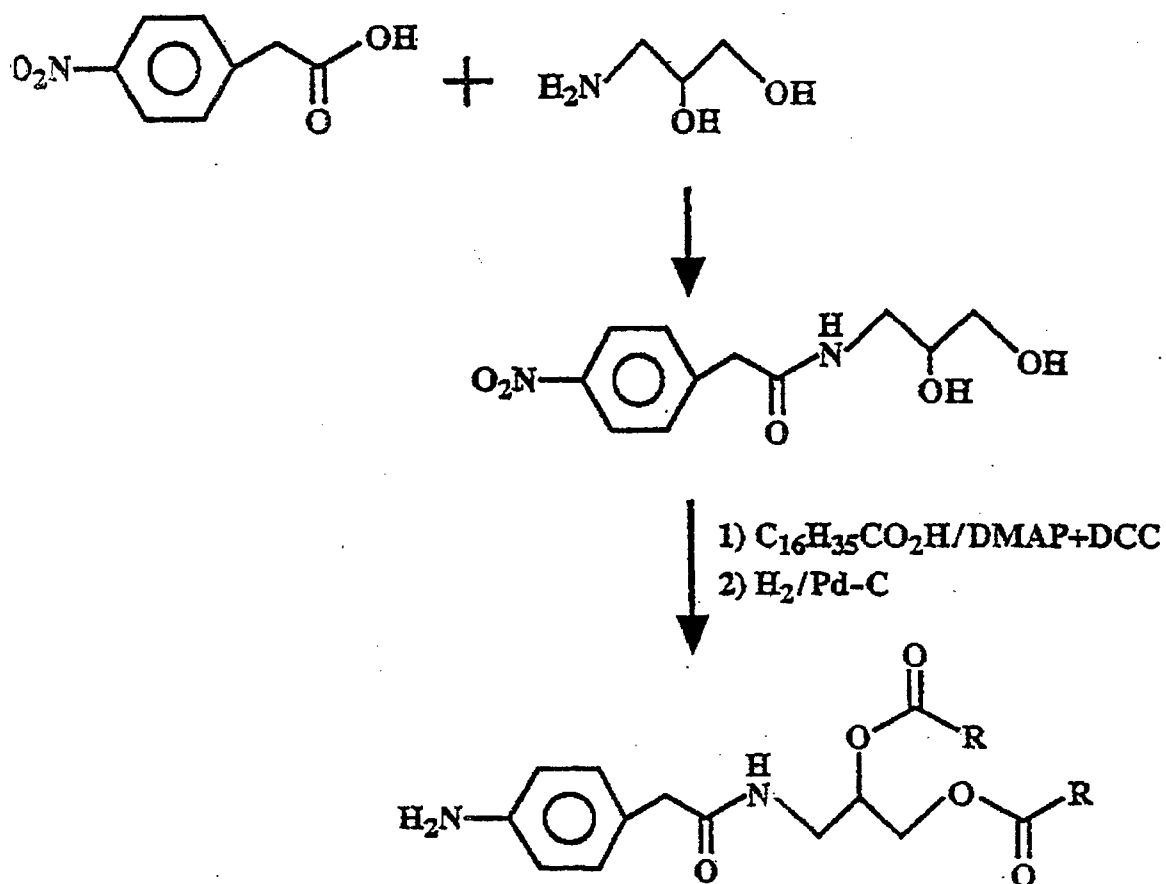


Fig. 2C

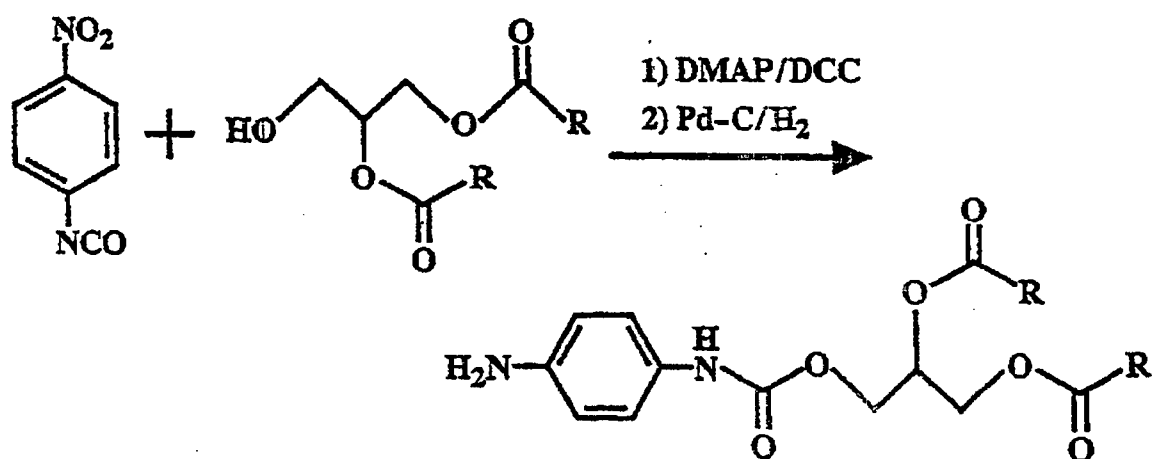


Fig. 2D

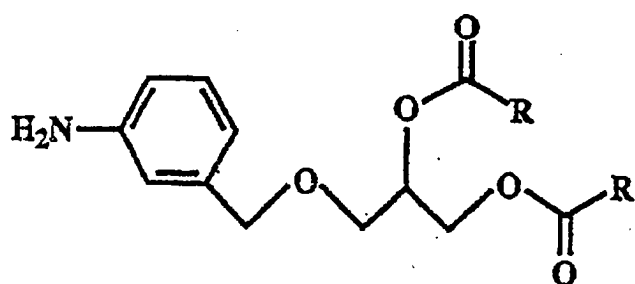


Fig. 3A

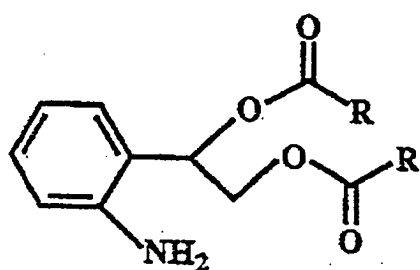


