[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C12N 15/87
A61K 48/00 C07H 15/04

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 99813646.8

[43]公开日 2002年5月8日

[11]公开号 CN 1348498A

[22]申请日 1999.12.2 [21]申请号 99813646.8
[30]优先权
[32]1998.12.3 [33]FR [31]98/15309
[32]1999.1.26 [33]US [31]60/117,184
[86]国际申请 PCT/FR99/02995 1999.12.2
[87]国际公布 WO00/32803 法 2000.6.8
[85]进入国家阶段日期 2001.5.24
[71]申请人 阿文蒂斯药物股份有限公司
地址 法国安东尼
[72]发明人 J·赫斯科维丝 H·霍夫兰德
C·杰科宾
D·谢尔曼
[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 陈文平

权利要求书5页 说明书41页 附图页数3页

[54]发明名称 新的核酸转移试剂、含有它们的组合物及其应用

[57]摘要

本发明涉及用于体外、体内或离体向细胞中转移核酸的新转移试 剂、含有它们的组合物及其应用。更具体地说,本发明涉及含有一个 一方面与多阳离子体另一方面与至少一个亲水取代基化学结合的疏水 间隔臂的新核酸转移试剂。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

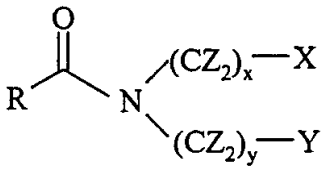
1、核酸转移试剂，其特征在于它包含一个一方面与多阳离子体另一方面与至少一个亲水取代基化学结合的疏水间隔臂。

2、权利要求1的核酸转移试剂，其特征在于所述疏水间隔臂由2条或3条线性脂肪烃链构成，每条链含10-20个碳原子，每条链可以有不同的长度，或者所述疏水间隔臂由一个含有20-50个碳原子的很长的线性脂肪烃链构成。

3、权利要求1的核酸转移试剂，其特征在于所述亲水取代基选自羟基、氨基、多元醇、糖、或亲水性肽。

4、权利要求1或3的核酸转移试剂，其特征在于至少一个亲水取代基是糖。

5、权利要求1的核酸转移试剂，其具有通式(I)：



(I)

其中：

- R代表多阳离子体，

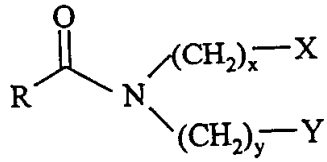
-Z 代表氢原子或氟原子，不同的Z互相独立，

- x和y相互独立地代表10-22的整数，而X和Y相互独立地代表氢原子、其中Alk代表1-4个碳原子的直链或支链烷基的-OAlk基团、羟基、氨基、多元醇、糖、亲水或非亲水肽、或寡核苷酸，条件是X和Y至少一个代表选自羟基、氨基、多元醇、糖或亲水肽的亲水基团，

-或者，x等于0或1，y为20-50的整数，而X为氢原子或其中Alk代表1-4个碳原子的直链或支链烷基的-OAlk基团，Y为选自羟基、氨基、多元醇、糖或亲水肽的亲水基团，

视情况其呈异构体形式，以及它们的混合物、或可能时呈它们的盐形式。

6、权利要求1或5的核酸转移试剂，其具有通式(III)：



(III)

其中:

-R 代表多阳离子体,

-x和y相互独立地代表10-22的整数，而X和Y相互独立地代表氢原子或糖，条件是X和Y至少一个代表糖,

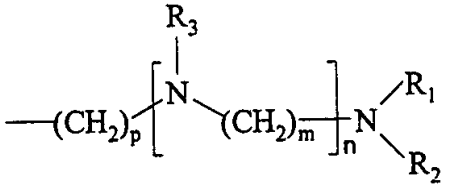
-或者，x等于0或1，y为20-50的整数，而X为氢原子，Y为糖,

视情况其呈异构体形式，以及它们的混合物、或可能时呈它们的盐形式。

7、权利要求6的核酸转移试剂，其特征在于x和y相互独立地代表10-22的整数，而X和Y之一代表氢原子，另一个代表糖。

8、权利要求1和5-7之一的核酸转移试剂，其特征在于所述多阳离子体为直链或支链多胺，每个氨基被一个或多个亚甲基分隔开。

9、权利要求8的核酸转移试剂，其特征在于所述多阳离子体具有通式(II):



(II)

其中:

- R_1、R_2和R_3独立地代表氢原子或$(CH_2)_qR'R''$基团，q为1-6的整数，其在不同的R_1、R_2和R_3基团间是独立的，条件是R_1、R_2和R_3中至少一个不是氢原子,

- R 和R" 独立地代表氢原子或$(CH_2)_qNH_2$基团，q如上所定义,

- m代表1-6的整数,

-n和p独立地代表0-6的整数，当n大于或等于2时，m可以取不同的值，通式(II)中R_3的意义可以不同，当n等于0时，取代基R_1和R_2中至

少一个不是氢原子。

10、权利要求1和5-7之一的核酸转移试剂，其特征在于所述多阳离子体选自精胺、亚精胺、尸胺、腐胺、六亚甲基四胺(六胺)、甲基丙烯酰氨基丙基-三甲基氯化铵(AMBTAC)、3-丙烯酰氨基-3-甲基丁基三甲基氯化铵(AMBTAC)、聚乙烯胺、聚乙烯亚胺、或紫罗烯。

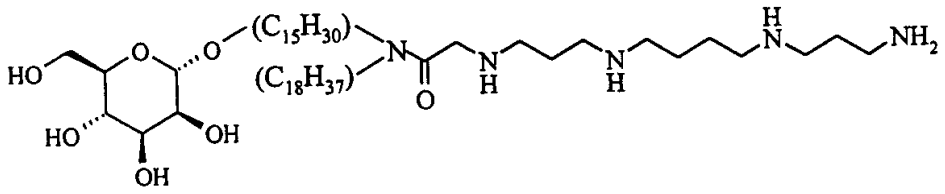
11、权利要求3-7之一的核酸转移试剂，其特征在于所述糖是单糖、寡糖或多糖分子。

12、权利要求11的核酸转移试剂，其特征在于所述糖选自葡萄糖、甘露糖、鼠李糖、半乳糖、果糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、岩藻糖、纤维二糖、阿洛糖、昆布二糖、龙胆二糖、2-葡糖-β-葡糖苷、蜜二糖、葡聚糖、α-直链淀粉、支链淀粉、果聚糖、甘露聚糖、木聚糖和阿聚糖。

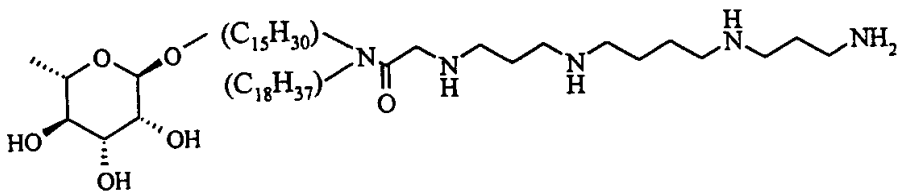
13、权利要求5的核酸转移试剂，其特征在于所述寡核苷酸是含有一个或多个核苷酸、脱氧核苷酸、核糖核苷酸和/或脱氧核糖核苷酸的链，任选地与一个或多个具有不同性质的分子偶联。

14、权利要求5的核酸转移试剂，其特征在于所述肽指任何含有由肽键相互连接的一个或多个氨基酸的链，任选地被一个或多个饱和或不饱和、直链、支链或环状脂肪基团取代。

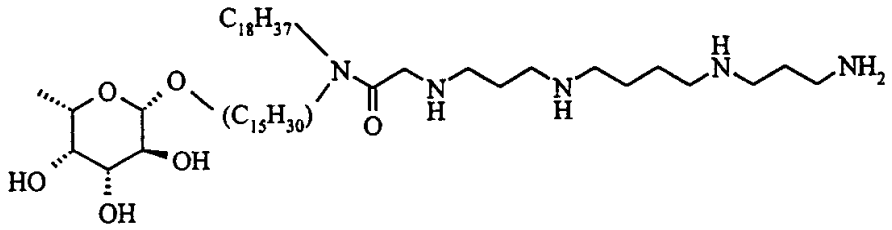
15、权利要求1的转移试剂，其为下式化合物:



16、权利要求1的转移试剂，其为下式化合物:



17、权利要求1的转移试剂，其为下式化合物:



18、含有权利要求1-17中所定义核酸转移试剂和核酸的组合物。

19、权利要求18的组合物，其特征在于核酸为脱氧核糖核酸或核糖核酸。

20、权利要求18或19的组合物，其特征在于所述核酸包含调控序列控制下的一个或多个具有治疗意义的基因。

21、权利要求18-20之一的组合物，其特征在于所述核酸是一种反义基因或序列。

22、权利要求18的组合物，其特征在于它还含有一种或多种添加剂。

23、权利要求22的组合物，其特征在于所述添加剂为一种或多种中性脂。

24、权利要求23的组合物，其特征在于所述中性脂为具有两条脂肪链的脂。

25、权利要求23或24的组合物，其特征在于所述中性脂为在生理条件下为两性离子或无离子电荷的天然或合成脂类，选自二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE）、油酰基棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(POPE）、二硬脂酰基-、二棕榈酰基-、二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺以及它们的1-3次N-甲基化衍生物、磷脂酰基甘油、二酰基甘油、糖基二酰基甘油、脑苷脂(具体如半乳糖脑苷脂）、鞘脂(具体如鞘磷脂），或脱唾液酸神经节苷脂(具体如脱唾液酸GM1和GM2)。

26、权利要求22的组合物，其特征在于所述添加剂为直接或间接参与核酸浓集的化合物。

27、权利要求26的组合物，其特征在于所述添加剂全部或部分衍生自鱼精蛋白、组蛋白、核仁蛋白和/或它们的衍生物，或全部或部分由肽基元(KTPKKAKKP）和/或(ATPAKKAA）构成，基元数可以是2-10，这些基元可以连续地或不连续地重复。

28、权利要求18-27的组合物，其特征在于它包含注射制剂的药物可接受的载体。

29、权利要求18-27的组合物，其特征在于它包含权利要求18-27的组合物，其特征在于它包含用于皮肤或粘膜应用的药物可接受的载体。

30、权利要求1-17所定义的转移试剂制备用于治疗疾病的药物的应用。

31、动物或人体的治疗方法，包括下列步骤:

(1) 将核酸与权利要求1-17所定义的转移试剂接触以形成一种复合物，和

(2) 将所述人或动物的细胞与(1)中形成的复合物接触。

32、向细胞中转移核酸的方法，该方法包括下述步骤:

(1) 让核酸与所定义的转移试剂接触，以形成一种复合物，和

(2) 让细胞与(1) 中生成的复合物接触。

33、根据权利要求31或32的向细胞中转移核酸的方法，其特征在于所述转移试剂和/或所述核酸预先与权利要求22-27中所定义的一种或多种添加剂混合。

说　明　书

新的核酸转移试剂、含有它们的组合物及其应用

本发明涉及用于在体外、体内或离体向细胞中转移核酸的新的转移试剂、含有它们的组合物及其应用。

随着生物技术的发展，向细胞中有效转移核酸正成为具有众多生物技术应用的基础技术。例如为了生产重组蛋白，或在实验室对基因表达调控、基因克隆的研究，或任何其他牵涉DNA的操作，都可能涉及体外细胞中的核酸转移。再例如在实现免疫接种、研究标记或治疗方法中，也可能涉及在体内细胞中的核酸转移。还可能涉及在从机体取出的细胞中转移基因，以便随后回输，例如为了建立转基因动物。

现在，向细胞中转移基因的最普遍的方法是使用病毒载体。但这些方法没能完全排除危险，也提出了基于使用合成病毒的许多其他方法。这些合成载体有两个主要功能：复合并压缩待转移的核酸，促进其通过浆膜和有时通过两层核膜。

已开发出许多类型的合成载体，例如聚合物或生化载体(由与细胞受体结合的阳离子蛋白构成)，但在非病毒转染方面重要的进步首先是由酯转染剂、特别是阳离子脂的发展取得的。已证明阳离子脂类由于其总的正电荷自动干扰总体带负电的DNA，形成能够与细胞膜融合的核脂复合物，从而得以在细胞内释放DNA。

已合成了不同类型的阳离子脂类：带有季铵基团的脂类(例如DOTMA，DOTAP，DMRIE，DLRIE等)，脂多胺如DOGS、DC-Chol或专利申请WO97/18185中公开的那些脂多胺，同时结合有季铵基团和多胺的脂类如DOSPA，以及带有各种其他阳离子基团、特别是离子化脒基团的脂类(例如ADPDE，ADODE或专利申请WO97/31935的脂类)。实际上，阳离子脂类的结构多样性部分反映了构效关系的观察结果。

但是，这些合成载体的应用产生了许多困难，其效力有待改善。尤其是，可能希望得到非阳离子或阳离子较少的载体，这是因为如下

各种原因:

-核酸和转移试剂所形成的复合物由于其总体正电荷具有被内织网系统截取的倾向，这导致其被消除，

-由于所形成复合物的总体正电性，胞浆蛋白有吸附在其表面的倾向，这导致转染能力的损失，

-对于局部注射的情况，强总正电荷的存在妨碍核酸复合物向给药部位之外的扩散，因为这些复合物被吸附在细胞外基质上。这些复合物因此不能到达靶细胞，结果导致相对所注射的复合物量转移效率降低，

-最后，基因非病毒转染领域的许多成员已显示，阳离子脂类或聚合物具有致炎作用。

另外，迄今为止开发的具有低电荷比的合成载体形成稳定制剂通常是困难的，甚至不可能，而且已证明电荷比低时常常转移效力就低(Pitard等，PNAS USA，94，p14412-14417，1997)。在下文中，“电荷比”指转移试剂的正电荷与DNA的负电荷的比例。该比例常用每微克DNA的转移试剂的纳摩尔数表示。

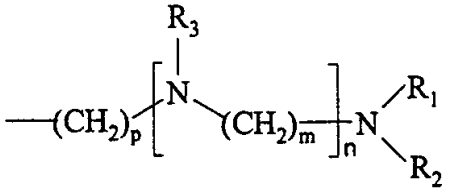
这些问题就是本申请人提出的新转染试剂(构成本发明的主题)所要解决的。实际上，它们特别的结构形成了一个疏水锚位，其一方面与多阳离子体结合、从而得以与核酸形成复合物，另一方面与至少一个亲水头结合、从而与非病毒转染中常规使用的阳离子脂类或聚合物相比降低表观总电荷密度。至少一个亲水头的存在通过降低与核酸所形成复合物的ζ电势建立了一种“电荷屏障”。因此，这些复合物对机体显示较低的阳离子性，从中产生了有利的结果。另外，本发明的转染试剂在物化性质方面特别有利，当它们与核酸以低电荷比接触时特别稳定。

