

一类可用于活性分子递送的可降解脂质体及其纳米复合物

技术领域

本发明涉及用于活性分子递送的可降解脂质体化合物，优选为用于生物活性分子递送的脂质体化合物，所述脂质体化合物能够高效递送活性分子，包括但不限于核酸、蛋白质以及小分子药物等，降低或最小化治疗相关毒性。本发明涉及使用所述可降解脂质体递送核酸的方法或者使用所述可降解脂质体在递送核酸中的用途。本发明还涉及包含所述脂质体化合物和活性分子的纳米复合物，以及所述纳米复合物的药物组合物。

背景技术

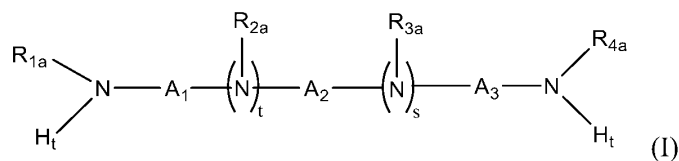
靶向性药物递送可提高药物针对疾病细胞的治疗选择性，最大程度降低递送载体以及生物活性分子对正常细胞的毒性以及药物的毒副作用等。生物大分子药物，如核酸和蛋白质等在重大、疑难疾病的治疗和/或预防呈现出广阔应用前景。然而，生物大分子药物易降解且无法自主进入哺乳细胞中，新型药物递送技术对于其生物治疗应用至关重要。发展新型药物递送载体，高效、安全地将生物大分子药物导入靶细胞中，并在病灶组织富集，对于提高生物药的治疗效果至关重要。例如，信使 RNA (mRNA) 需要进入靶细胞的细胞质以翻译产生功能性蛋白。然而，mRNA 易降解，分子量大，亲水性强，无法自主进入细胞。因此，mRNA 药物的生物治疗应用依赖安全、有效和稳定的递送系统，以保护核酸免遭降解，并促进 mRNA 的细胞摄取，控制 mRNA 在细胞内高效、选择性从载体中释放。病毒载体在基因药物递送及基因治疗方面获得了广泛关注和应用，是生物大分子药物递送的载体之一。然而，病毒载体递送基因药物时存在可包装的基因药物容量受限、免疫原性强、细胞毒性等问题。非病毒载体等纳米材料因毒性小、递送效率高等被广泛地应用于生物大分子药物递送，脂质体，无机纳米材料，金属-有机框架材料，高分子聚合物，蛋白质及肽类等核酸和蛋白质药物的递送中均得到了应用。脂质体由于其优异的递送效率和良好的生物兼容性，已经被广泛应用于 DNA、RNA 等生物大分子递送中。当前，已有数种用于小干扰 RNA 递送的脂质体制剂获得临床应用许可，其中脂质纳米颗粒封装的 mRNA 疫苗被应用于预防新型冠状病毒感染。封装核酸的脂质体一般通过内吞作用进入细胞，需进一步从溶酶体逃逸，以释放核酸至细胞质表达相应的蛋白。目前已经发现脂质体纳米颗粒进行溶酶体逃逸的主要机制有两种：一是脂质体与溶酶体膜相互作用使溶酶体膜不稳定；二是脂质体作为质子海绵，为了电荷平衡和浓度平衡，负离子和水大量内流，导致溶酶体膨胀破裂。

高效调控生物大分子药物在靶细胞中的释放对于提高其药物递送及生物治疗效率至关重要。因此，发展适用于新型生物活性分子特别是核酸的递送载体，使其不仅能够将生物活性分子更高效地递送至靶点，例如靶细胞或靶器官，保护正常组织或细胞免受给药的损害，同时高效的在疾病细胞或者病灶组织中高效释放药物，将进一步提高生物大分子药物的递送效率，发展靶向性治疗策略，由此降低或最小化治疗相关毒性的风险。

发明内容

本发明提供一种纳米药物载体，该纳米药物载体为一种基于活性氧物质(ROS)响应的可降解脂质体，其能将药物活性分子更高效且选择性递送至靶点的疾病细胞，其不仅提高了药物活性分子在疾病细胞中的释放效率，且通过靶向病灶组织进一步降低了对正常细胞的药物毒性。

第一方面，本发明提供式(I)的脂质体，



其中

R_{1a} 、 R_{2a} 、 R_{3a} 和 R_{4a} 各自独立地为氢、一价脂族烃基、一价杂脂族烃基、一价芳香烃基、一价杂芳香烃基或 H_t ;

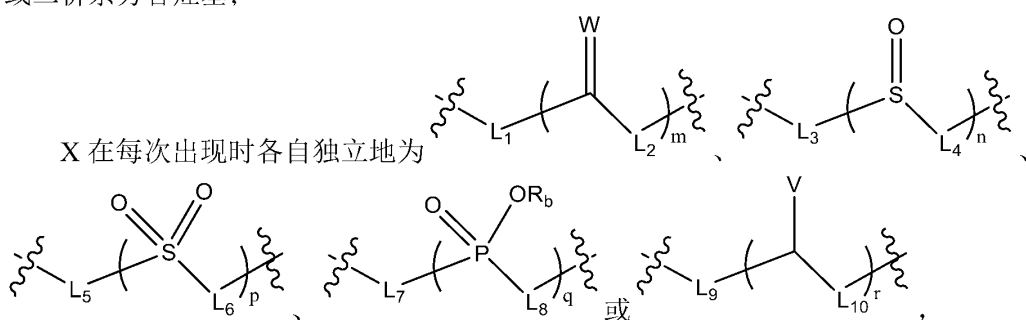
t 和 s 各自独立地为 0 或 1, 当 t 或 s 为零时表示该部分直接为单键;

A_1 、 A_2 和 A_3 各自独立地为单键、二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基或以上两者的组合;

H_t 在每次出现时各自独立地为 $-R_1-X-R_2-Y-R_3-Z-R_4$,

其中

R_1 在每次出现时各自独立地为二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基;



其中

m 、 n 、 p 、 q 和 r 各自独立地为 1-6;

W 是 O、S 或 NR_c ;

L_1 、 L_3 、 L_5 、 L_7 和 L_9 , 其直接与 R_1 或 R_2 连接且各自独立地为单键、O、S 或 NR_d ;

L_2 、 L_4 、 L_6 、 L_8 和 L_{10} 各自独立地为键、O、S 或 NR_e ;

V 是脂族烃基、 OR_f 、 SR_g 或 NR_hR_i ,

其中 R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_e 、 R_f 、 R_g 、 R_h 和 R_i 各自独立地为氢、羟基、脂族烃基氧基(oxyaliphatic radical)、一价脂族烃基、一价杂脂族烃基、一价芳香烃基或一价杂芳香烃基;

Y 和 Z 在每次出现时各自独立地为 S 或 O;

R_2 在每次出现时各自独立地为单键、二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基;

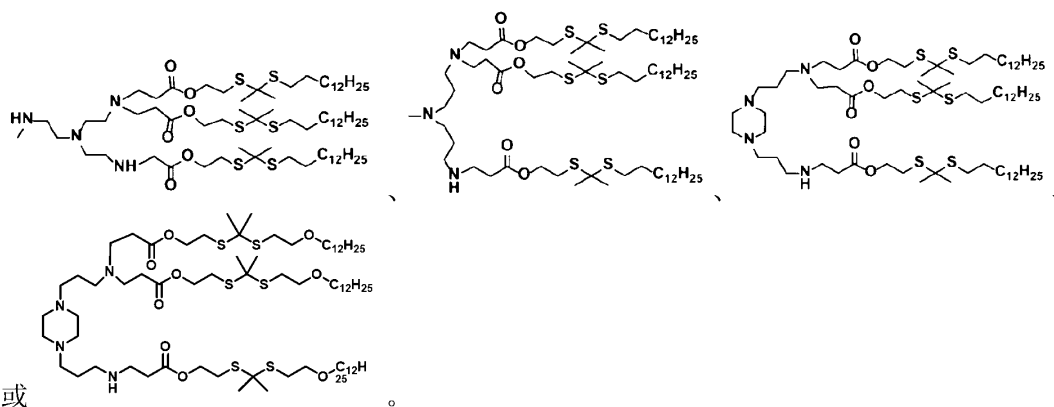
R_3 在每次出现时各自独立地为单键、二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基;

R_4 在每次出现时各自独立地为疏水基团;

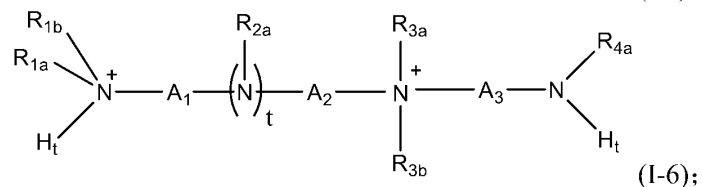
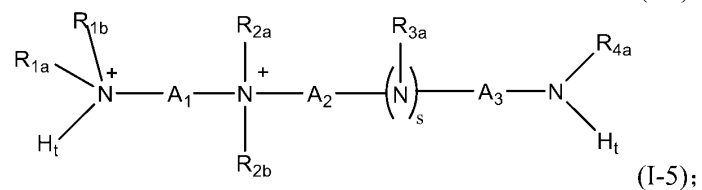
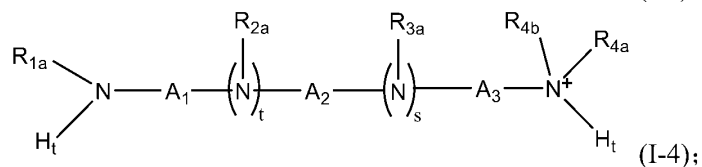
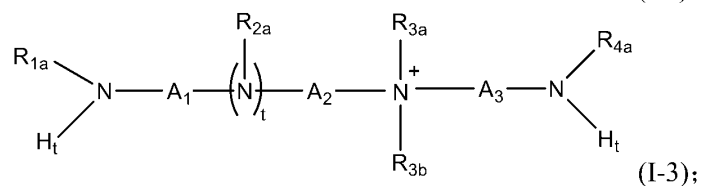
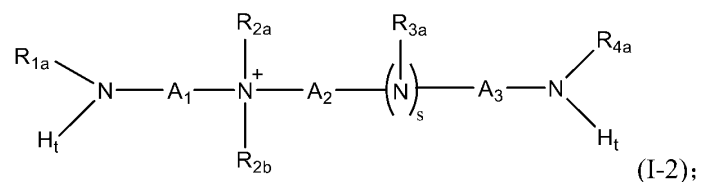
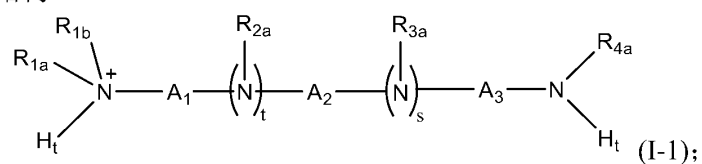
以及式(I)骨架结构中的 N 原子任选被阳离子化;

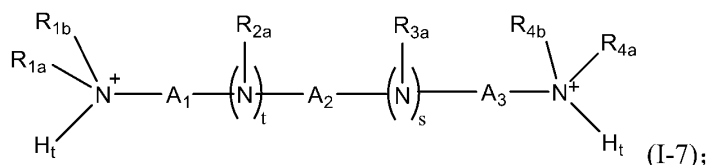
条件是 R_{1a} 和 R_{4a} 中至少一个为氢; 以及

条件是所述化合物不是下述化合物之一:



在一些实施方案中, 式(I)的脂质体为可离子化形式的, 即式(I)骨架结构中的一个或多个 N 原子可被离子化。在进一步的实施方案中, 所述式(I)的脂质体为可离子化形式的, 由此形成下述结构





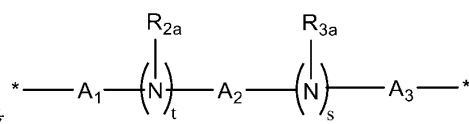
以及含有相应的抗衡离子, 其中 R_{1b} 、 R_{2b} 、 R_{3b} 和 R_{4b} 各自独立地为氢、一价脂族烷基、一价杂脂族烷基、一价芳香烷基、一价杂芳香烷基或 Ht, 其余变量如式(I)所定义。在一些实施方案中, 所述抗衡离子为与所述带正电的 N 原子形成盐的阴离子。合适的阴离子包括但不限于氯离子、溴离子、碘离子、硫酸根、硝酸根、磷酸根、柠檬酸根、甲磺酸根、三氟乙酸根、乙酸根、苹果酸根、甲苯磺酸根、酒石酸根、富马酸根、谷氨酸根、葡萄糖醛酸根、乳酸根、戊二酸根和马来酸根等。

在一些实施方案中, R_{1a} 或 R_{4a} 为氢; 或者 R_{1a} 和 R_{4a} 各自为氢。

在一些实施方案中, t 和 s 均为 0; 或者 t 为 0 且 s 为 1; 或者 t 为 1 且 s 为 0。

在一些实施方案中，t 和 s 均为 0；R_{1a} 为 Ht，以及 R_{4a} 为氢；或者 t 和 s 均为 0；R_{1a} 为氢，以及 R_{4a} 为 Ht。

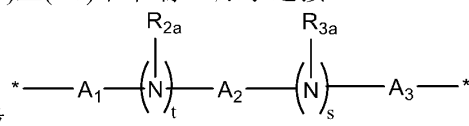
在一些实施方案中，R_{2a} 和 R_{3a} 如果存在的话，各自独立地为氢、一价脂族烷基或一价杂脂族烷基；优选为氢、一价 C₁₋₆ 烷基、一价 C₁₋₆ 杂烷基，例如氨基 C₁₋₆ 烷基、二(C₁₋₆ 烷基)氨基烷基、单(C₁₋₆ 烷基)氨基烷基、C₁₋₆ 烷氧基 C₁₋₆ 烷基、羟基 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷基硫基 C₁₋₆ 烷基或硫基 C₁₋₆ 烷基。



在一些实施方案中，片段

- A₁-A₃, 其中 A₁ 和 A₃ 各自独立地为 C₁-C₆ 二价脂族烃基(例如, C₁-C₄ 二价脂族烃基, 例如 C₁-C₆ 二价烷基, 优选为 C₁-C₄ 二价烷基); 或
- A₁-(NR_{2a})-A₃, 其中 A₁ 和 A₃ 各自独立地为 C₁-C₆ 二价脂族烃基(例如, C₁-C₄ 二价脂族烃基, 例如 C₁-C₆ 二价烷基, 优选为 C₁-C₄ 二价烷基), 以及 R_{2a} 为氢、一价脂族烃基或一价杂脂族烃基; 优选为氢、一价 C₁₋₆ 烷基、一价 C₁₋₆ 杂烷基, 例如氨基 C₁₋₆ 烷基、二(C₁₋₆ 烷基)氨基烷基、单(C₁₋₆ 烷基)氨基烷基、C₁₋₆ 烷氧基 C₁₋₆ 烷基、羟基 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷硫基 C₁₋₆ 烷基或巯基 C₁₋₆ 烷基; 或
- A₁-(NR_{2a})-A₂-(NR_{2b})-A₃, 其中 A₁、A₂ 和 A₃ 各自独立地为 C₁-C₆ 二价脂族烃基(例如, C₁-C₄ 二价脂族烃基, 例如 C₁-C₆ 二价烷基, 优选为 C₁-C₄ 二价烷基); 以及 R_{2a} 和 R_{2b} 各自独立地为氢、一价脂族烃基或一价杂脂族烃基; 优选为氢、一价 C₁₋₆ 烷基、一价 C₁₋₆ 杂烷基, 例如氨基 C₁₋₆ 烷基、二(C₁₋₆ 烷基)氨基烷基、单(C₁₋₆ 烷基)氨基烷基、C₁₋₆ 烷氧基 C₁₋₆ 烷基、羟基 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷硫基 C₁₋₆ 烷基或巯基 C₁₋₆ 烷基; 或
- A₁-A₂-A₃, 其中 A₁ 和 A₃ 各自独立地为 C₁-C₆ 二价脂族烃基(例如, C₁-C₄ 二价脂族烃基, 例如 C₁-C₆ 二价烷基, 优选为 C₁-C₄ 二价烷基); 以及 A₂ 为二价环状杂脂族烃基, 例如包含 1-3 个选自氧、氮和硫的杂环子的 3 员至 7 员单环环状杂脂族烃基, 优选为二价哌嗪基团;

其中星号*表示式(I)或(I-1)至(I-7)中末端 N 原子连接。



在一些实施方案中，片段

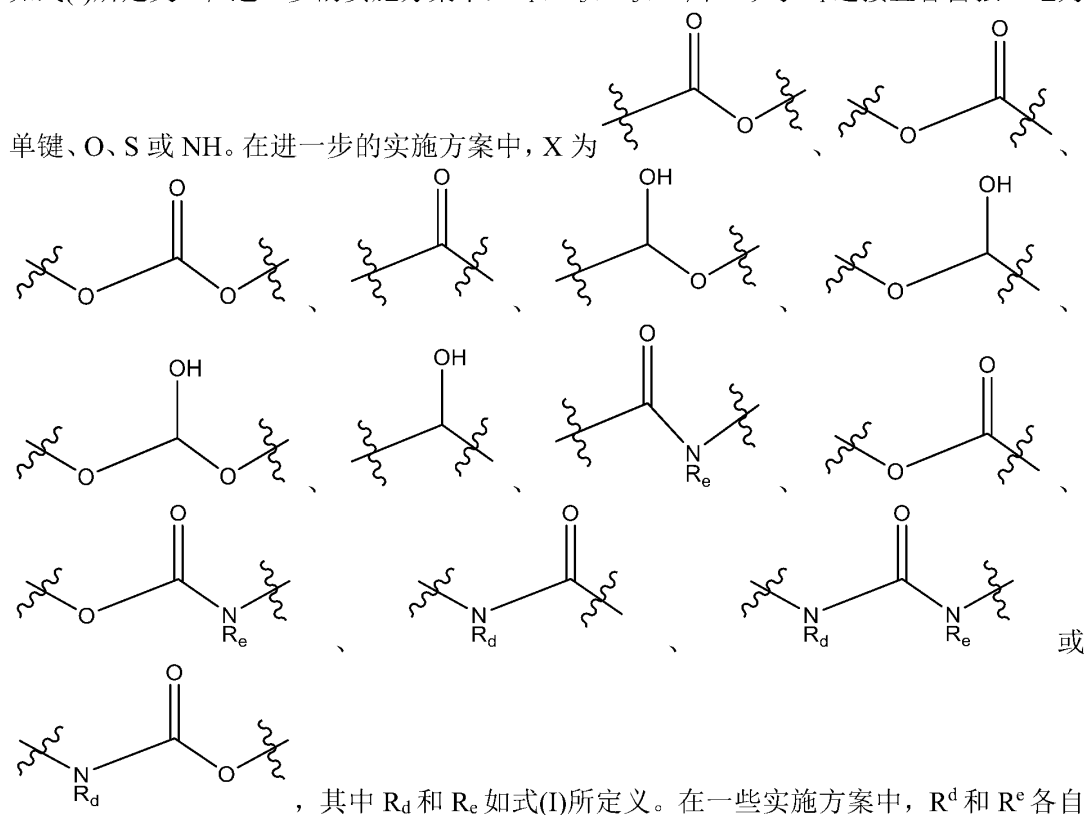
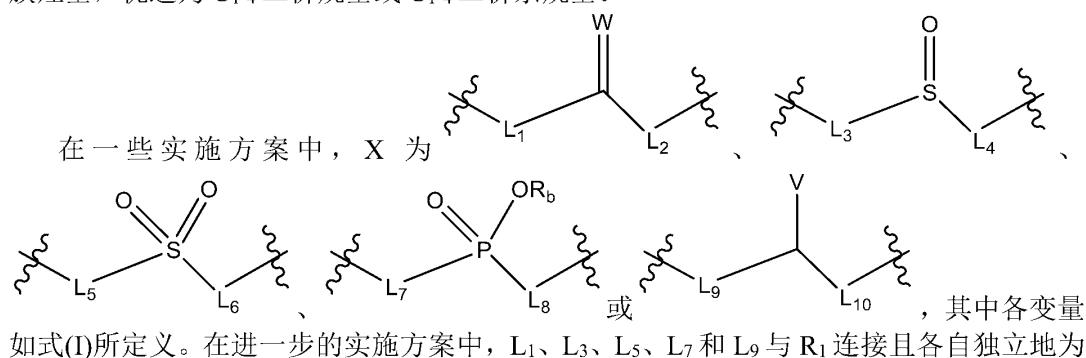
- $-(CH_2)_{m1}-$, 其中 $m1$ 为 2-12 的整数, 优选为 2-10 或 3-8; 或 3 的整数; 或
- $-(CH_2)_{m2}-(NR_{2a})-(CH_2)_{m3}-$, 其中 $m2$ 和 $m3$ 各自独立地为 1-6 的整数; 优选为 2-6 或 2-4 或 2 或 3 的整数; R_{2a} 为氢、一价 C_{1-6} 烷基、氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6}

6 烷基)氨基烷基、单(C₁₋₆ 烷基)氨基烷基、C₁₋₆ 烷氧基 C₁₋₆ 烷基、羟基 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷硫基 C₁₋₆ 烷基或巯基 C₁₋₆ 烷基；或

- $-(\text{CH}_2)_{m2}-(\text{NR}_{2a})-(\text{CH}_2)_{m4}-(\text{NR}_{2b})-(\text{CH}_2)_{m3}$ ，其中 $m2$ 、 $m3$ 和 $m4$ 各自独立地为 1-6 的整数；优选为 2-6 或 2-4 或 2 或 3 的整数； R_{2a} 和 R_{2b} 各自独立地为氢、一价 C₁₋₆ 烷基、氨基 C₁₋₆ 烷基、二(C₁₋₆ 烷基)氨基烷基、单(C₁₋₆ 烷基)氨基烷基、C₁₋₆ 烷氧基 C₁₋₆ 烷基、羟基 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷硫基 C₁₋₆ 烷基或巯基 C₁₋₆ 烷基；或
- $-(\text{CH}_2)_{m2}-A_2-(\text{CH}_2)_{m3}$ ，其中 $m2$ 和 $m3$ 各自独立地为 1-6 的整数；优选为 2-6 或 2-4 或 2 或 3 的整数；以及 A_2 为二价环状杂脂族烃基，例如包含 1-3 个选自氧、氮和硫的杂环子的 3 员至 7 员单环环状杂脂族烃基，优选为二价哌嗪基团；

其中星号*表示式(I)或(I-1)至(I-7)中末端 N 原子连接。

在一些实施方案中， R_1 为 C₁₋₆(例如，C₁₋₄)二价脂族烃基或 C₁₋₆(例如，C₁₋₄)二价杂脂族烃基，优选为 C₁₋₄ 二价烷基或 C₁₋₄ 二价杂烷基。

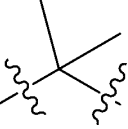
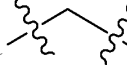
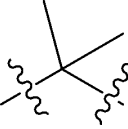


独立地为 H 或 C₁₋₄ 一价脂族烃基, 优选为 H 或 C₁₋₄ 一价烷基。

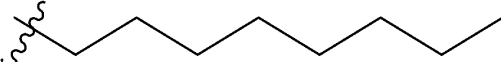
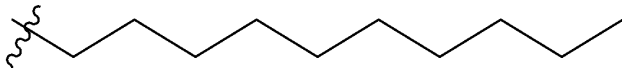
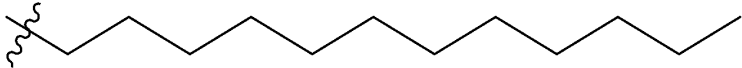
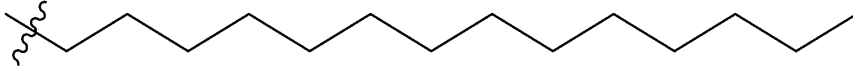
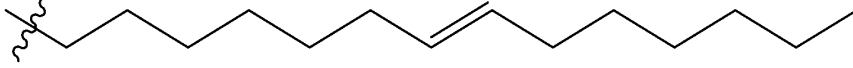
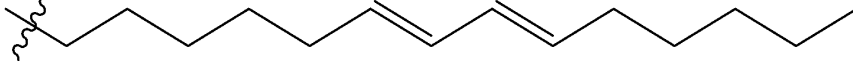
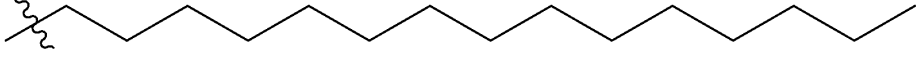
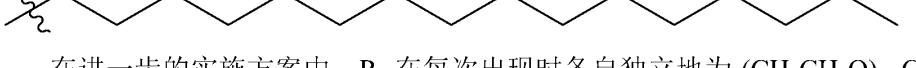
在一些实施方案中, Y 和 Z 均为 S; 或者 Y 为 S, 以及 Z 为 O; 或者 Y 为 O, 以及 Z 为 S; 或者 Y 和 Z 均为 O。

在一些实施方案中, R₂ 在每次出现时各自独立地为单键或 C₁₋₆ 二价脂族烃基(例如, C₁₋₄ 二价脂族烃基, 优选为 C₁₋₄ 二价烷基, 更优选为 C₁₋₂ 二价烷基)。

在一些实施方案中, R₃ 在每次出现时各自独立地为单键或 C₁₋₆ 二价脂族烃基(例如, C₁₋₄ 二价脂族烃基, 优选为 C₁₋₄ 二价烷基)。在进一步的实施方案中, R₃ 在每次出现时各

自独立地为单键或  或亚甲基() , 优选为 。

在一些实施方案中, R₄ 在每次出现时各自独立地为疏水基团, 所述疏水基团选自长链烷基、烯基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、芳基烯基、环状基团、脂环族基团和多环基团, 所述疏水基团任选具有至少一个选自氮、氧和硫的杂原子。在进一步的实施方案中, R₄ 在每次出现时各自独立地为 C₈-C₃₀ 烷基、C₈-C₃₀ 烯基或 C₈-C₃₀ 炔基。在进一步的实施

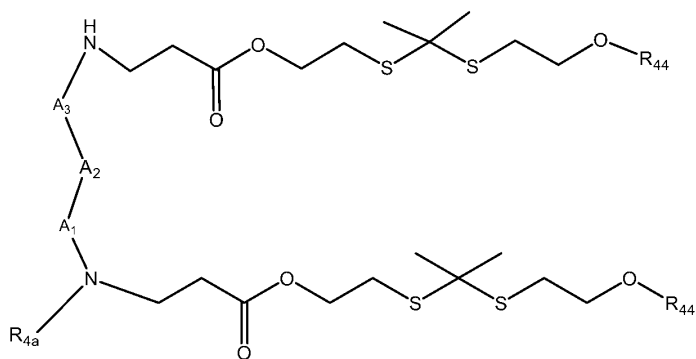
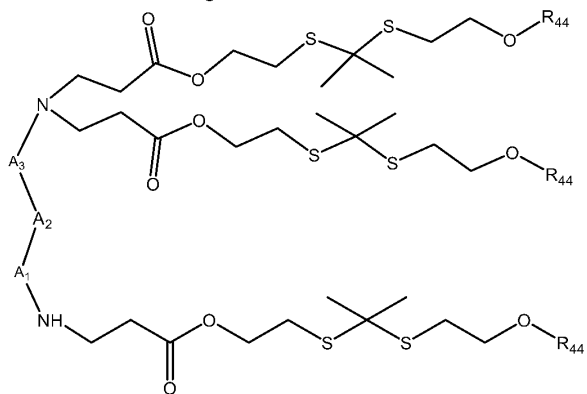
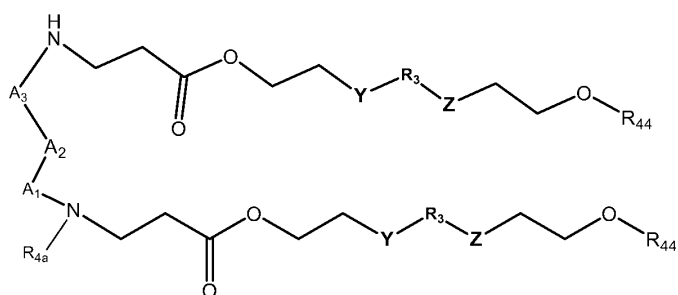
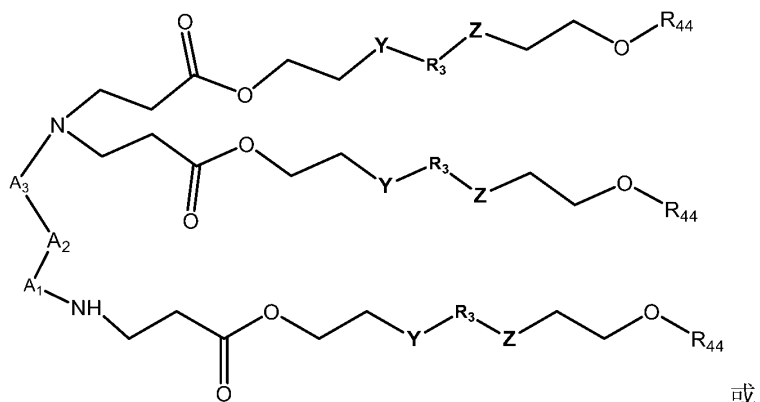
方案中, R₄ 为  (-C₈H₁₇)、
 (-C₁₀H₂₁)、
 (-C₁₂H₂₅)、
 (-C₁₄H₂₉)、
 (-C₁₄H₂₇)、
 (-C₁₄H₂₅)或
 (-C₁₅H₃₁)
 (-C₁₆H₃₃)。

