

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 970648 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21)	Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application	970648
(51)	Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification	
(22)	Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date	16.08.1995
(23)	Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date	14.02.1997
(41)	Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public	07.04.1997
(43)	Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date	13.06.2019
(86)	Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application	16.08.1995 PCT/AU1995/000505
(32) (33) (31)	Etuoikeus - Prioritet - Priority	
	16.08.1994 AU 7476 PM	25.08.1994 AU 7677 PM

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, 407 Royal Parade, Parkville, Victoria 3052, AUSTRALIA, (AU)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Whittaker, Robert George, West Pymble, NSW 2073, AUSTRALIA, (AU)
2 • Cameron, Fiona Helen, Lindfield, NSW 2070, AUSTRALIA, (AU)
3 • Bender, Veronika, Cremorne, NSW 2090, AUSTRALIA, (AU)
4 • Moghaddam, Minoo, Killara, NSW 2071, AUSTRALIA, (AU)
5 • Jennings, Philip Anthony, Brookfield, Queensland 4069, AUSTRALIA, (AU)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Seppo Laine Oy, PL 339, 00181 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä nukleiinihappojen jakelmiseksi
Förfarande för distribution av nukelinsyror

Nukleiinihappojen jakaminen

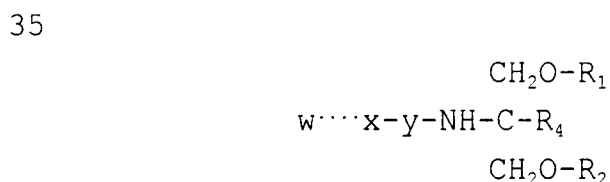
Tämä keksintö koskee menetelmää viedä yhdisteitä, erityises-
 5 ti nukleiinihappoja soluihin. Lisäksi tämä keksintö koskee
 koostumuksia käytettäväksi tässä menetelmässä.

On lukuisia tilanteita, missä on toivottavaa jakaa tarkoin
 määrättyjä yhdisteitä soluihin. Eräs näistä sovellutuksista
 10 on eukaryoottisolujen transfektio DNA:lla. Tätä tehdään täl-
 lä hetkellä käyttämällä erilaisia kaupallisia aineita, kuten
 "Transfectam" (Promega), "DOTAP", (Boehringer Mannheim),
 "Lipofectin" tai "Lipofectamine" (BRL) tai käyttämällä kal-
 siumfosfaatin välittämää transfektiota.

15 Kyvyllä jakaa nukleiinihappopohjaisia yhdisteitä soluihin on
 sovellutusta lääkkeen jakamisessa ja geeniterapiassa. Yhdis-
 teiden jakaminen soluihin muuttaa liittyneenä yhdisteeseen
 alla kuvattua kaavaa. Sellaiset muutokset voidaan selvästi
 20 osoittaa modifikaatioina niiden toiminnan kestoon (esim.
 hidas vapautuminen tai pitkitetty toiminta), vaaditun lääk-
 keen määrään tai jakamistapaan. Soluihin jakaminen käyttä-
 mällä yhdisteitä, jotka ovat vaihtelevia alla kuvattujen pa-
 rametrien puitteissa, voi myös tehdä lääkkeiden solu- tai
 25 kudosspesifisen kohdentamisen mahdolliseksi.

Tämän keksijät ovat havainneet, että molekyylien yhteenliit-
 tyminen yhdisteiden kanssa, joita on modifioitu rasvahappo-
 asyylijohdannaisilla, joilla on alla oleva yleinen kaava,
 30 helpottaa noiden yhdisteiden jakamista soluihin.

Sen mukaisesti ensimmäisessä näkökohdassa tämä keksintö
 koostuu menetelmästä viedä nukleiinihappo soluun, mihin si-
 sältyy solun altistaminen yhdisteelle, jonka kaava on:



missä:

w on nukleiinihappo

x on peptidi tai aminohappo

y on linkkeri, jonka ketjun pituus on vastaava kuin 1-20

5 hiiliatomia tai puuttuu

R_1 on H tai $\text{CH}_2\text{O}-R_3$; ja R_1 , R_2 ja R_3 ovat samat tai erilaiset

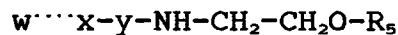
ja ovat joko vety, metyyli-, etyyli-, hydroksyyli- tai asyyli-ryhmä, joka on johdettu rasvahaposta, jossa on 3-24 tyydytetyn tai tyydyttämättömän hiiliatomin hiiliketju, edelly-

10 tyksellä, että ainakin yksi R_1 :stä, R_2 :sta ja R_3 :sta on asyyli-ryhmä, joka on johdettu rasvahaposta.

Toisessa näkökohdassa tämä keksintö koostuu menetelmästä

viedä nukleiinihappo soluun, mihin sisältyy solun altistami-

15 nen yhdisteelle, jonka kaava on:



missä:

20 w on nukleiinihappo

x on peptidi tai aminohappo

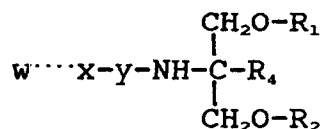
y on linkkeri, jonka ketjun pituus on vastaava kuin 1-20

hiiliatomia tai puuttuu

25 R_5 on asyyli-ryhmä, joka on johdettu rasvahaposta, jossa on 3-24 tyydytetyn tai tyydyttämättömän hiiliatomin hiiliketju.

Kolmannessa näkökohdassa tämä keksintö koostuu yhdisteestä käytettäväksi viettäessä nukleiinihappo soluun, yhdisteen kaavan ollessa:

30



35 missä:

w on nukleiinihappo

x on peptidi tai aminohappo

y on linkkeri, jonka ketjun pituus on vastaava kuin 1-20 hiiliatomia tai puuttuu

R_4 on H tai $\text{CH}_2\text{O}-R_3$; ja R_1 , R_2 ja R_3 ovat samat tai erilaiset ja ovat joko vety, metyyli-, etyyli-, hydroksyyli- tai asyyli-ryhmä, joka on johdettu rasvahaposta, jossa on 3-24 tyydytetyn tai tyydyttämättömän hiiliatomin hiiliketju edellytyksellä, että ainakin yksi R_1 :stä, R_2 :sta ja R_3 :sta on asyyli-ryhmä, joka on johdettu rasvahaposta.

10 Neljännessä näkökohdassa tämä keksintö koostuu yhdisteestä käytettäväksi viettäessä nukleiinihappo soluun, yhdisteen kaavan olessa:



15

missä:

w on nukleiinihappo

x on peptidi tai aminohappo

y on linkkeri, jonka ketjun pituus on vastaava kuin 1-20

20 hiiliatomia tai puuttuu

R_5 on asyyli-ryhmä, joka on johdettu rasvahaposta, jossa on 3-24 tyydytetyn tai tyydyttämättömän hiiliatomin hiiliketju.

25 Tämän keksinnön jokaisen näkökohdan edullisessa muodossa on y.

30 Tämän keksinnön edullisessa suoritusmuodossa nukleiinihappo on DNA, RNA tai oligonukleotidejä, joko DNA:ta tai RNA:ta, modifioituja oligonukleotidejä tai niiden yhdistelmä. Nukleiinihappossa voi olla myös kemiallisia lisäaineita, kuten fluoreseiini (FITC), kolesteroli, biotiini tai radioleima.

35 Tämän keksinnön menetelmää voidaan käyttää nukleiinihappojen jakamiseen, DNA, RNA, oligonukleotidejä, joko DNA:ta tai RNA:ta, modifioituja oligonukleotidejä tai niiden yhdistelmä mukaanluettuna, eukaryoottisiin soluihin, mukaanluettuna luodut eläin- tai kasvialkuperää olevat solulinjat, eläin- tai kasvialkuperää olevat primääriset solulinjat, kokonaiset

eläimet ja kasvit, käytetäänpä järjestelmällisesti tai paikallisesti tai aerosolina. Tässä suhteessa viitataan EPO 424 688:aan, mikä esitys on liitetty tähän viitteeksi. Nukleiinihappossa voi olla myös kemiallisia lisäaineita, kuten

5 fluoreskeiini (FITC), kolesteroli, biotiini tai radioleima.

Tämän keksinnön menetelmää tarkastellaan yleisesti sisältävän yhdisteen käytön pääasiallisesti vesipitoisessa seoksessa kiinnostuksen kohteena olevan solun pinnalle. Kokonaisten

10 organismien tapauksessa kuitenkin saattaa olla tarpeellista käyttää yhdistettä pääasiallisesti ei-vesipitoisessa muodossa paikallistetulla tai systeemisellä ruiskeella, paikallisesti tai sisäänhengittämällä.

15 Tämän keksinnön kuvaukseen sisältyy leimausyhdisteiden, kuten fluoreseiinin (FITC) tai biotiinin lisäys peptidiin visualisoitavaksi ja jäljittämään jälkiä soluissa ja organismeissa. Leimatut yhdisteet annettaisiin soluihin millä tahansa edellä kuvatuista reiteistä tai menetelmistä.

20 Peptidi voi olla minkä pituinen tahansa ja siinä voi olla toiminnallisia domeeneja, kuten tuman paikallistamissignaaleja ja/tai nukleiinihapon sitovia domeeneja. Sellaisia toiminnallisia domeeneja voi olla tandemissa tai haarautuneessa

25 rakenteessa, kuten sellainen joka voidaan rakentaa käyttämällä lysiiniä. Peptidissä on tyypillisesti kauttaaltaan positiivinen varaus vetämään puoleensa ja pitämään nukleiinihappo liittyneenä, esimerkiksi yhden tai useamman lysiinijäännöksen peptidiin. Peptidi voidaan kuitenkin rakentaa

30 kantamaan kauttaaltaan neutraalia varausta, jos tämä on edullista jakamisen erilaisille muodoille, esim. systeemiselle jakamiselle in vivo.

Linkkeri voi olla mikä tahansa alalla tunnetuista lukuisista

35 molekyyleistä. Tällä hetkellä on kuitenkin edullista, että linkkeri on aminohappo tai peptidi, esimerkiksialaniini, leusiini, glysiini, fenyyialaniini, lysiini tai niiden homo- tai seospolymeerit. Linkkerissä voi olla myös aminohap-

poja, jotka eivät ole tyypillisiä, täten sallien linkkerin pituuden pidennyksen yli standardi-aminohapon. Tässä suhteessa on erityisen edullista, että linkkeri on aminobutyry-, aminokaproni- tai aminokapryylihappo.

5

Vielä eräässä edullisessa tämän keksinnön suoritusmuodossa R_1 , R_2 ja R_3 ovat samat ja ovat edullisesti rasvahappojen asyylijohdannaisia, mukaanluettuna ryhmä, jossa on palmiaattia, myristaattia, lauraattia, kaproaattia, oleaattia ja kolesterolia ja erityisesti joko lauraattia tai myristaattia.

Tämän hakijan australialaisessa patenttihakemuksessa nro. 649242 on esitetty menetelmä liittää aminohapot tai peptidit rasvahappojen 1-3 asyylijohdannaisiin trometamiini- tai etanoliamiinijohdannaisen kautta. Käyttämällä tätä menetelmää voidaan muodostaa suuri määrä rasvahappokonjugaattien peptidi/asyylijohdannaisia, joissa on rasvahappojäännöksen 1-3 asyylijohdannaista. Tässä hakemuksessa esitettyä menetelmää käyttämällä voidaan muodostaa johtava yhdiste trilysiinialaniini-tris-tripalmitaatti (K3ATP3). Tämän hakemuksen esitys on liitetty tähän viitteeksi.

Nukleiinihappo (yhdisteen "w") voidaan liittää jäljelle jäävään yhdisteeseen käyttämällä positiivisesti varautuneita aminohappoja, esimerkiksi lyysiiniä, arginiinia, ornitiinia jne., yhdisteen "x"-asemassa. Erityisen edullisia ryhmiä ovat monolysiini, dilysiini, trilysiini, tetralysiini tai pentalysiiniryhmät. Vaihtoehtoisesti nukleiinihappo voi olla kovalenttisesti liittynyt peptidiin tai aminohappoon "x". Lisäksi voidaan linkkeriryhmä alaniini substituoida esimerkiksi leusiinilla, glysiinillä, fenyyialaniinilla tai α -BOC- (ϵ -vapaa) lyysiiniryhmällä ja rasvahappojen asyylijohdannaisten määrää voidaan vaihdella 1-3. Olisi huomattava, että milloin on toivottavaa käyttää rasvahappojen yhtä asyylijohdannaista, tris voidaan korvata etanoliamiinilla.

Uskotaan myös että formulointi liposomeiksi standardimene-
telmin lipidillä, kuten dioleoyylifosfatidyylietanoliini
(DOPE), DOPC (DOP koliini) tai kolesteroli, voi lisätä keksinnön kapasiteettiä helpottamaan yhdisteiden jakamista so-
luihin. Tämä on erityisesti todennäköistä, kun on 2 rasva-
asyylijohdannaista. Felgner et al, 1987, PNAS 84, ss. 7413-
7417 ja Yago, K. et al, 1993, Biochem. and Biophys. Res.
Comm. 196(3), ss. 1042-1048, ovat kuvanneet liposomien for-
mulointimenetelmiä. On myös osoitettu, että DOPE:n yksinker-
tainen lisääminen yhdisteiden liuoksiin voi merkitsevästi
lisätä niiden aktiivisuutta (koe 4 alla, VerafectinG2 +/-
DOPE). Samalla lailla muut transfektio-olosuhteiden modifi-
kaatiot, joissa on lisäaineita, kuten suolat, voivat lisätä
transfektiota. Muutokset ionivahvuudessa ja maa-alkalikatio-
nien läsnäollessa on kuvattu muuttuvaksi transfektio-
tehokkuudeksi (Loeffler ja Behr, Methods in Enzymology, 1993, H,
599-654).

Tämän keksinnön pääkäyttö olisi geeniterapiaa jakeleva aine.
Tähän mennessä havaittu suhteellisen tehokas geenien siirto
soluihin kytkettynä alhaiseen toksisuuteen (erityisesti kun
verrataan kaupallisesti saatavilla oleviin aineisiin) tekee
keksinnöstä ideaalisen yhdisteiden sarjan terapiakäyttöön.
Lisää tietoa koskien geeniterapiaa voidaan löytää Nabel et
al, 1993, PNAS, 90, ss. 11307-11311, mikä esitys on liitetty
tähän viitteeksi.

Jotta tämän keksinnön luonnetta ymmärrettäisiin selvemmin,
nyt kuvataan sen edullisia muotoja viittaamalla seuraaviin
esimerkkeihin ja kuvioihin, joissa:

Kuvio 1a esittää VerafectinIN ja DMSO:n toksisuuden ja 1b e-
sittää %:a selvinneet Verafectinissä verrattuna DMSO:hon.

Sytotoksisuus määritettiin käyttämällä standardia MTT- (3-
[4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli]2,5-difenyyli-tetrasoliumbromi-
di; tiatsolyylisininen) testiä. Verafectin on K3ATP3 ja kon-

sentraatio on esitetty μM :na, DMSO:ta käytettiin vastaavana konsentraationa kuin Verafectinin laimentimelle.

a. Solukuolema johtaa OD:n laskuun

- 5 b. Solun selviäminen laimennetun, vain DMSO:n läsnäollessa otettiin 100 %:ksi ja selviäminen Verafectinin läsnäollessa säädettiin sen mukaisesti.

10 Kuvio 2a esittää Verafectinin ja etanolin sytotoksisuuden ja 2b esittää selviämisen Verafectinissä verrattuna etanoliin.

Sytotoksisuus määritettiin käyttämällä standardia MTT (3-[4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli]2,5-difenyylitetrasoliumbromidi; tiatsolyylisininen) testiä. Verafectin (K3ATP3) liuotettiin 100 %:iin lämmintä etanolia 10 mg/ml ja sen jälkeen laimennettiin veteen konsentraatioiksi, jotka nähdään μM :na.

15 a. Etanoli laimennettiin rinnakkain ja sytotoksisuus testattiin samoissa konsentraatioissa kuin Verafectinin laimennin
b. Solun selviäminen laimennetun, vain etanolin läsnäollessa
20 otettiin 100 %:ksi ja selviäminen Verafectinin läsnäollessa säädettiin sen mukaisesti.

25 Kuvio 3 esittää CAT ekspression 48 h Verafectinin välittämän pSVLCAT-transfektion jälkeen.

Verafectinin määrä, joka nähdään μM :na, sekoitettiin 1 μg :n kanssa pSVLCAT:a ennenkuin laitettiin solujen päälle transfektiota varten. Nähdyt tulokset ovat CAT-ekspression tasoilla mitattuna 50 μl :sta soluviljelmää 48 h transfektion jälkeen.

30

Kuvio 4 esittää CAT ekspression 48 h testiaineiden välittämän CHO-solujen transfektion jälkeen.

35 Esitetyt tulokset transfektioaineen konsentraatioista, jotka antavat korkeimman transfektiotason kokeessa. Tämä oli 5 μl jokaisessa tapauksessa. CAT-määritykset tehtiin Neuman J.R.,

Morency, C.A. ja Russian, K.O. (1987) *Biotechniques* 5, s. 444-447, menetelmän mukaisesti.

Ei mitään: ei transfektioainetta, TF; Transfectam (Promega), Lfe; Lipofectamine (BRL), VF A3: K3ATP3, VF G2; K3GTP2.

5

Kuvio 5 esittää CAT ekspression 48 h testiaineiden välittämän Cos 1-solujen transfektion jälkeen.

Esitetyt tulokset transfektioaineen konsentraatioista, jotka antavat korkeimman transfektiotason. Ei mitään: ei ainetta,

10 VF A3: K3ATP3, VF G2; K3GTP2, VF G2 + DOPE; K3GTP2 + DOPE.

Kuvio 6 esittää transfektioaineiden suhteellisen sytotoksisuuden

Selitys

15 a. (CHO-solut)

Solujen elinkyky sen jälkeen, kun oli transfektoitu erilaisilla aineilla solun keräysajankohtana CAT-määrittystä varten.

Ei mitään: ei transfektioreagenssia, TF; Transfectam, Lfe;

20 Lipofectamine, VF G2; Verafectin G2 kaikki 5 μ l:ssa. Korkea OD tarkoittaa korkeata solun selviämistä.

b. (Cos 1-solut)

25 Solun elinkyky kuten kuviossa a, VF A3; Verafectin A3 9 μ l, Lfe 5 μ l. Määritykset tehtiin tässä kokeessa 35 mm astioissa.

Kuviot 7a ja 7b esittävät "x" peptidin, koe "a" tulokset

30 Kuvio 8 esittää "x" peptidin, koe "b" tulokset

Kuvio 9 esittää "x" peptidin, koe "c" tulokset

(Selitys - Kuviot 7, 8 ja 9; ei mitään; plasmidi-DNA:n kanssa ei käytetty ainetta, rb/sokeakoe; reagenssi-sokeakoe,

35 yhdisteen kuvausta seuraava luku tarkoittaa μ l-määrää 2 mM kantaliuoksesta (laimennettu vedellä). 7b: 100 % solun selviäminen otettiin astioista, jotka olivat "vale-transfektoitu", missä ei ollut DNA:ta tai transfektioainetta. 0 % elin-

kyky määritettiin solujen poissaollessa. Elinkyky vahvistettiin käyttämällä väriä alamarsinistä).

Kuviot 10a ja 10 b esittävät "y" linkkeri, koe "a" tulokset

5

Kuvio 11 esittää "y" linkkeri, koe "b" tulokset

Kuvio 12 esittää "y" linkkeri, koe "c" tulokset

(Selite - Kuviot 10a, 10b, 11,12; aine; testiyhdiste 2 mM kantaliuoksesta ellei toisin erityisesti mainita. (.4); aine
10 kantaliuos 0,4 mM:ssa. 0: ei ainetta. DNA yksin standardi transfektio-olosuhteissa. Alustojen sokeakoe: alustat yksin
CAT-määrittelyssä. suhteellinen elinkyky (alamarsininen):
kasvatusalustan, johon lisätty alamarsinistä inkubaation
15 ajaksi 37°C:ssa, OD₅₇₀₋₅₉₅ mittaaminen.)

Kuviot 13a ja 13b esittävät tulokset R1-R4-johdannainen, koe "a".

(Selite: kuten selite kuvioille 10a, 10b, 11, 12)

20

Kuviot 14a ja 14b esittävät tulokset R1-R4-johdannaiset, koe "b".

(Selite: kuten selite kuvioille 10a, 10b, 11, 12)

25

Kuviot 15a ja 15b esittävät tulokset R1-R4, koe "c".
(Selite: kuten selite kuvioille 10a, 10b, 11, 12. Keskiha-
jonta on esitetty.)

30

Kuviot 16a ja 16b esittävät tulokset R1-R4-johdannaiset, koe "d".

Kuviot 17a ja 17b esittävät tulokset R1-R4-johdannaiset, koe "e".

35

Kuviot 18a ja 18b esittävät tulokset R1-R4-johdannaiset, koe "g".

Cos 1-solut transfektoitiin standardimäärittelyn mukaisesti 60 mm astioissa. Inkuboitiin 50 μ l 48 tunnin viljelmäsUPER-natanttia 5 h 37°C:ssa CAT-määrittystä varten.

- 5 Kuviot 19a ja 19b esittävät tulokset R1-R4, C10-C16, koe "b". Hela-solut.

(Selitys - Kuviot 19a ja 19b; Lfe: Lipofectamine, (1,39) [lipidi]/[DNA] suhde, millä optimaalinen transfektio tapahtui, ei mitää; ei ainetta, mutta DNA:ta transfektiossa. Sytotoksisuus määritettiin alamarsinisellä.)

Kuviot 20a ja 20b esittävät tulokset "y" linkkeri, ei-standardi aminohapot, koe "1".

- (Selitys; LFE; Lipofectamine. Geeniekspression tasot nähdään "a":ssa β -galaktosidaasiyksikköinä. Suhteellinen elinkyky määritettiin "b":ssä käyttämällä väriä "alamarsininen" ja esitetään optisena tiheytenä mitattuna inkubaatiojakson jälkeä värin läsnäollessa. Korkea OD tarkoittaa korkeata solun selviämistä.)

20

Kuviot 21a ja 21b esittävät tulokset "y" linkkeri, ei-standardi aminohapot, "koe 2".

- (Selite; lfe; Lipofectamine, vf; Verafectin A3, C3; K3C3TL3, C5; K3C5TL3, C7; K3C7TL3, % transfektantteja laskettiin siniseksi varjättyjen solujen määrästä tietyistä määristä kenttiä verrattuna niihin soluihin, jotka eivät värjäytyneet. a; CHO-solut, b; Cos 1 solut.)

