

University of Groningen

**Base acetamide glycerin ether molecule, chemical synthesis method therefor, and applications thereof in field of gene therapy**

Yang, Zhenjun; Wang, Chao; Sun, Jing

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2018

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Yang, Z., Wang, C., & Sun, J. (2018). Base acetamide glycerin ether molecule, chemical synthesis method therefor, and applications thereof in field of gene therapy. (Patent No. *WO2018085962*).

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2018年5月17日 (17.05.2018)



(10) 国际公布号  
**WO 2018/085962 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
*C07D 473/34* (2006.01) *A61K 9/127* (2006.01)  
*C07D 473/18* (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)  
*C07D 239/54* (2006.01) *C12N 15/88* (2006.01)  
*C07D 239/47* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/000712
- (22) 国际申请日: 2016年12月27日 (27.12.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201611002249.1 2016年11月9日 (09.11.2016) CN
- (71) 申请人: 北京大学 (PEKING UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市海淀区学院路38号北京大学医学部, Beijing 100191 (CN)。
- (72) 发明人: 杨振军 (YANG, Zhenjun); 中国北京市海淀区学院路38号北京大学医学部, Beijing 100191 (CN)。 王超 (WANG, Chao); 中国北京市海淀区

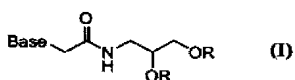
区学院路38号北京大学医学部, Beijing 100191 (CN)。 孙晶 (SUN, jing); 中国北京市海淀区学院路38号北京大学医学部, Beijing 100191 (CN)。

(74) 代理人: 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司 (KELONG INTERNATIONAL INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.); 中国北京市海淀区知春路6号锦秋国际大厦A座13-3室, Beijing 100088 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,

(54) Title: BASE ACETAMIDE GLYCERIN ETHER MOLECULE, CHEMICAL SYNTHESIS METHOD THEREFOR, AND APPLICATIONS THEREOF IN FIELD OF GENE THERAPY

(54) 发明名称: 一种碱基乙酰胺甘油醚分子, 其化学合成方法及其在基因治疗领域的应用



(57) Abstract: Disclosed in the present invention are a base acetamide glycerin ether molecule, a chemical synthesis method therefor, and applications thereof in the field of gene delivery. The molecule has an amphiphilic structure represented by formula (I), that is, a base-1-acetic acid is used as a hydrophilic head, and an amide bond is connected to glycerol aliphatic ether serving as a hydrophobic tail, so as to form an amphiphilic molecule. The Base group is common nature purine and a pyrimidine base, and the R group is a saturated or unsaturated aliphatic carbon chain. The compound can be prepared by means of an activated derivative of the base-1-acetic acid and 2, 3-dialkoxyl-1-propylamine, prices of the raw materials are low, and the synthesis method is simple. The compound can be used to prepare liposome and other supramolecular structures, and does not have obvious cytotoxicity. The base of the head of the compound can be combined with nucleic acid, and can carry the nucleic acid to enter a cell membrane. Accordingly, the compound has the potential of becoming a new non-cationic gene vector, and can be widely used in the field of gene therapy.

(57) 摘要: 本发明公开了一种碱基乙酰胺甘油醚分子, 其化学合成方法及其在基因转运中的应用。该分子具有如式 (I) 所示的两亲性结构, 即以碱基-1-乙酸为亲水性头部, 通过酰胺键连接作为疏水性尾部的甘油脂肪醚, 形成一个两亲性分子。其中Base基团为常见的天然嘌呤和嘧啶碱基, R基团为饱和或不饱和的脂肪族碳链。该化合物可以通过碱基-1-乙酸的活化衍生物与2, 3-二烷氧基-1-丙胺反应制得, 原料廉价, 合成方法简单。该化合物可制备成脂质体等超分子结构, 且没有明显的细胞毒性, 其头部的碱基能够结合核酸, 并运载核酸进入细胞膜。因而, 该化合物具有成为新型非阳离子基因载体的潜力, 在基因治疗领域将得到广泛应用。

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区  
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,  
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,  
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

## 一种碱基乙酰胺甘油醚分子，其化学合成方法 及其在基因治疗领域的应用

### 技术领域

本发明涉及一种碱基乙酰胺甘油醚分子及其化学合成方法。本发明还涉及这类碱基乙酰胺甘油醚分子在基因转运领域的应用，这类分子结构在生物材料及基因治疗领域有潜在的应用前景。本发明属于新型生物材料领域。

### 背景技术

相对于传统的以蛋白为靶点的小分子药物来讲，核酸药物可以从基因水平上调控相关的生理活动和行为，进而从根本上实现对疾病的治疗和预防。随着核酸药物(如反义核酸、siRNA、核酸适配体等)研究的飞速发展，与其相关的基因治疗在最近数十年间受到青睐。虽然核酸药物具有巨大的潜力和应用前景，但其明显的缺陷(稳定性差、脱靶效应、难以跨膜等)阻碍着核酸药物在临床上的进一步应用。因此，设计并构建系统的核酸药物递送载体成为当前研究的重点之一。

已经用于基因跨膜转运的载体可以分为两类：病毒类载体和非病毒类载体。病毒类载体转染基因的效率较高，但是制备比较困难，并且可能导致机体细胞突变甚至癌变，毒副作用难以控制。非病毒类载体大多为人工合成，虽然转染效率相对较差，但是种类繁多，结构性能可控，所以在基因运载中应用非常广泛。已经用作基因转运的非病毒类载体包括阳离子脂质体、阳离子聚合物、纳米粒子等(*Chem. Rev.* 2009, 109, 259–302)。

阳离子脂质体是应用最为广泛的非病毒类基因载体，由两亲性部分组成，阳离子基团作为极性头部，脂肪族长链作为非极性尾部，依靠正负电荷间的库仑力作用与核酸相结合，能够有效地包载核酸。但是由于细胞膜表面带有负电荷，而且血清中也含有大量的电负性蛋白，所以阳离子脂质体具有较高的细胞毒性和血清毒性。另外，由于电性作用较强，阳离子脂质体与核酸结合比较紧密，跨膜后难以有效释放(*Biomaterials* 2008, 29, 3477-3496)。为了避免阳离子脂质体的缺陷，构建新型载体并利用其它作用力代替电性作用，实现脂质体与核酸的结合意义非常重要。

近年来，利用氢键作用构建基因转运载体越来越受到重视。Milani 等(*J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 11664-11665)构建了一种核苷酸磷脂分子，利用腺嘌呤核苷作为极性头部，在 5'-羟基位通过磷酸键连接脂肪酸甘油酯作为非极性的尾部。该核苷

酸磷脂分子在水溶液中能够形成有序排列的双层膜状结构，通过氢键作用包裹聚尿嘧啶核酸链。Toth 等 (*Chem. Commun.* 2010, 46, 3140-3142) 报道了一种以碱基作为头部，脂肪链作为尾部的新型分子，证实了其与核酸单链的氢键结合作用。Chabaud 等 (*Bioconjugate Chem.* 2006, 17, 466-472) 报道了一类带有核苷结构的阳离子脂质体，具有较好的基因转运效果。作者认为产生这种效果是因为碱基与核酸之间的氢键作用。Moreau 等 (*J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 7533-7539) 也报道了一系列中性核苷核苷磷脂分子，这类分子在水溶液中能形成凝胶结构，起到诱捕 DNA 的效果。迄今未见依靠氢键结合作用的脂质体包载核酸跨膜转运的报道。

## 发明内容

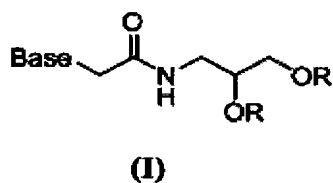
本发明目的之一是提供一类碱基乙酰胺甘油醚分子；

本发明目的之二是提供上述碱基乙酰胺甘油醚分子的化学合成方法；

本发明目的之三是提供上述碱基乙酰胺甘油醚分子在基因治疗领域的应用。

本发明上述目的是通过以下技术方案来实现的：

一种碱基乙酰胺甘油醚分子，其具有如式(I)所示的两亲性结构，即以碱基-1-乙酸为极性头部，以 2,3-二烷氧基-1-丙胺为非极性尾部，两部分通过酰胺键连接，形成一个既具有亲水性也具有亲脂性的两亲性结构。

