

一种类固醇-阳离子脂质化合物及其应用

技术领域

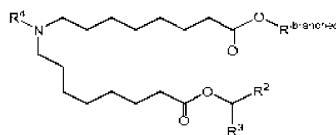
本发明属于生物医药领域，具体涉及一种类固醇-阳离子脂质化合物及其在生物活性物质递送中的应用。

背景技术

核酸药物主要指具有遗传特性和药理活性的含核苷酸或脱氧核苷酸结构的化合物，可用于肿瘤、组织再生、创面愈合、肺纤维化、炎症疾病、微生物感染等治疗，核酸药物在注射进入人体后，需要高效安全的药物递送系统将其递送到病变部位，该药物递送系统需要存留足够时间以准确靶向到病变部位，同时避免损伤正常细胞。

目前，药物递送系统可分为病毒载体和非病毒载体。病毒载体由于其免疫原性、致癌性、和有限的载药量，使其在核酸药物中的应用较少；非病毒载体，如聚合物类（polymer）、脂质类（liposome 或 LNP），可以将核酸药物与特定的配体结合使其能够靶向特定的细胞，在目前的核酸药物中应用较多。LNP 是目前核酸药物研究应用较多的递送系统之一，LNP 递送系统能够安全有效地递送核酸。具有核酸包封率高，能够有效转染细胞，组织穿透性强，细胞毒性和免疫原性低等优势，与其他药物递送系统相比，具有巨大的优势。因此，LNP 递送系统具有广阔的开发和应用前景。

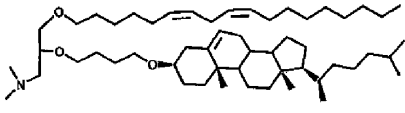
现有技术中，LNP 递送系统往往是由可电离脂质（阳离子脂质）、类固醇、中性脂质、聚乙二醇脂质、核酸药物等成分制成。例如：专利文献 AU2020325221A1 公开了一种靶细胞传递 LNPs 的组合物，包括(i)可电离脂质；(ii)甾醇或其他结构脂质；(iii)非阳离子辅助脂质或磷脂；(iv) PEG 脂质和(v)封装在 LNP 中的药剂(例如核酸分子)，这四组分以特定的配比增强靶细胞的递送效率；专利文献 WO2021/250263 A1 公开了一种包括可电离脂质、磷脂、甾醇、聚乙二醇脂质和一种或多种核酸，公开了包括小于约 1mol% 的 C14-PEG2000 脂质，以及其他脂质的特定百分比；专利 CN102712935B 公开了一种脂质粒子，其包含：阳离子脂质；中性脂质、两性离子脂质或阴离子脂质；聚乙二醇脂质；甾醇及核酸，并将上述组分组装成具有实体核心的有实体核心的脂质粒子，其实体核心能达到更高的包覆效率；专利文献 WO

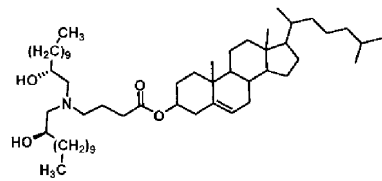


2021/055849A1 公开了一种结构如下的脂质：

(A)，该结构能够提高其安全性、有效性和特异性；专利文献 WO2021/026358A1 公开了一种靶细胞传递脂质纳米颗粒(LNP)：包括(i)可电离脂质(ii)甾醇或其他结构脂质；(iii)非阳离子辅助脂质或磷脂；(iv)有

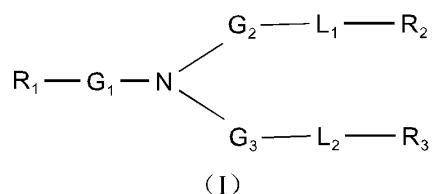
效载荷；(v)聚乙二醇脂质，作为一种药物递送系统，兼顾安全性和有效性。近年来发现在可电离脂质化合物中引入胆固醇同样也可以用来递送核酸药物。专利文献 US7514099B2 公开了

一种胆固醇的氨基脂质化合物 CLinDMA ，该化合物可以与磷脂、胆固醇、聚乙二醇脂质组成四组分 LNP 或者与磷脂、DMOBA 脂质、胆固醇和 PEG 脂质组成五组分 LNP 来递送 siRNA；专利文献 CN112424214A 公开了一种由胆固醇和直链烯

烃形成的可电离阳离子脂质化合物(3) ，该化合物与胆固醇、DPPC、DOPE 和 DMG-PEG200 构建脂质纳米颗粒来递送核酸。以上两种化合物均需要 4 种甚至 5 种不同的脂质辅料来形成核酸药物递送载体制剂，构建复杂。为了适应不同的应用场景，开发不同适用于不同给药途径的递送系统也尤为重要，比如利用雾化吸入给药来治疗肺部相关疾病或者预防呼吸道相关病原菌感染。目前，mRNA-LNP 的稳定储存仍是一大难点，目前通过冷冻干燥的方式可以实现 mRNA-LNP 在 2-8℃甚至常温下的稳定保存。由此可见，现有技术通过对组合物中的各组分进行优化，以及对阳离子脂质进行优化，为了进一步获得更加安全、有效、稳定，且构建简单、能够同时适用不同的给药途径的 LNP 递送系统，还需要对其组分和各组分的结构做进一步的开发。

发明内容

第一方面，本发明提供一种类固醇-阳离子脂质化合物，其具有式 (I) 所示的结构：



其中，所述 R_1 选自 $-\text{OR}_4$ 、 $-\text{NR}_4\text{R}_5$ 、 $-\text{NR}_4\text{C}(=\text{O})\text{R}_5$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_5$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}_5$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}_5$ 、 $-\text{CN}$ 、含氮杂环基团或胍基；

所述 R_4 、 R_5 各自独立地选自 H、 C_{1-9} 烷基、 C_{2-9} 烯基、 C_{2-9} 炔基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{3-8} 环烯基或 C_{3-8} 环炔基；

所述 G_1 选自化学键(-)、 C_{1-9} 亚烷基、 C_{2-9} 亚烯基、 C_{3-9} 亚炔基、 C_{3-8} 环亚烷基或 C_{3-8} 环亚烯基；

R₁-G₁-连续碳原子数不超过 10 个, 例如所述 R₁-G₁-连续碳原子可以为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

G₂、G₃ 各自独立地选自化学键(-)、C₁₋₁₂ 亚烷基、C₂₋₁₂ 亚烯基、C₂₋₁₂ 亚炔基、C₃₋₁₂ 环亚烷基、C₃₋₁₂ 环亚烯基、C₃₋₁₂ 的环亚炔基或 C₆₋₁₂ 的亚芳基;

L₁、L₂ 各自独立地选自化学键(-)、-O-、-S-、-O(C=O)O-、-(C=O)NR_a-、-NR_a (C=O)-、-O(C=O)-、-(C=O)O-、-S-S-、-S(O)_x-、-OS(O)_xO-、-C(=O)S-、-SC(=O)-、-NR_aC(=O)NR_b-、-OC(=O)NR_a-、-NR_aC(=O)O-、-OC(=O)S-、-SC(=O)O-、-P(O)(OR_a)O-、-OP(O)(OR_a)O-或 C₁₋₁₂ 亚烷基中一种或多种的组合;

其中, x 选自 0、1 或 2;

其中, R_a、R_b 各自独立地选自 H、C₁₋₁₂ 烷基、C₂₋₁₂ 烯基或 C₂₋₁₂ 炔基;

所述 R₂ 选自天然存在或非天然存在的类固醇;

所述 R₃ 独立的选自天然存在或非天然存在的类固醇、C₆₋₂₄ 烷基、C₆₋₂₄ 烯基、C₆₋₂₄ 炔基或 C₆₋₂₄ 烷氧基。

进一步的, 所述 R₁ 选自-OR₄、-NR₄R₅、吡唑基、咪唑基、哌嗪基、烷基哌嗪、哌啶基、烷基哌啶、胍基、吡咯基或吡咯烷基; 所述 R₄、R₅ 各自独立地选自 H、C₁₋₉ 烷基、C₂₋₉ 烯基、-C₂₋₉ 炔基、C₃₋₈ 环烷基或 C₃₋₈ 环烯基。

所述 G₁ 为化学键(-)、C₁₋₉ 亚烷基、C₂₋₉ 亚烯基、C₃₋₈ 环亚烷基或 C₃₋₈ 环亚烯基;

优选地, 所述 G₁ 为 C₁₋₆ 亚烷基或 C₂₋₆ 亚烯基;

所述 R₁-G₁-连续碳原子数不超过 10 个; 具体地, 所述 R₁-G₁-连续碳原子数可以为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

所述 G₂、G₃ 各自独立地选自化学键(-)、-C₁₋₁₂ 亚烷基、-C₂₋₁₂ 亚烯基或-C₂₋₁₂ 亚炔基;

所述 L₁、L₂ 各自独立地选自-O(C=O)-、-(C=O)O-、-S-S-、-O(C=O)O-、-NR_aC(=O)O-、-(C=O)NR_a-、-NR_a (C=O)-、-C(=O)S-、-SC(=O)-、-OC(=O)NR_a-或 C₁₋₁₂ 亚烷基中一种或多种的组合;

其中, R_a 为 H、C₁₋₁₂ 的烷基、C₂₋₁₂ 烯基或 C₂₋₁₂ 炔基;

进一步的, 所述 R₁ 选自-OR₄、-NR₄R₅、咪唑基、哌嗪基或胍基;

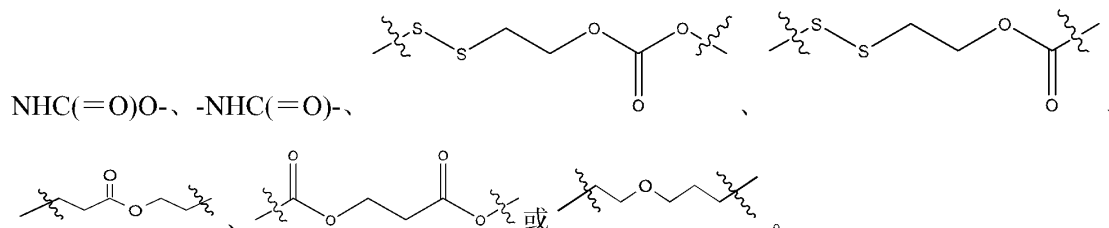
所述 R₄、R₅ 各自独立地选自 H、C₁₋₅ 烷基;

所述 G₁ 为未取代的 C₁₋₆ 亚烷基;

所述 R₁-G₁-连续碳原子数不超过 10 个; 具体地, 所述 R₁-G₁-连续碳原子数可以为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10;

所述 G₂、G₃ 各自独立地选自化学键(-)、C₁₋₁₀ 亚烷基;

所述 L₁、L₂ 各自独立地选自 -O-、-O(C=O)-、-(C=O)O-、-(C=O)S-、-O(C=O)O-、-



进一步地，所述 R₂ 为甾醇；

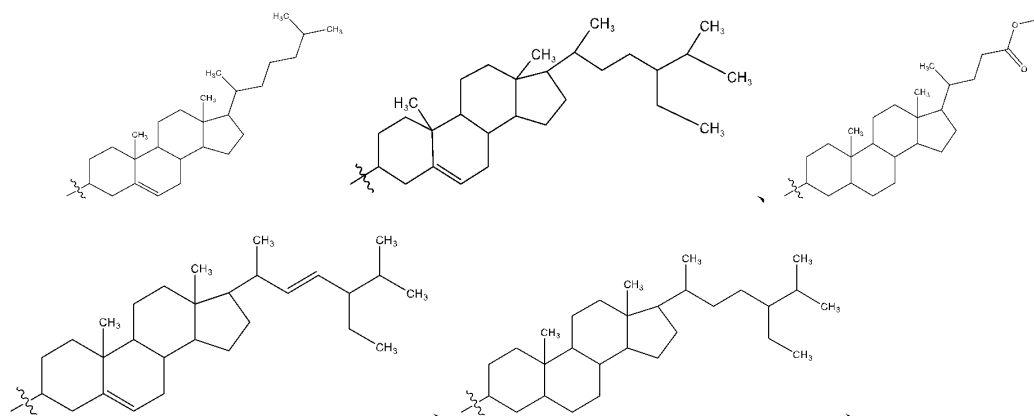
优选地，所述甾醇为动物甾醇，或者其氧化形式或还原形式；和/或，所述甾醇为植物甾醇，或者其氧化形式或还原形式；和/或，所述甾醇为合成甾醇，或者其氧化形式或还原形式；

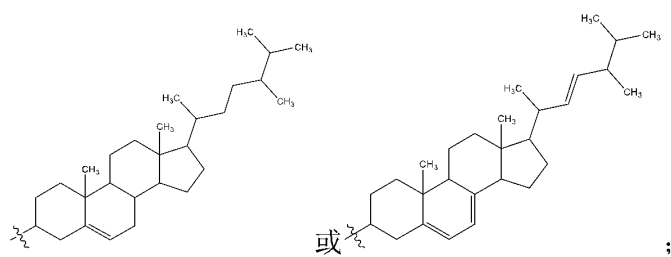
更优选地，所述甾醇选自胆固醇、胆固醇的氧化形式、胆固醇的还原形式、石胆酸烷基酯、豆甾醇、豆甾烷醇、菜油甾醇、麦角甾醇或谷甾醇；

更优选地，所述甾醇为胆固醇的氧化形式、胆固醇的还原形式、石胆酸烷基酯、豆甾醇、豆甾烷醇、菜油甾醇、麦角甾醇或谷甾醇；

更优选地，所述甾醇选自燕麦甾醇、β-谷甾醇、菜子甾醇、麦角骨化醇、菜油甾醇、胆甾烷醇、胆固醇、粪甾醇、脱氢胆固醇、链甾醇、二氢麦角骨化醇、二氢胆固醇、二氢麦角甾醇、黑海甾醇、表胆甾醇、麦角甾醇、岩藻甾醇、六氢光甾醇、羟基胆固醇；羊毛甾醇、光甾醇、海藻甾醇、谷甾烷醇、谷甾醇、豆甾烷醇、豆甾醇、胆酸、甘氨酸胆酸、牛磺胆酸、脱氧胆酸或石胆酸；

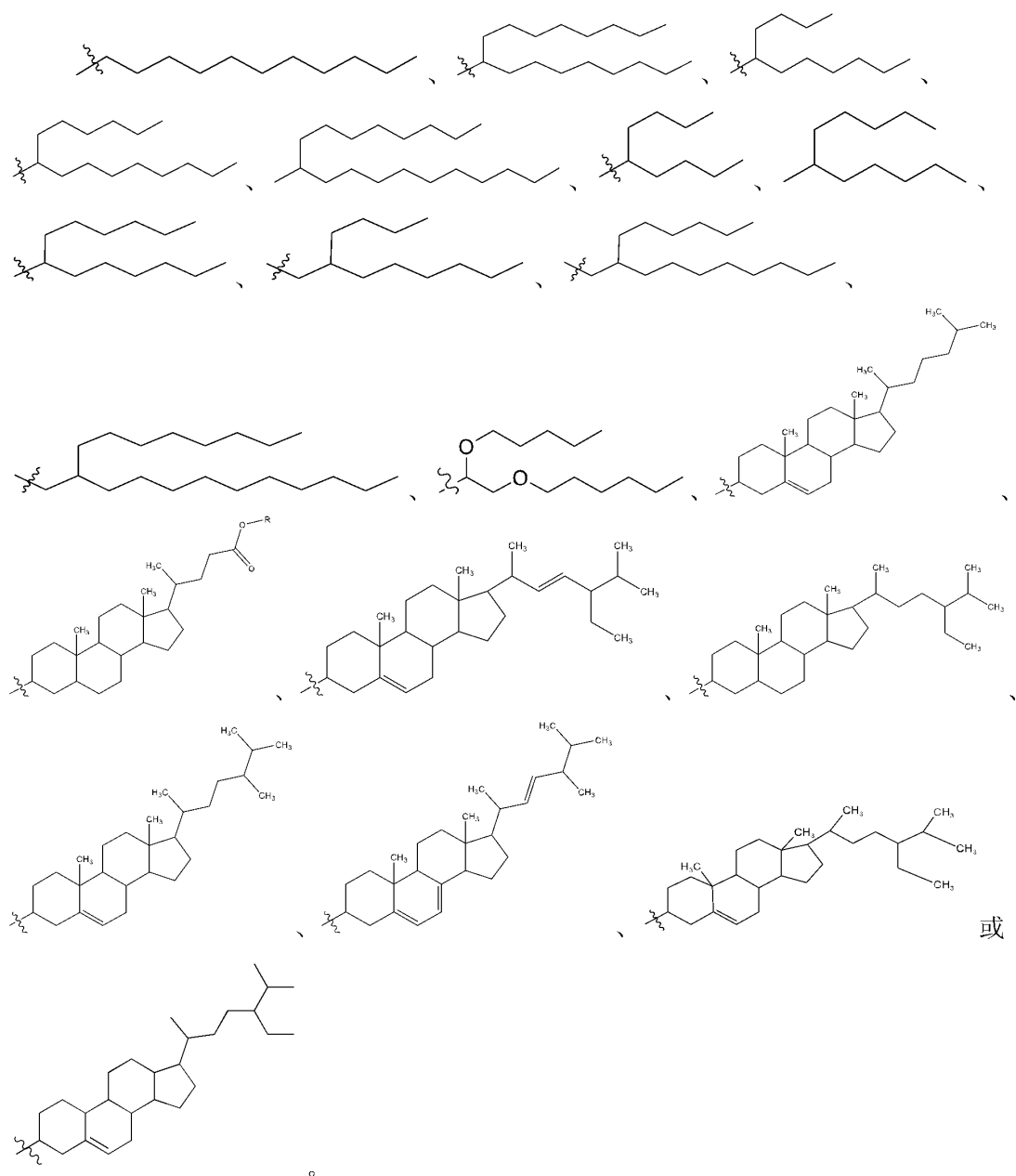
更优选地，所述甾醇的结构式如下：



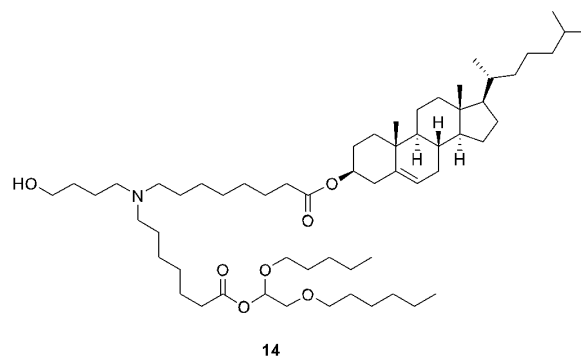
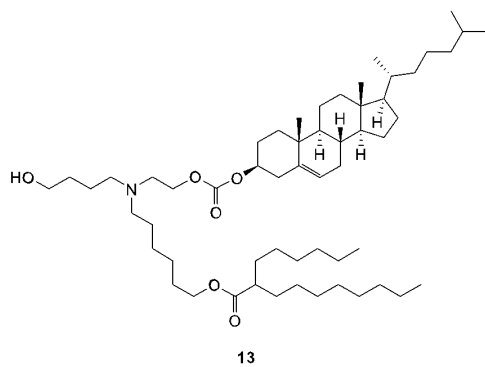
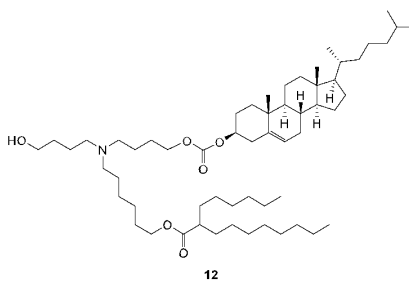
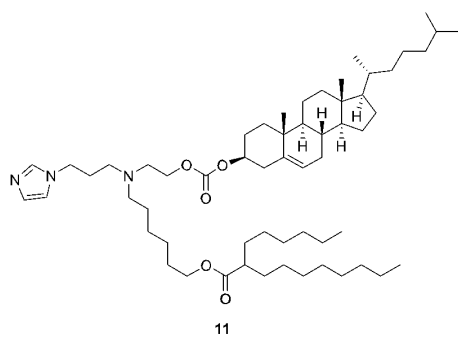
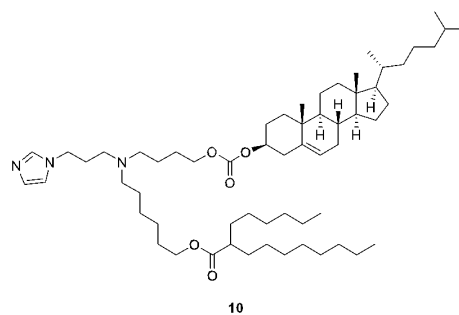
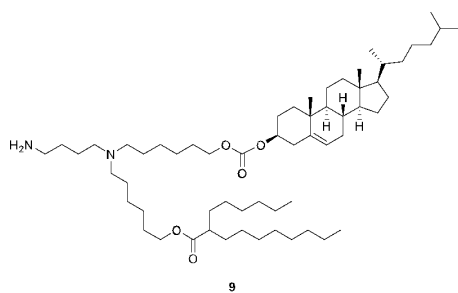
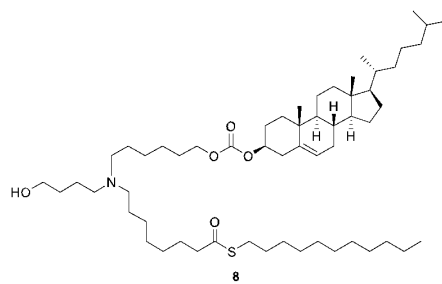
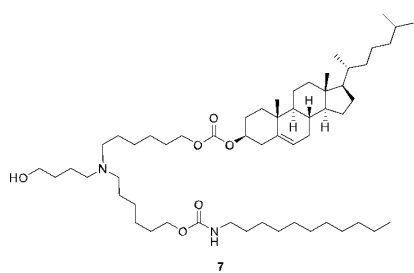