在进一步的实施方案中, R₄ 在每次出现时各自独立地为 -(CH₂CH₂O)_m-C₈-C₃₀ 烷基、-(CH₂CH₂O)_y-C₈-C₃₀ 烯基或 -(CH₂CH₂O)_y-C₈-C₃₀ 炔基, 其中 y 为 0 或 1 或 2, 例如 R₄ 为 -CH₂CH₂O-C₈H₁₇、-CH₂CH₂O-C₁₀H₂₁、-CH₂CH₂O-C₁₂H₂₅、-CH₂CH₂O-C₁₄H₂₉ 或 -CH₂CH₂O-C₁₅H₃₁。

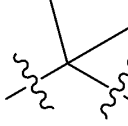
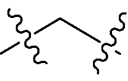
在一些实施方案中, 所述胺头的 pK_a 值大于 4, 优选大于 6, 更优选大于 8。

在一些实施方案中, A₁ 和 A₃ 各自独立地为单键或二价脂族烃基以及 A₂ 为二价脂族烃基或二价杂脂族烃基。在进一步的实施方案中, A₁ 和 A₃ 各自独立地为 C₁-C₆ 二价脂族烃基(例如, C₁-C₄ 二价脂族烃基, 优选为 C₁-C₄ 二价烷基)以及 A₂ 为二价环状杂脂族烃基, 例如包含 1-3 个选自氧、氮和硫的杂环原子的 3 员至 7 员单环环状杂脂族烃基。在进一步的实施方案中, A₁ 和 A₃ 各自独立地为亚乙基以及 A₂ 为二价哌嗪基团。

在一些实施方案中, 所述式(I)的脂质体为

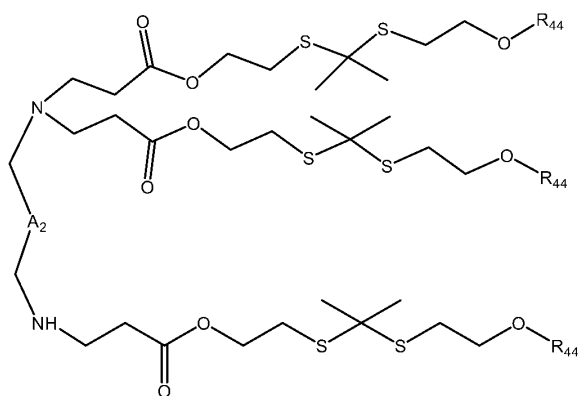
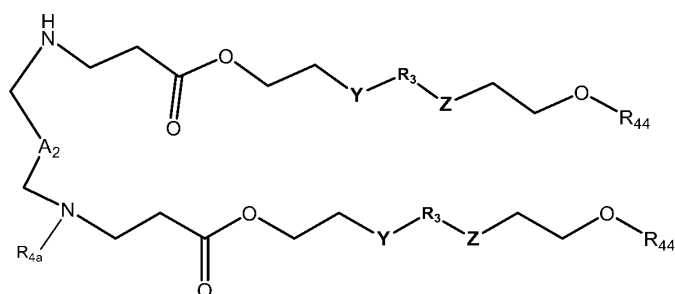
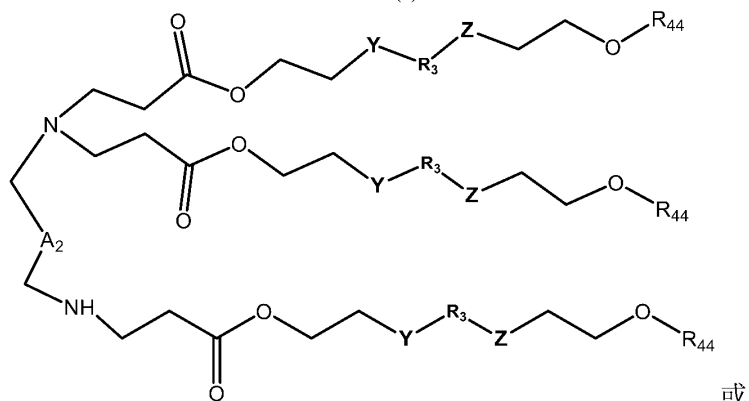


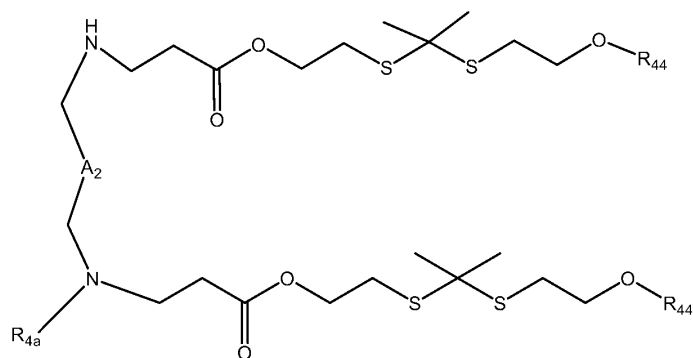
其中 A_1 、 A_2 、 A_3 和 R_{4a} 如式(I)所定义, 以及 $-(CH_2CH_2O)-R_{44}$ 为如式(I)所定义的 R_4 ; Y 和 Z 均为 S ; 或者 Y 为 S , 以及 Z 为 O ; 或者 Y 为 O , 以及 Z 为 S ; 或者 Y 和 Z 均为 O ;

R_3 在每次出现时各自独立地为单键或  或亚甲基(); 优选地其中 A_1

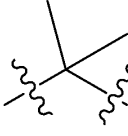
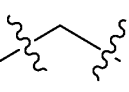
和 A_3 各自独立地为 $-(CH_2)_m-$; A_2 为 $-(CH_2)_m-$ 或二价环状杂脂族烃基, 例如包含 1-3 个选自氧、氮和硫的杂环子的 3 员至 7 员单环环状杂脂族烃基, 优选为二价哌嗪基团, 其中 m 在每次出现时独立地为 1-6 的整数; 优选为 2-6 或 2-4 或 2 或 3 的整数。在进一步的实施方案中, R_{44} 每次出现时各自独立地为烷基 C_uH_{2u+1} 或烯基 C_uH_{2u-1} , 其中 u 为 8-30, 优选为 8、12、14 或 16。在进一步的实施方案中, A_2 为二价环状杂脂族烃基, 优选为二价哌嗪基团, 以及 A_1 和 A_3 各自独立为 C_{1-4} 二价烷基, 例如亚甲基、亚乙基、亚丙基。

在一些实施方案中, 所述式(I)的脂质体为

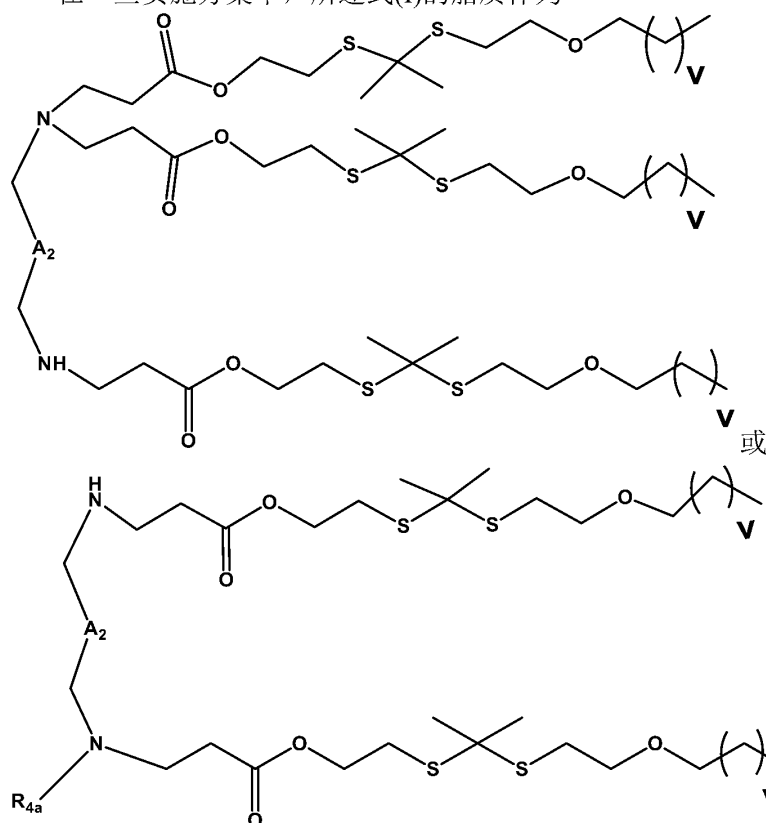




其中 A_2 和 R_{4a} 如式(I)所定义, 以及 $-(CH_2CH_2O)-R_{44}$ 为如式(I)所定义的 R_4 ; Y 和 Z 均为 S ; 或者 Y 为 S , 以及 Z 为 O ; 或者 Y 为 O , 以及 Z 为 S ; 或者 Y 和 Z 均为 O ; R_3 在每

次出现时各自独立地为单键或  或亚甲基(); 优选地 A_2 为 $-(CH_2)_m-$ 或二价环状杂脂族烃基, 例如包含 1-3 个选自氧、氮和硫的杂环子的 3 员至 7 员单环环状杂脂族烃基, 优选为二价哌嗪基团, 其中 m 在每次出现时独立地为 1-6 的整数; 优选为 2-6 或 2-4 或 2 或 3 的整数。在进一步的实施方案中, R_{44} 每次出现时各自独立地为烷基 C_uH_{2u+1} 或烯基 C_uH_{2u-1} , 其中 u 为 8-30, 优选为 8、12、14 或 16。在进一步的实施方案中, A_2 为二价环状杂脂族烃基, 优选为二价哌嗪基团。

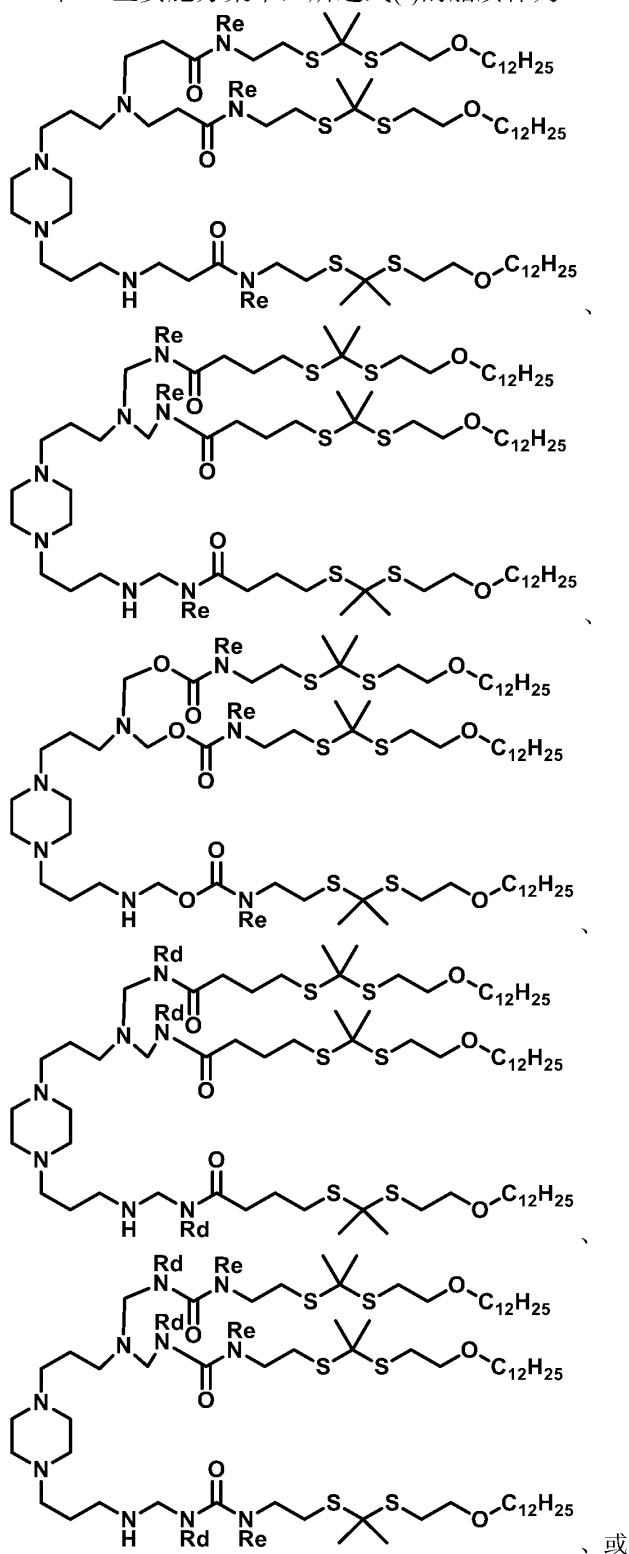
在一些实施方案中, 所述式(I)的脂质体为

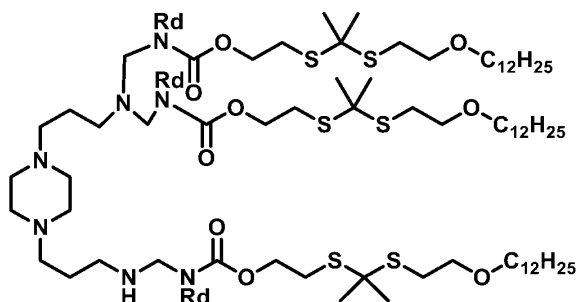


其中 v 为 6-28, 优选 v 为 10; A_2 和 R_{4a} 如式(I)所定义; 优选地 A_2 为 $-(CH_2)_m-$ 或二价环状杂脂族烃基, 例如包含 1-3 个选自氧、氮和硫的杂环子的 3 员至 7 员单环环状杂脂族烃基

基, 优选为二价哌嗪基团, 其中 m 在每次出现时独立地为 1-6 的整数; 优选为 2-6 或 2-4 或 2 或 3 的整数。在进一步的实施方案中, A_2 为二价环状杂脂族烃基, 优选为二价哌嗪基团。

在一些实施方案中, 所述式(I)的脂质体为



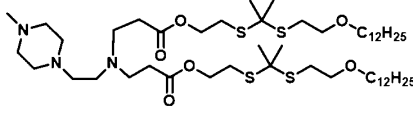
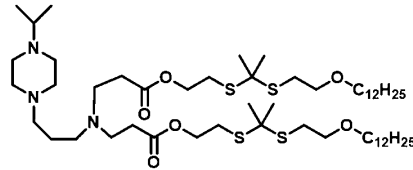
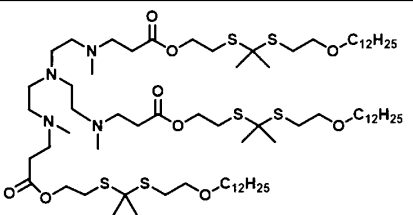
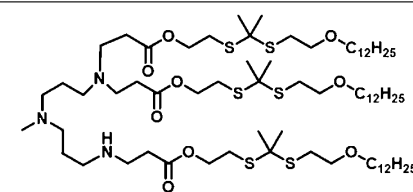
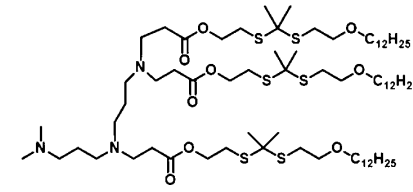
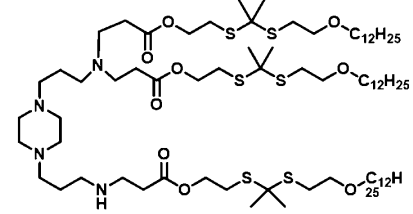
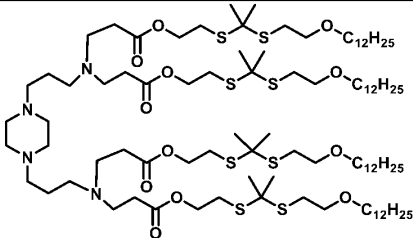
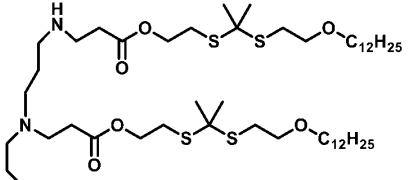


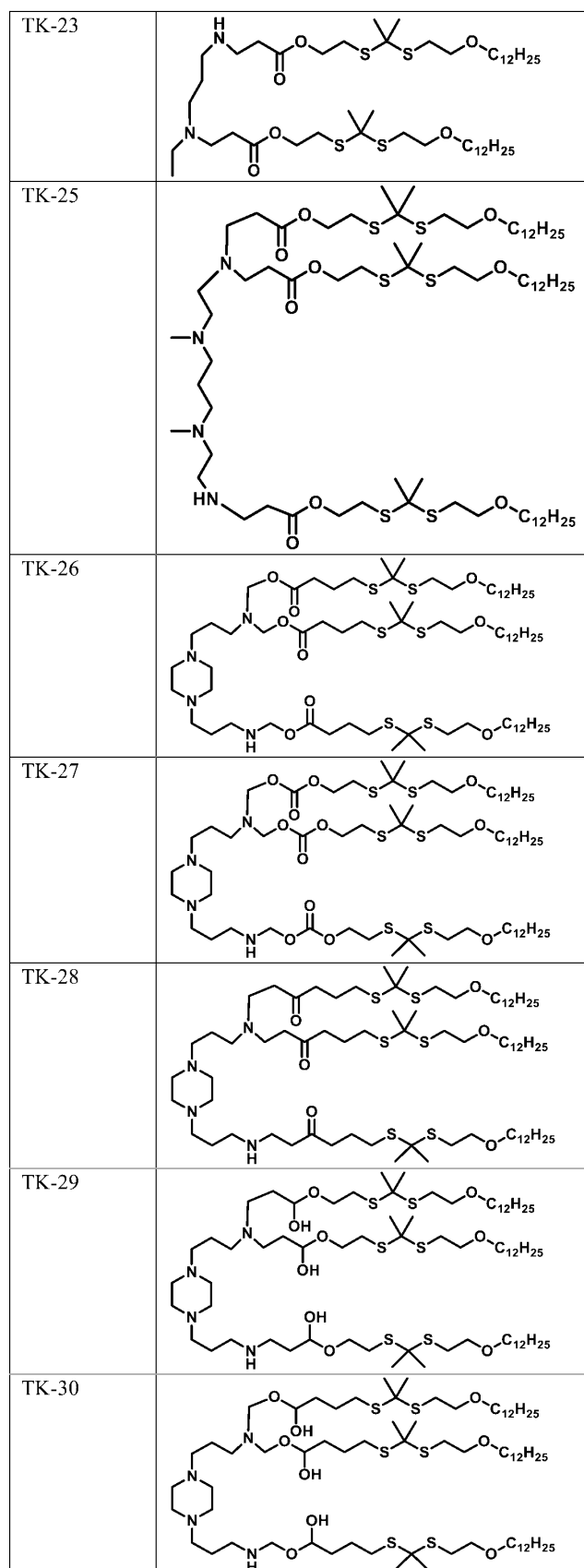
其中 R_d 和 R_e 如式(I)所定义, 优选各自独立为氢或一价脂族烃基, 例如 C₁₋₄ 烷基。

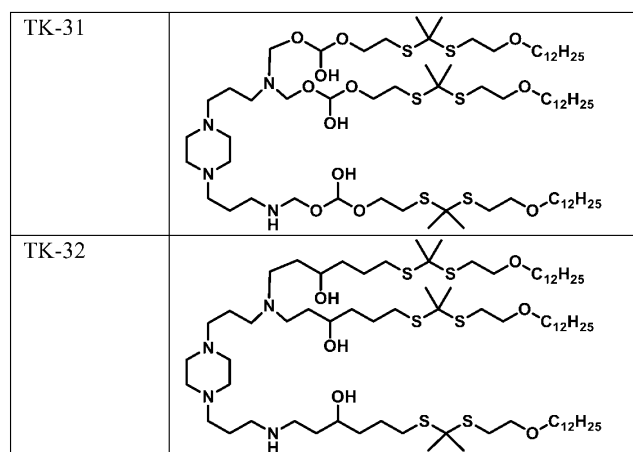
在一些实施方案中, 示例性的脂质体如下:

TK-2	
TK-3	
TK-5	
TK-6	
TK-7	
TK-8	

TK-9	
TK-10	
TK-11	
TK-12	
TK-13	
TK-14	
TK-15	

TK-16	
TK-17	
TK-18	
TK-19	
TK-20	
TK-21 (又名 BAmP- TK-12 或 TK- 12)	
TK-21-4	
TK-22	

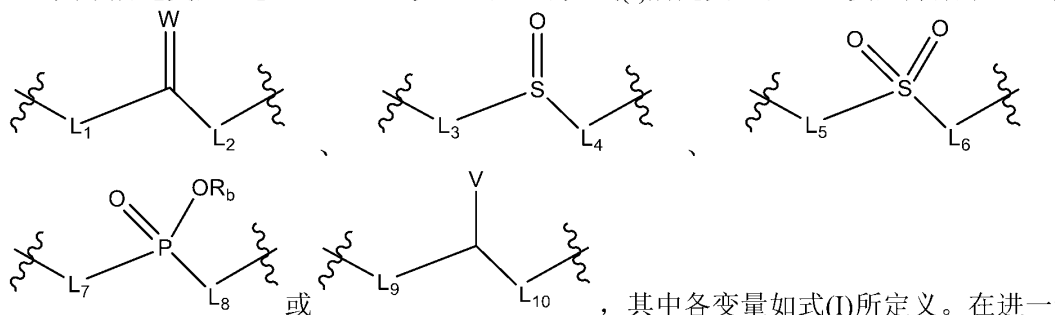




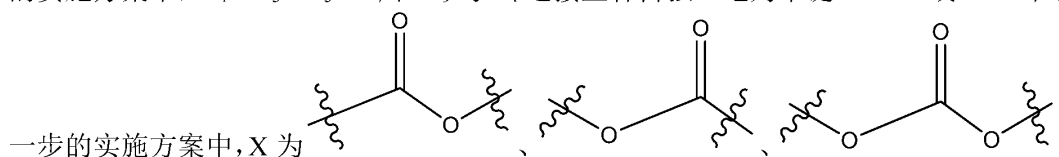
本发明的式(I)的脂质体由于在 Ht 基团中含有缩酮响应单元(特别是当 Y 和 Z 均为 S 时的硫缩酮相应单元),因而是生物可降解的,该类脂质体可高效结合 mRNA 并通过组装形成纳米结构,进入细胞后,选择性地对细胞内的氧化性环境响应并降解,进而高效释放 mRNA、表达响应蛋白。更进一步地,本发明的发明人发现通过将式(I)化合物中骨架结构上 N 原子上保留至少一个氢原子(即未被 Ht 取代或其他基团取代)进一步提高了递送效率并且并可靶向性递送药物到病灶组织,降低了给药相关的毒性,例如对正常细胞的药物毒性,对肝脏的毒性等。

第二方面,本发明提供制备 R₁ 为亚乙基的式(I)的脂质体的方法,所述方法包括:使式(II)的丙烯酸类化合物 CH₂=CH-X-R₂-Y-R₃-Z-R₄ (II)与亲水胺按照摩尔比混合反应,其中各变量如式(I)所定义,其中所述亲水胺含有至少一个伯氨基(-NH₂)或至少两个仲胺基(-NH-),其中所述式(II)丙烯酸酯水合物与所述亲水胺的摩尔比小于所述亲水胺中氨基上游离氢原子的摩尔数,但是所述式(II)丙烯酸酯水合物与所述亲水胺的摩尔比大于 1;例如所述式(II)丙烯酸酯水合物与含有 2 个(或 2 摩尔)氨基上游离氢原子的亲水胺的摩尔比小于 2,例如为 1.1-1.8,又例如为 1.5;所述式(II)丙烯酸酯水合物与含有 3 个氨基上游离氢原子的亲水胺的摩尔比小于 3,例如为 1.1-2.7,又例如为 1.5-2.4,再例如为 2.4;所述式(II)丙烯酸酯水合物与含有 4 个氨基上游离氢原子的亲水胺的摩尔比小于 4,例如为 1.1-3.5,例如为 1.1-1.8 或为 2.1-3.3,再例如为 3.3;然后任选地对所述产物经色谱纯化,得到期望的式(I)的脂质体;

其中所述变量 R₂、X、Y、R₃、Z 和 R₄ 如式(I)所定义。在一些实施方案中, X 为



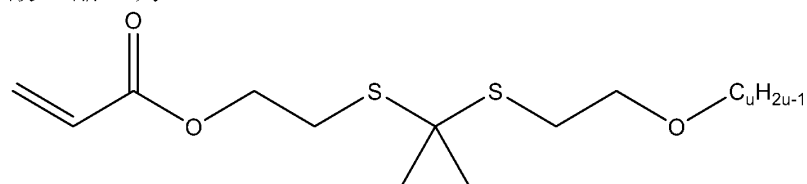
其中各变量如式(I)所定义。在进一步的实施方案中, L₁、L₃、L₅、L₇ 和 L₉ 与 R₁ 连接且各自独立地为单键、O、S 或 NH。在进



一步的实施方案中, X 为

C=C(C(=O)OCCYR3ZCCOR44)R3

, 其余变量如式(1)所定义。

NCCN1CCN(CC)CC1

基， C_uH_{2u+1} 表示烷基， C_uH_{2u} 表示烯基，以及其中u为8-30，优选为8、12、14或16。在一具体实施方案

中, 所述含有缩酮的丙烯酸酯为 2-((2-((2-(十二烷氧基)乙基)硫基)丙烷-2-基)硫基)乙基丙烯酸酯(2-((2-((2-(dodecyloxy)ethyl)thio)propan-2-yl)thio)ethylacrylate)。

在一些实施方案中, 所述反应为加成反应, 优选为迈克尔加成反应(Michael addition reaction)。

在一些实施方案中, 所述反应在 60-85℃ 的温度进行。

本发明所述的含有缩酮的丙烯酸酯可以按照本领域已知的方法例如 CN 110101665 A 披露的方法合成。所述含有缩(硫)酮的丙烯酸酯为丙烯酸与含有缩(硫)酮的醇类化合物经酯化反应所得到的酯类化合物。

本发明的其它脂质体可以使用其它合适的起始材料通过上述合成路线和本领域中已知的其它路线制备。上文列出的方法可以包括另外的一个或多个步骤来添加或移除适当的保护基, 以最终允许所述脂质体合成。此外, 可以以替代的次序或顺序进行各个合成步骤, 以得到所需的材料。可用于合成适用的脂质体的合成化学转化和保护基方法(保护和去保护)在本领域中是已知的。

第三方面, 本发明提供一种药物组合物, 所述药物组合物包括药用载体以及纳米复合物(nanocomplex), 其中纳米复合物包括本发明的式(I)的脂质体和药物活性分子。

在一些实施方案中, 药物活性分子是小分子药物、蛋白质、肽、核酸、糖类或其组合, 优选为核酸。在进一步的实施方案中, 所述药物活性分子是 mRNA。在更进一步的实施方案中, 所述 mRNA 可为表达红色荧光蛋白的 RFP mRNA, 表达绿色荧光蛋白的 GFP mRNA 或者表达 RAS 蛋白酶 DUF5 的 DUF5 mRNA 在进一步的实施方案中, 所述药物活性分子也可以是质粒 DNA, 如表达 GFP 的质粒 DNA 等。

在一些实施方案中, 所述纳米复合物具有 50 至 500nm(例如, 50 至 300nm 和 50 至 180nm)的粒度。

在一些实施方案中, 所述式(I)的脂质体为可离子化的。

在一些实施方案中, 所述脂质体与所述药物活性分子经由非共价相互作用, 共价键或它们二者结合。

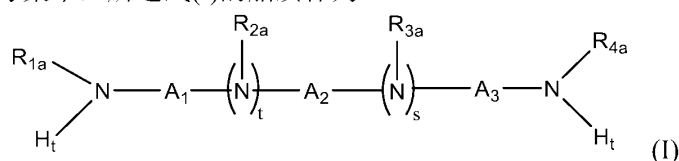
在一些实施方案中, 所述纳米复合物进一步含有其它脂质, 选自胆固醇、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE, CAS: 4004-05-1)和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-PEG2000, CAS: 147867-65-0)或其组合。在进一步实施方案中, 所述纳米复合物进一步含有胆固醇、二油酰磷脂酰乙醇胺和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000。在一实施方案中, 本发明示例中脂质体:胆固醇:DOPE:DSPE-PEG2000 的质量比为 4:1:1:1 或 4:1:1:8)。

在一些实施方案中, 本发明的纳米复合物如下制备: 包括分别将本发明的脂质体、胆固醇、DOPE 溶解在三氯甲烷中配成混合溶液, 挥发成膜, 再用无水乙醇超声溶解后滴加到含 DSPE-PEG2000 的醋酸钠缓冲溶液中, 高速搅拌制备得到脂质体纳米颗粒。

在一些实施方案中, 本发明的包括纳米复合物的药物组合物如下制备: 将药物活性分子与质量为其 5-20 倍 (脂质体与核酸的 N/P 比例范围为 3:1-20:1) 的所述纳米复合物混合孵育得到。在进一步的实施方案中, 所述药物活性分子为 mRNA。

第四方面, 本发明提供一种递送核酸的方法, 所述方法包括使用本发明的式(I)的脂质体递送核酸至靶细胞以在所述靶细胞内进行细胞内核酸药物释放; 或者提供式(I)的脂质体作为药物递送载体的用途, 其中所述药物为核酸; 或者提供式(I)的脂质体作为药物递送载体在制备核酸药物中的用途, 其中所述药物递送载体将所述核酸药物递送至靶细胞以在所述靶细胞内进行细胞内核酸药物释放。

在一些实施方案中, 所述式(I)的脂质体为



其中

R_{1a} 、 R_{2a} 、 R_{3a} 和 R_{4a} 各自独立地为氢、一价脂族烃基、一价杂脂族烃基、一价芳香烃基、一价杂芳香烃基或 H_t ;

