



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101952434 B

(45)授权公告日 2016.11.16

(21)申请号 200880125788.1

(22)申请日 2008.12.12

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 101952434 A

(43)申请公布日 2011.01.19

(30)优先权数据

61/013,358 2007.12.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2010.07.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2008/055256 2008.12.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02009/074970 EN 2009.06.18

(73)专利权人 聚加转染公司

地址 法国伊尔基希

(72)发明人 A·阿迪布 P·埃尔巴彻

F·斯多克 N·哈夫迪

(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 11038

代理人 罗菊华

(51)Int.Cl.

C12N 15/11(2006.01)

C12N 15/87(2006.01)

(56)对比文件

张猛.末端修饰的PAMAM非病毒基因治疗载体的研究.《中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士) 医药卫生科技辑》.2007,(第6期),

Jiehua zhou 等.PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing.《chemical communications》.2006,(第22期),2362-2364.

房宝英 等.siRNA及其导入体内外方法的研究进展.《国际病理科学与临床杂志》.2006,第27卷(第1期),44-47.

Munetaka kunishima 等.Formation of carboxamides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alcohols using a new alcohol- and water- soluble condensing agent:DMT-MM.《Tetrahedron》.2001,第57卷(第8期),1551-1558.

审查员 高雅

权利要求书1页 说明书12页
序列表3页 附图5页

(54)发明名称

使用合成的聚合物递送对基因沉默有活性的核酸的工具

(57)摘要

本发明涉及可用作转染剂的组合物,所述组合物含被芳香族氨基酸修饰的聚胺和用于RNA干扰的小双链或单链RNA。

1. 用作转染剂的组合物, 其含:
 - 聚胺, 其选自移接了15%~50%的酪氨酸和/或色氨酸的线性的聚乙烯亚胺或聚烯丙胺、和
 - 对RNA干扰有活性的双链小RNA或单链小RNA。
2. 权利要求1的组合物, 其中所述聚胺的分子量为400Da以上。
3. 权利要求1的组合物, 其中所述聚胺选自: 线性的2KD~220KD的聚乙烯亚胺和线性的10KD~70KD的聚烯丙胺。
4. 权利要求1的组合物, 其中所述RNA是普通或经修饰的RNA, 修饰基团为: 2'-氟基、2'-甲氧基、硫代磷酸基、锁核酸或吗啉基。
5. 权利要求1的组合物, 其中所述RNA是双链或单链反义siRNA, 或者单链正义/反义siRNA的混合物。
6. 权利要求5的组合物, 其中所述siRNA是15~30聚体。
7. 权利要求1的组合物, 其含:
 - 聚胺, 其选自移接了移接了15%~50%的酪氨酸和/或色氨酸的线性的聚乙烯亚胺或聚烯丙胺、和
 - 等渗介质中的双链siRNA或单链siRNA。
8. 权利要求7的组合物, 其中所述等渗介质为NaCl、葡萄糖、缓冲液。
9. 权利要求7的组合物, 其中所述siRNA的浓度为pmol量级~ μ mol量级。
10. 权利要求1的组合物, 其还含一种或数种添加剂。
11. 权利要求10的组合物, 其中所述添加剂为: 聚乙二醇、聚乙烯基醇、糖、聚糖、肽、蛋白质或维生素。
12. 权利要求1的组合物, 其中所述组合物中被芳香族氨基酸修饰的聚胺为0.01%~100%。
13. 用作转染剂的组合物, 其含:
 - 移接了15%~50%的色氨酸的线性的聚乙烯亚胺、和
 - 对RNA干扰有活性的双链小RNA或单链小RNA。
14. 用作转染剂的组合物, 其含:
 - 移接了15%~50%的酪氨酸的线性的聚乙烯亚胺、和
 - 对RNA干扰有活性的双链小RNA或单链小RNA。
15. 体外或离体转染siRNA的方法, 包括使用权利要求1的组合物。
16. 权利要求15的方法, 其中所述siRNA体外转染在含粘附细胞或悬浮细胞的培养基中进行。
17. 权利要求16的方法, 其中所述培养基是普通培养基或合成的培养基。

使用合成的聚合物递送对基因沉默有活性的核酸的工具

[0001] 本发明涉及在细胞中介导基因沉默的核酸、特别是提供RNA干扰(RNAi)的小干扰RNA(在后面的说明书和权利要求书中被称为siRNA)、以及任选质粒DNA的有效的合成的聚合物介导的体内或离体递送至培养中的真核细胞的工具、组合物和方法。

[0002] RNA干扰(RNAi)是一种用于在早期基因功能水平基因沉默mRNA的技术(Fire et al, 1998)。其原理是短RNA双链体(siRNA; 小干扰RNA)极端选择性干扰mRNA中的一个靶, 使提供序列特异性的mRNA降解从而抑制蛋白质产生。

[0003] RNAi的高效缘于对siRNA有活性的序列的可预测设计以及对mRNA的靶向性。在许多种哺乳动物细胞中, 包括细胞系(Elbashir et al, 2001)及原代细胞中, 当siRNA双链体通过载体、转染剂转染被导入, 且被递送到细胞质内时, RNAi就已经显示出有效的内源性 & 外源性基因沉默。

[0004] RNAi对于人治疗是很强大的工具, 它将引人注目地带来严重疾病(如癌症或病毒感染)的新治疗方法上的进展。对于开发RNAi的巨大潜能, 需要RNAi转染载体的构建和开发用于有效地将其递送到患病有机体的细胞和组织中的策略。

[0005] RNAi的成功取决于siRNA(设计和化学作用)和用于细胞递送的载体/载质。相比反义或核酶技术, 靶mRNA的二级结构(也许不是)对使用siRNA进行沉默并不是强限制因素。多个siRNA序列可能对一个靶向mRNA有效。siRNA双链体的稳定性和递送到细胞的siRNA的量是对沉默最大的限制因素, 而非所选序列的靶向接近性。有两个方法被提供用来将siRNA导入细胞: 用合成的siRNA双链体转染入细胞的细胞质中来递送; 以及由质粒(或DNA盒)原位表达通过基因转移至细胞核而初步导入的siRNA的递送。

[0006] RNAi在哺乳动物细胞中依赖于以下二者的有效的细胞内递送: siRNA或者表达si/shRNA或适合于微RNA的短发夹RNA(shRNAmir)的DNA载体(Sui et al., 2002; Yu et al., 2002; Miyagishi & Taira, 2002; Silva et al., 2005; Brummelkamp et al., 2002)。ShRNA(短发夹RNA)或siRNA在哺乳动物细胞中的表达可经由Pol II或Pol III(U6或H1)启动子的转录实现。DNA载体基于表达双链短发夹RNA(shRNA)的质粒和病毒载体系统, 所述shRNA随后被细胞器加工为siRNA。ShRNA系统的新进展允许了组织特异性且可诱导的基因敲除。这种表达对RNA干扰有活性的RNA的DNA载体的细胞内递送可使用重组病毒或非病毒递送系统实现。

[0007] 说到基因导入技术, 有效的病毒或非病毒载体对细胞中siRNA双链体的导入是有用的。对培养中的哺乳动物细胞来说, 因为病毒载体的转染效率和易于将DNA递送入细胞核, 其表现为对由递送的质粒DNA表达的siRNA的细胞内库的产生的有力手段。但是, 重组病毒递送系统仍然遭受来自它们临床表现中的免疫原性和潜在风险。相反, 用合成系统的核酸(质粒或合成的siRNA)转染则是显示了灵活性和不出现免疫原性的多用途方法。用非病毒载体转染合成的siRNA双链体(化学法产生的或酶法产生的)是主要将短双链RNA递送入细胞质的最好技术。对siRNA递送最有效的非病毒载体基于阳离子脂质介导的转染, 它最初来自基因递送领域或最近开发用于特异性RNAi应用。阳离子脂质制剂将核酸(质粒、寡核苷酸类、siRNA双链体)包装入带正电的颗粒中, 所述颗粒能在细胞表面与阴离子蛋白聚糖类

相互作用,并由胞吞作用进入细胞。在运送到胞吞胞内囊泡(主要是胞内体)后,阳离子脂质具有通过脂质交换/扩散使这些胞内小室的膜去稳定的特性,从而导致核酸“去复合”并释放到细胞质(Xu and Szoka,1996)。另外,被称为质子海绵活性的第二机制可与一些脂质诱导胞内体膨胀和破裂(其将核酸释放到细胞质中)相关。由于RNAi机制出现在细胞质中,基于阳离子脂质制剂的载体是将合成的siRNA双链体递送到细胞中的有效媒质。由质粒、非病毒载体原位表达的siRNA,基于阳离子脂质制剂或阳离子聚合物,使胞内体小室去稳定是适宜的。

