(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114073677 B
(45)授权公告日 2023.06.09

(21)申请号 202010841678.8

(22)申请日 2020.08.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114073677 A

(43)申请公布日 2022.02.22

(73)专利权人 深圳深信生物科技有限公司
地址 518000 广东省深圳市南山区西丽街道松坪山社区松坪山新东路1号清华信息港B座6楼

(72)发明人 李林鲜 查高峰 巴拉·悟空

(74)专利代理机构 北京鸿元知识产权代理有限公司 11327
专利代理师 王楠楠 杨桦

(51)Int.Cl.
A61K 9/127(2006.01)
A61K 47/18(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
C07C 229/16(2006.01)
C07C 255/24(2006.01)
C07D 295/13(2006.01)
C07C 233/36(2006.01)

审查员 王雪颖

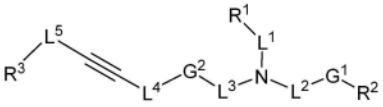
权利要求书11页 说明书31页

(54)发明名称

一种脂质纳米颗粒

(57)摘要

本发明涉及一种脂质纳米颗粒。所述脂质纳米颗粒由以下结构(I)的化合物或其药物可接受的盐、互变异构体或立体异构体形成。本发明还提供了所述脂质纳米颗粒用于递送治疗剂组分的用途。本发明还涉及所述脂质纳米颗粒在制备药物中的用途。

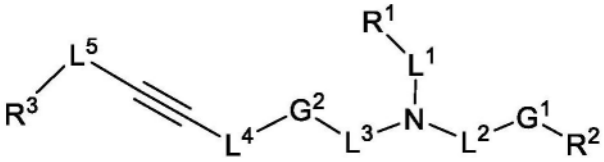


(I)

CN 114073677 B

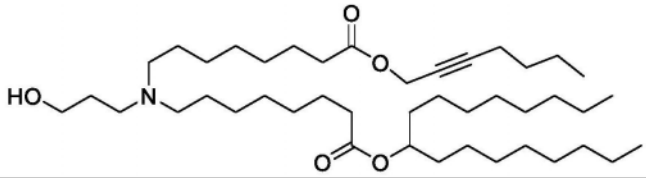
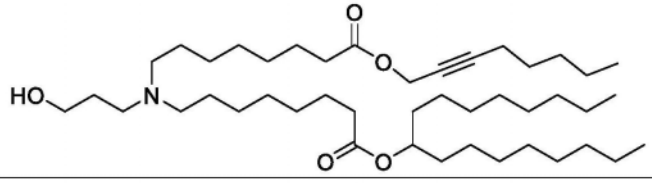
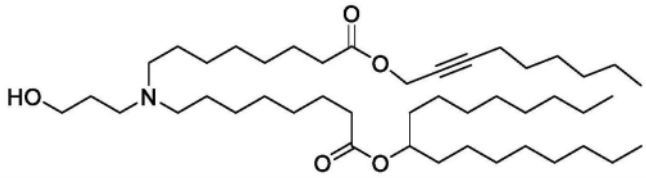
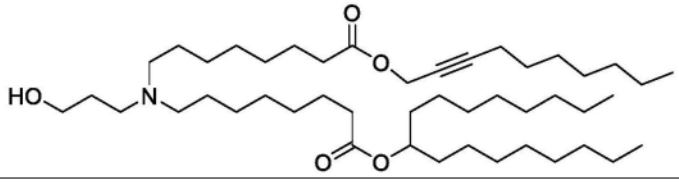
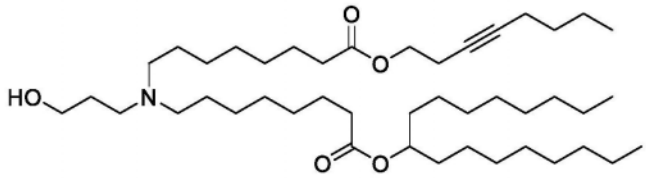
1.一种脂质纳米颗粒,其特征在于,所述脂质纳米颗粒包含化学式I的化合物:

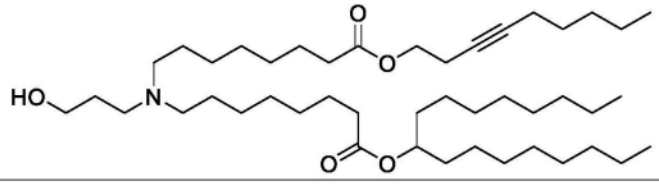
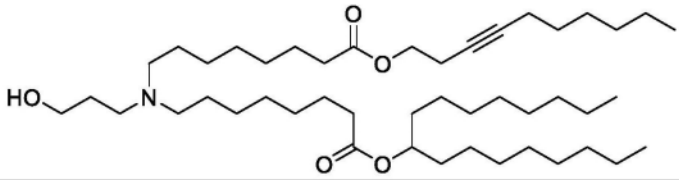
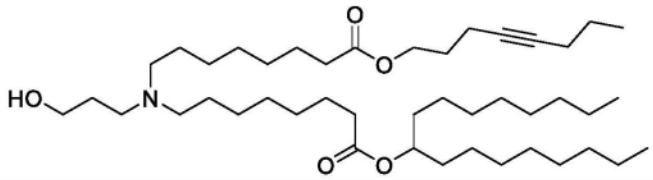
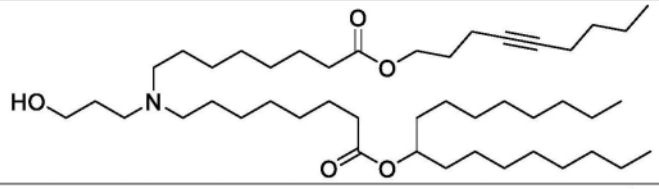
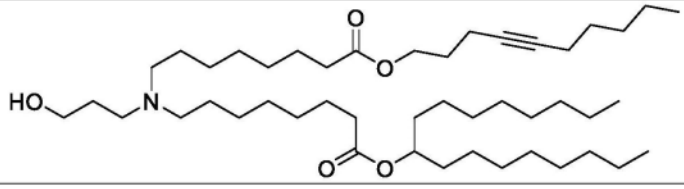
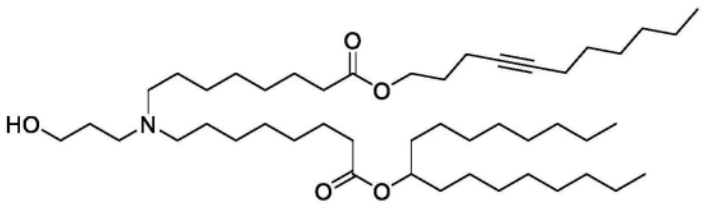
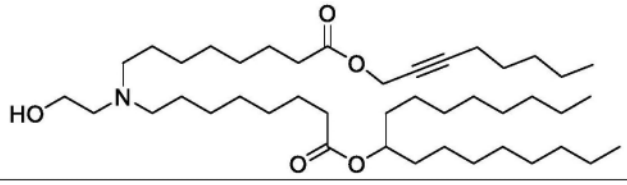
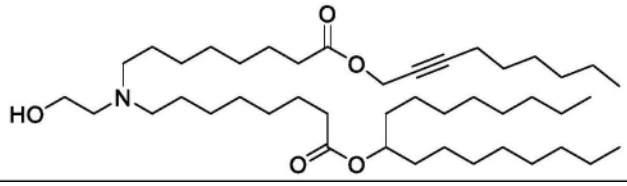
[化学式I]

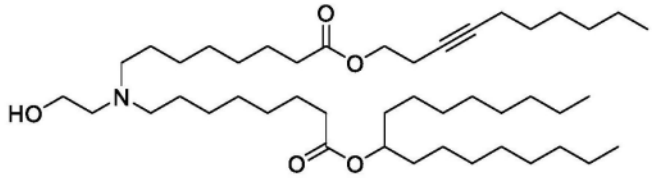
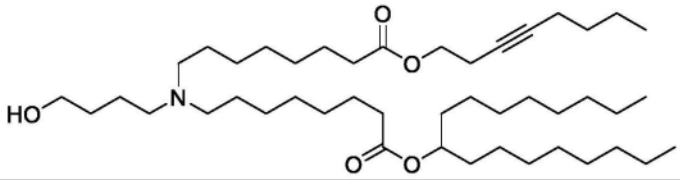
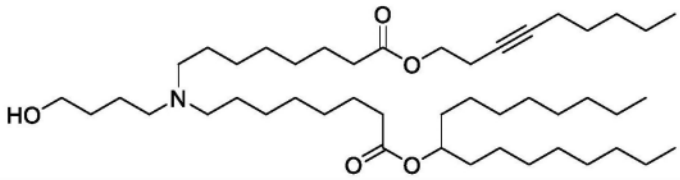
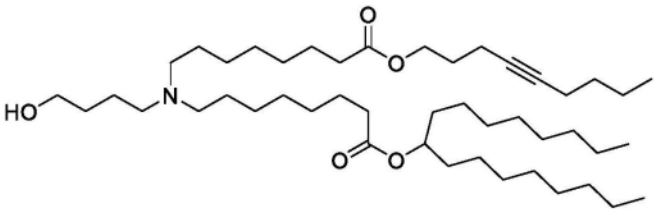
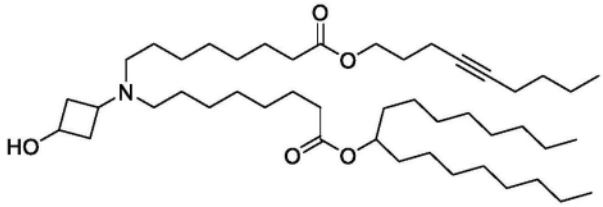
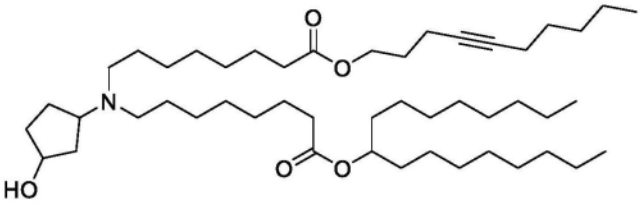
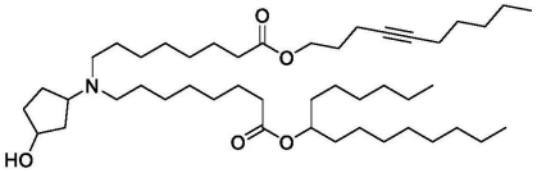
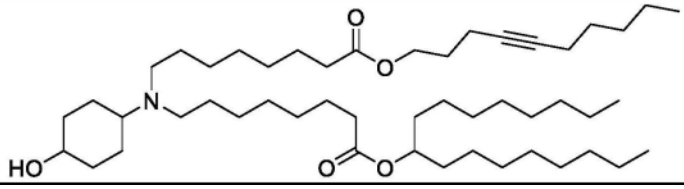


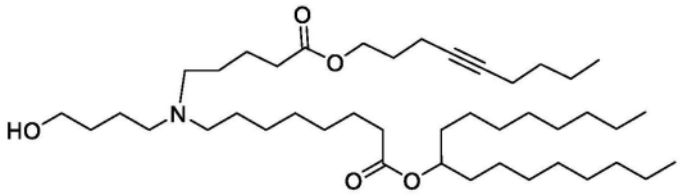
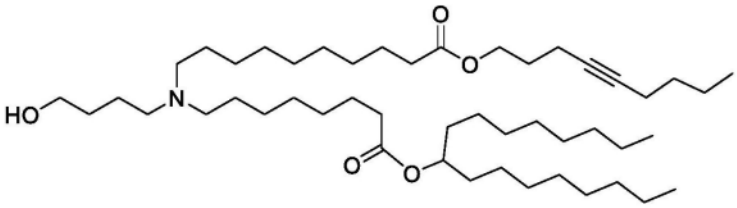
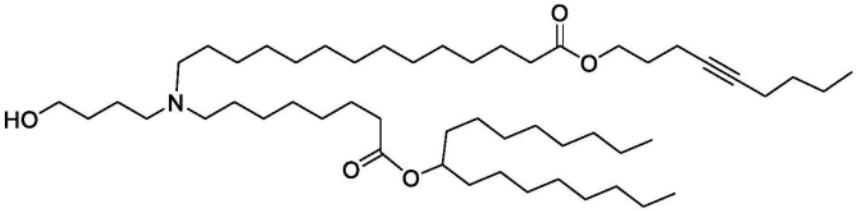
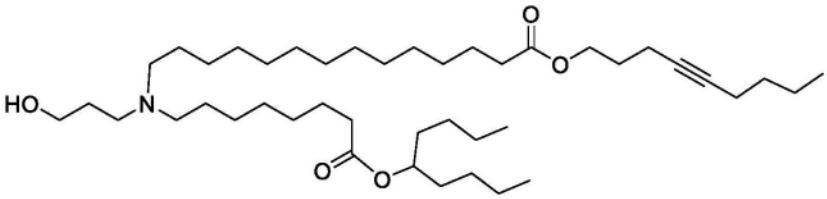
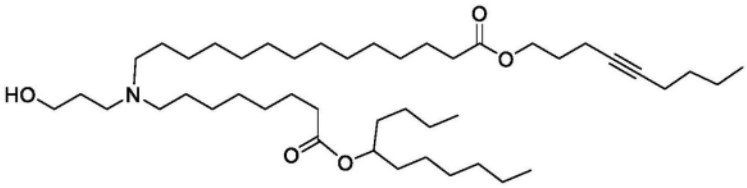
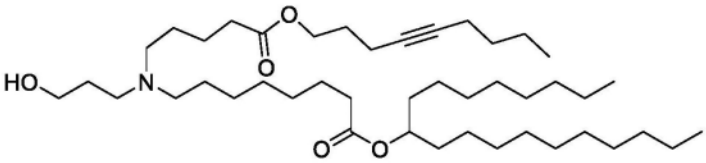
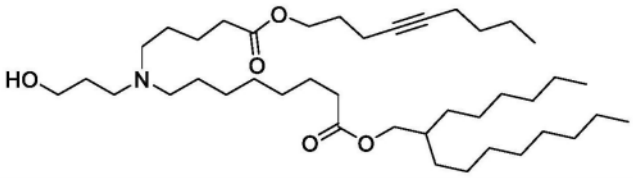
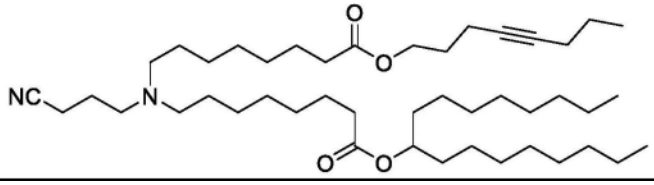
(I)

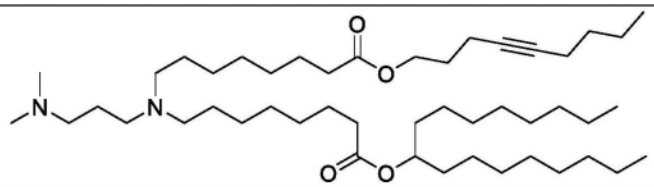
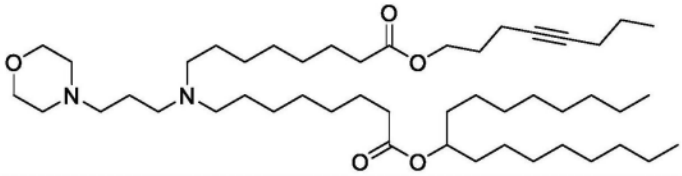
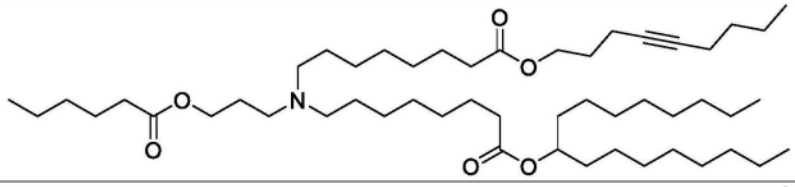
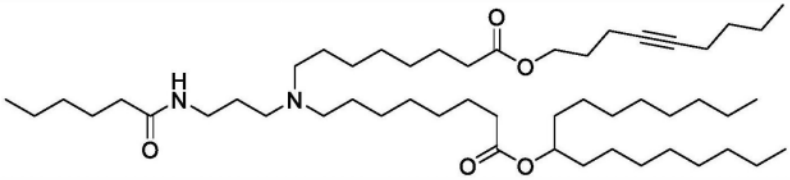
或其药物可接受的盐,其中,所述化学式I的化合物选自以下化合物:

编号	结构
1	
2	
3	
4	
5	

6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	

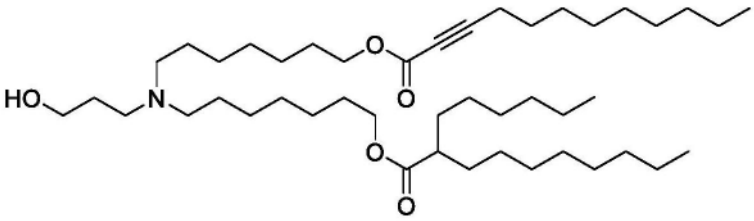
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	

22	
23	
24	
25	
26	
27	
28	
30	

31	
32	
33	
34	

2.一种脂质纳米颗粒，其特征在于，所述脂质纳米颗粒包含化合物29或其药物可接受的盐：

[化合物29]



3.根据权利要求1至2中任一项所述的脂质纳米颗粒，所述脂质纳米颗粒进一步含有辅助脂质、固醇、聚乙二醇脂质和生物活性剂中的一种或多种，其中，所述辅助脂质为非阳离子脂质。

4.根据权利要求3所述的脂质纳米颗粒，所述非阳离子脂质为非阳离子磷脂。

5.根据权利要求3所述的脂质纳米颗粒，所述非阳离子脂质为DOPE或DSPC。

6.根据权利要求3所述的脂质纳米颗粒，所述固醇为胆固醇。

7.根据权利要求3所述的脂质纳米颗粒，所述聚乙二醇脂质为PEG2000-DMG。

8.根据权利要求3所述的脂质纳米颗粒，所述生物活性剂为核酸、肽、蛋白和小分子中的一种或多种。

9.根据权利要求3所述的脂质纳米颗粒，所述生物活性剂为抗肿瘤剂、抗生素、免疫调节剂、抗炎剂和作用于中枢神经系统的药剂中的一种或多种。

10.根据权利要求3所述的脂质纳米颗粒，所述生物活性剂为抗原或其片段。

11.根据权利要求3所述的脂质纳米颗粒，所述生物活性剂为疫苗。

12.根据权利要求8所述的脂质纳米颗粒，所述蛋白为抗体。

13.根据权利要求8所述的脂质纳米颗粒,所述核酸为RNA或DNA。

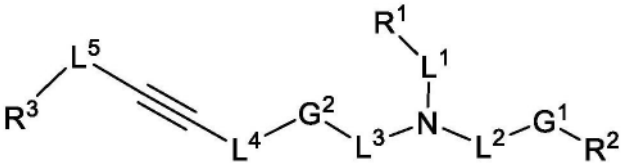
14.根据权利要求8所述的脂质纳米颗粒,所述核酸为反义寡核苷酸。

15.根据权利要求13所述的脂质纳米颗粒,所述RNA为信使RNA、核糖体RNA、微RNA、转移RNA、小的抑制RNA和小的核RNA中的任意一种。

16.根据权利要求13所述的脂质纳米颗粒,所述DNA为质粒。

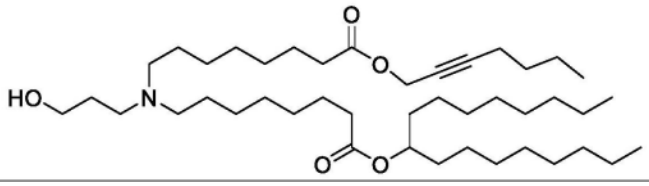
17.一种化学式I的化合物:

