



(21)申請案號：111116949

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 05 月 05 日

(51)Int. Cl.：

C07C219/06 (2006.01)

C07C327/32 (2006.01)

A61K31/713 (2006.01)

A61K47/18 (2006.01)

A61K47/20 (2006.01)

A61K9/127 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P29/00 (2006.01)

(30)優先權：2021/05/06

美國

63/185,303

(71)申請人：美商亞克圖羅斯醫療公司 (美國) ARCTURUS THERAPEUTICS, INC. (US)

美國

(72)發明人：拉賈潘 庫馬爾 RAJAPPAN, KUMAR (US)；坦尼斯 史蒂文 TANIS, STEVEN

(US)；薩吉 阿密特 SAGI, AMIT (IL)；卡瑪利 普莉亞 KARMALI, PRIYA

PRAKASH (US)

(74)代理人：林志剛

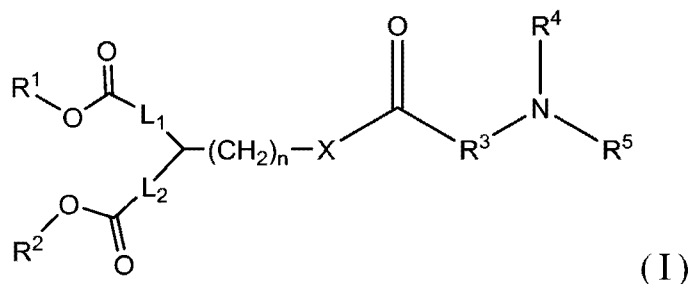
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：75 項 圖式數：0 共 138 頁

(54)名稱

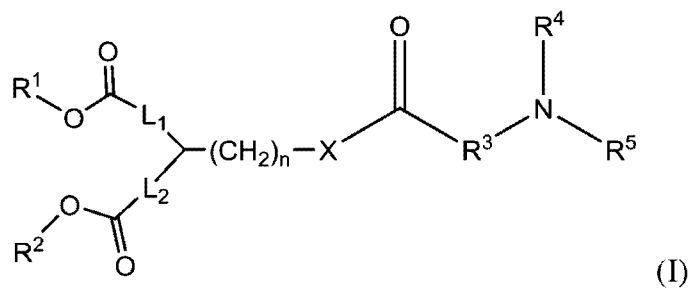
用於RNA遞送之可離子化陽離子脂質

(57)摘要

本揭示案闡述式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽：

其中：R¹及R²各自獨立地係(CH₃(CH₂)_m)₂CH-、(CH₃(CH₂)_m)(CH₃(CH₂)_{m-1})CH、(CH₃(CH₂)_m)(CH₃(CH₂)_{m-2})CH、(CH₃(CH₂)_m)₂CHCH₂-或(CH₃(CH₂)_m)(CH₃(CH₂)_{m-1})CHCH₂-，其中m係4-11；L¹及L²各自獨立地係不存在、直鏈C₁₋₅伸烷基或(CH₂)_p-O-(CH₂)_q，其中p及q各自獨立地係1-3；R³係視情況地經一或兩個甲基取代之直鏈C₂₋₅伸烷基；R⁴及R⁵各自獨立地係H或C₁₋₆烷基；X係O或S；且n係0-2。

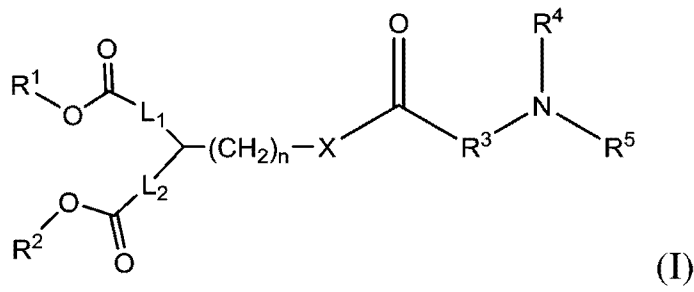
The present disclosure describes compounds of Formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt thereof:



wherein: R^1 and R^2 are each independently $(CH_3(CH_2)_m)_2CH-$, $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-1})CH$, $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-2})CH$, $(CH_3(CH_2)_m)_2CHCH_2-$, or $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-1})CHCH_2-$, wherein m is 4-11; L^1 and L^2 are each independently absent, a linear C_{1-5} alkylene, or $(CH_2)_p-O-(CH_2)_q$, wherein p and q are each independently 1-3; R^3 is a linear C_{2-5} alkylene optionally substituted with one or two methyl groups; R^4 and R^5 are each independently H or C_{1-6} alkyl; X is O or S; and n is 0-2.

特徵化學式：

式 (I)





【發明摘要】

【中文發明名稱】

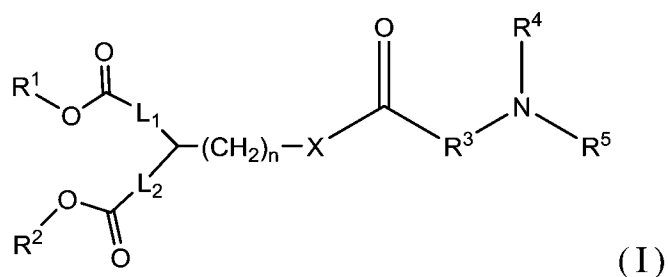
用於 R N A 遞送之可離子化陽離子脂質

【英文發明名稱】

IONIZABLE CATIONIC LIPIDS FOR RNA DELIVERY

【中文】

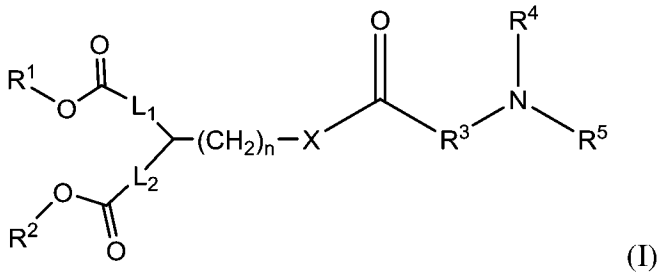
本揭示案闡述式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽：



其中： R^1 及 R^2 各自獨立地係 $(CH_3(CH_2)_m)_2CH-$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-1})CH$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-2})CH$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)_2CHCH_2-$ 或 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-1})CHCH_2-$ ，其中 m 係4-11； L^1 及 L^2 各自獨立地係不存在、直鏈 C_{1-5} 伸烷基或 $(CH_2)_p-O-(CH_2)_q$ ，其中 p 及 q 各自獨立地係1-3； R^3 係視情況地經一或兩個甲基取代之直鏈 C_{2-5} 伸烷基； R^4 及 R^5 各自獨立地係H或 C_{1-6} 烷基； X 係O或S；且 n 係0-2。

【 英文 】

The present disclosure describes compounds of Formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt thereof:

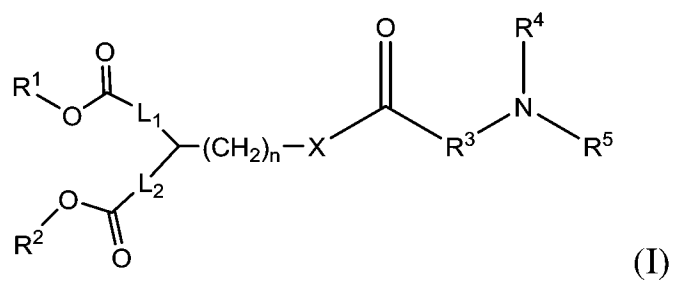


wherein: R^1 and R^2 are each independently $(CH_3(CH_2)_m)_2CH-$, $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-1})CH$, $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-2})CH$, $(CH_3(CH_2)_m)_2CHCH_2-$, or $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-1})CHCH_2-$, wherein m is 4-11; L^1 and L^2 are each independently absent, a linear C_{1-5} alkylene, or $(CH_2)_p-O-(CH_2)_q$, wherein p and q are each independently 1-3; R^3 is a linear C_{2-5} alkylene optionally substituted with one or two methyl groups; R^4 and R^5 are each independently H or C_{1-6} alkyl; X is O or S; and n is 0-2.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】式(I)



【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於 R N A 遞送之可離子化陽離子脂質

【英文發明名稱】

IONIZABLE CATIONIC LIPIDS FOR RNA DELIVERY

【技術領域】

【0001】本文之實施例概言之係關於脂質。具體而言，本文之實施例係關於促進生物活性及治療性分子之細胞內遞送之新脂質及脂質組合物。

【先前技術】

【0002】用於靶向遞送之多種基於核酸之治療劑對基於脂質之遞送媒劑造成挑戰。舉例而言，核酸之大小及類型在結構上係多樣的。實例包括用於基因療法之 DNA、質體、小干擾核酸 (siNA) 及用於 RNA 干擾 (RNAi) 之微小 RNA (miRNA)、反義分子、核酶、拮抗劑及適配體。

【0003】納入該等基於脂質之遞送媒劑中之陽離子脂質及可離子化陽離子脂質之設計及用途已顯示較大優點。然而，使用該等脂質在活體內投與時可能會導致顯著副作用。已觀察到之一個問題包括低生物降解性及自靶組織之清除率，由此產生脂質之活體內積聚。另一問題在於，大量脂質可能引起不利的免疫原性效應，此可導致個體不適

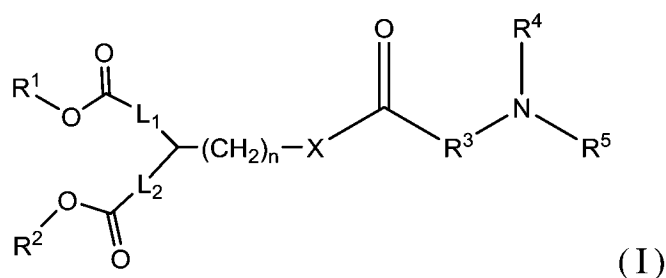
及活性成分之治療效應降低。與許多陽離子脂質相關之第三個問題係有效遞送至靶之百分比低，由此導致相對較低之治療效應或低功效。最後，重要的是，遞送媒劑中之陽離子脂質具有經特定調諧之 pH，因此其可與活性劑一起調配並保護活性劑免於在投與期間降解，但能夠在媒劑一旦到達其靶後便立即釋放活性劑。因此，業內需要開發出可滿足脂質-核酸遞送系統之特殊需求之新脂質。

【發明內容】

【0004】本揭示案提供如本文所述式(I)之脂質，其可用於基於脂質之遞送用來治療疾病之核酸及其他治療劑。熟習此項技術者將明瞭該等及其他用途。標的技術之其他特徵及優點將闡述於下文描述中，且部分地將自描述顯而易見，或可藉由實踐標的技術來學習。標的技術之優點將藉由書面描述及其實施例以及附圖中特定指出之結構來實現及獲得。

【0005】應理解，前述一般描述及以下詳細描述皆具例示性及解釋性且意欲提供標的技術之進一步解釋。

【0006】在一些實施例中，本揭示案提供式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽：



其中： R^1 及 R^2 各自獨立地係 $(CH_3(CH_2)_m)_2CH-$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-1})CH$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-2})CH$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)_2CHCH_2-$ 或 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-1})CHCH_2-$ ，其中 m 係4-11； L^1 及 L^2 各自獨立地係不存在、直鏈 C_{1-5} 伸烷基或 $(CH_2)_p-O-(CH_2)_q$ ，其中 p 及 q 各自獨立地係1-3； R^3 係視情況地經一或兩個甲基取代之直鏈 C_{2-5} 伸烷基； R^4 及 R^5 各自獨立地係H或 C_{1-6} 烷基； X 係O或S；且 n 係0-2。

【0007】在一些實施例中，本揭示案提供脂質奈米粒子，其包含複數種配位體，其中每一配位體獨立地係本文所述之化合物，其中複數種配位體自組裝形成包含內部及外部之脂質奈米粒子。

【0008】在一些實施例中，本揭示案提供醫藥組合物，其包含本文所述之化合物或本文所述之脂質奈米粒子及醫藥學上可接受之賦形劑。

【0009】在一些實施例中，本揭示案提供治療有需要之個體之疾病的方法，其包括向個體投與治療有效量之本文所述之化合物、本文所述之脂質奈米粒子或本文所述之醫藥組合物。

【0010】在一些實施例中，本揭示案提供將核酸遞送至有需要之個體之方法，其包括將治療有效量之核酸囊封於本文所述之脂質奈米粒子中，及將脂質奈米粒子投與個體。

【實施方式】

I. 概述

【0011】應理解，熟習此項技術者根據本揭示案將容易地明瞭標的技術之各種組態，其中標的技術之各種組態係藉助說明顯示及闡述。如應意識到，標的技術能夠具有其他及不同之組態且其若干細節能夠在各個其他方面進行修改，其皆不背離標的技術之範圍。因此，匯總及詳細描述欲視為具有說明性而非限制性。

【0012】下文所述之詳細描述意欲作為標的技術之各種組態之描述且不欲代表可實踐標的技術之唯一組態。將附圖納入本文中且構成詳細描述之一部分。詳細描述包括用於提供標的技術之充分理解之目的之具體細節。然而，熟習此項技術者應明瞭，標的技術可在無該等具體細節之情況下進行實踐。在一些情況下，熟知之結構及組分係以方塊圖形式顯示以避免模糊標的技術之概念。為易於理解，用相同之元件符號標記相似之組分。

II. 定義

【0013】在本說明書多處，本揭示案化合物之取代基係以組或範圍揭示。本揭示案特定意欲包括該等組及範圍之成員之每一及每個個別子組合。舉例而言，術語「C₁₋₆烷基」特定意欲個別地揭示甲基、乙基、C₃烷基、C₄烷基、C₅烷基及C₆烷基。

【0014】片語「以組合投與」或「組合投與」意指，兩種或更多種劑係同時或在一定間隔內投與個體，使得每

一劑對患者之效應可重疊。在一些實施例中，其係在彼此之約60分鐘、30分鐘、15分鐘、10分鐘、5分鐘或1分鐘內投與。在一些實施例中，投與劑之間隔足夠接近，使得達成組合(例如協同)效應。

【0015】如應用於一或多個所關注值之術語「大約」或「約」係指類似於所述參考值之值。在某些實施例中，除非另有說明或自上下文明顯看出，否則術語「大約」或「約」係指在任一方向上(大於或小於)在所述參考值之25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小內之一系列值(此數值將超過可能值之100%的情況除外)。

【0016】在申請專利範圍中，除非上下文指示相反情況或自上下文另外顯而易見，否則諸如「一(a)」、「一(an)」及「該」之冠詞可意指一個或一個以上。除非上下文指示相反情況或自上下文另外顯而易見，否則若一個、一個以上或所有群成員存在於、用於或以其他方式與給定產物或製程相關，則在組之一或多個成員之間包括「或」之申請專利範圍或描述視為令人滿意的。本揭示案包括其中組之恰好一個成員存在於、用於或以其他方式與給定產物或製程相關之實施例。本揭示案亦包括其中一個以上或所有組成員存在於、用於或以其他方式與給定產物或製程相關之實施例。

【0017】如本文所用之「烷基」係指完全飽和(即不

含雙鍵或三鍵)之直鏈或具支鏈烴鏈。烷基可具有1至20個碳原子(每當其出現在本文中，諸如「1至20」之數值範圍係指給定範圍內之每一整數；例如，「1至20個碳原子」意指，烷基可由1個碳原子、2個碳原子、3個碳原子等直至且包括20個碳原子組成，但本定義亦涵蓋未指定數值範圍之術語「烷基」之出現)。烷基亦可為具有1至9個碳原子之中等大小之烷基。烷基亦可為具有1至6個碳原子之低碳烷基。烷基可稱為「C₁₋₄烷基」或類似名稱。僅舉例來說，「C₁₋₄烷基」指示，在烷基鏈中存在1至4個碳原子，即烷基鏈選自由以下組成之群：甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基及第三丁基。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、己基及諸如此類。

【0018】「伸烷基」係指具有所指示碳原子數且連接至少兩個其他基團之直鏈或具支鏈、飽和脂族基團，即二價烴基。連接至伸烷基之兩個部分可連接至伸烷基之同一原子或不同原子。例如，直鏈伸烷基可為-(CH₂)_n-之二價基團，其中n係1、2、3、4、5或6。代表性伸烷基包括(但不限於)亞甲基、伸乙基、伸丙基、伸異丙基、伸丁基、伸異丁基、第二伸丁基、伸戊基及伸己基。伸烷基可經取代或未經取代。

【0019】術語「低碳烷基」意指在鏈中具有1至6個碳之基團，該鏈可為直鏈或具支鏈。適宜烷基之非限制性實例包括甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、第三丁

基、正戊基及己基。

【0020】如本文所用之術語「胺基」代表 $\text{—N(R}^{N1})_2$ ，其中每一 R^{N1} 獨立地係H、OH、 NO_2 、 $\text{N(R}^{N2})_2$ 、 $\text{SO}_2\text{OR}^{N2}$ 、 SO_2R^{N2} 、 SOR^{N2} 、N-保護基團、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、環烷基、烷基環烷基、羧烷基(例如視情況地經O-保護基團取代，例如視情況地經取代之芳基烷氧基羧基或本文所述之任一基團)、磺烷基、鹽基(例如乙鹽基、三氟乙鹽基或本文所述之其他基團)、烷氧基羧基烷基(例如視情況地經O-保護基團取代，例如視情況地經取代之芳基烷氧基羧基或本文所述之任一基團)、雜環基(例如雜芳基)或烷基雜環基(例如烷基雜芳基)，其中該等所列舉 R^{N1} 基團中之每一者可視情況地經取代，如本文針對每一基團所定義；或兩個 R^{N1} 組合形成雜環基或N-保護基團，且其中每一 R^{N2} 獨立地係H、烷基或芳基。本揭示案之胺基可為未經取代之胺基(即 —NH_2)或經取代之胺基(即 $\text{—N(R}^{N1})_2$)。在較佳實施例中，胺基係 —NH_2 或 —NHR^{N1} ，其中 R^{N1} 獨立地係OH、 NO_2 、 NH_2 、 NR^{N2}_2 、 $\text{SO}_2\text{OR}^{N2}$ 、 SO_2R^{N2} 、 SOR^{N2} 、烷基、羧烷基、磺烷基、鹽基(例如乙鹽基、三氟乙鹽基或本文所述之其他基團)、烷氧基羧基烷基(例如第三丁氧基羧基烷基)或芳基，且每一 R^{N2} 可為H、 C_{1-20} 烷基(例如 C_{1-6} 烷基)或 C_{1-10} 芳基。

