

脂质化合物及其在核酸递送中的应用

本申请要求2021年5月28日向中国国家知识产权局提交的专利申请号为202110592439.8，发明名称为“化合物及其在核酸递送中的应用”的在先申请的优先权。该在先申请的全文通过引用的方式结合于本申请中。

技术领域

本发明属于药用化合物技术领域，具体涉及一种可电离脂质化合物、其制备方法，以及其在活性治疗剂（例如核酸）递送中的应用。

背景技术

核酸包括小干扰RNA (siRNA)、信使RNA (mRNA)、微RNA (miRNA)、反义寡核苷酸 (ASO)、核酶、质粒和免疫刺激性核酸，通过多种机制发挥作用。以mRNA为例，mRNA是将遗传信息从DNA转运至细胞质的核糖体进行蛋白质翻译的一类RNA，它无需进入细胞核，因此不会带来基因突变的风险，可以用于实现特定细胞产物的表达。这些核酸在与蛋白质或酶的缺陷相关疾病的治疗中是有用的。然而，在治疗环境中核酸会遇到很多问题。例如mRNA，其为单链结构非常不稳定，进入体内后很快会被核酸酶降解。此外，mRNA具有较大的分子量且带有大量负电荷使其难以穿过带负电荷的细胞膜进入靶细胞。所以如何将mRNA有效地递送到细胞是实现其体内应用的技术关键。类似的问题在各种治疗性核酸中均存在。

在基因治疗中，可电离脂质化合物已经被证明是治疗各种疾病的核酸的优良递送载体。所述可电离脂质化合物的胺基在合适的酸性条件下可以质子化形成带正电头基，其尾部由疏水性碳链组成，带电部分用来以静电方式结合带负电RNA，同时疏水性尾部使得其能自组装成亲脂性粒子。可电离脂质化合物和其他三种或四种脂质如DSPC(二硬脂酰基磷脂酰胆碱)或DOPE(二油酰磷脂酰乙醇胺)、胆固醇(CHOL)和PEG化脂质[DMG-PEG2000 (1,2-二肉豆蔻-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇2000)或DSPE-PEG2000(二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000)]组合而自组装形成的脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)用来递送核酸，可以保护核酸避免被核酸酶降解，并且促进细胞摄取。目前可电离脂质化合物在核酸递送中取得了巨大进步，但

仍存在递送效率较低的问题，这也是制约行业发展的瓶颈问题之一。

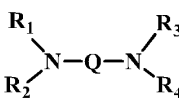
发明内容

本发明提供了一种新型可电离脂质化合物，其可用于递送生物活性分子（例如，mRNA，siRNA，micRNA，蛋白质，多肽等）。鉴于胺基结构可质子化形成带正电荷的阳离子基团，本发明的可电离脂质化合物尤其适用于传递带负电荷的活性物质，例如DNA、RNA或其它核苷酸分子。

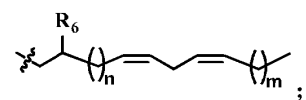
本发明还提供了包含所述可电离脂质化合物的生物活性物质递送系统，所述递送系统可以是微粒、纳米粒子、脂质体、脂质纳米颗粒或微泡。在本发明的一个实施方式中，所述递送系统是脂质纳米颗粒。此类脂质纳米颗粒可以将生物活性物质（如mRNA）高效递送到细胞、组织或器官中，实现生物活性物质的高效调控。在本发明中，所述可电离脂质化合物与靶向细胞或个体传递的生物活性物质或进一步包含其他的物质（例如，其它的阴离子、阳离子或可电离脂质化合物、合成或天然的聚合物、表面活性剂、胆固醇、碳水化合物、蛋白质、磷脂等）一同，组合形成微粒、纳米粒子、脂质体、脂质纳米颗粒或微泡。而所述的生物活性物质可呈气体、液体或固体形式，可为多核苷酸、蛋白质、肽或小分子。在本发明中，所述递送系统可接着任选地与医药赋形剂组合形成医药组合物。

本发明还提供了这些新型可电离脂质化合物的合成方法。

本发明还提供了所述新型可电离脂质化合物在制备生物活性物质递送系统中的应用。所述递送系统可以是微粒、纳米粒子、脂质体、脂质纳米颗粒或微泡。在本发明的一个实施方式中，所述递送系统是脂质纳米颗粒。

本发明的可电离脂质化合物具有如式I所示的结构  (I)，其中：

Q为经取代或未取代的直链C2-20亚烷基，所述亚烷基的1个或1个以上C原子任选被独立地选自O、S和N的杂原子所替换；或，Q为经取代或未取代、饱和或不饱和的4-6元环，所述4-6元环的环原子任选含有1个或1个以上独立地选自O、S、N的杂原子；所述取代的取代基团选自卤素、-OH、直链或支链的C1-20烷基、直链或支链的C1-20烷氧基、直链或支链的C2-20

烯基、直链或支链的C2-20炔基、；

R₁、R₂、R₃、R₄可以相同或不同，各自独立的选自氢，经取代或未取代的直链或支链C1-30烷基，经取代或未取代的直链或支链C2-30烯基，经取代或未取代的直链或支链C2-30炔基，

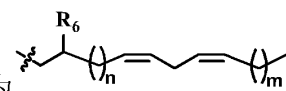
所述烷基、烯基或炔基的1个或1个以上C原子任选被独立地选自O、S和N的杂原子所替换，或-CH₂CH(OH)R₅；所述取代的取代基团选自卤素、-OH、直链或支链的C1-10烷基、直链或支链的C1-10烷氧基；



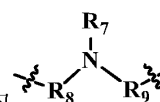
R₅选自氢，经取代或未取代的直链或支链C1-30烷基，经取代或未取代的直链或支链C2-30烯基，经取代或未取代的直链或支链C2-30炔基，所述烷基、烯基或炔基的1个或1个以上C原子任选被独立地选自O、S和N的杂原子所替换；所述取代的取代基团选自卤素、-OH、直链或支链的C1-10烷基、直链或支链的C1-10烷氧基；

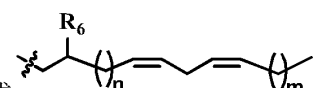
R₆选自氢，C1-3烷基，C1-3烷氧基，-OH；

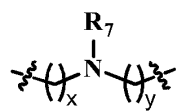
n选自1~8的整数，m选自0~8的整数，n和m彼此独立，可以相同也可以不同；

当R₁、R₂、R₃、R₄中至少两个为  时，每个所述基团中的n和m彼此独立，可以相同也可以不同。

在本发明的优选实施方式中，Q为经取代或未取代的直链C2-20亚烷基，所述亚烷基的1个或1个以上C原子任选被独立地选自O、S和N的杂原子所替换；

优选，Q为  ，其中，R₈、R₉彼此独立的选自经取代或未取代的直链C1-10亚烷基，所述亚烷基的1个或1个以上C原子任选被独立地选自O、S和N的杂原子所替换；R₇为氢，卤素，-OH，直链或支链C1-20烷基，直链或支链C2-20烯基，直链或支链C2-20炔基，或

-CH₂CH(OH)R₅，或  ；所述取代的取代基团为卤素、-OH、直链或支链的C1-10烷基、直链或支链的C1-10烷氧基；

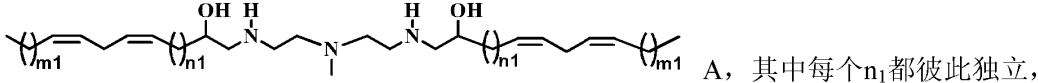
优选，Q为  ，其中：x和y可以相同或者不同，独立地选自1~8的整数；R₇定义和前述相同；优选，x或y相同或不同，选自1~3的整数，例如为1、2或3；优选，R₇为直链或支链C1-4烷基，例如为甲基、乙基、正丙基、正丁基等。

