

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07H 21/02

C07H 21/04 C12N 15/88

A61K 48/00



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97192600. X

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1168736C

[22] 申请日 1997. 1. 6 [21] 申请号 97192600. X

[30] 优先权

[32] 1996. 1. 5 [33] AU [31] PN7416

[86] 国际申请 PCT/AU1997/000004 1997. 1. 6

[87] 国际公布 WO1997/025339 英 1997. 7. 17

[85] 进入国家阶段日期 1998. 8. 26

[71] 专利权人 联邦科学技术研究组织

地址 澳大利亚首都直辖区

[72] 发明人 特雷弗·约翰·洛基特

罗伯特·乔治·惠特克

菲奥娜·海伦·卡梅隆

米努·贾利利·穆加达姆

西蒙·麦克埃文·卡罗尔

审查员 徐 赤

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

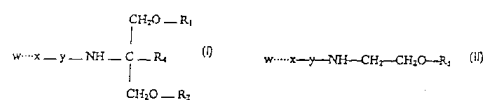
权利要求书 6 页 说明书 29 页 附图 6 页

[54] 发明名称 用于传递核酸的组合物和方法

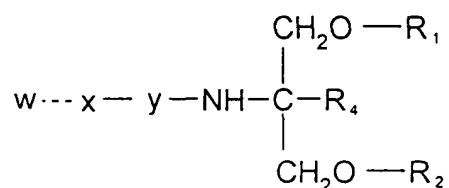
[57] 摘要

本发明提供了一种将核酸引入细胞的方法。该方法包括使细胞暴露于具有式(I)的化合物,在式(I)中:w是核酸,x是非氨基酸或者非肽核酸结合基团,y是具有等于1-30个碳-碳单共价键的链长的间隔基或者不存在,R₄是H或者卤素或者CH₂O-R₃;R₁、R₂和R₃是相同的或者不同的并且是氢、甲基、乙基、烷基、链烯基、羟基化烷基、羟基化链烯基或者包含烷基、链烯基、羟基化烷基或羟基化链烯基的醚,任选地是来源于具有等于3-24个碳原子的碳链长的饱和或不饱和脂肪酸的酰基,其条件是R₁、R₂或者R₃的至少一个包括具有3-24个碳原子的饱和或不饱和碳链的基团,或者使细胞暴露于具有式(II)的化合物,在式(II)中:w是核酸,x是非氨基酸或者非肽核酸结合基团,y是具有等于1-30个碳-碳单共价键的链长的间隔基或者不存在,R₅是烷基、链烯基、羟基化烷基、羟

基化链烯基或者包含烷基、链烯基、羟基化烷基或羟基化链烯基的醚,任选地是具有等于3-24个碳原子的饱和或不饱和碳链的链长的酰基,其条件是R₅包括具有3-24个碳原子的饱和或不饱和碳链的基团。本发明也涉及这些化合物。



1. 一种将核酸引入细胞的方法，该方法包含将细胞暴露于具有下式的化合物：



其中：

w 是核酸

x 是非氨基酸或非肽核酸结合基团

y 是具有等于 1-30 个碳-碳单共价键的链长的间隔基或者不存在

R_4 是 H 或者 $\text{CH}_2\text{O}-\text{R}_3$ ； R_1 、 R_2 和 R_3 相同或不同，并且是氢或者来源于具有等于 3-24 个碳原子的碳链长的饱和或不饱和脂肪酸的酰基，其条件是 R_1 、 R_2 或者 R_3 的至少一个为来源于具有等于 3-24 个碳原子的碳链长的饱和或不饱和脂肪酸的酰基。

2. 如权利要求 1 所要求的方法，其中 y 是存在的。

3. 如权利要求 1 所要求的方法，其中所说的核酸是 DNA、RNA 或者 DNA 或 RNA 的寡核苷酸、修饰的寡核苷酸或者它们的混合物。

4. 如权利要求 1 所要求的方法，其中 R_1 、 R_2 和 R_3 是相同的。

5. 如权利要求 1 所要求的方法，其中 R_1 、 R_2 和/或 R_3 是选自由棕榈酸、豆蔻酸、月桂酸、癸酸和油酸组成的组中的脂肪酸的胆固醇或者酰基衍生物。

6. 如权利要求 5 所要求的方法，其中， R_1 、 R_2 和/或 R_3 是豆蔻酸或者月桂酸的酰基衍生物。

7. 如权利要求 1 所要求的方法，其中所说的细胞是动物细胞。

8. 如权利要求 1 所要求的方法，其中所说的细胞是植物细胞。

9. 如权利要求 7 所要求的方法，其中所说的方法在体外实施。

10. 如权利要求 1 所要求的方法, 其中所说的化合物存在于脂质体中或者与另一种脂类混合。

11. 如权利要求 1 所要求的方法, 其中所说的化合物包含具有等于 3 至 17 个碳原子的链长的间隔基团“y”。

12. 如权利要求 11 所要求的方法, 其中所说的“y”是氨基丁酸、氨基己酸、氨基辛酸或氨基十一酸或者氨基辛酸和氨基十一酸的二肽。

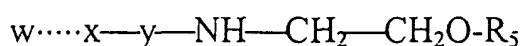
13. 如权利要求 1 所要求的方法, 其中所说的“x”具有整体正电荷, 并且核酸是静电缔合的。

14. 如权利要求 1 所要求的方法, 其中所说的“x”是寡核苷酸, 核酸“w”通过碱基配对或者三股螺旋形成与“x”缔合。

15. 如权利要求 1 所要求的方法, 其中所说的“w”与“x”以共价键结合。

16. 如权利要求 1 所要求的方法, 其中所说的“w”通过氢键合与“x”缔合。

17. 一种将核酸引入细胞的方法, 该方法包括使细胞暴露于具有下式的化合物:



其中:

w 是核酸

x 是非氨基酸或非肽核酸结合基团

y 是具有等于 1-30 个碳-碳单共价键的链长的间隔基或者不存在

R₅是具有等于 3-24 个碳原子的饱和或不饱和碳链的链长的酰基。

18. 如权利要求 17 所要求的方法, 其中“y”是存在的。

19. 如权利要求 17 所要求的方法, 其中所说的核酸是 DNA、RNA 或者 DNA 或 RNA 的寡核苷酸、修饰的寡核苷酸或者它们的混合物。

20. 如权利要求 17 所要求的方法, 其中 R₅ 是选自由棕榈酸、豆

蔻酸、月桂酸、癸酸和油酸组成的组中的脂肪酸的胆固醇或者酰基衍生物。

21. 如权利要求 20 所要求的方法, 其中 R_5 是豆蔻酸或者月桂酸的酰基衍生物。

22. 如权利要求 17 所要求的方法, 其中所说的细胞是动物细胞。

23. 如权利要求 17 所要求的方法, 其中所说的细胞是植物细胞。

24. 如权利要求 22 所要求的方法, 其中所说的方法在体外实施。

25. 如权利要求 17 所要求的方法, 其中所说的化合物存在于脂质体中或者与另一种脂类混合。

26. 如权利要求 17 所要求的方法, 其中所说的间隔基团“y”具有等于 3-17 个碳原子的链长。

27. 如权利要求 26 所要求的方法, 其中“y”是氨基丁酸、氨基己酸、氨基辛酸或氨基十一酸或者氨基辛酸和氨基十一酸的二肽。

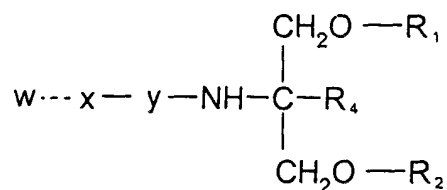
28. 如权利要求 17 所要求的方法, 其中“x”具有整体正电荷。

29. 如权利要求 17 所要求的方法, 其中“x”是寡核苷酸, 核酸“w”通过碱基配对或者三股螺旋形成与“x”缔合。

30. 如权利要求 17 所要求的方法, 其中“w”通过共价键与“x”结合。

31. 如权利要求 17 所要求的方法, 其中“w”通过氢键合与“x”缔合。

32. 一种用于将核酸引入细胞的化合物, 所说的化合物具有下式:



其中:

w 是核酸

x 是非氨基酸或非肽核酸结合基团

y 是具有等于 1-30 个碳-碳单共价键的链长的间隔基或者不存在

R₄ 是 H 或者 CH₂O-R₃; R₁、R₂ 和 R₃ 相同或不同, 并且是氢或者来源于具有等于 3-24 个碳原子的碳链长的饱和或不饱和脂肪酸的酰基, 其条件是 R₁、R₂ 或者 R₃ 的至少一个为来源于具有等于 3-24 个碳原子的碳链长的饱和或不饱和脂肪酸的酰基。

33. 如权利要求 32 所要求的化合物, 其中“y”是存在的。

34. 如权利要求 32 所要求的化合物, 其中“w”是 DNA、RNA 或者 DNA 或 RNA 的寡核苷酸、修饰的寡核苷酸或者它们的混合物。

35. 如权利要求 32 所要求的化合物, 其中所说的 R₁、R₂ 和 R₃ 是相同的。

36. 如权利要求 32 所要求的化合物, 其中所说的 R₁、R₂ 和/或 R₃ 是选自由棕榈酸、豆蔻酸、月桂酸、癸酸和油酸组成的组中的脂肪酸的胆固醇或者酰基衍生物。

37. 如权利要求 36 所要求的化合物, 其中所说的 R₁、R₂ 和/或 R₃ 是豆蔻酸或者月桂酸的酰基衍生物。

38. 如权利要求 32 所要求的化合物, 其中所说的化合物存在于脂质体中或者与另一种脂类混合。

39. 如权利要求 32 所要求的化合物, 其中所说的化合物包含具有等于 3-17 个碳原子的链长的间隔基团“y”。

40. 如权利要求 39 所要求的化合物, 其中“y”是氨基丁酸、氨基己酸、氨基辛酸或氨基十一酸或者氨基辛酸和氨基十一酸的二肽。

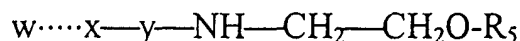
41. 如权利要求 32 所要求的化合物, 其中“x”具有整体正电荷。

42. 如权利要求 32 所要求的化合物, 其中“x”是寡核苷酸, 核酸“w”通过碱基配对或者三股螺旋形成与“x”缔合。

43. 如权利要求 32 所要求的化合物, 其中“w”以共价键与“x”结合。

44. 如权利要求 32 所要求的化合物, 其中“w”通过氢键合与“x”缔合。

45. 一种用于将核酸引入细胞的化合物, 所说的化合物具有下式:



其中:

w 是核酸

x 是非氨基酸或非肽核酸结合基团

y 是具有等于 1-30 个碳-碳单共价键的链长的间隔基或者不存在

R₅是具有等于 3-24 个碳原子的饱和或不饱和碳链的链长的酰基。

46. 如权利要求 45 所要求的化合物, 其中“y”是存在的。

47. 如权利要求 45 所要求的化合物, 其中“w”是 DNA、RNA 或者 DNA 或 RNA 的寡核苷酸、修饰的寡核苷酸或者它们的混合物。

48. 如权利要求 45 所要求的化合物, 其中 R₅是选自由棕榈酸、豆蔻酸、月桂酸、癸酸和油酸组成的组中的脂肪酸的胆固醇或者酰基衍生物。

49. 如权利要求 48 所要求的化合物, 其中 R₅是豆蔻酸或者月桂酸的酰基衍生物。

50. 如权利要求 45 所要求的化合物, 其中所说的化合物存在于脂质体中或者与另一种脂类混合。

51. 如权利要求 45 所要求的化合物, 其中所说的化合物包含具有等于 3-17 个碳原子的链长的间隔基团“y”。

52. 如权利要求 51 所要求的化合物, 其中“y”是氨基丁酸、氨基己酸、氨基辛酸或氨基十一酸或者氨基辛酸和氨基十一酸的二肽。

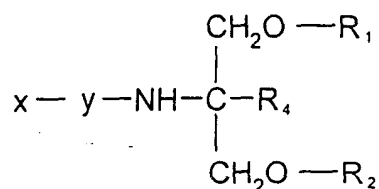
53. 如权利要求 45 所要求的化合物, 其中“x”具有整体正电荷。

54. 如权利要求 45 所要求的化合物, 其中“x”是寡核苷酸, 核酸“w”通过碱基配对或者三股螺旋形成与“x”缔合。

55. 如权利要求 45 所要求的化合物，其中“w”以共价键与“x”结合。

56. 如权利要求 45 所要求的化合物，其中“w”通过氢键合与“x”缔合。

57. 下式的化合物：



其中 y、R₁、R₂、R₄ 如权利要求 1 中所定义，且 x 是阳离子非氨基酸或非肽核酸结合基团。

58. 如权利要求 57 所要求的化合物，其中所述阳离子核酸结合基团是多胺、聚亚胺或者阳离子树状聚合物。

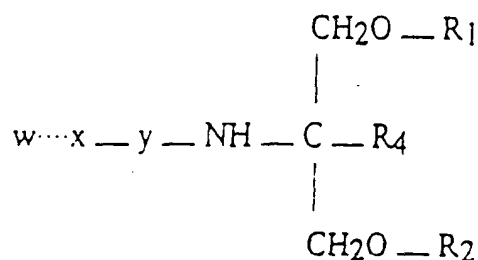
用于传递核酸的组合物和方法

本发明涉及把化合物，具体地说是将核酸引入细胞的方法。此外，本发明涉及用于这一方法的组合物。

有一些需要将特定化合物传递进细胞的情形。这些应用之一是具有 DNA 的真核细胞的转染。当前，这一应用已通过利用以磷酸钙为介导的转染或者通过细胞的电穿孔法采用如“Transfectam” (Promega) 和“Lipofectin” (BRL) 的各种商业脂质转染试剂实现。

向细胞传递以核酸为基础的化合物的能力也用于给药。向细胞施用与以下描述的结构式的化合物相关的药物改变了诸如药物作用(如缓释持续作用)持续时间、要求的用药量或者施药方式之类的参数。在以下描述的参数范围内采用化合物变体施药也应使在细胞和整个有机体范围之内的特定的导向施药能够实现。

正如本申请者的共同未决国际专利申请 PCT/AU95/00505 (其说明部分引入本文作参考) 所说明的，通过把细胞暴露于下式的化合物可以将核酸引入到细胞中：



其中：

w 是核酸

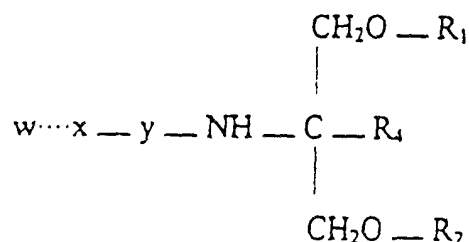
x 是氨基酸或者肽

y 是具有等于 1-20 个碳原子的链长的间隔基或者不存在

R_4 是 H 或者 $\text{CH}_2\text{O}-R_3$; 同时 R_1 、 R_2 和 R_3 是相同的或者不同的并且是氢、甲基、乙基、羟基或者来源于具有 3-24 个碳原子的饱和或不饱和碳链的脂肪酸的酰基, 其条件是 R_1 、 R_2 和 R_3 是来源于脂肪酸的酰基。

本发明人现在已发现利用类似的化合物将核酸引入细胞是可能的, 但是其中 “x” 的性质发生变化。

因此, 在第一个方面, 本发明包括将核酸引入细胞的方法, 所说的方法包含使细胞暴露于具有下式的化合物:



其中:

w 是核酸

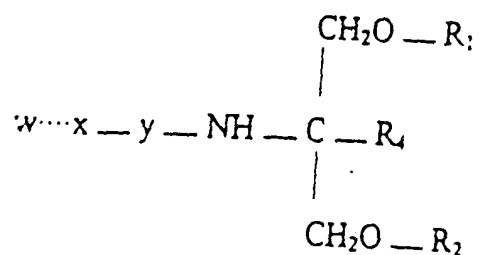
x 是非氨基酸或者非肽核酸结合基团

y 是具有等于 1-30 个碳-碳单共价键的链长的间隔基或者不存在

R_4 是 H 或者卤素或者 $\text{CH}_2\text{O}-R_3$; 同时 R_1 、 R_2 和 R_3 是相同的或者不同的并且是氢、甲基、乙基、烷基、链烯基、羟基化烷基、羟基化链烯基或者包含烷基、链烯基、羟基化烷基或羟基化链烯基的醚, 任选地是来源于具有等于 3-24 个碳原子的链长的饱和或不饱和脂肪酸的酰基, 其条件是 R_1 、 R_2 或者 R_3 的至少一个包括具有 3-24 个碳原子的饱

和或不饱和碳链的基团。

在第二方面，本发明包括用于将核酸引入细胞的化合物，所说的化合物具有下式：



其中：

w 是核酸

x 是非氨基酸或者非肽核酸结合基团

y 是具有等于 1-30 个碳-碳单共价键的链长的间隔基或者不存在

R₄ 是 H 或者卤素或者 CH₂O-R₃；同时 R₁、R₂ 和 R₃ 是相同的或者不同的并且是氢、甲基、乙基、烷基、链烯基、羟基化烷基、羟基化链烯基或者包含烷基、链烯基、羟基化烷基或者羟基化链烯基的醚，任选地是来源于具有等于 3-24 个碳原子的碳链长的饱和或不饱和脂肪酸的酰基，其条件是 R₁、R₂ 或者 R₃ 的至少一个包括具有 3-24 个碳原子的饱和或不饱和碳链的基团。

如本文所使用的，术语“核酸”以它最广的意义使用并且包括 DNA、RNA 或者 DNA 或 RNA 的寡核苷酸、修饰的寡核苷酸以及这些物质的混合物。此外，该术语意欲包括修饰的寡核苷酸。这些修饰包括但不限于糖修饰(如 2'-脱氧-2'-氟代核苷酸(Kawasaki, A. M. 等, 1993, *J. Med. Chem.* 36: 831-834), 2'-O-烯丙基-尿苷、-胞苷、-腺苷和-鸟苷(Beijer, B 等, 1994, 核苷核苷酸, 13: 1905-1927),

2'-脱氧-2'-C-烯丙基-核糖核苷酸, 2'-O-甲基核糖核苷酸 (Sproat, B. S. 和 Lamond, A. I., 1991, 在“寡核苷酸和类似物; 一种实践方法”中, pp49-86, F. Eckstein 编著, 牛津大学出版社, 牛津大学) 以及其它 2'-O-烷基核糖核苷酸 (Sproat, B. S. 等, 1991, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 24: 59-62))、磷酸修饰(如硫代磷酸酯 (Stec, W. I. 等, 1991, *核酸研究*, 19: 5883-5888)、二硫代磷酸酯 (Beaton G. 等, 在“寡核苷酸和类似物; 一种实践方法”中, pp109-136, F. Eckstein 编著, 牛津大学出版社, 牛津大学)、磷酰胺 (Froehler, B., Ng, P. 和 Matteucci, M. D., 1998, *核酸研究*, 16: 4831-4839)、甲基磷酸 (Miller, P. S. 等, 1986, *生物化学*, 25: 5092-5097) 和其它烷基磷酸 (Fathi, R. 等, 1994, *核酸研究*, 22: 5416-5424)) 以及其它主链修饰(如酰胺(包括但不限于 PNA) (Mesmaeker, A. 等, 1994, *Angew Chem., Int. Ed.* 33: 226-229; Egholm, M. 等, 1992, *美国化学会杂志* 114: 1895-1897)、氨基甲酸酯 (Habus, I. Temsamani J. 和 Agrawal, S., 1994, *生物医学化学通讯 (Bioorg. Med. Chem. Lett.)* 4: 1065-1070)、尿素 (Waldner, A. 等, 1994, *Synlett.* 57-61)、胺类 (Caulfield, T. J. 等, 1994, *生物医学化学通讯* 3: 2771-2776)、烯丙基醚 (Cao, X. 和 Matteucci, M. D., 1994, *四面体通讯* 35: 2325-2328)、烯丙基 (Cao, X. 和 Matteucci, M. D., 1994, *四面体通讯* 35: 2325-2328)、烷烃(的 De Mesmaeker, A. 等, 1994, *生物医学化学通讯* 4: 395-398)、吗啉类 (Stirchak, E. P., Summerton, J. E. 和 Weller D. D., 1989, *核酸研究*, 17: 6129-6141) 和胍翁 (Dempsy, R. O., Almarsson 和 Bruice, T. C., 1994, *美国科学院院报*, 91: 7864-7868) (产生聚阳离子寡核苷酸))。此外, 寡核苷酸可以包含碱基修饰、增加官能团(如补内脂

素、生物素或者胆固醇基团和非核苷酸区)的末端和内部修饰。

核酸“w”可以与以如共价键合、离子相互作用、氢键合、碱基配对等之任一方式结合的非氨基酸或者非肽核酸结合基团缔合。正如那些本领域技术人员所易于看出的,非氨基酸或者非肽核酸结合基团“x”的特异性质取决于将要传递的核酸“w”的特异性质。在“w”和“x”之间的缔合清楚地是离子相互作用(其中所说的核酸带整体正电荷)的情况下,结合基团“x”带全部负电荷。

然而,当前优选的是“w”和“x”之间的缔合是离子相互作用或者氢键或者三链体形成。

在核酸“w”结合基团带负电荷的情况下,核酸结合基团“x”可以是阳离子或者任一长度的聚阳离子。在这一实施方案中,核酸结合基团将典型地具有整体正电荷以便由离子相互作用吸引并保持核酸。例如,核酸结合基团可以是如精胺的多胺、聚亚胺或者树状聚合物(dendrimer)。

核酸结合基团“x”或者间隔基“y”也可以包括有利于细胞定向或者亚细胞定位的功能域,如糖、受体配体、多糖或者肽(如核定位信号、抗体或者其如FABs或者SCFVs的衍生物)。这样的功能域可以一前一后地包括在分叉结构中或在其上,作为同源或异源二聚体。

在本发明的另一个实施方案中,核酸结合基团“x”本身是DNA或者RNA的寡核苷酸、修饰的寡核苷酸或它们的混合物或者能够通过碱基配对、三股螺旋形成或者类似的相互作用与核酸“w”结合的PNA分子。

