



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110066800 B

(45)授权公告日 2019.12.24

(21)申请号 201910358434.1

审查员 李杏

(22)申请日 2019.04.30

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110066800 A

(43)申请公布日 2019.07.30

(73)专利权人 厦门甘宝利生物医药有限公司

地址 361022 福建省厦门市海沧区新园路
120号技术服务中心3层02单元

(72)发明人 崔坤元 林进镇 穆卓 王圣军

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

A61K 31/713(2006.01)

A61P 17/00(2006.01)

A61K 8/60(2006.01)

A61Q 19/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书16页
序列表3页 附图7页

(54)发明名称

一种化合物及其组合物的应用

(57)摘要

本发明涉及一种化合物及其对黑色素细胞中的酪氨酸酶mRNA干扰的应用。该化合物结构中含有siRNA和脂质分子。这种siRNA的骨架被修饰,使其不会被核酸酶降解,其正义链的3'末端偶联有脂质分子,与骨架修饰过的siRNA成为一个整体化合物结构,增强了其穿透黑色素细胞膜的能力,不需要外部载体的输送,可以自我递送进入黑色素细胞中,干扰黑色素形成所需的催化蛋白酪氨酸酶mRNA的功能,破坏其作为翻译模板的作用,从而抑制酪氨酸酶蛋白的合成。

1. 一种合成的siRNA,其特征在于,其序列为:

正义链:5' AUGCCUUGCACAUCUAUAU 3' ;

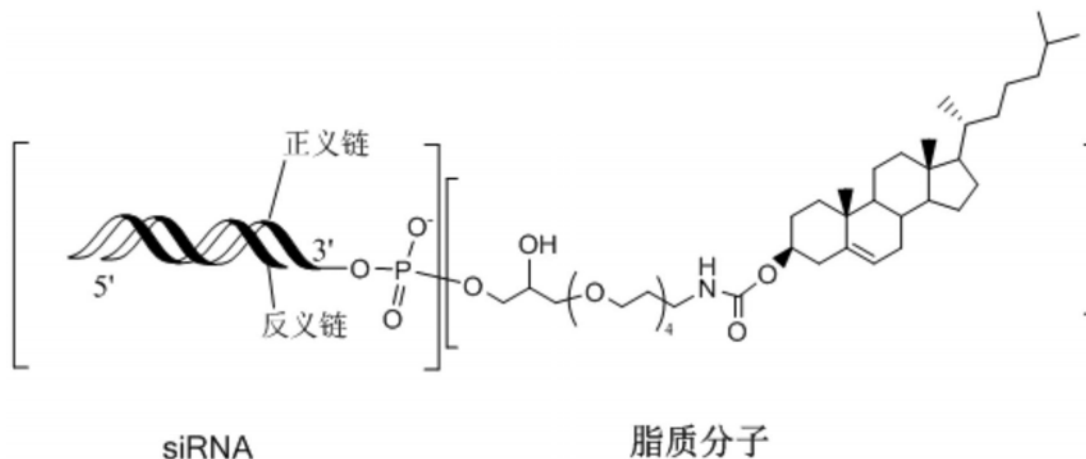
反义链:5' AUAUAGAUGUGCAAGGCAU 3' ;

或者

正义链:5' AUGCCUUGCACAUCUAUAUTT 3' ;

反义链:5' AUAUAGAUGUGCAAGGCAUTT 3' 。

2. 一种化合物,含权利要求1所述的siRNA和脂质分子,其特征在于,其结构为:



3. 根据权利要求2所述的化合物,其特征在于,所述siRNA经修饰后的具体正义链和反义链序列为:

正义链:5' mAmUfGmCfCmUfUmGmCAmCAmUCmUAU (s) mA (s) mU (s) 3' ;

反义链:5' p-mAUfAfUAfGfAfUmGUfGfC (s) A (s) mA (s) GfG (s) mC (s) A (s) mU 3' ;

其中:

“m”表示核苷酸的核糖的2'位被甲氧基取代;

“s”表示核苷酸通过3' -O→5' -O硫代磷酸酯基团连接;

“f”表示核苷酸的核糖的2'位被氟原子取代;

“p-mA”表示序列中最远端的这个腺苷酸上5'位上的羟基有磷酸基团与其成为酯,且其核糖的2'位被甲氧基取代,所述修饰使修饰后的siRNA在细胞内抵抗核酸酶降解的能力增强。

4. 一种用于治疗黑色素积聚相关疾病的药物组合物,其特征在于,该药物组合物含权利要求2或3所述的化合物作为功效成分。

5. 如权利要求4所述的药物组合物,其特征在于,该药物组合物还包含任何药学可接受的辅助剂。

6. 一种化合物在制备治疗黑色素积聚相关疾病药物中的应用,其特征在于,以权利要求2或3所述的化合物作为功效成分,直接给药于受药者身上的色素斑块。

7. 一种组合物,其特征在于,该组合物是乳剂、膏剂、霜剂、水剂、气雾剂或粉剂,并含权利要求2或3所述的化合物作为功效成分。

8. 根据权利要求7所述的组合物,其特征在于,其含有的功效成分的重量百分比含量是0.0001%-10%。

9. 根据权利要求8所述的组合物,其特征在于,该组合物还含有常用的化妆品成分。

10. 一种化合物在制备祛除黑色素和抑制黑色素生成的化妆品中的应用,其特征在于,以权利要求2或3所述的化合物作为功效成分。

一种化合物及其组合物的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种化合物及其对黑色素细胞中的酪氨酸酶mRNA干扰的应用。该化合物结构中含有siRNA和脂质分子。这种siRNA的骨架被修饰,使其不会被核酸酶降解,其正义链的3'末端偶联有脂质分子,与骨架修饰过的siRNA成为一个整体化合物结构,增强了其穿透黑色素细胞膜的能力,不需要外部载体的输送,可以自我递送进入黑色素细胞中,干扰黑色素形成所需的催化蛋白酪氨酸酶mRNA的功能,破坏其作为翻译模板的作用,从而抑制酪氨酸酶蛋白的合成。

[0002] 本发明的化合物可作为功效成分有效治疗黑色素相关疾病,以及祛除黑色素和抑制黑色素的形成。

背景技术

[0003] 黑色素与酪氨酸酶

[0004] 黑色素是赋予皮肤、头发和眼睛颜色的物质。皮肤颜色深浅主要由于其含有黑色素的多少决定的。黑色素的生成部位主要在皮肤基底层黑色素细胞内。黑色素细胞产生的黑色素分子聚集形成多聚体,并在细胞内形成黑色素小体并转移到上皮的细胞。上皮细胞内黑色素聚合体的多少决定了皮肤色泽的深浅。当上皮细胞内的黑色素聚合体在局部过多集中在一部位时,就形成局部色素沉着的斑点。黑色素过多也可以由于日晒和紫外线的照射、局部发炎、创伤和年龄增加而增多。黑色素沉着可以表现为雀斑、黄褐斑、黑斑、色素沉着的角质化等,不仅影响美观,而且容易导致疾病。

[0005] 酪氨酸酶是黑色素细胞活化酶,黑色素代谢中目前唯一已知的酶,控制黑色素细胞活性的关键,决定了黑色素合成的速率。酪氨酸酶是通过催化血液中的酪氨酸发生氧化,生成一种叫“多巴”的物质。多巴其实就是黑色素的前身。酪氨酸酶活性增加,产生的黑色素就会增多;酪氨酸酶活性被抑制,黑色素细胞产生黑色素的能力就相应降低。由酪氨酸氧化而成,释放出黑色素分子。黑色素又经由细胞代谢的层层移动,到了肌肤表皮层形成雀斑、晒斑、黑斑等形状,甚至引起色素沉着过度等色素性病症。

[0006] RNAi

[0007] 生物体DNA上的基因片段信息主要通过信使RNA(mRNA)传递到蛋白质,如黑色素细胞活化酶酪氨酸酶就是首先生成酪氨酸酶mRNA,之后由mRNA为模板合成酪氨酸酶蛋白。RNAi(RNA干扰)于1998年,由安德鲁·法厄(Andrew Z.Fire)等在秀丽隐杆线虫中进行反义RNA抑制实验时发现,并将这一过程称为RNAi。这一发现被《Science》杂志评为2001年的十大科学进展之一,并名列2002年十大科学进展之首。自此以后,以RNAi为作用机理的siRNA作为潜在的基因治疗药物得到人们广泛的关注,2006年,安德鲁·法厄与克雷格·梅洛(Craig C.Mello)由于在RNAi机制研究中的贡献获得诺贝尔生理医学奖。RNAi是在许多生物中,包括动物、植物和真菌,都可由双链RNA(dsRNA)触发的,在RNAi过程中,一种称为“Dicer”的酶将长链dsRNA切割或“切丁”成21~25个核苷酸长的小片段。这些小片段,被称为小干扰RNA(siRNA),其与一种叫Argonaute蛋白结合后,siRNA被解开,其中的反义链根据

碱基配对的规则可以与特定基因的mRNA靶序列结合。一旦结合,Argonaute蛋白就分裂mRNA,从而阻止其被用作翻译模板,进而阻止相关蛋白质的合成。

[0008] 利用RNAi技术,可以根据特定基因序列,设计出特异性高、效果好的siRNA的正义链和反义链序列,通过固相合成这些单链序列,然后正义链与反义链,在特定的退火缓冲液中按照碱基配对原则配对成siRNA,最后通过载体系统输送到体内相应靶点,降解目标mRNA,破坏目标mRNA作为翻译模板的功能。利用此特性开发的siRNA药物,Patisiran,已于2018年8月获得美国FDA批准上市,对于siRNA的在医药和其它领域的应用具有里程碑意义。

[0009] siRNA的递送系统

[0010] siRNA在血液和组织中不稳定,容易被核酸酶降解,为了提高siRNA的稳定性,可以通过对siRNA骨架和基团的修饰,但这些化学修饰只提供有限的免受核酸酶降解的保护作用并且可能最终影响siRNA的活性。因此,还需要相应的传递系统来保障siRNA安全高效的穿过细胞膜。由于siRNA分子质量较大,且带有大量负电荷,而且具有高水溶解性,所以自身无法顺利穿越细胞膜到达细胞内,脂质体基本结构是由亲水核和磷脂双分子层构成,具备类似生物膜的磷脂双分子层,拥有很高的生物相容性,所以脂质体成为目前最受欢迎,应用最广泛的siRNA载体。

[0011] 现有技术有很多基于脂质的载体系统递送化学修饰的或未修饰的治疗性siRNA的相关研究。脂质体介导的siRNA递送主要将脂质体将siRNA包裹到脂质体内,保护siRNA不被核酸酶降解,提高siRNA的通过细胞膜障碍的效率,从而促进细胞的吸收。例如阴离子脂质体、pH敏感性脂质体、免疫脂质体、膜融合脂质体(fusogenic liposome)和阳离子脂质体等等,尽管取得了一定的进展,但在实际临床应用中并不适合所有领域,因为当前的制剂技术,脂质体只能通过静脉注射应用于临床,且有些脂质体的毒性较大。本发明所述的siRNA的作用部位是皮肤基底的黑色素细胞,皮肤是由上皮和真皮组成的。上皮有多层细胞组成,接近外部的细胞为角质层,生理情况下保护皮肤不受外界损伤和保护水分不蒸发,但是角质层也是药物穿透皮肤的主要障碍,所以要有效的将药物输送到处于上皮基底的黑色素细胞,脂质体技术具有明显的不利因素,它不可能穿过上皮的多层角质细胞,并保持脂质体颗粒的完整性。专利CN101820921B公开了一种抑制酪氨酸酶基因表达的siRNA及组合物和应用,该组合物含有一种或多种应用抑制酪氨酸酶基因的siRNA,在组合物中含有载体,所述载体选自烃油、酯、高级脂肪酸和高级脂肪醇中的一种或几种,这些化合物对于骨架未有修饰或没有被脂质体包裹住的siRNA的保护极其有限,不能确保所有的siRNA都能被传递进入细胞,存在利用度不高的问题。

