



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103233003 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201310147988. X

W0 2008014979 A2, 2008. 02. 07,

(22) 申请日 2010. 05. 13

W0 2008014979 A2, 2008. 02. 07,

(30) 优先权数据

10-2009-0042297 2009. 05. 14 KR

Schnabel R et al. "Controlld-pore glass as a stationary phase in chromatography". 《Journal of Chromatography》. 1991, 第 544 卷

(62) 分案原申请数据

201080021324. 3 2010. 05. 13

审查员 苏保卫

(73) 专利权人 株式会社百奥尼

地址 韩国大田市

(72) 发明人 韩宝蓝 朴翰浯 申美湜 李三用

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

代理人 张福根 吴小瑛

(51) Int. Cl.

C12N 15/11(2006. 01)

C08G 65/48(2006. 01)

(56) 对比文件

US 5141813 A, 1992. 08. 25,

W0 2008014979 A2, 2008. 02. 07,

权利要求书2页 说明书21页

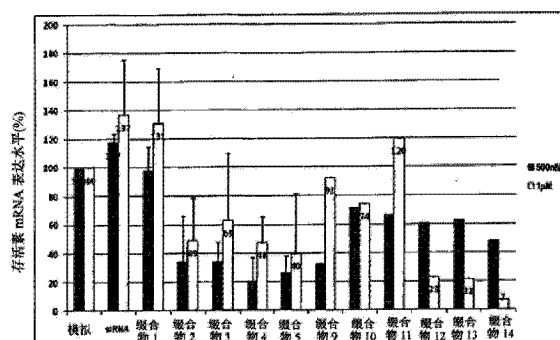
序列表1页 附图16页

(54) 发明名称

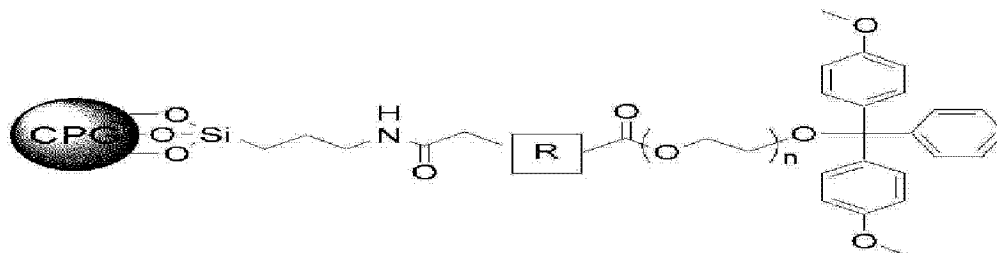
siRNA 缀合物及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种 siRNA- 聚合物缀合物及其制备方法, 更具体地, 涉及一种通过 siRNA 和用于提高 siRNA 生物稳定性的聚合物的共价结合而形成的杂合缀合物, 以及制备该杂合缀合物的方法。本发明的缀合物能提高 siRNA 的生物稳定性, 从而实现治疗性 siRNA 向细胞的有效传递, 且即使相对低浓度的小剂量也具有 siRNA 的活性。因此, 该缀合物不仅可有利地用作癌症和其它传染性疾病的 siRNA 治疗工具, 也可用作一种新型的 siRNA 传递系统。



1. 结合有聚乙二醇的固相支持物,其具有以下结构:



其中 R 为烷基 ;且 n 为 5 ~ 120 的整数。

2. 根据权利要求 1 所述的结合有聚乙二醇的固相支持物,其中所述 CPG 的直径为 40 ~ 180 μm , 且孔径为 500 $\text{\AA}$ ~ 3000 $\text{\AA}$ 。

3. 制备具有以下结构式 IV 的 3'-PEG-CPG 的方法,所述方法包括:

1) 使 CPG 与 3- 氨丙基三乙氧基硅烷反应,以形成长链烷基胺可控孔度玻璃 (LCAA-CPG) ;

2) 使聚乙二醇与 4, 4'- 二甲氧基三苯甲基氯化物反应,以形成 2-[双-(4- 二甲氧基三苯甲基)- 聚(乙二醇)] ;

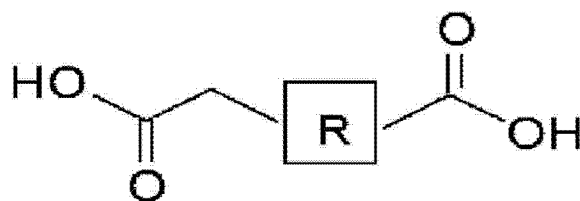
3) 使步骤 2) 中形成的化合物与具有下式 1 的化合物反应,以形成具有以下结构式 I 的化合物;

4) 使形成的具有以下结构式 I 的化合物与 4- 硝基苯基氯甲酸酯反应,以形成具有以下结构式 II 的化合物;

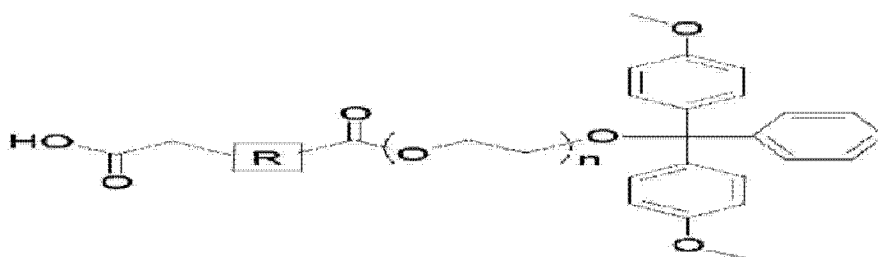
5) 使步骤 3) 中形成的具有以下结构式 I 的化合物与 N- 琥珀酰亚胺基三氟乙酸反应,以形成具有以下结构式 III 的化合物;以及

6) 使步骤 1) 中形成的 LCAA-CPG 化合物分别与步骤 3) 至 5) 中形成的具有以下结构式 I、II 和 III 的化合物反应

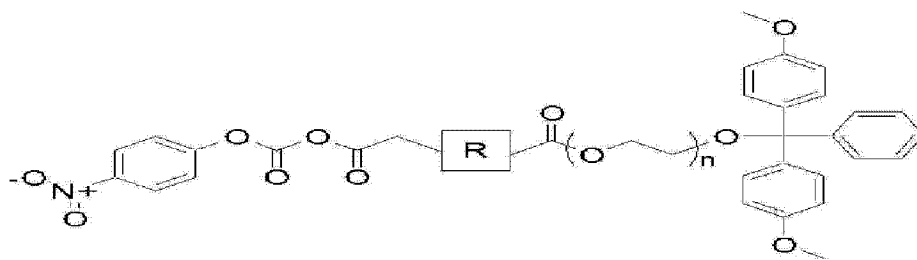
[式 1]



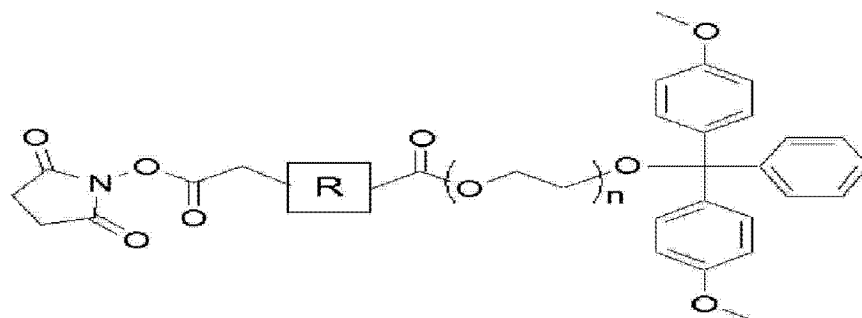
[结构式 I]



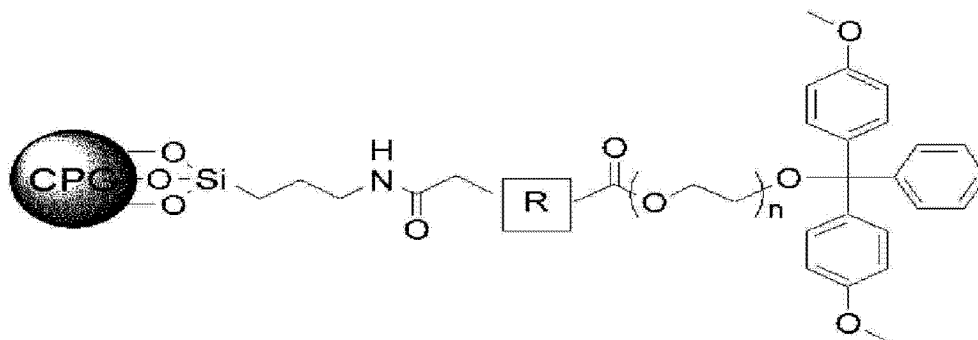
[结构式 II]



[结构式 III]



[结构式 IV]



其中 R 为烷基 ; 且 n 为 5 至 120 的整数。

siRNA 缀合物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种缀合物、制备该缀合物的方法以及利用该缀合物传递 siRNA 的方法,其中,在癌症和其它传染性疾病的基因疗法中用于促进 siRNA 传递的聚合物通过可降解键 (degradable bond) 或不可降解键缀合到 siRNA。

背景技术

[0002] RNA 干扰是指这样一种机制,其为在基因表达过程中,双链 RNA(dsRNA) 通过核苷酸序列特异性方式启动基因转录后沉默,并且这种机制首先在线虫 (*C. elegans*) 中被发现,并常见于植物、果蝇和脊椎动物 (Fire 等,自然 (Nature), 391:806-811, 1998 ; ; Novina&Sharp, 自然 (Nature), 430:161-164, 2004)。已知以如下方式发生 RNA 干扰:进入到细胞内的 19 ~ 25bp 的 dsRNA 与 RISC(RNA- 诱导的沉默复合物) 结合,且仅反义(向导)链与 mRNA 结合而与 mRNA 的核苷酸序列互补,从而通过存在于 RISC 的核酸内切酶结构域降解靶 mRNA (Rana, T. M., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 8:23-36, 2007 ;Tomari, Y. 和 Zamore, P. D., Genes Dev., 19:517-529, 2005)。

[0003] 当 dsRNA 被传递到细胞中,它特异性地结合靶基因序列以降解 mRNA,因此,它被认为是一种可调控基因表达的新型工具。然而,对于人类来说,由于向人体细胞引入 dsRNA 会诱导抗病毒干扰素途径,因此难以获得 RNAi 效果。在 2001 年,Elbashir 和 Tuschl 等发现向人体细胞导入 21nt 长度(核苷酸长度)的小 dsRNA 不会引起干扰素途径,但特异性地降解靶 mRNA (Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., 自然 (Nature), 411, 494-498, 2001 ; ;Elbashir, S. M., Lendeckel, W., Tuschl, T., 基因 (Genes) & Dev., 15, 188-200, 2001 ; ;Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., Tuschl, T., EMBO J., 20, 6877-6888, 2001)。因此,21nt 长度的 dsRNA 已经作为一种新型的功能基因组工具引起了公众的注意,并命名为小干扰 RNA(siRNA)。

[0004] 自从 siRNA 被报道在动物细胞中抑制特定基因表达上具有极好的效果,siRNA 作为一种基因治疗的药物引起了广泛关注。实际上,由于它的高活性和精确的基因选择性,根据 20 年的研究结果,siRNA 有望成为一种目前用作治疗药物的反义寡核苷酸 (ODN) 的替代治疗药物 (Dana J.Gary 等,控释杂志 (Journal of Controlled Release) 121:64-73, 2007)。用于治疗 siRNA 技术具有显著的优势,与其它药物相比,它易于设计并具有高目标选择性和抑制特定基因表达的性能。此外,由于 RNA 干扰利用生命系统中天然存在的机制抑制基因表达,所以它毒性较低。目前 OPKO Inc. 开发的湿性老年黄斑变性病的治疗药物“贝伐西尼 (Bevasiranib)”为一种 siRNA,其可选择性地作用于血管内皮生长因子 (VEGF),诱导新血管形成以抑制 VEGF 的表达,并通过了三期临床试验 (Dejneka NS 等, Mol Vis., 28(14):997-1005, 2008)。此外,目前正在研发含有靶向多种基因的 siRNA 的治疗药物 (Ryan P. Million, Nature Reviews Drug Discovery 7:115-116, 2008)。

[0005] 尽管各种结果表明体内通过 RNA 干扰诱导特异性的表达抑制,但 siRNA 在体内

的传递还有许多问题需要解决,如在血液中被酶降解、与血液中组分的相互作用以及非特异性地传递给细胞 (Shigeru Kawakami 和 Mitsuru Hashida, Drug Metab. Pharmacokin. 22 (3):142-151, 2007)。正在通过部分地利用抗核酸酶的核苷酸类似物或改良传递技术,尝试克服这些问题。

[0006] 改良的传递技术的实例包括:利用病毒如腺病毒、逆转录病毒等的基因传递技术,以及利用脂质体、阳离子脂质和阳离子聚合物的非病毒载体的基因传递技术。然而,由于传递的基因有可能整合到宿主的染色体中,从而诱导宿主基因的正常功能发生异常并激活致癌基因,因此病毒载体存在安全性方面的问题,此外,即使以较小的量连续表达病毒基因也可能引起自身免疫性疾病,或在由病毒载体诱导的修饰的病毒感染情况下,可能不会引起有效的保护性免疫。同时,非病毒载体的有效性低于病毒载体,但考虑到体内安全性和经济可行性,其具有副作用低和生产成本低的优势 (Lehrman S., 自然 (Nature). 401 (6753):517-518, 1999)。此外,非病毒传递方法要求有效地保护酶或非酶的降解,以便传递包括 siRNA 的 RNA 分子,其中一种方法为利用编码短发夹 RNA (shRNA) 的 DNA 表达质粒。通过 DNA 的系统的优势在于,仅当表达载体存在时进行 siRNA 表达。此外,目前 siRNA 化学修饰的研究提出一种用于改良针对核酸酶的稳定性以及低胞内摄取的方法 (Shigery Kawakami 和 Mitsuru Hashida, Drug Metab. Parmacokinet. 22 (3):142-151, 2007)。

[0007] 在一种 siRNA 的化学修饰中,作为被核酸酶降解部位的磷酸二酯键用硫代磷酸连接进行修饰,或戊糖的 2' 位被 2'-O-meRNA、2'-脱氧-2'-氟尿嘧啶核苷或通过 2' 位和 4' 位连接形成的锁核酸 (LNA) 修饰,结果提高了血清中的稳定性 ((Braasch D. A. 等, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14:1139-1143, 2003 ; Chiu Y. L. 和 Rana T. M., RNA, 9:1034-1048, 2003 ; Amarzguoui M. 等, Nucleic Acid Res. 31:589-595, 2003)。在另一种化学修饰中,官能团连接到正义 (反向导) 链的 3' 端区域,结果与对照相比,药动力学特性得到了改良,体内通过 siRNA 的亲水性和疏水性的平衡在施用诱导出较高的效率 (Soutschek J. 等, Nature 432:173-178, 2004)。

[0008] 然而,上述方法在保护 siRNA 免于核酸酶的消化以及改良细胞膜透性效率上仍然有许多有待改进之处。

[0009] 基于这一原因,发明人发现了一种缀合物,其中亲水性或疏水性聚合物通过可降解或不可降解键缀合到 siRNA,改良了 siRNA 的体内稳定性,并基于此完成了本发明。

发明内容

[0010] 技术问题

[0011] 本发明的一个目的在于提供一种缀合物,其中作为生物相容性聚合物的亲水性或疏水性聚合物通过可降解或不可降解键缀合到 siRNA 的正义链或反义链的末端,以提高 siRNA 在细胞内传递的效率。

[0012] 本发明的另一个目的在于提供一种含有聚合物的固相支持物,具体地,施用到人体时稳定性得到证实的聚合物,例如聚乙二醇 (PEG),以及提供一种有效地制备包括 RNA、DNA、RNA-DNA 嵌合体及其类似物的寡核苷酸的方法,其中,通过支持物将 PEG 结合到它的 3' 端。

[0013] 本发明又一目的在于提供制备 siRNA 缀合物的方法,以及利用 siRNA 缀合物传递

siRNA 的方法。

[0014] 技术方案

[0015] 为实现上述的目的,首先,本发明提供一种 siRNA- 聚合物缀合物,其结构如下:

[0016] $A-X-R-Y-B$

[0017] (其中, A 和 B 独立地为亲水性聚合物或疏水性聚合物; X 和 Y 独立地为简单的共价键或接头介导的 (linker-mediated) 共价键; 且 R 为 siRNA)。

[0018] 其次,本发明提供一种 siRNA- 聚合物缀合物,其结构如下:

[0019] $A-X-R$

[0020] (其中, A 为疏水性聚合物; X 为简单的共价键或接头介导的共价键; R 为 siRNA)

[0021] 第三,本发明提供一种缀合物,其中 siRNA (R) 的单链含有 19 ~ 31 个核苷酸。

[0022] 第四,本发明提供一种缀合物,其中疏水性聚合物 (A) 的分子量为 250 ~ 1,000。

[0023] 第五,本发明提供一种缀合物,其中疏水性聚合物 (A) 为 C16 ~ C50 烃或胆固醇。

[0024] 第六,本发明提供一种缀合物,其中共价键 (X, Y) 为不可降解键或可降解键。

[0025] 第七,本发明提供一种缀合物,其中不可降解键为酰胺键或磷酸键。

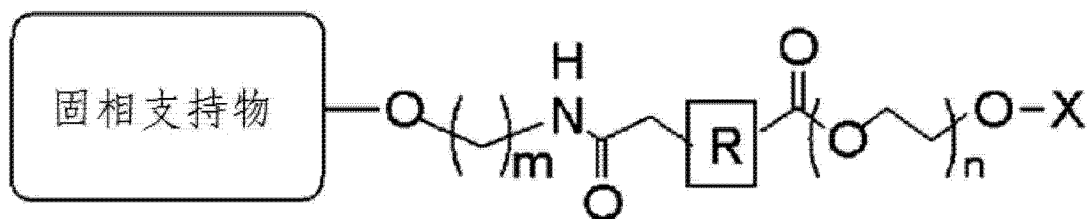
[0026] 第八,本发明提供一种缀合物,其中可降解键选自二硫键、酸裂解键、酯键、酸酐键、生物降解键和酶裂解键。

[0027] 第九,本发明提供一种缀合物,其中亲水性聚合物 (A 或 B) 为分子量为 1,000 ~ 10,000 的非离子聚合物。

[0028] 第十,本发明提供一种缀合物,其中亲水性聚合物选自下组:聚乙二醇 (PEG)、聚乙烯吡咯烷酮和聚噁唑啉。

[0029] 第十一,本发明提供一种结合聚乙二醇的固相支持物,其结构如下:

[0030]



[0031] [其中, R 为烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂烷基或杂芳基; m 为 2 ~ 18 的整数; n 为 5 ~ 120 的整数; 且 X 为氢、4- 单甲氧基三苯甲基、4, 4' - 二甲氧基三苯甲基或 4, 4', 4'' - 三甲氧基三苯甲基]。

