



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1646174 B

(45) 授权公告日 2010.12.08

(21) 申请号 03808319.1

C08G 73/02 (2006.01)

(22) 申请日 2003.05.13

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/378,164 2002.05.14 US

10/270,788 2002.10.11 US

US 6159591 A, 2000.12.12, 栏4第37-44页、
栏5第64-66页、栏13第25-49页、栏14第23-67
页、栏16第5-25页。

(85) PCT申请进入国家阶段日

审查员 王大鹏

2004.10.12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2003/015003 2003.05.13

(87) PCT申请的公布数据

W02003/097107 EN 2003.11.27

(73) 专利权人 日东电工株式会社

地址 日本大阪

(72) 发明人 俞磊 杜福胜 季守平 松本健一

(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 方挺

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 16 页

(54) 发明名称

可控降解的聚合生物分子或药物载体及其合
成方法

(57) 摘要

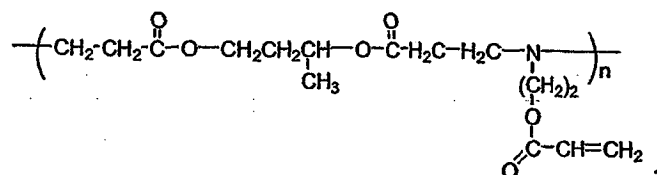
本发明提供一种可控降解的阳离子聚合物，
该聚合物用于传递生物分子（核酸、缩氨酸等）、
药物、医学造影应用中使用的分子、癌症治疗中使
用的敏化剂及组织工程中使用的分子。本发明还
提供一种合成本发明所述聚合物的方法。

1. 一种可降解的阳离子聚合物, 该聚合物包含多个阳离子分子和至少一个通过支链方式与所述阳离子分子连接的可降解的链接剂分子, 其中所述的阳离子分子选自:

聚乙烯亚胺 (PEI)、聚丙烯亚胺 (PPI)、五亚乙基六胺、N,N'-双(2-氨基乙基)-1,3-丙二胺、N-(2-氨基乙基)-1,3-丙二胺、N-(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺、精胺、亚精胺、1,4-双(3-氨基丙基)哌嗪、1-(2-氨基乙基)哌嗪、三(2-氨基乙基)胺、支化或树枝状聚酰胺胺 (PAMAM)、树枝状聚(丙烯亚胺) (DAB-am-16)、聚(L-赖氨酸) (PLL)、壳聚糖和 N,N'-双(2-氨基丙基)-亚乙基二胺, 以及

其中所述的可降解的链接剂分子选自:

二丙烯酸-1,3-丁二酯、二丙烯酸-1,4-丁二酯、二丙烯酸-1,6-己二酯、二丙烯酸二(乙二醇)酯、二丙烯酸聚(乙二醇)酯、二丙烯酸-2,4-戊二酯、二丙烯酸-2-甲基-2,4-戊二酯、二丙烯酸-2,5-二甲基-2,5-己二酯、三丙烯酸三羟甲基丙烷酯、四丙烯酸季戊四酯、二(三羟甲基丙烷)四丙烯酸酯、二季戊四醇五丙烯酸酯和含至少三个丙烯酸酯或丙烯酰胺侧基的聚酯, 以及具有下式结构的链接剂分子:



其中 n 是约为 10 的整数。

2. 根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物, 其中所述聚合物是通过水解、酶裂解、还原、光裂解或者声波降解法来降解的。

3. 根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物, 其中所述阳离子分子选自: 聚乙烯亚胺 (PEI)、N,N'-双(2-氨基乙基)-1,3-丙二胺、N-(2-氨基乙基)-1,3-丙二胺、1,4-双(3-氨基丙基)哌嗪、1-(2-氨基乙基)哌嗪、和三(2-氨基乙基)胺。

4. 根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物, 其中所述聚合物的分子量是 500Da 到 1,000,000Da。

5. 根据权利要求 4 所述的可降解的阳离子聚合物, 其中所述聚合物的分子量是 2,000Da 到 200,000Da。

6. 根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物, 其中所述阳离子化合物的分子量是 50Da 到 10,000Da。

7. 根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物, 其中所述链接剂分子的分子量是 100Da 到 40,000Da。

8. 根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物, 其中所述聚合物上还配合了一种生物分子。

9. 根据权利要求 8 所述的可降解的阳离子聚合物, 其中所述生物分子选自: 核酸、蛋白质、缩氨酸、脂类和碳水化合物。

10. 根据权利要求 9 所述的可降解的阳离子聚合物, 其中所述核酸选自: DNA、单链或双链 RNA、核酶、DNA-RNA 杂交体和反义 DNA。

11. 权利要求 10 所述的可降解的阳离子聚合物在制备基因治疗药物中的用途。

12. 一种转染真核生物细胞的方法, 该方法包括用权利要求 11 所述的聚合物体外接触

所述细胞。

13. 辄合的聚合物,其包括共辄结合到权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物上的诊断造影组合物。

14. 一个包括多种根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物的聚合物库,其中所述聚合物包含不同比例的阳离子化合物与链接剂分子。

15. 一个包括多种根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物的聚合物库,其中所述聚合物每个都包含一种不同的链接剂分子。

16. 一个包括多种根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物的聚合物库,其中每个所述聚合物都包含一种不同的阳离子低聚物。

17. 一个生物材料传递系统,包括:

至少一种生物分子;

权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物,其中所述聚合物对所述生物分子具有亲合力;和

至少一种可内在化进入真核生物细胞内的传递增强剂,该增强剂可以促进所述真核生物细胞内的受体识别、内在化、生物分子从内层中逸出、细胞核定位、生物分子释放、或系统稳定。

18. 根据权利要求 17 所述的生物材料传递系统,其中所述生物分子是核酸、缩氨酸、蛋白质或碳水化合物。

19. 根据权利要求 17 所述的生物材料传递系统,其中所述传递增强剂偶合在所述可降解的阳离子聚合物上。

20. 一个医疗诊断系统,包括:

造影对比剂,

权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物,其中所述聚合物对生物分子具有亲合力,和

一种起作用的可识别真核生物细胞、组织或器官的特异受体的配体、抗体或试剂,其中所述配体、抗体或试剂与所述可降解的阳离子聚合物偶合。

21. 一种药物组合物,包括:

可被光或其它物理刺激触发其功能的敏化剂;和

权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物,其中所述聚合物对生物分子具有亲合力。

22. 根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物,其中所述的阳离子分子是聚乙烯亚胺,所述链接剂分子是二丙烯酸-2,4-戊二酯。

23. 根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物,其中所述阳离子分子是具有 600Da 分子量的支化聚乙烯亚胺。

24. 根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物,其中所述阳离子分子是具有 423Da 分子量的线性聚乙烯亚胺。

25. 根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物,其中所述的阳离子分子是具有 600Da 分子量的支化聚乙烯亚胺,所述链接剂分子是二丙烯酸-2-甲基-2,4-戊二酯。

26. 根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物,其中所述的阳离子分子是具有 600Da 分子量的支化聚乙烯亚胺,所述链接剂分子是二丙烯酸-2,4-戊二酯。

27. 根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物,其中所述链接剂分子选自二丙烯酸-2,4-戊二酯、二丙烯酸-2-甲基-2,4-戊二酯、二丙烯酸-2,5-二甲基-2,5-己二酯和二(三羟甲基丙烷)四丙烯酸酯。

28. 根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物,其中所述链接剂分子是二丙烯酸-2,4-戊二酯。

29. 根据权利要求 1 所述的可降解的阳离子聚合物,其中所述链接剂分子选自二丙烯酸-2,4-戊二酯、二丙烯酸-2-甲基-2,4-戊二酯、二丙烯酸-2,5-二甲基-2,5-己二酯、二(三羟甲基丙烷)四丙烯酸酯和含至少三个丙烯酸酯或丙烯酰胺侧基的聚酯。

可控降解的聚合生物分子或药物载体及其合成方法

发明领域

[0001] 本发明涉及一种合成可控降解的聚合载体分子的新方法,该载体用于生物医学方面,例如生物分子的传递、诊断造影组分的传递、敏化剂组分的传递和组织工程。特别地,本发明涉及一种可控降解的聚合物的主链及用于生物分子传递(如将核酸、蛋白质、缩氨酸和药物传递到细胞、组织或者需要治疗的个体处)的聚合物的合成方法。

[0002] 发明背景

[0003] 基因治疗中首要关注的是基因的传递。基因传递系统被设计成通过影响基因表达系统的传递和进入目标细胞,和/或细胞表面受体的识别,及其后的细胞内运输及细胞核易位,来保护和控制基因在体内的位置(Friedmann,T.The Development of Human Gene Therapy.Cold SpringHarbor Laboratory Press.San Diego.1999)。

[0004] 由于病毒载体和阳离子脂基基因载体系统的局限性,人们对聚合基因载体的兴趣不断增长。聚合物是高分子物质,其为设计新的传递系统,包括小分子药物、蛋白质、缩氨酸、低聚核苷酸和基因,提供了很多令人兴奋的机会。在此类系统中,简单地通过改变混合物的组成、聚阳离子的分子质量、聚阳离子的结构(线性、无规则支链、树枝状聚合物、嵌段和接枝共聚物)以及通过引入支链或其它功能分子(如糖、缩氨酸和抗体)来对聚阳离子主链进行修饰,就可以实现其更大的设计灵活性(Pouton CW, Seymour LW.Key issues in non-viral gene delivery.Adv.Drug Deliv.Rev.2001 Mar 1;46(1-3):187-203)。低致免疫性或无致免疫性是聚合物优于脂基基因载体的另一方面,这一优点使聚合物可以作为生物相容性材料应用于患者。

[0005] 通常用作基因载体主链的阳离子聚合物是聚(L-赖氨酸)(PLL)、聚乙烯亚胺(PEI)、壳聚糖、PAMAM 树枝状聚合物和聚(2-二甲氨基)乙基异丁烯酸酯(pDMAEMA)。

[0006] 聚(L-赖氨酸)基聚合物(首次于1987年)被用于基因的传递,是通过使用靶向配体(如脱唾液酸血清类粘蛋白和叶酸盐)来促进以受体为媒介的摄取作用。(Wu, GT., and Wu, CH.Receptor-mediated in vitro genetransformation by a soluble DNA carrier system.J Biol Chem.1987 Apr5;262(10):4429-32;Wu, GY., and Wu, CH.Receptor-mediated gene deliveryand expression in vivo.J Biol Chem.1988Oct 15;263(29):14621-4;MislickKA, Baldeschwieler JD, Kayyem JF, Meade TJ.Transfection offolate-polylysine DNA complexes:evidence for lysosomal delivery.BioconjugChem.1995Sep-Oct;6(5):512-5)。已经证明,位于PLL/DNA配合物表面的配体与受体相互作用的结果使该配合物得以内在化进入细胞中。(Wagner E, Zenke M, Cotten M, Beug H.Birnstiel ML.Transferrin-polycationconjugates as carriers for DNA uptake into cells.Proc Natl Acad SciU S A.1990May;87(9):3410-4)。也可以通过使用亲溶酶体(lysosomatotropic)剂(如氯化奎宁)或失活的腺病毒,或自流感嗜血杆菌包膜蛋白中提取的缩氨酸,来促进PLL/DNA配体从内层中释放出来,从而提高以PLL为媒介的基因传递的效率。(Wagner E, Plank C, Zatloukal K, Cotton M BirnstielML.Influenza virus hemagglutinin HA-2N-terminal fusogenic

peptides augment gene transfer by transferring-polylysine-DNA complexes toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Sep 1; 89(17):7934-8; Curiel DT, Wagner E, Cotten M, Birnstiel ML, Agarwal S, Li CM, Loechel S, Hu PC. High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus coupled to DNA-polylysine complexes. *Hum Gene Ther*. 1992 Apr; 3(2):147-54)。很明显,因为 PLL 只是由伯胺构成的,所以当不使用靶向配体及内层溶解剂而单独使用 PLL 聚合复合物时,基因传递的效果不好。另一方面,高分子量的 PLL 对细胞有很大的毒性。

[0007] 与 PLL 不同,高分子量支化的和线性的聚乙烯亚胺 (PEI) 不需要内层溶解剂和靶向试剂的辅助就显示出高效的基因传递效率。(Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 1; 92(16):7297-301)。带正电的 PEI 聚合复合物被细胞内吞,且由于其高度密集的仲胺和叔胺基团,PEI 也被认为可促进内体的逸出。令人遗憾的是,也有报道称高分子量的 PEI 对细胞有毒性,因而极大地限制了 PEI 作为基因传递工具应用在人类患者身上的可能性。

[0008] 曾经将一系列的聚酰胺胺树枝状聚合物作为基因传递系统被研究。(Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR Jr. The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharm. Sci. Technol. Today*. 2000 Jul; 3(7):232-245)。末端氨基通过静电作用与 DNA 结合,形成带正电的配合物,该配合物通过细胞内吞作用被吸收。此类聚合物的星型外形的优点是,因为 DNA 仅与表面的伯胺相互作用,所以内部的叔胺基团得以保留并协助内体从树枝状聚合物-基因配合物中逸出。令人遗憾的是,也有报道称树枝状聚合物对细胞有毒性,这成为该聚合物应用在人类患者身上的主要限制。此外,只有高度衍生的聚酰胺胺树枝状聚合物才显示出可应用的基因转染效率,但制备此类聚合物的成本非常高。

[0009] 将基因载体应用在医学的基因治疗中,首要的考虑是安全性和对细胞可能造成的伤害,然后是转染效率。上述的有效基因传递所需的大分子量阳离子聚合物通常都有固有的缺陷,即对细胞有毒性。另一方面,尽管低分子量的阳离子聚合物或低聚物通常显示出较小的细胞毒性或者没有细胞毒性,但它们也不具有明显的基因转染效率。解决这一矛盾的方法之一是合成一种生物可降解的阳离子聚合物,该聚合物在基因传递至所需细胞的核内之后会降解为小分子。