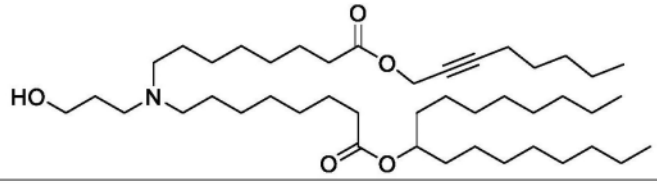
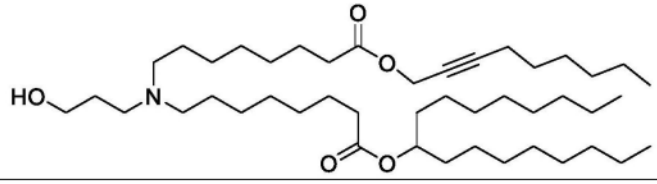
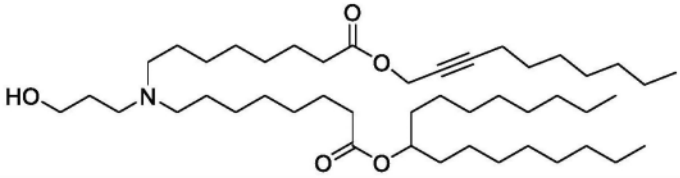
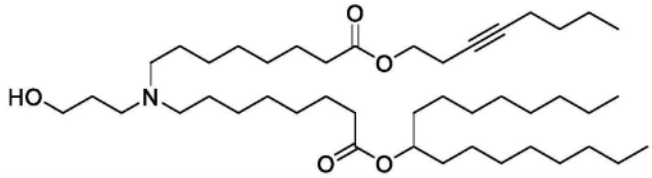
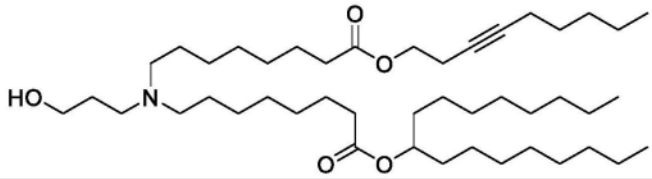
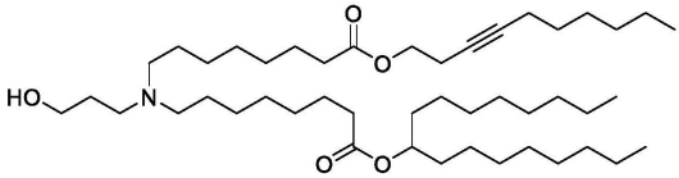
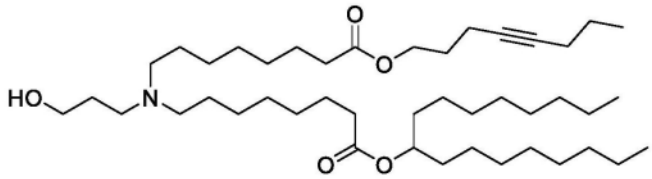
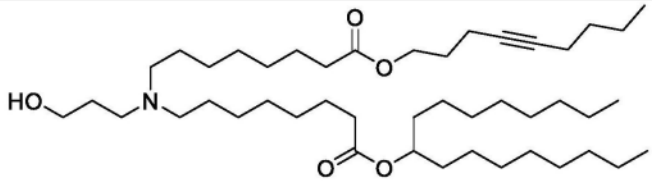
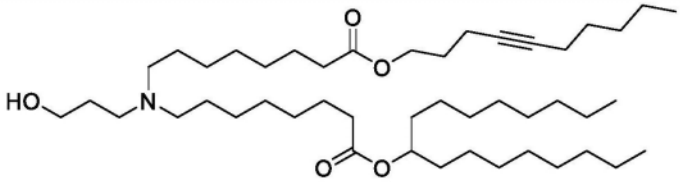
[化学式I]

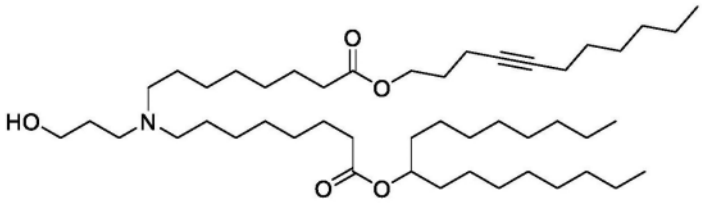
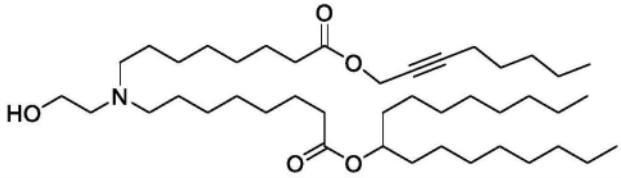
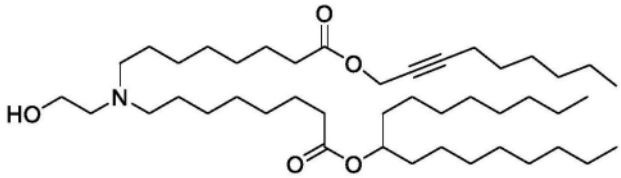
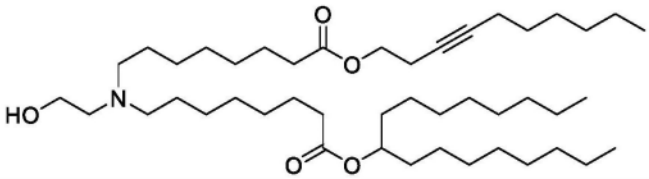
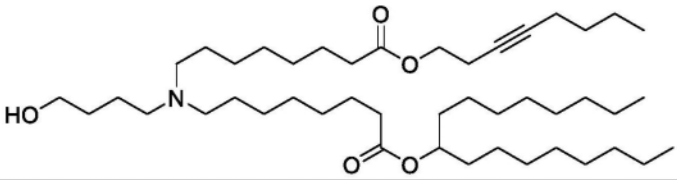
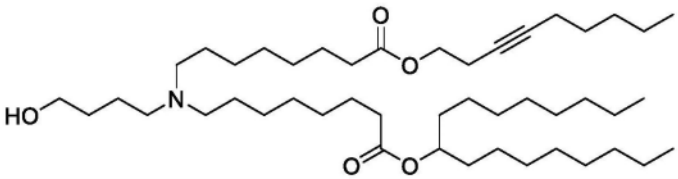
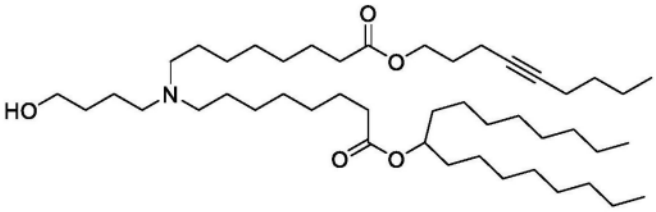
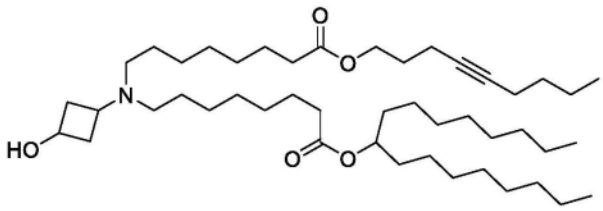


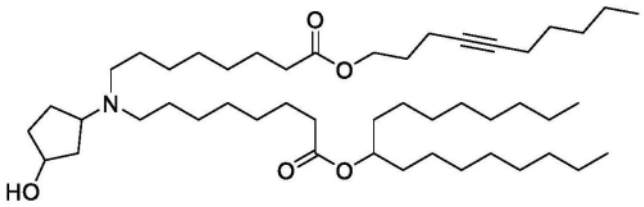
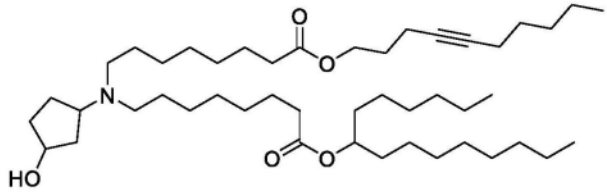
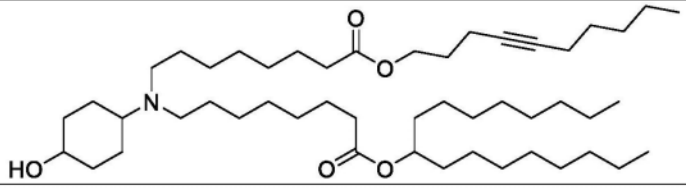
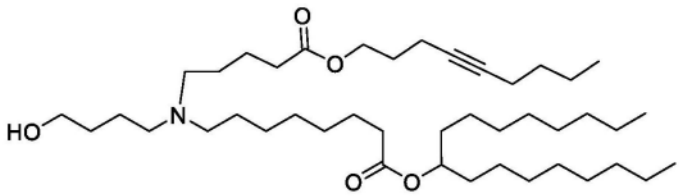
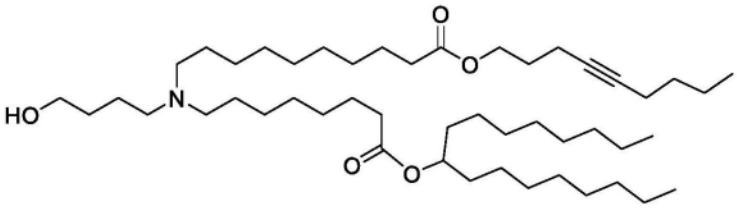
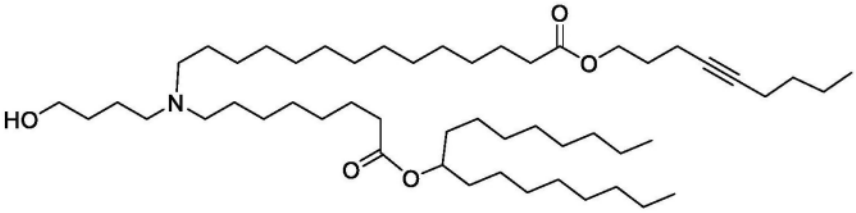
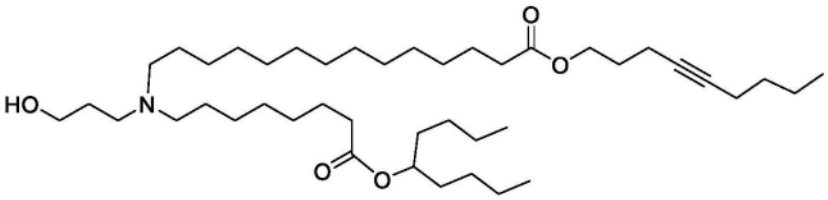
(I)

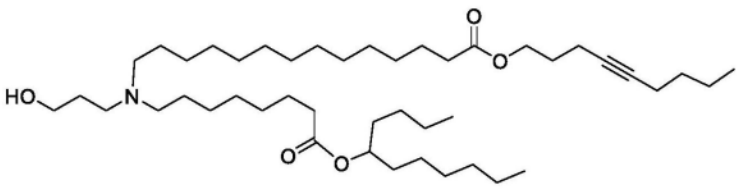
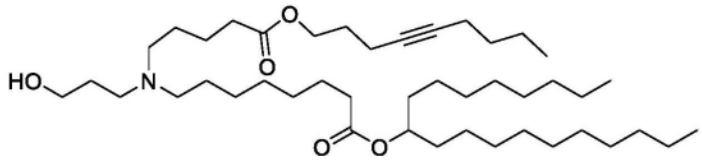
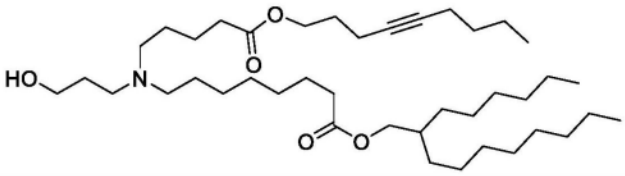
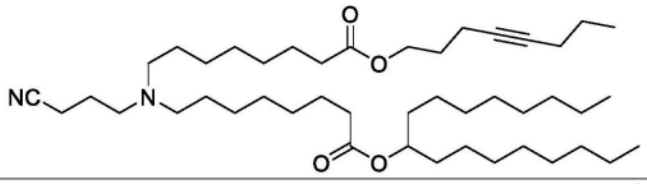
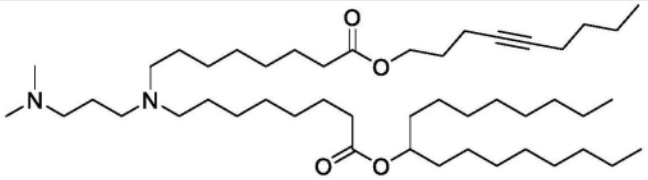
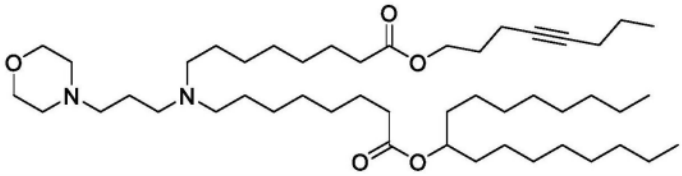
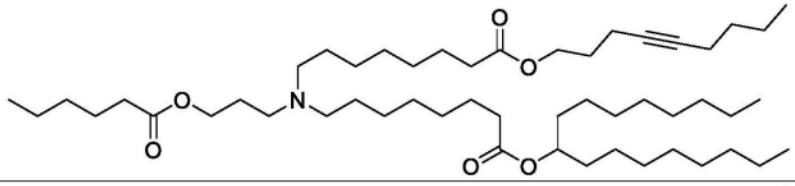
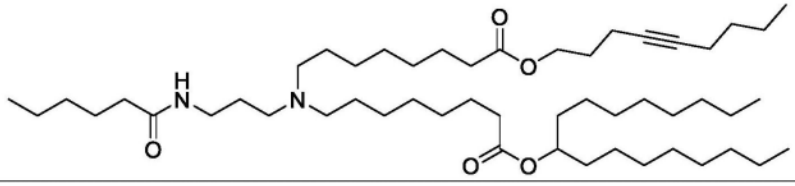
或其药物可接受的盐,其中,所述的化合物选自以下化合物:

编号	结构
1	

2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	

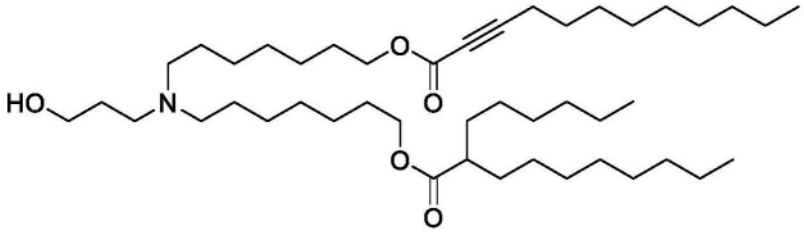
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	

26	
27	
28	
30	
31	
32	
33	
34	

。

18.一种化合物,或其药物可接受的盐,所述化合物为以下化合物29:

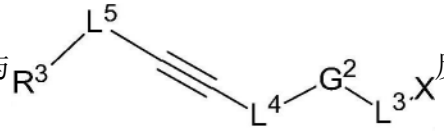
[化合物29]



19.一种根据权利要求17所述的化合物的制备方法,包括以下步骤:

(1)使化合物X-L^2-G^1-R^2与R^1-L^1-NH_2在有机碱作用下反应,获得化合物R^1-L^1-NH-L^2-G^1-R^2,其中,X为卤素;或者,

使化合物HO-L^2-G^1-R^2先在戴斯-马丁氧化剂作用下发生氧化反应,而后将所得产物与R^1-L^1-NH_2在硼氢化物作用下反应,获得化合物R^1-L^1-NH-L^2-G^1-R^2;

(2)使得到的化合物R^1-L^1-NH-L^2-G^1-R^2与反应,得到权利要求17所述的化合物,其中X为卤素。

20.根据权利要求1至16任一项所述的脂质纳米颗粒或权利要求17至18任一项所述的化合物在制备药物中的用途,所述药物是用于基因治疗、基因疫苗接种的药物。

21.根据权利要求20所述的用途,所述基因治疗为反义治疗或通过干扰RNA的治疗。

22.根据权利要求20所述的用途,所述基因治疗可用于癌症和遗传疾病的治疗。

23.根据权利要求22所述的用途,所述癌症为肺癌、胃癌、肝癌、食管癌、结肠癌、胰腺癌、脑癌、淋巴癌、血癌或前列腺癌中的一种或多种。

24.根据权利要求22所述的用途,所述遗传疾病为血友病、地中海贫血、高雪氏病中的一种或多种。

25.根据权利要求20所述的用途,所述基因疫苗接种用于治疗癌症、过敏和病原体感染。

26.根据权利要求25所述的用途,所述病原体为病毒、细菌或真菌中的一种或多种。

27.根据权利要求1至16任一项所述的脂质纳米颗粒或权利要求17至18任一项所述的化合物在制备用于核酸转移的药物中的用途。

28.根据权利要求27所述的用途,所述核酸为RNA或DNA。

29.根据权利要求27所述的用途,所述核酸为反义寡核苷酸。

30.根据权利要求28所述的用途,所述RNA为信使RNA、核糖体RNA、微RNA、转移RNA、小的抑制RNA和小的核RNA中的任意一种。

31.根据权利要求28所述的用途,所述DNA为质粒。

一种脂质纳米颗粒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种氨基脂质化合物、其制备方法和包含所述氨基脂质化合物的脂质颗粒。该脂质颗粒可用于递送生物活性剂至细胞中。本发明还涉及含有氨基脂质的脂质颗粒作为药物的用途。

背景技术

[0002] 基因治疗是通过人工手段将具有特定遗传信息的基因输送到靶细胞，表达的目标蛋白对先天或后天基因缺陷造成的病症具有调节、治疗甚至治愈的效果。核酸与细胞膜均带有负电荷，裸核酸很难直接导入到细胞内，且极易被细胞质中的核酸降解酶降解，达不到基因导入和基因治疗的作用，因此要借助外力或载体来实现基因传递。

