Vehikel zum Transport von molekularer Substanz

Die Erfindung betrifft ein Vehikel zum Transport von molekularer Substanz, wie DNA, RNA, Protein, PNA, Arzneistoffe lipophilen und lipophoben Charakters, in eukaryontische Zellen. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung des Vehikels, dessen Verwendung sowie Zusammenstellungen von Mitteln zur Anwendung bzw. Durchführung der Erfindung.

Eukaryontische Zellen nehmen unter bestimmten Bedingungen DNA, Proteine und andere Moleküle auf. Die Aufnahmerate ist allerdings meist gering. Außerdem ist der Transport der molekularen Substanz in bezug auf die Art der Zellen sowie die Zellkompartimente oder den Ort im Intrazellulärbereich nicht vorherbestimmbar.

Um insbesondere die Aufnahme von DNA in eukaryontische Zellen zu verbessern, ist es bekannt, virale Vektoren als Vehikel zum Transport in die Zelle zu verwenden. - Die Verwendung viraler Vektoren ist nachteilig, weil es dabei zur Kotransfektion viraler Genome kommen kann.

Aus der US 4,950,599 ist des weiteren bekannt, molekulare Substanz wie DNA unter Verwendung leerer Viruskapside, insbesondere Polyomakapside, in eukaryontische Zellen zu schleusen. - Auch bei diesem Verfahren kann eine Kotransfektion viraler Genome nicht ausgeschlossen werden. Außerdem können Moleküle, deren Größe das Innenvolumen des Polyomakapsids übertreffen, darin nicht verpackt werden. Schließlich ist eine synthetische Herstellung von Polyomakapsiden, die als Möglichkeit der Vermeidung einer Kotransfektion in Betracht kommt, äußerst schwierig und kostenaufwendig.

Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile des Stands der Technik zu beseitigen, insbesondere ein Vehikel zum Transport molekularer Substanz in eukaryontische Zellen anzugeben, das universell verwendbar sowie einfach und kostengünstig herstellbar ist.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 16 und 19 - 21 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 - 15 sowie 17 und 18.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Vehikel vorgesehen, das mindestens ein von einem Virus abgeleitetes oder stammendes Kapsomer aufweist, das an seiner einen Seite eine mit der molekularen Substanz in Wechselwirkungen tretende Struktur aufweist, so daß die molekulare Substanz an das Kapsomer bind- bzw. anlagerbar ist.

Das erfindungsgemäße Vehikel hat den Vorteil, daß es relativ einfach synthetisch herstellbar ist. Somit kann eine Kotransfektion viraler Genome vermieden werden. Außerdem kann wegen des Vorsehenes der mit der molekularen Substanz in Wechselwirkung tretenden Struktur molekulare Substanz jeglicher Größe gebunden und in Zellen geschleust werden. Dazu muß die typische Kapsidform nicht mehr gewahrt werden. Unter Verwendung der erfindungsgemäßen Vehikel bilden sich neben Kapsomeren auch andersartige schützende Formen aus. Ein besonderer Vorteil der Erfindung ist darin zu sehen, daß es mit dem erfingungsgemäßen Vehikel je nach Ausbildung des mindestens einen Kapsomers möglich ist, die molekulare Substanz spezifisch in bestimmte Zellen und/oder an einen vorgegebenen Ort im Intrazellulärbereich zu transportieren.

Das Kapsomer ist vorzugsweise so ausgebildet, daß es zum Aufbau eines Kapsids oder eines kapsidartigen Gebildes geeig-

net ist. Von besonderem Vorteil ist es, wenn das Kapsomer spontan Kapside bildet.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal der Erfindung ist das Kapsomer vom Polyomavirus abgeleitet, wobei es aus dem VP1-Pentamer des Polyomavirus gebildet sein kann.

