

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C08G 73/02

C12N 15/87



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01806801.4

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1178973C

[22] 申请日 2001.2.15 [21] 申请号 01806801.4

[30] 优先权

[32] 2000. 2. 18 [33] FR [31] 00/02059

[32] 2000. 5. 12 [33] US [31] 60/203,907

[86] 国际申请 PCT/FR2001/000460 2001.2.15

[87] 国际公布 WO2001/060890 法 2001.8.23

[85] 进入国家阶段日期 2002.9.18

[71] 专利权人 甘瑟尔股份有限公司

地址 法国塞纳河畔维特里

[72] 发明人 F·莱克里尔克 J·赫斯克维茨

D·施尔曼

审查员 张代飞

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 王 杰

权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 4 页

[54] 发明名称 官能化聚亚烷基亚胺的制备方法, 含有它们的组合物及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一种官能化聚亚烷基亚胺的制备方法, 该官能化聚亚烷基亚胺适用于有待转染到细胞中的核酸的配方。该方法在于在异丙醇钛(IV)和硼氢化钠存在下, 用官能化半缩醛处理聚亚烷基亚胺。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、官能化聚亚烷基亚胺的制备方法，其特征在于在异丙醇钛(IV)和硼氢化钠存在下，在醇溶剂中，用官能化半缩醛处理聚亚烷基亚胺。

2、权利要求1的官能化聚亚烷基亚胺的制备方法，其特征在于所述醇溶剂是甲醇或乙醇。

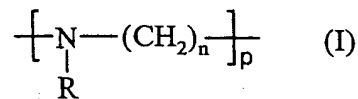
3、权利要求1的官能化聚亚烷基亚胺的制备方法，其特征在于在温度10-30℃下进行操作。

4、权利要求1的官能化聚亚烷基亚胺的制备方法，其特征在于每摩尔聚亚烷基亚胺使用25-100摩尔异丙醇钛(IV)。

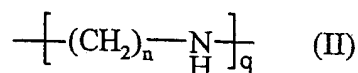
5、权利要求1的官能化聚亚烷基亚胺的制备方法，其特征在于硼氢化钠的用量等于异丙醇钛(IV)用量的50-80摩尔%。

6、权利要求1的官能化聚亚烷基亚胺的制备方法，其特征在于相对于每摩尔聚亚烷基亚胺使用6-100摩尔官能化半缩醛。

7、权利要求1的官能化聚亚烷基亚胺的制备方法，其特征在于起始的聚亚烷基亚胺具有下述通式：



式中R代表氢原子或下述通式的基团：



n是2-10的整数，

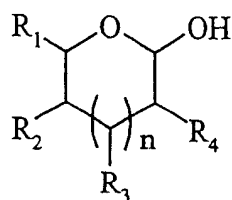
p和q是整数，其条件是p+q之和使得聚合物平均分子量是100-10<sup>7</sup>Da。

8、权利要求7的官能化聚亚烷基亚胺的制备方法，其特征在于所述起始聚亚烷基亚胺是聚亚乙基亚胺或聚亚丙基亚胺。

9、权利要求8的官能化聚亚烷基亚胺的制备方法，其特征在于所述起始聚亚烷基亚胺选自平均分子量为50 000 Da或25 000 Da或22 000 Da的聚亚乙基亚胺，或平均分子量为800 000 Da的聚亚丙基亚胺。

10、权利要求1的官能化聚亚烷基亚胺的制备方法，其特征在于官能化半

缩醛具有下述通式:



式中  $n$  等于 0 或 1,  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  相同或不同, 彼此独立地代表氢原子、与进行该反应相容的基团或靶元素, 条件是选自  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  的单独一个取代基是靶元素。

11、权利要求 10 的官能化聚亚烷基亚胺的制备方法, 其特征在于, 与进行所述反应相容的基团选自羟基、 $C_{1-4}$  烷基或羟基  $C_{1-4}$  烷基。

12、权利要求 10 的官能化聚亚烷基亚胺的制备方法, 其特征在于所述靶元素选自糖、肽、蛋白质、寡核苷酸、脂类、神经递质、激素、维生素或它们的衍生物。

13、权利要求 12 的官能化聚亚烷基亚胺的制备方法, 其特征在于所述靶元素选自生长因子受体、细胞因子受体、细胞凝集素类受体的配位体, 对如整联蛋白粘附蛋白质受体具有亲合性的 RGD 序列配位体、转铁蛋白受体、HDL、LDL、叶酸盐转运蛋白、唾液酸化的路易斯寡糖、抗体 Fab 片段、单链抗体 ScFv、单糖、二糖或三糖。