在本发明的一些实施例中，所述饱和或不饱和的4-6元环为哌嗪基或环己基。

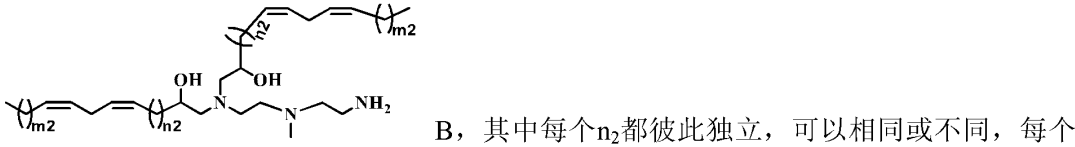
在本发明的优选实施方式中，R₆为-OH。

在本发明的优选实施方式中，n选自4~8的整数，m选自4~8的整数。

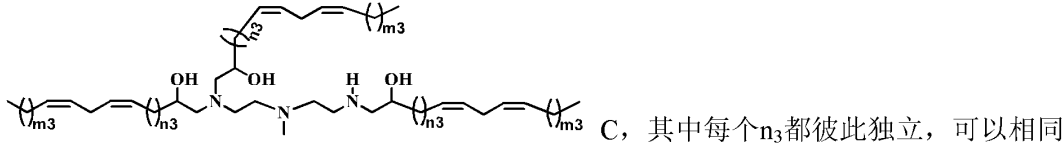
在本发明的优选实施方式中，所述式I化合物为下式A、B、C或D：



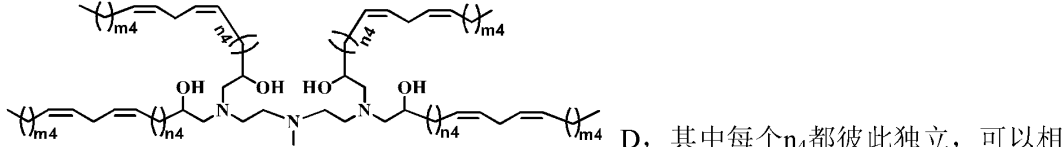
可以相同或不同，每个 n_1 选自1~8的整数，每个 m_1 都彼此独立，可以相同或不同，每个 m_1 选自0~8的整数；优选，每个 n_1 选自4~8的整数，每个 m_1 选自4~8的整数；优选，每个 n_1 都彼此相同，每个 m_1 都彼此相同。



n_2 选自1~8的整数，每个 m_2 都彼此独立，可以相同或不同，每个 m_2 选自0~8的整数；优选，每个 n_2 选自4~8的整数，每个 m_2 选自4~8的整数；优选，每个 n_2 都彼此相同，每个 m_2 都彼此相同。



或不同，每个 n_3 选自1~8的整数，每个 m_3 都彼此独立，可以相同或不同，每个 m_3 选自0~8的整数；优选，每个 n_3 选自4~8的整数，每个 m_3 选自4~8的整数；优选，每个 n_3 都彼此相同，每个 m_3 都彼此相同。



同或不同，每个 n_4 选自1~8的整数，每个 m_4 都彼此独立，可以相同或不同，每个 m_4 选自0~8的整数；优选，每个 n_4 选自4~8的整数，每个 m_4 选自4~8的整数；优选，每个 n_4 都彼此相同，每个 m_4 都彼此相同。

在本发明的一些具体实施方式中，所述式I化合物选自表1所示的以下化合物：

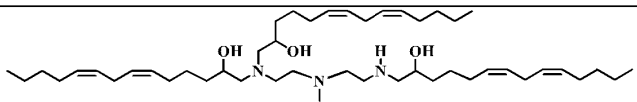
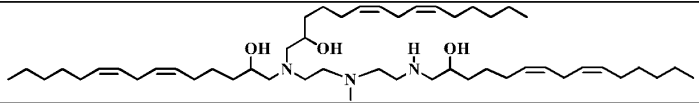
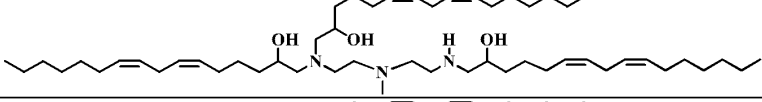
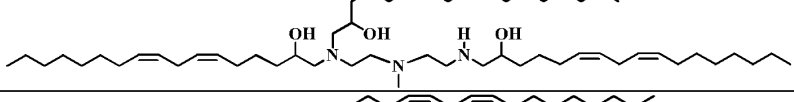
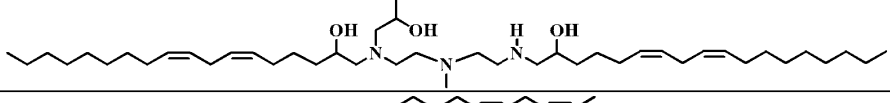
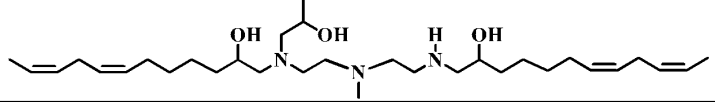
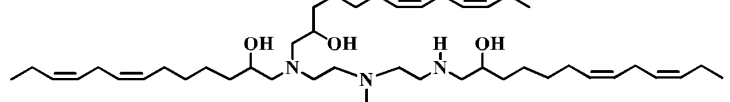
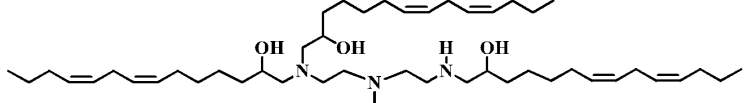
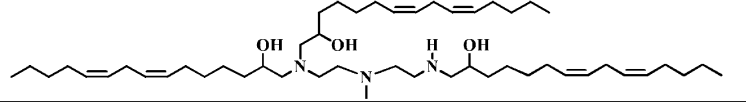
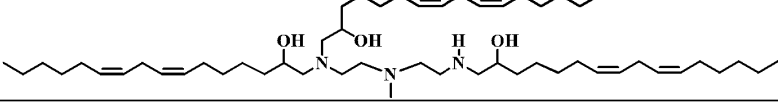
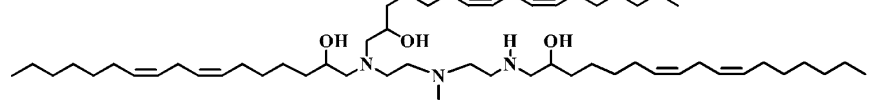
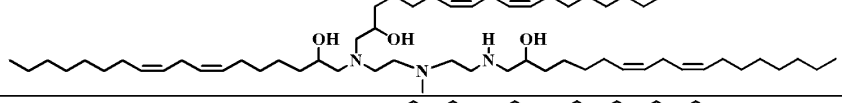
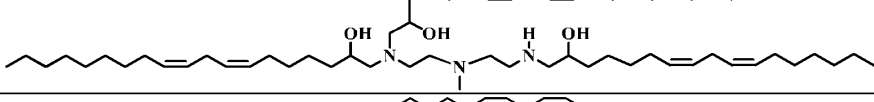
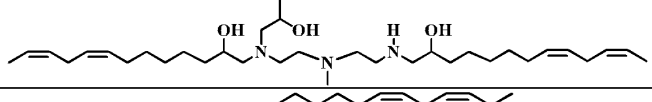
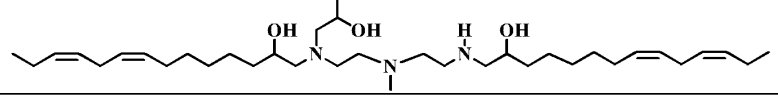
表1

编号	结构式
I-1	
I-2	

I-3	
I-4	
I-5	
I-6	
I-7	
I-8	
I-9	
I-10	
I-11	
I-12	
I-13	
I-14	
I-15	
I-16	
I-17	
I-18	
I-19	
I-20	
I-21	
I-22	
I-23	
I-24	
I-25	
I-26	
I-27	

