

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03824892.1

[51] Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/4035 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 100346833C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 29/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2003.9.2 [21] 申请号 03824892.1

[30] 优先权

[32] 2002. 9. 2 [33] DE [31] 10240418.6

[86] 国际申请 PCT/DE2003/002901 2003.9.2

[87] 国际公布 WO2004/022102 德 2004.3.18

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.30

[73] 专利权人 亚文塔克有限公司

地址 德国马丁斯里德

[72] 发明人 马库斯·海克

安德烈·H.·华格纳

[56] 参考文献

WO -0188159 -A2 2001.11.21

WO -0076554 -A1 2000.12.21

US -6323029 -B1 2001.11.27

US -4613505 -A 1986.9.23

DE -19912436 -A1 2000.9.21

WO -02061037 -A2 2002.8.8

Specificity of flurbiprofen and enantiomers for inhibition of prostaglandin synthesis in bovine iris/ciliary body.. A. A. van Sorge, et al. Prostaglandins and Other Lipid Mediators, Vol. 55 . 1998

审查员 宋智刚

[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 1 页 说明书 21 页 附图 7 页

[54] 发明名称

转移核酸到真核生物细胞内所用的含非甾体
抗炎药和核酸的药物配制品

[57] 摘要

本发明涉及将核酸引入真核生物细胞内的药物配制品，其特征在于该配制品具有在 pH6.0 至 pH7.4 范围内的 pH - 值，及/或在从 5 至 100 毫摩尔/升范围内的阴离子浓度及/或提供具有在从 10 至 500 微摩尔/升范围内的浓度之非甾体抗炎药物。

1. 一种包括核酸的药物配制品, 其特征在于该配制品具有的 pH-值在 pH 6.2 至 pH 7.0 范围内, 及/或具有的氯离子浓度在 5 至 100 毫摩尔/升范围内, 及/或提供浓度在 10 至 500 微摩尔/升范围内的非甾体抗炎药物。
2. 根据权利要求 1 的配制品, 其中该 pH 值为 6.5 或 7.0。
3. 根据权利要求 1 的配制品, 其中氯离子浓度在 5 至 50 毫摩尔/升范围内。
4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项的配制品, 其中氯离子浓度在 5 至 10 毫摩尔/升范围内。
5. 根据权利要求 1 的配制品, 其中非甾体抗炎药物的浓度在 50 至 250 微摩尔/升范围内。
6. 根据权利要求 1 的配制品, 其中非甾体抗炎药物的浓度为 100 微摩尔/升。
7. 根据权利要求 1 的配制品, 其中非甾体抗炎药物为氟比洛芬或吲哚洛芬。
8. 根据权利要求 1 的配制品, 其进一步包括载体物质和添加剂。

转移核酸到真核生物细胞内所用的含非甾体 抗炎药和核酸的药物配制品

技术领域

本发明涉及将核酸引入真核生物细胞内的药物配制品，其特征在于该配制品具有在 pH 6.0 至 pH 7.4 范围内的 pH 值，及/或在 5 至 100 毫摩尔/升范围内的阴离子浓度及/或具有浓度在 10 至 500 微摩尔/升范围内的非甾体抗炎药物。

背景技术

解译人类基因组的一项实质目标为鉴定出致病基因(以其产物之作用方式为基础)及/或鉴定这些基因构造中的致病性变化(多态性(polymorphisms))且将其归入一种疾病谱。若认可这些疾病是由一明确数目的基因产物表达太强、表达太弱或不正确地表达所引起之时，此种研究即可对多种疾病带来更接近的原因性治疗。事实上，对于整个系列的遗传性疾病(例如粘液粘稠病(mucoviscidosis))，一般性单基因缺陷(单基因性疾病(monogenetic disease))是已知的；不过，对于其它疾病(例如高血压)的情势显著地更为复杂。这些疾病明显地不是单基因缺陷而是多重基因缺陷(多基因性疾病(polygenetic disease))的结果，其决定了受累者在暴露于某些环境因素之时发展出该疾病。不管是否存在此种限制，对于一或多种基因的表达之目标导向性干预确实可提供对因治疗而非仅仅对症治疗的机会。

根据现有科学知识状态，对于此种“基因疗法”可有四种抉择。例如，如今已经可以顺利地将一替代基因经由使用基因-载体引入体细胞内且使其经由该细胞本身的蛋白质合成机制转录成为对应的蛋白质(质粒的

脂质体转移，瞬时表达及/或将此基因整合到目标细胞的基因组之内(病毒基因转移、稳定表达)。不过，在目标细胞的正确寻址(addressing)、转移效率及于需要处经转移基因的打开(switching on)与关闭(switching off)等之中仍然会遭遇到重大的困难。再者，目前所使用的脂质体转移系统和病毒转移系统时常具有细胞伤害效应或者会触动潜在地戏剧性、免疫学决定性的不耐受反应。

为了阻止致病基因的表达，与基因转移技术不同的是，此基因可以，首次地，于所谓的信使RNA(mRNA)翻译成对应的蛋白质之中予以特异地阻断。使用此种反义技术，将短的单链DNA(通常包括15-25核苷酸)引入目标细胞之内，其提供与其目标—mRNA呈互补之碱序列。反义寡核苷酸沉积在相似的单链上(DNA-RNA-杂交)导致翻译的中断。相反地，使用此类别的第二种选择，所谓的RNA-干扰(RNA-interference)(RNAi)，可将包括正好21碱基对的RNA-双链引入细胞之内，该RNA-双链的序列相同于编码目标蛋白质的一段mRNA所具序列。其后，在该目标细胞内形成一至今尚未详细知悉的蛋白质复合物；此复合物会特异地分解目标mRNA且因此阻止其翻译。此两种技术都有一项共同的问题：单DNA股和双DNA股个别地都显示不能任意地被吸收到目标细胞之内，而是必须，像显著地更大的质粒(通常为数千碱基对长者)一般，被转染到细胞内。为了此项目地，通常要将其包装到作为运载介质的脂质体之内。