【0021】術語「陰離子脂質」意指在生理pH下帶負電之脂質。該等脂質包括(但不限於)磷脂鹽甘油、心磷脂、二鹽基磷脂鹽絲胺酸、二鹽基磷脂酸、N-十二烷鹽磷脂鹽

乙醇胺、N-琥珀醯基磷脂醯乙醇胺、N-戊二醯基磷脂醯乙醇胺、離胺醯基磷脂醯甘油、棕櫚醯基油醯基磷脂醯甘油(POPG)及連接至中性脂質之其他陰離子改質基團。

【0022】在一系列項目前之片語「……中之至少一者」以及分開任一項目之術語「及」或「或」修飾作為整體之清單，而非清單之每一成員(即每一項目)。片語「……中之至少一者」不要求選擇每一所列項目中之至少一者；相反，該片語允許以下含義：包括項目中之任一者中之至少一者，及/或項目之任一組合中之至少一者，及/或項目中之每一者中之至少一者。舉例來說，片語「A、B及C中之至少一者」或「A、B或C中之至少一者」各自係指僅A、僅B或僅C；A、B及C之任一組合；及/或A、B及C中之每一者中之至少一者。

【0023】在描述或申請專利範圍中使用術語「包括」、「具有」或諸如此類，該術語意欲以與術語「包含」相似之方式具有包涵性，此乃因「包含」在申請專利範圍中用作過渡詞時得到解釋。

【0024】除非明確說明，否則以單數形式對元件之提及不欲意指「一個及僅一個」，而是「一或多個」。男性代詞(例如他的)包括女性及中性(例如她的及它的)，且反之亦然。術語「一些」係指一或多個。加下劃線及/或斜體標題及子標題僅出於方便使用，並不限制標的技術，且並不結合與標的技術之描述之解釋來提及。熟習此項技術者已知或隨後將知之本揭示案通篇所述之各種組態之元件

之所有結構及功能等效物以引用方式明確併入本文中且意欲涵蓋於標的技術中。另外，本文所揭示之內容不欲奉獻給公眾，不論該揭示案是否明確列舉於上文描述中。

【0025】術語「陽離子脂質」意指兩親性脂質及其鹽，其具有陽性親水頭基；一個、兩個、三個或更多個疏水脂肪酸或脂肪烷基鏈；及介於該兩個結構域之間的連接件。可離子化或可質子化陽離子脂質通常在低於其 pK_a 之 pH 下質子化(即帶正電)且在高於 pK_a 之 pH 下實質上為中性。較佳可離子化陽離子脂質係 pK_a 小於生理 pH (通常為約7.4)之彼等脂質。本揭示案之陽離子脂質亦可稱為可滴定陽離子脂質。陽離子脂質可為具有可質子化三級胺(例如 pH 可滴定)頭基之「胺脂質」。一些胺基例示性胺脂質可包括C18烷基鏈，其中每一烷基鏈獨立地具有0至3個(例如0個、1個、2個或3個)雙鍵；及介於頭基與烷基鏈之間的醚、酯或縮酮鏈接。該等陽離子脂質包括(但不限於)DSDMA、DODMA、DLinDMA、DLenDMA、 γ -DLenDMA、DLin-K-DMA、DLin-K-C2-DMA(亦稱為DLin-C2K-DMA、XTC2及C2K)、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLen-C2K-DMA、 γ -DLen-C2K-DMA、DLin-M-C2-DMA(亦稱為MC2)、DLin-M-C3-DMA(亦稱為MC3)及(DLin-MP-DMA)(亦稱為1-B11)。

【0026】術語「包含」意欲係開放的且容許但不要求包括其他元件或步驟。當在本文中使用術語「包含」時，由此亦涵蓋及揭示術語「由...組成」。

【0027】術語「與...組合」意指在本揭示案之治療方法中將本揭示案之脂質調配之 mRNA 與其他藥物一起投與，意指本揭示案之脂質調配之 mRNA 及其他藥物係以單獨劑量形式依序或同步投與，或係以相同劑量形式同步投與。

【0028】術語「市售化學品」及本文所述實例中所用之化學品可自標準商業來源獲得，其中該等來源包括例如 Acros Organics (Pittsburgh, Pa.)、Sigma-Aldrich Chemical (Milwaukee, Wis.)、Avocado Research (Lancashire, U.K.)、Bionet (Cornwall, U.K.)、Boron Molecular (Research Triangle Park, N.C.)、Combi-Blocks (San Diego, Calif.)、Eastman Organic Chemicals、Eastman Kodak Company (Rochester, N.Y.)、Fisher Scientific Co. (Pittsburgh, Pa.)、Frontier Scientific (Logan, Utah)、ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, Calif.)、Lancaster Synthesis (Windham, N.H.)、Maybridge Chemical Co. (Cornwall, U.K.)、Pierce Chemical Co. (Rockford, Ill.)、Riedel de Haen (Hannover, Germany)、Spectrum Quality Product, Inc. (New Brunswick, N.J.)、TCI America (Portland, Or.) 及 Wako Chemicals USA, Inc. (Richmond, Va.)。

【0029】片語「化學文獻中所述之化合物」可經由針對化學化合物及化學反應之參考書籍及資料庫來鑑別，如熟習此項技術者已知。詳述可用於製備本文所揭示化合物之反應物合成或向闡述本文所揭示化合物製備之文章提供

參考的適宜參考書籍及論文包括例如「Synthetic Organic Chemistry」, John Wiley and Sons, Inc. New York; S. R. Sandler等人,「Organic Functional Group Preparations」, 第2版, Academic Press, New York, 1983; H. O. House,「Modern Synthetic Reactions」, 第2版, W. A. Benjamin, Inc. Menlo Park, Calif., 1972; T. L. Glichrist,「Heterocyclic Chemistry」, 第2版, John Wiley and Sons, New York, 1992; J. March,「Advanced Organic Chemistry: reactions, Mechanisms and Structure」, 第5版, Wiley Interscience, New York, 2001; 特定及類似反應物亦可經由美國化學學會化學摘要服務處 (Chemical Abstract Service of the American Chemical Society) 製備之已知化學品索引來鑑別, 該等索引可在大多數公共及大學圖書館中獲得, 以及經由線上資料庫來鑑別 (更多細節可聯繫美國化學學會, Washington, D.C.)。目錄中已知但非市售之化學品可由定制化學品合成室製備, 其中許多標準化學品供應室 (例如上文所列之彼等室) 提供定制合成服務。

【0030】 如本文所用之術語劑之「有效量」係足以實現有益或期望結果 (例如臨床結果) 之量, 且因此, 「有效量」端視其所施用之背景而定。舉例而言, 在投與治療癌症之劑之背景下, 劑之有效量係例如與不投與劑獲得之反應相比, 足以達成如本文所定義之癌症治療之量。

【0031】 術語「完全囊封」意指, 核酸-脂質粒子中之核酸 (例如 mRNA) 在暴露於血清或將顯著降解游離 RNA

之核酸酶分析後並不顯著降解。當完全囊封時，在通常將降解100%游離核酸之治療中，較佳地粒子中小於25%之核酸降解，更佳地小於10%，且最佳地粒子中小於5%之核酸發生降解。「完全囊封」亦意指，核酸-脂質粒子在活體內投與後並不快速分解成其組成部分。

【0032】術語「化合物」意欲包括所繪示結構之所有立體異構物、幾何異構物、互變異構物及同位素。

【0033】術語「遞送」係指遞送化合物、物質、實體、部分、貨品或酬載之動作或方式。

【0034】術語「特徵」係指特性、性質或區別性要素。

【0035】如本文所用之術語「片段」係指部分。舉例而言，蛋白質之片段可包含藉由消化自所培養細胞分離之全長蛋白獲得之多肽。

【0036】術語「疏水脂質」意指具有非極性基團之化合物，該等非極性基團包括(但不限於)長鏈飽和及不飽和脂族烴基及視情況地經一或多個芳族、環脂族或雜環基團取代之該等基團。適宜實例包括(但不限於)二醯基甘油、二烷基甘油、N-N-二烷基胺基、1,2-二醯基氧基-3-胺基丙烷及1,2-二烷基-3-胺基丙烷。

【0037】術語「脂質」意指包含脂肪酸之酯且特徵在於不溶於水、但可溶於許多有機溶劑之有機化合物。脂質通常分成至少三類：(1)「簡單脂質」，其包括脂肪及油以及蠟；(2)「複合脂質」，其包括磷脂及糖脂；及(3)

「衍生脂質」，例如類固醇。

【0038】術語「脂質遞送媒劑」意指可用於將治療性核酸(例如 mRNA)遞送至所關注靶位點(例如細胞、組織、器官及諸如此類)之脂質調配物。脂質遞送媒劑可為核酸-脂質粒子，其可自陽離子脂質、非陽離子脂質(例如磷脂)、防止粒子聚集之結合脂質(例如 PEG-脂質)及視情況地膽固醇形成。通常，治療性核酸(例如 mRNA)可囊封於粒子之脂質部分中，由此保護其免於酶降解。

【0039】術語「脂質囊封」意指向治療性核酸(例如 mRNA)提供完全囊封、部分囊封或二者之脂質粒子。在較佳實施例中，核酸(例如 mRNA)完全囊封於脂質粒子中。

【0040】術語「兩親性脂質(amphipathic lipid)」或「兩親性脂質(amphiphilic lipid)」意指其中脂質材料之疏水部分定向於疏水相中、而親水部分定向於水相之材料。親水特性衍生自存在極性或帶電基團，例如碳水化合物、磷酸鹽、羧基、硫酸基、胺基、硫氫基、硝基、羥基及其他類似基團。可藉由納入非極性基團賦予疏水性，該等非極性基團包括(但不限於)長鏈飽和及不飽和脂族烴基及經一或多個芳族、環脂族或雜環基團取代之該等基團。兩親性化合物之實例包括(但不限於)磷脂、胺脂質及鞘脂。

【0041】術語「連接體」或「連接部分」係指具有多個原子(例如 10-100 個原子)之基團，且可包含諸如(但不限於)以下之原子或基團：碳、胺基、烷基胺基、氧、硫、亞砷、磺醯基、羰基及亞胺。連接體可具有足以不干擾納

入胺基酸序列中之長度。可納入連接體中之化學基團之實例包括(但不限於)烷基、烯基、炔基、醯胺基、胺基、醚、硫醚、酯、烷基、雜烷基、芳基或雜環基，其中之每一者可視情況地經取代，如本文所述。連接體之實例包括(但不限於)不飽和烷烴、聚乙二醇(例如乙二醇或丙二醇單體單元，例如二乙二醇、二丙二醇、三乙二醇、三丙二醇、四乙二醇或四乙二醇)及葡聚糖聚合物。其他實例包括(但不限於)連接體內之可裂解部分，例如二硫鍵(—S—S—)或偶氮鍵(—N=N—)，其可使用還原劑或光解來裂解。選擇性可裂解鍵之非限制性實例包括醯胺鍵，其可例如藉由使用參(2-羧乙基)膦(TCEP)或其他還原劑及/或光解來裂解，以及酯鍵，其可例如藉由酸性或鹼性水解來裂解。

【0042】術語「哺乳動物」意指人類或其他哺乳動物或意指人類。

【0043】術語「信使RNA」(mRNA)係指編碼所關注蛋白質或多肽且能夠經轉譯以活體外、活體內、原位或離體產生經編碼之所關注蛋白質或多肽的任一多核苷酸。

【0044】術語「經修飾」係指改變本揭示案分子之狀態或結構。分子可以包括化學、結構及功能之許多方式來修飾。在一個實施例中，核酸活性成分係藉由引入非天然核苷及/或核苷酸來修飾，例如與天然核糖核苷酸A、U、G及C相關。非規範核苷酸(例如帽結構)並不視為「經修飾」，儘管其可能不同於A、C、G、U核糖核苷酸之化學

結構。

【0045】術語「天然」意指在無人工幫助下存在於自然界中。

【0046】術語「非人類脊椎動物」包括除智人(*Homo sapiens*)外之所有脊椎動物，包括野生及家養物種。非人類脊椎動物之實例包括(但不限於)哺乳動物，例如羊駝、爪哇牛、野牛、駱駝、貓、牛、鹿、狗、驢、大額牛、山羊、豚鼠、馬、駱馬、騾、豬、兔、馴鹿、綿羊、水牛及犁牛。

【0047】術語「患者」係指可能尋求或需要治療、要求治療、正在接受治療、將接受治療之個體，或由針對特定疾病或疾患經訓練之專業人員進行護理之個體。

【0048】片語「視情況地經取代之X」(例如視情況地經取代之烷基)意欲等效於「X，其中X視情況地經取代」(例如，「烷基，其中該烷基視情況地經取代」)。其不欲意指特徵「X」(例如烷基)本身係視情況存在的。

【0049】片語「醫藥學上可接受之」在本文中用於指在合理醫學判斷範圍內，適用於與人類及動物之組織接觸而無過度毒性、刺激、過敏反應或其他問題或併發症且與合理益處/風險比相稱之彼等化合物、材料、組合物及/或劑量形式。

【0050】如本文所用之片語「醫藥學上可接受之賦形劑」係指具有在患者中實質上無毒且不發炎性質之除本文所述化合物外之任何成分(例如能夠懸浮或溶解活性化合

物之媒劑)。賦形劑可包括例如：抗黏劑、抗氧化劑、黏合劑、包衣、壓縮助劑、崩解劑、染料(著色劑)、軟化劑、乳化劑、填充劑(稀釋劑)、成膜劑或包衣、矯味劑、芳香劑、助流劑(流動增強劑)、潤滑劑、防腐劑、印刷油墨、吸附劑、懸浮或分散劑、甜味劑及水合水。例示性賦形劑包括(但不限於)：丁基化羥基甲苯(BHT)、碳酸鈣、磷酸鈣(二元)、硬脂酸鈣、交聯羧甲基纖維素、交聯聚乙炔基吡咯啉酮、檸檬酸、交聯聚維酮、半胱胺酸、乙基纖維素、明膠、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、乳糖、硬脂酸鎂、麥芽糖醇、甘露醇、甲硫胺酸、甲基纖維素、對羥基苯甲酸甲酯、微晶纖維素、聚乙二醇、聚乙炔基吡咯啉酮、聚維酮、預膠凝澱粉、對羥基苯甲酸丙酯、棕櫚酸視黃酯、蟲膠、二氧化矽、羧甲基纖維素鈉、檸檬酸鈉、羥乙酸澱粉鈉、山梨醇、澱粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化鈦、維生素A、維生素E、維生素C及木糖醇。

【0051】片語「醫藥學上可接受之鹽」係指所揭示化合物之衍生物，其中母體化合物係藉由將現有酸或鹼部分轉化成其鹽形式(例如藉由使游離鹼基團與適宜有機酸反應)來修飾。醫藥學上可接受之鹽之實例包括(但不限於)鹼性殘基(例如胺)之礦物酸或有機酸鹽；酸性殘基(例如羧酸)之鹼鹽或有機鹽；及諸如此類。代表性酸加成鹽包括乙酸鹽、己二酸鹽、海藻酸鹽、抗壞血酸鹽、天冬胺酸鹽、苯磺酸鹽、苯甲酸鹽、硫酸氫鹽、硼酸鹽、丁酸鹽、

樟腦酸鹽、樟腦磺酸鹽、檸檬酸鹽、環戊烷丙酸鹽、二葡萄糖酸鹽、十二烷基硫酸鹽、乙磺酸鹽、富馬酸鹽、葡庚糖酸鹽、甘油磷酸鹽、半硫酸鹽、庚酸鹽、己酸鹽、氫溴酸鹽、鹽酸鹽、氫碘酸鹽、2-羥基-乙磺酸鹽、乳糖酸鹽、乳酸鹽、月桂酸鹽、月桂基硫酸鹽、蘋果酸鹽、馬來酸鹽、丙二酸鹽、甲磺酸鹽、2-萘磺酸鹽、菸鹼酸鹽、硝酸鹽、油酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、雙羥萘酸鹽、果膠酸鹽、過硫酸鹽、3-苯基丙酸鹽、磷酸鹽、苦味酸鹽、新戊酸鹽、丙酸鹽、硬脂酸鹽、琥珀酸鹽、硫酸鹽、酒石酸鹽、硫氰酸鹽、甲苯磺酸鹽、十一烷酸鹽、戊酸鹽及諸如此類。代表性鹼或鹼土金屬鹽包括鈉、鋰、鉀、鈣、鎂及諸如此類以及無毒銨、四級銨及胺陽離子，包括(但不限於)銨、四甲基銨、四乙基銨、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺及諸如此類。本揭示案之醫藥學上可接受之鹽包括例如自無毒無機或有機酸形成之母體化合物之習用無毒鹽。本揭示案之醫藥學上可接受之鹽可藉由習用化學方法自含有鹼性或酸性部分之母體化合物合成。通常，該等鹽可藉由使該等化合物之游離酸或鹼形式與化學計量量之適當鹼或酸在水中或在有機溶劑中或在兩者之混合物中反應來製備；通常，非水性介質如醚、乙酸乙酯、乙醇、異丙醇或乙腈係較佳的。適宜鹽之清單參見 Remington's Pharmaceutical Sciences，第 17 版，Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985，第 1418 頁，Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. H. Stahl 及 C. G.