[0008] 与它们能够有效地将基因(长的双链DNA)转染到细胞内相反,阳离子聚合物对递送短的核酸缺乏效率。阳离子聚合物显示出比基于阳离子脂质的系统缺少递送siRNA的效率。阳离子聚合物能够体外介导siRNA浓度约100~200nM的RNA干扰。这种浓度下RNA干扰的选择性是它们使用上的限制。此外,所用siRNA的高量与诱导细胞毒性效应的聚合物高量相关联。迄今为止,体外使用了阳离子聚合物(如分枝的或线性的聚乙烯亚胺、聚组氨酰聚合物、壳聚糖、聚(氨基酯乙二醇氨基甲酸乙酯)、氨基环糊精衍生物),但未与阳离子脂质比较相关效率。

[0009] 本发明的目的是提高阳离子聚合物、此非病毒性递送载体的主要种类对体外siRNA转染的能力。阳离子聚合物能够经siRNA的磷酸与聚合物的氨基间的静电相互作用而相互作用。但依照siRNA的结构,聚合物不能缩合包含仅两个圈(每链约20个核苷酸)的如此小的双螺旋。甚至复合物出现在siRNA和阳离子聚合物之间,导致siRNA附着在聚胺主干上,阳离子聚合物缺乏协同相互作用来引发缩合入复合分子的颗粒或微-聚集物。

[0010] 除聚胺和小双链寡核苷酸携带的正负电荷间的静电相互作用之外,与核酸碱基的疏水堆积和氢键形成相互作用是我们旨在增大聚胺和siRNA之间相互作用的方法。总之,静电和疏水相互作用以及氢键提供足够能量导致siRNA的稳定复合和缩合作用。

[0011] 芳香族氨基酸(AAA)负责蛋白质的疏水特性并且还和蛋白质之间以及蛋白质-配体间经由疏水相互作用的相互作用有关。AAA还能够与核酸通过与核酸碱基(鸟嘌呤,腺嘌呤,胸腺嘧啶或胞嘧啶)堆积来相互作用。

[0012] 本发明涉及疏水性聚胺的新概念,所述疏水性聚胺包含被芳香族氨基酸高度修饰的聚胺主干。此类聚合物提供了与小核酸(如siRNA)经由静电作用、疏水性堆积以及氢键而相互作用的可能性。作为待克服能量壁垒,通过将AAA化学连接到聚胺的增加将能够提供足够的能量去诱导以缩合结束的协同相互作用。结果是由疏水相互作用产生的复合物的稳定化(以稳定颗粒或聚集物形式)。

[0013] 本发明描述了新类的非病毒转染剂,其属于阳离子聚合物类,尤其适合应用于小尺寸寡核苷酸的转染。特别是小核苷酸的物理性质提示了本发明人去设计基于疏水性和阳离子聚合物的新类转染剂。

[0014] 本发明人已发现,高效的转染剂可通过组合目的寡核苷酸与疏水性及阳离子聚合物形成稳定的转染复合物来获得。

[0015] 有益的是、所述制剂也可用于siRNA与质粒DNA的共转染,其可促进介导RNA干扰的小RNA的原位表达。

[0016] 本发明还旨在提供用作用于siRNA和表达对RNAi有活性的RNA的任选DNA载体的转染剂的新组合物。

- [0017] 本发明还涉及体外转染细胞的方法。
- [0018] 用作转染剂的本发明的组合物含：经芳香族氨基酸修饰的聚胺和小的双链或单链RNA。
- [0019] 有益的是、聚胺包括分枝或线性的聚乙烯亚胺、聚烯丙胺、树状聚体、聚氨酯、聚赖氨酸、聚组氨酸、聚精氨酸、聚鸟氨酸或壳聚糖。
- [0020] 所述聚胺更尤其选自：线性的聚乙烯亚胺(LPEI)、聚烯丙胺(PAA)和聚赖氨酸(PLL)。
- [0021] 所述聚胺的分子量优选400Da以上。
- [0022] 有用的聚胺选自：线性的2KD~220KD的聚乙烯亚胺、10KD~70KD的聚烯丙胺和1KD~300KD的聚赖氨酸。
- [0023] 所述用于修饰聚胺的芳香族氨基酸选自：酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸或它们的衍生物。
- [0024] 所述芳香族氨基酸优选色氨酸和/或酪氨酸。
- [0025] 在以上定义的组合物中，所述RNA是普通或经修饰的RNA，修饰基团为例如：2'-氟基、2'-甲氧基、硫代磷酸基、LNA或吗啉基。
- [0026] 上述定义的RNA是双链或单链反义siRNA，或者单链正义/反义siRNA的混合物。
- [0027] 有益的是、所述siRNA是15~30聚体。
- [0028] 优选的组合物含有如上定义的经芳香族氨基酸修饰的聚胺和等渗介质(如NaCl、葡萄糖、缓冲液)中的双链或单链siRNA。
- [0029] 所述siRNA的浓度可为pmol量级到μmol量级。
- [0030] 有益的是、上述定义的组合物含一种或数种添加剂，所述添加剂为例如：PEG、PVA、糖、聚糖、肽、蛋白质、维生素。
- [0031] 根据本发明的实施方式，上述定义的组合物还含质粒DNA、其表达对RNAi有活性的RNA或编码转基因。
- [0032] 所述质粒尤其表达：siRNA、shRNA或适于微RNA的短发卡RNA。
- [0033] 所述siRNA可分别含经合适的基团稳定化而抵抗降解的基团，其选自被经修饰的类似物(例如脱氧核苷酸)和/或经修饰的核苷酸类似物(如糖基或主干经修饰的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)取代的嘌呤核苷酸、嘧啶核苷酸。所述寡核苷酸序列可包含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或核苷酸类似物(Verma and Eckstein, 1998)，核苷酸类似物有例如：甲基磷酸基、吗啉基磷二酰胺(phosphorodiamidate)、硫代磷酸基、PNA、LNA、2'烷基-核苷酸类似物。
- [0034] 本发明还旨在提供合成所述组合物的方法。
- [0035] 所述合成上述定义的组合物的经芳香族氨基酸修饰的聚胺的方法包括：在聚胺存在的情况下使用经二甲氧基三嗪-N-甲基吗啉(DMTMM)活化的芳香族氨基酸超酯。
- [0036] 聚胺合成在碱性缓冲液中进行，如200mM、pH=7.5~9的硼酸盐缓冲液或者在碱或水/乙醇混合物的存在下在水介质中进行，是有利的。
- [0037] 所述组合物中聚胺被芳香族氨基酸修饰的百分比更尤其为0.01%~100%，尤其是15%~50%。
- [0038] 本发明还涉及体外、离体和体内转染siRNA或siRNA和质粒DNA的方法，包括使用例

如上述定义的组合物。

[0039] siRNA的体外转染在含粘附细胞或悬浮细胞的培养基中进行是有利的。

[0040] 所述培养基是普通培养基或合成的培养基。

[0041] 本发明还提供用作药物组合物的组合物,所述组合物用于诱发对一种或多种靶蛋白的表达的调控影响,所述蛋白负责或参与基因遗传性疾病或复杂的基因疾病。

[0042] 本发明旨在提供用作DNA载体转染剂的新组合物,其可促进介导RNA干扰的小RNA的原位表达。

[0043] 本发明的其它特性和优点在以下实施例提及的图1~8中给出,这些图各自涉及到:

[0044] ●图1:L-PEI-Tyr结合在D₂O上的¹H-NMR分析。

[0045] ●图2A和图2B:siRNA递送到A549细胞。

[0046] ●图3:由用经不同程度的酪氨酸残基修饰的L-PEI_{10K}经GL3Luc siRNA转染的A549-GL3Luc细胞稳定表达的荧光素酶基因(pGL3)的RNA干扰效率。

[0047] ●图4:由用L-PEI_{10K}或L-PEI_{10K}Tyr_{33%}缀合物经GL3Luc siRNA转染的A549-GL3Luc细胞稳定表达的荧光素酶基因(pGL3)的比较沉默效率。

[0048] ●图5:由用L-PEI_{10K}-Tyr_{33%}经GL3Luc siRNA转染的A549-GL3Luc细胞稳定表达的荧光素酶基因(pGL3)的选择性RNA干扰。

[0049] ●图6:用L-PEI_{10K}-Tyr_{33%}复合的siRNA转染后的HeLa细胞系中的有效的和选择性的GAPDH基因沉默。

[0050] ●图7:由用PAA_{17K}-Tyr_{40%}经GL3Luc siRNA转染的A549-GL3Luc细胞稳定表达的荧光素酶基因(pGL3)的选择性RNA干扰。

[0051] ●图8A和图8B:用PEI_{10K}-Tyr_{19%}经GL2Luc siRNA和pCMVLuc质粒(pGL2Luc)共转染后由HeLa细胞表达的荧光素酶基因(GL2Luc)的选择性RNA干扰。

