



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104803863 B

(45)授权公告日 2016.07.20

(21)申请号 201510232922.X

(22)申请日 2015.05.08

(73)专利权人 厦门成坤生物技术有限公司

地址 361027 福建省厦门市海沧区新阳工业  
业区翁角路289号科创大厦202-1单元

(72)发明人 崔坤元 郑志凌

(51)Int.Cl.

C07C 217/28(2006.01)

C07C 213/08(2006.01)

A61K 47/18(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

审查员 王大为

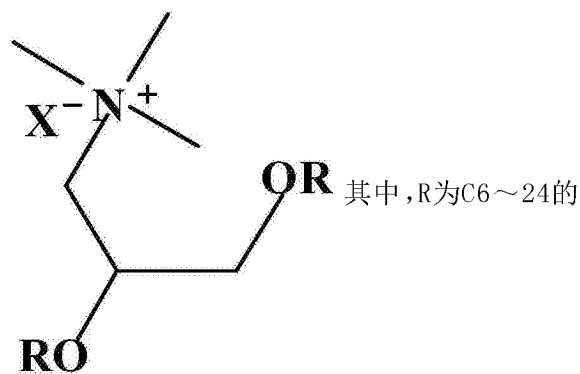
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

阳离子类脂化合物及其制备方法

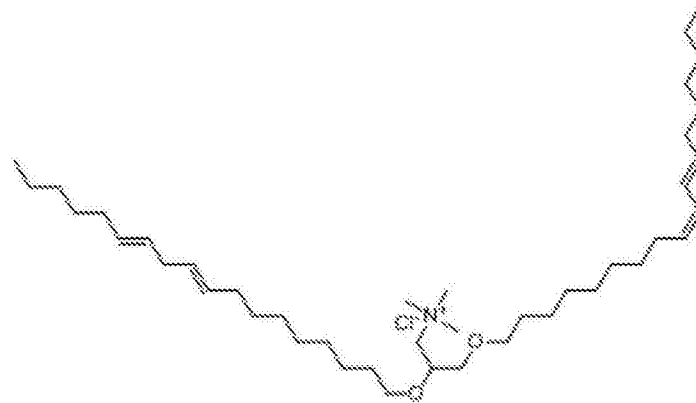
(57)摘要

本发明公开了一种阳离子类脂化合物及其制备方法。所述化合物的分子结构通式为：



烷基、C6~24的烯烷基、C6~24的酰基, X为Cl或Br。本发明为了改变脂质体制剂的特性、减少毒性, 增加其核酸分子的细胞及组织的传递作用。

1. 一种增加核酸分子的细胞及组织的传递作用的阳离子类脂化合物, 所述式I化合物如下式所示:

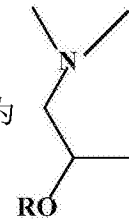


式 II。

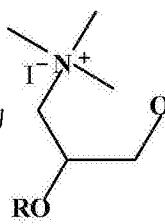
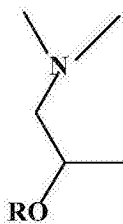
2. 一种权利要求1所述阳离子类脂化合物的制备方法, 包括以下各步骤:

1) 醇与对甲苯磺酰氯反应生成对甲苯磺酸酯, 其中所述醇通式为ROH, R为亚油烯基;

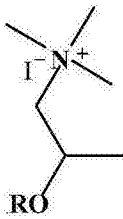
2) 对甲苯磺酸酯与3-(二甲氨基)-1,2-丙二醇反应生成通式为



3) 与碘甲烷反应生成通式为

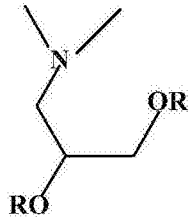


4) 与二氯甲烷或二溴甲烷反应生成所述用于脂质体的化合物。



3. 根据权利要求2所述的阳离子类脂化合物的制备方法, 其特征在于, 步骤1) 为将醇、三乙胺、4-二甲氨基吡啶加入二氯甲烷中, 保持在-5℃以下, 搅拌16h, 然后将对甲苯磺酰氯滴加于二氯甲烷中溶解, 并缓慢升温至室温后, 反应15h, 检测无醇后, 分离有机相, 水相二氯甲烷萃取2次, 取有机相干燥, 除去溶剂, 得对甲苯磺酸油脂。