Alternativ dazu kann das Kapsomer aus "non-enveloped" Viren, wie DNA-haltigen Papovaviridae, insbesondere Polyoma- und den Papillomaviren, Iridoviridae, Adenoviridae, Parvoviridae oder RNA-haltigen Picornaviridae, insbesondere Polioviren, Caliciviridae, Reoviridae und Birnaviridae, gewonnen oder davon abgeleitet sein. Je nach Art der zu transportierenden molekularen Substanz kann es auch von Vorteil sein, das Kapsomer aus der äußeren und/oder inneren Hülle von "enveloped" Viren wie DNA-haltigen Poxviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae oder RNA-haltigen Retroviridae, Paramyxoviridae, Sendaiviren, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Toroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Rhabdoviridae und Filoviridae zu gewinnen oder davon abzuleiten.

Bei den Wechselwirkungen handelt es sich zweckmäßigerweise um lipophile Wechselwirkungen und/oder Wechselwirkungen, die auf kovalenten, ionischen oder Wasserstoffbrücken-Bindungen beruhen. Damit ist sichergestellt, daß die molekulare Substanz beim Transport in die Zelle sicher am Vehikel gebunden bzw. angehaftet bleibt, sich jedoch nach vollzogenem Transport in die Zelle vom Vehikel löst bzw. durch zelluläre Systeme abgelöst werden kann.

Die Struktur kann bifunktionelle, vorzugsweise heterolog bifunktionelle Gruppen umfassen, wobei die bifunktionellen Gruppen vorzugsweise aus der Stoffgruppe der Maleinimid-Derivate, Alkylhalide, Arylhalide, Isocyanate,

Glutardialdehyde, acrylierenden Reagentien und Imidoester ausgewählt sind. Dadurch wird insbesondere die Abgabe der molekularen Substanz im Lysosom, im zytoplasmatischen Raum oder im Kern erreicht.

Als besonders zweckmäßig hat es sich erwiesen, daß die bifunktionellen Gruppen mit Cystein-Resten am Kapsomer reagieren. Als vorteilhaft wird des weiteren angesehen, daß die in Wechselwirkung tretende Struktur affinitätserhöhende Gruppen, wie 4-Iodoacetamido-salicylsäure und/oder p-Arsonsäure-phenyldiazonium-fluoroborat und/oder Derivate davon, umfaßt. - Die Struktur kann auch durch Epitope des VP1-Pentamers gebildet sein.

Nach einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung ist ein Vehikel vorgesehen, wobei mit mindestens einem weiteren Kapsomer ein kapsidartiges Gebilde zum Transport der molekularen Substanz in eine vorgegebene Art von Zellen oder an einen vorgegebenen Ort im Intrazellulärbereich herstellbar ist. Das weitere Kapsomer kann ein erfindungsgemäßes Kapsomer sein. Das kapsidartige Gebilde kann aber auch unter Verwendung nicht erfindungsgemäßer weiterer Kapsomere hergestellt werden. Die Wahl der Art der Kapsomere und deren Kombination zur Herstellung des kapsidartigen Gebildes hängt von der Art der Zelle bzw. vom vorgegebenen Ort im Intrazellulärbereich ab, in die bzw. an den die molekulare Sustanz transportiert werden soll.

Zweckmäßigerweise ist die eine Seite des Kapsomers Bestandteil der Innenseite des kapsidartigen Gebildes, wobei das kapisidartige Gebilde vorzugsweise vom Polyomavirus abgeleitet ist. Schließlich kann das kapsidartige Gebilde mindestens ein VP-2 und/oder VP-3 Protein umfassen.

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Vehikels ist ein die folgenden Schritte umfassendes Verfahren vorgesehen:

i) Synthetisieren, Aufreinigen oder Isolieren des Kapsomers und

ii) Komplexieren der molekularen Substanz unter Verwendung des Kapsomers.

Eine Weiterbildung des Verfahrens besteht darin, nach dem Schritt lit.i geeignete Reste des Kapsomers, insbesondere dessen Cystein-Reste, mit bifunktionellen Gruppen zu modifizieren. Die Modifizierung kann zweckmäßigerweise unter Verwendung einer oder mehrerer der folgenden Stoffe durchgeführt werden: Maleinimid-Derivate, Alkylhalide, Arylhalide, Isocyanate, Glutardialdehyde, acrylierende Reagenzien und Imidoester.