[0010] 目前,有报道称使用由可降解阳离子聚合物制成的基因载体,可成功地将基因传递至哺乳动物的细胞内部且细胞毒性大幅下降。(Lim YB, Kim SM, Lee Y, Lee WK, Yang TG, Lee MJ, Suh H, Park JS, J., Cationic Hyperbranched Poly(amino ester): A Novel Class of DNA Condensing Molecule with Cationic Surface, Biodegradable Three-Dimensional Structure, and Tertiary Amine Groups in the Interior, *J. Am. Chem. Soc.*, 123(10), 2460-2461, 2001)。然而,与不可降解聚合物主链相比,这些聚合物的基因传递效率较低,原因可能是这些聚合物在水溶液中快速地降解导致在基因传递试剂的制备过程中或者在基因传递至细胞内部之前其基因传递效力迅速地丧失。在控制降解速率及合成生物可降解的阳离子聚合物方面的困难限制了这些聚合基因载体在体内基因传递

和临床患者中的应用。

[0011] 为了提高低分子量 PEI 的转染效率, Gosselin 等人 (Gosselin, Micheal A., Guo, Menjin, and Lee, Robert J. Efficient Gene Transfer Using Reversibly Cross-Linked Low Molecular Weight Polyethylenimine. Bioconjugate Chem. 2001. 12 :232-245) 报道称通过使用含二硫化物的链接剂, 二硫代双(丁二酰亚胺基丙酸酯) (DSP) 和二甲基-3, 3'-二硫代双丙酰亚胺酯-2HCl (DTBP) 可以获得高分子量的 PEI, 且该聚合物显示出有相当的基因传递效率和更低的细胞毒性。因为细胞质内是明显的还原性环境, 因此可以合理地预期通过交联试剂引入的二硫键会在细胞质内被还原, 使得在基因传递到进行 DNA 转录的细胞核内部之前, PEI 结合物就已经被破坏了。然而, Gosselin 等人使用的含二硫化物的链接剂价格昂贵, 使得大规模制备此类系统很困难且没有必要。此类包含有含二硫化物的链接剂的聚合物只能在还原条件下降解, 因此限制了该聚合物在其它条件下的应用。并且, Gosselin 等人仅公开了支化 PEI-800Da 的应用, 且在大量应用于人体时该化合物仍表现出有细胞毒性。此外, 如果原料是低分子量的阳离子化合物(如五亚乙基六胺、N-(2-氨基乙基)-1,3-丙二胺), 按照 Gosselin 的方法很难得到有很高基因传递效率的聚合物。

[0012] Lynn 等人 (Lynn, David A.; Anderson, Daniel G.; Putnam, David; and Langer, Robert. Accelerated Discovery of Synthetic Transfection Vectors: Parallel Synthesis and Screening of a Degradable Polymer Library. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 8155-8156.) 描述了一种用二丙烯酸酯作为阳离子化合物之间的链接剂分子来合成生物可降解阳离子聚合物的方法。然而, 生成的聚合物是线性的且阳离子密度较低, 因而不足以凝缩 DNA。合成这些聚合物需要很长时间, 并且可用于基因传递的有效产物的量较低。按照 Lynn 等人的方法生产了一百多种阳离子聚合物, 但其中只有两种显示出有效的基因转染效率。这些因素使得按照这种方法难以实现制备高分子量的聚合物。

[0013] 发明概述

[0014] 当前需要一种聚合转染载体, 该载体是能有效传递基因材料的高分子量的阳离子聚合物, 但是为了使其细胞毒性和对细胞的损伤最小化, 该载体必须是可控降解的。虽然本说明书主要描述了可降解聚合物, 但这并不排除使用基本上不可降解的聚合物。

[0015] 本发明的一个实施方案是一种合成可控降解的阳离子聚合物及各种生物可降解聚合物的方法。可以将生物分子(如核酸和缩氨酸)及合成药物和其它分子与此类聚合物共轭或配合, 从而为这些分子提供了一种传递机理。此类聚合物的可控制时间和空间的降解作用, 在使细胞损伤最小化的同时, 为真核生物细胞(尤其是高级真核生物细胞)的高效转染提供了兴趣分子。

[0016] 进一步的实施方案提供了一种将低分子量的阳离子化合物或低聚物转化为低细胞毒性的高效转染材料的简单方法。在一个优选的实施方案中, 在温和条件下和很短时间内, 使用了一个合成步骤完成了整个合成过程。因为这种合成方法的大部分原料都是商业销售的, 因此该方法可以很容易地以很低的成本放大到生产和实验室应用。

[0017] 此外, 上述聚合物的合成方法效率很高。所观察到的按照本发明优选实施方案的聚合物的转染效率比以其它商业销售的聚合基因载体为媒介的转染效率更高。

[0018] 此处所述的聚合物合成方法根据可用来制造高分子量聚合物的分子种类而灵活变化。通过加入链接剂分子, 可以将任何含至少三个氨基的阳离子低聚物或化合物用作制

造有用的聚合基因载体试剂的原料。本发明中的链接剂分子包含有可水解的键。它们也可以包含其它物理学上、生物学上或化学上可控断裂的键（如可还原键、含有酶特异剪切位点的缩氨酸），或者物理上或化学上敏感的键（如光敏、pH 值敏感或声音敏感分子）。本发明所指的聚合物的降解可以通过但不局限于以下方法来实现，包括：水解、酶消化、声波降解法和物理降解法（如光分解）。

[0019] 此处描述的聚合物合成方法提供了一种有用的方法，该方法可以很容易地生成一个用于优化某些特殊应用的反应条件的聚合物库。这些方法也可以用来合成多组聚合物库，该库用于设计和筛选具备研究人员所需特性（如某一特定的降解速率）的聚合物。

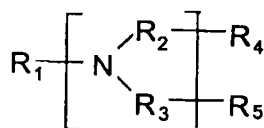
[0020] 所述聚合物合成方法还提供了一种有用的方法，该方法通过简单地将阳离子化合物与一个或多个含有兴趣官能团的链接剂交联起来，从而很容易地将缩氨酸、糖或者蛋白质与合成的聚合物相结合。也可以通过常用的方法（如通过含二硫键的基团）将所述配体引入该合成的聚合物中。也可以通过任何本领域所属技术人员公知的方法将核酸、缩氨酸、药物和其它官能团等共轭 / 结合到所述聚合物上。

[0021] 进一步优选的实施方案包括具有可控降解速率的生物可降解阳离子聚合物，与商业销售的转染试剂（如脂转染胺试剂（Invitrogen）和 SuperFect（Qiagen））相比较该聚合物表现出高基因转染效率和低细胞毒性。通过简单地调整聚合物组成中各分子的比例或者改变各种链接剂分子，可以很容易地控制按此处描述的方法合成的聚合物的降解过程。

[0022] 依照一个优选的实施方案，提供了一种可降解的阳离子聚合物，该聚合物包含多个阳离子分子和至少一个通过支链方式与所述阳离子分子连接的链接剂分子。所述的阳离子分子选自：

[0023] (i) 式 1 的阳离子化合物：

[0024]



[0025] 式 1

[0026] 其中：

[0027] R_1 是氢原子，含 2-10 个碳原子的烷基或杂烷基，含 5-30 个原子的芳基或杂芳基，或者另一个式 1 的化合物；

[0028] R_2 是氢原子，含 2-10 个碳原子的烷基或杂烷基，或者含 5-30 个原子的芳基或杂芳基；

[0029] R_3 是氢原子，含 2-10 个碳原子的烷基或杂烷基，或者含 5-30 个原子的芳基或杂芳基；

[0030] R_4 是氢原子，含 2-10 个碳原子的烷基或杂烷基，含 5-30 个原子的芳基或杂芳基，或者另一个式 1 的化合物；

[0031] R_5 是氢原子，含 2-10 个碳原子的烷基或杂烷基，含 5-30 个原子的芳基或杂芳基，或者另一个式 1 的化合物；

[0032] (ii) 阳离子聚氨酸；和

[0033] (iii) 阳离子聚合碳水化合物；

[0034] 可降解的链接剂分子由下式表示：

[0035] CL_n

[0036] 其中 C 是间隔部分，其可以是含 2-10 个碳原子的直链或支链烷基或杂烷基，或者含 5-30 个原子的芳基或杂芳基，且可以包含带有或不带有杂原子的醚、酯、酰胺、亚酰胺、羰基；L 是丙烯酸酯或异丁烯酸酯部分，且 n 是大于或等于二的整数；并且其中的 C 和 L 以共价键结合。

[0037] 依照另一优选的实施方案所述链接剂选自：二丙烯酸-1,3-丁二酯、二丙烯酸-1,4-丁二酯、二丙烯酸二（乙二醇）酯、二丙烯酸聚（乙二醇）酯、二丙烯酸-2,4-戊二酯、二丙烯酸-2-甲基-2,4-戊二酯、二丙烯酸-2,5-二甲基-2,5-己二酯、三丙烯酸三羟甲基丙烷酯、四丙烯酸季戊四酯、二（三羟甲基丙烷）四丙烯酸酯、二季戊四醇五丙烯酸酯和含至少三个丙烯酸酯或丙烯酰胺侧基的聚酯。

[0038] 依照一实施方案中，所述聚合物上还配合了一种生物分子。所述生物分子选自：核酸、蛋白质、缩氨酸、脂类和碳水化合物。优选地，所述核酸选自：DNA、单链或双链 RNA、核酶、DNA-RNA 杂交体和反义 DNA。因此，在另一个优选实施方案，提供了包含所述核酸分子的可降解的阳离子聚合物在制备基因治疗药物中的用途。

[0039] 依照另一个优选实施方案，提供了一种生物材料传递系统，该系统包含至少一种生物分子，即上述对生物分子有亲合力的可降解阳离子聚合物，和至少一种传递增强剂，该增强剂可以内在化进入真核生物细胞内，并且促进所述真核生物细胞内的受体识别、内在化、生物分子从内层中逸出、细胞核定位、生物分子释放、或系统稳定。

[0040] 依照另一个优选实施方案，提供了一种医疗诊断系统，该系统包含一种造影对比试剂，即上述对生物分子有亲合力的可降解阳离子聚合物，和一种起作用的可识别真核生物细胞、组织或器官的特异受体的配体、抗体或试剂，其中所述的配体、抗体或试剂偶合在所述的可降解阳离子聚合物上。

[0041] 依照另一个优选实施方案，提供了一种药物组合物，其中包含可被光或其它物理刺激功能上触发的敏化剂，和上述可降解阳离子聚合物，其中所述的聚合物对生物分子有亲合力。

[0042] 依照本发明的优选实施方案，本发明的可降解的阳离子聚合物的分子量是 500Da 到 1,000,000Da。在另一优选的实施方案中，所述聚合物的分子量是 2,000Da 到 200,000Da。在另一优选的实施方案中，所述阳离子化合物的分子量是 50Da 到 10,000Da。在另一优选的实施方案中，所述链接剂分子的分子量是 100Da 到 40,000Da。

[0043] 附图简要说明

[0044] 在以下附图中所使用的本发明的不同阳离子聚合物用 C_mL_n 来代表，其中 C_m 代表表 1 中所示的阳离子化合物，而 L_n 代表表 2 中所示的链接剂分子。例如， $C1L4$ 代表一种包含表 1 中的阳离子化合物 C1 和表 2 中的链接剂分子 L4 的阳离子聚合物。

[0045] 图 1 是对所述的可降解阳离子聚合物的合成和降解过程的说明。“C”代表阳离子化合物或阳离子低聚物，而“L”代表链接剂分子。

[0046] 图 2 说明了低聚物 C3、聚合物 C3L1 和 C4L1 对 DNA 的结合亲合力。聚合物/DNA 的重量比显示为 16、8、4、2、1 和 0.5，而自由 DNA（不受聚合物控制）显示为聚合物/DNA 重量比 0。M 指示了 1kb 的 DNA 分子的标记子。

[0047] 图 3 显示了某些阳离子低聚物和聚合物的电泳图案。泳道 1-3 分别是分子量为 25KD, 10KD 和 1.8KD 的支化 PEI。C3 是支化 PEI₆₀₀₀, PLL 是分子量为 30KD 的聚-L-赖氨酸, 而 C3L1 是由 C3 和 L1 衍生出来的聚合物。

[0048] 图 4 说明了转染后第 24 小时不同聚合物对绿色荧光蛋白 (GFP) 基因的转染效率, 其中 Y 轴指示了转染中使用的聚合物 /DNA 重量比。

[0049] 图 5 说明了使用所述可降解阳离子聚合物和商业销售的转染试剂对 293 细胞进行 GFP 基因转染之后观察到的 GFP 信号。

[0050] 图 6 说明了使用各种聚合物对 293 细胞进行 pCMV-Luc 基因转染后第 24 小时荧光素酶的活性。

[0051] 图 7 说明了使用不同聚合物-DNA 配合物处理后的细胞的存活情况。

[0052] 图 8A 应用琼脂糖凝胶电泳法说明在 37℃ 下经过 0h (A)、6h (B)、12h (C)、1d (D)、2d (E)、3d (F)、4d (G) 和 6d (H) 培养的 C3L1 的分子量的变化。泳道 1 含有支化 PEI10K, 而泳道 2 含有支化 PEI25K。泳道 3 和泳道 4 分别含有 C4 和 C3。

[0053] 图 8B 说明了将 C3L1 在 37℃ 下培养 0h、6h、12h、1d、2d、3d、4d 和 6d 之后, 使用该 C3L1 进行 GFP 基因转染的转染效率。