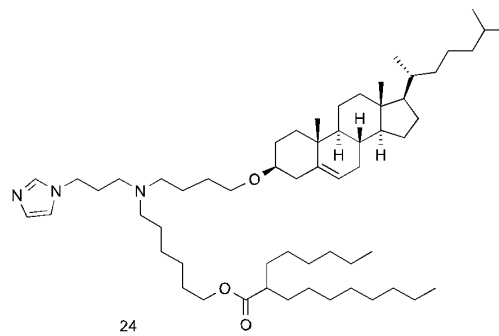
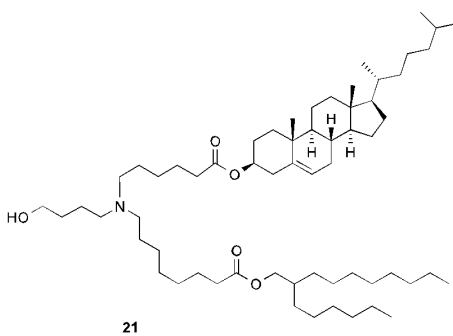
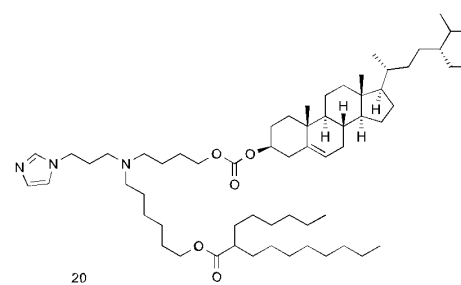
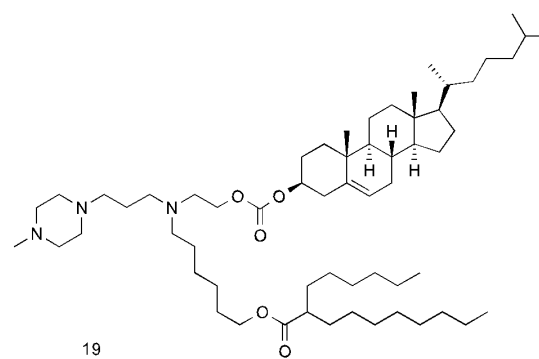
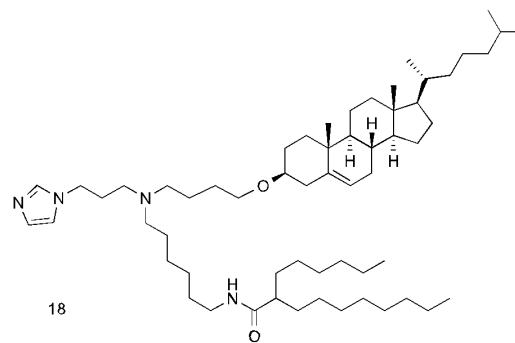
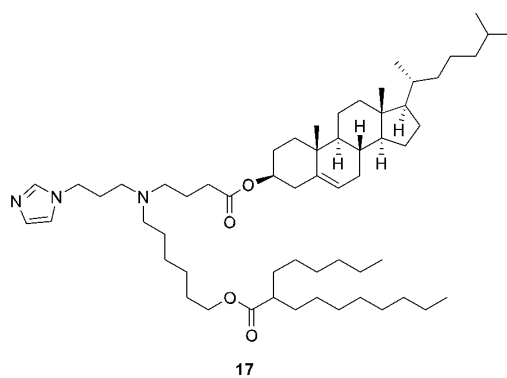
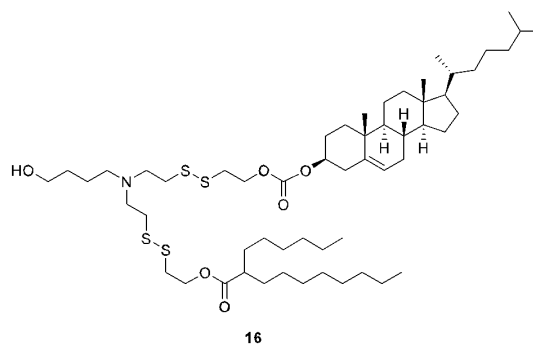
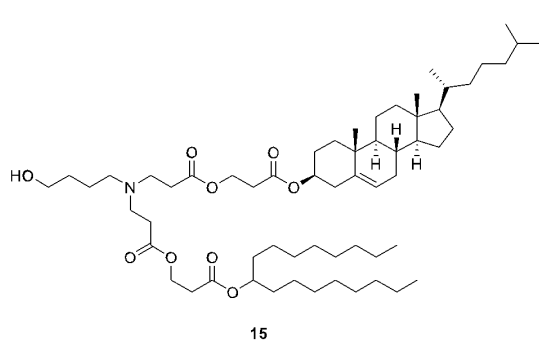
其中 R 为 C₁₋₂₀ 烷基。

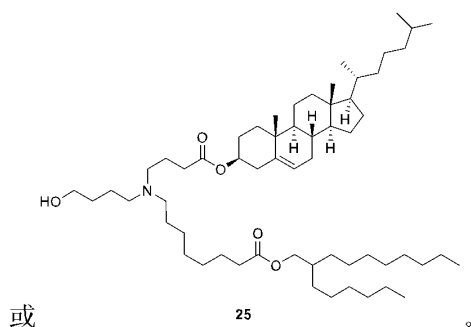
进一步地, 所述 R_3 选自如下结构:



优选地, 所述 R_3 选自如下结构:







或

另一方面，本发明还提供一种脂质纳米颗粒，包括前述的式(I)所示的类固醇-阳离子脂质化合物。

在一个实施方案中，所述脂质纳米颗粒还包括聚乙二醇脂质和至少一种辅助脂质；所述辅助脂质选自中性脂质、两性离子脂质或阴离子脂质。

在一个实施方案中，所述聚乙二醇脂质选自 2-[(聚乙二醇)-2000]-N,N-二十四烷基乙酰胺 (ALC-0159)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(PEG-DMG)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](PEG-DSPE)、PEG-二甾醇基甘油(PEG-DSG)、PEG-二棕榈油基、PEG-二油基、PEG-二硬脂基、PEG-二酰基甘油酰胺(PEG-DAG)、PEG-二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DPPE)或 PEG-1,2-二肉豆蔻酰基氧基丙基-3-(PEG-c-DMA)；

和/或，

所述中性脂质选自 1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DMPE)、2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-(1'-rac-甘油)(DOPG)、油酰磷脂酰胆碱(POPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、磷酸胆碱(DOPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、磷脂酰胆碱(PLPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DAPC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二月桂酰基磷脂酰胆碱(DLPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、1-肉豆蔻酰基-2-棕榈酰基磷脂酰胆碱(MPPC)、1-棕榈酰基-2-肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(PMPC)、1-棕榈酰基-2-硬脂酰基磷脂酰胆碱(PSPC)、1,2-二花生酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DBPC)、1-硬脂酰基-2-棕榈酰基磷脂酰胆碱(SPPC)、1,2-二十碳烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DEPC)、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE)、或溶血磷脂酰乙醇胺。

在一个实施方案中，所述脂质纳米颗粒中式(I)所示类固醇-阳离子脂质；辅助脂质：聚乙二醇脂质的摩尔比为 20~80：20~80：0.5~20；优选地，所述脂质纳米颗粒中式(I)所示类固醇-阳离子脂质；辅助脂质：聚乙二醇脂质的摩尔比为 30~80：30~80：0.5~20；更优选地，所述

式(I)所示类固醇-阳离子脂质:辅助脂质:PEG-脂质摩尔比为 40~60:40~60:0.5~5;更优选地,所述式(I)所示类固醇-阳离子脂质:辅助脂质:PEG-脂质摩尔比为 49.25: 49.25: 1.5。

在一个实施方案中,所述脂质纳米颗粒具有 15nm~300nm 的直径;优选地,所述脂质纳米颗粒具有 60nm~102nm 的直径;更优选地,所述脂质纳米颗粒具有 80nm~90nm 的直径。

在一个实施方案中,所述脂质纳米颗粒的包封率(%)为 80%~100%。

再一方面,本发明还提供一种前述类固醇-阳离子脂质化合物和前述脂质纳米颗粒在制备生物活性物质递送系统中的用途。

在一个实施方案中,所述生物活性物质可以为小分子化合物、核酸、寡肽等;优选地,所述的生物活性物质为核酸;更优选地,所述生物活性物质为 DNA 或 RNA;更优选地,所述 DNA 包括非编码 DNA(反义 DNA)或编码 DNA,和/或所述 RNA 包括反义 RNA、saRNA、mRNA、lncRNA、miRNA、siRNA、piRNA、gRNA、tsRNA、circRNA 和自复制 mRNA。

在一个实施方案中,所述生物活性物质用于预防和/或治疗癌症、炎症、纤维化疾病、自身免疫病、感染、精神性病症、血液病、染色体疾病、遗传病、结缔组织疾病、消化性疾病、耳鼻喉疾病、内分泌疾病、眼病、生殖性疾病、心脏病、肾病、肺病、代谢性病症、口部疾病、肌肉骨骼疾病、新生儿筛查、营养性疾病、寄生虫疾病、皮肤疾病等。

在一个实施方案中,所述生物活性物质递送系统为 mRNA 疫苗。

在一个实施方案中,所述 mRNA 疫苗可以用于预防癌症、病毒感染、细菌感染、真菌感染等。在一个实施方案中,所述病毒包括但不限于诺如病毒、埃博拉病毒、冠状病毒(包括新型冠状病毒 SARS-CoV-2)、巨细胞病毒、登革热病毒、寨卡病毒、柯萨奇病毒、肠病毒、肝炎病毒、单纯疱疹病毒、人乳头瘤病毒、流感病毒、马尔堡病毒、麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、轮状病毒、麻疹病毒等。

再一方面,本发明还提供一种脂质纳米颗粒,其包含前述脂质纳米颗粒和生物活性物质。

在一个实施方案中,所述生物活性物质可以为小分子化合物、核酸、寡肽等;优选地,所述的生物活性物质为核酸;更优选地,所述生物活性物质为 DNA 或 RNA;更优选地,所述 DNA 包括非编码 DNA(反义 DNA)或编码 DNA,和/或所述 RNA 包括反义 RNA、saRNA、mRNA、lncRNA、miRNA、siRNA、piRNA、gRNA、tsRNA、circRNA 和自复制 mRNA。

在一个实施方案中,所述脂质纳米颗粒的氮磷比为(1~15):1。例如,所述脂质纳米颗粒的氮磷比可以为 1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、6.5:1、7:1、7.5:1、8:1、8.5:1、9:1、9.5:1、10:1、10.5:1、11:1、11.5:1、12:1、12.5:1、13:1、13.5:1、14:1、14.5:1 或 15:1;优选地,所述脂质纳米颗粒的氮磷比为(2~10):1;更优选地,所述脂质纳米颗粒的氮磷比为(4~8):1;更优选地,

所述组合物的氮磷比为 6:1 或者 8: 1。

再一方面，本发明还提供了所述脂质纳米颗粒用于制备 mRNA 疫苗的用途。

在一个实施方案中，本发明的脂质纳米颗粒可以采用本领域的常规方法进行制备，例如微流控技术。

再一方面，本发明还提供一种药物，所述药物包括前述的生物活性物质和脂质纳米颗粒。

进一步的，所述药物还包括药学上可接受的辅料。

进一步的，本发明所述药学上可接受的辅料包括例如载体、佐剂、稀释剂等。

进一步的，本发明所述药物为基因药物。

进一步的，本发明所述药物为液体制剂、或冻干粉剂。

进一步的，本发明所述药物为口服制剂、肌肉注射制剂、皮下注射制剂、静脉注射制剂、雾化吸入制剂或干粉吸入制剂。

再一方面，本发明还提供了一种递送生物活性物质的方法，所述方法包括向有需要的个体施用本发明所述的药物。

本发明的有益效果：

本发明提供了一种涉及具有式(I)所示结构的类固醇-阳离子脂质化合物及其用途，该化合物与辅助脂质、聚乙二醇脂质混合可用于制备用于递送生物活性物质的脂质纳米颗粒。利用本发明的类固醇-阳离子脂质化合物制备的三组分 LNP 具有制备工艺简单，稳定性好，转染效率高的优点。将该三组分 LNP 用于递送核酸，例如 mRNA，可以高效稳定地将核酸 mRNA 递送至靶细胞或器官，并在动物体内引起较高的特异性抗体应答，而且具有更好的安全性。

利用本发明提供的类固醇-阳离子脂质化合物制备的三组分 LNP 在冻干工艺中稳定性更佳，更适合于 mRNA-LNP 冻干粉制剂的开发和应用。同时，利用本发明提供的类固醇-阳离子脂质化合物制备的三组分 LNP 在雾化后仍能保留结构的稳定性和高效的转染活性，从而具有应用于 mRNA 的雾化吸入给药或者干粉吸入给药的良好前景。

附图说明

图 1 所示为荧光显微镜检测 Hep3B 细胞中 GFP-mRNA-LNP 表达图；

图 2 所示为小鼠免疫 mRNA-LNP 后 ELISA 检测血清抗体滴度图；

图 3a 所示为小鼠免疫 mRNA-LNP 后 ICS 检测 CD8T 细胞免疫图；

图 3b 所示为小鼠免疫 mRNA-LNP 后 ICS 检测 CD4T 细胞免疫图；

图 4 所示为小鼠高剂量给药 mRNA-LNP 后血清 IL-6 表达图；

图 5 所示为 LNP 雾化前后的 DLS 对比图；

图 6 所示为荧光显微镜检测 GFP-mRNA-LNP 雾化前后转染至 Hep3B 细胞后 GFP 荧光蛋

白表达图;

图 7a 所示为小鼠经雾化吸入 Luc-mRNA-LNP 后活体和器官图;

图 7b 所示为小鼠经雾化吸入 Luc-mRNA-LNP 后活体和器官成像图。

具体实施方式

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

定义

如在本说明书中所使用的,除非使用它们的上下文指示其它含义,否则下列词和短语通常旨在具有如下所阐述的含义。

如本文所使用的,术语“脂质纳米颗粒”,“Lipid Nanoparticle”或“LNP”是指具有纳米量级,例如 1nm 至 1,000nm 的颗粒,其包含一种或多种类型的脂质分子。

如本文所使用的,术语“基因药物”通常由含工程化基因构建体的载体或递送系统组成,其活性成分可为 DNA、RNA、基因改造的病毒、细菌或细胞,通过将外源基因导入靶细胞或组织,替代、补偿、阻断、修正特定基因,以达到治疗和预防疾病的目的。

如本文所使用的,术语“核酸”是指呈单链或双链形式的含有至少两种脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合物,并且包括 DNA、RNA 及其杂交物。

如本文所使用的,术语“脂质化合物”或“脂质”是指一组有机化合物,其包括但不限于脂肪酸的酯,并且通常以难溶于水但可溶于许多有机溶剂为特征,本发明的有机溶剂包括但不限于:苯、甲苯、戊烷、己烷、甲醇、乙醇、异丙醇、乙醚、乙酸乙酯、丙酮、四氯化碳。

如本文所使用的,术语“烷基”是指饱和的直链或支链的烃基。如本文所使用的,C₁₋₉烷基包括含有 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 个碳原子的直链或支链烷基,例如包括但不限于 C₁₋₈、C₂₋₇、C₂₋₈、C₃₋₆ 或 C₄₋₇ 烷基; C₆₋₂₄ 烷基包括含有 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 个碳原子的直链或支链烷基,例如包括但不限于 C₆₋₈、C₆₋₁₇、C₆₋₂₂、C₁₀₋₁₆ 或 C₁₄₋₁₇ 烷基; C₁₋₅ 烷基包括含有 1、2、3、4 或 5 个碳原子的直链或支链烷基,例如包括但不限于 C₁₋₄、C₂₋₄、C₂₋₃、C₃₋₅ 或 C₄₋₅ 烷基; C₁₋₂₀ 烷基包括含有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个碳原子的直链或支链烷基,例如包括但不限于 C₁₋₈、C₁₋₁₀、C₆₋₂₂、C₁₀₋₁₆ 或 C₁₄₋₁₇ 烷基。

如本文所使用的,术语“烯基”是指含有一个或多个不饱和碳-碳双键的不饱和直链或者支

链烃基。该不饱和碳-碳双键可以存在于沿着链的任何稳定点。如本文所使用的，C₂₋₉烯基包括含有 2、3、4、5、6、7、8 或 9 个碳原子的直链或支链烯基，例如包括但不限于 C₁₋₈、C₂₋₇、C₂₋₈、C₃₋₆ 或 C₄₋₈ 直链或支链烯基；C₆₋₂₄ 烯基包括含有 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 个碳原子的直链或支链烯基，例如包括但不限于 C₆₋₈、C₆₋₁₇、C₆₋₂₂、C₁₀₋₁₆ 或 C₁₄₋₁₇ 烯基。

如本文所使用的，术语“炔基”是指含有一个或多个不饱和碳-碳三键的不饱和直链或者支链烃基。如本文所使用的，C₂₋₉ 炔基包括含有 2、3、4、5、6、7、8 或 9 个碳原子的直链或支链炔基，例如包括但不限于 C₁₋₈、C₂₋₇、C₂₋₈、C₃₋₆ 或 C₄₋₇ 炔基。

如本文所使用的，烷基、烯基、炔基的除去端基位置的其他位置的一个或者多个碳可以被杂原子如氮、氧、硫及其氧化物如氮氧化物、羰基、(亚)磺基取代，例如-(CH₂)_m-O-(CH₂)_n-、-(CH₂)_m-S-(CH₂)_n-、-(CH₂)_m-S-S-(CH₂)_n-、-(CH₂)_m-CO-(CH₂)_n-、-(CH₂)_m-OCO-(CH₂)_n-、-(CH₂)_m-OCOO-(CH₂)_n-，(其中 m、n 可以为 1~9 的整数)可以是未取代的或被一个或多个如本文所述的杂原子取代基取代。在某些实施方案中，烷基、烯基或炔基中不包括任何杂原子。

如本文所使用的，术语“亚烷基”是指饱和的二价直链或支链的烃基。如本文所使用的，C₁₋₉ 亚烷基包括含有 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 个碳原子的直链或支链亚烷基，例如包括但不限于 C₁₋₈、C₂₋₇、C₂₋₈、C₃₋₆ 或 C₄₋₇ 亚烷基；C₁₋₁₂ 亚烷基包括含有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个碳原子的直链或支链亚烷基，例如包括但不限于 C₁₋₈、C₂₋₇、C₂₋₈、C₃₋₆ 或 C₄₋₁₂ 亚烷基；C₁₋₁₀ 亚烷基包括含有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个碳原子的直链或支链亚烷基，例如包括但不限于 C₁₋₈、C₂₋₇、C₂₋₈、C₃₋₆ 或 C₄₋₁₀ 亚烷基；C₁₋₆ 亚烷基包括含有 1、2、3、4、5 或 6 个碳原子的直链或支链亚烷基，例如包括但不限于 C₁₋₅、C₂₋₄、C₃₋₆ 或 C₄₋₆ 亚烷基。

如本文所使用的，术语“亚烯基”是指含有一个或多个不饱和碳-碳双键的不饱和直链或者支链烃基。如本文所使用的，C₂₋₉ 亚烯基包括含有 2、3、4、5、6、7、8 或 9 个碳原子的直链或支链亚烯基，例如包括但不限于 C₂₋₇、C₂₋₈、C₃₋₆ 或 C₄₋₇ 亚烯基；C₂₋₁₂ 的亚烯基包括含有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个碳原子的直链或支链亚烯基，例如包括但不限于 C₂₋₈、C₂₋₇、C₃₋₆ 或 C₄₋₁₂ 亚烯基；C₂₋₆ 亚烯基包括含有 2、3、4、5 或 6 个碳原子的直链或支链亚烯基，例如包括但不限于 C₂₋₅、C₂₋₄、C₃₋₆ 或 C₄₋₆ 亚烯基。

如本文所使用的，术语“亚炔基”是指含有一个或多个不饱和碳-碳三键的不饱和直链或者支链烃基。如本文所使用的，C₂₋₁₂ 亚炔基包括含有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个碳原子的直链或支链亚炔基，例如包括但不限于 C₂₋₈、C₂₋₇、C₃₋₆ 或 C₄₋₁₂ 亚炔基；C₃₋₉ 亚炔基包括含有 3、4、5、6、7、8 或 9 个碳原子的直链或支链亚炔基，例如包括但不限于 C₃₋₆、C₃₋

₈ 或 C₄₋₇ 亚炔基。

如本文所使用的，亚烷基、亚烯基或亚炔基可以包含一个或多个环状脂族基和/或一个或多个杂原子诸如氧、氮或硫，并且可以任选地被一个或多个取代基诸如烷基、卤基、烷氧基、羟基、氨基、芳基、醚、酯或酰胺取代。除去端基位置，其他位置的一个或者多个碳可以被杂原子如氮、氧、硫及其氧化物如氮氧化物、羰基、砷基或亚砷基取代。在某些实施方案中，亚烷基、亚烯基或亚炔基是未取代的。在某些实施方案中，亚烷基、亚烯基或亚炔基不包括任何杂原子。

如本文所使用的，术语“含氮杂环基团”为结构中含有氮原子的杂环基团，包括但不限于取代或未取代的：吡丙啶基、吡丁啶基、β-丙内酰胺基、吡咯基、哌啶烷基、吡啶基、咪唑基、恶唑基、异恶唑基、噻唑基、吡啶基、己内酰胺基、吡喃基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、哌嗪基、哌嗪烷基、吡啶基、苯并咪唑基、咪唑基、喹啉基、异喹啉基、蝶啶基、吡啶基、7H 嘌呤基、吩嗪基、吩噻嗪基或 1H-氮杂萘基。

如本文所使用的，术语“烷氧基”是指“烷基-O-”基团，其中烷基如本文所定义。如本文所使用的，C₆₋₂₄ 烷氧基包括含有 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 个碳原子的直链或支链烷氧基，例如包括但不限于 C₆₋₈、C₆₋₁₇、C₆₋₂₂、C₁₀₋₁₆ 或 C₁₄₋₁₇ 烷氧基。

如本文所使用的，术语“环烷基”是指饱和环状烃基。如本文所使用的，C₃₋₈ 环烷基包括含有 3、4、5、6、7 或 8 个碳原子的环烷基，例如包括但不限于 C₃₋₇、C₄₋₇ 或 C₃₋₆ 环烷基。

如本文所使用的，术语“环烯基”是指包含至少一个碳碳双键的环状烃基。如本文所使用的，C₃₋₈ 环烯基包括含有 3、4、5、6、7 或 8 个碳原子的环烯基，例如包括但不限于 C₃₋₇、C₄₋₇ 或 C₃₋₆ 环烯基。

如本文所使用的，术语“环炔基”是指包含至少一个碳碳三键的环状烃基。如本文所使用的，C₃₋₈ 环炔基包括含有 3、4、5、6、7 或 8 个碳原子的环炔基，例如包括但不限于 C₃₋₇、C₄₋₇ 或 C₃₋₆ 环炔基。

如本文所使用的，术语“环亚烷基”是指二价环烷基，其用于将两个结构连接在一起。如本文所使用的，C₃₋₁₂ 环亚烷基包括含有 3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个碳原子的环亚烷基，例如包括但不限于 C₃₋₈、C₄₋₇、C₅₋₈ 或 C₆₋₁₂ 环亚烷基；C₃₋₈ 环亚烷基包括含有 3、4、5、6、7 或 8 个碳原子的环烷基，例如包括但不限于 C₃₋₇、C₄₋₇ 或 C₆₋₈ 环亚烷基。

如本文所使用的，术语“环亚烯基”是指二价环烯基，其用于将两个结构连接在一起。如本文所使用的，C₃₋₁₂ 环亚烯基包括含有 3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个碳原子的环亚烯基，例如包括但不限于 C₃₋₈、C₄₋₇、C₅₋₈ 或 C₆₋₁₂ 环亚烯基；C₃₋₈ 环亚烯基包括含有 3、4、

5、6、7 或 8 个碳原子的环亚烯基，例如包括但不限于 C₃₋₇、C₄₋₇ 或 C₆₋₈ 环亚烯基。

如本文所使用的，术语“环亚炔基”是指二价环炔基，其用于将两个结构连接在一起。

如本文所使用的，C₃₋₁₂ 环亚炔基包括含有 3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个碳原子的环亚炔基，例如包括但不限于 C₃₋₈、C₄₋₇、C₅₋₈ 或 C₆₋₁₂ 环亚炔基；C₃₋₈ 环亚炔基包括含有 3、4、5、6、7 或 8 个碳原子的环亚炔基，例如包括但不限于 C₃₋₇、C₄₋₇ 或 C₆₋₈ 环亚炔基。