Das erfindungsgemäße Vehikel kann vorzugsweise als Arzneistoffträger zur Applikation von Molekülen, wie DNA, RNA, Oligonukleotiden, PNA, Proteinen, Peptiden sowie von niedermolekularen lipophilen und lipophoben Reagenzien, von kolloidalem Gold, Gold-markierten Proteinen und Peptiden, in eukaryontische Zellen verwendet werden.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ferner einen Zusammenstellung des erfindungsgemäßen Vehikels mit zur Applikation geeigenten oder notwendigen Mitteln, bsp. Reagentien, Lösungsmitteln u.ä., vorgesehen. Gleichfalls ist eine Zusammenstellung von Mitteln zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgesehen. Diese Zusammenstellung kann auch Geräte u. dgl. umfassen.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele und Darstellungen näher beschrieben. Es zeigen

Fig.1 den gelelektrophoretischen Nachweis der VP3, VP2 und VP1-Fusionsproteine,

Fig.2 links eine elektronenmikroskopische Ansicht von aus dem VP1-Protein gebildeten Pentameren und rechts eine computerunterstützte Darstellung der 5-fachen Symmetrie der Pentamere,

Fig.3 hergestellte Pentamere und daraus gebildete Kapside und

Fig.4 eine elektronenmikroskopische Ansicht beladener VP1-Kapside.

Die nachfolgenden Beispiele beschreiben eine mögliche Ausführung der Erfindung.

1) Expression des VP1-Proteins von Polyomavirus in E.coli:

Es wird ein Gen des VP1 Hüllproteins des murinen Polyomavirus hergenommen, das sowohl Sequenzmerkmale des Stammes A2 als auch des Stammes A3 aufweist. Die kodierende Sequenz beginnend mit dem ATG bzw. der darauf folgenden Aminosäure wird unmittelbar hinter einer Faktor Xa Schnittstelle in ein Derivat des kommerziell erhältlichen Vektors pQE 10 der Firma Quiagen kloniert. Dieser Vektor versieht das Fusionsprotein Xa Schnittstelle-VP1 am Aminoterminus mit einer Histidinabfolge. Das so gewonnene Fusionskonstrukt ist innerhalb eines Markergens (lacZ-Komplementation) kloniert und ist über den lacZ Promotor induzierbar. Das Endkonstrukt wird in für die Expression von pQE-Vektoren geeignete E.coli Zellen

transformiert. Wenn die Zellen nach vorheriger Anzüchtung in der logarithmischen Phase sind, werden sie durch Zugabe eines geeigneten Induktors, bsp. IPTG, induziert. Sie exprimieren daraufhin große Mengen eines das VP1-Protein enthaltenden Fusionsproteins. Das Fusionsprotein wird nach 6-stündiger Induktion geerntet. Es liegt in löslicher Form vor und kann ohne größere Änderungen des Aufreinigungsprotokolls der Firma Quiagen über Nickelchelatsäulen rein dargestellt werden. Durch Inkubation mit Faktor Xa kann der reine VP1-Proteinanteil des Fusionsproteins von der Nickelchelatsäule wieder abgetrennt werden. Das erhaltene VP1-Protein liegt in sehr reiner Form vor und bildet von sich aus Pentamere. Analog können die Proteine VP2 und VP3 dargestellt werden.

Die Fig. 1 zeigt den gelelektrophoretischen Nachweis der VP3, VP2 und VP1-Fusionsproteine. Aus Fig. 2 ist links eine elektronenmikroskopische Ansicht von aus dem VP1-Protein gebildeten Pentameren und rechts eine computergestützte Darstellung der 5-fach Symmetrie der Pentamere ersichtlich.

2) Modifikation der Cystein-Reste an der einen Seite der Pentamere vor deren Assemblierung:

Die gemäß Ziffer 1 gewonnenen VP1-Pentamere besitzen mehrere Strukturen, die durch Reaktion mit geeigneten Reagenzien in bifunktionelle Gruppen umwandelbar sind. Die Strukturen befinden sich auf der Seite der Pentamere, die nach Assemblierung zum Kapsid dessen Innenseite entspricht. Als Reagenz wird ein in einer Aceton-Methanol-Wasser-Mischung dispergierter 3-Maleinimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimidester verwendet, der auf der einen Seite des Reaktionszentrums als reaktive Gruppen SH-Gruppen und auf der anderen Seite eine Reaktivestergruppe, nämlich einen aminogruppenreaktiven Succinimidester, trägt. Die Dispersion wird mit den gelösten

VP1-Proteinen gemischt, so daß eine quantitative Umsetzung erfolgt.

