



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101704949 A

(43) 申请公布日 2010.05.12

(21) 申请号 200910217849.3

(22) 申请日 2009.11.13

(71) 申请人 中国科学院长春应用化学研究所
地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625
号

(72) 发明人 陈学思 李非凡 田华雨 景遐斌

(74) 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任
公司 22001

代理人 马守忠

(51) Int. Cl.

C08G 73/04 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

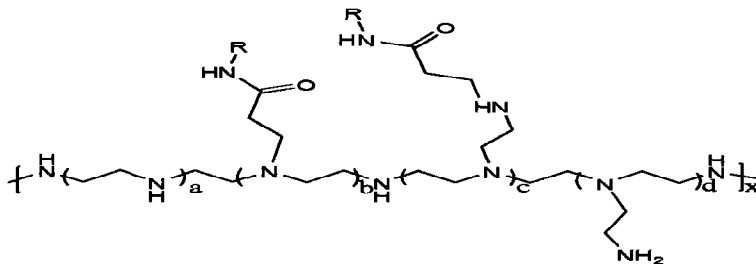
(54) 发明名称

丙烯酰胺类单体修饰的聚乙烯亚胺、制法和在基因传递中的应用

(57) 摘要

本发明涉及丙烯酰胺类单体修饰的聚乙烯亚胺、制法和在基因传递中的应用。本发明通过用丙烯酰胺或 N-异丙基丙烯酰胺单体修饰聚乙烯亚胺,不仅降低了细胞毒性,而且提高了转染效率。本发明提供的丙烯酰胺或 N-异丙基丙烯酰胺单体修饰的聚乙烯亚胺用作非病毒基因载体材料时,其最高转染效率为商品化的 PEI25K 的 9 倍多,而细胞毒性在浓度 20 μ g/ml 时仅为 PEI25K 的 1/3 左右,是一种低毒高效的非病毒基因载体,具有广泛的应用前景。

1. 丙烯酰胺类单体修饰的聚乙烯亚胺,其特征在于,其结构式如下:



式中,R基团为-H或者异丙基;所述的丙烯酰胺类单体为丙烯酰胺或N-异丙基丙烯酰胺。

2. 如权利要求1所述的丙烯酰胺类单体修饰的聚乙烯亚胺,其特征在于,所述的聚乙烯亚胺为超支化的重均分子量为25k的聚乙烯亚胺。

3. 如权利要求1所述的丙烯酰胺类单体修饰的聚乙烯亚胺的制备方法的步骤和条件如下:

(1) 按照聚乙烯亚胺在氯仿中浓度为0.05~0.3g/ml,将聚乙烯亚胺溶于氯仿中,再注入到反应器内;

(2) 然后,按照丙烯酰胺类单体与聚乙烯亚胺物质的量比为88:1~400:1,称取丙烯酰胺类单体加入上述聚乙烯亚胺的氯仿溶液中,50℃反应4天;

(3) 反应结束后,将反应液旋干,得到的粗产物溶于去离子水中,于截留分子量为3,500的透析袋中对去离子水透析3天,G4砂芯漏斗过滤,冻干,得到目标产物丙烯酰胺类单体修饰的聚乙烯亚胺。

4. 权利要求1所述的丙烯酰胺类单体修饰的聚乙烯亚胺在基因传递中的应用,其特征在于,其在体外转染中作为基因传递载体。

5. 权利要求1所述的丙烯酰胺类单体修饰的聚乙烯亚胺在基因传递中的应用,其特征在于,其在体内转染中作为基因传递载体。

丙烯酸酰胺类单体修饰的聚乙烯亚胺、制法和在基因传递中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及丙烯酸酰胺类单体修饰的聚乙烯亚胺、制法和在基因传递中的应用。