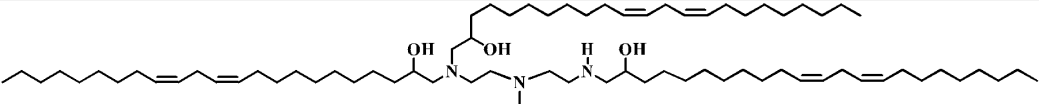
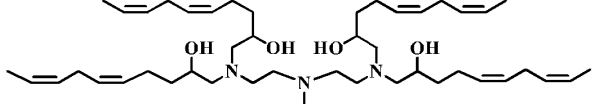
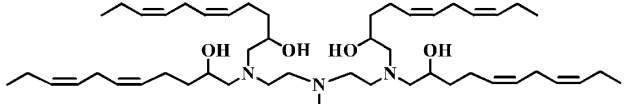
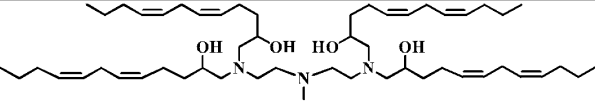
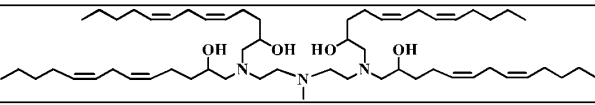
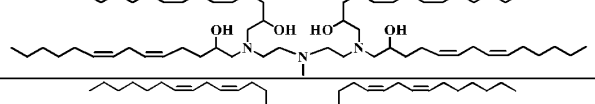
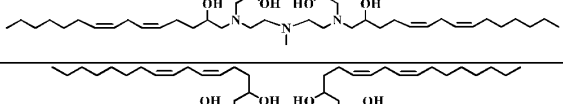
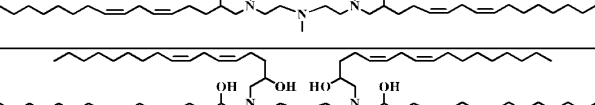
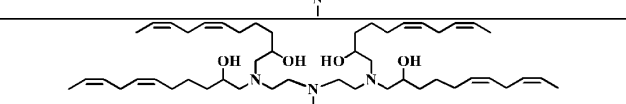
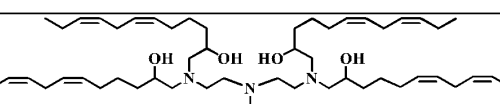
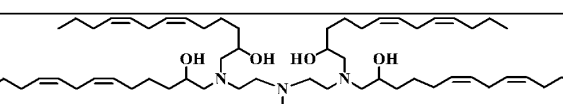
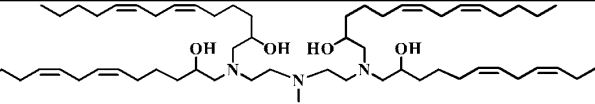
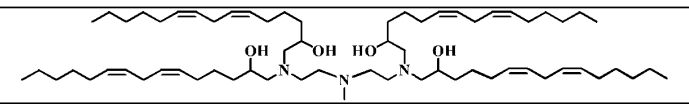
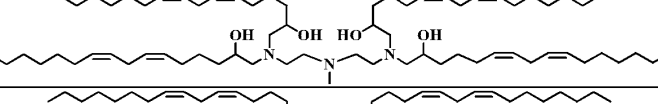
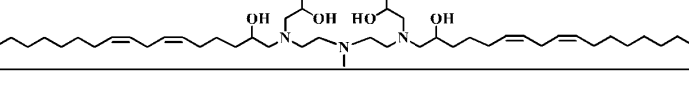
I-28	
I-29	
I-30	
I-31	
I-32	
I-33	
I-34	
I-35	
I-36	
I-37	
I-38	
I-39	
I-40	
I-41	
I-42	
I-43	
I-44	
I-45	
I-46	
I-47	
I-48	
I-49	
I-50	

I-51	
I-52	
I-53	
I-54	
I-55	
I-56	
II-1	
II-2	
II-3	
II-4	
II-5	
II-6	
II-7	
II-8	
II-9	
II-10	
II-11	

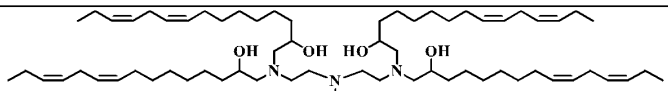
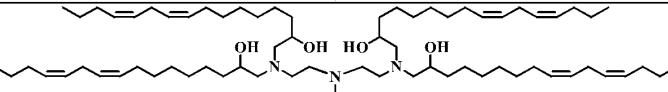
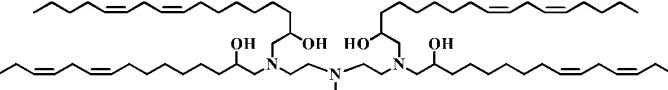
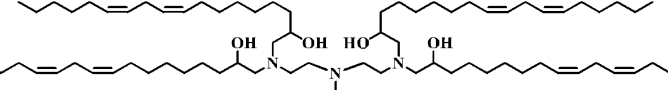
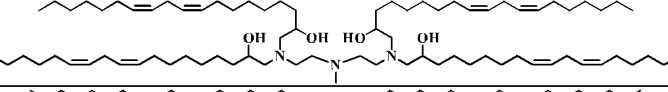
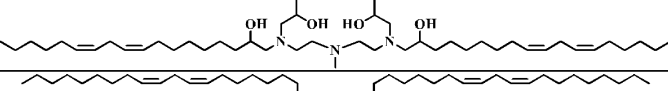
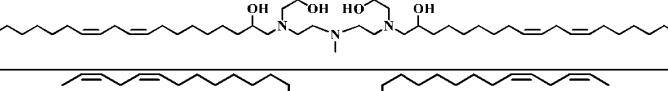
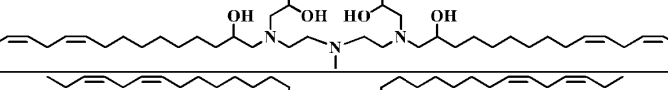
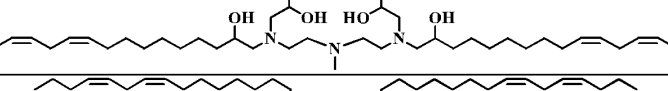
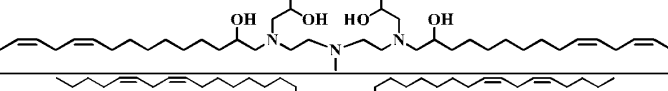
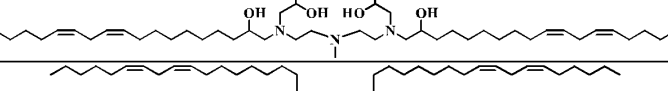
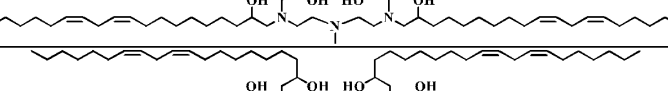
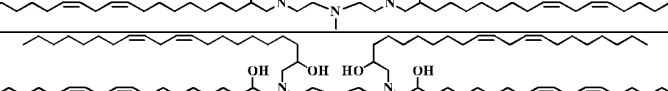
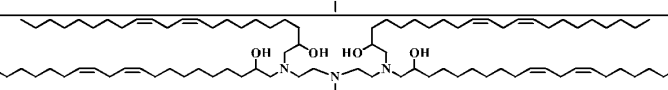
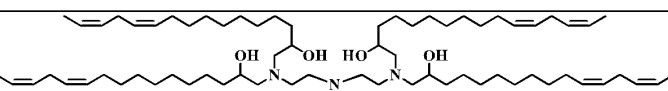
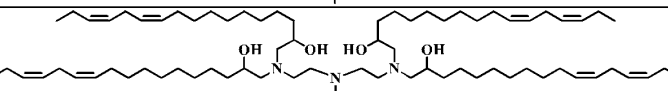
II-12	
II-13	
II-14	
II-15	
II-16	
II-17	
II-18	
II-19	
II-20	
II-21	
II-22	
II-23	
II-24	
II-25	
II-26	

