



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103031337 A

(43) 申请公布日 2013.04.10

(21) 申请号 201210367447.3

(22) 申请日 2012.09.28

(71) 申请人 北京吉利奥生物科技发展有限公司

地址 100101 北京市朝阳区安翔北里甲 11
号院北京创业大厦 B 座 348 室

(72) 发明人 殷勤伟 黄兵

(51) Int. Cl.

C12N 15/87 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

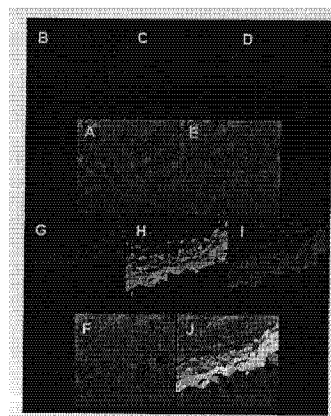
权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种小核酸分子快递技术

(57) 摘要

本发明提出了一种小核酸分子快递技术,利用多肽类转染剂将碱基数为 10~100 的单链或双链小分子核酸或脱氧核酸转染进入细胞,可以有效将小分子核酸或经过化学修饰的小分子核酸转染进入悬浮的和贴壁的细胞,解决了现有技术中基因治疗药物导入技术瓶颈的问题。



1. 一种小核酸分子快递技术,其特征在于:利用多肽类转染剂将碱基数为 10 ~ 100 的小分子核酸 / 脱氧核酸或经过化学修饰的小分子核酸转染进入细胞。

2. 如权利要求 1 所述的一种小核酸分子快递技术,其特征在于:所述多肽类转染剂与碱基数为 10 ~ 100 的单链或双链小分子 RNA/DNA 或经过化学修饰的单链或双链小分子 RNA/DNA 的质量比只为 0.02 ~ 200g 多肽 /g 核酸。

3. 如权利要求 1 所述的一种小核酸分子快递技术,其特征在于:所述多肽类转染剂包括 10 ~ 50 个氨基酸残基;所述多肽类转染剂的转染多肽含有带正电荷的氨基酸,所述正电荷氨基酸数目占多肽氨基酸数目的 20% ~ 80%;所述正电荷氨基酸连续分布的数目为 4 ~ 20;

所述多肽类转染剂的转染多肽为如下的 9 组多肽的序列中的一种或任意几种:

多肽 1 :R2GSTDR1KRRRRRR3RRRR ;

多肽 2 :AR3QAIR1IR2FQNKRRKKRKKK ;

多肽 3 :RRRRRRRSPLMVR1GGR2GGLK ;

多肽 4 :R2GDY1KRRRRRRRR ;

多肽 5 :ACSR1SPSR2HCGRRRRRRR ;

多肽 6 :AWGSR2GWSPKY1RRRRRR ;

多肽 7 :PPLSSSTTGGGY2GGGY1HRRRKRKRRRK ;

多肽 8 :RRRRRRRGAR2GDY1KRRRRRRRR ;

多肽 9 :AGY2LMSTLY1RRRRRKRKR ;其中 R1, R2, R3 为 20 个天然氨基酸或其 D- 型氨基酸中的任何一个。

4. 如权利要求 3 所述的一种小核酸分子快递技术,其特征在于:所述氨基酸残基为 D 型氨基酸和经过化学修饰的氨基酸;其中,所述化学修饰包括 N- 端修饰、C- 端修饰以及侧链修饰。

5. 如权利要求 4 所述的一种小核酸分子快递技术,其特征在于:所述修饰剂为胆固醇、胆固烷醇、植物固醇、植物固烷醇、荧光分子标记、PEG 或 PEI。

一种小核酸分子快递技术

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是指一种小核酸分子快递技术。

背景技术

[0002] 基因治疗是一种近年来发展起来的新型治疗技术。由于基因治疗的靶点明确,该技术在治疗重大疾病(如恶性肿瘤,糖尿病,病毒性肝炎等)方面显示出专一、高效的优势,近年来发展起来的小 RNA 干扰技术为基因治疗又提供了一种新的技术方法,基因治疗技术从实验室研究走向临床应用的技术瓶颈之一是核酸的导入技术,核酸的转移效率对于矫正在许多疾病中涉及的核酸表达的缺乏和过量是必要的,核酸转移还可以用于研究基因的表达调控和功能评估和鉴定,以及干细胞的自我更新和定向分化的分子基础的解析和应用,如今,人们提出了许多方法来进行此类遗传信息的细胞内释放,大体上可以分为病毒载体介导的和非病毒介导的核酸导入技术这两大类,尽管病毒载体在外源核酸的导入效率方面有着显著的成效,但是由于它们常常具有免疫源性,细胞毒性和生物危险性,尤其是临床研究中出现的腺病毒载体导致的癌症,病毒载体的这种长期毒性对通过病毒载体转导核酸药物的临床治疗产生了相当大的负面影响。另外一类的核酸转染技术是使用化学的或生化的载体。这些合成的载体具有两个主要功能:与要转染的核酸复合和促进其稳定性增加以及促进它穿过原生质膜。在开发的合成载体中聚赖氨酸类的阳离子聚合物和 DEAE 葡聚糖或脂转染剂,聚乙烯亚胺转染剂都是被广泛使用的。