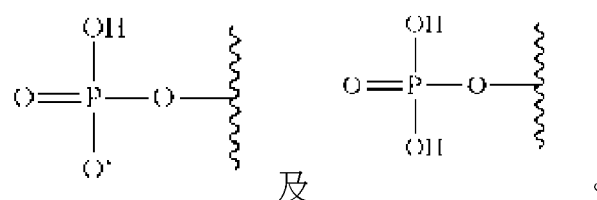
Wermuth (編輯), Wiley-VCH, 2008, 以及 Berge 等人, Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977), 其中之每一者之全文皆以引用方式併入本文中。

【0052】術語「藥物動力學」係指分子或化合物之與測定投與活有機體之物質命運相關之任一或多種性質。藥物動力學分成若干區域, 包括吸收之程度及速率、分佈、代謝及排泄。此統稱為 ADME, 其中: (A) 吸收係物質進入血液循環之過程; (D) 分佈係物質在身體之整個流體及組織中之分散或散佈; (M) 代謝(或生物轉型)係母體化合物不可逆轉型成子代謝物; 及 (E) 排泄(或消除)係指自身體消除物質。在極少情形下, 一些藥物不可逆地在身體組織中累積。

【0053】如本文所用之術語「醫藥學上可接受之溶劑化合物」意指本揭示案之化合物, 其中適宜溶劑之分子納入晶格中。適宜溶劑在投與劑量下係生理上可耐受的。舉例而言, 溶劑化合物可藉由自包括有機溶劑、水或其混合物之溶液結晶、重結晶或沈澱來製備。適宜溶劑之實例係乙醇、水(例如單水合物、二水合物及三水合物)、N-甲基吡咯啉酮(NMP)、二甲基亞砷(DMSO)、N,N'-二甲基甲醯胺(DMF)、N,N'-二甲基乙醯胺(DMAC)、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(DMEU)、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氫-2-(1H)-嘧啶酮(DMPU)、乙腈(ACN)、丙二醇、乙酸乙酯、苄基醇、2-吡咯啉酮、苯甲酸苄基酯及諸如此類。當水係溶劑時, 溶劑化合物稱為「水合物」。

【0054】術語「物理化學」意指或係指物理及/或化學性質。

【0055】術語「磷酸鹽」係以其如藉由熟習此項技術者所理解之普通含義使用且包括其質子化形式，例如



【0056】如本文所用之術語「單磷酸鹽」、「二磷酸鹽」及「三磷酸鹽」係以其如藉由熟習此項技術者所理解之普通含義使用，且包括質子化形式。

【0057】術語「預防」係指部分或完全延遲感染、疾病、病症及/或疾患之發作；部分或完全延遲特定感染、疾病、病症及/或疾患之一或多個症狀、特徵或臨床表現之發作；部分或完全延遲特定感染、疾病、病症及/或疾患之一或多個症狀、特徵或表現之發作；部分或完全延遲感染、特定疾病、病症及/或疾患之進展；及/或降低患上與感染、疾病、病症及/或疾患相關之病狀之風險。

【0058】術語「RNA」意指包含至少一個核糖核苷酸殘基之分子。「核糖核苷酸」意指在β-D-核糖-呋喃糖部分之2'位具有羥基之核苷酸。該等術語包括雙股RNA、單股RNA、經分離RNA，例如部分純化RNA、基本上純之RNA、合成RNA、重組產生之RNA以及藉由添加、缺失、取代及/或改變一或多個核苷酸而不同於天然RNA之經改變RNA。該等變化可包括將非核苷酸材料添加至例如干擾

RNA之末端或內部，例如在RNA之一或多個核苷酸處。本揭示案之RNA分子中之核苷酸亦可包含非標準核苷酸，例如非天然核苷酸或化學合成之核苷酸或去氧核苷酸。該等經改變RNA可稱為類似物或天然RNA之類似物。如本文所用之術語「核糖核酸」及「RNA」係指含有至少一個核糖核苷酸殘基之分子，包括siRNA、反義RNA、單股RNA、微小RNA、mRNA、非編碼RNA及多價RNA。

【0059】術語「樣品」或「生物樣品」係指其組織、細胞或組成部分之亞組(例如體液、包括(但不限於)血液、黏膜、淋巴液、滑液、腦脊液、唾液、羊水、羊膜臍帶血、尿液、陰道液及精液)。樣品可進一步包括自完整有機體或其組織、細胞或組成部分之亞組或其級分或部分製備之均質物、溶解物或提取物，包括(但不限於)例如血漿、血清、脊髓液、淋巴液、皮膚、呼吸道、腸道及泌尿生殖道之外部切片、眼淚、唾液、乳汁、血球、腫瘤、器官。樣品進一步指可含有細胞組分(例如蛋白質或核酸分子)之培養基，例如營養肉汁或凝膠。

【0060】術語「顯著」或「顯著地」與術語「實質上」以同義使用。

【0061】片語「單一單位劑量」係以一個劑量/一次性/單一途徑/單一接觸點投與之任一治療劑之劑量，即單一投與事件。

【0062】術語「siRNA」或小干擾RNA(有時稱為短干擾RNA或沈默RNA)係指一類雙股RNA非編碼RNA分子，

長度通常為 18-27 個鹼基對，類似於 miRNA，且在 RNA 干擾 (RNAi) 路徑內操作。其藉由在轉錄後降解 mRNA 來干擾具有互補核苷酸序列之特定基因之表現，由此防止轉譯。

【0063】術語「溶劑合物」意指本揭示案化合物與一或多個溶劑分子之物理締合。此物理締合涉及不同程度之離子鍵結，包括氫鍵結。在某些情況下，溶劑合物將能夠分離，例如當將一或多個溶劑分子納入結晶固體之晶格中時。「溶劑合物」涵蓋溶液相及可分離溶劑合物。適宜溶劑合物之非限制性實例包括乙醇合物、甲醇合物及諸如此類。

【0064】術語「分劑量」係將單一單位劑量或總日劑量分成兩個或更多個劑量。

【0065】術語「穩定」係指足夠穩健以使自反應混合物之分離達到有用的純度、且較佳地能夠調配成有效治療劑之化合物。

【0066】術語「穩定」、「穩定的」、「穩定的區域」意指使得或變得穩定。

【0067】術語「經取代」意指用除氫外之指定基團、或用各自例如經獨立選擇之可相同或不同之一或多個基團 (group)、部分或基團 (radical) 取代。

【0068】術語「實質上」係指展現所關注特性或性質之全部或接近全部的範圍或程度之定性條件。熟習生物技術者應理解，生物及化學現象極少 (若有) 進行完全及 / 或進展至完全或達成或避免絕對結果。因此，術語「實質上」

在本文中用於捕獲許多生物及化學現象中固有之潛在不完全性。

【0069】片語「實質上相等」與劑量之間的時間差相關，該術語意指加/減2%。

【0070】片語「實質上同時」與複數個劑量相關，該術語意指在2秒內。

【0071】片語「患有」係指「患有」疾病、病症及/或疾患之個體已經診斷患有或展示疾病、病症及/或疾患之一或多個症狀。

【0072】片語「易患」係指「易患」疾病、病症及/或疾患之個體尚未經診斷患有及/或可能未展現疾病、病症及/或疾患之症狀，但具有患上疾病或其症狀之傾向。在一些實施例中，易患疾病、病症及/或疾患(例如癌症)之個體之特徵可在於以下中之一或多者：(1)與疾病、病症及/或疾患之發展相關之遺傳突變；(2)與疾病、病症及/或疾患之發展相關之遺傳多型性；(3)與疾病、病症及/或疾患相關之蛋白質及/或核酸之增加及/或降低的表現及/或活性；(4)與疾病、病症及/或疾患之發展相關之習慣及/或生活方式；(5)疾病、病症及/或疾患之家族史；及(6)暴露於及/或感染與疾病、病症及/或疾患之發展相關之微生物。在一些實施例中，易患疾病、病症及/或疾患之個體將患上疾病、病症及/或疾患。在一些實施例中，易患疾病、病症及/或疾患之個體將不患上疾病、病症及/或疾患。

【0073】術語「合成」意指藉由人手產生、製備及/

或製造。本揭示案之多核苷酸或多肽或其他分子之合成可為化學或酶合成。

【0074】術語「治療劑」係指在投與個體時具有治療、診斷及/或預防效應及/或引發期望生物及/或藥理學效應之任一劑。

【0075】術語「治療有效量」意指在投與患有或易患感染、疾病、病症及/或疾患之個體時足以治療感染、疾病、病症及/或疾患、改良其症狀、診斷、預防及/或延遲其發作的欲遞送之劑(例如核酸、藥物、治療劑、診斷劑、預防劑等)之量。

【0076】術語「治療有效之結果」意指在患有或易患感染、疾病、病症及/或疾患之個體中足以治療感染、疾病、病症及/或疾患、改良其症狀、診斷、預防及/或延遲其發作之結果。

【0077】術語「總日劑量」係在24小時時段中給予或開處方之量。其可以單一單位劑量投與。

【0078】術語「治療」係指部分或完全緩解、改善、改良、減輕特定感染、疾病、病症及/或疾患之一或多個症狀或特徵、延遲其發作、抑制其進展、降低其嚴重程度及/或降低其發生率。舉例而言，「治療」癌症可指抑制腫瘤之存活、生長及/或擴散。治療可投與未展現疾病、病症及/或疾患之徵象之個體，及/或投與僅展現疾病、病症及/或疾患之早期徵象之個體用於降低患上與疾病、病症及/或疾患相關之病狀風險之目的。

【0079】術語「未經修飾」係指在以任何方式改變之前之任何物質、化合物或分子。未經修飾可但不總是指生物分子之野生型或天然形式。分子可經受一系列修飾，其中每一經修飾分子可作為「未經修飾」之起始分子用於後續修飾。

【0080】本文所述之化合物可為不對稱的(例如具有一或多個立體中心)。除非另有指示，否則意欲涵蓋所有立體異構物，例如鏡像異構物及非鏡像異構物。含有不對稱取代碳原子之本揭示案化合物可以光學活性或外消旋形式分離。自光學活性起始材料製備光學活性形式之方法為此項技術中已知，例如藉由拆分外消旋混合物或藉由鏡像選擇性及/或立體選擇性合成。烯烴之許多幾何異構物、 $C=N$ 雙鍵及諸如此類亦可存在於本文所述之化合物中，且本揭示案涵蓋所有該等穩定異構物。闡述本揭示案化合物之順式及反式幾何異構物且可將其分離為異構物之混合物或單獨異構形式。

【0081】本揭示案之化合物亦包括互變異構形式。互變異構形式源自單鍵與相鄰雙鍵之調換及質子之伴隨遷移。互變異構形式包括質子轉移互變異構物，其係具有相同經驗式及總電荷之異構質子化狀態。實例質子轉移互變異構物包括酮-烯醇對、醯胺-亞胺酸對、內醯胺-內醯亞胺對、烯胺-亞胺對及其中質子可佔據雜環系統之兩個或更多個位置之環狀形式，例如1H-及3H-咪唑、1H-、2H-及4H-1,2,4-三唑、1H-及2H-異吡啶以及1H-及2H-吡唑。互變

異構形式可呈平衡狀態或藉由適當取代在空間上鎖定成一種形式。

【0082】本揭示案之化合物亦包括在中間體或最終化合物中出現之原子之所有同位素。「同位素」係指具有相同原子序數但因核中之中子數不同引起質量數不同之原子。舉例而言，氫之同位素包括氕及氘。

【0083】本揭示案之化合物及鹽可藉由常規方法與溶劑或水分子組合製備以形成溶劑合物及水合物。

【0084】術語「半衰期」係量(例如核酸或蛋白質濃度或活性)降至如在時間段開始時量測之其值之一半所需的時間。

【0085】術語「活體外」係指發生在人造環境中(例如在測試管或反應容器中、在細胞培養物中、在皮氏培養皿(Petri dish)中等)而非有機體(例如動物、植物或微生物)內之事件。

【0086】術語「活體內」係指發生在有機體(例如動物、植物或微生物或其細胞或組織)內之事件。

【0087】術語「單體」係指可與相同或不同類型之另一分子連接形成寡聚物之單一單元，例如單核酸。在一些實施例中，單體可為解鎖核酸，即UNA單體。

【0088】術語「中性脂質」意指在所選pH下以不帶電或中性兩親離子形式存在之脂質種類。在生理pH下，該等脂質包括例如二醯基磷脂醯膽鹼、二醯基磷脂醯乙醇胺、神經醯胺、鞘磷脂、腦磷脂、膽固醇、腦苷脂及二醯基甘

油。

【0089】術語「非陽離子脂質」意指兩親性脂質或中性脂質或陰離子脂質且闡述於本文中。

【0090】術語「個體」或「患者」係指可向其投與本揭示案組合物、例如用於實驗、診斷、預防及/或治療目的之任一有機體。典型個體包括動物(例如哺乳動物，例如小鼠、大鼠、兔、非人類靈長類動物及人類)及/或植物。

【0091】術語「可轉譯」可與術語「可表現」互換使用且係指多核苷酸或其部分由宿主細胞轉化成多肽之能力。如此項技術中所理解，轉譯係細胞之細胞質中之核糖體產生多肽之過程。在轉譯中，信使RNA (mRNA)由核糖體複合物中之tRNA解碼以產生特定胺基酸鏈或多肽。另外，術語「可轉譯」在本說明書中用於提及寡聚物時意指，寡聚物之至少一部分(例如寡聚物序列之編碼區，亦稱為編碼序列或CDS)能夠轉化成蛋白質或其片段。

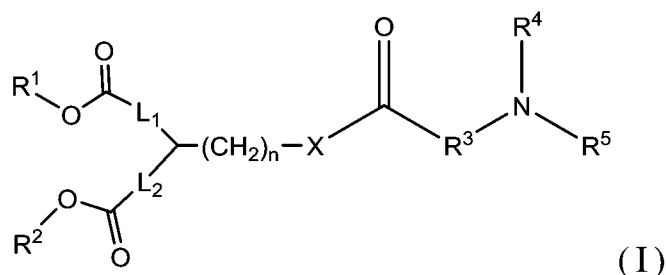
【0092】治療有效之結果：如本文所用之術語「治療有效之結果」意指在患有或易患感染、疾病、病症及/或疾患之個體中足以治療感染、疾病、病症及/或疾患、改良其症狀、診斷、預防及/或延遲其發作之結果。

【0093】術語「單位劑量」係指包含預定量之活性成分之醫藥組合物之離散量。活性成分之量通常可等於將投與個體之活性成分之劑量及/或方便分數之該劑量，包括(但不限於)該劑量之一半或三分之一。

【0094】儘管已針對某些實施例闡述本揭示案，且已出於說明之目的闡述許多細節，但熟習此項技術者應明瞭，本揭示案包括其他實施例，且本文所述之一些細節可在不背離本揭示案之情況下顯著變化。本揭示案包括該等其他實施例、修改及等效形式。具體而言，本揭示案包括各個說明性組分及實例之特徵、術語或元件之任一組合。

III. 化合物

【0095】在一些實施例中，本揭示案提供式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽：



其中： R^1 及 R^2 各自獨立地係 $(CH_3(CH_2)_m)_2CH-$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-1})CH$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-2})CH$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)_2CHCH_2-$ 或 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-1})CHCH_2-$ ，其中 m 係4-11； L^1 及 L^2 各自獨立地係不存在、直鏈 C_{1-5} 伸烷基或 $(CH_2)_p-O-(CH_2)_q$ ，其中 p 及 q 各自獨立地係1-3； R^3 係視情況地經一或兩個甲基取代之直鏈 C_{2-5} 伸烷基； R^4 及 R^5 各自獨立地係H或 C_{1-6} 烷基； X 係O或S；且 n 係0-2。

【0096】在一些實施例中， R^1 及 R^2 各自獨立地係 $(CH_3(CH_2)_m)_2CH-$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-1})CH$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-2})CH$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)_2CHCH_2-$ 或

$(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-1})\text{CHCH}_2-$ 。在一些實施例中， R^1 及 R^2 各自獨立地係 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CH}-$ 、
 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-1})\text{CH}$ 、 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CHCH}_2-$ 或
 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-1})\text{CHCH}_2-$ 。在一些實施例中， R^1 及 R^2 各自獨立地選自 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CH}-$ 及
 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CHCH}_2-$ 。在一些實施例中， R^1 及 R^2 各自獨立地係 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CH}-$ 。在一些實施例中， R^1 及 R^2 各自獨立地係 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CHCH}_2-$ 。在一些實施例中， R^1 及 R^2 各自獨立地選自 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-1})\text{CH}$ 、
 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-2})\text{CH}$ 及
 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-1})\text{CHCH}_2-$ 。在一些實施例中， R^1 係 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CH}-$ 或 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CHCH}_2-$ ，且 R^2 選自
 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-1})\text{CH}$ 、
 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-2})\text{CH}$ 及
 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-1})\text{CHCH}_2-$ 。

【0097】 在一些實施例中， m 係4至11。在一些實施例中， m 係4至9。在一些實施例中， m 係4至8。在一些實施例中， m 係5至7。在一些實施例中， m 係5。在一些實施例中， m 係6。在一些實施例中， m 係7。

【0098】 在一些實施例中， L^1 及 L^2 各自獨立地係不存在、直鏈 C_{1-5} 伸烷基或 $(\text{CH}_2)_p-\text{O}-(\text{CH}_2)_q$ 。在一些實施例中， L^1 及 L^2 各自獨立地係 C_{1-5} 伸烷基或 $(\text{CH}_2)_p-\text{O}-(\text{CH}_2)_q$ 。在一些實施例中， L^1 及 L^2 各自獨立地係 C_{2-5} 伸烷基或 $(\text{CH}_2)_p-\text{O}-(\text{CH}_2)_q$ 。在一些實施例中， L^1 及 L^2 各自獨立地係

C₂₋₅伸烷基。在一些實施例中，L¹及L²各自係伸丙基。在一些實施例中，L¹及L²各自獨立地係C₂₋₅伸烷基。在一些實施例中，L¹及L²各自獨立地係(CH₂)_p-O-(CH₂)_q。在一些實施例中，L¹及L²各自獨立地係不存在。

【0099】在一些實施例中，p及q各自獨立地係1-3。在一些實施例中，p及q各自獨立地係1-2。在一些實施例中，p及q各自獨立地係1。在一些實施例中，p及q各自獨立地係2。在一些實施例中，p及q各自獨立地係3。

【0100】在一些實施例中，R³係視情況地經一或兩個甲基取代之直鏈C₂₋₅伸烷基。在一些實施例中，R³係直鏈C₂₋₅伸烷基。在一些實施例中，R³係C₃₋₅伸烷基。在一些實施例中，R³係C₁₋₃伸烷基。在一些實施例中，R³係伸丙基。

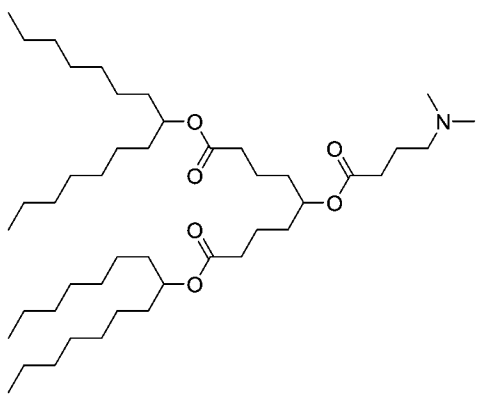
【0101】在一些實施例中，R⁴及R⁵各自獨立地係H或C₁₋₆烷基。在一些實施例中，R⁴及R⁵各自獨立地係C₁₋₆烷基。在一些實施例中，R⁴及R⁵各自獨立地係C₁₋₃烷基。在一些實施例中，R⁴及R⁵各自獨立地係甲基。在一些實施例中，R⁴及R⁵各自獨立地係H。

【0102】在一些實施例中，X係O或S。在一些實施例中，X係O。在一些實施例中，X係S。

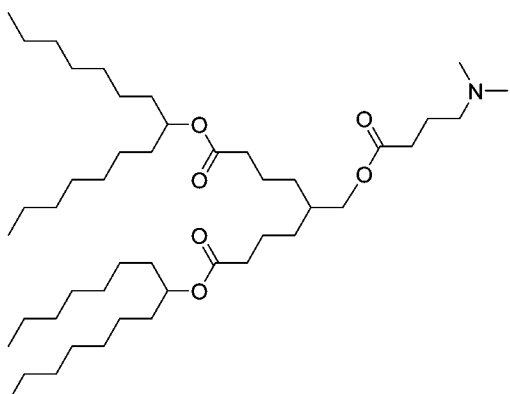
【0103】在一些實施例中，n係0-2。在一些實施例中，n係0-1。在一些實施例中，n係0。在一些實施例中，n係1。在一些實施例中，n係2。

