



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101716351 B

(45) 授权公告日 2012.04.11

(21) 申请号 200910241727.8

(22) 申请日 2009.12.08

(73) 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院  
野战输血研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

(72) 发明人 裴雪涛 李艳华 师伟 任祥亮  
吕洋 施双双 陈琳 南雪 岳文

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 鲁兵

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/455 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

审查员 樊颖

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一类吡啶化合物在制备 RNA 干扰增强剂中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一类吡啶化合物的新用途,即其在制备 NAR 干扰增强剂中的应用。实验证明,代号 HP01 的吡啶化合物作为一种新型医药中间体,能够有效的增强 RNA 干扰效率,是一类新型的 RNA 干扰增强剂。本发明将在 siRNA 的研究和开发中发挥重要作用,应用前景广阔。

1. 2- 甲氨基 -3- 羧酸吡啶在制备 RNA 干涉增强剂中的应用。
2. 一种 RNA 干涉组合物,其特征在於:是将权利要求 1 所述化合物 2- 甲氨基 -3- 羧酸吡啶 8-12mM 加入 0.5ml RNA 干涉体系中。
3. 根据权利要求 2 所述的 RNA 干涉组合物,其特征在於:所述 RNA 干涉体系包括转染有 RNA 干涉片段的细胞,含有 10%血清的 Opti-MEM I Reduced Serum Medium 500  $\mu$  l。
4. 根据权利要求 2 所述的 RNA 干涉组合物,其特征在於:所述 RNA 干涉体系包括转染有 RNA 干涉片段的细胞及完全培养基 500  $\mu$  l。

## 一类吡啶化合物在制备 RNA 干扰增强剂中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,涉及一类化合物的新用途,特别是涉及一类吡啶化合物(代号 HP01)在制备 RNA 干扰效率增强剂中的应用。

### 背景技术

[0002] 1990 年,为加深矮牵牛花的紫色, Jorgensen 等导入了一个强启动子控制的色素基因,可是结果与预期相反,许多花瓣颜色并未加深,反而呈杂色甚至白色,这是由于转基因和同源内源基因的表达都被抑制了, Jorgensen 把这个现象命名为共抑制 (cosuppression) (Jorgensen 等, Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs antisense constructs and single-copy vs complex T-DNA sequences, *Plant Mol Biol*, 1996, 31(5):957-973)。

[0003] 1995 年,康乃尔大学的 Su Guo 在利用反义 RNA 技术特异性地抑制秀丽新小杆线虫 (*C. elegans*) 中的 par-1 基因的表达时,意外发现对照实验中给线虫注射正义 RNA (sense RNA) 也能抑制 par-1 基因的表达 (Su Guo 等, Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed, *Cell*, 1995, 81(4):611-620)。该研究小组一直未能给出合理解释。直到 1998 年 2 月, Andrew Fire 和 Craig Mello 才首次揭开这个悬疑。Su Guo 遇到的正义 RNA 抑制基因表达的现象,是由于体外转录所得 RNA 中污染了微量双链 RNA 而引起,当他们将体外转录得到的单链 RNA 纯化后注射线虫,基因抑制效应变得十分微弱,而经过纯化的双链 RNA 却正好相反,能够高效特异性阻断相应基因的表达。该小组将这一现象称为 RNA 干扰 (RNA interference 简称 RNAi)。RNAi 的研究有着非常重要的意义,它可能被应用在功能基因组研究、作物的品种改良、基因治疗及其它的很多领域里。RNAi 作为一种调控特定基因表达的手段,被称为基因组的免疫现象,已成为当前生物医学领域的研究热点之一。

[0004] RNAi 在哺乳动物中的应用

[0005] 哺乳动物中导入 dsRNA 将引起严重的细胞毒性反应。Elbashir 等用人工合成的 21ntRNA 双链在体外培养的人胚肾 293 细胞及 HeLa 细胞取得成功 (Elbashir 等, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in mammalian cell culture, *Nature*, 2001, 411:494-498)。随后,在许多培养的人源、猴源、鼠源细胞均证实存在 siRNA 的 RNAi 效应。这一切让人们想到是否直接在细胞内生成或体外制备 siRNA 便会引起 RNAi 现象。著名的 Ambion 公司及 Operon 公司都开始提供 siRNA 化学合成服务,它非常方便、简单、不受碱基的限制,但合成费用相当昂贵。哺乳动物细胞中基因内含子多,基因结构复杂,不同的 siRNA 效率不一,因此一般一个靶基因至少需要设计 3~4 对不同的 siRNA 进行试验,造成 RNAi 成本较高。许多研究小组开发表达载体如质粒,利用不同的启动子如 Pol III 2<sub>6</sub>、T<sub>7</sub> 合成 dsRNA。质粒可以复制扩增,可以克服低转染及基因沉默的瞬时性。哈佛大学开发的载体 psilence 1.0-U<sub>6</sub> 已经成功地在 HeLa、H1299、U-20s 和 C-33A 细胞中敲除

了 Cdk-2 和 LaminA/C 的表达。科学家们证实,使用哺乳动物细胞中 U<sub>6</sub> 启动子去生成 siRNA 媒介不相同于 PolIII, U<sub>6</sub> 启动子不含有内源性 A 盒、B 盒子,它直接转录出小片断 RNA, 3' 末端有 4 个突出尿苷酸,且 U<sub>6</sub> 启动下游有针对靶基因的 19nt 的正义和反义核苷酸序列,它能自动生成双链 siRNA,并免受细胞内核酸酶的降解,持续稳定地抑制靶基因。如今,越来越多的载体用于构建 siRNA,将载体转移到细胞内合成出 siRNA,不但能增加有效转染细胞的种类,而且在长期稳定表达载体的细胞株中, siRNA 能够长期发挥阻断基因的作用,如 pSuper 载体, Bluescript 载体等。

[0006] RNAi 不但应用于哺乳动物细胞基因功能分析,而且通过载体在体内合成或体外转录的 siRNA 来调节,干扰基因表达进行治疗。许多研究表明, siRNA 可有效地抑制 HIV 病毒在原代 T 淋巴细胞中的复制。Novina 等特异性沉默了 HIV-1 细胞受体 CD<sub>4</sub>、病毒结构蛋白 Gag 和调节蛋白的 Nef (Novina 等, siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection, *Nat Med*, 2002, 8(7) :681-686)。有研究者用 siRNA 预处理的人和鼠细胞能够抵抗病毒感染。最新发现脆性 X 染色体综合征与 RNAi 相关,也为人类分子遗传学开出一个新的领域—RNAi 相关机制缺陷引发的疾病研究。

