



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **317653**

(13) **B1**

(51) Int Cl⁷

A 61 K 31/351

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20022148	(86)	Innt.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	2002.05.03	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	2002.05.03	(30)	Prioritet	Ingen
(41)	Alm.tilgj	2003.11.04			
(45)	Meddelt:	2004.11.29			
(71)	Søker	Stiftelsen Biopolymer , c/o Institutt for bioteknologi, NTNU, 7491 Trondheim, NO Pharmaconcepts AB , Noreensv 57, S-752 63 Uppsala, SE			
(72)	Oppfinner	Kjell Morten Vårum, Tambs Lyches vei 2, 7033 Trondheim, NO Bjørn Erik Christensen, Astri Aasens vei 16, 7051 Trondheim, NO Magnus Köping-Höggård, Svartbacksgatan 23, S-753 32 Uppsala, SE Per Artursson, Noreens veg 57, S-752 63 Uppsala, SE			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS , Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, NO			

(54)	Benevnelse	Formulering som omfatter komplekser av kitosanoligomerer og nukleinsyre, fremgangsmåte for å fremstille formuleringen samt anvendelser derav.			
(56)	Anførte publikasjoner	EP 994 726 B1 US 2001 031 497 US 5 972 707 WO 97 42975 WO 98 01162 WO 99 36089			
(57)	Sammendrag				

Den foreliggende oppfinnelsen gjelder en formulering som omfatter komplekser av kationiske kitosanoligomerer avledet fra kationisk polysakkaridkitosan, der de nevnte kationiske oligomerene inneholder en vektfraksjon på mindre enn 20 % oligomerer med en polymeriseringsgrad (DP)<10 i tillegg til en vektfraksjon på mindre enn 20 % med DP>50 samt en nukleinsyre. Disse formuleringene som omfatter veldefinerte kationiske kitosanoligomerer med en viss distribusjon av kjedelengder og nukleinsyre, er gunstige for å levere nukleinsyre til celler i et utvalgt vev, og for å få in vivo produksjon av de ønskede molekylene som nukleinsyren er kodet for.

Denne oppfinnelsen gjelder et nytt ikke-viralt leveringssystem for nukleinsyrer i form av en formulering som omfatter komplekser av kationiske kitosanoligomerer og en nukleinsyre, nærmere bestemt et system for innføring av nukleinsyre i celler i vertsvev etter at vevet har fått tilført nukleinsyre. Dette systemet er basert på det biologisk nedbrytbare polysakkaridet kitosan som ved kjemiske modifikasjoner oppnår en mer effektiv levering av biologiske aktive nukleinsyrer, f.eks. oligo- eller polynukleotider som koder et ønsket produkt, og som vil kunne lage ønskede produkter i celler tilstede i et aktuelt vev. Videre omfatter foreliggende oppfinnelse fremgangsmåte for å fremstille formuleringen, samt anvendelser derav.

Konseptet genterapi er basert på at nukleinsyrer, dvs. DNA og RNA, kan brukes som farmasøytiske produkter til å lage terapeutiske proteiner på ønskede steder i levende organismer. Leveringssystemer for nukleinsyrer blir ofte klassifisert som virale og ikke-virale leveringssystemer. På grunn av de høyt utviklede og spesialiserte komponentene er virale systemer i øyeblikket de mest virkningsfulle midlene til å levere DNA fordi de er svært effektive både når det gjelder levering og produksjon. Imidlertid er det knyttet visse sikkerhetsproblemer til virale leveringssystemer. Toksisitet, immunogenisitet, begrensede muligheter til å nå frem til spesifikke celletyper, begrenset DNA-bæreevne, produksjons- og emballasjeproblemer, rekombinasjoner og svært høye produksjonskostnader hemmer klinisk utnyttelse (Luo og Saltzman, 2000). Av disse grunnene har ikke-virale leveringssystemer blitt stadig mer etterspurt både i laboratorier for grunnforskning og kliniske miljøer. Fra et farmasøytisk synspunkt er det imidlertid fremdeles en utfordring å levere nukleinsyrer siden det i levende organismer oppnås en relativt lav produksjon med ikke-virale leveringssystemer i forhold til virale leveringssystemer (Saeki *et al.*, 1997).

En mengde ikke-virale leveringssystemer, deriblant kationiske lipider, peptider og polymerer i sammensetning med plasmid DNA (pDNA), er beskrevet tidligere (Boussif *et al.*, 1995, Felgner *et al.*, 1994, Hudde *et al.*, 1999). De negativt ladede nukleinsyrene reagerer med de kationiske molekylene primært via ione-ioneinteraksjoner og går over fra fri form til kompakt tilstand. I denne tilstanden kan de kationiske molekylene gi beskyttelse mot nukleasenedbrytning og kan også

gi det nukleinsyre-kationiske molekyllkomplekset overflate-egenskaper som fremmer interaksjon med cellene og opptak av cellene (Ledley, 1996).

Blant disse kationiske molekylene er det påvist at den syntetiske polymereren polyetylenimin (PEI) danner stabile komplekser med pDNA og fører til relativt stor ekspresjon av transgenet (uttrykk av transgenet) både *in vitro* og *in vivo* (Boussif *et al.*, 1995, Ferrari *et al.*, 1997, Gautam *et al.*, 2001). Derfor brukes PEI ofte som referansesystem i eksperimentell sammenheng. Imidlertid har det blitt antydnet at det eksisterer en korrelasjon mellom toksisitet og effektivitet for PEI (Luo og Saltzman, 2000), og nye undersøkelser har sett nærmere på toksisitet ved bruk av PEI (Godbey *et al.*, 2001, Putnam *et al.*, 2001). En annen ulempe med PEI er at det ikke er biologisk nedbrytbart, og følgelig kan det lagres i kroppen i lang tid. Derfor er det sterkt ønskelig å finne effektive og ikke-giftige biologisk nedbrytbare ikke-virale leveringssystemer.

I de fleste tilfellene har ikke-virale leveringssystemer blitt levert *in vivo* på parenteral måte. Etter intravenøs innføring i mus ble kompakte nukleinsyre-kationiske molekyllkomplekser hovedsakelig avsatt i lungekapillærene der genet ble produsert i de indre celleveggene på kapillærene i lungeblærene (Li og Huang, 1997, Li *et al.*, 2000, Song *et al.*, 1997) og til og med i de alveolare cellene (Bragonzi *et al.*, 2000, Griesenbach *et al.*, 1998), men ikke i epitelet. Derimot ble fritt, nakent DNA raskt brutt ned i blodomløpet før det nådde målet og resulterte stort sett i ingen genekspresjon. Innsprøyting av nakent DNA i skjelettmusklene resulterte derimot i doseavhengig genekspresjon (Wolff *et al.*, 1990), noe som ble ytterligere forsterket når det forekom sammen med en ikke-kompakterende, men "interaktiv" polymer, f.eks. polyvinylpyrrolidon (PVP) og polyvinylalkohol (PVA) (WO 9621470) (Mumper *et al.*, 1996, Mumper *et al.*, 1998). Konklusjonen er at gentransfeksjon *in vivo* er avhengig av vevet på en uforutsigelig måte og derfor fortsatt utgjør en utfordring.

Levering av ikke-virale genleveringssystemer via slimhinnene er også beskrevet, dvs. levering via fordøyelsessystemet, nesen og luftveiene (Koping-Hoggard *et al.*, 2001, Roy *et al.*, 1999), WO 01/41810. Bortsett fra levering til nesevevet, der DNA i ikke-kompaktert form gir best genekspresjon (WO 01/41810), blir ofte kompakterte nukleinsyre-kationiske molekyllkomplekser foretrukket fremfor ikke-kompaktert DNA når det kreves høy genekspresjon i slimhinnevevet.

I tidligere artikler er ikke-virale genleveringssystemer basert på kationiske polymerer, f.eks. kitosan med temmelig stor molekylvekt, ofte flere hundre kilodalton (kDa) med 5 kDa som nedre grense, se for eksempel MacLaughlin *et al.*, 1998, Roy *et al.*, 1999 og WO 97/42975. Hovedgrunnen er at polymerer med lavere molekylvekt (< 5 kDa) danner ustabile sammensetninger med DNA, noe som resulterer i lav genekspresjon (Koping-Hoggard, 2001). Det er imidlertid mange ulemper forbundet med å bruke kationer med høy molekylvekt, for eksempel økt aggregering av kompakterte nukleinsyre-kationiske molekylkomplekser og problemer med løsningssevnen (MacLaughlin *et al.*, 1998). Dessuten er det flere biologiske fordeler med å bruke kationiske molekyler med lavere molekylvekt. Generelt viser de for eksempel redusert toksisitet og redusert komplementær aktivering sammenlignet med kationer med høyere molekylvekt (Fischer *et al.*, 1999, Plank *et al.*, 1999).

I den tidligere artikkelen er det beskrevet noen eksempler på bruken av kationer med lav molekylvekt som danner sammensetninger med nukleinsyre (Florea 2001, Godbey *et al.*, 1999, Koping-Hoggard, 2001, MacLaughlin, *et al.*, 1998, Sato *et al.*, 2001). Imidlertid er det slik at disse kationene med lav molekylvekt danner ustabile forbindelser med DNA og skiller seg i et elektrisk felt (agarosegel-elektroforese). Dette resulterer i ingen eller en svært utydelig genekspresjon *in vitro* sammenlignet med kationer med høyere molekylvekt. Dette kan forklares med at komplekser dannet mellom DNA og kationer med lav molekylvekt generelt sett er ustabile og lett dissosieres (Koping-Hoggard, 2001). Faktisk har dissosiasjonen av kationisk molekylære DNA-komplekser og frigjøring av nakent DNA ved agarosegel-elektroforese ofte blitt brukt som en analyse på å skille ineffektive fra effektive formuleringer i litteraturen (Fischer *et al.*, 1999, Gebhart og Kabanov, 2001, Koping-Hoggard *et al.*, 2001).

Tidligere artikler omhandler forskjellige eksempler på metoder for levering av nukleinsyrer til luftveiene ved bruk av ikke-virale vektorer (Deshpande *et al.*, 1998, Ferrari *et al.*, 1997, Gautam *et al.*, 2000). Nylig identifiserte og karakteriserte vi ett slikt system basert på den DNA-komplekserende polymereren kitosan (Koping-Hoggard *et al.*, 2001), et lineært polysakkarid som kan fremstilles fra kitin. Kitosanbaserte genleveringssystemer er også beskrevet i US patent nr. 5, 972, 707 (Roy *et al.*, 1999), US patentsøknad nr. 2001/0031497 (Rolland *et al.*, 2001) og i WO 98/01160.

Kitosan har vist seg å kunne modifisere 'tight junctions' (celle-celle kontaktpunkter mellom epitelceller) og dermed oppnå bedre levering av legemidler over epitelbarrierene (Artursson *et al.*, 1994). Kitosan ansees for å være ikke-giftig når det tilføres gjennom munnen på mennesker og har blitt godkjent som tilsetning i matvarer og er også brukt som bestanddel i sårhelingsprodukt (Illum, 1998).

Kitosaner omfatter en familie med vannløselige, lineære polysakkarider som består av (1→4)-kjedete 2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukose (GlcNAc, A-enhet) og 2-amino-2-deoxy-β-D-glukose (GlcN, D-enhet) i varierende sammensetning og sekvens (figur 1). Den definisjonen som er anvendt her, for å skjelne mellom kitin og kitosan er basert på at kitin ikke lar seg oppløse i fortynnet syreoppløsning og at kitosan lar seg oppløse i den samme fortynnede syreoppløsningen (Roberts, 1992).

Det relative innholdet av A- og D-enheter kan uttrykkes som en fraksjon av A-enheter:

$$F_A = \text{antall A-enheter} / (\text{antall A-enheter} + \text{antall D-enheter})$$

F_A er relatert til den prosentvise delen av de-N-acetylenheter gjennom formelen:

$$\% \text{ de-N-acetylenheter} = 100 \% \times (1 - F_A)$$

Hver D-enhet inneholder en hydrofil og protondannende aminogruppe der hver A-enhet inneholder en hydrofob acetylgruppe. De relative mengdene av de to monomerene (dvs. $A/D = F_A/(1-F_A)$) kan varieres over et bredt område og gi stor variasjon i de kjemiske, fysiske og biologiske egenskapene. Dette omfatter egenskapene til kitosanene i oppløst tilstand, i geltilstand og i fast tilstand samt deres interaksjoner med andre molekyler, celler og annet biologisk og ikke-biologisk materiale.

Påvirkningen av kitosanets kjemiske struktur ble demonstrert da kitosaner ble brukt i et ikke-viralt genleveringssystem (Koping-Hoggard *et al.*, 2001).

Kitosaner med forskjellig kjemisk sammensetning viste strukturavhengig effektivitet som genleveringssystem. Bare kitosaner som dannet stabile komplekser med pDNA viste betydelig transgenetisk ekspresjon. Slike komplekser krevet at minst 65% av kitosanmonomerene var deacetyllert.