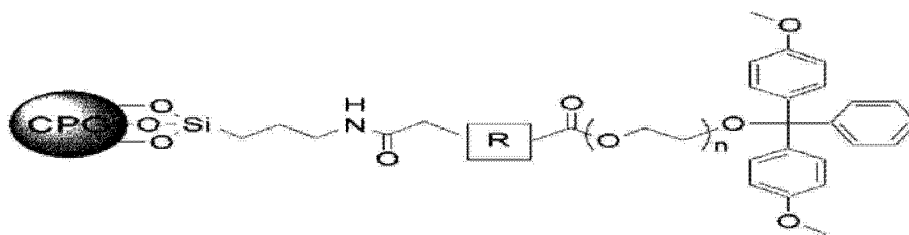
[0032] 第十二,本发明提供一种结合聚乙二醇的固相支持物,其中固相支持物为可控孔度玻璃 (CPG)。

[0033] 第十三,本发明提供一种结合聚乙二醇的固相支持物,其中 CPG 的直径为 40 ~ 180 μm , 且孔径为 500 $\text{\AA}$ ~ 3000 $\text{\AA}$ 。

[0034] 第十四,本发明提供一种结合聚乙二醇的固相支持物,其为具有下述结构式 IV 的 3'-PEG-CPG:

[0035] [结构式 IV]

[0036]



[0037] 第十五, 本发明提供一种制备 3'-PEG-CPG 的方法, 该方法包括:

[0038] 1) 将 CPG 与 3-氨基丙基三乙氧基硅烷反应, 形成长链烷基胺可控孔度玻璃 (LCAA-CPG);

[0039] 2) 将聚乙二醇与 4, 4'-二甲氧基三苯甲基氯化物反应, 形成 2-[双-(4-二甲氧基三苯甲基)-聚(乙二醇)];

[0040] 3) 将步骤 2) 形成的化合物与下述化学式 I 的化合物反应, 形成下述结构式 I 的化合物;

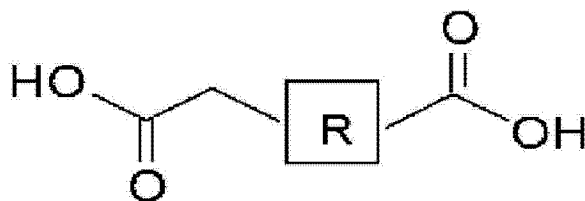
[0041] 4) 将形成的下述结构式 I 的化合物与 4-硝基苯基氯甲酸酯反应, 形成下述结构式 II 的化合物;

[0042] 5) 将步骤 3) 形成的下述结构式 I 的化合物与 N-琥珀酰亚胺基三氟乙酸反应, 形成下述结构式 III 的化合物; 以及

[0043] 6) 将步骤 1) 形成的 LCAA-CPG 化合物分别与步骤 3) 至 5) 形成的下述结构式 I、II 和 III 的化合物反应。

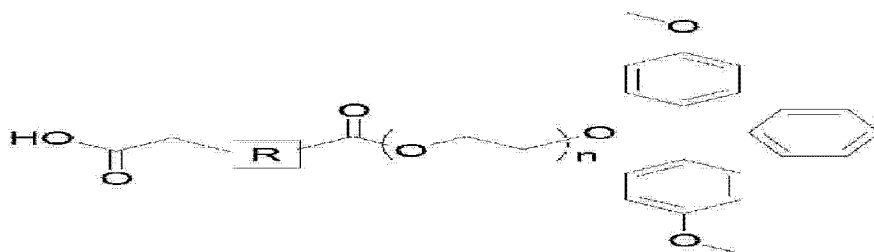
[0044] [化学式 I]

[0045]



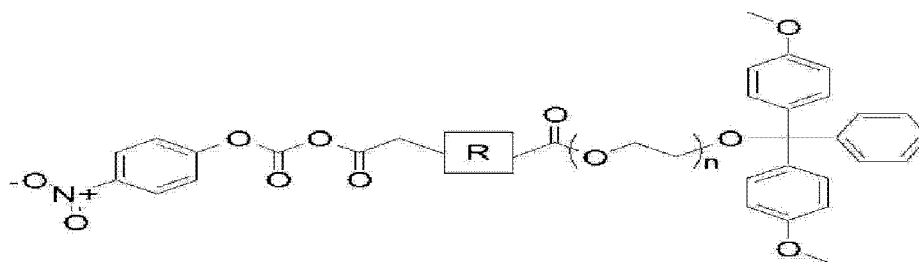
[0046] [结构式 I]

[0047]



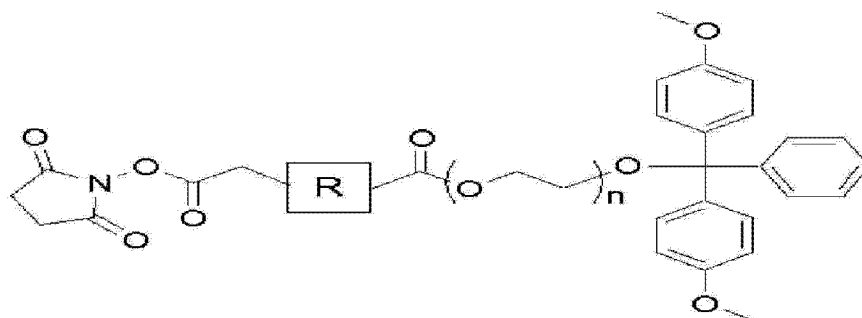
[0048] [结构式 II]

[0049]



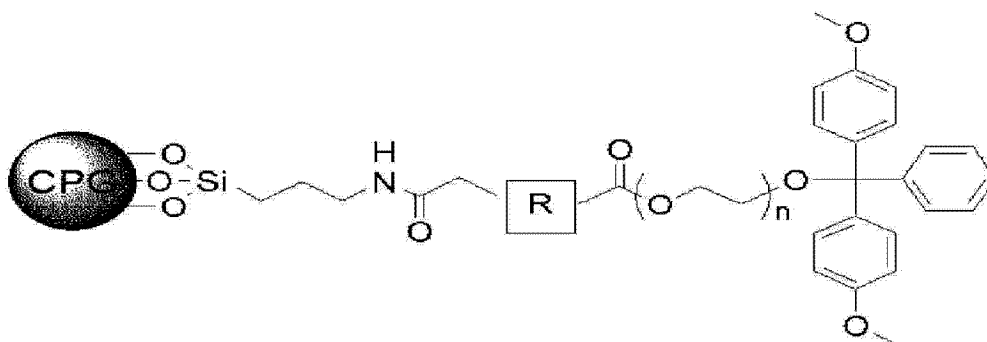
[0050] [结构式 III]

[0051]



[0052] [结构式 IV]

[0053]



[0054] [其中, R 为烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂烷基或杂芳基 ; 且 n 为不小于 5 且不大于 120 的整数]。

[0055] 第十六, 本发明提供一种制备 siRNA 缀合物的方法, 该方法包括 :

[0056] 1) 利用本发明第十一项所述的结合聚乙二醇的固相支持物制备针对靶基因的 siRNA ; 以及

[0057] 2) 通过共价键将 siRNA 的末端基团与聚乙二醇连接。

[0058] 第十七, 本发明提供由本发明第一项或第二项所述的 siRNA 缀合物组成的纳米微粒。

[0059] 第十八, 本发明提供一种基因治疗方法, 该方法包括 :

[0060] 1) 制备本发明第十七项所述的纳米微粒 ; 以及

[0061] 2) 向动物的体内施用该纳米微粒。

[0062] 第十九, 本发明提供一种基因治疗方法, 其中通过口服给药或静脉注射向体内施用所述纳米微粒。

[0063] 第二十, 本发明提供一种药物组合物, 其包括药学有效量的本发明第一项或第二项所述的 siRNA 缀合物。

[0064] 第二十一, 本发明提供一种药物组合物, 其包括药学有效量的本发明第十七项所述的纳米微粒。

[0065] 接下来, 将对本发明进行详细说明。

[0066] 本发明提供一种 siRNA- 聚合物缀合物, 其结构如下:

[0067] $A-X-R-Y-B$ 。

[0068] 其中, A 和 B 独立地为亲水性聚合物或疏水性聚合物; X 和 Y 独立地为简单的共价键或接头介导的共价键; 且 R 为 siRNA。

[0069] 此外, 本发明提供一种 siRNA- 聚合物缀合物, 其结构如下:

[0070] $A-X-R$ 。

[0071] 其中, A 为疏水性聚合物; X 为简单的共价键或接头介导的共价键; 且 R 为 siRNA。

[0072] 在本发明的缀合物中, siRNA 的寡核苷酸链可包括 19 ~ 31 个核苷酸。任何源自用于或可用于基因疗法或研究的基因的 siRNA 均可用作本发明中可用的 siRNA。

[0073] 疏水性聚合物可为分子量为 250 ~ 1,000 的疏水性聚合物。疏水性聚合物的实例包括烃, 优选 C16 ~ C50 烃, 以及胆固醇。本申请中, 疏水性聚合物不限于仅为烃和胆固醇。

[0074] 疏水性聚合物引起疏水性互作, 使得形成由 siRNA- 疏水性聚合物缀合物组成的微团 (micelle)。在这些疏水性聚合物中, 具体地, 饱和烃的优势在于, 它在 siRNA 生产过程中易于缀合到 siRNA, 因此, 它非常适合用于生产本发明的缀合物。

[0075] 同样, 共价键 (即 X, Y) 可以是任何不可降解或可降解键。在本申请中, 不可降解键可以是酰胺键或磷酸键, 可降解键可以是二硫键、酸裂解键、酯键、酸酐键、生物降解键和酶裂解键。然而, 不可降解键或可降解键不限于此。

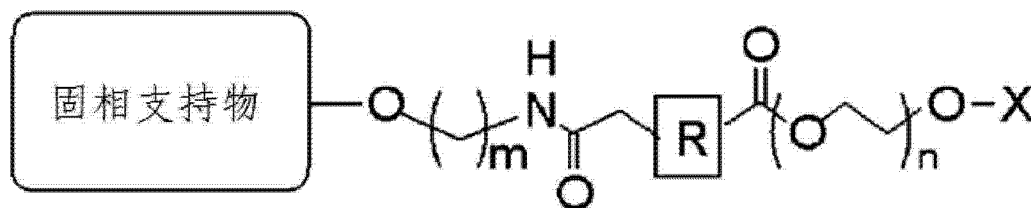
[0076] 接头介导的键能共价结合亲水性聚合物 (或疏水性聚合物) 和 siRNA 残基的末端, 只要必要时它能够在某一环境中提供可降解键, 对接头介导的键没有特别的限定。因此, 接头 (linker) 可包括任何能被 siRNA 和 / 或亲水性聚合物 (或疏水性聚合物) 结合以在缀合物的生产过程中激活它们的化合物。

[0077] 同样, 亲水性聚合物可以是分子量为 1,000 ~ 10,000 的非离子聚合物。例如, 亲水性聚合物可包括聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚噁唑啉等的非离子亲水性聚合物, 但不限于此。

[0078] 必要时, 亲水性聚合物的官能团可被另一个官能团取代。在亲水性聚合物中, 特别地, PEG 非常适合用于生产本发明的缀合物, 因为它具有各种分子量, 并具有能引入官能团的末端, 具有优异的生物相容性, 不诱导免疫反应, 且能增加水溶性从而提高体内基因传递效率。

[0079] 此外, 本发明提供下述结构的结合聚乙二醇的固相支持物:

[0080]



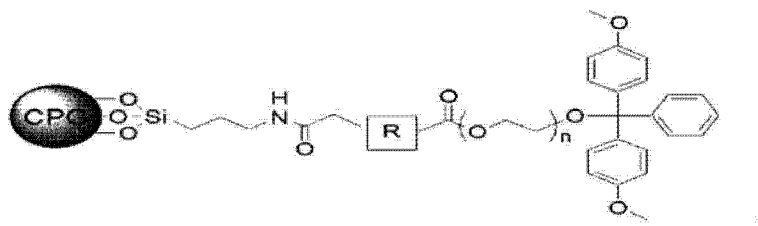
[0081] 其中, 固相支持物包括, 例如 CPG、聚苯乙烯、硅胶、纤维素纸等, 但不限于此; R 为

烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂烷基或杂芳基； m 为 2 ~ 18 的整数； n 为 5 ~ 120 的整数（摩尔质量 282 ~ 5300）；且 X 为 4- 单甲氧基三苯甲基、4, 4'- 二甲氧基三苯甲基或 4, 4', 4''- 三甲氧基三苯甲基，其经酸处理后被去除而变成氢。在其中固相支持物为 CPG 的情况下，它的直径可为 40 ~ 180 μm ，孔径可为 500 $\text{\AA}$ ~ 3000 $\text{\AA}$ 。

[0082] 本发明还提供一种结合聚乙二醇的固相支持物，其中结合有下述结构式 IV 的 3'-PEG-CPG：

[0083] [结构式 IV]

[0084]



[0085] 此外，本发明提供一种制备 3'-PEG-CPG 的方法，该方法包括：

[0086] 1) 将 CPG 与 3- 氨丙基三乙氧基硅烷反应，形成 LCAA-CPG；

[0087] 2) 将聚乙二醇与 4, 4'- 二甲氧基三苯甲基氯化物反应，形成 2-[双-(4- 二甲氧基三苯甲基)- 聚(乙二醇)]；

[0088] 3) 将步骤 2) 形成的化合物与下述化学式 I 的化合物反应，形成下述结构式 I 的化合物；

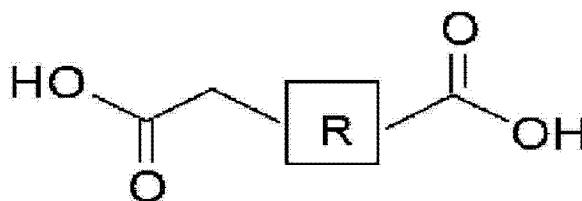
[0089] 4) 将形成的下述结构式 I 的化合物与 4- 硝基苯基氯甲酸酯反应，形成下述结构式 II 的化合物；

[0090] 5) 将步骤 3) 形成的下述结构式 I 的化合物与 N- 琥珀酰亚胺基三氟乙酸反应，形成下述结构式 III 的化合物；以及

[0091] 6) 将步骤 1) 形成的 LCAA-CPG 化合物分别与步骤 3) 至 5) 形成的下述结构式 I、II 和 III 的化合物反应。

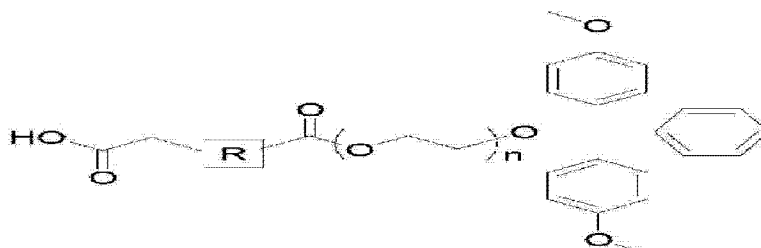
[0092] [式 I]

[0093]



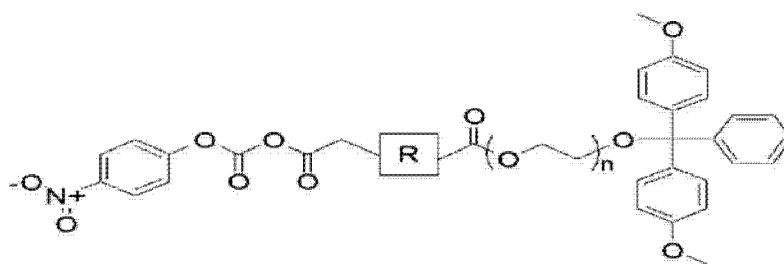
[0094] [结构式 I]

[0095]



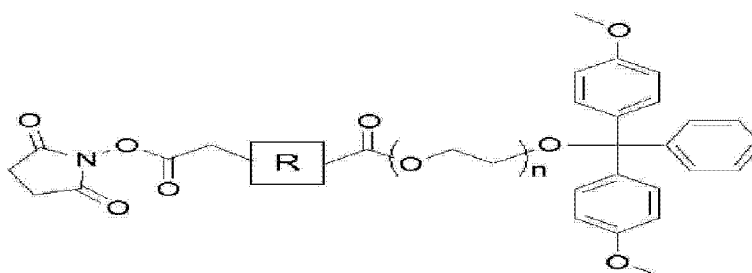
[0096] [结构式 II]

[0097]



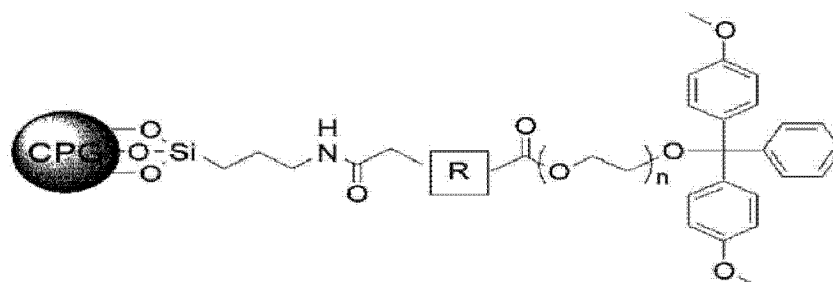
[0098] [结构式 III]

[0099]



[0100] [结构式 IV]

[0101]



[0102] [其中,R为烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂烷基或杂芳基 ;且 n 为不小于 5 且不大于 120 的整数]。

[0103] 本发明还提供利用结合聚乙二醇的固相支持物制备含有 siRNA 和 PEG 的缀合物的方法。更具体地,提供一种制备 siRNA 缀合物的方法,该方法包括:

[0104] 1) 利用结合聚乙二醇的固相支持物制备针对靶基因的 siRNA ;以及

[0105] 2) 通过共价键将 siRNA 的末端基团与聚乙二醇连接。通过这种方式,可有效制备包括 RNA、DNA、RNA-DNA 嵌合体及其类似物的寡核苷酸。

[0106] 根据本发明的一个优选的实施方案,可通过利用 β - 氰乙基亚磷酰胺连接磷酸二酯键构建 RNA 骨架结构而制备 siRNA (Shina 等. 核酸研究 (Nucleic Acids Research), 12:4539-4557, 1984)。例如,利用 RNA 合成器重复地在吸附核苷酸的固相支持物上进行由去封闭、偶联、氧化和加帽组成的一系列步骤,以获得含有所需长度 RNA 的反应物。然而,本发明不限于此。

[0107] 本发明还提供由 siRNA 缀合物组成的纳米微粒。

[0108] 本发明的 siRNA- 聚合物缀合物可通过相互之间的反应形成纳米微粒结构,且 siRNA- 聚合物缀合物以及所获得的由 siRNA- 聚合物缀合物组成的纳米微粒改良了 siRNA

的胞内传递,并且可用于疾病模型的治疗。缀合物的制备、由该缀合物组成的纳米微粒的特性和胞内传递效率以及作用将在下面的实施例中详细描述。

[0109] 本发明还提供一种利用所述纳米微粒进行基因治疗的方法。

[0110] 更具体地,该基因治疗的方法包括:制备各自由 siRNA- 聚合物缀合物组成的纳米微粒,以及向动物的体内施用该纳米微粒。

[0111] 本发明还提供一种药物组合物,其包括药学有效量的各自由 siRNA 缀合物组成的纳米微粒。

[0112] 本发明的组合物还可以制备成,除上述的活性组分外,包括一种或多种药用载体,以便给药。药用载体需要与本发明的活性组分相兼容。药用载体可与盐水溶液、无菌水、林格氏溶液、缓冲盐水溶液、葡萄糖溶液、麦芽糖糊精溶液、甘油和乙醇中的一种或多种混合使用,必要时,还可加入常规的添加剂,如抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂等。此外,还可辅助加入稀释剂、分散剂、表面活性剂、粘合剂和润滑剂制备成用于注射的制剂,如水溶液、悬浮液、乳液等。此外,本发明的组合物可优选根据特定的疾病或组分,利用本领域的适合的方法或雷明顿氏制药科学 (Remington's pharmaceutical Science) (Mack Publishing company, Easton PA) 中公开的方法进行制备。

