



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I654997 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：102120444

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 07 日

(51)Int. Cl. : A61K47/44 (2017.01)

C07C237/08 (2006.01)

C07C323/60 (2006.01)

C07C333/04 (2006.01)

A61K9/127 (2006.01)

(30)優先權：2012/06/08 美國

61/657,480

(71)申請人：日商日東電工股份有限公司(日本) NITTO DENKO CORPORATION (JP)  
日本

(72)發明人：潘恩 約瑟夫 E PAYNE, JOSEPH E. (US)；葛堤 約翰 A GAUDETTE, JOHN A. (US)；侯政 HOU, ZHENG (US)；阿瑪狄恩 默漢麥德 AHMADIAN, MOHAMMAD (US)；游來 YU, LEI (US)；諾波夫 維克多 KNOPOV, VICTOR (US)；寇派恩 凡歐里特 AKOPIAN, VIOLETTA (US)；卡馬利 佩利亞 KARMALI, PRIYA (IN)；威特 理查 P WITTE, RICHARD P. (US)；塞法拉特 奈達 SAFARZADEH, NEDA (US)；應文冰 YING, WENBIN (US)；張順 ZHANG, JUN (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CA 2800818A1

US 5459127

審查人員：張子威

申請專利範圍項數：42 項 圖式數：4 共 68 頁

(54)名稱

用於治療劑輸送配方之脂質

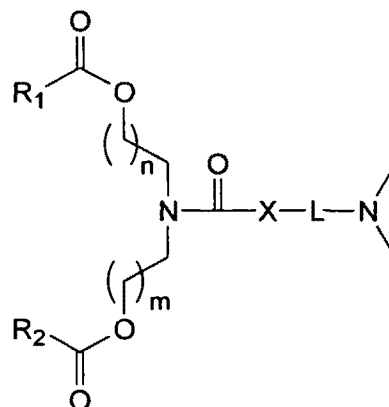
LIPIDS FOR THERAPEUTIC AGENT DELIVERY FORMULATIONS

(57)摘要

本發明係關於可離子化脂質，其可用於增強脂質體中治療劑之輸送。

The description is directed to ionizable lipids useful for enhancing the delivery of therapeutic agents in liposomes.

特徵化學式：



I

## 發明摘要

※ 申請案號：102120444

※ 申請日：102/06/07

※IPC 分類：A61K

A61K 47/44 (2017.01)  
C07C 237/08 (2006.01)  
C07C 323/60 (2006.01)  
C07C 333/04 (2006.01)  
A61K 9/127 (2006.01)

### 【發明名稱】

用於治療劑輸送配方之脂質

LIPIDS FOR THERAPEUTIC AGENT DELIVERY  
FORMULATIONS

### 【中文】

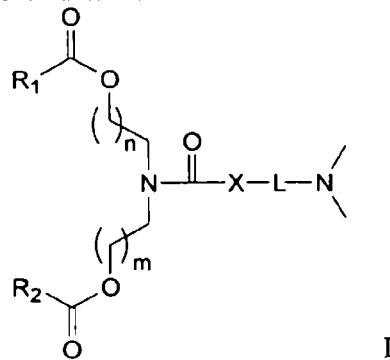
本發明係關於可離子化脂質，其可用於增強脂質體中治療劑之輸送。

### 【英文】

The description is directed to ionizable lipids useful for enhancing the delivery of therapeutic agents in liposomes.

**【代表圖】****【本案指定代表圖】：**(無)**【本代表圖之符號簡單說明】：**

無

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】

用於治療劑輸送配方之脂質

LIPIDS FOR THERAPEUTIC AGENT DELIVERY  
FORMULATIONS

## 【技術領域】

本發明係關於可離子化脂質，其可用於增強治療劑之輸送。

## 【先前技術】

許多技術係可採用用於輸送例如siRNA、核酸等之治療劑至細胞中。該等技術包括病毒及非病毒轉染系統。非病毒轉染系統包括(例如)聚合物、脂質、脂質體、微膠粒、樹枝狀聚合物、及奈米材料。已針對細胞轉染進行研究之聚合物包括陽離子聚合物，諸如(例如)聚(L-離胺酸)(「PLL」)、聚乙烯亞胺(「PEI」)、甲殼素、及聚甲基丙烯酸(2-二甲胺基)乙酯(「pDMAEMA」)。

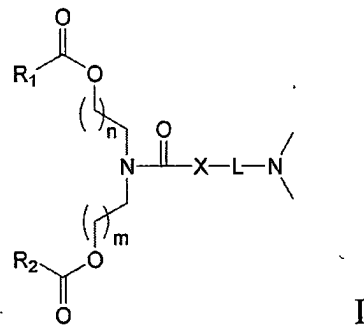
然而，病毒及非病毒轉染技術具有缺點。例如，病毒系統雖可產生高轉染效率，但可能不完全安全。此外，製備病毒系統可能係複雜及/或昂貴的。

已報導例如彼等利用陽離子聚合物者之非病毒轉染系統可將質體DNA轉移至細胞中。然而，陽離子聚合物可能係不穩定且可能對細胞具有毒性。

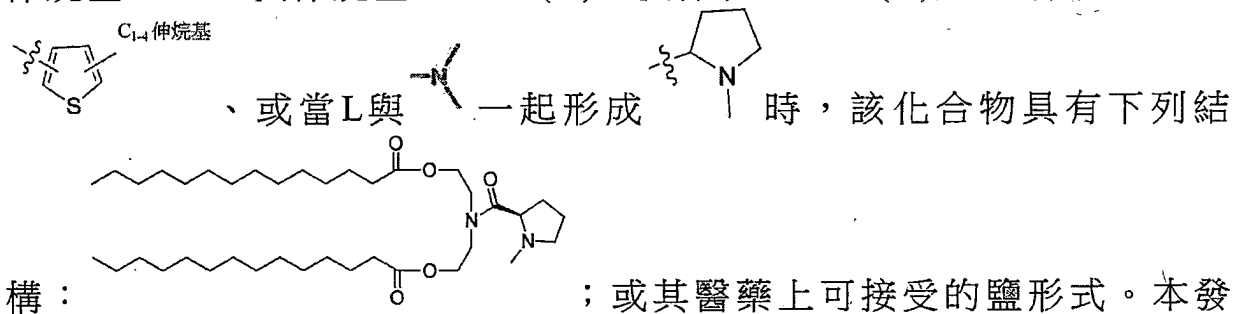
因此，有需要利用陽離子組合物來改良治療劑至細胞、組織、及生物體之輸送的新穎化合物、組合物、及方法。

## 【發明內容】

本發明係關於式I之可離子化脂質化合物，



其中n與m獨立地為1、2、3、或4；R<sub>1</sub>與R<sub>2</sub>獨立地為C<sub>10-18</sub>烷基或C<sub>12-18</sub>烯基；X為-CH<sub>2</sub>-、S、O、N、或不存在；L為C<sub>1-4</sub>伸烷基；-S-C<sub>1-4</sub>伸烷基；-O-C<sub>1-4</sub>伸烷基；-O-C(O)-C<sub>1-4</sub>伸烷基；-S(O)<sub>2</sub>-C<sub>1-4</sub>伸烷基；或



；或其醫藥上可接受的鹽形式。本發明亦闡述使用式I化合物之組合物、醫藥配方、藥物載劑、及方法。

### 【圖式簡單說明】

圖1繪示可離子化脂質：本發明之可離子化脂質實施例之活體外協同有效性。

圖2繪示可離子化脂質：本發明之可離子化脂質實施例之活體外協同有效性。

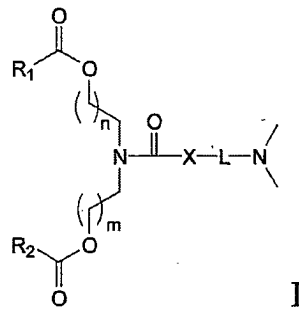
圖3繪示可離子化脂質：本發明之陽離子脂質實施例之活體外協同有效性。

圖4繪示可離子化脂質：本發明之陽離子脂質實施例之活體內有效性。

### 【實施方式】

本發明係關於可離子化脂質化合物、以及其於輸送治療劑至細胞、組織、及生物體中之用途。

本發明範疇內者是式I之可離子化脂質化合物：



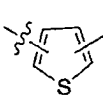

其中：

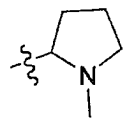
n與m獨立地為1、2、3、或4；

R<sub>1</sub>與R<sub>2</sub>獨立地為C<sub>10-18</sub>烷基或C<sub>12-18</sub>烯基；

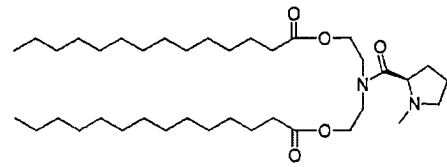
X為-CH<sub>2</sub>-、S、O、N、或不存在；

L為C<sub>1-4</sub>伸烷基；-S-C<sub>1-4</sub>伸烷基；-O-C<sub>1-4</sub>伸烷基；-O-C(O)-C<sub>1-4</sub>伸

烷基；-S(O)<sub>2</sub>-C<sub>1-4</sub>伸烷基；或  C<sub>1-4</sub>伸烷基、或當L與  一起形成



時，該化合物具有下列結構：



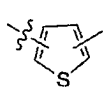
；或其

醫藥上可接受的鹽形式。

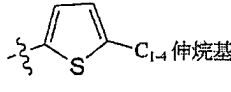
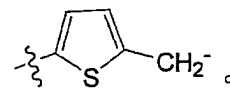
在本發明範疇內，n與m可以係相同或不同。於較佳實施例中，n與m係相同。尤佳為其中n與m均為1或n與m均為2之彼等實施例。

於本發明之一些實施例中，X為鍵。於其他實施例中，X為-CH<sub>2</sub>-。又於其他實施例中，X為S。同樣佳為其中X為O之實施例。其中X為N之實施例亦屬於本發明之範疇。

於本發明之一些實施例中，L為C<sub>1-4</sub>伸烷基。於其他實施例中，L為-S-C<sub>1-4</sub>伸烷基。又於其他實施例中，L為-O-C<sub>1-4</sub>伸烷基。又於其他實施例中，L為-O-C(O)-C<sub>1-4</sub>伸烷基。或者，L為-S(O)<sub>2</sub>-C<sub>1-4</sub>伸烷基。

其中L為  C<sub>1-4</sub>伸烷基之實施例亦在本發明之範疇內。

於其中X為鍵之彼等實施例中，L較佳為C<sub>1-4</sub>伸烷基。該等L實例包括-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、及-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-。於其

中X為鍵之其他實施例中，L為 ，例如，。

於其中X為-CH<sub>2</sub>-之其等實施例中，L較佳為-S-C<sub>1-4</sub>伸烷基。該等L實例包括-S-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、及-S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-。

於其中X為CH<sub>2</sub>-之其他實施例中，L較佳為-S(O)<sub>2</sub>-C<sub>1-4</sub>伸烷基。該等L實例包括-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>、-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>、-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、及S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-。

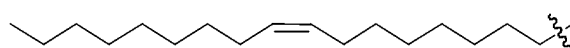
又於其中X為-CH<sub>2</sub>-之其他實施例中，L為-O-C<sub>1-4</sub>伸烷基。該等L實例包括-O-CH<sub>2</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、及-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-。

於本發明之其等實施例(其中X為S)中，L較佳為C<sub>1-4</sub>伸烷基。該等L實例包括-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、及-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-。

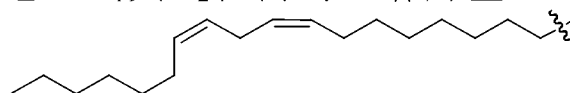
於其中X為O之其等實施例中，L較佳為C<sub>1-4</sub>伸烷基。該等L實例包括-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、及-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-。

本發明範疇內者係，R<sub>1</sub>與R<sub>2</sub>可以係相同或不同。較佳地，R<sub>1</sub>與R<sub>2</sub>係相同。較佳地，R<sub>1</sub>與R<sub>2</sub>為C<sub>10-18</sub>烷基。其中C<sub>10-18</sub>烷基為直鏈C<sub>10-18</sub>烷基之實施例亦佳。更佳為其中R<sub>1</sub>與R<sub>2</sub>為C<sub>12-18</sub>烷基之實施例。其中R<sub>1</sub>與R<sub>2</sub>為C<sub>12-15</sub>烷基之實施例亦佳。於最佳實施例中，R<sub>1</sub>與R<sub>2</sub>均為C<sub>13</sub>烷基。

於本發明之其他實施例中，R<sub>1</sub>與R<sub>2</sub>為C<sub>12-18</sub>烯基。較佳地，R<sub>1</sub>與R<sub>2</sub>為C<sub>13-17</sub>烯基。更佳地，R<sub>1</sub>與R<sub>2</sub>各自為油烯基：



於本發明之其他實施例中，R<sub>1</sub>與R<sub>2</sub>為C<sub>12-18</sub>烯基。較佳地，R<sub>1</sub>與R<sub>2</sub>為C<sub>13-17</sub>烯基。更佳地，R<sub>1</sub>與R<sub>2</sub>各自為亞麻烯基。



包含含於脂質體中之式I化合物之組合物亦屬於本發明之範疇，其中該脂質體包括雙層脂質分子。雖然式I之化合物可包含於該等組合物中任何莫耳百分比的脂質分子，但該式I化合物較佳為本發明組合物的脂質分子之約5至約50莫耳%。

包含含於脂質體中之式I化合物之本發明組合物可包含一種以上之式I化合物。於較佳實施例中，本發明之該等組合物包含兩種式I之化合物。於其等實施例中，此兩種式I之化合物之莫耳比較佳為約10:30至約30:10。

包含含於脂質體中之式I化合物之本發明組合物可進一步包含陽離子脂質。於該等實施例中，該陽離子脂質為組合物脂質分子之約5至約40莫耳%。亦於包含併與陽離子脂質含於脂質體中之式I化合物之該等實施例中，該式I化合物對該陽離子脂質之莫耳比為約5:35至約35:5。更佳地，該比率為約10:30至約30:10。

在本發明範疇內，本發明之任何組合物可進一步包含液體介質。較佳地，該液體介質適於注射至活生物體中。於一些實施例中，該液體介質包括有機溶劑。或者，用於本發明某些實施例中之液體介質包括水及有機溶劑。於本發明之其他實施例中，該液體介質可進一步包括非水性介質。

亦在本發明範疇內，本發明之任何組合物可進一步包含至少一種磷脂。

於本發明之其他實施例中，本發明之任何組合物可進一步包含至少一種PEG共軛脂質。

星狀細胞特定藥物載劑亦屬於本發明之範疇。本發明之該等實施例包括任何前述組合物、以及星狀細胞特定量的由(類視色素)<sub>n</sub>-連接子-(類視色素)<sub>n</sub>組成之靶向分子，其中n=0、1、2或3；且其中該連接子包括聚乙二醇(PEG)或類PEG分子。

於較佳實施例中，本發明之藥物載劑將進一步包含siRNA分子。

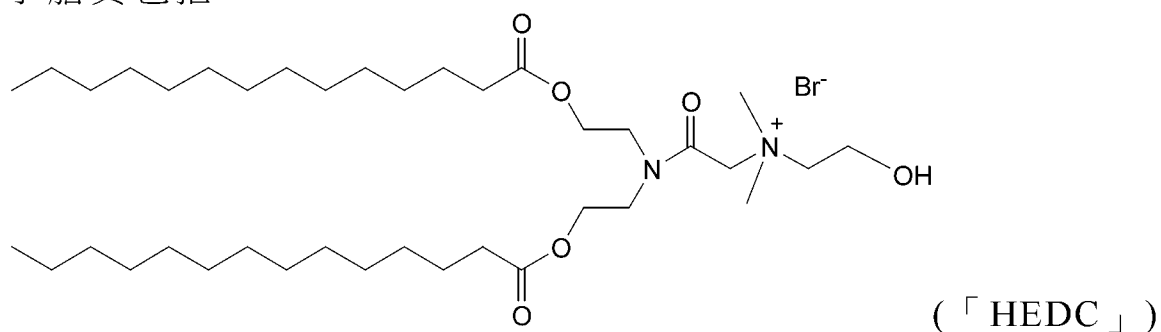
醫藥配方亦屬於本發明之範疇。於本發明範疇內之醫藥配方包括本發明之任何前述藥物載劑及醫藥上可接受的載劑或稀釋劑。較佳地，於該等配方中，siRNA經本發明組合物之脂質體囊封。

輸送藥物至有此治療需要的患者之方法亦屬於本發明之範疇。該等方法包括提供屬於本發明範疇之醫藥配方及投與該醫藥配方至該患者。

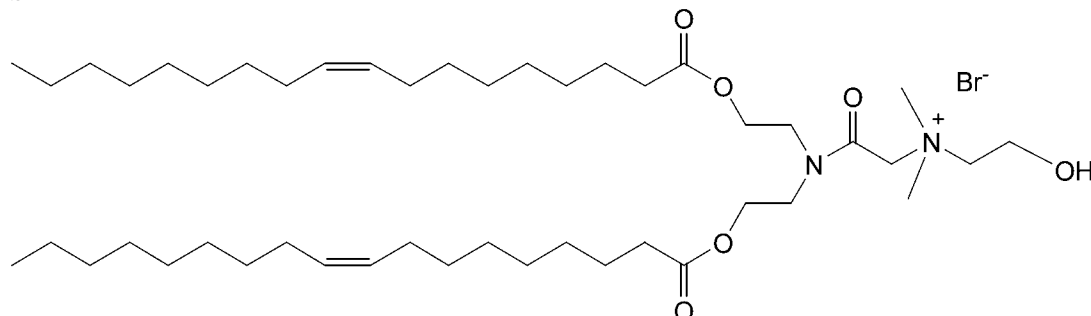
## 定義

本說明書中使用以下術語。

如本文所用，「陽離子脂質」係指包含至少一個脂質部分及帶正電荷與抗衡離子相關聯的四級氦之化合物。於本技藝中應明瞭「脂質」包含疏水烷基或烯基部分及羧酸或酯部分。用於本發明中之較佳陽離子脂質包括：



及



如本文所用，「可離子化脂質」係指於本發明範疇內之式I之化合物。該等化合物可在接觸適宜抗衡離子物質例如包含可離子化氫原子

之物質時形成帶電物質。

如本文所用，「烷基」係指直鏈或分支鏈全飽和(不存在雙鍵或三鍵)烴基，例如，具有通式 $-C_nH_{2n+1}$ 之基團。烷基可具有1至50個碳原子(本文中每當其出現時，數字範圍諸如「1至50」係指給定範圍中之各個整數；例如，「1至50個碳原子」意指可由1個碳原子、2個碳原子、3個碳原子等、至多且包括50個碳原子組成之烷基，然而，該定義亦涵蓋未指定數字範圍時之術語「烷基」情況)。烷基亦可為具有1至30個碳原子之中等大小烷基。烷基亦可為具有1至5個碳原子之低碳數烷基。該等化合物之烷基可表示為「 $C_{1-4}$ 烷基」或類似表示。僅舉例言之，「 $C_{1-4}$ 烷基」指示烷基鏈中存在一至四個碳原子，亦即，烷基鏈係選自由甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、及第三丁基組成之群。典型烷基包括(但絕不限於)甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基、第三丁基、戊基、己基及類似。

如本文所用，「伸烷基」係指烷二基官能基，例如， $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 等。

如本文所用，「烯基」係指烴直鏈或分支烴鏈中含有一或多個雙鍵之烷基。烯基可未經取代或經取代。於經取代之情況下，除非另作指明，否則該(等)取代基可選自與以上提及烷基取代時所揭示相同的基團。油醯基為此種烯基之一實例。

如本文所用，術語「醫藥載劑」係指有利於將化合物引入細胞或組織中之化合物。例如，二甲亞砜(DMSO)為常用載劑，因為其有利於吸收許多有機化合物於生物體之細胞或組織中。

如本文所用，術語「稀釋劑」係指經水稀釋將會溶解所關注的配方(例如，可包括化合物、類視色素、第二脂質、穩定劑、及/或治療劑之配方)並使配方之生物活性形式穩定之化合物。本技藝中使用溶解於緩衝溶液中之鹽作為稀釋劑。一常用緩衝溶液為磷酸鹽緩衝生

理鹽水，因為其模擬人體血液之鹽條件之故。由於緩衝鹽可於低濃度下控制溶液之pH，故經緩衝的稀釋劑很少調整配方之生物活性。如本文所用，「賦形劑」係指添加至配方以提供(但不限於)體積、稠度、穩定性、結合能力、潤滑、崩解能力等給組合物之惰性物質。「稀釋劑」為賦形劑之一種類型。

