[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780005929.1

[51] Int. Cl.
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C08G 65/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 3 月 11 日

[11] 公开号 CN 101384282A

[22] 申请日 2007.2.21
[21] 申请号 200780005929.1
[30] 优先权
[32] 2006.2.23 [33] DE [31] 102006008701.1
[86] 国际申请 PCT/EP2007/051661 2007.2.21
[87] 国际公布 WO2007/096382 德 2007.8.30
[85] 进入国家阶段日期 2008.8.19
[71] 申请人 奇亚根有限责任公司
地址 德国希尔登市
[72] 发明人 克里斯多福·埃尔巴赫
乌特·克鲁格
[74] 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司
代理人 朱晓江 周正雄
权利要求书 5 页 说明书 18 页 附图 1 页

[54] 发明名称

制备转化细胞的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种将生物分子结合到细胞中的方法，所述方法包括下列步骤：i) 由生物分子和聚合物制备出配合物，所述生物分子优选核酸，所述聚合物是由具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体进行反应而制得的；ii) 通过细胞与配合物的关联反应而将所述生物分子转移到细胞内。 本发明进一步涉及采用所述方法获得的转化细胞，一种特殊聚合物在将生物分子转移到细胞中的应用，一种将生物分子转移到细胞中的试剂盒(kit)、所述试剂盒在将生物分子转移到细胞中的应用，一种生物分子和聚合物制备的配合物，一种治疗剂组分，一种由生物分子和聚合物制备的配合物的应用，采用基因疗法治疗疾病的聚合物以及疾病的基因疗法。

1. 一种将生物分子转移到细胞中的方法，包含以下步骤：

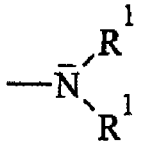
   i) 由生物分子和聚合物制备出配合物，所述生物分子优选核酸，所述聚合物是由具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体进行反应而制得的；

   ii) 通过细胞与配合物的关联反应而将所述生物分子转移到细胞内。

2. 根据权利要求 1 所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，步骤 i)中配合物的制备是在 pH 值为 6 到 8 的条件下将聚合物与生物分子进行关联反应。

3. 根据前述任意一项权利要求所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，所述生物分子是脱氧核糖核酸。

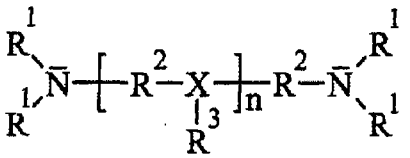
4. 根据前述任意一项权利要求所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，所述胺基单体具有至少两个结构式为 I 的功能基团：



I

其中，所述功能基团中的残基R^1是相同的或不相同的代表C_1到C_{20}的碳氢化合物残基、羟基功能化的C_1到C_{20}的碳氢化合物残基，或者氢原子。

5. 根据前述任意一项权利要求所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，所述胺基单体具有结构式为 II 的功能基团：



II

其中，

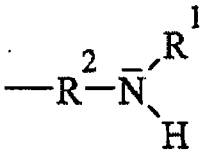
n 是1-100中的整数，

X 如果出现X，则是氧原子或氮原子，并且当X为氧原子时，X原子上的R^3基团并不出现，

R^1 R^1在结构式II中是相同的或不相同的代表C_1到C_{20}的碳氢化合物残基、羟基功能化的C_1到C_{20}的碳氢化合物残基，或者氢原子；

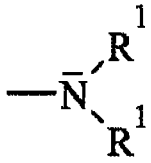
R^2 R^2在结构式II中是相同或不相同的代表C_1到C_{20}的亚烃基、或C_1到C_{20}的亚烃基、或C_1到C_{20}的氧化烯基；

R^3 R^3在结构式II中是相同或不相同的代表C_1到C_{20}的碳氢化合物残基、羟基功能化的C_1到C_{20}的碳氢化合物残基、氢原子或结构式为III的残基：



III

6. 根据前述任意一项权利要求所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，所述胺基单体包括芳香环体系，其中绑定了至少两个结构式为I的功能基团：



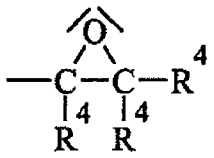
I

其中，R^1代表C_1到C_{20}的碳氢化合物残基、羟基功能化的C_1到C_{20}的碳氢化合物残基，或者氢原子。

7. 根据前述任意一项权利要求所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，所述芳香环体系是苯环、嘧啶环、吡啶环或是三氧烯环。

8. 根据权利要求4-7所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，其中至少一个R^1残基是氢原子。

9. 根据前述任意一项权利要求所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，所述环氧化物单体具有至少两个结构式为IV的功能基团：

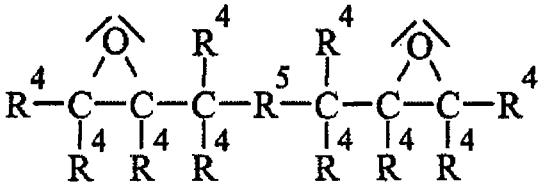


IV

其中，

R^4 残基R^4在结构式IV中是相同或不相同的代表C_1到C_{20}的碳氢化合物残基、羟基功能化的C_1到C_{20}碳氢化合物残基，或者氢原子。

10.根据前述任意一项权利要求所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，所述环氧化物单体具有结构式 V:

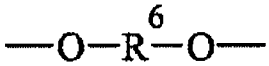


V

其中，

R^4 代表C_1到C_{20}的碳氢化合物残基、羟基功能化的C_1到C_{20}的碳氢化合物残基、或者氢原子；以及

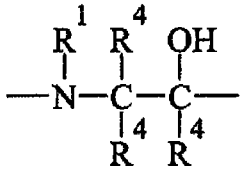
R^5 如果出现R^5，则其代表C_1到C_{20}的亚烃基，或者结构式为VI的基团:



VI

其中R^6代表C_1到C_{20}的亚烃基或者C_1到C_{200}的氧化烯基。

11.根据前述任意一项权利要求所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，所述聚合物具有至少两个结构式为 VII 的结构式单元:



VII

其中，

R^1 代表C_1到C_{20}的碳氢化合物残基、羟基功能化的C_1到C_{20}的碳氢化合物残基、或者氢原子；

R^4 代表为C_1到C_{20}的碳氢化合物残基、羟基功能化的C_1到C_{20}的碳氢化合物残基、或者氢原子。

12.根据前述任意一项权利要求所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，所述聚合物的平均分子量为 0.1kDa。

13.根据前述任意一项权利要求所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，所述聚合物是通过将两种结构不同的胺基单体与一种环氧基单体反应而制得的。