[0007] RNAi 在基因治疗方面的应用

[0008] RNAi 与肿瘤的基因治疗:血管生成在肿瘤生长及转移过程中扮演着十分重要的角色。血管内皮生长因子 (VEGF) 在血管生成过程中起着关键作用。研究表明,使 siRNA 靶向作用于 VEGF 的 mRNA,可以显著减少人前列腺癌细胞系 PC3 中 VEGF 的表达,从而使 PC3 细胞失去血管再生的功能。RNAi 在肿瘤疾病方面的体内试验报道近来也不断增加。研究表明,当裸鼠被移植了通过 siRNA 预作用而抗  $\beta$ -catenin 的结肠淋巴肿瘤细胞,其存活期可以大大延长。另外,通过 RNAi 使致癌基因 H-Ras 发生沉默,可以抑制人的卵巢癌细胞在小鼠体内的生长。胸苷酸合成酶 (TS) 是合成胸苷酸的十分重要的酶,抑制 TS 的活性可以导致 DNA 复制的抑制及细胞的凋亡。研究表明, RNAi 可以作为一种降低 TS 水平的替代治疗方法。Aloy 等对热休克蛋白 27 进行 RNAi 后,能提高放射治疗对肿瘤的敏感性 (Aloy 等, Protective role of Hsp27 protein against gamma radiation-induced apoptosis and radio sensitization effects of Hsp27 gene silencing in different human tumor cells, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, 70(2) :543-553)。

[0009] RNAi 与感染性疾病的基因治疗:RNAi 具有抵抗病毒入侵,抑制转座子活动,防止自私基因序列过量增殖等作用,因此可以利用 RNAi 现象产生抗病毒的植物和动物,并可利用不同病毒转录序列中高度同源区段相应的 dsRNA 抵抗多种病毒。借助 RNAi 技术治疗病毒感染性疾病仍然是其主要疾病应用研究领域,艾滋病是人类应用 RNAi 技术进行治疗研究最早的疾病。RNAi 可以直接和有效地抑制人类疾病相关 RNA 病毒的复制,研究主要集中在 HIV-1 和丙型肝炎病毒 (HCV)。此外也见于乙型肝炎病毒、呼吸道合胞病毒、脊髓灰质炎病毒、流感病毒、疱疹病毒等。Novina 等用 RNAi 技术实现了 HIV-1 病毒的阻抑 (Novina 等, siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med*, 2002, 8(7) :681-686)。McCaf-frey 等将合成的双链 RNA 和通过载体将双链 DNA 形成 shRNA 直接注入鼠的肝脏,均可明显抑制 HCV 基因的表达 (McCaf-frey 等, RNA interference in adult mice, *Nature*, 2002, 418(6893) :38-39)。Song 等通过静脉注射 Fas 的 siRNA 成功减轻了小鼠 Fas 诱导的暴发性肝炎的发生 (Song 等, RNA interference targeting Fas protects mice from

fulminant hepatitis, NatMed, 2003, 9(3) :347-351)。

[0010] RNAi 与其它疾病的基因治疗:显性遗传疾病发生通常是由于一个等位基因突变造成的。特异性地去除突变的等位基因而保留正常的另一个等位基因以维持正常细胞功能,已经成为该疾病的治疗目标之一。三核苷酸 CAG 重复子的大量出现引起的多聚谷氨酰胺过量表达与多种神经性遗传疾病(如亨廷顿病、Kennedy 综合征等)发生有关。最近,有学者在培养细胞中通过设计三核苷酸 CAG 重复子的 siRNA 成功抑制了多聚谷氨酰胺的表达,这无疑为这些疾病的治疗提供了新思路。此外,有关 RNAi 技术在自身免疫性疾病、血液疾病的研究报道也越来越多。

[0011] RNAi 基因治疗的优势:与传统的基因抑制工具相比, RNAi 具有更强大、更持久的抑制基因表达的能力,如其效能是反义寡核苷酸的 100 到 10000 倍;具有高度的序列特异性,若与目的 mRNA 的序列不完全匹配,将会大大削弱 RNAi 基因沉默的效应,从而大大提高了其作用的安全性;无免疫原性,因而不会引起机体的免疫反应;不易被核糖核酸酶(RNase)降解,因此具有更强的稳定性;由于其无需同基因组整合发挥作用,因而无需进入细胞核内,也就不需要复杂的转移系统;另外,由于其体积小,可以使用一个转移系统同时转移多个 siRNA 分子靶向于不同 mRNA,这就为治疗诸如癌症这类由多基因表达失调导致的疾病提供了可能。与传统的小分子药物相比,首先, siRNA 研发周期短;其次, RNAi 的作用具有高度特异性,这就减少了发生毒副作用的可能性;再者, RNAi 可以成为对抗耐药性的更加有效的方法。由于耐药性通常是由靶蛋白的编码基因发生点突变引起的,在这种情况下,很难针对每一个突变点分别设计合成一种新药,而且相应新药上市也需要很长时间,然而, siRNA 分子可以被很快设计出来,靶向于突变位点,使之发生沉默。

[0012] RNAi 基因治疗存在的问题:RNAi 技术广泛应用中所面临的关键问题之一就是如何有效的实现 RNA 干涉效率的提高。提高 RNAi 干涉效率,可以使剂量降低从而降低 RNA 感染的潜在副作用,这样既有助于推进 RNAi 相关的实验室研究而且还能进一步促进 RNAi 技术今后广泛应用临床治疗。目前,市场上尚无 RNA 干涉增强剂类产品。

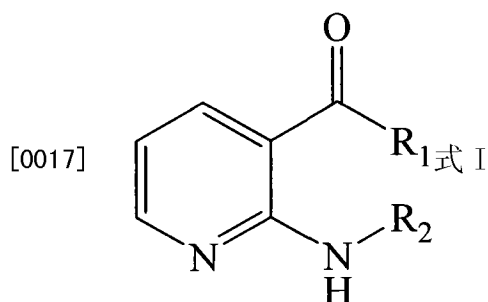
[0013] 另一方面,已知的吡啶类化合物已收录于小分子化合物库中,它是氢键的给体和受体,属于一类新型医药中间体(① Dolzhenko A V 等, Substituted amides and hydrazides of dicarboxylic acids, Pharmaceutical Chemistry Journal, 2003, 37(5) :229-231, ② Cocco M T 等, Synthesis of ibuprofen heterocyclic amides and investigation of their analgesic and toxicological properties, European Journal of Medicinal Chemistry, 2003, 38(5) :513-518), 其已知的用途有抗哮喘药、抗菌药、止痛剂、抗爱滋病毒药等。