[0012] 如何安全有效地把siRNA递送进入上皮基底的黑色素细胞内,是开发siRNA用于抑制和祛除黑色素的关键。我们使用胆固醇和三甘醇作为起始物料,通过化学合成形成一个两亲脂质化合物,并将该化合物固定在特定的固相载体上,其亲水端脱保护后通过固相亚磷酰胺法与siRNA的正义链的第一个核苷酸单体偶联,然后按顺序引入其它核苷酸单体,固相合成所得的正义链3'端偶联的脂质分子中疏水端裸露,增强整个分子结构与黑色素细胞膜的相容性,具有较强的细胞膜穿透能力,使其可以自我传递进入皮肤基底的黑色素细胞内。脂质偶联后的siRNA经体外实验和人体试用试验证明,可以有效的干扰黑色素细胞中酪氨酸酶mRNA的功能,从而抑制黑色素细胞生成,起到祛除黑色素和抑制黑色素生成或聚集的作用。本申请通过的化合物通过siRNA分子与脂质分子二者通过固相合成技术,成为

一个整体,从而解决了现有技术中siRNA利用度不高的问题。

发明内容

[0013] 本发明所述化合物中涉及的siRNA是发明人通过设计、筛选、结构修饰和末端偶联脂质分子后得到的。其作用机理是利用偶联脂质分子后的骨架修饰的siRNA具有稳定的结构和强的穿透黑色素细胞膜的能力,可以自我递送进入到皮肤基底层黑色素细胞,然后其能够特异性的与酪氨酸酶的mRNA结合,并使其降解。如上所述,酪氨酸酶是黑色素产生通路的一个重要合成酶,通过抑制酪氨酸酶基因的表达,即可有效的抑制黑色素的产生,从而起到治疗色素斑(点)的功效。所以利用本发明的成分和组合物配方可以祛除、抑制或预防黑色素的生成。

[0014] 本发明的内容包括,根据人体酪氨酸酶基因序列,通过设计、筛选、结构修饰和末端偶联脂质分子的方法发明一种新的siRNA,其特征在于,可以对黑色素细胞中的酪氨酸酶mRNA的功能进行干扰,该siRNA的序列为:

[0015] 正义链:5' AUGCCUUGCACAUCUAU 3' ;

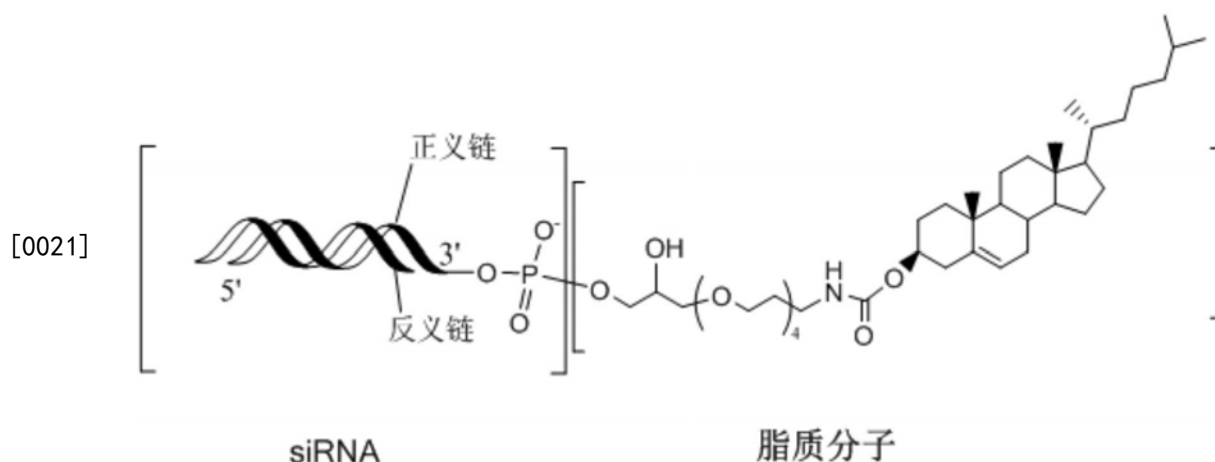
[0016] 反义链:5' AUAUAGAUGUGCAAGGCAU 3' ;

[0017] 或者

[0018] 正义链:5' AUGCCUUGCACAUCUAUAUTT 3' ;

[0019] 反义链:5' AUAUAGAUGUGCAAGGCAUTT 3'。

[0020] 本发明的内容还包括,提供的一种新的化合物,含有所述的siRNA和脂质分子,其特征在于,其结构为:



[0022] 所述的siRNA,可以进行骨架修饰使其稳定,修饰后序列为:

[0023] 正义链:5' mAmUfGmCfCmUfUmGmCmCmUCmUAU(s)mA(s)mU(s)3' ;

[0024] 反义链5' p-mAUfAfUAfGfAfUmGUfGfC (s) A (s) mA (s) GfG (s) mC (s) A (s) mU 3' ;

[0025] 其中：

[0026] "m"表示核苷酸的核糖的2'位被甲氧基取代;

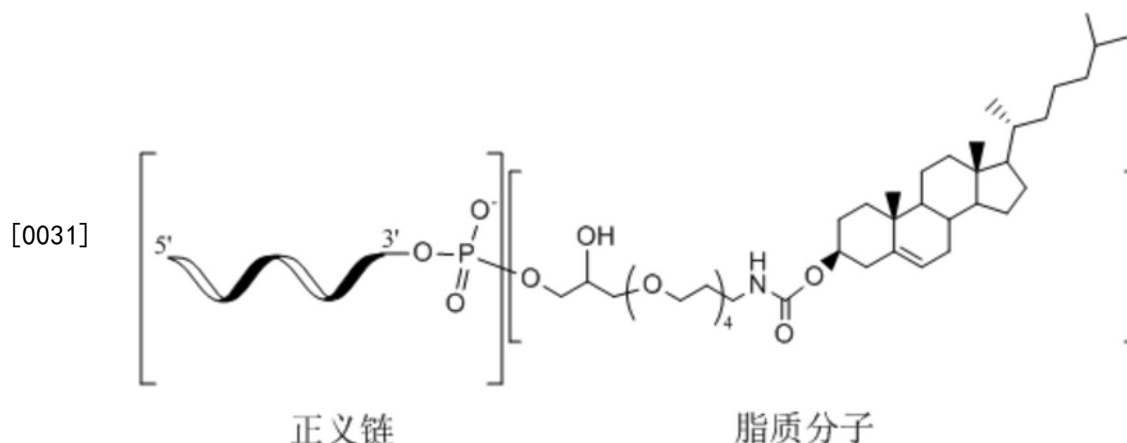
[0027] "s"表示核苷酸通过3'-O→5'-O硫代磷酸酯基团连接:

[0028] "f"表示核苷酸的核糖的2'位被氟原子取代;

[0029] “p-mA”表示序列中最远端的这个腺苷酸上5'位上的羟基有磷酸基团与其成为酯，且其核糖的2'位被甲氧基取代，所述修饰使修饰后的siRNA在细胞内抵抗核酸酶降解的能

力增强。

[0030] 所述的siRNA,在正义链的3'端偶联有脂质分子,增强其对黑色素细胞膜的穿透能力,其特征在于可以实现自我递送进入黑色素细胞中,正义链结构示意图为:



[0032] 本发明的内容还包括,提供一种用于治疗黑色素相关疾病的药物组合物,其特征在于,该药物组合物含有所述的siRNA作为功效成分。

[0033] 本发明的内容还包括,提供的一种化合物,其结构中含有siRNA和脂质分子,在制备治疗黑色素相关疾病药物中的应用。例如可将这种化合物作为药物给药于受药者身上特定部位,比如色素斑块。任选地,上述药物剂型中可以包含任何药学可接受的辅助剂,只要其适合于相应的给药体系、并且恰当地保持所述化合物分子的活性。

[0034] 本发明的内容还包括,一种用于祛除黑色素或抑制黑色素生出或聚集的化妆品组合物,其特征在于,该化妆品组合物含有所述的化合物作为功效成分。所述的化妆品组合物,所述的化合物的重量百分比含量可以是0.0001%-10%。所述的化妆品组合物,其它成分可以含有市场上常用的化妆品成分,如着色、芳香、乳化、保湿、抗菌剂、维生素、增加粘稠度的成分、抗氧化剂、抗真菌、抗微生物、抗过敏、抗肿瘤、抗刺激、抗病毒、消毒剂、助溶剂、抗病毒、酪合剂、防腐剂,其他小分子、润滑剂、增强皮肤通透性的成分、改变制剂物理特性的成分、植物提取物等用于皮肤保养和治疗的成分、美白成分等。所述的化妆品组合物,其可以说是乳剂、膏剂、霜剂、水剂、气雾剂和粉剂。

[0035] 综上,本发明第一个目的是提供一种新的化合物,其结构中含有siRNA和脂质分子。这种siRNA的骨架被修饰,使其不会被核酸酶降解,其正义链的3'末端偶联有脂质分子,与骨架修饰过的siRNA成为一个整体化合物结构,增强了其穿透黑色素细胞膜的能力,不需要外部载体的输送,可以自我递送进入黑色素细胞中,干扰黑色素形成所需的催化蛋白酪氨酸酶mRNA的功能,破坏其作为翻译模板的作用,从而抑制酪氨酸酶蛋白的合成。

[0036] 本发明的第二个目的是提供一种新化合物在制备用于治疗黑色素相关疾病的药物,或用于抑制黑色素生成和沉积或祛除黑色素的化妆品组合物中的应用。

[0037] 与现有技术相比,本发明的有益效果

[0038] 1、为了提高siRNA在组织中的稳定性,不被核酸酶降解。现有的技术对siRNA骨架和基团进行修饰,但这些化学修饰只提供有限的免受核酸酶降解的保护作用并且可能最终影响siRNA的活性。因此,还需要相应的传递系统来保障siRNA安全高效的穿过细胞膜。由于siRNA分子质量较大,且带有大量负电荷,具有高水溶解性,所以自身无法顺利穿越细胞膜

到达细胞内,脂质体基本结构是由亲水核和磷脂双分子层构成,具备类似生物膜的磷脂双分子层,拥有很高的生物相容性,所以脂质体成为目前最受欢迎,应用最广泛的siRNA载体。

