

一种阳离子脂质化合物、包含其的组合物及用途

本申请要求于 2022 年 1 月 13 日递交的中国专利申请第 202210034449.4 号的优先权，在此全文引用上述中国专利申请公开的内容以作为本申请的一部分。

技术领域

本发明属于医药领域。本发明具体涉及一种阳离子脂质化合物、包含其的组合物及用途。

10

背景技术

生物活性物质如小分子药物、多肽、蛋白质和核酸尤其是核酸的有效靶向递送是一个持久的医学难题。核酸治疗剂因低细胞渗透性和对某些核酸分子(包括RNA)降解的高敏感性而面临很大挑战。

15

证实，含阳离子脂质的组合物、脂质体和脂质体复合物(lipoplex)作为运输媒介物，有效地将生物活性物质如小分子药物、多肽、蛋白质和核酸运送至细胞和/或细胞内隔室中。这些组合物一般包含一种或多种“阳离子性”和/或氨基(可离子化)脂质，还包括中性脂质、结构脂质以及聚合物共轭脂质。阳离子性和/或可离子化脂质包括例如可容易地质子化的含胺脂质。尽管已经展示多种此类含脂质的纳米粒子组合物，但安全性、功效和特异性仍有待改良。值得注意的是，脂质纳米颗粒(Lipid Nanoparticle, LNP)复杂性的增加使其生产复杂化，并可能增加其毒性，这是一个可能限制其临床应用的主要担忧。例如，LNP siRNA颗粒(如patisiran)需要预先使用类固醇和抗组胺药来消除不必要的免疫反应(T. Coelho, D. Adams, A. Silva, et al., Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis, N Engl J Med, 369 (2013) 819-829.)。因此，需要开发有助于将治疗剂和/或预防剂如核酸递送至细胞的改进的阳离子脂质化合物，及包含其的组合物的需求。

20

25

30

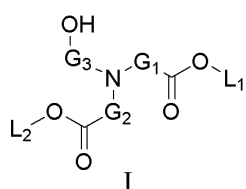
发明内容

本公开至少基于以下发现：阳离子脂质化合物的结构与细胞内转染效率、

对细胞产生的毒性以及在动物体内的高表达和持续表达之间无明显的对应关系。结构差异很小的化合物，在转染效率和/或对细胞的毒性、细胞内的高表达方面差异非常大，例如本申请的化合物YK-009和YK-010，细胞转染效率能差近60倍，对转染细胞的毒性能差别在25%以上；化合物YK-003和YK-010在小鼠体内的表达及持续表达差异能达到50倍。

因此，筛选合适的阳离子脂质化合物，能同时具有高的转染效率和对细胞的低毒性，在小鼠体内的高表达及持续表达是非常困难的事情。本公开通过独特的设计，发现了一些化合物，例如YK-009、YK-003、YK-006、YK-008和YK-011，相对于现有技术的其它化合物，能够以高的细胞转染效率，具有对细胞的低毒性或者无毒性，及在动物体内的高表达和持续表达来递送核酸，取得了预料不到的技术效果。

本公开一方面提供一种新的阳离子脂质化合物，其为式(I)化合物



I，或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体，其中：

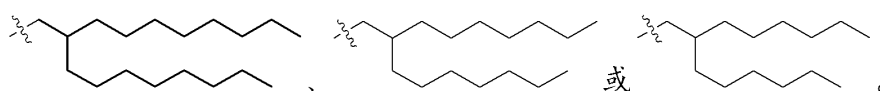
G₁ 为 C₁₋₆ 亚烷基，优选为未取代的 C₂₋₅ 亚烷基，更优选为未取代的 C₃ 亚烷基；

G₂ 为 C₂₋₈ 亚烷基，优选为未取代的 C₄₋₆ 亚烷基，更优选为未取代的 C₅ 亚烷基；

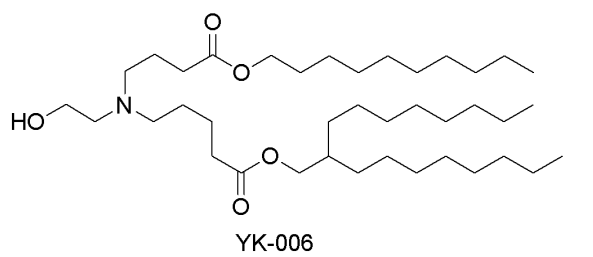
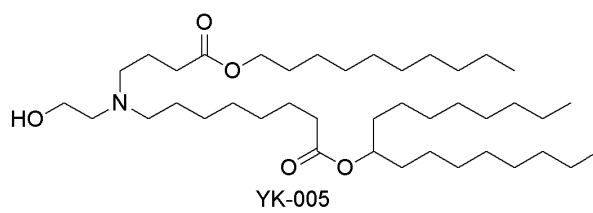
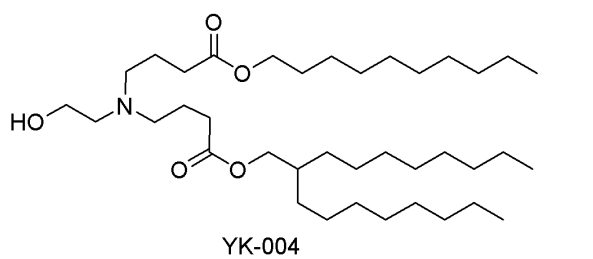
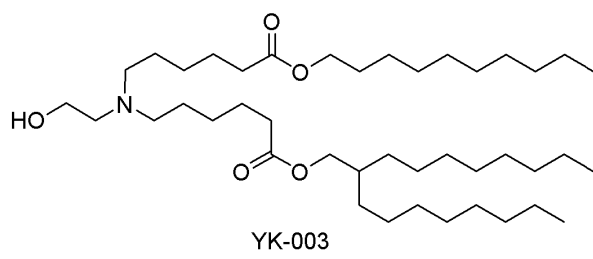
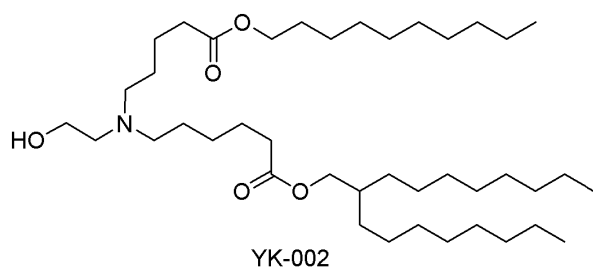
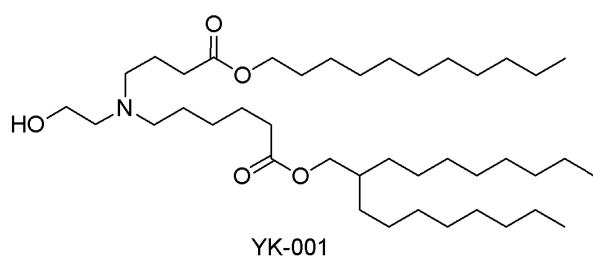
G₃ 为 C₁₋₃ 亚烷基，优选为未取代的 C₂ 亚烷基；

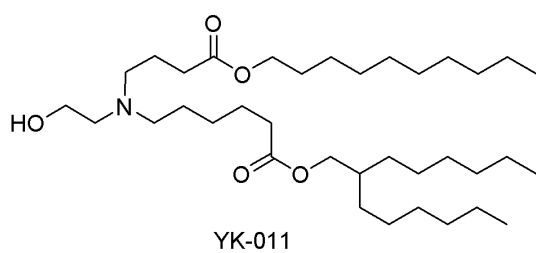
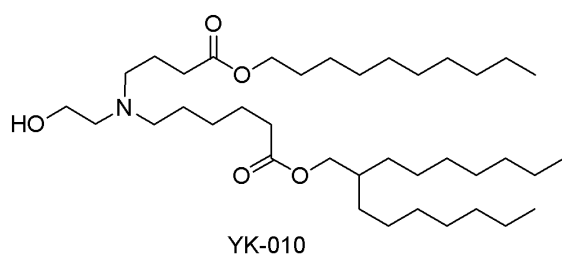
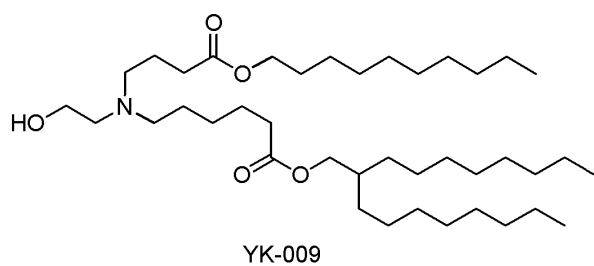
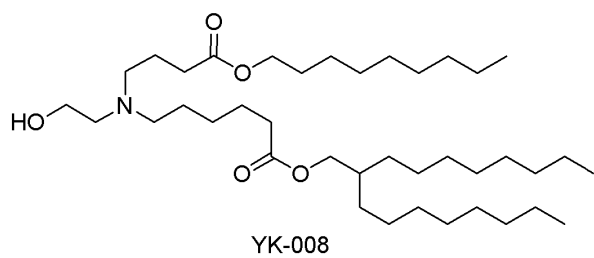
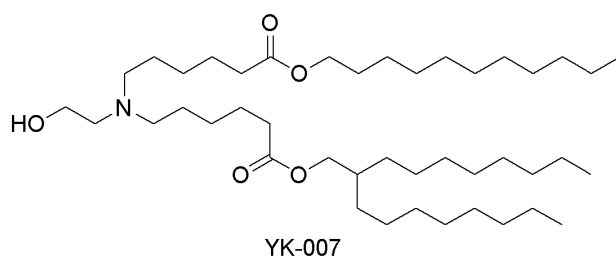
L₁ 为 C₆₋₁₅ 直链烷基，优选为未取代的 C₈₋₁₂ 直链烷基，更优选为未取代的 C₁₀ 直链烷基；

L₂ 为 C₁₂₋₂₅ 支链烷基，优选为未取代的 C₁₄₋₂₂ 支链烷基，更优选为未取代的 C₁₈ 支链烷基。例如，L₂ 为：



例如，式(I)化合物具有以下结构中的一种：





5

本公开又一方面提供一种组合物，其包含载体，所述载体包括上述阳离子脂质。

例如，所述阳离子脂质占载体的摩尔比为 30%~70%。

在一种实施方案中，所述载体还包含中性脂质。例如，所述阳离子脂质

与所述中性脂质的摩尔比为 1:1~10:1。

在一种实施方案中，所述中性脂质包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂、神经酰胺、甾醇及其衍生物中的一种或多种。

例如，所述中性脂质选自以下中的一种或多种：1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-双十一烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二-O-十八碳烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0 Diether PC)、1-油酰基-2-胆固醇基半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0 PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-rac-(1-甘油)钠盐(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(DMPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-硬脂酰乙醇胺(SOPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰胆碱(SOPC)、鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)以及其混合物。

在一种优选的实施方案中，所述中性脂质是 DOPE 和/或 DSPC。

在一种实施方案中，所述载体还包含结构性脂质。例如，所述阳离子脂质与所述结构性脂质的摩尔比为 1:1~5:1。

在一种实施方案中，所述结构性脂质选自以下中的一种或多种：胆固醇、非甾醇、谷固醇、麦角固醇、菜油甾醇、豆甾醇、芸苔甾醇、番茄碱、番茄碱、熊果酸、 α -生育酚、皮质类固醇。在一种优选的实施方案中，所述结构性脂质是胆固醇。

在一种实施方案中，所述载体还包含聚合物共轭脂质。例如，所述聚合物共轭脂质占载体的摩尔比为 0.5%~5%。

在一种实施方案中，所述聚合物共轭脂质选自以下中的一种或多种：PEG 修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG 修饰的磷脂酸、PEG 修饰的神经酰胺、PEG 修饰的二烷基胺、PEG 修饰的二酰基甘油、PEG 修饰的二烷基甘油。

例如，所述聚合物共轭脂质选自以下中的一种或多种：二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG2000)，二肉豆蔻酰甘油-3-甲氧基聚乙二醇 2000 (DMG-PEG2000) 和甲氧基聚乙二醇双十四烷基乙酰胺 (ALC-0159)。

在一种实施方案中，所述载体包括中性脂质、结构脂质以及聚合物共轭脂质，所述阳离子脂质、所述中性脂质、所述结构脂质、以及所述聚合物共轭脂质的摩尔比为 (25~65):(5~25):(25~45):(0.5~5)，优选为 50:10:38.5:1.5。

在一种实施方案中，所述组合物为纳米颗粒制剂，所述纳米颗粒制剂的平均粒径为 10nm~210nm，优选 100nm~205nm；所述纳米颗粒制剂的多分散系数 ≤50%，优选 ≤30%。

在一种实施方案中，所述阳离子脂质还包括一种或多种其它可电离的脂质化合物。

在一种实施方案中，组合物还包含治疗剂或预防剂。例如，组合物中的载体与所述治疗剂或预防剂的质量比为 10:1~30:1。

在一种实施方案中，所述载体与所述治疗剂或预防剂的质量比为 15:1~25:1，优选为 16:1。

在一种实施方案中，所述治疗剂或预防剂包括核酸分子、小分子化合物、多肽或蛋白质中的一种或多种。

例如，所述治疗剂或预防剂是能够引起免疫响应的疫苗或化合物。

在一种实施方案中，所述治疗剂或预防剂是核酸。例如，治疗剂或预防剂可以是脱氧核糖核酸(DNA)。

在一种实施方案中，所述治疗剂或预防剂是核糖核酸(RNA)。

在一种实施方案中，所述 RNA 选自由以下组成的组：小干扰 RNA(siRNA)、不对称干扰 RNA(aiRNA)、微 RNA(miRNA)、Dicer-底物 RNA(dsRNA)、小发夹 RNA(shRNA)、信使 RNA(mRNA)以及其混合物。例

如，所述 RNA 是 mRNA。

在一种实施方案中，所述组合物还包括药物可用的赋形剂或稀释剂中的一种或多种。

5 本公开又一方面提供上述阳离子脂质或组合物，其用于向有需要的患者递送治疗剂或预防剂。

本公开又一方面提供上述阳离子脂质或组合物在制备核酸药物、基因疫苗、小分子药物、多肽或蛋白质药物中的用途。

本公开又一方面提供上述阳离子脂质或组合物在制备用于治疗有需要哺乳动物的疾病或病症的药物中的用途。

10 本公开又一方面提供上述阳离子脂质或组合物，其用于治疗有需要哺乳动物的疾病或病症。

本公开又一方面提供治疗或预防疾病或病症的方法，包括向有需要的患者或受试者给药治疗或预防有效量的上述组合物。

15 在一种实施方案中，所述疾病或病症以功能失常或异常的蛋白质或多肽活性为特征。

例如，所述疾病或病症选自由以下组成的组：感染性疾病、癌症和增生性疾病、遗传性疾病、自体免疫性疾病、糖尿病、神经退化性疾病、心血管和肾血管疾病以及代谢性疾病。

20 例如，所述感染性疾病选自：由冠状病毒、流感病毒或 HIV 病毒引起的疾病，小儿肺炎，裂谷热，黄热病，狂犬病，或多种疱疹。

在一种优选的实施方案中，所述哺乳动物是人。

在一种实施方案中，所述组合物经静脉内、肌肉内、皮内、皮下、鼻内或通过吸入施用。例如，所述组合物是皮下施用的。

25 在一种实施方案中，将约 0.001mg/kg 至约 10mg/kg 剂量的所述治疗剂或预防剂施用给所述哺乳动物。

附图说明

30 为了更清楚地说明本公开实施例的技术方案，下面将对实施例的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅涉及本公开的一些实施例，而非对本发明的限制。

图1显示制备LNP制剂时所用载体(包含YK-009)与mRNA的不同重量比的细胞转染实验结果, a为载体:mRNA=4:1, b为载体:mRNA=16:1, c为空白对照。

图2显示制备LNP制剂时所用阳离子脂质YK-009与中性脂质DSPC不同摩尔比的细胞转染实验结果, a为1:1, b为5:1, c为10:1, d为空白对照。

图3显示制备LNP制剂时聚合物共轭脂质占载体(包含YK-009)不同摩尔比的细胞转染实验结果, a为5%, b为1.5%, c为空白对照。

图4显示制备LNP制剂时载体中各成分阳离子脂质YK-009、中性脂质DSPC、结构脂质胆固醇和聚合物共轭脂质DMG-PEG2000不同比例的细胞转染实验结果, a为65:8:25:2, b为50:10:38.5:1.5, c为空白对照。

图5显示由不同的阳离子脂质制备的Fluc-mRNA的LNP制剂荧光吸收强度。

图6显示分别由阳离子脂质YK-009和化合物25制备的Fluc-mRNA的LNP制剂荧光吸收强度, 其中Fluc-mRNA含量分别为0.075 μ g、0.15 μ g、0.225 μ g和0.3 μ g。

图7显示由不同的阳离子脂质制备的Fluc-mRNA的LNP制剂加入细胞培养液中, 培养24小时后的细胞存活率。

图8显示分别由阳离子脂质YK-009和化合物25制备的Fluc-mRNA的LNP制剂(其中Fluc-mRNA含量分别为0.375 μ g、0.75 μ g、1.125 μ g和1.5 μ g)加入细胞培养液中, 培养24小时后的细胞存活率。

图9显示由不同的阳离子脂质制备的Fluc-mRNA的LNP制剂的小鼠活体成像实验结果。

图10显示分别由阳离子脂质YK-009和化合物25制备的Fluc-mRNA的LNP制剂的小鼠活体成像实验结果, 其中LNP制剂中Fluc-mRNA含量不同: a为2.5 μ g, b为5 μ g, c为7.5 μ g, d为10 μ g。

具体实施方式

为使本公开实施例的目的、技术方案和优点更加清楚, 下面将结合本公开实施例的附图, 对本公开实施例的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,

所描述的实施例是本公开的一部分实施例，而不是全部的实施例。基于所描述的本公开的实施例，本领域普通技术人员在无需创造性劳动的前提下所获得的所有其它实施例，都属于本发明保护的范围。

5 本发明可在不偏离本发明基本属性的情况下以其它具体形式来实施。应该理解的是，在不冲突的前提下，本发明的任一和所有实施方案都可与任一其它实施方案或多个其它实施方案中的技术特征进行组合以得到另外的实施方案。本发明包括这样的组合得到的另外的实施方案。