14.根据权利要求 13 所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，其中一种胺基单体是亲水性的单体，另一种胺基单体是疏水性的单体。

15.根据权利要求 13 或 14 所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，首先将一种胺基单体与所述环氧化物单体反应，该胺基单体与环氧化物单体反应的摩尔比至多为 0.5：1，在将所述单体间的反应产物分离之后，再将反应产物与另一胺基单体反应。

16.根据前述任意一项权利要求所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，所述聚合物是通过将两种结构不同的环氧基单体与一种胺基单体反应而制得的。

17.根据前述任意一项权利要求所述的将生物分子转移到细胞中的方法，其特征在于，对所述聚合物中的胺基或羟基进行化学修饰。

18.聚合物在将生物分子转移到细胞中的应用，所述聚合物是由具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体进行反应而制得的。

19.一种将生物分子转移到细胞中的试剂盒，其特征在于，包括:

(β1) 权利要求 4-17 定义的聚合物，所述聚合物是由具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体进行反应而制得的;以及，

(β2) 其他试剂盒组分。

20.权利要求 19 所述的试剂盒在权利要求 1-17 所定义的方法中的应用。

21.一种由生物分子和聚合物制备的配合物，所述生物分子优选核酸，所述聚合物是由具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体进行反应而制得的。

22.一种治疗组合物，包含由生物分子和聚合物制备的配合物，其特征在于，所述生物分子优选核酸，所述聚合物是由具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体进行反应而制得的。

23.由生物分子和聚合物制备的配合物在制备治疗组合物中的应用，其特征在于，所述生物分子优选核酸，所述聚合物是由具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体进行反应而制得的。

24.一种用于人体或动物体治疗用药的聚合物，其特征在于，所述聚合物是由具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体进行反应而制得的。

25.一种通过基因疗法治疗疾病的方法，其特征在于，包含以下步骤:

I） 从生物体中切取细胞;

II） 将生物分子采用权利要求1-17所定义的方法转移到所述切取的细胞中；以及

III） 将所述细胞复原到生物体。

制备转化细胞的方法

【技术领域】

本发明涉及一种将生物分子转移到细胞中的方法，一种特殊聚合物在将生物分子转移到细胞中的应用，一种将生物分子转移到细胞中的试剂盒（kit），所述试剂盒在将生物分子转移到细胞中的应用，一种由生物分子和聚合物制备的配合物，一种治疗剂组分，由生物分子和聚合物制备的配合物的应用，一种通过基因疗法治疗疾病的聚合物，以及一种通过基因疗法治疗疾病的方法。

【背景技术】

已知现有技术中存在多种不同的将外源核酸--尤其是外源 DNA--重组入（转化或转染）细胞中的方法。对于活体内转化，主要采用两种方法：病毒介导的基因转化和借助于阳离子脂质体或阳离子聚合物--如聚乙烯亚胺、聚 L-赖氨酸或、聚 L-精氨酸--进行的转化。所采用的病毒载体包括腺病毒和逆转录酶病毒，这些病毒可将非病毒 DNA 转染到能够进行有丝分裂的活性细胞中。阳离子脂质体对 DNA 上带负电荷的磷酸盐骨架具有影响。

活体内转化的适当技术是磷酸钙共沉淀法（calcium phosphate precipitation），该技术中，在氯化钙和磷酸钠的混合物中，将待转化的 DNA 绑定到起沉淀作用的磷酸钙上，沉积的结晶体被添加到细胞培养基中，并通过内噬作用被细胞吸收。除了该化学转化技术外，还已知有多种物理的活体内转化技术，如显微注射，该技术采用注射器具直接将 DNA 注射到细胞核或细胞中，如电穿孔法（electroporation），该技术借助于电脉冲刺激细胞膜，而使得细胞膜对 DNA 是可渗透的，再如所谓的基因枪法（particle gun technique）技术，它是借助于在 DNA 上包覆细微的金属球而将外源 DNA 发射到细胞中。

上述活体内转化技术的一个特别不利情况是，这些技术往往是非常细胞特异性的（cell-specific）。在磷酸钙共沉淀法中，转化过程更多地依赖于选择恰当

的含盐浓度，且对不同类型的细胞需要一定的实验技巧与经验。甚至，更重要的是，现有技术中所描述的转化技术的不足之处在于，转化效率较高的转化试剂一般具有较强的毒性，而那些毒性较低或是无毒的试剂的转化效率却又不能令人满意。

作为一种备选，为了克服上述缺陷，阳离子聚合物被用于进行细胞的活体内转化或转染。例如，众所周之的，DNA 与聚乙烯亚胺（PEI）的配合可被成功地用在将基因运送到细胞内（(Boussif 等, 1995; Boussif 等, 1996; Abdallah 等, 1996）。在这种情况下，通过细胞对配合物的随机绑定和吞噬来实现基因转移（gene transfer）。象聚乙烯亚胺一样，碱性胺基酸的均聚物--如聚 L-赖氨酸，树枝状阳离子聚合物（dendritic cationic polymer）--如聚酰胺-胺（polyamidoamines，简称 PAMAM）、聚酰胺、聚丙烯胺、阳离子型甲基丙烯酸、壳聚糖或 D,L-丙交酯/乙交酯共聚物（poly(D,L-lactide-co-glycolide)，简称 PLGA）都可用作细胞转染的阳离子聚合物。对可用于细胞转染的阳离子的评论由 Holtorf 和 Mikos 发表于“*基于阳离子和非凝固性聚合物的基因转移*”一文，《核酸疗法药学展望》, 2002（183）, 第 367-387 页(*"Cationic and non-condensing polymer-based gene delivery"*, Pharmaceutical Perspectives of Nucleic Acid-Based Therapeutics, 2002 (183), pages 367-387)。

这些现有技术中的已知阳离子聚合物的不足之处是要么其转染效率低，要么虽然其具有较好的转染效率，但毒性却很强。此外，现有技术中已知的一些聚合物，特别是树枝状聚合物，其合成成本是相当地高，例如，需要花费几周的时间来合成 42 kDa 的 PAMAM 树枝状聚合物（dendrimer）。