Fig. 3B

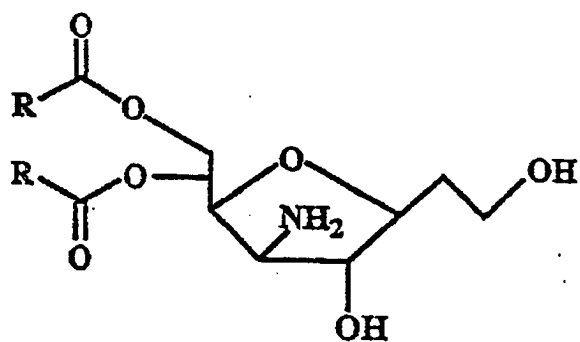


Fig. 3C

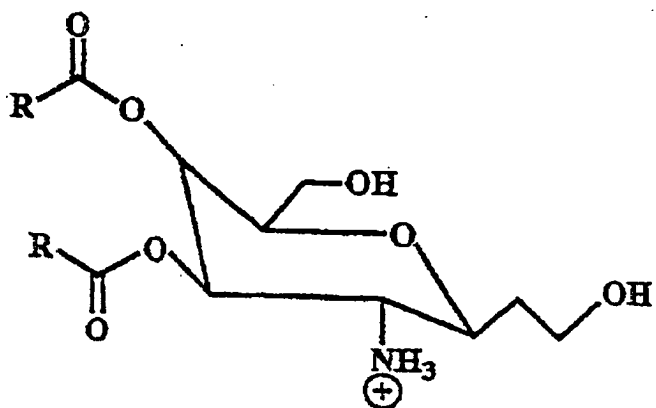


Fig. 3D

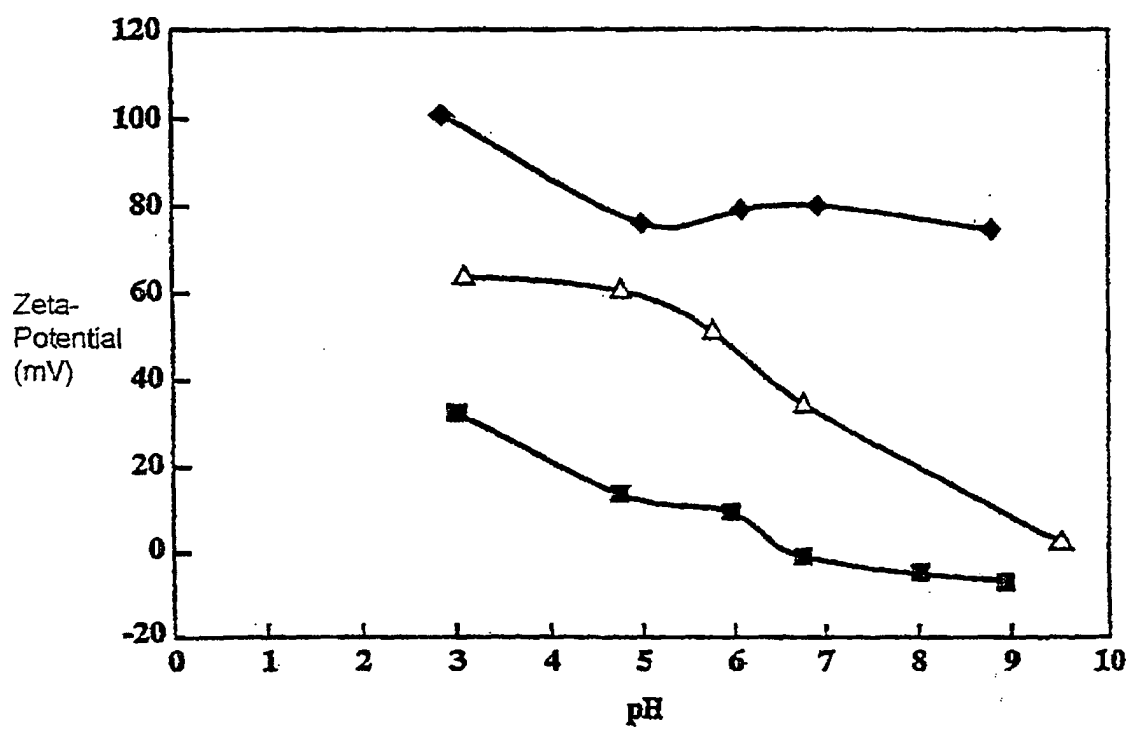
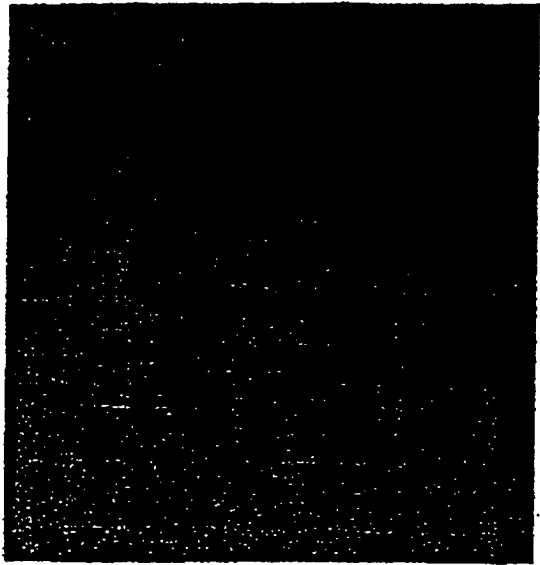


