



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115385820 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 25

(21) 申请号 202111673242.3

A61K 31/7105 (2006.01)

(22) 申请日 2021.12.31

A61K 31/713 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

A61K 39/00 (2006.01)

202110502635.1 2021.05.09 CN

A61K 39/385 (2006.01)

(71) 申请人 英维沃生物科技(苏州)有限公司

A61K 39/12 (2006.01)

地址 215000 江苏省苏州市高新区生命健康小镇产业园一期A座1楼

A61K 47/60 (2017.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(72) 发明人 孟浩 蔡聪潇

(51) Int. Cl.

C07C 235/06 (2006.01)

C07C 237/08 (2006.01)

C07C 323/41 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/20 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

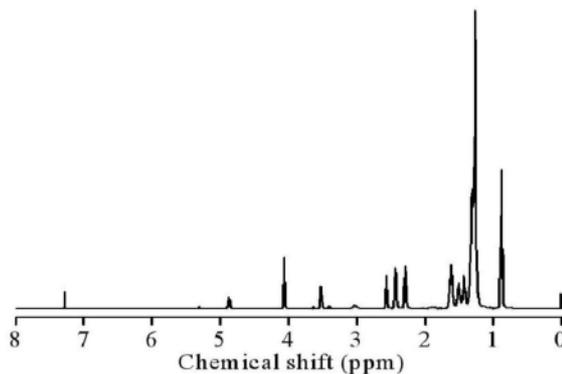
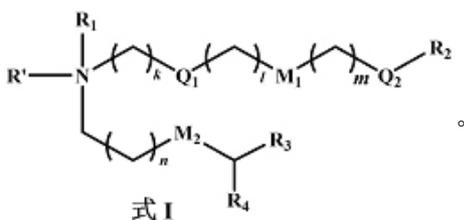
权利要求书2页 说明书24页 附图5页

(54) 发明名称

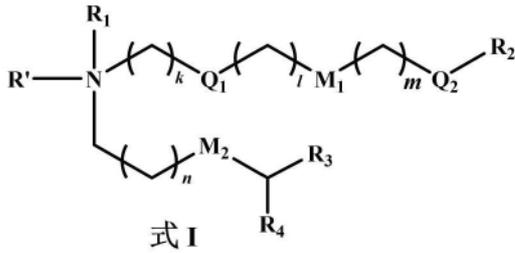
阳离子脂质及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一类阳离子脂质及其应用,该阳离子脂质可制备成核酸或者其他功能化合物导入细胞内的脂质颗粒,使用本发明制备的阳离子脂质的核酸导入剂进行功能性核酸的导入,可以利用递送至细胞质内的功能性核酸来实现有效的基因调控,其效果远高于市售产品。本发明所述阳离子脂质如式(I)所示:



1. 一种具有结构式 (I) 的化合物, 该化合物为阳离子脂质或其药学上可接受的盐:



其中:

R1为任选取代的烷基、烯基、炔基或 $-(CH_2)_p Q'$ ; 当取代基为 $-(CH_2)_p Q'$ 时,  $Q'$ 为OH、烷氧基、 $-NH_2$ 或烷基氨基,  $p$ 为1、2、3、4、5或6;

R' 不存在或为取代的氢或烷基;

$k$ 、 $l$ 、 $m$ 和 $n$ 各自独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

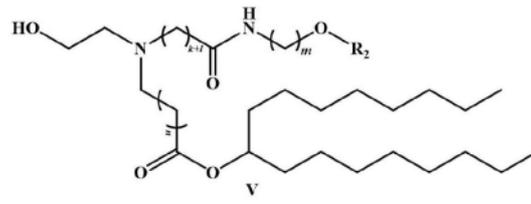
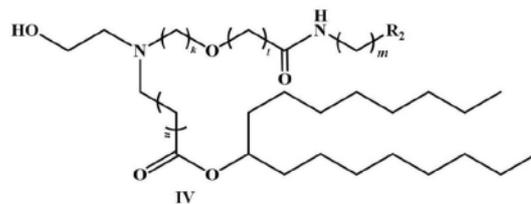
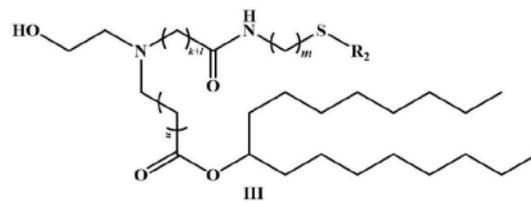
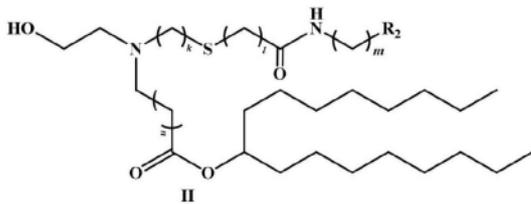
$M_1$ 和 $M_2$ 各自独立地为不存在或为取代的 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S-S-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NH-C(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-C(S)O-$ 、 $-NH-C(O)O-$ 或 $-OC(O)-NH-$ ;

$Q_1$ 、 $Q_2$ 为取代的 $-O-$ 或 $-S-$ 或至多有一个为不存在;

$R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 各自独立地为取代的C1-C12亚烷基或C2-C12亚烯基。

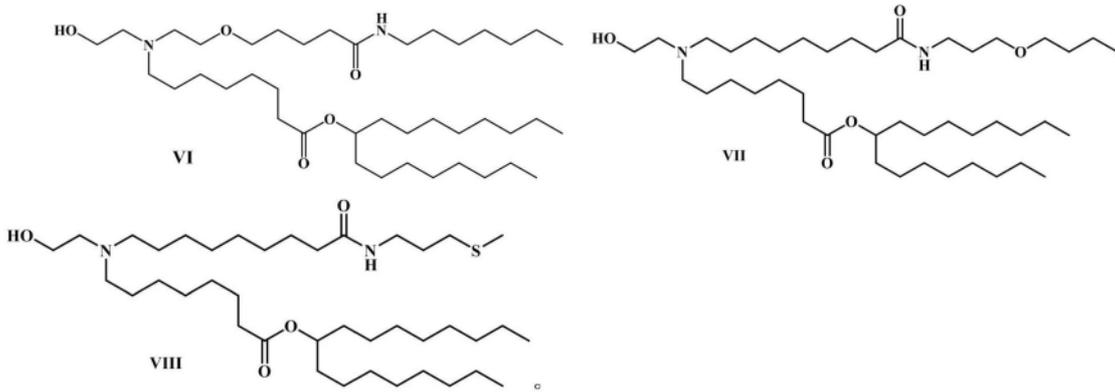
2. 根据权利要求1所述的化合物, 其中 $R_1$ 为 $-(CH_2)_2-OH$ 。

3. 根据权利要求1所述的化合物, 所述化合物选自如下所示的 II、III、IV、V 或其药学上可接受的盐,



其中,  $k$ 、 $l$ 、 $m$ 和 $n$ 各自独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,  $R_2$ 为取代的C1-C12亚烷基或C2-C12亚烯基。

4. 根据权利要求1所述的化合物, 所述化合物选自如下所示的 VI、VII、VIII 或其药学上可接受的盐,



5. 根据权利要求1所述的化合物,所述的k、l、m和n还包括各自独立地取为0。
6. 根据权利要求5所述的化合物,所述 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 还包括各自独立地为取代的C13-C24亚烷基或C13-C24亚烯基。
7. 一种脂质颗粒,包含权利要求1-4任一项所述的化合物。
8. 根据权利要求7所述的脂质颗粒,其中所述脂质颗粒还包含非阳离子脂质。
9. 根据权利要求8所述的脂质颗粒,其中所述非阳离子脂质为中性脂质和/或固醇。
10. 根据权利要求9所述的脂质颗粒,其中所述中性脂质为磷脂,所述磷脂包含二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、1,2-二油酰-SN-甘油-3-磷酸乙醇胺或1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的一种或几种组合。
11. 根据权利要求9所述的脂质颗粒,其中所述固醇为胆固醇或胆固醇衍生物。
12. 根据权利要求8所述的脂质颗粒,其中所述脂质颗粒还包含抑制颗粒聚集的缀合的脂质。
13. 根据权利要求12所述的脂质颗粒,其中所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质包含PEG-脂质缀合物。
14. 根据权利要求13所述的脂质颗粒,其中所述PEG-脂质缀合物包含PEG-二酰基甘油缀合物、PEG-二烷氧基丙基缀合物的一种或两种混合。
15. 一种药物组合物,其包含权利要求7所述的脂质颗粒和治疗剂。
16. 根据权利要求15所述的药物组合物,其中所述治疗剂为核酸。
17. 根据权利要求16所述的药物组合物,其中所述核酸包括干扰RNA分子,还包括单链或双链DNA、RNA或DNA/RNA杂交体、反义寡核苷酸、核酶、质粒、免疫刺激性寡核苷酸。
18. 根据权利要求17所述的药物组合物,其还包含药学上可接受的载体。
19. 权利要求15所述的药物组合物在制备用于在受试者中治疗或预防疾病的药物中的应用。
20. 根据权利要求19所述的应用,其中所述疾病选自病毒感染类疾病、肝脏疾病或癌症。

## 阳离子脂质及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种脂质化合物,具体涉及一种阳离子脂质、以及由该阳离子脂质制备的脂质颗粒,并涉及其递送治疗剂和药物制备中的用途。

### 背景技术

[0002] 脂质颗粒常常被用来将实验室和临床研究中的大分子(如:DNA、RNA/蛋白质)和小分子(如小分子化合物或医学上活性小分子)递送至细胞和组织中。特别是含有阳离子脂质组分的用于递送核酸等阴离子分子尤其有效。

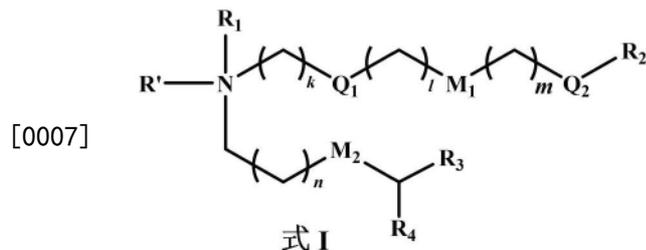
[0003] 近年来,基于核酸(特别是RNA,包括siRNA、miRNA和mRNA等)的药物在基因层面上调控蛋白的表达,已经引起越来越多的关注。在体外模型和体内模型中,已展现出传统小分子药物和抗体药物所不具备的优势。研究者已利用基于脂质的载体系统递送治疗性核酸,尽管已经取得了一定进展,但是仍然存在着递送效率低的问题,导致多项临床研究药效不及预期而终止实验。本领域仍然存在用于高效递送核酸的脂质载体的需求。

### 发明内容

[0004] 为了解决以上现有技术存在的问题,本发明的目的在于提供一种新型阳离子脂质、脂质颗粒组合物以及使用所述组合物将核酸引入细胞的方法。这些脂质颗粒保护核酸免于降解、清除,并在细胞中将核酸释放出来,极大改善核酸的递送效率问题,充分发挥RNA药物在活体中的作用。

[0005] 为了实现上述目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 一种具有结构式(I)的化合物,该化合物为阳离子脂质或其药学上可接受的盐:



[0008] 其中:

[0009] R1为任选取代的烷基、烯基、炔基或 $-(CH_2)_p Q'$ ;当取代基为 $-(CH_2)_p Q'$ 时, $Q'$ 为OH、烷氧基、 $-NH_2$ 或烷基氨基,p为1、2、3、4、5或6;

[0010] R'不存在或为取代的氢或烷基;

[0011] k、l、m和n各自独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

[0012]  $M_1$ 和 $M_2$ 各自独立地为不存在或为取代的 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S-S-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NH-C(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-C(S)O-$ 、 $-NH-C(O)O-$ 或 $-OC(O)-NH-$ ;

[0013]  $Q_1$ 、 $Q_2$ 为取代的 $-O-$ 或 $-S-$ 或至多有一个为不存在;

[0014]  $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 各自独立地为取代的C1-C12亚烷基或C2-C12亚烯基。

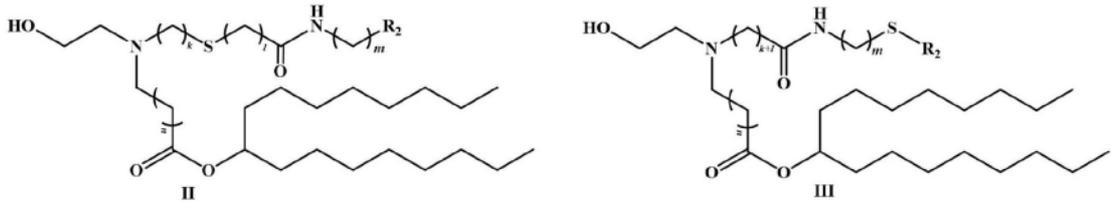
[0015] 进一步的,所述的k、l、m和n还包括各自独立地取为0。

[0016] 进一步的,所述 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 还包括各自独立地为取代的C13-C24亚烷基或C13-C24亚烯基。

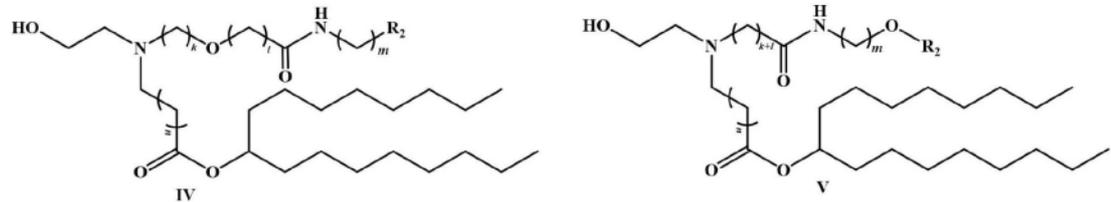
[0017] 优选的,本发明所述的化合物,其中 $R_1$ 为 $-(CH_2)_2-OH$ 。

[0018] 优选的,本发明所述的化合物,其中 $M_1$ 、 $M_2$ 各自独立地为 $-C(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$ 或 $-OC(O)-$ 。