[0003] 不同的合成多聚体导入核酸药物的作用机制细节各不相同,但它们也存在着一些共同特点,这些特点是基于核酸分子本身带负电,而细胞膜本身也带负电,核酸分子被导入到细胞内的过程中必须克服核酸分子与细胞表面的负电荷产生的静电斥力,所以目前已经广泛用于实验室研究的各种核酸转染剂都富含阳离子基团以中和核酸以及细胞表面的负电荷,最简单的转染剂就是磷酸钙,其它的如阳离子脂质体,阳离子聚合-L-赖氨酸以及聚乙烯亚胺等,然而由于上述有机聚合物的细胞毒性,转染剂造成的核酸药物的脱靶效应,限制了它们在基因治疗中的广泛应用,同时上述转染剂的转染效率不够高也限制了它们在基因治疗中的广泛使用,基因治疗的药物导入技术仍然是当前的技术瓶颈,寻找新的高效低毒以及组织专一的核酸转染方法仍然是当前的一个非常重要的课题。

发明内容

[0004] 本发明提出小核酸分子快递技术,解决了现有技术中基因治疗的药物导入技术瓶颈的问题。

[0005] 本发明的技术方案是这样实现的:一种小核酸分子快递技术,利用多肽类转染剂将碱基数为 10 ~ 100 的小分子核酸/脱氧核酸或经过化学修饰的小分子核酸转染进入细胞。

[0006] 作为优选的技术方案,所述多肽类转染剂与碱基数为 10 ~ 100 的单链或双链的小 RNA/DNA 或经过化学修饰的单链或双链的小 RNA/DNA 的质量比只为 0.02 ~ 200g 多肽/g 核

酸。

[0007] 作为优选的技术方案,所述多肽类转染剂包括 10 ~ 50 个氨基酸残基;所述多肽类转染剂的转染多肽含有带正电荷的氨基酸,所述正电荷氨基酸数目占多肽氨基酸数目的 20% ~ 80%;所述连续分布的数目为 4 ~ 20;所述正电荷氨基酸如赖氨酸、精氨酸;这些带阳性电荷的氨基酸序列的作用被认为是和核酸分子通过静电作用形成复合物的结构单元,如多肽-核酸复合物在精氨酸的正电荷作用下与细胞表面的负电荷作用,指导多肽/核酸复合物在细胞的表面结合形成复合物;

[0008] 所述多肽类转染剂的转染多肽为如下的 9 组多肽的序列中的一种或任意几种:

[0009] 多肽 1 :R2GSTDR1KRRRRRR3RRRR ;

[0010] 多肽 2 :AR3QAIR1IR2FQNKRRKRRKKK ;

[0011] 多肽 3 :RRRRRRRSPLMVR1GGR2GGLK ;

[0012] 多肽 4 :R2GDY1KRRRRRRRR ;

[0013] 多肽 5 :ACSR1SPSR2HCGRRRRRRR ;

[0014] 多肽 6 :AWGSR2GWSPKY1RRRRRR ;

[0015] 多肽 7 :PPLSSSTTGGGY2GGGY1HRRRKRKRRR ;

[0016] 多肽 8 :RRRRRRRGAR2GDY1KRRRRRRRR ;

[0017] 多肽 9 :AGY2LMSTLY1RRRRRKRKR ;其中 R1, R2, R3 为 20 个天然氨基酸或其 D-型氨基酸中的任何一个,D-型氨基酸取代天然氨基酸的好处是所得多肽对蛋白水解酶的耐受能力更强。

[0018] 作为优选的技术方案,所述氨基酸残基为 D 型氨基酸和经过化学修饰的氨基酸;其中,所述化学修饰包括 N-端修饰、C-端修饰以及侧链修饰。

[0019] 作为优选的技术方案,所述修饰剂为胆固醇、胆固烷醇、植物固醇、植物固烷醇、荧光分子标记、PEG 或 PEI。

[0020] 多肽的其它部分主要由非电荷氨基酸组成,提高多肽对细胞膜的穿透能力。疏水区域中增加疏水性氨基酸,尤其是色氨酸,酪氨酸,苯丙氨酸有助于提高多肽对核酸分子的转染能力。多个连续的非电荷氨基酸区域,如多个丝氨酸的存在也有助于提高多肽对核酸的转染能力;一些多肽中具有细胞膜受体的配体序列如;RGS 序列有助于多肽和细胞膜上的整合素 α III 结合,有助于提高核酸复合物在富含整合素 α III 的细胞,如 HeLa 细胞中的转染效率,在一段连续的带阳性电荷的氨基酸(如精氨酸和赖氨酸)序列的第 2 或 / 和第 3 位将带阳性电荷的氨基酸置换为丝氨酸可使复合物进入细胞浆后易于释放核酸分子,从而使得核酸分子能够寻找其作用位点,发挥其生物功能,此外,由于细胞内含有蛋白酶,蛋白酶对多肽的水解作用能够进一步帮助核酸分子从多肽-核酸分子复合物中的释放,为了保证合成的多肽具有良好的水溶性,在多肽的非正电荷氨基酸区域内也适当设计少量的带电荷氨基酸。