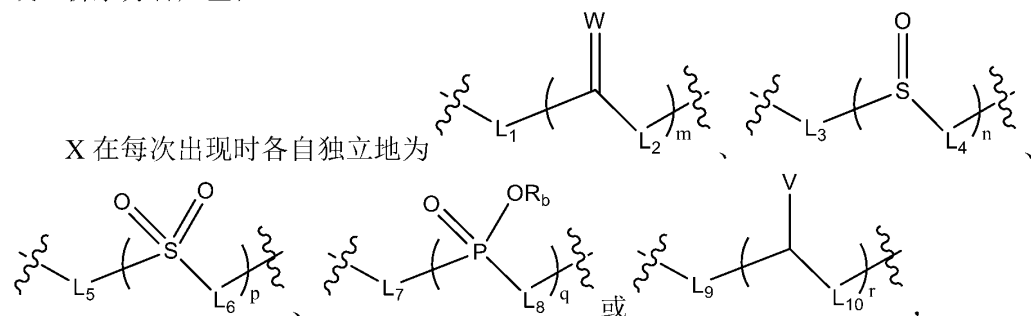
t 和 s 各自独立地为 0 或 1, 当 t 或 s 为零时表示该部分直接为单键;

A_1 、 A_2 和 A_3 各自独立地为单键、二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基或以上两者的组合;

H_t 在每次出现时各自独立地为 $-R_1-X-R_2-Y-R_3-Z-R_4$,

其中

R_1 在每次出现时各自独立地为二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基;



其中

m 、 n 、 p 、 q 和 r 各自独立地为 1-6;

W 是 O、S 或 NR_c ;

L_1 、 L_3 、 L_5 、 L_7 和 L_9 , 其直接与 R_1 或 R_2 连接且各自独立地为单键、O、S 或 NR_d ;

L_2 、 L_4 、 L_6 、 L_8 和 L_{10} 各自独立地为键、O、S 或 NR_c ;

V 是脂族烃基、 OR_f 、 SR_g 或 NR_hR_i ;

其中 R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_e 、 R_f 、 R_g 、 R_h 和 R_i 各自独立地为氢、羟基、脂族烃基氧基(oxaliphatic radical)、一价脂族烃基、一价杂脂族烃基、一价芳香烃基或一价杂芳香烃基;

Y 和 Z 在每次出现时各自独立地为 S 或 O;

R_2 在每次出现时各自独立地为单键、二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基;

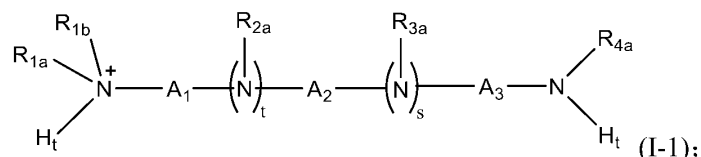
R_3 在每次出现时各自独立地为单键、二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基;

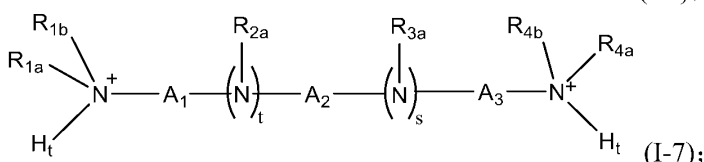
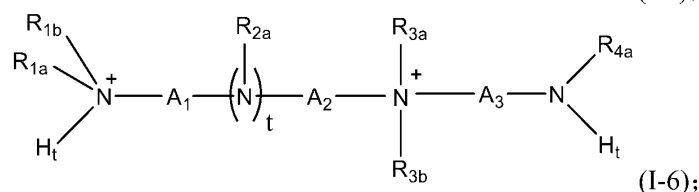
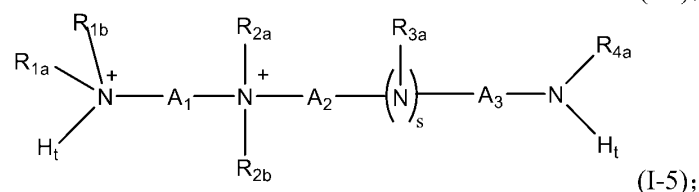
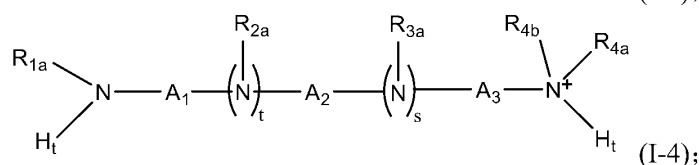
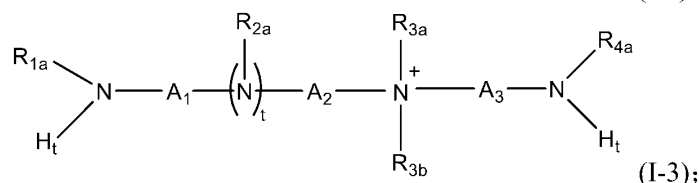
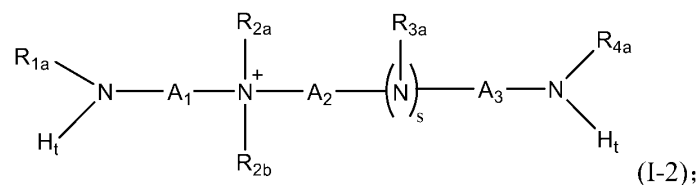
R_4 在每次出现时各自独立地为疏水基团;

以及式(I)骨架结构中的 N 原子任选被阳离子化;

条件是 R_{1a} 和 R_{4a} 中至少一个为氢。

在一些实施方案中, 式(I)的脂质体为可离子化形式的, 即式(I)骨架结构中的一个或多个 N 原子可被离子化。在进一步的实施方案中, 所述式(I)的脂质体为可离子化形式的, 由此形成下述结构





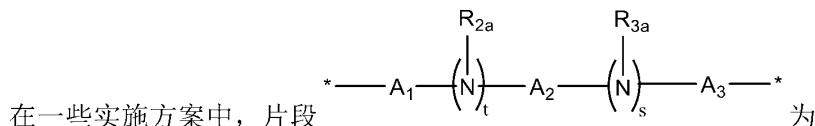
以及含有相应的抗衡离子，其中 R_{1b} 、 R_{2b} 、 R_{3b} 和 R_{4b} 各自独立地为氢、一价脂族烃基、一价杂脂族烃基、一价芳香烃基、一价杂芳香烃基或 H_t ，其余变量如式(I)所定义。在一些实施方案中，所述抗衡离子为与所述带正电的 N 原子形成盐的阴离子。合适的阴离子包括但不限于氯离子、溴离子、碘离子、硫酸根、硝酸根、磷酸根、柠檬酸根、甲磺酸根、三氟乙酸根、乙酸根、苹果酸根、甲苯磺酸根、酒石酸根、富马酸根、谷氨酸根、葡糖醛酸根、乳酸根、戊二酸根和马来酸根等。

在一些实施方案中， R_{1a} 或 R_{4a} 为氢；或者 R_{1a} 和 R_{4a} 各自为氢。

在一些实施方案中， t 和 s 均为 0；或者 t 为 0 且 s 为 1；或者 t 为 1 且 s 为 0。

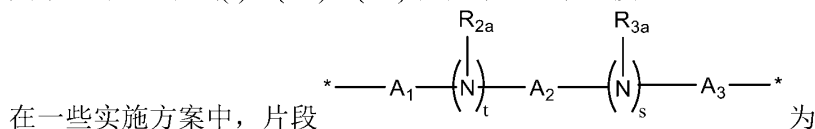
在一些实施方案中， t 和 s 均为 0； R_{1a} 为 H_t ，以及 R_{4a} 为氢；或者 t 和 s 均为 0； R_{1a} 为氢，以及 R_{4a} 为 H_t 。

在一些实施方案中， R_{2a} 和 R_{3a} 如果存在的话，各自独立地为氢、一价脂族烃基或一价杂脂族烃基；优选为氢、一价 C_{1-6} 烷基、一价 C_{1-6} 杂烷基，例如氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、单(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-6} 烷基或巯基 C_{1-6} 烷基。



- A_1-A_3 ，其中 A_1 和 A_3 各自独立地为 C_1-C_6 二价脂族烃基(例如， C_1-C_4 二价脂族烃基，例如 C_1-C_6 二价烷基，优选为 C_1-C_4 二价烷基)；或
- $A_1-(NR_{2a})-A_3$ ，其中 A_1 和 A_3 各自独立地为 C_1-C_6 二价脂族烃基(例如， C_1-C_4 二价脂族烃基，例如 C_1-C_6 二价烷基，优选为 C_1-C_4 二价烷基)，以及 R_{2a} 为氢、一价脂族烃基或一价杂脂族烃基；优选为氢、一价 C_{1-6} 烷基、一价 C_{1-6} 杂烷基，例如氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、单(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-6} 烷基或巯基 C_{1-6} 烷基；或
- $A_1-(NR_{2a})-A_2-(NR_{2b})-A_3$ ，其中 A_1 、 A_2 和 A_3 各自独立地为 C_1-C_6 二价脂族烃基(例如， C_1-C_4 二价脂族烃基，例如 C_1-C_6 二价烷基，优选为 C_1-C_4 二价烷基)；以及 R_{2a} 和 R_{2b} 各自独立地为氢、一价脂族烃基或一价杂脂族烃基；优选为氢、一价 C_{1-6} 烷基、一价 C_{1-6} 杂烷基，例如氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、单(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-6} 烷基或巯基 C_{1-6} 烷基；或
- $A_1-A_2-A_3$ ，其中 A_1 和 A_3 各自独立地为 C_1-C_6 二价脂族烃基(例如， C_1-C_4 二价脂族烃基，例如 C_1-C_6 二价烷基，优选为 C_1-C_4 二价烷基)；以及 A_2 为二价环状杂脂族烃基，例如包含 1-3 个选自氧、氮和硫的杂环子的 3 员至 7 员单环环状杂脂族烃基，优选为二价哌嗪基团；

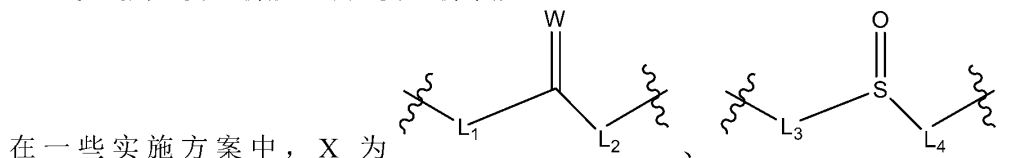
其中星号*表示式(I)或(I-1)至(I-7)中末端 N 原子连接。

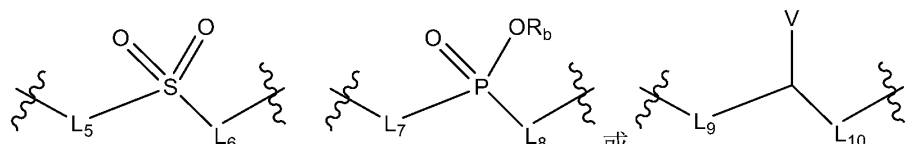


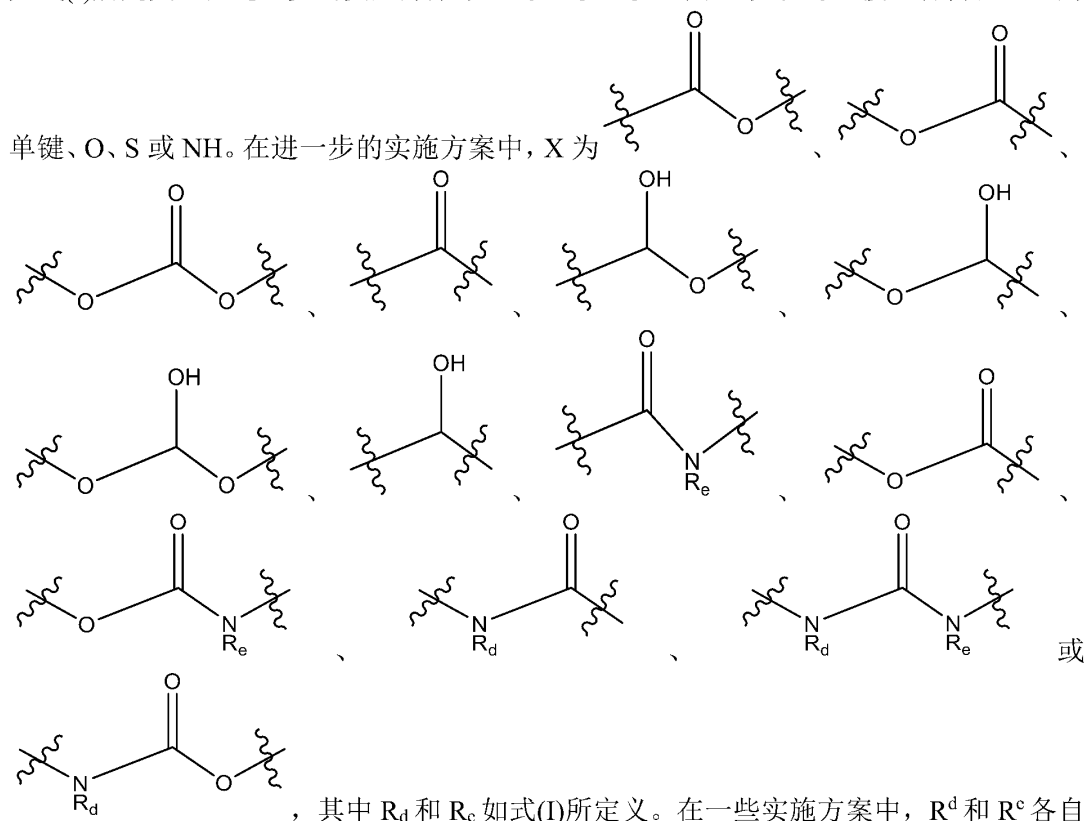
- $-(CH_2)_{m1}-$ ，其中 $m1$ 为 2-12 的整数，优选为 2-10 或 3-8；或 3 的整数；或
- $-(CH_2)_{m2}-(NR_{2a})-(CH_2)_{m3}-$ ，其中 $m2$ 和 $m3$ 各自独立地为 1-6 的整数；优选为 2-6 或 2-4 或 2 或 3 的整数； R_{2a} 为氢、一价 C_{1-6} 烷基、氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、单(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-6} 烷基或巯基 C_{1-6} 烷基；或
- $-(CH_2)_{m2}-(NR_{2a})-(CH_2)_{m4}-(NR_{2b})-(CH_2)_{m3}-$ ，其中 $m2$ 、 $m3$ 和 $m4$ 各自独立地为 1-6 的整数；优选为 2-6 或 2-4 或 2 或 3 的整数； R_{2a} 和 R_{2b} 各自独立地为氢、一价 C_{1-6} 烷基、氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、单(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-6} 烷基或巯基 C_{1-6} 烷基；或
- $-(CH_2)_{m2}-A_2-(CH_2)_{m3}-$ ，其中 $m2$ 和 $m3$ 各自独立地为 1-6 的整数；优选为 2-6 或 2-4 或 2 或 3 的整数；以及 A_2 为二价环状杂脂族烃基，例如包含 1-3 个选自氧、氮和硫的杂环子的 3 员至 7 员单环环状杂脂族烃基，优选为二价哌嗪基团；

其中星号*表示式(I)或(I-1)至(I-7)中末端 N 原子连接。

在一些实施方案中， R_1 为 C_{1-6} (例如， C_{1-4})二价脂族烃基或 C_{1-6} (例如， C_{1-4})二价杂脂族烃基，优选为 C_{1-4} 二价烷基或 C_{1-4} 二价杂烷基。



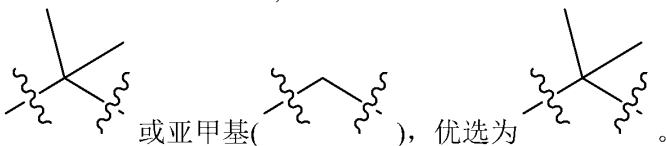
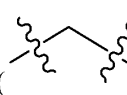
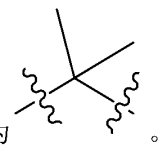

 , 其中各变量如式(I)所定义。在进一步的实施方案中, L₁、L₃、L₅、L₇和L₉与R₁连接且各自独立地为

单键、O、S或NH。在进一步的实施方案中, X为
 
 , 其中R_d和R_e如式(I)所定义。在一些实施方案中, R^d和R^e各自独立地为H或C₁₋₄一价脂族烃基, 优选为H或C₁₋₄一价烷基。

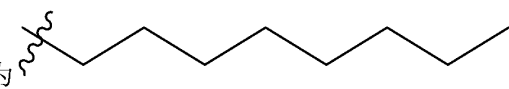
在一些实施方案中, Y和Z均为S; 或者Y为S, 以及Z为O; 或者Y为O, 以及Z为S; 或者Y和Z均为O。

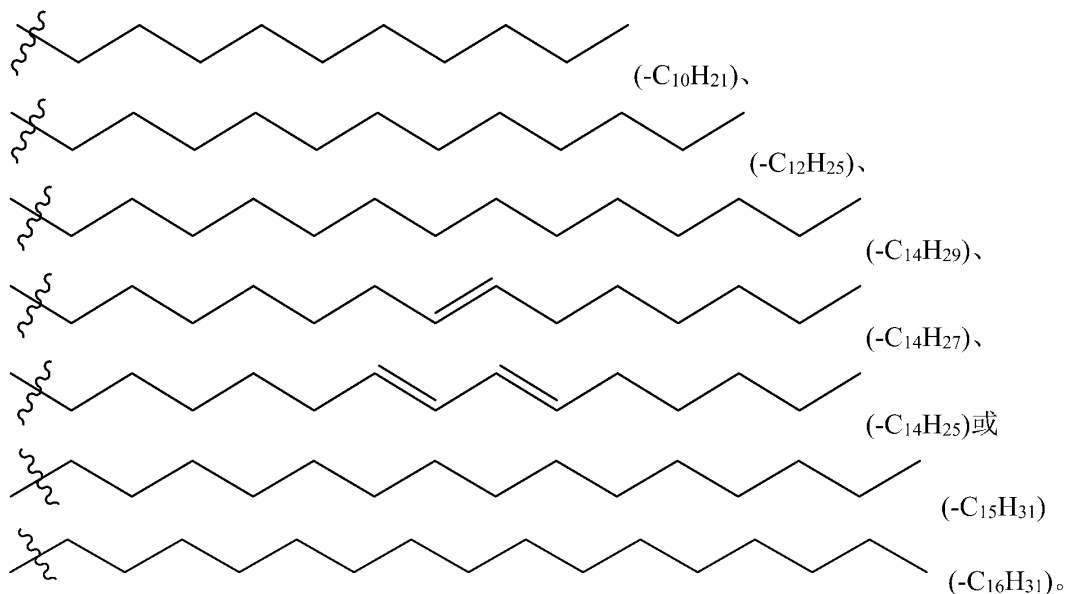
在一些实施方案中, R₂在每次出现时各自独立地为单键或C₁₋₆二价脂族烃基(例如, C₁₋₄二价脂族烃基, 优选为C₁₋₄二价烷基, 更优选为C₁₋₂二价烷基)。

在一些实施方案中, R₃在每次出现时各自独立地为单键或C₁₋₆二价脂族烃基(例如, C₁₋₄二价脂族烃基, 优选为C₁₋₄二价烷基)。在进一步的实施方案中, R₃在每次出现时各

自独立地为单键或
 
 或亚甲基(
 
), 优选为
 
 。

在一些实施方案中, R₄在每次出现时各自独立地为疏水基团, 所述疏水基团选自长链烷基、烯基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、芳基烯基、环状基团、脂环族基团和多环基团, 所述疏水基团任选具有至少一个选自氮、氧和硫的杂原子。在进一步的实施方案中, R₄在每次出现时各自独立地为C₈-C₃₀烷基、C₈-C₃₀烯基或C₈-C₃₀炔基。在进一步的实施

方案中, R₄为
 
 (-C₈H₁₇)、

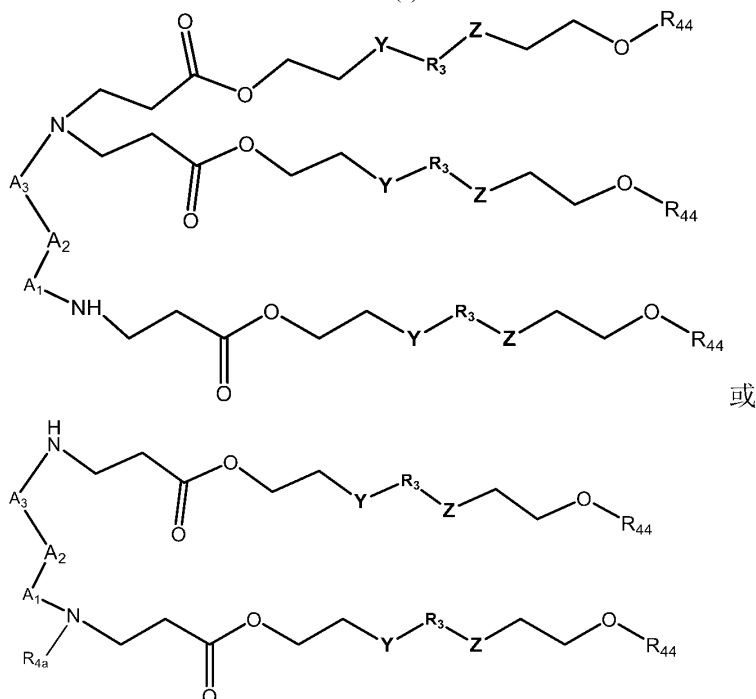


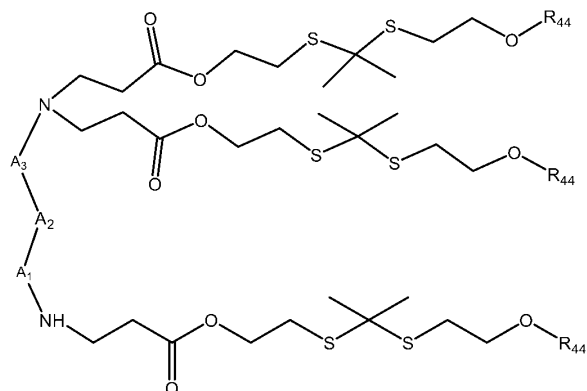
在进一步的实施方案中，R₄ 在每次出现时各自独立地为-(CH₂CH₂O)_m-C₈-C₃₀ 烷基、-(CH₂CH₂O)_y-C₈-C₃₀ 烯基或-(CH₂CH₂O)_y-C₈-C₃₀ 炔基，其中 y 为 0 或 1 或 2，例如 R₄ 为-CH₂CH₂O-C₈H₁₇、-CH₂CH₂O-C₁₀H₂₁、-CH₂CH₂O-C₁₂H₂₅、-CH₂CH₂O-C₁₄H₂₉ 或-CH₂CH₂O-C₁₅H₃₁。

在一些实施方案中，所述胺头的 pK_a 值大于 4，优选大于 6，更优选大于 8。

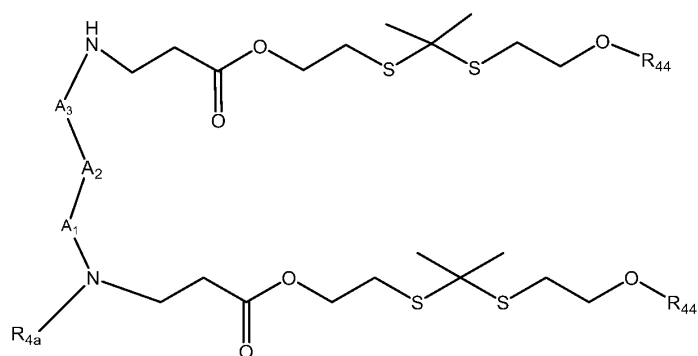
在一些实施方案中，A₁ 和 A₃ 各自独立地为单键或二价脂族烃基以及 A₂ 为二价脂族烃基或二价杂脂族烃基。在进一步的实施方案中，A₁ 和 A₃ 各自独立地为 C₁-C₆ 二价脂族烃基(例如，C₁-C₄ 二价脂族烃基，优选为 C₁-C₄ 二价烷基)以及 A₂ 为二价环状杂脂族烃基，例如包含 1-3 个选自氧、氮和硫的杂环子的 3 员至 7 员单环环状杂脂族烃基。在进一步的实施方案中，A₁ 和 A₃ 各自独立地为亚乙基以及 A₂ 为二价哌嗪基团。

在一些实施方案中，所述式(I)的脂质体为

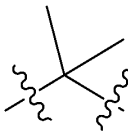
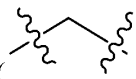




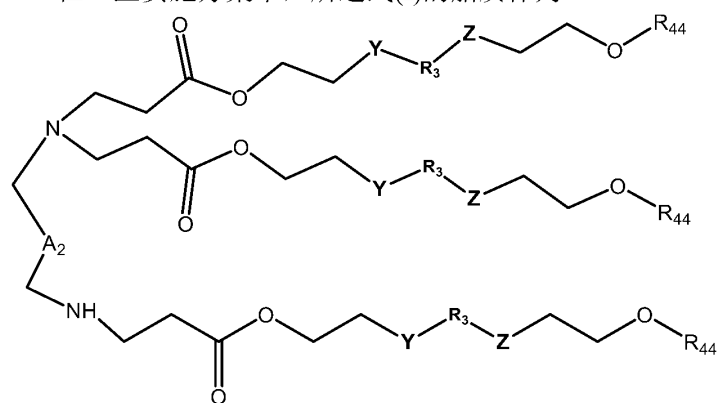
或



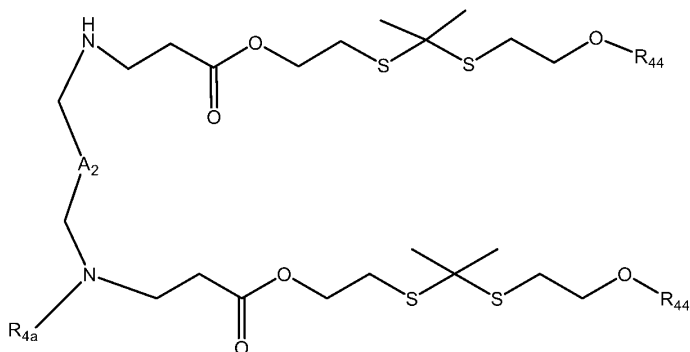
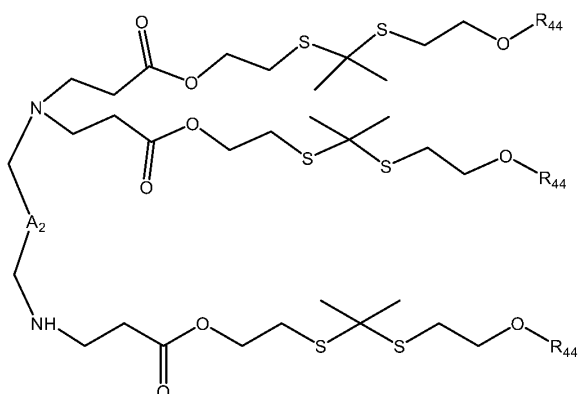
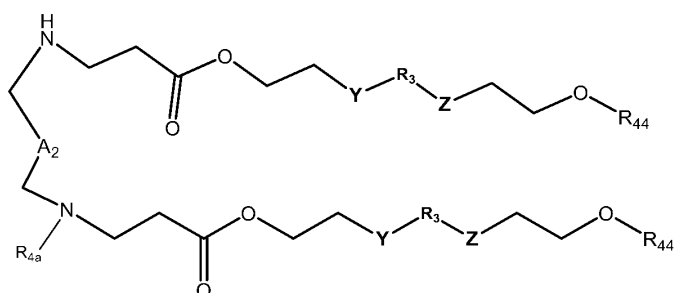
其中 A_1 、 A_2 、 A_3 和 R_{4a} 如式(I)所定义, 以及 $-(CH_2CH_2O)-R_{44}$ 为如式(I)所定义的 R_4 ; Y 和 Z 均为 S ; 或者 Y 为 S , 以及 Z 为 O ; 或者 Y 为 O , 以及 Z 为 S ; 或者 Y 和 Z 均为 O ;

R_3 在每次出现时各自独立地为单键或  或亚甲基()。在进一步的实施方案中, R_{44} 每次出现时各自独立地为烷基 C_uH_{2u+1} 或烯基 C_uH_{2u-1} , 其中 u 为 8-30, 优选为 8、12、14 或 16。在进一步的实施方案中, A_2 为二价环状杂脂族烃基, 优选为二价哌嗪基团, 以及 A_1 和 A_3 各自独立为 C_{1-4} 二价烷基, 例如亚甲基、亚乙基、亚丙基。

在一些实施方案中, 所述式(I)的脂质体为

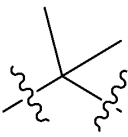
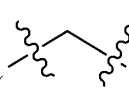