[0019] 优选的,本发明所述的化合物选自如下所示的II、III、IV、V或其药学上可接受的盐,

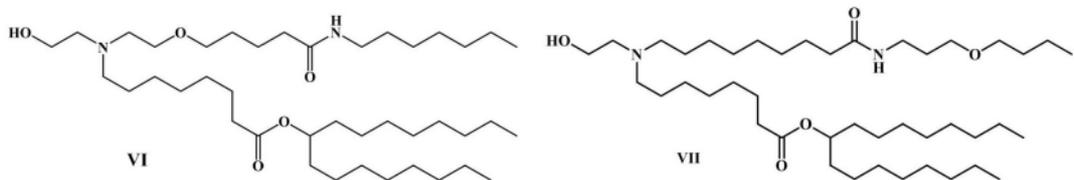


[0020]

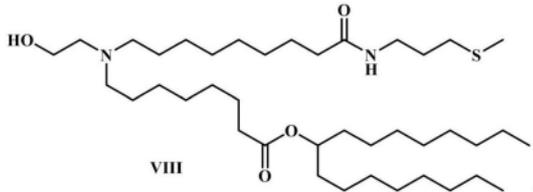


[0021] 其中,k、l、m和n各自独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10, $R_2$ 为取代的C1-C12亚烷基或C2-C12亚烯基。

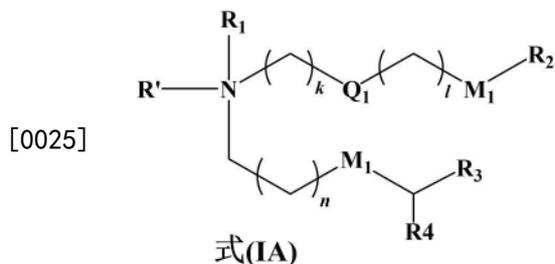
[0022] 优选的,本发明所述的化合物选自如下所示的VI、VII、VIII或其药学上可接受的盐,



[0023]



[0024] 一种具有结构式(IA)的化合物,该化合物为阳离子脂质或其药学上可接受的盐:



[0026] 其中:

[0027]  $R_1$ 为任选取代的烷基、烯基、炔基或 $-(CH_2)_p Q'$ ;当取代基为 $-(CH_2)_p Q'$ 时, $Q'$ 为OH、烷氧基、 $-NH_2$ 或烷基氨基,p为1、2、3、4、5或6;

[0028] R' 不存在或为取代的氢或烷基；

[0029] k、l、m和n各自独立地为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

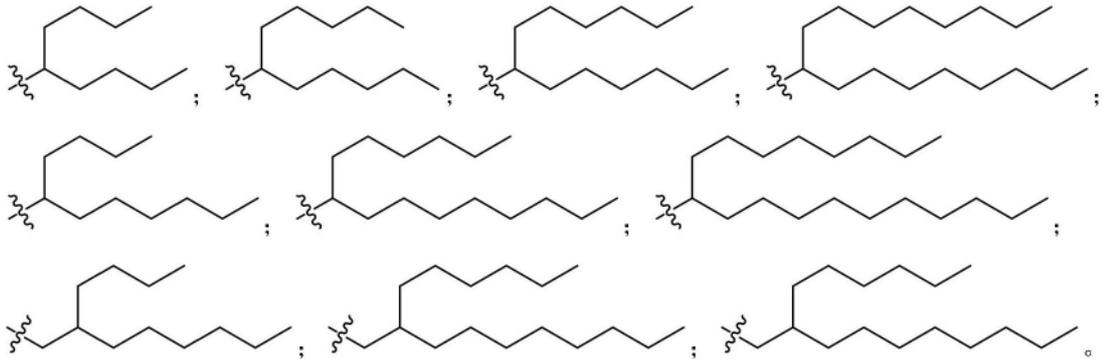
[0030] M<sub>1</sub>和M<sub>2</sub>各自独立地为不存在或为取代的-C(O)O-、-OC(O)-、-S-S-、-OC(O)O-、-C(O)NH-、-NH C(O)-、-C(O)S-、-C(S)O-、-NH-C(O)O-或-OC(O)-NH-；

[0031] Q<sub>1</sub>为取代的-O-或-S-；

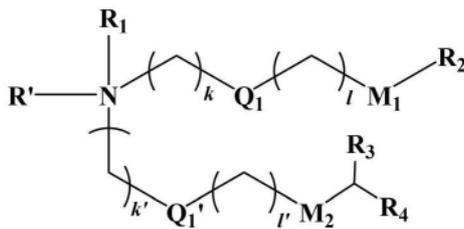
[0032] R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>各自独立地为取代的C1-C24亚烷基或C2-C24亚烯基。

[0033] 优选的，本发明所述的化合物，其中M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>各自独立地为-C(O)NH-、-C(O)O-或-OC(O)-。

[0034] 优选的，化合物IA中的R<sub>2</sub>各自独立的选自以下结构之一：



[0036] 一种具有结构式 (IB) 的化合物，该化合物为阳离子脂质或其药学上可接受的盐：



[0037]

式 (IB)

[0038] 其中：

[0039] R1为任选取代的烷基、烯基、炔基或-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Q'；当取代基为-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Q'时，Q'为OH、烷氧基、-NH<sub>2</sub>或烷基氨基，p为1、2、3、4、5或6；

[0040] R' 不存在或为取代的氢或烷基；

[0041] k、l、k' 和l' 各自独立地为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

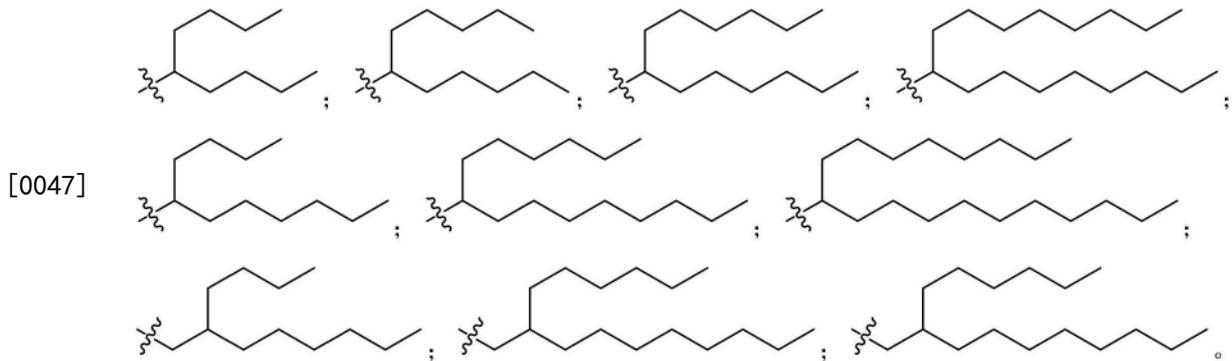
[0042] M<sub>1</sub>和M<sub>2</sub>各自独立地为不存在或为取代的-C(O)O-、-OC(O)-、-S-S-、-OC(O)O-、-C(O)NH-、-NH C(O)-、-C(O)S-、-C(S)O-、-NH-C(O)O-或-OC(O)-NH-；

[0043] Q<sub>1</sub>、Q<sub>1</sub>' 为取代的-O-或-S-；

[0044] R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>各自独立地为取代的C1-C24亚烷基或C2-C24亚烯基。

[0045] 优选的，本发明所述的化合物，其中M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>各自独立地为-C(O)NH-、-C(O)O-或-OC(O)-。

[0046] 优选的，化合物式 (IB) 中的R<sub>2</sub>各自独立的选自以下结构之一：



[0048] 一种脂质颗粒,包含以上所述的化合物。

[0049] 进一步的,本发明所述的脂质颗粒的中值直径为25-300nm。

[0050] 进一步的,本发明所述的脂质颗粒还包含非阳离子脂质。

[0051] 进一步的,本发明所述的脂质颗粒中所述非阳离子脂质为中性脂质和/或固醇。

[0052] 优选的,本发明所述的脂质颗粒所述中性脂质为磷脂,所述磷脂包含二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、1,2-二油酰-SN-甘油-3-磷酸乙醇胺或1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的一种或几种组合。

[0053] 优选的,本发明所述的脂质颗粒中所述固醇为胆固醇或胆固醇衍生物。

[0054] 进一步的,本发明所述脂质颗粒还包含抑制颗粒聚集的缀合的脂质。

[0055] 进一步的,本发明所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质包含PEG-脂质缀合物。

[0056] 优选的,本发明所述PEG-脂质缀合物包含PEG-二酰基甘油(PEG-DAG)缀合物、PEG-二烷氧基丙基(PEG-DAA)缀合物的一种或两种混合。

[0057] 一种核酸导入剂,其包含本发明所述的脂质颗粒以及核酸。

[0058] 一种药物组合物,其包含本发明所述的脂质颗粒和治疗剂。

[0059] 进一步的,本发明所述治疗剂为核酸。

[0060] 进一步的,所述核酸包括干扰RNA分子,还包括单链或双链DNA、RNA或DNA/RNA杂交体、反义寡核苷酸、核酶、质粒、免疫刺激性寡核苷酸。

[0061] 进一步的,所述干扰RNA分子包括小的干扰RNA、不对称干扰RNA、微小RNA、小发夹RNA的一种或者几种组合。

[0062] 进一步的,本发明所述的药物组合物,其中所述治疗剂被完全包囊在所述脂质颗粒中。

[0063] 进一步的,本发明所述的药物组合物,其中所述脂质颗粒中的脂质与治疗剂的质量比为(5:1)-(15:1)。

[0064] 进一步的,本发明所述的药物组合物还包含药学上可接受的载体。

[0065] 本发明所述的药物组合物在制备用于在受试者中治疗或预防疾病的药物中的应用,其中所述疾病选自病毒感染类疾病、肝脏疾病或癌症。

[0066] 进一步的,所述药物的给药方式选自口服、鼻内、静脉内、腹膜内、肌肉内、关节内、病灶内、气管内、皮下或皮内。

[0067] 一种制剂,其包含本发明所述的药物组合物,还包含疫苗或抗原。因此,疫苗可包括脂质颗粒,所述脂质颗粒包含免疫刺激性寡核苷酸并且还与其产生免疫反应的抗原缔合。所述抗原包括肿瘤抗原或传染物抗原。

[0068] 进一步的,本发明所述的制剂中,所述抗原为肿瘤抗原,所述肿瘤抗原包括Ras、p53、Her2、KSA、TRP1、TRP2或BCR-ab1致癌基因的蛋白。

[0069] 进一步的,本发明所述的制剂中,所述抗原为传染物抗原,所述传染物抗原包括病毒抗原、细菌抗原或寄生虫抗原。

[0070] 进一步的,本发明所述的制剂中,所述病毒抗原包括乙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、肺结核病毒、风疹病毒、天花病毒、流感病毒、麻疹病毒、轮状病毒或冠状病毒。

[0071] 进一步的,本发明所述的制剂中,所述病毒抗原还来源于逆转录病毒科、小核糖核酸病毒科、杯状病毒科、冠状病毒科、弹状病毒科、丝状病毒科、正黏病毒科、副黏液病毒科、披膜病毒科、黄病毒科、布尼亚病毒科、沙粒病毒科、双核糖核酸病毒科、肝脱氧核糖核酸病毒科、细小病毒科、乳多空病毒科、腺病毒科、疱疹病毒科、彩虹病毒科或未分类的病毒。

[0072] 有益效果:本发明公开了一种阳离子脂质,以及由该阳离子脂质制备的脂质颗粒,该脂质颗粒可制备成药物组合物或者其他制剂,还可制备核酸导入剂,进行功能性核酸向细胞的导入,有效的发挥功能性核酸的功能。通过实验结果得出,使用本发明制备的阳离子脂质的核酸导入剂进行功能性核酸的导入,可以利用递送至细胞质内的功能性核酸来实现有效的基因调控,其效果远高于市售产品。

## 附图说明

[0073] 图1为式VII化合物的核磁共振图。

[0074] 图2为包含式VI、VII和VIII化合物制备的脂质颗粒对Jurkat细胞中mRNA的敲除结果图。

[0075] 图3为LNP-4~LNP-14脂质颗粒对Jurkat细胞中mRNA的敲除结果图。

[0076] 图4为LNP-15~LNP-25脂质颗粒对Jurkat细胞中mRNA的敲除结果图。

[0077] 图5为包含式A1~A12、B1~B11化合物制备的脂质颗粒对Jurkat细胞中mRNA的敲除结果图。

[0078] 图6为包含式VI、VII和VIII化合物制备的脂质颗粒对小鼠体内mRNA的敲除结果图。

[0079] 图7为包含式VI、VII和VIII化合物制备的脂质颗粒对小鼠体内肿瘤细胞mRNA的敲除结果图。

[0080] 图8为包含式VI、VII和VIII化合物制备的脂质颗粒介导的mRNA在小鼠体内表达的结果图。

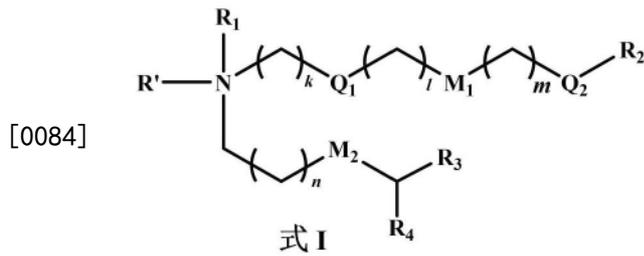
[0081] 图9为包含式A6、A7、A9和B5化合物制备的脂质颗粒介导的mRNA在小鼠体内表达的结果图。

## 具体实施方式

[0082] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,但实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0083] 申请人开发了制备成脂质颗粒的阳离子脂质,本发明的脂质颗粒可以用于递送治

疗剂(例如核酸分子)或其它制剂至细胞(受试者体外或体内),从而进一步发挥递送物质的功能。本发明提供了一种具有结构式(I)的阳离子脂质或其药学上可接受的盐,



[0085] 其中:

[0086] R<sub>1</sub>为任选取代的烷基、烯基、炔基或 $-(CH_2)_pQ'$ ;当取代基为 $-(CH_2)_pQ'$ 时,Q'为OH、烷氧基、 $-NH_2$ 或烷基氨基,p为1、2、3、4、5或6;

[0087] R' 不存在或为取代的氢或烷基;