[0113] 本领域技术人员可基于患者的综合征和疾病严重性确定本发明的药物组合物。同样,本发明的药物组合物可制备成各种类型,如粉剂、片剂、胶囊、液体、注射剂、膏剂、糖浆等,并可在单剂或多剂容器中提供,如密封的安瓿、小瓶等。

[0114] 本发明的药物组合物可口服或胃肠外给药。本发明药物组合物的给药途径可包括但不限于口服、静脉内、肌内、髓内、鞘内、心脏内、真皮下、皮下、腹膜内、肠内、舌下或外用。

[0115] 为了这种临床施用,可使用本领域公知的方法将本发明的药物组合物制成适合的制剂。本发明的药物组合物的剂量根据体重、年龄、性别、健康状况、饮食、给药时间和方法、排泄率以及患者疾病的严重性而有所不同,对此本领域技术人员很容易确定。

[0116] 有益效果

[0117] 由本发明缀合物组成的纳米微粒可改善体内 siRNA 的稳定性,从而有效地将治疗性 siRNA 传递到细胞中,并且即使没有转染试剂,相对低剂量浓度也具有 siRNA 的活性,因此其可在生物技术和医药行业的基础研究中用作一种新型的 siRNA 传递系统以及癌症和其它传染性疾病的 siRNA 治疗工具。

附图说明

[0118] 图 1 所示为制备的 3'-PEG-CPG 的结构式;

[0119] 图 2 所示为实施例 1 获得的化合物的 ^1H NMR 数据;

[0120] 图 3 所示为与实施例 1 的 LCAA-CPG 结合的 3'-PEG 试剂 [化合物 A] 的 ^1H NMR 数据;

[0121] 图 4 所示为与实施例 1 的 LCAA-CPG 结合的 3'-PEG 试剂 [化合物 B] 的 ^1H NMR 数据;

[0122] 图 5 所示为与实施例 1 的 LCAA-CPG 结合的 3'-PEG 试剂 [化合物 C] 的 ^1H NMR 数据;

[0123] 图 6 所示为实施例 1 ~ 3 制备的 3'-PEG-CPG 和寡核苷酸 (siRNA) 的 Maldi-Tof

分子量数据；

[0124] 图 7 所示为实施例 1～4 制备的 3'-PEG-CPG 和寡核苷酸 (siRNA) 的 Maldi-Tof 分子量数据；

[0125] 图 8 所示为无聚合物缀合的裸 siRNA 与缀合亲水性或疏水性聚合物的 siRNA- 聚合物缀合物的电泳照片 (siRNA 是裸 siRNA, 各自的缀合物表示表 1 中所示的 siRNA- 聚合物缀合物。同样, 19mer、23mer、27mer 和 31mer 分别是指含有 19、23、27 和 31 个核苷酸的 siRNA, 并且它们都用于以 siRNA 缀合物 4 的结构制备 siRNA- 聚合物缀合物。);

[0126] 图 9 所示为存在血清蛋白的条件下, siRNA 随时间的降解度的电泳照片, 用于评价无聚合物缀合的裸 siRNA 和缀合亲水性聚合物 PEG 的 siRNA- 聚合物缀合物在血液中的稳定性；

[0127] 图 10 所示为 siRNA- 聚合物缀合物形成的纳米微粒的示意图；

[0128] 图 11 所示为通过电动电位测定仪器测定的由无聚合物缀合的裸 siRNA 组成的纳米微粒的粒径的结果；

[0129] 图 12 所示为通过电动电位测定仪器测定的各自由 siRNA- 聚合物缀合物 9 组成的纳米微粒的粒径结果；

[0130] 图 13 所示为通过电动电位测定仪器测定的各自由 siRNA- 聚合物缀合物 10 组成的纳米微粒的粒径结果；

[0131] 图 14 所示为通过电动电位测定仪器测定的各自由 siRNA- 聚合物缀合物 11 组成的纳米微粒的粒径结果；

[0132] 图 15 所示为通过电动电位测定仪器测定的各自由 siRNA- 聚合物缀合物 12 组成的纳米微粒的粒径结果；

[0133] 图 16 所示为通过电动电位测定仪器测定的各自由 siRNA- 聚合物缀合物 13 组成的纳米微粒的粒径结果；

[0134] 图 17 所示为与转染试剂共同转染后的存活素基因的 mRNA 表达水平的比较, 用于分析裸 siRNA 和各自缀合亲水性聚合物 PEG 的 siRNA- 聚合物缀合物的 RNAi 效果；

[0135] 图 18 所示为与转染试剂共同转染后的存活素基因的 mRNA 表达水平的比较, 用于分析裸 siRNA 和各自转化长序列 siRNA 的 siRNA- 聚合物缀合物 4 的 RNAi 效果；以及

[0136] 图 19 所示为无转染试剂下转染后的存活素基因的 mRNA 表达水平的比较, 用于分析裸 siRNA 和 siRNA- 聚合物缀合物 1～5 以及 9～14 的 RNAi 效果。

[0137] 最佳实施方式

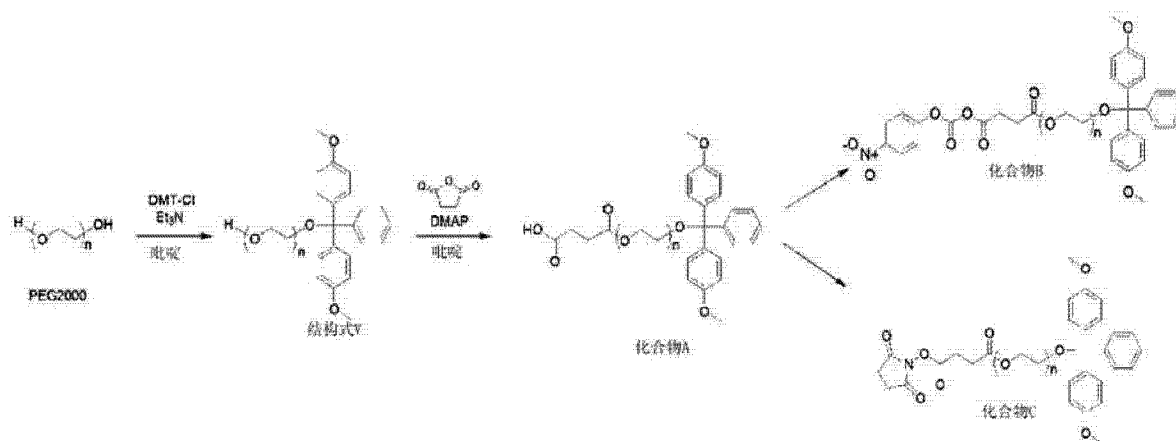
[0138] 下文将详细描述本发明的示例性实施方式。然而, 以下示例性实施方式仅以举例方式说明, 不用来限制本发明。

[0139] 实施例 1: 用于制备 3'-PEG 寡核苷酸的固相支持物的制备

[0140] 实施例 1-1: 用于结合 LCAA-CPG 的 3'-PEG 试剂 (化合物 A、B 和 C) 的制备

[0141] 在下面的实施例中, 3'-PEG-CPG 按如下反应式制备得到。

[0142]



[0143] 实施例 1-1-1:2-[双-(4-二甲氧基三苯甲基)-聚(乙二醇)]的制备

[0144] 将 30g (15mmol) 聚乙二醇 2000 (Alfa Aesar GmbH&Co. KG, 德国) 作为起始物, 溶解于 270ml 吡啶 (Sigma Aldrich, 美国) 中, 然后加入 3.55ml (25.5mmol) 三乙胺 (Sigma Aldrich, 美国) 和 7.12g (21mmol) 4,4'-二甲氧基三苯甲基氯 (GL biochem, 中国), 然后所得物在室温下反应 20 小时。反应完成后, 浓缩反应混合物, 用 450ml 乙酸乙酯和 450ml 水萃取, 然后真空蒸发并真空干燥, 获得 2-[双-(4-二甲氧基三苯甲基)-聚(乙二醇)] 23g (66%)。

[0145] 该化合物的 ¹H NMR 数据如图 2 所示。

[0146] ¹H NMR (CDCl₃); δ 1.93 (br, 1, OH), 3.20-3.80 (m, 186, PEG, DMT-OCH₃), 6.80-6.83 (m, 4, DMT), 7.19-7.47 (m, 9, DMT)。

[0147] 实施例 1-1-2:琥珀酸 2-[双-(4-二甲氧基三苯甲基)-聚(乙二醇)][化合物 A]的制备

[0148] 将 3.9g (1.672mmol) 实施例 1-1-1 中获得的 2-[双-(4-二甲氧基三苯甲基)-聚(乙二醇)] 溶解于 20ml 吡啶中, 然后冷却至 0℃。向反应物中加入 351mg (3.512mmol) 琥珀酸酐 (Acros Organics, 美国) 和 42.5mg (0.334mmol) DMAP (4-二甲氨基吡啶, Sigma Aldrich, 美国), 50℃ 搅拌 3 天后反应结束。反应完成后, 真空蒸发反应混合物, 获得琥珀酸 2-[双-(4-二甲氧基三苯甲基)-聚(乙二醇)][化合物 A] 3.65g (90%, 白色固体)。

[0149] 该化合物的 ¹H NMR 数据如图 3 所示。

[0150] ¹H NMR (CDCl₃); δ 2.65 (m, 2, CH₂CO), 3.20-3.88 (m, 186, PEG, DMT-OCH₃), 4.25 (m, 2, CH₂CO), 6.80-6.82 (m, 4, DMT), 7.19-7.47 (m, 9, DMT)。

[0151] 实施例 1-1-3:对硝基苯基琥珀酸 2-[双-(4-二甲氧基三苯甲基)-聚(乙二醇)][化合物 B]的制备

[0152] 将 1g (0.411mmol) 实施例 1-1-2 中获得的化合物 A 溶解于 20ml 二氯甲烷 (DaeYeon Chemicals, Co. Ltd., 韩国) 中, 并冷却至 0℃。向反应物中加入 143 μl (1.03mmol) 三乙胺, 并向其中加入 149mg (0.740mmol) 4-硝基氯甲酸苯酯。然后, 将温度升至室温, 搅拌所得物 4 小时, 然后反应结束。反应完成后, 反应混合物用 20ml 水饱和的 NaHCO₃ 和冷却至 0℃~4℃ 的 20ml 1M 柠檬酸 (Sigma Aldrich, 美国) 洗涤一次, 然后用 Na₂SO₄ (Samchum Chemical Co., 韩国) 干燥。用抽滤瓶、布氏漏斗或抽吸器过滤所得物, 然后真空蒸发, 获得对硝基苯基琥珀酸 2-[双-(4-二甲氧基三苯甲基)-聚(乙二醇)][化合物 B] 1.0g (94%, 奶油状固

体)。

[0153] 该化合物的 ^1H NMR 数据如图 4 所示。

[0154] ^1H NMR (CDCl_3); δ 2.80–2.90 (m, 2, CH_2CO), 3.20–3.87 (m, 186, PEG, DMT-OCH_3), 4.25 (m, 2, CH_2CO), 6.80–6.82 (m, 4, DMT), 7.19–7.47 (m, 9, DMT)。

[0155] 实施例 1-1-4: 2,5-二氧代-吡咯烷-1-基琥珀酸酯 2-[双-(4-二甲氧基三苯甲基)-聚(乙二醇)] [化合物 C] 的制备

[0156] 将 500mg (0.206mmol) 实施例 1-1-2 中获得的化合物 A 溶解于 10ml 二氯甲烷中, 然后向其中加入 83.14 μl (1.03mmol) 吡啶。向其中加入 165mg (0.781mmol) N-琥珀酰亚胺三氟乙酸 (Sigma Aldrich, 美国), 室温下搅拌 7 小时后反应结束。反应完成后, 真空蒸发反应混合物, 获得 2,5-二氧代-吡咯烷-1-基琥珀酸酯 2-[双-(4-二甲氧基三苯甲基)-聚(乙二醇)] [化合物 C] 490mg (94%, 白色固体)。

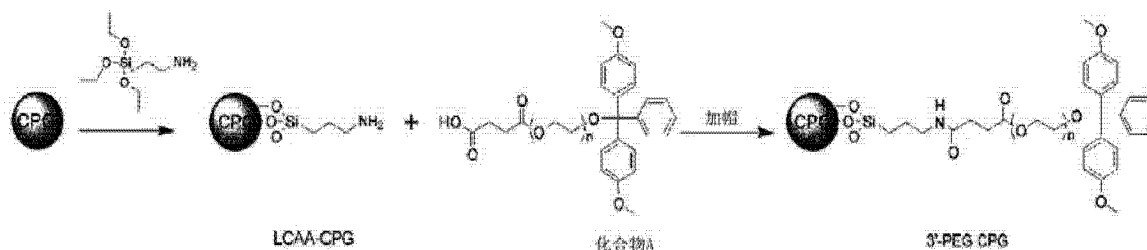
[0157] 该化合物的 ^1H NMR 数据如图 5 所示。

[0158] ^1H NMR (CDCl_3); δ 2.72–2.97 (m, 6, CH_2CO , CH_2CH_2), 3.20–3.87 (m, 186, PEG, DMT-OCH_3), 4.27–4.28 (m, 2, CH_2CO), 6.80–6.83 (m, 4, DMT), 7.20–7.47 (m, 9, DMT)。

[0159] 实施例 1-2: LCAA-CPG 和 3'-PEG 试剂(化合物 A) 的结合

[0160] 在下面的实施例中, CPG 和 3'-PEG 试剂按如下反应式结合:

[0161]



[0162] 实施例 1-2-1: LCAA-CPG (2000 Å) 的制备

[0163] 将 10g 直径 40 ~ 75 μm 、2000 Å 纳米孔的 CPG (Silicycle Inc., 加拿大) 与 100 μm 甲苯混合均匀进行润湿, 然后加入 2ml 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (TCI Org. Chem, 日本)。然后混合所得物, 在室温反应 8 小时。反应完成后过滤该混合物, 依次用甲醇、水和二氯甲烷洗涤, 然后真空干燥, 获得 10g LCAA-CPG (2000 Å)。

[0164] 实施例 1-2-2: 用琥珀酸 2-[双-(4-二甲氧基三苯甲基)-聚(乙二醇)] [化合物 A] 制备 3'-PEG-CPG (2000 Å)

[0165] 将 2g 实施例 1-2-1 中获得的 LCAA-CPG (2000 Å) 在 20ml 二氯甲烷中润湿。

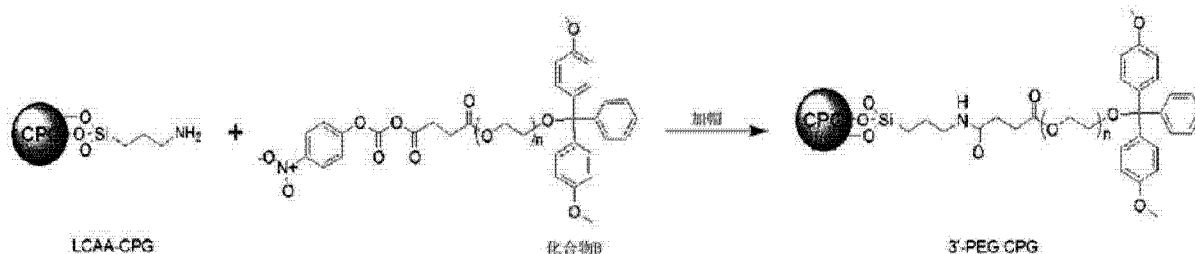
此外, 将该 LCAA-CPG (2000 Å) 溶液与含有 80mg 化合物 A、14 μl LTEA (三乙胺, Sigma Aldrich, 美国) 的溶液均匀混合。将 15mg BOP (苯并三唑-1-基氧代三(二甲氨基)磷鎓六氟磷酸盐, TCI Org. Chem, 日本) 和 5mg HOBT (无水 1-羟基苯并三氮唑, TCI Org. Chem, 日本) 溶解于 2ml 二氯甲烷中, 所得物回流反应 8 小时。反应完成后过滤该混合物, 并依次用甲醇、水和亚甲二醇洗涤, 然后真空干燥。

[0166] 将 1g 所得物在 10ml 吡啶中润湿, 然后向其中加入 1ml 1-甲基咪唑 (Sigma

Aldrich, 美国)和 1.6ml 醋酸酐(Sigma Aldrich, 美国)。将该所得物均匀混合, 在室温反应 8 小时。将反应完成后获得的完成加帽的 CPG (capping-completed CPG) 依次用甲醇、水、甲醇和二氯甲烷洗涤, 然后真空干燥, 获得 1g 的 3'-PEG-CPG。

[0167] 实施例 1-3 :LCAA-CPG (2000 Å) 和 3'-PEG 试剂(化合物 B) 的结合

[0168]



[0169] 使用化合物 B 制备 3'-PEG-CPG (2000 Å)。

[0170] 具体地, 将 1g 实施例 1-2-1 中获得的 LCAA-CPG (2000 Å) 在 8ml 吡啶中充分润湿。此外, 将溶解于 2ml 吡啶的 205mg(2eq) 化合物 B 和 55 μL 三乙胺的溶液与该 LCAA-CPG 溶液均匀混合。所得物在 50 ~ 60°C 反应 8 小时, 反应完成后过滤该混合物。过滤后的偶联-CPG 依次用甲醇、水和二氯甲烷洗涤, 然后真空干燥。将 1g 干燥后的偶联-CPG 在 10ml 吡啶中润湿, 然后加入 500 μL 1-甲基咪唑和 800 μL 醋酸酐。均匀混合所得物, 然后在室温反应 8 小时。反应完成后过滤该混合物, 然后偶联-CPG 依次用甲醇、水和二氯甲烷洗涤, 然后真空干燥, 获得 1g 的 3'-PEG-CPG。

[0171] 图 6 显示了使用 3'-PEG-CPG 作为起始物制备的 siRNA 的 Maldi-Tof 分子量测定结果, 如下文描述的实施例 2 中所示。

[0172] 3'-PEG-CPG 制备序列;

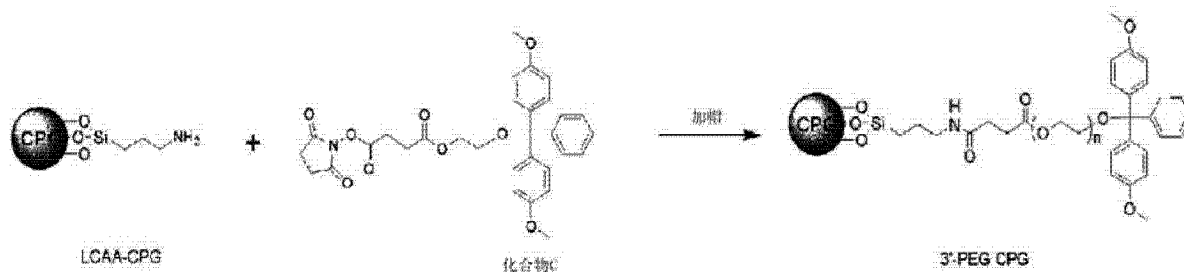
[0173] 正义 5'-AAGGAGAUCAACAUUUUCA (dTdT)-PEG (6664.96Da+2000Da) (SEQ ID No. 1)