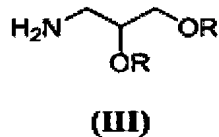
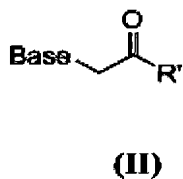


上述碱基乙酰胺甘油醚分子所含的碱基，即式(I)中的 Base 基团，为常见的天然嘌呤和嘧啶碱基，即腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶及尿嘧啶。

上述碱基乙酰胺甘油醚分子所含的脂肪长链，即式(I)中的 R 基团，为长度在 8 个碳到 25 个碳之间，饱和或不饱和的脂肪族碳链。

一种制备上述碱基乙酰胺甘油醚分子的化学合成方法，其特征在于，以如式(II)所示的碱基-1-乙酸活化衍生物及如式(III)所示的 2,3-二烷氧基-1-丙胺为原料在有机溶剂中反应得到碱基乙酰胺甘油醚分子。使用的如式(II)所示的碱基-1-乙酸活化衍生物，其 R' 基团为氯或 N-氧基-琥珀酰亚胺等活化结构。使用的如式(III)所示的 2,3-二烷氧基-1-丙胺，其 R 基团为长度在 8 个碳到 25 个碳之间，饱和或不饱和的脂肪

族碳链。



上述化学合成方法包括以下步骤：(i) 商业购买或者由简单原料制备如式(II)所示的碱基-1-乙酸活化衍生物、如式(III)所示的 2,3-二烷氧基-1-丙胺；(ii) 用如式(II)所示的碱基-1-乙酸活化衍生物、如式(III)所示的 2,3-二烷氧基-1-丙胺在有机溶剂中直接反应，或者加入碱或酯缩合催化剂反应，得到如式(I)所示的目标产物。

在上述化学合成方法的步骤(ii)中，优选的，如式(II)所示的碱基-1-乙酸活化衍生物由碱基逐步合成；优选以 N-羧基琥珀酰亚胺来活化羧基。如式(III)所示的 2,3-二烷氧基-1-丙胺由甘油和长链脂肪醇或长链脂肪族烷基溴化物逐步合成，合成路线如图 2 所示。

在上述合成方法中，步骤(ii)所用溶剂是乙腈，或 N,N-二甲基甲酰胺，或 N-甲基吡咯烷，或二氯甲烷，或二氯乙烷，或四氢呋喃，或苯，或其它非质子性溶剂；优选的，以 N,N-二甲基甲酰胺为溶剂。以反应需要加入 4-二甲氨基吡啶，或三乙胺，或吡啶、或氢氧化钾，或氢氧化钠等添加剂。优选的，加入 4-二甲氨基吡啶作为催化剂，加入吡啶或者三乙胺作为有机碱。

以上任一项所述的碱基乙酰胺甘油醚分子在制备具有超分子结构的物质中的应用，优选的，所述的超分子结构为脂质体。

由上述碱基乙酰胺甘油醚分子在水相溶媒中所形成的超分子结构。通过一定的制备方法，该分子能够组装成脂质体等超分子结构。

上述碱基乙酰胺甘油醚分子在基因治疗领域，特别是在制备用于基因治疗的转染试剂中的应用。实验证明，本发明的化合物没有明显的细胞毒性。该化合物头部含有碱基，可以通过氢键作用以及电子云  $\pi$ - $\pi$  堆积作用结合核酸。这类化合物具有亲水性和亲脂性两亲性结构，能够在水溶液中组装成脂质体等超分子结构，具有跨细胞膜能力，可以用作基因载体，将核酸药物运载至细胞膜中。所以其能够成为凝聚、诱捕、承载、运载核酸类药物，或者介导核酸类药物跨膜的高效生物材料，在基因治疗领域具有广阔的应用前景。

本发明可以实现以下优点：提供了一类碱基乙酰胺甘油醚分子，该类分子具有两亲性，能够在水溶液中形成脂质体结构。分子其头部含有碱基，可以通过氢键及

电子云  $\pi$ - $\pi$  堆积作用结合核酸，运载核酸跨膜，因此是具有很大潜力的高效生物材料。本发明提供的合成方法所用原料廉价易得，合成方法简单高效。这类分子没有明显的细胞毒性，在水相溶剂中可以形成脂质体结构，制备简单，具有良好的运载核酸跨膜能力，具有潜在的药物治疗前景。

## 附图说明

图 1 为两种碱基乙酸甘油醚酯分子的化学结构；

图 2 为 2,3-二(油醇氧基)-1-丙胺的合成路线；

图 3 为碱基乙酰胺甘油醚分子 DNTA 的合成路线；

图 4 为碱基乙酰胺甘油醚分子 DNCA 的合成路线；

图 5 为 DNTA (c, d) 以及 DNCA (a, b) 脂质体的扫描电子显微镜观察结果；

图 6 为碱基乙酸甘油醚酯类分子 DNCA 和 DNTA 在 24 小时 (左) 以及 72 小时 (右) 内对 CCK8 细胞的生长抑制率；

图 7 为 DNTA 以及 DNCA 脂质体对 FAM-polyA 及 FAM-polyG 的细胞转染结果；

图 8 为 MCF-7 细胞对反义核酸 Cenersen 的摄取结果。

## 具体实施方式

根据本发明中如式(I)所述化合物的合成路线，以及其所形成的多种超分子结构，并结合具体实施例对发明进行进一步说明，但并非限制本发明的范围。

### 实施例一、碱基乙酰胺甘油醚分子的合成

#### [实施例 1] 油醇甲基磺酰酯的合成

将油醇 (50 g, 纯度 85%, 158 mmol)、 $\text{Et}_3\text{N}$  (40 mL, 286 mmol) 加入到 1 L 的圆底烧瓶中，加入 DCM (500 mL)，置于冰浴上充分搅拌，使温度降为  $0^\circ\text{C}$ 。通过注射器向其中缓缓加入甲磺酰氯 (16 mL, 206 mmol)，溶液变浑浊。之后撤去冰浴，使反应液慢慢回复至室温，继续搅拌 12 h。加入水 (250 mL) 以淬灭反应，然后通过分液漏斗分离有机相。水相用 DCM (250 mL  $\times$  2) 反萃，然后合并有机相。合并后的有机相依次用 1 N 盐酸 (250 mL)、10%  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (250 mL) 和饱和食盐水 (250 mL) 洗涤，无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥。有机相减压蒸干，残余物通过硅胶柱层析分离 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=20/1,  $R_f=0.3$ )，得到浅黄色油状液体 44.3 g，产率为 81%。 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.30-5.43 (m, 2 H), 4.22 (t,  $J=6.6$  Hz, 2 H), 3.00 (s, 3 H), 1.90-2.10 (m,

4 H), 1.70-1.80 (m, 2 H), 1.20-1.40 (m, 22 H), 0.88 (t,  $J=6.8$  Hz, 3 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 130.2, 129.9, 70.3, 37.5, 32.0, 29.90, 29.83, 29.66, 29.46, 29.29, 29.26, 29.15, 27.36, 27.30, 25.6, 22.8, 14.3; IR (neat)  $\nu$ 2925.5, 2854.5, 1463.6, 1355.9, 1175.4, 974.8, 947.8, 831.7, 721.6, 528.8; MS (ESI-TOF<sup>+</sup>) for  $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_3\text{SNa}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  found 369.2315, calcd 369.2434; Anal. calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_3\text{S}$ : C 65.85, H 11.05, Found: C 65.63, H 10.98.