II-27	
II-28	
II-29	
II-30	
II-31	
II-32	
II-33	
II-34	
II-35	
II-36	
II-37	
II-38	
II-39	
II-40	
II-41	

II-42	
II-43	
II-44	
II-45	
II-46	
II-47	
II-48	
II-49	
II-50	
II-51	
II-52	
II-53	
II-54	
II-55	

II-56	
III-1	
III-2	
III-3	
III-4	
III-5	
III-6	
III-7	
III-8	
III-9	
III-10	
III-11	
III-12	
III-13	
III-14	
III-15	

III-16	
III-17	
III-18	
III-19	
III-20	
III-21	
III-22	
III-23	
III-24	
III-25	
III-26	
III-27	
III-28	
III-29	
III-30	
III-31	
III-32	
III-33	

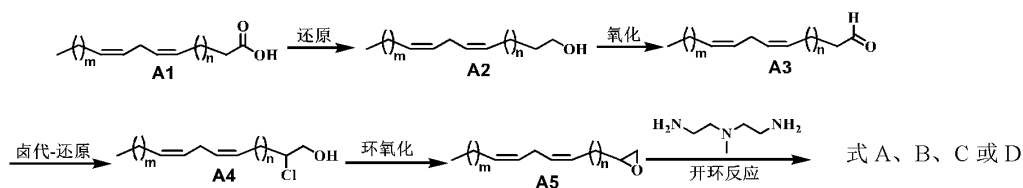
III-34	
III-35	
III-36	
III-37	
III-38	
III-39	
III-40	
III-41	
III-42	
III-43	
III-44	
III-45	
III-46	
III-47	
III-48	
III-49	
III-50	

III-51	
III-52	
III-53	
III-54	
III-55	
III-56	

本发明的可电离脂质化合物可以采用本领域已有的方法进行合成，例如，使一当量或一当量以上的胺与一当量或一当量以上的环氧基封端化合物在合适的条件下反应形成。可电离脂质化合物的合成是在有或无溶剂的情况下进行，并且所述合成可在25-100 °C范围内的较高温度下进行。可任选纯化制得的可电离脂质化合物。举例来说，可纯化可电离脂质化合物的混合物，得到特定的可电离脂质化合物。或可纯化混合物，得到特定立体异构体或区域异构体。所述环氧化物可以商业购买，或者合成制备。

在某些实施例中，胺的所有氨基都与环氧基封端化合物完全反应形成叔胺。在其它实施例中，胺的所有氨基并不都与环氧基封端化合物完全反应，由此在可电离脂质化合物中产生伯胺或仲胺。使这些伯胺或仲胺保持原样或可与诸如不同环氧基封端化合物等另一亲电子试剂反应。本领域技术人员可知，使过量的胺与环氧基封端化合物反应将会产生多种具有各种尾部数目的不同的可电离脂质化合物。举例来说，二胺或多胺可在分子的各种氨基部分上包括一个、两个、三个或四个环氧基衍生的化合物尾部，从而产生伯胺、仲胺和叔胺。在某些实施例中，使用两种同一类型的环氧基封端化合物。在其它实施例中，使用两种或两种以上不同环氧基封端化合物。

在本发明的一些实施方式中，本发明的可电离脂质化合物可以采用如下的一般制备方法进行制备。



步骤1：还原

在还原剂的存在下，将化合物A1的羧基还原成羟基以获得化合物A2。还原剂的实例包括但不限于氢化铝锂、二异丁基氢化铝等。反应所用溶剂的实例包括但不限于醚类（如乙醚、四氢呋喃和二氧六环等），卤代烃（如氯仿、二氯甲烷和二氯乙烷等），烃类（如正戊烷、正己烷、苯和甲苯等），及这些溶剂的两种或以上形成的混合溶剂。

步骤2：氧化

在氧化剂的存在下，将化合物A2的羟基氧化成醛基以获得化合物A3。氧化剂的实例包括但不限于2-碘酰基苯甲酸(IBX)、氯铬酸吡啶(PCC)、二氯铬酸吡啶盐(PDC)、戴斯-马丁氧化剂、二氧化锰等。反应所用溶剂的实例包括但不限于卤代烃（如氯仿、二氯甲烷和二氯乙烷等），烃类（如正戊烷、正己烷、苯和甲苯等），腈类（例如乙腈等），及这些溶剂的两种或以上形成的混合溶剂。

步骤3：卤代-还原

首先在酸性条件下，将化合物A3的醛 α -氢与卤代试剂发生卤代反应以获得 α -卤代醛中间体，然后在还原剂存在下，将 α -卤代醛的醛基还原成羟基以获得化合物A4。提供酸性条件的实例包括但不限于DL-脯氨酸。卤代试剂的实例包括但不限于N-氯代丁二酰亚胺(NCS)和N-溴代丁二酰亚胺(NBS)。还原剂的实例包括但不限于硼氢化钠、氰基硼氢化钠和三乙酰氧基硼氢化钠。

步骤4：环氧化

将化合物A4在碱的存在下进行分子内的亲核取代反应以获得环氧化合物A5。碱的实例包括但不限于碱金属的氢氧化物或氢化物，例如氢氧化钠、氢氧化钾和氢化钠。反应所用溶剂的实例包括但不限于二氧六环和水的混合物。

步骤5：开环反应

使化合物A5与胺（例如N,N-二(2-氨基乙基)甲胺）发生开环反应以获得最终化合物。反应所用溶剂的实例包括但不限于乙醇、甲醇、异丙醇、四氢呋喃、三氯甲烷、己烷、甲苯、乙醚等。

所述制备方法中的原料A1可以商购也可以采用常规方法合成。

本发明的可电离脂质分子结构中含有两个相邻的顺式双键，使其在后续应用于递送系统包裹活性物质（例如核酸如mRNA）时，具有较高的包封率，较好的细胞转染率；此外，在制备脂质纳米颗粒时，得到的脂质纳米颗粒粒径更均匀。本发明的可电离脂质化合物尤其适合于制备实心结构的纳米颗粒。

本发明的可电离脂质化合物在用于药物递送系统时，可囊封药剂，包括多核苷酸、小分子、蛋白质、肽、金属等。所述可电离脂质化合物具有适合于制备药物递送系统的若干性质：1)脂质复合和“保护”不稳定药剂的能力；2)缓冲体内pH值的能力；3)充当“质子海绵”和引起体内溶解的能力；4)中和带负电活性物质上的电荷的能力。

所述药物递送系统可以是粒子形式的。在某些实施例中，粒子直径在1 μm 到1000 μm 范围内。在某些实施例中，粒子直径在1 nm到1000 nm范围内。例如，粒子直径在1 μm 到100 μm 范围内，或者在1 μm 到10 μm 范围内，或者在10 μm 到 100 μm 范围内，或者在20 nm到800 nm范围内，或者在50 nm到500 nm范围内，或者在80 nm到200 nm范围内，或者在1 nm到100 nm范围内，或者在1 nm到10 nm范围内。当粒子的粒径范围在1 nm到1000 nm范围内，就是本领域通常所述的纳米颗粒了。所述粒子可使用所属领域中已知的任何方法来制备。这些方法包括(但不限于)喷雾干燥、单一和双重乳液溶剂蒸发、溶剂萃取、相分离、纳米沉淀、微流控、简单和复杂凝聚以及所属领域的普通技术人员熟知的其它方法。

所述药物递送系统还可以是微泡、脂质体或脂质纳米颗粒，它们很适用于递送药剂。

可通过本发明的可电离脂质化合物形成的递送系统传递的活性物质可为治疗剂、诊断剂或预防剂。活性物质的性质可为小分子化合物、核酸、蛋白质、肽、金属、经同位素标记的化合物、疫苗等。