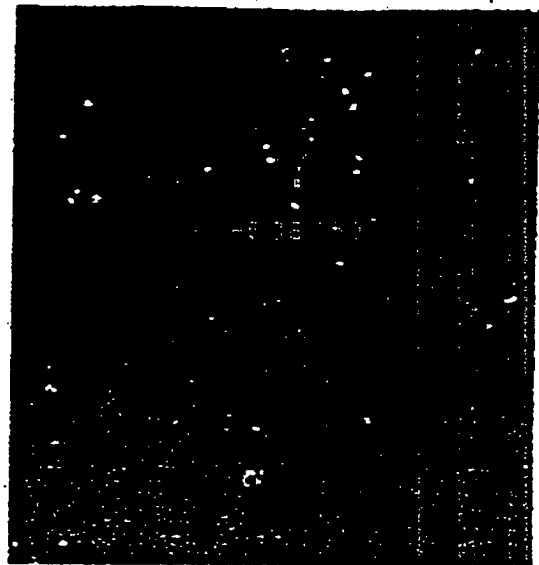
Fig. 4



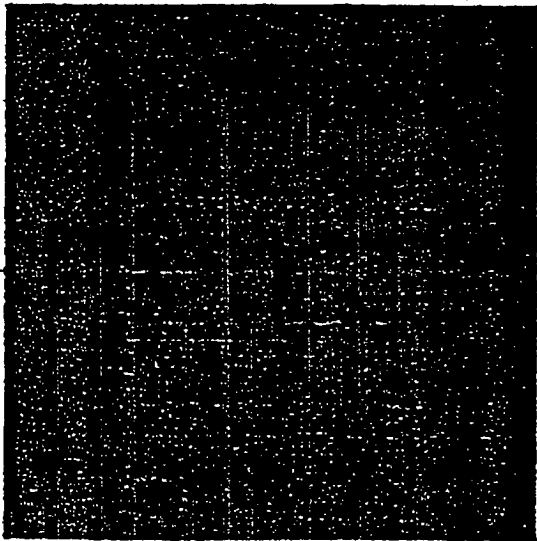
1 Kb-DNA-Liefer
DNA
DNA mit DNase
DNA/Liposom-Komplex
Komplex mit DNase
Spur Nr.



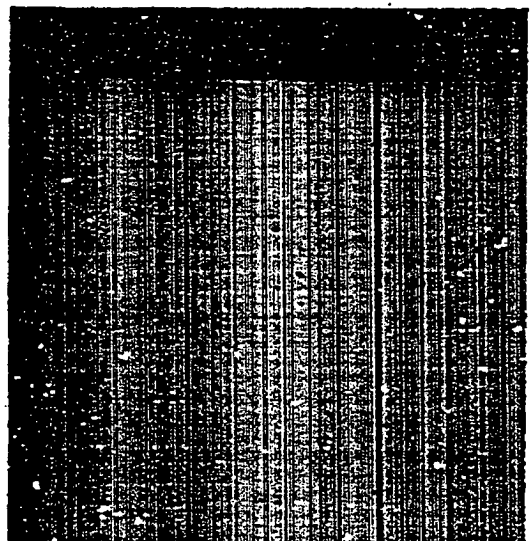
A



B



C



D