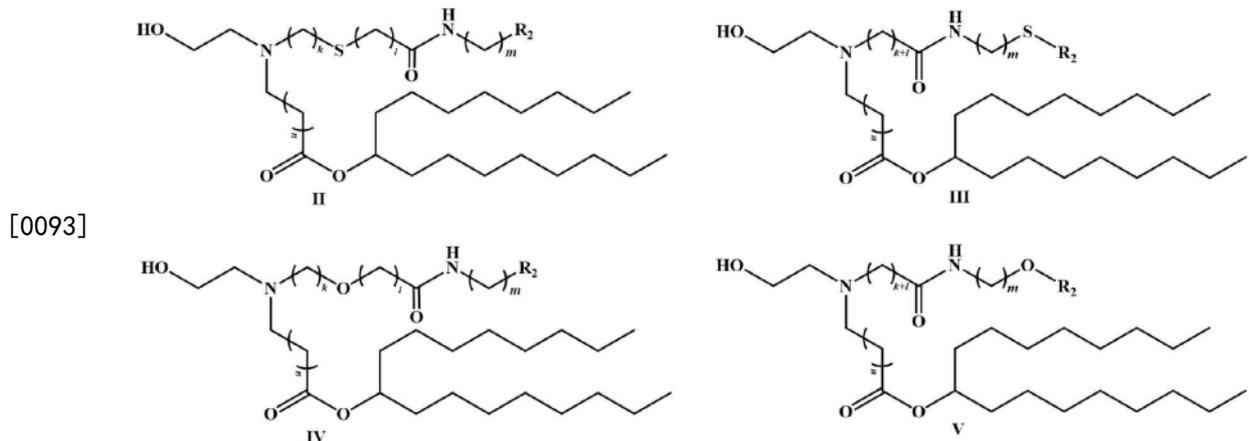
[0088] k、l、m和n各自独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

[0089] M<sub>1</sub>和M<sub>2</sub>各自独立地为不存在或为取代的 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S-S-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NH-C(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-C(S)O-$ 、 $-NH-C(O)O-$ 或 $-OC(O)-NH-$ ;

[0090] Q<sub>1</sub>、Q<sub>2</sub>为取代的 $-O-$ 或 $-S-$ 或至多有一个为不存在;

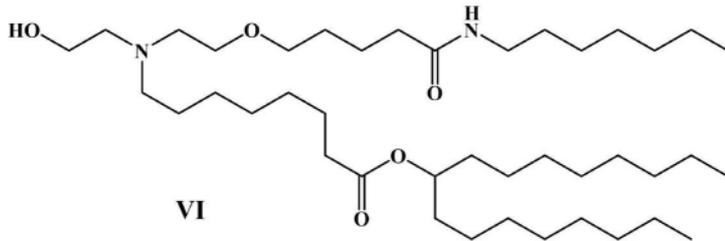
[0091] R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>各自独立地为取代的C1-C12亚烷基或C2-C12亚烯基。

[0092] 在一个实施方案中,所述阳离子脂质为选自式II-V或其药学上可接受的盐,

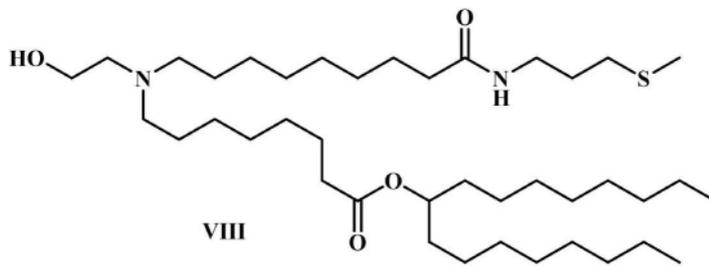
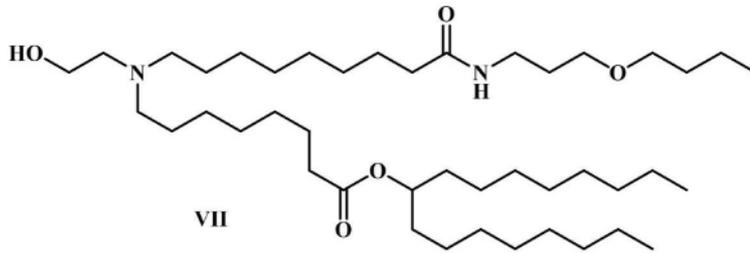


[0094] 其中,k、l、m和n各自独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,R<sub>2</sub>为C1-C12亚烷基或C2-C12亚烯基。

[0095] 在特定实施方案中,所述阳离子脂质选自以下式VI、VII、VIII:



[0096]



[0097] 在特定实施方案中,所述阳离子脂质选自下表中式L1~L22。

[0098] 表1

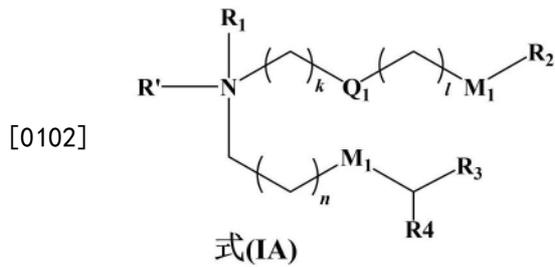
[0099]

化合	M <sub>1</sub>	Q <sub>1</sub>	Q <sub>2</sub>	k	l	m	R <sub>2</sub>

[0100]

物							
L1	-CONH-	-S-	不存在	7	4	4	-CH <sub>3</sub>
L2	-CONH-	-S-	不存在	5	2	6	-CH <sub>3</sub>
L3	-CONH-	-S-	不存在	3	3	5	-CH <sub>3</sub>
L4	-CONH-	-S-	不存在	2	5	7	-CH <sub>3</sub>
L5	-CONH-	-S-	不存在	4	4	3	-CH=C H <sub>2</sub>
L6	-CONH-	-O-	不存在	3	8	4	-CH <sub>3</sub>
L7	-CONH-	-O-	不存在	5	7	2	-CH <sub>3</sub>
L8	-CONH-	-O-	不存在	8	3	6	-CH <sub>3</sub>
L9	-CONH-	-O-	不存在	5	7	9	-CH <sub>3</sub>
L10	-CONH-	不存在	-S-	7	4	4	-CH <sub>3</sub>
L11	-CONH-	不存在	-S-	5	2	6	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> - CH <sub>3</sub>
L12	-CONH-	不存在	-S-	9	4	5	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> - CH <sub>3</sub>
L13	-CONH-	不存在	-S-	7	5	2	-CH <sub>2</sub> CH 3
L14	-CONH-	-S-	-S-	3	4	5	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> - CH <sub>3</sub>
L15	-CONH-	-S-	-S-	6	5	3	-CH <sub>2</sub> CH 3
L16	-CONH-	-S-	-O-	3	4	5	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub>
L17	-CONH-	-O-	-O-	5	4	6	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> - CH <sub>3</sub>
L18	-C(O)O-	-O-	不存在	5	7	2	-CH <sub>3</sub>
L19	-C(O)O-	不存在	-O-	3	6	4	-CH <sub>2</sub> CH 3
L20	-NHCO-	-S-	不存在	3	3	5	-CH <sub>3</sub>
L21	-NHCO-	不存在	-S-	4	4	5	-CH <sub>3</sub>
L22	-S-S-	不存在	-S-	8	4	2	-CH <sub>3</sub>

[0101] 本发明提供了一种具有结构式 (IA) 的化合物, 该化合物为阳离子脂质或其药学上可接受的盐:



[0103] 其中：

[0104]  $R_1$  为任选取代的烷基、烯基、炔基或  $-(CH_2)_p Q'$ ；当取代基为  $-(CH_2)_p Q'$  时， $Q'$  为 OH、烷氧基、 $-NH_2$  或烷基氨基， $p$  为 1、2、3、4、5 或 6；

[0105]  $R'$  不存在或为取代的氢或烷基；

[0106]  $k$ 、 $l$ 、 $m$  和  $n$  各自独立地为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；

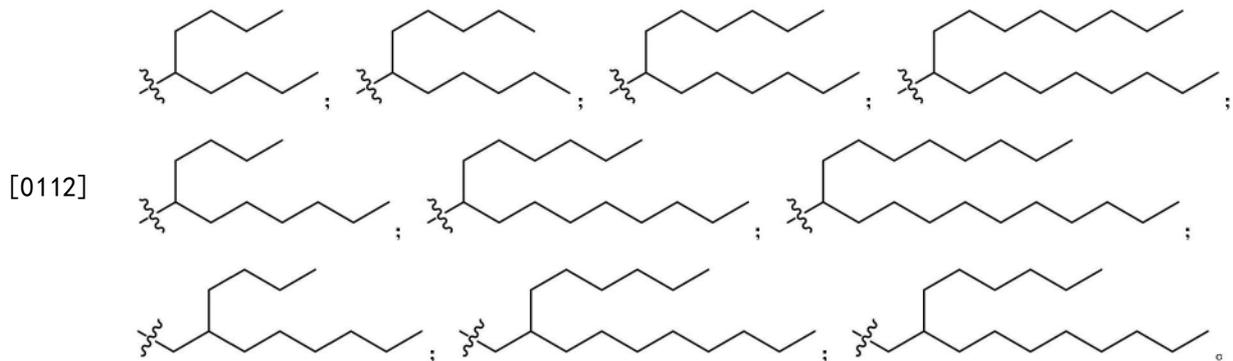
[0107]  $M_1$  和  $M_2$  各自独立地为不存在或为取代的  $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S-S-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NH C(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-C(S)O-$ 、 $-NH-C(O)O-$  或  $-OC(O)-NH-$ ；

[0108]  $Q_1$  为取代的  $-O-$  或  $-S-$ ；

[0109]  $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  各自独立地为取代的 C1-C24 亚烷基或 C2-C24 亚烯基。

[0110] 在特定的实验方案中，式 (IA) 中的  $M_1$ 、 $M_2$  各自独立地为  $-C(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$  或  $-OC(O)-$ 。

[0111] 在特定的实验方案中，化合物 IA 中的  $R_2$  各自独立的选自以下结构之一：



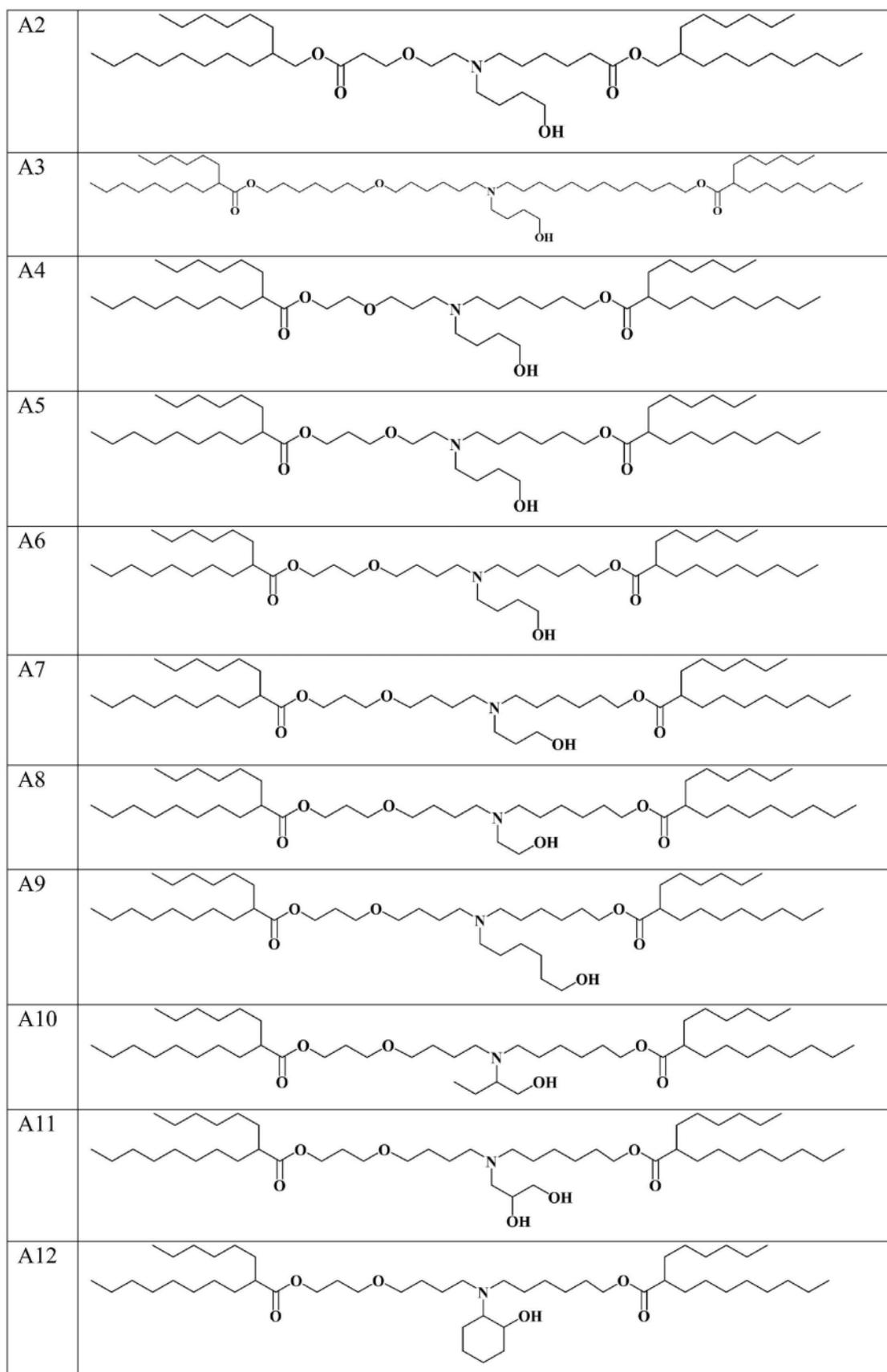
[0113] 在特定实施方案中，所述阳离子脂质选自下表中式 A1~A12。

[0114] 表 2

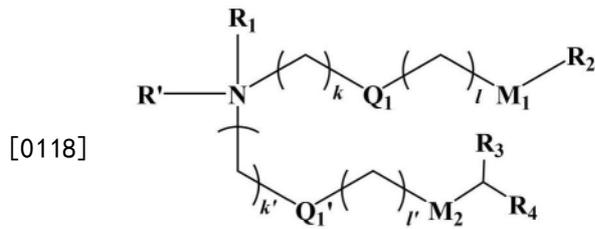
[0115]

编号	结构
A1	

[0116]



[0117] 一种具有结构式 (IB) 的化合物, 该化合物为阳离子脂质或其药学上可接受的盐:



式 (IB)

