



(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2020 114 183.1**  
(22) Anmeldetag: **27.05.2020**  
(43) Offenlegungstag: **02.12.2021**

(51) Int Cl.: **A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61K 47/30** (2006.01)  
**A61K 31/7105** (2006.01)  
**A61K 31/711** (2006.01)  
**A61K 47/42** (2017.01)  
**C12N 15/87** (2006.01)  
**C12N 15/90** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

(71) Anmelder:  
**Universität Leipzig Dezernat Forschung und  
Transfer, 04109 Leipzig, DE**

(74) Vertreter:  
**Fortmann Tegethoff Patent- und Rechtsanwälte,  
10117 Berlin, DE**

(72) Erfinder:  
**Aigner, Achim, Prof. Dr., 04107 Leipzig, DE;  
Ewe, Alexander, Dr., 04107 Leipzig, DE; Karimov,  
Michael, Dipl.-Pharm., 04107 Leipzig, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

**US 2011 / 0 020 927 A1**  
**EP 2 229 445 B1**

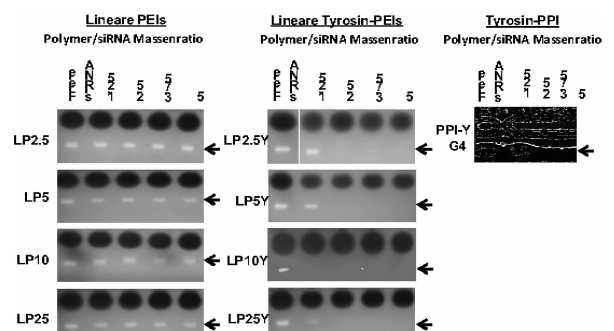
**EWE, Alexander [u.a.]: Polymeric  
nanoparticles based on tyrosine-modified, low  
molecular weight polyethylenimines for siRNA  
delivery. In: Pharmaceuticals, Bd. 11, 2019, H.  
11, Artikelnummer: 600. - ISSN 1999-4923 (e).  
DOI: 10.3390/pharmaceutics11110600. URL:  
<https://www.mdpi.com/1999-4923/11/11/600/pdf>  
[abgerufen am 2020-07-13].**

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.**

(54) Bezeichnung: **MITTEL ZUR TRANSFEKTION VON NUKLEINSÄUREN IN ZELLEN**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Mittel umfassend eine Zusammensetzung, ein Verfahren zu ihrer Herstellung sowie deren Verwendung für den nicht-viralen Transfer von Nukleinsäuren in lebende Zellen, insbesondere in schwer-transfizierbaren Zellen, sowie für Anwendungen in vivo. Die vorliegende Erfindung stellt eine Zusammensetzung zur Verfügung, umfassend Komplexe aus einer Mischung aus linearen niedermolekularen Polyethylenimininen (PEI), die durch kovalente Kopplung mit der Aminosäure Tyrosin (Tyr; Y) modifiziert sind, wobei der Grad der Modifizierung mit Tyrosin zwischen 20 bis 50%, bevorzugt zwischen 25 bis 40%, liegt; oder Polypropylenimin-Dendrimern (PPI), die durch kovalente Kopplung mit der Aminosäure Tyrosin (Tyr; Y) modifiziert sind, wobei der Grad der Modifizierung mit Tyrosin zwischen 30 bis 65%, bevorzugt zwischen 40 bis 60 %, liegt mit Nukleinsäuren.



**Beschreibung**

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

## Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Mittel umfassend eine Zusammensetzung, ein Verfahren zu ihrer Herstellung sowie deren Verwendung für den nicht-viralen Transfer von Nukleinsäuren in lebende Zellen, insbesondere in schwer-transfizierbare Zellen, sowie für Anwendungen in vivo. Die erfindungsgemäße Zusammensetzung erlaubt beispielsweise die in vitro Transfektion in Zellkultur, und hier vor allem auch in schwer-transfizierbare Zellen, sowie eine Anwendung in vivo, in therapeutischen Verfahren.

## Kurze Beschreibung des Stands der Technik

**[0002]** Das Einbringen von fremder DNA oder RNA in Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Für die Transfektion stehen unterschiedliche Techniken und damit auch unterschiedliche Mittel und Methoden zur Verfügung. Die jeweils geeignete Methode hängt sowohl von der zu transfizierenden DNA oder RNA ab als auch vom Zelltyp, in welchen die Nukleinsäuren eingebracht werden sollen.

**[0003]** Die Nukleinsäuren umfassen alle Arten von DNA- und RNA-basierten Nukleinsäuren mit oder ohne chemische Modifikationen zum Zweck des Einbringens eines Gens, zum Herbeiführen eines Gen-Knockdowns oder für eine andere Art der Intervention (z.B. Hemmung einer miRNA). Die vorliegende Erfindung eignet sich besonders für das Einbringung kleiner RNA-Moleküle, wie sog. „small interfering RNAs“ (siRNAs), microRNAs (miRNAs, miRNA mimics), microRNA-Inhibitoren (antimiRs, antiseeds o.ä.) und andere RNA-, DNA- oder RNA/DNA-Oligonukleotide, einzel- oder doppelsträngig, mit oder ohne chemische Modifikationen.

**[0004]** Die Verwendung von Nukleinsäuren, speziell von RNA-Molekülen, erfordert Formulierungen zur Verpackung und Einschleusung in Zellen. Während dies in vitro, also zumeist in der Zellkultur durch so genannte Transfektionsreagenzien gelöst werden kann, stehen hierfür in vivo derzeit keine befriedigenden oder für die Zellen mancher Organe gar keine Lösungen zur Verfügung. In vitro ist zudem das Problem bei schwer transfizierbaren Zellen nur unzureichend gelöst.

**[0005]** Aus dem Stand der Technik sind viral basierte Transfersysteme bekannt, die für den Transfer virale Vektoren verwenden. Im Bereich der nicht-viralen Transfersysteme sind u.a. Liposomen, polymere Nanopartikel, anorganische Nanopartikel oder physikalische Methoden wie Elektroporation oder Magnetofektion, alleine oder in Kombination, im Stand der Technik beschrieben. Weiterhin werden chemisch modifizierte Nukleinsäuren mit kovalent gekoppelten Molekülen (z.B. GalNAc) zur Einschleusung verwendet.

**[0006]** Bei viralen Systemen kann als nachteilig angesehen werden, dass diese nicht zur Formulierung von RNA-Molekülen geeignet sind. Zudem zeigen derartige Systeme diverse Probleme bezüglich Sicherheit, Immunogenität, Upscaling, Nebenwirkungen und Beladungskapazität.

**[0007]** Nukleinsäure-Konjugate verhindern in vivo nicht eine renale Ausscheidung und zeigen häufig unzureichende Effizienz. Vor allem sind sie aber nur für Zellen ganz bestimmter - weniger - Organe geeignet (vor allem der Leber).

**[0008]** Nanopartikel aus dem Stand der Technik sind in vitro nicht für alle Zellen geeignet und zeigen vor allem Schwächen bei schwer transfizierbaren Zellen. Das stellt eine erhebliche Limitierung für viele in vitro Anwendungen dar.

**[0009]** Viele der aus dem Stand der Technik bekannten Transfektionssysteme sind nicht für eine in vivo Anwendung geeignet. Sie zeigen eine nicht zufriedenstellende Bioverteilung, unzureichende Biokompatibilität, unzureichende Stabilität, schlechte Effizienz bezüglich der zellulären Aufnahme und eine schlechte Effizienz im Hinblick auf die intrazelluläre Freisetzung der Nukleinsäure im richtigen subzellulären Kompartiment. Zudem sind sie häufig vom Aufbau her chemisch und/oder physikalisch komplex und empfindlich gegenüber biologischen Medien, speziell Serumproteinen. Das stellt eine erhebliche Limitierung für in vivo Anwendungen dar, weshalb diese oftmals unmöglich sind.

**[0010]** Die publizierte europäische Patentanmeldung EP 2 229 445 A2 bezieht sich auf eine als Transfektionsmittel nützliche Zusammensetzung, die sich aus mit aromatischen Aminosäuren modifizierten Polyaminen und kleinen doppel- oder einzelsträngigen RNAs zusammensetzt, die der RNA-Interferenz dienen.

**[0011]** Die Veröffentlichung von Ewe und Kollegen (Ewe et al., *J Control Release*, 28, 230, S.13-25, 2016) offenbart ein neuartiges Tyrosin-modifiziertes niedermolekulares verzweigtes Polyethylenimin für die effiziente siRNA-Verabreichung *in vitro* und *in vivo*. Die Autoren beschreiben die Synthese eines neuartigen verzweigten Tyrosin-modifizierten niedermolekularen Polyethylenimins (P10Y) für eine effiziente siRNA-Komplexierung und -Verabreichung. Der Vergleich mit den jeweils unmodifizierten PEIs zeigt, dass die Knockdown-Wirksamkeit durch die Tyrosin-Modifikation, wie sie in verschiedenen Reporterzelllinien bestimmt wurde, ohne nennenswerte Zytotoxizität erheblich gesteigert wird. Darüber hinaus beschreiben die Autoren optimale Bedingungen für die Komplex-Präparation sowie für die Lagerung oder Lyophilisierung der Komplexe ohne Verlust der biologischen Aktivität. Über die Reporterzelllinien hinaus vermitteln P10Y/siRNA-Komplexe den effizienten Knockdown von endogenen Zielgenen und, nach dem Knockdown des anti-apoptotischen Onkogens Survivin, tumorzellinhibierende Effekte in verschiedenen Karzinomzelllinien. Die Publikation von Ewe und Kollegen, die das System weiter in Richtung seiner therapeutischen *in vivo*-Anwendung vorantreibt, zeigt bei Mäusen die Verabreichung intakter siRNAs und ausgeprägter Biodistributionsprofile nach systemischer (intravenöser oder intraperitonealer) Injektion. Es werden keine unerwünschten Wirkungen (Hepatotoxizität, Immunstimulation/Veränderungen des Immunphänotyps, Gewichtsverlust) beobachtet. Wichtiger ist, dass bei systemischer Applikation von P10Y/siRNA-Komplexen zum siRNA-vermittelten Onkogen-Knockdown tiefgreifende tumorhemmende Wirkungen in einem Melanom-Xenotransplantat-Mausmodell beobachtet werden konnten, was auf die therapeutische Wirksamkeit von P10Y/siRNA-Komplexen hinweist. Zusammengefasst lehrt das Dokument ein verzweigtes Tyrosin-modifiziertes PEI (P10Y) als effiziente Plattform für die siRNA-Verabreichung *in vitro* und *in vivo* und identifiziert optimale Präparations- und Lagerbedingungen sowie physikochemische und biologische Eigenschaften von P10Y-Komplexen.

**[0012]** Eine weitere Studie von Ewe und Kollegen aus dem Jahr 2019 (Ewe et al., *Pharmaceutics*, 12, 11 (11), 2019) bezieht sich auf die chemische Modifikation von Polyethylenimin (PEI), die einen besonders attraktiven Weg zur Entwicklung effizienterer nichtviraler Verabreichungssysteme bieten. Das Dokument lehrt verzweigte Tyrosin-modifizierte Polyethylenimine mit niedrigem oder sehr niedrigem Molekulargewicht (P2Y, P5Y, P10Y) für die siRNA-Verabreichung. Im Vergleich zu ihren jeweiligen Ausgangs-PEIs, zeigen sie deutlich erhöhte Knockdown-Effektivitäten und eine sehr geringe Zytotoxizität bei Tyrosin-Modifikation, wie sie in verschiedenen Reporter- und Wildtyp-Zelllinien bestimmt wurden. Die Verabreichung von siRNAs, die auf das antiapoptotische Onkogen Survivin oder die Serin/Threonin-Proteinkinase PLK1 (polo-like kinase 1; PLK-1) als Zielmolekül ausgerichtet sind, zeigt *in vitro* starke hemmende Effekte. In einer therapeutischen *in vivo*-Umgebung werden bei systemischer Anwendung von Komplexen für Survivin oder PLK1-Knockdown in Abwesenheit von *in vivo*-Toxizität in einem Prostatakarzinom-Xenotransplantat-Mausmodell tiefgreifende Anti-Tumor-Wirkungen beobachtet. Das Dokument demonstriert die Tyrosin-Modifikation von (sehr) niedermolekularen verzweigten PEIs zur Erzeugung effizienter Nanocarrier für die siRNA-Verabreichung *in vitro* und *in vivo*, präsentiert Daten zu ihren physikochemischen und biologischen Eigenschaften und zeigt ihre Wirksamkeit als siRNA-Therapeutikum *in vivo* bei Abwesenheit von Nebenwirkungen.

**[0013]** Im Jahr 2017 veröffentlichten Ewe und Kollegen (*Drug Deliv Transl Res*, 7(2), p. 206-216) Ergebnisse zur Optimierung von verzweigten Polyethylenimin (PEI)-basierten Nanopartikeln für die siRNA-Verabreichung, die *in vitro* und *in vivo* in einem *ex vivo*-Tumorgewebsschnitt-Kulturmodell analysiert wurden. Das Dokument präsentiert Daten zu verschiedenen Polyplex-Modifikationen für die definierte Verbesserung der physikochemischen und biologischen Nanopartikeleigenschaften und für eine gezielte Verabreichung. Über die Tumorzellkulturen hinaus werden die Analysen auf Tumorschnittkulturen aus Tumor-Fremdtransplantat-Geweben ausgedehnt, die die *in vivo*-Situation realistischer widerspiegeln. Die Bestimmung des siRNA-vermittelten Knockdowns von endogenen Zielgenen, d.h. des onkogenen Überlebensfaktors Survivin und der onkogenen Rezeptor-Tyrosinkinase HER2, zeigt die Penetration von Nanopartikeln und die biologische Wirksamkeit auch unter intakten Gewebe- und Stroma-Bedingungen.

**[0014]** In weiteren Publikationen (Ewe et al., *Eur J Lipid Sci Technol*, 116(9), p.1195-1204; Ewe et al., *Acta Biomater*, 10, p. 2663-2673; Hobel et al., *Anal Chem*, 86(14), p.6827-6835; Ewe et al., *Nanomedicine*, 13 (1), p. 209-218; Ewe et al., *Drug Deliv Transl Res*, 7(2), p. 206-216) werden die Kombination von chemisch nicht-modifizierten Polyplexen, basierend auf verzweigtem PEI, mit Phospholipid-Liposomen unter Bildung ternärer Komplexe („Lipopolyplexe“) beschrieben, die die günstigen Eigenschaften von PEI- und Lipidsystemen kombinieren. Einige Lipopolyplexe erlauben auch eine längere Lagerung, wodurch Formulierungen mit höherer Stabilität entstehen. Ferner wurde die ligandenvermittelte Aufnahme von Komplexen durch Kopplung

von Liganden von Zelloberflächenproteinen an verzweigte PEIs beschrieben. Hierbei ist die Abschirmung von Oberflächenladungen eine entscheidende Voraussetzung, die z.B. durch PEI-Pfropfung mit Polyethylenglykol (PEG) vor der kovalenten Kopplung von Anti-HER1-Antikörpern (Erbix®) als Ligand für die gezielte Abgabe und Aufnahme realisiert wird. Über die Tumorzellkulturen hinaus wurden die Analysen dieser Präparate auch auf Tumorschnittkulturen aus Tumor-Fremdtransplantat-Geweben ausgedehnt, die die in vivo-Situation realistischer widerspiegeln.

**[0015]** Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein System umfassend polymere Nanopartikel zur hocheffizienten in vitro Einschleusung von Nukleinsäuren zur Verfügung zu stellen, das vor allem auch für den Transfer in schwer transfizierbare Zellen im Sinne der u.g. Definition geeignet ist. Es soll ermöglicht werden, auch mit diesen Anforderungen ein einfaches, effizientes und biokompatibles System zur Einschleusung von Nukleinsäuren in vitro, ex vivo und in vivo zur Verfügung zu haben. Das erfindungsgemäße System soll sich daher auch durch seine Stabilität gegenüber Serumproteinen auszeichnen und somit auch in therapeutischen Anwendungen verwendbar sein.

**[0016]** Zur Lösung dieser Aufgabe werden keine verzweigten, sondern lineare Polyethylenimine (PEIs) sowie Polypropylen-Dendrimere als Grundgerüst verwendet. Lineare PEIs sind aus verschiedenen Gründen besonders interessant. So wurden Synthese-Bedingungen soweit optimiert, dass bei linearen PEIs - im Gegensatz zu verzweigten PEIs - Polymere mit einer besonders engen Größenverteilung und besonders kleinen Chargenvariabilitäten hergestellt werden können. Auch sind Variationen im Mengenverhältnis primärer : sekundärer : tertiärer Amine ausgeschlossen (Tauhardt et al., Macromol. Chem. Phys. 212, 1918-1924 (2011); von Harpe et al., J Control Release, 309-322 (2000)). Lineare PEIs zeichnen sich ferner durch höhere Biokompatibilität im Vergleich zu verzweigten PEIs aus, so dass sie bereits in klinischen Studien für den Transfer längerer Nukleinsäuren (z.B. Plasmid-DNA) eingesetzt wurden. Für den Transfer kurzer Oligonukleotide, speziell kleiner RNA-Moleküle, sind sie jedoch aufgrund einer unzureichenden Komplexierungseffizienz weitgehend ungeeignet. Gleichfalls zeichnen sich Polypropylen (PPI)-Dendrimere durch besondere Eigenschaften aus wie z.B. einer definierten Struktur mit einem definierten Molekulargewicht. PPI-Dendrimere haben in der inneren Struktur nur tertiäre Amine und in der äußeren Peripherie primäre Amine, dadurch lassen diese sich definierter chemisch modifizieren als beispielsweise verzweigte PEIs.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0017]** Die vorliegende Erfindung stellt eine Zusammensetzung zur Verfügung, umfassend Komplexe aus einer Mischung aus

- linearen niedermolekularen Polyethylenimin (PEI), die durch kovalente Kopplung mit der Aminosäure Tyrosin (Tyr; Y) modifiziert sind, wobei der Grad der Modifizierung mit Tyrosin zwischen 20 bis 50%, bevorzugt zwischen 25 bis 40%, liegt; und/oder
- Polypropylenimin-Dendrimere (PPI), die durch kovalente Kopplung mit der Aminosäure Tyrosin (Tyr; Y) modifiziert sind, wobei der Grad der Modifizierung mit Tyrosin zwischen 30 bis 65%, bevorzugt zwischen 40 bis 60 %, liegt

mit Nukleinsäuren.

**[0018]** In einem weiteren Aspekt der Erfindung ist vorgesehen, dass die molekulare Masse der linearen PEIs zwischen 2 bis 25 kDa, bevorzugt zwischen 2 bis 10 kDa, beträgt.

**[0019]** Weiterhin ist erfindungsgemäß vorgesehen, dass das Dendrimer in einer Generation zwischen G3 bis G5 vorliegt.

**[0020]** In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann es sich bei der Nukleinsäure um RNA oder ein kurzes DNA-Oligonukleotid handeln, wobei die Nukleinsäure ausgewählt sein kann aus der Gruppe umfassend siRNAs, microRNAs (miRNAs, miRNA mimics), microRNA-Inhibitoren (antimiRs, antiseeds o.ä.), oder anderen RNA-, DNA- oder RNA/DNA-Oligonukleotiden, einzel- oder doppelsträngig, mit oder ohne chemische Modifikationen.

**[0021]** Erfindungsgemäß kann die Größe der Komplexe zwischen 100 nm bis 1 µm betragen.

**[0022]** In einem weiteren Aspekt der Erfindung können die Komplexe eine negative Oberflächenladung aufweisen.

**[0023]** Die Zusammensetzung kann in einer weiteren Ausführungsform einen Zusatz von Serum- oder anderen Proteinen, oder anderen Zusatzstoffen, die eine Protein-analoge Corona um den Komplex bilden können, umfassen

**[0024]** Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1, die folgenden Schritte umfassend

- a. Herstellen einer ersten Lösung mit einem definierten Volumen umfassend eine zuvor berechnete Masse des gereinigten Polymers in einer definierten wässrigen Lösung, bevorzugt in einer Pufferlösung bestehend aus anorganischen Salzen und/oder organischen Carbonsäuren/Sulfonsäuren, mit Zusatz eines Salzes und/oder eines Kohlenhydrats und mit einem pH-Wert zwischen 4,5 bis 8,0,
- b. Herstellen einer zweiten Lösung umfassend eine zuvor berechnete Masse einer Nukleinsäure in einer definierten, mit der Polymerlösung identischen oder davon abweichenden wässrigen Lösung, bevorzugt in einer Pufferlösung mit Zusatz eines Salzes und/oder eines Kohlenhydrats, besonders bevorzugt eine Pufferlösung bei einem pH von 4,5 bis 8,0,
- c. Mischung der ersten und zweiten Lösung,
- d. Inkubation der Mischung, bevorzugt für 15 min bis 1,5 h, besonders bevorzugt für 15 bis 45 min bei Raumtemperatur.

**[0025]** In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens kann als Nukleinsäure RNA verwendet werden, wobei die RNA ausgewählt sein kann aus der Gruppe umfassend siRNAs, microRNAs (miRNAs, miRNA mimics), microRNA-Inhibitoren (antimiRs, antiseeds o.ä.), oder anderen RNA-, DNA- oder RNA/DNA-Oligonukleotiden, einzel- oder doppelsträngig, mit oder ohne chemische Modifikationen.

**[0026]** In einem weiteren Aspekt das Verfahren betreffend kann der Zusammensetzung bei ihrer Herstellung oder im Anschluss daran Proteine in einer Konzentration von 5% bis 50 %, bevorzugt Serumproteine, zugegeben werden.

**[0027]** Es ist erfindungsgemäß auch vorgesehen, dass eine lagerstabile Formulierung hergestellt wird, bevorzugt durch Lyophilisieren oder Einfrieren.

**[0028]** In einem weiteren Aspekt in Bezug auf das Verfahren ist vorgesehen, dass die erste und zweite Lösung einen pH von 7,4 haben.

**[0029]** Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer Zusammensetzung wie zuvor beschrieben zur Transfektion schwer transfizierbarer Zellen.

**[0030]** Die Erfindung betrifft auch die Verwendung einer Zusammensetzung, wie oben beschrieben, in vitro, insbesondere in einer 2D- oder 3D-Zellkultur, ex vivo, insbesondere bei in Zellkultur gehaltenem Gewebe, oder in vivo, insbesondere im lebenden Organismus zur Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen.

**[0031]** Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der zuvor beschriebenen Zusammensetzung zur gezielten Beeinflussung (patho-)physiologischer Prozesse, bevorzugt zum Gene-Silencing / Gene-Targeting, speziell zum Knockdown einer kodierenden oder nicht-kodierenden RNA, oder zum miRNA replacement oder zur Inhibition einer miRNA.

**[0032]** Die Erfindung betrifft auch die Verwendung einer Zusammensetzung, wie zuvor beschrieben, zur Einbringung einer Nukleinsäure, insbesondere einer modifizierten oder nicht-modifizierten RNA zur Induktion von CRISPR-Cas, zum Zwecke der Modifikation oder Deaktivierung eines Gens.

**[0033]** Letztlich betrifft die vorliegende Erfindung auch noch die Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Einbringung einer Nukleinsäure zum Zwecke der Induktion eines Splice-Switching.

**[0034]** Weitere Aspekte, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung ergeben sich ohne weiteres aus der folgenden detaillierten Beschreibung, in der einfach bevorzugte Ausführungsformen und Implementierungen dargestellt sind. Die vorliegende Erfindung kann auch in anderen und unterschiedlichen Ausführungsformen verwirklicht werden und ihre verschiedenen Details können in verschiedenen, offensichtlichen Aspekten modifiziert werden, ohne Lehre und Umfang der vorliegenden Erfindung zu verlassen. Dementsprechend sind

die Zeichnungen und Beschreibungen als veranschaulichend und nicht als einschränkend anzusehen. Zusätzliche Aufgaben und Vorteile der Erfindung werden teilweise in der folgenden Beschreibung dargelegt und werden teilweise aus der Beschreibung offensichtlich oder können der Ausführung der Erfindung entnommen werden.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ABBILDUNGEN

**[0035]** Die Erfindung wird im Folgenden anhand von Abbildungen näher dargestellt. Dabei ist für den Fachmann offensichtlich, dass es sich nur um mögliche, beispielhafte Ausführungsformen handelt, ohne dass die Erfindung auf die gezeigten Ausführungsformen beschränkt wird. Der Schutzbereich wird durch die Ansprüche und er zugrundeliegenden Lehre und den sich daraus ergebenden Äquivalenten definiert. Für den Fachmann ergibt sich, dass Merkmale einer Ausführungsform auch mit Merkmalen anderer gezeigter oder beschriebener Ausführungsformen kombiniert werden können, wobei PEI für Polyethylenimin, PPI für Polypropylenimin Dendrimer, Y für Tyrosin, eine Zahl für die Masse in kDa und G für die Generation eines PPI-Dendrimers steht. Diese Zahlenangabe der Generation hinter dem Buchstaben G ist dabei definiert als die Anzahl der sukzessiven Kettenelongationsschritte, die jeweils zu einer neuen „Schicht“ im so wachsenden Dendrimer führen. Die Begriffe „Komplex“ und „Nanopartikel“ werden synonym verwendet.