#### [实施例 2]1-三苯基甲氧基甘油醇的合成

将甘油 (40 g, 435 mmol)、三苯基氯甲烷 (30 g, 107 mmol)、DMAP (300 mg, 2.46 mmol)置于干燥的 500 mL 圆底烧瓶中, 加入 THF (80 mL)和  $\text{Et}_3\text{N}$  (18 mL), 室温搅拌 12 h。向反应液中加入水 (100 mL)以淬灭反应, 然后加入乙酸乙酯 (150 mL)稀释。充分震荡后, 将混合液转移到分液漏斗中, 分离有机相。水相用乙酸乙酯(100 mL $\times$ 2)萃取, 然后合并有机相。合并后的有机相依次用饱和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (200 mL)、水 (200 mL)和饱和食盐水 (200 mL)洗涤, 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥。过滤后, 蒸干溶剂, 得到黄色油状物。将其溶解到甲苯/正己烷 (200 mL,  $v/v=1/1$ )中, 室温下放置 24 h, 结晶出白色固体 29 g, 产率为 85%。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.38-7.48 (m, 6 H), 7.20-7.35 (m, 9 H), 3.84 (s, 1 H), 3.63-3.71 (m, 1 H), 3.53-3.63 (m, 1 H), 3.20-3.28 (m, 2 H), 2.74 (brs, 1 H), 2.35 (brs, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  143.8, 128.7, 128.0, 127.3, 87.1, 71.3, 65.1, 64.4; IR (film, KBr)  $\nu$  3380.8, 3058.1, 2920.0, 2866.8, 1490.0, 1447.8, 1081.5, 1028.5, 699.8; MS (EI) for  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_3$   $[\text{M}]^+$  found 334.5, calcd 334.2; Anal. calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_3$ : C 79.02, H 6.63, Found: C 79.26, H 6.49.

#### [实施例 3]1-三苯基甲基-2,3-二油醇醚-甘油的合成

将 1-三苯基甲氧基-甘油-2,3-二醇(8 g, 23.1 mmol)、KOH (3.3 g, 58.9 mmol)和油醇对甲基磺酰酯(19.2 g, 55.42 mmol)混合后溶于干燥的苯(150 mL)溶液中, 装备分水 器, 加热至  $80^\circ\text{C}$ , 回流 32 小时。之后向其中加入乙酸乙酯 100 mL 和水 150 mL, 萃取, 分离有机相。水相用乙酸乙酯(150 mL $\times$ 3)萃取, 合并有机相, 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 蒸干溶剂后减压硅胶柱层析分离, 得到目标产物 6.1 g, 产率为 31%。另得到 1-三苯基甲氧基-3-油醇醚-甘油-2-醇 3.7 g, 产率为 27%。目标产物为淡黄色液体。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.40-7.50 (m, 6 H), 7.18-7.32 (m, 9 H), 5.26-5.43 (m, 4 H), 3.50-3.60 (m, 5 H), 3.35-3.45 (m, 2 H), 3.12-3.20 (m, 2 H), 1.92-2.08 (m, 8 H),



1.50-1.58 (m, 4 H), 1.26 (brs, 44 H), 0.88 (t,  $J = 6.6$  Hz, 6 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  144.31, 130.07, 130.00, 128.90, 127.85, 127.02, 86.64, 78.45, 71.76, 71.33, 70.84, 63.73, 32.77, 32.06, 30.28, 29.94, 29.93, 29.85, 29.82, 29.72, 29.68, 29.65, 29.47, 27.37, 27.06, 26.31, 26.25, 22.84, 14.27; IR (film, KBr)  $\nu$  3004.4, 2925.3, 2854.1, 1742.6, 1597.7, 1490.7, 1450.0, 1220.6, 1118.7, 763.9, 745.0, 704.1, 632.8  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI-TOF+) for  $\text{C}_{58}\text{H}_{90}\text{O}_3\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  found 857.9059, calcd 857.6782; Anal. calcd for  $\text{C}_{58}\text{H}_{90}\text{O}_3$ : C 83.39, H 10.86, Found: C 83.10, H 10.62.

#### [实施例 4] 1,2-二油醇醚-甘油-3-醇的合成

取 1-三苯基甲基-2,3-二油醇醚-甘油(8.34 g, 10 mmol)混悬于甲醇-四氢呋喃(100 mL, v/v= 1/1)混合溶液中, 加入浓盐酸(2 mL, 12 M), 室温下搅拌 2 h。TLC 检测发现原料已经完全反应。减压蒸干溶剂, 向残余物中加入乙酸乙酯(50 mL)和水(100 mL), 萃取后分离有机相。水相用乙酸乙酯(3×100 mL)萃取, 合并有机相, 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥。过滤除去干燥剂, 减压蒸干溶剂, 硅胶柱层析分离(洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=20/1,  $R_f = 0.2$ ), 得到目标产物 3.7 g, 产率 62%。浅黄色油状液体。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.30-5.45 (m, 4 H), 3.40-3.75 (m, 9 H), 2.18 (s, 1 H), 1.90-2.10 (m, 8 H), 1.55-1.65 (m, 4 H), 1.25-1.40 (brs, 44 H), 0.88 (t,  $J = 6.4$  Hz, 6 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  130.10, 129.97, 78.39, 72.00, 71.07, 70.54, 63.27, 32.06, 30.23, 29.92, 29.85, 29.81, 29.77, 29.67, 29.65, 29.60, 29.47, 29.41, 27.36, 26.25, 22.83, 14.25; IR (film, KBr)  $\nu$  3470.1, 3004.4, 2925.4, 2854.0, 1651.2, 1463.2, 1376.2, 1117.5, 1041.3, 968.0, 721.9  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI-TOF+) for  $\text{C}_{39}\text{H}_{76}\text{O}_3\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  found 615.7213, calcd 615.5687; Anal. calcd for  $\text{C}_{39}\text{H}_{76}\text{O}_3$ : C 78.99, H 12.92, Found: C 78.72, H 12.68.

#### [实施例 5] 1,2-二油醇醚-3-甘油醇甲磺酸酯

取三乙胺 (0.54 mL, 3.91 mmol)、1,2-二油醇醚-甘油-3-醇 (1.932 g, 3.26 mmol) 于 25 mL 单口瓶中, 加入干燥的二氯甲烷 (5 mL), 磁力搅拌使其溶解, 冰水浴使反应体系降温至  $0^\circ\text{C}$ , 逐滴加入甲磺酰氯 (0.3 mL, 3.91 mmol),  $0^\circ\text{C}$  继续反应 2 小时。将反应体系加入到饱和的  $\text{NaHCO}_3$  (50 mL) 溶液中, 分离有机相, 水相用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2×50 mL) 萃取, 合并有机相, 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥过夜。过滤除去干燥剂, 减压蒸干溶剂, 残余物用硅胶柱层析分离(洗脱剂: 石油醚/甲醇=120/1), 得到目标产物 2.02 mg(产率 92.6%)。  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.37 (s, 4H), 4.40 (d,  $J = 10.9$

Hz, 1H), 4.27 (d,  $J = 10.7, 5.8$  Hz, 1H), 3.54 (d,  $J = 29.7, 27.4, 20.6$  Hz, 8H), 3.06 (s, 3H), 2.03 (d,  $J = 5.2$  Hz, 7H), 1.58 (s, 4H), 1.29 (d,  $J = 10.6$  Hz, 44H), 0.90 (t,  $J = 6.1$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  127.93, 127.27, 77.34, 77.22, 77.02, 76.70, 76.38, 71.90, 70.83, 69.08, 37.40, 32.62, 31.92, 29.95, 29.78, 29.71, 29.59, 29.54, 29.52, 29.33, 29.28, 27.23, 26.08, 26.02, 22.70, 14.13. MS (EI) for  $\text{C}_{40}\text{H}_{78}\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  found 693.36, calcd 693.55;

[实施例 6] 1,2-二油醇醚-甘油-3-叠氮

取干燥的化合物 1,2-二油醇醚-甘油-3-甲磺酸酯 (970 mg, 1.44 mmol) 于 25 mL 单口瓶中, 加入干燥的 DMF (8 mL) 溶液, 磁力搅拌使其溶解, 加入  $\text{NaN}_3$  (188 mg, 2.88 mmol) 氩气保护, 反应升温至  $70^\circ\text{C}$  反应 15 小时。将反应液冷却至室温, 加入丙酮 (30 mL) 稀释, 反应液用硅藻土过滤, 滤液减压蒸干, 残余物用硅胶柱层析分离 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=200/1), 得到无色油状目标产物 345.5 mg (产率 56%)。  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.37 (s, 4H), 3.60 – 3.36 (m, 9H), 2.31 (s, 1H), 2.07 – 1.95 (m, 8H), 1.59 (d,  $J = 8.3$  Hz, 4H), 1.30 (d,  $J = 10.8$  Hz, 44H), 0.90 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  129.89 (d,  $J = 10.6$  Hz), 77.90 (s), 77.45 – 76.95 (m), 76.95 – 76.86 (m), 76.70 (s), 71.79 (s), 70.66 (s), 70.11 (s), 52.08 (s), 32.62 (s), 31.92 (s), 30.38 – 29.54 (m), 29.37 (t,  $J = 11.7$  Hz), 27.22 (s), 26.07 (d,  $J = 7.5$  Hz), 22.70 (s), 14.13 (s). MS (EI) for  $\text{C}_{39}\text{H}_{75}\text{N}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  found 640.49, calcd 640.58.