由本发明的可电离脂质化合物形成的递送系统还可修饰上靶向分子，使其成为靶向剂而能靶向特定细胞、组织或器官。靶向分子可包括在整个递送系统中或可仅位于其表面上。靶向分子可为蛋白质、肽、糖蛋白、脂质、小分子、核酸等，其实例包括(但不限于)抗体、抗体片段、低密度脂蛋白(LDL)、转铁蛋白(transferrin)、脱唾液酸糖蛋白(asialoglycoprotein)、受体配体、唾液酸、适体等。

由本发明的可电离脂质化合物形成的递送系统可与一种或一种以上医药赋形剂组合形成适合于投予动物(包括人类)的医药组合物。术语“医药赋形剂”的意思是任何类型的无毒、惰性固体、半固体或液体填充剂、稀释剂等，包括但不限于糖，诸如乳糖、海藻糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉；纤维素和其衍生物，诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素；明胶；滑石；油，诸如花生油、棉籽油、红花油、橄榄油、玉米油和大豆油；二醇，诸如丙二醇；酯，诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯；表面活性剂，诸如吐温80 (Tween 80)；缓冲剂，诸如磷酸盐缓冲溶液、乙酸盐缓冲液和柠檬酸盐缓冲液；着色剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂等。

本发明的医药组合物可经口、经直肠、静脉内、肌注、阴道内、鼻内、腹膜内、经颊或

以口服或鼻用喷雾等形式授予人类和/或动物。

如本文中所使用，术语“烷基”是指从含有1到30个碳原子的烃部分通过去除单个氢原子得到的饱和烃基。烷基的实例包括(但不限于)甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、正庚基、正辛基、正癸基、正十一烷基和正十二烷基。

术语“烯基”表示从具有至少一个碳-碳双键的烃部分通过去除单个氢原子得到的单价基团。烯基包括例如例如乙烯基、丙烯基、丁烯基、1-甲基-2-丁烯-1-基等。

术语“炔基”是指从具有至少一个碳-碳三键的烃通过去除单个氢原子得到的单价基团。代表性炔基包括乙炔基、2-丙炔基(炔丙基)、1-丙炔基等。

术语“烷氧基”是指如前文所定义的烷基通过氧原子连接于母体分子。烷氧基的实例包括(但不限于)甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、叔丁氧基、新戊氧基和正己氧基。

术语“卤基”和“卤素”是指选自氟、氯、溴和碘的原子。

术语“饱和或不饱和的4-6元环”是指具有4-6个环原子的环，所述环原子可以是C、N、S、O，其实例包括但不限于4-6元饱和的环烷基，例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基；4-6元芳基，例如苯基；4-6元杂环基，例如吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基等；4-6元杂芳基，例如三唑基、唑基、异唑基、噻唑基等。在本发明的一些实施例中，所述饱和或不饱和的4-6元环优选为哌嗪基、环己基。

术语“经取代”(无论前面是否存在术语“任选地”)和“取代基”是指将一个官能团变为另一个官能团的能力，条件是维持所有原子的价数。当任何特定结构中的一个以上位置可经一个以上选自指定群组的取代基取代时，所述取代基可在每一位置相同或不同。

附图说明

图1 可电离脂质II-37的pKa的曲线

图2 可电离脂质II-37形成的包裹mRNA的LNP的细胞转染效率

图3 可电离脂质II-37形成的包裹pDNA的LNP的细胞转染效率

图4 可电离脂质II-37形成的包裹siRNA的LNP的细胞转染效率

图5 可电离脂质II-37和商用分子MC3分别形成的包裹mRNA的LNP的细胞转染效率对比

图6 用Cy5标记负载的mRNA，分别用可电离脂质II-37和商用分子MC3形成包裹mRNA的LNP，用荧光染色观察所述LNP递送mRNA进入细胞内的效率

图7 可电离脂质II-37和C14-113分别形成的包裹mRNA的LNP的细胞转染效率对比

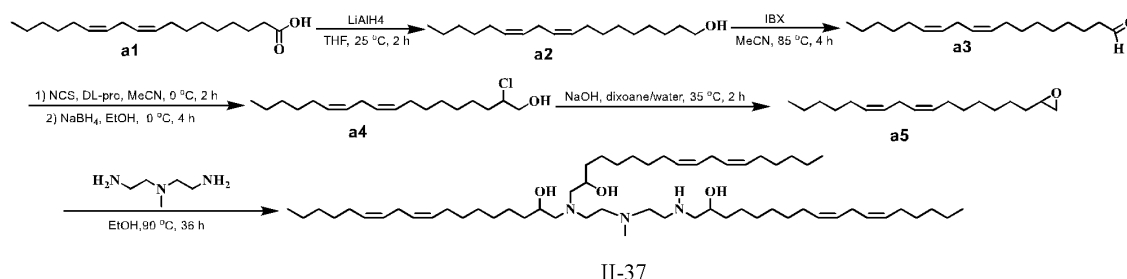
图8 MTT法测定II-37-LNP和C14-113-LNP的细胞毒性

具体实施方式

下文将结合具体实施例对本发明的技术方案做更进一步的详细说明。应当理解，下列实施例仅为示例性地说明和解释本发明，而不应被解释为对本发明保护范围的限制。凡基于本发明上述内容所实现的技术均涵盖在本发明旨在保护的范围内。

除非另有说明，以下实施例中使用的原料和试剂均为市售商品，或者可以通过已知方法制备。

实施例1 可电离脂质II-37的合成



亚麻油醇(a2)的合成：在0 °C下，向950 mL四氢呋喃中加入LiAlH₄ (7.20 g)、亚麻油酸(50 g, a1)，之后混合物在25 °C下搅拌2 h。薄层色谱法(TLC)显示反应完成后，向反应液依次加入水(7.2 mL)，NaOH水溶液(7.2 mL，质量分数为15%)和水(21.6 mL)淬灭，并加入适量Na₂SO₄搅拌15分钟后通过布氏漏斗过滤并用乙酸乙酯洗涤滤饼，收集滤液并蒸发浓缩，得到目标产物亚麻油醇(a2) 47.4 g。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.27-5.44 (m, 4 H), 3.63 (t, J = 6.63 Hz, 2 H), 2.77 (t, J = 6.44 Hz, 2 H), 1.97-2.12 (m, 4 H), 1.57-1.63 (m, 1 H), 1.20-1.46 (m, 18 H), 0.83-0.95 (m, 3 H)

(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯醛(a3)的合成：在室温下，向170 mL乙腈中加入亚麻油醇(25.0 g, a2)和2-碘酰基苯甲酸(39.4 g)，之后混合物在85 °C下搅拌4 h。反应液通过布氏漏斗过滤并用二氯甲烷洗涤滤饼，收集滤液并蒸发浓缩，得到目标产物(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯醛(a3) 24.0 g。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.76 (t, J = 1.76 Hz, 1 H), 5.25-5.43 (m, 4 H), 2.76 (t, J = 6.17 Hz, 2 H), 2.41 (td, J = 7.33, 1.87 Hz, 2 H), 2.04 (q, J = 6.84 Hz, 4 H), 1.56-1.68 (m, 2 H), 1.22-1.36 (m, 14 H), 0.88 (t, J = 6.73 Hz, 3 H)