或

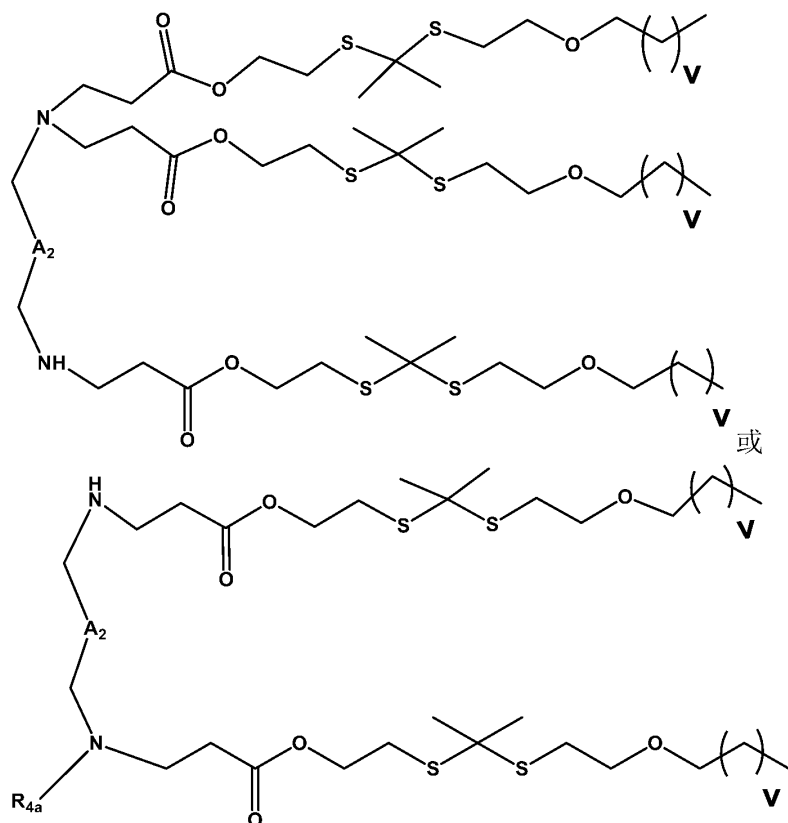


或

其中 A_2 和 R_{4a} 如式(I)所定义, 以及 $-(CH_2CH_2O)-R_{44}$ 为如式(I)所定义的 R_4 ; Y 和 Z 均为 S ; 或者 Y 为 S , 以及 Z 为 O ; 或者 Y 为 O , 以及 Z 为 S ; 或者 Y 和 Z 均为 O ; R_3 在每

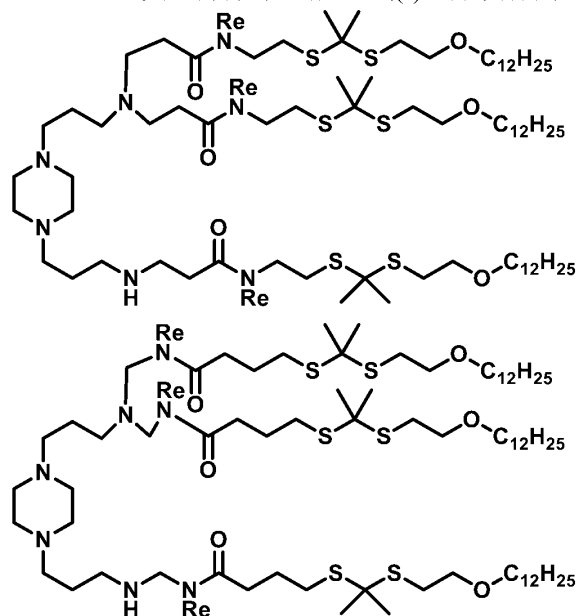
次出现时各自独立地为单键或  或亚甲基()。在进一步的实施方案中, R_{44} 每次出现时各自独立地为烷基 C_uH_{2u+1} 或烯基 C_uH_{2u-1} , 其中 u 为 8-30, 优选为 8、12、14 或 16。在进一步的实施方案中, A_2 为二价环状杂脂族烃基, 优选为二价哌嗪基团。

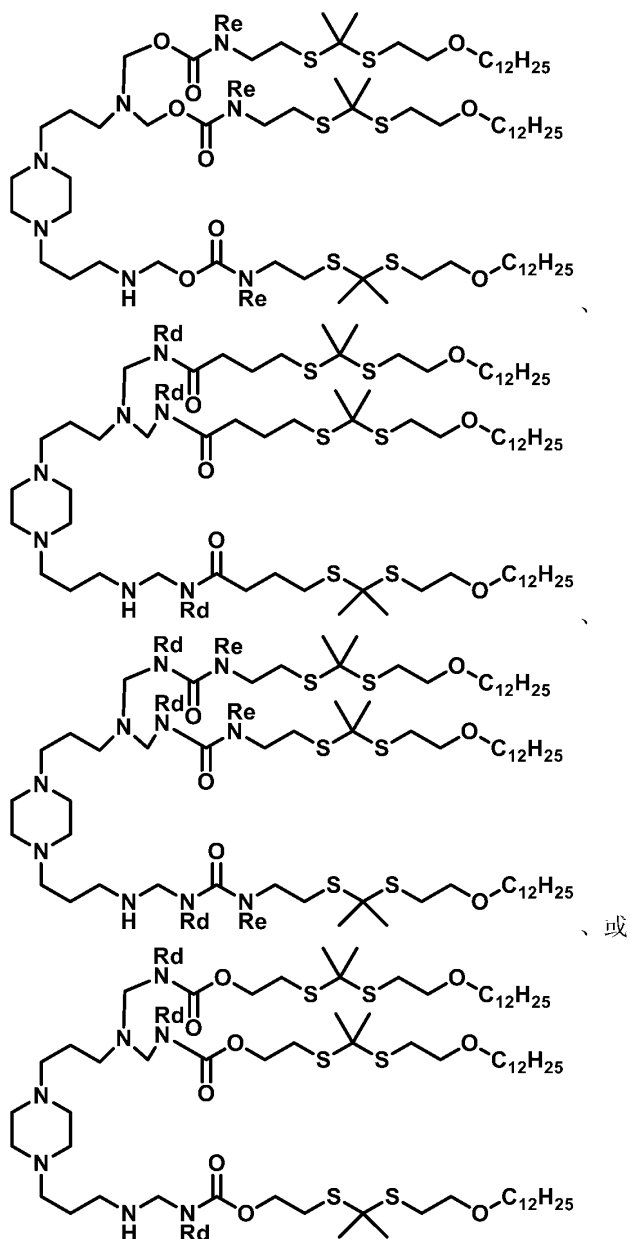
在一些实施方案中, 所述式(I)的脂质体为



其中 v 为 6-28, 优选 v 为 10; A_2 和 R_{4a} 如式(I)所定义。在进一步的实施方案中, A_2 为二价环状杂脂族烃基, 优选为二价哌嗪基团。

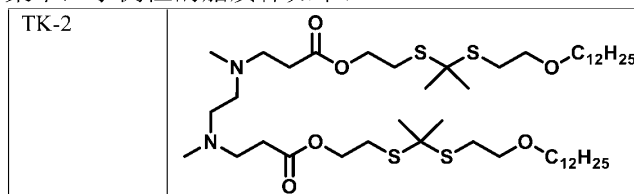
在一些实施方案中, 所述式(I)的脂质体为

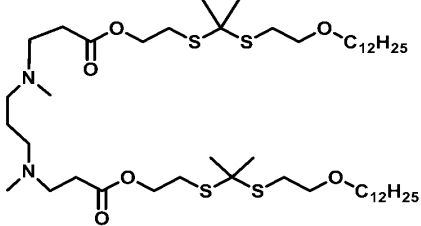
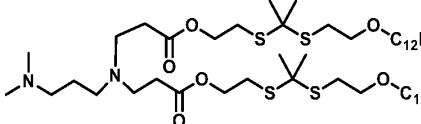
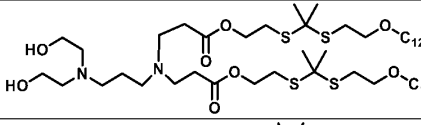
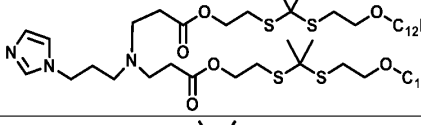
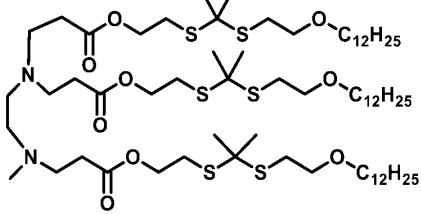
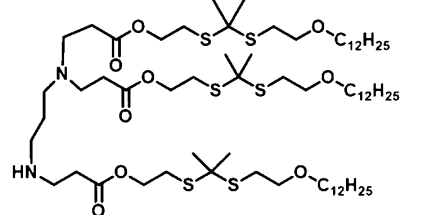
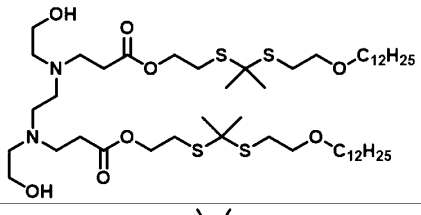
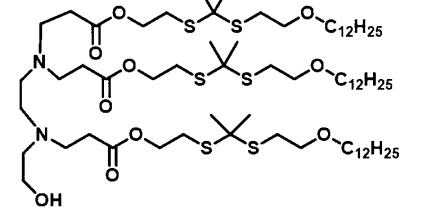




其中 R_d 和 R_e 如式(I)所定义, 优选各自独立为氢或一价脂族烷基, 例如 C₁₄ 烷基。

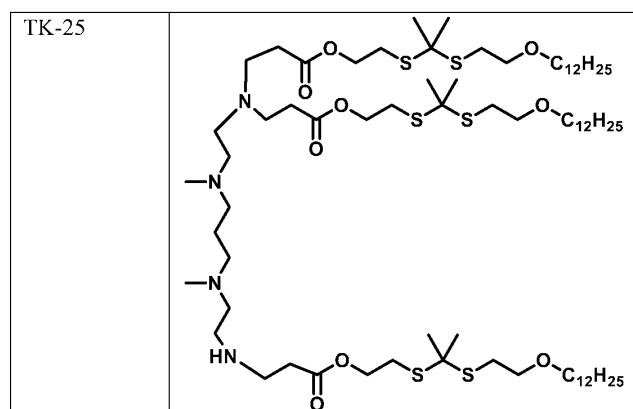
在一些实施方案中, 示例性的脂质体如下:



TK-3	
TK-5	
TK-6	
TK-7	
TK-8	
TK-9	
TK-10	
TK-11	

TK-12	
TK-13	
TK-14	
TK-15	
TK-16	
TK-17	
TK-18	

TK-19	
TK-20	
TK-21 (又名 BAmP- TK-12)	
TK-21-4	
TK-22	
TK-23	
TK-24	



在一些实施方案中，所述靶细胞为癌细胞、病原体感染的细胞或介导疾病的细胞；例如选自内皮细胞、上皮细胞、肌细胞、脑细胞、神经细胞、皮肤细胞、毛细胞、祖细胞和周细胞。

在一些实施方案中，所述核酸选自寡聚核苷酸、适配体、单链 DNA、双链 DNA、质粒 DNA(plasmid)、短异构体、反义分子、小干扰 RNA (siRNA)、不对称干扰 RNA (aiRNA)、microRNA (miRNA)、dsRNA (double-strand RNA)、shRNA (small/short hairpin RNA)、转移 RNA (tRNA)、信使 RNA (mRNA)、small activating RNA 以及 circRNA 和本领域已知的其他形式的 RNA 分子。

在一些实施方案中，所述核酸是以纳米复合物形式存在的。在一些实施方案中，所述纳米复合物进一步含有其它脂质。

在本发明中，A₁、A₂ 和 A₃ 及其相连的 N 共同构成了本发明脂质体的胺头，其与疏水性脂质尾部加成反应得到一系列脂质体，由于胺头可被质子化，该类脂质体纳米颗粒整体可呈正电性，因而能够与呈负电性的核酸例如 mRNA 及细胞膜、溶酶体膜发生静电相互作用，从而使该类脂质体能够有效包封和递送核酸。本发明的发明人发现：胺头上氮不完全取代的脂质体比完全取代脂质体具有更强的质子海绵作用，溶酶体逃逸能力得到改善，从而进一步提高了对核酸药物的递送能力；而且特异性响应于病灶细胞内的 ROS 物质增强药物释放从而降低了给药相关的毒性。本发明的发明人设计并合成了一类 ROS 响应性的脂质体，并筛选出了高效递送质粒的脂质体，例如本发明的 BAmP-TK-12，可实现 RAS 蛋白酶 DUF5 mRNA 在多种 KRAS 突变类型癌细胞及活动物层面上的高效、选择性递送，从而解决了肿瘤 RAS 突变普适性调控难的问题。本发明的发明人利用脂质体和 DUF5 mRNA 自组装形成的复合物(BAmP-TK-12/DUF5 mRNA)，预期能够在体外和体内抑制异常的 RAS/RAF/MAPK/ERK 和 RAS/PI3K/AKT 信号通路和肿瘤生长，实现靶癌细胞中多种突变类型 KRAS 的目标。本发明致力于探索 BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 复合物的癌症治疗潜力，为靶向抑制 RAS 的癌症治疗策略提供了新的思路。

定义

术语“脂族烃基(aliphatic)”是指饱和或不饱和的、直链或支链的、无环的、环状的或多环的烃部分(hydrocarbon moiety)。例子包括但不限于，烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基部分。

术语“烷基”包括选自包含 1 至 30，例如 1 至 24，1 至 18 个，例如 1 至 12 个，进一步例如 1 至 10 个，更进一步例如 1 至 8 个或 1 至 6 个或 1 至 4 个碳原子的直链和支链饱和和烃基的烃基。一价烷基或烷基的例子包括但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基(icosyl)和三十烷基(triacontyl)等等。

二价烷基，即亚烷基的例子包括但不限于亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基、亚己基、亚庚基、亚辛基、亚壬基、亚癸基、亚十一烷基、亚十二烷基、亚十三烷基、亚十四烷基、亚十五烷基、亚十六烷基、亚十七烷基、亚十八烷基、亚十九烷基、亚二十烷基(icosylene)和亚三十烷基(triacotylene)等等。

一价基团为从相应烃部分脱去一个氢原子所形成的基团。二价基团为从相应烃部分脱去两个氢原子所形成的基团。

术语“烯基”包括选自包含至少一个 $C=C$ 双键和 2 至 30，例如 2 至 24，2 至 18 个，例如 2 至 8 个，进一步例如 2 至 6 个碳原子的直链和支链烃基的烃基。烯基，例如 C_2-6 烯基的例子包括但不限于乙烯基(ethenyl/vinyl)、丙-1-烯基、丙-2-烯基、2-甲基丙-1-烯基、丁-1-烯基、丁-2-烯基、丁-3-烯基、丁-1,3-二烯基、2-甲基丁-1,3-二烯基、己-1-烯基、己-2-烯基、己-3-烯基、己-4-烯基、己-1,3-二烯基、十二碳烯基、十四碳烯基、十六碳烯基、十八碳烯基等。

术语“炔基”包括选自包含至少一个 $C\equiv C$ 三键和 2 至 30，例如 2 至 24，2 至 18 个，例如 2 至 8 个，进一步例如 2 至 6 个碳原子的直链和支链烃基的烃基。炔基，例如 C_2-6 炔基的例子包括但不限于乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基(炔丙基)、1-丁炔基、2-丁炔基和 3-丁炔基。

术语“环烷基”包括选自包含单环和多环(例如双环和三环)基团的饱和环烃基的烃基，包括稠合、桥连或螺环烷基。环烷基可以包含 3 至 30 个，3 至 12 个，例如 3 至 10 个，进一步例如 3 至 8 个，进一步例如 3 至 6 个、3 至 5 个或 3 至 4 个碳原子。进一步地，举例来说，环烷基可以选自包含 3 至 12 个，例如 3 至 10 个，进一步例如 3 至 8 个、3 至 6 个碳原子的单环基团。单环环烷基的例子包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环壬基、环癸基、环十一烷基和环十二烷基。术语“环烯基”是指含有至少一个双键的非芳香族的、环状的烃部分，如环己烯基、亚环己烯基。术语“环炔基”是指含有至少一个三键的非芳香族的、环状的烃部分，环辛炔基和亚环辛炔基。类似地，亚环烷基、亚环烯基和亚环炔基为相应的二价基团。

术语“杂脂族烃基(heteroaliphatic)”是指含有至少一个选自 N、O、P、B、S、Si、Sb、Al、Sn、As、Se 和 Ge 的杂原子的脂族部分。本发明的杂脂族烃基包括含有至少一个选自 N、O、P、B、S、Si、Sb、Al、Sn、As、Se 和 Ge 的杂原子的烷基、烯基或炔基，以及含有至少一个选自 N、O、P、B、S、Si、Sb、Al、Sn、As、Se 和 Ge 的杂原子的环烷基、环烯基或环炔基部分。环状杂脂族烃基包括 3 员至 7 员单环环状杂脂族烃基和 7 员至 12 员二环环状杂脂族烃基，所述环状杂脂族烃基含有 1-3 个或多个，例如 1-3 个选自氧、氮和硫的杂原子。在一些实施方案中，所述环状杂脂族烃基为包含 1-3 个选自氧、氮和硫的杂原子的 3 员至 7 员单环环状杂脂族烃基。环状杂脂族烃基包括但不限于吡咯烷基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、吡喃基、吗啉基、环氧乙烷基、氮杂环丙烷基、环硫乙烷基、氮杂环丁基、氧杂环丁烷基、硫杂环丁基、二硫杂环丁基、二氢吡啶、四氢吡啶、硫代吗啉、高哌嗪基、高哌啶基、氮杂环庚烷基、氧杂环庚烷基、硫杂环庚烷基、氧硫杂环己烷基、二氧杂环庚烷基、氧硫杂环庚烷基、氮氧杂环庚烷基、二硫杂环庚烷基、氮硫杂环庚烷基、二氮杂环庚烷、氮硫杂环己烷基、氧氮杂卓、二氮杂卓、硫氮杂卓、二氢噻吩基、二氢吡喃基、二氢呋喃基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、四氢噻喃基、吡咯啉基、吡啶基、二氧杂环己烷基、二氧环戊基、吡啶基、吡啶基、二噻烷基、二噻环戊基、噻唑酮基、二氧代-硫代吗啉基、氮杂双环[3.1.0]己基、氮杂双环[4.1.0]庚烷基、氮杂双环[2.2.2]己基等。典型的杂脂族烃基为杂烷基，即含有至少一个 N、O 或 S 的杂原子的烷基，例如含有一个 N 原子的 C_{1-6} 烷基(例如氨基烷基、烷基氨基烷基等，又例如氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、单(C_{1-6} 烷基)氨基烷基)、含有一个 O 原子的 C_{1-6} 烷基(例如烷氧基烷基、羟基烷基等，又例如 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 烷基)、或含有一个 S 原子的 C_{1-6} 烷基(例如烷硫基烷基、巯基烷基等，又例如 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-6} 烷基、

烷基 C₁₋₆ 烷基); 或者含有一个 N 原子的 C₁₋₄ 杂烷基、含有一个 O 原子的 C₁₋₄ 杂烷基、或含有一个 S 原子的 C₁₋₄ 杂烷基。

术语“脂族烃基氧基(oxyaliphatic)”是指-O-脂族烃基。脂族烃基氧基的例子包括甲氧基, 乙氧基, 正丙氧基, 异丙氧基, 正丁氧基, 异丁氧基, 仲丁氧基和叔丁氧基。

术语“芳基(芳香烃基, aryl)”是指 C₆ 单环、C₁₀ 二环、C₁₄ 三环、C₂₀ 四环或 C₂₄ 五环的芳香环体系。芳基的例子包括苯基, 亚苯基, 萘基, 亚萘基, 蒽基, 亚蒽基, 茈萘基和亚茈萘基。

术语“杂芳基(杂芳族烃基, heteroaryl)”是指具有一个或多个杂原子(如 O, N, S 或 Se)的芳族 5-8 元单环, 8-12 元双环, 11-14 元三环和 15-20 元四环的环体系。杂芳基的实例包括呋喃基、亚呋喃基、茚基、亚茚基、吡咯基、亚吡咯基、噻吩基、亚噻吩基、噁唑基、亚噁唑基、咪唑基、亚咪唑基、苯并咪唑基、亚苯并咪唑基、噻唑基、亚噻唑基、吡啶基、亚吡啶基、嘧啶基、亚嘧啶基、喹啉基、亚喹啉基、喹啉基、亚喹啉基、异喹啉基、异亚喹啉基、吲哚基和亚吲哚基。

除非另有说明, 本申请提及的脂族烃基、杂脂族烃基、脂族烃基氧基、烷基、亚烷基、烯基、亚烯基、炔基、亚炔基、环烷基、亚环烷基、环烯基、亚环烯基、环炔基、亚环炔基、杂环烷基、亚杂环烷基、杂环烯基、亚杂环烯基、芳基和杂芳基包括取代和未取代的部分二者。环烷基、亚环烷基、环烯基、亚环烯基、环炔基、亚环炔基、杂环烷基、亚杂环烷基、杂环烯基、亚杂环烯基、芳基和杂芳基上的可能取代基包括、但不限于、C₁-C₁₀ 烷基、C₂-C₁₀ 烯基、C₂-C₁₀ 炔基、C₃-C₂₀ 环烷基、C₃-C₂₀ 环烯基、C₂-C₂₀ 杂环烷基、C₃-C₂₀ 杂环烯基、C₁-C₁₀ 烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基、氨基、C₁-C₁₀ 烷基氨基、C₂-C₂₀ 二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基、C₁-C₁₀ 烷基磺酰氨基、芳基磺酰氨基、C₁-C₁₀ 烷基亚氨基、芳基亚氨基、C₁-C₁₀ 烷基磺酰亚氨基、芳基磺酰亚氨基、羟基、卤代、硫代(thio)、C₁-C₁₀ 烷硫基、芳硫基、C₁-C₁₀ 烷基磺酰基、芳基磺酰基、酰基氨基、氨基酰基、氨基硫代酰基(aminothioacyl)、酰胺基、脒基、胍基、脲基、硫脲基、氰基、硝基、亚硝基、叠氮基、酰基、硫代酰基、酰基氧基、羧基、和羧酸酯。另一方面、脂族烃基、杂脂族烃基、脂族烃基氧基、烷基、亚烷基、烯基、亚烯基、炔基和亚炔基上的可能取代基包括以上列出的所有取代基, 但是 C₁-C₁₀ 烷基除外。环烷基、亚环烷基、环烯基、亚环烯基、杂环烷基、亚杂环烷基、杂环烯基、亚杂环烯基、芳基和杂芳基还可以彼此耦合。

术语“药物活性分子”是指任何意在用于疾病的医学诊断、治愈、治疗或预防的化学物质, 包括小分子和大分子药物。

术语“小分子物质”是指具有小于 800 道尔顿(例如, 小于 500 道尔顿)的分子量的有机化合物, 包括寡肽、寡糖和寡核苷酸。

术语“大分子药物”包括“肽”或“蛋白质”, 是指通过酰胺键连接在一起的天然或非天然氨基酸的聚合物, 其具有 800 道尔顿以上的分子量。

术语“核酸”是指通过磷酸二酯键连接在一起的核苷酸的聚合物。这些聚合物都可以被化学修饰。具体地, 所述核酸包括任何形式的核酸分子, 包括但不限于寡聚核苷酸、适配体、单链 DNA、双链 DNA、质粒 DNA(plasmid)、短异构体、反义分子、小干扰 RNA (siRNA)、不对称干扰 RNA (aiRNA)、microRNA (miRNA)、dsRNA (Dicer-substrate RNA)、shRNA (small/short hairpin RNA)、转移 RNA (tRNA)、信使 RNA (mRNA)、small activating RNA 以及 circRNA 和本领域已知的其他形式的 RNA 分子。术语“核酸药物”是指上述具有疾病治疗功能的核酸分子。所述核酸分子作为核酸药物还可以包含任何其它可药用的载体或赋形剂。

术语“药物递送系统”是指用于将药物(特别是核酸)给药至有此需要的受试者, 例如人或动物的组合物。在一些实施方案中, 药物递送系统包含本发明的脂质体和/或其它脂质体作为药物递送载体, 能够将包封药物(核酸)的脂质体递送至人或动物中感兴趣的部位,

优选地选择性地递送至靶细胞，例如癌细胞中，而不是递送至身体或器官的其他部位；更优选地通过内吞作用递送至靶细胞。

术语“药物递送载体”是指在药物递送过程中将药物释放至体内，例如靶细胞，以增强药物的选择性、功效、安全性和/或药代动力学的物质。

术语“靶细胞”是指通过药物递送系统被递送有药物的细胞，通常是指癌细胞、病原体感染的细胞或介导疾病的细胞；例如选自内皮细胞、上皮细胞、肌细胞、脑细胞、神经细胞、皮肤细胞、毛细胞、祖细胞和周细胞。

术语“非共价相互作用”是指任何非共价结合，其包括离子相互作用、氢键合、范德华力相互作用和疏水相互作用。

附图说明

图 1 示出了脂质体对 RFP mRNA 递送。

图 2 示出了 BAmP-TK-12 脂质体的构效关系研究。其中 a) BAmP-TK-12 和 BAmP-NTK 的化学结构；b) BAmP-TK-12 和 BAmP-NTK 对 RFP mRNA 的包裹效率；c) BAmP-TK-12 和 BAmP-NTK 对 ROS 刺激的 mRNA 释放；d) HeLa 细胞中 BAmP-TK-12 和 BAmP-NTK 对 Cy3-mRNA 的递送效率；e) HeLa 细胞中 BAmP-TK-12 和 BAmP-NTK 对 RFP mRNA 的递送效率。

图 3 示出了以 21TK（即 BAmP）为胺头的脂质体中疏水性脂质尾部个数对递送的影响。

图 4 示出了 HeLa 细胞中本发明的脂质体对不同剂量 GFP mRNA 的递送效率。

图 5 示出了 BAmP-TK-12 递送 DUF5 mRNA 抑制肿瘤细胞增殖，其中 a) BAmP-TK-12 递送 DUF5 mRNA 抑制含有 KRAS^{G13D} 突变的结直肠癌细胞系 HCT-116 增殖；b) BAmP-TK-12 递送 DUF5 mRNA 抑制含有 KRAS^{G13C} 突变的结直肠癌细胞系 H358 增殖；c) BAmP-TK-12 递送 DUF5 mRNA 抑制含有 KRAS^{G12V} 突变的结直肠癌细胞系 SW480 增殖；d) BAmP-TK-12 递送 DUF5 mRNA 抑制含有 KRAS^{G12S} 突变的非小细胞肺癌细胞系 A549 增殖；e) Western blot 实验，对于 HCT-116, H358, SW480, A549 细胞系，经 BAmP-TK-12 递送的 DUF5 mRNA 通过切割 RAS 蛋白抑制 AKT 蛋白和 ERK 蛋白的磷酸化抑制肿瘤细胞增殖。

图 6 示出了 BAmP-TK-12 脂质体对 DUF5 mRNA 的活体递送及肿瘤抑制。a) BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 的活体分布。b) HCT-116 荷瘤小鼠肿瘤相对体积增长曲线。c) 实验终点小鼠肿瘤组织。d) 肿瘤组织 western blot 实验。

图 7 示出了化合物 TK-21(BAmP-TK-12)的 NMR 谱图。

图 8 示出了化合物 TK-21-4(BAmP with 4 TK-12)的 NMR 谱图。

图 9 示出了 BAmP-TK-12 对 pDHFR-GFP 质粒(5185 bp)的递送实验。

图 10 示出了 BAmP-TK-12 对 pDNMT3A-GFP (9746 bp)质粒的递送实验。

图 11 示出了本发明的脂质体对 DUF5 mRNA 和 GFP mRNA 的递送实验。

图 12 示出了 BAmP-TK-12 对 P53 mRNA 的递送实验。

图 13 示出了 BAmP-TK-12 对 GFP 蛋白质和 GFP mRNA 的递送实验。

具体实施方式

下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述，给出的实施例仅为了阐明本发明，而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南，并不以任何方式构成对本发明的限制。

下述实施例中的定量试验，均设置三次重复实验，结果取平均值。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

以下实施例中胆固醇为麦克林公司产品，货号为 C10006595, CAS: 57-88-5。

以下实施例中 DOPE(二油酰磷脂酰乙醇胺)为瓦硕生物公司产品, CAS: 4004-05-1。

以下实施例中 DSPE-PEG2000 为瓦硕生物公司产品, 货号为 E05275, CAS: 147867-65-0。

以下实施例中质粒 pDHFR-GFP, pDNMT3A-GFP 为武汉淼灵生物科技有限公司产品。

以下实施例中 GFP 蛋白为北京索莱宝科技有限公司产品。

以下实施例中 HeLa 细胞、HCT-116 细胞、SW480 细胞、A549 细胞为北京协和细胞中心产品。

以下实施例中 Nu/Nu 小鼠为北京维通利华实验动物技术有限公司产品。

实施例

实施例 1: 脂质体合成及复合物制备

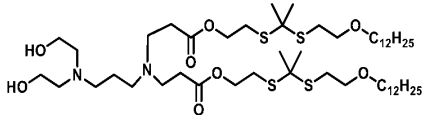
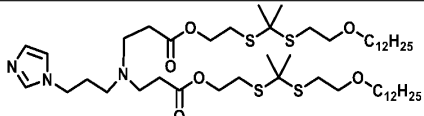
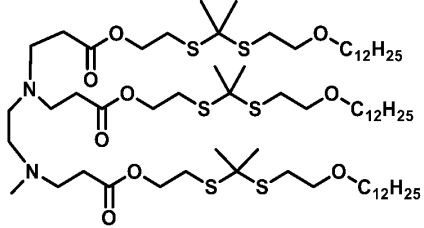
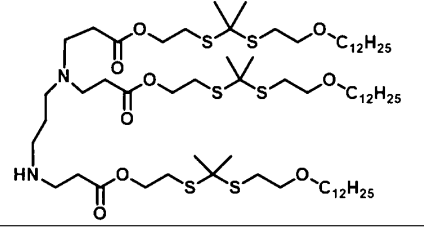
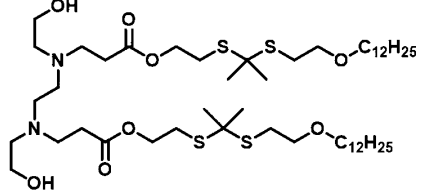
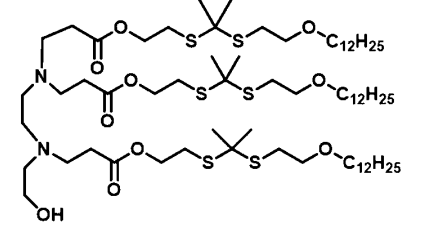
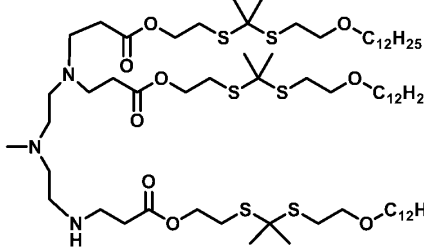
实施例 1a: 脂质体合成