30

Kuviot 22a ja 22b esittävät tulokset "y" linkkeri, ei-standardi aminohapot PC3:lla ja Jurkat solulinjoilla.

Kuvio 23a esittää "formulaatio", koe "A" tulokset.

35

CAT-ekspressio CHO-soluista, jotka oli transfektoitu käyttämällä erilaisia liposomiformulaatioita, ainesosia ja Lipofectaminea (Lfe). Esimerkkinä olevan kokeen tulokset on esitetty.

Kuvio 23b esittää "formulaatio" ,koe "b" tulokset.

- % soluja transfektoitu käyttämällä liposomiformulaatioita, ainesosa-aineita ja kaupallisia valmisteita. VF A2; K3ATP2.
- 5 Liposomit formuloitiin käyttämällä VF A2:ta ja DOPE:a määrätyssä VF A2:DOPE-suhteessa. Esitetyt tulokset ovat yksittäisestä kokeesta.

- 10 Kuvio 24 esittää "ei-formuloitujen seosten", koe "2", tulokset.

- (Selitys; Transfektio tehokkuutta arvioidaan β -gal-yksiköiden, joita ekspressoidaan 48 h kuluttua, tasona. L3: K3ATL3, M3; K3ATM3. Piikki osoittaa lipopeptidin ja DNA:n yhdistelmän, joka antaa korkeimman lukeman. [lipidi] osoittaa käytetyn kokonaislipopeptidin konsentraation.)
- 15

Esimerkit

Kemia

20

Käytetyt lyhenteet:

- | | | |
|----|-----------------------------------|--|
| | α -BOC(ϵ -Z-lys) | = α -butyylioksidikarbonyyli- ϵ -karbobentsoksyliini |
| | AEP | = Alaniini-etanolamiinipalmitaatti |
| 25 | ATP1 | = Alaniini-tris-monopalmitaatti |
| | ATP2 | = Alaniini-tris-dipalmitaatti |
| | ATP3 | = Alaniini-tris-tripalmitaatti |
| | CDCl ₃ | = Kloroformi-d |
| | DCCD | = Disykloheksyylikarbodi-imidi, |
| 30 | DCM | = Dikloorimetaani, |
| | DIEA | = Di-isopropyylietyyliamiini, |
| | DMAP | = Dimetyyliaminopyridiini, |
| | DMF | = Dimetyyliformamidi, |
| | DMSO-D ₆ | = Dimetyylisulfoksidi-d6 |
| 35 | DSC | = Disukkinimidyylikarbonaatti, |
| | FATP1 | = Fluoreseiinialaniini-tris-monopalmitaatti |
| | FATP2 | = Fluoreseiinialaniini-tris-dipalmitaatti |
| | FATP3 | = Fluoreseiinialaniini-tris-tripalmitaatti |

	FITC	= Fluoreseiini-isotiosyanaatti (isomeeri I)
	HOSU	= Hydroksisukkinimidi,
	TEA	= Trietyyliamiini
	TFA	= Trifluorietikkahappo,
5	THF	= Tetrahydrofuraani,
	Tris	= 2-amino-2-hydroksimetyyli-1,3-propaanidio- li,
	Z	= N-karboksibentsoksi

10 Materiaalit ja menetelmät

α -BOC(ϵ -Z-lys) ostettiin Peptidi Institute:sta, Inc. (Osaka, Japani) ja DSC ostettiin Tokyo Kasei Kogyo, Co:ltta (Tokio, Japani). Kaikki aminohapot olivat L-konfiguraatiota ja os-
tettiin Sigma Chemical Company:stä (St. Louis, MO), ellei
toisin mainita. Kaikki liuottimet olivat analyyttistä laatua
ja käytettiin kuten ostettuna.

Ohutlevykromatografia (TLC)

20

Suoritettu Alufolein Silicageeli 60 F₂₅₄-levyillä (Merck) seuraavissa liuotinsysteemeissä; R_f¹, kloroformi/metanoli/etikkahappo: 95/5/3; R_f² kloroformi/metanoli/trietyyliamiini: 95/7/3.

25

Korkeapainenestekromatografia (HPLC)

30

Analyyttinen HPLC suoritettiin Millipore Waters HPLC-laitteella (Waters Chromatography Division of Millipore, Milford, MA), mihin sisältyi 6000A sarjan liuottimen jakosysteemi, jossa oli automaattinen gradientin ohjain ja Model 746 Data Module. Kromatografia suoritettiin NOVAPAKTM C₁₈ käänteisfaasipylväällä (100 x 8 mm). Peptidit ja peptidi-tris-konjugaatit analysoitiin lineaarisessa gradienttieluatiossa, jossa oli 24-80 % asetonitriiliä 0,1 %:a TFA:ta, 5 minuutissa 2 ml/min virtausnopeudella (System A). Havaitseminen suoritettiin 260 nm:ssä käyttämällä Waters Lambda Max 480:tä; (R_f^A). Lipopeptidikonjugaatit analysoitiin C₁₈-pyl-

väässä lineaarisella gradientilla 50 %:sta vettä, 50 %:sta asetonitriiliä, jossa oli 0,1 % TFA:ta, 50 %:iin asetonitriiliä, 50 % THF, jossa oli 0,1 % TFA:ta, 5 minuutissa virtausnopeudella 2 ml/min (System B); (R_t^B). Fluoreseiini-leimattujen yhdisteiden erottaminen suoritettiin PrepPak^R C4 Semipreparative Reverse Phase pylväässä (25 x 10) virtausnopeudella 6 ml/min.

Preparatiivinen HPLC

10

Erottamiset suoritettiin Millipore Waters DeltaPrep 4000 HPLC:llä käyttämällä Prepak C, käänteisfaasipylvästä (100 x 40 mm), joka oli eluoitu lineaarisella gradientilla samojen eluenttipuskurisysteemien kanssa kuin edellä on mainittu analyttiselle HPLC:lle virtausnopeudella 20 ml/min.

15

Nukleomagneettinen resonanssi (NMR)

NMR-spektri tallennettiin 200 MHz Brucker spektrofotometrillä.

20

Kemialliset synteetit

ATP1:n, ATP2:n ja ATP3:n valmistus

25 Nämä yhdisteet saatiin hydraamalla Z-Ala-Tris-mono-, di- ja tripalmitaatit 40 psi:ssä Parr-hydrogenaattorissa, jossa oli palladiumia hiilellä (10 %) etanolissa. Bentsyylioksidikarbo-
nyyliryhmän poistoa tarkkailtiin HPLC:llä (System B). Sen jälkeen, kun katalyytti oli poistettu suodattamalla, ja
30 haihduttamalla liuottimet, ATP1, ATP2 ja ATP3 saatiin kvantitatiivisinä saantoina. Whittaker, R.G., Hayes, P.J. ja Bender, V.J., (1993), Peptide Research, 6, 125-128, ja Whittaker, R.W. patentti nro. 64 92 42, Amino acids, peptides or derivatives thereof coupled to fats, ovat kuvanneet ZATP1:n,
35 ZATP2:n ZATP3:n ja vastaavien glysylyhyhdisteiden synteetit ja puhdistuksen.

FATP1:n, FATP2:n ja FATP3:n valmistus

ATP1-liuokseen (10 mg, 25 μ mol) DCM:ssä (500 μ l) lisättiin
 5 FITC-liuosta (10 mg, 25 μ mol) DMF:ssä (500 μ l) sekoittamalla. Reaktion näennäinen pH pidettiin 9,0:ssa lisäämällä TEA:ta ja tarkkailtiin HPLC:llä (System B). Fluoreseiini-Ala-Tris-palmitaatin muodostuminen oli valmista 10 minuutissa ja tuote puhdistettiin preparatiivisellä HPLC:llä antamaan
 10 FATP1-tuote kromatografisesti puhtaassa tilassa, R_f :7,08. Liuottimet poistettiin alennetussa paineessa ja FATP1-tuote lyofilisoitiin tert-butanolista.

FATP2 ja FATP3 syntetisoitiin samalla tavalla antamalla ATP-
 15 2:n (16,3 mg, 25 μ mol) ja ATP3:n (22 mg, 25 μ mol) DCM:ssä (500 μ l) reagoida FITC:n kanssa (10 mg, 26 μ mol) antamaan kromatografisesti puhtaat tuotteet, R_f :8,61 ja 9,92, vastavasti.

20 Fluoreseiini-leimatus alaniinietanolipalmitaatin valmistus

Alaniinietanolipalmitaatti (AEP) valmistettiin hydraamalla
 Z-Ala-etanoliamiinipalmitaatti Parr-hydrogenaattorissa, jossa oli palladiumia hiilellä (10 %) etanolissa. Bentsyylioksikarboxyyli-ryhmän poistoa tarkkailtiin HPLC:llä (System B).
 25 Sen jälkeen, kun katalyytti oli poistettu suodattamalla, ja liuotin haihduttamalla, etsikon yhdiste saatiin kvantitatiivisena saantona.

30 (Lys)_n-yhdisteiden valmistus

Whittaker, R.G., Hayes, P.J. ja Bender, V.J., (1993), Peptide Research, 6, 125-128, ja Whittaker, R.G. patentti nro. 64
 92 42, Amino acids, peptides or derivatives thereof coupled
 35 to fats, ovat kuvanneet Z-Ala-etanoliamiinin ja vastaavan palmitaatin synteessin ja puhdistuksen.

AEP-liuokseen (20 mg, 54 μ mol) DCM:ssä (500 μ l) lisättiin FITC-liuosta (22 mg, 56 μ mol) sekoittamalla ja näennäinen pH pidettiin 9,0:ssä lisäämällä TEA:ta. Reaktio oli valmis alle 20 min ja tuote puhdistettiin preparatiivisellä HPLC:llä antamaan otsikon yhdiste kromatografisesti puhtaassa tilassa, R_f :7,01.

Oligo-Lys-yhdisteiden $[(\text{BOC}(\epsilon\text{-Z-Lys})_n]$ synteetit suoritettiin klassisilla liuosmenetelmillä (1). Lipopeptidit $\text{BOC}(\epsilon\text{-Z-Lys})_n\text{-X-Tris-palmitaatti}$ syntetisoitiin kytkemällä oligo-Lys ja palmitiinihappo linkkeriaminohappo (X)-Tris-yhdisteellä. Loppulähestyminen synteesiin oli kytkeä $\text{BOC}(\epsilon\text{-Z-Lys})_n\text{-OH}$ aminohappo-Tris (2):n kanssa aktivoitulla esterimenetelmällä ja edelleen kytkeä palmitiinihappo tähän konjugaattiin symmetrisellä anhydridimenetelmällä (1). Välituotteen ja lopullisen tuotteen puhtaus tarkastettiin TLC:llä, HPLC:llä ja NMR:llä.

1) Bodanszky, M. ja Bodanszky, A. 1984. Principles of peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berliini.

2) Whittaker, R.G., Hayes, P.J. ja Bender, V.J., 1993, A Gentle Method for Linking Tris to Amino Acids and Peptides, Peptide Research, 6, 3 (s.125-128).

25 Alla on merkitty tyypillisiä synteesisimerkkejä.

Vaihe I $\alpha\text{-BOC}(\epsilon\text{-Z-Lys})_2\text{-OH}$

$\alpha\text{-BOC}(\epsilon\text{-Z-Lys})_2\text{-OH}$ (9,9 g, 30 mmol) liuotettiin 100 ml:aan DCM:ää. Liuokseen lisättiin HOSU:a (5,2 g, 45 mmol) ja DIEA:ta (9,0 g, 15 mmol) ja jäähdytettiin 0°C:een. DCCD (6,2 g, 30 mmol), joka oli liuotettu 50 ml:aan DCM:ää, tiputettiin reaktioseokseen. Sitä sekoitettiin 0°C:ssa 1 h, jonka jälkeen huoneenlämmössä yön yli, jotta saadaan aktivoitu esteri ($\alpha\text{-BOC}(\epsilon\text{-Z-Lys})\text{OSU}$ 86 % saannolla HPLC:llä. DCU- (disykloheksyyliurea) saostuma suodatettiin pois ja lisättiin α -amino ($(\epsilon\text{-Z-Lys})\text{OH}$:ta (7,56 g, 27 mmol) reaktioseokseen ja sitä sekoitettiin huoneenlämmössä yön yli. Yhdiste I muodostui 93

%:n saannolla määritettynä HPLC:llä. Liuotin poistettiin alennetussa paineessa ja öljyinen jäännös liuotettiin etyyliasetattiin ja pestiin hapolla, emäksellä ja vedellä. Etyyliasetattifaasi kuivattiin natriumsulfaatin päällä ja
 5 haihdutettiin kuiviin. Jäännös trituroitiin dietyylieetterillä, jotta saatiin 16,6 g yhdistettä I 93 % saannolla, R_f^1 : 0,52, R_t^A : 7,33 min; $^1\text{H NMR}$: δ (DMSO- d_6 , ppm), 1,39 (9H, s, $\text{BOC}(\text{CH}_3)_3$), 1,4-1,8 (12H, brs, β , γ , δ CH_2), 2,99 (4H, brs, ϵ CH_2), 3,95 (1H, m, αCH), 4,14 (1H, m, αCH), 5,03 (4H, s, Ar-
 10 CH_2), 6,89 (1H, d, α -uretaani NH, $J=7,5$ Hz), 7,25 (2H, t, ϵ -uretaani NH), 7,41 (10H, m, Ar(H)), 7,95 (1H, d, amidi NH, $J=8,5$ Hz).

Vaihe (II) $\text{H}(\epsilon\text{-Z-Lys})_2\text{OH}$

15

Yhdiste I (15,6 g, 27 mmol) liuotettiin 50 ml:aan DCM:ää ja jäädytettiin 0°C :een. Lisättiin reaktioseokseen TFA:ta (50 ml) ja sitä sekoitettiin 0°C :ssa 10 min ja huoneenlämmössä lisäksi 50 min. Liuotin ja ylimäärä TFA:ta haihdutettiin
 20 kuiviin ja öljyinen jäännös trituroitiin dietyylieetterillä, Saatiin 15,3 g yhdistettä II; R_f^2 : 0,19, R_t^A : 6,07 min.

Vaihe III $\alpha\text{-BOC}(\epsilon\text{-Z-Lys})_3\text{-OH}$

25

$\alpha\text{-BOC}(\epsilon\text{-Z-Lys})\text{OH}$ (8,96 g, 27 mmol) aktivoitiin HOSU:lla ja DCCD:llä, kuten esimerkissä 1. DCU suodatettiin pois ja suodos lisättiin 15,1 g:aan yhdistettä II. Lisättiin reaktioseokseen DIEA (6 g, 46 mmol) ja sekoitettiin huoneenlämmössä yön yli. Liuotin haihdutettiin ja jäännös liuotettiin etyyliasetattiin ja pestiin hapolla, emäksellä ja vedellä. Etyyliasetatti kuivattiin natriumsulfaatin päällä ja haihdutettiin kuiviin. Jäännös trituroitiin dietyylieetterillä, jotta saatiin 20 g yhdisteen III saostumaa valkoista 87 % saannolla; R_f^1 : 0,36, R_t^A : 7,92 min; $^1\text{H NMR}$: δ (DMSO- d_6 , ppm),
 30 1,39 (9H, s, $\text{BOC}(\text{CH}_3)_3$), 1,4-1,8 (18H, brs, β , γ , δ CH_2), 2,99 (6H, brs, ϵ CH_2), 3,95 (1H, m, αCH), 4,14 (1H, m, αCH),
 35 4,34 (1H, m, αCH), 5,03 (6H, s, Ar- CH_2), 6,8 (1H, d, ϵ -uretaani NH, $J=7,5$ Hz), 7,25 (3H, t, ϵ -uretaani NH), 7,41 (15H,

m, Ar(H)), 7,80 (1H, d, amidi NH, J=8 Hz), 8,15 (1H, d, amidi NH, J=8 Hz).

Vaihe IV α -BOC(ϵ -Z-Lys)₃-Ala-Tris

5

α -BOC(ϵ -Z-Lys)₃-OH (1 g, 1,2 mmol) liuotettiin 40 ml:aan DMF:ää ja lisättiin DSC:tä (0,92 g, 3,6 mmol). Sen jälkeen, kun oli lisätty DIEA:ta (0,2 ml, 1,2 mmol) ja sekoitettu huoneenlämmössä 1 h, muodostui aktivoitu tri-Lys:n esteri 78 %
 10 saannolla määritettynä HPLC:llä. Ala-Tris:ä (0,46 g, 2,4 mmol) lisättiin reaktioseokseen ja pH säädettiin 8:ksi lisäämällä 0,6 ml DIEA:ta. Otsikon yhdisteen muodostumista seurattiin HPLC:llä. 2 h kuluttua aktivoitu esteri oli melkein kokonaan käytetty ollen joko kytkeytynyt Ala-Tris:iin
 15 muodostamaan yhdisteen IV tai hydrolysoitunut tri-Lys-yhdisteeseen. Yhdisteen IV kokonaissaanto oli 52 % HPLC:llä. Preparaatiivinen HPLC tuotti 270 mg puhdasta yhdistettä, jossa oli R_f :7,4 min; ^1H NMR: δ (DMSO- d_6 , ppm), 1,39 (9H, s, BOC-(CH₃)₃), 1,4-1,9 (18H, brs, β , γ , δ CH₂), 2,97 (6H, brs, ϵ CH₂), 3,53 (6H, d, Tris (CH₂)), J=3 Hz, 3,75-4,43 (4H, brs, α CH), 3,89 (3H, t, OH), 5,08 (6H, s, Ar-CH₂), 6,8 (1H, d, α -uretaani NH, J=7,4 Hz), 7,19 (3H, t, ϵ -uretaani NH), 7,41 (15H, m, Ar(H)), 7,80 (1H, d, amidi NH, J=8 Hz), 8,15 (1H, d, amidi NH, J=8 Hz), 8,35 (1H, d, amidi NH, J=8 Hz).
 20

25

Vaihe V α -BOC(ϵ -Z-Lys)₃-Ala-Tris(palmitaatti)_n, n=1,2,3

α -BOC(ϵ -Z-Lys)₃-Ala-Tris (173 mg, 0,173 mmol) liuotettiin 3 ml:aan DCM:ää ja 1 ml:aan DMF:ää. Reaktioseokseen lisättiin
 30 palmitiinihappoa (89 mg, 0,346 mmol) ja katalyyttinen määrä DMAP:tä. Se jäädytettiin 0°C:een ja tiputeltiin DCCD:tä (71 mg, 0,346 mmol) liuotettuna 2 ml:aan DCM:ää reaktioseokseen. Sitä sekoitettiin 0°C:ssa 30 min, jonka jälkeen huoneenlämmössä yön yli. Otsikon yhdisteen suhde mono-, di- ja tripalmitaatin kanssa oli 17 %, 40 % ja 43 % HPLC:llä (System B).
 35

Liuotin haihdutettiin kuiviin ja jäännös liuotettiin uudelleen DCM:ään. DCU suodatettiin pois ja suodos pestiin nat-

riumbikarbonaatilla (5 %) ja vedellä. Tämän seoksen prepara-
 tiivinen HPLC tuotti erittäin puhtaita monopalmitaatti- (17
 mg, R_t^B :7,63 min), dipalmitaatti- (76 mg, R_t^B :8,65 min) ja
 tripalmitaatti- (63 mg, R_t^B :9,29 min) yhdisteitä. Tripalmi-
 5 taattiyhdisteen $^1\text{H NMR}$: δ (CDCl_3 , ppm):0,8-0,95 (9H, t, CH_3)
 1,3-1,47 (84H, m, $\text{BOC}(\text{CH}_3)_3$), palmitaatti (CH_2), Ala (CH_3)
 1,47-1,9 (18H, brs, β , γ , δ CH_2), 1,83 (6H, t, CH_2), 2,28
 (6H, t, CH_2), 3,09 (6H, brs, ϵCH_2), 3,97 (2H, m, α CH), 4,29
 (1H, m, α CH), 4,35 (6H, s, $\text{Tris}(\text{CH}_2)$), 4,47 (1H, t, α CH),
 10 5,04 (6H, s, Ar-CH_2), 5,56 (1H, d, amidi NH, $J=7$ Hz), 5,7
 (1H, d, amidi NH, $J=7,5$ Hz), 5,78 (1H, d, amidi NH, $J=7,5$
 Hz), 6,92 (1H, d, α -uretaani NH, $J=7,4$ Hz), 7,19 (3H, t, ϵ -
 uretaani NH), 7,35 (15H, m, $\text{Ar}(\text{H})$).

15 Vaihe (VI) (Lys)₃-Ala-Tris(palmitaatti)

Yhdiste V (45 mg) liuotettiin DCM:ään (2 ml) ja jäädytet-
 tiin 0°C:een. Lisättiin TFA:ta (2 ml) poistamaan Boc-ryhmä
 0°C:ssa 10 min ja huoneenlämmössä 30 min. Liuotin ja ylimäärä
 20 TFA:ta poistettiin huolellisesti toistetulla samanaikaisella
 haihduttamisella dietyylieetterin kanssa. Tämän yhdisteen
 $^1\text{H NMR}$ osoitti BOC- $(\text{CH}_3)_3$ -ryhmän häviämisen. Sitten jäännös
 liuotettiin DCM/Metanoli-liuokseen (50/50, 4 ml) ja hydrat-
 tiin Parr-hydrogenaattorissa 2 h 40 psi:ssä käyttämällä 10 %
 25 palladium/hiiltä poistamaan Z-ryhmät. Z-ryhmien poisto var-
 mistettiin $^1\text{H NMR}$ -spektroskopiolla (kemiallisten siirtymien
 katoamisella 5,04 ja 7,35 ppm:ssä).

Biologia

Käytetyt lyhenteet:-

A = Alaniini

DDME = (Depleted) Dulbeccos Modified Eagles Medium,
 tehty 2x konsentraationa, jäädytetty, sulatettu
 35 37°C:ssa, suodatettu ja laimennettu 1x:ksi ennen
 käyttöä (Loeffler, J-P ja Behr, J-P, Methods in
 Enzymology (1993) H, s. 599-654.