对基因表达进行目标导向入性干预所用的第三种方法使用短的双链DNA，所谓的诱饵寡核苷酸(decoy polynucleotide)。基因表达中的第一阶段将染色体上的相应DNA节段转录到一RNA单链内。所谓的转录因子对于转录的起始具有关键性。这些调节性蛋白质会结合到基因的起始区(启动子区)且通过RNA聚合酶起始基因的转录。结合到DNA的转录因子也可能阻断此种转录程序。诱饵寡核苷酸都是短的双链DNA(通常包括15-

25碱基对), 其可模拟序列基序(motif), 而目标转录因子可在其(它们的)目标基因(多目标基因)所含起始区中结合到这些基序。每一转录因子只能辨识出其对应的序列基序; 于此方式中, 诱饵寡核苷酸做法具有特异性。

由于诱饵寡核苷酸在细胞质内或在细胞核内的存在使得转录因子被中和, 其后果为其不再能够诱导或阻断其(它们的)目标基因(多目标基因)之表达。

所以, 迫切需要一种简单的, 不会将细胞或生物置于压力(stress)下的引入核酸之手段。

此目标是由本申请权利要求所界定的主题所达到。

附图说明

本发明要参照下列附图予以更详细地解说。

图1系举例显示出针对转录因子 C/EBP的经FITC-标记的诱饵寡核苷酸(10微摩尔/升; 图1 a)与一针对转录因子 AP-1的经FITC-标记的诱饵寡核苷酸(10微摩尔/升; 图1 b)在业经在细胞培养基中培育过的人类培养内皮细胞内的时间相关性吸收之结果。经荧光-染料-标记核酸的吸收系利用荧光显微镜(放大400x)展现出。

图2以条图形式显示出在人类培养内皮细胞中于1小时期间内, 反义寡核苷酸(AS)-支持的小窝蛋白-1(caveolin-1)的蛋白质表达减低(对照的 $37 \pm 10\%$, $n=3$)对于经FITC-标记C/EBP诱饵寡核苷酸(10微摩尔/升)的吸收之影响。统计学分析($n = 3-4$, 相对于诱饵寡核苷酸在未处理对照细胞内的吸收之百分比; $*P < 0.05$ 相对于对照, $\dagger P < 0.05$ 相对于AS)。SCR(混杂)表示的是使用该反义寡核苷酸有相同的碱基组成但不同的序列之寡核苷酸处理内皮细胞所得结果。

图3以条图形式显示出在人类培养内皮细胞中于1小时期间，细胞外pH-值变化对于经FITC-标记C/EBP诱饵寡核苷酸(10微摩尔/升)的吸收之影响。统计学分析($n=4-5$ ，相对于诱饵寡核苷酸在 pH值7.35的吸收之百分比； $*P<0.05$)。

图4以条图形式显示出在人类培养内皮细胞中于1小时期间内，反义寡核苷酸(AS)-支持的还原叶酸载体的蛋白质表达减低(对照的 $37\pm 10\%$ ， $n=3$)对于经FITC-标记C/EBP诱饵寡核苷酸(10微摩尔/升)的吸收之影响。统计学分析($n = 3-4$ ，相对于诱饵寡核苷酸在未处理对照细胞内的吸收之百分比； $*P<0.05$ 相对于对照， $\dagger P<0.05$ 相对于AS)。SCR(混杂)表示使用无活性反义寡核苷酸处理内皮细胞所得结果。

图5以条图形式(a)显示出在人类培养内皮细胞中于1小时期间，细胞外氯离子浓度变化(逐渐以羟乙基磺酸盐取代)对于经FITC-标记C/EBP诱饵寡核苷酸(10微摩尔/升)的吸收之影响。统计学分析($n=4$ ，相对于诱饵寡核苷酸在156 毫摩尔/升 Cl^- 的吸收之百分比； $*P<0.05$)。图5(b)举例说明人类培养内皮细胞中于1小时期间，细胞外氯离子浓度从156至11毫摩尔/升的变化对于经FITC-标记STAT-1诱饵寡核苷酸的吸收之影响。(荧光显微镜影像，放大200x)。

图6以条图形式(a)显示出使用氟比洛芬(flurbiprofen)或吲哚洛芬(indoprofen)(各100微摩尔/升)共温育，在人类培养内皮细胞中于1小时期间对于经FITC-标记C/EBP诱饵寡核苷酸(10微摩尔/升)的吸收之影响。统计学分析($n=4$ ，相对于诱饵寡核苷酸在未处理细胞内的吸收之百分比； $*P<0.05$)。

图7以条图形式(a,b)与代表性Western印迹分析(Western-blot analysis)(c)显示出(a)细胞培养基($n=3$)和(b,c)未改良与各改良的(mod) Ringer氏液(Ringer's solution)(11 毫摩尔/升氯离子，pH 7.0)作为温育培养基对于在人类培养内皮细胞中STAT-1诱饵寡核苷酸-媒介的细胞因子刺激((100单

位/毫升(U/ml)肿瘤坏死因子a (tumour necrosis factor a)[TNFa]加上1000单位/毫升的干扰素- γ (interferon- γ) [IFN γ], 10小时)的CD40蛋白质表达之影响(相对于细胞因子刺激细胞中的蛋白质之量的百分比[T/I]) *P<0.05 相对于 T/I; b, 统计学分析, n = 6; c, 使用 β -肌动蛋白(β -actin)作为内标准品的代表性Western印迹分析。于暴露于细胞因子之前, 将内皮细胞与未标记的诱饵寡核苷酸(10微摩尔/升)预温育30分钟。

具体实施方式

与质粒, 反义和RNAi 寡核苷酸不同, 诱饵寡核苷酸(双链DNA寡核苷酸)显然地可以不必用到辅助剂(转染剂(transfection agents))就能进入相关的目标细胞。在此运载之下的机制至今为止仍属未知。本发明人于今已可成功地解说此机制。以在本文中所得知识为基础, 提出用以将核酸导到真核细胞, 尤其是哺乳动物细胞且特别是人类细胞之内之新的配制品。

