

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C12N 15/64

C12N 15/88



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96121733.2

[43]公开日 1997 年 9 月 10 日

[11] 公开号 CN 1158898A

[22]申请日 96.11.20

[30]优先权

[32]95.11.22[33]EP[31]95118338.3

[71]申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72]发明人 J-Y·莱根卓 A·苏泊萨斯克

A·特泽西克

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所

代理人 张 闽

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图页数 0 页

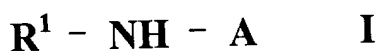
[54]发明名称 细胞转染

[57]摘要

分子式 $R^1-NH-AI$ 的化合物, 其中 R^1 为 C_{12-40} 脂族羧酸的酰基部分, 而 A 为缺少一个氨基的寡肽的残基或其衍生物, 因而可用于细胞转染。

权 利 要 求 书

1. 式 I 的化合物或其衍生物 作为用聚核苷酸或任何其它阴离子大分子转染细胞的载体的应用,



其中 R^1 为 $C_{12} - 40$ 脂族羧酸的酰基部分, 而 A 是缺少一个氨基的寡肽的残基。

2. 如权利要求 1 的应用, 其中附加有协助脂质。

3. 如权利要求 2 的应用, 其中协助脂质为卵磷脂或脑磷脂或其混合物。

4. 如权利要求 3 的应用, 其中协助脂质为二油酰脑磷脂。

5. 如权利要求 1 - 4 中任一项的应用, 其中在分子式 I 化合物中的寡肽含有达 10 个氨基酸残基。

6. 如权利要求 5 的应用, 其中在分子式 I 化合物中的寡肽残基含 2 - 6 个氨基酸残基。

7. 如权利要求 1 - 6 中任一项的应用, 其中寡肽至少含有一个 α , γ - 二氨基丁酸、鸟氨酸或赖氨酸残基。

8. 如权利要求 1 - 7 的应用, 其中寡肽的末端羧基被转变为酰肼。

9. 如权利要求 1 - 8 中任一项的应用, 其中分子式 I 的化合物中 R^1 为棕榈酰基或油酰基。

10. 如权利要求 1 - 9 中任一项的应用, 其中至少存在着一个转染感受态分子。

11. 如权利要求 1 - 10 中任一项的应用, 其中附加有短链磷脂。

12. 如权利要求 1 - 11 中任一项的应用, 其中短链磷脂为二辛基或二辛酰基卵磷脂。

13. 一种组合物, 它含有如权利要求 1 中定义的分子式 I 的至少一种化合物、聚核苷酸或任何其它阴离子大分子, 以及可选择的协助脂质及/或短链磷脂。

14. 一种组合物, 它含有一种如权利要求 1 所定义的分子式 I 的化合物和一种协助脂质。

15. 如权利要求 14 中的一种组合物，其中协助脂质为卵磷脂或脑磷脂。

16. 如权利要求 14 或 15 的一种组合物，其中各组分的形式为脂质体、混合性微团、有机溶液或水分散体。

17. 如权利要求 13 - 16 的一种组合物，其中组合物形式为固体、液体、半固体或气溶胶。

说 明 书

细胞转染

基因转移技术已成为人们极为关注的一个领域。把一外源基因导入细胞中（即转染）在科学及医学上具有许多重要应用，范围包括从基因调控及重组蛋白质的生产到基因治疗。

病毒已演化得能绕过各种细胞障碍达到基因转移的目的，其实际上已成为转染的选择性载体。目前人们已对多种病毒〔包括逆转录病毒、腺病毒或疱疹病毒〕进行工程处理以携带治疗基因，用于基因治疗中的人类临床尝试。不过，这方面存在着感染及免疫反应上的危险，而病毒的大规模生产既困难又耗时。

由于这些原因，人们便开发出了非病毒性系统来把 DNA 携带入细胞中，例如依据阳离子脂质（二油酰氧基三甲铵）的转染技术(Felgner 等人, Proc. Natl., Acad. Sci, USA, 84, 7413-7417, 1987), 商用形式为 LipofectinTM。由于发现了这种转染技术，已经合成出多种阳离子脂质，其中一些已做为可商购转染试剂用于实验室： DOGS(TransfectamTM)、DOSPA (LipofectamineTM)、DOTAP (DOTAPTM)。