[0052] 材料与方法

[0053] 化学品和寡核苷酸

[0054] 寡核苷酸是由Eurogentec(比利时)化学合成且经PAGE纯化的。寡核苷酸在1×退火缓冲液(50mM醋酸钾、50mM醋酸镁)(Eurogentec)中于95℃退火2分钟,接着于室温温育2~4小时。GAPDH SMARTpool®试剂来自Dharmacon。

[0055] 所用siRNA双链体对应于序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8。

[0056]

GL3Luc siRNA 双链体	SEQ ID NO: 1 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGA(dT) ₂ -3' SEQ ID NO: 2 3'-(dT) ₂ GAAUGCGACUCAUGAAGCU-5'
GL2Luc siRNA 双链体	SEQ ID NO: 3 5'-CGUACGCGGAAUACUUCGA(dT) ₂ -3' SEQ ID NO: 4 3'-(dT) ₂ GCAUGCGCCUUAUGAAGCU-5'
siRNA TNF-α 若丹明双链体	SEQ ID NO: 5 5'-GCACCACUAGUUGGUUGUC(dT) ₂ -3' SEQ ID NO: 6 3'-(dT) ₂ CGUGGUGAUCAACCAACAG-5'
核纤层蛋白 A/C siRNA 双链体	SEQ ID NO: 7 5'-CUGGACUUCAGAGAACAAdTdT-3' SEQ ID NO: 8 3'-dTdTGACCUGAAGGUCUUCUUGU-5'

[0057] 所有化学试剂和原材料均购自Sigma-Aldrich(法国)并不经纯化而使用。溶液订

购自SDS-Carlo Erba(法国)。二乙醚经二苯甲酮钠干燥和蒸馏。

[0058] ^1H NMR光谱于25℃在 CDCl_3 、 D_2O 或 CD_3OD 中,用Bruker AF-400光谱仪记录,且质子化学位移的低磁场报告来自TMS。NMR多重态简写为:s=单线态,d=双线态,br=宽,m=多重态,t=三线态。

[0059] 线性聚乙烯亚胺(L-PEI)的合成

[0060] LPEI由2-乙基-2-噁唑啉单体的活性阳离子开环聚合后产生的中间体聚2-乙基-2-噁唑啉得到。

[0061] 聚2-乙基-2-噁唑啉的合成:将0.4mol的2-乙基-2-噁唑啉单体溶于40ml乙腈后在氩气氛下加入0.4/Xmol的甲基对甲苯磺酸。所述反应于80℃加热24~48小时。该反应应用 Na_2CO_3 饱和溶液淬灭,及加热24小时。在室温缓慢冷却后,加入10ml甲醇和乙醚直到沉淀。该沉淀物经过滤并用乙醚洗涤。以80~90%的产率得到聚2-乙基-2-噁唑啉。 ^1H -NMR分析,400MHz,在 CDCl_3 中:1~1.06ppm(s,3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CONCH}_2\text{CH}_2$);2.2~2.3ppm(m,2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CONCH}_2\text{CH}_2$);3~3.4ppm(s,4H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CONCH}_2\text{CH}_2$)。

[0062] L-PEI的合成:将0.35mol的聚2-乙基-2-噁唑啉溶于100ml水中,其后加入200ml、37%的盐酸,并将该混合液于120℃加热。24小时后蒸发该反应混合液,然后在冻干前加入水。该产率为90%。

[0063] 用 ^1H -NMR分析,400MHz,在 D_2O 中:单个峰值位于3.4ppm

[0064]

0.4/Xmol的对甲苯磺酸甲酯	x=单体的数量	聚-2-乙基-2-噁唑啉的Mw	聚乙烯亚胺的Mw
8mmol	50	5KDa	2KDa
1.6mmol	250	25KDa	10KDa
0.8mmol	500	47KDa	20KDa

[0065] 聚乙烯亚胺-芳香族 α 氨基酸缀合物的合成

[0066] N,O-Boc-酪氨酸的合成

[0067] 将5g的L-酪氨酸(Sigma)溶于125ml的 Na_2CO_3 (0.1mg/ml)和50ml的THF中。然后,将17.2g的 Boc_2O 溶于75ml的THF后加入上述酪氨酸溶液中,并将混合液在室温搅拌3天。加入水(40ml),并且将N,O-Boc-酪氨酸用乙醚抽提。将该水相用HCl酸化,且用乙酸乙酯进行2次新的抽提。蒸发后,将粗产物用色谱法在硅胶(在5%的 $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 中)上纯化。得到5.2g的N,O-Boc-酪氨酸。

[0068] 通过 ^1H -NMR分析,400MHz,在 CDCl_3 中:7.2ppm(d,2H,芳香族H),7.1ppm(d,2H,芳香族H),4ppm(m,1H, $\text{BocO-Ar-CH}_2\text{-CH}(\text{NHBOC})\text{-COOH}$),3~2.99ppm(dd,1H, $\text{BocO-Ar-CH}_2\text{-CH}(\text{NHBOC})\text{-COOH}$),2.84~2.78ppm(dd,1H, $\text{BocO-Ar-CH}_2\text{-CH}(\text{NHBOC})\text{-COOH}$),1.48ppm(s,9H, $\text{BocO-Ar-CH}_2\text{-CH}(\text{NHBOC})$),1.32ppm(s,9H, $\text{BocO-Ar-CH}_2\text{-CH}(\text{NHBOC})\text{-COOH}$)。

[0069] N-Boc-色氨酸的合成

[0070] N-Boc-色氨酸的合成使用与N,O-Boc-酪氨酸合成所使用的相同的方案获得,由2g的色氨酸和6.5g的 Boc_2O 开始,得到2.79g的白色固体。

[0071] 由 ^1H -NMR分析,400MHz,在 CDCl_3 中:8.1ppm(s,1H, $-\text{COOH}$),7.6ppm(d,H,芳香族H),7.38ppm(d,1H,芳香族H),7.2ppm(m,1H,芳香族H),7.16(m,1H,芳香族H),7.01ppm(m,1H,芳香族H),5.09ppm(d,1H, NHBOC),4.68ppm(br,1H, $\text{BocO-Ar-CH}_2\text{-CH}(\text{NHBOC})\text{-COOH}$),3.35ppm(m br,2H, $\text{BocO-Ar-CH}_2\text{-CH}(\text{NHBOC})\text{-COOH}$),1.45ppm(s,9H, $\text{BocO-Ar-CH}_2\text{-CH}(\text{NHBOC})$)。

[0072] 聚乙烯亚胺-酪氨酸缀合物(L-PEI-Tyr)的合成

[0073] L-PEI_{10KD}-Tyr_{33%}的合成

[0074] 方案1:将100mg的L-PEI_{10K}.HCl(1.26mmol)溶于5ml、200mM、pH=8.2的硼酸盐缓冲液中。然后用10N NaOH将pH值调节到8。将240mg的N,O-Boc-酪氨酸(0.632mmol)溶于15ml THF中后将其添加到上述溶液中,然后将该混合液搅拌10分钟。将DMTMM(500mg)加入到该混合液中并搅拌48小时。蒸发后,将该固体用水洗涤。干燥后,得到239mg的黄色固体(L-PEI_{10K}-TyrBoc₂)。将185mg的LPEI-TyrBoc₂溶于5ml的三氟醋酸(TFA)。3小时后,蒸发反应混合液,并在水中透析。冻干后,得到111mg白色固体(L-PEI_{10K}-Tyr)。

[0075] 方案2:将200mg的L-PEI_{10K}.HCl(2.53mmol)加入4ml的水中,0.56ml的N-甲基吗啉和483mg的N,O-Boc-酪氨酸(0.5当量,1.26mmol)溶于12ml的甲醇中后将其添加到上述(L-PEI_{10K}.HCl)溶液中。将该反应混合液搅拌30分钟后加入700mg的DMTMM。48小时后将该反应混合液蒸发,将形成的固体溶于8mL的TFA中。3小时后,该反应混合液蒸发后在水中透析一天,再于2N的HCl中透析2天。冻干后,得到260mg的白色固体。

[0076] ¹H NMR,400MHz,CDCl₃(图1):6.9ppm(s br,2H,H芳香族),6.7ppm(s br,2H,H芳香族),3.8ppm(s,4H,TyrCONCH₂CH₂),3.68ppm(br,1H,ArCH₂CH(NH₂)COPEI),3.1ppm(br,2H,ArCH₂CH(NH₂)COPEI),2.74ppm(s br,4H,NHCH₂CH₂)。

[0077] 聚乙烯亚胺-色氨酸缀合物(L-PEI-Trp)的合成

[0078] L-PEI_{10KD}-Trp_{33%}的合成

[0079] L-PEI-Trp的合成使用与L-PEI-Tyr的合成所使用的相同的方案获得,始于0.1g的LPEI和0.193g的N-Boc-色氨酸。

[0080] ¹H NMR,400MHz,D₂OD:7.4~7.1ppm(m br,5H,H芳香族),3.91ppm(m br,3H,ArCH₂CH(NH₂)COPEI),3.47ppm(s br,4H,ArCONCH₂CH₂和HNCH₂CH₂)。