14、权利要求 13 的官能化聚亚烷基亚胺的制备方法, 其特征在于所述糖选自半乳糖、甘露糖、岩藻糖、鼠李糖、乳糖或麦芽糖。

15、权利要求 1 的官能化聚亚烷基亚胺的制备方法, 其特征在于接枝在聚亚烷基亚胺上的官能化半缩醛百分数是 1-20 摩尔%。

16、含有至少一种根据权利要求 1 所述方法得到的官能化聚亚烷基亚胺和至少一种核酸的组合物。

17、权利要求 16 的组合物, 其特征在于所述核酸是脱氧核糖核酸或核糖核酸。

18、权利要求 17 的组合物, 其特征在于所述核酸包含一种或多种在调节序列控制下具有治疗意义的基因。

19、权利要求 16 的组合物在制备用于转染细胞的药物中的应用。

20、权利要求 16 的组合物在核酸往细胞中转移的应用。

21、往细胞中转移核酸的方法，该方法包括下述步骤：

- (1) 制备权利要求 16 限定的组合物，和
- (2) 让细胞与(1)中生成的组合物进行接触。

## 官能化聚亚烷基亚胺的制备方法, 含有它们的组合物及其应用

本发明涉及适用于有待转染到细胞中的核酸配方的官能化聚亚烷基亚胺的制备方法。

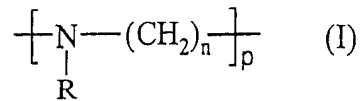
随着生物技术的发展,往细胞中有效转移核酸的可能性已变成许多生物技术应用的基本技术。可以涉及例如用于生产重组蛋白质、或在实验室中研究基因表达的调节作用、基因克隆选择,或涉及DNA任何其他处理方面核酸往离体细胞中的转移。还可以涉及例如用于制备疫苗、研究标记或治疗方法方面核酸往活体内细胞中的转移。还可以涉及在从生物体取出的细胞中转移基因,以便以后再使用这些基因,例如用于产生转基因动物。

目前用于往细胞中转移基因的最流行的方法是使用病毒载体。由于这些载体并未完全丧失危险性,所以人们曾提出其他几种基于应用合成载体的方法。这些合成载体具有两种基本功能:复合和密集待转染的核酸,促进核酸通过质粒膜并且任选地通过两种核膜。

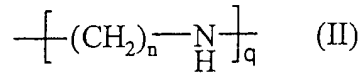
于是曾提出多组合成载体。在这些载体中,阳离子聚合物如聚亚烷基亚胺是特别有意义的。事实上业已证明,特别是在活体内转染核酸时,这些阳离子聚合物是比较有效的,并且还具有比较低的毒性。还观察到,这些阳离子聚合物与核酸生成的配合物(也被称作《聚丛(polyplexes)》)在注射点外扩散得比较好(J. S. Remy 等人《*Advanced Drug Delivery Reviews*》,30,1998,第85-95页)。

另外,迄今为止,重要的似乎是将能击中适当核酸的载体带到器官、组织、一类细胞或特别的细胞腔,因为重要的是能够保证转染的核酸与靶细胞有效地整合在一起,而不会非常不利地扩散到生物体的其余部分。希望达到的目的是避免核酸与除靶细胞外的细胞有任何非专一的作用。于是证明了,半乳糖基化聚亚乙基亚胺是一种质粒体离体转移到具有相应于半乳糖的细胞受体(凝集素)的细胞中的有效载体(Zanta 等人,《*Bioconj. Chem.*》,8(2),1997,第839页;





式中 R 代表氢原子或下述通式基团:



n 是 2~10 的整数,

p 和 q 是整数, 其条件是 p+q 之和使得聚合物平均分子量是 100-10<sup>7</sup>Da.

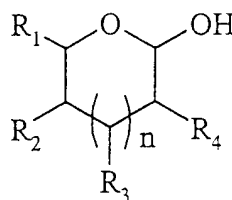
应当理解在通式(I)中, n 值和 R 基团可以在不同结构单元-NR-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-与-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-之间发生变化。因此, 通式(I)同时汇集了直链聚合物和支链聚合物以及均聚物和杂聚物。

优选地, n 是 2-5, 优选的聚合物例如是聚亚乙基亚胺(PEI)或聚亚丙基亚胺(PPI)。另外, 曾证明实施本发明的优选聚合物在转染中是特别有效的, 这些聚合物的平均分子量为 10<sup>3</sup>-5 × 10<sup>6</sup>。作为实例, 可以列举平均分子量为 50 000 Da (PEI 50K)、25 000 Da (PEI 25K)、22 000 Da (PEI22K) 的聚亚乙基亚胺, 或 800 000 Da (PPI 800K) 聚亚丙基亚胺。

本发明中使用的聚亚烷基亚胺可以根据本领域技术人员已知的不同方法得到。例如可以在阴离子聚合(例如亚乙基亚胺聚合)条件下使用一种或多种相应单体采用化学方法、或通过还原由二酸或二胺缩聚作用得到的聚酰胺或通过还原由二醛与二胺缩聚作用得到的亚胺可以合成这些聚亚烷基亚胺。另外, 许多聚亚烷基亚胺可从市场上得到, 例如像 PEI 25K、PEI 22K 或 PPI 800K。

