

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **230096**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **410078**

(51) Int.Cl.

**A61K 9/127 (2006.01)**

**C12N 15/88 (2006.01)**

**A61K 48/00 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **06.11.2014**

(54) **System nośników kwasów nukleinowych, sposób przygotowania systemu  
oraz ich zastosowanie**

(30) Pierwszeństwo:

**28.08.2014, PL, P-409298**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**29.02.2016 BUP 05/16**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**28.09.2018 WUP 09/18**

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI POLSKIEJ  
AKADEMII NAUK, Warszawa, PL  
UNIwersytet Jagielloński, Kraków, PL  
INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ POLSKIEJ  
AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**EWA KULA-ŚWIEŻEWSKA, Warszawa, PL  
MONIKA RAK, Osiek Jasielski, PL  
ZBIGNIEW MADEJA, Kraków, PL  
TADEUSZ CHOJNACKI, Warszawa, PL  
KATARZYNA GAWARECKA, Warszawa, PL  
MAREK MASNYK, Warszawa, PL  
MAREK CHMIELEWSKI, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Aleksandra Twardowska-Czerwińska**

**PL 230096 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest system nośników kwasów nukleinowych w postaci kompozycji opartych na kationowych pochodnych poliprenoli, sposób przygotowania systemu nośników kwasów nukleinowych oraz ich zastosowanie.

Postęp w rozumieniu patogenezы wielu chorób i dynamiczny rozwój narzędzi do przenoszenia kwasów nukleinowych stworzył perspektywę nowych zastosowań dla technik dostarczania DNA i RNA do komórek oraz ich wprowadzania do praktyki laboratoryjnej i klinicznej. Obecnie kwasy nukleinowe można już uważać za leki przeciw ciągle rosnącej liczbie chorób zarówno genetycznych, jak i nabytych. Do takich chorób zaliczyć można hemofilję, niedobory odporności, ból przewlekły, a także HIV, mukowiscydozę, arteriosklerozę, reumatoidalne zapalenie stawów, nowotwory i inne (Kaiser J, *Gene therapy celebrates a decade of progress*. Science 2011; vol 334; 7: 29–30; Flotte TR, *Gene therapy: the first two decades and the current state-of-the-art*. J Cell Physiol 2007; 213: 301–305). Obiecujący i stale rosnący potencjał terapii genowej w zwalczaniu chorób, które w obecnej chwili uważane są za nieuleczalne, stymuluje poszukiwania efektywnych przenośników materiału genetycznego, które mogłyby być bezpiecznie stosowane *in vivo*.

Najbardziej efektywne strategie dostarczania genów oparte są na stosowaniu wektorów wirusowych. Jednak ich zastosowania kliniczne napotykać na szereg istotnych ograniczeń, np. ich ograniczoną ładowność, mutagenne, onkogenne i auto-immunogenne skutki uboczne, a także wysokie koszty produkcji wielkoskalowej (Vannucci L, Lai M, Chiuppesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M. *Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology*. New Microbiologica 2013; 36: 1–22). Wektory nie-wirusowe stanowią obiecującą alternatywę, ponieważ są bezpieczne i stosunkowo tanie w produkcji. Wśród strategii transferu genów, w których stosuje się wektory nie-wirusowe, lipofekcja uważana jest za jedną z najbardziej obiecujących metod.

Strategia lipofekcji oparta jest na zastosowaniu lipidów kationowych, które mogą spontanicznie oddziaływać z negatywnie naładowanymi kwasami nukleinowymi tworząc lipopleksy (kompleksy lipidów z kwasami nukleinowymi). Ich niespecyficzne oddziaływanie z komórkowymi białkami i cukrami znajdującymi się na powierzchni błony komórkowej stymuluje endocytozę prowadząc do tworzenia pęcherzyków endocytarnych. Mieszanki lipidów kationowych i pomocniczych (zwanymi także ko-lipidami), np. DOPE (1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfatydyloetanolamina), zmieniają właściwości lipopleksów ułatwiając uwalnianie kwasów nukleinowych w czasie endocytozy.

Znaczący potencjał lipidów kationowych jako nośników, dostarczających leki genetyczne, stał się przyczyną intensywnych badań mających na celu opracowanie efektywnych przenośników lipidowych. Jednakże, pomimo tego, że zsyntetyzowano liczne rodzaje lipidów kationowych i pomocniczych (Koynova R and Tenchov B, *Recent Patents in Cationic Lipid Carriers for Delivery of Nucleic Acids*, Recent Patents on DNA & Gene Sequences 2011; 1 5: 8–27), dotychczas nie udało się opracować idealnego wektora do lipofekcji. Może to wynikać z faktu, że wydajność lipofekcji zależy nie tylko od struktury lipidów i ko-lipidów, ale także od właściwości komórek będących obiektem lipofekcji i warunków jej prowadzenia (np. *in vitro* vs. *in vivo*). Co więcej, różnorodność szlaków i mechanizmów biorących udział w procesie lipofekcji skutkuje wysoką złożonością wzajemnych relacji pomiędzy strukturą nośników do lipofekcji, bezpieczeństwem ich działania i wydajnością. Często sprzeczne dane literaturowe dotyczące wpływu właściwości nośników i lipopleksów na wydajność transfekcji stanowią dodatkowe przeszkody w opracowaniu nowych lipidów i ko-lipidów do dostarczania genów do komórek.