[0081] 细胞培养

[0082] 将HeLa(人宫颈上皮细胞腺癌,CCI-2)细胞在添加了2mM glutamax(Eurobio)、Earle的BSS(Eurobio)、1.5g/L的碳酸氢钠(Eurobio)、0.1mM的非必需氨基酸(Eurobio)、1.0mM的丙酮酸钠(Eurobio)、100个单位/ml青霉素(Eurobio)、100μg/ml链霉素(Eurobio)和10%的FBS(Perbio)的MEM(Eurobio)培养基中培养。

[0083] 在pGL3Luc质粒(Clontech)稳定转染后,得到稳定表达GL3荧光素酶(在SV40基础调控下的北美萤火虫荧光素酶)的A549(人肺癌,ATCC NO.CCL-185)细胞。将A549-GL3Luc细胞在RPMI-1640中培养,并添加了10%的胎牛血清、2mM glutamax、100个单位/ml青霉素、100μg/ml链霉素和0.8μg/ml的G418(Promega)。所有细胞均在37℃、5%CO₂的湿润气氛中维护。

[0084] 转染实验

[0085] 转染前一天,将 2.5×10^4 的细胞接种在24孔组织培养皿里的含10%FBS的1ml新鲜的完全培养基中。转染前,制备好siRNA/聚合物的复合物。将所需量的siRNA在50μl的50mM、pH6或8的磷酸盐缓冲液中稀释。然后,将所需体积的聚合物溶液(7.5mM的氮)加入该siRNA溶液中。将得到的溶液用涡旋10秒钟来混合,并于室温放置10~15分钟。在将转染溶液加入细胞前,将完全培养基移出,且用0.55ml含10%FBS的新鲜的完全培养基来替换。然后,将50μl的复合物溶液加入每个孔中且将该培养皿在37℃温育。

[0086] 共转染实验

[0087] 转染前一天,将 5×10^4 的细胞接种在24-孔组织培养皿里的含10%FBS的1ml新鲜完全培养基中。转染前,制备含聚合物、质粒和siRNA的复合物。将100ng pCMVLuc(GL2Luc双链体序列)所需量的siRNA在50 μ l、50mM、pH7的磷酸盐缓冲液中稀释。然后,将2 μ l的I-PEI_{10k}-Tyr_{19%}溶液(7.5mM的氮)加入到所述质粒和siRNA溶液中。将得到的溶液用涡旋10秒钟来混合,并于室温放置10~15分钟。把转染溶液添加到细胞之前,将完全培养基移出,并以0.55ml含10%FBS的新鲜完全培养基来替换。然后,每孔加入50 μ l的复合物溶液,并将培养皿于37℃温育。24小时的温育期后测量荧光素酶基因的表达。实验以一式三份进行,且所述对荧光素酶活性用经细胞裂解物中的蛋白质含量(mg蛋白质)标准化的相对光单位(RLU)来表示。随后,由经GL2LucsiRNA-转染的细胞与GL3Luc siRNA-转染的细胞的荧光素酶活性比率来计算出沉默效率。

[0088] 基于DNA载体的RNAi技术转染方案

[0089] 转染前一天,将 5×10^4 的细胞接种在24-孔组织培养皿的1ml新鲜的含10%FBS的完全培养基中。转染前,制备了含聚合物和表达介导RNAi的短RNA(siRNA、shRNA、适于微RNA短发夹RNA)的DNA载体的复合物。将质粒RNAi载体(1 μ g)在50 μ l、50mM、pH7的磷酸盐缓冲液中稀释。然后,将2~4 μ l的I-PEI_{10k}-Tyr_{19%}溶液(7.5mM的氮)加入所述质粒RNAi载体溶液中。将得到的溶液用涡旋10秒钟来混合,并于室温放置10~15分钟。在把转染溶液加入所述细胞前,移出完全培养基,替代以0.55ml的含10%FBS的新鲜完全培养基。然后,每孔加入1~50 μ l的复合物溶液后将培养皿于37℃温育。温育一天后,加入0.4ml新鲜的完全培养基。在24小时~数天后测定所述靶基因表达水平(mRNA水平)或蛋白质产生的抑制(蛋白质水平)。作为对照,相对靶向基因表达,使用了表达非特异活性的RNA(包含一个错配序列)的质粒RNAi载体。

[0090] 荧光素酶和蛋白质测定

[0091] 荧光素酶基因表达使用商品化试剂盒(Promega,法国)来测定。移除所述完全培养基后,使用1ml的PBS溶液进行3次洗涤。随后,每孔加入100 μ l的1 $\times$ 裂解缓冲液后将培养皿置于室温温育30分钟。收集所述裂解物,且用14,000g离心5分钟。该荧光素酶的测定用注入100 μ l荧光素溶液后的2.5 μ l裂解物来评估。发光(RLU)用光度计(LB960,Berthold,法国)经5秒钟积分来监视。结果使用BCA测定法(Pierce,法国)用经10秒钟积分的光单位(RLU)/mg细胞蛋白质来表示。

[0092] mRNA水平的测量

[0093] 通过**QuantiGene®**分支DNA测定法(GenoSpectra)测定信使RNA水平,所述测定可用全细胞裂解物且无需靶扩增来进行。

[0094] 转染48小时后,将HeLa细胞用1ml的PBS1 $\times$ (Cambrex)洗涤,并于0.6ml的1 $\times$ Genospectra裂解缓冲液中在50℃裂解30分钟。然后将该培养皿贮藏于-80℃至少30分钟。将所述裂解物解冻,并将2~20 μ l该裂解物添加至捕获培养皿。将10 μ l的裂解工作试剂(用于48反应,该裂解工作试剂通过添加25 μ l的CE(捕获扩展剂),25 μ l的LE(标记扩展剂)和25 μ l的BL(封闭探针)和425 μ l的3 $\times$ 裂解混合液来制备,所有成分均来自Genospectra)加入该培养皿,并用1 $\times$ 裂解混合液使终体积达到100 μ l。将该培养皿盖上盖子,并于50℃温育16小时。用300 μ l的1 $\times$ 洗涤缓冲液(Genospectra)洗涤3次该培养皿,并将100 μ l的放大工作溶液

(将0.116 μ l的放大液稀释于116 μ l的放大液稀释液中,均来自Genospectra)加入到各孔中。将该培养皿于50℃温育1小时。用1 $\times$ 洗涤液洗涤3次后,各孔加入100 μ l的标记探针工作试剂(将0.116 μ l的标记探针稀释于116 μ l的放大液稀释液中,均来自Genospectra),并于50℃温育1小时。将该培养皿用1 $\times$ 洗涤缓冲液洗涤3次后,各孔加入100 μ l的底物工作试剂(10%的十二烷基硫酸锂0.348 μ l于116 μ l的底物中,均来自Genospectra)。温育30分钟后,所述每孔中的发光用分光光度计(Berthold)测量。

[0095] 荧光显微镜镜检

[0096] 转染前一天,将 2.5×10^4 的A549细胞接种于24-孔组织培养皿中的1ml含10%FBS的新鲜完全培养基里。转染前,制备siRNA/聚合物的复合物。将所需量的siRNA-若丹明(Rho)稀释于50 μ l、50mM、pH6或8的磷酸盐缓冲液中。然后,将所需体积的L-PEI_{10k}-Tyr_{33%}溶液(7.5mM的氮)加入到所述siRNA溶液中。将得到的溶液用涡旋10秒钟来混合,并于室温放置10~15分钟。将转染溶液加入细胞前,将完全培养基移除,并取代以0.55ml含10%FBS的新鲜完全培养基。其后,各孔加入50 μ l的复合物溶液,并将培养皿于37℃温育24或48小时。

[0097] 观测前,用1ml的PBS-BSA1%洗涤细胞,并随后用荧光显微镜镜检(ECLIPSE TE2000-S, Nikon)来观察。

[0098] 结果

[0099] 具有10kDa平均分子量的线性聚乙烯亚胺(L-PEI)用2-乙基-2-噁唑啉单体的阳离子开环聚合来制备出。随后,根据材料和方法中所述的方案1或2,用酪氨酸残基以不同程度修饰L-PEI_{10k}。如图1所例示,所有L-PEI-Tyr衍生物通过¹H-NMR表征。