[0014] RNAi 是一种在动、植物中广泛存在的序列特异性转录后水平的基因沉默过程,由于被抑制基因同源的 dsRNA 所启动,是生物基因组抵抗转座子或病毒之类的外来遗传元件入侵的一种保护性机制。

## 发明内容

[0015] 本发明提供了一类吡啶化合物(代号 HP01)的新用途,即在制备 RNA 干涉效率增强剂中的应用。

[0016] 所述化合物 HP01 具有式 I 所示的分子式:



[0018] R<sub>1</sub> = H、OH、OCH<sub>3</sub>、OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H、CH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; 优选 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>。

[0019] 使用 HP01 增强剂提高 RNA 干涉效率时, 是将 8-12mM (优选为 10mM) HP01 加入 0.5ml RNA 干涉体系中。

[0020] 所述 RNA 干涉体系包括转染有 RNA 干涉片段的细胞, 含有 10% 血清的 Opti-MEM I Reduced Serum Medium 500 μl。

[0021] 或者, 所述 RNA 干涉体系包括转染有 RNA 干涉片段的细胞, 完全培养基 500 μl。

[0022] 本发明提供了一类吡啶化合物 HP01 的新用途, 即作为增强剂在提高 RNA 干涉效率中的应用。实验证明, HP01 作为一种新型医药中间体, 能够有效的增强 RNA 干涉效率, 是一类新型的 RNA 干涉增强剂。本发明将在 siRNA 的研究和开发中发挥重要作用, 应用前景广阔。

[0023] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

#### 附图说明

[0024] 图 1 为 HP01 合成过程示意图

[0025] 图 2 为 HP01 对 siGAPDH 干涉效率增强效果的检测结果

[0026] 图 3 为 HP01 对 siNRSF 干涉效率增强效果的检测结果

[0027] 图 4 为 HP01 对 siSIRT1 干涉效率增强效果的检测结果

[0028] 图 5 为 HP01 对 siHath6 干涉效率增强效果的检测结果

[0029] 图 6 为 HP01 对 siBeta-actin 干涉效率增强效果的检测结果

#### 具体实施方式

[0030] 下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法。

[0031] 实施例 1、HP01 的合成

[0032] 如图 1 所示, 用本发明的方法合成 HP01, 具体方法包括以下步骤:

[0033] 以 3-氰基吡啶 (100mmol) 为原料, 加入 5.0g 氢氧化钠水溶液 (30ml), 搅拌下于 70 ~ 80°C 反应 5h, 用浓盐酸调至 pH 4 ~ 5, 抽滤, 滤饼干燥后用乙醇重结晶得白色固体 1。

[0034] 氨基钠 (0.81mol)、二甲苯 (45ml)、N,N-二甲基苯胺 (5ml) 加至 500ml 压力釜中, 加热至 155°C, 1h 内加入白色固体 1 (0.60mol), 加毕于 153 ~ 155°C 继续搅拌 3h, 冷却至 38 ~ 40°C, 加入水 (60ml), 同温搅拌 30min, 静置分层, 水相用二甲苯 (100ml × 2) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 滤液蒸出溶剂, 得到 HP01。(参考文献①杨建等, 2-氯烟酸的合成, 合成化学, 2009, 17(2):252-254, ②蒲通等, 2-氨基-3-甲基吡啶的制备, 中国医药工业杂志, 2008, 39(9):653-654)

[0035] 合成的吡啶化合物为 2-甲氨基-3-羧酸吡啶。以下实验均以此化合物为例。当

然,该化合物也可用其它已公开文献介绍的方法合成。

[0036] 同样,式 I 表示的其它化合物可按已公开文献方法合成,或参照以上合成操作改变相应基团后合成,本发明不再一一详述。

[0037] 实施例 2、HP01 能够增强 siGAPDH 的干涉效率

[0038] 一、GAPDH 基因的 RNAi 抑制

[0039] HeLa 细胞用胰酶消化后,以  $2 \times 10^5$  个细胞 / 孔种于 24 孔板。设置 2 孔对照组,2 孔 siGAPDH 组。

[0040] 取  $1 \mu\text{l}$  / 孔 Lipofectamine2000(购自 Gibco 公司,使用前轻轻摇匀),用  $50 \mu\text{l}$  Opti-MEM I Reduced Serum Medium(购自 Gibco 公司)稀释,轻轻混和后在室温孵育 5min。取适量 siGAPDH(购自 invitrogen 公司,根据不同转染浓度取量, $50\text{nM}$  为  $1.25 \mu\text{l}$  / 孔),用  $50 \mu\text{l}$  Opti-MEM I Reduced Serum Medium 稀释,轻轻混和均匀;稀释的 Lipofectamine2000 经过 5min 的孵育后,与稀释 siGAPDH 轻轻混和,室温静置 20min,以形成 si-GAPDH- 转染试剂混和物。将 siGAPDH- 转染试剂混和物加入含有细胞及 Opti-MEM I Reduced Serum Medium 的孔中,轻轻摇晃孔板,使混和;在  $37^\circ\text{C}$  的  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 12 小时后,换成含有 10% 血清的培养基,并在每组的一个孔中加入  $5 \mu\text{l}$  的 HP01 ( $10\text{mM}$ )。

[0041] 二、检测干涉前后 HeLa 细胞中 GAPDH mRNA 表达量的变化情况

[0042]  $37^\circ\text{C}$  的  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 72 小时后,弃去培养基,每孔加入  $500 \mu\text{l}$  的 Trizol(购自 invitrogen 公司),将细胞转移至  $1.5\text{ml}$  的 EP 管中,加入  $100 \mu\text{l}$  的氯仿,剧烈混匀,室温静置 5min。 $4^\circ\text{C}$ , 12000 转 /min, 离心 15min。取上清,放入一新的 EP 管中,加入  $500 \mu\text{l}$  预冷的异丙醇, $4^\circ\text{C}$  冰箱中放置 10min; $4^\circ\text{C}$ , 12000 转 /min, 离心 10min。弃去上清,加入  $1\text{ml}$  75% 乙醇,颠倒混匀; $4^\circ\text{C}$ , 12000 转 /min, 离心 5min。弃去上清,超净台中干燥 10min。用适量的 DEPC 水溶解,紫外分光光度仪测定浓度。