【发明内容】

本发明的一个目的是克服现有技术在细胞转化、特别是活体内转化中的上述缺陷。

本发明进一步的目的是提供一种制备转化细胞的方法，该方法具有较高的转化效率。另外，该方法尽可能地不使用细胞毒素助剂（cytotoxic auxiliaries）。

本发明的又一目的是提供一种制备转化细胞的方法，该方法中所采用的与

被转换的细胞群的特性和特定的转化条件所相应的转化助剂的合成成本降至最低。所采用的该助剂尽可能地易于制备且花费不高。

为达到前述目的，本发明提供了一种将生物分子转移到细胞中的方法，包括如下步骤:

i) 由生物分子和聚合物制备出配合物，所述生物分子最好是核酸，所述聚合物是由具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体进行反应而制得的，以及

ii) 通过细胞与配合物的关联反应（contacting）而将所述生物分子转移到细胞内。

让人非常惊讶地发现，借助于经由二元胺与双环氧化物的加聚反应而制得的聚合物，生物分子可以高效地被转移到细胞中，且仅有轻微的细胞毒素应激反应。

在本发明方法的步骤 i)中，首先制备生物分子和聚合物的配合物，所述聚合物是由具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体进行反应而制得的。

优选地，在步骤 i)中所使用的用于制备所述配合物的生物分子是核酸，这样根据本发明的方法可用于细胞的转化。此处术语“转化”通常是指将生物分子，尤其是核酸，更尤其是脱氧核糖核酸（DNA），引入细胞的过程。其还特别包括转染这一特例，它是将外源 DNA 引入细胞培养基细胞。术语“转化”既包括仅暂时性地将 DNA--如基因，引入到细胞（瞬时转化），也包括永久性地将 DNA 结合在细胞基因组中（稳定转化）。

步骤 i)中用于制备该配合物的核酸也可采用术语多聚核苷酸作为同义词，它可以是核糖核酸（RNA）、脱氧核糖核酸（DNA）或是它们的混合形式，其中优选是脱氧核糖核酸。通常，可以是任何类型的多聚核苷酸，如嘌呤或嘧啶碱基的 N 苷或 C 苷，或者是修饰后的嘌呤或嘧啶碱基的 N 苷或 C 苷，因此也可包括非天然的碱基。除了碱基本身之外，也可对残糖基进行修饰。这包括具有亚基修饰键的核酸，例如偶磷-硫醇盐或-醯胺键。所述核酸可以是单链、双链或是多链的，线性的或环状的。它可以是与细胞中存在的分子相对应的，如

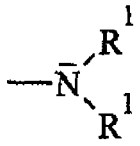
基因组 DNA 或信使 RNA（mRNA），或可以是在活体内生成的，如互补 DNA（cDNA）、反义 RNA（aRNA），或是人造核酸。所述核酸可包括多个亚基，至少两个亚基，优选 8 个或更多亚基，如低聚核苷酸，也可以是几百到几千个亚基，如特定的表达载体。优选地，所述核酸包含有与调控序列具有功能关系的多肽的编码信息，该编码信息使得引入了该核酸的细胞对多肽进行表达。

因此，在优选的实施例中，核酸就是表达载体。在另一实施例中，所述核酸是 pDNA（质粒 DNA）、siRNA、siRNA 双体（siRNA-duplex）、siRNA-异双体（siRNA-hetero-duplex）或 miRNA，其中术语“siRNA”表示具有长度为 22 个核苷酸的核糖核酸，这些核糖核酸来自于经“Dicer”酶裂解后的双链 RNA（dsRNA），并在酶复合体“RISC”（RNA 诱导沉默复合体）中插入。人造 siRNA 也可用作步骤 i)中的生物分子。

除了核酸以外，也可考虑采用低聚肽、蛋白或脂质作为生物分子。

步骤 i)中所采用的聚合物可由具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体进行反应而得到。

根据本发明方法的优选实施例，所述胺基单体具有至少两个为结构式 I 的功能基团：



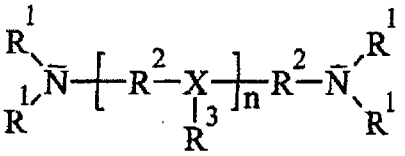
I

其中，所述功能基团中的残基R^1可以是相同的或不相同的代表C_1到C_{20}的碳氢化合物残基，特别优选C_1到C_{10}的碳氢化合物残基，最佳地是C_1到C_5的碳氢化合物残基，尤其是甲基残基、乙基残基、正丙基残基或异丙基残基，羟基功能化的（hydroxyfunctional）C_1到C_{20}的碳氢化合物残基，特别优选羟基功能化的C_1到C_{10}的碳氢化合物残基，最佳的是羟基功能化的C_1到C_5的碳氢化合物残基，或者是氢原子。此外，同样优选地，根据本发明所述的具有结构式I的功能基团中，至少有一个残基R^1是氢原子。术语“碳氢化合物残基”包括仅仅由碳原子和氢原子组

成的残基，以及在碳原子和氢原子中含有杂环原子、特别是卤素原子（=卤化碳氢化合物）的残基。

功能性胺基I因此可以是伯胺基、叔胺基或仲胺基，并且该胺基具有两个伯胺基（在这种情况下，两个残基R^1均为氢原子）是最有选的。特别有选的是，残基R^1是乙烷基、甲基、-CH_2CH_2OH-基团和氢原子。

此外，优选地，本发明的胺基单体具有结构式 II:



II

其中，

X 如果出现X，则其是氧原子或氮原子，特别优选氧原子或氮原子，并且其为氧原子时，X原子上的R^3基团并不出现，且同一胺基单体上的X原子可以是不同的;

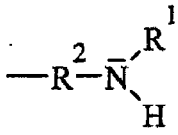
R^1 R^1在结构式II中可以是相同的或不相同的代表C_1到C_{20}的碳氢化合物残基，特别优选C_1到C_{10}的碳氢化合物残基，最佳的是C_1到C_5的碳氢化合物残基，特别是甲基残基、乙基残基、正丙基残基或异丙基残基，羟基功能化的C_1到C_{20}的碳氢化合物残基，特别优选羟基功能化的C_1到C_{10}的碳氢化合物残基，最佳的是羟基功能化的C_1到C_5的碳氢化合物残基，或者是氢原子。

R^2 R^2在结构式II中可以是相同或不相同的代表C_1到C_{20}的亚烃基，特别优选C_1到C_{10}的亚烃基，并最佳的是C_1到C_6的亚烃基，或C_1到C_{200}的氧化烯基，特别优选C_1到C_{50}的氧化烯基，且最佳的是C_2到C_{10}的氧化烯基，残基R^2特别优选自残基-CH_2CH_2-、-$CH_2CH_2CH_2$-和-$CHCH_3CH_2$-，最佳的是-CH_2CH_2-;

n 当R^2是亚烃基时，n为0-6的整数，特别优选1到5，更优选1到3，且最优选的是1到3；当R^2是氧化烯基时，n为0-100的整数，特别优选1到50，更优选2到25，且最优选的是2到10，并且

