



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101035835 B

(45) 授权公告日 2011.06.08

---

(21) 申请号 200580033784.7 *C12Q 1/68* (2006.01)  
(22) 申请日 2005.09.16 *A61K 48/00* (2006.01)  
(30) 优先权数据 *C12N 15/88* (2006.01)  
60/615,764 2004.10.04 US  
60/698,357 2005.07.11 US  
(85) PCT申请进入国家阶段日 (56) 对比文件  
2007.04.04 EP 1279682 A, 2003.01.29, 全文.  
US 6696038 B1, 2004.02.24, 全文.  
审查员 吴进高  
(86) PCT申请的申请数据  
PCT/US2005/033274 2005.09.16  
(87) PCT申请的公布数据  
W02006/041617 EN 2006.04.20  
(73) 专利权人 日东电工株式会社  
地址 日本大阪  
(72) 发明人 赵刚 付晓丽 俞磊  
(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理  
有限责任公司 11204  
代理人 王达佐 韩克飞  
(51) Int. Cl.  
*C08G 73/02* (2006.01)  
*G01N 33/545* (2006.01)  
*A61K 41/00* (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 9 页

---

(54) 发明名称  
可生物降解的阳离子聚合物

(57) 摘要  
用于向细胞输送生物活性剂的组合物,其包含聚乙烯亚胺、可生物降解的基团和相对疏水的基团。



7. 如权利要求 1 所述的聚合物,其能够通过选自水解、酶裂解、还原、光裂解和超声处理的机制降解。

8. 如权利要求 1 所述的聚合物,其中 L 选自  $C_2-C_{50}$  烷基、 $C_2-C_{50}$  杂烷基、 $C_2-C_{50}$  烯基、 $C_2-C_{50}$  杂烯基、 $C_2-C_{50}$  炔基、 $C_2-C_{50}$  杂炔基、 $C_2-C_{50}$  羧基烯基和  $C_2-C_{50}$  羧基杂烯基。

9. 如权利要求 1 所述的聚合物,其中 L 选自  $C_{12}-C_{18}$  脂肪酸基团和胆固醇基团。

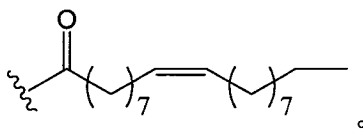
10. 如权利要求 1 所述的聚合物,其中所述聚乙烯亚胺重复单元具有 600 道尔顿至 25,000 道尔顿的分子量。

11. 如权利要求 1 所述的聚合物,具有 2,000 道尔顿至 200,000 道尔顿的重均分子量。

12. 如权利要求 1 所述的聚合物,其是交联的。

13. 如权利要求 1 所述的聚合物,其中所述聚合物包含通式 (Ia) 的重复单元,其中 PEI 是聚乙烯亚胺重复单元;R 是电子对或氢;L 是  $C_2-C_{50}$  羧基烯基;并且 m 是 1 至 30 的整数。

14. 如权利要求 1 所述的聚合物,其中 L 的结构为:



15. 如权利要求 1 所述的聚合物,其中 L 是油酸基团。

16. 组合物,其包含与权利要求 1 所述聚合物配合的生物分子。

17. 如权利要求 16 所述的组合物,其中所述生物分子选自核酸、蛋白质、肽、脂质和碳水化合物。

18. 如权利要求 17 所述的组合物,其中所述核酸选自 DNA、单链 RNA、双链 RNA、核酶、DNA-RNA 杂交体和反义 DNA。

19. 如权利要求 17 所述的组合物,其中所述核酸是 siRNA 或反义寡核苷酸。

20. 如权利要求 16 所述的组合物,其还包含能够进入真核细胞的输送增强剂。

21. 如权利要求 20 所述的组合物,其还包含与所述聚合物配合的诊断显像组分。

22. 如权利要求 20 所述的组合物,其中所述输送增强剂促进真核细胞内的一种或多种功能,所述功能选自:受体识别、内化作用、所述生物分子从细胞核内体的脱逸、核定位、生物分子释放和体系稳定化。

23. 如权利要求 22 所述的组合物,其中所述生物分子选自核酸、肽、蛋白质和碳水化合物。

24. 如权利要求 20 所述的组合物,其中所述输送增强剂与所述聚合物偶联。

25. 向源于培养细胞系的真核细胞输送生物分子的方法,其包括使所述细胞与权利要求 16 所述的组合物在体外接触,由此向所述细胞输送所述生物分子。

26. 权利要求 19 定义的组合物在制备用于治疗需要基因治疗的哺乳动物的药物中的用途。

27. 组合物,其包含与权利要求 1 所述聚合物配合的诊断显像剂。

28. 权利要求 27 定义的组合物在制备向哺乳动物输送诊断显像组合物的药物中的用途。

29. 聚合物库,其包括多种权利要求 1 所述的聚合物,其中对于所述聚合物中的至少两种,选自 R、L、W、PEI 和 m 的至少一个参数是不同的。

30. 医学诊断系统,其包括权利要求 1 所述的聚合物和识别真核细胞的特异性受体的配体。
31. 如权利要求 30 所述的医学诊断系统,其中所述聚合物与所述配体偶联。
32. 药物组合物,其包含致敏剂和权利要求 1 所述的聚合物。
33. 如权利要求 32 所述的药物组合物,其中所述致敏剂对可见光辐射、紫外线辐射或同时对二者敏感。
34. 如权利要求 32 所述的药物组合物,其中所述聚合物对生物分子具有亲合力。
35. 诊断显像组合物,其包含图像对比度试剂和权利要求 1 所述的聚合物。
36. 如权利要求 35 所述的诊断显像组合物,其还包含靶向剂。

## 可生物降解的阳离子聚合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于 2004 年 10 月 4 日提交的美国临时申请第 60/615,764 号和于 2005 年 7 月 11 日提交的美国临时申请第 60/698,357 号的优先权,本文引入这两篇申请的全部内容作为参考。

[0003] 发明背景

### 发明领域

[0004] 本发明涉及用于向细胞输送生物活性剂的组合物和方法。在优选实施方案中,本发明涉及包含聚乙烯亚胺 (PEI)、可生物降解的基团和相对疏水的基团的阳离子脂质聚合物,还涉及使用这样的脂质聚合物来输送生物活性剂的方法,该生物活性剂例如是 DNA、RNA、寡聚核苷酸、蛋白质、肽和药物。

[0005] 相关技术描述

[0006] 多种技术可用于向细胞输送生物活性剂,其包括使用病毒转染体系和非病毒转染体系。病毒体系通常具有比非病毒体系更高的转染率,但是对于病毒体系的安全性已经存在各种问题。参见 Verma I. M and Somia N., Nature 389(1997), pp 239-242; Marhsall E. Science 286(2000), pp 2244-2245。此外,病毒载体的制备倾向于是复杂且昂贵的过程。尽管非病毒转染体系效率通常低于病毒体系,但它们受到更多的关注,因为通常认为它们相对于病毒体系来说更为安全且更加容易制备。

[0007] 多种非病毒转染体系涉及使用与生物活性剂配合的阳离子聚合物。已经被用作基因载体的阳离子聚合物的实例包括聚(L-赖氨酸)(PLL)、聚乙烯亚胺(PEI)、壳聚糖、PAMAM 树状聚合物和聚甲基丙烯酸(2-甲氨基)乙酯(pDMAEMA)。不幸的是,使用 PLL 的转染率通常很差,并且高分子量的 PLL 已显示出对细胞的显著毒性。在某些情况下,PEI 提供有效的基因转移而无需内溶剂(endosomolytic)或靶向剂。参见 Boussif O., Lezoualc' h F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B., Behr J. P., Proc Natl Acad Sci USA. Aug. 1, 1995, 92(16)7297-301。对一系列作为基因输送体系的聚胺树状聚合物进行了研究。参见 Eichman J. D., Bielinska A. U., Kukowska-Latallo J. F., Baker J. R. Jr., Pharm. Sci. Technol. Today 2000 July ;3(7) :232-245。不幸的是,已经被报道了 PEI 和树状聚合物对细胞均具有毒性,因而限制了在人类患者中将 PEI 用作基因输送工具的潜力。此外,具有商业实用性的基因转染率的聚胺树状聚合物的成本相对较高。

[0008] 已经报道了由可降解的阳离子聚合物制成的基因载体以降低的细胞毒性将基因输送至哺乳动物细胞。参见 Lim Y. B., Kim S. M., Lee Y., Lee W. K., Yang T. G., Lee M. J., Suh H., Park J. S., J. Am. Chem. Soc, 123(10), 2460-2461, 2001。不幸地,相对于不可降解的聚合物来说,这些可降解体系同样具有较低的基因转移效率。为了改善低分子量 PEI 的转染率, Gosselin 等人报道了通过使用含有二硫化物的连接剂,可以获得更高分子量的 PEI。参见 Gosselin, Micheal A., Guo, Menjin and Lee, Robert J. Bioconjugate Chem. 2001. 12 : 232-245。使用二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DSP)和二甲基-3,3'-二硫代双丙酸亚

酰胺酯 (dithiobispropionimide)-2HCl (DTBP) 制造的 PEI 聚合物显示出可比的基因转染率和较低的细胞毒性。然而,含有二硫化物的连接剂是昂贵的,这使得该体系的大量制备是困难的并且是不合需要的。具有含有二硫化物的连接剂的聚合物在还原条件下仅仅被降解,这限制了聚合物在其它条件下的应用。

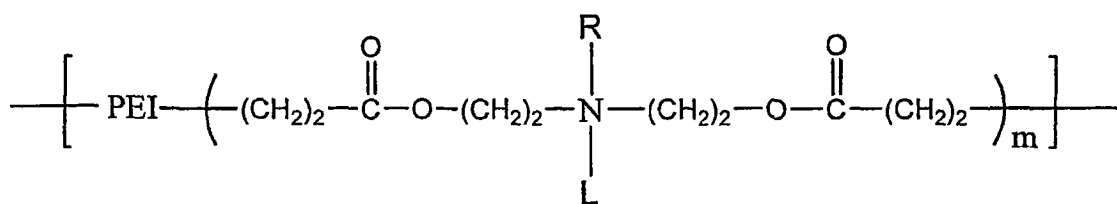
[0009] Lynn 等人已经描述了合成可生物降解的阳离子聚合物的方法,其中使用二丙烯酸酯作为阳离子化合物之间的连接剂分子。参见 Lynn, David A.; Anderson, Daniel G.; Putnam, David; and Langer, Robert. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 8155-8156。然而,所得聚合物不会与众多生物活性剂良好地配合。这些聚合物的合成需要数天完成,并且可被用于基因输送中有效产物的量较低。根据 Lynn 等人的方法,制造了超过一百种阳离子聚合物,但是这些聚合物中仅有两种显示出有效的基因转染率。这些因素使得通过该方法进行高分子聚合物的制备难以完成。

[0010] 因此,仍然亟需能够用于安全且有效地促进将生物活性剂输送至细胞的阳离子聚合物。

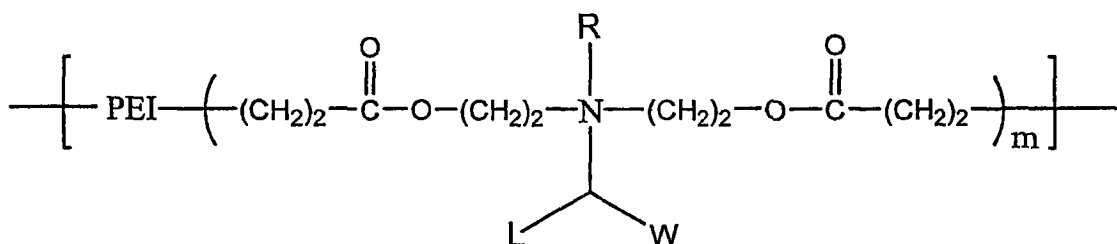
[0011] 发明概述

[0012] 一实施方案提供了包含选自通式 (Ia) 和通式 (Ib) 的重复单元的聚合物:

[0013]



(Ia)



(Ib)

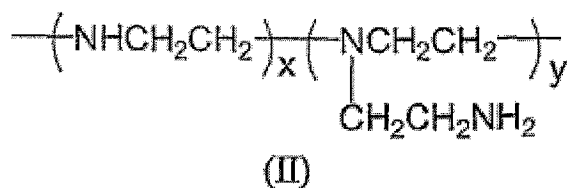
[0014] 其中:PEI 是聚乙烯亚胺重复单元;R 选自电子对、氢、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 杂烷基、C<sub>5</sub>-C<sub>30</sub> 芳基和 C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub> 杂芳基;L 选自 C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 杂烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 杂烯基、C<sub>5</sub>-C<sub>50</sub> 芳基;C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 杂芳基;C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 炔基、C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 杂炔基、C<sub>5</sub>-C<sub>50</sub> 芳基;C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 杂芳基;C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 羧基烯基和 C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 羧基杂烯基;W 是包含约 2 至约 50 个碳原子的阳离子部分;以及 m 是约 1 至约 30 的整数。

[0015] 选自通式 (Ia) 和通式 (Ib) 的重复单元在本文中也可以称为式 (I) 的重复单元。因此,例如包含选自通式 (Ia) 和通式 (Ib) 的重复单元的聚合物在本文中也可以称为包含通式 (I) 的重复单元的聚合物或者称为通式 (I) 的聚合物。包含通式 (I) 的重复单元的聚

合物在本文中也可以称为阳离子脂质聚合物。

[0016] 在优选的实施方案中,通式 (Ia) 和 (Ib) 中的 PEI 由通式 (II) 的重复单元表示:

[0017]



[0018] 其中 x 为约 1 至约 100 的整数并且 y 是约 1 至约 100 的整数。本领域技术人员可以理解,通式 (I) 的重复单元中的氮原子可带有阳离子型电荷并因此可以与多种带负电荷的物质形成离子键,所述带负电荷的物质例如阴离子,如氯化物、溴化物、碘化物、硫酸根等。可以制备式 (I) 的多种聚合物并储存直至使用,并因此另一实施方案提供了包括多种聚合物的聚合物库,其中每一聚合物独立地包含通式 (I) 的重复单元,其中对于所述聚合物至少两种,其选自 R、L、PEI、W 和 m 的至少一个参数是不同的。在另一实施方案中,提供包含选自通式 (Ia) 和通式 (Ib) 的重复单元的聚合物,其中 W 包括胺和选自如下的含碳基团: C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 杂烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 杂烯基、C<sub>5</sub>-C<sub>50</sub> 芳基; C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 杂芳基; C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 羧基烯基和 C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> 羧基杂烯基。

[0019] 在另一实施方案中,包含通式 (I) 重复单元的聚合物还包括与聚合物配合的生物分子。该生物分子可带有一个或多个阴离子基团并可与通式 (I) 的重复单元形成离子键。带有一个或多个阴离子基团的生物分子的实例包括核酸(例如 DNA、单链 RNA、双链 RNA、核酶、DNA-RNA 杂交体、siRNA、反义 DNA 和反义寡核苷酸(oligo))、蛋白质、肽、脂质和碳水化合物。

[0020] 在另一实施方案中,包含通式 (I) 重复单元的聚合物还包含生物分子、能够进入真核细胞的输送增强剂和 / 或与所述聚合物配合的诊断显像组合物。该输送增强剂可促进真核细胞内的一种或多种功能,例如受体识别、内化作用、该生物分子从细胞核内体的脱逸、核定位、生物分子释放和体系稳定化。

[0021] 包含通式 (I) 的重复单元的聚合物可用于转染真核细胞,所述聚合物还包含生物分子,并且还可以包含能够进入真核细胞的输送增强剂和 / 或与所述聚合物配合的诊断显像组合物。因此,另一实施方案提供了转染真核细胞的方法,其包括使细胞与这样的聚合物(包含通式 (I) 的重复单元和生物分子,任意地含包括石松增强剂和 / 或诊断显像组合物)接触,以由此将该生物分子输送至细胞。该方法可以涉及治疗哺乳动物,其包括识别需要基因治疗的哺乳动物并将这样的聚合物给予该哺乳动物。在一优选的实施方案中,所述生物分子是 siRNA,其中该 siRNA 能有效降低所关注的基因的表达。

[0022] 另一实施方案提供了医学诊断系统,其包括识别真核细胞的特异性受体的配体和聚合物,其中所述聚合物包含通式 (I) 的重复单元和生物分子,并且还可以包含能够进入真核细胞的输送增强剂和 / 或与该聚合物配合的诊断显像组合物。

[0023] 另一实施方案提供了药物组合物,其包含致敏剂和聚合物,其中所述聚合物包含通式 (I) 的重复单元和生物分子,并且还可以包含能够进入真核细胞的输送增强剂和 / 或与该聚合物配合的诊断显像组合物。所述致敏剂可以通过暴露于光或其它刺激而经历了性质的转变,由此促进生物分子的输送(例如通过提高所述聚合物的降解速率)的化合物。

所述致敏剂本身可以是对刺激活性有所改变的生物分子。

[0024] 另一实施方案提供了向哺乳动物输送诊断显像组合物的方法,其包括对所述哺乳动物给予组合物,其中所述组合物包含与含有选自通式 (Ia) 和通式 (Ib) 的重复单元的聚合物配合的诊断显像剂。

[0025] 另一实施方案诊断显像组合物,其包含图像对比度试剂和含有选自通式 (Ia) 和通式 (Ib) 的重复单元的聚合物,并且所述聚合物还能够包含靶向剂。

[0026] 如下更详细地描述这些及其他实施方案。

[0027] 附图的简要说明

[0028] 图 1 显示由脂质聚合物 (5A、5B 和 5C) 和 lipofectamine 2000 转染后,293 细胞中典型的 GFP 信号。

[0029] 图 2 显示由脂质聚合物 (5A、5B 和 5C) 和 lipofectamine 2000 转染后,208F 细胞中典型的 GFP 信号。

[0030] 图 3 显示由脂质聚合物 (5A、5B 和 5C) 和 lipofectamine 2000 (“lipo”) 转染后,208F 和 293 细胞的相对荧光水平的图。

[0031] 图 4 显示由脂质聚合物 (5A、5B 和 5C) 和 lipofectamine 2000 进行 siRNA 输送后,HT-GFP 细胞中典型的 GFP 信号。

[0032] 图 5 显示由脂质聚合物 (5A、5B 和 5C) 和 lipofectamine 2000 进行 siRNA 输送后,HeLa-GFP 细胞中典型的 GFP 信号。

[0033] 图 6 显示由脂质聚合物 (5A、5B 和 5C) 和 lipofectamine 2000 (“lipo”) 进行 siRNA 输送后,HT-GFP 和 HeLa GFP 细胞的相对荧光水平的图。

[0034] 图 7 显示 siRNA 输送后,脂质聚合物 (5A、5B 和 5C) 和 lipofectamine2000 (“lipo”) 的细胞存活分数的图。

[0035] 图 8 显示由阳离子脂质聚合物 (5A、5B 和 5C) 输送不同的 SiRNA 后,HT-GFP 基因的相对荧光水平的图。

[0036] 图 9 显示与游离寡核苷酸的溶液相比,反义寡核苷酸 / 脂质聚合物配合物的相对荧光单位的图。

[0037] 图 10 显示聚合物 6 与 DNA 结合的凝胶电泳的结果。

[0038] 图 11 显示由 7A 和 lipofectamine 2000 转染后,293 细胞的典型的 GFP 信号。

[0039] 图 12 显示由聚合物 7A 和 lipofectamine 2000 输送反义寡核苷酸后,luc 705 细胞中虫荧光素酶活性的图。

[0040] 图 13 显示聚合物 7A 和 lipofectamine 2000 介导的 SiRNA 输送后,CHO-AA8luc 中虫荧光素酶活性的图。

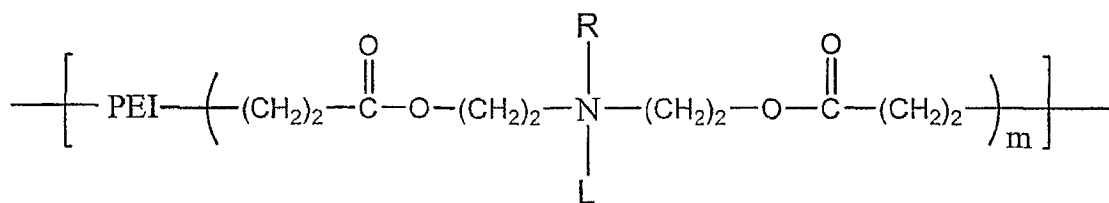
[0041] 图 14 显示使用 7A 和 lipofectamine 转染后表明细胞存活分数的图。

[0042] 图 15 显示在 opti MEM 中孵育不同时间后,7A 的 GFP 转染率的图。

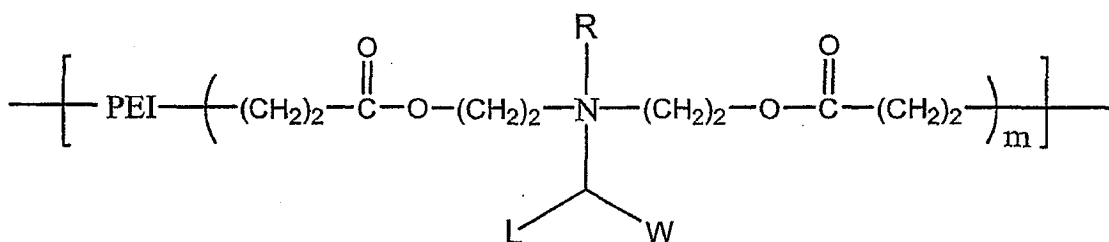
[0043] 实施方案的详细说明

[0044] 一实施方案提供包含聚乙烯亚胺、可生物降解的基团和相对疏水的“脂”基团的阳离子脂质聚合物。优选的阳离子脂质聚合物包含选自通式 (Ia) 和通式 (Ib) 的重复单元:

[0045]



(Ia)



(Ib)