Kitosan kan bli depolymerisert enten kjemisk eller enzymatisk for å oppnå kitosanpolymerer eller oligomerer med ønsket molekylstørrelse. Forskjellige kjemiske nedbrytningsmekanismer kan brukes til å depolymerisere kitosaner, det kan være syrehydrolyse, salpetersyrling og oksidativ-reduktiv depolymerisering.

Ultrasonisk depolymerisering av polymerer kan også brukes, men disse metodene er ikke hensiktsmessige å bruke for å oppnå svært lav molekylvekt.

Depolymerisering av kitosan ved hjelp av salpetersyrling er en måte for å oppnå kitosan med lav molekylvekt, for eksempel som beskrevet i US 3, 922, 260 og US 5, 312, 908. Denne mekanismen innebærer deaminering av en D-enhet ved dannelsen av 2,5-anhydro-D-mannose-enhet, på reduserende ende som videre kan reduseres til 2,5-anhydro-D-mannitol ved bruk av NaBH_4 som vist på figur 2. Det er også mulig å bruke forskjellige enzymer til depolymerisering av kitosan, for eksempel US 5, 482, 843, kitosanaser, kitinaser og lysozym. I tillegg kan syrehydrolyse brukes til å depolymerisere kitosan (Vårum *et al.*, 2001 og henvisninger der).

Tidligere har undersøkelser på effekt av kitosans molekylvekt på transfeksjonseffektivitet *in vitro* av kitosan-pDNA-komplekser ikke påvist noen betydelig avhengighet av molekylvekt i området 20-200 kDa (Koping-Hoggard *et al.*, 2001, MacLaughlin *et al.*, 1998). Men i en annen undersøkelse (Sato *et al.*, 2001) viste kitosaner på 15 kDa og 52 kDa høyere genekspressjon enn kitosan > 100 kDa, mens det ikke ble detektert noen genekspressjon med kitosan på 1,3 kDa. I tillegg har undersøkelser av genekspressjon *in vitro* og i lungevev *in vivo* med bruk av kitosaner med lav molekylvekt (1,2 kDa, 2,4 kDa og 4,7 kDa) vist at kun kitosanet på 4,7 kDa formidlet en signifikant genekspressjon (Koping-Hoggard, 2001).

Kitosaner med forskjellig molekylvekter er blitt brukt som komponenter i komplekser til ikke-viral genlevering. For eksempel henviser US patentsøknad nr. 2001/0031497A til bruken av kitosan med lav molekylvekt som komponent i leveringssystemet, dvs. kitosan i området 2-4 kDa Mw, som resulterte i den minste partikkelen i genleveringssystemet, og også i en økt transfeksjon av celler med det kondenserte leveringssystemet *in vitro*.

Kitosaner med forskjellig molekylvekter som brukes i genleveringssystemer, kommer vanligvis som ufraksjonerte prøver fra leverandører på markedet, og lavere molekylvekter fås fra de nevnte prøvene ved partiell nedbrytning ved hjelp av organiske og uorganiske syrer, salpetersyre og kitosannedbrytende enzymer. I alle tilfeller er fordelingen av molekylvekter relativt høy. For eksempel ble en kommersiell kitosan med en gjennomsnittlig molekylvekt (M_w) på 180 000 analysert med 'Size-exclusion chromatography with multi-angle laser light

scattering (SEC-MALLS)' (Størrelsesfraksjoneringskromatografi med lys-
spredningsdeteksjon ved flere spredningsvinkler). Figur 3A viser elusjonsprofilen,
dvs. detektorsignalet brytningsindeks, som er proporsjonalt med konsentrasjonen
av kitosan, kombinert med et plott av den beregnede molekylvekten (uttrykt som
5 kitosan i acetatsalt form) som funksjon av elusjonsvolumet. Det er tydelig at
prøven inneholder molekylvekter fra 10^6 g/mol (1000 kDa) til venstre i
kromatogrammet og ned til 10^4 (10 kDa) til høyre i kromatogrammet. Ny beregning
av disse dataene gir den kumulative distribusjonen av molekylvekter (figur 3B).
Det kan slutes av disse beregningene at 12 % (w/w) av prøven har en
10 molekylvekt på under 40 kDa og 38 % av prøven en molekylvekt på under 100
kDa. Likeledes har 18 % av prøven en molekylvekt på over 300 kDa og 9 % en
molekylvekt på over 400 kDa. Prøven er således polydispers siden den inneholder
polymerer med forskjellige molekylvekter eller kjedelengder.

Kitosaner kan leveres i fri aminform eller som forskjellige salter, f.eks.
15 kitosanklorid, kitosanglutamat og kitosanacetat. Saltformen påvirker forholdet
mellom molekylvekten (M) og DP (antallet sukkerenheter per molekyl). De
følgende ligningene beskriver dette forholdet mellom DP og M:

Fri base:	$M = DP (161(1-F_A) + 203F_A)$	$= DP (161 + 42F_A)$
20 Kitosanklorid:	$M = DP (197,45(1-F_A) + 203F_A)$	$= DP (197,45 + 5,55F_A)$
Kitosanacetat:	$M = DP (221(1-F_A) + 203F_A)$	$= DP (221 - 18F_A)$
Kitosanglutamat:	$M = DP (308(1-F_A) + 203F_A)$	$= DP (308 - 105F_A)$

Den vektsgjennomsnittlige molekylvekten (M_w) på en polydispers prøve kan
25 uttrykkes som $M_w = \sum c_i M_i / \sum c_i$, der c_i er konsentrasjonen (g/l) av en spesiell
molekylvekt (M_i) i fordelingen (Tanford, C. (1961) Physical chemistry of
macromolecules, John Wiley and Sons, New York, del 8b). På samme måte kan
det antalls gjennomsnittlige molekylvekten (M_n) uttrykkes som $M_n = \sum c_i / \sum (c_i / M_i)$. I
det tilfellet som det vises til over, er $M_w = 180$ kDa og $M_n = 84,5$ kDa, og
30 polydispersitetsindeksen, som defineres som M_w / M_n , lik 2,1. En polydispersitet på
ca. 2 er karakteristisk for en lineær polymer som har vært utsatt for tilfeldig
depolymerisering (Tanford, C. (1961) Physical chemistry of macromolecules, John
Wiley and Sons, New York, del 33a).

Fordelingen av kjedelengder etter en tilfeldig depolymerisering av en lineær polymer som kitosan er gitt ved ligningen (Tanford (1961):

$$W_x = xp^{x-1}(1-p)^2$$

5

W_x er vektfraksjonen av kjeder som inneholder x monomerer (for kitosaner er monomerene sukkerenheter), p er fraksjonen av intakte bindinger, og $1-p$ er fraksjonen av spaltede bindinger. Antallsgjennomsnittet for polymeriseringsgraden (x_n) er lik $1/(1-p)$. Siden $M_n = M_0x_n$, der M_0 er monomerens ekvivalentvekt, som er 10 203 g/mol for N-acetyl-glukosamin når den opptrer i en kitosankjede og 161 g/mol for glukosamin i fri baseform når den opptrer i en kitosankjede. For en gitt F_A blir gjennomsnittlig M_0 lik $203 \cdot F_A + 161 \cdot (1-F_A)$.

Figur 4 viser SEC-MALLS kromatogram (4A) og differensiell (4B) og kumulativ (4C) distribusjon av molekylvekter for en kitosan som er depolymerisert med salpetersyrling for å oppnå forskjellig vektsgjennomsnittlige molekylvekter i 15 området fra 41 500 til 13 400. Det vises tydelig at det fortsatt er en bred distribusjon av de beregnede molekylvektene. Disse dataene viser tydelig at kitosaner med forskjellige molekylvekter som er produsert fra høye molekylvekter med partiell nedbrytning, forblir polydisperse og inneholder kjeder med vidt 20 forskjellige molekylvekter.

Molekylvektfordelingen av en polymer kan modifiseres ved selektiv fjerning av visse deler av distribusjonen. Kitosan prøver med relativt korte kjeder kan fraksjoneres ved hjelp av gelfiltrering slik at det oppstår individuelle oligomerer eller fraksjoner med forholdsvis liten distribusjon av molekylvektene. Ett eksempel 25 gis av Tømmeraas *et al.* (2001), som fikk rene kitosanoligomerer i området 2-10 monomerer per kjede.

Prøver med høyere molekylvekter kan også fraksjoneres ved hjelp av gelfiltrering som vist for kitosaner av Ottøy *et al.* (1996). Fraksjoner med M_w/M_n -verdier på 1,2 – 1,5 ble oppnådd ved å fraksjonere en vanligvis polydispers prøve med $M_w = 270\ 000$ ved bruk av en gelfiltreringskolonne med Sepharose CL-4B og 30 Sepharose CL-6B.

I en alternativ metode kan polydisperse kitosaner fraksjoneres ved dialyse eller membranteknikker, noe som gir mulighet for selektiv fjerning av de korteste kjedene, og hvor molekylvektfordelings resultatet er avhengig av den

opprinnelige molekylvektfordelingen samt membran porøsitet og transportkoeffisienter i tillegg til driftsforholdene.

I forbindelse med den foreliggende oppfinnelsen ble det overraskende nok oppdaget at kitosaner som består av én enkelt kjedelengde eller kitosaner med
5 smal molekylvektfordeling, hadde forskjellige egenskaper som kompleksdannere ved genlevering enn andre prøver med sammenlignbar M_w eller M_n , men med større molekylvektfordeling.

En annen ulempe ved mange kationer som brukes til komplekser med nukleinsyre, f.eks. PEI, polylysin og kitosan, er at de er masseproduserte
10 kjemikalier med stor molekylvektfordeling og følgelig temmelig udefinert (Godbey *et al.*, 1999). Det er godt kjent at slike kjemikalier kan vise variasjoner fra den ene serien til den andre. Fra et farmasøytisk synspunkt foretrekkes det derfor veldefinerte polykationer med smal molekylvektfordeling.

Enda en ulempe med å bruke polykationer med bred molekylvektfordeling
15 til komplekser med nukleinsyrer og videre transfeksjon, er at kjeder med forskjellige lengder kan ha forskjellig effektivitet når det gjelder evnen til å danne komplekser og utføre transfeksjon.

Denne oppfinnelsen dreier seg om formuleringer som omfatter komplekser
av:

- 20 (a) kationiske kitosanoligomerer som er fremstilt fra kationisk polysakkarid-kitosan der de nevnte kationiske oligomerene inneholder en vektfraksjon på mindre enn 20 % oligomerer med polymeriseringsgrad (DP) <10 i tillegg til en vektfraksjon på mindre enn 20 % med DP >50 , og
(b) en nukleinsyre.

25 I forbindelse med den foreliggende oppfinnelsen er det uventet blitt oppdaget at formuleringer som omfatter veldefinerte kationiske kitosanoligomerer med en viss distribusjon av kjedelengder, og nukleinsyre er gunstige for å oppnå levering av nukleinsyre til celler av utvalgt vev for å oppnå ekspresjon *in vivo* av de ønskede molekylene som nukleinsyren er kodet for.

30 En annen hensikt med oppfinnelsen er å utvikle en fremgangsmåte for å fremstille formuleringen i henhold til oppfinnelsen som omfatter trinnene å:

- (a) eksponere den nevnte kationiske kitosanoligomeren for et vandig løsningsmiddel,

(b) blande den vandige løsningen i trinn (a) med den nevnte nukleinsyren i et vandig løsningsmiddel, og

(c) redusere volumet av produktløsningen i trinn (b) for å oppnå en ønsket konsentrasjon av den nevnte formulering.

5 Det beskrives en metode for å gi nukleinsyre til et pattedyr ved innføring av formuleringen ifølge denne oppfinnelsen i pattedyret.

Ytterligere et mål for oppfinnelsen er anvendelser av denne formuleringen ved fremstilling av et medikament til profylaktisk eller terapeutisk behandling av et pattedyr eller ved fremstilling av et diagnostisk middel til bruk i *in vitro* eller *in vivo* diagnostiske metoder.

10 Disse og andre mål for oppfinnelsen er beskrevet i versjonene av oppfinnelsen under.

Formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan fremstilles fra kationisk polysakkaridkitosan ved bruk av kjemiske eller enzymatiske metoder.

15 En foretrukket formulering av oppfinnelsen er at de nevnte kationiske oligomerene helst skal inneholde en vektfraksjon på mindre enn 20 % av oligomerene med $DP < 12$ i tillegg til en vektfraksjon på under 20 % med en $DP > 40$ og helst en vektfraksjon på under 20 % oligomerer med $DP < 15$ i tillegg til en vektfraksjon på under 20 % med en $DP > 30$.

