(11) Número de Publicação: **PT 104158 B**

(51) Classificação Internacional:
A61K 9/127 (2006.01) ***C12N 15/88*** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2008.08.18**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2010.02.18**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.02.21**
39/2011

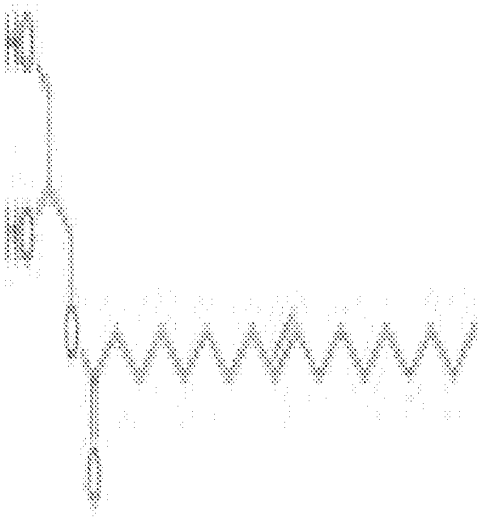
(73) Titular(es):
UNIVERSIDADE DO MINHO
LARGO DO PAÇO 4704-553 BRAGA **PT**

(72) Inventor(es):
MARGARIDA PAULA PEDRA AMORIM CASAL **PT**
MARIA ELISABETE CUNHA DIAS REAL OLIVEIRA **PT**
PAULO JOSÉ GOMES COUTINHO **PT**
OLGA MARIA FERNANDES PEREIRA COUTINHO **PT**
ANDREIA FERREIRA CASTRO GOMES **PT**

(74) Mandatário:

(54) Epígrafe: **APLICAÇÃO DA MONOOLEÍNA COMO NOVO LÍPIDO ADJUVANTE EM LIPOFECÇÃO**

(57) Resumo:



A PRESENTE INVENÇÃO DIZ RESPEITO À APLICAÇÃO DE SISTEMAS LÍPIDICOS CATIÔNICOS À BASE DE MONOOLEINA, NA COMPLEXAÇÃO, TRANSPORTE E TRANSFECÇÃO DE MATERIAL GENÉTICO EM CÉLULAS ALVO. OS SISTEMAS LIPÍDÍCOS SÃO PREPARADOS ATRAVÉS DA CONJUGAÇÃO DO LÍPIDO NEUTRAL MONOOLEOÍL-RAC-GLÍCEROL (MONOOLEINA) COM OS TENSIOACTIVOS CATIÁNÍCOS DA FAMÍLIA DE DIOCTADECILDÍMETÍLAMÓNIO (DODAX) (BROMETO DE DIOCTADECILDIMETILAMÓNIO (DODAB), CLORETO DE DIOCTADECILDÍMETILAMÓNIO (DODAC) E FOSFATO DE DIOCTADECILDÍMETILAMÓNIO (DODAP)) . ESTE MÉTODO DE LÍPOFECÇÃO É APLICÁVEL TANTO NO DOMÍNIO DA INVESTIGAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR (APLICAÇÃO IN VITRO), COMO NA ÁREA DASAÚDE EM TERAPIA GÉNICA (APLICAÇÃO IN VIVO), APRESENTANDO ELEVADOS NÍVEIS DE BIOCOMPATIBÍLÍDADE E REDUZIDOS CUSTOS DE AQUISIÇÃO.

RESUMO

"APLICAÇÃO DA MONOOLEÍNA COMO NOVO LÍPIDO ADJUVANTE EM LIPOFECÇÃO"

A presente invenção diz respeito à aplicação de sistemas lipídicos catiónicos à base de Monooleína, na complexação, transporte e transfecção de material genético em células alvo. Os sistemas lipídicos são preparados através da conjugação do lípido neutral monooleoil-rac-glicerol (Monooleína) com os tensioactivos catiónicos da família de Dioctadecildimetilamónio (DODAX) (Brometo de Dioctadecildimetilamónio (DODAB), Cloreto de Dioctadecildimetilamónio (DODAC) e Fosfato de Dioctadecildimetilamónio (DODAP)). Este método de lipofecção é aplicável tanto no domínio da investigação em Biologia Molecular (aplicação *in vitro*), como na área da saúde em Terapia Génica (aplicação *in vivo*), apresentando elevados níveis de biocompatibilidade e reduzidos custos de aquisição.