核苷酸是核酸的构件。在它们的最丰富的天然形式中,它们包括具有以共价键附着于1'碳上的疏水含氮碱基(嘌呤、腺嘌呤或者鸟嘌呤、或者嘧啶、胸腺嘧啶(在核糖核苷酸中的尿嘧啶)或者胞嘧啶)

的戊糖(核糖或者 2-脱氧核糖)以及在戊糖的 5' 碳上与游离羟基酯化的磷酸。核酸是连续核苷酸单位的多聚体, 其中一个核苷酸通过该核苷酸的戊糖组分的 3' 羟基和下一个核苷酸的戊糖组分的 5' 羟基之间的磷酸二酯桥同下一个核苷酸连接。虽然在核酸中发现有两种主要糖, 但是本质上任一具体的核酸并不同时含有这两种糖。因此存在有两种核酸, 即核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)。此外, 核酸的共价主链包括交替戊糖和磷酸基团并提供了具有确定极性(从其显示侧链嘌呤和嘧啶碱基)的分子支架。正是该碱基序列, 在与这一极化多聚体一道存在时它们赋予核酸特定性质。

对本发明的这一实施方案来说, 至关重要的核酸性质(或者更具体地说是个体碱基的性质)是碱基能够通过氢键相互配对。一般来说, 腺嘌呤与胸腺嘧啶(在 RNA 中的尿嘧啶)碱基配对, 鸟嘌呤与胞嘧啶碱基配对(互补碱基配对)。其中碱基配对发生在不同核酸分子上的碱基之间, 如果显示有碱基的糖/磷酸主链的极性在两条链中处于相反方向那么就在碱基之间发生适当的相互作用。发生于这些碱基相互作用之中的氢键合提供了一种力, 该力能够加强和稳定不同核酸分子之间的缔合。当与相反极性一致作用时, 这些缔合力取决于相互作用的链的碱基顺序的互补程度。在一种含水溶剂中, 核酸的互补链协同形成具有与溶剂接触的糖磷酸主链和在螺旋中间有疏水碱基堆积的双螺旋或者双链体。因此, 除在所有组合碱基对之间的氢键合力之外, 通过堆积的碱基之间的相互作用产生的伦敦力和疏水效应也用于稳定核酸的互补链之间的缔合。(Saenger, W. 1984, 核酸结构的原理, Springer-Verlag, 纽约)。虽然腺嘌呤-胸腺嘧啶(尿嘧啶)和鸟嘌呤-胞嘧啶碱基对本质上是最普通的, 但是其它碱基配对也能够发生并且仍然极为有助于双链体的稳定(Saenger, 1984, 同上)。

用于核酸合成的化学方法的发展使产生嵌合的 DNA/RNA 分子成为可能。此外，它提供了用交替的碱基和糖以及磷酸基团合成核酸的方法，这些交替基团能够导致在生物体液(参见“寡核苷酸和类似物；一种实践方法”，1991，牛津大学出版社 IRL 出版分社，牛津大学，F.Eckstein 编著)中的这些分子的稳定性改善。此外，也能够合成修饰的氨基酸(其中氨基酸侧链为在核酸中发现的嘌呤与嘧啶碱基所替代)(Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. E. 和 Berg, R. H., 1992, 美国化学会杂志 114: 1895-1897; Egholm, M., P. E. Nielsen, O. Buchardt 和 R. H. Berg, 1992, 美国化学会杂志 114: 9677-9678)。这些蛋白质-核酸分子或者 PNA 也可以通过碱基配对与互补序列的核酸相缔合(Nielsen P. E., Egholm, M., Berg, R. H. 和 Buchardt, O., 1993, 抗癌药研究, 8: 53-63; Hanvey, J. C., Peffer, N. J., Bisi, J. E., Thomson, S. A., Cadilla, R., Josey, J. A., Ricca, D. J., Hassman, C. F., Bonham, M. A., Au, K. G. 等, 1992, 科学, 258, 1481-5; Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S. M., Driver, D. A., Berg, R. H., Kim, S. K., Norden, B. 和 Nielsen, P. E., 1993, 自然, 365, 566-8; Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H. 和 Buchardt, O., 1993, 核酸研究, 21, 197-200)。

当在上述的核酸、修饰的核酸以及 PNA 物种之间的所有相互作用都包括在两个分子之间的相互作用时，由同源嘧啶段核酸组成的核酸能够与携带双链体(包含互补序列同源嘌呤和相同的同源嘧啶段)的区的双链核酸缔合。在这样一种三元复合物中，初始双链体的同源嘌呤同源嘧啶段仍然是反平行的和以正常方式 Watson-Crick 碱基配对的，而侵染的同源嘧啶链适合进入该双螺旋的深大沟中并包含在与聚

嘌呤(包含链)碱基配对的 Hoogsteen 型碱基中。在这样的三股螺旋结构中,侵染的聚嘧啶链的极性是与聚嘌呤链的极性相同的(在 Saenger, W., 1984, 核酸结构的原理, Springer-Verlag, 纽约)。虽然有证据表明与相应的 DNA 第三链相比 RNA 第三链可以更强烈地与 DNA/DNA 双链体结合 (Roberts, R.W. 和 Crothers, D.M., 1992, 科学, 258: 1463-1466), 但有助于三链体的核酸可以是 RNA 或者 DNA。修饰的寡核苷酸也可以用作第三链, 例如 4' -硫代-RNA (Leydier C., Bellon, L. Barascut, J-L., Morvan, F., Rayner, B. 和 Imbach, J-L., 1995, 反义研究和进展, 5: 167-174)。也形成了三链体, 其中所说的第三链包含聚嘌呤的核酸 (Porumb, H., Dagneaux, C., Letellier, R., Malvy, C. 和 Taillandier, E., 1994, 基因, 1494: 101-107)。在这一例子中, 复合物基于具有相反方向碱基的反向 Hoogsteen G(GC) 和 A(AT) 三联体(在括号中的碱基对表明在初始的双链体中存在 Watson-Crick 碱基对)并且所有链都具有 S 型糖构象。

从上述的讨论中可明显地看出各种形式的碱基配对有利于两个核酸分子之间或核酸分子与另一个 PNA 分子之间或者(在特别的情况下)单链核酸与核酸双链体之间的缔合从而形成三股螺旋结构。就一切情况而论, 众所周知结合亲和性取决于同源性的长度、互补性的水平、相互作用的序列的碱基组合物和 pH 以及溶液的离子强度(对于双链相互作用, 参见 Britten, R. J 和 Davidson, E. H., 1985, 在“核酸杂交: 一种实践方法”中, 牛津大学 IRL 出版社, 华盛顿 D.C., Hames, B. D., 和 Higgins, S. J. 编著; Sarnbrook, J., Frirsch, E. F. 和 Maniatis, T., 1989, “分子克隆, 实验室手册”, 冷泉港实验室出版社, Nolan, C. 编著。对于三链体, 参见 Rougee, M., Faucon, B. Mergny, J.L., Barceio, F., Giovannangeli, C., Garestier, T.

和 Helene, C., 1992, 生物化学, 31: 9269-9278; Singlelton, S.F. 和 Dervan, P.B., 1992, 生物化学, 31: 10995-11003; Singieton, S.F. 和 Dervan, P.B., 1992, 美国化学会杂志 114: 6957-6965。对于核酸/PNA, 参见 Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S. M., Driver, D. A., Berg, R. H., Kim, S. K., Norden, B. 和 Nielscn, P. E., 1993, 自然, 365: 566-8; Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. E. 和 Berg, R. H., 1992, J. Am. Chem. 114: 1895-1897)。因此在本发明中, 通过与在所要传递的核酸上的互补单链区的碱基配对或者通过与在所要传递的核酸中的合适的双链序列形成三链体, 具有确定序列性质的单链核酸或者 PNA “x” 基团能够起到作为核酸结合结构域的作用。

对于本领域技术人员来说, 明显的是通过碱基配对与所要传递的分子结合的转染试剂与其它试剂相比具有显著的优点, 在其它试剂中, 经由有利于具有非荷电主链(如 PNA 和非荷电寡核苷酸类似物)的核酸导向治疗剂向细胞传递的电荷相互作用实现结合。

在一个可替的实施方案中, 例如, 在所要传递的核酸(w)是寡核苷酸的情况下, w 能够与 x 基团以共价键连接, 尤其是在 x-接头-亲脂复合物是亚磷酰胺的情况下。

核酸结合基团的另一个例子是以抗生素偏端霉素和纺锤菌素为例子的聚酰胺。通过混合芳香族羧酸和芳香胺以形成新月形三肽来形成偏端霉素的重复酰胺。该三肽结合在双链 DNA 的小沟中(在五个连续碱基对的位点)但是没有显示出可观的与单链 DNA 或者 RNA 的结合。一般认为通过与碱基对的氢键合、范德化接触和静电力的综合作用可实现抗生素与双链 DNA 的结合(Coll, M., Frederick, C. A., Wang A. H. 和 Rich, A., 1987, 美国科学院院报, 84: 8385-8389)。虽然

纺锤菌素和偏端霉素在小沟中结合作为单体，但是高浓度的偏端霉素能够结合作为二聚体(Pelton, J.G. 和 Wemmer, D.E., 1969, 美国科学院院报, 86: 5723-5727)。基于这些观察，包含 *N*-甲基咪唑和 *N*-甲基吡咯氨基酸的在结构上相关的聚酰胺已得到合成并且显示出与 DNA 的小沟结合作为反平行的并行二聚复合物(Mrksich, M., Wade, W.S., Dwyer, T.J., Geierstranger, B.H., Wemmer, D.E. 和 Devan P.B., 1992, 美国科学院院报, 89: 7586-7590)。这样的聚酰胺异源二聚体与同源二聚体的共价连接导致了具有增加的亲和性和特异性的配体设计(Mrksich, M., Parks, M.E. 和 Dervan, P.B., 1994, 美国化学会杂志 116: 7983)。现在能够有效地合成这样的发夹连接的聚酰胺并且可大规模地利用固相合成(Baird, E.E. 和 Dervan, P.B., 1996, 美国化学会杂志 118: 6141-6146)，并且该聚酰胺携带反应末端基团，该基团易于直接或者经由间隔基偶联到本发明的亲脂结构域上。

除那些存在于碱基配对之中的“x”基团外，有能力通过氢键的形成与核酸配合的其它潜在的“x”基团以聚乙烯衍生物为例子，如聚乙烯醇(PVA)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。PVA 和 PVP 都有能力形成氢键以及分别作为氢键供体和受体(Galaev, Y, Garg, N. 和 Mattiasson, 1996, 层析学杂志 A. 684: 45-64; Buhler, V., 1993, Kollidon: 用于药物工业的聚乙烯吡咯烷酮, BASF Ntiengellschaft Feinchemie, Ludwigshafen)。当 PVP 和 PVA 显示出提高大鼠骨骼肌肉的 DNA 吸收时，PVP 尤其显示出与 DNA 相互作用并且保护其免于核酸酶化学侵蚀(Mumper, R.J., Duguid, J.G, Anwer, K., Barron, M.K., Nitta, H. 和 Rolland, A.P., 1996, 药物学研究, 13: 701-709)。当经由间隔基组分与亲脂结构域偶联时，乙烯醇和乙烯基吡咯烷酮的更短寡聚体