术语“配制品”或“药物配制品”, 在本文件中是指药物制剂形式, 例如, 用于一药物或一接种培养基, 其要在体内(*in vivo*)施用到人类或动物, 或体外(*in vitro*)或离体(*ex vivo*)施用到器官、组织或细胞, 且其包括一或多种活性成分和辅助配制剂。根据本发明的活性成分为核酸。

术语“辅助配制剂”如本文件中是指上面所提及的药物制剂中除了活性成分之外的所有成分。辅助配制剂可为, 例如, 生理盐溶液, 缓冲溶液, 水, 防腐剂, 离子, 酸类, 碱类, 器官移植用的保存溶液, 血液置换液, 吸入、输注和注射用溶液与药物。

本发明涉及将核酸引入真核生物细胞内的新的配制品, 其特征在于该配制品具有的pH-值在pH 6.0到pH 7.4, 优选地在从约pH 6.2到约pH 7.0范围内, 且特别优选地为pH 6.5或pH 7.0, 及/或具有的阴离子浓度在约5至约100毫摩尔/升范围内, 优选地在约5至约50毫摩尔/升范围内, 且

特别优选地为在约5至约10毫摩尔/升范围内，且优选地为氯离子浓度，及/或非甾体抗炎药物，例如，氟比洛芬(flurbiprofen)或吲哚洛芬(indoprofen)，其浓度在约10至约500微摩尔/升范围内，优选地在约50至约250微摩尔/升范围内，且特别优选地其浓度为约100微摩尔/升。再者，除了上面所述活性成分和特点之外，该配制品也可以包含一或多种适当的缓冲剂。适当的缓冲剂之例子为改良Ringer氏液，含有145毫摩尔/升的 Na^+ ，5毫摩尔/升的 K^+ ，11毫摩尔/升的 Cl^- ，2毫摩尔/升的 Ca^{2+} ，1毫摩尔/升的 Mg^{2+} ，10毫摩尔/升的Hepes，145毫摩尔/升的羟乙基磺酸盐(isethionate)，10毫摩尔/升D-葡萄糖，其中的pH-值在从6.5至7.0的范围之内，优选地为6.5或7.0。

最初，本发明人观察到被所探讨的人类内皮细胞吸收到的经荧光-染料-标记诱饵寡核苷酸之细胞内分布是不均匀的。除了在囊泡状构造中积聚，还显示出对细胞质和细胞核有更强的弥漫性标记。特别者，核酸在囊泡中的积聚支持该吸收程序可能为受体介导的，细胞内吞样作用程序(endocytosis-like process)。

随后证明，如同血管平滑肌细胞或单核细胞一般，人类内皮细胞会表达一或两种叶酸受体的变异体，其为将核酸吸收到细胞内所用的潜在候选物。此种受体优选地系集中在细胞膜内的所谓小窝(caveolae)中。小窝的破坏 – 透过胆固醇的抽取或对小窝蛋白-1表达的抑制(图2) – 会导致诱饵寡核苷酸的吸收之明显限制。

不同的是，将细胞外 pH-值降低有利于受体介导的叶酸结合(亲和性)且对于诱饵寡核苷酸吸收到人类内皮细胞内也显示出此种pH-相关性(图3)。在叶酸结合到受体之后，小窝即被内部化(internalised)(细胞摄液作用(potocytosis; RGW Anderson (1998) Annu. Rev. Biochem, 67, 199)。为了将包封在这些囊泡内的叶酸释放到细胞质之内，需要一种阴离子转运体(载体)，此可能被4-(二丙基氨磺酰基)苯甲酸(probenicid)所抑制

(Kamen et al. (1991) J. Clin. Invest. 87, 1442)且此与系面所述及的还原叶酸载体 hFRC不相同。事实上，诱饵寡核苷酸在人类内皮细胞内的积聚也是4-(二丙基氨磺酰基)苯甲酸敏感性的。

所以，本发明涉及一种具有pH值在从约pH 6.0至约pH 7.4范围内之配制品。该pH值优选地系在pH 6.2至约pH 7.0的范围之内且特别优选地为约pH 6.5或7.0。

除了受体介导的细胞摄液作用，叶酸进入哺乳动物细胞内的主要转运途径系通过还原-叶酸载体 hRFC (LH Matherly (2001) Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 67, 131)。原则上，此种转运体必须能够被进行细胞分裂的每一体细胞所用，因为叶酸系DNA合成所必需者(也请参考 Whetstine et al. (2002) Biochem. J. Jul 29 (epub ahead of print))。人类内皮细胞也会表达hFRC。反义寡核苷酸支持的将hFRC 蛋白质的表达缩减到这些细胞的三分之一之结果导致45%的诱饵-寡核苷酸吸收被抑制(图4)。进一步提示这些转运系统参与诱饵-寡核苷酸吸收(参考在LH Matherly (2001) Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 67, 131 中所述的hFRC 之特性)的是，与叶酸比较之下，抗叶酸药氨甲喋呤(氨甲喋呤)可显著改进其抑制，以及对阴离子-交换抑制剂DIDS (4,4'-二异硫氰酸基-2,2'-二苯乙烯-二磺酸(4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilben-disulfonic acid))的高度敏感性。

事实上，对于hFRC-媒介的阴离子叶酸进入哺乳动物细胞内之吸收，需要使一阴离子，优选地氯离子，以对抗方式，离开细胞(反向共同运输(antiport)) 及/或使一阳离子，优选地一质子(H^+)共同运输到细胞之内(同向共同运输(symport))。无论如何，由于在7.5的准生理pH-值下，载体对于叶酸及/或氨甲喋呤具有最大的亲和性，细胞外 pH的降低(亦即，质子浓度的提高)无法透过此种运输途径达到降低核酸吸收的合意效用。助成将氯离子从细胞运送出来是更为有希望者，例如，经由减低细胞外氯离子浓度(典型者120毫摩尔/升)，优选地低于细胞内值(12 毫摩尔