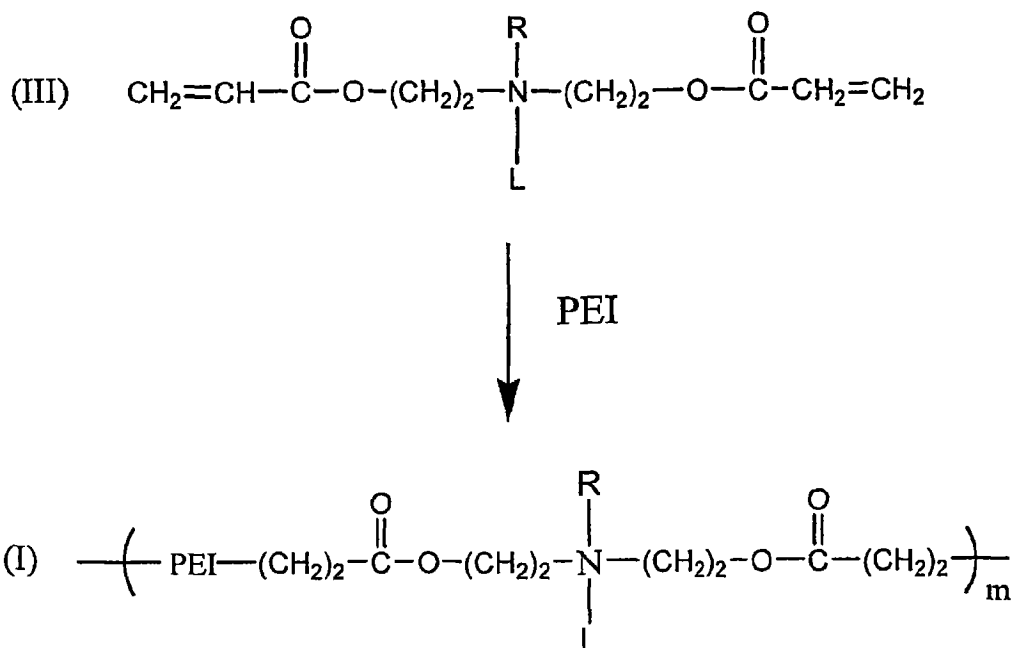
[0046] 应该理解,本文使用的“通式(I)”表示通式(Ia)和通式(Ib)。在通式(I)中,PEI是聚乙烯亚胺(例如包含由上述通式(II)表示的重复单元的聚合物),酯键是可生物降解的基团,L代表相对疏水的“脂”基团,并且m为约1至约30。例如,在某些实施方案中,L选自C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>杂烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>杂烯基、C<sub>5</sub>-C<sub>50</sub>芳基;C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>杂芳基;C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>炔基、C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>杂炔基、C<sub>5</sub>-C<sub>50</sub>芳基;C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>杂芳基;C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>羧基烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>羧基杂烯基。在优选实施方案中,L选自C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>脂肪酸、胆固醇以及它们的衍生物。通式(I)中的R可以代表电子对或氢原子。本领域技术人员可以理解,当R代表电子对时,在低pH下,通式(I)的重复单元是阳离子型的。通式(I)中的R也可以代表相对疏水的脂基团,例如C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>杂烷基、C<sub>5</sub>-C<sub>30</sub>芳基或C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>杂芳基,在这样的情况下,应该理解,通常在较宽的pH范围内,氮原子带有阳离子型电荷。

[0047] 如下列方案所示,包含通式(I)重复单元的阳离子脂质聚合物可以由通式(III)的二丙烯酸酯单体与聚乙烯亚胺(PEI)反应来制备:

[0048]

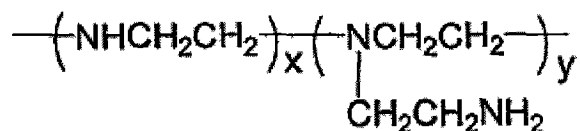
方案A

[0049]



[0050] 在通式 (III) 中, R 和 L 具有与上述包含通式 (I) 的重复单元的阳离子脂质聚合物相同的含义。方案 A 说明了包含通式 (Ia) 的重复单元的聚合物的制备。应该理解, 可以按照类似的方式从含有 W 基团的合适的二丙烯酸酯单体来制备包含通式 (Ib) 的重复单元的聚合物。PEI 优选含有通式 (II) 的重复单元, 其中 x 是约 1 至约 100 的整数并且 y 是约 1 至约 100 的整数。

[0051]



(II)

[0052] 方案 A 中说明的反应可以通过在诸如乙醇等互溶剂中搅拌混合 PEI 和二丙烯酸酯 (III) 来进行, 优选在室温下进行数小时的反应, 然后蒸发溶剂以回收所得到的聚合物。本发明并不受到理论的约束, 但是我们认为 PEI 和二丙烯酸酯 (III) 之间的反应涉及一种或多种 PEI 的胺与二丙烯酸酯的双键之间的 Michael 反应。参见 J. March, *Advanced Organic Chemistry* 3<sup>rd</sup> Ed., pp 711-712 (1985)。可以使用下述实施例中所述的方法制备方案 A 中所示的二丙烯酸酯。

[0053] 通过改变 PEI 的分子量和结构、二丙烯酸酯 (III) 上的 R、W 和 L 基团的尺寸和类型以及二丙烯酸酯 (III) 与 PEI 之比, 可以根据方案 A 制备多种包含通式 (I) 的重复单元的聚合物。可以使用不同的二丙烯酸酯的混合物和 / 或不同的 PEI 的混合物。PEI 可以为多功能的, 并因此能够与两种或多种二丙烯酸酯反应。可以使用交联剂以生产交联的阳离子脂质聚合物和 / 或可以调节多功能 PEI 和二丙烯酸酯 (III) 的相对比例以生产交联的阳离子脂质聚合物。PEI 的分子量优选为约 600 至大 25,000 道尔顿。PEI 与二丙烯酸酯的摩尔比优选为约 1 : 2 至约 1 : 20。所述阳离子脂质聚合物的重均分子量可以为约 500 道尔顿至约 1,000,000 道尔顿, 优选为约 2,000 道尔顿至约 200,000 道尔顿。可以使用 PEG 标

准样品通过尺寸排阻色谱法或通过琼脂糖凝胶电泳来确定分子量。在一实施方案中,通过制备其中对于至少两种聚合物来说 R、L、W、PEI 和 / 或 m 不同的多种阳离子脂质聚合物来提供聚合物库。

[0054] 所述阳离子脂质聚合物优选为可降解的,更优选为可生物降解的,例如可通过选自水解、酶裂解、还原、光裂解和超声处理等机制降解。虽然本发明并不限于理论,但是人们认为细胞内通式 (I) 阳离子脂质聚合物的降解是通过酶裂解和 / 或酯键的水解进行的。

[0055] 所述阳离子脂质聚合物可以与生物分子形成配合物并因此可用作将生物分子输送至细胞的载体。与通式 (I) 所述阳离子脂质聚合物形成配合物的生物分子的实例包括核酸、蛋白质、肽、脂质和碳水化合物。核酸的实例包括 DNA、单链 RNA、双链 RNA、核酶、DNA-RNA 杂交体和反义 DNA, 例如反义寡核苷酸。优选的核酸是 siRNA。可以通过在互溶剂中混合阳离子脂质聚合物和生物分子来形成包含与聚合物配合的生物分子的阳离子脂质聚合物,更优选通过以下实施例中所述的方法进行。

[0056] 包含与聚合物配合的生物分子的阳离子脂质聚合物还可以包含能够进入真核细胞的输送增强剂。所述输送增强剂可以被所述配合物溶解或与所述配合物混合,或者可以与所述阳离子脂质聚合物偶联(例如共价连接或配合)。输送增强剂是促进生物分子向细胞运输的物质,通常通过增强生物分子 / 载体配合物的跨膜运输、减少运输期间的降解和 / 或促进生物分子从载体的释放。诸如基因等生物分子运输进细胞优选涉及生物分子 / 载体配合物穿过细胞膜、核内体膜和核膜后,从载体中释放生物分子。例如,在核酸的情况下,核酸 / 载体配合物首先穿过细胞膜。当这通过内吞作用完成时,核酸 / 载体配合物被内在化。通过形成袋状物由细胞膜包裹载体和核酸 - 负载物 (cargo), 并随后修整所述袋状物。所得是细胞核内体,这是一种包含核酸负载物和载体的大的膜包裹结构。核酸 - 载体配合物随后通过核内体膜脱逸而进入细胞质,避免了细胞质中的酶降解,并穿过核膜。一旦处于核中,所述核酸负载物就从载体分离出来。

[0057] 通常,输送增强剂分为两类:病毒载体体系和非病毒载体体系。由于人类病毒已经进化出克服障碍以运输入上述细胞核的方法,所以病毒或病毒成分可用于将核酸运输入细胞。可用作输送增强剂的病毒成分的一个实例是血细胞凝集素肽 (HA-肽)。该病毒肽通过核内体破裂促进了生物分子向细胞的转移。在核内体的酸性 pH 下,该蛋白质引起生物分子和载体向细胞溶质的释放。可用作输送增强剂的病毒成分的其它实例是本领域技术人员公知的。

[0058] 非病毒输送增强剂通常是基于聚合物的或基于脂质的。它们通常是平衡所述核酸负电荷的聚阳离子。部分由于聚阳离子聚合物能够浓缩无限大小的 DNA 质粒以及对于病毒载体的安全性的顾虑,聚阳离子聚合物已经显示出非常有希望作为非病毒基因输送增强剂。实例包括具有富含碱性氨基酸区域的肽,所述碱性氨基酸例如寡赖氨酸、寡精氨酸或其组合以及 PEI。这些聚阳离子聚合物被认为通过 DNA 的浓缩促进了运输。诸如 PEI 等聚阳离子的支链形式和星形树状聚合物可以介导 DNA 的浓缩和核内体的释放。参见 Boussif, et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 92 :7297-7301。PEI 可以被制备为具有可在 pH 6.9 时可电离的位于末端的胺并且具有在 pH 3.9 时可电离的位于内部的胺的高度支化聚合物。由于该结构,PEI 可以产生泡 pH 的变化,该变化导致泡的膨胀,并且最终从核内体捕集释放。

[0059] 对于阳离子脂质聚合物,增强输送的另一方式包括由已经靶向生物分子负载物输送的细胞上的受体识别的配体。生物分子向细胞的输送可随后由受体识别启动。在本文中,术语“配体”指可以与位于靶细胞表面或者其细胞核或细胞溶质中的特异性受体蛋白结合的生物分子。在一实施方案中,所述配体可以是抗体、激素、信息素或神经递质、或能够作为配体与受体结合的任何生物分子。抗体指由 B 淋巴细胞应答抗原而产生的任何蛋白质。当配体与特定的细胞受体结合时,内吞作用得到刺激。已经与多种细胞类型使用以增强生物分子运输的配体实例是半乳糖、铁传递蛋白、糖蛋白脱唾液酸血清类粘蛋白、腺病毒纤维、疟原虫环孢子(circumsporozite)蛋白质、表皮生长因子、人类乳头状瘤病毒衣壳、成纤维细胞生长因子和叶酸。在叶酸受体的情况下,所述结合配体通过被称作饮液作用的过程内在化,其中所述受体结合所述配体,围绕膜封闭细胞表面,以及所述内在化的材料随后穿过液胞膜进入细胞质。参见 Gottschallc, et al. (1994) Gene Ther 1 :185-191。

[0060] 多种输送增强剂被认为通过核内体破裂起作用。例如,除了上述的 HA- 蛋白质以外,缺损的病毒颗粒也已用作内溶剂。参见 Cotten, et al. (July 1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 89 :pages 6094-6098。非病毒剂通常是两亲的或者是基于脂质的。

[0061] 可以通过介导核内体破裂、减少降解或同时绕过该过程的试剂来增强诸如 DNA 等生物分子释放入细胞的细胞质。提高核内体 pH 的氯喹已经被用于通过抑制溶酶体水解酶来减少胞吞材料的降解。参见 Wagner et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA vol. 87 : 3410-3414。诸如 PEI 等支链聚阳离子和星形树状聚合物也促进了上述核内体的释放。