DME = Dulbeccos Modified Eagles Medium

	DOPE	=	Diioleoyylifosfatidyylietanoliamiini
	EM	=	Elektronimikroskooppi (-mikroskopia)
	F	=	Fenyylialaniini
	FCS	=	Vasikan sikiön seerumi
5	FLAEP	=	fluoreseiinialaniinietanoliamiinipalmitaatti
	FLATP3	=	fluoreseiinialaniini-tris-tripalmitaatti
	G	=	glysiini
	K	=	lysiini
	K3ATP1-3	=	trilysiinialaniini-tris-mono-tripalmitaatti
10	L	=	leusiini
	Lfe	=	lipofectamine (Gibco BRL)
	MTS	=	3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-5-(3-karboksime- toksifenyyli)-2-(4-sulfofenyyli)-2H-tetrasolium, sisäinen suola; (Owenin reagenssi)
15	MTT	=	3-[4,5, dimetyylitiatsol-2-yyli]2,5-difenyyli- tetrasoliumbromidi, tiatsolisini
	PBS	=	fosfaattipuskuroitu suolaliuos
	TEM	=	läpivalaisuelektronimikroskooppi
	VF	=	Verafectin = K3ATP3
20	VFA3	=	K3ATP3
	VFG2	=	K3GTP2

A. Solujen talteenotto ja jakaminen

- 25 Jotta määritetään kyky jakaa yhdisteitä soluihin, suoritettiin alustavat kokeet fluoreseiinialaniinietanoliamiinipalmitaatilla (FLAEP) ja fluoreseiinialaniini-tris-tripalmitaatilla (FLATP3).
- 30 FLAEP- ja FLATP3-konjugaatit laimennettiin DMSO-liuoksesta vesipitoiseen alustaan (PBS) 10 μM :ksi ja laitettiin pestyjen subkonfluenttien Cos 1 solujen, jotka kasvoivat keitettyjen peitinlasien päällä, yksinkertaisen kerroksen päälle. Inkubaatioajan jälkeen, kuten kokeessa yksityiskohtaisesti
- 35 on selitetty, 24 h asti altistamista, solut pestiin ja kiinnitettiin formaldehydissä 20 min. Sitten soluja havainnointiin laservirityksessä Bio Rad MRC 5000 samapolttopisteisessä mikroskoopissa.

Soluissa, jotka kiinnittyivät vain 15 min joko FLAEP- tai FLATP3-käsittelyn jälkeen, oli voimakas sytoplasminen värjäytyminen. Soluissa, joita oli altistettu vastaavalle tasolle fluoreseiiniä yksinään, oli vain hyvin heikko yleinen fluoresenssi verrattuna koko soluun. Oli erityisesti huomion arvoista, että FLATP3 näytti liittyvän edullisesti yhteen solu- ja tumamembraanien kanssa, malli joka pysyi soluissa, salli kasvaa 24 h huolimatta konjugaattiliuoksesta, joka oli pesty pois yksinkertaisen kerroksen päältä ja korvattu serumilla, jossa oli 2 h vanhaa alustaa. Tätä samaa värjäyksen pysymistä ei havaittu FLAEP-konjugaatilla samoissa olosuhteissa.

Kiinnitys 4 %:een paraformaldehydiin säilytti solun morfologian paremmin kuin formaldehydikiinnite. Sen mukaisesti saatiin soluihin korkea fluoresenssin erottelukuva. Tämä osoitti, että molemmat konjugaatit näyttivät paikallistavan sytoplasman hyvin erillisille alueille mieluummin kuin esittivät yleistä jakaantumista. Havainnot valomikroskooppitasolla osoittivat, että paikallistamisalueet voivat olla solulimakalvosto, golginlaite ja mahdolliset mitokondrian membraanit.

Havainnot alemmalla resoluutiolla (40 x objektiivi) eläviin, ei-kiinnitettyihin soluihin tehtynä samoilla altistumisjaksoilla kuin kiinnitetyille soluille, osoittivat erilaisen värjäntymismallin. FLAEP-konjugaatti näytti menevän soluun helposti, mutta konsentroitui erityisesti tumaan. Tämä merkitsee mahdollisesti, että tämä yleistynyt soluliman ja tumen jakaantuminen johtuu molekyyleistä, jotka eivät kiinnity näiden osastojen komponentteihin. Kiinnityksessä sellaiset molekyylit pestäisiin soluista jättäen vain konjugaatin, joka on sitoutunut solun komponentteihin. FLATP3-konjugaatilla oli kuitenkin samanlainen malli, olivatpa solut eläviä tai kiinnitettyjä.

Avointa sytotoksisuutta ei tapahtunut soluissa, joita oli käsitelty kummallakin yhdisteellä 10 μ M konsetraatiossa 2 h

asti. Kun Cos 1 soluja oli altistettu 72 h jatkuvasti 50 μM :lle tai enemmälle FLAEP:ä, havaittiin merkittävää sytotoksisuutta, kun määritettiin standardilla MTT sytotoksisuusmäärityksellä (katso alla). Saman pidennetyn 72 h altistusjakson jälkeen FLATP3 aiheutti likimäärin 80 % sytotoksisuuden 12,5 μM :ssa (verrannollinen samalle DMSO-laimentimen konsentraatiolle) ja 70 % sytotoksisuuden 6,25 μM :ssa.

Nämä tulokset osoittivat selvästi, että johtoyhdisteet, joissa on rasva-asyylijohdannaisia, voisivat helpottaa niiden omaa soluihin menemistä. Havaittu sytotoksisuus oli merkityksetön verrattuna ajanjaksoon, joka tarvittiin yhdisteelle mennä soluun, mutta kasvoi merkitsevästi pidennetyssä altistuksessa. Sen mukaisesti kokeet suoritettiin, jotta määritetään, voidaanko samanlaisia yhdisteitä käyttää vie-
mään muita yhdisteitä, kuten DNA:ta, soluihin yhteenliittämällä.

B. Transfektiokokkeet

a) Sytotoksisuus

Sytotoksisuus määritettiin käyttämällä standardia MTT-(3-[4,5, dimetyylitiatsol-2-yyli]2,5-difenyyli-tetrasoliumbromidi, tiatsolisini) määrittystä. Lyhyesti, Cos 1 solut ympättiin 2×10^4 solua/kuoppa 96 kuopan mikrotiitterilevyllä ja annettiin tarttua yön yli 100 μl kasvatusalustassa. Sitten lisättiin testiyhdistettä $2 \times$ konsentraatio 100 μl :ssa kasvatusalustaa kaksoislaimennuksissa levyllä. Soluja inkuboitiin normaaleissa viljelyolosuhteissa 37°C:ssa ja 5 % CO_2 :ssa, 72 h. Lisättiin 20 μl MTT:tä (5 mg/ml PBS:ssä) 2,5 tunniksi 37°C:ssa ja sitten kaikki neste poistettiin. Lisättiin 100 μl hapanta propanolia ja levyä ravisteltiin 10 min ennenkuin OD 570 nm:ssä luettiin, vertailu OD 630 nm.

Suunniteltiin johtoyhdiste, K3ATP3 (tri-lysiini-alaniini-tris-palmitaatti), jota kutsutaan VerafectinA3:ksi, jonka odotettaisiin vetävän DNA:ta puoleensa sen positiivisen kokonaisvarauksen nojalla. Se on liukenematon vesipitoiseen

liuokseen, osittain liukoinen lämpöiseen etanoliin ja liukoinen DMSO:hon. Sytotoksisuus testattiin altistamalla Cos 1 solut jatkuvasti 72 h ajan K3ATP3:lle, joka oli laimennettu 2,5 mg/ml kantaliuoksesta 25 %:een DMSO:hon. 70 % soluista selvisi verrattuna DMSO-laimentimen samaan konsentraatioon 12,5-50 μ M:ssa yhdistettä (kuvio 1a ja b). Kun yhdiste liuotettiin samanlaiseen etanolikonsentraatioon, solujen selviäminen oli hieman suurempi (kuvio 2a ja b).

10 b) DNA:n jakaminen

Koe 1: Jotta testataan johtoyhdisteen K3ATP3 (VerafectinA3) transfektio-ominaisuudet, koko leikkaamaton plasmidi, jossa on CAT:a (kloramfenikoliasetyylitransferaasi) koodaava geeni SV40 myöhäisen promoottorin kontrollin alaisena, pSVLCAT (Cameron, F.H. ja Jennings, P.A. (1989) PNAS 86, 9139-9143) sekoitettiin testiaineen kanssa ja laitettiin Cos 1-soluille erilaisissa olosuhteissa. 48 h kasvatuksen kuluttua eritetyn CAT:n taso määritettiin viljelyalustasta.

20

Menetelmä

Liuos I: 1 μ g plasmidi DNA:ta 500 μ l:ssa Dulbeccos Modified Eagles Medium (DME)

25

Liuos II: 0-20 μ l VerafectinA3 (2,5 mg/ml 25 % DMSO) 500 μ l:ssa DME:tä, sekoita Vortexilla

Yhdistä liuos I ja II, sekoita Vortexilla lyhyesti ja inkuboi huoneenlämmössä 10 min.

30

Lisää seos pestyihin soluihin 60 mm kudosisviljelmäastioissa (ympätty $0,5 \times 10^6$ /astia edellisenä päivänä) 6 tunniksi 37°C, 5 % CO₂.

35

Lisää 2 ml DME + 10 % FCS lopuiksi 48 tunniksi. Määritä CAT-tasot kudosisviljelmäalustassa (Sleigh, M.J. (1986) Anal. Biochem. 156.251-256).

Tulos:

Havaittiin merkittäviä CAT-tasoja niistä näytteistä, jotka oli transfektoitu 5 μ l:lla (12,5 μ g) VerafectinA3:a (2,5 mg/ml=1,8 mM) ja enemmällä. CAT-tason piikki havaittiin 10 μ l:lla (25 μ g) VerafectinA3:a (kuvio 3).

Koe 2:

10 Transfektiotasojen vertaamiseksi Cos 1-soluissa käyttämällä VerafectinA3 kantaliuosta (10 mg/ml), joka oli liuotettu joko 100 % DMSO:hon tai etanoliin, ja solujen VerafectinA3/DNA-kompleksille altistamisajan optimoimiseksi.

15 Menetelmä:

- a. Vertaa VerafectinA3 liuotettu DMSO:hon tai etanoliin.
- b. Vertaa VerafectinA3 soluille 6 h - yön yli.

VerafectinA3 10 mg/ml 100 %:ssa liuotinta laimennettiin 2,5 mg/ml:ksi vedellä.

Transfektio suoritettiin kuten kokeessa 1. Verafectin A3 jätettiin solujen kanssa kosketuksiin vaihteleviksi ajoiksi.

25 Tulokset:

1) Merkittävät CAT-tasot havaittiin kaikista näytteistä, joita oli käsitelty 10 μ l:lla (25 μ g) VerafectinA3:a ja suuremmalla määrällä.

30 ii) Etanolipitoiset näytteet osoittivat vähentyneitä transfektiolaatuja.

iii) Yön yli tapahtunut inkubaatio VerafectinA3:n kanssa vähensi CAT-tasoja likimäärin 50 % verrattuna 6 h inkubaatioon.

Koe 3:

5 Vertaamaan transfektiotasoja, joita saavutettiin CHO-soluis-
sa käyttämällä VerafectinA3:a ja G2:ta, siihen, mikä saavu-
tettiin kaupallisesti saatavilla olevilla reagensseilla
Transfectam (Promega) ja Lipofectamine (BRL).

Menetelmä:

10

Protokolla oli sama VerafectinA3:lle ja Transfectamille
(katso edellä) poikkeuksena, että käytettiin 0,5 µg pSVLCAT
DNA:ta/60 mm astia.

15

Lipofectamine protokolla oli valmistajan ohjeiden mukainen.

0,5 µg pSVLCAT/60 mm astia.

CHO-solut ympättiin 1×10^5 /60 mm astia ja tarttuivat yön yli
DME/Hams alustassa, jossa oli 10 % FCS:ää.

Transfectam 5 tai 10 µl 1 mg/400 µl kantaliuos.

Lipofectamine 5 tai 10 µl 2 mg/ml (sekoitettu formulaatio
3:1 DOPE:n kanssa).

20

VerafectinA3 (K3ATP3) ja VerafectinG2 (K3G[glysiini]TP2)
kumpikin 5, 10 ja 15 µl 2 mM:sta (2,8 ja 2,3 mg/ml vastaa-
vasti) kantaliuoksesta.

25

Inkubaatiojakso, jossa ei ollut seerumia, testattavien ai-
neiden ja DNA:n läsnäollessa oli 6 h, sitten lisättiin 1 ml
DME/Hams + 10 % FCS. 24 h:n kohdalla alusta vaihdettiin 2
ml:aan tuoretta DME/Hams + 10 % FCS, kunnes kerättiin 48 h:n
kohdalla.

30

Tulokset:

35

CHO-solut lyysattiin 48 h transfektiovaiheen aloittamisen
jälkeen ja CAT-aktiivisuus määritettiin. Transfektiopiikki
havaittiin 5 µl:lla transfektioainetta kaikissa tapauksissa.
CAT-tasot, jotka saatiin käyttämällä VerafectinA3:a, olivat
noin 54 % niistä, jotka saatiin Transfectamilla ja 18 %
niistä, jotka saatiin Lipofectaminella.

CAT-tasot, jotka saatiin käyttämällä VerafectinG2:ta, olivat noin 64 % niistä, jotka saatiin Transfectamilla ja 22 % niistä, jotka saatiin Lipofectaminella.

Katso kuvio 4.

5

Koe 4:

Vertaamaan transfektiotasoja, joita saavutettiin Cos 1-soluissa käyttämällä VerafectinA3:a (K3ATP3) ja VerafectinG2:ta (K3GTP2), siihen, mikä saavutettiin kaupallisesti saatavilla olevalla reagenssilla, Lipofectamine (BRL).

Protokolla oli sama Verafectineille kuin edellä kuvattiin. Lipofectamine protokolla oli valmistajan ohjeiden mukainen.

15 Cos 1-solut ympättiin $5 \times 10^5/60$ mm astia ja tarttuivat yön yli DME:ssä, jossa oli 10 % FCS:ää.

Liuos A: 0,5 μ g pSVLCAT/60 mm astia.

Liuos B: Lipofectamine 10 tai 15 μ l 2 mg/ml (sekoitettu formulaatio 3:1 DOPE:n kanssa).

20 OR; VerafectinA3 ja VerafectinG2 20 μ l 2 mM:sta (2,8 ja 2,3 mg/ml vastaavasti) kantaliuoksesta.

OR; VerafectinG2 testattiin myös ekvimoolisella määrällä DOPE:a. VerafectinG2 ja DOPE sekoitettiin DDME:ssä ja sekoitettiin vortexilla 30 sek ennen käyttöä.

25 Liuokset A ja B yhdistettiin ennekuin levitettiin pestyjen solujen päälle.

Inkubaatiojakso, jossa ei ollut seerumia, testattavien aineiden ja DNA:n läsnäollessa oli 6 h, sitten lisättiin 1 ml DME + 10 % FCS. 24 h:n kohdalla alusta vaihdettiin 2 ml:aan tuoretta DME + 10 % FCS, kunnes kerättiin 48 h:n kohdalla.

30

Tulokset:

35 Cos 1-solujen kudosisjelmälustojen näytteistä (supernatanteista) määritettiin CAT-aktiivisuus 48 h transfektiovaiheen aloittamisen jälkeen. VerafectinA3 ja Verafectin G2 transfektoivat Cos 1-soluja tasolle, jotka olivat noin 60 % ja

30 %, vastaavasti siitä, mitä saavutettiin käyttämällä Lipofectamiinia. Ekvimoolisen ei-formuloidun DOPE:n (2 mM DMSO/H₂O:ssa) lisääminen VerafectinG2 näytteeseen johti likimäärin transfektiotehokkuuden kaksinkertaistumiseen verrattuna VerafectinG2:een yksin, saattaen sen 60 % suuruusluokkaan siitä, mitä saavutettiin Lipofectaminella ja yhtä suureksi VerafectinA3:n kanssa. Saadut CAT-tasot nähdään kuviossa 5.

C. Suhteellinen toksisuus

10

Suhteellisia sytotoksistasoja, joita erilaiset aineet aiheuttivat, verrattiin kokeen aikana käyttämällä väriä "alamar-sininen" (Alamar, Sacramento, CA). Keksinnön tyyppisillä yhdisteillä oli yleensä merkittävästi alempi sytotoksisuus kuin muilla aineilla.

15

Esimerkit kuviot 6a ja b.

Sytotoksisuuden suhteellisia tasoja määritettiin myös myöhemmin tulevilla kokeilla käyttämällä väriä MTS, jota markkinoidaan Cell titre 96 Aqueous:na (Promega).

20

D. Johto "transfektio"-yhdisteiden muunnosten suhteelliset tehokkuudet

25

Solulinjat Cos 1 tai CHO transfektoitiin 0,5 µg:lla pSVLCAT- tai 2 µg:lla pPGKlacZ-plasmidia käyttämällä jokaisen transfektioyhdisteen konsentraatioiden arvoaluetta. Yhdisteen optimaalinen konsentraatio, se on konsentraatio joka antaa korkeimman CAT-tason 48 h:ssa tai korkeimman lacZ % (β-galaktosidaasi), joka värjää solut 24 h:ssa, käytettiin vertaamaan tietoja taulukkoa 1 varten. Koska kaikkia yhdisteitä ei testattu yksittäisessä kokeessa, ei käytetty ehdottomia lukuja osoittamaan transfektiota. Mieluummin, symboleja on käytetty osoittamaan transfektiotehokkuutta, joka on suhteellinen Lipofectaminelle (BRL), joka oli mukana kontrollina kaikissa kokeissa. Taulukko 1 täten osoittaa suhteel-

30

35

liset tehokkuudet joukolle yhdisteitä välitettäessä ainakin yhden solutyypin transfektiota.

Taulukko 1

5

Testiyhdisteillä aikaansaadun transfektion suhteelliset tehokkuudet arvioituina reportterigeenin ekspressiona

10

15

20

25

30

Yhdiste	Solutyyppi	Transfektio (CAT)	Transfektio (β Gal)
Lipofectamine	Cos 1	+++++	8-10 % soluista
	CHO	+++++	8-10 % soluista
Transfectam	Cos 1	++++	ei havaittu
	CHO	++++	ei havaittu
Lipofectin	Cos 1	+++(+)	ei havaittu
K3	Cos 1	-	ei havaittu
K3ATP0	Cos 1	-	ei havaittu
K3ATP1	Cos 1	+	ei havaittu
	CHO	+	ei havaittu
K3ATP2	Cos 1	+/-	ei havaittu
	CHO	+/-	ei havaittu
K3ATP3	Cos 1	+++(+)	ei havaittu
	CHO	+++	ei havaittu
K3GTP0	Cos 1	-	ei havaittu
K3GTP1	Cos 1	+	ei havaittu
	CHO	+	ei havaittu
K3GTP2	Cos 1	++	ei havaittu
	CHO	+++	< 1 %
K3GTP3	Cos 1	+/-	ei havaittu
	CHO	+	ei havaittu
K4ATP2	Cos 1	+	ei havaittu
K4ATP3	Cos 1	+(+)	< 1 %

Kokeet suoritettiin, kuten osan B kokeessa 1, kokeessa 3 kuvatuin muunnoksien. Esitetyt tulokset johdettiin transfektio-
 aineen optimoiduista tasoista. Kaikki esitetyt tulokset ovat
 kirjoittajan tuottamat; mukaan ei ole otettu yhtiön kirjallisuutta, joka seuraa kaupallisia aineita. Alla on kuvattu
 5 muita syntetisoituja ja testattuja muunnosyhdisteitä.

Johtopäätös

10 Edellä taulukossa esitetyt tulokset osoittavat, että kaikki testatut yhdisteet, joissa oli K1-4-, A- tai G-linkkeri ja palmitaatti 1-3, olivat kykeneviä jonkin tason transfektioon testatuissa solutyypeissä. Yhdisteet, joista puuttui joko
 lyysiini tai palmitaatti, eivät kyenneet tukemaan transfektiota osoittaen sekä DNA:ta vetävän osan (K) että otaksutavan solun läpäisevän osan (palmitaatti) tarpeen. Erilaisilla linkkereillä oli vaikutusta transfektion tasoon, mutta molemmat kykenivät tukemaan transfektiota.

Muunnokset johtoyhdisteessä muuttavat transfektiotehokkuutta

Sivulla 3 kuvatussa yleiskaavan yhdisteiden osoitettiin koostuvan kuvatuista perusrakenneosista: "x, y, R1-R4". Näitä komponentteja vaihdeltiin systemaattisesti, jotta arvioidaan
 25 optimaaliset rakennusosat standardien solulinjojen transfektioille standardissa määrittelyssysteemeissä. Tulokset esitetään esimerkkikokeiden käytöllä ja on osoitettu reportterigeenin ekspression tasoina, jotka on saavutettu standardi olosuhteissa joko kokonaistasoilla (CAT- tai β -galaktosidaasi-ekspressio) tai % soluja transfektoitu (β -galaktosidaasi - siniset solut). Vastaavat sytotoksisuustasot kuvataan myös.

"x"-peptidi

35 Edellä kuvatussa johtoyhdisteessä "VerafectinA3" on 3 lysiinijäännöstä (K3) antaen molekyyleille 4⁺ varauksen. Muunnoksilla, joissa oli K0-K5, testattiin olevan 0⁺-6⁺, vastaavasti.

Päämäärä: Arvioida optimaalinen K-jäännösten lukumäärä tehokasta transfektiota varten.

Menetelmä: Erillisissä kokeissa suoritettiin vertailut seuraavien välillä:

- 5 a. K0ATP3, K3ATP3, K5ATP3 ja
K2ATP2, K5ATP2 (CHO-solut)
- b. K1ATP2, K2ATP2 (Cos 1 solut)
- c. K3ATP3, K4ATP3, K5ATP3 (CHO-solut)

- 10 Kaikki testin liposomireagenssit liuotettiin alunperin 10 mM:ssa 75 %:een DMSO:hon ja sen jälkeen laimennettiin vedellä tekemään 2 mM kantaliuos, joka varastoitiin 4°C:ssa. Tilavuuksia, vaihdellen 2 μ l - 15 μ l, laimennettiin 2 mM kantaliuoslipopeptidistä 500 μ l:aan DDME:tä. 1 μ g plasmidia pSVL-
- 15 CAT laimennettiin erikseen 500 μ l:aan DDME:tä. Liuokset yhdistettiin 10-20 minuutiksi huoneenlämmössä ennenkuin lisättiin 500 μ l:aan DDME:tä 60 mm astioissa, joissa oli subkonfluentteja CHO-soluja (2×10^5 päivä -1) tai Cos 1-soluja (5×10^5 päivä -1), pestiin DDME:llä seerumin poistamiseksi.

- 20 Soluja inkuboitiin 6 h standardiolosuhteissa 37°C:ssa ja 5 % CO₂:ssa 6 h. Lisättiin 1,5 ml DME/Hams + 10 % FCS (CHO) tai DME + 10 % FCS (Cos 1) soluille yön yli tapahtuvaa inkubaatiota varten. Käytettiin tuoretta DME/Hams + 10 % FCS tai
- 25 DME + 10 % FCS korvaamaan alusta vielä 24 tunniksi ennen keräämistä. Valmistettiin solulysaatit ja CAT-aktiivisuus määritettiin kuten edellä on kuvattu. Cos 1-solujen viljelysupernatantista määritettiin CAT-aktiivisuus.