[0100] 用L-PEI-Tyr衍生物将siRNA递送至培养中的细胞

[0101] 使用荧光siRNA(经若丹明标记的siRNA, siRNA-FluoR)研究了用线性聚乙烯亚胺和经酪氨酸修饰的线性聚乙烯亚胺(L-PEI_{10k}Tyr_{33%})的至培养中的细胞的比较siRNA递送能力。将少量的siRNA-FluoR(终浓度为25和50nM)与2 μ l的L-PEI_{10k}或L-PEI_{10k}Tyr_{33%}(两种储存溶液均以7.5mM的氮)在50 μ l、50mM、pH6.0的磷酸盐缓冲液中复合。将得到的转染物加至培养在含10%FBS的完全培养基中的A549细胞。在荧光显微镜镜检这些细胞前,将其以24孔组织培养皿模式温育24小时。该结果在图2中给出,在1ml含10%FBS的完全细胞培养基中温育,且将25nM(A)或50nM(B)的siRNA-若丹明(Rho)与2 μ l的L-PEI_{10k}或L-PEI_{10k}-Tyr_{33%}(7.5mM氮)在50 μ l、50mM、pH6.0的磷酸盐缓冲液中复合。观察前,用1ml的PBS-BSA1%洗涤细胞,然后用放大倍数 $\times 200$ 的荧光显微镜(ECLIPSE TE2000-S, Nikon)镜检观察。

[0102] 用所测两个siRNA浓度的L-PEI_{10k}介导的递送观察到所述细胞细胞质内稀少标示的荧光。用L-PEI_{10k}Tyr_{33%}的siRNA递送后观察到细胞质全部区域内的强烈且标示的荧光。这些结果显示,相比未经修饰的聚胺,使用L-PEI_{10k}Tyr_{33%}时siRNA的细胞摄取是非常有效的。

[0103] 作为测试本发明聚合物介导内源性报告基因的沉默的有效性的靶模型,我们使用了所述稳定表达GL3荧光素酶(SV40元件调控下的北美萤火虫荧光素酶)的A549细胞。细胞在0.55ml含10%FBS的完全培养基(以24孔组织培养皿形式)中用20nM的与2 μ l的L-PEI_{10k}-Tyr_{x%}(7.5mM的氮)在50 μ l、50mM、pH6.0的磷酸盐缓冲液中复合的GL3Luc siRNA转染。在48小时的温育期后检测荧光素酶基因的表达。实验以一式三份进行,且荧光素酶活性用经细胞裂解物中蛋白质含量(mg蛋白质)标准化的相对光单位(RLU)来表示。然后由非转染细胞计算出沉默效率。

[0104] 将下列用于该转染实验:明确定义的(经Elbashir et al.,2001验证)且常规的siRNA(siRNAGL3Luc),化学生成的和序列特异性的GL3Luc siRNA,它由匹配GL3Luc mRNA且含2个脱氧核糖核苷酸(dT)的3'-突出端的19个核苷酸的短dsRNA组成。SiRNA用未经修饰或经酪氨酸残基在50mM、pH6.0的磷酸盐缓冲液中不同程度修饰(每个聚合物3、8、25或33%的氮修饰)的L-PEI_{10k}复合。将得到的转染复合物溶液加到在含血清的培养基中培养的细胞,且细胞最终暴露于20nM的siRNA浓度。该结果在图3给出。转染后48小时由经细胞裂解物的蛋白质含量标准化的标准发光分析测定荧光素酶活性来确定沉默效率。当使用未经修饰的聚胺进行转染时该荧光素酶活性(表示为RLU/mg的蛋白质)不被显著性地抑制(<2%)。当使用聚胺-酪氨酸缀合物时沉默效率得到加强,以酪氨酸至聚胺的移接(graft)程度以达到修饰物的25~33%的平稳段与荧光素酶活性的90~95%的抑制的函数。

[0105] 由用L-PEI_{10k}或L-PEI_{10k}-Tyr_{33%}缀合物转染了GL3Luc siRNA的A549-GL3Luc细胞稳定表达的荧光素酶基因(pGL3)的比较沉默效率

[0106] 用稳定表达GL3荧光素酶(在SV40元件调控下的北美萤火虫荧光素酶)的A549细胞评价了聚合物介导的siRNA递送后的选择性沉默。细胞在0.55ml含10%FBS的完全培养基(在24孔组织培养皿中的形式)中使用1~100nM的与2μl的1-PEI_{10k}或1-PEI_{10k}-Tyr_{33%}缀合物(7.5mM氮)在50μl、50mM、pH6.0的磷酸盐缓冲液中复合的GL3Luc siRNA转染。荧光素酶基因表达在48小时的温育期后进行检测。实验以一式三份进行,且荧光素酶活性用经细胞裂解物中蛋白质含量(mg的蛋白质)标准化的相对光单位(RLU)来表示。然后由非转染细胞计算出沉默效率。

[0107] 特异性siRNAGL3Luc与L-PEI_{10k}Tyr_{33%}在50mM、pH6.0的磷酸盐缓冲液中复合。细胞用5~100nM的siRNA转染。荧光素酶活性在转染后48小时测定,当使用5~100nM的siRNA转染时其活性可被抑制达98%。其结果在图4中给出。作为对照聚合物未经修饰的L-PEI_{10k}(100nM),在相同条件下荧光素酶活性显示被抑制10%。但当用此L-PEI_{10k}进行转染时,使用5~50nM的更低siRNA浓度不抑制荧光素酶活性。

[0108] 用siRNA/L-PEI_{10k}-Tyr复合物的特异性基因沉默

[0109] 在用L-PEI_{10k}Tyr_{33%}转染的相同条件下,用靶向GL2Luc基因的非特异性siRNA(由Elbashir et al.,2001验证的siRNA)检测了荧光素酶沉默的选择性。稳定表达荧光素酶基因的A549-GL3Luc细胞是在0.55ml含10%FBS的完全培养基(在24孔组织培养皿中的形式)中用1~20nM的与2μl的1-PEI_{10k}-Tyr_{33%}(7.5mM氮)在50μl、50mM、pH8.0的磷酸盐缓冲液中复合的GL3Luc siRNA转染。荧光素酶基因表达在48小时的温育期后进行检测。实验以一式三份进行,且荧光素酶活性用经细胞裂解物中蛋白质含量(mg的蛋白质)标准化的相对光单位(RLU)来表示。然后由非转染细胞计算出沉默效率。该结果在图5中给出。

[0110] 当在相同条件下用不相关序列(GL2Luc siRNA)转染细胞时,无对荧光素酶活性的影响,证实了序列特异性的RNA干扰。

[0111] 用L-PEI_{10k}-Tyr_{33%}复合的siRNA的有效的内源性基因沉默转染

[0112] HeLa细胞用与2μl的1-PEI_{10k}-PTyr_{33%}(7.5mM氮)在50μl的50mM、pH8.0的磷酸盐缓冲液中复合的GAPDH siRNA(1~25nM)转染。GAPDH mRNA水平于48小时的温育期后通过分支的DNA测定检测,且使用1~25nM浓度的siRNA时其表达被抑制多于90%。其结果在图6中给出。作为非特异性对照,在相同条件下转染匹配不相关序列(核纤层蛋白A/C)的siRNA。非特

异性对照显示对GAPDH mRNA水平没有抑制性影响。

[0113] 经疏水性 α 氨基酸或衍生物修饰的阳离子聚合物介导有效的基因沉默

[0114] 在用经酪氨酸残基修饰的聚合物siRNA递送至培养中的细胞后基因沉默的提高也使用具有17kDa的MW的聚烯丙胺(PAA)进行了例示。用以40%氮的程度修饰的酪氨酸残基移接了PAA。用siRNAGL3Luc与1 μ l的PAA_{17k-Tyr40%}在50 μ l、50mM、pH6.0的磷酸盐缓冲液中制备了转染复合物。A549-GL3Luc细胞是在0.55ml含10%FBS的完全培养基中使用与2 μ l的L-PEI_{10k-Tyr33%}(7.5mM的氮)在50 μ l、50mM、pH8.0的磷酸盐缓冲液中复合的GAPDH siRNA(1~25nM)转染。GAPDHmRNA水平于48小时的温育期后通过分支的DNA测定检测。作为非特异性对照,在相同条件下转染匹配不相关序列(核纤层蛋白A/C)的siRNA。实验以一式三份进行,且由非-转染细胞的内源性GAPDH水平计算出GAPDH沉默效率。其结果在图7中给出。PAA_{17k-Tyr40%}可提供90%的沉默,而未经修饰的PAA则显示约10%的低水平的和不显著的沉默。再者,由PAA_{17k-Tyr40%}得到的沉默确认是选择性的,因为siRNAGL2Luc完全不能使荧光素酶基因沉默。

[0115] 许多聚合物,包括线性的或分支的聚乙烯亚胺、聚烯丙胺或聚-L-赖氨酸都是经不同的疏水性 α 氨基酸或衍生物(如酪氨酸、色氨酸或苯丙氨酸的衍生物3,4-二羟基-L-苯丙氨酸(DOPA))化学修饰的。这些聚合物缀合物的沉默效率在使用5或20nM的siRNA转染稳定表达GL3荧光素酶的A549细胞后测试。其结果在以下的表1中给出。

