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

This Sheet Has Been Replaced

ERSATZBLATT (REGEL 26)

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

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

ERSATZBLATT (REGEL 26)

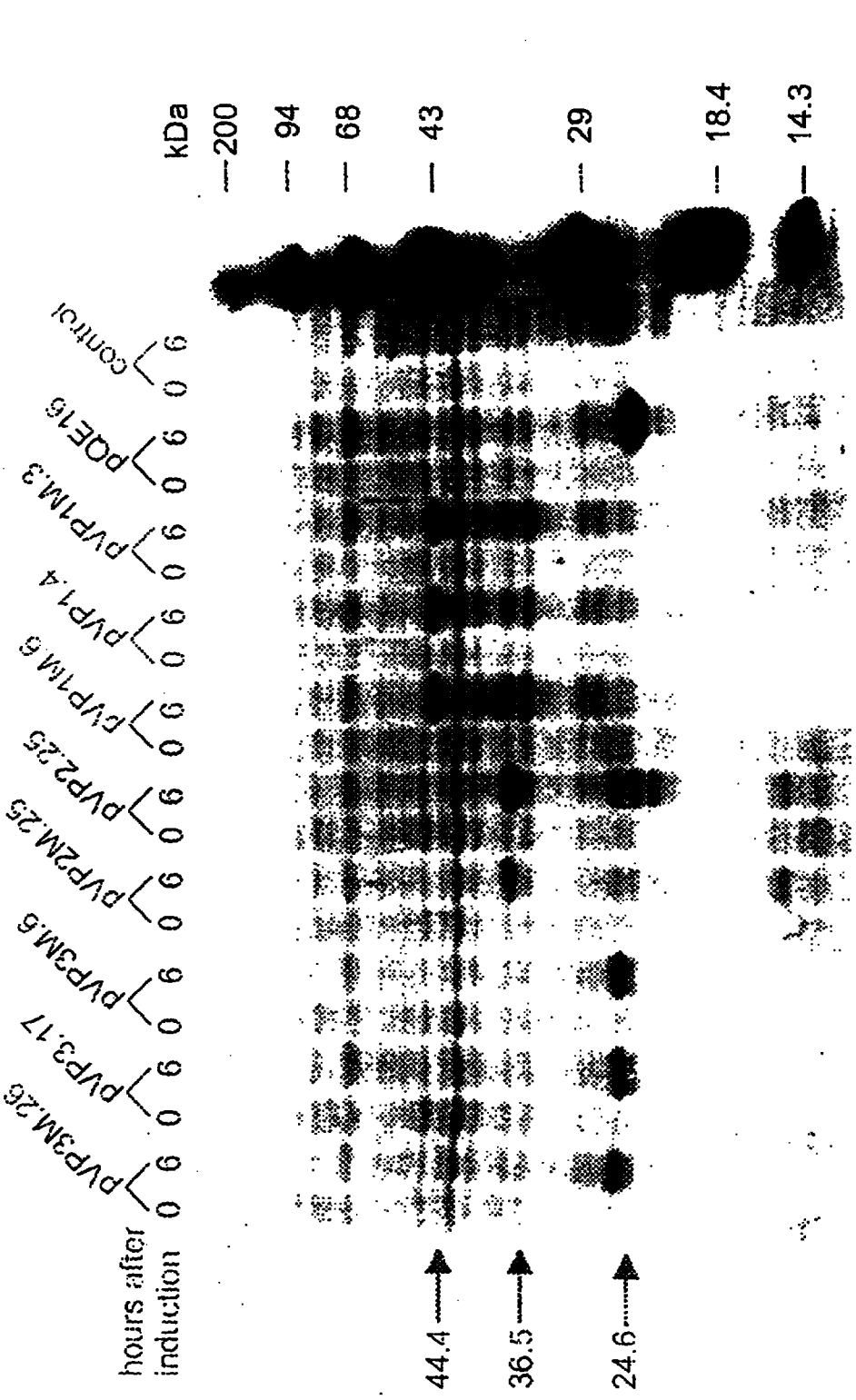

kDa
200
94
68
43
29
18.4
14.3
hours after induction
0 6 9 0
pVP3M.26
pVP3.17
pVP3M.6
pVP2M.25
pVP2.25
pVP1M.6
pVP1.4
pVP1M.3
pOE16
control
44.4
36.5
24.6