30 Tulokset:

- a: Tripalmitaattiyhdisteissä K3ATP3 johti hyvään transfekti-
oon (6237 cpm keskiarvo 25 μ l lysaatista 20 min määritysajan
jälkeen 37°C:ssa, 1 μ l C¹⁴ asetyyli-CoA (yhteensä saatavilla
35 olevia lukemia 40-50 000 cpm)). K5-yhdiste antoi merkitse-
västi vähentyneet lukemat sen optimaalisella tasolla (kes-
kiarvo 1785 cpm). K0-yhdiste ei antanut mitattavaa transfek-
tiota tässä määrittelyssysteemissä, havaittiin kuitenkin alhai-

sia transfektiotasoja käyttämällä β -gal-määrityssysteemiä (kuvattu alla) CHO-soluissa.

Dipalmitaattiyhdisteillä K2:n läsnäolo oli merkitsevästi

5 parempi transfektiolle antaen keskiarvon 5418 cpm verrattuna K5-yhdisteen keskiarvoon 132 cpm. Transfektioitujen astioiden solujen elinkyky on osoitettu graafisessa kaaviossa 7b. Toksisuus on korkein (OD alhaisin) astioissa, joissa on transfektion korkeimmat tasot.

10

Katso kuviot 7 a ja b.

b: Yksittäisen K:n mukaanottaminen teki mahdolliseksi merkittävän transfektion tapahtua, 12670 cpm:n keskiarvolla (25

15 μ l lysaatista 135 min inkubaatio 37°C:ssa, 2 μ l C^{14} asetyyli-CoA (yhteensä saatavilla olevia lukemia 90-100 000 cpm)). Toisen lysiini-jäännöksen läsnäolo johti melkein 5 kertaisiin transfektiotasoihin (keskiarvo 62 215 cpm), optimaalitulosten ollessa yhdisteen samalla tasolla.

20 Kuvio 8

c: Sekä K4ATP3- että K5ATP3-yhdisteet johtivat merkitsevästi vähentyneeseen transfektioon suhteessa vastaavaan K3:een antaen keskiarvotason CAT-aktiivisuudelle mitattuna 1071, 25 6363 ja 13 467 cpm:ssä vastaavasti, kun oli inkuboitu 2 h 20 μ l lysaattia.

Kuvio 9

Johtopäätös

30

Esitetyistä tiedoista voidaan piirtää optimaalisen aktiivisuuden järjestys 0-5 lysiinien liittämisestä $K_{n=1-5}$ ATP2/3:-hen seuraavasti:
K3 $\geq$ K2 $>$ K5 $>$ K4 $>$ K1.

35

Tyypillinen solun elinkyvyn graafinen piirros on esitetty koetta b varten (katso kuvio7b). Tämä osoittaa käänteisen

suhteen solun elinkyvyn ja transfektion välillä. Tämä on yleinen havainto.

"y"-linkkeri

5

Edellä kuvatussa johtoyhdisteessä oli 3 lyysiinjäännöstä (K3) ja alaniini- (A) linkkeri "y"-asemassa. Muunnoksia, joissa oli alaniini (A), leusiini (L), fenyylialaniini (F), lyysiini (K) tai glysiini (G), testattiin.

10

Päämäärä: Arvioida optimaalinen linkkerijäännös tehokasta transfektiota varten.

Menetelmä: Erillisissä kokeissa suoritettiin vertailut seuraavien välillä:

15

a. K2 K/F/L TP2 (Cos 1)

b. K2 A/L TP2 (Cos 1)

c. K3 A/L/G TL3 (Cos 1)

pSVLCAT:n transfektiota ja sitä seuraavaa CAT-entsyymin määritystä varten suoritettiin kokeet "a" ja "b" kuten edellä kuvattiin.

20

Koetta "c" varten transfektoitiin plasmidi pPGKlacZNLS, joka koodaa β -galaktosidaasia hiiren PGK-promoottorin kontrollin alaisena (ystävällinen lahja G. Hannan:lta) tai pSVLGAL, joka käyttää SV40 aikaista promoottoria (Sleigh, M.J. ja Lockett, T.J. (1985). EMBO J. 4: 3831-3837). Tämä koe ja määrittäminen oli modifioitu Felgner:ltä et al., J. Biol. Chem. 269 (4), 2550-2561, 1994. Tämä protokolla sallii DNA:n ja testiaineen 72 erilaisen kombinaation ja konsentraation samanaikaisen arvioinnin mikrotiitteritarjottimella. Kuoppa, joka osoitti maksimaalisen geenituotteen tason, valittiin optimaaliseksi tulokseksi jokaiselle reagenssille.

30

Sytotoksisuus arvioitiin käyttämällä alamarsinistä ja näytteen graafinen kaavio on esitetty koetta a varten.

35

Tulokset

a: Verrattaessa linkkereitä K, F ja L dilysiinissä, dipalmi-
 5 taattiyhdiste, L antoi marginaalisesti erinomaiset tulokset
 F:lle, mutta oli olennaisesti tehokkaampi kuin K-yhdiste.
 Katso kuvio 10a. L- ja F-yhdisteiden toksisuus oli jonkin
 verran korkeampi kuin K-yhdisteelle osoittaen, että korkeim-
 10 pia CAT-tasoja ei nähty yksinkertaisesti solun korkeampien
 selviämistasojen takia.
 Kuvio 10b.

b: Vertailtaessa A-linkkeriä, jota käytettiin peptidin ver-
 tailukokeissa, ja L-linkkeriä, jonka oli osoitettu antavan
 15 korkeampia geeniekspression tasoja kokeessa "a", kahden yh-
 disteen aktiivisuuksien osoitettiin olevan hyvin samalaiset.
 Kuvio 11.

c: Kaksi johtavaa linkkeriä A ja L testattiin trilysiini-
 20 taustassa, trilauraatti (L3), G-linkkeriä vastaan. Tässä
 tapauksessa A-linkkeriyhdiste oli parempi transfektion saa-
 vuttamisessa, muiden yhdisteiden osoittaessa suhteellisia
 transfektiotasoja: L 57 %, G 12 % ja Lipofectamine 39 %.
 Kuvio 12.

Johtopäätös

Esitettyjen tietojen vertailusta voidaan laatia erilaisten
 linkkereiden tehokkuusjärjestys:
 30 $A \geq L > F > K > G$.

"R1-R4" rasva-asyylijohdannaiset

1. Asyylijohdannaisten lukumäärä tris-linkkerissä, 1-3

35 Tris-linkkeri helpottaa yhden, kahden tai kolmen rasva-a-
 syylijohdannaisen lisäämisen peptidiin ja linkkeriin. Ylei-
 sesti kaikki nämä johdannaiset olisivat identtisiä toistensa
 kanssa. Yhdisteitä, joissa kaikissa on identtiset rakenne-

osat, mutta 1, 2 tai 3 rasva-asyylijohtannaista, on verrattu käyttämällä edellä kuvattuja standardeja transfektio- ja määritysmenetelmiä.

- 5 Päämäärä: Verrata peptidirasva-asyylijohtannaisyhdisteiden, joissa on 1, 2 tai 3 rasva-asyylijohtannaista, kykyä transfektoida nisäkässoluja.

Menetelmä

10

Yhdisteistä testattiin niiden kyky transfektoida joko CAT- tai β -gal-geeni, joka on plasmidilla, ja määritettiin kuten edellä on kuvattu.

15 Kokeet:

- | | | | |
|----|--------|------------------------------------|---|
| a. | K2 A T | P1/P2/P3 (palmitaatti, 1, 2 tai 3) | (Cos 1) |
| b. | K2 F T | P1/P2/P3 | (Cos 1) |
| c. | K2 L T | P1/P2/P3 | (Cos 1) |
| d. | K2 K T | P2/P3 | (Cos 1) |
| 20 | e. | K3 A T | P2/P3 (CHO) |
| | f. | K3 A T | P1/P3 (Cos 1) |
| | | K3 A T | M1/M2/M3 (myristaatti 1, 2 tai 3) (Cos 1) |
| | | K3 A T | L1/L2/L3 (lauraatti 1, 2 tai 3) (Cos 1) |
| | g. | K4 A T | P1/P2/P3 (Cos 1) |

25

Tulokset

30

a: Kokeessa "a" testattujen yhdisteiden vertailu osoitti, että di- ja tripalmitaattimolekyylit molemmat antoivat korkeat transfektiotasot, kun taas monopalmitaattimolekyyli on hyvin tehoton.

Kuvio 13a.

35

Muissa kokeissa K3 monopalmitaattiyhdiste on osoittanut aktiivisuutta 30 %:ssa tripalmitaatti K3 molekyyliä (ei esitetty).

Yhdisteiden suhteellinen sytotoksisuus on esitetty mukana olevassa graafisessa kaaviossa.

Kuvio 13b.

b: Mono-, di- ja tripalmitaattiyhdisteiden suhteelliset transfektiokyvyt fenyylialaniinilinkkerin kanssa olivat samanlaiset kuin alaniinilinkkerille (a).

Kuviot 14a ja b.

5

c: Mono-, di- ja tripalmitaattiyhdisteiden suhteelliset transfektiokyvyt leusiinilinkkerin kanssa olivat samanlaiset kuin alaniinilinkkerille (a).

Kuviot 15a ja b.

10

d: Lysiinilinkkerin tapauksessa dipalmitaatin on osoitettu olevan merkitsevästi vähemmän aktiivinen kuin tripalmitaattimolekyylin. Tripalmitaatin lisääntynyt transfektioaktiivisuus seuraa sytotoksisuuden lisääntymistä, kuten edellä olevissa tapauksissa on nähty.

15

Kuviot 16a ja b.

e: Tässä vertailussa tripalmitaattimolekyyli on dramaattisesti tehokkaampi (keskiarvo 8325 cpm) kuin dipalmitaatti (keskiarvo 984 cpm). Sytotoksisuuden tasot ovat jonkin verran suuremmat lisääntyneellä transfektiolla.

Kuviot 17 a ja b.

20

f: Tässä vertailussa, jossa vertaillaan yhdisteiden, joissa on eri määrät rasva-asyyliryhmiä (n=1-3), transfektiotehokkuutta taustassa 3 eri pituista rasva-asyylijohtonanaista (palmitaatti, myristaatti ja lauraatti), yhdisteiden joissa on 3 rasva-asyyliryhmää, osoitettiin yhdenmukaisesti olevan tehokkaampia transfektiossa kuin ne, joissa oli 2 ryhmää tai 1 ryhmä. 3 rasva-asyyliryhmän läsnäollessa toksisuus oli yleisesti hieman korkeampi, mutta aina vähemmän kuin lipofektaminen kanssa. Katso taulukko 2.

25

30

Taulukko 2

Testiaine	Suhde [lipidi]/ [DNA]	yksikköä β - gal	MTS OD ₄₉₀₋₆₅₅
K3ATP1	(5,55)	$9,32 \times 10^{-6}$	1,34
K3ATP3	(0,69)	$2,73 \times 10^{-4}$	1,244
K3ATM1*	(0,69)	$5,85 \times 10^{-6}$	ei havaittu
K3ATM2	(0,35)	$3,46 \times 10^{-5}$	1,56
K3ATM3	(1,39)	$2,86 \times 10^{-4}$	1,22
K3ATL1*	(0,35)	$1,09 \times 10^{-5}$	ei havaittu
K3ATL2	(0,69)	$1,06 \times 10^{-5}$	1,554
K3ATL3	(1,39)	$4,95 \times 10^{-4}$	1,363
Lfe	(1,39)	$4,65 \times 10^{-4}$	0,924
Ei mitään		$-5,62 \times 10^{-6}$	1,482

Jokainen tulos esittää korkeinta lukemaa 72 erilaisen olosuhteen mikrottiitterilevyiltä. Suhde [lipidi]/[DNA], missä maksimi saavutettiin, on esitetty. Esitetyt kokeet suoritettiin Cos 1-soluissa, kuten edellä on kuvattu. MTS OD on solujen, jotka on altistettu erilaisille aineille, suhteellisen elinkyvyn mitta, korkeampi arvo tarkoittaa suurempaa solun elinkykkyä. *Nämä pisteet otettiin erillisestä kokeesta ja jonkin verran vähäistä variaatiota absoluuttisten määrien välillä olisi odotettava kokeiden välillä. Elinkyky mitattiin alamarisinisellä värillä tässä kokeessa eikä täten ole suoraan verrattavissa.

g. K4 yhdisteet

Vertailu tehtiin 1-3 palmitaattien välillä tetra-lysiinialaniinin ollessa taustalla (K4ATP1/2/3). Kuten edellisissä kokeissa nähtiin, tripalmitaatti oli tehokkaampi kuin di- tai monopalmitaatti. Aktiivisuus oli mitattavissa, kun käytettiin mitä tahansa yhdisteistä. Sytotoksisuus oli alhai-

nen, vaikka näitä reagenssejä tarvittiinkin korkeita tasoja optimaaliseen transfektioon.

Kuviot 18a ja b.

5 Johtopäätös

Tulokset kokeista "K3"-yhdisteillä ovat samanlaiset kuin nähtiin "K4"-yhdisteillä . Se tarkoittaa, että kolme rasva-asyyliryhmää ovat paremmat kuin 2 tai 1 ryhmä niiden kyvyssä transfektoida solut.

Johtopäätös osa R1-R4

Kuten edellä olevissa esimerkeissä esitettiin, yhdisteet joissa on 3 rasva-asyylijohdannaista, osoittivat yleisesti suurempaa kykyä transfektoida soluja kuin ne, joissa oli 1 tai 2 rasva-asyylijohdannaista. Transfektion optimaalisissa pisteissä ovat yhdisteet yleisesti vähemmän toksisia soluille kuin kaupallinen aine "Lipofectamine". Vaikka suurin osa tiedoista, joita tässä osassa on esitetty, on kokeista, jotka suoritettiin Cos 1-soluille, näitä tuloksia heijastettiin tuloksiin, jotka saatiin CHO-soluilla. Optimaaliset konsentraatiot erilaisille yhdisteille vaihtelivat solulinjojen välillä, kuten tekivät geenituotteen absoluuttiset tasot, kuitenkin optimaalinen suhde [lipidi]/[DNA] oli yleisesti solusta riippumaton ja yhdisteiden suhteelliset asemat transfektoitavuudessa jäivät samanlaisiksi.

Esitettyjen tietojen vertailu sallii ei-formuloitujen, ei-sekoitettujen yhdisteiden rasva-asyyliryhmien erilaisten määrien (n=1-3) tehokkuuden järjestyksen hahmottelun:
 $3 > 2 > 1$.

"R1-R4" rasva-asyylijohdannaiset

35 2. Hiiliketjun pituus

Päämäärä: Määritetään, oliko eri pituisilla, C16:een asti (palmitaatti), rasva-asyylijohdannaisilla suurempi kyky

transfektoida nisäkässoluja.

Menetelmä: Luotiin vaihtoehtoisia trilysiinialaniini-tris-
(K3AT) yhdisteitä, joissa oli 1-3 identtistä, vaihtelevan
5 pituista rasva-asyylijohtannaista, seuraavasti:

C16 palmitaatti (P)

C14 myristaatti (M)

C12 lauraatti (L)

C10 kaproaatti (C)

10

Jokaisesta näistä yhdisteistä testattiin transfektiokyky ja
sytotoksisuus standardisolulinjoihin käyttämällä edellä ku-
vattuja standardiolosuhteita.

15 Tulokset

a. Vertailut P-, M-, L- ja C-johdannaisien välillä Cos 1- ja
CHO-soluissa.

Tämä taulukko esittää, että yhdisteet, joissa on lauraatti
20 ja myristaatti, kykenevät yleisesti transfektoimaan solut
tehokkaammin kuin alunperin käytetyt palmitaatti-johdannai-
set. Kaproaatti oli vähiten aktiivinen johdannainen näissä
yhdisteissä.

25 Taulukko 3

Aine	β -gal (Cos 1)	Elinkyky (Cos 1)	β -gal (CHO)	Elinkyky (CHO)
K3ATL1 (.35) (2,77)	$1,09 \times 10^{-5}$	0,104	$2,99 \times 10^{-6}$	0,072
K3ATM1 (.69) (.69)	$5,85 \times 10^{-6}$	0,102	$5,18 \times 10^{-6}$	0,07
K3ATP1 (5,55)	$9,32 \times 10^{-6}$	1,34*		
K3ATL2 (.69)	$1,06 \times 10^{-5}$	1,55*		
K3ATM2 (.35)	$3,46 \times 10^{-5}$	1,56*		

30

35

5	K3ATC3 (2,77)	$9,08 \times 10^{-6}$	0,104	$5,27 \times 10^{-6}$	0,052
	K3ATL3 (.69) (.69)	$3,02 \times 10^{-4}$	0,095	$7,89 \times 10^{-4}$	0,027
	K3ATP3 (1,39)	$3,52 \times 10^{-5}$	0,077		
	#K3ATL3 (1,39)	$4,95 \times 10^{-4}$	1,36*		
10	#K3ATM3 (1,39)	$2,86 \times 10^{-4}$	1,22*		
	#K3ATP3 (.69)	$2,73 \times 10^{-4}$	1,24*		
15	Lfe (1,39)	$1,71 \times 10^{-4}$	0,082		
	Ei yhtään	$3,10 \times 10^{-6}$	0,11	$3,97 \times 10^{-6}$	0,059
	Lfe(1,39)	4.65×10^{-4}	0,924*		

Selitys:

20

Jokainen tulos esittää korkeinta lukemaa 72 erilaisen olo-suhteen mikrotiitterilevyiltä. Suhde [lipidi]/[DNA], millä maksimi saavutettiin, on esitetty suluissa kahdelle erilaiselle solutyypille seuraavassa järjestyksessä; (Cos 1) (CHO). Esitetyt kokeet suoritettiin Cos 1-soluissa, kuten edellä on kuvattu. Elinkyky mitattiin alamarsinisellä värillä. # tarkoittaa, että yhdisteet testattiin erillisessä kokeessa.

30

*Elinkyky tässä koeessa määritettiin MTS:llä. OD on solujen, jotka on altistettu erilaisille aineille, suhteellisen elinkyvyn mitta, ja kuten alamarsinisellä, korkeampi arvo tarkoittaa suurempaa solun elinkykyä.

35

b. R1-R4 C10-C16:na testattu Hela-soluihin

Päämäärä: Määrittää, oliko tehokkain rasva-asyyliryhmä, joka testattiin Cos 1- ja CHO-soluihin, myös tehokkain Hela-soluissa.

Menetelmä: Hela-solut ympättiin Cos 1- ja/tai CHO-solujen tilalle DME + 10 % FCS:ssä 2×10^4 /kuoppa tiheydellä ja transfektoitiin pPGKlacZNLS:llä, kuten edellä on kuvattu.

- 5 48 h kohdalla määritettiin toksisuus alamarsinisellä ja solut työstettiin β -gal-määrittystä varten.

Tulokset:

- 10 β -gal-määrittelyn tulokset osoittivat, että kuten Cos 1- ja CHO-soluissa, kun hiiliketjun pituus väheni C16:sta C12:een, transfektiokyky lisääntyi. Kun C10-molekyyliä käytettiin, transfektiokyky oli todella vähentynyt osoittaen transfektiotehokkuuden piikkiä C12:ssa tässä sarjassa. Odottamatta
15 solun elinkyvyn piikkitaso tapahtui myös C12-yhdisteellä (K3ATL3).
Kuviot 19a ja b.

Johtopäätös

- 20 Rasva-asyylijohdannaisten pituuden muutoksella on dramaattinen vaikutus yhdisteiden kykyyn transfektoida useita solutyppejä. Transfektion aste ylläpidetään kaikissa solutyypeissä, missä ne testattiin. Sekä myristaatti että lauraatti
25 antoivat tässä asemassa suuremmat transfektiotasot kuin palmitaatin prototyyppi, lauraatin ollessa parempi kuin kaikki testatut.

"y"-linkkeri - ei-standardit aminihapot

- 30 Aminohappojen sarjaa on käytetty linkkeriryhmänä. Näihin kuuluvat leusiini, glysiini, alaniini, fenyyialaniini, α -BOC-(ϵ -vapaa)-lysiini, kuten edellä on osoitettu. Lisäksi ei-standardreja aminihappoja, kuten aminobutyryi-, aminokaproiini- ja aminokapryylihapot (mitkä antavat linkkeripituudelle 3, 5 ja 7 hiili-hiili yksinkertaisen sidoksen jatkeen, vastaavasti), on myös testattu.
35

Koe 1

Päämäärä: Määrittää yhdisteiden, joilla on suurempi pituus Tris:n ja varatun "x"-peptidin välissä, transfektio-ominaisuuksia, käyttämällä ei-standardeja aminohappolinkkereitä, joissa on vaihtelevat pituudet asemassa "y".

Menetelmä: Syntetisoitiin peptidi/rasva-asyylikonjugaatit käyttämällä ei-standardeja aminohappoja, aminobutyry- (C3), aminokaproiini- (C5) ja aminokapryylihappoja (C7) linkkeriryhminä, tri-lysiini nukleiinihapon sitomisdomeenia ja lauraattia kolmelle rasva-asyyliryhmälle. Näissä uusissa konjugaateissa DNA:n sitomis- ja tris/rasva-asyyliosat erotettiin ylimääräisellä 3, 5 ja 7 hiilisidospituudella, vastaavasti verrattuna prototyyppin molekyyliin. Sitten nämä yhdisteet testattiin standardilla tavalla, kuten edellä on kuvattu, määrittämään niiden suhteellinen kyky transfektoida solut.

Tulokset: K3 "y" TL3 yhdisteiden, missä y= C3, C5, C7, A, L, G, transfektiotehokkuutta verrattiin toisiinsa ja kaupalliseen aineeseen Lipofectamineen käyttämällä standardia β -gal-reportterigeenisysteemiä, joka on kuvattu edellä. Kaikkien muiden yhdisteiden paitsi K3GTL3 havaittiin olevan tehokkaampia transfektoimaan kuin Lipofectaminen. C3-, C5- ja erityisesti C7-yhdisteiden osoitettiin olevan dramaattisesti tehokkaampia kuin yhdisteet, joissa käytetään standardia yksittäistä aminohappolinkkeriä.

Kuvio 20a.

Aineiden sytotoksisuus esitetään mukana olevassa graafisessa kaaviossa. Kaavia 20b.

Huomaa että lisääntyneet transfektion tasot eivät ole samanaikaisia sytotoksisuuden lisääntymisen kanssa.