[0054] 图 9A 应用琼脂糖凝胶电泳法说明了在 37℃ 下经过 0 (A)、6h (B)、12h (C)、1d (D)、2d (E)、3d (F)、4d (G) 和 6d (H) 培养的 C3L2 的分子量的变化。泳道 1 含有 BPEI10K 而泳道 2 含有 C3。

[0055] 图 9B 说明了将 C3L2 和 C3L1 在 37℃ 下培养 0h、6h、12h、1d、2d、3d、4d 和 6d 之后, 使用他们进行 GFP 基因转染的转染效率。

[0056] 图 10 说明了使用不同聚合物传递 ODN 之后的 FITC 信号, 还说明了使用不同聚合物时的 ODN 转染效率。

[0057] 图 11 提供了一些按照下面优选的实施方案所述, 可以使用的阳离子分子的例子。然而, 可以使用的阳离子分子并不局限于这些例子。

[0058] 图 12 提供了一些按照下面优选的实施方案所述, 可以使用的链接剂分子的例子。然而, 可以使用的链接剂分子并不局限于这些例子。

[0059] 图 13 提供了一些按照本文描述的优选实施方案所述, 可以使用的除异丁烯酸酯基之外的其它具有氨基反应活性的残基的例子。然而, 可以使用的有反应活性的残基并不局限于这些例子。

[0060] 图 14 是被转染细胞所占百分比的示意图, 使用不同聚合物 (CmLn) 将 GFP 基因转染入这些细胞内, 并进行了蛋白质表达。应用阳离子化合物和链接剂的不同组合来制备阳离子聚合物载体。然而, 可以应用的阳离子聚合物载体并不局限于这些例子。

[0061] 优选实施方案的详细说明

[0062] 在此描述了一种可降解的阳离子聚合物, 该聚合物用于传递生物分子 (核酸、缩氨酸等)、药物、医学造影应用中使用的分子、癌症治疗中使用的敏化剂, 和组织工程中使用的分子。此外还提供了一种合成这些聚合物的方法。

[0063] 根据优选实施方案, 可以使用阳离子分子或任何包含有三个以上反应位点的氨基基团的分子。当用作使基因或核酸转移进细胞的载体时, 这些低分子量的阳离子化合物或低聚物通常表现出没有或者很低的转染效率。然而, 它们与具有高转染效率的更高分子量

的载体相比,确实具有很低的细胞毒性或没有细胞毒性。因为降解迅速,生物可降解的阳离子聚合物通常在表现出低细胞毒性的同时也表现出低的转染效率,因此与用于基因转移和其它应用的其它载体相比,它们的竞争力较低。可以通过可降解的链接剂将低分子量的阳离子化合物或低聚物连接起来,从而提高这些可降解阳离子聚合物的转染效率。这些链接剂含有生物学上、物理学上、或化学上可断裂的键,如可水解键、可还原键、含有酶特异剪切位点的缩氨酸序列、pH 敏感的或声波敏感的键。这些聚合物的降解过程可以通过但不局限于以下的方法进行,包括:水解、酶消化和物理降解方法如光裂解(光分解)。

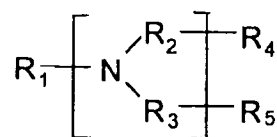
[0064] 此外,可以通过将可降解聚合物与病毒性或非病毒性蛋白共轭或结合,从而增强其转染效率。例如,可以将囊状口腔炎病毒 G 蛋白(VSVG)和其它本领域所属技术人员公知的缩氨酸或蛋白质加到所述聚合物上,以提高其转染效率。

[0065] 此处所述聚合物的最吸引人的特性之一在于,根据链接剂的类型和结构不同,该聚合物的降解过程在聚合物降解的速率和位置上是可以控制的。

[0066] 可以用阳离子低聚物(如低分子量的聚乙烯亚胺(PEI)、低分子量的聚(L-赖氨酸)(PLL)、低分子量的壳聚糖和低分子量的PAMAM聚合复合物)来生产此处所述的聚合物。此外,可以使用任何包含有三个以上反应位点的氨基的分子。阳离子化合物可以选自但并不局限于下列物质:

[0067] (i) 式 1 的阳离子化合物:

[0068]



[0069] 式 1

[0070] 其中:

[0071] R_1 是氢原子,含 2-10 个碳原子的烷基或杂烷基,含 5-30 个原子的芳基或杂芳基,或者另一个式 1 的化合物;

[0072] R_2 是氢原子,含 2-10 个碳原子的烷基或杂烷基,或者含 5-30 个原子的芳基或杂芳基;

[0073] R_3 是氢原子,含 2-10 个碳原子的烷基或杂烷基,或者含 5-30 个原子的芳基或杂芳基;

[0074] R_4 是氢原子,含 2-10 个碳原子的烷基或杂烷基,含 5-30 个原子的芳基或杂芳基,或者另一个式 1 的化合物;

[0075] R_5 是氢原子,含 2-10 个碳原子的烷基或杂烷基,含 5-30 个原子的芳基或杂芳基,或者另一个式 1 的化合物;

[0076] (ii) 阳离子聚氨酸;和

[0077] (iii) 阳离子聚合碳水化合物;

[0078] 这些阳离子分子的例子包括但不局限于图 11 和表 1 中所示的阳离子分子以及 N-(2-氨基丙基)-1,3-丙二胺。

[0079] 表 1:依照本发明优选实施方案的阳离子化合物和低聚物的结构

[0080]

符号	名称	结构
C1	五亚乙基六胺	
C2	线性聚乙烯亚胺 (Mw=423)	
C3	支化聚乙烯亚胺 (Mw=600)	
C4	支化聚乙烯亚胺 (Mw=1200)	
C5	N,N-双(2-氨基丙基)-亚乙基二胺	
C6	精胺	
C7	N-(2-氨基乙基)-1,3-丙二胺	
C8	N-(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺	
C9	N,N-双(2-氨基乙基)-1,3-丙二胺	
C10	聚(酰胺胺)聚合复合物	PAMAM (2 nd G)
C11	聚(丙烯亚胺)聚合复合物	DAB-Am-16 (3 rd G)

[0081]

C12	亚精胺	
C13	1,4-双(3-氨基丙基)哌嗪	
C14	1-(2-氨基乙基)哌嗪	
C15	三(2-氨基乙基)胺	
C16	聚(L-赖氨酸)	

[0082] 此处使用的阳离子聚合物可以包含伯胺基或仲胺基,该基团可以与活性配体如

糖、缩氨酸、蛋白质和其它分子共轭结合。在一个优选的实施方案中,将乳糖酸共轭结合到所述阳离子聚合物上。因为肝细胞表面存在半乳糖受体,所以该半乳糖基单元提供了有用的指向肝细胞的靶向分子。在进一步的实施方案中,将乳糖共轭结合到可降解阳离子聚合物上,从而在该聚合物上引入半乳糖基单元。

[0083] 可降解的链接分子包括但不限于:含有至少一个生物可降解间隔部位的二-丙烯酸酯和多-丙烯酸酯、二-异丁烯酸酯和多-异丁烯酸酯、二-丙烯酰胺和多-丙烯酰胺、二-异硫氰酸酯和多-异硫氰酸酯、二-异氰酸酯和多-异氰酸酯、二-环氧化物和多-环氧化物、二-醛和多-醛、二-酰氯和多-酰氯、二-磺酰氯和多-磺酰氯、二-卤化物和多-卤化物、二-酸酐和多-酸酐、二-马来酰亚胺和多-马来酰亚胺、二-羧酸和多-羧酸、二- α -乙酰卤基和多- α -乙酰卤基,和二-N-羟基丁二酰亚胺酯和多-N-羟基丁二酰亚胺酯。下式表示可以依照优选实施方案使用的链接剂:

[0084] CL_n

[0085] 其中 C 是间隔部位,其可以是含 2-10 个碳原子的直链或支链烷基或杂烷基,或者含 5-30 个原子的芳基或杂芳基,且可以包括有或没有杂原子的醚、酯、酰胺、亚酰胺、羰基; L 是丙烯酸酯或异丁烯酸酯部分,且 n 是大于等于二的整数;并且其中 C 和 L 以共价键结合。图 12 中提供了几个链接剂分子的例子,然而此处也预想和描述了这些分子的其它实施方案。

[0086] 图 13 说明了所述链接剂分子反应残基的几个实施方案,然而这些例子并不用于限制本发明的范围。该反应残基可以选自但并不局限于:丙烯酰基、马来酰亚胺、卤化物、羧基酰卤、异氰酸酯、异硫氰酸酯、环氧化物、醛、磺酰氯、和 N-羟基丁二酰亚胺酯及其组合。此处也公开了所述链接剂和阳离子分子的其它实施方案。表 2 列出本发明优选实施方案中使用的链接剂。

[0087] 表 2:本发明优选实施方案中应用的生物可降解的链接剂分子的结构

[0088]

符号	名称	结构
L1	二丙烯酸-1,3-丁二酯	$\text{H}_2\text{C}=\text{HC}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2$
L2	二丙烯酸-2-甲基-2,4-戊二酯	$\text{H}_2\text{C}=\text{HC}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}\text{CH}_2\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}(\text{CH}_3)-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2$
L3	三丙烯酸三羟甲基丙烷酯	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}(\text{OCH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2)_3$
L4		$\left(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}\text{CH}_2\text{CH}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\text{N}(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2 \right)_n$ n: 约10
L5	二丙烯酸-2,4-戊二酯	$\text{H}_2\text{C}=\text{HC}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}\text{CH}_2\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2$
L6	四丙烯酸季戊四酯	$\text{C}(\text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2)_4$
L7	二季戊四醇五丙烯酸酯	$_2(\text{H}_2\text{C}=\text{HC}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{OH}_2\text{C})-\underset{\text{HOH}_2\text{C}}{\text{C}}-\text{H}_2-\text{O}-\text{H}_2-\text{C}-\text{C}-(\text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2)_3$
L8	二(三羟甲基丙烷)四丙烯酸酯	$\text{H}_2\text{C}=\text{HC}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{OH}_2\text{C}-\underset{\text{C}_2\text{H}_5}{\text{C}}(\text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-\text{O}-\underset{\text{C}_2\text{H}_5}{\text{C}}(\text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2)_2$
L9	二丙烯酸-1,4-丁二酯	$\text{H}_2\text{C}=\text{HC}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2$
L10	二丙烯酸-1,6-己二酯	$\text{H}_2\text{C}=\text{HC}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2$
L11	二丙烯酸二(乙二醇)	$\text{H}_2\text{C}=\text{HC}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2$

[0089]

	酯	
L12	二丙烯酸聚(乙二醇)酯	$\text{H}_2\text{C}=\text{HC}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2$
L13	二丙烯酸-2,5-二甲基-2,5-己二酯	$\text{H}_2\text{C}=\text{HC}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}(\text{CH}_3)-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2$

[0090] 可以通过改变所述聚合物的组成、进料比例和该聚合物的分子量,来控制该聚合物的降解速率。例如,当使用含较大烷基的链接剂时,所述聚合物降解较慢。此外,在某些情况下增加分子量也会导致降解速率的下降。可以通过调整阳离子聚合物和链接剂的比例或者通过改变各种可降解的链接剂分子,来控制所述聚合物的降解速率。

[0091] 在本发明的一个进一步的实施方案中,可以产生不可降解的阳离子聚合物。在这些聚合物中,阳离子化合物之间的一种或多种链接剂分子用此处描述的方法是不可降解的。

[0092] 因为含二硫化物的链接剂的合成更为困难,所以丙烯酸酯链接剂比含二硫化物的链接剂廉价得多。丙烯酸酯链接剂在任何水溶液中都是可降解的,所以,只要其中含有水,含有丙烯酸酯链接剂的聚合物可以在各种环境中降解。因此,含丙烯酸酯链接剂的聚合物与含二硫化物链接剂的聚合物相比,具有广泛的应用。此外,含二硫化物链接剂的聚合物的降解速率通常是一样的,但是用丙烯酸酯链接剂合成的聚合物的降解速率根据所使用的丙烯酸酯链接剂的不同而变化。

[0093] 此处所述的制备阳离子聚合物的合成方法简单且成本相对较低。通过使用不同的阳离子化合物或低聚物与链接剂分子的组合,或者通过改变阳离子化合物与链接剂的比例,可以得到一个生物可降解的阳离子聚合物库。可以通过使用不同的阳离子化合物与链接剂的组合,或者通过改变阳离子化合物与链接剂的比例来调整库中聚合物的物理和化学性质。库中的聚合物可以作为可降解的基因载体,将兴趣质粒 DNA 和反义寡 -DNA 引入细胞内。图 14 所示的 GFP 转染结果显示,这些聚合物中 50% 以上可以有效地将 GFP 基因传递到细胞内并产生蛋白质表达。

[0094] 实施例 1

[0095] 合成概述

[0096] 图 1 说明了支链型的或轻微交联的生物可降解阳离子聚合物的合成过程。可以用这种合成方法来生成支链型的或轻微交联的生物可降解阳离子聚合物的大型库。图中也对本发明的阳离子聚合物的降解过程进行了说明。

[0097] 在图 1 中,C 代表有至少三个反应位点(用于迈克尔加成)的含氨基的阳离子化合物或低聚物,且 L 代表含至少两个丙烯酸酯基的化合物。C 和 L 之间的反应在有机溶剂中,在很温和的条件下进行。反应后,可以通过两种不同的方法回收所述聚合物。在第一种方法中,通过在减压条件下直接除去溶剂来回收该聚合物。在第二种方法中,该聚合物通过加酸(如盐酸)中和,且中和后的聚合物通过过滤或离心分离回收。可以通过控制 C 和 L 的比例、反应时间、反应温度、溶剂和溶质浓度来得到支链型的或轻微交联的水溶性的高分子量聚合物。