如本文所使用的，术语“亚芳基”是指二价芳基，其用于将两个结构连接在一起，其中，芳基包括单环芳族（具有例如 4n+2 个离域电子）基团和多环芳族基团。如本文所使用的，C₆₋₁₂ 亚芳基包括含有 6、7、8、9、10、11 或 12 个碳原子的亚芳基，例如包括但不限于 C₆₋₈、C₆₋₉、C₆₋₁₂ 亚芳基。

如本文所使用的，术语“阳离子脂质”是指能够响应环境 pH 值或氢离子活性而带正电的脂质分子。

如本文所使用的，术语“辅助脂质”是指在环境 pH 值条件下不带正电荷的脂质，其包含不带任何电荷的中性脂质、两性离子脂质以及带负电荷的阴离子脂质。

如本文所使用的，术语“聚乙二醇脂质”是指包含脂质部分和聚乙二醇部分的脂质分子。

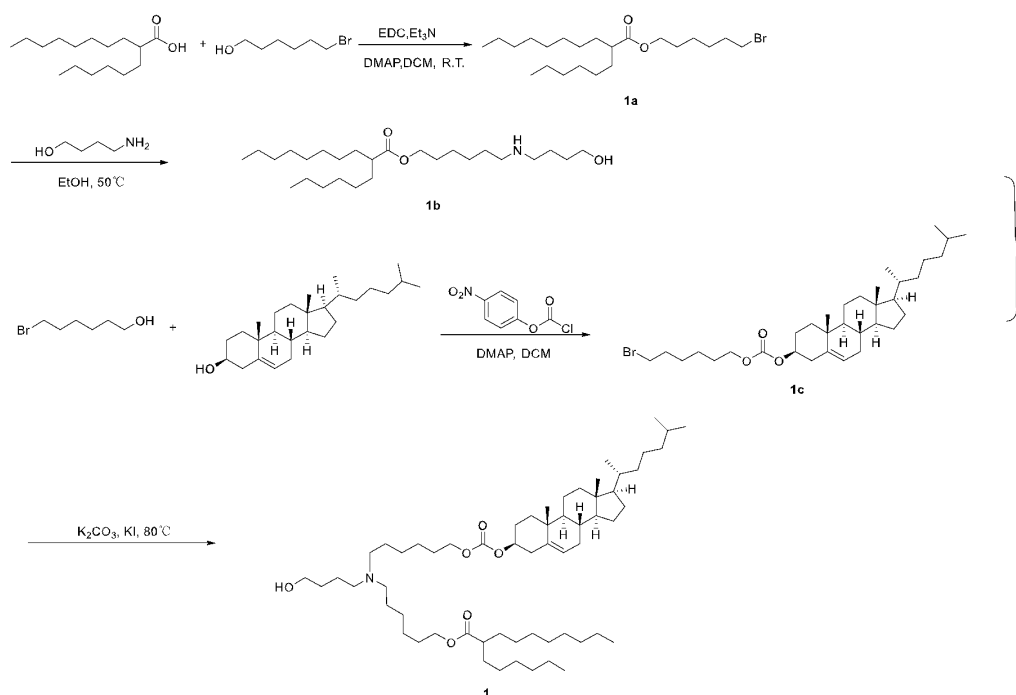
如本文所使用的，术语“递送系统”是指调控生物活性成分在空间、时间及剂量在生物体内分布的制剂或组合物。

需要说明的是，本发明中所使用的方法，如无特殊规定，均为常规方法，本发明所使用的试剂，如无特殊规定，均为市售产品。

实施例

实施例 1 化合物 1 的合成

16



步骤 1: 6-溴己基 2-己基癸酸酯 (1a) 的合成

将 2-己基癸酸 (2.12 g, 5.0 mmol) 溶于 30 mL 二氯甲烷中, 加入 6-溴正己醇 (0.93 g, 5.0 mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP, 0.21 g, 2.0 mmol)、三乙胺 (0.62 g, 6.0 mmol), 搅拌溶解。滴入 EDC.HCL (1.10 g, 6.0 mmol) 的二氯甲烷溶液, 滴加完毕后, 室温搅拌 16 小时。加水淬灭, 加入稀盐酸, 调节 pH 值至 1-3, 分液。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物 1a (1.45 g, 淡黄色油状物), 产率 70%。

MS m/z (ESI): 419.2 [M+1]

步骤 2: 6-((4-羟基丁基)氨基)己基 2-己基癸酸酯 (1b) 的合成

室温条件下, 将 6-溴己基 2-己基癸酸酯 1a (1.28 g, 3 mmol) 溶于 20 mL 乙醇中, 加入 4-氨基-1-丁醇 (4.00 g, 45 mmol), 升温至 50 °C, 搅拌 8 h, 监控反应进程, 原料消耗完全后降至室温, 45 °C 除去乙醇, 用二氯甲烷溶解粗品, 用饱和食盐水洗涤三次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到化合物 1b (1.13 g, 淡黄色油状物)。

MS m/z (ESI): 428.4 [M+1]

步骤 3: 6-溴己基胆固醇碳酸酯 (1c) 的合成

将 6-溴己醇 (0.91 g, 5.0 mmol) 溶于 30 mL 二氯甲烷中, 加入 4-二甲氨基吡啶 (1.22 g, 10 mmol), 再分批次加入对硝基氯甲酸苯酯 (1.11 g, 5.5 mmol), 反应室温搅拌 3 h, 在此反应液中加入胆固醇 (2.16 g, 5.6 mmol), 混合物在室温下搅拌过夜, TLC 显示反应完成后, 加入 20 mL 二氯甲烷稀释, 然后用 30 mL 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤

并浓缩，得到产品 1c (1.83 g, 淡黄色油状物)，产率 62%。

MS m/z (ESI): 593.3 [M+1]

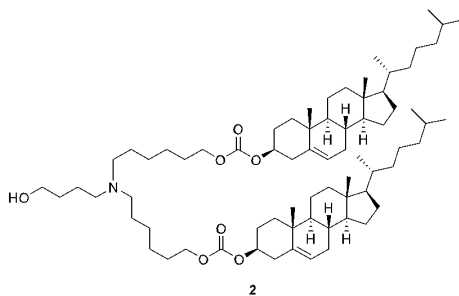
步骤 4: 化合物 1 的合成

将 6-((4-羟基丁基)氨基)己基 2-己基癸酸酯 1b (428 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中，加入乙腈，6-溴己基胆固醇碳酸酯 1c (711 mg, 1.2 mmol)，碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol)，碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol)，在 83°C 下搅拌 16-20h。冷却至室温，过滤，滤渣用二氯甲烷洗涤，向得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液，用二氯甲烷萃取 2 次，合并有机相，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩，柱层析分离，得到化合物 1 (470 mg, 淡黄色油状物)，产率 50%。

MS m/z (ESI): 941.4 [M+1]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 5.40 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.20-4.02 (m, 4H), 3.67-3.61 (m, 2H), 3.58-3.50 (m, 2H), 2.47-2.42 (m, 8H), 2.03-1.72 (m, 5H), 1.67-0.85 (m, 82H), 0.70 (s, 3H)

实施例 2 化合物 2 的合成

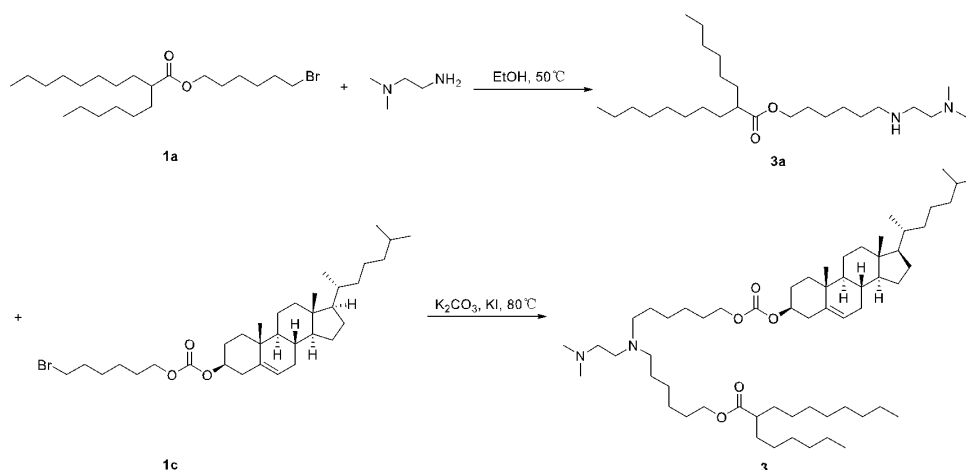


将 6-溴己基胆固醇碳酸酯 1c (1.48 g, 2.5 mmol) 溶于四氢呋喃中，加入乙腈，4-氨基-1-丁醇 (89.2 mg, 1.0 mmol)，碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol)，碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol)，在 83°C 下搅拌 16-20h。冷却至室温，过滤，滤渣用二氯甲烷洗涤，得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液，用二氯甲烷萃取 2 次，合并有机相，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩，柱层析分离，得到化合物 2 (679 mg, 淡黄色固体)，产率 61%。

MS m/z (ESI): 1115.2 [M+1]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 5.40 (t, 2H, J = 5.4 Hz), 4.53-4.40 (m, 2H), 4.15 (t, 4H, J = 5.6 Hz), 3.76 (t, 2H, J = 5.4 Hz), 3.20-3.01 (m, 6H), 2.45-2.31 (m, 4H), 2.02-1.75 (m, 16H), 1.74-1.22 (m, 36H), 1.19-0.87 (m, 44H), 0.70 (s, 6H)

实施例 3 化合物 3 的合成



步骤 1: 6-((2-(二甲基氨基)乙基)氨基)己基 2-己基癸酸酯 (3a) 的合成

室温下, 将 6-溴己基 2-己基癸酸酯 1a (1.28 g, 3 mmol) 溶于 20 mL 乙醇中, 加入 N,N-二甲基乙二胺 (4.00 g, 45 mmol), 升温至 50°C, 搅拌 8 h, 监控反应进程, 原料消耗完全后降至室温, 45°C 除去乙醇, 用二氯甲烷溶解粗品, 用饱和食盐水洗涤三次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到化合物 3a (1.20 g, 淡黄色油状物)。

MS m/z (ESI): 427.4 [M+1]

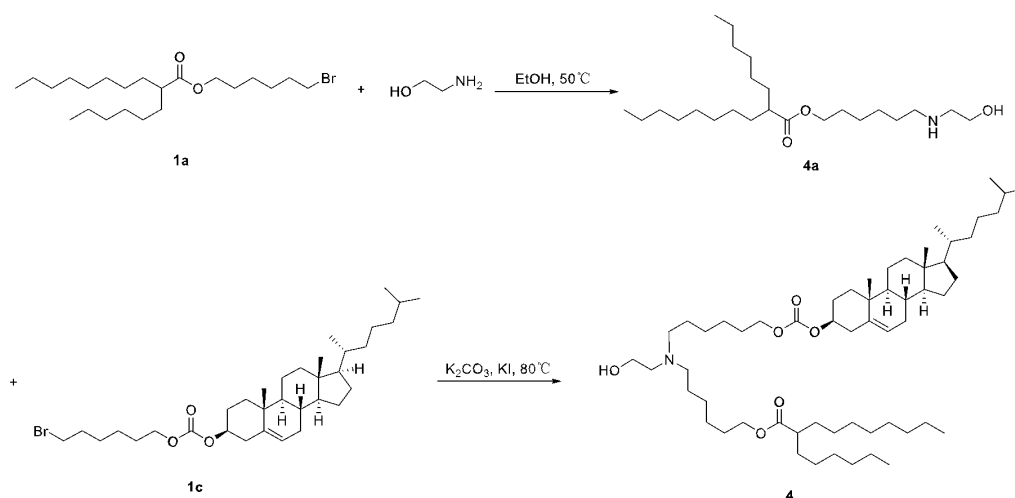
步骤 2: 化合物 3 的合成

将 6-((2-(二甲基氨基)乙基)氨基)己基 2-己基癸酸酯 3a (426 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中, 加入乙腈, 6-溴己基胆固醇碳酸酯 1c (711 mg, 1.2 mmol), 碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol), 碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol), 在 83°C 下搅拌 16-20h。冷却至室温, 过滤, 滤渣用二氯甲烷洗涤, 得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液, 用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析分离, 得到化合物 3 (517 mg, 淡黄色油状物), 产率 55%。

MS m/z (ESI): 940.0 [M+1]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 5.40 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.20-4.02 (m, 3H), 3.76-3.61 (m, 2H), 3.45-3.38 (m, 3H), 2.94-2.85 (m, 1H), 2.55-2.27 (m, 5H), 2.03-0.85 (m, 70H), 0.70 (s, 3H)

实施例 4 化合物 4 的合成



步骤 1: 6-((2-羟乙基)氨基)己基 2-己基癸酸酯 (4a) 的合成

室温下, 将 6-溴己基 2-己基癸酸酯 1a (1.28 g, 3 mmol) 溶于 20 mL 乙醇中, 加入乙醇胺 (2.75 g, 45 mmol), 升温至 50°C, 搅拌 8 h, 监控反应进程, 原料消耗完全后降至室温, 45°C 除去乙醇, 用二氯甲烷溶解粗品, 用饱和食盐水洗涤三次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到化合物 4a (1.01 g, 淡黄色油状物)。

MS m/z (ESI): 400.4 [M+1]

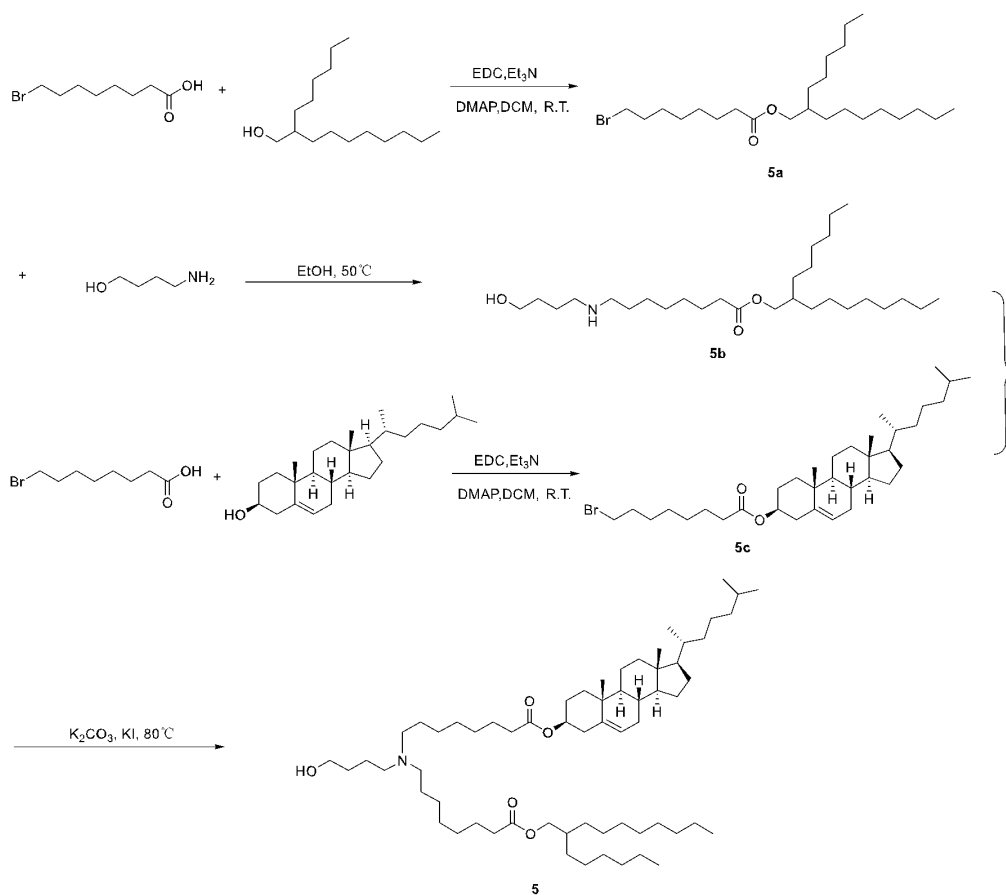
步骤 2: 化合物 4 的合成

将 6-((2-羟乙基)氨基)己基 2-己基癸酸酯 4a (400 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中, 加入乙腈, 6-溴己基胆固醇碳酸酯 1c (711 mg, 1.2 mmol), 碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol), 碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol), 在 83°C 下搅拌 16-20h。冷却至室温, 过滤, 滤渣用二氯甲烷洗涤, 得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液, 用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析分离, 得到化合物 4 (474 mg, 淡黄色油状物), 产率 52%。

MS m/z (ESI): 913.1 [M+1]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 5.40 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.20-4.02 (m, 4H), 3.67-3.61 (m, 2H), 3.58-3.50 (m, 4H), 2.47-2.42 (m, 2H), 2.03-1.72 (m, 5H), 1.67-0.85 (m, 82H), 0.70 (s, 3H)

实施例 5 化合物 5 的合成



步骤 1: 8-溴辛酸 2-己基癸酯 (5a) 的合成

将 8-溴辛酸 (1.12 g, 5.0 mmol) 溶于 30 mL 二氯甲烷中, 加入 2-己基癸醇 (1.21 g, 5.0 mmol)、DMAP (0.21 g, 2.0 mmol)、三乙胺 (0.62 g, 6.0 mmol), 搅拌溶解。滴入 EDC.HCL (1.10 g, 6.0 mmol) 的二氯甲烷溶液, 滴加完毕后, 室温搅拌 16 小时。加水淬灭, 加入稀盐酸, 调节 pH 值为 1-3, 分液。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物 5a (1.52 g, 淡黄色油状物), 产率 68%。

MS m/z (ESI): 447.2 [M+1]

步骤 2: 8-((4-羟基丁基)氨基)辛酸 2-己基癸酯 (5b) 的合成

室温条件下, 将 8-溴辛酸 2-己基癸酯 5a (1.34 g, 3 mmol) 溶于 20 mL 乙醇中, 加入丁醇胺 (4.00 g, 45 mmol), 升温至 50°C, 搅拌 8 h, 监控反应进程, 原料消耗完全后降至室温, 45°C 除去乙醇, 用二氯甲烷溶解粗品, 用饱和食盐水洗涤三次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到化合物 5b (1.21 g, 淡黄色油状物)。

MS m/z (ESI): 456.4 [M+1]

步骤 3: 8-溴辛酸胆固醇酯 (5c) 的合成

将 8-溴辛酸(1.12 g, 5.0 mmol)溶于 30 mL 二氯甲烷中,加入胆固醇(1.93 g, 5.0 mmol)、DMAP (0.21 g, 2.0 mmol)、三乙胺(0.62 g, 6.0 mmol), 搅拌溶解。滴入 EDC.HCL (1.10 g, 6.0 mmol) 的二氯甲烷溶液,滴加完毕后,室温搅拌 16 小时。加水淬灭,加入稀盐酸,调节 pH 值为 1-3, 分液。有机相用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩,得到化合物 5c (1.77 g, 淡黄色油状物), 产率 60%。

MS m/z (ESI): 591.4 [M+1]

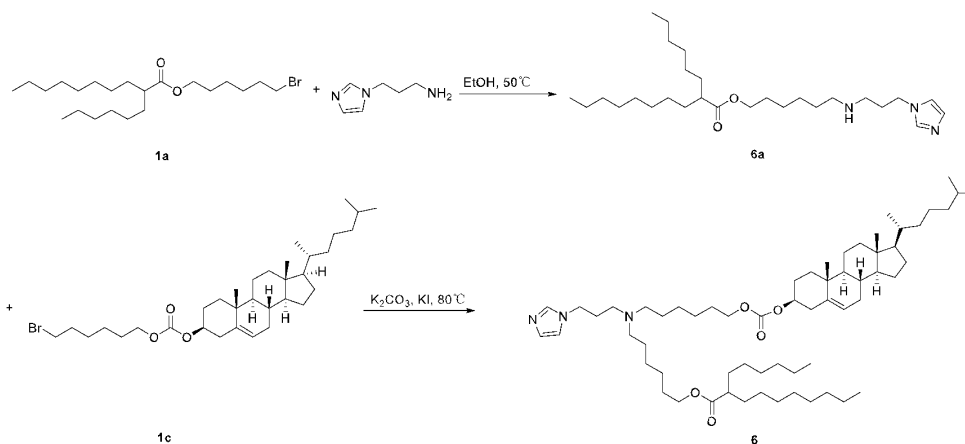
步骤 4: 化合物 5 的合成

将 8-((4-羟基丁基)氨基)辛酸 2-己基癸酯 5b (455 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中,加入乙腈, 8-溴辛酸胆固醇酯 5c (708 mg, 1.2 mmol), 碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol), 碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol), 在 83°C 下搅拌 16-20h。冷却至室温, 过滤, 滤渣用二氯甲烷洗涤, 得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液, 用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析分离, 得到化合物 5 (464 mg, 淡黄色油状物), 产率 48%。

MS m/z (ESI): 967.6 [M+1]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 5.40 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.20-4.02 (m, 2H), 3.67-3.61 (m, 2H), 2.64 (t, 6H, J = 5.4 Hz), 2.37-2.25 (m, 6H), 2.10-0.85 (m, 93H), 0.70 (s, 3H)

实施例 6 化合物 6 的合成



步骤 1: 6-((3-(1H-咪唑-1-基)丙基)氨基)己基 2-己基癸酸酯 (6a) 的合成

室温下, 将 6-溴己基 2-己基癸酸酯 1a (1.28 g, 3 mmol)溶于 20 mL 乙醇中, 加入 1-(3-氨基丙基)咪唑 (5.63 g, 45 mmol), 升温至 50°C, 搅拌 8 h, 监控反应进程, 原料消耗完全后降至室温, 45°C 除去乙醇, 用二氯甲烷溶解粗品, 用饱和食盐水洗涤三次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到化合物 6a (1.46 g, 淡黄色油状物)。

MS m/z (ESI): 464.4 [M+1]