Fig. 1

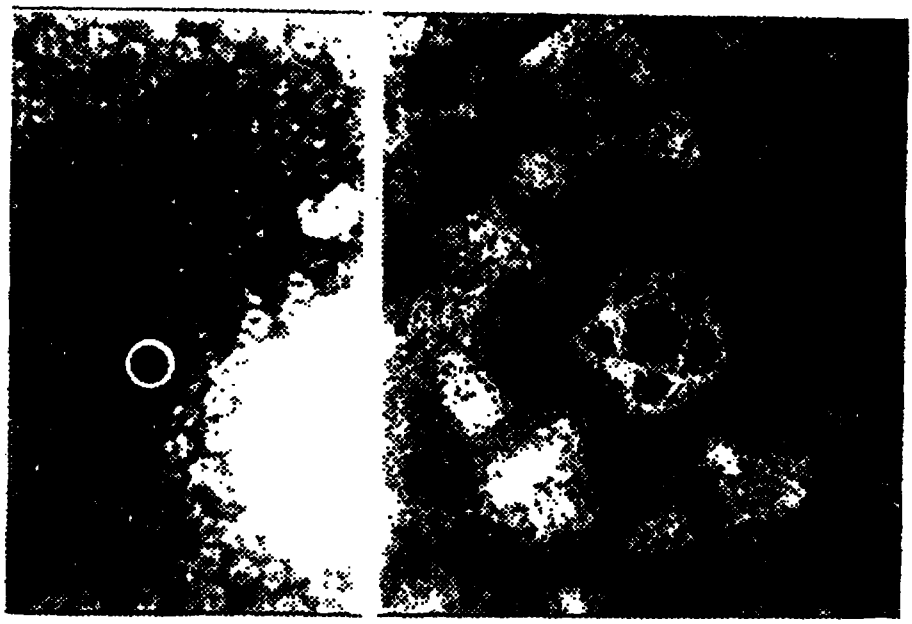


Fig. 2



Fig. 4

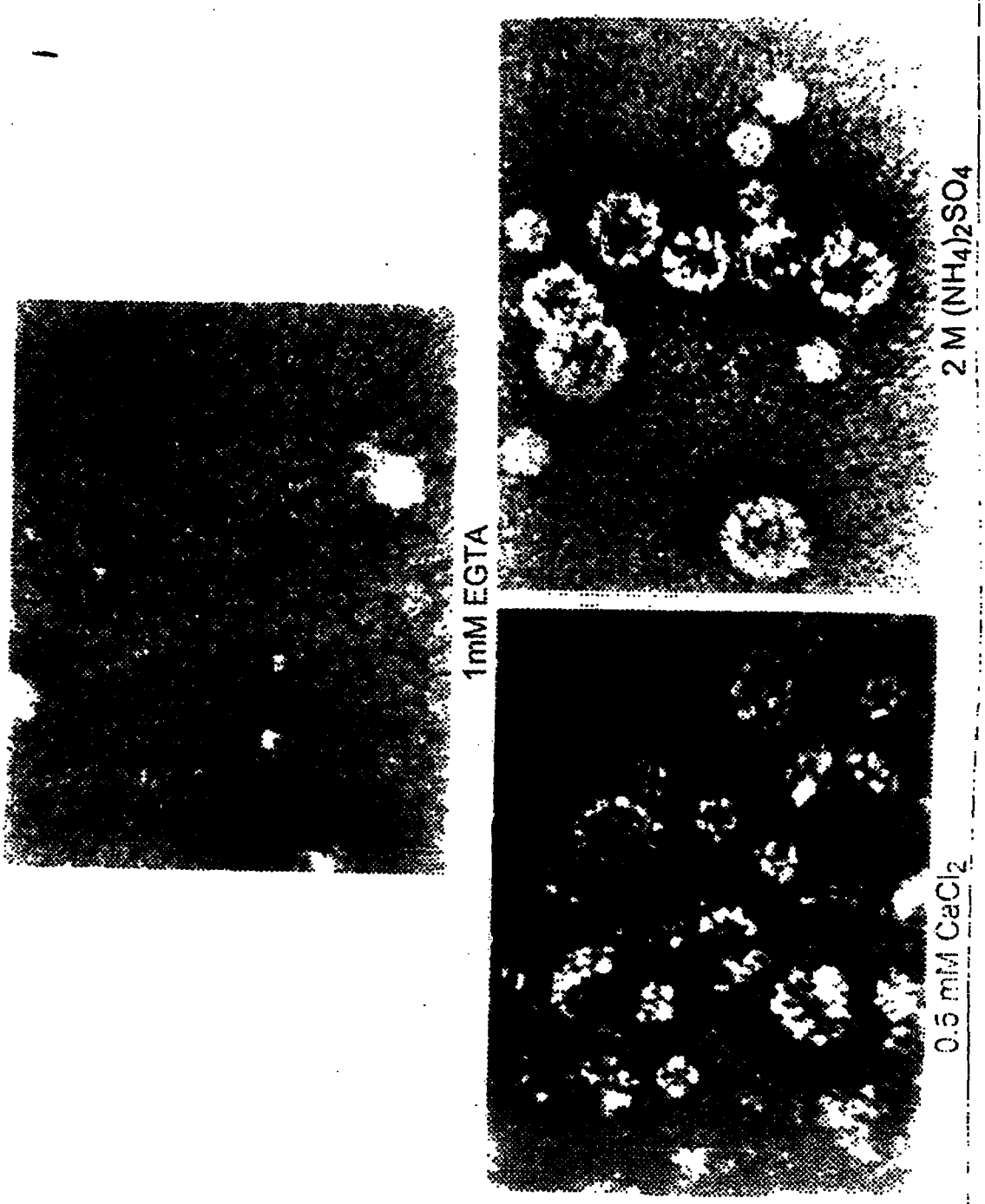


Fig. 3

Vehicle for the transport of molecular substances

The invention relates to a vehicle for the transport of molecular substance, such as DNA, RNA, protein, PNA, pharmaceuticals of lipophilic and lipophobic character, into eukaryotic cells. The invention furthermore relates to a process for the preparation of the vehicle, its use and compositions of agents for applying or carrying out the invention.

Under certain conditions, eukaryotic cells absorb DNA, proteins and other molecules. The absorption rate, however, is usually low. Additionally, the transport of the molecular substance is not predeterminable with respect to the nature of the cells and the cell compartment or the site in the intracellular region.

In order to improve, in particular, the absorption of DNA into eukaryotic cells, it is known to use viral vectors as vehicles for transport into the cell. - The use of viral vectors is disadvantageous because in this case the cotransfection of viral genomes can occur.

It is furthermore disclosed in US 4,950,599 to lock molecular substance such as DNA into eukaryotic cells using empty virus capsids, in particular polyoma capsids. - Even in this process cotransfection of viral genomes cannot be excluded. Additionally, molecules whose size exceed [sic] the internal volume of the polyomia capsid cannot be packed therein. Finally, synthetic preparation of polyoma capsids, which comes into consideration as one possibility of avoiding cotransfection, is extremely difficult and cost-intensive.

The object of the invention is to eliminate the disadvantages of the prior art, in particular to

indicate a vehicle for the transport of molecular substance into eukaryotic cells which can be used universally and can be prepared simply and in a cost-effective manner.

This object is achieved by the features of claims 1, 16 and 19 - 21. Advantageous embodiments of the invention are clear from the features of claims 2 - 15 and also 17 and 18.

According to the invention, a vehicle is provided which contains at least one capsomere derived or originating from a virus, which on one of its sides has a structure interacting with the molecular substance such that the molecular substance can be bound or added to the capsomere.

The vehicle according to the invention has the advantage that it can be synthetically prepared relatively simply. Cotransfection of viral genomes can thus be avoided. Additionally, because of the provision of the structure interacting with the molecular substance, molecular substance of any size can be bound and locked into cells. To do this, the typical capsid form no longer has to be maintained. Using the vehicles according to the invention, besides capsomeres protective forms of a different kind are also formed. A particular advantage of the invention can be seen in that, with the vehicle according to the invention, depending on the formation of the at least one capsomere, it is possible to transport the molecular substance specifically into certain cells and/or to a prespecified site in the intracellular region.

The capsomere is preferably formed such that it is suitable for the construction of a capsid or a capsid-like structure. It is particularly advantageous if the capsomere spontaneously forms capsids.