20 Formuleringer som omfatter komplekser mellom kationiske kitosan-oligomerer med lav molekylvekt og nukleinsyre er beskrevet der de kationiske kitosanoligomerene har veldefinerte kjedelengder, smal distribusjon av kjedelengdene og en veldefinert kjemisk sammensetning. Det typiske er at den kationiske kitosanoligomeren har en molekylvekt på mellom 500 og 10 000 Da, 25 helst mellom 1200 og 5000 Da og aller helst mellom 3000 og 4700 Da. Det typiske er at den kationiske kitosanoligomeren har en fraksjon A-enheter (F_A) på 0-0,35 (65-100 % de-N-acetylerete enheter), helst mellom 0-0,1 (90-100 % de-N-acetylerete enheter) og aller helst mellom 0-0,01 (99-100 % de-N-acetylerete enheter). Den nevnte nukleinsyren omfatter en kodesekvens som vil uttrykke funksjonen sin når 30 den nevnte nukleinsyren innføres i en vertscelle.

Ifølge en utførelse av oppfinnelsen er de nevnte oligomerene fremstilt fra kationiske polysakkaridkitosaner etterfulgt av fraksjonering av en mengde polydisperse oligomerer til oligomerer med veldefinerte kjedelengder, liten distribusjon av kjedelengder og en fraksjon A-enheter (F_A) på 0-0,35 (65-100 %

de-N-acetylerede enheter), helst mellom 0-0,1 (90-100 % de-N-acetylerede enheter) og aller helst mellom 0-0,01 (99-100 % de-N-acetylerede enheter). Det typiske er at de nevnte oligomerene består av 6-50 monomerenheter, helst av 10-30 monomerenheter og aller helst av 15-25 monomerenheter med molekylvekt mellom 3000 og 4700 Da og en F_A på under 0,01 (over 99 % de-N-acetylerede enheter).

Ifølge en annen utførelse av oppfinnelsen velges den nevnte nukleinsyren fra gruppen som består av RNA- og DNA-molekyler. Disse RNA- og DNA-molekylene kan bestå av sirkelrunde molekyler, lineære molekyler eller en blanding av begge. Helst skal den nevnte nukleinsyren bestå av plasmid-DNA.

Ifølge en annen fortrukket utførelse av den foreliggende oppfinnelsen skal den nevnte nukleinsyren omfatte en kodende sekvens som vil uttrykke funksjonen sin når den nevnte nukleinsyren innføres i en vertscelle. Den kan for eksempel kode et biologisk aktivt produkt, f.eks. et protein, et polypeptid eller et peptid med terapeutiske, diagnostiske, immunogene eller antigene egenskaper

Denne oppfinnelsen tar også for seg formuleringer som beskrevet over, der den nevnte nukleinsyren omfatter en kodende sekvens som koder et protein, et enzym, et polypeptidantigen eller et polypeptidhormon, eller der den nevnte nukleinsyren omfatter en nukleotidsekvens som fungerer som et antisense-molekyl, f.eks. RNA.

Oppfinnelsens formulering skal helst ha en pH-verdi mellom 3,5 og 8.

Formuleringen av oppfinnelsen kan også bli derivatisert med målbærende ligander og/eller stabiliseringsmidler.

Et videre aspekt ved oppfinnelsen er relatert til dråpestørrelsen på den nevnte formuleringen etter forstøvning. Dråpestørrelsen til formuleringen av oppfinnelsen skal helst være lik dråpestørrelsen til nakent pDNA etter forstøvning.

Den foreliggende oppfinnelsen er også rettet inn mot en fremgangsmåte for å fremstille den foreliggende formuleringen. Den nevnte fremgangsmåten omfatter da trinnene: å fremstille den foreliggende kationiske kitosanoligomerer som beskrevet over, (a) å eksponere de nevnte kationiske kitosanoligomerene for en vandig løsning med en pH-verdi fra 3,5 til 8,0, (b) å blande den vandige løsningen fra trinn (a) med den nevnte nukleinsyren i en vandig løsning og (c) dehydrere produktløsningen fra trinn (b) for å oppnå en høy konsentrasjon av sammensetningen før den innføres *in vivo*. Trinn (c) kan nås ved (1) å fordampe væsken fra produktløsningen i trinn (b) for å få den ønskede konsentrasjonen eller (2)

frysetørke produktløsningen i trinn (b) etterfulgt av rehydrering av det frysetørkede produktet for å oppnå den ønskede konsentrasjonen av formuleringen. Det typiske er at den nevnte nukleinsyre skal finnes i en konsentrasjon på 1 ng/ml-300 µg/ml, helst 1 µg/ml-100 µg/ml og aller helst 10-50 µg/ml i trinn (b) og 10 ng/ml-3000 µg/ml, helst 10 µg/ml-1000 µg/ml og aller helst 100-500 µg/ml i trinn (c) ved bruk av fordampningsmetoden (1).

Man bør være klar over at en fagperson kan lage den foreliggende formuleringen med forskjellige ladninger med aminer/fosfater og få negative, nøytrale eller positive ladninger. Den realiseringen som foretrekkes, er imidlertid den som har en formulering av oppfinnelsen med netto positiv ladning.

Denne oppfinnelsen er videre opptatt med å finne anvendelser av formuleringen for fremstilling av profylaktisk eller terapeutisk medikament for å tilføre en nukleinsyre til et pattedyr ved å introdusere formuleringen i dyret. Den nevnte formuleringen skal helst gis til pattedyret gjennom slimhinnene i lunger, nese, munn, kinn, under tungen, i rektum eller vagina. I henhold til en annen versjon gis den nevnte sammensetningen til pattedyret på parenteral måte, f.eks. intravenøst, i musklene, i huden, under huden eller i hjertet.

Den foreliggende oppfinnelsen er også opptatt med anvendelse av formuleringen ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament til profylaktisk eller terapeutisk behandling av pattedyr eller til produksjon av et diagnostisk middel til bruk i *in vivo* eller *in vitro* diagnostiske metoder, og spesifikt til produksjon av et medikament til bruk i genterapi, antisense-terapi eller genetisk vaksinerings til profylaktisk eller terapeutisk behandling av ondartede svulster, autoimmune sykdommer, arvelige sykdommer, patogene infeksjoner og andre patologiske sykdommer.

Andre mål, funksjoner og fordeler med den foreliggende oppfinnelsen vil fremgå av den følgende detaljerte beskrivelsen. Det bør imidlertid være klart at den detaljerte beskrivelsen og de spesifikke eksemplene nok angir ønskede utførelser av oppfinnelsen, men at de bare er ment som illustrasjoner av oppfinnelsen.

BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 viser den kjemiske sammensetningen av kitosan, der et fragment av kitosankjeden inneholder en enhet av N-acetyl-β-D-glukosamin (A-enhet) og 3

enheter av β -D-glukosamin (D-enheter). Aminogruppen av D-enheter kan være i protondannende eller ikke protondannende form avhengig av pH-verdi.

Figur 2a viser den kjemiske strukturen som oppstår etter depolymerisering av en kitosan ved hjelp av en syre eller en kitosanase. Syrer spalter
 5 glykosidbindingen etter en A-enhet (A-enhet av det nye reduserte stoffet). Enzymene varierer i spesifisitet ved hydrolyse av begge typer monomerer.

Figur 2B viser depolymerisering av kitosan ved hjelp av salpetersyre, som bare angriper D-rester, som danner 2,5-anhydro-D-mannose.

Figur 3 viser resultatene der en kommersiell kitosan med vektsgjennomsnittlig molekylvekt (M_w) på 180 000 ble analysert med SEC-MALLS. Kolonner:
 10 TSK G6000PWXL, 5000PWXL og 4000 PWXL (seriekoplet). Ekstraksjonsmiddel: 0,2 M ammoniumacetat, pH 4,5. RI-detektor: Optomed DSP (Wyatt). Lysspredningsdetektor: DAWN DSP (Wyatt). Prosessparametere (Astra software v. 4.70.07): $dn/dc = 0,142$ ml/g (bestemt 'off line' (frakoplet) for kitosanacetat,
 15 verdien ble funnet å være uavhengig av F_A). $A_2: 5,0 \cdot 10^{-3}$ mol·ml·g⁻². 3A: Elusjonsprofil, dvs. detektorsignalet brytningstall, som er proporsjonalt med konsentrasjonen av kitosan, kombinert med et plott av den beregnede molekylvekten, som i dette tilfellet ble uttrykt som kitosan i acetatsalt form som funksjon av elusjonsvolumet. 3B: Den kumulative molekylvektfordelingen av
 20 molekylvekt beregnet fra dataene i 3A.

Figur 4 viser SEC-MALLS-kromatogram (4A) samt differensiell (4B) og kumulativ (4C) molekylvektfordelingen av en kitosan som er depolymerisert med salpetersyrling og gir forskjellig gjennomsnittlig molekylvekt mellom 41 500 og 13 400. Forsøksforholdene var de samme som i figur 3.

Figur 5: Beregnet kumulativ (A) og differensiell (B) molekylvektfordeling
 25 som tilsvarende Kuhns fordeling for kitosan som er depolymerisert og gir 100, 50, 20 og 10 enheter (DP_n).

Figur 6: SEC-kromatogram av en fullt de-N-acetyllert kitosan ($F_A < 0.001$) som er depolymerisert med a) salpetersyrlig og redusert med $NaBH_4$ (N1-N4) og
 30 b) kitosanase (E1-E4) (Superdex 30: to 2,5 x 100 cm kolonner i serie, elueringsmiddel: 0,15M ammoniumacetat, pH 4,5, gjennomstrømningsmengde 0,8 ml/min). $DP=6$ indikerer elueringsvolumet for en fullt de-N-acetyllert kitosanheksamer.

Figur 7: SEC-MALLS-kromatogram (7A) av en fullt de-*N*-acetykert kitosan ($F_A < 0.001$), som er depolymerisert med salpetersyrling og redusert med NaBH_4 (ufraksjonert prøve) og fraksjonene N1-N4, som man fikk som beskrevet i figur 6. Forsøksforholdene var de samme som i figur 3 bortsett fra at det ble brukt én enkelt kolonne (TSK G3000 PWXL). Figur 7B viser den tilsvarende kumulative distribusjonen av molekylvekt beregnet fra dataene i 7A.

Figur 8: SEC-MALLS-kromatogram (8A) av en kitosan, som er depolymerisert med en kitosanase (ufraksjoner prøve) og fraksjonene E1-E4, som man fikk som beskrevet i figur 6. Forsøksforholdene var de samme som i figur 3 bortsett fra at det ble brukt én enkelt kolonne (TSK G3000 PWXL). Figur 8B viser den tilsvarende kumulative distribusjonen av molekylvekt beregnet fra dataene i 8A.

Figur 9 viser *in vivo* produksjon av lungeluciferase (pg/mg) 3 dager etter innføring av 25 μg pLuc i luftveiene hos mus (fire dyr per gruppe). Det ble laget komplekser mellom kitosanoligomerer og pLuc med et forhold mellom amin/fosfat på 60:1 (+/-). Den største luciferaseproduksjonen ble oppnådd med pLuc kompleksert med kitosanoligomeren N0 med 18 som antalls gjennomsnittlig polymeriseringsgrad, bestemt ved ^{13}C -NMR-spektroskopi. Statistiske forskjeller mellom gjennomsnittsverdiene ble undersøkt med bruk av ANOVA. Forskjellene mellom gruppegjennomsnittene ble ansett som signifikant når $P < 0,05$.

Figur 10 viser *in vivo* produksjon av lungeluciferase (pg/mg) 3 dager etter innføring av 25 μg pLuc i luftveiene hos mus (fire dyr per gruppe). Kitosan-oligomeren N0 med 18 som antalls gjennomsnittlig polymeriseringsgrad, ble fraksjonert i fire forskjellige prøver med veldefinert og smal distribusjon av polymeriseringsgrad. Det ble laget komplekser mellom kitosanoligomerer og pLuc med et forhold mellom amin/fosfat på 60:1 (+/-). Komplekser basert på fraksjonen som inneholdt oligomerer med kjedelengder på mellom 15 og 21 monomerenheter (N3), viste betydelig ($p < 0,05$) høyere genekspresjon enn komplekser basert på den ufraksjonerte prøven N0 med 18 som antalls gjennomsnittlig polymeriseringsgrad. Statistiske forskjeller mellom gjennomsnittsverdiene ble undersøkt med bruk av ANOVA. Forskjellene mellom gruppegjennomsnittene ble ansett som signifikant når $P < 0,05$.

Figur 11 viser resultatene av en retardasjonstest på agarosegel. Det ble laget komplekser mellom kitosanoligomerer og pLuc med et forhold mellom

amin/fosfat på 60:1 (+/-). Med økende molekylvekt (polymeriseringsgraden) av kitosanligomeren, ble det observert større stabilitet i de kompleksene som ble dannet. Ingen vandring ble detektert for pLuc kompleksert med den fraksjonen som inneholdt 36-50 monomerenheter (N1) til sammenligning med kompleksert dannet med 15-21 monomerenheter (N3).