[0098] 实施例 2

[0099] 通过使用二丙烯酸酯链接剂交联阳离子低聚物制备,并通过直接除去溶剂将其回收的聚合物

[0100] 可以通过多种本领域所属技术人员公知的方法来进行按照本发明所述的高分子量的阳离子聚合物的合成。下面提供了衍生自分子量为 600 的聚乙烯亚胺低聚物(PEI-600)及二丙烯酸-1,3-丁二酯(1,3-BDODA)的聚合物的合成过程,作为通用的方法,该方法可以作为使用类似化合物的其它合成方法的模板,这些类似化合物可以用来合成一系列可降解的阳离子聚合物。称取 0.44g PEI-600(Aldrich)装入一个小瓶中,并加入 6ml 二氯甲烷。当 PEI-600 完全溶解后,在搅拌的同时缓慢加入含有 0.1g 1,3-BDODA 的 2ml 二氯甲烷溶液。反应混合物在室温下搅拌 10 小时。减压下除去有机溶剂之后,得到 0.55g 透明的粘稠的液体。¹H-核磁共振谱图显示丙烯酸的碳-碳双键彻底地消失了。使用琼脂糖

凝胶电泳估算所得聚合物的分子量。通过类似方法,可制备与此处所使用的链接剂有类似结构的其它阳离子低聚物和其它链接剂衍生出来的其它支链型的或轻微交联的可降解阳离子聚合物。

[0101] 实施例 3

[0102] 通过使用二丙烯酸酯链接剂交联阳离子低聚物制备,并在用酸中和后将其回收的聚合物

[0103] 下面提供的衍生自 PEI-600 及二丙烯酸 1,6-己二酯 (1,6-HDODA) 的聚合物的合成过程,可作为通用的方法,该方法可以作为使用类似化合物的其它合成方法的模板,这些类似化合物可以用来合成一系列可降解的阳离子聚合物。使用移液管或注射器将含有 0.43g PEI-600 的 2ml 二氯甲烷溶液加入 20ml 的小瓶中。搅拌下将 0.23g (1.0mmol) 的 1,6-HDODA 快速加入上述 PEI-600 溶液中。通过加入更多二氯甲烷将反应溶液中的 PEI-600 浓度调节至 0.1g/ml。室温下 (25℃) 将反应混合物搅拌 5 小时。然后,加入 2.5ml 4M 的 HCl 中和反应混合物。将生成的白色沉淀过滤,用二氯甲烷洗涤并在室温下减压干燥。所得的聚合物用 NMR 谱图和琼脂糖凝胶电泳进行表征。通过类似的方法,也可以用与此处所使用的有类似结构的其它阳离子低聚物 (如聚丙烯亚胺) 和其它聚烯亚胺来制备其它不同的可降解阳离子聚合物。

[0104] 实施例 4

[0105] 通过使用多-丙烯酸酯链接剂交联阳离子低聚物制备的聚合物

[0106] 可以用含三个或三个以上丙烯酸酯基的丙烯酸酯型链接剂来交联如实施例 2 和 3 中所述的阳离子低聚物。但是,与二丙烯酸酯链接剂相比,当使用含三个或多于三个丙烯酸酯基的链接剂与阳离子聚合物交联时,所需的链接剂的摩尔比更低。下面提供了使用三丙烯酸三羟甲基丙烷酯 (TMOPTA) 交联 PEI-600 的反应过程,作为通用的方法,该方法可以作为其它使用类似化合物的合成方法的模板。搅拌下,将含有 0.13g (0.44mmol) TMOPTA 的 2ml 二氯甲烷溶液快速加入含有 0.43g PEI-600 的 2ml 二氯甲烷溶液中。通过加入更多二氯甲烷将反应溶液中的 PEI-600 浓度调节至 0.1g/ml。室温下 (25℃) 将反应混合物搅拌 5 小时,并用和实施例 3 中相同的方法回收生成的聚合物。可以用类似方法,通过使用与此处所使用的有类似结构的其它多-丙烯酸酯链接剂交联其它聚烯亚胺来制备聚合物。

[0107] 实施例 5

[0108] 通过使用丙烯酸酯链接剂交联 PAMAM 低聚物制备的聚合物

[0109] 按照本发明中的方法,可以将末端带伯胺基或仲胺基的聚(酰胺胺)树枝状聚合物 (PAMAM) 作为阳离子低聚物制备可降解阳离子聚合物。为了得到均质的溶液,此处使用甲醇和二氯甲烷的混合溶剂作为溶剂。将 0.1g PAMAM (第二代,含 0.39mmol 伯胺基) 溶解在由 0.5ml 甲醇和 1.0ml 二氯甲烷构成的混合溶剂中。搅拌下,向溶液中加入含有 40mg 1,3-BDODA 的 1ml 二氯甲烷溶液。在 5℃ 搅拌 10h 后,将 0.25ml 2M HCl 加入反应混合物中。通过离心分离回收生成的聚合物,并在常温下减压干燥。可以通过类似的方法,制备衍生自与此处所用的有类似结构的 PAMAM 低聚物和其它丙烯酸酯链接剂的聚合物。

[0110] 实施例 6

[0111] 通过使用丙烯酸酯链接剂交联聚(氨基酸)低聚物制备的聚合物

[0112] 将 0.11g 氢溴化聚(L-赖氨酸)低聚物 (Mw:1000-3000) 和 50mg 三乙胺溶解在

1.0ml 干燥的 DMSO 中。向上述溶液中快速加入含 42mg 二丙烯酸 -2,4- 戊二酯 (2,4-PDODA) 的 1.0ml 干燥 DMSO 溶液。室温下搅拌 6 小时后,通过加入 0.5M HCl 水溶液将反应混合物的 pH 值调节至 4.5。在 HCl 水溶液中 (pH:4.0,4℃) 使用 MWC0 为 3000 的透析管进行透析来纯化所生成的聚合物,并使用冻-干法回收。可以通过类似的方法,制备衍生自与此处所使用的有类似结构的其它含三个以上伯胺基或仲胺基的聚(氨基酸)低聚物和其它丙烯酸酯链接剂的聚合物。

[0113] 实施例 7

[0114] 通过使用丙烯酸酯链接剂交联多-胺制备的聚合物

[0115] 除实施例 2-6 中使用的阳离子低聚物外,按照本发明中的交联方法,也可以用低分子量的多-胺来制备所述的可降解阳离子聚合物。下面提供了使用二(三羟甲基丙烷)四丙烯酸酯 (DTMOPTA) 交联五亚乙基六胺 (PEHA) 的反应过程作为通用的方法,该方法可以作为其它使用类似化合物的合成方法的模板。称取 0.23g PEHA 加入盛有 2ml 二氯甲烷的小瓶中。当 PEHA 完全溶解后,搅拌下将含有 0.28g DTMOPTA 的 1ml 二氯甲烷溶液缓慢加入上述溶液中。另外再加入 2ml 二氯甲烷。室温下搅拌 8 小时后,加入 2ml 4M HCl 中和该反应混合物。生成的聚合物通过直接去除有机溶剂来回收,然后在室温下减压干燥。可以通过类似的方法,制备衍生自其它与此处所使用的多-胺和丙烯酸酯链接剂有类似结构的多-胺和丙烯酸酯链接剂的聚合物。

[0116] 实施例 8

[0117] 一个由通过使用丙烯酸酯链接剂交联阳离子低聚物或化合物制备的可降解阳离子聚合物库

[0118] 以实施例 2-6 所述的方法为基础,可以由不同的阳离子低聚物或化合物与不同的链接剂制备一个由支链型的或轻微交联的、水溶性的、可降解阳离子聚合物库。本发明中使用的阳离子低聚物或化合物和链接剂分别显示但并不局限于表 1 和表 2 中,本发明中制备的聚合物显示但并不局限于表 3 中。可以通过控制阳离子化合物与链接剂的比例、反应时间、反应温度、溶剂和溶质的浓度来调整所述聚合物的性质。其中某些聚合物用其对 GFP 报道基因的转染效率进行了评估(图 11)。

[0119] 表 3 使用不同阳离子化合物和链接剂制备的聚合物

[0120]

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7		L9	L10	L11	L12	L13
C1	C1L1		C1L3	C1L4	C1L5	C1L6	C1L7	C1L8					
C2	C2L1		C2L3		C2L5	C2L6	C2L7	C2L8					
C3	C3L1	C3L2				C3L6	C3L7	C3L8	C3L9	C3L10	C3L11	C3L12	C3L13
C4	C4L1	C4L2							C4L9		C4L11		
C5	C5L1		C5L3		C5L5	C5L6	C5L7	C5L8					
C6			C6L3			C6L6	C6L7	C6L8					
C7			C7L3		C7L5	C7L6	C7L7	C7L8					
C8	C8L1		C8L3		C8L5	C8L6	C8L7	C8L8					
C9	C9L1		C9L3		C9L5	C9L6	C9L7	C9L8					

[0121]	C10	C10L1	C10L2						
	C11	C11L1		C11L3					
	C12			C12L3		C12L6	C12L7	C12L8	
	C13			C13L3		C13L6	C13L7	C13L8	
	C14	C14L1		C14L3	C14L5	C14L6	C14L7	C14L8	
	C15	C15L1		C15L3	C15L4				
	C16				C16L5			C16L8	

[0122] 实施例 9

[0123] 通过使用双环氧化合物链接剂交联阳离子低聚物制备的基本上不可降解的阳离子聚合物

[0124] 下面提供了使用甘油醇二缩水甘油醚交联 PEI-600 制备聚合物的合成过程,作为通用的方法,该方法可以作为其它用来合成一系列不可降解阳离子聚合物的合成方法的模板。将 0.43g PEI-600 和 0.37g 甘油醇二缩水甘油醚溶解在 7.0ml 甲醇中。将反应溶液在 40℃ 搅拌 48h。冷却至室温后,向反应溶液中加入 2.5ml 4M HCl (在二噁烷中),产生白色沉淀。生成的聚合物用离心分离法回收并在室温下减压干燥。所得聚合物用 NMR 谱图和琼脂糖凝胶电泳表征。可以通过类似的方法制备使用其它双环氧化合物链接剂交联其它阳离子低聚物制备的聚合物。

[0125] 实施例 10

[0126] 通过使用多-环氧化合物链接剂交联多-胺制备的基本上不可降解的阳离子聚合物

[0127] 下面提供了使用三羟甲基丙烷三缩水甘油醚 (TMOPTe) 交联 N,N'-双(2-氨基丙基)-乙二胺 (BAPEDA) 制备聚合物的合成过程,作为通用的方法,该方法可以作为其它使用类似化合物的合成方法的模板。将 0.18g BAPEDA 和 0.24g TMOPTe 溶解在 3.0ml 甲醇中。反应溶液在 35℃ 下搅拌 74 小时。冷却至室温后,向反应溶液中加入 1.0ml 4M HCl (在二噁烷中),生成的沉淀聚合物通过减压除去溶剂进行回收。所得聚合物用 NMR 谱图和琼脂糖凝胶电泳表征。可以通过类似的方法制备使用其它多-环氧化合物链接剂交联其它多-胺制备的聚合物。

[0128] 实施例 11

[0129] 半乳糖基单元连接到所述阳离子聚合物上的过程

[0130] 在本合成方法的一个实施方案中,将 102mg 聚合物 C3L5 和 50ml 乳糖酸加入 10ml 水中,并用 Na₂CO₃ 水溶液调节至 pH5.5。剧烈搅拌下加入 25mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺。室温下搅拌 5 小时后,反应溶液在水 (pH = 3.5) 中透析 24 小时。生成的连有半乳糖基的聚合物用冻-干法回收,并用 NMR 谱图表征。

[0131] 实施例 12

[0132] DNA 阻滞实验

[0133] 结合和凝缩 DNA 是以阳离子聚合物为媒介的基因转染过程的第一步。DNA 阻滞实验通常用于判断 DNA 聚合物的结合亲和力。低 DNA 结合能力的聚合物通常表现出低的或者没有转染效率。实验方案如下所述。简而言之,在涡流条件下将溶在 10 μl DMEM (不含血清和抗体) 中的不同比例的聚合物滴加入溶有 0.2 μg 绿色荧光蛋白 (GFP) 质粒的

10 μ l DMEM (不含血清和抗体) 中。在进行电泳前,将生成的配合物在室温下静置 15 分钟。分别在各配合物中加入 5 μ l 示踪染料,并将每种混合物各取 15 μ l 装入各孔中。使用电泳法分析 DNA 配合物,介质使用含 0.04M 三价醋酸盐缓冲剂、pH 值为 7.4、并含 1mM EDTA 的浓度为 0.3% 琼脂糖凝胶,在电压为 100V 条件下进行 30 分钟。DNA 在 UV 照射下显影。在电场中,自由 DNA 完全从孔中逸出,而在凝胶中可以看到质粒条带(每个样品中的 0 线,图 2)。如果质粒完全被聚合物包裹,那么它的迁移就被完全阻止了,因而在凝胶中就看不到条带。然而如果质粒没有被聚合物结合,那么该质粒就会从孔中迁移出来,因此在凝胶中只能观察到被结合了的质粒或者污点。在这个试验中,即使当聚合物/DNA 比例为 16 : 1 时,下列物质的 DNA 结合亲和力也很弱,其包括:原料阳离子化合物或低聚物、五亚乙基六胺 (C1)、线性 PEI423Da (C2)、支化 PEI600Da (C3) 和支化 PEI1200Da (C4)。质粒仍然流失了(图 2, C3)。交联之后,所有本发明的衍生自原料低聚物或阳离子化合物的聚合物都表现出了高结合亲和力。例如,当聚合物/DNA 比例为 2 : 1 时,DNA 迁移完全被 C3L1 阻止;而当聚合物/DNA 比例为 4 : 1 时,DNA 迁移完全被 C4L1 阻止(图 2, C4L1)。图 2 的结果显示,用本发明制造的聚合物的 DNA 结合亲和力提高了。