**[0036]** Fig. 1A-C zeigt die Komplexierungseffizienzen verschiedener Polymere. LP = Lineares PEI; [Zahl] = Molekulargewicht der Ausgangspolymere; Y = Tyrosin-modifiziert.

**[0037]** Fig. 2A, B zeigt die Stabilität verschiedener Polymer/siRNA-Komplexe gegenüber dem anionischen Polysaccharid Heparin.

**[0038]** Fig. 3A-D zeigt die Luciferase-Expression nach Transfektion von Polymer/siRNA Komplexen in stabil Luciferase-exprimierenden H441-Luc Zellen.

**[0039]** Fig. 4 zeigt den Vergleich des Luciferase-Knockdowns eines PPI-Dendrimers und eines Tyrosin-modifizierten PPI-Dendrimers (PPI-G4-Y) bei verschiedenen Polymer/siRNA Massenverhältnissen in PC3-Luc Zellen.

**[0040]** Fig. 5 zeigt: Oben: Mikroskopische Aufnahme von H441-Luc Zellen nach Behandlung mit freiem Polymer (10 kDa lin. PEI (LP10) und dem Tyrosin-modifizierten Gegenstück, LP10Y) bzw. deren siRNA-Komplexen. Unten: Laktat-Dehydrogenase-Freisetzung nach Transfektion von siRNA-Komplexen, basierend auf verschiedenen unmodifizierten bzw. Tyrosin-modifizierten linearen PEIs.

**[0041]** Fig. 6 zeigt: Oben Mikroskopische Aufnahme von G55T2 Glioblastomzellen nach Transfektion verschiedener siRNA-Mengen für die Komplexe des LP10Y und des Tyrosin-modifizierten PPI-Dendrimers. Unten: Laktat-Dehydrogenase-Freisetzung nach Transfektion von siRNA-Komplexen beider Polymere.

**[0042]** Fig. 7 zeigt eine Vitalitätsmessung in PC-3 Prostatakarzinomzellen nach Transfektion mit LP10Y/siRNA und PPI-G4-Y/siRNA Komplexen in verschiedenen Konzentrationen.

**[0043]** Fig. 8A, B zeigt: A) Erythrozyten-Aggregationstest und B) Hämoglobin-Freisetzung aus Erythrozyten nach Kontakt mit LP10Y/siRNA und PPI-G4-Y/siRNA Komplexen.

**[0044]** Fig. 9A-C zeigt den Effekt von fötalem Kälberserum (FCS) auf die biologische Aktivität von LP10Y/siRNA Nanopartikeln bei verschiedenen Lagertemperaturen.

**[0045]** Fig. 10 zeigt die Etablierung von geeigneten Formulierungen von LP10Y/siRNA Komplexen für die Langzeitlagerung.

**[0046]** Fig. 11A, B zeigt: A 1-4) siRNA-vermittelte Knockdown-Effizienz bei verschiedenen schwer transfizierbaren Zelllinien für verschiedene Tyrosin-modifizierte Polymere. B 1-4) Direkter Vergleich der EGFP-Knockdown Effizienz verzweigter und linearer Tyrosinmodifizierter PEIs mit unterschiedlichen Molmassen.

**[0047]** Fig. 12A-C zeigt den konzentrationsabhängigen Knockdown von zwei Reportergenen nach Transfektion mit LP10Y/siRNA Komplexen in schwer transfizierbaren MV4-11-Luc/EGFP Zellen (Fig. 12A: EGFP; Fig. 12B: Luciferase; Daten erhoben nach Optimierung des Komplexierungspuffers). C) Vergleich des Lucife-

rase-Knockdowns für Komplexe basierend auf den effizientesten Polymeren LP10Y und PPI-G4-Y in MV4-11-Luc/EGFP Zellen bei 3µg siRNA.

**[0048] Fig. 13** zeigt: Mikroskopische Aufnahmen 72 h nach Transfektion von 3 µg siRNA für alle Komplexe basierend auf unmodifizierten bzw. Tyrosin-modifizierten PEIs (verzweigt bzw. linear). Unabhängig von einer effizienten Transfektion war durch die Tyrosin-Modifikation die Toxizität der PEI-Komplexe deutlich verringert.

**[0049] Fig. 14A-C** zeigt einen direkten Vergleich der Luciferase-Knockdown-Effizienzen der Komplexe und Effekte der Tyrosin-Modifikation aller verzweigten PEIs (A), linearen PEIs (B) und PPI-Dendrimere (C) in Abhängigkeit der siRNA Menge in HT29-EGFP/Luc Zellen.

**[0050] Fig. 15 A-C** zeigt in A) den EGFP-Knockdown in der murinen Makrophagen-Zelllinie Raw264.7-EGFP/Luc. In B) den GAPDH-Knockdown nach Transfektion von PPI-G4-Y/siRNA Komplexen in Raw264.7 Zellen und in C) die Luciferase-Expression von THP-1-EGFP/Luc Zellen nach Differenzierung zu Makrophagen und anschließender Transfektion.

**[0051] Fig. 16A, B** zeigt Ergebnisse der qRT-PCR nach Transfektion von schwer transfizierbaren HROC24 Zellen mit LP10Y/siRNA Komplexen zum Knockdown der Onkogene PLK1 bzw. Survivin. C) Zellproliferation nach Transfektion gemessen über mehrere Tage.

**[0052] Fig. 17** zeigt Ergebnisse der qRT-PCR nach Transfektion von schwer transfizierbaren MV4-11 Zellen mit LP10Y/siRNA Komplexen gerichtet gegen die Onkogene PLK1 (A) und Survivin (B). Zellproliferation 6 d nach Transfektion (C).

**[0053] Fig. 18** zeigt Durchlicht- und Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von PC3-Luc/EGFP Sphäroiden nach Transfektion mit LP10Y/siRNA Komplexen. Bei PC3-Zellen handelt es sich zwar nicht um eine schwer-transfizierbare Zelllinie, doch tritt durch die Dreidimensionalität der Spheroide eine Verschlechterung der Zugänglichkeit ein. Dennoch werden hier gute Effizienzen beobachtet.

**[0054] Fig. 19** zeigt einen schematischen Überblick von der Präparation der Tumor-Tissue-Slice Kulturen.

**[0055] Fig. 20A, B** zeigt Ergebnisse von Tumor-Tissue-Slice Kulturen aus Tumor-Xeno-transplantaten von schwer transfizierbaren HROC24-Zellen. Wie im Falle der Spheroide tritt hier durch die dreidimensionale Gewebestruktur eine Verschlechterung der Zugänglichkeit ein. Dennoch werden hier gute Knockdown-Effizienzen beobachtet. So reduzierte die LP10Y/siRNA Transfektion das Zielgen GAPDH auf mRNA-Ebene (A, qRT-PCR) und auf Protein-Ebene (B, Western Blot).

**[0056] Fig. 21** zeigt die Ergebnisse einer Genotoxizitätsstudie (COMET-Assay). Es wird für LP10Y keine, für das nicht Tyrosin-modifizierte Ausgangspolymer LP10 dosisabhängig eine geringe Genotoxizität beobachtet. Oben: Original-Photographien, unten: Quantifizierung.

**[0057] Fig. 22A-C** zeigt Ergebnisse zur in vivo Biokompatibilität und Bioverteilung von LP10Y/siRNA-Komplexen. (A) Es wird in immunkompetenten Mäusen unter Behandlung mit LP10Y/siRNA Komplexen keine Erhöhung der Zytokine TNFα oder INFγ beobachtet. (B) Auch bei wiederholter Behandlung von Mäusen ist kein Einfluss auf das Körpergewicht zu verzeichnen. (C) Eine Bioverteilungsstudie mit [<sup>32</sup>P]-markierter, LP10Y-komplexierter siRNA zeigt nach systemischer Applikation der Komplexe die Einschleusung intakter siRNA (Gelbände in der Autoradiographie) in verschiedene Organe. Der Umfang ist abhängig von der Injektionsart (intravenös (iv) oder intraperitoneal (ip)).

**[0058] Fig. 23A-C** zeigt Ergebnisse der LP10Y/siRNA Therapiestudie in vivo. Die Komplexe wurden systemisch über intraperitoneale Injektion appliziert. A) Tumorwachstum der einzelnen Behandlungsgruppen. B) Exemplarische Bilder von Mäusen aus den jeweiligen Gruppen. C) Western Blot von Tumorklysaten (gepoolte Gruppen = Mittelwert der einzelnen Behandlungsgruppen).

#### AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0059]** Die zuvor formulierte Aufgabe der Erfindung wird durch die Merkmale der unabhängigen Ansprüche gelöst. Die abhängigen Ansprüche decken weitere spezifische Ausführungsformen der Erfindung ab.

**[0060]** Die vorliegende Erfindung basiert darauf, die zu formulierende und einzuschleusende Nukleinsäure (im Folgenden als RNA bezeichnet) durch Kombination mit ausgewählten Polymeren in Nanopartikel zu verpacken.

**[0061]** Insbesondere umfasst dies kleine RNA-Moleküle, wie sog. „small interfering RNAs“ (siRNAs), microRNAs (miRNAs, miRNA mimics), microRNA-Inhibitoren (antimiRs, antiseeds o.ä.) und andere RNA-, DNA- oder RNA/DNA-Oligonukleotide, einzel- oder doppelsträngig, mit oder ohne chemische Modifikationen.

**[0062]** Die vorliegende Erfindung liegt auf dem Gebiet des nicht-viralen Transfers von RNA in lebende Zellen, sie ist z.B. vorgesehen für in vitro (Zellkultur) und in vivo (therapeutische Applikation im lebenden Organismus). Die in vitro Transfektion umfasst im Wesentlichen Säugerzellen, bezieht sich aber auch auf Zellen anderer Organismen, und bezieht sich vor allem auch auf schwer transfizierbare Zellen, d.h. Zellen, in denen die Einbringung von Nukleinsäuren mit anderen Methoden nur schwer bzw. nur ineffizient möglich ist.

**[0063]** Als schwer transfizierbare Zellen werden Zellen definiert, die mit chemischen Methoden (= nicht-viralen Transfersystemen) nicht bzw. nur unzureichend transfiziert werden können. Hierzu zählen z.B.: Immunzellen (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Lymphozyten, NK-Zellen, B-Zellen, T-Zellen), einige Tumorzelllinien des Colons (z.B. HT29, HCT116, HROC24) sowie viele Tumorzelllinien, die in Suspension wachsen (z.B. H69 u.a.). Auch viele primäre Tumorzellen oder Stammzellen werden hierzu gerechnet.

**[0064]** Die in vivo-Anwendung bezieht sich auf Zellen von Säugetieren, im Wesentlichen menschlicher und tierischer Zellen, und umfasst lokale oder systemische Applikationen, einschließlich therapeutischer Anwendungen.

**[0065]** Im Sinne der vorliegenden Beschreibung der Erfindung sollen unter dem Begriff „Nanopartikel“ oder „Komplexe“ Partikel mit einer Partikelgröße von 100 nm bis maximal 1 µm verstanden werden. Der Begriff „polymere Nanopartikel“ bezieht sich darauf, dass die Nanopartikel gemäß der vorliegenden Erfindung Polymere als Bestandteil aufweisen. Konkret handelt es sich um niedermolekulare Polyethylenimine (PEI; P), lineare, niedermolekulare Polyethylenimine (LPEI; LP) oder strukturell definierte Polypropylenimin-Dendrimere (PPI), die durch kovalente Kopplung mit der Aminosäure Tyrosin (Tyr; Y) modifiziert sind (LP-Y, PPI-Y). Aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen LP-Y/PPI-Y und RNA sowie auch aufgrund anderer physikalischer Eigenschaften der Tyrosin-modifizierten Polymere kommt es zur Ausbildung von Nanopartikeln. Diese vermitteln den Schutz der RNA gegen enzymatischen und nicht-enzymatischen Abbau, die zelluläre Aufnahme und die intrazelluläre Freisetzung ins Zytoplasma der Zelle. Die RNA kann anschließend aus dem Komplex wieder freigesetzt werden.

**[0066]** Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Tyrosin-Modifikation gestattet es, dabei wesentlich kleinere lineare PEIs bzw. PPIs (2 - 10 kDa) in wesentlich geringeren Polymer/RNA-Mischungsverhältnissen (N/P-Verhältnis) einzusetzen.

**[0067]** Überraschenderweise zeichnen sich die entstehenden speziellen Nanopartikel nicht nur durch höhere Stabilität aus. Entscheidend ist vielmehr, dass hiermit Nanopartikel entstehen, die besonders gute Transfektionseigenschaften zeigen und sogar bei schwer transfizierbaren Zellen noch sehr gute Ergebnisse liefern. Beim direkten Vergleich zwischen verzweigten und linearen PEIs gilt dies insbesondere für die linearen Polymere.

**[0068]** Es werden polymere Nanopartikel beschrieben, die auf Tyrosin-modifizierten kleinen linearen PEI-Molekülen oder PPI-Dendrimern basieren und sich durch besondere Eigenschaften auszeichnen, die sie für die Einschleusung von RNA-Molekülen besonders geeignet machen.

**[0069]** Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden polymere Nanopartikel beschrieben, die auch bei schwer transfizierbaren Zellen noch eine hervorragende RNA-Einschleusung und RNA-Aktivität gewährleisten. Somit wird der nicht-virale Transfer von Nukleinsäuren in solche schwer transfizierbare Zellen durch die Gegenstände der vorliegenden Erfindung möglich.

**[0070]** Durch die gezielte Tyrosin-Modifikation sind für die Bildung dieser Nanopartikel sehr kurzkettige PEI-Moleküle (2 - 10 kDa) oder PPI-Dendrimere der Generationen G3/G4 ausreichend, die sonst nicht geeignet wären. Ferner können sie in sehr niedrigen Mengenverhältnissen (N/P-Verhältnis) eingesetzt werden.

**[0071]** Weiterhin zeigen die neuartigen polymeren Nanopartikel eine sehr hohe Stabilität in Anwesenheit von Serumproteinen und können unter Zusatz von fötalem Kälberserum (FCS) bei Raumtemperatur bzw. sogar bei 37°C gelagert werden, ohne ihre biologische Aktivität zu verlieren. Im Gegensatz dazu aggregieren Nano-



partikel der nicht Tyrosin-modifizierten Ausgangspolymere innerhalb kurzer Zeit und zeigen nur noch geringe biologische Aktivität.

**[0072]** Ein kritischer Punkt von therapeutischen Nanopartikeln ist die Partikelgröße, die entscheidend die Effizienz und die Bioverteilung in vivo beeinflusst. Die Nanopartikelgrößen der Tyrosin-modifizierten Polymere lassen sich durch eine gezielte Auswahl der Pufferbedingungen (hohe/niedrige Ionenstärke, pH-Wert) bei der Komplexierung einstellen. Es können somit Nanopartikel im Bereich von 100 nm bis 1µm hergestellt werden, die auch im höheren Größenbereich eine erstaunlich gute Transfektionseffizienz aufweisen. Eine hohe Transfektionseffizienz von Komplexen größer ca. 500 nm ist überraschend und ist, basierend auf der bisherigen Lehre und den üblichen Mechanismen einer zellulären Einschleusung, keinesfalls naheliegend.

**[0073]** Es wird somit möglich, eine effiziente nicht-virale Einschleusung von RNA in schwer transfizierbare Zielzellen in vitro bzw. ex vivo zu erzielen. Hierzu zählen z.B. hämatopoetische Zellen (relevant etwa bei Leukämien) oder Immunzellen (relevant u.a. in Immuntherapien) sowie mesenchymale Stammzellen (z.B. für regenerative Therapieansätze). Die Effizienz, welche mit den Mitteln der vorliegenden Erfindung erzielt werden kann, geht deutlich über die Effizienz bekannter Transfektionsschemikalien oder anderer Nanopartikel hinaus. Es entfällt somit insbesondere auch die Notwendigkeit, zusätzlich über physikalische Methoden (z.B. Elektroporation; sehr zellschädlich und ineffizient) eine Einschleusung zu realisieren.

**[0074]** Die Möglichkeit, mit besonders kleinen Mischungsverhältnissen, d.h. sehr kleinen Polymeranteilen, bereits effiziente Nanopartikel herstellen zu können, führt ferner zu einer verbesserten Verträglichkeit (Biokompatibilität) in vitro und in vivo. Darüber hinaus sind die Nanopartikel auch in vivo anwendbar.

**[0075]** Es ist bekannt, dass unter anderem die Oberflächenladung und die Größe von Nanopartikeln kritische Parameter für deren Aufnahme in Zellen sind. Dennoch ist es bei so genannten schwer transfizierbaren Zellen nicht möglich, hier gezielt Parameter einzustellen, die eine hinreichende Transfektionseffizienz realisieren. Es wurden daher überwiegend Ansätze einer „targeted delivery“ untersucht, bei der die Nanopartikel an ihrer Oberfläche für die Zielzelle spezifische Liganden tragen, die dann eine Bindung und Aufnahme vermitteln sollen. Dies hat diverse Nachteile:

- wenig effizient,
- technisch schwer zu realisieren,
- als Gesamtsystem zu kompliziert,
- kaum ein Upscaling möglich,
- funktioniert nur für ausgewählte Zellen,
- zu anfällig gegenüber biologischen Medien, z.B. bezüglich der Bildung einer Proteincorona, die die Liganden maskiert.

**[0076]** Es ist somit nicht naheliegend und keinesfalls aus dem Stand der Technik abzuleiten, dass eine vergleichsweise einfache, aber gezielte Modifikation von LPEI oder PPI mit Tyrosin (unter Beachtung kritischer Parameter wie beispielsweise des Tyrosin-Substitutionsgrads etc.) zu Nanopartikeln führt, die in überraschender Art und Weise die Aspekte Transfektionseffizienz vor allem auch bei schwer transfizierbaren Zellen - unter gleichzeitiger Beibehaltung einer guten Verträglichkeit / hohen Biokompatibilität - gewährleisten.

**[0077]** Die Tyrosin-Modifikation von PEI wurde bereits beschrieben, nicht jedoch die besondere Eignung für schwer transfizierbare Zellen (gilt innerhalb der PEIs insbesondere für die linearen Varianten - weitere Beschreibung folgt weiter unten).

**[0078]** Die Tyrosin-Modifikation von PPI wurde noch nicht beschrieben.

**[0079]** Weiterhin überraschend ist, wie die Struktur des modifizierten Polymers die Oberflächenladung (Zetapotenzial) der Nanopartikel maßgeblich beeinflusst. So besitzen Nanopartikel der Tyrosin-modifizierten PEIs ein positives Zetapotenzial, wie es für Nanopartikel mit kationischen Polymeren zu erwarten ist. Dahingegen können die Tyrosin-modifizierten PPI-Dendrimere nach der Komplexierung mit der RNA negativ-geladene Nanopartikel bilden.

**[0080]** Bemerkenswert ist in diesem Fall auch, dass diese negativ-geladenen Nanopartikel ebenfalls sehr hohe Stabilitäten, eine effiziente zelluläre Aufnahme sowie eine sehr gute Transfektionseffizienz aufweisen. Dies

sind besonders gewollte Eigenschaften für in vivo Anwendungen, da negativ-geladene oder neutrale Nanopartikel längere Zirkulationshalbwertszeiten im Blut zeigen und eine bessere Bioverteilung und bessere Biokompatibilität besitzen als positiv-geladene Nanopartikel. Meist gelingt dies sonst nur durch z.B. eine Ladungsschirmung mit Polyethylenglykol (PEG), was jedoch zu einer Verringerung der biologischen Aktivität führt. Im hier vorliegenden Fall wird somit auch die mittlerweile häufig als biologisch problematisch angesehene „PEGylierung“ vermieden, indem das Problem ganz anders, technisch einfacher und von der biologischen Effizienz und Verträglichkeit wesentlich zielführender gelöst wird.

**[0081]** Schließlich können deutlich kleinere Polymere verwendet werden (bis zu ca. Faktor 10 kleiner als der „Goldstandard 25 kDa PEI“).

**[0082]** Überraschend ist die verbesserte Wirksamkeit von Tyrosin-modifizierten linearen PEIs gegenüber Tyrosin-modifizierten verzweigten PEIs.

**[0083]** Überraschend ist auch die nochmalige Verbesserung der biologischen Aktivität beim Übergang von Tyr-modifizierten PEI zu Tyr-modifizierten PPI.

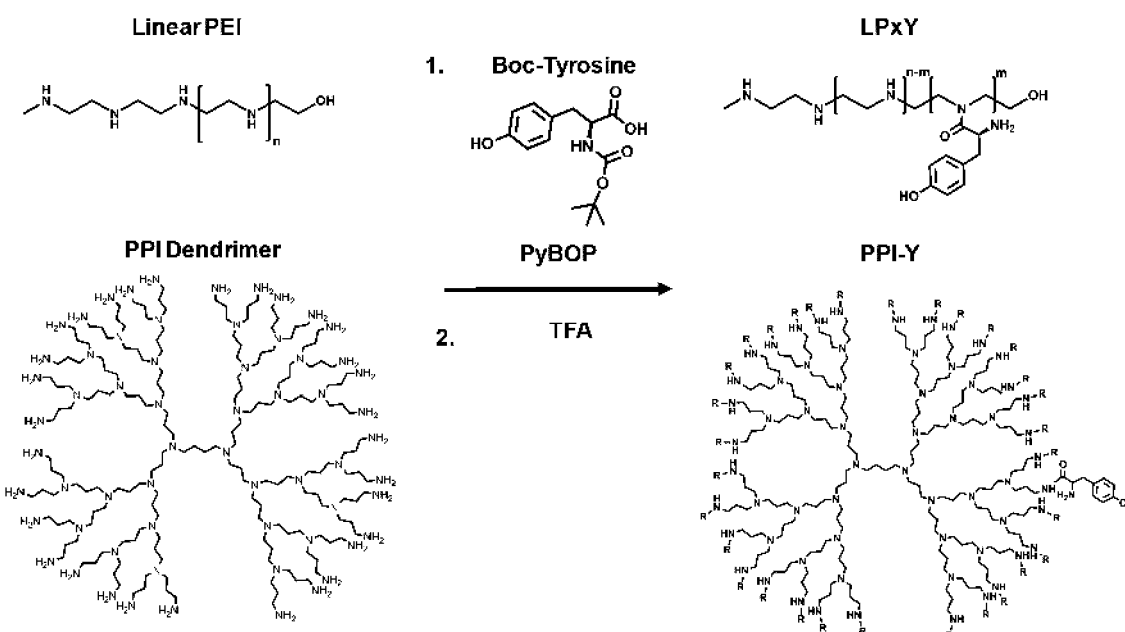
**[0084]** Die Erfindung gestattet neue Wege, therapeutische Nucleinsäuren in Zellen zu bringen und damit Nucleinsäuren als Therapeutika nutzbar zu machen.

**[0085]** In vivo (direkte Anwendung im Organismus) liegt eine besonders hohe Effizienz bei gleichzeitig besonders guter Biokompatibilität vor.

**[0086]** In vitro / ex vivo wird es möglich, im Rahmen einer Zelltherapie von Patienten Zellen zu entnehmen, ex vivo durch Einbringen einer Nucleinsäure gezielt zu modifizieren und anschließend wieder dem Patienten zu reinjizieren.

**[0087]** In der vorliegend beschriebenen Erfindung werden verschiedene kommerzielle, Amin-reiche Polymere (PEI, PPI) mittels Peptidkopplungsreagenzien mit N-Boc-geschütztem Tyrosin derivatisiert. Experimentelle Studien zeigten, dass der Modifizierungsgrad (Tyrosin : Polymermonomer) sehr kritisch ist und im Bereich von 25-40 % für die linearen PEIs liegen muss, um eine hohe biologische Effizienz der neuen Polymere zu erzielen. Bei den PPI-Dendrimern sollte der Tyrosin-Substitutionsgrad bezogen auf die äußeren primären Amine im Bereich von 40-60 % liegen.

**[0088]** Im Folgenden ist ein kurzes Reaktionsschema dargestellt:



**[0089]** Zur Herstellung wurde im ersten Schritt bei Raumtemperatur das Polymer in Dimethylformamid (DMF) gelöst und mit der Base Diisopropylethylamin (DIPEA) versetzt. Eine entsprechende Menge N-Boc geschütz-

tes Tyrosin wurde ebenfalls bei Raumtemperatur in DMF gelöst und unter Rühren wurde das Kopplungsreagenz PyBOP ((Benzotriazol-1-yl-oxytripyr-rolidinophosphonium-hexafluorophosphat) hinzugefügt. Die Mischung wurde für ca. 5 min inkubiert und anschließend unter Rühren zu der Polymerlösung gegeben. Der Reaktionsansatz wurde anschließend für 2 d bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Polymer durch Dialyse gegen Methanol von niedermolekularen Reaktanden und DMF gereinigt. Das gereinigte, in Methanol gelöste Polymer wurde mit einem deutlichen Überschuss Trifluoressigsäure (TFA) versetzt und über Nacht gerührt, um die Boc-Schutzgruppe am Tyrosin-Stickstoff zu entfernen. Danach wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Polymer mittels Dialyse (1 d in 0.1 M HCl, 2 d in dest. H<sub>2</sub>O) gereinigt. Nach Lyophilisation erhielt man weiße bis leicht bräunliche Schäume.