[实施例 7] 1,2-二油醇醚-甘油-3-胺

将 1,2-二油醇醚-甘油-3-叠氮 (309 mg, 0.5 mmol) 加入到干燥的 THF (10 ml) 中, 磁力搅拌使其溶解, 将溶液降温至  $0^\circ\text{C}$ , 加入  $\text{LiAlH}_4$  (95 mg, 2.5 mmol) 氩气保护, 反应 45 min 后将溶液升温至室温, 继续反应 2.5 h, 加入饱和  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (0.7 mL) 溶液淬灭反应, 反应液用硅藻土过滤, 滤液减压蒸干, 残余物硅胶柱层析分离 (洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=50/1), 得到目标产物 233.5 mg (产率 79%)。淡黄色油状物。  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.30\text{-}5.45$  (m, 4 H), 3.40-3.75 (m, 9 H), 2.18 (s, 1 H), 1.90-2.10 (m, 8 H), 1.55-1.65 (m, 4 H), 1.25-1.40 (brs, 44 H), 0.88 (t,  $J = 6.4$  Hz, 6 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 130.10, 129.97, 78.39, 72.00, 71.07, 70.54, 63.27, 32.06, 30.23, 29.92, 29.85, 29.81, 29.77, 29.67, 29.65, 29.60, 29.47, 29.41, 27.36, 26.25, 22.83, 14.25$ ; MS (ESI-TOF+) for  $\text{C}_{39}\text{H}_{77}\text{NO}_2$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  found 590.75, calcd 591.60;

## [实施例 8] (胸腺嘧啶-1-基)-乙酸的合成

将胸腺嘧啶(10.0 g, 79.3 mmol)悬浮于 H<sub>2</sub>O (150 mL), 向其中加入 KOH 水溶液 (50 mL, 3.6 M)。该混合物在室温下搅拌 10 min 后, 溶液逐渐变澄清。然后向其中加入氯乙酸(15.0 g, 159 mmol), 反应液加热回流 90min。反应液冷却至室温后, 用浓盐酸酸化至 pH 3, 然后在 4°C 下放置过夜, 析出白色晶状沉淀。过滤得到该白色晶状沉淀, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 真空干燥, 得到目标产物 4.5 g(产率 31%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 13.11 (s, 1 H), 11.34 (s, 1 H), 7.50 (s, 1 H), 4.37 (s, 2 H), 1.75 (s, 3 H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.6, 164.4, 151.0, 141.8, 108.4, 48.4, 11.9; IR (film, KBr) ν 3180.2, 3076.2, 3027.0, 2962.3, 2835.8, 1737.7, 1708.4, 1664.8, 1631.9, 1418.3, 1356.3, 1201.7, 1147.0, 829.8, 566.9 cm<sup>-1</sup>; MS (EI): m/z (%): 184.1 (39) [M<sup>+</sup>], 95.9 (100); Anal. Calcd for C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C 45.66, H 4.38, N 15.21, Found: C 45.59, H 4.40, N 15.25.

## [实施例 9](胸腺嘧啶-1-基)-乙酰-(N-羧基琥珀酰亚胺)-酯的合成

向干燥的 25 mL 茄形瓶中加入(胸腺嘧啶-1-基)-乙酸(3 g, 16.3 mmol)和干燥的 DMF (30 mL), 搅拌使其完全溶解。然后向其中加入 N-羧基琥珀酰亚胺(2.38 g, 21 mmol)和 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC, 3.36 g, 16.3 mmol)。室温搅拌过夜, 析出大量白色沉淀。过滤除去沉淀, 滤液减压蒸馏, 然后将残余物复溶于 DMF (5 mL)中。向其中加入无水乙醚(30 mL), 析出白色固体。过滤得到该固体, 真空干燥, 得到目标产物 4.6 g(产率 61%)。白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.52 (s, 1 H), 7.63 (s, 1 H), 4.96 (s, 2 H), 2.83 (brs, 4 H), 1.77 (s, 3 H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.8, 165.0, 164.2, 150.7, 140.8, 109.3, 46.4, 25.5, 11.9; IR (film, KBr) ν 3154.4, 3003.4, 2830.5, 1827.4, 1785.4, 1739.8, 1697.2, 1467.8, 1422.8, 1382.8, 1358.6, 1213.7, 1106.8, 1065.1, 793.9, 651.3 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI-TOF+) for C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> found 304.0489, calcd 304.0540; Anal. Calcd for C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: C 46.98, H 3.94, N 14.94, Found: C 46.75, H 3.96, N 14.95.

[实施例 10] 1,2,-二(油烯基)-甘油-3-胺-(胸腺嘧啶-1-基)-乙酰酯的合成 (DNIA, 结构式如图 1 所示)

DNIA 的合成路线如图 3 所示。

将(胸腺嘧啶-1-基)-乙酰-(N-羧基琥珀酰亚胺)-酯(280 mg, 1.0 mmol)、1,2,-二(油烯基)-甘油-3-胺(709 mg, 1.2 mmol)、DMPA(14.6 mg, 0.1 mmol)、吡啶(0.4 mL)和无水 DMF(20 mL)混合, 氩气保护, 室温搅拌过夜。向其中加入乙酸乙酯(200 mL)稀

释，转移至分液漏斗中，依次用稀盐酸(0.1 M)、饱和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液、水、饱和食盐水冲洗，有机相用无水硫酸钠干燥。过滤除去干燥剂，滤液减压蒸干，残余物用硅胶柱层析分离(洗脱剂：二氯甲烷/甲醇=50/1)，得到目标产物 537.5 mg(产率 71%)。淡黄色油状物。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.12 (s, 1 H), 7.09 (s, 1 H), 6.43 (s, 1 H), 5.38 (d, J = 18.8 Hz, 4 H), 4.31 (s, 2 H), 3.58 (s, 1 H), 3.52-3.42 (m, 6 H), 2.05-1.94 (m, 10 H), 1.60 (s, 4 H), 1.29 (d, J = 11.7 Hz, 45 H), 0.89 (d, J = 6.7 Hz, 6H). (ESI-MS) for C<sub>46</sub>H<sub>83</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> [M-H]<sup>-</sup> found 756.61, calcd. 757.23. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 167.54, 163.69, 150.61, 140.18, 130.13, 129.98, 111.38, 76.35, 72.03, 70.89, 69.97, 65.77, 48.60, 32.06, 29.93, 29.78, 29.67, 29.61, 29.48, 27.37, 26.19, 14.25, 12.45; (ESI-MS) for C<sub>46</sub>H<sub>83</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> [M-H]<sup>-</sup> found 756.61, calcd. 757.23.