[0021] 多肽的修饰还包括 PEG 修饰,类固醇类修饰,硬脂酸基,月桂酸基,聚乙烯亚胺修饰,甜菜碱修饰。修饰的位置包括除赖氨酸/精氨酸簇之外的任何部位,包括 N-端修饰,C-端修饰,巯基修饰等。

[0022] 这种多肽类转染剂可用于小 RNA/DNA 的细胞导入,从而可于临床的基因治疗和细胞治疗。

[0023] 表 1 列出了符合本发明保护权项的具有核酸转染功能的小肽的序列。这些序列仅仅是为了便于说明本发明的具有高效转染核酸分子的多肽转染剂的结构特点,而不仅仅局限于表 1 所列举的多肽,如改变阳性氨基酸的数目和排列组合可形成数千计的序列

[0024]

序号	多肽的序列
1	X ₁ GSTD ₁ KXXXXXXXX ₁
2	AX ₁ QAIXIXFQNKKKKKKKK
3	X1XXXXXXXXSPLMVX ₁ GGXGGLK
4	X ₁ GDX ₁ KXXXXXXXX
5	ACSX ₁ SPSX ₁ HCGXXXXXXXX
6	AWGSX ₁ GWSPKYXXXXXXXX
7	PPLSSSTGGGYGGYHXXXXXXXXK
8	X ₁ XXXXXXXXGAXGDYXXXXXXXX
9	AGYLMSTLYXXXXXXXXKX
10	X ₁ GDYXXXXXXXX-FITC
11	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPXXXXXXXXK
12	GALFLGFLGAAGSTMGAWPXXXXXXK
13	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKXXXXKSKX
14	KXXXXXXGDCDGXXXXXXKXXXXXXGDCGXXX
15	GALFLGFLGAAGSTMGAGKXXXXXXV
16	GALFLGFLGAAGSTMGAGKXXXXXXXXS
17	KETWWETWWTEWSQPXXXXXXXX
18	KWFETWFTEWPKSXXXXXXXXKSK
19	KETWFETWFTEWSQPXXXXXXXXKX
20	KWFETWFTEWSQPXXXXXXK

21	KWFETWFTEWPKXKXKXKX
22	KWFETWFTEWPXSXXXXXX
23	KWFETWFTEWPKKXKXKXKX
24	YAXAAAXQAXAXXXXXXX
25	PLSSIFSXIGDPKSKXKXKXKX
26	GCXKXKXQXXXXKWPXSXXXXCA
27	XQIKIWFQNXMKWKXKXKX
28	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKXKXKXKX
29	ACSSSPSKHCGGKXKXKXKX
30	ACSSSPSKHCGGKSKXKXKXKX
31	ACSSSPSKHCGGXSXKXKXKX
32	ACSSSPSKHCGGKXKXKXKX
33	WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEAXSXXXXX
34	YTIWMPENXPXGTPCDIFTNSXGKXASNGKSKXKXKXKX
35	YTIWMPENXPXGTPCDIFTNSXGKXASNGGKSKXKXKXKX
36	KFTIVFPHNQGNWKNVPSNYHYCPXXXXXXX
37	KFTIVFPHNQGNWKNVPSNYHYCPKXKXKXKXKX
38	GLFEALLELLESLWELLLLLEAXXXXXXX
39	LIXLWSHLIHIWFQNXKXKXKXKX
40	AGYLLGKINLKALAALAKKILXXXXXX
41	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKXXXXXX
42	YAXAAAXQAXAXSXXXXXK
43	YAXAAAXQAXAXXXXXSXK
44	LLTILXXXXIXKQAHHSKXKX

45	MVXXFLVTLXIXXACGPPXVXVXXX
46	LTXLWSHLTHIWFQNXKWKKKXXX
47	TPWWXLWTKWHHKXXDLPXKPEKXXX
48	GLWXALWLLXSLWLLWXAXXKXK
49	DSHAKXHHGYKXKFHEKHSHXGYXXX
50	GCG (AXKKAAXXCA) 3
51	MANLGYWLLALFVTMWDVGLCKKXPKPKKXXX
52	ALWKTLLKKVLKAPKKKXK-amide
53	PKKKXKVALWKTLLKKVLKA-amide

[0025]

[0026] 表 1

[0027] 其中, R1 可以是 20 种天然氨基酸中的任何一种, 也可以是相应的 D- 型氨基酸。

[0028] 多肽转染核酸的方法与脂质体、PEI 类转染剂相似。但用本转染剂能够使多种细胞 (包括原代的干细胞、悬浮的血细胞和贴壁的肿瘤细胞) 获得高的转染效率并表现出低的毒性。所转染的核酸分子能够在细胞中发挥功能, 另外本发明可以用于核酸分子的组织转染如皮肤和其它组织。