**[0090]** Die Herstellung der Polymer/siRNA-Komplexe erfolgte durch eine einfache Mischung beider Komponenten unter definierten Bedingungen. Zunächst wurden beide Komponenten in der zuvor berechneten Menge (Polymer/siRNA Massenratio) in separaten Reaktionsröhrchen in definierten Volumina eines Puffers (z.B. 0.15 M NaCl, 10 mM HEPES pH 7.4 oder 5 % Glucose, 20 mM HEPES pH 7.4 oder 10-20 % Trehalose, 20 mM HEPES pH 7.4 oder Mischungen aus diesen Puffern) verdünnt.

**[0091]** Die siRNA-Verdünnung wurde anschließend zu der Polymer-Verdünnung gegeben, sorgfältig durchmischt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert.

**[0092]** Fig. 1A-C zeigt die Komplexierungseffizienzen verschiedener Polymere. Eine konstante Menge an siRNA wurde mit verschiedenen Polymer/siRNA Massenverhältnissen, wie in der Abbildung angegeben, gemischt und für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Komplexe auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Eine vollständige siRNA-Komplexierung ist bei der Massenratio erfolgt, bei der keine freie siRNA-Bande mehr sichtbar ist (Vergleich mit freier siRNA, Pfeilmarkierung). Für die unmodifizierten linearen PEIs (Fig. 1A) erfolgt für alle getesteten Massenverhältnisse keine vollständige Komplexierung, wohingegen für alle Tyrosin-modifizierten Polymere (Fig. 1B, Fig. 1C) bereits partiell die siRNA ab der Ratio 1.25 und vollständig ab Ratio 2.5 gebunden wurde.

**[0093]** In Fig. 2A, B wird die Stabilität verschiedener Polymer/siRNA-Komplexe gegenüber dem anionischen Polysaccharid Heparin dargestellt. Der sog. „Heparin Displacement Assay“ imitiert in vitro das Dekomplexierungsverhalten von elektrostatisch gebildeten Nanopartikeln. Die Komplexe wurden mit einer Massenratio, wie in der Grafik angegeben, hergestellt, und mit aufsteigenden Mengen an Heparin gemischt und für 30 min inkubiert. Die freigesetzte siRNA (siehe Pfeil) wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese betrachtet. Für alle Tyrosin-modifizierten linearen PEIs (Fig. 2A) wie auch das Tyrosin-modifizierte PPI-Dendrimer (Fig. 2B) konnte keine siRNA durch Heparin freigesetzt werden, was für eine besondere Stabilität dieser Nanopartikel spricht.

**[0094]** Nach Komplexierung (d.h. Herstellung der Polymer/siRNA-Komplexe; s.o.) werden Nanopartikel definierter Größe und Oberflächenladung (Zetapotential) erhalten.

**[0095]** Tabelle 1 zeigt eine Auswahl an Komplexgrößen und Zetapotenzialen. Hier zeigt sich auch die Möglichkeit, wie durch die Wahl des Komplexierungspuffers die Partikelgröße variiert werden kann.

Tabelle 1

Polymer	Puffer	Größe (nm)	Zeta Potential (mV)
LP2.5Y	10 mM HEPES 150 mM NaCl	564.45 +/- 34.51	10.44 +/- 0.44
	20 mM HEPES 10 % Trehalose	159.2 +/- 0.7	21.36 +/- 0.94
LP5Y	10 mM HEPES 150 mM NaCl	759.83 +/- 25.02	0.22 +/- 0.16
	20 mM HEPES 10 % Trehalose	139.2 +/- 2.7	10.53 +/- 1.11
LP10Y	10 mM HEPES 150 mM NaCl	304.03 +/- 32.32	2.13 +/- 0.08

Polymer	Puffer	Größe (nm)	Zeta Potential (mV)
	20 mM HEPES 10 % Trehalose	134.6 +/- 1.1	23.58 +/- 2.98
LP25Y	10 mM HEPES 150 mM NaCl	628.66 +/- 68.91	8.34 +/- 6.93
	20 mM HEPES 10 % Trehalose	333.6 +/- 2.8	14.02 +/- 1.84
PPI-G4-Y	10 mM HEPES 0.1 NaCl	618.9 +/- 7.4	-8.8 +/- 1.6
	20 mM HEPES 75 mM NaCl 2.5 % Glucose	911.3 +/- 30.4	n.d.
	20 mM HEPES 10 % Trehalose,	1123 +/- 54.9	-5.9 +/- 7.4

**[0096]** Es fällt insbesondere auch auf, dass häufig sehr große Nanopartikel erhalten werden. Dass diese noch biologische Effizienz zeigen (s.u.), ist sehr überraschend und nach bisherigem Wissensstand / Stand der Technik keinesfalls zu erwarten.

**[0097]** In **Fig. 3A** ist die Luciferase-Aktivität nach siRNA-Transfektion mit linearen PEIs verschiedener Molekulargewichte in stabil Luciferase-exprimierenden H441-Luc Zellen gezeigt. Für die Komplexierung der siRNA wurde eine PEI/siRNA-Massenratio von 2.5 gewählt (größere Ratios führten zu Toxizität und/oder erbrachten keinen weiteren Vorteil bzgl. Effizienz). Die schwarzen Balken zeigen die Luciferase-Aktivität nach Transfektion mit einer Kontroll-siRNA, die grauen Balken zeigen die Ergebnisse nach Transfektion mit der Luciferase-spezifischen siRNA. Die Differenz der Balken gibt somit die Knockdown-Effizienz an. Die Ergebnisse wurden auf die Luciferase-Aktivität von unbehandelten Zellen normiert (= 100%), um zusätzlich toxische oder unspezifische Effekte darzustellen. Wie in **Fig. 3A** deutlich zu erkennen ist, konnte mit keinem linearen PEI/siRNA Komplex die Luciferase-Expression nennenswert erniedrigt werden, es zeigte sich lediglich eine Toxizitätsvermittelte Verringerung mit steigendem PEI-Molekulargewicht. Anders sahen die Ergebnisse nach der Modifizierung der linearen PEIs mit Tyrosin aus (**Fig. 3B**), analog wurden die siRNA-Komplexe mit einer Polymer/siRNA-Massenratio von 2.5 hergestellt. Die Luciferase-Aktivität nach Transfektion mit der Kontroll-siRNA war unabhängig vom PEI-Molekulargewicht allenfalls leicht erniedrigt (~ 20%); vor allem für die 10 kDa und 25 kDa linearen PEIs wurde nach Tyrosin-Modifikation eine besonders geringe Zytotoxizität erzielt. Dies ist insbesondere überraschend, da nach der publizierten Lehre die Toxizität mit ansteigendem Molekulargewicht der Polymere zunimmt. Die spezifisch siRNA-vermittelte Reduktion der Luciferase-Expression (Gen-knockdown; graue Balken) lag bei ~ 90% für alle linearen Tyrosin-modifizierten PEIs; diese erwiesen sich damit als außerordentlich effizient.

**[0098]** **Fig. 3C** zeigt die Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener Massenverhältnisse für Komplexe mit dem LP10Y. Bemerkenswert ist, dass bereits bei einer sehr niedrigen Polymer/siRNA Massenratio von 1,25 die Luciferase-Expression um mehr als 50% verringert werden konnte. Sehr gute Ergebnisse bzgl. des Knockdowns wurden bei einer Massenration von 2,5 erzielt. Höhere Massenverhältnisse als 2,5 wiederum zeigten keine besseren Ergebnisse, sondern erhöhten lediglich die Zytotoxizität, so dass im Folgenden die Polymer/siRNA-Massenratio 2,5 als Standard festgelegt wurde.

**[0099]** Ein wichtiger Faktor für die Effizienz der Tyrosin-modifizierten linearen PEIs ist der Modifizierungsgrad. Das 10 kDa lineare PEI wurde mit verschiedenen Tyrosin-Substitutionsgraden im Bereich von 10 - 50 % bezogen auf das PEI-Monomer hergestellt. In **Fig. 3D** sind die Luciferase-Aktivitäten nach siRNA-Transfektion in H441-Luc Zellen dargestellt. Bereits ein niedriger Substitutionsgrad von 10 % erzielte eine Verbesserung der Biokompatibilität, was an den höheren Werten für die Kontroll-siRNA (schwarze Balken) zu erkennen ist. Ebenso verbesserte sich die spezifische Verringerung der Luciferase Aktivität (graue Balken) ab 10 % Tyrosin und erzielte das beste Ergebnis mit 33 % bevor eine weitere Erhöhung des Tyrosingehalts den spezifischen Effekt verringerte.

**[0100]** Sehr ähnliche Ergebnisse konnten auch für das PPI-Dendrimer der Generation 4 (3,5 kDa) gezeigt werden (**Fig. 4**). Das unmodifizierte PPI erzielte über einen weiten Bereich verschiedener Massenverhältnisse keine spezifische Verringerung der Luciferase-Aktivität (sog. Knockdown) in stabil Luciferase-exprimierenden

PC-3-Luc Zellen. Hingegen wurde die Effizienz des PPI nach Tyrosin-Modifikation drastisch gesteigert und es konnten exzellente Knockdown-Raten erzielt werden.

**[0101]** Wie bereits oben gezeigt, verbessert die Tyrosin-Modifikation nicht nur die Transfektionseffizienz, sondern beeinflusst auch die Biokompatibilität günstig. Dieser Aspekt wurde im Folgenden weitergehend untersucht. Ein etablierter Test bestimmt die Freisetzung der Laktat-Dehydrogenase (LDH) nach Transfektion der Zellen mit Polymer/siRNA Komplexen und ist ein Maß für direkte Zellschäden. In **Fig. 5**, unten, sind die Ergebnisse nach 24 h für die linearen PEIs und deren Tyrosin-modifizierte Pendanten in H441-Luc Zellen gezeigt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit dem Detergenz TritonX-100 lysiert und diente als maximal erreichbarer Wert (=100 %; schwarzer Balken). Alle unmodifizierten linearen PEIs zeigten eine deutliche LDH-Freisetzung mit Werten von 20-40 % des maximal Erreichbaren. Die Tyrosin-modifizierten linearen PEIs (s. Pfeile) blieben hingegen auf dem Niveau von unbehandelten Zellen (grau-gestrichelter Balken; untransfiziert, „UT“). Der deutlich zellschädigende Effekt der unmodifizierten linearen PEIs, nicht jedoch des Tyrosin-modifizierten Gegenstücks, ist auch in **Fig. 5**, oben, in mikroskopischen Aufnahmen zu erkennen.

**[0102]** **Fig. 6** zeigt oben mikroskopische Aufnahmen von G55T2 Glioblastomzellen nach Transfektion verschiedener siRNA-Mengen für die Komplexe des LP10Y und des Tyrosin-modifizierten PPI-Dendrimers und unten die LDH-Freisetzung von G55T2 Glioblastomzellen, in denen die siRNA-Komplexe des LP10Y und des PPI-G4-Y direkt miteinander verglichen wurden. Wie bei den H441-Luc Zellen war die LDH-Freisetzung auf dem Niveau von unbehandelten Zellen.

**[0103]** Ein anderer, gut etablierter Vitalitätstest beruht auf der Messung der metabolischen Aktivität der Zellen, welche proportional zur Zahl lebender Zellen ist. In diesem Experiment wurde als Substrat das WST-8 verwendet, welches durch zelluläre Dehydrogenasen zu einem farbigen Produkt reduziert und durch eine Absorptionsmessung quantifiziert wird. In **Fig. 7** ist die Vitalitätsmessung für LP10Y/siRNA und PPI-G4-Y/siRNA für verschiedene Konzentrationen in PC-3 Prostatakarzinomzellen abgebildet. Die Messung wurde 72h nach Transfektion durchgeführt und die Werte auf unbehandelte Zellen (100 % vital) normiert. Die PPI-G4-Y/siRNA Komplexe zeigten über einen üblich verwendeten Konzentrationsbereich eine hohe Vitalität, wohingegen die LP10Y/siRNA Komplexe abhängig von der eingesetzten siRNA-Menge leicht niedrigere Vitalitätswerte um 80 % hatten.

**[0104]** Ein weiterer wichtiger Biokompatibilitätsparameter ist das Verhalten der Polymer/siRNA Komplexe nach Kontakt mit Blutzellen und Blutbestandteilen (Serumproteine).

**[0105]** Intravenös applizierte Nanopartikel können nach Kontakt die Erythrozyten massiv schädigen, was entweder zu einem Verklumpen der roten Blutkörperchen führt oder diese platzen lässt. Beide Effekte müssen ausgeschlossen werden, um Thrombosen zu verhindern oder einen massiven Zellverlust zu vermeiden. Des Weiteren ist freies Hämoglobin toxisch und kann Organe stark schädigen.

**[0106]** In **Fig. 8A** sind Erythrozyten-Aggregationstests für die siRNA-Komplexe des LP10Y und PPI-G4-Y gezeigt. Die Erythrozyten zeigten nach Inkubation mit einem hochmolekularen 750 kDa verzweigten PEI die vormals in der Literatur beschriebene (Ewe et al., *Pharmaceutics* 2019) starke Aggregation und Deformation, wohingegen keine negativen Effekte nach Inkubation mit den LP10Y und PPI-G4-Y Komplexen beobachtet werden konnten. **Fig. 8B** zeigt die Hämoglobin-Freisetzung für beide Komplexe mittels UV/VIS-Spektroskopie der zellfreien Pufferlösung. Als Positivkontrolle wurden Erythrozyten mit dem Detergenz Triton X-100 lysiert (= 100 % Hämoglobin-Freisetzung). Es wurde in beiden Fällen (PPI-G4-Y/siRNA Komplex und LP10Y/siRNA Komplex) über einen weiten Bereich von Komplexmengen, entsprechend 0.4 - 3 µg siRNA, eine sehr geringe hämolytische Wirkung gemessen.

**[0107]** Wie im letzten Abschnitt erwähnt, ist auch das Verhalten der Nanopartikel in Anwesenheit von Serumproteinen ein kritischer Aspekt bei der Entwicklung neuer nanopartikulärer Therapeutika. Im Allgemeinen binden Serumproteine sofort nach Kontakt an der Oberfläche der Nanopartikel, dies kann zu Verklumpungen der Nanopartikel führen und in vivo zu Thrombosen/Mikroembolien hervorrufen, außerdem kann nach Serumkontakt der Nanopartikel die biologische Wirksamkeit verloren gehen. Somit ist dieser Aspekt für die in vivo-Anwendung (Therapie) besonders wichtig und häufig limitierend.

**[0108]** Um dies zu überprüfen, wurden Polymer/siRNA Komplexe mit steigenden Serumkonzentrationen (**Fig. 9A-C**) für 1 h und für 3 d bei Raumtemperatur bzw. 37 °C inkubiert. Anschließend an die jeweilige Inkubationszeit wurden H441-Luc Zellen mit den Nanopartikeln transfiziert und der Luciferase-Knockdown im Vergleich zu frisch hergestellten, serumfreien Komplexen verglichen. Hier zeigte sich deutlich, dass eine ein-

stündige Inkubation mit bis zu 50 % Serum keinen negativen Einfluss hatte und der Luciferase-Knockdown (graue Balken) ebenso stark war wie bei den unbehandelten Komplexen (**Fig. 9A**). Ein sehr interessanter Effekt wurde nach längerer Inkubation von 3 d beobachtet, hier wirkte das Serum in zunehmender Konzentration protektiv. Die Lagerung bei Raumtemperatur führte zu einem völligen Verlust der biologischen Aktivität der Nanopartikel ohne Serum (**Fig. 9B**), zu einem Teilverlust bei 5 % Serum und die biologische Aktivität blieb ab einer Serumkonzentration von 10 % vollständig erhalten. Selbst für die Lagerung bei 37 °C (**Fig. 9C**) konnte bei der höchsten Serumkonzentration von 50 % die biologische Aktivität über den ganzen Zeitraum vollständig erhalten werden. Dieses Verhalten der LP10Y/siRNA Komplexe war erstaunlich, ein solch positiver Einfluss von Serumproteinen wird nur selten beobachtet und ist für biologische Anwendungen besonders günstig und nützlich. Andererseits kann sich die Bildung einer sog. „Protein-Corona“, d.h. einer Umhüllung der Nanopartikel mit einer oder mehreren Proteinschichten, sogar als positiv erweisen im Hinblick auf Gewebepenetration und zelluläre Aufnahme. Insofern ist es sehr bedeutsam, dass die Nanopartikel gegenüber solchen Proteinen stabil sind und es nicht zu einem Zerfall in die Einzelkomponenten (hier: Polymer und siRNA) kommt.

**[0109]** Für eine potenzielle klinische Anwendung ist es notwendig, die siRNA-haltigen Nanopartikel vorab unter standardisierten Bedingungen herzustellen und als klinisches Fertigpräparat zur Verfügung zu stellen. Aufgrund der häufigen kolloidalen Instabilität sog. weicher Nanopartikel, wie oben in **Fig. 9A** (ohne FCS nach Lagerung) gezeigt, bedarf es hierbei geeigneter Stabilisierungsmethoden. Hierzu wurden zum einen das Einfrieren solcher nanopartikelhaltiger Lösungen und zum anderen die Gefriertrocknung (Lyophilisation) getestet. Um die optimalen Bedingungen zu ermitteln, wurden gängige Pufferlösungen mit und ohne Kohlenhydrate als Kryoprotektoren verwendet. Der Einfluss des Konservierungsprozesses wurde anschließend durch Transfektion von H441-Luc Zellen und den Luciferase-Knockdown geprüft.

**[0110]** Die **Fig. 10** zeigt die Ergebnisse beider Methoden, die sich hinsichtlich des Puffereffekts ähneln. Beide Methoden, das Einfrieren und Lyophilisieren, eignen sich zur Konservierung der Nanopartikel. Ein Kohlenhydratzusatz (Glucose oder Trehalose als sog. Lyoprotektor) ist notwendig, um die biologische Aktivität vollständig zu erhalten.

**[0111]** Ein großes Problem für die präklinische und klinische Entwicklung von Nukleinsäure-basierten Therapeutika ist häufig deren Ineffizienz, vor allem bei schwer transfizierbaren Zellen, welche nicht selten die interessierenden Zielzellen sind. In **Fig. 11A** 1-4 sind die Knockdown-Effizienzen von vier verschiedenen schwer transfizierbaren Zelllinien dargestellt. Bei der stabil Luciferase-exprimierenden Zelllinie HCT116-Luc (Kolonkarzinom) (**Fig. 11A1**) erzielten alle Tyrosin-modifizierten linearen PEIs eine Erniedrigung der Luciferase-Aktivität um -70 %. Bei einer weiteren Kolonkarzinom-Zelllinie HROC24 (**Fig. 11A2**) konnte der GAPDH-mRNA Gehalt nach Transfektion mit einer gegen GAPDH-gerichteten siRNA um -50-60 % reduziert werden; hier war der LP10Y/siRNA Komplex noch effizienter und die GAPDH-mRNA Konzentration wurde um -75 % verringert.

**[0112]** Als schwer transfizierbar gelten im Allgemeinen zum Beispiel Leukämie-Zellen und die Kolonkarzinom-Zelllinie HT29. Bei diesen beiden Zelllinien konnte die Effizienz der verschiedenen Polymere weiter herausgearbeitet werden (**Fig. 11A3** und **Fig. 11A4**). So war für die Zelllinie MV4-11 (**Fig. 11A3**), eine nicht-adhären wachsende Leukämie-Zelllinie, das LP10Y für die siRNA-Transfektion am besten. Dies zeigt sich an der ~70 % Reduktion der GAPDH-mRNA Konzentration. Schlechter waren hingegen die linearen Tyrosin-modifizierten PEIs mit größerem (25 kDa) oder mit kleinerem (2,5 kDa, 5 kDa) Molekulargewicht, ebenso wie das verzweigte 10 kDa Tyrosin-PEI (P10Y). Beim direkten Vergleich der Tyrosin-modifizierten 10 kDa PEIs (P10Y vs. LP 10Y) zeigte sich auch hier wieder ein ähnlicher Trend, dass das lineare Tyrosin-PEI eine bessere biologische Aktivität aufwies.

**[0113]** In einem Screening wurde in zwei Leukämie-Zelllinien (MV4-11-EGFP/Luc und U937-EGFP/Luc) die Wirksamkeit des Knockdowns auf Proteinebene für das grünfluoreszierende Protein (EGFP) als Reporter gen untersucht (**Fig. 11B** 1-4). Es konnten erhebliche Unterschiede verschiedener Polymere in Abhängigkeit der siRNA-Konzentration herausgearbeitet werden. In beiden Zelllinien war der EGFP-Knockdown durch die auf den verzweigten Tyrosin-modifizierten PEIs basierenden Komplexe (linke Panels; 1 und 3) deutlich schlechter als im Falle der linearen PEI-Derivate (rechte Panels; 2 und 4). Der EGFP-Knockdown lag bei maximal 20-30 % für das P5Y und P10Y bei einer siRNA-Menge von max. 6 µg pro 100.000 Zellen, während im Falle der linearen Polymere ein bis zu 70% Knockdown erzielt werden konnte. In diesem Übersichtsexperiment zeigten sich das LP5Y und das LP10Y als die effizientesten Polymere, welches aus dem bisherigen Stand der Technik und Lehre nicht zu erwarten gewesen war. Dies gilt sowohl im Hinblick auf die Tatsache, dass speziell die linearen Polymere besonders hohe Effizienz zeigten, als auch im Hinblick auf die Tatsache, dass das 25 kDa-Derivat LP25Y wieder schlechtere Knockdown-Effizienzen aufwies.

**[0114]** Durch eine weitere Optimierung der Komplexierungsbedingungen, wie der Austausch von einem Natriumchlorid-basierten Puffer auf einen Trehalose-Puffer, konnte die Transfektionseffizienz nochmals gesteigert werden. In **Fig. 12A+B** sind die Knockdown-Ergebnisse für LP10Y/siRNA Komplexe für die Reporter-gene Luciferase und grünfluoreszierendes Protein (EGFP) in stabil-exprimierenden MV4-11-EGFP/Luc Zellen gezeigt. Dieser Optimierungsschritt konnte nochmals das Ergebnis um die Hälfte verbessern (vgl. **Fig. 11B2** mit **Fig. 12A+B**). Dies war im gewählten Mengenbereich unabhängig von der siRNA-Menge, die zur Transfektion eingesetzt wurde. Auch der direkte Vergleich der beiden effizientesten Polymere LP10Y und PPI-G4-Y (**Fig. 12C**) zeigten deutliche Unterschiede des Luciferase-Knockdowns für die MV4-11-EGFP/Luc Zellen; das Tyrosin-modifizierte Dendrimer war hier weniger effizient. Dies deutet in einem gewissen Maße auch auf eine Zelllinien-Spezifität der Effizienzen hin, da der gegenteilige Effekt bei den HT29-Luc/EGFP-Zellen (**Fig. 11A4**), einer adhären wachsenden Zelllinie, zu beobachten war. Für diese war das effizienteste Polymer das PPI-G4-Y, mit einer Reduktion der Luciferase-Aktivität um 80 %, sowie das LP5Y, welches die Luciferase-Aktivität um 60 % reduzierte.

**[0115]** Die Tyrosin-Modifikation von PEI verbesserte nicht nur die Transfektionseffizienz, sondern reduzierte auch deutlich deren toxischen Effekte. In **Fig. 13** sind mikroskopische Aufnahmen von MV4-11 und U937-Zellen gezeigt, die mit den verschiedenen unmodifizierten bzw. Tyrosin-modifizierten PEIs mit 3 µg siRNA transfiziert wurden. Nach 72 h war für alle unmodifizierten PEIs (verzweigt und linear) eine starke bis sehr starke Toxizität zu sehen. Bei den Tyrosin-PEIs, unabhängig von der deutlich höheren Transfektionseffizienz, waren keine toxischen Effekte zu beobachten.

**[0116]** Ein weiteres Screening im Hinblick auf Knockdown-Effizienz wurde auch für die schwer transfizierbare Kolonkarzinomzelllinie HT29-EGFP/Luc durchgeführt. **Fig. 14A-C** zeigt den Luciferase-Knockdown für alle Komplexe basierend auf unmodifizierten und Tyrosin-modifizierten PEIs sowie dem PPI-Dendrimer in Abhängigkeit verschiedener siRNA-Mengen. Bei allen unmodifizierten verzweigten PEIs (**Fig. 14A**) konnte bis auf das bPEI 25 kDa mit 60 pmol siRNA kein Knockdown erreicht werden. Demgegenüber erzielte die Tyrosin-Modifikation eine gewisse Verbesserung der Transfektionseffizienz; zumindest für das P5Y und P10Y konnte die Luciferase-Expression bei der höchsten siRNA-Menge um 60-70 % reduziert werden. Wesentlich bessere Knockdown-Ergebnisse wurden hingegen mit den Tyrosin-modifizierten linearen PEIs (**Fig. 14B**) sowie dem PPI-Y erzielt (**Fig. 14C**).