[0039] 现有技术有很多基于脂质的载体系统递送化学修饰的或未修饰的治疗性siRNA的相关研究。脂质体介导的siRNA递送主要将脂质体将siRNA包裹到脂质体内,保护siRNA不被核酸酶降解,提高siRNA的膜通透性,从而促进细胞的吸收。例如阴离子脂质体、pH敏感性脂质体、免疫脂质体、膜融合脂质体(fusogenic liposome)和阳离子脂质体等等,尽管取得了一定的进展,但在实际临床应用中并不适合所有领域,因为当前的制剂技术,脂质体只能通过静脉注射应用于临床。本发明所述的siRNA的作用点是皮肤上皮层基底的黑色素细胞,属于局部用药,不可能通过静脉注射进入皮肤。局部应用,脂质体也不能够穿过上皮层的角质层,并保持其完整性。专利CN101820921B公开了一种抑制酪氨酸酶基因表达的siRNA及组合物和应用,该组合物含有一种或多种应用抑制酪氨酸酶基因的siRNA,在组合物中含有载体,所述载体选自烃油、酯、高级脂肪酸和高级脂肪醇中的一种或几种,这些化合物对于骨架未有修饰或没有被脂质体包裹住的siRNA的保护极其有限,不能确保所有的siRNA都能被传递进入细胞,存在利用度不高的问题。

[0040] 如何安全有效地把siRNA递送进入皮肤基底层的黑色素细胞内,是开发siRNA用于抑制和祛除黑色素的关键。本发明中,我们使用常规脂质化合物胆固醇和三甘醇作为起始物料,通过化合合成形成一个两亲脂质分子,并将该脂质分子固定在特定的固相载体上,其亲水端脱保护后通过固相亚磷酰胺法与正义链的第一个核苷酸单体偶联,然后按顺序引入正义链其它核苷酸单体,固相合成所得的正义链3'端偶联的脂质分子中疏水端裸露,增强整个分子结构与黑色素细胞膜的相容性,具有较强的细胞膜穿透能力,使其可以自我传递进入皮肤基底层的黑色素细胞内,本发明的化合物经体外实验和人体试用试验证明可以干扰黑色素细胞中酪氨酸酶mRNA,破坏其作为翻译模板的功能,从而抑制黑色素细胞生成,起到祛除黑色素和抑制黑色素生成或聚集的作用。本申请是通过siRNA分子与脂质分子二者通过固相合成技术,成为一个整体化合物,增强了整个分子结构与黑色素细胞膜的相容性,具有较强的细胞膜穿透能力,使其可以自我传递进入皮肤基底层的黑色素细胞内,解决了现有技术中siRNA需要借助外部载体进入黑色素细胞,导致siRNA利用度不高的问题。

[0041] 2、本发明的siRNA可以特异性抑制酪氨酸酶的表达,因而阻断了黑色素的合成,淡化色斑,避免了化学美白产品带来的有害化学物质损伤细胞、重金属沉积等副作用。

[0042] 3、本发明的siRNA是经筛选、验证后(见表1)的最优的序列,不仅抑制率高而且可重复性好;由其形成的本发明的化合物作为一个有机整体能够十分稳定地进入黑色素细胞,这也是现有的含siRNA的组合物无法比拟的优势。

附图说明

[0043] 为了使本发明的目的、技术方案和有益效果更加清楚,本发明提供如下附图说明:

[0044] 图1为SK-01-C2高分辨率质谱图;

[0045] 图2为SK-01-C4高分辨率质谱图;

[0046] 图3为SK-01-C5高分辨率质谱图;

[0047] 图4为SK-01-C6高分辨率质谱图;

[0048] 图5为SK-01-C7高分辨率质谱图;

- [0049] 图6为SK-01-C8高分辨率质谱图；
- [0050] 图7为SK-01转染到细胞后24hr (白色)、48hr (黑色) 后,对酪氨酸酶mRNA表达的影响；
- [0051] 图8为SK-02转染到细胞后24hr (白色)、48hr (黑色) 后,对酪氨酸酶mRNA表达的影响；
- [0052] 图9为SK-03转染到细胞后24hr (白色)、48hr (黑色) 后,对酪氨酸酶mRNA表达的影响；
- [0053] 图10为SK-04转染到细胞后24hr (白色)、48hr (黑色) 后,对酪氨酸酶mRNA表达的影响；
- [0054] 图11为不同浓度的SK-01和SK-0101对酪氨酸酶mRNA的影响。

具体实施方式

[0055] 1、根据人体酪氨酸酶基因序列,设计了四条与人黑色素细胞中的酪氨酸酶基因序列相吻合的siRNA,每一条序列的正义链和反义链3'端各加上两个胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸(TT或dTdT),并利用脂质体转染试剂将这四条siRNA递送到人黑色素细胞(A375细胞株),进行体外抑制效果筛选,其中SK-01的抑制活性最高,具体序列见下表1。

[0056] 表1

名称	siRNA 序列 (不加 TT 的部分)
SK-01	正义链: 5'AUGCCUUGCACAUCUAUAU 3' 反义链: 5'AUAUAGAUGUGCAAGGCAU 3'
SK-02	正义链: 5'UGCCUUCUGAUUAUUUAAA3' 反义链: 5'UUUAAAUAUCAGAAGGCA3'
SK-03	正义链: 5'GUUUAACGACAUCAAUAAU3' 反义链: 5'AUUAUUGAUGUCGUUAAAC 3'
SK-04	正义链: 5'GUAUCAGAGCCAUUUAUAA 3' 反义链: 5'UUAUAAAUGGCUCUGAUAC 3'

[0058] 2、对siRNA进行骨架修饰使其更加稳定,不易被核酸酶降解,修饰后序列为:

[0059] 正义链: 5' mAmUfGmCfCmUfUmGmCmCmUcUAU (s) mA (s) mU (s) 3'

[0060] 反义链: 5' p-mAUfAfUAfGfAfUmGUfGfC (s) A (s) mA (s) GfG (s) mC (s) A (s) mU 3'

[0061] 其中:

[0062] "m"表示核苷酸的核糖的2'位被甲氧基取代;

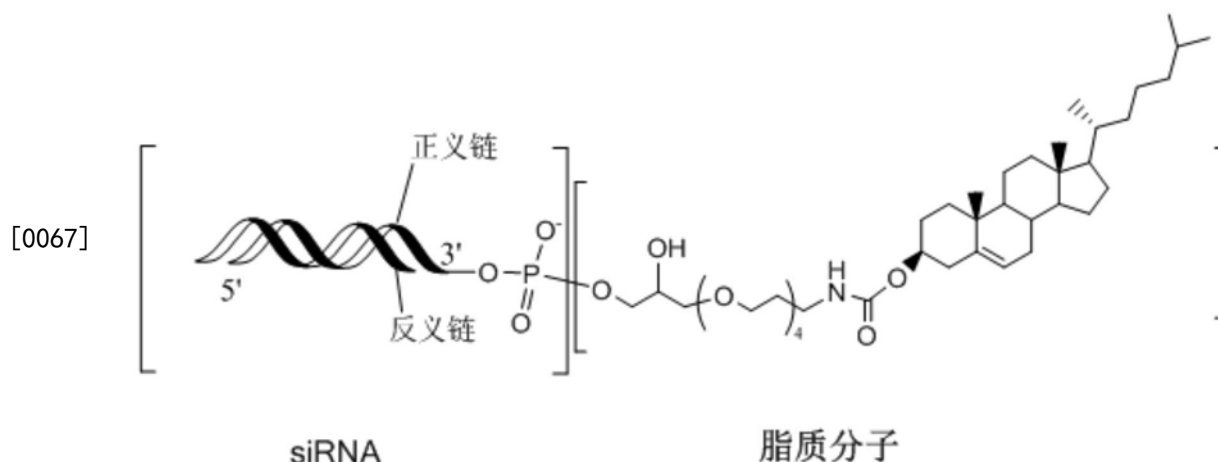
[0063] "s"表示核苷酸通过3'-O→5'-O硫代磷酸酯基团连接;

[0064] "f"表示核苷酸的核糖的2'位被氟原子取代;

[0065] "p-mA"表示序列中最远端的这个腺苷酸5'位上的羟基有磷酸基团与其成为酯,且

其核糖的2'位被甲氧基取代,所述修饰使修饰后的siRNA在细胞内抵抗核酸酶降解的能力增强。

[0066] 3、合成一个新化合物,其结构中含有siRNA和脂质分子,结构示意图为:



[0068] 4、siRNA的正义链和反义链的固相亚磷酰胺法合成

[0069] siRNA中的正义链是以SK-01-C9化合物为起点单体通过固相亚磷酰胺法偶联所得的。固相亚磷酰胺法基本步骤包括:1)脱保护:脱掉SK-01-C9上氧原子上的保护基(DMT);2)偶联:加上第一个核苷酸单体,通过3'至5'方向发生偶联反应;3)封闭:将没有反应的第二个核苷酸单体5'-OH加冒封死,使其不再进一步参与反应;4)氧化:将所得的核苷亚磷酸酯氧化成更稳定的核苷磷酸酯(即三价磷氧化成五价磷);重复上述步骤,直至完成所需的序列。合成后,用二乙胺、乙腈溶液来裂解固相载体上连接化合物与初始核苷间的酯键,将合成好的寡聚核苷酸从固相载体进行氨解切割下来,并将寡聚核苷酸上的各个碱基与磷酸上的保护基氰乙基(P)、苯甲酰基(rA)、乙酰基(rC、mC)和异丁酰基(rG)脱掉。最后,溶解于DMSO的产物,加入三乙胺三氢氟酸盐溶液脱掉糖基2'的TBDMS基团。经HPLC分离纯化后,过滤除菌,冻干。

[0070] siRNA中的反义链是以mU为起点单体,通过固相亚磷酰胺法合成。基本步骤与正义链的合成一样。

[0071] 5、siRNA由正义链与反义链在退火缓冲溶液中按照碱基配对原则形成。基本步骤包括:将正义链和反义链分别复溶,混合,加入注射用水适量,投入适量TRIS缓冲溶液,使溶液混合均匀。水浴升温至92℃~95℃,加热3min~5min,使溶液受热均匀。自然冷却至室温,取样送检,测浓度,用灭菌注射水将溶液稀释至标准浓度。

[0072] 6、化妆品组合物中,含siRNA的化合物以总重量的0.0001%-10%加入。

[0073] 7、化妆品组合物的其它成分可以含有市场上常用的化妆品成分,如着色剂、芳香剂、乳化剂、保湿剂、抗菌剂、增稠剂、抗氧化剂、助溶剂、螯合剂、防腐剂,其他小分子、润滑剂、增强皮肤通透性的成分、改变制剂物理特性的成分、植物提取物等用于皮肤保养和治疗的成分、美白成分等。

[0074] 实施例1:siRNA的筛选

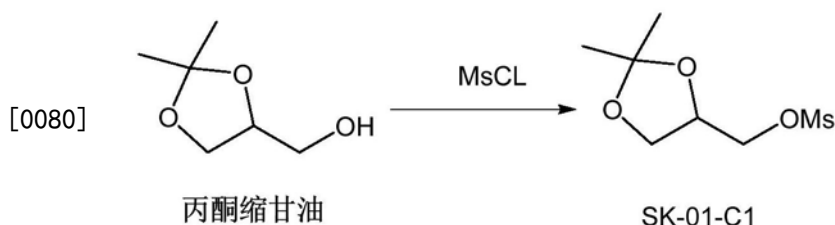
[0075] 根据人体酪氨酸酶基因序列,设计了四条与人黑色素细胞中的酪氨酸酶基因序列相吻合的siRNA,在每一条序列的正义链和反义链3'端各加上两个胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸(TT或dTdT),具体筛选的序列见下表2。