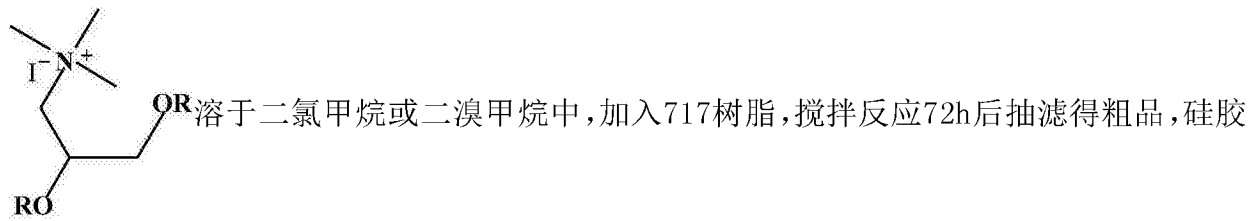
4. 根据权利要求2所述的阳离子类脂化合物的制备方法, 其特征在于, 步骤2) 为在氩气保护下, 将氢化钠与四氢呋喃混合搅拌均匀, 然后滴加3-(二甲氨基)-1,2-丙二醇, 再滴加对甲苯磺酸油脂, 然后升温至66℃, 微回流反应24h, 降至室温后抽滤, 石油醚萃取滤液、合并水洗有机相、干燥、除去溶剂, 得黄色油状物, 然后硅胶柱层析分离得下式化合物:



5. 根据权利要求2所述的阳离子类脂化合物的制备方法, 其特征在于, 步骤3) 为在



6. 根据权利要求2所述的阳离子类脂化合物的制备方法, 其特征在于, 步骤4) 为将



柱层析分离得所述用于脂质体的化合物。

## 阳离子类脂化合物及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及阳离子类脂化合物及其制备方法,属于医药生物领域。

### 背景技术

[0002] 随着人们在细胞水平上对疾病发病机制认识的不断深入,基因治疗已日渐成为科学家们研究的热点。寻找安全有效的基因转移载体也越来越为人们所关注。目前主要使用的载体为病毒载体,如重组腺病毒载体。这类载体由于转染效率较高且对大多数细胞都具有靶向作用,因此在基因转移方面具有一定的优点。然而,因它会引起体内的一些免疫反应,而且含有可转录的病毒基因,可能在体内发生基因的重组或互补,进一步对人体造成伤害。近年来,人们对非病毒载体用于基因治疗的研究取得了一些成果,其中最为重要的就是阳离子脂质体的使用。1987年,Felgner等首次将N-[1-(2,3)-二油烯氧基]丙基-N,N,N-三甲基氯化胺(DOTMA)与二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)各10mg制成小单室脂质体(转染试剂,商品名为Lipofectin,转化脂)。而在siRNA药物开发过程中,也应用DOTMA作为脂质体、颗粒的一个组分。

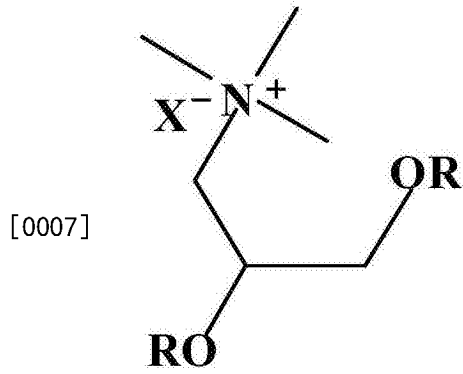
[0003] 脂质体或脂质颗粒是由脂质分子,如磷脂、胆固醇等为膜材包含而成。按电荷性,脂质体可分为中性脂质体、负电性脂质体、正电性脂质体。脂质体已经广泛用于科学研究及药物的开发。利用阳性脂质分子与中性脂质分子等混合,可用于包裹核酸分子,如DNA、RNA、小干扰核酸、MiRNA等,用于基因治疗,基因抑制,这种技术广泛用于研究和新药的开发。脂质体或脂质分子也已用于有些药物的包裹,促进药物的靶向性、稳定性、提高药物的有效性、减少副作用等。