DESCRIÇÃO

" APLICAÇÃO DA MONOOLEÍNA COMO NOVO LÍPIDO ADJUVANTE EM LIPOFECÇÃO "

Campo da Invenção

A transformação genotípica de uma célula implica uma modificação fenotípica induzindo uma alteração hereditária permanente do DNA e do seu perfil de expressão. Este fenómeno pode ser obtido artificialmente através da inserção de material génico exógeno na célula (transfecção). A presente invenção diz respeito a uma nova formulação com recurso a lípidos catiónicos (lipofecção), através da conjugação do lipido neutral monooleoil-rac-glicerol (Monooleína) com os tensioactivos catiónicos derivados de **D**i**o**ctadecil**d**imetil**a**mónio (**DODAX**), como por exemplo, **B**rometo de **D**i**o**ctadecil**d**imetil**a**mónio (**DODAB**), **C**loreto de **D**i**o**ctadecil**d**imetil**a**mónio (**DODAC**) e **F**osfato de **D**i**o**ctadecil**d**imetil**a**mónio (**DODAP**), com aplicação no domínio da investigação em Biologia Molecular (aplicação *in vitro*), assim como na área da saúde em Terapia Génica (aplicação *in vivo*).

Antecedentes da Invenção

A modificação fenotípica de uma célula, induzida por uma alteração hereditária permanente do DNA e do seu perfil de expressão, dá-se o nome de transformação. Este fenómeno pode ser obtido artificialmente através da inserção de material génico exógeno na célula (transfecção), e revela-se de extrema importância tanto no domínio da investigação em Biologia Molecular (aplicação *in vitro*), como na área da saúde em Terapia Génica (aplicação *in vivo*).

Os vários métodos de transfecção actualmente conhecidos têm sido frequentemente agrupados em dois grupos: métodos virais (vírus recombinantes) ou métodos não-virais (complexação de DNA por intermédio de lípidos ou polímeros, co-precipitação de DNA com fosfato de cálcio, electroporação, bombardeamento de partículas carregadas, ou microinjecção de DNA) (Maslov et al., 2002).

A **Tabela I** apresenta um resumo comparativo das principais vantagens e desvantagens associadas a estes dois tipos de sistemas de transfecção.

Tabela I - Comparação entre as propriedades de sistemas de transfecção virais e não-virais (Gregoriadis, 2007)

Sistemas virais	Sistemas não-virais
(+) Eficiência de transfecção elevada	(-) Eficiência de transfecção média
(+) Transfecção em linhas celulares tumorais e finitas	(-) Transfecção limitada no caso de linhas celulares finitas
(-) Elevada imunogenicidade	(+) Baixa imunogenicidade e toxicidade
(-) Risco de mutagenicidade	(+) Sistemas biodegradáveis (p.e., lípidos)
(-) Baixos títulos virais	(-) Possibilidade de libertação direccionada
(-) Capacidade limitada de complexação	(+) Capacidade de transporte de DNA com diferentes tamanhos e diferentes formas (CCC, OC, linear)
(-) Dificuldade no caso de dosagem contínua	(+) Possibilidade de dosagem contínua e repetível
(-) Dificuldade no processo de manufactura	(-) Processo de manufactura relativamente simples e barato

Dentro do grande grupo dos métodos não-virais, uma especial relevância tem sido dada nas últimas décadas ao método de lipofecção, que envolve o uso de lipossomas catiónicos para a complexação e libertação de DNA exógeno no interior das células. Foi em 1987 que Felgner e seus

colaboradores descreveram pela primeira vez o uso de moléculas lipídicas com grupos químicos positivos para transfecção génica em culturas de células (Felgner et al.,1987). Ao contrário de outras drogas transportadas em sistemas lipídicos, o DNA plasmídico não era encapsulado no interior do lipossoma, mas antes ficava fortemente condensado pela acção de pequenos vesículos catiónicos que cobriam total ou parcialmente o plasmídeo, dando origem a estruturas mais tarde designadas de lipoplexos, cuja formação era fortemente dependente da atracção electrostática entre o esqueleto de fosfatos negativos do DNA e as cabeças positivas dos surfactantes catiónicos (Labat-Moleur et al., 1996; Meager, 1999).

O desenvolvimento de novos lípidos para aplicação em Terapia Génica, dá-se essencialmente através do teste empírico de compostos nunca antes utilizados para esse fim, cada um dos quais sendo analisado para uma aplicação particular. Depois da descoberta inicial de Felgner e seus colaboradores, uma primeira vaga de investigação resultou na descoberta de numerosas moléculas, conforme referido em diversos documentos publicados: US5279833 (Rose, 1994), US6936469 (S. deJong, S.L. Vanderbyl, 1998). Novos desenvolvimentos continuam a ser propostos na síntese de novos lípidos catiónicos para transfecção, como referido nos documentos US5651981 (Asley et al, 1997), WO2005033289 (F. MacDonald, L. Wang, 2005), onde é descrita a aplicação de misturas de lípidos catiónicos sintéticos 1,2-**dio**leoil-sn-glicero-3-**e**til**f**os**f**o**c**olina (**EDOPC**), 1,2-**di**lauroil-sn-glicero-3-**e**til**f**os**f**o**c**olina (**EDLPC**), e 1,2-**di**miristoil-sn-