[0003] 虽然基因治疗的优势明显，但基因载体缺乏安全性和高效性，使之无法广泛用于临床。通常把基因载体分为病毒型载体和非病毒型载体。由于病毒性载体在体内和体外的转染效率极高，但它同时具有诸多缺陷，如毒性大，免疫反应强烈，基因容量小，靶向性差，制备过程复杂等。而非病毒载体由于容易制备、运输、储藏，且安全、有效、无免疫原性等优点，已引起越来越多专家学者的注意。

[0004] 然而，相对于细胞水平的基因递送，在治疗过程中基因递送目前面临着两个问题。第一，游离的RNA易于在血浆中核酸酶消化。经常使用的解决方案是在纳米颗粒中引入装载有PEG链的膦酯，在自组装过程中PEG链段伸展在胶束的最外层。由于它具有电中性，抗蛋白吸附，端基没有官能团等特点， PEG层可以降低纳米载体在体内的细胞毒性和延长循环时间。第二，在细胞内吞之后，基因载体会被运送至内体/溶酶体囊泡中，基因容易被溶酶体中富含的酶或酸性物质降解。所以，核酸能否从内体/溶酶体逃逸进入到细胞质，是非病毒载体基因递送的重要环节。在内体/溶酶体途径中，纳米复合物会经历一个酸性降低的过程，从晚期内体中的pH 5-6到pH约4.5的溶酶体。同时，溶酶体富含大量的溶酶体酶，极易降解纳米复合物。常用的非病毒载体具有非常低的内体/溶酶体逃逸效率。所以，内体/溶酶体逃逸是提高非病毒载体基因转染的关键步骤。本文公开了一种含炔基的氨基脂质，该脂质同时含有多条烷基链，在体内的递送研究中，显示了优良的递送核酸至细胞中的能力，并显著优于阳性对照(DLin-MC3)和相应的不含有炔基的氨基脂质。

发明内容

[0005] 技术问题

[0006] 本发明的一个目的是提供一种氨基脂质化合物，该系列化合物具备含炔基的烷基链，在体内循环过程中保持稳定，在内体/溶酶体内能迅速地被降解，具有显著增强的递送效率。

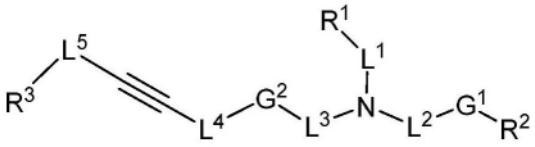
[0007] 本发明的另一目的是提供一种原料易得、反应条件温和、反应选择性好、产率高、仪器设备要求低和操作简单的制备新氨基脂质化合物的方法。

[0008] 本发明的另一目的是提供一种包含所述氨基脂质化合物的脂质纳米颗粒。

[0009] 技术方案

[0010] 本发明的一个方面提供一种脂质纳米颗粒，所述脂质纳米颗粒包含化学式I的化合物：

[0011] [化学式I]

[0012] 

(I)

[0013] 或其药物可接受的盐、前药或立体异构体，其中：

[0014] G^1和G^2相同或不同，各自独立地选自-O(C=O)-、-(C=O)O-、-C(=O)-、-O-、-S(O)$_p$-、-S-S-、-C(=O)S-、-SC(=O)-、-NR^aC(=O)-、-C(=O)NR^a-、-NR^aC(=O)NR^a-、-OC(=O)NR^a-或-NR^aC(=O)O-；其中，p=0,1或2；R^a为H或C_1-C_{12}烷基；

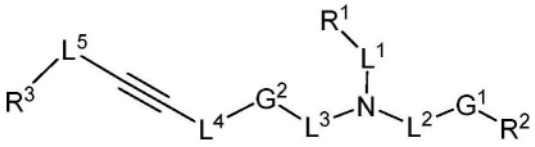
[0015] L^1、L^2、L^3、L^4和L^5彼此相同或不同，并且各自独立地选自C_1-C_{24}亚烷基、C_2-C_{24}亚烯基、C_3-C_8亚环烷基、C_3-C_8亚环烯基，或包含选自氮、硫和氧中的杂原子的任选地取代的4至10元杂环，其中，所述C_1-C_{24}亚烷基、C_2-C_{24}亚烯基、C_3-C_8亚环烷基、C_3-C_8亚环烯基任选地被选自烃基、羧基、酰基和烷氧基中的一个或多个取代基取代；

[0016] R^2为支化的C_6-C_{24}烷基或支化的C_6-C_{24}烯基；

[0017] R^1和R^3相同或不同，各自独立地选自H、OR^{1a}、CN、-C(=O)OR^{1a}、-OC(=O)R^{1a}、-NR^{1b}C(=O)R^{1a}或-$NR^{1a}R^{1b}$；其中，R^{1a}、R^{1b}为H或C_1-C_{12}烃基。

[0018] 本发明的另一个方面提供一种氨基脂质化合物，该氨基脂质化合物是化学式I的化合物：

[0019] [化学式I]

[0020] 

(I)

[0021] 或其药物可接受的盐、前药或立体异构体，其中：

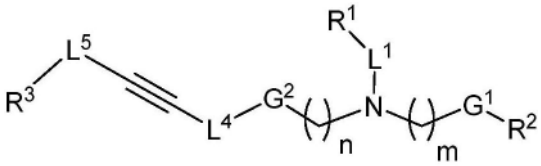
[0022] G^1和G^2相同或不同，各自独立地选自-O(C=O)-、-(C=O)O-、-C(=O)-、-O-、-S(O)$_p$-、-S-S-、-C(=O)S-、-SC(=O)-、-NR^aC(=O)-、-C(=O)NR^a-、-NR^aC(=O)NR^a-、-OC(=O)NR^a-或-NR^aC(=O)O-；其中，p=0,1或2；R^a为H或C_1-C_{12}烃基；

[0023] L^1、L^2、L^3、L^4和L^5彼此相同或不同，并且各自独立地选自C_1-C_{24}亚烷基、C_2-C_{24}亚烯基、C_3-C_8亚环烷基、C_3-C_8亚环烯基，或包含选自氮、硫和氧中的杂原子的任选地取代的4至10元杂环，其中，所述C_1-C_{24}亚烷基、C_2-C_{24}亚烯基、C_3-C_8亚环烷基、C_3-C_8亚环烯基任选地被选自烃基、羧基、酰基和烷氧基中的一个或多个取代基取代；

[0024] R^2为支化的C_6-C_{24}烷基或支化的C_6-C_{24}烯基；

[0025] R^1和R^3相同或不同，各自独立地选自H、OR^{1a}、CN、-C(=O)OR^{1a}、-OC(=O)R^{1a}、-NR^{1b}C(=O)R^{1a}或-$NR^{1a}R^{1b}$；其中，R^{1a}、R^{1b}为H或C_1-C_{12}烃基。

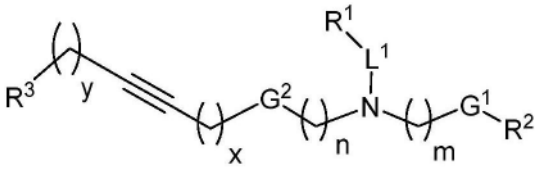
[0026] 优选地，所述化合物具有以下结构：

[0027] 

(II)

[0028] 其中m和n相同或不同，各自独立地为1至12的整数。

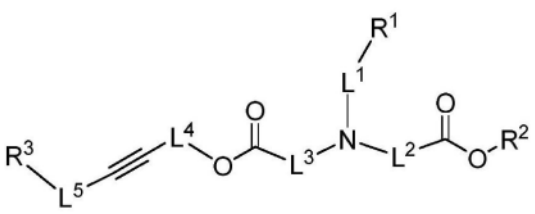
[0029] 优选地，所述化合物具有以下结构：

[0030] 

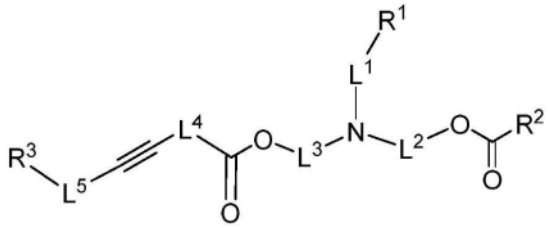
(III)

[0031] 其中x，y，m，n相同或不同，各自独立地为1至12的整数。

[0032] 优选地，所述化合物具有以下结构(IVa)或(IVb)之一：

[0033] 

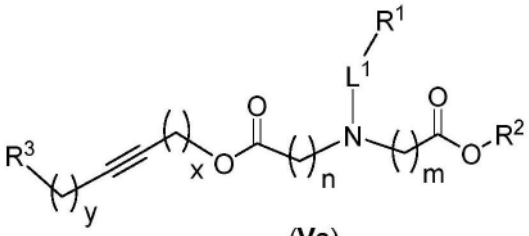
(IVa)



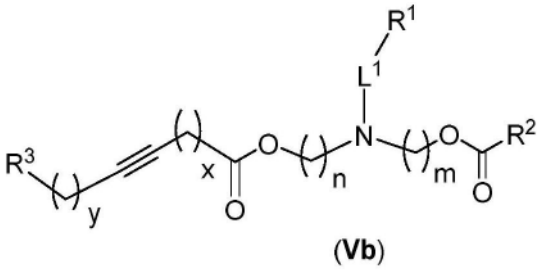
(IVb)

[0034] L^1，L^2，L^3，L^4，L^5相同或不同，各自独立地选自C_1-C_{12}亚烷基、C_2-C_{12}亚烯基、C_3-C_8亚环烷基、C_3-C_8亚环烯基。

[0035] 优选地，所述化合物具有以下结构(Va)或(Vb)之一：

[0036] 

(Va)

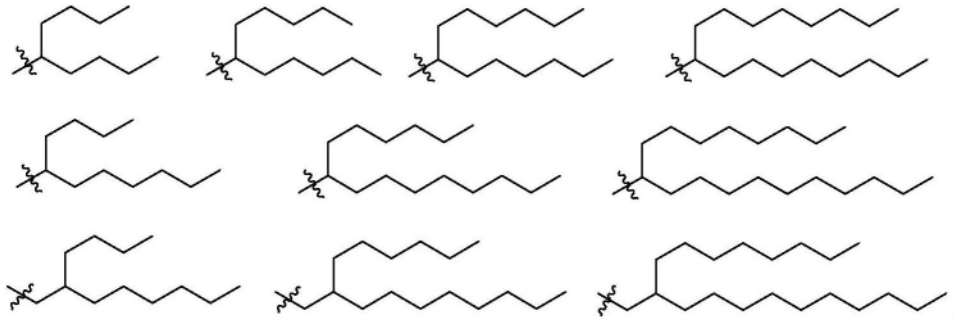


(Vb)

[0037] 其中x，y，m，n相同或不同，各自独立地为1至12的整数。

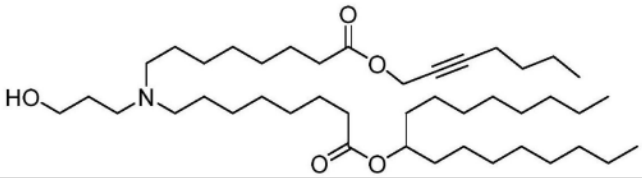
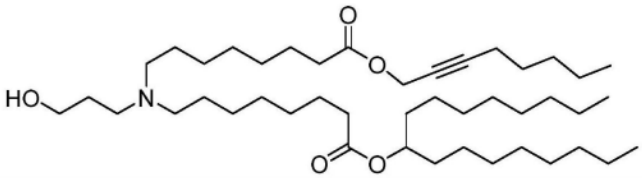
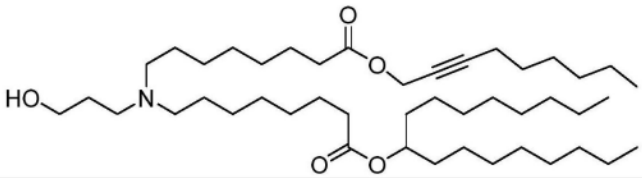
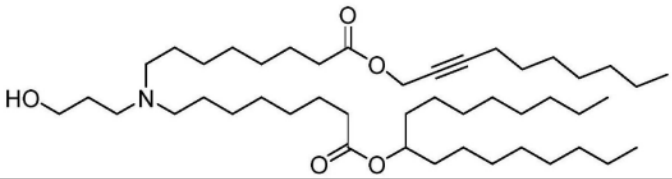
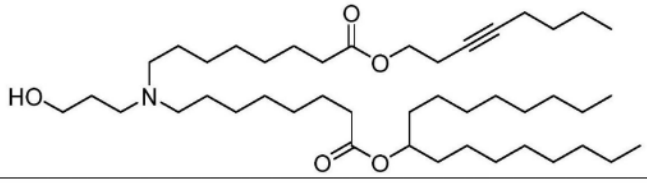
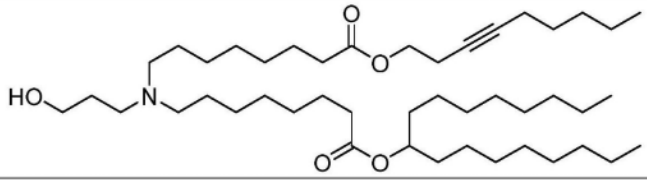
[0038] 优选地，所述化合物中R^3为H。

[0039] 优选地，所述化合物中R^2选自具有以下结构中的一种：

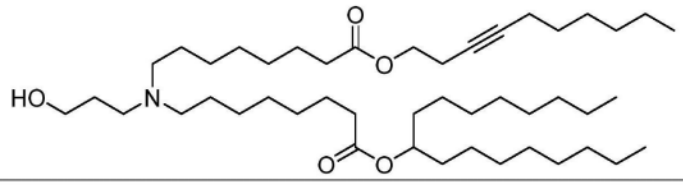
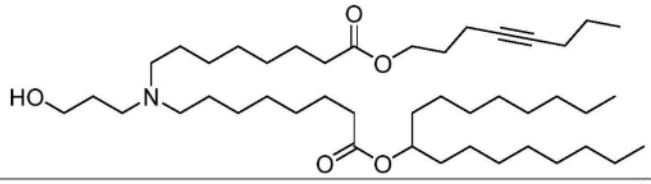
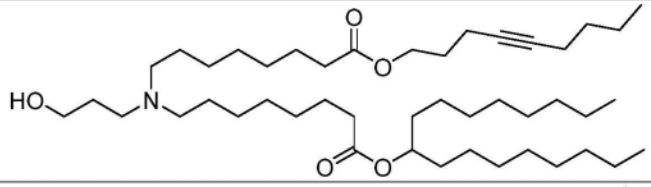
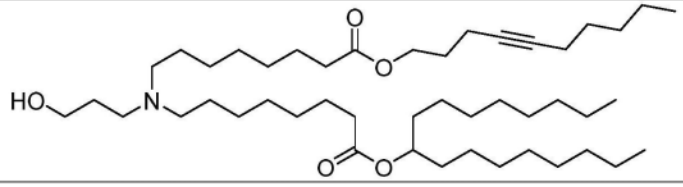
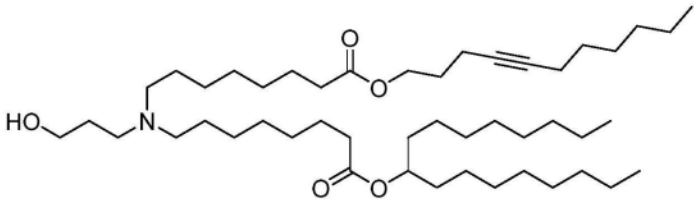
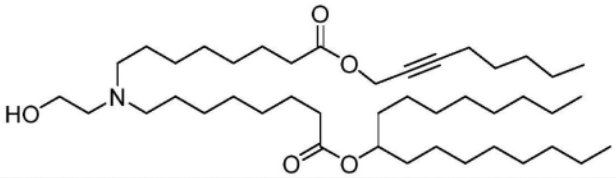
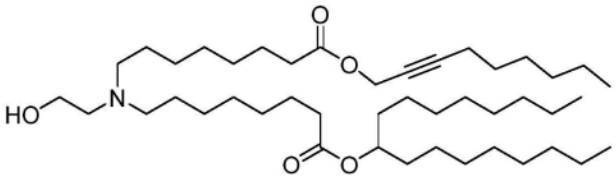
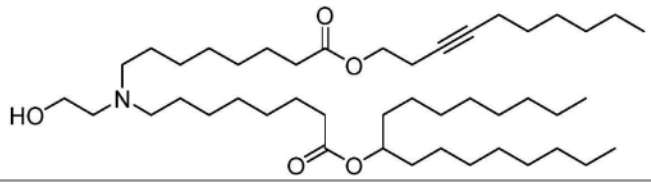
[0040] 。

[0041] 本发明提供了以下代表性化合物：

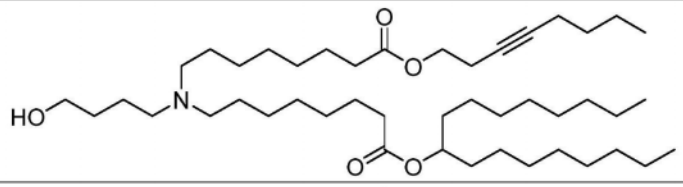
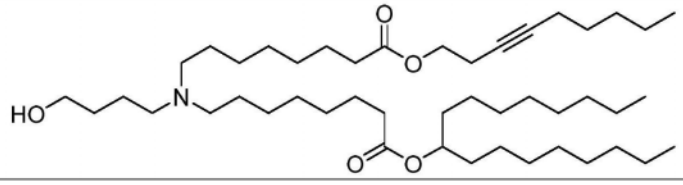
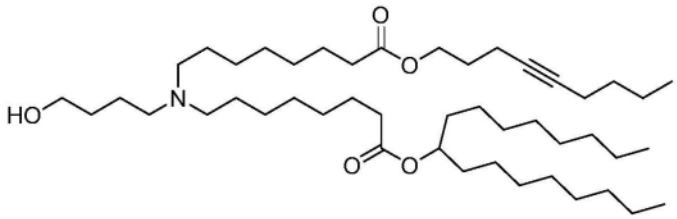
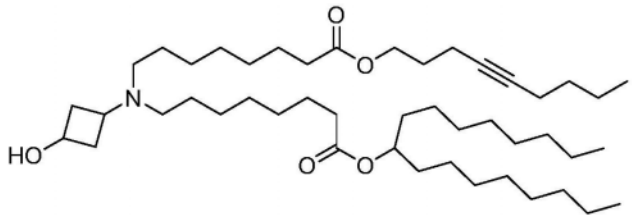
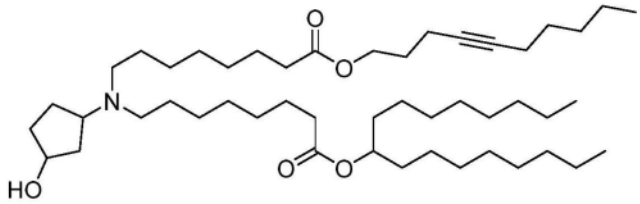
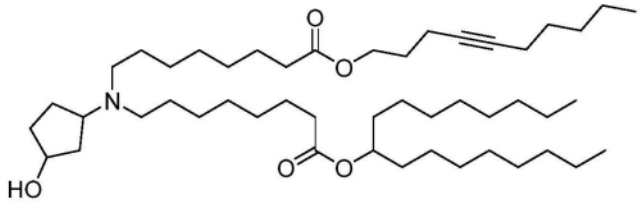
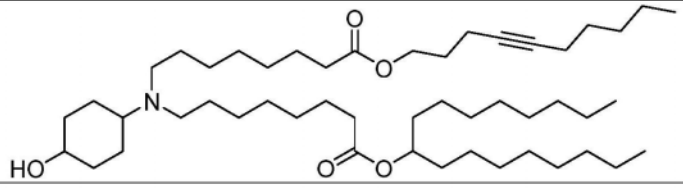
[0042]