按照本发明, 《官能化聚亚烷基亚胺》应当被理解为靶元素以共价键方式与其连接的聚亚烷基亚胺类阳离子聚合物。这些靶元素能够使核酸转移朝向某些类型细胞、某些组织或某些所希望的细胞腔。靶元素与聚亚烷基亚胺之间的共价键是在上述反应条件下通过与官能化半缩醛, 即其中一个取代基是上述靶元素的半缩醛反应得到的。

更确切地, 按照本发明, 官能化半缩醛应当被理解为具有下述通式的任何分子:



式中  $n$  等于 0 或 1,  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  相同或不同, 彼此独立地代表氢原子、与进行该反应相容的基团, 或靶元素, 条件是选自  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  的单独一个取代基是靶元素。

作为相容基团实例, 可以列举羟基、具有 1-4 个碳原子的( $C_{1-4}$ )烷基或羟基( $C_{1-4}$ )烷基。

靶元素可以直接接枝在半缩醛上, 或者通过双官能键分子(还被称作《连接剂》)被接枝。《连接剂》能将所述靶元素接枝在半缩醛上, 即从化学观点来看不大可能进行的接枝, 和/或能将所述靶元素远离半缩醛。关于双官能键分子, 应当被理解为包括至少一个能够以共价键方式与靶元素相连的官能团和至少一个能够以共价键方式与半缩醛相连的官能团的分子。

按照本发明, 靶元素应当被理解为任何能够使核酸转移定向的分子。这种靶元素可以是能够将 DNA 转移定向于某些类型细胞或某些所希望组织(肿瘤细胞、肝细胞、造血细胞等)的细胞外靶元素。还可以涉及能够将核酸转移定向于某些优选细胞腔(例如线粒体或细胞核)的细胞内靶元素。

在本发明范围内可使用的靶元素中, 可以列举糖、肽、蛋白质、寡核苷酸、脂类、神经传递质、激素、维生素或它们的衍生物。优选地, 例如涉及糖、肽或蛋白质像抗体或抗体片段、细胞受体的配位体或它们的片段、受体或受体片段。特别地, 可能涉及生长因子受体、细胞因子受体、细胞凝集素类受体的配位体, 或对如整联蛋白粘附蛋白质受体具有亲合性的 RGD 序列配位体。还可以列举转铁蛋白受体、HDL 和 LDL 或叶酸盐转运蛋白。靶元素还可以是能够对凝集素的糖, 例如脱唾液酸糖蛋白或唾液酸化受体, 像唾液酸化的路易斯寡糖(Sialyl Lewis X), 或抗体 Fab 片段, 或单链抗体(ScFv)。作为实例, 所述糖可以选自单糖、二糖或三糖。例如可以涉及半乳糖、甘露糖、岩藻糖、鼠李糖、乳糖或麦芽糖。

一般地, 在例如甲醇或乙醇的醇溶剂中, 在温度 100-30°C 下进行该反应。优选地, 在乙醇中在室温下, 即在温度 18-25°C 下操作。

另外, 一般地相对于每摩尔加入的聚合物使用 25-100 摩尔异丙醇钛(IV), 更优选地, 40-60 摩尔异丙醇钛(IV)。

在反应混合物中还加入其量等于 50-80 摩尔 % 异丙醇钛(IV)用量的硼氢化钠。

用于实施本发明方法的官能化半缩醛的量取决于希望达到的接枝率。有利地，每摩尔聚合物使用 6-100 摩尔官能化半缩醛。

根据官能化半缩醛的用量，得到比率可以是 1-20%，优选地是 4-20% 的官能化聚亚烷基胺。在利用糖作为靶元素的情况下，采用间苯二酚法可以精确地测定接枝在聚亚烷基胺上的糖百分数。这种方法在于用间苯二酚和硫酸处理预先渗析的官能化聚亚烷基胺，然后在 90°C 加热 20 分钟。在冷却后，测量在 495nm 处的吸收，并与参比试样(标准溶液)比较。渗析能够除去未接枝的靶元素，通过与参比试样比较进行的测量能够确定接枝靶元素的量。这种方法还是一种最准确表征所得到产物的方法，因为涉及聚合物，不可能如对通常小分子所进行的采用 NMR(核磁共振)或采用质量测定表征它们。

本发明的方法对于制备能对准某些组织、某些类型细胞或某些特定细胞腔的转移核酸载体是特别有意义的，因为这种方法是一种既便宜、毒性又不大的可供选择替代的方法。另外，可以看出，用糖官能化的聚亚烷基胺对细胞的毒性小于非官能化的聚亚烷基胺。