[0174] 反义 5'-UGAAAAUGUUGAUCUCCUU (dTdT)-PEG (6592.84Da+2000Da) (SEQ ID No. 5)

[0175] 可以发现, Maldi-Tof 分子量随 PEG 的分子量(2000Da) 增加。

[0176] 实施例 1-4 :LCAA-CPG (2000 Å) 和 3'-PEG 试剂(化合物 C) 的结合

[0177]



[0178] 使用化合物 C 制备 3'-PEG-CPG (2000 Å)。

[0179] 具体地, 将 1g 实施例 1-2-1 中获得的 LCAA-CPG (2000 Å) 在 8ml 吡啶中充分润湿。此外, 将溶解于 2ml 吡啶中的 200mg 化合物 C 和 55 μL 三乙胺的溶液与 LCAA-CPG 溶液均匀混合。所得物在 50 ~ 60°C 反应 8 小时, 反应完成后过滤该混合物。过滤后的偶联-CPG

依次用甲醇、水和二氯甲烷洗涤,然后真空干燥。将 1g 干燥后的偶联-CPG 在 10ml 吡啶中润湿,然后向其中加入 500 μ L 1-甲基咪唑和 800 μ L 醋酸酐。均匀混合所得物,然后在室温反应 8 小时。反应完成后完全加帽的 CPG 依次用甲醇、水和二氯甲烷洗涤,然后真空干燥,获得 1g 的 3'-PEG-CPG。

[0180] 图 7 显示了使用 3'-PEG-CPG 作为起始物制备的 siRNA 结果,如下文描述的实施例 2 中所示。

[0181] 3'-PEG-CPG 制备序列;

[0182] 正义 5'-AAGGAGAUCAACAUUUUCA (dTdT)-PEG (6664.96Da+2000Da) (SEQ ID No. 1)

[0183] 反义 5'-UGAAAAUGUUGAUCUCCUU (dTdT)-PEG (6592.84Da+2000Da) (SEQ ID No. 5)

[0184] 可以发现,Maldi-Tof 分子量随 PEG 的分子量(2000Da)增加。

[0185] 实施例 2:siRNA-聚合物缀合物的制备

[0186] 在下面的实施例中,使用存活素(survivin) siRNA 以抑制存活素。存活素是一种到目前为止检测到的仅在大多数肿瘤或转化细胞系中普遍表达的蛋白,因此它有望成为抗癌治疗的重要靶标(Abbrosini G. 等, Nat. Med. 3 (8) 917-921, 1997)。本发明的存活素 siRNA 序列,当包含 19 个核苷酸时,由 SEQ ID No. 1 的一条正义链和一条完全与该正义链互补的反义链组成,此外,当它包含 23、27 或 31 个核苷酸时,碱基序列为 SEQ ID No. 2、3 或 4。

[0187] (SEQ ID No. 1) 5'-AAGGAGAUCAACAUUUUCA-3'

[0188] (SEQ ID No. 2) 5'-AGGAAAGGAGAUCAACAUUUUCA-3'

[0189] (SEQ ID No. 3) 5'-AGGAAAGGAGAUCAACAUUUUCAA AUU-3'

[0190] (SEQ ID No. 4) 5'-AAAGGAGAUCAACAUUUUCAAAUA GAUGUU-3'

[0191] 使用 β -氰乙基磷酰胺,通过连接磷酸二酯键构建 RNA 骨架结构制备 siRNA(Shina 等,核酸研究,12:4539-4557,1984)。具体地,采用 RNA 合成仪(384 合成仪,BIONEER,韩国),在附着核苷酸的固相支持物上重复进行由去封闭、偶联、氧化和加帽组成的一系列步骤,获得含所需长度 RNA 的反应物。

[0192] 此外,通过将 PEG 连接到 5'-端区域,或通过疏水性聚合物十二烷接头将十六烷(C16)或十八烷(C18)饱和烃连接到 5'-端区域,制备 siRNA-聚合物缀合物。此外,采用实施例 1 中制备的 3' PEG-CPG 作为支持物进行上述反应,获得 3'-端区域带有 PEG 的 siRNA-聚合物缀合物。

[0193] 通过 HPLC(LC-20A Prominence, SHIMADZU, 日本)从反应物中分离 RNA,确定反应物是否与待制备的核苷酸序列一致,并采用 MALDI-TOF 质谱仪(MALDI TOF-MS, SHIMADZU, 日本)测定其分子量。之后,正义 RNA 链和反义 RNA 链等量混合,并加入 1 $\times$ 退火缓冲液(30mM HEPES, 100mM 醋酸钾, 2mM 醋酸镁, pH 值 7.0 ~ 7.5)。所得物在 90 $^{\circ}$ C 恒温浴中反应 3 分钟,然后再于 37 $^{\circ}$ C 反应,制备双链 siRNA-聚合物缀合物。制得的 siRNA-聚合物缀合物具有表 1 中所示的结构。制得的 siRNA-聚合物缀合物的退火通过电泳照片证实(图 8)。

[0194] **【表 1】**

[0195] siRNA-聚合物缀合物的结构和末端修饰类型

[0196]

缀合物名称	缀合物的结构名称	末端修饰类型
siRNA	裸 siRNA	正义：无
		反义：无
siRNA-聚合物缀合物 1	5' PEG-正义 siRNA	正义：5' PEG
		反义：无
siRNA-聚合物缀合物 2	5'PEG-反义 siRNA	正义：无
		反义：5'PEG
siRNA-聚合物缀合物 3	5'ssPEG-反义 siRNA	正义：无
		反义：5'ssPEG
siRNA-聚合物缀合物 4	5'PEG+PEG siRNA	正义：5'PEG
		反义：5'PEG
siRNA-聚合物缀合物 5	5'PEG+ssPEG siRNA	正义：5'PEG
		反义：5'ssPEG
siRNA-聚合物缀合物 6	3'PEG-正义 siRNA	正义：3'PEG
		反义：无
siRNA-聚合物缀合物 7	3'PEG-反义 siRNA	正义：无
		反义：3'PEG
siRNA-聚合物缀合物 8	3'PEG+PEG siRNA	正义：3'PEG
		反义：3'PEG
siRNA-聚合物缀合物 9	5'C18-正义 siRNA	正义：5'C18-C6-ss-C6
		反义：无
siRNA-聚合物缀合物 10	5'C18+PEG siRNA	正义：5'C18-C6-ss-C6
		反义：5'PEG
siRNA-聚合物缀合物 11	5'C16+PEG siRNA	正义：5'C16-C6-ss-C6
		反义：5'PEG
siRNA-聚合物缀合物 12	5'C18-反义 siRNA	正义：无
		反义：5'C18-C6-ss-C6

[0197]

siRNA-聚合物缀合物 13	5'PEG+C18 siRNA	正义：5'PEG
		反义：5'C18-C6-ss-C6
siRNA-聚合物缀合物 14	5'PEG+C16 siRNA	正义：5'PEG
		反义：5'C16-C6-ss-C6

[0198] * 在缀合结构中,“ss”表示二硫键,“C16”或“C18”表示 C16 或 C18 烃。因此,“C18-C6-ss-C6”和“C16-C6-ss-C6”表示疏水聚合物。

[0199] 实施例 3:在体内条件下 siRNA- 聚合物缀合物稳定性的评价

[0200] 确定实施例 2 中制备并分离的 siRNA- 聚合物缀合物与未结合聚合物的裸 siRNA 相比,稳定性是否提高。将未修饰的裸 siRNA 和实施例 2 中制得的 siRNA- 聚合物缀合物 1-5 在模拟体内条件的含 10% 胎牛血清(FBS)的培养基中孵育 0、1、3、6、9、12、24、36 或 48 小时,然后通过电泳对 siRNA 的降解度进行评价。

[0201] 结果表明,引入 PEG 的 siRNA- 聚合物缀合物显示出长达 48 小时的 siRNA 稳定性(图 9)。甚至在 100% 血清的条件下显示出 12 ~ 24 小时的 siRNA 稳定性。

[0202] 实施例 4:siRNA- 疏水聚合物缀合物纳米微粒大小的测定

[0203] 在 siRNA- 聚合物缀合物 9 ~ 14 的各情况下,由 siRNA- 聚合物缀合物组成的纳米微粒,也就是说,通过 siRNA- 末端提供的疏水聚合物之间的疏水性相互作用形成的胶质粒子(micelle)(图 10)。使用 Zeta 电位测量仪测量疏水纳米微粒的大小。测定由实施例 2 中分别制备的 siRNA- 聚合物缀合物 9 ~ 13 和 siRNA 组成的纳米微粒的大小。

[0204] 具体地,将 2nmol siRNA 和 siRNA- 聚合物缀合物溶解于 1ml 蒸馏水中,然后用超声波匀浆仪(Wiseclean, DAHAN, 韩国)进行纳米微粒匀浆(200W, 40kHz, 5s)。使用 Zeta 电位测量仪(Nano-ZS, MALVERN, 英国)测量匀浆纳米微粒的大小。此处,将材料的折射指数和吸收指数分别设定为 1.454 和 0.001,然后输入作为溶剂的水的温度 25℃,并输入其粘度和折射指数。一次测量包括 20 个重复大小的测定,这种测量进行三次。

[0205] 图 11 显示了采用 Zeta 电位测量仪测得的裸 siRNA 纳米微粒的大小结果。它表明 142 ~ 295nm(最高点:164nm)的微粒占各自由 siRNA 组成的总纳米微粒的 73.5%。

[0206] 图 12 显示了采用 Zeta 电位测量仪测得的各自由 siRNA- 聚合物缀合物 9 组成的纳米微粒的大小结果。它表明 4.19 ~ 7.53nm(最高点:6.50nm)的微粒占各自由 siRNA- 聚合物缀合物 9 组成的总纳米微粒的 59.1%。

[0207] 图 13 显示了采用 Zeta 电位测量仪测得的各自由 siRNA- 聚合物缀合物 10 组成的纳米微粒的大小结果。它表明 5.61 ~ 10.1nm(最高点:8.72nm)的微粒占各自由 siRNA- 聚合物缀合物 10 组成的总纳米微粒的 58.9%。

[0208] 图 14 显示了采用 Zeta 电位测量仪测得的组成各 siRNA- 聚合物缀合物 11 的纳米微粒的大小结果。它表明 5.61 ~ 10.1nm(最高点:8.72nm)的微粒占各自由 siRNA- 聚合物缀合物 11 组成的总纳米微粒的 45.6%。

[0209] 图 15 显示了采用 Zeta 电位测量仪测得的组成各 siRNA- 聚合物缀合物 12 的纳米微粒的大小结果。它表明 4.85 ~ 5.61nm 的微粒占各自由 siRNA- 聚合物缀合物 12 组成的总纳米微粒的 23.6%, 21.0 ~ 32.7nm 的微粒占各自由 siRNA- 聚合物缀合物 12 组成的总纳

米微粒的 23.5%, 68.1 ~ 78.8nm 的微粒占各自由 siRNA- 聚合物缀合物 12 组成的总纳米微粒的 23.1%。

[0210] 图 16 显示了采用 Zeta 电位测量仪测得的各自由 siRNA- 聚合物缀合物 13 组成的纳米微粒的大小结果。它表明 4.85 ~ 8.72nm(最高点: 5.61nm)的微粒占各自由 siRNA- 聚合物缀合物 13 组成的总纳米微粒的 84.6%。

[0211] 除 siRNA- 聚合物缀合物 12 之外, 在 siRNA- 聚合物缀合物 9 ~ 13 的情况下, 纳米微粒的大小大多是 4 ~ 8nm。在 siRNA- 聚合物缀合物 12 的情况下, 测得不同的纳米微粒大小, 认为即使用超声波匀浆仪进行同质化, 由于在测定过程中随着时间的推移, 纳米微粒也会各自聚集。如图 12 ~ 16 所示, 测得的各自由 siRNA 缀合物组成的纳米粒径为 100nm 或以下, 其大小足以通过胞饮作用内吞进入胞内(Kenneth A. Dawson 等, 自然纳米技术 4:84-85, 2009)。

[0212] 实施例 5: 通过使用 siRNA- 聚合物缀合物和转染试剂对肿瘤细胞系中靶基因表达的抑制

[0213] 人宫颈癌细胞系, 其为肿瘤细胞系, 分别用实施例 2 中制备的 siRNA- 聚合物缀合物 1 ~ 8 转染, 分析转染的肿瘤细胞系中存活素的表达水平。

[0214] 实施例 5-1: 肿瘤细胞系的培养

[0215] 将从美国菌种保藏中心(ATCC)获得的人宫颈癌细胞(HeLa)于添加有 10% (v/v) 胎牛血清、青霉素 100 单位 /ml 和链霉素 100 μ g/ml 的 RPMI1640 培养基(GIBCO, Invitrogen, 美国)中, 在 37°C、5% (v/v) CO₂ 条件下培养。

[0216] 实施例 5-2: 使用 siRNA- 聚合物缀合物抑制靶基因的表达

[0217] 用实施例 2 中制备的 SEQ ID No1 的 siRNA- 聚合物缀合物 1 ~ 8 转染 HeLa 肿瘤细胞系, 分析转染的肿瘤细胞系中存活素的表达。

[0218] 实施例 5-2-1: 用 siRNA- 聚合物缀合物转染肿瘤细胞系

[0219] 将实施例 5-1 中培养的 1.3×10^5 个肿瘤细胞系于盛有 RPMI1640 培养基的 6 孔板中, 在 37°C、5% (v/v) CO₂ 条件下培养 18 小时, 然后去除培养基, 然后每孔分配 800 μ L Opti-MEM 培养基(GIBCO, 美国)。

[0220] 同时, 将 2 μ L 脂质体TM2000 (LipofectamineTM2000) (Invitrogen, 美国) 和 198 μ L Opti-MEM 培养基混合, 然后在室温反应 5 分钟, 然后向其中加入实施例 2 制备的各 siRNA- 聚合物缀合物(25pmole/ μ L)0.8 或 4 μ L (终浓度为 20 或 100nM)。然后, 所得物在室温下再反应 20 分钟, 制备溶液。

[0221] 之后, 向已用 Opti-MEM 培养基分配的各孔中加入 200 μ L 该转染液, 培养肿瘤细胞 6 小时, 然后去除 Opti-MEM 培养基。向其中加入 2.5ml RPMI1640 培养基, 然后将肿瘤细胞置于 37°C、5% (v/v) CO₂ 条件下培养 24 小时。

[0222] 实施例 5-2-2: 存活素基因 mRNA 的相对定量分析

[0223] 从实施例 5-2-1 中的转染的细胞系中提取总 RNA 以制备 cDNA, 然后通过实时 PCR 相对定量存活素基因 mRNA 的含量。

[0224] 实施例 5-2-2-1: 从转染细胞中分离 RNA 和制备 cDNA

[0225] 用 RNA 提取试剂盒(AccuPrep 细胞总 RNA 提取试剂盒, BIONEER, 韩国) 从实施例 5-2-1 的转染细胞系中提取总 RNA, 用 RNA 反转录酶(AccuPower CycleScript RT Premix/

dT20, BIONEER, 韩国) 从提取的 RNA 中制备 cDNA, 如下。

[0226] 具体地, 将 1 μ g 提取的 RNA 加入到含有 AccuPower CycleScript RT Premix/dT20 (BIONEER, 韩国) 的各 0.25ml Eppendorf 管中, 向其中加入经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的蒸馏水, 使总体积为 20 μ L。通过使用 PCR 仪 (MyGenie™96 梯度热块 (Gradient Thermal Block), BIONEER, 韩国), 将在 30℃ 杂交 RNA 引物 1 分钟和在 52℃ 合成 cDNA 4 分钟的两个步骤重复 6 次。然后在 95℃ 使酶失活 5 分钟以结束扩增反应。

[0227] 实施例 5-2-2-2: 存活素基因 mRNA 的相对定量分析

[0228] 通过实时 PCR, 以实施例 5-2-2-1 中制备的 cDNA 为模板, 对存活素 mRNA 的相对含量进行定量, 如下。

[0229] 就是说, 用蒸馏水对 96-孔板各孔中由实施例 5-2-2-1 制备的 cDNA 进行 1/5 稀释, 然后加入 3 μ L 稀释的 cDNA、10 μ L 2 $\times$ GreenStar™PCR 混合物 (master mix) (BIONEER, 韩国)、6 μ L 蒸馏水和 1 μ L 存活素 qPCR 引物 (各 10pmole/ μ L, BIONEER, 韩国), 制备混合液以分析存活素表达水平。另一方面, 使用下述管家基因 (以下简称为“HK 基因”): HMBS (羟甲基胆色烷合成酶)、HPRT1 (次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 1)、UBC (泛素 C) 和 YWHAZ (酪氨酸 3-单加氧酶 / 色氨酸 5-单加氧酶激活蛋白, zeta 多肽), 作为对照基因, 为了使 mRNA 表达水平标准化, 对实施例 5-2-2-1 中制备的 cDNA 进行 1/5 稀释, 然后向 96-孔板的各孔中加入 3 μ L 稀释的 cDNA、10 μ L 2 $\times$ GreenStar™PCR 混合物 (master mix) (BIONEER, 韩国)、6 μ L 蒸馏水和 1 μ L 各 HK 基因的 qPCR 引物 (各 10pmole/ μ L, BIONEER, 韩国), 在 96-孔板的每孔中制备 HK 基因实时 PCR 混合物液体。采用 Exicycler™96 实时定量加热块 (Real-Time Quantitative Thermal Block) (BIONEER, 韩国), 在含有该混合液的 96-孔板上进行以下反应。

[0230] 通过在 95℃ 反应 15 分钟灭活酶和破坏 cDNA 的二级结构。然后, 在 94℃ 变性 30 秒, 58℃ 退火 30 秒, 72℃ 延伸 30 秒和 SYBR Green 扫描, 这四个步骤重复进行 42 次, 最后 72℃ 延伸 3 分钟。然后, 55℃ 保持 1 分钟, 分析 55℃~95℃ 的融解曲线。

[0231] PCR 结束后, 通过 HK 基因标准化的 mRNA 值 (标准化因子, NF) 纠正各自获得的存活素 Ct (循环阈值) 值, 然后获得了介于仅用转染试剂处理的对照组的 Ct 值和纠正的 Ct 值之间的 Δ Ct 值。用 Δ Ct 值和 $2^{(-\Delta Ct)} \times 100$ (图 17) 的计算公式相互比较存活素 mRNA 的表达率。在图 17 中, 模拟 (mock) 表示仅用转染试剂处理的对照组。

[0232] 如图 17 所示, 结果表明 siRNA 的 RNAi 效果是不同的, 这取决于 PEG-疏水聚合物缀合的 siRNA-聚合物缀合物的末端修饰类型。特别是缀合物 6~8, 各自具有 PEG 缀合至 3'-端区域的末端修饰类型, 其表现出类似于裸 siRNA 的表达抑制度。因此, 基于 siRNA 的 RNAi 机制, 预计缀合物 6~8 在与 RNA-诱导的沉默复合物 (RISC) 形成的复合物中具有小的空间位阻。此外, 大多数的 siRNA-PEG 缀合物在低浓度 (20nM) 处理条件比在高浓度 (100nM) 处理条件下, 表现出对靶基因 mRNA 表达的较高抑制, 并因此预期由于形成 siRNA-PEG 缀合的 PEG 浓度条件较高, 从而防止了 siRNA 与 RISC 的结合。