Koe 2

Osa soluista transfektoitiin

Päämäärä: Määritetään heijastuuko C3-C7-yhdisteiden osoittama transfektion lisääntyminen lisääntyneeseen transfektoitujen solujen osuuteen.

Menetelmä: Näitä konjugantteja käytettiin transfektoimaan

- 5 CHO- ja Cos 1-solut pPGKlacZNLs:llä transfektoitujen solujen osuuden arvioimiseksi. Käytetyt transfektio-olosuhteet olivat, kuten on kuvattu edellä CAT-kokeille, joissa soluja kasvatetaan 35 mm astioissa. Solut ympätettiin päivä ennen transfektiota $3,4 \times 10^5$ /astia (Cos 1) tai $6,8 \times 10^4$ /astia (CHO)
- 10 tiheydellä. Sen jälkeen kun oli tehty elinkykyanalyysi 24 h transfektion jälkeen, solut pestiin 2 x PBS:llä, sitten kiinnitettiin 5 min 4°C:ssa 0,2 % glutaraldehydissä 0,1 M:ssa fosfaattipuskurissa, pH 7,3. Solut pestiin 2 x kylmällä PBS:llä. Lisättiin jokaiseen astiaan tuoretta värjäysliuosta (10
- 15 ml 0,1 M fosfaattipuskuria, pH 7,3; 1,0 ml 1:1 seos 105 mg kaliumferrosyanidia 2,5 ml:ssa H₂O:ta ja 82 mg kaliumferri-
- syanidia 2,5 ml:ssa H₂O:ta; 0,2 ml 2 % X-gal:a dimetyyliformamidissa, 11,2 µl 1 M:sta MgSO₄:a) (2 ml) ja astioita inkuboitettiin 37°C:ssa, kunnes väri kehittyi. Tutkittiin sattuman-
- 20 varaisia solukenttiä valomikroskoopilla ja määritettiin sinisten (β-gal ekspressoivia) solujen osuus.

Tulos: Lisääntynyt transfektio, mikä havaittiin testiaineilla, heijastui lisääntyneeseen transfektoitujen solujen osuuteen, kuten osoitettiin siniseksi värjäytyneiden solujen lukumäärällä.

Kuvio 21a esittää tulokset, jotka saatiin CHO-soluilla, kun taas 21b esittää tulokset Cos 1-soluilla. Näiden panelien X-akselilla Lfe tarkoittaa lipofectaminea; vf peptidi/rasva-asyylikonjugaatin K3ATP3 prototyyppiä; A, K3ATL3, kun taas C3, C5, C7 edustavat aminobutyry-, aminokaproiini- ja aminokapryylihappoon liittyneitä konjugaatteja, vastaavasti.

Kuvio 21 a ja b.

35 Johtopäätös

Peptidi/rasva-asyylikonjugaattien linkkeriosuuden pituuden lisääminen parantaa dramaattisesti niiden transfektio-omi-

naisuuksia, sekä reportterigeeniekspression kokonaistasoilla että myös transfektoitujen solujen osuudessa. On erityisesti huomattava, että transfektion piikkitasot saavutetaan käyttämällä näitä reagenssejä suhteellisen alhaisella toksisuustasolla. Nämä aineet eivät seuraa aikaisempia havaintoja, että transfektion kohonneet tasot liittyvät suoraan sytotoksisuuden kohonneisiin tasoihin.

Tämä konjugaattien parantunut kapasiteetti edistää pidemmällä linkkereillä transfektiota näyttää olevan riippumaton solutyypistä.

Kuvioissa 22 a ja b esitetyt tiedot osoittavat, että aminokapryylihappoon liittynyt konjugaatti, K3C7TL3, on myös tehokkaampi transfektioreagenssi kuin lipofectamine ihmisen eturauhassyövän epiteelisolulinjassa PC3 (kuvio 22a) ja Jurkat T-solulinjassa (kuvio 22b)

Kuviot 22 a ja b.

20 Testatut solutyypit

Kuten edellä on kuvattu, kuvatus geneerisen kaavan konjugaatteja on käytetty onnistuneesti transfektoimaan useita solutyyppejä. Alla on annettu täydellisempi luettelo:

25

Transfektoidut solut

30

Solulinja	Solun kuvaus	Transfektoidut plasmidit
Cos 1	Afrikan vihreän apinan fibroblastoja	pSVLCAT pGKlacZ-NLS pSVGAL
CHO	Kiinan hamsterin munasarjasolut	pSVLCAT pGKlacZ-NLS pSVGAL
Hela	Ihmisen karsinoomasolut	pGKlacZ-NLS
PC3	Eturauhassyövän epiteelisolut	pGKlacZ-NLS pSVGAL

Jurkat	Ihmisen T-lymfosyytit	pGKlaczNLS pSVGAL
CSL503	Lampaan epiteelisolut	pGKlaczNLS pSVGAL

5 Oligonukleotiditransfektio

Päämäärä: Määrittää, ovatko yhdisteet, jotka ovat osoittaneet kyvyn transfektoida reportterigeenit kokonaisissa plasmideissa soluihin, ovat myös tehokkaita oligonukleotidien transfektiossa.

Menetelmä: 18-meeri 5'-fluoresoitu fosforitioaattioligonukleotidi transfektoitiin CHO-soluihin. Verrattiin K3C7ATL3:n, K3ATL3:n ja ei-ainetta välistä kykyä transfektoida oligonukleotidi soluihin. Oligonukleotidit laimennettiin sarjassa 121,2 μM :sta nukleotidistä 60,6 ja 30,3 μM :ksi nukleotidiksi. Testilipopeptidit laimennettiin sarjassa 84 μM :sta 42 ja 21 μM :ksi. Nämä laimennukset yhdistettiin 3 x 3 matriisiin, mikä johti konsentraatioihin, jotka olivat puolet kuvatuista. Se tarkoittaa, oligonukleotidin päällimmäiseksi laimennukseksi tuli 60,6 μM nukleotidi (3,37 μM 18-meeri oligonukleotidi) ja lipopeptidi 42 μM :ksi. Seoksen annettiin inkuboitua 10 min huoneenlämmössä ja sitten peitettiin CHO-solut (ympätty 1 x 10⁴/kuoppa edellisenä päivänä), pestiin vapaaksi seerumista DDME:llä, 100 μl :n kokonaistilavuudessa. Kuopissa, jotka saivat seoksen, jossa ei ollut testiainetta, oli kolme erilaista oligonukleotidikonsentraatiota päällystettyinä samoissa olosuhteissa.

3 h inkubaation jälkeen standardiolosuhteissa 37°C:ssa ja 5 % CO₂:ssa, seos poistettiin ja korvattiin 50 μl :lla DDME:tä. Solut katsottiin eläviksi samapolttopisteisellä mikroskoopilla. Fluoresenssin taso oli niin korkea, että valoaukko LASER:a varten BioRad MCR 500 samapolttopisteisessä mikroskoopissa suljettiin minimiin. Sitten kerättiin kaikki kuvat samoilla asetuksilla kvantitatiivista vertailua varten.

Samapolttopisteanalyysin jälkeen lisättiin 100 μ l EMEM + 10 % FCS:ää takaisin kuoppiin ja soluja inkuboitiin samoissa standardi olosuhteissa yön yli. Soluista tutkittiin uudelleen fluoresenssi.

5

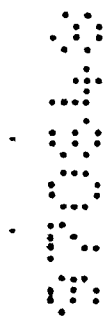
Tulokset

Taulukossa 4 on esitetty transfektion tulokset 3 h transfektion jälkeisessä pisteessä:

10

.

.



Taulukko 4

[illegible]

Johtopäätös

Kummankin transfektioaineen käyttö johti 100 % selvinneisiin soluihin, jotka ottivat suuret tasot oligonukleotidejä. 3 h
 5 ajan pisteessä, joka on kuvattu kokeessa, solun tumat olivat voimakkaasti värjäytyneet fluorensenoidulla oligonukleotidillä.

Tulokset, jotka oli merkitty tähdellä "*", eivät olleet niin
 10 voimakkaasti fluoresoivia kuin ei-merkityt, poikkeuksena ei-ainetta koe. Ei-aineen kanssa fluorensenssitaset olivat rajoittuneet yksittäiseen täplään, jolla oli vaihteleva voimakkuus jokaisessa fluoresoivassa solussa, kokeessa käytetyllä havaintotasolla.

15

On todennäköistä, että suurempi osuus soluista kuin taulukossa 4 on eritelty, otti sisään oligonukleotidiä transfektioaineen puuttuessa, mutta sisäänoton määrä oli riittämätön rekisteröitäväksi käytetyllä havaintotasolla. Sen jälkeen,
 20 kun oli inkuboitu yön yli täydellä alustalla (EMEM + 10 % FCS), fluorensenssin tasot vähenivät kaikissa näytteissä, kaikkein huomattavimman muutoksen ollessa fluorensenssin katoaminen useimmissa tumissa, pilkullisen soluliman värjäätymisen ollessa tyypillistä. Fluorensenssin tasot näytteissä, jotka käyttivät transfektioainetta, jäivät olennaisesti korkeimmiksi kuin niissä näytteissä, joissa ei käytetty transfektioainetta.

Formulaatio

30

Useimmat kaupallisesti saatavilla olevat transfektioaineet on formuloituja liposomeja, joissa on neutraali lipididioleoyylifosfatidyylietanoliamiini (DOPE). Lisäksi kirjallisuudessa on ehdotettu, että yhdisteet, joissa on 2 rasva-asyylijohtannaista, muodostavat todennäköisemmin stabiileja liposomirakenteita kuin ne yhdisteet, joissa on 1 tai 3 rasva-asyylijohtannaista, ja todellakin kaupallisissa aineissa on poikkeuksetta 2 asyylijohtannaista. Edellä olevien tulosten

valossa, jotka osoittavat, että lyhytketjuisimmilla rasva-
 syylijohdannaisilla, ja erityisesti lauraatilla, on lisään-
 tynyt kyky transfektoida soluja, voi olla että lyhytket-
 juisempien fosfatidyylietanoliiniyhdisteiden käyttö voi
 5 myös tarkoittaa tehokkaampaa transfektiota. Täten DOPE:n
 käyttö pitäisi nähdä tällä tavalla valaisevana kyvyssään
 muodostaa tehokkaita liposomirakenteita transfektiota var-
 ten, eikä rajoittavana.

- 10 Päämäärä: Testata liposomiformulaatioiden tehokkuus DOPE
 lipidin kanssa.
 Menetelmä: Verafectin A2 (K3ATP2) formuloitiin liposomeiksi
 käyttämällä standardimenetelmiä (K. Yagi et al., Biochem.
 Biophys. Res. Comm. 196, 3, 1993, ss. 1042-1048) ja liuotet-
 15 tiin H₂O:hon 2 mM:ssa. Formulaatiot tehtiin 1:2, 1:1 ja 2:1
 moolisissa suhteissa DOPE:n kanssa.

Liposomiformulaatioita verrattiin kaupallisiin yhdisteisiin,
 kuten alla erillisissä kokeissa kuvataan:

- 20 a. Käyttämällä standardeja, edellä kuvattuja transfektiome-
 netelmiä ja 1 µg plamsidia pSVLCAT, nämä formulaatiot tes-
 tattiin CHO-soluihin yksittäisellä konsentraatiolla, joka
 vastasi 10 µl Verafectin A2:ta (2 mM)/näyte ja verrattuna
 ei-formuloituun yhdisteeseen ja Lipofectamineen samassa so-
 25 lutyypissä. CAT-tuotto määritettiin 48 h transfektion jäl-
 keen.
 b. Liposomiformulaatiot testattiin myös samoissa konsentraa-
 tioissa käyttämällä plasmidia, joka koodaa β-gal-ekspres-
 siota, pPGKlacZ ja verrattiin Lipofectamineen ja DOTAP:iin
 30 (Boehringer Mannheim). 24 h transfektion jälkeen solut kiin-
 nitettiin ja värjättiin β-gal-ekspressiota varten.

Tulokset

- 35 a. Liposomiformulaatioiden käyttö johti CAT-ekspressioon
 CHO-soluista vaihdellen 62 % - 156 % optimaalisesta Lipofec-
 taminien indusoimasta ekspressiosta käyttämällä kolmea eri-
 laista suhdetta kahdessa erillisessä kokeessa. VFA2-yhdis-

teen käyttö ei-liposomiformulaatiossa antoi CAT-tasot, jotka olivat vain noin 5 % Lipofectaminesta. DOPE yksin, joko ei-formuloituna tai "formuloituna" liposomimenetelmällä. ei antanut transfektiota.

- 5 NB. DOPE yksin ei muodosta todellista liposomia, katso EM osa alla.

Kuvio 23 a.

- b. Alustava solun laskenta värjätyt vs. ei-värjätyt solut osoittivat, että paras liposomiformulaatio (K3ATP2:DOPE 1:2) antoi kaksinkertaisen ja DOTAP antoi noin puolet transfektoitujen solujen määrästä suhteessa siihen, mikä saatiin käyttämällä Lipofectaminea. CHO-solujen osuus, jotka transfektoitiin käyttämällä Lipofectaminea näissä olosuhteissa määritettiin olevan 17,5 %.

- 15 Kuvio 23b.

Aineen konsentraatiota ei optimoitu näille Verafectin A2/DOPE-formulaatioille. Tiedot Lipofectaminesta ja DOPA:sta kuitenkin olivat optimoiduista konsentraatioista.

- 20

Alustavat tiedot osoittavat, että näiden formulaatioiden sytotoksisuus oli karkeasti sama kuin Lipofectaminen ja DOPA:n (ei esitetty).

- 25 Elektronimikroskopia

Formuloitujen ja ei-formuloitujen yhdisteiden liuoksista analysoitiin mahdollinen membraanin kaltainen rakenne. Erillisissä kokeissa analysoitiin seuraavat näytteet:

- 30 a: Negatiivisesti värjätyt formuloitujen yhdisteiden K3ATP2:DOPE, DOPE ja ei-formuloitujen yhdisteiden K3C7ATL3 ja Lipofectamine näytteet.
- b: Pyörövarjostetut K3C7ATL3- ja Lipofectamine-näytteet, jotka oli sekoitettu kahden osan kanssa nukleotidiä (plasmidia).
- 35

Menetelmä: Negatiivivärjäys

2 mM liposomin kantaliuosnäytteet laimennettiin 1:10 suodatetulla tislatusella vedellä ja sekoitettu 1.1 suodatetun negatiivivärin kanssa (ammoniummolybdaatti 2 %, pH 6,5) ja levitettiin hiili-formvar-päälystetyille kupari/rodium 200 seulamitan elektronimikroskooppihilalle ja tutkittiin Jeol JEM 100CX elektronimikroskoopilla 60 kV suurennuksilla 33k-100k.

Pyörivä metallivarjostus

Liposomisuhteet 0,69 ja 0,25:1 mol DNA-nukleotidiä laimennettiin vedellä ja sekoitettiin 10 min huoneenlämmössä, levitettiin hiili-formvar-päälystetyille hiloille ja pyörömetallivarjostettiin platina-palladiumilla (60:40), joka haihdutettiin 7° kulmassa ja tutkittiin elektronimikroskoopilla 60 kV suurennuksilla 26k-66k.

Tulokset:

a: Jotta määritetään onnistunut liposomien muodostuminen, negatiivisesti värjätyt näytteet, jotka oli formuloitu K3AT-P2:DOPE, analysoitiin TEM:ssä. Näiden näytteiden osoitettiin muodostaneen monilamellisia liposomirakenteita, kun taas DOPE yksin ei samoissa olosuhteissa muodostanut.

Koska formuloitu liposomi kykeni antamaan tehokkaan transfektion, oli kiinnostavaa nähdä, oliko puhtailla ei-formuloituilla yhdisteillä, jotka antoivat tehokkaan transfektion, yhtään membraanin kaltaista rakennetta. Jotkut näistä yhdisteistä värjättiin täten negatiivisesti ja jälleen analysoitiin TEM:ssä. Mielenkiintoisesti näiden yhdisteiden, jotka antoivat tehokkaan transfektion, ja joilla oli 3 rasva-asyylijohtannaista, havaittiin muodostaneen spontaanisti membraani-sitoutuneiden rakkuloiden "lauttoja" tai "kasoja", jotka vaihtelivat kooltaan 10 nm-0,2 µm.

b: Yhdisteet sekoitettiin plasmidi-DNA:n kanssa suboptimaalisissa (0,25) ja optimaalisissa (0,69) lipopetidi:nukleotidi-suhteissa ja pyörövarjostettiin. Näiden näytteiden analyysi osoitti dramaattisesti, että transfektion optimaalissa suhteessa suurin osa DNA:sta liitettiin liposomien kokoelmiin. Suhteissa, joissa oli riittämättömästi yhdistettä läsnä (0,25:1), oli suuri määrä DNA:ta vapaana liuoksessa. Tämä oli totta sekä testiyhdisteelle K3C7TL3 että Lipofectaminelle, jotka näyttivät hyvin samanlaisilta EM:ssä, kun sekoitettiin DNA:n kanssa, vaikka niiden ilmenemistapa ei-kompleksoituneena DNA:n kanssa oli hyvin erilainen.

Transfektioyhdisteiden ja muiden lipidien ei-formuloidut seokset

15

Solujen osan välillä, jotka oli transfektoitu oligonukleotideilla (100 % fluoresoivia soluja), ja jotka ekspressoivat geenituotetta (<100 % sinisiä soluja) oli erilaisuutta. Koska DNA:lle on välttämätöntä, että se otetaan tumaan sisään, transkriboidaan ja transloidaan, jotta saavutetaan geenituote, kun taas oligonukleotidin täytyy vain päästä plasmamembraanin läpi "transfektion" saavuttamiseksi, tämä ei ollut yllättävä tulos. Se tarkoittaa kuitenkin, että onnistunut transfektio ja geenituotteen synnyttäminen on monivaiheinen menettelytapa, joka voisi hyötyä yhdisteiden yhdistelmästä, jolla voi olla tunnusmerkillisiä kykyjä ylittää erilaisia membraaneja, esimerkiksi plasma- ja tumamembraanit. Tämä mielessä yhdistettiin lukuisia muuten identtisiä yhdisteitä, joissa oli erilaiset rasva-asyyliryhmät, jotka erosivat sekä määrältään että pituudeltaan, ja testattiin β -gal-maljamäärityksellä, kuten alla on kuvattu.

Joidenkin yhdisteiden aiheuttamat parannukset transfektiossa on nähty myös yksinkertaisella neutraalin lipidin DOPE:n lisäyksellä, kuten edellä nähtiin kokeessa 4 käyttämällä VerafectinG2(K3GTP2):ta.

Päämäärä: Määrittää onko tässä hakemuksessa kuvatun yleisen kaavan lipopeptidiyhdisteiden seoksilla etu saavuttaa geenien transfektio, kuten määritettiin geenituotteen osoittamisella verrattuna puhtaan yhdisteen käyttöön.

5

Yhdisteiden seokset; koe 1

Menetelmä: Optimaalisen transfektiotason saavuttaminen käyttämällä yhdistettä K3ATL3 on määritetty aikaisemmin vaatimaan n. 5 μM K3ATL3:a. K3ATL3 sekoitettiin jokaisen K3ATL1:n, K3ATL2:n, K3ATM3:n, K3ATP3:n ja K3ATC3:n kanssa antamaan lipidiin kokonaiskonsentraation 5 μM 100 μl :ssa suhteissa 0:5, 1:4, 2:3, 3:2, 4:1 ja 5:0. K3ATM3 sekoitettiin samalla lailla K3ATM1:n, K3ATM2:n ja K3ATP3:n kanssa. Jokainen lipidi-seokseista yhdistettiin vakiomäärän kanssa pSVGAL DNA:ta 15 0,5 μg /kuoppa ja transfektion annettiin edistyä normaalisti.

Tulokset: Jokaisen kuopan ekspressio oli alhainen, kun oli käytetty kaksinkertainen optimaalitaso DNA:ta, kuitenkin 20 kuopissa, joissa oli K3ATL3:n ja K3ATM3:n yhdistelmä suhteessa 4:1, oli voimakas ekspressiotaso antaen korkeamman β -gal:n ekspression tason kuin kumpikaan K3ATL3 tai K3ATM3 yksin (tiedot eivät näy).

25 Koe 2

Tätä testattiin edelleen tekemällä 4:1 moolinen seos kahdesta lipopeptidistä K3ATL3 ja K3ATM3 ja testaamalla niitä standardimaljämäärityksellä, mihin sisältyi kaksoislaimennukset molemmista lipopeptidi- ja DNA-konsentraatioista. 30 Tätä verrattiin ekspressioon, joka saavutettiin käyttämällä puhdasta yhdistettä K3ATL3 samoissa olosuhteissa.

Tulos: Saavutettiin pieni, mutta selvä ekspression lisääntyminen käyttämällä lipopeptidien seosta. Jokaisessa testatussa lipopeptidikonsetraatiossa transfektioaineen optimaalinen taso johti korkeampaan transfektiotasoon käytettäessä L3/M3 4:1 seosta verrattuna L3:een yksin samassa konsentraatiossa. 35

Kuvio 24.

Johtopäätös

- 5 Lipopeptiditransfektioaineiden yhdistelmät voivat saavuttaa paremmat transfektion tasot verrattuna jompaankumpaan aineeseen yksin. Odotetaan että lisätestaus näissä linjoissa johtaisi muihin yhdistelmiin, jotka antavat kummallekin komponenteista yksin paremmat transfektion tasot. Tulokset osoittavat, että näiden molekyylien seoksilla saattaa olla merkittäviä vaikutuksia niiden yksittäisiin transfektio-ominaisuuksiin.

In vivo transfektio

15

Päämäärä: Määrittää, voidaanko kuvattua kaavaa käyttää jakamaan DNA:ta tehokkaasti koko organismiin, johtaen jaetun geenin ekspressioon.

- 20 Menetelmä: Plasmidi pGFP-N1 (Clontech), joka koodaa vihreää fluoresoivaa proteiinia, laimennettiin 10 µg (10 µl:ssa) 20 µl:aan 5 %:sta dekstroosia vedessä ja sitten yhdistettiin 2,1 µl 10 mM:sta K3ATL3:a (10 % DMSO) 27,9 µl:ssa 5 % dekstroosia vedessä. 10 min inkubaation jälkeen huoneenlämmössä
- 25 seos injektoidiin karvattoman hiiren säärilihakseen. Hiiri uhrattiin 24 h kuluttua ja lihaspala jäädytettiin hiilihapojäässä. Kudoksesta tehtiin jääleikkeet ja fluoresenssi analysoitiin samapolttopisteisessä mikroskoopissa.
- 30 Tulokset: Pilkullista fluoresenssiä havaittiin lihassolujen solulimassa ja myös hyvin voimakasta fluoresenssiä nähtiin liikehermon päätelevyssä. Fluoresenssiä ei havaittu kudoksessa, joka oli leikattu ei-injektoidusta säärestä.