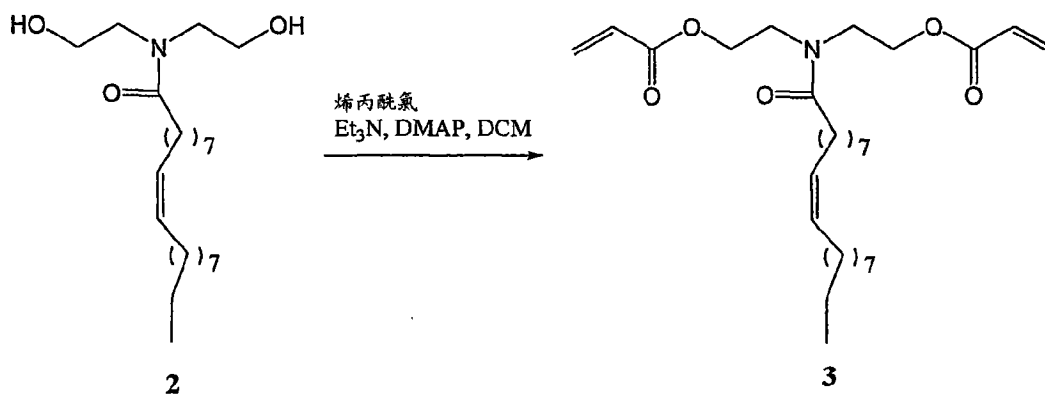
[0062] 核内体的降解可以通过并入作为嵌合蛋白质成分的毒素的亚单位而回避,所述毒素例如白喉 (Diphtheria) 毒素和假单胞菌属 (Pseudomonas) 外毒素,所述嵌合蛋白质可以并入阳离子脂质聚合物 / 生物分子配合物。参见 Uherek et al. (1998) J Biol. Chem. vol. 273 :8835-8841。这些成分促进了核酸穿过核内体膜并返回内质网。

[0063] 一旦处于细胞质中,生物分子负载物向细胞核的运输可以通过包含核酸载体上核定位信号的包含而得到增强。例如,可以使用作为核定位信号 (NLS) 而起作用的特异性氨基酸顺序。人们认为生物分子 / 载体配合物上的 NLS 与位于细胞溶质中的特异性核运输受体蛋白相互作用。一旦所述生物分子 / 载体配合物得到装配,配合物中的受体蛋白被认为与核孔蛋白产生多重接触,由此通过核膜孔输送配合物。所述生物分子 / 载体配合物到达其目的地后,发生解离,释放出负载物及其他成分。来自 SV40 大型 T 抗原的序列 Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val 可以被用于向细胞核运输。人们认为来自 SV40 大型 T 抗原的该短序列可以提供引起缔合大分子运输至细胞核的信号。

[0064] 阳离子脂质聚合物还可以包含与所述聚合物配合的诊断显像化合物,例如荧光的、放射性的或放射性不可穿透的染料。可以通过在互溶剂中混合阳离子脂质聚合物和诊断显像化合物来形成所述配合物。对哺乳动物给药后,可以使用公知技术,例如 PET、MRI、CT、SPECT 等来追踪所述聚合物 (与诊断显像化合物配合的)。(参见 Molecular Imaging of Gene Expression and Protein Function In Vivo With PET and SPECT (使用 PET 和 SPECT 对体内基因表达和蛋白质功能的分子显像), Vijay Sharma, PhD, Gary D. Luker, MD, and David Piwnica-Worms, MD, Ph.D., JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING 16 : 336-351 (2002))。

[0065] 另一实施方案提供了药物组合物,其包含致敏剂和聚合物,其中所述聚合物包含





[0071] 在室温下将三乙胺 (8.1g, 80mmol)、DMAP (0.5g, 4mmol) 和 2 (7.1g, 20mmol) 溶于 200mL 的二氯甲烷中。使用氩气冲洗体系并在冰浴中冷却所述溶液。滴加烯丙酰氯 (5.4g, 60mmol) 的 25mL 二氯甲烷溶液。加入后, 反应被温和加热至室温并搅拌过夜。用二氯甲烷稀释所述反应混合物并用 1N HCl 和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液洗涤。干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 有机相并减压浓缩。然后使用硅胶柱 (1 : 3 乙酸乙酯 : 己烷) 纯化粗残余物, 得到 7.5g (81%) 无色油状化合物 3。

#### [0072] 实施例 3

[0073] 根据方案 A, 通过将具有分子量为 600 的聚乙烯亚胺 (PEI-600) 与化合物 3 反应, 如下进行阳离子脂质聚合物的合成: 称量约 0.6g PEI-600 (Aldrich) 并放入小瓶中, 并且加入 10mL 乙醇。在 PEI-600 完全溶解后, 将 3.7g (8.0mmol) 3 的 10mL 乙醇溶液迅速加入至 PEI 溶液中同时搅拌。在室温下将所述反应混合物搅拌 2 小时。减压除去有机溶剂后, 得到透明的粘稠液体。<sup>1</sup>H-NMR 光谱显示丙烯酸的碳-碳双键完全消失。通过琼脂糖凝胶电泳估计所得到的聚合物的分子量。这是作为涉及类似化合物的其它合成操作模型的通常操作, 并且可被用来合成一系列的可降解的阳离子脂质聚合物。

#### [0074] 实施例 4

[0075] 如实施例 3 所述来制备阳离子脂质聚合物, 所不同的是在室温 (25°C) 下搅拌反应混合物 2 小时后, 通过加入的 2.5mL 4M HCl 的醚溶液来中和所述反应混合物。过滤白色沉淀物 5C, 使用乙醇洗涤, 并且在室温下减压干燥。使用 NMR 波谱仪和琼脂糖凝胶电泳表征所得到的聚合物 5C。使用类似的方法制备聚合物 5A 和 5B : 5A : PEI<sub>1800</sub>, m = 12 ; 5B : PEI<sub>600</sub>, m = 3 ; 5C : PEI<sub>600</sub>, m = 8。这是作为涉及类似化合物的其它合成操作模型的通常操作, 并且可被用来合成一系列的可降解的阳离子脂质聚合物。

#### [0076] 实施例 5

[0077] 细胞培养: 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 和 100% 湿度的条件下, 将 HEK 293T、208F、HT 1080-EGFP 和 HeLa-EGFP 细胞保持在含有 10% FBS、100 单位 /ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 中。在该培养基中, 细胞具有约 20 小时的倍增时间并且每 3-4 天进行分离以避免融合。

#### [0078] 实施例 6

[0079] 质粒 DNA 制备: 从 BD Sciences Clontech 公司购买 pEGFP-N1 质粒, 编码野生型 GFP 的红移变体, 将其优化用于哺乳动物细胞中更亮的荧光和更高的表达。通过 CMV (P<sub>CMV IE</sub>)

的立即早期启动子控制 GFP。所述质粒在 DH5  $\alpha$  E. coli 中扩增并且使用 Qiagen Plasmid Max Preparation Kit 进行纯化, 并且其总是具有大于 1.7 的 A260/A280。

[0080] 实施例 7

[0081] 体外转染: 将 293 和 208F 细胞置于 96 孔组织培养板中 (对于 293 细胞  $5 \times 10^4$  细胞 / 孔, 对于 208F 细胞  $1 \times 10^4$  细胞 / 孔) 并在含有 10% FBS 的 DMEM 中孵育过夜。质粒 - 聚合物配合物的准确混合顺序是转染结果中的关键参数。对于每一孔, 将等份的不同浓度的  $7.5 \mu\text{l}$  的脂质聚合物溶液加入至含有  $0.6 \mu\text{g}$  pEGFP-N1 质粒的  $7.5 \mu\text{l}$  DNA 溶液中并完全混合。在室温下将 DNA 和脂质聚合物的混合物孵育 15 分钟以形成 DNA- 脂质聚合物配合物。将配合物加入每一孔并且在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下将细胞孵育 24 小时。通过 GFP 信号分析确定 EGFP 基因转染率。根据制造商提供的实验方案, Lipofectamine 被用作阳性对照。

[0082] 实施例 8

[0083] GFP 信号的观察: 在荧光显微镜 (Olympus, 520nm 滤波器) 下观察来自实施例 3 的转染细胞中的绿色荧光信号。使用 10 倍物镜对细胞拍照。从最佳阳离子聚合物数量的三场 (three fields) 计数来确定转染的培养物中具有 GFP 信号的细胞百分比。293 细胞中的 lipofectamine 2000 的转染率约为 60%, 5A、5B 和 5C 的转染率分别为约 25%、55% 和 40%, 但 5A 和 5C 的荧光密度稍许降低 (参见图 1)。在 208F 中也检测到了上述脂质聚合物的基因转染率, 其中在通过 5A、5B、5C 和 lipofectamine 2000 介导的转染后, GFP 阳性细胞分别为约 40%、45%、25% 和 50% (参见图 2)。虽然脂质聚合物不如 lipofectamine 2000 那么好, 但是 5B 的转染率与 lipofectamine 2000 很接近, 所述 lipofectamine 2000 是市场上一种主要的转染试剂。结果显示所述脂质聚合物具有成为多种细胞系的转染试剂的潜力。

[0084] 为了定量所述转染率, 通过荧光微量培养板读板器 (FLX 800, Bio-TEK Instruments Co Ltd) 确定转染细胞的相对荧光单位。lipofectamine 2000 转染的 293 细胞的相对荧光单位 (RFU) 是 14596, 为 5B 转染的细胞 (6318) 的约 2.3 倍, 而 lipofectamine 2000 和 5C 转染的 208F 细胞的 RFU 分别是 2544 和 1954, 这表明在不同的细胞中转染试剂显示出不同的性能并且新的脂质聚合物在某些细胞系中可能具有更好的性能 (参见图 3)。

[0085] 实施例 9

[0086] SiRNA 输送研究: 在 HT1080-EGFP 和 HeLa EGFP 细胞中确定 SiRNA 输送效率, 其分别来源于具有稳定 EGFP 基因表达的 HT 1080 和 HeLa 细胞。通过 Dharmacon Research Inc. 的 SiRNA 靶向 EGFP 来合成 SiRNA 靶向 EGFP 基因和虫荧光素酶基因, 并且虫荧光素酶基因是 21bp 的双链 RNA, 其有义链的序列分别是 AAC GAG AAG CGC GAU CAC AUG 和 AAG UGC GCU GCU GGU GCC AAC。

[0087] 转染前, 对于每一孔, 将  $1.5 \times 10^4$  HT1080-EGFP 和 HeLa-EGFP 接种在 96 孔板中 24h。对于每一孔, 将等份的不同浓度的  $7.5 \mu\text{l}$  的脂质聚合物溶液加入至含有  $2.0 \text{pmol}$  siRNA 的  $7.5 \mu\text{l}$  DNA 溶液中并完全混合。在室温下将 DNA 和脂质聚合物的混合物孵育 15 分钟以形成 SiRNA- 脂质聚合物配合物。向每一孔中加入所述配合物并在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下将细胞孵育 48 小时。根据制造商提供的实验方案, Lipofectamine 被用作阳性对照。通过 GFP 信号分析确定 siRNA 输送效率。

[0088] 在 HT-GFP 和 HeLa GFP 细胞中, 5C 显示出非常高的 siRNA 输送, 因为在 5C 介导

siRNA 输送后,GFP 信号被极大地抑制。5C 介导的 siRNA 输送的 HT-GFP 和 HeLa-GFP 细胞中的 GFP 信号低于 lipofectamine 2000 介导的 siRNA 输送细胞中的 GFP 信号。结果表明在两种细胞系中 5C 均具有比 lipofectamine 2000 更高的 siRNA 输送效率(图 4 和图 5)。另一方面,样品 5A 和 5B 也显示出 siRNA 输送效率,尽管该效率低于 lipofectamine 2000 的效率。通过荧光微量培养板读板器来确定相对荧光单位,并且结果显示 5C 介导的 siRNA 输送的 HT1080-EGFP 和 HeLaEGFP 细胞的相对荧光水平仅为未输送试剂基团的 27-28%,低于 lipofectamine 2000 介导的 siRNA 输送细胞,与未输送试剂基团相比,这显示出约 33-46% 的相对荧光水平。换句话说,在 5C 介导的输送的细胞中的 EGFP 基因表达抑制效率约为 72-73%,比 lipofectamine 2000 高得多后者显示出 54-67% 的抑制效率。结果表明 5C 比 lipofectamine 2000 具有更高的 siRNA 输送效率。