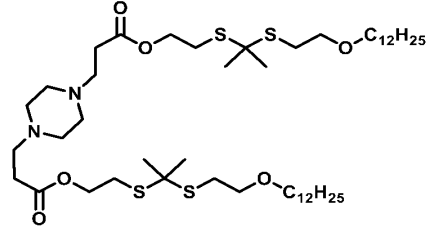
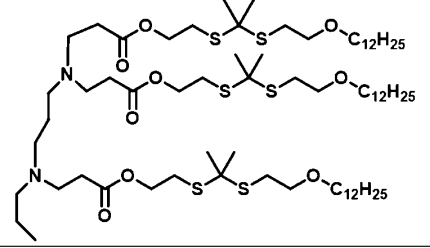
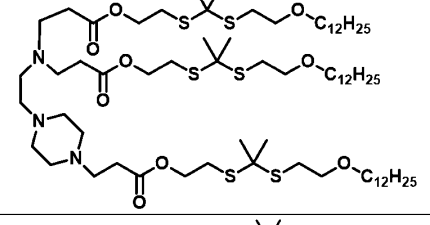
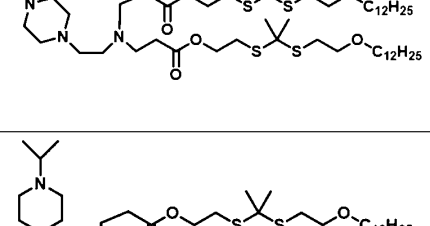
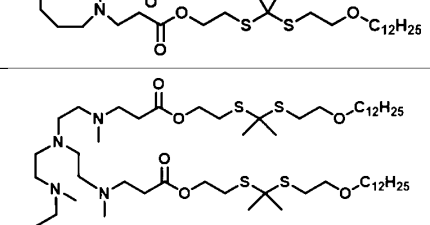
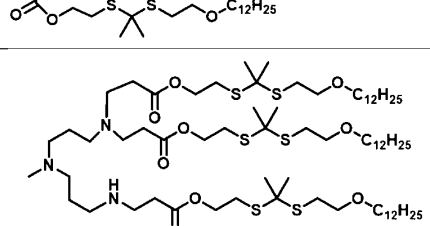
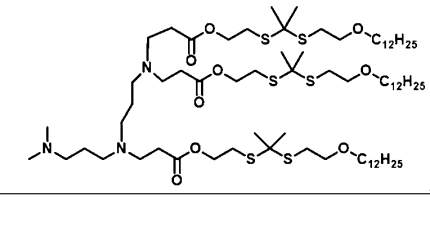
脂质体由亲水胺化合物及疏水尾部通过迈克尔加成反应合成, 其中疏水尾部即为含有缩酮的丙烯酸酯, 具体为含有缩硫酮的丙烯酸酯。其中含有缩硫酮的丙烯酸酯, 即 2-((2-((2-(十二烷氧基)乙基)硫基)丙烷-2-基)硫基)乙基丙烯酸酯如 CN110101665A 实施例 1 和 2 的方法制备。所制备的 2-((2-((2-(十二烷氧基)乙基)硫基)丙烷-2-基)硫基)乙基丙烯酸酯的 ^1H NMR 如下所示: ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 6.18 (s, 1H), 5.97 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 4.26 (s, 2H), 3.51 (s, 4H), 3.34 (s, 6H), 2.87 (s, 1H), 2.74 (s, 1H), 1.55 (s, 4H), 1.50 – 1.39 (m, 1H), 1.25 (s, 6H), 0.86 (s, 1H)。

然后使所制备的 2-((2-((2-(十二烷氧基)乙基)硫基)丙烷-2-基)硫基)乙基丙烯酸酯与亲水胺化合物 1,4-双(3-氨基丙基)哌嗪(1,4-Bis(3-aminopropyl)piperazine, CAS: 7209-38-3, 简称 BAmP)以 3.3:1 的摩尔比混合, 80°C 加热 24 h, 粗产物在硅胶柱上以二氯甲烷/甲醇为洗脱液进行纯化, 得到脂质体 TK-21(亦称为 BAmP-TK-12)。

以类似的方法, 以合适比例的相应亲水胺(对于含有氨基上四个游离氢原子的亲水胺而言, 2-((2-((2-(十二烷氧基)乙基)硫基)丙烷-2-基)硫基)乙基丙烯酸酯与亲水胺的摩尔比为 3.3:1; 对于含有氨基上三个游离氢原子的亲水胺而言, 2-((2-((2-(十二烷氧基)乙基)硫基)丙烷-2-基)硫基)乙基丙烯酸酯与亲水胺的摩尔比为 2.4:1), 制备了相应的脂质体化合物。

编号	TK 编号	结构式	NMR	分子量
1)	TK-2		^1H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 4.23 (s, 4H), 3.58 (s, 4H), 3.43 (s, 4H), 2.84 (s, 7H), 2.73 (s, 4H), 2.49 (s, 7H), 2.25 (s, 5H), 1.79 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H), 1.60 (s, 16H), 1.26 (s, 37H), 0.88 (s, 6H).	MS Calc. 925.6 Found. 925.8
2)	TK-3		^1H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 4.23 (s, 4H), 3.58 (s, 4H), 3.43 (s, 4H), 2.84 (s, 8H), 2.70 (s, 4H), 2.48 (s, 4H), 2.36 (s, 4H), 2.22 (s, 6H), 1.60 (s, 18H), 1.26 (s, 36H), 0.88 (s, 6H).	MS Calc. 939.6 Found. 939.8
3)	TK-5		^1H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 4.22 (s, 4H), 3.58 (s, 4H), 3.43 (s, 4H), 2.82 (s, 11H), 2.45 (s, 5H), 2.30 (s, 6H), 1.60 (s, 16H), 1.26 (s, 34H), 0.88 (s, 6H).	MS Calc. 939.6 Found. 939.8

4)	TK-6		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.23 (s, 2H), 3.79 (s, 4H), 3.60 (s, 4H), 3.44 (s, 4H), 2.87 (s, 10H), 2.53 – 2.18 (m, 5H), 1.62 (s, 15H), 1.26 (s, 38H), 0.88 (s, 6H).	MS Calc. 999.6 Found.99 9.9
5)	TK-7		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.27 (s, 1H), 7.08 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 4.23 (t, J = 6.9 Hz, 3H), 3.97 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 3.58 (t, J = 6.7 Hz, 3H), 3.43 (t, J = 6.7 Hz, 3H), 2.81 (ddd, J = 23.7, 15.3, 6.8 Hz, 9H), 2.50 – 2.32 (m, 4H), 1.93 (dd, J = 13.2, 6.5 Hz, 1H), 1.72 – 1.46 (m, 14H), 1.26 (s, 32H), 0.88 (t, J = 6.4 Hz, 6H).	Calc. 962.6 Found.96 2.9
6)	TK-8		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.22 (s, 4H), 3.58 (s, 4H), 3.43 (s, 4H), 2.82 (s, 11H), 2.71 (s, 2H), 2.55 (s, 2H), 2.46 (s, 5H), 2.24 (s, 2H), 1.60 (s, 19H), 1.26 (s, 42H), 0.88 (s, 9H).	Calc. 1328.86 Found.13 29.86
7)	TK-9		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.22 (s, 4H), 3.58 (s, 4H), 3.43 (s, 4H), 2.80 (ddd, J = 27.5, 16.4, 9.3 Hz, 15H), 2.45 (s, 5H), 1.60 (s, 19H), 1.26 (s, 50H), 0.88 (s, 9H).	Calc. 1328.86 Found.13 29.86
8)	TK-10		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.25 (s, 2H), 3.79 (s, 1H), 3.58 (s, 5H), 3.43 (s, 4H), 2.86 (s, 11H), 2.58 (s, 9H), 1.60 (s, 12H), 1.26 (s, 32H), 0.88 (s, 6H).	Calc. 985.6 Found.98 5.9
9)	TK-11		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.27 (s, 4H), 4.07 (s, 4H), 3.58 (s, 4H), 3.43 (s, 4H), 2.80 (ddd, J = 27.5, 16.4, 9.3 Hz, 15H), 2.45 (s, 6H), 1.60 (s, 19H), 1.26 (s, 48H), 0.88 (s, 9H).	Calc. 1358.87 Found.13 55.91
10)	TK-12		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.18 (dd, J = 27.0, 20.2 Hz, 4H), 3.60 (dd, J = 19.6, 12.9 Hz, 4H), 3.43 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 2.85 (ddt, J = 20.0, 13.3, 6.5 Hz, 12H), 2.70 (t, J = 6.9 Hz, 3H), 2.61 – 2.35 (m, 12H), 2.23 (s, 3H), 1.99 (s, 1H), 1.72 – 1.49 (m, 16H), 1.26 (s, 47H), 0.88 (t, J = 6.3 Hz, 9H).	Calc.134 4.87 Found.13 44.81

11)	TK-13		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.23 (s, 4H), 3.58 (s, 4H), 3.43 (s, 4H), 2.84 (s, 8H), 2.69 (s, 5H), 2.48 (s, 11H), 1.60 (s, 17H), 1.26 (s, 38H), 0.88 (s, 6H).	Calc.923.6 Found.923.8
12)	TK-14		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.22 (s, 4H), 3.58 (s, 4H), 3.43 (s, 4H), 2.82 (s, 13H), 2.54 (dd, J = 14.5, 7.2 Hz, 1H), 2.45 (s, 9H), 1.60 (s, 18H), 1.26 (s, 45H), 0.88 (s, 9H).	Calc.1371.91 Found.1371.91
13)	TK-15		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.22 (s, 4H), 3.58 (s, 5H), 3.43 (s, 5H), 2.84 (s, 13H), 2.48 (s, 16H), 1.60 (s, 19H), 1.26 (s, 45H), 0.88 (s, 9H).	Calc.1370.90 Found.1384.90
14)	TK-16		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.22 (s, 4H), 3.58 (s, 4H), 3.43 (s, 4H), 2.82 (s, 11H), 2.60 (s, 3H), 2.55 – 2.37 (m, 11H), 2.28 (s, 3H), 1.60 (s, 15H), 1.26 (s, 36H), 0.88 (s, 6H).	Calc.980.6 Found.980.9
15)	TK-17		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.21 (s, 4H), 3.58 (s, 4H), 3.43 (s, 4H), 2.82 (s, 14H), 2.43 (s, 4H), 2.27 (s, 2H), 1.60 (s, 19H), 1.26 (s, 38H), 0.88 (s, 6H).	Calc.1023.7 Found.1023.8
16)	TK-18		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.23 (s, 5H), 3.58 (s, 6H), 3.43 (s, 6H), 2.84 (s, 12H), 2.72 (s, 5H), 2.61 (s, 5H), 2.49 (s, 10H), 2.25 (s, 7H), 1.60 (s, 23H), 1.26 (s, 54H), 0.88 (s, 9H).	Calc.1443.98 Found.1443.98
17)	TK-19		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.22 (s, 4H), 3.79 (s, 1H), 3.58 (s, 5H), 3.43 (s, 5H), 2.82 (s, 15H), 2.45 (s, 9H), 1.60 (s, 23H), 1.26 (s, 54H), 0.88 (s, 9H).	Calc.1400.93 Found.1400.94
18)	TK-20		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.21 (s, 6H), 3.57 (s, 6H), 3.42 (s, 6H), 2.80 (s, 19H), 2.39 (dt, J = 14.8, 7.6 Hz, 14H), 2.29 (s, 6H), 1.59 (s, 28H), 1.25 (s, 57H), 0.87 (s, 9H).	Calc.1414.95 Found.1414.95

19)	TK-21		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.22 (s, 6H), 3.58 (s, 6H), 3.43 (s, 6H), 2.82 (s, 12H), 2.69 (s, 6H), 2.55 (s, 6H), 2.35 (s, 6H), 2.23 (s, 9H), 1.60 (s, 27H), 1.26 (s, 56H), 0.88 (s, 9H).	Calc. 1414.95 Found. 1455.98
20)	TK-21-4		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.22 (s, 7H), 3.58 (s, 7H), 3.43 (s, 7H), 2.82 (s, 23H), 2.45 (s, 14H), 2.30 (s, 5H), 1.60 (s, 42H), 1.26 (s, 65H), 0.88 (s, 12H).	Calc. 1874.23 Found. 1874.24
21)	TK-22		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.25(q,4H), 3.60(s,4H), 3.45(s,4H), 2.84(m,12H), 2.66(s,2H), 2.55(s,2H), 2.47(q,4H), 2.38(t,2H), 1.62(s,13H), 1.59(m,4H), 1.46(q,2H), 1.28(s,38H), 0.88(s,9H).	Calc. 953.6 Found. 953.8
22)	TK-23		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.22 (s,4H), 3.59(s,4H), 3.43(s,4H), 2.82(m,11H), 2.64(m,4H), 2.48(m,7H), 1.61(s, 18H), 1.26 (m,32H), 1.11(s,4H), 0.88(s,6H).	Calc. 939.6 Found. 939.8
23)	TK-24		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.23 (s, 4H), 3.58 (s, 4H), 3.43 (s, 4H), 2.94 – 2.77 (m, 7H), 2.71 (s, 4H), 2.61 (s, 7H), 2.46 (d, J = 12.0 Hz, 10H), 2.24 (s, 6H), 1.60 (s, 15H), 1.26 (s, 34H), 0.88 (s, 6H).	Calc. 1025.72 Found. 1025.71
24)	TK-25		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 5.30 (s, 2H), 4.22 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 3.58 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 3.43 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 2.98 – 2.74 (m, 2H), 2.69 (s, 1H), 2.53 (s, 1H), 2.46 (s, 1H), 2.35 (s, 1H), 2.22 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 1.60 (s, 3H), 1.26 (s, 4H), 0.88 (t, J = 6.6 Hz, 1H).	Calc. 1443.98 Found. 1443.95

实施例 1b: 脂质体复合物的制备

为了构建转染效率高、生物兼容性好的递送载体, 发明人进行了脂质体复合物的制备, 具体方法如下: 分别将实施例 1a 所制备的脂质体, 胆固醇, DOPE 溶解在三氯甲烷中, 配制浓度为 10 mg/mL 的混合溶液; 按比例取三者的混合溶液挥发成膜, 再用无水乙醇超声溶解后滴加入含 5 mg/mL DSPE-PEG2000 的醋酸钠缓冲溶液(200 mM, pH=5.2)中, 2000 rpm 搅拌 5 分钟, 制备得到脂质体复合物。本实施例选用实施例 1a 制备的脂质体(TK-2,

TK-3, TK-5, TK-6, TK-7, TK-8, TK-10, TK-11, TK-13, TK-14, TK-15, TK-16, TK-17, TK-18, TK-20, TK-21, 按照上述方法, 组装出脂质体:胆固醇:DOPE: DSPE-PEG2000 的质量比依次为 16:4:4:1 的 16 种脂质体复合物。

将上述制备得到的 16 种脂质体复合物按照相同的方法递送 RFP mRNA, 检测 RFP 阳性细胞率以进行脂质体的筛选。具体方法如下:

在醋酸钠缓冲溶液(25 mM, pH=5.2)中加入含有 0.33 $\mu\text{g/mL}$ RFP mRNA, 与 15 倍质量的上述制备的 16 种脂质体复合物分别混合, 混匀后孵育 15 分钟, 完成脂质体/RFP mRNA 自组装。各取 50 μL 自组装体系加入到 HeLa 细胞中, 孵育 8 h 后更换新鲜培养基, 于 40 h 后用流式细胞仪分析 RFP 阳性细胞率。

结果见图 1, 表明 16 种脂质体均能进行 RFP mRNA 的递送, 其中脂质体 TK-21 (又名 BAmP-TK-12) 的 RFP 阳性细胞率(见图 1)最高。

实施例 2: BAmP-TK-12 脂质体构效关系研究

1. 缩硫酮结构对于 BAmP-TK-12 的 ROS 刺激响应能力影响

本发明通过在脂质体的疏水性脂质尾部中引入能被 ROS 裂解的缩硫酮结构, 使脂质体能够在细胞内 ROS 的刺激下发生降解从而释放包封的 mRNA。为了验证缩硫酮结构对于 BAmP-TK-12 的 ROS 刺激响应能力影响, 首先合成具有与其具有相同胺头结构 BAmP 但疏水性尾部中不含有缩硫酮的 BAmP-NTK 脂质体(结构式见图 2A)。即将 BAmP 胺头及疏水尾部丙烯酸十八酯(CAS: 4813-57-4)以 1:3.3 的摩尔比混合, 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 24 h, 粗产物在硅胶柱上以二氯甲烷/甲醇为洗脱液进行纯化得到脂质体 BAmP-NTK。

为了比较 BAmP-TK-12 和 BAmP-NTK 对 mRNA 包封效率和 ROS 刺激响应能力, 分别使用 BAmP-TK-12 和 BAmP-TK 与十五分之一于其质量的 RFP mRNA 在醋酸钠缓冲溶液(25 mM, pH=5.2)中自组装, 孵育 15 min 后使用 iQuant broad range RNA quantitation kit (GeneCopoeia)测量未被包封的 mRNA 浓度。将等量 mRNA 直接溶于缓冲液中对应的浓度为 100%对测量结果归一化, 结果见图 2B。BAmP-TK-12 和 BAmP-TK 对 mRNA 的包封效率均接近 100%。为了模拟疾病细胞中 ROS 刺激脂质体颗粒破裂释放 mRNA 的过程, 在 BAmP-TK-12/RFP mRNA 和 BAmP-TK/RFP mRNA 中加入终浓度为 25 mM 的 H_2O_2 , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后测量释放的 mRNA 浓度, 将等量 mRNA 直接溶于缓冲液中对应的浓度为 100%对测量结果归一化, 结果见图 2C。由图可知, 经过 H_2O_2 处理后, BAmP-NTK 仅少量释放 mRNA, 而 BAmP-TK-12 显著释放 mRNA, 证明缩硫酮结构使得 BAmP-TK-12 具有 ROS 刺激响应性释放 mRNA 的能力。

为了比较 BAmP-TK-12 和 BAmP-NTK 对 mRNA 递送的性能, 分别使用不同浓度 BAmP-TK-12 和 BAmP-NTK 与十五分之一于其质量的 Cy3 标记 mRNA(Cy3-mRNA)在醋酸钠缓冲溶液(25 mM, pH=5.2)中自组装, 孵育 15 min 后加入 HeLa 细胞中。孵育 8 h 后用流式细胞仪分析 Cy3 阳性细胞率。实验结果见图 2D。结果表明在各浓度条件下, BAmP-TK-12 和 BAmP-NTK 与 mRNA 复合物 Cy3 阳性细胞率接近, 证明二者进入细胞效率相似。进一步, 将 BAmP-TK-12 和 BAmP-NTK 如前述方法应用于 RFP mRNA 的递送, 结果如图 2E。通过比较 RFP 阳性细胞率可知, 在各浓度条件下, 由于 BAmP-TK-12 能够响应于 HeLa 细胞中偏高的 ROS 而破裂和释放 mRNA, 其递送效率均高于 BAmP-NTK。

2. 疏水长链个数对递送效率的影响

本发明通过将不同胺头与疏水性脂质尾部加成反应得到一系列脂质体, 胺头中的 N 原子作为质子受体可被质子化, 从而使该类脂质体纳米颗粒整体呈正电性, 因而能够与呈负电性的 mRNA 及细胞膜、溶酶体膜发生静电相互作用, 因此不完全被疏水尾部取代的 N 结构是使该脂质体能够有效包封和递送 mRNA 的重要原因。为了研究不同胺头结构如何影响脂质体的 mRNA 递送能力, 合成含有 3 条缩硫酮疏水尾部的 BAmP-TK-12 和含有 4 条缩硫酮疏水尾部的 TK-21-4(即含有 4 条缩硫酮疏水尾部的 BAmP), TK-21(BAmP-TK-12)的 NMR 谱图见图 7, TK-21-4(BAmP with 4 TK-12) 的 NMR 谱图见图

8, 并比较其 mRNA 递送能力。分别使用不同浓度 BAmP-TK-12 和 TK-21-4 与十五分之一于其质量的 GFP mRNA 在醋酸钠缓冲溶液(25 mM, pH=5.2)中自组装, 孵育 15 min 后加入 HeLa 细胞中。孵育 8 h 后换液, 36 h 后用流式细胞仪分析 GFP 阳性细胞率。实验结果见图 3。结果表明在各浓度条件下, BAmP-TK-12 均能高效地递送 GFP mRNA, 而 TK-21-4 无法递送 GFP mRNA。实验证明, 胺头中不完全被疏水尾部取代的 N 是使该脂质体能够有效包封和递送 mRNA 的重要原因。

3. 不同脂质体的递送效率

为了进一步证明胺头中不完全被疏水尾部取代的 N 是使该脂质体能够有效包封和递送 mRNA 的重要原因, 使用更多的胺头中有不完全取代的 N 的脂质体进行 GFP mRNA 递送。分别将脂质体 TK-12,TK-19,TK-21,TK-22,TK-23,TK-24,TK-25 与胆固醇, DOPE 溶解在三氯甲烷中, 配制浓度为 10 mg/mL 的混合溶液; 按比例取三者的混合溶液挥发成膜, 再用无水乙醇超声溶解后滴加入含 5 mg/mL DSPE-PEG2000 的醋酸钠缓冲溶液(200 mM, pH=5.2)中, 2000 rpm 搅拌 5 分钟, 制备得到脂质体复合物。本实施例所制备的 TK-12,TK-19,TK-21,TK-22,TK-23,TK-24,TK-25 之一, 按照上述方法, 组装出脂质体:胆固醇:DOPE:DSPE-PEG2000 的质量比依次为 16:4:4:1 的 7 种脂质体复合物。在醋酸钠缓冲溶液(25 mM, pH=5.2)中加入含有 37.5, 75, 150, 300, 600 ng/mL GFP mRNA, 与 15 倍质量的上述制备的 7 种脂质体复合物分别混合, 混匀后孵育 15 分钟, 完成脂质体/GFP mRNA 自组装。各取 50 μ L 自组装体系加入到 HeLa 细胞中, 孵育 8 h 后更换新鲜培养基, 于 40 h 后用流式细胞仪分析 GFP 阳性细胞率。结果参见图 4。实验证明胺头中有不完全取代的 N 的脂质体都能高效地递送 mRNA。

实施例 3: BAmP-TK-12 脂质体对 DUF5 mRNA 的胞内递送及抑制癌细胞增殖

1. BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 对结肠癌细胞 HCT-116 的抑制作用

编码 DUF5 蛋白的基因即 DUF5 基因, 其蛋白质为 *V. vulnificus* rtxA1 gene (GI: 27366913; VV2_0479) 3596-4079 处片段, 序列见 PDB ID: 5W6L。以 pcDNA3.1 作为载体重组克隆 DUF5 基因, 得到 DUF5 蛋白的重组表达载体 pcDNA3.1-DUF5 质粒。以 XhoI 核酸内切酶(NEB)对 pcDNA3.1-DUF5 质粒进行线性化, 以该线性化质粒作为模板用 RiboMAX™ Large Scale RNA Production System—T7(Promega)试剂盒进行转录, 然后用 *E. coli* Poly(A) Polymerase(NEB)进行加尾, 获得 DUF5 mRNA。

如上述方法将不同剂量 DUF5 mRNA 或 GFP mRNA 与 15 倍于其质量的 BAmP-TK-12 脂质体在醋酸钠缓冲溶液(25 mM, pH=5.2)中混匀, 孵育 15 min 后加入结肠癌细胞中, 使其终浓度为 0, 150, 300, 600 ng/mL。孵育 8 h 后检测细胞活力。使用 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 试剂盒(Promega)检测细胞活力, 其原理是荧光素酶在 ATP 存在的条件下催化荧光素的氧化反应, 同时产生化学发光, 化学发光的强度正比于活细胞中的 ATP 含量, 因此可以指示细胞活力。使用酶标仪测量化学发光的强度, 计算经过实验处理的细胞化学发光强度相比于空白对照组的百分比, 得到细胞存活率。实验结果如图 5a, 相比于接受 BAmP-TK-12/GFP mRNA 处理的细胞, 接受 BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 处理的 HCT-116 细胞活力显著下降, 随着 DUF5 mRNA 浓度的升高, 杀伤作用逐渐增强。证明 BAmP-TK-12 成功递送 DUF5 mRNA 进入结肠癌细胞 HCT-116 细胞并抑制其增殖。

为了探究 DUF5 mRNA 对癌症细胞中 RAS 蛋白及其下游信号通路的影响, 收集经过 8 h BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 或 BAmP-TK-12/GFP mRNA 孵育或未经处理的 HCT-116 细胞裂解液进行 western blot 实验。所使用一抗为 anti-RAS (RAS Antibody, CST #3965), anti-Phospho-p44/42 MAPK (phosphorylated ERK1/2, Thr202/Tyr204, 197G2, CST #4377), anti-p44/42 MAPK (ERK1/2, L34F12, CST #4696), anti-Phospho-Akt (Phospho-Akt, Thr308, CST #9275), anti-AKT (anti-pan-AKT, Abcam #ab8805), anti- β -Actin (anti- β -Actin, 8H10D10, CST #3700)。所用二抗为 anti-rabbit (anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody, CST #7074) 和 anti-mouse (anti-mouse IgG, HRP-linked antibody, CST #7076)。实验结果见图 5e, 相比于

其他对照组, 经过 BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 处理后, HCT-116 细胞中 RAS 被显著切割, 进而引起 p-ERK(磷酸化 ERK 蛋白)水平降低(ERK 蛋白表达水平未受影响), 同时, p-AKT(磷酸化 AKT 蛋白)水平亦有所降低(AKT 蛋白表达水平未受影响)。在此证明, DUF5 mRNA 被 BAmP-TK-12 递送进入含有 KRAS^{G13D} 突变的 HCT-116 细胞中后, 翻译产生的 DUF5 蛋白特异性识别和切割 RAS 蛋白, 阻断其激活 ERK 蛋白、AKT 蛋白的磷酸化, 从而抑制结肠癌细胞 HCT-116 的细胞活力和增殖过程, 证明了 DUF5 对于 RAS/RAF/MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路的调控功能。

2. BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 对结肠癌细胞 SW480 和人非小细胞肺癌细胞 A549 的抑制作用

前述实验已经证明 BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 对于含有 KRAS^{G13D} 突变的结肠癌 HCT-116 细胞增殖的抑制作用, 为了进一步证明该体系对于各类 KRAS 突变导致的癌变细胞的治疗作用, 将其应用于含有 KRAS^{G12V} 突变的结肠癌细胞 SW480 和含有 KRAS^{G12S} 突变的人非小细胞肺癌细胞 A549。

如 1. 中所述, 将不同剂量 DUF5 mRNA 或 GFP mRNA 与 15 倍于其质量的 BAmP-TK-12 脂质体在醋酸钠缓冲溶液(25 mM, pH=5.2)中混匀, 孵育 15 min 后加入结肠癌细胞 SW480 或非小细胞肺癌细胞 A549 中, 使 mRNA 终浓度为 0, 150, 300, 600 ng/mL。孵育 8 h 后检测细胞活力。另外收集经过处理 8 h 后的细胞裂解液用于 western blot 实验。实验结果见图 5b,c,d, 相比于其他对照组, 经过 BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 处理后, SW480 和 A549 细胞活力明显降低, 在 DUF5 mRNA 浓度仅为 150 ng/mL 时, 经过 8 h 快速杀伤细胞存活率即降至 40%。其内在机制是 RAS 被 DUF5 蛋白切割, 进而引起磷酸化 ERK 蛋白水平降低(ERK 蛋白表达水平未受影响), 同时, 磷酸化 AKT 蛋白水平亦有所降低(AKT 蛋白表达水平未受影响)。

在此证明, DUF5 mRNA 被 BAmP-TK-12 递送进入癌细胞中翻译产生 DUF5 蛋白, 对含有 G13D、G12V、G12S 突变的 RAS 蛋白均可产生高效的切割作用, 抑制了其下游 ERK、AKT 蛋白的磷酸化激活过程, 从而抑制不同类型癌细胞增殖, 表明 BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 对于多种 RAS 突变导致的癌症都具有广谱性的治疗作用。

实施例 4: BAmP-TK-12 脂质体对 DUF5 mRNA 的活体递送及肿瘤抑制

1. BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 的活体分布

以 XhoI 核酸内切酶对 pcDNA3.1-DUF5 质粒进行线性化, 以该线性化质粒作为模板用 HyperScribe™ T7 High Yield Cy5 RNA Labeling Kit (Apexbio) 试剂盒进行转录获得 Cy5 标记的 DUF5 mRNA(Cy5-DUF5 mRNA)。如前述方法制备 BAmP-TK-12/ Cy5-DUF5 mRNA 复合物。

为获得结肠癌 HCT-116 细胞的异种移植荷瘤小鼠模型, 在 4-6 周龄雌性 Nu/Nu 小鼠右侧腋下接种 5.0×10^6 个 HCT-116 细胞(悬浮于 PBS 溶液中), 当肿瘤体积达到 200 mm³ 时(肿瘤体积计算公式为 $\text{volume (mm}^3\text{)} = (l \times w^2)/2$, 其中 l 为肿瘤长度, w 为肿瘤宽度), 对其进行尾静脉注射 200 μg BAmP-TK-12/Cy5-DUF5 mRNA, 或 200 μg Cy5-DUF5 mRNA 或 200 μL PBS 溶液。尾静脉注射后 6 h, 对小鼠进行安乐死后解剖得到心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、肿瘤组织, 在激发波长 620 nm 和发射波长 660 nm 下进行成像。实验结果见图 6a。如图所示, 未与 BAmP-TK-12 脂质体复合的 Cy5-DUF5 mRNA 在各主要脏器和肿瘤组织中均无分布, 其信号强度与注射了 PBS 的空白对照组相似。与之相对, BAmP-TK-12/Cy5-DUF5 mRNA 除了在肝脏中有所累积外, 大量分布于肿瘤组织中。在此证明, BAmP-TK-12/Cy5-DUF5 mRNA 经过体内循环后能积聚于肿瘤组织中, 具有抑制肿瘤组织的潜力。

2. BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 对活体肿瘤的抑制作用

如 1 中所述构建结肠癌 HCT-116 细胞的异种移植荷瘤小鼠模型, 当肿瘤体积达到 100 mm³ 时, 对其尾静脉注射 BAmP-TK-12/DUF5 mRNA, 或 BAmP-TK-12/GFP mRNA, 或

PBS 溶液, 剂量为 200 μg /只, 给药频率为 2 天/次, 共六次。同时监测肿瘤体积和小鼠体重。到达实验终点后采血并取血清用于血生化检测, 对小鼠进行安乐死, 解剖得到肿瘤组织。

由小鼠肿瘤体积相对增长曲线(见图 6b)可知, 给予 BAmP-TK-12/GFP mRNA 或 PBS 溶液尾静脉注射处理的小鼠肿瘤快速增殖, 而给予 BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 治疗的小鼠肿瘤体积较实验开始时仅略有增长。由小鼠肿瘤组织照片(见图 6c)可知, 在实验终点时, 经过 BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 治疗的小鼠肿瘤体积远小于对照组, 证明 BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 在活体层次有效地抑制了结直肠癌恶性肿瘤增殖。

剪取小鼠肿瘤组织外周部分, 使用组织匀浆机研磨, 得到肿瘤组织细胞裂解液用于 western blot 实验, 所用抗体如前所述。Western blot 实验(如图 6d 所示)表明 BAmP-TK-12/GFP mRNA 或 PBS 对小鼠肿瘤部位细胞中的 RAS 蛋白和其所调控的 AKT、ERK 及其磷酸化蛋白 p-AKT 和 p-ERK 表达量没有影响, 而 BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 通过切割 RAS 蛋白使得 p-AKT 和 p-ERK 表达量下降。在此证明, BAmP-TK-12/DUF5 mRNA 在活体中介导了 RAS 蛋白的酶解和下游信号通路的失活从而实现抗肿瘤的功能。

实施例 5: 本发明的脂质体对不同质粒的递送实验

1. pDHFR-GFP (5185 bp)质粒和 pDNMT3A-GFP (9746 bp)质粒递送实验: 分别将脂质体 TK-21 与胆固醇, DOPE 溶解在三氯甲烷中, 配制浓度为 10 mg/mL 的混合溶液; 按比例取三者的混合溶液挥发成膜, 再用无水乙醇超声溶解后滴加入含 5 mg/mL DSPE-PEG2000 的醋酸钠缓冲溶液(200 mM, pH=5.2)中, 2000 rpm 搅拌 5 分钟, 制备得到脂质体复合物。脂质体复合物中脂质体:胆固醇:DOPE: DSPE-PEG2000 的质量比依次为 16:4:4:1。在醋酸钠缓冲溶液(25 mM, pH=5.2)中加入含有 40、80、160、320、640 ng/mL pDHFR-GFP (5185 bp)质粒, 与 15 倍质量的上述制备的 TK-21 脂质体复合物分别混合, 混匀后孵育 15 分钟, 完成 TK-21/pDHFR-GFP 质粒自组装。各取 50 μL 自组装体系加入到 HeLa 细胞中, 孵育 8 h 后更换新鲜培养基, 于 40 h 后用流式细胞仪分析 GFP 阳性细胞率。结果参见图 9。类似地, 将上述制备的 TK-21 纳米脂质体复合物 pDNMT3A-GFP (9746 bp)质粒混合用于 HeLa 细胞递送, 并检测 GFP 阳性细胞率。结果参见图 10, 结果表明本发明的脂质体, 例如 TK-21 适用于有效递送多种长度的质粒。

实施例 6: 本发明的脂质体对不同 mRNA 的递送实验

1. DUF5 mRNA 递送实验: 分别将脂质体与胆固醇, DOPE 溶解在三氯甲烷中, 配制浓度为 10 mg/mL 的混合溶液; 按比例取三者的混合溶液挥发成膜, 再用无水乙醇超声溶解后滴加入含 5 mg/mL DSPE-PEG2000 的醋酸钠缓冲溶液(200 mM, pH=5.2)中, 2000 rpm 搅拌 5 分钟, 制备得到脂质体复合物。本实施例选用所制备的 TK-12, TK-22, TK-23, TK-24, TK-25 之一, 按照上述方法, 组装出脂质体:胆固醇:DOPE: DSPE-PEG2000 的质量比依次为 16:4:4:1 的 5 种脂质体复合物。在醋酸钠缓冲溶液(25 mM, pH=5.2)中加入含有 0.33 μg /mL DUF5 mRNA 或 GFP mRNA, 与 15 倍质量的所制备的 5 种脂质体复合物分别混合, 混匀后孵育 15 分钟, 完成脂质体/mRNA 自组装。各取 50 μL 自组装体系加入到 HeLa 细胞中, 孵育 8 h 后测定对应的细胞活力, 并将细胞活力百分比归一化到空白孔。结果参见图 11。

2. TK-21 对 p53 mRNA 的递送实验: 类似地, 制备 TK-21 纳米脂质体复合物, 与 15 分之一于 TK-21 质量的 40、80、160、320、640 ng/mL p53 mRNA 混合用于 HeLa 细胞递送, 孵育 36 h 后检测细胞活力。结果见图 12, 证明 TK-21 能有效地递送 p53 mRNA 并对细胞产生杀伤效果, TK-21 适用于有效递送多种功能性 mRNA。

实施例 7: 本发明的脂质体对核酸和蛋白的递送实验

1. GFP 蛋白质递送及其与核酸递送的比较: 将 TK-21 与胆固醇, DOPE 溶解在三氯甲烷中, 配制浓度为 10 mg/mL 的混合溶液; 按比例取三者的混合溶液挥发成膜, 再用无水乙醇超声溶解后滴加入含 5 mg/mL DSPE-PEG2000 的醋酸钠缓冲溶液(200 mM,

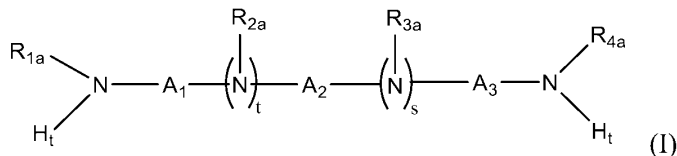
pH=5.2)中, 2000 rpm 搅拌 5 分钟, 制备得到脂质体复合物, 其中 TK-21:胆固醇:DOPE:DSPE-PEG2000 的质量比依次为 16:4:4:1。在 DMEM 缓冲溶液中加入上述制备的 1.2, 2.4, 4.8, 9.6, 19.2 $\mu\text{g/mL}$ TK-21 脂质体复合物, 与 0.6 倍质量的 GFP 蛋白质分别混合, 混匀后孵育 15 分钟, 完成脂质体/GFP 蛋白质自组装。各取 50 μL 自组装体系加入到 HeLa 细胞中, 孵育 6 h 后用流式细胞仪分析 GFP 阳性细胞率。结果参见图 13, 其中在相同浓度的脂质体复合物情况下, 本发明的脂质体递送核酸的能力要强于递送蛋白的能力。

以上所述, 仅为本发明较佳的具体实施方式, 但本发明的保护范围并不局限于此, 任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内, 可轻易想到的变化或替换, 都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此, 本发明的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。

权利要求书

1. 式(I)的脂质体作为药物递送载体在制备核酸药物中的用途, 其中所述药物递送载体将所述核酸药物递送至靶细胞以在所述靶细胞内进行细胞内核酸药物释放,

其中所述式(I)的脂质体为



其中

R_{1a} 、 R_{2a} 、 R_{3a} 和 R_{4a} 各自独立地为氢、一价脂族烃基、一价杂脂族烃基、一价芳香烃基、一价杂芳香烃基或 H_t ;

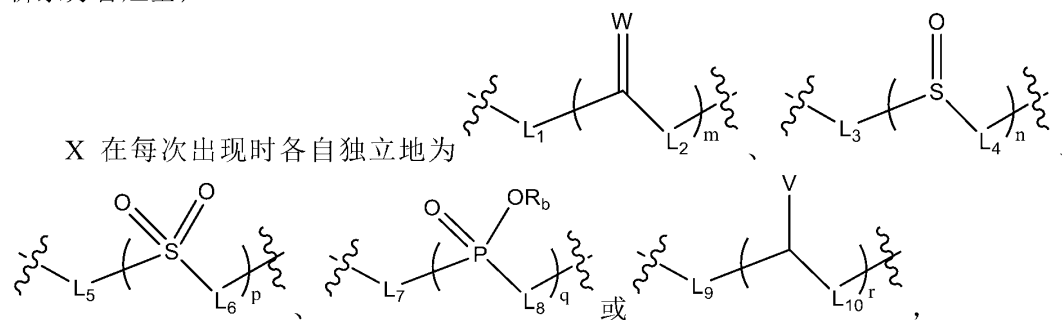
t 和 s 各自独立地为 0 或 1, 当 t 或 s 为零时表示该部分直接为单键;

A_1 、 A_2 和 A_3 各自独立地为单键、二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基或以上两者的组合;

H_t 在每次出现时各自独立地为 $-R_1-X-R_2-Y-R_3-Z-R_4$,

其中

R_1 在每次出现时各自独立地为二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基;



其中

m 、 n 、 p 、 q 和 r 各自独立地为 1-6;

W 是 O、S 或 NR_c ;

L_1 、 L_3 、 L_5 、 L_7 和 L_9 , 其直接与 R_1 或 R_2 连接且各自独立地为单键、O、S 或 NR_d ;

L_2 、 L_4 、 L_6 、 L_8 和 L_{10} 各自独立地为键、O、S 或 NR_c ;

V 是脂族烃基、 OR_f 、 SR_g 或 NR_hR_i ;

其中 R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_e 、 R_f 、 R_g 、 R_h 和 R_i 各自独立地为氢、羟基、脂族烃基氧基(oxyaliphatic radical)、一价脂族烃基、一价杂脂族烃基、一价芳香烃基或一价杂芳香烃基;

Y 和 Z 在每次出现时各自独立地为 S 或 O;

R_2 在每次出现时各自独立地为单键、二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基;

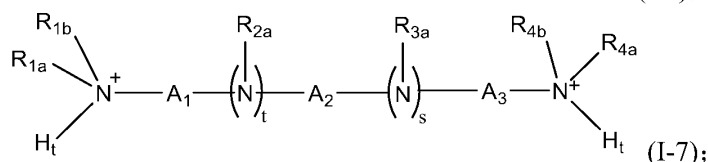
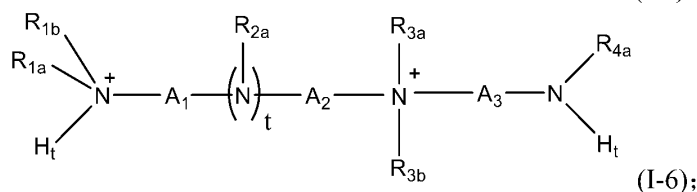
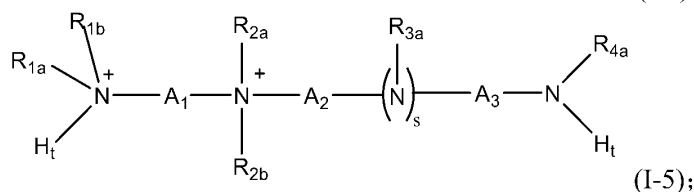
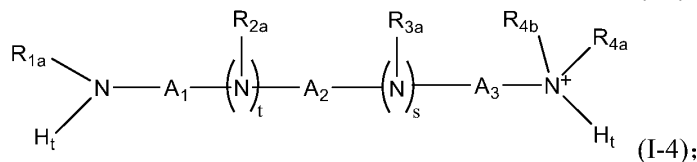
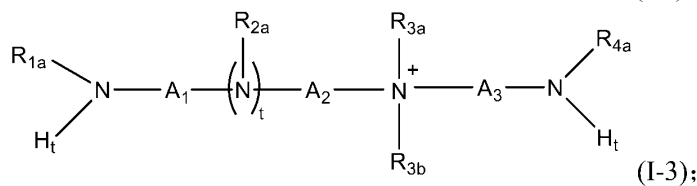
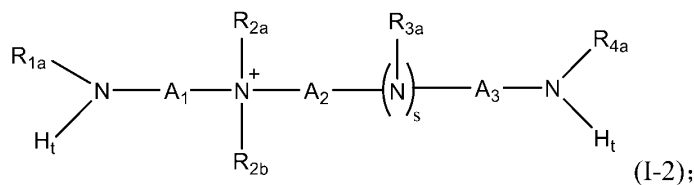
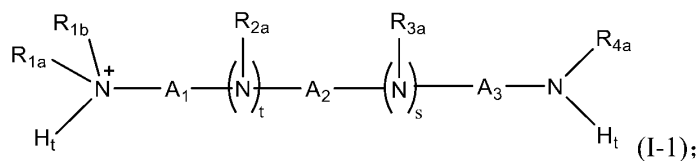
R_3 在每次出现时各自独立地为单键、二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基;

R_4 在每次出现时各自独立地为疏水基团;

以及式(I)骨架结构中的 N 原子任选被阳离子化;

条件是 R_{1a} 和 R_{4a} 中至少一个为氢。

2. 权利要求 1 的用途, 其中所述脂质体为可离子化形式的, 由此形成下述结构



以及含有相应的抗衡离子，其中 $\text{R}_{1\text{b}}$ 、 $\text{R}_{2\text{b}}$ 、 $\text{R}_{3\text{b}}$ 和 $\text{R}_{4\text{b}}$ 各自独立地为氢、一价脂族烃基、一价杂脂族烃基、一价芳香烃基、一价杂芳香烃基或 Ht ，其余变量如式(I)所定义。

3. 权利要求1的用途，其中 $\text{R}_{1\text{a}}$ 或 $\text{R}_{4\text{a}}$ 为氢；或者 $\text{R}_{1\text{a}}$ 和 $\text{R}_{4\text{a}}$ 各自为氢。

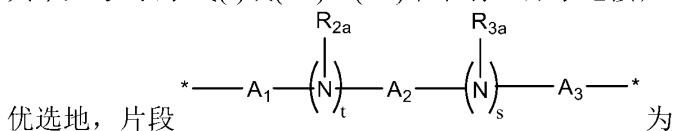
4. 权利要求1的用途，其中 t 和 s 均为0；或者 t 为0且 s 为1；或者 t 为1且 s 为0；优选地 t 和 s 均为0； $\text{R}_{1\text{a}}$ 为 Ht ，以及 $\text{R}_{4\text{a}}$ 为氢；或者 t 和 s 均为0； $\text{R}_{1\text{a}}$ 为氢，以及 $\text{R}_{4\text{a}}$ 为 Ht 。

5. 权利要求1的用途，其中片段 $\begin{array}{c} \text{R}_{2\text{a}} \\ | \\ * - \text{A}_1 - (\text{N})_t - \text{A}_2 - (\text{N})_s - \text{A}_3 - * \end{array}$ 为

- A_1 - A_3 ，其中 A_1 和 A_3 各自独立地为 C_1 - C_6 二价脂族烃基(例如， C_1 - C_4 二价脂族烃基，例如 C_1 - C_6 二价烷基，优选为 C_1 - C_4 二价烷基)；或

- $A_1-(NR_{2a})-A_3$, 其中 A_1 和 A_3 各自独立地为 C_1-C_6 二价脂族烃基(例如, C_1-C_4 二价脂族烃基, 例如 C_1-C_6 二价烷基, 优选为 C_1-C_4 二价烷基), 以及 R_{2a} 为氢、一价脂族烃基或一价杂脂族烃基; 优选为氢、一价 C_{1-6} 烷基、一价 C_{1-6} 杂烷基, 例如氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、单(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-6} 烷基或巯基 C_{1-6} 烷基; 或
- $A_1-(NR_{2a})-A_2-(NR_{2b})-A_3$, 其中 A_1 、 A_2 和 A_3 各自独立地为 C_1-C_6 二价脂族烃基(例如, C_1-C_4 二价脂族烃基, 例如 C_1-C_6 二价烷基, 优选为 C_1-C_4 二价烷基); 以及 R_{2a} 和 R_{2b} 各自独立地为氢、一价脂族烃基或一价杂脂族烃基; 优选为氢、一价 C_{1-6} 烷基、一价 C_{1-6} 杂烷基, 例如氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、单(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-6} 烷基或巯基 C_{1-6} 烷基; 或
- $A_1-A_2-A_3$, 其中 A_1 和 A_3 各自独立地为 C_1-C_6 二价脂族烃基(例如, C_1-C_4 二价脂族烃基, 例如 C_1-C_6 二价烷基, 优选为 C_1-C_4 二价烷基); 以及 A_2 为二价环状杂脂族烃基, 例如包含 1-3 个选自氧、氮和硫的杂环子的 3 员至 7 员单环环状杂脂族烃基, 优选为二价哌嗪基团;

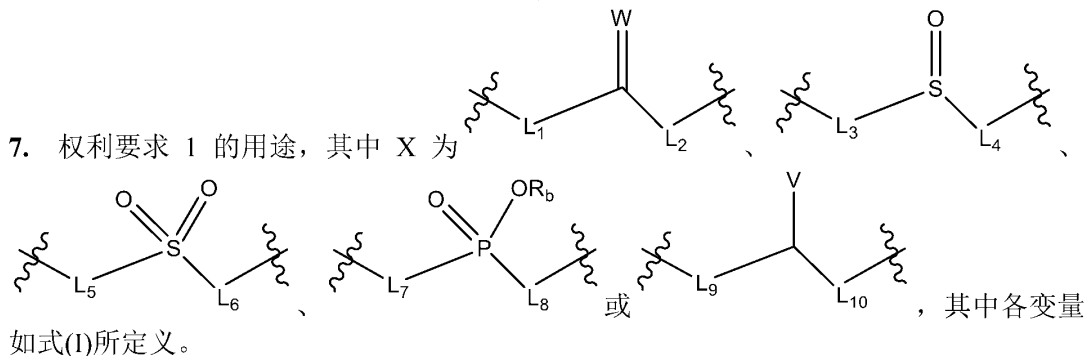
其中星号*表示式(I)或(I-1)至(I-7)中末端 N 原子连接;

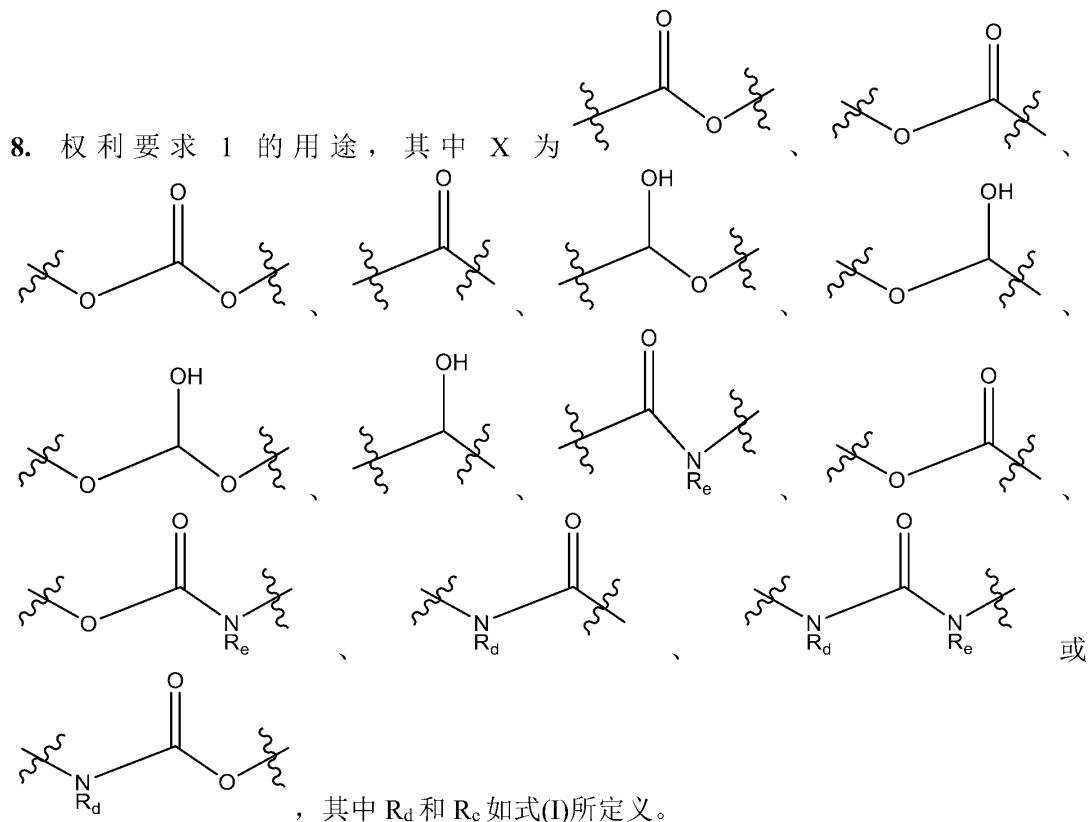


- $-(CH_2)_{m1}-$, 其中 $m1$ 为 2-12 的整数, 优选为 2-10 或 3-8; 或 3 的整数; 或
- $-(CH_2)_{m2}-(NR_{2a})-(CH_2)_{m3}-$, 其中 $m2$ 和 $m3$ 各自独立地为 1-6 的整数; 优选为 2-6 或 2-4 或 2 或 3 的整数; R_{2a} 为氢、一价 C_{1-6} 烷基、氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、单(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-6} 烷基或巯基 C_{1-6} 烷基; 或
- $-(CH_2)_{m2}-(NR_{2a})-(CH_2)_{m4}-(NR_{2b})-(CH_2)_{m3}-$, 其中 $m2$ 、 $m3$ 和 $m4$ 各自独立地为 1-6 的整数; 优选为 2-6 或 2-4 或 2 或 3 的整数; R_{2a} 和 R_{2b} 各自独立地为氢、一价 C_{1-6} 烷基、氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、单(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-6} 烷基或巯基 C_{1-6} 烷基; 或
- $-(CH_2)_{m2}-A_2-(CH_2)_{m3}-$, 其中 $m2$ 和 $m3$ 各自独立地为 1-6 的整数; 优选为 2-6 或 2-4 或 2 或 3 的整数; 以及 A_2 为二价环状杂脂族烃基, 例如包含 1-3 个选自氧、氮和硫的杂环子的 3 员至 7 员单环环状杂脂族烃基, 优选为二价哌嗪基团;

其中星号*表示式(I)或(I-1)至(I-7)中末端 N 原子连接。

6. 权利要求 1 的用途, 其中 R_1 为 C_{1-6} 二价脂族烃基或 C_{1-6} 二价杂脂族烃基。

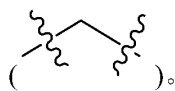




9. 权利要求 1 的用途, 其中 Y 和 Z 均为 S; 或者 Y 为 S, 以及 Z 为 O; 或者 Y 为 O, 以及 Z 为 S; 或者 Y 和 Z 均为 O。

10. 权利要求 1 的用途, 其中 R_2 在每次出现时各自独立地为单键或 C_{1-6} 二价脂族烃基或 C_{1-6} 二价杂脂族烃基。

11. 权利要求 1 的用途, 其中 R_3 在每次出现时各自独立地为单键或 C_{1-6} 二价脂族烃基。

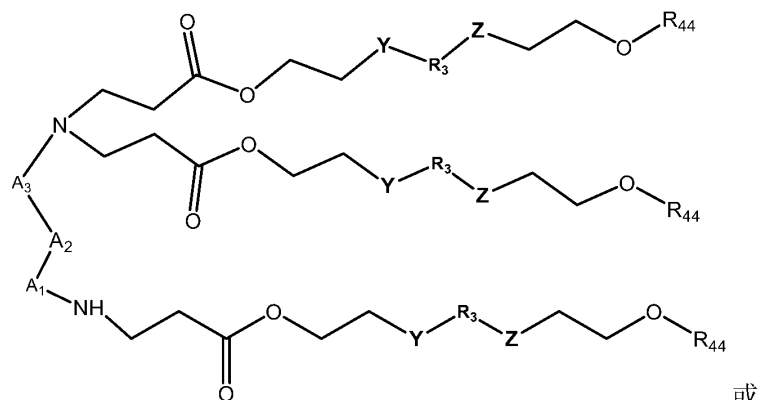


13. 权利要求 1 的用途, 其中 R_4 在每次出现时各自独立地为疏水基团, 所述疏水基团选自长链烷基、烯基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、芳基烯基、环状基团、脂环族基团和多环基团, 所述疏水基团任选具有至少一个选自氮、氧和硫的杂原子。

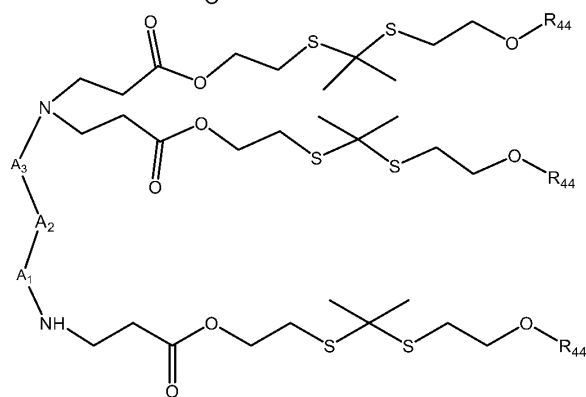
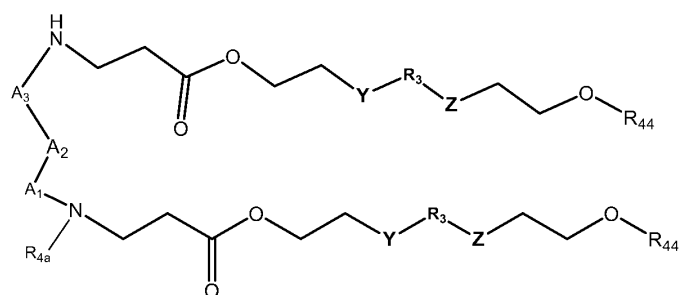
14. 权利要求 1 的用途, 其中 R_4 在每次出现时各自独立地为 C_8-C_{30} 烷基、 C_8-C_{30} 烯基或 C_8-C_{30} 炔基; 或者 R_4 在每次出现时各自独立地为 $-(CH_2CH_2O)_m-C_8-C_{30}$ 烷基、 $-(CH_2CH_2O)_y-C_8-C_{30}$ 烯基或 $-(CH_2CH_2O)_y-C_8-C_{30}$ 炔基, 其中 y 为 0 或 1 或 2, 例如 R_4 为 $-CH_2CH_2O-C_8H_{17}$ 、 $-CH_2CH_2O-C_{10}H_{21}$ 、 $-CH_2CH_2O-C_{12}H_{25}$ 、 $-CH_2CH_2O-C_{14}H_{29}$ 或 $-CH_2CH_2O-C_{15}H_{31}$ 。

15. 权利要求 1 的用途, 其中 A_1 和 A_3 各自独立地为单键或二价脂族烃基以及 A_2 为二价脂族烃基或二价杂脂族烃基。

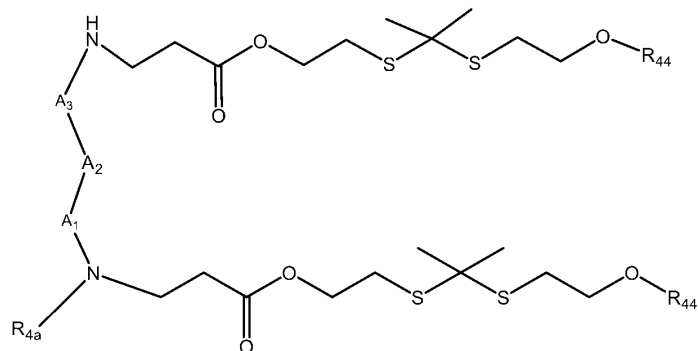
16. 权利要求 1 的用途, 其中所述式(I)的脂质体为



或

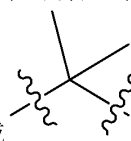


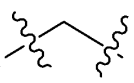
或



其中 A₁、A₂、A₃ 和 R_{4a} 如式(I)所定义, 以及 -(CH₂CH₂O)-R₄₄ 为如式(I)所定义的 R₄;
Y 和 Z 均为 S; 或者 Y 为 S, 以及 Z 为 O; 或者 Y 为 O, 以及 Z 为 S; 或者 Y 和 Z 均为