能结合核酸并且有利于细胞对它的吸收。经常通过以碱水解聚乙烯乙酸盐产生 PVA。当 PVA 或者寡乙烯醇(寡 VA)的醇基团是比较非活性时,通过在部分水解的寡 VA 上的活性乙酸盐基团能够实现连接。利用类似的原理,如果通过使如聚氯乙烯(或者寡聚氯乙烯)的化合物与吡咯烷酮反应来产生 PVP(或者寡乙烯吡咯烷酮(寡 VP)),那么就能够通过在不完全衍生的 PVP(或者寡 VP)产物上的剩余氯基团实现与本发明中的间隔基团的偶联。

把核酸结合基团“x”与接头的氨基连接的间隔基“y”(例如 Tris)可以是一些本领域所熟知的任一分子。间隔基的性质将取决于可供使用在核酸结合组分上的活性基团。“y”间隔基的例子是:

1. 在具有氨基的“x”基团和接头的氨基之间

a) 一个具有羧基对“x”组分和羧基对氨基的间隔基,例如经由酸酐(如琥珀酐、马来酐等)的羧酸。

b) 一个具有羧基对“x”组分和醛基对氨基的间隔基,例如乙醛酸(存在还原剂,如 NaBH_4)或者反之亦然。

c) 一个具有羧基对“x”组分和卤化物对氨基的间隔基,例如氯乙酸或者反之亦然。

d) 一个具有卤化物基团对“x”和磺酸基团对氨基的间隔基,例如 2-溴乙烷磺酸或者反之亦然。

e) 一个具有氯甲酸酯基团对“x”和卤化物基团对氨基的间隔基,例如溴乙基氯甲酸酯或者反之亦然。

f) 一个具有卤化物基团对“x”和卤化物基团对氨基的间隔基,例如 1, 2-二溴乙烷。

g) 可能合适的在“x”基团与酰胺基团和氨基之间的间隔基的其它例子包括以丙烯酸为例子的化合物系列。

2. 在具有羟基的“x”基团和接头的氨基之间

a) 一个具有羧基对“x”基团和羧基对氨基的间隔基，例如经由酸酐(如琥珀酐、马来酐等)的羧酸。

b) 一个具有羧基对“x”组分和醛基对氨基的间隔基，例如乙醛酸(存在还原剂，如 NaBH_4)。

c) 一个具有羧基对“x”组分和卤化物对氨基的间隔基，例如氯乙酸。

b) 一个具有羧基对“x”组分和 $\text{N}=\text{C}=\text{O}$ 基团对氨基的间隔基，例如乙基异氰酰乙酸酯。

3 在具有巯基的“x”基团和接头的氨基之间

a) 一个具有羧基对“x”基团和羧基对氨基的间隔基，例如经由酸酐(如琥珀酐、马来酐等)的羧酸。

b) 一个具有羧基对“x”组分和醛基对氨基的间隔基，例如乙醛酸(存在还原剂，如 NaBH_4)。

c) 一个具有羧基对“x”组分和卤化物对氨基的间隔基，例如氯乙酸。

b) 一个具有羧基对“x”组分和 $\text{N}=\text{C}=\text{O}$ 基团对氨基的间隔基，例如乙基异氰酰乙酸酯。

4 在具有游离羧基的“x”基团和接头的氨基之间

a) 一个具有氨基至“x”组分和羧基对氨基的间隔基，例如氨基酸或者抗生素。

b) 一个具有氨基至“x”组分和磺酸基团对氨基的间隔基，例如2-氨基乙烷磺酸(牛磺酸)。

c) 一个具有羟基至“x”组分和羟基对氨基的间隔基，例如乙醇酸、乳酸等。

d) 一个具有羟基至“x”和和磺酸基团对氨基的间隔基, 例如 2-羟基乙烷磺酸。

e) 一个具有羟基至“x”组分和活性卤化物对氨基的间隔基, 例如 2-氯乙醇。

f) 可能合适的化合物与活性羧基和氨基之间的间隔基的其它例子包括以对羟基苯甲醛、2-氯乙酸、1, 2-二溴甲烷和环氧乙烷为例子的化合物系列。

正如以上描述所清楚表明的, 间隔基“y”可以不存在, 然而优选的是分子确实包括间隔基“y”。正如以上所说明的, 间隔基可以是本领域所熟知的一些分子之任一。然而, 当前优选的是间隔基具有等于 3 至 17 个碳原子的链长。关于这一点, 特别优选的是间隔基是氨基丁酸、氨基己酸、氨基辛酸、氨基十一酸或者氨基辛酸和氨基十一酸的二肽。

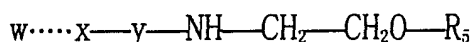
在本发明的优选实施方案中, R_1 、 R_2 和 R_3 是烷基、羟烷基或者链烯基。优选的烷基来源于 1-溴十一烷、1-溴十三烷或者 1-溴十六烷。优选的羟烷基来源于 11-溴代-1-十一醇、13-溴代-1-十三醇或者 16-溴代-1-十六醇。优选的链烯基来源于 7-十二碳烯-1-, 11-十四烯-1-, 11-十六碳烯-1-或者十八碳烯对甲苯磺酸酯。这些基团可以经由醚键与接头偶联。

在进一步优选的实施方案中, R_1 、 R_2 和 R_3 是酰基并且具有长为 3-24 个碳原子的饱和或不饱和碳链。这些基团可以通过包含酰基的酯键与接头偶联。

在本发明的其它进一步优选的实施方案中, R_1 、 R_2 和 R_3 是相同的并且优选的是脂肪酸(包括由棕榈酸、豆蔻酸、月桂酸、癸酸和油酸组成的组)的胆固醇或者酰基衍生物。

虽然上述化合物被描述为利用氨基三丁醇来使间隔基(并通过核酸结合结构域以及从此时起通过核酸本身)与 1-3 亲脂基团偶联,但是对于本领域技术人员来说明显的是通过乙醇胺衍生物也能够实现类似的偶联(其中要求仅仅利用脂肪酸的一种酰基衍生物)。

因此,在第三方面,本发明包括这样一种用于将核酸引入细胞的方法,该方法包含使细胞暴露于具有下式的化合物:



其中:

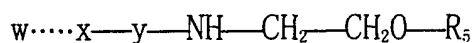
w 是核酸

x 是非氨基酸或者非肽核酸结合基团

y 是具有等于 1-30 个碳-碳单共价键的链长的间隔基或者不存在

R_5 是烷基、链烯基、羟基化烷基、羟基化链烯基或者包含烷基、链烯基、羟基化烷基或羟基化链烯基的醚,任选地是具有等于 3-24 个碳原子的饱和或不饱和碳链的链长的酰基,其条件是 R_5 包括具有长为 3-24 个碳原子的饱和或不饱和碳链的基团。

在第四方面,本发明包括用于将核酸引入细胞中的这样一种化合物,该化合物具有下式:



w 是核酸

x 是非氨基酸或者非肽核酸结合基团

y 是具有等于 1-30 个碳-碳单共价键的链长的间隔基或者不存在

R_5 是烷基、链烯基、羟基化烷基、羟基化链烯基或者包含烷基、链烯基、羟基化烷基或羟基化链烯基的醚,任选地是具有等于 3-24 个碳原子的饱和或不饱和碳链的链长的酰基,其条件是 R_5 包括具有长为 3-24 个碳原子的饱和或不饱和碳链的基团。

本发明的方法和化合物可以用于传递包括 DNA、RNA、寡核苷酸(或者整个 DNA 或 RNA 或者其嵌合体)以及修饰的寡核苷酸在内的核酸进入培养物(包括动物或者植物源的建立的细胞系和动物或者植物源的原代细胞)中的真核细胞。关于传递到植物细胞和哺乳动物细胞系,可参考 EP0424688, 该参考文献公开的内容本文一并参考。由于植物能够从培养物中的原生质体再生, 因此本方法也提供了包含所传递的核酸的整个植物的产物。它也能够用来引入这样的核酸到整个动物中。向哺乳动物宿主的引入可以是数种途径之任一, 这些途径包括但不限于静脉注射或者腹膜内注射、气管内、鞘内、肠胃外、关节内、肌肉等途径。

一般而言, 本发明的方法包括以本质上含水的混合物形式将上述组合物应用于感兴趣的细胞的表面。然而, 在整个有机体的情况下, 必须通过局部的或者系统的注射、表面地或者以吸入方式以本质上无水形式应用上述组合物。

脂质传递剂可以包含多层孔 (MLV)、小单层孔 (SUV)、大单层孔 (LUV) 或者相关结构。为了制备 LUV 和 MLV, 将含水材料与干燥的脂质薄膜混合并旋涡搅拌(而非超声搅拌)该混合物。通过大小分级聚碳酸酯过滤器挤压这些混合物可以产生大小更均匀的传递微粒。由 MLV 的扩展超声处理可以产生 SUV, 如此则产生单层传递微粒的均相群体。一般用来制造脂质传递微粒的方法包括: 醚注射 (Deamer, D. 和 Bangham, A., 生物化学生物物理学学报, 1976, 443: 629; Ostro 等, 生物化学生物物理学研究通讯, 1977, 76: 836; Fraley 等, 美国科学院院报, 1979, 76: 3348)、 Ca^{2+} -EDTA 螯合作用 (Papahadjopoulos 等, 生物化学生物物理学学报, 1975, 394: 483; wilson 等, 细胞, 1979, 17: 77)、去污剂透析 (Enoch, H. 和

Strittmatter. P., 美国科学院院报, 1979, 76: 145) 以及反相蒸发 (REV) (Fraley 等, 生物化学杂志, 1980, 225: 10431; Szoka, F. 和 Papahadjopoulos, D., 美国科学院院报, 1978, 75: 145; Schaefer-Ridder 等, 科学, 1982, 215: 166)。PCT/AU95/00505(其通过参考并入本文)中也描述了用于制备多孔结构(由阳离子肽/脂肪酰基缀合物形成)和适合于转染的其它方法。

为了能够在适当的条件下形成阳离子脂质体, 可能必须包括中性脂类的加入。用如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、DOPC(二油酰基磷脂酰胆碱)或者胆固醇的中性脂质由标准方法可形成本发明的脂质体, 一般认为这样的形成将增加本发明有利于将化合物传递进细胞的能力。特别可能的是其中本发明的亲脂基团的数量是 2。用于形成脂质体的方法已在有关文献中得到描述, 例如 Felgner, P.L. 等, 1987, 美国科学院院报, 84: 7413-7417; Yago, K. 等, 1993, 生物化学生物物理学研究通讯, 196: 1042-1048 和 Campbell, M.J., 1995, 生物技术, 18: 1027。

本发明的主要应用将是作为基因治疗传递剂, 其中预期它将有用于细胞对核酸的体内吸收(通过以遗传方式操纵的细胞向身体的尔后返回)或者体外吸收(通过患者的组织对核酸的直接吸收)。关于基因治疗的其它信息可以在 Nabel 等, 1993, 美国科学院院报, 90: 11307-11311 中发现, 该文献公开的内容本文一并参考。也预期本发明将在转基因动物和植物的产生、基因免疫接种(有利于改善组织的细胞对编码所需要的抗原的核酸的吸收和表达, 并伴随着尔后的免疫反应被提高至所表达的抗原水平上, 其中核酸/传递化合物复合物应用于所说的组织的细胞中)和基因置换(经由同源重组)中发现重要的用途。