[0233] 实施例 5-3: 使用长序列 siRNA-聚合物缀合物对靶基因表达的抑制

[0234] 当用 siRNA-亲水聚合物缀合物与转染试剂一起转染细胞时, 分析对靶基因 mRNA 表达的抑制。此处, 使用 siRNA-聚合物缀合物 4 的结构中引入末端修饰的 siRNA, 各 siRNA 碱基序列为 SEQ ID No. 1~4。

[0235] 实施例 5-3-1:用 siRNA- 聚合物缀合物转染肿瘤细胞系

[0236] 将实施例 5-1 中培养的 1.3×10^5 个肿瘤细胞系于盛有 RPMI1640 培养基的 6-孔板中,在 37℃、5% (v/v) CO₂ 的条件下培养 24 小时,然后去除培养基,向各孔中加入 800 μL Opti-MEM 培养基。

[0237] 同时,将 2 μL 脂质体™2000 和 198 μL Opti-MEM 培养基混合,然后在室温反应 5 分钟,然后向其中加入实施例 2 中制备的各 siRNA- 聚合物缀合物 (25pmole/μL) 0.8 或 4 μL (终浓度为 20 或 100nM)。然后,所得物在室温下再反应 20 分钟,制备溶液。

[0238] 之后,向已用 Opti-MEM 培养基分配的各孔中加入 200 μL 该转染液,培养肿瘤细胞 6 小时,然后去除 Opti-MEM 培养基。向其中加入 2.5ml RPMI1640 培养基,然后将肿瘤细胞置于 37℃、5% (v/v) CO₂ 条件下培养 24 小时。

[0239] 实施例 5-3-2:存活素基因 mRNA 的相对定量分析

[0240] 从实施例 5-3-1 中转染的细胞系中提取总 RNA 以制备 cDNA,然后通过实时 PCR 相对定量存活素基因 mRNA 的含量。

[0241] 实施例 5-3-2-1:从转染细胞中分离 RNA 和制备 cDNA

[0242] 用 RNA 提取试剂盒 (AccuPrep 细胞总 RNA 提取试剂盒, BIONEER, 韩国) 从实施例 5-3-1 的转染细胞系中提取总 RNA,用 RNA 反转录酶 (AccuPower CycleScript RT Premix/dT20, BIONEER, 韩国) 从提取的 RNA 中制备 cDNA,如下。

[0243] 具体地,将 1 μg 提取的 RNA 加入到含有 AccuPower CycleScript RT Premix/dT20 (BIONEER, 韩国) 的各 0.25ml Eppendorf 管中,向其中加入经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的蒸馏水,使总体积为 20 μL。通过使用 PCR 仪 (MyGenie™96 梯度热块, BIONEER, 韩国),将在 30℃ 杂交 RNA 引物 1 分钟和在 52℃ 制备 cDNA 4 分钟的两个步骤重复 6 次。然后在 95℃ 使酶失活 5 分钟以结束扩增反应。

[0244] 实施例 5-3-2-2:存活素基因 mRNA 的相对定量分析

[0245] 通过实时 PCR,以实施例 5-3-2-1 中制备的 cDNA 为模板,对存活素基因 mRNA 的相对含量进行定量,如下。

[0246] 就是说,用蒸馏水对 96-孔板各孔中由实施例 5-3-2-1 制备的 cDNA 进行 1/5 稀释,然后加入 3 μL 稀释的 cDNA、10 μL 2×GreenStar™PCR 混合物 (BIONEER, 韩国)、6 μL 蒸馏水和 1 μL 存活素 qPCR 引物 (10pmole/μL, BIONEER, 韩国),制备混合液以分析存活素表达水平。另一方面,使用如下 HK 基因:HMBS、HPRT1、UBC 和 YWHAZ,作为对照基因,为了使 mRNA 表达水平标准化,对实施例 5-3-2-1 中制备的 cDNA 进行 1/5 稀释,然后向 96-孔板的各孔中加入 3 μL 稀释的 cDNA、10 μL 2×GreenStar™PCR 混合物 (BIONEER, 韩国)、6 μL 蒸馏水和 1 μL 各 HK 基因 qPCR 引物 (10pmole/μL, BIONEER, 韩国),在 96-孔板的每孔中制备 HK 基因实时 PCR 混合物液体。采用 Exicycler™96 实时定量加热块 (BIONEER, 韩国),在含有该混合液的 96-孔板上进行以下反应。

[0247] 通过在 95℃ 反应 15 分钟灭活酶和破坏 cDNA 的二级结构。然后,在 94℃ 变性 30 秒,58℃ 退火 30 秒,72℃ 延伸 30 秒和 SYBR Green 扫描,这四个步骤重复进行 42 次,最后 72℃ 延伸 3 分钟。然后,55℃ 保持 1 分钟,分析 55℃~95℃ 的融解曲线。

[0248] PCR 结束后,通过 HK 基因标准化的 mRNA 值 (标准化因子, NF) 纠正各自获得的存活素 Ct (循环阈值) 值,然后获得了介于仅用转染试剂处理的对照组的 Ct 值和纠正的 Ct 值之

间的 ΔCt 值。用 ΔCt 值和 $2^{(-\Delta Ct)} \times 100$ (图 18) 的计算公式相互比较存活素 mRNA 的表达率。在图 18 中, 模拟(mock)表示仅用转染试剂处理的对照组, 19mer、23mer、27mer 和 31mer 分别代表 SEQ ID No. 1 ~ 4。5' P+P 代表 siRNA- 聚合物缀合物 4 的结构。分别用 20nM 和 40nM 处理细胞, 相互比较对靶基因表达的抑制程度。

[0249] 结果, 如图 18 所示, 与裸 siRNA 相比, 以 siRNA- 聚合物缀合物 4 形式的转化的长链裸 siRNA, 对靶基因 mRNA 表达的抑制表现出较小差异。因此, 可以发现, 与短链相比, 转化的长链 siRNA 由于 PEG 而降低了空间位阻现象。

[0250] 也就是说在长链 siRNA 的情况下, 在 RNAi 的工作机制中, siRNA 在 19+2 结构中被 dicer 酶断裂, 裂解的 siRNA 与 RISC 复合物结合从而引发 RNAi 的工作机制。出于这个原因, 两个末端带有 PEG 的长链 siRNA, 导致了大量未结合 PEG 的 siRNA 的存在, 因此与 SEQ ID No. 1 相比, 其具有与 PESC 复合物相对较强的相互作用, 这被认为是保持了 RNAi 诱导作用。

[0251] 实施例 6: 仅使用 siRNA- 聚合物缀合物, 而不使用转染试剂对靶基因表达的抑制

[0252] 用实施例 2 中制备的 siRNA- 聚合物缀合物 1 ~ 14 转染 HeLa 肿瘤细胞系, 分析转染的肿瘤细胞系中存活素基因的表达。

[0253] 实施例 6-1: 肿瘤细胞系的培养

[0254] 将从美国菌种保藏中心(ATCC)获得的人宫颈癌细胞(HeLa)于添加有 10% (v/v) 胎牛血清、青霉素 100 单位 /ml 和链霉素 100 μ g/ml 的 RPMI1640 培养基(GIBCO, Invitrogen, 美国)中, 在 37℃、5% (v/v) CO₂ 条件下培养。

[0255] 实施例 6-2: 用 siRNA- 聚合物缀合物转染肿瘤细胞系

[0256] 将实施例 6-1 中培养的 1.3×10^5 个肿瘤细胞系于盛有 RPMI1640 培养基的 6 孔板中, 在 37℃、5% (v/v) CO₂ 条件下培养 24 小时, 然后去除培养基, 然后每孔加入 900 μ L Opti-MEM 培养基。

[0257] 同时, 向其中加入 100 μ L Opti-MEM 培养基, 5 或 10 μ L 实施例 2 制备的各 siRNA- 聚合物缀合物 1 ~ 5 (1nmole/ μ L) (终浓度为 500nM 或 1 μ M), 所得物在室温下再反应 20 分钟, 制备溶液。

[0258] 同时, 向其中加入 100 μ L Opti-MEM 培养基, 5 或 10 μ L 实施例 2 制备的各 siRNA- 聚合物缀合物 9 ~ 14 (1nmole/ μ L) (终浓度为 500nM 或 1 μ M), 通过高频超声对由 siRNA- 聚合物缀合物组成的胶质粒子进行匀浆, 制备溶液。

[0259] 之后, 向已用 Opti-MEM 培养基分配的各孔中加入 100 μ L 该转染液, 培养肿瘤细胞 24 小时, 然后加入含 20%FBS 的 RPMI1640 培养基 1ml。进一步将肿瘤细胞于 37℃、5% (v/v) CO₂ 条件下培养 24 小时, 用 siRNA- 聚合物缀合物处理, 然后总计培养 48 小时。

[0260] 实施例 6-3: 存活素基因 mRNA 的相对定量分析

[0261] 从实施例 6-2 中转染的细胞系中提取总 RNA 以制备 cDNA, 然后通过实时 PCR 相对定量存活素基因 mRNA 的含量。

[0262] 实施例 6-3-1: 从转染细胞中分离 RNA 和制备 cDNA

[0263] 用 RNA 提取试剂盒 (AccuPrep 细胞总 RNA 提取试剂盒, BIONEER, 韩国) 从实施例 6-2 的转染细胞系中提取总 RNA, 用 RNA 反转录酶 (AccuPower CycleScript RT Premix/dT20, BIONEER, 韩国) 从提取的 RNA 中制备 cDNA, 如下。

[0264] 具体地, 将 1 μ g 提取的 RNA 加入到含有 AccuPower CycleScript RT Premix/dT20

(BIONEER, 韩国) 的各 0.25ml Eppendorf 管中, 向其中加入经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的蒸馏水, 使总体积为 20 μ L。通过使用 PCR 仪 (MyGenie™96 梯度热块, BIONEER, 韩国), 将在 30℃ 杂交 RNA 引物 1 分钟和在 52℃ 合成 cDNA 4 分钟的两个步骤重复 6 次。然后在 95℃ 使酶失活 5 分钟以结束扩增反应。

[0265] 实施例 6-3-2: 存活素基因 mRNA 的相对定量分析

[0266] 通过实时 PCR, 以实施例 6-3-1 中制备的 cDNA 为模板, 对存活素基因 mRNA 的相对含量进行定量, 如下。

[0267] 就是说, 用蒸馏水对 96-孔板各孔中由实施例 6-3-1 制备的 cDNA 进行 1/5 稀释, 然后加入 3 μ L 稀释的 cDNA、10 μ L 2 $\times$ GreenStar™PCR 混合物 (master mix) (BIONEER, 韩国)、6 μ L 蒸馏水和 1 μ L 存活素 qPCR 引物 (10pmole/ μ L, BIONEER, 韩国), 制备混合液以分析存活素表达水平。另一方面, 使用如下管家基因 (以下简称为“HK 基因”): HMBS (羟甲基胆色烷合成酶)、HPRT1 (次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 1)、UBC (泛素 C)、YWHAZ (酪氨酸 3-单加氧酶 / 色氨酸 5-单加氧酶激活蛋白, zeta 多肽), 作为对照基因, 为了使 mRNA 表达水平标准化, 对实施例 6-3-1 中制备的 cDNA 进行 1/5 稀释, 然后向 96-孔板的各孔中加入 3 μ L 稀释的 cDNA、10 μ L 2 $\times$ GreenStar™PCR 混合物 (BIONEER, 韩国)、6 μ L 蒸馏水和 1 μ L 各 HK 基因 qPCR 引物 (10pmole/ μ L, BIONEER, 韩国), 在 96-孔板的每孔中制备 HK 基因实时 PCR 混合物液体。采用 Exicycler™96 实时定量加热块 (Real-Time Quantitative Thermal Block) (BIONEER, 韩国), 在含有该混合液的 96-孔板上进行以下反应。

[0268] 通过在 95℃ 反应 15 分钟灭活酶和破坏 cDNA 的二级结构。然后, 在 94℃ 变性 30 秒, 58℃ 退火 30 秒, 72℃ 延伸 30 秒和 SYBR Green 扫描, 这四个步骤重复进行 42 次, 最后 72℃ 延伸 3 分钟。然后, 55℃ 保持 1 分钟, 分析 55℃ ~ 95℃ 的融解曲线。PCR 结束后, 通过 HK 基因标准化的 mRNA 值 (标准化因子, NF) 纠正各自获得的存活素 Ct (循环阈值) 值, 然后获得了介于仅用转染试剂处理的对照组的 Ct 值和纠正的 Ct 值之间的 Δ Ct 值。用 Δ Ct 值和 $2^{(-\Delta Ct)} \times 100$ (图 19) 的计算公式相互比较存活素 mRNA 的表达率。

[0269] 结果, 如图 19 所示, 与 siRNA- 聚合物缀合物 1 相比, siRNA PEG 的缀合物 2 ~ 5 高度抑制存活素 mRNA 水平, 而不同于用转染试剂进行转染的结果。siRNA- 聚合物缀合物 1 ~ 5 在低浓度 (500nM) 比在高浓度 (100nM), 表现出更高的 RNAi 作用。此外, 当用相同浓度 (500nM) 处理时, 与 siRNA 缀合物 1 ~ 5 相比, siRNA- 疏水聚合物缀合物 9 ~ 14 表现出对存活素 mRNA 表达水平的较低抑制。然而, 当在高浓度条件下 (1 μ M) 处理时, 特别是 siRNA- 聚合物缀合物 14 的末端修饰导致对存活素 mRNA 表达水平的较高抑制。

[0270] 序列表

[0271] 见序列表

[0001]

序列表		
<110>	株式会社百奥尼	
<120>	siRNA缀合物及其制备方法	
<130>	2010-opa-4495	
<150>	KR 10-2009-0042297	
<151>	2009-05-14	
<160>	5	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	siRNA	
<400>	1	
	aaggagauca acauuuua	19
<210>	2	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	siRNA	
<400>	2	
	aggaaaggag aucaacaauu uca	23
<210>	3	
<211>	27	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	siRNA	
<400>	3	
	aggaaaggag aucaacaauu ucaaaau	27
<210>	4	
<211>	31	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	siRNA	
<400>	4	
	aaaggagauca aacaauuuua aaauagaugu u	31
<210>	5	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	SEQ. ID. No. 1的siRNA的反义序列	
<400>	5	
	ugaaaaauguu gaucuccuu	

