(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101842347 B
(45)授权公告日 2014.06.11

(21)申请号 200880113639.3
(22)申请日 2008.08.20
(30)优先权数据
10-2007-0086524 2007.08.28 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2010.04.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2008/004819 2008.08.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2009/028824 EN 2009.03.05
(73)专利权人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔
专利权人 首尔大学校产学协力团
(72)发明人 吴裕耕 徐玟成 辛惠贞 沈嘉蓉
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
代理人 康健 林晓红
(51)Int.Cl.
C07C 237/04(2006.01)
(56)对比文件
WO 00/37046 A1,2000.06.29, 说明书第4-42页,权利要求1-46.
US 2003/0199090 A1,2003.10.23, 说明书第1-45页.
WO 2005/042590 A2,2005.05.12, 说明书第1-21页.
审查员 李享

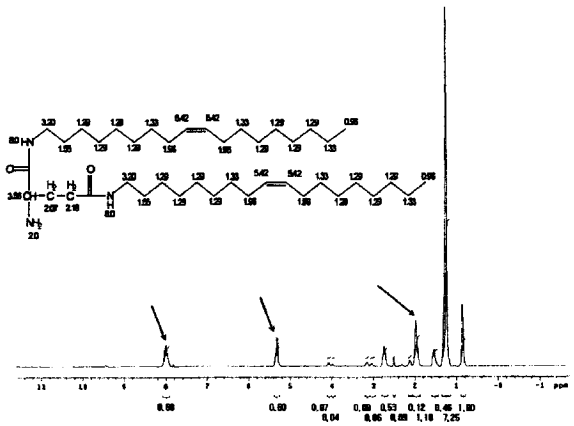
权利要求书2页 说明书19页 附图9页

(54)发明名称

阳离子脂质、其制备方法以及包含其的输送系统

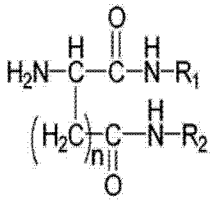
(57)摘要

本发明提供了新的阳离子脂质、制备其的方法以及包含其的输送系统。本发明的阳离子脂质用于制备核酸或者生理学活性阴离子蛋白质的输送系统。本发明的阳离子脂质可以通过简便的方法便利地制备和纯化,因此对于工业规模生产具有较高的经济学益处。再者,包含本发明的阳离子脂质的核酸或者蛋白质输送系统不仅明显改良具有生理学活性的希望的核酸药物(如DNA、RNA、siRNA、反义寡核苷酸以及核酸适体)或者阴离子蛋白质的胞内输送效率,而且也由于输送系统弱化的细胞毒性而用于增加核酸或者蛋白质药物的治疗效力。



CN 101842347 B

1. 包含如下化学式 (I) 所示的阳离子脂质的小干扰 RNA(siRNA) 输送系统 :



(I)

其中 :

n 是 1,且

R_1 和 R_2 独立地是 C_{12}-C_{20} 饱和或者不饱和脂肪烃基 ;其中所述输送系统由选自脂质体和乳状液的配制物组成。

2. 权利要求 1 的小干扰 RNA(siRNA) 输送系统,其进一步包含半乳糖衍生的脂质、甘露糖衍生的脂质、叶酸衍生的脂质、PEG- 衍生的脂质或者生物素衍生的脂质。

3. 权利要求 1 的小干扰 RNA(siRNA) 输送系统,其中所述输送系统由含有阳离子脂质和细胞融合磷脂的脂质体配制物组成。

4. 权利要求 3 的小干扰 RNA(siRNA) 输送系统,其中所述细胞融合磷脂是二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)。

5. 权利要求 3 的小干扰 RNA(siRNA) 输送系统,其中所述细胞融合磷脂是 1,2- 二植烷酰 -sn- 甘油 -3- 磷酸乙醇胺。

6. 权利要求 1 的小干扰 RNA(siRNA) 输送系统,其中所述输送系统由含有阳离子脂质和表面活性剂的乳状液配制物组成。

7. 权利要求 6 的小干扰 RNA(siRNA) 输送系统,其中所述表面活性剂是鲸蜡基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基溴化铵、十二烷基甜菜碱、十二烷基二甲基氧化胺、3-(N,N- 二甲基棕榈基铵基) 丙磺酸盐、Tween20、Tween80、Triton X-100、聚乙二醇单油基醚、三乙二醇单十二烷基醚、辛基葡萄糖苷或者 N- 壬酰基 -N- 甲基葡萄糖胺。

8. 权利要求 1 的小干扰 RNA(siRNA) 输送系统与小干扰 RNA(siRNA) 的复合物。

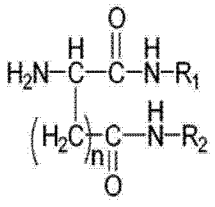
9. 预防或者治疗由于病原性蛋白质过表达所致疾病的组合物,其包含 权利要求 8 的小干扰 RNA(siRNA) 输送系统 / 小干扰 RNA(siRNA) 复合物作为活性成分。

10. 权利要求9的组合物,其中所述疾病选自肿瘤、关节炎、心血管疾病和内分泌疾病。

11. 权利要求 8 的小干扰 RNA(siRNA) 输送系统 / 小干扰 RNA(siRNA) 复合物在制备用于治疗由于病原性蛋白质过表达所致疾病的治疗剂中的应用。

12. 权利要求 11 的应用,其中所述疾病选自肿瘤、关节炎、心血管疾病和内分泌疾病。

13. 包含如下化学式 (I) 所示的阳离子脂质的小干扰 RNA(siRNA) 输送系统 :



(I)

其中：

所述由化学式 (I) 所示的阳离子脂质是二油酰天冬酰胺或二硬脂酰天冬酰胺；其中所述输送系统由选自脂质体和乳状液的配制物组成。

阳离子脂质、其制备方法以及包含其的输送系统

技术领域

[0001] 本发明涉及新的阳离子脂质、其制备方法以及包含其的输送系统。

背景技术

[0002] 随着近年来对于各种核酸如质粒 DNA、小干扰 RNA(siRNA)、微小 RNA 以及反义寡核苷酸的医学应用的阐述，认识到用于提供有效的核酸的细胞内输送的核酸输送材料和系统的重要性。

[0003] 在细胞内输送核酸材料的核酸输送系统可以广泛分为病毒载体和非病毒载体系统。

[0004] 举例的非病毒载体系统可包含各种类型配制物，如脂质体、阳离子聚合物、微团、乳状液、纳米粒子等。在这些配制物的组成成分中，阳离子脂质提供与带负电核酸的静电结合力，因此对于设计核酸输送系统很关键。阳离子脂质与带负电核酸分子通过稳定的离子键形成复合颗粒。然后，所得复合颗粒被输送至靶细胞以用于治疗性用途或应用，例如通过细胞膜融合或者细胞胞吞作用。

[0005] 通过组合中性脂肪酸与含胺化合物如伯胺、仲胺、叔胺或者季铵盐开发了具有阳离子度 (cationicity) 的常规阳离子脂质。

[0006] 先前的输送核酸的阳离子脂质是由 Felgner 研究小组在 1987 年合成的 N-[1-(2,3- 二油氧基) 丙基]-N,N,N- 三乙基氯化铵 (DOTMA)，其是阳离子四氨基脂质。DOTMA 通过与已知具有细胞膜融合活性的二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 形成阳离子脂质体而用于基因转移。DOTMA 具有疏水性 (亲脂性) 部分，其由具有双键的 C_{18}- 脂族基团以及通过具有醚连接键的间隔臂与亲脂性基团连接的季铵基团组成。DOTMA 具有高基因转移效率，但是呈现出如高细胞毒性及需要众多复杂的合成过程。

[0007] 为了解决 DOTMA 的潜在毒性问题以及改善核酸的细胞内输送效率，已经开发了 DOTMA 的多种衍生物，包括 1,2- 二肉豆蔻基氧丙基 -3- 二甲基羟基乙基溴化铵 (DMRIE)、N-[1-(2,3- 二油基氧) 丙基]-N,N,N- 三甲基铵硫酸 甲酯 (DOTAP)、2,3- 二油基氧 -N-[2-(精胺甲酰胺) 乙基]-N,N- 二甲基 -1- 丙烷铵三氟乙酸盐 (DOSPA) 等。

[0008] 此外，已经合成了胆固醇的一些衍生物用以输送核酸如 DNA，其包括 3β-[N-(N′,N′- 二甲基氨基乙烷) 氨甲酰] 胆固醇 (DC-Chol)、二甲基 - 二 - 十八烷基溴化铵 (DDAB)、N-(α- 三甲基铵基乙酰)- 二 - 十二烷基 -D- 氯化谷氨酸 (TMAC) 以及二 - 十八烷基氨基甘氨酸精胺 (DOGS)。

[0009] 根据其结构和正电荷的数目，这些阳离子脂质可以分为 :1) 阳离子脂质 (如 DC-Chol、DDAB 和 TMAC)，其通过在脂质的头基团 (head group) 中存在叔胺或者季铵或者存在羟乙基季铵而提供一个正电荷 ;以及 2) 阳离子脂质 (如 DOGS)，其由脂质的头基团提供多个正电荷以及附着聚胺如精胺。

[0010] 用于核酸输送的另一类型阳离子脂质是季铵去污剂，其包括单链去污剂如十六烷基三甲基溴化铵 (cetrimethylammonium bromide) 以及双链去污剂如双十八烷基二甲基

溴化铵 (dimethyldioctadecyl ammonium bromide)。这些去污剂可以将核酸输送进任何类型动物细胞中。这些两亲性分子中的氨基基团是季铵，脂质的单链与伯胺基团连接，无间隔臂或者接头键。令人遗憾地，使用这些两亲性去污剂的药物学配制物在给予对象时典型示出明显的细胞毒性。另一类型两亲性分子包括 1,2- 二油酰 -3-(4′ - 三甲基铵) 丁酰 -sn- 甘油、胆甾醇 (4′ - 三甲基铵) 丁酸酯和 1,2- 二油酰 -3- 琥珀酰 -sn- 甘油胆碱酯，其是 DOTMA 的结构类似物，但是缺点是具有较低的细胞内核酸输送效率。

[0011] 在非病毒载体系统中，与病毒基因输送系统如慢病毒、腺病毒等相比，阳离子脂质提供许多优势，如输送系统的制备简便、甚至在通过病毒壳体蛋白重复给予之后仍较低的免疫学副作用、无潜在的与病毒基因本身的体内安全性相关的危险，以及低生产成本和过程的商业优势。然而，目前揭示的用于核酸输送的许多阳离子脂质在合成方法、细胞毒性和细胞内核酸输送效率方面具有仍未解决的许多缺点。为此，非常需要开发可通过短的合成方法制备且能实现以核酸的低细胞毒性的有效细胞内输送的技术。

[0012] 除了核酸之外，也指出生理学活性的蛋白质由于较短的体内半衰期而具有如较低药物动力学保留时间的缺点，因此需要频繁重复给予。对于生理学活性蛋白质，已经应用技术通过与聚合物材料如聚乙二醇化学缀合而 增加蛋白质的体内保留时间。然而，所述化学缀合导致蛋白质的生理学活性位点的化学修饰，通常导致该蛋白质的固有生理学活性降低。为此，需要开发能防止生理学活性蛋白质由于蛋白酶体内攻击而迅速分解而不引起该蛋白质不希望的化学修饰的输送系统。特别地，当作为生理学活性阴离子蛋白质的肝素等与阳离子输送系统形成静电复合物时，可以改变靶蛋白质的体内药物动力学特性而无化学结构修饰。

[0013] 作为为了解决如上述问题而进行的众多广泛和深入的研究和实验的结果，本发明人揭示了与常规的阳离子脂质合成方法不同的通过使阴离子氨基酸与具有胺结构的脂肪酸衍生物结合而赋予阳离子性质的方法。本发明基于这个发现而完成。

发明内容

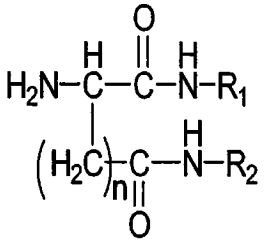
[0014] 技术问题

[0015] 本发明的一个目的是提供新的阳离子脂质、其制备方法以及包含其的输送系统。本发明的阳离子脂质可以配制为各种类型的具有生理学活性的核酸输送系统或者阴离子蛋白质输送系统，然后可用于增强靶材料的细胞内输送。

[0016] 技术方案

[0017] 本发明提供了由如下化学式 (I) 表示的阳离子脂质 ：

[0018]



(I)

[0019] 其中 ：

[0020] N 是 1 或 2，且

[0021] 每个 R_1 和 R_2 独立地是 C_{12}-C_{20} 饱和或不饱和烃。

[0022] 在本发明的一个实施方案中，每个 R_1 和 R_2 可以是含有 16 个碳原子的饱和或不饱和烃。

[0023] 在本发明的另一个实施方案中，每个 R_1 和 R_2 可以是含有 18 个碳原子 的饱和或不饱和烃。

[0024] 由化学式 (I) 表示的本发明的阳离子脂质是带负电的氨基酸基团与疏水性 C_{12}-C_{20} 饱和或不饱和脂肪酸胺衍生物的组合。

[0025] 本发明的阳离子脂质是两亲性化合物，其由亲水性氨基酸基团和疏水性脂肪酸部分组成，其中所述氨基酸的羧基基团 (-COOH) 与所述脂肪酸的胺基团 ($-NH_2$) 通过酰胺键连接。

[0026] 因此，本发明进一步提供了制备如化学式 (I) 所示阳离子脂质的方法，包括通过酰胺键连接阴离子氨基酸脂肪酸的羧基基团 (-COOH) 与脂肪酸胺衍生物的胺基团 ($-NH_2$)。

[0027] 对于组成本发明阳离子脂质的脂肪酸胺衍生物无特殊限制，只要其是 C_{12}-C_{20} 饱和或者不饱和脂肪酸即可。举例的脂肪酸胺衍生物可包括油胺、十四烷基胺 (myristylamine)、棕榈胺 (palmitylamine)、硬脂胺 (stearylamine)、月桂胺 (laurylamine)、亚油胺 (linoleylamine)、二十烷基胺 (arachidylamine) 等。

[0028] 组成本发明的阳离子脂质的氨基酸基团可以是具有负电荷且含有 10 个或更少碳原子的任何氨基酸。优选是谷氨酸 (E) 或者天冬氨酸 (D)。

[0029] 其中 n 是 1 的化学式 (I) 所示阳离子脂质是通过组合具有胺结构的脂肪酸衍生物与天冬氨酸合成。另一方面，其中 n 是 2 的化学式 (I) 所示阳离子脂质是通过组合具有胺结构的脂肪酸衍生物与谷氨酸合成。