於本發明範疇內使用之「有機溶劑」本身為相關技藝熟知且包括(例如)C<sub>1-4</sub>烷基醇、二甲亞砜(「DMSO」)等。

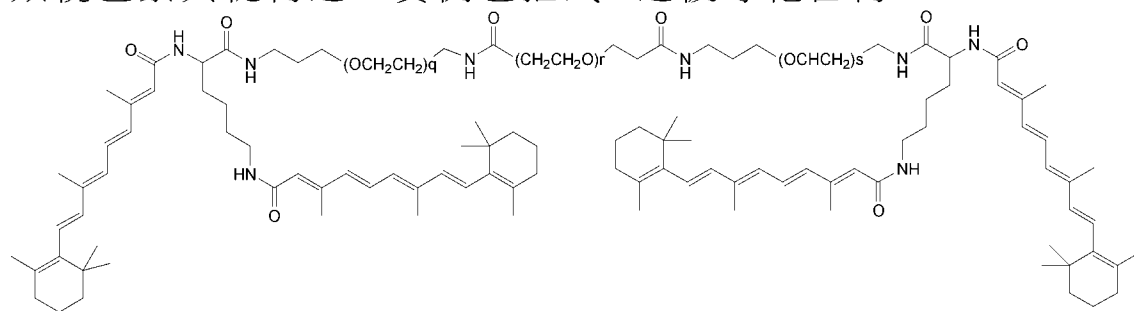
如本文所用，「治療劑」係指以治療有效量投與給哺乳動物時即可提供該哺乳動物治療效益之化合物。本文中治療劑可稱為藥物。熟習此項技藝者當明瞭術語「治療劑」不限於已接受監管機構批准之藥物。「治療劑」可在操作中與本文所述化合物類視色素、及/或第二脂質相關聯。例如，本文所述第二脂質可形成脂質體，及該治療劑可在操作中與(例如)如本文所述脂質體相關聯。

如本文所用，「類視色素」為由四個以頭對尾方式接合之類異戊二烯單位組成之化合物類別中之一員，參見G. P. Moss，「Biochemical Nomenclature and Related Documents」，第2版，Portland Press，第247-251頁(1992)。「維他命A」係定性展現視黃醇生物活性之類視色素之一般描述項。如本文所用，類視色素係指天然及合成類視色素，其包括第一代、第二代、及第三代類視色素。天然生成之類視色素之實例包括(但不限於)(1) 11-順式-視網醛、(2)全反式視黃醇、(3)棕櫚酸視黃酯、(4)全反式視黃酸、及(5) 13-順式-視黃酸。此外，術語「類視色素」包涵視黃醇、視黃醛、視黃酸、類視色素、及其衍生物。

如本文所用，「類視色素共軛物」係指包括至少一個類視色素部分之分子。於本發明之較佳實施例中，類視色素共軛物將以組合物或配方之總重量計約0.3至約30重量%之濃度存在，該濃度等同於約0.1至約10莫耳%，等同於約0.1至約10之莫耳比。較佳地，類視色素共軛

物為類視色素-連接子-脂質分子或類視色素-連接子-類視色素分子。

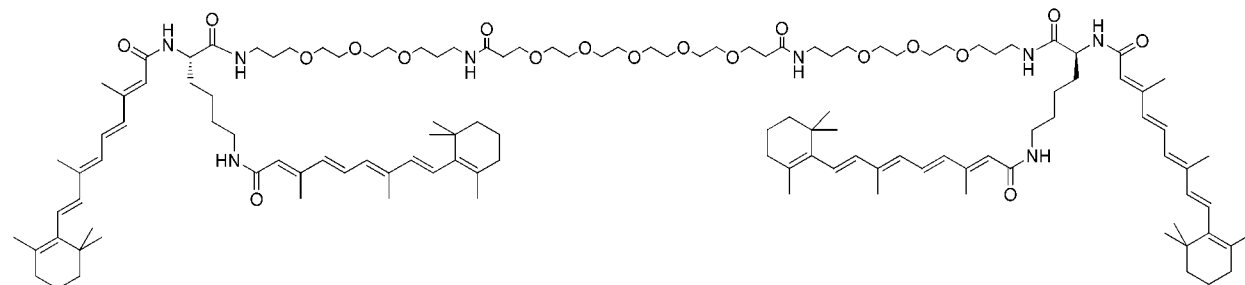
類視色素共軛物之一實例包括式II之彼等化合物：



## II

其中q、r、及s各自獨立地為1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10、及其對映異構體及非對映異構體。

式II之較佳化合物包括其中q、r、及s各自獨立地為1、2、3、4、5、6、或7之彼等。更佳為其中q、r、及s各自獨立地為3、4、或5之彼等式II之化合物。最佳為其中q為3，r為5，及s為3之彼等式II之化合物。式II化合物之一實例為



## DiVA-PEG-DiVA

DiVA-PEG-DiVA包括立構中心且所有對映異構體及非對應異構體被視為屬於本發明之範疇。

如本文所用，「類視色素-連接子-脂質分子」係指包括至少一個經由至少一個諸如(例如)PEG部分之連接子連接至至少一個脂質部分之類視色素部分的分子。

如本文所用，「類視色素-連接子-類視色素分子」係指包括至少一個經由至少一個諸如(例如)PEG部分之連接子連接至至少一個其他類視色素部分(其可以係相同或不同)之類視色素部分的分子。

如本文所用，術語「脂質」及「親油」係以其為熟習此項技藝者理解之尋常含義用於本文中。脂質及親油基團之非限制性實例包括脂肪酸、固醇、 $C_2-C_{50}$ 烷基、 $C_2-C_{50}$ 雜烷基、 $C_2-C_{50}$ 烯基、 $C_2-C_{50}$ 雜烯基、 $C_2-C_{50}$ 芳基、 $C_2-C_{50}$ 雜芳基、 $C_2-C_{50}$ 炔基、 $C_2-C_{50}$ 雜炔基、 $C_2-C_{50}$ 羧基烯基、及 $C_2-C_{50}$ 羧基雜烯基。脂肪酸為含有(例如)12至24個碳原子之飽和或不飽和長鏈單羧酸。脂質之特徵係基本上水不可溶，其具有在水中小於約0.01%(以重量計)之溶解度。如本文所用，術語「脂質部分」及「親油部分」係指已附接至另一基團之脂質或其部分。例如，脂質基團可藉由脂質之官能基(諸如羧酸基)及單體之適宜官能基間之化學反應而附接至另一化合物(例如，單體)。

如本文所用，「星狀細胞」包含肝臟星狀細胞。

如本文所用，「siRNA」係指小分子干擾RNA，於此相關技藝中亦稱為短分子干擾RNA或沉默RNA。siRNA為一類具有多種為相關技藝所熟知的效應之雙股RNA分子，最值得注意的係其對特定基因之表現及蛋白質表現之干擾。

術語「脂質體」係以為熟習此項技藝者理解之尋常含義用於本文中，且係指包含附接至極性親水基團之脂質的脂質雙層結構，該等極性親水基團於水性介質中形成實質上封閉結構。於一些實施例中，脂質體可操作地與一或多種化合物相關聯，諸如治療劑及類視色素。脂質體可包括單一脂質雙層(亦即，單層)或其可包括兩個或更多脂質雙層(亦即，多層)。雖然脂質體之內部可由多種化合物組成，但該脂質體外部是包含該脂質體之水性配方可進入的。脂質體之形狀可以是近似球形或橢圓形。

於一些實施例中，將由脂質體囊封siRNA以致該siRNA無法進入水性介質。在囊封siRNA時，脂質體將具有實體核心；該等囊封

siRNA並具有實體核心之脂質體於本文中稱為「脂質奈米粒子」。於其他實施例中，siRNA將不經脂質體囊封。於該等實施例中，藉由在水溶液中使預形成之脂質體與RNA混合，可於脂質體之外表面上複合siRNA。於該等實施例中，siRNA可進入水性介質。siRNA僅結合在其外表面上之脂質體於本文中稱為「脂複合體」。

本發明之配方亦可包含PEG共軛之脂質。屬於本發明範疇之PEG共軛之脂質本身為相關技藝熟知。適宜之PEG-脂質包括PEG-磷脂及PEG-神經醯胺，諸如(例如)PEG2000-DSPE、PEG2000-DPPE、PEG2000-DMPE、PEG2000-DOPE、PEG1000-DSPE、PEG1000-DPPE、PEG1000-DMPE、PEG1000-DOPE、PEG550-DSPE、PEG550-DPPE、PEG-550DMPE、PEG-1000DOPE、PEG-BML、PEG-膽固醇、PEG2000-神經醯胺、PEG1000-神經醯胺、PEG750-神經醯胺、PEG550-神經醯胺。

前述之本發明組合物可包含一或多種諸如(例如)以下之磷脂：1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-膽鹼磷酸(「DSPC」)、二棕櫚醯磷脂醯膽鹼(「DPPC」)、1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油-3-磷脂醯乙醇胺(「DPPE」)、及1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷脂醯乙醇胺(「DOPE」)。較佳地，輔助脂質為DOPE。

除醫藥上可接受的載劑或稀釋劑外尚包含任何前述組合物之醫藥配方亦屬於本發明之範疇。本發明之醫藥配方將包含至少一種治療劑。較佳地，該治療劑為siRNA。可設想於本發明範疇內可使用任何siRNA分子。例如，siRNA可包括：

正義(5'→3')GGACAGGCCUCUACAACUATT(SEQ. ID. NO.1)

反義(3'→5')TTCCUGUCCGGAGAUGUUGAU(SEQ. ID. NO.2)

及

正義(5'→3')GGACAGGCCUGUACAACUATT(SEQ. ID. NO.3)

反義(3'→5')TTCCUGUCCGGACAUGUUGAU(SEQ. ID. NO.4)

於包含 siRNA 之本發明較佳配方中，siRNA 經脂質體囊封。於其他實施例中，siRNA 可在脂質體外側。於彼等實施例中，siRNA 可複合至脂質體之外側。

輸送治療劑至患者之方法亦屬於本發明之範疇。該等方法包括提供包含任何前述組合物及醫藥上可接受的載劑或稀釋劑之醫藥配方；及投與該醫藥配方至該患者。

於另一態樣中，本揭示案係關於一種醫藥配方，其包含一或多種生理上可接受的表面活性劑、醫藥載劑、稀釋劑、賦形劑、及懸浮劑、或其組合；及一種本文所揭示配方(例如，可包含化合物、類視色素、第二脂質、穩定劑、及/或治療劑之配方)。用於治療用途之其他可接受的醫藥載劑或稀釋劑為相關醫藥技藝所熟知，且述於(例如)Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版，Mack Publishing Co.，Easton，PA(1990)中，其全文以引用的方式併入本文中。可在醫藥配方中提供防腐劑、穩定劑、染料等。例如，可添加苯甲酸鈉、抗壞血酸、及對羥基苯甲酸之酯作為防腐劑。此外，可使用抗氧化劑及懸浮劑。於各種實施例中，醇、酯、硫酸化脂族醇等可用為表面活性劑；蔗糖、葡萄糖、乳糖、澱粉、結晶纖維素、甘露醇、輕質無水矽酸鹽、鋁酸鎂、偏矽酸鋁酸鎂、合成矽酸鋁、碳酸鈣、酸式碳酸鈉、磷酸氫鈣、羧甲基纖維素鈣等可用為賦形劑；椰子油、橄欖油、芝麻油、落花生油、大豆油可用為懸浮劑或潤滑劑；作為碳水化合物諸如纖維素或蔗糖之衍生物之乙酸酞酸纖維素酯、或作為聚乙烯之衍生物之乙酸甲酯-甲基丙烯酸酯共聚物可用為懸浮劑；及諸如酞酸酯等之塑化劑可用為懸浮劑。

本文所述的醫藥配方可本身、或呈醫藥配方形式投與人類患者，在醫藥配方之情形下彼等與組合療法中之其他活性成分、或一或

多種適宜醫藥載劑或賦形劑混合。調配及投與本申請案化合物之技術可參見「Remington's Pharmaceutical Sciences」, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第18版, 1990年。

適宜之投藥途徑可包括(例如)非經腸式輸送, 包括肌肉內、皮下、靜脈內、髓內注射、以及鞘內、直接室內、腹膜內、鼻內、或眼內注射。配方(例如, 可包含化合物、類視色素、第二脂質、穩定劑、及/或治療劑之配方)亦可呈用於長時間及/或定時脈衝投藥之持續或可控釋放劑型(包括儲積注射、滲透泵等)以預定速率進行投與。另外, 投藥途徑可為局部或全身性。

可以本身為吾人已知的方式製造醫藥配方, 例如藉由習知之混合、溶解、粒化、製造糖衣丸、磨細(levigating)、乳化、囊封、包埋或製錠製程。

可使用一或多種包括賦形劑及助劑之生理上可接受的載劑依任何習知方式來調配醫藥配方, 該等賦形劑及助劑有利於處理活性化合物形成醫藥上可使用之製劑。恰當的配方係取決於所選擇的投藥途徑。可適宜地及如本技藝; 例如, 上述Remington's Pharmaceutical Sciences中所理解般使用任何所熟知技術、醫藥載劑、及賦形劑。

注射液可製備成習知形式, 製備成液體溶液或懸浮液、適於注射之前在液體中形成溶液或懸浮液之固體形式、或製備成乳液形式。適宜之賦形劑為(例如)水、生理鹽水、右旋糖、甘露醇、乳糖、卵磷脂、白蛋白、麩胺酸鈉、半胱胺酸鹽酸鹽等。此外, 若需要, 可注射醫藥配方可包含少量無毒輔助物質, 諸如潤濕劑、pH緩衝劑等。生理上相容的緩衝劑包括(但不限於)漢克氏溶液(Hanks's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)、或生理鹽水緩衝劑。若需要, 可使用吸收促進劑。

用於(例如)藉由一次全劑量注射或連續輸注進行非經腸式投與之

醫藥配方包括呈水溶性形式之活性配方(例如，可包含化合物、類視色素、第二脂質、穩定劑、及/或治療劑之配方)水溶液。另外，活性化合物之懸浮液可製備成適宜之油性注射懸浮液。水性注射懸浮液可包含增加懸浮液黏度之物質，諸如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇、或右旋糖。視情況，該懸浮液亦可包含適宜穩定劑或可增加化合物溶解度以容許製得高度濃縮溶液之試劑。注射用配方可呈單位劑型存於(例如)安瓿或多劑量容器(添加防腐劑)中。該等配方可採用(諸如)於油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液之形式，且可包含諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑之調配劑。或者，該活性成分可呈粉末形式，適於在使用前與適宜媒劑(例如)滅菌無熱源水進行構造。

除了前面所述製劑之外，該等配方亦可經調配為儲積製劑。可藉由肌肉內注射投與該等長效配方。因此，例如，該等配方(例如，可包含化合物、類視色素、第二脂質、穩定劑、及/或治療劑之配方)可利用適宜聚合或疏水性材料(例如(諸如)於可接受油中之乳液)或離子交換樹脂調配、或呈為略溶衍生物，例如(諸如)略溶鹽。

本發明之組合物及配方亦可經調配用於局部輸送且可利用任何適於施用局部輸送媒劑之方法將其施用至個體的皮膚。例如，可用手、利用施料器、或藉由涉及兩者之方法施用配方。於施用後，可(例如)藉由摩擦處理使配方進入個體的皮膚中。可每日多次或以每日一次為基礎進行施用。例如，可每天一次、每天兩次、或每天多次施用配方至個體的皮膚，或者可每兩天一次、每三天一次、或約每週一次、每兩週一次、或每幾週一次進行施用。

本文中之一些實施例係關於輸送治療劑至細胞之方法。例如，一些實施例係關於輸送諸如siRNA之治療劑至細胞中之方法。適於根據本文所述方法使用之細胞包括原核生物、酵母、或高級真核細胞，包括植物及動物細胞(例如，哺乳動物細胞)。於一些實施例中，該等

細胞可為人纖維肉瘤細胞(參見，HT1080細胞系)。於其他實施例中，該等細胞可為肝臟星狀細胞(LX2細胞系)。於其他實施例中，該等細胞可為癌細胞。又於其他實施例中，該等細胞可為干細胞(pHSC細胞系)。可使用為癌症模型系統之細胞系，包括(但不限於)乳癌(MCF-7、MDA-MB-438細胞系)、U87神經膠質母細胞瘤細胞系、B16F0細胞(黑素瘤)、海拉細胞(HeLa cell)(子宮頸癌)、A549細胞(肺癌)、及大鼠腫瘤細胞系GH3及9L。於該等實施例中，本文所述配方可用於轉染細胞。該等實施例可包括使細胞與本文所述包含治療劑之配方接觸，藉此輸送治療劑至該細胞。

本文揭示用於治療特徵為異常性纖維化之病症之方法，該方法可包括投與治療有效量之本文所述配方。特徵為異常性纖維化之病症可包括癌症及/或纖維化疾病。可藉由本文所述配方治療或改善之癌症類型包括(但不限於)肺癌、胰腺癌、乳癌、肝癌、胃癌、及結腸癌。於一實施例中，可治療或改善之癌症為胰腺癌。於另一實施例中，可治療或改善之癌症為肺癌。可藉由本文所述配方治療或改善之纖維化疾病之類型包括(但不限於)肝臟纖維化、肝臟硬化、胰腺炎、胰腺纖維化、囊性纖維化、聲帶疤痕、聲帶黏膜纖維化、喉部纖維化、肺纖維化、特發性肺纖維化、囊性纖維化、骨髓纖維化、腹膜後位纖維化、及腎源性全身纖維化。於一實施例中，可治療或改善之病症為肝臟纖維化。

本文所述之配方或醫藥組合物可依任何適宜方式投與給個體。投藥方法之非限制性實例尤其包括(a)經皮下、經腹膜內、經靜脈內、經肌肉內、經皮內、經眼窩內、經囊內、經脊柱內、經胸骨內等注射投與，包括輸注泵輸送；(b)諸如藉由直接在腎臟或心臟區域注射、(例如)藉由儲積灌輸之局部投與；以及如被熟習此項技藝者認為使活性化化合物接觸活組織合適者。

適於投與之醫藥組合物包括配方(例如，可包含化合物、類視色素、第二脂質、穩定劑、及/或治療劑之配方)，其中以可有效達成其預期目的的量包含活性成分。本文所揭示化合物作為一劑量所必需之治療有效量將取決於投藥途徑、所治療之動物種類(包括人)、及列入考慮之特定動物的物理特徵。可定製該劑量以達成所預期效果，但將取決於諸如體重、飲食、併用藥物之該等因素及熟習醫學技藝者將瞭解之其他因素。更特定言之，治療有效量意指化合物可有效預防、減輕或改善疾病症狀或延長所治療個體之生存期之量。尤其根據本文提供的具體揭示內容，熟習此項技藝者完全具備確定治療有效量之能力。

如熟習此項技藝者當可輕易明瞭，待投與之有用活體內劑量及特定投藥模式將根據年齡、體重及所治療的哺乳動物物種、所使用的特定化合物、及使用該等化合物之特定用途而改變。確定有效劑量水平(換言之，達成所預期結果必需的劑量水平)可由熟習此項技藝者利用例行藥理學方法實現。典型地，產品之人類臨床應用係以較低劑量水平開始，增加劑量水平直到達成所預期效果。或者，可接受的活體外研究可用於利用既存藥理學方法確定依本發明方法識別的組合物之有用劑量及投藥途徑。

於非人動物研究中，施用有潛力產品係以較高劑量水平開始，減小劑量直到不再獲致所預期效果或不良副作用消失。可根據所預期的效果及治療適應症寬泛地改變該劑量。典型地，劑量可為約10微克/kg至約100毫克/kg體重，較佳為約100微克/kg至約10毫克/kg體重。或者，如熟習此項技藝者所明瞭，劑量可基於患者體表面積計並計算。

可由個別醫師根據患者病況選擇醫藥組合物之準確配方、投藥途徑及劑量。(參見(例如)Fingl等人(1975)之「The Pharmacological

Basis of Therapeutics」，其全文因此以引用的方式併入本文中，特別參考第1頁第1章)。典型地，投與給患者之組合物的劑量範圍可為約0.5至約1000 mg/kg患者體重。如患者所需要，該劑量可為單劑量或依一或多天之療程中之一連兩次或多次給予。於已針對至少一些病況確定化合物之人類劑量之實例中，該等劑量將大致相同，或該等劑量為所確定人類劑量之約0.1%至約500%，更佳約25%至約250%。在沒有確定人類劑量之情況下，如針對於新發現醫藥組合物之情況，可如由動物之毒性研究及有效性研究所驗證，自ED<sub>50</sub>或ID<sub>50</sub>值、或其他源自活體外或活體內研究之適當值推斷適宜之人類劑量。

請注意主治醫師當應明瞭由於毒性或器官功能障礙如何及何時終止、中斷、或調整投藥。相反地，主治醫師亦應明瞭，假若臨床反應不足夠，則調整治療至更高水平(排除毒性)。管理所關注病症時所投與劑量的量值將隨待治療病況之嚴重度及投藥途徑而改變。例如，可部分地依標準預後評估方法評估病況之嚴重度。此外，給藥及可能給藥頻率亦將根據年齡、體重、及個別患者的反應改變。可於動物用藥中使用與以上所述相當之程序。