因此，本发明的第一个主题涉及新的核酸转移试剂，其带有一个一方面与多阳离子体另一方面与至少一个亲水取代基化学结合的疏水间隔臂。

所述多阳离子体使得能通过与核酸的阴离子电荷作用与核酸形成

复合物。所述疏水间隔臂有双重功能。它一方面使得能通过细胞膜，另一方面它使得与核酸形成的复合物在生物介质中可维持存在。实际上，这种疏水间隔臂在复合物上建立了一种物理限制，它保护核酸对抗外界环境。复合物生存所需的疏水性容易由本领域技术人员确定，例如使用常规研究方法或通过常用摸索方法。最后，亲水取代基的存在使得所形成的复合物ζ电势减小，这使得所述复合物对外界环境的阳离子性较小。

在本发明中，多阳离子体是易于与核酸结合的多阳离子的直链或支链分子。在本发明中，与核酸结合指任何类型的连接，例如共价连接、静电相互作用、离子键、氢键等。优选，多阳离子体是一种直链或支链的多胺，每个氨基被一个或多个亚甲基分隔。任选地，这种多胺还可以被其他阳离子功能团取代，如脒离子或胍离子、环形胍等。尤其涉及如专利申请WO96/17823、WO97/18185、WO97/31935、WO98/54130或WO99/51581中所定义的多胺，更广义地讲，在涉及本领域技术人员已知阳离子脂类结构的任何文献中所定义的多胺。根据本发明的一个优选方案，多阳离子体为通式(II)的多胺:



(II)

其中:

- R_1、R_2和R_3独立地代表氢原子或$(CH_2)_qR'R''$基团，q为1-6的整数，其在不同的R_1、R_2和R_3基团间是独立的，条件是R_1、R_2和R_3中至少一个不是氢原子，

- R'和R''独立地代表氢原子或$(CH_2)_qNH_2$基团，q如上所定义，

- m代表1-6的整数，

-n和p独立地代表0-6的整数，当n大于或等于2时，m可以取不同的值，通式(II)中R_3的意义可以不同，当n等于0时，取代基R_1和R_2中至少一个不是氢原子。

其他可能的多阳离子体还选自精胺、亚精胺、尸胺、腐胺、六亚甲基四胺(六胺)、甲基丙烯酰氨基丙基-三甲基氯化铵(AMBTAC)、3-丙烯酰氨基-3-甲基丁基三甲基氯化铵(AMBTAC)、聚乙烯胺、聚乙烯亚胺、或紫罗烯(参考文献:Barton等，综合有机化学(Comprehensive Organic Chemistry, Vol. 2, Ed. Pergamon Press, p90; 聚合物科学和工程大全(Encyclopedia of Polymer Science and Engineering)第二版，Ed. Wiley Interscience, Vol. 11, p489; Mahler和Cordes, 生物化学(Biological Chemistry, Harper International Edition, p124)。

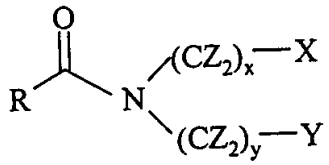
只要具有保证保护核酸和使其通过膜的足够的疏水性，疏水间隔臂可以采取相当不同的结构。本领域技术人员利用普通研究方法可以测定这种足够的疏水性。根据本发明的一个优选实施方案，疏水间隔臂由2条或3条线性脂肪烃链构成(即，每条链10-20个碳原子，优选每条链12、14、15、16、17或18个碳原子，每条链可以有不同的长度)。根据另一方案，疏水间隔臂由一个很长的线性脂肪烃链构成，即含有20-50个碳原子，优选40-50个碳原子、更优选44-50个碳原子。

适合的亲水取代基例如选自羟基、氨基、多元醇、糖、或亲水性肽。多元醇指任何含有至少2个羟基的直链、支链或环状烃分子。作为实例可以举出甘油、乙二醇、丙二醇、丁糖醇、戊糖醇、环状戊糖醇(或栎醇)、己糖醇如甘露糖醇、山梨糖醇、半乳糖醇，环状己糖醇或肌醇等(Stanek等，The Monosaccharidess Academic Press, 621-655页和778-855页)。

根据一个优选实施方案，本发明的转移试剂含有至少一个作为糖的亲水取代基。本发明中，“糖”指任何由一个或多个单糖(saccharide)组成的分子。作为糖的例子例如可以提到吡喃糖和呋喃糖，例如葡萄糖、甘露糖、鼠李糖、半乳糖、果糖、或麦芽糖、乳糖、蔗糖、岩藻糖、纤维二糖、阿洛糖、昆布二糖、龙胆二糖、2-葡糖-β-葡糖苷、蜜二糖等。优选地，糖选自葡萄糖、甘露糖、鼠李

糖、半乳糖、果糖、乳糖、蔗糖和纤维二糖。另外还涉及所谓的“复合”糖，即多个糖互相共价连接，其中每个糖优选选自上述名单。作为适用的多糖，可以举出葡聚糖、α-直链淀粉、支链淀粉、果聚糖、甘露聚糖、木聚糖和阿聚糖。某些优选的糖还可以与细胞受体相作用，例如某些类型的凝集素。

特别优选地，本发明的转移试剂可以由通式(I)代表:



(I)

其中

- R代表多阳离子体，

-Z 代表氢原子或氟原子，不同的Z互相独立，

- x和y相互独立地代表10-22的整数，而X和Y相互独立地代表氢原子、其中Alk代表1-4个碳原子的直链或支链烷基的-OAlk基团、羟基、氨基、多元醇、糖、亲水或非亲水肽、或寡核苷酸，条件是X和Y至少一个代表选自羟基、氨基、多元醇、糖或亲水肽的亲水基团，

-或者，x等于0或1，y为20-50的整数，而X为氢原子或其中Alk代表1-4个碳原子的直链或支链烷基的-OAlk基团，Y为选自羟基、氨基、多元醇、糖或亲水肽的亲水基团。

在本发明中，通式(I)的多阳离子体、多元醇和糖如上所定义。

x和y在通式(I)中定义为根据情况在10-22或20-50之间取值。优选，x和y相互独立地在12-18之间。更优选x和y的值相互独立地为14、15、16、17或18。当x等于0或1时，y优选为30-50，或40-50。更优选，y为44-50。

在本发明中，“寡核苷酸”是指含有一个或多个核苷酸、脱氧核苷酸、核糖核苷酸和/或脱氧核糖核苷酸的链，这些核苷酸是以碱基的存在互相区别的单体单元，碱基可以选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或尿嘧啶[见Lehninger Biochimie, Flammarion Medecine Science, 第二版, 305-329页]。由于它们形成碱基对的

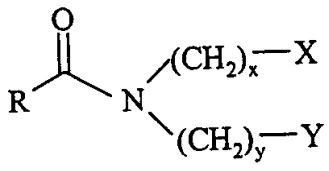
特性，寡核苷酸大量用于分子生物学，例如作为连接子(连接分子)或作为探针。另外，寡核苷酸还可以以偶联物的形式使用，即与一个或多个具有不同特性的分子偶联。例如，寡核苷酸可以与反应性化学基团、荧光基团或化学发光基团、或与有利于分子间相互作用以促进进入细胞的基团偶联。生物偶联物化学(Bioconjugate Chemistry)[John Goodchild，寡核苷酸和修饰的寡核苷酸的偶联物：其合成和性质综述(Conjugates of Oligonucleotides and Modified Oligonucleotides: a Review of their Synthesis and properties)，Vol. 1，No.3，1990，165-187页]中描述的这类偶联物具有许多用途和优势，例如能改善复合物进入细胞、降低被核酸酶的降解率、提高相关复合物的稳定性、跟踪寡核苷酸在机体中的命运等。因此，当接在本发明的转移试剂上时，这种寡核苷酸能给所述转移试剂带来额外的性质(例如导向或标记等特性)。这些寡核苷酸可以根据本领域技术人员已知的常规方法获得，也可以按以下文献描述的方法合成修饰的寡核苷酸：“生物偶联物化学”，John Goodchild，寡核苷酸和修饰的寡核苷酸的偶联物：其合成和性质综述，Vol. 1，No.3，1990，165-187页，或“四面体”(Tetrahedron)，Beaucage等，用亚磷酰胺合成修饰的寡核苷酸及其应用(The Synthesis of Modified Oligonucleotides by the Phosphoramiditeb Approach and Their Application)，Vol.49，No.28，p6123-6194，1993。

本发明中“肽”指含有由肽键相互连接的一个或多个氨基酸的链[Lehninger Biochimie，Flammarion Medecine Science，第二版]。其中的氨基酸可以是20种“常规”氨基酸，即通常在蛋白组成中发现的那些(丙氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，脯氨酸，苯丙氨酸，色氨酸，蛋氨酸，天冬氨酸，谷氨酰胺，赖氨酸，精氨酸，组氨酸，甘氨酸，苏氨酸，丝氨酸，半胱氨酸，酪氨酸，天冬酰胺，谷氨酸)，或者也可以是所谓的“稀有”氨基酸，例如，4-羟基脯氨

酸，锁链赖氨素，5-羟基赖氨酸，N-甲基赖氨酸，3-甲基组氨酸，异锁链赖氨素等。最后，还可以涉及以游离或结合形式出现在不同细胞或各种组织中并通常衍生自α-氨基酸的氨基酸(例如β-丙氨酸，γ-氨基丁酸，高半胱氨酸，鸟氨酸，刀豆氨酸，黎豆氨酸，β-氰基丙氨酸等)。这种肽例如可以使得导向于特定类型的细胞。对此，可以提到肽RGD或NLS。还可能涉及具有标记特性的肽序列，即可以识别，例如通过一些分析技术，如荧光分光光度法、红外分光光度法、核磁共振(NMR)等。对此，例如可以举出含有整联蛋白类蛋白主要和/或次要受体的识别表位Arg-Gly-Asp(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)的线性或环状肽序列或假肽序列。本发明的肽另外可以在一个或多个功能团上被取代，例如在α位羧基、α位氨基和/或每个氨基酸侧链的功能团上。例如，可以提到被下列基团的取代：含1-24个碳原子的直链、支链或环状饱和或不饱和脂肪基团，如胆甾烯基、花生四烯基(arachidonyl)或视黄酰基(retinoyl)，单芳基或多芳基基团，如取代或未取代的苄氧羰基、苄基酯或若丹明基衍生物。这些取代基的意义体现在对所述肽的化学性质和有时对生物性质的修饰，例如为了标记。当所述肽用作亲水取代基时，它们选自亲水肽，即仅由亲水性氨基酸组成的或部分由亲水性氨基酸组成但其组成使得总体为亲水性的肽。

根据本发明的一个优选方案，基团Z均代表氢原子。

根据本发明一个特别有利的方面，所述转移试剂具有通式(III)：



(III)

其中：

-R 代表多阳离子体，

- -x和y相互独立地代表10-22的整数，而X和Y相互独立地代表氢原子或糖，条件是X和Y至少一个代表糖，

-或者，x等于0或1，y为20-50的整数，而X为氢原子，Y为糖。

在本发明中，通式(III)中的多阳离子体、糖、x和y如通式(I)中所定义。

特别优选的转移试剂具有通式(III)，x和y相互独立地为10-22的整数，X和Y之一代表氢原子，另一个为糖。根据另一个有利的方案，本发明的转移试剂具有通式(III)，且x等于0，y为40-50的整数，X代表氢原子，Y为糖。

应理解，本发明还涉及通式(I)产品的异构体(当其存在时)、它们的混合物或它们的盐。

值得注意的是，本发明的化合物可以以药物可接受的无毒盐的形式存在。这些无毒盐包括与无机酸(例如盐酸，硫酸，氢溴酸，磷酸，硝酸)的盐，与有机酸(例如乙酸，丙酸，琥珀酸，马来酸，羟基马来酸，苯甲酸，富马酸，甲磺酸或草酸)的盐，与无机碱(例如氢氧化钠，氢氧化钾，氢氧化锂，氢氧化钙)的盐，与有机碱(例如叔胺如三乙胺，哌啶，苄基胺)的盐。

根据本发明，通式(I)产物的制备可按以下步骤进行:

1) 首先通过打开相应的内酯制备带有羟基功能团和酯功能团的x个碳原子(x如上所定义)的烷基链。该反应一般在醇中、碱性pH和-10°C到室温的温度下进行。例如，醇可以是甲醇或乙醇。

2) 然后，将基团X结合在上步得到的双官能烷基链上。当X代表糖时，在含氯溶剂如二氯甲烷或氯仿中、在路易斯酸存在下、于-5°C到10°C的温度下进行缩合。路易斯酸例如可以选自氯化锡、氯化铁、对甲苯磺酸(tsOH)、三甲基甲硅烷基三氟甲磺酸(TMStf)、三氟化硼醚化物等[Kazunobu Toshima等，O-糖基化方法的最新进展和其在天然产物合成中的应用，Chem. Rev. 1993, Vol.93, 1503-1531页]。

当X代表亲水或非亲水性肽基团时，按常规方法(Bodanski M.，肽合成原理和实践，Springe-Verlag编)或本领域技术人员已知的任何类似方法进行肽偶联。特别是，该反应一般在非亲核性碱存在下、

在适当的非质子溶剂中、在0-100℃的温度下和9-11的pH条件下进行。例如，氯仿、二甲基甲酰胺、甲基吡咯烷酮、乙腈、二氯甲烷、甲苯或苯可用作溶剂。所用的非亲核性碱优选为叔胺、碳酸钙或碳酸氢钠。更优选，所用的碱是叔胺，如三乙胺(TEA)或N-乙基二异丙基胺。肽偶联有利地在0-50℃、优选10-30℃下进行。

当希望X代表羟基时，不进行这一步。

当X代表氨基时，按本领域技术人员已知的能从醇获得胺的常规方法通过亲核取代进行反应。

当X代表-OAlk基团时，按本领域技术人员已知的常规方法或类似方法进行醇功能团的烷基化。例如，任选在催化剂如HBF_4或硅胶存在下，与式Alk-N_2的偶氮化合物反应。还可以在Williamson反应条件下进行，即在碱性介质中将式Alk-Hal的化合物(Hal代表卤原子如氯、溴或碘)与带有醇功能团的链反应。