[0076] 表2

名称	siRNA 序列（不加 TT 的部分）	序列号	作用位点
SK-01F	正义链: 5' AUGCCUUGCACAUCUAUUAU 3'	SEQ ID NO.1	1174-1192
SK-01R	反义链: 5' AUAUAGAUGUGCAAGGCAU 3'	SEQ ID NO.2	
SK-02F	正义链: 5' UGCCUUCUGAUUAUUUAAA 3'	SEQ ID NO.3	1991-2008
SK-02R	反义链: 5' UUUAAAUAUUCAGAAGGCA 3'	SEQ ID NO.4	
SK-03F	正义链: 5' GUUUAACGACAUCAAUAAU 3'	SEQ ID NO. 5	580-596
SK-03R	反义链: 5' AUUAUUGAUGUCGUUAAAC 3'	SEQ ID NO.6	
SK-04F	正义链: 5' GUAUCAGAGCCAUUUUAUA 3'	SEQ ID NO.7	1654-1672
SK-04R	反义链: 5' UUAUAAAUGGCUCUGAUAC 3'	SEQ ID NO.8	

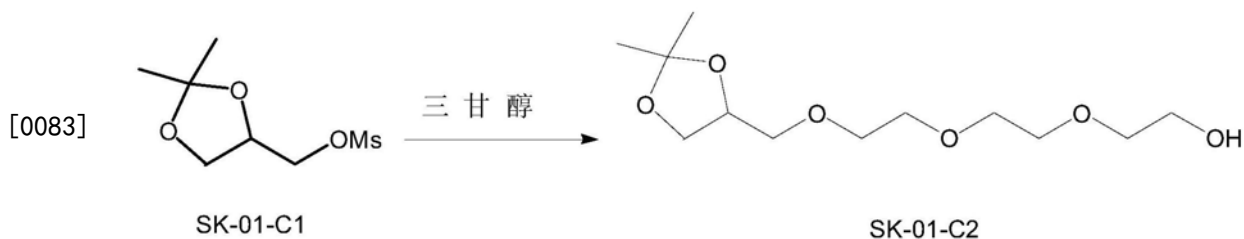
[0078] 实施例2:脂质化合物的SK-01-C9合成

[0079] (1) SK-01-C1的合成



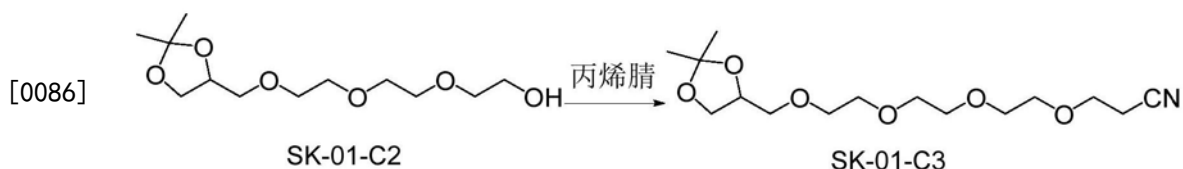
[0081] 称取丙酮缩甘油 (13.2g), 溶于二氯甲烷中 (100mL), 加三乙胺 (17.16g), 于冰水浴中滴加甲基磺酰氯 (11.6mL) 的二氯甲烷溶液 (50mL), 室温搅拌反应, 进行TLC分析, 反应完全, 加乙酸乙酯 (150mL), 有机相用饱和氯化铵 (150mL) 和饱和食盐水 (150mL) 依次洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋蒸, 过柱, 得SK-01-C1产品19.0g, 收率91%。

[0082] (2) SK-01-C2的合成



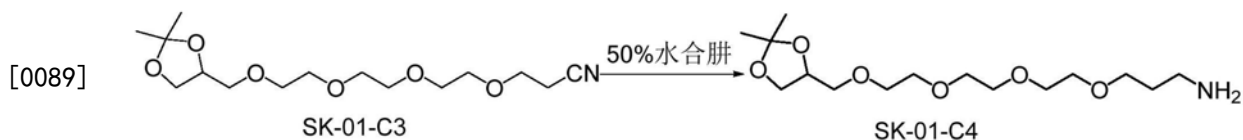
[0084] 于三甘醇 (30mL) 中分批加入氢化钠 (0.960g), 缓慢升温至氢化钠全部溶解后冷却, 加入SK-01-C1 (4.242g), 升温至100℃, 搅拌4h后冷却至室温, 进行TLC分析, 反应完全, 饱和氯化铵 (50mL) 淬灭, 加水 (100mL), 二氯甲烷-异丙醇 (9:1) (30mL) 萃取, 重复操作5次, 合并有机相并用饱和食盐水洗涤 (100mL), 无水硫酸钠干燥, 旋蒸, 过柱, 得SK-01-C2产品4.080g, 收率76.5%, SK-01-C2产品的质谱图见图1。

[0085] (3) SK-01-C3的合成



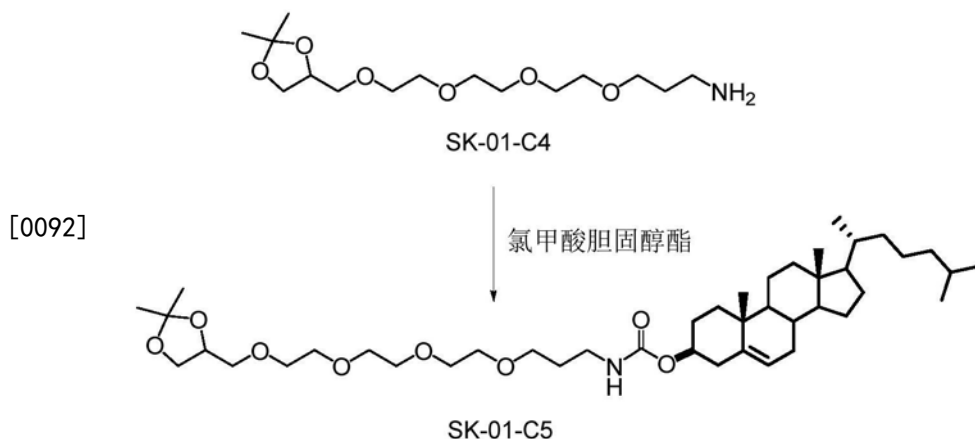
[0087] 称取丙烯腈 (2.47g), 于室温加甲醇钠, 室温分批加入SK-01-C2 (4g), 室温搅拌2h, 进行TLC分析, 反应完全, 滴加乙酸 (微量), 旋蒸, 再加二氯甲烷 (20mL), 硅藻土过滤, 旋蒸。过柱得SK-01-C3产品4.0g, 收率82.36%。

[0088] (4) SK-01-C4的合成



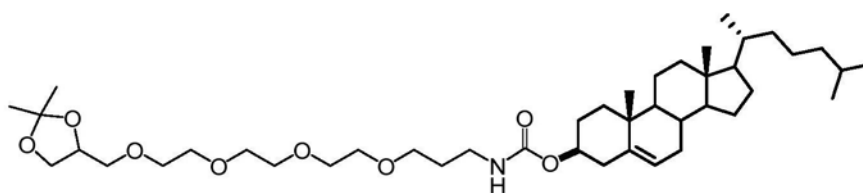
[0090] 称取SK-01-C3 (4.0g) 溶解于乙醇 (20mL) 中, 依次加入雷尼镍水溶液 (4mL) 和50%的水合肼 (6mL), 升温至55℃, 保温搅拌反应, 不再有气泡产生, 停止加热, 降温至室温, 进行TLC分析, 反应完全, 降温至室温, 过滤除掉雷尼镍催化剂, 滤液浓缩得到SK-01-C4产品4.0g, 收率95.16%, SK-01-C4产品的质谱图见图2。

[0091] (5) SK-01-C5的合成



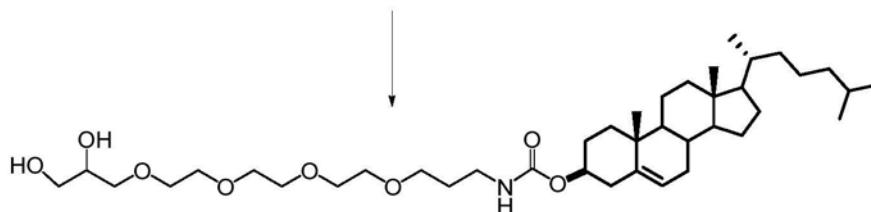
[0093] 称取SK-01-C4 (4.0g) 溶于二氯甲烷 (60mL) 中, 加入三乙胺 (1.88g), 室温滴加氯甲酸胆固醇酯 (6.148g) 和二氯甲烷溶液 (20mL), 室温进行反应, 进行TLC分析, 反应完全, 加水淬灭, 二氯甲烷萃取, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 过柱提纯得SK-01-C5产品5.78g, 收率63.3%, SK-01-C5产品的质谱图见图3。

[0094] (6) SK-01-C6的合成



SK-01-C5

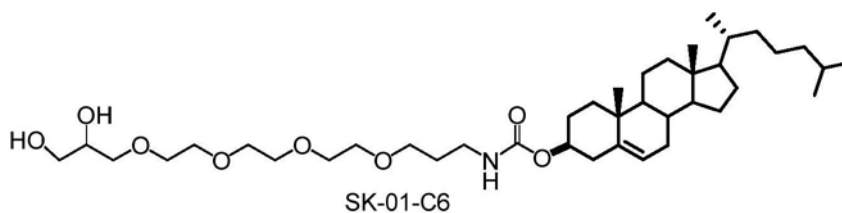
[0095]



SK-01-C6

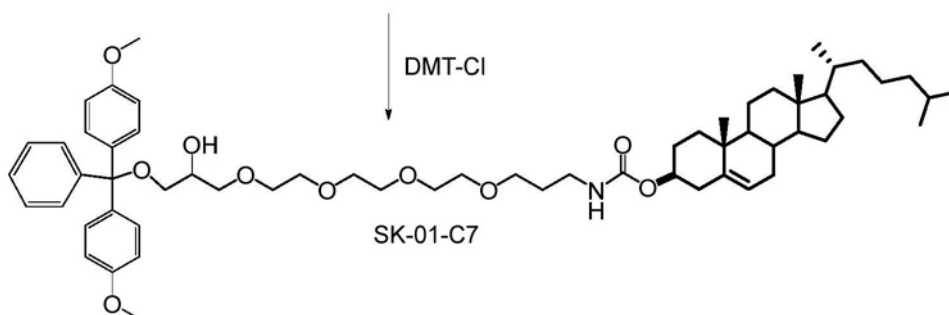
[0096] 称取SK-01-C5 (5.78g) 溶于盐酸-四氢呋喃 (1:1) 混合液 (100mL) 中, 室温反应, 进行TLC分析, 反应完全, 加水淬灭, 用饱和碳酸氢钠水溶液进行中和, 浓缩除去四氢呋喃, 二氯甲烷萃取, 饱和碳酸氢钠水溶液和饱和食盐水先后洗涤, 无水硫酸钠干燥, 旋蒸, 过柱提纯得SK-01-C6产品4.48g, 收率82%, SK-01-C6产品的质谱图见图4。