Figur 12 viser genekspressjon av med luciferase *in vitro* etter inkubasjon av 293 celler med to serier med fraksjonerte kationiske kitosanligomere med lav molekylvekt (N1 og E1), som var laget med ni måneders mellomrom, og kommersielle kitosaner (Protasan UPG 210) bestilt med tre års mellomrom. Genekspressjonen varierte 10-dobbelte mellom de to seriene med Protasan UPG 210 som var kompleksert med pLuc med et forhold mellom amin/fosfat på 2,4:1 (+/-), men ikke signifikant mellom de to seriene med fraksjonerte kationiske kitosanligomere med lav molekylvekt (N1 og E1) kompleksert med pLuc med et forhold mellom amin/fosfat på 10:1 (+/-). Statistiske forskjeller mellom gjennomsnittsverdiene ble undersøkt med bruk av ANOVA. Forskjellene mellom gruppegjennomsnittene ble ansett som signifikant når $P < 0,05$.

Figur 13 viser dråpestørrelsen (massens mediandiameter, MMD) etter aerosolering av kompleksert som inneholder kationer med pLuc. Fraksjoner av kitosanligomere med 15-21 (N3) og 36-50 (N1) monomerenheter og en helt ren kitosan, Protasan UPG 210 (UPC), ble podet med pLuc i forhold mellom amin/ fosfat på henholdsvis 60:1 (+/-) og 3:1 (+/-). MMD var helt tydelig avhengig av sammensetningen. Den minste dråpestørrelsen fikk man med nakent pLuc og kompleksert med 15-21 monomerenheter (N3) og pLuc. Statistiske forskjeller mellom gjennomsnittsverdiene ble undersøkt med bruk av ANOVA. Forskjellene mellom gruppegjennomsnittene ble ansett som signifikant når $P < 0,05$.

Med bruk av et kontrollprotein, luciferase, som modell for et terapeutisk protein i en *in vivo* lungemodell fant man at formuleringer med plasmid DNA og en spesiell sammensetning av kitosanligomere med veldefinert kjedelengde, distribusjon av kjedelengder og kjemisk sammensetning er gunstige for å levere nukleinsyre til celler i et utvalgt vev og for å få *in vivo* produksjon av de ønskede molekylene som nukleinsyrene er kodet for å gi.

Det ble funnet at en fraksjon av kitosanligomer fremstilt fra kitosan med antalls gjennomsnittlig polymeriseringsgrad på 18 ($DP_n=18$ bestemt ved ^{13}C -NMR-spektroskopi), som har relativ smal størrelsesfordeling sammenlignet med

Kuhns fordeling og med over 99 % D-enheter ($F_A < 0,01$), dannet stabile komplekser (vist ved agarosegel-elektroforese) med pLuc med et forhold mellom amin/fosfat på 60:1 (+/-). Et vesentlig høyere *in vivo* genekspressjon av luciferase ble oppnådd med en polydispers $DP_n=18$ - prøve enn med monodisperse kitosan-oligomerer med 6, 10 og 12 monomerenheter som dannet ustabile komplekser med pLuc med et forhold mellom amin/fosfat på 60:1 (+/-). Det faktum at stabile komplekser resulterte i en større genekspressjon enn ustabile komplekser stemmer med tidligere artikler (Fischer *et al.*, 1999, Gebhart og Kabanov, 2001, Koping-Hoggard *et al.*, 2001). Men det ble lavere produksjon av luciferase med stabile komplekser som ble dannet med kitosanoligomerer med større gjennomsnittlige molekylstørrelser enn for $DP_n=18$ -prøven. Fraksjonen $DP_n=18$ ble ytterligere fraksjonert i fraksjoner med mindre distribusjon, dvs. 10-14 monomerenheter (N4), 15-21 monomerenheter (N3), 22-35 monomerenheter (N2) og 36-50 monomerenheter (N1). Komplekser mellom fraksjoner med 15-21 monomerenheter og pLuc resulterte uventet nok i den største *in vivo* genekspressjonen i lungene selv om det ble dannet ustabile sammensetninger med et forhold mellom amin/fosfat på 60:1 (+/-). Fraksjonen 10-14 monomerenheter dannet også ustabile sammensetninger med pLuc og resulterte kun i beskjeden produksjon av luciferase.

Dessuten resulterte aerosolering av kompleksene mellom fraksjoner med 15-21 monomerenheter og pLuc i sammenlignbare dråpestørrelser i form av en aerosolert løsning av nakent pLuc. Derimot bandt aerosolerte fraksjoner med 36-50 monomerenheter seg til pLuc og UPC (ca. 1000-mer) kompleksert med pLuc og gav henholdsvis 2 og 3 ganger større dråpestørrelse. Denne formulering-avhengige virkningen på dråpestørrelsen kan forklares med økt viskositet av løsningen når polykationets molekylvekt øker, slik at det dannes større dråper.

EKSEMPLER

Eksempel 1. Fremstilling av kitosaner med lav molekylvekt

Kitosanet Protasan UP G 210 ($F_A=0,17$, gjennomsnittlig molekylvekt på 162 000) er fra Pronova Biomedical AS, Oslo, Norge. Oligomeren av N-glukosamin med lav molekylvekt ble fremstilt ved kjemisk depolymerisering av kitosan med bruk av NaNO_2 og videre reduksjon ved hjelp av NaBH_4 som beskrevet av Tømmeraas *et al.*, 2001, der molekylvekten ble styrt av mengden NaNO_2 i forhold til mengden av kitosan. Fraksjonen av acetylerede enheter ble kontrollert av

heterogen deacetylering for å få F_A med mindre enn 0,001 som bestemt ved proton-NMR-spektroskopi som tidligere beskrevet (Vårum *et al.*, 1991). Det typiske var at 1,0 gram kitosan ble oppløst i 100 ml med 2,5 % vannholdig eddiksyre, oppløst oksygen ble fjernet ved å sende nitrogengass gjennom løsningen i 5 minutter, og 5 ml med en helt fersk løsning av NaNO_2 i destillert vann (10 mg/ml) ble tilført. Reaksjonen pågikk i 4 timer i mørke, og deretter ble den depolymeriserte kitosanen redusert ved tilsetning av 3 grams med NaBH_4 og henstand i mørke over natt. pH-verdien ble justert til 4,5 med eddiksyre. Løsningen ble dialysert (Medicells dialyserør, MWCO 12000-14000) tre ganger med 0,2M NaCl og seks ganger med destillert vann og og frysetørket for å få oligomer med lav molekylvekt som hydrokloridsalt. Oligomerene med lav vekt ble også fremstilt ved hjelp av enzymatisk depolymerisering med bruk av kitosanase fra *Streptomyces griseus* (Sigma C 9830 og Sigma C 0794), der molekylvekten styres av mengden av enzymer i forhold mengden av kitosan og inkubasjonstiden. 0.5 gram med kitosan ble oppløst i en konsentrasjon på 20 mg/ml i 0,1M natriumacetat/eddiksyre (pH 5,5), og 0,65 enheter med kitosanase (Sigma C 0794) ble tilsatt kitosanløsningen, som så stod i 18 timer ved 37 °C. Enzymreaksjonen ble stoppet ved å redusere pH-verdien til 2 påfulgt av koking i 5 minutter. Den depolymeriserte kitosanen ble dialysert og frysetørket som beskrevet over for å få et lav molekylært, enzym nedbrutt kitosan på hydrokloridsalt form.

Eksempel 2. Produksjon og karakterisering av fraksjonerte prøver

Kitosanene med lav molekylvekt som ble fremstilt slik det er beskrevet i eksempel 1, ble fraksjonert ved hjelp av SEC i to seriekoblede kolonner på 2,5 x 100 cm som beskrevet tidligere (Tømmeraas *et al.*, 2001). Fraksjoner på 4 mL ble samlet og sammenstilt i henhold til kromatogrammene i figur 6 (a og b). Fire fraksjoner med forskjellig molekylvekt ble fremstilt:

N1 (spaltet ved hjelp av salpetersyring) eller E1 (spaltet ved hjelp av kitosanase)
N2 (spaltet ved hjelp av salpetersyring) eller E2 (spaltet ved hjelp av kitosanase)
N3 (spaltet ved hjelp av salpetersyring) eller E3 (spaltet ved hjelp av kitosanase)
N4 (spaltet ved hjelp av salpetersyring) eller E4 (spaltet ved hjelp av kitosanase)

Tabell 1: Prøvene ble analysert ved hjelp av SEC-MALLS. Vi fikk følgende distribusjon av kjedelengder (gjennomsnitt av 3 injeksjoner):

Prøve	DP _w	DP _n	DP _w /DP _n	
Ufraksjonert N0 (spaltet ved hjelp av salpetersyrling)	31	25	1,22	
N1	44	40	1,09	
N2	27	26	1,03	
N3	20	19	1,03	
N4	14	13	1,04	
Ufraksjonert E0 (spaltet ved hjelp av salpetersyrling)	27	21	1,31	
E1	50	44	1,12	
E2	33	30	1,06	
E3	25	23	1,03	
E4	17	16	1,07	

der DP_w = vektsgjennomsnittlig DP

5 and DP_n = antallsgjennomsnittlig DP

Eksempel 3. Formulering og *in vivo* uttrykk for gener i lunger

En polydispers fraksjon av kationisk kitosanligomer med en polymeriseringsgrad (DP) mellom 6 og 50 (antalls gjennomsnittlig DP på 18 bestemt fra de ikke-reduserende endene i ¹³C-nmr-spekteret, N0) og veldefinerte kationiske oligomerer med DP på 6, 10, 12, 10-14 (N4), 15-21 (N3), 22-35 (N2), 36-50 (N1) ble fremstilt av kitosan i henhold til de metodene som er beskrevet i eksempel 1 og eksempel 2. Ildfluoriferase plasmid DNA (pLuc) ble kjøpt fra Aldevron, Fargo, ND, USA. Stamnløsninger av egne kationiske kitosanligomerer (2 mg/ml) ble fremstilt i sterilt destillert deionisert vann, pH 6,2 ± 0,1 fulgt av steril filtrering. Komplekser mellom kationiske kitosanligomerer og pLuc ble formulert i et forhold på 60:1 (+/-) ved tilsetning av kationiske oligomerer og deretter pLuc i sterilt vann under intens omrøring i en vortex mikser (Heidolph REAX 2000, KEBO

Lab, Spånga, Sverige). Etter 15 minutter ble kompleksene kondensert ved hjelp av mild fordampning i vakuum i en SpeedVac Plus-sentrifuge (Savant Instruments, Holbrook, NY) i ca. 90 minutter for å få pLuc-konsentrasjoner på omtrent 250 µg/ml (Koping-Hoggard *et al.*, 2001). Dessuten ble pLuc formulert med PEI 25 kDa (Aldrich Sweden, Stockholm, Sverige) og en ultraren kitosan, Protasan UPG 210 (Pronova Biopolymer, Oslo, Norge) under optimale forhold, forhold på henholdsvis 5:1(+/-) og 3:1 (+/-) (Bragonzi *et al.*, 2000, Koping-Hoggard *et al.*, 2001).

Mus (hann Balb/c, 6-8 uker gamle, 4 dyr per gruppe, Charles River, Uppsala, Sverige) ble bedøvet med ketamin/xylazin (5/20 volumprosent, 0,1 ml/10 g kroppsvekt), og luftrøret ble blottlagt med et 0,5 cm langt snitt i nakken. 100 µl av de kompleksene som er beskrevet over, ble langsomt ført dråpevis inn i luftrøret, og musene ble sydd igjen. 72 timer etter innføring ble dyrene drept med karbondioksid, og lungene ble fjernet på kirurgisk måte, skylt i PBS, og det ble tilført 0,3 ml iskald luciferaselysebuffer (Promega, Madison, WI) med en blanding av proteaseinhibitor (Complete, Boehringer Mannheim Scandinavia AB, Bromma, Sverige). Vevsprøvene ble raskt frosset ned i flytende nitrogen og lagret ved -80 °C til de skulle analyseres.

Vevsprøvene ble homogenisert ved hjelp av en morter i et kaldt rom (Biospec Products, Inc., OK) og deretter sentrifugert (Centrifuge 5403, Eppendorf-Nethelar-Hinze GmbH, Hamburg, Tyskland) ved 4 °C og 15 000 rpm (omdreininger pr. min) i 10 min. En mengde på 50 µl av det klare skummet fra hvert reagensrør ble blandet med 50 µl av luciferase som reaksjonsmiddel (Promega) og analysert med et luminometer (Mediators PhL, Wien, Østerrike) med en integrasjonstid på 8 sekunder. For å kvantifisere luciferaseekspressjonen ble det laget en standardkurve av luciferase (Sigma, St. Louise, MO) ved tilsetning av definerte mengder av luciferasestandarden til skummet på homogenisert vev fra ubehandlede dyr i en kontrollgruppe. Det samlede proteininnholdet i hver prøve ble analysert ved BCA-analyse (Pierce, Rockford, IL) og kvantifisert med BSA (bovine serum albumin) som referanseprotein. Absorpsjonsevnen ble målt ved 540 nm på en mikroplateleser (Multiscan MCC/340, Labsystems Oy, Helsinki, Finland).