R^3 在结构式II中可以是相同或不相同的代表C_1到C_{20}的碳氢化合物残基，特别优选C_1到C_{10}的碳氢化合物残基，更优选C_1到C_5的碳氢化合物残基，尤其是

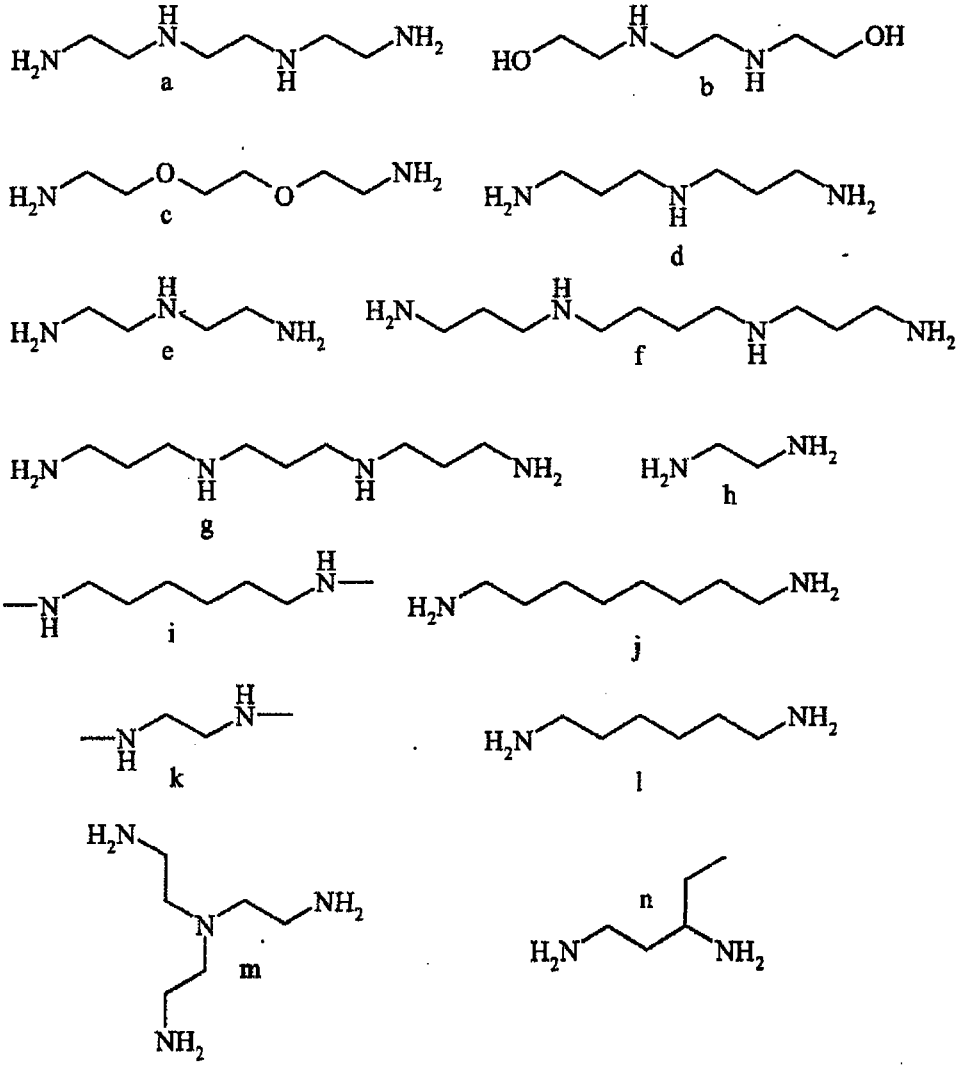
甲基残基、乙基残基、正丙基残基或是异丙基残基，羟基功能化的C_1到C_{20}的碳氢化合物残基，特别优选羟基功能化的C_1到C_{10}的碳氢化合物残基，最佳的是羟基功能化的C_1到C_5的碳氢化合物残基，氢原子，或具有结构式III的残基:



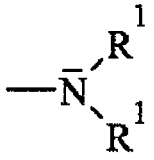
III

对于残基$-CH_2-CH_2-NR^1H$，特别是当$R^1=H$及$R^2=-CH_2CH_2-$之时，其最优选的即是残基R^3 。

本发明中优选的胺基单体是具有上述结构式II，并选自包含下列单体a到n的组合:



不同于上述具有上述结构式II的胺基单体，根据本发明方法的另一实施例，为制备所述聚合物，也可能会采用包括随机杂原子取代基的芳香环体系的胺基单体，特别优选随机杂原子取代基的C_6或C_{10}芳香环体系，其中至少绑定有两个具有结构式I的功能基团：

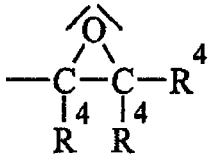


I

式中R^1的定义如上。

“芳香环体系”优选地表示任何满足休克尔规则(Hückel's rule)的sp2-杂化碳原子环状体系，在此可选一个或多个卤素原子--如氟或氯（=卤代芳烃），一个或多个烷基--特别是甲基，或一个或多个可绑定在碳原子上的羟基。

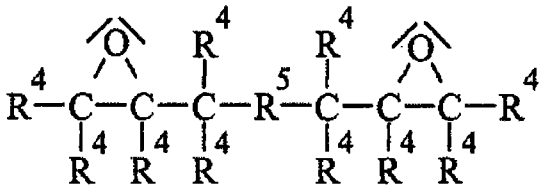
用于制备所述聚合物的环氧化物单体，优选地具有至少两个结构式IV的功能基团：



IV

其中，结构式IV中的残基R^4可以是相同或不相同的代表C_1到C_{20}的碳氢化合物残基，特别优选C_1到C_{10}的碳氢化合物残基，更优选C_2到C_5的碳氢化合物残基，尤其是甲基残基、乙基残基、正丙基残基或异丙基残基，羟基功能化的C_1到C_{20}的碳氢化合物残基，特别优选羟基功能化的C_1到C_{10}的碳氢化合物残基，最佳的是羟基功能化的C_2到C_5的碳氢化合物残基或氢原子，残基R^4优选地是氢原子。