官能化的聚亚烷基胺适用于在细胞中转染核酸。为此目的，官能化的聚亚烷基胺与一种或多种核酸混合，以便生成也被称作《聚丛》的配合物(这时可以说“多染”(polyfection)，而不说转染)。为了达到最佳的转染效率，优选地选择官能化聚亚烷基胺与核酸的比例，以便生成的聚丛总体上呈中性或稍微呈阳性。一般地，选择所述的比例以便生成不沉淀、也不会过分增加所生成的聚丛阳离子性的阳性聚丛，否则这样也会增加毒性。所述比例因此应该根据具体情况决定。但是，一般选择所述比例以便官能化聚亚烷基胺的胺与核酸的磷酸酯的摩尔比是 0.1-50，优选地是 0.5-20。当然，本领域技术人员可以根据使用的官能化聚亚烷基胺、核酸、靶细胞、用药方式或根据所希望的应用(特别地待转染细胞类型)，很容易修改和优化这个比例。

在上述聚丛中，核酸既是脱氧核糖核酸又是核糖核酸。可能涉及自然或人工序列，特别是基因组 DNA(gDNA)、互补 DNA(cDNA)、信使 RNA(mRNA)、转移 RNA(tRNA)、核蛋白体 RNA(rRNA)、杂交序列或合成或半合成序列、修饰或未修饰寡核苷酸。这些核酸例如可以是人、动物、植物、细菌或病毒源的。它们可以采用本领域技术人员已知的任何技术、特别是采用库靶、化学合成或其中包

括采用库靶所得到序列的化学或酶修饰在内的混合方法得到。它们可以通过化学方法修饰。

更特别地涉及脱氧核糖核酸，它们可以是单链或双链以及短链的寡核苷酸或更长序列。特别地，核酸有利地由例如质粒、载体、游离基因或表达盒构成。这些脱氧核糖核酸特别地可以在靶细胞中带有官能或非官能复制源，一个或多个标记基因，转录或复制调节序列，有治疗意义的基因，修饰或未修饰反义序列，或与其他细胞组分连接的区域。

优选地，该核酸包括一个或多个在调节序列控制下有治疗意义的基因，例如在靶细胞中一个或多个启动子和活性转录终止区。

按照本发明，有治疗意义的基因特别应当被理解为任何可编码具有治疗作用的蛋白质产品的基因。如此编码的蛋白质产品特别地可以是蛋白质或肽。这种蛋白质产品可以是对靶细胞均匀外生或内生的，即靶细胞没有任何病理时，通常可在这种细胞中表达的产品。在这种情况下，蛋白质表达例如能够克服在细胞中不充分表达或由于修饰失活或低活性蛋白质的表达，或能够过表达所述蛋白质。有治疗意义的基因还可以编码例如具有高稳定性或修饰活性的细胞蛋白质的突变体。蛋白质产品对靶细胞也可以是异源的。在这种情况下，表达的蛋白质例如可以补充或带来在该细胞中缺失的活性，这样能够使它抵抗疾病，或刺激免疫反应。

本发明的治疗产品中，作为实例可以列举酶、血液衍生物、激素、淋巴因子(例如白细胞介素、干扰素或 TNF: FR 92/03120)、生长因子、神经递质或它们的前体或合成酶、营养因子(例如 BDNF、CNTF、NGF、IGF、GMF、aFGF、bFGF、VEGF、NT3、NT5 或 HARP/超营养蛋白)、阿朴脂蛋白(例如 ApoAI、ApoAIV 或 ApoE: FR 93/05125)、肌营养不良蛋白或微肌营养不良蛋白(FR 91/11947)、与粘液粘稠病相关的 CFTR 蛋白质、肿瘤抑制基因(例如 p53, Rb, Rap1A, DCC 或 k-rev: FR 93/04745)、凝结中相关因子的编码基因(例如因子 VII、VIII、IX)、在 DNA 修复中涉及的基因、自杀基因(胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶)、血红蛋白基因或其他蛋白质转运基因、新陈代谢或分解代谢酶。

有治疗意义的核酸还可以是基因或反义序列，它们在靶细胞中的表达能够控制基因表达或细胞 mRNA 转录。根据在专利 EP 140 308 中描述的技术，这样

一些序列例如可以在靶细胞中转录成细胞 mRNA 的互补 RNA, 并且因此可以阻断它们在蛋白质中翻译。治疗基因还包括核酶的编码序列, 这些酶能够有选择地破坏靶 RNA (EP 321 201)。

如上所述, 核酸还可以包括一个或多个抗原肽的编码基因, 这些基因能在人体或动物体内产生免疫反应。在这种特别实施方式中, 本发明允许制造疫苗, 或者应用于人或动物体内特别是抗微生物、病毒或癌的免疫治疗。特别地涉及 Epstein Barr 病毒、HIV 病毒、乙型肝炎病毒 (EP 185 573)、假-暴怒病毒、“多核体形成病毒”、其他病毒的特效抗原肽, 或肿瘤的特效抗原肽 (EP 259 212)。