Resultatene av genenes transfeksjonseffektivitet i muselunger 72 timer etter innføring av pLuc kompleksert med kationiske kitosanoligomerer med forskjellige grader av polymerisering (molekylvekt) vises i figur 9. Overraskende nok ble det

vesentlig høyeste luciferaseuttrykket oppnådd med pLuc kompleksert med en kitosanligomer N0 med 18 som antalls gjennomsnittlig polymeriseringsgrad.

Resultatene av genenes transfeksjonseffektivitet i muselunger 72 timer etter innføring av pLuc komplekset med kationiske kitosanligomerer med forskjellige grader av polymerisering (molekylvekt) vises i figur 10. Kitosanligomeren N0 med 18 som antalls gjennomsnittlig polymeriseringsgrad ble fraksjonert, som beskrevet i eksempel 2, i fire prøver med veldefinert og liten distribusjon av polymeriseringsgrad. Det var overraskende å se at fraksjonen med kitosanligomerer med kjedelengder på mellom 15 og 21 monomerenheter (N3) viste større genekspresjon enn for PEI og betydelig større genekspresjon sammenlignet med den ufraksjonerte prøven N0 med 18 som antalls gjennomsnittlig polymeriseringsgrad.

Resultatene av retardasjonstesten på agarosegel vises i figur 11. Når molekylvekten (graden av polymerisering) på kitosanligomeren øker, økes også stabiliteten til de kompleksene som dannes. Ingen vandring ble detektert for pLuc kompleksert med den fraksjonen som inneholdt 22-35 (N2) og 36-50 monomerenheter (N1) til sammenligning med komplekser dannet med 10-14 (N4) og 15-21 monomerenheter (N3). Den ufraksjonerte prøven N0 med 18 som antalls gjennomsnittlig polymeriseringsgrad dannet også stabile sammensetninger med pDNA. Et betydeligere *in vivo* genekspresjon (figur 10) ble overraskende nok oppnådd med de mindre stabile sammensetningene 15-21 (N3) enn for de stabile sammensetningene dannet med DPn18 (N0).

Eksempel 4. *In vitro* uttrykk for gener

To forskjellige serier med fraksjonerte kitosanligomerer med lav molekylvekt: N1 og E1, som beskrevet i eksempel 2 og laget med 9 måneders mellomrom og kommersiell kitosan (Protasan UPG 210, serie 1: tilsynelatende viskositet på 70 mPas, serie 2: tilsynelatende viskositet på 146 mPas) bestilt med 3 års mellomrom ble sammensatt med pLuc, henholdsvis med et forhold på 10:1 (+/-) og 2,4:1 (+/-), som beskrevet i eksempel 2. Det ble brukt stabile pDNA-sammensetninger. 24 timer før transfeksjon ble epitelvevet i en cellekultur fra en nyre til et menneskefoster 293 (ATCC, Rockville, MD, USA) seedet med 70 % konfluks i dyrkningsbrett med 96 brønner (Costar, Cambridge, Storbritannia). Før transfeksjon ble cellene skylt, og deretter ble 50 µl (som tilsvarer 0,33 µg pLuc) av de polyplekse

formuleringene tilsatt per brønn. Etter en inkubasjon på 5 timer ble formuleringene fjernet, og 0,2 ml nytt dyrkningsmedium ble tilsatt. Mediet ble skiftet annenhver dag for eksperimentering i overkant av to dager. Etter 96 timer og 144 timer ble cellene skylt med PBS (pH 7,4), åpnet (Promega), og luciferase genekspressjonen ble målt med et luminometer (Mediators PhL). Mengden av produsert luciferase ble fastsatt ved hjelp av en standardkurve laget av ildfluoluciferase (Sigma), og det totale celleproteinet ble fastsatt med bruk av 'bichinoninic'syretest (Pierce).

Resultatene av genekspressjon med luciferase *in vitro* etter inkubasjon av 293 celler med to serier med fraksjonerte kationiske kitosanoligomerer med lav molekylvekt, N1 og E1, og kommersiell kitosanholdig Protasan UPG 210 vises i figur 12. Ekspresjonen for gener varierte 10-dobbel mellom de to seriene med Protasan UPG 210, men ikke vesentlig mellom de to seriene med de fraksjonerte kationiske kitosanoligomerer med lav molekylvekt, N1 og E1.

15 **Eksempel 5. Dråpestørrelse etter aerosolering**

Komplekser mellom kationiske kitosanoligomerer og pLuc ble laget som beskrevet i eksempel 3 for å få konsentrasjoner av pLuc på 500 µg/ml. Som kontroll ble det brukt en ultrarent kitosan (UPC, polymeriseringsgrad på ca. 1000) kompleksert med pLuc ved optimale forhold, forhold på 3:1 (+/-) (Koping-Hoggard *et al.*, 2001). Aerosoler med komplekser mellom kationiske kitosanoligomerer og pLuc ble fremstift ved hjelp av et forstøvningskateter (Trudell Medical International, London Ontario, Canada) med væske- og gasskanaler (luftkanaler). Først ble 100 µl av den sammensatte løsningen matet inn i en væskebeholder forbundet med forstøvningskateteret (væskeinnløp). For å oppnå aerosoler ble det deretter brukt pulser med trykkluft (3,5 bar) i korte perioder over væskebeholderen (20 ms) og gasskanalene til forstøvningskateteret (50 ms). Dråpestørrelsen på aerosolene som ble produsert, ble målt med en Mastersizer X (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Storbritannia).

Størrelsen på væskedråpene (massens mediandiameter, MMD) etter aerosolisering av sammensetningene med kationer kompleksert med pLuc, vises i figur 13. MMD var helt tydelig avhengig av sammensetningen. De minste dråpestørrelsene fikk man med "nakent" pLuc og formuleringen med 15-21 monomerenheter (N3) kompleksert med pLuc.

KILDER

- Artursson P, Lindmark T, Davis SS and Illum L (1994) Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm Res* 11:1358-1361.
- 5 Boussif O, Lezoualch F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B and Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligo nucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyetylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92:7297-7301.
- 10 Bragonzi A, Dina G, Villa A, Calori G, Biffi A, Bordignon C, Assael BM and Conese M (2000) Biodistribution and transgene expression with non-viral cationic vector/DNA complexes in the lungs. *Gene Ther* 7:1753-1760.
- Deshpande D, Blezinger P, Pillai R, Duguid J, Freimark B and Rolland A (1998) Target specific optimization of cationic lipid-based systems for pulmonary gene therapy. *Pharm Res* 15:1340-1347.
- 15 Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M and Felgner PL (1994) Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *Journal of Biological Chemistry* 269:2550-2561.
- 20 Ferrari S, Moro E, Pettenazzo A, Behr J, Zacchello F and Scarpa M (1997) ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Therapy* 4:1100-1106.
- Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsasser HP and Kissel T (1999) A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* 16:1273-1279.
- 25 Florea B, Thanou, M., Geldof, M., Meaney, C., Junginger, H. E. and Borchard, G. (2001) Modified chitosan oligosaccharides and polyethylenimine as transfection agents for gene therapy in cystic fibrosis. *Journal*
- 30 Gautam A, Densmore CL, Golunski E, Xu B and Waldrep JC (2001) Transgene expression in mouse airway epithelium by aerosol gene therapy with PEI-DNA complexes. *Mol Ther* 3:551-556.
- Gautam A, Densmore CL, Xu B and Waldrep JC (2000) Enhanced gene expression in mouse lung after PEI-DNA aerosol delivery. *Mol Ther* 2:63-70.

- Gebhart CL and Kabanov AV (2001) Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J Control Release* 73:401-416.
- Godbey WT, Wu KK and Mikos AG (1999) Size matters: Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res* 45:268-275.
- Godbey WT, Wu KK and Mikos AG (2001) Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials* 22:471-480.
- Griesenbach U, Chonn A, Cassady R, Hannam V, Ackerley C, Post M, Tanswell AK, Olek K, O'Brodvich H and Tsui LC (1998) Comparison between intra tracheal and intravenous administration of liposome-DNA complexes for cystic fibrosis lung gene therapy. *Gene Ther* 5:181-188.
- Hudde T, Rayner SA, Comer RM, Weber M, Isaacs JD, Waldmann H, Larkin DF and George AJ (1999) Activated polyamidoamine dendrimers, a non-viral vector for gene transfer to the corneal endothelium. *Gene Ther* 6:939-943.
- Illum L (1998) Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res* 15:1326-1331.
- Koping-Hoggard M, Melnikova, Y., Vårum K. M., Lindman, B. and Artursson, P. (2001) Chitosan polyplexes as a gene delivery system. Characterization of structure-activity relationships from supramolecular shape. Unpublished
- Koping-Hoggard M, Tubulekas I, Guan H, Edwards K, Nilsson M, Vårum KM and Artursson P (2001) Chitosan as a non-viral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther* 8:1108-1121.
- Ledley FD (1996) Pharmaceutical approach to somatic gene therapy. *Pharm Res* 13:1595-1614.
- Li S and Huang L (1997) In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther* 4:891-900.
- Li S, Tan Y, Viroonchatapan E, Pitt BR and Huang L (2000) Targeted gene delivery to pulmonary endothelium by anti-PECAM antibody. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:L504-511.
- Luo D and Saltzman WM (2000) Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 18:33-37.
- MacLaughlin FC, Mumper RJ, Wang J, Tagliaferri JM, Gill I, Hinchcliffe M and Rolland AP (1998) Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing

- carriers for in vivo plasmid delivery [In Process Citation]. *J Controlled Release* 56:259-272.
- Mumper RJ, Duguid JG, Anwer K, Barron MK, Nitta H and Rolland AP (1996) Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. *Pharm Res* 13:701-709.
- Mumper RJ, Wang J, Klakamp SL, Nitta H, Anwer K, Tagliaferri F and Rolland AP (1998) Protective interactive noncondensing (PINC) polymers for enhanced plasmid distribution and expression in rat skeletal muscle. *J Control Release* 52:191-203.
- Ottøy MH, Vårum KM, Christensen BE, Anthonsen MW & Smidsrød O (1996) Preparative and analytical size-exclusion chromatography of chitosans. *Carbohydr. Polym.* 31:253-261.
- Plank C, Tang MX, Wolfe AR and Szoka FC, Jr. (1999) Branched cationic peptides for gene delivery: role of type and number of cationic residues in formation and in vitro activity of DNA polyplexes [published erratum appears in *Hum Gene Ther* 1999 Sep 1;10(13):2272]. *Hum Gene Ther* 10:319-332.
- Putnam D, Gentry CA, Pack DW and Langer R (2001) Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1200-1205.
- Roberts, G.A.F., "Chitin Chemistry" (1992), Macmillan, London, page 6-7.
- Roy K, Mao HQ, Huang SK and Leong KW (1999) Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med* 4:387-391.
- Saeki Y, Matsumoto N, Nakano Y, Mori M, Awai K and Kaneda Y (1997) Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai virus): reciprocal effect of cationic lipid for in vitro and in vivo gene transfer. *Hum Gene Ther* 8:2133-2141.
- Sato T, Ishii T and Okahata Y (2001) In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials* 22:2075-2080.
- Song YK, Liu F, Chu S and Liu D (1997) Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer in vivo by intravenous administration. *Hum Gene Ther* 8:1585-1594.

- C. Tanford (1961) Physical chemistry of macromolecules, John Wiley and Sons, New York, Section 8b and 33a)
- Tømmeraas K, Vårum KM, Christensen BE and Smidsrød O (2001) Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. *Carbohydr Res* 333:137-144.
- 5 Vårum KM, Anthonsen MW, Grasdalen H and Smidsrød O (1991) Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy. *Carbohydr Res* 211:17-23.
- 10 Vårum, KM, Ottøy, MH and Smidsrød, O (2001) Acid hydrolysis of chitosans. *Carbohydr. Polym.* 46: 89-98.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A and Felgner PL (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247:1465-1468.

PATENTKRAV

1. Formulering, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter komplekser av:
 - (a) kationiske kitosanoligomerer fremstilt fra kationisk polysakkaridkitosan der de nevnte kationiske oligomerene inneholder en vektfraksjon på mindre enn 20 % oligomerer med en polymeriseringsgrad (DP)<10 i tillegg til en vektfraksjon på mindre enn 20 % med DP>50, og
 - (b) en nukleinsyre.

2. Formulering i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at de nevnte kationiske kitosanoligomerene oppnås fra kitosan ved anvendelse av kjemiske eller enzyatiske metoder.