利用这一方法能够形成具有 1-3 个亲脂基团的各种可能的两亲性缀合物。为了能够更清楚地理解本发明的性质，现在将描述前导化合物的合成实例，其中除用于评估它们的转染活性的方法外，还包括评估前导化合物活性的实验实例。

附图简要描述：

图 1

该图概述 BOC 保护的精胺中间体的合成，该中间体用于提供前导化合物 SpSucTL3 的 DNA 结合结构域。这一合成在正文中得到详尽描述。

图 2

该图概述如正文中所详尽描述的 OSU-Suc-TL3 结构单元的合成。当与保护的精胺化合物(图 1)偶联时，这一化合物产生前导化合物 SpSucTL3。

图 3

该图概述以如图 1 所概述的方法产生的二-BOC-精胺化合物与以如图 2 所概述的方法产生的 Suc-TL3 的活化酯的偶联，结果导致前导化合物 SpSucTL3 的产生。这一偶联在正文中得到详尽描述。

图 4

该图概述 Suc-TL3 亚磷酰胺的合成，该亚磷酰胺能够用于寡核苷酸合成仪从而产生其中核酸结合结构域本身就是核酸的转染试剂。这一合成在正文中得到详尽描述。

图 5

该图描述 pCI β -Gal 质粒的主要特性，该质粒在实施例所描述的转染实验中用作为报道基因构建体。CMV IE 是来源于人巨细胞病毒的

立即早期启动子, β -Gal 是大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因, SVPA 是来源于 SV40 的聚腺苷酸化信号, Amp^r 表示编码对抗生素氨苄青霉素抗性的基因。峰结构表示包括在 pCI 载体中用来提高转基因表达的复合内含子的位点。指出了一些限制酶位点的近似位置。以粗体和下划线指出用于克隆 β -半乳糖苷酶基因进入 pCI 载体的 Xbo I 与 Xba I 位点的位置。该图没有按比例绘制。

图 6

该图显示用我们的前导化合物 SpSucTL3 所达到的峰转染水平, 并且将其与用商业试剂脂质转染胺所达到的峰转染水平比较(图 B)。在这些相同条件下处理的细胞的相对生存力显示在图 A 中。由如转染性质的评估的方法和材料部分, 转染, 实施例 4 中所描述的微量滴定盘分析利用两种试剂使 pCI β -Gal 转染进入细胞。在每一图中的数据表示来源于两个独立实验的平均值。在所有情况下的误差线显示上述平均值的标准误差。

化学合成

所使用的缩写:

BOC = 叔丁氧羰基

DCCD = 二环己基碳二亚胺

DCM = 二氯甲烷

DLEA = 二异丙基乙胺

DMAP = 二乙基氨基吡啶

DMF = *N,N*-二甲基甲酰胺

HOSU = *N*-羟基琥珀酰亚胺

HPLC = 高效液相层析

Suc = 琥珀酸

TFA = 三氟乙酸

THF = 四氢呋喃

Tris = 2-氨基-2-羟基-甲基-1, 3 丙二醇

Z = 苄氧羰基

所利用的方法:

薄层层析法(TLC)

在下列溶剂系统中的 Alufolein 硅胶 60 F254 平板(Merck)上完成薄层层析分析: DCM/MeOH = 97/3 (R_f^1), 氯仿/MeOH = 65/35 (R_f^2), DCM/MeOH/DIEA = 98/2/1 (R_f^3)。

高效液相层析(HPLC)

在 MilliporeWaters HPLC 设备 (Waters Chromatography Division of Millipore, Milford, MA)上实现分析型 HPLC, 该设备包括具有自动梯度控制器的 6000A 系列溶剂输送系统以及 Model 746 数据模块。用 NOVAPAK™ C₁₈ 反相柱(100x8 mm)实现层析分析。在 2ml/min 流速下在 5 分钟之内由 24 至 80 %的乙腈(具有 0.1% TFA)线性梯度洗脱(系统 A)分析肽和肽-Tris 缀合物。利用 Waters Lambda Max 480 在 260 nm 实现检测; (R_t^A)。

在 2ml/min 流速下在 5 分钟之内用 40 %水、50 %乙腈和 10% THF 至 50 %乙腈、50 % THF(具有 0.1% TFA)的线性梯度(系统 B)在 C₁₈ 柱上分析脂肽缀合物; (R_t^B)。

制备型 HPLC

在 20 ml/min 流速下利用 PrePak C₁₈ 反相柱(100x40 mm)在 Millipore Waters DeltaPrep 4000 HPLC 上实现分离, 该反相柱由具有与上述用于分析 HPLC 一样的洗脱缓冲液系统的线性梯度洗脱。

核磁共振(NMR)

用 200 MHz Bruker 分光光度计记录 NMR 光谱。

实施例 1

用于制备精胺-Suc-Tris-三月桂酸酯的方法

N⁴-N⁹-二-BOC-精胺的制备

用以下所描述的 3 个步骤合成这一化合物，该步骤如同 Goodnow 等(1990)四面体 46: 463267-3286 所报道的一样并具有如图 1 所示的一些修改。

步骤 1: N, N' (二氨基丁基)-二乙基脒(1)的制备

在 0°C 下在 5 ml MeOH 中的二氨基丁烷(4.38 g, 48.8 mmol)中加入丙烯腈(3.9 g, 73.5 mmol)，并搅拌上述反应混合物 5 小时。使溶剂蒸发至干，并由用氯仿/MeOH 以逐渐增加的 MeOH 比例洗脱的硅胶闪烁层析法纯化油渣从而获得 2.1 g 的上述标题化合物(R_f²=0.4)。这一化合物的结构由 ¹HNMR 确定。

步骤 2: N, N' -二-BOC-(二氨基丁基)-二乙基脒(2)的制备

将化合物 1(2 g, 10.3 mmol)溶解在 15 ml DCM 中。其中加入 BOC-酸酐(4.5 g, 20.6 mmol)并在室温下搅拌反应混合物 3 小时。然后用碳酸氢钠和水洗涤上述反应混合物并在 MgSO₄ 上干燥有机相，然后使之蒸发至干从而获得 4.2 g 上述标题化合物(R_f¹=0.8)。这一化合物的结构由 ¹HNMR 确定。

步骤 3: N₄, N₉-二-BOC-精胺(3)的制备

在 10 ml 二乙基醚中的 560 mg 化合物 2(1.4 mmol)中，在 0°C 下加入 Li Al H₄ (0.19 g, 在二乙基醚中的 5 ml 1 M 溶液)并在 0°C 下搅拌反应混合物 1 小时。在 0°C 下通过加入 1N NaOH 猝灭过量 Li Al H₄。

过滤沉淀并用水洗涤滤液。在 MgSO_4 上干燥有机层并使之蒸发至干从而获得 270 mg 上述标题化合物。这一化合物的结构由 ^1H NMR 确定。

OSU-Suc-Tris-三月桂酸酯的制备

这一过程的步骤 5 在图 2 中得到概述。

步骤 1: Z-Tris(4) 的制备

在 30 ml 乙腈中的 Z-OSU 溶液(4.98 g, 20 mmol)中, 加入在 20 ml 水中的 Tris (6.6 g, 60 mmol)。搅拌反应混合物为 1 小时以获得 82% 的由 HPLC (R_t^A : 24) 确定的 Z-Tris。使溶剂蒸发至干, 将残渣再溶解在乙酸乙酯中并用水洗去过量的 Tris。在硫酸钠上干燥有机层, 并使之蒸发至干从而给出 3.2 g 的由 ^1H NMR 确定的纯 Z-Tris。

步骤 2: Z-Tris 三月桂酸酯(5) 的制备

使 Z-Tris(2.8 g, 10.9 mmol) 溶解在 6 ml DMF 和 30 ml DCM 中。在反应混合物中加入 DCCD (6.57 g, 32.7 mmol) 和月桂酸(6.56 g, 32.7 mmol) 以及催化量的 DMAP 并将其搅拌一夜。在 16 小时的反应之后, HPLC 显示出 49% 产率的上述标题化合物的形成, 同时有 41% 二月桂酸酯和 10% 单月桂酸酯。蒸发溶剂至干并使残渣再溶解在 DCM 中。过滤二环己基脲(DCU) 沉淀并用碳酸氢钠(5%) 和水洗涤滤液。混合物的制备型 HPLC 产生高纯度的上述标题化合物(3.5 g, R_t^B : 9.26)。

步骤 3: Tris-三月桂酸酯(6) 的制备

将 Z-Tris-三月桂酸酯(3.4 g, mmol) 溶解在 DCM/甲醇(50/50, 60 ml) 中, 并利用 10% 钯/碳在帕尔氢化器中在 40 psi 下氢化 3 小时以除去 Z 基团。过滤钯/碳并蒸发滤液至干燥从而获得 2.2 g 上述标题化合物。由 HPLC 和 ^1H NMR 光谱确定 Z 基团的除去。

步骤 4: Suc-Tris-三月桂酸酯(7) 的制备

将 Tris-三月桂酸酯(1.5 g, 2.24 mmol) 溶解在 20 ml DCM 中。

在反应混合物中加入琥珀酸酐(0.45 g, 4.49 mmol)和 DIEA (382 ml, 2.24 mmol), 然后在室温下搅拌上述反应混合物一夜。反应之后是 TLC ($R_f=0.42$)。用水洗去过量琥珀酸酐。蒸发 DCM 至干燥从而获得 1.9 g 的由 ^1H NMR 确定的上述标题化合物。

步骤 5: OSU-Suc-Tris-三月桂酸酯(8)的制备

将 Suc-Tris-三月桂酸酯(1 g, 1.3 mmol)溶解在 8 ml DCM 中。加入 DCCD (0.268, 1.30 mmol)和 HOSU (0.224, 1.95 mmol)并搅拌反应混合物 16 小时。反应混合物的 TLC 显示出上述标题化合物的定量形成($R_f=0.50$)。过滤 DCU, 蒸发滤液至干燥并将其用于其后的偶联而无需进一步纯化。

N^1 -(N^{12} -Z, N^4 , N^9 -二-BOC-精胺)Suc-Tris-三月桂酸酯(10)的制备

在 5 ml DCM 中的化合物 3 (67 mg, 0.168 mmol)溶液中, 加入在 8 ml DCM 中的化合物 8 (0.168 mmol), 通过加入 DIEA 将反应混合物的 pH 调整至 8。搅拌反应混合物一夜从而获得化合物 9。加入 Z-OSU (80 mg, 0.32 mmol)至上述反应混合物中并再搅拌 2 小时从而获得上述标题化合物 10。

上述混合物的制备型 HPLC 产生 12 mg 纯化合物 10, 其余组分是具有化合物 7 和化合物 9 的上述标题产物的混合物。上述标题化合物的结构由 ^1H NMR 确定。