[0119] 其中：

[0120]  $R_1$  为任选取代的烷基、烯基、炔基或  $-(CH_2)_p Q'$ ；当取代基为  $-(CH_2)_p Q'$  时， $Q'$  为 OH、烷氧基、 $-NH_2$  或烷基氨基， $p$  为 1、2、3、4、5 或 6；

[0121]  $R'$  不存在或为取代的氢或烷基；

[0122]  $k$ 、 $l$ 、 $k'$  和  $l'$  各自独立地为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；

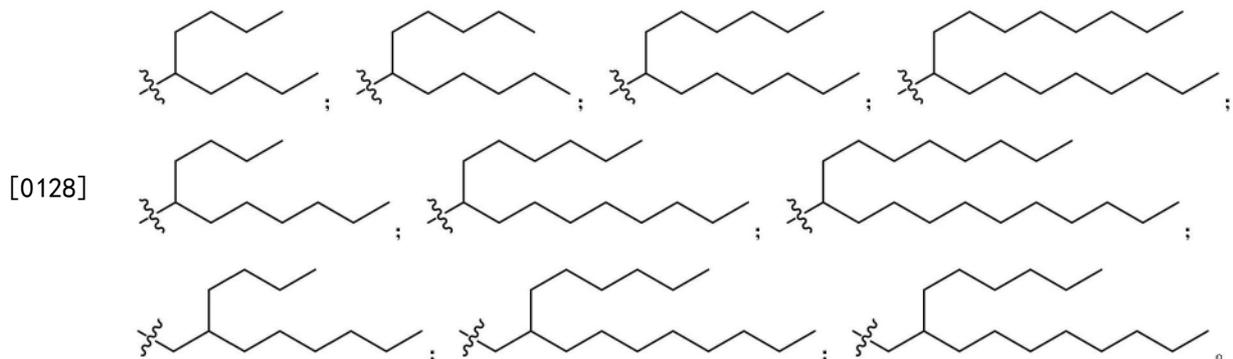
[0123]  $M_1$  和  $M_2$  各自独立地为不存在或为取代的  $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-S-S-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NH-C(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-C(S)O-$ 、 $-NH-C(O)O-$  或  $-OC(O)-NH-$ ；

[0124]  $Q_1$ 、 $Q_1'$  为取代的  $-O-$  或  $-S-$ ；

[0125]  $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  各自独立地为取代的 C1-C24 亚烷基或 C2-C24 亚烯基。

[0126] 在特定的实验方案中，化合物式 (IB) 中的  $M_1$ 、 $M_2$  各自独立地为  $-C(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$  或  $-OC(O)-$ 。

[0127] 在特定的试验方案中，化合物式 (IB) 中的  $R_2$  各自独立的选自以下结构之一：



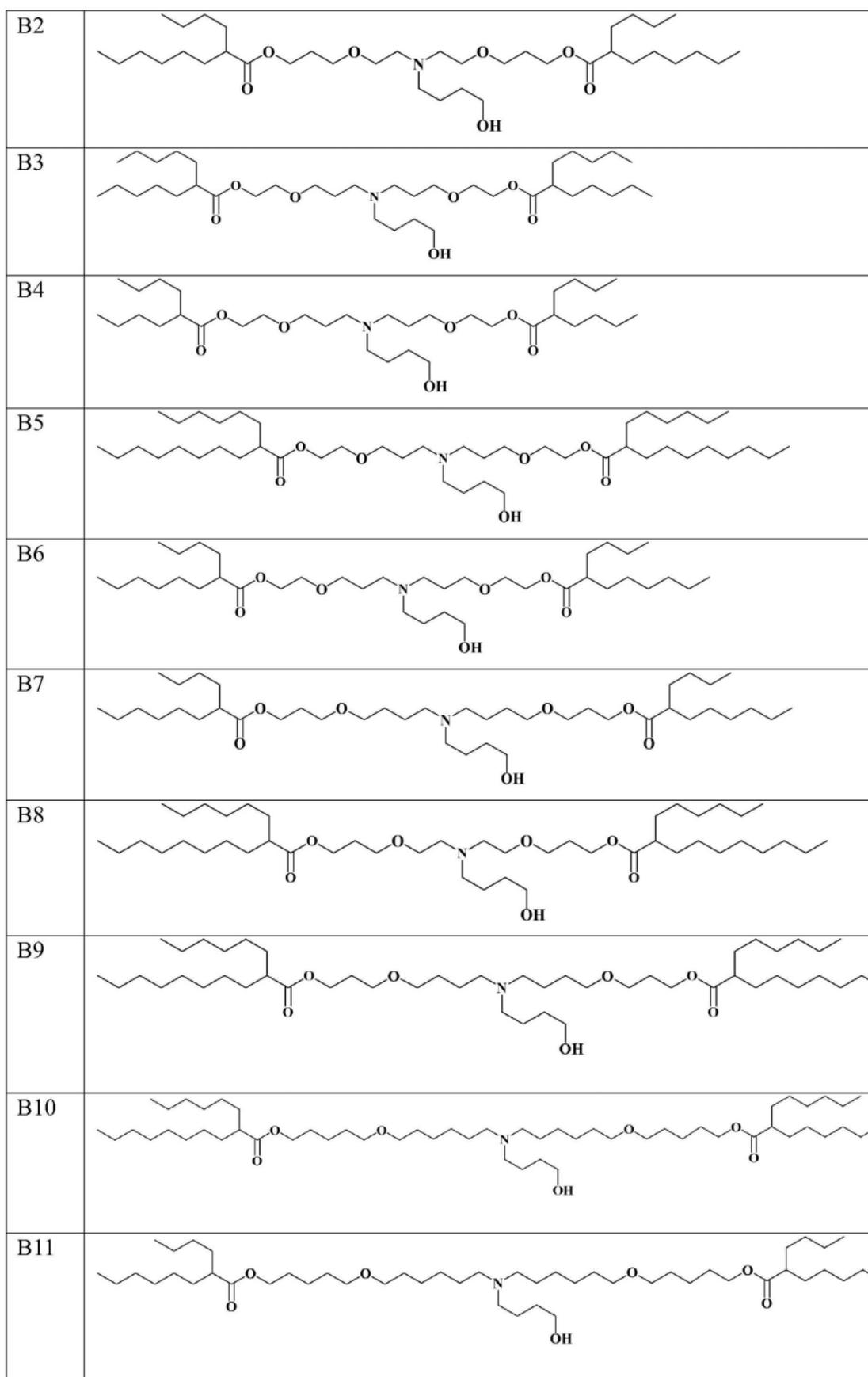
[0129] 在特定实施方案中，所述阳离子脂质选自下表中式 B1~B11。

[0130] 表3

[0131]

编号	结构
B1	

[0132]



[0133] 可以通过已知的有机合成技术,包括在实施例中描述的方法,来制备本发明的化合物。应当理解,通过阅读本文描述,可对实施方案的某些非关键变量进行改变,这对于本

领域技术人员而言将是显而易见的。

[0134] 本发明还公开了一种包括本发明所述的阳离子脂质的脂质颗粒,所述脂质颗粒为纳米颗粒,所述脂质颗粒的平均直径为约25nm至约300nm,例如约50nm至200nm或约100nm至约200nm。在一个实施方案中,所述脂质颗粒包括本发明所述式I的化合物。进一步的,在特定的实施方案中,所述脂质颗粒包括如本发明所述式II-V中任一项的化合物或者包括本发明所述式VI、VII、VIII或表1中L1-L22任一项的化合物。

[0135] 所述脂质颗粒还可以是阳离子脂质在其药学上可接受的盐。脂质颗粒进一步包含一种或多种非阳离子脂质,如中性脂质。在某些其他实施方案中,脂质颗粒进一步还包含一种或多种能够减少或抑制颗粒聚集的缀合的脂质。脂质颗粒中的非阳离子脂质组分可以包含但不限于磷脂、胆固醇(或胆固醇衍生物)或其混合物。磷脂包含但不限于DOPE、DOPC、DSPC、DPPC的一种或几种组合。能够减少或抑制颗粒聚集的缀合的脂质组分包含但不限于聚乙二醇(PEG)-脂质缀合物,具体的PEG-脂质缀合物包含但不限于PEG-DMG、PEG-DAG、PEG-DAA缀合物的一种或几种组合。

[0136] 在一个特定的实施方案中,所述脂质颗粒包含本发明的阳离子脂质、中性脂质、固醇和PEG-脂质缀合物。所述脂质颗粒包括按摩尔百分比计约25%至约75%的阳离子脂质,例如按摩尔百分比计约30%至约60%,约40%至约70%,约35%、约50%、约70.1%或约61.5%。所述脂质颗粒包括按摩尔百分比计约0%至约20%的中性脂质,例如按摩尔百分比计约5%至约10%,约4%至约12%,约15%、约6.3%或约0%,在一个特定实施方案中,所述中性脂质为DSPC或DOPE。所述脂质颗粒包括按摩尔百分比计约5%至50%的固醇,例如按摩尔百分比计约10%至40%,约15至35%,约6.1%、约12%、约31.5%或约33.7%,在一个特定实施方案中,所述固醇为胆固醇。所述脂质颗粒包括按摩尔百分比计约0.1%至约20%的PEG缀合物,例如按摩尔百分比计约0.2%至20%,约1.5至15%,约10%、约12%、约1.5%或约0.7%,在一个特定实施方案中,PEG-脂质缀合物为PEG-DMG。

[0137] 在一个特定实施方案中,按摩尔百分比计,所述脂质颗粒包括25-75%的阳离子脂质、0.5-15%的中性脂质、5-50%的固醇和0.5-20%的PEG缀合物。

[0138] 表4根据一些非限制性实施方案的示例性脂质颗粒(以摩尔%计)

脂质颗粒	式 VI 化合物	DOPE	胆固醇	PEG-DMG
[0139] 1	50	10	39	1
2	40	10	40	10
3	39.5	12	48	0.5

[0140] 4	60.7	8.4	20.5	10.4
5	50	10	39.1	0.9

[0141] 表5根据一些非限制性实施例的示例性脂质颗粒(以摩尔%计)

脂质颗粒	式VII化合物	DSPC	胆固醇	PEG-DAG
[0142] 1	50.5	10	38.5	1
2	40	15	40	5

3	39.5	6	44	10.5
4	60.7	12.4	20.5	6.4
5	51	9	39.1	0.9

[0143] 本发明还公开了一种药物组合物,其包含本发明所述的脂质颗粒和治疗剂或者活性剂,活性剂或治疗剂包含核酸。在某些实施方案中,核酸包含干扰RNA分子,例如siRNA、miRNA、shRNA或其混合物。在某些实施方案中,核酸包含单链或双链DNA、RNA或DNA/RNA杂交体例如mRNA、反义寡核苷酸、核酶、质粒、免疫刺激性寡核苷酸或其混合物。

[0144] 在一些实施方案中,按质量比计,所述脂质颗粒:核酸的比例在约0.5:1至约12:1之间或者在约0.5:1至约30:1之间。

[0145] 活性剂或治疗剂被完全包裹在脂质颗粒内,使得脂质颗粒中的活性剂或治疗剂在水溶液中对例如由核酸酶或蛋白酶引起的酶促降解有抗性,脂质颗粒对哺乳动物如人基本无毒。

[0146] 本发明还提供了一种核酸导入剂,其包含本发明所述的脂质颗粒以及核酸。核酸引入到细胞中的方法为:使细胞与本发明所述的核酸-脂质颗粒接触,在一个特定实施方案中,细胞处于哺乳动物中并且哺乳动物为人。

[0147] 在一个特定试验方案中,向细胞密度为约 $10^3$ 至约 $10^5$ 个细胞/mL,60-80%融合度接种细胞中添加脂质-核酸颗粒。在另一实施方案中,脂质颗粒可用于将核酸递送至细胞或细胞系,包括但不限于A549、HeLa、MDA-MB-231、K562、Jurkat细胞等。

[0148] 本发明还公开了药物组合物在制备用于在受试者中治疗或预防疾病的药物中的应用,其中所述疾病选自病毒感染类疾病、肝脏疾病或癌症;所述药物的给药方式选自口服、鼻内、静脉内、腹膜内、肌肉内、关节内、病灶内、气管内、皮下或皮内。在一些具体实施方案中,药物组合物例如经由肠内或肠胃外施用途径系统施用。在一些优选的实施方案中,哺乳动物为人。

[0149] 在一些实施方案中,经静脉内施用核酸-脂质颗粒药物组合物。在另一些实施方案中,经由肌肉内施用核酸-脂质颗粒药物组合物。在特定的实施方案中,通过注射经静脉内或腹膜内施用核酸-脂质颗粒药物组合物。

[0150] 在一些实施方案中,还可以将核酸-脂质颗粒药物组合物直接敷用到组织上使药物组合物与靶组织接触。敷用可为局部、开放式或封闭式手术。局部指将药物制剂直接敷用到暴露于环境中的组织上,例如皮肤、口咽、外耳道等。开放式手术包括切开患者的皮肤并且直接肉眼观察敷用药物制剂的下层组织的手术。封闭式手术为侵入性手术,其中不可直接看到内部靶组织,例如腰椎穿刺。

[0151] 在一些实施方案中,药物组合物也可呈气雾剂的形式吸入呼吸道,例如肺部。

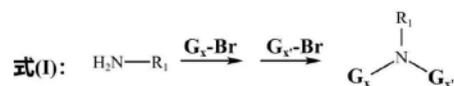
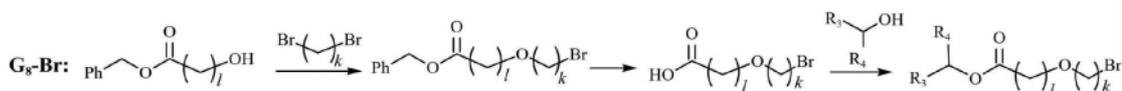
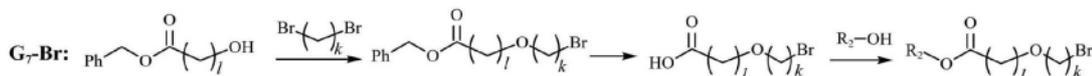
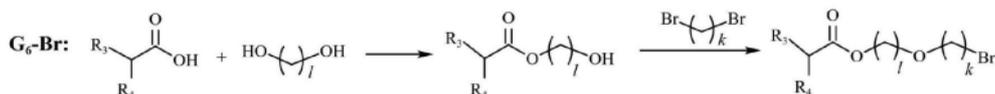
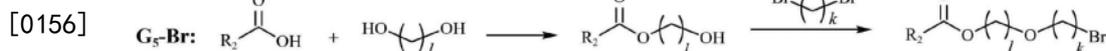
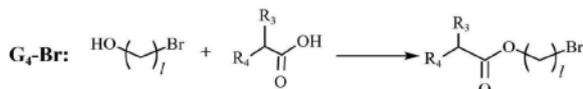
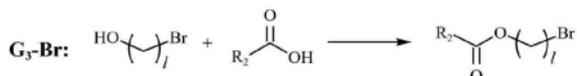
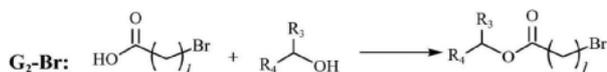
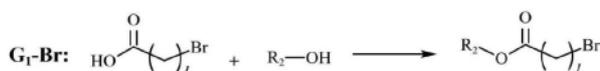
[0152] 在特定实施方案中,包含脂质-核酸颗粒的药物组合物还进一步包含药学上可接受的载体。通常,可采用生理盐水作为药学上可接受的载体。其他适合的载体包括水、5%葡萄糖等,还包括用于提高稳定性的糖蛋白,例如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。