编号	结构
1	
2	
3	
4	
5	
6	

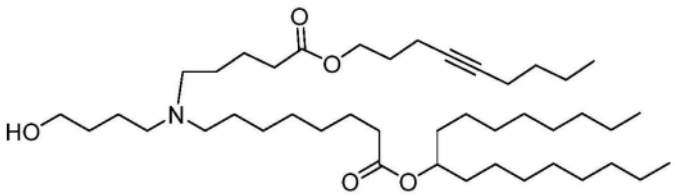
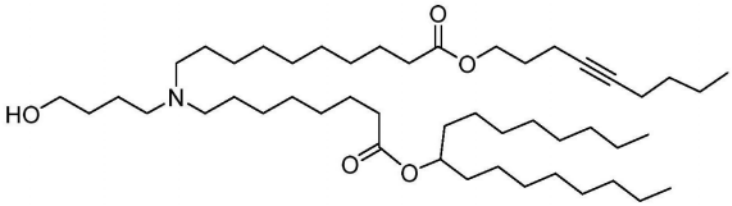
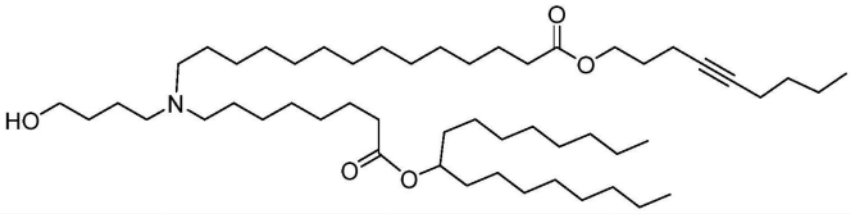
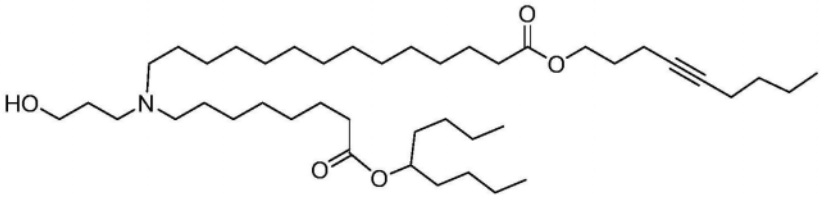
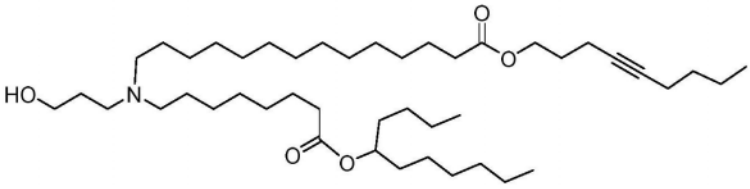
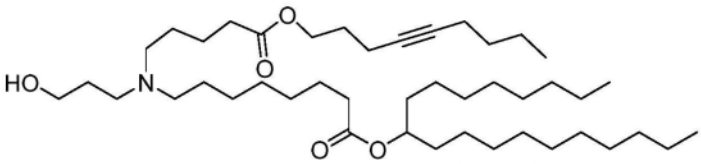
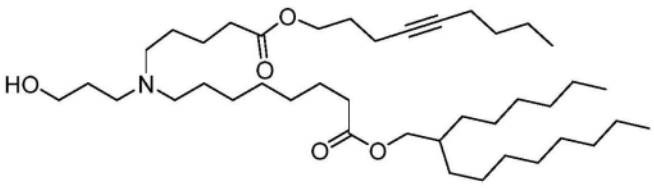
[0043]

7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	

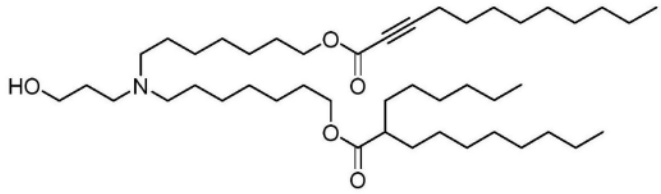
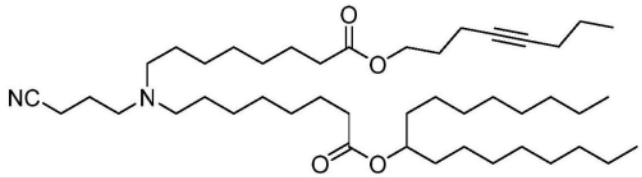
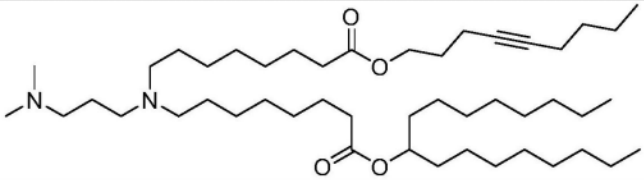
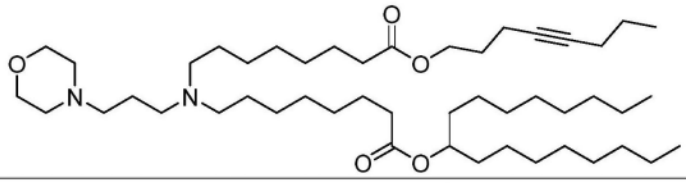
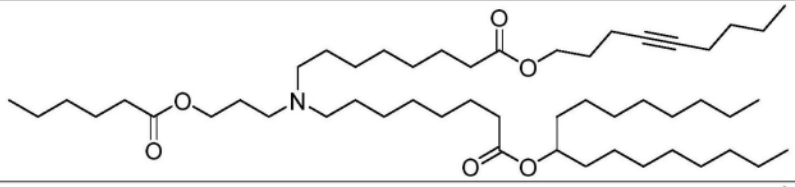
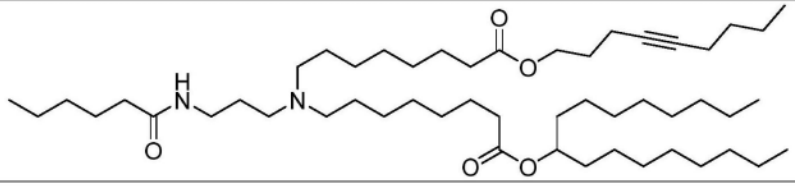
[0044]

15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	

[0045]

22	
23	
24	
25	
26	
27	
28	

[0046]

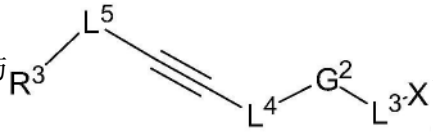
29	
30	
31	
32	
33	
34	

。

[0047] 本发明的另一方面提供一种氨基脂质化合物的制备方法，该制备方法包括以下步骤：

[0048] (1)使化合物X-L^2-G^1-R^2与R^1-L^1-NH_2在有机碱作用下反应，获得化合物R^1-L^1-NH-L^2-G^1-R^2，其中，X为卤素；所述有机碱优选三乙胺、吡啶、DMAP、N,N-二异丙基乙胺；或者，

[0049] 使化合物HO-L^2-G^1-R^2先在戴斯-马丁氧化剂作用下发生氧化反应，而后将所得产物与R^1-L^1-NH_2在硼氢化物作用下反应，获得化合物 R^1-L^1-NH-L^2-G^1-R^2；所述硼氢化物优选三乙酰氧基硼氢化钠、硼氢化钠、硼氢化钾、氰基硼氢化钠、氰基硼氢化钾；

[0050] (2)使化合物R^1-L^1-NH-L^2-G^1-R^2与反应，得到所述化合物，其中X为卤素；优选所述反应在碱和催化剂作用下进行，所述碱选自有机碱或无机碱，所述有机碱选自三乙胺、吡啶、DMAP、N,N-二异丙基乙胺，所述无机碱选自碳酸钠、碳酸钾、碳酸氢钠、碳酸氢钾、氢氧化钠、氢氧化钾、氢化钠或氢化钾，所述催化剂选自碘粒、碘化

钠或碘化钾。

[0051] 本发明还提供了含有所述氨基脂质化合物的脂质颗粒及其用于将生物活性剂传送至细胞中的用途。本发明还包括含有氨基脂质化合物的脂质颗粒作为药物的用途。

[0052] 有益效果

[0053] 本发明的氨基脂质化合物具备炔基基团，炔烃脂质的加入显着增加了膜融合以增强mRNA的释放，从而导致mRNA递送的协同改善。在体内循环过程中保持稳定，在内体/溶酶体内能迅速地被降解，具有显著增强的递送效率。所述氨基脂质化合物的制备方法具有原料易得、反应条件温和、反应选择性好、反应产率高、仪器设备要求低和操作简单的优点。

具体实施方式

[0054] 下文中，将更详细地描述本说明书。

[0055] 本发明所用的术语“任选地取代的”意指与原子或基团连接的一个或多个氢原子独立地未被取代，或被一个或多个例如一、二、三或四个取代基取代，所述取代基独立地选自：氘(D)、卤素、-OH、巯基、氰基、-CD_3、C_1-C_6烷基(优选C_1-C_3烷基)、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、环烷基(优选C_3-C_8环烷基)、芳基、杂环基(优选3-8元杂环基)、杂芳基、芳基C_1-C_6烷基-、杂芳基C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、-OC_1-C_6烷基(优选-OC_1-C_3烷基)、-OC_2-C_6烯基、OC_1-C_6烷基苯基、C_1-C_6烷基-OH(优选C_1-C_4烷基-OH)、C_1-C_6烷基-SH、C_1-C_6烷基 -O-C_1-C_6烷基、OC_1-C_6卤代烷基、NH_2、C_1-C_6烷基-NH_2(优选C_1-C_3烷基-NH_2)、 -N(C_1-C_6烷基)$_2$(优选-N(C_1-C_3烷基)$_2$)、-NH(C_1-C_6烷基)(优选-NH(C_1-C_3烷基))、 -N(C_1-C_6烷基)(C_1-C_6烷基苯基)、-NH(C_1-C_6烷基苯基)、硝基、-C(O)-OH、-C(O)OC_1-C_6烷基(优选-C(O)OC_1-C_3烷基)、-CONRiRii(其中Ri和Rii是H、D 和C_1-C_6烷基，优选C_1-C_3烷基)、-NHC(O)(C_1-C_6烷基)、-NHC(O)(苯基)、 -N(C_1-C_6烷基)C(O)(C_1-C_6烷基)、-N(C_1-C_6烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C_1-C_6烷基、-C(O)杂芳基(优选-C(O)-5-7元杂芳基)、-C(O)C_1-C_6烷基苯基、-C(O)C_1-C_6卤代烷基、-OC(O)C_1-C_6烷基(优选-OC(O)C_1-C_3烷基)、-S(O)$_2$-C_1-C_6烷基、 -S(O)-C_1-C_6烷基、-S(O)$_2$-苯基、-S(O)$_2$-C_1-C_6卤代烷基、-S(O)$_2NH_2$、 -S(O)$_2$NH(C_1-C_6烷基)、-S(O)$_2$NH(苯基)、-NHS(O)$_2$(C_1-C_6烷基)、-NHS(O)$_2$(苯基)和-NHS(O)$_2$(C_1-C_6卤代烷基)，其中所述的烷基、环烷基、苯基、芳基、杂环基和杂芳基中的每一个任选地被选自以下中的一个或多个取代基进一步取代：卤素、-OH、-NH_2、环烷基、3-8元杂环基、C_1-C_4烷基、C_1-C_4卤代烷基-、 -OC_1-C_4烷基、-C_1-C_4烷基-OH、-C_1-C_4烷基-O-C_1-C_4烷基、-OC_1-C_4卤代烷基、氰基、硝基、-C(O)-OH、-C(O)OC_1-C_6烷基、-CON(C_1-C_6烷基)$_2$、-CONH(C_1-C_6烷基)、-$CONH_2$、-NHC(O)(C_1-C_6烷基)、-NH(C_1-C_6烷基)C(O)(C_1-C_6烷基)、 -SO_2(C_1-C_6烷基)、-SO_2(苯基)、-SO_2(C_1-C_6卤代烷基)、-SO_2NH_2、-SO_2NH(C_1-C_6烷基)、-SO_2NH(苯基)、-$NHSO_2$(C_1-C_6烷基)、-$NHSO_2$(苯基)和-$NHSO_2$(C_1-C_6卤代烷基)。当一个原子或基团被多个取代基取代时，所述多个取代基可以相同或不同。

[0056] 本发明所用的术语“烃基”意指脂肪烃失去一个氢原子后剩余的基团，包括直链的或支链的、饱和的或不饱和的烃基，所述烃基包括烷基、烯基和炔基，优选地所述烃基为C_1-C_{10}的烃基，C_1-C_6烃基，或C_1-C_3的烃基。

[0057] 本发明所用的术语“烷基”是指C_1-C_{24}烷基，C_1-C_{20}烷基，C_1-C_{18}烷基， C_1-C_{12}烷基，C_1-C_6烷基，C_3-C_{24}烷基，C_3-C_{20}烷基，C_3-C_{18}烷基，C_3-C_{12}烷基， C_3-C_6烷基，C_6-C_{24}烷基，C_6-C_{20}烷基，C_6-C_{18}烷基或C_6-C_{12}烷基。

[0058] 本发明所用的术语“烯基”是指C_2-C_{24}烯基，C_2-C_{20}烯基，C_2-C_{18}烯基，C_2-C_{12}烯基，C_2-C_6烯基，C_3-C_{20}烯基，C_3-C_{18}烯基，C_3-C_{12}烯基，C_3-C_6烯基，C_6-C_{24}烯基，C_6-C_{20}烯基，C_6-C_{18}烯基或C_6-C_{12}烯基。

[0059] 本发明所用的术语“炔基”是指C_2-C_{24}炔基，C_2-C_{20}炔基，C_2-C_{18}炔基，C_2-C_{12}炔基，C_2-C_6炔基，C_3-C_{20}炔基，C_3-C_{18}炔基，C_3-C_{12}炔基，C_3-C_6炔基，C_6-C_{24}炔基，C_6-C_{20}炔基，C_6-C_{18}炔基或C_6-C_{12}炔基。

[0060] 本发明中的术语“酰基”意指烃基-羰基，优选地所述酰基是C_4-C_{24}酰基、C_6-C_{18}酰基、C_6-C_{12}酰基、C_6-C_{10}酰基、C_4-C_6酰基、C_2-C_{12}酰基，C_2-C_6酰基。

[0061] 本发明中的术语“烷氧基”意指烷基-氧基，优选所述烷氧基是C_1-C_{10}烷氧基，更优选地，所述烷氧基为C_1-C_6烷氧基，最优选地，所述烷氧基为C_1-C_3烷氧基。

[0062] 本发明中的术语“杂环”意指包含选自N、O、S等杂原子的饱和的或不饱和的环状基团，优选地，所述杂环为包含选自N、O、S中的1至6个杂原子的任选地取代的4至10元杂环，或者为包含选自N、O、S中的1，2，或 3个杂原子的任选地取代的4至6元饱和杂环。所述杂环可以任选被一个或多个取代基取代，取代基的种类参见上述有关“任选地取代的”的定义。

[0063] 本发明的另一实施方案涉及含前述氨基脂质化合物的脂质颗粒。由于本发明的氨基脂质化合物含有长的非极性残基，所得到的化合物全部具有疏水性特征，并且由于氨基，同时又具有亲水性特征。这种两性特征可以用于形成脂质颗粒，例如，脂质双层、胶束、脂质体等。

[0064] 在本发明的范围内，术语“脂质颗粒”意思是将氨基脂质化合物放入水溶液中制得的纳米大小的物质(脂质纳米颗粒)，这些颗粒特别是脂质双层泡囊(脂质体)、多层泡囊或胶束。

[0065] 在本发明的优选实施方案中，所述脂质颗粒是含有前述氨基脂质化合物的脂质体。在本发明的范围内，脂质体是由包裹含水隔室的脂质两性(两亲 (amphiphilic))分子的双层组成的微泡囊。

[0066] 脂质体形成不是一个自发的过程。当脂质放入水中时首先形成脂质泡囊，因此形成一个双层或一系列双层，每个通过水分子分开。可以通过在水中超声波处里脂质泡囊来形成脂质体。

[0067] 在本发明的范围内，术语“脂质双层”意思是由两层脂质分子形成的薄膜。术语“胶束”意思是分散在液体胶体中的表面活性剂分子的聚集物。水溶液中的典型胶束接触水时与亲水性头部区域形成聚集物，螯合胶束中心的疏水性单尾区。

[0068] 在本发明的范围内，术语“细胞”意思是一般术语，并且包括单个细胞、组织、器官、昆虫细胞、禽类细胞、鱼细胞、两栖类细胞、哺乳动物细胞、初级细胞、连续细胞系、干细胞和/或遗传工程化细胞(如表达异源多肽或蛋白的重组细胞)的培养。重组细胞包括，例如，表达异源多肽或蛋白(如生长因子或血液因子)的细胞。

[0069] 在优选的实施方案中，所述脂质颗粒或脂质体进一步含有辅助脂质。在优选的实施方案中，所述辅助脂质是非阳离子脂质。在更优选的实施方案中，所述辅助脂质是非阳离子磷脂。在本发明的范围内，非阳离子脂质可以含有阳离子官能团(例如，铵基)，但应当含有阴离子官能团，以至少中和分子。脂质分子中的所有官能团的总体应当是非阳离子的。由阳离子氨基脂质和非阳离子(中性)磷脂的混合物组成的脂质体对于将核酸传送至细胞中

是最有效的。在甚至更优选的实施方案中，所述非阳离子脂质是DOPE或DSPC。

[0070] 在进一步优选的实施方案中，脂质颗粒或脂质体进一步包含固醇。固醇，如胆固醇，是细胞膜中的天然成分。其可以用于稳定颗粒，并且帮助与细胞膜的整合。

[0071] 在本发明的另一个实施方案中，脂质颗粒或脂质体进一步含有生物活性剂。在本发明的范围内，生物活性剂是引入细胞或宿主中时具有生物作用的物质，例如，通过刺激免疫应答或炎性应答、通过发挥酶活性或通过补充突变等来起作用，生物活性剂特别是核酸、肽、蛋白、抗体和小分子。将脂质体用于将药物包裹在脂质双层内或脂质体的内部含水空间中时，都可以使用术语“脂质颗粒药物”。

[0072] 在最优选的实施方案中，生物活性剂是核酸。在另一个优选的实施方案中，所述生物活性剂是选自抗肿瘤剂、抗生素、免疫调节剂、抗炎剂、作用于中枢神经系统的药剂、多肽或多肽类(polypeptoid)的成员。