[0030] 本发明的阳离子脂质可以使用简便的方法使用组成蛋白质的氨基酸高产率合成。在本发明的阳离子脂质中，谷氨酸和天冬氨酸的胺基团在正常体内环境的中性 pH 范围内是正电荷形式，因此化学式 (I) 所示阳离子脂质在细胞环境中具有净正电荷。所述阳离子脂质的正电荷使得与在中性 pH 范围带负电的多个核酸形成复合物，且增加与在体内具有相对负电荷的靶细胞膜接触。因此，本发明的阳离子脂质可用于制备各种类型核酸输送配制物，如脂质体、微团、乳状液等。

[0031] 因此，本发明进一步提供了包含化学式 (I) 所示阳离子脂质的核酸输送系统。如本文所用，术语“核酸输送系统”是指这样的核酸输送介质，其通过与带负电核酸序列相互作用而结合核酸且随后形成可以细胞内导入靶细胞中的复合物。

[0032] 如本文所用，“核酸”是指包含 RNA、小干扰 RNA(siRNA)、反义寡核苷酸、DNA、适体 (aptamer) 等。

[0033] 在本发明的实施方案中，包含本发明的阳离子脂质的核酸输送系统介导核酸的细胞内输送，所述核酸包括 RNA、小干扰 RNA(siRNA)、反义寡核苷酸、DNA、适体等。

[0034] 本发明的核酸输送系统可以是选自脂质体、微团、乳状液和纳米粒子的配制物。

[0035] 除了本发明的阳离子脂质成分之外，所述核酸输送系统可进一步包含脂质衍生物，如半乳糖衍生的脂质、甘露糖衍生的脂质、叶酸衍生的脂质、PEG 衍生的脂质，或者生物素衍生的脂质。

[0036] 在本发明的一个实施方案中，所述核酸输送系统可以是含有前述阳离子脂质和细胞融合磷脂的脂质体配制物。举例的细胞融合磷脂可包括二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 和 1,2- 二植烷酰 (diphytanoyl)-sn- 甘油 -3- 磷酸乙醇胺。

[0037] 在本发明的另一个实施方案中，所述核酸输送系统可以是含有前述阳离子脂质和表面活性剂的微团配制物。举例的表面活性剂可包括 Tween 20、聚乙二醇单油基醚、乙二醇单十二烷基醚、二乙二醇单己基醚、三甲基十六烷基氯化铵、十二烷基三甲基溴化铵、环己基甲基 β-D- 麦芽糖苷、季戊四醇棕榈酸酯 (pentaerythrityl palmitate)、十二烷基二甲基氧化胺和 N- 月桂酰肌氨酸钠盐。

[0038] 在本发明的另一个实施方案中，所述核酸输送系统可以是含有前述阳离子脂质和表面活性剂的乳状液配制物。可用于乳状液配制物中的表面活性剂可分为阳离子、两性离子和非离子表面活性剂三类。举例的阳离子表面活性剂可包括鲸蜡基三甲基溴化铵 (cetyl trimethylammonium bromide)、十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 等。举例的两性离子表面活性剂可包括十二烷基甜菜碱 (dodecyl betaine)、十二烷基二甲基氧化胺 (dodecyl dimethylamine oxide)、3-(N,N- 二甲基棕榈基铵基) 丙磺酸盐等。举例的非离子表面活性剂可包括 Tween 20、Tween 80、Triton X-100、聚乙二醇单油基醚、三乙二醇单十二烷基醚、辛基葡萄糖苷 (octyl glucoside)、N- 壬酰基 -N- 甲基葡萄糖胺等。

[0039] 阳离子脂质体、微团或者乳状液配制物形式的本发明的核酸输送系统可显著增强希望的核酸输送进动物细胞中的效率，且也可以降低潜在的细胞毒性。

[0040] 含有本发明的阳离子脂质的核酸输送系统可以根据被转移的核酸的预期用途和应用实现有效地将核酸输送进任何类型动物细胞中。提供如下实施例用以评估所述核酸输送系统将核酸输送至各种类型肿瘤细胞中的核酸输送效率，所述肿瘤细胞例如是人子宫颈癌上皮细胞系 SiHa、人肺癌细胞系 A549、人阴道角化细胞系 VK2 以及鼠肝细胞瘤细胞系 Hepa1-6。

[0041] 为此，使用是荧光素标记的 dsRNA 的 Block IT(Invitrogen，USA) 形成含有所述阳离子脂质的多种配制物复合物，然后输送至靶细胞中。随后在荧光显微镜下检测，以特异性测量所述阳离子脂质将核酸输送进靶细胞中的能力。此外，本发明的核酸输送系统的细胞毒性可以通过使用测热性四唑 (3-(4,5- 二甲基噻唑 -2- 基)-2,5- 二苯基四唑溴化物 (MTT)) 测定法评估。

[0042] 与含有 DC-Chol(其是常用于增强在不同细胞类型中核酸输送效率的阳离子脂质) 的阳离子磷脂脂质体配制物相比，包含本发明揭示的阳离子脂质如脂质体、微团和乳状液的核酸输送系统，不仅明显增加细胞内输送程度，而且也明显降低细胞毒性。因此，本发明的核酸输送系统可以有效地用于使用核酸药物如 DNA、RNA、siRNA、反义寡核苷酸和核酸适体的治疗中。

[0043] 此外，本发明提供了前述核酸输送系统与核酸的复合物。脂质体、微团、乳状液或者纳米粒子形式的本发明的核酸输送系统由于阳离子脂质的存在而是带正电荷的。因此，由于核酸输送系统的正电荷以及核酸的负电荷的存在，通过简单混合这两种成分可以通过静电键合而形成所述核酸输送系统与所述核酸的复合物。

[0044] 可以将所述核酸输送系统 / 核酸复合物导入靶细胞中，用以治疗由病原性蛋白质

过表达导致的各种疾病如肿瘤、关节炎、心血管疾病和内分泌疾病。本发明的核酸输送系统呈现出极佳的核酸输送效力以及低细胞病毒性，因此通过抑制病原性蛋白质的细胞内过表达而可以获得极佳的治疗效力。

[0045] 因此，本发明进一步提供了预防或者治疗由于病原性蛋白质的过表达导致的疾病的组合物，该组合物包含前述核酸输送系统 / 核酸复合物作为活性成分，即核酸治疗剂；本发明提供了前述核酸输送系统 / 核酸复合物在制 备核酸治疗剂中的应用；以及提供了治疗由于病原性蛋白质的过表达导致的多种疾病的方法，所述方法包括将治疗量的前述核酸输送系统 / 核酸复合物导入治疗对象的细胞中，其中所述疾病包括肿瘤、关节炎、心血管疾病、内分泌疾病等。

[0046] 利用本发明的核酸治疗剂在体内或者离体在细胞内导入希望的核酸，导致靶蛋白质的表达选择性降低或者靶基因突变的另外修正，这使得可以治疗病原性蛋白质的过表达或者靶基因突变导致的疾病。

[0047] 如本文所用，术语“治疗有效量”是指对于感兴趣的疾病发挥治疗作用所需要的核酸输送系统 / 核酸复合物的量。如本领域技术人员所显而易见，所述核酸输送系统 / 核酸复合物作为活性药物成分的有效剂量可以根据不同因素而变化，所述因素如疾病的性质、疾病的严重性、给予的核酸的性质、剂型的种类、患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食习惯、给予时间和途径、治疗持续时间以及药物如共同给予的化疗药物。对于成年人，所述核酸治疗剂可优选每天给予一次 0.001mg/kg-100mg/kg 剂量。

[0048] 或者，本发明的阳离子脂质可用于在细胞内输送阴离子蛋白质，通过与阴离子蛋白质而不是核酸形成复合物而输送。

[0049] 此外，本发明提供了前述蛋白质输送系统与阴离子蛋白质的复合物。与本发明的核酸输送系统的形成相似，蛋白质输送系统也可以制备成脂质体、微团、乳状液和纳米粒子配制物形式。此外，这种配制物除了所述阳离子脂质成分之外，可进一步包含举例的另外掺入核酸输送系统中的成分。本发明的蛋白质输送系统由于存在阳离子脂质而是带正电荷的。因此，由于输送系统的正电荷以及被输送的蛋白质的负电荷的存在，通过简单混合这两种成分就可以通过静电键合而形成输送系统与阴离子蛋白质之间的复合物。

[0050] 可以导入所述蛋白质输送 / 阴离子蛋白质复合物，以改良对于不同疾病如肿瘤、关节炎、心血管疾病和内分泌疾病具有治疗作用的生理学活性阴离子蛋白质的体内稳定性和效力。由本发明的阳离子脂质组成的蛋白质输送系统可以通过与阴离子蛋白质形成复合物而赋予蛋白质配偶体体内蛋白酶抗性，且由于低细胞毒性也可以实现体内治疗效力改良。

[0051] 因此，本发明进一步提供了包含前述蛋白质输送系统 / 阴离子蛋白质复 合物作为活性成分的蛋白质治疗剂；提供了前述蛋白质输送系统 / 阴离子蛋白质复合物在制备所述蛋白质治疗剂中的应用；以及提供了治疗包括肿瘤、关节炎、心血管疾病和内分泌疾病等多种疾病的方法，所述方法包括将治疗有效量的前述蛋白质输送系统 / 蛋白质复合物导入治疗对象的细胞中。

[0052] 此外，本发明的阳离子脂质可用作使用离体核酸适体的诊断试剂盒的成分。例如，其可用于诊断感兴趣样品中与适体选择性反应的材料的存在，通过用所述阳离子脂质包被诊断平板表面及使所述适体与包被表面结合进行诊断。

[0053] 因此，本发明还提供了包含用本发明的阳离子脂质包被的平板的诊断试剂盒。适体可以附着于所述诊断试剂盒的阳离子脂质包被的表面。

[0054] 优势效果

[0055] 如前文例证，本发明的阳离子脂质可以通过简便的方法制备和纯化，且因此对于工业规模生产具有显著的经济学优势。此外，包含本发明的阳离子脂质的核酸或者蛋白质输送系统不仅显著改善希望的具有生理学活性的核酸药物（如 DNA、RNA、siRNA、反义寡核苷酸及核酸适体）或者阴离子蛋白质的细胞内输送效率，而且由于所述输送系统减弱的细胞毒性而还可用于增加核酸或蛋白质药物的治疗效率。

[0056] 附图简述

[0057] 图 1 示出实施例 1 中通过组合谷氨酸和油胺制备的阳离子脂质二油酰谷氨酰胺 (dioleoyl glutamide) 的 1H NMR 光谱测定结果。

[0058] 图 2 示出相差显微照片 (A，B) 和荧光显微照片 (C，D)，举例说明了 dsRNA 在人肺癌细胞系 A549 中的细胞内输送，其使用荧光标记的 dsRNA 与对比例 1 的阳离子脂质体的复合物 (A，C) 以及与实施例 11 的含有本发明的阳离子脂质的脂质体配制物的复合物 (B，D) 进行。

[0059] 图 3 示出相差显微照片 (A，B) 和荧光显微照片 (C，D)，举例说明了 dsRNA 在人子宫颈上皮癌细胞系 SiHa 中的细胞内输送，其使用荧光标记的 dsRNA 与对比例 1 的阳离子脂质体的复合物 (A，C) 以及与实施例 13 的含有本发明的阳离子磷脂的脂质体配制物的复合物 (B，D) 进行。

[0060] 图 4 示出相差显微照片 (B，C) 和荧光显微照片 (D，E)，举例说明了 dsRNA 在人阴道角化细胞系 VK2 中的细胞内输送，其使用荧光标记的 dsRNA 与对比例 1 的阳离子脂质体的复合物 (B，D) 以及与实施例 14 的含有本发明的阳离子磷脂的微团配制物的复合物 (C，E) 进行（图 4A：作为对照的未处理的 VK2 细胞的相差显微照片）。

[0061] 图 5 示出相差显微照片 (A，B) 和荧光显微照片 (C，D)，举例说明了 dsRNA 在鼠肝细胞瘤细胞系 Hepa1-6 中的细胞内输送，其使用荧光标记的 dsRNA 与对比例 1 的阳离子脂质体的复合物 (A，C) 以及与实施例 16 的含有本发明的阳离子脂质的乳状液配制物的复合物 (B，D) 进行。

[0062] 图 6 示出通过 RT-PCR 测定的靶基因 stat3 与三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 之间转录表达的对比照片，其针对 stat3- 选择性 dsRNA 被输送进人肺癌细胞系 A549 中的细胞内输送，使用对比例 1 和 2 的脂质体配制物 (D，C) 以及实施例 12、14 和 17 的含有本发明阳离子脂质的脂质体、微团和乳状液配制物 (E，F，G) 进行 (6A：作为对照物的未处理的细胞系 A549；6B：单独 stat3- 选择性 siRNA 处理组）。

[0063] 图 7 示出通过 RT-PCR 测定的靶基因 stat3 与三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 之间转录表达的对比照片，其针对 stat3- 选择性 dsRNA 被输送进人子宫颈癌细胞系 HeLa 中的细胞内输送，使用对比例 1 和 2 的脂质体配制物 (D，C) 以及实施例 11、16 和 20 的含有本发明阳离子脂质的脂质体、乳状液和微团配制物 (E，F，G) 进行 (7A：作为对照物的未处理的细胞系 A549；7B：单独 stat3- 选择性 siRNA 处理组）。

[0064] 图 8 示出通过 RT-PCR 测定的靶 bcl-2 转录表达的抑制作用对比照片，其针对 bcl-2 反义寡核苷酸的细胞输送，使用靶基因 bcl-2- 选择性反义寡核苷酸针对对比例 1 和

2 的脂质体配制物 (D,C) 以及实施例 12、15 和 17 的含有本发明阳离子脂质的脂质体、微团和乳状液配制物 (E, F, G) 进行 (8A :作为对照的未处理细胞系的相差显微照片 ;6B :单独 bcl-2- 选择性反义寡核苷酸处理组)。

[0065] 图 9 示出相差显微照片 (B, C) 和荧光显微照片 (E, F),举例说明随着绿色荧光蛋白 (GFP) 表达的抑制, siRNA 被输送进人肾细胞系 293T 中的输送效率,其使用选择性抑制 GFP 表达的 siRNA 针对对比例 2 的脂质体配制 物 (B,E) 和实施例 12 的含有本发明阳离子脂质的脂质体配制物 (C,F) 而进行 (图 9A :未处理的 293T 细胞系的相差显微照片 ;图 9D : 未处理的 293T 细胞系的荧光显微照片)。