[0029] 本发明中的核酸分子应当理解为单链或双链的脱氧核糖核酸和核糖核酸。可能涉及天然或人工序列, 具体地如基因组、互补 DNA (cDNA)、信使 mRNA、转移 RNA (tRNA)、核糖体 RNA (rRNA) 的序列, 杂合序列或合成、半合成的序列, 修饰或未修饰的寡核苷酸如 miRNA, siRNA, piRNA, shRNA 和反义核苷酸。这些核酸可以来自人、动物、植物、细菌、病毒等。它们可以采用本领域技术人员已知的任何技术得到, 它们可以用化学方法修饰。

[0030] 按照本发明所制备的多肽转染剂对细胞的毒性极低, 在最佳转染剂量范围如多肽 / 核酸比例为 10 : 1 到 30 : 1; 在次最佳转染剂量范围如多肽 / 核酸比列为 1 : 1 到 60 : 1; 在一般转染剂量范围如多肽 / 核酸比列为 0.1 : 1 到 90 : 1; 多肽转染剂对细胞的增殖都没有可观察到的细胞毒性。

[0031] 由于采用了上述技术方案, 一种小核酸分子快速技术, 利用多肽类转染剂将碱基数为 10 ~ 100 的小分子核酸或经过化学修饰的小分子核酸高效地转染进入悬浮的或贴壁的细胞, 可以有效将小分子核酸或经过化学修饰的小分子核酸转染进入细胞, 解决了现有技术中基因治疗的药物导入技术瓶颈的问题。

[0032] 下面结合具体实例进一步说明本发明 :

[0033] 实例 1 : 转染多肽的合成

[0034] 所有的多肽均采用 Milipore 公司的 9050 固相多肽合成仪, 用 AEDI-expansin 树脂为固定相进行合成的。树脂用二异丙基乙胺活化, 转染肽 C 端第一氨基酸的氨基用叔丁

氧保护后,以二异丙基碳二亚胺为缩合剂,羧基即以共价键结合到树脂上。用无水三氟醋酸解离氨基酸保护基团后,多肽 C-端第二个氨基酸重复上述步骤循环合成,使肽链按照上述转染肽的氨基酸序列顺序延伸合成多肽。多肽合成到最后一步时,把树脂悬浮在无水三氟乙酸中,通入干燥的 HBr,使多肽从树脂上解离下来,同时一些保护基团也被除去,得到的产物即为转染肽粗品。多肽粗品用半制备高效液相色谱进行纯化,结构验证用电喷雾质谱进行质荷比分析,如对多肽 10 (R1 = F) 的质荷比为 444.7 (M5+/5)。

[0035] 实例 2:用多肽转染荧光标记的单链 DNA 进入贴壁肿瘤细胞中

[0036] 将转染多肽 4 (R1 = F, R2 = R) 用无菌水配成 10mg/ml 的储存液,将合成的 3' 用 TAMRA 标记的红色荧光标记的单链

[0037] DNA (5' -GTTCCGAGGTTGTTGTTGAAG-3') 配置成 400g/ml 储存液。取 11 多肽和 11 核酸加入到含 100 1 无血清培养基中震荡混合后,37℃ 孵育 30 分钟。

[0038] 另取 24 孔细胞培养板,于 12 小时前,每孔接种前列腺癌肿瘤细胞 Du145 (购自 ATCC,美国) 20 万,使细胞分散均匀。经 12 小时的培养 (培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,培养条件为 37℃,5% 二氧化碳) 后,换成新鲜的无血清培养基 5001,再将孵育 30 分钟后的多肽-核酸培养基均匀的滴加到 24 孔培养板的一个培养孔中,轻轻震荡培养板 5-10 下,将细胞放回细胞培养箱中继续培养 6 小时。这时更换新的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,继续培养细胞 12 小时。

[0039] 将转染后 18 小时的 Du145 细胞培养板在倒置荧光显微镜 (奥林帕斯 IX-71, OLYMPUS, 日本) 下观察,用绿色光激发,在红色光通道中观察荧光 RNA (如图 1 所示),作为阴性对照,在只加入荧光标记的小 RNA 的细胞培养孔中,几乎观察不到标记的核酸分子,表明单独的核酸分子不能进入到细胞中,而在转染多肽的作用下,可以观察到大量的红色荧光斑点,这些斑点均位于细胞内,表明多肽转染剂能够将核酸分子转染到贴壁细胞中。