#### [实施例 11] (4-N-(二苯甲氧羰基)-胞嘧啶)-1-乙酸的合成

取胞嘧啶 (10.3 g, 90 mmol, 1.0 eq) 溶于 DMF (90 mL) 中，加入叔丁醇钾(11.6 g, 103.5 mmol, 1.15 eq)，之后将反应体系加热至 100°C 反应 2 小时。将反应体系降温至 10°C，分 30 分钟逐滴滴加 2-溴乙酸苄酯(16.05 mL, 101 mmol, 1.12 eq)，滴加完毕后将反应体系升温至室温继续反应 12 小时，加入醋酸(5.9 mL, 103.5 mmol, 1.2 eq) 淬灭反应，将反应液旋干。残余物重新悬浮于 H<sub>2</sub>O(100 mL) 中，继续搅拌 4 小时后过滤，H<sub>2</sub>O(4x 150 mL) 洗涤，烘干后得到胞嘧啶-1-苄基乙酸 20.6g。取胞嘧啶-1-苄基乙酸 (20.6 g, 82 mmol, 1.0 eq) 溶于 DMF(160 mL) 中，加入 N,N'-羰基二咪唑(21.25 g, 131.25 mmol, 1.6 eq)。TLC 检测反应完全后加入甲醇，继续搅拌 1.5 小时，加入二苯甲醇(19.65 g, 106.5 mmol, 1.3 eq)。将反应体系加热至 60 °C，之后分两批间隔 1 小时加入二苯基甲醇(2 x 1.825 g, 9.9 mmol, 0.12 eq)，继续反应 6 小时。停止加热反应 12 小时，加入甲醇(4.65 g, 115 mmol, 1.4 eq) 淬灭反应。将反应液旋干，残余物继续用乙醇重结晶，之后甲醇(100 mL) 重结晶得到 (4-N-(二苯甲氧羰基)-胞嘧啶)-1-醋酸盐 29.35 g。取 (4-N-(二苯甲氧羰基)-胞嘧啶)-1-醋酸盐(29.35 g, 62.5 mmol, 1.0 eq) 溶于乙腈:MeOH:H<sub>2</sub>O:EtOH(2:2:1:1, 350 mL) 混合溶液体系中，加热使化合物溶解，之后降温至 0°C，加入 LiOH·H<sub>2</sub>O (25.5 g, 0.61 mol, 9.7 eq) 的水溶液(196.8 mL)。TLC 检测发现反应完全后加入柠檬酸(58.5 g, 303.5, 4.9 eq) 的水溶液(290 mL) 淬灭反应。得到 [4-N-(二苯甲氧羰基)-胞嘧啶]-1-乙酸 22.1 g。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>6</sub>-DMSO, 25 °C) δ 8.03-8.01 (d, J = 7.5, 1H, C<sub>6</sub>), 7.46 (d, J = 7.5, 4H, Ph), 7.38 (t, J = 7.5, 4H, Ph), 7.3 (d, J = 7.5, 2H, Ph), 6.96 (d, J = 7.5, 1H, C<sub>5</sub>), 6.82 (s, 1H, CH-(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>), 4.50 (s, 2H,

N-CH<sub>2</sub>-CO); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>6</sub>-DMSO, 25 °C) δ 169.9, 163.5, 155.5, 152.8, 151.1, 140.8, 129.0, 128.3, 126.9, 94.2, 71.9, 51.3; HRMS (ESI) calculated for C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: (M+Na<sup>+</sup>): 402.1060, found: 402.1010.

[实施例 12] 1,2,-二(油烯基)-甘油-3-胺-(胞嘧啶-1-基)-乙酯的合成(DNCA, 结构式如图 1 所示) DNCA 的合成路线如图 4 所示。

向干燥的 25 mL 茄形瓶中加入(4-N-(二苯甲氧羰基)-胞嘧啶)-1-乙酸(3.29 g, 10 mmol)和干燥的 DMF (30 mL), 搅拌使其完全溶解。然后向其中加入 N-羟基琥珀酰亚胺(14.73 g, 13 mmol)和 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC, 2.06 g, 10 mmol)。室温搅拌过夜, 析出大量白色沉淀。过滤除去沉淀, 滤液减压蒸馏, 然后将残余物复溶于 DMF (5 mL)中。向其中加入无水乙醚(30 mL), 析出白色固体。过滤得到该固体, 真空干燥, 得到目标产物 2.62 g(产率 55%)。白色固体。将(4-N-(二苯甲氧羰基)-胞嘧啶)-(N-羟基琥珀酰亚胺)-酯(476 mg, 1.0 mmol)、1,2,-二(油烯基)-甘油-3-胺(910 mg, 1.2 mmol)、DMPA(14.6 mg, 0.1 mmol)、吡啶(0.4 mL)和无水 DMF(20 mL)混合, 氩气保护, 室温搅拌过夜。向其中加入乙酸乙酯(200 mL)稀释, 转移至分液漏斗中, 依次用稀盐酸(0.1 M)、饱和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液、水、饱和食盐水冲洗, 有机相用无水硫酸钠干燥。过滤除去干燥剂, 滤液减压蒸干, 残余物用硅胶柱层析分离(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=50/1), 得到目标产物 485.5 mg(产率 51%)。将 1,2,-二(油烯基)-甘油-3-胺-(4-N-(二苯甲氧羰基)-胞嘧啶)-乙酯(476 mg, 0.5 mmol)溶于 5%TFA 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(20 mL)中, 室温搅拌 0.5 小时。加入 DCM(30 mL)和水(30 mL)萃取分液, 水相用 DCM(2 x30 mL)进行反萃, 合并有机相。有机相依次用 10%NaHCO<sub>3</sub>(200 mL)、水(200 mL)和饱和食盐水(200 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥过夜。减压蒸干有机溶剂, 硅胶色谱柱分离(洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇=50/1), 得到目标产物 345 mg(产率 93%) DNCA: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.44-7.29 (m, 4 H), 5.80 (d, J = 3.8 Hz, 1 H), 5.37 (dd, J = 12.0, 7.4 Hz, 4 H), 4.45 (s, 2 H), 3.59-3.40 (m, 7 H), 2.11-1.91 (m, 8 H), 1.55 (s, 4 H), 1.44-1.10 (m, 45 H), 0.90 (t, J = 6.4 Hz, 6 H). (ESI-MS) for C<sub>45</sub>H<sub>82</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> found 743.50, [M+Na]<sup>+</sup> found 756.44. calcd. 742.21.

## 实施例二、碱基乙酰胺甘油醚的脂质体制备

碱基乙酰胺甘油醚分子具有两亲性结构, 可以制备成脂质体等超分子结构。以 DNTA 为例, 其脂质体制备方法是: 取 DNTA (1.18 mg, 1.56 μmol) 溶于甲醇(1 mL)

溶液中，涡旋使其充分溶解，离心后取 DNTA 的甲醇溶液 (12.8  $\mu\text{L}$ ) 加入 200  $\mu\text{L}$  离心管中，加入 PBS (100  $\mu\text{L}$ ) 后涡旋 (10s) 使其充分混匀。将其置于 PCR 中程序退火。程序：95 $^{\circ}\text{C}$  加热 10 分钟，每 5 钟降温 5 $^{\circ}\text{C}$ ，直至 15 $^{\circ}\text{C}$ ，之后 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。退火完成后置于 40 $^{\circ}\text{C}$  孵育 30min，是甲醇完全挥发掉，得到其脂质体溶液。

#### 颗粒度及其形态：

在投射电子显微镜 (TEM) 下可以看到中性碱基脂质载体分子 DNCA 和 DNTA 可以在水溶液中形成稳定均一的纳米颗粒，DNTA 分子在水中自行组装形成的脂质体粒径在 150 nm 左右，DNCA 载体分子在水中自行组装形成的脂质体粒径在 180nm 左右 (图 5)。

### 实施例三、碱基乙酰胺甘油醚分子在基因治疗领域的应用

#### 1. 碱基乙酰胺甘油醚分子的细胞毒性

碱基乙酰胺甘油醚分子要作为新型的生物材料，实现在基因治疗领域的应用，其本身必须具有良好的生物兼容性。两种碱基乙酰胺甘油醚化合物，通过 CCK-8 试剂盒研究了其细胞毒性 (以 DOCA 和 DOTA 为比对)，结果显示这两种化合物 (DNTA、DNCA) 都没有明显的细胞毒性。在 60  $\mu\text{M}$  浓度，加入碱基乙酰胺甘油醚化合物 72 小时后，细胞生存率均接近 100%，显示其具有良好的生物兼容性 (图 6)。

#### 2. 对核酸的转染

以 DNTA 和 DNCA 为例，FAM 标记的 polyA/G 为模板，研究了胸腺嘧啶碱基乙酰胺甘油醚的核酸转染能力。具体的包被与转染过程如下：

将 DNTA 或 DNCA 脂质体与 FAM-polyA 或 FAM-polyG 以 5/1 的碱基比配制成混合溶液。加热至 96 $^{\circ}\text{C}$ ，然后逐级递减至 4  $^{\circ}\text{C}$  (退火)，在 4 $^{\circ}\text{C}$  放置 2 天。转染实验所用细胞为 HeLa 细胞。

(1) 铺板：六孔板中加入 30 万细胞，每孔体积为 1.8 mL；

(2) 18-24h 后，将样品稀释于适量 opti-MEM 中，移液枪吹打混匀，每孔加入 20  $\mu\text{L}$  该混合溶液使 FAM-polyA 或 FAM-polyG 终浓度为 100 nM。不加 DNA 和只加入 DNA 的孔作为两种阴性对照，加入转染试剂 Lipofectamine 2000-DNA 复合物 (转染试剂与 DNA 组加入的方法按 protocol 进行) 为阳性对照；