【0104】在一些實施例中，化合物選自由以下組成之

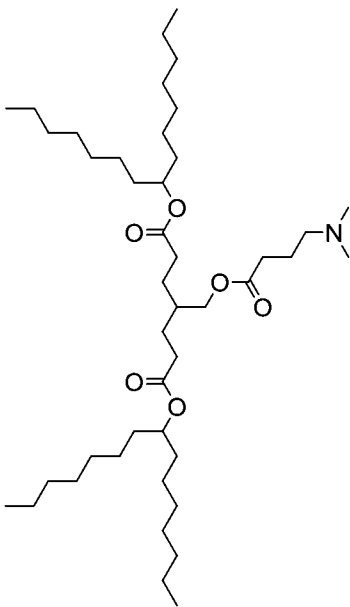
群：



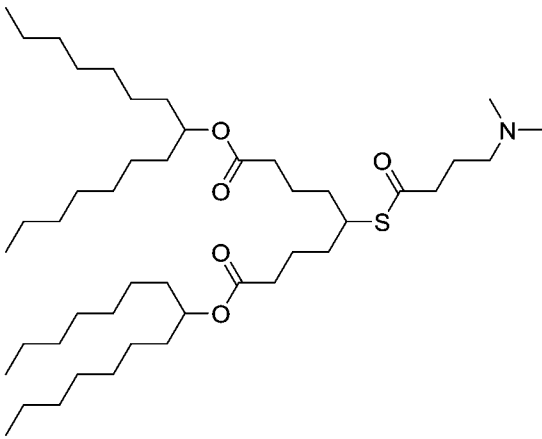
ATX-193



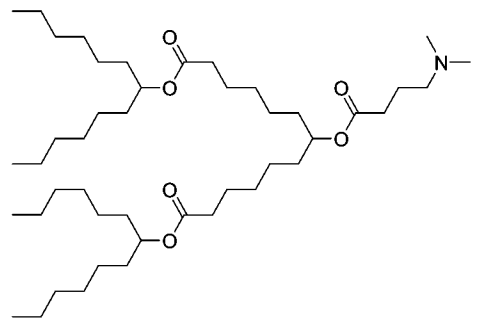
ATX-200



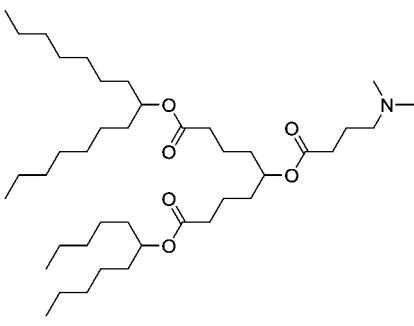
ATX-201



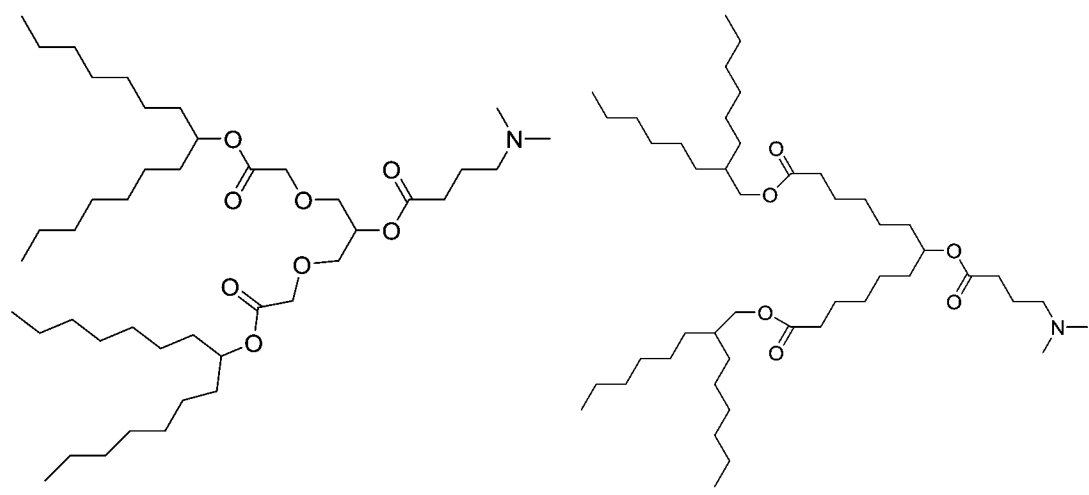
ATX-202



ATX-209

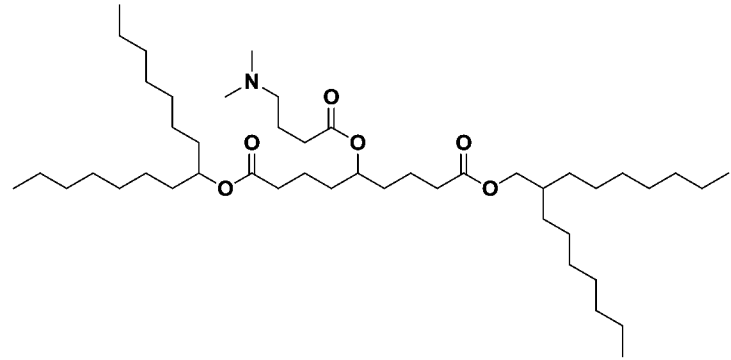


ATX-210



ATX-231

ATX-230



及

；

ATX-232

或其醫藥學上可接受之鹽。

【0105】 在一些實施例中，化合物係ATX-193。在一些實施例中，化合物係ATX-200。在一些實施例中，化合物係ATX-201。在一些實施例中，化合物係ATX-202。在一些實施例中，化合物係ATX-209。在一些實施例中，化合物係ATX-210。在一些實施例中，化合物係ATX-230。在一些實施例中，化合物係ATX-231。在一些實施例中，化合物係ATX-232。

【0106】 在一些實施例中，本發明提供脂質組合物，其包含核酸及本發明之化合物。在一些實施例中，核酸選

自 siRNA、mRNA、自複製 RNA、DNA 質體及反義寡核苷酸。在一些實施例中，核酸係包含編碼所關注治療蛋白之編碼區之 mRNA 或自複製 RNA。在一些實施例中，所關注治療蛋白係酶及抗體、抗原、受體或轉運子。在一些實施例中，所關注治療蛋白係基因編輯酶。在一些實施例中，基因編輯酶選自 TALEN、CRISPR、大範圍核酸酶或鋅指核酸酶。在一些實施例中，脂質組合物包含脂質體、脂複合物(lipoplex)或脂質奈米粒子。

IV. 脂質調配物及奈米粒子

基於脂質之調配物

【0107】基於將核酸細胞內遞送至靶細胞之療法面臨細胞外及細胞內障壁。實際上，裸核酸材料因其毒性、低血清穩定性、快速腎清除率、減少的靶細胞攝取、吞噬細胞攝取及其活化免疫反應之能力而無法容易地全身性投與，所有該等特徵阻礙其臨床開發。當外源核酸材料(例如 mRNA)進入人類生物系統時，其由網狀內皮系統(RES)識別為外來病原體且在可能遇到血管系統內或外之靶細胞之前自血液循環清除。已報導，血流中裸核酸之半衰期係約幾分鐘(Kawabata K、Takakura Y, Hashida M Pharm Res. 1995年6月; 12(6):825-30)。化學修飾及適當遞送方法可減少 RES 之攝取並保護核酸免於遍在核酸酶降解，此增加基於核酸之療法之穩定性及效率。另外，RNA 或 DNA 係不利於細胞攝取之陰離子親水性聚合物，其表面亦為陰離子

的。因此，基於核酸之療法之成功極大地依賴於可高效且有效地將遺傳材料遞送至靶細胞並獲得足夠活體內表現水準及最小毒性之媒劑或載體之開發。

【0108】另外，在內化至靶細胞中後，核酸遞送載體受到細胞內障壁之挑戰，該等細胞內障壁包括胞內體俘獲、溶酶體降解、核酸自載體解封、跨核膜易位(針對DNA)及在細胞質釋放(針對RNA)。因此，成功的基於核酸之療法依賴於載體將核酸遞送至細胞內之靶位點以獲得足夠期望活性(例如基因表現)水準之能力。

【0109】儘管若干基因療法已能夠成功地利用病毒遞送載體(例如AAV)，但基於脂質之調配物因其生物相容性及其易於大規模生產而愈來愈視為RNA及其他核酸化合物之最有前景的遞送系統之一。基於脂質之核酸療法之最顯著進步之一發生在2018年8月，當時帕替西蘭(Patisiran, ALN-TTR02)係經食品藥品管理局(Food and Drug Administration, FDA)及歐盟委員會(European Commission, EC)批准之首個siRNA治療劑。ALN-TTR02係基於所謂的穩定核酸脂質粒子(SNALP)轉染技術之siRNA調配物。儘管帕替西蘭係成功的，但經由脂質調配物遞送核酸治療劑(包括mRNA)仍處於開發中。由於COVID-19大流行，在脂質遞送媒劑中使用mRNA快速上升至顯著地位，其中遞送編碼COVID-19之刺突蛋白之mRNA之若干疫苗顯示強保護能力。該等基於脂質之mRNA疫苗包括Pfizer及BioNtech之BNT162b2及Moderna之mRNA-1273，其已在世界各地獲得

緊急使用授權。

【0110】根據多個實施例，核酸治療劑之一些公認脂質調配之遞送媒劑包括基於聚合物之載劑，例如聚乙亞胺(PEI)、脂質奈米粒子及脂質體、奈米脂質體、含神經醯胺之奈米脂質體、多囊脂質體、蛋白脂質體、天然及合成源性胞外體、天然、合成及半合成層狀體、奈米微粒、膠束及乳液。該等脂質調配物之結構及組成可發生變化，且如快速發展之領域中可預期，此項技術中已使用若干不同之術語來闡述單一類型之遞送媒劑。同時，用於脂質調配物之術語在整個科學文獻中具有不同之預期含義，且此不一致之使用已導致脂質調配物之若干術語之確切含義混淆。在若干潛在脂質調配物中，脂質體、陽離子脂質體及脂質奈米粒子出於本揭示案之目的特定詳細闡述且定義於本文中。

脂質體

【0111】習用脂質體係由至少一個雙層及內部水性隔室組成之囊泡。脂質體之雙層膜通常係由兩親性分子(例如包含在空間上分離之親水及疏水結構域之合成或天然起源之脂質)形成(Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998)。脂質體之雙層膜亦可由兩親性聚合物及表面活性劑(例如聚合體、非離子表面活性劑囊泡(noisome)等)形成。其通常呈現為球形囊泡且大小可介於20 nm至幾微米範圍內。脂質體調配物可製備為膠質分散液或其可經凍乾

以降低穩定性風險並改良基於脂質體之藥物之儲放壽命。製備脂質體組合物之方法為此項技術中已知且在熟習此項技術者之技能範圍內。

【0112】僅具有一個雙層之脂質體稱為單層，且具有一個以上雙層之彼等脂質體稱為多層。脂質體之最常見類型係小單層囊泡(SUV)、大單層囊泡(LUV)及多層囊泡(MLV)。與脂質體不同，溶酶體、膠束及反膠束係由單層脂質構成。通常，認為脂質體具有單一內部隔室，然而，一些調配物可為多囊脂質體(MVL)，其係由若干非同心脂質雙層分開之多個不連續內部水性隔室組成。

【0113】鑑於脂質體基本上係生物膜之類似物，且可自天然及合成磷脂製備，脂質體因其優異的生物相容性而已長期視為藥物遞送媒劑(Int. J. Nanomedicine. 2014; 9:1833-1843)。在其作為藥物遞送媒劑使用時，由於脂質體具有由疏水膜包圍之水性溶液核心，故溶解於核心中之親水溶質無法容易地通過雙層，且疏水化合物將與雙層締合。因此，脂質體可負載疏水及/或親水性分子。當使用脂質體來攜載核酸(例如RNA)時，核酸含於水相中之脂質體隔室內。

陽離子脂質體

【0114】脂質體可由陽離子脂質、陰離子脂質及/或中性脂質構成。作為脂質體之重要子類，陽離子脂質體係整體或部分自帶正電之脂質或更特定而言包含陽離子基團

及親脂部分之脂質製得的脂質體。除上文對脂質體剖析之一般特性外，用於陽離子脂質體中之陽離子脂質之帶正電部分提供若干優點及一些獨特的結構特徵。舉例而言，陽離子脂質之親脂部分係疏水的且因此將引導其自身遠離脂質體之水性內部並與其他非極性及疏水物質締合。相反，陽離子部分將與水性介質締合且更重要的是與其可在陽離子脂質體之水性內部與之複合的極性分子及物質締合。出於該等原因，陽離子脂質體愈來愈經研究用於基因療法，此乃因其經由靜電相互作用有利於帶負電之核酸，產生提供活體內臨床應用所需之生物相容性、低毒性及大規模生產可能性的複合物。適用於陽離子脂質體中之陽離子脂質列於下文中。

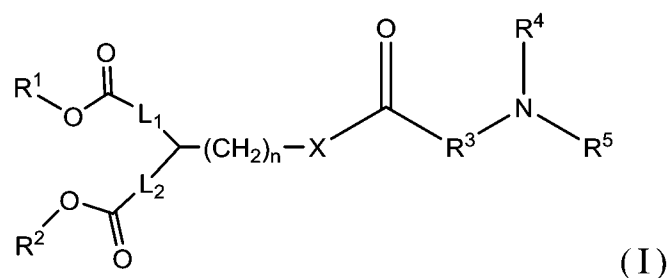
脂質奈米粒子

【0115】與脂質體及陽離子脂質體相反，脂質奈米粒子(LNP)具有包括將化合物囊封於固相中之單一單層或雙層脂質之結構。因此，與脂質體不同，脂質奈米粒子在其內部不具水相或其他液相，而是雙層或單層殼之脂質直接與內部化合物複合，由此將其囊封於固體核心中。脂質奈米粒子通常係具有相對均勻之形狀及大小分配之球形囊泡。儘管關於使脂質粒子有資格作為奈米粒子之大小的來源有所不同，但有一點係一致的，即脂質奈米粒子可具有介於10 nm至1000 nm範圍內之直徑。然而，更通常認為其小於120 nm或甚至100 nm。

【0116】對於脂質奈米粒子核酸遞送系統，脂質殼可經調配以包括可與核酸核心之帶負電骨架複合並締合之可離子化陽離子脂質。表觀 pK_a 值低於約7之可離子化陽離子脂質具有提供陽離子脂質之益處，該陽離子脂質在低於帶正電之可離子化脂質之 pK_a 的 pH 值下與核酸之帶負電骨架複合並負載至脂質奈米粒子中。在生理 pH 值下，脂質奈米粒子則可採用相對中性之外部，從而顯著增加粒子在i.v.投與後之循環半衰期。在核酸遞送之背景下，脂質奈米粒子與其他基於脂質之核酸遞送系統相比提供許多優點，包括高核酸囊封效率、強效轉染、改良之組織穿透以遞送治療劑及低細胞毒性及免疫原性水準。

【0117】在開發用於核酸之脂質奈米粒子遞送系統之前，陽離子脂質廣泛地研究為遞送核酸藥物之合成材料。在該等早期努力中，在生理 pH 下混合在一起後，核酸由陽離子脂質縮合形成脂質-核酸複合物，稱為脂複合物。然而，脂複合物證實係不穩定的且特徵在於介於亞微米級至幾微米範圍內之寬大小分佈。已發現脂複合物(例如Lipofectamine®試劑)於活體外轉染之相當效用。然而，該等第一代脂複合物尚未證實可用於活體內。大粒徑及正電荷(由陽離子脂質賦予)產生快速血漿清除率、溶血及其他毒性以及免疫系統活化。

【0118】在一些實施例中，脂質奈米粒子包含式I之脂質：



或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物，其中： R^1 及 R^2 各自獨立地係 $(CH_3(CH_2)_m)_2CH-$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-1})CH-$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-2})CH-$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)_2CHCH_2-$ 或 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-1})CHCH_2-$ ，其中 m 係4-11； L^1 及 L^2 各自獨立地係不存在、直鏈 C_{1-5} 伸烷基或 $(CH_2)_p-O-(CH_2)_q$ ，其中 p 及 q 各自獨立地係1-3； R^3 係視情況地經一或兩個甲基取代之直鏈 C_{2-5} 伸烷基； R^4 及 R^5 各自獨立地係H或 C_{1-6} 烷基； X 係O或S；且 n 係0-2。

【0119】在一些實施例中，可明確排除本文所列舉之任一或多種脂質。

【0120】在一些實施例中，本揭示案提供脂質奈米粒子，其包含複數種配位體，其中每一配位體獨立地係本文所述之化合物，其中複數種配位體自組裝形成包含內部及外部之脂質奈米粒子。

【0121】在一些實施例中，脂質奈米粒子之平均大小係約100 nm。在一些實施例中，脂質奈米粒子之平均大小小於約100 nm。在一些實施例中，脂質奈米粒子之平均粒徑係約40 nm至約100 nm。在一些實施例中，脂質奈米粒子之平均粒徑係約50 nm至約90 nm。在一些實施例中，脂

質奈米粒子之平均粒徑係約55 nm至約85 nm。

【0122】在一些實施例中，脂質奈米粒子在內部進一步包含核酸。在一些實施例中，核酸選自 siRNA、mRNA、自複製 RNA、DNA 質體及反義寡核苷酸。在一些實施例中，核酸係包含編碼所關注治療蛋白之編碼區之 mRNA 或自複製 RNA。在一些實施例中，所關注治療蛋白係酶及抗體、抗原、受體或轉運子。在一些實施例中，所關注治療蛋白係基因編輯酶。在一些實施例中，基因編輯酶選自 TALEN、CRISPR、大範圍核酸酶或鋅指核酸酶。