[0073] 在另一个实施方案中，脂质颗粒或脂质体进一步含有至少一种聚乙二醇 (PEG)-脂质。PEG脂质有助于保护颗粒及其内含物免受体外或体内降解。此外，PEG在脂质体表面上形成保护层，并且提高了体内循环时间。其可以用于脂质体药物传送中(PEG-脂质体)。优选地，所述聚乙二醇脂质为 PEG2000-DMG。

[0074] 含有生物活性剂的脂质颗粒或脂质体可以用于将多种治疗剂中的任何一种传送至细胞中。本发明包括如上所述的脂质颗粒(尤其是脂质体)用于将生物活性剂传送至细胞中的用途。

[0075] 优选，所述生物活性剂是核酸，包括但不限于，信使RNA(mRNA)、反义寡核苷酸、DNA、质粒、核糖体RNA(rRNA)、微RNA(miRNA)、转移RNA(tRNA)、小的抑制RNA(siRNA)和小的核RNA(snRNA)。生物活性剂还可以是抗肿瘤剂、抗生素、免疫调节剂、抗炎剂、作用于中枢神经系统的药剂、抗原或其片段、蛋白、肽、多肽类、疫苗和小分子，或其混合物。如上所示，含有本发明中限定的氨基脂质化合物的脂质颗粒或脂质体适用于将生物活性剂传送至细胞中。可以对通过所述通用合成方法合成的多种不同氨基脂质化合物给予脂质体的特定特征进行筛选。重要的特征例如是转染效率、细胞毒性、待传送至细胞中的药剂的粘附、脂质体的稳定性、脂质体的大小等。本发明的方法可以形成特定适应的脂质体，以用于特定的应用。

[0076] 例如，脂质颗粒或脂质体可以用于转染多细胞组织或器官。这给病人提供了新的治疗处理的可能性。

[0077] 根据本发明，病人可以是任何哺乳动物，优选选自人、小鼠、大鼠、猪、猫、狗、马、山羊、牛和猴子和/或其他。最优选，病人是人。

[0078] 本发明的重要实施方案是所述含有根据通式(I-III)之一的氨基脂质化合物的脂质颗粒或脂质体用作药物的用途。

[0079] 特别地，所述脂质颗粒或脂质体可以给予病人，用于基因治疗、基因疫苗接种、反义治疗或通过干扰RNA的治疗中。具体的应用范围包括但不限于：

[0080] (1)本发明的脂质颗粒可以传递核酸以用于基因治疗。通过本发明的氨基脂质将外源基因导入靶细胞，以纠正或补偿缺陷和异常基因引起的疾病，以达到治疗目的。其中也包括转基因等方面的技术应用，也就是将外源基因通过基因转移技术将其插入病人的适当的受体细胞中，使外源基因制造的产物能治疗某种疾病，如常见的肺癌、胃癌、肝癌、食管

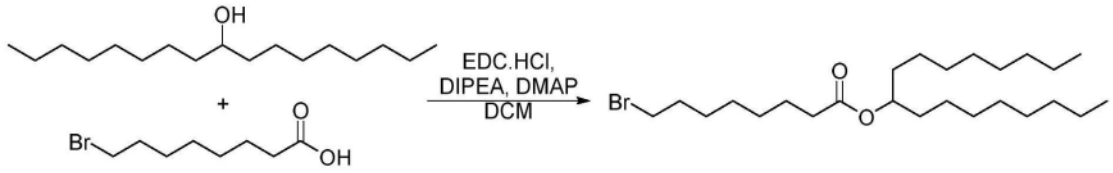
癌、结肠癌、胰腺癌、脑癌、淋巴癌、血癌、前列腺癌等。还可导入经过基因编辑的核酸物质以用于多种遗传疾病的治疗，如血友病，地中海贫血、高雪氏病等。

[0081] (2)本发明的脂质颗粒可以用于疫苗接种中。本发明的脂质颗粒或脂质体可以用于传送抗原或编码抗原的核酸。本发明的脂质颗粒还可以用于引发对抗各种抗原的免疫应答，所述抗原用于治疗和/或预防多种病症，如癌症、过敏、毒性和病原体(如，病毒、细菌、真菌和其他致病生物体)感染。

[0082] 上述的脂质颗粒可用于制备用于核酸转移的药物，优选地，所述核酸为 RNA、信使RNA(mRNA)、反义寡核苷酸、DNA、质粒、核糖体RNA(rRNA)、微RNA(miRNA)、转移RNA(tRNA)、小的抑制RNA(siRNA)和小的核RNA(snRNA)。

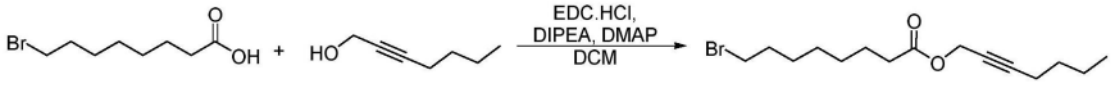
[0083] 为了使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合具体实施例对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0084] 实施例1:8-溴辛酸1-辛基壬酯的合成

[0085] 

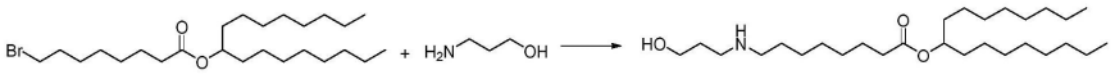
[0086] 在250mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸(22.3g，100mmol)，十七烷-9- 醇(25.6g，100mmol)，二氯甲烷100mL，搅拌溶解后，再加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(23.0g，120mmol)，4-二甲氨基吡啶(0.61g， 5mmol)，N,N-二异丙基乙胺(25.8g，200mmol)室温下反应2h，水洗3次后，使用无水硫酸钠干燥，浓缩后，使用快速柱层析系统纯化(正己烷:乙酸乙酯＝10:1至3:1)得到8-溴辛酸1-辛基壬酯(41.5g，90％)。

[0087] 实施例2:8-溴辛酸庚-2-炔酯的合成

[0088] 

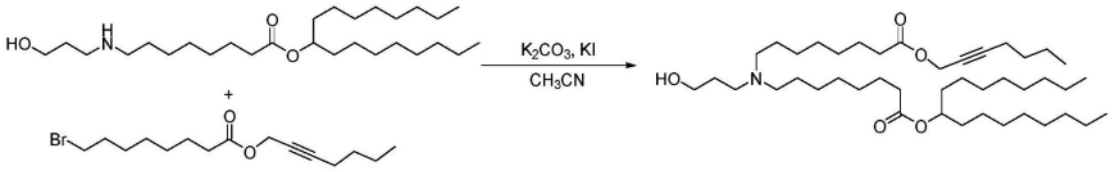
[0089] 在100mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸(2.23g，10mmol)，2-庚炔-1-醇 (1.12g，10mmol)，二氯甲烷30mL，搅拌溶解后，再加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(2.3g，12mmol)，4-二甲氨基吡啶(0.06g，0.5 mmol)，N,N-二异丙基乙胺(2.58g，20mmol)室温下反应2h，水洗3次后，使用无水硫酸钠干燥，浓缩后，使用快速柱层析系统纯化(正己烷:乙酸乙酯＝ 10:1至2:1)得到8-溴辛酸庚-2-炔酯(3.01g，95％)。

[0090] 实施例3:8-(3-羟基-丙基氨基)辛酸1-辛基壬酯的合成

[0091] 

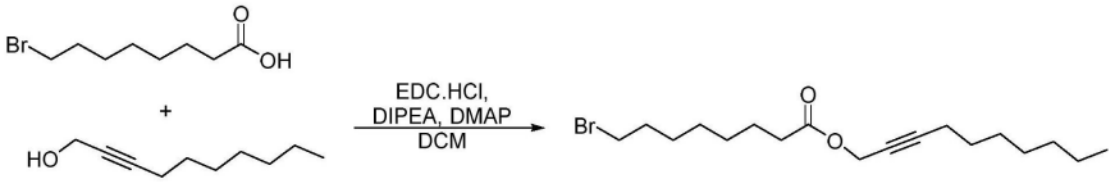
[0092] 在100mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸1-辛基壬酯(4.61g，10mmol)， 3-氨基-1-丙醇(7.5g，100mmol)，乙醇30mL，搅拌溶解后，再加入N,N-二异丙基乙胺(2.58g，20mmol)，室温下反应24h，加入二氯甲烷100mL，水洗3次后，使用无水硫酸钠干燥，浓缩后，使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇＝20:1至5:1)得到8-(3-羟基-丙基氨基)辛酸1-辛基壬酯(3.32 g，73％)。

[0093] 实施例4:化合物1的合成

[0094] 

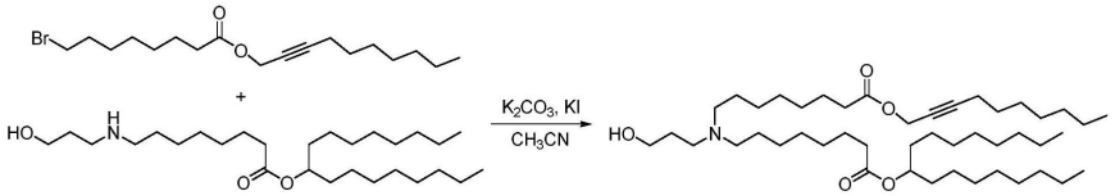
[0095] 在100mL的反应瓶中依次加入8-(3-羟基-丙基氨基)辛酸1-辛基壬酯(455 mg,1mmol),8-溴辛酸庚-2-炔酯(380mg,1.2mmol),乙腈20mL,搅拌溶解后,再加入碳酸钾(276mg,2mmol),碘化钾(166mg,1mmol),室温下反应 24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1至5:1)得到化合物1(560 mg,81%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ:ppm 4.88(m,1H);4.65(m,2H); 3.68-3.46(m,2H);2.77-2.37(m,8H);2.28(m,4H);1.75-1.42(m,14H);1.39-1.18 (m,40H);0.89(m,9H).ESI-MS calculated for $C_{43}H_{82}NO_5^+$[M+H]+692.6,found 692.7

[0096] 实施例5:癸-2-炔-1-基8-溴辛酸酯的合成

[0097] 

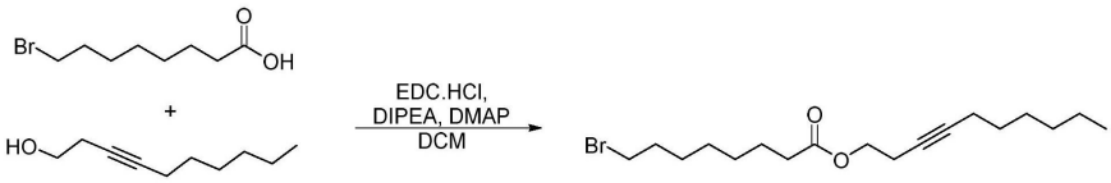
[0098] 在100mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸(2.23g,10mmol),2-癸炔-1-醇 (1.54g,10mmol),二氯甲烷30mL,搅拌溶解后,再加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(2.3g,12mmol),4-二甲氨基吡啶(0.06g,0.5 mmol),N,N-二异丙基乙胺(2.58g,20mmol)室温下反应2h,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(正己烷:乙酸乙酯= 10:1至2:1)得到癸-2-炔-1-基8-溴辛酸酯(3.3g,92%)。

[0099] 实施例6:化合物4的合成

[0100] 

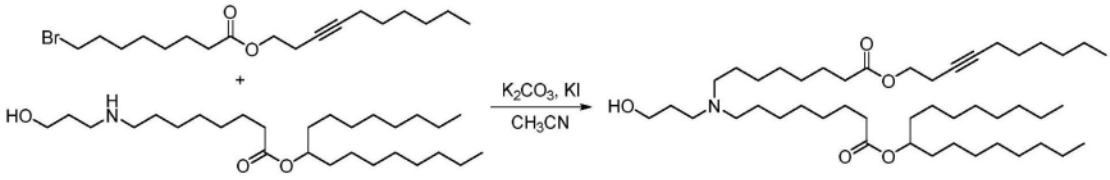
[0101] 在100mL的反应瓶中依次加入8-(3-羟基-丙基氨基)辛酸1-辛基壬酯(455 mg,1mmol),癸-2-炔-1-基8-溴辛酸酯(380mg,1.2mmol),乙腈20mL,搅拌溶解后,再加入碳酸钾(276mg,2mmol),碘化钾(166mg,1mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1至5:1)得到化合物4(558mg,76%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ:ppm 4.87(m,1H);4.68(m, 2H);3.64-3.42(m,2H);2.79-2.38(m,8H);2.27(m,4H);1.76-1.43(m,14H); 1.41-1.16(m,46H);0.88(m,9H).ESI-MS calculated for $C_{46}H_{88}NO_5^+$[M+H]$^+$ 734.7,found 734.7

[0102] 实施例7:癸-3-炔-1-基8-溴辛酸酯的合成

[0103] 

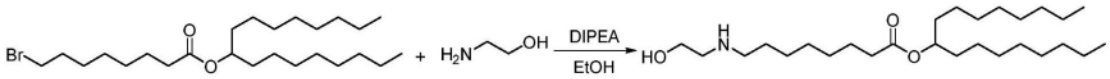
[0104] 在100mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸(2.23g,10mmol),3-癸炔-1-醇 (1.54g,10mmol),二氯甲烷30mL,搅拌溶解后,再加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(2.3g,12mmol),4-二甲氨基吡啶(0.06g,0.5 mmol),N,N-二异丙基乙胺(2.58g,20mmol)室温下反应2h,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(正己烷:乙酸乙酯= 10:1至2:1)得到癸-3-炔-1-基8-溴辛酸酯(3.2g,89%)。

[0105] 实施例8:化合物7的合成

[0106] 

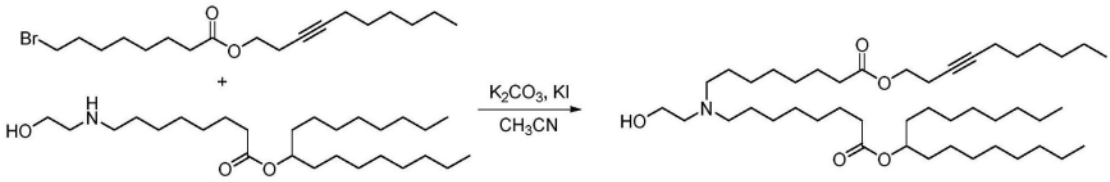
[0107] 在100mL的反应瓶中依次加入8-(3-羟基-丙基氨基)辛酸1-辛基壬酯(455 mg,1mmol),癸-3-炔-1-基8-溴辛酸酯(380mg,1.2mmol),乙腈20mL,搅拌溶解后,再加入碳酸钾(276mg,2mmol),碘化钾(166mg,1mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1至5:1)得到化合物7(558mg,76%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ:ppm 4.89(m,1H);4.67(m,2H);3.66-3.43(m,2H);2.78-2.36(m,10H);2.28(m,4H);1.77-1.45(m,14H); 1.40-1.15(m,44H);0.89(m,9H).ESI-MS calculated for $C_{46}H_{88}NO_5^+$[M+H]$^+$ 734.7,found 734.8

[0108] 实施例9:8-((2-羟乙基)氨基)辛酸1-辛基壬酯的合成

[0109] 

[0110] 在100mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸1-辛基壬酯(4.61g,10mmol), 2-氨基-1-乙醇(6.1g,100mmol),乙醇30mL,搅拌溶解后,再加入N,N-二异丙基乙胺(2.58g,20mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1至5:1)得到8-((2-羟乙基)氨基)辛酸1-辛基壬酯(3.35 g,76%)。

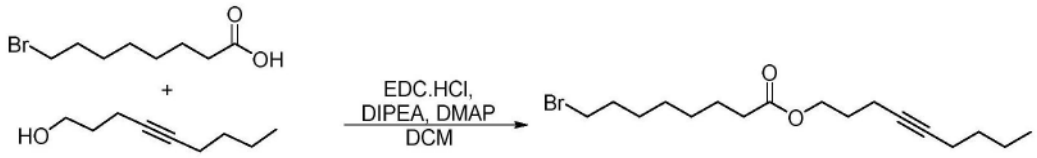
[0111] 实施例10:化合物14的合成

[0112] 

[0113] 在100mL的反应瓶中依次加入8-((2-羟乙基)氨基)辛酸1-辛基壬酯(442mg,1mmol),癸-3-炔-1-基8-溴辛酸酯(380mg,1.2mmol),乙腈20mL,搅拌溶解后,再加入碳酸钾(276mg,2mmol),碘化钾(166mg,1mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1至5:1)得

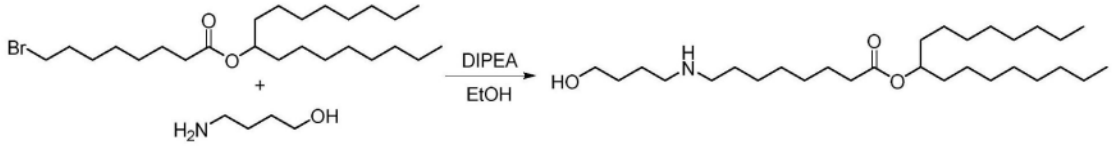
到化合物14 (511mg,71%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ:ppm 4.89(m,1H);4.67(m,2H); 3.66-3.43(m,2H);2.78-2.36(m,10H);2.28(m,4H);1.77-1.45(m,14H); 1.40-1.15(m,42H);0.89(m,9H).ESI-MS calculated for $C_{45}H_{86}NO_5^+$[M+H]$^+$ 720.7,found 720.8

[0114] 实施例11:8-溴辛酸4-壬炔-1-基酯的合成

[0115] 

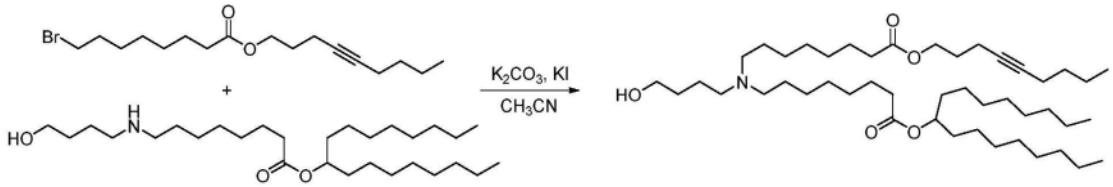
[0116] 在100mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸(2.23g,10mmol),4-壬炔-1-醇 (1.4g,10mmol),二氯甲烷30mL,搅拌溶解后,再加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(2.3g,12mmol),4-二甲氨基吡啶(0.06g,0.5 mmol),N,N-二异丙基乙胺(2.58g,20mmol)室温下反应2h,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(正己烷:乙酸乙酯= 10:1至2:1)得到8-溴辛酸4-壬炔-1-基酯(3.0g,88%)。

[0117] 实施例12:8-((4-羟丁基)氨基)辛酸1-辛基壬酯的合成

[0118] 