N^1 -精胺-Suc-Tris-三月桂酸酯(11)的制备

将化合物 10 溶解 3 ml (DCM/MeOH=50/50)中, 并利用 10%钯/碳在帕尔氢化器中在 40 psi 下氢化 2 小时以除去 Z 基团。Z 基团的除去由 HPLC 确定。然后过滤钯/碳并蒸发滤液至干燥。Z 基团的除去由 ^1H NMR 光谱确定。将残渣再溶解在 0.5 ml DCM 中并冷却至 0°C。加入 TFA (0.5 ml), 并在 0°C 下搅拌反应混合物 10 分钟以及在室温下搅拌 30 分钟。

蒸发 TFA 和 DCM 至干燥，并冷冻干燥残渣从而获得上述标题化合物。

按照以上所描述的方法，只需稍微改进就能够合成具有不同长度的多胺、不同种类间隔基和不同类型脂酰基的其它类似物。

实施例 2

用 DNA 5'末端中的亚磷酰胺接头制备 DNA-Tris-三月桂酸酯缀合物的方法

这一合成概述在图 4 中。

OSU-Suc-Tris-三月桂酸酯的制备

如实施例 1 所示合成这一化合物。

Hex-Suc-Tris-三月桂酸酯(12)的制备

这一合成概述在图 4 中。

在 20 ml DCM 中的 1.3 mmol OSU-Suc-Trjs-三月桂酸酯溶液中，加入 6-氨基-己醇(152 mg, 1.3 mmol)并搅拌反应混合物一夜。蒸发溶剂至干，将残渣再溶解在 DCM 中并用硅胶闪烁层析柱(由 DCM/MeOH 利用逐渐增加比率的 MeOH 洗脱)纯化。获得 400 mg 上述标题化合物(R_f^3 : 0.28)，其结构由 ^1H NMR 确定。

亚磷酰胺-Hex-Suc-Tris-三月桂酸酯(13)的制备

将化合物 12 (160 mg, 0.189 mmol)溶解在 3 ml 干 THF 中，在反应混合物中加入氯代二异丙基氰乙氧基磷化氢(89 mg, 0.380 mmol)和 DIEA (96 μ l)。在氮条件下搅拌 2 小时。然后蒸发溶剂至干，并用硅胶闪烁层析柱(由 DCM/MeOH 利用逐渐增加比率的 MeOH 洗脱)纯化残渣。获得 98 mg 上述标题化合物(R_f^3 : 0.3)，这一化合物的结构由 ^1H NMR 确定。

DNA-Tris-月桂酸酯缀合物的制备

将亚磷酰胺-Hex-Suc-Tris-三月桂酸酯溶解在 DCM 中，如同亚磷酰胺核苷一样利用它，并与在最后的偶联环中的支持体结合 DNA 的 5' 末端偶合。氨切割和脱保护可以给出在溶液中的脂肪酸-DNA 缀合物。

实施例 3

用在 3' 或者 5' 末端任一中的氨基接头制备 DNA-Tris-单、二和三月桂酸酯缀合物的方法

巯基乙酸酯-单、二和三月桂酸酯的制备

当 DCC 存在时可以用 HOSU 激活巯基乙酸。然后能够使活化的酯与在 DMF 溶液中 Tris 偶联。然后可以用乙酸乙酯提纯。在存在 DCC 的情况下可以用月桂酸酰化这一产物从而给出标题产物的混合物。然后由硅胶层析法(具有利用有机溶剂的洗脱)可以分离上述三种化合物。

DNA-碘代-乙酰的制备

当 DCC 存在时能够用 HOSU 激活碘乙酸。然后能够使这一活化的酯与在 DNA 的 3' 或者 5' 末端中的氨基接头偶联；氨基接头基团可以由市售的氨基连接臂试剂附着于 DNA 的 3' 或者 5' 末端之任一上。然后在阴离子交换柱上纯化产物。

DNA-乙酰基-甘醇酸酯-Tris-月桂酸酯的制备

在制备 DNA 碘代乙酰之后，能够立即使 DNA-碘代-乙酰具体地与巯基乙酸酯-月桂酸酯的巯基偶联。然后能够由反相 HPLC 纯化产物。

转染性质的评估

所使用的缩写：

B-Gal = β -半乳糖苷酶(来源于大肠杆菌)

CAT = 氯霉素乙酰转移酶

CHO = 中国仓鼠卵巢细胞

Cos1 = 携带 SV40 病毒的大 T 抗原的非洲绿猴肾细胞。

DME = Dulbecco 改进的 Eagles 培养基

DMSO = 二甲基亚砷

DPBS = Dulbecco 的磷酸缓冲盐溶液

EMEM = Eael 改进的 Eagles 培养基

FCS = 胎牛血清

h = 小时

lacZ= 编码大肠杆菌 β -半乳糖苷酶的基因

min = 分钟

MTS = 3-(4, 5-二甲基噻唑 2-基)-5-(3-羧甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑, 内盐

PBS = 磷酸缓冲盐溶液

PMS = 吩嗪硫酸甲酯

PGK = 磷酸甘油酸激酶

x-Gal = 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷

实施例 4

由前导化合物 SpSucTL3 转染培养细胞

使用的方法和材料:

化合物和核酸

如上所述合成前导化合物 SpSucTL3(精胺-琥珀酸间隔基-Tris-三月桂酸酯)。将该化合物以 20 mM 溶解在乙醇中, 并用等量的无菌

水稀释以提供 10 mM 在 50%乙醇中的贮存液。随着旋涡搅拌将该 10 mM 贮存液进一步稀释在无菌水中以产生 2 mM 工作原液。市售的阳离子脂质转染试剂脂转染胺试剂(GIBCO/BRL)用作为正对照。

为了检验前导化合物 SpSucTL3 的转染性质,利用了整个的未切割的 pCI β -Gal 质粒,该质粒携带在巨细胞病毒立即早期启动子的控制之下的大肠杆菌 β -半乳糖苷酶报道基因。为了产生报道基因表达盒,首先把来源于 pSVGAL (Sleigh, M. J. 和 Lockett, T. J., 1985, EMBO J. 4: 3831-3537)的大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因作为 Hind III-Bam HI 片段克隆进 Bluescript SK+ (Clontech)从而产生 Bst β -Gal。然后从 Bst β -Gal 上切除上述报道基因作为 Xbo I-Xba I 片段并克隆其进 Xbo I-Xba I 切割的 pCI (Clontech)中从而产生图 5 所示的表达质粒。

转染方案

在把报道基因盒引入细胞之后第 48 小时,通过测量存在于细胞中的报道基因产物(β -Gal 活性)的水平来测定转染率。为了完成该测定,用在 EMEM、10% FCS 中的 1×10^4 个 CHO 细胞接种在微量滴定平皿中的 8 $\times$ 9 序列孔的每孔,并且使之贴壁一夜。第二天,在新的微量滴定盘中,通过放入 250 μ l EMEM(包含 4.0 μ g pCI β -Gal 质粒)在平板的顶层九孔之每孔中来建立 DNA 稀释平板。立即在包含孔的 DNA 之下的七行九孔中加入 EMEM (125 μ l)。然后在两个重复步骤中对全部七行包含培养基的孔连续稀释 DNA,结果产生具有八行孔的平板,其中任一所给出的行的所有孔具有等量的 DNA。按照类似方法,也可制备转染试剂稀释平板。在新微量滴定平板的最左边列的八孔中,以 168 μ M 加入包含转染试剂(SpSucTL3 或者脂转染胺试剂)的 120 μ l EMEM。在孔的邻近八列的八孔中,加入 60 μ l DME。然后在两个重复步骤中对全部

七列包含培养基的孔连续地稀释转染试剂，结果产生具有八列的孔，其中任一列给出的列的所有孔包含等浓度的所要检验的转染试剂并且最后一个列不包含任一试剂。然后通过把包含培养基的 60 μ l DNA 从上述 DNA 稀释平板的每行的孔中转移到转染试剂稀释平板的相应行，叠加 DNA 和转染试剂稀释矩阵。可以也可以不将平板摇动 1 分钟。在混合之后，使携带结合试剂和 DNA 的平板在室温下保持 10 分钟从而有利于转染复合物在应用到细胞中之前形成。用 EMEM 洗涤细胞一次，然后将转染基质转移到细胞平板上，每孔混合 100 μ l 适当的 DNA/试剂。在 37 $^{\circ}$ C、95%湿度(在 5% CO₂中)条件下培养平板 4 小时。然后在每孔中加入 EIMEM、10% FCS (100 μ l)并培养平板一夜。次日早晨，用新鲜 EMEM、10% FCS 取代上述培养基，将平板放回培养箱，培养 48 小时(表达时间)。

毒性分析

作为每个转染研究的一部分，本发明利用 MTS 测定法在分析报道基因表达之前检验与核酸结合的检验化合物的毒性。以 20:1 比例新混合 MTS (Promega) (在 DPBS 中的 2 mg/ml)和 PMS (Promega) (在 DPBS 中的 0.92 mg/ml)，并在微量滴定板的每一检验和对照孔中每 100 μ l 培养基加入 20 μ l 该混合物。然后在标准条件(37 $^{\circ}$ C，95%湿度和 5% CO₂)下将培养物再培养 0.5-2 小时。然后通过利用平板读数器计算所有样品和对照在 A490(检验)与 A655(参照)读数之间的差别来测定细胞生存力，该读数器已知存活细胞的数量与这种差别的大小之间的关系。

经由报道基因表达测量转染活性

首先除去包含 MTS 的培养基并用 PBS 洗涤细胞 1 次。为了进行 β -Gal 测定，通过加入 50 μ l 裂解缓冲液(0.1%曲通 X-100, 250 mM

pH8.0)裂解每孔中的洗涤的细胞。密封平板，使之在-70℃下冻结，解冻并在每孔中加入 50 μ l PBS、0.5%BSA。为了量化 β -Gal 活性，在每孔中加入 150 μ l 在缓冲液中的底物(1 mg/ml 氯酚红半乳糖苷(Boehringer Mannheim)，在 60 mM 磷酸钠缓冲液 pH 8.0、1 mM MgSO₄、10 mM KCl、50 mM 2-巯基乙醇中)，并使颜色在室温下显现 1 分钟至 24 小时。通过读取每孔的 A570 读数并把它与那些由已知系列的 β -Gal 标准产生的读数比较来测定活性。

所获得的结果显示在图 6 中。图 6A 显示出 SpSucTL3 和脂转染胺在那些其中它们显示最大转染活性(对于脂转染胺的为 21 μ M 脂质，0.25 μ g 质粒；对于 SpSucTL3 为 21 μ M 脂质，0.5 μ g 质粒)的孔中都显示类似水平的毒性。图 6B 显示出 SpSucTL3 能够有效地把报道基因构建体引入培养细胞。当这一活性稍低于用脂转染胺所观察到的活性时，对于本领域技术人员来说明显的是 SpSucTL3 表示新系列的相关化合物的前导化合物。通过使疏水结构域的长度、数量和化学性质，间隔基的长度和性质以及核酸结合结构域的大小、电荷、性质和键系统交替变化和/或通过用中性脂类形成，有可能合成可大大改善核酸传递性能而不改变本申请所描述的分子设计的基本特征的试剂。通过在转染复合物形成时包括进具有核酸和试剂的聚阳离子，也有可能提高这些试剂的转染性能，该转染复合物如同以前所描述的一些阳离子脂质体(Gao, X. 和 Huang, L., 1996, 生物化学, 35: 1027-1036)。