[0097] (7) SK-01-C7的合成



SK-01-C6

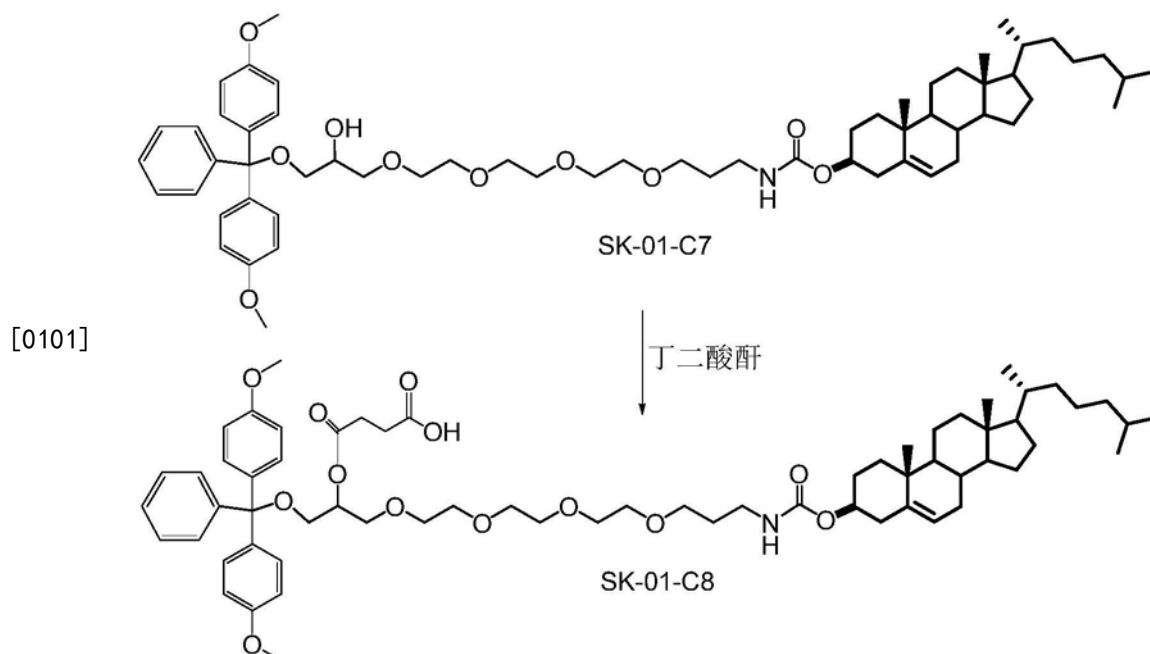
[0098]



SK-01-C7

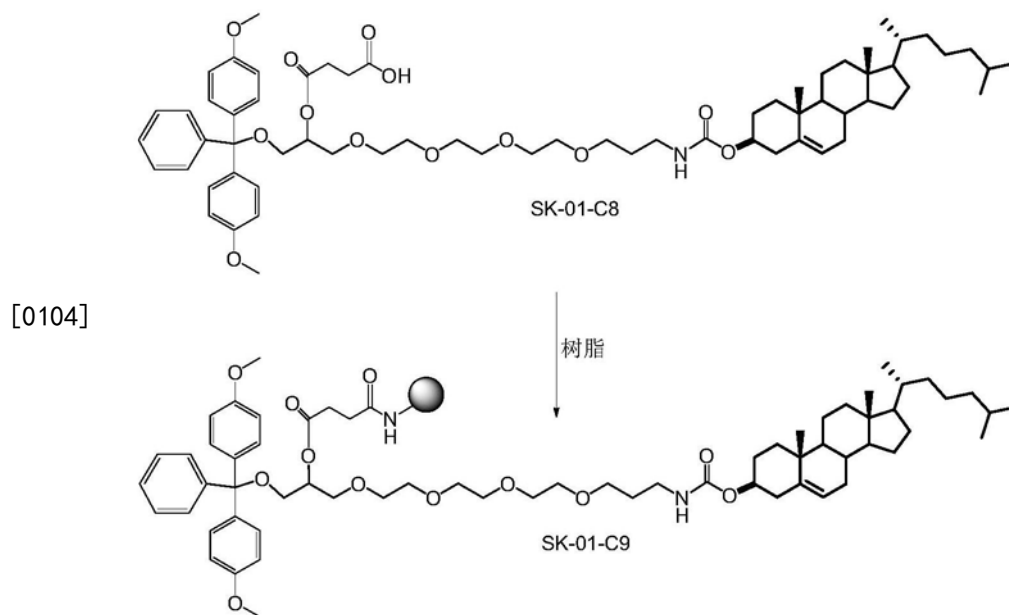
[0099] 称取SK-01-C6 (4.48g) 溶于吡啶 (100mL) 中, 依次加DMT-C1 (2.63g)、DMAP (0.663g)、DIPEA (1.34g), 室温搅拌反应, 进行TLC分析, 反应完全, 加甲醇淬灭, 浓缩除掉吡啶, 二氯甲烷萃取, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过柱纯化, 得SK-01-C7产品3.5g, 收率54%, SK-01-C7产品的质谱图见图5。

[0100] (8) SK-01-C8的合成



[0102] 称取SK-01-C7 (3.5g), 溶于二氯甲烷 (100mL) 中, 依次加入DBU (1.61g)、丁二酸酐 (1.06g), 室温进行反应, TLC中控, 反应结束, 加水洗涤, 有机相用饱和食盐水洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩, 过柱纯化, 得SK-01-C8产品3.56g, 收率92%, SK-01-C8产品的质谱图见图6。

[0103] (9) SK-01-C9的合成



[0105] 称取SK-01-C8 (1.0g), 溶于DMF (50mL) 中, 加入DIPEA (0.354g)、HBTU (0.345g), 氮气保护室温搅拌五分钟, 再加入Primer support 5G Amino (GE树脂) (3.6g), 封口进行摇床摇动12h, 过滤除掉滤液, 滤饼用DMF洗涤, 洗涤完后滤饼用CAP-A/CAP-B (1:1) 混合液 (30mL) 进行封端, 封端结束, 过滤除掉封端液, 滤饼用甲醇、二氯甲烷、甲醇依次洗涤, 滤饼真空抽干, 得SK-01-C9产品4.6g, 取代度160 μ mol/g。

[0106] 实施例3: 细胞实验

[0107] 1、利用脂质体转染试剂, 输送SK-01~SK-04进入人黑色素瘤细胞A375细胞, 考察

对酪氨酸酶基因抑制效果研究

[0108] ①细胞培养:

[0109] A375细胞(中科院干细胞库),常规培养使用含10%胎牛血清(BI)的DMEM培养基(Sigma)(含1.5mM L-Glutamine,100U/mL penicillin,100μg/mL Streptomycin)基,于37℃ 5%CO₂饱和湿度培养箱中培养。

[0110] 实验材料及试剂:

[0111]	名称	批号与厂家
	DMEM 培养基	Lot:RNBG4104, Sigma, 含 1.5 mM L-Glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL Streptomycin
	双抗 Pen Strep	Lot:1953103, Gibco

[0112]	名称	批号与厂家
	0.05% Trypsin - EDTA	Lot:1961601, Gibco
	胎牛血清 FBS	Lot:1717393, BI
	GP-siRNA-Mate Plus 转染试剂	上海吉玛制药技术有限公司
	oligo : NC-CY3	上海吉玛制药技术有限公司
	96 孔板	Corning Incorporated
	6cm 培养皿	Corning Incorporated

[0113] 实验步骤描述:

[0114] A375细胞在6cm培养皿中培养至80-90%融合时,倾去培养基,用2mL PBS洗涤细胞两次。加入1mL Trypsin-EDTA solution溶液,使其均匀覆盖细胞表面,小心吸弃,将6cm培养皿于37℃放置2分钟。取出6cm培养皿,加入2mL含10%FBS的DMEM培养基,吹打使细胞形成单细胞悬液。血球计数板计数,将细胞稀释至 1×10^5 细胞/mL。按 5×10^4 细胞/孔的密度接种96孔板,混匀后于培养箱中培养24h。用120μL DEPC水稀释10D NC-CY3oligo,使其终浓度为20μM。转染试剂GP-siRNA-Mate Plus用于转染NC-CY3 oligo。使用前将转染试剂轻轻混匀,直接将适量的NC-CY3 oligo与GP-siRNA-Mate Plus转染试剂混合,用移液器吸打混匀,室温静置10-15min,再加入100μL完全培养基,混匀。

[0115] ②细胞转染:

[0116] 实验材料及试剂:

[0117]

名称	批号与厂家
DMEM 培养基	Lot:RNBG4104, Sigma, 含 1.5 mM L-Glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL Streptomycin
双抗 Pen Strep	Lot:1953103, Gibco
0.05% Trypsin - EDTA	Lot:1961601, Gibco
胎牛血清 FBS	Lot:1717393, BI
GP-siRNA-Mate Plus 转染试剂	上海吉玛制药技术有限公司
oligo : SK-01	Lot:SK-01180202,
oligo : SK-02	Lot:SK-02180202,
oligo : SK-03	Lot:SK-03180201,
oligo : SK-04	Lot:SK-04180205,
96 孔板	Corning Incorporated
6cm 培养皿	Corning Incorporated

[0118] 实验步骤描述:

[0119] A375细胞在10cm培养皿中培养至80-90%融合时,倾去培养基,用2mL PBS洗涤细胞两次。加入1mL Trypsin-EDTA solution溶液,使其均匀覆盖细胞表面,小心吸弃,将10cm培养皿于37℃放置2分钟。取出10cm培养皿,加入2mL含10%FBS的DMEM培养基,吹打使细胞形成单细胞悬液。血球计数板计数,将细胞稀释至 1×10^7 细胞/mL。按 1.5×10^6 细胞/孔的密度接种6孔板,混匀后于培养箱中培养24h。用120µL DEPC水稀释10D oligo,使其终浓度为20µM。转染试剂GP-siRNA-Mate Plus用于转染oligo。使用前将转染试剂轻轻混匀,直接将适量的oligo与GP-siRNA-Mate Plus转染试剂混合(所需剂量见下表),用移液器吸打混匀,室温静置15min,再加入1mL完全培养基,混匀。吸去6孔板中的培养基,每孔加入1mL上述转染混合物,混匀后,在培养箱中温育5小时。弃去转染混合液,换为DMEM完全培养基,在培养箱内孵育24h或48h后收样用于后续RT-PCR检测。

[0120] ③RT-PCR检测

[0121] 引物设计:

[0122]

Gene		Sequence
hGAPDH	F primer	TCTCTGCTCCTCCTGTTCGA SEQ ID NO.9
	R primer	GCGCCCAATACGACCAAATC SEQ ID NO.10
	Size: 122bp	
hTYR	F primer	GCCTCAATTTCCCTTCACAG SEQ ID NO.11
	R primer	CAGTTTCCACAGTTGAATCCC SEQ ID NO.12
	Size: 111bp	

[0123] 试剂和仪器

[0124]	名称	批号与厂家
	实时荧光定量通用试剂	上海吉玛制药技术有限公司
	Ezol裂解液	上海吉玛制药技术有限公司
	WB试剂	上海吉玛制药技术有限公司
	三氯甲烷	上海润捷化学试剂有限公司
	乙醇	Lot:20180201,江苏强盛功能化学股份有限公司
	TL988实时荧光定量PCR仪	西安天隆科技有限公司
	cence离心机	湘仪

[0125] 实验步骤描述:

[0126] 总RNA提取:往收集完毕的细胞样品中加入1mL Ezol裂解液,漩涡震荡混匀。加入0.2mL三氯甲烷,剧烈摇动10s,室温放置1分钟。4℃,12,000x g离心15min。将上清水相转移至另一新的无RNA酶离心管中,并加入等体积的100%乙醇。吸取全部样品,加入带有2mL收集管的mini-spin离心柱。8,000x g,室温离心15s,弃尽流穿液。将剩余的样品转移至离心柱,重复第5步。往离心柱中加入700μL WB,轻盖盖子,8,000x g,室温离心15s,弃尽流穿液。重复第7步,用500μL WB洗涤离心柱两次。将离心柱转移至一新的无RNA酶的1.5mL离心管中,往硅胶膜中央滴加50μL DEPC水,4℃,10,000x g离心3min洗脱RNA。

[0127] 逆转录反应体系:

[0128]	组分	终浓度.	用量
	2×逆转录缓冲液	2×	10μL
	逆转录引物 (1μM)	50nM	1.2μL
	总RNA	—	2μL
	MMLV逆转录酶 (200U/μL)	2U/μL	0.2μL
	DEPC水		To 20μL

[0129] 逆转录程序为42℃ 30min;85℃ 10min.实时荧光定量反应体系为:

[0130]	组分	终浓度.	用量
	2×定量PCR Master Mix	1×	10μL
	上游引物 (20μM)	0.08μM	0.08μL
	下游引物 (20μM)	0.08μM	0.08μL
	cDNA模板	—	2μL
	Taq DNA聚合酶 (2.5U/μL)	0.05U/μL	0.4μL
	dd H ₂ O		加至20μL

[0131] 定量PCR反应程序为95℃,3分钟变性,95℃,12秒;62℃,40秒。40循环。

[0132] ④试验结果

[0133] 利用了脂质转染试剂(吉玛基因)按照其实验方法将四条骨架未经修饰的siRNA在不同浓度下递送到人的黑色素细胞(A375细胞株)。并在转染后24和48小时收集细胞,通过RT-PCR定量的方法测定酪氨酸酶mRNA的变化。试验结果见下表3。

[0134] 表3

[0135]

样品	抑制率(%) \ 浓度(nm) \ 时间(h)	0.01	0.1	1	10
对照 siRNA	24	1.15	1.02	1.11	0.95
	48	0.99	1.11	0.98	0.85
SK-01	24	0.81	0.71	0.37	0.26
	48	0.42	0.28	0.23	0.15
SK-02	24	1.23	1.19	0.63	0.48
	48	0.75	0.59	0.75	0.45
SK-03	24	0.85	0.97	0.35	0.25
	48	1.05	0.87	0.24	0.26
SK-04	24	1.19	1.06	0.77	0.59
	48	0.85	0.75	0.47	0.29

[0136] 如上表及图7~10所示结果,表明SK-01以GAPDH基因作为参照基因的RT-PCR定量,其对酪氨酸酶的表达具有较高的抑制效果,并呈现剂效关系,在浓度为10nmol的时候,酪氨酸酶的mRNA抑制程度可以达到85%。

[0137] 2、偶联脂质分子的siRNA对酪氨酸酶基因抑制效果研究。

[0138] 本实验没有利用外在脂质体转染试剂做载体,直接将阴性对照siRNA、SK-01和SK-0101加入培养的A735人黑色素细胞中。应用实施例1中同样的方法,考察在没有利用外在脂质转染试剂做载体的情况下,阴性对照siRNA、SK-01和SK-0101对酪氨酸酶基因抑制效果,同实施例1细胞培养条件,将阴性对照siRNA、SK-01和SK-0101分别直接加入细胞培养液中,其浓度均为:1 μ M、2 μ M、4 μ M,72小时后收集细胞,提取RNA,用RT-PCR方法定量细胞内的mRNA含量的变化,对人黑色素瘤细胞A375细胞的抑制效果研究。结果见下表4:

[0139] 表4

[0140]

抑制效果 \ 试验样品	浓度 (μ M)		
	1	2	4
阴性对照 siRNA	1.105	1.203	0.878
SK-01	0.973	0.856	0.890
SK-0101	0.431	0.161	0.021

[0141] 结果表明,在没有转染试剂的协助下,阴性对照siRNA和SK-01不能有效的进入细胞,没有显示出对人黑色素瘤细胞(A375细胞)的酪氨酸酶基因抑制效果,但是SK-0101抑制效果非常明显。如上表和图11结果所示,SK-0101对酪氨酸酶基因抑制效果在1、2、4 μ M的浓

度下分别达到了57%、84%和98%，也呈现显著剂效效应。

[0142] 实施例4:SK-0101水剂的人体局部应用的效果评估

[0143] 1、实验制剂

[0144]	制剂名称	制备方法
	SK-0100水剂	即空白对照,为常用化妆品组分配制而成的水剂,作为SK-0101的基质。
	SK-0101水剂	在SK-0100水剂中加入一定比例的SK-0101制得。

[0145] 2、实验对象及方法

[0146] 2.1试验对象

[0147] 在美容院中挑选四种问题性皮肤类型女性试用者,均为脸部色素沉积较明显。每一大组又分为A和B两个小组,每一小组10例试用者。A组试用SK-0100水剂,B组试验用SK-0101水剂。两小组每天各用1次,连续试用一个月。

[0148] 试验结果见下表5:

[0149] 表5

	斑的种类		斑点祛除	斑点淡化	斑点无变化	斑点恶化
	黄褐斑	A 组	0	2	8	0
		B 组	9	1	0	0
[0150]	雀斑	A 组	0	3	7	0
		B 组	9	1	0	0
	日晒斑	A 组	0	3	7	0
		B 组	8	1	1	0
	炎症后的色素沉着	A 组	0	1	9	0
		B 组	9	0	7	0

[0151] 2.2试验结论

[0152] 由上表可以看出,含有SK0101的水剂对常见的雀斑、黄褐斑、日晒斑和炎症后的色素沉着均有很好的祛除效果,与没有添加SK-0101的产品相比有很大程度的改善,大约四天开始显现效果,使用一个月时的效果已经很明显。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 厦门甘宝利生物医药有限公司
- [0003] <120> 一种新化合物及其组合物的应用
- [0004] <130> 2019
- [0005] <160> 12
- [0006] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 19
- [0009] <212> RNA
- [0010] <213> 人工序列()
- [0011] <400> 1
- [0012] augccuugca caucuauau 19
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 19
- [0015] <212> RNA
- [0016] <213> 人工序列()
- [0017] <400> 2
- [0018] auauagaugu gcaaggcau 19
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 19
- [0021] <212> RNA
- [0022] <213> 人工序列()
- [0023] <400> 3
- [0024] ugccuucuga uuauuuaaa 19
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 19
- [0027] <212> RNA
- [0028] <213> 人工序列()
- [0029] <400> 4
- [0030] uuuaaauaau cagaaggca 19
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 19
- [0033] <212> RNA
- [0034] <213> 人工序列()
- [0035] <400> 5
- [0036] guuuuacgac aucaauaau 19
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 19

[0039] <212> RNA
[0040] <213> 人工序列()
[0041] <400> 6
[0042] auuauugaug ucguuaaac 19
[0043] <210> 7
[0044] <211> 19
[0045] <212> RNA
[0046] <213> 人工序列()
[0047] <400> 7
[0048] guaucagagc cauuaauaa 19
[0049] <210> 8
[0050] <211> 19
[0051] <212> RNA
[0052] <213> 人工序列()
[0053] <400> 8
[0054] uuauaaaugg cucugauac 19
[0055] <210> 9
[0056] <211> 20
[0057] <212> DNA
[0058] <213> 人工序列()
[0059] <400> 9
[0060] tctctgctcc tcctgttcga 20
[0061] <210> 10
[0062] <211> 20
[0063] <212> DNA
[0064] <213> 人工序列()
[0065] <400> 10
[0066] gcgccaata cgaccaaatac 20
[0067] <210> 11
[0068] <211> 20
[0069] <212> DNA
[0070] <213> 人工序列()
[0071] <400> 11
[0072] gcctcaattt cccttcacag 20
[0073] <210> 12
[0074] <211> 21
[0075] <212> DNA
[0076] <213> 人工序列()
[0077] <400> 12