同样的Williamson型反应也可以在希望X代表多元醇时使用。

最后，当X代表寡核苷酸时，按本领域技术人员已知的共价接枝寡核苷酸的常规方法将其与双官能链偶联。例如，所述寡核苷酸借助于适当的接头(连接分子)连接。

3) 第三步，双官能链上存在的酯功能基按已知方法水解成酸功能基。例如，可以在高沸点醇中碱性介质中在50℃至反应混合物回流温度间的温度下进行。

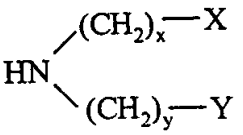
4) 然后，将通式(IV)的取代或未取代的烷基胺链

$$H_2N-(CH_2)_y-Y \qquad (IV)$$

其中y和Y如上所定义，与上步获得的化合物按常规肽偶联方法(Bodanski M.，肽合成原理和实践，Springe-Verlag编)或本领域技术人员已知的任何类似方法偶联。具体讲，该反应一般在适当的非质子溶剂中在非亲核性碱存在下在0-100℃的温度下进行，pH调节在9-11之间。例如，氯仿、二甲基甲酰胺、甲基吡咯烷酮、乙腈、二氯甲烷、甲苯或苯可用作溶剂。所用的非亲核性碱优选为叔胺、碳酸钙或碳酸氢钠。更优选，所用的碱是叔胺，如三乙胺(TEA)或N-乙基二异

丙基胺。肽偶联有利地在0-50℃、优选10-30℃下进行。通式(IV)的化合物可在市场上得到或者可以通过Y与相应的未取代烷基胺按类似于以上2)中所述方法缩合得到。

5) 然后将上步获得的酰胺还原成胺。按本领域技术人员已知的常规方法进行该反应。例如，在无水有机溶剂如无水四氢呋喃中，在氢化锂铝$LiAlH_4$的作用下进行。可以使用的其他还原剂例如有硼烷、二甲硫醚中的硼烷(BH_3-SMe_2)、硼氢化钠/四氯化钛($NaBH_4$, $TiCl_4$)、三氯氧磷/锌($POCl_3$/Zn)、五硫化磷(P_4S_{10})/Raney镍等[Richard C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Inc., 1989]。还可以通过催化氢化进行。有利地，在无水四氢呋喃中在混合物回流温度下用氢化锂铝$LiAlH_4$作用进行该反应。从而得到通式(V)的化合物:



(V)

其中X、Y、x和y如上所定义。

6) 最后，在最后一步中，将相应于如上所定义多阳离子体R的酸衍生物按常规肽偶联方法(Bodanski M., 肽合成原理和实践, Springe-Verlag编)或本领域技术人员已知的任何类似方法与通式(IV)的化合物偶联。具体讲，该反应一般在适当的非质子溶剂中在非亲核性碱存在下在0-100℃的温度下进行，pH调节在9-11之间。例如，氯仿、二甲基甲酰胺、甲基吡咯烷酮、乙腈、二氯甲烷、甲苯或苯可用作溶剂。所用的非亲核性碱优选为叔胺、碳酸钙或碳酸氢钠。更优选，所用的碱是叔胺，如三乙胺(TEA)或N-乙基二异丙基胺。肽偶联有利地在0-50℃、优选10-30℃下进行。相应于多阳离子体的酸衍生物可在市场上得到。

根据另一方案，本发明的转移试剂可按以下方式制备:

1) 首先通过打开相应的内酯制备带有一个羟基功能团和一个酯功能团的x个碳原子(x如上所定义)的烷基链。该反应一般在醇中、碱

性pH和-10°C到室温的温度下进行。例如，醇可以是甲醇或乙醇。

2) 然后，在该双官能烷基链上偶联一个通式(IV)的取代或未取代的烷基胺链

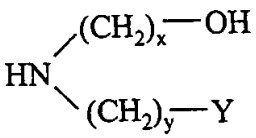
$$H_2N-(CH_2)_y-Y \qquad (IV)$$

其中y和Y如上所定义。该反应在高于每种反应物的熔点的温度下在有或无真空的条件下进行。该反应还可以在醇溶剂存在下在回流温度下进行。例如，溶剂可以是甲醇或乙醇。例如在45-60°C的温度下进行。

该反应还可以在醇如甲醇作为溶剂存在下在混合物回流温度下进行。另一种选择是将通式(IV)的化合物与内酯直接偶联(此时，不进行第一步的内酯打开)。

通式(IV)的化合物可以在市场上得到或可以按上述类似方法将相应未取代的烷基胺与Y偶联而得到。

3) 然后将获得的双链双官能酰胺还原成胺。按本领域技术人员已知的常规方法进行该反应。例如，在无水有机溶剂如无水四氢呋喃中，在氢化锂铝$LiAlH_4$的作用下进行。可以使用的其他还原剂例如有硼烷、二甲硫醚中的硼烷(BH_3-SMe_2)、硼氢化钠/四氯化钛($NaBH_4$, $TiCl_4$)、三氯氧磷/锌($POCl_3$/Zn)、五硫化磷(P_4S_{10})/Raney镍等[Richard C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Inc., 1989]。还可以通过催化氢化进行。有利地，在无水四氢呋喃中在混合物回流温度下用氢化锂铝$LiAlH_4$作用进行该反应。从而得到通式(VI)的化合物:



(VI)

其中Y、x和y如上所定义。

4) 然后，将X基团缩合在上步获得的通式(VI)的胺上。按类似于第一合成路线中所述的方法进行该缩合。

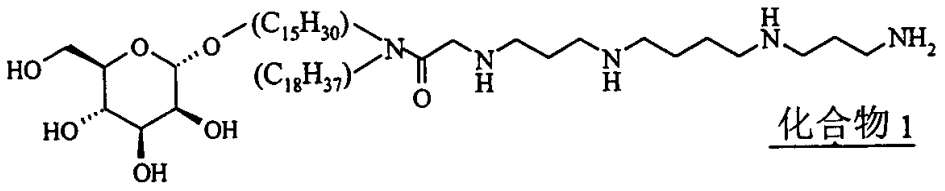
5) 最后，在最后一步中，将相应于如上所定义多阳离子体R的酸

衍生物按常规肽偶联方法(Bodanski M.，肽合成原理和实践，Springe-Verlag编)或本领域技术人员已知的任何类似方法与通式(VI)的化合物偶联。具体讲，该反应一般在适当的非质子溶剂中在非亲核性碱存在下在0-100°C的温度下进行，pH调节在9-11之间。例如，氯仿、二甲基甲酰胺、甲基吡咯烷酮、乙腈、二氯甲烷、甲苯或苯可用作溶剂。所用的非亲核性碱优选为叔胺、碳酸钙或碳酸氢钠。更优选，所用的碱是叔胺，如三乙胺(TEA)或N-乙基二异丙基胺。肽偶联有利地在0-50°C、优选10-30°C下进行。相应于多阳离子体的酸衍生物可在市场上得到。

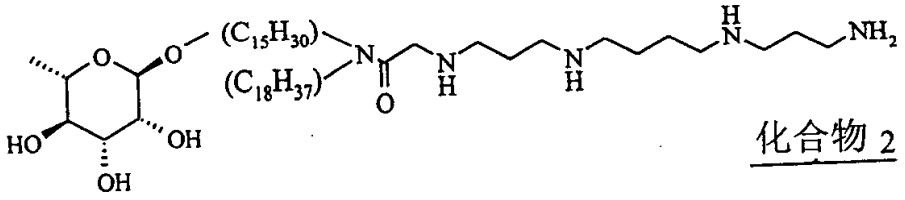
自然，当X、Y和/或多阳离子体的取代基可能干扰反应时，优选预先用适当的基团保护这些取代基，所述基团可以在不影响分子其余部分的情况下接上和消除。按本领域技术人员已知的常规方法进行这种保护，特别是根据T.W. GREENE，有机合成中的保护基，第二版，Wiley-Interscience、McOMIE，有机化学中的保护基，Plenum Press(1973)、或Philip J Kocienski，保护基，Thieme中描述的方法。

另外，上述制备方法的每一步后视情况可以有按本领域技术人员已知方法分离和纯化所得化合物的步骤。

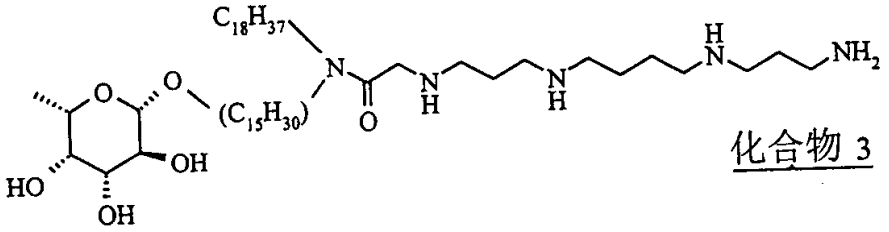
作为本发明有利的核酸转移试剂的说明性实例，可以提到下列化合物:



化合物1



化合物 2



化合物 3

本发明的另一个主题涉及含有如上所定义的核酸转移试剂和核酸的组合物。每种成分的量容易由本领域技术人员根据所用的转移试剂、核酸、所寻求的应用(特别是待转移的细胞类型)来调节。

在本发明中，“核酸”应该理解是脱氧核糖核酸或核糖核酸。可能涉及天然或人工的序列，特别是基因组DNA(gDNA）、互补DNA(cDNA）、信使RNA(mRNA）、转移RNA(tRNA）、核糖体RNA(rRNA)、杂合序列或合成或半合成序列、修饰或未修饰的寡核苷酸。这些核酸可以来自人、动物、植物、细菌、病毒等。采用本领域技术人员已知的任何技术，特别是采用文库筛选、化学合成，或采用混合方法，其中包括化学修饰或酶修饰采用筛选文库所得到的序列，可以得到这些核酸。这些核酸可以采用化学方法进行修饰。

更特别地涉及脱氧核糖核酸，它们可以是单链或双链脱氧核糖核酸，以及短的寡核苷酸或较长的序列。特别是，这些核酸有利地由质粒、载体、附加体、表达盒等组成。这些脱氧核糖核酸可以带有在靶细胞中有功能或非功能性复制起点、一个或多个标记基因、转录或复

制调控序列、有治疗意义的基因、修饰或未修饰的反义序列、与其他细胞组分结合的区域等。

优选地，核酸含有在调控序列如在靶细胞中有活性的一个或多个启动子和转录终止子控制下的一个或多个有治疗意义的基因。

在本发明中，关于“有意义的基因”特别应该理解为任何编码具有治疗效果的蛋白产物的基因。如此编码的蛋白产物特别可以是一种蛋白质或一种肽。该蛋白产物相对宿主细胞可以是同源或内源的，即当细胞没有任何疾病的情况下在宿主细胞中正常表达的产物。此时，蛋白的表达可以例如克服细胞中的表达不足、或由于突变所表达的蛋白无活性或活性低、或所述蛋白的过量表达。有治疗意义的基因还可以编码稳定性提高、活性改变等的细胞蛋白突变体。该蛋白产物还可以是相对靶细胞异源的。此时，所表达的蛋白例如可以补充或带来细胞中缺乏的活性，使其得以对抗疾病或刺激免疫应答。

在本发明的治疗产物中，可以特别举出酶，血液衍生物，激素，淋巴因子：白介素、干扰素、TNF等(FR92/03120)，生长因子，神经递质或其前体或合成酶，营养因子(BDNF、CNTF、NGF、IGF、GMF、aFGF、bFGF、NT3、NT5、HARP/多效因子等)，载脂蛋白(ApoAI，ApoAIV，ApoE等，FR93/05125)，营养不良蛋白或小营养不良蛋白(FR91/11947)，与黏稠物阻塞症相关的CFTR蛋白，肿瘤抑制基因(p53，Rb，Rap1A，DCC，k-rev等，FR93/04745)，编码凝血相关因子的基因(第VII、VIII、IX因子)，参与DNA修复的基因，自杀基因(胸苷激酶，胞嘧啶脱氨酶)，血球蛋白或其他蛋白转运蛋白、代谢-分解代谢酶的基因等。

有治疗意义的核酸还可以是反义基因或序列，其在宿主细胞中的表达可以控制细胞基因的表达或mRNA的转录。这种序列例如可以在靶细胞中转录成细胞mRNA的互补RNA并因此阻断其翻译成蛋白质，参见专利EP 140 308。治疗基因还包括核酶编码序列，它们能够选择性地破坏靶RNA（EP 321 201）。

如前面所指出的，核酸还可以含有一个或多个编码抗原性肽的基

因，这种肽在人体或动物中能够造成免疫应答。在这种特定实施方式中，本发明因此使得可能制备用于人体或动物的疫苗或进行免疫治疗，尤其是用于抗微生物、病毒或癌的疫苗。特别地涉及对E－B病毒、HIV病毒、乙型肝炎病毒(EP 185 573）、伪狂犬病病毒、“合胞体形成病毒”、其他病毒特异的抗原性肽、或对肿瘤特异的抗原性肽(EP 259 212）。

优选地，核酸还含有允许有治疗意义的基因和/或抗原肽编码基因在细胞或所希望的器官中表达的序列。这可以涉及天然地负责表达所考虑的基因的序列，只要这些序列在感染的细胞中能够起作用。还涉及不同来源的序列(负责表达其他的蛋白质，或甚至是合成的）。具体地，可以涉及真核细胞或病毒基因的启动子序列。例如，可以涉及来自人们希望感染的细胞基因组的启动子序列。同样地，可以涉及来自病毒基因组的启动子序列。为此，例如可以列举基因E1A、MLP、CMV、RSV等的启动子。另外，这些表达序列可以通过加入活化序列、调控序列等进行修饰。也可以涉及可诱导的或可抑制的启动子。

另外，核酸特别在有治疗意义的基因上游还可以含有指导合成的治疗产品至靶细胞分泌通道中的信号序列。这种信号序列可以是治疗产品的天然信号序列，但也可以涉及任何其他功能性信号序列或人工信号序列。核酸还可以含有将合成的治疗产品引导向特定的细胞室的信号序列。

本发明的组合物还可以含有能够与本发明化合物与核酸所形成复合物结合并能够改善其转染能力的一种或多种添加剂。在另外一种实施方式中，本发明因此涉及含有核酸、如前面定义的核酸转移试剂以及至少一种能够与转移试剂/核酸复合物结合并能够改善其转染能力的添加剂的组合物。这类添加剂（例如脂类、肽或蛋白质）对增加化合物转染能力可以很有利。对此，本发明的组合物可以含有作为添加剂的一种或多种中性脂。

更优选地，在本发明范围内使用的中性脂是具有两个脂肪链的脂类。特别有利地，使用在生理条件下为两性离子或无离子电荷的天然

或合成脂类。更具体地，它们可以选自二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE）、油酰基棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(POPE）、二硬脂酰基-、二棕榈酰基-、二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺以及它们的1-3次N-甲基化衍生物、磷脂酰基甘油、二酰基甘油、糖基二酰基甘油、脑苷脂(具体如半乳糖脑苷脂）、鞘脂(具体如鞘磷脂），或脱唾液酸神经节苷脂(具体如脱唾液酸GM1和GM2）。