[0089]

## 实施例 10

[0090] 细胞毒性试验:使用 3-[4,5 二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基四唑鎓溴化物(MTT)在哺乳动物细胞中评价阳离子基因载体的细胞毒性。通过实施例 9 中描述的方法 siRNA 输送 48 小时后,将 10  $\mu$ l MTT 溶液(PBS 中 5.0mg/mL, Sigma)加入至每一孔,并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 3 小时。随后除去培养基并将 200  $\mu$ l DMSO 加入每一孔以溶解活细胞产生的甲臞(formazan)晶体。在 570nm 测量该溶液的吸光度。使用如下等式来计算 细胞活力:活力(%) =  $\{Abs_{570}(\text{样品})/Abs_{570}(\text{对照})\}$ 。对照指没有向细胞加入任何试剂或 siRNA。结果表明所有的 3 个样品 5A、5B 和 5C 的细胞毒性都很低,在最优条件下, siRNA 输送后超过 95% 的细胞存活,通过 lipofectamine 2000 的 siRNA 输送后,细胞活力约为 65%。由于 HeLa 细胞对转染试剂的细胞毒性敏感,该结果表明新的脂质聚合物具有很低的细胞毒性。

[0091]

## 实施例 11

[0092] 在 siRNA 输送中脂质聚合物的特异性:为了评价 GFP 信号的抑制是否是由细胞毒性或其它非特异性因素引起的,研究了 siRNA 输送的特异性。将 siRNA 靶向 GFP 和 Luc 基因由 5A、5B 和 5C 输送到 HT-GFP 细胞。在输送后 48 小时观察 GFP 信号:发现 5B 和 5A 具有低的输送效率,因为 GFP 信号没有任何改变。5C 显示出很高的输送效率,因为当在最优条件下时,在 siRNA 输送(靶向 GFP 基因)48 小时后,72% 的 GFP 受到抑制。另一方面,当使用 siRNA 靶向 luc 基因时,没有发现任何抑制。该结果表明 siRNA 输送特异性地抑制 GFP 信号,而不是细胞毒性引起的抑制。

[0093]

## 实施例 12

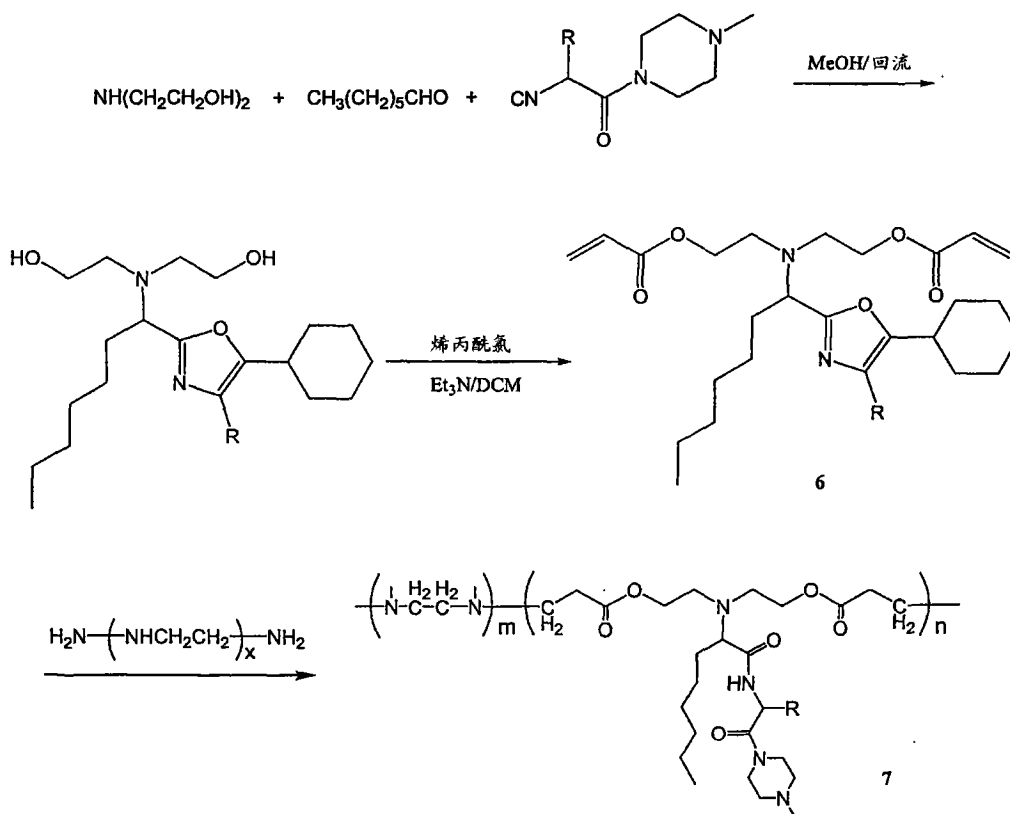
[0094] 降解研究:为了检测生物降解,在 opti MEM 中将脂质聚合物稀释至 320  $\mu$ g/ml 的最终浓度并在 37 $^{\circ}$ C 下分别孵育 2、4、8 和 24 小时。通过 FITC 标记的反义寡核苷酸来确定样品的 DNA 结合亲和力。将 100  $\mu$ l 聚合物加入到 96 孔板中的 100  $\mu$ l 寡核苷酸溶液(2  $\mu$ mol/L)中,同时旋涡振荡,并将该混合物孵育 15 分钟。然后,通过荧光微量培养板读板器来确定荧光(灵敏度 = 45)。游离寡核苷酸溶液(寡核苷酸溶液仅仅与 100  $\mu$ l 的 opti MEM 溶液混合)的相对荧光单位约为 5200RFU,而 PEI 25K 和 PEI 600 分别为 1823 和 4350。该结果表明具有高 DNA 结合亲和力的 PEI25K 显示出高的荧光抑制(约 64% 抑制),而 PEI 600 显示出很低的荧光单位抑制(18%),因为 PEI 600 通常显示出很低的 DNA 结合亲和力。至于基于阳离子脂质的聚合物,荧光抑制效率约为 65% 至 70%,这表明该聚合物具有高的 DNA 结合亲和力。

[0095] 在 37°C 下在 opti MEM 中孵育 24h 后, PEI 25K 和 PEI 600 均没有显示出 DNA 结合亲和力的显著变化, 因为与原始样品相比, 荧光信号几乎没有发生变化, 这表明 PEI 25K 是不可降解的。然而, 在 37°C 下孵育 8 小时后, 5A、5B 和 5C 的荧光抑制效率逐渐地降低至约 10%, 低于 PEI600。该结果表明脂质聚合物在 opti MEM 中是可降解的。

[0096]

### 实施例 13

[0097]



[0098] 称量五亚乙基六胺 (PEHA) (43mg, 0.19mmol) 并放入小瓶中, 并加入 2ml 乙醇。PEHA 完全溶解后, 将化合物 6 ( $n \times 100\text{mg}$ ,  $n \times 0.19\text{mmol}$ ) 迅速加入该 PEHA 溶液中, 同时搅拌。在室温 (25°C) 下将反应混合物搅拌 2 小时。然后, 通过加入 1ml 4M HCl 的醚溶液来中和该反应混合物。过滤白色沉淀物, 使用乙醇洗涤, 并且在室温下减压干燥。由 NMR 和琼脂糖凝胶电泳表征所得到的聚合物 7。

[0099] 使用类似的方法通过改变 PEHA 与 6 之比如下制备其它交联的可降解的阳离子脂质聚合物: 7A: PEHA/6 = 1/1; 7B: PEHA/6 = 2/1; 7C: PEHA/6 = 3/1; 7D: PEHA/6 = 4/1; 7E: PEHA/6 = 5/1; 7F: PEHA/6 = 6/1。

[0100]

### 实施例 14

[0101] 细胞培养: 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 以及 100% 湿度条件下, 将 HEK 293 细胞和 HeLa 705 细胞保持在含有 10% FBS、100 单位 /mL 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基中。在含有 10% FBS 和抗生素的 MEM 培养基中培养 CHO-AA8luc, 其它条件与 293 和 HeLa 705 细胞相同。所述细胞具有约 20 小时的倍增时间并且每 3-4 天进行分离以避免融合。

[0102] 质粒 DNA 制备: 从 BD Sciences Clontech 公司购买 pEGFP-N1 质粒, 编码野生型 GFP 的红移变体, 其被优化用于哺乳动物细胞中更亮的荧光和更高的表达。通过 CMV (P<sub>CMV IE</sub>) 的立即早期启动子控制 GFP。以相同方式构建 pCMV-luc 质粒。所述质粒在 DH5 α E. coli

中倍增并且使用 Qiagen Plasmid Max Preparation Kit 进行纯化,并且其具有大于 1.7 的 A260/A280。

[0103] 聚合物 7 的 DNA 结合:在 opti MEM 中分别稀释聚合物 7 和 DNA 的一系列样品,然后将 10  $\mu$ l 聚合物 7 的溶液加入到 DNA 溶液 (20  $\mu$ g/ml) 中,同时涡旋振动。聚合物 /DNA 之比为 32 : 1、16 : 1、8 : 1 和 10 : 1。在室温下将该混合物孵育 15 分钟以形成聚合物 /DNA 配合物。然后,向所述配合物中加入 5  $\mu$ l DNA 荷载缓冲液并且对于每一孔,将 15  $\mu$ l 混合物加入到 0.3% 琼脂糖凝胶中。在 100V 下对样品进行电泳约 30 分钟并且使用紫外光将所述凝胶可视化。图 10 显示了 DNA 结合亲合力的结果。大多数样品显示较低的 DNA 结合亲合力。例如,即使当聚合物 /DNA 之比为 32 : 1 时,7B、7C、7D、7E 和 7F/DNA 混合物的 DNA 电泳图谱与游离的 DNA (聚合物数量为 0) 也是相同的。然而,当聚合物 /DNA 比率为 32 : 1 和 16 : 1 时,7A 阻滞了质粒,这表明样品 7A 具有 DNA 结合亲合力。

[0104] 实施例 15

[0105] 体外基因转染:将 293 细胞置于 96 孔组织培养板 ( $5 \times 10^4$  细胞 / 孔) 中并且在含有 10% FBS 的 DMEM 中孵育过夜。对于每一孔,将等份的不同浓度的 7.5  $\mu$ l 的脂质聚合物 7 溶液加入到含有 0.6  $\mu$ g pEGFP-N1 质粒的 7.5  $\mu$ l DNA 溶液中并完全混合。在室温下将 DNA 和脂质聚合物 7 的混合物孵育 15 分钟以形成 DNA-脂质聚合物配合物。将所述配合物加入至每一孔并在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下将细胞孵育 24 小时。通过 GFP 信号分析来确定 EGFP 基因转染率。根据制造商提供的实验方案, Lipofectamine 被用作阳性对照。荧光显微镜 (Olympus, 520nm 滤光器) 下观察来自样品的转染细胞中的绿色荧光信号。使用 10 倍物镜对细胞拍照。从最佳阳离子聚合物数量的三场计数来确定转染的培养物中具有 GFP 信号的细胞百分比。