glicero-3-etilfosfocolina (EDMPC) em sistemas de transfecção sem indicação de lípidos adjuvantes. Num outro documento US7067697, (Xiang Gao,2006), são apresentados vários lípidos catiónicos combinados com agentes bioactivos funcionais para aplicações farmacêuticas e onde DOPE (dioleoil-fosfatidil-etanolamina) e colesterol são identificados como lípidos adjuvantes.

Tem sido demonstrado que a adição de lípidos neutros adjuvantes à formulação dos lipoplexos promovem um aumento na taxa de libertação do DNA e na eficiência de transfecção, quer pela promoção do processo de fusão dos lipoplexos de maiores dimensões com a membrana celular, quer pela intensificação do processo de endocitose com lipoplexos de dimensões reduzidas (M.F. Almofti et al., 2003).

No entanto, dependendo do tipo e propriedades da linha celular utilizada, o mesmo sistema de lipofecção pode apresentar eficiências de transfecção muito diferentes, o que tem justificado a constante necessidade de procura de novas formulações adaptadas a cada tipo de célula.

De vários documentos publicados até à data, os lípidos adjuvantes mais frequentemente citados são o DOPE, o colesterol e seus derivados (US5888821 - R. Reszka, 1999; e US7001614 - N. Smyth-Templeton e G.N. Pavlakis, 2006).

Estes adjuvantes, apesar de, num modo geral promoverem o processo de transfecção, mostraram ser apenas um dos vários factores que condicionam a eficiência de transfecção, uma vez que o próprio tipo de célula a transfectar pode ser determinante na eficiência do

processo. Além disso, parâmetros como o tamanho e o tipo de estrutura dos complexos parecem ser igualmente importantes no desenvolvimento de um sistema de transfecção, uma vez que acabam por condicionar o grau de biofuncionalidade, biocompatibilidade e toxicidade dos sistemas. Todos estes factores ajudam a explicar a razão pela qual uma eficiência elevada de complexação de DNA não está necessariamente associada a uma alta taxa de transfecção.

Recentemente, o tensioactivo sintético **B**rometo de **D**ioctadecil**d**imetil**a**mónio (**DODAB**) (**Fig.1**) foi utilizado pelos próprios autores da presente invenção em conjugação com um lípido natural de baixo valor comercial (Monooleína), para desenvolver sistemas vesiculares que demonstraram ser capazes de complexar eficientemente DNA comercial (Silva et al., 2008). No entanto, à semelhança do que já foi verificado em muitos outros sistemas vesiculares (C. Esposito et al., 2006) e do já referido anteriormente, altas eficiências de complexação de DNA não estão necessariamente associadas a taxas elevadas de transfecção.

A Monooleína, 1-**m**onooleoil-*rac*-glicerol (**MO**) - **Fig.2**, é um lípido neutral anfifílico de origem natural que apresenta a particularidade de possuir duas fases cúbicas bicontínuas invertidas, mesmo em excesso de H2O (< 90% w/w), como se pode verificar no seu diagrama de fase, representado na **Fig. 3** (Lipowsky et al,1995). A existência de diversas fases não-lamelares, acrescida do seu baixo valor comercial, indicam que o composto Monoleína se apresente como um potencial candidato a lípido adjuvante.

A estrutura dos complexos lípidos/DNA depende fortemente da proporção lípido catiónico:DNA, assim como da proporção lípido catiónico:lípido neutral (May et al., 2004). Além disso, a própria formação dos lipoplexos é dependente do método de preparação dos lipossomas, assim como do procedimento utilizado para complexar o DNA com os vesículos catiónicos (Simões et al., 2005). É também reconhecido que a ordem de adição dos lípidos e DNA tem um efeito crítico nas propriedades físicas e na actividade biológica dos lipoplexos resultantes (Tranchant et al., 2004). Desta forma, do conhecimento da eficiência da monooleína na complexação do DNA (Silva e tal., 2008) não resulta óbvia a sua aplicação em transfecção.

Até ao momento, não foi descrita a utilização de Monooleína como lípido adjuvante em sistemas de lipofecção, isto apesar do seu reduzido valor comercial e da sua baixa citotoxicidade, como é proposto agora nesta nova invenção. A monooleína apenas parece referida como fazendo parte de formulações que utilizam o encapsulamento do DNA em lipossomas, e não por lipofecção via complexação [WO2003/057190 (2003)]. A aplicação da monooleína como adjuvante traz ainda a vantagem adicional de poder ser aplicada em diferentes tipos de células.