[0040] 多肽对小核酸分子的这种转染作用具有明显的量效关系。图 2 显示了不同剂量的混合转染多肽 P1-4x 转染针对 GSK 基因的绿色荧光标记的双链核酸 siRNA (正义链:5' -FAM-GCAUUUAUCGUUAACCUAAdTdT-3'; 反义链序列为 5' -UUAGGUUAACGAUAAAUGCdTdT-3' (上海吉玛制药技术有限公司合成) 进入肺腺癌细胞株 A549 的转染程度的变化。在 24 孔细胞培养板中接种细胞 50000 个,过夜后用不含血清的 DMEM 培养基给细胞换液三次。另取无 RNA 酶的样品管,每管中加入 50 微升的 DMEM 无血清培养基,再加入 400ng 的 GSK siRNA,在另外的装有同样 DMEM 培养基的样品管中分别加入 3ug,6ug,12ug,24ug 的混合多肽,将上述样品震荡混匀后,把装有多肽的培养基分别转入到含 siRNA 的培养基中,震荡混合并在 37℃ 保温 20 分钟,形成多肽计量依次为 3,6,12,24ug 的多肽、RNA 转染混合物。将上述转染混合物分别均匀滴加到细胞培养孔中,无血清培养 5h 后,加入含胎牛血清的 DMEM 培养基,使培养孔内的血清终浓度为 5%。细胞培养过夜后,在荧光显微镜下观察细胞内的绿色荧光发光情况,可以看到在最低剂量 (3ug/孔) 的条件下,A549 细胞只有极少数的被转染,发出淡绿色的荧光,随着转染多肽剂量的升高,被转染的细胞数明显增加,被转染的标记荧光强度也显著增强,说明增加转染多肽的量能够提高多肽对细胞的转染能力。在多肽剂量为 24ug 时,对细胞的转染能力达到约 80% 以上,而对细胞的生长没有可察的抑制作用,显示出多肽对小核酸的良好转染能力。

[0041] 实例 3:多肽转染剂能将化学修饰的双链 RNA 核酸分子转入到悬浮细胞中

[0042] 将转染多肽 5(R1 = S) 用无菌水配成 10mg/ml 的储存液, 将合成的绿色荧光标记的双链小 RNA

[0043] (正义链:

[0044] 5' -AUCCUCCCACCUCAGCCUCCCAAGUAGCUGGGACUACAGG-3'; 反义链序列为

[0045] 5' -CCUGUAGUCCCAGCUACUUGGGAGGCUGAGGUGGGAGGAU-3', 在核酸分子的 5' 端用绿色荧光分子 FAM 共价标记, 委托上海吉玛制药技术有限公司合成) 配置成 400g/ml 储存液。取 11 多肽和 11 核酸加入到含 100l 无血清培养基中震荡混合后, 37°C 孵育 30 分钟。

[0046] 将 K562 细胞 (购自 ATCC, 美国) 接种到 24 孔细胞培养板中, 每孔的接种数为 5 万个。将孵育好的多肽-核酸复合物滴加到含 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养基中, 震动使之均匀。20 小时后在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光的分布如图 3 所示。可以看到在不加多肽转染剂的条件下, 荧光 RNA 不能进入细胞中, 加入多肽转染剂后, 细胞发出绿色荧光。指示荧光小 RNA 已经被导入到细胞中。

[0047] 实例 4, 用多肽转染剂转染活性 siRNA 能有效沉默其靶基因

[0048] 将转染多肽 5(R1 = K) 用无菌水配成 10mg/ml 的储存液, 将合成的绿色荧光标记的针对人 GSK 基因的双链 siRNA

[0049] (正义链: 5' -FAM-GCAUUUAUCGUUAAACCUAAdTdT-3'; 反义链序列为 5' -UUAGGUUAAACGAUAAAUGCdTdT-3' (委托上海吉玛制药技术有限公司合成) 配置成 400g/ml 储存液。取 11 多肽和 11 核酸加入到含 100l 无血清培养基中震荡混合后, 37°C 孵育 30 分钟。将 HeLa 细胞 (购自 ATCC) 接种到 24 孔细胞培养板中, 每孔的接种数为 5 万个, 过夜培养后, 换成无血清培养基。将孵育好的多肽-核酸复合物滴加到不含血清的 DMEM 细胞培养基中, 震动使之均匀。无血清培养 5 小时后, 换成含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 培养过夜。同时用阴性对照的双链 siRNA

[0050] (正义链: 5' -UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 反义链: 5' -ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3') 作平行对照。

[0051] 细胞用 Invitrogen 公司的 Trizol 1ml 按照试剂使用的说明书提取总 RNA, 总 RNA 的 OD260/OD280 高于 1.8, 取 2ug 的总 RNA, 用 Promega 公司的逆转录试剂盒, 按照说明书的操作条件进行逆转录, 转录反应进行 50min 后, 转录样品 95°C 5min 灭活样品中的酶。PCR 反应采用天根生物技术公司的定量 PCR 预混液 (含 PCR 荧光探针分子 SYBR Green I) 按照产品说明书的操作进行, 在 20ul 的反应体系中加入 10ul 的预混液, 1ul 的 RNA 逆转录产物, 正向及反向 PCR 引物

[0052] (5' -AATTACGGGACCCAAATGTC-3'; 5' -TCCACCTCTGGCTACCATCC-3')

[0053] 各 1ul, 7ul 无菌水混合均匀, 并以 -Actin (引物 5' -agcgagcatccccaaagt-3' 和 5' -gggcacgaaggctcatt-3') 基因为对照, 进行定量 PCR 扩增。实验中每一模板设 3 组平行样品。扩增程序为 95°C 10min, 然后进行 PCR 循环 40 次 (60°C 15s, 72°C 30s, 95°C 20s) 停止反应, 反应曲线经归一化处理, 获得荧光信号强度出现 5% 时的 PCR 反应循环数 Ct 值, 见表 3