3. Formulering i henhold til kravene 1 og 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at de nevnte kationiske oligomerene fortrinnsvis inneholder en vektfraksjon på mindre enn 20 % oligomerer med DP<12 i tillegg til en vektfraksjon på mindre enn 20 % med en DP>40 og aller helst en vektfraksjon på mindre enn 20 % oligomerer med DP<15 i tillegg til en vektfraksjon på mindre enn 20 % med en DP>30.

4. Formulering i henhold til kravene 1-3, k a r a k t e r i s e r t v e d at fraksjonen av N-acetylerede enheter (F_A) av de nevnte kitosanoligomerene er mindre enn 0,60, fortrinnsvis mindre enn 0,35, helst mindre enn 0,1 og aller helst mindre enn 0,01.

5. Formulering i henhold til kravene 1-4, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte formulering i det vesentlige har en netto positiv ladning.

6. Formulering i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at de nevnte kitosanoligomerene er derivatisert med målbærende ligander og stabiliseringsmidler.

7. Formulering i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at de nevnte formuleringene omfatter en kodende sekvens som vil uttrykke funksjonen sin når den nevnte nukleinsyren innføres i en vertscelle.

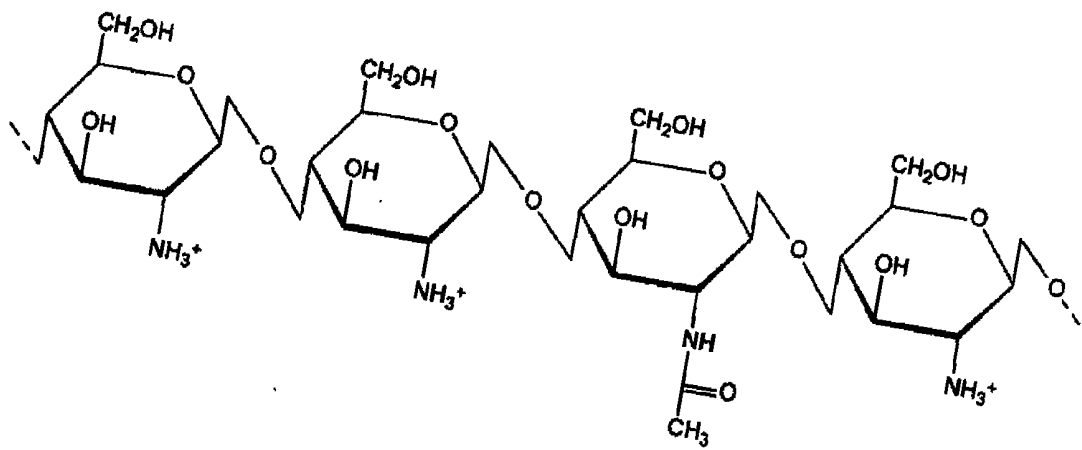
8. Formulering i henhold til krav 7, karakterisert ved at nevnte nukleinsyre velges fra gruppen som består av DNA- og RNA-molekyler.
9. Formulering i henhold til krav 8, karakterisert ved at nevnte sammensetning har en pH mellom 3,5 og 8.
10. Formulering i henhold til krav 9, karakterisert ved at nevnte formulering etter aerosolisering i det vesentlige har en sammenlignbar dråpestørrelse med en formulering som består av bare nukleinsyre ved like konsentrasjoner av nukleinsyre.
11. Fremgangsmåte for å fremstille formuleringen i henhold til kravene 1-10, karakterisert ved at den omfatter trinnene å:
 - (a) eksponere den nevnte kationiske kitosanoligomeren for et vandig løsningsmiddel,
 - (b) blande den vandige løsningen i trinn (a) med den nevnte nukleinsyren i et vandig løsningsmiddel, og
 - (c) redusere volumet av produktløsningen i trinn (b) for å oppnå en ønsket konsentrasjon av den nevnte formulering.
12. Anvendelse av formuleringen i henhold til kravene 1-10, for fremstilling av et profylaktisk eller terapeutisk medikament for å tilføre en nukleinsyre til et pattedyr ved å introdusere formuleringen i pattedyret.
13. Anvendelse i henhold til krav 12, der formuleringen skal føres inn i pattedyret via administrasjon til slimhinnevevet i lunger, nese, munn, kinn, under tungen, i rektum eller vagina.
14. Anvendelse i henhold til krav 12, der formuleringen skal føres inn i pattedyret ved administrering til underslimhinnevevet på parenteral måte, det vil si intravenøst, intramuskulært, i huden, under huden eller i hjertet, eller inn i de indre organer, blodkar eller andre kroppsoverflater eller hulrom som blottlegges i forbindelse med kirurgisk behandling.

15. Anvendelse i henhold til krav 12 som omfatter formuleringen i henhold til hvilket som helst av kravene 1-10, der den nevnte nukleinsyren er i stand til å uttrykke funksjonen sin inne i den nevnte cellen.

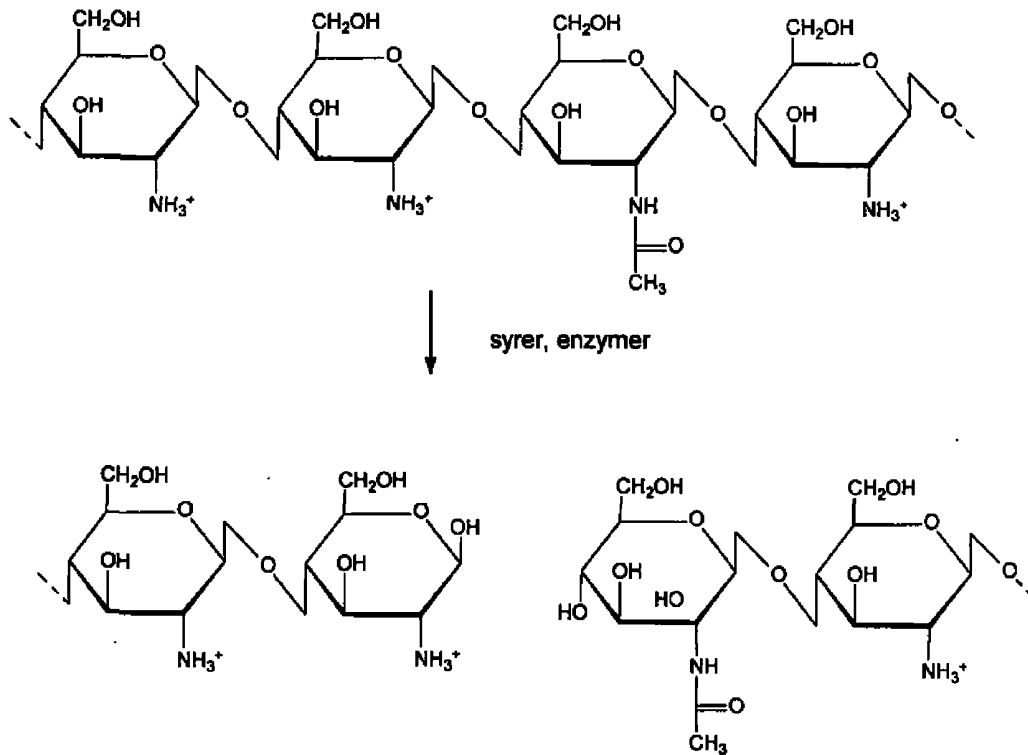
16. Anvendelse av formuleringen i henhold til hvilke som helst av kravene 1-10, for fremstilling av et medikament til profylaktisk eller terapeutisk behandling av et pattedyr, eller ved fremstilling av et diagnostisk middel til bruk ved *in vivo* eller *in vitro*-diagnostiske metoder.

17. Anvendelse av formuleringen i henhold til krav 16, for fremstilling av et medikament til anvendelse i genterapi, antisense-terapi eller genetisk vaksinerings for profylaktisk eller terapeutisk behandling av ondartede svulster, autoimmune sykdommer, arvelige sykdommer, patogene infeksjoner og andre patologiske sykdommer.

FIGUR 1

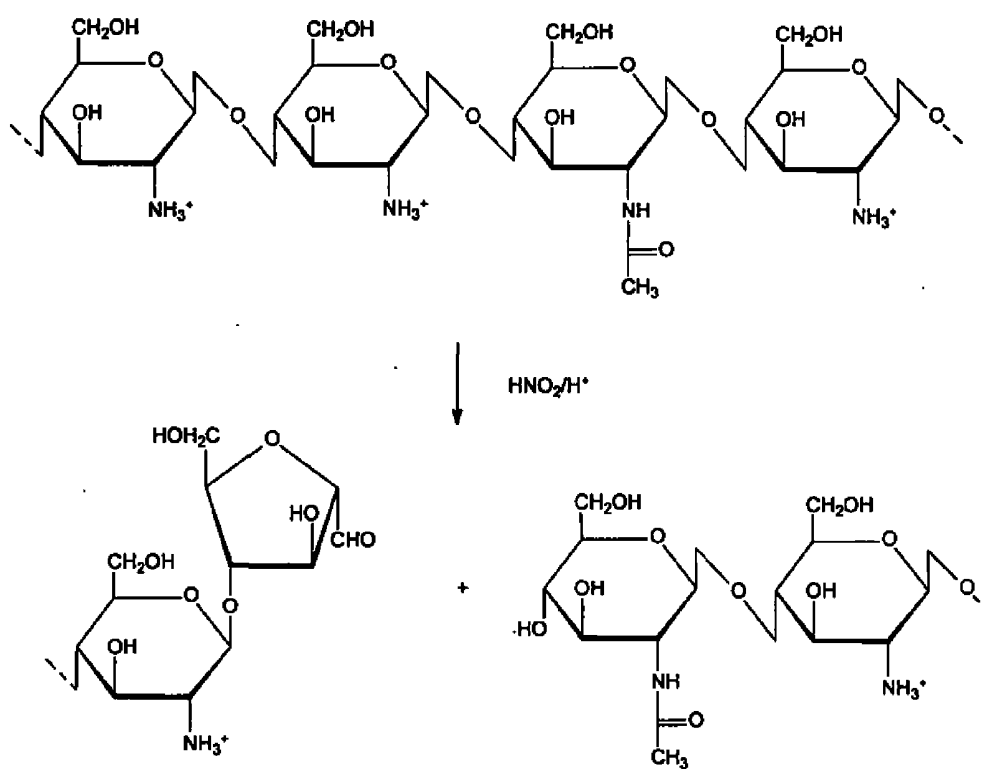


FIGUR 2A

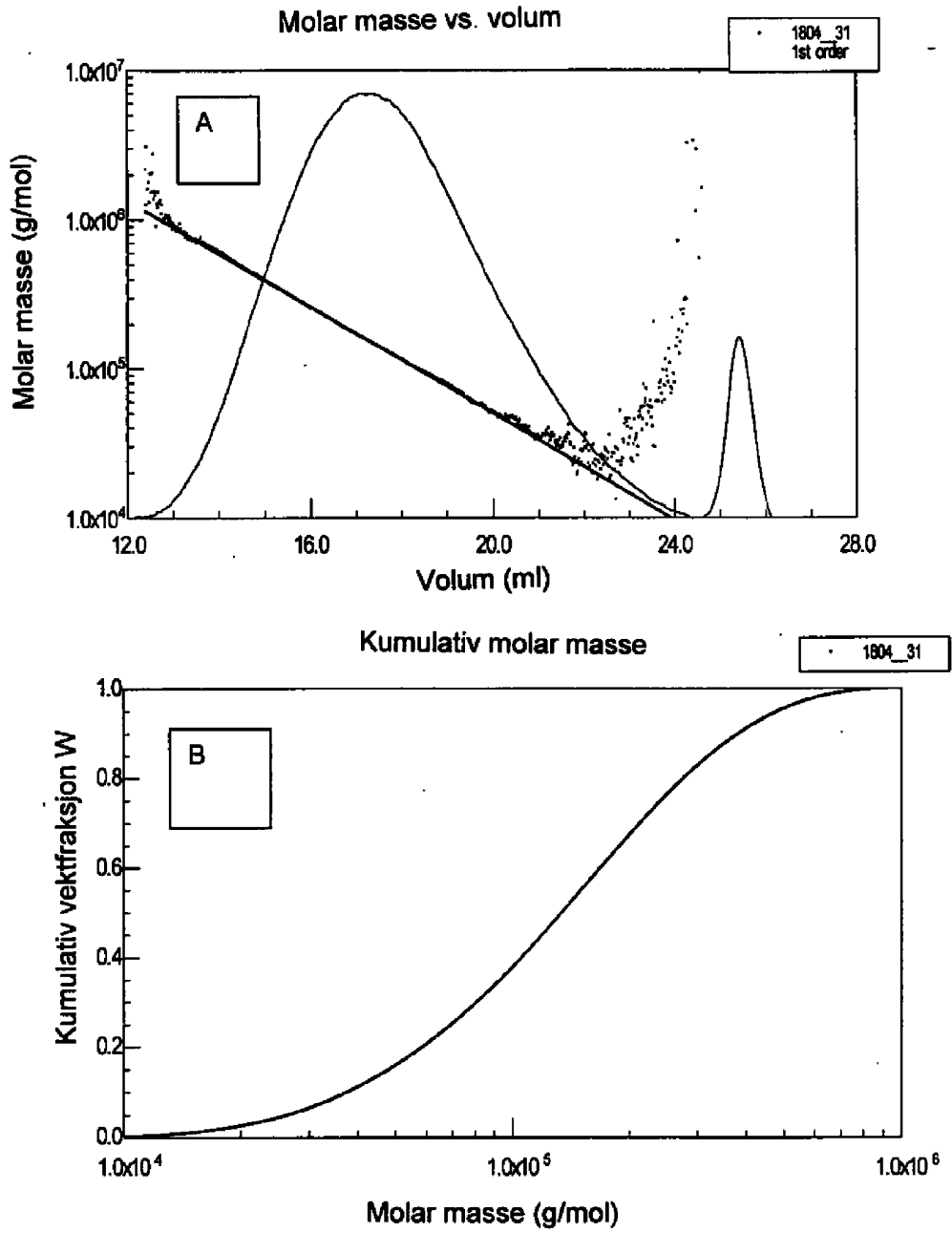


Sur hydrolyse: Primær hydrolyse av N-acetyl-glukosaminrester.
Enzymer: Bindingene som blir hydrolysert er avhengig av type enzym.
I begge tilfeller dannes en ny reduserende ende.