优选地, 核酸还包括能表达有治疗意义的基因和/或在所希望细胞或器官中编码抗原肽的基因的序列。这些序列在感染细胞中能功能化时, 可能涉及自然是对所考虑基因表达负责的序列。还可能涉及不同源的序列(负责其他蛋白质或合成蛋白质的表达)。特别地, 可能涉及真核生物或病毒基因的启动子序列。例如, 可能涉及来自希望感染的细胞的基因组的启动子序列。对此, 可以列举例如 E1A、MLP、CMV 或 RSV 基因的启动子。另外, 这些表达序列可以例如通过添加活化或复制序列进行修饰。还可能涉及诱导或阻抑型启动子。

为了例如通过局部、皮肤、口服、直肠、阴道、肠胃道外、鼻内、静脉内、肌肉内、皮下、眼内、经皮、气管内或腹膜内方式用药, 可以配制如此生成的聚丛。优选地, 生成的聚丛含有在药学上可接受的注射配方用、特别是在所希望器官部位直接注射用或局部用药(皮肤和/或粘膜上)载体。特别地涉及无菌等渗溶液或干组合物, 特别是冻干组合物, 根据灭菌水或生理血清的情况, 它们还可以含有可注射溶质成分。注射使用的核酸剂量以及给药次数可以根据不同的参数、特别是根据用药方式、相关疾病、待表达基因或要求治疗时间进行修改。更特别地, 有关用药方式, 可能涉及直接注射到组织中如注射到肿瘤部位、或在循环途径中、或者培养物中细胞处理, 接着通过注射或接枝进行活体再移植。在本发明范围内有关组织例如是肌肉、皮肤、脑、肺、肝脏、脾、骨髓、胸腺、心脏、淋巴、血、骨、软骨、胰腺、肾脏、膀胱、胃、肠、睾丸、卵巢、直肠、神经系统、眼、腺体或结缔组织。

含有上述聚丛的组合物可以用于往细胞中转移核酸。更确切地, 所述组合

物可以用于制备用于治疗疾病，特别是因缺乏蛋白质或核酸产品所造成的疾病的药物。

往细胞中转移核酸的方法在于进行下述步骤：

- (1) 制备含有上述聚丛的组合物，和
- (2) 让细胞与(1)中生成的组合物进行接触。

除了上述内容以外，本发明还包括由下述实施例和附图得出的其他特点和优点，这些实施例和附图应该认为用于说明本发明，而不限制其保护范围。

#### 附图

图 1：柱状图代表对于电荷比(+/-)为 3-28 的糖基化聚亚烷基亚胺/ DNA 不同配方，在 ECV304 细胞中以 RLU/微克蛋白质表示的荧光素酶活性(RLU：《相对光单位》)。

黑色连续曲线表示对于每个使用的配方[3a]、[3b]、[4a]和[4b]，按照糖基化聚亚烷基亚胺与 DNA 之间电荷(+/-)比的细胞存活百分数。

图 2：柱状图代表对于电荷比(+/-)为 3-28 的糖基化聚亚烷基亚胺/ DNA 不同配方，在 HeLa 细胞中以 RLU/微克蛋白质表示的荧光素酶活性(RLU：《相对光单位》)。

黑色连续曲线表示对于每个使用的配方[3a]、[3b]、[4a]和[4b]，按照糖基化聚亚烷基亚胺与 DNA 之间电荷(+/-)比的细胞存活百分数。

图 3：柱状图代表对于电荷比(+/-)为 3-28 的糖基化聚亚烷基亚胺/ DNA 不同配方，在 HepG2 细胞中以 RLU/微克蛋白质表示的荧光素酶活性(RLU：《相对光单位》)。

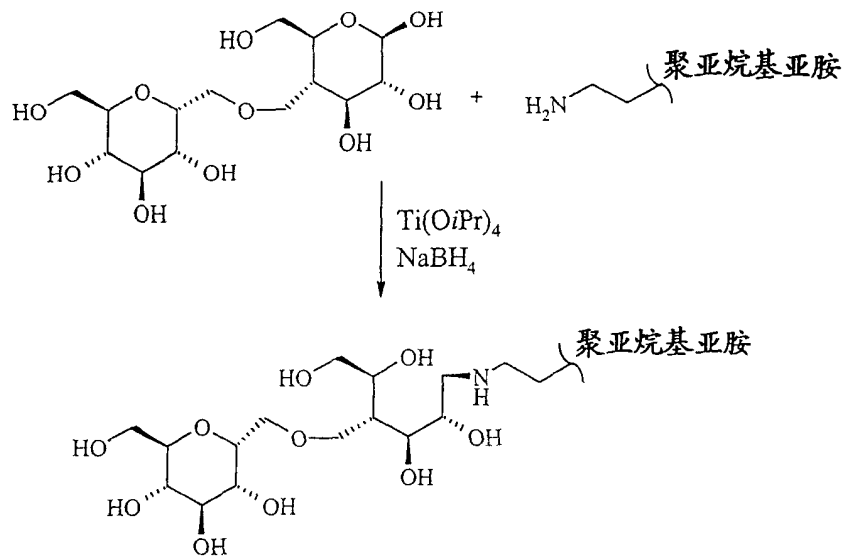
黑色连续曲线表示对于每个使用的配方[3a]、[3b]、[4a]和[4b]，按照糖基化聚亚烷基亚胺与 DNA 之间电荷(+/-)比的细胞存活百分数。