雖然欲逐個藥物地確定準確劑量，但在大多數情況中，可制定一些關於劑量之一般化。針對於成人患者之日劑量療程可為(例如)每種活性成分約0.1 mg至2000 mg，較佳係約1 mg至約500 mg，例如5至200 mg之劑量。於其他實施例中，使用每種活性成分約0.01 mg至約100 mg，較佳約0.1 mg至約60 mg，(例如)約1至約40 mg之靜脈內、皮下、或肌肉內劑量。在投與醫藥上可接受的鹽之情況中，劑量可計算為基於游離鹼之劑量。於一些實施例中，該配方係每日投與1至4次。或者，該等配方可藉由連續靜脈內輸注，較佳以每種活性成分至多約1000 mg/天劑量進行投與。如熟習此項技藝者所明瞭，於一些情境中，可能需要以超過、或甚至遠超過以上所規定較佳劑量範圍的量進

行本文所揭示配方之投與，以有效及侵襲性地治療具特定侵襲性之疾病或感染。於一些實施例中，投與該等配方持續連續治療時段，例如持續一週或更長、或持續數月或幾年。

可個別地調整給藥量及時間間隔以提供足以維持調節效果、或最低有效濃度(MEC)之活性部分血漿含量。每種化合物之MEC將不同但可自活體外數據估算得。達成MEC所必需的劑量將取決於個體特徵及投藥途徑。然而，HPLC試驗或生物檢定可用於測定血漿濃度。

亦可利用MEC值決定給藥時間間隔。組合物應利用在10至90%(較佳介於30至90%之間及最佳介於50至90%之間)時間維持血漿含量高於MEC之療程進行投與。

於局部投與或選擇性吸收之情況中，藥物之有效局部濃度可能與血漿濃度無關。

配方的投藥量可取決於所治療的個體、個體體重、病痛嚴重度、投藥方式及開立處方醫師之判斷。

可利用已知方法評估本文所揭示配方(例如，可包含化合物、類視色素、第二脂質、穩定劑、及/或治療劑之配方)之有效性及毒性。例如，可藉由測定針對諸如哺乳動物(且較佳係人)細胞系之細胞系的活體外毒性確定特定化合物、或共享特定化學部分之化合物子組之毒物學。該等研究之結果通常可預測動物(諸如哺乳動物，或更特定言係指人)體內之毒性。或者，可利用已知方法測定特定化合物於諸如小鼠、大鼠、兔、或猴之動物模型中之毒性。利用若干公認方法諸如活體外方法、動物模型、或人類臨床試驗來確定特定化合物之有效性。已知對於每種病況幾乎都已存在有活體外模型，包括(但不限於)癌症、心血管疾病、及各種免疫功能障礙。類似地，可接受的動物模型可用於確定化學品治療該等病況之有效性。在選擇模型來確定有效性時，熟習此項技藝者可在當前最先進技術之導引下來選擇適宜模

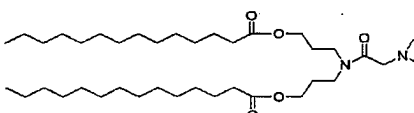
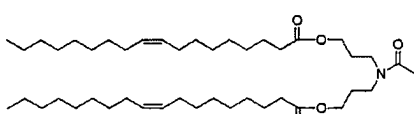
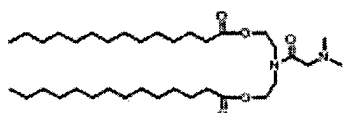
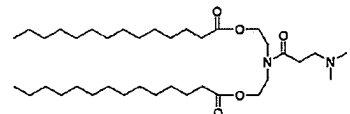
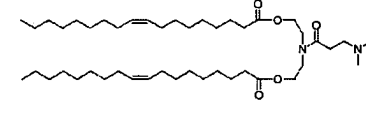
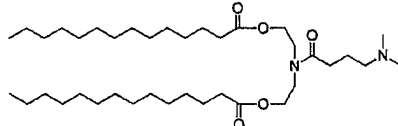
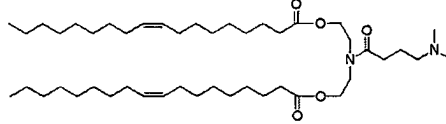
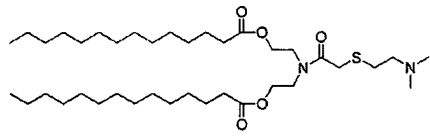
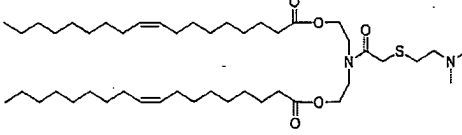
型、劑量、及投藥途徑、及療程。當然，人類臨床試驗亦可用於確定化合物於人體內之有效性。

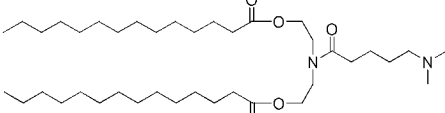
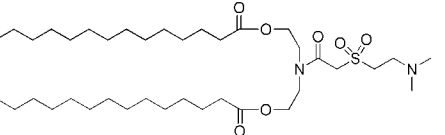
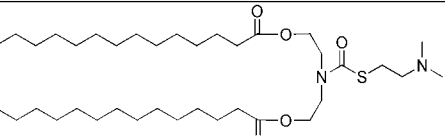
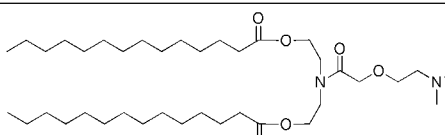
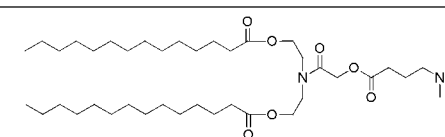
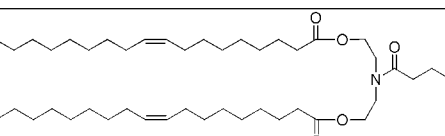
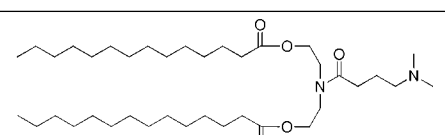
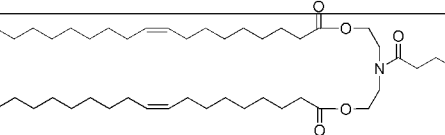
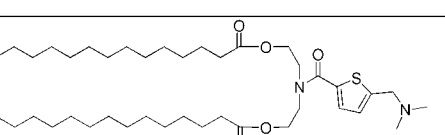
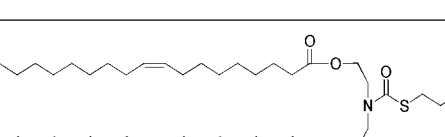
若需要，該等配方可呈可包括一或多種含活性成分之單位劑型之包裝或施配裝置存在。該包裝可(例如)包括金屬或塑料薄膜，諸如泡殼包裝。該包裝或施配裝置可附隨投藥說明書。該包裝或施配器亦可附隨以由管理藥品製造、使用、或銷售之政府機構所規定之形式與容器相關聯之注意事項，該注意事項反映用於人體或動物投藥用藥物之形式獲得該機構批准。該注意事項可為例如由美國食品及藥品管理局針對處方藥品所批准之標籤、或已批准之產品插頁。亦可製備包含在相容醫藥載劑中調配之化合物之組合物，置於適宜之容器中，然後加貼用於治療所指示病況之標籤。

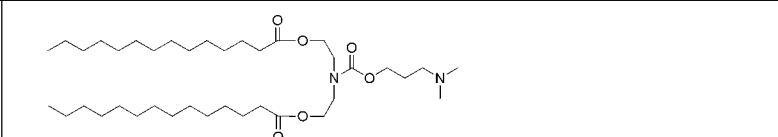
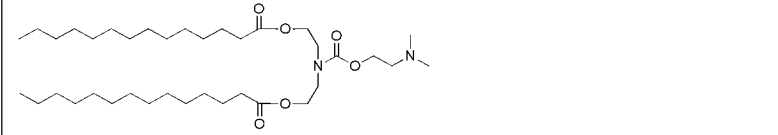
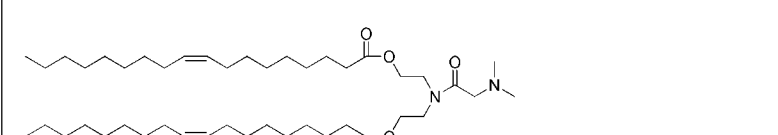
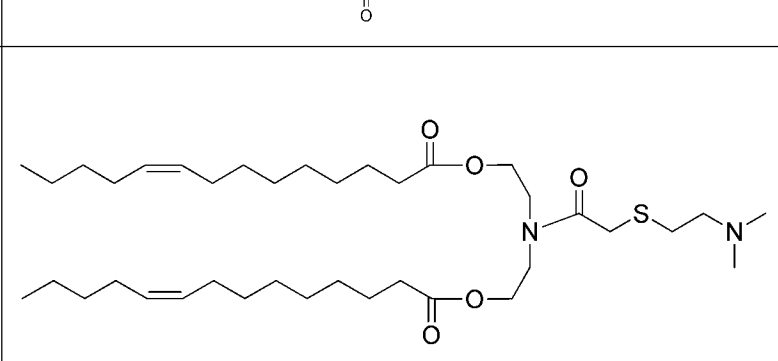
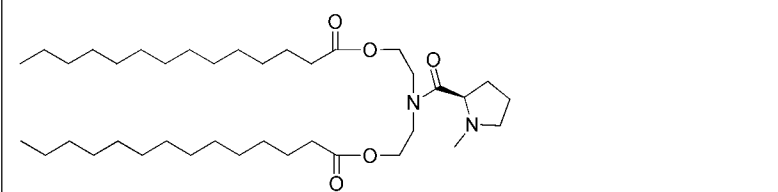
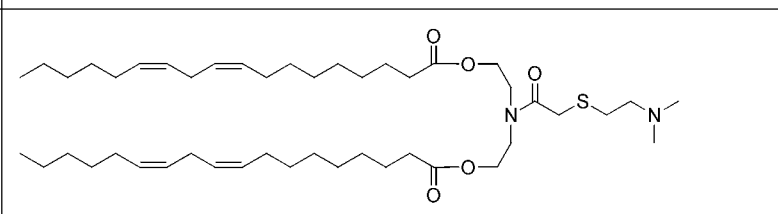
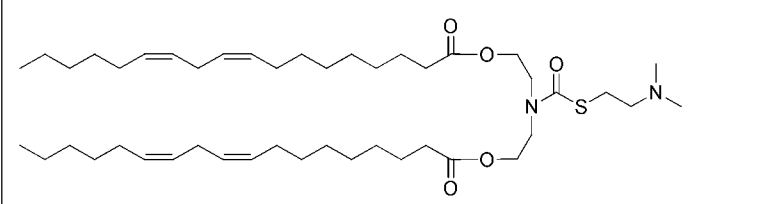
應理解，於本文所述具有一或多個立構中心之任何化合物中，假若未明文指明絕對立體化學，則各中心可獨立地為R組態或S組態或其混合物。因此，提供於本文中之化合物可為純對映異構體或立體異構體混合物。此外，應理解，於具有一或多個產生可定義為E或Z之幾何異構體之雙鍵之任何化合物中，各雙鍵可獨立地為E或Z、或其混合物。同樣地，意欲亦包括所有互變異構形式。

屬於本發明範疇之較佳之式I化合物陳述於表1中。活體外及活體內數據(參見以下)亦陳述於表1中。

表1

脂質	結構式	活體外 (pHSC) %KD	活體內 (大鼠DMNQ) %KD
i-Pr-DC		53% , 50 nM	
i-Pr-DODC		60% , 50 nM	
i-DC		89% , 200 nM	
i-Et-DC (Et104)		65% , 50 nM	
i-Et-DODC		43% , 50 nM	
i-Prop-DC		55% , 50 nM	
i-Prop-DODC		55% , 50 nM	
S104		68% , 50 nM	52% , 0.5 mpk
S104-DO		78% , 20 nM	65% , 0.5 mpk

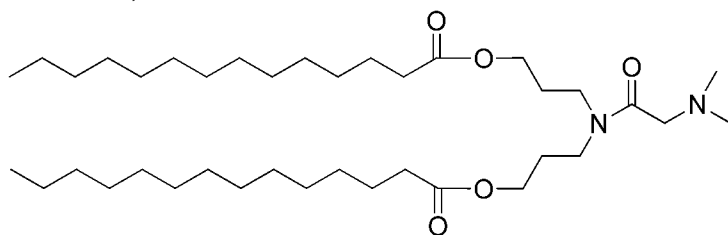
脂質	結構式	活體外 (pHSC) %KD	活體內 (大鼠DMNQ) %KD
<b>C104</b>		53% , 20 nM	75% , 0.5 mpk
<b>SO2-S104</b>		75% , 20 nM	18% , 0.5 mpk
<b>TU104</b>		76% , 20 nM	
<b>O104</b>		55% , 20 nM	
<b>HEDC-M1</b>		53% , 20 nM	
<b>C104-DO</b>		32% , 20 nM	
<b>Pr104</b>		54% , 20 nM	
<b>Pr104-DO</b>		27% , 20 nM	
<b>T104</b>		58% , 20 nM	
<b>TU104-DO</b>		81% , 20 nM	40% , 0.25 mpk

脂質	結構式	活體外 (pHSC) %KD	活體內 (大鼠DMNQ) %KD
CB104		42% , 20 nM	
CA104			
INT-4		70% , 50 nM	
S104-DMO		40% , 10 nM	
Pro-DC			
S104-DLin			
TU104-DLin			

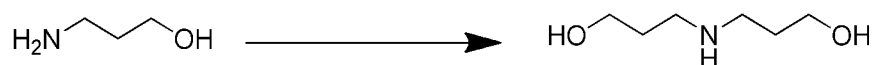
可進一步參考以下實例舉例說明本發明。該等實例僅係例示性，且用意不在限制本發明。

## 實驗部分

### 二-十四烷酸((2-(二甲胺基)乙醯基)氮烷二基)雙(丙烷-3,1-二酯)(i-Pr-DC)之製法

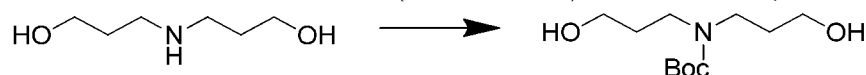


#### 步驟1：中間物1：3,3'-氮烷二基雙(丙-1-醇)之製法



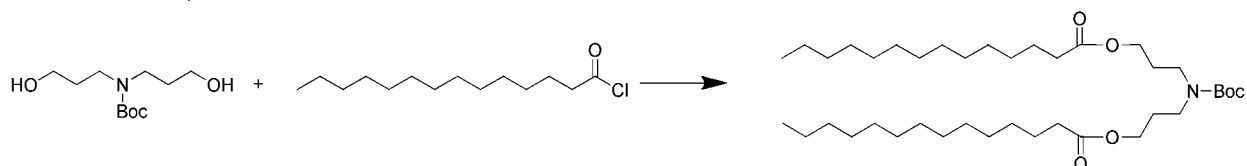
使3-胺基-1-丙醇(14.5 mL, 19.0毫莫耳)、1-氯-3-羥基丙烷(8.00 mL, 95.6毫莫耳)及H<sub>2</sub>O(~50mL)之混合物回流歷時24小時。接著添加氫氧化鉀(5.40 g)。於溶解後，蒸發全部水而留存黏性油及大量氯化鉀。將彼等過濾並以無水丙酮及二氯甲烷洗滌。有機相經Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>乾燥，過濾然後蒸發而留存油。藉以DCM/MeOH梯度洗脫之矽膠層析純化，獲得3,3'-氮烷二基雙(丙-1-醇)(12.5 g)。

#### 步驟2：中間物2：雙(3-羥丙基)胺基甲酸第三丁酯之製法



以DCM(25 mL)稀釋3,3'-氮烷二基雙(丙-1-醇)(12.5 g, 95.4毫莫耳)。慢慢添加含二碳酸二第三丁酯(26.0 g, 119毫莫耳)之DCM(25 mL)溶液同時於氫氣覆蓋氣下攪拌。容許反應攪拌過夜。濃縮反應混合物。藉以DCM/MeOH梯度洗脫之矽膠層析純化，獲得雙(3-羥丙基)胺基甲酸第三丁酯。

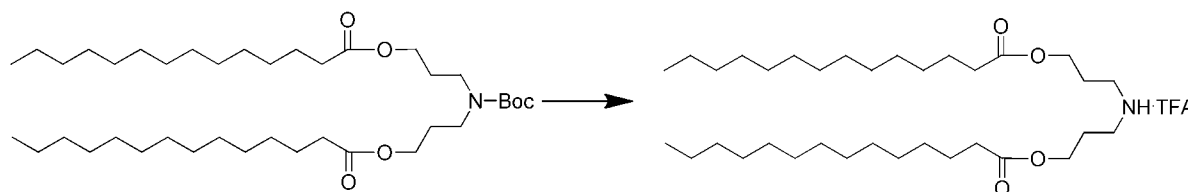
### 步驟3：中間物3：二-十四烷酸((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(丙烷-3,1-二酯)之製法



將雙(3-羥丙基)胺基甲酸第三丁酯(4.00 g, 17.3毫莫耳)、 $\text{Et}_3\text{N}$ (4.8 mL、34.6毫莫耳)及DMAP(529 mg, 4.33毫莫耳)溶解於氯仿(50 mL)中。於冰浴中攪拌時，歷時15分鐘添加肉豆蔻醯氯溶液。該添加係以使得反應溫度不超過 $30^\circ\text{C}$ 之方式進行。容許該反應在室溫下攪拌過夜。第二天，添加MeOH(50 mL)及0.9%鹽水溶液(50 mL)以淬滅該反應。分離出有機層並以1M  $\text{NaHCO}_3$ 洗滌。利用 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 乾燥溶劑，過濾並於真空中濃縮獲得呈油之二-十四烷酸((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(丙烷-3,1-二酯)，其無需進一步純化而用於以下步驟中。

#### 步驟4：中間物4：二-十四烷酸氮烷二基雙(丙烷-3,1-二酯)

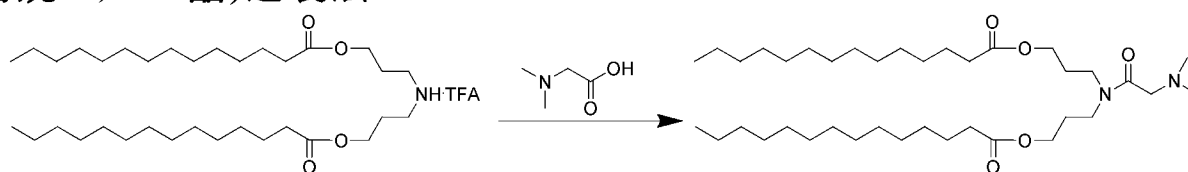
##### 酯)TFA鹽之製法



將二-十四烷酸((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(丙烷-3,1-二酯)(11.3 g, 17.3毫莫耳)溶解於TFA/ $\text{CHCl}_3$ (1:1, 20 mL)中且容許在室溫下攪拌該混合物15分鐘。接著於真空中濃縮該物質。第二次重複該濃縮。接著將該物質溶解於DCM中且以 $\text{H}_2\text{O}$ 洗滌，利用 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 乾燥，於真空中濃縮然後充分乾燥過夜。濃縮該反應混合物。藉以DCM/MeOH梯度洗脫之矽膠層析純化，獲得二-十四烷酸氮烷二基雙(丙烷-3,1-二酯)TFA鹽(7.5 g)。

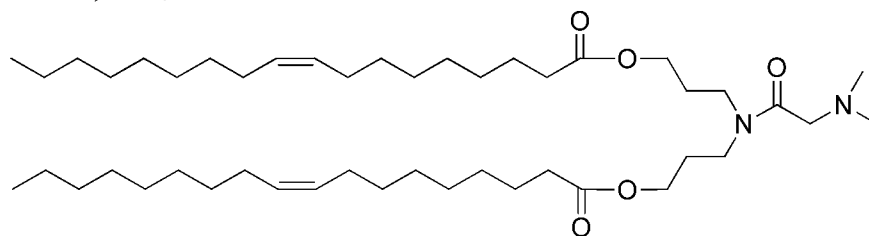
#### 步驟5：i-Pr-DC：二-十四烷酸((2-(二甲胺基)乙醯基)氮烷二基)