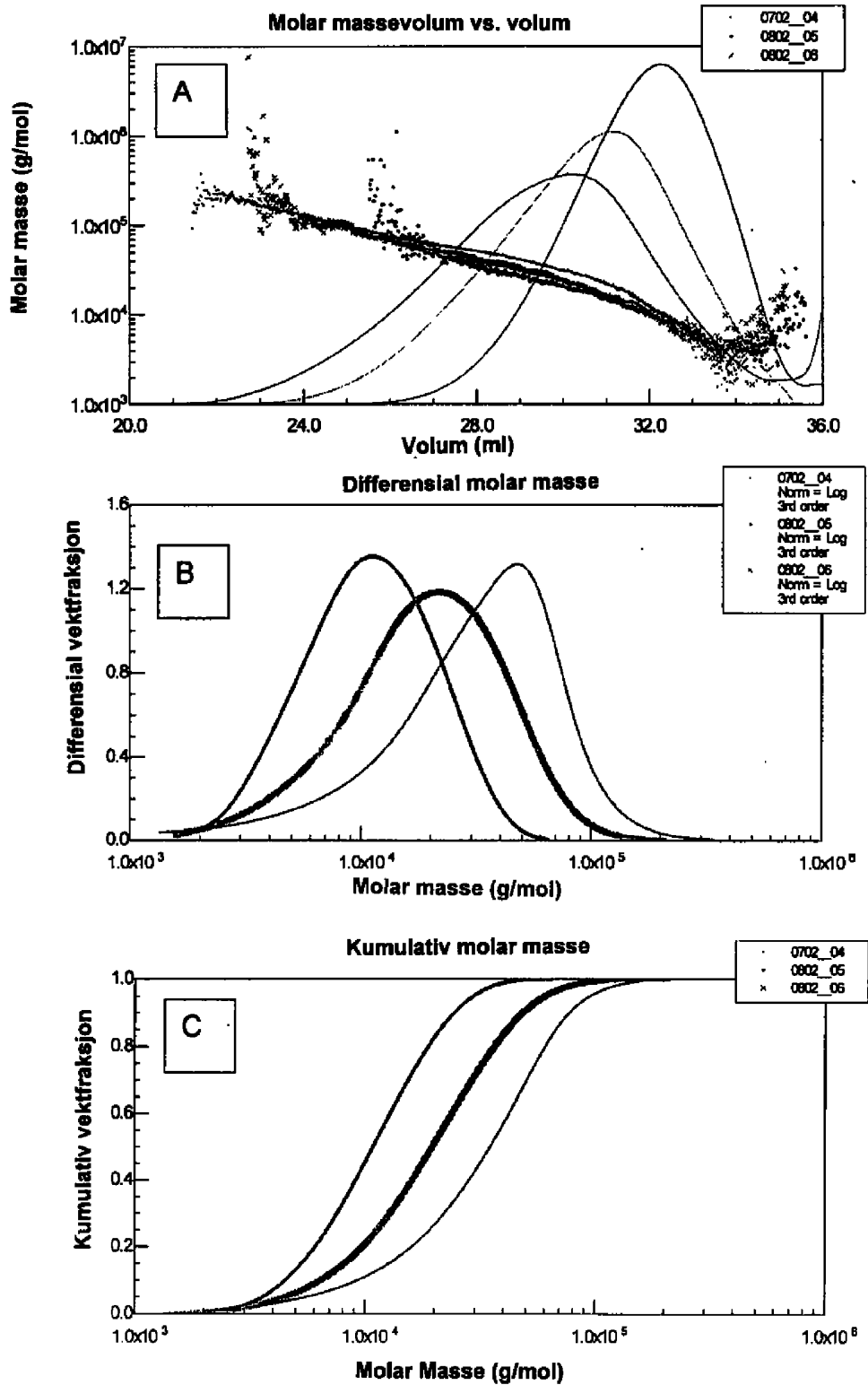
FIGUR 2B



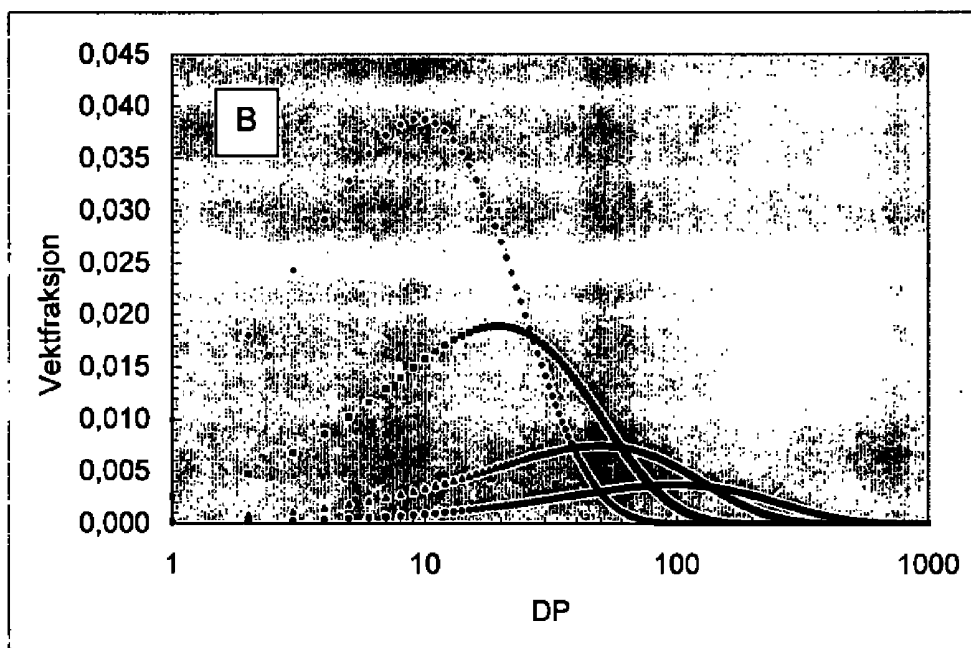
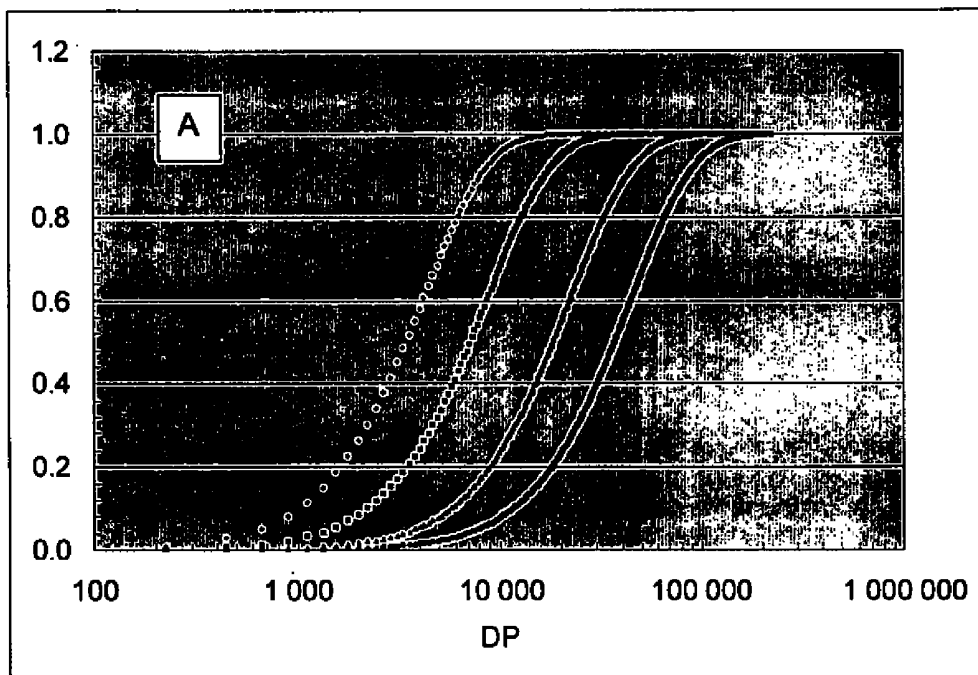
FIGUR 3