本发明中特别优选的环氧化物单体是具有结构式V：

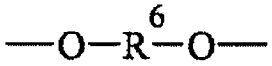


V

其中，

R^4 定义如上，并且

R^5 如果出现R^5，其代表C_1到C_{20}的亚烃基，特别优选C_1到C_{10}的亚烃基，更优选C_1到C_6的亚烃基，该亚烃基特别优选是$-CH_2CH_2-$、$-CH_2CH_2CH_2-$ 或$-CHCH_3CH_2-$，最佳的是$-CH_2CH_2-$，或者是结构式为VI的基团：



VI

其中R^6：

代表C_1到C_{20}的亚烃基，特别优选C_1到C_{10}的亚烃基，更优选C_1到C_6的亚烃基，而其中

$–CH_2CH_2–$，

$–CH_2CH_2CH_2–$，

$–CHCH_3CH_2–$，

$[-CH_2CH_2-]_n$，其中n=1-10，

$[-CH_2CH_2CH_2-]_n$ ，其中n=1-10，

$[-CHCH_3CH_2-]_n$，其中n=1-10，

或者包含有乙烯和丙烯单体的聚亚烷基是特别优选的亚烃基；

或代表C_1到C_{200}的氧化烯基团，特别优选C_2到C_{100}的氧化烯基团，最佳的是C_2到C_5的氧化烯基团，而其中

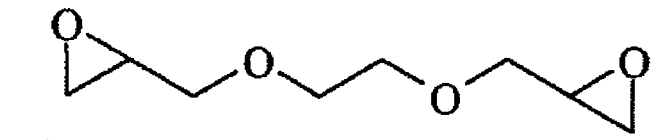
$[-CH_2CH_2-O-]_nCH_2-$，其中n=2-100，

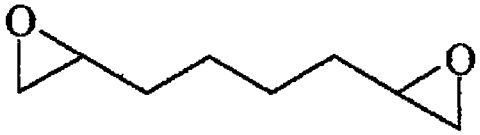
$[-CH_2CH_2CH_2-O-]_nCH_2CH_2CH_2-$，其中n=2-100，

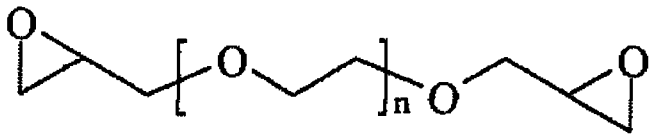
$[-CHCH_3CH_2-O-]_nCHCH_3CH_2-$，其中n=2-100，

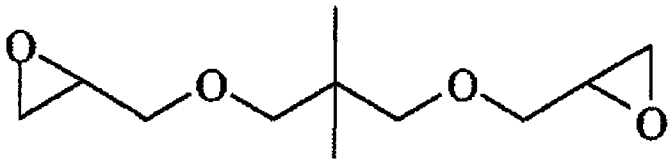
或者包含有氧乙烯和氧丙烯单体的聚乙二醇是特别优选的氧化烯基团。

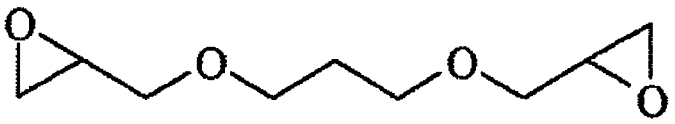
本发明中特别优选的环氧化物单体是具有上述结构式V，并选自包含下列单体A到F的组合：

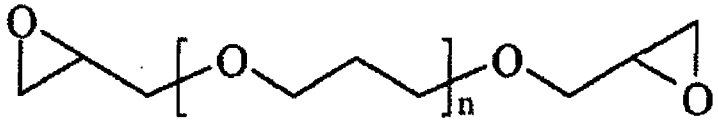

A


B


C

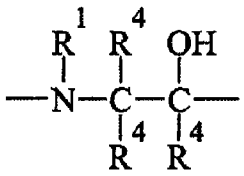

D


E


F

本发明步骤i)中优选的用于制备该配合物的聚合物是那些由下列单体组分进行反应而获得的：aA、aB、aC、aD、aE、aF、bA、bB、bC、bD、bE、bF、cA、cB、cC、cD、cE、cF、dA、dB、dC、dD、dE、dF、eA、eB、eC、eD、eE、eF、fA、fB、fC、fD、fE、fF、gA、gB、gC、gD、gE、gF、hA、hB、hC、hD、hE、hF、iA、iB、iC、iD、iE、iF、jA、jB、jC、jD、jE、jF、kA、kB、kC、kD、kE、kF、lA、lB、lC、lD、lE、lF、mA、mB、mC、mD、mE、mF、nA、nB、nC、nD、nE、nF、oA、oB、oC、oD、oE、oF、qA、qB、qC、qD、qE、qF、rA、rB、rC、rD、rE、rF、sA、sB、sC、sD、sE、sF、tA、tB、tC、tD、tE、tF、uA、uB、uC、uD、uE、uF、vA、vB、vC、vD、vE、vF、wA、wB、wC、wD、wE和wF。

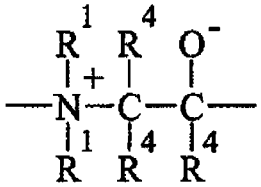
胺基单体和环氧化物单体之间的反应是加成反应，该反应形成了聚合物，其中如果采用具有伯胺基或叔胺基的胺基单体，该聚合物则具有至少两个结构式VII的结构单元:



VII

其中，R^1和R^4如前所定义。

然而，如果使用的胺基单体包括叔胺基，形成的聚合物则具有至少两个结构式VIII的结构单元:



VIII

其中，R^1和R^4同样如前所定义。

通过胺基单体和环氧化物单体之间的加成聚合反应来合成该聚合物，可采用本领域技术人员已知的聚合反应方法来达成。本领域技术人员可通过简单的初步试验来确定该反应的条件，特别是与目标产物所想到达到的性质--尤其是希望获得的分子量--相关的反应条件，如溶剂类型、离析物浓度（胺基单体和环氧化物单体）、反应温度和反应时间。

通常在该反应时，首先将所述胺基单体和环氧化物单体同时溶解或分散--优选溶解--在适当的溶剂中，优选那些至少可同时部分溶解所述胺基单体和环氧化物单体的溶剂。举例来说，该适当的溶剂是水和醇类，如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、n-丁醇、叔-丁醇或异丁醇，醚，酮，碳氢化合物，卤代烃，烷氧基烷醇--优选烷氧基丙醇，烷基吡咯烷酮--如甲基吡咯烷酮，二烃基亚砜--如二甲亚砜，或至少两种上述溶剂的混合物。

在加合物成形的初期，溶剂中各种单体的浓度范围通常为1-10000mmol/L，优选范围为1-5000mmol/L，更优选的范围是50-1000mmol/L，最佳范围是100-500mmol/L。