[0066] 图 10 示出对 dsRNA 与实施例 11、13 和 16 的含有本发明阳离子脂质的脂质体和乳状液配制物的各个复合物的细胞毒性检测结果图,在人肺癌细胞系 A549 中进行。

[0067] 图 11 示出对 dsRNA 与实施例 12、18 和 19 的含有本发明阳离子脂质的脂质体配制物的各个复合物的细胞毒性检测结果图,在人子宫颈癌细胞系 SiHa 中进行。

[0068] 图 12 示出对 dsRNA 与实施例 11、14 和 17 的含有本发明阳离子脂质的脂质体、微团和乳状液配制物的各个复合物的细胞毒性检测结果图,在人阴道角化细胞系 VK2 中进行。

实施例

[0069] 从结合以下实施例的详细实施方案,本领域技术人员将显而易见本发明所述的及其它目的、优势和特征。本发明可以不同方式实施,且不应误解为仅限于本文所述的实施方案,本领域技术人员知道在不偏离所附权利要求书要求的本发明的范围和精神的前提下,可以对本发明进行各种修改、添加和取代。因此,应理解提供在本文揭示的实施方案只是举例说明本发明,而无限制本发明范围和精神之意。

[0070] 新的阳离子脂质的合成

[0071] 实施例 1 :二油酰谷氨酰胺 (dioleoyl glutamide) 的合成

[0072] 1-1) 将 1 当量 (1.47g,10mmol) 谷氨酸加入 5mL 三氟乙酸和 5mL 二氯甲烷中,并将所得混合物在 40℃搅拌 1 小时。然后,将 3 当量 (2.18mL,30mmol) 的 $SOCl_2$ 缓慢滴加至在冰浴中的反应溶液中,随后在 0-40℃反应 6 小时。在反应完成后,通过在减压下浓缩除去三氟乙酸和二氯甲烷,并且通过薄层层析法 (TLC) 证实反应。

[0073] 1-2) 将在实施例 1-1 中获得的反应产物溶解于二氯甲烷中,向其中缓慢滴加溶解于二氯甲烷中的 1.5 当量 (4.01g,15mmol) 油胺。将该混合物在冰 浴中搅拌 1 小时,向其中滴加 3mL 三乙胺,随后在 0-50℃温度反应 4 小时。在完成反应之后,通过在减压下浓缩除去三乙胺和二氯甲烷,将所得产物溶解于乙酸乙酯中,然后用过饱和氯化钠 (NaCl) 溶液洗涤两次以除去未反应的谷氨酸。使用氯化镁 ($MgCl_2$) 除去含有溶解于其中的反应产物的乙酸乙酯中的微量水分,并且通过 TLC 证实反应。

[0074] 通过在减压下浓缩除去乙酸乙酯,将残余物在真空下干燥过夜,从而获得浅褐色高粘性液体产物 (4.12g,产量 :92.8%)。使用 1H NMR 分光光度计证实终产物的正确结构。图 1 示出谷氨酸与油胺之间酰胺键的氢原子在 8.0ppm 检测,谷氨酸的胺氢原子在 2.0ppm 检测,油胺的特征性双键的氢原子在 5.42ppm 检测。

[0075] 1H NMR(DMSO-d_6, ppm) :8.0(1H,谷氨酸和油胺的 -NH-CO)

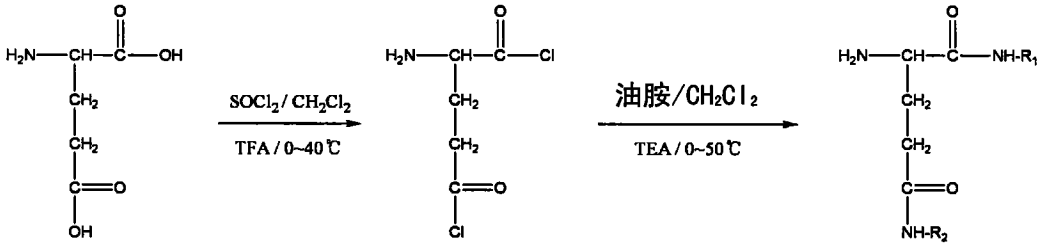
[0076] 2.0(2H,谷氨酸的 $-NH_2$)

[0077] 5.42(2H,油胺的 -CH = CH-)

[0078] 实施例 1 的反应过程如下文反应式 1 所示。

[0079] [反应式 1]

[0080]



[0081] 在反应式 1 中,R_1 和 R_2 独立地是 C_{18}- 不饱和 (C_9) 烃。

[0082] 实施例 2 :双十四酰谷氨酰胺 (dimyristoyl glutamide) 的合成

[0083] 2-1) 与实施例 1-1 类似,使用 2 当量的谷氨酸进行反应,获得谷氨酸衍生物。

[0084] 2-2) 将在实施例 2-1 中获得的反应产物溶解于二氯甲烷中。与实施例 1-2 类似,随后使用 1.5 当量 (3.20g,15mmol) 十四烷基胺 (myristylamine) 进行反应。获得浅褐色固体产物 (3.22g,产量 :85.7%),使用 1H NMR 分光光度计进行结构分析。

[0085] 1H NMR(DMSO-d_6, ppm) :8.0(1H,谷氨酸和十四烷基胺的 -NH-CO)

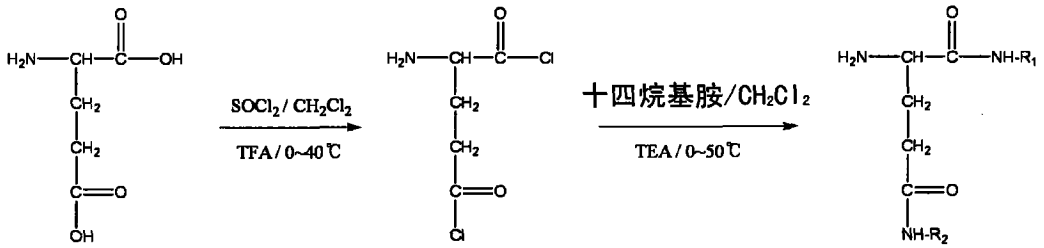
[0086] 2.0(2H,谷氨酸的 $-NH_2$)

[0087] 1.29(2H,十四烷基胺的 $-CH_2-$)

[0088] 实施例 2 的反应过程如下文反应式 2 所示。

[0089] [反应式 2]

[0090]



[0091] 在反应式 2 中,R_1 和 R_2 独立地是 C_{14}- 饱和烃。

[0092] 实施例 3 :二棕榈酰谷氨酰胺 (dipalmitoyl glutamide) 的合成

[0093] 3-1) 与实施例 1-1 类似,使用 2 当量的谷氨酸进行反应,获得谷氨酸衍生物。

[0094] 3-2) 将在实施例 3-1 中获得的反应产物溶解于二氯甲烷中。与实施例 1-2 类似,随后使用 1.5 当量 (3.62g,15mmol) 棕榈胺 (palmitylamine) 进行反应。获得浅褐色固体产物 (3.74g,产量 :90.1%),使用 1H NMR 分光光度计进行结构分析。

[0095] 1H NMR(DMSO-d_6, ppm) :8.0(1H, 衍生 棕榈胺 /CH_2Cl_2 胺的 -NH-CO)

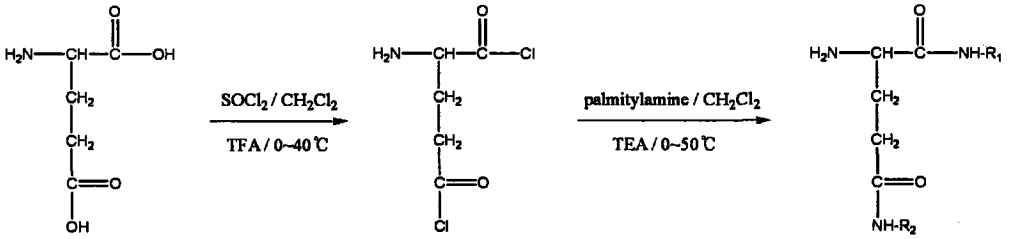
[0096] 2.0(2H,谷氨酸的 $-NH_2$)

[0097] 1.29(2H,棕榈胺的 $-CH_2-$)

[0098] 实施例 3 的反应过程如下文反应式 3 所示。

[0099] [反应式 3]

[0100]



[0101] 在反应式 3 中，R_1 和 R_2 独立地是 C_{16}- 饱和烃。

[0102] 实施例 4 :二硬脂酰谷氨酰胺 (distearoyl glutamide) 的合成

[0103] 4-1) 与实施例 1-1 类似，使用 2 当量的谷氨酸进行反应，获得谷氨酸衍 生物。

[0104] 4-2) 将在实施例 4-1 中获得的反应产物溶解于二氯甲烷中。与实施例 1-2 类似，随后使用 1.5 当量 (4.04g,15mmol) 硬脂胺 (stearylamine) 进行反应。获得浅褐色固体产物 (3.96g,产量 :87.1％)，使用 1H NMR 分光光度计进行结构分析。

[0105] 1H NMR(DMSO-d_6, ppm) :8.0(1H,谷氨酸和硬脂胺的 -NH-CO)

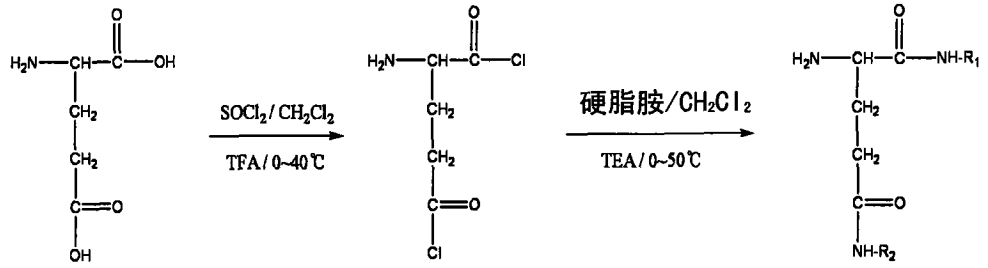
[0106] 2.0(2H,谷氨酸的 $-NH_2$)

[0107] 1.29(2H,硬脂胺的 $-CH_2-$)

[0108] 实施例 4 的反应过程如下文反应式 4 所示。

[0109] [反应式 4]

[0110]



[0111] 在反应式 4 中，R_1 和 R_2 独立地是 C_{18}- 饱和烃。

[0112] 实施例 5 :二月桂酰谷氨酰胺 (dilauroyl glutamide) 的合成

[0113] 5-1) 与实施例 1-1 类似，使用 2 当量谷氨酸进行反应，获得谷氨酸衍生物。

[0114] 5-2) 将在实施例 5-1 中获得的反应产物溶解于二氯甲烷中。与实施例 1-2 类似，随后使用 1.5 当量 (2.78g,15mmol) 月桂胺 (laurylamine) 进行反应。获得浅褐色固体产物 (3.32g,产量 :91.9％)，使用 1H NMR 分光光度计进行结构分析。

[0115] 1H NMR(DMSO-d_6, ppm) :8.0(1H,谷氨酸和月桂胺的 -NH-CO)

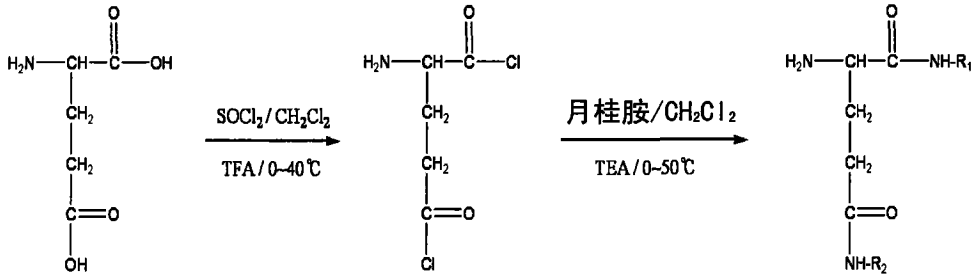
[0116] 2.0(2H,谷氨酸的 $-NH_2$)

[0117] 1.29(2H,月桂胺的 $-CH_2-$)

[0118] 实施例 5 的反应过程如下文反应式 5 所示。

[0119] [反应式 5]

[0120]



[0121] 在反应式 5 中，R_1 和 R_2 独立地是 C_{12}- 饱和烃。

[0122] 实施例 6：二亚油酰谷氨酰胺 (dilinoleoyl glutamide) 的合成

[0123] 6-1) 与实施例 1-1 类似，使用 2 当量的谷氨酸进行反应，获得谷氨酸衍生物。

[0124] 6-2) 将在实施例 6-1 中获得的反应产物溶解于二氯甲烷中。与实施例 1-2 类似，随后使用 1.5 当量 (3.98g，15mmol) 亚油胺 (linoleylamine) 进行反应。获得浅褐色高粘性液体产物 (3.72g，产量：82.8％)，使用 1H NMR 分光光度计进行结构分析。

[0125] 1H NMR(DMSO-d_6，ppm)：8.0(1H，谷氨酸和亚油胺的 -NH-CO)

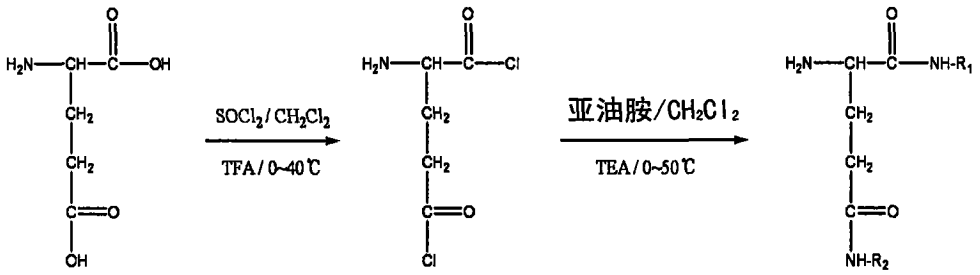
[0126] 2.0(2H，谷氨酸的 $-NH_2$)

[0127] 5.49 和 2.63(3H，亚油胺的＝ CH-CH_2-)

[0128] 实施例 6 的反应过程如下文反应式 6 所示。

[0129] [反应式 6]

[0130]