[0153] 本发明还公开了一种制剂,其包含本发明所述的药物组合物。在特定的实施方案中,制剂还包括疫苗或抗原,所述疫苗可包含脂质颗粒,所述脂质颗粒包含免疫刺激性寡核苷酸。在特定的实施方案中,抗原为肿瘤抗原或与传染物缔合,例如病毒、细菌或寄生虫。肿瘤抗原、传染物抗原和其他疾病相关的抗原在本领域内众所周知。一方面,抗原包括但不限

于乙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、肺结核病毒、风疹病毒、天花病毒、流感病毒、麻疹病毒、轮状病毒或冠状病毒。另一方面,抗原为肿瘤抗原,包括Ras、p53、Her2、KSA、TRP1、TRP2或BCR-ab1致癌基因的蛋白。

[0154] 本发明所述的制剂中,所述病毒抗原的来源包括但不限于:逆转录病毒科、小核糖核酸病毒科、杯状病毒科、冠状病毒科、弹状病毒科、丝状病毒科、正黏病毒科、副黏液病毒科、披膜病毒科、黄病毒科、布尼亚病毒科、沙粒病毒科、双核糖核酸病毒科、肝脱氧核糖核酸病毒科、细小病毒科、乳多空病毒科、腺病毒科、疱疹病毒科、彩虹病毒科或未分类的病毒。以下通用反应方案示例性说明了制备本发明化合物的方法,应理解,本领域技术人员能够通过类似的方法或者通过本领域技术人员已知的其他方法来制备这些化合物。还应理解,本领域技术人员能够以下文描述的类似的方式,通过使用适当的起始组分并按照规定需要修改合成的参数,来制备下文未明确说明的其他化合物。

[0155] 通用反应方案

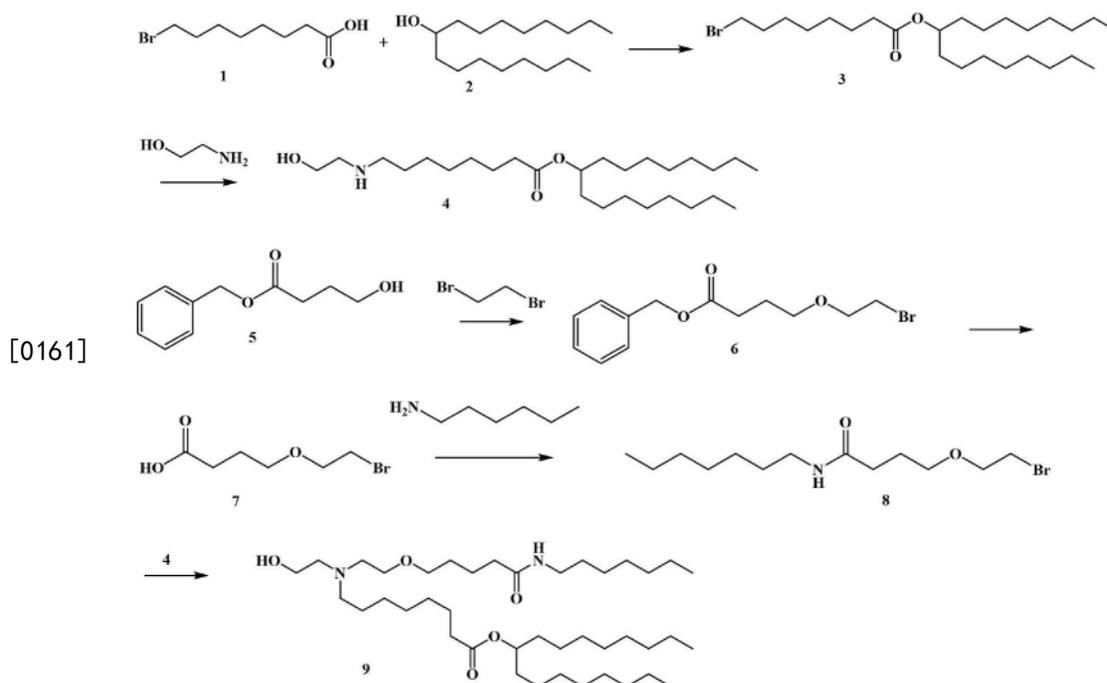


[0157] 通用反应方案提供了用于制备本发明化合物的示例性方法。方案中的 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$ 、 $k$ 、 $l$ 、 $k'$  和 $l'$  如本文所定义,方案中的 $\text{G}_x$ 、 $\text{G}_{x'}$  分别各自独立地取自 $\text{G}_1 \sim \text{G}_8$ ,通用反应方案中所用原料可通过购买或根据本领域已知的方法制备得到。

[0158] 实施例

[0159] 下面将通过具体实施例来更详细地描述本发明。以下实施例出于说明的目的而提供,并不旨在以任何方式限制本发明。本领域技术人员将很容易地认识到,可改变或修改某个非关键性参数以产生基本上相同的结果。

[0160] 实施例1式VI化合物的合成



[0162] 化合物3的合成:向化合物1 (10.0g, 44.2mmol) 和化合物2 (15.0g, 58mmol) 的二氯甲烷 (200mL) 溶液中添加二异丙基乙胺 (33mL, 187mmol)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐 (11g, 58mmol) 和DMAP (1.14g, 9mmol)。在室温下搅拌反应混合物14h。然后用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (400mL) 稀释反应混合物并且用饱和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液 (300mL) 洗涤。用无水 $\text{MgSO}_4$ 干燥有机层, 过滤并浓缩。用硅胶柱色谱法纯化粗产物以获得化合物3 (8.1g, 38%)。 $\text{C}_{25}\text{H}_{49}\text{BrO}_2$  (M+H)<sup>+</sup>的分子量计算值为461.57, 测量值为461.5。

[0163] 化合物4的合成:将化合物3 (4g, 8.6mmol) 与2-羟基乙胺 (15mL, 248mmol) 溶解在乙醇中 (50mL), 并在62℃下搅拌18小时。反应结束后旋转蒸发除去有机溶剂, 然后用乙酸乙酯溶解并且用水洗涤。用无水 $\text{MgSO}_4$ 干燥有机层, 过滤并浓缩。用硅胶柱色谱法纯化粗产物以获得化合物4 (3g, 78%)。 $\text{C}_{27}\text{H}_{55}\text{NO}_3$  (M+H)<sup>+</sup>的分子量计算值为442.68, 测量值为442.7。化合物6的合成:将1,2-二溴乙烷 (20g, 108.7mmol) 与碳酸钾 (18g, 130mmol) 在200mL DMF中溶解, 加热至60℃, 然后将化合物5 (10g, 51.5mmol) 的DMF溶液滴加进去, 反应6个小时。反应结束后旋转蒸发除去有机溶剂, 然后用二氯甲烷溶解并且用水洗涤。用无水 $\text{MgSO}_4$ 干燥有机层, 过滤并浓缩。用硅胶柱色谱法纯化粗产物以获得化合物6 (4.3g, 28%)。 $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{BrO}_3$  (M+H)<sup>+</sup>的分子量计算值为301.18, 测量值为301.2。

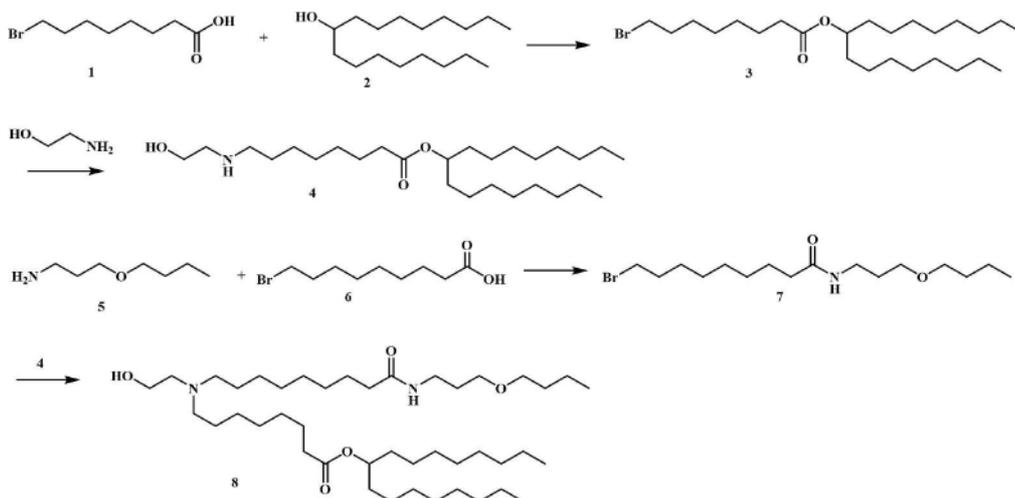
[0164] 化合物7的合成:向化合物6 (4.0g, 13.3mmol) 和Pd/C (0.4g) 加入30mL乙醇溶解, 在氢气环境下反应两个小时。反应结束后旋转蒸发除去有机溶剂, 然后用硅胶柱色谱法纯化粗产物以获得化合物7 (2.1g, 75%)。 $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{BrO}_3$  (M+H)<sup>+</sup>的分子量计算值为211.06, 测量值为211。

[0165] 化合物8的合成:向化合物7 (2.0g, 9.5mmol) 和正己胺 (0.96g, 9.5mmol) 的二氯甲烷 (30mL) 溶液中添加二异丙基乙胺 (3.3mL, 19mmol)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐 (1.8g, 9.5mmol) 和DMAP (0.11g, 0.9mmol)。在室温下搅拌反应混合物12h。然后用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100mL) 稀释反应混合物并且用饱和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液 (100mL) 洗涤。用无水 $\text{MgSO}_4$ 干燥有机层, 过滤并浓缩。用硅胶柱色谱法纯化粗产物以获得化合物8 (2.1g, 72%)。 $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{BrNO}_2$

(M+H)<sup>+</sup>的分子量计算值为308.26,测量值为308.2。

[0166] 化合物9的合成:向化合物4 (1.4g, 3.25mmol) 和化合物8 (1g, 3.25mmol) 的二氯甲烷 (30mL) 溶液中添加二异丙基乙胺 (0.42g, 3.25mmol), 在65℃搅拌反应混合物18h。反应结束后旋转蒸发除去有机溶剂, 然后用乙酸乙酯溶解并且用水洗涤。用无水MgSO<sub>4</sub>干燥有机层, 过滤并浓缩。用硅胶柱色谱法纯化粗产物以获得化合物9 (0.6g, 27%)。C<sub>41</sub>H<sub>82</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (M+H)<sup>+</sup>的分子量计算值为683.12, 测量值为683.2。

[0167] 实施例2式VII化合物的合成



[0168]

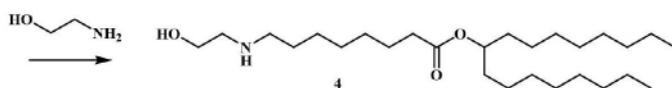
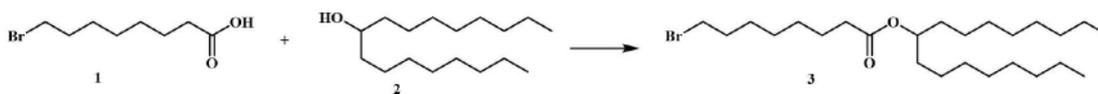
[0169] 化合物3的合成:向化合物1 (10.0g, 44.2mmol) 和化合物2 (15.0g, 58mmol) 的二氯甲烷 (200mL) 溶液中添加二异丙基乙胺 (33mL, 187mmol)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐 (11g, 58mmol) 和DMAP (1.14g, 9mmol)。在室温下搅拌反应混合物14h。然后用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400mL) 稀释反应混合物并且用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液 (300mL) 洗涤。用无水MgSO<sub>4</sub>干燥有机层, 过滤并浓缩。用硅胶柱色谱法纯化粗产物以获得化合物3 (8.1g, 38%)。C<sub>25</sub>H<sub>49</sub>BrO<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup>的分子量计算值为461.57, 测量值为461.5。

[0170] 化合物4的合成:将化合物3 (4g, 8.6mmol) 与2-羟基乙胺 (15mL, 248mmol) 溶解在乙醇中 (50mL), 并在62℃下搅拌18小时。反应结束后旋转蒸发除去有机溶剂, 然后用乙酸乙酯溶解并且用水洗涤。用无水MgSO<sub>4</sub>干燥有机层, 过滤并浓缩。用硅胶柱色谱法纯化粗产物以获得化合物4 (3g, 78%)。C<sub>27</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>3</sub> (M+H)<sup>+</sup>的分子量计算值为442.68, 测量值为442.7。

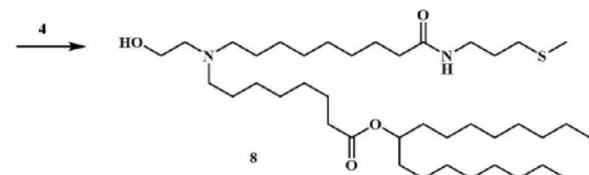
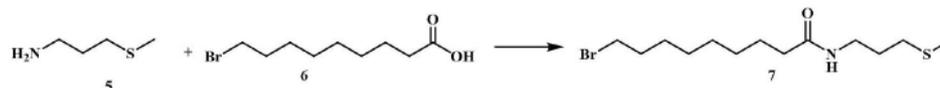
化合物7的合成:向化合物5 (1.0g, 7.6mmol) 和化合物6 (1.7g, 7.6mmol) 的二氯甲烷 (30mL) 溶液中添加二异丙基乙胺 (2.6mL, 15mmol)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐 (1.4g, 7.6mmol) 和DMAP (0.08g, 0.7mmol)。在室温下搅拌反应混合物12h。然后用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100mL) 稀释反应混合物并且用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液 (100mL) 洗涤。用无水MgSO<sub>4</sub>干燥有机层, 过滤并浓缩。用硅胶柱色谱法纯化粗产物以获得化合物7 (1.8g, 67%)。C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>BrNO<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup>的分子量计算值为350.34, 测量值为350.4。