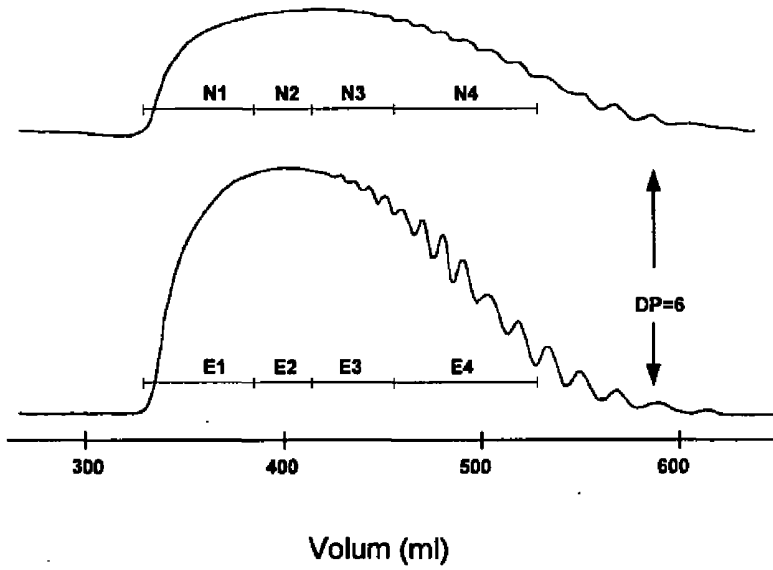
FIGUR 4



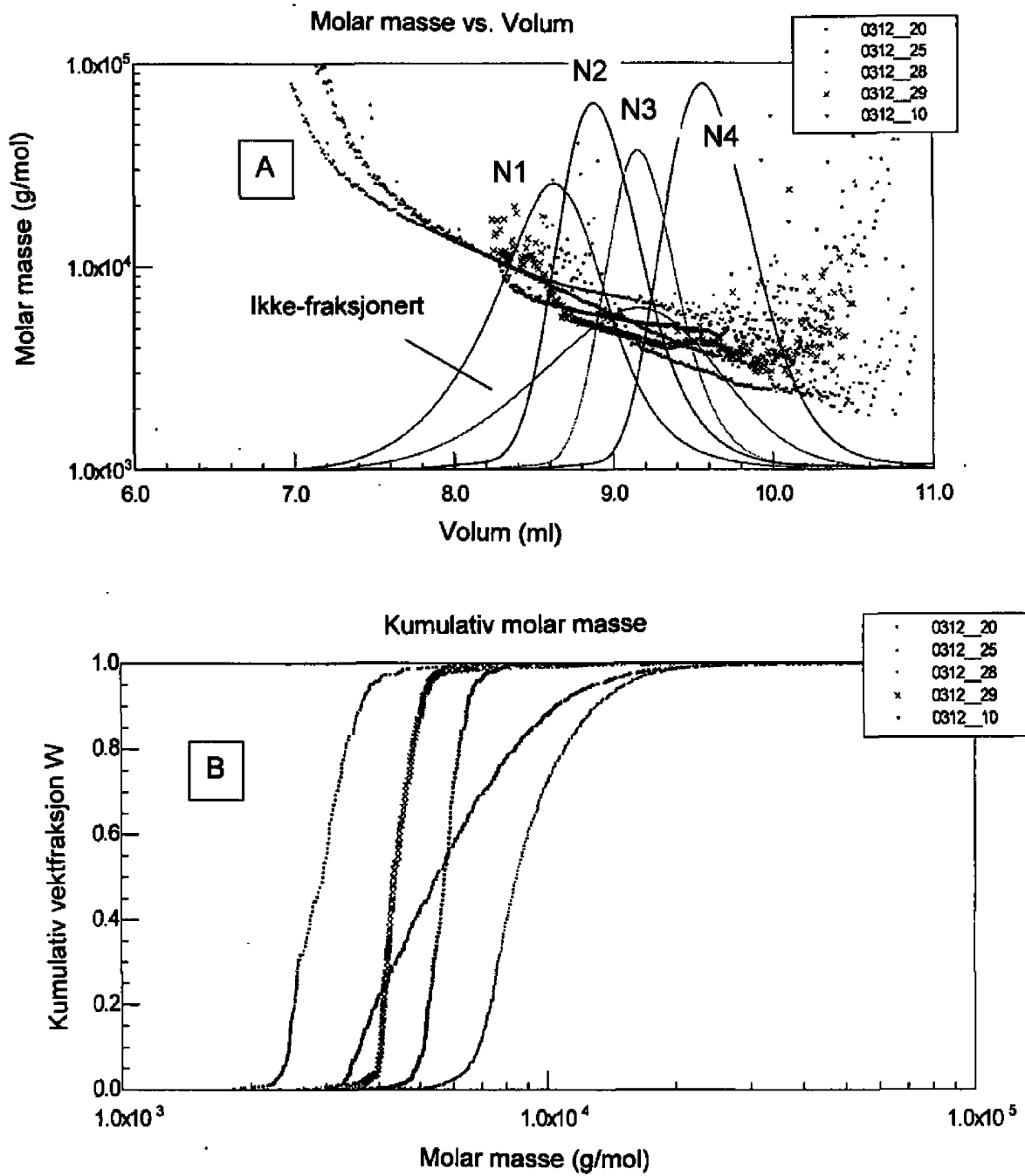
FIGUR 5



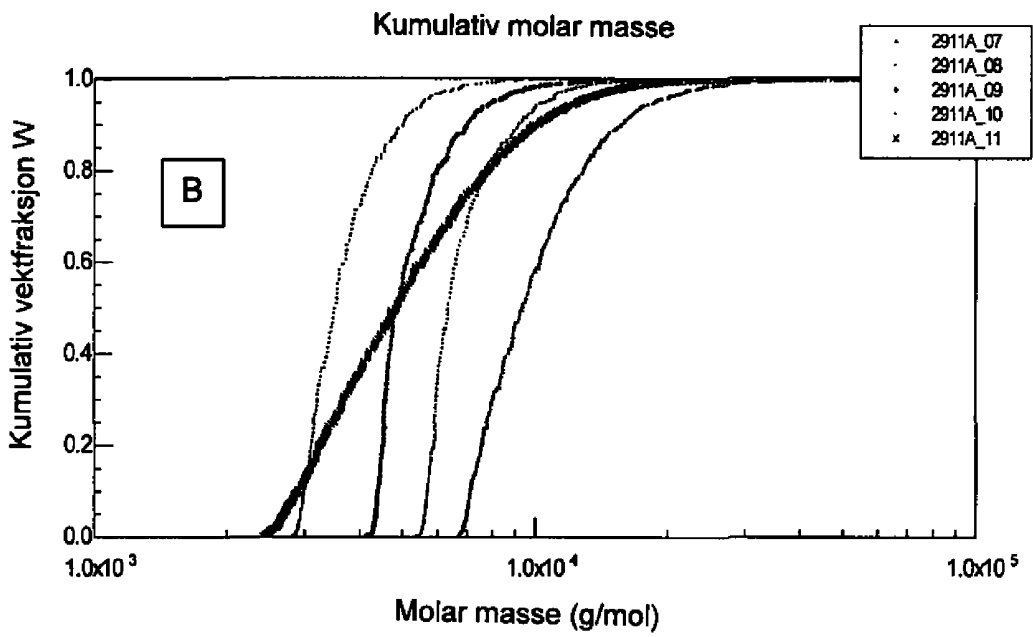
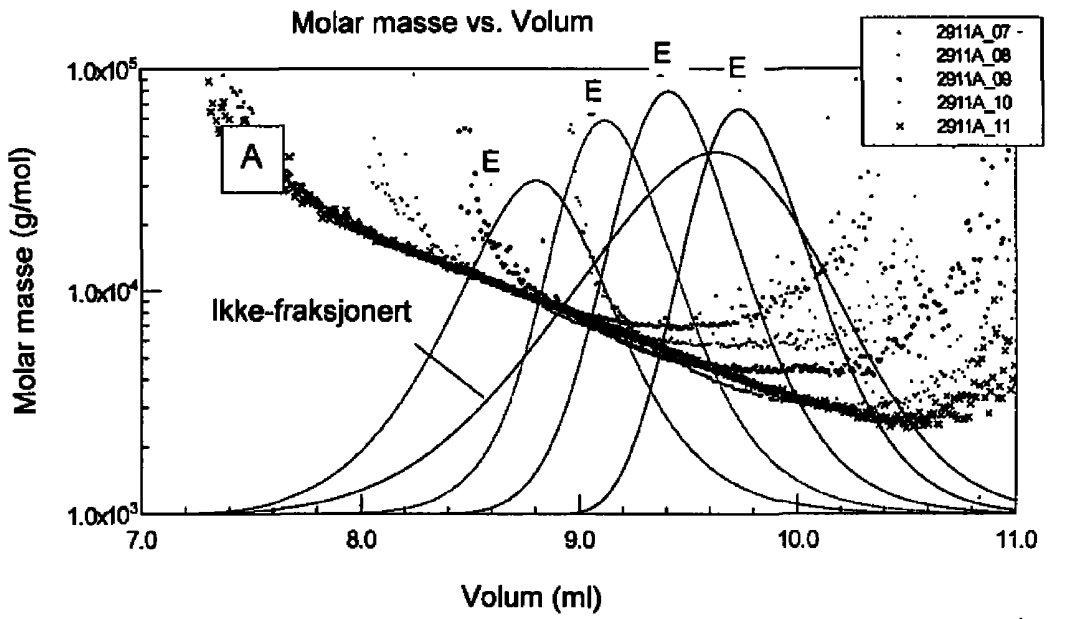
FIGUR 6



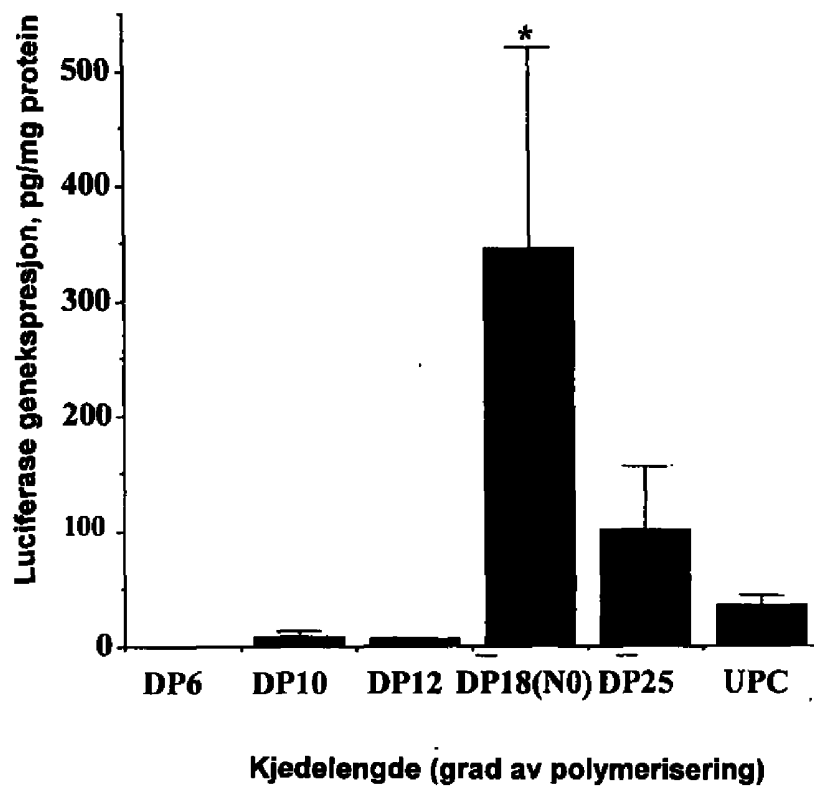
FIGUR 7



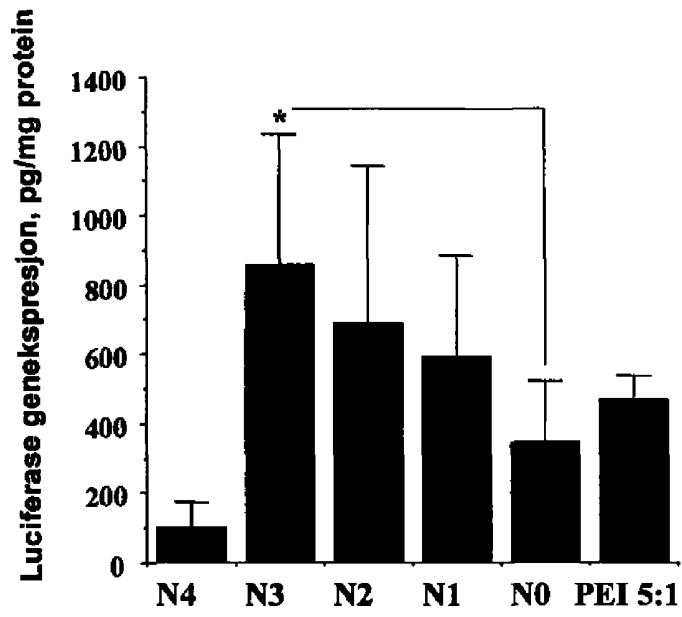
FIGUR 8



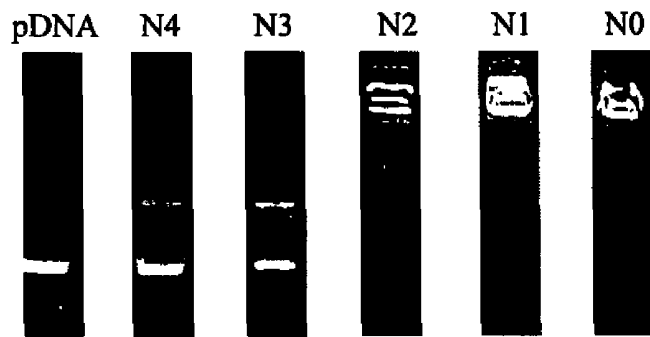
FIGUR 9



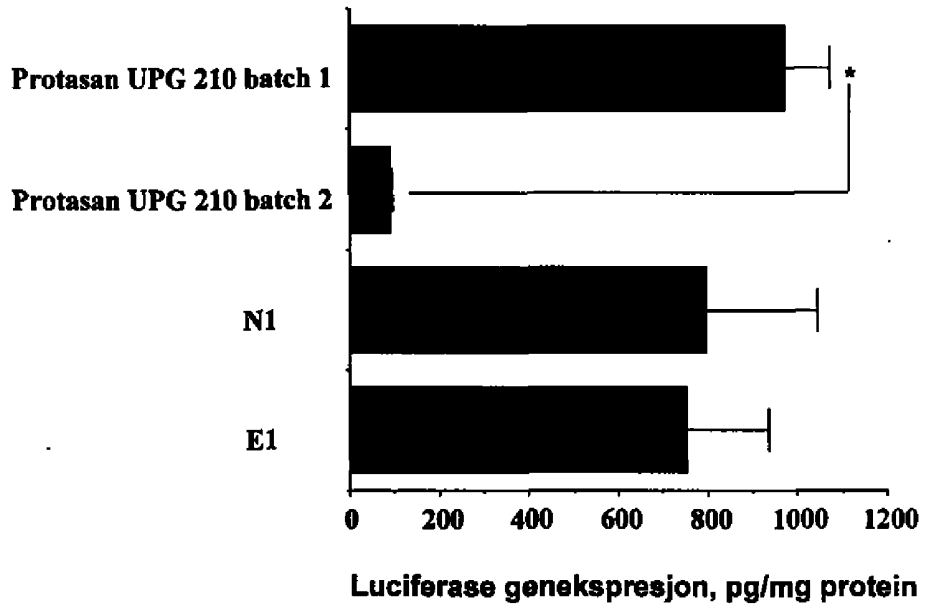
FIGUR 10



FIGUR 11



FIGUR 12



FIGUR 13