[0106] 转染后约 24 小时,约 28% 的 7A 转染的 293 细胞显示出转染率。该结果表明脂质聚合物 7A 是转染试剂 (图 11)。

[0107] 实施例 16

[0108] 反义寡核苷酸输送:University of Northern Carolina 的 Dr. Kole 研发出用于反义输送的功能分析的虫荧光素酶 705 基因系统。在该系统中,将在 705 具有突变的人类  $\beta$ -球蛋白插入虫荧光素酶 cDNA 间的序列。该质粒被引入到 HeLa 细胞用于稳定的基因表达,该细胞系被称作 HeLaLuc705。通常,所述细胞具有低虫荧光素酶活性,因为它表达错误的虫荧光素酶蛋白质。然而,与 705 序列结合的反义寡核苷酸将阻止所述错误的剪接位点并产生具有生物活性的虫荧光素酶蛋白质。虫荧光素酶 705 现在被用作反义寡核苷酸输送中功能模型:较高的虫荧光素酶活性表明较高的反义输送效率。

[0109] 在 Luc 705 细胞系中评价聚合物 7 样品的反义寡核苷酸输送效率。寡核苷酸靶向 luc 705 的最终浓度为 1.0  $\mu$ mol/L,聚合物浓度为 320 和 160  $\mu$ g/ml (与转染期间聚合物 /DNA 之比是 16 : 1 和 8 : 1 时聚合物的量相同)。转染约 24 小时后,确定虫荧光素酶活性。

[0110] 705 细胞中的背景虫荧光素酶活性约为  $1.6 \times 10^5$  RLU/mg 蛋白质。由 7A 输送至细胞的反义寡核苷酸的虫荧光素酶活性极大地增加,接近非输送细胞中的 50 倍。lipofectamine 2000 的输送效率较低,约为非输送细胞中的 15 倍。该结果表明脂质聚合物 7A 具有比 lipofectamine 2000 更高的反义寡核苷酸输送效率 (图 12)。

**[0111] 实施例 17**

[0112] 在 CHO-AA8-luc 细胞系中确定脂质聚合物的 SiRNA 输送效率。CHO-AA8 Luc 为 Tet-off 细胞系,其中通过 Dox 控制虫荧光素酶基因表达。当 Dox 被加入到细胞中时,虫荧光素酶基因表达将被关闭,并且在除去 Dox 后,它将继续表达。

[0113] 在 SiRNA 输送研究中,靶基因的存在蛋白质可影响评价,因为如果半衰期时间长,尽管靶基因已经被关闭,但是仍然可以检测到蛋白质。在该情况下,CHO-AA8 Luc 细胞显示出优势。通过加入 Dox 可以关闭虫荧光素酶基因表达以减少背景蛋白质。在 SiRNA 输送期间,可以通过改变培养基除去 Dox,并且虫荧光素酶基因开始表达,与此同时,如果将 SiRNA 成功地输送至细胞,则可以通过 SiRNA 来抑制该虫荧光素酶的表达水平。

[0114] 将 CHO AA8 luc 接种于含有 Dox 的 96 孔板中。18-24 小时后,产生 SiRNA 盒 / 聚合物 7 配合物。聚合物的最终浓度为 320 和 160  $\mu$ g/ml (与基因转染中 16 : 1 和 8 : 1 时浓度相同)。SiRNA 盒的量为 150ng/ml。改变培养基并且使用 PBS 洗涤细胞后,将 SiRNA/ 聚合物 7 配合物加入到细胞中。在 37°C 下将细胞孵育 48 小时后,检测到虫荧光素酶活性。

[0115] 对照 (空白) 的虫荧光素酶活性约为  $10^7$ RLU/mg 蛋白质,由 7A 和 lipofectamine 2000 输送 SiRNA 盒后,虫荧光素酶活性分别被极大地抑制至 2.47 和  $3.49 \times 10^6$ RLU/mg 蛋白质。该结果表明 7A 可以有效地将 siRNA 盒输送至细胞并且其输送效率高于 lipofectamine (图 13)。

**[0116] 实施例 18**

[0117] 使用 3-[4,5 二甲基噻唑 -2-基]-2,5-二苯基四唑输溴化物 (MTT) 在哺乳动物细胞中评价阳离子脂质聚合物 7 基因载体的细胞毒性。通过上述的方法进行基因转染 48 小时后,向每一孔中加入 10  $\mu$ l MTT 溶液 (PBS 中 5.0mg/ml, Sigma),并且在 37°C 下孵育 3 小时。然后除去培养基并向每一孔中加入 200  $\mu$ l DMSO 以溶解活细胞产生的甲臞 (formazan) 晶体。在 570nm 测量该溶液的吸光度。使用如下等式来计算细胞活力:活力 (%) =  $\{AbS_{570}(\text{样品})/AbS_{570}(\text{对照})\}$ 。该结果显示 7A 的细胞毒性很低,在最佳的条件下输送 siRNA 后,超过 95% 细胞成活,而由 lipofectamine 2000 输送 siRNA 后,细胞活力约为 75%。该结果表明 7A 具有很低的细胞毒性 (图 14)。

**[0118] 实施例 19**

[0119] 聚合物 7 的生物降解:使用 opti MEM 将聚合物 7A 稀释至最终浓度为 320  $\mu$ l/ml。在 37°C 下将一系列样品孵育 4 小时、8 小时和 24 小时,然后将样品用于在 96 孔板中的 293 细胞种子的基因转染研究。通过上述实验方案进行转染。在转染后 24 小时观察 GFP 信号。

[0120] 7A 的 GFP 基因转染率约为 25%,并且在将样品孵育 4 小时后转染率没有显著的变化。在将样品孵育 8 小时后转染率极大地减低,并且将样品孵育 24 小时后几乎没有发现转染率。该结果表明该 7A 在中性条件下是可生物降解的 (图 15)。

[0121] 本领域技术人员应该理解,在不偏离本发明范围的情况下,可以对上述的组合物和方法进行各种省略、添加和修改,并且正如所附的权利要求所限定的那样,所有这样的修改和改变都属于本发明的范围。