虽然不知道 SpSucTL3 提高细胞的转染的确切机理，又由于它是阳离子脂质，但我们假定它通过提供脂质包被的电荷相互作用与核酸相互作用，如同 Gershon 等(Gershon, H. 等, 1993, 生物化学, 32: 7143)所提出假设一样，该包被将有利于它们的细胞吸收。

除传递包含基因表达盒的核酸之外，本发明的转染试剂也能用来

传递寡核苷酸(不论其是否包含 RNA、DNA、保护的核苷酸或者它们的混合物)进入细胞。转染试剂能够传递这样的核酸进入细胞的效率能够通过由任一本领域所熟知的方法标记寡核苷酸来测定,所说的标记方法包括但不限于利用放射性、荧光标记、生物素和地高辛配基。例如,当要利用荧光标记的寡核苷酸测量利用具体试剂由寡核苷酸转染的细胞的比例时,可以使用下列的方法。简言之,将 8×10^4 个 Cos1 细胞 (5×10^4 个 CHO 细胞)接种在 DME(对于 Cos1 细胞)或者 EMEM(对于 CHO 细胞)、10% FCS 中的 24 孔平板中的条状盖板上,并在 37°C 下在 $250\mu\text{l}$ CO_2 /空气中培养从而使得细胞可以附着。将荧光标记的寡核苷酸(1- $20\mu\text{M}$, 在 $250\mu\text{l}$ 培养基中)与转染试剂(SpSucTL3 或者脂转染胺, 0.25、0.5 或者 $1\mu\text{l}$ 的 2 mM 原液, 在 $250\mu\text{l}$ 培养基中)混合,并使之在室温下保持 15 分钟。然后用无血清培养基洗涤细胞 1 次,并在孔中加入 $500\mu\text{l}$ 不同转染混合物。然后在 37°C 、95%湿度条件下在 5% CO_2 中培养平板 4 小时。在培养之后,除去培养基,并用 PBS 洗涤细胞 1 次。从孔中撤走条状盖板并将其安装在 PBS 中,通过共焦点扫描激光显微术检测条状盖板获得包含荧光标记的细胞的比例。

本领域一般技术人员清楚的是,可以制备许多变体和/或修饰物用于由具体实施方案所显示的本发明,而不改变所广泛描述的本发明的精神与范围。

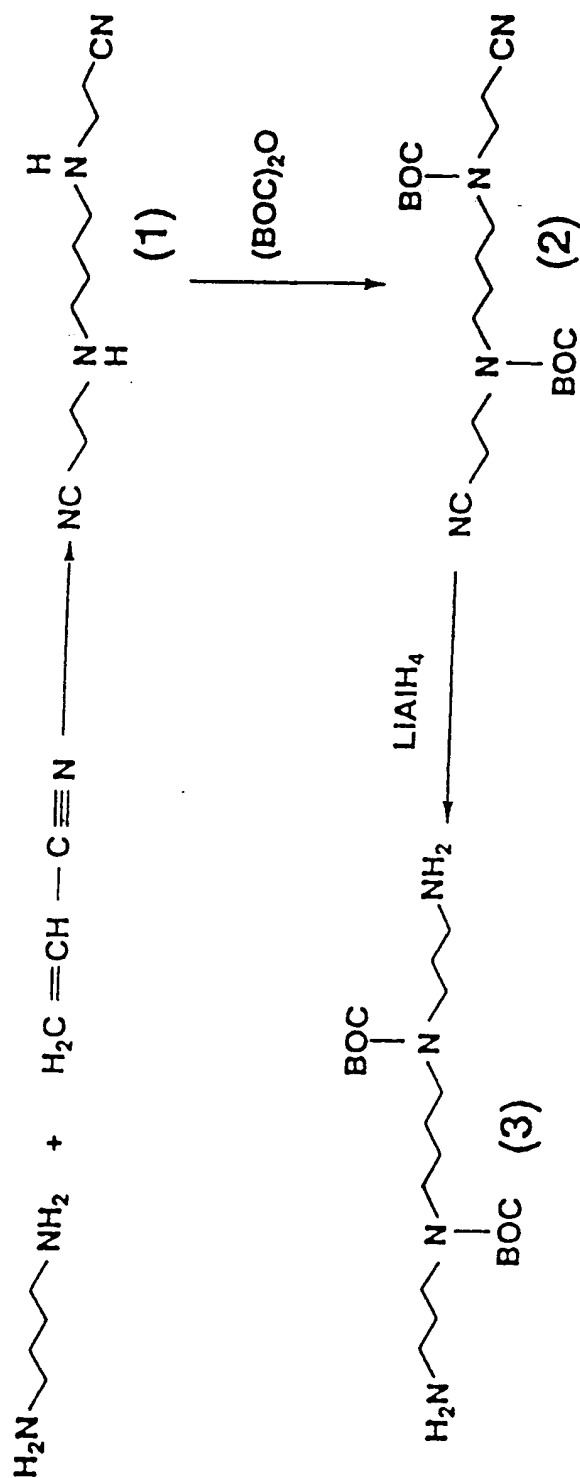


图1

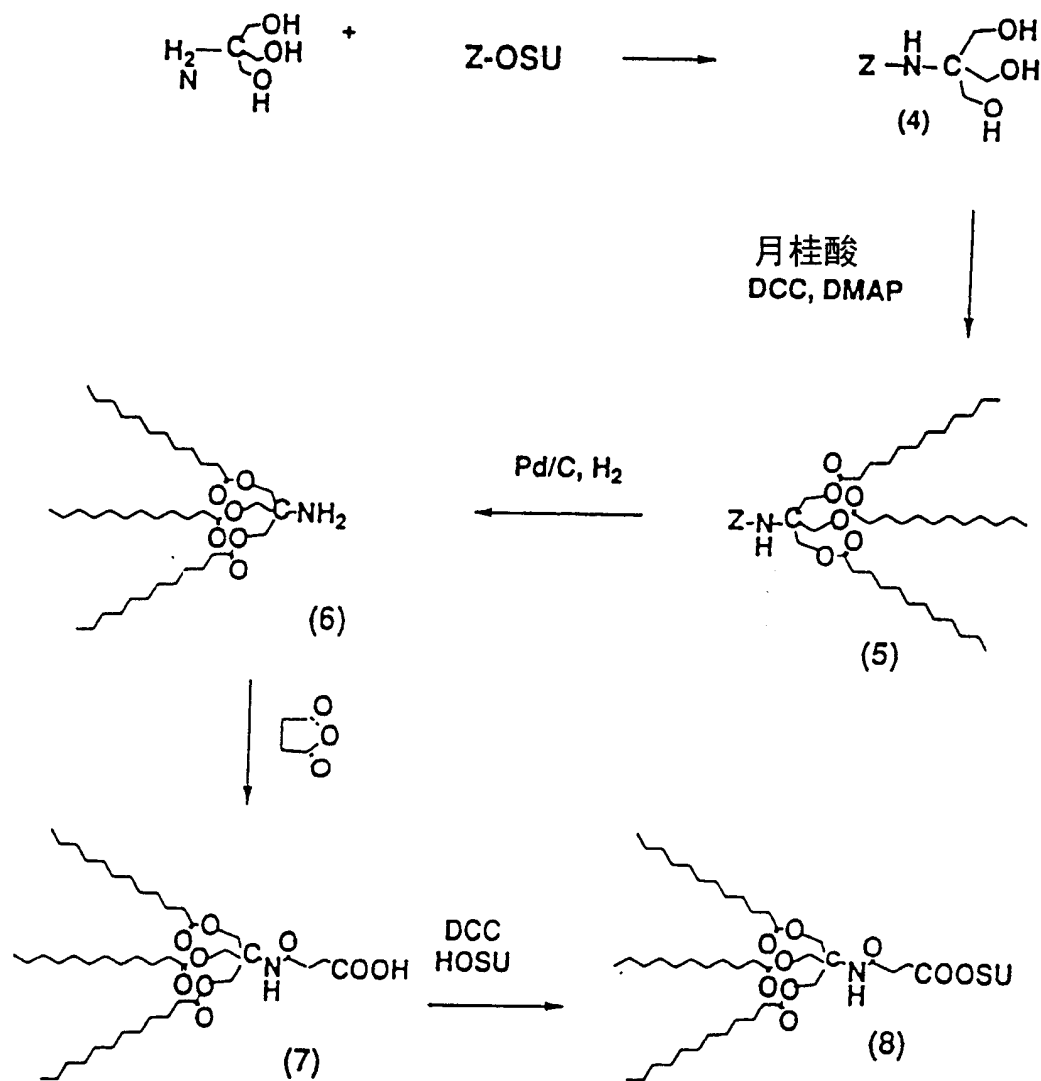
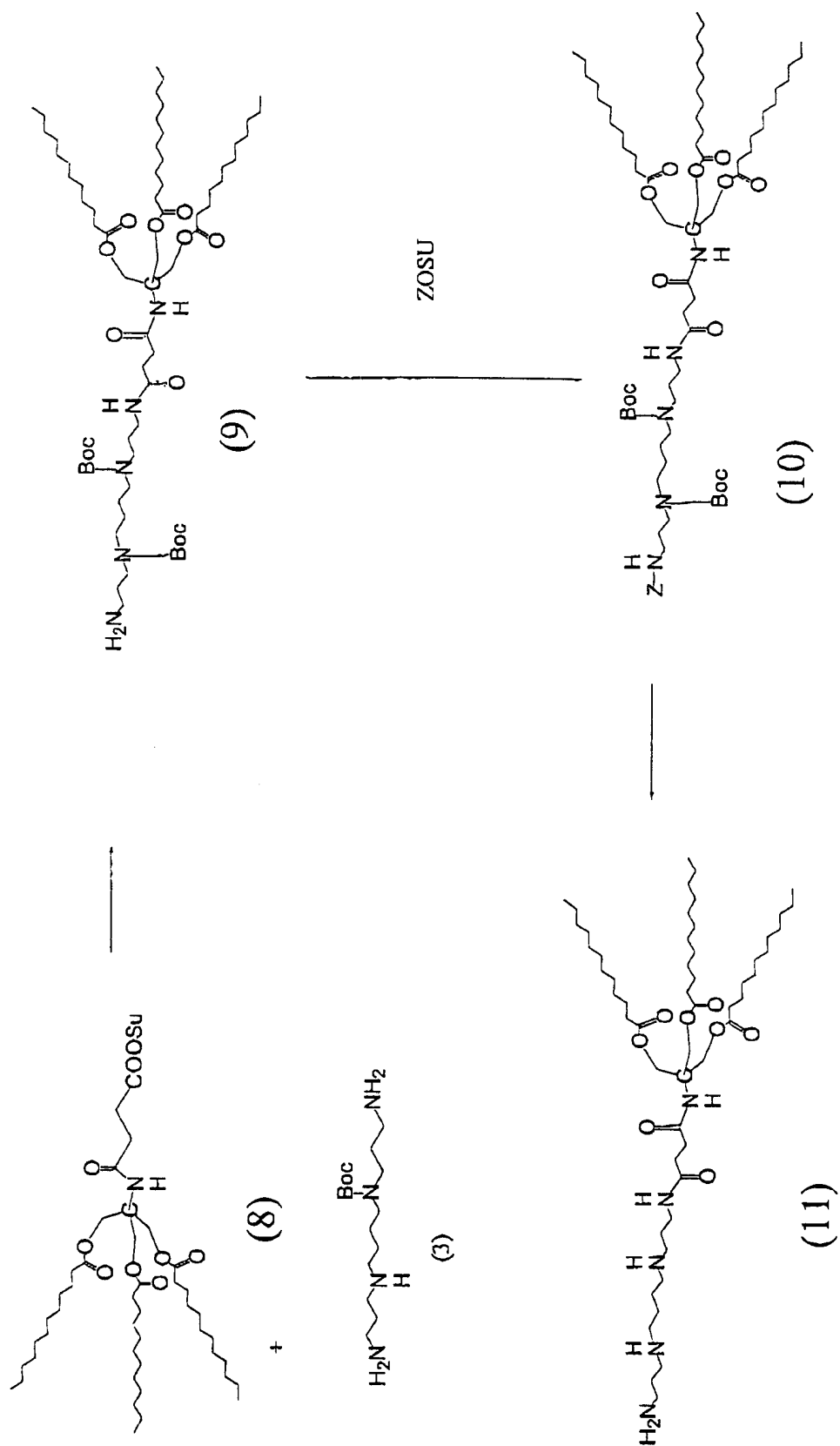