尽管如此，虽然在建立非病毒性基因送递系统方面取得了重要的进展，但仍然存在着对更有效技术的需求，因为合成系统的转染效率通常要低于病毒载体的转染效率。另外，在活体应用方面 also 存在着许多问题，而生物液体中非病毒系统稳定性差也无法保证活体转染的高、可再现水平。

根据本发明我们发现，与脂肪酸部分相偶联的寡肽可以结合核酸、并可用于细胞转染。

因此，一方面，本发明涉及到具下述分子式 I 的化合物或其衍生物作为用聚核苷酸或任何其它阴离子大分子转染细胞的载体的应用：



其中， R^1 为 $C_{12} - 40$ 脂族羧酸的酰基部分，而 A 是缺少一个氨基的

寡肽的残基。

术语“ C_{12-40} ”指从 12 - 40 个碳原子。酰基部分 R^1 可以是直链或支链、饱和或非饱和部分。酰基部分 R^1 优选含 12 - 20 个碳原子。这类基团的实例有月桂酰、棕榈酰、硬脂酰、油酰以及 $(CH_3(CH_2)_n)_2CHCO-$ ，其中 n 为 3 - 19 的整数。最优选者为棕榈酰以及油酰。术语“寡肽”指含氨基酸残基达 20 个（至少含一个碱性氨基酸）的肽，优选达 10 个，更优选达 2 - 6 个氨基酸残基。术语“衍生物”指寡肽，其中末端羧基被酯化，尤其是形成了低级烷基酯（如甲酯及乙酯）；或者转化为酰胺、低级烷基酰胺或双低级烷基酰胺或酰肼。酰肼为优选衍生物。术语“低级”是指含 1 - 6 碳原子的基团。术语“碱性氨基酸”是指所含碱性基团（如氨基、胍基或胍基）比羧基多的氨基酸。这类碱性氨基酸的实例有天然及非天然性的二氨基一元羧酸，如 α, β - 二氨基丙酸、 α, γ - 二氨基丁酸，赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸和对氨基苯丙氨酸。氨基酸可属于 L - 或 D - 系列的，也可以是外消旋的， α, γ - 二氨基丁酸、赖氨酸及鸟氨酸为具分子式 I 的化合物的优选氨基酸组分。聚核苷酸的实例为脱氧核糖核酸（DNA）和核糖核酸（RNA）。除聚核苷酸之外的阴离子大分子实例为蛋白质如核糖核蛋白及用于免疫作用的蛋白质（例如病毒蛋白）。

本发明中所使用的 DNA 实例为质粒及基因，特别是那些基因治疗方案中已利用的 DNA，如囊性纤维化跨膜调节基因（CFTR）、腺苷脱氨酶（ADA）、腺苷激酶（tk）及 HLA B7；还有报告基因，如 β - 半乳糖苷酶、荧光素酶、氯霉素转移酶以及 α - 1 抗胰蛋白酶。

DNA 的其它实例为寡脱氧核苷酸及其用做反义、aptamer 或“三螺旋”试剂的类似物。RNA 的实例为核酶或寡核糖核苷酸反义分子。

本发明中使用的具分子式 I 的化合物实例有 N^α - 棕榈酰 - L - 赖氨酸酰 - L - 赖氨酸及其甲酯及乙酯； N^γ - 棕榈酰 - D - (α, γ - 二氨基丁酰) - L - (α, γ - 二氨基丁酸) 酰肼；以及 N^γ - 棕榈酰 - D - (α, γ - 二氨基丁酰) - D - (α, γ - 二氨基丁酰) - L - (α, γ - 二氨基丁酸) 酰肼。人们已熟知具分子式 I 的化合物，参见 Helv. Chim. Acta. 47 (1964) P.526-543。