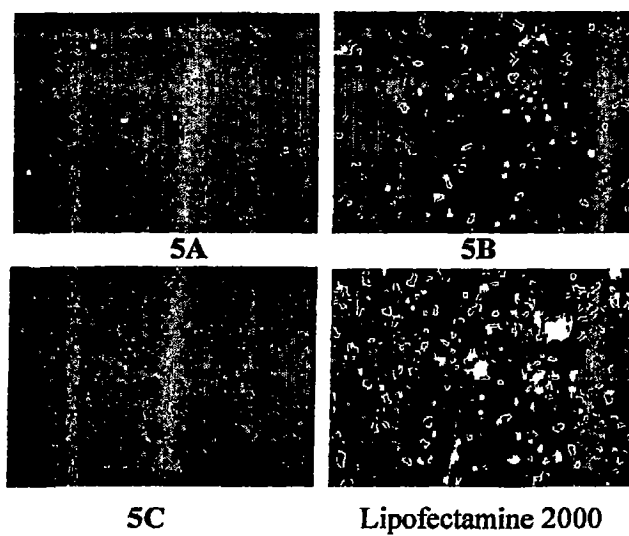


图 1

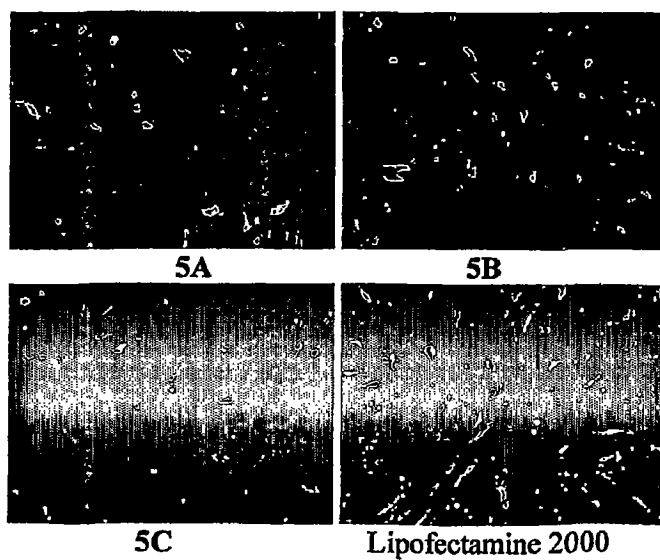


图 2

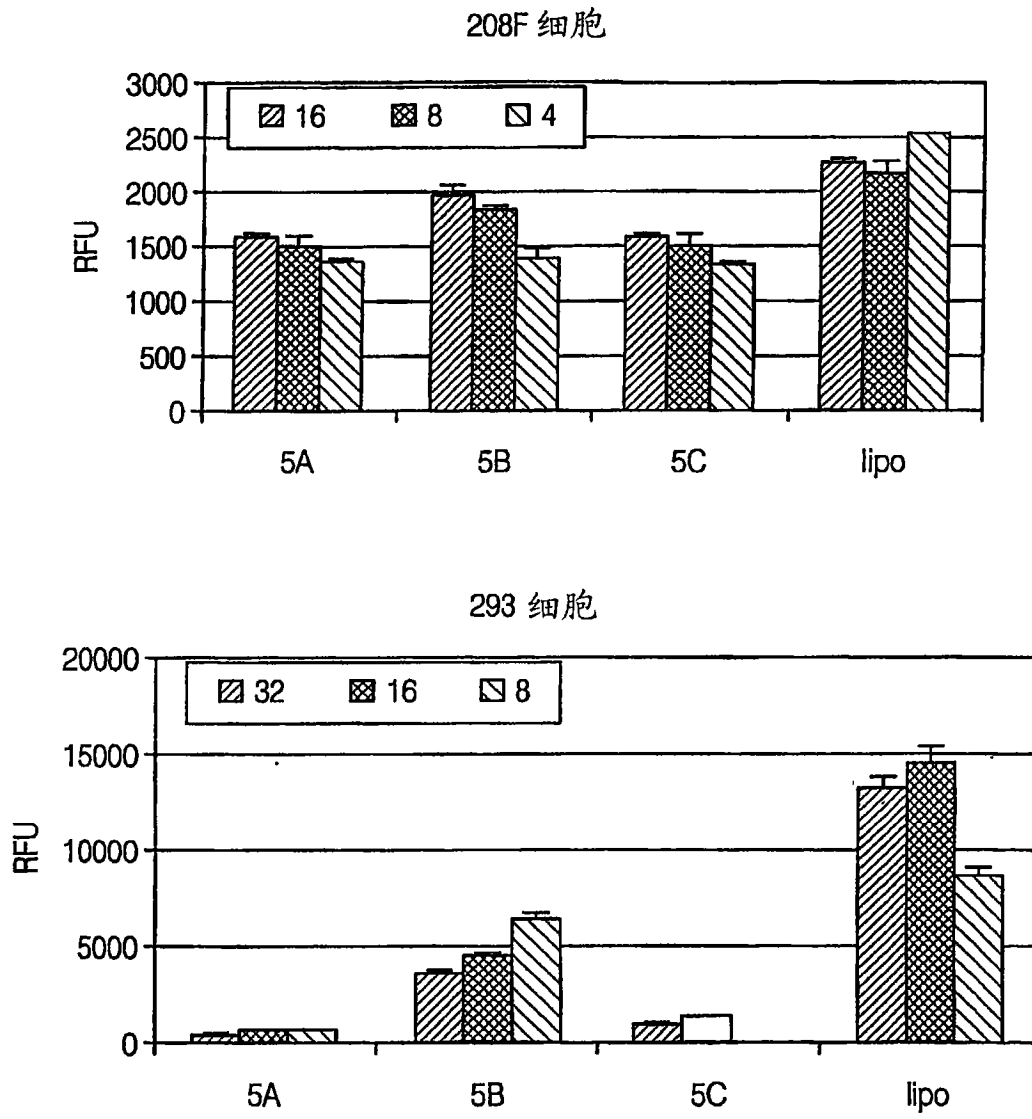


图 3

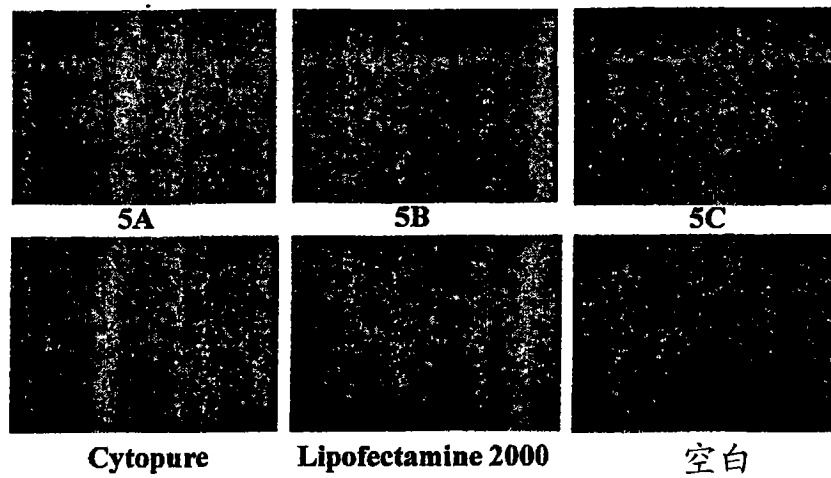


图 4

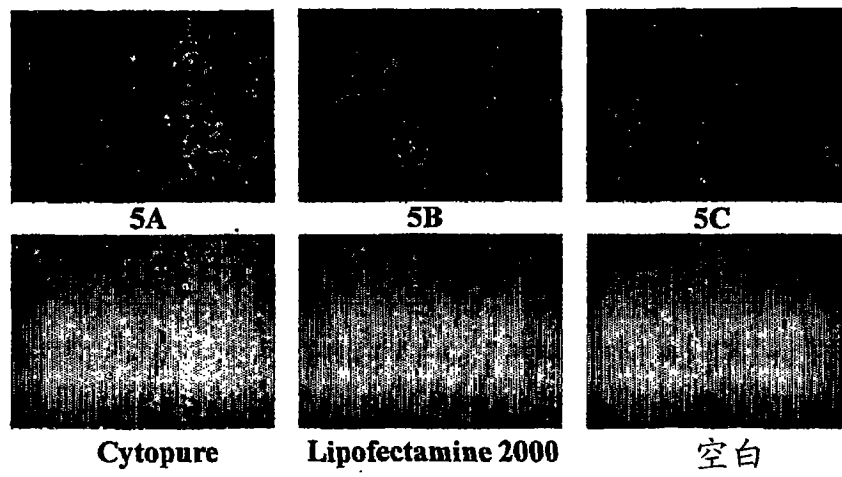


图 5

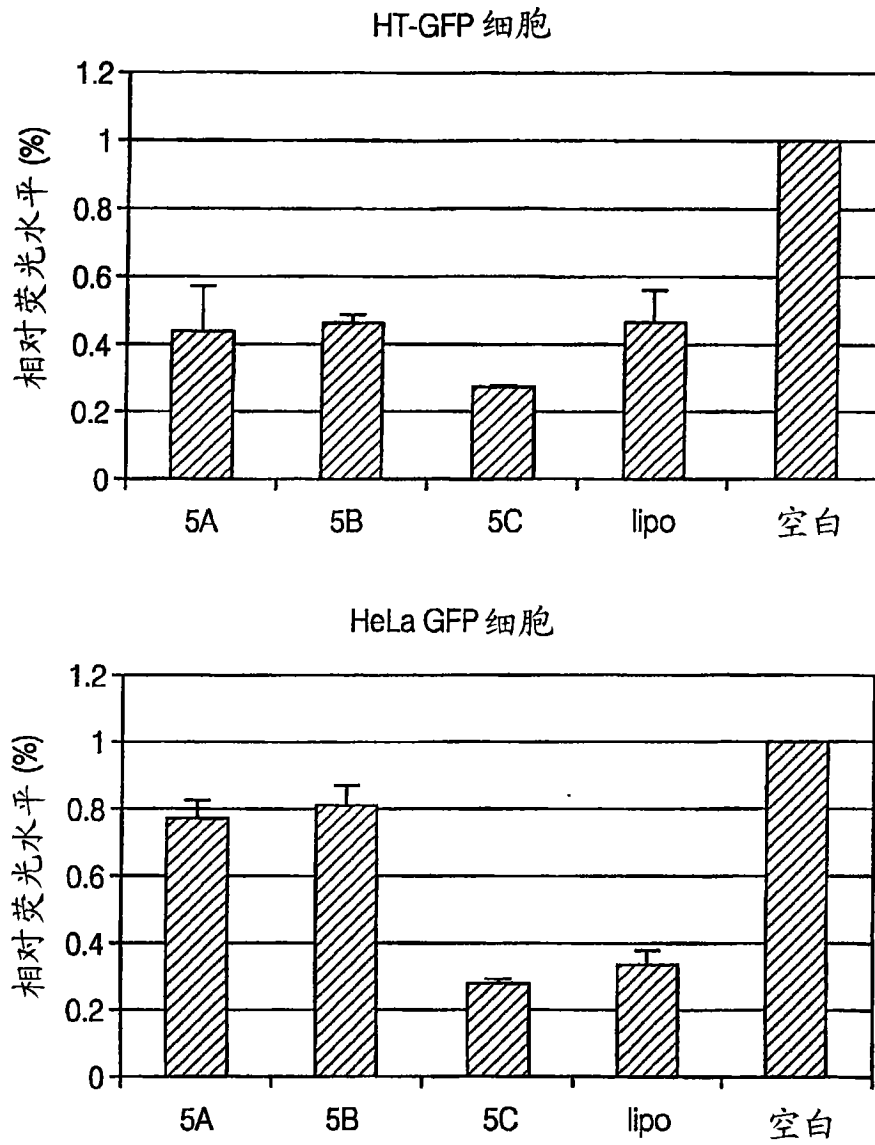


图 6

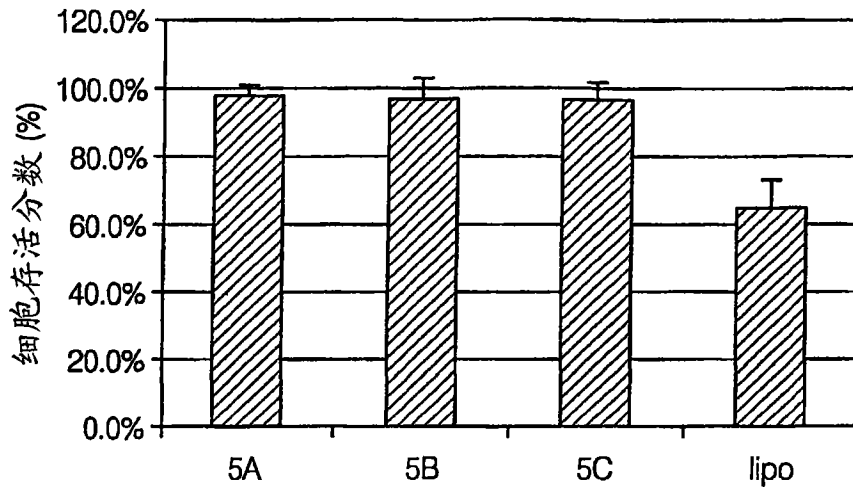


图 7

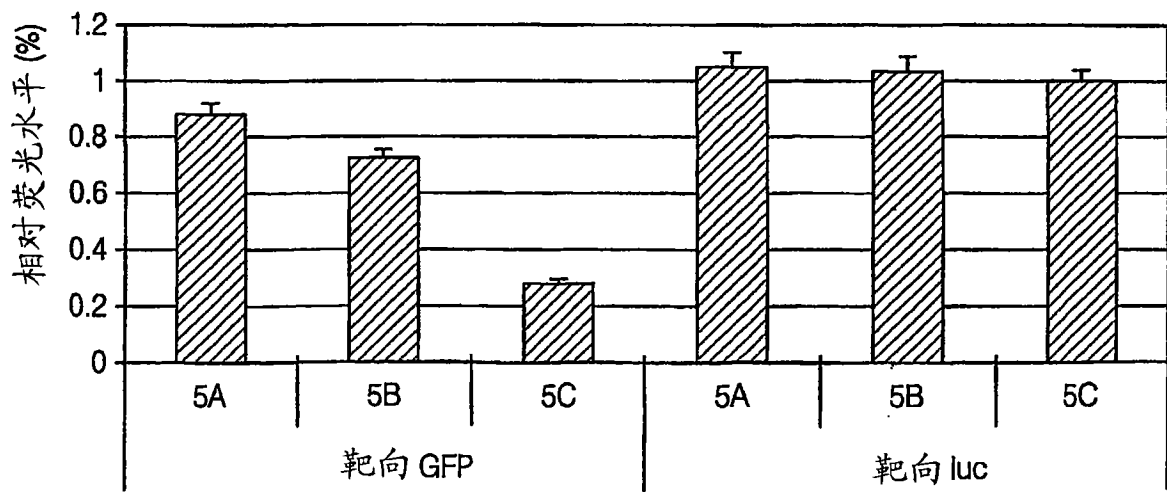


图 8

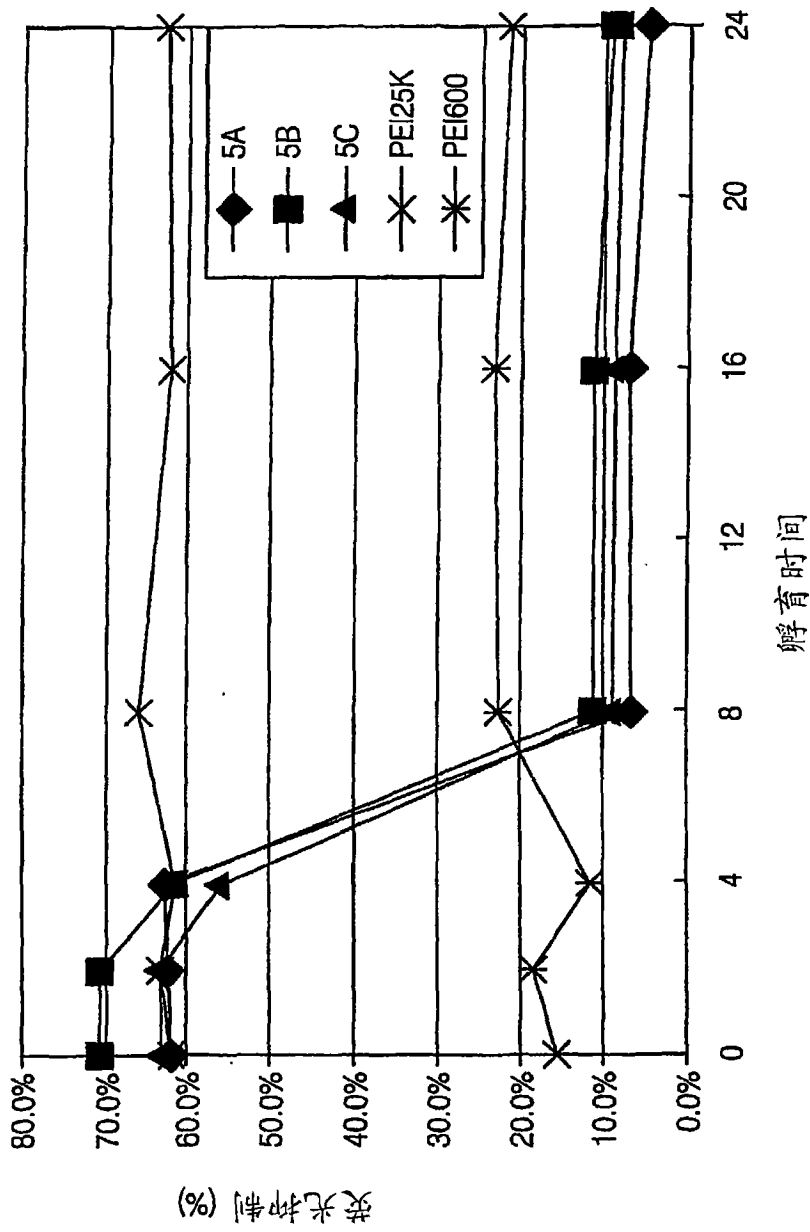
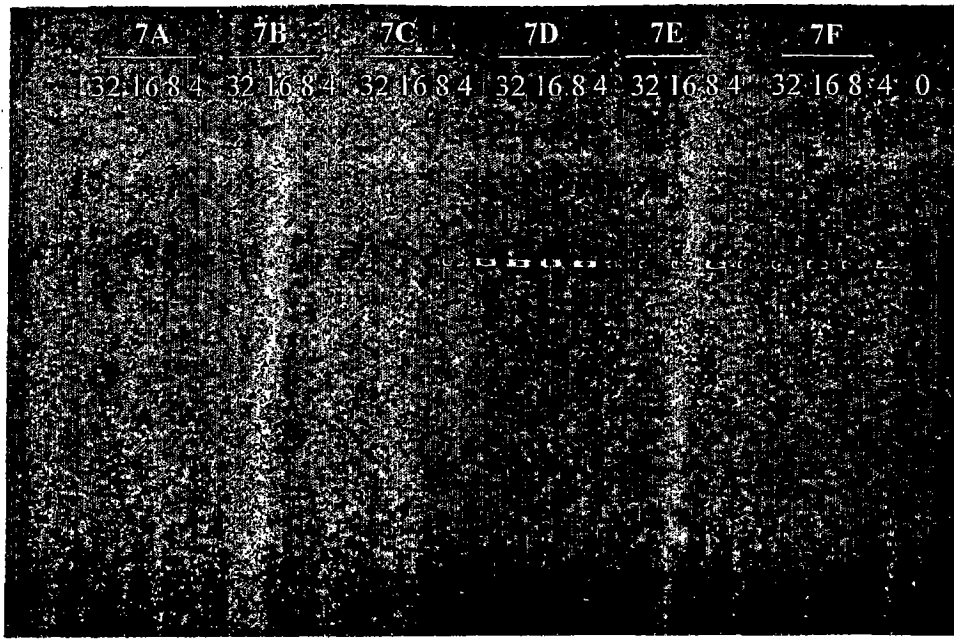
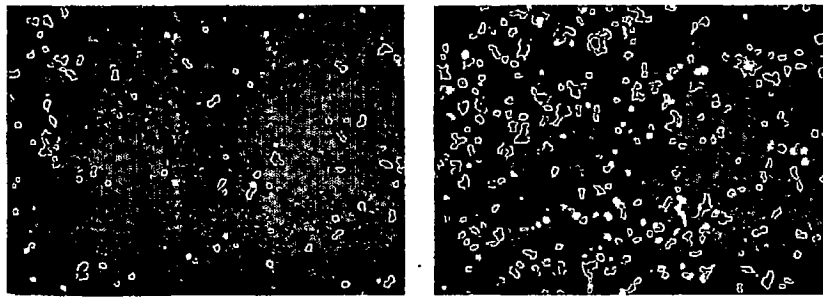