According to a further embodying feature of the invention, the capsomere is derived from the polyoma virus, it being possible to form it from the VP1 pentamer of the polyoma virus.

Alternatively, the capsomere can be obtained from "non-enveloped" viruses such as DNA-containing Papovaviridae, in particular polyoma viruses and the papilloma viruses, Iridoviridae, Adenoviridae, Parvoviridae or RNA-containing Picornaviridae, in particular polio viruses, Caliciviridae, Reoviridae and Birnaviridae, or derived therefrom. Depending on the type of molecular substance to be transported, it may also be advantageous to obtain the capsomere from the outer and/or inner coat of "enveloped" viruses such as DNA-containing Poxviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae or RNA-containing Retroviridae, Paramyxoviridae, Sendai viruses, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Toroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Rhabdoviridae and Filoviridae or to derive it therefrom.

The interactions are expediently lipophilic interactions and/or interactions which are based on covalent bonds, ionic bonds or hydrogen bridges. It is thus ensured that the molecular substance on transporting into the cell remains safely bound or adhered to the vehicle, but after transport into the cell has taken place is released from the vehicle or can be detached by cellular systems.

The structure can comprise bifunctional, preferably heterologous bifunctional groups, the bifunctional groups preferably being selected from the substance group consisting of maleimide derivatives, alkyl halides, aryl halides, isocyanates, glutaraldehydes, acrylating reagents and imidoesters. By this means, the release of the molecular substance is in particular achieved in the lysosome, in the cytoplasmic space or in the nucleus.

It has proven to be particularly expedient that the bifunctional groups react with cysteine residues on the capsomere. It is additionally regarded as advantageous that the interacting structure comprises affinity-increasing groups such as 4-iodoacetamidosalicylic acid and/or p-arsonic acid phenyldiazonium fluoroborate and/or derivatives thereof. - The structure can also be formed by epitopes of the VP1 pentamer.

According to a further embodiment of the invention, a vehicle is provided where, using at least one further capsomere, it is possible to prepare a capsid-like structure for the transport of the molecular substance into a prespecified type of cells or to a prespecified site in the intracellular region. The further capsomere can be a capsomere according to the invention. The capsid-like structure, however, can also be prepared using further capsomeres not according to the invention. The choice of the type of capsomeres and their combination for the preparation of the capsid-like structure depends on the nature of the cell or on the prespecified location in the intracellular region, into which or to which the molecular substance is to be transported.

Expediently one side of the capsomere is part of the inside of the capsid-like structure, the capsid-like structure preferably being derived from the polyoma virus. Finally, the capsid-like structure can comprise at least one VP-2 and/or VP-3 protein.

For the preparation of a vehicle according to the invention, a process comprising the following steps is proposed:

i) synthesis, purification or isolation of the capsomere and

ii) complexation of the molecular substance using the capsomere.

A development of the process consists in modifying suitable residues of the capsomere, in particular its cysteine residues, with bifunctional groups after step lit.i [sic]. The modification can expediently be carried out using one or more of the following substances: maleimide derivatives, alkyl halides, aryl halides, isocyanates, glutaraldehydes, acrylating reagents and imidoesters.

The vehicle according to the invention can preferably be used as a pharmaceutical carrier for the administration of molecules such as DNA, RNA, oligonucleotides, PNA, proteins, peptides and of low molecular weight lipophilic and lipophobic reagents, of colloidal gold, gold-labeled proteins and peptides to eukaryotic cells.

According to the invention, a combination of the vehicle according to the invention with agents suitable or necessary for the administration, for example reagents, solvents and the like, is furthermore proposed. A combination of agents for carrying out the process according to the invention is likewise proposed. This combination can also include apparatus and the like.

The invention is described in greater detail with the aid of the following examples and illustrations.

Fig. 1 shows the gel electrophoretic detection of VP3, VP2 and VP1 fusion proteins,

Fig. 2 on the left shows an electron microscopic view of pentamers formed from the VP1 protein and on the right shows a computer-assisted illustration of the 5-fold symmetry of the pentamers,

Fig. 3 shows prepared pentamers and capsids formed

therefrom and

Fig. 4 shows an electron microscopic view of loaded VP1 capsids.