(9Z,12Z)-2-氯代-十八碳-9,12-二烯-1-醇(a4)的合成：在0 °C下，向246 mL乙腈中加入

(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯醛(43.0 g, a3), DL-脯氨酸(5.62 g)和N-氯代丁二酰亚胺, 然后在0°C下搅拌2 h。反应完成后, 用无水乙醇(246 mL)稀释反应液, 再加入硼氢化钠(8.8 g), 之后在0°C下搅拌4 h。向反应混合物中加水(120 mL)淬灭, 并用甲基叔丁基醚萃取, 合并有机相后用饱和食盐水洗涤, 硫酸钠干燥之后过滤、蒸发浓缩, 得到目标产物(9Z,12Z)-2-氯代-十八碳-9,12-二烯-1-醇(a4, 46 g), 直接用于下一步。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 5.25 - 5.51 (m, 4 H), 3.97-4.07 (m, 1 H), 3.79 (dd, $J = 12.01$, 3.63 Hz, 1 H), 3.59-3.70 (m, 1 H), 2.67-2.90 (m, 2 H), 1.96-2.15 (m, 5 H), 1.64-1.82 (m, 1 H), 1.20-1.49 (m, 15 H), 0.89 (br t, $J = 6.75$ Hz, 3 H)

2-[(7Z,10Z)-十六碳烷-7,10-二烯]环氧乙烷(a5)的合成: 在室温下, 向450 mL 1,4-二氧六环中加入(9Z,12Z)-2-氯代-十八碳-9,12-二烯-1-醇(45 g, a4)和氢氧化钠水溶液(120 g 氢氧化钠溶于585 mL水), 滴加完毕后混合物在35 °C下搅拌2 h。TLC显示反应完成后, 反应液通过分液漏斗分离, 并用饱和食盐水洗涤, 硫酸钠干燥后过滤并蒸发浓缩, 然后通过快速过柱法用石油醚/乙酸乙酯洗脱来纯化残余物, 得到目标产物2-[(7Z,10Z)-十六碳烷-7,10-二烯]环氧乙烷(a5) 29.11 g。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 5.27-5.46 (m, 4 H), 2.87-2.98 (m, 1 H), 2.70-2.85 (m, 3 H), 2.46 (dd, $J = 5.00$, 2.75 Hz, 1 H), 1.94-2.21 (m, 4 H), 1.24 -1.58 (m, 17 H), 0.78 - 1.00 (m, 3 H)

II-37的合成: 在室温下, 向10 mL乙醇中加入2-[(7Z,10Z)-十六碳烷-7,10-二烯]环氧乙烷(5 g)和N,N-二(2-氨基乙基)甲胺(739 mg), 之后混合物在90°C下搅拌36 h。反应液蒸发浓缩, 然后通过快速过柱法用二氯甲烷/甲醇洗脱来纯化残余物, 得到粗产物II-37 (4 g)。再次通过快速过柱法用二氯甲烷/甲醇纯化目标产物, 得到II-37 (2.2 g)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 5.27-5.44 (m, 12 H), 3.48-3.79 (m, 3 H), 2.63-3.00 (m, 12 H), 2.16-2.61 (m, 12 H), 2.05 (q, $J = 6.80$ Hz, 12 H), 1.18-1.57 (m, 51 H), 0.89 (t, $J = 6.88$ Hz, 9 H)

ESI-MS: m/z 910.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 911.8 $[\text{M}+2\text{H}]^+$, 912.8 $[\text{M}+3\text{H}]^+$

实施例2 可电离脂质II-37的解离常数 (pK_a)

可电离脂质有两个主要作用: 结合核酸和允许核酸分子在细胞中释放。脂质的 pK_a 是一个重要因素, 因为脂质需要在低pH值下带正电荷才能与核酸结合, 但在中性pH值下不带电荷, 才能使形成的LNP不会引起毒性。通过TNS染料结合试验测定可电离脂质II-37的 pK_a 在6.81, 结果如图1所示。

实施例3 II-37包裹mRNA制备脂质纳米颗粒

可电离脂质II-37、DSPC、CHOL和DMG-PEG2000分别按照摩尔比35%:15%:48.5%:1.5%配置乙醇溶液作为有机相，把Luciferase mRNA(LucRNA)溶于pH=4的水溶液作为水相。按照水相和有机相的体积比为3:1，在纳米药物制造仪(加拿大PNI公司，Ignite型号)上用微流控技术制备得到纳米颗粒混悬液。制备完后再超滤浓缩得到最终的LucRNA-LNP脂质纳米颗粒，保存于2-8℃备用。

使用Zetasizer Pro纳米粒度电位仪(马尔文帕纳科)进行LucRNA-LNP粒径和Zeta电位的表征。用F-280荧光分光光度计(天津港东) Ribogreen的方法来检测LucRNA-LNP的包封率。用多功能酶标仪(BioTek, 型号为SLXFATS)荧光素报告基因法来检测制备的LucRNA-LNP CHO细胞的转染效率。体外转录LucRNA的方法如下：CHO-K1细胞铺板，细胞密度为 2.5×10^5 个细胞/mL，当细胞融合度为30%-50%进行转染。每孔转染2 μg LucRNA，阳性对照使用转染试剂Lipofectamine MessengerMAX (ThermoFisher Scientific)转染，按照转染试剂产品说明书进行转染操作。转染48 h后使用多功能酶标仪检测蛋白表达量。阴性对照为不添加LucRNA-LNP的细胞培养基。实施例3的检测结果显示如表2所示。

表2

	粒径 (nm)	PDI	Zeta 电位 (mV)	包封率(%)	RLU (2 μg/mL)
LucRNA-LNP	108.66	0.13	17.87	96.4%	1088112

从实施例3的结果可以看出，由新型脂质化合物配伍制备的脂质纳米颗粒LucRNA-LNP粒径在108 nm左右，LucRNA-LNP粒径分布较窄(PDI较小)，包封率高达96%。体外细胞转染效率高达100万。表明由可电离脂质II-37制备的LNP包裹mRNA不仅具有非常好的理化参数，还具有极高的细胞转染效率。

进一步，采用相同的LNP，用多功能酶标仪(BioTek, 型号为SLXFATS)荧光素报告基因法来检测制备的LucRNA-LNP HEK293T细胞的转染效率，转染的LucRNA量分别为0.5μg、1.0μg、2.0μg。体外转录LucRNA的方法如下：HEK293T细胞铺板，细胞密度为 2.5×10^5 个细胞/mL，当细胞融合度为30%-50%进行转染。阳性对照使用转染试剂Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific)转染0.5μg LucRNA，按照转染试剂产品说明书进行转染操作。转染48 h后使用多功能酶标仪检测蛋白表达量。阴性对照为不添加LucRNA-LNP的细胞培养基。该体外细胞转染效率如图2所示，表明由可电离脂质II-37制备的LNP包裹mRNA具有极高的细胞转染效率，在转染相同的mRNA量的情况下，比商用Lipofectamine 2000高约10倍。

实施例4 II-37包裹DNA制备脂质纳米颗粒

可电离脂质II-37、DSPC、CHOL和DMG-PEG2000分别按照摩尔比45%:10%:43.5%:1.5%配置乙醇溶液作为有机相，把Luciferase DNA(pDNA)溶于pH=4的水溶液作为水相。按照水相和有机相的体积比为3:1，在纳米药物制造仪(加拿大PNI公司，Ignite型号)上用微流控技术制备得到纳米颗粒混悬液。制备完后再超滤浓缩得到最终的pDNA-LNP脂质纳米颗粒，保存于2-8℃备用。

使用Zetasizer Pro纳米粒度电位仪(马尔文帕纳科)进行pDNA-LNP粒径和Zeta电位的表征。实施例4的检测结果显示，新型脂质化合物配伍制备的脂质纳米颗粒pDNA-LNP粒径在173 nm左右，pDNA-LNP粒径分布较窄(PDI较小)。