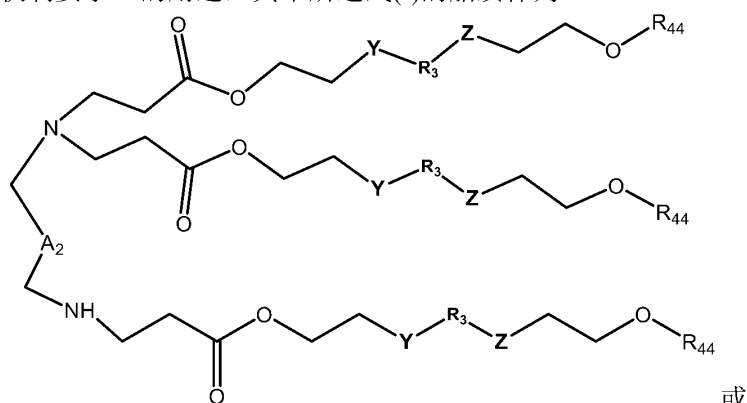
O; R₃ 在每次出现时各自独立地为单键或



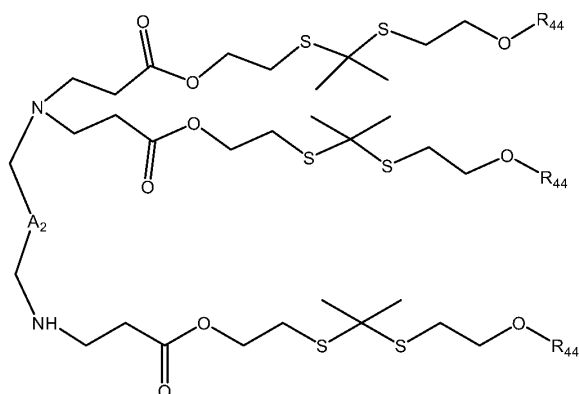
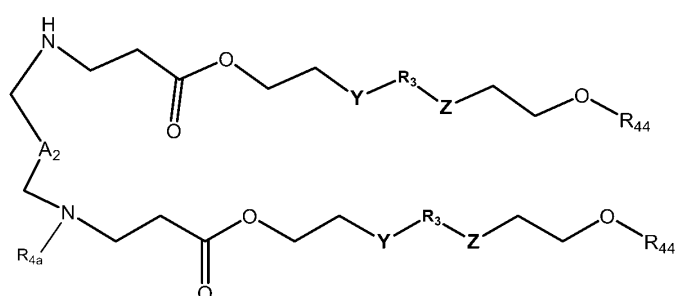
或亚甲基()。

17. 权利要求 16 的用途, 其中 A_2 为二价环状杂脂族烃基, 以及 A_1 和 A_3 各自独立为 C_1 - C_4 二价烷基。

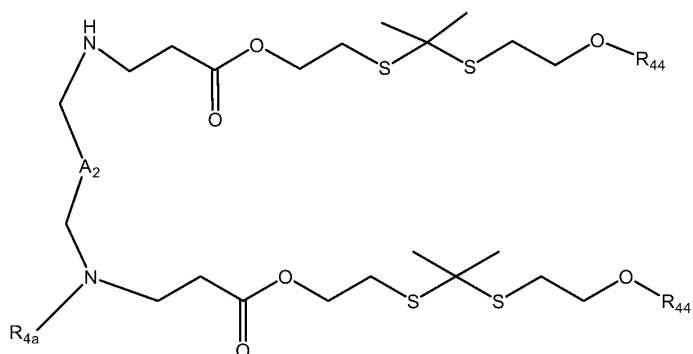
18. 权利要求 1 的用途, 其中所述式(I)的脂质体为



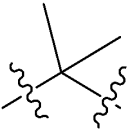
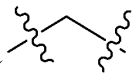
或



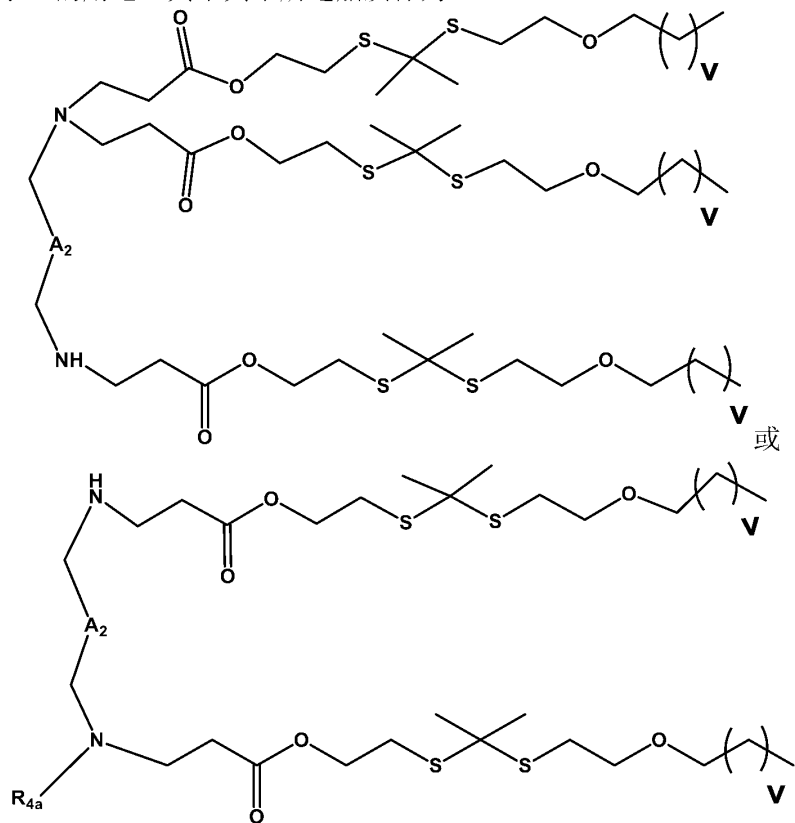
或



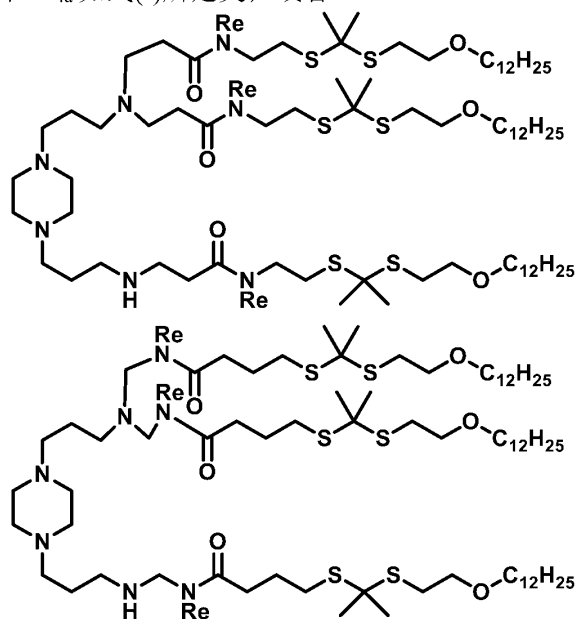
其中 A_2 和 R_{4a} 如式(I)所定义, 以及 $-(CH_2CH_2O)-R_{44}$ 为如式(I)所定义的 R_4 ; Y 和 Z 均为 S; 或者 Y 为 S, 以及 Z 为 O; 或者 Y 为 O, 以及 Z 为 S; 或者 Y 和 Z 均为 O; R_3 在

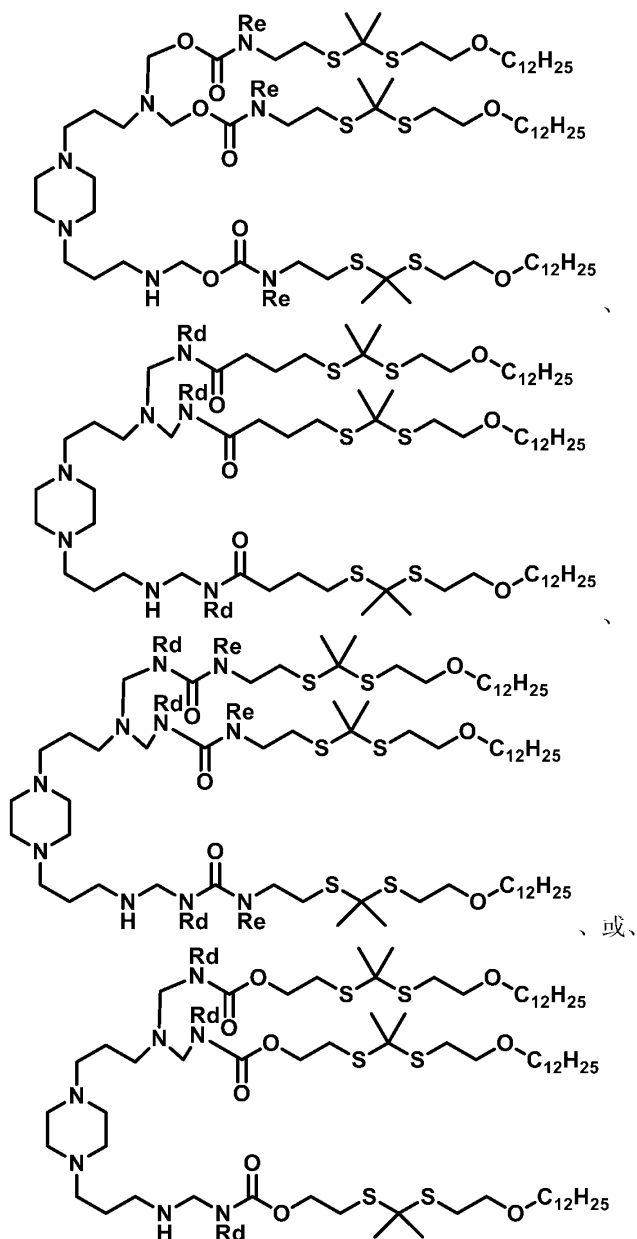
每次出现时各自独立地为单键或  或亚甲基()。

19. 权利要求 1 的用途，其中其中所述脂质体为



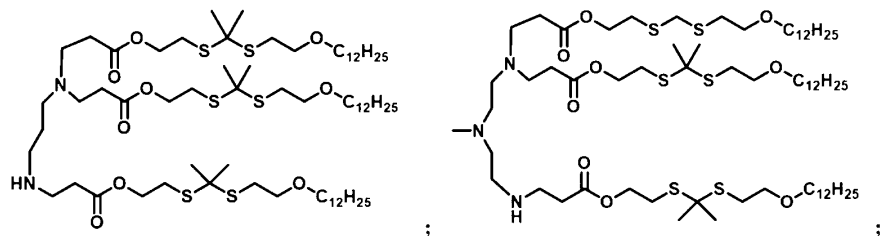
其中 v 为 6-28; A₂ 和 R_{4a} 如式(I)所定义; 或者

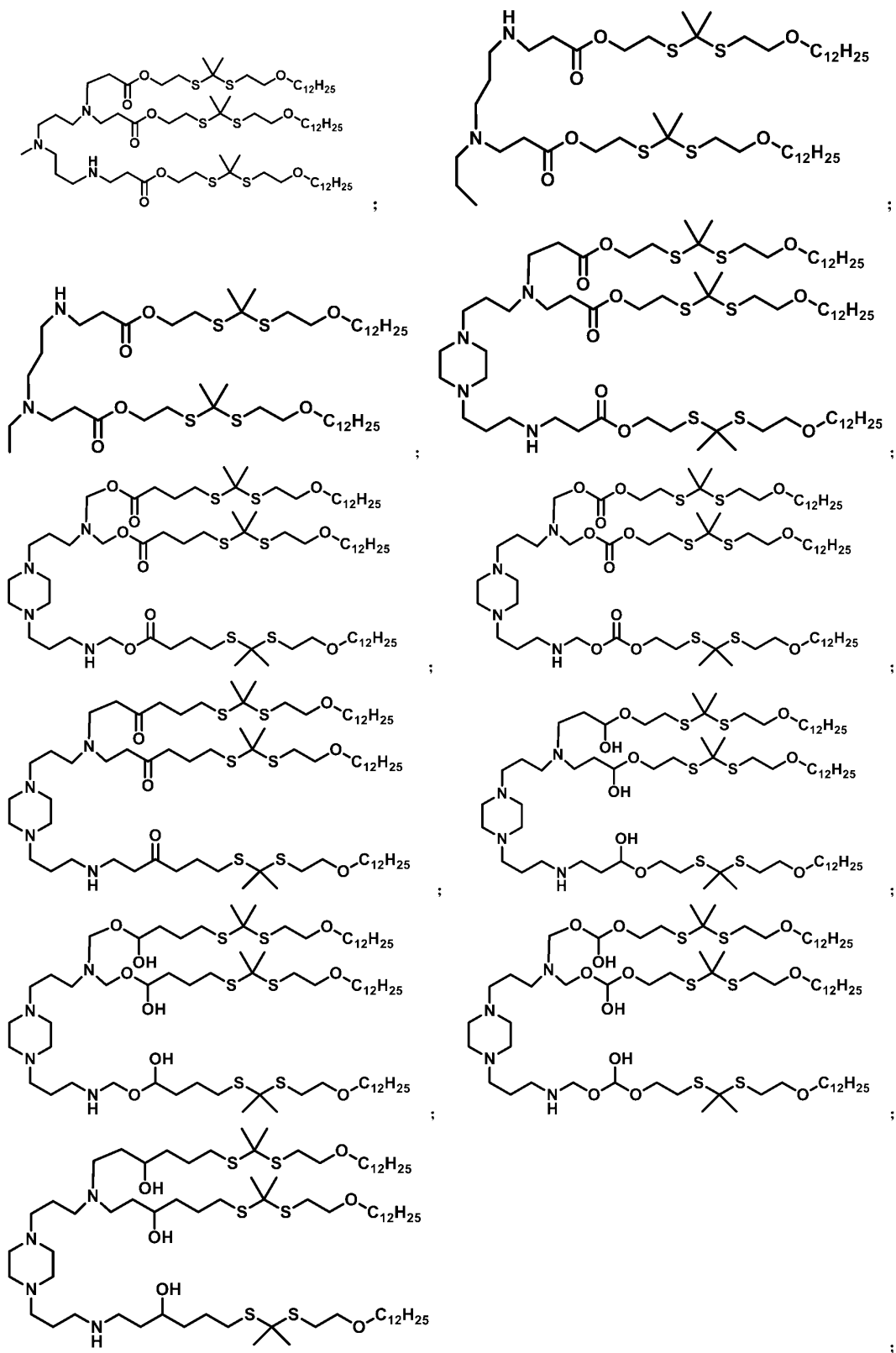


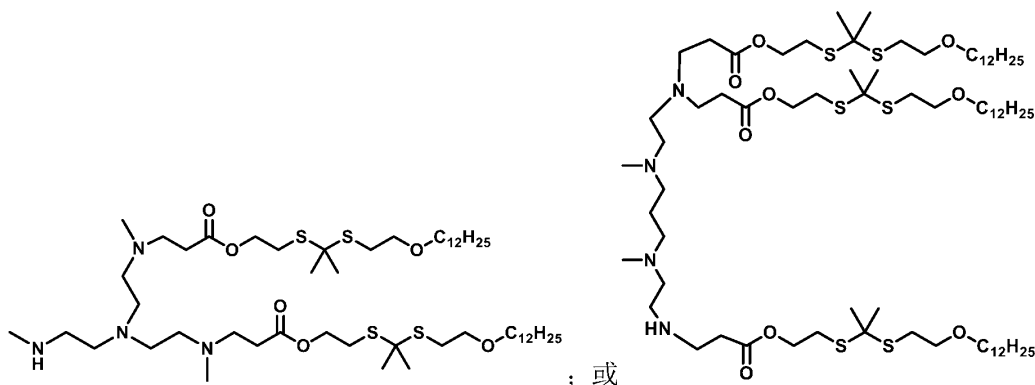


其中 R_d 和 R_e 如式(I)所定义。

20. 权利要求 1 的用途，其中所述脂质体为：



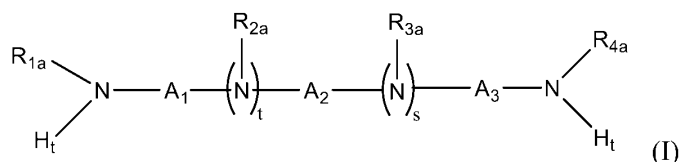




21. 权利要求 1 的用途, 其中所述靶细胞为癌细胞、病原体感染的细胞或介导疾病的细胞。

22. 权利要求 1 的方法, 其中所述核酸选自寡聚核苷酸、适配体、单链 DNA、双链 DNA、质粒 DNA、短异构体、反义分子、小干扰 RNA (siRNA)、不对称干扰 RNA (aiRNA)、microRNA (miRNA)、dsRNA (double strand RNA)、shRNA (small/short hairpin RNA)、转移 RNA (tRNA)、信使 RNA (mRNA)、small activating RNA 以及 circRNA。

23. 式(I)的脂质体,



其中

R_{1a} 、 R_{2a} 、 R_{3a} 和 R_{4a} 各自独立地为 H、一价脂族烃基、一价杂脂族烃基、一价芳香烃基、一价杂芳香烃基或 Ht;

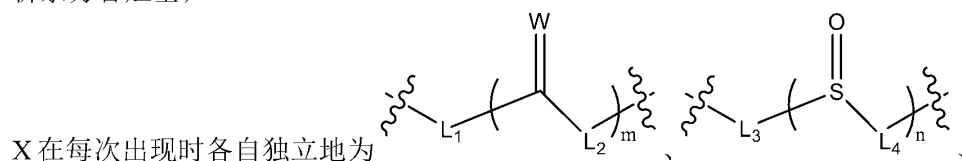
t 和 s 各自独立地为 0 或 1, 当 t 或 s 为零时表示该部分直接为单键;

A_1 、 A_2 和 A_3 各自独立地为单键、二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基或以上两者的组合;

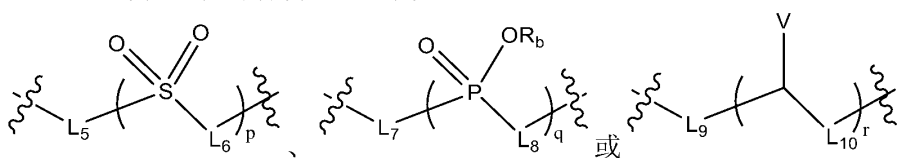
Ht 在每次出现时各自独立地为 $-R_1-X-R_2-Y-R_3-Z-R_4$,

其中

R_1 在每次出现时各自独立地为二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基;



X 在每次出现时各自独立地为



其中

m 、 n 、 p 、 q 和 r 各自独立地为 1-6;

W 是 O、S 或 NR_c ;

L_1 、 L_3 、 L_5 、 L_7 和 L_9 , 其直接与 R_1 或 R_2 连接且各自独立地为单键、O、S 或 NR_d ;

L_2 、 L_4 、 L_6 、 L_8 和 L_{10} 各自独立地为键、O、S 或 NR_c ;

V 是脂族烃基、OR_f、SR_g 或 NR_hR_i，

其中 R_b、R_c、R_d、R_e、R_f、R_g、R_h 和 R_i 各自独立地为 H、OH、脂族烃基氧基、一价脂族烃基、一价杂脂族烃基、一价芳香烃基或一价杂芳香烃基；

Y 和 Z 在每次出现时各自独立地为 S 或 O；

R₂ 在每次出现时各自独立地为单键、二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基；

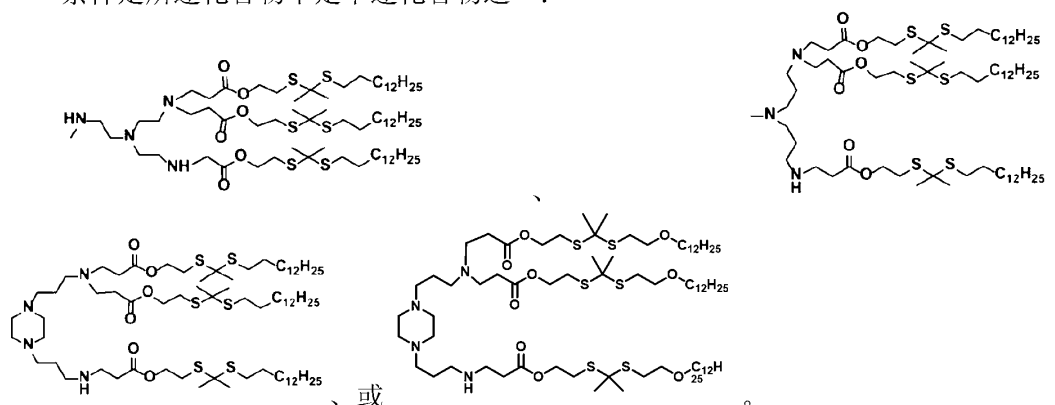
R₃ 在每次出现时各自独立地为单键、二价脂族烃基、二价杂脂族烃基、二价芳香烃基或二价杂芳香烃基

R₄ 在每次出现时各自独立地为疏水基团；

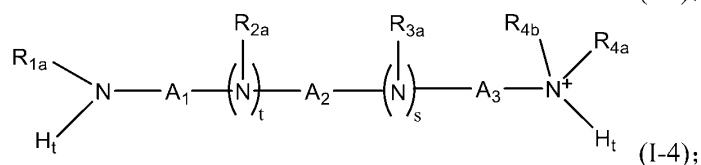
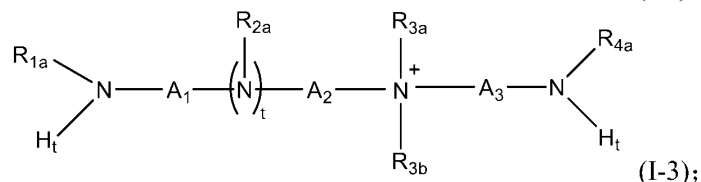
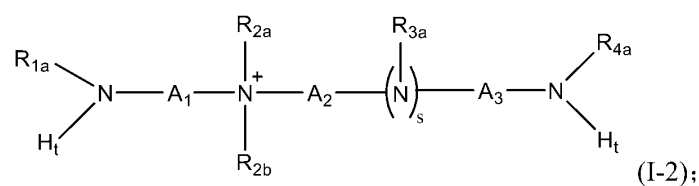
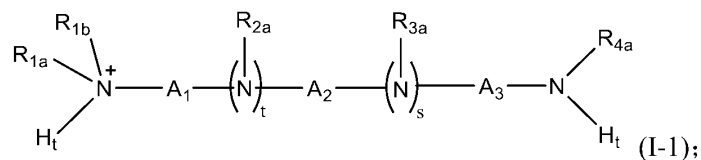
以及式(I)骨架结构中的 N 原子任选被阳离子化；

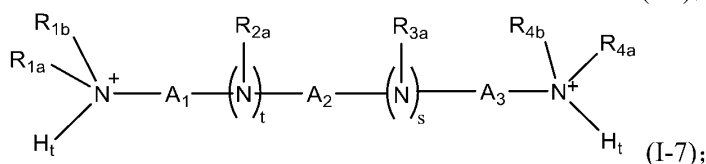
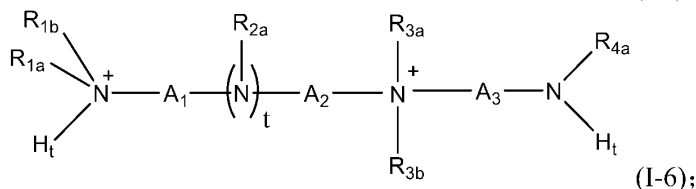
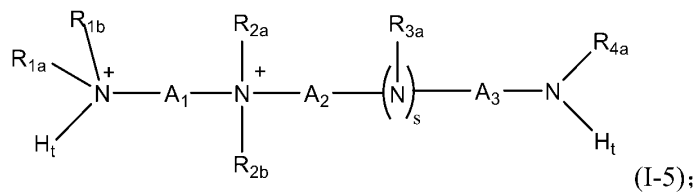
条件是 R_{1a} 和 R_{4a} 中至少一个为氢；以及

条件是所述化合物不是下述化合物之一：



24. 权利要求 23 的脂质体，其中所述脂质体为可离子化形式的，由此形成下述结构

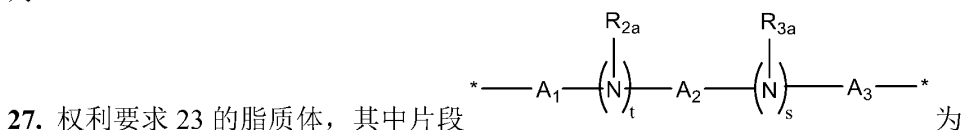




以及含有相应的抗衡离子，其中 R_{1b} 、 R_{2b} 、 R_{3b} 和 R_{4b} 各自独立地为氢、一价脂族烷基、一价杂脂族烷基、一价芳香基、一价杂芳香基或 H_t ，其余变量如式(I)所定义。

25. 权利要求 23 的脂质体，其中 R_{1a} 或 R_{4a} 为氢；或者 R_{1a} 和 R_{4a} 各自为氢。

26. 权利要求 23 的脂质体，其中 t 和 s 均为 0；或者 t 为 0 且 s 为 1；或者 t 为 1 且 s 为 0；优选地 t 和 s 均为 0； R_{1a} 为 H_t ，以及 R_{4a} 为氢；或者 t 和 s 均为 0； R_{1a} 为氢，以及 R_{4a} 为 H_t 。



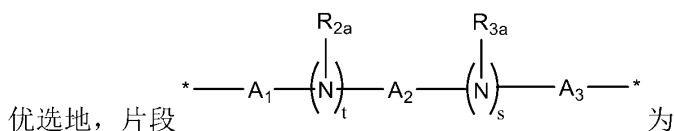
• A_1 - A_3 ，其中 A_1 和 A_3 各自独立地为 C_1 - C_6 二价脂族烷基(例如， C_1 - C_4 二价脂族烷基，例如 C_1 - C_6 二价烷基，优选为 C_1 - C_4 二价烷基)；或

• A_1 -(NR_{2a})- A_3 ，其中 A_1 和 A_3 各自独立地为 C_1 - C_6 二价脂族烷基(例如， C_1 - C_4 二价脂族烷基，例如 C_1 - C_6 二价烷基，优选为 C_1 - C_4 二价烷基)，以及 R_{2a} 为氢、一价脂族烷基或一价杂脂族烷基；优选为氢、一价 C_{1-6} 烷基、一价 C_{1-6} 杂烷基，例如氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、单(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-6} 烷基或巯基 C_{1-6} 烷基；或

• A_1 -(NR_{2a})- A_2 -(NR_{2b})- A_3 ，其中 A_1 、 A_2 和 A_3 各自独立地为 C_1 - C_6 二价脂族烷基(例如， C_1 - C_4 二价脂族烷基，例如 C_1 - C_6 二价烷基，优选为 C_1 - C_4 二价烷基)；以及 R_{2a} 和 R_{2b} 各自独立地为氢、一价脂族烷基或一价杂脂族烷基；优选为氢、一价 C_{1-6} 烷基、一价 C_{1-6} 杂烷基，例如氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、单(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-6} 烷基或巯基 C_{1-6} 烷基；或

• A_1 - A_2 - A_3 ，其中 A_1 和 A_3 各自独立地为 C_1 - C_6 二价脂族烷基(例如， C_1 - C_4 二价脂族烷基，例如 C_1 - C_6 二价烷基，优选为 C_1 - C_4 二价烷基)；以及 A_2 为二价环状杂脂族烷基，例如包含 1-3 个选自氧、氮和硫的杂环子的 3 员至 7 员单环环状杂脂族烷基，优选为二价哌嗪基团；

其中星号*表示式(I)或(I-1)至(I-7)中末端 N 原子连接；



• $-(CH_2)_{m1}-$, 其中 $m1$ 为 2-12 的整数, 优选为 2-10 或 3-8; 或 3 的整数; 或

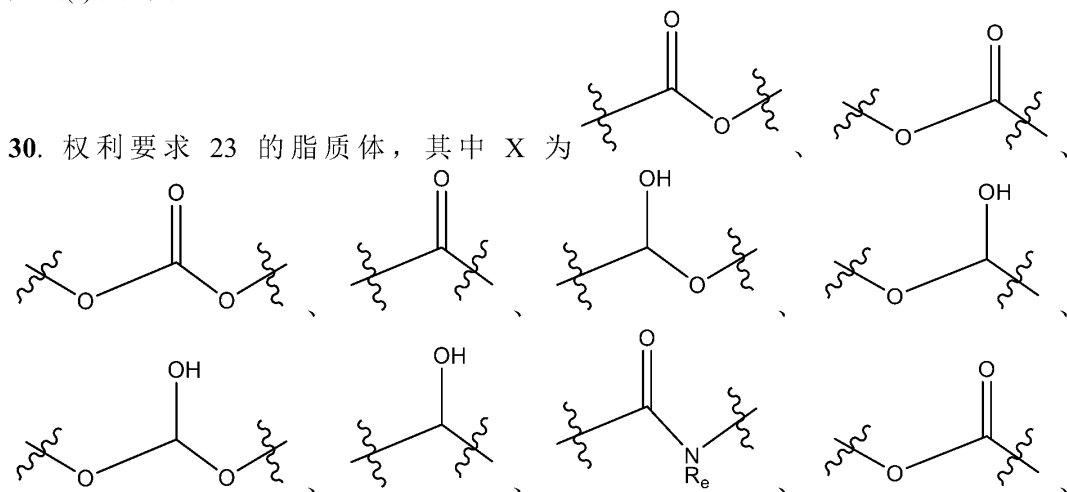
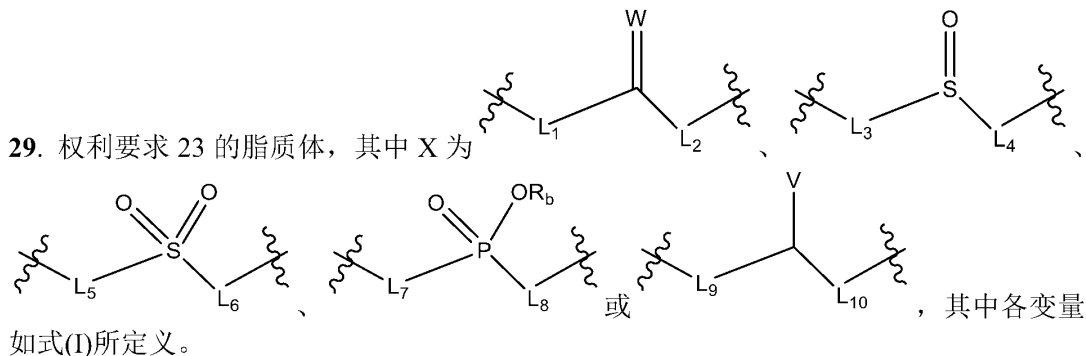
• $-(CH_2)_{m2}-(NR_{2a})-(CH_2)_{m3}-$, 其中 $m2$ 和 $m3$ 各自独立地为 1-6 的整数; 优选为 2-6 或 2-4 或 2 或 3 的整数; R_{2a} 为氢、一价 C_{1-6} 烷基、氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、单(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-6} 烷基或硫基 C_{1-6} 烷基; 或