O documento US6074667(Paavo Kinnunem et al; 1998) menciona métodos de transfecção utilizando como vectores não-virais lípidos catiónicos derivados de esfingosinas, utilizando um primeiro lípido adjuvante DOPE e como segundo lípido adjuvante selecionado dos diacyl glycerois em células KK-1.

Contrariamente à monoleína que pertence à classe dos monoacilgliceróis, os diacilgliceróis têm duas caudas hidrofóbicos, sendo por isso semelhantes aos lípidos adjuvantes habituais (DOPE).

Breve Descrição das Figuras

Fig.1 - Representação química da molécula Brometo de Dioctadecildimetilamónio (DODAB).

Fig.2 - Representação química da molécula 1-monooleoil-rac-glicerol (Monoleína).

Fig.3 - Diagrama de fase da molécula 1-monooleoil-rac-glicerol (Monoleína), contendo diferentes estruturas de organização: estrutura Lamelar (L_α; L_β); estrutura Não-Lamelar Hexagonal Invertida (H_{II}) e estrutura Não-Lamelar Cúbica Invertida (Q_{II}).

Fig.4 - Comparação da citotoxicidade (48h) de diferentes lipoplexos catiónicos em células embrionárias de rim humano 293T, calculada como função da viabilidade celular determinada por ensaios da actividade da enzima lactato desidrogenase (absorvância a 340nm).

Fig.5 - Comparação da eficiência de transfecção (48 horas) de diferentes lipoplexos catiónicos em células embrionárias de rim humano 293T, calculada como função da

expressão do gene repórter β-galactosidase (absorvância a 420nm).

Descrição Geral da Invenção

A presente invenção descreve o uso de sistemas lipídicos catiónicos compostos por surfactantes catiónicos derivados de dioctadecildimetilamónio (DODAX) e pelo tensioactivo neutral 1-monooleoil-rac-glicerol (Monooleina, MO), na complexação e transporte de DNA, e como veículo de transformação genética em células. A Monooleina, 1-monooleoil-rac-glicerol (MO), é um lípido neutral anfifílico de origem natural que apresenta a particularidade de possuir duas fases cúbicas bicontínuas invertidas, mesmo em excesso de H2O (< 90% w/w), como se pode verificar no seu diagrama de fase, representado na Fig. 3 (Lipowsky et al., 1995). A existência de diversas fases não-lamelares, acrescida do seu baixo valor comercial, indicam que o composto Monooleina se apresenta como um potencial candidato a lípido adjuvante em sistemas de lipofecção.

A complexação do DNA, determinada pela atracção electrostática entre os grupos amónia carregados positivamente do surfactante sintético DODAX e o esqueleto de fosfatos negativos do DNA plasmídico, provoca a condensação da estrutura, dando origem a complexos DNA/Lípido vulgarmente conhecidos por lipoplexos, e que neste caso contêm também o lípido neutro Monooleina.

A inclusão de Monooleína na constituição do lipoplexo confere a este propriedades completamente distintas, devido ao facto dos monoacilgliceróis apresentarem um padrão de curvatura distinto do surfactante catiónico utilizado.
A diminuição da rigidez estrutural dos vesículos de DODAX provocada pela adição de Monooleína, aumenta a mobilidade lateral da cadeia lipídica, o que acaba por promover a interacção membrana-lipoplexo, favorecendo assim o processo de transfecção.

Descrição Detalhada da Invenção

Sendo aplicáveis razões molares monooleína:lípido catiónico entre 0.1 e 0.3, um modelo de realização da invenção consiste na aplicação da formulação com razão molar lípido catiónico (DODAB):lípido adjuvante (Monooleína) 2:1,em razões de carga (+/-) distintas (2:1 e 4:1), de entre as possiveis (de 1:1 a 4:1), correspondendo a diferentes concentrações de grupos amónio positivos (DODAB) para a mesma concentração de grupos fosfato negativos (DNA).

A eficiência relativa dos sistemas (quer ao nivel da sua taxa de transfecção e do seu grau de citotoxicidade) foi aferida por comparação directa com um sistema comercial de lipofecção (Lipofectamina®), nas condições indicadas pelo fabricante (Invitrogen).

A eficiência de transfecção foi determinada através da medição da actividade da enzima *repórter* β-galactosidase

(Absorvância a 420nm) (**Fig. 4**). O nível de citotoxicidade foi determinado através da medição da actividade da enzima Lactato Desidrogenase (Absorvância a 340nm) (**Fig. 5**).