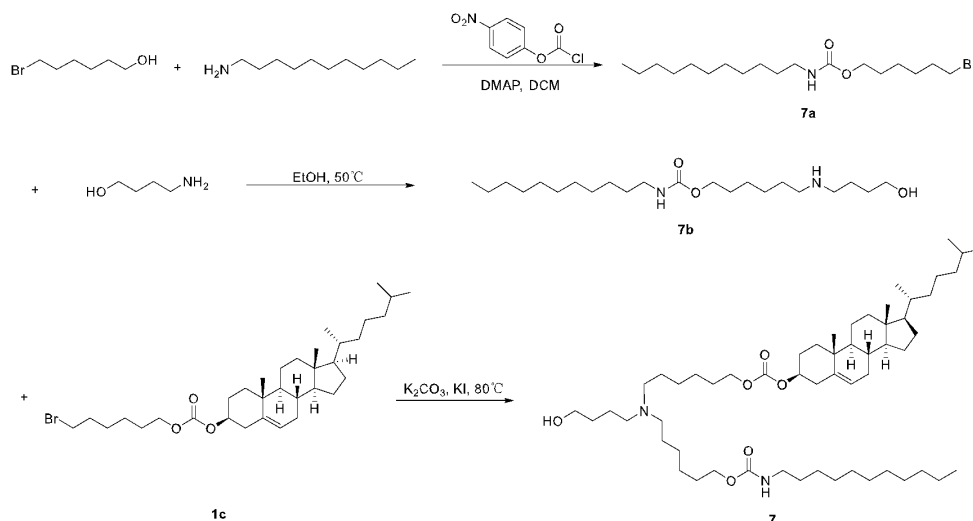
步骤 2: 化合物 6 的合成

将 6-((3-(1H-咪唑-1-基)丙基)氨基)己基 2-己基癸酸酯 6a (463 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中, 加入乙腈, 6-溴己基胆固醇碳酸酯 1c (711 mg, 1.2 mmol), 碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol), 碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol), 在 83°C 下搅拌 16-20h。冷却至室温, 过滤, 滤渣用二氯甲烷洗涤, 得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液, 用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析分离, 得到化合物 6 (517 mg, 淡黄色油状物), 产率 53%。

MS m/z (ESI): 976.9 [M+1]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 7.49 (s, 1H), 7.08 (d, 1H, J = 5.6 Hz), 6.93 (d, 1H, J = 5.6 Hz), 5.40 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.20-3.95 (m, 5H), 2.47-2.30 (m, 9H), 2.36-0.85 (m, 87H), 0.70 (s, 3H)

实施例 7 化合物 7 的合成



步骤 1: 6-溴己基十一烷基氨基甲酸酯 (7a) 的合成

将 6-溴己醇 (0.91 g, 5.0 mmol) 溶于 30 mL 二氯甲烷中, 加入 4-二甲氨基吡啶 (1.22g, 10 mmol), 再分批次加入对硝基氯甲酸苯酯 (1.11 g, 5.5 mmol), 反应室温搅拌 3h, 在此反应液中加入十一胺 (0.96 g, 5.6 mmol), 混合物在室温下搅拌过夜, TLC 显示反应完成后, 加入 20 mL 二氯甲烷稀释, 然后用 30 mL 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物 7a (1.23 g, 淡黄色油状物), 产率 65%。

MS m/z (ESI): 378.2 [M+1]

步骤 2: 6-((4-羟基丁基)氨基)十一烷基氨基甲酸己酯 (7b) 的合成

室温条件下, 将 6-溴己基十一烷基氨基甲酸酯 7a (1.13 g, 3 mmol) 溶于 20 mL 乙醇中, 加入丁醇胺 (4.00 g, 45 mmol), 升温至 50°C, 搅拌 8 h, 监控反应进程, 原料消耗完全后降至室

温，45℃除去乙醇，用二氯甲烷溶解粗品，用饱和食盐水洗涤三次，有机相用无水硫酸钠干燥，浓缩得到化合物 **7b** (1.14 g，淡黄色油状物)。

MS m/z (ESI): 387.4 [M+1]

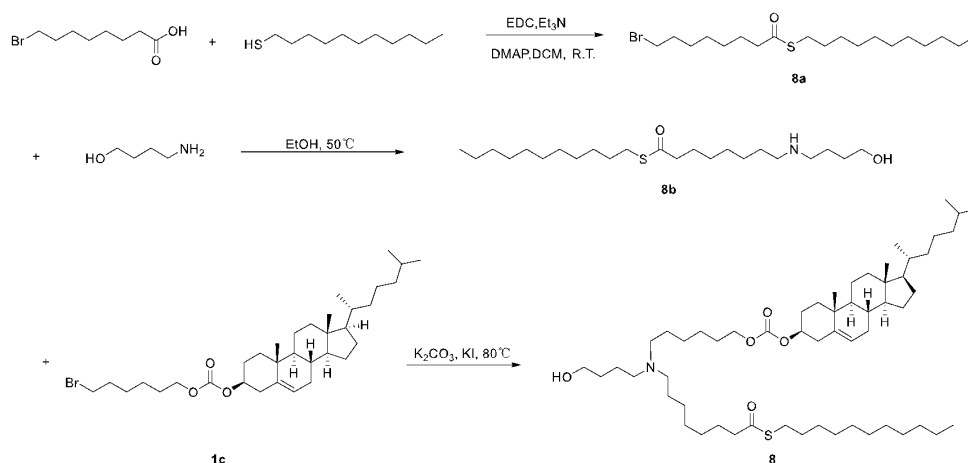
步骤 3: 化合物 7 的合成

将 6-((4-羟基丁基)氨基)十一烷基氨基甲酸己酯 7b (386 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中，加入乙腈，6-溴己基胆固醇碳酸酯 1c (711 mg, 1.2 mmol)，碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol)，碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol)，在 83℃ 下搅拌 16-20h。冷却至室温，过滤，滤渣用二氯甲烷洗涤，得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液，用二氯甲烷萃取 2 次，合并有机相，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩，柱层析分离，得到化合物 7 (459 mg, 淡黄色油状物)，产率 51%。

MS m/z (ESI): 900.4 [M+1]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 5.42 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 4.80-4.71 (m, 1H), 4.51-4.40 (m, 1H), 4.20-4.02 (m, 4H), 3.75-3.61 (m, 2H), 3.20-3.11 (m, 2H), 2.91-2.73 (m, 5H), 2.43-2.36 (m, 2H), 2.10-0.83 (m, 79H), 0.70 (s, 3H)

实施例 8 化合物 8 的合成



步骤 1: S-十一烷基 8-溴代辛烷硫酸酯 (8a) 的合成

将 8-溴辛酸 (1.12 g, 5.0 mmol) 溶于 30 mL 二氯甲烷中, 加入十一硫醇 (0.94 g, 5.0 mmol)、DMAP (0.21 g, 2.0 mmol)、三乙胺 (0.62 g, 6.0 mmol), 搅拌溶解。滴入 EDC.HCL (1.10 g, 6.0 mmol) 的二氯甲烷溶液, 滴加完毕后, 室温搅拌 16 小时。加水淬灭, 加入稀盐酸, 调节 pH 值为 1-3, 分液。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物 8a (1.30 g, 淡黄色油状物), 产率 66%。

MS m/z (ESI): 393.2 [M+1]

步骤2: S-十一烷基 8-((4-羟丁基)氨基)辛硫代酸酯 (8b)的合成

室温条件下, 将 S-十一烷基 8-溴代辛烷硫酸酯 8a (1.18 g, 3 mmol) 溶于 20 mL 乙醇中, 加入丁醇胺 (4.00 g, 45 mmol), 升温至 50°C, 搅拌 8 h, 监控反应进程, 原料消耗完全后降至室温, 45°C 除去乙醇, 用二氯甲烷溶解粗品, 用饱和食盐水洗涤三次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到化合物 8b (1.18 g, 淡黄色油状物)。

MS m/z (ESI): 402.3 [M+1]

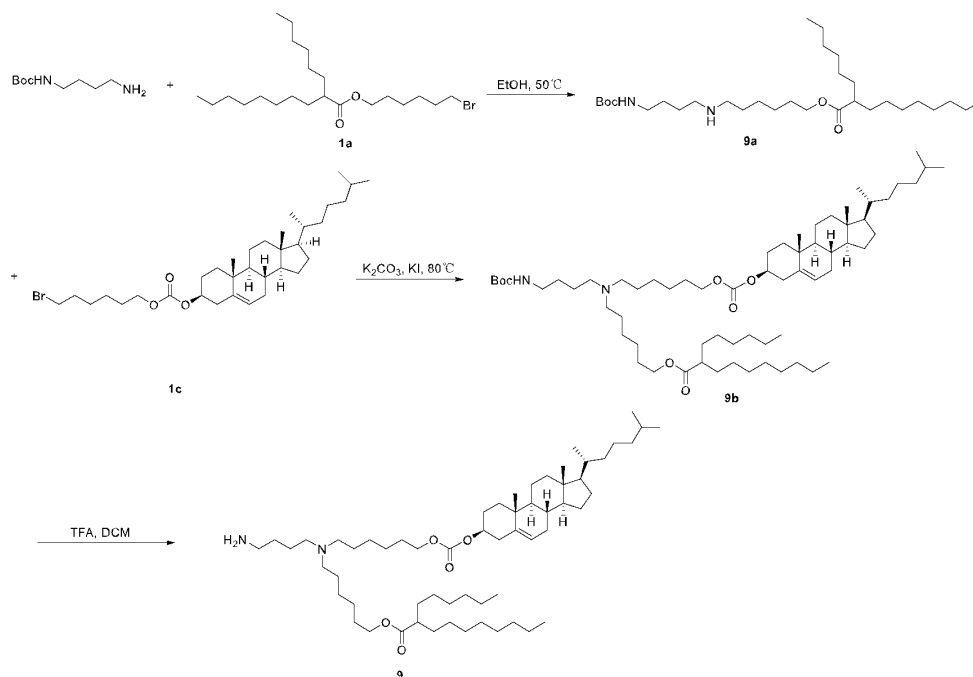
步骤 3: 化合物 8 的合成

将 S-十一烷基 8-((4-羟丁基)氨基)辛硫代酸酯 8b (401 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中, 加入乙腈, 6-溴己基胆固醇碳酸酯 1c (711 mg, 1.2 mmol), 碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol), 碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol), 在 83°C 下搅拌 16-20h。冷却至室温, 过滤, 滤渣用二氯甲烷洗涤, 得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液, 用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析分离, 得到化合物 8 (458 mg, 淡黄色油状物), 产率 50%。

MS m/z (ESI): 914.9 [M+1]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 5.42 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 4.51-4.40 (m, 1H), 4.20-4.02 (m, 2H), 3.65-3.51 (m, 2H), 2.91-2.83 (m, 2H), 2.60-2.36 (m, 10H), 2.10-0.86 (m, 82H), 0.70 (s, 3H)

实施例 9 化合物 9 的合成



步骤 1: 6-((4-((叔丁氧基羰基)氨基)丁基)氨基)己基 2-己基癸酸酯 (9a) 的合成

室温下, 将 6-溴己基 2-己基癸酸酯 1a (1.28 g, 3 mmol) 溶于 20 mL 乙醇中, 加入 BOC-1,4-丁二胺盐酸盐 (10.1 g, 45 mmol), 升温至 50°C, 搅拌 8 h, 监控反应进程, 原料消耗完全后降

至室温，45°C除去乙醇，用二氯甲烷溶解粗品，用饱和食盐水洗涤三次，有机相用无水硫酸钠干燥，浓缩得到化合物 9a (1.51 g，淡黄色油状物)。

MS m/z (ESI): 527.5 [M+1]

步骤 2: 化合物 9b 的合成

将 6-((4-((叔丁氧羰基)氨基)丁基)氨基)己基 2-己基癸酸酯 9a (526 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中，加入乙腈，6-溴己基胆固醇碳酸酯 1c (711 mg, 1.2 mmol)，碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol)，碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol)，在 83°C 下搅拌 16-20h。冷却至室温，过滤，滤渣用二氯甲烷洗涤，得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液，用二氯甲烷萃取 2 次，合并有机相，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩，柱层析分离，得到化合物 9b (540 mg，淡黄色油状物)，产率 52%。

MS m/z (ESI): 1039.9 [M+1]

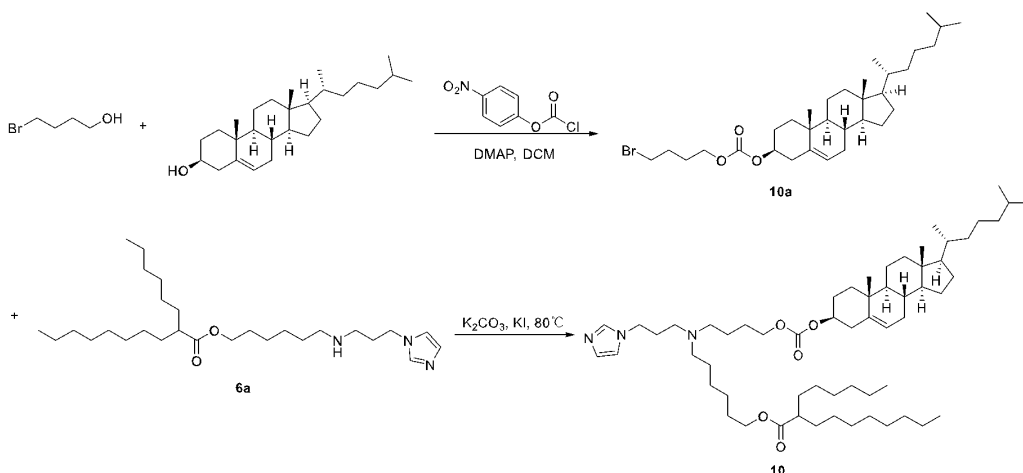
步骤 3: 化合物 9 的合成

将化合物 9b (1.04 g, 1.0 mmol) 溶于二氯甲烷中，冰浴下加入三氟乙酸的二氯甲烷溶液，室温下搅拌 16h。旋转蒸发除去三氟乙酸，加入二氯甲烷溶解，用饱和碳酸氢钠溶液洗涤 2 次，有机相经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩，柱层析分离，得到化合物 9 (460 mg，淡黄色油状物)，产率 49%。

MS m/z (ESI): 940.1 [M+1]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 5.40 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 4.63-4.40 (m, 1H), 4.19-4.03 (m, 4H), 2.79-2.70 (m, 2H), 2.55-2.28 (m, 10H), 2.02-0.87 (m, 89H), 0.70 (s, 3H)

实施例 10 化合物 10 的合成



步骤 1: 4-溴丁基胆固醇碳酸酯 (10a) 的合成

将 4-溴丁醇 (0.77 g, 5.0 mmol) 溶于 30 mL 二氯甲烷中，加入 4-二甲氨基吡啶 (1.22g,

10 mmol)，再分批次加入对硝基氯甲酸苯酯（1.11 g，5.5 mmol），反应室温搅拌 3h，在此反应液中加入胆固醇（2.16 g，5.6 mmol），混合物在室温下搅拌过夜，TLC 显示反应完成后，加入 20 mL 二氯甲烷稀释，然后用 30 mL 饱和食盐水洗涤，有机相用无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩，得到产品 10a（1.50 g，淡黄色油状物），产率 53%。

MS m/z (ESI): 565.3 [M+1]

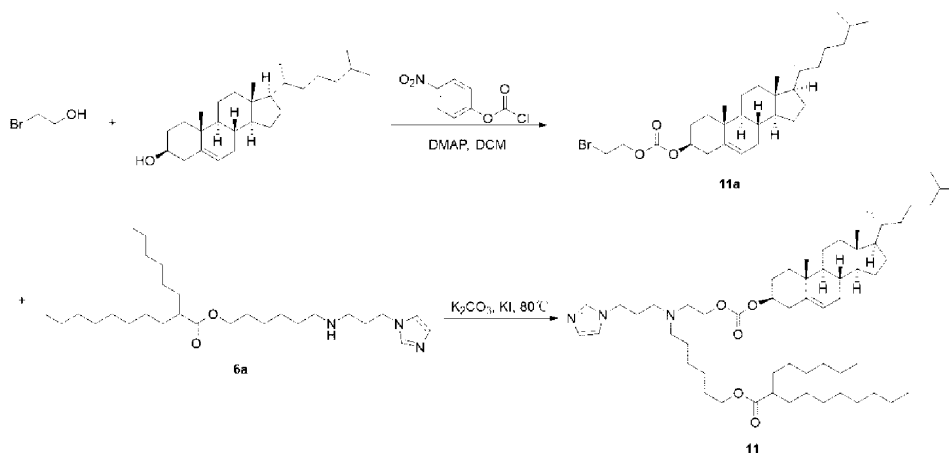
步骤 2：化合物 10 的合成

将 6-((3-(1H-咪唑-1-基)丙基)氨基)己基 2-己基癸酸酯 6a（463 mg，1.0 mmol）溶于四氢呋喃中，加入乙腈，4-溴丁基胆固醇碳酸酯 10a（678 mg，1.2 mmol），碳酸钾（550 mg，4.0 mmol），碘化钾（332 mg，2.0 mmol），在 83°C 下搅拌 16-20 h。冷却至室温，过滤，滤渣用二氯甲烷洗涤，得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液，用二氯甲烷萃取 2 次，合并有机相，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩，柱层析分离，得到化合物 10（455 mg，淡黄色油状物），产率 48%。

MS m/z (ESI): 948.9 [M+1]

^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ 7.49 (s, 1H), 7.08 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz), 6.93 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz), 5.40 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.20-3.95 (m, 6H), 2.47-2.30 (m, 8H), 2.36-0.85 (m, 83H), 0.70 (s, 3H)

实施例 11 化合物 11 的合成



步骤 1：2-溴乙基胆固醇碳酸酯（11a）的合成

将 2-溴乙醇（0.63 g，5.0 mmol）溶于 30 mL 二氯甲烷中，加入 4-二甲氨基吡啶（1.22 g，10 mmol），再分批次加入对硝基氯甲酸苯酯（1.11 g，5.5 mmol），反应室温搅拌 3h，在此反应液中加入胆固醇（2.16 g，5.6 mmol），混合物在室温下搅拌过夜，TLC 显示反应完成后，加入 20 mL 二氯甲烷稀释，然后用 30 mL 饱和食盐水洗涤，有机相用无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩，得到产品 11a（1.53 g，淡黄色油状物），产率 57%。

MS m/z (ESI): 537.3 [M+1]

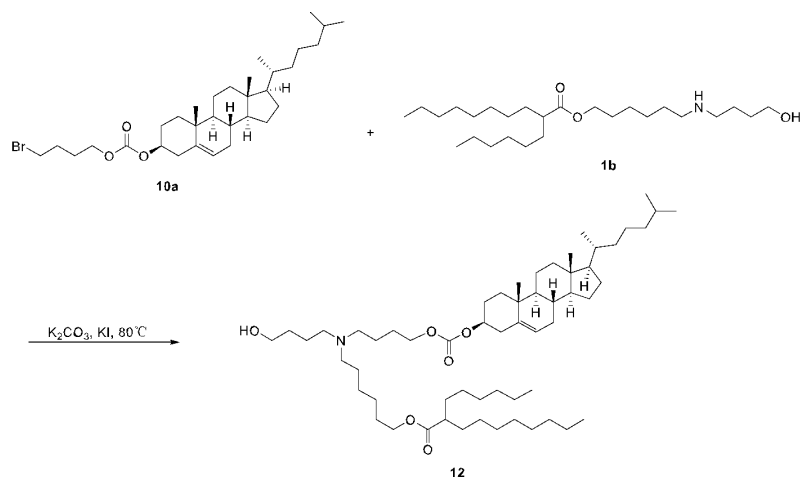
步骤 2: 化合物 11 的合成

将 6-((3-(1H-咪唑-1-基)丙基)氨基)己基 2-己基癸酸酯 6a (463 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中, 加入乙腈, 2-溴乙基胆固醇碳酸酯 11a (644 mg, 1.2 mmol), 碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol), 碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol), 在 83°C 下搅拌 16-20 h。冷却至室温, 过滤, 滤渣用二氯甲烷洗涤, 得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液, 用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析分离, 得到化合物 11 (506 mg, 淡黄色油状物), 产率 55%。

MS m/z (ESI): 920.8 [M+1]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 7.49 (s, 1H), 7.08 (d, 1H, J = 5.6 Hz), 6.93 (d, 1H, J = 5.6 Hz), 5.40 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.20-3.95 (m, 6H), 2.74-2.365 (m, 2H), 2.47-2.30 (m, 6H), 2.36-0.85 (m, 79H), 0.70 (s, 3H)

实施例 12 化合物 12 的合成

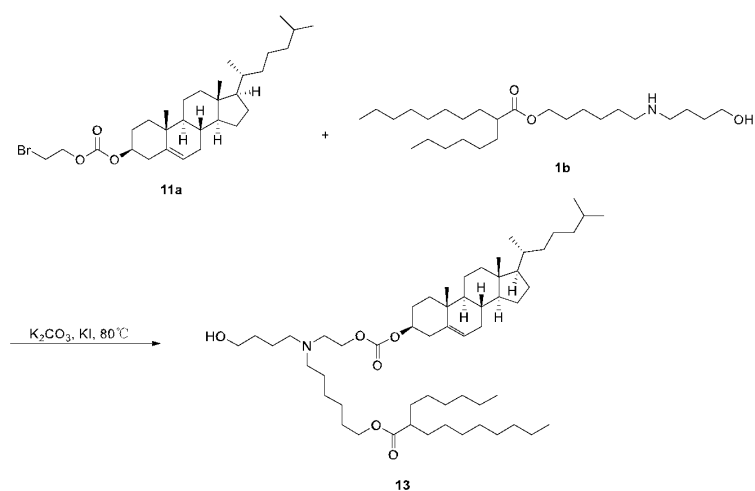


将 6-((4-羟基丁基)氨基)己基 2-己基癸酸酯 1b (428 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中, 加入乙腈, 4-溴丁基胆固醇碳酸酯 10a (679 mg, 1.2 mmol), 碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol), 碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol), 在 83°C 下搅拌 16-20h。冷却至室温, 过滤, 滤渣用二氯甲烷洗涤, 得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液, 用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析分离, 得到产物 12 (566 mg, 淡黄色油状物), 产率 62%。

MS m/z (ESI): 913.0 [M+1]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 5.40 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.20-4.02 (m, 4H), 3.67-3.61 (m, 2H), 2.63-2.32 (m, 8H), 2.03-1.72 (m, 5H), 1.67-0.85 (m, 80H), 0.70 (s, 3H)

实施例 13 化合物 13 的合成

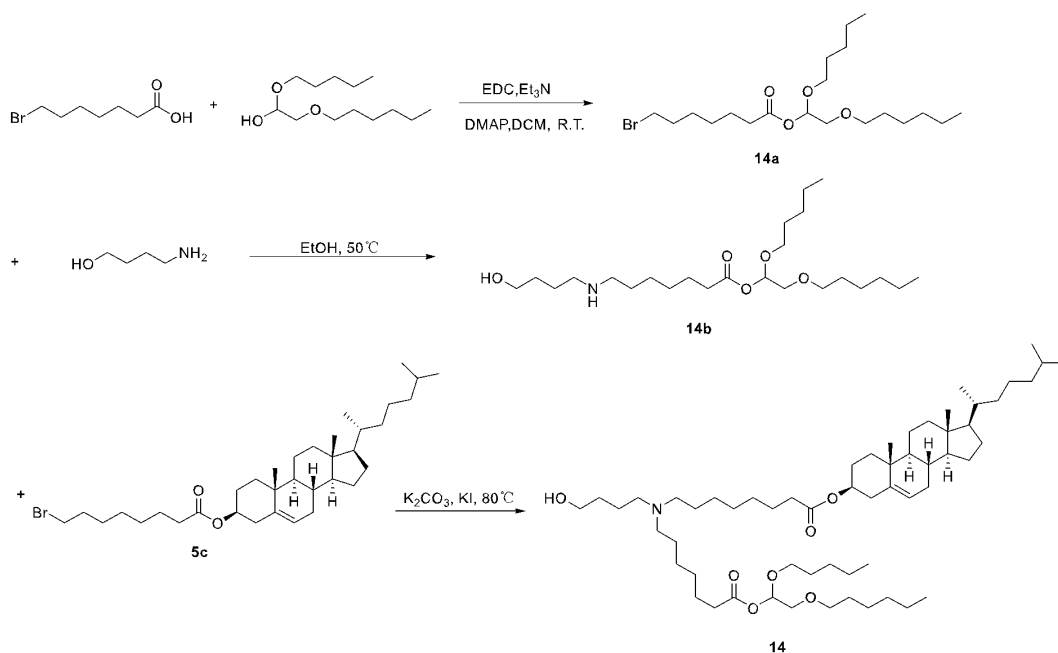


将 6-((4-羟基丁基)氨基)己基 2-己基癸酸酯 1b (428 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中，加入乙腈，4-溴丁基胆固醇碳酸酯 11a (645 mg, 1.2 mmol)，碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol)，碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol)，在 83°C 下搅拌 16-20h。冷却至室温，过滤，滤渣用二氯甲烷洗涤，得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液，用二氯甲烷萃取 2 次，合并有机相，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩，柱层析分离，得到产物 13 (451 mg，淡黄色油状物)，产率 51%。