表3

	粒径 (nm)	PDI	Zeta 电位 (mV)
pDNA-LNP	173.2	0.213	24.1

用多功能酶标仪(BioTek, 型号为SLXFATS)荧光素报告基因法来检测制备的pDNA-LNP 293T细胞的转染效率，转染的pDNA量分别为0.5μg、1.0μg、2.0μg。体外转录的方法如下：293T细胞铺板，细胞密度为2.0×10⁵个细胞/mL，当细胞融合度为30%-50%进行转染。阳性对照使用转染试剂Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific)转染2 μg pDNA，按照转染试剂产品说明书进行转染操作。转染48 h后使用多功能酶标仪检测蛋白表达量。阴性对照为不添加pDNA-LNP的细胞培养基。体外细胞转染效率如图3所示，表明由可电离脂质II-37制备的LNP包裹DNA具有极高的细胞转染效率：用II-37制备的LNP转染1.0μg pDNA的蛋白表达量高于Lipofectamine 2000转染2 μg pDNA的量；在转染相同2 μg pDNA的情况下，II-37体外细胞转染效率比商用Lipofectamine 2000高约3倍。

实施例5 II-37包裹siRNA制备脂质纳米颗粒

可电离脂质II-37、DSPC、CHOL和DMG-PEG2000分别按照摩尔比45%:15%:38.5%:1.5%配置乙醇溶液作为有机相，把Luciferase siRNA(siRNA)溶于pH=4的水溶液作为水相。按照水相和有机相的体积比为3:1，在纳米药物制造仪(加拿大PNI公司，Ignite型号)上用微流控技术制备得到纳米颗粒混悬液。制备完后再超滤浓缩得到最终的siRNA-LNP脂质纳米颗粒，保存于2-8℃备用。

使用Zetasizer Pro纳米粒度电位仪(马尔文帕纳科)进行siRNA-LNP粒径和Zeta电位的表征。实施例5的检测结果显示，新型脂质化合物配伍制备的脂质纳米颗粒siRNA-LNP粒径在294 nm左右。

表4

	直径 (nm)	PDI	Zeta 电位 (mV)
siRNA-LNP	294.0	0.318	20.3

用多功能酶标仪(BioTek, 型号为SLXFATS)荧光素报告基因法来检测制备的siRNA-LNP 293T细胞的转染效率, 转染的siRNA量分别为0.5 μ g、1.0 μ g、2.0 μ g。体外转录的方法如下: 稳转Luciferase报告的293T细胞铺板, 细胞密度为 2.0×10^5 个细胞/mL, 当细胞融合度为30%-50%进行转染。阳性对照使用转染试剂Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific)转染1.0 μ g siRNA, 按照转染试剂产品说明书进行转染操作。转染24 h后使用多功能酶标仪检测蛋白表达量。阴性对照为不添加siRNA-LNP的细胞培养基。体外细胞转染效率如图4所示, 表明由可电离脂质II-37制备的LNP包裹siRNA具有极高的蛋白敲低效率。

实施例6 II-37和商业化可电离阳离子脂质分子MC3的效果对比

MC3的分子式为: 4-(N,N-二甲基氨基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-庚三十碳-6,9,28,31-四烯-19-基脂。

按照实施例3所述的方法, 分别使用II37和MC3制备脂质纳米颗粒, 具体摩尔配比为: II-37 : DSPC : CHOL : DMG-PEG2000 = 45 : 15 : 38.5 : 1.5; MC3 : DSPC : CHOL : DMG-PEG2000 = 45 : 15 : 38.5 : 1.5; N/P比为5:1。

制备得到的脂质纳米颗粒理化质控数据如下表所示:

样本信息	粒径 (nm)	PDI	Zeta 电位	包封率
mRNA-LNP (II-37)	154.58	0.1068	22.07	90.5
mRNA-LNP (MC3)	234.08	0.1259	2.44	40.7

由上表可见, II-37制备的脂质纳米颗粒包封率高达90.5%, 远高于MC3的脂质纳米颗粒, 并且粒径更小更均一, 电位更高。

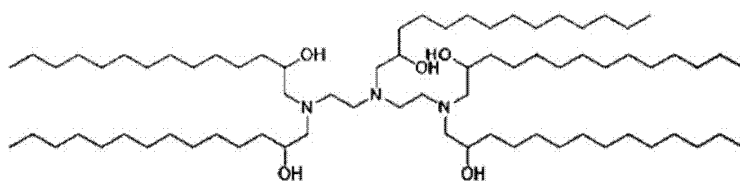
采用实施例3相同的转染方式, 将制备的脂质纳米颗粒转染细胞CHO-K1, 了解蛋白的表达情况, 结果如图5所示, 在转染的mRNA量相同的情况下, II-37 (图中以C2表示) 制备的脂质纳米颗粒携带mRNA转染细胞之后, 细胞中蛋白表达量远远高于MC3的, 说明II-37制成的脂质纳米颗粒的细胞转染效率很高。

此外, 用Cy5标记负载的mRNA得到Cy5-mRNA-LNP(II-37)和Cy5-mRNA-LNP(MC3)。与293T细胞共孵育2h和6h后, 以LysoSensorTM Green对细胞溶酶体进行染色, 观察Cy5-mRNA入胞效果。由图6可见, Cy5-mRNA-LNP(II-37)与细胞孵育6h后, Cy5-mRNA大多数到达溶酶体, 共定位系数达0.626; Cy5-mRNA-LNP(MC3)与细胞孵育6h后, Cy5-mRNA入胞较少, 由此对比可知, II-37分子的核酸递送效率优于MC3分子。

从实施例6的结果可以看出,由新型脂质化合物配伍制备的脂质纳米颗粒在核酸递送效率和体外细胞转染效率均优于MC3分子。

实施例7 II-37和其结构类似物分子C14-113的对比

C14-113的结构式为:



按照实施例3所述的方法,分别使用II-37和C14-113制备脂质纳米颗粒,具体摩尔配比为: II-37 : DSPC : CHOL : DMG-PEG2000 = 45 : 15 : 38.5 : 1.5; C14-113 : DSPC : CHOL : DMG-PEG2000 = 45 : 15 : 38.5 : 1.5; N/P比为10:1。

制备得到的脂质纳米颗粒理化质控数据如下表所示:

样本信息	粒径 (nm)	PDI	Zeta 电位
mRNA-LNP (II-37-LNP)	136.68	0.14	20.07
mRNA-LNP (C14-113-LNP)	152.65	0.12	24.1

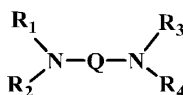
采用实施例3相同的转染方式,将制备的脂质纳米颗粒转染细胞293T,了解蛋白的表达情况,结果如图7所示,在转染的mRNA量相同的情况下,II-37(图中以II-37-LNP表示)制备的脂质纳米颗粒携带mRNA转染细胞之后,细胞中蛋白表达量远远高于C14-113的,说明II-37制成的脂质纳米颗粒的细胞转染效率很高。

此外,采用MTT法测定II-37-LNP和C14-113-LNP的细胞毒性,考察载体剂量、作用时间等因素对正常细胞(293T)细胞增殖的影响。结果如图8所示,II-37(图中以II-37-LNP表示)制备的脂质纳米颗粒携带mRNA转染细胞48小时之后,在较高的剂量(2 $\mu\text{g/mL}$)时依然保持较好细胞活性,说明II-37制成的脂质纳米颗粒的细胞毒性很低。

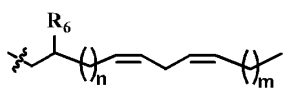
从实施例7的结果可以看出,由新型脂质化合物配伍制备的脂质纳米颗粒细胞毒性低,且在mRNA转染效率优于结构类似物分子C14-113。

以上,对本发明的实施方式进行了说明。但是,本发明不限于上述实施方式。凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

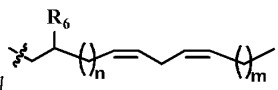
权利要求书

1、一种具有式I所示结构  (I) 的化合物，其中：

Q为经取代或未取代的直链C2-20亚烷基，所述亚烷基的1个或1个以上C原子任选被独立地选自O、S和N的杂原子所替换；或，Q为经取代或未取代、饱和或不饱和的4-6元环，所述4-6元环的环原子任选含有1个或1个以上独立地选自O、S、N的杂原子；所述取代的取代基团选自卤素、-OH、直链或支链的C1-20烷基、直链或支链的C1-20烷氧基、直链或支链的C2-20