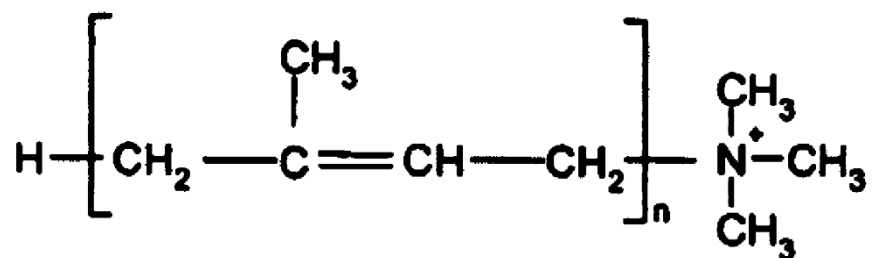
Polizoprenoidy są lipidowymi składnikami komórkowych układów enzymatycznych, biorących udział w glikozylacji białek u prokariotów (poliprenole) i eukariotów (dolichole), równocześnie jako elementy strukturotwórcze modulują właściwości błon lipidowych. Związki te biosyntetycznie są blisko powiązane z innymi ważnymi elementami metabolizmu komórki (np. ubichinonem, cholesterolem, witaminami A, D, E, K). Kationowe formy poliprenoli i dolicholi najprawdopodobniej nie występują w żywych komórkach, ale mogą być syntetyzowane z występujących w naturze alkoholi izoprenoidowych (Madeja Z, Rak M, Wybieralska E, Róžański I, Masnyk M, Chmielewski M, Lysek R, Chojnacki T, Jankowski W, Ciepichal E, Swiezewska E, Tekle M, Dallner G, *New cationic polyprenyl derivative proposed as a lipofecting agent*, Acta Biochim Pol. 2007 54(4): 873–6, patent: Chojnacki T, Ciepichal E, Jankowski W, Kula-Świeżewska E, Chmielewski M, Masnyk M, Łysek, Madeja Z, Rak M, *Trimetyloaminowe pochodne poli-cis i poli-trans liniowych oligomerów izoprenowych, sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowanie*, PL 211824 B1). Znane są ze stanu techniki kationowe pochodne poliprenoli o aktywności lipofekcyjnej

(Madeja Z, Rak M, Wybieralska E, Różański I, Masnyk M, Chmielewski M, Lysek R, Chojnacki T, Jankowski W, Ciepichal E, Swieżewska E, Tekle M, Dallner G, *New cationic polyprenyl derivative proposed as a lipofecting agent*, Acta Biochim Pol. 2007 54(4): 873–6, patent: Chojnacki T, Ciepichal E, Jankowski W, Kula-Świeżewska E, Chmielewski M, Masnyk M, Łysek, Madeja Z, Rak M, *Trimetyloaminowe pochodne poli-cis i poli-trans liniowych oligomerów izoprenowych, sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowanie*) jednak zaproponowane rozwiązanie uniemożliwia użycie w warunkach surowicznych (w obecności surowicy), co znacznie ogranicza ich aplikację – przede wszystkim nie rokuje dobrze do zastosowań *in vivo* (Simberg D, Weisman S, Talmon Y, Faerman A, Shoshani T, Barenholz Y, *The role of organ vascularization and lipoplex-serum initial contact in intravenous murine lipofection*, J Biol Chem. 2003; 10;278(41): 39858–65). Ponadto, zaproponowany sposób przygotowania mieszaniny transfekcyjnej nie był korzystny do wygodnego przygotowania odczynnika działającego skutecznie przez dłuższy okres czasu, chronionego przed zakażeniem bakteryjnym.

Nieoczekiwanie okazało się, że przy zastosowaniu niniejszego wynalazku możliwe jest dostarczenie nowego systemu nośników lipidowych do transfekcji komórek, który nie posiada powyższych ograniczeń.

Nieoczekiwanie zatem wynalazek pozwala na uzyskanie odpowiednio prostego i skutecznego systemu modyfikowalnych nośników opartych na kationowych pochodnych poliprenoli realizujących zapotrzebowanie w dziedzinie wprowadzania kwasów nukleinowych do różnych typów komórek w warunkach bezsurowicznych i surowicznych (mniej sprzyjających wysokiej wydajności transfekcji niż bezsurowiczne – Li S, Tseng WC, Stolz DB, Wu SP, Watkins SC, Huang L, *Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection*, Gene Ther. 1999; 6(4):585–94; Zelphati O, Uyechi LS, Barron LG, Szoka FC Jr, *Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells*, Biochim Biophys Acta. 1998; 16; 1390(2): 119–33), bezpiecznych dla erytrocytów krwi ludzkiej, łatwych do modyfikacji i przechowywania bez utraty właściwości transfekcyjnych (stabilnych podczas przechowywania, co znacznie ułatwia wygodne wykorzystanie bez konieczności każdorazowego sporządzania bezpośrednio przed użyciem), odpornych na zakażenia bakteryjne. Nieoczekiwanie, zmiana składu i przygotowania kompozycji zawierających kationowe pochodne poliprenoli, doprowadziła do otrzymania nośników o takich właśnie niezwykle istotnych i korzystnych cechach.