MS m/z (ESI): 885.1 $[M+1]$

^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ 5.40 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.29-4.21 (m, 2H), 4.20-4.02 (m, 2H), 3.67-3.61 (m, 2H), 2.85-2.78 (m, 2H), 2.63-2.32 (m, 6H), 2.03-1.72 (m, 5H), 1.67-0.85 (m, 76H), 0.70 (s, 3H)

实施例 14 化合物 14 的合成



步骤 1: 2-(己氧基)-1-(戊氧基)乙基 7-溴庚酸酯 (14a) 的合成

将 7-溴庚酸 (1.05 g, 5.0 mmol) 溶于 30 mL 二氯甲烷中, 加入 2-(己氧基)-1-(戊氧基)乙醇 (1.16 g, 5.0 mmol)、DMAP (0.21 g, 2.0 mmol)、三乙胺 (0.62 g, 6.0 mmol), 搅拌溶解。滴入 EDC.HCL (1.10 g, 6.0 mmol) 的二氯甲烷溶液, 滴加完毕后, 室温搅拌 16 小时。加水淬灭, 加入稀盐酸, 调节 pH 值为 1-3, 分液。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物 14a (1.08 g, 淡黄色油状物), 产率 51%。

MS m/z (ESI): 423.2 [M+1]

步骤 2: 2-(己氧基)-1-(戊氧基)乙基 7-((4-羟丁基)氨基)庚酸酯 (14b) 的合成

室温条件下, 将 2-(己氧基)-1-(戊氧基)乙基 7-溴庚酸酯 14a (1.27 g, 3 mmol) 溶于 20 mL 乙醇中, 加入丁醇胺 (4.00 g, 45 mmol), 升温至 50°C, 搅拌 8 h, 监控反应进程, 原料消耗完全后降至室温, 45°C 除去乙醇, 用二氯甲烷溶解粗品, 用饱和食盐水洗涤三次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到化合物 14b (1.05 g, 淡黄色油状物)。

MS m/z (ESI): 432.4 [M+1]

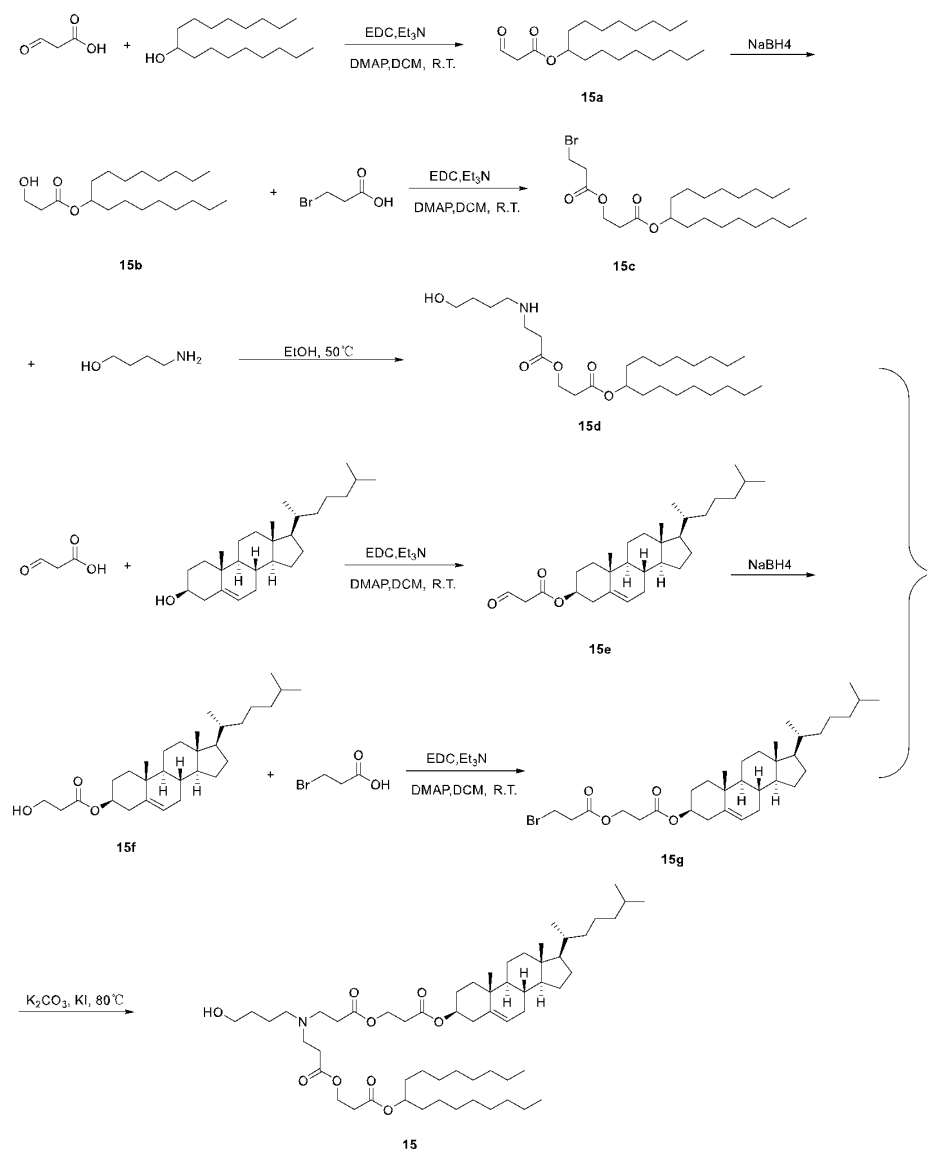
步骤 3: 化合物 14 的合成

将 2-(己氧基)-1-(戊氧基)乙基 7-((4-羟丁基)氨基)庚酸酯 14b (432 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中, 加入乙腈, 8-溴辛酸胆固醇酯 5c (708 mg, 1.2 mmol), 碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol), 碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol), 在 83°C 下搅拌 16-20h。冷却至室温, 过滤, 滤渣用二氯甲烷洗涤, 得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液, 用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析分离, 得到化合物 14 (490 mg, 淡黄色油状物), 产率 52%。

MS m/z (ESI): 942.8 [M+1]

^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ 6.67 (t, 1H, $J = 6.3$ Hz), 5.40 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.20-4.02 (m, 2H), 3.67-3.61 (m, 2H), 3.47-3.31 (m, 4H), 2.64 (t, 6H, $J = 5.4$ Hz), 2.37-2.25 (m, 6H), 2.10-0.85 (m, 80H), 0.70 (s, 3H)

实施例 15 化合物 15 的合成



步骤 1: 十七-9-基 3-氧代丙酸酯 (15a) 的合成

将 3-氧代丙酸 (0.44 g, 5.0 mmol) 溶于 20 mL 二氯甲烷中, 加入 9-十七醇 (1.28 g, 5.0 mmol)、DMAP (0.21 g, 2.0 mmol)、三乙胺 (0.62 g, 6.0 mmol), 搅拌溶解。滴入 EDC.HCL (1.10 g, 6.0 mmol) 的二氯甲烷溶液, 滴加完毕后, 室温搅拌 16 小时。加水淬灭, 加入稀盐

酸, 调节 pH 值为 1-3, 分液。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物 15a (0.78 g, 淡黄色油状物), 产率 48%。

MS m/z (ESI): 327.3 [M+1]

步骤 2: 十七-9-基 3-羟基丙酸酯 (15b) 的合成

将十七-9-基 3-氧代丙酸酯 15a (0.78 g, 2.3 mmol) 溶于 10 mL 正丁醇中, 0℃下加入硼氢化钠(266 mg, 7 mmol), 室温下搅拌 12 h, 监控反应进程, 原料消耗完全后加入饱和氯化铵溶液淬灭反应, 用二氯甲烷萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到化合物 15b (0.70 g, 淡黄色油状物)。

MS m/z (ESI): 329.3 [M+1]

步骤 3: 化合物 15c 的合成

将 3-溴丙酸 (306 mg, 2.0 mmol) 溶于 10 mL 二氯甲烷中, 加入十七-9-基 3-羟基丙酸酯 15b (658 mg, 2.0 mmol)、DMAP (84 mg, 0.8 mmol)、三乙胺 (248 mg, 2.4 mmol), 搅拌溶解。滴入 EDC.HCL (440 mg, 2.4 mmol) 的二氯甲烷溶液, 滴加完毕后, 室温搅拌 16 小时。加水淬灭, 加入稀盐酸, 调节 pH 值为 1-3, 分液。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物 15c (528 mg, 淡黄色油状物), 产率 57%。

MS m/z (ESI): 463.2 [M+1]

步骤 4: 化合物 15d 的合成

室温条件下, 将化合物 15c (528 mg, 1.14 mmol) 溶于 10 mL 乙醇中, 加入丁醇胺(1.5 g, 17 mmol), 升温至 50℃, 搅拌 8 h, 监控反应进程, 原料消耗完全后降至室温, 45℃除去乙醇, 用二氯甲烷溶解粗品, 用饱和食盐水洗涤三次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到化合物 15d (480 mg, 淡黄色油状物)。

MS m/z (ESI): 472.4 [M+1]

步骤 5: 化合物 15e 的合成

将 3-氧代丙酸 (0.44 g, 5.0 mmol) 溶于 20 mL 二氯甲烷中, 加入胆固醇 (1.93 g, 5.0 mmol)、DMAP (0.21 g, 2.0 mmol)、三乙胺 (0.62 g, 6.0 mmol), 搅拌溶解。滴入 EDC.HCL (1.10 g, 6.0 mmol) 的二氯甲烷溶液, 滴加完毕后, 室温搅拌 16 小时。加水淬灭, 加入稀盐酸, 调节 pH 值为 1-3, 分液。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物 15a (1.03 g, 淡黄色油状物), 产率 45%。

MS m/z (ESI): 456.4 [M+1]

步骤 6: 化合物 15f 的合成

将化合物 15e (1.03 g, 2.2 mmol) 溶于 10 mL 正丁醇中, 0℃下加入硼氢化钠(266 mg, 7

mmol), 室温下搅拌 12 h, 监控反应进程, 原料消耗完全后加入饱和氯化铵溶液淬灭反应, 用二氯甲烷萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到化合物 15f (980 mg, 淡黄色油状物)。

MS m/z (ESI): 459.4 [M+1]

步骤 7: 化合物 15g 的合成

将 3-溴丙酸 (306 mg, 2.0 mmol) 溶于 10 mL 二氯甲烷中, 加入化合物 15f (916 mg, 2.0 mmol)、DMAP (84 mg, 0.8 mmol)、三乙胺 (248 mg, 2.4 mmol), 搅拌溶解。滴入 EDC.HCL (440 mg, 2.4 mmol) 的二氯甲烷溶液, 滴加完毕后, 室温搅拌 16 小时。加水淬灭, 加入稀盐酸, 调节 pH 值为 1-3, 分液。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物 15g (629 mg, 淡黄色油状物), 产率 53%。

MS m/z (ESI): 593.3 [M+1]

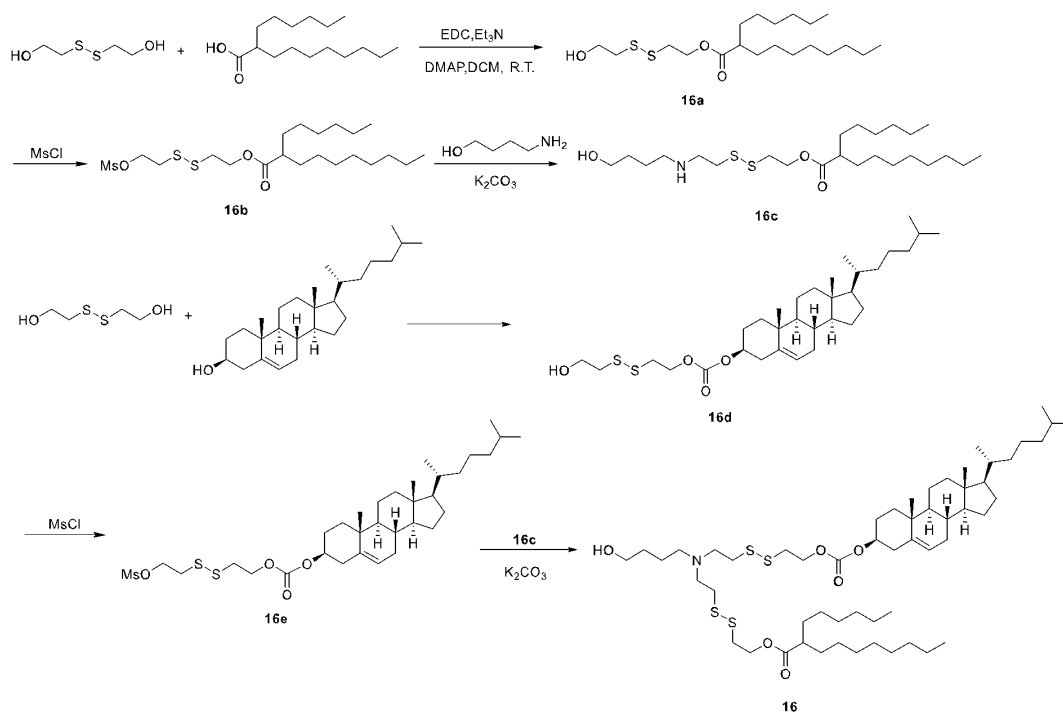
步骤 8: 化合物 15 的合成

将化合物 15d (480 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中, 加入乙腈, 化合物 15g (600 mg, 1.1 mmol), 碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol), 碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol), 在 83°C 下搅拌 16-20 h。冷却至室温, 过滤, 滤渣用二氯甲烷洗涤, 得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液, 用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析分离, 得到化合物 15 (384 mg, 淡黄色油状物), 产率 39%。

MS m/z (ESI): 984.8 [M+1]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 5.40 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 4.53-4.30 (m, 6H), 3.77-3.71 (m, 4H), 3.47-3.31 (m, 2H), 3.12-3.05 (m, 2H), 2.68-2.60 (m, 8H), 2.37-2.25 (m, 6H), 2.10-0.85 (m, 72H), 0.70 (s, 3H)

实施例 16 化合物 16 的合成



步骤 1: 化合物 16a 的合成

将 2-己基癸酸 (1.28 g, 5.0 mmol) 溶于 20 mL 二氯甲烷中, 加入双 (2-羟乙基) 二硫化物 (1.54 g, 10.0 mmol)、DMAP (0.21 g, 2.0 mmol)、三乙胺 (0.62 g, 6.0 mmol), 搅拌溶解。滴入 EDC.HCL (1.10 g, 6.0 mmol) 的二氯甲烷溶液, 滴加完毕后, 室温搅拌 16 小时。加水淬灭, 加入稀盐酸, 调节 pH 值为 1-3, 分液。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析得到化合物 16a (1.00 g, 淡黄色油状物), 产率 51%。

MS m/z (ESI): 393.2 [M+1]

步骤 2: 化合物 16b 的合成

将化合物 16a (1.00 g, 2.5 mmol) 溶于 20 mL 二氯甲烷中, 加入三乙胺 (0.76 g, 7.5 mmol), 冰水浴降温至 0℃, 加入甲基磺酰氯 (0.72 g, 6.2 mmol), 室温搅拌 16-20 h。反应完全, 用饱和碳酸氢钠洗涤 2 次, 水洗涤 2 次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物 16b (1.00 g, 淡黄色油状物), 产率 85%。

MS m/z (ESI): 471.2 [M+1]

步骤 3: 化合物 16c 的合成

将化合物 16b (1.00 g, 2.0 mmol) 溶于 20 mL 乙腈中, 加入碳酸钾 (0.83 g, 6.0 mmol) 和 4-氨基丁醇 (0.18 g, 2.0 mmol), 室温搅拌 16-20 h。反应完全, 硅藻土过滤, 滤液中加入二氯甲烷, 用饱和碳酸氢钠洗涤 2 次, 水洗涤 2 次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩,

得到化合物 16c (658 mg, 淡黄色油状物), 产率 71%。

MS m/z (ESI): 464.3 [M+1]

步骤 4: 化合物 16d 的合成

将胆固醇 (1.93 g, 5.0 mmol) 溶于 20 mL 二氯甲烷中, 加入 4-二甲氨基吡啶 (1.22g, 10 mmol), 再分批次加入对硝基氯甲酸苯酯 (1.11 g, 5.5 mmol), 反应室温搅拌 3h, 在此反应液中加入双 (2-羟乙基) 二硫化物 (0.86 g, 5.6 mmol), 混合物在室温下搅拌过夜, TLC 显示反应完成后, 加入 20 mL 二氯甲烷稀释, 然后用 30 mL 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到产品 16d (1.45 g, 淡黄色油状物), 产率 51%。

MS m/z (ESI): 567.4 [M+1]

步骤 5: 化合物 16e 的合成

将化合物 16d (1.42 g, 2.5 mmol) 溶于 20 mL 二氯甲烷中, 加入三乙胺 (0.76 g, 7.5 mmol), 冰水浴降温至 0℃, 加入甲基磺酰氯 (0.72 g, 6.2 mmol), 室温搅拌 16-20 h。反应完全, 用饱和碳酸氢钠洗涤 2 次, 水洗涤 2 次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物 16e (1.26 g, 淡黄色油状物), 产率 78%。

MS m/z (ESI): 645.3 [M+1]

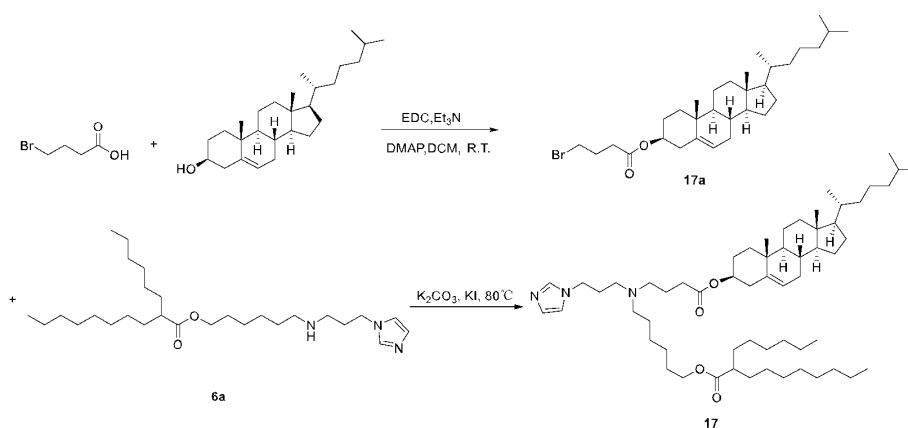
步骤 6: 化合物 16 的合成

将化合物 16e (1.26 g, 2.0 mmol) 溶于 20 mL 乙腈中, 加入碳酸钾 (0.83 g, 6.0 mmol) 和化合物 16c (0.93 g, 2.0 mmol), 室温搅拌 16-20 h。反应完全, 硅藻土过滤, 滤液中加入二氯甲烷, 用饱和碳酸氢钠洗涤 2 次, 水洗涤 2 次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析得到化合物 16 (871 mg, 淡黄色油状物), 产率 43%。

MS m/z (ESI): 1012.7 [M+1]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 5.40 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.20-4.02 (m, 4H), 3.67-3.61 (m, 2H), 3.58-3.50 (m, 2H), 2.47-2.42 (m, 8H), 2.03-1.72 (m, 5H), 1.67-0.85 (m, 74H), 0.70 (s, 3H)

实施例 17 化合物 17 的合成



步骤 1: 化合物 17a 的合成

将 4-溴丁酸 (0.84 g, 5.0 mmol) 溶于 30 mL 二氯甲烷中, 加入胆固醇 (1.94 g, 5.0 mmol)、DMAP (0.21 g, 2.0 mmol)、三乙胺 (0.62 g, 6.0 mmol), 搅拌溶解。滴入 EDC.HCL (1.10 g, 6.0 mmol) 的二氯甲烷溶液, 滴加完毕后, 室温搅拌 16 小时。加水淬灭, 加入稀盐酸, 调节 pH 值为 1-3, 分液。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物 17a (1.68 g, 淡黄色油状物), 产率 63%。

MS m/z (ESI): 535.3 [M+1]

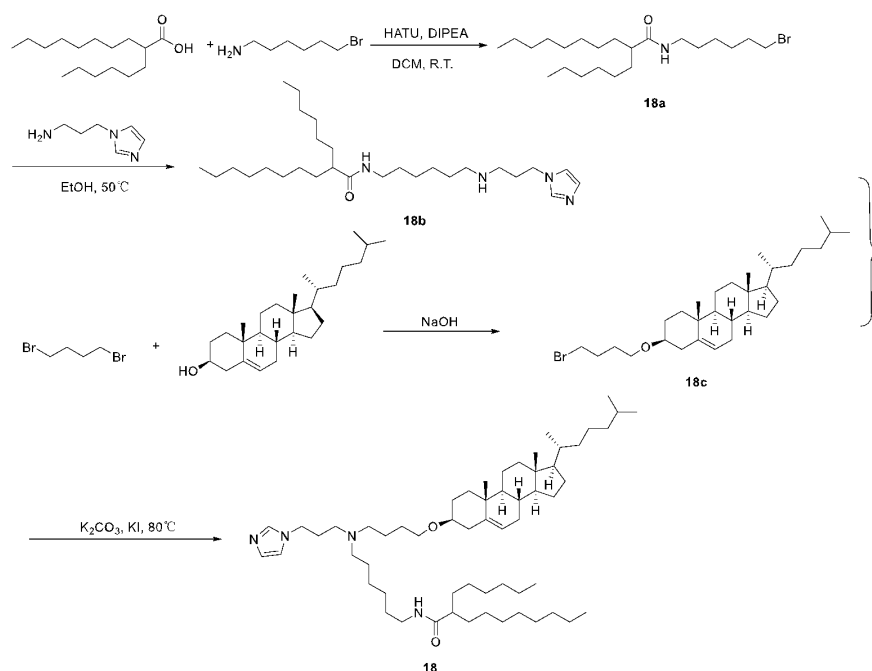
步骤 2: 化合物 17 的合成

将化合物 6a (463 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中, 加入乙腈, 化合物 17a (643 mg, 1.2 mmol), 碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol), 碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol), 在 83°C 下搅拌 16-20 h。冷却至室温, 过滤, 滤渣用二氯甲烷洗涤, 得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液, 用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析分离, 得到化合物 17 (505 mg, 淡黄色油状物), 产率 55%。