[0131] 在反应式 6 中，R_1 和 R_2 独立地是 C_{18}- 双不饱和 (C_9，C_{12}) 烃。

[0132] 实施例 7：双二十酰谷氨酰胺 (diarachidoyl glutamide) 的合成

[0133] 7-1) 与实施例 1-1 类似，使用 2 当量谷氨酸进行反应，获得谷氨酸衍生物。

[0134] 7-2) 将在实施例 7-1 中获得的反应产物溶解于二氯甲烷中。与实施例 1-2 类似，随后使用 1.5 当量 (4.46g，15mmol) 二十烷基胺进行反应。获得浅褐色固体产物 (3.95g，产量：80.2％)，使用 1H NMR 分光光度计进行结构分析。

[0135] 1H NMR(DMSO-d_6，ppm)：8.0(1H，谷氨酸和二十烷基胺的 -NH-CO)

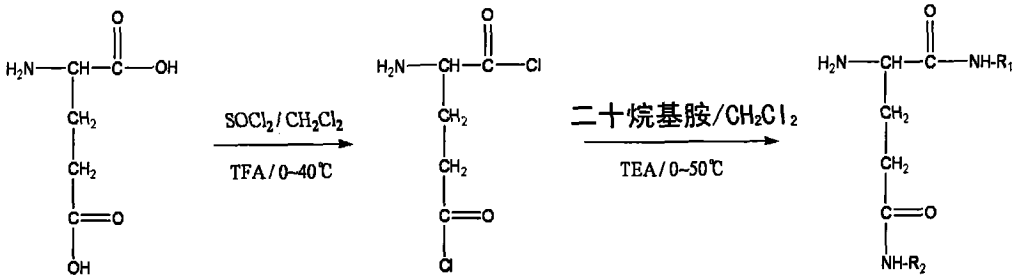
[0136] 2.0(2H，谷氨酸的 $-NH_2$)

[0137] 1.29(2H，二十烷基胺的 $-CH_2$-)

[0138] 实施例 7 的反应过程如下文反应式 7 所示。

[0139] [反应式 7]

[0140]



[0141] 在反应式 7 中，R_1 和 R_2 独立地是 C_{20}- 饱和烃。

[0142] 实施例 8：二棕榈酰天冬酰胺 (dipalmitoyl aspartamide) 的合成

[0143] 8-1) 与实施例 1-1 类似，使用 2 当量的天冬氨酸进行反应，获得天冬氨酸衍生物。

[0144] 8-2) 将在实施例 8-1 中获得的反应产物溶解于二氯甲烷中。与实施例 1-2 类似，随后使用 1.5 当量 (3.62g，15mmol) 棕榈胺进行反应。获得浅褐色固体产物 (3.59g，产量：88.6％)，使用 1H NMR 分光光度计进行结构分析。

[0145] 1H NMR(DMSO-d_6，ppm)：8.0(1H，天冬氨酸和棕榈胺的 -NH-CO-)

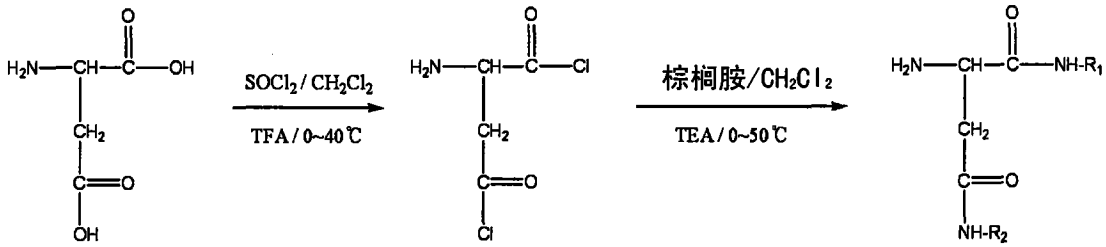
[0146] 2.0(2H，天冬氨酸的 $-NH_2$)

[0147] 1.29(2H，棕榈胺的 $-CH_2-$)

[0148] 实施例 8 的反应过程如下文反应式 8 所示。

[0149] [反应式 8]

[0150]



[0151] 在反应式 8 中，R_1 和 R_2 是 C_{16}- 饱和烃。

[0152] 实施例 9：二硬脂酰天冬酰胺 (distearoyl aspartamide) 的合成

[0153] 9-1) 与实施例 1-1 类似，使用 2 当量天冬氨酸进行反应，获得天冬氨酸衍生物。

[0154] 9-2) 将在实施例 9-1 中获得的反应产物溶解于二氯甲烷中。与实施例 1-2 类似，随后使用 1.5 当量 (4.04g，15mmol) 硬脂胺进行反应。获得浅褐色固体产物 (4.02g，产量：90.4％)，使用 1H NMR 分光光度计进行结构分析。

[0155] 1H NMR(DMSO-d_6，ppm)：8.0(1H，天冬氨酸和硬脂胺的 -NH-CO-)

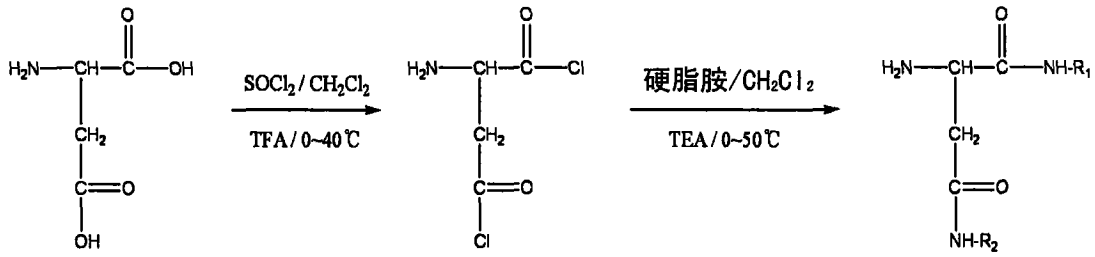
[0156] 2.0(2H，天冬氨酸的 $-NH_2$)

[0157] 1.29(2H，硬脂胺的 $-CH_2-$)

[0158] 实施例 9 的反应过程如下文反应式 9 所示。

[0159] [反应式 9]

[0160]



[0161] 在反应式 9 中，R_1 和 R_2 是 C_{18}- 饱和烃。

[0162] 实施例 10：二油酰天冬酰胺 (dioleoyl aspartamide) 的合成

[0163] 10-1) 与实施例 1-1 类似，使用 2 当量天冬氨酸进行反应，获得天冬氨酸衍生物。

[0164] 10-2) 将在实施例 10-1 中获得的反应产物溶解于二氯甲烷中。与实施例 1-2 类似，随后使用 1.5 当量 (4.01g，15mmol) 油胺进行反应。获得浅褐 色固体产物 (4.07g，产量：92.1％)，使用 1H NMR 分光光度计进行结构分析。

[0165] 1H NMR(DMSO-d_6，ppm)：8.0(1H，天冬氨酸和油胺的 -NH-CO-)

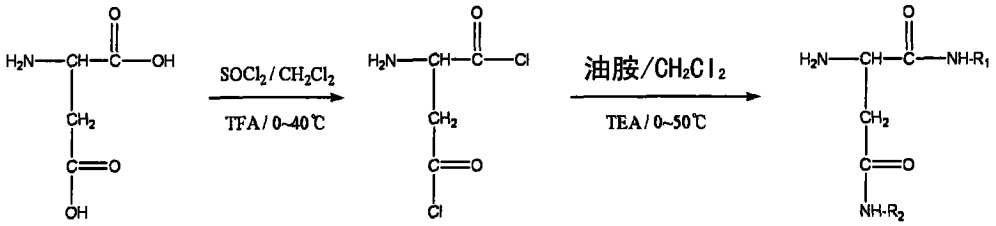
[0166] 2.0(2H，天冬氨酸的 -NH_2)

[0167] 5.42(2H，油胺的 -CH ＝ CH-)

[0168] 实施例 10 的反应过程如下文反应式 10 所示。

[0169] [反应式 10]

[0170]



[0171] 在反应式 10 中，R_1 和 R_2 是 C_{18}- 不饱和 (C_9) 烃。

[0172] 含有阳离子脂质的核酸输送系统的制备

[0173] 实施例 11：含有二油酰谷氨酰胺的阳离子脂质体的制备

[0174] 将在实施例 1 中制备的阳离子脂质二油酰谷氨酰胺和细胞融合磷脂 DOPE(Avanti Polar Lipids Inc.，USA) 各自溶解于 1mL 氯仿中。然后将每个所得溶液以 1 ： 1 摩尔比率在 10mL 玻璃隔瓶 (glass septum vial)(Pyrex，USA) 中混合，在氮气压下低速旋转蒸发直至氯仿完全蒸发，从而制备液态薄膜。对于制备液态多层脂囊 (MLV)，将 1mL 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 加入上述制备的薄膜中，然后将该小瓶在 37℃密封，随后涡旋 3 分钟。为了获得均一的颗粒大小，使用挤出设备 (extruder(Northern Lipids Inc.，Canada)) 将小瓶中溶液通过三次 0.2μm 聚碳酸酯膜。所得阳离子脂质体在 4℃贮存直至使用。

[0175] 实施例 12：含有双十四酰谷氨酰胺 (dimyristoyl glutamide) 的阳离子脂质体的制备

[0176] 将在实施例 2 中制备的阳离子脂质双十四酰谷氨酰胺和细胞融合磷脂 DOPE(Avanti Polar Lipids Inc.，USA) 各自溶解于 1mL 氯仿中。然后，将每个所得溶液以 1 ： 1 摩尔比率在 10mL 玻璃隔瓶 (glass septum vial)(Pyrex，USA) 中混合。与实施例 11 类似制备阳离子脂质体。

[0177] 实施例 13：含有二硬脂酰谷氨酰胺 (distearoyl glutamide) 的阳离子磷脂脂质

体的制备

[0178] 将在实施例 4 中制备的阳离子脂质二硬脂酰谷氨酰胺和细胞融合磷脂 1,2- 二植烷酰 -sn- 甘油 -3- 磷酸乙醇胺 (DPhPE)(Avanti Polar Lipids Inc.,USA) 各自溶解于 1mL 氯仿中。然后,将每个所得溶液以 1 ∶ 1 摩尔比率在 10mL 玻璃隔瓶 (glass septum vial)(Pyrex,USA) 中混合。与实施例 11 类似制备阳离子脂质体。

[0179] 实施例 14 :含有双十四酰谷氨酰胺 (dimyristoyl glutamide) 的阳离子微团的制备

[0180] 将在实施例 2 中制备的阳离子脂质双十四酰谷氨酰胺与表面活性剂 Tween 20 以 1 ∶ 1 摩尔比率混合。将所得混合物与 PBS 以 1 ∶ 10(v/v) 比率混合。将所得混合溶液涡旋几次,然后使用超声发生器超声处理大约 1 分钟以形成阳离子微团。

[0181] 实施例 15 :含有双二十酰谷氨酰胺 (diarachidoyl glutamide) 的阳离子微团的制备

[0182] 将在实施例 7 中制备的阳离子脂质 diarachidoyl glutamide 与表面活性剂聚乙二醇单油基醚以 1 ∶ 2 摩尔比率混合。将所得混合物与 PBS 以 1 ∶ 10(v/v) 比率混合。将所得混合溶液涡旋几次,然后使用超声发生器超声处理大约 1 分钟以形成阳离子微团。

[0183] 实施例 16 :含有二棕榈酰天冬酰胺 (dipalmitoyl aspartamide) 的阳离子乳状液的制备

[0184] 将在实施例 8 中制备的阳离子脂质二棕榈酰天冬酰胺与 Tween 80 以 1 ∶ 0.1 摩尔比率混合。将所得混合物与 PBS 以 1 ∶ 10(v/v) 比率混合。将该混合溶液用均质器均质大约 2 分钟,从而制备水包油 (O/W) 型阳离子乳状液。

[0185] 实施例 17 :含有二油酰天冬酰胺 (dioleoyl aspartamide) 的阳离子乳状液的制备

[0186] 将在实施例 10 中制备的阳离子脂质二油酰天冬酰胺与 Tween 80 以 1 ∶ 0.1 摩尔比率混合。将所得混合物与 PBS 以 1 ∶ 10(v/v) 比率混合。将该混合溶液用均质器均质大约 2 分钟,从而制备水包油 (O/W) 型阳离子乳状液。

[0187] 实施例 18 :含有二棕榈酰谷氨酰胺 (dipalmitoyl glutamide) 和半乳糖衍生的脂质的阳离子脂质的制备

[0188] 将在实施例 3 中制备的阳离子脂质二棕榈酰谷氨酰胺、细胞融合磷脂 DPhPE(Avanti Polar Lipids Inc.,USA) 和半乳糖衍生的脂质脑苷脂 (AvantiPolar Lipids Inc.,USA) 各自溶解于 1mL 氯仿中。然后将每个所得溶液以 1 ∶ 1 ∶ 0.05 摩尔比率混合,与实施例 11 类似制备阳离子脂质体,最终获得在其表面上具有半乳糖部分的阳离子脂质体。

[0189] 实施例 19 :含有双二十酰谷氨酰胺 (diarachidoyl glutamide) 和聚乙二醇 (PEG)- 衍生的脂质的阳离子磷脂脂质体的制备

[0190] 将在实施例 7 中制备的阳离子脂质双二十酰谷氨酰胺、细胞融合磷脂 DOPE(Avanti Polar Lipids Inc.,USA) 和 PEG- 衍生的脂质 1,2- 二酰基 -sn- 甘油 -3- 磷酸乙醇胺 -N-[甲氧基 (聚乙二醇)-3000(Avanti Polar Lipids Inc.,USA) 各自溶解于 1mL 氯仿中。然后将每个所得溶液以 1 ∶ 1 ∶ 0.05 摩尔比率混合,与实施例 11 类似制备阳离子脂质体,最终获得在其表面上具有聚乙二醇部分的阳离子脂质体。

[0191] 实施例 20 :含有二硬脂酰天冬酰胺 (distearoyl aspartamide) 和叶酸衍生的脂质的阳离子磷脂微团的制备

[0192] 将在实施例 9 中制备的阳离子脂质二硬脂酰天冬酰胺、叶酸衍生的脂质 1,2- 二硬脂酰 -sn- 甘油 -3- 磷酸乙醇胺 -N-[叶酸 (聚乙二醇)-2000(AvantiPolar Lipids Inc., USA) 和表面活性剂 Tween 20 以 1 ： 0.05 ： 1 摩尔比率混合。将所得混合物与 PBS 以 1 ： 10(v/v) 比率混合。将该混合溶液涡旋几次,然后使用超声发生器超声处理大约 1 分钟,以形成阳离子微团。