[0171] 化合物8的合成:向化合物4 (1.4g, 3.25mmol) 和化合物7 (1.1g, 3.25mmol) 的二氯甲烷 (30mL) 溶液中添加二异丙基乙胺 (0.42g, 3.25mmol), 在65℃搅拌反应混合物18h。反应结束后旋转蒸发除去有机溶剂, 然后用乙酸乙酯溶解并且用水洗涤。用无水MgSO<sub>4</sub>干燥有机层, 过滤并浓缩。用硅胶柱色谱法纯化粗产物以获得化合物9 (0.72g, 31%)。C<sub>43</sub>H<sub>86</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (M+H)<sup>+</sup>的分子量计算值为710.65, 测量值为710.6。其核磁共振结果图如图1所示。

## [0172] 实施例3式VIII化合物的合成



## [0173]



[0174] 化合物3的合成:向化合物1 (10.0g, 44.2mmol) 和化合物2 (15.0g, 58mmol) 的二氯甲烷 (200mL) 溶液中添加二异丙基乙胺 (33mL, 187mmol)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐 (11g, 58mmol) 和DMAP (1.14g, 9mmol)。在室温下搅拌反应混合物14h。然后用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (400mL) 稀释反应混合物并且用饱和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液 (300mL) 洗涤。用无水 $\text{MgSO}_4$ 干燥有机层, 过滤并浓缩。用硅胶柱色谱法纯化粗产物以获得化合物3 (8.1g, 38%)。 $\text{C}_{25}\text{H}_{49}\text{BrO}_2$  (M+H)<sup>+</sup>的分子量计算值为461.57, 测量值为461.5。

[0175] 化合物4的合成:将化合物3 (4g, 8.6mmol) 与2-羟基乙胺 (15mL, 248mmol) 溶解在乙醇中 (50mL), 并在62℃下搅拌18小时。反应结束后旋转蒸发除去有机溶剂, 然后用乙酸乙酯溶解并且用水洗涤。用无水 $\text{MgSO}_4$ 干燥有机层, 过滤并浓缩。用硅胶柱色谱法纯化粗产物以获得化合物4 (3g, 78%)。 $\text{C}_{27}\text{H}_{55}\text{NO}_3$  (M+H)<sup>+</sup>的分子量计算值为442.68, 测量值为442.7。

化合物7的合成:向化合物5 (1.0g, 9.5mmol) 和化合物6 (2.2g, 9.5mmol) 的二氯甲烷 (30mL) 溶液中添加二异丙基乙胺 (3.3mL, 19mmol)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐 (1.8g, 9.5mmol) 和DMAP (1.1g, 0.95mmol)。在室温下搅拌反应混合物12h。然后用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100mL) 稀释反应混合物并且用饱和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液 (100mL) 洗涤。用无水 $\text{MgSO}_4$ 干燥有机层, 过滤并浓缩。用硅胶柱色谱法纯化粗产物以获得化合物7 (2.3g, 74.7%)。 $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{BrNO}_2$  (M+H)<sup>+</sup>的分子量计算值为324.32, 测量值为324.3。

[0176] 化合物8的合成:向化合物4 (1.4g, 3.25mmol) 和化合物7 (1.05g, 3.25mmol) 的二氯甲烷 (30mL) 溶液中添加二异丙基乙胺 (0.42g, 3.25mmol), 在65℃搅拌反应混合物18h。反应结束后旋转蒸发除去有机溶剂, 然后用乙酸乙酯溶解并且用水洗涤。用无水 $\text{MgSO}_4$ 干燥有机层, 过滤并浓缩。用硅胶柱色谱法纯化粗产物以获得化合物9 (0.8g, 36%)。 $\text{C}_{40}\text{H}_{80}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$  (M+H)<sup>+</sup>的分子量计算值为685.15, 测量值为685.2。

## [0177] 实施例4化合物A6的合成

[0178] 将2-己基癸酸 (8.8g, 34.3mmol)、DCC (8.5g, 41.2mmol) 和DMAP (0.47g, 3.5mmol) 加入到6-溴-1-己醇 (6.4g, 35.1mmol) 的二氯甲烷 (200mL) 溶液中, 并搅拌溶液过夜。过滤反应混合物, 并去除溶剂。将残留物溶于二氯甲烷中并用稀盐酸洗涤, 用无水硫酸镁干燥, 得到中间体A6-1 (3.8g)。

[0179] 将A6-1 (3.8g, 9.1mmol) 和4-氨基-1-丁醇 (1.6g, 18.2mmol) 溶于乙醇中65℃搅拌反应16小时然后冷却到室温后真空干燥。粗产物用乙酸乙酯和饱和的NaHCO<sub>3</sub>萃取, 溶剂经真空干燥去除, 最后用硅胶色谱柱提纯, 得到中间体A6-2 (3.6g)。

[0180] 将2-己基癸酸 (8.7g, 33.9mmol)、DCC (8.4g, 40.7mmol) 和DMAP (0.46g, 3.4mmol) 加入到1,3-丙二醇 (10.3g, 135mmol) 的二氯甲烷 (200mL) 溶液中, 并搅拌溶液过夜。过滤反应混合物, 并去除溶剂。将残留物溶于二氯甲烷中并用稀盐酸洗涤, 用无水硫酸镁干燥, 得到中间体A6-3 (7.9g)。

[0181] 将中间体A6-3 (4.3g, 12.9mmol) 溶于二氯甲烷 (150mL) 中, 用钠盐处理后加入1,4-二溴丁烷 (5.6g, 25.8mmol), 搅拌反应过夜, 并通过硅胶柱提纯, 得到中间体A6-4 (3.9g)。

[0182] 将中间体A6-2 (3.6g, 7.1mmol) 和中间体A6-4 (2.3g, 7.1mmol) 在N,N-二异丙基乙胺 (0.91g, 7.1mmol) 的乙醇液中65℃搅拌反应16小时然后冷却到室温后真空干燥, 粗产物用乙酸乙酯和饱和的NaHCO<sub>3</sub>萃取, 有机相经真空干燥去除, 产物用硅胶色谱柱提纯, 得到化合物A6 (0.76g)。

[0183] 实施例5化合物A7的合成

[0184] 将中间体A6-1 (1.18g, 2.8mmol) 和3-氨基-1-丙醇 (0.21g, 2.8mmol) 溶于乙醇中65℃搅拌反应16小时然后冷却到室温后真空干燥。粗产物用乙酸乙酯和饱和的NaHCO<sub>3</sub>萃取, 溶剂经真空干燥去除, 最后用硅胶色谱柱提纯, 得到中间体A7-1 (1.05g)。

[0185] 将中间体A7-1 (1.05g, 2.1mmol) 和中间体A6-3 (0.71g, 2.1mmol), 合成步骤同实施例14) 在N,N-二异丙基乙胺 (0.27g, 7.1mmol) 的乙醇液中65℃搅拌反应16小时然后冷却到室温后真空干燥, 粗产物用乙酸乙酯和饱和的NaHCO<sub>3</sub>萃取, 有机相经真空干燥去除, 产物用硅胶色谱柱提纯, 得到化合物A7 (0.39g)。

[0186] 实施例6化合物B3的合成

[0187] 将二戊基乙酸 (8.0g, 39.9mmol)、DCC (9.9g, 47.9mmol) 和DMAP (0.54g, 4.0mmol) 加入到乙二醇 (8.6mL, 155mmol) 的二氯甲烷 (200mL) 溶液中, 并搅拌溶液过夜。过滤反应混合物, 并去除溶剂。将残留物溶于二氯甲烷中并用稀盐酸洗涤, 用无水硫酸镁干燥, 得到中间体B3-1, 产量为7.6g。

[0188] 将中间体B3-1 (3.8g, 15.5mmol) 溶于二氯甲烷 (100mL) 中, 用钠盐处理后加入1,3-二溴丙烷 (6.3g, 31.0mmol), 搅拌反应过夜, 并通过硅胶柱提纯, 得到中间体B3-2 (3.6g)。

[0189] 将中间体2 (3.6g, 9.85mmol), 4-氨基-1-丁醇 (0.45g, 4.9mmol) 和N,N-二异丙基乙胺 (0.63g, 4.9mmol) 溶于乙醇中65℃搅拌反应16小时, 然后冷却到室温后真空干燥。粗产物用乙酸乙酯和饱和的NaHCO<sub>3</sub>萃取, 溶剂经真空干燥去除, 最后用硅胶色谱柱提纯, 得到化合物B3 (1.6g)。

[0190] 实施例7化合物B4的合成

[0191] 将二丁基乙酸 (8.0g, 46.4mmol)、DCC (11.5g, 55.7mmol) 和DMAP (0.62g, 4.6mmol) 加入到乙二醇 (10.3mL, 186mmol) 的二氯甲烷 (200mL) 溶液中, 并搅拌溶液过夜。过滤反应混合物, 并去除溶剂。将残留物溶于二氯甲烷中并用稀盐酸洗涤, 用无水硫酸镁干燥, 得到中间体B4-1 (7.8g)。

[0192] 将中间体B4-1 (3.9g, 16.2mmol) 溶于二氯甲烷 (150mL) 中, 用钠盐处理后加入1,3-二溴丙烷 (6.6g, 32.5mmol), 搅拌反应过夜, 并通过硅胶柱提纯, 得到中间体B4-2 (3.8g)。

[0193] 将中间体B4-2 (3.8g, 10.5mmol), 4-氨基-1-丁醇 (0.5g, 5.2mmol) 和N,N-二异丙基乙胺 (0.67g, 5.2mmol) 溶于乙醇中65℃搅拌反应16小时然后冷却到室温后真空干燥。粗产物用乙酸乙酯和饱和的NaHCO<sub>3</sub>萃取, 溶剂经真空干燥去除, 最后用硅胶色谱柱提纯, 得到化合物B4 (1.7g)。

[0194] 实施例8化合物B5的合成

[0195] 将2-己基癸酸 (12.5g, 48.7mmol)、DCC (12.1g, 58.5mmol) 和DMAP (0.65g, 4.9mmol) 加入到乙二醇 (10.8mL, 195mmol) 的二氯甲烷 (200mL) 溶液中, 并搅拌溶液过夜。过滤反应混合物, 并去除溶剂。将残留物溶于二氯甲烷中并用稀盐酸洗涤, 用无水硫酸镁干燥, 得到中间体B5-1 (12.2g)。

[0196] 将中间体B5-1 (6.1g, 19.1mmol) 溶于二氯甲烷 (100mL) 中, 用钠盐处理后加入1,3-二溴丙烷 (7.6g, 38.2mmol), 搅拌反应过夜, 并通过硅胶柱提纯, 得到中间体B5-2 (5.9g)。

[0197] 将中间体B5-2 (5.9g, 13.4mmol), 4-氨基-1-丁醇 (0.6g, 6.7mmol) 和N,N-二异丙基乙胺 (0.86g, 6.7mmol) 溶于乙醇中65℃搅拌反应16小时然后冷却到室温后真空干燥。粗产物用乙酸乙酯和饱和的NaHCO<sub>3</sub>萃取, 溶剂经真空干燥去除, 最后用硅胶色谱柱提纯, 得到化合物B5 (2.12g)。

[0198] 实施例9化合物B6的合成

[0199] 将2-丁基辛酸 (10.2g, 50.9mmol)、DCC (12.6g, 61.1mmol) 和DMAP (0.68g, 5.1mmol) 加入到乙二醇 (11.3mL, 204mmol) 的二氯甲烷 (200mL) 溶液中, 并搅拌溶液过夜。过滤反应混合物, 并去除溶剂。将残留物溶于二氯甲烷中并用稀盐酸洗涤, 用无水硫酸镁干燥, 得到中间体B6-1 (10.0g)。

[0200] 将中间体B6-1 (5.0g, 18.6mmol) 溶于二氯甲烷 (100mL) 中, 用钠盐处理后加入1,3-二溴丙烷 (7.5g, 37.3mmol), 搅拌反应过夜, 并通过硅胶柱提纯, 得到中间体B6-2。

[0201] 将中间体B6-2 (4.8g, 12.4mmol) 和4-氨基-1-丁醇 (0.55g, 6.2mmol) 和N,N-二异丙基乙胺 (0.8g, 6.2mmol) 溶于乙醇中65℃搅拌反应16小时然后冷却到室温后真空干燥。粗产物用乙酸乙酯和饱和的NaHCO<sub>3</sub>萃取, 溶剂经真空干燥去除, 最后用硅胶色谱柱提纯, 得到化合物B6 (1.8g)。

[0202] 实施例10化合物B8的合成

[0203] 将中间体A6-3 (3.8g, 11.9mmol) 溶于二氯甲烷 (150mL) 中, 用钠盐处理后加入1,2-二溴乙烷 (4.5g, 23.9mmol), 搅拌反应过夜, 并通过硅胶柱提纯, 得到中间体B8-1 (3.6g)。

[0204] 将中间体B8-1 (3.6g, 8.2mmol), 4-氨基-1-丁醇 (0.36g, 4.1mmol) 和N,N-二异丙基乙胺 (0.53g, 4.1mmol) 溶于乙醇中65℃搅拌反应16小时然后冷却到室温后真空干燥。粗产物用乙酸乙酯和饱和的NaHCO<sub>3</sub>萃取, 溶剂经真空干燥去除, 最后用硅胶色谱柱提纯, 得到化合物B8 (1.2g)。

[0205] 实施例11化合物B9的合成

[0206] 将中间体A6-3 (4.3g, 12.9mmol) 溶于二氯甲烷 (150mL) 中, 用钠盐处理后加入1,4-二溴丁烷 (5.6g, 25.8mmol), 搅拌反应过夜, 并通过硅胶柱提纯, 得到中间体B9-1 (3.9g)。