[0054] 表 3: 定量 PCR 阈值时的反应循环数 Ct 值

[0055]

	β -Actin	GSK
对照组	20.85	28.87
GSK 沉默组	20.53	30.49

[0056] 计算按照扩增效率 100% 计算其模板的量, 计算得到用多肽转染的针对 GSK 基因的 siRNA

[0057] 能够沉默 GSK 的表达, 沉默效率为 75%, 这一沉默效率和文献报道的结果接近, 说明本发明所保护的多肽序列具有将功能性小核酸导入到细胞内并发挥功能的作用。

[0058] 实例 5: 多肽转染剂能通过皮肤进入组织细胞中

[0059] 将转染多肽 10 (R1 = R) 用无菌水配成 10mg/ml 的储存液, 将合成的红色荧光标记的小 RNA 配置成 400g/ml 储存液。取 50 μ l 多肽和 50 μ l 核酸加入到含 100 μ l 无血清培养基中震荡混合后, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 加入 10 μ l 甘油。

[0060] 将 8 周龄的雄性豚鼠 (购自中国医学科学院实验动物所) 用诗美佳速效脱毛膏 (生产商: 广州市南粤之花化妆品有限公司) 脱去豚鼠背部的毛发, 用温水洗净后, 取混合好的转染复合物 20 μ l, 涂抹在豚鼠皮肤表面, 面积为 1cm 2 , 1.5 小时后, 将豚鼠处死, 将皮肤剥离后, 沿表皮的垂直切面做冷冻切片 (MEV 冷冻切片机, SLEE, 德国), 切片厚度为 5 μ m。切片在激光共聚焦显微镜 (尼康, 日本) 下观察, 如图 4。可以看到红色荧光标记的小 RNA (图 4-I) 和绿色荧光标记多肽 10 (图 4-H) 能够进入皮层细胞中, 红光和绿光同时被激发发出黄色光 (图 4-J), 进一步验证了单链 DNA 分子是通过多肽的转染作用进入豚鼠皮的。相反在对照组中只给单链 DNA 而不给多肽时, DNA 不能透过豚鼠皮 (图 4-A-E)。

[0061] 实例 6: 多肽转染剂对细胞的增殖没有明显的抑制作用

[0062] MTT 法是用来表征药物对细胞增殖影响的一种有效方法, 在抗癌药物的研究中应用很广。我们通过 MTT 法表征了多肽转染剂对肿瘤细胞的细胞毒作用。细胞在给药的前一天接种, 接种量为 5000 个 / 孔, 细胞给不同剂量的转染多肽后在 5% CO $_2$ 培养箱中培养 48 小时。按照文献的方法每孔加入 20 μ l 15mg/ml 的 MTT 无菌溶液后继续再培养箱中培养 4 小时后终止培养。小心吸取孔内的培养液, 弃取上清液并加入 150 μ l 二甲基亚砜 (Sigma, 美国), 震荡 10min, 使结晶紫溶解, 在酶联免疫检测仪上, 490nm 测定各孔光吸收值。图 5A 和图 5B 给出了多肽转染剂 2 在不同的多肽剂量下对前列腺癌 Du145 细胞株以及食管癌细胞株 CaES-17 的增殖影响, 并设定不加转染多肽的细胞样为 100%。图 5 的结果表明多肽转染剂对细胞无可以观察到的细胞毒性, 甚至对 DU145 细胞还有轻微的刺激生长作用。

附图说明

[0063] 图 1 为用多肽转染剂 P2 转染荧光标记的单链 DNA 的转染效果图, 其中, A) 只加入单链小 RNA, 并在白光下观察到的细胞图象; B) 在 A) 中的视野下, 用绿色荧光激发, 在红色荧光通道观察到的细胞图象; C) 加入单链小 RNA 和多肽转染剂, 并在白光下观察到的细胞图象; D) 在 C) 的视野下, 改用绿色荧光激发, 在红色荧光通道观察到的细胞图象;

[0064] 图 2 为多肽转染剂对小 RNA 转染细胞株 A549 的量效关系, 其中图 A, B, C 和 D 显示的是在相同的暴光条件下, 不同剂量的转染多肽转染细胞 A549 时的转染程度和转染效率。其中荧光标记的小 RNA 的剂量是每孔 400ng, 转染多肽的剂量依次为 3, 6, 12 和 24 μ g / 孔,

图 E, F, G 和 H 分别是细胞 A549 在 A, B, C 和 D 图对应条件下在白光下拍照所得的细胞形态图；

[0065] 图 3 为多肽 5 将染荧光双链 RNA 转染到人白血病细胞 K562 的转染效果, 其中, A) 加入双链小 RNA 和多肽转染剂后, 用蓝色荧光激发, 在绿色荧光通道观察到的细胞图象, B) 图 A) 中的细胞在同样视野下, 用白光下观察到的细胞图象；