/升), 藉此造成对于氯离子的向外导向浓度梯度。如图5中所显示者, 细胞外氯离子浓度的减低确实可导致在诱饵-寡核苷酸吸收到人类内皮细胞内上的明显改善。

简言之。上面所报告的发现所肯定者为, 与pH-敏感性叶酸-受体介导的细胞摄液作用一起者, 核酸进入人类细胞内的吸收作用也通过还原叶酸载体而发生, 且此运载途径的效率可以经由降低细胞外阴离子浓度, 尤其是氯离子浓度而显著地增加。

所以, 根据本发明的配制品涉及一种配制品, 其阴离子浓度, 优选地氯离子浓度, 在约5至约100毫摩尔/升范围内, 优选地在约5至约50毫摩尔/升范围内, 且特别优选地从约5至约10毫摩尔/升范围内。再者, 可以经由, 例如, 添加等摩尔量的羟乙基磺酸盐而达到氯离子的生理学取代。

除了物质的吸收, 其排出也对其在细胞内的短暂浓度及/或利用度起着重要作用。抗炎性药物(非甾体抗炎药物), 例如, 氟比洛芬(flurbiprofen)或吲哚洛芬(indoprofen), 可抑制叶酸从哺乳动物细胞运载出的途径已经述及(M Saxena, GB Henderson (1996) Biochem. Pharmacol. 51, 974)。如图6中所显示, 诱饵寡核苷酸也通过此种运载途径从人类细胞移出; 也就是说, 细胞内的核酸浓度可以经由此种运载途径的阻断而明显地增加。

根据本发明的配制品因而也涉及一种包括非甾体抗炎药物的配制品, 该非甾体抗炎药物例如氟比洛芬或吲哚洛芬的浓度在约10至约500微摩尔/升的范围, 优选地在约50至约250微摩尔/升范围内, 且特别优选地为约100微摩尔/升。

除了诱饵寡核苷酸, 上面所述的运载途径也可能为其它核酸, 例如单链RNA/DNA 寡核苷酸或双链 RNA 寡核苷酸, 所使用到可相比的程度, 且不限于内皮细胞。例如, 经FITC-标记单链DNA寡核苷酸可以与

相应的双链(诱饵)寡核苷酸一样有效地运载到人类内皮细胞之内,且诱饵寡核苷酸进入人类内皮细胞和血管平滑肌细胞内的吸收速率通常是相同的。

除了一般的条件,例如,诱饵寡核苷酸有效地中和其目标转录因子,对于核酸的治疗效率至关重要,要在不需要潜在地具有胞毒性的辅助剂之下快速地且足够地吸收到目标细胞内。于此方面,施用这些核酸的本发明的优选的方法包括使用恰当的缓冲剂,所述缓冲剂:

1. 具有的pH值在约pH 6.0至pH 7.4范围内,优选地在约pH 6.2至pH 7.0范围内,且特别优选地为约pH 6.5或7.0,及/或
2. 具有的细胞外阴离子浓度,优选地氯离子浓度(例如,通过添加羟乙基磺酸盐),在约5至约100毫摩尔/升范围内,优选地在约5至约50毫摩尔/升范围内,且特别优选地在约5至约10毫摩尔/升范围内,及/或
3. 具有非甾体抗炎药物,优选地氟比洛芬或吲哚洛芬,其浓度在约10至约500微摩尔/升的范围内,优选地在约50至约250微摩尔/升的范围内,且特别优选地为约100微摩尔/升。

再者,本发明涉及一种用以将核酸引入真核细胞内之配制品,其中可以组合二或更多项的上述特征。图7显示出其结果所达到的核酸生物学活性增加之一例子。一优选的配制品包括调整根据本发明的pH-值与氯离子-浓度之组合。

于一优选的具体实施方式中,一要用来与目标细胞接触的根据本发明之配制品只包含核酸(浓度为从 0.01至100微摩尔/升)和缓冲剂。可以使用一或更多种恰当的缓冲剂。此类型的缓冲剂的一个例子为改良Ringer氏液,其包含145 毫摩尔/升的 Na^+ , 5 毫摩尔/升的 K^+ , 11 毫摩尔/升的 Cl^- , 2 毫摩尔/升的 Ca^{2+} , 1 毫摩尔/升的 Mg^{2+} , 10毫摩尔/升的Hepes, 145 毫摩尔/升的羟乙基磺酸盐, 10毫摩尔/升D-葡萄糖, pH为6.5或7.0,如在图 7所示实验中所使用者。

在根据本发明方法中所使用的配制品优选地系经由注射、输注、吸入或任何其它施用形式的局部施用。在本发明方法之内使用的配制品之活体外施用(血管、组织或细胞的温育)也可以促成局部进入。其目标为使含核酸的混合物尽可能地接近要处理的细胞且创造出——在最短时间内——用于将核酸吸收到目标细胞内的最优细胞外环境。

下面诸实施例仅作为解说之用而无意用来限制本发明的范围。

1. 细胞培养

人类内皮细胞系从脐静脉(umbilical veins)使用1.6单位/毫升的分散酶(disperse)在Hepes-改良Tyrode溶液中在37°C处理30分钟而分离,且在明胶包被的6孔组织培养皿上(2毫克/毫升明胶于0.1 M HCl中室温下30分钟)于1.5毫升 M199培养基(Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Germany)内培养,该培养基含有20%胎牛血清,50单位/毫升的青霉素,50微克/毫升的链霉素,10单位/毫升的制霉菌素,5 mM HEPES 和5 mM TES,1 微克/毫升的肝素与40微克/毫升的内皮细胞生长因子(endothelial growth factor)。该细胞通过如下方面进行鉴定:典型的铺路石形态学(pavement morphology),对von Willebrandt-Factor (vWF)的阳性免疫染色,PECAM-1 (CD31)的阳性荧光分析展示(FACS),以及对平滑肌 α -肌动蛋白(α -actin)的阴性免疫染色(Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191)。