Przedmiotem wynalazku jest system nośników kwasów nukleinowych w postaci kompozycji opartych na kationowych pochodnych poliprenoli, zawierających jako nośniki kwasów nukleinowych kationowe pochodne poliprenoli, o różnej długości łańcucha poliprenyloвого, przedstawione wzorem 1,



wzór 1

w którym n wynosi od 11 do 15 reszt izoprenowych, oraz lipidy pomocnicze wybrane z grupy obejmującej DOPE (1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfatydyloetanoloamina), cholesterol, DC-cholesterol [chlorowodorek {3β-[*N,N,N*-dimetyloaminoetan]-karbamilo]cholesterolu}], DOPC: (1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfatydylocholina), DLPC (1,2-dilaurylo-*sn*-glicero-3-fosfatydylocholina), DMPC (1,2-dimirystylo-*sn*-glicero-3-fosfatydylocholina) oraz, że zawiera etanol, którego stężenie jest zawarte w przedziale 48,5 do 73,5%, zaś pozostałą część stanowi roztwór wodny, oraz że ewentualnie, zawiera substancje modyfikujące powierzchnię lipopleksów.

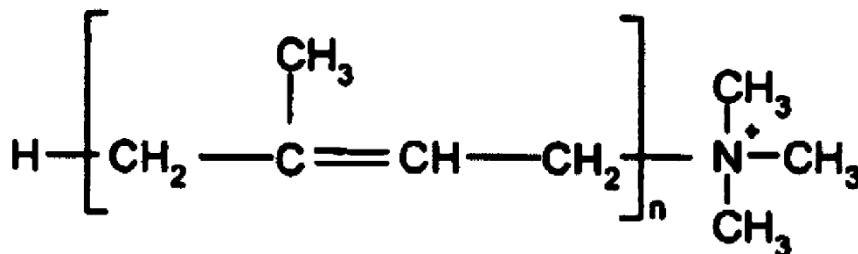
Korzystnie, gdy system w warunkach surowicznych jako lipidy pomocnicze zawiera DOPE, DOPE+DC-cholesterol lub DOPE+DC-cholesterol+DOPC.

Korzystnie, gdy roztwór wodny stanowi standardowe medium do hodowli komórek.

Korzystnie, gdy substancje modyfikujące powierzchnię lipopleksów stanowi glikol polietylenowy (PEG).

Korzystnie, gdy system przeznaczony jest do wprowadzania DNA i/lub RN A komórek eukariotycznych zarówno w warunkach surowicznych i bezsurowicznych, bez uszkodzenia erytrocytów krwi ludzkiej.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób przygotowywania systemu nośników kwasów nukleinowych określonego powyżej, charakteryzujący się tym, że nośniki kwasów nukleinowych kationowych pochodnych poliprenoli, o różnej długości łańcucha poliprenylowego, przedstawione wzorem 1,



w którym n wynosi od 11 do 15 reszt izoprenowych i lipidy pomocnicze rozpuszcza się w etanolu, po czym miesza z roztworem wodnym do uzyskania homogennego roztworu, przy czym stężenie etanolu w uzyskanych preparatach do wprowadzania DNA i/lub RN A zawarte jest w przedziale od 48,5 do 73,5%.

Korzystnie, gdy roztwór wodny stanowi standardowe medium do hodowli komórek.

Korzystnie, gdy system uzupełnia się o substancje modyfikujące powierzchnię lipopleksów, korzystnie glikol polietylenowy (PEG).

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie systemu określonego powyżej do otrzymywania preparatów do wprowadzania DNA i/lub RNA do komórek eukariotycznych w warunkach surowicznych i/lub bezsurowicznych, bez uszkodzenia erytrocytów krwi ludzkiej.

Przedmiot wynalazku w przykładzie realizacji jest uwidoczniiony na rysunku, na którym:

Na fig. 1 przedstawiono wzór 1 kationowych pochodnych poliprenoli – soli trimetylopoliprenyloamoniowych.

Na fig. 2 przedstawiono wydajne działanie (wprowadzanie DNA do komórek) wybranych kompozycji – PTAI-11 (jodek trimetylopoliprenyloamoniowy o wzorze 1 gdzie n=11) + DOPE + DC-cholesterol oraz PTAI-11 + DOPE + DC-cholesterol + DOPC bezpośrednio po ich przygotowaniu oraz po 8 miesiącach przechowywania w 4°C na modelowych komórkach nowotworu ludzkiej prostaty DU145 zarówno w warunkach bezsurowicznych, jak i w obecności surowicy.

Na fig. 3 przedstawiono efektywne działanie (wprowadzanie DNA do komórek) proponowanych kompozycji na różne typy komórek innych niż modelowe komórki linii DU 145 – komórki mysiego czerniaka B16-F10, szczurzego mięsaka XC oraz fibroblasty skóry ludzkiej.

Na fig. 4 przedstawiono brak właściwości hemolitycznych lipopleksów (kompleksów wybranych kompozycji z DNA) wobec erytrocytów krwi ludzkiej.

Na fig. 5 przedstawiono skuteczność wybranych kompozycji do wprowadzania RNA do komórek – na przykładzie shRNA wyciszającego ekspresję białka fluorescencyjnego EGFP w modelowych komórkach DU145.

Niniejszy wynalazek zobrazowano za pomocą poniższych przykładów wykonania:

**P r z y k ł a d I: Przygotowanie i wykorzystanie wybranych kompozycji do transfekcji komórek DU145 i porównanie ich wydajności w warunkach bezsurowicznych i w obecności surowicy**

PTAI-11 i lipidy pomocnicze – DOPE, DC-cholesterol, DOPC zostały rozpuszczone w 99,8% etanolu w stężeniach odpowiednio – 10; 3,2; 3,2 lub 10; 15 mg/ml. Następnie zostały zmieszane z sobą w odpowiednich proporcjach w celu uzyskania stosunków molowych w mieszaninach:

PTAI-11+DOPE+DC-cholesterol – 1:1:1

PTAI-11+DOPE+DC-cholesterol+DOPC – 1:1:1:1

a następnie zmieszane z medium DMEM F-12 HAM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM) bez dodatku surowicy i antybiotyków i intensywnie wortexowane przez 3 min – stężenie etanolu w tak przygotowanych odczynnikach wynosi:

PTAI-11+DOPE+DC-cholesterol – 73,5%

PTAI-11+DOPE+DC-cholesterol+DOPC – 59,4%

Jest więc ono wystarczające, aby chronić przechowywane odczynniki przed zakażeniem bakteryjnym.