图2



3

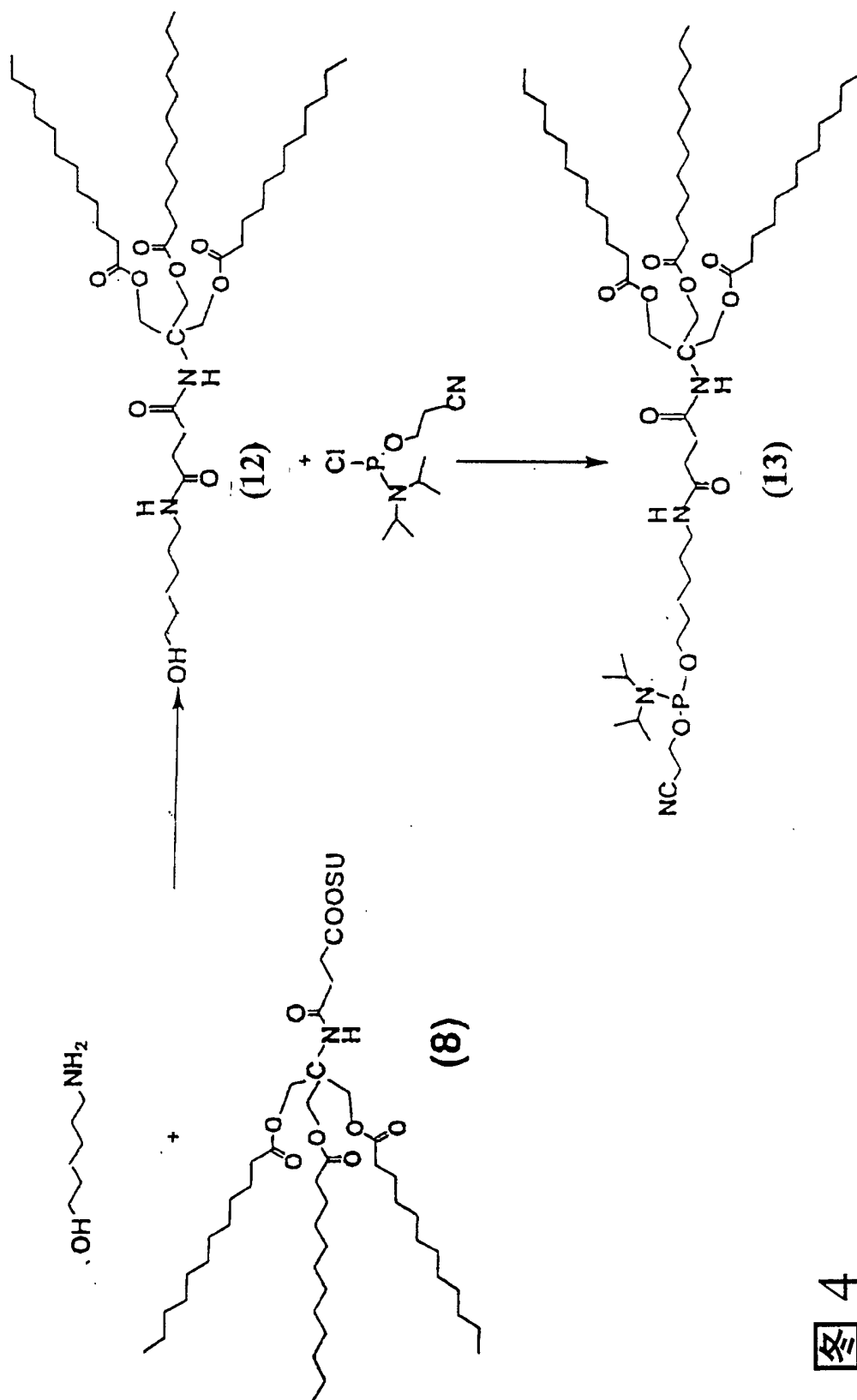


图 4

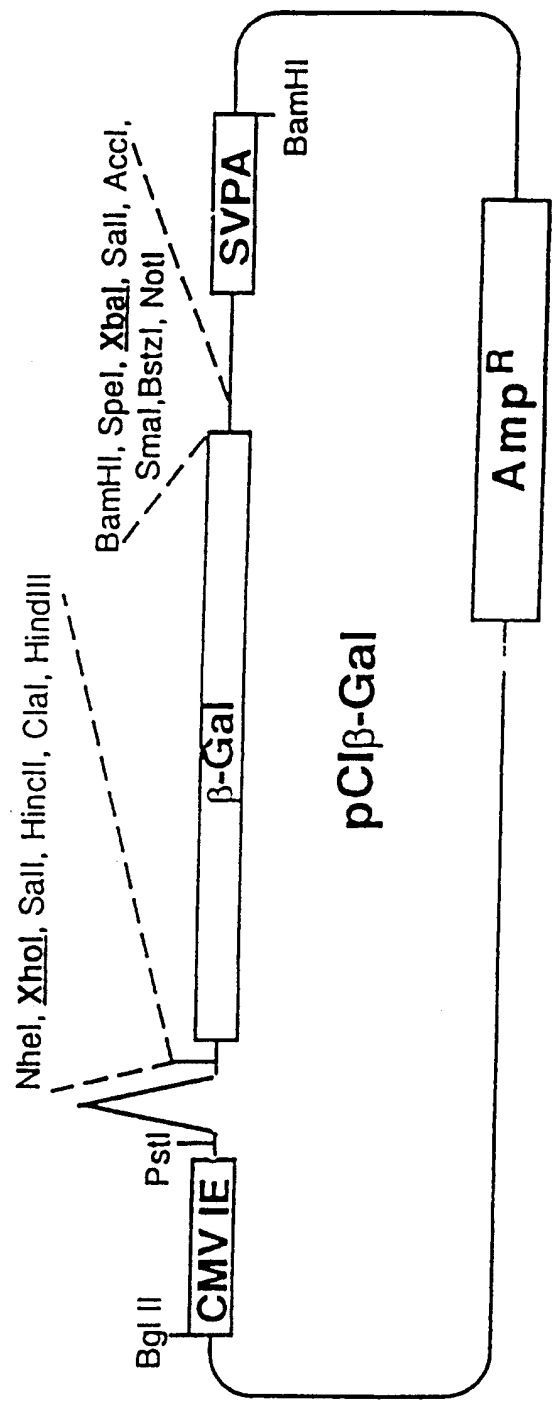


图5

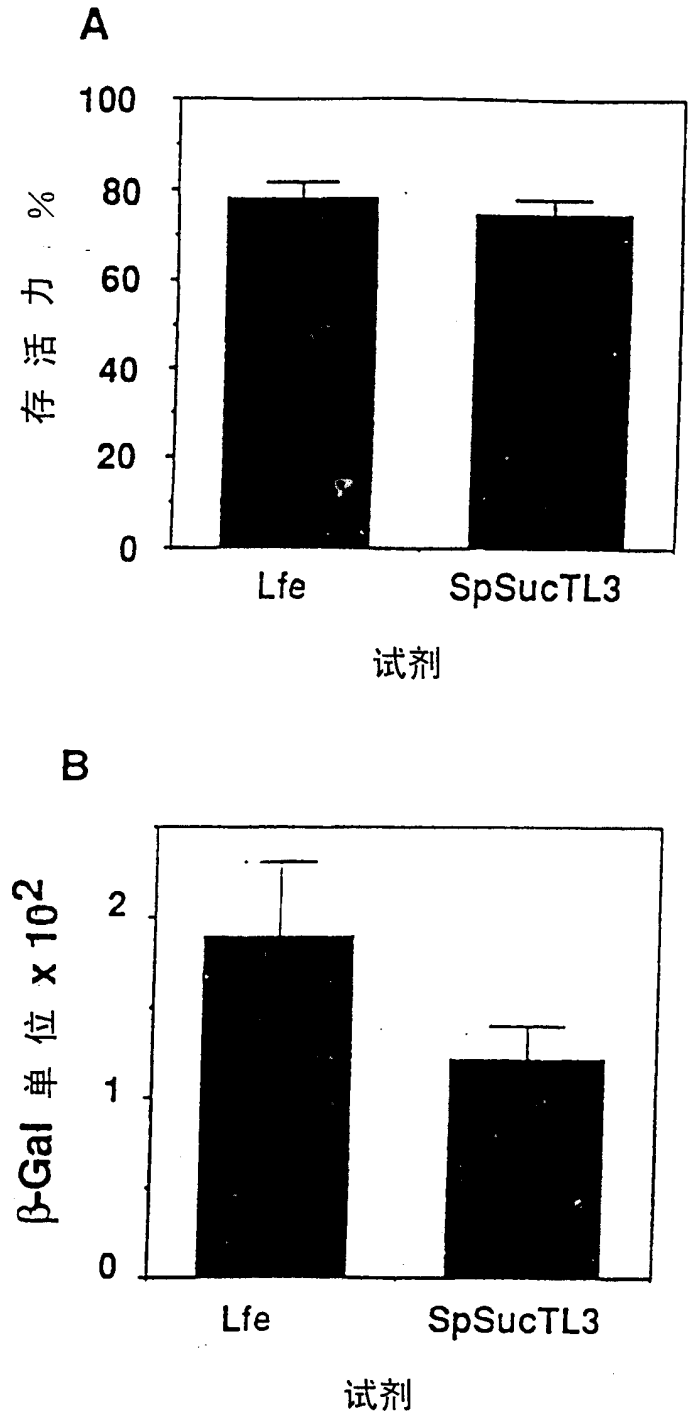


图6