本公开中提及的所有出版物和专利在此通过引用以它们的全部内容纳入本公开。如果通过引用纳入的任何出版物和专利中使用的用途或术语与本公开中使用的用途或术语冲突，那么以本公开的用途和术语为准。

10 本文所用的章节标题仅用于组织文章的目的，而不应被解释为对所述主题的限制。

除非另有规定，本文使用的所有技术术语和科学术语具有要求保护主题所属领域的通常含义。倘若对于某术语存在多个定义，则以本文定义为准。

15 除了在工作实施例中或另外指出之外，在说明书和权利要求中陈述的定量性质例如剂量的所有数字应理解为在所有情况中被术语“约”修饰。还应理解的是，本申请列举的任何数字范围意在包括该范围内的所有的子范围和该范围或子范围的各个端点的任何组合。

本公开中使用的“包括”、“含有”或者“包含”等类似的词语意指出现该词前面的要素涵盖出现在该词后面列举的要素及其等同，而不排除未记载的要素。本文所用的术语“含有”或“包括(包含)”可以是开放式、半封闭式和封闭式的。换言之，所述术语也包括“基本上由...组成”、或“由...组成”。

20 术语“药学上可接受的”在本申请中是指：化合物或组合物在化学上和/或在毒理学上与构成制剂的其它成分和/或与用其预防或治疗疾病或病症的人类或哺乳动物相容。

术语“受试者”或“患者”在本申请中包括人类和哺乳动物。

25 本文所用的术语“治疗”是指给患有疾病或者具有所述疾病的症状的患者或受试者施用一种或多种药物物质，用以治愈、缓解、减轻、改善或影响所述疾病或者所述疾病的症状。在本申请的上下文中，除非作出相反的具体说明，术语“治疗”也可包括预防。

术语“溶剂合物”在本申请中指的是通过组合式(I)化合物或其药学上可接受的盐和溶剂(例如乙醇或水)而形成的复合物。应理解的是,在治疗疾病或病症中使用的式I化合物的任何溶剂合物尽管可能提供不同的性质(包括药代动力学性质),但是一旦吸收至受试者中,会得到式I化合物,使得式I化合物的使用分别涵盖式I化合物的任何溶剂合物的使用。

术语“水合物”指的是上述术语“溶剂合物”中溶剂为水的情形。

应进一步理解,式I化合物或其药学上可接受的盐可以溶剂合物形式分离,并且因此任何所述溶剂合物皆包括于本发明的范围内。例如,式I化合物或其药学上可接受的盐可以未溶剂化形式以及与药学上可接受的溶剂(诸如,水、乙醇等)形成的溶剂化形式存在。

术语“药学上可接受的盐”是指本公开化合物的相对无毒、无机酸或有机酸加成盐。例如,参见S. M. Berge等人“Pharmaceutical Salts”, *J. Pharm. Sci.* 1977, 66, 1-19。其中,无机酸例如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸或硝酸等;有机酸例如甲酸、乙酸、乙酰乙酸、丙酮酸、三氟乙酸、丙酸、丁酸、己酸、庚酸、十一酸、月桂酸、苯甲酸、水杨酸、2-(4-羟基苯甲酰基)-苯甲酸、樟脑酸、肉桂酸、环戊烷丙酸、二葡萄糖酸、3-羟基-2-萘甲酸、烟酸、巴莫酸、果胶酯酸、3-苯基丙酸、苦味酸、特戊酸、2-羟基乙磺酸、衣康酸、胺基磺酸、三氟甲磺酸、十二烷基硫酸、乙磺酸、苯磺酸、对-甲苯磺酸、甲磺酸、2-萘磺酸、萘二磺酸、樟脑磺酸、柠檬酸、酒石酸、硬脂酸、乳酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、己二酸、海藻酸、马来酸、富马酸、D-葡萄糖酸、扁桃酸、抗坏血酸、葡庚糖酸、甘油磷酸、天冬氨酸、磺基水杨酸等。例如,可使用HCl(或盐酸)、HBr(或氢溴酸溶液)、甲磺酸、硫酸、酒石酸或富马酸与式I所示的化合物形成药学上可接受的盐。

本公开的式(I)的含氮化合物可通过用氧化剂(例如间氯过氧苯甲酸、过氧化氢、臭氧)处理而转化成N-氧化物。因此,在价态和结构允许的条件下,本申请要求保护的化合物不但包括结构式所示的含氮化合物,而且还包括其N-氧化物衍生物。

本公开的某些化合物可以以一种或多种立体异构体的形式存在。立体异构体包括几何异构体、非对映异构体和对映异构体。因此,本公开要求保护的化合物还包括外消旋混合物、单一的立体异构体和具有光学活性的混合物。

本领域技术人员应该理解的是，一种立体异构体可能比其它立体异构体具有更好的功效和/或更低的副作用。单一的立体异构体和具有光学活性的混合物可手性源合成法、手性催化、手性拆分等方法得到。消旋体可通过色谱拆分法或者化学拆分法进行手性拆分。例如，可通过加入手性酒石酸、手性苹果酸等手性酸类拆分试剂与本公开的化合物成盐，利用产物的物理化学性质例如溶解度不同进行分离。

本发明还包括本公开化合物所有适合的同位素变体。同位素变体定义为这样的化合物，其中至少一个原子被具有相同原子序数但其原子质量不同于自然界中常见的或主要存在的原子质量的原子替代。可以引入到本公开化合物中的同位素的实例包括氢、碳、氮和氧的同位素，分别例如 ^2H (氘)、 ^3H (氚)、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 和 ^{18}O 。

术语“烷基”在本公开中是指包括具有规定碳原子数的支链和直链饱和脂族一价烃基。术语“亚烷基”在本公开中是指包括具有规定碳原子数的支链和直链饱和脂族二价烃基。 C_{n-m} 是指包括具有n至m个碳原子数的基团。例如 C_{2-5} 亚烷基包括 C_2 亚烷基、 C_3 亚烷基、 C_4 亚烷基、 C_5 亚烷基。

烷基(或亚烷基)可未经取代，或烷基(或亚烷基)可经取代，其中至少一个氢被另一种化学基团代替。

“治疗有效量”为当给予患者时能改善疾病或症状的治疗剂的量。“预防有效量”为当给予受试者时能预防疾病或症状的预防剂的量。构成“治疗有效量”的治疗剂的量或“预防有效量”的预防剂的量随着治疗剂/预防剂、疾病状态及其严重性、待治疗/预防的患者/受试者的年龄、体重等而变化。本领域普通技术人员可根据其知识以及本公开常规地确定治疗有效量和预防有效量。

在本申请中，当化合物的名称与结构式不一致时，以结构式为准。

应理解，本申请所用的术语“本公开化合物”根据语境可包括：式I化合物、其N-氧化物、其溶剂合物、其药学上可接受的盐、其立体异构体、以及它们的混合物。

本文所用术语阳离子脂质是指在选定的pH值带正电荷的脂质。

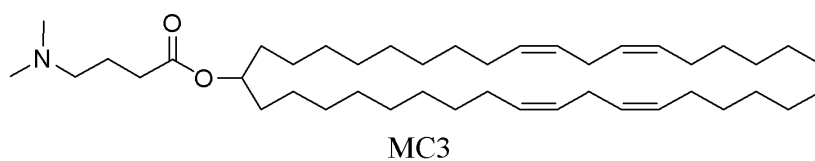
阳离子脂质体易于与带负电荷的核酸结合，即通过静电力与核酸中存在的带负电的磷酸基团相互作用，形成脂质纳米颗粒(LNP)。LNP是目前主流的

递送载体之一。

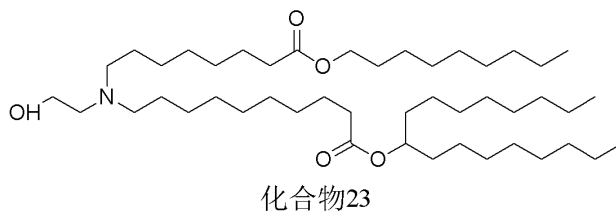
发明人在筛选大量化合物时发现，筛选出满足以下条件的合适的阳离子脂质化合物是非常困难的：同时具有高的转染效率和低的细胞毒性，在小鼠体内的高表达及持续表达。发明人发现了一些化合物例如YK-009、YK-003、
 5 YK-006、YK-008和YK-011等相对于现有技术的化合物，能够以高的细胞内转染效率，对细胞的低毒性或者无毒性，及在动物体内的高表达和持续表达来递送核酸。结构差异很小的化合物，在转染效率和/或对细胞的毒性、细胞内的高表达方面差异非常大，例如本申请的化合物YK-009和YK-010，细胞转染效率能差近60倍，对转染细胞的毒性能差别在25%以上；化合物YK-003和
 10 YK-010在小鼠体内的表达及持续表达差异能达到50倍。

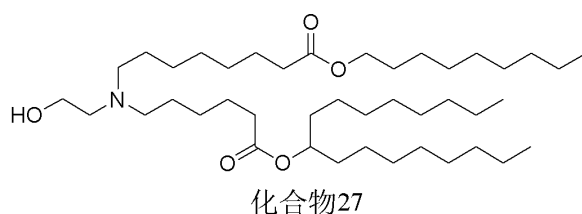
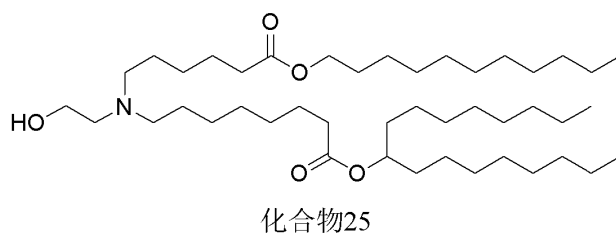
在此，我们挑选了阿里拉姆制药公司 Alnylam Pharmaceuticals, Inc. (NASDAQ: ALNY)在CN102625696B中公开的阳离子脂质DLin-MC3-DMA (MC3)和我们设计的化合物进行了比较。DLin-MC3-DMA (MC3)除了能够有效且安全地递送siRNA，现在还广泛用于mRNA递送。

15 DLin-MC3-DMA (MC3) 阳离子脂质结构：



另外，我们也将本公开的化合物与 Moderna 公司申请的专利 CN110520409A 中的结构类似化合物 23、25（即 SM-102，CAS No.: 2089251-47-6，Moderna 公司新冠疫苗 mRNA-1273 中使用的阳离子脂质）和
 20 进行了比较。



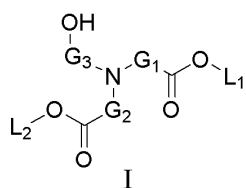


我们发现本公开的化合物在转染效率和/或对细胞的毒性方面显著改善，例如化合物YK-009转染mRNA时的细胞转染效率比MC3、化合物23和化合物27分别提高40倍、8倍和13倍以上；对转染细胞的毒性与MC3、化合物23和化合物27分别降低12%、13%和16%；在小鼠体内的表达，化合物YK-009比MC3、化合物23和化合物27分别提高25倍、7倍和6倍以上，化合物YK-003比MC3、化合物23和化合物27分别提高18倍、8倍和7倍以上。

与化合物25相比，本公开的化合物YK-009转染mRNA时的细胞转染效率提高7倍，对转染细胞的毒性降低9%，在小鼠体内的表达提高7倍以上。

本公开一方面提供一种新的用于递送治疗剂或预防剂的阳离子脂质化合物。本公开的阳离子脂质化合物可用于递送核酸分子、小分子化合物、多肽或蛋白质。相对于已知的阳离子脂质化合物，本公开的阳离子脂质化合物表现出较高的转染效率和较小的细胞毒性，提高了递送效率和安全性。

本公开提供一种阳离子脂质，其为式(I)化合物



，或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体，其中

G₁ 为 C₁₋₆ 亚烷基，优选为未取代的 C₂₋₅ 亚烷基，更优选为未取代的 C₃ 亚烷基；

G_2 为 C_{2-8} 亚烷基, 优选为未取代的 C_{4-6} 亚烷基, 更优选为未取代的 C_5 亚烷基;

G_3 为 C_{1-3} 亚烷基, 优选为未取代的 C_2 亚烷基;

L_1 为 C_{6-15} 直链烷基, 优选为未取代的 C_{8-12} 直链烷基, 更优选为未取代的 C_{10} 直链烷基;

L_2 为 C_{12-25} 支链烷基, 优选为未取代的 C_{14-22} 支链烷基, 更优选为未取代的 C_{18} 支链烷基。

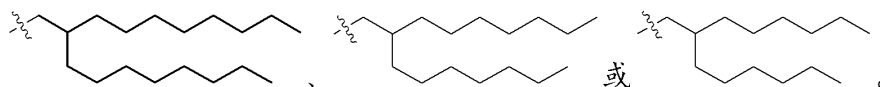
在一种实施方案中, G_1 为未取代的 C_{2-5} 亚烷基, 优选为未取代的 C_3 亚烷基, 例如, $-(CH_2)_3-$ 。

在一种实施方案中, G_2 为未取代的 C_{4-6} 亚烷基, 优选为未取代的 C_5 亚烷基, 例如, $-(CH_2)_5-$ 。

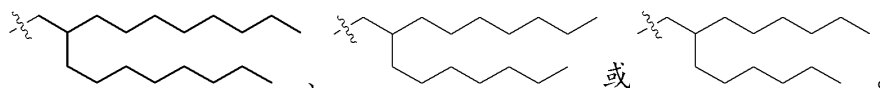
在一种实施方案中, G_3 为未取代的 C_2 亚烷基, 即 $-(CH_2)_2-$ 。

在一种实施方案中, L_1 为未取代的 C_{8-12} 直链烷基, 优选为未取代的 C_{10} 直链烷基, 例如, $-(CH_2)_9CH_3$ 。

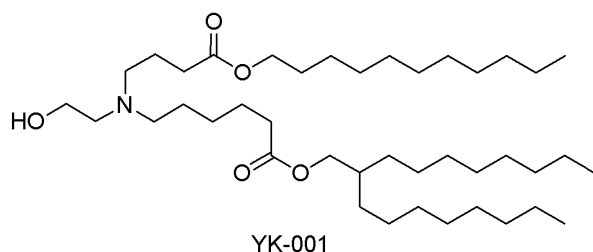
在一种实施方案中, L_2 为未取代的 C_{14-22} 支链烷基, 优选为未取代的 C_{18} 支链烷基。例如, L_2 为:

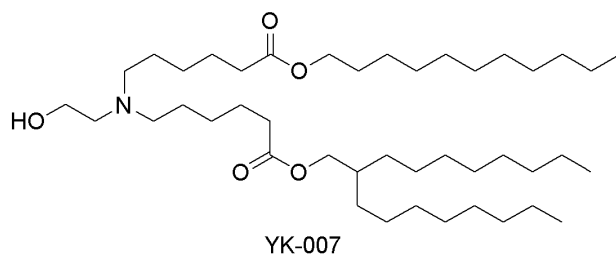
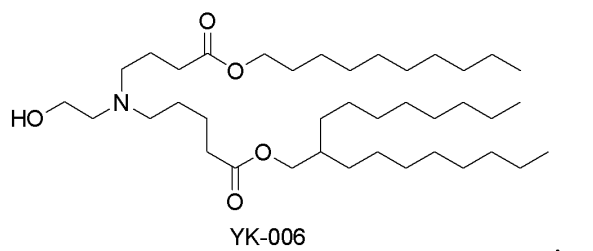
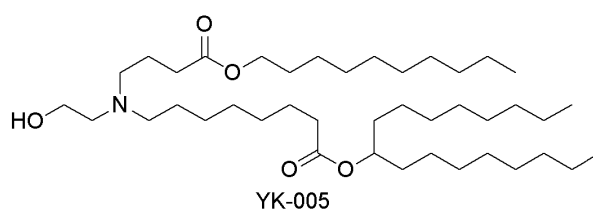
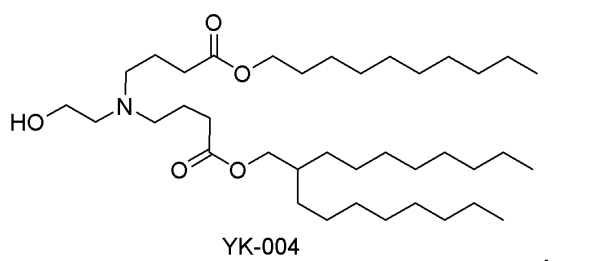
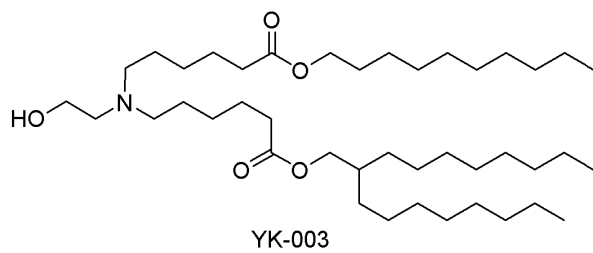
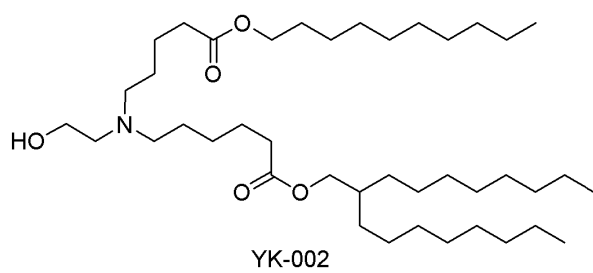