##### 雙(丙烷-3,1-二酯)之製法

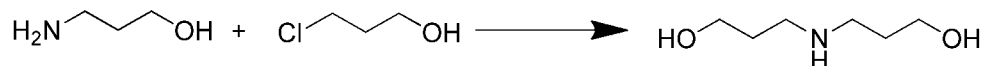


以DCM(5 mL)稀釋二-十四烷酸氮烷二基雙(丙烷-3,1-二酯)TFA鹽(750 mg, 1.35毫莫耳)接著添加至N,N-二甲基甘胺酸(154 mg, 1.49毫莫耳)、HATU (616 mg, 1.62毫莫耳)及DIEA(495  $\mu$ L, 2.84毫莫耳)於DCM(5 mL)中之預活化混合物。用氫氣沖洗燒瓶且容許在室溫下攪拌過夜。濃縮反應混合物。藉以DCM/MeOH梯度洗脫之矽膠層析純化, 獲得二-十四烷酸((2-(二甲胺基)乙醯基)氮烷二基)雙(丙烷-3,1-二酯)(465 mg)。QTOF MS ESI+ : m/z 639.6(M+H)。

**(Z)-二油酸((2-(二甲胺基)乙醯基)氮烷二基)雙(丙烷-3,1-二酯)(i-Pr-DODC)之製法**

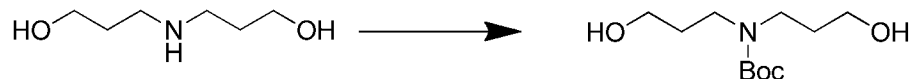


**步驟1：中間物1：3,3'-氮烷二基雙(丙-1-醇)之製法**



使3-胺基-1-丙醇(14.5 mL, 19.0毫莫耳)、1-氯-3-羥基丙烷(8.00 mL, 95.6毫莫耳)及水(50 mL)之混合物回流歷時24小時。接著添加氫氧化鉀(5.40 g)。於溶解後, 蒸發全部水而留存黏性油及大量氯化鉀。將彼等過濾並以無水丙酮及二氯甲烷洗滌。有機相經 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 乾燥, 過濾然後蒸發而留存油。藉以DCM/MeOH梯度洗脫之矽膠層析純化獲得3,3'-氮烷二基雙(丙-1-醇)(12.5 g)。

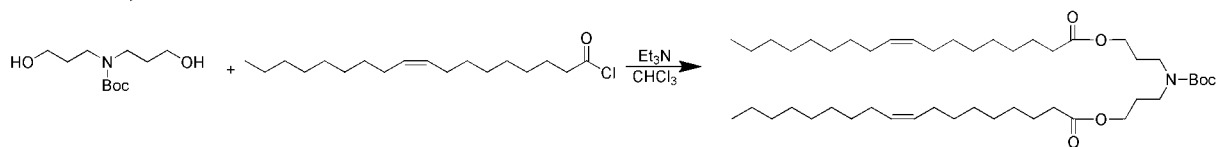
**步驟2：中間物2：雙(3-羥丙基)胺基甲酸第三丁酯之製法**



以DCM(25 mL)稀釋3,3'-氮烷二基雙(丙-1-醇)(12.5 g, 95.4毫莫耳)。慢慢添加含二碳酸二第三丁酯(26.0 g, 119毫莫耳)之DCM(25 mL)溶液同時於Ar氣覆蓋下攪拌。容許反應攪拌過夜。濃縮反應混合

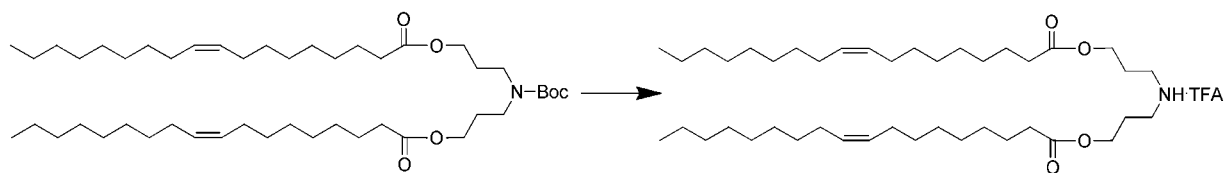
物。藉以DCM/MeOH梯度洗脫之矽膠層析純化，獲得雙(3-羥丙基)胺基甲酸第三丁酯。

### 步驟3：中間物3：(Z)-二油酸((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(丙烷-3,1-二酯)之製法



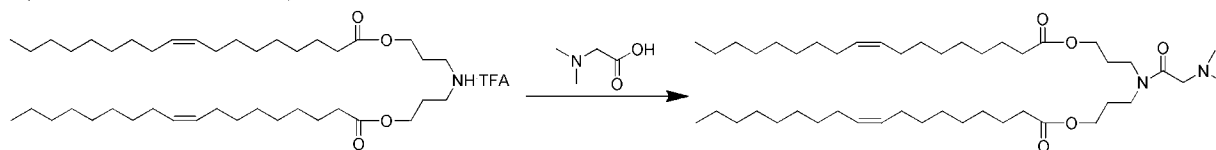
將雙(3-羥丙基)胺基甲酸第三丁酯、三乙胺及DMAP溶解於氯仿中。於冰浴中攪拌時，歷時15分鐘添加油醯氯溶液。該添加係以使得反應溫度不超過30°C之方式進行。容許反應在室溫下攪拌過夜。第二天，添加MeOH(50 mL)及0.9%鹽水溶液(50 mL)以淬滅該反應。分離出有機層接著以1M NaHCO<sub>3</sub>洗滌。利用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>乾燥溶劑，過濾然後於真空中濃縮獲得呈油之(Z)-二油酸((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(丙烷-3,1-二酯)，其無需進一步純化而用於以下步驟中。

### 步驟4：中間物4：(Z)-二油酸氮烷二基雙(丙烷-3,1-二酯)TFA鹽之製法



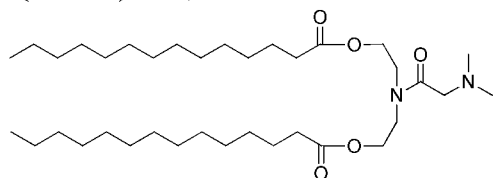
將(Z)-二油酸((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(丙烷-3,1-二酯)(13.2 g, 17.3毫莫耳)溶解於TFA/CHCl<sub>3</sub>(1:1, 20 mL)中且容許在室溫下攪拌該混合物15分鐘。接著於真空中濃縮該物質。第二次重複該濃縮。接著將該物質溶解於DCM中然後用H<sub>2</sub>O洗滌，利用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>乾燥然後於真空中濃縮。藉以DCM/MeOH梯度洗脫之矽膠層析純化獲得(Z)-二油酸氮烷二基雙(丙烷-3,1-二酯)TFA鹽。

**步驟 5：i-Pr-DODC：(Z)-二油酸((2-(二甲胺基)乙醯基)氮烷二基)雙(丙烷-3,1-二酯)之製法**

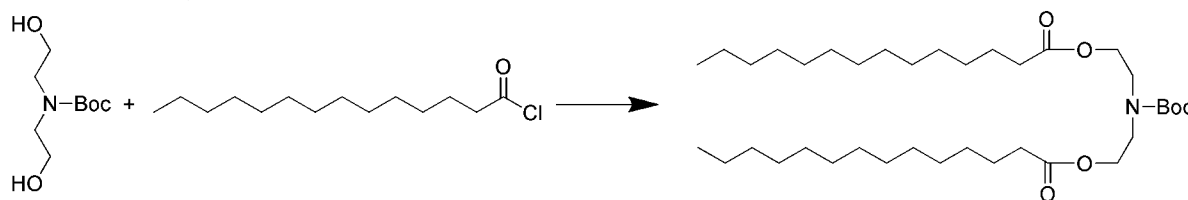


以DCM(5 mL)稀釋(Z)-二油酸氮烷二基雙(丙烷-3,1-二酯)TFA鹽(750 mg, 1.13毫莫耳)且添加至於DCM(5 mL)中之N,N-二甲基甘胺酸(128 mg, 1.24毫莫耳)、HATU(517 mg, 1.36毫莫耳)及DIEA(413  $\mu$ L, 2.37毫莫耳)之預先活化之混合物。以氫氣沖洗燒瓶且容許在室溫下攪拌過夜。濃縮反應混合物。藉以DCM/MeOH梯度洗脫之矽膠層析純化獲得(Z)-二油酸((2-(二甲胺基)乙醯基)氮烷二基)雙(丙烷-3,1-二酯)(450 mg)。QTOF MS ESI+：m/z 747.7(M+H)。

**二-十四烷酸((2-(二甲胺基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)，(i-DC)之製法**



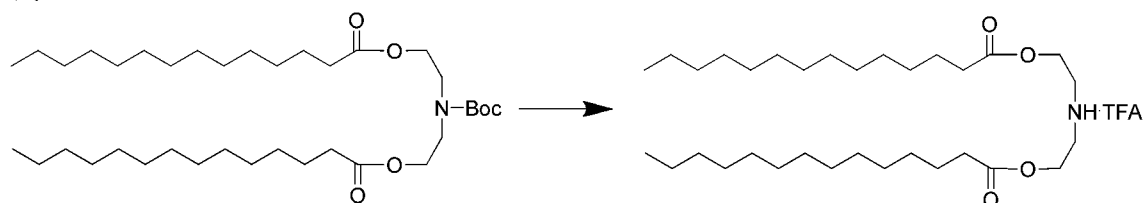
**步驟 1：中間物 1：二-十四烷酸((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)之製法**



將N-Boc二乙醇胺(MW 205.25；8.4 g, 0.041莫耳)、三乙胺(MW 101.19；11.5 ml, 0.083莫耳)及4-(二甲胺基)吡啶(MW 122.17；1.3 g, 0.011莫耳)溶解於氯仿(170 mL)中。於冰/水浴中攪拌時，滴加含肉豆蔻醯氯(MW 246.82；22 mL, 80.9毫莫耳)之100 mL氯仿溶液。接

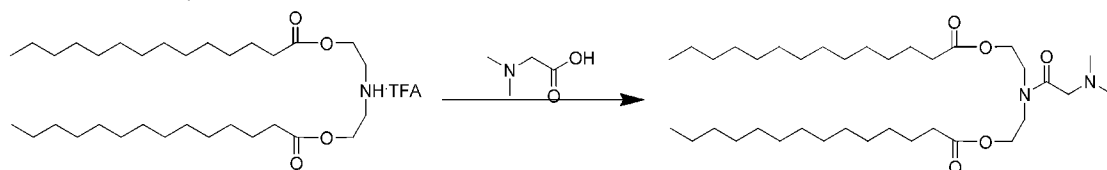
著從冷浴中取出反應混合物，並繼續於室溫下攪拌2小時。添加200 mL甲醇與200 ml 0.9%鹽水之混合物以淬滅反應。停止攪拌並分離出有機層。藉由旋轉蒸發移除溶劑而獲得呈無色油之二-十四烷酸((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(25.7 g)，其無需進一步純化而用於以下步驟中。

### 步驟2：中間物2：二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽之製法



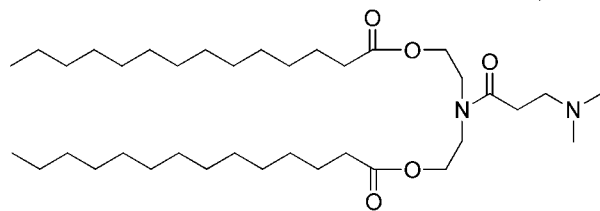
將三氟乙酸(150 mL, 2.02莫耳)添加至含二-十四烷酸((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(33.0 g, 0.053莫耳)之100 ml氯仿溶液。於室溫下攪拌該反應混合物過夜。藉由旋轉蒸發移除溶劑之後，所得軟固體經80 ml甲醇再結晶獲得呈白色固體之二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽(16.6 g)。

### 步驟3：i-DC：二-十四烷酸((2-(二甲胺基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)之製法

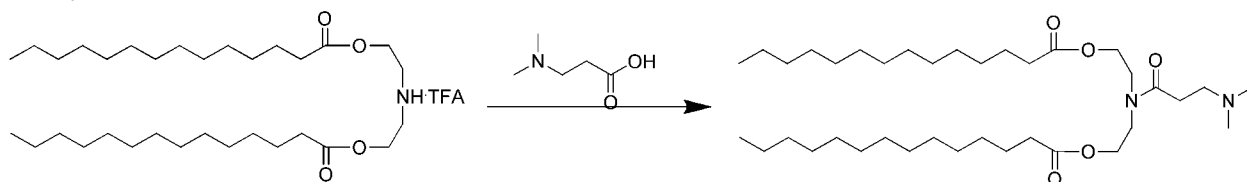


利用在吡啶(20 mL)中之二甲基甘胺酸(42.5 g, 25毫莫耳)、DCC(4.7 g, 23毫莫耳)及DIEA(6.33 mL, 40毫莫耳)稀釋二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽(10 g, 16毫莫耳)。以氫氣沖洗圓底燒瓶，然後於55°C下加熱該反應混合物過夜。第二天，濃縮該反應混合物。藉以DCM/MeOH洗脫之矽膠層析純化之後，濃縮組併在一起之餾份獲得二-十四烷酸((2-(二甲胺基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)。

二-十四烷酸((3-(二甲胺基)丙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(i-Et-DC，本文中亦稱為Et104)之製法

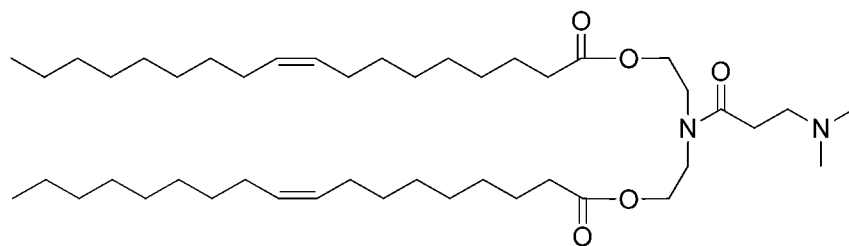


i-Et-DC：二-十四烷酸((3-(二甲胺基)丙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)之製法

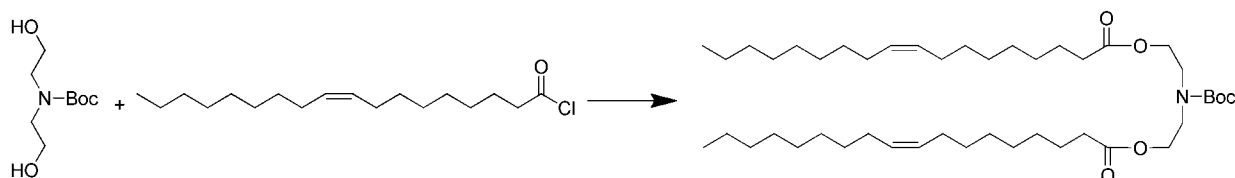


前述二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽之合成。以DCM(10 mL)稀釋二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽(1.50 g，2.85毫莫耳)且添加至在DCM (10 mL)中之3-(二甲胺基)丙酸HCl鹽(482 mg，3.14毫莫耳)、HATU(1.30 g，3.42毫莫耳)及DIEA(1.04 mL，5.98毫莫耳)之預先活化之混合物。以氫氣沖洗圓底燒瓶且容許於室溫下攪拌該反應混合物過夜。濃縮該反應混合物。藉以DCM/MeOH洗脫之矽膠層析純化之後，濃縮組併在一起之餾份並於0-5°C下在DCM (20 mL)及10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(20 mL)中攪拌30分鐘。分離出有機層，然後進一步利用DCM(2×10 mL)萃取水層。於0-5°C下攪拌已合併之有機物與MgSO<sub>4</sub>持續30分鐘，過濾，以DCM洗滌，然後濃縮獲得二-十四烷酸((3-(二甲胺基)丙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(1.01 g)。QTOF MS ESI+：m/z 625.6(M + H)。

(Z)-二油酸((3-(二甲胺基)丙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)i-Et-DODC之製法

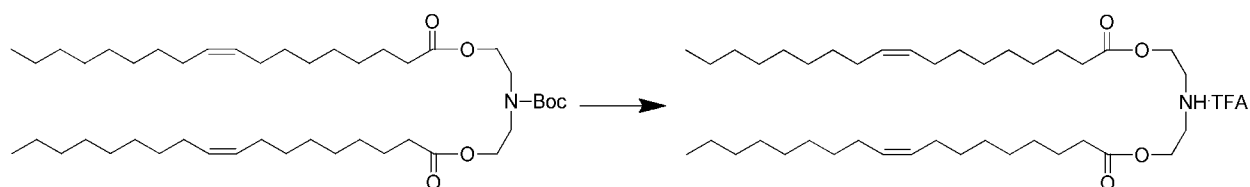


**步驟1：中間物1：(Z)-二油酸((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)之製法**



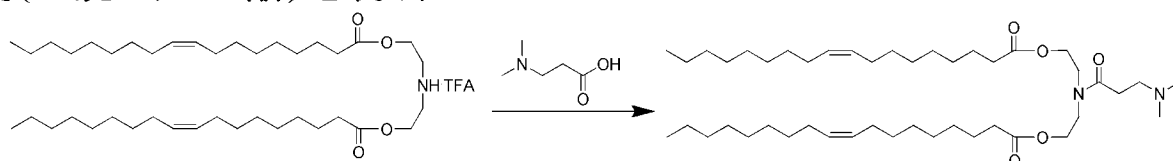
將N-Boc二乙醇胺(17.8 g, 0.087莫耳)、三乙胺(24.4 mL, 0.176莫耳)及4-(二甲胺基)吡啶(2.76 g, 0.023莫耳)溶解於350 ml氯仿中。於攪拌時，歷時10分鐘添加含油醯氯(61.6 g, 0.174莫耳)之100 ml氯仿溶液(或者，將N-Boc二乙醇胺之氯仿溶液浸於冰/水浴中同時添加油醯氯)。該添加係以使得反應混合物溫度不超過50°C之方式進行。於室溫下攪拌該反應混合物2小時。添加200 ml甲醇與200 ml 0.9%鹽水之混合物以淬滅該反應。分離出有機層並用2×100 ml稀碳酸氫鈉水溶液洗滌。藉由旋轉蒸發移除溶劑，獲得呈淺黃色油之(Z)-二油酸((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(59.5 g)。該物質係無需進一步純化而用於下一步驟中。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 0.87 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.20-1.40 (m, 40H, CH<sub>2</sub>), 1.45 (s, 9H, tBu CH<sub>3</sub>), 1.59 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)), 2.00(m, 8H, CH<sub>2</sub>CH=CH), 2.33 (t, 4H, CH<sub>2</sub>C(=O)), 3.48 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.18 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 5.33 (m, 4H, CH=CH)。

**步驟2：中間物2：(Z)-二油酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽之製法**



以100 ml三氟乙酸(100 mL, 1.35莫耳)及100 ml氯仿處理(Z)-二油酸((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(59.5 g, 0.081莫耳)兩次。每次處理由於室溫下攪拌10分鐘組成, 然後在各處理結束時藉由旋轉蒸發移除溶劑。將殘餘物溶解於200 ml二氯甲烷中然後用100 ml水洗滌該混合物兩次。藉由使用甲醇與二氯甲烷之混合物作為溶離劑之矽膠層析純化殘餘物, 獲得(Z)-二油酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽(44.0 g)。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 0.87 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.20-1.40 (m, 40H, CH<sub>2</sub>), 1.59 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)), 2.00 (m, 8H, CH<sub>2</sub>CH=CH), 2.33 (t, 4H, CH<sub>2</sub>C(=O)), 3.31 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.38 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 5.33 (m, 4H, CH=CH)。

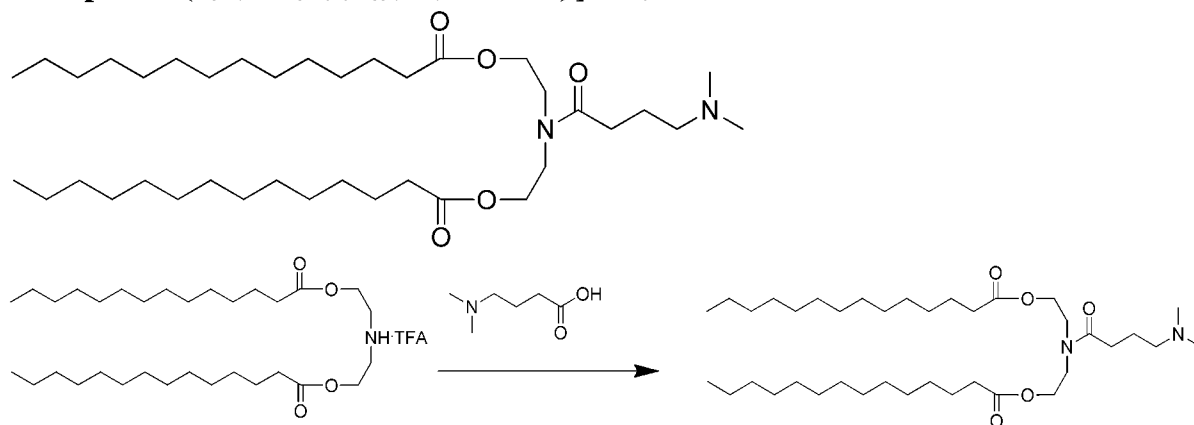
### 步驟3：i-Et-DODC：(Z)-二油酸((3-(二甲胺基)丙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)之製法