[0004] 现脂质体不能广泛用于研究,其临床的最大缺点是:脂质体的毒性和有效性制约了它的应用,尤其是药物开发的应用。

[0005] 改进脂质体或脂质颗粒的方法,主要从几个方面进行:例如成分。脂质体、脂质颗粒通常有几种成分混合而成,主要有磷脂、胆固醇、为了增强脂质体、颗粒的稳定性及在体内的半衰期,脂质体、颗粒的表面中会通过脂质-PEG分子,保护脂质纳米颗粒,不宜聚集及被白细胞吞噬。在所有影响脂质体的功能及应用的因素中,脂质体的组分占有显著的作用。目前,阳离子脂质体在核酸的应用(研究及药物的开发)均占有主导的市场。但是,其毒性与有效性仍是阻碍阳离子脂质体应用的关键。

### 发明内容

[0006] 本发明的一个目的在于提供了一种增加核酸分子的细胞及组织的传递作用的阳离子类脂化合物,所述化合物如式I所示:

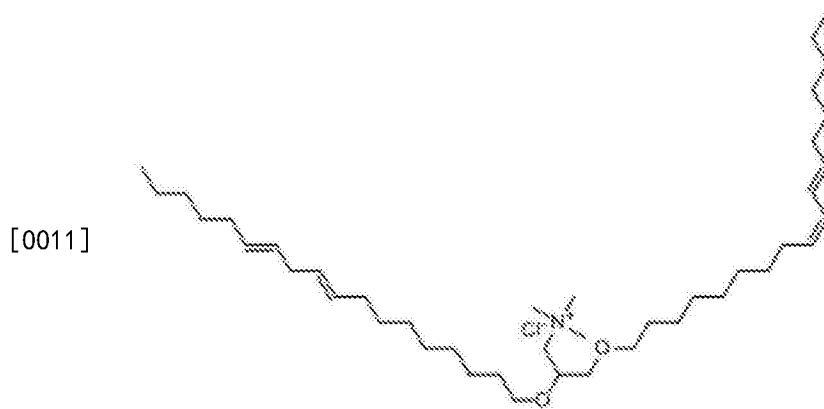


式 I

[0008] 其中,R为C6~24的烷基、C6~24的烯烃基、C6~24的酰基,X为Cl或Br。

[0009] 在本发明的一个实施方案中,取代基R优选为亚油烯基、油烯基、亚油酰基、油酰基、正十二烷基、正十四烷基、正十六烷基。

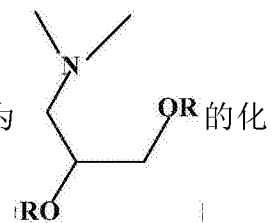
[0010] 出人意料的是,本发明发现当所述式I化合物的取代基R为亚油烯基,并且X为Cl或Br时,所述化合物在核酸分子的细胞及组织的传递作用时的效果最好,并且稳定性极佳。所述化合物结构式如下:



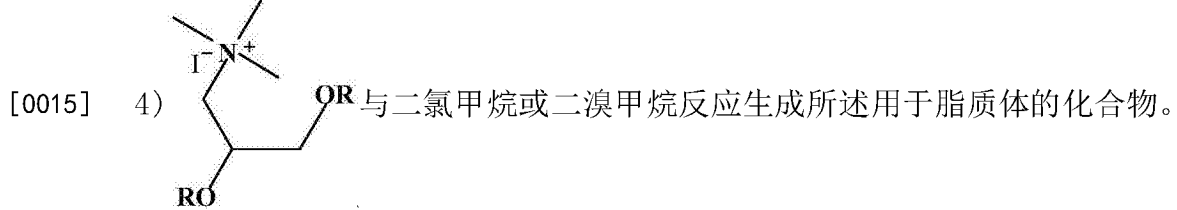
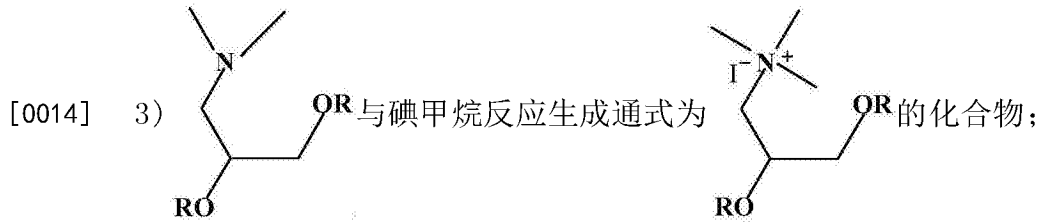
式 II

[0012] 本发明的另一个目的是提供一种所述的用于脂质体的化合物的制备方法,包括以下各步骤:1)醇与对甲苯磺酰氯反应生成对甲苯磺酸酯,其中所述醇通式为ROH,R为C6~24的烷基、C6~24的烯烃基;

[0013] 2)对甲苯磺酸酯与3-(二甲氨基)-1,2-丙二醇反应生成通式为



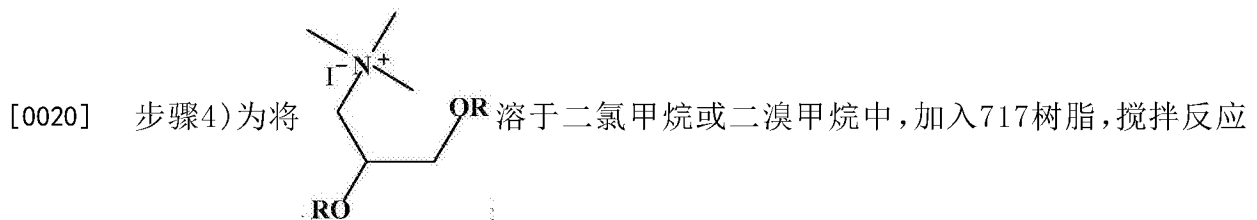
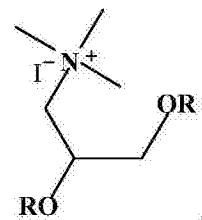
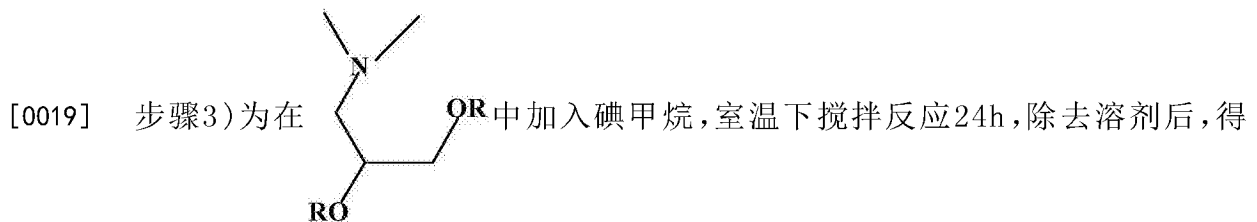
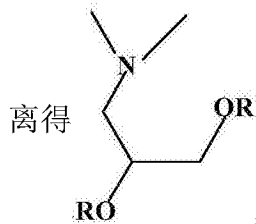
合物;