此外，如果所述聚合物是由具有相同结构的胺基单体和相同结构的环氧化物单体来制备的话，较佳的是将胺基单体和环氧化物单体的摩尔比设置为2：1到1：2，更佳的是将胺基单体和环氧化物单体的摩尔比设置为1.5：1到1：1.5，最佳的摩尔比为1：1。

该加成反应一般在10到200°C的温度范围中进行，较佳的温度范围为20到150°C，最佳温度范围为50到100°C，反应的持续时间和所需的反应温度主要取决于单体的反应活性。通常加成反应的反应时间为0.5到10小时，较佳的反应时间为1到5小时。当采用具有伯胺基的胺基单体时，反应一般持续到不再检测出伯胺基为止，而当采用具有仲胺基或叔胺基的胺基单体时，反应一般持续到检测不出仲胺基或是叔胺基为止。

根据本发明方法的一个特定实施例，在步骤i）中所用到的用于制备所述配合物的聚合物可经由将两种不同结构的胺基单体与环氧化物单体进行反应而获得。例如，在根据本发明方法的一个特定实施例中，可使用亲水性的和疏水性的胺基单体。

当使用两种不同结构的胺基单体时，有两种工艺程序可用于制备所述聚合物。在一方面，两种胺基单体与环氧化物单体一同被溶解或悬浮在适当的溶剂中，在这种情况下，如果两种胺基单体与环氧化物单体的反应活性大致相同的话，所得到的聚合物中这两种单体是随机分布的。然而，在另一方面，可以先将一种胺基单体与过量的环氧化物单体反应，所述胺基单体与环氧化物的摩尔比至多为0.5：1，特别优选地至多为0.25：1，最佳地至多为0.1：1。以这种方式获得的聚合物，在其碳链的尾部具有活性的环氧化物基团。在将第一种胺基单体与环氧化物单体反应后，将制得的聚合物从反应混合物中与其它组分相分离，特别是在仍然存在环氧化物单体的情况下；所述分离可采用本领域技术人员所公知的分离方法来完成，如萃取法、蒸馏法、结晶法或透析法，特别优选透析法。接着，倘若所述聚合物在清除了未反应的单体后成为了纯净物，将该聚合

物再次溶解到适当的溶剂中，并与第二胺基单体反应，这样第二胺基单体就被加成到聚合物尾部的环氧化物基团上。

当然可以以相同的方式将具有两种不同结构的环氧化物单体与一种胺基单体制备成所述聚合物。此外，同样也可以采用具有至少两种、至少三种、至少四种或至少五种不同结构的胺基单体，和/或采用具有至少两种、至少三种、至少四种或至少五种结构不同的环氧化物单体。

在加聚反应完成后，可获得溶解或分散在所使用的溶剂中的聚合物、以及未反应的胺基和/或环氧化物单体。当根据本发明的方法，在步骤i）中使用该聚合物来制备所述配合物之前，最好是对所述反应混合物进行处理，特别是将所述聚合物与所述反应混合物中的其他组分分离。对于分离方法，可再次考虑萃取法、蒸馏法、结晶法或透析法，优选透析法，这是因为采用透析法可获得可直接溶解或分散在溶剂中的聚合物。另外，通过选择不同的透析膜，透析法提供了对特定大小的聚合物的选择性离析。除了将聚合物从反应混合物中分离以外，优选对该聚合物进行杀菌处理或在透析时对聚合物和溶剂的混合物进行杀菌处理。可采用本领域技术人员公知的任何杀菌方法对所述聚合物或是聚合物和溶剂的混合物进行杀菌处理，如无菌过滤、γ-照射、UV光照射或高压灭菌，其中最佳的是无菌过滤。

根据本发明的优选实施例，将单体从反应混合物中与其它组分相分离并对所述聚合物进行杀菌处理之后，首先用水将反应混合物稀释，反应混合物与水的体积比范围为5：1到1：5，优选2：1到1：2，且最佳为1：1，并且将稀释后所得的反应混合物进行透析，透析时所采用的透析膜的截留分子量最大为10kDa，特别优选5kDa，最佳的是1kDa，尤其是从水性溶剂透析时，如从去矿物质水、生理盐水溶液或营养培养基透析。从这种方式所获得的水性聚合物溶液--如果该聚合物是从水中离析的话），随后优选冷冻干燥的方式去除水分，这样的话即可获得纯净的聚合物。接着，将聚合物进行再悬浮，优选在水介质中进行，如去矿物质水、生理盐水溶液--如PBS--或营养培养基，紧接着进行无菌过滤。以这种方式获得的无菌水性聚合物溶液中含有的聚合物的浓度范围为0.1到500mg/ml，特别优选0.5到100 mg/ml、最佳的是1到10 mg/ml。还可以想象得

到的是，最好是直接对离析后的无菌水性聚合物溶液进行快速的杀菌处理。非常重要的是：对于活体外的应用，该试剂必须为无菌的。

步骤i)中所使用的聚合物的分子量--采用质谱法测定--优选的范围是0.1到500kDa，特别优选1到100kDa，最佳的是10到50kDa。特别是，通过改变反应时间、单体浓度、溶剂、反应温度、胺基单体与环氧化物单体的摩尔比以及透析膜的截留值，聚合物的平均分子量可以以简单的方式得以控制，同样，也可针对所需的特定转换而优化转换效率。

此外，根据本发明方法的特定实施例，同样有利的是，在将所述聚合物从反应混合物中与其它组分分离之前或之后，可对所述聚合物进行化学修饰。修饰优选地发生在聚合物的胺基或羟基上。根据本发明，所述修饰优选的是促进细胞对所述聚合物的摄取的修饰。根据本发明，优选的修饰包括生物素基团的附着，如DE-A-100 16 811中所描述。该文献中公开了关于通过在阳离子聚合物上附着效应物基团的方式而将核酸分子靶标引入（targeted introduction）到细胞的可能性，本发明在此结合引用，以作参考，并成为本发明公开的一部分。除了生物素基团，还可采用其他效应物基团修饰所述胺基或羟基，例如采用抗生素蛋白或链霉亲和素（streptavidin）。这些基团具有可与特定细胞受体相互绑定的配合体，如铁转移蛋白或与碳水化合物。此外，可采用环氧丙醇处理以在所述聚合物中形成末端二醇基团，或是可通过醋酸或醋酸盐处理以在所述聚合物中生成负电荷基团。此外，还可采用烷基化试剂--如硫酸二甲酯、溴化甲基、对甲苯磺酸甲酯或甲磺酸甲酯--将所述聚合物中的胺基至少部分地季胺化。可以想象得到，所述胺基至少部分地被转化成了精氨酸基团。