人类血管平滑肌细胞分离自切下的胸腺之静脉。在移除掉粘附的结缔组织和脂肪组织之后,使用解剖刀将血管机械地细分。其后,将组织置于一消化溶液(5%胎牛血清,5毫摩尔/升 HEPES,5毫摩尔/升TES,50单位/毫升青霉素,50微克/毫升链霉素,10单位/毫升制霉菌素和0.15%胶原酶(collagenase) (溶组织梭菌(*Clostridium histolyticum*), Sigma-Aldrich, Deisenhofen)于DMEM 培养基内; Gibco Life Technologies)中在

37°C与5% CO₂ 温育14-16小时。于将细胞悬浮液在室温下以1000rpm离心5分钟之后，将细胞沉淀悬浮于2-3毫升的生长培养基之内(Smooth Muscle Cell Growth Medium 2, PomoCell GmbH, Heidelberg)，且铺平到组织培养皿之内，所述培养皿事先已经使用明胶在室温下包被至少30分钟(2毫克明胶每毫升 0.1 N HCl)，且使用该培养基洗涤过两次。2天之后，于无菌条件之下，置换生长培养基且使用该培养基略为洗涤细胞。于后续期间中，每隔4天更换该培养基。

将人类单核细胞系THP-1 (ATCC TIB 202)置于RPMI 1640培养基(Gibco Life Technologies)中培养，该培养基含有10% 胎牛血清，50单位/毫升的青霉素，50微克/毫升的链霉素与10单位/毫升的制霉菌素。

2. 诱饵寡核苷酸合成

双链诱饵寡核苷酸从互补的单链，经荧光素异硫氰酸酯(FITC)-标记的寡核苷酸(Eurogentec, Köln, Germany) 按照在 Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191中所述制备。该寡核苷酸的单链序列如下(底下划线者代表经硫代磷酸酯连接的碱基(phosphorothioate-coupled bases):

AP-1, 5'-CGCTTGATGACTCAGCCGGAA-3' (SEQ ID NO:1)

C/EBP, 5'-TGCAGATTGCGCAATCTIGCA-3' (SEQ ID NO:2)

STAT-1, 5'-CATGTTATGCATATTCCTGTAAAGTG-3 (SEQ ID NO:3)

3. 反义寡核苷酸的合成与温育

对于一反义混合物，将3%脂质体转染试剂(Lipofectin) (v/v) (Gibco Life Technologies)添加到1毫升培养基中，且在室温(RT)下温育60分钟。其后，添加相应的反义或对照寡核苷酸(Eurogentec, Köln, Germany)，到最终浓度为0.5 微摩尔/升，且在室温下继续温育30分钟。于实验起始时，加入相应量的肝素和内皮细胞生长因子，且使用反义脂质体转染试

剂培养基置换常规的内皮细胞培养物的细胞培养基。于6小时之后，取出反义脂质体转染试剂培养基并改换以新鲜的细胞培养基；于转染24小时之后，进行诱饵-寡核苷酸吸收的Western印迹分析及/或荧光-显微镜分析。

小窝蛋白-1的反义寡核苷酸所具序列(硫代磷酸酯键标记为*)为 5'-A*T*G*TCCCTCCGAGT*C*T*A-3' (SEQ ID NO:4)；作为对照，使用具有与反义寡核苷酸相同的碱基组成但是不同的序列之混杂寡核苷酸(5'-C*T*C*GATCCTGACTA*C*T*G-3') (SEQ ID NO:5)。还原叶酸载体(hRFC)的反义寡核苷酸所具序列为 5'-C*A*A*A*GG*T*A*GC*A*C*A*CG*A*G-3' (SEQ ID NO:6)。在此同样使用一混杂寡核苷酸作为对照(5'-A*C*A*T*GG*A*C*A*CG*A*A*GC*A*G-3') (SEQ ID NO:7)。

4. RT-PCR分析

总细胞RNA是使用 Qiagen RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany)分离的；其后，使用最大量3微克的RNA和200单位的SuperscriptTM II 逆转录酶(Gibco Life Technologies)，以20微升的总体积，根据制造商的说明实施cDNA-合成。对于后续的聚合酶链反应(PCR)，在50微升的总体积中使用5微升的cDNA和1单位的Taq DNA聚合酶(Gibco Life Technologies)。将PCR产物在含有0.1%的溴化乙锭(ethidium bromide)之1.5%琼脂凝胶上分离，使用CCD摄影机系统以光密度测量法测量分离带的强度并且使用Scanalytics(Billerica, MA, USA)所制造的One-Dscan凝胶分析软件予以记录。

所有的PCR反应都针对每一引物配对(primer pair)在*Tpersonal* Cycler (Biometra, Göttingen, Germany)中个别地进行：

hFR1(叶酸受体 a), 产物大小181 bp, 37循环, 添加温度60°C, (正向引物), 5'-CAAGGTCAGCAACTACAGCCGAGGG-3' (SEQ ID NO:8), (反向引物) 5'-TGAGCAGCCACAGCAGCATTAGGG-3' (SEQ ID NO:9)。

hFR2 (叶酸受体 b), 产物大小 385 bp, 37循环, 添加温度 61°C, (正向引物), 5'-CTGTGTAGCCACCATGTGCAGTGC-3' (SEQ ID NO:10), (反向引物) 5'-TGTGACAATCCTCCCACCAGCG-3' (SEQ ID NO:11)。

h1FRC, 产物大小333 bp, 37循环, 添加温度 60°C, (正向引物), 5'-CCAAGCGCAGCCTCTTCTTCTTCAACC-3' (SEQ ID NO:12), (反向引物) 5'-CCAGCAGCTGGAGGCAGCATCTGCC-3' (SEQ ID NO:13); Sprecher et al., (1998) Arch. Dermatol. Res. 290, 656)。

h2FRC2, 产物大小167 bp, 37循环, 添加温度 56°C, (正向引物), 5'-CCATCGCCACCTTTCAGATTGC-3' (SEQ ID NO:14), 反向引物 5'-CGGAGTATAACTGGAAGTCTTGCG-3' (SEQ ID NO:15)。