要进行转染的细胞的特性并非要求十分严格。细胞可以是原核或真核细胞、哺乳动物或植物细胞。

依据本发明来转染细胞（例如用 DNA 或 RNA 进行转染）时，具分子式 I 的化合物与 DNA 或 RNA 之间的比率优选为：具分子式 I 的正电荷性化合物与负电荷性的 DNA 或 RNA 之间的+/-电荷之比的范围为 0.1-10，更优选为 0.5-5。

在本发明的优选方面，转染是在存在协助脂质及/或短链磷脂及/或其它已知转染感受态分子的条件下进行的。协助脂质的实例为磷脂，如卵磷脂或脑磷脂或其混合物。优选的协助脂质是脑磷脂，如二油酰脑磷脂。短链磷脂的实例是卵磷脂，其携带着两个 C₆ - 12 脂肪酸残基。优选的短链磷脂为二辛基及二辛酰基卵磷脂。协助脂质及/或短链磷脂的适宜形式为脂质体、混合性微团、有机溶液或水分散体。

转染感受态分子的实例包括阳离子脂质，如 J.B.Behr 在 *Bioconjugate Chem.* 5:382-389 (1994)及 X. Gao 和 L. Huang 在 *Gene Ther.* 2:710-722 (1995)中所述；聚阳离子，如 A.V. Kabanov 及 V.A. Kabanov 在 *Bioconjugate Chem.* 6:7-20 (1995)中所述；肽及聚合物及其它非病毒基因递送体系，如 F.D. Ledley 在 *Human Gene Therapy* 6:1129-1144(1995)中所述。

另一方面，本发明涉及含上述分子式 I 化合物、聚核苷酸或任何其它阴离子大分子、以及可选择的协助脂质和/或短链磷脂及/或如上所述的其它已知转染感受态分子的组合物。在其另一方面，本发明还涉及含上述分子式 I 化合物、以及协助脂质及/或短链磷脂的组合物。

在本发明的实施中，将适宜量的分子式 I 化合物加入溶于适当的水溶液中的要转染的分子（例如质粒 DNA）中。加入协助脂质，如需要的话，加入短链磷脂及/或其它已知转染感受态分子，可以是脂质体、混合性微团形式，也可以是有机溶液或水分散体形式。另外，向含分子式 I 化合物、协助脂质及如需要的话，短链磷脂及/或其它已知转染感受态分子的组合物中，加入所要转染的分子。该组合物可以是固态、液态、半固态或气溶胶形式的，适宜的形式为脂质体、混合性微团或为有机溶液或水分散体形式。

组分（即分子式 I 的化合物、转染分子、及可选择的附加成份）之间的最适比例要依所转染的细胞而定。化合物 I 及所转染的分子之间的最适 +/- 电荷比在 0.1-10 间变化，优选为 0.5-5。分子式 I 的化合物与协助脂质之间的最适摩尔比为 0.1-50，优选为 1 - 10。协助脂质与短链磷脂之间的最适摩尔比为 2 - 20。分子式 I 的化合物与附加性转染感受态分子之间的最适摩尔比为 0.1-10。

对转染而言，把含有上述分子式 I 化合物、聚核苷酸或任何其它阴离子大分子及可选择的协助脂质及/或短链磷脂及/或上述其它已知转染感受态分子的组合物加入细胞中。对病毒或患者的细胞进行转染时，组合物的施用途径可以为口服、肠胃外服用(i.v., i.m., s.c., i.d., i.p.)、跨皮肤施用、肺部、鼻道、直肠、眼部、心室、血管（导管）及肿瘤内使用。另外，该组合物还可以通过高速嵌塞在皮肤表面使用。转染的进展可通过本领域技术人员所熟知的适宜测试方案进行检测。

下述非限制性实施例将进一步说明本发明。

实施例 1

利用真空下干燥氯仿中的脂质溶液，而后再利用 30mM Tris Cl (pH 8.5) 来再水化，以此来制备出二油酰脑磷脂(DOPE, Avanti Polar Lipid 公司)。脂质的终浓度为 2mM。而后在声波浴 (Elgasonic, 50kHz) 中对脂质分散液进行声波处理 10 - 15 分钟。