[0078] cagtttccac agttgaatcc c 21

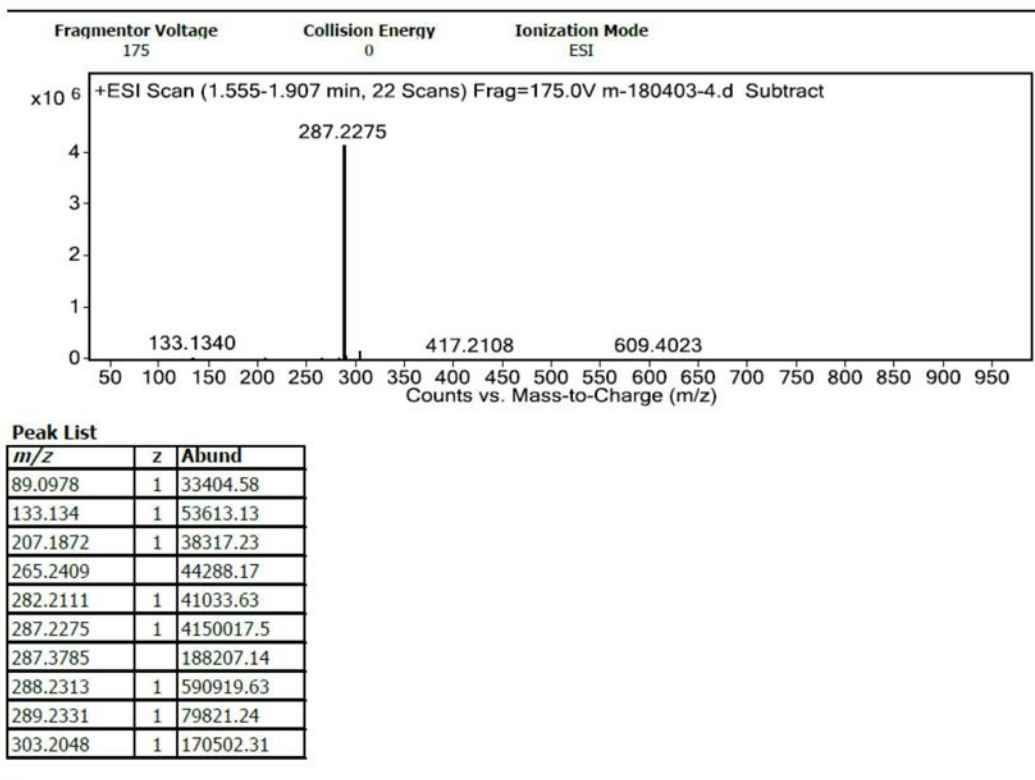


图1

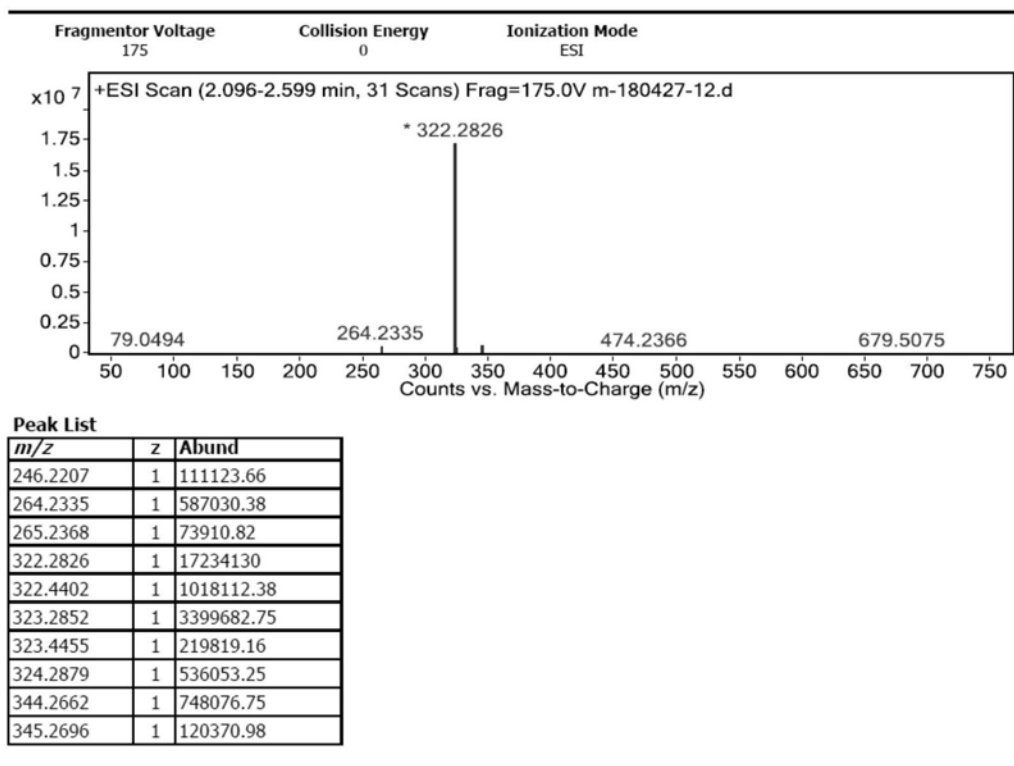


图2

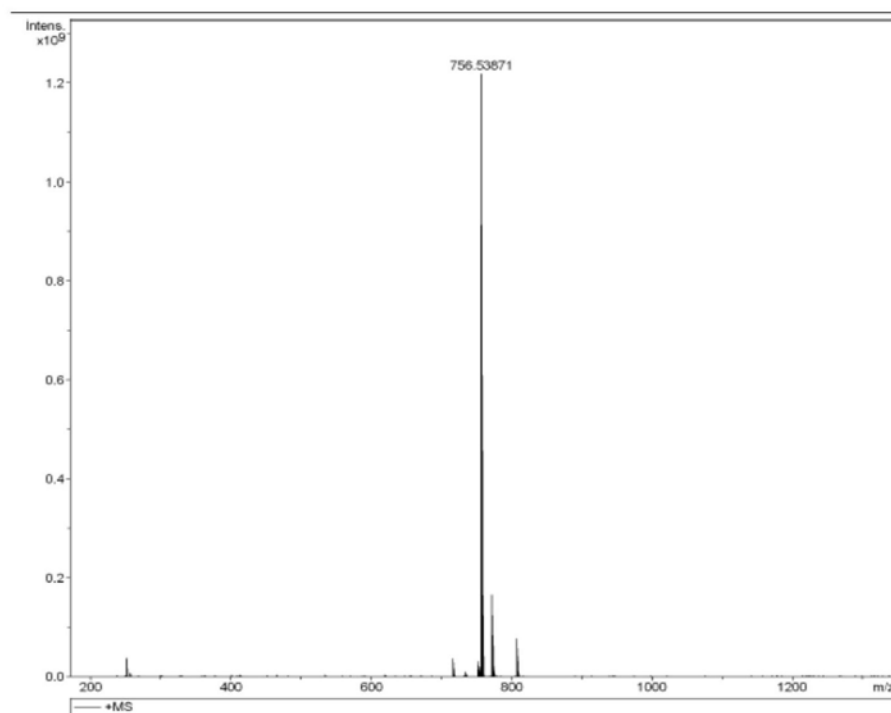


图3

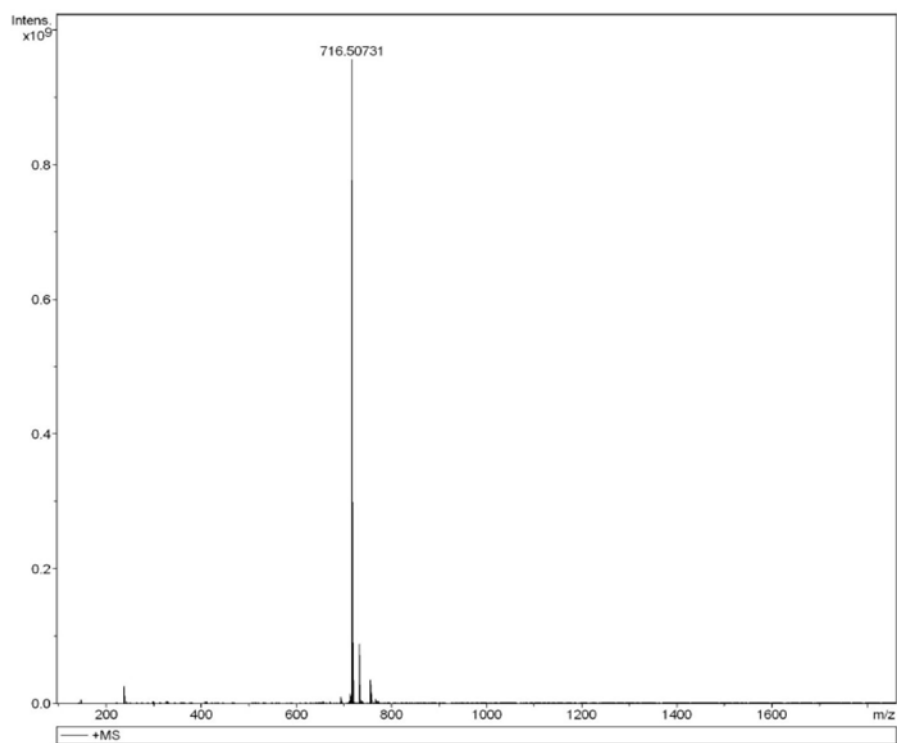


图4

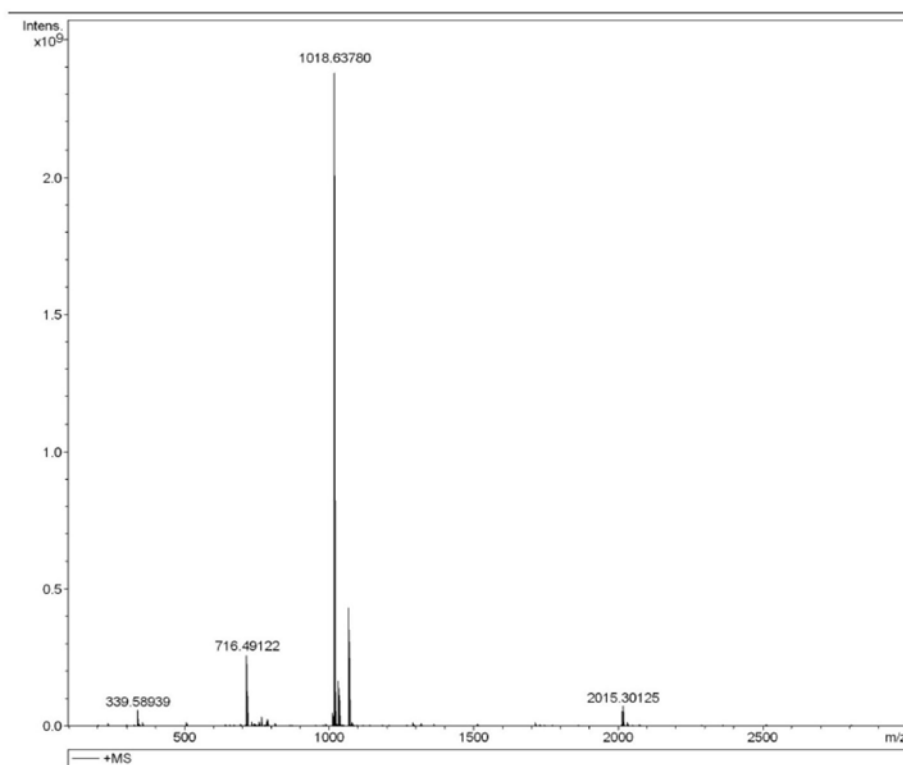


图5