**[0117]** Als schwer transfizierbar gelten auch Makrophagen, deren Targetierung potenziell für die Entwicklung neuer Therapien gegen Tumore eine wichtige Rolle spielen kann. Makrophagen nehmen in der Regel Nanopartikel in großen Mengen gut auf, hier ist das größte Problem die endo-/lysosomale Freisetzung der Nukleinsäure. In **Fig. 15A** ist der EGFP-Knockdown als funktionaler Assay auf eingeschleuste und intrazellulär freigesetzte siRNA in der stabil EGFP-exprimierenden Raw264.7-EGFP (murine Makrophagen-Zelllinie) gezeigt. Der EGFP-Knockdown mit dem verzweigten Tyrosin-modifizierten PEI P10Y war mit 30 % relativ gering. Hingegen erzielten auch in diesem Zelltyp die LP10Y/siRNA Komplexe eine starke Verringerung der EGFP-Expression um 65 %. Ein noch besseres Ergebnis konnte mit PPI-G4-Y/siRNA-Komplexen mit einer Erniedrigung um 80 % erreicht werden. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit PPI-G4-Y/siRNA-Komplexen auch für den Knockdown von GAPDH als endogenes Zielgen beobachtet (**Fig. 15B**). Hier wurden zusätzlich drei verschiedene siRNA-Sequenzen gegen GAPDH getestet, die alle die GAPDH-Expression um etwa 80 % reduzierten. In der humanen monozytären Leukämie-Zelllinie THP-1, bei welcher die Zellen zu Makrophagen differenziert wurden, konnte die Wirksamkeit ebenfalls gezeigt werden. In **Fig. 15C** wird der Luciferase-Knockdown von differenzierten THP-1-Luc Zellen nach Transfektion mit dem LP5Y, LP10Y und dem PPI-G4-Y gezeigt. Bei beiden Tyrosin-modifizierten linearen PEIs (LP5Y, LP10Y) wurde die Luciferase um etwa 50 % verringert, auch hier war das PPI-G4-Y noch besser mit einem Luciferase-Knockdown von 65%.

**[0118]** Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass nicht alle effizienten Polymere jede Zelllinie in gleicher Weise effektiv transfizieren können. Die Daten bestätigen dennoch wiederum die obigen Ergebnisse bzgl.

- i. einer Verbesserung der Transfektionseffizienz nach Tyrosin-Modifikation,
- ii. der Überlegenheit der linearen Tyrosin-modifizierten PEIs gegenüber ihren verzweigten Analoga gleichen Molekulargewichts,
- iii. der besonderen Überlegenheit der 5 kDa- und 10 kDa-Polymere hinsichtlich der Transfektionseffizienz - überraschenderweise auch gegenüber dem entsprechenden 25 kDa Polymer, und
- iv. der besonderen Effizienz bei der Transfektion schwer transfizierbarer Zellen.

**[0119]** Neben den artifiziellen Reportergenen Luciferase und EGFP sowie dem ubiquitär exprimierten Haushaltsprotein GAPDH wurden auch therapeutisch relevante Onkogene mittels spezifischer siRNA herunterreguliert. Als Zielproteine wurden das Survivin und die Polo-Like Kinase 1 (PLK-1) in HROC24 Zellen untersucht.

**[0120]** Die Ergebnisse der quantitativen Realtime-PCR (**Fig. 16A+B**) zeigen die mRNA-Konzentrationen nach Transfektion mit LP10Y und den spezifischen siRNAs, Kontroll-siRNA sowie unbehandelten Zellen nach 24 h und 48 h. Für beide Zielgene wurde bereits nach 24 h die mRNA-Konzentration um über 60 % reduziert, wobei für das Survivin (**Fig. 16B**) der bessere Knockdown erzielt wurde. Der biologische Effekt des Knockdowns konnte auch mit Hilfe eines Proliferationstests durch ein sehr stark vermindertes Zellwachstum (**Fig. 16C**, offene bzw. geschlossene Dreiecke) nachgewiesen werden.

**[0121]** Sehr vergleichbar waren die Ergebnisse für die LP10Y/siRNA Nanopartikel in MV4-11 Zellen. Die PLK1 und Survivin mRNA-Konzentrationen waren um mehr als 50 % reduziert nach Transfektion mit den spezifischen siRNAs (**Fig. 17, A, B**). Die Erniedrigung der mRNA-Mengen führte auch in den MV4-11 Zellen zu einer deutlichen Inhibition der Zellproliferation, zum Beispiel um mehr als 60 % für das PLK1 (**Fig. 17, C**).

**[0122]** Neben der klassischen zweidimensionalen Zellkultur wurden die siRNA-Komplexe der neuen Polymere auch in dreidimensionalen Zell-Assays getestet. Dreidimensionale Zell- und Gewebe-Assays spielen eine immer wichtigere Rolle in der präklinischen Entwicklung von Wirkstoffen und Nanopartikeln. So bilden sie wesentlich besser die in vivo-Situation ab, indem auch der Einfluss der Zell-umgebenden Matrix z.B. auf die Nanopartikel-Penetration und zelluläre Aufnahme berücksichtigt werden.

**[0123]** In **Fig. 18** ist das Ergebnis eines EGFP-Knockdowns von stabil EGFP-exprimierenden PC3-Luc/EGFP Sphäroiden nach Transfektion mit LP10Y/siRNA Komplexen dargestellt. Sehr gut zu erkennen ist, dass durch Transfektion mit der spezifischen EGFP-siRNA die Fluoreszenz der Zellen/Sphäroiden im Vergleich zu Kontroll-transfizierten und unbehandelten Sphäroiden erniedrigt wurde (**Fig. 18**, Spalten „EGFP“, obere/mittlere Reihe vs. untere Reihe).

**[0124]** Ein noch komplexerer, sog. „ex vivo-Assay“, sind Tissue-Slice Kulturen. Für dieses Modell wurden hier entweder Xenograft-Tumore (in vivo gewachsene Tumore aus Zelllinien) oder „Patient-Derived Xenograft“-Tumore (PDX, primäre humane Tumore, in der Maus propagiert) in dünne Gewebe-Schnitte aufgearbeitet (**Fig. 19**).

**[0125]** Anschließend wurden die Tumorschnitte mit siRNA-Komplexen transfiziert. Im folgenden Experiment wurde der GAPDH-Knockdown nach Transfektion mit LP10Y/siRNA Komplexen in HROC24-Tumorschnitte untersucht. Die Analyse der GAPDH-Expression über quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) zeigte, dass die LP10Y/siGAPDH Komplexe die GAPDH-mRNA-Konzentration um -50 % reduziert hatten (**Fig. 20A**). Der GAPDH-Knockdown konnte auch auf Protein-Ebene mittels Western Blot nachgewiesen werden (**Fig. 20B**).

**[0126]** Für ein viel versprechendes Polymer, das LP10Y, wurden weitergehende Untersuchungen für eine in vivo Applikation durchgeführt. Zunächst erfolgte ein Test auf Genotoxizität, der sog. COMET-Assay, der DNA-Schäden bzw. DNA-Fragmentierungen anzeigt. Hierzu wurden H441 Zellen mit LP10Y/siRNA-Komplexen bzw. mit LP10/siRNA-Komplexen transfiziert. In dem folgenden Assay erscheint nach Zellyse intakte genomische DNA als leuchtende Punkte (vgl. Negativkontrolle; **Fig. 21**). Bei Zellen mit einem DNA-Schaden wird hingegen ein Schweif („Comet“) sichtbar, vgl. Positivkontrolle nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid. Das Ergebnis nach LP10Y/siRNA Transfektion war vergleichbar mit unbehandelten Zellen und bewies somit die Abwesenheit von Genotoxizität. Als Vergleich wurde das unmodifizierte LP10 mitgeführt. Die Transfektion mit LP10/siRNA bei 30 pmol siRNA (eine toxische Konzentration) wies wenige Zellen mit DNA-Schaden (s. Pfeil) auf. Die Schweifbildung und deren Ausmaß wurde mit einer Software analysiert und quantifiziert (Balkendiagramm) und zeigt nochmals deutlich die Abwesenheit einer Genotoxizität bzw. von DNA-Schäden.

**[0127]** Eine immunstimulierende Wirkung der LP10Y/siRNA-Komplexe wurde ebenfalls untersucht. Immunkompetente Mäuse wurden 24 h und 4h vor Blutentnahme mit den Komplexen (10 µg siRNA, 25 µg LP10Y) i.v. behandelt. Als Positivkontrolle wurde den Mäusen Lipopolysaccharid (LPS) gespritzt und unbehandelte Mäuse dienten als Negativkontrolle. Eine Messung der Zytokine TNF $\alpha$  und INF $\gamma$  mittels ELISA ergab keine Erhöhung der Zytokinkonzentrationen (**Fig. 22A**). In einem weiteren Versuch wurden Mäusen verschiedene LP10Y/siRNA-Dosierungen (25, 50, 100 µg siRNA; LP10Y : siRNA Massenratio 2,5) fünfmal alle zwei Tage injiziert. Eine Auswertung des Körpergewichtes zeigte keine signifikanten Gewichtsabnahmen der Tiere (**Fig. 22B**).



**[0128]** Für eine therapeutische Anwendung von kleinen RNA-Molekülen in vivo ist es essenziell, dass die intakten RNA-Moleküle das Zielgewebe erreichen. Dies wurde mittels einer radioaktiven Bioverteilungsstudie für LP10Y/siRNA Komplexe in tumortragenden Mäusen untersucht. Zur Etablierung des Tumor-Xenograft Mausmodells wurden zunächst Nacktmäusen HROC24-Zellen subkutan in die Flanken injiziert. Nachdem sich ausreichend große Tumore gebildet hatten, wurden [32Phosphor]-endmarkierte siRNAs mit LP10Y komplexiert und i.v. bzw. i.p. appliziert. Nach vier Stunden wurden die Tiere euthanasiert und die Organe entnommen. Zum Nachweis der siRNA wurde die Gesamt-RNA der jeweiligen Gewebe isoliert und über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde mittels Kapillarblot die siRNA auf eine Nylonmembran transferiert und autoradiographisch dargestellt. In **Fig. 22C** links sind die Originalbilder der Blots gezeigt, die intakte siRNA in verschiedenen Geweben nachweist. In **Fig. 22C** rechts ist die Quantifizierung der Banden pro Organ dargestellt, die zeigt, dass vor allem nach i.p.-Injektion eine siRNA-Einschleusung in die Tumoren erfolgte.

**[0129]** Letztendlich wurde das LP10Y, auch in einer Tumor-Xenograft Therapiestudie untersucht. In Nacktmäusen wurden HROC24-Zellen subkutan in die Flanken injiziert, nach Etablierung der Tumore wurden die Tiere in verschiedene Behandlungsgruppen randomisiert (5-6 Tiere pro Gruppe). Zwei spezifische Behandlungsgruppen wurden mit LP10Y/siRNA Komplexen gegen Survivin bzw. PLK-1 behandelt, eine Gruppe wurde mit einer Kontroll-siRNA behandelt und eine weitere Gruppe blieb unbehandelt. Den Tieren wurde dreimal pro Woche die siRNA-Komplexe intraperitoneal injiziert und die Tumorgöße gemessen. Das Tumolvolumen über den Behandlungszeitraum ist in **Fig. 23A** abgebildet. Für die beiden spezifischen Gruppen konnte ein verlangsamtes Tumorwachstum beobachtet werden, wie die Wachstumskurven und exemplarische Bilder der Tiere zeigen (**Fig. 23B**). Der spezifische Knockdown von Survivin und PLK1 wurde auf Protein-Ebene mittels Western Blot der Tumorsylate nachgewiesen (**Fig. 23C**) und betrug durchschnittlich 50 % im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

**[0130]** Für die hier gezeigten Ergebnisse wurde siRNA Sequenzen gemäß Tabelle 2 verwendet:

Tabelle 2:

siRNA		Sequenz (5' - 3')	SEQ ID NO
siLuc2 <sup>(a)</sup>	sense	CGUACGCGGAUACUUCGA dTdT	SEQ ID NO. 1
	antisense	UCGAAGUAUCCGCGUACG dTdT	SEQ ID NO. 2
siLuc3 <sup>(b)</sup>	sense	CUUACGCUGAGUACUUCGA dTdT	SEQ ID NO. 3
	antisense	UCGAAGUACUCAGCGUAAG dTdT	SEQ ID NO. 4
siEGFP	sense	GCAGCACGACUUCUUCAAG dTdT	SEQ ID NO. 5
	antisense	CUUGAAGAAGUCGUGCUGC dTdT	SEQ ID NO. 6
siPLK1 Nr1	sense	GAAGAUGCUCAGACAGAU dTdT	SEQ ID NO. 7
	antisense	AUCUGUCUGAAGCAUCUUC dTdT	SEQ ID NO. 8
siSurvivin	sense	GAAUUAACCCUUGGUGAAU dTdT	SEQ ID NO. 9
	antisense	AUUCACCAAGGGUAAUUC dTdT	SEQ ID NO. 10
siGAPDH #2	sense	CCUCAACUACAUGGUUUAC dTdT	SEQ ID NO. 11
	antisense	GUAAACCAUGUAGUUGAGG dTdT	SEQ ID NO. 12
siGAPDH mu #1	Sense	CAAGAGAGGCCCUAUCCCA dTdT	SEQ ID NO. 13
	antisense	UGGGAUAGGGCCUCUCUUG dTdT	SEQ ID NO. 14
siGAPDH mu #2	sense	AUGGGAAGCUUGUCAUCA dTdT	SEQ ID NO. 15
	antisense	UUGAUGACAAGCUUCCCAU dTdT	SEQ ID NO. 16
siGAPDH mu #3	sense	GCUCAUUCCUGGUAUGAC dTdT	SEQ ID NO. 17
	antisense	GUCAUACCAGGAAAUGAGC dTdT	SEQ ID NO. 18

<sup>(a)</sup> siLuc2 dient als negativ Kontroll-siRNA für den Luciferase knockdown.

<sup>(b)</sup> siLuc3 ist die spezifische Luciferase siRNA, dient aber als negativ Kontroll-siRNA in allen anderen Knock-down Experimenten

**[0131]** In Tabelle 3 sind die Sequenzen der verwendeten RT-qPCR-Primer aufgelistet:

Tabelle 3:Sequenzen RT-qPCR-Primer

Primer		Sequenz (5'- 3')	SEQ ID NO
GAPDH	for	GGT GTG AAC CAT GAG AAG TAT	SEQ ID NO. 19
		GA	SEQ ID NO. 20
	rev	GAG TCC TTC CAC GAT ACC AAA G	
RPLPO	for	TCT ACA ACC CTG AAG TGC TTG AT	SEQ ID NO. 21
	rev	CAA TCT GCA GAC AGA CAC TGG	SEQ ID NO. 22
Survivin	for	TGA TGA GAG AAT GGA GAC AGA G	SEQ ID NO. 23
	rev	ACA GCA GTG GCA AAA GGA G	SEQ ID NO. 24
PLK1	for	ATC TTC TGG GTC AGC AAG TG	SEQ ID NO. 25
	rev	GCC GTC ACG CTC TAT GTA CT	SEQ ID NO. 26
GAPDH mu (Nr3)	for	GCC TCG TCC CGT AGA CAA AA	SEQ ID NO. 27
	rev	GAT GGG CTT CCC GTT GAT GA	SEQ ID NO. 28
RPLPO mu	for	GGA CCC GAG AAG ACC TCC TT	SEQ ID NO. 29
	rev	GCA CAT CAC TCA GAA TTT CAA TGG	SEQ ID NO. 30

**[0132]** Die vorstehende Beschreibung der bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wurde zum Zweck der Veranschaulichung und Beschreibung gegeben. Es ist nicht beabsichtigt, erschöpfend zu sein oder die Erfindung genau auf die offenbarte Form zu beschränken. Modifikationen und Variationen sind angesichts der obigen Lehre möglich oder können aus der Praxis der Erfindung erlangt werden. Die Ausführungsform wurde gewählt und beschrieben, um die Prinzipien der Erfindung und ihre praktische Anwendung zu erläutern, um es dem Fachmann zu ermöglichen, die Erfindung in verschiedenen Ausführungsformen zu verwenden, die für die spezielle beabsichtigte Verwendung geeignet sind. Es ist beabsichtigt, dass der Umfang der Erfindung durch die beigefügten Ansprüche und deren Äquivalente definiert wird. Die Gesamtheit jedes der oben genannten Dokumente wird durch Bezugnahme hierin aufgenommen.

#### SEQUENCE LISTING

**[0133]**

Organization Applicant

-----  
Street:

City :

State :

Country :

PostalCode :

PhoneNumber :

FaxNumber :

EmailAddress :

<110> OrganizationName : UNIVERSITAET LEIPZIG

Application Project

-----

<120> Title : MITTEL ZUR TRANSFEKTION VON NUKLEINSAEUREN IN ZELLEN

<130> AppFileReference : 80444DE

<140> CurrentAppNumber:

<141> CurrentFilingDate : \_\_\_\_ - \_\_ - \_\_

#### Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

cguacgcgga auacuucgat t 21

<212> Type: RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO.1

SequenceDescription :

#### Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO.1:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom: 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

#### Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

ucgaaguauu ccgcgucgt t 21

<212> Type: RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO.2

SequenceDescription :

#### Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO.2:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom: 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

## Sequence

-----

&lt;213&gt; OrganismName : Artificial Sequence

&lt;400&gt; PreSequenceString :

cuuacgcuga guacuucgat t 21

&lt;212&gt; Type: RNA

&lt;211&gt; Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO.3

SequenceDescription :

## Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO.3:

&lt;221&gt; FeatureKey : misc\_feature

&lt;222&gt; LocationFrom: 20

&lt;222&gt; LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

## Sequence

-----

&lt;213&gt; OrganismName : Artificial Sequence

&lt;400&gt; PreSequenceString :

ucgaaguacu cagcguaagt t 21

&lt;212&gt; Type: RNA

&lt;211&gt; Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO.4

SequenceDescription :

## Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO.4:

&lt;221&gt; FeatureKey : misc\_feature

&lt;222&gt; LocationFrom: 20

&lt;222&gt; LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

## Sequence

-----

&lt;213&gt; OrganismName : Artificial Sequence

&lt;400&gt; PreSequenceString :

gcagcacgac uucuucaagt t 21

<212> Type: RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 5

SequenceDescription :

#### Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 5:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom: 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

#### Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

cuugaagaag ucgugcugct t 21

<212> Type: RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO.6

SequenceDescription :

#### Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO.6:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom: 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

#### Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

gaaugcuu cagacagaut t 21

<212> Type: RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 7

SequenceDescription :

#### Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 7:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom: 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

#### Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

aucugucuga agcaucuuct t 21

<212> Type: RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 8

SequenceDescription :

#### Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 8:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom: 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

#### Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

gaauuaacc uuggugaaut t 21

<212> Type: RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 9

SequenceDescription :

#### Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 9:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom: 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

## Sequence

-----

&lt;213&gt; OrganismName : Artificial Sequence

&lt;400&gt; PreSequenceString :

auucaccaag gguuaauuct t

21

&lt;212&gt; Type: RNA

&lt;211&gt; Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 10

SequenceDescription :

## Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 10:

&lt;221&gt; FeatureKey : misc\_feature

&lt;222&gt; LocationFrom: 20

&lt;222&gt; LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

## Sequence

-----

&lt;213&gt; OrganismName : Artificial Sequence

&lt;400&gt; PreSequenceString :

ccucaacuac augguuuact t

21

&lt;212&gt; Type: RNA

&lt;211&gt; Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 11

SequenceDescription :

## Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 11:

&lt;221&gt; FeatureKey : misc\_feature

&lt;222&gt; LocationFrom: 20

&lt;222&gt; LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

## Sequence

-----

&lt;213&gt; OrganismName : Artificial Sequence

&lt;400&gt; PreSequenceString :

guaaaccaug uaguugaggt t

21

<212> Type: RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 12

SequenceDescription :

#### Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 12:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom: 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

#### Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

caagagaggc ccuaucccat t 21

<212> Type: RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 13

SequenceDescription :

#### Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 13:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom: 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

#### Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

ugggauaggg ccucucuugt t 21

<212> Type: RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 14

SequenceDescription :

#### Feature

-----



Sequence: SEQ ID NO. 14:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom: 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

augggaagcu ugucaucaat t 21

<212> Type: RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 15

SequenceDescription :

Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 15:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom: 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

uugaugacaa gcuucccaut t 21

<212> Type: RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 16

SequenceDescription :

Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 16:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom: 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

## Sequence

-----

&lt;213&gt; OrganismName : Artificial Sequence

&lt;400&gt; PreSequenceString :

gcucuuuucc ugguaugact t

21

&lt;212&gt; Type: RNA

&lt;211&gt; Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 17

SequenceDescription :

## Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 17:

&lt;221&gt; FeatureKey : misc\_feature

&lt;222&gt; LocationFrom: 20

&lt;222&gt; LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

## Sequence

-----

&lt;213&gt; OrganismName : Artificial Sequence

&lt;400&gt; PreSequenceString :

gucauacc

gucauaccag gaaaugagct t

21

&lt;212&gt; Type: RNA

&lt;211&gt; Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 18

SequenceDescription :

## Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 18:

&lt;221&gt; FeatureKey : misc\_feature

&lt;222&gt; LocationFrom: 20

&lt;222&gt; LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

## Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

ggtgtgaacc atgagaagta tga 23

<212> Type: DNA

<211> Length : 23

SequenceName : SEQ ID NO. 19

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

ggtgtgaacc atgagaagta tga 23

<212> Type: DNA

<211> Length : 23

SequenceName : SEQ ID NO. 20

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

tctacaacc tgaagtgctt gat 23

<212> Type: DNA

<211> Length : 23

SequenceName : SEQ ID NO. 21

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

caatctgcag acagacactg g 21

<212> Type: DNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 22

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

tgatgagaga atggagacag ag 22

<212> Type: DNA

<211> Length : 22

SequenceName : SEQ ID NO. 23

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

acagcagtgg caaaaggag 19

<212> Type: DNA

<211> Length : 19

SequenceName : SEQ ID NO. 24

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

atcttctggg tcagcaagtg 20

<212> Type: DNA

<211> Length : 20

SequenceName : SEQ ID NO. 25

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

gccgtcacgc tctatgtact 20

<212> Type: DNA

<211> Length : 20

SequenceName : SEQ ID NO. 26

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

gcctcgtccc gtagacaaaa 20

<212> Type: DNA

<211> Length : 20

SequenceName : SEQ ID NO. 27

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

gatgggcttc ccgttgatga 20

<212> Type: DNA

<211> Length : 20

SequenceName : SEQ ID NO. 28

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

ggacccgaga agacctcctt 20

<212> Type: DNA

<211> Length : 20

SequenceName : SEQ ID NO. 29

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

gcacatcact cagaatttca atgg 24

<212> Type: DNA

<211> Length : 24

SequenceName : SEQ ID NO. 30

SequenceDescription :

**[0134]**

Organization Applicant

-----

Street :  
City :  
State :  
Country :  
PostalCode :  
PhoneNumber :  
FaxNumber :  
EmailAddress :  
<110> OrganizationName : UNIVERSITAET LEIPZIG

Application Project

-----  
<120> Title : MITTEL ZUR TRANSFEKTION VON NUKLEINSAEUREN IN ZELLEN  
<130> AppFileReference : 80444DE  
<140> CurrentAppNumber :  
<141> CurrentFilingDate : \_\_\_ - \_\_ - \_\_

Sequence

-----  
<213> OrganismName : Artificial Sequence  
<400> PreSequenceString :  
cguacgcgga auacuucgat t  
21  
<212> Type : RNA  
<211> Length : 21  
SequenceName : SEQ ID NO.1  
SequenceDescription :

Feature

-----  
Sequence: SEQ ID NO.1:  
<221> FeatureKey : misc\_feature  
<222> LocationFrom : 20  
<222> LocationTo : 21  
Other Information : deoxythymidine  
CDSJoin : No

Sequence

-----  
<213> OrganismName : Artificial Sequence  
<400> PreSequenceString :  
ucgaaguauu ccgcuacgt t  
21  
<212> Type : RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO.2

SequenceDescription :

Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO.2:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom : 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

cuuacgcuga guacuucgat t

21

<212> Type : RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO.3

SequenceDescription :

Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO.3:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom : 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

ucgaaguacu cagcguaagt t

21

<212> Type : RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO.4 SequenceDescription :

Feature

-----  
Sequence: SEQ ID NO.4:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom : 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

Sequence

-----  
<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

gcagcacgac uucuucaagt t

21

<212> Type : RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 5

SequenceDescription :

Feature

-----  
Sequence: SEQ ID NO. 5:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom : 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

Sequence

-----  
<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

cuugaagaag ucgugcugct t

21

<212> Type : RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO.6

SequenceDescription :

Feature



Sequence: SEQ ID NO.6:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom : 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

gaagaugcuu cagacagaut t

21

<212> Type : RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 7

SequenceDescription :

Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 7:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom : 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

aucugucuga agcaucuuct t

21

<212> Type : RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 8

SequenceDescription :

Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 8:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom : 20

<222> LocationTo : 21  
Other Information : deoxythymidine  
CDSJoin : No

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence  
<400> PreSequenceString :  
gaauuaaccc uuggugaaut t  
21  
<212> Type : RNA  
<211> Length : 21  
SequenceName : SEQ ID NO. 9  
SequenceDescription :

Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 9:  
<221> FeatureKey : misc\_feature  
<222> LocationFrom : 20  
<222> LocationTo : 21  
Other Information : deoxythymidine  
CDSJoin : No

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence  
<400> PreSequenceString :  
auucaccaag gguuauuct t  
21  
<212> Type : RNA  
<211> Length : 21  
SequenceName : SEQ ID NO. 10  
SequenceDescription :

Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 10:  
<221> FeatureKey : misc\_feature  
<222> LocationFrom : 20  
<222> LocationTo : 21  
Other Information : deoxythymidine  
CDSJoin : No

## Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

ccucaacuac augguuuact t

21

<212> Type : RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 11

SequenceDescription :

## Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 11:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom : 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

## Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

guaaaccaug uaguugaggt t

21

<212> Type : RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 12

SequenceDescription :

## Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 12:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom : 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

## Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

caagagaggc ccuaucccat t

21

<212> Type : RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 13

SequenceDescription :

Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 13:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom : 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

ugggauaggg ccucucuugt t

21

<212> Type : RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 14

SequenceDescription :

Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 14:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom : 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

augggaagcu ugucaucaat t

21

&lt;212&gt; Type : RNA

&lt;211&gt; Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 15

SequenceDescription :

## Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 15:

&lt;221&gt; FeatureKey : misc\_feature

&lt;222&gt; LocationFrom : 20

&lt;222&gt; LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

## Sequence

-----

&lt;213&gt; OrganismName : Artificial Sequence

&lt;400&gt; PreSequenceString :

uugaugacaa gcuucccaut t

21

&lt;212&gt; Type : RNA

&lt;211&gt; Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO 16

SequenceDescription :

## Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 16:

&lt;221&gt; FeatureKey : misc\_feature

&lt;222&gt; LocationFrom : 20

&lt;222&gt; LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

## Sequence

-----

&lt;213&gt; OrganismName : Artificial Sequence

&lt;400&gt; PreSequenceString :

gcucauuucc ugguaugact t

21

&lt;212&gt; Type : RNA

&lt;211&gt; Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 17

SequenceDescription :

Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 17:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom : 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

gucauaccag gaaaugagct t

21

<212> Type : RNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 18

SequenceDescription :

Feature

-----

Sequence: SEQ ID NO. 18:

<221> FeatureKey : misc\_feature

<222> LocationFrom : 20

<222> LocationTo : 21

Other Information : deoxythymidine

CDSJoin : No

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

ggtgtgaacc atgagaagta tga

23

<212> Type : DNA

<211> Length : 23

SequenceName : SEQ ID NO. 19

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

gggtgtaacc atgagaagta tga

23

<212> Type : DNA

<211> Length : 23

SequenceName : SEQ ID NO. 20

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

tctacaaccc tgaagtgctt gat

23

<212> Type : DNA

<211> Length : 23

SequenceName : SEQ ID NO. 21

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

caatctgcag acagacactg g

21

<212> Type : DNA

<211> Length : 21

SequenceName : SEQ ID NO. 22

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

tgatgagaga atggagacag ag

22

<212> Type : DNA

<211> Length : 22

SequenceName : SEQ ID NO. 23

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

acagcagtgg caaaaggag

19

<212> Type : DNA

<211> Length : 19

SequenceName : SEQ ID NO. 24

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

atcttctggg tcagcaagtg

20

<212> Type : DNA

<211> Length : 20

SequenceName : SEQ ID NO. 25

SequenceDescription :

Sequence

-----

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

gccgtcacgc tctatgtact

20

<212> Type : DNA

<211> Length : 20



SequenceName : SEQ ID NO. 26

SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

gcctcgtccc gtagacaaaa

20

<212> Type : DNA

<211> Length : 20

SequenceName : SEQ ID NO. 27

SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

gatgggcttc ccgtgatga

20

<212> Type : DNA

<211> Length : 20

SequenceName : SEQ ID NO. 28

SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

ggacccgaga agacctcctt

20

<212> Type : DNA

<211> Length : 20

SequenceName : SEQ ID NO. 29

SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Artificial Sequence

<400> PreSequenceString :

gcacatcact cagaattca atgg

24

<212> Type : DNA

<211> Length : 24

SequenceName : SEQ ID NO. 30

SequenceDescription :

**Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO ST.25. Dieses kann sowohl  
in DEPATISnet als auch im DPMRegister aufgerufen werden.**

## ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

### Zitierte Patentliteratur

- EP 2229445 A2 [0010]

### Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Ewe et al., J Control Release, 28, 230, S.13-25, 2016 [0011]
- Ewe et al., Pharmaceutics, 12, 11(11), 2019 [0012]
- Drug Deliv Transl Res, 7(2), p. 206-216 [0013]
- Ewe et al., Eur J Lipid Sci Technol, 116(9), p.1195-1204 [0014]
- Ewe et al., Acta Biomater, 10, p. 2663-2673 [0014]
- Hobel et al., Anal Chem, 86(14), p.6827-6835 [0014]
- Ewe et al., Nanomedicine, 13(1), p. 209-218 [0014]
- Ewe et al., Drug Deliv Transl Res, 7(2), p. 206-216 [0014]
- Tauhardt et al., Macromol. Chem. Phys. 212, 1918-1924 (2011) [0016]
- Harpe et al., J Control Release, 309-322 (2000) [0016]

### Patentansprüche

1. Eine Zusammensetzung, umfassend Komplexe aus einer Mischung aus
  - linearen niedermolekularen Polyethyleniminen (PEI), die durch kovalente Kopplung mit der Aminosäure Tyrosin (Tyr; Y) modifiziert sind, wobei der Grad der Modifizierung mit Tyrosin zwischen 20 bis 50%, bevorzugt zwischen 25 bis 40%, liegt; und/oder
  - Polypropylenimin-Dendrimeren (PPI), die durch kovalente Kopplung mit der Aminosäure Tyrosin (Tyr; Y) modifiziert sind, wobei der Grad der Modifizierung mit Tyrosin zwischen 30 bis 65%, bevorzugt zwischen 40 bis 60 %, liegt mit Nukleinsäuren.
2. Die Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die molekulare Masse der linearen PEIs zwischen 2 bis 25 kDa, bevorzugt zwischen 2 bis 10 kDa, beträgt.
3. Die Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Dendrimer in einer Generation zwischen G3 bis G5 vorliegt.
4. Die Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei es sich bei der Nukleinsäure um RNA oder ein kurzes DNA-Oligonukleotid handelt.
5. Die Zusammensetzung nach Anspruch 4, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend siRNAs, microRNAs (miRNAs, miRNA mimics), microRNA-Inhibitoren (antimiRs, antiseeds o.ä.), oder anderen RNA-, DNA- oder RNA/DNA-Oligonukleotiden, einzel- oder doppelsträngig, mit oder ohne chemische Modifikationen.
6. Die Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Größe der Komplexe zwischen 100 nm bis 1 µm beträgt.
7. Die Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei die Komplexe eine positive oder negative Oberflächenladung aufweisen.
8. Die Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, weiterhin umfassend einen Zusatz von Serum- oder anderen Proteinen, die eine Protein-Corona um den Komplex bilden können, oder anderen Zusatzstoffen, die eine Protein-analoge Corona um den Komplex bilden können.
9. Ein Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1, die folgenden Schritte umfassend
  - Herstellen einer ersten Lösung mit einem definierten Volumen umfassend eine zuvor berechnete Masse des gereinigten Polymers in einer definierten wässrigen Lösung, bevorzugt in einer Pufferlösung bestehend aus anorganischen Salzen und/oder organischen Carbonsäuren/Sulfonsäuren, mit Zusatz eines Salzes und/oder eines Kohlenhydrats und mit einem pH-Wert zwischen 4,5 bis 8,0,
  - Herstellen einer zweiten Lösung umfassend eine zuvor berechnete Masse einer Nukleinsäure in einer definierten, mit der Polymerlösung identischen oder davon abweichenden wässrigen Lösung, bevorzugt in einer Pufferlösung mit Zusatz eines Salzes und/oder eines Kohlenhydrats, besonders bevorzugt eine Pufferlösung bei einem pH von 4,5 bis 8,0,
  - Mischung der ersten und zweiten Lösung,
  - Inkubation der Mischung, bevorzugt für 15 min bis 1,5 h, besonders bevorzugt für 15 bis 45 min bei Raumtemperatur.
10. Das Verfahren nach Anspruch 9, wobei als Nukleinsäure RNA verwendet wird.
11. Das Verfahren nach Anspruch 10, wobei die RNA oder das DNA-Oligonukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend siRNAs, microRNAs (miRNAs, miRNA mimics), microRNA-Inhibitoren (antimiRs, antiseeds o.ä.), oder anderen RNA-, DNA- oder RNA/DNA-Oligonukleotiden, einzel- oder doppelsträngig, mit oder ohne chemische Modifikationen.
12. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei der Zusammensetzung bei ihrer Herstellung oder im Anschluss daran Proteine in einer Konzentration von 5% bis 50 %, bevorzugt Serumproteine, zugegeben werden.

13. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei eine lagerstabile Formulierung hergestellt wird, bevorzugt durch Lyophilisieren oder Einfrieren.
14. Das Verfahren nach Anspruch 9, wobei die erste und zweite Lösung einen pH von 7,4 haben.
15. Die Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Transfektion schwer transfizierbarer Zellen.
16. Die Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 in vitro, insbesondere in einer 2D- oder 3D-Zellkultur, ex vivo, insbesondere bei in Zellkultur gehaltenem Gewebe, oder in vivo, insbesondere im lebenden Organismus zur Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen.
17. Die Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, zur gezielten Beeinflussung (patho-)physiologischer Prozesse, bevorzugt zum Gene-Silencing / Gene-Targeting, speziell zum Knock-down einer kodierenden oder nicht-kodierenden RNA, oder zum miRNA replacement oder zur Inhibition einer miRNA.
18. Die Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Einbringung einer Nukleinsäure, insbesondere einer modifizierten oder nichtmodifizierten RNA zur Induktion von CRISPR-Cas, zum Zwecke der Modifikation oder Deaktivierung eines Gens.
19. Die Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Einbringung einer Nukleinsäure zum Zwecke der Induktion eines Splice-Switching.

Es folgen 27 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

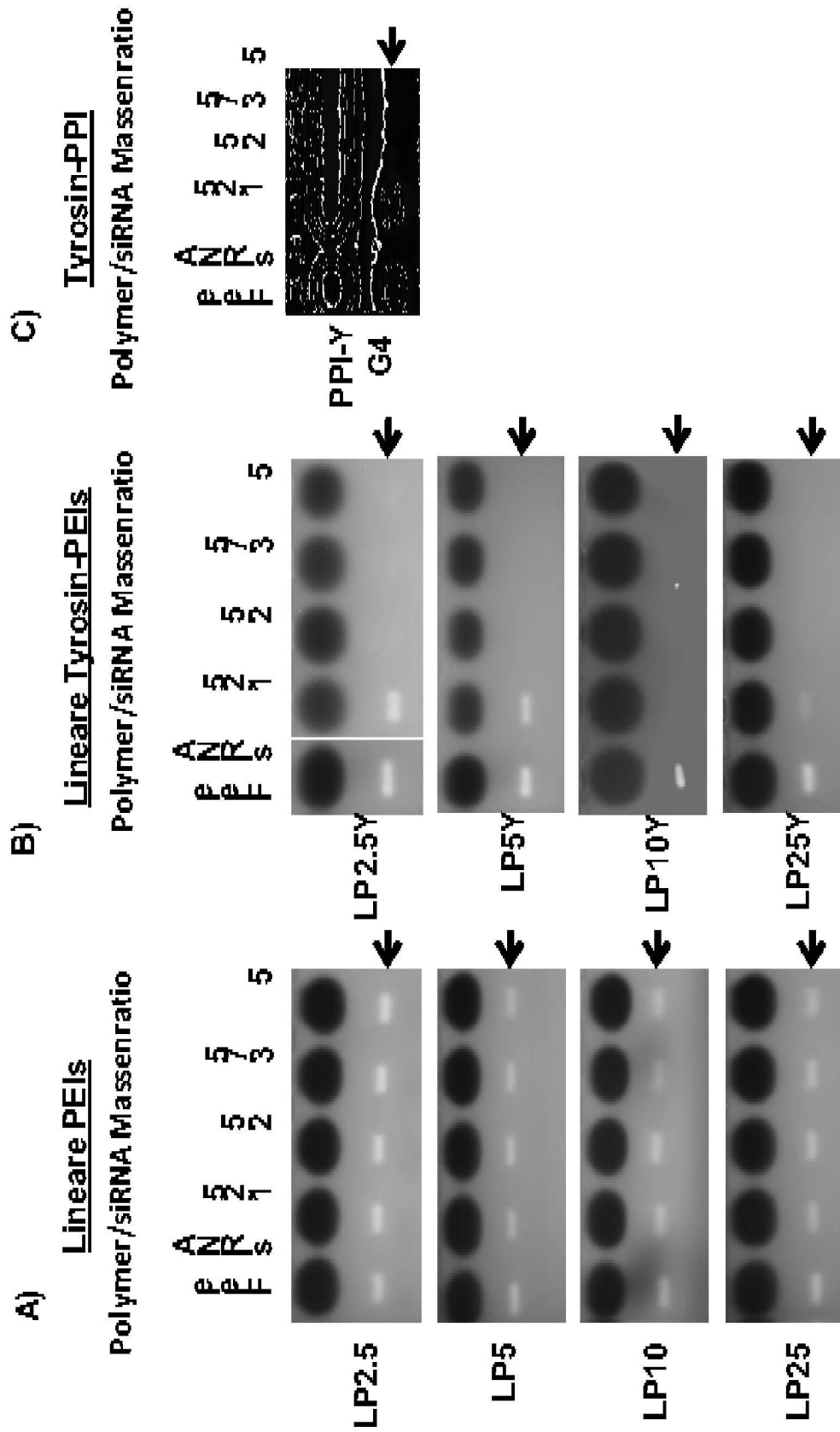


FIG. 2

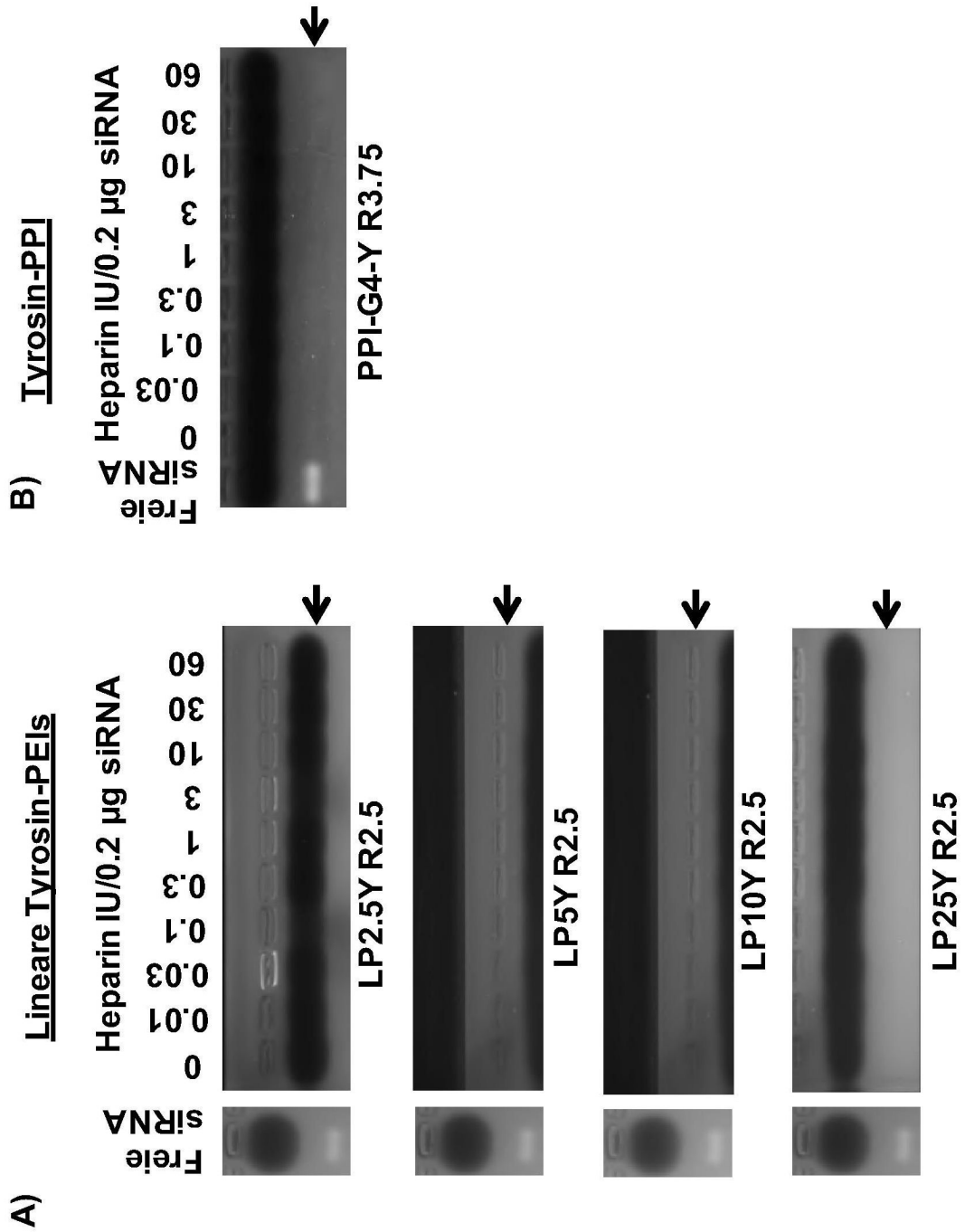


FIG. 3

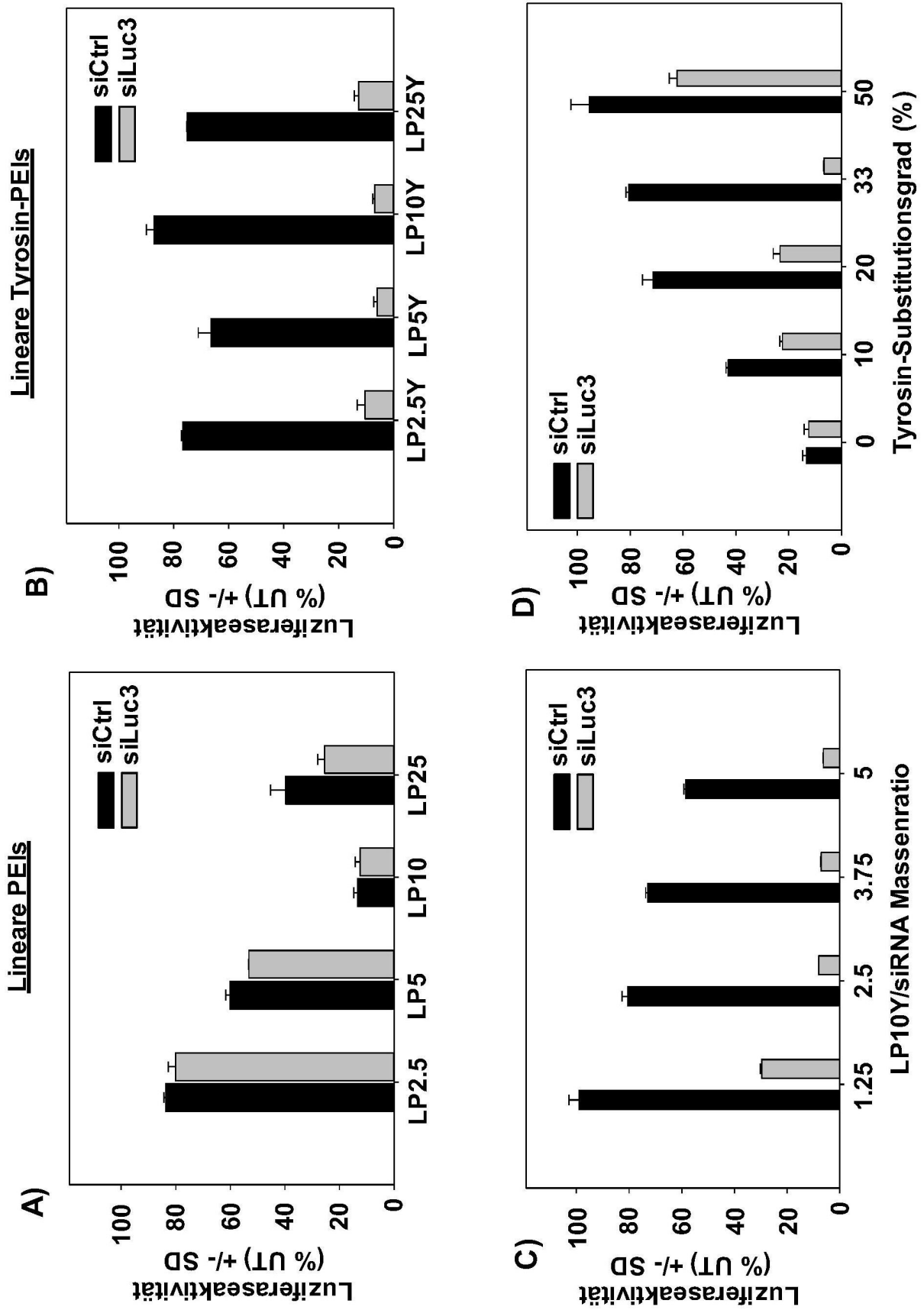




FIG. 4

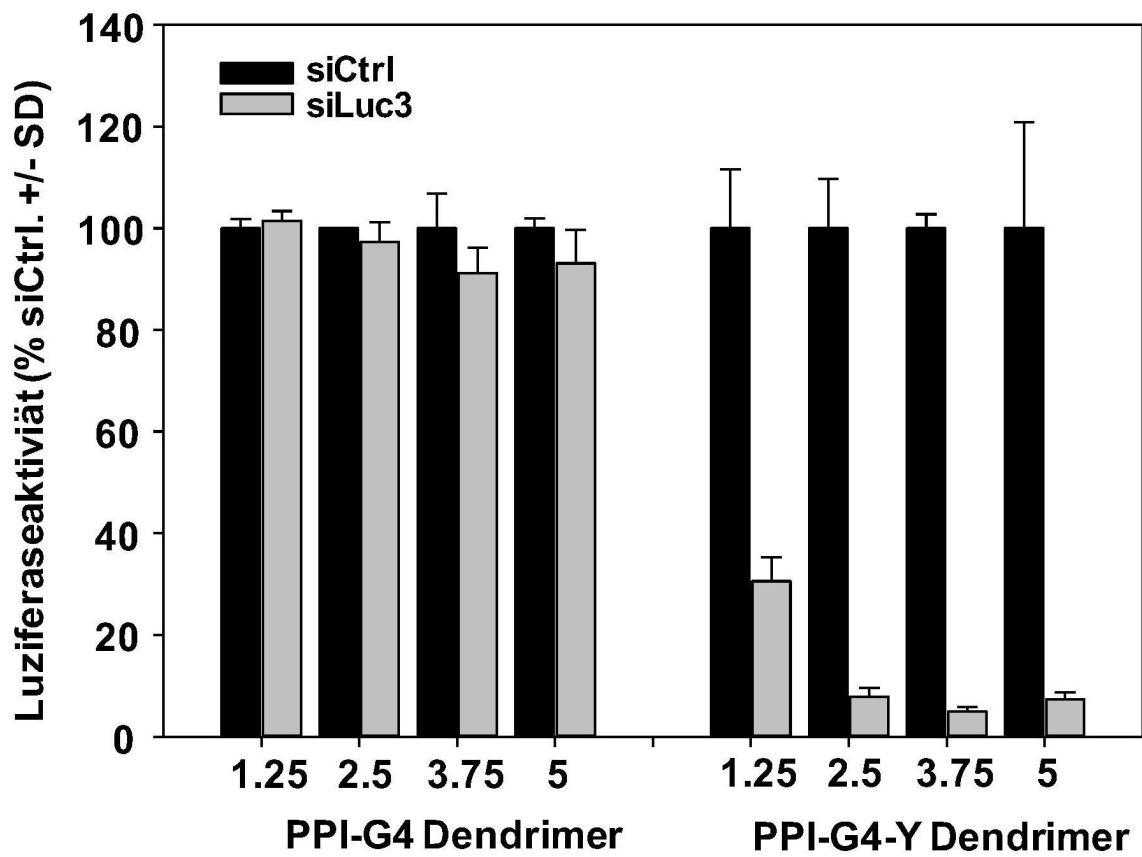


FIG. 5

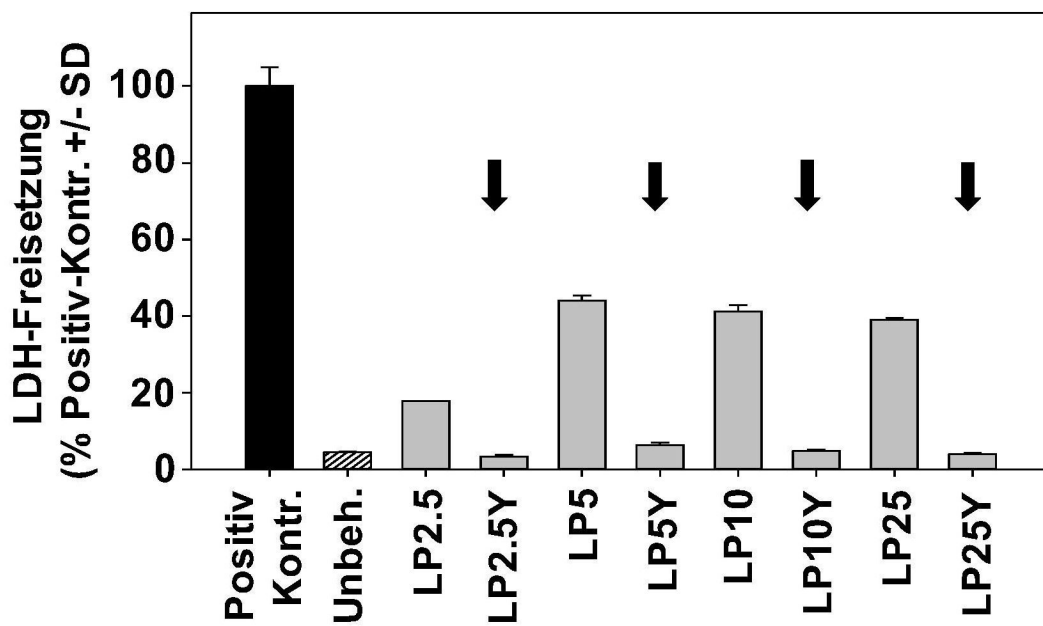
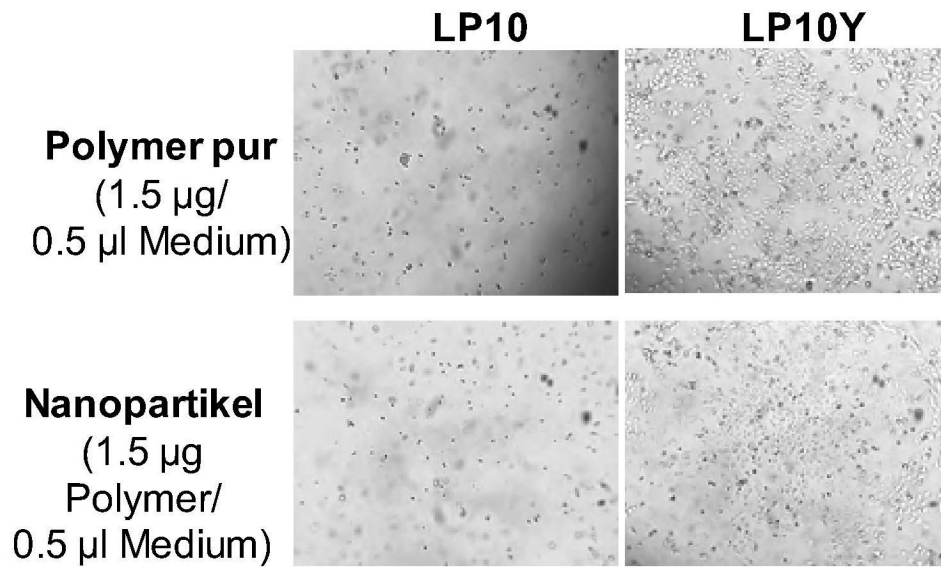