W celu przygotowania mieszaniny transfekcyjnej odpowiednią ilość przygotowanych kompozycji (taką, aby stosunek PTAI-11 + DOPE : plazmidowe DNA wynosił 3,7 µg PTAI-11+DOPE / 1 µg DNA) rozcieńczano w medium DMEM F-12 HAM. Plazmid pEGFP-C1 (o wielkości 4,7 kb) kodujący białko zielonej fluorescencji EGFP został rozpuszczony w DMEM F-12 HAM bez surowicy i antybiotyków w stężeniu 80 ng/µl. Równe objętości mieszaniny lipidów oraz plazmidowego DNA były mieszane, inkubowane przez 30 min w temperaturze pokojowej w celu otrzymania lipopleksów, a następnie rozcieńczone medium (1:4).

Komórki DU145 wysiewano na płytce 24-dołkowe w liczbie  $8 \times 10^4$  komórek/dołek i hodowano przez 24 godziny w medium DMEM F-12 HAM z 10% dodatkiem surowicy bez antybiotyków, Medium usuwano i dodawano medium DMEM F-12 HAM bez surowicy i antybiotyków oraz lipopleksy (objętość mieszaniny transfekcyjnej – 400 µl) aby osiągnąć ilość kationowej pochodnej PTAI-11 + DOPE w mieszaninie transfekcyjnej równą 4 µg (procedura bezsurowicza) lub zostawiano 200 µl medium, w którym komórki zostały wysiane i dodawano lipopleksy (objętość mieszaniny transfekcyjnej – 400 µl, procedura transfekcji w obecności surowicy). Po 5 godzinach inkubacji w 37°C przy 5% CO<sub>2</sub>, dodawano 400 µl medium DMEM F-12 HAM z 20% dodatkiem surowicy i podwójną ilością antybiotyków.

Wydajność transfekcji oceniano poprzez obserwację fluorescencji komórek po 24 godzinach od transfekcji.

Na fig. 2 przedstawiono wyniki, które wykazały wysoką wydajność kompozycji zarówno w warunkach bezsurowicznych, jak i w obecności surowicy.

#### **P r z y k ł a d II: Porównanie wydajności wybranych kompozycji bezpośrednio po przygotowaniu oraz po długoterminowym przechowywaniu**

Kompozycje przygotowane według przykładu I zostały użyte bezpośrednio po przygotowaniu oraz po 8 miesiącach przechowywania w 4°C do transfekcji komórek DU145 w różnych warunkach (bezsurowiczych i w obecności surowicy). Na fig. 2 przedstawiono wyniki, które wykazały wysoką wydajność kompozycji bezpośrednio po przygotowaniu (A) oraz po 8 miesiącach przechowywania w 4°C (B).

Wydajność transfekcji oceniano poprzez obserwację fluorescencji komórek po 24 godzinach od transfekcji. Wyniki przedstawiono w postaci zdjęć z mikroskopii kontrastowo-fazowej (KF) i fluorescencyjnej (EGFP).

#### **P r z y k ł a d III: Przygotowanie, wykorzystanie i wydajność wybranych kompozycji do transfekcji różnych typów komórek, mysiego czerniaka B16-F10, szczurzego mięsaka XC oraz fibroblastów skóry ludzkiej**

PTAI-15 (jodek trimetylopoliprenyloamomowy o wzorze 1 gdzie n=15) został rozpuszczony w 99,8% etanolu w stężeniu 10 mg/ml, natomiast PEG 8000 (glikol polietylenowy o masie cząsteczkowej 8000) w jałowej wodzie destylowanej w stężeniu 0,5 mg/ml. Pozostałe lipidy zostały przygotowane tak, jak opisano w przykładzie I, tj. DOPE, DC-cholesterol, DOPC zostały rozpuszczone w 99,8% etanolu w stężeniach odpowiednio – 3,2; 3,2 lub 10; 15 mg/ml. Następnie składniki zostały zmieszane ze sobą w odpowiednich proporcjach w celu uzyskania stosunków molowych w mieszaninach:

PTAI-11+DOPE+DC-cholesterol - 1:1:1

PTAI-11+DOPE+PEG; PTAI-11+DOPE - 1:1

PTAI-15+DOPE+DC-cholesterol+DOPC - 1:1:1:1

a następnie zmieszane z medium DMEM F-12 HAM bez dodatku surowicy i antybiotyków i intensywnie worteksowane – stężenie etanolu w tak przygotowanych odczynnikach wynosiło:

PTAI-11+DOPE+DC-cholesterol – 73,5%

PTAI-11+DOPE+PEG – 48,5%

PTAI-15+DOPE+DC-cholesterol+DOPC – 58,9%

W celu przygotowania mieszaniny transfekcyjnej odpowiednią ilość przygotowanych odczynników (taką, aby stosunek PTAI + DOPE : plazmidowe DNA wynosił 3,7 µg PTAI-11 + DOPE i 4,2 µg PTAI-15 + DOPE / 1 µg DNA) rozcieńczano w medium hodowlanym bez dodatku surowicy i antybiotyków. Plazmid pEGFP-C1 kodujący białko zielonej fluorescencji EGFP został rozpuszczony w medium hodowlanym bez surowicy i antybiotyków w stężeniu 80 ng/µl. Równe objętości mieszaniny lipidów oraz plazmidowego DNA były mieszane, inkubowane przez 30 min w temperaturze pokojowej w celu otrzymania lipopleksów, a następnie rozcieńczane medium (1:4). Na 5 min. przed końcem 30-minutowej inkubacji do wybranych lipopleksów dodawano PEG 8000, tak aby stanowił on 4% w/v.