[0207] 将中间体B9-1 (3.9g, 8.3mmol), 4-氨基-1-丁醇 (0.36g, 4.1mmol) 和N,N-二异丙基乙胺 (0.53g, 4.1mmol) 溶于乙醇中65℃搅拌反应16小时然后冷却到室温后真空干燥。粗产物用乙酸乙酯和饱和的NaHCO<sub>3</sub>萃取, 溶剂经真空干燥去除, 最后用硅胶色谱柱提纯, 得到化

合物B9 (1.3g)。

[0208] 实施例12化合物B10的合成

[0209] 将2-己基癸酸(14.5g, 56.5mmol)、DCC(14.0g, 67.8mmol)和DMAP(0.76g, 5.7mmol)加入到1,5-戊二醇(23.1g, 222mmol)的二氯甲烷(200mL)溶液中,并搅拌溶液过夜。过滤反应混合物,并去除溶剂。将残留物溶于二氯甲烷中并用稀盐酸洗涤,用无水硫酸镁干燥,得到中间体B10-1(13.1g)。

[0210] 将中间体B10-1(6.65g, 18.4mmol)溶于二氯甲烷(150mL)中,用钠盐处理后加入1,6-二溴己烷(8.9g, 36.7mmol),搅拌反应过夜,并通过硅胶柱提纯,得到中间体B10-2(6.2g)。将中间体B10-2(6.2g, 11.9mmol),4-氨基-1-丁醇(0.55g, 5.9mmol)和N,N-二异丙基乙胺(0.76g, 5.9mmol)溶于乙醇中65℃搅拌反应16小时然后冷却到室温后真空干燥。粗产物用乙酸乙酯和饱和的NaHCO<sub>3</sub>萃取,溶剂经真空干燥去除,最后用硅胶色谱柱提纯,得到化合物B10(1.5g)。

[0211] 实施例13核酸-脂质颗粒的制备及表征

[0212] 将阳离子脂质、DSPC、胆固醇和PEG-脂质溶解于乙醇中,摩尔比分别为40/10/40/10。将脂质混合物添加到缓冲液(50mM柠檬酸盐, pH 4)中,混合至乙醇和脂质最终浓度分别为25% (vol/vol)和5mg/mL,在室温下平衡2min。

[0213] 将10% (wt/wt)的siRNA(溶解于pH 4.0的50mM柠檬酸盐中,含有25%乙醇的水溶液)添加到颗粒中,再在35℃下孵育混合物30min以使复合物重新组装并包裹siRNA。然后用PBS(155mM NaCl, 3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5)透析置换外部缓冲液,最后储存在4℃环境中。

[0214] 以上制备的脂质纳米颗粒(LNP)的粒径、多分散指数(PDI)以及表面电位用动态光散射法(ZetasizerNano; Malvern instruments Ltd.)进行了测定。

[0215] 而对siRNA包封率及siRNA回收率,用RiboGreen(Invitrogen; Thermo Fischer Scientific)进行了测定。具体地说:将以上制备的各种LNP用10mM pH 7.4HEPES缓冲液稀释成1000ng/mL,将其制成样品溶液。另外,将待检测的核酸-脂质纳米颗粒用10mM pH 7.4HEPES缓冲液阶梯性稀释成0~2000ng/mL,将其制成标准曲线溶液。在这些溶液之外,准备了用10mM HEPES缓冲液将葡聚糖硫酸、Triton X-100、Ribogreen分别稀释成0.08mg/mL、0.4%、5μL/mL而成的测定溶液。另外,也准备了用10mM HEPES缓冲液替换Triton X-100而成的溶液。向96孔板添加标准曲线溶液或样品溶液50μL,进一步分别加入含有或者不含Triton X-100的测定溶液50μL并混合,以700rpm搅拌5分钟之后,测定了在激发波长500nm及观测波长525nm的荧光强度。通过用含有Triton X-100的条件下测定时的siRNA量除以1000ng/mL,算出了siRNA回收率。再从以含有Triton X-100的条件测定时的siRNA量减去以不含Triton X-100的条件测定时的siRNA量,通过用含有Triton X-100的条件测定时的siRNA量除以该值,算出了siRNA封装率。

[0216] 结果示于表6及表7。

[0217] 表6

LNP 编号	阳离子脂质	平均粒径 (nm)	PDI	siRNA 回收率 (%)	siRNA 包封率 (%)
[0218] LNP-1	VI	115	0.06	81	94
LNP-2	VII	123	0.12	87	91
LNP-3	VIII	106	0.08	76	96

[0219] 表7

LNP 编号	阳离子脂质	平均粒径 (nm)	PDI	siRNA 回收率 (%)	siRNA 包封率 (%)
LNP-4	L1	133	0.10	89	91
LNP-5	L2	114	0.06	85	94
LNP-6	L3	106	0.13	83	92
LNP-7	L4	115	0.14	91	89
LNP-8	L5	121	0.13	84	96
LNP-9	L6	129	0.08	86	97
LNP-10	L7	95	0.14	88	95
LNP-11	L8	145	0.23	74	94
[0220] LNP-12	L9	123	0.17	79	93
LNP-13	L10	119	0.07	81	96
LNP-14	L11	121	0.11	83	95
LNP-15	L12	128	0.13	81	97
LNP-16	L13	92	0.18	85	94
LNP-17	L14	124	0.12	87	87
LNP-18	L15	136	0.12	80	90
LNP-19	L16	132	0.15	86	91
LNP-20	L17	125	0.16	81	96
LNP-21	L18	123	0.09	82	92
LNP-22	L19	109	0.11	84	93
[0221] LNP-23	L20	117	0.16	92	91
LNP-24	L21	108	0.13	83	95
LNP-25	L22	123	0.12	91	95

[0222] 实施例14脂质颗粒的体外功效测定

[0223] 为了评估各种核酸-脂质纳米颗粒制剂的功效,使用靶向GAPDH的siRNA分子进行体外测定。如以上实施例13中所述,使用针对GAPDH的siRNA制备核酸-脂质纳米颗粒制剂。

[0224] 细胞培养与siRNA转染:

[0225] 提前将Jurkat细胞铺于24孔板中,保证实验当天70-90%的汇合。实验当天加入50

$\mu\text{L}$ 的核酸-脂质颗粒 (siRNA浓度为100nM), 并继续孵育48h。对于Lipofectamine™对照, 将2.5 $\mu\text{L}$  2 $\mu\text{M}$ 的siRNA溶液与46.5 $\mu\text{L}$  Opti-MEM和1 $\mu\text{L}$  Lipofectamine™ RNAiMAX混合。将得到的50 $\mu\text{L}$ 混合物加入12孔板的单个孔, 并在室温孵育20分钟以形成复合物。然后加入细胞中, 并继续培养48h。通过qRT-PCR测定靶基因敲除效率。

[0226] RNA提取与分析:

[0227] 用2mL PBS洗涤细胞一次, 并使用RNeasy Mini Kit™ (Qiagen) 提取总RNA并以30 $\mu\text{L}$ 总体积洗脱。使用Transcriptor 1st Strand cDNA Kit™ (Roche) 和随机六聚体根据说明书反转录1 $\mu\text{g}$ 总RNA。将得到的cDNA的三十分之一 (0.66 $\mu\text{L}$ ) 与5 $\mu\text{L}$  IQ Multiplex Powermix (Bio-Rad)、3.33 $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O和1 $\mu\text{L}$ 含有特异性针对GAPDH靶序列的引物和探针的3 $\mu\text{M}$ 混合物混合在一起。然后使用C1000热循环仪 (Bio-Rad) 的CFX96实时系统用于扩增反应。PCR条件是: 95 $^{\circ}\text{C}$ 持续3分钟; 然后以95 $^{\circ}\text{C}$ 、10秒钟循环; 并以55 $^{\circ}\text{C}$ 、1分钟进行40个循环。每个样品三次重复测试。将相对GAPDH mRNA水平标准化为靶mRNA水平并与用单独转染剂治疗或未治疗的对照样品中获得的mRNA水平对比。

[0228] 图2、图3和图4提供了使用LNP-1~LNP-25的脂质纳米颗粒的体外基因敲除结果, 图5提供了使用A1~A12和B1~B11的脂质纳米颗粒的体外基因敲除结果。总体上, 当施用Jurkat细胞时, LNP-1~LNP-25都能有效抑制靶mRNA水平。特别地, LNP-1、LNP-2以及LNP-3对靶mRNA的敲除效率可以达到80%以上, A6、A7、A9和B5对靶mRNA的敲除效率可以达到90%以上, 并且显著高于Lipofectamine™ RNAiMAX对照组。

[0229] 实施例15: 核酸-脂质纳米颗粒的体内性能

[0230] 为了进一步评估LNP的性能, 使用具有针对Factor VII的siRNA的制剂进行体内实验。按实施例13所示的方法制备纳米制剂。通过经由尾静脉的静脉内施用给大约4周大的雌性小鼠施用单剂 (1mg/kg、0.5mg/kg或0.1mg/kg) 脂质颗粒制剂, 给药体积为10 $\mu\text{L}$ /g体重。24小时后采血, 通过将血液样品以1000g, 10分钟, 4 $^{\circ}\text{C}$ 进行离心, 回收上清得到了血浆。

[0231] 使用BIOPHEN FVII CHROMOGENIC ASSAY (Sysmex BioMed) 对血浆中的Factor VII (FVII) 进行定量, 将未处理组 (NT) 的FVII表达量作为1, 以相对值 (血浆中的相对FVII量) 示出了各给药组的FVII表达量。图6显示了具有误差线的数据,  $n=5$ 只动物/组的平均值 $\pm$ SD。结果显示在脂质制剂的剂量为0.1mg/kg时, 含有化合物VI、VII和VIII的三个给药组 (LNP-VI、LNP-VII和LNP-VIII) 对FVII的敲除效率达到80%。特别是, LNP-VII显示了最高的敲除效率。

[0232] 实施例16: 核酸-脂质纳米颗粒制剂对体内肿瘤中基因敲除的性能

[0233] 为了进一步评估含有式VI、VII以及VIII阳离子脂质在肿瘤中的递送效率, 我们在皮下肿瘤模型中进行验证。siRNA采用靶HPRT1 mRNA的siRNA, 按实施例13所示的方法制备纳米制剂。通过在小鼠皮下注射50 $\mu\text{L}$   $3 \times 10^6$ 细胞建立了Hep3B肿瘤。在肿瘤接种后10-17天, 将小鼠随机分成治疗组。通过尾静脉注射来施用核酸-脂质制剂, 基于根据个体动物体重的mg siRNA/kg体重基础来计算。mRNA表达数据表示为治疗组与未处理组 (NT) 之间的对比。图7显示了具有误差线的数据,  $n=5$ 只动物/组的平均值 $\pm$ SD。结果显示在脂质制剂的剂量为1mg/kg时, 含有化合物VI、VII和VIII的三个给药组 (LNP-VI、LNP-VII和LNP-VIII) 对HPRT1 mRNA的敲除效率达到70%。特别是, LNP-VII显示了最高的敲除效率 (>85%)。

[0234] 实施例17: 体内的mRNA表达试验

[0235] 按实施例13所示的方法制备纳米制剂(LNP-VI、LNP-VII和LNP-VIII),并用PBS稀释至使得mRNA为10 $\mu$ g/mL,将其在6周龄的雌性小鼠颈部进行皮下给药。在24小时后,将预先制备的荧光素(VivoGlo<sup>TM</sup> Luciferin, In Vivo Grade, Promega)水溶液,从腹腔内给予各小鼠,30分钟后,利用IVIS<sup>TM</sup> LuminaII(Caliper Life Sciences)观察给药部位的发光情况并进行定量。

[0236] 结果示于图8。在LNP-VI、LNP-VII和LNP-VIII中均确认到发光,均显示了mRNA表达活性。其中,在LNP-VI中显示最强的发光量,显示mRNA表达活性较高。

[0237] 实施例18皮下注射mRNA-脂质纳米颗粒组合物的体内评价

[0238] mRNA脂质纳米颗粒的体内效果在6周龄的昆明小鼠上进行研究,使用表达荧光蛋白的mRNA的制剂进行体内实验。按实施例13所示的方法分别用化合物A6、A7、A9和B5制备mRNA-脂质纳米颗粒,并用PBS稀释至使得mRNA浓度为10 $\mu$ g/mL,将其在雌性小鼠颈部进行皮下给药(剂量为0.5mg/kg)。在给药后的12小时,将预先制备的荧光素(VivoGlo<sup>TM</sup> Luciferin, In Vivo Grade, Promega)水溶液,从腹腔内给予各小鼠,30分钟后,利用IVIS<sup>TM</sup> LuminaII(Caliper Life Sciences)观察给药部位的发光情况并进行定量。