FIG. 6

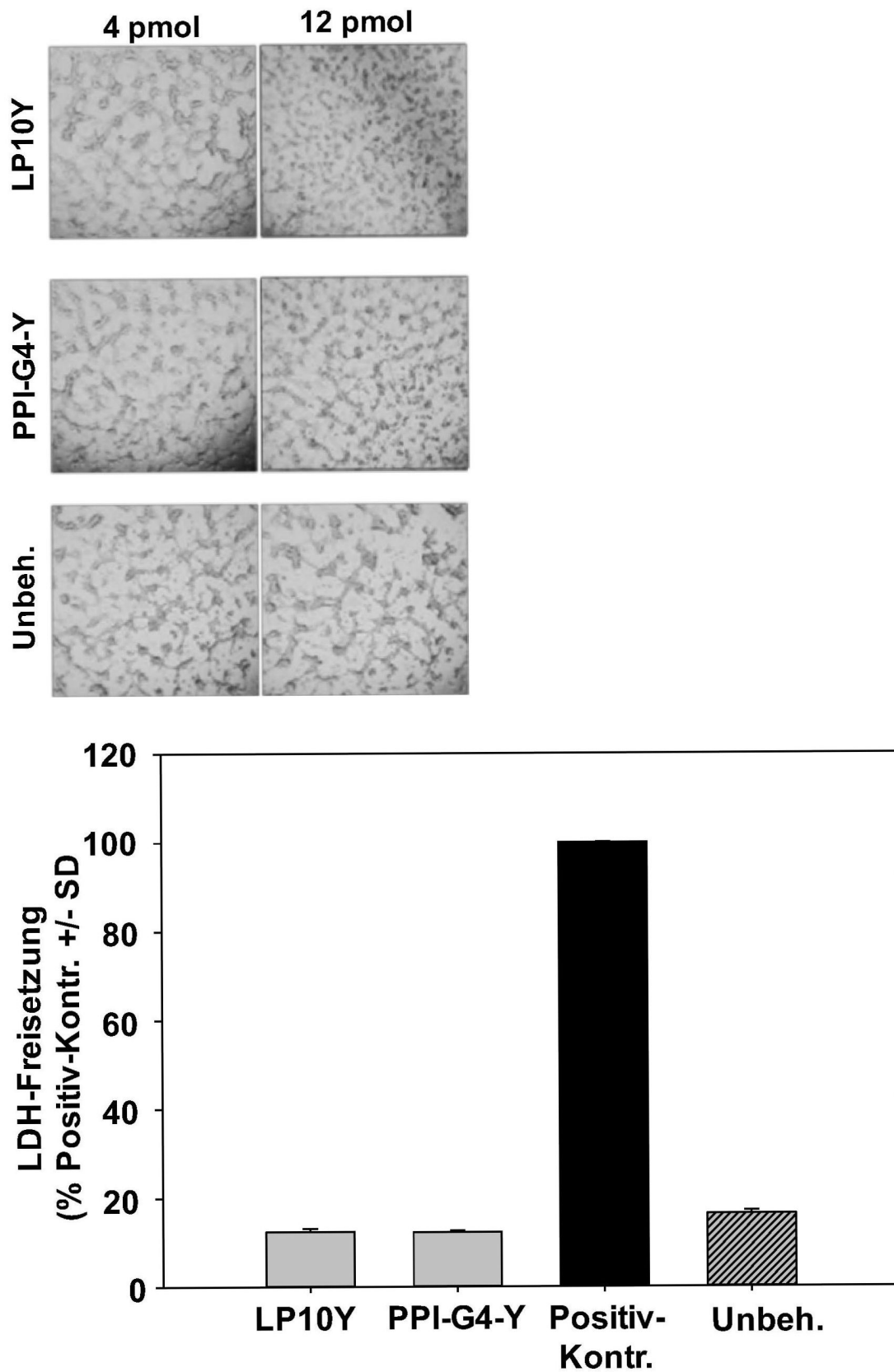


FIG. 7

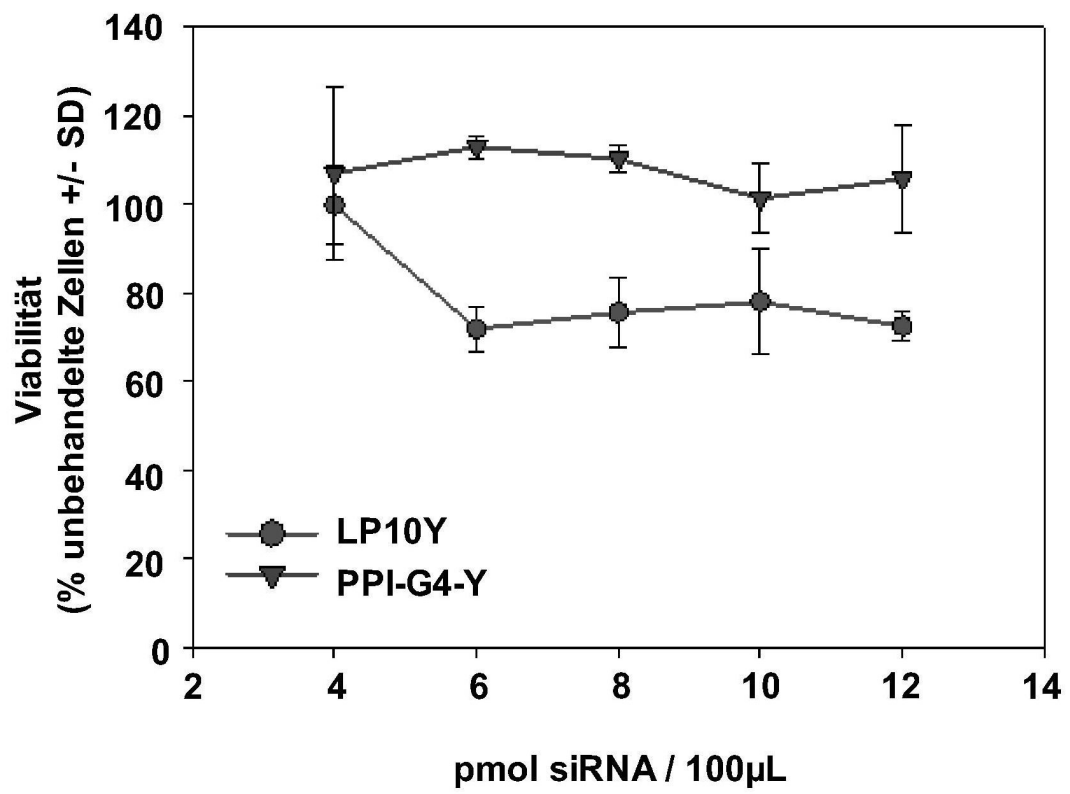


FIG. 8

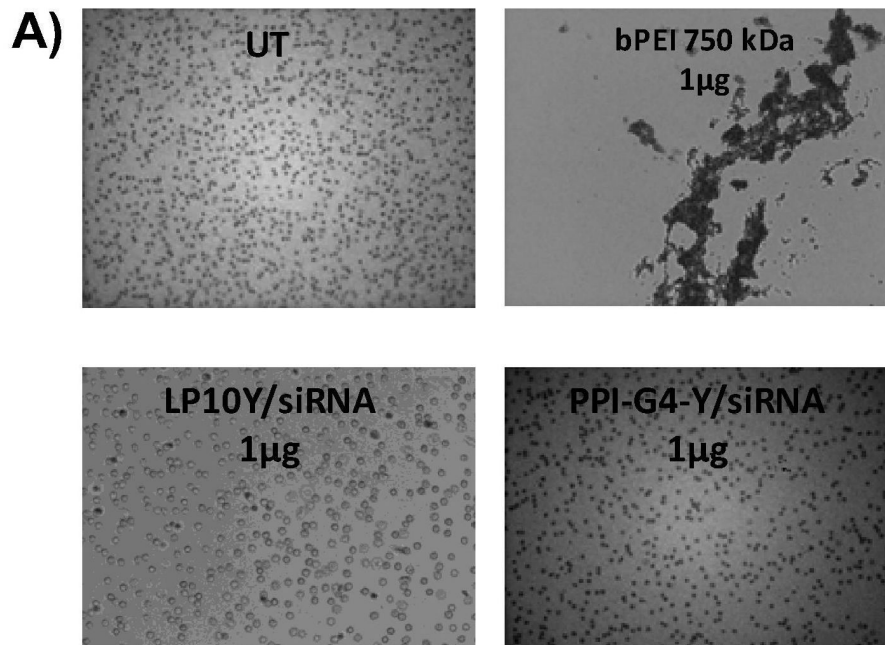


FIG. 8

B)

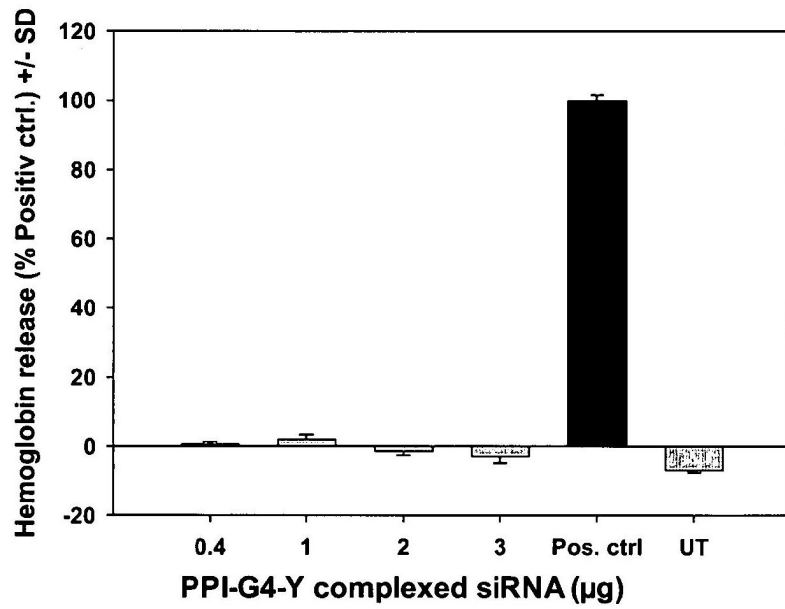
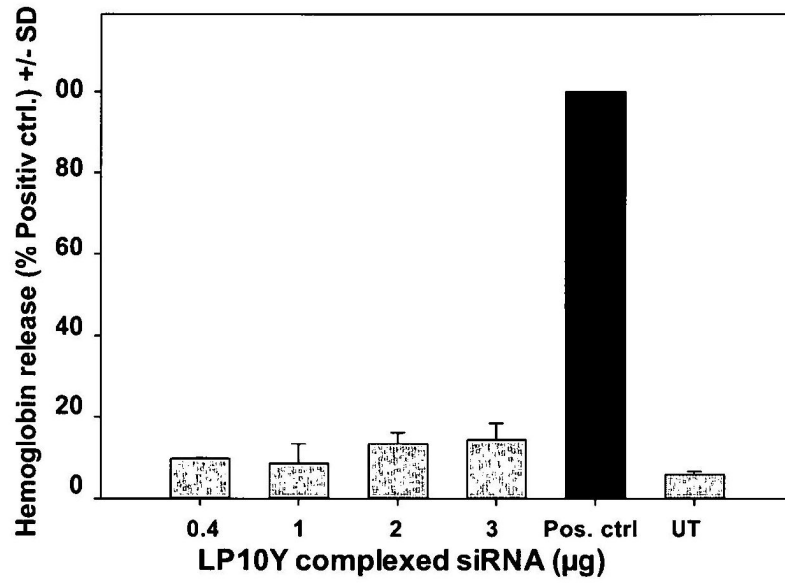


FIG. 9

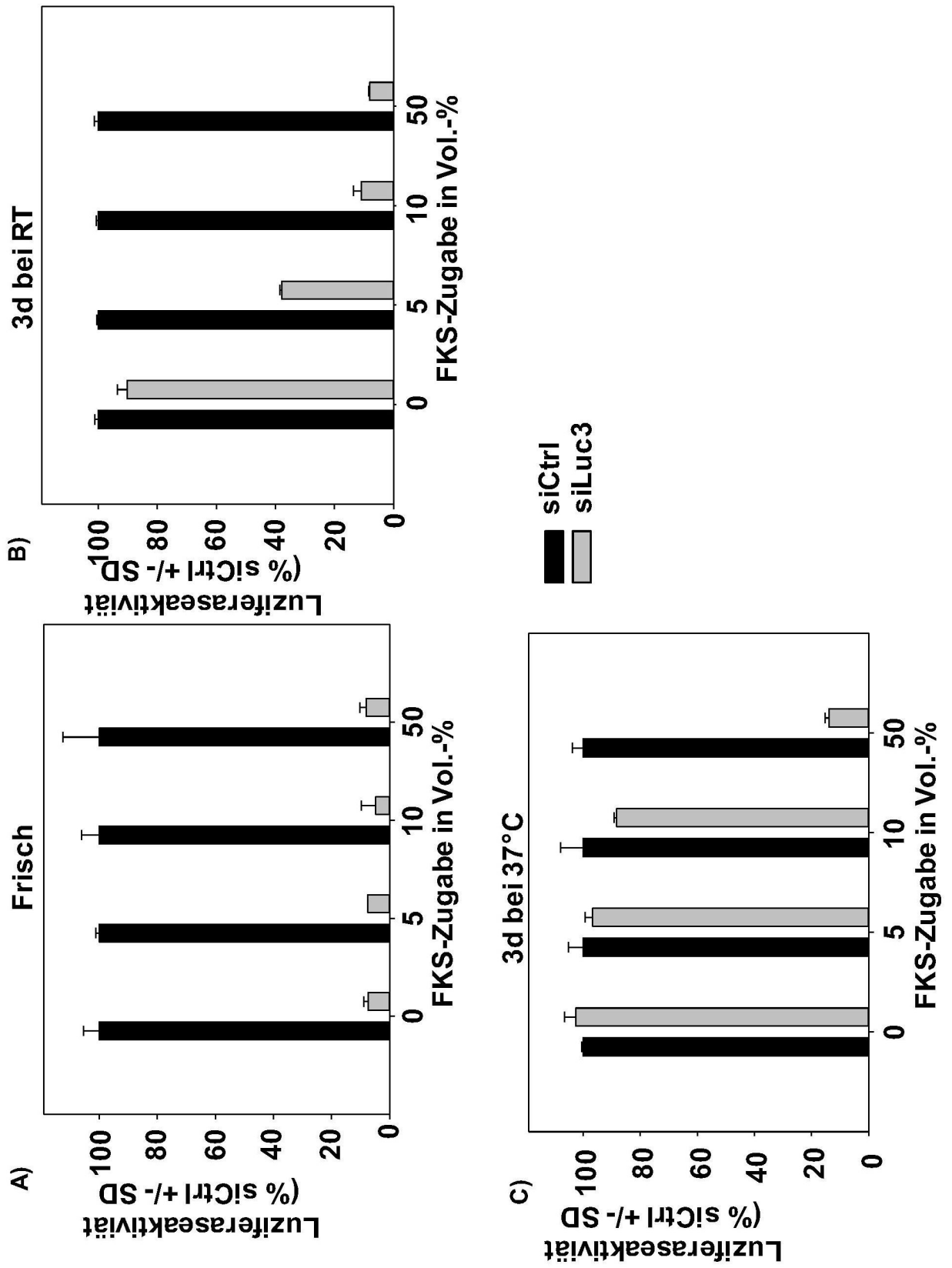


FIG. 10

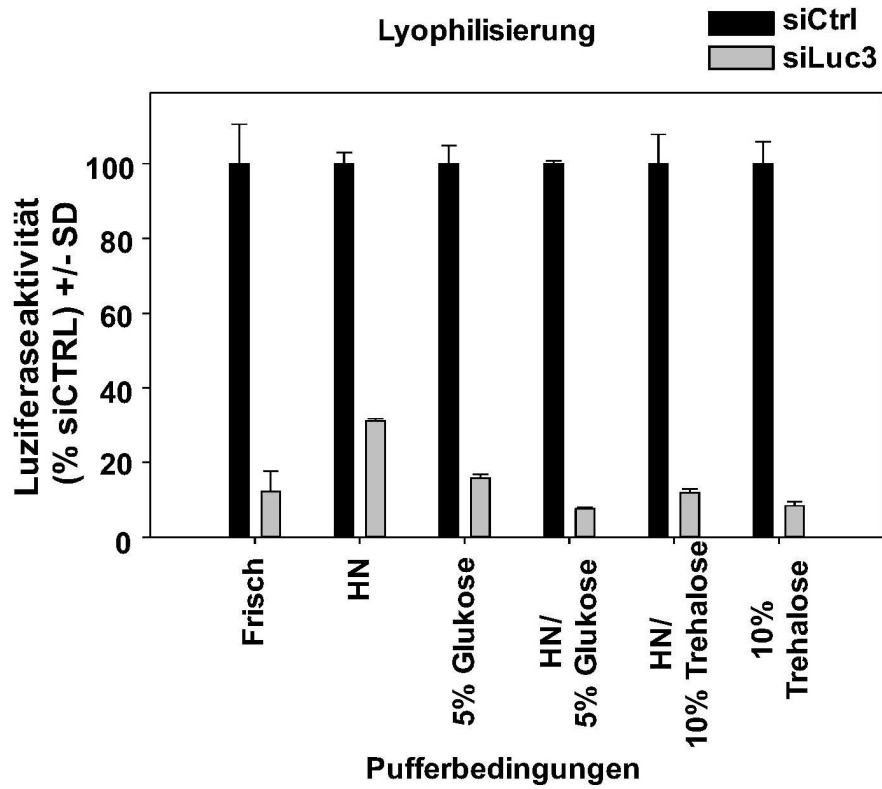
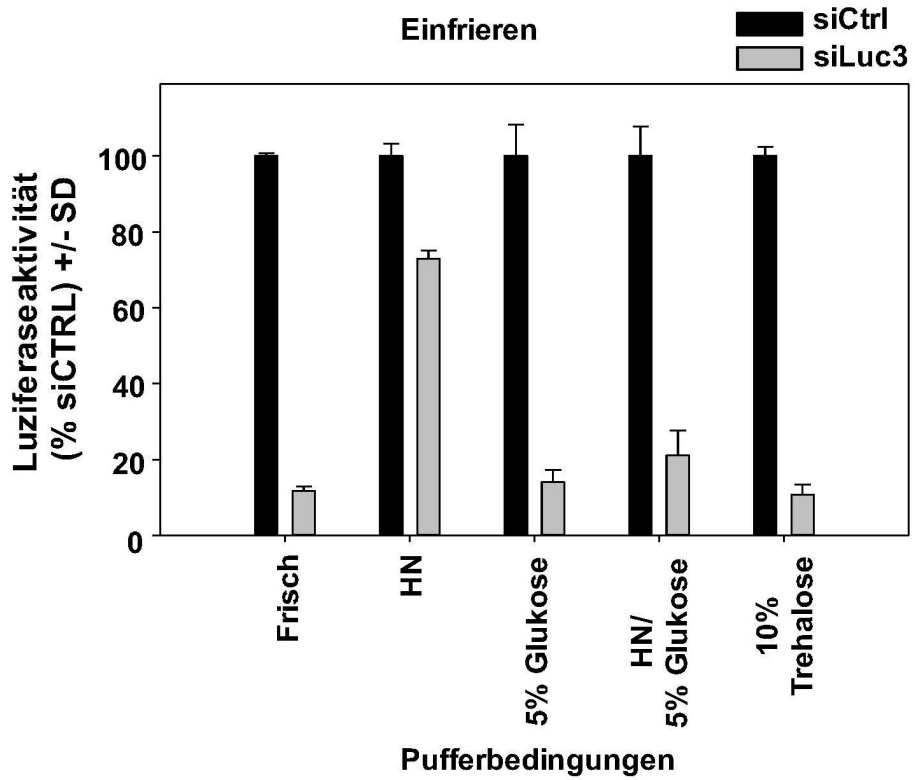