(3) 用 500  $\mu\text{L}$  PBS 洗涤三次；

(4) 4h 后，吸去培养孔中液体，加入 250  $\mu\text{L}$  5% 胰蛋白酶消化后，置于 1.5 mL EP 管中，加入含 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min；

- (5) 离心，弃上清，加 400  $\mu$ L PBS；
- (6) 用流式细胞仪检测荧光强度；

图 7 显示了 DNTA 脂质体以及 DNCA 脂质体对 FAM-polyA/G 的转染结果。实验结果表明，DNTA 脂质体以及 DNCA 脂质体能够成功地将 FAM-polyA 运载至细胞内。

### 3. 反义核酸摄取实验

步骤同 DNCA 及 DNTA 包载 PolyG/PolyA 转染实验（以 DOCA 和 DOTA 为对比），细胞系选择 MCF-7 细胞系。

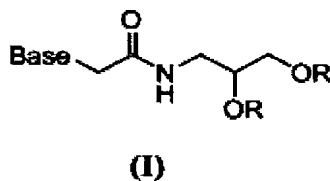
图 8 显示了 DNTA 脂质体以及 DNCA 脂质体对 MCF-7 细胞对反义核酸 Cenersen 摄取的影响。实验结果表明，相较于空白组和 DOCA/DOCA 脂质体组，DNTA 脂质体以及 DNCA 脂质体能够明显提高 MCF-7 细胞对反义核酸 Cenersen 的摄取能力。

本发明显示并详细描述的信息足以实现本发明的上述目的，因此本发明的优选实施方案代表本发明的主题，该主题为本发明所广泛涵盖。本发明的范围完全涵盖其它对本领域技术人员来说显而易见的实施方案，因此，本发明的范围不被除所附权利要求之外的任何内容所限制，其中除了明确说明外，所用元素的单数形式并不是指“一个和唯一”，而是指“一个或更多”。对本领域一般技术人员来说，所有公知的上述优选的实施方案和附加实施方案部分的结构、组成和功能上的等价物因此引入本文作参考，而且试图被本发明的权利要求所涵盖。

此外，不需要某种设备或方法来表达本发明所解决的每个问题，因为它们都已包括在本发明的权利要求之内。另外，无论本发明公开事实中的所有部分、成分，或者方法步骤是否在权利要求中被明确叙述，它们都没有贡献给公众。但是，对本领域普通技术人员来说，很明显在不背离如所附权利要求中所阐明的本发明的实质和范围的前提下，可以在形式、试剂和合成细节上做出各种改变和修饰。

## 权利要求

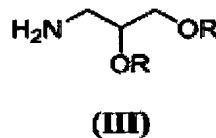
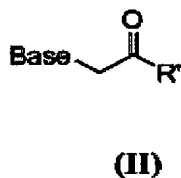
1. 一种碱基乙酰胺甘油醚分子，其特征在于具有如式(I)所示的两亲性结构，即以碱基-1-乙酸为极性头部，以2,3-二烷氧基-1-丙胺为非极性尾部，两部分通过酰胺键连接，形成一个既具有亲水性也具有亲脂性的两亲性结构：



2. 根据权利要求1所述的碱基乙酰胺甘油醚分子，其特征在于，其所含碱基，即式(I)中的Base基团，为常见的天然嘌呤和嘧啶碱基，即腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶及尿嘧啶。

3. 根据权利要求1所述的碱基乙酰胺甘油醚分子，其特征在于，其所含脂肪长链，即式(I)中的R基团，为长度在8个碳到25个碳之间，饱和或不饱和的脂肪族碳链。

4. 一种制备如权利要求1至3任一项所述碱基乙酰胺甘油醚分子的化学合成方法，其特征在于，以如式(II)所示碱基-1-乙酸活化衍生物、如式(III)所示的2,3-二烷氧基-1-丙胺原料，反应制得如权利要求1至3任一项中式(I)所示的碱基乙酰胺甘油醚分子；



5. 根据权利要求4所述的化学合成方法，其特征在于，使用的如式(II)所示的碱基-1-乙酸活化衍生物，其R'基团为氯或N-氧基-琥珀酰亚胺；使用的如式(III)所示的2,3-二烷氧基-1-丙胺，其R基团为长度在8个碳到25个碳之间，饱和或不饱和的脂肪族碳链。

6. 根据权利要求4或5所述的化学合成方法，其特征在于，其包括以下步骤：  
(i)商业购买或者由简单原料制备如式(II)所示的碱基-1-乙酸活化衍生物、如式(III)所



示的 2,3-二烷氧基-1-丙胺；(ii)用如式(II) 所示的碱基-1-乙酸活化衍生物、如式(III) 所示的 2,3-二烷氧基-1-丙胺在有机溶剂中反应，或者加入碱或酯缩合催化剂反应，得到如式(I)所示的目标产物。

7. 根据权利要求 6 所述的合成方法，其特征在于，步骤(ii)所用有机溶剂选自乙腈，N,N-二甲基甲酰胺，N-甲基吡咯烷，二氯甲烷，二氯乙烷，四氢呋喃，苯或其它非质子性溶剂中的一种或几种的混合。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的合成方法，其特征在于，步骤(ii)中加入 4-二甲氨基吡啶，三乙胺，吡啶、氢氧化钾或氢氧化钠中的一种或几种作为添加剂，优选的，加入 4-二甲氨基吡啶作为催化剂，加入吡啶或者三乙胺作为有机碱。