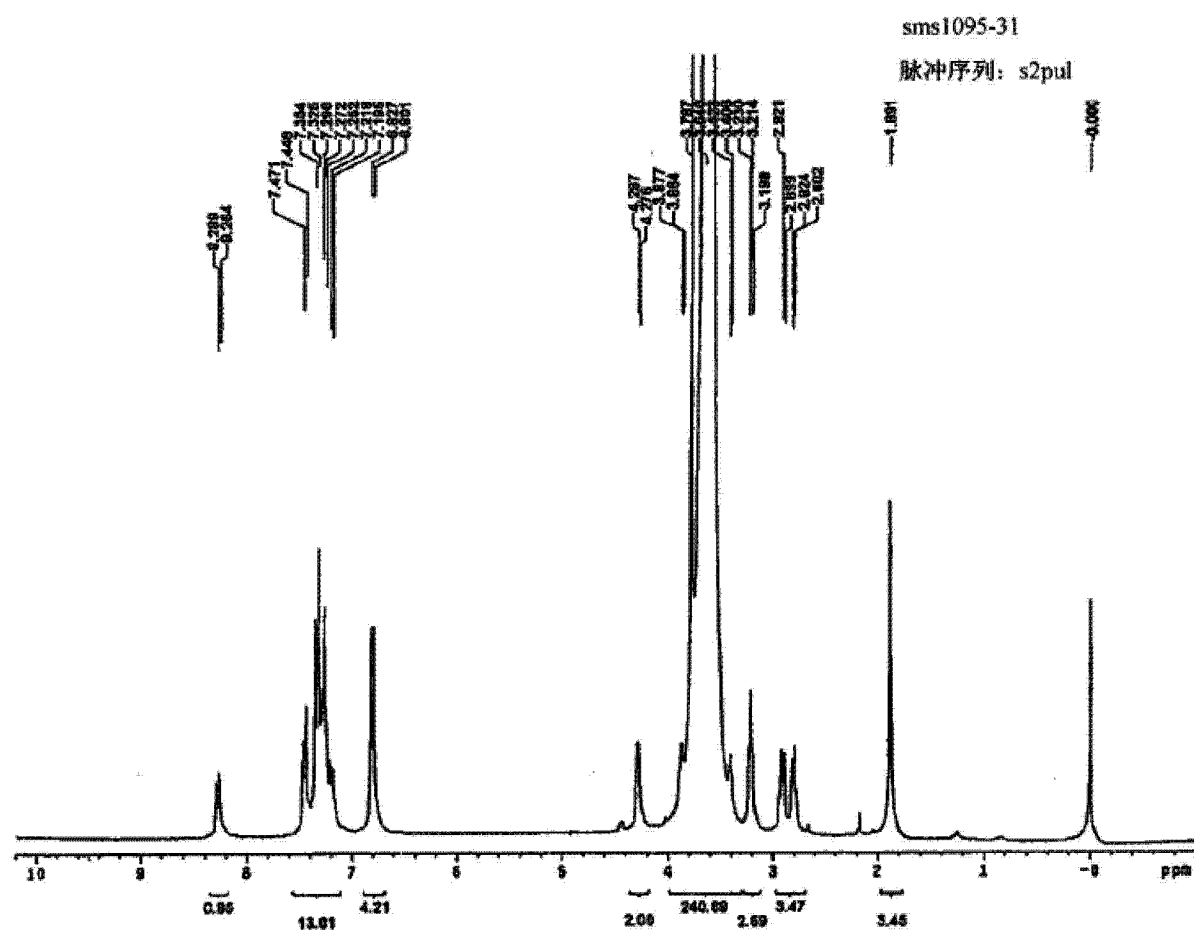


图 4

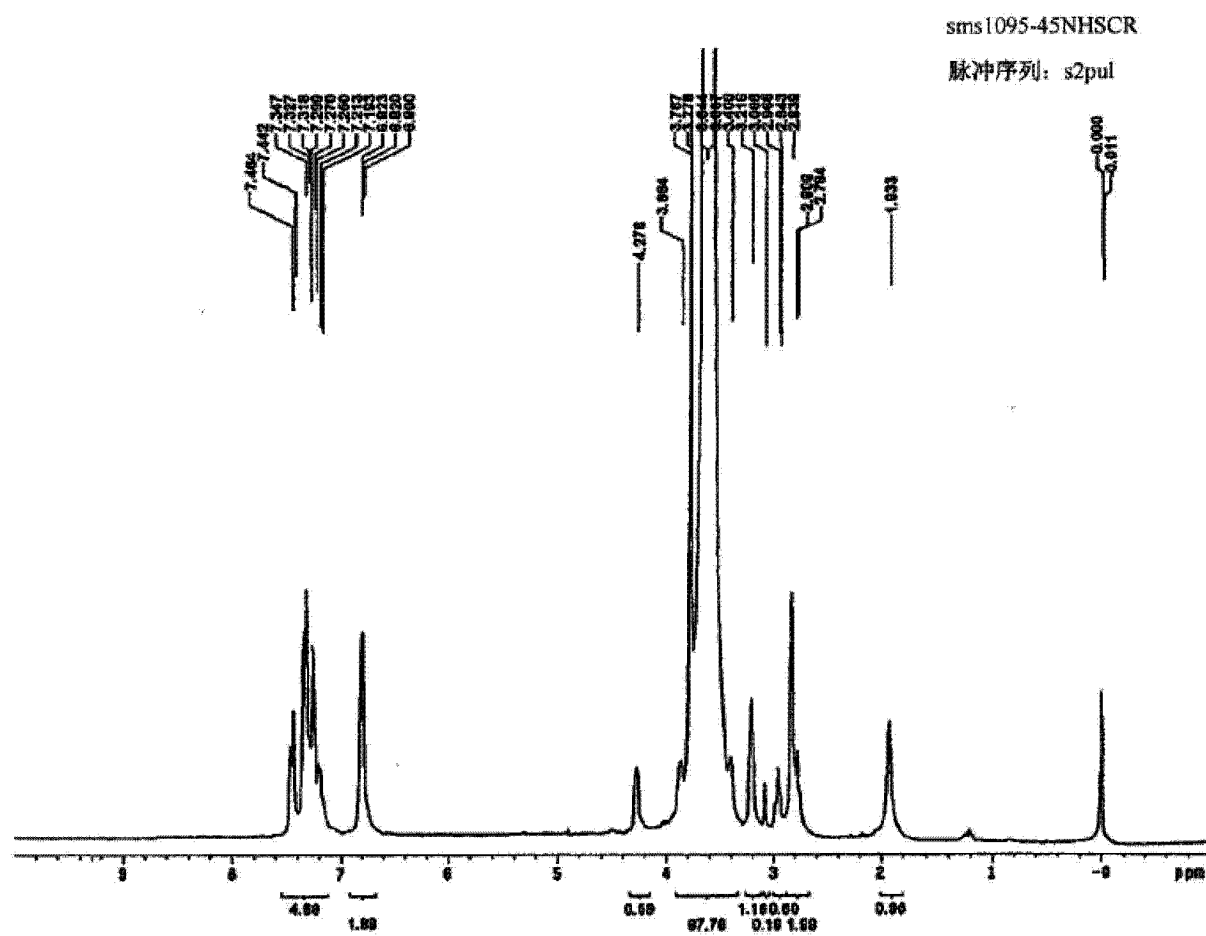
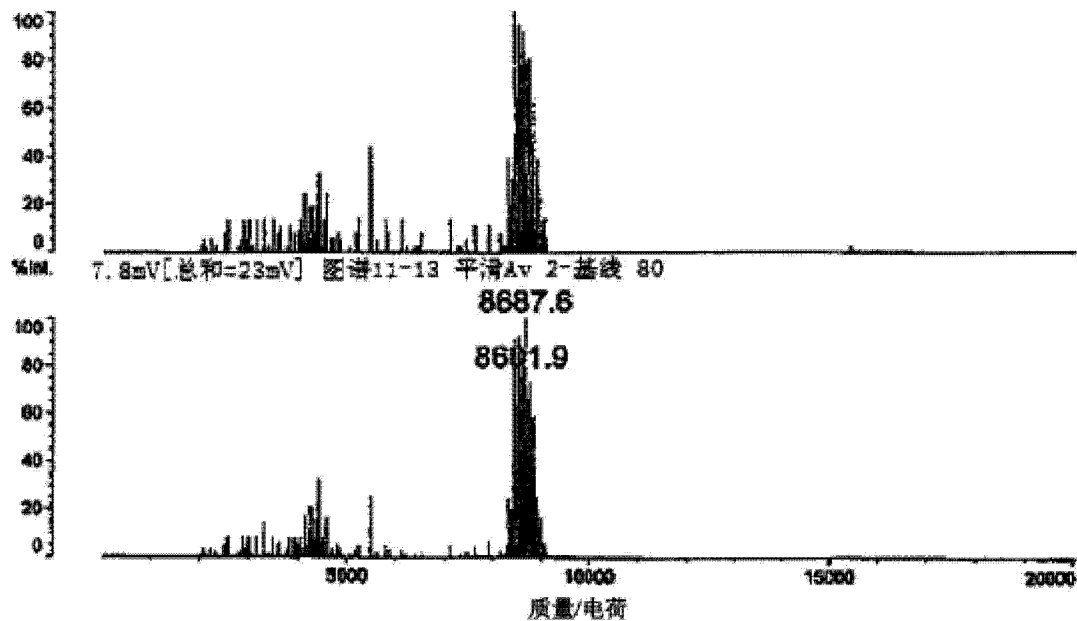


图 5

RNA-1

日期: A10001.A3 2009 年 3 月 6 日 17:04 cal: 2009 年 4 月 8 日 14:03
Kratos PC Axima LNR V2.3.5: 线性模式, 功率: 160, P.Ext.@8000(bin 138)
%int. 14mV[总和=42mV] 图谱 11-13: 平均



RNA-2

日期: B10001.B3 2009 年 3 月 6 日 17:06 cal: 2009 年 4 月 8 日 14:04
Kratos PC Axima LNR V2.3.5: 线性模式, 功率: 160, P.Ext.@8000(bin 138)
%int. 6.5mV[总和=26mV] 图谱 1-4: 平均

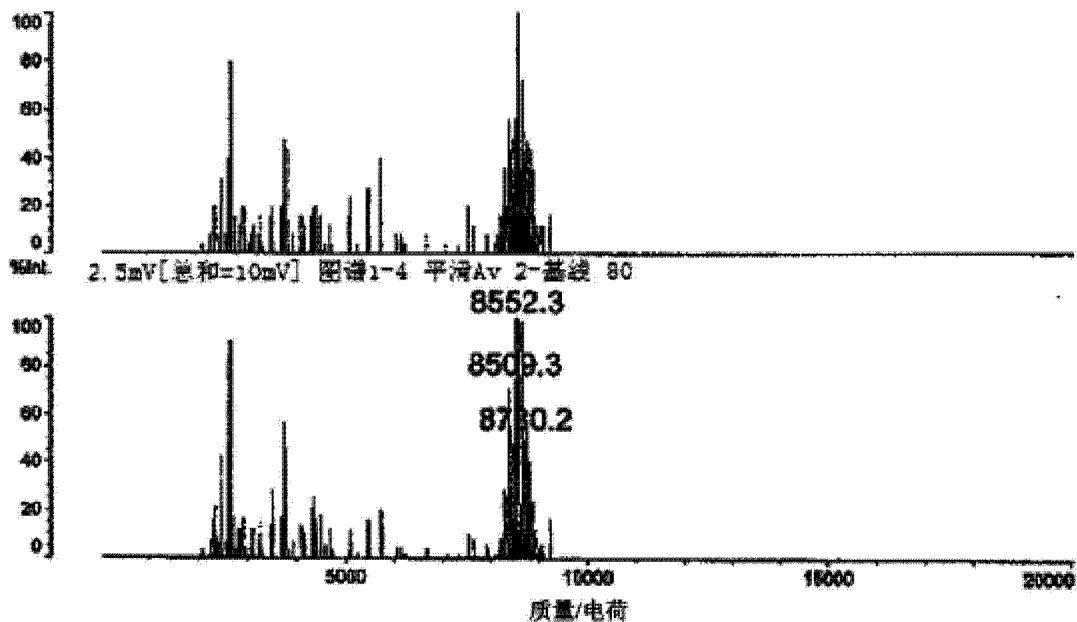
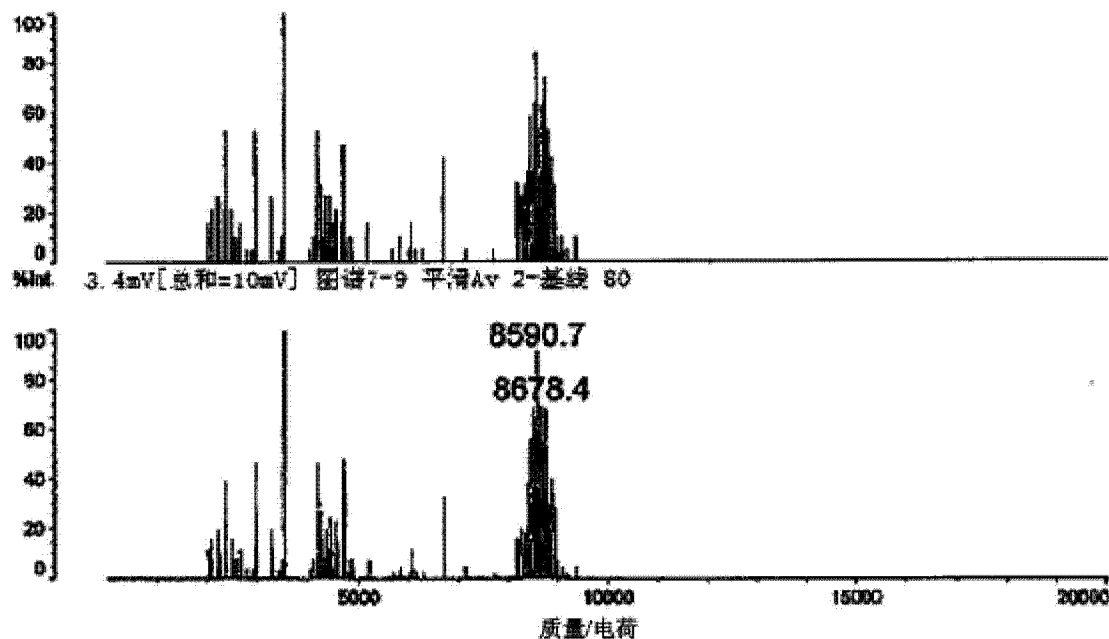


图 6

RNA-3

日期: C10001.C3 2009 年 3 月 6 日 17:06 cal: 2009 年 4 月 8 日 14:04
Kratos PC Axima LNR V2.3.5: 线性模式, 功率: 160, P.Ext.@8000(bin 138)
%int. 7.4mV[总和=22mV] 图谱 7-9: 平均



RNA-4

日期: D10001.D3 2009 年 3 月 6 日 17:08 cal: 2009 年 8 月 8 日 14:04
Kratos PC Axima LNR V2.3.5: 线性模式, 功率: 160, P.Ext.@8000(bin 138)
%int. 13mV[总和=39mV] 图谱 1-3: 平均

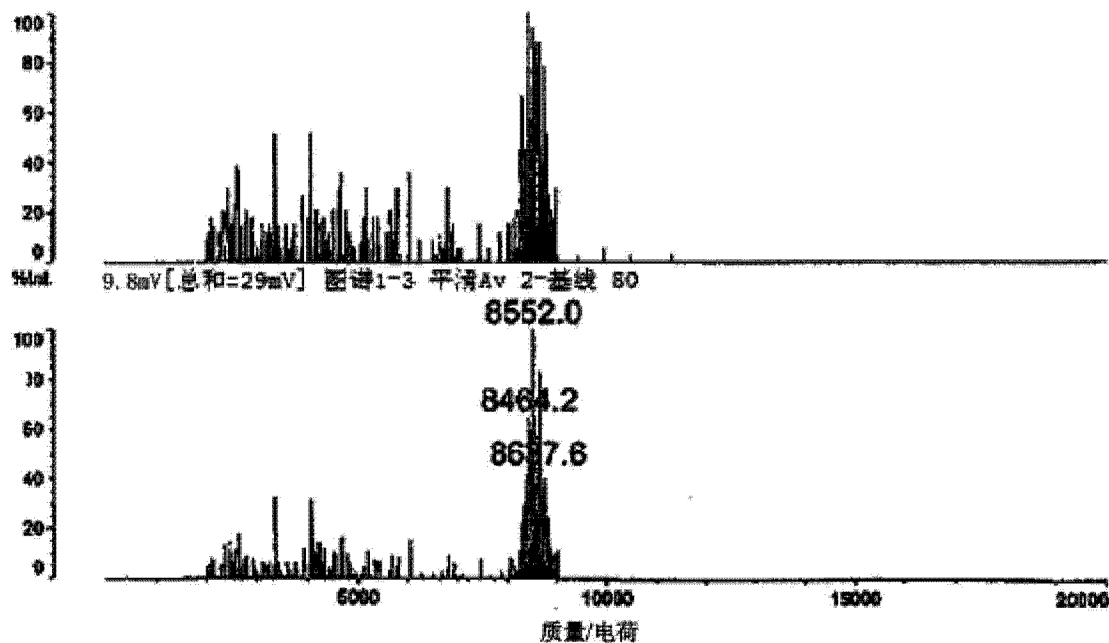


图 7

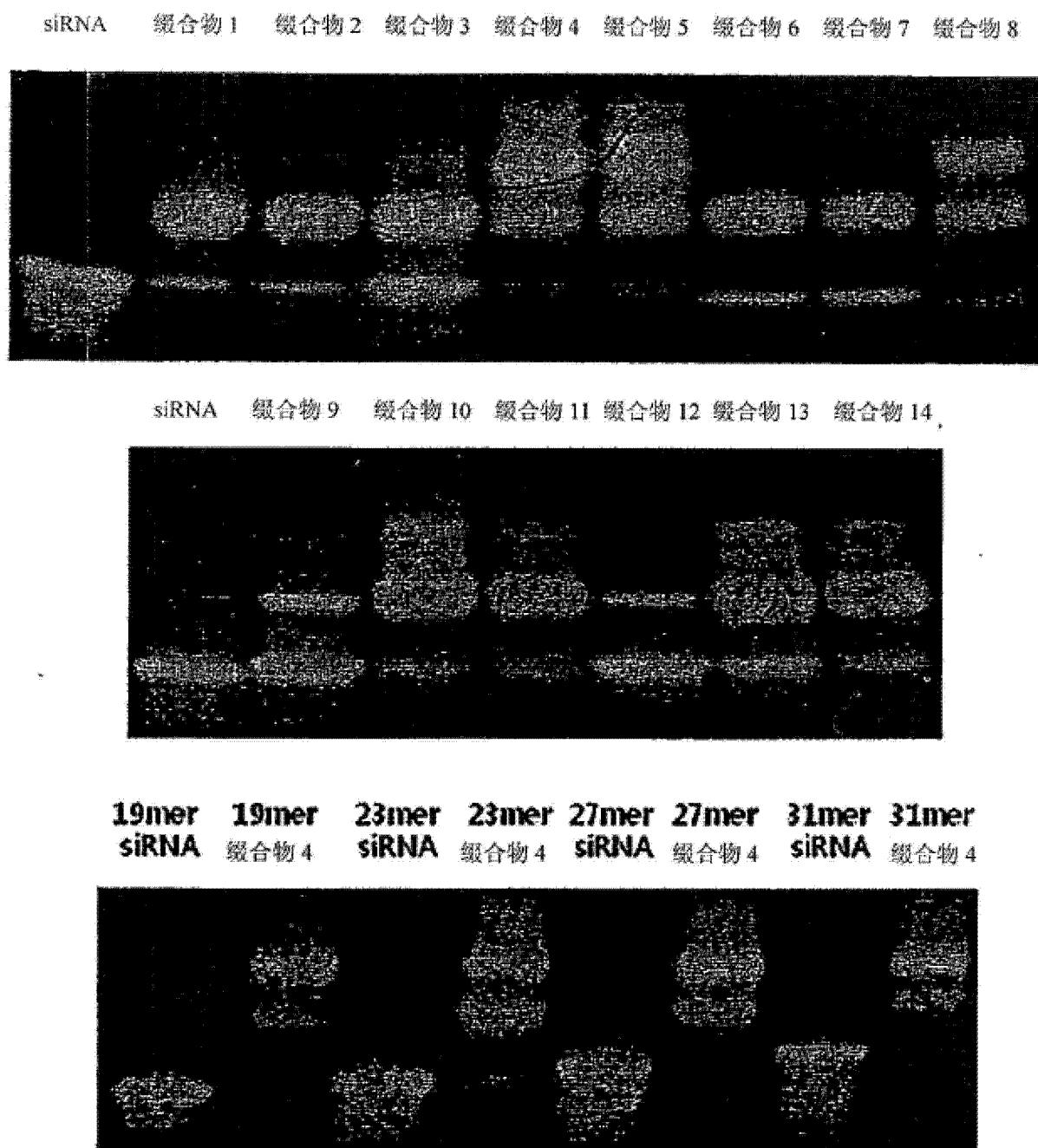


图 8

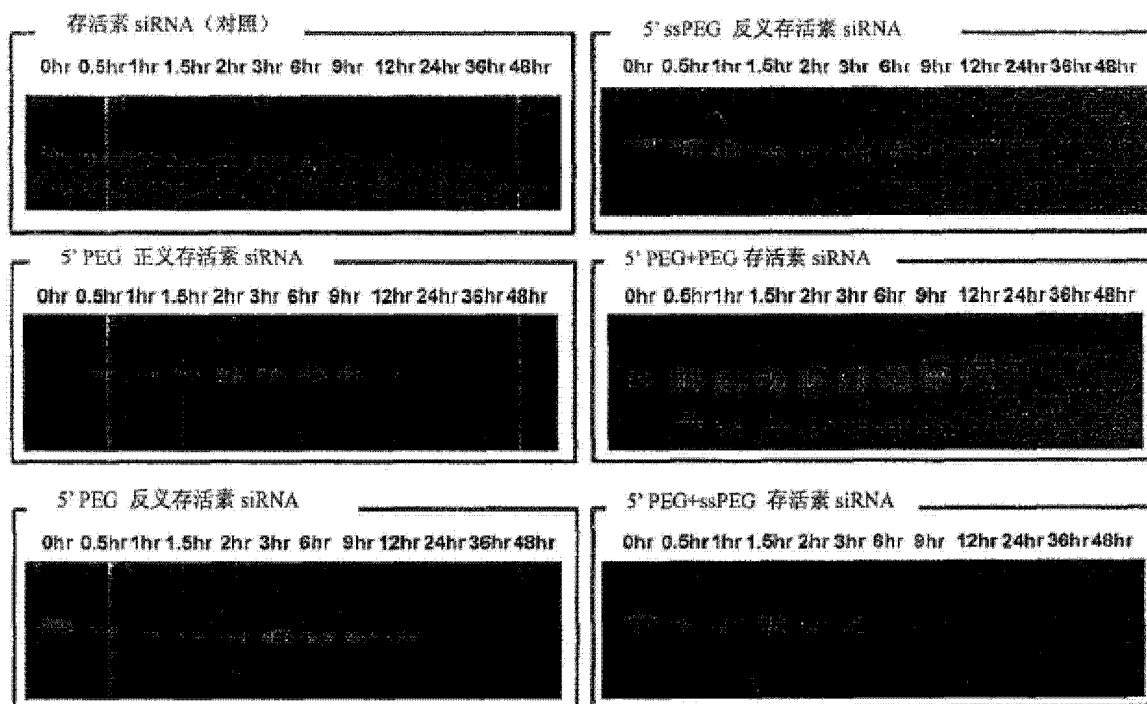


图 9

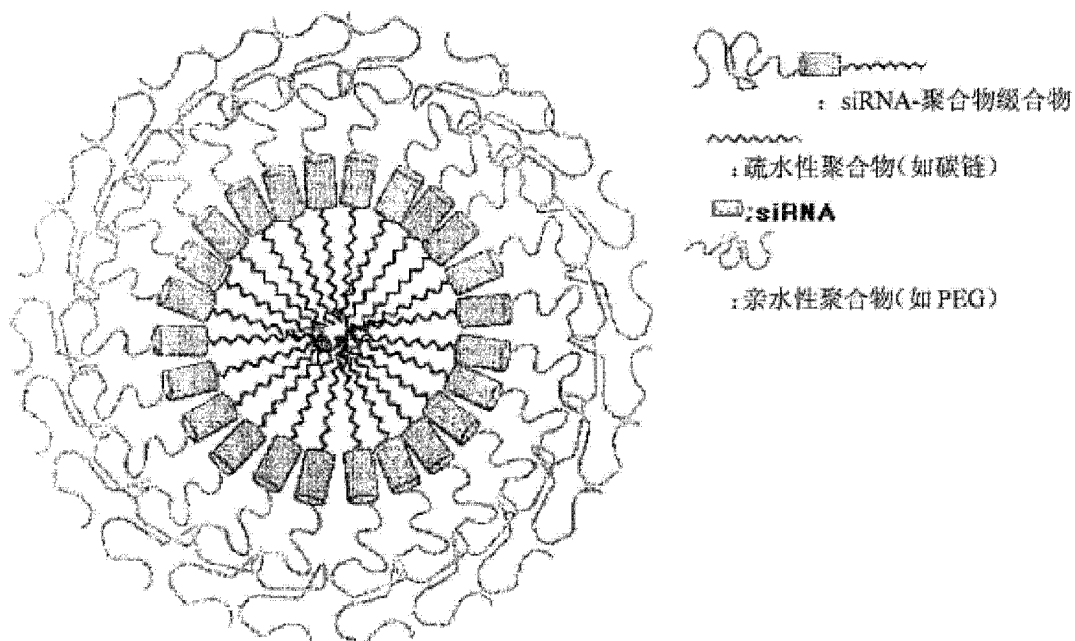


图 10

Z-平均值(nm): 530.8741

衍生的计数率(kcps): 175.73873138...