MS m/z (ESI): 918.9 [M+1]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 7.49 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 5.40 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.10-3.92 (m, 4H), 2.48-2.25 (m, 11H), 2.10-0.85 (m, 80H), 0.70 (s, 3H)

实施例 18 化合物 18 的合成



步骤 1: 化合物 18a 的合成

将 2-己基癸酸 (2.12 g, 5.0 mmol) 溶于 30 mL 二氯甲烷中, 加入 6-溴己胺盐酸盐 (1.09 g, 5.0 mmol)、HATU (2.28 g, 6.0 mmol)、DIPEA (1.29 g, 10.0 mmol), 室温搅拌 16 小时。加水淬灭, 加入稀盐酸, 调节 pH 值为 1-3, 分液。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物 18a (1.40 g, 淡黄色油状物), 产率 67%。

MS m/z (ESI): 418.3 [M+1]

步骤 2: 化合物 18b 的合成

室温条件下, 将化合物 18a (1.25 g, 3 mmol) 溶于 20 mL 乙醇中, 加入 1-(3-氨基丙基)咪唑 (5.63 g, 45 mmol), 升温至 50°C, 搅拌 8 h, 监控反应进程, 原料消耗完全后降至室温, 45°C 除去乙醇, 用二氯甲烷溶解粗品, 用饱和食盐水洗涤三次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到化合物 18b (1.42 g, 淡黄色油状物)。

MS m/z (ESI): 463.4 [M+1]

步骤 3: 化合物 18c 的合成

将 1,4-二溴丁烷 (2.16 g, 10.0 mmol) 溶于 30 mL 正丁醇中, 加入胆固醇 (1.94 g, 5.0 mmol) 和氢氧化钠 (1.20 g, 30 mmol), 加热回流搅拌 5h。反应完毕后, 加入稀盐酸调节 pH 至中性。旋走正丁醇, 加入 20 mL 二氯甲烷稀释, 然后用 30 mL 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析得到产品 18c (1.25 g, 淡黄色油状物), 产率 48%。

MS m/z (ESI): 521.3 [M+1]

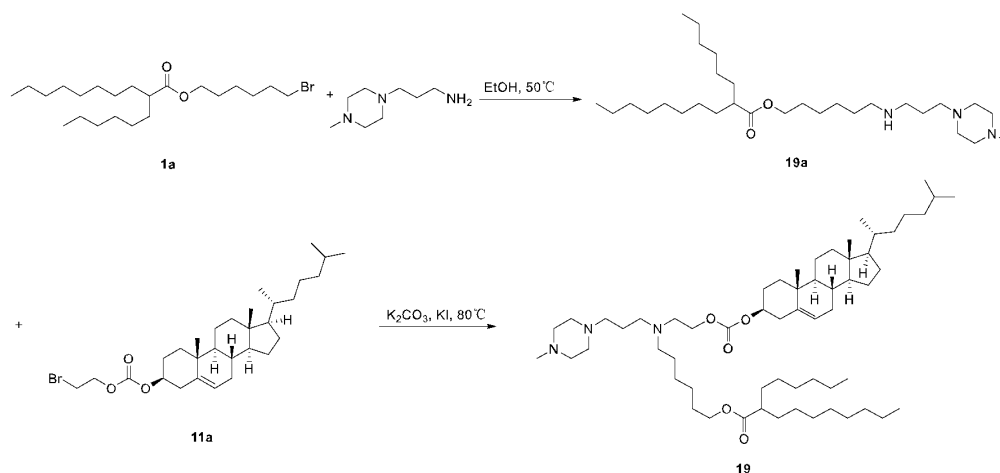
步骤 4: 化合物 18 的合成

将化合物 18b (463 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中, 加入乙腈, 化合物 18c (625 mg, 1.2 mmol), 碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol), 碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol), 在 83°C 下搅拌 16-20 h。冷却至室温, 过滤, 滤渣用二氯甲烷洗涤, 得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液, 用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析分离, 得到产物 18 (434 mg, 淡黄色油状物), 产率 48%。

MS m/z (ESI): 903.9 [M+1]

^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ 8.01 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 5.40 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz), 4.10-3.92 (m, 2H), 3.35 (t, 2H, $J = 5.4$ Hz), 3.28-3.01 (m, 7H), 2.50-2.42 (m, 4H), 2.10-0.85 (m, 83H), 0.70 (s, 3H)

实施例 19 化合物 19 的合成



步骤 1: 化合物 19a 的合成

室温下, 将 6-溴己基 2-己基癸酸酯 1a (1.28 g, 3 mmol) 溶于 20 mL 乙醇中, 加入 1-(3-(氨基丙基)-4-甲基哌嗪 (7.07 g, 45 mmol), 升温至 50°C, 搅拌 8 h, 监控反应进程, 原料消耗完全后降至室温, 45°C 除去乙醇, 用二氯甲烷溶解粗品, 用饱和食盐水洗涤三次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到化合物 19a (1.49 g, 淡黄色油状物)。

MS m/z (ESI): 496.5 [M+1]

步骤 2: 化合物 19 的合成

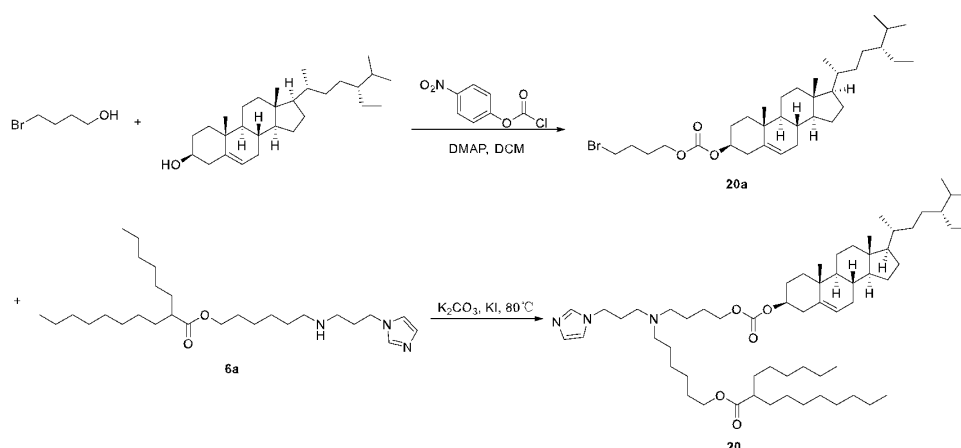
将化合物 19a (496 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中, 加入乙腈, 化合物 11a (646 mg, 1.2 mmol), 碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol), 碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol), 在 83°C 下搅拌 16-20 h。冷却至室温, 过滤, 滤渣用二氯甲烷洗涤, 得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液, 用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析分离, 得到化合物 19

(543 mg, 淡黄色油状物), 产率 57%。

MS m/z (ESI): 952.9 [M+1]

^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ 5.40 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.20-3.95 (m, 6H), 2.74-2.65 (m, 2H), 2.47-2.40 (m, 6H), 2.36-0.85 (m, 90H), 0.70 (s, 3H)

实施例 20 化合物 20 的合成



步骤 1: 化合物 20a 的合成

将 4-溴丁醇 (0.77 g, 5.0 mmol) 溶于 30 mL 二氯甲烷中, 加入 4-二甲氨基吡啶 (1.22 g, 10 mmol), 再分批次加入对硝基氯甲酸苯酯 (1.11 g, 5.5 mmol), 反应室温搅拌 3h, 在此反应液中加入 β -谷甾醇 (2.32 g, 5.6 mmol), 混合物在室温下搅拌过夜, TLC 显示反应完成后, 加入 20 mL 二氯甲烷稀释, 然后用 30 mL 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到产品 20a (1.63 g, 淡黄色油状物), 产率 55%。

MS m/z (ESI): 593.3 [M+1]

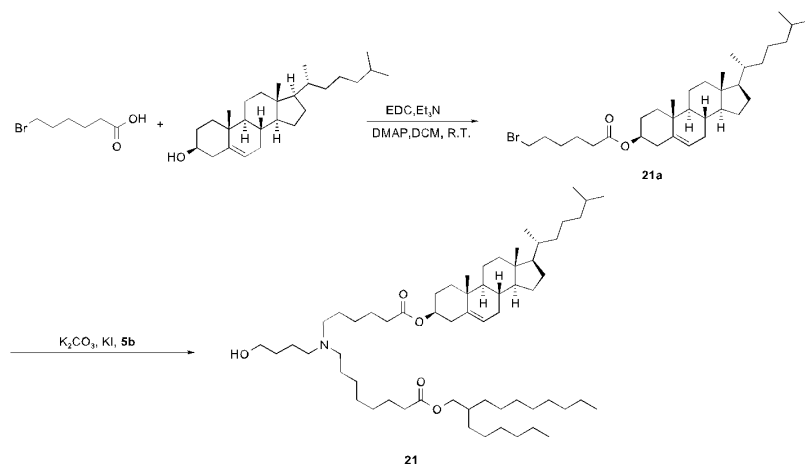
步骤 2: 化合物 20 的合成

将 6-((3-(1H-咪唑-1-基)丙基)氨基)己基 2-己基癸酸酯 6a (463 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中, 加入乙腈, 化合物 20a (713 mg, 1.2 mmol), 碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol), 碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol), 在 83°C 下搅拌 16-20 h。冷却至室温, 过滤, 滤渣用二氯甲烷洗涤, 得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液, 用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析分离, 得到化合物 20 (547 mg, 淡黄色油状物), 产率 56%。

MS m/z (ESI): 976.9 [M+1]

^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ 7.49 (s, 1H), 7.08 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz), 6.93 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz), 5.40 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.20-3.95 (m, 6H), 2.47-2.30 (m, 8H), 2.36-0.85 (m, 87H), 0.70 (s, 3H)

实施例 21 化合物 21 的合成



步骤 1: 化合物 21a 的合成

将 6-溴己酸(0.975 g, 5.0 mmol)溶于 30 mL 二氯甲烷中,加入胆固醇(1.93 g, 5.0 mmol)、DMAP (0.21 g, 2.0 mmol)、三乙胺 (0.62 g, 6.0 mmol), 搅拌溶解。滴入 EDC.HCL (1.10 g, 6.0 mmol) 的二氯甲烷溶液,滴加完毕后,室温搅拌 16 小时。加水淬灭,加入稀盐酸,调节 pH 值为 1-3, 分液。有机相用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩,得到化合物 **21a** (1.92 g, 淡黄色油状物), 产率 68%。

MS m/z (ESI): 563.4 [M+1]

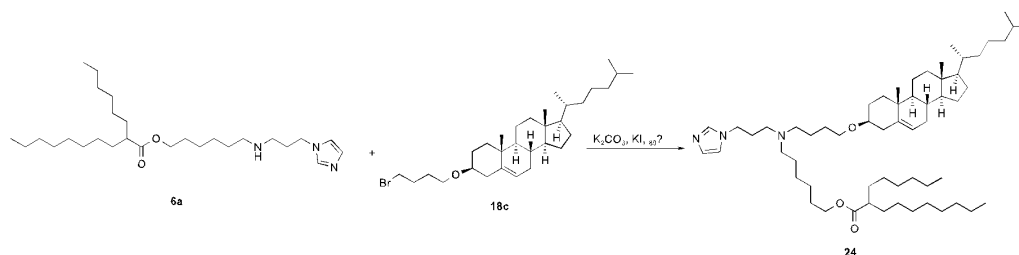
步骤 2: 化合物 21 的合成

将 8-((4-羟基丁基)氨基)辛酸 2-己基酯 **5b** (455 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中,加入乙腈, 6-溴己酸胆固醇酯 **21a** (676 mg, 1.2 mmol), 碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol), 碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol), 在 83°C 下搅拌 16-20h。冷却至室温, 过滤, 滤渣用二氯甲烷洗涤, 得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液, 用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析分离, 得到化合物 **21** (422 mg, 淡黄色油状物), 产率 45%。

MS m/z (ESI): 938.9 [M+1]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.27 (tt, J = 12.5, 2.0 Hz, 1H), 4.64 (p, J = 14.8 Hz, 1H), 4.31 (ddd, J = 103.0, 24.8, 14.1 Hz, 2H), 3.46 (t, J = 14.8 Hz, 2H), 2.78 – 2.63 (m, 6H), 2.44 – 2.27 (m, 4H), 2.27 – 1.47 (m, 21H), 1.45 – 1.15 (m, 47H), 1.15 – 0.96 (m, 4H), 0.95 – 0.83 (m, 21H).

实施例 22 化合物 24 的合成

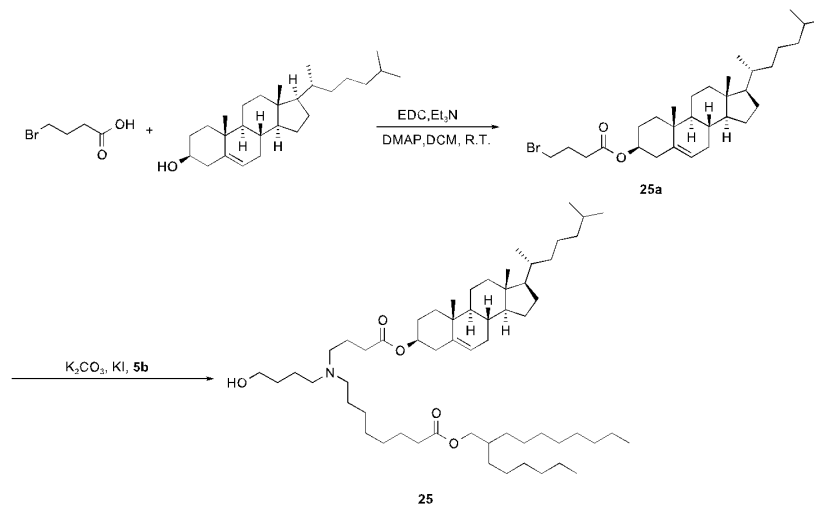


将化合物 **6a** (463 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中, 加入乙腈, 化合物 **18c** (625 mg, 1.2 mmol), 碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol), 碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol), 在 83°C 下搅拌 16-20 h。冷却至室温, 过滤, 滤渣用二氯甲烷洗涤, 得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液, 用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 柱层析分离, 得到产物 **24** (470 mg, 淡黄色油状物), 产率 52%。

MS m/z (ESI): 904.9 [M+1]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.92 (s, 1H), 7.24–6.71 (m, 2H), 5.27 (tt, $J = 12.5, 2.0$ Hz, 1H), 4.17–3.98 (m, 4H), 3.57–3.31 (m, 3H), 2.79–2.63 (m, 4H), 2.47–2.38 (m, 4H), 2.37–1.77 (m, 7H), 1.75–1.00 (m, 58H), 0.96–0.81 (m, 21H).

实施例 23 化合物 25 的合成



步骤 1: 化合物 25a 的合成

将 4-溴丁酸 (0.835 g, 5.0 mmol) 溶于 30 mL 二氯甲烷中, 加入胆固醇 (1.93 g, 5.0 mmol)、DMAP (0.21 g, 2.0 mmol)、三乙胺 (0.62 g, 6.0 mmol), 搅拌溶解。滴入 EDC.HCL (1.10 g, 6.0 mmol) 的二氯甲烷溶液, 滴加完毕后, 室温搅拌 16 小时。加水淬灭, 加入稀盐酸, 调节 pH 值为 1-3, 分液。有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物 **25a** (1.90 g, 淡黄色油状物), 产率 71%。

MS m/z (ESI): 535.4 [M+1]

步骤 2：化合物 25 的合成

将 8-((4-羟基丁基)氨基)辛酸 2-己基癸酯 **5b** (455 mg, 1.0 mmol) 溶于四氢呋喃中，加入乙腈，4-溴丁酸胆固醇酯 **21a** (643 mg, 1.2 mmol)，碳酸钾 (550 mg, 4.0 mmol)，碘化钾 (332 mg, 2.0 mmol)，在 83℃下搅拌 16-20h。冷却至室温，过滤，滤渣用二氯甲烷洗涤，得到的滤液中加入饱和碳酸氢钠溶液，用二氯甲烷萃取 2 次，合并有机相，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩，柱层析分离，得到化合物 **25** (373 mg，淡黄色油状物)，产率 41%。

MS m/z (ESI): 910.9 [M+1]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.27 (tt, J = 12.5, 2.0 Hz, 1H), 4.68 (p, J = 14.8 Hz, 1H), 4.31 (ddd, J = 103.0, 24.8, 13.0 Hz, 2H), 3.46 (t, J = 14.8 Hz, 2H), 2.79 – 2.62 (m, 4H), 2.43 (td, J = 12.2, 6.0 Hz, 4H), 2.37 – 2.11 (m, 3H), 2.11 – 1.80 (m, 9H), 1.79 – 1.46 (m, 11H), 1.45 – 1.15 (m, 43H), 1.14 – 0.98 (m, 4H), 0.97 – 0.80 (m, 21H).

实施例 24：三组分 LNP 组合物对 mRNA-的包裹及 LNP-mRNA 表征

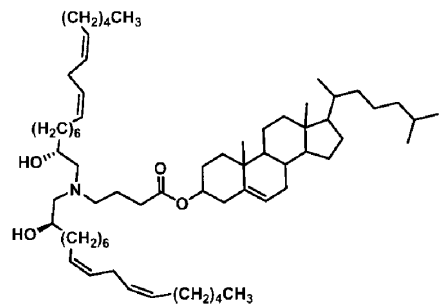
以 GFP mRNA 为例，进行类固醇-阳离子脂质三组分 LNP-mRNA 疫苗构建的展示：将本发明脂质化合物、辅助脂质、聚乙二醇脂质按照表 1 的摩尔比溶解在乙醇溶液中获得脂质混合物，将 mRNA 溶解在 pH 4.0 醋酸缓冲液中，将脂质混合物和 mRNA 以流速比 1:3 通过微流控设备 Precision Nanosystems 的纳米颗粒制备仪器 Ignite 制备 mRNA-LNP 组合物（具体配方见表 1）。将包装好的 mRNA-LNP 透析并超滤浓缩到 DPBS 中，无菌过滤后获得用于后续动物实验的样品。取样检测包封率、平均粒径、PDI 及 Zeta 电位。

表 1 类固醇-阳离子脂质化合物形成的三组分 LNP 的脂质配方摩尔百分比和氮磷比

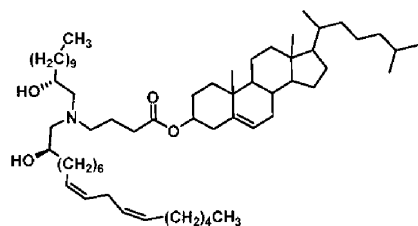
组别编号	脂质配方（摩尔百分比）	氮磷比
LNP1	化合物 1：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	6
LNP2	化合物 2：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	4
LNP3	化合物 3：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	8
LNP4	化合物 4：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	6
LNP5	化合物 5：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	6
LNP6	化合物 6：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	8
LNP7	化合物 7：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	6
LNP8	化合物 8：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	6
LNP9	化合物 9：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	8
LNP10	化合物 10：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	8

LNP11	化合物 11：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	8
LNP12	化合物 12：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	6
LNP13	化合物 13：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	6
LNP14	化合物 14：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	6
LNP15	化合物 15：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	6
LNP16	化合物 16：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	6
LNP17	化合物 17：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	6
LNP18	化合物 18：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	6
LNP19	化合物 19：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	10
LNP20	化合物 20：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	6
LNP21	化合物 1：DSPC：DMG-PEG2000 = 73.87:24.62:1.5	6
LNP22	化合物 1：DSPC：DMG-PEG2000 = 65.7:32.8:1.5	6
LNP23	化合物 2：DOPE：DMG-PEG2000 = 73.87:24.62:1.5	4
LNP24	化合物 6：DSPC：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	6
LNP25	化合物 6：DOPE：DMG-PEG2000 = 65：33：2	6
LNP26	化合物 10：DOPE：DMG-PEG2000 = 47.25：47.25：5	8
LNP27	化合物 11：DSPC：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	8
LNP28	化合物 11：DOPE：DMG-PEG2000 = 65：33：2	8
对照组 1	专利 CN112424214A 化合物（1）：DOPE：DMG-PEG2000 = 49.25：49.25：1.5	6
对照组 2	专利 CN112424214A 化合物（2）：DOPE：DMG-PEG2000=49.25：49.25：1.5	6
对照组 3	专利 CN112424214A 化合物（3）：DOPE：DMG-PEG2000=49.25：49.25：1.5	6
对照组 4	专利 US7514099B2 化合物（CLinDMA）：DOPE：DMG-PEG2000= = 49.25：49.25：1.5	6
对照组 5	ALC-0315：DSPC：胆固醇：DMG-PEG2000 = 50：10：38.5：1.5	6

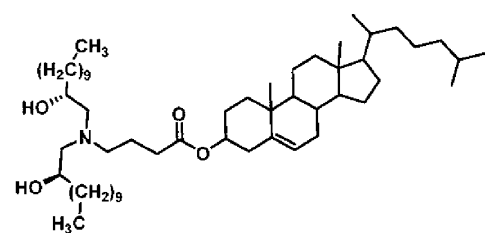
其中，专利 CN112424214A 化合物（1）



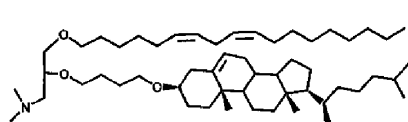
专利 CN112424214A 化合物 (2)



专利 CN112424214A 化合物 (3)



专利 US7514099B2 化合物 (CLinDMA) :



如表 2 所示,结果表明本发明的类固醇-阳离子脂质与辅助磷酸酯、聚乙二醇脂质和 mRNA 形成的组合物具有较好的理化性能,例如平均粒径在 60-100 nm 之间,PDI 均小于 0.2,具有较好的多分散系数;zeta 电势为±10 mV 之间,具有较小的弱电性;包封率均大于 85%。本发明提供的三组分脂质纳米颗粒配方的 PDI 和 mRNA 包封率均优于 CN112424214A 和 US7514099B2 提供的脂质化合物制成的脂质纳米颗粒配方。侧链为支链结构的化合物制成的 LNP 对 mRNA 的包封率高于直链结构的化合物制成的 LNP (LNP7 和 LNP8)。由此证明本发明提供的类固醇-阳离子脂质化合物所制成的三组分 LNP 可以对 mRNA 实现高效的包封。

表 2 类固醇-阳离子脂质化合物形成的三组分 GFP-mRNA-LNP 组合物参数表征

样品	平均粒径 (nm)	PDI	Zeta 电位 (mV)	包封率 (%)
LNP1	84.16	0.0950	-0.6080	98
LNP2	101.82	0.1805	0.4262	85
LNP3	75.95	0.1208	1.017	93
LNP4	67.47	0.1301	-4.773	95
LNP5	73.13	0.1118	3.376	90
LNP6	60.56	0.1955	3.213	97