The following examples describe one possible embodiment of the invention.

1) Expression of the VP1 protein of polyoma virus in E.coli:

A gene of the VP1 coat protein of the murine polyoma virus is taken which contains sequence features of both the strain A2 and the strain A3. The coding sequence beginning with the ATG or the following amino acid is cloned immediately behind a factor Xa cleavage site in a derivative of the commercially available vector pQE 10 from Quiagen. This vector provides the fusion protein Xa cleavage site VP1 at the amino terminus with a histidine sequence. The fusion construct thus obtained is cloned inside a marker gene (lacZ complementation) and is inducible via the lacZ promoter. The final construct is transformed in E. coli cells suitable for the expression of pQE vectors. When the cells, after prior culture, are in the logarithmic phase, they are induced by addition of a suitable inductor, e.g. IPTG. After this, they express large amounts of a fusion protein containing the VP1 protein. The fusion protein is harvested after induction for 6 hours. It is present in soluble form and can be prepared pure on nickel chelate columns with minor changes to the purification protocol of Quiagen. By incubation with factor Xa, the pure VP1 protein portion of the fusion protein can be removed again from the nickel chelate column. The VP1 protein obtained is present in very pure form and forms pentamers by itself. The proteins VP2 and VP3 can be prepared analogously.

Fig. 1 shows the gel electrophoretic detection of the VP3, VP2 and VP1 fusion proteins. Shown in Fig. 2 are on

the left an electron microscopic view of pentamers formed from the VP1 protein and on the right a computer-assisted illustration of the 5-fold symmetry of the pentamers.

2) Modification of the cysteine residues on one side of the pentamers before their assembly:

The VP1 pentamers obtained according to 1 have a plurality of structures which can be converted into bifunctional groups by reaction with suitable reagents. The structures are found on the side of the pentamers [sic] which corresponds to its inside after assembly to give the capsid. The reagent used is a 3-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester dispersed in an acetone/methanol/water mixture, which on one side of the reactive center carries as reactive groups SH groups and on the other side a reactive ester group, namely an amino group-reactive succinimide ester. The dispersion is mixed with the dissolved VP1 proteins so that a quantitative reaction takes place.

Shown in Table 1 are the loop structures of polyoma capsomeres which are to be found on one side of the capsomeres and which after assembly point to the inside of the capsid or the capsid-like structure:

Table 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 of amino acid residue 1 to residue 29 (at least from the amino acid 18 of the N-terminus which is well localized in the structural analysis up to residue 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) The assembly of VP1 pentamers to give VP1 capsids:

The VP1 pentamers are present in a buffer solution which contains EGTA to stabilize of the pentameric non-assembled state. Magnesium ions, sodium ions and tris/HCl, pH 7.6, are further added to the buffer solution to stabilize the pH. The protein solution is transferred to a dialysis chamber and dialyzed against a 2M ammonium sulfate solution. After several changes of the dialysis buffer, the VP1 pentamers form capsids. These do not differ from empty capsids of the polyoma virus on inspection in the electron microscope, in diameter, or in their stability, although they lack the inner coat proteins VP2 and VP3. Fig. 3 shows the pentamers prepared and capsids formed therefrom.

4) The packing of DNA oligonucleotides in polyoma VP1 capsids:

Conventional oligonucleotides, i.e. those unchanged in their chemical structure, can be packed into polyoma VP1 capsids in high yield according to the following protocol: capsid structures, such as have been obtained in Example 3, are buffered to pH 5.5. They are then reacted in an osmotic shock procedure with an equi- or higher molar amount, typically with a two-fold molar excess, of oligonucleotides. For the oligonucleotides used in this example (20-mers) a weight ratio of about 1:6 thus results compared with the VP1 protein. The form of the VP1 capsids loaded with oligonucleotides thus obtained cannot be differentiated in the electron microscope from the unloaded VP1 capsids. Fig. 4 shows an electron microscopic view of loaded VP1 capsids.

REPLACED SHEETS SG
☐ Description : paged ..... to paged .....
☒ Claim(s) : paged 01 to paged 04
☐ Drawing(s) : paged ..... to paged .....
☐ Abstract : paged ..... to paged .....