[0193] 对比例 1 :使用常规阳离子脂质制备脂质体

[0194] 将阳离子脂质 DC-Chol(Avanti Polar Lipids Inc., USA) 和细胞融合磷脂 DOPE(Avanti Polar Lipids Inc.,USA) 各自溶解于 1mL 氯仿中。然后,将每个所得溶液以 1 ： 1 摩尔比率在 10mL 玻璃隔瓶 (glass septum vial)(Pyrex,USA) 中混合,然后在氮气压下低速旋转蒸发脂质氯仿被完全蒸发,从而制备液态薄膜。对于制备液态多层脂囊 (MLV),将 1mL 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 加入上述制备的薄膜中,然后将该小瓶在 37℃密封,随后涡旋 3 分钟。为了获得均一的颗粒大小,使用挤出机 (Northern Lipids Inc., Canada) 将小瓶中溶液通过三次 0.2μm 聚碳酸酯膜。所得阳离子脂质体在 4℃贮存直至使用。

[0195] 对比例 2 :常规可商购的阳离子脂质体

[0196] LipofectAMINE 2000(Invitrogen,USA) 是常规可商购的阳离子脂质体配制物,可购买并根据厂商指导使用。

[0197] 实验例 :含有阳离子脂质的核酸输送系统的核酸输送效率

[0198] 细胞培养

[0199] 人子宫颈癌细胞系 SiHa 和 HeLa、人阴道角化细胞系 VK2、人肺癌细胞系 A549、人肾细胞系 293T 以及小鼠肝细胞瘤细胞系 Hepa1-6 购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC,USA)。SiHa 和 Hepa1-6 细胞系在含有 10％ w/v 胎牛血清 (FBS,HyClone Laboratories Inc.,USA) 和 100 单位 /mL 青霉素或者 100μg/mL 链霉素的 Dulbecco 改良的 Eagle's 培养基 (DMEM, Gibco, USA) 中培养。A549 细胞系在补加 10％ FBS、青霉素和链霉素的 RPMI 1640(Gibco, USA) 中培养。VK2 细胞系在补加 0.1ng/mL 重组人上皮生长因子 (rhEGF, Gibco, USA)、0.05mg/mL 牛垂体提取物 (BPE,Gibco,USA) 以及 100 单位 /mL 青霉素或者 100μg/mL 链霉素的角质形成细胞 -SFM(Gibco, USA) 中培养。

[0200] 实验例 I :使用荧光标记的 siRNA 评估核酸输送效率

[0201] I-1. 输送 siRNA 进入 A549 细胞系中的输送效率

[0202] 在实验前当天,将 A549 细胞以 8×10^4 个细胞 / 孔的密度接种于 24 孔平板中。当每个平板的细胞生长至 60％ -70％铺满时,将该平板的培养基用 500μl/ 孔的新鲜培养基置换。将 50μl 无血清培养基加入 Eppendorf 试管中,随后加入 2μl 作为荧光标记的 siRNA 的 Block-iT(20μmol, Invitrogen, USA) 和在对比例 1 和实施例 11 中制备的 10μl 阳离子脂质体。将这些材料缓慢移液、混合并在室温保持 20 分钟,由此使得复合物形成。将由此制备的复合物加入多孔平板中,随后在 CO_2 培养箱中在 37℃保温 24 小时。将 A549 细胞培养基用 500μl/ 孔新鲜培养基置换,在荧光显微镜下检验基因转移效率。

[0203] 图 2 示出在对比例 1(A, C) 和实施例 11(B, D) 中制备的阳离子脂质体的核酸输送效率的相差和荧光显微镜观测结果。A :当用对比例 1 的脂质体组合物处理时的相差显微镜

图像。B：当用实施例 11 的脂质体组合物处理时的相差显微镜图像。C：当用对比例 1 的脂质体组合物处理时荧光标记的 siRNA 的细胞内输送的荧光显微镜图像。D：当用实施例 11 的脂质体组合物处理时荧光标记的 siRNA 的细胞内输送的荧光显微镜图像。从图 2 的结果可以看出，与具有已知成分的对比例 1 的脂质体相比，在实施例 11 中制备的含有本发明阳离子脂质的阳离子脂质体呈现出增加的输送 siRNA 进 A549 细胞中的输送效率。

[0204] I-2. 输送 siRNA 进入 SiHa 细胞系中的输送效率

[0205] 在实验前当天，将 SiHa 细胞以 8×10^4 个细胞 / 孔的密度接种于 24 孔平板中。当每个平板的细胞生长至 60％ -70％铺满时，将该平板的培养基用 500μl/ 孔的新鲜培养基置换。与实验例 I-1 类似，制备具有对比例 1 和实施例 13 的阳离子脂质体的每个 Block-iT 复合物。将由此制备的复合物加入多孔平板中，随后在 CO_2 培养箱中在 37℃保温 24 小时。将 SiHa 细胞培养基用 500μl/ 孔新鲜培养基置换，在荧光显微镜下检验核酸输送效率。

[0206] 图 3 示出在对比例 1(A，C) 和实施例 13(B，D) 中制备的阳离子脂质体的核酸输送效率的相差和荧光显微镜观测结果。A：当用对比例 1 的脂质体组合物处理时的相差显微镜图像。B：当用实施例 13 的脂质体组合物处理时的相差显微镜图像。C：当用对比例 1 的脂质体组合物处理时荧光标记的 siRNA 的细胞内输送的荧光显微镜图像。D：当用实施例 13 的脂质体组合物处理时荧光标记物标记的 siRNA 的细胞内输送的荧光显微镜图像。从图 3 的结果可以看出，与含有已知阳离子脂质的对比例 1 的脂质体相比，在实施例 13 中制备的含有新的阳离子脂质的脂质体呈现出增加的输送 siRNA 进 SiHa 细胞中的输送效率。

[0207] I-3. 输送 siRNA 进入 VK2 细胞系中的输送效率

[0208] 在实验前当天，将 VK2 细胞以 8×10^4 个细胞 / 孔的密度接种于 24 孔平板中。当每个平板的细胞生长至 60％ -70％铺满时，将该平板的培养基用 500μl/ 孔的新鲜培养基置换。与实验例 I-1 类似，制备具有对比例 1 的阳离子脂质体和实施例 14 的阳离子微团的每个 Block-iT 复合物。将由此制备的复合物加入多孔平板中，随后在 CO_2 培养箱中在 37℃保温 24 小时。将 VK2 细胞培养基用 500μl/ 孔新鲜培养基置换，在荧光显微镜下检验核酸输送效率。

[0209] 图 4 示出在对比例 1(B，D) 中制备的阳离子脂质体和实施例 14(C，E) 中制备的阳离子磷脂微团的核酸输送效率的相差和荧光显微镜观测结果。从图 4 的结果可以看出，与含有在对比例 1 中使用的已知阳离子脂质的脂质体 (图 4D) 相比，含有在实施例 14(图 4E) 中制备的含有阳离子脂质的微团呈现出 siRNA 被输送进 VK2 细胞中的输送效率增加。此外，如图 4 所示，在相差显微镜下观测的细胞形态学中，当用对比例 1 的脂质体组合物处理时大多数细胞呈现出细胞皱缩 (图 4B)，因此表示与未处理的对照组 (图 4A) 相比细胞形态的明显变形。另一方面，如图 4C 所示，用实施例 14 的阳离子微团处理的细胞呈现出与未处理的对照组 (图 4A) 相似的形态，因此表示在细胞形态学方面明显降低的细胞毒性。

[0210] I-4. 输送 siRNA 进入 Hepa1-6 细胞系中的输送效率

[0211] 在实验前当天，将 Hepa1-6 细胞以 8×10^4 个细胞 / 孔的密度接种于 24 孔平板中。当每个平板的细胞生长至 60％ -70％铺满时，将该平板的培养基用 500μl/ 孔的新鲜培养基置换。与实验例 I-1 类似，制备具有对比例 1 的阳离子脂质体和实施例 16 的阳离子乳状液的每个 Block-iT 复合物。将由此制备的复合物加入多孔平板中，随后在 CO_2 培养箱中在 37℃保温 24 小时。将 Hepa1-6 细胞培养基用 500μl/ 孔新鲜培养基置换，在荧光显微镜下

检验 核酸输送效率。

[0212] 图 5 示出在对比例 1(A,C) 中制备的阳离子脂质体和实施例 16(B,D) 中制备的阳离子磷脂乳状液的核酸输送效率的相差和荧光显微镜观测结果。A :当用对比例 1 的脂质体组合物处理时的相差显微镜图像。B :当用实施例 16 的阳离子乳状液处理时的相差显微镜图像。C :当用对比例 1 的脂质体组合物处理时荧光标记的 siRNA 的细胞内输送的荧光显微镜图像。D :当用实施例 16 的阳离子乳状液处理时荧光标记的 siRNA 的细胞内输送的荧光显微镜图像。从图 5 的结果可以看出,与含有常规阳离子脂质的对比例 1 的脂质体配制物相比,在实施例 16 中制备的含有新的阳离子脂质的乳状液呈现出增加的输送 siRNA 进 Hepa1-6 细胞中的效率。

[0213] 实验例 II :通过基因表达谱的鉴别评估核酸输送效率

[0214] II-1. 输送 siRNA 进入 A549 细胞系中的输送效率

[0215] 在实验前当天,将 A549 细胞以 8×10^4 个细胞 / 孔的密度接种于 24 孔平板中。当每个平板的细胞生长至 60% -70%铺满时,将该平板的培养基用 250μl/ 孔的新鲜培养基置换。将 50μl 无血清培养基加入 Eppendorf 试管中,然后向其中加入 Stat3- 选择性 siRNA 与在对比例 1 和 2 以及在实施例 12、14 和 17 中制备的含有阳离子脂质的脂质体、微团和乳状液的每个复合物。使用 siGENOME SMARTpool(Dharmacon,Lafayette,CO,USA) 构建诱导 Stat3 基因 (Genbank 登记号 :NM_213662) 表达抑制的 siRNA。将培养基中 siRNA 的终浓度调节为 100nM。将这些材料缓慢移液、混合并在室温保持 20 分钟,由此导致复合物形成。将由此制备的复合物加入多孔平板中,随后在 CO_2 培养箱中在 37℃保温 24 小时。24 小时后,使用 Trizol 试剂 (Invitrogen,Carlsbad,CA,USA) 从培养细胞中分离总 RNA,然后使用 AccuPower RT PreMix(Bioneer,Daejeon,Korea) 逆转录为 cDNA。Stat3 特异性引物具有如下序列 :5′ -AGTTCTCCTCCACCACCAAG-3′ (左) 和 5′ -CCTTCTCCACCCAAGTGAAA-3′ (右) ;聚合酶链反应 (PCR) 产物的大小为长度为 348bp。测定 Stat3 转录物的表达水平,通过将 Stat3- 特异性 PCR 产物的条带密度根据 GAPDH(三磷酸甘油醛脱氢酶) 基因的扩增出现的条带密度标准化,确定基因表达的数量变化。

[0216] 图 6 示出当用各个组合物处理细胞时,A549 细胞中靶基因 Stat3 的转录表达的对比显微照片。A :对照组 ;B :单独 siRNA- 处理组 ;C :对比例 2 的组合物处理组 ;D :对比例 1 的组合物处理组 ;E :实施例 12 的组合物处理组 ;F :实施例 14 的组合物处理组 ;以及 G :实施例 17 的组合物处理组。与实施例 12、14 和 17 的脂质体、微团和乳状液处理组相比,对照组 (A) 和单独 siRNA- 处理组 (B) 由于无 siRNA 的细胞内输送而呈现出 Stat3 转录物表达无变化,而对比例 1 的脂质体处理组 (D) 呈现出 Stat3 转录物表达略降低。另一方面,实施例 12、14 和 17 的脂质体、微团和乳状液呈现出 Stat3 转录物表达有效减弱,与对比例 2 的可商购脂质体类似。从图 6 的这些结果可以看出,在实施例 12、14 和 17 中制备的含有阳离子脂质的脂质体、微团和乳状液可通过有效地在细胞内输送 siRNA 至 A549 细胞中而选择性抑制靶蛋白质表达。

[0217] II-2. 输送 siRNA 进 HeLa 细胞系中的输送效率

[0218] 在实验前当天,将 HeLa 细胞以 8×10^4 个细胞 / 孔的密度接种于 24 孔平板中。当每个平板的细胞生长至 60% -70%铺满时,将该平板的培养基用 250μl/ 孔的新鲜培养基置换。将 50μl 无血清培养基加入 Eppendorf 试管中,然后向其中加入 Stat3- 选择性 siRNA

与在对比例 1 和 2 以及在实施例 11、16 和 20 中制备的含有阳离子脂质的脂质体、微团和乳状液的每个复合物。然后以与实验例 II-1 相同方式和条件进行实验。

[0219] 图 7 示出当用各个组合物处理细胞时，HeLa 细胞中靶基因 Stat3 的转录表达的对比显微照片。A：对照组；B：单独 siRNA- 处理组；C：对比例 2 的组合物处理组；D：对比例 1 的组合物处理组；E：实施例 11 的组合物处理组；F：实施例 16 的组合物处理组；以及 G：实施例 20 的组合物处理组。与实施例 11、16 和 20 的脂质体、微团和乳状液处理组相比，对照组 (A) 和单独 siRNA- 处理组 (B) 由于较低的 siRNA 的细胞内输送效率而呈现出 Stat3 转录物表达基本无变化，而对比例 1 的脂质体处理组 (D) 呈现出 Stat3 转录物表达略降低。从图 7 的这些结果可以看出，在实施例 11、16 和 20 中制备的含有阳离子脂质的脂质体、微团和乳状液可通过有效地在细胞内输送 siRNA 至 HeLa 细胞中而选择性抑制靶蛋白质表达。