图 4：在往细胞中转移 DNA 的试验中使用的 Px12774 质粒示意图。

#### 实施例

实施例 1：制备 PEI-4%麦芽糖[3a]

按照下述方式示意说明进行的反应：



0.02 毫摩尔 PEI 25 KDa (500 毫克, Aldrich 公司) 溶于 20 毫升无水乙醇中。然后添加 0.7 毫摩尔麦芽糖 (252 毫克), 这样得到的溶液在氮气气氛下混合 15 分钟。再往反应混合物缓慢添加 1 毫摩尔异丙醇钛 IV (0.3 毫升), 保持搅拌一夜。然后, 添加 0.75 毫摩尔硼氢化钠 (28.5 毫克), 再继续搅拌 8 小时。然后过滤反应混合物, 并浓缩到 10 毫升。最后, 得到的溶液渗析 12 小时 (尺寸为 12000 的排斥膜)。产率是 80%。

可采用上述间苯二酚法测定接枝麦芽糖残基百分数: 23 个麦芽糖残基接枝在 PEI 25 KDa 上, 相应于氨基基团接枝率为 4%。

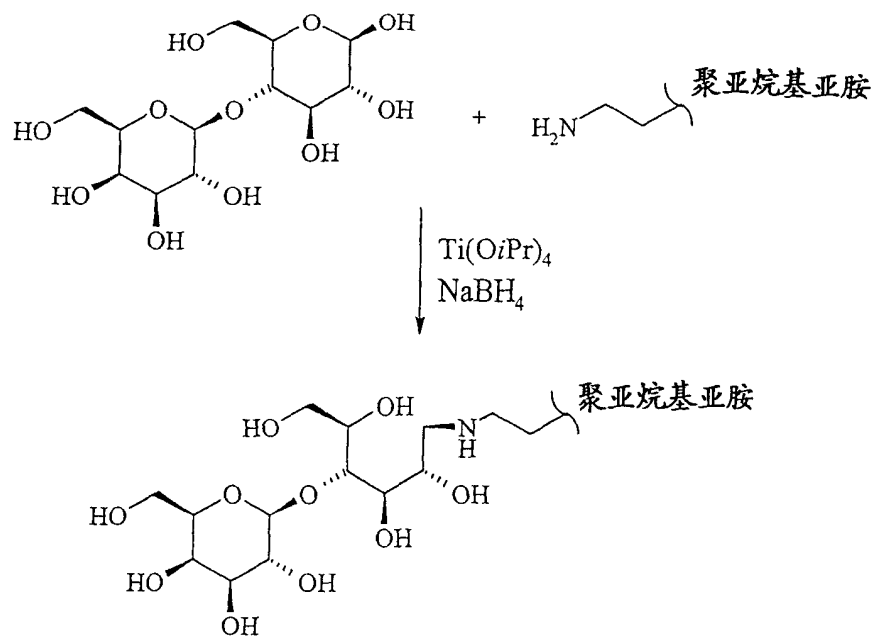
#### 实施例 2: 制备 PEI-12% 麦芽糖 [3b]

0.02 毫摩尔 PEI 25 KDa (500 毫克, Aldrich 公司) 溶于 20 毫升无水乙醇中。然后添加 2 毫摩尔麦芽糖 (720 毫克), 这样得到的溶液在氮气气氛下混合 15 分钟。再往反应混合物缓慢添加 2.7 毫摩尔异丙醇钛 IV (0.8 毫升), 保持搅拌一夜。然后, 添加 2 毫摩尔硼氢化钠 (76 毫克), 再继续搅拌 8 小时。然后过滤反应混合物, 并浓缩到 10 毫升。最后, 得到的溶液渗析 12 小时 (尺寸为 12000 的排斥膜)。产率是 80%。

可采用上述间苯二酚法测定接枝麦芽糖残基百分数: 70 个麦芽糖残基接枝在 PEI 25 KDa 上, 相应于氨基基团接枝率为 12%。

#### 实施例 3: 制备 PEI-6% 乳糖 [4a]

按照下述方式示意说明进行的反应:



0.02 毫摩尔 PEI 25 KDa (500 毫克, Aldrich 公司) 溶于 20 毫升无水乙醇中。然后, 添加 1 毫摩尔乳糖 (360 毫克), 这样得到的溶液在氮气气氛下混合 15 分钟。再往反应混合物缓慢添加 1.35 毫摩尔异丙醇钛 IV (0.4 毫升), 保持搅拌一夜。然后, 添加 1 毫摩尔硼氢化钠 (38 毫克), 再继续搅拌 8 小时。然后, 过滤反应混合物, 并浓缩到 10 毫升。最后, 得到的溶液渗析 12 小时 (尺寸为 12000 的排斥膜)。产率是 80%。

可采用上述间苯二酚法测定接枝乳糖残基百分数: 35 个乳糖残基接枝在 PEI 25 KDa 上, 相应于氨基基团接枝率为 6%。

#### 实施例 4: 制备 PEI-17%乳糖 [4b]

0.02 毫摩尔 PEI 25 KDa (500 毫克, Aldrich 公司) 溶于 20 毫升无水乙醇中。然后添加 3 毫摩尔乳糖 (1080 毫克), 这样得到的溶液在氮气气氛下混合 15 分钟。再往反应混合物缓慢添加 4 毫摩尔异丙醇钛 IV (1.2 毫升), 保持搅拌一夜。然后, 添加 3 毫摩尔硼氢化钠 (114 毫克), 再继续搅拌 8 小时。然后, 过滤反应混合物, 并浓缩到 10 毫升。最后, 得到的溶液渗析 12 小时 (尺寸为 12000 的排斥膜)。产率是 80%。

可采用上述间苯二酚法测定接枝乳糖残基百分数: 99 个乳糖残基接枝在 PEI 25 KDa 上, 相应于氨基基团接枝率为 17%。

应用实施例: 在不同细胞类型中, 与 PEI-4% 和 12% 麦芽糖配合或与 PEI-6% 和 17% 乳糖配合的质粒 DNA 离体转染

这个实施例说明上述合成的官能化聚亚烷基亚胺在细胞中转染 DNA 的能力。

使用的 DNA 是在浓度为 80 微克/毫升的 150 毫摩尔氯化钠混合物溶液中的 pXL2774 质粒。这种质粒含有在细胞肥大病毒的 CMV 启动子控制下编码荧光素酶的 luc 基因。其大小是 4500 碱基对。这种质粒示意图被展示于图 4 中。根据专利申请 WO 97/35002 中描述的方法纯化 pXL2774 质粒。

pXL2774 质粒溶液与稀释在水中的官能化 PEI 溶液按照体积与体积混合可以制备聚丛，所述稀释浓度可按照所希望的电荷比而改变。

24 井微板按照每个井 60000 HeLa 细胞(ATCC)接种，稍后转染 24 小时。往每个井滴加 50 微升聚丛溶液。在无血清的情况下，在转染前 2 小时，该介质预先补加 SVF(胎牛血清)。然后，这些细胞在 37℃ 培养 4 小时。然后除去含有配合物的介质，用 DMEM 和 10% 胎牛血清混合物替换。然后，这些细胞再培养 24 小时。最后，这些细胞溶解，使用荧光素酶检测盒(Promega)和 Dynex MLX 光度计进行检测。另外，通过测量细胞的溶胞产物浓度评价聚丛毒性，其毒性可用相对于每微克溶胞产物蛋白质的酶活性表示。

这些结果列于图 1、2 和 3 中，这些结果说明对于不同 DNA 以及在 3 种不同细胞系中的电荷比而言，前面合成的不同官能化 PEI 的转染效率。

总体上看到，转移效率是相对高的，除非使用由高接枝率的 PEI 制成的聚丛(PEI-12%麦芽糖的效率低于 PEI-4%麦芽糖的效率，PEI-17%乳糖的效率低于 PEI-6%乳糖的效率)。因此，接枝率是一个按照所希望应用优化的重要参数。

另外，还观察到，用官能化半缩醛取代氨基基团可显著降低 PEI 诱导的对细胞的毒性，特别是在高 DNA 的电荷比情况下。事实上，对于转染 DNA(未列出结果)，细胞存活百分数(图 1-3)远高于使用非官能化 PEI 所得到的百分数。