[0043] 根据所测浓度取  $1 \mu\text{g}$  的 RNA,加入  $2 \mu\text{l}$  的 oligo(dT),补 1% DEPC 水至  $6 \mu\text{l}$ , $70^\circ\text{C}$  恒温 10min,冰浴 2min。依次加入  $2 \mu\text{l}$   $5 \times \text{M-MLV Buffer}$ , $0.5 \mu\text{l}$  dNTP, $0.25 \mu\text{l}$  Rnase Inhibitor, $1 \mu\text{l}$  RTase M-MLV, $0.25 \mu\text{l}$  的 DEPC 水。混匀后, $42^\circ\text{C}$  恒温 1h, $70^\circ\text{C}$  恒温 15min。得到的 cDNA 于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中保存。

[0044] 进行 PCR 反应,以 Beta-actin 为内参,检测干涉前后 HeLa 细胞中 GAPDH mRNA 表达量的变化情况。引物序列如下:

[0045] 检测 GAPDH 基因的引物:

[0046] 上游 :GAGTCAACGGATTTGGTCGT

[0047] 下游 :TTGATTTTGGAGGGATCTCG。

[0048] 检测 Beta-actin 的引物:

[0049] 上游 :GGACTTCGAGCAAGAGATGG

[0050] 下游 :AGCACTGTGTTGGCGTACAG。

[0051] PCR 体系如下:

[0052]  $10 \times \text{PCR Buffer}$   $2 \mu\text{l}$ ,

[0053] dNTP Mix ( $2.5\text{mM}$ )  $1.6 \mu\text{l}$ ,

[0054] 引物 (上、下游)  $1 \mu\text{l}$ ,

[0055] rTag 聚合酶  $0.2 \mu\text{l}$ ,

[0056] cDNA 1  $\mu$  l,

[0057] H<sub>2</sub>O 14.2  $\mu$  l,

[0058] 总共 20  $\mu$  l。

[0059] PCR 反应条件为 :先 95 $^{\circ}$ C 5min, 然后 (95 $^{\circ}$ C 30s, 56 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s), 共 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min 后冷至 4 $^{\circ}$ C。

[0060] PCR 完毕后加入 4  $\mu$  l 6 $\times$ loading buffer, 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。采用 AlphaImage<sup>TM</sup>3300 型凝胶成像仪附带软件对目的条带进行灰度扫描分析。

[0061] 进行 Real-time PCR, 采用 SYBR GREEN 染料 (购自美国 Bio-Rad 公司), 美国 Bio-Rad 公司 IQ5 型全自动荧光实时定量 PCR 系统进行 real-time PCR 分析 GAPDH 干涉效果。

[0062] 从结果 (如图 2 所示, 横坐标为实验条件, 纵坐标为表达量, Control 为对照, \* 表示与对照组相比有显著性差异) 可以看出, HP01 能够增强 siGAPDH 的干涉效率。

[0063] 实施例 3、HP01 能够增强 siNRSF 的干涉效率

[0064] 一、NRSF 基因的 RNAi 抑制

[0065] HeLa 细胞用胰酶消化后, 以  $5 \times 10^5$  个细胞 / 孔种于 6 孔板。设置 2 孔脱靶对照组, 2 孔 siNRSF 组。去除 HeLa 细胞的培养基, 加入含有 NRSF 干涉片段的慢病毒毒液 (杨印祥等, NRSF 慢病毒干涉载体的构建及功能初步检测, 生物化学与生物物理进展, 2008, 35 (2) : 151 ~ 158) 或者脱靶对照的慢病毒毒液, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养过夜, 次日, 去除毒液, 添加完全培养基 (高糖 DMEM+10% FBS, DMEM 与 FBS 均购自 Gibco 公司), 并在每组的一个孔中加入 5  $\mu$  l 的 HP01 (10mM)。

[0066] 二、检测干涉前后 HeLa 细胞中 NRSF mRNA 表达量的变化情况

[0067] 37 $^{\circ}$ C 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 小时后, 弃去培养基, 每孔加入 500  $\mu$  l 的 Trizol, 将细胞转移至 1.5ml 的 EP 管中, 加入 100  $\mu$  l 的氯仿, 剧烈混匀, 室温静置 5min。4 $^{\circ}$ C, 12000 转 /min, 离心 15min。取上清, 放入一新的 EP 管中, 加入 500  $\mu$  l 预冷的异丙醇, 4 $^{\circ}$ C 冰箱中放置 10min; 4 $^{\circ}$ C, 12000 转 /min, 离心 10min。弃去上清, 加入 1ml 75% 乙醇, 颠倒混匀; 4 $^{\circ}$ C, 12000 转 /min, 离心 5min。弃去上清, 超净台中干燥 10min。用适量的 DEPC 水溶解, 紫外分光光度仪测定浓度。

[0068] 根据所测浓度取 1  $\mu$  g 的 RNA, 加入 2  $\mu$  l 的 oligo (dT), 补 1% DEPC 水至 6  $\mu$  l, 70 $^{\circ}$ C 恒温 10min, 冰浴 2min。依次加入 2  $\mu$  l 5 $\times$ M-MLV Buffer, 0.5  $\mu$  l dNTP, 0.25  $\mu$  l Rnase Inhibitor, 1  $\mu$  l RTase M-MLV, 0.25  $\mu$  l 的 DEPC 水。混匀后, 42 $^{\circ}$ C 恒温 1h, 70 $^{\circ}$ C 恒温 15min。得到的 cDNA 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

[0069] 进行 PCR 反应, 以 Beta-actin 为内参, 检测干涉前后 HeLa 细胞中 NRSF mRNA 表达量的变化情况。引物序列如下:

[0070] 检测 NRSF 基因的引物:

[0071] 上游 :GAAGAACAGTTTGTGCATC

[0072] 下游 :GCTACAATACTAATCGATA。

[0073] PCR 体系如下:

[0074] 10 $\times$ PCR Buffer 2  $\mu$  l,

[0075] dNTP Mix (2.5mM) 1.6  $\mu$  l,



- [0076] 引物（上、下游） 1  $\mu$  l,  
[0077] rTag 聚合酶 0.2  $\mu$  l,  
[0078] cDNA 1  $\mu$  l,  
[0079] H<sub>2</sub>O 14.2  $\mu$  l,  
[0080] 总共 20  $\mu$  l。

[0081] PCR 反应条件为：先 95℃ 5min, 然后 (95℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 30s), 共 25 个循环, 最后 72℃ 延伸 7min 后冷至 4℃。

[0082] PCR 完毕后加入 4  $\mu$  l 6 $\times$ loading buffer, 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。采用 AlphaImage™3300 型凝胶成像仪附带软件对目的条带进行灰度扫描分析。

[0083] 进行 Real-time PCR, 采用 SYBR GREEN 染料, 美国 Bio-Rad 公司 IQ5 型全自动荧光实时定量 PCR 系统进行 real-time PCR 分析 NRSF 干涉效果。

[0084] 从结果（如图 3 所示, 横坐标为实验条件, 纵坐标为表达量, Control 为对照, Off-target 表示脱靶对照, \* 表示与对照组和脱靶对照组相比均有显著性差异）可以看出, HP01 能够增强 siNRSF 的干涉效率。

[0085] 实施例 4、HP01 能够增强 siSIRT1 的干涉效率

[0086] 一、SIRT1 基因的 RNAi 抑制

[0087] HeLa 细胞用胰酶消化后, 以  $5 \times 10^5$  个细胞 / 孔种于 6 孔板。设置 2 孔脱靶对照组, 2 孔 si SIRT1 组。去除 HeLa 细胞的培养基, 加入含有 SIRT1 干涉片段的慢病毒毒液（制备方法参考：杨印祥等, NRSF 慢病毒干涉载体的构建及功能初步检测, 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(2): 151 ~ 158）或者脱靶对照的慢病毒毒液, 置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养过夜, 次日, 去除毒液, 添加完全培养基, 并在每组的一个孔中加入 5  $\mu$  l 的 HP01 (10mM)。

[0088] 二、检测干涉前后 HeLa 细胞中 SIRT1mRNA 表达量的变化情况

[0089] 37℃ 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 小时后, 弃去培养基, 每孔加入 500  $\mu$  l 的 Trizol, 将细胞转移至 1.5ml 的 EP 管中, 加入 100  $\mu$  l 的氯仿, 剧烈混匀, 室温静置 5min。4℃, 12000 转 /min, 离心 15min。取上清, 放入一新的 EP 管中, 加入 500  $\mu$  l 预冷的异丙醇, 4℃ 冰箱中放置 10min; 4℃, 12000 转 /min, 离心 10min。弃去上清, 加入 1ml 75% 乙醇, 颠倒混匀; 4℃, 12000 转 /min, 离心 5min。弃去上清, 超净台中干燥 10min。用适量的 DEPC 水溶解, 紫外分光光度仪测定浓度。

[0090] 根据所测浓度取 1  $\mu$  g 的 RNA, 加入 2  $\mu$  l 的 oligo (dT), 补 1% DEPC 水至 6  $\mu$  l, 70℃ 恒温 10min, 冰浴 2min。依次加入 2  $\mu$  l 5 $\times$ M-MLV Buffer, 0.5  $\mu$  l dNTP, 0.25  $\mu$  l Rnase Inhibitor, 1  $\mu$  l RTase M-MLV, 0.25  $\mu$  l 的 DEPC 水。混匀后, 42℃ 恒温 1h, 70℃ 恒温 15min。得到的 cDNA 于 -20℃ 冰箱中保存。

[0091] 进行 PCR 反应, 以 Beta-actin 为内参, 检测干涉前后 HeLa 细胞中 SIRT1 mRNA 表达量的变化情况。引物序列如下:

[0092] 检测 SIRT1 基因的引物:

[0093] 上游: CAG CAT CTT GCC TGA TTT GTA A

[0094] 下游: ACC AGA ACA GTT TCA TAG AGC A。

[0095] PCR 体系如下:

[0096]	10×PCR Buffer	2 μ l,
[0097]	dNTP Mix (2.5mM)	1.6 μ l,
[0098]	引物 (上、下游)	1 μ l,
[0099]	rTag 聚合酶	0.2 μ l,
[0100]	cDNA	1 μ l,
[0101]	H <sub>2</sub> O	14.2 μ l,
[0102]	总共	20 μ l。

[0103] PCR 反应条件为 :先 95℃ 5min, 然后 (95℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 30s) 共 25 个循环, 最后 72℃ 延伸 7min 后冷至 4℃。

[0104] PCR 完毕后加入 4 μ l 6×loading buffer, 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。采用 AlphaImage™3300 型凝胶成像仪附带软件对目的条带进行灰度扫描分析。

[0105] 进行 Real-time PCR, 采用 SYBR GREEN 染料, 美国 Bio-Rad 公司 IQ5 型全自动荧光实时定量 PCR 系统进行 real-time PCR 分析 SIRT1 干涉效果。

[0106] 从结果 (如图 4 所示, 横坐标为实验条件, 纵坐标为表达量, Control 为对照, Off-target 表示脱靶对照, \* 表示与对照组和脱靶对照性比均有显著性差异) 可以看出, HP01 能够增强 siSIRT1 的干涉效率。

[0107] 实施例 5、HP01 能够增强 siHath6 的干涉效率

[0108] 一、Hath6 基因的 RNAi 抑制

[0109] HeLa 细胞用胰酶消化后, 以  $5 \times 10^5$  个细胞 / 孔种于 6 孔板。设置 2 孔脱靶对照组, 2 孔 si Hath6 组。去除 HeLa 细胞的培养基, 加入含有 Hath6 干涉片段的慢病毒毒液 (制备方法参考 :杨印祥等, NRSF 慢病毒干涉载体的构建及功能初步检测, 生物化学与生物物理进展, 2008, 35 (2) :151 ~ 158) 或者脱靶对照的慢病毒毒液, 置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养过夜, 次日, 去除毒液, 添加完全培养基, 并在每组的一个孔中加入 5 μ l 的 HP01 (12mM)。