No exemplo apresentado, a utilização de diferentes razões de carga (+/-) (2:1 e 4:1) para o sistema DODAB:MO (2:1), prendeu-se com a necessidade de determinar a concentração mínima de lípido que permitisse obter uma taxa máxima de transfecção, sem que isso representasse um acréscimo de toxicidade para as próprias células.

Na formulação lipídica testada, muito embora fosse esperado que a razão de carga (+/-) 4:1 apresentasse uma eficiência de transfecção mais elevada que a razão de carga (+/-) 2:1 (devido à maior concentração de agente de lipofecção), o mesmo não se veio a verificar experimentalmente (Fig. 4), devido ao acréscimo de citoxicidade verificado às 48 horas (5% para 7% nas razões de carga (+/-) 2:1 e 4:1, respectivamente) (Fig. 5). De referir que o sistema comercial (Lipofectamina) apresenta um nível de citotoxicidade (7%), superior ao do sistema DODAB:MO (2:1), para a razão de carga (+/-) 2:1.

Em todo o caso, a demonstração de que a formulação DODAB:Monooleína (2:1) em razões de carga (+/-) distintas, apresentam eficiências de transfecção comparáveis (r.c. (+/-) 2:1) e mesmo superiores (r.c. (+/-) 4:1) ao sistema comercial, mostram que o modelo da invenção é efectivo em concentrações variáveis de lípido e DNA.

Esta versatilidade pode vir a revelar-se útil na aplicação do sistema de lipofecção noutro tipo de linhas celulares em que a razão de carga (+/-) 2:1 seja menos

eficiente que as restantes, e em que outras condições de transfecção sejam requeridas para aumentar a eficiência do processo.

Preparação dos lipossomas catiónicos mistos

Para a preparação das soluções lipossomais mis-tas, volumes definidos das soluções stock de DODAB e Monooleína em etanol (20 mM) foram injectadas sob forte agitação a uma solução-tampão aquosa a 70°C (30 mM Tris-HCl). Uma concentração final de lípido (DODAB + Monooleína) de 1 mM foi obtida para a razão molar lípido catiónico (DODAB):lípido adjuvante (Monooleína) 2:1.

Preparação dos lipoplexos catiónicos

Os lipoplexos catiónicos foram preparados através da adição de volumes definidos de soluções lipossomais mistas (concentrações variáveis de grupos amónia positivos) a um volume constante de solução de DNA (concentração fixa de grupos fosfato negativos = número de poços × 1µg DNA/poço). Diferentes volumes de meio Opti-mem I foram utilizados para perfazer um volume total constante de solução nas várias formulações e razões de carga (+/-) testadas (100µL/poço). Os lipoplexos resultantes foram incubados à temperatura ambiente durante 30 min sem agitação.

O material genético introduzido na célula foi o plasmídeo pSV-β-gal (Invitrogen), que foi amplificado pela estirpe competente *Escherichia coli* DH5α. O isolamento e

purificação do DNA foi feito utilizando o Kit de extracção *"Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System"*, comercializado pela empresa Promega. A concentração final de DNA (1.75µg/µL) foi medida pela absorvância a 260 nm num espectrofotómetro Shimadzu UV-3101-PC.

Cultura de células

Para ensaios de transfecção e de análise de citotoxicidade, células da linha celular 293T foram cultivadas em frascos T75cm^2 com meio DMEM suplementado com L-glutamina (4 mM), bicarbonato de sódio (1.5 g/L), glucose (4.5 g/L), soro fetal de bovino (10% v/v) e antibiótico (1 uni/ml). As células foram regularmente subcultivadas entre as passagens 18 e 24, sendo sempre mantidas a confluências inferiores a 90% (37°C e 5% CO2).

Lipofecção

Doze horas antes da transfecção, cada frasco T75cm3 foi lavado uma vez com solução PBS (1X) e as células foram desaderidas através da adição de solução de tripsina 0.05% (3 min incubação a 37°C e 5% CO2). O número de células viáveis foi quantificado num hemocitómetro pelo método de exclusão do azul de tripano. As células foram ressuspendidas em volume apropriado de meio DMEM suplementado para obter a densidade de 2×10^5 células/poço, transferidas para placas de 24-Multipoços num volume final

de 500 µl/poço (cerca de 50-80% confluência no dia da transfecção).

No dia da transfecção, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM fresco, e os lipoplexos recém-preparados (ver secção "*Preparação dos Lipoplexos Catiónicos*") foram adicionados homogeneamente a cada poço, num volume que não excedeu 20% do volume final (1 µg DNA/poço). As células foram então novamente incubadas a 37°C e 5% CO_2, durante 24h-48h. A eficiência de transfecção foi determinada através do nível de expressão do gene repórter (β-galactosidase). A citotoxicidade foi medida através da quantificação intra e extracelular da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) nas amostras analisadas.