用 260 μ l 的无菌蒸馏水，在聚苯乙烯无菌试管中对 20 μ g 质粒 DNA 进行稀释。而后，加入 56nmol(35.2 μ g)的 N^γ-棕榈酰-D-(α , γ -二氨基丁酰)-L-(α , γ -二氨基丁酸)酰肼，使得 N^γ-棕榈酰-D-(α , γ -二氨基丁酰)-L-(α , γ -二氨基丁酸)酰肼与 DNA 之间的 +/- 电荷比为 2: 1。而后缓慢逐滴加入 140 μ l 的 DOPE 脂质体，使 DOPE 与 N^γ-棕榈酰-D-(α , γ -二氨基丁酰)-L-(α , γ -二氨基丁酸)酰肼之间的摩尔比为 5: 1。谨慎混合复合体。将制备液放置室温下大约 5 分钟，然后加入到在 96 小格平板上生长的 COS - 1 细胞中。

对于其它分子式 I 化合物使用类似的制备程序。

各种化合物的转染效率如表 1 所示。

表 1

实施例 1 中分子式 I 的化合物在 COS - 1 细胞中的转染效率。

用 β - 半乳糖苷酶编码质粒来转染细胞, 转染后 48 小时对 β - 半乳糖苷酶活性进行检测。结果表述为每转染格的 β - 半乳糖苷酶 μ 单位。

分子式 I 的化合物	β - 半乳糖苷酶活性	
	0.2 μ g DNA/格	1 μ g DNA/格
N^{γ} - 棕榈酰 - D - (α , γ - 二氨基丁酰) - L - (α , γ - 二氨基丁酸) 酰肼	5772	9942
N^{α} 棕榈酰 - L (α , γ - 二氨基丁酰) - L - (α , γ - 二氨基丁酸) 酰肼	2742	3519
N^{γ} 棕榈酰 - D (α , γ - 二氨基丁酰) - D (α , γ - 二氨基丁酰) - L - (α , γ - 二氨基丁酸) 酰肼	1847	7768
N^{γ} 棕榈酰 - L (α , γ - 二氨基丁酰) - D (α , γ - 二氨基丁酰) - D (α , γ - 二氨基丁酰) - L (α , γ - 二氨基丁酸) 酰肼	497	542
N^{γ} 棕榈酰 - L (α , γ - 二氨基丁酰) - L (α , γ - 二氨基丁酰) - L (α , γ - 二氨基丁酸) 酰肼	1800	7835
N^{α} 棕榈酰 - L (α , γ - 二氨基丁酸) 酰肼	606	1411
N^{γ} - 棕榈酰 - D (α , ϵ - 二氨基丙酰) - L - (α , ϵ - 二氨基丙酸) 酰肼	0	3671
N^{γ} - 棕榈酰 - D - (α , ϵ - 二氨基丙酰) - L (α , ϵ - 二氨基丙酸) 乙酯	359	0
N^{α} 棕榈酰 - L 赖氨酰 - L 赖氨酸乙酯	138	424
N^{α} 棕榈酰 - L 赖氨酰 - L 赖氨酰 - L 赖氨酸酰肼	136	2232
N^{α} 棕榈酰 - L 赖氨酰 - L 赖氨酸甲酯	0	150

N^{α} 棕榈酰 - L 赖氨酰 - L 赖氨酸	0	530
N^{ϵ} 棕榈酰 - L 赖氨酰 - L 赖氨酸甲酯	0	100
N^{ϵ} 棕榈酰 - L 赖氨酰 - L 赖氨酰 - L 赖氨酸甲酯	0	1426
N^{α} 油酰 - L 赖氨酰 - L 赖氨酸乙酯	0	1333
N^{α} 花生酰 - L 赖氨酰 - L 赖氨酸甲酯	0	148
N^{α} 棕榈酰 - L - 精氨酰 - L 精氨酸乙酯	0	382
N^{α} 棕榈酰 - L 鸟氨酰 - L 鸟氨酸甲酯	44	789
N^{α} 棕榈酰 - (L 鸟氨酰) ₅ - L 鸟氨酸乙酯	625	12210
N^{α} 棕榈酰 - L 赖氨酰 - L 丝氨酸甲酯	0	219
N^{α} 棕榈酰 - L - 精氨酰 - L 鸟氨酸甲酯	0	870
N^{α} 棕榈酰 - L (α , γ - 二氨基丁酰) - L 赖氨酸甲酯	62	791
N^{α} 棕榈酰 - L 赖氨酰 - L 赖氨酸苄酰胺	510	845