所有PCR产物的特性都以后续的测序分析予以确定。

5. Western印迹分析

将人类脐静脉内皮细胞经由置于液氮中与在37°C 解冻连续5次的处理以使之破裂。按照Hecker et al. (1994) Biochem J. 299, 247中所述制造蛋白质提取物。将20-30微克的蛋白质使用10%聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis), 在存在SDS的变性条件下根据标准程序予以分离, 且转移到BioTrace™ 聚偏二氟乙烯转移膜 (polyvinylidene fluoride transfer membrane)之上(Pall Corporation, Rossdorf, Germany)。使用得自BD Biosciences, Heidelberg, Germany的多克隆抗-人类抗体进行小窝蛋白-1的免疫学实证。使用一多克隆抗-人类抗体(感

谢Dr. Hamid M. Said, Veterans Affairs Medical Center, Long Beach, California USA的慷慨提供)进行 hFRC 蛋白质的免疫学实证。对CD40 蛋白质, 使用一多克隆抗-人类抗体(Research Diagnostics Inc., Flanders, New Jersey, USA)予以检测。对于蛋白质分离带, 通过在添加过氧化物酶-偶合抗-小鼠IgG(Peroxidase-coupled anti-mouse IgG)及/或抗-兔IgG(1:3000, Sigma, Deisenhofen, Germany)之后, 使用化学发光法(SuperSignal Chemiluminescent Substrate; Pierce Chemical, Rockford, IL, USA)且随后进行放射自显术(autoradiography) (Hyperfilm™ MP, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)予以显形。在“剥开”转移膜(5分钟 0.2 N NaOH, 接着用H₂O洗涤3 x 10分钟)之后, 经由使用单克隆抗体与过氧化物酶-偶合抗-小鼠IgG (两者皆得自Sigma-Aldrich, 1:3000稀释), 展示相同的β-肌动蛋白蛋白质分离带, 从而证明有相同蛋白质量的施加与转移。

6. 荧光显微镜

于实验起始之前, 将在24孔细胞培养板中培养的内皮细胞使用37°C Ringer氏液(组成: 145 毫摩尔/升 Na⁺, 5 毫摩尔/升 K⁺, 156 毫摩尔/升 Cl⁻, 2 毫摩尔/升 Ca²⁺, 1 毫摩尔/升 Mg²⁺, 10毫摩尔/升 HEPES, 10 毫摩尔/升 D-葡萄糖, pH 7.35) 洗涤一次。其后, 在37°C下, 依照实验混合物而定, 施加150微升经改良或分别地未-改良Ringer氏液于细胞, 且添加经FITC-标记的诱饵寡核苷酸, 其终浓度为10微摩尔/升。于在37°C下和环境空气中温育长达180分钟的期间之后, 使用1毫升温的未-改良Ringer氏液洗涤细胞3次。使用连接到Axiovert S100TV 显微镜(Zeiss, Göttingen, Germany)的MicroMax CCD-摄影机(Princeton Instruments Inc., Trenton, NJ, USA)以494nm的激发波长, 518nm的发射波长与200x的放大倍率记录荧光强度。荧光影像(对每一份实验混合物采取

一幅影像)与后续的定量分析系使用MetaMorph V3.0 Software (Universal Imaging West Chester, PA, USA)实施。对于定量分析,首先将一实验混合物的所有荧光影像校准到相同的量度和对比水平。其后,使用该软件测定对每一影像跨过诸个别像素积分的整体亮度作为荧光强度的量度,由是呈现出诱饵寡核苷酸的细胞内浓度。

7. 统计学分析

除非有另外不相同的指明,否则附图中所有的数据都是显示为n个实验的平均值 \pm SEM。使用单变量方差分析(one-sided variance analysis) (ANOVA),随后进行Dunnett Post Test 而进行统计评定系。采用 <0.05 的P-值作为有统计学显著差异。

序列表

<110> 亚文塔克有限公司

<120> 用于将核酸引入真核生物细胞内的配制品

<130> HEC-007 PCT

<140> Unknown

<141> 2003-09-02

<150> 102 40 418.6

<151> 2002-09-02

<160> 15

<170> Patent version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

<220>

<221> Decoy oligonucleotide

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 1

cgcttgatga ctcagccgga a

21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

<220>

<221> Decoy oligonucleotide

<222> (1)..(20)

<223>

<400> 2

tgcagattgc gcaatctgca

20

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

<220>

<221> Decoy oligonucleotide

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 3

catgttatgc atattcctgt aagtg

25

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

<220>

<221> Antisense oligonucleotide

<222> (1)..(17)

<223>

<400> 4

atgtccctcc gagtcta

17

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

<220>

<221> Antisense oligonucleotide

<222> (1)..(17)

<223>

<400> 5

ctcgatcctg actactg

17

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

<220>

<221> Antisense oligonucleotide

<222> (1)..(17)

<223> .

<400> 6

caaaggtagc acacgag

17

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

<220>

<221> Antisense oligonucleotide

<222> .(1)..(17)

<223>

<400> 7

acatggacac gaagcag

17

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 8

caaggtcagc aactacagcc gaggg

25

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 9

tgagcagcca cagcagcatt aggg

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 10

ctgtgtagcc accatgtgca gtgc

24

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(22)

<223>

<400> 11

tgtgacaatc ctcccaccag cg

22

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 12

ccaagcgcag cctcttcttc aacc

24

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 13

ccagcagcgt ggaggcagca tctgcc

26

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(22)