图 9



DNA结合亲和力

图 10

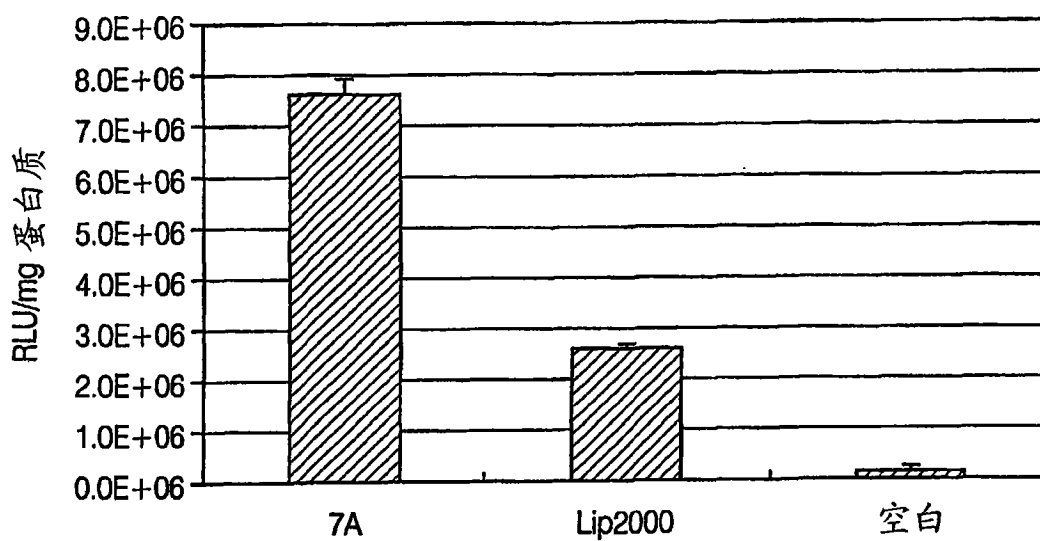


7A

Lipofectamine 2000

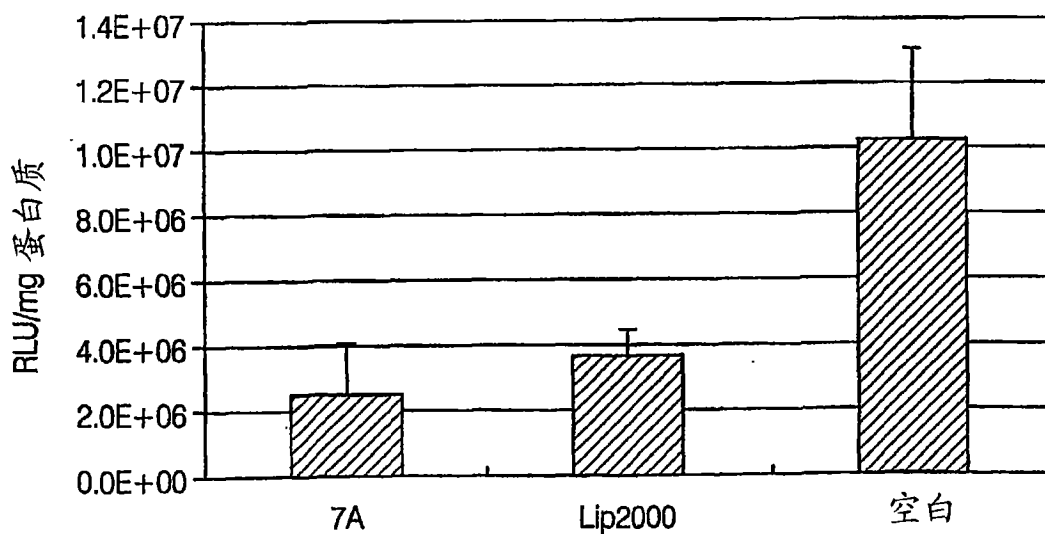
7A 和 lipofectamine 2000 转染后, 293 细胞的典型GFP信号

图 11



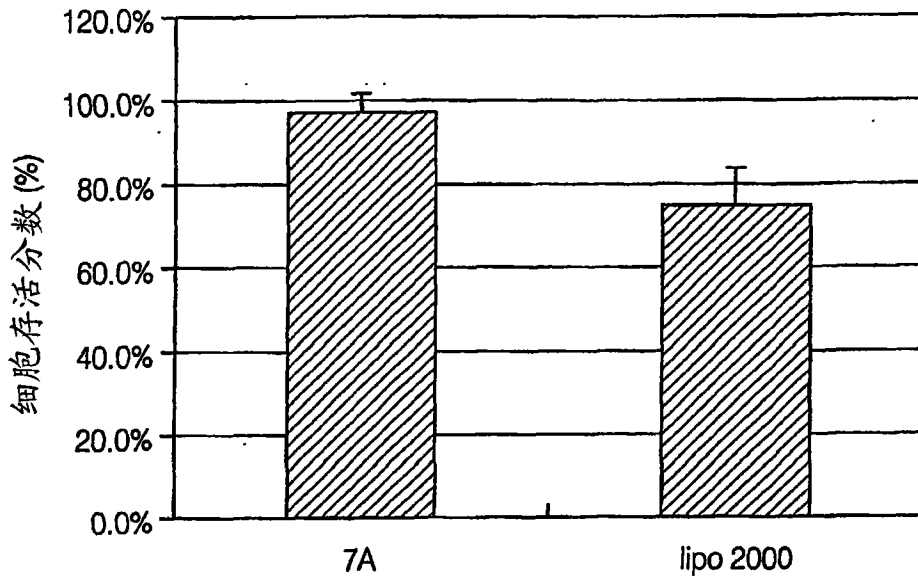
聚合物 7A 和 lipofectamine 2000 输送反义寡核苷酸后 luc 705 细胞中  
虫荧光素酶活性

图 12



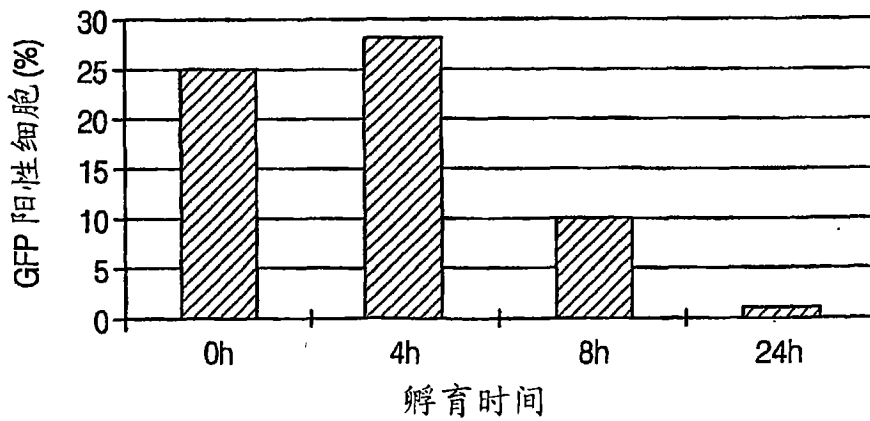
聚合物 7A 和 lipofectamine 2000 介导的 SiRNA 输送后  
CHO-AA8 luc 中虫荧光素酶活性

图 13



使用7A和 lipofectamine 转染后细胞存活分数

图 14



在opti MEM中孵育不同时间后7A的GFP转染率

图 15