背景技术

[0002] 基因传递作为一种可能从根本上治疗疾病的新兴医疗手段,多年来引起了科学家的极大兴趣,而限制基因传递发展的一个关键因素是基因载体材料的发展。基因载体材料一般分为病毒类和非病毒类,病毒类载体包括腺病毒,腺相关病毒,逆转录病毒等,它们的转染效率较高,但是装载量有限,成本高,而最为关键的是其安全隐患,可能引起癌变、基因变异等,极大地限制了其发展。非病毒基因载体应运而生,它们具有结构多样,物理化学性质确定,装载容量大,容易大量制备等优点,但是转染效率较低【参见 Wong SY, Pelet JM, Putnam D. Polymer systems for gene delivery—past, present, and future. PROGRESS IN POLYMER SCIENCE, 2007, 32(8-9):799-837】。非病毒基因载体材料中最为著名的是超支化的重均分子量为 25K 的聚乙烯亚胺,简称 PEI25K,具有相对较高的转染效率,研究学者将其归因于“质子海绵效应”【参见 Boussif O, Zanta M. A, Behr J. P, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo—polyethylenimine. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 1995, 92(16):7297-7301】。然而,其不可降解的特性和很高的细胞毒性极大地限制了其应用前景【参见 Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, et al. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, 2005, 60(2):247-266】。

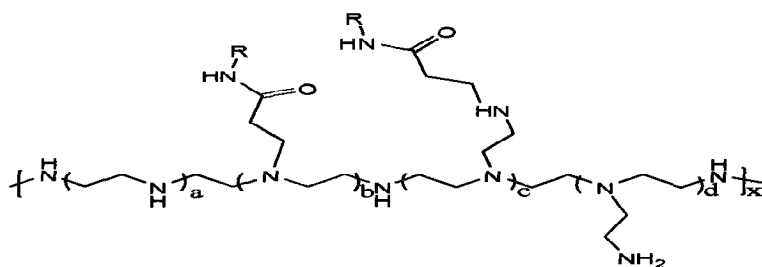
发明内容

[0003] 为了解决已有技术存在的问题,本发明提供了丙烯酸酰胺类单体修饰的聚乙烯亚胺、制法和在基因传递中的应用。

[0004] 本发明通过用丙烯酸酰胺类单体修饰聚乙烯亚胺,不仅降低了细胞毒性,而且极大提高了转染效率,具有良好的应用前景。

[0005] 丙烯酸酰胺类单体修饰的聚乙烯亚胺,其结构式如下:

[0006]



[0007] 式中,R基团为-H或者异丙基;所述的丙烯酸酰胺类单体为丙烯酸酰胺或N-异丙基丙

烯酰胺。

[0008] 优选聚乙烯亚胺为超支化的重均分子量为 25k 的聚乙烯亚胺。

[0009] 丙烯酸胺类单体修饰的聚乙烯亚胺制备方法的步骤和条件如下：

[0010] (1) 按照聚乙烯亚胺在氯仿中浓度为 0.05 ~ 0.3g/ml, 将聚乙烯亚胺溶于氯仿中, 再注入到反应器内；

[0011] (2) 然后, 按照丙烯酸胺类单体与聚乙烯亚胺物质的量比为 88 : 1 ~ 400 : 1, 称取丙烯酸胺类单体加入上述聚乙烯亚胺的氯仿溶液中, 50℃ 反应 4 天；

[0012] (3) 反应结束后, 将反应液旋干, 得到的粗产物溶于去离子水中, 于截留分子量为 3,500 的透析袋中对去离子水透析 3 天, G4 砂芯漏斗过滤, 冻干, 得到目标产物丙烯酸胺类单体修饰的聚乙烯亚胺。

[0013] 丙烯酸胺类单体修饰的聚乙烯亚胺在基因传递中的应用, 其在体外转染或体内转染中作为基因传递载体。

[0014] 丙烯酸胺类单体修饰的聚乙烯亚胺在体外转染中作为基因传递载体的用法, 其步骤和条件如下：

[0015] (1) 细胞的培养

[0016] 将细胞置于含体积分数为 10% 胎牛血清的培养液中, 在 37℃ 含体积分数为 5% 二氧化碳的孵箱中连续培养。

[0017] (2) 体外转染

[0018] 转染前 24 小时内, 取对数生长期细胞, 胰酶消化后用达尔伯克改良伊格尔 (DMEM) 培养基稀释, 按每孔 1×10^4 细胞的密度接种于 96 孔培养板, 置于 37℃ 含体积分数为 5% 二氧化碳的孵箱中继续培养至汇合度达到 80 ~ 90%, 转染时, 吸弃前一天加注的细胞培养板中的培养液, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤两次后, 加入基因转染的复合物颗粒以及无血清或者含有体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基至终体积 200 μ l, 继续培养 48 小时。