[0110] 二、检测干涉前后 HeLa 细胞中 Hath6mRNA 表达量的变化情况

[0111] 37℃ 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 小时后, 弃去培养基, 每孔加入 500 μ l 的 Trizol, 将细胞转移至 1.5ml 的 EP 管中, 加入 100 μ l 的氯仿, 剧烈混匀, 室温静置 5min。4℃, 12000 转 /min, 离心 15min。取上清, 放入一新的 EP 管中, 加入 500 μ l 预冷的异丙醇, 4℃ 冰箱中放置 10min ;4℃, 12000 转 /min, 离心 10min。弃去上清, 加入 1ml 75% 乙醇, 颠倒混匀 ;4℃, 12000 转 /min, 离心 5min。弃去上清, 超净台中干燥 10min。用适量的 DEPC 水溶解, 紫外分光光度仪测定浓度。

[0112] 根据所测浓度取 1 μ g 的 RNA, 加入 2 μ l 的 oligo (dT), 补 1% DEPC 水至 6 μ l, 70℃ 恒温 10min, 冰浴 2min。依次加入 2 μ l 5×M-MLV Buffer, 0.5 μ l dNTP, 0.25 μ l Rnase Inhibitor, 1 μ l RTase M-MLV, 0.25 μ l 的 DEPC 水。混匀后, 42℃ 恒温 1h, 70℃ 恒温 15min。得到的 cDNA 于 -20℃ 冰箱中保存。

[0113] 进行 PCR 反应, 以 Beta-actin 为内参, 检测干涉前后 HeLa 细胞中 Hath6mRNA 表达量的变化情况。引物序列如下 :

[0114] 检测 Hath6 基因的引物 :

[0115] 上游 :TATGAGTAGCACGGCACCTG

[0116] 下游 :CGGGGAAAGTTCCTACTCGT。

[0117] PCR 体系如下 :

[0118] 10×PCR Buffer 2 μ l,

[0119] dNTP Mix(2.5mM) 1.6 μ l,

[0120] 引物(上、下游) 1 μ l,

[0121] rTag 聚合酶 0.2 μ l,

[0122] cDNA 1 μ l,

[0123] H<sub>2</sub>O 14.2 μ l,

[0124] 总共 20 μ l。

[0125] PCR 反应条件为 :先 95℃ 5min, 然后 (95℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 30s) 共 25 个循环, 最后 72℃ 延伸 7min 后冷至 4℃。

[0126] PCR 完毕后加入 4 μ l 6×loading buffer, 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。采用 AlphaImage™3300 型凝胶成像仪附带软件对目的条带进行灰度扫描分析。

[0127] 进行 Real-time PCR, 采用 SYBR GREEN 染料, 美国 Bio-Rad 公司 IQ5 型全自动荧光实时定量 PCR 系统进行 real-time PCR 分析 Hath6 干涉效果。

[0128] 从结果(如图 5 所示, 横坐标为实验条件, 纵坐标为表达量, Control 为对照, Off-target 表示脱靶对照, \* 表示与对照组和脱靶对照组相比均有显著性差异)可以看出, HP01 能够增强 siHath6 的干涉效率。

[0129] 实施例 6、HP01 能够增强 siBeta-actin 的干涉效率

[0130] 一、Beta-actin 基因的 RNAi 抑制

[0131] HeLa 细胞用胰酶消化后, 以  $2 \times 10^5$  个细胞 / 孔种于 24 孔板。设置 2 孔对照组, 2 孔 siBeta-actin 组。

[0132] 取 1 μ l / 孔 Lipofectamine2000(使用前轻轻摇匀), 用 50 μ l Opti-MEM I Reduced Serum Medium 稀释, 轻轻混和后在室温孵育 5min。取适量 siBeta-actin(购自 invitrogen 公司, 根据不同转染浓度取量, 50nM 为 1.25 μ l / 孔), 用 50 μ l Opti-MEM I Reduced Serum Medium 稀释, 轻轻混和均匀; 稀释的 Lipofectamine2000 经过 5min 的孵育后, 与稀释 siBeta-actin 轻轻混和, 室温静置 20min, 以形成 siBeta-actin- 转染试剂混和物。将 siBeta-actin- 转染试剂混和物加入含有细胞及 Opti-MEM I Reduced Serum Medium 的孔中, 轻轻摇晃孔板, 使混和; 在 37℃ 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 12 小时后, 换成含有 10% 血清的培养基, 并在每组的一个孔中加入 5 μ l 的 HP01 (8mM)。

[0133] 二、检测干涉前后 HeLa 细胞中 Beta-actin mRNA 表达量的变化情况

[0134] 37℃ 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 小时后, 弃去培养基, 每孔加入 500 μ l 的 Trizol, 将细胞转移至 1.5ml 的 EP 管中, 加入 100 μ l 的氯仿, 剧烈混匀, 室温静置 5min。4℃, 12000 转 /min, 离心 15min。取上清, 放入一新的 EP 管中, 加入 500 μ l 预冷的异丙醇, 4℃ 冰箱中放置 10min; 4℃, 12000 转 /min, 离心 10min。弃去上清, 加入 1ml 75% 乙醇, 颠倒混匀; 4℃, 12000 转 /min, 离心 5min。弃去上清, 超净台中干燥 10min。用适量的 DEPC 水溶解, 紫外分光光度仪测定浓度。

[0135] 根据所测浓度取 1 μ g 的 RNA, 加入 2 μ l 的 oligo(dT), 补 1% DEPC 水至 6 μ l, 70℃ 恒温 10min, 冰浴 2min。依次加入 2 μ l 5×M-MLV Buffer, 0.5 μ l dNTP, 0.25 μ l Rnase

Inhibitor, 1  $\mu$ l RTase M-MLV, 0.25  $\mu$ l 的 DEPC 水。混匀后, 42 $^{\circ}$ C 恒温 1h, 70 $^{\circ}$ C 恒温 15min。得到的 cDNA 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

[0136] 进行 PCR 反应, 以 GAPDH 为内参, 检测干涉前后 HeLa 细胞中 Beta-actin mRNA 表达量的变化情况。PCR 体系如下:

[0137] 10 $\times$ PCR Buffer 2  $\mu$ l,

[0138] dNTP Mix (2.5mM) 1.6  $\mu$ l,

[0139] 引物 (上、下游) 1  $\mu$ l,

[0140] rTag 聚合酶 0.2  $\mu$ l,

[0141] cDNA 1  $\mu$ l,

[0142] H<sub>2</sub>O 14.2  $\mu$ l,

[0143] 总共 20  $\mu$ l。

[0144] PCR 反应条件为: 先 95 $^{\circ}$ C 5min, 然后 (95 $^{\circ}$ C 30s, 56 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s) 共 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min 后冷至 4 $^{\circ}$ C。