FIG. 11 A

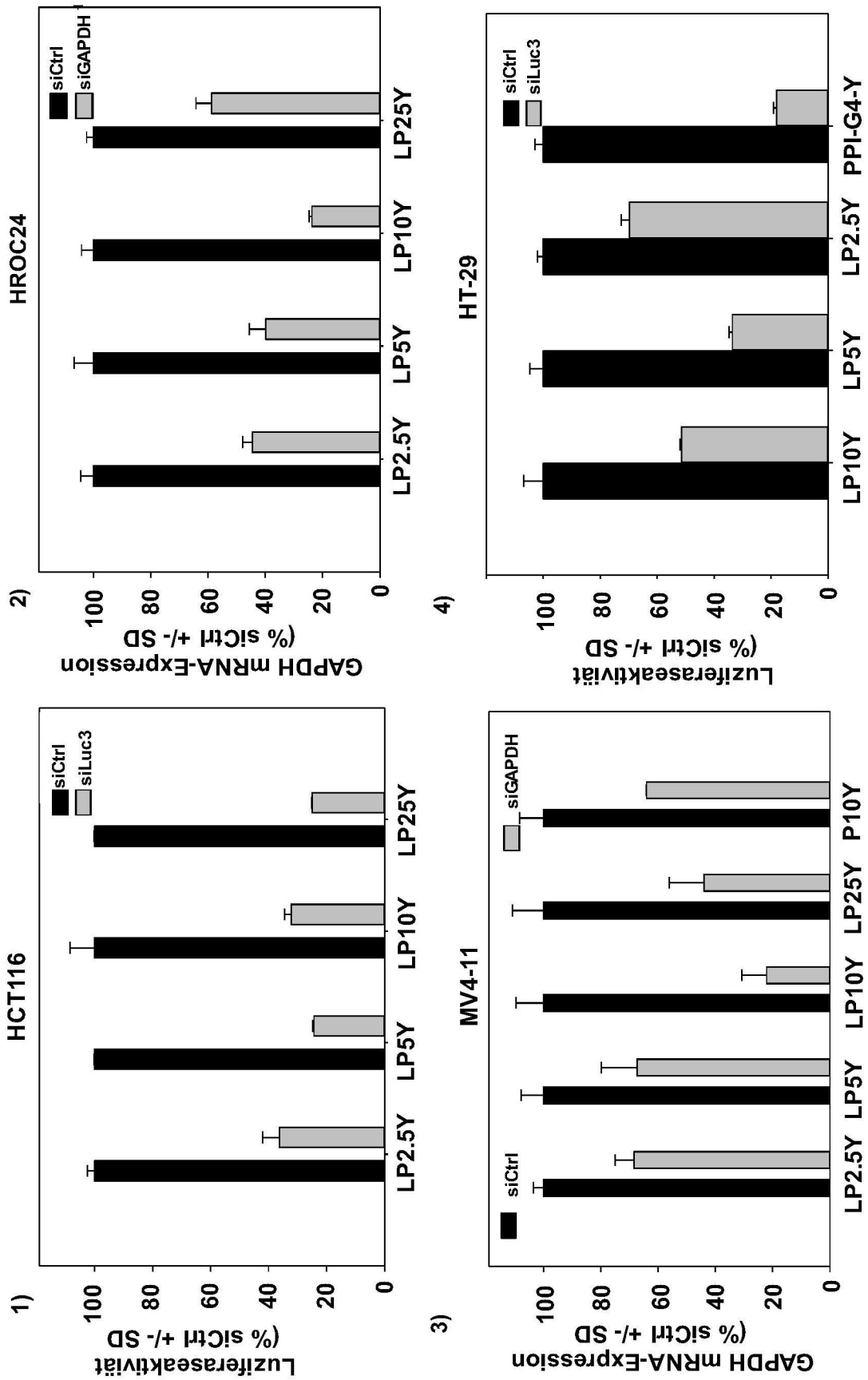


FIG. 11 B

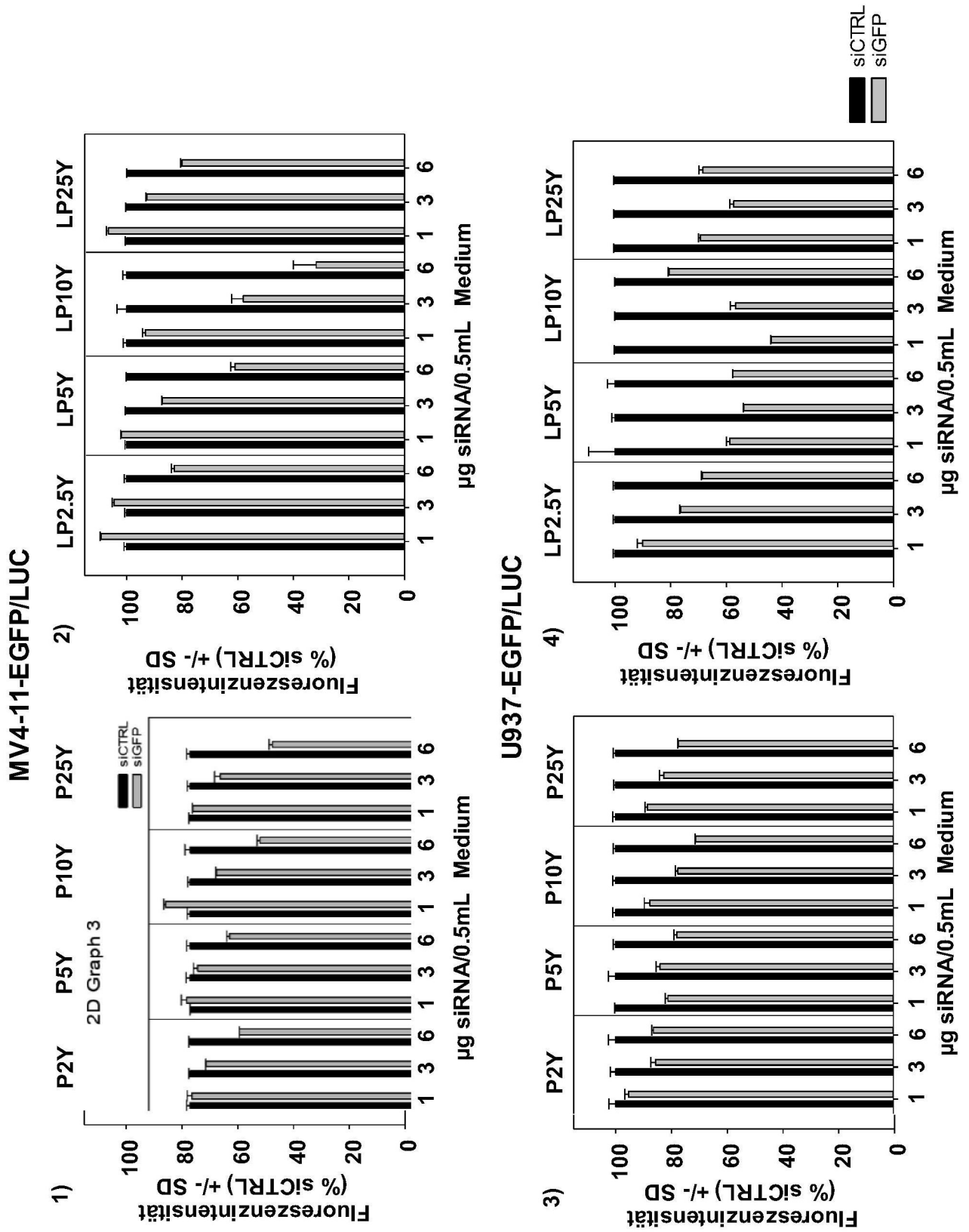


FIG. 12

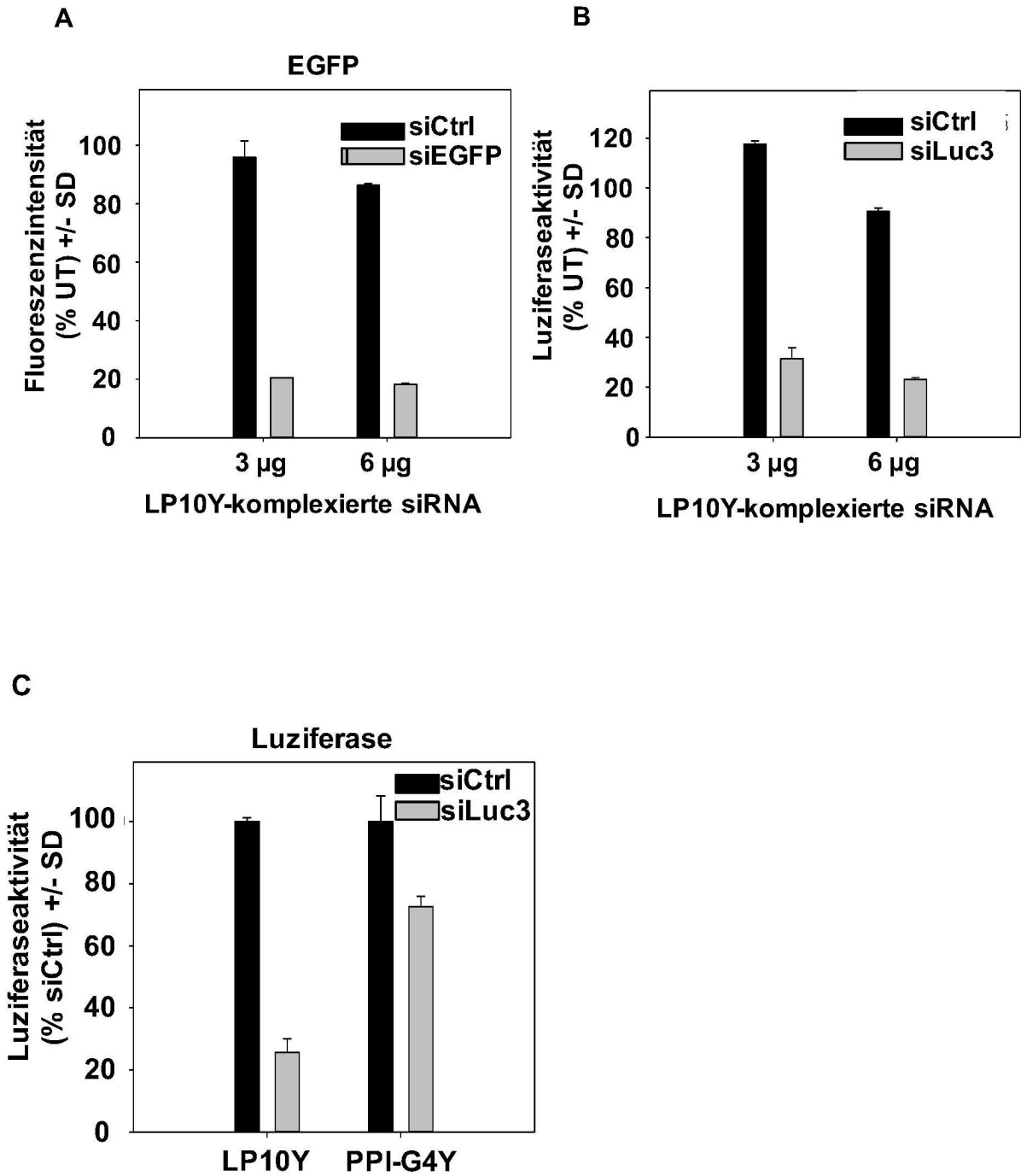


FIG. 13

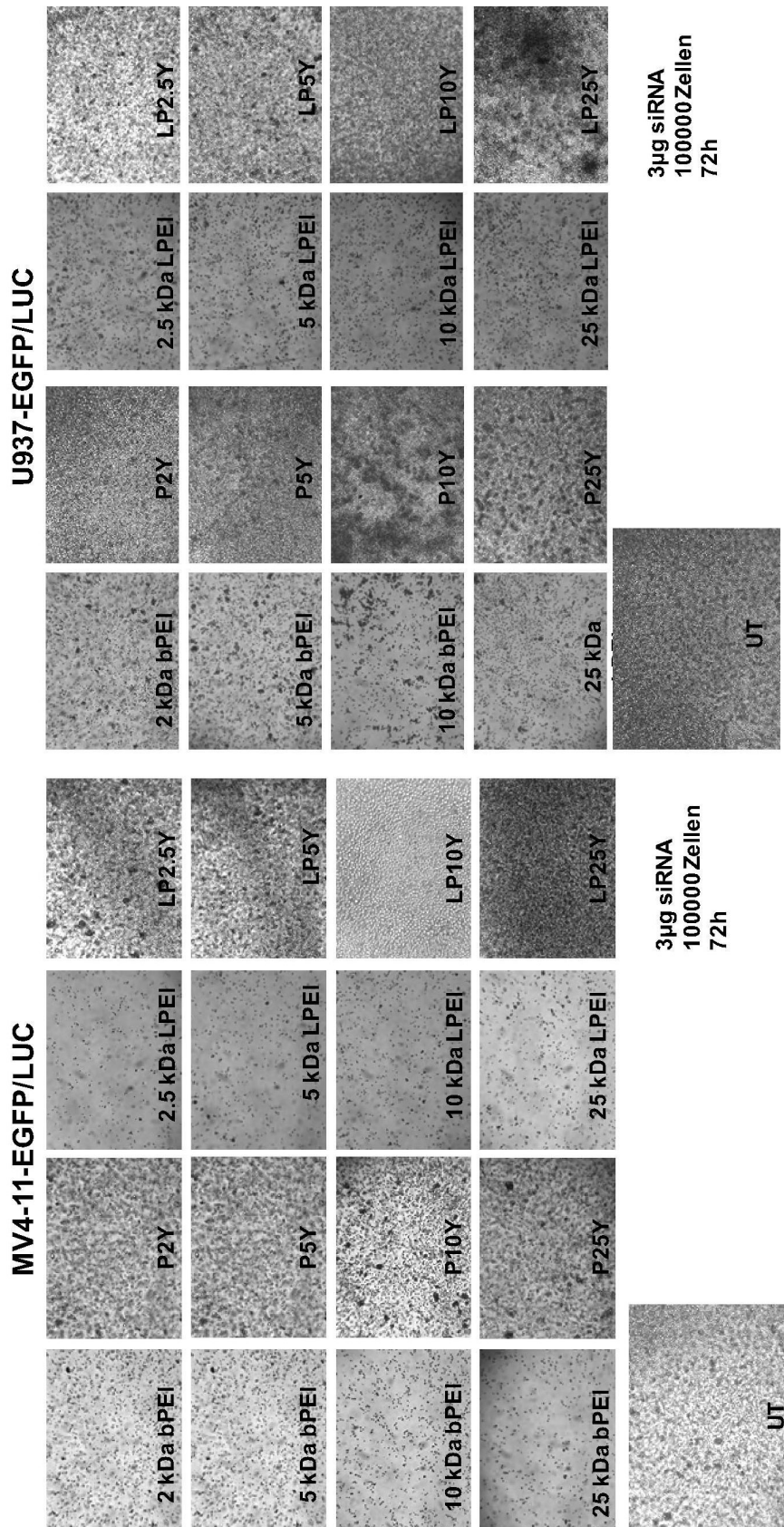


FIG. 14A

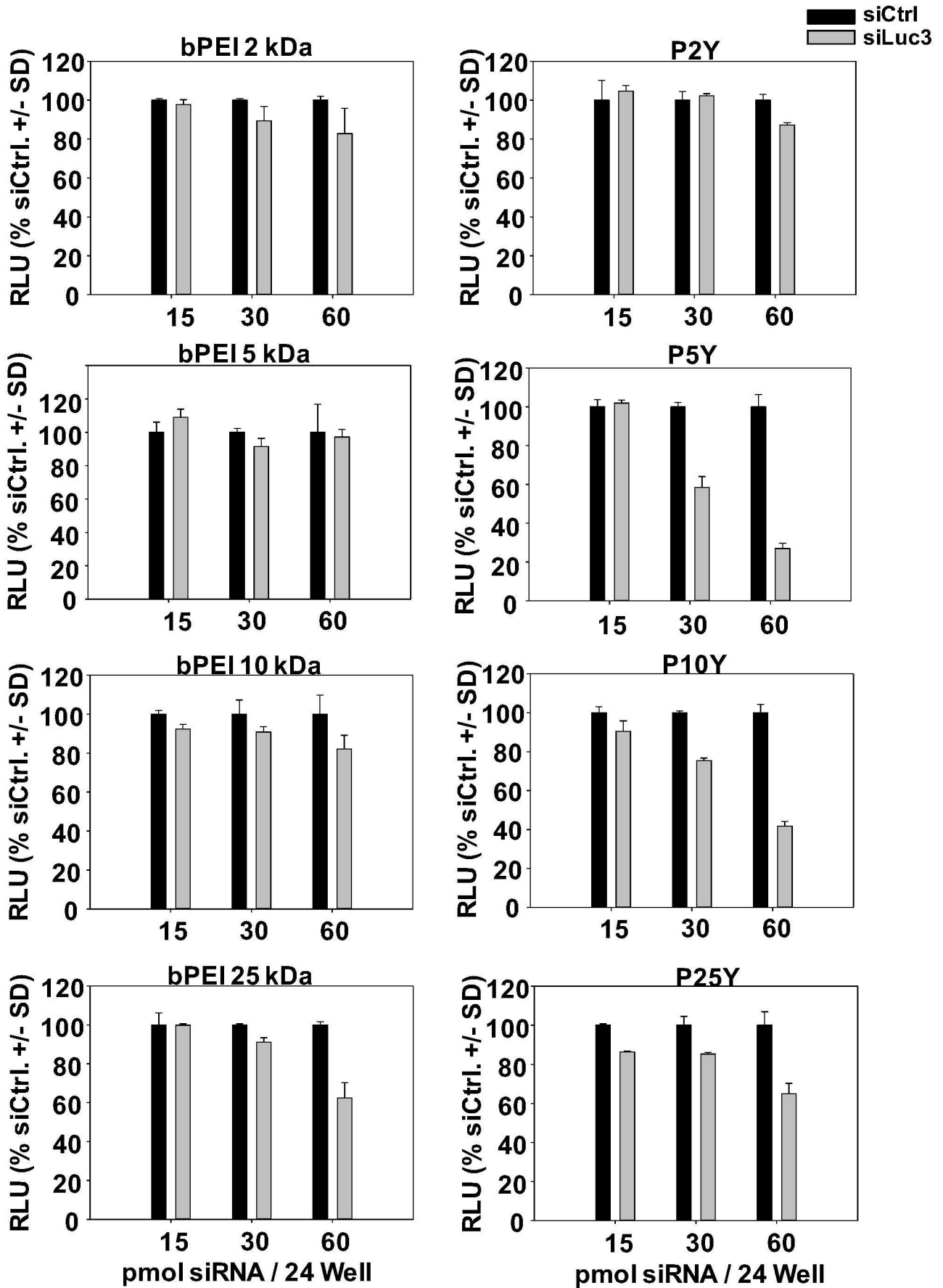


FIG. 14B

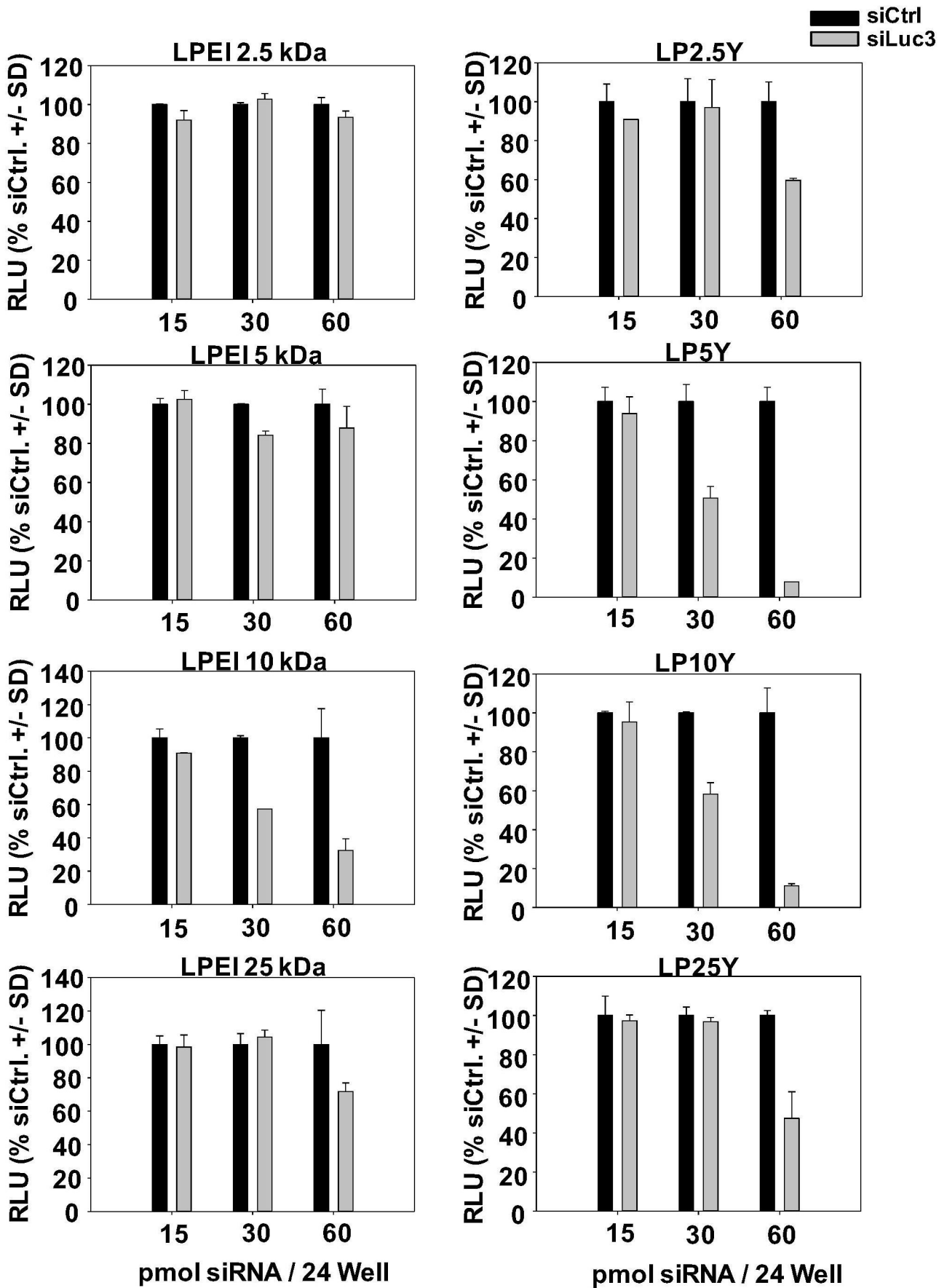


FIG. 14C

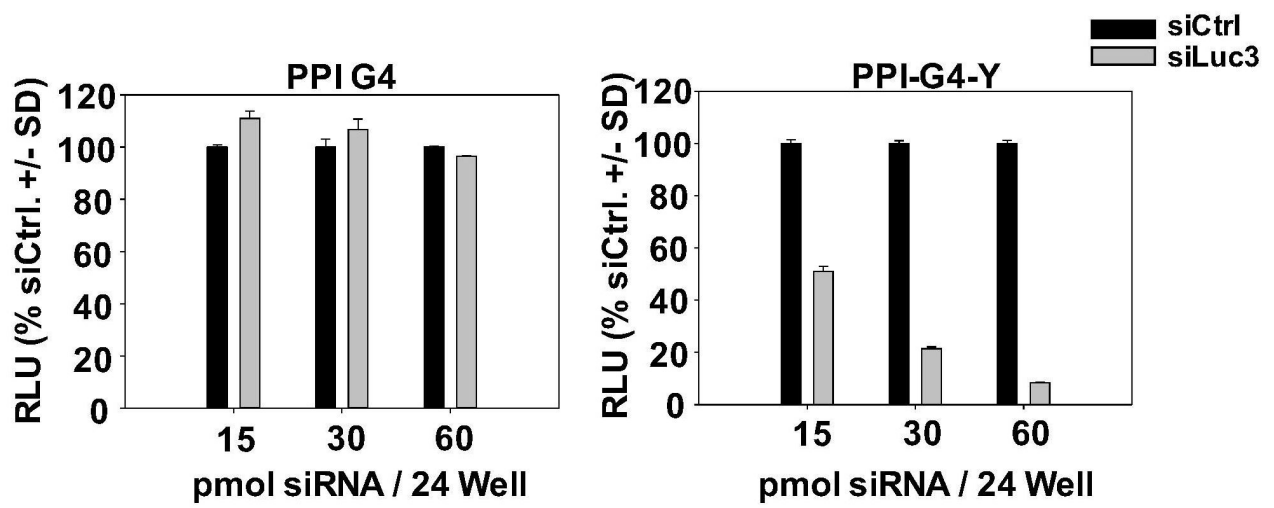


FIG. 15