【0123】在一些實施例中，脂質奈米粒子在內部進一步包含 siRNA 或 mRNA。在一些實施例中，脂質奈米粒子在內部進一步包含 mRNA。

【0124】在一些實施例中，脂質奈米粒子進一步包含如下文所述之輔助脂質。在一些實施例中，脂質奈米粒子進一步包含如本文所述之 PEG-脂質結合物。

【0125】在一些實施例中，脂質奈米粒子包含約 45 mol% 至 65 mol% 之本發明化合物、約 2 mol% 至約 15 mol% 之輔助脂質、約 20 mol% 至約 42 mol% 之膽固醇及約 0.5 mol% 至約 3 mol% 之 PEG-脂質結合物。在一些實施例中，脂質奈米粒子包含約 50 mol% 至約 61 mol% 之本發明化合物、約 5 mol% 至約 9 mol% 之輔助脂質、約 29 mol% 至約 38 mol% 之膽固醇及約 1 mol% 至約 2 mol% 之 PEG-脂質結合物。在一些實施例中，脂質奈米粒子包含約 56 mol% 至約 58 mol% 之本發明化合物、約 6 mol% 至約 8 mol% 之 DSPC、

約 31 mol% 至約 34 mol% 之膽固醇及約 1.25 mol% 至約 1.75 mol% 之 PEG-脂質結合物。

【0126】在一些實施例中，脂質奈米粒子包含約 50 mol% 至 61 mol% 之本發明化合物、約 2 mol% 至約 12 mol% 之 DSPC、約 25 mol% 至約 42 mol% 之膽固醇及約 0.5 mol% 至約 3 mol% 之 PEG2000-DMG。在一些實施例中，脂質奈米粒子包含約 50 mol% 至約 61 mol% 之本發明化合物、約 5 mol% 至約 9 mol% 之 DSPC、約 29 mol% 至約 38 mol% 之膽固醇及約 1 mol% 至約 2 mol% 之 PEG2000-DMG。在一些實施例中，脂質奈米粒子包含約 56 mol% 至約 58 mol% 之本發明化合物、約 6 mol% 至約 8 mol% 之 DSPC、約 31 mol% 至約 34 mol% 之膽固醇及約 1.25 mol% 至約 1.75 mol% 之 PEG2000-DMG。

【0127】在一些實施例中，脂質奈米粒子之總脂質:核酸重量比係約 50:1 至約 10:1。在一些實施例中，脂質奈米粒子之總脂質:核酸重量比係約 40:1 至約 20:1。在一些實施例中，脂質奈米粒子之總脂質:核酸重量比係約 35:1 至約 25:1。在一些實施例中，脂質奈米粒子之總脂質:核酸重量比係約 32:1 至約 28:1。在一些實施例中，脂質奈米粒子之總脂質:核酸重量比係約 31:1 至約 29:1。

【0128】在一些實施例中，脂質奈米粒子之總脂質:mRNA 重量比係約 50:1 至約 10:1。在一些實施例中，脂質奈米粒子之總脂質:mRNA 重量比係約 40:1 至約 20:1。在一些實施例中，脂質奈米粒子之總脂質:mRNA 重量比係約

35:1至約25:1。在一些實施例中，脂質奈米粒子之總脂質:mRNA重量比係約32:1至約28:1。在一些實施例中，脂質奈米粒子之總脂質:mRNA重量比係約31:1至約29:1。

【0129】在一些實施例中，脂質奈米粒子奈米粒子包含pH為約7.4之HEPES緩衝液。在一些實施例中，HEPES緩衝液之濃度係約7 mg/mL至約15 mg/mL。在一些實施例中，脂質奈米粒子進一步包含約2.0 mg/mL至約4.0 mg/mL之NaCl。

【0130】在一些實施例中，脂質奈米粒子進一步包含一或多種冷凍保護劑。在一些實施例中，一或多種冷凍保護劑選自蔗糖、甘油或蔗糖及甘油之組合。在一些實施例中，脂質奈米粒子包含濃度為約70 mg/mL至約110 mg/mL之蔗糖及濃度為約50 mg/mL至約70 mg/mL之甘油的組合。

脂質-核酸調配物

【0131】核酸或其醫藥學上可接受之鹽可納入脂質調配物(即基於脂質之遞送媒劑)中。

【0132】在本揭示案之上下文中，基於脂質之遞送媒劑通常用於將期望核酸(siRNA、質體DNA、mRNA、自複製RNA等)轉運至靶細胞或組織。基於脂質之遞送媒劑可為此項技術中已知之任一適宜基於脂質之遞送媒劑。在一些實施例中，基於脂質之遞送媒劑係脂質體、陽離子脂質體或含有核酸之脂質奈米粒子。在一些實施例中，基於脂質之遞送媒劑包含脂質分子及核酸之奈米粒子或雙層。在

一些實施例中，脂質雙層較佳地進一步包含中性脂質或聚合物。在一些實施例中，脂質調配物較佳地包含液體介質。在一些實施例中，調配物較佳地進一步囊封核酸。在一些實施例中，脂質調配物較佳地進一步包含核酸及中性脂質或聚合物。在一些實施例中，脂質調配物較佳地囊封核酸。

【0133】本描述提供脂質調配物，其包含囊封於脂質調配物中之一或多種治療性核酸分子。在一些實施例中，脂質調配物包含脂質體。在一些實施例中，脂質調配物包含陽離子脂質體。在一些實施例中，脂質調配物包含脂質奈米粒子。

【0134】在一些實施例中，核酸完全囊封於脂質調配物之脂質部分內，使得脂質調配物中之核酸在水溶液中抵抗核酸酶降解。在其他實施例中，本文所述之脂質調配物對哺乳動物(例如人類)實質上係無毒的。

【0135】本揭示案之脂質調配物之總脂質:核酸比(質量/質量比)通常亦為約1:1至約100:1、約1:1至約50:1、約2:1至約45:1、約3:1至約40:1、約5:1至約38:1、或約6:1至約40:1、或約7:1至約35:1、或約8:1至約30:1；或約10:1至約25:1；或約8:1至約12:1；或約13:1至約17:1；或約18:1至約24:1；或約20:1至約30:1。在一些較佳實施例中，總脂質:核酸比(質量/質量比)係約10:1至約25:1。比率可為所列舉範圍(包括終點)內之任一值或子值。

【0136】本揭示案之脂質調配物之平均直徑通常係約

30 nm至約150 nm、約40 nm至約150 nm、約50 nm至約150 nm、約60 nm至約130 nm、約70 nm至約110 nm、約70 nm至約100 nm、約80 nm至約100 nm、約90 nm至約100 nm、約70至約90 nm、約80 nm至約90 nm、約70 nm至約80 nm或約30 nm、約35 nm、約40 nm、約45 nm、約50 nm、約55 nm、約60 nm、約65 nm、約70 nm、約75 nm、約80 nm、約85 nm、約90 nm、約95 nm、約100 nm、約105 nm、約110 nm、約115 nm、約120 nm、約125 nm、約130 nm、約135 nm、約140 nm、約145 nm或約150 nm，且實質上係無毒的。直徑可為所列舉範圍(包括終點)內之任一值或子值。另外，核酸在存在於本揭示案之脂質奈米粒子中時在水溶液中抵抗核酸酶降解。

【0137】在較佳實施例中，脂質調配物包含核酸、陽離子脂質(例如本文所述之一或多種陽離子脂質或其鹽)、磷脂及抑制粒子聚集之結合脂質(例如本揭示案之一或多種PEG-脂質結合物及/或其他脂質結合物)。脂質調配物亦可包括膽固醇。

【0138】在一些實施例中，脂質奈米粒子進一步包含PEG-脂質結合物。在一些實施例中，PEG-脂質結合物係PEG-DMG。在一些實施例中，PEG-DMG係PEG2000-DMG。

【0139】在核酸-脂質調配物中，核酸可完全囊封於調配物之脂質部分內，由此保護核酸免於核酸酶降解。在較佳實施例中，包含核酸之脂質調配物完全囊封於脂質調

配物之脂質部分內，由此保護核酸免於核酸酶降解。在某些情況下，在粒子於37℃下暴露於核酸酶至少20分鐘、30分鐘、45分鐘或60分鐘後，脂質調配物中之核酸實質上並不降解。在某些其他情況下，在將調配物在血清中在37℃下培育至少30分鐘、45分鐘或60分鐘或至少2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、12小時、14小時、16小時、18小時、20小時、22小時、24小時、26小時、28小時、30小時、32小時、34小時或36小時後，脂質調配物中之核酸實質上並不降解。在其他實施例中，核酸與調配物之脂質部分複合。

【0140】在核酸之背景下，完全囊封可藉由實施膜不透性螢光染料排除分析來測定，該分析使用與核酸締合時具有增強的螢光之染料。囊封係藉由以下方式來測定：將染料添加至脂質調配物中，量測所得螢光，及比較其與在添加少量非離子清潔劑後觀察到之螢光。清潔劑介導之脂質層破裂會釋放囊封之核酸，從而允許其與膜不透性染料相互作用。核酸囊封可計算為 $E=(I_0-I)/I_0$ ，其中I及 I_0 係指添加清潔劑之前及之後的螢光強度。

【0141】在其他實施例中，本揭示案提供核酸-脂質組合物，其包含複數個核酸-脂質體、核酸-陽離子脂質體或核酸-脂質奈米粒子。在一些實施例中，核酸-脂質組合物包含複數個核酸-脂質體。在一些實施例中，核酸-脂質組合物包含複數個核酸-陽離子脂質體。在一些實施例中，核酸-脂質組合物包含複數個核酸-脂質奈米粒子。

【0142】在一些實施例中，脂質調配物包含核酸，其完全囊封於調配物之脂質部分內，使得約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約30%至約95%、約40%至約95%、約50%至約95%、約60%至約95%、約70%至約95%、約80%至約95%、約85%至約95%、約90%至約95%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%或至少約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%或約99% (或其任一分數或其中之範圍)之粒子具有囊封於其中之核酸。量可為所列舉範圍(包括終點)內之任一值或子值。

【0143】端視脂質調配物之預期用途，各組分之比例可發生變化，且可使用此項技術中已知之分析來量測特定調配物之遞送效率。

【0144】根據一些實施例，可對可表現多核苷酸、核酸活性劑及mRNA構築物進行脂質調配。脂質調配物較佳地選自(但不限於)脂質體、陽離子脂質體及脂質奈米粒子。在一個較佳實施例中，脂質調配物係陽離子脂質體或脂質奈米粒子(LNP)，其包含：

(a) 核酸(mRNA、siRNA等)，

(b) 本揭示案之脂質，其可為陽離子脂質

- (c) 視情況地非陽離子脂質(例如中性脂質)，及
- (d) 視情況地固醇。

陽離子脂質

【0145】脂質調配物較佳地包括適於形成陽離子脂質體或脂質奈米粒子之陽離子脂質。陽離子脂質經廣泛研究用於核酸遞送，此乃因其可結合至帶負電之膜並誘導攝取。通常，陽離子脂質係含有陽性親水頭基、兩個(或更多個)親脂尾或類固醇部分及介於該兩個結構域之間的連接件之兩親體。較佳地，陽離子脂質在約生理pH下攜載淨正電荷。陽離子脂質體傳統上最常用於寡核苷酸(包括質體DNA、反義寡聚物及siRNA/小髮夾RNA-shRNA)之非病毒遞送系統。陽離子脂質(例如DOTAP (1,2-二油醯基-3-三甲基銨-丙烷)及DOTMA (N-[1-(2,3-二油醯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基-銨硫酸甲酯))可藉由靜電相互作用與帶負電之核酸形成複合物或脂複合物，從而提供高活體外轉染效率。

【0146】在當前揭示之脂質調配物中，陽離子脂質可包括例如N,N-二甲基-N,N-二-9-順式-十八烯基氯化銨(DODAC)、N,N-二硬脂醯基-N,N-二甲基溴化銨(DDAB)、1,2-二油醯基三甲基銨丙烷氯化物(DOTAP) (亦稱為N-(2,3-二油醯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨及1,2-二油烯基氧基-3-三甲基胺基丙烷氯化物鹽)、N-(1-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)、N,N-二甲

基-2,3-二油烯基氧基)丙基胺(DODMA)、1,2-二亞油酸基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA)、1,2-二次亞麻油基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -次亞麻油基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ -DLenDMA)、1,2-二亞油酸基胺甲醯基氧基-3-二甲基胺基丙烷(DLin-C-DAP、1,2-二亞油酸基氧基-3-(二甲基胺基)乙醯基丙烷(DLin-DAC、1,2-二亞油酸基氧基-3-嗎啉基丙烷(DLin-MA、1,2-二亞油醯基-3-二甲基胺基丙烷(DLinDAP、1,2-二亞油酸基硫基-3-二甲基胺基丙烷(DLin-S-DMA、1-亞油醯基-2-亞油酸基氧基-3-二甲基胺基丙烷(DLin-2-DMAP、1,2-二亞油酸基氧基-3-三甲基胺基丙烷氯化物鹽(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亞油醯基-3-三甲基胺基丙烷氯化物鹽(DLin-TAP.Cl、1,2-二亞油酸基氧基-3-(N-甲基六氫吡嗪基)丙烷(DLin-MPZ)或3-(N,N-二亞油酸基胺基)-1,2-丙二醇(DLinAP、3-(N,N-二油烯基胺基)-1,2-丙二醇(DOAP、1,2-二亞油酸基側氧基-3-(2-N,N-二甲基胺基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA、2,2-二亞油酸基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-DMA)或其類似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)四氫-3aH-環戊[d][1,3]二氧雜環戊烯-5-胺、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基胺基)丁酸酯(MC3、1,1'-(2-(4-(2-((2-(雙(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)六氫吡嗪-1-基)乙基氮烷二基)雙十二烷-2-醇(C12-200、2,2-二亞油酸基-4-(2-二甲基胺基乙基)-[1,3]-二氧戊環

(DLin-K-C2-DMA、2,2-二亞油酸基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-DMA、3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(MC3醚、4-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丁-1-胺(MC4醚)或其任一組合。其他陽離子脂質包括(但不限於) N,N-二硬脂醯基-N,N-二甲基溴化銨(DDAB)、3P-(N-(N',N'-二甲基胺基乙烷)-胺甲醯基)膽固醇(DC-Chol)、N-(1-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N-2-(精胺甲醯胺基)乙基)-N,N-二甲基三氟乙酸銨(DOSPA)、雙十八烷基醯胺基甘胺醯羧精胺(DOGS)、1,2-二油醯基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二油醯基-3-二甲基銨丙烷(DODAP)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羥基乙基溴化銨(DMRIE)及2,2-二亞油酸基-4-二甲基胺基乙基-[1,3]-二氧戊環(XTC)。另外，可使用陽離子脂質之商業製劑，例如LIPOFECTIN(包括DOTMA及DOPE，可自GIBCO/BRL獲得)及Lipofectamine(包含DOSPA及DOPE，可自GIBCO/BRL獲得)。

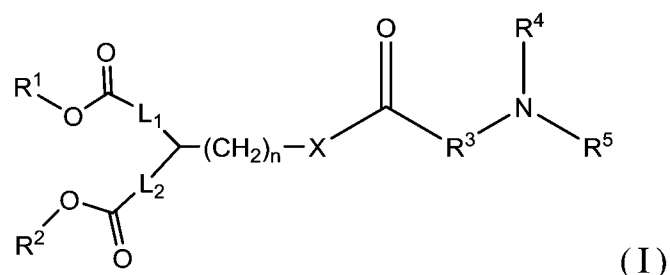
【0147】其他適宜陽離子脂質揭示於國際公開案第WO 09/086558號、國際公開案第WO 09/127060號、國際公開案第WO 10/048536號、國際公開案第WO 10/054406號、國際公開案第WO 10/088537號、國際公開案第WO 10/129709號及國際公開案第WO 2011/153493號；美國專利公開案第2011/0256175號、美國專利公開案第2012/0128760號及美國專利公開案第2012/0027803號；美

國專利第8,158,601號；及Love等人，PNAS, 107(5), 1864-69, 2010中，該等文獻之內容以引用方式併入本文中。

【0148】其他適宜陽離子脂質包括具有替代脂肪酸基團及其他二烷基胺基之彼等脂質，包括其中烷基取代基不同(例如N-乙基-N-甲基胺基-及N-丙基-N-乙基胺基-)之彼等脂質。該等脂質係陽離子脂質之子類(稱為胺脂質)之一部分。在本文所述脂質調配物之一些實施例中，陽離子脂質係胺脂質。一般而言，具有較不飽和烷基鏈之胺脂質更容易定大小，尤其當複合物之大小必須低於約0.3微米時，用於無菌過濾之目的。可使用含有不飽和脂肪酸且碳鏈長度介於C₁₄至C₂₂範圍內之胺脂質。亦可使用其他支架來分離胺脂質之胺基及脂肪酸或脂肪烷基部分。

【0149】在一些實施例中，本揭示案之陽離子脂質係可離子化的且具有至少一個可質子化或可去質子化基團，使得脂質在等於或低於生理pH(例如pH 7.4)之pH下帶正電，且在第二pH、較佳地等於或高於生理pH下為中性。當然，應理解，隨著pH變化添加或移除質子係平衡過程，且提及帶電或中性脂質係指優勢種類之性質且並不要求所有脂質皆以帶電或中性形式存在。不排除在本揭示案中使用具有一個以上可質子化或可去質子化基團或為兩親離子性之脂質。在某些實施例中，可質子化脂質具有介於約4至約11範圍內之可質子化基團之pK_a。在一些實施例中，可離子化陽離子脂質之pK_a係約5至約7。在一些實施例中，可離子化陽離子脂質之pK_a係約6至約7。

【0150】 在一些實施例中，脂質調配物包含式I之脂質：



或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物，其中： R^1 及 R^2 各自獨立地係 $(CH_3(CH_2)_m)_2CH-$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-1})CH-$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-2})CH-$ 、 $(CH_3(CH_2)_m)_2CHCH_2-$ 或 $(CH_3(CH_2)_m)(CH_3(CH_2)_{m-1})CHCH_2-$ ，其中 m 係4-11； L^1 及 L^2 各自獨立地係不存在、直鏈 C_{1-5} 伸烷基或 $(CH_2)_p-O-(CH_2)_q$ ，其中 p 及 q 各自獨立地係1-3； R^3 係視情況地經一或兩個甲基取代之直鏈 C_{2-5} 伸烷基； R^4 及 R^5 各自獨立地係H或 C_{1-6} 烷基； X 係O或S；且 n 係0-2。

【0151】 在一些實施例中，可明確排除本文所列舉之任一或多種脂質。

輔助脂質及固醇

【0152】 本揭示案之mRNA-脂質調配物可包含輔助脂質，其可稱為中性脂質、中性輔助脂質、非陽離子脂質、非陽離子輔助脂質、陰離子脂質、陰離子輔助脂質或兩親離子性脂質。已發現，若輔助脂質存在於調配物中，則脂質調配物、尤其陽離子脂質體及脂質奈米粒子具有增加的細胞攝取。(Curr. Drug Metab. 2014; 15(9):882-92)。舉例