LNP7	75.70	0.2175	-9.268	80
LNP8	61.97	0.2181	-0.4146	81
LNP9	72.86	0.1925	-4.955	89
LNP10	73.43	0.1345	-0.4146	89
LNP11	86.8	0.0805	-3.400	91
LNP12	93.62	0.1175	-6.023	88
LNP13	64.07	0.1645	1.692	89
LNP14	73.43	0.1345	-0.4146	89
LNP15	81.68	0.1087	-4.955	87
LNP16	70.23	0.1483	0.8040	95
LNP17	67.47	0.1638	5.283	97
LNP18	75.95	0.0947	-0.3641	94
LNP19	75.25	0.0832	-7.539	93
LNP20	92.76	0.1104	-2.188	93
LNP21	72.36	0.1523	4.382	92
LNP22	55.89	0.1850	14.40	99
LNP23	66.16	0.1923	1.859	86
LNP24	64.83	0.1667	0.7289	87
LNP25	60.56	0.1481	3.213	97
LNP26	65.27	0.1756	2.656	86
LNP27	58.27	0.1807	12.53	99
LNP28	95.91	0.1555	0.4262	91
对照组 1	123.30	0.2334	3.269	78
对照组 2	138.27	0.2150	3.564	79
对照组 3	89.93	0.1938	-8.152	78
对照组 4	141.30	0.2226	-2.365	77
对照组 5	73.13	0.0486	-3.222	92

实施例 25：编码 GFP 的 mRNA-LNPs 组合物的细胞实验

将细胞密度为 6.5×10^5 细胞/mL 的 Hep3B 细胞以 1 mL/孔的量接种到 24 孔细胞培养板中，24 小时后每孔转染 500 ng GFP mRNA-LNP (实施例 24 制备)后将细胞培养板置于 37°C，

5% CO₂ 细胞培养箱中培养，阴性对照组转染等体积生理盐水。24 小时后，显微镜拍照成像，结果如图 1 所示。结果表明，使用本发明所述的类固醇-阳离子脂质化合物形成的三组分 LNP 组合物可以实现 GFP-mRNA 在细胞内的高表达，表达水平明显高于对照组。其中，脂肪链结构为支链结构的化合物组成的 LNP 对 mRNA 的包封和递送效率高于脂肪链结构为直链结构的化合物，其可能原因是这种支链结构造作脂质层更容易由层状相转为反六角相，从而利于 mRNA 的释放，提高了转染效率。

实施例 26：新冠抗原 mRNA-LNP 组合物的动物免疫试验

使用新冠病毒 S 蛋白抗原 mRNA 按实施例 24 中表 1 脂质配方进行新冠病毒抗原 mRNA-LNP 的制备。将 6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠按 5 只/组随机分组，采用后腿肌肉注射的免疫途径进行免疫。分别在第 0 天和第 14 天免疫给药，免疫剂量为 3 μg mRNA-LNP，阴性对照组注射等体积的生理盐水。分别在免疫后第 14 天采血并分离血清，用 ELISA 法检测针对 SARS-CoV2 病毒 S 蛋白抗原的特异性抗体滴度，在第 28 天进行 ICS 抗原特异性细胞免疫检测，结果如图 2、图 3a 和图 3b 所示，LNP1、LNP5、LNP6、LNP10 和 LNP11 实验组均可以诱导较好的体液免疫和细胞免疫（其中，图 2 各组中左侧为一免后 IgG 抗体滴度，右侧为二免后 IgG 抗体滴度，图 3a 和图 3b 各组中从左到右分别为 TNF α +、TNF γ +、IL2+、IL4+、IL5+）。

实施 27 胆固醇阳离子化合物的安全性评价

将新冠病毒抗原 mRNA-LNP 复合物以 30 ug 剂量通过肌注方式接种到 CD1 小鼠体内，阴性对照组注射等体积的生理盐水,通过监测小鼠系统性炎症因子 IL-6 来评价基于化合物 1、化合物 6 和化合物 11 三组分 LNP 的安全性。如图 4 所示，在高剂量给药后，基于化合物 1、化合物 6 和化合物 11 的三组分 LNP 实验组所引起的系统性的炎症因子 IL-6 的表达水平较已上市化合物 ALC-0315 的四组分 LNP 有显著的降低。

实施例 28 胆固醇阳离子脂质化合物三组分 LNP 的冻干研究

以 GFP-mRNA-LNP 复合物为例，将 mRNA-LNP 溶解在含有 10% 质量分数蔗糖的 20 mM Tris-乙酸钠 pH 7.5 缓冲溶液中，取 300 μL 分装至 3 mL 西林瓶中进行冷冻干燥。冷冻干燥程序：预冻阶段：-30℃ 2 小时；解吸干燥阶段：25℃，1 小时；升华干燥阶段：-40℃ 2h，-20℃ 2h，全程真空压力控制≤10Pa。2-8℃稳定性放置 1 个月。无菌无酶水复溶后检测 mRNA 总量、游离 mRNA 浓度、包封率和 mRNA 完整性。

表 3 LNP 冻干前后关键质量属性变化

样品实验组	平均粒径 (nm)	PDI	Z-电势 (mV)	包封率 (%)
-------	--------------	-----	--------------	------------

LNP1	冻干前	84.16	0.0950	-0.608	98
	冻干后	90.13	0.0980	-2.130	96
LNP2	冻干前	101.82	0.1805	0.4262	85
	冻干后	110.23	0.1870	-4.12	84
LNP3	冻干前	75.95	0.1208	1.017	93
	冻干后	84.80	0.1500	-2.21	90
LNP4	冻干前	67.47	0.1301	-4.773	95
	冻干后	80.12	0.1120	-4.31	95
LNP5	冻干前	73.13	0.1118	3.376	90
	冻干后	83.12	0.1240	1.223	85
LNP6	冻干前	60.56	0.1955	3.213	97
	冻干后	75.12	0.1520	-4.11	92
LNP7	冻干前	75.70	0.2175	-9.268	80
	冻干后	72.15	0.0710	-10.23	74
LNP8	冻干前	61.97	0.2181	-0.4146	81
	冻干后	80.23	0.1422	-3.78	75
LNP9	冻干前	72.86	0.1925	-4.955	89
	冻干后	79.23	0.1650	-4.83	85
LNP10	冻干前	73.43	0.1345	-0.4146	89
	冻干后	90.13	0.0923	-3.98	85
LNP11	冻干前	86.80	0.0805	-3.4	91
	冻干后	90.12	0.0912	-3.11	88
LNP12	冻干前	93.62	0.1175	-6.023	88
	冻干后	113.40	0.1210	-6.24	83
LNP13	冻干前	64.07	0.1645	1.692	89
	冻干后	86.77	0.2000	-4.35	84
LNP14	冻干前	73.43	0.1345	-0.4146	89
	冻干后	82.13	0.1025	-0.1254	85
LNP15	冻干前	81.68	0.1087	-4.955	87
	冻干后	90.01	0.0856	3.66	83

LNP16	冻干前	70.23	0.1483	0.804	95
	冻干后	78.21	0.1325	1.265	92
LNP17	冻干前	67.47	0.1638	5.283	97
	冻干后	75.36	0.1325	4.12	95
LNP18	冻干前	75.95	0.0947	-0.3641	94
	冻干后	80.23	0.0845	0.0125	90
LNP19	冻干前	75.25	0.0832	-7.539	93
	冻干后	83.35	0.1036	-3.216	89
LNP20	冻干前	92.76	0.1104	-2.188	93
	冻干后	100.20	0.1202	1.255	90
LNP21	冻干前	72.36	0.1523	4.382	92
	冻干后	81.20	0.1236	2.565	90
LNP22	冻干前	55.89	0.1850	14.4	99
	冻干后	65.02	0.1256	10.32	95
LNP23	冻干前	66.16	0.1923	1.859	86
	冻干后	73.25	0.1462	3.654	81
LNP24	冻干前	64.83	0.1667	0.7289	87
	冻干后	73.26	0.1526	6.325	83
LNP25	冻干前	60.56	0.1481	3.213	97
	冻干后	68.36	0.1256	7.541	92
LNP26	冻干前	65.27	0.1756	2.656	86
	冻干后	73.84	0.1862	5.625	82
LNP27	冻干前	58.27	0.1807	12.53	99
	冻干后	66.19	0.1484	13.24	95
LNP28	冻干前	95.91	0.1555	0.4262	91
	冻干后	103.75	0.1654	3.785	88
对照 组 1	冻干前	123.30	0.2334	3.269	78
	冻干后	140.35	0.2126	7.364	71
对照 组 2	冻干前	138.27	0.2150	3.564	79
	冻干后	151.27	0.3080	7.625	70

对照 组 3	冻干前	89.93	0.1938	-8.152	78
	冻干后	112.36	0.2322	0.2562	71
对照 组 4	冻干前	141.30	0.2226	-2.365	77
	冻干后	136.90	0.1792	3.185	70
对照 组 5	冻干前	73.13	0.0486	-3.222	92
	冻干后	109.55	0.1560	3.611	63

结果见表 3。本发明提供的脂质化合物制成的三组分 LNP 冻干后其稳定性（例如粒径、PDI 和包封率参数）明显高于对照组。本发明提供的脂质化合物制成的 LNP 冻干前后粒径变化均小于 10 nm 以下，包封率变化也均在 6%以内；而对照组的 LNP 冻干后粒径增大高于 10 nm，且 mRNA 包封率变化也均高于 10%。

实施例 29 胆固醇阳离子脂质化合物三组分 LNP 的雾化研究

使用 GFP-mRNA-LNP 复合物，mRNA-LNP 经雾化器雾化后收集雾滴，使用纳米粒度检测仪检测粒径、PDI 和电势电位，使用 Ribogreen 检测试剂盒检测含量和包封率。

表 4 LNP 雾化前后关键质量属性参数

样品实验组		平均粒径 (nm)	PDI	Z-电势 (mV)	包封率 (%)
LNP1	雾化前	84.16	0.0950	-0.608	98
	雾化后	154.73	0.2077	-11.67	94
LNP4	雾化前	67.47	0.1301	-4.773	95
	雾化后	156.82	0.2130	-9.132	94
LNP5	雾化前	73.13	0.1118	3.376	90
	雾化后	163.90	0.1868	-7.954	90
LNP10	雾化前	73.43	0.1345	-0.4146	89
	雾化后	144.66	0.2000	-3.856	81
对照组 3	雾化前	89.93	0.1938	-8.152	78
	雾化后	190.38	0.2353	-20.13	48
对照组 4	雾化前	141.30	0.2226	-2.365	77
	雾化后	207.55	0.3927	-15. 57	38
对照组 5	雾化前	73.13	0.0486	-3.222	92
	雾化后	239.43	0.5013	-25.71	未检出

实验结果如表 4 和图 5 所示, LNP1、LNP4、LNP5 和 LNP10 样品经雾化后, 其粒径、PDI 和包封率等关键质量属性变化较小, 雾化后依然保持着较好的颗粒状态、包封率变化也低于 10%以内。相较而言, 对照组 3 和 4 的 LNP 配方在雾化后的粒径接近 200 nm, 包封率也下降至接近 40%, 对照组 5 的基于 ALC-0315 的四组分 LNP 雾化后颗粒结构被破坏, 包封率甚至未能检测到。将雾化后样品转染至 Hep3B 细胞中, 500 ng mRNA-LNP/10⁵ 个细胞/孔, 24 小时后显微镜成像检测 GFP 表达水平, 结果如图 6 所示, 对照组 3 和 4 的 LNP 配方雾化后样品的细胞表达较弱, LNP1、LNP4、LNP5 和 LNP10 四组样品雾化后仍能保留着较好的细胞转染活性, 而四组分 LNP 雾化后并无细胞表达。

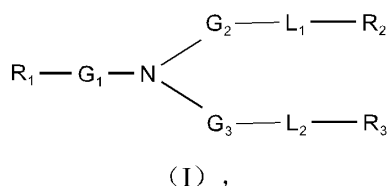
实施例 30 小鼠雾化吸入 LNP 后肺部的表达情况

按实施例 24 操作过程, 使用 LNP4、LNP5、LNP10 配方对 Luc mRNA 进行包载, 选用 7-9 周龄的 C57BL/6 雌性小鼠, 经雾化给药 10 ug Luc-mRNA-LNP 复合物。给药 6 小时后, 将小鼠麻醉后腹腔注射荧光底物, 将小鼠处死解剖, 分别对心、肝、脾、肺和肾进行荧光成像, 并统计荧光总量子数, 结果如图 7a 和图 7b 所示 (其中, 图 7b 各组中从左到右分别为 LNP4、LNP5 和 LNP10)。小鼠经雾化吸入 Luc-mRNA-LNP 后, 肺部可检测到非常强的荧光表达。这表明, LNP4、LNP5 和 LNP10 经雾化吸入后可实现 mRNA 在小鼠肺部的选择性表达, 从而进一步说明我们设计的基于胆固醇阳离子脂质化合物的三组分 LNP 可用于 mRNA 的雾化吸入治疗的应用中。

最后应说明的是: 以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案, 而非对其限制; 尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明, 本领域的普通技术人员应当理解: 其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改, 或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换; 而这些修改或者替换, 并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

权 利 要 求 书

1、式(I)所示化合物



其中, R_1 选自 $-\text{OR}_4$ 、 $-\text{NR}_4\text{R}_5$ 、 $-\text{NR}_4\text{C}(=\text{O})\text{R}_5$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_5$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}_5$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}_5$ 、 $-\text{CN}$ 、含氮杂环基团或胍基;

R_4 、 R_5 各自独立地选自 H 、 C_{1-9} 烷基、 C_{2-9} 烯基、 C_{2-9} 炔基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{3-8} 环烯基或 C_{3-8} 环炔基;

G_1 选自化学键(-)、 C_{1-9} 亚烷基、 C_{2-9} 亚烯基、 C_{3-9} 亚炔基、 C_{3-8} 环亚烷基或 C_{3-8} 环亚烯基;

优选地, R_1 - G_1 -连续碳原子数不超过 10 个;

G_2 、 G_3 各自独立地选自化学键(-)、 C_{1-12} 亚烷基、 C_{2-12} 亚烯基、 C_{2-12} 亚炔基、 C_{3-12} 环亚烷基、 C_{3-12} 环亚烯基、 C_{3-12} 环亚炔基或 C_{6-12} 亚芳基;

L_1 、 L_2 各自独立地选自化学键(-)、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{NR}_a-$ 、 $-\text{NR}_a(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_x-$ 、 $-\text{OS}(\text{O})_x\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$ 、 $-\text{SC}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NR}_a\text{C}(=\text{O})\text{NR}_b-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}_a-$ 、 $-\text{NR}_a\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{S}-$ 、 $-\text{SC}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}_a)\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}_a)\text{O}-$ 或 C_{1-12} 亚烷基中一种或多种的组合;

x 选自 0、1 或 2;

R_a 、 R_b 各自独立地选自 H 、 C_{1-12} 烷基、 C_{2-12} 烯基或 C_{2-12} 炔基;

R_2 选自天然存在或非天然存在的类固醇;

R_3 选自天然存在或非天然存在的类固醇、 C_{6-24} 烷基、 C_{6-24} 烯基、 C_{6-24} 炔基或 C_{6-24} 烷氧基。

2、根据权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 所述 R_1 选自 $-\text{OR}_4$ 、 $-\text{NR}_4\text{R}_5$ 、吡啶基、咪唑基、哌嗪基、烷基哌嗪、哌啶基、烷基哌啶、胍基、吡咯基或吡咯烷基; 所述 R_4 、 R_5 各自独立地选自 H 、 C_{1-9} 烷基、 C_{2-9} 烯基、 C_{2-9} 炔基、 C_{3-8} 环烷基或 C_{3-8} 环烯基;

所述 G_1 为化学键(-)、 C_{1-9} 亚烷基、 C_{2-9} 亚烯基、 C_{3-8} 环亚烷基或 C_{3-8} 环亚烯基;

优选地, 所述 G_1 为 C_{1-6} 亚烷基或 C_{2-6} 亚烯基;

优选地, 所述 R_1 - G_1 -连续碳原子数不超过 10 个;

所述 G_2 、 G_3 各自独立地选自化学键(-)、 C_{1-12} 亚烷基、 C_{2-12} 亚烯基或 C_{2-12} 亚炔基;

所述 L_1 、 L_2 各自独立地选自 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{NR}_a\text{C}(=$

O)O-、-(C=O)NR_a-、-NR_a(C=O)-、-C(=O)S-、-SC(=O)-、-OC(=O)NR_a-或 C₁₋₁₂ 亚烷基中一种或多种的组合；

其中, R_a 为 H、C₁₋₁₂ 烷基、C₂₋₁₂ 烯基或 C₂₋₁₂ 炔基。

3、根据权利要求1所述的化合物，其特征在于，所述R₁选自-OR₄、-NR₄R₅、咪唑基、哌嗪基或胍基；

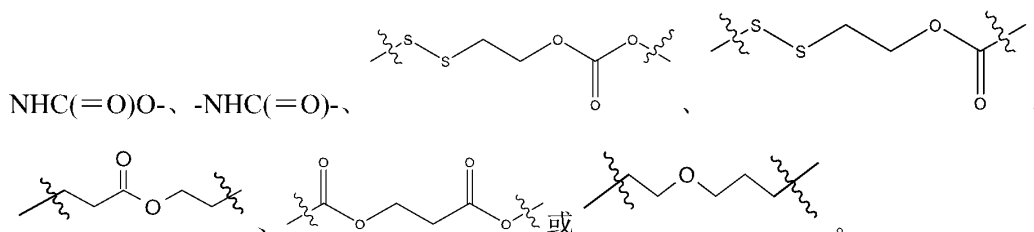
所述 R₄、R₅ 各自独立地选自 H、C₁₋₅ 烷基;

所述 G₁ 为未取代的 C₁₋₆ 亚烷基;

优选地，所述 R₁-G₁-连续碳原子数不超过 10 个；

所述 G₂、G₃ 各自独立地选自化学键(-)、C₁₋₁₀ 亚烷基;

所述 L₁、L₂ 各自独立地选自 -O-、-O(C=O)-、-O(C=O)O-、-(C=O)O-、-(C=O)S-、-



4、根据权利要求1所述的化合物，其特征在于，所述R₂为甾醇；

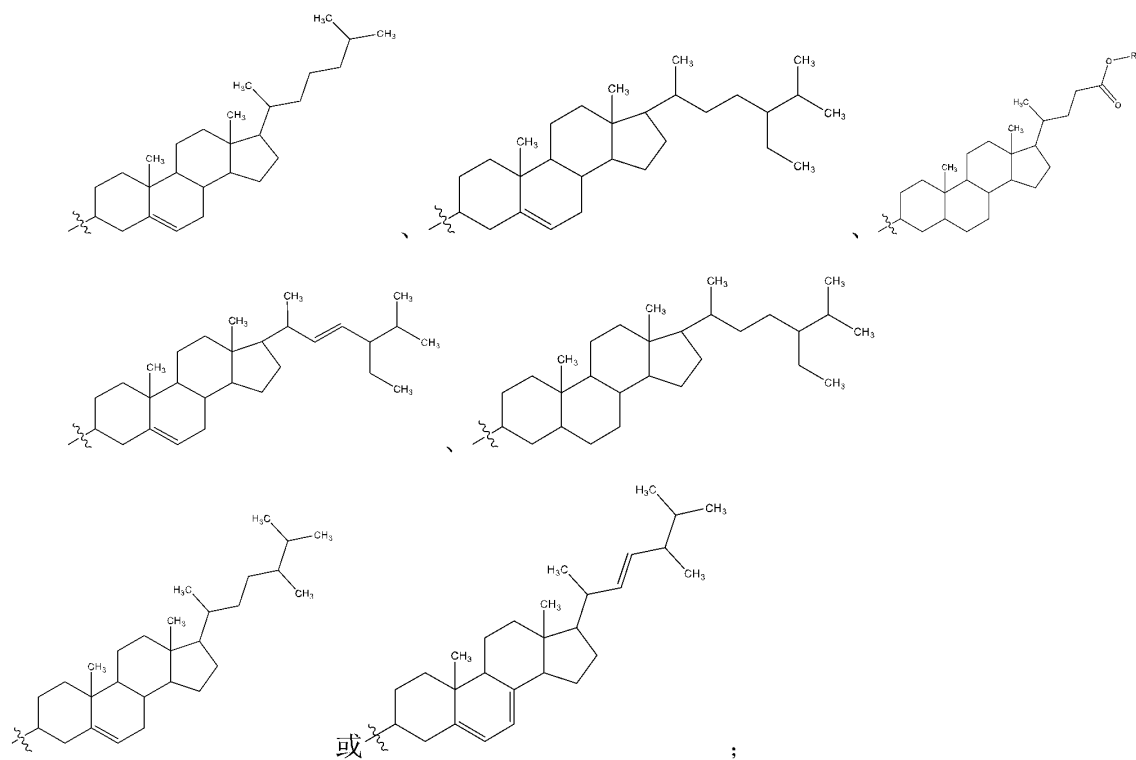
优选地，所述甾醇为动物甾醇，或者其氧化形式或还原形式；和/或，所述甾醇为植物甾醇，或者其氧化形式或还原形式；和/或，所述甾醇为合成甾醇，或者其氧化形式或还原形式；

更优选地,所述甾醇选自胆固醇、胆固醇的氧化形式、胆固醇的还原形式、石胆酸烷基酯、豆甾醇、豆甾烷醇、菜油甾醇、麦角甾醇或谷甾醇;

更优选地, 所述甾醇为胆固醇的氧化形式、胆固醇的还原形式、石胆酸烷基酯、豆甾醇、豆甾烷醇、菜油甾醇、麦角甾醇或谷甾醇;