[0220] II-3. 反义寡核苷酸被输送进 SiHa 细胞系中的输送效率

[0221] 在实验前当天，将 SiHa 细胞以 8×10^4 个细胞 / 孔的密度接种于 24 孔平板中。当每个平板的细胞生长至 60％ -70％铺满时，将该平板的培养基用 250μl/ 孔的新鲜培养基置换。将 50μl 无血清培养基加入 Eppendorf 试管中，然后向其中加入反义寡核苷酸与在对比例 1 和 2 以及在实施例 12、15 和 17 中制备的含有阳离子脂质的脂质体、微团和乳状液的每个复合物。诱导抑制 Bcl2 基因 (Genbank 登记号：NM_000633) 表达的反义寡核苷酸应要求由 Bioneer(Daejeon,Korea) 合成 (5′ -TCT CCC AGC GTG CGC CAT-3′)。将培养基中所述反义寡核苷酸的终浓度调节为 100nM。将这些材料缓慢移液、混合并在室温保持 20 分钟，由此导致复合物形成。将由此制备的复合物加入多孔平板中，随后在 CO_2 培养箱中在 37℃保温 24 小时。24 小时后，使用 Trizol 试剂 (Invitrogen，Carlsbad，CA，USA) 从培养细胞中分离总 RNA，然后使用 AccuPower RT PreMix(Bioneer，Daejeon，Korea) 逆转录为 cDNA。Bcl2- 特异性引物具有序列 5′ -ATG GCG CAC GCT GGG AGA AC-3′ （左）和 5′ -GCG GTA GCG GCG GGA GAA GT-3′ （右），聚合酶链反应 (PCR) 产物的大小为长度为 348bp。测定 Bcl2 转录物的表达水平，通过将 Bcl2- 特异性 PCR 产物的条带密度根据 GAPDH（三磷酸甘油醛脱氢酶）基因的扩增出现的条带密度标准化，确定基因表达的数量变化。

[0222] 图 8 示出当用各个组合物处理细胞时，SiHa 细胞中靶基因 Bcl2 的转录表达的对比显微照片。A：对照组；B：单独 Bcl2- 选择性反义寡核苷酸处理组；C：所述反义寡核苷酸与对比例 2 的脂质体的复合物处理组；D：所述反义寡核苷酸与对比例 1 的脂质体的复合物处理组；E：所述反义寡核苷酸与实施例 12 的阳离子脂质体的复合物处理组；F：所述反义寡核苷酸与实施例 15 的阳离子微团的复合物处理组；以及 G：所述反义寡核苷酸与实施例 17 的阳离子乳状液的复合物处理组。与未处理对照组 (图 8A) 相比，所述单独反义寡核苷酸处理组 (8B) 由于所述反义寡核苷酸无细胞内输送而呈现出 Bcl2 转录物的量无变化。与对比例 2 的可商购的脂质体产品 (图 8C) 以及对比例 1 的脂质体 (图 8D) 相比，实施例 12、15 和 17 的含有阳离子脂质的配制物呈现出胞内 Bcl2 转录物的量明显降低。从图 8 的这些结果可以看出， 在实施例 12、15 和 17 中制备的含有阳离子脂质的配制物通过输送反义寡核苷酸进入 SiHa 细胞中而有效抑制靶蛋白质 Bcl-2 的细胞内表达。

[0223] 实验例 III：使用表达荧光蛋白的细胞系 293T-GFP 评估 siRNA 输送效率

[0224] 在实验前当天，将表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的 293T-GFP 细胞以 8×10^4 个细胞 / 孔的密度接种于 24 孔平板中。当每个平板的细胞生长至 60％ -70％铺满时，将该平板的培

养基用 250μl/ 孔的新鲜培养基置换。将 25μl 无血清培养基加入 Eppendorf 试管中。然后将抑制 GFP 表达质粒表达的 siRNA 与在对比例 2 以及在实施例 12 中制备的含有阳离子脂质体的每个复合物加入多孔平板中，随后在 CO_2 培养箱中在 37℃培养细胞 24 小时。将 293T-GFP 细胞培养基用 500μl/ 孔新鲜培养基置换，在荧光显微镜下检验基因转移效率。诱导 GFP 表达抑制的 siRNA 购自 Bioneer(Daejeon，Korea)，具有序列 5′ -GCA UCA AGG UGA ACU UCA A-3′（正向）和 5′ -UUG AAG UUC ACCUUG AUG C-3′（反向）。将培养基中 siRNA 终浓度调节为 300nM。

[0225] 图 9 示出当用各个组合物处理细胞时，293T 细胞中 GFP 表达的相差和荧光显微镜观测结果。A：未处理的表达 GFP 的 293T 细胞的相差显微镜图像。B：当用对比例 2 的脂质体组合物处理时，293T 细胞的相差显微镜图像。C：当用实施例 12 的脂质体组合物处理时，293T 细胞的相差显微镜图像。D：未处理的 293T 细胞的荧光显微镜图像。E：当用对比例 2 的组合物处理时，293T 细胞的荧光显微镜图图像。F：当用实施例 12 的脂质体组合物处理时，293T 细胞的荧光显微镜图像。在荧光显微镜下，在未处理的 293T 细胞中由于无 GFP 表达抑制而清晰观测到荧光表达。另一方面，用对比例 2 和实施例 12 的组合物处理的细胞由于抑制 GFP 表达的 siRNA 的细胞内输送而呈现出 GFP 表达抑制。

[0226] 实验例 IV：含有阳离子脂质的核酸输送系统的体内毒性

[0227] IV-1. 含有阳离子脂质的核酸输送系统对于 A549 细胞系的毒性

[0228] 根据如下实验测定含有本发明的新的阳离子脂质的核酸输送系统的细胞毒性。

[0229] 将人肺癌细胞系 A549 用 siRNA 与实施例 11、13 和 16 的含有阳离子脂质的脂质体和乳状液的每个复合物以及单独用 siRNA 基因处理，评估各个细胞组的细胞毒性。为了仅精确评估核酸输送系统的细胞毒性，本文所用 siRNA 是在细胞内无活性的混杂 RNA。使用 MTT(3-(4,5- 二甲基噻唑 -2- 基)-2,5- 二苯基四唑溴化物) 比色测定法进行毒性测定。

[0230] 将 A549 细胞以 2×10^4 个细胞 / 孔的密度接种于 48 孔平板上，培养 12 小时。之后，将细胞用 siRNA 与实施例 11、13 和 16 的含有阳离子脂质的脂质体和乳状液的每个复合物以及单独用 siRNA 处理。在用各个检测复合物处理细胞 24 小时后，加入 MTT 溶液制成 10％的培养基，随后进一步培养细胞 4 小时。弃去上清，向培养基中加入 0.04N 烟酸异丙醇溶液。然后，使用 ELISA 阅读器在 570nm 测量吸光率数值。未处理细胞用作对照组。

[0231] 图 10 示出在人肺癌细胞系 A549 中使用 siRNA 与实施例 11、13 和 16 的含有阳离子脂质的脂质体和乳状液的复合物进行的细胞毒性检测结果。结果，与对照组相比，siRNA 与实施例 11、13 和 16 的含有阳离子脂质的脂质体和乳状液的复合物呈现出无明显细胞毒性。因此，从图 10 中可以看出在实施例 11、13 和 16 中制备的本发明含有阳离子脂质的脂质体和乳状液配制物对于人肺癌细胞系无明显细胞毒性。

[0232] IV-2. 含有阳离子脂质的核酸输送系统对于 SiHa 细胞系的毒性

[0233] 与实验例 IV-1 类似，将人子宫颈癌细胞系 SiHa 用 siRNA 与实施例 12、18 和 19 的阳离子磷脂脂质体的每个复合物以及单独用 siRNA 基因处理，评估各个细胞组的细胞毒性。

[0234] 图 11 示出在 SiHa 细胞中使用混杂 siRNA 与实施例 12、18 和 19 的含有阳离子脂质的脂质体的复合物进行的细胞毒性检测结果。结果，与对照组相比，siRNA 与实施例 12、18 和 19 的含有阳离子脂质体的复合物呈现出无明显细胞毒性。因此，从图 11 中可以看出

在实施例 12、18 和 19 中制备的本发明含有阳离子脂质的脂质体配制物对于人子宫颈癌细胞系无明显细胞毒性。

[0235] IV-3. 含有阳离子脂质的核酸输送系统对于 VK2 细胞系的毒性

[0236] 与实验例 IV-1 类似，将人阴道角化细胞 VK2 用 siRNA 与实施例 11、14 和 17 的阳离子磷脂脂质体、微团和乳状液的每个复合物以及单独用 siRNA 基因处理，评估各个细胞组的细胞毒性。

[0237] 图 12 示出在人阴道角化细胞 VK2 细胞中使用混杂 siRNA 与实施例 11、14 和 17 的阳离子脂质体、微团和乳状液的复合物进行的细胞毒性检测结果。结果，与对照组相比，siRNA 与实施例 11、14 和 17 的阳离子脂质体、微团和乳状液的复合物呈现出无明显细胞毒性。因此，从图 12 中可以看出在实施例 11、14 和 17 中的含有阳离子脂质的脂质体、微团和乳状液配制物对于 VK2 细胞无明显细胞毒性。

[0238] 工业应用

[0239] 从上文描述中显而易见，本发明的阳离子脂质可以通过简便方法便利地制备和纯化，且因此对于工业规模生产具有较高的经济学优势。此外，包含本发明的阳离子脂质的核酸或者蛋白质输送系统不仅明显改善具有生理学活性的希望的核酸药物（如 DNA、RNA、siRNA、反义寡核苷酸和核酸适体）或者阴离子蛋白质的细胞输送效率，而且由于该输送系统减弱的细胞毒性还可用于增加核酸或者蛋白质药物的治疗效力。