Análise da eficiência de transfecção (ensaio de actividade da enzima β-galactosidase)

Para determinar a eficiência de transfecção, as células recém-incubadas (24h-48h) foram lavadas duas vezes com PBS (1X) e lisadas durante 15 min com solução-tampão de lise (RLB 1X). As células foram então recolhidas e centrifugadas durante 2min a 14000rpm para remover os restos celulares. A actividade da enzima β-galactosidase nas diversas amostras (em unidades arbitrárias de fluorescência, a.u.) foi determinada com o kit de expressão "β-galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer" de acordo com instruções do fabricante (1 µl de extracto celular + 49 µl de solução RLB 1X + 50 µl de

solução Assay 2X + 150 µl de solução de carbonato de sódio para parar a reacção colorimétrica), com leitura a absorvância 420 nm em placa 96-Multipoços num leitor de microplacas SpectraMax 340PC.

Análise do nível de citotoxicidade (ensaio de actividade da enzima Lactato Desidrogenase)

Para determinar o nível de citotoxicidade nos sistemas analisados, foram quantificados os níveis intra- e extracelulares da enzima Lactato Desidrogenase. A recolha do meio de cultura em cada poço permitiu a posterior quantificação da LDH extracelular. Para obter o valor da LDH intracelular, procedeu-se à lavagem dos poços com 500 µl de solução-tampão Tris-HCl (15mM), seguida de raspagem mecânica e lise da amostra celular por 3 períodos de sonicação de 30seg. Ambas as amostras obtidas (intra- e extracelular) foram centrifugadas durante 1min a 13000rpm para remover os restos celulares. A actividade intracelular da enzima LDH foi determinada [10 µl de amostra intracelular + 250 µl de solução NADH (0.31 mM) + 10 µl de solução de piruvato (8.96 mM) para parar a reacção colorimétrica] em placa 96-Multipoços num leitor de microplacas SpectraMax 340PC (absorvância a 340 nm).

A actividade extracelular da enzima LDH foi também medida [40 µl de amostra intracelular + 250 µl de solução NADH (0.31 mM) + 10 µl de solução de piruvato (8.96mM) para parar a reacção colorimétrica] em placa 96-Multipoços num

leitor de microplacas SpectraMax 340PC (absorvância a 340 nm).

O balanço entre a actividade intra- e extracelular da enzima LDH, permite a determinação da taxa de sobrevivência celular.

REFERÊNCIAS

Artigos

M.A. Maslov, E.I. Sylcheva, N.G. Morozova, G.A. Serebrennikova, (2002), "Cationic Amphiphiles of Both Lipid and Non-lipid Nature in Gene Therapy", (2000), Russian Chemical Zulletin, v. 49, n. 3, pp. 385-401

G. Gregoriadis, (2007), "Liposome Technology - II - Entrapment of Drugs and Other Materials Into Liposomes", 3rd Edition, Editions I. Healthcare, New York (USA), pp. 424

P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, R.M. Ringold, M. Danielson, (1987), "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, n. 84, pp. 7413-7417

F. Labat-Moleur, A.M. Steffan, C. Brisson, H. Perron, O. Feugeas, P. Furstenberger, F. Oberling, E. Brambilla, J.P. Behr, (1996), "An electron microscopy study into the

mechanism of gene transfer with lipopolyamines", Gene Therapy, n. 11, pp. 1010-1017

A. Meager, (1999), "Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations", 1st Edition, Editions J.W.S. Limited, New York (USA), pp. 438

S.W. Hui, et al., (1996), "The Role Of Helper Lipids In Cationic Liposome-Mediated Gene Transfer", Biophysical Journal, n. 71, pp. 590-599

P.L. Felgner, Y.I. Tsai, L. Sukhu, C.J. Wheeler, M. Manthorpe, J. Marshall, S.H. Cheng, (1995), "Improved cationic lipid formulations for *in vivo* gene therapy", Ann.N. Y. Acad. Sci., n. 772, pp. 126-139

N. Farhood, R. Bottega, R.M. Epand, L. Huang, (1992), "Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity", Biochim. Biophys. Acta, n. 2, pp. 239-246

G.J. Nabel, D. Gordon, D.K. Bishop, B.J. Nickoloff, Z.Y. Yang, A. Aruga, M.J. Cameron, E.G. Nabel, A.F. Chang, (1996), "Immune response in human melanoma after transfer of an allogeneic class I major histocompatibility complex gene with DNA-liposome complexes", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, n. 26, pp. 15388-15393