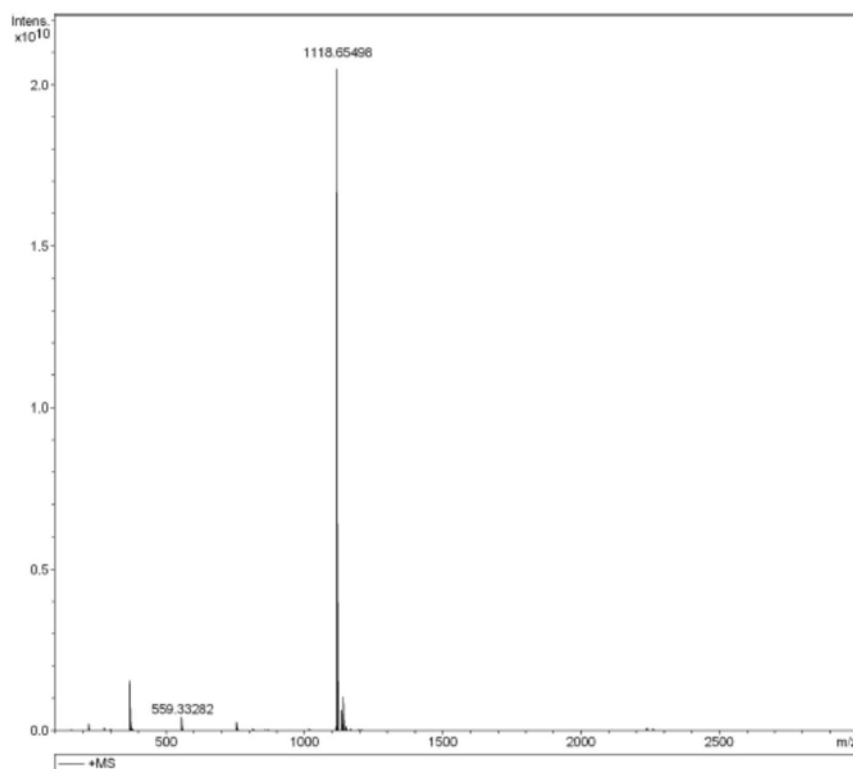


图6

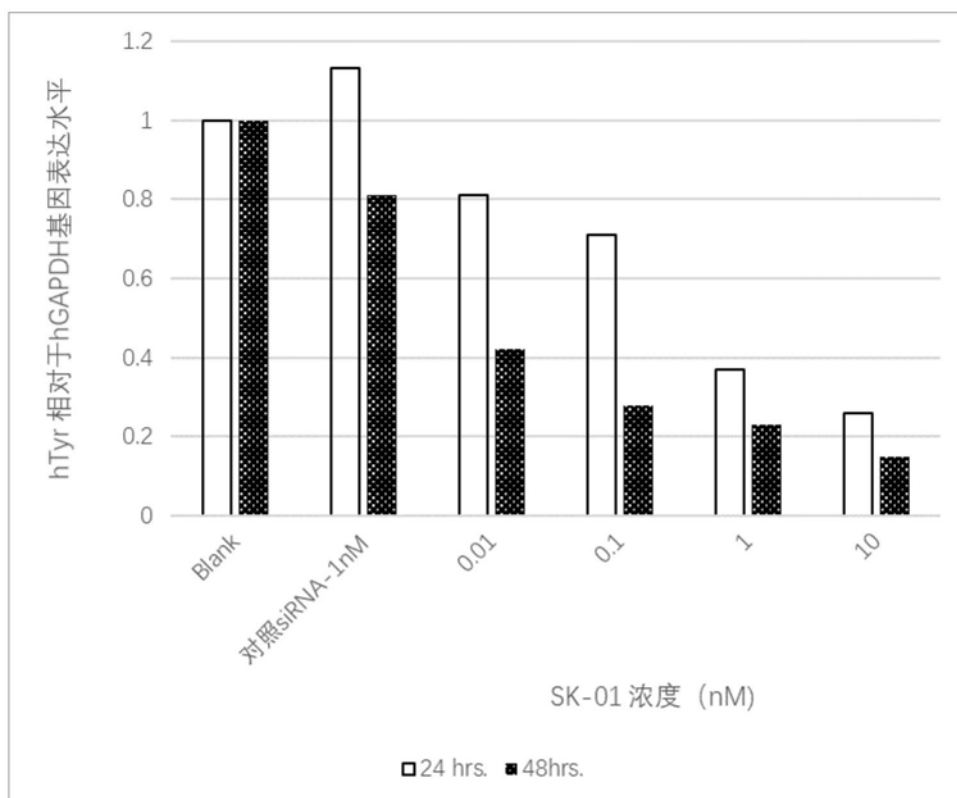


图7

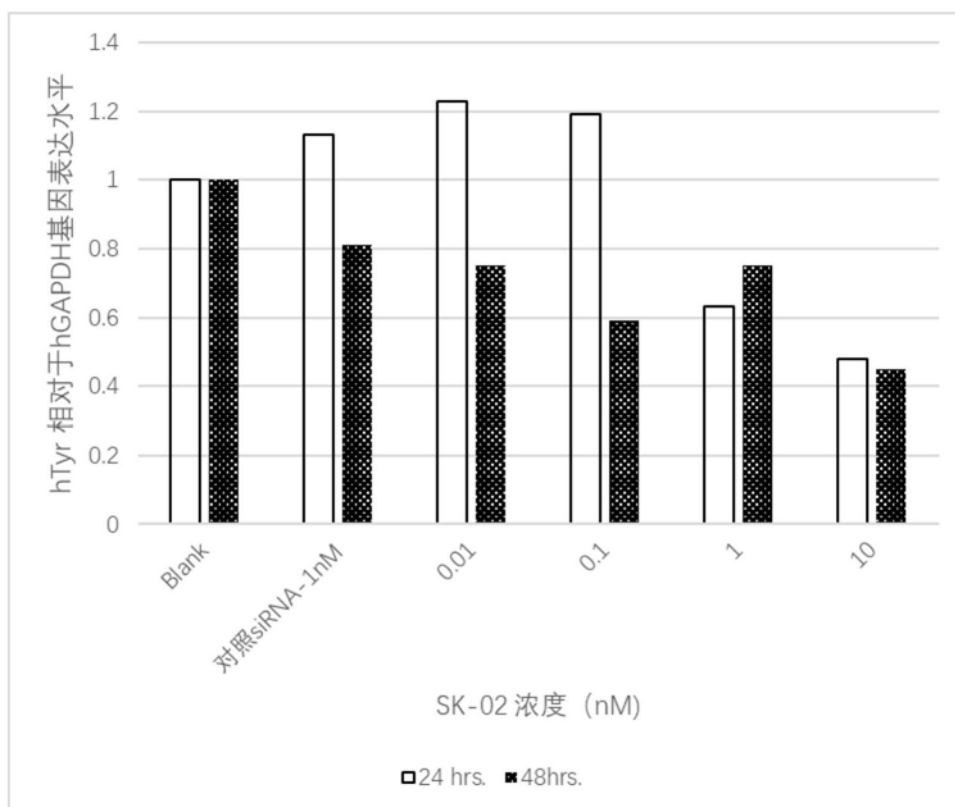


图8

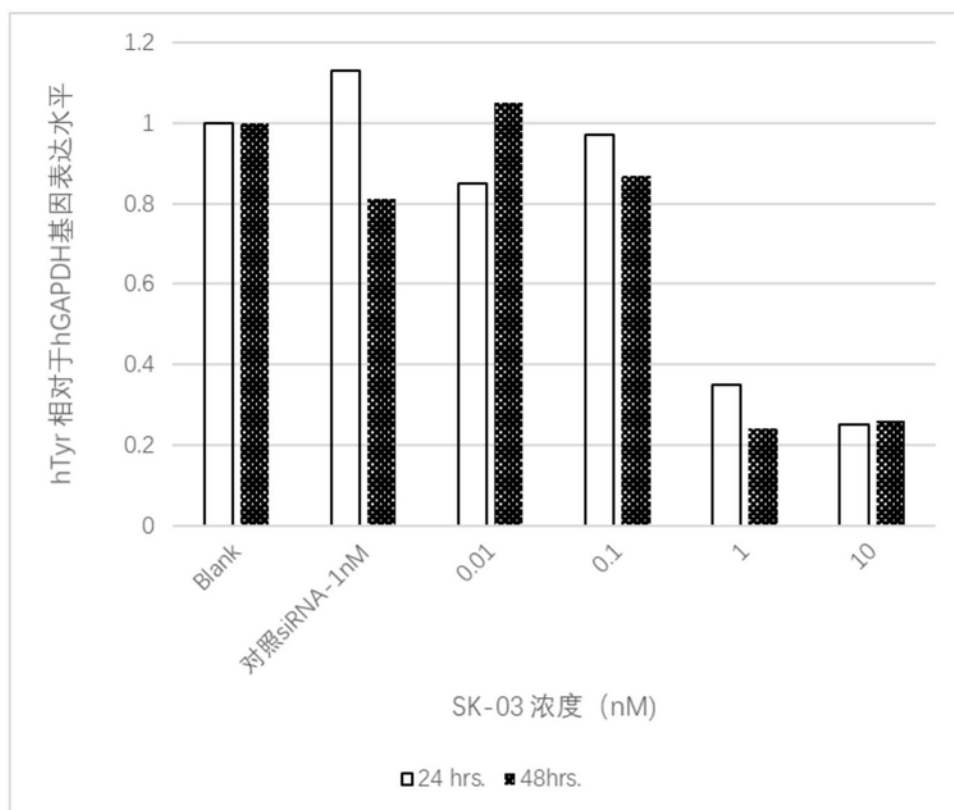


图9

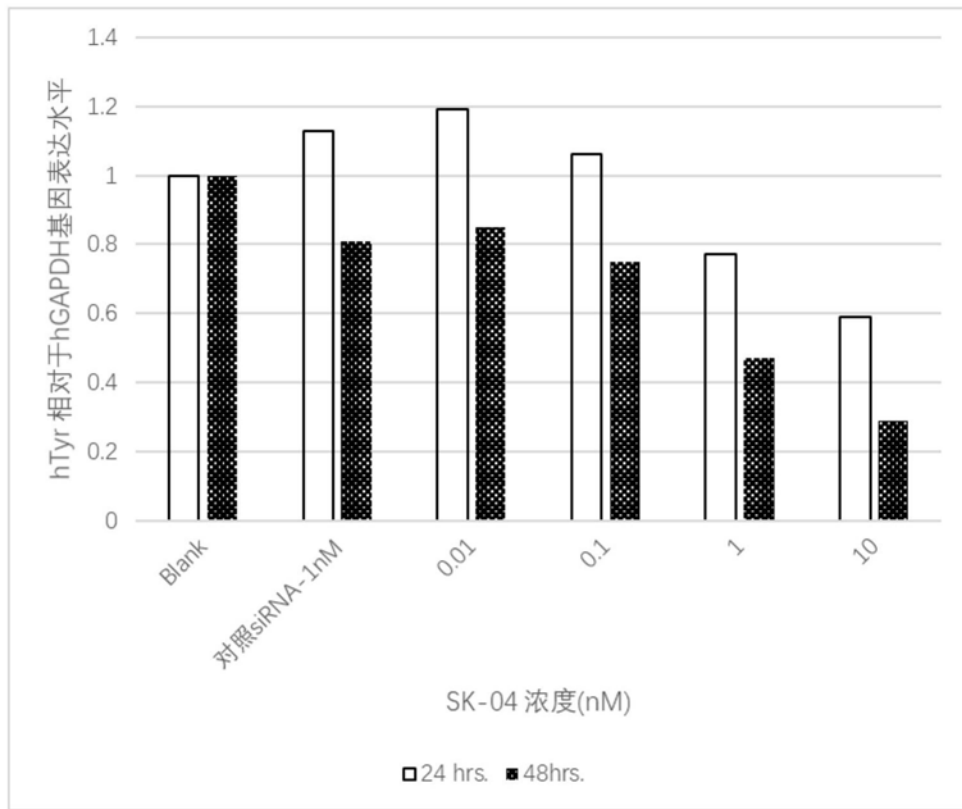


图10

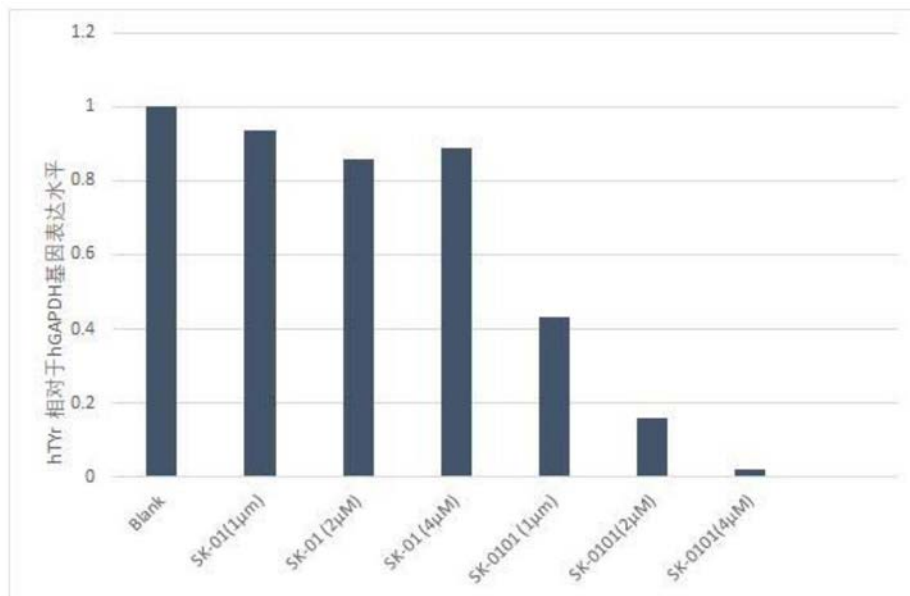


图11