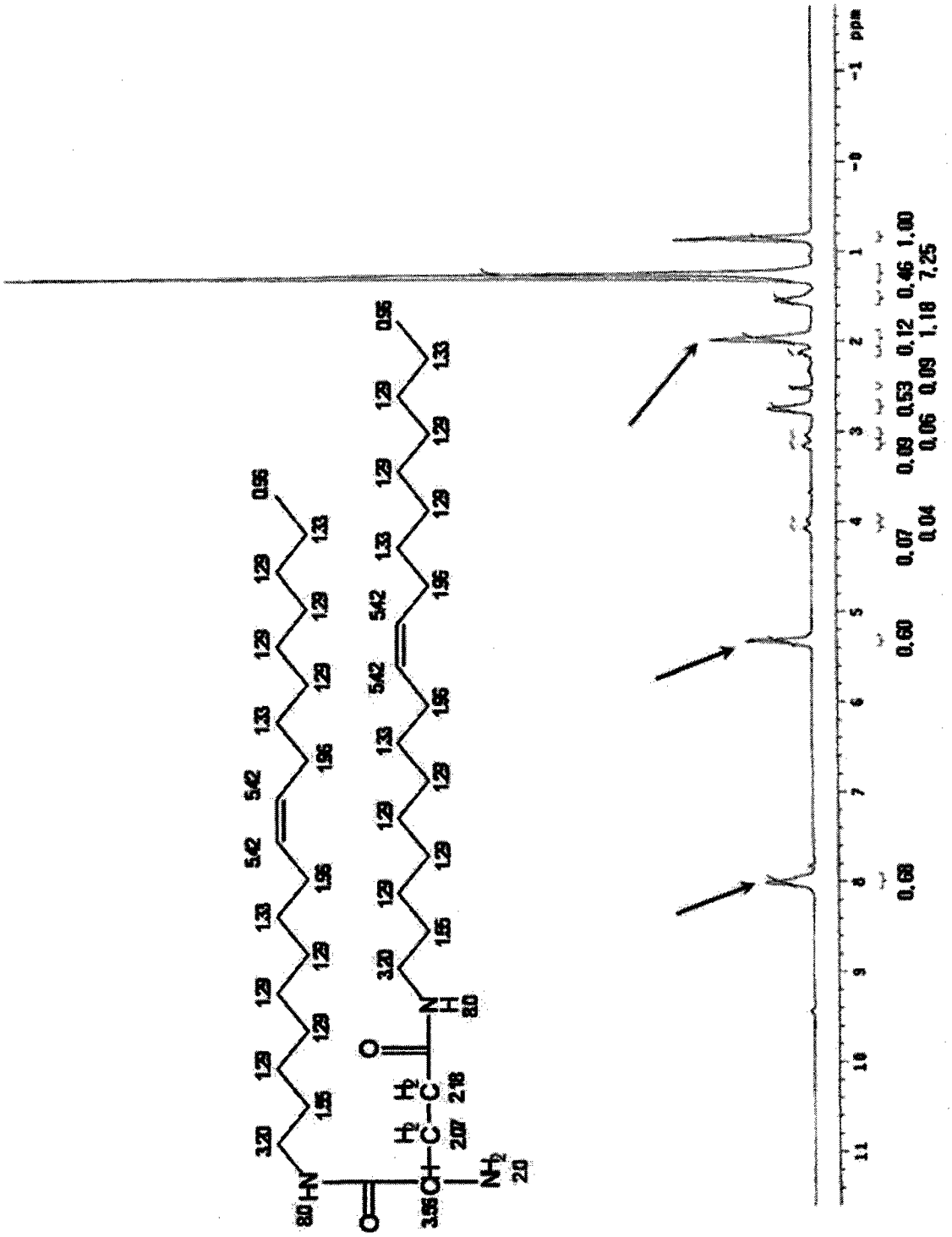


图 1

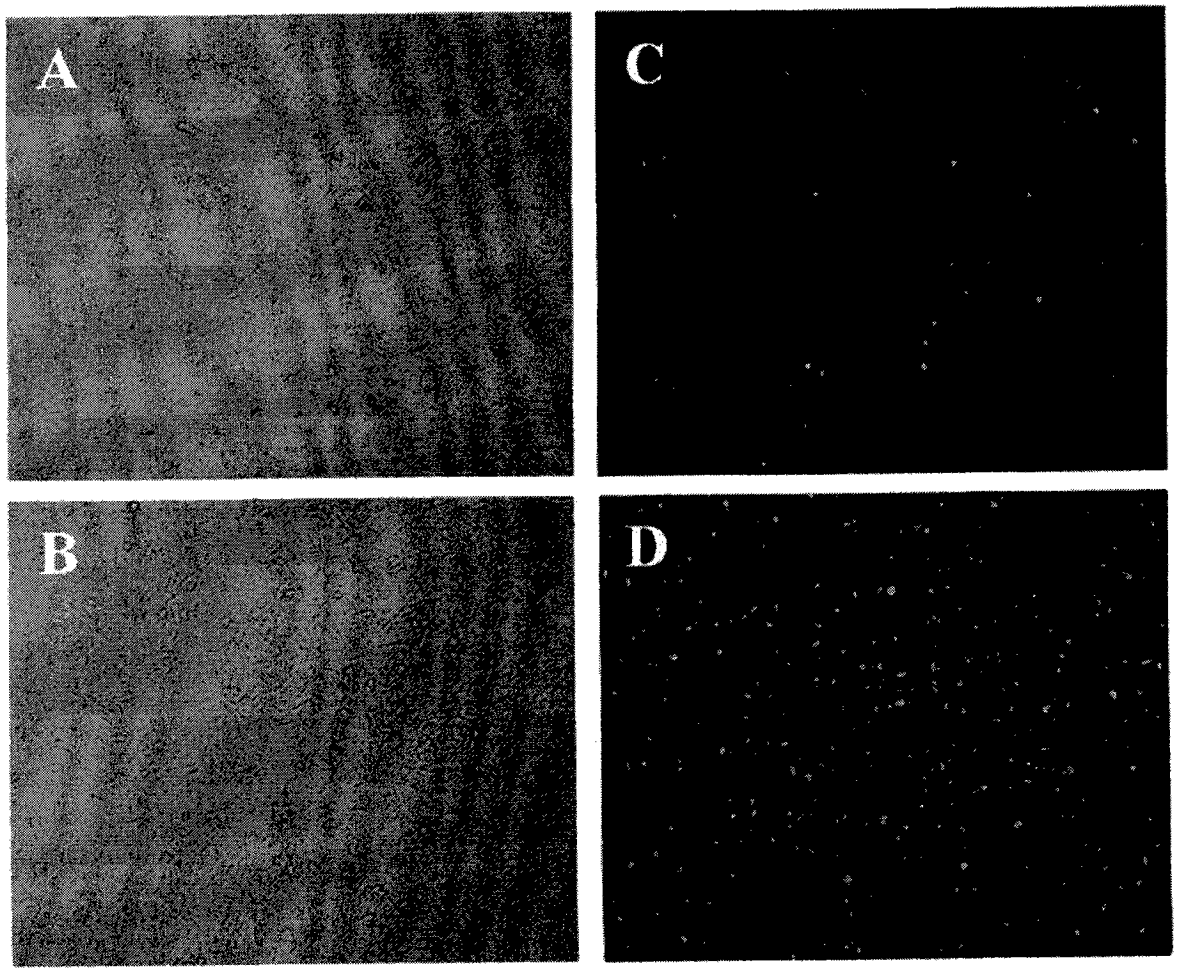


图 2

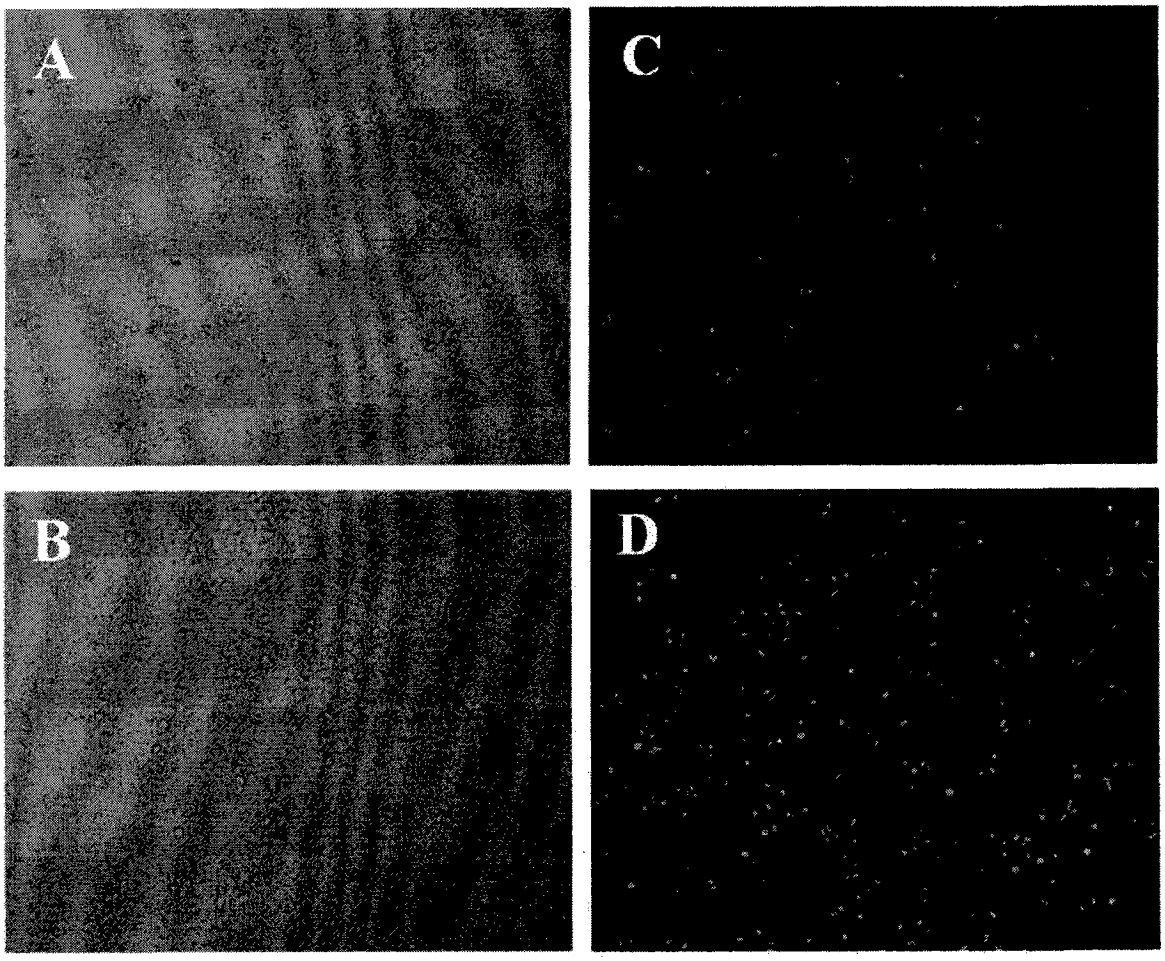


图 3

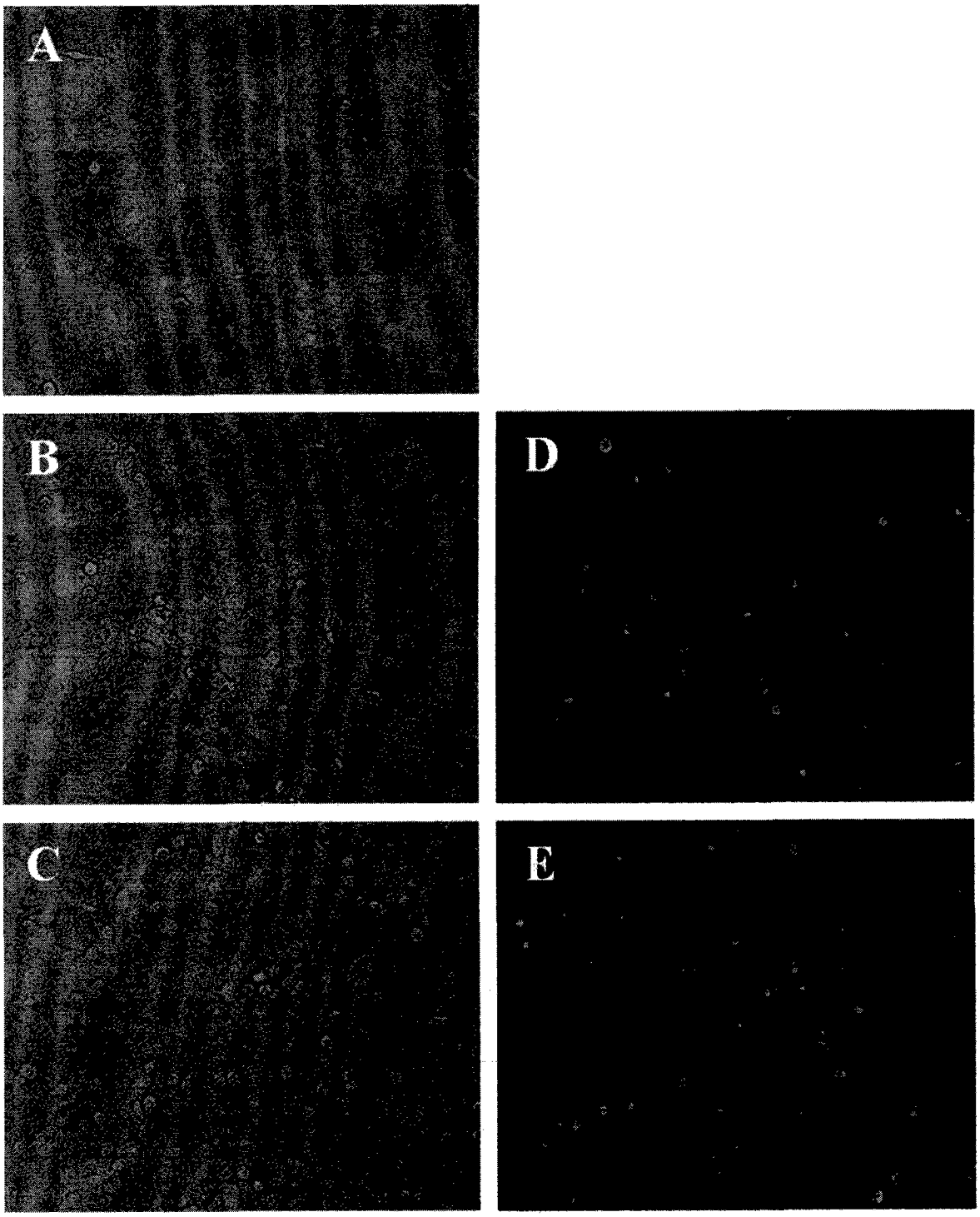


图 4

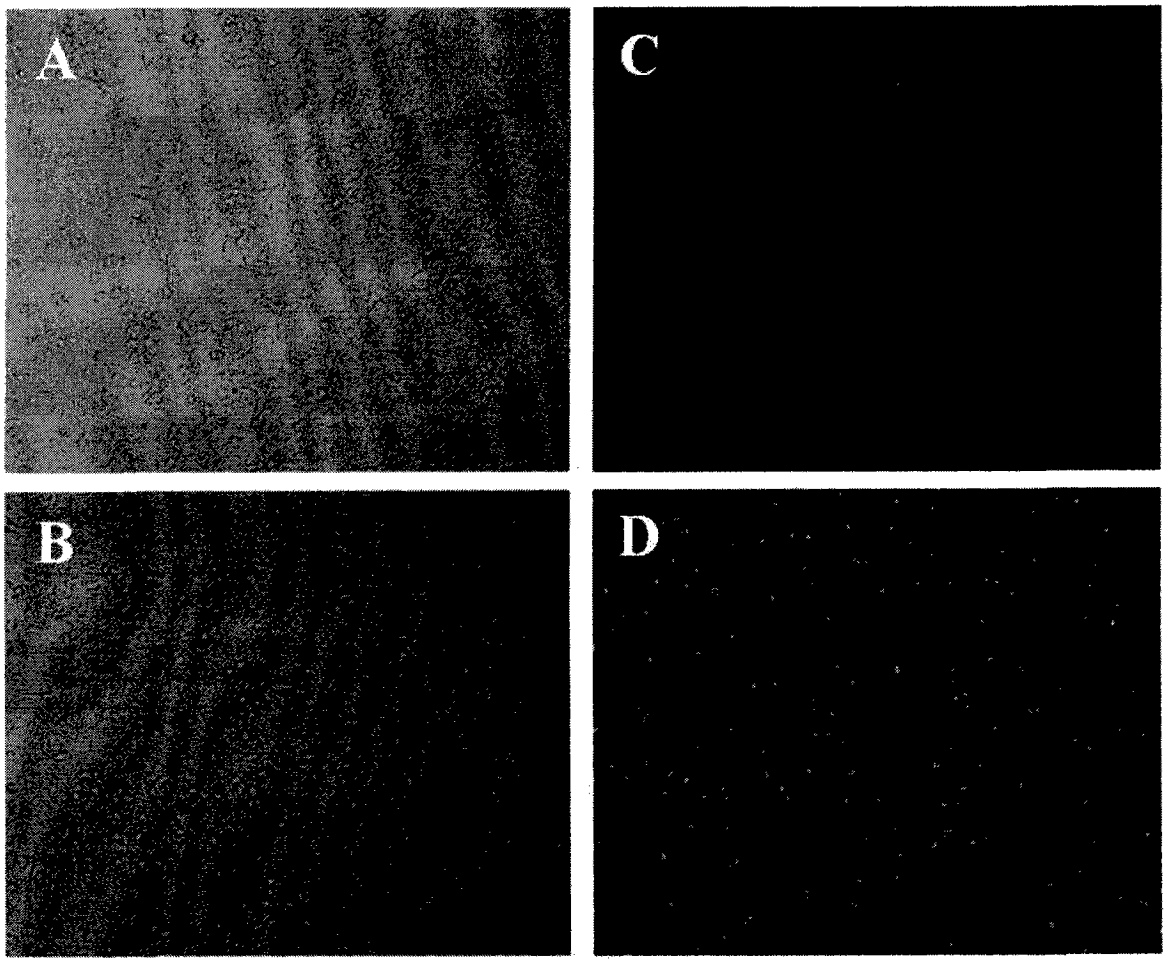


图 5

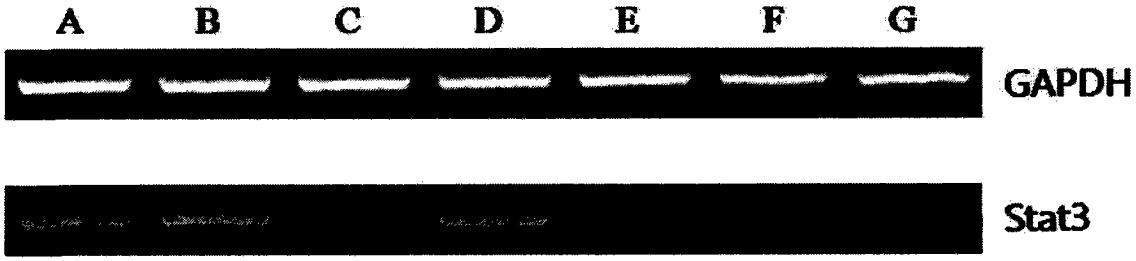


图 6

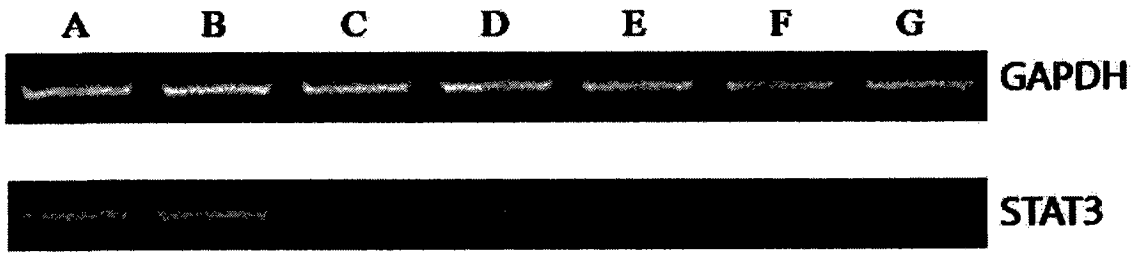


图 7