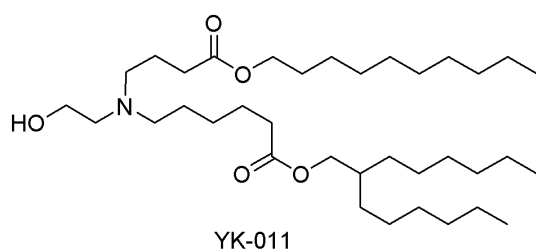
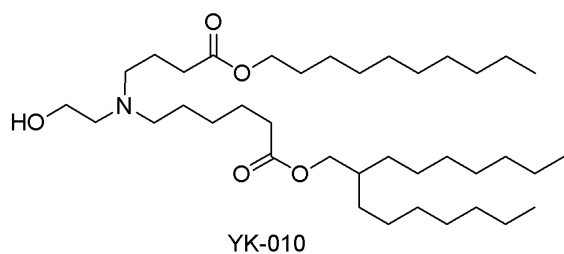
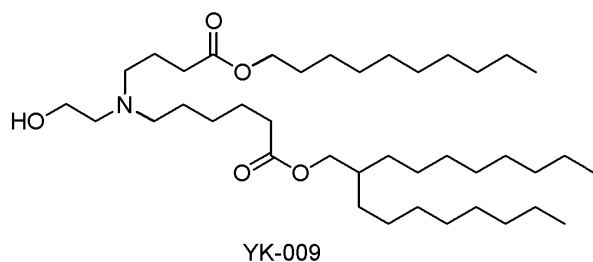
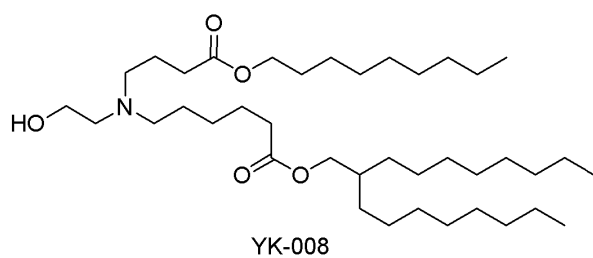
在一种实施方式中, G_1 为 $-(CH_2)_3-$, G_2 为 $-(CH_2)_5-$, G_3 为 $-(CH_2)_2-$, L_1 为 $-(CH_2)_9CH_3$, L_2 为:



在示例性的实施方案中, 所述的化合物选自下面的化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体:







- 5 本公开的又一方面提供一种组合物，其包含载体，所述载体包括阳离子脂质，所述阳离子脂质包括上述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体。

在一种实施方案中，所述组合物为纳米颗粒制剂，所述纳米颗粒制剂的平均尺寸为 10nm~210nm，优选为 100nm~205nm；所述纳米颗粒制剂的多分散系数 $\leq 50\%$ ，优选 $\leq 30\%$ ，更优选 $\leq 25\%$ 。

10

阳离子脂质

在本公开的组合物/载体的一种实施方式中，所述阳离子脂质为选自上述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体中的一种或多种。在一种实施方案中，所述阳离子脂质为选自上述的式(I)化合物。例如，阳离子脂质为化合物 YK-001、YK-002、YK-003、YK-004、YK-005、
5 YK-006、YK-007、YK-008、YK-009、YK-010 或 YK-011。在一种优选实施方案中，所述阳离子脂质为化合物 YK-009。

在本公开的组合物/载体的另一种实施方式中，所述阳离子脂质包括：(a) 选自上述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体中的一种或多种；(b)一种或多种与(a)不同的其它可电离的脂质化合物。
10 (b)阳离子脂质化合物可以是可商购的阳离子脂质，或者文献中报道的阳离子脂质化合物。例如，(b)阳离子脂质化合物可以是 DLin-MC3-DMA (MC3)。例如，(b)阳离子脂质化合物可以是 CN110520409A 中的化合物 23、25、27 等。

在一种实施方案中，所述阳离子脂质占载体的摩尔比为 30%~70%，例如
15 35%、45%、50%、55%、60%、65%。

该载体可用于递送活性成分例如治疗剂或预防剂。活性成分可包封在载体内或者与载体结合。

例如，所述治疗剂或预防剂包括核酸分子、小分子化合物、多肽或蛋白质中的一种或多种。所述核酸包括但不限于单链 DNA、双链 DNA 和 RNA。
20 适宜的 RNA 包括但不限于小干扰 RNA(siRNA)、不对称干扰 RNA(aiRNA)、微 RNA(miRNA)、Dicer-底物 RNA(dsRNA)、小发夹 RNA(shRNA)、信使 RNA(mRNA)以及其混合物。

中性脂质

25 载体可包含中性脂质。中性脂质在本公开中是指在选定的pH值不带电荷或者以两性离子形式存在的起辅助作用的脂质。该中性脂质可能通过促进脂质相变来调节纳米颗粒流动性成脂质双层结构并提高效率，同时还可能影响靶器官的特异性。

在一种实施方案中，所述阳离子脂质与所述中性脂质的摩尔比为约
30 1:1~10:1，例如约9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1。在一种优选的实施方案

中, 所述阳离子脂质与所述中性脂质的摩尔比为约5:1。

例如, 中性脂质可包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂、神经酰胺、甾醇及其衍生物中的一种或多种。

包含阳离子脂质的组合物的载体组分可以包括一种或多种中性脂质-磷脂, 如一种或多种(多)不饱和脂质。磷脂可以组装成一个或多个脂质双层。一般来说, 磷脂可以包括磷脂部分和一个或多个脂肪酸部分。

中性脂质部分可以选自由以下组成的非限制性组: 磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、2-溶血磷脂酰胆碱和鞘磷脂。脂肪酸部分可以选自由以下组成的非限制性组: 月桂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻烯酸、棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、 α -亚麻酸、芥酸、植烷酸、花生酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、山萘酸、二十二碳五烯酸和二十二碳六烯酸。还涵盖包括带有修饰和取代的天然物种的非天然物种, 所述修饰和取代包括分支、氧化、环化和炔烃。例如, 磷脂可以用一种或多种炔烃(例如一个或多个双键被三键置换的烯基)官能化或与该一种或多种炔烃交联。在适当反应条件下, 炔基在暴露于叠氮化物时可能经历铜催化的环加成反应。这些反应可用于使组合物的脂质双层官能化以促进膜渗透或细胞识别, 或将组合物与有用组分如靶向或成像部分(例如染料)偶联。

可用于这些组合物中的中性脂质可以选自由以下组成的非限制性组: 1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-双十一烷酰基-sn-甘油-磷酸胆碱(DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二-O-十八碳烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0 Diether PC)、1-油酰基-2-胆固醇基半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0 PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油

-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-rac-(1-甘油)钠盐(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二硬脂酰基-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-硬脂酰乙醇胺(SOPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰胆碱(SOPC)、鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)以及其混合物。

在一些实施方案中，中性脂质包括 DSPC。在某些实施方案中，中性脂质包括 DOPE。在一些实施方案中，中性脂质包括 DSPC 和 DOPE 两种。

10

结构性脂质

包含阳离子脂质的组合物的载体还可以包括一种或多种结构性脂质。结构性脂质在本公开中是指通过填充脂质之间的间隙来增强纳米颗粒的稳定性的脂质。

15 在一种实施方案中，所述阳离子脂质与所述结构性脂质的摩尔比为约 1:1~5:1，例如，约 1.0:1、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2.0:1。

结构性脂质可以选自但不限于由以下组成的组：胆固醇、甾醇、谷固醇、麦角固醇、菜油甾醇、豆甾醇、芸苔甾醇、番茄碱、番茄碱、熊果酸、
20 α -生育酚、皮质类固醇以及其混合物。在一些实施方案中，结构性脂质是胆固醇。在一些实施方案中，结构性脂质包括胆固醇和皮质类固醇(如泼尼松龙(prednisolone)、地塞米松、泼尼松(prednisone)和氢化可的松(hydrocortisone))或其组合。

25 聚合物共轭脂质

包含阳离子脂质的组合物的载体还可以包括一种或多种聚合物共轭脂质。聚合物共轭脂质主要是指聚乙二醇(PEG)修饰的脂质。亲水性PEG稳定 LNP，通过限制脂质融合来调节纳米颗粒大小，并通过减少与巨噬细胞的非特异性相互作用来增加纳米颗粒的半衰期。

30 在一种实施方案中，所述聚合物共轭脂质选自以下中的一种或多种：PEG

修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油、PEG修饰的二烷基甘油。PEG修饰的PEG分子量通常为350-5000Da。

例如，所述聚合物共轭脂质选自以下中的一种或多种：二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG2000)，二肉豆蔻酰甘油-3-甲氧基聚乙二醇 2000 (DMG-PEG2000) 和甲氧基聚乙二醇双十四烷基乙酰胺 (ALC-0159)。

在本公开的组合物/载体的一种实施方案中，所述聚合物共轭脂质是 DMG-PEG2000。

10 在本公开的组合物/载体的一种实施方案中，载体包括中性脂质、结构脂质以及聚合物共轭脂质，所述阳离子脂质、所述中性脂质、所述结构脂质、以及所述聚合物共轭脂质的摩尔比为 (25~65) : (5~25) : (25~45) : (0.5~5)，例如 (45~55) : (9~11) : (34~43) : (0.5~2.5)。

15 在本公开的组合物/载体的一种实施方案中，载体包括中性脂质、结构脂质以及聚合物共轭脂质，所述阳离子脂质、所述中性脂质、所述结构脂质、以及所述聚合物共轭脂质的摩尔比为 50:10:38.5:1.5。

治疗剂和/或预防剂

20 组合物可以包括一种或多种治疗剂和/或预防剂。在一种实施方案中，载体与所述治疗剂或预防剂的质量比为 10:1~30:1，例如 15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1。

在一种实施方案中，载体与所述治疗剂或预防剂的质量比为 15:1~25:1，优选为 16:1。

25 所述治疗剂或预防剂包括但不限于核酸分子、小分子化合物、多肽或蛋白质中的一种或多种。

例如，所述治疗剂或预防剂是能够引起免疫响应的疫苗或化合物。

30 本公开的载体可将治疗剂和/或预防剂递送至哺乳动物细胞或器官，因此本公开还提供治疗有需要哺乳动物的疾病或病症的方法，这些方法包括向哺乳动物施用包括治疗剂和/或预防剂的组合物和/或使哺乳动物细胞与该组合物接触。

治疗剂和/或预防剂包括生物活性物质并且替代地称为“活性剂”。治疗剂和/或预防剂可以是在递送至细胞或器官后在该细胞或器官中或者其它身体组织或系统中引起所希望的变化物质。此类物种可用于治疗一种或多种疾病、病症或病况。在一些实施方案中，治疗剂和/或预防剂是可用于治疗特定疾病、病症或病况的小分子药物。可用于组合物的药物的实例包括但不限于抗赘生剂(例如长春新碱(vincristine)、多柔比星(doxorubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、喜树碱(camptothecin)、顺铂(cisplatin)、博莱霉素(bleomycin)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、甲氨蝶呤和链脲佐菌素(streptozotocin))、抗肿瘤剂(例如放线菌素D(actinomycin D)、长春新碱、长春碱(vinblastine)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(cytosine arabinoside)、蒽环霉素(anthracycline)、烷化剂、铂类化合物、抗代谢物以及核苷类似物，如甲氨蝶呤以及嘌呤和嘧啶类似物)、抗感染剂、局部麻醉剂(例如地布卡因(dibucaine)和氯丙嗪(chlorpromazine))、 β -肾上腺素能阻断剂(例如普萘洛尔(propranolol)、第莫洛(timolol)和拉贝洛尔(labetalol))、抗高血压剂(例如可乐定(clonidine)和肼酞嗪(hydralazine))、抗抑郁剂(例如丙咪嗪(imipramine)、阿米替林(amitriptyline)和多虑平(doxepin))、抗痉挛剂(例如苯妥英(phenytoin))、抗组胺(例如苯海拉明(diphenhydramine)、氯苯那敏(chlorpheniramine)和异丙嗪(promethazine))、抗生素/抗菌剂(例如庆大霉素(gentamycin)、环丙沙星(ciprofloxacin)和头孢西丁(cefazolin))、抗真菌剂(例如咪康唑(miconazole)、特康唑(terconazole)、益康唑(econazole)、异康唑(isoconazole)、布康唑(butoconazole)、克霉唑(clotrimazole)、伊曲康唑(itraconazole)、制霉菌素(nystatin)、奈替芬(naftifine)和两性霉素B(amphotericin B))、抗寄生虫剂、激素、激素拮抗剂、免疫调节剂、神经递质拮抗剂、抗青光眼药、维生素、镇静剂以及成像剂。

在一些实施方案中，治疗剂和/或预防剂是细胞毒素、放射性离子、化学治疗剂、疫苗、引起免疫反应的化合物和/或另一治疗剂和/或预防剂。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害的任何试剂。实例包括但不限于紫杉醇(taxol)、细胞松弛素B(cytochalasin B)、短杆菌肽D(gramicidin D)、溴化乙锭(ethidium bromide)、依米丁(emetine)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙碱(colchicine)、

多柔比星、柔红霉素(daunorubicin)、二羟基蒽二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌、光辉霉素(mithramycin)、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔、嘌呤霉素、类美登素(maytansinoid)如美登醇(maytansinol)、拉奇霉素(rachelmycin)(CC-1065), 以及其类似物或同系物。放射性离子包括但不限于碘(例如碘125或碘131)、锶89、磷、钷、铯、铟、磷酸根、钴、钇90、钐153和镭。疫苗包括能够提供针对与感染性疾病如流感、麻疹、人乳头瘤病毒(HPV)、狂犬病、脑膜炎、百日咳、破伤风、瘟疫、肝炎和肺结核相关的一种或多种病况的免疫性的化合物和制剂并且可以包括编码感染性疾病源性抗原和/或表位的mRNA。疫苗还可以包括引导针对癌细胞的免疫响应的化合物和制剂并且可以包括编码肿瘤细胞源性抗原、表位和/或新表位的mRNA。引起免疫响应的化合物可以包括疫苗、皮质类固醇(例如地塞米松)和其它物种。在一些实施方案中, 通过包括根据式(I)、(IA)、(IB)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)、(IIf)、(IIg)或(III)的化合物(例如化合物3、18、20、25、26、29、30、60、108-112或122)的组合物肌肉内施用能够引起免疫响应的疫苗和/或化合物。其它治疗剂和/或预防剂包括但不限于抗代谢物(例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷和5-氟尿嘧啶达卡巴嗪(dacarbazine))、烷化剂(例如氮芥(mechlorethamine)、噻替哌(thiotepa)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、拉奇霉素(CC-1065)、美法兰(melphalan)、卡莫司汀(carmustine, BSNU)、罗莫司汀(lomustine, CCNU)、环磷酰胺、白消安(busulfan)、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C和顺二氯二胺络铂(II)(DDP)、顺铂)、蒽环霉素(例如柔红霉素(以前称为道诺霉素(daunomycin))和多柔比星)、抗生素(例如更生霉素(dactinomycin)(以前称为放线菌素)、博莱霉素、光辉霉素(mithramycin)和安曲霉素(anthracycline, AMC))以及抗有丝分裂剂(例如长春新碱、长春碱、紫杉酚和类美登素)。

在其它实施方案中, 治疗剂和/或预防剂是蛋白质。可用于本公开中的纳米粒子中的治疗性蛋白质包括但不限于庆大霉素、阿米卡星(amikacin)、胰岛素、促红细胞生成素(EPO)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、因子VIR、黄体激素释放激素(LHRH)类似物、干扰

素、肝素、乙型肝炎表面抗原、伤寒疫苗和霍乱疫苗。

在一些实施方案中，治疗剂是多核苷酸或核酸(例如核糖核酸或脱氧核糖核酸)。术语“多核苷酸”的最广泛含义包括呈寡核苷酸链或可以并入寡核苷酸链中的任何化合物和/或物质。根据本公开使用的示例性多核苷酸包括但不限于以下一种或多种：脱氧核糖核酸(DNA)；核糖核酸(RNA)，包括信使 mRNA(mRNA)、其杂交体；RNAi诱导因子；RNAi因子；siRNA；shRNA；miRNA；反义RNA；核糖酶；催化性DNA；诱导三股螺旋形成的RNA；适体等。在一些实施方案中，治疗剂和/或预防剂是RNA。可用于本文所描述的组合物和方法中的RNA可以选自由但不限于以下组成的组：shortmer、antagomir、反义RNA、核糖酶、小干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、Dicer-底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA(shRNA)、转运RNA(tRNA)、信使RNA(mRNA)及其混合物。在某些实施方案中，RNA是mRNA。

在某些实施方案中，治疗剂和/或预防剂是mRNA。mRNA可以编码任何所关注多肽，包括任何天然或非天然存在或以其它方式修饰的多肽。由mRNA编码的多肽可以具有任何大小并且可以具有任何二级结构或活性。在一些实施方案中，由mRNA编码的多肽当在细胞中表达时可以具有治疗作用。

在其它实施方案中，治疗剂和/或预防剂是siRNA。siRNA能够选择性降低所关注基因的表达或下调该基因的表达。例如，siRNA的选择可以使得在将包括该siRNA的组合物施用给有需要受试者后使与特定疾病、病症或病况有关的基因沉默。siRNA可以包含与编码所关注基因或蛋白质的mRNA序列互补的序列。在一些实施方案中，siRNA可以是免疫调节性siRNA。

在某些实施方案中，治疗剂和/或预防剂是sgRNA和/或cas9 mRNA。sgRNA和/或cas9 mRNA可以用作基因编辑工具。例如，sgRNA-cas9复合物可以影响细胞基因的mRNA翻译。

在一些实施方案中，治疗剂和/或预防剂是shRNA或者其编码载体或质粒。shRNA可以在将适当构建体递送至核中后在目标细胞内部产生。与shRNA相关的构建体和机制是相关领域中众所周知的。

疾病或病症

本公开的组合物/载体可以向受试者或患者递送治疗剂或预防剂。所述治疗剂或预防剂包括但不限于核酸分子、小分子化合物、多肽或蛋白质中的一种或多种。因此，本公开的组合物可用于制备核酸药物、基因疫苗、小分子
5 药物、多肽或蛋白质药物。由于上述治疗剂或预防剂的种类广泛，本公开的组合物可用于治疗或预防多种疾病或病症。

在一种实施方案中，所述疾病或病症以功能失常或异常的蛋白质或多肽活性为特征。

例如，所述疾病或病症选自由以下组成的组：感染性疾病、癌症和增生
10 性疾病、遗传性疾病、自体免疫性疾病、糖尿病、神经退化性疾病、心血管和肾血管疾病以及代谢性疾病。

在一种实施方案中，所述感染性疾病选自由冠状病毒，流感病毒，或 HIV 病毒引起的疾病、小儿肺炎，裂谷热，黄热病，狂犬病，多种疱疹。

15 其它组分

组合物可以包括一种或多种除前述部分中所描述的那些外的组分。例如，组合物可以包括一个或多个疏水性小分子，如维生素(例如维生素A或维生素E)或固醇。

组合物还可以包括一个或多个渗透性增强分子、碳水化合物、聚合物、
20 表面改变剂或其它组分。渗透性增强分子可以是例如美国专利申请公布第2005/0222064号所描述的分子。碳水化合物可以包括简单糖(例如葡萄糖)和多糖(例如糖原以及其衍生物和类似物)。