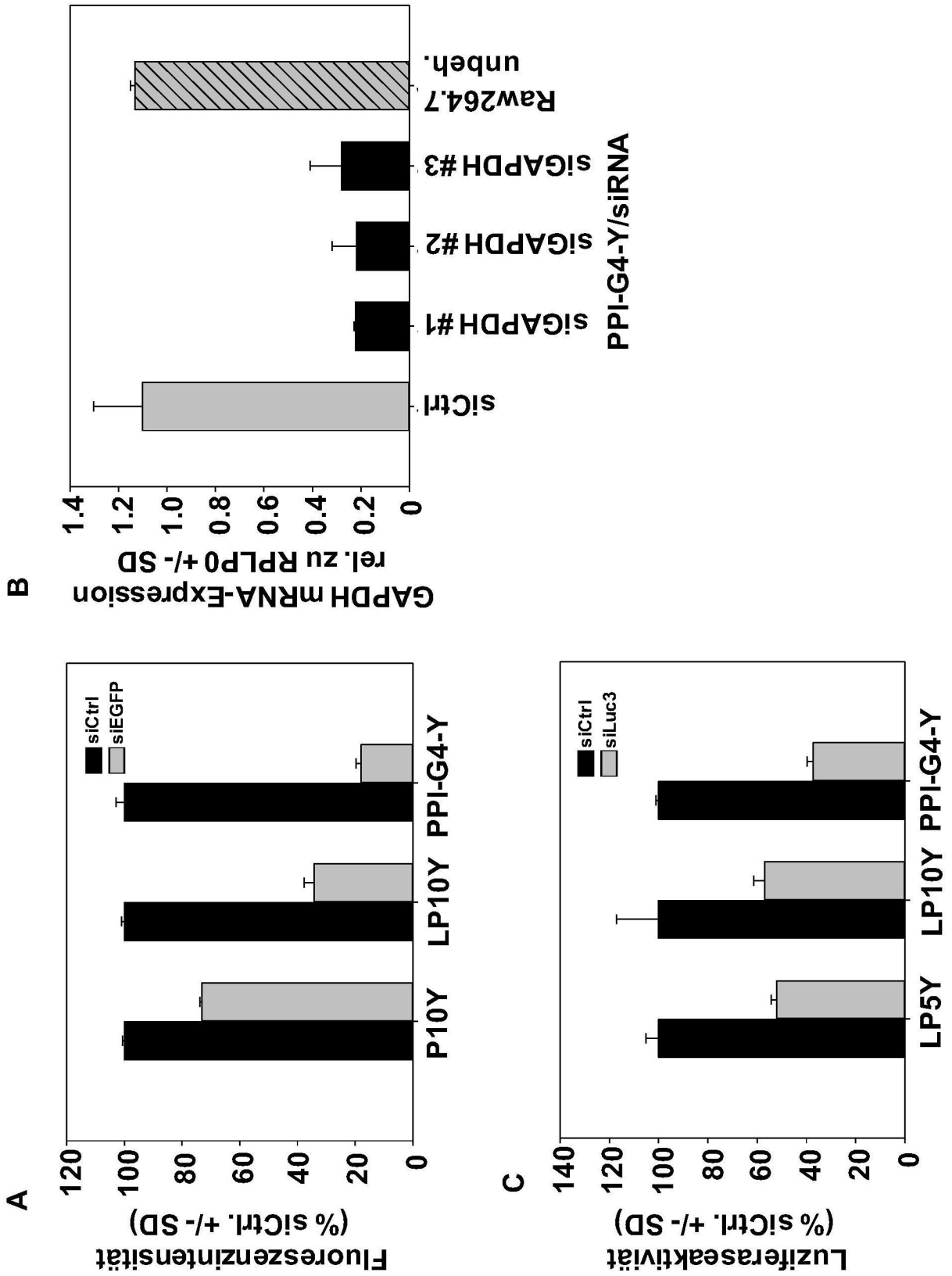




FIG. 16

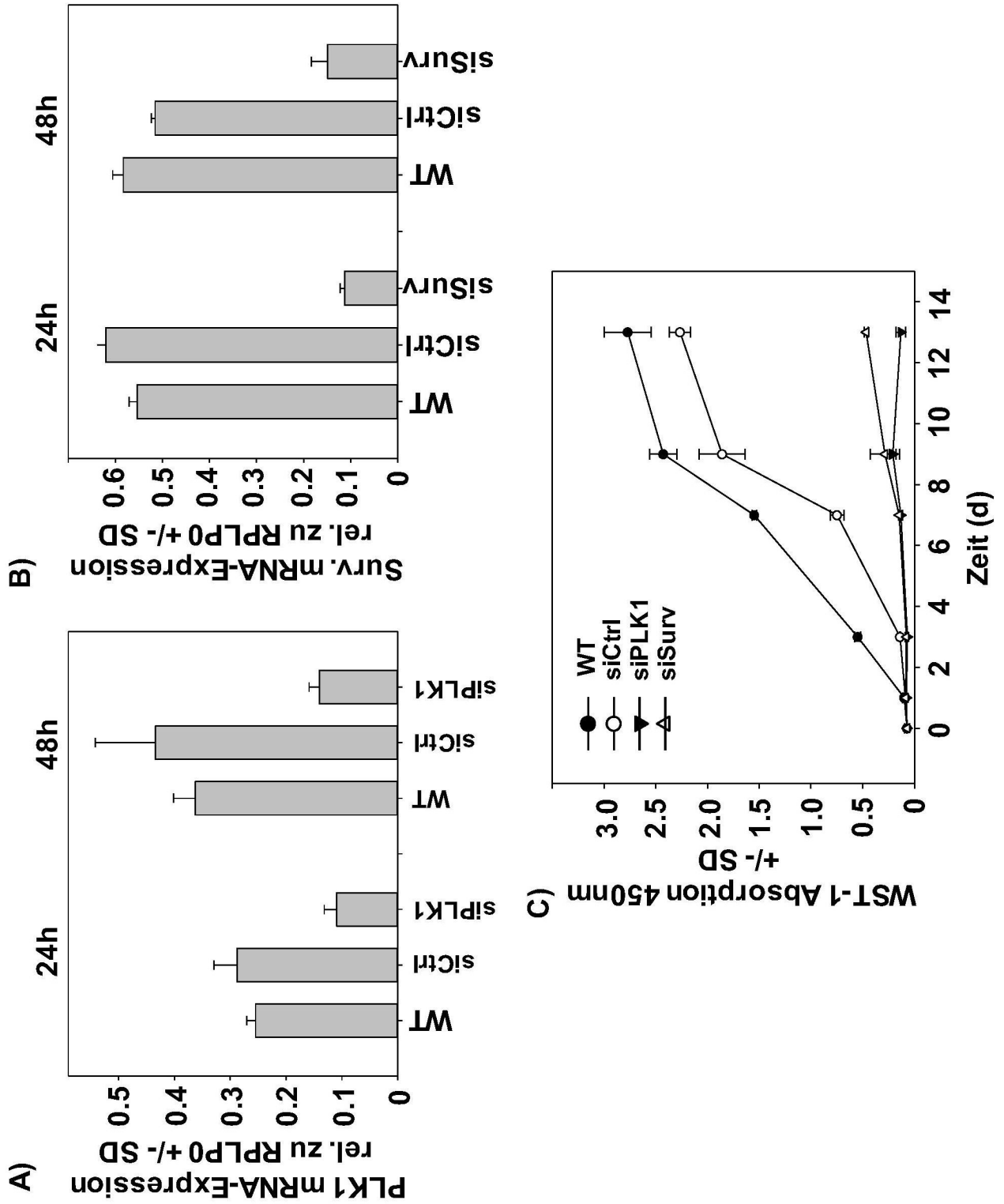


FIG. 17

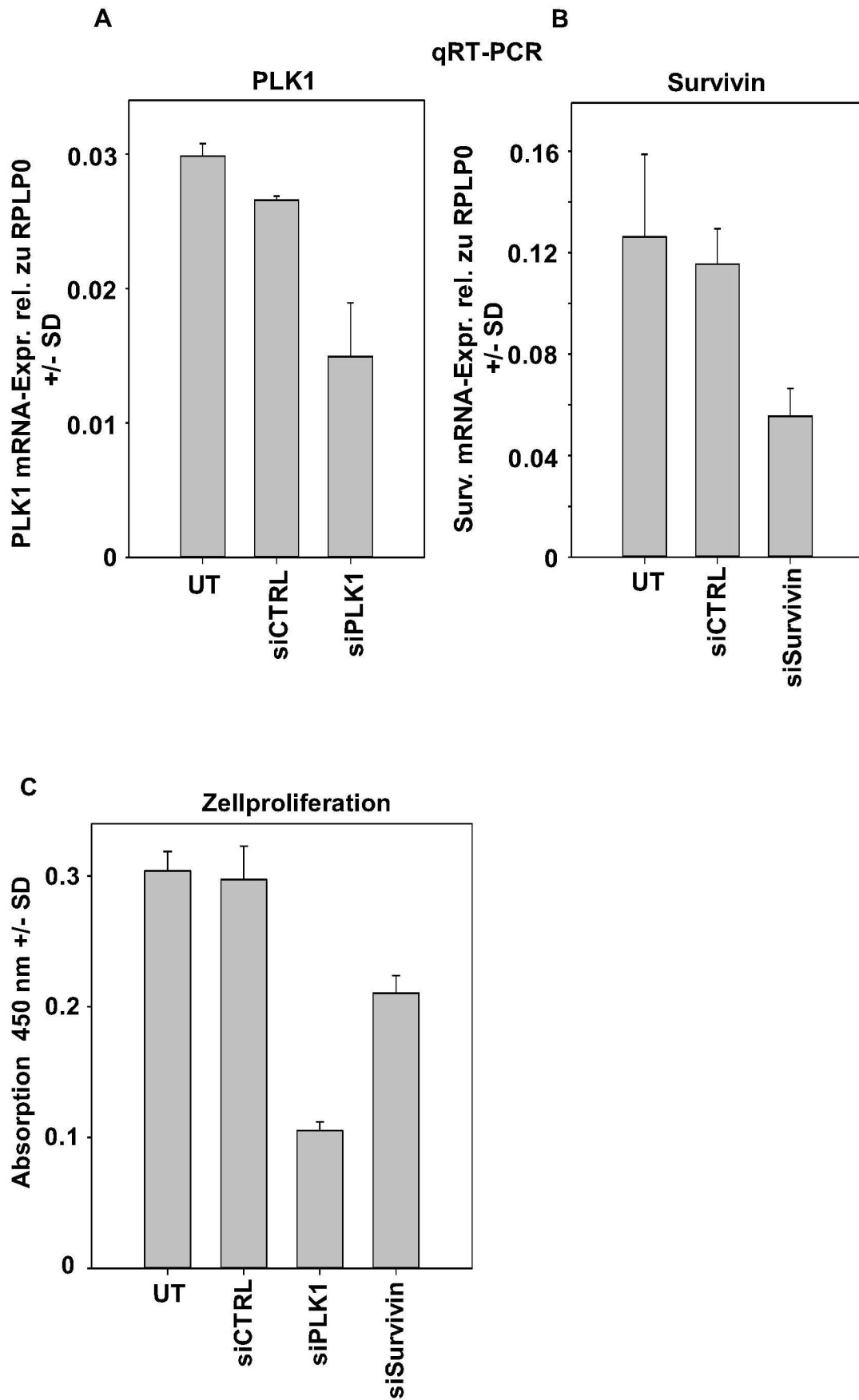


FIG. 18

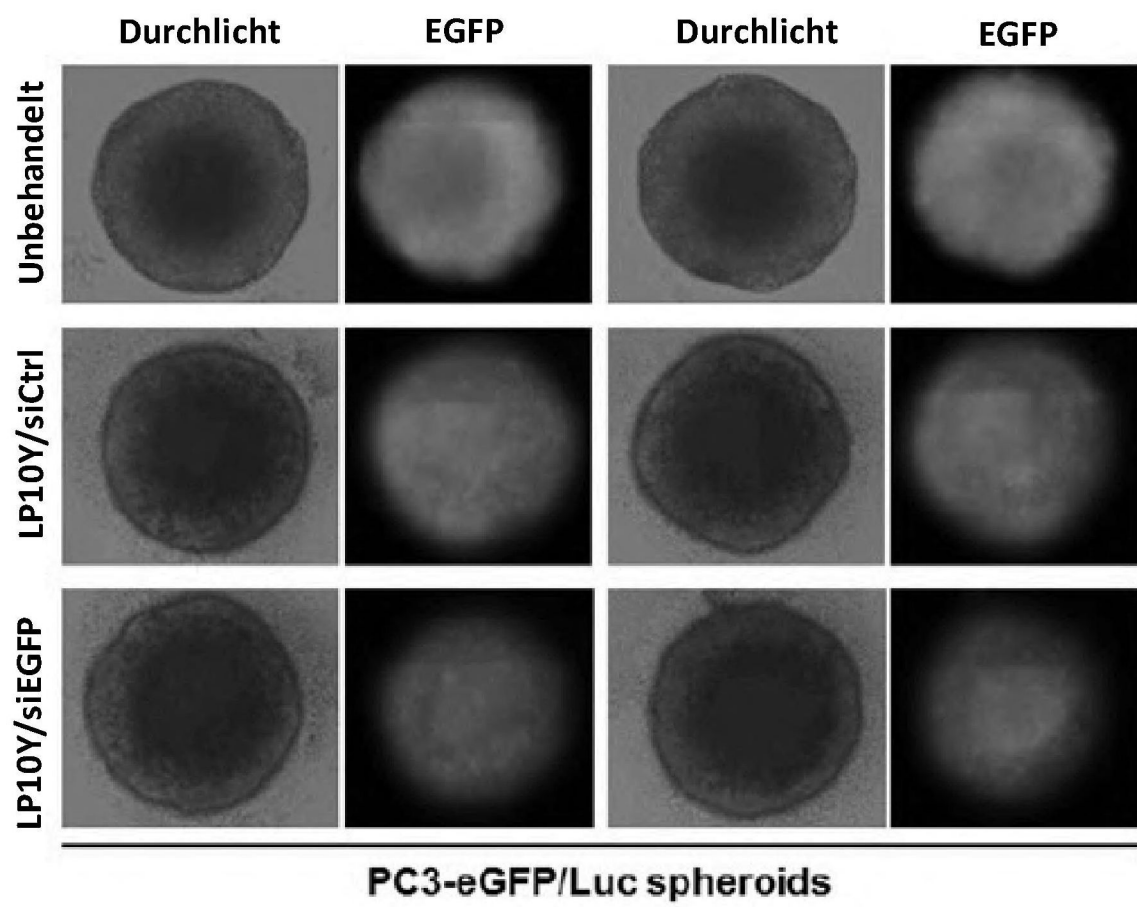


FIG. 19

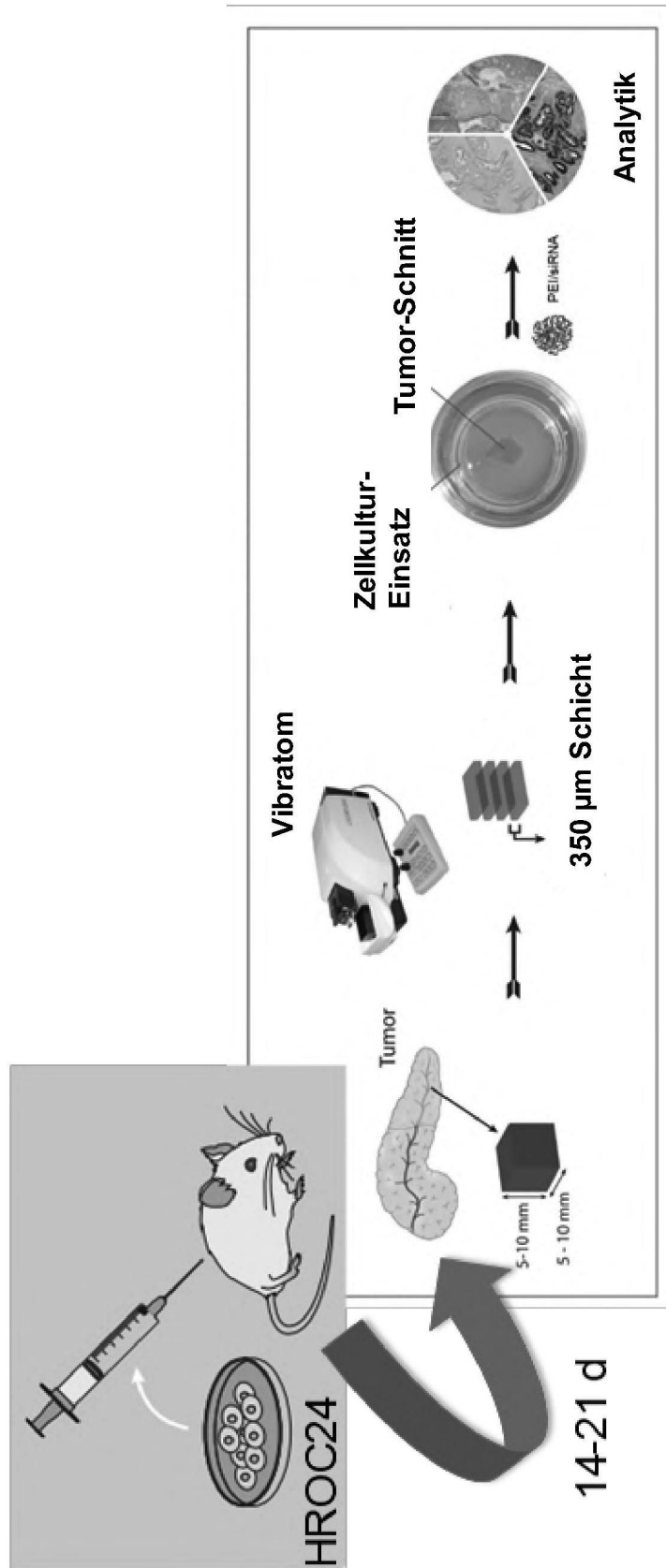


FIG. 20

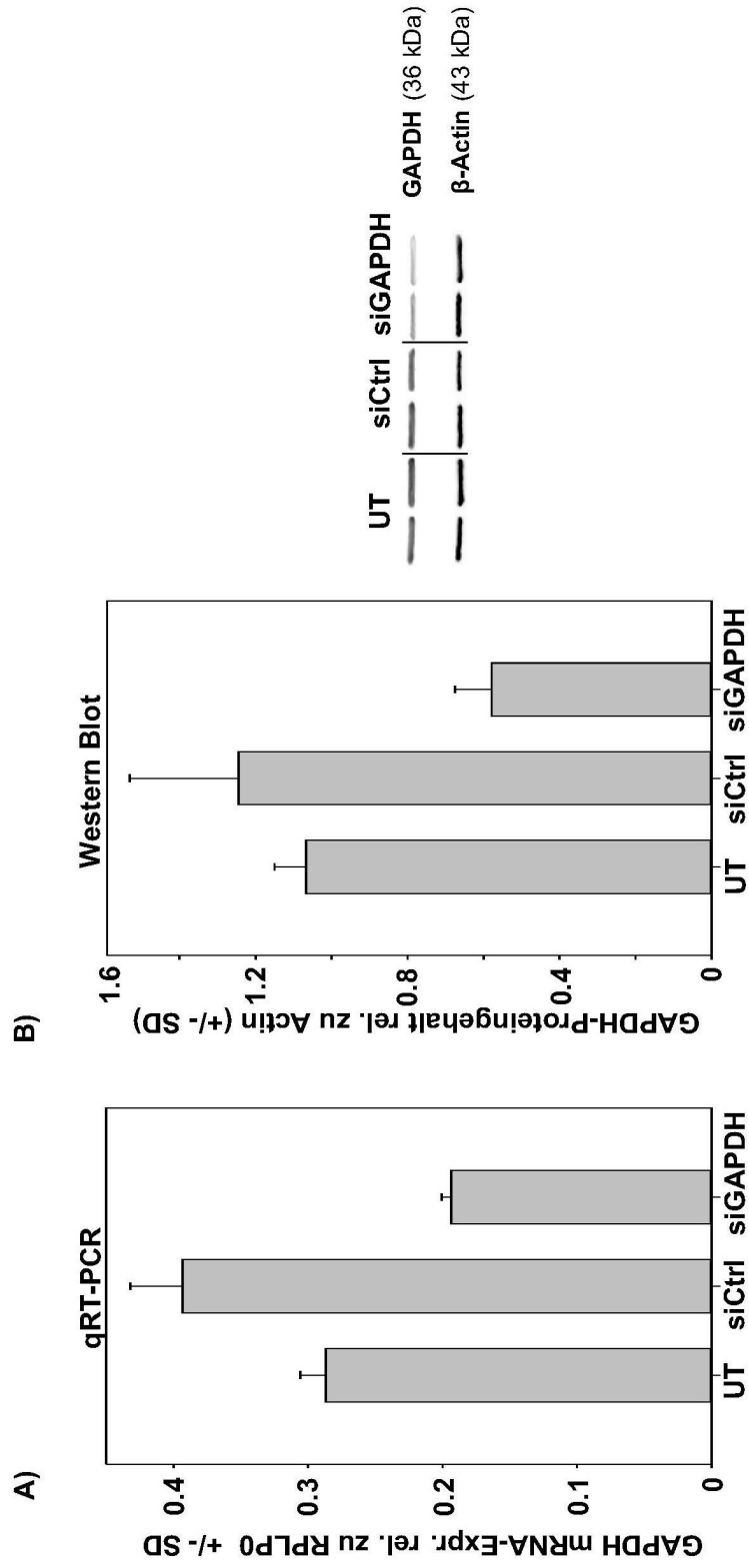


FIG. 21

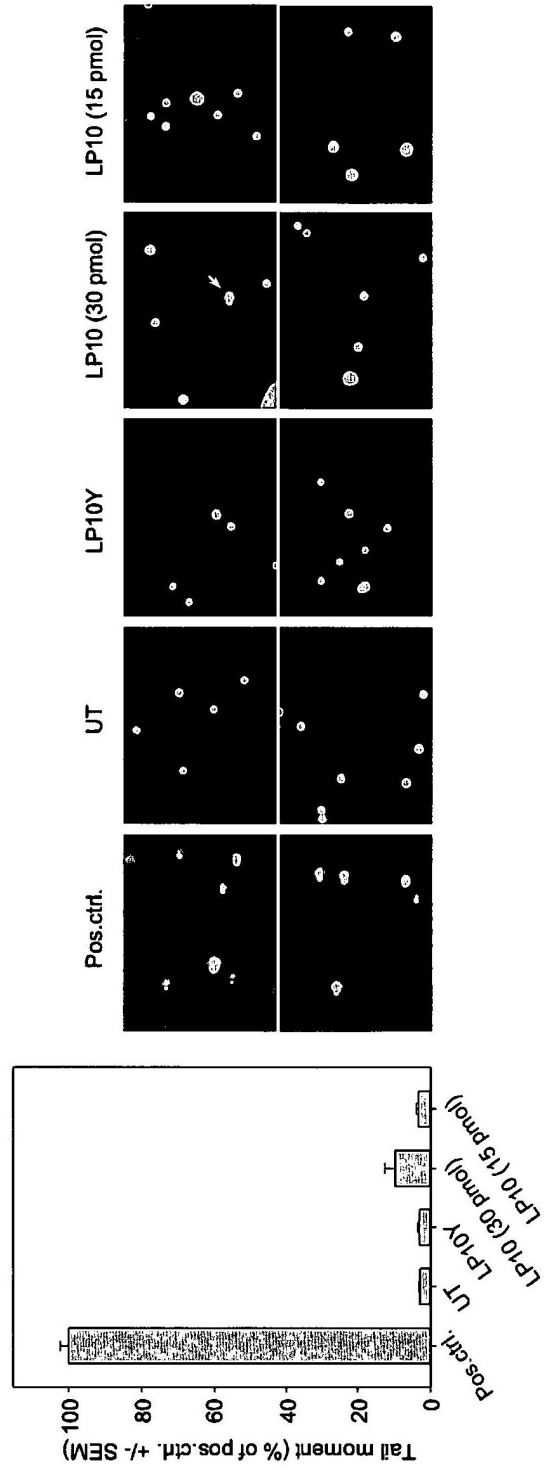


FIG. 22

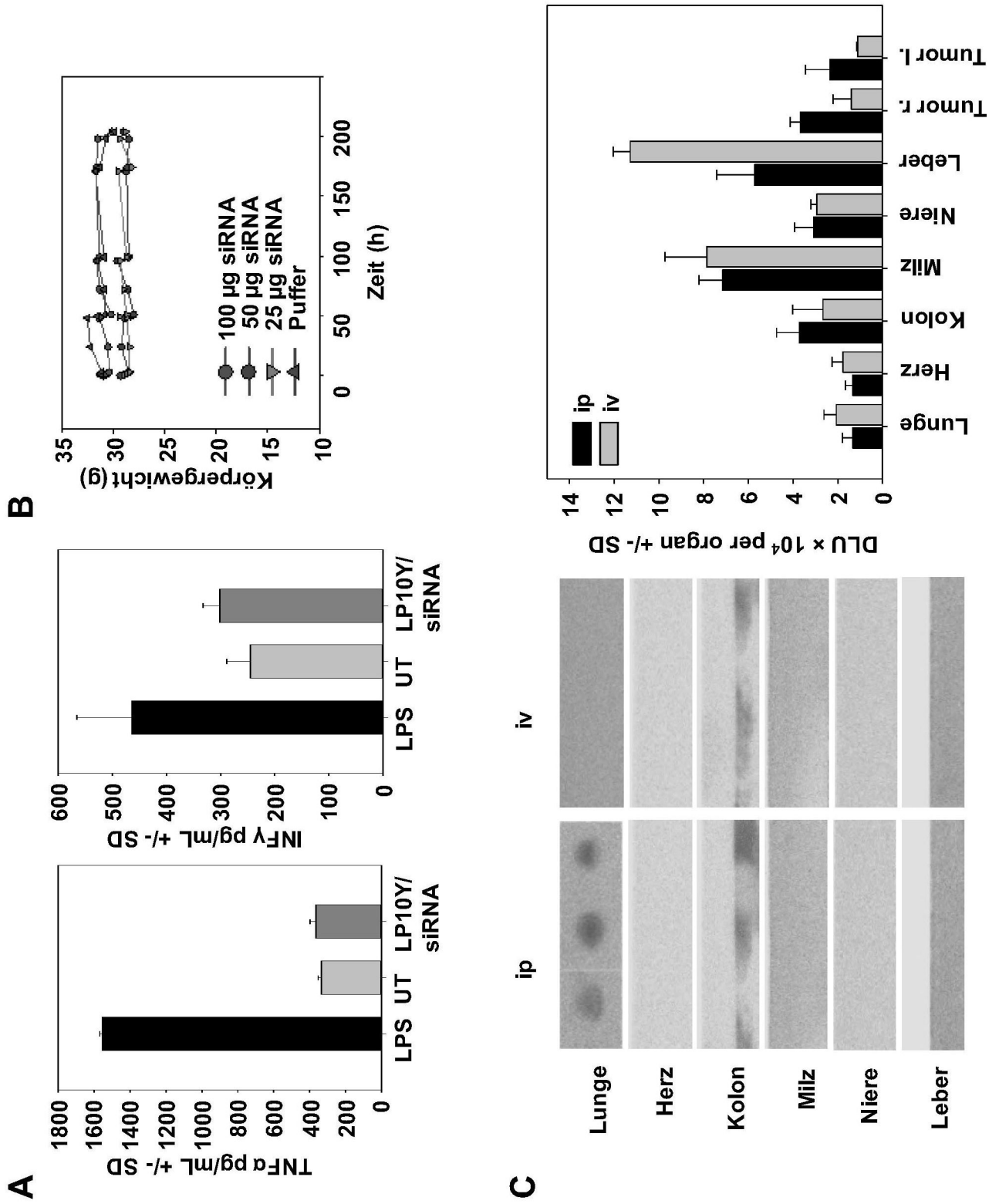


FIG. 23