Johtopäätös

Alustavat kokeet osoittavat, että tehokas geenin siirto ko-
5 konaisiin eläimiin voidaan saavuttaa käyttämällä näitä yh-
disteitä.

Tämä keksintö antaa tehokkaan tavan jakaa yhdistettä, eri-
tyisesti DNA:ta eukaryoottiseen soluun. Menetelmä on tehok-
10 kaampi kuin standardi $CAPO_4$ -tyylin transfektiot, joidenkin
tämän keksinnön suoritusmuotojen ollessa olennaisesti parem-
pi kuin kaupallisesti saatavilla olevat transfektioaineet.
Uskotaan että tämän keksinnön menetelmä olisi yhtä hyödylli-
nen muiden yhdisteiden jakamisessa, kuten nukleiinihappopoh-
15 jaiset lääkeaineet, kuten ribosymit, antisense ja sen kal-
taiset.

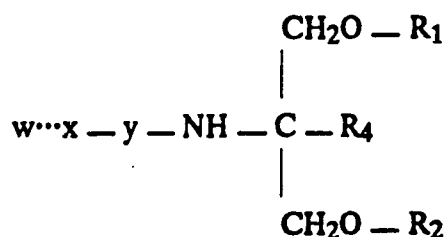
Ammattimies ymmärtää, että keksintöön voidaan tehdä lukuisia
muunnoksia ja/tai modifikaatioita, kuten erityisissä suori-
20 tusmuodoissa on esitetty irtaantumatta keksinnön hengestä ja
ulottuvuudesta laajasti kuvattuna. Nämä suoritusmuodot on
siksi käsitettävä kaikissa suhteissa valaiseviksi eikä ra-
joittaviksi.

25

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä nukleiinihapon viemiseksi soluun, joka menetelmä käsittää solun altistamisen yhdisteelle, jonka kaava on:

5



10

jossa kaavassa:

w on nukleiinihappo

x on peptidi tai aminohappo

15 y on linkkeri, jonka ketjun pituus vastaa 1-20 hiiliatomia tai puuttuu

R₄ on H tai CH₂O-R₃; ja R₁, R₂ ja R₃ ovat samat tai erilaiset ja ovat joko vety, metyyli-, etyyli-, hydroksyyli- tai asyyli-ryhmä, joka on johdettu rasvahaposta, jossa on 3-24 tyydytetyn tai tyydyttämättömän hiiliatomin hiiliketju edellytyksellä, että ainakin yksi R₁:stä, R₂:sta ja R₃:sta on asyyli-ryhmä, joka on johdettu rasvahaposta.

20

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että y on läsnä.

25

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R₁, R₂ ja R₃ ovat samat.

4. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R₁, R₂ ja/tai R₃ ovat rasvahappojen asyylijohdannaisia, jotka on valittu ryhmästä, joka koostuu palmitaatista, myristaatista, lauraatista, kaproaatista, oleaatista ja kolesterolista.

30

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R₁, R₂ ja/tai R₃ ovat myristaatin tai lauraatin asyylijohdannaisia.

35

6. Menetelmä nukleiinihapon viemiseksi soluun, joka menetelmä käsittää solun altistamisen yhdisteelle, jonka kaava on:



jossa kaavassa:

w on nukleiinihappo

x on peptidi tai aminohappo

10 y on linkkeri, jonka ketjun pituus vastaa 1-20 hiiliatomia tai puuttuu

R_5 on asyyliiryhmä, joka on johdettu rasvahaposta, jossa on 3 - 24 tyydytetyn tai tyydyttämättömän hiiliatomin hiiliketju.

15 7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että y on läsnä.

8. Patenttivaatimuksen 6 tai 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R_5 on rasvahappojen asyylijohdannainen, jotka on valittu ryhmästä, joka koostuu palmitaatista, myristaatista, lauraatista, kaproaatista, oleaatista ja kolesterolistasta.

20

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R_5 on myristaatin tai lauraatin asyylijohdannainen.

25

10. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että nukleiinihappo on DNA, RNA tai oligonukleotidejä, joko DNA:ta tai RNA:ta, modifioituja oligonukleotidejä tai niiden yhdistelmä.

30

11. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että yhdistettä on li-
posomissa tai sekoitettuna toisen lipidin kanssa.

35

12. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että yhdisteessä on linkkeriryhmä "y", jonka ketjun pituus vastaa 3 - 7 hiiliatomia.

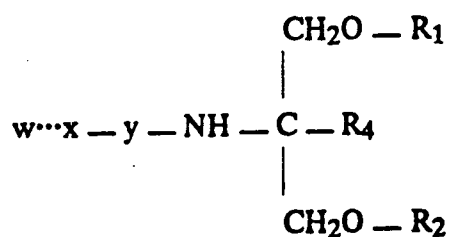
5 13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että y on aminobutyyri-, aminokaproini- tai aminokapryylihappo.

10 14. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että x:llä on positiivinen kokonaisvaraus.

15 15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että x on monolysiini, dilysiini, trilysiini, tetralysiini tai pentalysiini.

20 16. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että w on kovalenttisesti kiinnittynyt x:ään.

17. Yhdiste käytettäväksi viemään nukleiinihappo soluun, yhdisteen kaavan ollessa:



jossa kaavassa:

w on nukleiinihappo

x on peptidi tai aminohappo

35 y on linkkeri, jonka ketjun pituus vastaa 1 - 20 hiiliatomia tai puuttuu

R₄ on H tai CH₂O-R₃; ja R₁, R₂ ja R₃ ovat samat tai erilaiset ja ovat joko vety, metyyli-, etyyli-, hydroksyyli- tai asyyli-ryhmä, joka on johdettu rasvahaposta, jossa on 3 - 24 tyy-

dytetyn tai tyydyttämättömän hiiliatomin hiiliketju, edellytyksellä, että ainakin yksi R_1 :stä, R_2 :sta ja R_3 :sta on asyylliryhmä, joka on johdettu rasvahaposta.

5 18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että y on läsnä.

19. Patenttivaatimuksen 17 tai 18 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R_1 , R_2 ja R_3 ovat samat.

10

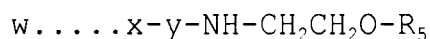
20. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 17 - 19 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R_1 , R_2 ja/tai R_3 ovat rasvahappojen asyylijohdannaisia, jotka on valittu ryhmästä, joka koostuu palmitaatista, myristaatista, lauraatista, kaproaatista, oleaatista ja kolesterolista.

15

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R_1 , R_2 ja/tai R_3 ovat myristaatin tai lauraatin asyylijohdannaisia.

20

22. Yhdiste käytettäväksi viemään nukleiinihappo soluun, jolla yhdisteellä on kaava:



25

jossa kaavassa:

w on nukleiinihappo

x on peptidi tai aminohappo

y on linkkeri, jonka ketjun pituus vastaa 1 - 20 hiiliatomia tai puuttuu

30

R_5 on asyylliryhmä, joka on johdettu rasvahaposta, jossa on 3 - 24 tyydytetyn tai tyydyttämättömän hiiliatomin hiiliketju.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että y on läsnä.

35

24. Patenttivaatimuksen 22 tai 23 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R_5 on rasvahappojen asyylijohdannai-

nen, jotka on valittu ryhmästä, joka koostuu palmitaatista, myristaatista, lauraatista, kaproaatista, oleaatista ja kolesterolista.

5 25. Patenttivaatimuksen 24 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R_5 on myristaatin tai lauraatin asyylijohdannainen.

26. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 17 - 25 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että yhdistettä on liposomissa tai sekoitettuna toisen lipidin kanssa.

27. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 17 - 26 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että yhdisteessä on linkkeriryhmä "y", jonka ketjun pituus vastaa 3 - 7 hiiliatomia.

28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että y on aminobutyyri-, aminokaproiini- tai aminokapryylihappo.

20 29. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 17 - 28 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että x:llä on positiivinen kokonaisvaraus.

25 30. Patenttivaatimuksen 29 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että x on dilysiini, trilyysiini, tetralysiini tai pentalysiini.

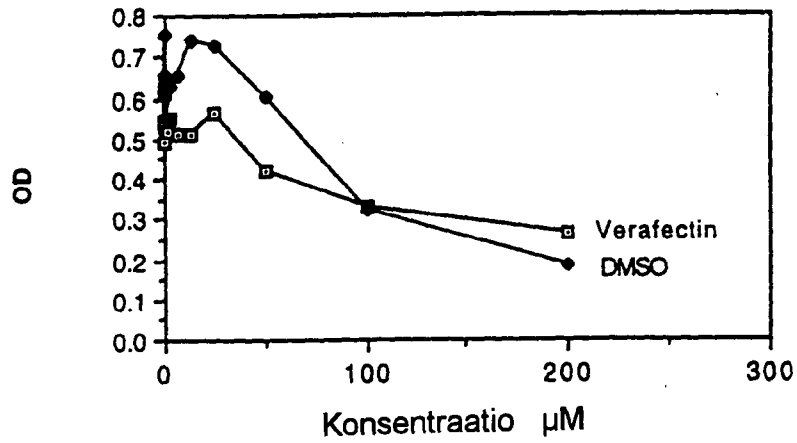
31. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 17 - 28 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että w on kovalenttisesti kiinnittynyt x:ään.

32. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 17 - 31 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että w on DNA, RNA tai oligonukleotidejä, joko DNA:ta tai RNA:ta, modifioituja oligonukleotidejä tai niiden yhdistelmä.

Kuvio 1

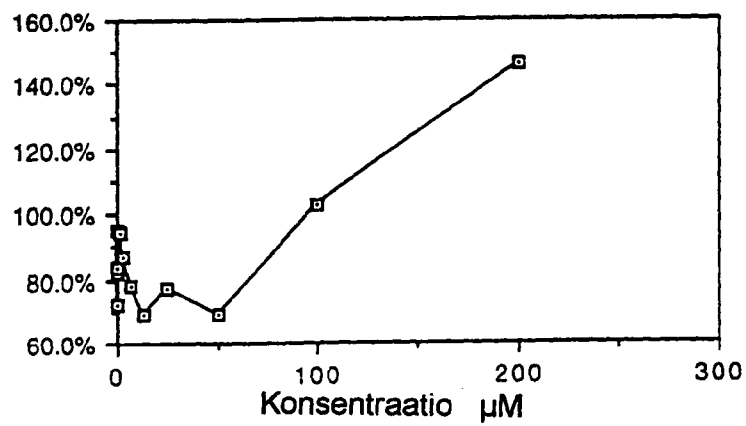
1a.

Verafectinin ja DMSO:n toksisuus



1b.

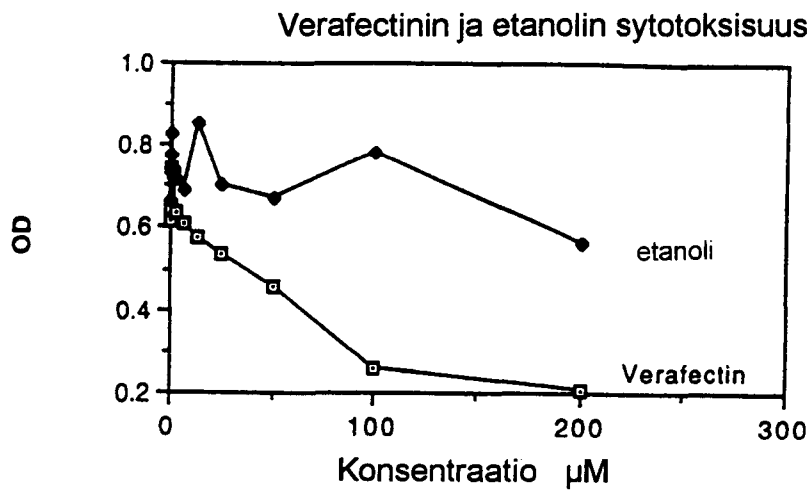
% elinkyky Verafectinissä verrattuna DMSO:hon



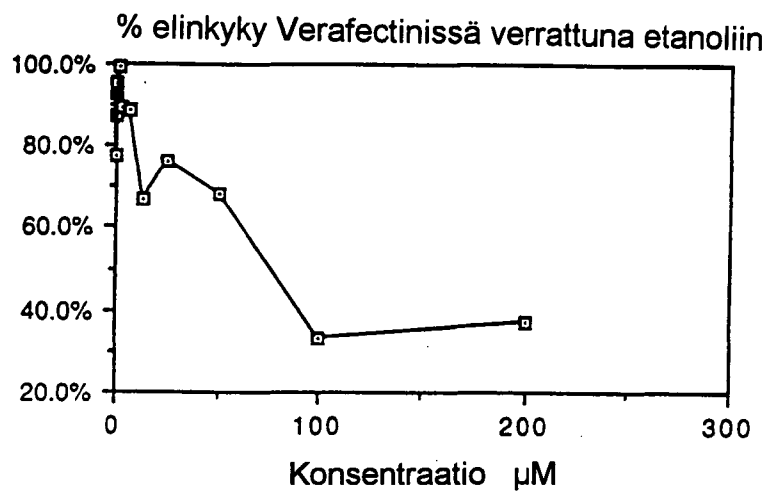
Kuvio 2

2/21

2a

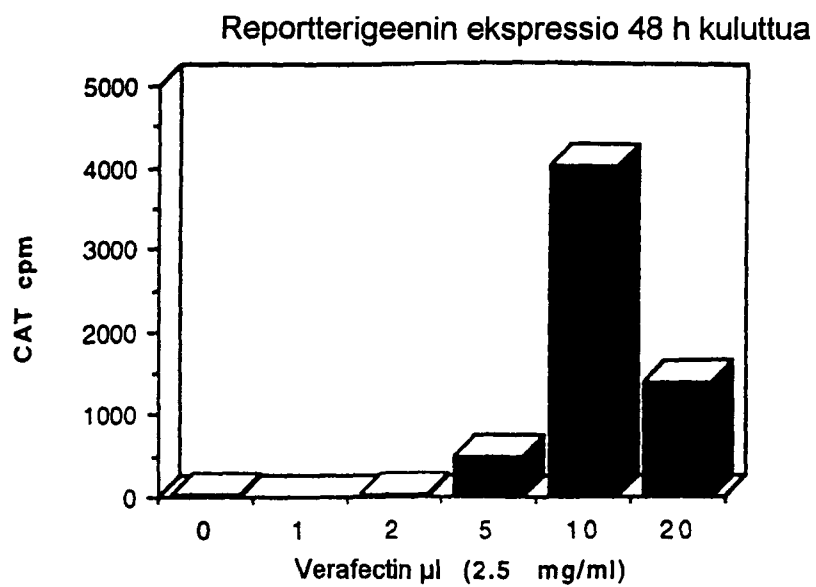


2b

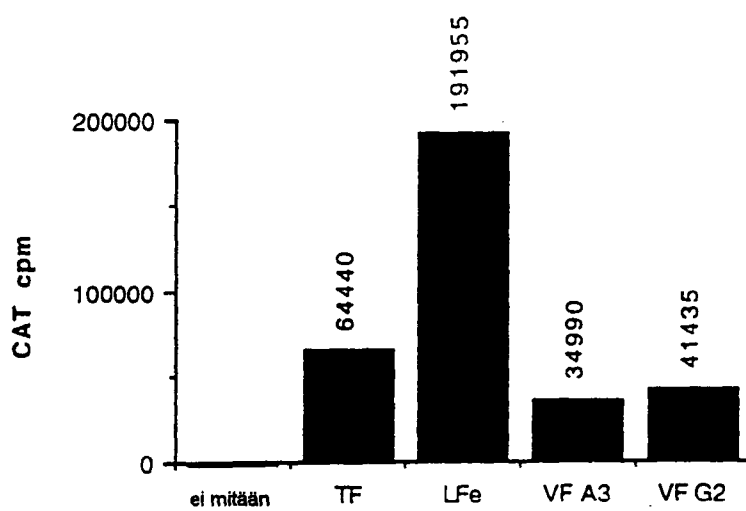


Kuvio 3

3/21

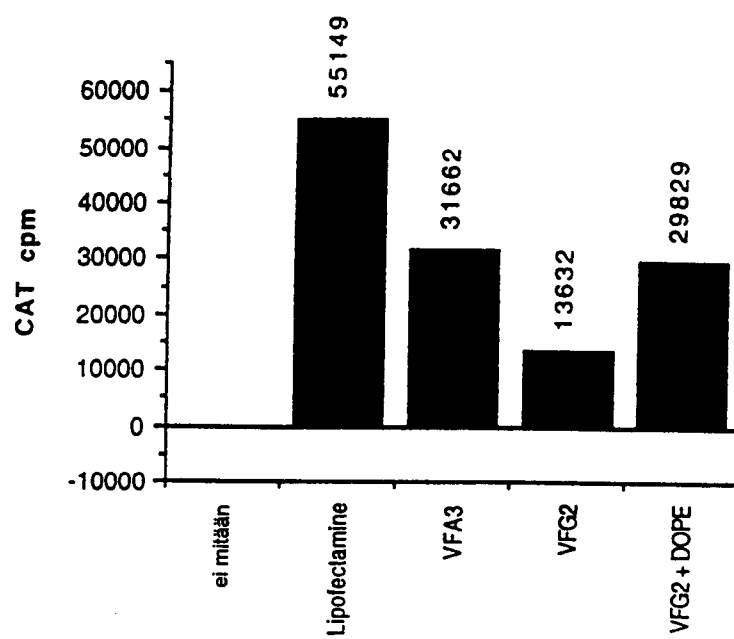


Kuvio 4



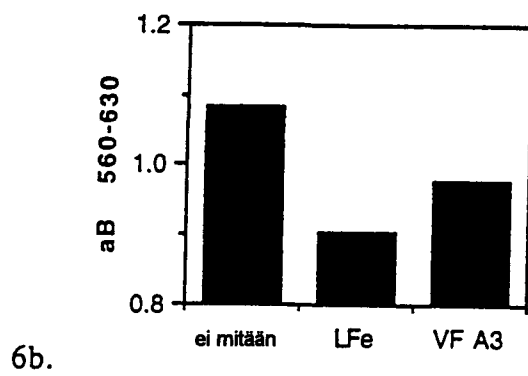
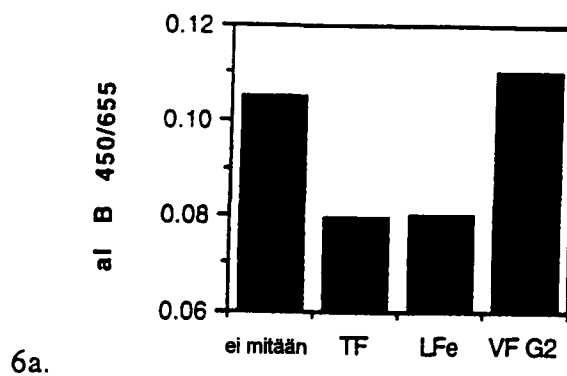
Kuvio 5

4/21



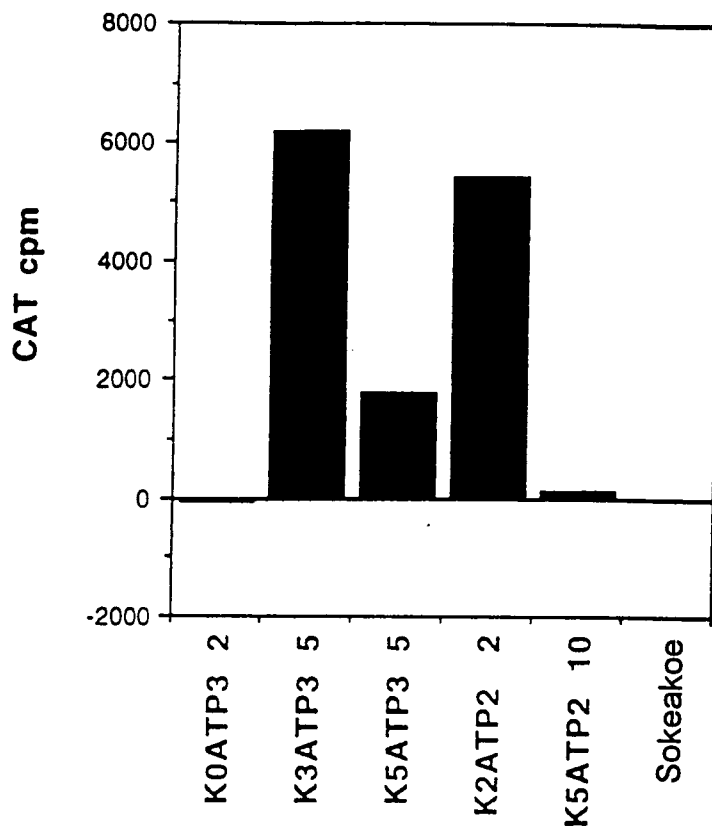
Kuvio 6

5/21



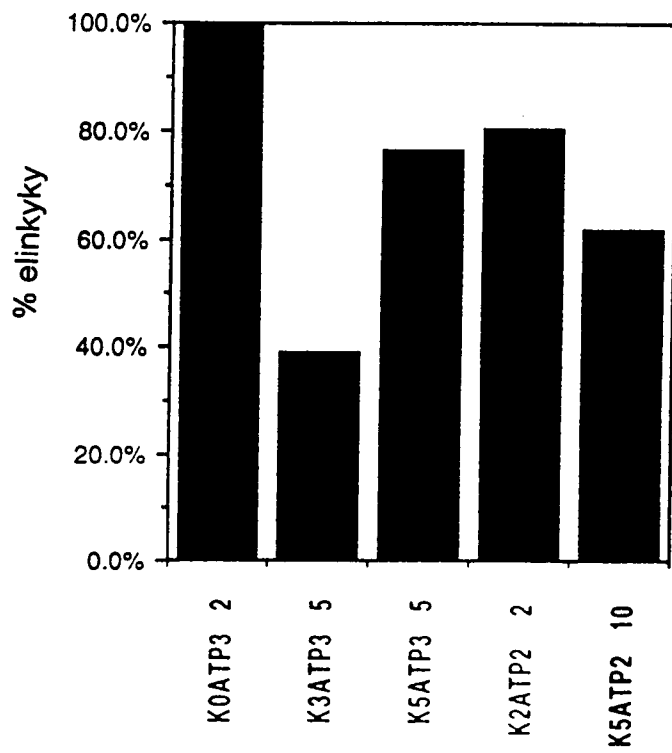
Kuviot 7a ja b

6/21



Aine

7a.