而言，一些研究已指示，中性及兩親離子性脂質(例如 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷脂醯膽鹼(DOPC)、二-油醯基-磷脂醯-乙醇胺(DOPE)及 1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)，其比陽離子脂質更致融(即促進融合))可影響脂質-核酸複合物之多型性特徵，從而促進自層狀相向六方相轉變，且因此誘導細胞膜之融合及破裂。(Nanomedicine (Lond). 2014年1月; 9(1):105-20)。另外，使用輔助脂質可幫助減少來自使用許多流行陽離子脂質之任何潛在有害之效應，例如毒性及免疫原性。

【0153】適於本揭示案之脂質調配物之非限制性實例非陽離子脂質包括磷脂，例如卵磷脂、磷脂醯乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、腦磷脂、心磷脂、磷脂酸、腦苷脂、磷酸雙十六烷基酯、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPC)、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二油醯基磷脂醯甘油(DOPG)、二棕櫚醯基磷脂醯甘油(DPPG)、二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、棕櫚醯基油醯基-磷脂醯膽鹼(POPC)、棕櫚醯基油醯基-磷脂醯乙醇胺(POPE)、棕櫚醯基油醯基-磷脂醯甘油(POPG)、二油醯基磷脂醯乙醇胺4-(N-馬來醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯(DOPE-mal)、二棕櫚醯基-磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻醯基-磷脂醯乙醇胺(DMPE)、二硬脂醯基-磷脂醯乙醇胺(DSPE)、單甲基-磷脂醯乙醇胺、二甲基-磷脂醯乙醇胺、二反油醯基-磷脂醯乙醇胺(DEPE)、硬脂

醯基油醯基-磷脂醯乙醇胺(SOPE)、溶血磷脂醯膽鹼、二亞油醯基磷脂醯膽鹼及其混合物。亦可使用其他二醯基磷脂醯膽鹼及二醯基磷脂醯乙醇胺磷脂。該等脂質中之醯基較佳地係衍生自具有C10-C24碳鏈之脂肪酸之醯基，例如月桂醯基、肉豆蔻醯基、棕櫚醯基、硬脂醯基或油醯基。

【0154】在一些實施例中，輔助脂質選自：二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油(DMPG)、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)及磷脂醯膽鹼(PC)。在一些實施例中，輔助脂質係二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)。

【0155】非陽離子脂質之其他實例包括固醇，例如膽固醇及其衍生物。一項研究推斷出，作為輔助脂質，膽固醇會增加與核酸介接之脂質層之電荷間距，從而使得電荷分佈與核酸之電荷分佈更緊密地匹配。(J. R. Soc. Interface. 2012年3月7日；9(68): 548-561)。膽固醇衍生物之非限制性實例包括極性類似物，例如5 α -膽甾烷醇、5 α -糞甾烷醇、膽固醇基-(2'-羥基)-乙醚、膽固醇基-(4'-羥基)-丁基醚及6-酮膽甾烷醇；非極性類似物，例如5 α -膽甾烷、膽甾烯酮、5 α -膽甾烷酮、5 α -膽甾烷酮及膽固醇基癸酸酯；及其混合物。在較佳實施例中，膽固醇衍生物係極性類似物，例如膽固醇基-(4'-羥基)-丁基醚。

【0156】在一些實施例中，存在於脂質調配物中之輔助脂質包含一或多種磷脂及膽固醇或其衍生物之混合物或

由其組成。在其他實施例中，存在於脂質調配物中之輔助脂質包含一或多種磷脂或由其組成，例如不含膽固醇之脂質調配物。在其他實施例中，存在於脂質調配物中之輔助脂質包含膽固醇或其衍生物或由其組成，例如不含磷脂之脂質調配物。在一些實施例中，脂質奈米粒子進一步包含膽固醇。

【0157】輔助脂質之其他實例包括不含磷之脂質，例如硬脂醯胺、十二烷基胺、十六烷基胺、棕櫚酸乙醯酯、蓖麻油酸甘油酯、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸異丙基酯、兩親性丙烯酸聚合物、三乙醇胺-月桂基硫酸鹽、烷基-芳基硫酸鹽聚乙氧基化脂肪酸醯胺、雙十八烷基二甲基溴化銨、神經醯胺及鞘磷脂。

【0158】在一些實施例中，輔助脂質佔存在於脂質調配物中之總脂質的約1 mol%至約50 mol%、約5 mol%至約48 mol%、約5 mol%至約46 mol%、約25 mol%至約44 mol%、約26 mol%至約42 mol%、約27 mol%至約41 mol%、約28 mol%至約40 mol%或約29 mol%、約30 mol%、約31 mol%、約32 mol%、約33 mol%、約34 mol%、約35 mol%、約36 mol%、約37 mol%、約38 mol%或約39 mol% (或其任一分數或其中之範圍)。在一些實施例中，輔助脂質佔約1 mol%至約20 mol%、約2 mol%至約12 mol%、約5 mol%至約9 mol%或約6 mol%至約8 mol%。

【0159】在一些實施例中，調配物中之總輔助脂質包含兩種或更多種輔助脂質，且輔助脂質之總量佔存在於脂

質調配物中之總脂質的約 20 mol% 至約 50 mol%、約 22 mol% 至約 48 mol%、約 24 mol% 至約 46 mol%、約 25 mol% 至約 44 mol%、約 26 mol% 至約 42 mol%、約 27 mol% 至約 41 mol%、約 28 mol% 至約 40 mol% 或約 29 mol%、約 30 mol%、約 31 mol%、約 32 mol%、約 33 mol%、約 34 mol%、約 35 mol%、約 36 mol%、約 37 mol%、約 38 mol% 或約 39 mol% (或其任一分數或其中之範圍)。在一些實施例中，輔助脂質係 DSPC 及 DOTAP 之組合。在一些實施例中，輔助脂質係 DSPC 及 DOTMA 之組合。

【0160】脂質調配物中之膽固醇或膽固醇衍生物可佔存在於脂質調配物中之總脂質的高達約 40 mol%、約 45 mol%、約 50 mol%、約 55 mol% 或約 60 mol%。在一些實施例中，膽固醇或膽固醇衍生物佔存在於脂質調配物中之總脂質的約 15 mol% 至約 45 mol%、約 20 mol% 至約 40 mol%、約 30 mol% 至約 40 mol% 或約 35 mol%、約 36 mol%、約 37 mol%、約 38 mol%、約 39 mol% 或約 40 mol%。

【0161】存在於脂質調配物中之輔助脂質之百分比係目標量，且存在於調配物中之輔助脂質之實際量可變化例如 ± 5 mol%。

脂質調配物之細胞攝取之作用機制

【0162】用於細胞內遞送核酸之脂質調配物、具體而言脂質體、陽離子脂質體及脂質奈米粒子經設計以經由利用靶細胞之胞吞機制穿透靶細胞進行細胞攝取，其中將脂

質遞送媒劑之內容物遞送至靶細胞之胞質液。(Nucleic Acid Therapeutics, 28(3):146-157, 2018)。特定而言，在本文所述之核酸-脂質調配物之情形下，脂質調配物經由受體介導之胞吞作用進入細胞。在胞吞作用之前，脂質遞送媒劑表面之官能化配位體(例如本揭示案之脂質結合物)可自表面脫落，此觸發內化至靶細胞中。在胞吞作用期間，細胞質膜之一部分包圍載體且將其吞噬至囊泡中，該囊泡隨後脫離細胞膜，進入胞質液且最終經受內溶酶體路徑。對於含有可離子化陽離子脂質之遞送媒劑，隨著胞內體老化增加之酸度使媒劑表面具有強正電荷。遞送媒劑與胞內體膜之間的相互作用隨後引起導致酬載之胞質遞送之膜融合事件。對於 mRNA 或自複製 RNA 酬載，細胞自身之內部轉譯過程隨後將 RNA 轉譯成經編碼蛋白質。經編碼蛋白質可進一步經受轉譯後處理，包括轉運至細胞內之靶向細胞器或位置。

【0163】藉由控制脂質結合物之組成及濃度，吾人可控制脂質結合物交換出脂質調配物時之速率，且進而控制脂質調配物變得致溶時之速率。另外，可使用其他變量(包括例如 pH、溫度或離子強度)來改變及/或控制脂質調配物變得致溶時之速率。熟習此項技術者在閱讀本揭示案後將明瞭可用於控制脂質調配物變得致溶時之速率之其他方法。另外，藉由控制脂質結合物之組成及濃度，吾人可控制脂質體或脂質粒徑。

脂質調配物製造

【0164】存在許多不同的製備包含核酸之脂質調配物之方法。(Curr. Drug Metabol. 2014, 15, 882-892 ; Chem. Phys. Lipids 2014, 177, 8-18 ; Int. J. Pharm. Stud. Res. 2012, 3, 14-20)。本文簡要闡述薄膜水合、雙乳化、反相蒸發、微流體製備、雙重不對稱離心、乙醇注射、清潔劑透析、藉由乙醇稀釋自發形成囊泡及囊封於預先形成之脂質體中之技術。

薄膜水合

【0165】在薄膜水合(TFH)或薄膜分散法(Bangham method)中，將脂質溶解於有機溶劑中，然後經由使用旋轉蒸發器蒸發，形成薄脂質層。在藉由含有欲負載化合物之水性緩衝溶液進行層水合後，形成多層囊泡(MLV)，可藉由擠出通過膜或藉由起始MLV之超音波處理減小其大小以產生小或大的單層囊泡(LUV及SUV)。

雙乳化

【0166】脂質調配物亦可經由雙乳化技術來裝備，該技術涉及將脂質溶解於水/有機溶劑混合物中。將含有水滴之有機溶液與過量水性介質混合，形成水包油包水(W/O/W)雙乳液。機械劇烈振蕩後，部分水滴破裂，給出大單層囊泡(LUV)。

反相蒸發

【0167】反相蒸發(REV)方法亦允許吾人達成負載有核酸之LUV。在此技術中，藉由將磷脂溶解於有機溶劑及水性緩衝液中形成兩相系統。然後對所得懸浮液進行短暫超音波處理直至混合物變成澄清單相分散液。在減壓下蒸發有機溶劑後達成脂質調配物。此技術已用於囊封包括核酸之不同的大及小親水性分子。

微流體製備

【0168】與其他整體技術不同，微流體方法給出控制脂質水合過程之可能性。根據操縱流動之方式，該方法可分成連續流動之微流體及基於液滴之微流體。在以連續流動模式操作之微流體流體力學聚焦(MHF)方法中，脂質溶解於異丙醇中，異丙醇在兩個水性緩衝液流之間的微通道交叉接合處以流體力學方式聚焦。可藉由調節流動速率來控制囊泡大小，由此控制脂質溶液/緩衝液稀釋過程。該方法可藉由使用由三入口及一出口埠組成之微流體器件用於產生寡核苷酸(ON)脂質調配物。

雙重不對稱離心

【0169】雙重不對稱離心(DAC)不同於更常見之離心，此乃因其使用繞其自身垂直軸之額外旋轉。因生成兩個疊加移動而達成高效均質化：樣品被向外推出，如在正常離心機中，且然後其因額外旋轉而被推向瓶之中心。藉

由混合脂質及 NaCl 溶液，達成黏性囊泡狀磷脂凝膠 (VPC)，然後將其稀釋以獲得脂質調配物分散液。可藉由最佳化 DAC 速度、脂質濃度及均質化時間來調控脂質調配物大小。

乙醇注射

【0170】乙醇注射 (EI) 方法可用於核酸囊封。此方法經由使用針提供將其中溶解脂質之乙醇溶液快速注射至含有欲囊封核酸之水性介質中。當磷脂分散在整個介質中時，自發形成囊泡。

清潔劑透析

【0171】清潔劑透析方法可用於囊封核酸。簡言之，將脂質及質體溶解於適當離子強度之清潔劑溶液中，藉由透析移除清潔劑後形成穩定脂質調配物。然後藉由離子交換層析移除未經囊封之核酸且藉由蔗糖密度梯度離心移除空囊泡。該技術對陽離子脂質含量及透析緩衝液之鹽濃度高度敏感，且該方法亦難以規模化。

藉由乙醇稀釋自發形成囊泡

【0172】穩定的脂質調配物亦可經由藉由乙醇稀釋自發形成囊泡方法來產生，其中逐步或逐滴乙醇稀釋藉由將溶解於乙醇中之脂質受控添加至快速混合的含有核酸之水性緩衝液中來提供負載有核酸之囊泡之瞬時形成。

V. 醫藥組合物及遞送方法

【0173】為促進活體內核酸活性(例如 mRNA 表現或藉由 ASO 或 siRNA 之減弱)，可將本文所述之脂質調配物遞送媒劑與一或多種其他核酸、載劑、靶向配位體或穩定試劑組合，或在其與適宜賦形劑混合之藥理學組合物中組合。用於藥物調配及投與之技術可參見「Remington's Pharmaceutical Sciences」，Mack Publishing Co., Easton, Pa.，最新版。

【0174】本揭示案之脂質調配物及醫藥組合物可根據當前醫學實踐投與及給藥，將個體之臨床疾患、投與之位點及方法、投與之時間安排、個體之年齡、性別、體重及與熟習此項技術者之臨床醫師相關之其他因素考慮在內。用於本文目的之「有效量」可根據如熟習實驗臨床研究、藥理學、臨床及醫學技術者已知之該等相關考慮因素來確定。在一些實施例中，投與之量可有效地達成症狀及如由熟習此項技術者選擇作為疾病進展、消退或改良之適當量度的其他指標之至少一定穩定、改良或消除。舉例而言，適宜量及給藥方案係引起至少短暫蛋白質(例如酶)產生之量及給藥方案。

【0175】本文所述之醫藥組合物可為可吸入組合物。適宜投與途徑包括例如氣管內、吸入或鼻內。在一些實施例中，投與可將核酸遞送至肺上皮細胞。在一些實施例中，與其他類型之肺細胞及氣道細胞相比，投與顯示針對

肺上皮細胞之選擇性。

【0176】本文所揭示之醫藥組合物可使用一或多種賦形劑來調配以：(1)增加穩定性；(2)增加細胞轉染；(3)容許持續或延遲釋放(例如自核酸之儲積調配物)；(4)改變生物分佈(例如使核酸靶向特定組織或細胞類型)；(5)增加核酸或自其表現之蛋白質之活體內活性；及/或(6)改變核酸或經編碼蛋白質之活體內釋放概況。

【0177】較佳地，脂質調配物可以局部而非全身方式來投與。局部遞送可以多種方式實現，此端視欲靶向之組織而定。舉例而言，含有本揭示案組合物之氣溶膠可為吸入的(用於鼻、氣管或支氣管遞送)。

【0178】醫藥組合物可投與任一期望組織。在一些實施例中，由本揭示案之脂質調配物或組合物遞送之核酸在投與脂質調配物及/或組合物之組織中係有活性的。在一些實施例中，核酸在不同於投與脂質調配物及/或組合物之組織中之組織中係有活性的。可遞送核酸之實例組織包括(但不限於)肺、氣管及/或鼻道、肌肉、肝臟、眼或中樞神經系統。

【0179】本文所述之醫藥組合物可藉由藥理學技術中已知或此後開發之任一方法來製備。一般而言，該等製備方法包括締合活性成分(即核酸)與賦形劑及/或一或多種其他輔助成分之步驟。本揭示案之醫藥組合物可以整體、以單一單位劑量、及/或以複數個單一單位劑量來製備、包裝及/或出售。

【0180】醫藥組合物可另外包含醫藥學上可接受之賦形劑，其如本文所用包括(但不限於)如適於期望具體劑量形式之任何及所有溶劑、分散介質、稀釋劑或其他液體媒劑、分散或懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠或乳化劑、防腐劑及諸如此類。

【0181】除傳統賦形劑(例如任何及所有溶劑、分散介質、稀釋劑或其他液體媒劑、分散或懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠或乳化劑、防腐劑)外，本揭示案之賦形劑可包括(但不限於)脂質體、脂質奈米粒子、聚合物、脂複合物、核心-殼奈米粒子、肽、蛋白質、用一級DNA構築物或mRNA(例如用於移植至個體中)轉染之細胞、透明質酸酶、奈米粒子模擬物及其組合。

【0182】因此，本文所述之調配物可包括一或多種賦形劑，其各自之量共同增加脂質調配物中核酸之穩定性，增加核酸(例如mRNA或siRNA)對細胞之轉染，增加經編碼蛋白質之表現，及/或改變經編碼蛋白質之釋放概況，或增加靶天然核酸之減弱。另外，核酸可使用自組裝核酸奈米粒子來調配。

【0183】用於調配醫藥組合物之各種賦形劑及用於製備組合物之技術為此項技術中已知(參見Remington: The Science and Practice of Pharmacy，第21版，A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 2006；其全文皆以引用方式併入本文中)。習用賦形劑介質之使用可涵蓋於本揭示案實施例之範圍內，可能與物質或其衍生

物不相容之任何習用賦形劑介質除外，例如藉由產生任何不期望生物效應或另外以有害方式與醫藥組合物之任何其他組分相互作用。

【0184】 本揭示案組合物之劑量形式可為固體，其可在投與之前在液體中復原。固體可以粉末形式投與。在一些實施例中，醫藥組合物包含已凍乾之核酸脂質調配物。

【0185】 在較佳實施例中，本文所述醫藥組合物之劑量形式可為本文所述核酸-脂質奈米粒子之液體懸浮液。在一些實施例中，液體懸浮液處於緩衝溶液中。在一些實施例中，緩衝溶液包含選自由以下組成之群緩衝液：HEPES、MOPS、TES及TRIS。在一些實施例中，緩衝液之pH係約7.4。在一些較佳實施例中，緩衝液係HEPES。在一些其他實施例中，緩衝溶液進一步包含冷凍保護劑。在一些實施例中，冷凍保護劑選自糖及甘油或糖及甘油之組合。在一些實施例中，糖係二聚體糖。在一些實施例中，糖係蔗糖。在一些較佳實施例中，緩衝液包含HEPES、蔗糖及甘油，pH為7.4。在一些實施例中，將懸浮液在儲存期間冷凍且在投與前解凍。在一些實施例中，將懸浮液冷凍於低於約-70℃之溫度下。在一些實施例中，將懸浮液在可吸入投與前用無菌水稀釋。在一些實施例中，可吸入投與包括用約1體積至約4體積之無菌水稀釋懸浮液。在一些實施例中，凍乾的核酸-脂質奈米粒子調配物可重懸浮於如本文所述之緩衝液中。

【0186】 本揭示案之組合物及方法可藉由多種黏膜投

與模式(包括鼻內及/或肺內)投與個體。在本揭示案之一些態樣中，黏膜組織層包括上皮細胞層。上皮細胞可為肺、氣管、支氣管、肺泡、鼻及/或頰。本揭示案之組合物可使用習用致動器(例如機械噴霧器件)以及加壓、電活化或其他類型之致動器來投與。