表面改变剂可以包括但不限于阴离子性蛋白质(例如牛血清白蛋白)、表面活性剂(例如阳离子性表面活性剂，如二甲基双十八烷基溴化铵)、糖或糖衍生物(例如环糊精)、核酸、聚合物(例如肝素、聚乙二醇和泊洛沙姆)、粘液溶解剂(例如乙酰半胱氨酸、艾蒿、菠萝蛋白酶(bromelain)、木瓜蛋白酶、大青
25 (clerodendrum)、溴己新(bromhexine)、羧甲司坦(carbocisteine)、依普拉酮(eprazinone)、美司钠(mesna)、氨溴索(ambroxol)、索布瑞醇(sobrerol)、多米奥醇(domiodol)、来托司坦(letosteine)、司替罗宁(steproinin)、硫普罗宁(tiopronin)、
30 凝溶胶蛋白(gelsolin)、胸腺肽(thymosin) β 4、链球菌DNA酶 α (dornase alfa)、奈

替克新(neltenexine)和厄多司坦(erdosteine))和DNA酶(例如rhDNA酶)。表面改变剂可以被安置在组合物的纳米粒子内和/或表面上(例如通过涂布、吸附、共价连接或其它方法)。

5 组合物还可以包含一种或多种官能化脂质。例如，脂质可以用炔基官能化，该炔基当在适当反应条件下暴露于叠氮化物时可能经历环加成反应。确切地说，脂质双层可以通过这一方式，用一个或多个可有效地促进膜渗透、细胞识别或成像的基团官能化。组合物的表面还可以与一种或多种有用抗体偶联。可用于靶向细胞递送、成像和膜渗透的官能团和偶联物是本领域中众所周知的。

10 除这些组分外，组合物可以包括可用于药物组合物中的任何物质。例如，组合物可以包括一种或多种药学上可接受的赋形剂或辅助成分，如但不限于一种或多种溶剂、分散介质、稀释剂、分散助剂、悬浮助剂、造粒助剂、崩解剂、填充剂、助流剂、液体媒剂、粘合剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、缓冲剂、润滑剂、油、防腐剂、调味剂、着色剂等。赋形剂例如
15 淀粉、乳糖或糊精。药学上可接受的赋形剂是本领域中众所周知的(参见例如 Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 第21版, A.R.Gennaro; Lippincott, Williams&Wilkins, Baltimore, MD, 2006)。

稀释剂的实例可以包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸钙、磷酸氢钙、磷酸钠、乳糖、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、
20 甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、氯化钠、干淀粉、玉米淀粉、粉末状糖和/或其组合。

在一些实施方案中，包括一种或多种本文所述的脂质的组合物还可以包括一种或多种佐剂，例如吡喃葡萄糖基脂质佐剂(GLA)、CpG寡聚脱氧核糖核苷酸(例如A类或B类)、多聚(I:C)、氢氧化铝和Pam3CSK4。

25 本公开的组合物可以制成固体、半固体、液体或气体的形式的制剂，例如片剂、胶囊剂、软膏剂、酏剂、糖浆、溶液、乳液、悬浮液、注射剂、气溶胶。本公开的组合物可以通过制药领域熟知的方法来制备。例如，无菌注射溶液可通过将所需量的治疗剂或预防剂与所需的上述各种其它成分掺入适当的溶剂例如无菌蒸馏水中，然后过滤灭菌来制备。还可以加入表面活性剂
30 以促进形成均匀的溶液或悬浮液。

例如, 本公开的组合物可以经静脉内、肌肉内、皮内、皮下、鼻内或通过吸入施用。在一种实施方案中, 所述组合物是皮下施用的。

- 本公开的组合物以治疗有效量给药, 所述量不仅可以随所选择的特定试剂而变化, 还可以随给药途径, 所治疗疾病的性质以及患者的年龄和状况而变化, 并且最终可以由主治医师或临床医生自行决定。例如, 可将约0.001mg/kg至约10mg/kg剂量的所述治疗剂或预防剂施用给哺乳动物(例如人)。

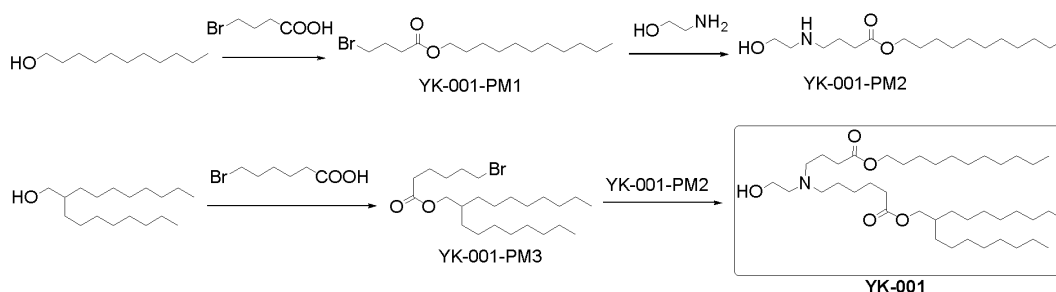
实施例

- 下面结合实施例对本发明作进一步描述, 但本发明并不限于以下实施例。
- 10 实施例中未注明具体条件者, 按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例1: 阳离子脂质化合物的合成

- 15 1. 6-((4-(十一氧基)-4-氧代丁基)(2-羟乙基)氨基)己酸2-辛基癸酯 (YK-001) 的合成

合成路线如下:



步骤一: 4-溴丁酸正十一酯制备 (YK-001-PM1) 的合成

- 20 将正十一醇(5.00g, 29.02mmol)和4-溴丁酸(5.14g, 30.78mmol)溶于二氯甲烷(40mL)中, 向上述溶液加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(6.67g, 34.82mmol)及4-二甲基氨基吡啶(177mg, 1.45mmol), 于30~35℃下搅拌反应8小时。反应完毕后将反应液用饱和碳酸钠洗涤、饱和食盐水洗涤, 并经Na₂SO₄干燥。将混合物过滤, 滤液经真空减压浓缩。将残余物通过硅胶色谱

法纯化，得到4-溴丁酸正十一酯(6.68g, 20.79mmol, 71.64%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.08 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.47 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.50 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.18 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.61 (dd, $J = 14.2, 7.0$ Hz, 2H), 1.39 – 1.19 (m, 16H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

5 步骤二：4-((2-羟乙基)氨基)丁酸正十一酯 (YK-001-PM2) 的合成

将4-溴丁酸正十一酯(2.71g, 8.43mmol)和乙醇胺(1.40g, 22.92mmol)溶于乙腈(50mL)中，向上述体系加入碳酸钾(3.17g, 22.92mmol)加热至70℃搅拌反应2小时。反应完毕后待反应液冷却至室温后过滤，滤液经真空减压浓缩除去溶剂。将残余物通过硅胶色谱法纯化，得到4-((2-羟乙基)氨基)丁酸正十一酯
10 (1.47g, 4.88mmol, 57.89%)。 $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{NO}_3$, MS(ES): $m/z(\text{M}+\text{H}^+)$ 302.2。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.06 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.67 – 3.60 (m, 3H), 2.82 – 2.77 (m, 2H), 2.69 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.38 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.13 – 2.02 (m, 3H), 1.84 (p, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.66 – 1.53 (m, 2H), 1.28 (d, $J = 15.5$ Hz, 14H), 0.89 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H).

15 步骤三：6-溴己酸-2-辛基癸酯 (YK-001-PM3) 的合成

以6-溴己酸(2.60g, 13.33mmol)和2-辛基癸醇(3.00g, 11.09mmol)为原料，按照制备YK-001-PM1的方法，得到6-溴代己酸2-辛基癸酯(3.05g, 6.82mmol, 61.50%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.97 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.40 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.93 – 1.84 (m, 2H), 1.66 (dt, $J = 20.5, 7.4$ Hz, 3H),
20 1.48 (m, $J = 8.6, 6.9, 4.2$ Hz, 2H), 1.35 – 1.19 (m, 28H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H).

步骤四：6-((4-(十一氧基)-4-氧代丁基)(2-羟乙基)氨基)己酸2-辛基癸酯 (YK-001) 的合成

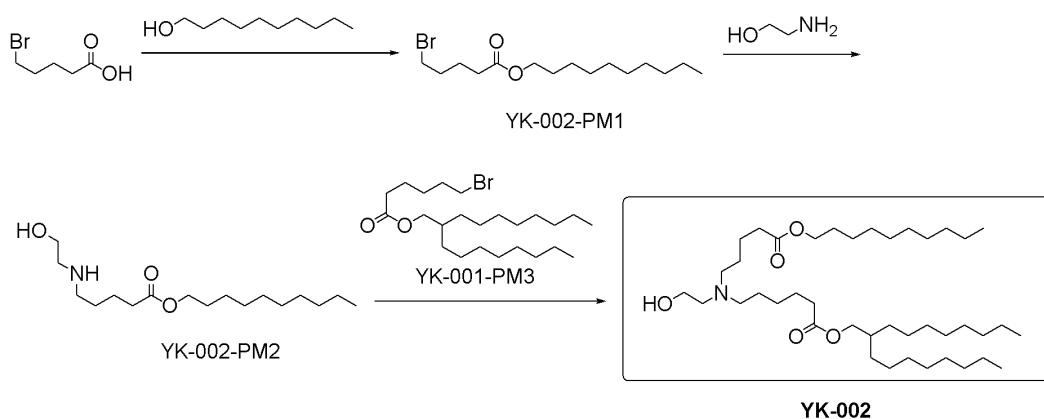
将6-溴代己酸-2-辛基癸酯(200mg, 0.45mmol)和4-((2-羟乙基)氨基)丁酸正
25 十一酯 (102mg, 0.34mmol) 溶于乙腈(10mL)中，向上述体系加入碳酸钾(188mg, 1.36mmol)和碘化钾(5mg, 0.03mmol)加热至70℃搅拌反应20小时。反应液冷却至室温后过滤，滤液经真空减压浓缩除去溶剂。将残余物通过硅胶色谱法纯化，得所述目标化合物(36mg, 0.054mmol, 14.7%)。 $\text{C}_{41}\text{H}_{81}\text{NO}_5$,

MS(ES): $m/z(M+H^+)$ 668.6。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.06 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.97 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.84 – 3.72 (m, 1H), 3.53 – 3.48 (m, 1H), 3.46 – 3.40 (m, 1H), 2.42 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 2.32 (dd, $J = 15.2, 7.6$ Hz, 4H), 2.13 – 2.04 (m, 1H), 1.70 – 1.57 (m, 6H),
5 1.39 – 1.18 (m, 53H), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 9H).

2. 6-((5-(癸氧基)-5-氧代戊基)(2-羟乙基)氨基)己酸2-辛基癸酯 (YK-002) 的合成

合成路线如下:



10

步骤一：5-溴戊酸正癸酯 (YK-002-PM1) 的合成

以5-溴己戊酸(1.81g, 10.00mmol)与正癸醇(1.45g, 9.16mmol)为原料, 按照制备YK-001-PM1的方法, 5-溴戊酸正癸酯(2.50g, 7.78mmol, 84.93%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.07 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.41 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.34 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.96 – 1.85 (m, 2H), 1.83 – 1.73 (m, 2H), 1.69 – 1.54 (m, 2H), 1.31 (dd, $J = 18.9, 15.6$ Hz, 14H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H).
15

步骤二：5-((2-羟乙基)氨基)戊酸正癸酯 (YK-002-PM2) 的合成

以5-溴戊酸正癸酯(1.92g, 5.98mmol)和乙醇胺(0.31g, 5.07mmol)为原料, 按照制备YK-001-PM2的方法, 得到5-((2-羟乙基)氨基)戊酸正癸酯(0.34g, 20 1.13mmol, 18.90%)。 $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{NO}_3$, MS(ES): $m/z(M+H^+)$ 302.3。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.05 (dd, $J = 8.9, 4.7$ Hz, 1H), 4.00 – 3.92 (m,

1H), 3.82 – 3.77 (m, 2H), 3.63 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.58 – 3.51 (m, 2H), 3.37 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 2.41 (m, 2H), 1.84 – 1.76 (m, 4H), 1.66 – 1.51 (m, 4H), 1.28 (d, $J = 14.2$ Hz, 12H), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

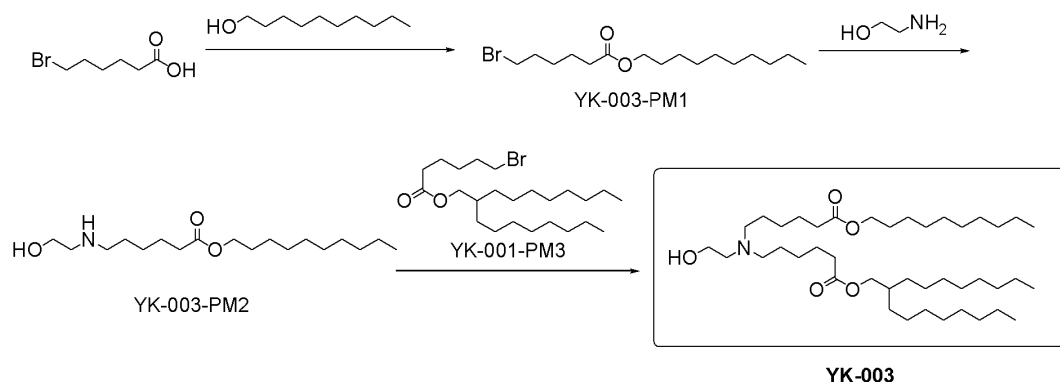
5 步骤三：6-((5-(癸氧基)-5-氧代戊基)(2-羟乙基)氨基)己酸2-辛基癸酯 (YK-002) 的合成

以5-((2-羟乙基)氨基)戊酸正癸酯(151mg, 0.50mmol)和6-溴己酸-2-辛基癸酯 (226mg, 0.50mmol)为原料, 按照制备YK-001的方法, 得所述目标化合物 (216mg, 0.32mmol, 64.0%)。C₄₁H₈₁NO₅, MS(ES): $m/z(M+H^+)$ 668.5。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.06 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.97 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.66-3.64(m, 2H), 2.42 (t, $J = 6.2$ Hz, 6H), 2.32 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.88–1.76 (m, 5H), 1.68 – 1.58 (m, 7H), 1.37 – 1.20 (m, 44H), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 9H).

3. 6-((6-(癸氧基)-6-氧代己基)(2-羟乙基)氨基)己酸2-辛基癸酯 (YK-003) 的合成

15 合成路线如下:



步骤一：6-溴己酸正癸酯 (YK-003-PM1) 的合成

以6-溴己酸(1.95g, 10.00mmol)与正癸醇(1.45g, 9.16mmol)为原料, 按照制备YK-001-PM1的方法, 得到6-溴己酸正癸酯(2.41g, 7.19mmol, 78.49%)。

20 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.06 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.41 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.94 – 1.81 (m, 2H), 1.73 – 1.56 (m, 3H), 1.54 – 1.41 (m, 2H), 1.39 – 1.19 (m, 15H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

步骤二：6-((2-羟乙基)氨基)己酸正癸酯（YK-003-PM2）的合成

将6-溴己酸正癸酯(1.12g, 3.34mmol)、乙醇胺(8.20g, 134.25mmol)溶于乙醇(15mL)中，室温搅拌反应16小时。反应液经真空减压浓缩除去溶剂后再用乙酸乙酯(80mL)稀释，用饱和食盐水(50mL×3)洗涤。有机相减压浓缩后通过
5 硅胶色谱法纯化，得到6-((2-羟乙基)氨基)己酸正癸酯(0.66g, 2.09mmol, 62.6%)。C₁₈H₃₇NO₃, MS(ES): m/z(M+H⁺)316.3。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.05 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.93 – 3.88 (m, 1H), 3.72 – 3.70 (m, 1H), 3.66 – 3.56 (m, 1H), 3.55 – 3.50 (m, 1H), 3.34 (s, 2H), 2.83 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 2.72 – 2.68 (m, 1H), 2.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.69 – 1.54 (m, 6H),
10 1.35 – 1.21 (m, 16H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H).

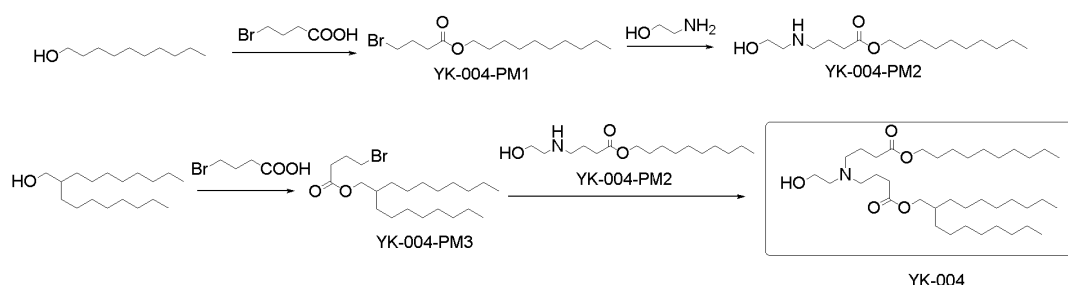
步骤三：6-((6-(癸氧基)-6-氧代己基)(2-羟乙基)氨基)己酸2-辛基癸酯（YK-003）的合成

以6-((2-羟乙基)氨基)己酸正癸酯(157mg, 0.50mmol)和6-溴己酸-2-辛基癸酯(226mg, 0.50mmol)为原料，按照制备YK-001的方法，得到所述目标化合物
15 (140mg, 0.21mmol, 42.00%)。C₄₂H₈₃NO₅, MS(ES): m/z(M+H⁺)682.8。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.06 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.97 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.72 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.64 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 2.32 (td, *J* = 7.4, 2.4 Hz, 5H), 1.73 – 1.54 (m, 14H), 1.41–1.19 (m, 49H), 0.89 (d, *J* = 6.6 Hz, 9H).

20 4. 4-((4-(癸氧基)-4-氧代丁基)(2-羟乙基)氨基)丁酸2-辛基癸酯（YK-004）的合成

合成路线如下：



步骤一：4-溴丁酸正癸酯(YK-004-PM1)的合成

以4-溴丁酸(15.00g, 89.82mmol)和1-癸醇(12.90g, 81.50mmol)为原料, 按照制备YK-001-PM1的方法, 得到4-溴丁酸正癸酯(10.52g, 34.2mmol, 42.0%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.07 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.47 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.50 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.18 (dd, *J* = 12.5, 5.5 Hz, 2H), 1.62 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.30 – 1.20 (m, 14H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H).