标准差: 197.7296

标准差: 18.73728116...

标准差%: 37.24604

标准差%: 10.662010026...

方差: 39097

方差: 351.0857053...

粒径 d.nm	平均 强度 %	标准差 强度 %	粒径 d.nm	平均 强度 %	标准差 强度 %	粒径 d.nm	平均 强度 %	标准差 强度 %	粒径 d.nm	平均 强度 %	标准差 强度 %
0.400	0.0	0.0	5.61	0.0	0.0	78.8	1.0	2.0	1110	0.0	0.0
0.463	0.0	0.0	6.50	0.0	0.0	91.3	0.3	0.5	1280	0.0	0.0
0.536	0.0	0.0	7.33	0.0	0.0	106	0.0	0.0	1460	0.0	0.0
0.621	0.0	0.0	8.72	0.0	0.0	122	2.1	4.2	1720	0.0	0.0
0.719	0.0	0.0	10.1	0.0	0.0	142	10.1	12.3	1990	0.0	0.0
0.833	0.0	0.0	11.7	0.0	0.0	184	17.1	19.8	2300	0.0	0.0
0.965	0.0	0.0	13.6	0.0	0.0	190	15.2	13.7	2670	0.0	0.0
1.12	0.0	0.0	15.7	0.0	0.0	220	8.6	5.6	3090	0.0	0.0
1.29	0.0	0.0	18.2	0.0	0.0	253	10.1	12.1	3590	0.0	0.0
1.50	0.0	0.0	21.0	1.0	1.3	295	10.3	12.0	4150	0.0	0.0
1.74	0.0	0.0	24.4	2.3	2.7	342	6.7	6.0	4800	0.0	0.0
2.01	0.0	0.0	28.2	1.8	2.2	396	2.2	4.5	5560	0.0	0.0
2.33	0.0	0.0	32.7	0.1	0.2	459	0.6	1.1	6440	0.0	0.0
2.70	0.0	0.0	37.8	0.5	0.9	531	0.0	0.0	7460	0.0	0.0
3.12	0.0	0.0	43.8	1.8	2.7	615	0.0	0.0	8630	0.0	0.0
3.62	0.0	0.0	50.7	3.1	3.7	712	0.0	0.0	1.00e4	0.0	0.0
4.18	0.0	0.0	58.8	3.1	3.7	825	0.0	0.0			
4.85	0.0	0.0	68.1	2.0	3.3	955	0.0	0.0			

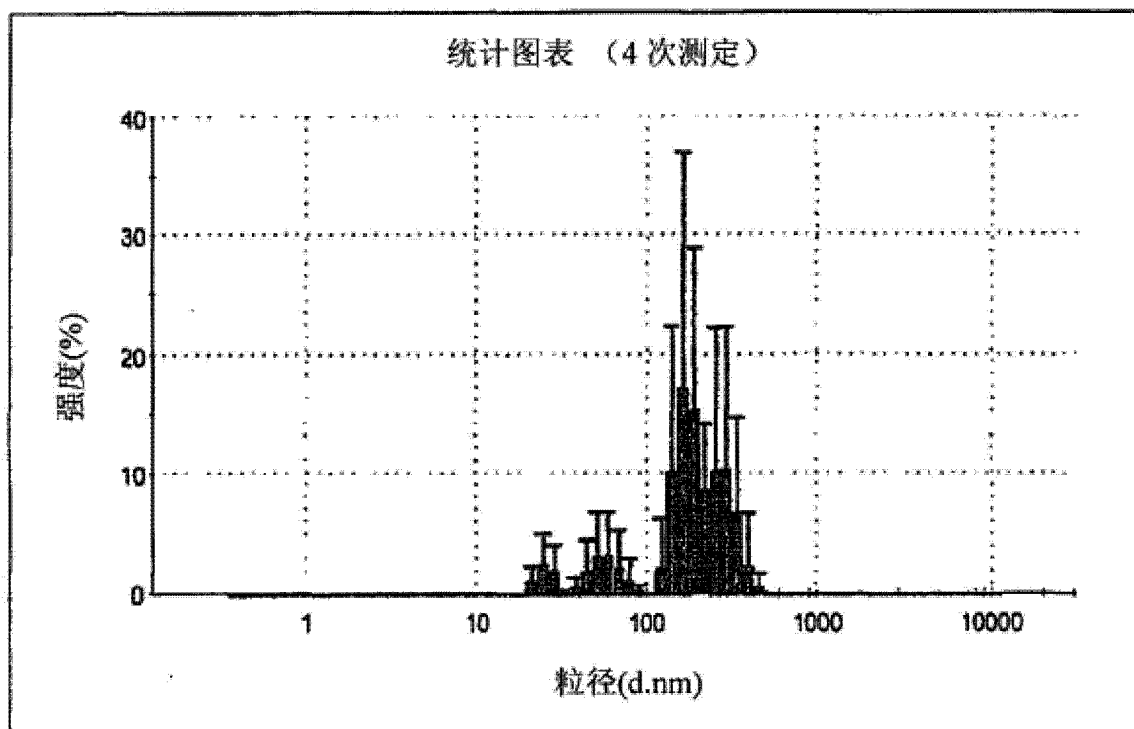


图 11

Z-平均值(nm): 15684.82
 标准差: 25442.89
 标准差%: 162.2135
 方差: 6.473406E+08

衍生的计数率(kcps): 148.84755961...
 标准差: 17.606241138...
 标准差%: 11.828370706...
 方差: 309.97972704...

粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %	粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %	粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %	粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %
0.400	0.0	0.0	5.61	12.3	11.2	78.8	0.0	0.0	1110	0.0	0.0
0.463	0.0	0.0	6.50	13.3	20.6	91.3	0.0	0.0	1280	0.0	0.0
0.536	0.0	0.0	7.53	9.1	15.6	106	0.0	0.0	1480	0.0	0.0
0.621	0.0	0.0	8.72	2.9	5.0	122	0.0	0.0	1720	0.0	0.0
0.719	0.0	0.0	10.1	0.4	0.6	142	0.0	0.0	1990	0.0	0.0
0.833	0.0	0.0	11.7	0.0	0.1	164	0.0	0.0	2300	0.0	0.0
0.966	0.0	0.0	13.5	0.0	0.1	190	0.0	0.0	2670	0.0	0.0
1.12	0.0	0.0	15.7	0.0	0.0	220	0.0	0.0	3090	0.0	0.0
1.29	0.0	0.0	18.2	0.0	0.0	255	0.0	0.0	3580	0.0	0.0
1.50	0.0	0.0	21.0	0.0	0.0	295	0.0	0.0	4150	0.0	0.0
1.74	0.0	0.0	24.4	0.0	0.0	342	0.0	0.0	4800	0.0	0.0
2.01	0.0	0.0	28.2	0.0	0.0	396	0.0	0.0	5580	0.0	0.0
2.33	0.0	0.0	32.7	0.0	0.0	459	0.0	0.0	6440	0.0	0.0
2.70	0.0	0.0	37.8	0.0	0.0	531	0.0	0.0	7460	0.0	0.0
3.12	0.0	0.0	43.8	0.0	0.0	615	0.0	0.0	8630	0.0	0.0
3.62	4.2	7.2	50.7	0.0	0.0	712	0.0	0.0	1.00e4	0.0	0.0
4.19	11.5	19.9	58.8	0.0	0.0	825	0.0	0.0			
4.85	12.9	18.7	68.1	0.0	0.0	955	0.0	0.0			

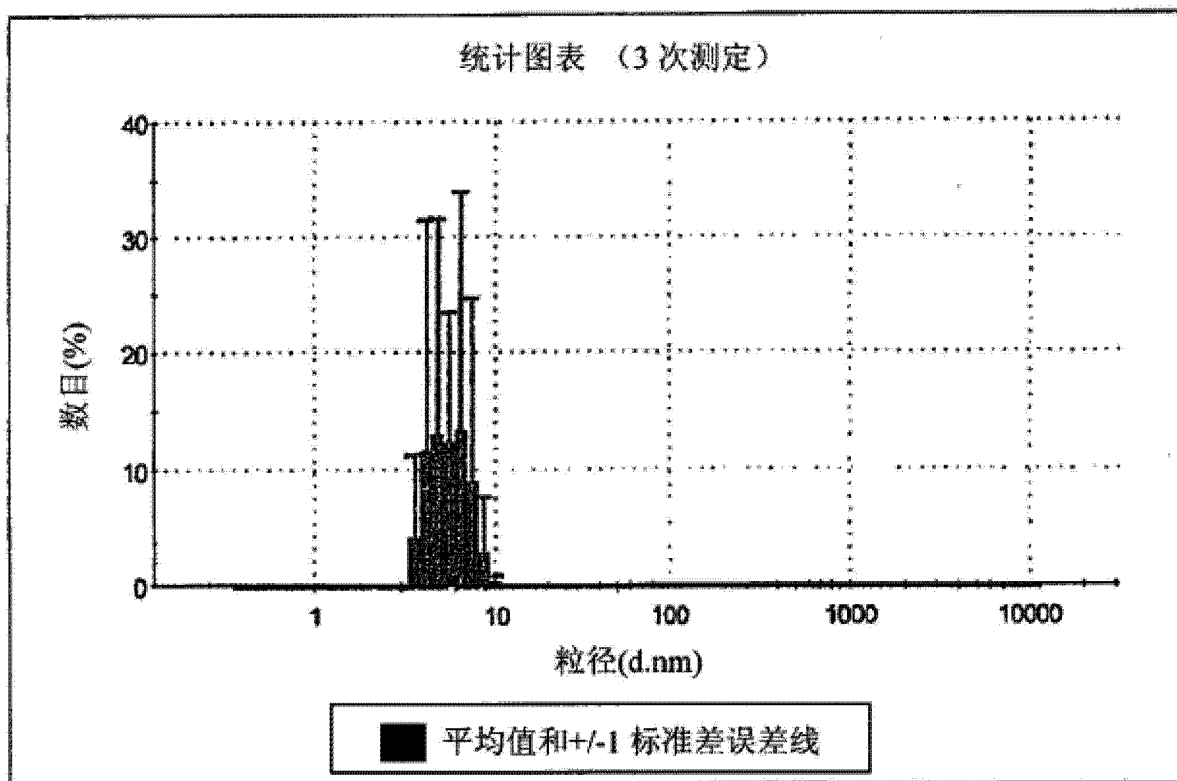


图 12

Z-平均值(nm): 9202.46

衍生的计数率(kcps): 171.78628540...

标准差: 20246.44

标准差: 21.397925191...

标准差%: 220.0112

标准差%: 12.456131257...

方差: 4.099184E+08

方差: 457.87120249...

粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %	粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %	粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %	粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %
0.400	0.0	0.0	5.61	14.1	20.2	78.8	0.0	0.0	1110	0.0	0.0
0.463	0.0	0.0	6.50	11.9	16.6	91.3	0.0	0.0	1280	0.0	0.0
0.536	0.0	0.0	7.53	9.6	8.6	106	0.0	0.0	1480	0.0	0.0
0.621	0.0	0.0	8.72	13.2	19.6	122	0.0	0.0	1720	0.0	0.0
0.719	0.0	0.0	10.1	10.1	15.7	142	0.0	0.0	1990	0.0	0.0
0.833	0.0	0.0	11.7	3.1	4.8	164	0.0	0.0	2300	0.0	0.0
0.965	0.0	0.0	13.5	0.3	0.6	190	0.0	0.0	2670	0.0	0.0
1.12	0.0	0.0	15.7	0.0	0.0	220	0.0	0.0	3090	0.0	0.0
1.29	0.0	0.0	18.2	0.0	0.0	255	0.0	0.0	3580	0.0	0.0
1.50	0.0	0.0	21.0	0.0	0.0	295	0.0	0.0	4150	0.0	0.0
1.74	0.0	0.0	24.4	0.0	0.0	342	0.0	0.0	4800	0.0	0.0
2.01	0.0	0.0	28.2	0.0	0.0	396	0.0	0.0	5660	0.0	0.0
2.33	0.0	0.0	32.7	0.0	0.0	459	0.0	0.0	6440	0.0	0.0
2.70	0.2	0.5	37.8	0.0	0.0	531	0.0	0.0	7460	0.0	0.0
3.12	2.3	5.7	43.8	0.0	0.0	615	0.0	0.0	8830	0.0	0.0
3.62	5.4	13.3	50.7	0.0	0.0	712	0.0	0.0	100e4	0.0	0.0
4.19	5.3	12.9	58.6	0.0	0.0	825	0.0	0.0			
4.85	7.9	8.7	68.1	0.0	0.0	955	0.0	0.0			

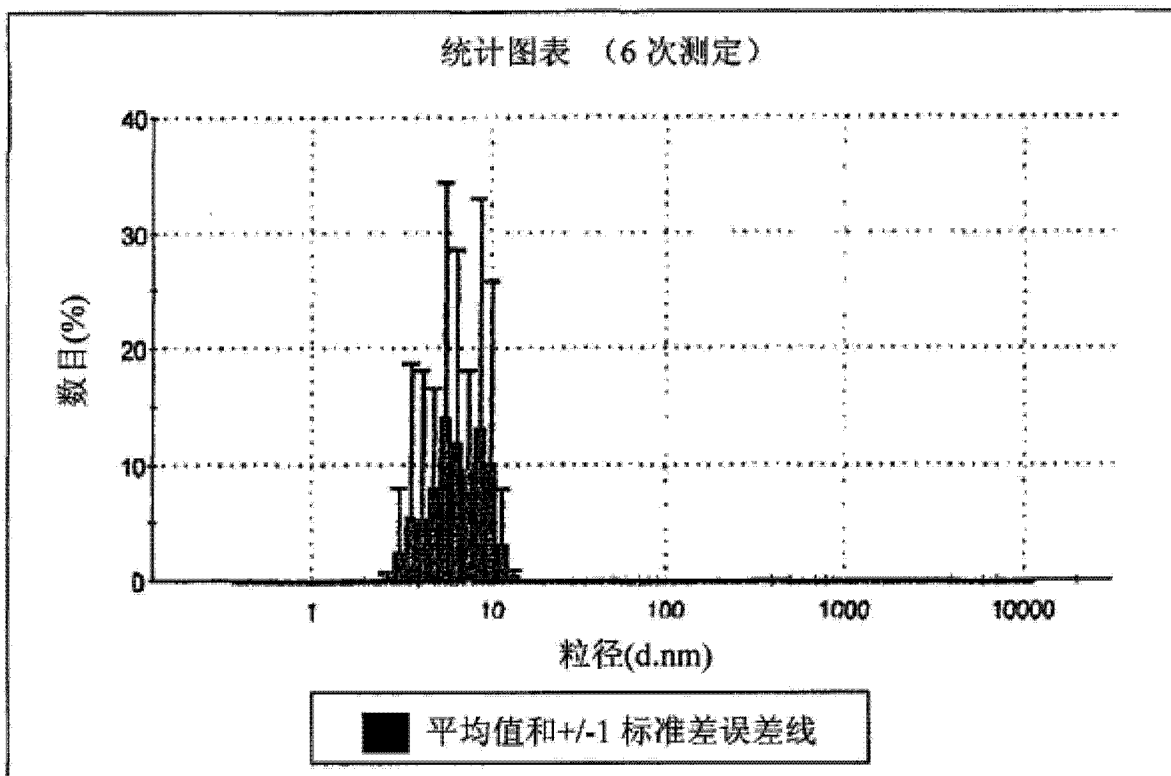


图 13

Z-平均值(nm): 21555.67

衍生的计数率(kcps): 357.43748982...

标准差: 20246.44

标准差: 63.854840339...

标准差%: 220.0112

标准差%: 17.864617494...

方差: 4.099184E+08

方差: 4077.4405348...

粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %	粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %	粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %	粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %
0.400	0.0	0.0	5.61	7.7	13.3	78.8	0.0	0.0	1110	0.0	0.0
0.463	0.0	0.0	6.50	7.5	8.0	81.3	0.0	0.0	1280	0.0	0.0
0.536	0.0	0.0	7.53	10.3	10.8	106	0.0	0.0	1480	0.0	0.0
0.621	0.0	0.0	8.72	11.8	16.4	122	0.0	0.0	1720	0.0	0.0
0.719	0.0	0.0	10.1	8.5	13.2	142	0.0	0.0	1990	0.0	0.0
0.833	0.0	0.0	11.7	4.3	8.9	164	0.0	0.0	2300	0.0	0.0
0.965	0.0	0.0	13.5	1.5	2.5	190	0.0	0.0	2870	0.0	0.0
1.12	0.0	0.0	15.7	0.4	0.6	220	0.0	0.0	3090	0.0	0.0
1.29	0.0	0.0	18.2	0.0	0.1	255	0.0	0.0	3580	0.0	0.0
1.50	0.0	0.0	21.0	0.0	0.0	295	0.0	0.0	4150	0.0	0.0
1.74	0.0	0.0	24.4	0.0	0.0	342	0.0	0.0	4800	0.0	0.0
2.01	0.0	0.0	28.2	0.0	0.0	396	0.0	0.0	5560	0.0	0.0
2.33	0.0	0.0	32.7	0.0	0.0	459	0.0	0.0	6440	0.0	0.0
2.70	0.0	0.0	37.8	0.0	0.0	531	0.0	0.0	7480	0.0	0.0
3.12	0.0	0.0	43.8	0.0	0.0	615	0.0	0.0	8630	0.0	0.0
3.62	1.5	2.8	50.7	0.0	0.0	712	0.0	0.0	1.00e4	0.0	0.0
4.18	5.3	9.2	58.8	0.0	0.0	825	0.0	0.0			
4.85	8.2	14.2	68.1	0.0	0.0	955	0.0	0.0			

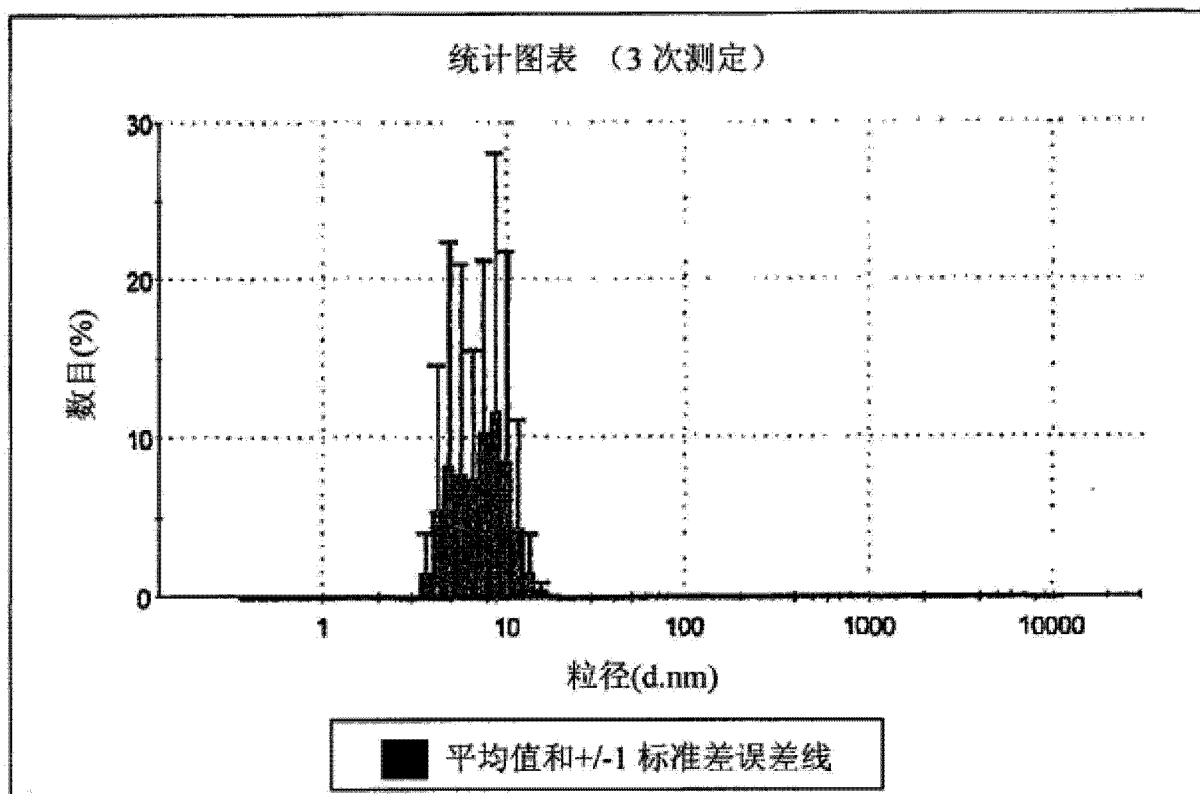


图 14

Z-平均值(nm): 619.118

衍生的计数率(kcps): 212.37313588...

标准差: 403.0866

标准差: 13.009675837...

标准差%: 65.10658

标准差%: 6.1258575777...

方差: 162478.8

方差: 169.25166540...

粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %	粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %	粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %	粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %
0.400	0.0	0.0	5.61	10.4	15.4	78.8	10.3	15.4	1110	0.0	0.0
0.483	0.0	0.0	6.50	3.0	5.3	91.3	3.4	6.6	1280	0.0	0.0
0.536	0.0	0.0	7.53	0.2	0.5	106	0.4	1.0	1480	0.0	0.0
0.621	0.0	0.0	8.72	0.0	0.0	122	0.0	0.0	1720	0.0	0.0
0.719	0.0	0.0	10.1	0.0	0.0	142	0.0	0.0	1990	0.0	0.0
0.833	0.0	0.0	11.7	0.0	0.0	184	0.0	0.0	2300	0.0	0.0
0.965	0.0	0.0	13.5	0.0	0.0	190	0.0	0.0	2670	0.0	0.0
1.12	0.0	0.0	15.7	1.0	2.5	220	0.0	0.0	3090	0.0	0.0
1.29	0.0	0.0	18.2	3.6	8.8	255	0.0	0.0	3580	0.0	0.0
1.50	0.0	0.0	21.0	5.7	12.6	295	0.0	0.0	4150	0.0	0.0
1.74	0.0	0.0	24.4	6.6	10.5	342	0.0	0.0	4800	0.0	0.0
2.01	0.0	0.0	28.2	6.3	10.7	396	0.0	0.0	5560	0.0	0.0
2.33	0.0	0.0	32.7	5.0	10.5	459	0.0	0.0	6440	0.0	0.0
2.70	0.0	0.0	37.8	3.0	7.1	531	0.0	0.0	7460	0.0	0.0
3.12	0.0	0.0	43.8	1.4	3.5	615	0.0	0.0	8630	0.0	0.0
3.62	0.5	1.2	50.7	1.1	1.7	712	0.0	0.0	100e4	0.0	0.0
4.19	6.0	9.8	58.8	6.1	10.3	825	0.0	0.0			
4.85	13.2	20.5	68.1	12.8	20.0	855	0.0	0.0			

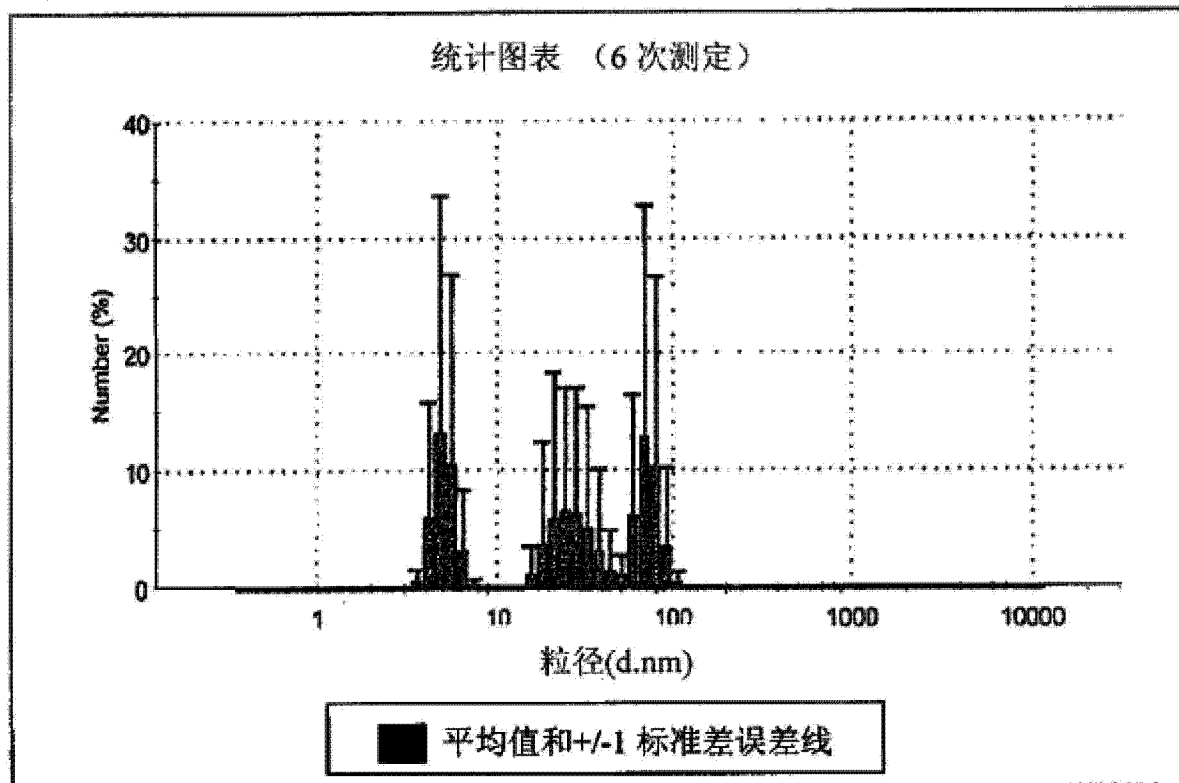


图 15

Z-平均值(nm): 699.8798

衍生的计数率(kcps): 146.85276489...

标准差: 182.5856

标准差: 11.380419421...

标准差%: 26.08814

标准差%: 7.7495438573...

方差: 33337.5

方差: 129.51394620...

粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %	粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %	粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %	粒径 d.nm	平均 数目%	标准差 数目 %
0.400	0.0	0.0	5.61	24.0	14.3	78.8	0.0	0.0	1110	0.0	0.0
0.463	0.0	0.0	6.50	21.3	13.9	91.3	0.0	0.0	1280	0.0	0.0
0.538	0.0	0.0	7.53	13.8	6.9	106	0.0	0.0	1460	0.0	0.0
0.621	0.0	0.0	8.72	10.8	14.6	122	0.0	0.0	1720	0.0	0.0
0.719	0.0	0.0	10.1	7.9	14.9	142	0.0	0.0	1980	0.0	0.0
0.833	0.0	0.0	11.7	3.2	6.3	164	0.0	0.0	2300	0.0	0.0
0.965	0.0	0.0	13.6	0.6	1.1	190	0.0	0.0	2670	0.0	0.0
1.12	0.0	0.0	15.7	0.0	0.0	220	0.0	0.0	3090	0.0	0.0
1.29	0.0	0.0	18.2	0.0	0.0	255	0.0	0.0	3560	0.0	0.0
1.50	0.0	0.0	21.0	0.0	0.0	295	0.0	0.0	4150	0.0	0.0
1.74	0.0	0.0	24.4	0.0	0.0	342	0.0	0.0	4800	0.0	0.0
2.01	0.0	0.0	28.2	0.0	0.0	396	0.0	0.0	5560	0.0	0.0
2.33	0.0	0.0	32.7	0.0	0.0	459	0.0	0.0	6440	0.0	0.0
2.70	0.0	0.0	37.8	0.0	0.0	531	0.0	0.0	7460	0.0	0.0
3.12	0.0	0.0	43.8	0.0	0.0	615	0.0	0.0	8630	0.0	0.0
3.62	0.0	0.0	50.7	0.0	0.0	712	0.0	0.0	1.00e4	0.0	0.0
4.19	3.8	5.2	58.8	0.0	0.0	825	0.0	0.0			
4.85	14.7	13.1	68.1	0.0	0.0	955	0.0	0.0			

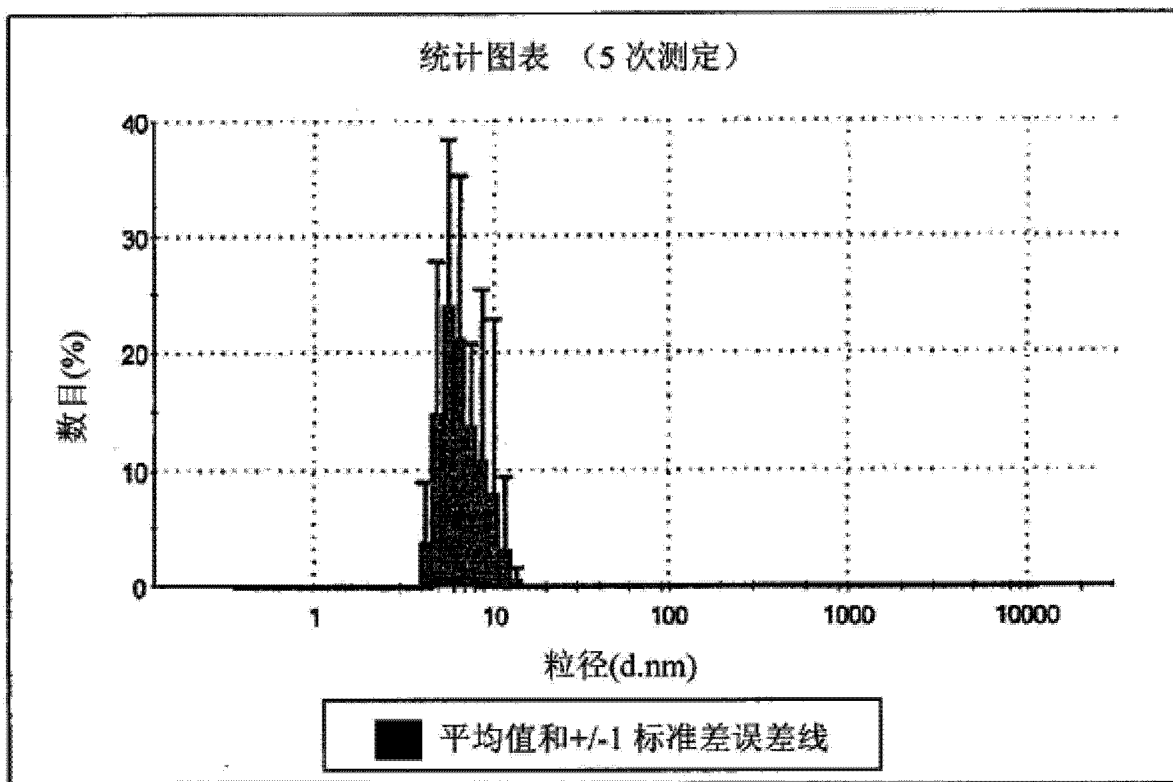


图 16

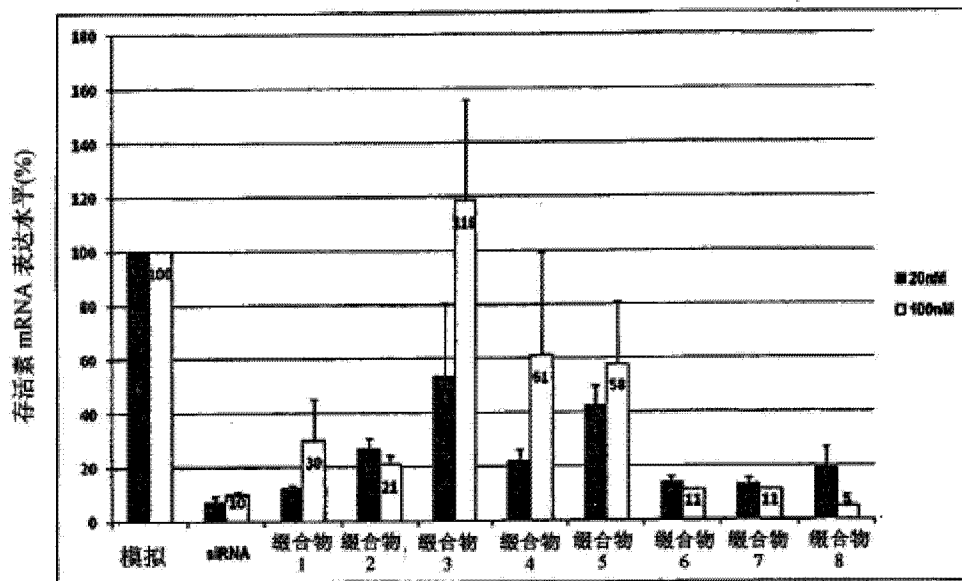


图 17

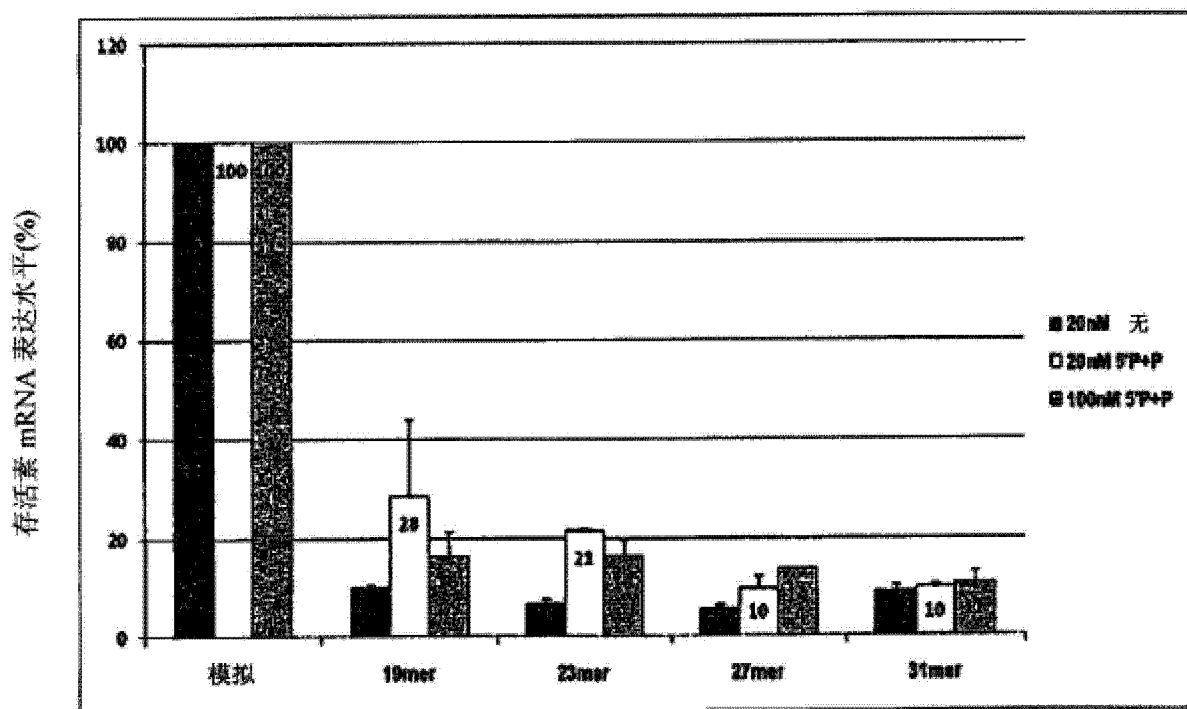


图 18

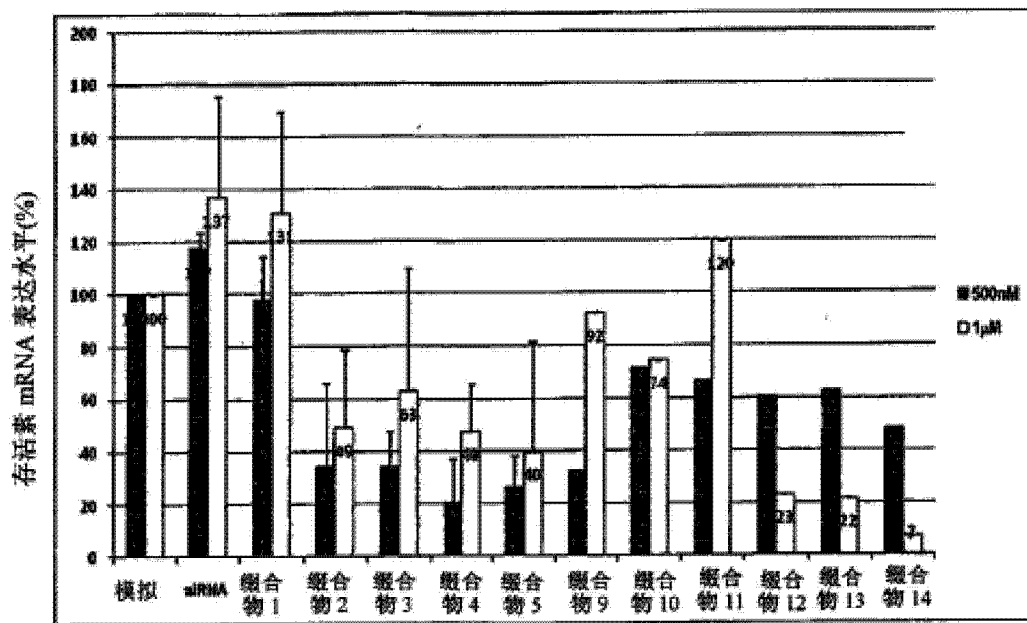


图 19