[0016] 步骤1)中R优选为亚油烯基、油烯基、正十二烷、正十四烷、正十六烷。

[0017] 在具体合成时,上述制备方法的步骤1)为将醇、三乙胺、4-二甲氨基吡啶加入二氯甲烷中,保持在 $-5^{\circ}\text{C}$ 以下,搅拌16h,然后将对甲苯磺酰氯滴加于二氯甲烷中溶解,并缓慢升温至室温后,反应15h,检测无醇后,分离有机相,水相二氯甲烷萃取2次,取有机相干燥,除去溶剂,得对甲苯磺酸油脂。

[0018] 步骤2)为在氩气保护下,将氢化钠与四氢呋喃混合搅拌均匀,然后滴加3-(二甲氨基)-1,2-丙二醇,再滴加对甲苯磺酸油脂,然后升温至 $66^{\circ}\text{C}$ ,微回流反应24h,降至室温后抽滤,石油醚萃取滤液、合并水洗有机相、干燥、除去溶剂,得黄色油状物,然后硅胶柱层析分



72h后抽滤得粗品,硅胶柱层析分离得所述用于脂质体的化合物。

[0021] 本发明的有益效果:所述化合物可以较好的改变脂质体制剂的特性、减少毒性并增加稳定性,增加其核酸分子的细胞及组织的传递作用。

### 附图说明

[0022] 图1是本发明实施例1所述化合物的核磁氢谱

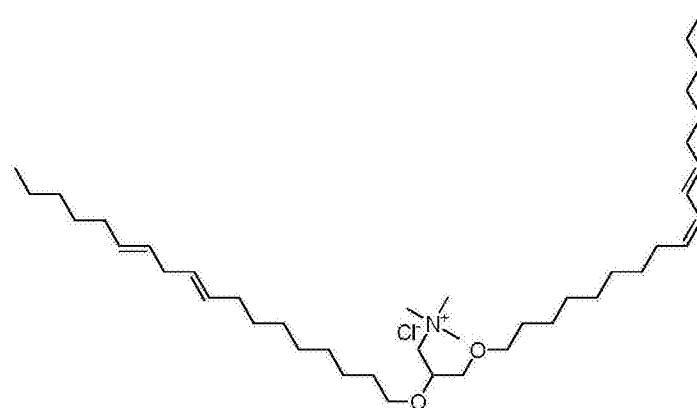
[0023] 图2是本发明实施例1所述化合物的核磁碳谱

### 具体实施方式

[0024] 以下结合附图对本发明的优选实施例进行说明,应当理解,此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明,并不用于限定本发明。

[0025] 实施例1 三甲基[2,3-(二亚油烯基氧基)丙基]氯化铵的合成

[0026]



N,N,N-TriMethyl-2,3-bis[(9Z)-9-octadecen-1-yloxy]-1-propanaMinium Chloride

Chemical Formula:  $C_{42}H_{80}ClNO_2$

Exact Mass: 665.5878

Molecular Weight: 666.5431

m/z: 665.5878 (100.0%), 666.5911 (45.4%), 667.5848 (32.0%), 668.5882 (14.5%), 667.5945 (10.1%), 669.5915 (3.2%), 668.5978 (1.5%)

Elemental Analysis: C, 75.68; H, 12.10; Cl, 5.32; N, 2.10; O, 4.80

[0027] 1)将亚油醇(顺-9,12-十八(碳)二烯醇)13.35g,三乙胺7.78g,4-二甲氨基吡啶0.732g加入0.25L三口烧瓶中,加入二氯甲烷30ml,于-10度低温循环泵中搅拌,降至-5度以下,将对甲苯磺酰氯13.35g溶于二氯甲烷20ml于恒压滴液漏斗中滴加,保持液温-5度,90mins滴毕,5ml二氯甲烷冲洗恒压滴液漏斗,缓慢升温,室温反应15h后,TLC石油醚:乙酸乙酯5:1监测无亚油醇,分离有机相,水相二氯甲烷萃取2次,取有机相用无水硫酸镁干燥,旋蒸脱溶,得无色油状物20。