步骤二：4-((2-羟乙基)氨基)丁酸正癸酯(YK-004-PM2)的合成

以4-溴丁酸正癸酯(8.00g, 26.04mmol)和乙醇胺(4.78g, 78.26mmol)为原料, 按照制备YK-001-PM2的方法, 得到4-((2-羟乙基)氨基)丁酸正癸酯(4.40g, 15.3mmol, 58.8%)。C₁₆H₃₃NO₃, MS(ES): *m/z*(M+H⁺)288.2。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.76 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.62 (dd, *J* = 8.3, 4.9 Hz, 4H), 3.50 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.45 – 3.36 (m, 2H), 2.91 – 2.76 (m, 2H), 2.44 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.08 (dd, *J* = 15.1, 7.5 Hz, 2H), 1.67 – 1.51 (m, 2H), 1.27 (s, 12H), 0.88 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H).

步骤三：4-溴丁酸-2-庚基壬酯(YK-004-PM3)的合成

以2-庚基壬醇(390mg, 1.45mmol)和4-溴丁酸(265mg, 1.59mmol)为原料, 按照制备YK-001-PM1的方法, 得到4-溴丁酸-2-庚基壬酯(500mg, 1.19mmol, 82.07%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.99 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.47 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.51 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.18 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.29 (d, *J* = 21.2 Hz, 29H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H).

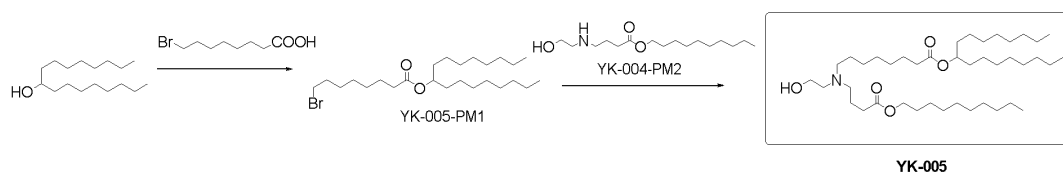
步骤四：4-((4-(癸氧基)-4-氧代丁基)(2-羟乙基)氨基)丁酸2-辛基癸酯(YK-004)的合成

以4-溴丁酸-2-庚基壬酯(250mg, 0.60mmol)和4-((2-羟乙基)氨基)丁酸正癸酯(172mg, 0.60mmol)为原料, 按照制备YK-001的方法, 得所述目标化合物(50mg, 0.081mmol, 13.3%)。C₃₈H₇₅NO₅, MS(ES): *m/z*(M+H⁺)626.6。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.06 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.97 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.61–3.58 (m, 2H), 2.33 (t, $J = 6.9$ Hz, 4H), 1.81 (s, 3H), 1.65–1.55 (m, 3H), 1.35–1.18 (m, 50H), 0.87 (d, $J = 7.0$ Hz, 9H).

5 5. 8-((4-(癸氧基)-4-氧代丁基)(2-羟基乙基)氨基)辛酸9-十七烷基酯 (YK-005) 的合成

合成路线如下:



步骤一: 8-溴辛酸-9-十七烷基酯 (YK-005-PM1) 的合成

10 以8-溴辛酸(2.87g, 12.86mmol)和9-十七醇(3.00g, 11.70mmol)为原料, 按照制备YK-001-PM1的方法, 得到8-溴辛酸-9-十七烷基酯(3.15g, 6.82mmol, 58.3%)。

步骤二: 8-((4-(癸氧基)-4-氧代丁基)(2-羟基乙基)氨基)辛酸9-十七烷基酯 (YK-005) 的合成

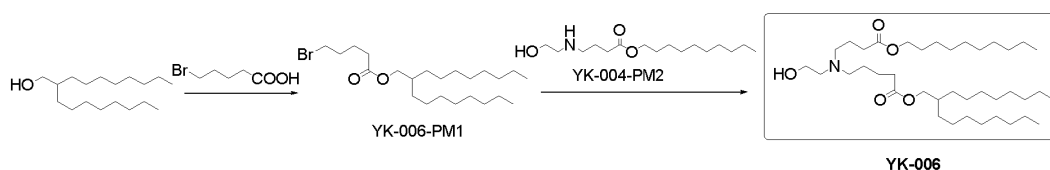
15 以4-((2-羟基乙基)氨基)丁酸正癸酯(150mg, 0.52mmol)和8-溴辛酸-9-十七烷基酯(285mg, 0.62mmol)为原料, 按照制备YK-001的方法, 得所述目标化合物(140mg, 0.21mmol, 40.4%)。 $\text{C}_{41}\text{H}_{81}\text{NO}_5$, MS(ES): $m/z(\text{M}+\text{H}^+)$ 668.6。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.06 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.63 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 2.71 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 2.67–2.54 (m, 4H), 2.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.28 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.89–1.80 (m, 2H), 1.61 (dd, $J = 12.7, 5.9$ Hz, 5H), 1.50 (d, $J = 5.9$ Hz, 6H), 1.38–1.18 (m, 45H), 0.90–0.84 (m, 9H).

20

6. 5-((4-(癸氧基)-4-氧代丁基)(2-羟基乙基)氨基)戊酸2-辛基癸酯 (YK-006) 的合成

25 合成路线如下:



步骤一：5-溴戊酸-2-庚基壬酯（YK-006-PM1）的合成

以2-庚基壬醇(300mg, 1.11mmol)和5-溴戊酸(220mg, 1.22mmol)为原料，按照制备YK-001-PM1的方法，得到5-溴戊酸-2-庚基壬酯(438mg, 1.01mmol, 91.0%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.98 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.41 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.90 (ddd, $J = 13.6, 7.7, 3.7$ Hz, 2H), 1.84 – 1.72 (m, 2H), 1.29 (d, $J = 21.6$ Hz, 29H), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H).

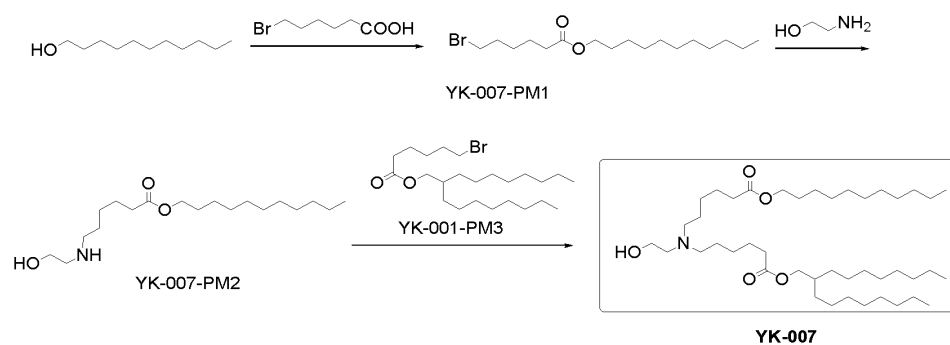
步骤二：5-((4-(癸氧基)-4-氧代丁基)(2-羟乙基)氨基)戊酸2-辛基癸酯（YK-006）的合成

以5-溴戊酸-2-庚基壬酯(200mg, 0.46mmol)和4-((2-羟乙基)氨基)丁酸正癸酯 (133mg, 0.46mmol) 为原料，按照制备YK-001的方法，得所述目标化合物 (65mg, 0.10mmol, 21.7%)。 $\text{C}_{39}\text{H}_{77}\text{NO}_5$, MS(ES): $m/z(\text{M}+\text{H}^+)$ 640.6。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.06 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.97 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.55–3.50 (m, 2H), 2.65–2.45 (m, 3H) 2.33 (t, $J = 6.7$ Hz, 4H), 2.01 (s, 1H), 1.61 (d, $J = 6.8$ Hz, 10H), 1.39 – 1.10 (m, 44H), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 9H).

7. 6-((2-羟乙基)(6-氧代-6-(十一烷氧基)己基)氨基)己酸2-辛基癸酯（YK-007）的合成

合成路线如下：



步骤一：6-溴己酸-1-十一酯（YK-007-PM1）的合成

以6-溴己酸(2.50g, 12.82mmol)和1-十一醇(2.00g, 11.61mmol)为原料，按照制备YK-001-PM1的方法，得到6-溴己酸1-十一酯(2.40g, 6.87mmol, 59.2%)。

步骤二：6-((2-羟乙基)氨基)己酸十一烷基酯（YK-007-PM2）的合成

5 以6-溴己酸1-十一酯(2.25g, 6.44mmol)和乙醇胺(1.18g, 19.29mmol)为原料，按照制备YK-001-PM2的方法，得到十一烷基6-((2-羟乙基)氨基)己酸酯(855mg, 2.59mmol, 40.2%)。C₁₉H₃₉NO₃, MS(ES): m/z(M+H⁺)330.3。

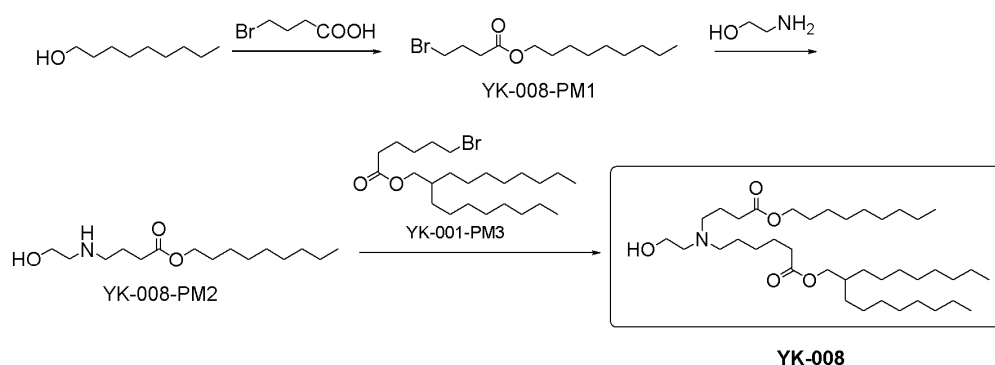
步骤三：6-((2-羟乙基)(6-氧代-6-(十一烷氧基)己基)氨基)己酸2-辛基癸酯（YK-007）的合成

10 以6-((2-羟乙基)氨基)己酸十一烷基酯(300mg, 0.91mmol)和6-溴代己酸2-辛基癸酯(488mg, 1.09mmol)为原料，按照制备YK-001的方法，得所述目标化合物(260mg, 0.37mmol, 41.1%)。C₄₃H₈₅NO₅, MS(ES): m/z(M+H⁺)696.6。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.09 – 4.02 (m, 2H), 3.97 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.53 – 3.48 (m, 2H), 2.35–2.29 (m, 4H), 2.01 (dd, *J* = 12.6, 6.9 Hz, 2H), 1.74 – 1.55
15 (m, 6H), 1.28 (d, *J* = 14.7 Hz, 58H), 0.89 (d, *J* = 6.5 Hz, 9H)。

8. 6-((4-(壬氧基)-4-氧代丁基)(2-羟乙基)氨基)己酸2-辛基癸酯（YK-008）的合成

合成路线如下：



20

步骤一：4-溴丁酸正壬酯制备（YK-008-PM1）的合成

以正壬醇(5.00g, 34.66mmol)与4-溴丁酸(6.11g, 36.59mmol)为原料，按照制

备YK-001-PM1的方法, 得到4-溴丁酸正壬酯(3.66g, 12.5mmol, 36.0%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.08 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.47 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.50 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.18 (p, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.61 (dd, $J = 14.1, 7.0$ Hz, 2H), 1.40 – 1.19 (m, 12H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

5 步骤二: 4-((2-羟乙基)氨基)丁酸正壬酯 (YK-008-PM2) 的合成

以4-溴丁酸正壬酯(2.46g, 8.39mmol)与乙醇胺 (1.28g, 20.96mmol)为原料, 按照制备YK-001-PM2的方法, 得到4-((2-羟乙基)氨基)丁酸正壬酯(1.22g, 4.46mmol, 53.2%), $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{NO}_3$, MS(ES): $m/z(\text{M}+\text{H}^+)$ 274.2。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.06 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.53 – 3.47 (m, 3H), 2.68 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.43 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 2.37 (s, 1H), 2.12 – 2.01 (m, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.67 – 1.51 (m, 2H), 1.40 – 1.21 (m, 10H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

步骤三: 6-((4-(壬氧基)-4-氧代丁基)(2-羟乙基)氨基)己酸2-辛基癸酯 (YK-008) 的合成

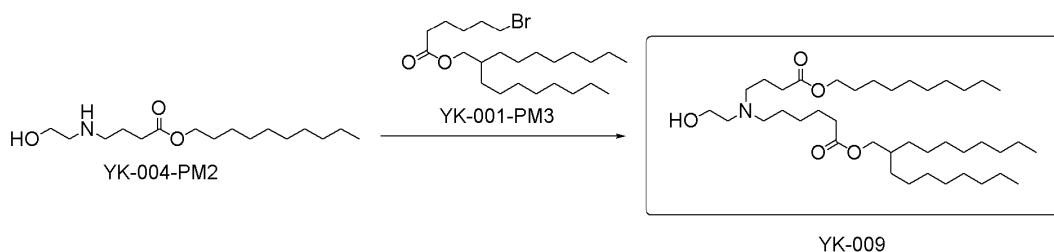
以6-溴代己酸-2-辛基癸酯(200mg, 0.45mmol)与4-((2-羟乙基)氨基)丁酸正壬酯 (102mg, 0.37mmol)为原料, 按照制备YK-001的方法, 得所述目标化合物 (30mg, 0.047mmol, 13.5%)。 $\text{C}_{39}\text{H}_{77}\text{NO}_5$, MS(ES): $m/z(\text{M}+\text{H}^+)$ 640.6。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.06 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.97 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.68 – 3.62 (m, 2H), 2.32 (dd, $J = 15.2, 7.6$ Hz, 4H), 1.63 (dd, $J = 15.1, 7.6$ Hz, 6H), 1.39 – 1.17 (m, 52H), 0.87 (d, $J = 7.0$ Hz, 9H).

20

9. 6-((4-(癸氧基)-4-氧代丁基)(2-羟乙基)氨基)己酸2-辛基癸酯 (YK-009) 的合成

合成路线如下:



步骤一：6-((4-(癸氧基)-4-氧代基丁基)(2-羟基乙基)氨基)己酸2-辛基癸酯(YK-009)的合成

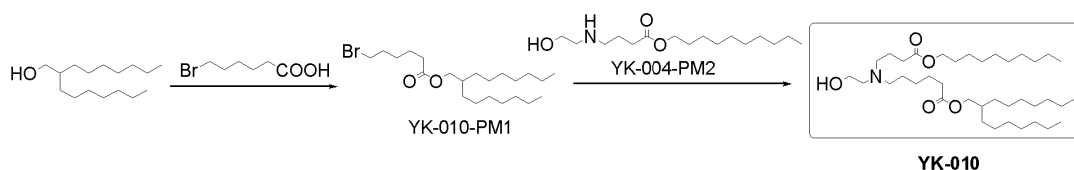
以4-((2-羟基乙基)氨基)丁酸正癸酯(1.00g, 3.48mmol)和6-溴代己酸2-辛基癸酯(1.87g, 4.18mmol)为原料, 按照制备YK-001的方法, 得所述目标化合物(0.92g, 1.41mmol, 40.5%)。C₄₀H₇₉NO₅, MS(ES): m/z(M+H⁺)654.6。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.07 (t, *J* = 6.8 Hz, 4H), 3.96 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.49 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.27–2.17 (m, 2H), 2.01 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 1.68–1.62(m, 9H), 1.46–1.43(m, 3H), 1.36–1.15 (m, 44H), 0.87 (d, *J* = 7.0 Hz, 9H).

10

10. 6-((4-(癸氧基)-4-氧代基丁基)(2-羟基乙基)氨基)己酸2-庚基壬酯(YK-010)的合成

合成路线如下:



15 步骤一：6-溴己酸2-庚基壬酯(YK-010-PM1)的合成

以6-溴己酸(290mg, 1.49mmol)和2-庚基壬醇(300mg, 1.24mmol)为原料, 按照制备YK-001-PM1的方法, 得到6-溴己酸2-庚基壬酯(280mg, 0.67mmol, 54.0%)。

20 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.97 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.41 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.93 – 1.84 (m, 2H), 1.66 (dt, *J* = 20.5, 7.4 Hz, 3H), 1.52 – 1.43 (m, 2H), 1.36 – 1.20 (m, 24H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H).

步骤二：6-((4-(癸氧基)-4-氧代基丁基)(2-羟基乙基)氨基)己酸2-庚基壬酯(YK-010)的合成

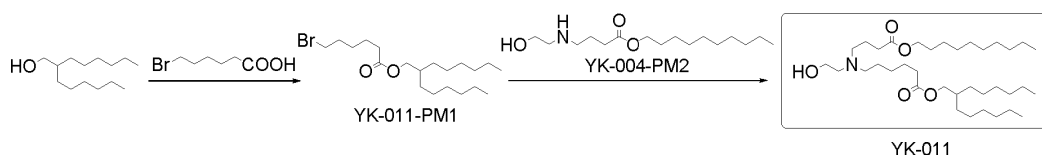
25 以4-((2-羟基乙基)氨基)丁酸正癸酯(150mg, 0.52mmol)和6-溴己酸2-庚基壬酯(260mg, 0.62mmol)为原料, 按照制备YK-001的方法, 得所述目标化合物

(150mg, 0.24mmol, 46.2%). $C_{38}H_{75}NO_5$, MS(ES): $m/z(M+H^+)$ 626.7.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.27 (qd, *J* = 11.0, 5.8 Hz, 2H), 4.13–4.01 (m, 2H), 3.97 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.33 (dt, *J* = 12.5, 7.3 Hz, 4H), 1.86–1.81 (m, 1H), 1.78–1.68 (m, 2H), 1.67–1.59 (m, 4H), 1.33–1.17 (m, 49H), 0.88 (t, *J* = 4.6 Hz, 9H).

11. 6-((4-(癸氧基)-4-氧代丁基)(2-羟基乙基)氨基)己酸2-己基辛酯 (YK-011) 的合成

合成路线如下:



步骤一：6-溴己酸2-己基辛酯（YK-011-PM1）的合成

以6-溴己酸(290mg, 1.49mmol)与2-己基辛醇(300mg, 1.40mmol)为原料, 按照制备 YK-001-PM1 的方法, 得到6-溴己酸2-己基辛酯(240mg, 0.61mmol, 41.6%)。

15 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.97 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.41 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.92 – 1.83 (m, 2H), 1.66 (dt, *J* = 20.5, 7.4 Hz, 3H), 1.48 (ddd, *J* = 8.6, 6.8, 4.2 Hz, 2H), 1.37 – 1.20 (m, 20H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H).