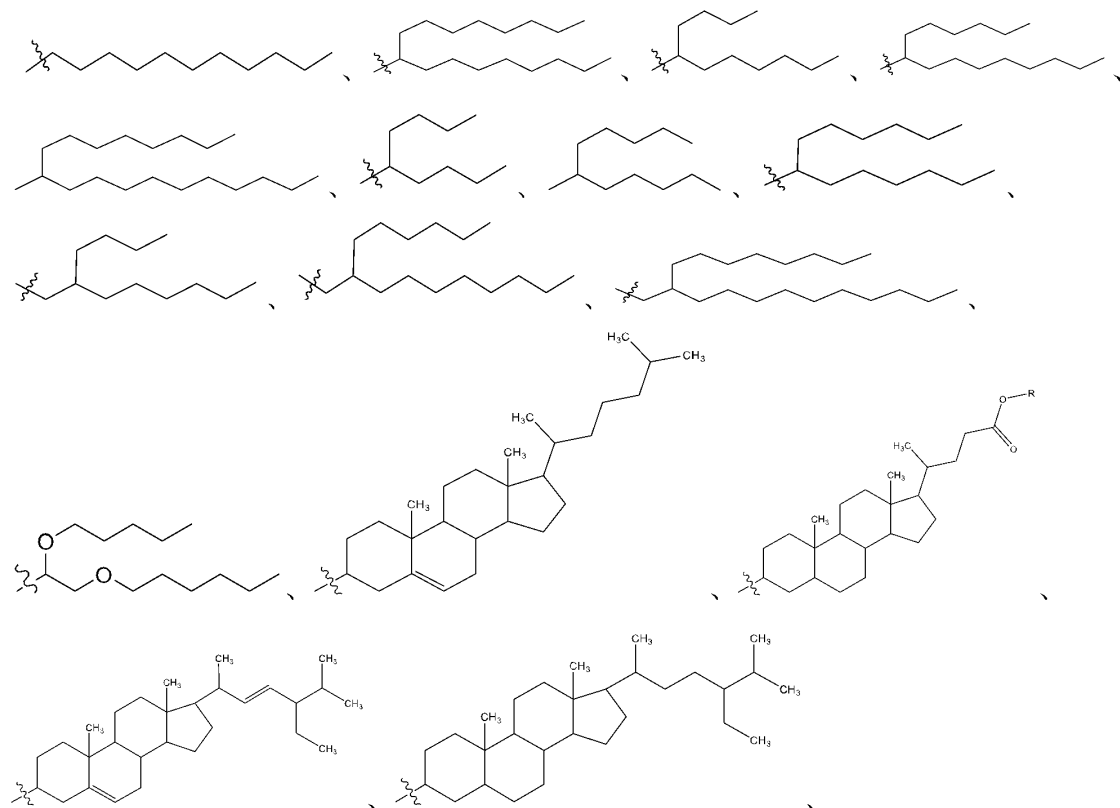
更优选地,所述甾醇选自燕麦甾醇、 β -谷甾醇、菜子甾醇、麦角骨化醇、菜油甾醇、胆甾烷醇、胆固醇、粪甾醇、脱氢胆固醇、链甾醇、二氢麦角骨化醇、二氢胆固醇、二氢麦角甾醇、黑海甾醇、表胆甾醇、麦角甾醇、岩藻甾醇、六氢光甾醇、羟基胆固醇、羊毛甾醇、光甾醇、海藻甾醇、谷甾烷醇、谷甾醇、豆甾烷醇、豆甾醇、胆酸、甘氨胆酸、牛磺胆酸、脱氧胆酸或石胆酸;

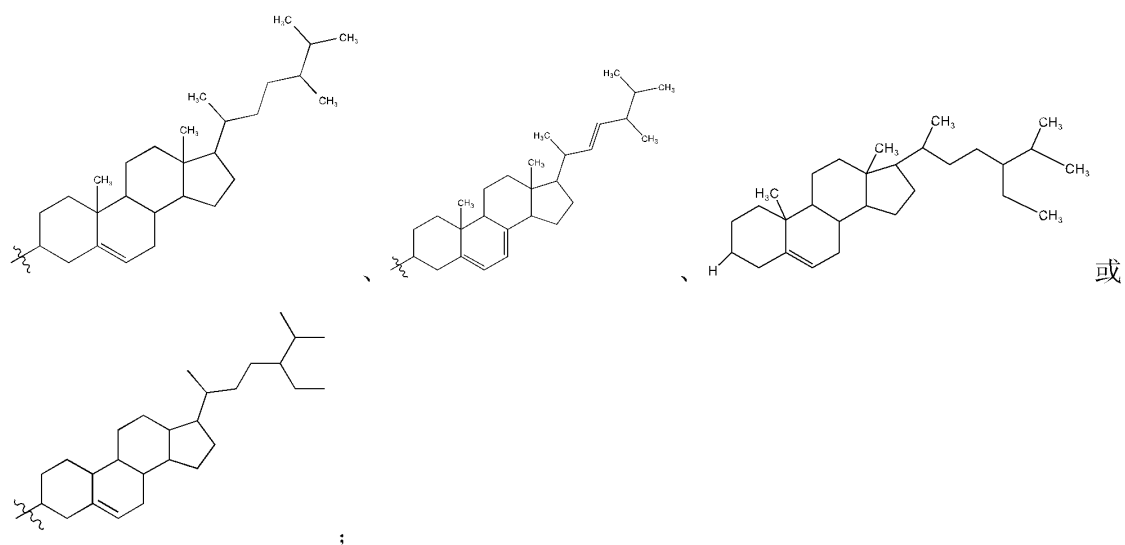
更优选地，所述甾醇的结构式如下：



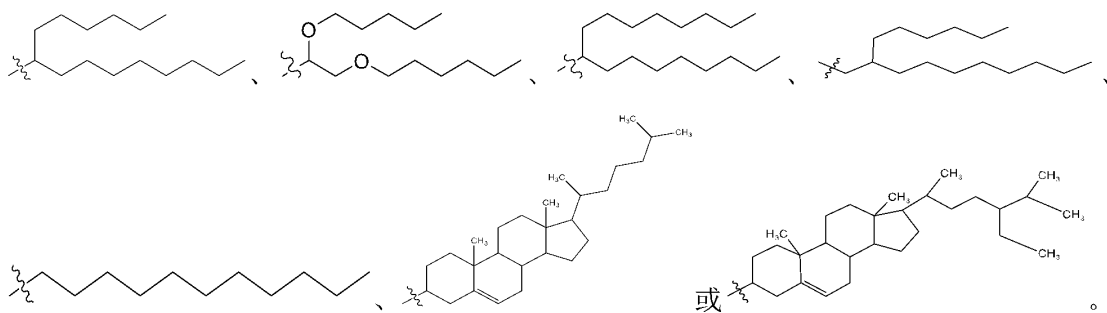
其中, R 为 C_{1-20} 烷基。

5、根据权利要求 1~4 中任一项所述的化合物, 其特征在于, 所述 R_3 选自:

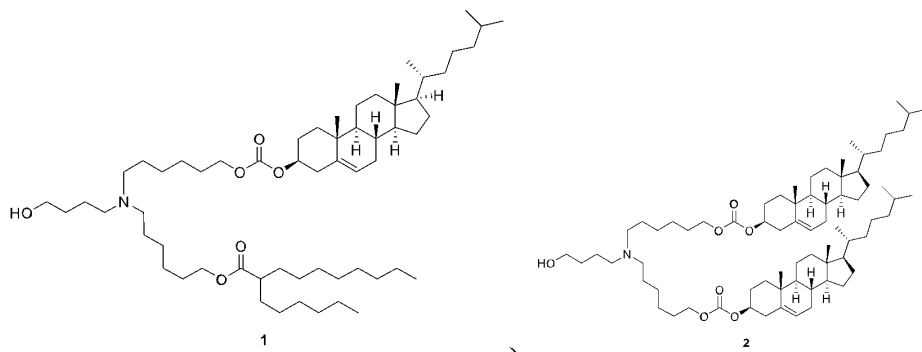


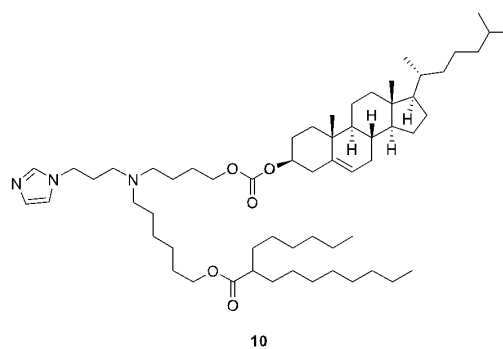
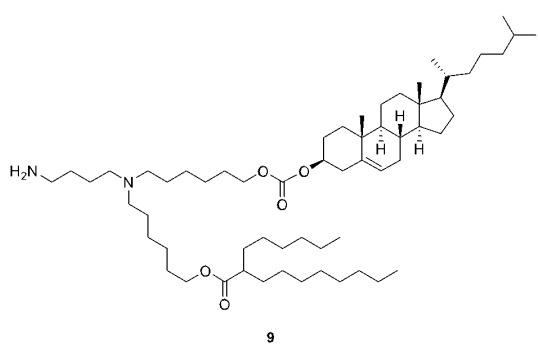
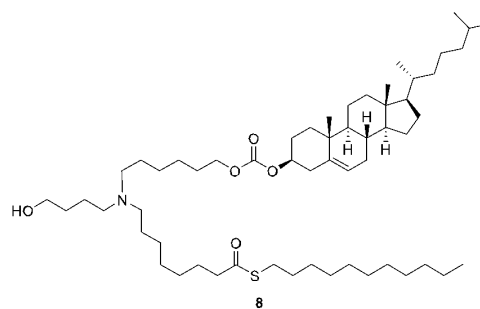
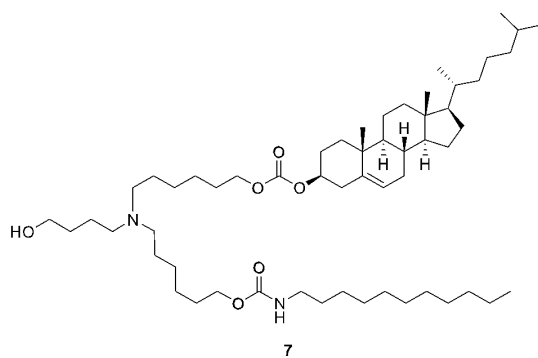
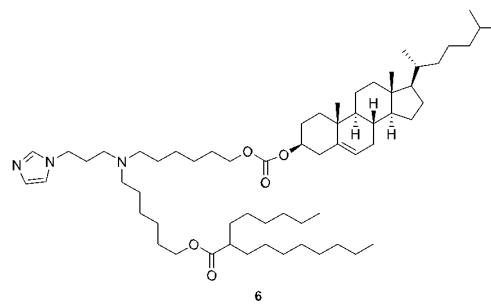
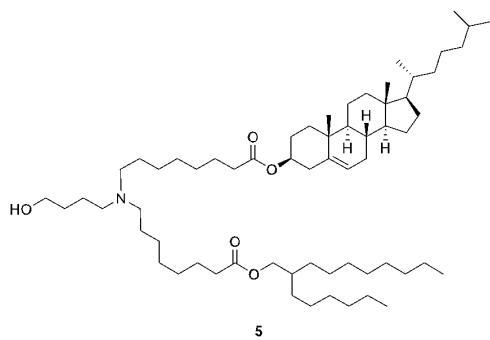
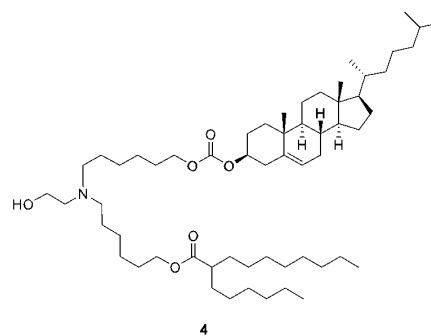
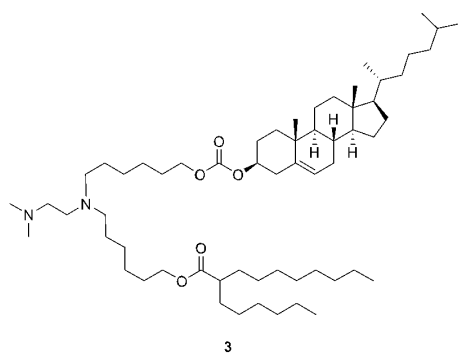


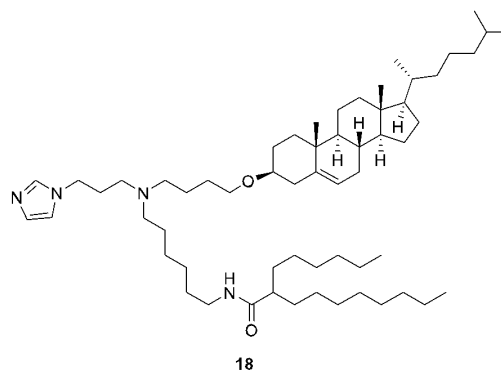
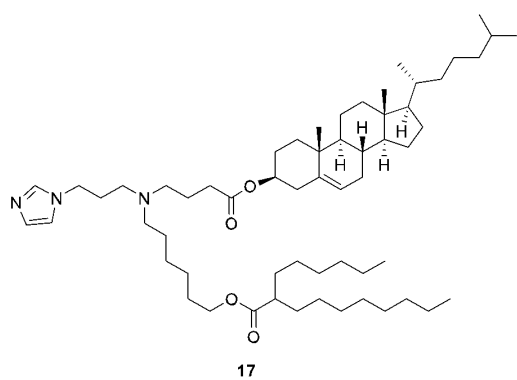
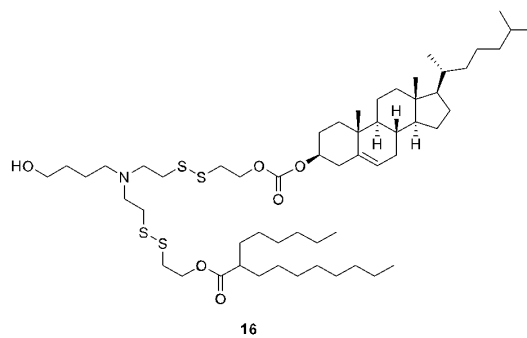
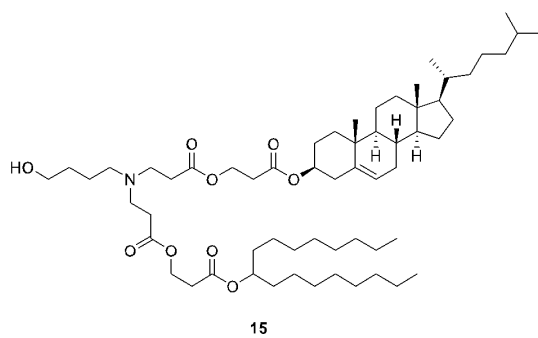
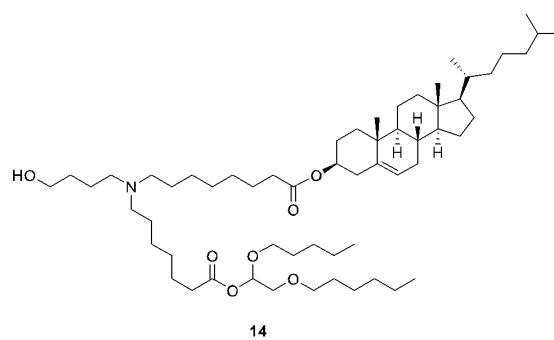
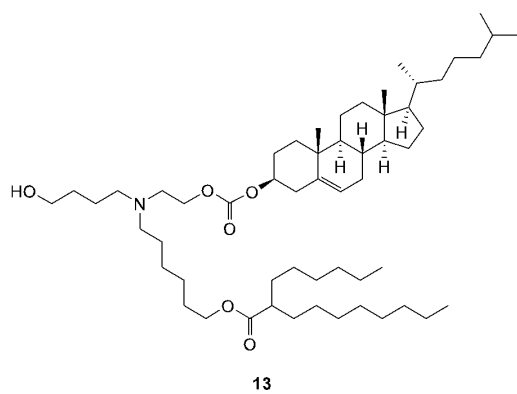
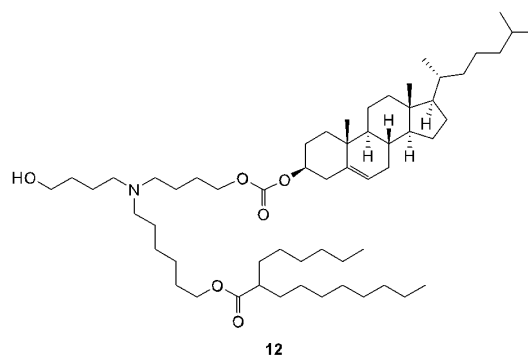
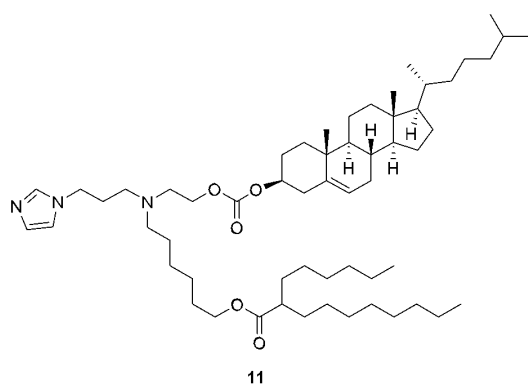
优选地，所述 R_3 选自：

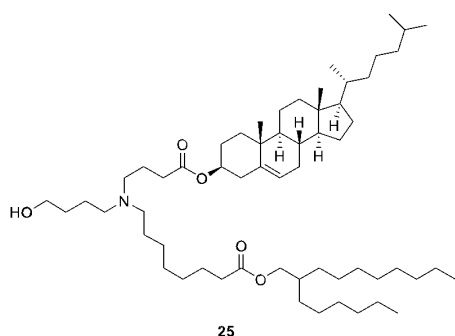
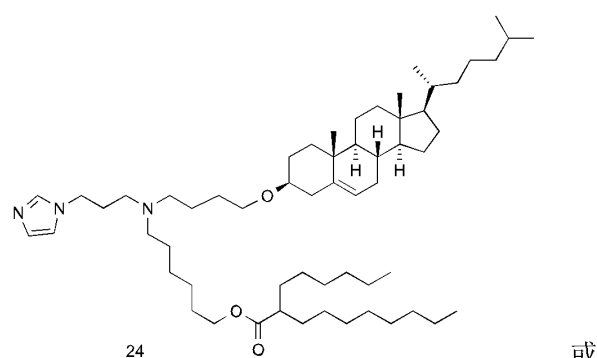
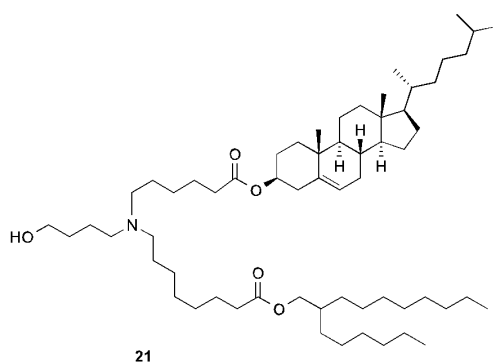
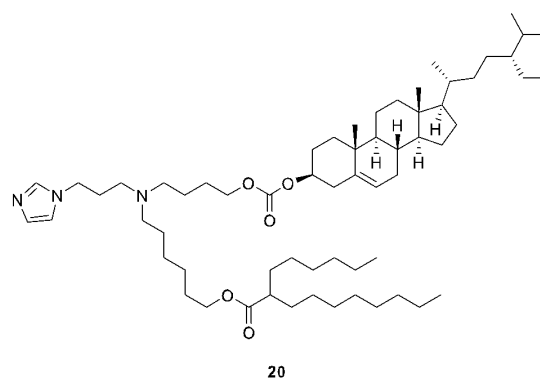
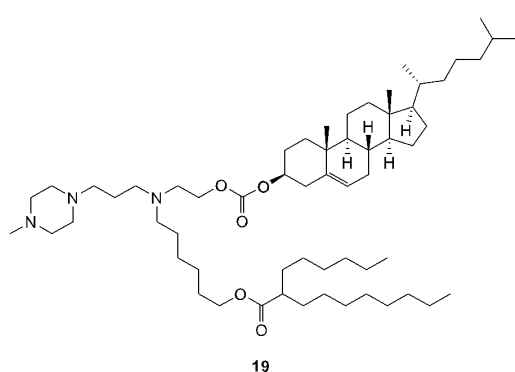


6、根据权利要求 1-5 中任一项所述的化合物，其特征在于，所述化合物选自：









7、一种脂质纳米颗粒，其特征在于，包括根据权利要求 1~6 中任一项所述的化合物。

8、根据权利要求 7 所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，还包括聚乙二醇脂质和至少一种辅助脂质；其中所述辅助脂质选自中性脂质、两性离子脂质或阴离子脂质。

9、根据权利要求 8 所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，所述聚乙二醇脂质选自 2-[(聚乙二醇)-2000]-N,N-二十四烷基乙酰胺(ALC-0159)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(PEG-DMG)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](PEG-DSPE)、PEG-二甾醇基甘油(PEG-DSG)、PEG-二棕榈油基、PEG-二油基、PEG-二硬脂基、PEG-二酰基甘油酰胺(PEG-DAG)、PEG-二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DPPE)或 PEG-1,2-二肉豆蔻酰基氧基丙基-3-胺(PEG-c-DMA)；

所述辅助脂质选自 1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DMPE)、2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-(1'-rac-甘油)(DOPG)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、磷酸胆碱(DOPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、磷脂酰胆碱(PLPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DAPC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二月桂酰基磷脂酰胆碱(DLPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、1-肉豆蔻酰基-2-棕榈酰基磷脂酰胆碱(MPPC)、1-棕榈酰基-2-肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(PMPC)、1-棕榈酰基-2-硬脂酰基磷脂酰胆碱(PSPC)、1,2-二花生酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DBPC)、1-硬脂酰基-2-棕榈酰基磷脂酰胆碱(SPPC)、1,2-二十碳烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DEPC)、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE)、或溶血磷脂酰乙醇胺。

10、根据权利要求 8 所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，所述权利要求 1~6 中任一项所述的化合物：辅助脂质：聚乙二醇脂质的摩尔比为 20~80：20~80：0.5~20；优选地，所述权利要求 1~6 中任一项所述的化合物：辅助脂质：聚乙二醇脂质的摩尔比为 30~80：30~80：0.5~20。

11、根据权利要求 7 所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，其具有 15nm~300nm 的直径。

12、根据权利要求 1-6 所述的化合物和/或权利要求 7-11 所述的脂质纳米颗粒在制备生物活性物质递送系统中的用途。

13、根据权利要求 12 所述的用途，其特征在于，所述生物活性物质为 DNA 或 RNA，其中所述 RNA 选自反义 RNA、saRNA、mRNA、lncRNA、miRNA、siRNA、piRNA、gRNA、tsRNA、circRNA 和自复制 mRNA；

优选地，所述的生物活性物质递送系统为 mRNA 疫苗；

优选地，所述 mRNA 疫苗为用于预防癌症、病毒感染、细菌感染、真菌感染的疫苗；

优选地，所述病毒选自诺如病毒、埃博拉病毒、冠状病毒、巨细胞病毒、登革热病毒、寨卡病毒、柯萨奇病毒、肠病毒、肝炎病毒、单纯疱疹病毒、人乳头瘤病毒、流感病毒、马尔堡病毒、麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、轮状病毒、和/或麻疹病毒。

14、根据权利要求 7-11 中任一项所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，还包含生物活性物质。

15、根据权利要求 14 所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，所述生物活性物质为 DNA 或 RNA，其中所述 RNA 优选地选自反义 RNA、saRNA、mRNA、lncRNA、miRNA、

siRNA、piRNA、gRNA、tsRNA、circRNA 和自复制 mRNA。

16、根据权利要求 14 或 15 所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，所述脂质纳米颗粒的氮磷比为 (1~15) :1。

17、一种药物，其特征在于，所述药物包含根据权利要求 14-16 中任一项所述的脂质纳米颗粒，以及药学上可接受的辅料。

18、根据权利要求 17 所述的药物，其特征在于，所述药物为液体制剂、冻干粉剂。

19、根据权利要求 17 所述的药物，其特征在于，所述药物为口服制剂、肌肉注射制剂、皮下注射制剂、静脉注射制剂、雾化吸入制剂和/或干粉吸入制剂。