Y. Liu, D. Liggitt, W. Zhong, C. Ti, K. Gaensler, R. Debs, (1995), "Cationic liposome mediatedintravenous gene delivery", J. Biol. Chem, n. 42, pp. 24864-24870

R.I. Mahato, K. Kawabata, Y. Takakora, M. Hashida, (1995), "*In vivo* disposition characteristics of plasmid DNA complexed with cationic liposomes", J. Drug Targeting, n. 2, pp. 149-157

N. Oudrhiri, J.P. Vigneron, M. Peuchmaitr, T. Leclerc, J.M. Lehn, P. Lehn, (1997), "Gene transfer by guanidinium-cholesterol cationic lipids into airway epithelial cells *in vitro* and *in vivo*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, n. 5, pp. 1651-1656

P.C.A. Barreleiro, (2001), "Equilibrium and Kinetic Studies of the Binding of DNA to Cationic Liposomes", Ph.D. thesis, Physical Chemistry Department, Center for Chemistry and Chemical Engineering, Lund University, Sweden

J.P. Neves Silva, P.J.G. Coutinho, M.E.C.D. Real Oliveira, (2008), "Characterization of Monoolein-Based Lipoplexes Using Fluorescence Spectroscopy", Journal of Fluorescence, pp. 1-8

R. Lipowsky, E. Sackmann, (1995), "Structure and Dynamics of Membranes", 2nd Edition, Elsevier Editions, New York, USA, pp. 957

S. May, A. Ben-Shaul, (2004), "Modeling of cationic lipid-DNA complexes", Curr. Med. Chem., n. 11, pp. 151-167

S. Simões, A. Filipe, H. Fanseca, M. Mano, N. Penacho, N. Düzgünes, M.P. Lima, (2005), "Cationic liposomes for gene delivery", Expert Opin. Drug Deliv, n. 2, pp. 1-19

I. Tranchant, et al., (2004), "Physicochemical Optimisation of Plasmid Delivery by Cationic Lipids", The Journal of Gene Medicine, n. 6, pp. S24-S35

M.R. Almofti et al., (2003), "Cationic Liposome Mediated Gene Delivery: Biophysical study and Mechanism of Internalization", Archives of Biochemistry and Biophysics, n. 410, pp. 246-253

C. Esposito et al., (2006), "The Analysis of serum on structure, size and toxicity of DDAB-DOPE and DC-Chol-DOPE lipoplexes Contributes to Explain Their Differebt Transfection Efficiency", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, n. 53, pp. 187-192

Patentes

[A] J.K. Rose, (1994), "Liposomal Transfection of Nucleic Acids into Animal Cells", US5279833, p.1-13

[B] G. deJong, S.L. Vanderbyl, (2005), "Methods for Delivering Nucleic Acid Molecules Into Cells and Assessment Thereof", US6936469, p 1-39.

[C] R. MacDonald, L. Wang, (2005), "Transfection Reagents", WO2005033289, W.I.P. Organization, p. 1-42.

[D] Xiang Gao, (2006) "Cationic Liposomes for Gene Transfer" US7067697, p.1-44.

[E] Asley et al (1997) "Cationic Phospholipids for transfection" US5651981, p.1-13.

[E] N. Smyth-Templeton, G.N. Pavlakis, (2006), "Liposome Complexes for Increased Systemic Delivery", US7001614, p. 1-23.

[F] R. Reszka, (1999), "Cholesterol Derivative for Liposomal Gene Transfer", US5888821, p. 1-4.

[H] Kinnunem et al (1998), "Liposomal Transfection Method" US6074667, p.1-10.

Braga, 8 de Fevereiro de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Um método para o transporte e libertação de ácidos nucléicos em células *ex vivo*, para indução ou silenciamento de genes, caracterizado por:
    a. Obtenção de uma mistura contendo monooleína numa fracção molar compreendida entre 0.1 e 0.3 e estando conjugada com um ou mais moléculas do grupo de lípidos: brometo de dioctadecildimetilamónio (DODAB), cloreto de dioctadecildimetilamónio (DODAC), fosfina de dioctadecildimetilamónio (DODAP), colesterol, DC-colesterol;
    b. Complexação do ácido nucléico através da adição da mistura anterior à temperatura ambiente, por um período de incubação de 30 minutos, em meio de cultura preferencialmente com baixo teor de soro, a pH 7.4 e forte agitação mecânica;
    c. Adição da mistura às células-alvo, numa proporção 1/5 (v/v), com um período de incubação entre 12 a 48h, a 37°C e 5% CO_2.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a condensação do ácido nucléico ser efectuada pela adição do agente de lipofecção a razões de carga lípido catiónico/fosfato entre 1.0 e 4.0.