[0134] 实施例 13

[0135] 用琼脂糖凝胶电泳法估算聚合物的分子量

[0136] 分子量是决定 DNA 结合亲和力和转染效率的关键问题。高 DNA 结合亲和力和转染效率需要较高的分子量。本发明的重要优点之一是可以将低分子量的阳离子低聚物或阳离子化合物转变成较大分子量的聚合物。为了评估本发明合成的聚合物的分子范围,进行了一个琼脂糖凝胶电泳检测。在这个实验中,将聚合物溶解在 150mM 的 NaCl 溶液达到最终浓度为 5mg/ml。在每个孔中,各取 20 μ l 样品与 2 μ l 50% 的甘油和 1 μ l 10regon 红色荧光染料混合,并装载于含 0.6% 的琼脂糖凝胶的 TAE 缓冲液中。电泳在 100 伏特下进行 30 分钟,聚合物的分子量可以通过在 UV 光下对荧光染料进行显影或者在用 commassie 蓝染色之后进行显影来分析。聚合物的迁移速率取决于聚合物的大小。通常,在琼脂糖凝胶中低分子量的聚合物比高分子量的聚合物迁移得更快。在这些实验中,在泳道 1-3 中,分别用支化的 PEI_{25K}、PEI_{10K}、PEI_{1.8K} 作为聚合物分子量的标准。泳道 C3 是一种阳离子低聚物 (PEI_{0.6K}),它是合成聚合物 C3L1 的原料。对比标准分子量,实验结果显示聚合物 C3L1 的分子量远高于其原料 (C3) 的分子量(图 3)。

[0137] 实施例 14

[0138] 体外转染

[0139] 在研究过程中,始终在不断调整为个体实验制定的转染实验方案。将永久性细胞 (293 细胞和 HT1080 细胞, ATCC) 铺板在 24 孔的组织培养板中 (293 细胞, 2×10^5 个细胞 / 孔; HT1080 细胞, 8×10^4 个细胞 / 孔),并在含有 10% FBS (Gibco) 的 DMEM (Gibco) 中培养过夜。精确的质粒 / 聚合物配合物的混和顺序是决定转染结果的重要参数。涡流条件下,在每一个孔中,将等份的含不同量的所述聚合物的 30 μ l DMEM 滴加到含 0.6 μ g 质粒 DNA (如 pCMV-GFP 质粒 DNA 或 pCMV-luc) 的 30 μ l DMEM 溶液中。室温下,将聚合物-DNA 溶液培养 15 分钟以形成 DNA- 聚合物配合物。在上述 DNA- 聚合物配合物中加入含 10% 的 FBS 和抗体的 150 μ l (150 微升) DMEM 培养基,在用 PBS 清洗细胞之后,将混合物分别加入每一孔内的细胞中。将细胞培养 3 小时 (37°C, 7.5% CO₂),然后将培养基替换为含 10% FBS 和 100U/ml

盘尼西林及 100 i g/ml 链霉素的 DMEM 培养基。转染 24 小时后,使用下述方法检测 GFP 信号和萤火虫荧光素酶的活性。根据生产商提供的方案,将 Lipofectamine 和 Superfect 用作正控制。

[0140] 以新的合成聚合物为媒介的 GFP 报道基因转染

[0141] 在第一轮筛选中使用了绿色荧光蛋白 (GFP) 基因。转染后,在荧光显微镜 (Olympus, 515-550nm 滤光片) 下观察细胞内的 GFP 信号。使用 10X 的物镜对细胞进行拍照。通过对三块区域进行统计,可以确定转染培养基中具备 GFP 信号的细胞比例,从而确定最佳的阳离子聚合物用量。结果显示原料聚合物 C1、C2、C3 和 C4 基本上没有转染效率。交联之后,由上述原料衍生出来的聚合物则显示出高的转染效率。例如, C4L1、C3L1、C3L2、C2L3、C1L3、C1L4 的转染效率约为 45% 到 55%, 优于 LPEI_{25KDa} (约 45%)。

[0142] 图 5 显示了使用 C3、C4 和 C3L1、C4L1 的通常结果。转染 24h 后,在测试细胞内, C3 和 C4 基本上没有显示出 GFP 信号。C4L1 和 C3L1 则显示出非常明亮的 GFP 信号,该结果与商业转染试剂 lipofectamine (Gibco) 相当,且优于另一种商业转染试剂 Superfect (Qiagen)。

[0143] 以新的合成聚合物为媒介的荧光素酶报道基因转染

[0144] 按照生产商的指导 (荧光素酶检测系统 ;Promega, Madison, WI, USA) 使用化学发光检测法对荧光素酶活性进行测量。简而言之,基因转染三十小时后,测试细胞用 PBS 清洗两次,然后在室温下,用细胞溶解缓冲液 (1% Triton X-100、100mM K₃PO₄、2mM 二硫苏糖醇、10% 甘油醇、和 2mM EDTA pH 7.8) 溶解细胞 15 分钟。然后室温下,在光度计中将一份 10 i l 的细胞溶解产物与 50 i l 荧光素酶检测剂用注射器混和。对光发射量测量三次,每次 10 秒,用 RLU s (相对光单位) 表示。用 Coomassie 蛋白质检测法 (Pierce, Rockford, Illinois) 将代表每一样品中蛋白质含量的相对光单位 (RLU) 进行标准化。所有实验均重复三次。图 6 中显示了使用各种转染试剂对 293 和 HT1080 进行 pCMV-luc 转染的结果。结果显示 C4、C3 和 C2 没有转染效率;其荧光素酶活性与背景相当。交联后,由这些低分子量阳离子化合物衍生出来的 C3L1、C4L1 和 C2L3 则显示出高转染效率。C4L1 的荧光素酶活性是 1.88×10^6 , 高于支化 PEI 25K 和 lipofectamin (荧光素酶活性分别为 1.58 和 1.28×10^6), 并且与线性 PEI 25K 相比,其荧光素酶活性高 7.9 倍。实验结果表明使用本发明的方法可以显著提高转染效率,进而找到制造新转染试剂的优良方法。

[0145] 实施例 15

[0146] 新合成聚合物对细胞的毒性

[0147] 阳离子基因载体对哺乳动物细胞的细胞毒性可以用 3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基四唑葎溴化物 (MTT) 法评估。简而言之,将 HT1080 细胞 (2×10^4 细胞 / 孔) 或 293 细胞 (4×10^4 个细胞 / 孔) 接种在 96 孔培养板中,并培养 16-24 小时。将一份 15 μ l 含聚合物的 DMEM 滴加在 15 μ l 含 0.3 μ g 质粒的 DMEM 中,并在室温下培养 15 分钟以形成聚合物-DNA 配合物。在聚合物-DNA 配合物中加入 75 μ l DMEM,取 50 μ l 该混合物加入细胞中,再培养 3h (37°C, 7.5% CO₂)。然后除去培养基,并加入含 10% FBS 和 100U/ml 盘尼西林及 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基。继续培养 24 小时后,除去培养基并在每个孔中加入 10 i l MTT 溶液 (5.0mg/ml, Sigma),再培养 3 小时。然后除去培养基并加入 200 i l DMSO 以溶解生成的甲槽 (formazan) 晶体。在 570nm 处测量溶液的吸光度。细胞的成活力用下式进行计算:成活力 (%) = $\{Abs_{570}(\text{样品}) / Abs_{570}(\text{对照组})\} \times 100$ 。所有的实验均重复三遍。

结果显示 C4L1、C3L1、C2L3、C1L3 的细胞毒性比支化 PEI_{25K} 要低,即转染后存活的细胞要多得多;这些聚合物的细胞毒性与 LPEI25K 的类似或者更低(图 7)。实验结果表明使用本发明的方法可以很容易地得到高基因转染效率及较低细胞毒性的合成阳离子聚合物。

[0148] 实施例 16

[0149] 合成聚合物的可控降解

[0150] 为了评估新的合成阳离子聚合物的降解过程,将由 PEI600D 衍生出来的 C1L3 在 37℃ 用 PBS 分别培养 6 小时(h)、12h、1 天(d)、2d、3d、4d 和 6d。在培养前后,采用分子量分析的凝胶谱图(图 8A)和转染效率(图 8B)对聚合物的降解过程进行评估。分子量检测的数据显示培养前 C1L3 的分子量高于标准聚合物(PEI25K)。在 37℃ 培养 6 小时后,凝胶上面部份的聚合物带逐渐消失而凝胶底部的色带逐渐累积,这一证据表明聚合物已降解为低分子量的低聚物。培养三天后,大多数的聚合物出现在低分子量区域中,表明聚合物基本上已完全降解了(图 8A)。这一结果与转染效率变化的结果相一致,转染效率变化的结果显示,在 37℃ 培养 3 天后,转染效率从 30% 降到 0(图 8B)。

[0151] 通过简单地改变不同类型的链接剂,可以很容易地得到具有不同降解速率的聚合物。例如,聚合物 C3L1 和 C3L2 是使用相同的阳离子化合物 C3(支化 PEI600D)合成的,但使用了不同的可水解的链接剂。C3L1 是使用二丙烯酸-1,3-丁二酯(L1)合成的,而 C3L2 是使用二丙烯酸-2-甲基-2,4-戊二酯(L2)合成的。这两种生成的聚合物在凝胶电泳检测法和在转染检测法中均显示出不同的降解速率。转染检测法显示,C3L2 聚合物在 37℃ 下用 PBS 培养 24 小时后,其转染效率基本上没有变化,在 37℃ 下用 PBS 培养 3 天后仅下降了 10%;然而在相同条件下培养 24 小时后,聚合物 C3L1 的转染效率明显地从 40% 降到了 25%,培养 3 天后其转染效率基本降到 0%(图 9A)。琼脂糖凝胶电泳的数据也与转染检测法中相一致,该数据显示 C3L2 的分子量基本上没有明显的变化(图 9B,底部),而 C3L1 的分子量在第 6 小时开始变化,降解 4 天后则基本上和 C3 相同了(图 9B,顶部)。实验结果表明聚合物的降解速率是可以控制的,并且可以通过使用不同的链接剂来实现所需的降解速率。

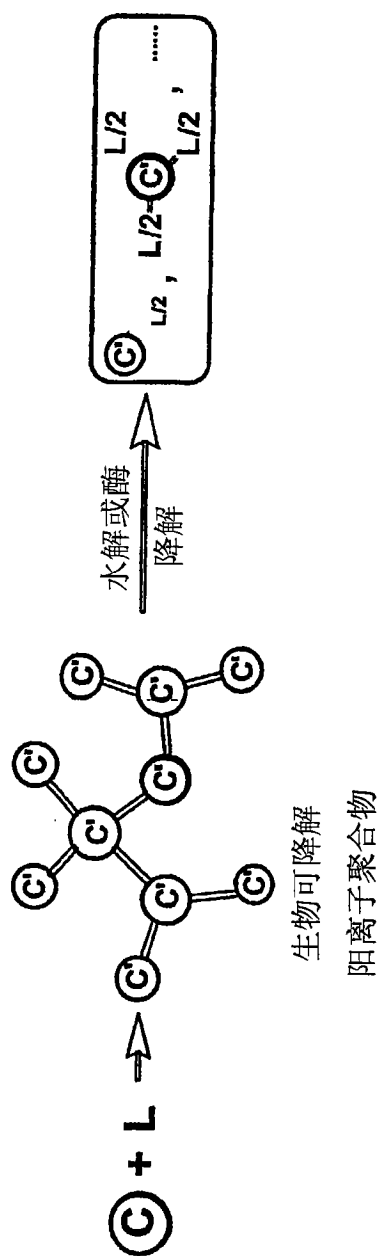
[0152] 实施例 17

[0153] 以新的合成聚合物为媒介的反义寡脱氧核苷酸的传递

[0154] 在本实验中,对 C4、C3、C2、C3L1、C2L3、C1L3、BPEI25K 和 Lipofectamine 的反义 ODN 传递效率进行了测试。

[0155] 在涡流搅拌的同时,将溶解在 25 μ l DMEM(不含血清和抗体)中的不同比例的样品滴加在含有 FITC 标记的 0.3 μ g ODN 的 10 μ l DMEM(不含血清和抗体)溶液中。15 分钟后,将 150 μ l DMEM(不含血清和抗体)加入聚合物-ODN 配合物中并混和。ODN 的最终浓度是 250nM。用 PBS 清洗置于 24 孔的培养板中的 HeLa705 细胞,然后将聚合物-ODN 配合物加入细胞中。在显微镜下观察 FITC 信号。结果显示 C4、C3、C2 没有传递 FITC 标记的 ODN 的效率。BPEI25K 和 Lipofectamine 在传递 ODN 中有很高的效率。BPEI 具有比 Lipofectamine 更高的传递效率,且当 PEI/ODN 比例为 0.25 μ g/0.3 μ g 时,用 ODN 处理 2 小时后,约 60-70% 的细胞显示出 FITC 信号。此时,在 Lipofectamine 组中只有 5-10% 的细胞是正信号。在 ODN 传递 24 小时后,在 BPEI25K 组中有超过 85% 的细胞显示出 FITC 信号,而在 Lipofectamine 组中有 65% 的细胞显示出了 FITC 信号。所有 3 组样品都显示出高 ODN 传递效率。C3L1、

C2L3、C1L3 显示出的传递效率比 BPEI25K 稍低,而其细胞毒性远远低于 BPEI25K。C3L1、C2L3、C1L3 的 ODN 传递效率均高于 Lipofectamine(图 10)。