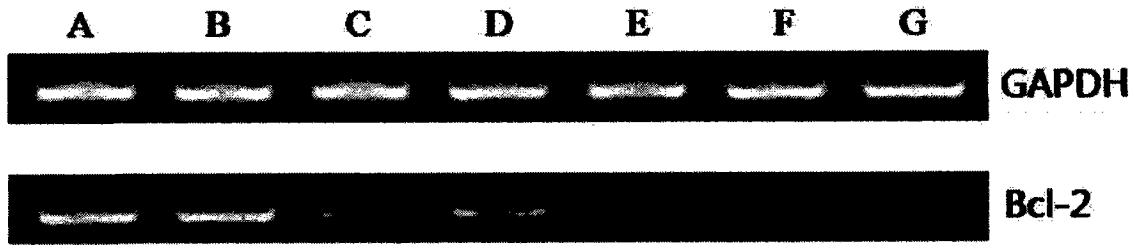


图 8

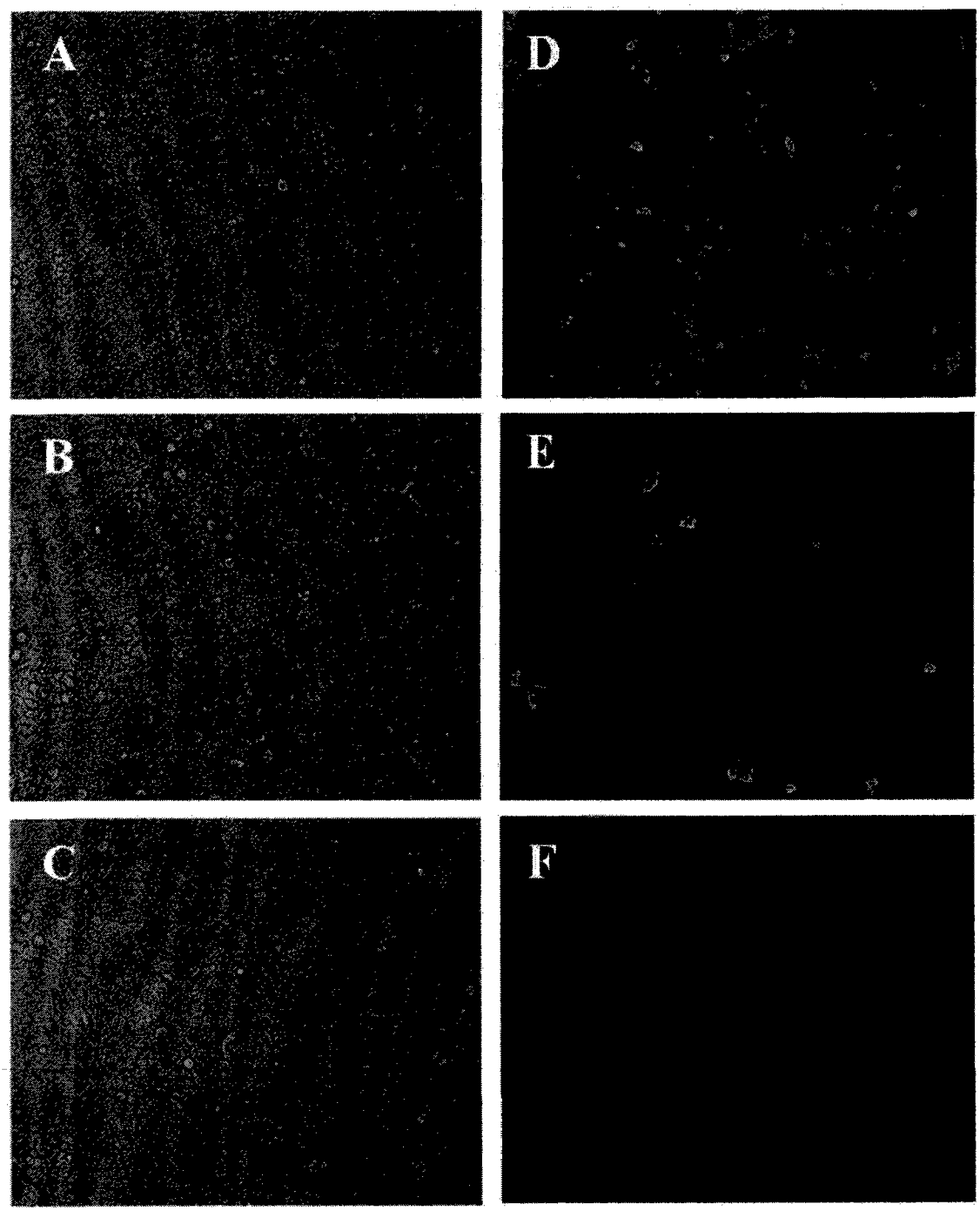


图 9

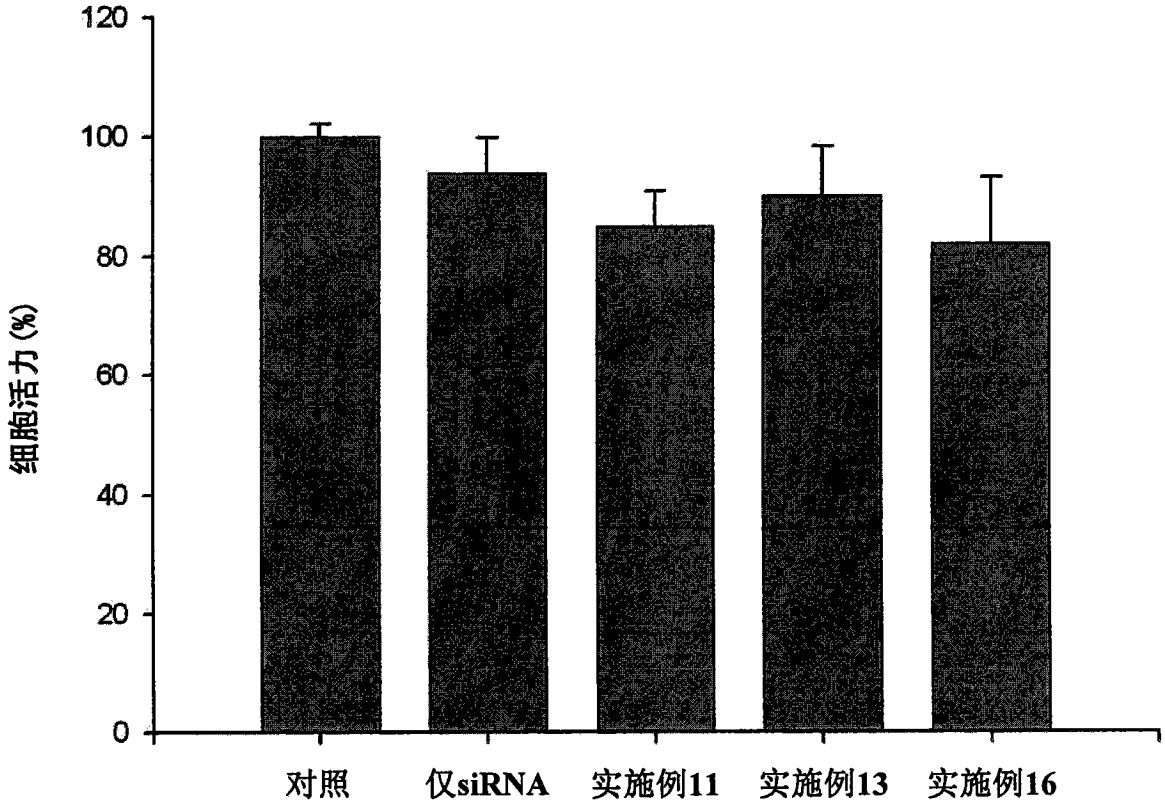


图 10

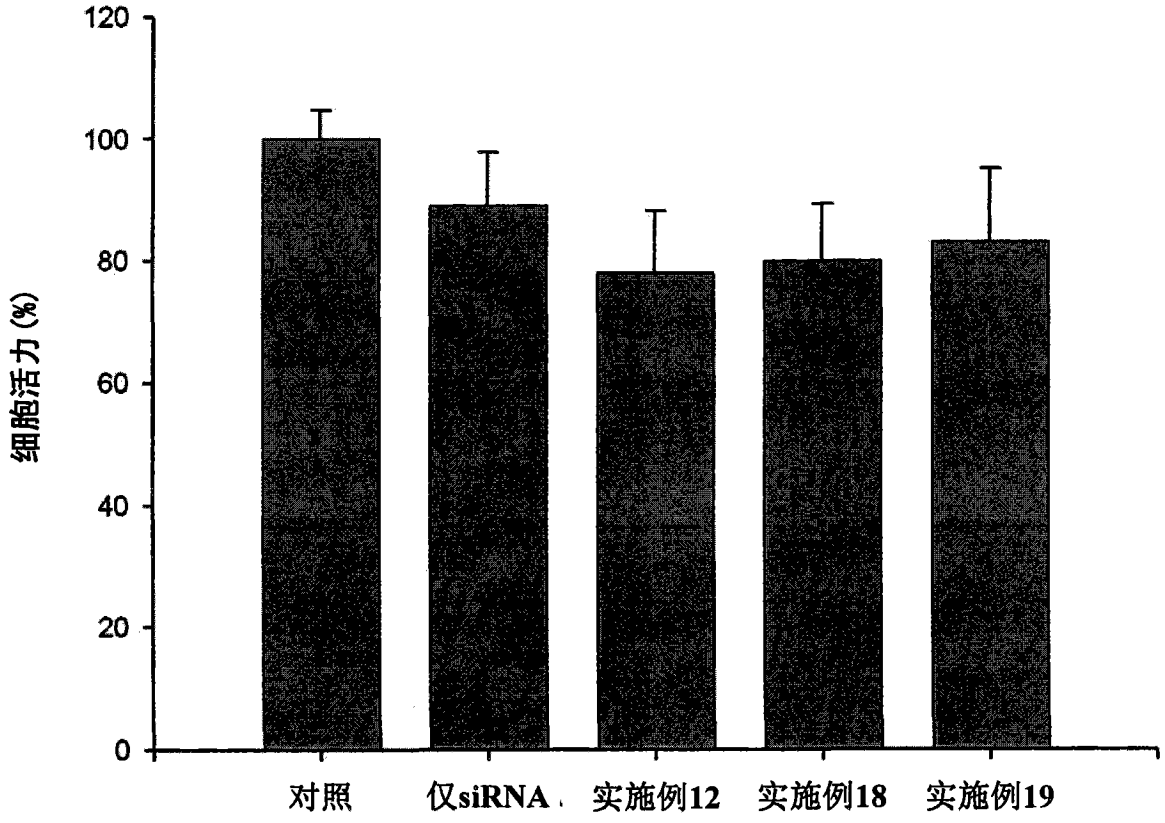

120
100
80
60
40
20
0
细胞活力(%)
对照
仅siRNA
实施例12
实施例18
实施例19

图 11

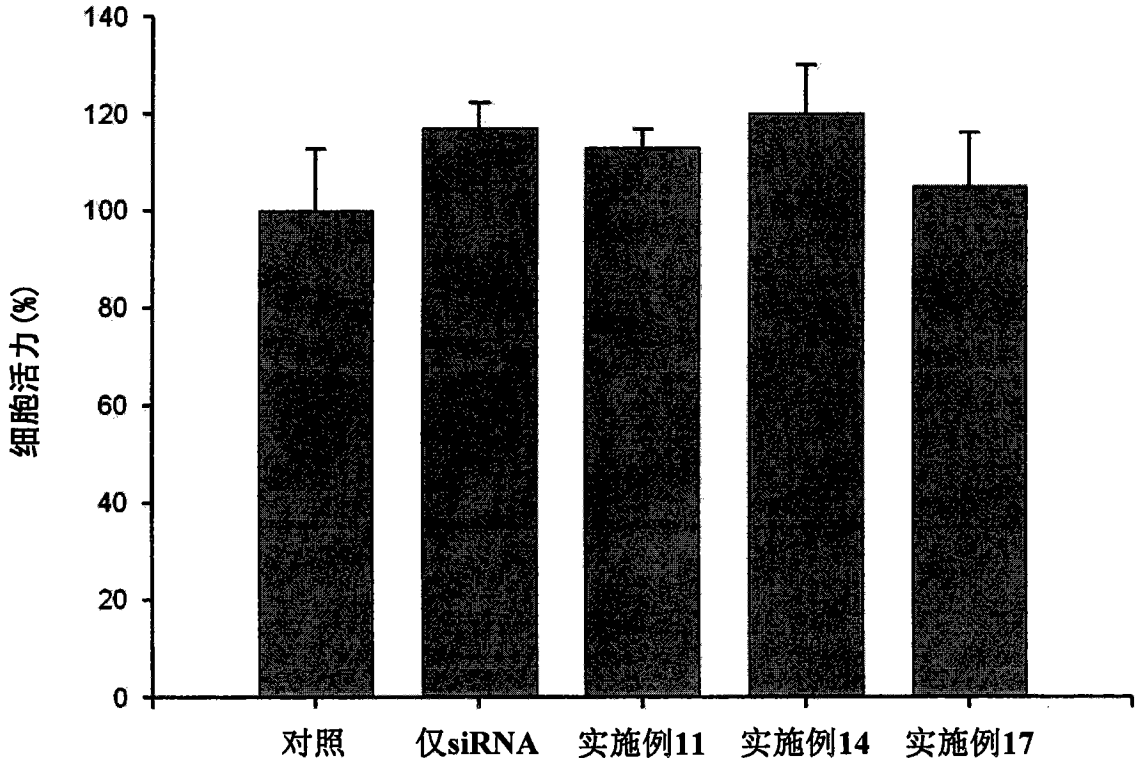

140
120
100
80
60
40
20
0
细胞活力(%)
对照
仅siRNA
实施例11
实施例14
实施例17

图 12