<223>

<400> 14

ccatcgccac ctttcagatt gc

22

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 15

cggagtataa ctggaactgc ttgcg

25

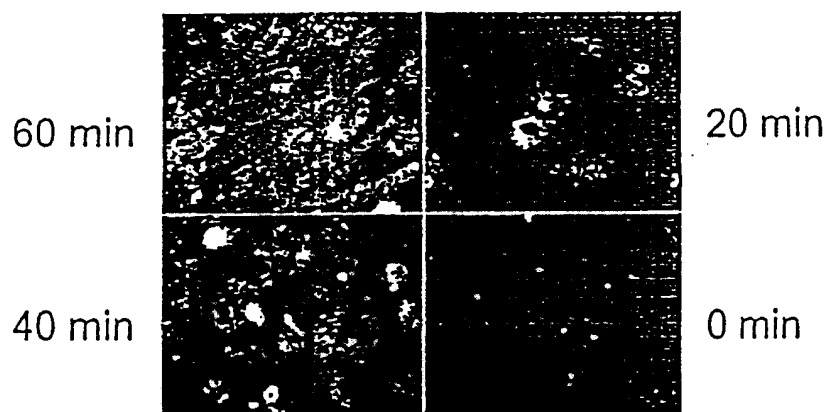


图1a

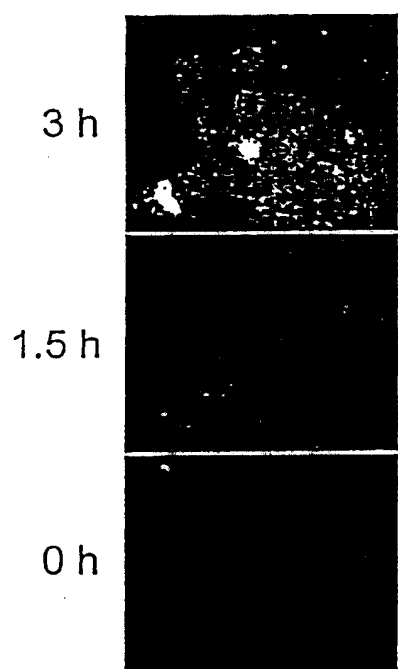


图1b

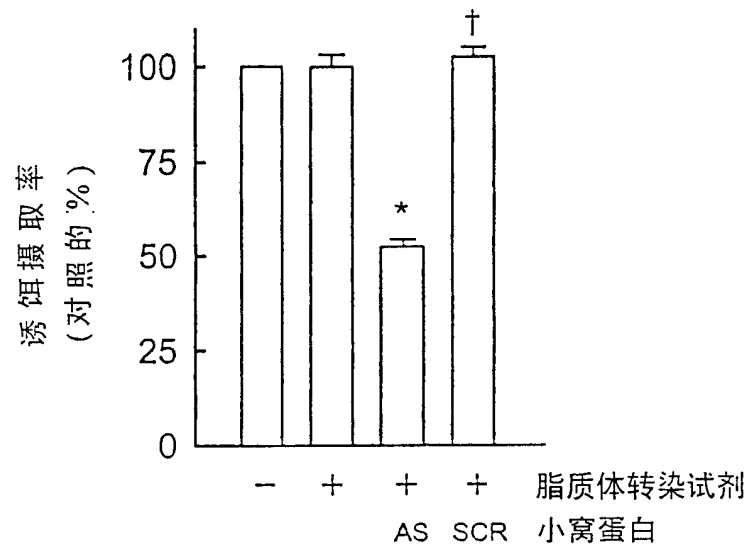


图2