这些不同的脂类采用本领域的技术人员熟知的经典技术通过合成方法，或者从器官(例如脑）或蛋提取的方法得到。特别是，采用有机溶剂的方法可以提取天然脂类（也可参见Lehninger，Biochemistry）。

最近，申请人已证明，使用直接或间接干预所述核酸浓集(condensation)的化合物作为添加剂，也是特别有利的，如专利申请WO96/25508中描述的那些。在本发明组合物中，这样一种化合物的存在，能够降低转染试剂的量，在毒理学方面由此获得有益结果，对所述组合物的转染活性不会带来任何损害。关于干预核酸浓集的产品，应该定义为直接或非直接地压紧核酸的化合物。更确切地，这种产品或者直接作用于待转染核酸，或者干预直接参与这种核酸浓集作用的辅助化合物。优选地，直接作用于核酸。例如，预致密(precompactant)产品可以是任何多阳离子物，例如聚赖氨酸。根据一种优选实施方式，干预核酸浓集作用的这种产品完全或部分地从鱼精蛋白、组蛋白、核仁蛋白和/或它们的衍生物得到。这样一种产品还可以全部或部分地由肽基元(KTPKKAKKP）和/或(ATPAKKAA）构成，基元数可以是2-10。在本发明化合物结构中，这些基元可以连续地或不连续地重复。因此它们可以通过生物化学性质的连接(例如一个或多个氨基酸）隔开，例如通过一个或多个氨基酸隔开，或通过化学性质的连接隔开。

优选地，本发明的组合物含有每一核酸当量为0.01-20当量的一种或多种添加剂(摩尔/摩尔），更优选地是0.5-5。

在一种特别优选的实施方式中，本发明的组合物还可以使用一种

靶向元件，这些元件能够使核酸转移定向。这种靶向元件可以是细胞外靶向元件，该元件能够使DNA向一些细胞类型或一些希望的组织结构转移（肿瘤细胞、肝细胞、造血细胞等）。还可以涉及细胞内靶向元件，该元件能够使核酸向一些特别有利的细胞室转移（线粒体、核等）。靶向元件可以与本发明化合物连接也可与核酸连接，如以前详细描述过的。当靶向元件与通式(I)的核酸转移试剂连接时，优选它构成取代基X和Y之一。

在本发明范围内可使用的靶向元件中，可以列举糖、肽、蛋白质、寡核苷酸、脂类、神经递质、激素、维生素或它们的衍生物。优选地，涉及糖、肽或蛋白质，如抗体或抗体片段、细胞受体的配体或它们的片段、受体或受体片段等。特别地，可以涉及生长因子受体配体、细胞因子受体配体、细胞凝集素受体配体或具有RGD序列并与如整联蛋白之类粘附蛋白的受体有亲和力的配体。还可以列举转铁蛋白、HDL和LDL的受体，或叶酸转运蛋白。靶向元件还可以是能够靶向于整联蛋白的糖，例如靶向脱唾液酸糖蛋白或唾液酸化衍生物(syalydes)如syalyde Lewis X的受体，或抗体Fab片段，或单链抗体（ScFv）。

可以采用本领域技术人员已知的任何技术，例如通过与本发明转移试剂的疏水部分或与核酸作用部分偶合的方法，或与本发明转移试剂作用的基团偶合的方法，或与核酸偶合，将靶向元件与本发明核脂复合物结合。根据一种优选方式，所述相互作用可以是离子或共价性质。

本发明还涉及如上定义的化合物用于在体外、体内或离体向细胞中转移多核苷酸(更一般地，多阴离子体)的用途。更具体地讲，本发明涉及如上定义的化合物在制备用于治疗疾病、特别是由于缺乏一种蛋白或核酸产物引起的疾病的药物中的用途。所述药物中含有的多核苷酸编码所述蛋白或核酸产物，或构成所述核酸产物，用于在体内或离体治疗所述疾病。

对于体内应用，例如治疗方面的应用，或为了研究基因的调节或

建立动物疾病模型，本发明的组合物经配制可以采用局部、皮肤、口、直肠、阴道、肠胃外、鼻内、静脉内、肌肉内、皮下、眼内、皮内、气管内、腹膜内等方式给药。优选地，本发明的组合物含有下述药学上可接受的赋形剂，该赋形剂适用于注射剂，尤其是用于在所希望器官中直接注射的注射剂，或适于用局部方式(皮肤和/或粘膜上）用药。特别涉及等渗的无菌溶液，或干的尤其是冻干的组合物，这些组合物可根据情况加入无菌水或生理盐水配制成注射溶液。注射使用的核酸剂量以及用药次数可以根据不同的参数而变化，特别是根据用药方式、涉及的疾病、待表达基因或所进行治疗的时间长短而变化。更具体地对于用药方式，可以涉及在组织中，例如在肿瘤中，或循环通路中直接注射，或者处理培养细胞接着采用注射或移植方法将它们再植入体内。在本发明范围内涉及的组织例如是肌肉、皮肤、脑、肺、肝脏、脾、骨髓、胸腺、心脏、淋巴、血液、骨、软骨、胰、肾脏、膀胱、胃、肠、睾丸、卵巢、直肠、神经系统、眼、腺体、结缔组织等。

本发明的另一主题是动物或人体的治疗方法，包括下列步骤:

(1) 将核酸与如上所定义的转移试剂接触以形成一种复合物，和

(2) 将所述人或动物的细胞与(1)中形成的复合物接触。

本发明还涉及向细胞中转移核酸的方法，该方法包括下述步骤:

（1） 让核酸与如前面定义的转移试剂接触，以形成一种复合物，

(2）让细胞与(1）中生成的复合物接触。

细胞与复合物的接触可以通过细胞与所述复合物一起培养(体外或离体应用），或给生物体注入复合物(体内应用）来实现。优选地，例如10^6个细胞可在0.01-1000微克核酸存在下进行培养。体内使用时，可以使用的核酸剂量例如为0.01-10毫克。

在本发明组合物还含有一种或多种如前面定义的添加剂的情况下，一种或多种添加剂预先与本发明转移试剂混合，和/或与核酸混合。

本发明因此提供了一种体内转移核酸、特别是治疗疾病的特别有利的方法，包括体内或体外给予编码适于治疗所述疾病的蛋白或可转录成适于治疗所述疾病的核酸的核酸，所述核酸与通式(I)的化合物在以上定义的条件下结合。

本发明的核酸转移试剂对于向原代细胞或已建立的细胞系中转移核酸特别有用。这特别涉及成纤维细胞、肌细胞、神经细胞(神经元、星形细胞、神经胶质细胞)、上皮细胞等，它们呈分化形式或多能形式(前体)。

除了前面的描述，本发明还包括由下述实施例和附图得出的其他特点和优点，这些实施例和附图应该认为是说明本发明而不是限制其保护范围。具体地，申请人非限制性地提出可用于制备本发明通式（I）转移试剂的各种操作方案以及反应中间体。当然，本领域的技术人员在这些方案和/或中间体的启示下能够找到类似的方法，以便得到这些相同的化合物。对于合成通式(I)中的多阳离子体R，本领域技术人员似还可以参考上文引述的各种专利申请中描述的合成(WO 96/17823、WO 97/18185、WO 97/31935等)。

附图

图1: 用于细胞中DNA转移实验的质粒pXL2774的示意图。

图2: 在无辅助脂质、或存在胆固醇或存在DOPE下从本发明化合物2形成的复合物在HeLa细胞中的体外基因转移活性。纵坐标表示萤光素酶的表达，pg/孔。横坐标表示转移试剂/DNA的比值，nmol/ug DNA。

图3: 在小鼠后胫骨肌中直接注射在DOPE存在下从本发明化合物2(1: 1)形成的复合物后的体内基因转移活性。纵坐标表示萤光素酶的表达，pg/肌肉。横坐标表示化合物2/DNA的比值，nmol/ug DNA。

实施例

A\ 材料与方法

a) 材料

- 起始的多胺如亚精胺、精胺、三-(2-氨基乙基)胺、亚苯二胺、二氨基烷烃等是市场上可买到的或可以按常规方法合成(例如通过市场上可得胺的氰基乙基化得到支化的胺)
- 许多化合物如三乙胺、苯并三唑-1-基氧三(二甲氨基)鏻六氟磷酸盐(BOP)、氯甲酸苄基酯、11-溴十一烷醇等也是商品。
- Amberlite IR 120是商业化的离子交换树脂(货号BDH)。
- 用氢氧化钾预处理过的二甲基亚砜(DMSO)在氢化钙上蒸馏，然后加4埃分子筛保存。
- 四氢呋喃(THF)在二苯酮存在下用钠蒸馏。
- 对于要求无水条件的反应，所有玻璃仪器在氮气流下火焰干燥。

b) 方法

-光谱分析

在Bruchker MSL 30光谱仪上记录核磁共振谱(NMR)，对质子的频率为300MHz，对碳的频率为75MHz。化学位移以相对于四甲基硅烷(TMS)或溶剂的频率的ppm数表示。用TMS或溶剂的残余信号作为内标记录光谱。信号的多重性用下列简写表示：s(单峰)，d(双重峰)，t(三重峰)，q(四重峰)，m(多重峰)。

- 层析技术

•用薄层层析(TLC)跟踪反应的动力学过程，用含有荧光指示剂的硅胶作为层析载体。通过喷洒茴香醛的醇溶液显示层析结果。

•用硅胶60(0.05-0.02mm)作为固定相在压缩空气下进行柱层析。所用的流动相根据合成的类型而不同(中压层析)。

•在装有Applied Biosystem的C4型分析柱(长3厘米直径0.46厘米的不锈钢柱“Brownlee Columns”)和“Waters 486” 220nm检测器的Waters LC 4000仪器进行HPLC分析(高效液相层析)。固定相为7微米的aquapore buty，流动相为去离子水(2500毫升)或加有三氟乙酸(2.5毫升)的乙腈(2500毫升)。流量为每分钟1毫升。

B\ 转染试剂的合成

实施例 1；(3-[4-(3-氨基-丙基-氨基)-丁基-氨基] -亚甲基-氨基

甲酰基-15-十五烷基-16-十八烷基 α-D-吡喃甘露糖苷(化合物1)的合成

a) 3-[4-(3-叔丁氧羰基-氨基-丙基-叔丁氧羰基-氨基)-丁基-叔丁氧羰基-氨基] 乙酸(FRM 375)的合成

向精胺(5 g; 24.96 mmol) 在甲醇(125 ml)中的溶液加入氰基硼氢化钠$NaBH_3CN$ (0.548 g; 8.74 mmol)。 然后将该溶液进行剧烈搅拌。通过容量瓶在100分钟内加入二羟乙酸(2.34 g; 25.46 mmol) 在甲醇(80 ml)中的溶液。过夜后，向混合物中加入三乙胺(3.86 ml; 27.71 mmol)和溶解在四氢呋喃(55 ml)中的二碳酸二叔丁酯 (27.67 g;129.79 mmol)。过夜后，用旋转蒸发仪浓缩，然后用乙酸乙酯(63 ml)溶解，用硫酸氢钾和盐水洗涤。然后用硫酸镁干燥并浓缩。所得产物经层析纯化(CH_2Cl_2/MeOH 9 : 1)。收率为30%。

^1H NMR ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.42 (s, 36H, $C(CH_3)_3$), 1.45 (m, 4H, CH_2), 1.60 (m,4H, CH_2), 3.04-3.33 (m, 12H, CH_2), 3.91 (s, 2H, NCH_2COO)。

b) 15-羟基十五烷酸甲酯的合成

向10g十五烷酸内酯(41.60 mmol)在41.60毫升甲醇中的溶液在0℃下加入6.66毫升2N (13.31 mmol)甲醇钠。9小时后，加入9.24毫升乙酸并搅拌15分钟。然后将该溶液真空蒸发至干，随后用二氯甲烷溶解，用碳酸氢钠洗涤。用硫酸镁干燥所得的有机相并用旋转蒸发仪蒸发溶剂。在己烷/乙酸乙酯6:4中纯化。得到1-羟基十五烷酸甲酯，收率为80 %。

^1H NMR ($CDCI_3$) : δ(ppm) 1.26 (m, 12H, $(CH_2)_{10}$), 1.5-1.6 (m, 4H, H-2和H-13), 2.30 (t, 2H, J= 7.60 Hz, H-14), 3.64 (t, 1H, J= 5.84 Hz, H-1), 3.67 (s, 3H, H-16)。

c) 十五烷酸甲酯2,3,4,6-四-O-乙酰基-α-D-吡喃甘露糖苷的合成

0℃下30分钟内将5.26毫升氯化锡(44.94 mmol) 加入在8.72 g五乙酰基甘露糖(22.47 mmol)在56毫升二氯甲烷中的溶液中。然后加入7.34 g 前文a)中得到的1-羟基-十五烷酸甲酯(26.96 mmol)。2

小时后，用乙醚稀释反应混合物并倒入在磷酸氢钠溶液（$NaHPO_4$）中。水层用乙醚萃取，有机相相继用碳酸钠溶液、盐水洗涤，然后用硫酸镁干燥。真空蒸发至干后所得产物经中压层析纯化，用庚烷/乙酸乙酯7:3洗脱。收率为53 %。

^1H NMR ($CDCl_3$)：δ (ppm) 1.26 (m, 20H, $(CH_2)_{10}$)，1.59 (m, 4H, $OCH_2\underline{CH_2}$和H-13)，2.01，2.05，2.12 和 2.17 (s, 3H, $OCO\underline{CH_3}$)，2.29 (t, 2H, J= 7.62 Hz, H-14)，3,40(m, 1H, J= 7.89 Hz, $O\underline{CH_a}CH_2$)，3.66 (m, 1H, J= 7.89 Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$)，3.67 (s, 3H, $COO\underline{CH_3}$)，4.05 (ddd, 1H, J= 9.56 Hz和5.57 Hz, H-5)，4.1 (dd, 1H, J= 5.57 Hz和12.32 Hz, H-6a)，4.29 (dd, 1H, J= 5.57 Hz和12.32 Hz, H-6b)，4.8 (d, 1H, J= 1.85Hz, H-1)，5.23 (dd, 1H, J= 1.85 Hz和3.23 Hz, H-2)，5.27 (dd, 1H, J= 9.97 Hz和9.56Hz, H-4)，5.35 (dd, 1H, J= 9.97 Hz和3.23 Hz, H-3)。

d) 十五烷酸甲酯 α-D-吡喃甘露糖苷的合成

3.63 g上步所得产物 (6.01 mmol)在12毫升甲醇中的溶液用3毫升2N甲醇钠(6.01 mmol)处理。反应结束时用Amberlite IR120树脂(1当量,重量/体积)中和，过滤并真空蒸发至干。