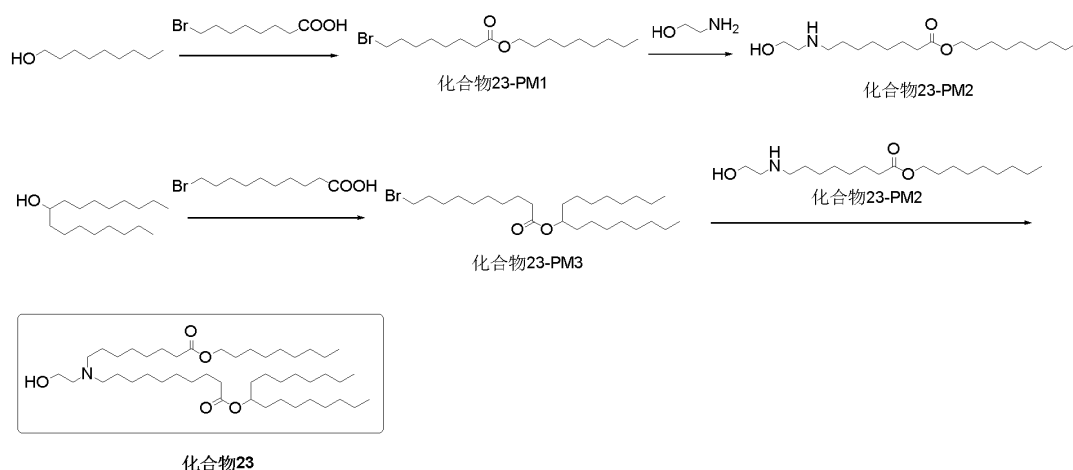
步骤二：6-((4-(癸氧基)-4-氧代丁基)(2-羟基乙基)氨基)己酸2-己基辛酯
(YK-011)的合成

20 以4-((2-羟乙基)氨基)丁酸正癸酯(150mg, 0.52mmol)和6-溴己酸2-己基辛酯 (240mg, 0.61mmol)为原料, 按照制备YK-001的方法, 得所述目标化合物 (120mg, 0.20mmol, 38.5%)。C₃₆H₇₁NO₅, MS(ES): m/z(M+H⁺)598.5。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.09 – 4.03 (m, 4H), 3.56-3.53(m, 2H), 2.41 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.71–1.63 (m, 3H), 1.58– 1.54 (m, 2H), 1.42 – 1.19 (m, 47H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 9H).

12. 8-((2-羟乙基)(10-((9-十七烷基)氧基)-10-氧代癸基)氨基)辛酸壬酯 (化合物23) 的合成

合成路线如下:



5 步骤一: 8-溴辛酸正壬酯 (化合物23-PM1)的合成

以8-溴辛酸(2.50g, 11.21mmol)与正壬醇(1.47g, 10.19mmol)为原料, 按照制备YK-001-PM1的方法, 得到8-溴辛酸正壬酯(1.85g, 5.30mmol, 52.0%)。

步骤二: 8-((2-羟乙基)氨基)辛酸壬酯(化合物23-PM2)的合成

以上述制得8-溴辛酸正壬酯(1.50g, 4.29mmol)与乙醇胺(7.96g, 130.32mmol)为原料, 按照YK-001-PM2的方法, 得8-((2-羟乙基)氨基)辛酸壬酯(610mg, 1.85mmol, 43.1%)。C₁₉H₃₉NO₃, MS(ES): m/z(M+H⁺)330.3。

步骤三: 10-溴癸酸-9-十七烷基酯 (化合物23-PM3)的合成

以10-溴癸酸(3.23g, 12.86mmol)与9-十七醇(3.00g, 11.70mmol)为原料, 按照制备YK-001-PM1的方法, 得到10-溴癸酸-9-十七烷基酯(3.10g, 6.72mmol, 57.4%)。

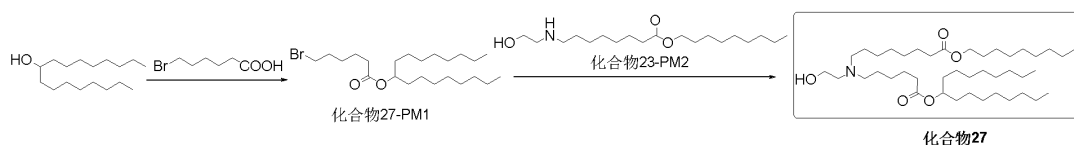
步骤四: 8-(10-((9-十七烷基)氧基)-10-氧代癸基)氨基)辛酸壬酯(化合物23)的合成

以8-((2-羟乙基)氨基)辛酸壬酯(500mg, 1.52mmol)和10-溴癸酸-9-十七烷基酯(840mg, 1.72mmol)为原料, 按照制备YK-001的方法, 得所述目标化合物(520mg, 0.70mmol, 46.1%)。C₄₆H₉₁NO₅, MS(ES): m/z(M+H⁺)738.8。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.88–4.86(m, 1H), 4.05 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.97 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 2.77–2.69(m, 5H), 2.25(m, 4H), 1.61 (dd, $J = 13.5, 6.6$ Hz, 13H), 1.38 – 1.18 (m, 55H), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 9H).

5 13. 8-((2-羟乙基)(6-((9-十七烷基)氧基)-6-氧代己基)氨基)辛酸壬酯(化合物27)的合成

合成路线如下:



步骤一: 6-溴己酸-9-十七烷基酯 (化合物27-PM1)的合成

10 以6-溴己酸(2.51g, 12.87mmol)与9-十七醇(3.00g, 11.70mmol)为原料, 按照制备YK-001-PM1的方法, 得到6-溴己酸-9-十七烷基酯(2.77g, 6.39mmol, 54.6%)。

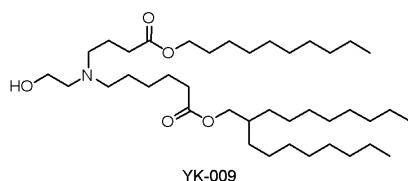
步骤二: 8-((2-羟乙基)(6-((9-十七烷基)氧基)-6-氧代己基)氨基)辛酸壬酯(化合物27)的合成

15 以8-((2-羟乙基)氨基)辛酸壬酯(500mg, 1.52mmol)和6-溴己酸-9-十七烷基酯(760mg, 1.75mmol)为原料, 按照制备YK-001的方法, 得所述目标化合物(471mg, 0.69mmol, 45.4%)。 $\text{C}_{42}\text{H}_{83}\text{NO}_5$, MS(ES): $m/z(\text{M}+\text{H}^+)$ 682.6。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.83–4.81(m, 1H), 4.05–4.00 (m, 2H), 3.77–3.69 (m, 2H), 2.75–2.59(m, 5H), 2.25–2.19(m, 4H), 1.59(dd, $J = 13.3, 6.3$ Hz, 13H), 1.34 – 1.03 (m, 47H), 0.87 (t, $J = 6.7$ Hz, 9H).

实施例2: 纳米脂质颗粒 (LNP制剂) 制备条件优化

1. 载体 (脂质体) 与mRNA比例优化



将实施例1中合成的阳离子脂质化合物YK-009分别与DSPC（艾伟拓（上海）医药科技有限公司）、胆固醇（艾伟拓（上海）医药科技有限公司）和DMG-PEG2000按照50: 10: 38.5: 1.5的摩尔比溶于乙醇，制备乙醇脂质溶液。通过乙醇注入法将乙醇脂质溶液快速加入柠檬酸盐缓冲液（pH=4~5），涡旋30s
5 备用。将eGFP-mRNA（购自上海起发实验试剂有限公司）在柠檬酸盐缓冲液（pH=4~5）中稀释得到mRNA水溶液。将一定体积的脂质体溶液与mRNA水溶液，分别以总脂质与mRNA的重量比为4: 1、10: 1、16: 1、24: 1、和30: 1制备脂质体。25℃超声15min（超声频率40kHz，超声功率800W）。所得脂质体用PBS稀释至10倍体积后，300KDa超滤管进行超滤除乙醇。再经PBS定容至一
10 定体积，得到使用阳离子脂质YK-009/DSPC/胆固醇/DMG-PEG2000（摩尔百分比为50: 10: 38.5: 1.5）包封eGFP-mRNA的LNP制剂。

细胞转染实验结果显示，载体与mRNA重量比在10: 1~30: 1范围内，均有较好转染效果，其中转染效果最好为16: 1，比例为4: 1转染效果较差，不能用此比例来运载mRNA。（图1）

15

2. 阳离子脂质与中性脂质比例优化

按照1中方法制备包封eGFP-mRNA的LNP制剂，其中阳离子脂质YK-009与中性脂质DSPC摩尔比分别为1: 1、5: 1和10: 1。

通过细胞转染实验可以看出，阳离子脂质与中性脂质摩尔比为1: 1~10: 1
20 均有转染效果，其中转染效率最高的是5: 1。（图2）

3. 聚合物共轭脂质占载体（脂质体）比例优化

按照1中方法制备包封eGFP-mRNA的LNP制剂，载体中阳离子脂质为YK-009，其中聚合物共轭脂质DMG-PEG2000占载体摩尔比分别为0.5%、
25 1.5%、2.5%、3.5%和5%。

细胞转染实验结果显示，聚合物共轭脂质占载体摩尔比在0.5%~5%范围内，均有转染效果，1.5%时转染效率最高，5%时最低。（图3）

4. 载体（脂质体）中各成分比例优化

按照1中方法制备包封eGFP-mRNA的LNP制剂，其中阳离子脂质YK-009、中性脂质DSPC、结构脂质胆固醇和聚合物共轭脂质DMG-PEG2000摩尔比分别为65: 8: 25: 2、50: 10: 38.5: 1.5、40: 17.5: 40: 2.5和25: 35: 35: 5。

通过细胞转染实验可知，阳离子脂质、中性脂质、结构脂质和聚合物共轭脂质摩尔比为50: 10: 38.5: 1.5转染效果最好，摩尔比为65: 8: 25: 2时效果差一些，但仍能转染。（图4）

实施例3： eGFP-mRNA的LNP制剂细胞转染实验

细胞复苏与传代：将293T细胞复苏，于培养皿中培养传代至所需的细胞数量。

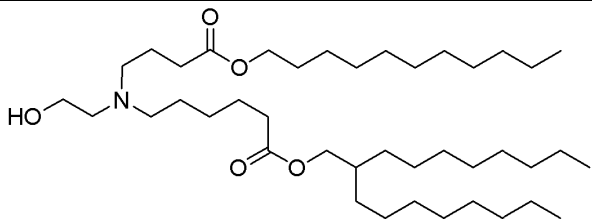
种板：将培养皿中的细胞消化并计数，以每孔1万个细胞铺在96孔板中，以每孔15万个细胞铺在12孔板中，过夜培养至细胞贴壁。

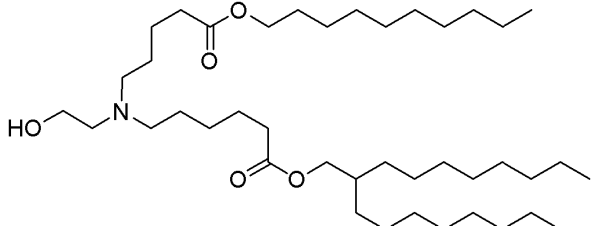
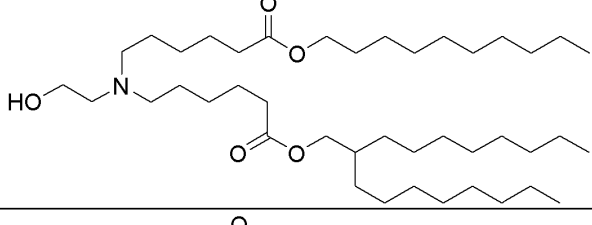
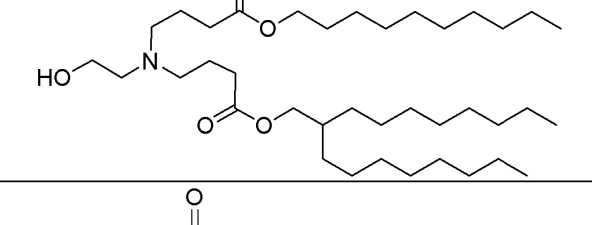
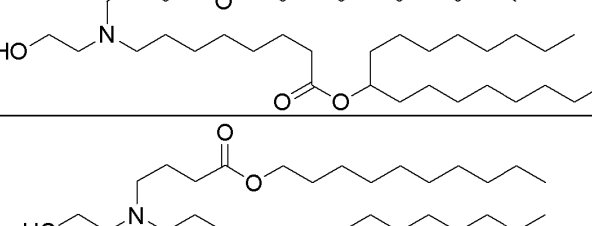
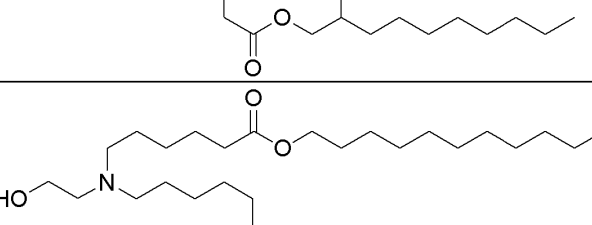
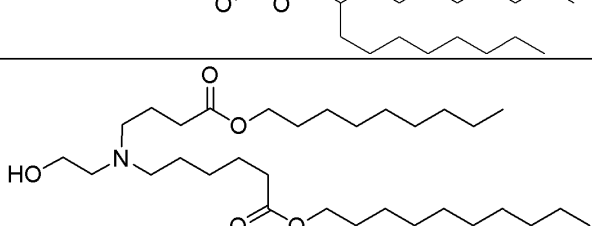
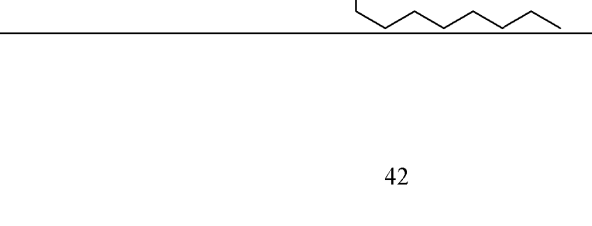
细胞转染实验：分别将含有1.5μg实施例2中制备的eGFP-mRNA的LNP制剂（载体中阳离子脂质为YK-009）以及eGFP-mRNA的Lipofectamin2000制剂加入12孔板的细胞培养液中，继续培养24h后，经荧光显微镜观察，根据荧光强度考察不同样品的转染效率。

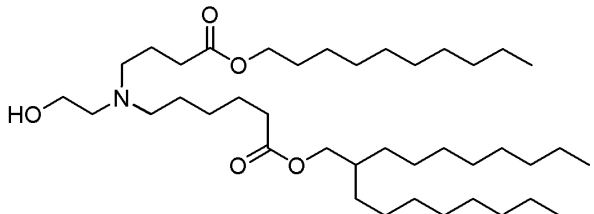
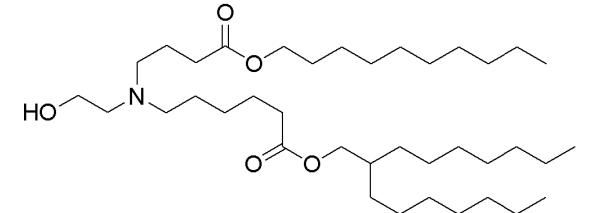
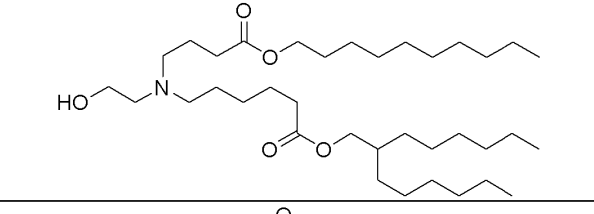
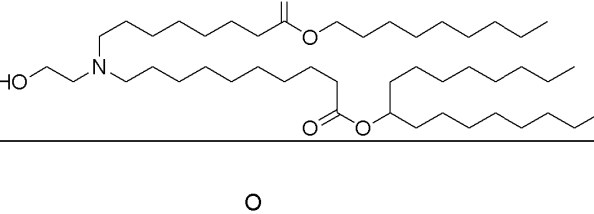
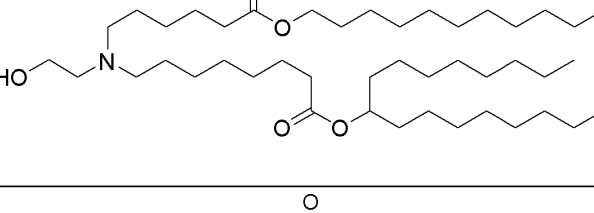
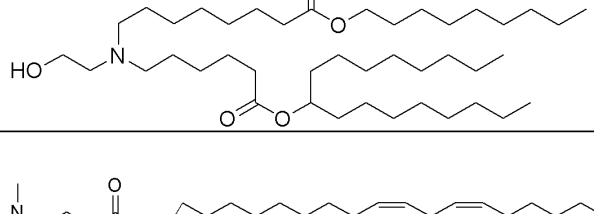
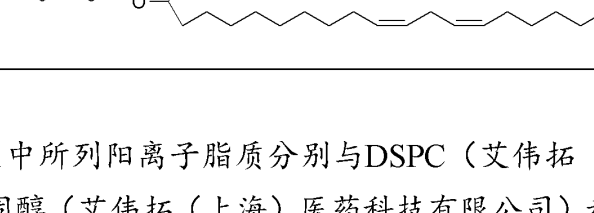
根据实验结果，最后确定了纳米脂质颗粒（LNP制剂）的制备条件：载体与mRNA比例为16: 1；阳离子脂质与中性脂质摩尔比为5: 1；聚合物共轭脂质占脂质体1.5%；阳离子脂质、中性脂质、结构脂质和聚合物共轭脂质摩尔比为50: 10: 38.5: 1.5，后面的实验用此条件制备纳米脂质颗粒（LNP制剂）。

实施例4： 纳米脂质颗粒（LNP制剂）的制备（最优配比）

表1 阳离子脂质结构

名称	结构	备注
YK-001		实施例1中合成

YK-002		实施例1中合成
YK-003		实施例1中合成
YK-004		实施例1中合成
YK-005		实施例1中合成
YK-006		实施例1中合成
YK-007		实施例1中合成
YK-008		实施例1中合成