以DCM(10 mL)稀釋(Z)-二油酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽(1.50 g, 2.37毫莫耳)且添加至在DCM(10 mL)中之3-(二甲胺基)丙酸HCl鹽(383 mg, 2.49毫莫耳)、HATU(1.03 g, 2.72毫莫耳)及DIEA(831 μL, 4.77毫莫耳)之預先活化之混合物。用氫氣沖洗圓底燒瓶且容許於室溫下攪拌該反應混合物過夜。濃縮該反應混合物。藉以DCM/MeOH洗脫之矽膠層析純化之後, 濃縮組併在一起之餾份且於0-5°C下在DCM(20 mL)及10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(20 mL)中攪拌30分鐘。分離出有機層然後進一步利用DCM(2×10 mL)萃取水層。於0-5°C下攪拌已合併

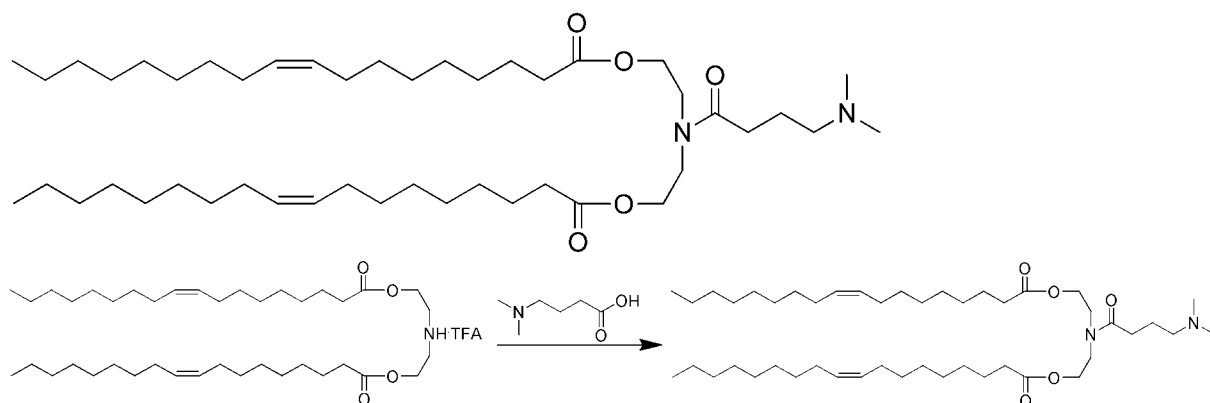
之有機物與MgSO<sub>4</sub>持續30 min，過濾，用DCM洗滌，然後濃縮獲得(Z)-二油酸((3-(二甲胺基)丙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)。QTOF MS ESI+ : m/z 733.6 (M + H)。

**二-十四烷酸((4-(二甲胺基)丁醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)[i-Prop-DC(本文中亦稱為Pr104)]之製法**



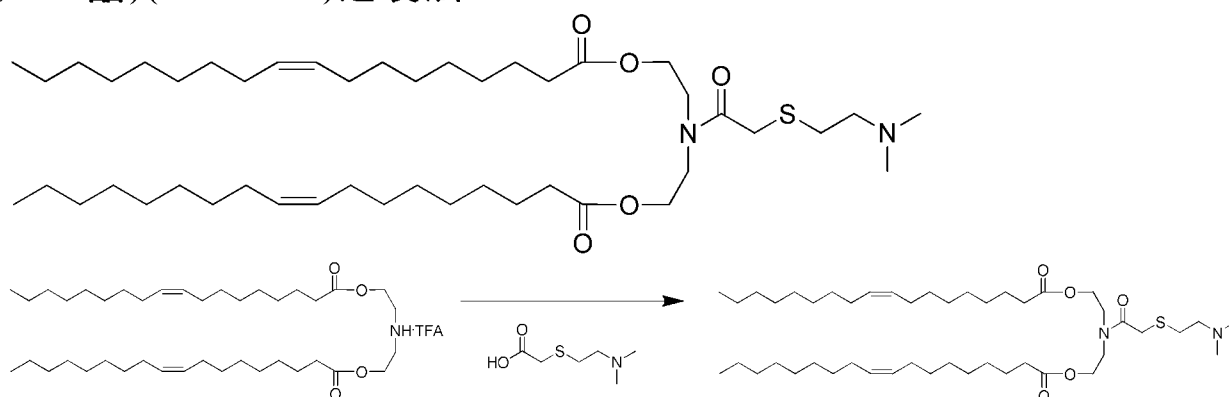
前述二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽之合成。以DCM(5 mL)稀釋二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽(1.00 g, 1.90毫莫耳)並添加至在DCM(5 mL)中之4-(二甲胺基)丁酸HCl鹽(382 mg, 2.28毫莫耳)、HATU(867 mg, 2.28毫莫耳)及DIEA(728 μL, 4.18毫莫耳)之預先活化之混合物。用氫氣沖洗圓底燒瓶然後容許於室溫下攪拌該反應混合物過夜。濃縮該反應混合物。藉以DCM/MeOH洗脫之矽膠層析純化之後，濃縮組併在一起之餾份且於0-5°C下在DCM (20 mL)及10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(20 mL)中攪拌30分鐘。分離出有機層然後進一步利用DCM(2×10 mL)萃取水層。於0-5°C下攪拌已合併之有機物與MgSO<sub>4</sub>持續30分鐘，過濾，用DCM洗滌，然後濃縮獲得二-十四烷酸((4-(二甲胺基)丁醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)。LCMS ESI+ : m/z 639.6 (M + H)。

**(Z)-二油酸((4-(二甲胺基)丁醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)[i-Prop-DODC(本文中亦稱為Pr104-DO)]之製法**



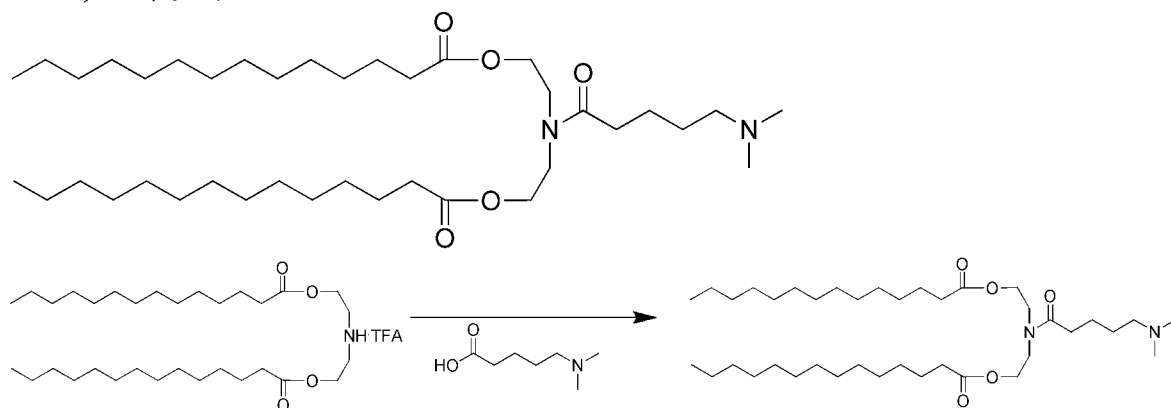
前述(Z)-二油酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽之合成。以DCM (5 mL)稀釋(Z)-二油酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽(1.00 g, 1.58毫莫耳)並添加至在DCM(5 mL)中之4-(二甲胺基)丁酸HCl鹽(317 mg, 1.89毫莫耳)、HATU(719 mg, 1.89毫莫耳)及DIEA(606  $\mu$ L, 3.48毫莫耳)之預先活化之混合物。用氫氣沖洗圓底燒瓶且容許於室溫下攪拌該反應混合物過夜。濃縮該反應混合物。藉以DCM/MeOH洗脫之矽膠層析純化之後，濃縮組併在一起之餾份且於0-5 $^{\circ}$ C下在DCM(20 mL)及10%  $K_2CO_3$ (20 mL)中攪拌30分鐘。分離出有機層然後進一步利用DCM(2 $\times$ 10 mL)萃取水層。於0-5 $^{\circ}$ C下攪拌已合併之有機物與 $MgSO_4$ 持續30分鐘，過濾，用DCM洗滌，然後濃縮獲得(Z)-二油酸((4-(二甲胺基)丁醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)。LCMS ESI+ : m/z 747.7 (M + H)。

**(Z)-二油酸((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(S104-DO)之製法**



前述(Z)-二油酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽之合成。於0-5°C下攪拌在含10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(30 mL)之DCM(60 mL)中之(Z)-二油酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽(4.06 g, 6.41毫莫耳)。30分鐘後，分離出有機相且進一步利用DCM(30 mL)萃取水相。於0-5°C下攪拌已合併之有機相與MgSO<sub>4</sub>持續30分鐘，過濾然後利用DCM(~30 mL)洗滌。將2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙酸(1.26 g, 7.70毫莫耳)、EDC HCl鹽(1.84 g, 9.62毫莫耳)、DMAP(78.3 mg, 0.64毫莫耳)添加至已合併之濾液，於室溫下攪拌稀懸浮液過夜。第二天，添加H<sub>2</sub>O(60 mL)及MeOH(30 mL)且於攪拌10分鐘後，分離出澄清有機相。利用DCM萃取渾濁水相。濃縮已合併之有機萃取物。藉由矽膠塞柱過濾粗產物並溶於DCM (40 mL)中然後添加PBS(pH=11, 50mL)。於室溫下攪拌該混合物~10分鐘。此後，分離出有機相，然後再次利用DCM(15 mL)萃取水相。乾燥(MgSO<sub>4</sub>)已合併之有機物持續30分鐘，過濾，用DCM洗滌，然後濃縮獲得(Z)-二油酸((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(3.44 g)。LCMS ESI+ : *m/z* 780.2 (M + H)。

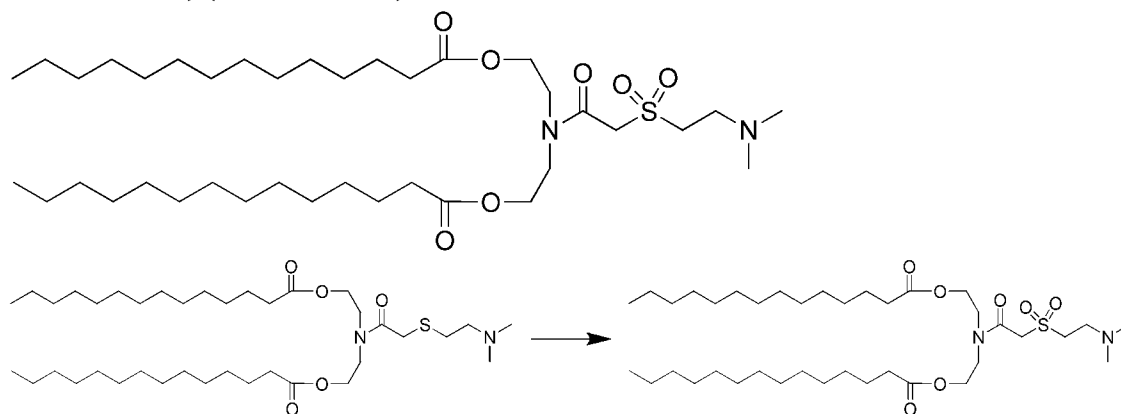
### 二-十四烷酸((5-(二甲胺基)戊醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(C104)之製法



前述二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽之合成。於0-5°C下攪拌在含10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(10 mL)之DCM(20 mL)中之二-十四烷酸氮

烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽(730 mg, 1.14毫莫耳)。於30分鐘後，分離出有機相且進一步利用DCM(10 mL)萃取水相。於0-5°C下攪拌已合併之有機相與MgSO<sub>4</sub>持續30分鐘，過濾然後用DCM(10 mL)洗滌。將5-(二甲胺基)戊酸(248 mg, 1.37毫莫耳)、EDC HCl鹽(328 mg, 1.71毫莫耳)、DMAP(14 mg, 0.114毫莫耳)添加至已合併之濾液，於室溫下攪拌該稀懸浮液過夜，此後溶液變澄清。第二天，添加H<sub>2</sub>O(20 mL)及MeOH(10 mL)且於攪拌10分鐘後，分離出澄清有機相。利用DCM萃取渾濁水相。濃縮已合併之有機萃取物。藉以100%乙酸乙酯接著10% MeOH/DCM洗脫之矽膠層析純化之後，將純化之殘餘物溶於DCM(25mL)及PBS(pH=11, 25mL)中。於室溫下攪拌該混合物15分鐘。此後，分離出有機相然後再次利用DCM(15 mL)萃取水相。乾燥(MgSO<sub>4</sub>)已合併之有機物持續30分鐘，過濾，用DCM洗滌，然後濃縮獲得二-十四烷酸((5-(二甲胺基)戊醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(405 mg)。LCMS ESI+ : m/z 654.1 (M + H)。

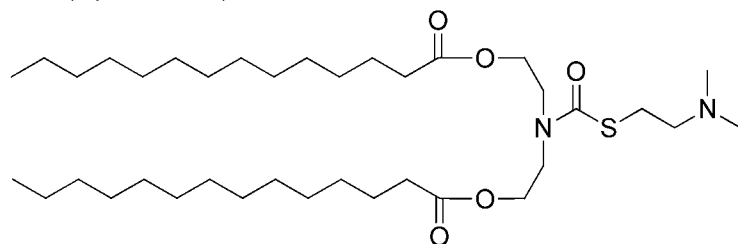
### 二-十四烷酸((2-((2-(二甲胺基)乙基)磺醯基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(SO2-S104)之製法



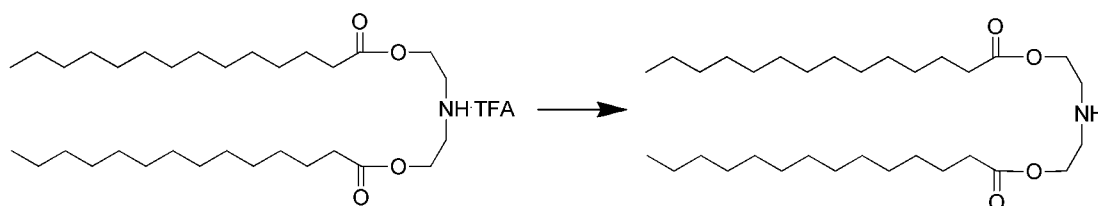
論述二-十四烷酸((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(亦稱S104)之合成。在經氫氣沖洗之圓底燒瓶中，將DCM(10 mL)添加至二-十四烷酸((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)。藉由冰浴冷卻該溶液。歷時5分鐘將

mCPBA(含於DCM中之溶液)慢慢添加至該溶液。於添加之後，移去該冰浴，然後容許該反應於室溫下攪拌過夜。3.5小時後，慢慢添加2M DMA/THF(4.55 mL)且容許該反應混合物攪拌過夜。然後以DCM稀釋該反應混合物至75 mL。用H<sub>2</sub>O(2×50 mL)及10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(50 mL)洗滌。用DCM(40 mL)反萃取所有水相洗液。乾燥(MgSO<sub>4</sub>)已合併之有機物，過濾，然後濃縮獲得無色油。濃縮該反應混合物。藉以乙酸乙酯/MeOH梯度洗脫之矽膠層析純化獲得二-十四烷酸(((2-((2-(二甲胺基)乙基)磺醯基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯))(540 mg)。LCMS ESI+ : m/z 704.0 (M + H)。

### 二-十四烷酸(((2-((2-(二甲胺基)乙基)磺基)羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯))(TU104)之製法

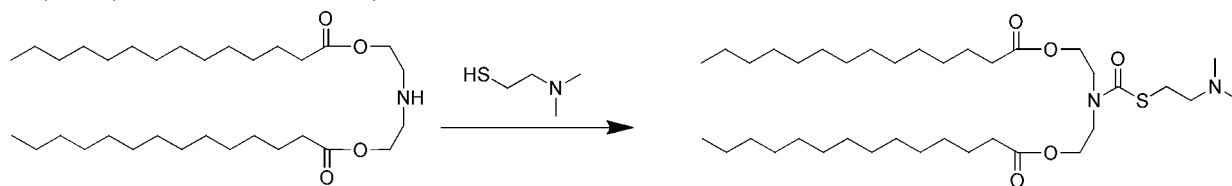


### 步驟1：中間物1：二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)之製法



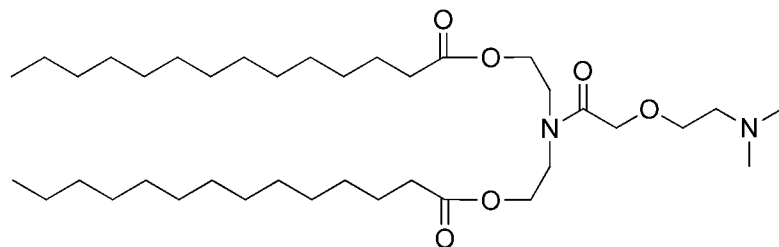
前述二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽之合成。將二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽溶解於DCM(50 mL)中並添加PBS(pH=11, 50mL)。於室溫下攪拌該混合物15分鐘。然後，分離出有機相且再次利用DCM(25 mL)萃取水相。乾燥(MgSO<sub>4</sub>)已合併之有機物持續30分鐘，過濾，用DCM洗滌，然後濃縮獲得呈游離鹼之二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)。

**步驟2：TU104：二-十四烷酸((((2-(二甲胺基)乙基)硫基)羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)之製法**

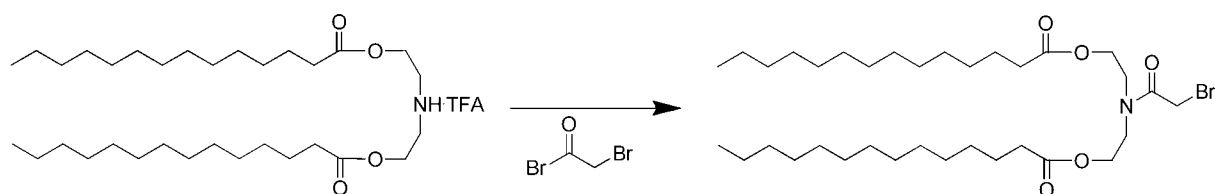


將氯甲酸三氯甲酯(亦稱雙光氣)(257  $\mu\text{L}$ ，2.13毫莫耳)添加至含2-(二甲胺基)乙硫醇HCl鹽(302 mg，2.13毫莫耳)之無水DCM(20 mL)溶液且於室溫下在氬氣覆蓋氣中攪拌4小時。然後，於真空中移除DCM及過量雙光氣。接著添加二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)游離鹼(1068 mg，2.03毫莫耳)、DCM(20 mL)及三乙胺(580  $\mu\text{L}$ ，4.16毫莫耳)。於16小時後，於室溫下以DCM稀釋該反應混合物然後用1M HCl(75 mL)、 $\text{H}_2\text{O}$ (75 mL)及PBS(pH=11，75 mL)洗滌，乾燥( $\text{MgSO}_4$ )，過濾，然後濃縮。藉以乙酸乙酯接著DCM/MeOH梯度洗脫之矽膠層析純化獲得二-十四烷酸((((2-(二甲胺基)乙基)硫基)羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(120 mg)。LCMS ESI+：m/z 657.5(M + H)。

**二-十四烷酸((2-(2-(二甲胺基)乙氧基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(O104)之製法**

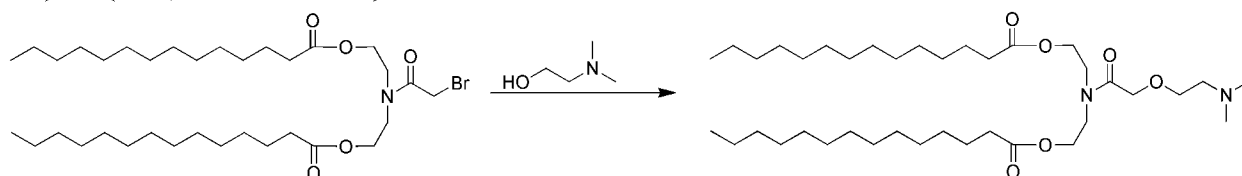


**步驟1：中間物1：二-十四烷酸((2-溴乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)之製法**



前述二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽之合成。將二-十四烷酸氮烷二基雙(乙醇-2,1-二酯)TFA鹽(1500 mg, 2.34毫莫耳)溶解於DCM(20 mL)中並置於冰浴中。添加溴乙醯溴(214  $\mu$ L, 2.46毫莫耳)接著添加三乙胺(685  $\mu$ L, 4.91毫莫耳)。移去冰浴且容許於室溫在惰性氣體覆蓋氣下攪拌該反應過夜。第二天, 以DCM稀釋至100 mL。用1M HCl(75 mL)、H<sub>2</sub>O(75 mL)、飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液(75 mL)及飽和鹽水溶液(75 mL)洗滌。以DCM(25 mL)反萃取所有水性洗液。利用MgSO<sub>4</sub>乾燥有機物, 過濾然後於真空中濃縮。藉由矽膠層析且以100%乙酸乙酯洗脫進行純化。組併並濃縮餾份獲得二-十四烷酸((2-溴乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(1220 mg)。