[0239] 结果示于图9。各实验组均确认到发光,均显示了mRNA表达活性。其中,在含化合物B5的实验组显示最强的发光量,显示mRNA表达活性较高。

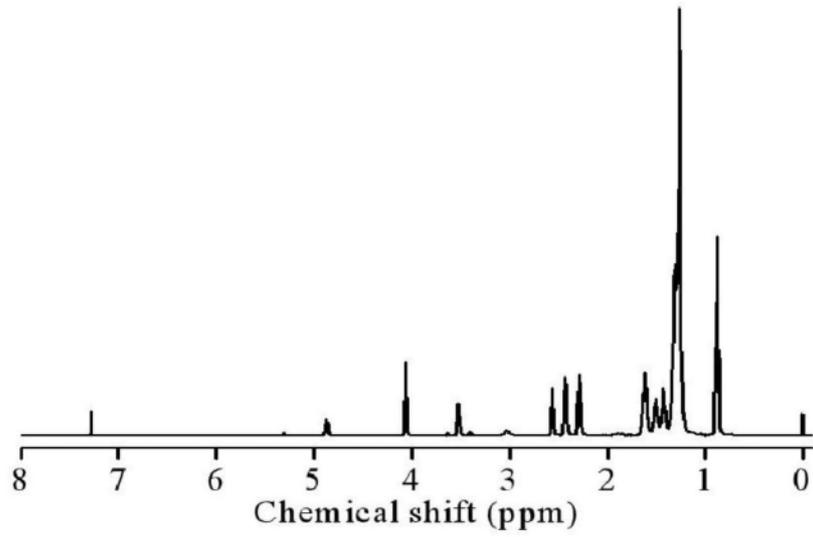


图1

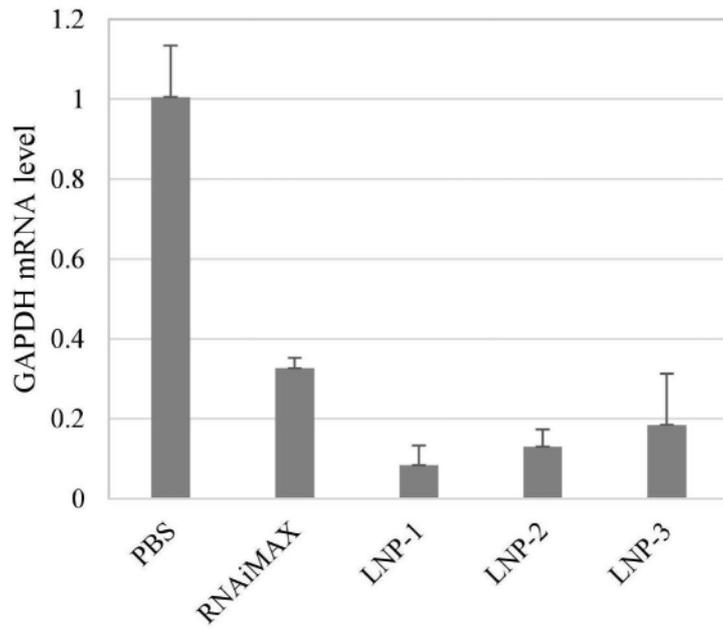


图2

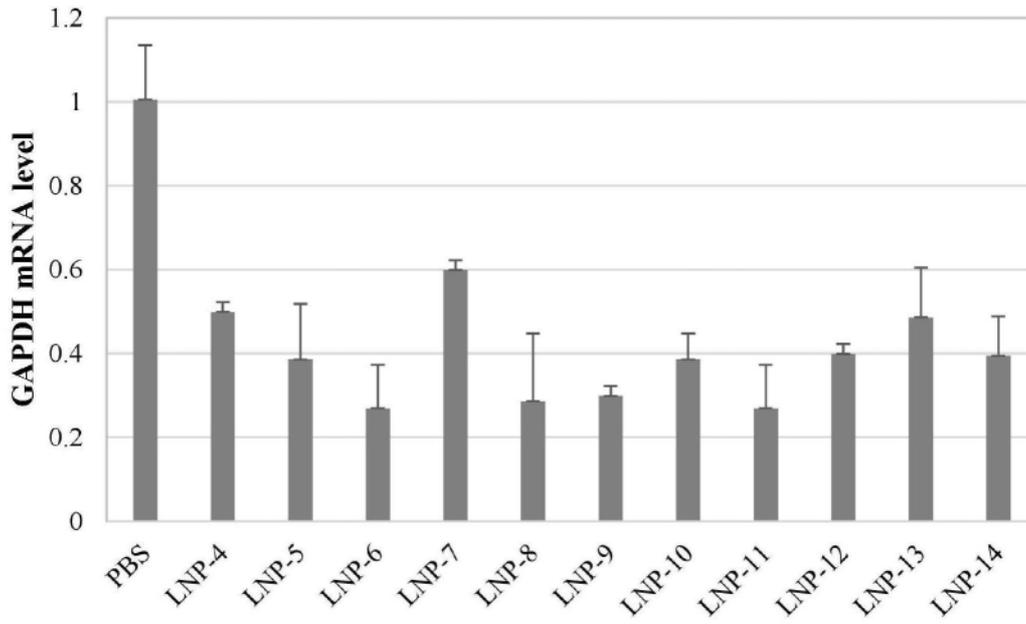


图3

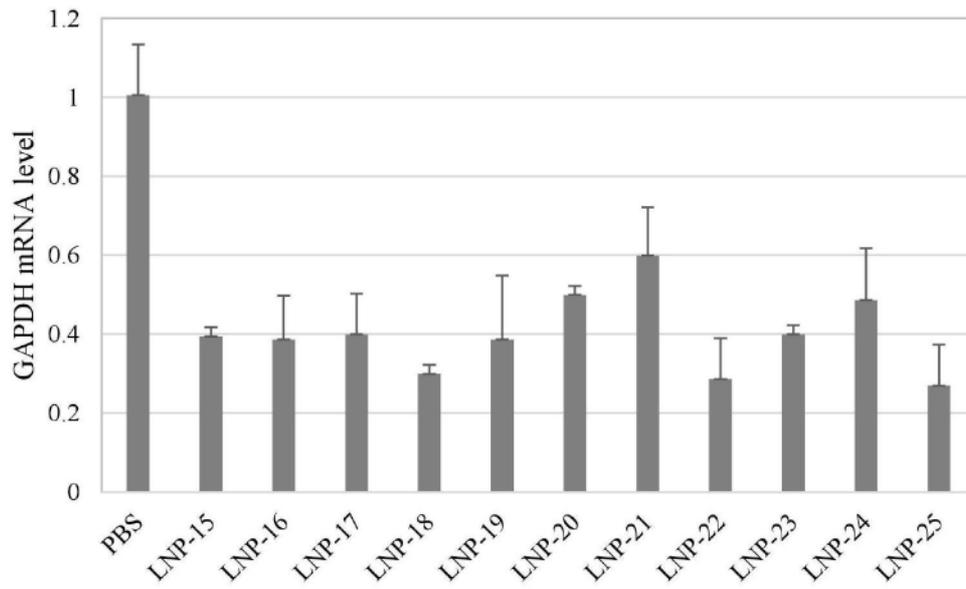


图4

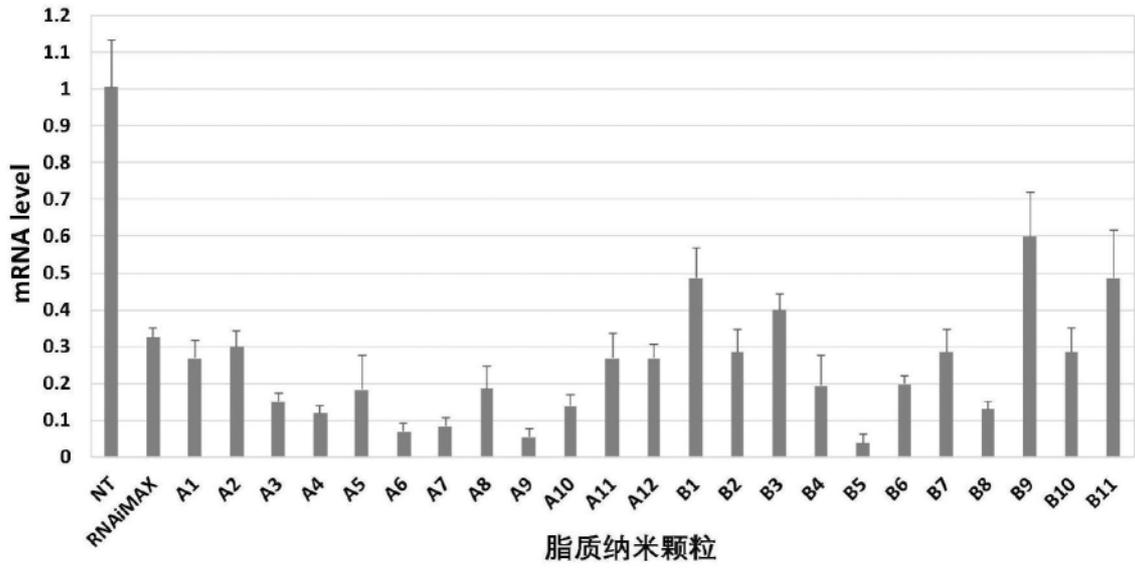


图5

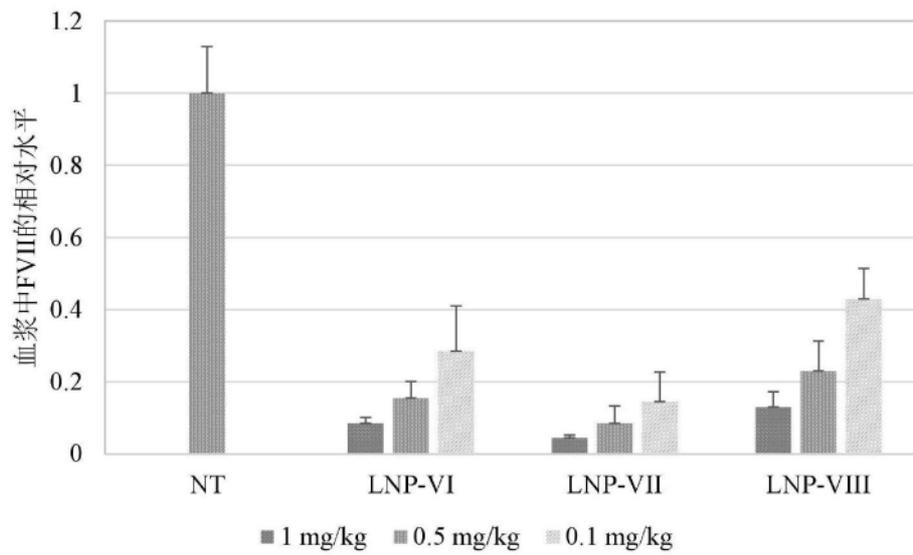


图6

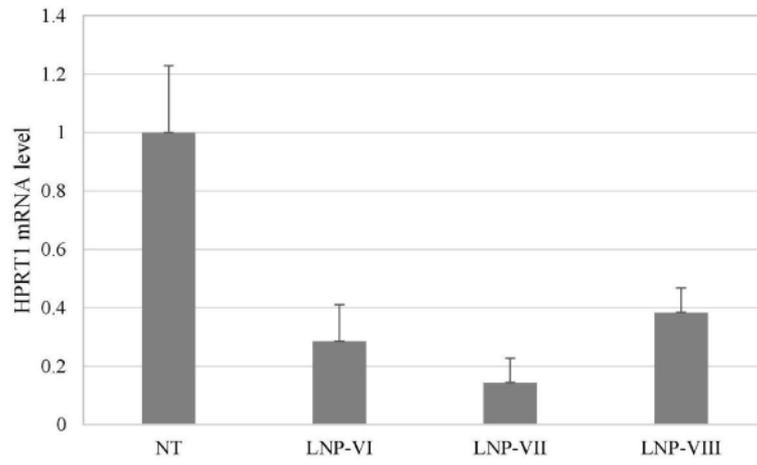


图7

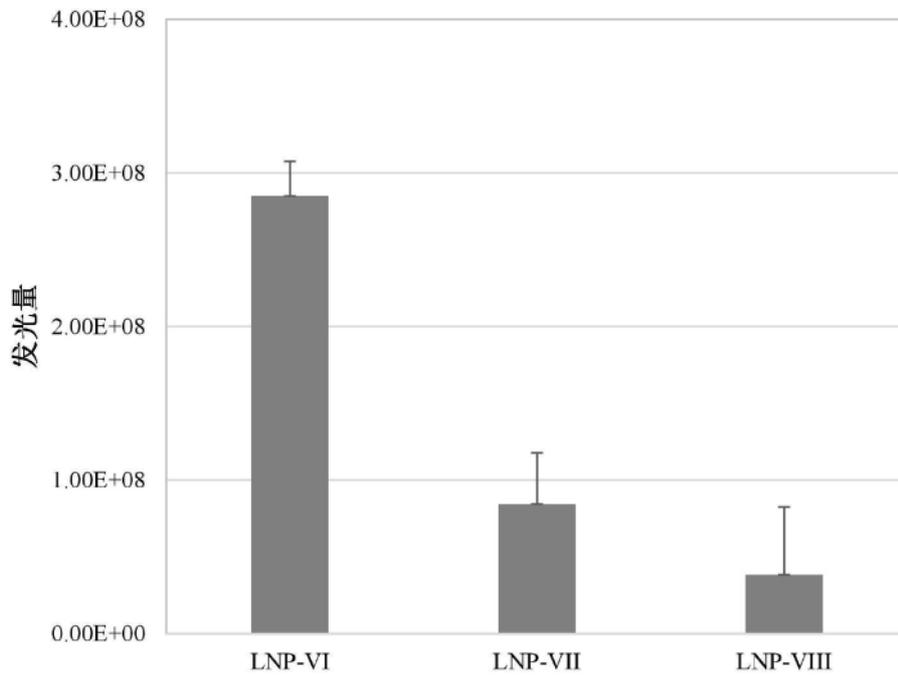


图8

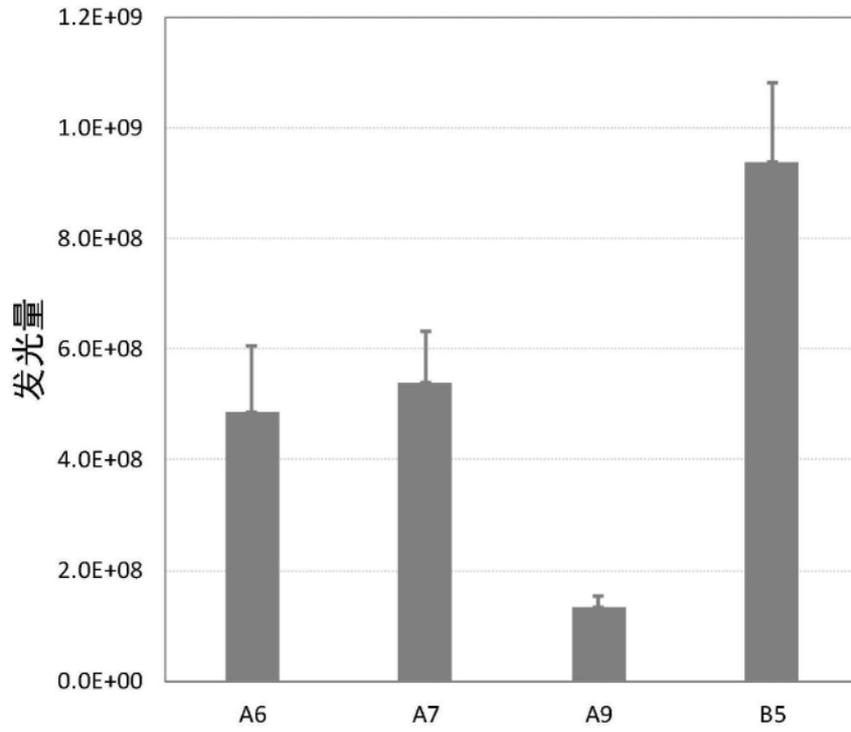


图9