CLAIMS

1. A vehicle for the transport of molecular substance, such as DNA, RNA, protein, PNA, pharmaceuticals of lipophilic and lipophobic character, into eukaryotic cells comprising at least one capsomere derived or originating from a virus, which on one of its sides has a structure interacting with the molecular substance such that the molecular substance can be bound or added to the capsomere.

2. A vehicle as claimed in claim 1, where the capsomere is formed such that it is suitable for the construction of a capsid or a capsid-like structure.

3. A vehicle as claimed in claim 1 or 2, where the capsomere is derived from the polyoma virus.

4. A vehicle as claimed in claim 3, where the capsomere is formed from the VP1 pentamer of the polyoma virus or is derived therefrom.

5. A vehicle as claimed in claim 1 or 2, where the capsomere is obtained from "non-enveloped" viruses such as DNA-containing Papovaviridae, in particular polyoma and papilloma viruses, Iridoviridae, Adenoviridae, Parvoviridae or RNA-containing Picornaviridae, in particular polio viruses, Caliciviridae, Reoviridae and Birnaviridae or is derived therefrom.

6. A vehicle as claimed in claim 1 or 2, where the capsomere is obtained from the outer and/or inner coat of "enveloped" viruses such as DNA-containing Poxviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae or RNA-containing Retroviridae, Paramyxoviridae, Sendai

This Sheet Has Been Replaced

* C L M S *

viruses, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Toroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Rhabdoviridae and Filoviridae or is derived therefrom.

7. A vehicle as claimed in one of the preceding claims, where the interactions are lipophilic interactions and/or are based on covalent bonds, ionic bonds or hydrogen bridges.

8. A vehicle as claimed in one of the preceding claims, where the interacting structure comprises bifunctional, preferably heterologous bifunctional, groups.

9. A vehicle as claimed in claim 8, where the bifunctional groups are selected from the substance group consisting of maleimide derivatives, alkyl halides, aryl halides, isocyanates, glutaraldehydes, acrylating reagents and imidoesters.

10. A vehicle as claimed in claim 8 or 9, where the bifunctional groups react with cysteine residues on the capsomere.

11. A vehicle as claimed in one of the preceding claims, where the interacting structure comprises affinity-increasing groups such as 4-iodoacetamidosalicylic acid and/or p-arsonic acid phenyldiazonium fluroborate and/or derivatives thereof.

12. A vehicle as claimed in one of claims 4 - 11, where the interacting structure is formed by epitopes of the VP1 pentamer.

13. A vehicle as claimed in one of the preceding claims, where, using at least one further capsomere, it is possible to prepare a capsid-like

This Sheet Has Been Replaced

* C L M S *

structure for the transport of the molecular substance into a prespecified type of cells or to a prespecified site in the intracellular region.

14. A vehicle as claimed in one of the preceding claims, where one side of the capsomere is part of the inside of the capsid-like structure.

15. A vehicle as claimed in claim 14, where the capsid-like structure comprises at least one VP-2 and/or VP-3 protein.

16. A process for the preparation of the vehicle as claimed in claim 1, comprising the following steps:

    i) synthesis, purification or isolation of the capsomere and

    ii) complexation of the molecular substance using the capsomere.

17. A process as claimed in claim 16, where after step lit.i [sic] the suitable residues of the capsomere, in particular its cysteine residues, are modified with bifunctional groups.

18. The process as claimed in claim 17, where the modification is carried out using one or more of the following substances: maleimide derivatives, alkyl halides, aryl halides, isocyanates, glutaraldehydes, acrylating reagents and imidoesters.

19. The use of the vehicle as claimed in one of the preceding claims 1 - 15 as a pharmaceutical carrier for the administration of molecules such as DNA, RNA, oligonucleotides, PNA, proteins, peptides and also lower molecular weight lipophilic and lipophobic reagents, colloidal gold and gold-labeled

This Sheet Has Been Replaced

* C L M S *

proteins and peptides to eukaryotic cells.

20. A combination of agents for the administration of the vehicle as claimed in one of the preceding claims 1 - 15.

21.. A combination of agents for carrying out the process as claimed in one of claims 16 - 18.