9. 权利要求 1 至 3 任一项所述的碱基乙酰胺甘油醚分子在制备具有超分子结构的物质中的应用，优选的，所述的超分子结构为脂质体。

10. 权利要求 1 至 3 任一项所述的碱基乙酰胺甘油醚分子在制备用于基因治疗的转染试剂中的应用。

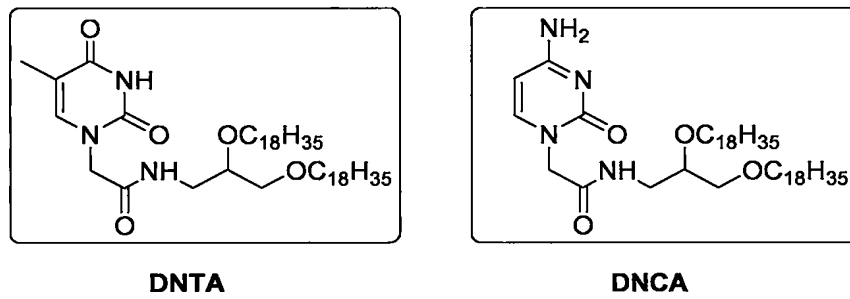


图 1

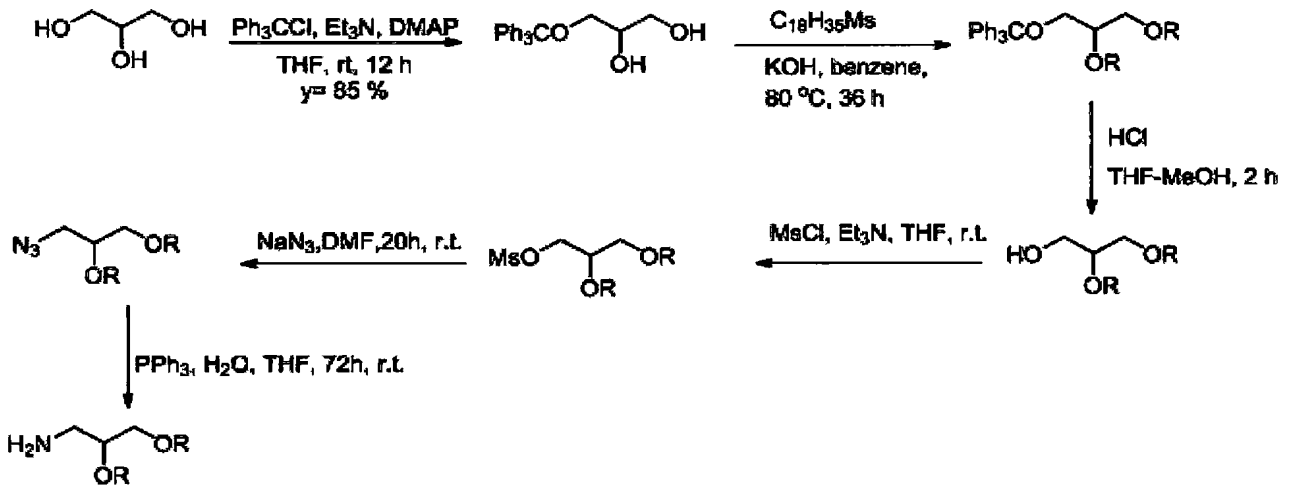


图 2

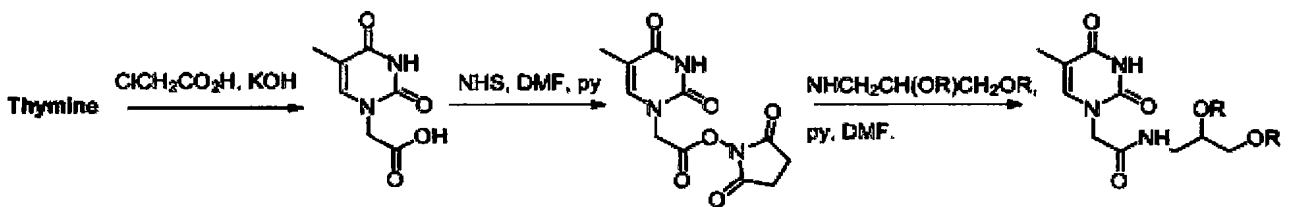


图 3

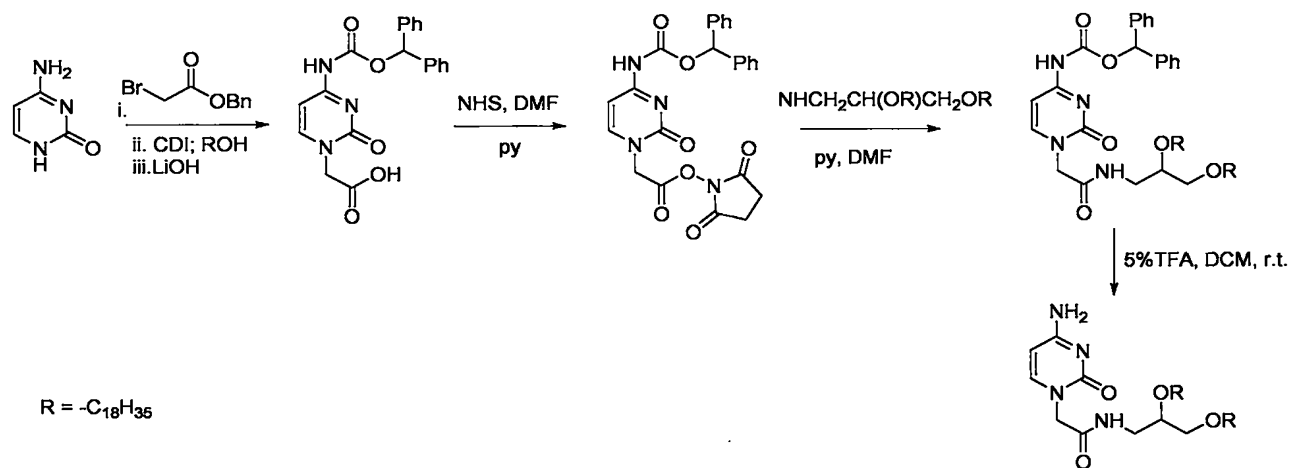


图 4

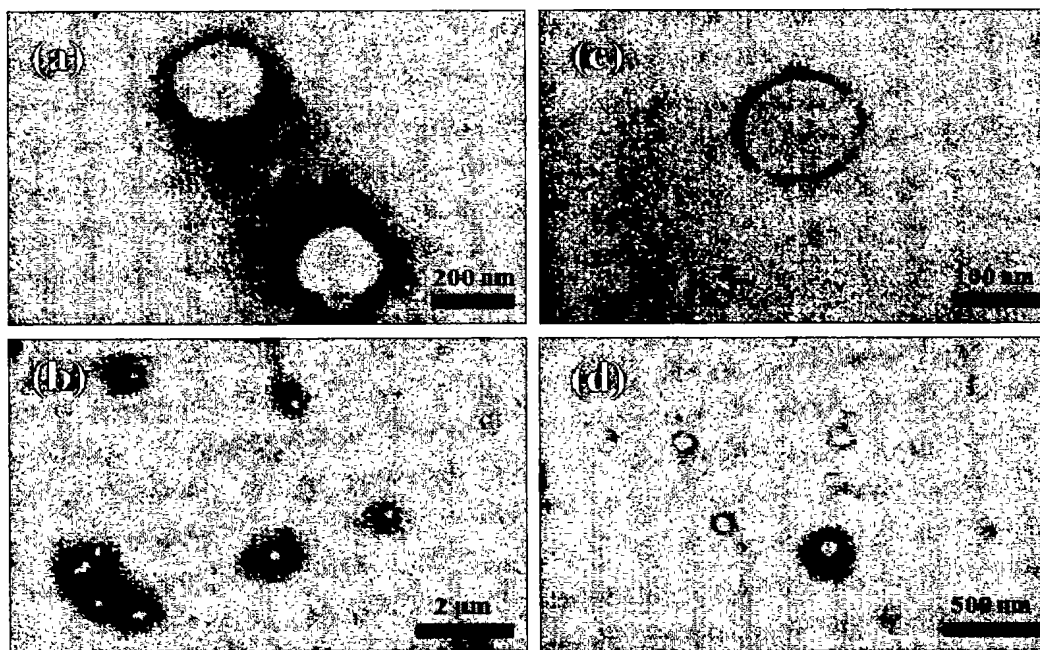


图 5

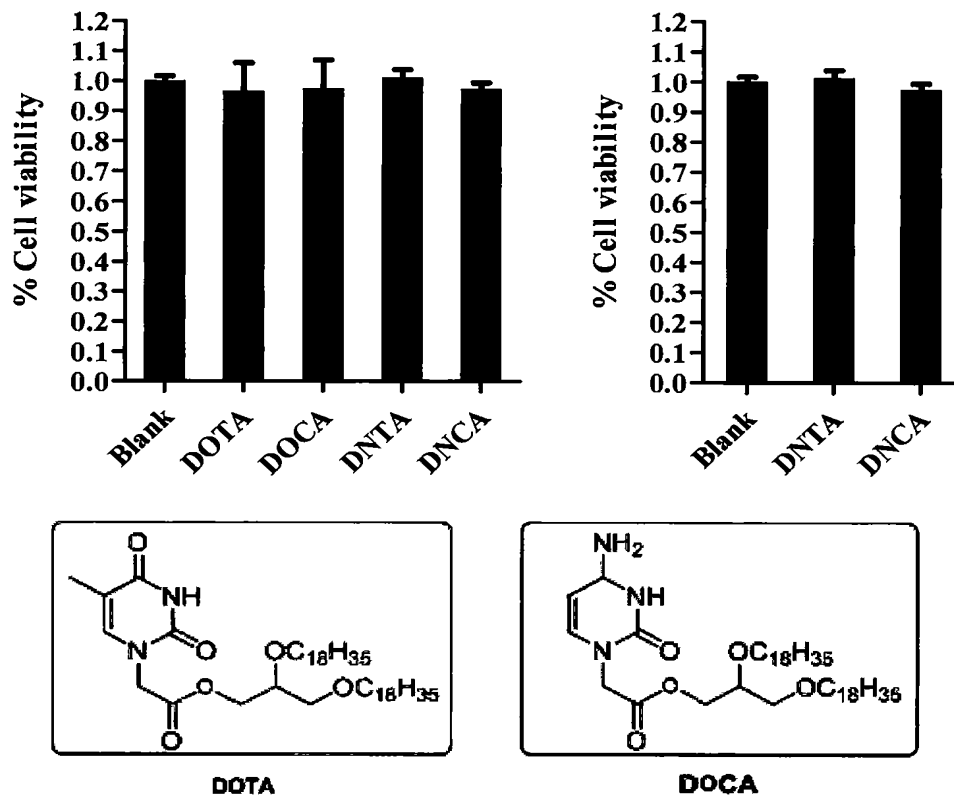


图 6

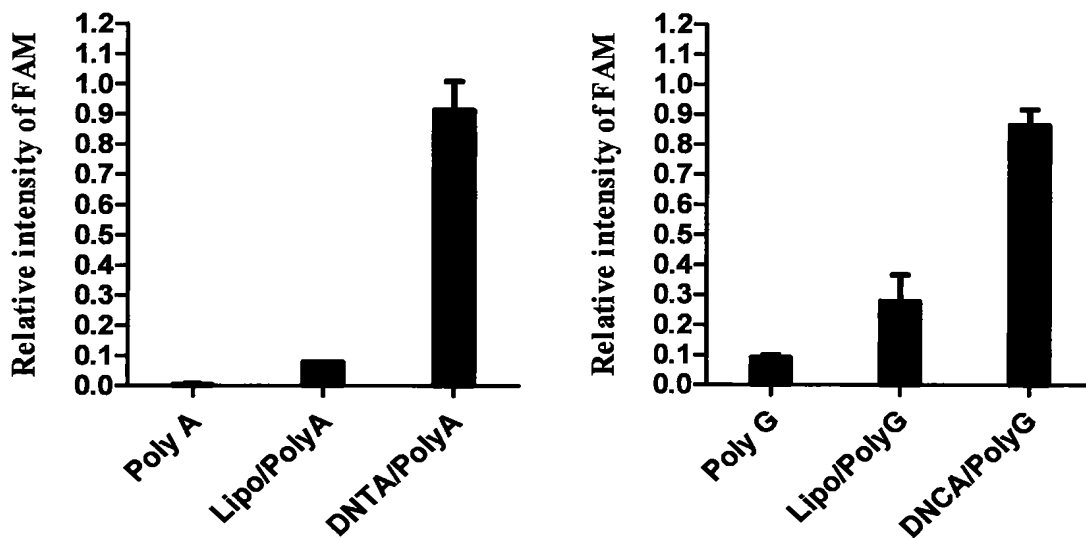


图 7

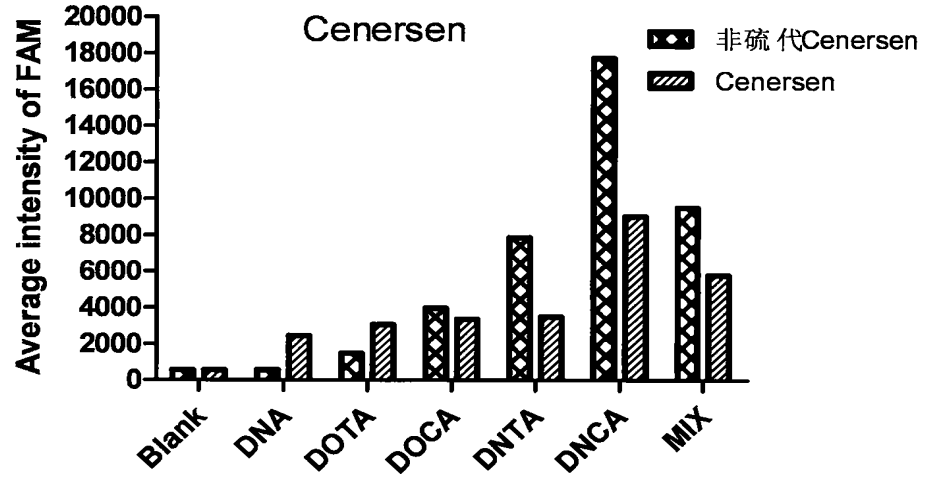


图 8

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/CN2016/000712

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C07D 473/34 (2006.01) i; C07D 473/18 (2006.01) i; C07D 239/54 (2006.01) i; C07D 239/47 (2006.01) i; A61K 9/127 (2006.01) i; A61K 48/00 (2006.01) i; C12N 15/88 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 473/-; C07D 239/-; A61K 9/-; A61K 48/-; C12N 15/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNABS, VEN, STN (REG, CAP) 脂质体, 脂质载体, 载体, 酰胺, 甘油, 嘌呤, 嘧啶, 两性, liposome, vesicle, acetamide, GLYCEROL, purin, pyridine, adenine, guanine, hypoxanthine, cytosine, thymine, uracil, amphiphilic

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 103242243 A (PEKING UNIVERSITY), 14 August 2013 (14.08.2013), claims 1-10	1-10
Y	SKWARCZYNSKI, M. et al. "Thymine, adenine and lipoamino acid based gene delivery systems" Chem. Commun, vol. 46, 05 March 2010 (05.03.2010), pages 3140-3142, Scheme 1	1-10
A	CN 103232510 A (PEKING UNIVERSITY), 07 August 2013 (07.08.2013), the whole description	1-10
A	CN 102925487 A (PEKING UNIVERSITY), 13 February 2013 (13.02.2013), the whole description	1-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 20 March 2017	Date of mailing of the international search report 31 March 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer TIAN, Dingding Telephone No. (86-10) 62086305

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2016/000712

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103242243 A	14 August 2013	CN 103242243 B	19 August 2015
CN 103232510 A	07 August 2013	CN 103232510 B	23 December 2015
CN 102925487 A	13 February 2013	CN 102925487 B	15 October 2014