[0019] (3) 体外转染效率的测定

[0020] 取出培养板, 吸去培养液, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入细胞裂解液裂解, 然后加入荧光素酶底物, 用照度计测定转染效率。

[0021] (4) 细胞毒性测试

[0022] 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法比较评价基因载体材料的细胞毒性。

[0023] 实验前 24 小时内, 取对数生长期细胞, 胰酶消化后用 DMEM 培养基稀释, 按每孔 1×10^4 细胞的密度接种于 96 孔培养板, 置于 37℃ 含体积分数为 5% 二氧化碳的孵箱中继续培养至汇合度到达 80 ~ 90%, 将不同浓度的材料与细胞共同培养 24 小时后, 每孔分别加入 20 μ l 含质量分数为 0.5% MTT 的 PBS 溶液, 混合物在 37℃ 继续作用 4 小时, 加入 200 μ l 二甲亚砜溶解 MTT 甲臞结晶 10 分钟, 然后用酶标仪测试每孔的吸收, 测试波长选用 492nm, 细胞存活率按下公式计算：

[0024] 细胞存活率 (%) = $(A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$

[0025] A_{sample} 是加入聚合物溶液的细胞样品孔的吸收, A_{control} 是未加入聚合物溶液的细胞样品孔的吸收, 每组实验重复三次。

[0026] 丙烯酸胺类单体修饰的聚乙烯亚胺在体内转染中作为基因传递载体的用法, 其步骤和条件如下：

[0027] 取 5 周的巴比赛裸鼠,在腹侧皮下接种人宫颈癌上皮细胞的细胞株,待肿瘤直径长至 0.4cm 后,随机分为两组,每组 6 只,分别在瘤内注射含 5 μ g 荧光素酶质粒的基因组转染的复合物颗粒溶液 100 μ l。第二天重复注射一次,注射后 48 小时,用精诺真活体成像仪观测体内转染效果。在进行活体成像观察之前,将小鼠麻醉。麻醉 5 分钟后,向小鼠体内注入 200 μ l 荧光素酶底物,10 分钟后,用活体成像系统观察体内转染效果。

[0028] 有益效果:本发明提供的丙烯酰胺类单体修饰的聚乙烯亚胺用作非病毒基因载体材料时,PEI175 其最高转染效率为商品化的 PEI25K 的 9 倍多,而细胞毒性在浓度 20 μ g/ml 时仅为 PEI25K 的 1/3 左右,是一种低毒高效的非病毒基因载体,具有广泛的应用前景。

附图说明

[0029] 图 1 是实施例 1 的用 N-异丙基丙烯酰胺修饰的聚乙烯亚胺的体外转染效率柱形图。

[0030] 图 2 是实施例 1 和 2 制备的目标产物的细胞毒性曲线。■为 PEI25k,▲为 PEA100,▼为 PEA200,●为 PEA400,△为 PEN88,▽为 PEN175,○为 PEN350。

具体实施方式

[0031] 实施例 1:用 N-异丙基丙烯酰胺(简称 NIPA)修饰的聚乙烯亚胺的制备

[0032] (1) 分别称取 1.5g 超支化的重均分子量为 25K 的聚乙烯亚胺(简称 PEI25k),按照表 1 分别溶于氯仿中,注入到反应器内;

[0033] (2) 然后,分别按照表 1 的 N-异丙基丙烯酰胺与 PEI25k 的物质的量比为 88 : 1、175 : 1 和 350 : 1,称取 N-异丙基丙烯酰胺加入上述聚乙烯亚胺的氯仿溶液中,50 $^{\circ}$ C 反应 4 天;

[0034] (3) 反应结束后,将反应液旋干,得到的粗产物溶于去离子水中,于截留分子量为 3,500 的透析袋中对去离子水透析 3 天,G4 砂芯漏斗过滤,冻干,分别得到 N-异丙基丙烯酰胺修饰的聚乙烯亚胺 PEN88、PEN175 和 PEN350,详见表 1。