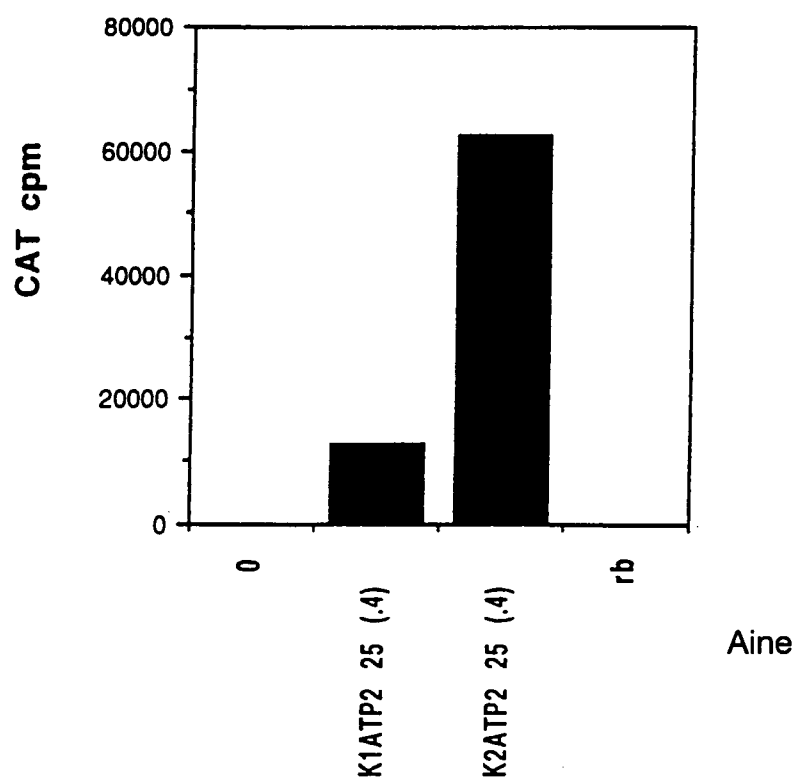


Aine

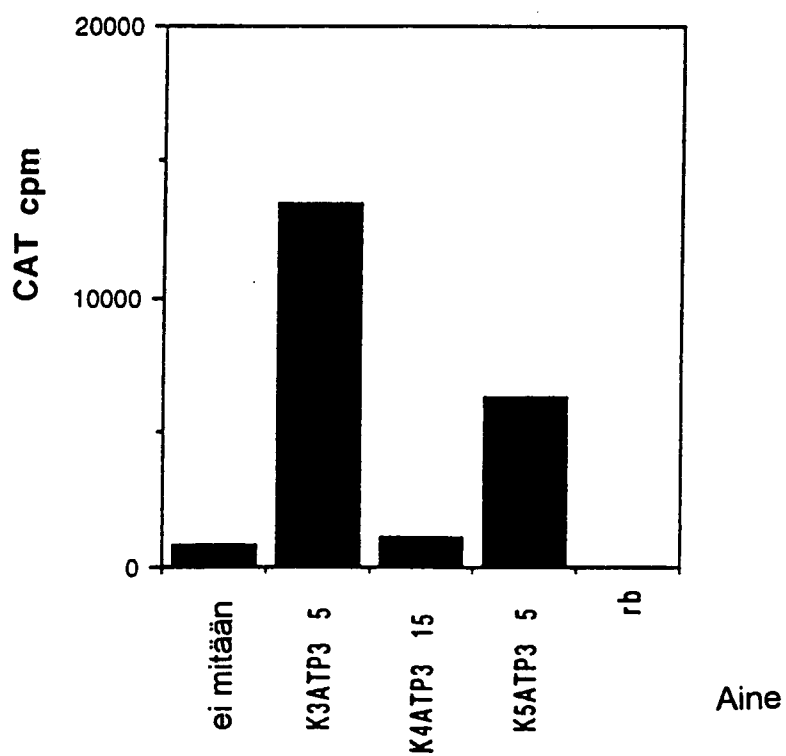
7b.

Kuvio 8

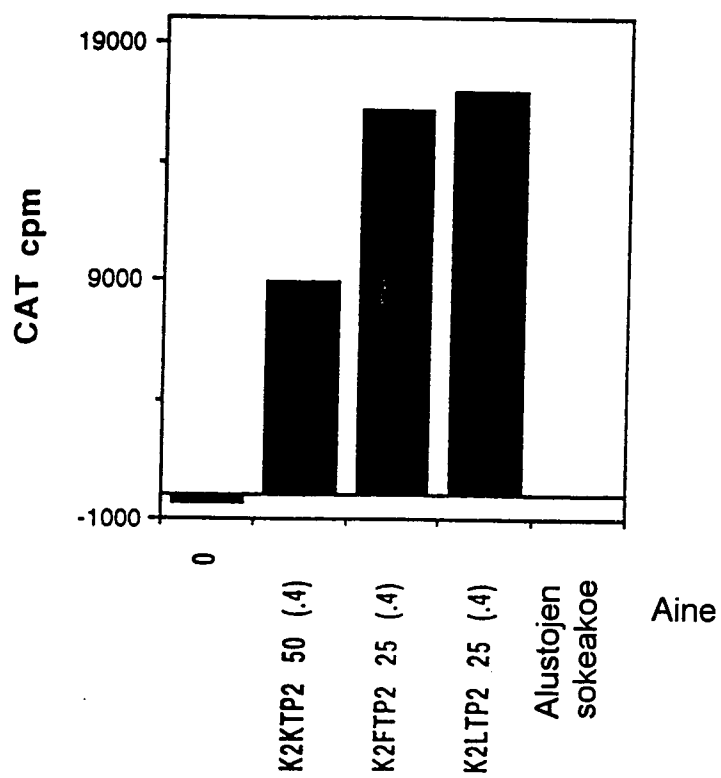
7/21

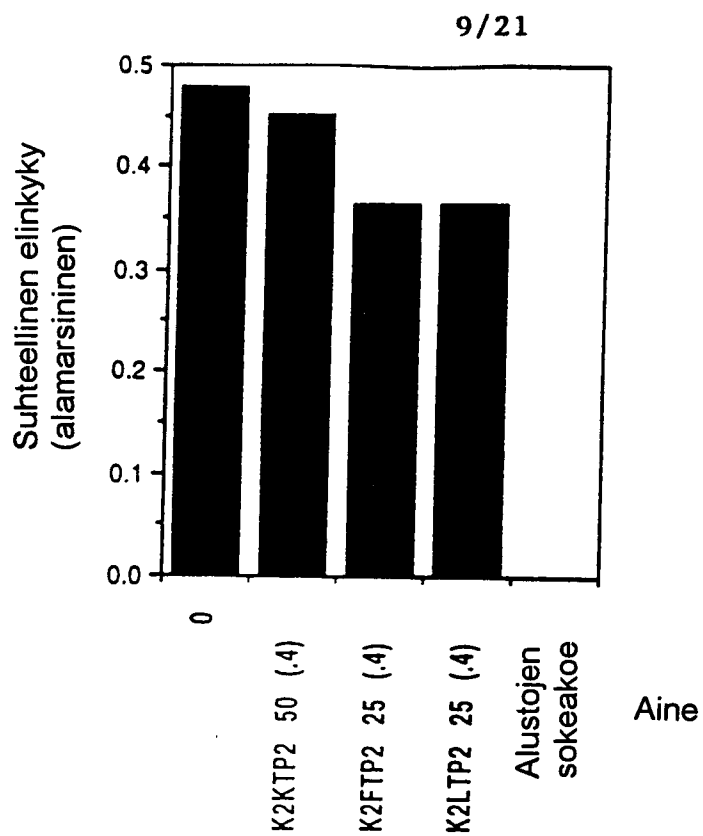


Kuvio 9

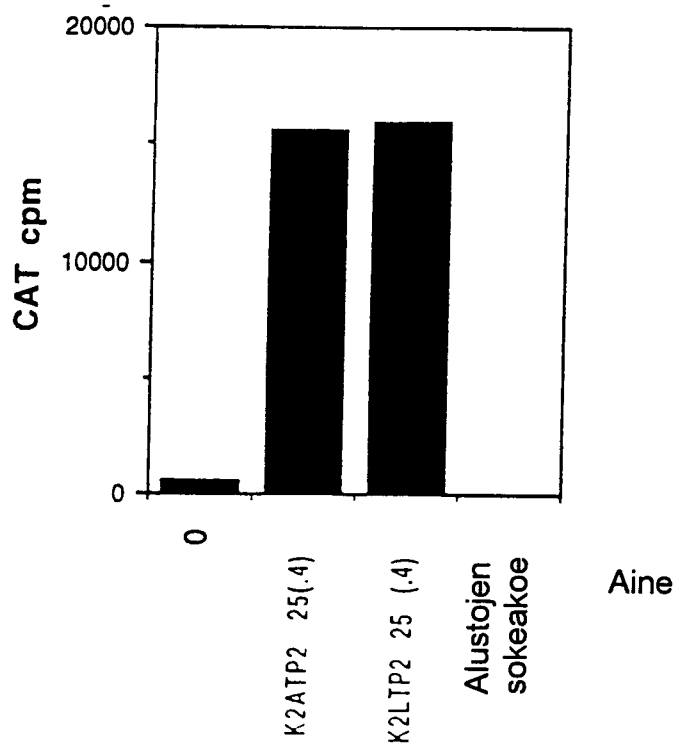


Kuvio 10a





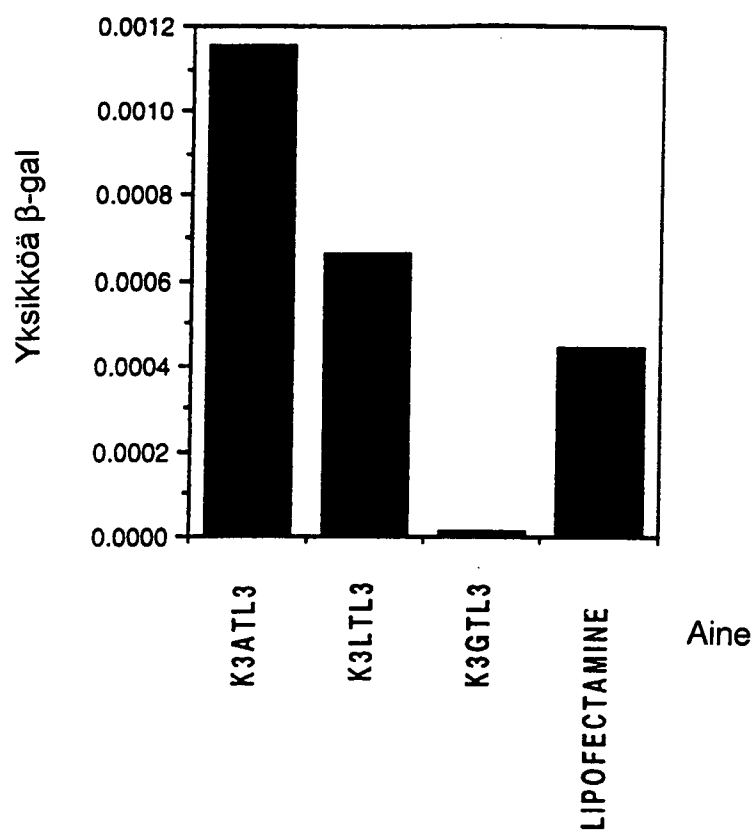
Kuvio 10b

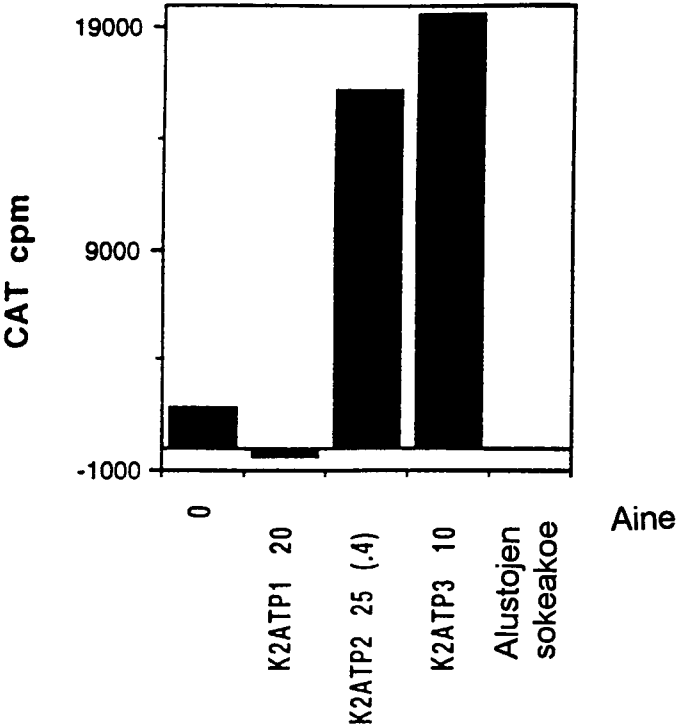


Kuvio 11

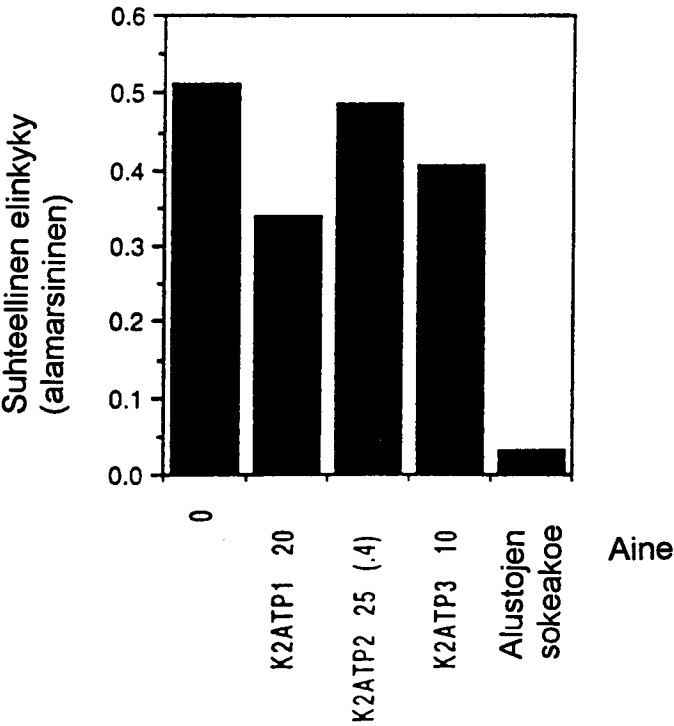
Kuvio 12

10/21

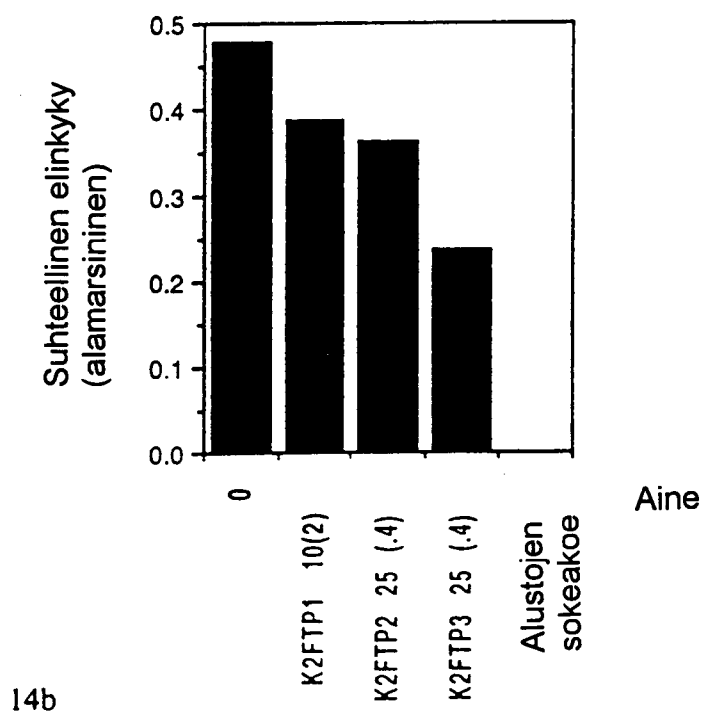
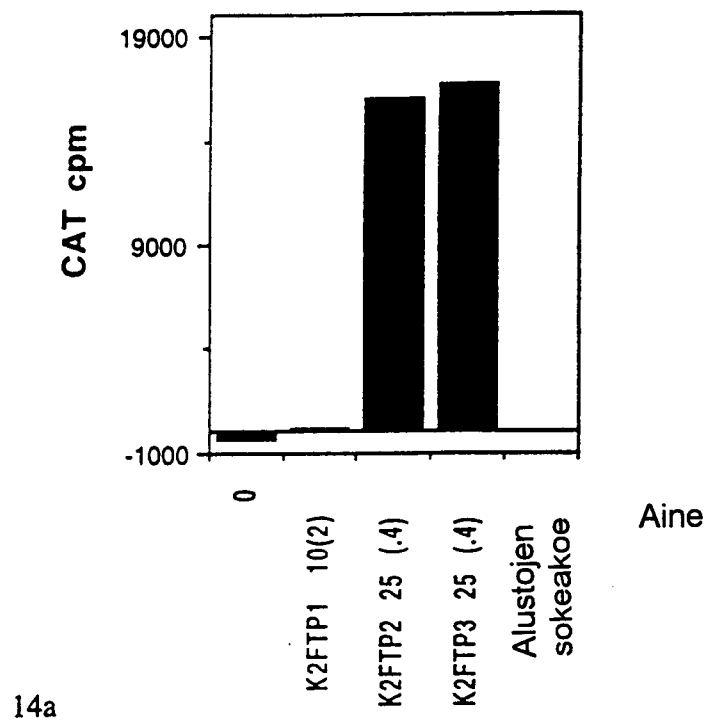


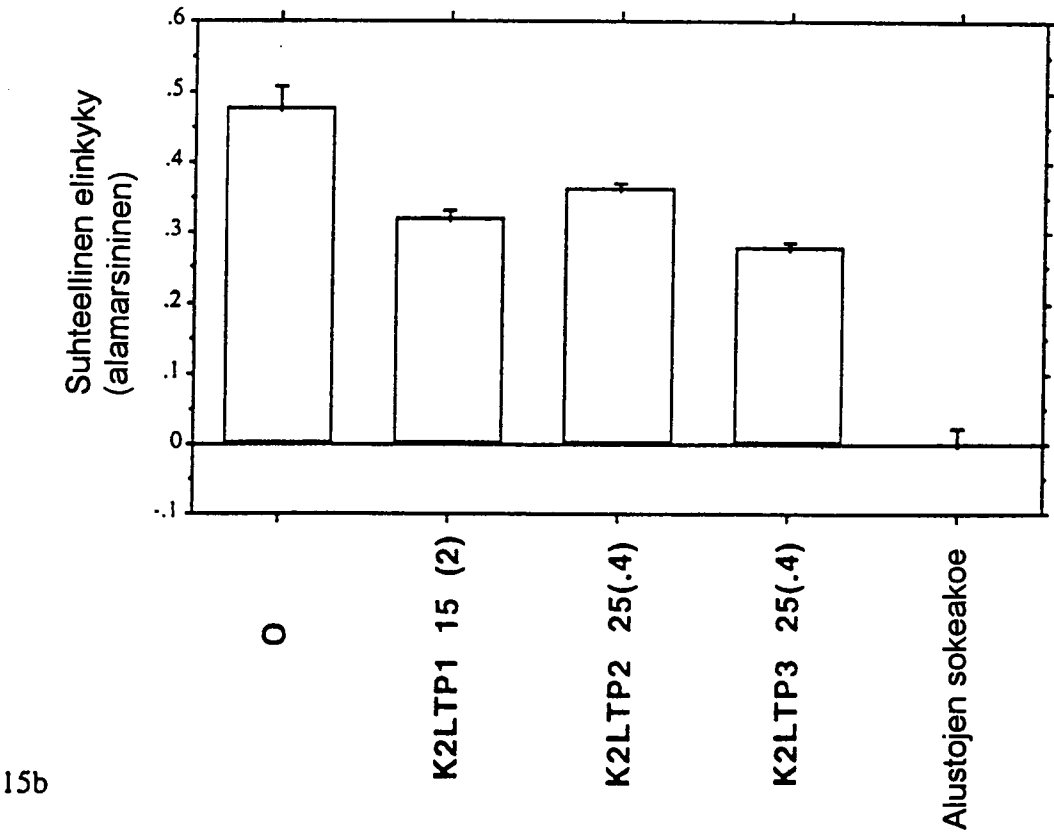
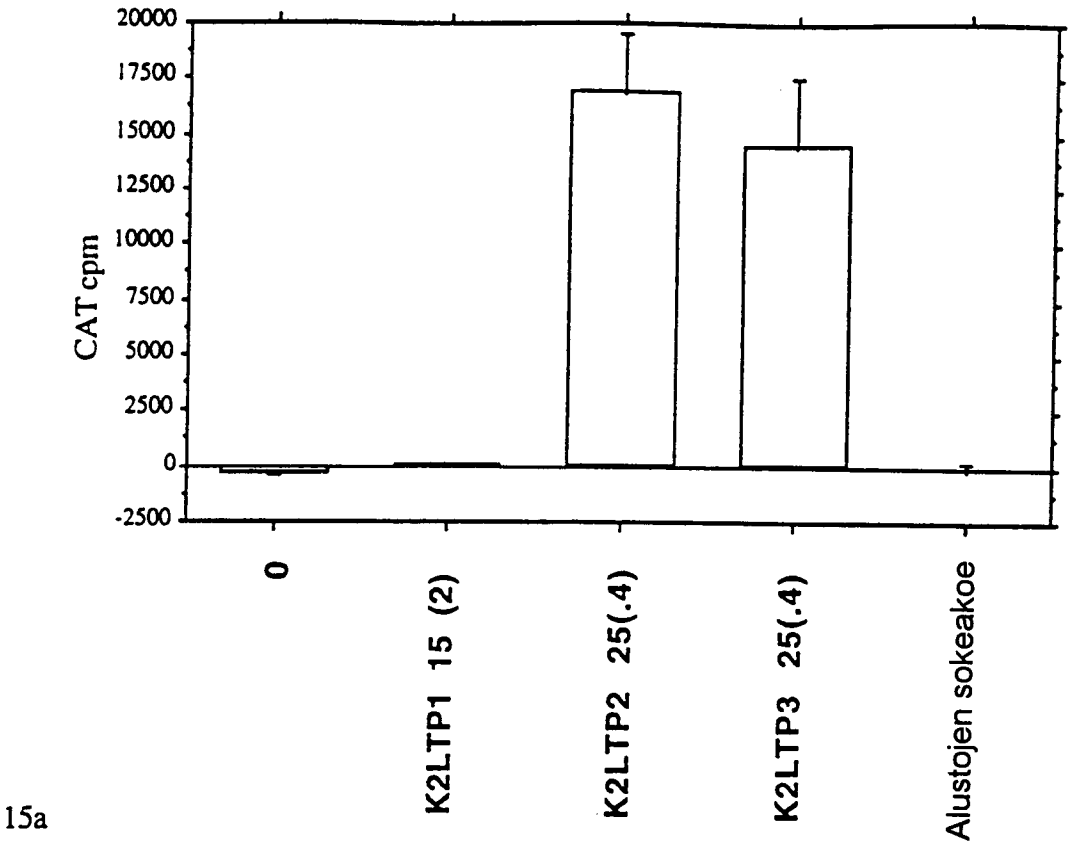