【0187】本揭示案之組合物可於水溶液中以鼻或肺噴霧投與且可以噴霧形式藉由熟習此項技術者已知之多種方法分配。本揭示案組合物之肺遞送係藉由以液滴、粒子或噴霧形式投與組合物來達成，該等液滴、粒子或噴霧可為例如氣溶膠化、霧化或噴霧化的。組合物、噴霧或氣溶膠之粒子可呈液體或固體形式，例如凍乾脂質調配物。用於分配液體作為鼻噴霧之較佳系統揭示於美國專利第4,511,069號中。該等調配物可方便地藉由將本揭示案之組合物溶解於水中以產生水溶液、並使該溶液無菌來製備。調配物可呈現於多劑量容器中，例如呈現於美國專利第4,511,069號中所揭示之密封分配系統中。其他適宜鼻噴霧遞送系統已闡述於 TRANSDERMAL SYSTEMIC MEDICATION, Y. W. Chien編輯，Elsevier Publishers, New York, 1985；及美國專利第4,778,810號中。其他氣溶膠遞送形式可包括例如壓縮空氣噴霧器、噴射噴霧器、超音波噴霧器及壓電噴霧器，其遞送核酸-脂質調配物或懸浮於醫藥溶劑(例如水、乙醇或其混合物)中。

【0188】本揭示案之鼻及肺噴霧溶液通常包含核酸，視情況地調配有表面活性劑，例如非離子表面活性劑(例

如聚山梨醇酯-80)，及一或多種緩衝液，條件係納入表面活性劑不會破壞脂質調配物之結構。在本揭示案之一些實施例中，鼻噴霧溶液進一步包含推進劑。鼻噴霧溶液之pH可為pH 6.8至7.2。所用醫藥溶劑亦可為pH 4-6之弱酸性水性緩衝液。可添加其他組分以增強或維持化學穩定性，包括防腐劑、表面活性劑、分散劑或氣體。

【0189】在一些實施例中，本揭示案提供醫藥產品，其包括含有本揭示案組合物之溶液及用於肺、黏膜或鼻內噴霧或氣溶膠之致動器。

【0190】本揭示案組合物之劑量形式可為呈液滴或乳液形式或呈氣溶膠形式之液體。

【0191】本揭示案組合物之劑量形式可為固體，其可在投與之前在液體中復原。固體可以粉末形式投與。固體可呈膠囊、錠劑或凝膠之形式。

【0192】為調配本揭示案內用於肺遞送之組合物，核酸-脂質調配物可與各種醫藥學上可接受之添加劑以及用於分散核酸-脂質調配物之基底或載劑組合。添加劑之實例包括pH控制劑，例如精胺酸、氫氧化鈉、甘胺酸、鹽酸、檸檬酸及其混合物。其他添加劑包括局部麻醉劑(例如苄基醇)、等滲劑(例如氯化鈉、甘露醇、山梨醇)、吸收抑制劑(例如Tween 80)、溶解度增強劑(例如環糊精及其衍生物)、穩定劑(例如血清白蛋白)及還原劑(例如麩胱甘肽)。當用於黏膜遞送之組合物係液體時，如參考0.9% (w/v)生理鹽水溶液之張力作為單位所量測，通常將調配

物之張力調整至在黏膜中之投與位點處將不會引起實質性不可逆組織損傷時之值。通常，將溶液之張力調整至 1/3 至 3、更通常 1/2 至 2、且最通常 3/4 至 1.7 之值。

【0193】核酸-脂質調配物可分散於基底或媒劑中，該基底或媒劑可包含具有分散核酸-脂質調配物及任何期望添加劑能力之親水性化合物。基底可選自寬範圍之適宜載劑，包括(但不限於)多羧酸或其鹽、羧酸酐(例如馬來酸酐)與其他單體(例如(甲基)丙烯酸甲酯、丙烯酸等)之共聚物、親水性乙烯基聚合物(例如聚乙酸乙烯酯、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯啶酮)、纖維素衍生物(例如羥甲基纖維素、羥丙基纖維素等)及天然聚合物(例如幾丁聚糖、膠原、海藻酸鈉、明膠、透明質酸及其無毒金屬鹽)。通常，選擇生物可降解聚合物作為基底或載劑，例如聚乳酸、聚(乳酸-羥乙酸)共聚物、聚羥基丁酸、聚(羥基丁酸-羥乙酸)共聚物及其混合物。替代地或另外，可採用合成脂肪酸酯(例如聚甘油脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯等)作為載劑。親水性聚合物及其他載劑可單獨或組合使用，且可藉由部分結晶、離子鍵結、解離及諸如此類來賦予載劑增強的結構完整性。載劑可以多種形式提供，包括流體或黏性溶液、凝膠、糊劑、粉末、微球及直接施用至鼻黏膜之膜。在此背景下使用所選載劑可促進核酸-脂質調配物之吸收。

【0194】本揭示案之組合物可替代地含有如接近生理條件所需之物質作為醫藥學上可接受之載劑，例如 pH 調整

及緩衝劑、張力調整劑及潤濕劑，例如乙酸鈉、乳酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、去水山梨醇單月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯及其混合物。對於固體組合物，可使用習用無毒醫藥學上可接受之載劑，其包括例如醫藥級甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、滑石粉、纖維素、葡萄糖、蔗糖、碳酸鎂及諸如此類。

【0195】在本揭示案之某些實施例中，核酸-脂質調配物可以時間釋放調配物、例如以包括緩慢釋放聚合物之組合物投與。核酸-脂質調配物可使用將防止快速釋放之載劑(例如控制釋放媒劑，例如聚合物、微囊封遞送系統或生物黏著性凝膠)製備。在本揭示案之各種組合物中延長核酸-脂質調配物之遞送可藉由將延遲吸收之劑(例如單硬脂酸鋁水凝膠及明膠)納入組合物中來進行。

【0196】已展示，核酸可藉由氣管內投與核酸組合物之液體懸浮液及吸入由液體噴霧器產生之氣溶膠霧或使用例如美國專利第5,780,014號中所述之乾粉裝置遞送至肺，該專利以引用方式併入本文中。

【0197】在某些實施例中，本揭示案之組合物可經調配，使得其可在投與個體之前或之後經氣溶膠化或以其他方式作為微粒液體或固體遞送。該等組合物可在一或多種適於投與該等固體或液體微粒組合物(例如氣溶膠化水溶液或懸浮液)之器件的幫助下投與以生成個體可容易地呼吸或吸入之粒子。在一些實施例中，該等器件(例如計量劑量吸入器、噴射噴霧器、超音波噴霧器、乾粉吸入器、

基於推進劑之吸入器或吹入器)有助於向個體投與預定質量、體積或劑量之組合物(例如約 0.010 mg/kg 至約 0.5 mg/kg 核酸/劑量)。舉例而言，在某些實施例中，本揭示案之組合物係使用含有包含組合物及適宜推進劑之懸浮液或溶液之計量劑量吸入器投與個體。在某些實施例中，本揭示案之組合物可調配為意欲用於吸入之微粒粉末(例如可呼吸乾燥粒子)。在某些實施例中，對調配為可呼吸粒子之本揭示案組合物適當定大小，使得其可由個體呼吸或使用適宜器件遞送(例如平均 D50 或 D90 粒徑小於約 500 μm 、400 μm 、300 μm 、250 μm 、200 μm 、150 μm 、100 μm 、75 μm 、50 μm 、25 μm 、20 μm 、15 μm 、12.5 μm 、10 μm 、5 μm 、2.5 μm 或更小)。在其他實施例中，本揭示案之組合物經調配以包括一或多種肺表面活性劑(例如層狀體)。在一些實施例中，將本揭示案之組合物投與個體，使得以單劑量投與至少 0.010 mg/kg、至少 0.015 mg/kg、至少 0.020 mg/kg、至少 0.025 mg/kg、至少 0.030 mg/kg、至少 0.035 mg/kg、至少 0.040 mg/kg、至少 0.045 mg/kg、至少 0.05 mg/kg、至少 0.1 mg/kg、至少 0.5 mg/kg、至少 1.0 mg/kg、至少 2.0 mg/kg、至少 3.0 mg/kg、至少 4.0 mg/kg、至少 5.0 mg/kg、至少 6.0 mg/kg、至少 7.0 mg/kg、至少 8.0 mg/kg、至少 9.0 mg/kg、至少 10 mg/kg、至少 15 mg/kg、至少 20 mg/kg、至少 25 mg/kg、至少 30 mg/kg、至少 35 mg/kg、至少 40 mg/kg、至少 45 mg/kg、至少 50 mg/kg、至少 55 mg/kg、至少 60 mg/kg、至少 65 mg/kg、至少 70

mg/kg、至少 75 mg/kg、至少 80 mg/kg、至少 85 mg/kg、至少 90 mg/kg、至少 95 mg/kg或至少 100 mg/kg體重之濃度。在一些實施例中，將本揭示案之組合物投與個體，使得以一或多個劑量投與至少 0.1 mg、至少 0.5 mg、至少 1.0 mg、至少 2.0 mg、至少 3.0 mg、至少 4.0 mg、至少 5.0 mg、至少 6.0 mg、至少 7.0 mg、至少 8.0 mg、至少 9.0 mg、至少 10 mg、至少 15 mg、至少 20 mg、至少 25 mg、至少 30 mg、至少 35 mg、至少 40 mg、至少 45 mg、至少 50 mg、至少 55 mg、至少 60 mg、至少 65 mg、至少 70 mg、至少 75 mg、至少 80 mg、至少 85 mg、至少 90 mg、至少 95 mg或至少 100 mg核酸之總量。

【0198】在一些實施例中，本揭示案之醫藥組合物係每月一次投與個體。在一些實施例中，本揭示案之醫藥組合物係每月兩次投與個體。在一些實施例中，本揭示案之醫藥組合物係每月三次投與個體。在一些實施例中，本揭示案之醫藥組合物係每月四次投與個體。

【0199】根據本揭示案，與治療前之基線活性水準相比，治療有效劑量之所提供組合物在定期投與時可增加個體中之核酸活性水準。通常，活性水準係在自個體獲得之生物樣品(例如血液、血漿或血清、尿液或固體組織提取物)中進行量測。基線水準可在即將治療前進行量測。在一些實施例中，與治療前之基線水準相比，投與本文所述之醫藥組合物可使生物樣品(例如血漿/血清或肺上皮拭子)中之核酸活性水準增加至少約 10%、20%、30%、40%、

50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些實施例中，與治療前之基線水準相比，投與所提供組合物可使生物樣品(例如血漿/血清或肺上皮拭子)中之核酸活性水準增加至少約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%，持續至少約24小時、至少約48小時、至少約72小時、至少約4天、至少約5天、至少約6天、至少約7天、至少約8天、至少約9天、至少約10天、至少約11天、至少約12天、至少約13天、至少約14天或至少約15天。

【0200】在一些實施例中，本揭示案提供醫藥組合物，其包含本文所述之化合物或本文所述之脂質奈米粒子及醫藥學上可接受之賦形劑。

【0201】在一些實施例中，本揭示案提供將核酸遞送至有需要之個體之方法，其包括將治療有效量之核酸囊封於本文所述之脂質奈米粒子中，及將脂質奈米粒子投與個體。

【0202】在一些實施例中，本揭示案提供將 mRNA 遞送至有需要之個體之方法，其包括將治療有效量之 mRNA 囊封於本文所述之脂質奈米粒子中，及將脂質奈米粒子投與個體。

VI. 治療方法

【0203】在一些實施例中，本揭示案提供治療有需要之個體之疾病的方法，其包括向個體投與治療有效量之本文所述之化合物、本文所述之脂質奈米粒子或本文所述之

醫藥組合物。在一些實施例中，化合物或脂質奈米粒子係靜脈內或肌內投與。在一些實施例中，化合物或脂質奈米粒子係靜脈內投與。在一些實施例中，化合物或脂質奈米粒子係肌內投與。

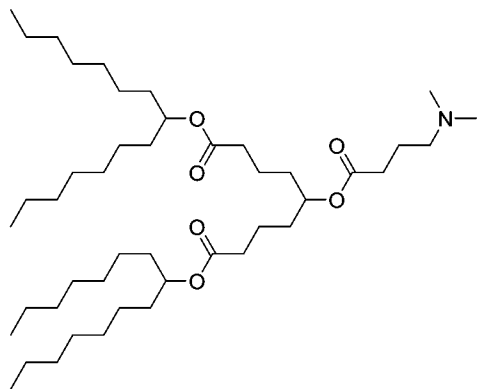
【0204】在一些實施例中，提供治療有需要之個體之疾病的方法，其包括向個體投與本文所述之脂質組合物。在一些實施例中，脂質組合物係靜脈內或肌內投與。在一些實施例中，脂質組合物係靜脈內投與。在一些實施例中，脂質組合物係肌內投與。

【0205】在一些實施例中，提供治療哺乳動物個體之疾病或病症之方法。可向患有與可由組合物減少、降低、下調或沈默之基因之表現或過表現相關的疾病或病症之個體投與治療有效量之如本文所揭示包含脂質、特定而言陽離子脂質、核酸、兩親體、磷脂、膽固醇及PEG連接膽固醇之組合物。本文所述之組合物可用於治療癌症或發炎性疾病之方法中。疾病可為選自由以下組成之群中之一者：中樞神經系統病症、外周神經系統病症、肌萎縮、肌營養不良、免疫病症、癌症、腎病、纖維疾病、遺傳異常、發炎及心血管病症。

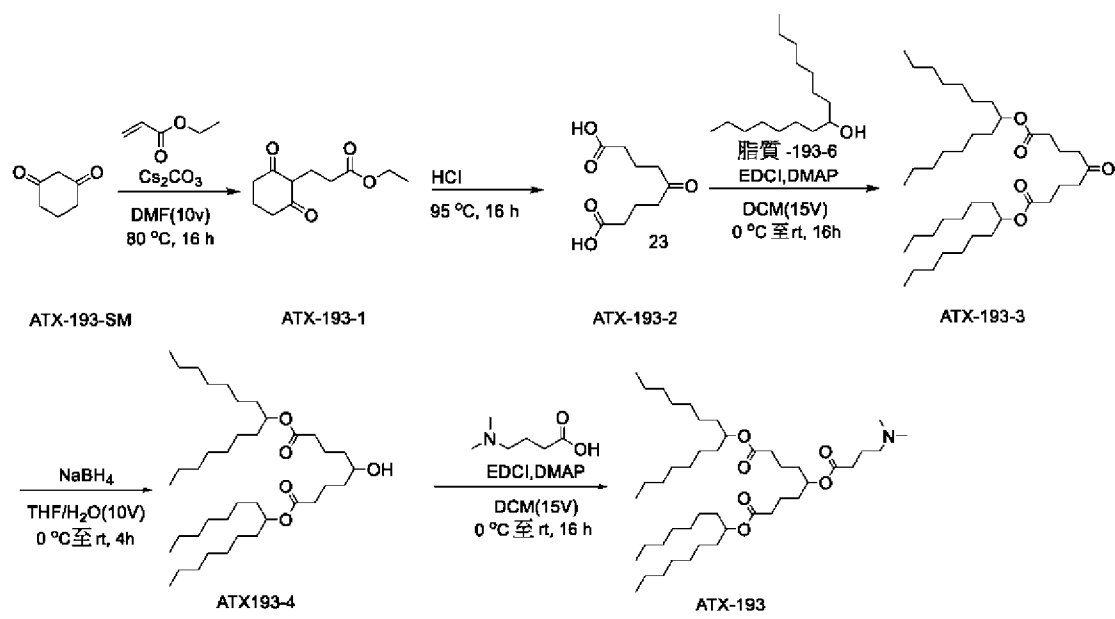
【0206】在一些實施例中，本揭示案提供在靶細胞中表現蛋白質或多肽之方法，其包括使靶細胞與本文所述之脂質奈米粒子或本文所述之醫藥組合物接觸。在一些實施例中，蛋白質或多肽係抗原，且抗原之表現提供活體內免疫原性反應。

VII. 實例

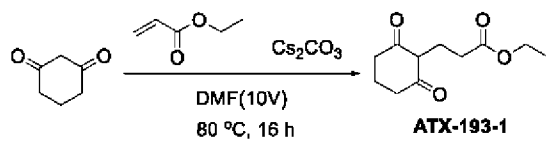
實例 1. 合成 ATX-193



一般方案：



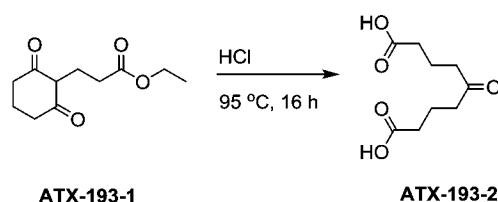
合成 ATX-193-1



【0207】將1,3環己烷二酮(20 g, 1.00 equiv)及二甲基甲醯胺(200 mL)置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之1 L 3頸圓底燒瓶中。添加丙烯酸乙酯(21.45 g, 1.20 equiv)及Cs₂CO₃

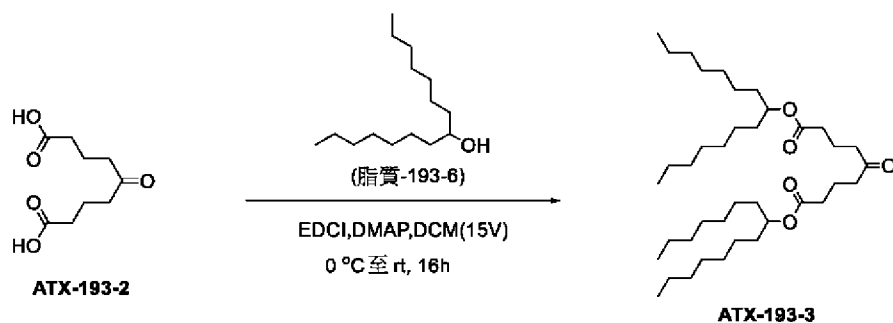
(35.00 g, 0.60 equiv)且將所得溶液在80℃下攪拌16 h。然後藉由添加600 mL水/冰淬滅反應。用HCl (1 mol/L)將溶液之pH值調整至6。用2× 1 L乙酸乙酯萃取所得溶液且合併有機層。用2 ×1 L鹽水洗滌合併之有機層。經無水MgSO₄乾燥有機層，過濾且在真空下濃縮。此產生29 g (78%)黃色固體狀3-(2,6-二側氧基環己基)丙酸乙酯。LCMS (Schimadzu 2020；ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 95:5至5:95 A/B，2.00 min.，保持0.7 min)：RT 1.01 min，m/z (計算值) 212.10，(實驗值) 213.10 (M+H)。