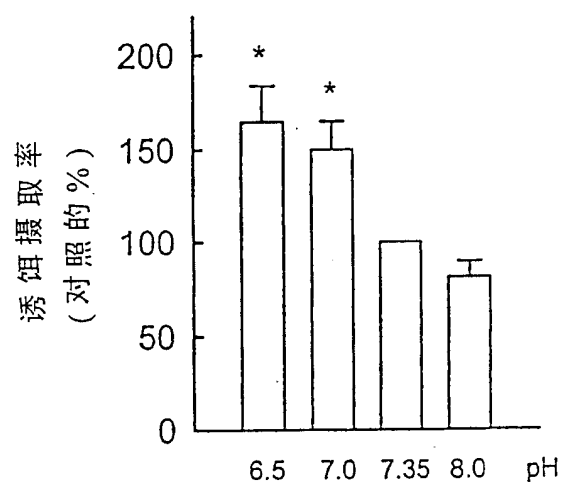


图3

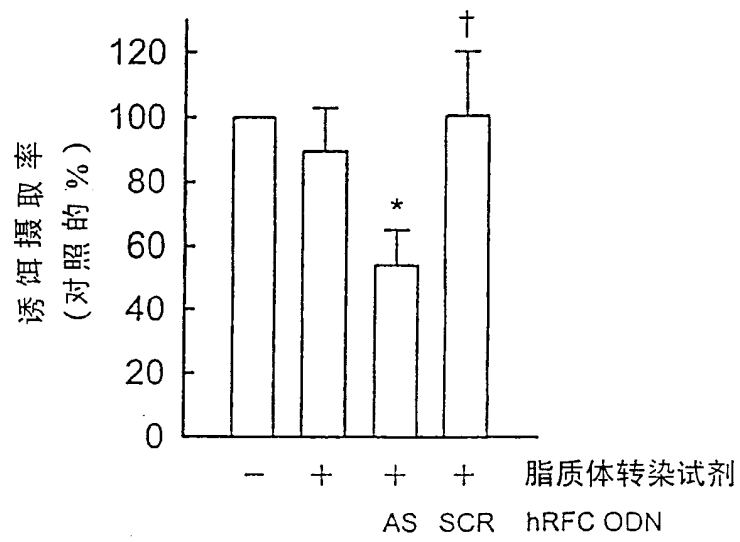


圖4

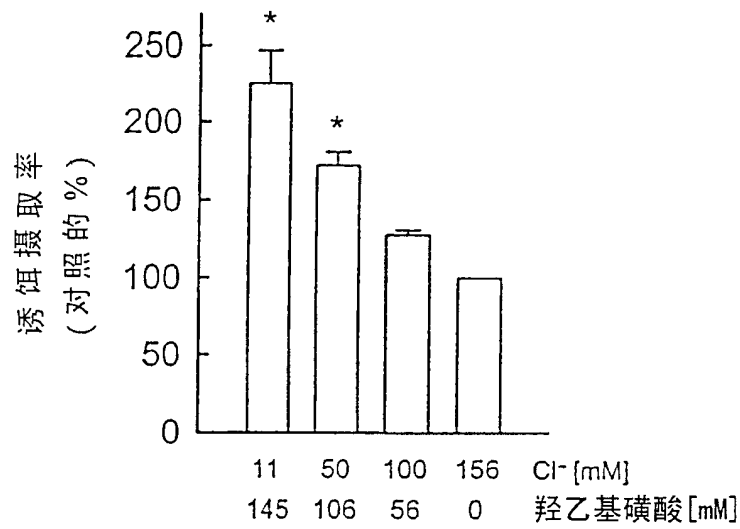


图5a



—	—	—	11	Cl ⁻ [mM]
—	—	—	145	羟乙基磷酸 [mM]
—	C/EBP	STAT-1	STAT-1	dODN-FITC

图5b

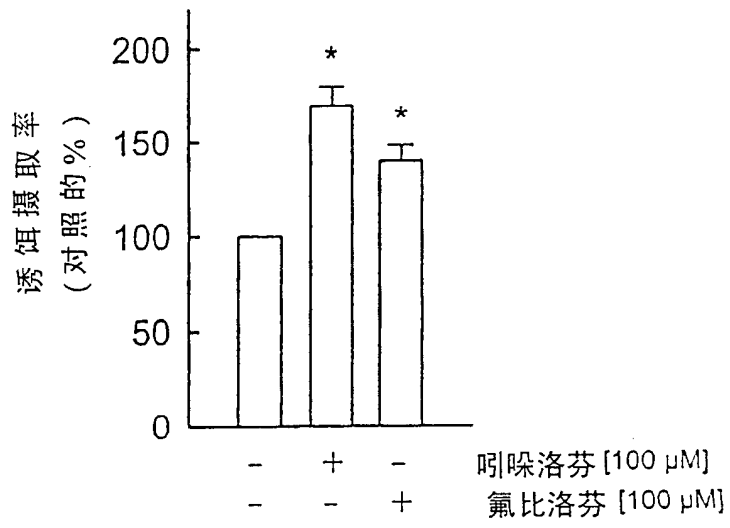


图6

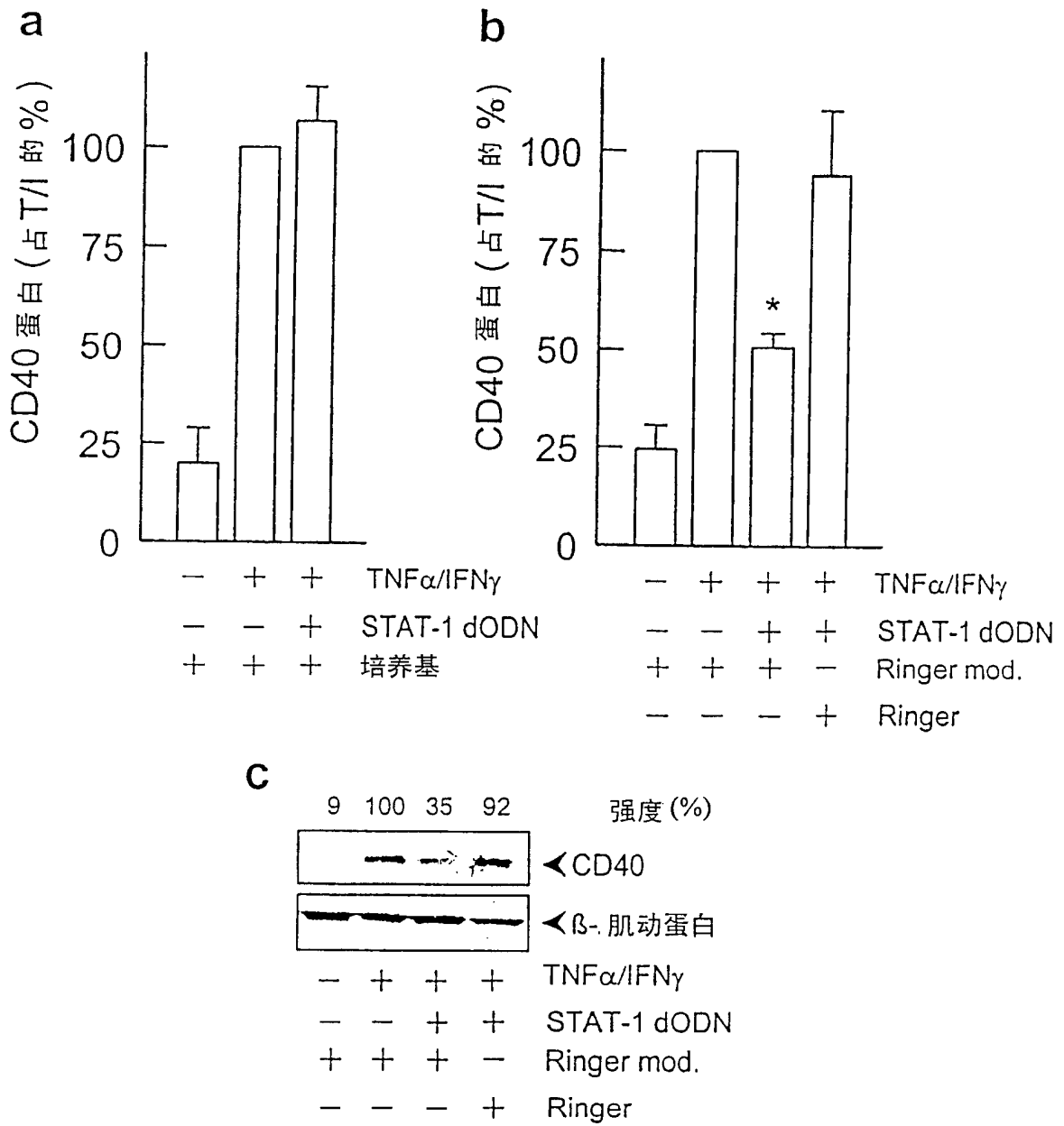


图7