Aus Tabelle 1 sind die Loop-Strukturen von Polyomakapsomeren ersichtlich, die auf der einen Seite der Kapsomere zu finden sind, die nach der Assemblierung zur Innenseite des Kapsids bzw. der kapsidartigen Struktur weisen:

Tabelle 1

Loop 1: Asp 38, Leu 39, Val 40, Thr 41, Gly 42, Pro 43, Asp 44, Ser 45

Loop 2: Asn 109, Glu 110, Asp 111, Leu 112, Thr 113, Lys 114, Asp 115, Thr 116, Leu 117

Tail: N-Terminus von Aminosäurerest 1 bis Rest 29 (zumindest aber ab der in der Strukturanalyse gut lokaliesierten Aminosäure 18 vom N-Terminus bis zu Rest 29): Lys 18, Ala 19, Cys 20, Pro 21, Arg 22, Pro 23, Ala 24, Pro 25, Val 26, Pro 27, Lys 28, Leu 29

Loop 3: Tyr 354, Asp 355, Gly 356, Thr 357, Gln 358, Pro 359, Val 360

3) Die Assemblierung von VP1-Pentameren zu VP1-Kapsiden:

Die VP1-Pentamere liegen in einer Pufferlösung vor, die EGTA zur Stabilisierung des pentameren nicht assemblierten Zustands enthält. Ferner sind der Pufferlösung Magnesium-Ionen, Natrium-Ionen und Tris/HCl, pH 7,6, zur Stabilisierung des pH zugesetzt. Die Proteinlösung wird in eine Dialysekammer überführt und gegen eine 2M Ammoniumsulfatlösung dialysiert. Nach mehrfachem Wechsel des Dialysepuffers bilden die VP1-Pentamere Kapside. Diese unterscheiden sich von leeren Kapsiden des Polyomavirus weder bei Betrachtung im Elektronenmikroskop noch im Durchmesser, noch in ihrer Stabilität, obwohl ihnen die inneren Hüllproteine

VP2 und VP3 fehlen. Fig. 3 zeigt die hergestellten Pentamere und daraus gebildete Kapside.

4) Die Verpackung von DNA Oligonukleotiden in Polyoma-VP1 Kapside:

Konventionelle, d.h. in ihrer chemischen Struktur nicht veränderte Oligonukleotide, lassen sich nach folgendem Protokoll mit hoher Ausbeute in Polyoma-VP1 Kapside verpacken: Kapsidstrukturen, wie sie im Beispiel 3 gewonnen worden sind, werden auf pH 5,5 umgepuffert. Anschließend werden sie in einer osmotischen Schockprozedur mit einer equi- oder höher molaren Menge, typischerweise mit einem zweifachen molaren Überschuß an Oligonukleotiden umgesetzt. Für die in diesem Beispiel verwendeten Oligonukleotide (20-mere) ergibt sich damit ein Gewichtsverhältnis von ca. 1:6 gegenüber dem VP1-Protein. Die Form der so erhaltenen mit Oligonukleotiden beladenen VP1-Kapside läßt sich im Elektronenmikroskop nicht von der unbeladener VP1-Kapside unterscheiden. Fig. 4 zeigt eine elektronenmikroskopische Ansicht beladener VP1-Kapside.

Patentansprüche

1. Vehikel zum Transport von molekularer Substanz wie DNA, RNA, Protein, PNA, Arzneistoffe lipophilen und lipophoben Charakters, in eukaryontische Zellen umfassend mindestens ein von einem Virus abgeleitetes oder stammendes Kapsomer, das an seiner einen Seite eine mit der molekularen Substanz in Wechselwirkungen tretende Struktur aufweist, so daß die molekulare Substanz an das Kapsomer bind- bzw. anlagerbar ist.

2. Vehikel nach Anspruch 1, wobei das Kapsomer so ausgebildet ist, daß es zum Aufbau eines Kapsids oder eines kapsidartigen Gebildes geeignet ist.