This Sheet Has Been Replaced

Neue Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Vehikels mit molekularer Substanz, wie DNA, RNA, Protein, PNA, Arzneistoffe lipophilen und lipophoben Charakters, zum Transport in eukaryontische Zellen, umfassend mindestens ein von einem Virus abgeleitetes oder stammendes Kapsomer, das so ausgebildet ist, daß es zum Aufbau eines Kapsids oder eines kapsidartigen Gebildes geeignet ist und 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, und wobei die eine Seite des Kapsomers nach Assemblierung Bestandteil der Innenseite des Kapsids bzw. kapsidartigen Gebildes ist, umfassend die folgenden Schritte:

   i) Synthetisieren, Aufreinigen oder Isolieren des Kapsomers und

   ii) Komplexieren der molekularen Substanz unter Verwendung des Kapsomers.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Kapsomer vom Polyomavirus abgeleitet ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Kapsomer aus dem VP1-Pentamer des Polyomavirus gebildet oder davon abgeleitet ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 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.

5. Verfahren nach Anspruch 1, 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, Bunyaviridae, Arenaviridae, Toroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Rhabdoviridae und Filoviridae gewonnen bzw. davon abgeleitet ist.

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

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

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die bifunktionellen Gruppen aus der Stoffgruppe der Maleinimid-Derivate, Alkylhalide, Arylhalide, Isocyanate, Glutardialdehyde, acrylierenden Reagenzien und Imidoester ausgewählt sind.

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, wobei die bifunktionellen Gruppen mit Cystein-Resten am Kapsomer reagieren.

GEÄNDERTES BLATT

10. Verfahren 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.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 10, wobei die in Wechselwirkung tretende Struktur durch Epitope des VP1-Pentamers gebildet ist.

12. Verfahren 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.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das kapsidartige Gebilde mindestens ein VP-2 und/oder VP-3 Protein umfaßt.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei nach dem Schritt lit.i die geeigneten Reste des Kapsomers, insbesondere dessen Cystein-Reste, mit bifunktionellen Gruppen modifiziert werden.

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

16. Verwendung des nach dem Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche hergestellten Vehikels als Arzneistoffträger zur Applikation von Molekülen wie DNA, RNA, Oligonukleotiden, PNA, Proteinen, Peptiden sowie niedermolekularen lipophilen und lipophoben Reagenzien, kolloidalem Gold und Gold-markierten Proteinen und Peptiden in eukaryontische Zellen.

GEÄNDERTES BLATT

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 13-01588	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/DE97/00919	International filing date (*day/month/year*) 07 May 1997 (07.05.1997)	Priority date (*day/month/year*) 10 May 1996 (10.05.1996)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/87, 15/86, A61K 48/00		
Applicant BERTLING, Wolf		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

   ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

   These annexes consist of a total of 4 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

   - I ☒ Basis of the report
   - II ☐ Priority
   - III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
   - IV ☐ Lack of unity of invention
   - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
   - VI ☐ Certain documents cited
   - VII ☐ Certain defects in the international application
   - VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
05 December 1997 (05.12.1997)	17 April 1998 (17.04.1998)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (January 1994)

International application No.
PCT/DE97/00919

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-9, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.

☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-16, filed with the letter of 31 March 1998 (31.03.1998),
Nos. _____, filed with the letter of _____.

☒ the drawings, sheets/fig 1/2,2/2, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____
☐ the claims, Nos. _____
☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1 - 16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1 - 16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The claimed process is distinguished from that described in the available prior art in that the molecular substance to be transported interacts with structures present on the inside of the vehicle to form complexes, whereas formerly the molecular substance interacted with structures present on the surface of the vehicle. The displacement to the inside prevents *inter alia* premature breakdown of the molecular substance. No suggestions of this difference, which is essential to the invention, are to be found in the documents cited in the international search report. Consequently, the subject matter of the present claims complies with the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

* C L M S *

CLAIMS

1. A process for the preparation of a vehicle with molecular substance, such as DNA, RNA, protein, PNA, pharmaceuticals of lipophilic and lipophobic character, for transport into eukaryotic cells, comprising at least one capsomere derived or originating from a virus, which capsomere is formed such that it is suitable for the construction of a capsid or a capsid-like structure and on one of its sides has a structure interacting with the molecular substance such that the molecular substance can be bound or added to the capsomere, and where one side of the capsomere after assembly is a constituent of the inside of the capsid or capsid-like structure, comprising the following steps:

   i) synthesis, purification or isolation of the capsomere and

   ii) complexation of the molecular substance using the capsomere.