[0066] 图 4 为多肽转染剂 P2 转运单链 DNA 透过豚鼠皮肤的激光共聚焦照片, 其中, A-E) 只给药单链 DNA ;F-J) 转染多肽和单链 DNA 混合后皮肤给药, A 和 F) 白光共聚焦的冰凍切片照片 ;B) 和 G) DAPI 染色的激发荧光照片, 蓝色斑点显示皮下细胞核的位置, C) 和 H) 为标记的多肽转染绿色荧光照片, 最外层连续的绿色区域对应豚鼠皮的表皮层, D) 和 I) 为标记的单链核酸红色荧光的照片, E) 和 J) 是蓝色荧光、绿色荧光和红色荧光的叠加图, 对应白色的区域, 指示真皮结构中细胞核的位置, 黄色区域对应标记多肽与标记核酸共同存在的区域, 这些区域包括无细胞结构的表皮层以及真皮层细胞的核外区域, 在上述各图中荧光呈像所用的各参数均相同；

[0067] 图 5 为不同浓度的转染多肽作用 48h 后对细胞株 Du145 和 CaES-17 的细胞毒作用图；其中细胞毒分析采用 MTT 法检测, 并以不给药的细胞样品在 490nm 处的吸光度为 100%。

具体实施方式

[0068] 下面将结合本发明实施例中的附图, 对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述, 显然, 所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例, 而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例, 本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例, 都属于本发明保护的范围。

[0069] 一种小核酸分子快递技术, 其特征在于: 利用多肽类转染剂将碱基数为 10 ~ 100 的小分子核酸或经过化学修饰的小分子核酸转染进入细胞。

[0070] 所述多肽类转染剂与碱基数为 10 ~ 100 的小分子核酸或经过化学修饰的小分子核酸的质量比只为 0.02 ~ 200g 多肽 /g 核酸。

[0071] 所述多肽类转染剂包括 10 ~ 50 个氨基酸残基 ;所述多肽类转染剂的转染多肽含有带正电荷的氨基酸, 所述正电荷氨基酸数目占多肽氨基酸数目的 20% ~ 80% ;所述正电荷氨基酸连续分布的数目为 4 ~ 20 ;

[0072] 所述多肽类转染剂的转染多肽为如下的 9 组多肽的序列中的一种或任意几种 :

[0073] 多肽 1 :R2GSTDR1KRRRRRR3RRRR ;

[0074] 多肽 2 :AR3QAIR1IR2FQNKRRKKRKKK ;

[0075] 多肽 3 :RRRRRRRSPLMVR1GGR2GGLK ;

[0076] 多肽 4 :R2GDY1KRRRRRRRR ;

[0077] 多肽 5 :ACSR1SPSR2HCGRRRRRRR ;

[0078] 多肽 6 :AWGSR2GWSPKY1RRRRRR ;

[0079] 多肽 7 :PPLSSSTTGGGY2GGGY1HRRRKRKRRR ;

[0080] 多肽 8 :RRRRRRRGAR2GDY1KRRRRRRRR ;