实施例 2

通过真空下干燥脂质、再用 1ml 的 30mM Tris Cl 缓冲液(pH 8.5)对脂质膜进行再水化来制备出 DOPE (2 μ mol)和二己酰基卵磷脂 (15 μ mol) 的混合性微团。用 260 μ l 的蒸馏水在聚苯乙烯无菌试管中将 20 μ g 的质粒 pCH 110 稀释。而后,加入 56nmol (35.2 μ g) 的 N^{γ} - 棕榈酰 - D - (α , γ - 二氨基丁酰) - L - (α , γ - 二氨基丁酸) 酰肼,使得 N^{γ} - 棕榈酰 - D - (α , γ - 二氨基丁酰) - L - (α , γ - 二氨基丁酸) 酰肼与 DNA 的 + / - 电荷比为 2 : 1。然后缓慢加入 140 μ l 的 DOPE/二己酰基 PC 混合微团,使得 DOPE 与 N^{γ} - 棕榈酰 - D - (α , γ - 二氨基丁酰) - L - (α , γ - 二氨基丁酸) 酰肼之间的摩尔比为 5 : 1。谨慎混合复合体。把制备液在室温下放置约 5 分钟,而后加入到 96 小格平板上生长的 COS - 1 细胞中。

COS - 1 细胞的转染效率(以 β - 半乳糖苷酶活性表示),每格 0.2 μ g 及 1 μ g DNA 时分别是 7280 和 6375 μ 单位/格。

实施例 3

将 56nmol (35.2 μ g) 的 N $^{\gamma}$ - 棕榈酰 - D - (α , γ - 二氨基丁酰) - L - (α , γ - 二氨基丁酸) 酰肼与 5 摩尔过量的 DOPE 脂质体 (280nmol , 如实施例 1 所制备) 相混合。将混合物加入到 260 μ l 蒸馏水中的 20 μ g 质粒 DNA 中,使得 N $^{\gamma}$ - 棕榈酰 - D - (α , γ - 二氨基丁酰) - L - (α , γ - 二氨基丁酸) 酰肼与质粒 DNA 的 +/- 电荷比为 2 : 1。谨慎混合复合体。将制备物在室温下放置约 5 分钟, 而后加入到 96 小格平板上生长的 COS - 1 细胞中。

COS - 1 细胞的转染效率 (以 β - 半乳糖苷酶活性表示) 在每格为 0.2 μ g 及 1 μ g DNA 时分别为 4205 及 7880 μ 单位/格。

实施例 4

如实施例 1 所述, 制备出含 N $^{\gamma}$ - 棕榈酰 - D - (α , γ - 二氨基丁酰) - L - (α , γ - 二氨基丁酸) 酰肼 (化合物 A) 的转染复合体。依照厂家说明来制备 Lipofectamine 复合体。利用荧光素酶编码载体在各种细胞系中对二者系统的转染效率进行比较。

结果见表 2。

表 2

细胞系	cpd A	Lipofectamine	cpdA 优于 Lipofectamine 的效果
293-EBNA	5.0 10^5	9.9 10^4	5
CHO K1	1.6 10^6	4.8 10^4	33
HeLa	1.0 10^3	2.4 10^2	4
LM tk-	5.7 10^5	4.5 10^4	12

利用荧光素酶编码质粒转染细胞, 转染后 48 小时后对荧光素酶活性进行检测。结果表述为相对光单位。