[0035] 表 1:用 N-异丙基丙烯酰胺修饰的聚乙烯亚胺的制备

[0036]

产物编号	NIPA : PEI25k (mol)	PEI25k 浓度 (g/ml)	产物中 NIPA 数
PEN88	88 : 1	0.3	79.8
PEN175	175 : 1	0.15	128.6
PEN350	350 : 1	0.05	131.1

[0037] 实施例 2:用丙烯酰胺(简称 AA)修饰的聚乙烯亚胺的制备

[0038] (1) 分别称取 15g 超支化的重均分子量为 25K 的聚乙烯亚胺(简称 PEI25k),按照表 2 分别溶于氯仿中,注入到反应器内;

[0039] (2) 然后,分别按照表 2 的丙烯酰胺与 PEI25k 的物质的量比为 100 : 1、200 : 1 和 400 : 1,称取丙烯酰胺加入上述聚乙烯亚胺的氯仿溶液中,50 $^{\circ}$ C 反应 4 天;

[0040] (3) 反应结束后,将反应液旋干,得到的粗产物溶于去离子水中,于截留分子量为 3,500 的透析袋中对去离子水透析 3 天, G4 砂芯漏斗过滤,冻干,分别得到丙烯酰胺修饰的聚乙烯亚胺 PEA88、PEA175 和 PEA350,详见表 2。

[0041] 表 2 :用丙烯酰胺修饰的聚乙烯亚胺的制备

[0042]

产物编号	AA : PEI25k (mol)	PEI25k 浓度 (g/ml)	产物中 AA 数
PEA100	100 : 1	0.3	129.0
PEA200	200 : 1	0.15	190.4
PEA400	400 : 1	0.05	366.0

[0043] 实施例 3 :目标产物介导荧光素酶质粒对人宫颈癌细胞 (HeLa 细胞) 的体外转染

[0044] 1、HeLa 细胞的培养

[0045] 取 HeLa 细胞置于含体积分数为 10% 胎牛血清的培养液中,在 37°C 含体积分数为 5% 二氧化碳的孵箱中连续培养;

[0046] 2、体外转染

[0047] 转染前 24 小时内,取对数生长期 HeLa 细胞,胰酶消化后用 DMEM 稀释,按每孔 1×10^4 细胞的密度接种于 96 孔培养板,置于体积分数为 5% CO_2 、37°C 孵箱中继续培养至汇合度到达 80 ~ 90%。转染时,吸弃前一天加注的细胞培养板中的培养液,更换 200 μl / 孔含有体积分数 10% 胎牛血清的新鲜 DMEM 培养液,再选用荧光素酶质粒 (pGL3) 分别加入实施例 1-2 得到的各种目标产物与 pGL3 及 PEI25k/pGL3 的复合物颗粒进行转染对比,继续培养 48 小时;

[0048] 3、体外转染效率的测定

[0049] 取出培养板,吸弃培养液,磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次,加入细胞裂解液裂解,然后加入荧光素酶底物,使用照度计测定转染效率,表示为每毫克蛋白的发光单元数 (RLU/mg Protein),测试结果见图 1。

[0050] 实施例 4 :目标产物的细胞毒性测试

[0051] 1、HeLa 细胞的培养

[0052] 取 HeLa 细胞置于含体积分数为 10% 胎牛血清的培养液中,在 37°C 含体积分数为 5% 二氧化碳的孵箱中连续培养;

[0053] 2、毒性测试

[0054] 采用 MTT 的方法比较评价实施例 1-2 得到的各种目标产物和 PEI25k 的材料细胞毒性。实验前 24 小时内,取对数生长期的 HeLa 细胞,胰酶消化后用 DMEM 稀释,按每孔 1×10^4 细胞的密度接种于 96 孔培养板,置于 37°C 含体积分数为 5% 二氧化碳的孵箱中继续培养至汇合度达到 80 ~ 90%。将不同浓度的材料与细胞共同培养 24 小时后,每孔分别加入 20 μl 含质量分数为 0.5% MTT 的 PBS 溶液。混合物在 37°C 继续作用 4 小时,加入 200 μl 二甲亚砜溶解 MTT 甲臞结晶 10 分钟。然后用酶标仪测试每孔的吸收,测试波长选用 492nm。细