3. Método, de acordo com as reivindicações 1 a 2, caracterizado por os ácidos nucléicos serem DNA ou RNA.

4. Método, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado por as células-alvo serem de natureza eucariótica, tais como células vegetais e células animais, incluíndo células de culturas primárias e linhas celulares contínuas.

5. Aplicação do método, conforme descrito nas reivindicações 1 a 4, caracterizado por se destinar a aplicações nas áreas da genética e da biotecnologia molecular.

Braga, 8 de Fevereiro de 2011

FIGURAS

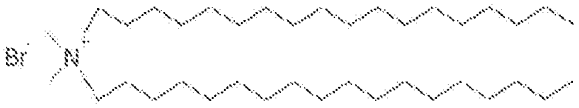


Figura 1

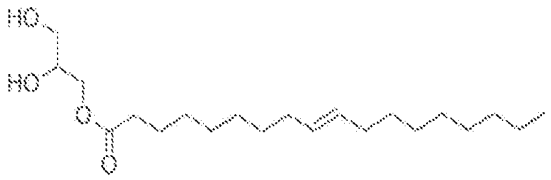


Figura 2

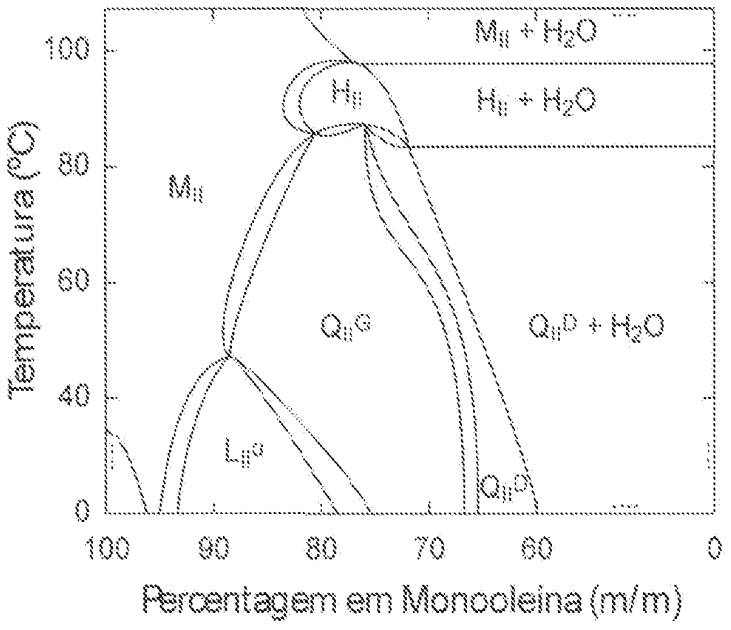


Figura 3

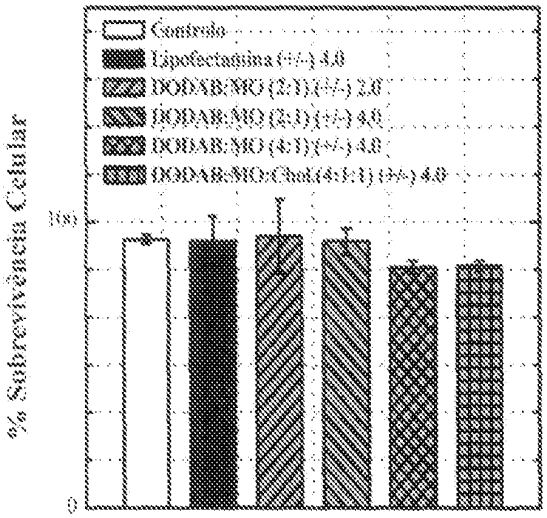


Figura 4

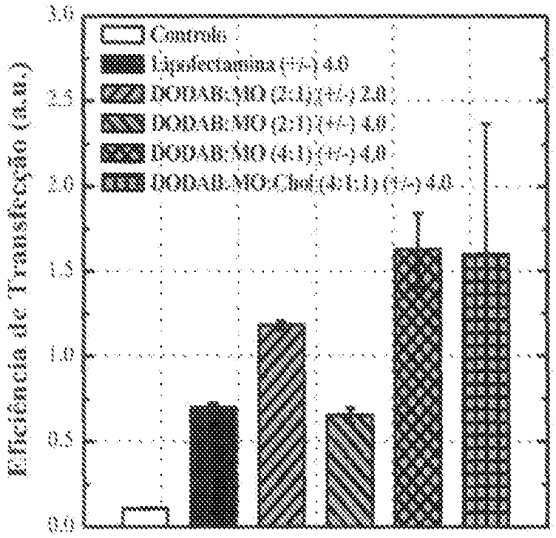


Figura 5