Komórki wysiewano na płytki 24-dołkowe w liczbie  $7 \times 10^4$  komórek/dołek (B16-F10),  $8 \times 10^4$  komórek/dołek (XC);  $3 \times 10^4$  komórek/dołek (fibroblasty skóry ludzkiej) i hodowano przez 24 godziny w medium EMEM (Minimal Essential Medium Eagle) (B16-F10, XC) lub DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; fibroblasty skóry ludzkiej) z 10% dodatkiem surowicy, bez antybiotyków. Zostawiano 200  $\mu$ l medium i dodawano lipopleksy, aby osiągnąć ilości kationowych pochodnych PTAI-11/15 + DOPE w mieszaninach transfekcyjnych równe 4  $\mu$ g PTAI-11+DOPE i 5  $\mu$ g PTAI-15+DOPE / 400  $\mu$ l mieszaniny transfekcyjnej. Po 5 godzinach inkubacji w 37°C przy 5% CO<sub>2</sub>, dodawano 400  $\mu$ l odpowiedniego medium z 20% dodatkiem surowicy i podwójną ilością antybiotyków.

Wydajność transfekcji oceniano poprzez obserwację fluorescencji komórek po 24 godzinach od transfekcji.

Na fig. 3 przedstawiono wyniki, które wykazały wysoką wydajność proponowanych kompozycji w obecności surowicy na przykładzie wybranych typów komórek: linii komórek mysiego czerniaka B16-F10 i szczurzego mięsaka XC oraz fibroblastów skóry ludzkiej. Wyniki przedstawiono w postaci zdjęć z mikroskopii kontrastowo-fazowej (KF) i fluorescencyjnej (EGFP).

#### **Przykład IV: Bezpieczeństwo kompozycji względem erytrocytów krwi ludzkiej**

Odczynniki PTAI-11/15+DOPE+DC-cholesterol+DOPC przygotowano i zastosowano do sporządzenia lipopleksów jak opisano w przykładach I i III.

Właściwości hemolityczne lipopleksów testowano na erytrocytach krwi ludzkiej (RBC) zawieszonych w PBS (buforowany fizjologiczny roztwór soli). RBC pozyskane od zdrowych dawców – ochotników oczyszczano przez trzykrotne wirowanie (1000xg, 10 min) i zawieszanie w podwójnej ilości PBS (w stosunku do początkowej objętości krwi pełnej), a następnie rozcieńczano 50-krotnie. Nośniki i lipopleksy w DMEM F-12 HAM bez dodatku czerwieni fenolowej dodawano do zawiesiny RBC, tak aby osiągnąć stężenia PTAI+DOPE podane na Fig. 4 ( $\mu$ g / 400  $\mu$ l mieszaniny) i inkubowano przez 1 godzinę w 37°C delikatnie mieszając. Próbkę wirowano (1000xg, 10 min) i nadsącze przenoszono do płytki 96-dołkowej w celu określenia stopnia hemolizy. Względne stężenie hemoglobiny określano korzystając z urządzenia Multiscan FC (Thermo Scientific) – mierzono absorbancję próbek przy długości fali równej 405 nm. RBC z dodatkiem 1% detergentu Triton X-100 stosowano jako kontrolę pozytywną (100% hemolizy).

Na fig. 4 przedstawiono wyniki, które wykazały brak właściwości hemolitycznych lipopleksów sporządzonych na bazie kompozycji stosowanych do wprowadzania plazmidowego DNA wobec erytrocytów krwi ludzkiej.

#### **Przykład V: Zastosowanie kompozycji do wprowadzania RNA do komórek**

Odczynniki PTAI-11/15+DOPE+DC-cholesterol+DOPC i lipopleksy z RNA przygotowano tak jak opisano w przykładach I i III. Komórki DU145 wysiewano na płytki 24-dołkowe w liczbie  $5 \times 10^4$  (24h),  $2,5 \times 10^4$  (48h),  $1,25 \times 10^4$  (72h), 104 (96h) komórek/dołek i hodowano przez 24 godziny w medium DMEM F-12 HAM z 10% dodatkiem surowicy, bez antybiotyków. Zastosowano po 100  $\mu$ l lipopleksów dodawanych do 200  $\mu$ l pożywki, w której komórki zostały wysiane. Do komórek wprowadzono shRNA wyciszające ekspresję białka fluorescencyjnego EGFP stosując mieszaniny transfekcyjne zawierające (w 300  $\mu$ l):

- PTAI-11+DOPE+DC-cholesterol+DOPC (w ilości zawierającej 2,4  $\mu$ g PTAI-11+DOPE) + 30 pmoli shRNA
- PTAI-15+DOPE+DC-cholesterol+DOPC (w ilości zawierającej 3  $\mu$ g PTAI-11+DOPE) + 30 pmoli shRNA