由生物分子和所述聚合物所制备的步骤i)中的配合物是通过将聚合物和生物分子进行关联而得到的，该配合物的构造是静电相互作用的结果。可选择地，该生物分子--如果是核酸的话--在与所述聚合物关联之前，可先将其与适当的强化因子（enhancer）--特别是与多肽，如来自鲑鱼精子的鱼精蛋白硫酸盐或其类似物--孵化浓缩,。也可以想象得到的是，可将该生物分子与缩氨酸关联以便于细胞的摄取。此外也可以想象得到可将聚合物与另一转化试剂--如卵磷脂或是非卵

磷脂脂质或是在化学上不同的聚合物的混合物--相结合，以将生物分子--特别是核酸--引入到细胞中。

优选地，该生物分子与该聚合物相关联时，生物分子和聚合物的重量比范围是10：1到1：50，特别优选1：1到1：30，最佳的是1：2到1：20。本领域技术人员可通过常规实验来确定混合物的最优比例。优选地，当生物分子为核酸时，在负电荷过剩的情况中，通过设定聚合物与生物分子的比例而使得zeta电位大约在+20到+50mV之间。

生物分子和聚合物的关联优选在水性溶剂中进行，例如生理盐水溶液、缓冲溶液或营养培养基，该关联反应优选在pH范围为5到8，特别优选5.5到7.4的情况下进行，且温度范围在4到40°C，优选10到37°C，最佳地为15到25°C。优选地，该关联反应的进行是将组分的水溶液相混合，并且这些溶液中的一种或两种都可以是缓冲液，且可选择性地包含其他添加剂。特别优选地，配合物的生成可以是在生物分子--如当生物分子是核酸时--不在生理盐浓缩液中分离的情况下发生关联反应，这可简单地通过采用溴化乙锭置换试验（ethidium bromide displacement assay）来测定（Plank等，1999）。

本发明方法的步骤ii）中，将上述生物分子和聚合物形成的配合物与细胞进行关联，以获得引入了该生物分子的细胞，并且所述关联可以发生在活体内或活体外，尽管对细胞进行活体外处理是特别优选的。紧接着在该细胞存在的情况下制备生物分子和聚合物的配合物是基本可能的（因此步骤i)和步骤ii)是同时进行地）。可以想象得到且优选地是，可以在待处理的细胞不存在的情况下制备该配合物，这样的话步骤ii)就在步骤i)之后进行。

在活体外处理的情况下，细胞或组织可与配合物一起在适当的环境中进行孵化，原核生物与真核生物都可被看作是细胞。如果要对培养细胞进行处理，可向营养培养基中添加该配合物或含有该配合物的无菌水性溶液。本发明的方法既适宜于在细胞培养基上生长的细胞（悬浮细胞），也适宜于黏附在在培养基而表面生长的细胞（贴壁细胞）。

对于活体内处理，所述配合物或含有配合物的无菌水性溶液可应用于包括人类的动物或植物有机体内。该应用可以是系统的或是局部的，并且对于动物

有机体，特别适用于非肠道施用，例如静脉内注射、腹膜内注射、肌肉注射、皮层或皮下注射、静脉输液、肺部、口腔、鼻部、真皮或透皮给药。在适当的条件和相应的剂型下，其它施用途径，如口服/肠道给药，也是可以的。所述配合物或含有配合物的无菌水性溶液也可局部直接地应用于靶组织，例如器官或肿瘤。对于活体内施用，该配合物需要制成药剂兼容的形式，为此，可将其与药剂容许的赋形剂相结合。而其剂型取决于给药方式。例如，对于注射剂或是输液剂，该配合物可以制成等渗压盐溶液或等渗亚缓冲液--如PBS或林嘉氏溶液（Ringer's solution），对于肺部给药，可以制成药剂兼容的气雾剂（arosol）。也可选择固体剂型，取决于使用意图，如冻干剂这，在给药前可将该固体制剂在水中再生。适当的药剂赋形剂和剂型对本领域技术人员来说是公知的，例如可参见Gennaro (Publ.)，雷明顿："药剂科学与实践"，第19版，1995，美国宾州阿斯顿，麦克出版有限公司[Gennaro (Publ.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995, Mack Publishing Co., Easton, PA, USA]。在这种方式下，采用适当的核酸作为生物分子，该配合物可被用于基因疗法的医药品。

本领域技术人员可根据病症、病人状况、治疗方法和其他因素来选择剂量。通常，当生物分子是核酸时，对于使用，DNA给药的数值范围是0.1μg/kg体重到100μg/kg体重，优选2.5μg/kg体重到10μg/kg体重。

对为达到一开始所提出的目标所做出的贡献是，提供了一种采用前述方法被引入了生物分子的细胞。

使用上述聚合物将生物分子转移到细胞中，尤其是细胞的转化，对于为达到一开始所提出的也做出了贡献。所述聚合物是通过具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体之间的反应而得到的。

对为达到一开始所提出的目标所做出的进一步贡献是，同时提供了一套将生物分子转移到细胞中--特别是用于细胞转化--的试剂盒，其包括:

(β1) 所述聚合物,该聚合物可通过具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体之间的反应而制得，以及，

(β2) 其他试剂盒组分，特别是促进剂（用于核酸的浓缩或是改善摄取），例如，来自鲑鱼精子的鱼精蛋白硫酸盐，附加缓冲液--如PBS或生理

盐水，控制转化效率的试剂以及附加转化试剂--如卵磷脂或非卵磷脂脂质或附加聚合物。

基于将要被转染的细胞的特定类型，聚合物与类脂物或脂质体的结合物、或各种聚合物的混合物都可能是有用的。因此，也基于本专利申请制成的混合物但在化学性质上不同的聚合物也可以被采用。

对为达到一开始所提出的目标所做出的进一步贡献是，同时提供了一种生物分子--优选核酸--与前述聚合物的配合物，该聚合物可通过具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体之间的反应而制得。例如，该配合物可通过将生物分子和聚合物在适当的水性体系中相关联而制得，这已经在前面本发明的方法中进行了描述。

对为达到一开始所提出的目标所做出的贡献是，同时提供了一种治疗组合物，包含上述生物分子--优选核酸--与前述聚合物的配合物，该聚合物可通过具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体之间的反应而制得。除了所述配合物，该治疗组合物也可特别包括药剂容许的赋形剂，如生理盐水。类似地，采用上述配合物制备这样的药物组合物同样对为达到一开始所提出的目标做出了贡献。