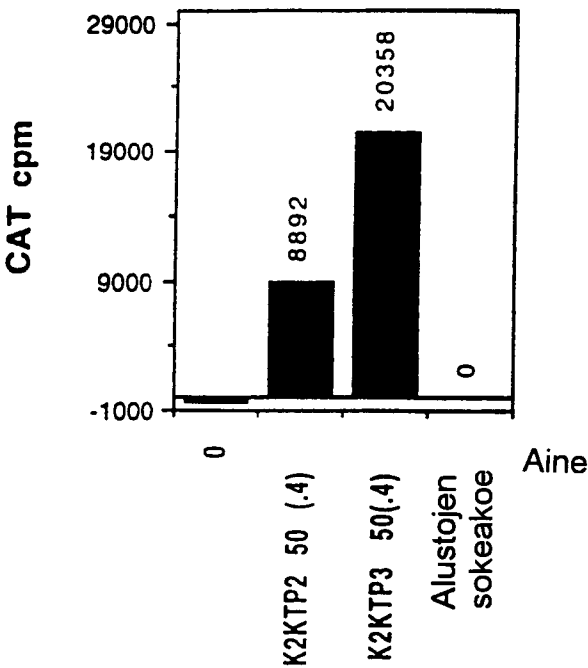
13a



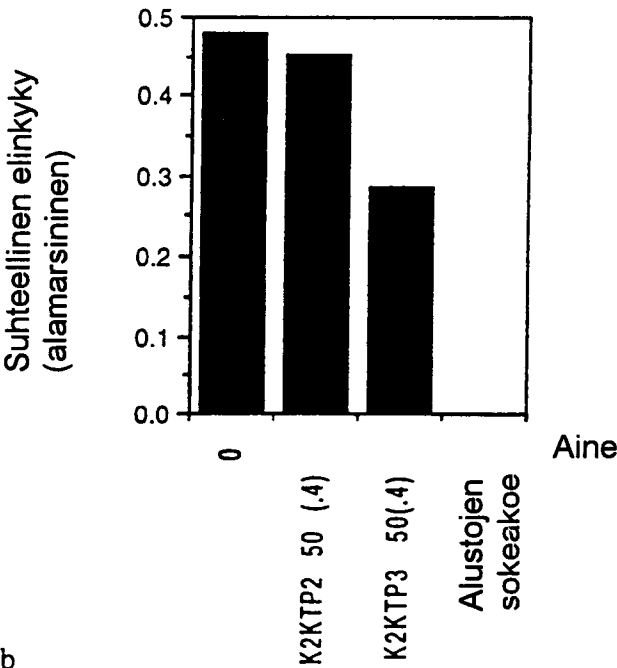
13b







16a

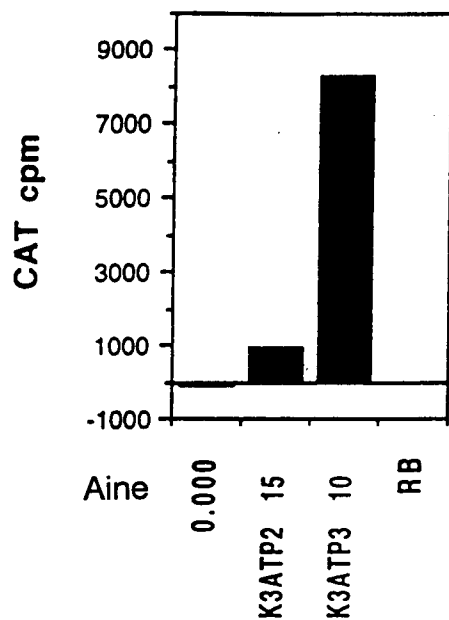


16b

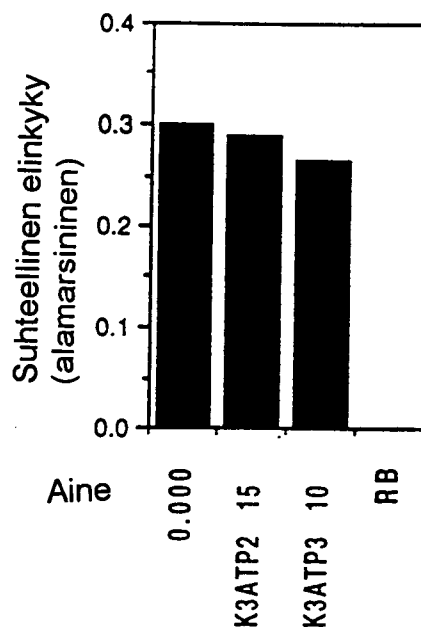
Kuviot 17a ja b

15/21

17a.

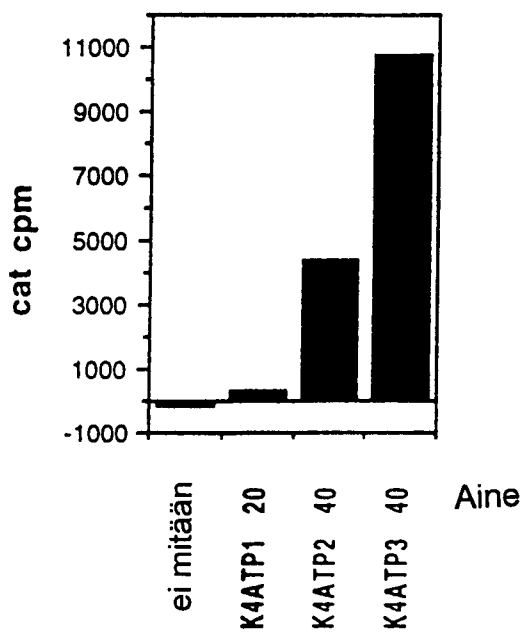


17b.

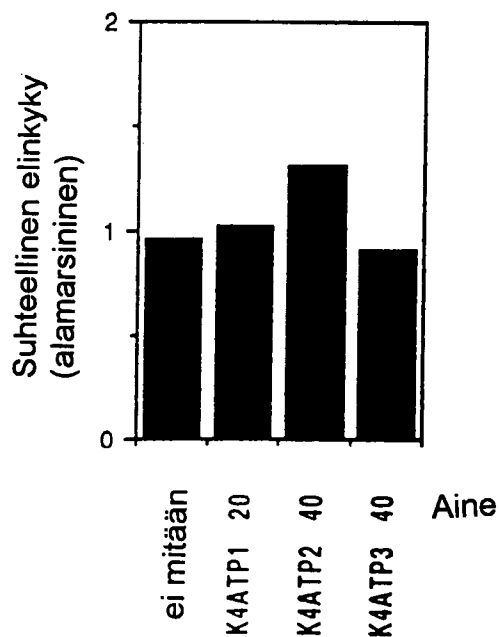


Kuviot 18a ja b

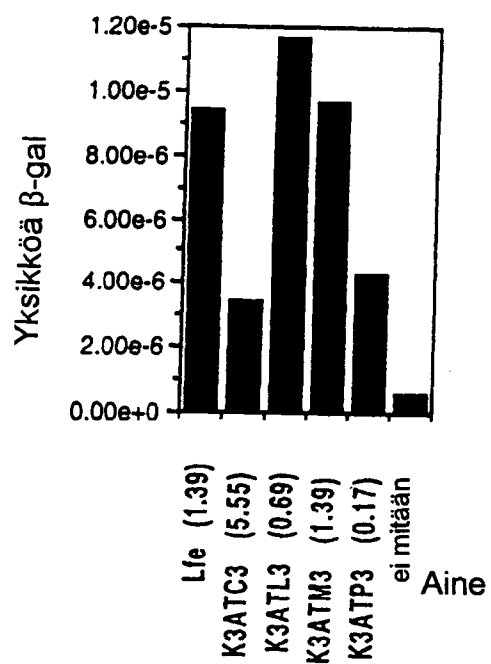
18a.



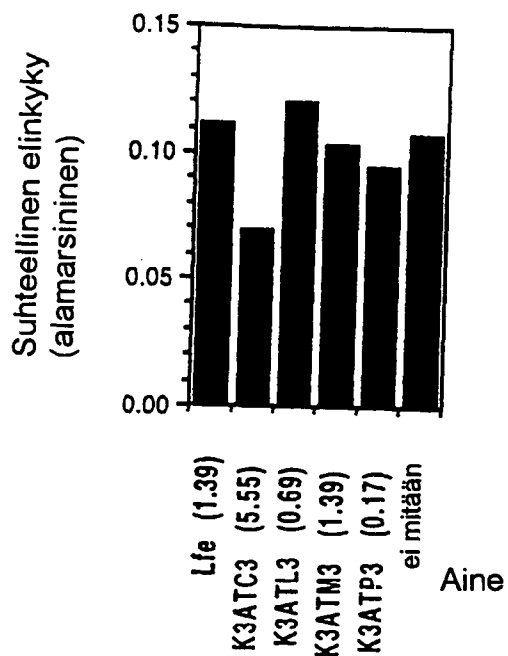
18b.



19a.



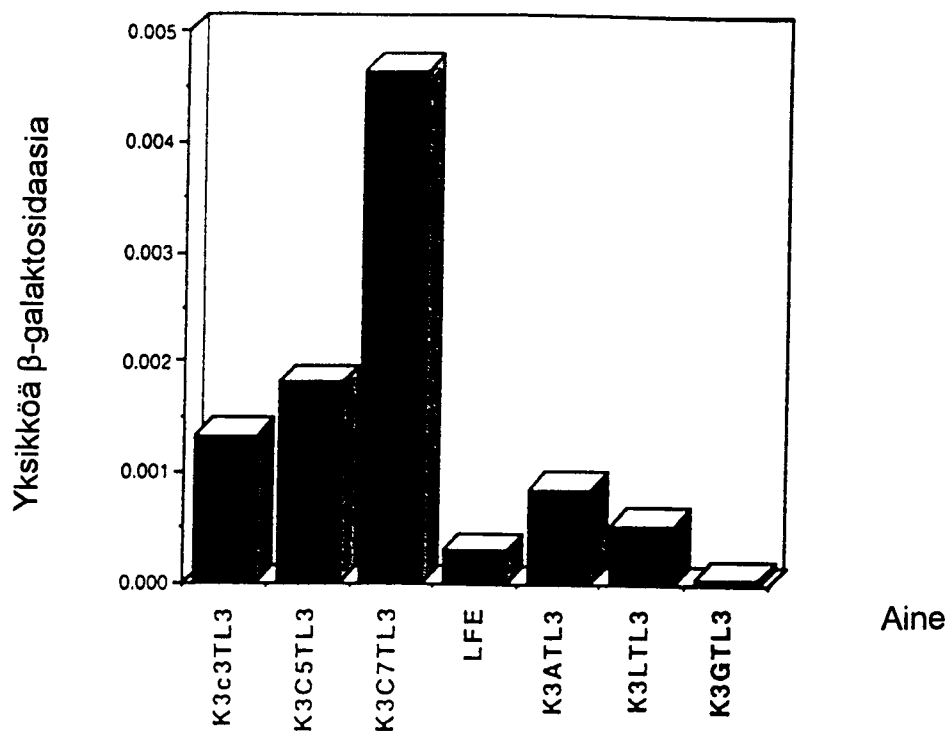
19b.



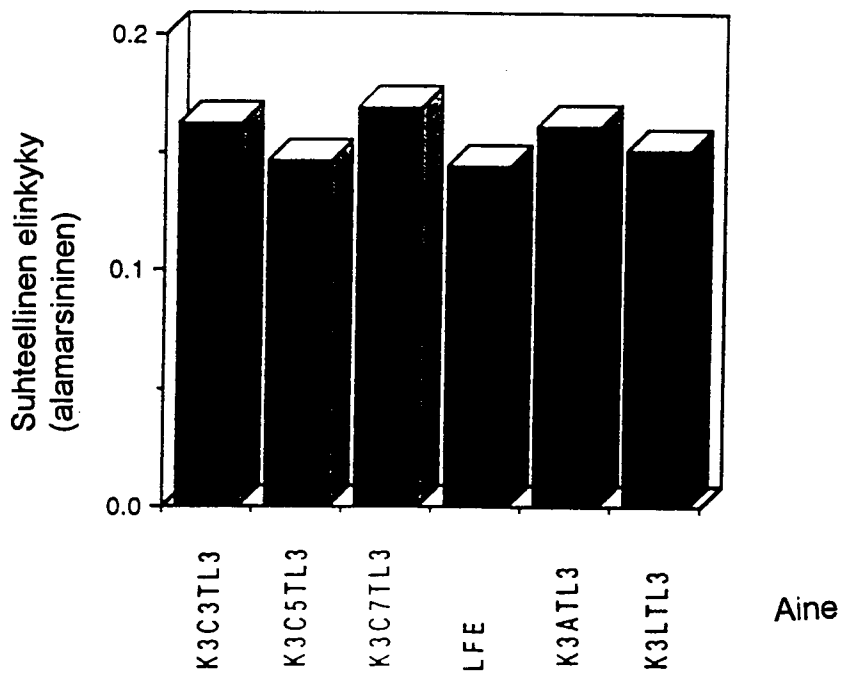
Kuvioiden 19a ja b selitys

Kuvio 20a

17/21



20a

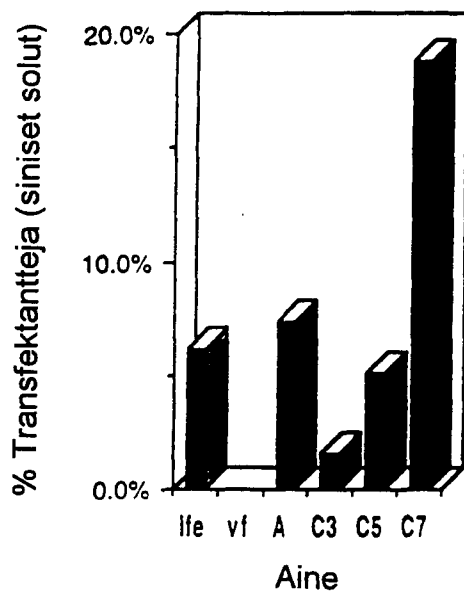


20b

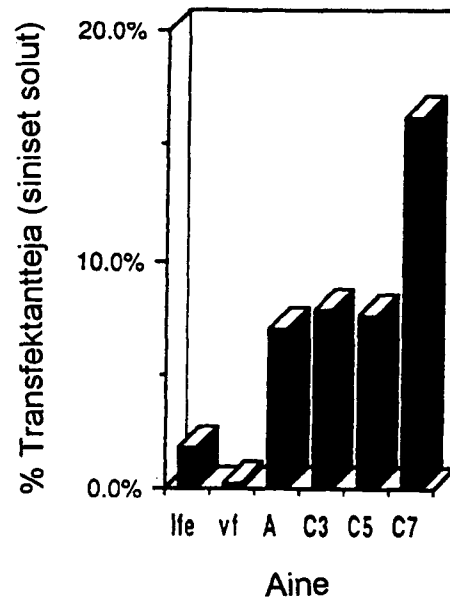
Kuviot 21a ja b

18/21

21a. CHO-solut

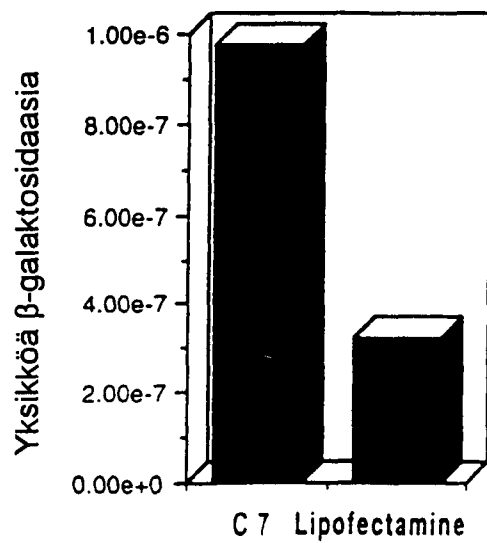


21b. Cos 1-solut

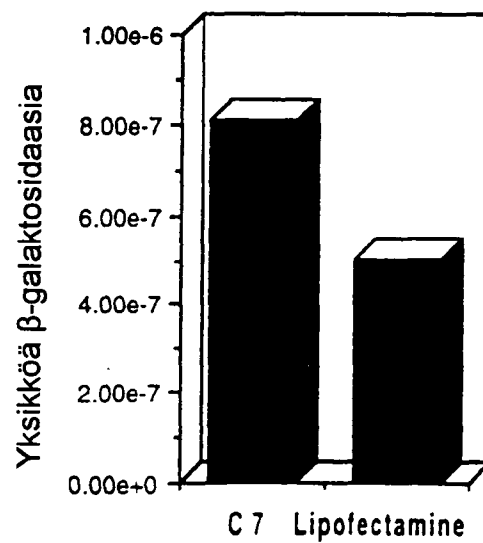


Kuviot 22a ja b

22a. PC3-solut



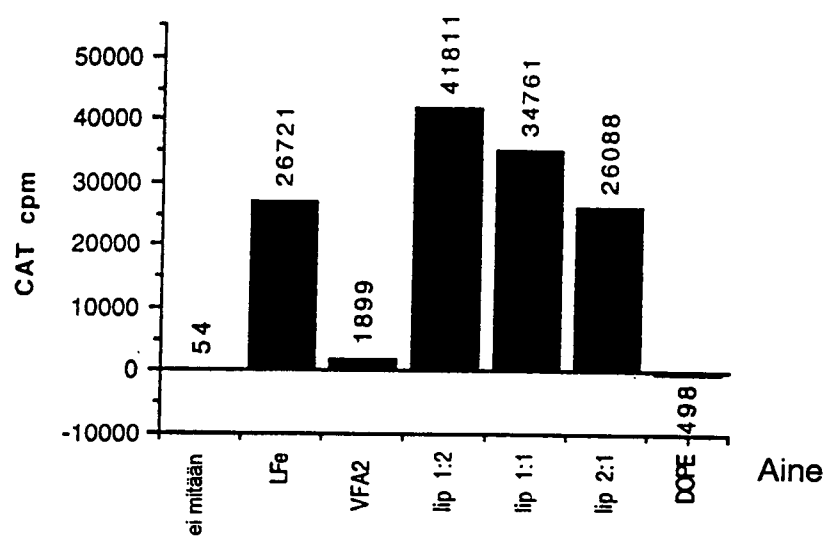
22b. Jurkat-solut



Aine

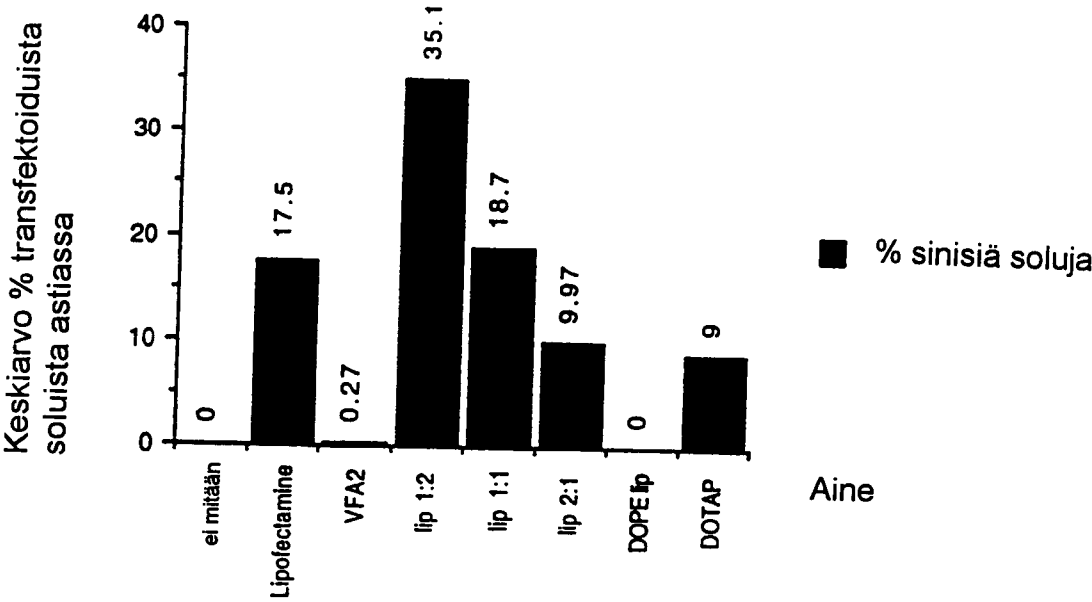
Aine

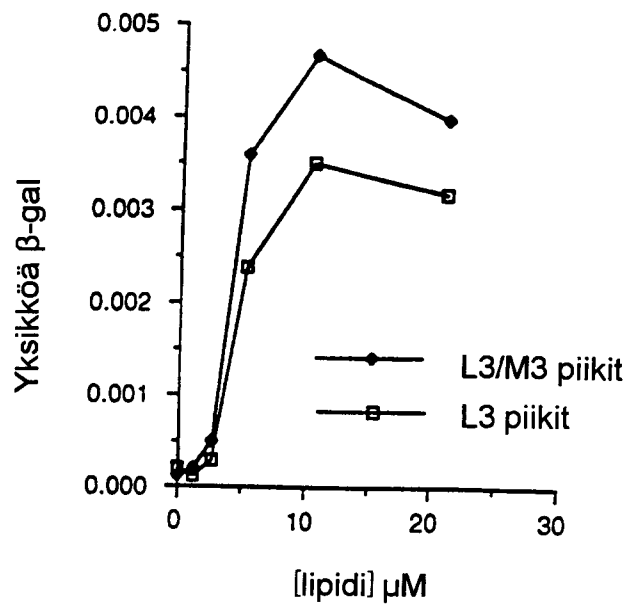
Kuvio 23a



Kuvio 23b

20/21





Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Käännä

Vänd

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO 9109837 A1

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:



Allekirjoitus