[0028] 2)500ml四口烧瓶中加入氢化钠1.5g,四氢呋喃50ml,搅拌均匀,氩气保护。将3-(二甲氨基)-1,2-丙二醇1g通过恒压滴液漏斗滴加,10mins滴毕,滴加对甲苯磺酸亚油醇脂9g,0.5h内滴毕,升温至66度,微回流反应24h,颜色淡黄,降温后,布氏漏斗抽滤,石油醚萃取滤液,合并水洗有机相,无水硫酸镁干燥,旋蒸脱溶,得红色油状物10g。硅胶柱层析,洗脱剂二氯甲烷:甲醇10:1分离得2.73g淡黄色油状物。

[0029] 3)将N,N,二甲基-2,3-(二亚油烯基氧基)丙胺0.57g加入50ml单口瓶中,加入碘甲烷0.6ml,室温下搅拌反应24h,旋蒸抽干反应剩余碘甲烷,得淡黄色油状物0.6g。

[0030] 4)三甲基[2,3-(二亚油烯基氧基)丙基]碘化铵0.6g溶于20ml二氯甲烷中,加入717树脂2g,搅拌反应72h后抽滤得粗品,硅胶柱层析,洗脱剂二氯甲烷:甲醇10:1分离得无色油状物0.4g。

[0031] 所得化合物鉴定分析:MS:630.6166Calculate Exact Mass:630.6184。

[0032] 核磁氢谱<sup>1</sup>H NMR(500MHz CDC13)见图1,核磁<sup>13</sup>C NMR(500MHz CDC13)碳谱见图2。

[0033] 实施例2 siRNA制剂制备

[0034] 将实施例1合成的三甲基[2,3-(二亚油烯基氧基)丙基]氯化铵溶在乙醇中,与ALDH siRNA混合产生水不溶性的沉淀物(1:1.5),分离和干燥沉淀物后,将沉淀物溶解在氯仿或类似溶剂中,并进一步与其他脂质,磷脂酰乙醇胺:胆固醇:胆固醇-PEG(0.2:3:2.5:2)在氯仿混合,如(WO/2010/135207)所述工艺。除去有机溶剂后,干燥制剂与9%蔗糖水水合,即可动物给药。

[0035] 实施例3

[0036] 试验方法:

[0037] 1、体内实验动物的研究中使用的所有程序是机构动物管理和使用委员会(IACUC)批准的,并按照当地,州和联邦法规进行。通过小鼠尾静脉注射0.2毫升注射实施例2制备siRNA的配方。收获的组织 and 血液用于分析基因表达的变化。另外,为了说明三甲基[2,3-(二亚油烯基氧基)丙基]氯化铵的优越性,以三甲基[2,3-(二正十二烷氧基)丙基]氯化铵、三甲基[2,3-(二正十四烷氧基)丙基]氯化铵、三甲基[2,3-(二正十六烷氧基)丙基]氯化铵、三甲基[2,3-(二油烯基氧基)丙基]氯化铵等类似化合物作为对比,siRNA制剂的制备方法同实施例2。

[0038] 2、mRNA的分离:转染后两天,将细胞用100 $\mu$ L PBS洗一次,然后加入100 $\mu$ L (Turbocapture试剂盒,Qiagen公司制)裂解缓冲液。溶解的细胞产物(80 $\mu$ L)转移到一个96孔的mRNA的捕捉板,在室温下孵育1小时。对于小鼠组织,给药两天后,小鼠采集小鼠肝脏组织。用Polytron(Turbocapture试剂盒,Qiagen公司制)在裂解缓冲液匀浆。然后转移80 $\mu$ L到一个96孔的mRNA的捕捉板,在室温下孵育1小时。用100 $\mu$ L洗涤缓冲液洗涤三次,然后80 $\mu$ L的洗脱缓冲液加入到各孔中,在65 $^{\circ}$ C下温育5分钟。洗脱溶液(含有mRNA的)被转移到一个新的96孔清晰板。