2. The process as claimed in claim 1, where the capsomere is derived from the polyoma virus.

3. The process as claimed in claim 2, where the capsomere is formed from the VP1 pentamer of the polyoma virus or is derived therefrom.

4. The process as claimed in claim 1, where the capsomere is obtained from "non-enveloped" viruses such as DNA-containing Papovaviridae, in particular polyoma and papilloma viruses, Iridoviridae, Ade-

noviridae, Parvoviridae or RNA-containing Picornaviridae, in particular polio viruses, Caliciviridae, Reoviridae and Birnaviridae or is derived therefrom.

5. The process as claimed in claim 1, where the capsomere is obtained from the outer and/or inner coat of "enveloped" viruses such as DNA-containing Poxviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae or RNA-containing Retroviridae, Paramyxoviridae, Sendai viruses, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Toroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Rhabdoviridae and Filoviridae or is derived therefrom.

6. The process as claimed in one of the preceding claims, where the interactions are lipophilic interactions and/or are based on covalent bonds, ionic bonds or hydrogen bridges.

7. The process as claimed in one of the preceding claims, where the interacting structure comprises bifunctional, preferably heterologous bifunctional, groups.

8. The process as claimed in claim 7, where the bifunctional groups are selected from the substance group consisting of maleimide derivatives, alkyl halides, aryl halides, isocyanates, glutaraldehydes, acrylating reagents and imidoesters.

9. The process as claimed in claim 7 or 8, where the bifunctional groups react with cysteine residues on the capsomere.

* C L M S *

10. The process as claimed in one of the preceding claims, where the interacting structure comprises affinity-increasing groups such as 4-iodoacetamidosalicylic acid and/or p-arsonic acid phenyldiazonium fluroborate and/or derivatives thereof.

11. The process as claimed in one of claims 3 to 10, where the interacting structure is formed by epitopes of the VP1 pentamer.

12. The process as claimed in one of the preceding claims, where, using at least one further capsomere, it is possible to prepare a capsid-like structure for the transport of the molecular substance into a prespecified type of cells or to a prespecified site in the intracellular region.

13. The process as claimed in one of the preceding claims, where the capsid-like structure comprises at least one VP-2 and/or VP-3 protein.

14. The process as claimed in one of the preceding claims, where after step lit.i [sic] the suitable residues of the capsomere, in particular its cysteine residues, are modified with bifunctional groups.

15. The process as claimed in one of the preceding claims, where the modification is carried out using one or more of the following substances: maleimide derivatives, alkyl halides, aryl halides, isocyanates, glutaraldehydes, acrylating reagents and imidoesters.

* C L M S *

16. The use of the vehicle prepared by the process as claimed in one of the preceding claims as a pharmaceutical carrier for the administration of molecules such as DNA, RNA, oligonucleotides, PNA, proteins, peptides and also lower molecular weight lipophilic and lipophobic reagents, colloidal gold and gold-labeled proteins and peptides to eukaryotic cells.

IPOS COPY +
VERIFIED TRA
OF SPEC
IPER + ANNEX
+
VERIFIED TRANS
OF ANNEXES

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:
C12N 15/87, 15/86, A61K 48/00	A1	WO 97/43431
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. November 1997 (20.11.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00919

(22) Internationales Anmeldedatum: 7. Mai 1997 (07.05.97)

(30) Prioritätsdaten:
196 18 797.4 10. Mai 1996 (10.05.96) DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: BERTLING, Wolf [DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE).

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nürnberger Strasse 71, D-91052 Erlangen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CZ, JP, KR, MX, SG, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: VEHICLE FOR THE TRANSPORT OF MOLECULAR SUBSTANCES

(54) Bezeichnung: VEHIKEL ZUM TRANSPORT VON MOLEKULARER SUBSTANZ

(57) Abstract

The invention relates to a vehicle for the transport of molecular substances such as DNA, RNA, protein, PNA, pharmaceutical substances of lipophile and lipophobe character in eukaryotic cells comprising at least one capsomer derived from or originating from a virus that exhibits on its side a structure which interacts with the molecular substance so that the molecular substance can be bonded or become attached to the capsomer.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein 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.