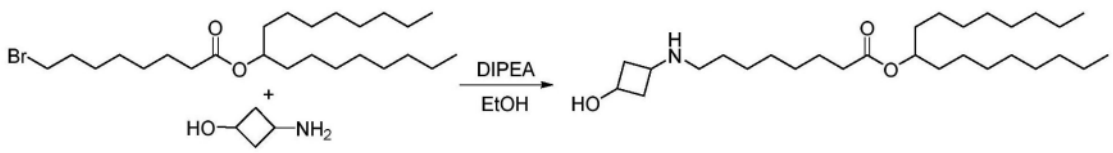
[0119] 在100mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸1-辛基壬酯(4.61g,10mmol), 4-氨基-1-丁醇(8.9g,100mmol),乙醇30mL,搅拌溶解后,再加入N,N-二异丙基乙胺(2.58g,20mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1至5:1)得到8-((4-羟丁基)氨基)辛酸1-辛基壬酯(3.71 g,79%)。

[0120] 实施例13:化合物17的合成

[0121] 

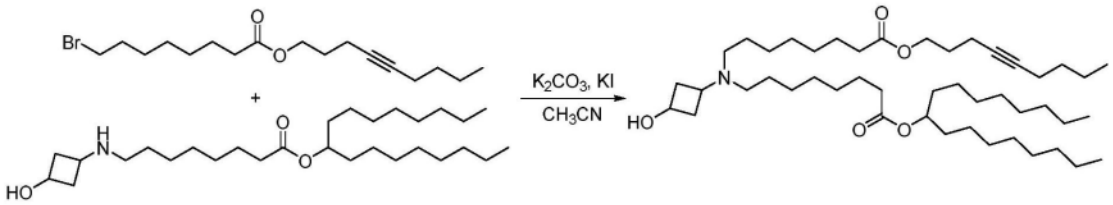
[0122] 在100mL的反应瓶中依次加入8-((4-羟丁基)氨基)辛酸1-辛基壬酯(442 mg,1mmol),8-溴辛酸4-壬炔-1-基酯(414mg,1.2mmol),乙腈20mL,搅拌溶解后,再加入碳酸钾(276mg,2mmol),碘化钾(166mg,1mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1至5:1)得到化合物17(550mg,75%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ:ppm 4.91(m,1H);4.68(m, 2H);3.68-3.44(m,2H);2.79-2.36(m,10H);2.29(m,4H);1.78-1.46(m,14H); 1.42-1.16(m,44H);0.89(m,9H).ESI-MS calculated for $C_{46}H_{88}NO_5^+$[M+H]$^+$ 734.7,found 734.7。

[0123] 实施例14:8-((3-羟基环丁基)氨基)辛酸1-辛基壬酯的合成

[0124] 

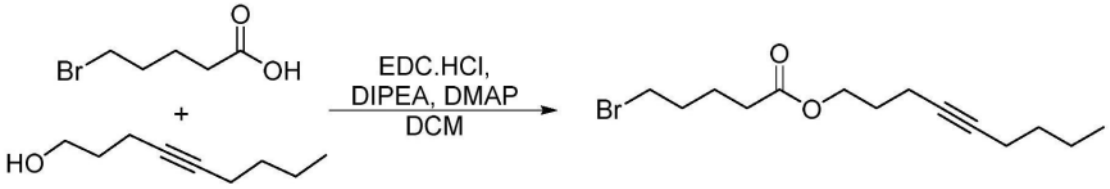
[0125] 在100mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸1-辛基壬酯(4.61g,10mmol)，3-氨基环丁醇(8.7g,100mmol)，乙醇30mL，搅拌溶解后，再加入N,N-二异丙基乙胺(2.58g,20mmol)，室温下反应24h，加入二氯甲烷100mL，水洗3次后，使用无水硫酸钠干燥，浓缩后，使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇＝20:1至5:1)得到8-((3-羟基环丁基)氨基)辛酸1-辛基壬酯(3.23g,69%)。

[0126] 实施例15:化合物18的合成

[0127] 

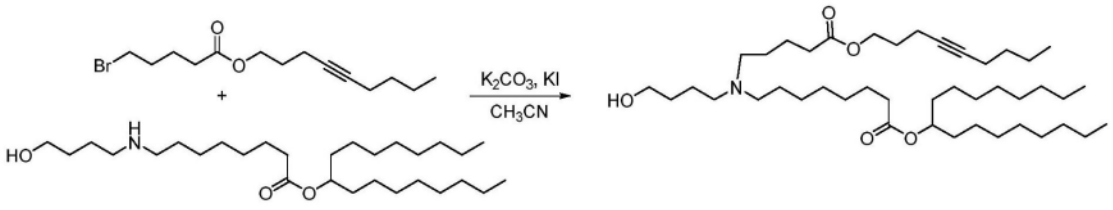
[0128] 在100mL的反应瓶中依次加入8-((3-羟基环丁基)氨基)辛酸1-辛基壬酯(468mg,1mmol)，8-溴辛酸4-壬炔-1-基酯(414mg,1.2mmol)，乙腈20mL，搅拌溶解后，再加入碳酸钾(276mg,2mmol)，碘化钾(166mg,1mmol)，室温下反应24h，加入二氯甲烷100mL，水洗3次后，使用无水硫酸钠干燥，浓缩后，使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇＝20:1至5:1)得到化合物18(600mg,82%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ:ppm 4.90(m,1H);4.68 (m,2H);3.68-3.44(m,1H);2.79-2.36(m,10H);2.29(m,3H);1.78-1.46(m,14H); 1.42-1.16(m,44H);0.89(m,9H).ESI-MS calculated for $C_{46}H_{86}NO_5^+$[M+H]$^+$ 732.7,found 732.7。

[0129] 实施例16:5-溴戊酸4-壬炔-1-基酯的合成

[0130] 

[0131] 在100mL的反应瓶中依次加入5-溴戊酸(1.81g,10mmol)，4-壬炔-1-醇(1.4 g,10mmol)，二氯甲烷30mL，搅拌溶解后，再加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(2.3g,12mmol)，4-二甲氨基吡啶(0.06g,0.5mmol)，N,N-二异丙基乙胺(2.58g,20mmol)室温下反应2h，水洗3次后，使用无水硫酸钠干燥，浓缩后，使用快速柱层析系统纯化(正己烷:乙酸乙酯＝10:1至 2:1)得到5-溴戊酸4-壬炔-1-基酯(2.7g,89%)。

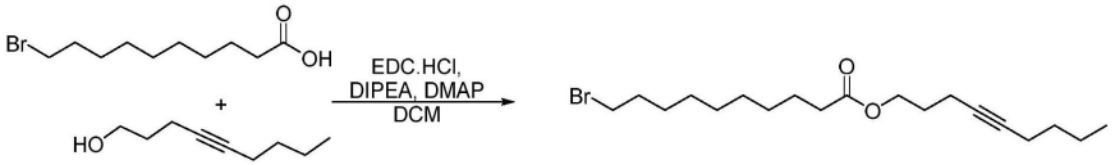
[0132] 实施例17:化合物22的合成

[0133] 

[0134] 在100mL的反应瓶中依次加入8-((4-羟丁基)氨基)辛酸1-辛基壬酯(442mg,1mmol)，5-溴戊酸4-壬炔-1-基酯(364mg,1.2mmol)，乙腈20mL，搅拌溶解后，再加入碳酸钾(276mg,2mmol)，碘化钾(166mg,1mmol)，室温下反应24h，加入二氯甲烷100mL，水洗3次后，使用无水硫酸钠干燥，浓缩后，使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇＝20:1至5:1)得到化合物22 (581mg,84%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ:ppm 4.91(m,1H);4.68(m, 2H);3.68-

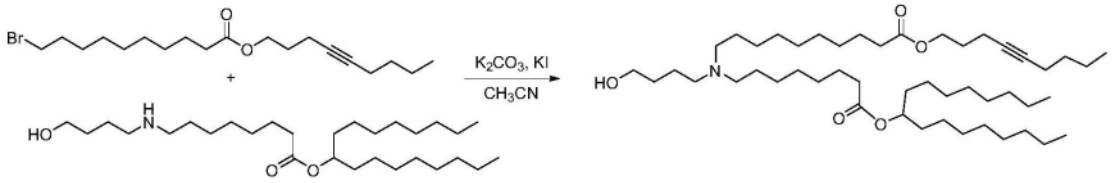
3.44(m,2H);2.79-2.36(m,10H);2.29(m,4H);1.78-1.46(m,14H); 1.42-1.16(m,38H); 0.89(m,9H).ESI-MS calculated for $C_{43}H_{82}NO_5^+[M+H]^+$ 692.6,found 692.7。

[0135] 实施例18:10-溴癸酸4-壬炔-1-基酯的合成

[0136] 

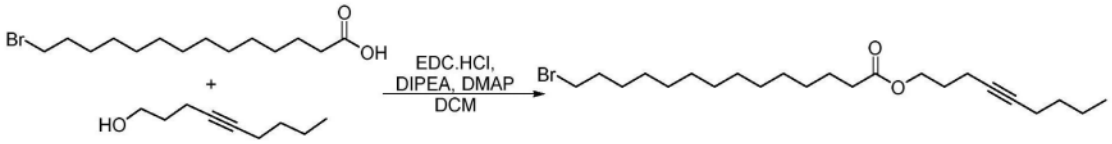
[0137] 在100mL的反应瓶中依次加入10-溴癸酸(2.51g,10mmol),4-壬炔-1-醇 (1.4g,10mmol),二氯甲烷30mL,搅拌溶解后,再加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(2.3g,12mmol),4-二甲氨基吡啶(0.06g,0.5 mmol),N,N-二异丙基乙胺(2.58g,20mmol)室温下反应2h,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(正己烷:乙酸乙酯= 10:1至2:1)得到10-溴癸酸4-壬炔-1-基酯(2.95g,79%)。

[0138] 实施例19:化合物23的合成

[0139] 

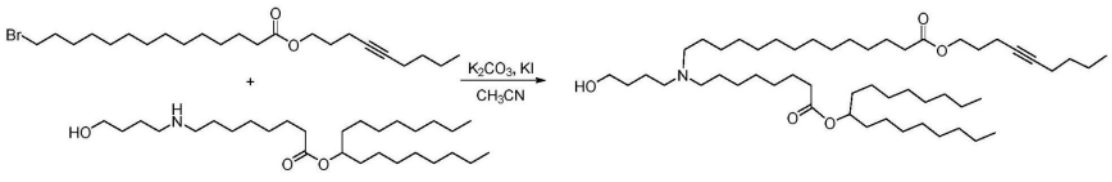
[0140] 在100mL的反应瓶中依次加入8-((2-羟丁基)氨基)辛酸1-辛基壬酯(442 mg,1mmol),10-溴癸酸4-壬炔-1-基酯(373mg,1.2mmol),乙腈20mL,搅拌溶解后,再加入碳酸钾(276mg,2mmol),碘化钾(166mg,1mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1至5:1)得到化合物23(648mg,85%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ:ppm 4.90(m,1H);4.67(m, 2H);3.69-3.43(m,2H);2.76-2.34(m,10H);2.28(m,4H);1.79-1.47(m,14H); 1.44-1.18(m,48H); 0.88(m,9H).ESI-MS calculated for $C_{48}H_{92}NO_5^+[M+H]^+$ 762.7,found 762.7。

[0141] 实施例20:14-溴十四酸4-壬炔-1-基酯的合成

[0142] 

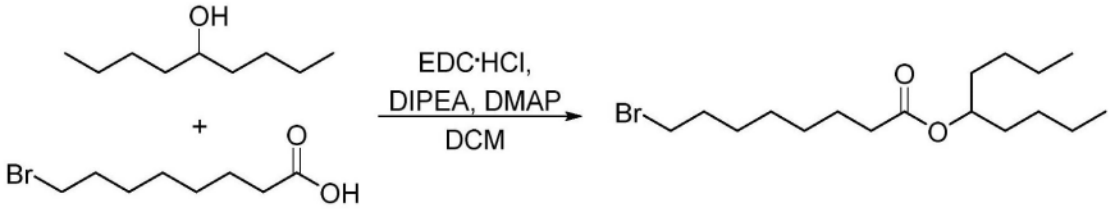
[0143] 在100mL的反应瓶中依次加入14-溴十四酸(3.07g,10mmol),4-壬炔-1- 醇(1.4g,10mmol),二氯甲烷30mL,搅拌溶解后,再加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(2.3g,12mmol),4-二甲氨基吡啶(0.06g,0.5 mmol),N,N-二异丙基乙胺(2.58g,20mmol)室温下反应2h,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(正己烷:乙酸乙酯= 10:1至2:1)得到14-溴十四酸4-壬炔-1-基酯(3.51g,82%)。

[0144] 实施例21:化合物24的合成

[0145] 

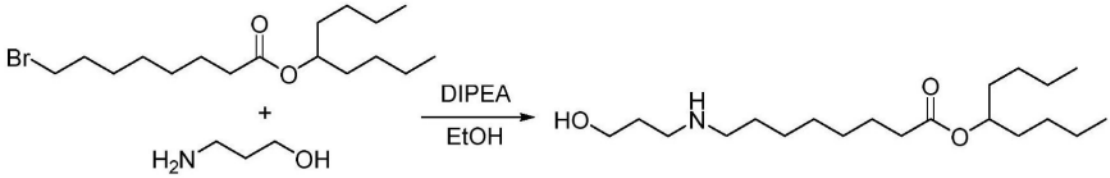
[0146] 在100mL的反应瓶中依次加入8-((4-羟丁基)氨基)辛酸1-辛基壬酯(442mg,1mmol),14-溴十四酸4-壬炔-1-基酯(429mg,1.2mmol),乙腈20mL,搅拌溶解后,再加入碳酸钾(276mg,2mmol),碘化钾(166mg,1mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1至5:1)得到化合物 24(654mg,80%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ:ppm 4.90(m,1H);4.67(m, 2H);3.69-3.43(m,2H);2.76-2.34(m,10H);2.28(m,4H);1.79-1.47(m,14H); 1.44-1.18(m,56H);0.88(m,9H).ESI-MS calculated for $C_{52}H_{100}NO_5^+[M+H]^+$ 818.7,found 818.8。

[0147] 实施例22:8-溴辛酸壬基-5-酯的合成

[0148] 

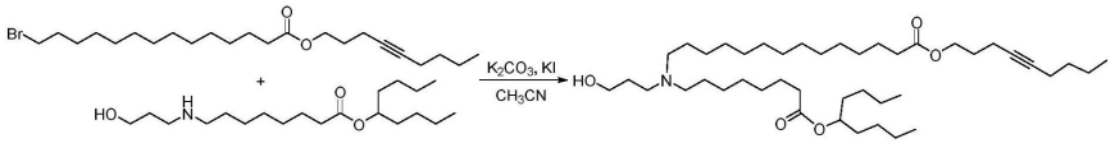
[0149] 在250mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸(22.3g,100mmol),5-壬醇(14.4 g,100mmol),二氯甲烷100mL,搅拌溶解后,再加入1-(3-二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺盐酸盐(23.0g,120mmol),4-二甲氨基吡啶(0.61g,5mmol), N,N-二异丙基乙胺(25.8g,200mmol)室温下反应2h,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(正己烷:乙酸乙酯=10:1 至3:1)得到8-溴辛酸壬基-5-酯(27.9g,82%)。

[0150] 实施例23:8-((3-羟丙基)氨基)辛酸壬基-5-酯的合成

[0151] 

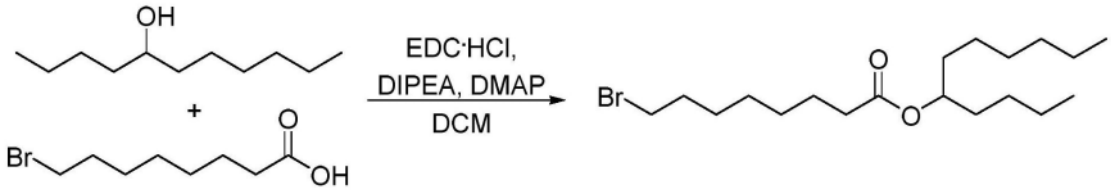
[0152] 在100mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸壬基-5-酯(3.49g,10mmol),3- 氨基-1-丙醇(7.5g,100mmol),乙醇30mL,搅拌溶解后,再加入N,N-二异丙基乙胺(2.58g,20mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3 次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1至5:1)得到8-((3-羟丙基)氨基)辛酸壬基-5-酯(2.57g,75%)。

[0153] 实施例24:化合物25的合成

[0154] 

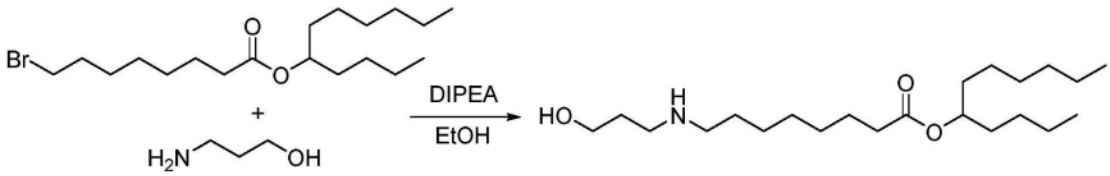
[0155] 在100mL的反应瓶中依次加入8-((3-羟丙基)氨基)辛酸壬基-5-酯(343 mg,1mmol),14-溴十四酸4-壬炔-1-基酯(429mg,1.2mmol),乙腈20mL,搅拌溶解后,再加入碳酸钾(276mg,2mmol),碘化钾(166mg,1mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1至5:1)得到化合物25(574mg,83%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ:ppm 4.90(m,1H);4.67(m, 2H);3.69-3.43(m,2H);2.76-2.34(m,10H);2.28(m,4H);1.79-1.47(m,14H); 1.44-1.18(m,38H);0.88(m,9H).ESI-MS calculated for $C_{43}H_{82}NO_5^+[M+H]^+$ 692.6,found 692.7。

[0156] 实施例25:十一烷-5-基8-溴辛酸酯的合成

[0157] 

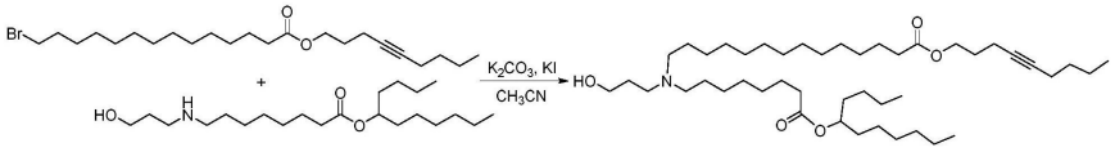
[0158] 在250mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸(22.3g,100mmol),十一烷-5- 醇(17.2g,100mmol),二氯甲烷100mL,搅拌溶解后,再加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(23.0g,120mmol),4-二甲氨基吡啶(0.61g, 5mmol),N,N-二异丙基乙胺(25.8g,200mmol)室温下反应2h,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(正己烷:乙酸乙酯=10:1至3:1)得到十一烷-5-基8-溴辛酸酯(29.7g,79%)。

[0159] 实施例26:8-(3-羟基-丙基氨基)-辛酸1-丁基庚酯的合成

[0160] 