烯基、直链或支链的C2-20炔基、；

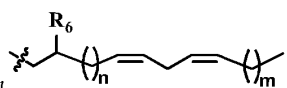
R₁、R₂、R₃、R₄可以相同或不同，各自独立的选自氢，经取代或未取代的直链或支链C1-30烷基，经取代或未取代的直链或支链C2-30烯基，经取代或未取代的直链或支链C2-30炔基，所述烷基、烯基或炔基的1个或1个以上C原子任选被独立地选自O、S和N的杂原子所替换，或-CH₂CH(OH)R₅；所述取代的取代基团选自卤素、-OH、直链或支链的C1-10烷基、直链或支链的C1-10烷氧基；

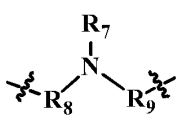
条件是，R₁、R₂、R₃、R₄中至少一个为 ，

R₅选自氢，经取代或未经取代的直链或支链C1-30烷基，经取代或未取代的直链或支链C2-30烯基，经取代或未取代的直链或支链C2-30炔基，所述烷基、烯基或炔基的1个或1个以上C原子任选被独立地选自O、S和N的杂原子所替换；所述取代的取代基团选自卤素、-OH、直链或支链的C1-10烷基、直链或支链的C1-10烷氧基；

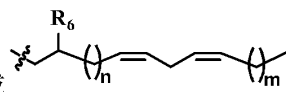
R₆选自氢，C1-3烷基，C1-3烷氧基，-OH；

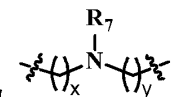
n选自1~8的整数，m选自0~8的整数，n和m彼此独立，可以相同也可以不同；

当R₁、R₂、R₃、R₄中至少两个为  时，每个所述基团中的n和m彼此独立，可以相同也可以不同。

2、如权利要求1所述的化合物，其特征在于，Q为 ，其中，R₈、R₉彼此独立的选自经取代或未取代的直链C1-10亚烷基，所述亚烷基的1个或1个以上C原子任选被独

立地选自O、S和N的杂原子所替换；R₇为氢，卤素，-OH，直链或支链C1-20烷基，直链或支

链C2-20烯基，直链或支链C2-20炔基，或-CH₂CH(OH)R₅，或 ；所述取代的取代基团为卤素、-OH、直链或支链的C1-10烷基、直链或支链的C1-10烷氧基。

3、如权利要求1或2所述的化合物，其特征在于，Q为 ，其中：x和y相同或者不同，独立地选自1~8的整数；

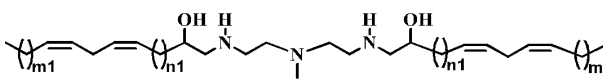
优选，x和y相同或不同，选自1~3的整数；

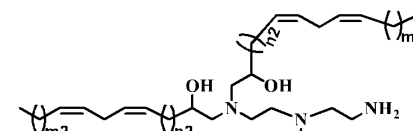
优选，R₇为直链或支链C1-4烷基。

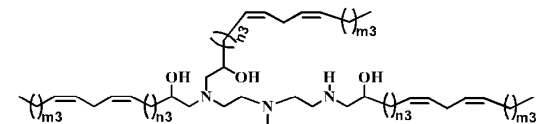
4、如权利要求1-3任一项所述的化合物，其特征在于，R₆为-OH。

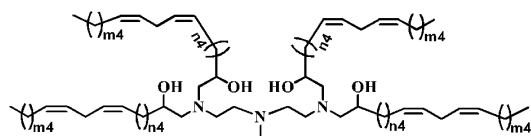
5、如权利要求1-4任一项所述的化合物，其特征在于，n选自4~8的整数，m选自4~8的整数。

6、如权利要求1-5任一项所述的化合物，选自如下式A、B、C或D：

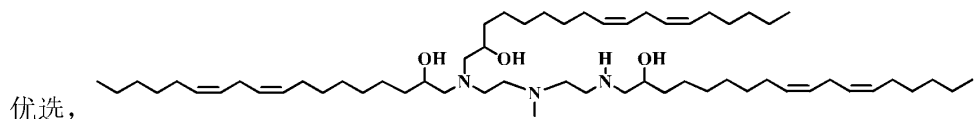
 A，其中每个n₁都彼此独立，相同或不同，每个n₁选自1~8的整数，每个m₁都彼此独立，相同或不同，每个m₁选自0~8的整数；优选，每个n₁选自4~8的整数，每个m₁选自4~8的整数；优选，每个n₁都彼此相同，每个m₁都彼此相同；

 B，其中每个n₂都彼此独立，相同或不同，每个n₂选自1~8的整数，每个m₂都彼此独立，相同或不同，每个m₂选自0~8的整数；优选，每个n₂选自4~8的整数，每个m₂选自4~8的整数；优选，每个n₂都彼此相同，每个m₂都彼此相同；

 C，其中每个n₃都彼此独立，相同或不同，每个n₃选自1~8的整数，每个m₃都彼此独立，相同或不同，每个m₃选自0~8的整数；优选，每个n₃选自4~8的整数，每个m₃选自4~8的整数；优选，每个n₃都彼此相同，每个m₃都彼此相同；



D, 其中每个 n_4 都彼此独立, 相同或不同, 每个 n_4 选自1~8的整数, 每个 m_4 都彼此独立, 相同或不同, 每个 m_4 选自0~8的整数; 优选, 每个 n_4 选自4~8的整数, 每个 m_4 选自4~8的整数; 优选, 每个 n_4 都彼此相同, 每个 m_4 都彼此相同;

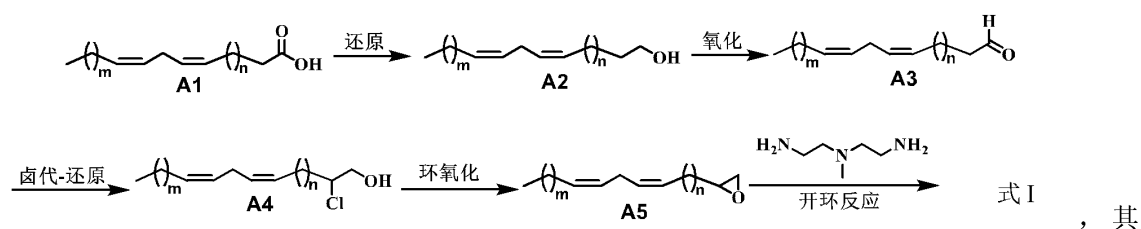


7、权利要求1-6任一项所述的化合物在制备生物活性物质递送系统中的应用; 优选, 所述递送系统为微粒、纳米粒子、脂质体、脂质纳米颗粒或微泡。

8、一种生物活性物质递送系统, 其特征在于, 含有权利要求1-6任一项所述的化合物; 优选, 所述递送系统为微粒、纳米粒子、脂质体、脂质纳米颗粒或微泡。

9、一种药物组合物, 其特征在于, 含有权利要求8所述的生物活性物质递送系统。

10、权利要求1-6任一项所述化合物的制备方法, 其特征在于:



中, 1) 在还原剂的存在下, 将化合物A1的羧基还原成羟基以获得化合物A2; 2) 氧化, 在氧化剂的存在下, 将化合物A2的羟基氧化成醛基以获得化合物A3; 3) 卤代-还原, 首先在酸性条件下, 将化合物A3的醛 α -氢与卤代试剂发生卤代反应以获得 α -卤代醛中间体, 然后在还原剂存在下, 将 α -卤代醛的醛基还原成羟基以获得化合物A4; 4) 环氧化, 将化合物A4在碱的存在下进行分子内的亲核取代反应以获得环氧化合物A5; 5) 开环反应, 使化合物A5与胺发生开环反应以获得最终化合物。