一
四

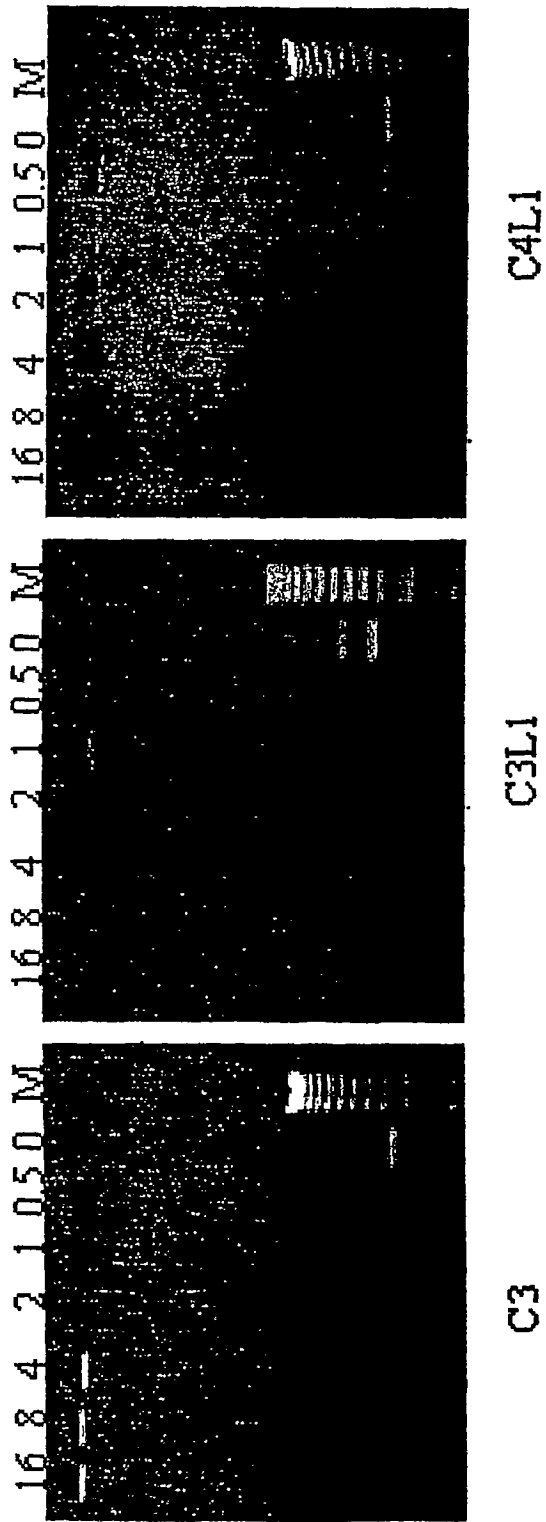


图 2

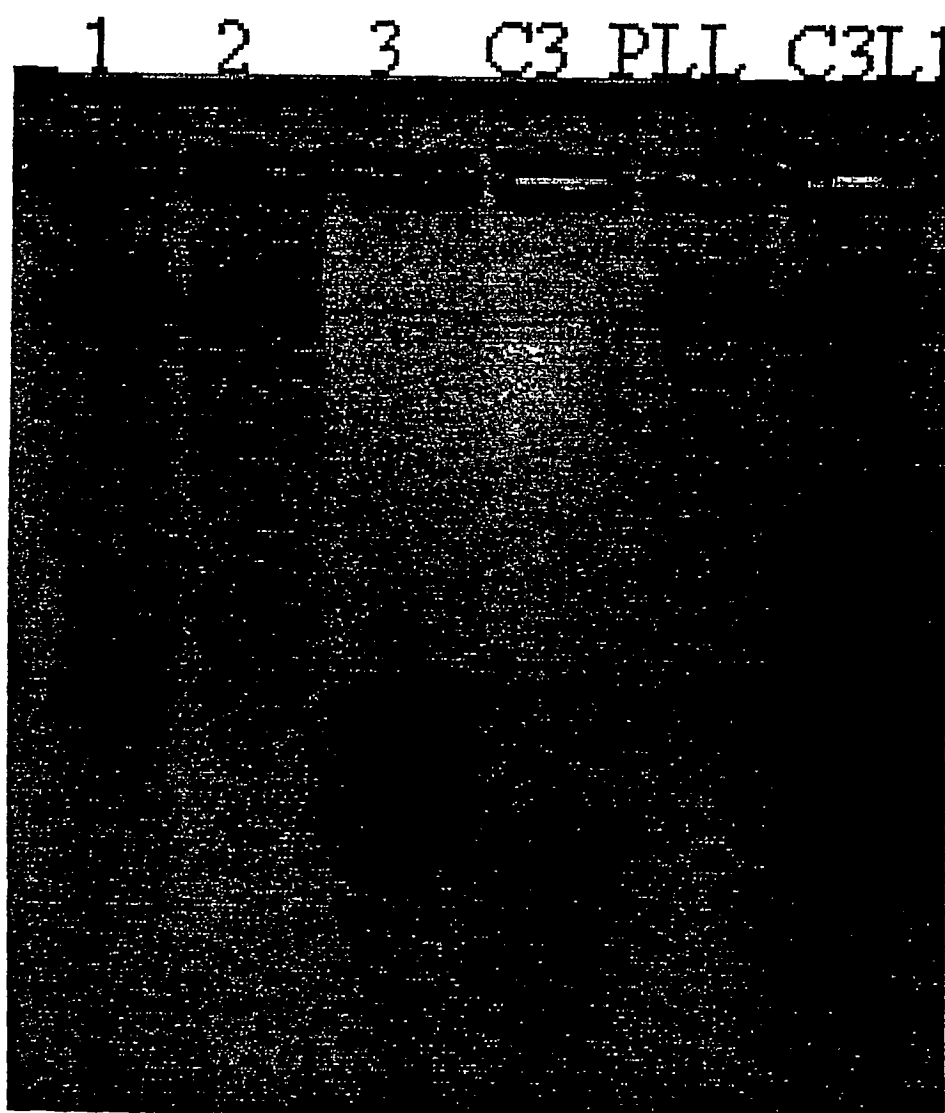


图 3

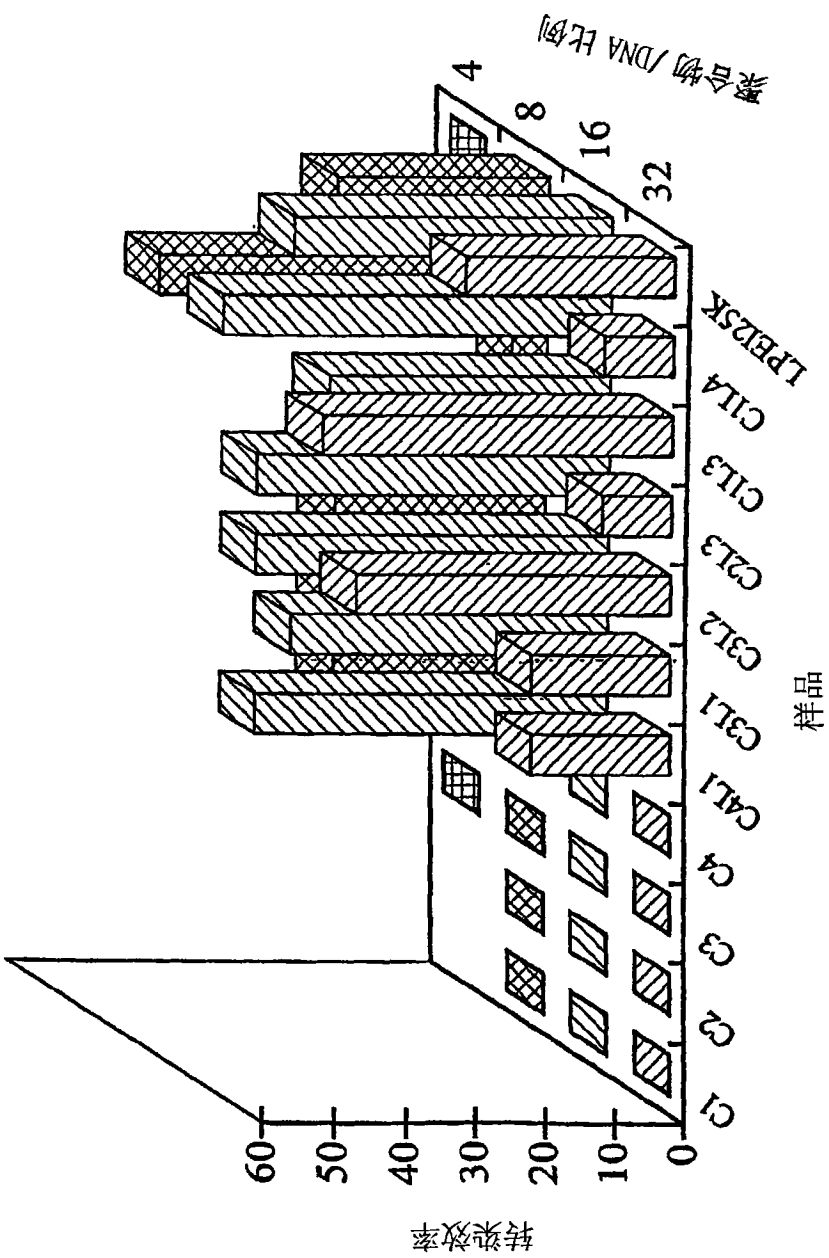


图 4

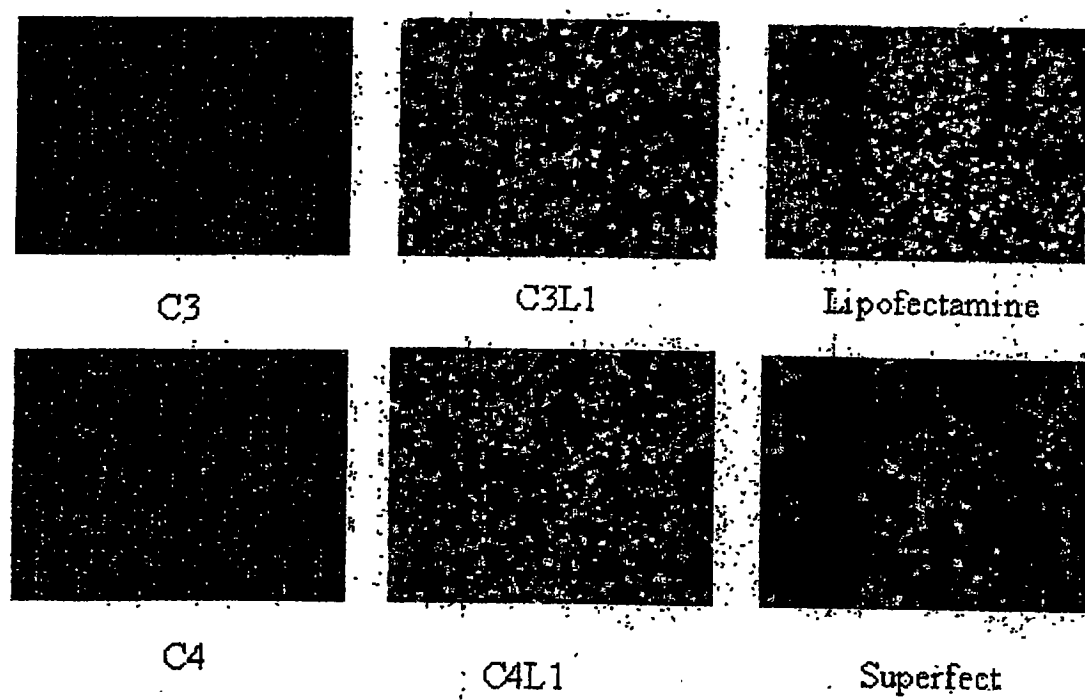
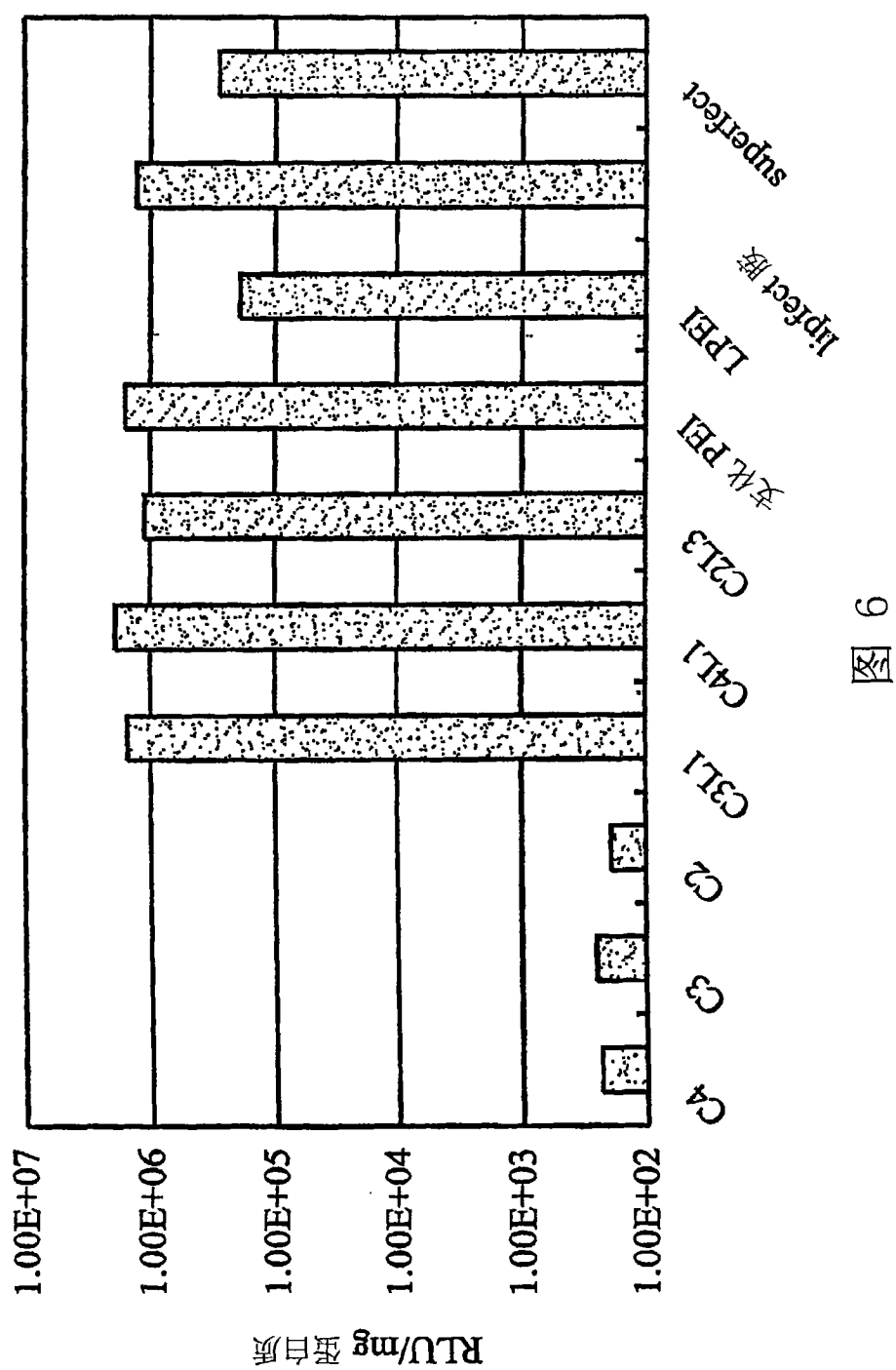