3. Vehikel nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Kapsomer vom Polyomavirus abgeleitet ist.

4. Vehikel nach Anspruch 3, wobei das Kapsomer aus dem VP1-Pentamer des Polyomavirus gebildet oder davon abgeleitet ist.

5. Vehikel nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Kapsomer aus "non-enveloped" Viren wie DNA-haltigen Papovaviridae, insbesondere Polyoma- und Papillomaviren, Iridoviridae, Adenoviridae, Parvoviridae oder RNA-haltigen Picornaviridae, insbesondere Polioviren, Caliciviridae, Reoviridae und Birnaviridae gewonnen oder davon abgeleitet ist.

6. Vehikel nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Kapsomer aus der äußeren und/oder inneren Hülle von "enveloped" Viren wie DNA-haltigen Poxviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae oder RNA-haltigen Retroviridae, Paramyxoviridae, Sendaiviren, Orthomyxoviridae,

This Sheet Has Been Replaced

Bunyaviridae, Arenaviridae, Toroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Rhabdoviridae und Filoviridae gewonnen bzw. davon abgeleitet ist.

7. Vehikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Wechselwirkungen lipophile Wechselwirkungen sind und/oder auf kovalenten, ionischen oder Wasserstoffbrücken-Bindungen beruhen.

8. Vehikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die in Wechselwirkung tretende Struktur bifunktionelle, vorzugsweise heterolog bifunktionelle Gruppen, umfaßt.

9. Vehikel nach Anspruch 8, wobei die bifunktionellen Gruppen aus der Stoffgruppe der Maleinimid-Derivate, Alkylhalide, Arylhalide, Isocyanate, Glutardialdehyde, acrylierenden Reagenzien und Imidoester ausgewählt sind.

10. Vehikel nach Anspruch 8 oder 9, wobei die bifunktionellen Gruppen mit Cystein-Resten am Kapsomer reagieren.

11. Vehikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die in Wechselwirkung tretende Struktur affinitätserhöhende Gruppen, wie 4-Iodoacetamido-salicylsäure und/oder p-Arsonsäure-phenyldiazonium-fluoroborat und/oder Derivate davon, umfaßt.

12. Vehikel nach einem der Ansprüche 4 - 11, wobei die in Wechselwirkung tretende Struktur durch Epitope des VP1-Pentamers gebildet ist.

13. Vehikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mit mindestens einem weiteren Kapsomer ein kapsidartiges Gebilde zum Transport der molekularen Substanz in

eine vorgegebene Art von Zellen oder an einen vorgegebenen Ort im Intrazellulärbereich herstellbar ist.

14. Vehikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die eine Seite des Kapsomers Bestandteil der Innenseite des kapsidartigen Gebildes ist.

15. Vehikel nach Anspruch 14, wobei das kapsidartige Gebilde mindestens ein VP-2 und/oder VP-3 Protein umfaßt.

16. Verfahren zur Herstellung des Vehikels nach Anspruch 1, umfassend die folgenden Schritte:

i) Synthetisieren, Aufreinigen oder Isolieren des Kapsomers und

ii) Komplexieren der molekularen Substanz unter Verwendung des Kapsomers.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei nach dem Schritt lit.i die geeigneten Reste des Kapsomers, insbesondere dessen Cystein-Reste, mit bifunktionellen Gruppen modifiziert werden.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Modifikation unter Verwendung einer oder mehrerer der folgenden Stoffe durchgeführt wird: Maleinimid-Derivate, Alkylhalide, Arylhalide, Isocyanate, Glutardialdehyde, acrylierenden Reagentien und Imidoester.

19. Verwendung des Vehikels nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 - 15 als Arzneistoffträger zur Applikation von Molekülen wie DNA, RNA, Oligonukleotiden, PNA, Proteinen, Peptiden sowie niedermolekularen lipophilen

This Sheet Has Been Replaced

und lipophoben Reagenzien, kolloidalem Gold und Gold-markierten Proteinen und Peptiden in eukaryontische Zellen.

20. Zusammenstellung von Mitteln zur Applikation des Vehikels nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 - 15.

21. Zusammenstellung von Mitteln zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 16 - 18.

This Sheet Has Been Replaced