^1H NMR ($CDCl_3$)：δ(ppm) 1.28 (m, 20H, $(CH_2)_{10}$)，1.59 (m, 4H, $OCH_2\underline{CH_2}$和H-13)，2.34 (t, 2H, J= 7.62 Hz, H-14)，3.41 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_a}CH_2$)，3.74 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$)，3.67 (s, 3H, $\underline{CH_3}OCO$)，3.5-3.82 (m, 6H, H-2, H-3, H-4, H-5和H-6)，4.75 (d, 1H, J= 1.82 Hz, H-1)。

e) 十五烷酸甲酯2,3,4,6-四-O-苄基-α-D-吡喃甘露糖苷的合成

向2 g (4.56 mmol) 上步d)所得产物在20毫升无水二甲基甲酰胺(DMF)中相继加入4.54 g 碘化钾(27.36 mmol)、1.09 g 60% 氢化钠(27.36 mmol) 和3.25毫升苄基溴(27.36 mmol)。12小时后，加入18.24毫升氯化铵饱和溶液，保持搅拌10分钟。然后用水稀释，有机相用乙酸乙酯萃取。然后用水和盐水洗涤，最后用硫酸镁干燥。

另外在用硫代硫酸钠饱和溶液洗涤，以消除碘离子。真空蒸发，并在庚烷/乙酸乙酯9:1混合物中纯化。所获产物的收率为60 %。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) : d (ppm) 1.28 (m, 20H, $(CH_2)_{10}$), 1.49 (m, 2H, $OCH_2\underline{CH_2}$), 1.59(m, 2H, H-13), 2.31 (t, 2H, J= 7.62 Hz, H-14), 3.34 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.63 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$), 3.67 (s, 3H, $\underline{CH_3}OCO$), 3.75 (m,1H, J= 8.97Hz 和6.21 Hz, H-5), 3.78 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 3.90 (dd, 1H, J= 6.21 Hz和J= 11.82 Hz, H-6a), 3.97 (dd, 1H, J= 6.21 Hz和J= 11.82 Hz, H-6b), 4.07 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.52(dd, J= 2.91 Hz和7.83 Hz, H-3), 4.57 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.63 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.69(dd, 1H, J= 2.52 Hz 和2.91 Hz, H-2), 4.74 (1H, J= 2.52 Hz, H-1), 4.85 (dd, 1H, J=7.83 Hz和8.97 Hz, H-4), 7.35 (m, 20H, Phe)。

f) 十五烷酸 2,3,4,6-四-O-苄基-α-D-吡喃甘露糖苷的合成

向0.50 g (0.73 mmol) 上步e)所得产物在7毫升甲醇中的溶液加入4.68毫升25 %氢氧化钠溶液。将反应化合物加热回流30分钟。然后用5%的盐酸溶液在冷却下中和。用乙酸乙酯萃取有机相，并真空蒸发至干。在庚烷/乙酸乙酯4: 6混合物中纯化。以62%的收率获得产物。

^{1}H NMR ($CDCI_3$) : d (ppm) 1.28 (m, 20H, $(CH_2)_{10}$), 1.49 (m, 2H, $OCH_2\underline{CH_2}$), 1.59(m, 2H, H-13), 2.34 (t, 2H, J= 7.62 Hz, H-14), 3.34 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.63 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$), 3.75 (m, 1H, J= 8.97 Hz和6.21 Hz, H-5), 3.78(s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 3.90 (dd, 1H, J= 6.21 Hz和J= 11.82 Hz, H-6a), 3.97 (dd, 1H, J=6.21 Hz和J= 11.82 Hz, H-6b), 4.07 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.52 (dd, J= 2.91 Hz和7.83Hz, H-3), 4.57 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.63 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.69 (dd, 1H, J= 2.52 Hz和2.91 Hz, H-2), 4.74 (1H, J= 2.52 Hz, H-1), 4.85 (dd, 1H, J= 7.83 Hz和8.97 Hz, H-4), 7.35 (m, 20H, Phe)。

g) N-十八烷基-15-氨基甲酰基-十五烷基 2,3,4,6-四-O-苄基-α-D-吡喃甘露糖苷的合成

向0.29 g (0.37 mmol)上步f)所得产物在5毫升氯仿中的溶液中相继加入0.23g BOP(0.52 mmol)、0.21毫升二异丙基乙基胺(1.48mmol)和0.12 g十八烷基胺(0.44 mmol)。反应结束时用二氯甲烷稀释，用水洗涤。然后用硫酸镁干燥并真空蒸发至干。所得产物经中压层析纯化，用庚烷/乙酸乙酯6: 4混合物洗脱。以98%的收率获得产物。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) : δ(ppm) 0.88 (t, 3H, J= 6.36 Hz, H-33), 1.27 (m, 50H, $(CH_2)_{25}$), 1.47 (m, 4H, $OCH_2\underline{CH_2}$和H-17), 1.58 (m, 2H, H-13), 2.13 (t, 2H, J= 7.92 Hz, H-14), 3.23 (m, 2H, H-16), 3.34 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.63 (m, 1H, J= 6.71Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$), 3.75 (m, 1H, J= 8.97 Hz和6.21 Hz, H-5), 3.78 (s, 2H, CH_2Phe), 3.90 (dd, 1H, J= 6.21 Hz和J= 11.82 Hz, H-6a), 3.97 (dd, 1H, J= 6.21 Hz和J= 11.82Hz, H-6b), 4.07 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.52 (dd, J= 2.91 Hz和7.83 Hz, H-3), 4.57 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.63 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.69 (dd, 1H, J= 2.52 Hz和2.91 Hz, H-2), 4.74 (1H, J= 2.52 Hz, H-1), 4.85 (dd, 1H, J= 7.83 Hz和8.97 Hz, H-4), 5,37 (宽带, 1H, $\underline{HN}$CO), 7.35 (m, 20H, Phe)。

h) 15-十八烷基氨基-十五烷基 2,3,4,6-四-O-苄基-α-D-吡喃甘露糖苷的合成

向在15毫升无水四氢呋喃 (THF)中的0.77 g (0.75 mmol) 上步g)所得产物加入0.056g氢化锂铝$AlLiH_4$(1.50 mmol)。加热回流10小时。然后将反应混合物在冰浴中冷却，加入56微升水，10分钟后加入112微升2N氢氧化钠，最后再过10分钟加入56微升水。过滤并真空蒸发至干。所得产物在二氯甲烷/甲醇/28%氨水的9:2:0.5混合物中纯化。以86%的收率得到产物。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) : δ(ppm) 0.88 (t, 3H, J= 6.36 Hz, H-33),

1.27 (m, 50H, $(CH_2)_{25}$), 1.4-1.6 (m, 9H, $OCH_2\underline{CH_2}$, H-17, H-14, H-17和NH), 2.57 (t, 4H, J= 7.92 Hz, H-15和H-16), 3.34 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.63 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$), 3.75 (m, 1H, J= 8.97 Hz和6.21Hz, H-5), 3.78 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 3.90(dd, 1H, J= 6.21 Hz和J= 11.82 Hz, H-6a), 3.97 (dd, 1H, J= 6.21 Hz和J=11.82 Hz, H-6b), 4.07 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.52 (dd, J= 2,91Hz和7.83Hz, H-3), 4.57 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.63 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.69 (dd, 1H, J= 2.52 Hz和2.91Hz, H-2), 4.74 (1H, J= 2.52 Hz, H-1), 4.85 (dd, 1H, J= 7.83 Hz和8.97 Hz, H-4), 7.35 (m, 20H, Phe)。

i) (3-[4-(3-叔丁氧羰基-氨基-丙基-叔丁氧羰基-氨基)-丁基-叔丁氧羰基-氨基]-亚甲基-氨基甲酰基)-15-十五烷基-16-十八烷基2,3,4,6-四-O-苄基-α-D-吡喃甘露糖苷的合成

向0.63 g (0.61mmol)上步h)所得产物在10毫升氯仿中的溶液中加入0.38 g BOP (0.85 mmol)、0.425毫升二异丙基乙基胺(2.44 mmol)和0.48 g步骤a)所得3-[4-(3-叔丁氧羰基-氨基-丙基-叔丁氧羰基-氨基)-丁基-叔丁氧羰基-氨基]-乙酸(FRM 375) (0.73 mmol)。4小时后用二氯甲烷稀释，用水洗涤。用硫酸镁干燥并真空蒸发至干。所得产物经中压层析纯化，用庚烷/乙酸乙酯6: 4混合物洗脱。以80%的收率获得产物。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) : δ(ppm) 0.88 (t, 3H, J= 6.36 Hz, H-33), 1.27 (m, 50H, $(CH_2)_{25}$), 1.4-1.6 (m, 17H, $OCH_2\underline{CH_2}$, H-17, H-14, H-17, H-37, H-40, H-41和H-44), 1.46 (m, 36H, Boc), 2.8-2.9 (m, 6H, H-15, H-16和H-35), 3.09-3.33 (m, 12H, H-36, H-38, H-39, H-42, H-43和H-45), 3.34 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.63 (m, 1H, J= 6.71Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$), 3.75 (m, 1H, J- 8.97 Hz和6.21 Hz, H-5), 3.78 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 3.90 (dd, 1H, J= 6.21 Hz和J= 11.82 Hz, H-6a), 3.97 (dd, 1H, J= 6.21 Hz和J= 11.82Hz, H-6b), 4.07 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.52 (dd, J= 2,91 Hz

和 7.83 Hz, H-3), 4.57 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.63 (s, 2H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.69 (dd, 1H, J= 2.52 Hz和2.91 Hz, H-2), 4.74 (1H, J= 2.52 Hz, H-1), 4.85 (dd, 1H, J= 7.83 Hz和8.97 Hz, H-4), 7.35 (m, 18H, Phe)。

j) (3-[4-(3-叔丁氧羰基-氨基-丙基-叔丁氧羰基-氨基)-丁基-叔丁氧羰基-氨基]-亚甲基-氨基甲酰基)-15-十五烷基-16-十八烷基 α-D-吡喃甘露糖苷的合成

向0.63 g (0.38 mmol)上步i)所得产物在5毫升甲醇中的溶液加入10 %炭载钯(0.027 g)。在室温氢气压力下搅拌该溶液。6小时后过滤然后真空蒸发至干。该反应是定量的。

^{1}H NMR (CD_3OD) : δ (ppm) 0.88 (t, 3H, J= 6.36 Hz, H-33), 1.27 (m, 50H, $(CH_2)_{25}$), 1.4-1.6 (m, 17H, $OCH_2\underline{CH_2}$, H-17, H-14, H-17, H-37, H-40, H-41和 H-44), 1.46 (m, 36H, Boc), 2.8-2.9 (m, 6H, H-15, H-16和H-35), 3.09-3.33 (m, 12H, H-36, H-38, H-39, H-42, H-43和H-45), 3.34 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.5-3.82 (m, 6H, H-2, H-3, H-4, H-5和H-6), 3.63 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$), 4.72 (1H, J= 2.52 Hz, H-1)。

k) (3-[4-(3-氨基-丙基-氨基)-丁基-氨基]-亚甲基-氨基甲酰基)-15-十五烷基-16-十八烷基 α-D-吡喃甘露糖苷 (化合物1)的合成

向0.37 g (0.28 mmol) 上步j)所得产物中加入21.50毫升蒸馏的四氢呋喃(TFA)。1小时后将反应混合物冷却下浓缩并冷冻干燥。如“材料与方法”部分所述经HPLC在甲醇溶液中验证产物的纯度。

^{1}H NMR (CD_3OD) : 0.88 (t, 3H, J= 6.36 Hz, H-33), 1.27 (m, 14H, $(CH_2)_{25}$), 1.4-1.6 (m, 17H, $OCH_2\underline{CH_2}$, H-17, H-14, H-17, H-37, H-40, H-41和H-44), 2.8-2.9 (m, 6H, H-15, H-16和H-35), 2.92 (m, 2H, H-45), 2.92-3.17 (m, 12H, H-36, H-38, H-39, H-42, H-43), 3.34 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.5-3.82 (m, 6H, H-2, H-3, H-4,
H-5和H-6), 3.63 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$), 4.72 (1H, J=

2.02 Hz, H-1)。

实施例 2: (3-[4-(3-氨基-丙基-氨基)-丁基-氨基] -亚甲基-氨基甲酰基)-15-十五烷基-16-十八烷基 6-脱氧-α-L-吡喃甘露糖苷 (化合物2)的合成

a) 3-[4-(3-叔丁氧羰基-氨基-丙基-叔丁氧羰基-氨基)-丁基-叔丁氧羰基-氨基]乙酸(FRM 375)的合成

向精胺(5 g; 24.96 mmol) 在甲醇(125 ml)中的溶液加入氰基硼氢化钠$NaBH_3CN$ (0.548 g; 8.74 mmol)。然后将该溶液进行剧烈搅拌。通过容量瓶在100分钟内加入二羟乙酸(2.34 g; 25.46 mmol) 在甲醇(80 ml)中的溶液。过夜后，向混合物中加入三乙胺(3.86 ml; 27.71 mmol)和溶解在四氢呋喃(55 ml)中的二碳酸二叔丁酯 (27.67 g;129.79 mmol)。过夜后，用旋转蒸发仪浓缩，然后用乙酸乙酯(63 ml)溶解，用硫酸氢钾和盐水洗涤。然后用硫酸镁干燥并浓缩。所得产物经层析纯化(CH_2Cl_2/MeOH 9 : 1)。收率为30%。

^1H NMR ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.42 (s, 36H, $C(CH_3)_3$), 1.45 (m, 4H, CH_2), 1,60 (m,4H, CH2), 3.04-3.33 (m, 12H, CH_2), 3.91 (s, 2H, NCH_2COO)。

b) 15-羟基-十五烷酸甲酯的合成

向10g十五烷酸内酯(41.60 mmol)在41.60毫升甲醇中的溶液在0℃下加入6.66毫升2N (13.31 mmol)甲醇钠。9小时后，加入9.24毫升乙酸并搅拌15分钟。然后将该溶液真空蒸发至干，随后用二氯甲烷溶解，用碳酸氢钠洗涤。用硫酸镁干燥所得的有机相并用旋转蒸发仪蒸发溶剂。在己烷/乙酸乙酯6:4中纯化。得到1-羟基十五烷酸甲酯，收率为80 %。