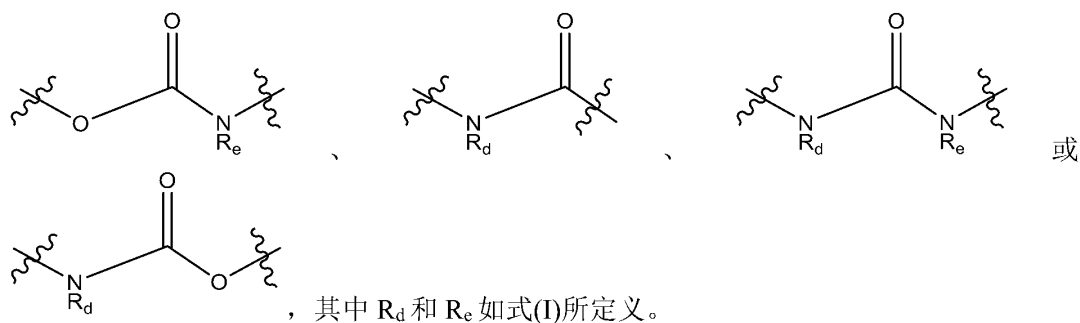
• $-(CH_2)_{m2}-(NR_{2a})-(CH_2)_{m4}-(NR_{2b})-(CH_2)_{m3}-$, 其中 $m2$ 、 $m3$ 和 $m4$ 各自独立地为 1-6 的整数; 优选为 2-6 或 2-4 或 2 或 3 的整数; R_{2a} 和 R_{2b} 各自独立地为氢、一价 C_{1-6} 烷基、氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、单(C_{1-6} 烷基)氨基烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-6} 烷基或硫基 C_{1-6} 烷基; 或

• $-(CH_2)_{m2}-A_2-(CH_2)_{m3}-$, 其中 $m2$ 和 $m3$ 各自独立地为 1-6 的整数; 优选为 2-6 或 2-4 或 2 或 3 的整数; 以及 A_2 为二价环状杂脂族烃基, 例如包含 1-3 个选自氧、氮和硫的杂环子的 3 员至 7 员单环环状杂脂族烃基, 优选为二价哌嗪基团;

其中星号*表示式(I)或(I-1)至(I-7)中末端 N 原子连接。

28. 权利要求 23 的脂质体, 其中 R_1 为 C_{1-6} 二价脂族烃基或 C_{1-6} 二价杂脂族烃基。





31. 权利要求 23 的脂质体，其中 Y 和 Z 均为 S；或者 Y 为 S，以及 Z 为 O；或者 Y 为 O，以及 Z 为 S；或者 Y 和 Z 均为 O。

32. 权利要求 23 的脂质体，其中 R_2 在每次出现时各自独立地为单键或 C_{1-6} 二价脂族烃基或 C_{1-6} 二价杂脂族烃基。

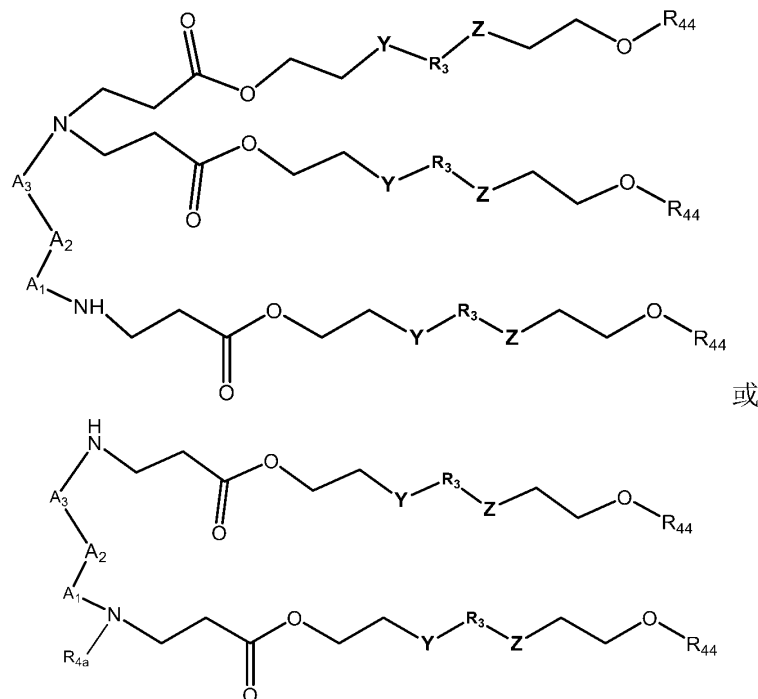
33. 权利要求 23 的脂质体，其中 R_3 在每次出现时各自独立地为单键或 C_{1-6} 二价脂族烃基。

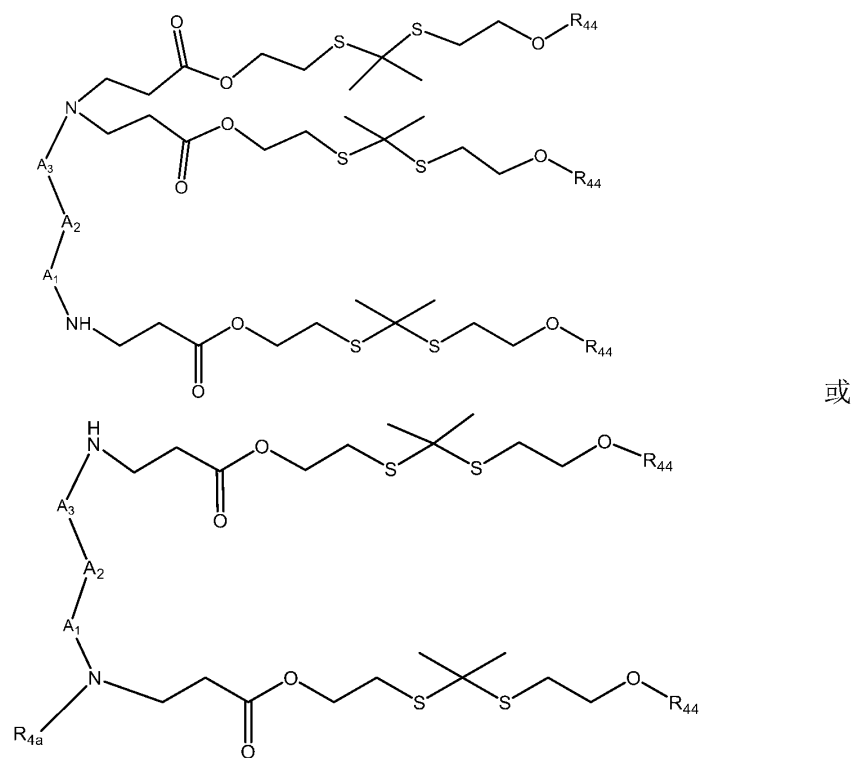
34. 权利要求 23 的脂质体，其中 R_4 在每次出现时各自独立地为疏水基团，所述疏水基团选自长链烷基、烯基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、芳基烯基、环状基团、脂环族基团和多环基团，所述疏水基团任选具有至少一个选自氮、氧和硫的杂原子。

35. 权利要求 34 的脂质体，其中 R_4 在每次出现时各自独立地为 C_8-C_{30} 烷基、 C_8-C_{30} 烯基或 C_8-C_{30} 炔基；或者 R_4 在每次出现时各自独立地为 $-(CH_2CH_2O)_m-C_8-C_{30}$ 烷基、 $-(CH_2CH_2O)_y-C_8-C_{30}$ 烯基或 $-(CH_2CH_2O)_y-C_8-C_{30}$ 炔基，其中 y 为 0 或 1 或 2，例如 R_4 为 $-CH_2CH_2O-C_8H_{17}$ 、 $-CH_2CH_2O-C_{10}H_{21}$ 、 $-CH_2CH_2O-C_{12}H_{25}$ 、 $-CH_2CH_2O-C_{14}H_{29}$ 或 $-CH_2CH_2O-C_{15}H_{31}$ 。

36. 权利要求 23 的脂质体，其中 A_1 和 A_3 各自独立地为单键或二价脂族烃基以及 A_2 为二价脂族烃基或二价杂脂族烃基。

37. 权利要求 23 的脂质体，其中所述脂质体为





其中 A_1 、 A_2 、 A_3 和 R_{4a} 如式(I)所定义, 以及 $-(CH_2CH_2O)-R_{44}$ 为如式(I)所定义的 R_4 ; Y 和 Z 均为 S; 或者 Y 为 S, 以及 Z 为 O; 或者 Y 为 O, 以及 Z 为 S; 或者 Y 和 Z 均为 O;

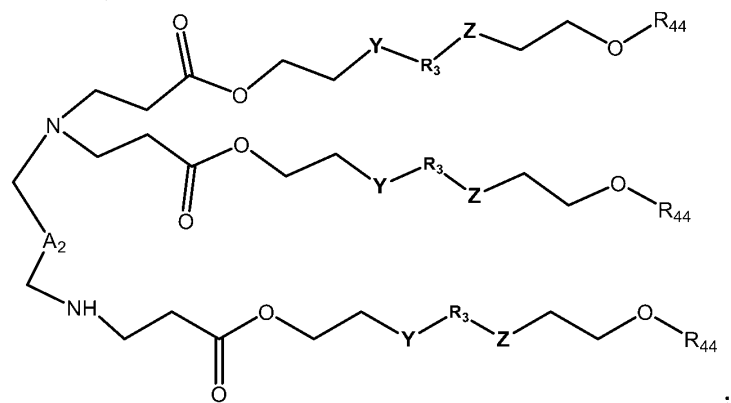
R_3 在每次出现时各自独立地为单键或

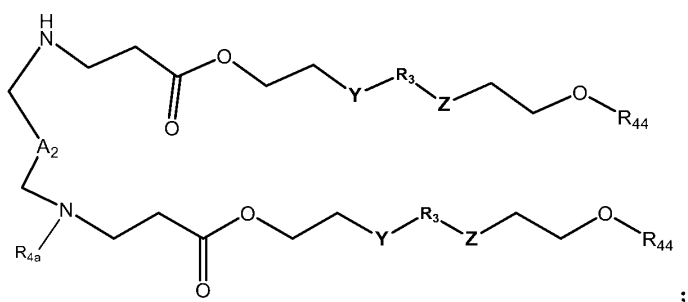


或亚甲基()。

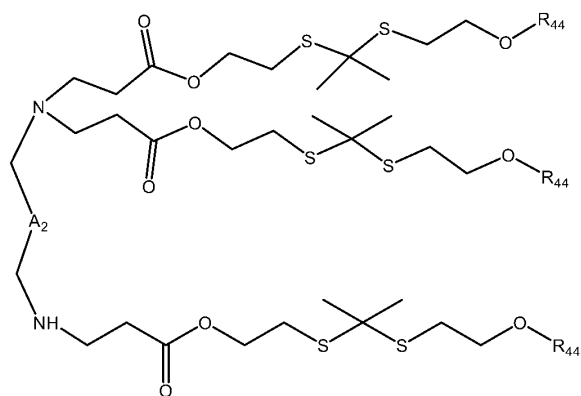
38. 权利要求 37 的脂质体, 其中 A_2 为二价哌嗪基团, 以及 A_1 和 A_3 各自独立为 C_{1-4} 二价烷基。

39. 权利要求 23 的脂质体, 其中所述脂质体为

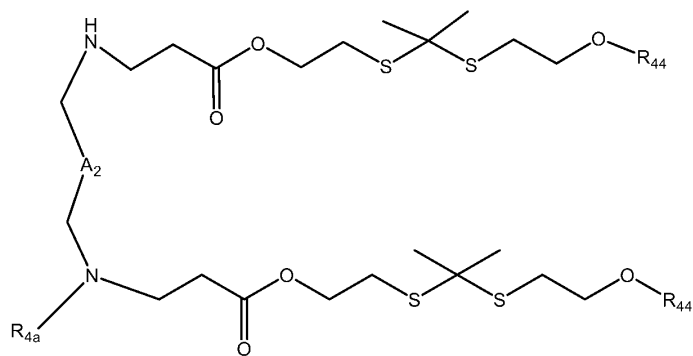




;

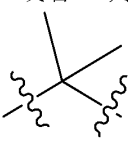
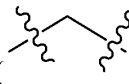


或



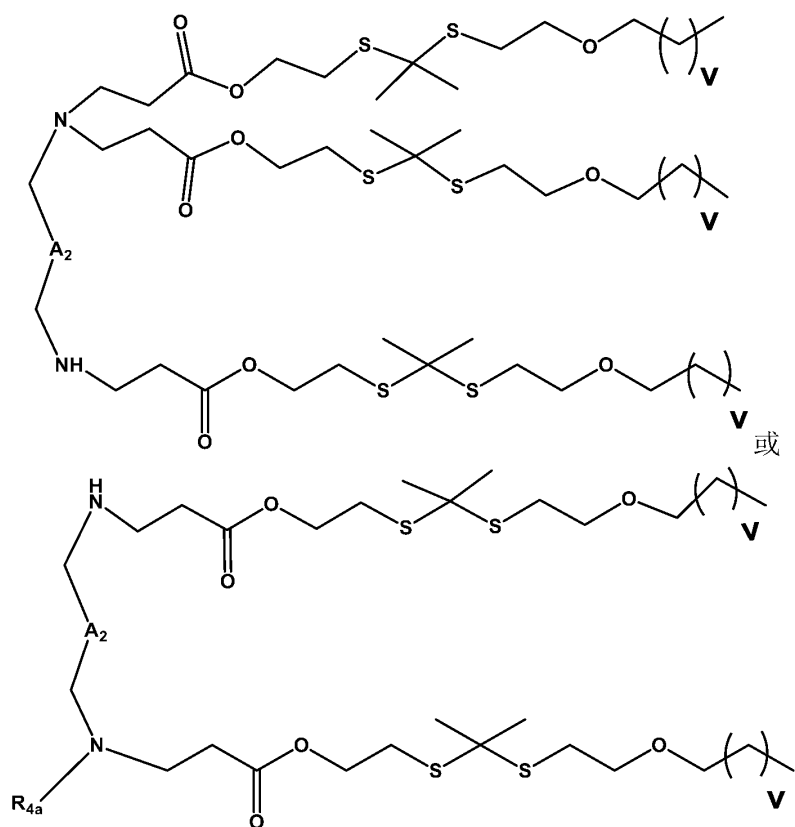
,

其中 A_2 和 R_{4a} 如式(I)所定义, 以及 $-(CH_2CH_2O)-R_{44}$ 为如式(I)所定义的 R_4 ; Y 和 Z 均为 S ; 或者 Y 为 S , 以及 Z 为 O ; 或者 Y 为 O , 以及 Z 为 S ; 或者 Y 和 Z 均为 O ; R_3 在每

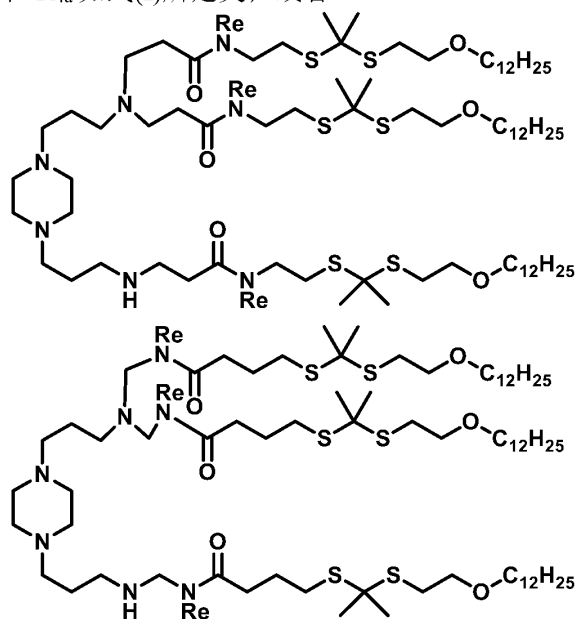
次出现时各自独立地为单键或  或亚甲基()。

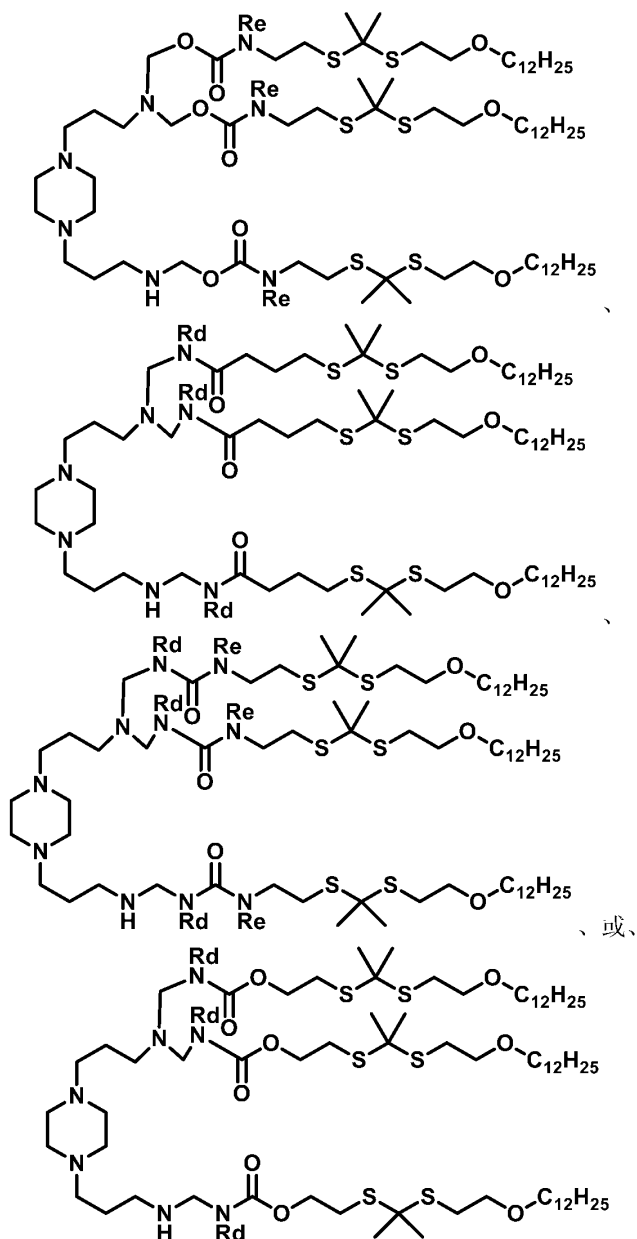
40. 权利要求 39 的脂质体, 其中 A_2 为二价哌嗪基团, 以及 A_1 和 A_3 各自独立为 C_{1-4} 二价烷基。

41. 权利要求 1 的脂质体, 其中所述脂质体为



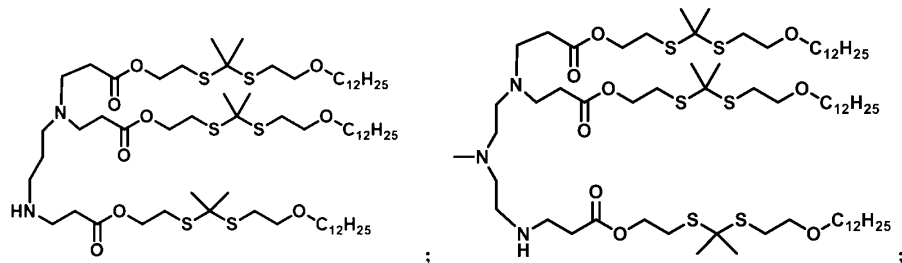
其中 v 为 6-28; A_2 和 R_{4a} 如式(I)所定义; 或者

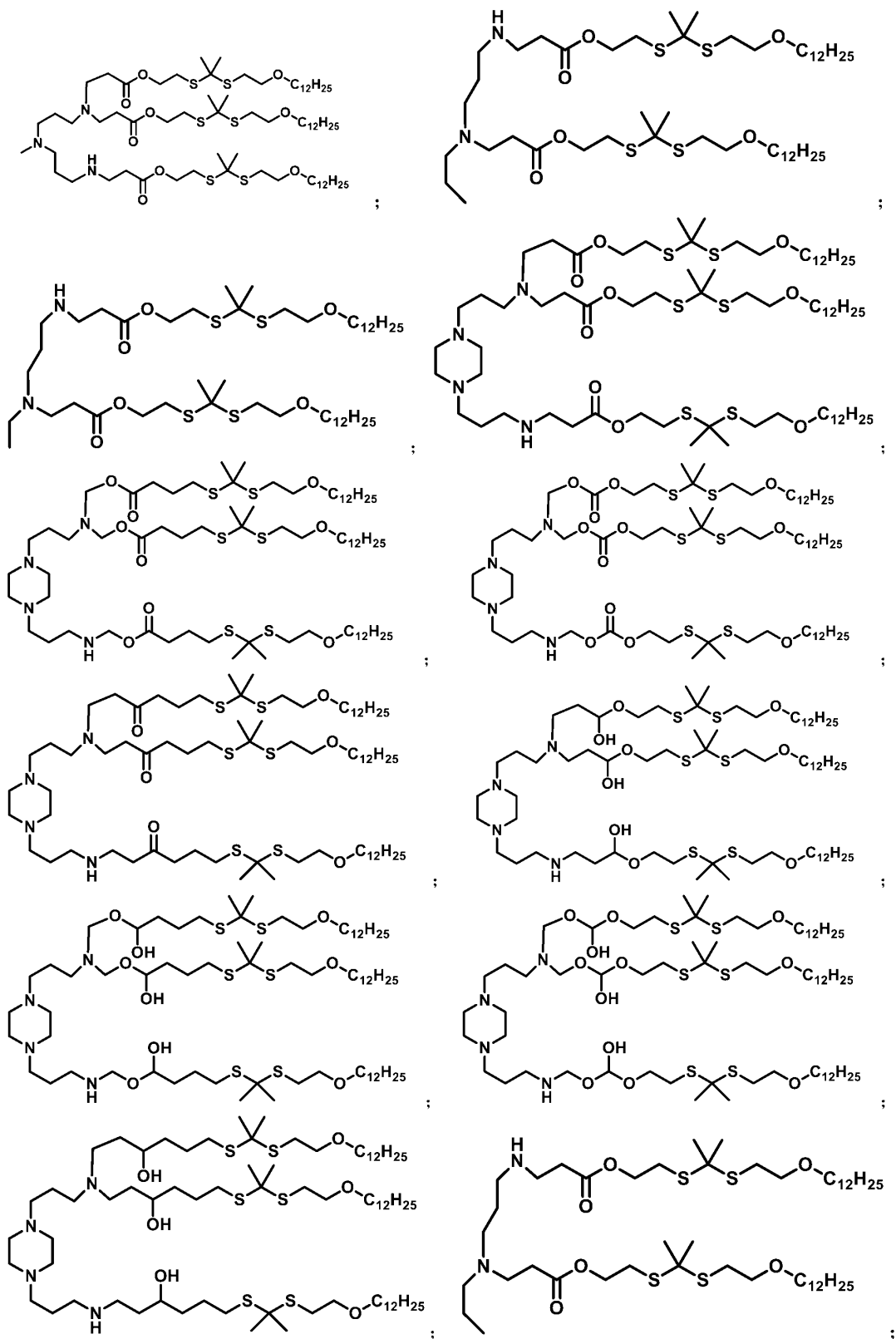


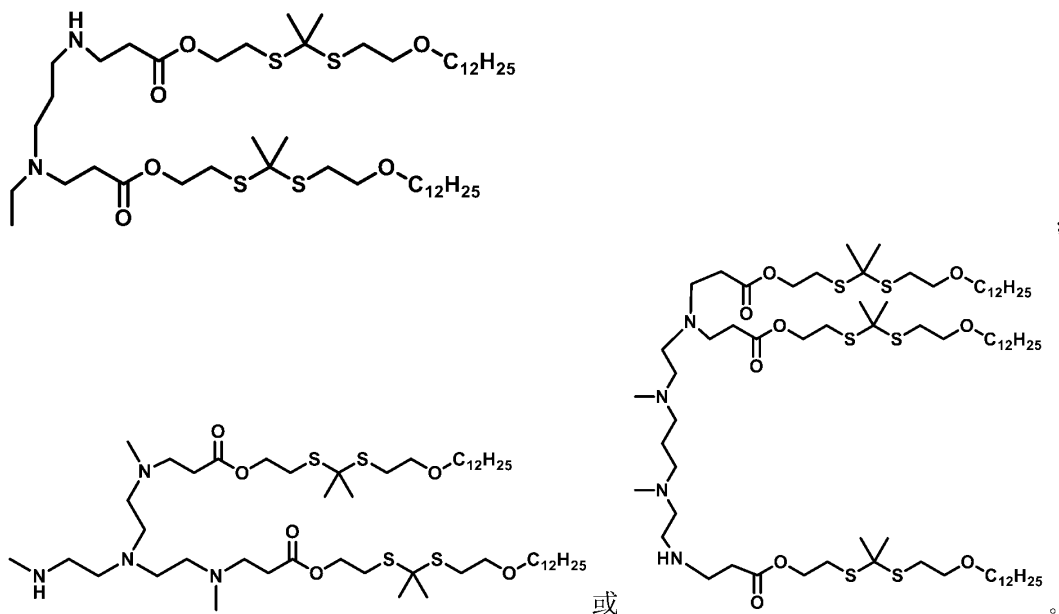


其中 R_d 和 R_e 如式(I)所定义。

42. 权利要求 23 的脂质体，其中所述脂质体为：







43. 一种制备式(I)的脂质体的方法, 其中 R_1 为亚乙基, X 为 $-C(O)-O-$, 所述方法包括:

使式(II)的丙烯酸类化合物 $CH_2=CH-X-R_2-Y-R_3-Z-R_4$ (II) 与亲水胺混合反应, 其中各变量如式(I)所定义, 其中所述亲水胺含有至少一个伯氨基($-NH_2$)或至少两个仲胺基($-NH-$), 其中所述式(II)的丙烯酸类化合物与所述亲水胺的摩尔比小于所述亲水胺中氨基上游离氢原子的摩尔数, 但是所述式(II)的丙烯酸类化合物与所述亲水胺的摩尔比大于 1; 然后任选地对所述产物经色谱纯化, 得到期望的式(I)的脂质体,

其中所述变量 R_2 、X、Y、 R_3 、Z 和 R_4 如式(I)所定义。

44. 一种制备式(I)的脂质体的方法, 其中 R_1 为亚乙基, X 为 $-C(O)-O-$, 所述方法包括:

使含有缩酮的丙烯酸酯 $CH_2=CH-C(O)O-R_2-Y-R_3-Z-R_4$ 与亲水胺混合反应, 其中各变量如式(I)所定义, 其中所述亲水胺含有至少一个伯氨基($-NH_2$)或至少两个仲胺基($-NH-$), 其中所述含有缩酮的丙烯酸酯与所述亲水胺的摩尔比小于所述亲水胺中氨基上游离氢原子的摩尔数, 但是所述含有缩酮的丙烯酸酯与所述亲水胺的摩尔比大于 1; 然后任选地对所述产物经色谱纯化, 得到期望的式(I)的脂质体,

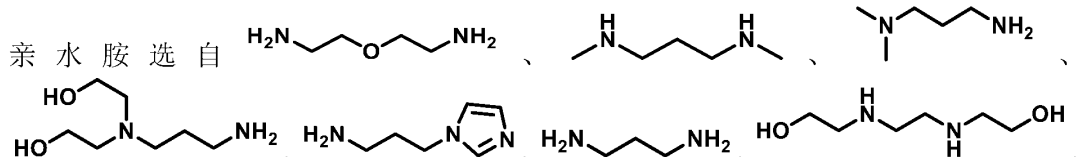
其中所述变量 R_2 、Y、 R_3 、Z 和 R_4 如式(I)所定义。

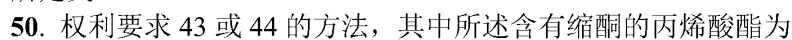
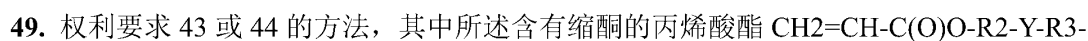
45. 权利要求 43 或 44 的方法, 其中所述含有缩酮的丙烯酸酯与所述亲水胺的摩尔比比所述亲水胺中氨基上游离氢原子的摩尔数小 1 或小 2, 但是所述含有缩酮的丙烯酸酯与所述亲水胺的摩尔比大于 1。

46. 权利要求 43 或 44 的方法, 其中所述含有缩酮的丙烯酸酯与含有 2 个氨基上游离氢原子的亲水胺的摩尔比为 1.1-1.8; 或者所述含有缩酮的丙烯酸酯与含有 3 个氨基上游离氢原子的亲水胺的摩尔比为 1.1-2.7; 或者所述含有缩酮的丙烯酸酯与含有 4 个氨基上游离氢原子的亲水胺的摩尔比为 1.1-3.5。

47. 权利要求 43 或 44 的方法, 其中所述亲水胺 pK_a 值大于 4。

48. 权利要求 43 或 44 的方法, 其中所述方法(a)中的所述亲水胺或方法(b)中未受保护的





51. 一种药物组合物, 所述药物组合物包括药用载体以及纳米复合物, 其中纳米复合物包

括权利要求 23-42 中任一项的脂质体和药物活性分子。

52. 权利要求 51 的药物组合物，其中所述药物活性分子是小分子药物、蛋白质、肽、核酸、糖类或其组合。

53. 权利要求 51 的药物组合物，其中所述纳米复合物进一步含有其它脂质。