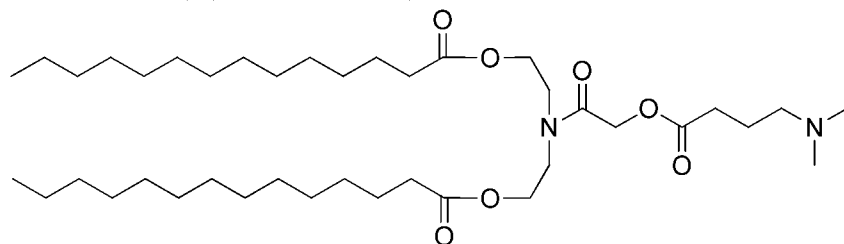
### 步驟2：O104：二-十四烷酸((2-(2-(二甲胺基)乙氧基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)之製法



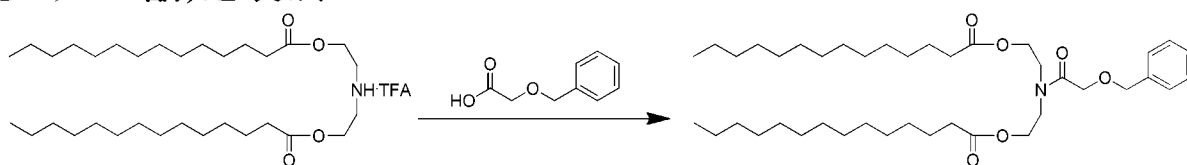
將二-十四烷酸((2-溴乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(1.22 g, 1.87毫莫耳)、N,N-二甲基乙醇胺(197  $\mu$ L, 1.96毫莫耳)、碘化鉀(6.2 mg, 0.0374毫莫耳)及無水THF(25 mL)添加至配備有攪拌棒之圓底燒瓶。使所得溶液冷卻至-40 $^{\circ}$ C。歷時5分鐘滴加DBU(588  $\mu$ L, 3.93毫莫耳)且使溶液升溫至0 $^{\circ}$ C維持2小時。濃縮該反應混合物。利用DCM溶解殘餘物, 添加1M HCl(12 mL), 接著攪拌雙相混合物15分鐘。然後, 利用PBS(pH=11)進行鹼化。分離出有機層, 乾燥

(MgSO<sub>4</sub>)，過濾然後濃縮。藉以100%乙酸乙酯接著DCM/MeOH梯度洗脫之矽膠層析純化獲得二-十四烷酸((2-(2-(二甲胺基)乙氧基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(53 mg)。LCMS ESI+：m/z 655.6 (M + H)。

### 二-十四烷酸((2-((4-(二甲胺基)丁醯基)氧基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(HEDC-M1)之製法

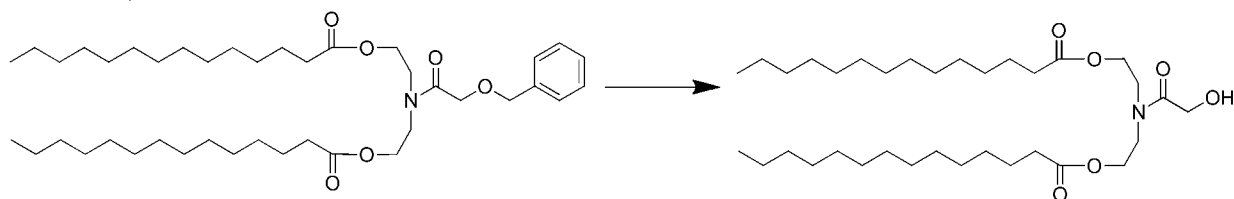


### 步驟1：中間物1：二-十四烷酸((2-(苄氧基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)之製法



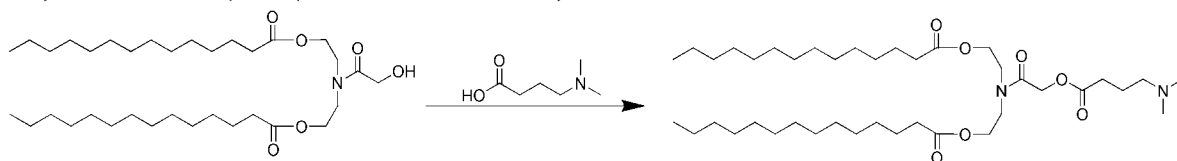
前述二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽之合成。於0-5°C下攪拌在含10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(12.5 mL)之DCM(25 mL)中之二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽。於30分鐘後，分離出有機層然後進一步利用DCM(12 mL)萃取水層。於0-5°C下攪拌已合併之有機相與MgSO<sub>4</sub>維持30分鐘，過濾，利用DCM(12 mL)洗滌。將苄氧基乙酸(402 μL，2.81毫莫耳)、EDC HCl鹽(673 mg，3.51毫莫耳)、及DMAP(29 mg，0.234毫莫耳)添加至已合併之濾液。容許於室溫下攪拌懸浮液過夜。第二天，添加H<sub>2</sub>O(25 mL)及MeOH(12 mL)且在攪拌10分鐘後分離出澄清有機相。以DCM(25 mL)萃取渾濁水相。利用MgSO<sub>4</sub>乾燥已合併之有機萃取物，過濾然後濃縮。藉以己烷/乙酸乙酯梯度洗脫之矽膠層析純化獲得二-十四烷酸((2-(苄氧基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(1.28 g)。

**步驟2：中間物2：二-十四烷酸((2-羥基乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)之製法**



將二-十四烷酸((2-(苄氧基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(1.28 g, 1.80毫莫耳)溶解於含有MeOH(20 mL)之圓底燒瓶中。對該燒瓶加蓋然後利用氫氣沖洗。添加10% Pd/C(135 mg)然後再次利用氫氣沖洗該燒瓶一次。藉由真空泵移除所有空氣且接著添加填充H<sub>2</sub>氣之8"氣球。容許於室溫下劇烈攪拌該反應。於30分鐘後，過濾(矽藻土(celite))該反應混合物，利用甲醇洗滌，濃縮至殘餘物，溶於DCM(25mL)及10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(25 mL)中。攪拌該混合物15分鐘且接著分離出有機層。利用DCM(15 mL)反萃取水性洗液。利用MgSO<sub>4</sub>乾燥已合併之有機物，過濾然後濃縮獲得二-十四烷酸((2-羥基乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(990 mg)。

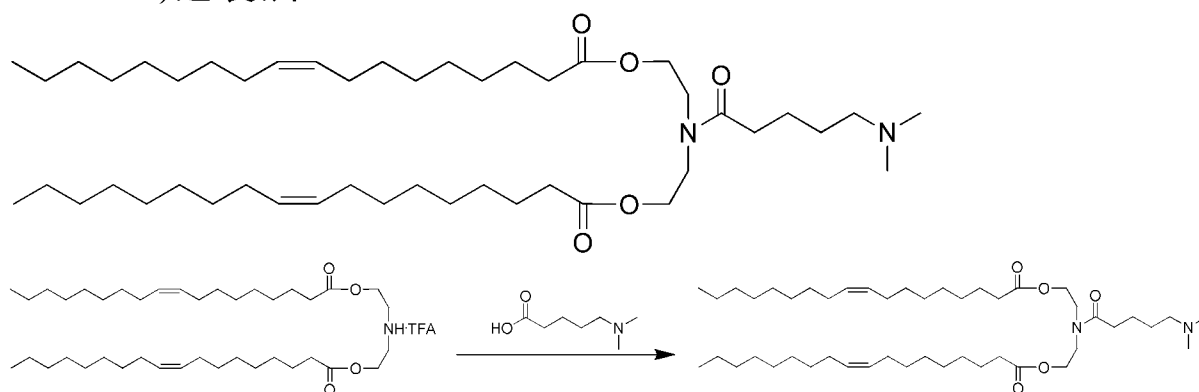
**步驟3：HEDC-M1：二-十四烷酸((2-((4-(二甲胺基)丁醯基)氧基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)之製法**



攪拌在DCM(20 mL)中之二-十四烷酸((2-羥基乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(990 mg, 1.70毫莫耳)然後添加4-二甲胺基丁酸(268 mg)、EDC HCl鹽(487 mg)及DMAP(21 mg)。容許於室溫下攪拌該懸浮液過夜。第二天，添加H<sub>2</sub>O(20mL)及MeOH(10mL)且在攪拌10分鐘之後分離出澄清有機相。以DCM(20 mL)萃取渾濁水相。利用MgSO<sub>4</sub>乾燥已合併之有機萃取物，過濾然後濃縮。藉以DCM/MeOH梯度洗

脫之矽膠層析純化粗產物。濃縮組併且經濃縮之餾份並利用DCM(25 mL)及PBS(pH=11, 25 mL)溶解。於室溫下攪拌該混合物15分鐘。然後，分離出有機相，接著再次以DCM(25 mL)萃取水相。乾燥(MgSO<sub>4</sub>)已合併之有機物，過濾，然後濃縮獲得二-十四烷酸((2-((4-(二甲胺基)丁醯基)氧基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(672 mg)。LCMS ESI+ : m/z 697.6 (M + H)。

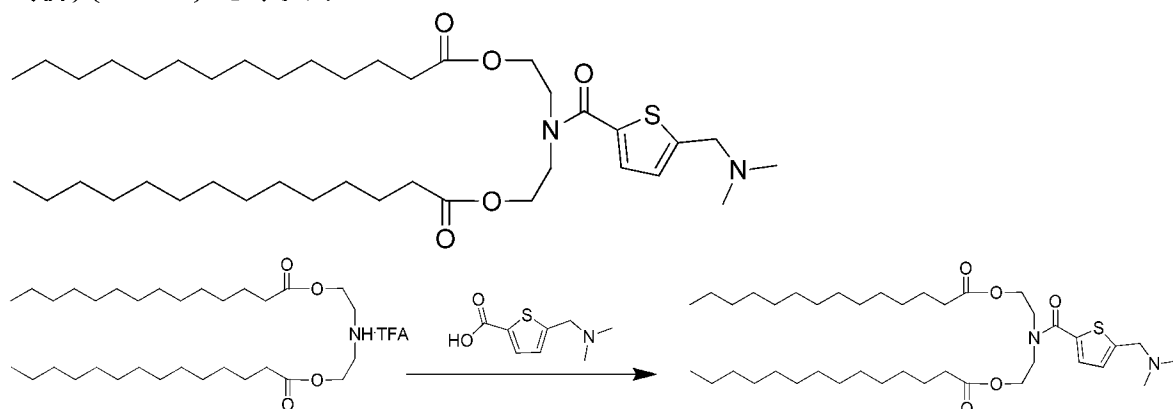
### (Z)-二油酸((5-(二甲胺基)戊醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(C104-DO)之製法



前述(Z)-二油酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽之合成。於0-5°C下攪拌在含10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(10 mL)之DCM(20 mL)中之(Z)-二油酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽(1.50 g, 2.37毫莫耳)。於30分鐘後，分離出有機相然後進一步利用DCM(10 mL)萃取水相。於0-5°C下攪拌已合併之有機相與MgSO<sub>4</sub>持續30分鐘期間，過濾然後利用DCM(15 mL)洗滌。將5-(二甲胺基)戊酸(516 mg, 2.84毫莫耳)、EDC HCl鹽(681 mg, 3.55毫莫耳)、DMAP(29 mg, 0.237毫莫耳)添加至已合併之濾液且於室溫下攪拌該懸浮液過夜，於該時段之後，形成澄清溶液。第二天，添加H<sub>2</sub>O(20 mL)及MeOH(10 mL)且在攪拌10分鐘後，分離出澄清有機相。以DCM萃取渾濁水相。乾燥(MgSO<sub>4</sub>)已合併之有機物，過濾然後濃縮。在藉以DCM/MeOH梯度洗脫之矽膠層析進行純化之

後，利用DCM (25 mL)及PBS(pH=11, 25mL)溶解經組併且經濃縮之餾份。於室溫下攪拌該混合物~10分鐘。然後，分離出有機相接著以DCM(15 mL)萃取水相。乾燥(MgSO<sub>4</sub>)已合併之有機物，過濾，然後濃縮獲得(Z)-二油酸((5-(二甲胺基)戊醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(1.10 g)。LCMS ESI+ : m/z 761.7 (M + H)。

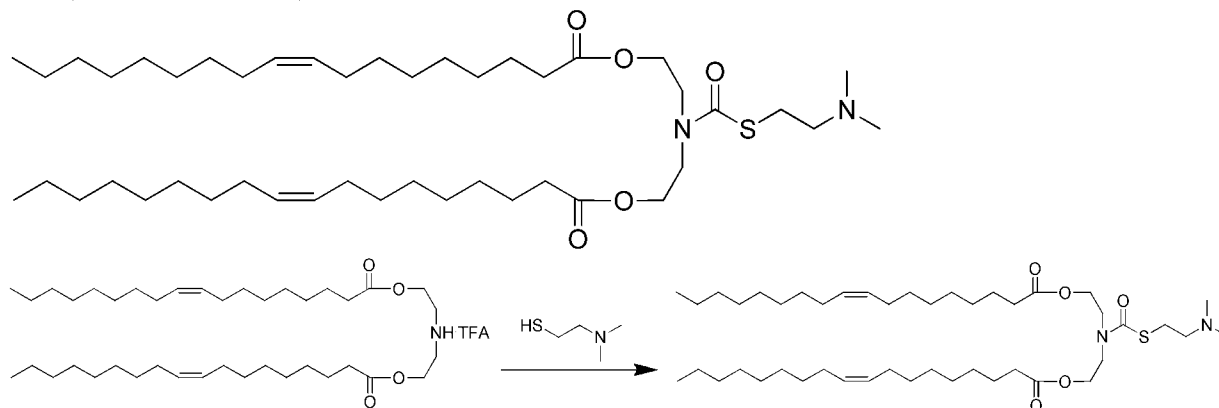
### 二-十四烷酸((5-((二甲胺基)甲基)噻吩-2-羧基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(T104)之製法



前述二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽之合成。於0-5°C下攪拌在含10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(20 mL)之DCM(20 mL)中之二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽(1004 mg, 1.57毫莫耳)。於30分鐘後，分離出有機相然後進一步利用DCM(10 mL)萃取水相。於0-5°C下利用MgSO<sub>4</sub>乾燥已合併之有機物持續30分鐘，過濾然後利用DCM(10 mL)洗滌。將((二甲胺基)甲基)噻吩-2-羧酸(350 mg, 1.89毫莫耳)、EDC HCl鹽(452 mg, 2.36毫莫耳)、及DMAP(19.2 mg, 0.157毫莫耳)添加至已合併之濾液。容許於室溫下攪拌該懸浮液過夜。第二天，添加H<sub>2</sub>O(20 mL)及MeOH(10 mL)且在攪拌10分鐘後，分離出澄清有機相。以DCM(25 mL)萃取渾濁水相。乾燥(MgSO<sub>4</sub>)已合併之有機物，過濾，然後濃縮。在藉以己烷/乙酸乙酯梯度洗脫之矽膠層析進行純化之後，利用DCM(20 mL)及PBS(pH=11, 20 mL)溶解經組併且經濃縮之餾份。於室溫下攪拌該混合物~10分鐘。然後，分離出有機相接

著再次以DCM(15 mL)萃取水相。乾燥(MgSO<sub>4</sub>)已合併之有機物持續30分鐘，過濾，利用DCM洗滌，然後濃縮獲得二-十四烷酸((5-((二甲胺基)甲基)噻吩-2-羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(482 mg)。LCMS ESI+ : m/z 693.6(M + H)。

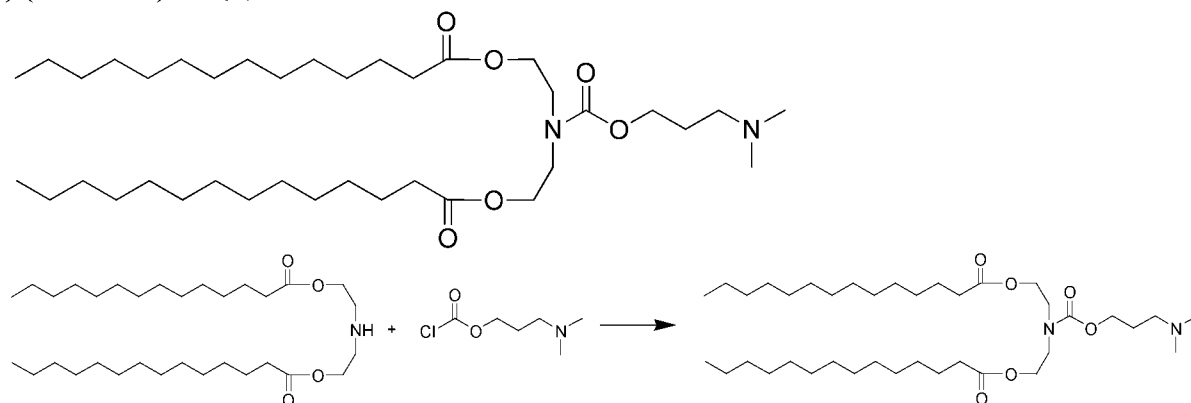
### (Z)-二油酸(((2-(二甲胺基)乙基)硫基)羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(TU104-DO)之製法



前述(Z)-二油酸((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)之合成。將(Z)-二油酸((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(4.20 g, 5.72毫莫耳)溶解於DCM(20 mL)中且在冰浴中冷卻至0°C。添加TFA(20 mL)且容許於惰性氣體覆蓋氣下攪拌該混合物20分鐘。然後，於真空中濃縮該反應混合物。將殘餘物分配在10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(20 mL)及DCM(20 mL)之間，且在冰浴中攪拌20分鐘。分離出有機層，乾燥(MgSO<sub>4</sub>)，然後過濾。將雙光氣(1.38 mL, 11.4毫莫耳)添加至在DCM中之(Z)-二油酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)物質且於室溫在惰性氣體覆蓋氣下攪拌。第二天，於真空中移除DCM及過量雙光氣。以DCM(50 mL)及三乙胺(5.2 mL, 37.2毫莫耳)溶解2-(二甲胺基)乙烷硫醇HCl鹽(4.05 g, 28.6毫莫耳)接著添加至(Z)-二油酸((羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)殘餘物。容許於室溫下攪拌該物質過夜。第二天，以DCM稀釋然後利用0.3M HCl(75 mL)、H<sub>2</sub>O(75 mL)及

10%  $K_2CO_3$  (75 mL) 洗滌。利用 DCM (25 mL) 反萃取所有水性洗液。經  $MgSO_4$  乾燥已合併之有機物，過濾然後濃縮。藉以 DCM/MeOH 梯度洗脫之矽膠層析純化獲得 (Z)-二油酸(((2-(二甲胺基)乙基)巰基)羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯) (1.90 g)。LCMS ESI+ :  $m/z$  765.7 (M + H)。

### 二-十四烷酸(((3-(二甲胺基)丙氧基)羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(CB104)之製法

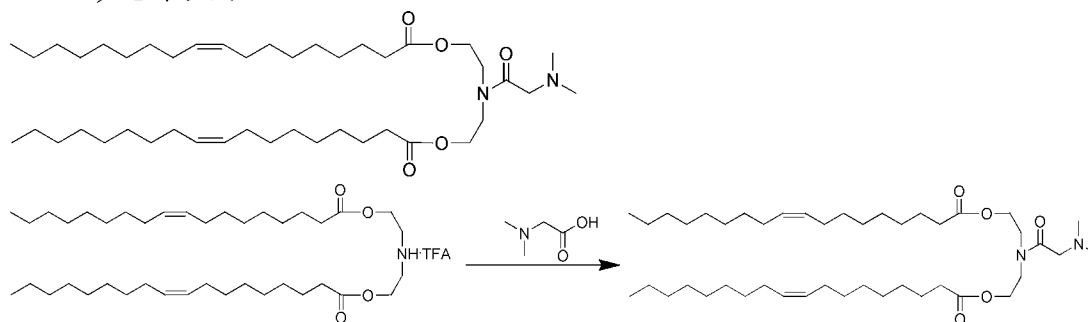


前述二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)之合成。將雙光氣 (266  $\mu$ L, 2.2 毫莫耳) 添加至在 DCM (10 mL) 中之二甲胺基丙醇 (413 mg, 4.00 毫莫耳) 且於室溫在惰性氣體覆蓋氣下攪拌 4 小時。於真空中移除 DCM 及過量雙光氣接著添加二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)。利用氫氣沖洗圓底燒瓶並添加 DCM (10 mL) 及三乙胺 (859  $\mu$ L, 6.16 毫莫耳)。容許於室溫下攪拌該物質過夜。然後以 DCM 稀釋該反應混合物且利用 0.3M HCl (75 mL)、 $H_2O$  (75 mL) 及 10%  $K_2CO_3$  (75 mL) 洗滌。利用 DCM (25 mL) 反萃取所有水性洗液。經  $MgSO_4$  乾燥已合併之有機物，過濾然後濃縮。藉以 DCM/MeOH 梯度洗脫之矽膠層析純化獲得二-十四烷酸(((3-(二甲胺基)丙氧基)羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯) (87 mg)。LCMS ESI+ :  $m/z$  655.59 (M + H)。