^1H NMR ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.26 (m, 12H, $(CH_2)_{10}$), 1.5-1.6 (m, 4H, H-2和H-13), 2.30 (t, 2H, J= 7.60 Hz, H-14), 3.64 (t, 1H, J= 5.84 Hz, H-1), 3.67 (s, 3H, H-16)。

c) 十五烷酸甲酯 2,3,4-三-O-乙酰基-6-脱氧-α-L-吡喃甘露糖苷

的合成

0℃下30分钟内将2.49毫升氯化锡(21.30 mmol)加入在3.55 g四乙酰基鼠李糖(10.65 mmol)在27毫升二氯甲烷中的溶液中。然后加入3.48 g 前文中得到的1-羟基-十五烷酸甲酯(12.78 mmol)。2小时后，用乙醚稀释反应混合物并倒入在磷酸钠溶液 (Na_2PO_4)中。水层用乙醚萃取，有机相相继用碳酸钠溶液、盐水洗涤，然后用硫酸镁干燥。真空蒸发至干，经中压层析纯化，用庚烷/乙酸乙酯7:3洗脱。以收率53 %得到产物。

^{1}H NMR ($CDOD_3$) : δ(ppm) 1.20 (d, 3H, J= 6.45 Hz, H-6), 1.26 (m, 20H, $(CH_2)_{10}$), 1.59 (m, 4H, $OCH_2\underline{CH_2}$和H-13), 1.98, 2.04 和2.16 (s, 3H, $OCO\underline{CH_3}$), 2.29 (t, 2H, J= 7,62 Hz, H-14), 3,40 (m, 1H, J= 6,71 Hz, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.66 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$), 3.67 (s, 3H, $COO\underline{CH_3}$), 3.88 (m, 1H, J= 6.45 Hz和9.97 Hz, H-5), 4.70(d, 1H, J= 1.72 Hz, H-1), 5.06 (dd, 1H, J= 9,97 Hz和9.97 Hz, H-4), 5.22 (dd, 1H, J=1.72 Hz和3.52 Hz, H-2), 5.30 (dd, 1H, J= 3.52 Hz和9.97 Hz, H-3)。

d)十五烷酸甲酯 α-脱氧-L-6-吡喃甘露糖苷的合成

5.08 g上步所得产物 (9.36mmol)在20毫升甲醇中的溶液用9.34毫升2N甲醇钠(18.68mmol)处理。反应结束时用Amberlite IR120树脂中和反应混合物，过滤并真空蒸发至干。

^{1}H NMR ($CDCI_3$) : δ (ppm) 1.20 (d, 3H, J= 6.45 Hz, H-6), 1.26 (m, 20H, $(CH_2)_{10}$), 1.59 (m, 4H, $OCH_2\underline{CH_2}$和H-13), 2.29 (t, 2H, J= 7.62 Hz, H-14), 3.40 (m, 1H, J=6.71 Hz, $O\underline{CHb}CH_2$), 3.66 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CHb}CH_2$), 3.67 (s, 3H, CH_3OCO), 3.6-3.9 (m, 4H, H-2, H-3, H-4和H-5), 4.70 (d, 1H, J- 7.72 Hz, H-1)。

e) 十五烷酸甲酯 2,3,4-三-O-苄基-6-脱氧-α-L-吡喃甘露糖苷的合成

向在30毫升无水二甲基甲酰胺(DMF)中的2.09 g (5.00 mmol)上步d)所得产物相继加入3.32g 碘化钾(20.00mmol)、0.80 g 60%氢化钠(20.00mmol)和2.38毫升苄基溴(20.00 mmol)。12小时后，加入20毫升氯化铵饱和溶液，保持搅拌10分钟。然后用水稀释，有机相用乙酸乙酯萃取。然后用水和盐水洗涤，最后用硫酸镁干燥。另外再用硫代硫酸钠饱和溶液洗涤，以消除碘离子。真空蒸发，并在庚烷/乙酸乙酯9:1混合物中纯化。所获产物的收率为60 %。

^{1}H NMR ($CDCI_3$) : δ(ppm) 1.28 (m, 20H, $(CH_2)_{10}$), 1.33 (d, 3H, J= 6.21 Hz, H-6), 1.59 (m, 4H, $OCH_2\underline{CH_2}$和H-13), 2.31 (t, 2H, J= 7.62 Hz, H-14), 3.40 (m, 1H, J=6.71 Hz, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.61 (dd, 1H, J= 8.96 Hz和9.5 Hz, H-4), 3.66 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$), 3.67 (s, 3H, $\underline{CH_3}OCO$), 3.68 (m, 1H, J= 9.5 Hz和6.21Hz, H-5), 3.75 (dd, 1H, J= 2.01Hz和3.02Hz, H-2), 3.88 (dd, J= 3.02 Hz和8.96 Hz, H-3), 4.64(s, 6H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.73(1H, J=2.01Hz, H-1), 7.35(m, 15H, Phe)。

f) 十五烷酸 2,3,4-三-O-苄基-6-脱氧-α-L-吡喃甘露糖苷

向0.50 g (0.73 mmol) 上步e)所得产物在7毫升甲醇中的溶液加入4.68毫升25 %氢氧化钠溶液。将反应化合物加热回流30分钟。然后用5%的盐酸溶液在冷却下中和。用乙酸乙酯萃取有机相，并真空蒸发至干。在庚烷/乙酸乙酯4: 6混合物中纯化。以72%的收率获得产物。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) : δ(ppm) 1.28 (m, 20H, $(CH_2)_{10}$), 1.33 (d, 3H, J= 6.21 Hz, H-6), 1.59 (m, 4H, $OCH_2\underline{CH_2}$和H-13), 2.34 (t, 2H, J= 7.62 Hz, H-14), 3.40 (m, 1H, J=6.71 Hz, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.61 (dd, 1H, J= 8.96 Hz和9.5 Hz, H-4), 3.66 (m, 1H, J= 6.71Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$), 3.68 (m, 1H, J= 9.5 Hz和6.21Hz, H-5), 3.75 (dd, 1H, J= 2.01 Hz和3.02 Hz, H-2), 3.88 (dd, J= 3,02 Hz和8.96 Hz, H-3), 4.64 (s, 6H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.73(1H, J= 2.01 Hz, H-1), 7.35 (m, 20H, Phe)。

g) N-十八烷基-15-氨基甲酰基-十五烷基 2,3,4-三-O-苄基-6-脱氧-α-L-吡喃甘露糖苷的合成

向0.70g (1.04 mmol)上步f)所得产物在13毫升氯仿中的溶液中相继加入0.69 g BOP(1.56 mmol)、0.72毫升二异丙基乙基胺(4.16 mmol)和0.34 g十八烷基胺(1.25 mmol)。反应结束时用二氯甲烷稀释，用水洗涤。然后用硫酸镁干燥并真空蒸发至干。所得产物经中压层析纯化，用庚烷/乙酸乙酯6: 4混合物洗脱。以84%的收率获得产物。

^{1}H NMR ($CDCI_3$) : δ(ppm 0.88 (t, 3H, J= 6.36 Hz, H-33), 1.27 (m, 50H, $(CH_2)_{25}$), 1.33 (d, 3H, J= 6.21 Hz, H-6), 1.47 (m, 4H, $OCH_2\underline{CH_2}$和H-17), 1.58 (m, 2H, H-13), 2.13 (t, 2H, J= 7.92 Hz, H-14), 3.23 (m, 2H, H-16), 3.40 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.61 (dd, 1H, J= 8.96 Hz和9.5 Hz, H-4), 3.66 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$), 3.68 (m, 1H, J= 9.5 Hz和6.21 Hz, H-5), 3.75 (dd, 1H, J= 2.01 Hz和3.02 Hz, H-2), 3.88 (dd, J= 3,02 Hz和8.96 Hz, H-3), 4.64 (s, 6H, $\underline{CH_2}$Phe), 4.73(1H, J= 2.01 Hz, H-1), 5,37 (宽带, 1H, HNCO), 7.35 (m, 15H, Phe)。

h) 15-十八烷基-氨基-十五烷基 2,3,4-三-O-苄基-6-脱氧-α-L-吡喃甘露糖苷的合成

向在15毫升无水四氢呋喃 (THF)中的0.81g (086mmol) 上步g)所得产物加入0.065g氢化锂铝$AlLiH_4$(1.72 mmol)，加热回流10小时。然后将反应混合物在冰浴中冷却，加入65微升水，10分钟后加入130微升2N氢氧化钠，最后再过10分钟加入65微升水。过滤并真空蒸发至干。所得产物在二氯甲烷/甲醇/28%氨水的9:2:0.5混合物中纯化。以93%的收率得到产物。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.88 (t, 3H, J= 6.36 Hz, H-33), 1.27 (m, 50H, $(CH_2)_{25}$), 1.33 (d, 3H, J= 6.21 Hz, H-6), 1.4-1.6 (m, 9H, $OCH_2\underline{CH_2}$, H-17, H-14, H-17和NH), 2.57 (t, 4H,

J= 7.92 Hz, H-15 和 H-16), 3.40 (m, 1H, J= 6.71 Hz, OCH_aCH_2), 3.61(dd, 1H, J= 8.96 Hz和9.5 Hz, H-4), 3.66 (m, 1H, J= 6.71 Hz, OCH_bCH_2), 3.68 (m, 1H, J= 9.5 Hz和6.21 Hz, H-5), 3.75 (dd, 1H, J= 2.01 Hz和3.02 Hz, H-2), 3.88 (dd, J= 3.02 Hz和8.96 Hz, H-3), 4.64 (s, 6H, CH_2Phe), 4,73 (1H, J= 2.01 Hz, H-1), 7.35(m, 15H, Phe)。

i) (3-[4-(3-叔丁氧羰基-氨基-丙基-叔丁氧羰基-氨基)-丁基-叔丁氧羰基-氨基]-亚甲基-氨基甲酰基)-15-十五烷基-16-十八烷基 2,3,4-三-O-苄基-6-脱氧-α-L-吡喃甘露糖苷的合成

向0.78 g (0.86 mmol)上步h)所得产物在7毫升氯仿中的溶液中加入0.53 g BOP (1.20 mmol)、0.30毫升二异丙基乙基胺(1.72 mmol) 和0.62g步骤a)所得FRM 375 (0.95 mmol)。4小时后用二氯甲烷稀释，用水洗涤。用硫酸镁干燥并真空蒸发至干。所得产物经“快速”层析纯化，用庚烷/乙酸乙酯6: 4混合物洗脱。以72%的收率获得产物。

^{1}H NMR ($CDCI_3$) : δ(ppm) 0.88 (t, 3H, J= 6.36 Hz, H-33), 1.27 (m, 50H, $(CH_2)_{25}$), 1.33 (d, 3H, J= 6.21 Hz, H-6), 1.4-1.6 (m, 17H, OCH_2CH_2, H-17, H-14, H-17, H-37, H-40, H-41和H-44), 1.46 (m, 36H, Boc), 2.8-2.9 (m, 6H, H-15, H-16和H-35), 3.09-3.33 (m, 12H, H-36, H-38, H-39, H-42, H-43和H-45), 3.40 (m, 1H, J= 6,71 Hz, OCH_aCH_2), 3.65 (s, 2H, CH_2Phe), 3.66 (m, 1H, J= 6.71 Hz, OCH_bCH_2), 3.68 (m, 1H, J= 9.5 Hz和6.21 Hz, H-5), 3.99 (s, 2H, CH_2Phe), 4.02 (dd, 1H, J= 8.96 Hz和9.5Hz, H-4), 4.32 (s, 2H, CH_2Phe), 4.57 (dd, 1H, J= 2.01 Hz和3.02 Hz, H-2), 4.73 (1H,
J= 2.01 Hz, H-1), 4.82 (dd, J= 3.02 Hz和8.96 Hz, H-3), 7.35 (m, 18H, Phe)。

j) (3-[4-(3-叔丁氧羰基-氨基-丙基-叔丁氧羰基-氨基)-丁基-叔丁氧羰基-氨基]-亚甲基-氨基甲酰基)-15-十五烷基-16-十八烷基 6-

脱氧-α-L-吡喃甘露糖苷的合成

向0.74 g (0.48 mmol)上步i)所得产物在10毫升甲醇中的溶液加入10 %炭载钯(0.034 g)。在室温氢气压力下搅拌该溶液。4小时后过滤然后真空蒸发至干。该反应是定量的。

^{1}H NMR (CD_3OD) : δ(ppm) 0.88 (t, 3H, J= 6.36 Hz, H-33), 1.20 (d, 3H, J= 6.45 Hz, H-6), 1.27 (m, 14H, $(CH_2)_{25}$), 1.4-1.6 (m, 17H, $OCH_2\underline{CH_2}$, H-17, H-14, H-17, H-37, H-40, H-41和H-44), 1.46 (m, 36H, Boc), 2.8-2.9 (m, 6H, H-15, H-16和H-35), 3.09-3.33 (m, 12H, H-36, H-38, H-39, H-42, H-43和H-45), 3.40 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.66 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$), 3.6-3.9 (m, 4H, H-2, H-3, H-4和H-5), 4.73 (1H, J= 2.01 Hz, H-1).

k) (3-[4-(3-氨基-丙基-氨基)-丁基-氨基]-亚甲基-氨基甲酰基)-15-十五烷基-16-十八烷基 6-脱氧-α-L-吡喃甘露糖苷 (化合物2)的合成

向0.40 g (0.31 mmol)上步j)所得产物中加入24毫升蒸馏的四氢呋喃(TFA)。1小时后将反应混合物冷却下浓缩并冷冻干燥。经HPLC在甲醇溶液中验证产物的纯度。

^{1}H NMR (CD_3OD) : δ(ppm) 0.88 (t, 3H, J= 6.36 Hz, H-33), 1.20 (d, 3H, J= 6.45 Hz, H-6'), 1.27 (m, 14H, $(CH_2)_{25}$), 1.4-1.6 (m, 17H, $OCH_2\underline{CH_2}$, H-17, H-14, H-17, H-37, H-40, H-41和H-44), 2.8-2.9 (m, 6H, H-15, H-16和H-35), 2.92 (m, 2H, H-45), 2.92-3.17 (m, 12H, H-36, H-38, H-39, H-42, H-43), 3.40 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.66 (m, 1H, J= 6.71 Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$), 3.6-3.9 (m, 4H, H-2, H-3, H-4和H-5), 4.73 (1H, J= 2.01 Hz, H-1)。