[0116] 表1:经芳香族 α -氨基酸残基以不同分子量和不同修饰程度修饰的聚胺类缀合物样品的沉默效率(L-PEI:线性聚乙烯亚胺;PAA:聚烯丙胺;PLK:聚-L-赖氨酸)。

[0117]

聚合物	MW kDa (聚胺)	移接率 (%)	MW kDa (缀 合物)	以 20nM 的 siRNA 的沉默 (%)	以 5nM 的 siRNA 的沉默 (%)
L-PEI-Tyr	10	25	31	84+/-18	86+/-1
B-PEI-Tyr	25	25	75.6	96+/-1	92+/-1
PAA-Tyr	17	40	47.4	91+/-5	nd
PLK-Tyr	22	50	35	87+/-11	86+/-8
L-PEI-Trp	10	33	32.5	40+/-9	nd
PAA-Trp	17	37	49.8	87+/-10	nd
L-PEI-DOPA	10	23	27.9	nd	80+/-24

[0118] nd:未测定

[0119] 由聚胺的平均分子量与经芳香族 α -氨基酸残基修饰的百分比计算出各缀合物的分子量。使用稳定表达荧光素酶基因的A549-GL3Luc细胞测定沉默效率。细胞在0.55ml的含10%FBS的完全培养基中(在24孔组织培养皿中)使用5或20nM的与2 μ l的缀合物在50 μ l的50mM、pH6.0的磷酸盐缓冲液中复合的GL3Luc siRNA转染。荧光素酶基因表达于48小时的温育期后进行检测。实验以一式三份进行,且荧光素酶活性用经细胞裂解物中蛋白质含量(mg的蛋白质)标准化的相对光单位(RLU)来表示。其后,由非转染细胞计算出沉默效率。

[0120] 使用低浓度的siRNA所测全部的聚合物缀合物显示出高水平(80%及以上)的荧光素酶基因沉默。

[0121] 高修饰程度需要得到高水平的基因沉默效率。这个需要也在使用相同主干但持有不同分子量的聚合物中得到证实。该结果在下面的表2中给出。

[0122] 表2:25%经酪氨酸残基修饰的不同分子量的线性聚乙烯亚胺缀合物样品的沉默效率。

[0123]

MW kDa(聚胺)	MW kDa(缀合物)	以5nM的siRNA的沉默(%)
2	6.04	67
10	30.2	96
22	66.5	95

[0124] 由聚胺的平均分子量及由被酪氨酸残基修饰的百分比计算出各缀合物的分子量。使用的稳定表达荧光素酶基因的A549-GL3Luc细胞测定沉默效率。细胞在0.55ml的含10% FBS的完全培养基中(24孔培养皿中的形式)使用5nM的与2 μ l缀合物在50 μ l、50mM、pH6.0的磷酸盐缓冲液中复合的GL3Luc siRNA转染。在48小时的温育期后测量荧光素酶基因的表达。实验以一式三份进行,且荧光素酶活性用经细胞裂解物中的蛋白质含量(mg的蛋白质)标准化的相对光单位(RLU)来表示。其后,由非转染细胞计算出沉默效率。

[0125] 如所述结果中显示的,2、10或22kDa的线性聚乙烯亚胺经相同程度的酪氨酸残基修饰(25%)进行修饰。所有这些聚合物在以低siRNA浓度(5nM)转染A549-GL3Luc细胞后都能使荧光素酶基因沉默。

[0126] 在更多的细节分析上,移接到聚胺的高含量的疏水性 α 氨基酸强效地增加了聚合物缀合物的质量(MW)(表1和2)。尤其是,在偶联疏水性 α 氨基酸或衍生物后,聚胺的初始质量增加2~3倍,经修饰的聚合物显示对RNA干扰有效。这些经修饰的聚合物比阳离子聚合物更疏水。该分析证实了疏水相互作用在siRNA存在下驱动聚胺的全部运动,并促成高基因沉默效率。

[0127] 质粒和用L-PEI_{10K}-Tyr复合的siRNA共转染后有效的基因沉默

[0128] 将HeLa细胞(50000个细胞/孔)在0.55ml的含10%FBS的完全培养基(在24孔组织培养皿中的形式)中用pCMVLuc质粒(100ng、GL2Luc序列)与特异性GL2Luc siRNA或错配的GL3Luc siRNA(0~50nM)进行共转染,其中所述GL2Luc siRNA或GL3Luc siRNA已与2 μ l的PEI_{10K}-Tyr_{19%}在50 μ l的50mM、pH7.0的磷酸盐缓冲液中复合。24小时的温育期后测量荧光素酶基因表达。其结果在图8中给出。实验以一式三份进行,且该荧光素酶活性(A)由经细胞裂解物中的蛋白质含量(mg的蛋白质)标准化的相对光单位(RLU)来表示。其后,由来自GL2Luc siRNA与GL3Luc siRNA转染细胞的荧光素酶活性比率计算出沉默效率(B)。

[0129] 使用10~50nM浓度的siRNA,特异性GL2Luc siRNA抑制了超过90%的GL2荧光素酶表达(图8)。作为非特异性对照,在相同条件下共转染匹配不相关序列的siRNA(GL3Luc序列)。非特异性对照显示,对荧光素酶活性无抑制影响。该实验证实了I-PEI_{10K}-Tyr缀合物能够同时共递送编码转基因的质粒和特异的且有活性的siRNA。

[0130] 参考文献

[0131] Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami. 2002. A system for stable

expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*.296:550-3.

[0132] Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*.411:494-8.

[0133] Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*.391:806-11.

[0134] Miyagishi, M., and K. Taira. 2002. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol*.20:497-500.

[0135] Silva, J. M., M. Z. Li, K. Chang, W. Ge, M. C. Golding, R. J. Riclles, D. Siolas, G. Hu, P. J. Paddison, M. R. Schlabach, N. Sheth, J. Bradshaw, J. Burchard, A. Kulkarni, G. Cavet, R. Sachidanandam, W. R. McCombie, M. A. Cleary, S. J. Elledge, and G. J. Hannon. 2005. Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet*.37:1281-8.

[0136] Sui, G., C. Soohoo, B. Affar el, F. Gay, Y. Shi, W. C. Forrester, and Y. Shi. 2002. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.99:5515-20.

[0137] Verma, S., and F. Eckstein. 1998. Modified oligonucleotides: synthesis and strategy for users. *Annu Rev Biochem*.67:99-134.

[0138] Yu, J. Y., S. L. DeRuiter, and D. L. Turner. 2002. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.99:6047-52.

序列表

	<110> POLYPLUS-TRANSFECTION	
	<120> 使用合成的聚合物递送对基因沉默有活性的核酸的工具	
	<130> 62716	
	<140> PCT/IB2008/055256	
	<141> 2008-12-12	
	<150> US 61/013 358	
	<151> 2007-12-13	
	<160> 8	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸	
[0001]	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (20).. (22)	
	<223> 脱氧核糖核苷酸	
	<400> 1	
	cuuacgcuga guacuucgad tdt	23
	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1).. (3)	
	<223> 脱氧核糖核苷酸	
	<400> 2	
	dttdtgaaugc gacucaugaa gcu	23
	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	寡核苷酸	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(20)..(22)	
	<223>	deoxyribonucleotides	
	<400>	3	
		cguacgcgga auacuucgad tdt	23
	<210>	4	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(3)	
	<223>	脱氧核糖核苷酸	
[0002]	<400>	4	
		dtgtgcaugc gccuuaugaa gcu	23
	<210>	5	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(20)..(22)	
	<223>	脱氧核糖核苷酸	
	<400>	5	
		gcaccacuag uugguugcd tdt	23
	<210>	6	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸	

	<400> 6 dtdtcguggu gaucaaccaa cag	23
	<210> 7 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 寡核苷酸	
	<220> <221> misc_feature <222> (20)..(22) <223> 脱氧核糖核苷酸	
[0003]	<400> 7 cuggacuucc agaagaacad tdt	23
	<210> 8 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 寡核苷酸	
	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(3) <223> 脱氧核糖核苷酸	
	<400> 8 dtdtgaccug aaggucuucu ugu	23