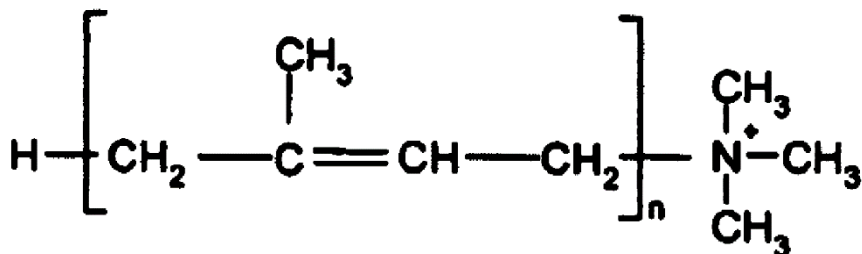
Po 24 godzinach wprowadzono do komórek plazmid pEGFP-C1 za pomocą komercyjnie dostępnego odczynnika Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Life Technologies) stosując 1,25  $\mu$ l Lipofectamine® 2000 + 1  $\mu$ g plazmidowego DNA pEGFP-C1/ dołek płytki 24-dołkowej.

Na fig. 5 przedstawiono wyniki, które pokazują wydajne wprowadzenie shRNA do komórek i jego efekt – wyciszoną ekspresję EGFP w komórkach DU145.

Wyniki przedstawiono w postaci zdjęć z mikroskopii kontrastowo-fazowej (KF) i fluorescencyjnej (EGFP).

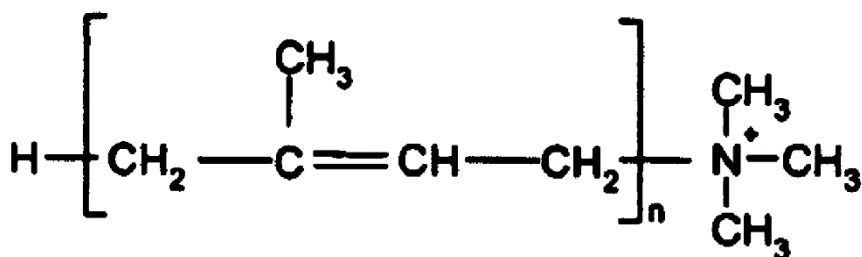
## Zastrzeżenia patentowe

1. System nośników kwasów nukleinowych w postaci kompozycji opartych na kationowych pochodnych poliprenoli, zawierających jako nośniki kwasów nukleinowych kationowe pochodne poliprenoli, o różnej długości łańcucha poliprenylowego, przedstawione wzorem 1,



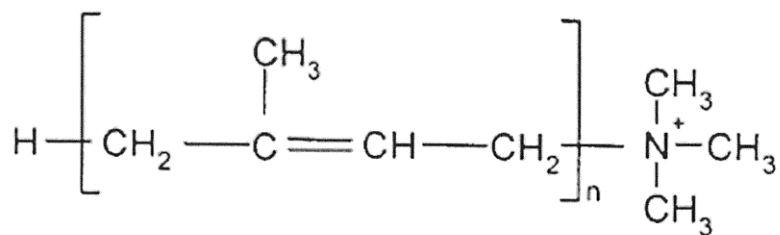
wzór 1

- w którym n wynosi od 11 do 15 reszt izoprenowych, oraz lipidy pomocnicze wybrane z grupy obejmującej DOPE (1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfatydyloetanolamina), cholesterol, DC-cholesterol [chlorowodorek {3β-[*N,N'*-dimetyloaminoetan]-karbamilo]cholesterolu}, DOPC:(1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfatydylocholina), DLPC (1,2-dilaurylo-*sn*-glicero-3-fosfatydylocholina), DMPC (1,2-dimirystylo-*sn*-glicero-3-fosfatydylocholina) oraz, że zawiera etanol, którego stężenie jest zawarte w przedziale 48,5 do 73,5%, zaś pozostałą część stanowi roztwór wodny, oraz że ewentualnie, zawiera substancje modyfikujące powierzchnię lipopleksów.
2. System według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w warunkach surowicznych jako lipidy pomocnicze zawiera DOPE, DOPE+DC-cholesterol lub DOPE+DC-cholesterol+DOPC.
  3. System według zastrz. 1, **znamienny tym**, że roztwór wodny stanowi standardowe medium do hodowli komórek.
  4. System według zastrz. 1, **znamienny tym**, że substancje modyfikujące powierzchnię lipopleksów stanowi glikol polietylenowy (PEG).
  5. System według zastrz. 1, **znamienny tym**, że przeznaczony jest do wprowadzania DNA i/lub RNA komórek eukariotycznych zarówno w warunkach surowicznych i bezsurowicznych, bez uszkodzenia erytrocytów krwi ludzkiej.
  6. Sposób przygotowywania systemu nośników kwasów nukleinowych określonego zastrzeżeniami 1 do 5, **znamienny tym**, że nośniki kwasów nukleinowych kationowych pochodnych poliprenoli, o różnej długości łańcucha poliprenylowego, przedstawione wzorem 1,



- w którym n wynosi od 11 do 15 reszt izoprenowych i lipidy pomocnicze rozpuszcza się w etanolu, po czym miesza z roztworem wodnym do uzyskania homogennego roztworu, przy czym stężenie etanolu w uzyskanych preparatach do wprowadzania DNA i/lub RNA zawarte jest w przedziale od 48,5 do 73,5%.
7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że roztwór wodny stanowi standardowe medium do hodowli komórek.
  8. Sposób według zastrz. 7, **znamienny tym**, że system uzupełnia się o substancje modyfikujące powierzchnię lipopleksów, korzystnie glikol polietylenowy (PEG).
  9. Zastosowanie systemu określonego zastrzeżeniami 1 do 5 do otrzymywania preparatów do wprowadzania DNA i/lub RNA do komórek eukariotycznych w warunkach surowicznych i/lub bezsurowicznych, bez uszkodzenia erytrocytów krwi ludzkiej.