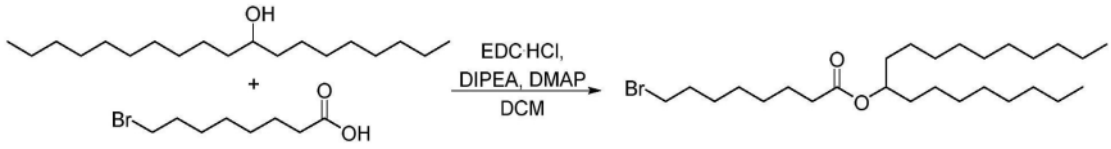
[0161] 在100mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸1-丁基庚酯(3.49g,10mmol), 3-氨基-1-丙醇(7.5g,100mmol),乙醇30mL,搅拌溶解后,再加入N,N-二异丙基乙胺(2.58g,20mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1至5:1)得到8-(3-羟基-丙基氨基)-辛酸1-丁基庚酯(2.93 g,79%)。

[0162] 实施例27:化合物26的合成

[0163] 

[0164] 在100mL的反应瓶中依次加入8-(3-羟基-丙基氨基)-辛酸1-丁基庚酯(371 mg,1mmol),14-溴十四酸4-壬炔-1-基酯(429mg,1.2mmol),乙腈20mL,搅拌溶解后,再加入碳酸钾(276mg,2mmol),碘化钾(166mg,1mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1至5:1)得到化合物26(583mg,81%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$) δ:ppm 4.90(m,1H);4.67(m, 2H);3.69-3.43(m,2H);2.76-2.34(m,10H);2.28(m,4H);1.79-1.47(m,14H); 1.44-1.18(m,42H);0.88(m,9H).ESI-MS calculated for $C_{45}H_{86}NO_5^+$[M+H]$^+$ 720.7,found 720.8。

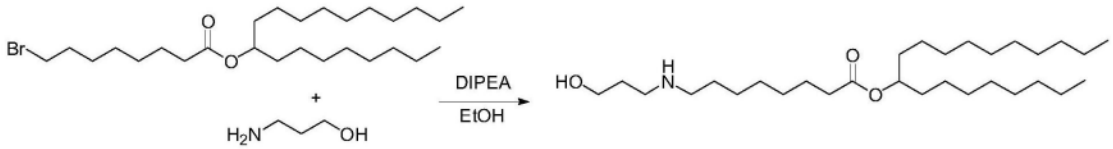
[0165] 实施例28:8-溴辛酸1-辛基十一烷基酯的合成

[0166] 

[0167] 在250mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸(22.3g,100mmol),9-十九醇(28.4 g,100mmol),二氯甲烷100mL,搅拌溶解后,再加入1-(3-二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺盐酸盐(23.0g,120mmol),4-二甲氨基吡啶(0.61g,5mmol), N,N-二异丙基乙胺(25.8g,

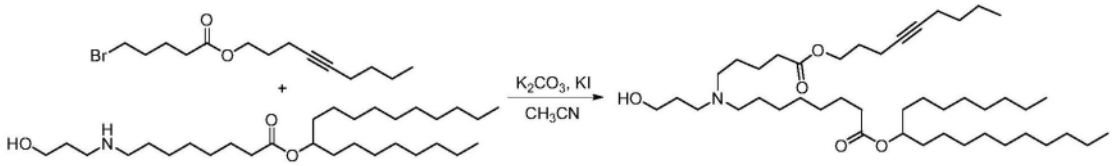
200mmol)室温下反应2h,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(正己烷:乙酸乙酯=10:1 至3:1)得到8-溴辛酸1-辛基十一烷基酯(38.1g,79%)。

[0168] 实施例29:8-((3-羟丙基)氨基)辛酸1-辛基十一烷基酯的合成

[0169] 

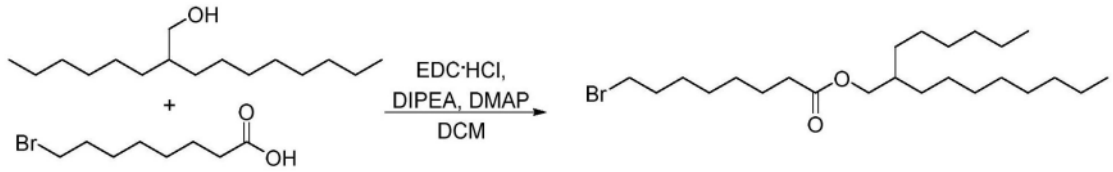
[0170] 在100mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸1-辛基十一烷基酯(4.89g,10 mmol),3-氨基-1-丙醇(7.5g,100mmol),乙醇30mL,搅拌溶解后,再加入 N,N-二异丙基乙胺(2.58g,20mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100 mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化 (二氯甲烷:甲醇=20:1至5:1)得到8-((3-羟丙基)氨基)辛酸1-辛基十一烷基酯(3.97g,72%)。

[0171] 实施例30:化合物27的合成

[0172] 

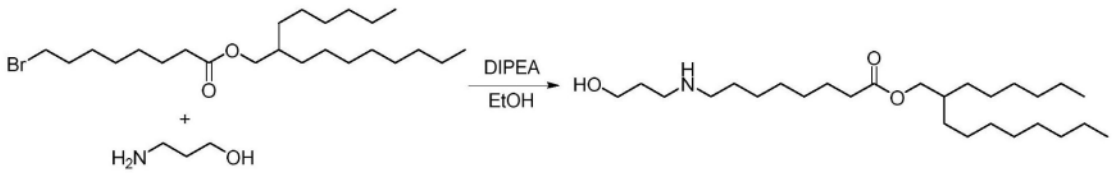
[0173] 在100mL的反应瓶中依次加入8-((3-羟丙基)氨基)辛酸1-辛基十一烷基酯(371mg,1mmol),5-溴戊酸4-壬炔-1-基酯(364mg,1.2mmol),乙腈20mL,搅拌溶解后,再加入碳酸钾(276mg,2mmol),碘化钾(166mg,1mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1至5:1)得到化合物27(536mg,76%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ:ppm 4.90(m,1H);4.67 (m,2H);3.69-3.43(m,2H);2.76-2.34(m,10H);2.28(m,4H);1.79-1.47(m,14H); 1.44-1.18(m,40H);0.88(m,9H).ESI-MS calculated for $C_{44}H_{84}NO_5^+$[M+H]$^+$ 706.6,found 706.6。

[0174] 实施例31:8-溴辛酸2-己基癸酯的合成

[0175] 

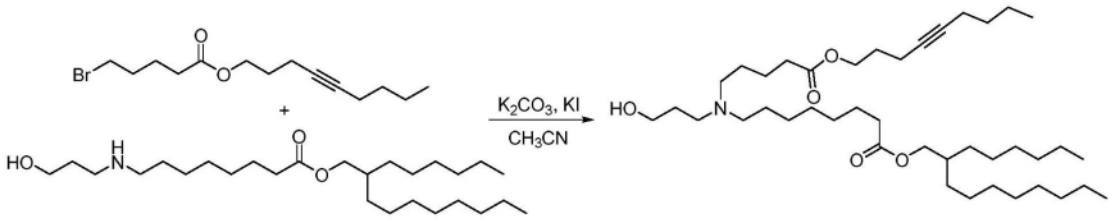
[0176] 在250mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸(22.3g,100mmol),2-己基癸烷 -1-醇(24.2g,100mmol),二氯甲烷100mL,搅拌溶解后,再加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(23.0g,120mmol),4-二甲氨基吡啶(0.61 g,5mmol),N,N-二异丙基乙胺(25.8g,200mmol)室温下反应2h,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(正己烷:乙酸乙酯=10:1至3:1)得到8-溴辛酸2-己基癸酯(38.1g,79%)。

[0177] 实施例32:8-((3-羟丙基)氨基)辛酸2-己基癸酯的合成

[0178] 

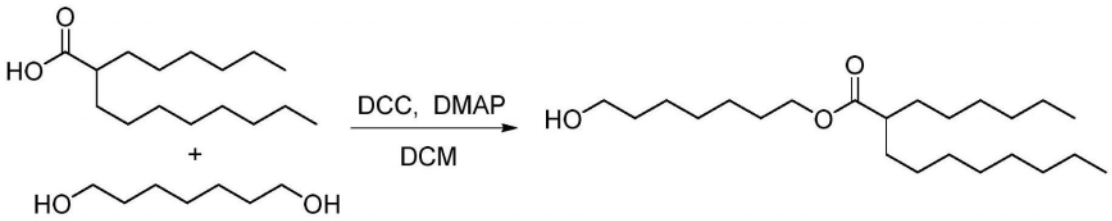
[0179] 在100mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸2-己基癸酯(4.89g,10mmol)，3-氨基-1-丙醇(7.5g,100mmol)，乙醇30mL，搅拌溶解后，再加入N,N-二异丙基乙胺(2.58g,20mmol)，室温下反应24h，加入二氯甲烷100mL，水洗3次后，使用无水硫酸钠干燥，浓缩后，使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇＝20:1至5:1)得到8-((3-羟丙基)氨基)辛酸2-己基癸酯(3.35g，76%)。

[0180] 实施例33:化合物28的合成

[0181] 

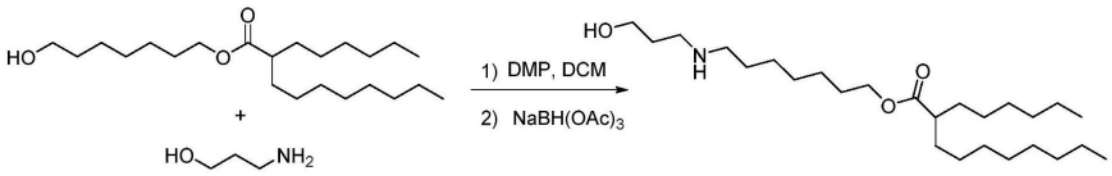
[0182] 在100mL的反应瓶中依次加入8-((3-羟丙基)氨基)辛酸2-己基癸酯(441 mg，1mmol)，5-溴戊酸4-壬炔-1-基酯(364mg,1.2mmol)，乙腈20mL，搅拌溶解后，再加入碳酸钾(276mg,2mmol)，碘化钾(166mg,1mmol)，室温下反应24h，加入二氯甲烷100mL，水洗3次后，使用无水硫酸钠干燥，浓缩后，使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇＝20:1至5:1)得到化合物28(471mg,71%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ:ppm 4.90(m,1H);4.67(m,2H);3.69-3.43(m,2H);2.76-2.34(m,10H);2.28(m,4H);1.79-1.47(m,14H); 1.44-1.18(m,34H);0.88(m,9H).ESI-MS calculated for $C_{41}H_{78}NO_5^+$[M+H]$^+$ 664.6,found 664.6。

[0183] 实施例34:2-己基癸酸7-羟基庚酯的合成

[0184] 

[0185] 在250mL的反应瓶中依次加入2-正己基癸酸(25.6g,100mmol)，1,7-庚二醇(66.0g,0.5mol)，二氯甲烷150mL，搅拌溶解后，再加入二环己基碳二亚胺(20.6g，100mmol)，4-二甲氨基吡啶(0.61g,5mmol)，室温下反应2h，水洗3次后，使用无水硫酸钠干燥，浓缩后，使用快速柱层析系统纯化(正己烷:乙酸乙酯＝5:1至1:1)得到2-己基癸酸7-羟基庚酯(22.6g,61%)。

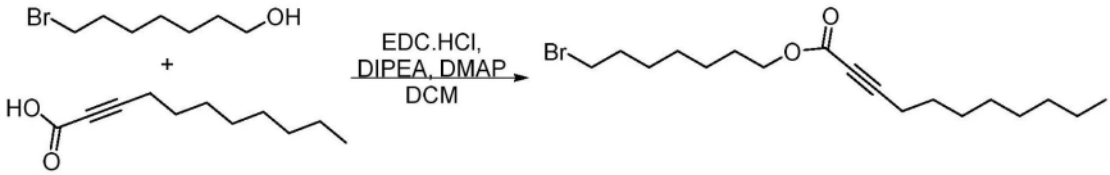
[0186] 实施例35:7-((3-羟丙基)氨基)2-己基癸酸庚酯的合成

[0187] 

[0188] 在250mL的反应瓶中依次加入2-己基癸酸7-羟基庚酯(3.7g,10mmol)，二氯甲烷100mL，戴斯-马丁氧化剂(5.09g,12mmol)，室温下搅拌反应12h 后，加入碳酸氢钠饱和溶液洗涤三次后，水洗一次，无水硫酸钠干燥后，滤除干燥剂，并用10mL二氯甲烷洗涤干燥剂，合并后加入三乙酰氧基硼氢化钠(3.18g,15mmol)，再加入3-氨基-1-丙醇(7.5g,100mmol)，室温下反应 24h，水洗3次后，使用无水硫酸钠干燥，浓缩后，使用快速柱层析系统纯化 (二氯

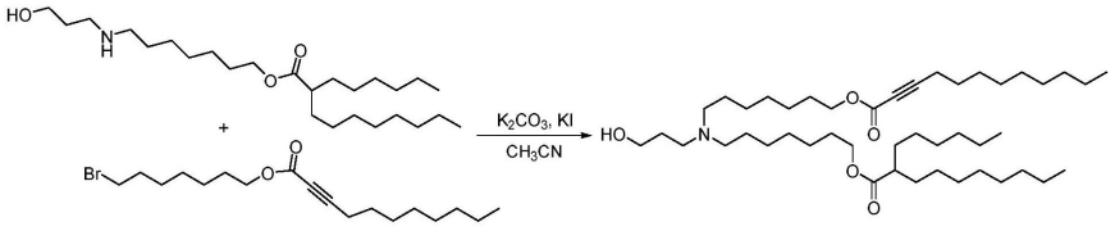
甲烷:甲醇＝20:1至5:1)得到7-((3-羟丙基)氨基)2-己基癸酸庚酯(3.03g,71%)。

[0189] 实施例36:十一烷基-2-炔酸7-溴庚酯的合成

[0190] 

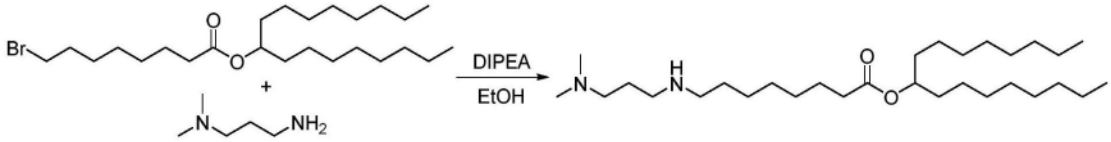
[0191] 在250mL的反应瓶中依次加入8-溴庚醇(19.5g,100mmol),2-十一炔酸(18.2g,100mmol),二氯甲烷100mL,搅拌溶解后,再加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(23.0g,120mmol),4-二甲氨基吡啶(0.61g,5 mmol),N,N-二异丙基乙胺(25.8g,200mmol)室温下反应2h,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(正己烷:乙酸乙酯＝10:1至3:1)得到十一烷基-2-炔酸7-溴庚酯(25.4g,71%)。

[0192] 实施例37:化合物29的合成

[0193] 

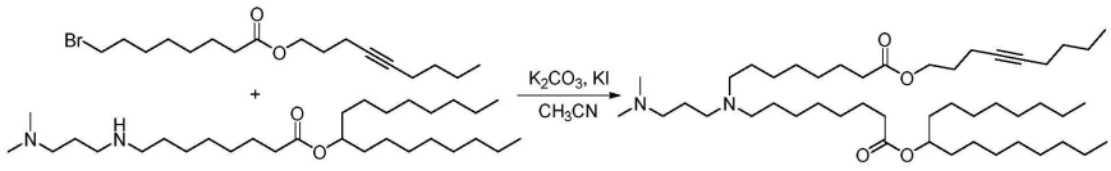
[0194] 在100mL的反应瓶中依次加入7-((3-羟丙基)氨基)2-己基癸酸庚酯(427 mg,1mmol),十一烷基-2-炔酸7-溴庚酯(431mg,1.2mmol),乙腈20mL,搅拌溶解后,再加入碳酸钾(276mg,2mmol),碘化钾(166mg,1mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇＝20:1至5:1)得到化合物29(454mg,63%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ:ppm 4.88(m,4H); 3.67-3.43(m,2H);2.76-2.14(m,9H);1.79-1.47(m,12H);1.44-1.18(m,48H); 0.89(m,9H).ESI-MS calculated for $C_{45}H_{86}NO_5^+$[M+H]$^+$720.7,found 720.8。

[0195] 实施例38:8-((3-(二甲基氨基)丙基)氨基)辛酸1-辛基壬酯的合成

[0196] 

[0197] 在100mL的反应瓶中依次加入8-溴辛酸1-辛基壬酯(4.61g,10mmol), N,N-二甲基丙二胺(8.9g,100mmol),乙醇30mL,搅拌溶解后,再加入N,N- 二异丙基乙胺(2.58g,20mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇＝20:1至5:1)得到8-((3-(二甲基氨基)丙基)氨基)辛酸1-辛基壬酯(3.62g,75%)。

[0198] 实施例39:化合物31的合成

[0199] 

[0200] 在100mL的反应瓶中依次加入庚烷8-((3-(二甲基氨基)丙基)氨基) 辛酸1-辛基壬酯(482mg,1mmol),8-溴辛酸4-壬炔-1-基酯(414mg,1.2 mmol),乙腈20mL,搅拌溶解后,再加入碳酸钾(276mg,2mmol),碘化钾 (166mg,1mmol),室温下反应24h,加入二氯甲烷100mL,水洗3次后,使用无水硫酸钠干燥,浓缩后,使用快速柱层析系统纯化(二氯甲烷:甲醇= 20:1至5:1)得到化合物31(537mg,72%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ: ppm 4.91(m,1H);4.68(m,2H);2.79-2.36(m,20H);2.29(m,4H);1.78-1.46(m, 14H);1.42-1.16(m,42H);0.89(m,9H).ESI-MS calculated for $C_{47}H_{91}N_2O_4^+$ $[M+H]^+$747.7,found 747.8。

[0201] 实施例40:氨基脂质化合物制备的脂质纳米颗粒的荧光素酶mRNA体内递送性能评价

[0202] 脂质纳米颗粒的制备:

[0203] 制剂方法一:将本发明中所述的氨基脂质化合物与DOPE,胆固醇, PEG2000-DMG按摩尔比为45:10:42.5:2.5的比例混合溶解在无水乙醇中。使用两个微量注射泵,控制其配比为乙醇溶液与醋酸钠溶液(50mM, pH=4.0)的比例为1:3,在微流道芯片中制得脂质纳米颗粒的粗溶液,再使用透析盒(Fisher,MWCO 20,000)在1X PBS、控温4℃下透析6h,使用前用0.22μm的微孔滤膜过滤。氨基脂质化合物与荧光素酶mRNA(Fluc mRNA) 的质量比约为10:1。作为皮下和肌注的给药方式。