[0145] PCR 完毕后加入 4  $\mu$ l 6 $\times$ loading buffer, 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。采用 AlphaImage<sup>TM</sup>3300 型凝胶成像仪附带软件对目的条带进行灰度扫描分析。

[0146] 进行 Real-time PCR, 采用 SYBR GREEN 染料, 美国 Bio-Rad 公司 IQ5 型全自动荧光实时定量 PCR 系统进行 real-time PCR 分析 Beta-actin 干涉效果。

[0147] 从结果 (如图 6 所示, 横坐标为实验条件, 纵坐标为表达量, Control 为对照, \* 表示与对照组相比具有显著性差异) 可以看出, HP01 能够增强 siBeta-actin 的干涉效率。

[0148] 以上实验以 2-甲氨基-3-羧酸吡啶为例, 验证了式 I 表示的化合物能提高 RNA 干涉效率。本发明用同样方法也验证了式 I 表示的其它化合物也具有类似效果, 这里不再一一详述实验过程。

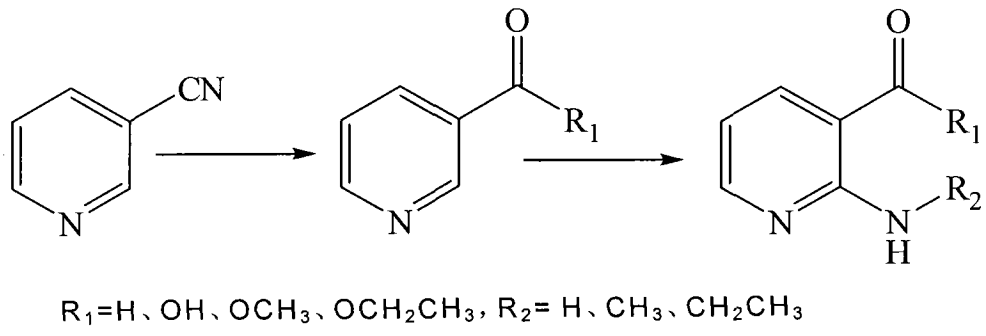


图 1

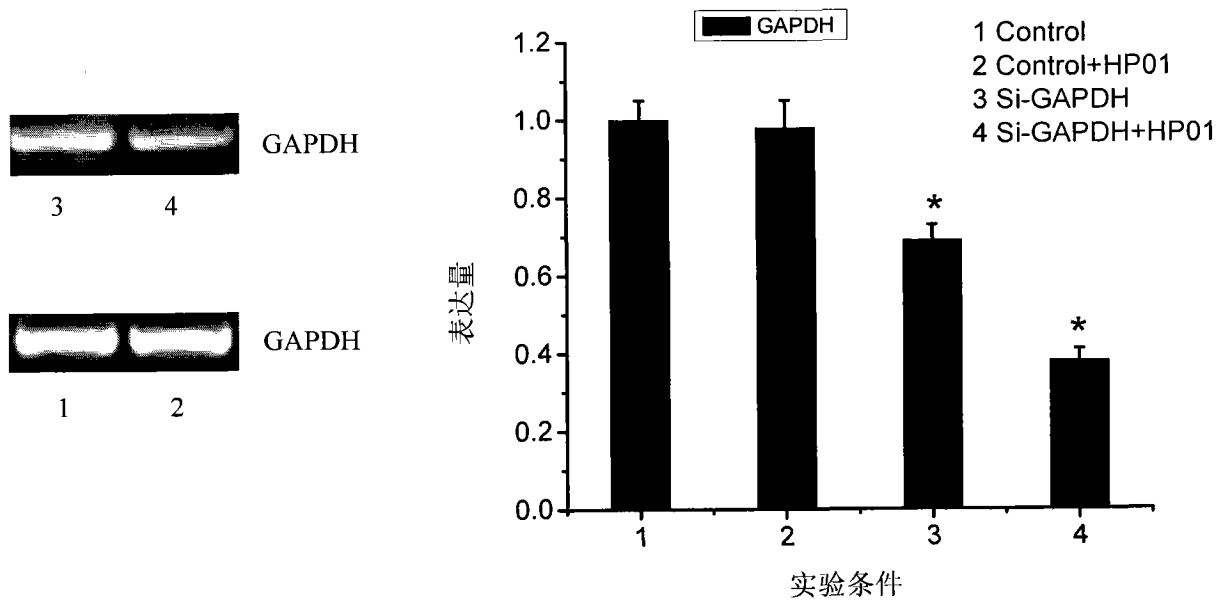


图 2

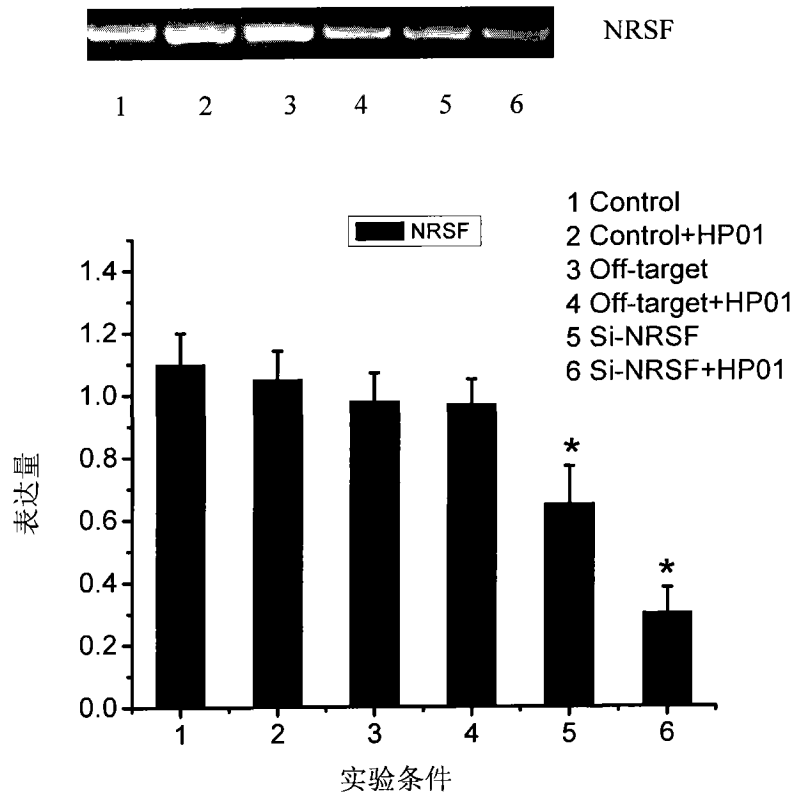


图 3

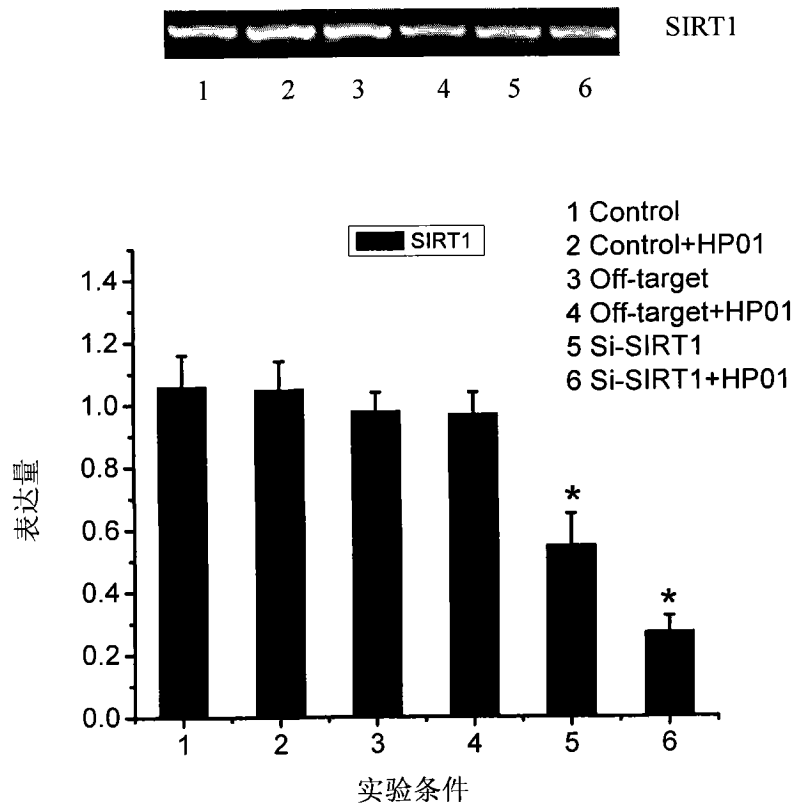


图 4

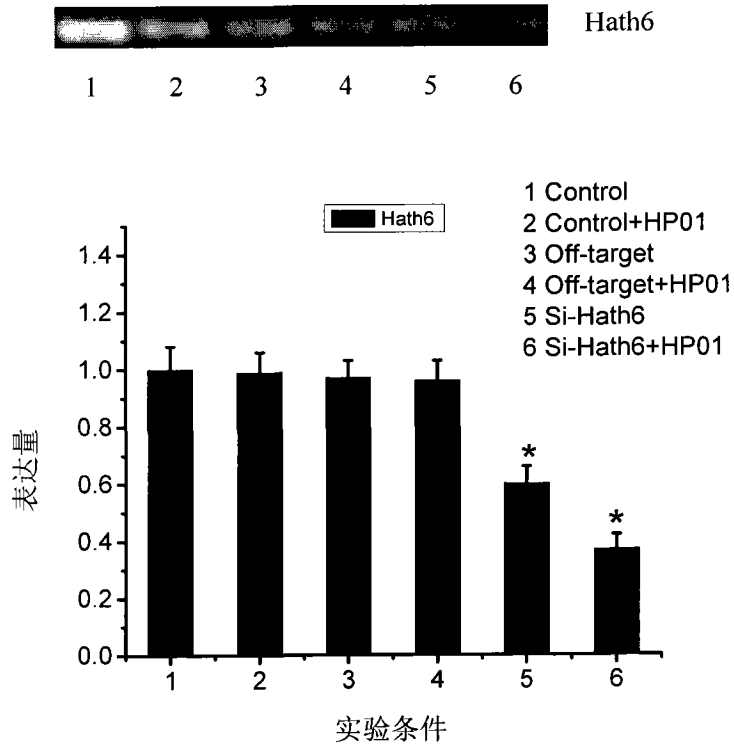


图 5

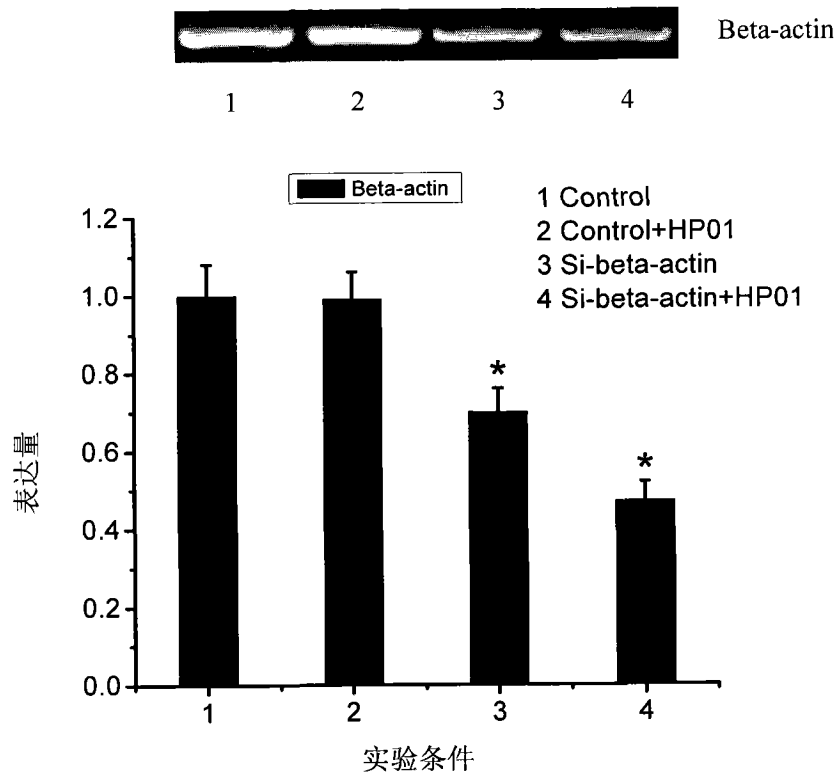


图 6