胞存活率按下公式计算：

$$[0055] \quad \text{细胞存活率}(\%) = (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

[0056] A_{sample} 是转染后的细胞样品孔的吸收, A_{control} 是不与复合物溶液作用的细胞样品孔的吸收, 每组实验重复三次, 测试结果见图 2。

[0057] 实施例 5 :PEN175 介导的体内转染实验

[0058] 取 5 周的巴比赛裸鼠, 在腹侧皮下接种人宫颈癌上皮细胞的细胞株, 待肿瘤直径长至 0.4cm 后, 随机分为两组, 每组 6 只, 分别在瘤内注射含 $5 \mu\text{g}$ 荧光酶质粒 (pGL3) 的 PEN175/pGL3 与 PEI25K/pGL3 复合物颗粒溶液 $100 \mu\text{l}$ 。第二天重复注射一次, 注射后 48 小时, 用精诺真活体成像仪观测体内转染效果。在进行活体成像观察之前, 将小鼠麻醉。麻醉 5 分钟后, 向小鼠体内注入 $200 \mu\text{l}$ 荧光素酶底物。10 分钟后, 用活体成像系统观察体内转染效果。

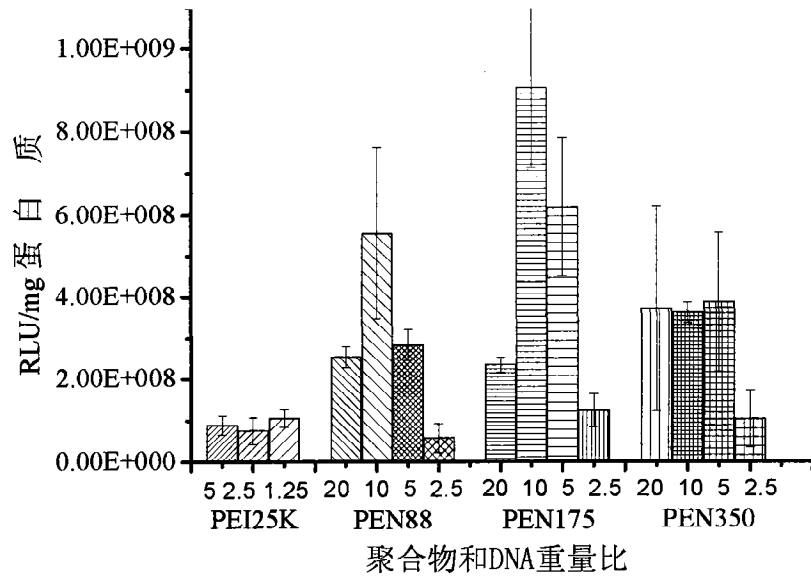


图 1

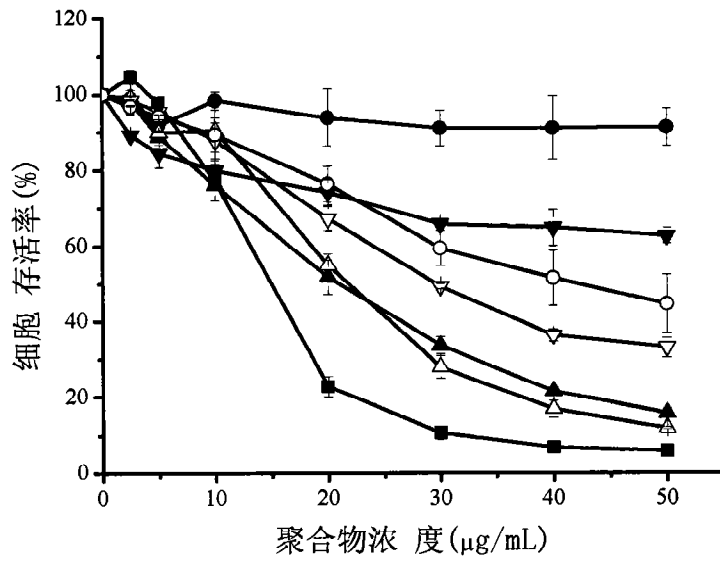


图 2