## Rysunki



wzór 1

fig. 1

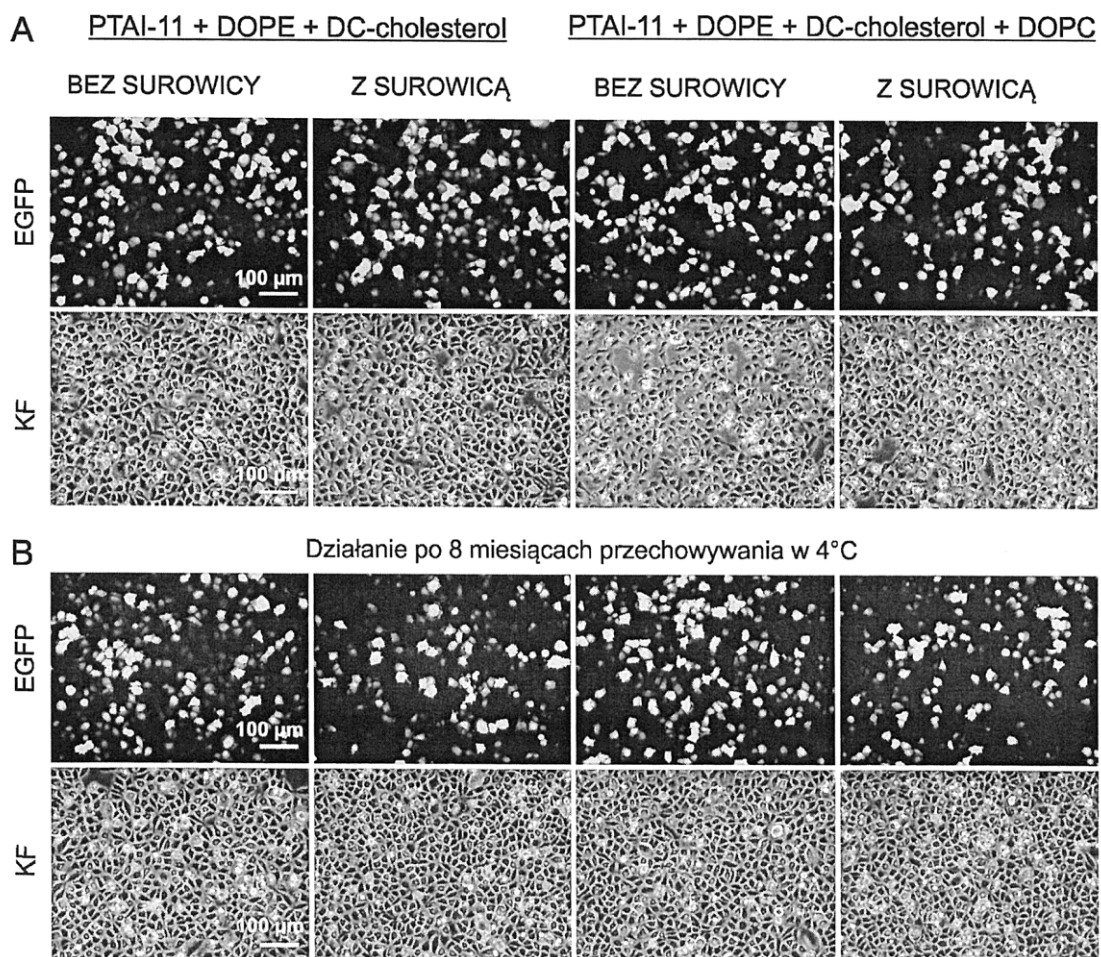


fig. 2

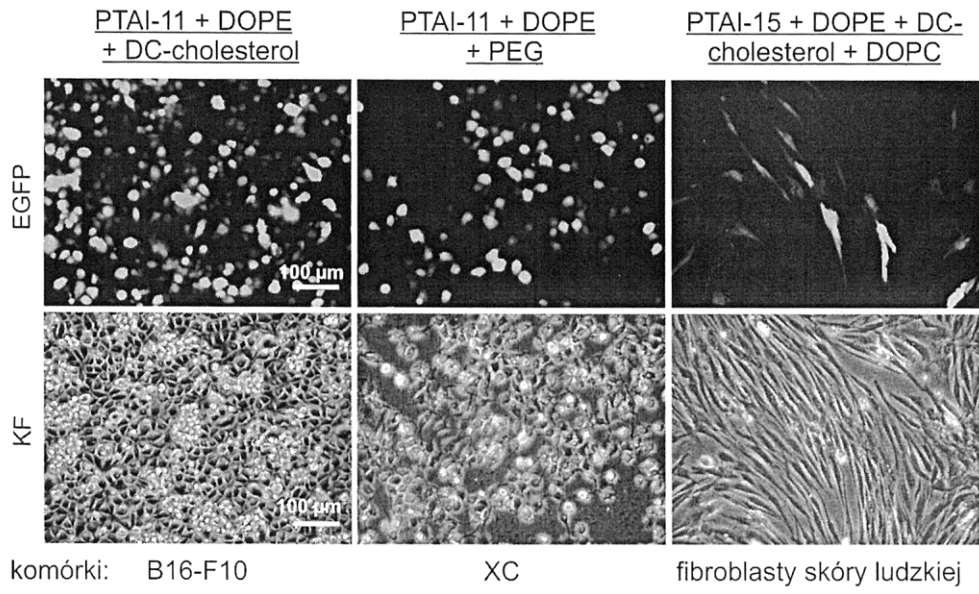