因此，这个实施例表明，采用本发明的可靠与廉价方法所得到的官能化聚亚烷基亚胺是在细胞中转染 DNA 的良好候选者。

图 1

细胞 ECV304

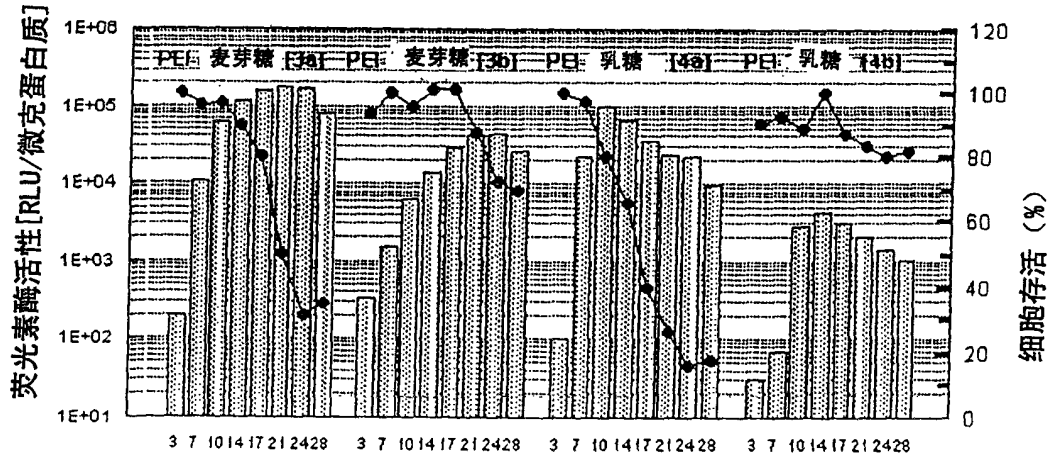


图 2

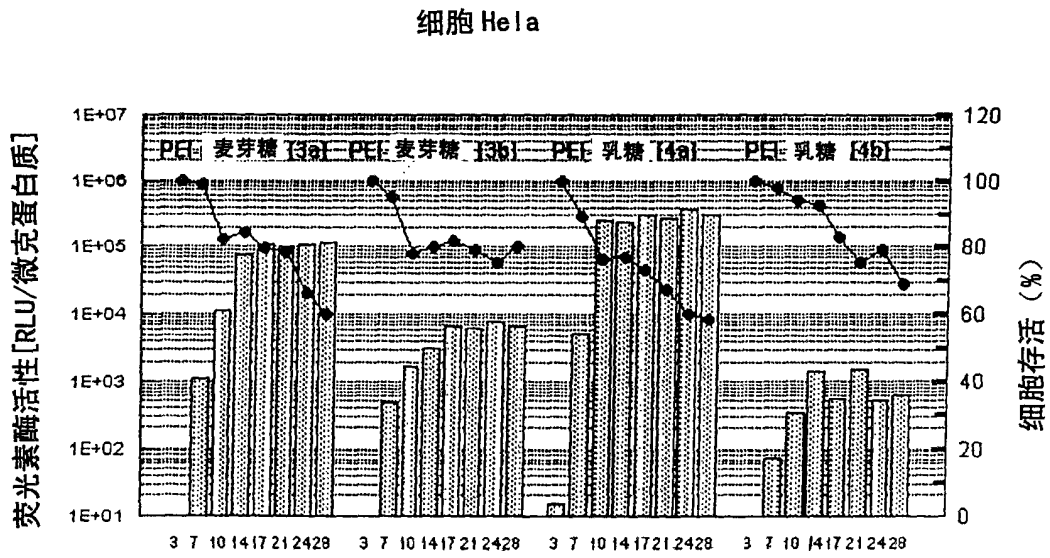


图 3

细胞 HepG2

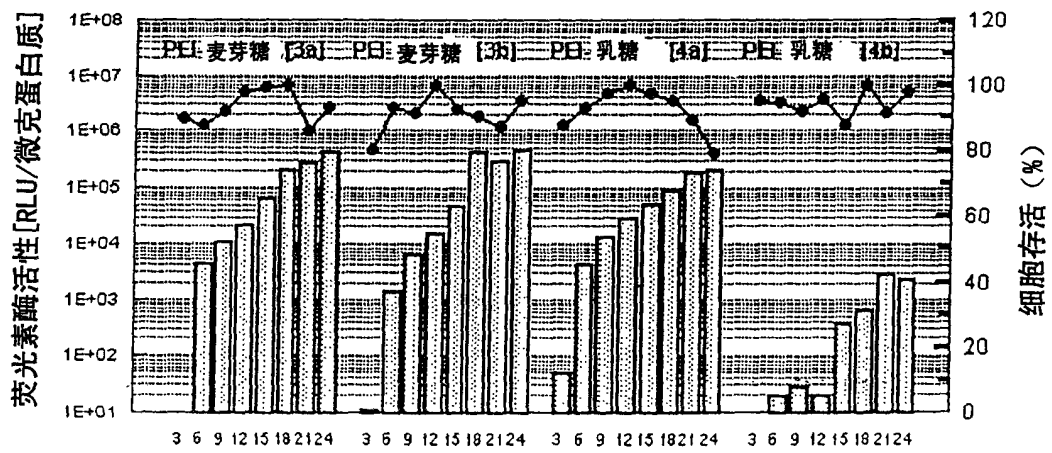


图 4