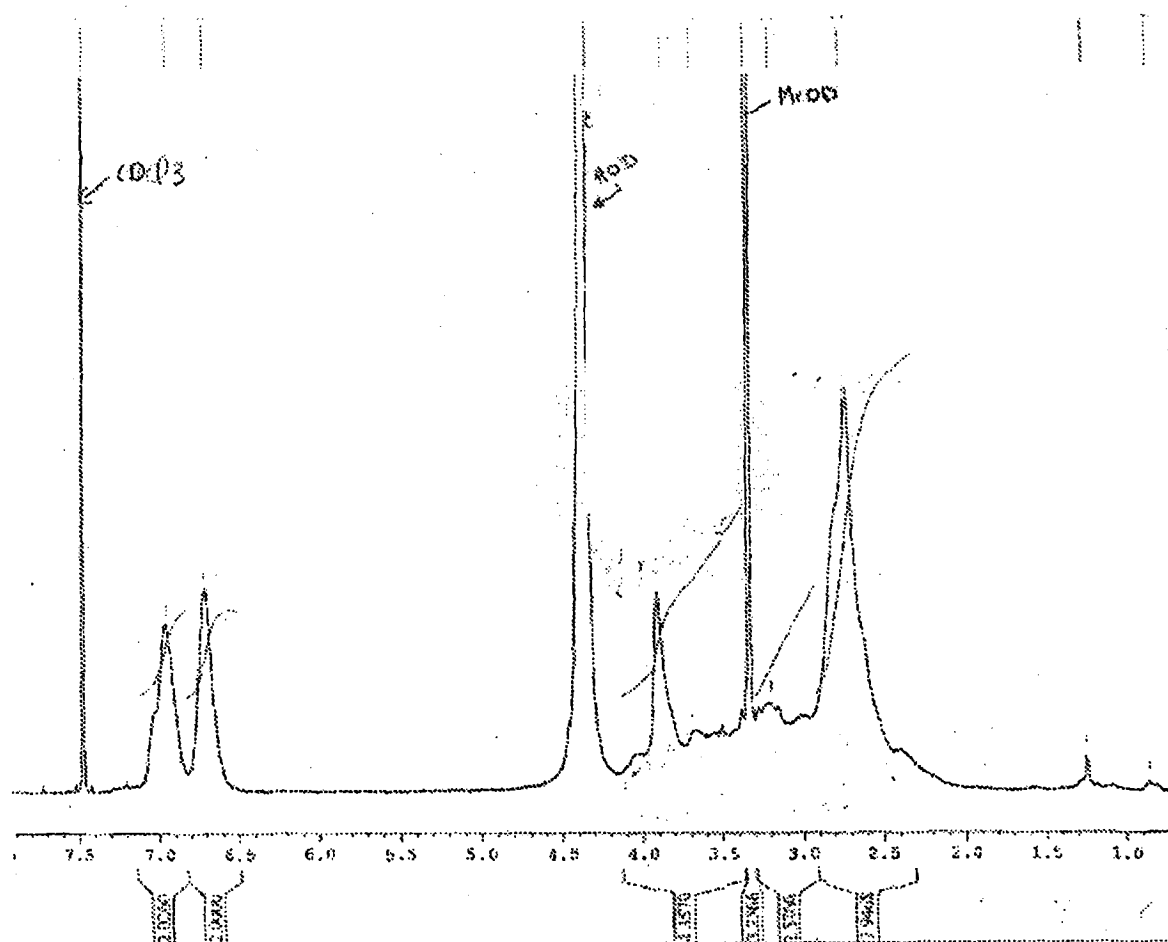
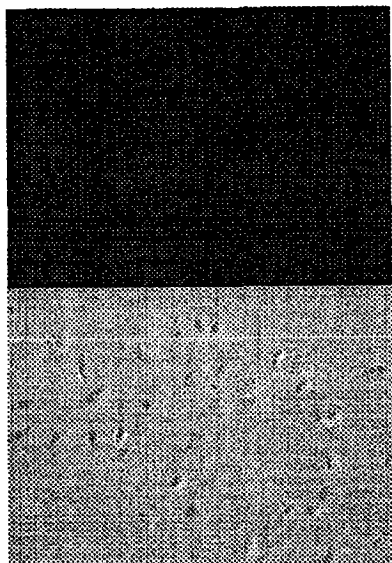
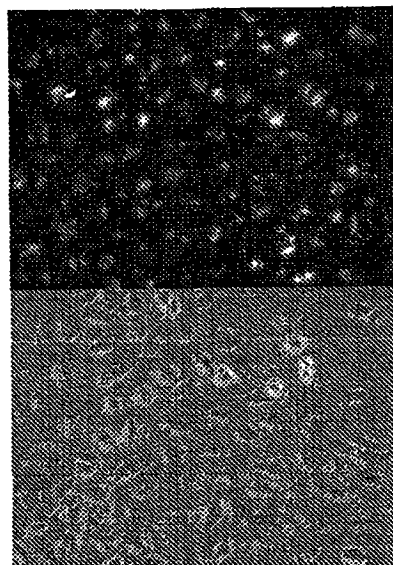