fig. 3

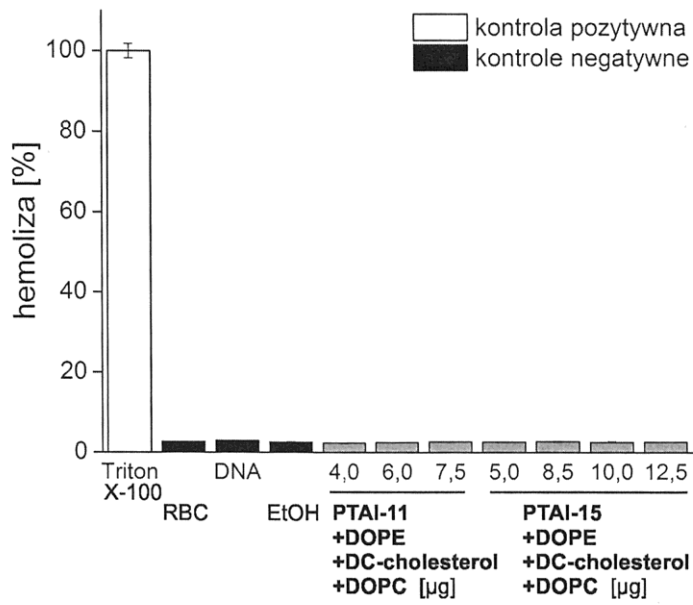


fig. 4

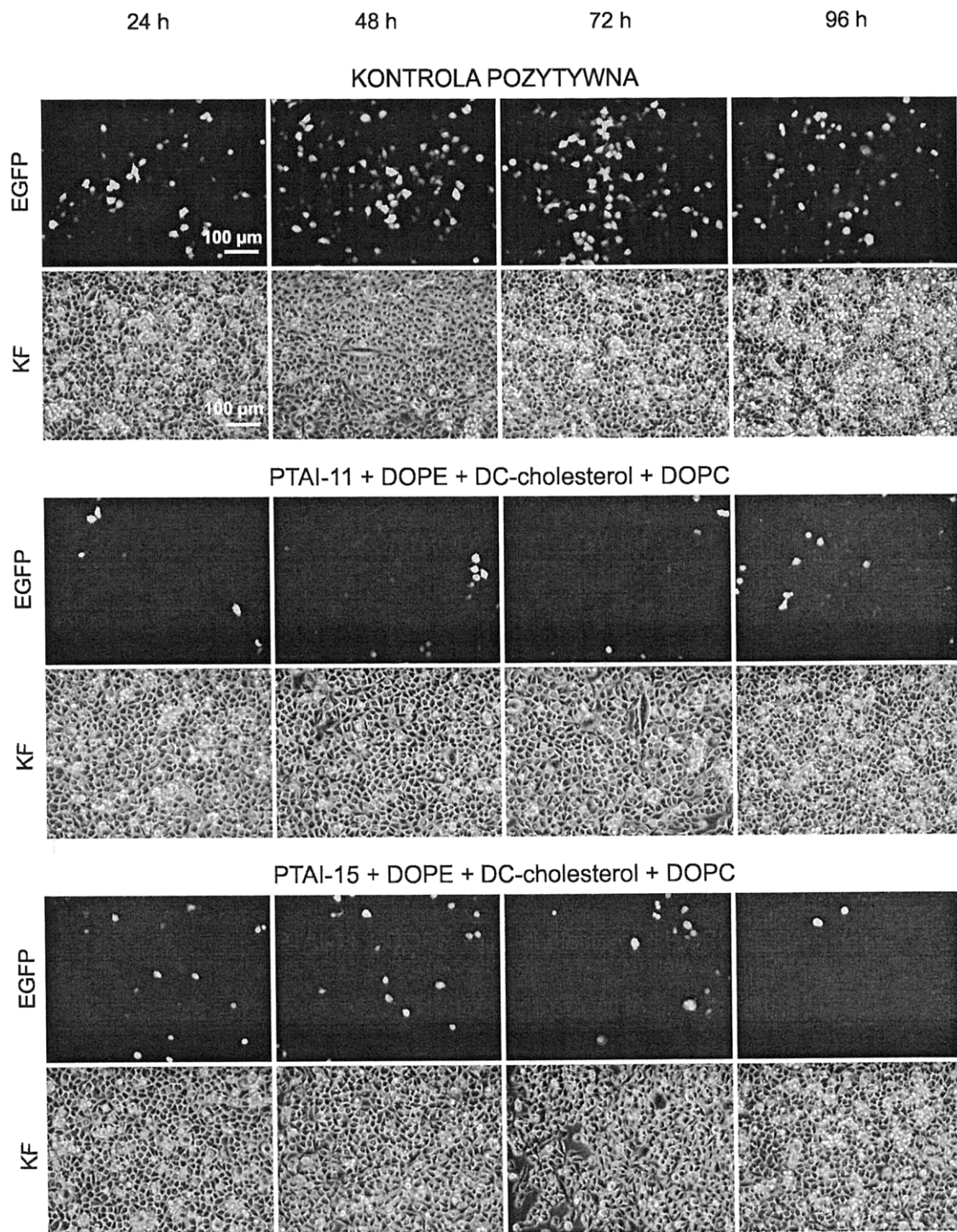


fig. 5