### 二-十四烷酸(((2-(二甲胺基)乙氧基)羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(CA104)之製法

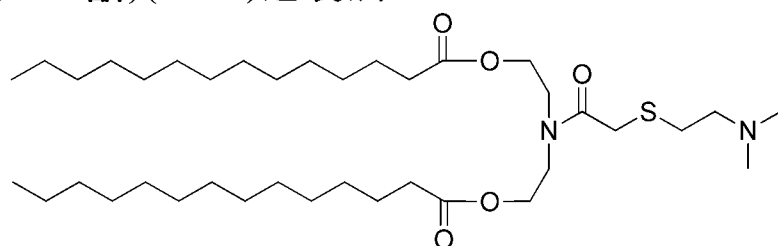


## 二-十四烷酸((2-(二甲胺基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(INT-4)之製法

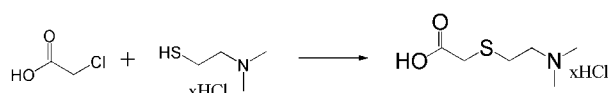


(Z)-二油酸((2-(二甲胺基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)之合成，以與*i*-Prop-DODC類似的方式製得，改用二甲基甘胺酸替代3-(二甲胺基)丙酸。QTOF MS ESI+： $m/z$  720.1 (M + H)。

## 二-十四烷酸((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)(S104)之製法



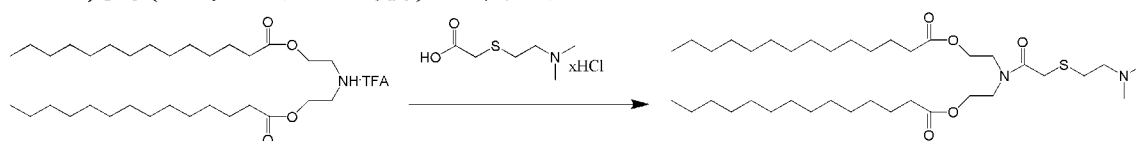
### 步驟1：中間物1：2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙酸鹽酸鹽之製法：



藉由三次排空至60毫巴維持1-2分鐘對乙醇(500 mL)除氣，然後以氮氣再增壓。添加氯乙酸(36.9 g, 0.391莫耳)且於17-20°C下攪拌5分鐘後形成澄清溶液。添加2-(二甲胺基)-乙硫醇鹽酸鹽(52.7 g, 0.372莫耳)，且於25°C下攪拌20分鐘後形成澄清溶液。歷時20分鐘分批添加固體氫氧化鈉(47.7 g, 1.19莫耳)伴隨冷卻以維持溫度低於35°C，在短時間內觀察到44°C。觀察到大多數即刻沉澱。最終加熱該反應混合物且於40°C下攪拌兩小時，在該時間點時，TLC顯示反應完成。添加矽藻土545(74 g)，然後透過G3燒結玻璃板歷時6分鐘過濾該混合物，

利用乙醇(2×105 mL)洗滌。從50°C浴蒸發已合併之渾濁濾液獲得110 g白色固體。將該固體溶解於水(250 mL)中然後使用濃HCl(5.5 mL)將pH從13.1(溫度30°C)調整至10.5(溫度31°C)，而獲得極淺黃色溶液。利用DCM(3×100 mL)洗滌水相以移除二硫化物雜質(3種洗液均有此要求)。將濃HCl添加至該水相(pH 10.7，溫度22°C)直到pH為1.4(添加57.5 mL，溫度35°C)。利用DCM(100 mL)洗滌該水相且接著濃縮至乾燥(浴溫55°C)。添加甲苯(250 mL)，將該混合物濃縮至乾燥(浴溫55°C)且重複此步驟一次而獲得溼白色固體(98 g)。將乙腈(750 mL)添加至該固體，於55°C下攪拌該混合物持續45分鐘，接著透過G3燒結玻璃板過濾。將乙腈(250 mL)添加至濾餅，於55°C下攪拌該混合物持續25分鐘，接著透過G3燒結玻璃板過濾，利用乙腈(50 mL)洗滌。濃縮已合併之濾液至300 mL，從而獲得重白色沉澱。於氮氣下冷卻該混合物及於0°C下攪拌持續30分鐘。透過G3燒結玻璃板過濾分離出該沉澱物，接著利用冷乙腈(100 mL)洗滌濾餅。於減壓下乾燥3天獲得47.0 g(63%) 2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙酸鹽酸鹽。

### 步驟2：S104：二-十四烷酸((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)之製法

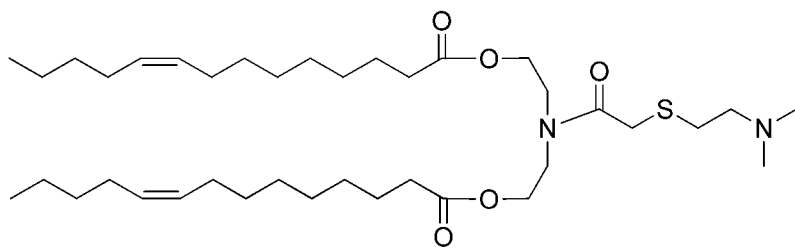


前述二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽之合成。於0-5°C下攪拌二-十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽(152 g，238毫莫耳)與DCM(2.3 L)及10%碳酸氫鉀(1.15 L)。分離出有機相且進一步利用DCM(1.15 L)萃取水相。於0-5°C下攪拌已合併之有機相與水合硫酸鎂(236 g)持續30分鐘，過濾然後利用DCM(1.15 L)洗滌。將2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙酸鹽酸鹽(57.0 g，285毫莫耳)、EDC鹽酸鹽(68.4 g，357毫莫耳)及DMAP(2.91 g，23.8毫莫耳)添加至已合併之濾

液，然後於環境溫度下攪拌稀懸浮液過夜，於該時段之後，形成澄清溶液。添加水(2.3 L)及甲醇(460 mL)及在攪拌10分鐘之後，分離出澄清有機相。以DCM(575 mL)萃取渾濁水相(pH 3.0)。濃縮已合併之有機萃取物，從而獲得143 g呈鹽酸鹽之粗產物。將該粗產物(142.6 g)轉移至含有DCM(500 mL)之蒸餾瓶，並添加乙酸乙酯(1 L)。於大氣壓下將該溶液加熱至蒸餾，且持續蒸餾歷時70分鐘以獲得76°C溫度之殘餘物。添加乙酸乙酯(800 mL)達成1.4 L之總體積，然後添加乙醇(70 mL)。於50°C下使該澄清溶液冷卻至37°C且添加晶種。於37-35°C歷時10分鐘觀察到開始顯著結晶，使該懸浮液冷卻且於0°C下攪拌過夜然後藉由過濾分離出沉澱，接著利用冷乙酸乙酯(210 mL)洗滌。在環境溫度下於油泵真空中歷時4.5小時乾燥至恆重，獲得134 g呈鹽酸鹽白色結晶固體之再結晶物質。

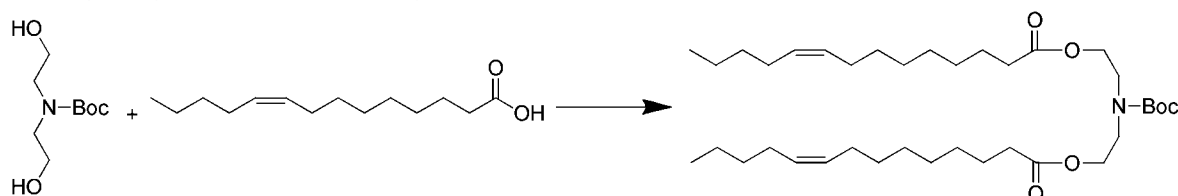
將磷酸三鉀(85 g, 0.40莫耳)及磷酸氫二鉀(226 g, 1.30莫耳)添加至純水(1.7 L)，且使pH 10.9之所形成溶液冷卻至18-20°C。添加DCM(1.3 L)及再結晶S104鹽酸鹽(133.0 g, 0.188莫耳)，且攪拌該混合物持續10分鐘。以中等速率(歷時35分鐘)分離出澄清有機相，接著進一步利用DCM(650 mL)萃取渾濁水相。攪拌已合併之有機相與水合硫酸鎂(65 g)持續40分鐘，然後過濾該混合物，利用DCM(200 mL)洗滌。於減壓(降至20毫巴，於該壓力下，持續蒸發1小時)下，藉由50°C水浴蒸發已合併之濾液。再於油泵真空下藉由15-20°C水浴蒸發，從而獲得126 g部分固化油。-20°C冷卻浴中冷卻達成完全固化，且於-20°C在真空下乾燥兩天之後，吾人獲得126 g二-十四烷酸((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)，亦稱為S104。HPLC顯示98.1%純度。QTOF MS ESI+ :  $m/z$  671.6 (M + H)。

**(9Z,9'Z)-雙(十四烷-9-烯酸)((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二基)酯(S104-DMO)之製法**



**步驟1：中間物1：(9Z,9'Z)-雙(十四烷-9-烯酸)((第三丁氧基羰基)**

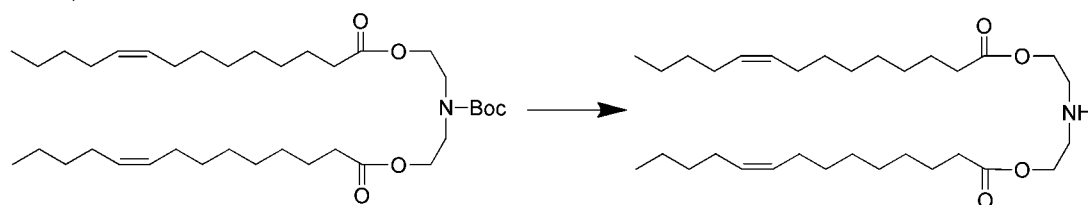
**氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二基)酯之製法**



於環境溫度下，在經惰性氣體沖洗之圓底燒瓶中，將N-Boc-二乙醇胺(454 mg, 2.21毫莫耳)、肉豆蔻油酸(1000 mg, 4.42毫莫耳)及DMAP(54 mg, 0.442毫莫耳)溶解於DCM(25 mL)且置於水浴中。歷時5分鐘分3批添加EDC HCl鹽(932 mg, 4.86毫莫耳)。容許於室溫在惰性氣體覆蓋氣下攪拌反應過夜。第二天，添加H<sub>2</sub>O(25 mL)且攪拌10分鐘。分離出有機層然後進一步利用DCM(50 mL)萃取水層。乾燥(MgSO<sub>4</sub>)已合併之有機物10分鐘，過濾然後濃縮。藉以己烷/乙酸乙酯梯度洗脫之矽膠層析純化獲得(9Z,9'Z)-雙(十四烷-9-烯酸)((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二基)酯(1.10 g)。

**步驟2：中間物2：(9Z,9'Z)-雙(十四烷-9-烯酸)氮烷二基雙(乙烷-**

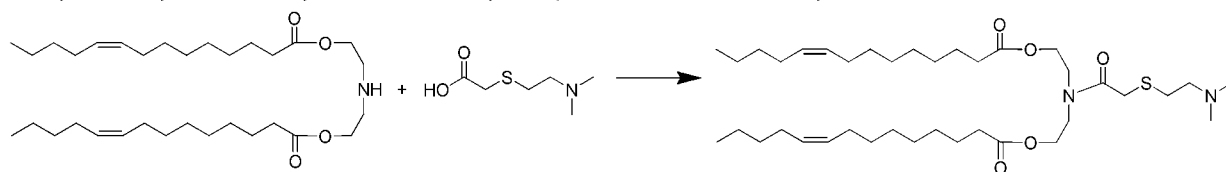
**2,1-二基)酯之製法**



將DCM(10 mL)添加至含於圓底燒瓶中之(9Z,9'Z)-雙(十四烷-9-烯酸)((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二基)酯(1100 mg, 1.77毫莫耳)並置於冰浴中。添加TFA(10 mL)且容許該混合物攪拌20分鐘。然後濃縮該反應混合物。將甲苯添加至殘餘物以助於共沸除去過

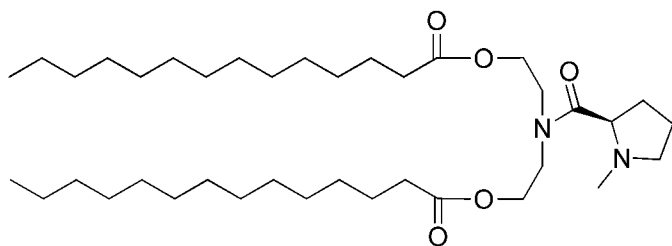
量的TFA。將該殘餘物回置於冰浴中且添加PBS(pH=11, 25mL)及DCM(25 mL)。攪拌該混合物15分鐘且接著分離出有機層。以DCM(10 mL)萃取渾濁水層。於0°C下乾燥(MgSO<sub>4</sub>)已合併之有機物維持15分鐘，過濾然後濃縮獲得(9Z,9'Z)-雙(十四烷-9-烯酸)氮烷二基雙(乙烷-2,1-二基)酯(923 mg)。

**步驟3：S104-DMO：(9Z,9'Z)-雙(十四烷-9-烯酸)((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二基)酯之製法**

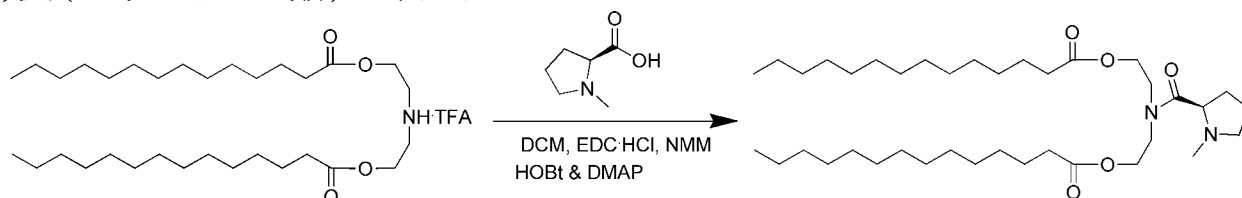


將(9Z,9'Z)-雙(十四烷-9-烯酸)氮烷二基雙(乙烷-2,1-二基)酯(923 mg, 1.77毫莫耳)、2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙酸(346 mg, 2.12毫莫耳)及EDC HCl鹽(509 mg, 2.66毫莫耳)之混合物懸浮於DCM(10 mL)中。添加DMAP(21.6 mg, 0.177毫莫耳)且容許於室溫下攪拌該混合物過夜。第二天，添加H<sub>2</sub>O(10 mL)及MeOH(10 mL)且在攪拌10分鐘後，分離出澄清有機相。以DCM(2×20 mL)萃取渾濁水相。利用MgSO<sub>4</sub>乾燥已合併之有機萃取物，過濾然後濃縮。在藉以DCM/MeOH洗脫之矽膠層析純化之後，利用DCM(25 mL)及PBS(pH=11, 25 mL)溶解經組併且經濃縮之餾份。於室溫下攪拌該混合物~10分鐘。然後，分離出有機相接著再次以DCM(2×15 mL)萃取水相。乾燥(MgSO<sub>4</sub>)已合併之有機相，過濾，然後濃縮獲得(9Z,9'Z)-雙(十四烷-9-烯酸)((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二基)酯(589 mg)。LCMS ESI+：m/z 667.6 (M + H)。

**(R)-二-十四烷酸((1-甲基吡咯啉-2-羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二基)酯(Pro-DC)之製法**

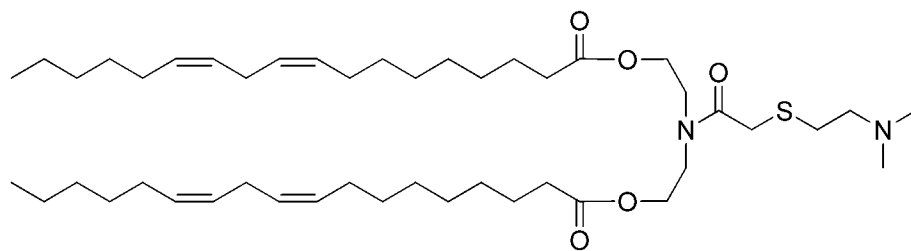


**步驟1：Pro-DC：(R)-二-二十四烷酸((1-甲基吡咯啉-2-羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)之製法**

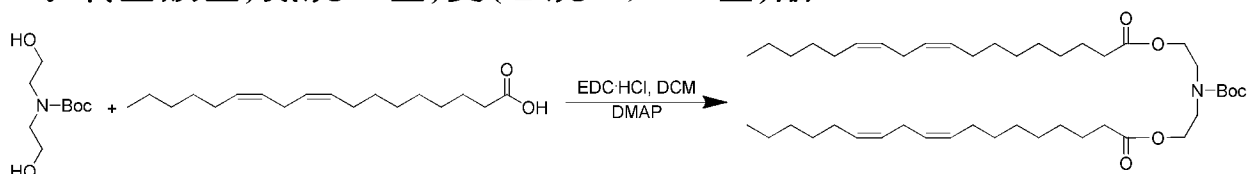


前述二-二十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽之合成。攪拌二-二十四烷酸氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)TFA鹽(1000 mg, 1.56毫莫耳)與DCM(10 mL)並添加N-甲基-L-脯氨酸(228 mg, 1.77毫莫耳)、HOBT·H<sub>2</sub>O(239 mg, 1.77毫莫耳)。添加NMM (365 μL, 3.32毫莫耳)且溶液幾乎變成澄清。添加含EDC鹽酸鹽(518 mg, 2.70毫莫耳)、NMM(257 μL, 2.34毫莫耳)及DMAP(19 mg, 0.156毫莫耳)之DCM(10 mL)懸浮液且於環境溫度下攪拌該混合物約12小時，於該時段後形成澄清溶液。此後，以DCM(50 mL)稀釋該混合物且利用10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液(60 mL)洗滌。利用MgSO<sub>4</sub>乾燥有機物，過濾然後濃縮。藉以(0-10)%甲醇的DCM溶液梯度洗脫之矽膠層析純化所得粗製化合物獲得(R)-二-二十四烷酸((1-甲基吡咯啉-2-羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二酯)。LCMS ESI+：m/z 637.6 (M + H)。

**(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-雙(十八烷-9,12-二烯酸)((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二基)酯(S104-DLin)之製法**

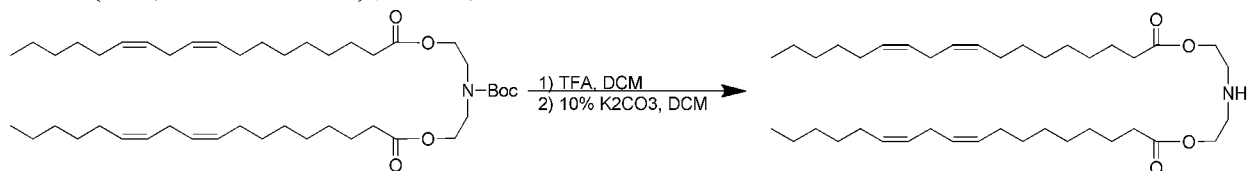


**步驟 1：中間物 1：(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-雙(十八烷-9,12-二烯酸)  
((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二基)酯**



將N-Boc-二乙醇胺(5 g, 24.4毫莫耳)、亞麻油酸(14.4 g, 51.2毫莫耳)溶解於DCM(100 mL)中。添加EDC HCl鹽(10.3 g, 53.7毫莫耳)接著添加DMAP(596 mg, 4.88毫莫耳)。容許於室溫在惰性氣體覆蓋氣下攪拌該反應約12小時。此後，添加50 mL水及50 mL甲醇，且攪拌該混合物10分鐘。分離出有機層且進一步以DCM(150 mL)萃取水層。乾燥(MgSO<sub>4</sub>)已合併之有機物10分鐘，過濾然後濃縮。藉以己烷/乙酸乙酯梯度洗脫之矽膠層析純化獲得(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-雙(十八烷-9,12-二烯酸)((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二基)酯(15.9 g)。