[0081] 多肽 9 :AGY2LMSTLY1RRRRRKRKR ;其中 R1, R2, R3 为 20 个天然氨基酸或其 D- 型氨

基酸中的任何一个。

[0082] 所述氨基酸残基为 D 型氨基酸和经过化学修饰的氨基酸；其中，所述化学修饰包括 N- 端修饰、C- 端修饰以及侧链修饰。

[0083] 所述修饰剂为胆固醇、胆固醇醇、植物固醇、植物固醇醇、荧光分子标记、PEG 或 PEI。

[0084] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

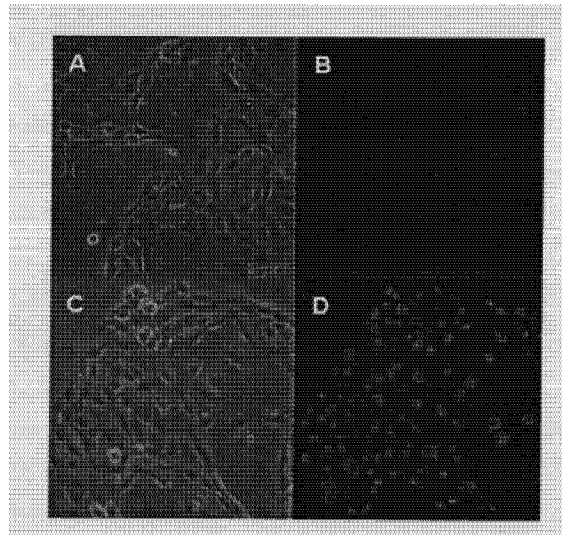


图 1

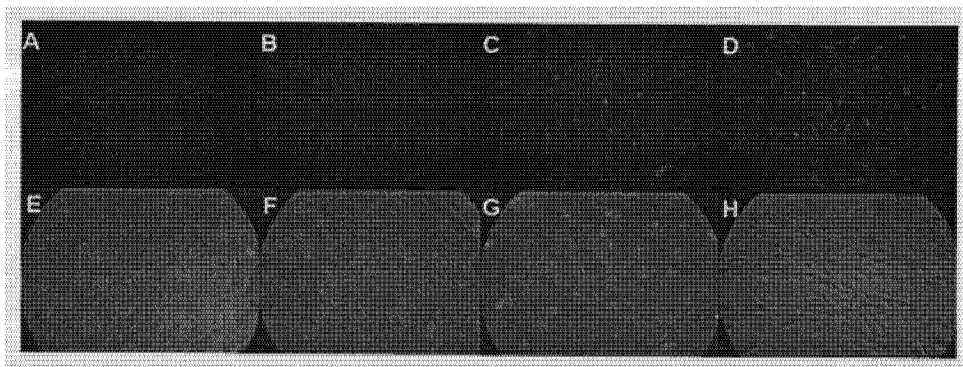


图 2

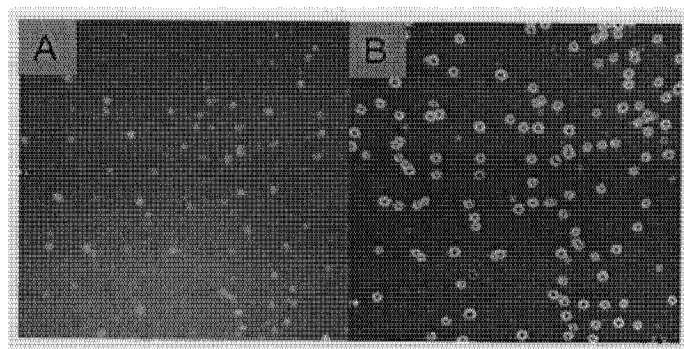


图 3

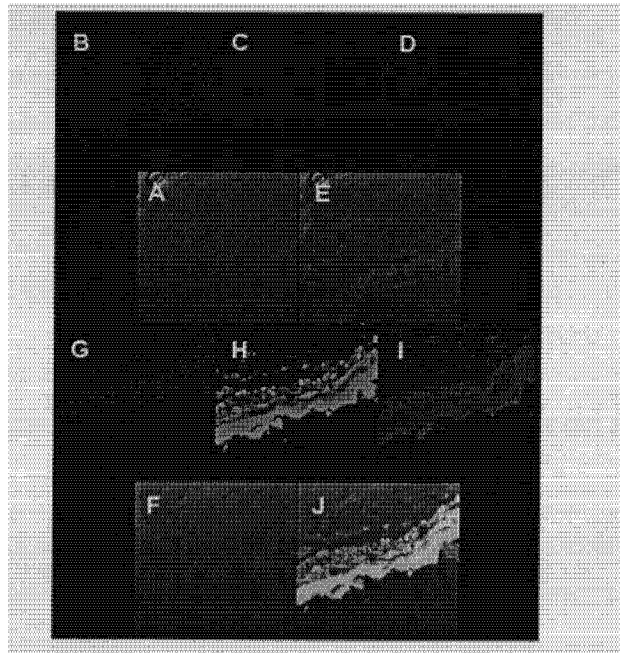


图 4

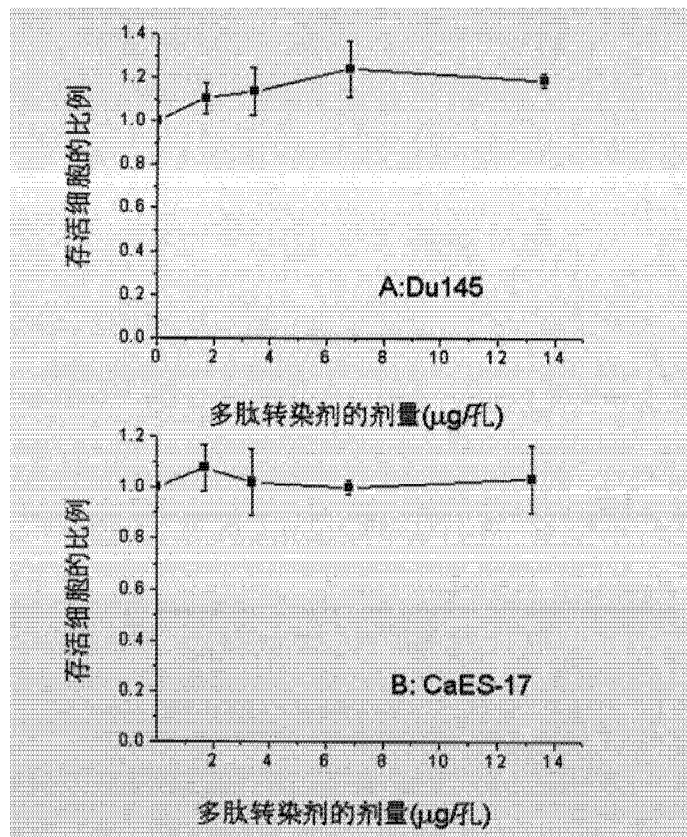


图 5