YK-009		实施例1中合成
YK-010		实施例1中合成
YK-011		实施例1中合成
化合物 23		实施例1中合成, 为 CN110520409A中化合物23
化合物 25		外购(厦门赛诺邦格生物科技股份有限公司), 为 CN110520409A中化合物25
化合物 27		实施例1中合成, 为 CN110520409A中化合物27
MC3		外购 (厦门赛诺邦格生物科技股份有限公司)

将表1中所列阳离子脂质分别与DSPC (艾伟拓(上海)医药科技有限公司)、胆固醇(艾伟拓(上海)医药科技有限公司)和DMG-PEG2000按照50: 10: 38.5: 1.5的摩尔比溶于乙醇, 制备乙醇脂质溶液, 通过乙醇注入法将乙醇

脂质溶液快速加入柠檬酸盐缓冲液 (pH=4~5)，涡旋30s备用。将eGFP-mRNA (购自上海起发实验试剂有限公司) 或Fluc-mRNA (购自上海起发实验试剂有限公司) 在柠檬酸盐缓冲液(pH=4~5)中稀释得到mRNA水溶液。将一定体积的脂质体溶液与mRNA水溶液,以总脂质与mRNA的重量比为16: 1制备脂质体。25℃超声15min (超声频率40kHz, 超声功率800W)。所得脂质体经用PBS稀释至10倍体积后, 300KDa超滤管进行超滤除乙醇。再经PBS定容至一定体积, 得到使用阳离子脂质/DSPC/胆固醇/DMG-PEG2000 (摩尔百分比为50: 10: 38.5: 1.5)包封eGFP-mRNA或Fluc-mRNA的LNP制剂。

10 实施例5：纳米脂质颗粒粒径及多分散系数（PDI）的测定

利用动态光散射, 采用马尔文激光粒度仪测定粒径及多分散系数 (PDI)。

取脂质体溶液10μL, 用无RNA酶去离子水稀释至1mL, 加入样品池, 每个样品重复测定3次。测定条件为: 90°散射角, 25℃。检测结果如下表:

表2 粒径及多分散系数 (PDI)

名称	粒径 (nm)	PDI (%)
YK-001	164.03	10.2
YK-002	156.70	27.7
YK-003	119.91	21.3
YK-004	190.65	9.7
YK-005	148.75	17.3
YK-006	125.35	22.9
YK-007	178.06	13.6
YK-008	205.00	24.4
YK-009	136.44	18.2
YK-010	124.46	19.8
YK-011	173.16	21.2
化合物23	114.12	24.4
化合物25	117.10	23.1
化合物27	178.85	13.6
MC3	205.20	18.3

实施例4中制备的纳米脂质颗粒粒径在110~210nm之间，均可用于递送 mRNA，其中由化合物23和YK-003制备的颗粒粒径最小，分别为114.12nm和 119.91nm，由YK-008和MC3制备的颗粒粒径最大，分别为205.00nm和 205.20nm。所有纳米脂质颗粒的多分散系数在5%~30%之间，其中最小的是 5 YK-004，为9.7%，最大的是YK-002，为27.7%。

实施例6：体外验证LNP递送载体的性能

细胞复苏与传代：方法同实施例3。

种板：方法同实施例3。

10 1. Fluc-mRNA的荧光检测

将含有0.3μg Fluc-mRNA的LNP制剂（LNP制剂载体组分为阳离子脂质、中性脂质、结构脂质和聚合物共轭脂质，摩尔比为50: 10: 38.5: 1.5，其中阳离子脂质为表1中所列阳离子脂质）加入96孔板的细胞培养液中，继续培养24小时后，按照Gaussia Luciferase Assay Kit说明书加入相应试剂，经IVIS荧光检测 15 系统检测每孔荧光表达强度。本实验验证了LNP制剂在细胞内的转染效率。结果见表3。

为了进一步比较分别由阳离子脂质YK-009和化合物25制备的LNP制剂细胞内转染效率，我们制备了Fluc-mRNA含量分别为0.3μg、0.225μg、0.15μg和 20 0.075μg的LNP制剂（LNP制剂载体组分为阳离子脂质、中性脂质、结构脂质和聚合物共轭脂质，摩尔比为50: 10: 38.5: 1.5，其中阳离子脂质为YK-009或化合物25），并对制备的LNP制剂进行了细胞内转染活性检测，检测方法同上。结果见表4。

表3 Fluc-mRNA的荧光检测结果

序号	阳离子脂质	相对光单位 (RLU)	相对于化合物23的倍数
1	YK-001	2243585	3.4
2	YK-002	1284254	2.0
3	YK-003	346698	0.5
4	YK-004	138599	0.2
5	YK-005	1444202	2.2
6	YK-006	2714015	4.1
7	YK-007	471960	0.7
8	YK-008	1259555	1.9
9	YK-009	5479373	8.4
10	YK-010	93801	0.1
11	YK-011	285918	0.4
12	化合物23	654930	1.0
13	化合物27	414334	0.6
14	MC3	129292	0.2

表4 不同Fluc-mRNA含量的荧光检测结果

Fluc-mRNA含量 (μg)	阳离子脂质	相对光单位 (RLU)
0.3	化合物25	1461700
	YK-009	5479373
0.225	化合物25	1296275
	YK-009	5234354
0.15	化合物25	530850
	YK-009	3725475
0.075	化合物25	325425
	YK-009	1444785

5 由表3和图5可知，由不同的阳离子脂质制备的Fluc-mRNA的LNP制剂中，

YK-009的荧光吸收最强，RLU值为5479373，YK-001、YK-002、YK-005、YK-006和YK-008也很强，均在 $10^6 \sim 10^7$ 之间，YK-009、YK-006、YK-001、YK-005、YK-002和YK-008的RLU值分别是化合物23的8.4倍、4.1倍、3.4倍、2.2、2.0倍和1.9倍；荧光吸收最弱的是YK-010，RLU值为93801，YK-004、化合物23、化合物27和MC3也很弱，YK-009的RLU值分别为YK-010、YK-004、化合物23、化合物27和MC3的58倍、39倍、8倍、13倍和42倍。

从表4和图6可以看出，由YK-009和化合物25制备的LNP制剂荧光吸收有很大差别，包含0.075 μ g、0.15 μ g、0.225 μ g和0.3 μ g Fluc-mRNA的LNP制剂，YK-009制剂的荧光吸收分别是化合物25制剂的3.7倍、4.0倍、7.0倍和4.4倍。

用GraphPad Prism软件对数据进行分析，其中YK-009、YK-006、YK-001、YK-005、YK-002和YK-008与化合物23有显著差异，YK-009、YK-006、YK-001、YK-005、YK-002和YK-008与化合物27有显著差异。除了YK-004和YK-010，所有化合物均与MC3有显著差异；包含0.075 μ g、0.15 μ g、0.225 μ g和0.3 μ g Fluc-mRNA的LNP制剂，YK-009与化合物25均有显著差异。

从结构上看，与YK-009相比，YK-001的L₁基团多1个C，其它结构完全相同；YK-002的G₁基团多1个C，其它结构完全相同；YK-004的G₂基团少2个C，其它结构完全相同；YK-006的G₂基团少1个C，其它结构完全相同；YK-010的L₂基团双链各少1个C，其它结构完全相同；化合物23的G₁基团多4个C，L₁基团少1个C，G₂基团多4个C，L₂基团单链少1个C，其它结构完全相同；化合物25的G₁基团多2个C，L₁基团多1个C，G₂基团多2个C，L₂基团单链少1个C，其它结构完全相同；化合物27的G₁基团多4个C，L₁基团少1个C，L₂基团单链少1个C，其它结构完全相同。

由此可知，化合物的结构和细胞内转染效率之间无对应关系，结构差异很小的化合物，在转染效率方面很大概率差异非常大。例如与YK-009相比，YK-010、YK-004、化合物23和化合物27，结构仅有很小的差别，但YK-009的细胞转染效率分别是这些阳离子脂质化合物的58倍、39倍、8倍和13倍。YK-009与化合物25结构上也仅有很小差别，但细胞转染效率相差可达7倍。因此，并不是结构相近的化合物，就必定会有类似的转染效率，而是很有可能具有差异巨大的转染效率。筛选具有高的转染效率的阳离子脂质化合物，并不容易，需要进行多种设计，付出大量创造性劳动。

2. 细胞存活率测定

将含有1.5μg Fluc-mRNA的LNP制剂（LNP制剂载体组分为阳离子脂质、中性脂质、结构脂质和聚合物共轭脂质，摩尔比为50: 10: 38.5: 1.5，其中阳离子脂质为表1中所列阳离子脂质）加入96孔板的细胞培养液中，继续培养24小
5 时后，向每孔中加入10μL CCK-8溶液，将培养板在培养箱中孵育1小时后，经酶标仪测定在450nm处的吸光度。结果见表4。

为了比较由阳离子脂质YK-009和化合物25制备的LNP制剂的细胞毒性，我们制备了Fluc-mRNA含量分别为1.5μg、1.125μg、0.75μg和0.375μg的LNP制
10 剂（LNP制剂载体组分为阳离子脂质、中性脂质、结构脂质和聚合物共轭脂质，摩尔比为50: 10: 38.5: 1.5，其中阳离子脂质为YK-009或化合物25），细胞存活率测定方法同上。结果见表6。

表5 细胞存活率

序号	阳离子脂质	细胞存活率（%）
1	YK-001	85
2	YK-002	89
3	YK-003	84
4	YK-004	87
5	YK-005	88
6	YK-006	96
7	YK-007	96
8	YK-008	91
9	YK-009	100
10	YK-010	77
11	YK-011	98
12	化合物23	87
13	化合物27	84
14	MC3	88

表6 不同Fluc-mRNA含量的细胞存活率

Fluc-mRNA含量 (μg)	阳离子脂质	细胞存活率 (%)
1.5	化合物25	91
	YK-009	100
1.125	化合物25	95
	YK-009	100
0.75	化合物25	97
	YK-009	100
0.375	化合物25	99
	YK-009	100

由表5和图7可知，由不同的阳离子脂质制备的Fluc-mRNA的LNP制剂，细胞毒性差别很大，细胞存活率YK-009最高，为100%，YK-011为98%；而YK-010为77%，YK-003为84%，YK-001为85%，化合物23为87%，化合物27为84%，MC3为88%，明显比YK-009低。

从表6和图8可以看出，由YK-009和化合物25制备的LNP制剂对细胞的抑制活性有很大差别，Fluc-mRNA含量为1.5μg、1.125μg、0.75μg和0.375μg的LNP制剂，YK-009制剂细胞存活率均为100%，而化合物25制剂对细胞的抑制活性比YK-009制剂最高可以低9%。

用GraphPad Prism软件对数据进行分析，其中YK-009、YK-011、YK-006和YK-007与化合物23、化合物27和MC3在细胞毒性上均具有显著差异。

从以上实验结果可知，阳离子脂质化合物的结构与对细胞的毒性之间无对应关系，结构差别很小的化合物对细胞毒性方面差异很大，例如与YK-009相比，YK-010的L₂基团双链各少1个C，其它结构完全相同，但细胞存活率降低了23%；YK-002的G₁基团多1个C，其它结构完全相同，但细胞存活率降低了11%；化合物23的G₁基团多4个C，L₁基团少1个C，G₂基团多4个C，L₂基团单链少1个C，其它结构完全相同，但细胞存活率降低了13%；化合物25的G₁基团多2个C，L₁基团多1个C，G₂基团多2个C，L₂基团单链少1个C，其它结构完全相同，但细胞存活率降低了9%。化合物27的G₁基团多4个C，L₁基团少1个C，L₂基团单链少1个C，其它结构完全相同，但细胞存活率降低了16%。YK-009虽然与YK-010、YK-002、化合物23、化合物27和化合物25结构相近，

但是细胞毒性要分别低23%、11%、13%、16%和9%，可见，结构细微差别的阳离子脂质可能会导致显著区别的细胞毒性。

实施例7：体内验证阳离子脂质（LNP）递送载体的性能

5 另外，我们也验证了我们设计的阳离子脂质递送载体递送的mRNA在小鼠体内的蛋白质表达和持续时间。体内实验进一步证明了我们的LNP递送载体能将mRNA有效地递送至体内，并高效持续地表达。

10 将含有10μg Fluc-mRNA的LNP制剂经肌肉注射至4~6周龄、重量为17~19g的雌性BALB/C小鼠体内，并在给药后特定的时间节点（3h、6h、24h、48h和72h）对小鼠进行腹腔注射荧光成像底物，小鼠自由活动5分钟，然后经IVIS Spectrum小动物活体成像仪检测LNP所携带的mRNA在小鼠体内表达的蛋白质的平均辐射强度（对应于荧光表达强度）。检测结果见表5和图7。

15 为了比较由阳离子脂质YK-009和化合物25制备的LNP制剂在小鼠体内的蛋白质表达和持续时间，我们制备了Fluc-mRNA含量分别为10μg、7.5μg、5μg和2.5μg的LNP制剂（LNP制剂载体组分为阳离子脂质、中性脂质、结构脂质和聚合物共轭脂质，摩尔比为50: 10: 38.5: 1.5，其中阳离子脂质为YK-009或化合物25），小鼠活体成像实验方法同上。结果见表8。

表7 小鼠活体成像实验数据

阳离子脂质	时间				
	3h	6h	24h	48h	72h
YK-003	1500820	770220	527800	128720	39538
YK-004	69640	40100	16080	4236	2066
YK-009	1234280	976000	757440	135420	29435
YK-010	60100	42520	15180	4676	810.2
化合物23	554600	766540	142800	19746	4801
化合物27	632450	609570	195700	21765	5512
MC3	126862	130678	28780	14140	6716

表8 不同Fluc-mRNA含量的小鼠活体成像实验数据

Fluc-mRNA含量 (μg)	阳离子脂质	时间				
		3h	6h	24h	48h	72h
10	化合物25	654600	666540	140130	19065	4768
	YK-009	1234280	976000	757440	135420	29435
7.5	化合物25	436650	514410	109040	14809	3271
	YK-009	925710	732000	568080	101565	22076
5	化合物25	342850	304240	68710	10417	2206
	YK-009	617140	488000	378720	67710	14717
2.5	化合物25	192860	142520	35050	4993	1207
	YK-009	308570	244000	189360	33855	7358

从表7和图9可以看出，由不同的阳离子脂质制备的Fluc-mRNA的LNP制剂，在小鼠体内表达强度差别很大，从3h到72h，YK-003和YK-009均为最高，表明由其制备的LNP制剂在体内高表达，且持续表达；在3h时，YK-003和YK-009平均辐射强度分别为1500820和1234280，YK-004和YK-010最低，分别为69640和60100，四者所携带的mRNA在动物体内的表达最高与最低Fluc-mRNA表达相差20倍以上；在72h时，YK-003和YK-009平均辐射强度分别为39538与29435，最低为YK-004和YK-010，平均辐射强度分别为2066和810.2，四者所携带的mRNA在动物体内的表达最高与最低相差达50倍；化合物23和27在3h时数值分别为554600和632450，但在6h~48h之间降低很快，到72h仅为4801和5512，表明由其制备的LNP制剂，携带的mRNA在小鼠体内很快降解或者代谢掉；MC3携带的mRNA的表达在各时间数值都很低，表明其携带的mRNA在体内低表达，且其表达不持续。

由表8和图10可知，由YK-009和化合物25制备的LNP制剂在小鼠体内的表达有很大差别，Fluc-mRNA含量分别为2.5 μg 、5.0 μg 、7.5 μg 和10 μg 的LNP制剂，3h时YK-009表达为化合物25的1.6~2.1倍，6h时为1.4~1.7倍，24h为5.2~5.5倍，48h为6.5~7.1倍，72h为6.1~6.8倍。不同Fluc-mRNA含量的LNP制剂，YK-009制剂均能长时间在体内高表达，化合物25制剂在3h和6h能维持较高表达，但

6~48h下降很快。

用GraphPad Prism软件对数据进行分析，在LNP所携带的mRNA在动物体内的高表达和持续表达方面，YK-003和YK-009与化合物23相比有显著差异，YK-003和YK-009与化合物25相比有显著差异，YK-003和YK-009与化合物27相比有显著差异，YK-003和YK-009与MC3相比有显著差异。

从以上实验结果可知，阳离子脂质化合物的结构与LNP所携带的mRNA在动物体内的高表达及持续表达之间无对应关系。结构差别很小的阳离子脂质化合物在小鼠体内促进mRNA表达差异也会很大，例如与YK-009相比，YK-004仅G₂基团少2个C，其它结构完全相同；YK-010的L₂基团双链各少1个C，其它结构完全相同；化合物23的G₁基团多4个C，L₁基团少1个C，G₂基团多4个C，L₂基团单链少1个C，其它结构完全相同；化合物27的G₁基团多4个C，L₁基团少1个C，L₂基团单链少1个C，其它结构完全相同，但在3h时，四者所携带的mRNA在动物体内的表达方面，最高与最低相差20倍以上；在72h时，四者所携带的mRNA在动物体内的表达方面，最高与最低相差可达50倍。

与YK-009相比，化合物25的G₁基团多2个C，L₁基团多1个C，G₂基团多2个C，L₂基团单链少1个C，其它结构完全相同，但由YK-009和化合物25制备的LNP制剂，Fluc-mRNA含量分别为2.5μg、5.0μg、7.5μg和10μg，3h时YK-009最高可达化合物25的2.1倍，6h时YK-009最高可达化合物25的1.7倍，24h时YK-009最高可达化合物25的5.5倍，48h时YK-009最高可达化合物25的7.1倍，72h时YK-009最高可达化合物25的7.2倍。

结论

上述体外和体内验证LNP递送载体性能的实验表明：阳离子脂质化合物的结构与细胞内转染效率、对细胞产生的毒性以及在动物体内的高表达和持续表达之间无明显的对应关系。结构差异很小的化合物，在转染效率和/或对细胞的毒性、细胞内的高表达方面可能差异非常大，例如本申请的化合物YK-009和YK-010，细胞转染效率能差近60倍，对转染细胞的毒性能差别在25%以上；化合物YK-003和YK-010在小鼠体内的表达及持续表达差异能达到50倍。因此，筛选合适的阳离子脂质化合物，能同时具有高的转染效率和对