实施例 3 : 1-(3-[4-(3-氨基-丙基-氨基)-丁基-氨基-丙基-氨基]-亚甲基-氨基甲酰基)-15-十五烷基-16-十八烷基 6-脱氧-β-L-吡喃

半乳糖苷（化合物3)的合成

a) {3-[4-(3-苄氧羰基-氨基-丙基-苄氧羰基-氨基)-丁基-苄氧羰基-氨基]-丙基氨基}乙酸的合成

向精胺(10g; 49.91mmol)在甲醇(200ml)中的溶液加入氰基硼氢化钠$NaBH_3CN$ (1.10g; 17.47mmol)。然后将该溶液进行剧烈搅拌。通过容量瓶在100分钟内加入二羟乙酸(4.59g; 49.91 mmol) 在甲醇(120ml)中的溶液。过夜后，将反应混合物中置于冰浴中，相继加入2N氢氧化钠(34ml)和分十份加入的氯甲酸苄酯(14.25ml; 99.82mmol)。温度保持在5-10°C，剧烈混和。室温下2小时后，用乙醚萃取混合物，用5N盐酸溶液中和。然后，有机相用硫酸镁干燥，用旋转蒸发仪浓缩。所得产物经层析纯化(100% CH_2Cl_2，然后CH_2Cl_2/MeOH 9 : 1)。收率为52%。

^1H NMR ($CDCl_3$) :δ(ppm) 1.28 (t, 4H, CH_2), 1.60 (m, 4H, CH_2), 3.04-3.33 (m, 12H, CH_2), 3.49 (s, 2H, NCH_2COO), 5.07 (s, 8H, CH_2), 7.27 (m, 20H, Phe)。

b) 15-羟基十五烷酸甲酯的合成

向10g十五烷酸内酯(41.60 mmol)在41.60毫升甲醇中的溶液在0℃下加入6.656毫升2N (13.31 mmol)甲醇钠。9小时后，加入9.24毫升乙酸并搅拌15分钟。然后将该溶液真空蒸发至干，随后用二氯甲烷溶解，用碳酸氢钠洗涤。倾析后，用硫酸镁干燥所得的有机相并蒸发。在己烷/乙酸乙酯6:4中纯化，得到15-羟基十五烷酸甲酯，收率为80 %。

^1H NMR ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1.29 (m, 20H, $(CH_2)_{10}$), 1.5-1.6 (m, 4H, H-2和H-13), 2.30 (t, 2H, J= 7.60 Hz, H-14), 3.64 (t, 1H, J= 5.84 Hz, H-1), 3.67 (s, 3H, H-16)。

c) N-十八烷基-15-羟基十五烷酸酰胺的合成

真空下，于150°C将10克上步b)获得的15-羟基十五烷酸甲酯(36.85mmol)和19.86克十八烷基胺(73.70mmol)熔化。24小时后，将混合物冷却并用二氯甲烷稀释。形成的沉淀用Buchner滤器过滤。然

后将所得固体在甲醇中重结晶，以100%的收率获得N-十八烷基-15-羟基十五烷酸酰胺。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.88 (t, 3H, J= 6.96 Hz, H-33), 1.26 (m, 54H, $(CH_2)_{27}$), 1.4-1.6 (m, 6H, H-2, H-13和H-17), 2.30 (t, 2H, J= 7.60 Hz, H-14), 3.25(m, 2H, H-16), 3.64 (t, 2H, J= 5.84 Hz, H-1), 5.39 (宽带, NHCO)。

^{13}C NMR ($CDCl_3$) : δ (ppm) 14.48 (C-33), 25.3和26.3 (C-2和C-13), 29.72($(CH_2)_{27}$), 36.7和34.8 (C-14和C-16), 63.6 (C-1), 174.31 (CO)。

d) 15-十八烷基氨基-十五烷醇的合成

向20 g上步c)获得的N-十八烷基-15-羟基十五烷酸酰胺(39.22 mmol)在无水四氢呋喃(250 ml)中的溶液中，加入2.98g氢化锂铝$LiAlH_4$ (78.44 mmol)。回流反应10小时。冷却反应物后，相继加入水(2.98 ml)和2N氢氧化钠(2.98 ml)。10分钟后，再加入水(2.98 ml)。用Buchner过滤所形成的沉淀，将滤液用旋转蒸发仪浓缩，得到15-十八烷基氨基-十五烷醇。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.88 (t, 3H, J= 6.96 Hz, H-33), 1.26 (m, 54H, $(CH_2)_{27}$), 1.43-1.59 (m, 7H, H-2, H-14, H-17和宽带NH), 1.5-1.6 (m, 4H, H-2和H-13), 2.60 (t, 4H, J= 6.50 Hz, H-15和H-16), 3.64 (t, 2H, J= 5.84 Hz, H-1)。

^{13}C NMR ($CDCl_3$) : δ (ppm) 14.48 (C-33), 25.3和26.3 (C-2和C-14), 29.72($(CH_2)_{27}$), 51.7 (C-15和C-16), 63.6 (C-1)。

e) N-[苄氧羰基]-15-十八烷基氨基-十五烷醇的合成

向冷却至0°C的上步d)所得15-十八烷基氨基-十五烷醇(13.71 g ; 27.63 mmol)和三乙胺(7.7 ml ; 55.26 mmol)在无水二氯甲烷(150 ml)中的溶液中滴加7.89 ml氯甲酸苄基酯(55.26 mmol)。10分钟后，检验混合物的pH值。然后室温下将反应混合物静置过夜。然后用水洗涤溶液，用硫酸镁($MgSO_4$)干燥并浓缩。层析纯化反应混合物(庚烷/AcOEt 6 : 4)。以70%的收率得到N-[苄基氧羰基]-15-十八烷

基氨基-十五烷醇。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) : δ (ppm) 0.88 (t, 3H, J= 6.96 Hz, H-33), 1.26 (m, 54H, $(CH_2)_{27}$), 1.43-1.59 (m, 6H, H-2, H-14, H-17), 3.20-3.22 (m, 4H, H-15和H-16), 3.64 (t, 2H, J= 5.84 Hz, H-1), 5.12 (s, 2H, OCH_2Phe), 7.34 (m, 5H, Phe).

^{13}C NMR ($CDCI_3$) : δ (ppm) 14.48 (C-33), 25.8, 26.9和31.94 (C-2, C-14和C-17), 29.72 ($(CH_2)_{27}$), 47.26-48.04 (C-15和C-16), 63.08 (C-1), 66.79 (OCH_2), 128.40(Phe).

f) 15-[N- (苄氧羰基)-十八烷基氨基]-十五烷基 2,3,4-三-O-乙酰基-6-脱氧-β -L-吡喃半乳糖苷

将1.5 g 四乙酰基果糖(4.52 mmol)与0.634 ml四氯化锡(5.42 mmol)在无水乙腈(50 ml)中反应30分钟。然后加入3.132 g上步e)获得的N-[苄氧羰基]-15-十八烷基氨基-十五烷醇(4.97 mmol)。5小时后，萃取反应混合物，所得产物经层析纯化(庚烷/乙酸乙酯6 : 4)。收率为69 %。

^{1}H NMR : δ (ppm) 0.87 (t, 3H, J= 6.96 Hz, H-33), 1.2 (d, 3H, J= 6,51 Hz, H-6), 1,25(m, 54H, $(CH_2)_{27}$). 1.52 (m, 6H, $OCH_2\underline{CH_2}$, H-14 和 H-17), 1.95, 2.05和2.15 (s,3H, $OCO\underline{CH_3}$), 3.14-3.25 (m, 4H, H-15和H-16), 3.44 (m, 1H, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.63 (m,1H, $O\underline{CH_b}CH_2$), 3.79 (m, 1H, H-5), 4.41 (d, 1H, J= 7.98 Hz, H-1), 4.99 (dd, 1H, J=3.52 Hz和10.46 Hz, H-3), 5.09 (s, 2H, $O\underline{CH_2}$Phe), 5.16 (dd, 1H, J= 7.98 Hz和10.46 Hz, H-2), 5.23 (dd, J= 3.52 Hz和3.37Hz, H-4), 7.32 (m, 5H, Phe).

^{13}C NMR ($CDCI_3$) : δ (ppm) 14.68 (C-33), 17.31 (C-2), 20.75 ($\underline{CH_3}COO$), 27.29(C-6), 29.72 ($(CH_2)_{27}$). 25.89-31.98 ($OCH_2\underline{CH_2}$, C-14, C-17), 47.25-48.04 (C-15 和 C-16), 66.91 ($\underline{CH_2}$Phe), 69.63 ($O\underline{CH_2}CH_2$), 69.45 (C-2), 70.57 (C-5), 70.85 (C-4),71.44 (C-3), 96.25 (C-1), 128.43 (Phe), 156.21 et 171.30 (CO)。

g)15-十八烷基氨基-十五烷基 2,3,4-三-O-乙酰基-6-脱氧-β-L-吡喃半乳糖苷的合成

向上步f)所得 15-[N-(苄基氧羰基)-十八烷基氨基]-十五烷基 2,3,4-三-O-乙酰基-6-脱氧-β-L-吡喃半乳糖苷 (2.72 g ; 4.23 mmol)在甲醇(100 ml)中的溶液中，在氢气压力下加入10%钯/活性炭(0.5 g)。该反应是定量的。

1H NMR : δ (ppm) 0.87 (t, 3H, J= 6.96 Hz, H-33), 1.2 (d, 3H, J= 6.51 Hz, H-6), 1.25(m, 54H, $(CH_2)_{27}$), 1.52 (m, 6H, $OCH_2\underline{CH_2}$, H-14 和 H-17), 1.88-1.93 (bande NH), 1.95, 2.05和2.15 (s, 3H, $OCO\underline{CH_3}$), 2.64 (m, 4H, H-15和H-16), 3.46 (m, 1H, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.63 (m, IH, $O\underline{CH_b}CH_2$), 3.79 (m,1H, H-5), 4.41 (d, 1H, J= 7.98 Hz,H-1), 4.99 (dd, 1H, J= 3.52 Hz和10.46 Hz, H-3), 5.16 (dd, 1H, J= 7.98 Hz和10.46Hz, H-2), 5.23 (dd, J= 3,52 Hz和3.37Hz, H-4).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) : δ (ppm) 14.68 (C-33), 17.31 (C-2), 20.75 ($\underline{CH_3}COO$), 27.29(C-6), 29.72 ($(CH_2)_{27}$)), 25.89-31.98 ($OCH_2\underline{CH_2}$, C-14, C-17), 47.75-48.04 (C-15 和 C-16), 69.63 ($OCH_2\underline{CH_2}$), 69.45 (C-2), 70.57 (C-5), 70.85 (C-4), 71.44 (C-3), 96.25 (C-1), 171.30 (CO)。

h) (3-[4-(3-(氨基-丙基-氨基)-丁基-氨基-丙基-苄氧羰基-氨基]-亚甲基-氨基甲酰基)-15-十五烷基-16-十八烷基 2,3,4-三-O-乙酰基-6-脱氧-β-L-吡喃半乳糖苷的合成

向0.60g上步g)所得化合物(0.94 mmol)在氯仿(15 ml)中的溶液中，相继加入二异丙基乙基胺(0.491ml; 2.82 mmol)、BOP (0.457 g; 1.03 mmol)和上步a)获得的{3-[4-(3-苄基氧羰基-氨基-丙基-苄氧羰基-氨基)-丁基-苄氧羰基-氨基]-丙基氨基}-乙酸(0.748 g ; 0.94mmol)。生成的油经层析纯化(庚烷/乙酸乙酯4 :6)，得到45 %收率的(3-[4-(3-(氨基-丙基-氨基)-丁基-氨基-丙基-苄氧羰基-氨基]-亚甲基-氨基甲酰基)-15-十五碳烷基-16-十八烷基 2,3,4-三-

O-乙酰基-6-脱氧-β-L-吡喃半乳糖苷。

^{1}H NMR : δ (ppm) 0.87 (t, 3H, J= 6.96 Hz, H-33), 1.2 (d, 3H, J= 6.51 Hz, H-6), 1.24(m, 54H, $(CH_2)_{27}$), 1.39-1.67 (m, 15H, $OCH_2\underline{CH_2}$, H-14, H-17, NH, CH_2), 1.95, 2.05和2.15 (s, 3H, $OCOCH_3$), 3.05-3.35 (m, 18H, H-15, H-16和$\underline{CH_2}N$), 3.43 (m, 1H, $O\underline{CH_a}CH_2$), 3.67 (m, 1H, J= 6.74 Hz, $O\underline{CH_b}CH_2$), 3.79 (m, 1H, H-5), 4.41 (d, 1H, J= 7.98 Hz, H-1), 4.99 (dd, 1H, J= 3.52 Hz和10.46 Hz, H-3), 5.05 (s, 8H, $\underline{CH_2}$Phe), 5.16 (dd, 1H, J= 7.98 Hz和10.46 Hz, H-2), 5.23 (dd, J= 3,52 Hz和3.37Hz, H-4), 5.47 (宽带CONH, 1H), 7.32 (m, 20H, Phe).