[0039] 3、实时RT-PCR:3 $\mu$ L分离的mRNA用来实时RT-PCR。RT-PCR方法采用SYBR Green一步实时RT-PCR试剂盒(SensiMix一步SYBR Green试剂盒,BIOLINE)。混合11 $\mu$ L master mix(含逆转录酶),1 $\mu$ L的正向和反向引物(6 $\mu$ M),0.3 $\mu$ L 50X的SYBR Green和2.7 $\mu$ L水。反转录反应的温度在42 $^{\circ}$ C,30分钟后,之后95 $^{\circ}$ C,15分钟用于激活Tag聚合酶;PCR循环的温度和时间是95 $^{\circ}$ C,15秒,60 $^{\circ}$ C,30秒,72 $^{\circ}$ C,20秒。用 $\Delta\Delta$ CT方法分析基因表达的变化。

[0040] 3.1 小鼠肝脏ALDH酶的抑制效果



[0041]

| 化合物                     | 基因抑制效果<br>(剩余的 mRNA) | 脂肪链        |
|-------------------------|----------------------|------------|
| 三甲基[2,3-(二正十二烷氧基)丙基]氯化铵 | 45%                  | C12        |
| 三甲基[2,3-(二正十四烷氧基)丙基]氯化铵 | 42%                  | C14        |
| 三甲基[2,3-(二正十六烷氧基)丙基]氯化铵 | 40%                  | C16        |
| 三甲基[2,3-(二油烯基氧基)丙基]氯化铵  | 55%                  | C16 (两个双键) |
| 三甲基[2,3-(二亚油烯基氧基)丙基]氯化铵 | 21%                  | C16 (四个双键) |
| 对照组*                    | 100%                 |            |

[0042] \*对照组:注射没被脂质体包裹的siRNA,其值为100%。基因抑制效果值愈低,效果愈好。每组五只小鼠,取平均值。

[0043] 3.2 溶解度

[0044]

| 化合物                     | 溶解度 | 脂肪链       |
|-------------------------|-----|-----------|
| 三甲基[2,3-(二正十二烷氧基)丙基]氯化铵 | 1.5 | C12       |
| 三甲基[2,3-(二正十四烷氧基)丙基]氯化铵 | 1   | C14       |
| 三甲基[2,3-(二正十六烷氧基)丙基]氯化铵 | 0.5 | C16       |
| 三甲基[2,3-(二油烯基氧基)丙基]氯化铵  | 1   | C16(两个双键) |
| 三甲基[2,3-(二亚油烯基氧基)丙基]氯化铵 | 1.5 | C16(四个双键) |

[0045] \*将三甲基[2,3-(二油烯基氧基)丙基]氯化铵的相对溶解度设为1,数值愈大溶解度愈高。

[0046] 3.3 稳定性

[0047]

| 化合物                     | 稳定性 | 脂肪链       |
|-------------------------|-----|-----------|
| 三甲基[2,3-(二正十二烷氧基)丙基]氯化铵 | 2   | C12       |
| 三甲基[2,3-(二正十四烷氧基)丙基]氯化铵 | 2   | C14       |
| 三甲基[2,3-(二正十六烷氧基)丙基]氯化铵 | 2   | C16       |
| 三甲基[2,3-(二油烯基氧基)丙基]氯化铵  | 1   | C16(两个双键) |
| 三甲基[2,3-(二亚油烯基氧基)丙基]氯化铵 | 2   | C16(四个双键) |

[0048] \*将三甲基[2,3-(二油烯基氧基)丙基]氯化铵的相对稳定性为1数值愈大稳定性愈高。稳定性试验是把制剂放置于37℃,一周。用高压液相分析。按照新出现的杂质峰的总面积推算。

[0049] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。