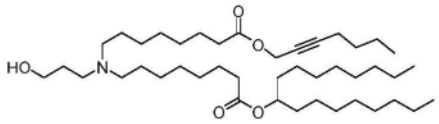
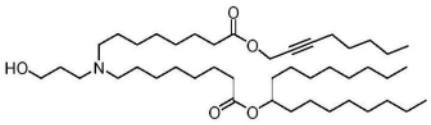
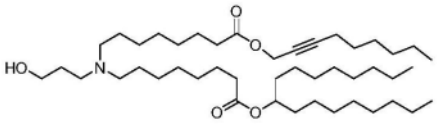
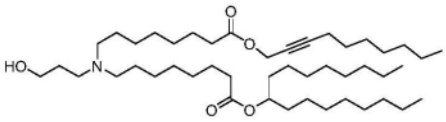
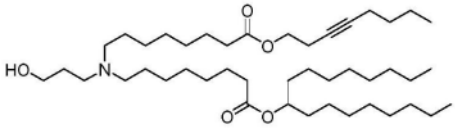
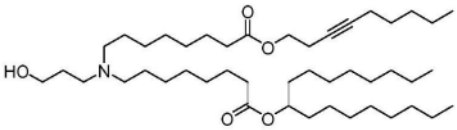
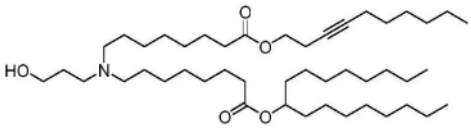
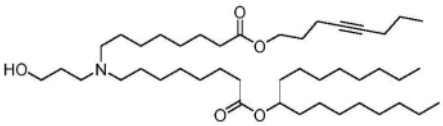
[0204] 制剂方法二:氨基脂质化合物与DSPC,胆固醇,PEG2000-DMG的摩尔比为 50:10:38.5:1.5,制备方法同方法一。作为尾静脉的给药方式。

[0205] 动物准备:选取6周龄的雄性BALB/c小鼠,体重在20g左右,饲养环境为 SPF级的饲养室,动物试验严格按照国家健康机构的指南以及动物伦理要求进行。

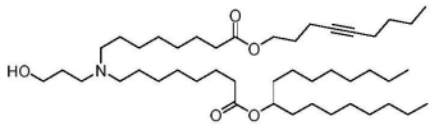
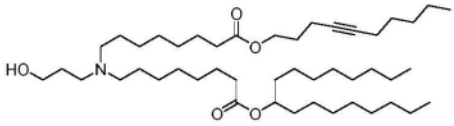
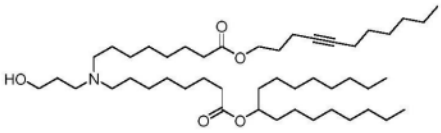
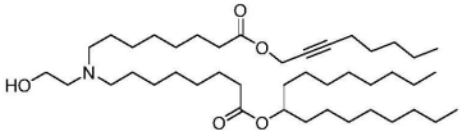
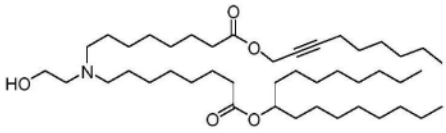
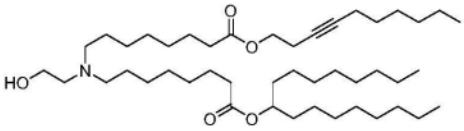
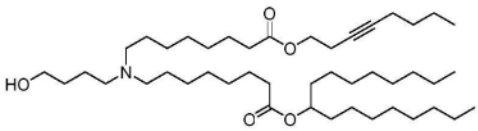
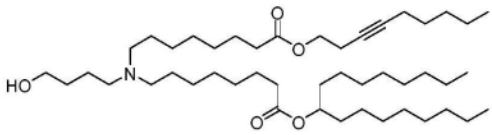
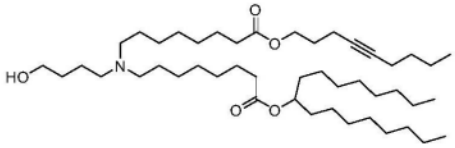
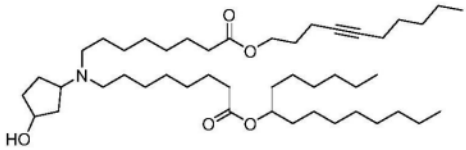
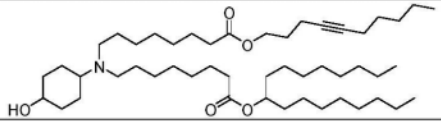
[0206] 体内递送:每组随机选取9只小鼠,按0.5mg/kg的用量,分别使用皮下、肌注和尾静脉三种给药方法注射脂质纳米颗粒(每种给药方式三只)。6小时后,分别往每只小鼠体内通过尾静脉注射200μL 10mg/mL的D-荧光素钾盐, 10分钟后,将小鼠放置于活体成像系统(IVIS-200,Xenogen)下,观察每只小鼠总的萤光强度,并拍照记录下来。代表性氨基脂质化合物三种给药方式递送 Fluc mRNA的表达强度见表1-3。DLin-MC3作为对照,未引入炔基的氨基脂质化合物(36,37)与其对应的引入炔基后的氨基脂质化合物(17,31)在的体内递送研究中,引入炔基后的递送能力得到显著增强。

[0207] 表1:代表性氨基脂质化合物皮下给药递送Fluc mRNA的表达强度。

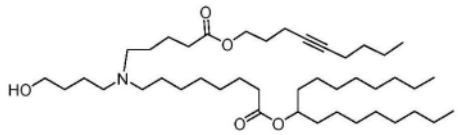
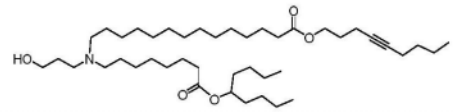
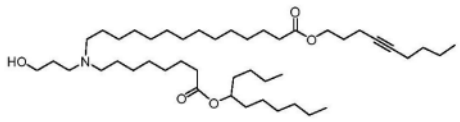
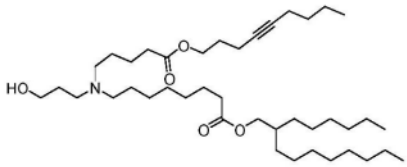
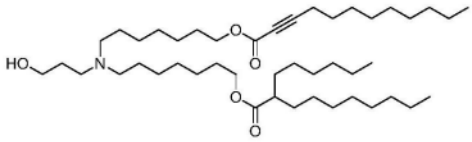
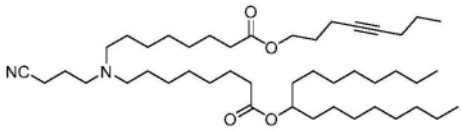
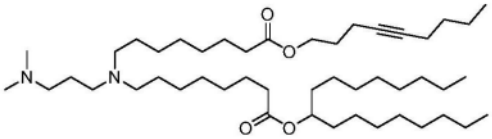
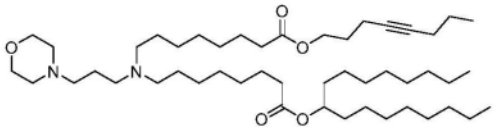
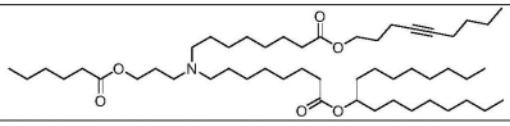
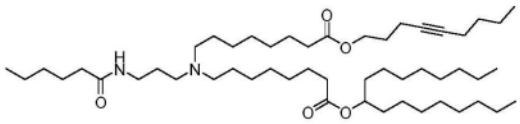
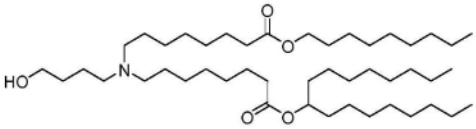
[0208]

编号	结构	平均萤光强度（皮下）
1		1.4E+07
2		1.1E+07
3		2.1E+06
4		2.1E+05
5		7.1E+06
6		2.1E+06
7		2.1E+05
8		7.1E+06

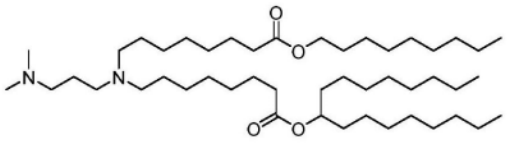
[0209]

9		2.7E+06
10		3.1E+05
11		2.1E+05
12		3.2E+07
13		2.6E+07
14		2.1E+06
15		3.1E+05
16		2.7E+06
17		2.5E+06
20		3.7E+07
21		4.1E+06

[0210]

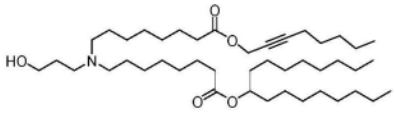
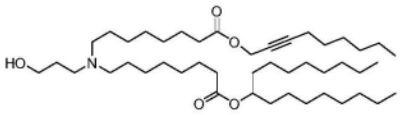
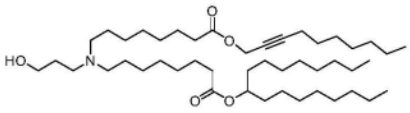
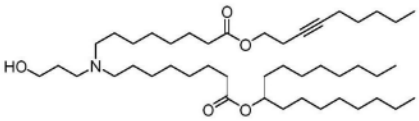
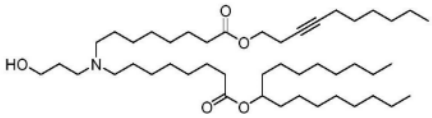
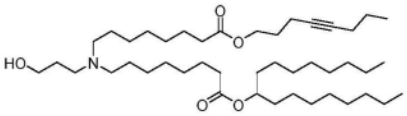
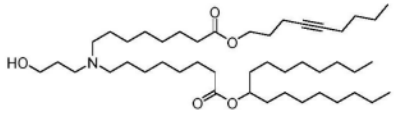
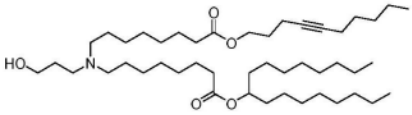
22		2.8E+07
25		2.6E+07
26		1.7E+06
28		2.1E+06
29		8.1E+06
30		7.1E+06
31		5.1E+05
32		7.1E+05
33		3.1E+06
34		5.3E+05
35	**DLin-MC3**	4.1E+04
36		1.1E+05

[0211]

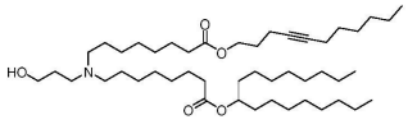
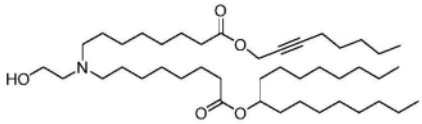
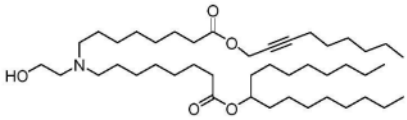
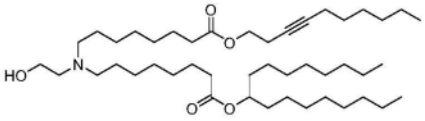
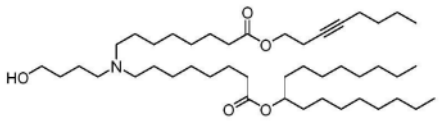
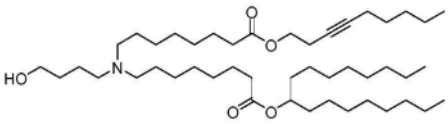
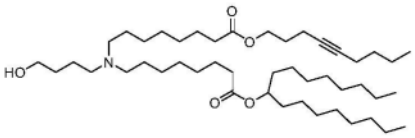
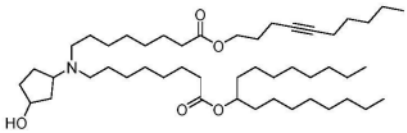
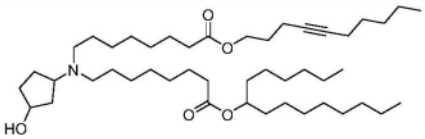
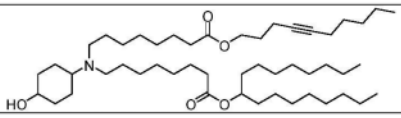
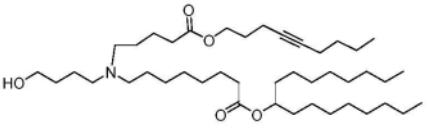
37		2.0E+05

[0212] 表2:代表性氨基脂质化合物肌注给药递送Fluc mRNA的表达强度。

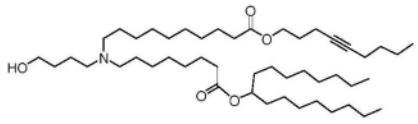
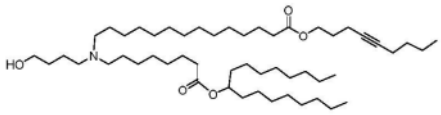
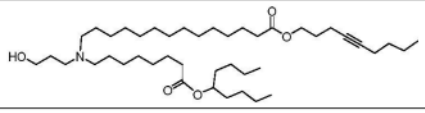
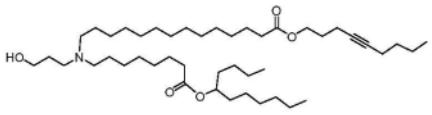
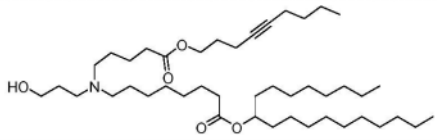
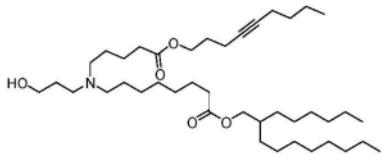
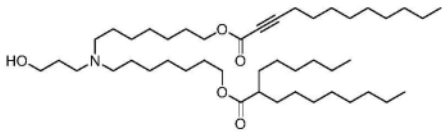
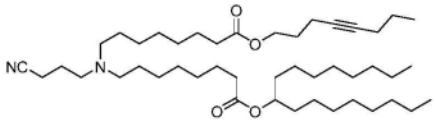
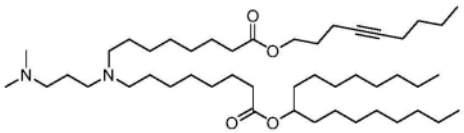
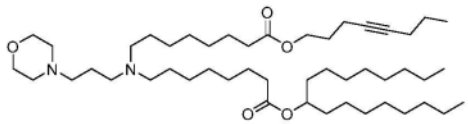
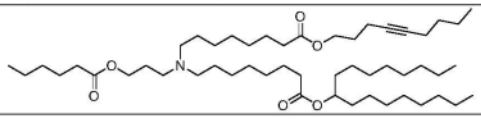
[0213]

编号	结构	平均萤光强度（肌注）
2		2.4E+06
3		2.1E+06
4		2.1E+06
6		2.1E+05
7		4.1E+05
8		2.1E+07
9		5.1E+06
10		2.1E+05

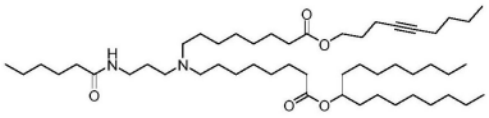
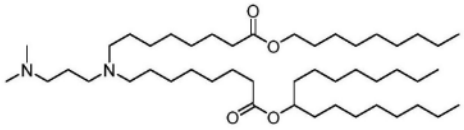
[0214]

11		2.1E+06
12		2.1E+06
13		2.1E+06
14		4.1E+06
15		2.8E+07
16		1.4E+07
17		2.7E+06
19		2.1E+05
20		5.2E+05
21		1.1E+07
22		3.1E+05

[0215]

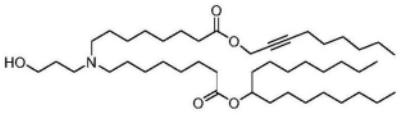
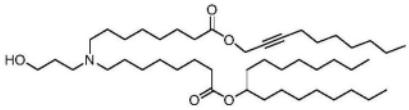
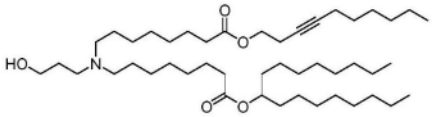
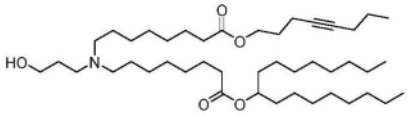
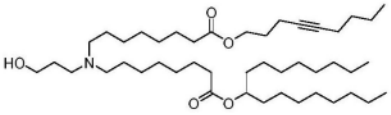
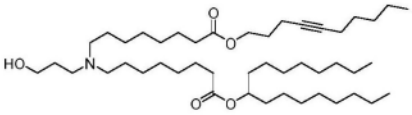
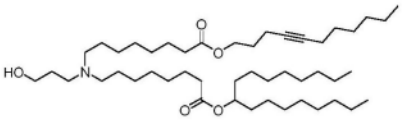
23		2.7E+05
24		2.1E+05
25		2.1E+05
26		6.1E+07
27		2.1E+07
28		6.1E+07
29		1.8E+07
30		1.1E+07
31		1.5E+07
32		2.8E+07
33		1.1E+07

[0216]

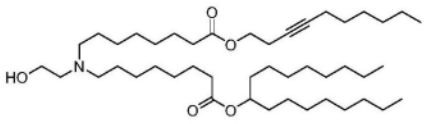
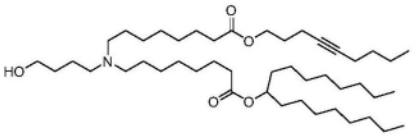
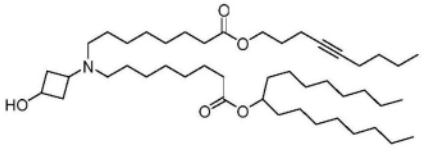
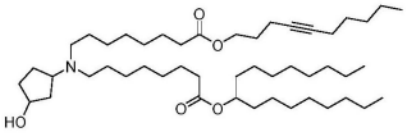
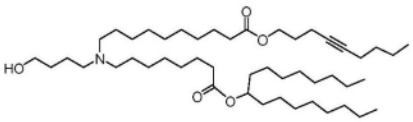
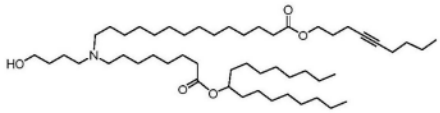
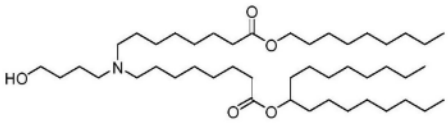
34		4.8E+06
35	DLin-MC3	3.9E+03
37		2.5E+06

[0217] 表3:代表性氨基脂质化合物尾静脉给药递送Fluc mRNA的表达强度。

[0218]

编号	结构	平均萤光强度（尾静脉）
3		2.1E+07
4		2.9E+07
7		8.1E+06
8		6.1E+06
9		2.8E+07
10		2.5E+07
11		5.1E+07

[0219]

14		1.1E+07
17		5.1E+07
18		7.1E+07
19		9.1E+06
23		6.1E+07
24		7.8E+06
35	DLin-MC3	6.2E+06
36		4.2E+05

[0220] 缩写列表

[0221] DNA 脱氧核糖核酸

[0222] RNA 核糖核酸

[0223] DOPE 二油酰基磷脂酰乙醇胺

[0224] DSPC 二硬脂酰磷脂酰胆碱

[0225] PEG2000-DMG 1-(单甲氧基聚乙二醇)-2,3二肉豆寇酰基甘油

[0226] kD 千道尔顿

[0227] PBS 磷酸盐缓冲溶液。