^{13}C NMR ($CDCI_3$) ; δ (ppm) 14.84 (C-33), 20.75 ($\underline{CH_3}COO$), 27.29 (C-6'), 29.72($(CH_2)_{27}$), 25.89-31.98 ($OCH_2\underline{CH_2}$, C-14, C-17和CH2), 37.87-46.87 (C-15, C-16和C-N), 66.84 ($\underline{CH_2}$Phe), 68.63 ($O\underline{CH_2}CH_2$), 69.45 (C-2), 70.57 (C-5), 70.85 (C-4), 71.44 (C-3), 96.25 (C-1), 128.31 (Phe), 157.01 和 171.30 (CO)。

i)1-[-(3-[4-(3-氨基-丙基-氨基)-丁基-氨基-丙基-苄氧羰基-氨基]-亚甲基-氨基甲酰基-15-十五烷基-16-十八烷基 6-脱氧-β-L-吡喃半乳糖苷

向含有上步h)获得产物(0.60 g; 0.94 mmol)的甲醇(3 ml)溶液中加入氨的饱和甲醇(1ml)溶液。1小时后浓缩。

^{1}H NMR : δ (ppm) 0.87 (t, 3H, J= 6.96 Hz, H-33), 1.2 (d, 2H, J= 6.51 Hz, H-6), 1.24(m, 54H, $(CH_2)_{27}$), 1.39-1.67 (m, 15H, $OCH_2\underline{CH_2}$, H-14, H-17, NH, CH_2), 3.05-3.35 (m, 18H, H-15, H-16 和$\underline{CH_2}N$), 3.4-3.7 (m, 6H, $O\underline{CH_2}CH_2$, H-3, H-4, H-5, H-2), 4.73 (d, 1H, J=7.98 Hz, H-1), 5.05 (s, 8H, $\underline{CH_2}$Phe), 5.47 (宽带CONH, 1 H), 7.32 (m, 20H, Phe).

j) 1-[-(3-[4-(3-氨基-丙基-氨基)-丁基-氨基-丙基-氨基]-亚甲基-氨基甲酰基)-15-十五碳烷基-16-十八烷基 6-脱氧-β-L-吡喃半乳

糖苷 (化合物3)的合成

向上步i)所得产物(0.072 g; 0.05 mmol)的溶液中，加入甲醇中的10% (0.032 g)钯/炭。过夜后，在玻璃漏斗中经滤纸过滤，然后用旋转蒸发仪浓缩。产物在C-4型制备性柱上经HPLC纯化。

^{1}H NMR: δ (ppm) 0.87 (t, 3H, J= 6.96 Hz, H-33), 1.2 (d, 2H, J= 6.51 Hz, H-6), 1.24(m, 54H, $(CH_2)_{27}$), 1.39-1.67 (m, 15H, $OCH_2\underline{CH_2}$, H-14, H-17, CH_2), 2.92-3.19 (m,18H, H-15, H-16和 $\underline{CH_2}N$), 3.4-3.7 (m, 6H, $O\underline{CH_2}CH_2$, H-3, H-4, H-5, H-2), 4.73 (d, 1H, J- 7.98 Hz, H-1)。

C \ 本发明转移试剂的应用

实施例 4 : 用化合物2制备转移试剂/核酸复合物并测定其大小

本实施例说明本发明转移试剂与核酸间复合物的制备和随后对其大小的测定。

本实施例以及随后实施例中所用的糖脂是浓度为10mg/ml的化合物2的氯仿溶液。在一些情形下，将中性辅助脂胆固醇或DOPE与化合物2预先混合。

按以下方法制备脂溶液: 取出所需量的样品，在氩气流下蒸发溶剂，风干1小时。然后在4°C用含有5%葡萄糖和10mM氯化钠的溶液再水化过夜。第二天，将脂溶液加热到60°C 5分钟，然后超声1分钟。重复该操作，直到脂颗粒的大小稳定。

所用的DNA是质粒pXL3031(图1)在5%葡萄糖和10mM氯化钠混合物中的溶液，浓度为0.5mg/ml或1.0mg/ml。该质粒含有编码萤光素酶的luc基因，该基因处于巨细胞病毒CMV P/E启动子的控制之下。其大小为3671bp。该质粒的示意图见图1。按专利申请WO97/35002中所述的方法纯化了质粒pXL3031。

在室温下快速混合适当体积的质粒DNA溶液和化合物2(根据所希望的电荷比)制备化合物2/DNA复合物。转移试剂的量在0.25nmol/ug

DNA到12 nmol/ug DNA之间变化。

用Coulter N4Plus仪器通过动力学光散射(动力学激光散射)测定流体动力学直径，从而分析复合物的大小。用含5%葡萄糖和20mM氯化钠的溶液稀释样品20倍，以避免多次散射。

在3nmol脂/ugDNA的比例下，得到如下结果:

	大小(nm)
胶束	130nm
与胆固醇的制剂	153nm
与DOPE的制剂	137nm

术语“胶束”指化合物2单独使用，即没有加入中性辅助脂，因此形成一种胶束溶液。

该表表明所得复合物的大小在约130-150nm之间，这与药物应用、特别是注射相适应。

实施例5: 从化合物2形成的不同电荷比的复合物的表现

本实施例表明改变电荷比时本发明转移试剂/核酸复合物的表现。还证明了加入辅助脂(胆固醇或DOPE)的影响。

按常规，当评述转移试剂/DNA电荷比时，区分3种物理-化学相(B. Pitard等，质粒DNA与阳离子胶束间病毒大小的自聚集层状复合物可以促进基因转移，PNAS，Vol.94，14412-14417页，1997)。这三个相决定着转移试剂的治疗潜力。

电荷比小时，DNA没有被转移试剂所饱和。还剩余没有被复合的DNA，复合物总体带负电荷，而且尺寸较小。该相稳定，称为“A相”。DNA没有被转移试剂完全饱和表明DNA没有被完全保护。因而DNA可能遭受核酸酶的降解。另外，由于复合物总体带负电，难以通过细胞膜。因此，A相核脂复合物相对为非活性的。

中等电荷比时，DNA被转移试剂完全饱和，复合物总体为中性或略带正电。该相不稳定，因为离子排斥很小，可能产生聚集现象。这种颗粒的大小远在动力学光散射检测的检测限之上(远大于3微米)。

该相不稳定，称为“B相”。这种复合物的大小不适于注射使用，尽管这并不说明复合物在B相中无活性：它们只是处于一种不适合药物注射目的的制剂形式。

电荷比更高时，DNA被转移试剂过饱和，复合物总体为正电性。由于正电荷间的强排斥力，该相是稳定的，称为“C相”。与A相不同，所得复合物中DNA被很好地保护，不受核酸酶破坏，复合物的总体正电荷有利于与阴离子性的细胞膜结合和通过该膜。因此C相的复合物适于细胞中的核酸转移应用。

还用本发明的化合物2作为转移试剂显示了A、B、C三个区：

电荷比	0.25	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4	6	8	10	12
胶束	A	A	B	B	B	B	C	C	C	C	C	C
+胆固醇	A	A	B	B	B	C	C	C	C	C	C	C
+DOPE	A	A	B	B	B	C	C	C	C	C	C	C

如上表所示，B区(不稳定区)特别小，位于低电荷比部分。当化合物2与辅助脂(胆固醇或DOPE)一起使用时C区从2nmol脂/ug DNA开始，当仅使用化合物2时从3nmol脂/ug DNA开始。如上文所述，该区对于药物应用特别有利。

作为对比，用专利申请WO97/18185中公开的阳离子脂表明，根据溶液中氯化钠的浓度，从电荷比至少2开始形成C区(见B. Pitard等，PNAS USA，94，14412-14417页，1997的图3A)。

因此，化合物2是一种特别有利的转移试剂，因为它在低电荷比下稳定，这得以与小量的糖脂形成稳定的复合物，从而具有毒性方面的有利效果。

实施例6：化合物2体外转移核酸的应用

本实施例证明本发明转移试剂在无或有中性辅助脂(胆固醇或DOPE)存在下以不同的电荷比体外向细胞中转移DNA的能力。

在24孔微板上接种HeLa细胞，每孔60000个细胞，并生长过夜。

过夜后，即转染时的细胞数为100000个细胞/孔。

将每个孔与0.5毫升无血清的DMEM培养基（Gibco/BRL）中的含有1微克质粒DNA的从化合物2形成的复合物接触。这些细胞在37℃培养5小时。然后抽取含有复合物的培养基，用DMEM培养基和10%胎牛血清的混合物更换。然后这些细胞再培养24小时。最后，使用萤光素酶检验试剂盒盒（Promega）和Dynex MLX荧光仪，溶解并检测这些细胞。

所得结果以棒图显示在图2中。转移的效率用萤光素酶的表达(pg)/孔表示。发现最高转染为约500皮克/孔。

结论，这个实施例清楚地表明，可以利用本发明化合物2形成用于促进体外向细胞中转移DNA的复合物。

实施例7：化合物2体内转移DNA的应用

本实施例证明本发明转移试剂体内向细胞转染DNA的能力。

通过气管内、静脉内和肌肉内给药在Balb/C鼠上进行体内基因转移。

在肌肉内注射的情况下，每只鼠在前胫骨肌肉中注入30微升含有15微克质粒DNA的配制品。在注射7天后取出这些组织，冷冻并储存在－80℃下，等待进行萤光素酶活性试验。

在通过静脉内注射的情况下，每只鼠注射200微升含有50微克质粒DNA的配制品。在注射24小时后取出这些组织，然后冷冻并以与前面相同的方式储存。

图3表示与化合物2形成的复合物肌内注射时体内基因转移的活性。这些结果清楚地表明本发明化合物2与DNA间复合物的形成可以促进所述DNA在体内向细胞中的转移。

同样，可以利用本发明定义的任何转移试剂促进向任何组织类型细胞中的DNA转移。

01.05.24

说 明 书 附 图

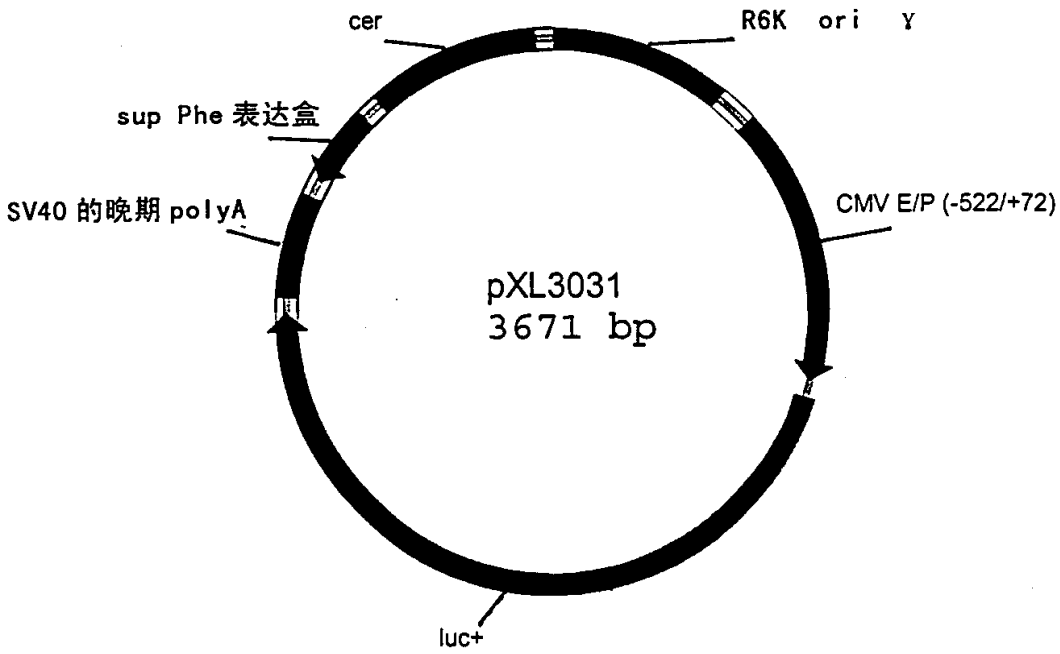


图 1

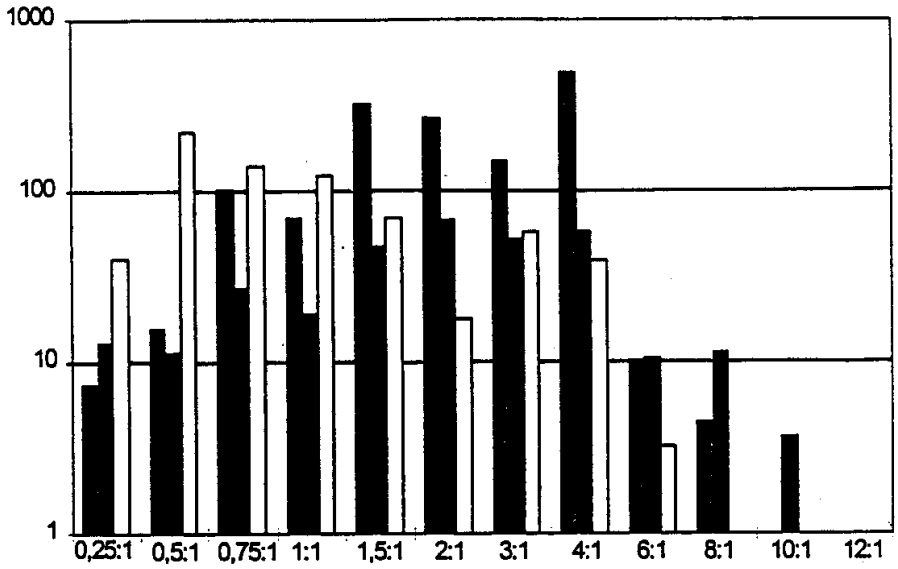

1000
100
10
1
0,25:1
0,5:1
0,75:1
1:1
1,5:1
2:1
3:1
4:1
6:1
8:1
10:1
12:1
脂/DNA 比
胶束
胆固醇
DOPE

图 2

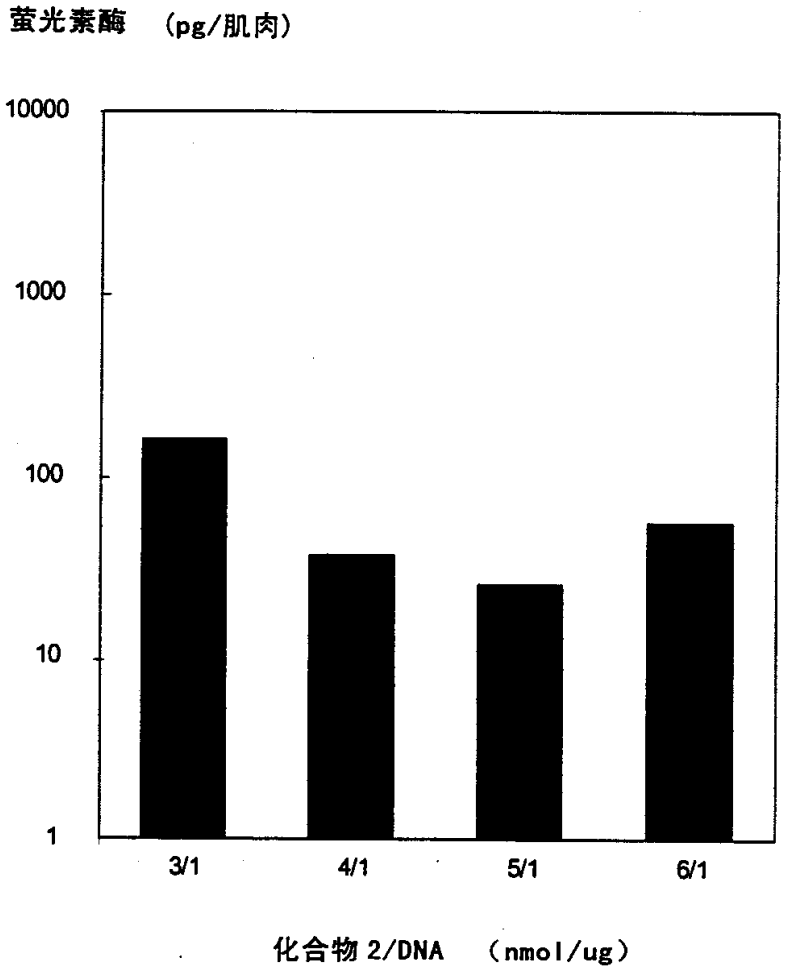


图 3