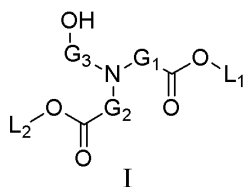
细胞的低毒性、在小鼠体内的高表达及持续表达是非常困难的事情。

- 本申请通过独特的设计和大量的筛选，发现了一些化合物，例如YK-009、YK-003、YK-006、YK-008和YK-011，相对于现有技术的其它化合物，能够以高的细胞转染效率、对细胞的低毒性或者无毒性以及在动物体内的高表达和持续表达来递送核酸，取得了预料不到的技术效果。
- 5

以上所述仅是本发明的示范性实施方式，而非用于限制本发明的保护范围，本发明的保护范围由所附的权利要求确定。

权利要求书

1. 一种式(I)化合物



, 或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异

5 构体, 其中

G₁ 为 C₁₋₆ 亚烷基;

G₂ 为 C₂₋₈ 亚烷基;

G₃ 为 C₁₋₃ 亚烷基;

L₁ 为 C₆₋₁₅ 直链烷基;

10 L₂ 为 C₁₂₋₂₅ 支链烷基。

2. 根据权利要求 1 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体, 其中 G₁ 为未取代的 C₂₋₅ 亚烷基。

3. 根据权利要求 2 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体, 其中 G₁ 为未取代的 C₃ 亚烷基。

15 4. 根据权利要求 1 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体, 其中 G₂ 为未取代的 C₄₋₆ 亚烷基。

5. 根据权利要求 4 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体, 其中 G₂ 为未取代的 C₅ 亚烷基。

20 6. 根据权利要求 1 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体, 其中 G₃ 为未取代的 C₂ 亚烷基。

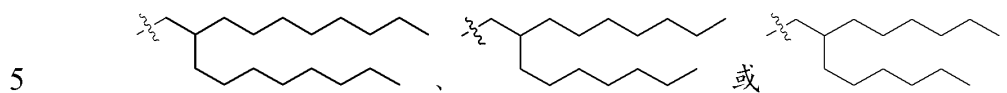
7. 根据权利要求 1 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体, 其中 L₁ 为未取代的 C₈₋₁₂ 直链烷基。

8. 根据权利要求 7 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体, 其中 L₁ 为未取代的 C₁₀ 直链烷基。

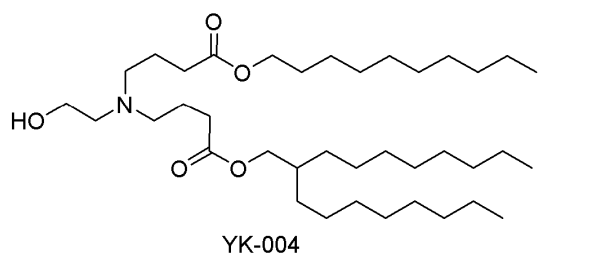
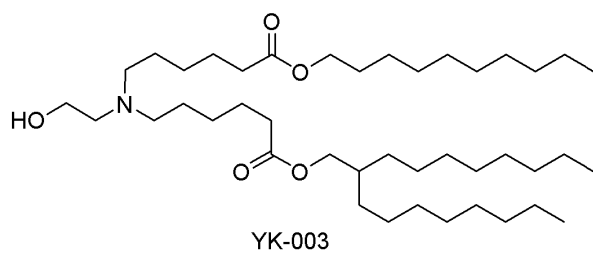
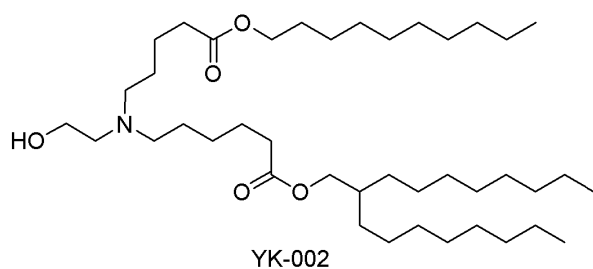
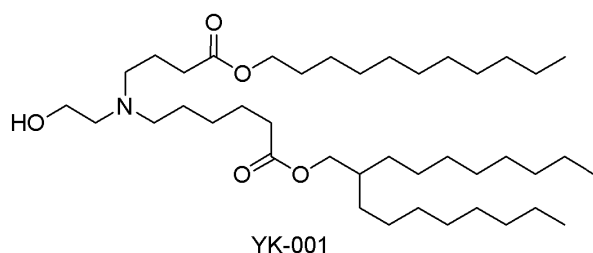
25 9. 根据权利要求 1 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体, 其中 L₂ 为未取代的 C₁₄₋₂₂ 支链烷基。

10. 根据权利要求 9 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体, 其中 L_2 为未取代的 C_{18} 支链烷基。

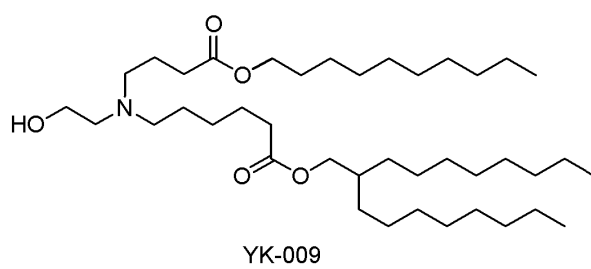
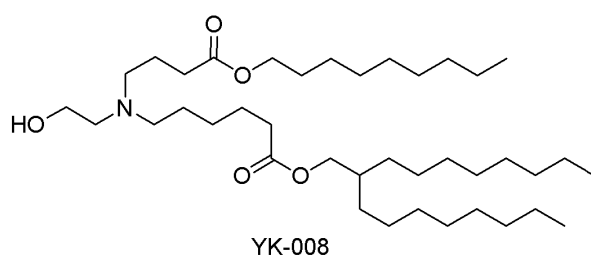
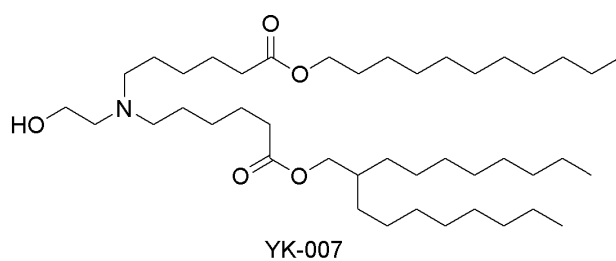
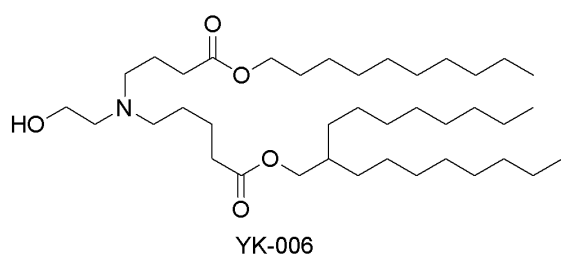
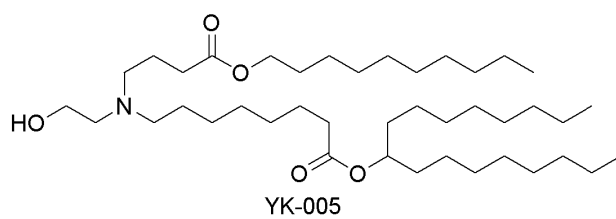
11. 根据权利要求 9 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体, 其中 L_2 为:

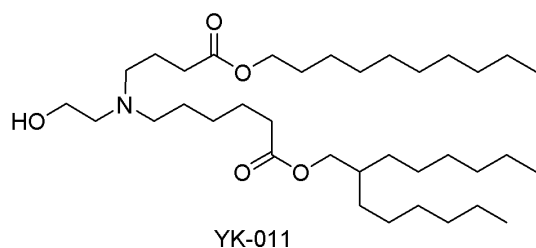
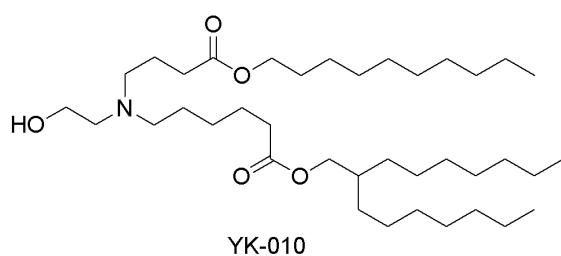


12. 根据权利要求 1 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体, 其中所述式(I)化合物具有以下结构中的一种:



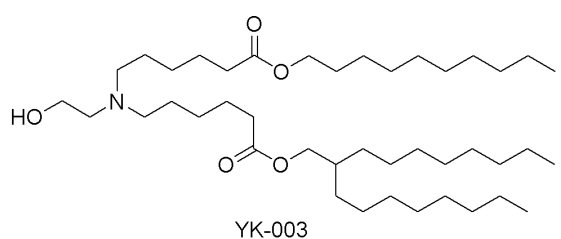
10





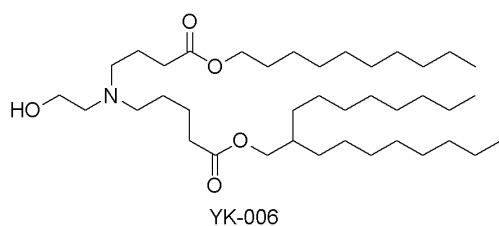
13. 根据权利要求 1 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体, 其中所述式(I)化合物是具有以下结构的化合物

5 YK-003:



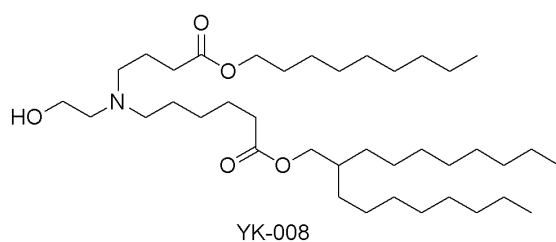
14. 根据权利要求 1 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体, 其中所述式(I)化合物是具有以下结构的化合物

YK-006:

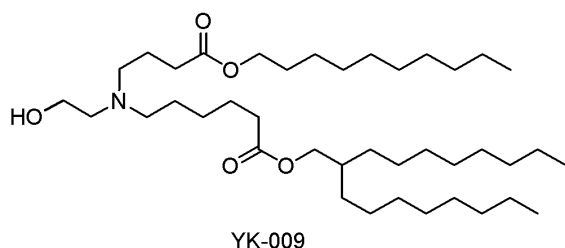


10

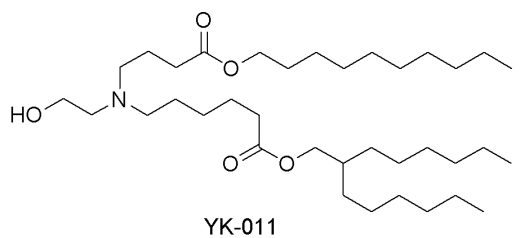
15. 根据权利要求 1 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体, 其中所述式(I)化合物是具有以下结构的化合物 YK-008:



16. 根据权利要求 1 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药
 上可接受的盐或立体异构体, 其中所述式(I)化合物是具有以下结构的化合物
 YK-009:



17. 根据权利要求 1 所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药
 上可接受的盐或立体异构体, 其中所述式(I)化合物是具有以下结构的化合物
 YK-011:



10 18. 一种组合物，其包含载体，所述载体包括阳离子脂质，所述阳离子脂质包括权利要求 1 至 17 中任一项所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体。

19. 根据权利要求 18 所述的组合物, 其中所述阳离子脂质占载体的摩尔比为 30%~70%。

15 20. 根据权利要求 18 所述的组合物, 其中所述载体还包含中性脂质。

21. 根据权利要求 20 所述的组合物, 其中所述阳离子脂质与所述中性脂质的摩尔比为 1:1~10:1。

22. 根据权利要求 20 所述的组合物, 其中所述中性脂质包括磷脂酰胆

碱、磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂、神经酰胺、甾醇及其衍生物中的一种或多种。

23. 根据前述权利要求 20 所述的组合物, 其中所述中性脂质选自以下中的一种或多种: 1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-双十一烷酰基-sn-甘油-磷酸胆碱(DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二-O-十八碳烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0 Diether PC)、1-油酰基-2-胆固醇基半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0 PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-rac-(1-甘油)钠盐(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二硬脂酰基-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(DMPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-硬脂酰乙醇胺(SOPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰胆碱(SOPC)、鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)以及其混合物。

24. 根据权利要求 23 所述的组合物, 其中所述中性脂质是 DOPE 和/或 DSPC。

25. 根据权利要求 18 所述的组合物, 其中所述载体还包含结构性脂质。

26. 根据权利要求 25 所述的组合物, 其中所述阳离子脂质与所述结构性脂质的摩尔比为 1:1~5:1。

27. 根据权利要求 25 所述的组合物, 其中所述结构性脂质选自以下中的一种或多种: 胆固醇、非甾醇、谷固醇、麦角固醇、菜油甾醇、豆甾醇、芸苔甾醇、番茄碱、熊果酸、 α -生育酚、皮质类固醇。

28. 根据权利要求 27 所述的组合物, 其中所述结构性脂质是胆固醇。

29. 根据权利要求 18 所述的组合物, 其中所述载体还包含聚合物共轭脂质。

30. 根据权利要求 29 所述的组合物, 其中所述聚合物共轭脂质占载体的
5 摩尔比为 0.5%~5%。

31. 根据权利要求 29 所述的组合物, 其中所述聚合物共轭脂质选自以下中的一种或多种: PEG 修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG 修饰的磷脂酸、PEG 修饰的神经酰胺、PEG 修饰的二烷基胺、PEG 修饰的二酰基甘油、PEG 修饰的二烷基甘油。

10 32. 根据权利要求 31 所述的组合物, 其中所述聚合物共轭脂质选自以下中的一种或多种: 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG2000), 二肉豆蔻酰甘油-3-甲氧基聚乙二醇 2000 (DMG-PEG2000) 和甲氧基聚乙二醇双十四烷基乙酰胺 (ALC-0159)。

15 33. 根据前述权利要求 18 所述的组合物, 其中所述载体包括阳离子脂质、中性脂质、结构脂质以及聚合物共轭脂质, 所述阳离子脂质、所述中性脂质、所述结构脂质、以及所述聚合物共轭脂质的摩尔比为 (25~65): (5~25): (25~45): (0.5~5)。

34. 根据权利要求 33 所述的组合物, 其中所述阳离子脂质、所述中性脂质、所述结构脂质、以及所述聚合物共轭脂质的摩尔比为 50:10:38.5:1.5。

20 35. 根据前述权利要求 18~34 中任一项所述的组合物, 其中所述组合物为纳米颗粒制剂, 所述纳米颗粒制剂的平均粒径为 10nm~210nm; 所述纳米颗粒制剂的多分散系数 $\leq 50\%$ 。

25 36. 根据前述权利要求 35 所述的组合物, 其中所述组合物为纳米颗粒制剂, 所述纳米颗粒制剂的平均粒径为 100nm~205nm; 所述纳米颗粒制剂的多分散系数 $\leq 30\%$ 。

37. 根据前述权利要求 18~34 中任一项所述的组合物, 其中所述阳离子脂质还包括一种或多种其它可电离的脂质化合物。

38. 根据前述权利要求 18~34 中任一项所述的组合物, 其还包含治疗剂或预防剂。

30 39. 根据权利要求 38 所述的组合物, 其中所述载体与所述治疗剂或预防

剂的质量比为 10:1~30:1。

40. 根据权利要求 39 所述的组合物, 其中所述载体与所述治疗剂或预防剂的质量比为 15:1~25:1。

41. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其中所述载体与所述治疗剂或预防剂的质量比为 16:1。

42. 根据权利要求 38 所述的组合物, 其中所述治疗剂或预防剂包括核酸分子、小分子化合物、多肽或蛋白质中的一种或多种。

43. 根据权利要求 38 所述的组合物, 其中所述治疗剂或预防剂是能够引起免疫响应的疫苗或化合物。

44. 根据权利要求 38 所述的组合物, 其中所述治疗剂或预防剂是核酸。

45. 根据权利要求 44 所述的组合物, 其中所述治疗剂或预防剂是核糖核酸(RNA)。

46. 根据权利要求 44 所述的组合物, 其中所述治疗剂或预防剂是脱氧核糖核酸(DNA)。

47. 根据权利要求 45 所述的组合物, 其中所述 RNA 选自由以下组成的组: 小干扰 RNA(siRNA)、不对称干扰 RNA(aiRNA)、微 RNA(miRNA)、Dicer-底物 RNA(dsRNA)、小发夹 RNA(shRNA)、信使 RNA(mRNA) 以及其混合物。

48. 根据权利要求 47 所述的组合物, 其中所述 RNA 是 mRNA。

49. 根据权利要求 38 所述的组合物, 其中所述组合物还包括药物可用的赋形剂或稀释剂中的一种或多种。

50. 一种如权利要求 1~17 中任一项所述的式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体或者如权利要求 18 至 49 中任一项所述的组合物在制备核酸药物、基因疫苗、小分子药物、多肽或蛋白质药物中的用途。

51. 一种如权利要求 1~17 中任一项所述的通式(I)化合物或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体或者如权利要求 18 至 49 中任一项所述的组合物在制备用于治疗有需要哺乳动物的疾病或病症的药物中的用途。

52. 根据权利要求 51 所述的用途, 其中所述疾病或病症以功能失常或异常的蛋白质或多肽活性为特征。

53. 根据权利要求 51 所述的用途, 其中所述疾病或病症选自以下组成的组: 感染性疾病、癌症和增生性疾病、遗传性疾病、自体免疫性疾病、糖尿病、神经退化性疾病、心血管和肾血管疾病以及代谢性疾病。

54. 根据权利要求 53 所述的用途, 其中所述感染性疾病选自: 由冠状病毒、流感病毒或 HIV 病毒引起的疾病, 小儿肺炎, 裂谷热, 黄热病, 狂犬病, 或多种疱疹。

55. 根据权利要求 51~54 中任一项所述的用途, 其中所述哺乳动物是人。

56. 根据权利要求 51~54 中任一项所述的用途, 其中所述组合物经静脉内、肌肉内、皮内、皮下、鼻内或通过吸入施用。

57. 根据权利要求 56 所述的用途, 其中所述组合物是皮下施用的。

58. 根据权利要求 51~54 中任一项所述的用途, 其中将约 0.001mg/kg 至约 10mg/kg 剂量的所述治疗剂或预防剂施用给所述哺乳动物。