图1

A

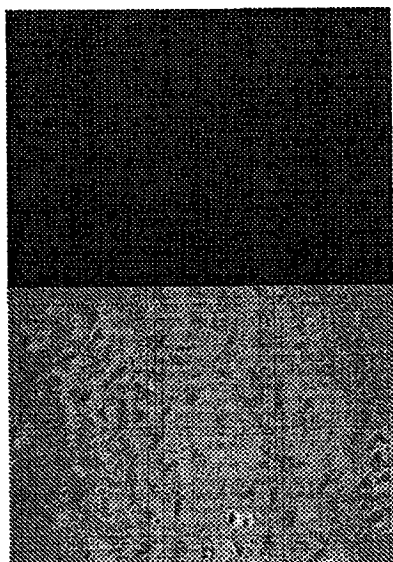


siRNA-FluoR/L-PEI_{10KD}
25 nM siRNA-Rho

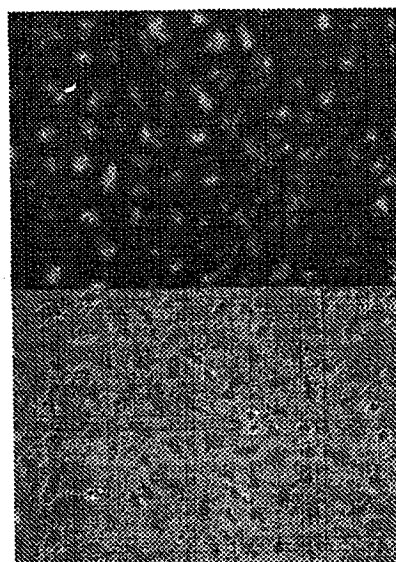


siRNA-FluoR/L-PEI_{10KD}-Tyr_{33%}
25 nM siRNA-Rho

B



siRNA-FluoR/L-PEI_{10K}
50 nM siRNA-Rho



siRNA-FluoR/L-PEI_{10K}-Tyr_{33%}
50 nM siRNA-Rho

图2

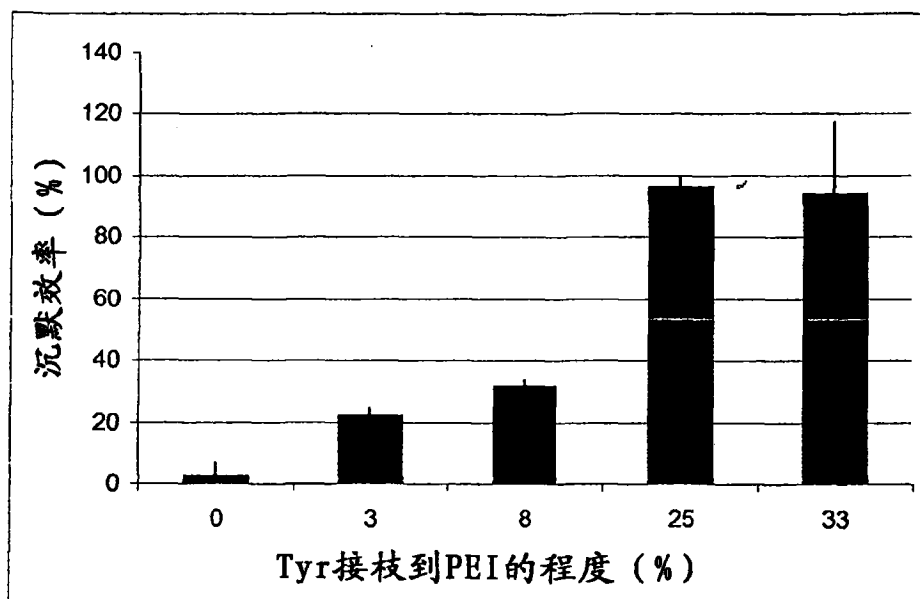


图3

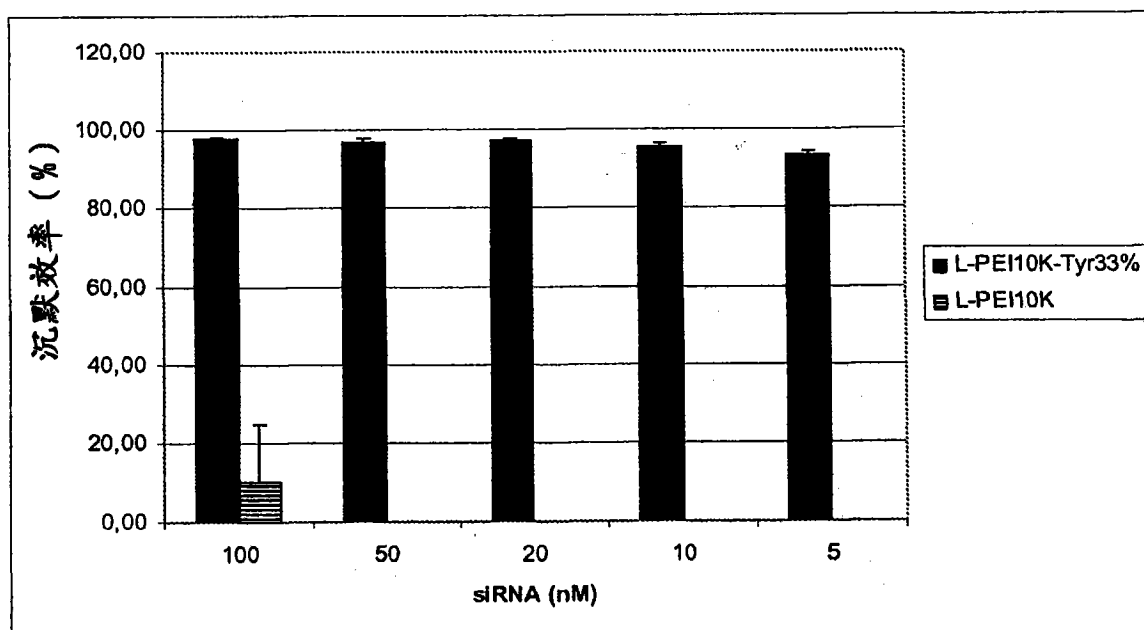


图4

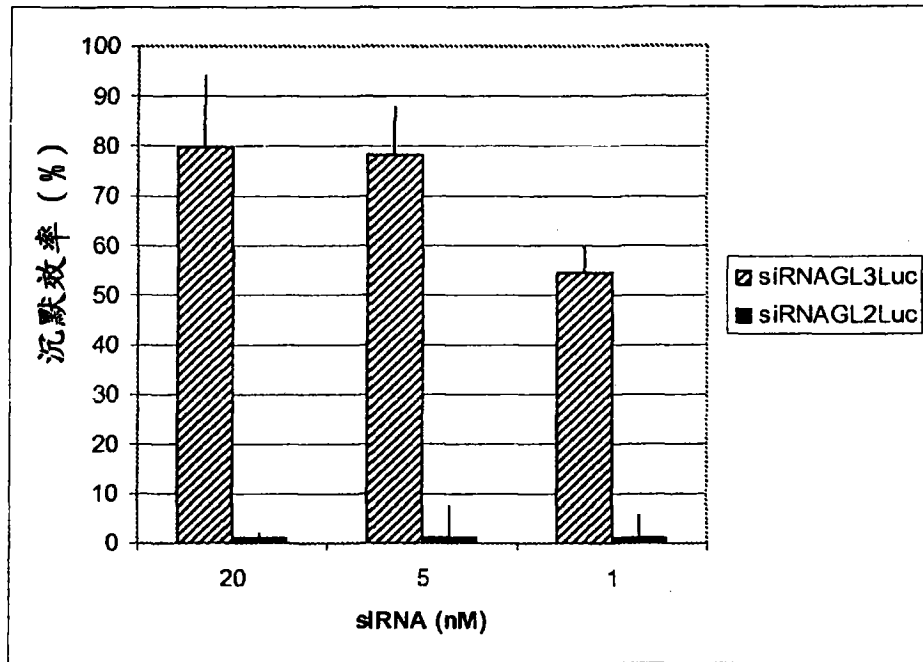


图5

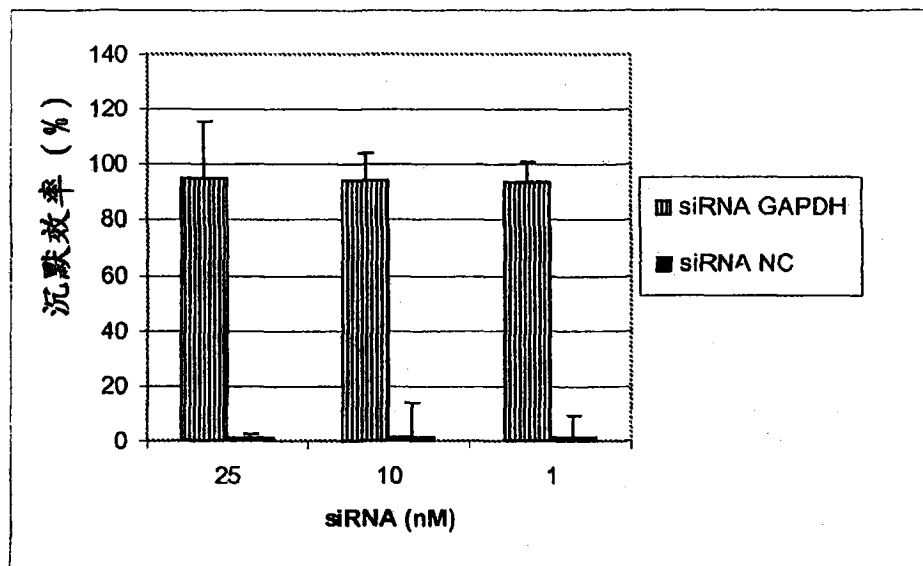


图6

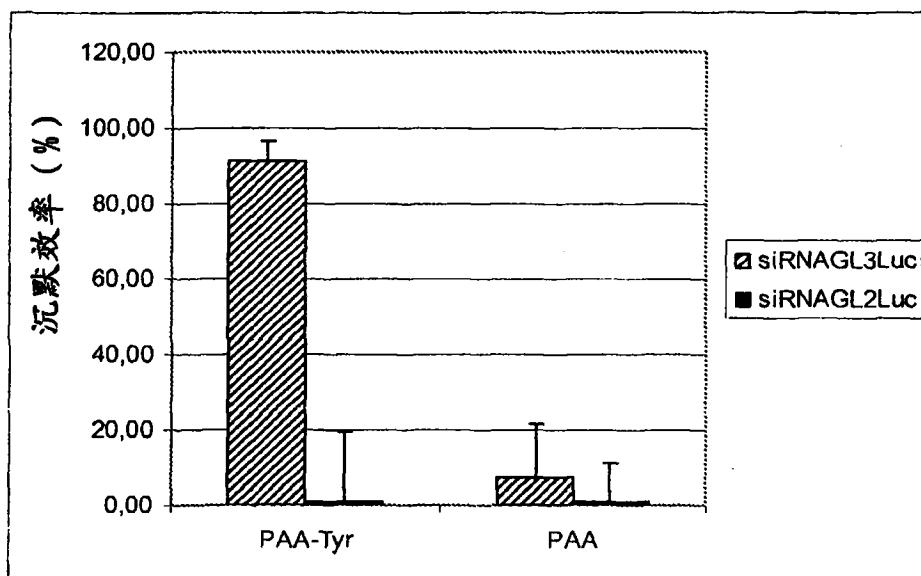
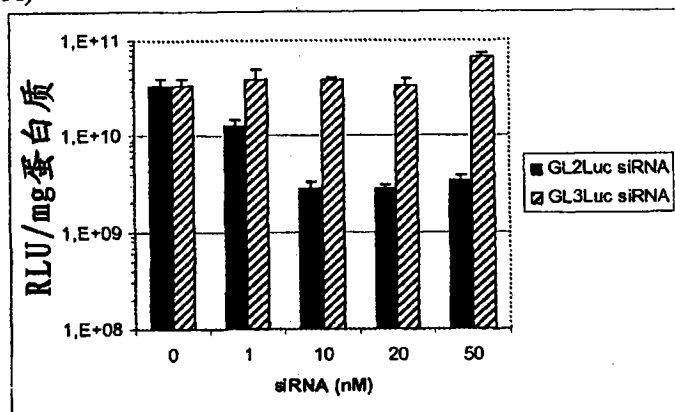


图7

A)



B)

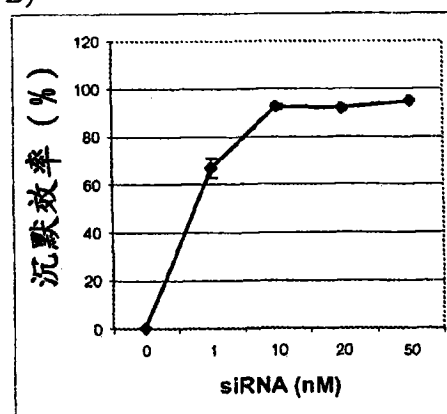


图8