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07D 473/34(2006.01)i; C07D 473/18(2006.01)i; C07D 239/54(2006.01)i; C07D 239/47(2006.01)i; A61K 9/127(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; C12N 15/88(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07D 473/-; C07D 239/-;A61K 9/-; A61K 48/-; C12N 15/-</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNKI, CNABS, VEN, STN (REG, CAP) 脂质体, 脂质载体, 载体, 酰胺, 甘油, 嘌呤, 嘧啶, 两性, liposome, vesicle, acetamide, GLYCEROL, purin, pyridine, adenine, guanine, hypoxanthine, cytosine, thymine, uracil, amphiphilic</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103242243 A (北京大学) 2013年 8月 14日 (2013 - 08 - 14) 权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>M. SKWARCZYNSKI, ET. AL. "Thymine, adenine and lipoamino acid based gene delivery systems" Chem. Commun, 第46卷, 2010年 3月 5日 (2010 - 03 - 05), 第3140-3142页, Scheme 1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103232510 A (北京大学) 2013年 8月 7日 (2013 - 08 - 07) 说明书全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102925487 A (北京大学) 2013年 2月 13日 (2013 - 02 - 13) 说明书全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN 103242243 A (北京大学) 2013年 8月 14日 (2013 - 08 - 14) 权利要求1-10	1-10	Y	M. SKWARCZYNSKI, ET. AL. "Thymine, adenine and lipoamino acid based gene delivery systems" Chem. Commun, 第46卷, 2010年 3月 5日 (2010 - 03 - 05), 第3140-3142页, Scheme 1	1-10	A	CN 103232510 A (北京大学) 2013年 8月 7日 (2013 - 08 - 07) 说明书全文	1-10	A	CN 102925487 A (北京大学) 2013年 2月 13日 (2013 - 02 - 13) 说明书全文	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
Y	CN 103242243 A (北京大学) 2013年 8月 14日 (2013 - 08 - 14) 权利要求1-10	1-10															
Y	M. SKWARCZYNSKI, ET. AL. "Thymine, adenine and lipoamino acid based gene delivery systems" Chem. Commun, 第46卷, 2010年 3月 5日 (2010 - 03 - 05), 第3140-3142页, Scheme 1	1-10															
A	CN 103232510 A (北京大学) 2013年 8月 7日 (2013 - 08 - 07) 说明书全文	1-10															
A	CN 102925487 A (北京大学) 2013年 2月 13日 (2013 - 02 - 13) 说明书全文	1-10															
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		<input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。															
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p>		<p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>															
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2017年 3月 20日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2017年 3月 31日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>田丁丁</p> <p>电话号码 (86-10)62086305</p>															



国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/000712

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103242243	A	2013年 8月 14日	CN	103242243	B	2015年 8月 19日
CN	103232510	A	2013年 8月 7日	CN	103232510	B	2015年 12月 23日
CN	102925487	A	2013年 2月 13日	CN	102925487	B	2014年 10月 15日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)