对为达到一开始所提出的目标所做出的贡献是，同时提供了与根据本发明的方法相关的聚合物，该聚合物可通过具有至少两个胺基的胺基单体与具有至少两个环氧基的环氧化物单体之间的反应而制得，该聚合物可用于人体或动物体的治疗，特别是采用基因疗法治疗疾病。

最后，本发明也涉及一种通过基因疗法治疗疾病的方法，包含以下步骤：

I） 从生物体中切取细胞；

II） 将生物分子转移到所切取的细胞中，优选地，采用本发明中将生物分子转移到细胞中的方法将切取的细胞进行转化，以及

III） 将所述细胞复原到生物体。

由于细胞可能开始被考虑用于所说的基因治疗，特别是，所有的细胞都可得到应用，只要细胞对抵抗切取具有足够的抗性、被引入--特别是转化--了生物分子、以及从生物体或是向生物体进行了再培植。同样，这些细胞也需要尽可

能长时间地存活，这样生物体才可从所述处理后的细胞--如从转化后的细胞分泌的蛋白质--中足够地受益。特别是，皮肤细胞--如纤维原细胞、肝细胞、T-细胞--如T-淋巴细胞、或骨髓细胞特别适合作为本发明的细胞。

下面将在非限制性实施例的基础上，对本发明进行更加详细的描述。

【附图说明】

图 1 所示是分别采用本发明的方法与传统的转染技术对具有 pCMVβ 质体的 Huh-7 进行转染的转染效率比较图。“MK-7-11”是对从下面实施例中的三乙烯四胺和乙二醇二缩水甘油醚中而获得的聚合物的称谓。

【具体实施方式】

（细胞的转化）

聚合物的制备

将三乙烯四胺（10mmol）和乙二醇二缩水甘油醚（10mmol）溶解在50ml的二甲亚砜中，并将该溶液置于60°C温度下的圆底瓶中3小时。接着，采用相同体积的去离子水将所述反应混合物稀释到两倍体积，并采用去离子水透析18小时，并换水3次（透析膜的截留分子量为1kDa）。在透析后，将样品冷冻干燥，获得水色透明、粘性的物质，然后将其溶解在无内毒素的去盐水中，获得的聚合物浓度为3mg/ml。采用无菌过滤对由此获得的水性聚合物溶液进行杀菌处理。

细胞的培养

将肝细胞瘤细胞系Huh-7种植在每孔100μl DMEM培养基、密度为2×10^4个细胞/孔的96-孔板上。细胞播种24小时后，进行转染。

配合物的制备

为了将核酸和聚合物制备成配合物，表1中列出了溶解于DMEMS培养基（0.01μg/μl*）中的DNA的总量（pCMVβ质体，克隆技术实验室(Clontech Laboratories)），并且按表格1中的量将从三乙烯四胺和乙二醇二缩水甘油醚（“MK-7-11”）中获得聚合物的水性无菌溶液吸入96-孔板的孔中，然后在室温下孵化10分钟。采用现有技术中已知的来自德国希尔登的Qiagen GmbH公司的转

染试剂SuperFect®（SuperFect® from the company Qiagen GmbH, Hilden, Germany）进行转染，并作为对照实验。

*注意在该方法中：DNA与聚合物之间的配合物制备是在50μl不含血清的培养基中进行的。所列出的浓度与其体积有关。在10分钟的孵化时间之后，通过吸管添加100μl含血清的培养基，随后将全体溶液（150μl）加入到细胞中，当中的培养基已被事先去除。

表1

配合物	质体总量	聚合物总量	Superfect®试剂总量
1	0.5μg	0.5μl	
2	0.5μg	1μl	
3	0.5μg	2μl	
4	0.5μg	4μl	
5	0.5μg		0.5μl
6	0.5μg		1μl
7	0.5μg		2μl
8	0.5μg		4μl

细胞的转染

对于转染，将该配合物添加到细胞中，并在37°C下孵化4小时，已提前快速更换培养基。在孵化4小时后，更换培养基，采用新鲜的细胞培养基替换含有配合物的溶液。在将细胞采用本发明的配合物孵化或采用核酸和转染剂SuperFect孵化后，在细胞转染的2天后，采用裂解缓冲液（5mM $MgCl_2$、1%NP-40、100mM NaCl、10Mm Tris/HCl，pH7.4）对细胞进行裂解。转染效率采用β-半乳糖苷酶筛选法测定，以ONPG（2-硝基苯-β-D-半乳糖苷，Merck KGaA, Darmstadt, Germany）作为基质。转染效率（在每毫升的单位β-半乳糖苷酶中）见图1所示。

由图1可见，采用本发明的方法，可获得比现有技术中已知的转化试剂更好的转染效率。

Huh-7 96 孔

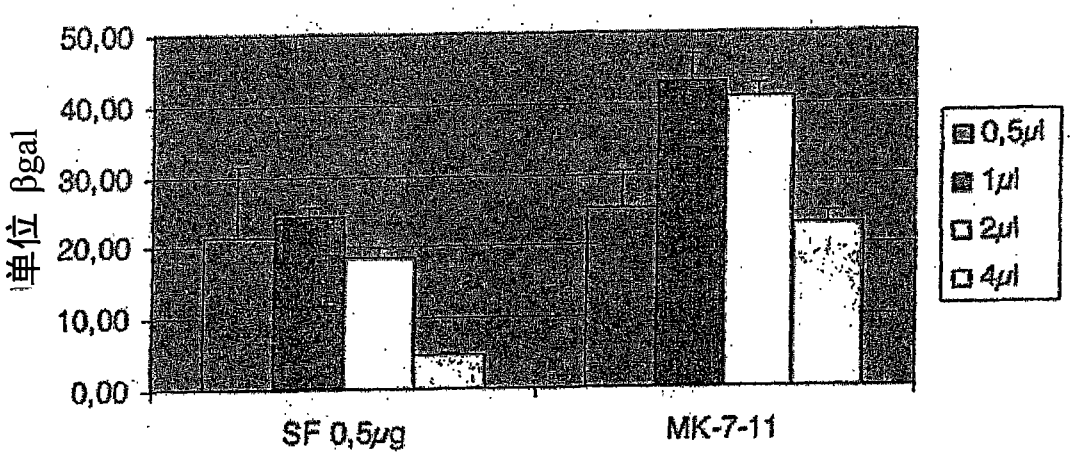

50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
单位 βgal
SF 0,5μg
MK-7-11
0,5μl
1μl
2μl
4μl

图 1