图 5



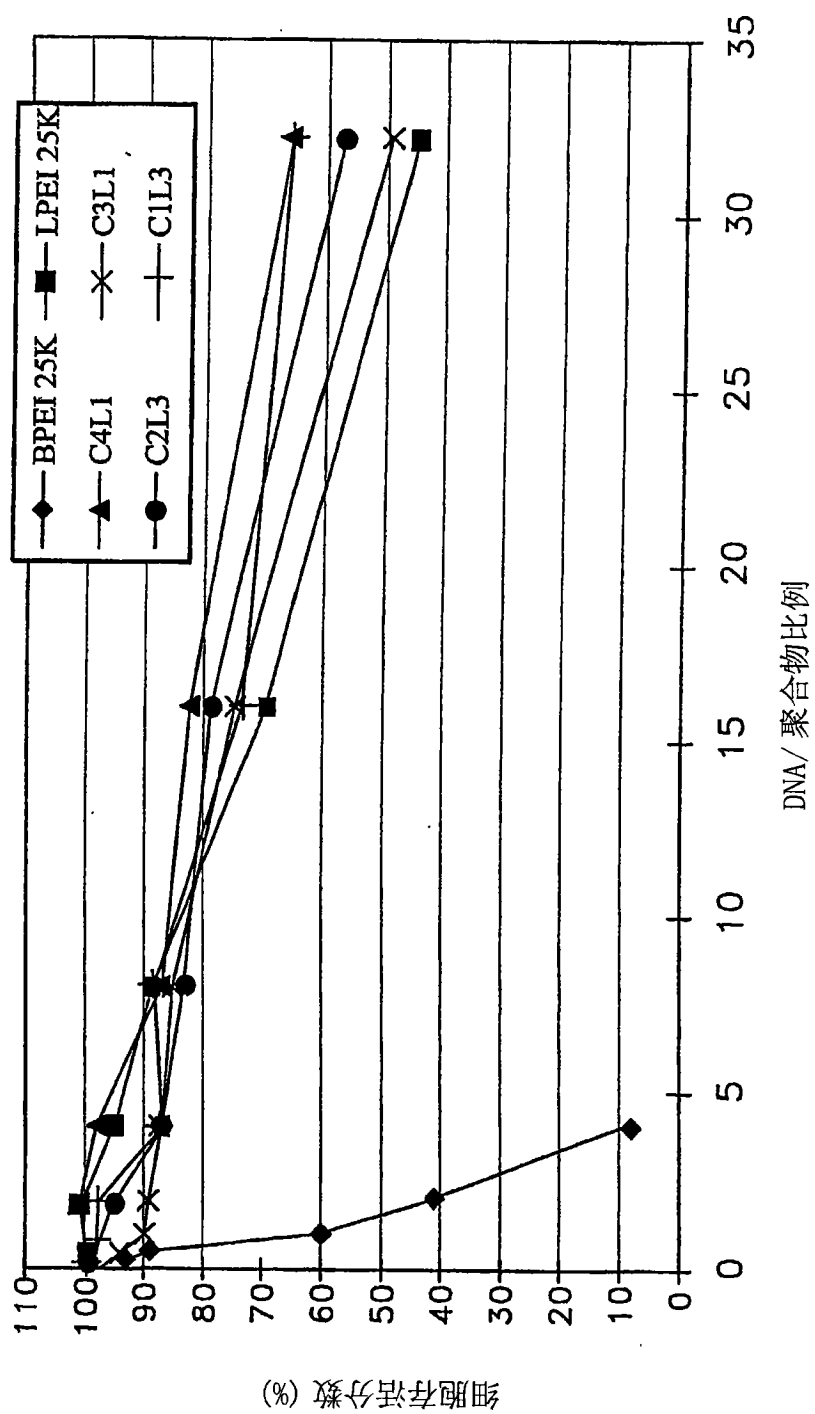


图 7

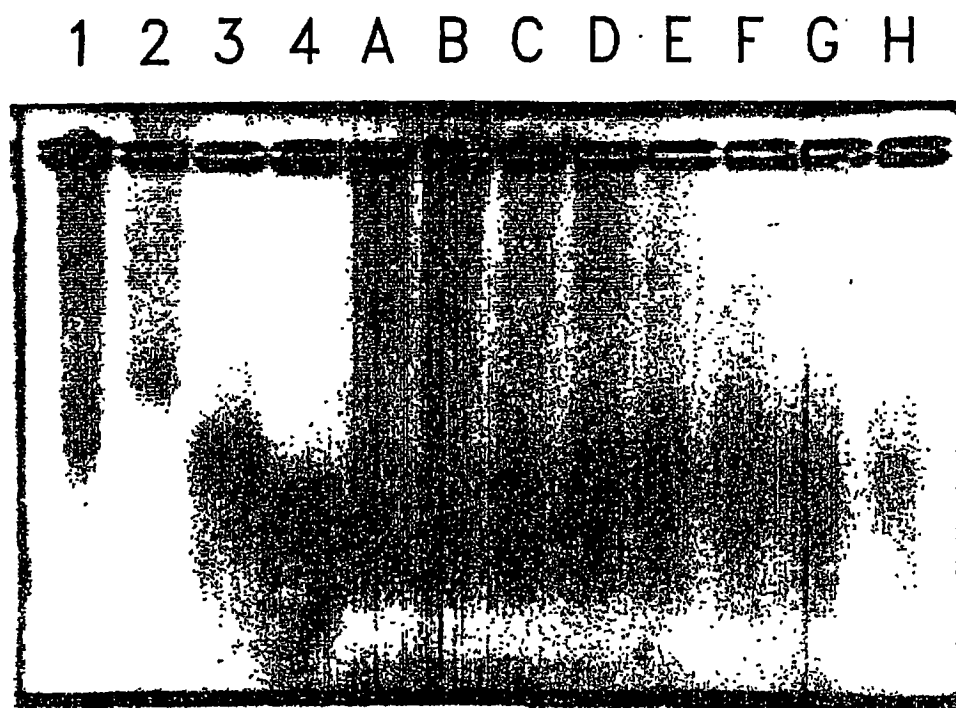


图 8A

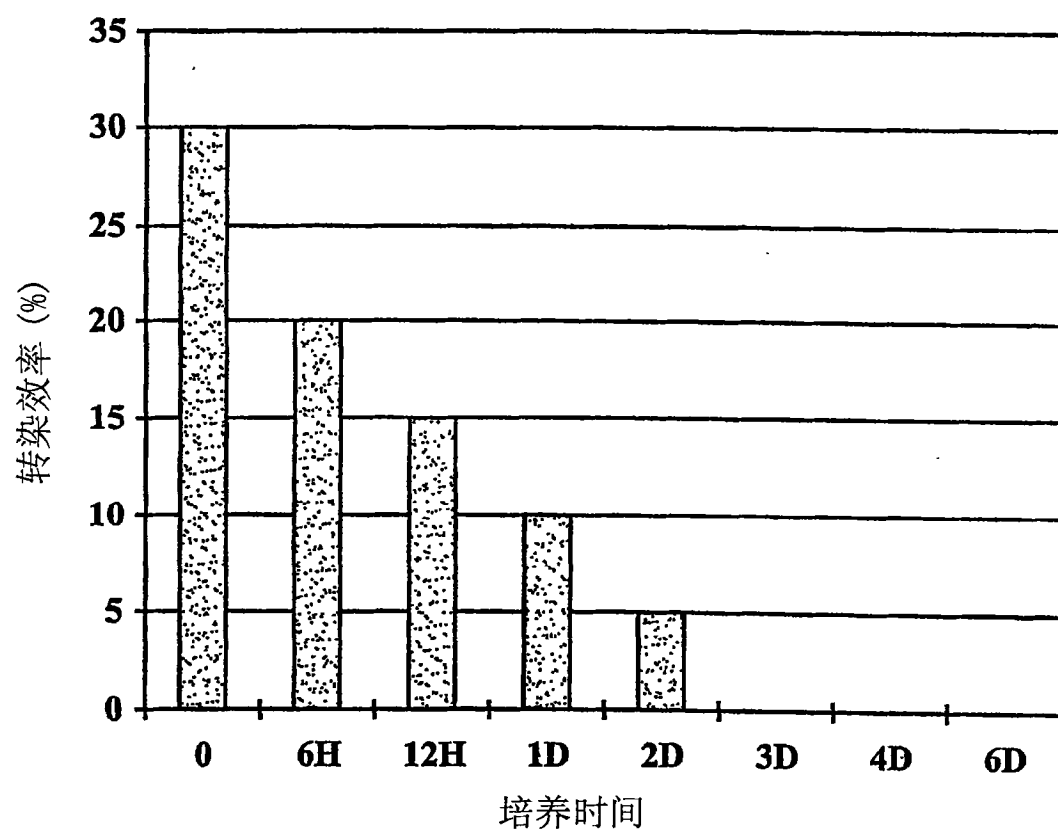


图 8B



图 9A

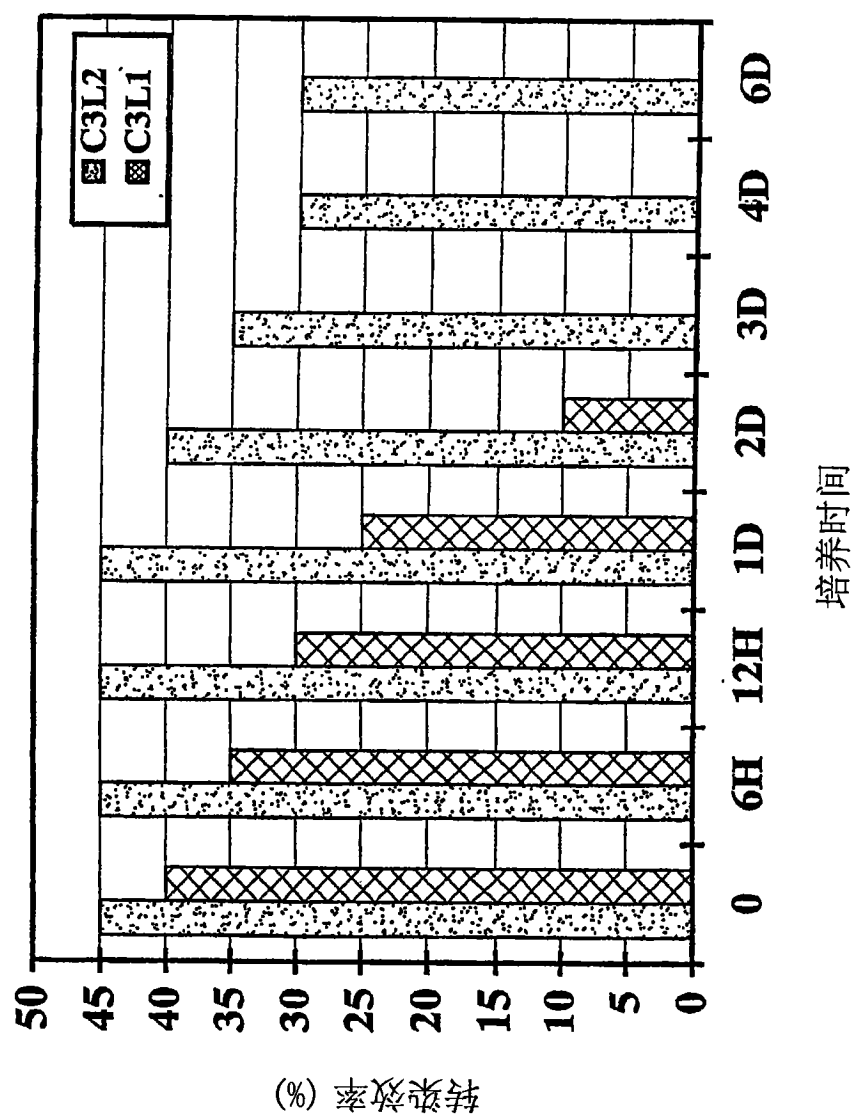