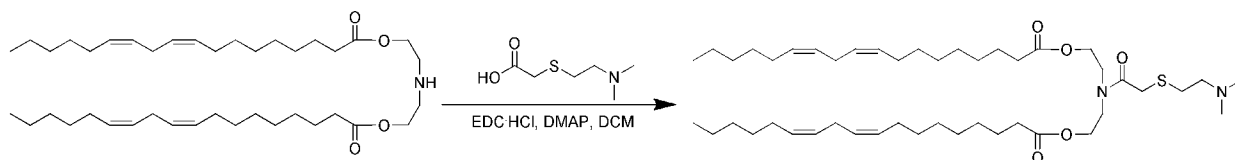
**步驟 2：中間物 2：(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-雙(十八烷-9,12-二烯酸)氮  
烷二基雙(乙烷-2,1-二基)酯之製法**



將DCM(50 mL)添加至含於圓底燒瓶中之(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-雙(十八烷-9,12-二烯酸)((第三丁氧基羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二基)酯(5.33 g, 7.30毫莫耳)並置於冰浴中。添加TFA(50 mL)且容許攪拌該

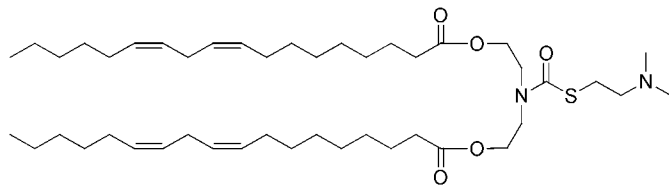
混合物30分鐘。然後濃縮該反應混合物。將甲苯添加至殘餘物以助於共沸除去過量TFA。將該殘餘物回置於該冰浴中並添加10%  $K_2CO_3$  (50 mL) 及DCM(50 mL)。攪拌該混合物15分鐘並分離出有機層。以DCM(20 mL)萃取渾濁水層。乾燥( $MgSO_4$ )已合併之有機物，過濾然後濃縮獲得(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-雙(十八烷-9,12-二烯酸)氮烷二基雙(乙烷-2,1-二酯)(定量)。

**步驟3：S104-DLin：(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-雙(十八烷-9,12-二烯酸)((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二基)酯之製法**

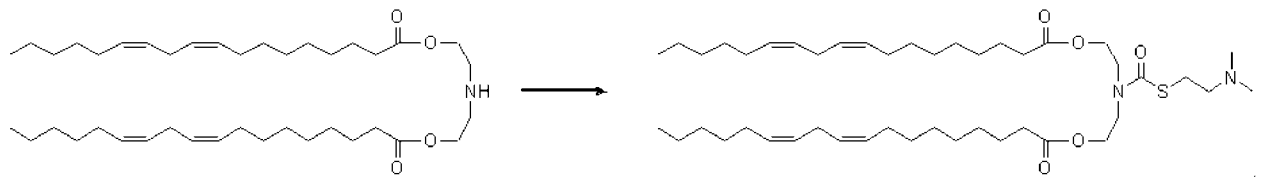


將(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-雙(十八烷-9,12-二烯酸)氮烷二基雙(乙烷-2,1-二基)酯(4.68 g, 7.30毫莫耳)、2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙酸(1.43 g, 8.76毫莫耳)及EDC HCl鹽(2.10 g, 10.95毫莫耳)之混合物懸浮於DCM(100 mL)中。添加DMAP (89 mg, 0.73毫莫耳)，於室溫下攪拌12小時。添加水及甲醇各50 mL且在攪拌10分鐘後，分離出澄清有機相。以DCM(2×20 mL)萃取渾濁水相並利用PBS(pH=11, 100mL)洗滌已合併之有機萃取物。利用 $MgSO_4$ 乾燥產物，過濾然後濃縮。藉以在DCM中之MeOH梯度洗脫之矽膠層析進行純化。組併並濃縮餾份，獲得(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-雙(十八烷-9,12-二烯酸)((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二基)酯(4.3 g)。LCMS ESI+：m/z 775.9 (M + H)。

**(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-雙(十八烷-9,12-二烯酸)((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)羰基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二基)酯(TU104-DLin)之製法**



**步驟1：TU104-Dlin：(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-雙(十八烷-9,12-二烯酸)  
(((2-(二甲胺基)乙基)硫基)羰基)氮烷二基雙(乙烷-2,1-二基)酯之製法**



前述(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-雙(十八烷-9,12-二烯酸)氮烷二基雙(乙烷-2,1-二基)酯之合成。將氯甲酸三氯甲酯(亦稱雙光氣)(740  $\mu\text{L}$ )添加至在無水DCM(40 mL)中之(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-雙(十八烷-9,12-二烯酸)氮烷二基雙(乙烷-2,1-二基)酯(2.6 g)溶液且於室溫下在氬氣覆蓋氣中攪拌12小時。於真空中移除DCM及過量雙光氣。接著添加2-(二甲胺基)乙烷硫醇HCl鹽(2.9 g)、DCM(40 mL)及三乙胺(3.7 mL)。16小時後，於室溫下以DCM稀釋反應混合物然後用10%  $\text{K}_2\text{CO}_3$ (75 mL)洗滌，乾燥( $\text{MgSO}_4$ )，過濾，然後濃縮。藉以乙酸乙酯接著DCM/MeOH梯度洗脫之矽膠層析來進行純化，從而獲得(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-雙(十八烷-9,12-二烯酸)(((2-(二甲胺基)乙基)硫基)羰基)氮烷二基雙(乙烷-2,1-二基)酯(850 mg)。LCMS ESI+：m/z 761.9 (M + H)。

含非diVA siRNA之脂質體之形成。將可離子化脂質、DOPE、膽固醇、及PEG共軛之脂質以~4.4 mg/mL之最終重量濃度溶解於無水EtOH(200 proof)中。將siRNA以~0.26 mg/mL濃度溶解於檸檬酸鹽緩衝液中且將溫度調整至35-40 $^{\circ}\text{C}$ 。然後將乙醇/脂質混合物添加至含siRNA緩衝液同時攪拌以自發形成負載siRNA之脂質體。將脂質與

siRNA合併以達成7:1至14:1(wt:wt)之最終總脂質對siRNA比。利用10×體積之PBS濾洗負載siRNA之脂質體以移除乙醇並進行緩衝液之交換。透過0.22  $\mu\text{m}$ 滅菌級過濾器過濾最終產物以減少生物負載量。此過程獲得具有平均粒徑為40-100 nm、PDI<0.2、及>85% RNA囊封(包埋)效率之脂質體。

與diVA共同溶解的含siRNA脂質體之形成。利用上述方法製備siRNA-diVA-脂質體配方。使diVA-PEG-diVA係與其他脂質(可離子化脂質、DOPE、膽固醇、及PEG共軛之脂質)共同溶解於無水乙醇中，再添加至含siRNA緩衝液。diVA-PEG-diVA之莫耳含量範圍為0.1至5莫耳%。此過程會產生具有平均粒徑為40-100 nm、PDI<0.2、及>85%包埋效率之脂質體。

具有可離子化及陽離子脂質之含siRNA脂質體之形成。利用上述方法製備siRNA-diVA-脂質體配方及siRNA-脂質體配方。使陽離子脂質與其他脂質(可離子化脂質、DOPE、膽固醇、PEG共軛之脂質、及diVA-PEG-diVA)共同溶解於無水乙醇中，再添加至含siRNA緩衝液。陽離子脂質之莫耳含量範圍為5至40莫耳%。此過程會產生具有平均粒徑為40-100 nm、PDI<0.2、及>85%包埋效率之脂質體。

### **活體外(pHSC, gp46 KD, 20 nM)有效性**

在96孔盤中，以由可離子化脂質配方C104、可離子化脂質配方Tu104、或具有不同比率可離子化脂質(C104:Tu104)之組合配方中任一者組成之配方與PHSC培養。於30分鐘後，將培養基改為新製生長培養基。48小時後，細胞裂解且藉由定量RT-PCR(TaqMan®)試驗測得gp46及GAPDH mRNA含量，且將gp46含量與GAPDH含量標準化。經標準化之gp46含量表示為空白對照細胞之百分比。誤差棒指示標準偏差(n=3)。結果繪示於圖1中。如該等結果所證實，觀察到本發明之兩種可離子化脂質之組合會導致協同減弱基因表現。

利用其他可離子化脂質:可離子化脂質及可離子化脂質:陽離子脂質組合進行類似實驗。S104-DO:Tu104-DO組合之結果繪示於圖2中。HEDODC:Tu104組合之結果繪示於圖3中。可離子化脂質及可離子化:陽離子脂質兩者之組合再次導致協同減弱基因表現。

#### **活體內(DMNQ)有效性:**

在短期肝損傷模型(稱為快速模型或DMNQ)中評估標靶配方之活體內活性。於該模型中，藉由以肝毒劑諸如二甲基亞硝胺(DMN)之處理誘發之短期肝損傷伴隨gp46 mRNA含量增加。為了誘發該等變化，連續六天對雄性斯潑雷格-多雷(Sprague-Dawley)大鼠經腹膜內注射DMN。於DMN處理期結束時，基於個別動物體重將動物隨機分組。在最後注射DMN一小時後，以單次IV劑量投與配方。24小時後，切除肝葉且藉由定量RT-PCR(TaqMan)試驗測定gp46及MRPL19 mRNA含量二者。將gp46之mRNA含量與MRPL19含量標準化。結果繪示於圖4中。就單次0.5 mg/kg動物體重劑量之囊封siRNA而言，可離子化:陽離子脂質之若干組合達成基因表現減弱50%。

#### **活體外毒理學數據、活體外細胞毒性(HepG2，200 nM)**

在HepG2細胞毒性試驗中，將20莫耳% S104加入本發明配方來提高細胞存活率，自27%提高至52%。

配方	存活率 %
40:30:25:5:2(HEDC:DOPE:膽固醇:Peg-脂質:DiVA)	27±5.3%
20:20:30:25:5:2(HEDC:S104:DOPE:膽固醇:Peg-脂質:DiVA)	52±10%

#### **HepG2細胞毒性試驗說明：**

於補充10% FBS(Hyclone，Logan，Utah，目錄號SH30910)之MEM/EBSS(Hyclone，Logan，Utah，目錄號SH30024.01)中培養

HepG2細胞(源自人肝細胞癌之貼附細胞系)。以5000個細胞/孔將HepG2細胞接種於96-孔Optilux黑板(BD Falcon, 目錄號BD353220)中過夜。將配方添加至各孔至最終指定siRNA濃度(n=3)。在添加配方48小時後,使用CellTiter-Glo發光細胞存活率試驗套組(Promega, 目錄號G7572),遵循製造商使用說明測定細胞存活率。在透明度發光微量分析盤讀取器(502-Biotek, Winooski, Vermont)上測定化學發光信號。基於經過空白處理孔標準化之經配方處理之孔中之化學發光信號%計算存活率。

### 活體內毒理學數據

如毒性研究中所示,本發明之HEDC:S104(20:20)配方案具特佳耐受性。當配方分別以高達25 mg/kg及12 mg/kg之劑量經靜脈內注射於大鼠及猴時未觀察到毒性,此點被熟習此項技藝者認為是優異的。

利用本發明配方之轉染:

LX-2及pHSC之轉染方法相同。以所預期濃度將本發明之脂質體配方或脂複合體配方與生長培養基混合。取100 µl該混合物添加至96孔盤中之細胞且在具有5% CO<sub>2</sub>之培養箱中於37°C下培養該等細胞30分鐘。30分鐘後,將培養基改為新製生長培養基。在轉染48小時後,使用細胞溶胞試劑(Applied Biosystems)依製造商使用說明處理細胞。

用於測定HSP47 mRNA表現之定量(q)RT-PCR

HSP47及GAPDH TaqMan®試驗及一步式RT-PCR預混液(master mix)購自Applied Biosystems。各PCR反應包含以下組成:一步式RT-PCR混合液5 µl、TaqMan® RT酶混合液0.25 µl、TaqMan®基因表現試驗探針(HSP47)0.25 µl、TaqMan®基因表現試驗探針(GAPDH) 0.5 µl、無RNA酶水3.25 µl、細胞溶胞產物0.75 µl,總體積為10 µl。使用GAPDH作為內源性對照組來進行HSP47 mRNA含量之相對定量。於ViiA 7即時PCR系統(Applied Biosciences)中進行定量RT-PCR。將所有

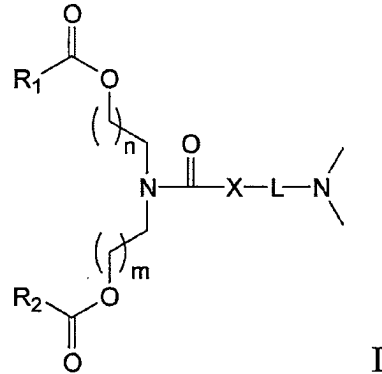
值與空白轉染細胞之平均HSP47表現標準話且表示為HSP47表現相對於空白之百分比。

**【符號說明】**

無

## 申請專利範圍

1. 一種式I之可離子化脂質化合物，



或其醫藥上可接受的鹽形式，



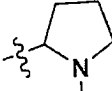
其中：

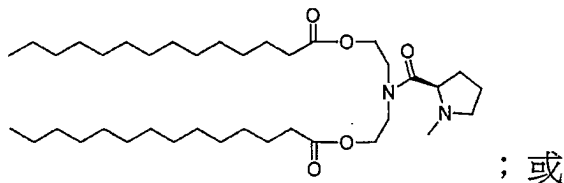
n與m獨立地為1、2、3、或4；

R<sub>1</sub>與R<sub>2</sub>獨立地為C<sub>10-18</sub>烷基或C<sub>12-18</sub>烯基；

(i) X為-CH<sub>2</sub>-、S、O、N，或不存在；及



L為-S-C<sub>1-4</sub>伸烷基、-O-C(O)-C<sub>1-4</sub>伸烷基、

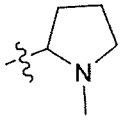
-S(O)<sub>2</sub>-C<sub>1-4</sub>伸烷基、或 、或當L與  一起形成  時，該化合物具有下列結構：



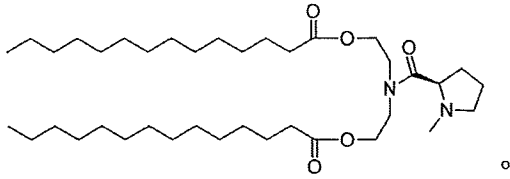
(ii) X為S或N；及

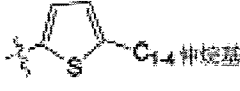

L為C<sub>1-4</sub>伸烷基、-S-C<sub>1-4</sub>伸烷基、-O-C<sub>1-4</sub>伸烷基、-O-C(O)-C<sub>1-4</sub>伸烷基、

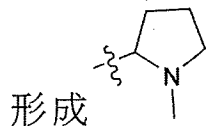
-S(O)<sub>2</sub>-C<sub>1-4</sub>伸烷基、或 、或當L與  一起形成



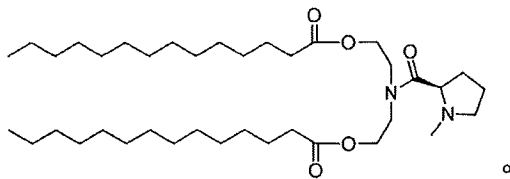
時，該化合物具有下列結構：

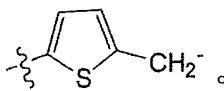


2. 如請求項1之化合物，其中n與m為1。
3. 如請求項1之化合物，其中n與m為2。
4. 如請求項1之化合物，其中X不存在。
5. 如請求項4之化合物，其中L為-S-C<sub>1-4</sub>伸烷基、-O-C(O)-C<sub>1-4</sub>伸烷基、-S(O)<sub>2</sub>-C<sub>1-4</sub>伸烷基。
6. 如請求項4之化合物，其中L為 、或當L與  一起

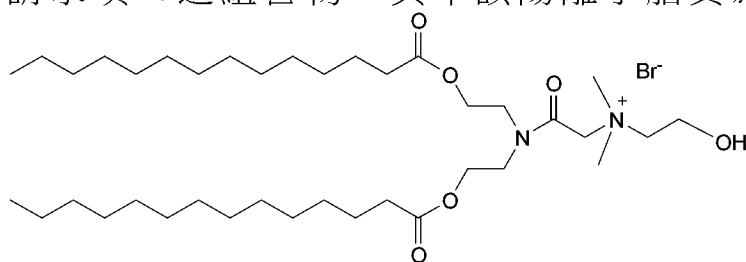


形成 時，該化合物具有下列結構：



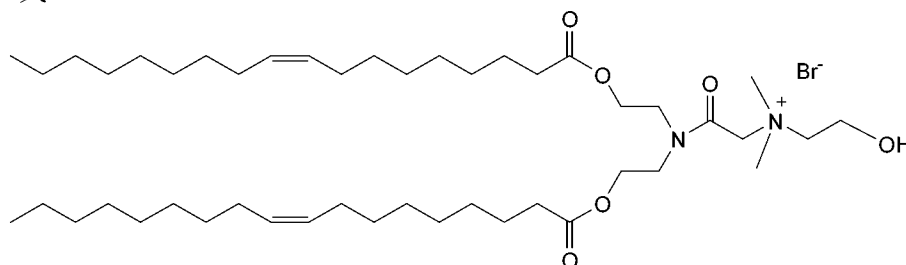
7. 如請求項6之化合物，其中L為 。
8. 如請求項1之化合物，其中X為-CH<sub>2</sub>-。
9. 如請求項8之化合物，其中L為-S-C<sub>1-4</sub>伸烷基。
10. 如請求項9之化合物，其中L為-S-CH<sub>2</sub>-或-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-。
11. 如請求項8之化合物，其中L為-S(O)<sub>2</sub>-C<sub>1-4</sub>伸烷基。
12. 如請求項11之化合物，其中L為-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-。
13. 如請求項8之化合物，其中L為-O-C(O)-C<sub>1-4</sub>伸烷基。
14. 如請求項13之化合物，其中L為-O-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-。
15. 如請求項1之化合物，其中X為S。
16. 如請求項15之化合物，其中L為C<sub>1-4</sub>伸烷基。

17. 如請求項16之化合物，其中L為 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 。
18. 如請求項1之化合物，其中X為O。
19. 如請求項1之化合物，其中 $\text{R}_1$ 與 $\text{R}_2$ 各自為 $\text{C}_{10-18}$ 烷基。
20. 如請求項19之化合物，其中 $\text{R}_1$ 與 $\text{R}_2$ 各自為 $\text{C}_{13}$ 烷基。
21. 如請求項1之化合物，其中 $\text{R}_1$ 與 $\text{R}_2$ 各自為 $\text{C}_{12-18}$ 烯基。
22. 如請求項21之化合物，其中 $\text{R}_1$ 與 $\text{R}_2$ 各自為 $\text{C}_{13-17}$ 烯基。
23. 如請求項22之化合物，其中 $\text{R}_1$ 與 $\text{R}_2$ 各自為油烯基或亞麻烯基。
24. 一種組合物，其包含含有如請求項1之可離子化脂質化合物之脂質分子。
25. 如請求項24之組合物，其中該化合物為該脂質分子之5至50莫耳%。
26. 如請求項25之組合物，其包含兩種如請求項1至23中任一項之化合物，且其中該兩種化合物之莫耳比為約10:30至約30:10。
27. 如請求項25之組合物，其進一步包含陽離子脂質。
28. 如請求項27之組合物，其中該陽離子脂質為



HEDC

或



HEDODC。

29. 如請求項27之組合物，其中該陽離子脂質為該脂質分子之5至40莫耳%。

30. 如請求項29之組合物，其中該可離子化脂質化合物與該陽離子脂質之莫耳比為5:35至35:5。
31. 如請求項24之組合物，其進一步包含液體介質。
32. 如請求項31之組合物，其中該液體介質適於注射至活生物體中。
33. 如請求項31之組合物，其中該液體介質包括有機溶劑。
34. 如請求項31之組合物，其中該液體介質包括水及有機溶劑。
35. 如請求項24之組合物，其進一步包含非水性介質。
36. 如請求項24之組合物，其進一步包含至少一種磷脂。
37. 如請求項24之組合物，其進一步包含至少一種PEG共軛之脂質。
38. 一種藥物載劑，其包含如請求項24之組合物、及結構式(類視色素)<sub>n</sub>-連接子-(類視色素)<sub>n</sub>之化合物，其中n=0、1、2或3；且其中該連接子包括聚乙二醇(PEG)或類PEG分子。
39. 如請求項38之藥物載劑，其進一步包含siRNA分子。
40. 一種醫藥配方，其包含如請求項39之藥物載劑及醫藥上可接受的載劑或稀釋劑。
41. 如請求項40之醫藥配方，其中該siRNA係經脂質體囊封。
42. 一種輸送治療劑至細胞之活體外方法，該方法包括使該細胞與如請求項40或41之醫藥配方接觸，藉此輸送治療劑至該細胞。