图 9B

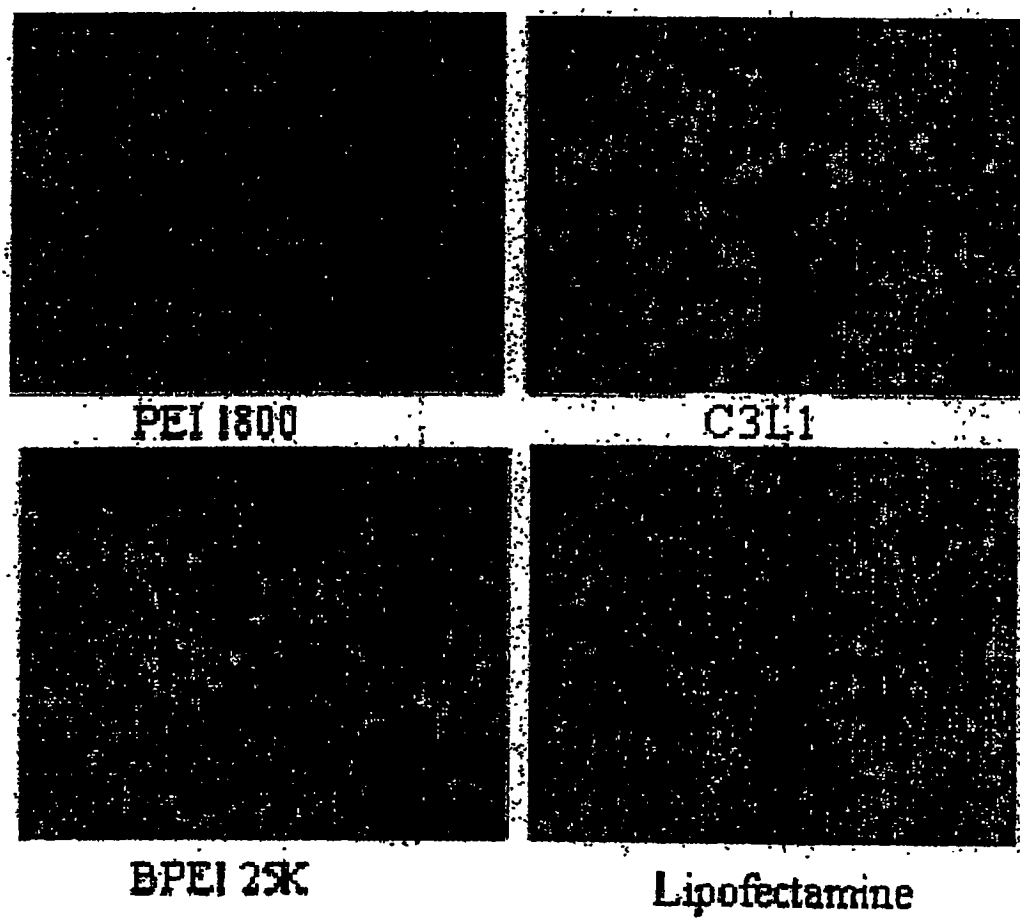


图 10

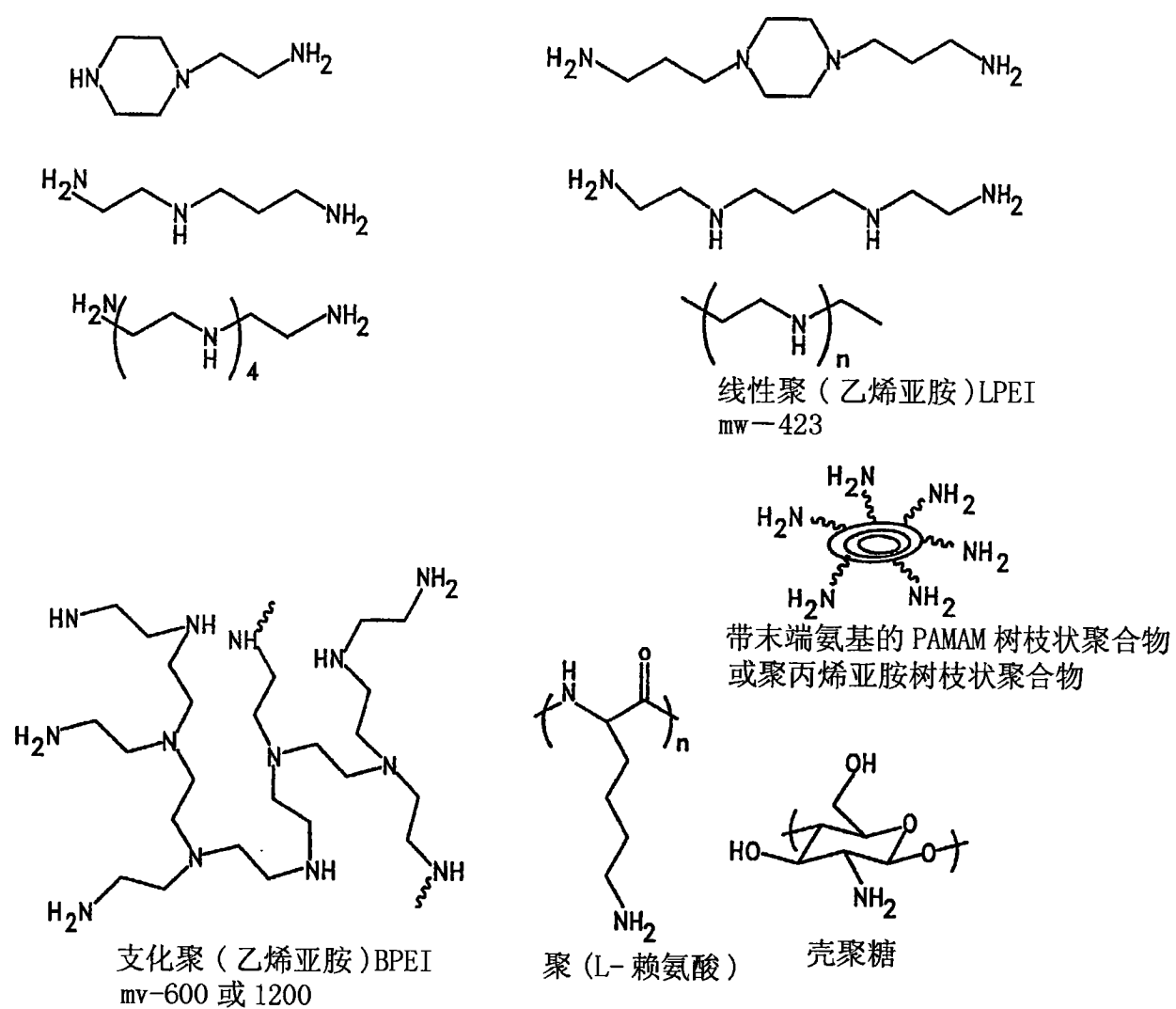


图 11

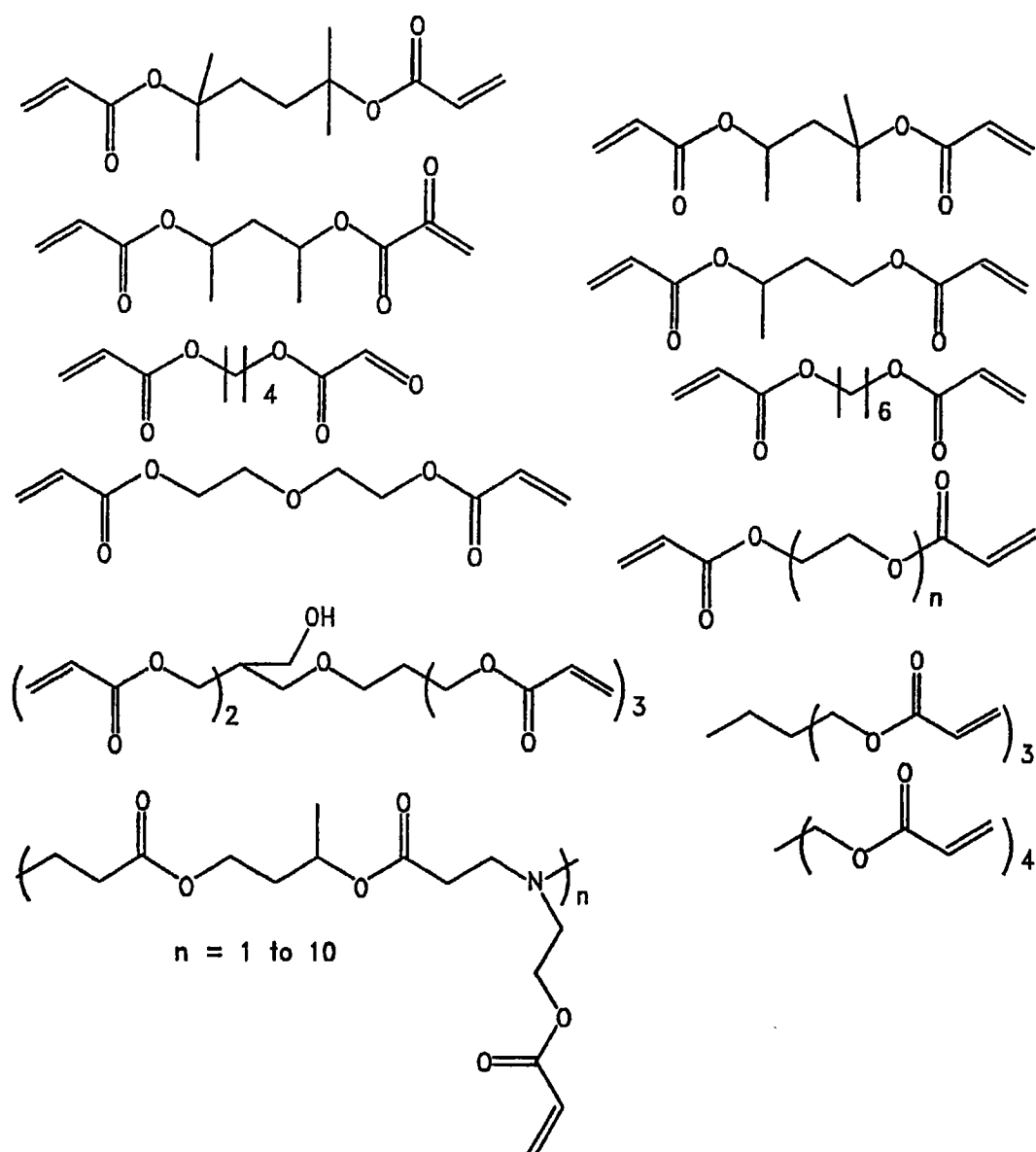


图 12

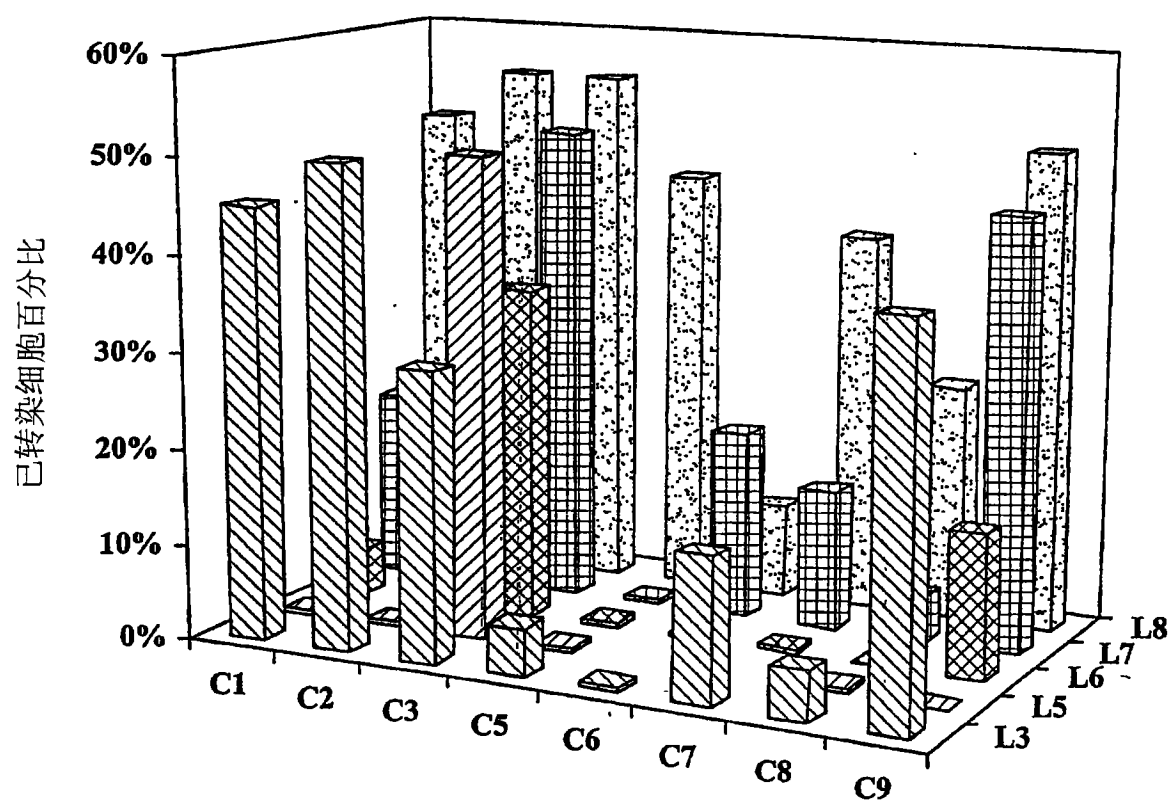


图 14