合成 ATX-193-2



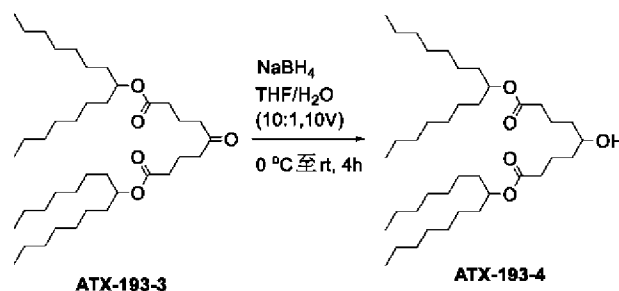
【0208】將3-(2,6-二側氧基環己基)丙酸乙酯(29 g, 1.00 equiv)及HCl (1 mol/L, 300 mL aq)置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之1 L 3頸圓底燒瓶中。將所得溶液在95℃下攪拌16 h。在真空下濃縮所得混合物。將殘餘物溶解於1 L EtOAc中。過濾出未溶解之固體。將所得EA相在真空下濃縮至乾燥。此產生23 g (粗製)黃色固體狀5-側氧基壬二酸。

合成 ATX-193-3



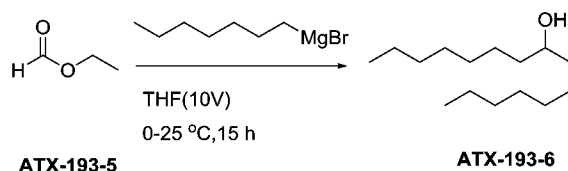
【0209】在室溫下，將5-側氧基壬二酸(23 g, 1.00 equiv)及DCM (345 mL)置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之1 L 3頸圓底燒瓶中。然後在室溫下添加十五烷-8-醇(62 g, 2.2 equiv)及DMAP (13 g, 1.00 equiv)，然後在0°C下添加EDCI (52 g, 2.20 equiv)。將所得溶液在室溫下攪拌16 h。然後藉由添加75 mL HCl aq (1 mol/L)淬滅反應。用2×1 L DCM萃取所得溶液且合併有機層。用2 ×1 L鹽水洗滌有機層且用MgSO₄乾燥，過濾並在真空下濃縮至約500 mL。向此中添加100 g矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目)且在真空下濃縮混合物。將此矽膠施加至矽膠管柱(1 Kg, 類型：ZCX-2, 100-200目)上且用1/0至80/1 PE/EA梯度溶析產物。收集流份且在真空下濃縮產物流份。此產生26 g (38%)黃色油狀5-側氧基壬二酸 1,9-雙(十五烷-8-基)酯。LCMS (Schimadzu 2020；ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 95:5至5:95 A/B，2.00 min.，保持0.7 min)：RT 2.99 min，m/z (計算值) 623.02，(實驗值) 645.35 (M+Na)。

合成ATX-193-4



【0210】向經吹掃且維持惰性氮氣氛之500 mL 3頸圓底燒瓶中添加5-側氧基壬二酸1,9-雙(十五烷-8-基)酯(18 g, 1.00 equiv)及THF/H₂O (10:1, 180 mL)。然後在0℃下添加NaBH₄ (1.08 g, 1.00 equiv)。將所得溶液在室溫下攪拌4 h。然後藉由添加200 mL水/冰淬滅反應。用3×300 mL乙酸乙酯萃取所得溶液且合併有機層。經無水MgSO₄乾燥有機層，過濾且在真空下濃縮。此產生17.3 g (95%)淺黃色油狀5-羟基壬二酸1,9-雙(十五烷-8-基)酯。

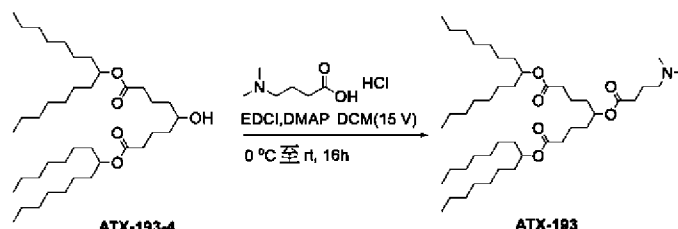
合成ATX-193-6



【0211】在25℃下在N₂下，向具有機械攪動之1 L四頸圓底燒瓶中裝填THF (180 mL)中之486 mL溴(庚基)鎂(1 mol/L)。在0℃下在30 min內邊攪拌邊逐滴裝填甲酸乙酯(18.00 g, 1.00 equiv)。將所得溶液在室溫下攪拌15 h。然後藉由添加500 mL飽和NH₄Cl水溶液淬滅反應。分離各相，且用2×500 mL乙酸乙酯萃取水層。然後經無水MgSO₄乾燥合併之有機層，過濾，且在真空下濃縮。將固體殘餘物於60 mL CH₃CN中製成漿液。藉由過濾收集固體且真空

乾燥。此產生 50 g (78%) 白色粉末狀十五烷-8-醇。此原樣用於下一反應步驟中。

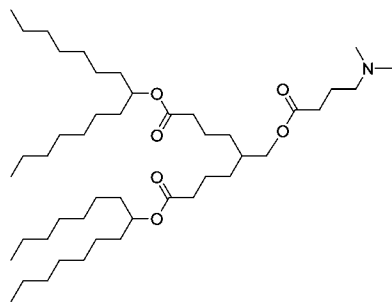
合成 ATX-193



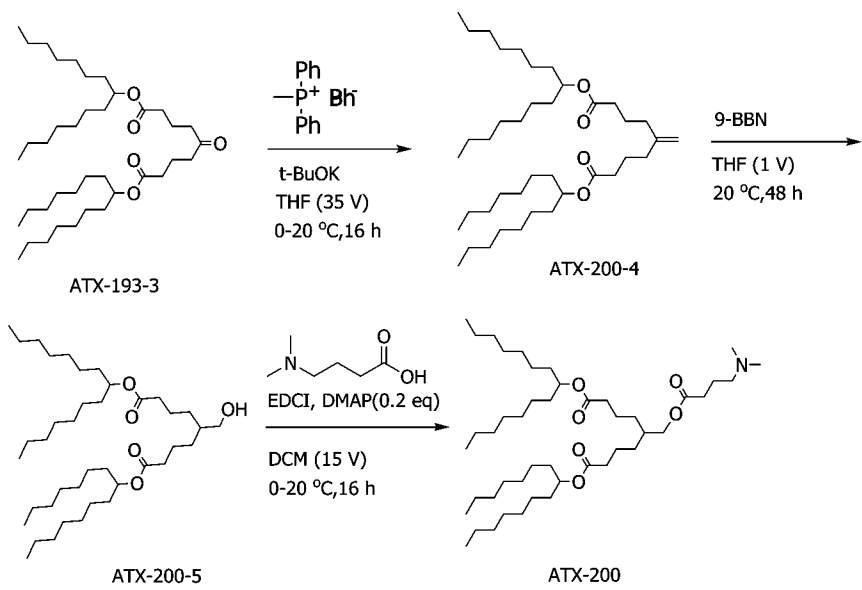
【0212】在室溫下，將5-羥基壬二酸1,9-雙(十五烷-8-基)酯(17.3 g, 1.00 equiv)於DCM (180 mL)中之溶液置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之250 mL 3頸圓底燒瓶中。在室溫下添加4-(二甲基胺基)丁酸(5.58 g, 1.20 equiv)及DMAP (0.69 g, 0.20 equiv)，然後在0℃下逐份添加EDCI (6.39 g, 1.20 equiv)。將所得溶液在室溫下攪拌16 h。然後藉由添加300 mL HCl (1 mol/L)淬滅反應。用2×500 mL DCM萃取所得溶液且合併有機層。用2 ×500 mL鹽水洗滌有機層。在真空下濃縮所得有機層且將獲得之40 g粗產物吸附於80 g矽膠上。在矽膠管柱(800 g, 類型：ZCX-2, 100-200目)上使用100:0至90:10 DCM/ME梯度純化殘餘物。在真空下濃縮含有產物之流份。然後將產物溶解於庚烷(300 mL, 20 V)中，然後用MeOH/H₂O (3:1) 300 mL (20 V)洗滌有機層。在真空下濃縮庚烷相。此產生10.5 g (49%)無色油狀5-[[4-(二甲基胺基)丁醯基]氧基]壬二酸1,9-雙(十五烷-8-基)酯。ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 95:5至5:95 A/B，2.00 min.，保持0.7 min)：RT 2.76 min，m/z (計算

值) 737.6 , (實驗值) 738.5(M+H) ; H-NMR: (300 MHz, 氯仿-d, ppm): δ 4.881 (h, 3H), 2.332 (dt, 8H), 2.241 (s, 6H), 1.812 (m, 2H), 1.710 - 1.413 (m, 16H), 1.282 (s, 40H), 0.952 - 0.844 (m, 12H) 。

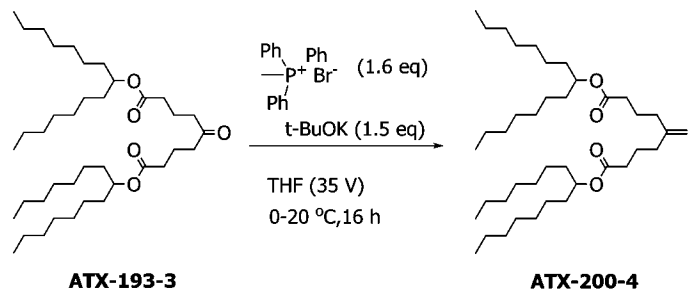
實例 2. 合成 ATX-200



一般方案：

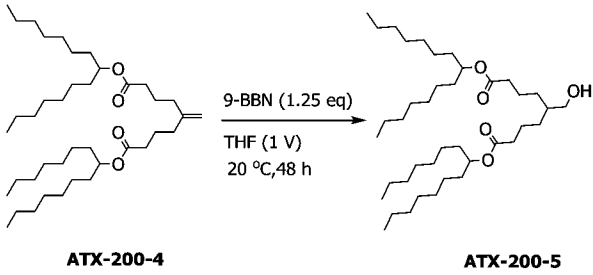


合成 ATX-200-4



【0213】將甲基三苯基溴化磷鎗(4540.31 mg, 12.456 mmol, 1.60 equiv, 98%)、THF (150.00 mL, 99%)置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之500 mL 4頸圓底燒瓶中。然後在0℃下在10 min內分幾批添加t-BuOK (1323.54 mg, 11.677 mmol, 1.50 equiv, 99%)。在0℃下在20 min內，向此中添加THF (25 ml)中之5-側氧基壬二酸1,9-雙(十五烷-8-基)酯(5.00 g, 7.785 mmol, 1.00 equiv, 97%)。將所得溶液在25℃下攪拌18 hr。濃縮所得混合物。將殘餘物施加至含有乙酸乙酯/石油醚(1:50)之矽膠管柱上。此產生3.7 g (75.00%)無色油狀5-亞甲基壬二酸1,9-雙(十五烷-8-基)酯。

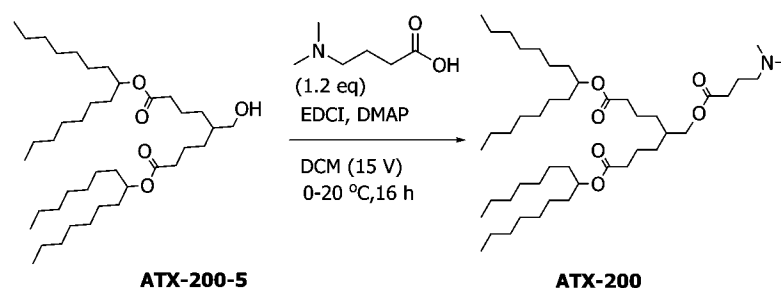
合成ATX-200-5



【0214】將5-亞甲基壬二酸1,9-雙(十五烷-8-基)酯(3.7 g, 5.779 mmol, 1.00 equiv, 97%)、THF (3.70 mL)置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之100 mL 4頸圓底燒瓶中。然後在18℃下在20 min內邊攪拌邊逐滴添加9-BBN (14.90 mL, NaN mmol, 1.25 equiv)。將混合物在18℃下攪拌18 h後，連續添加水(1 mL)及3 N NaOH (5 mL)。然後，逐滴添加30% H₂O₂ (10 mL)，同時維持溫度低於50℃。在室溫下攪拌18 h後，用2×50 mL乙酸乙酯萃取所得溶液。用3×50 mL鹽水洗滌所得混合物。經無水硫酸鈉乾燥混合物且濃縮。

將殘餘物施加至含有乙酸乙酯/石油醚(1:20)之矽膠管柱上。此產生 2.6 g (68.29%) 白色油狀 5-(羥基甲基)壬二酸 1,9-雙(十五烷-8-基)酯。LCMS (Schimadzu 2020; ELSD A: 水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 95:5至5:95 A/B, 2.00 min., 保持 0.7 min): RT 3.19 min, m/z (計算值) 638.5, (實驗值) 661.5 (M+Na)。

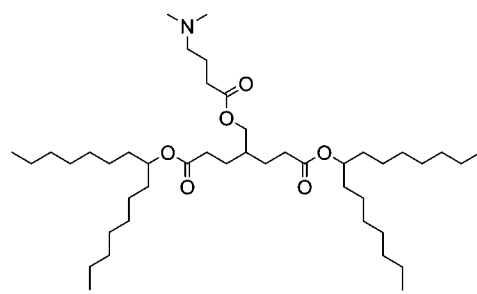
合成 ATX-200



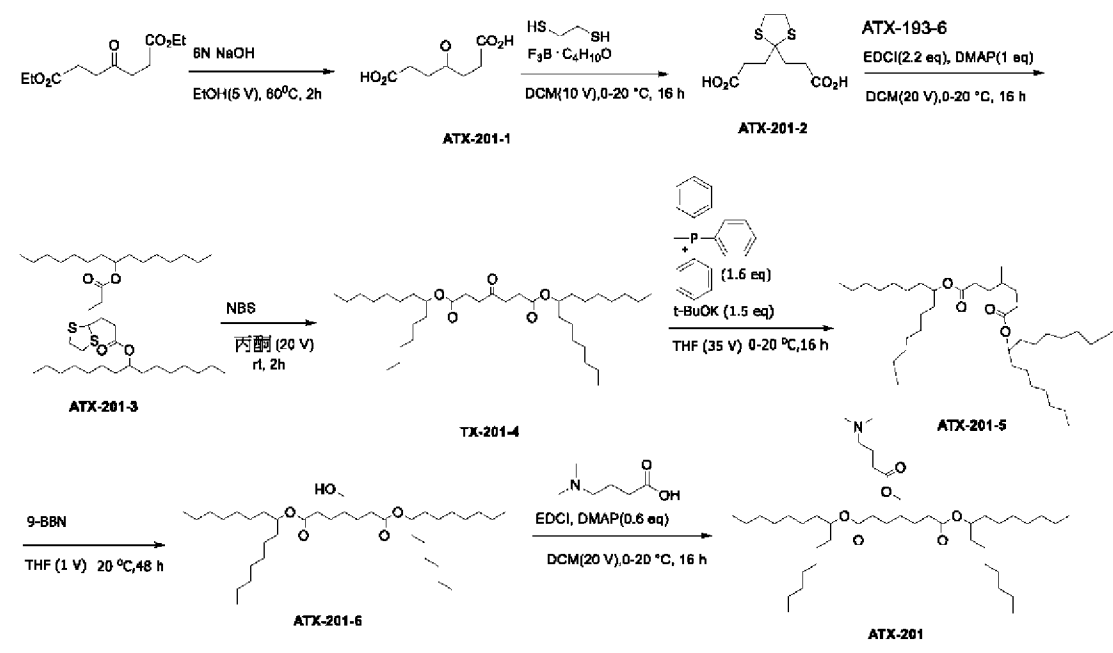
【0215】將 5-(羥基甲基)壬二酸 1,9-雙(十五烷-8-基)酯 (2.60 g, 3.946 mmol, 1.00 equiv, 97%)、THF (15.00 mL) 置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之 100 mL 4 頸圓底燒瓶中。然後在 0°C 下在 10 min 內分幾批添加 4-(二甲基胺基)丁酸 (633.88 mg, 4.736 mmol, 1.20 equiv, 98%)。在 0°C 下在 10 min 內，向此中分幾批添加 EDCI (926.37 mg, 4.736 mmol, 1.20 equiv, 98%)。在 0°C 下在 10 min 內，向混合物中分幾批添加 DMAP (98.39 mg, 0.789 mmol, 0.20 equiv, 98%)。將所得溶液在 18°C 下攪拌 18 hr。濃縮所得混合物。將殘餘物施加至含有乙基 DCM: MeOH (30:1) 之矽膠管柱上。藉由急速製備型 HPLC 使用以下條件 (IntelFlash-1) 純化粗產物：管柱，C18 矽膠；移動相，2-丙醇：H₂O=60:40 增加至 2-丙醇：H₂O=80:20，在 30 內；偵測器，蒸發光。獲得產物。然

後將產物溶解於庚烷(30 mL, 20 V)中，然後用MeOH/H₂O (3:1) (20 V)洗滌有機層。在真空下濃縮庚烷相。此產生 1.5 g (50.02%)淺黃色油狀 5-([4-(二甲基氨基)丁醯基]氧基]甲基)壬二酸 1,9-雙(十五烷-8-基)酯。ELSD A：水 / 0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 95:5 至 5:95 A/B，2.00 min.，保持0.7 min)：RT 3.19 min，m/z (計算值) 751.67，(實驗值) 752.50 (M+H)；H-NMR: (400 MHz，氯仿-*d*, ppm): 4.847-4.909 (m, 2H), 4.001-4.015 (m, 2H), 2.241-2.380 (m, 14H), 1.392 - 1.845 (m, 69H)。

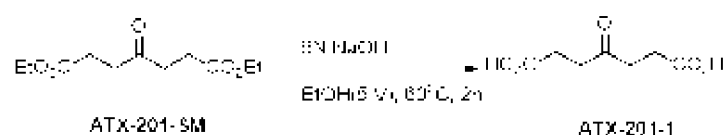
實例3. 合成ATX-201



一般方案：

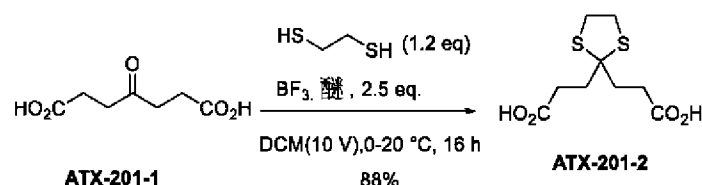


合成 ATX-201-1



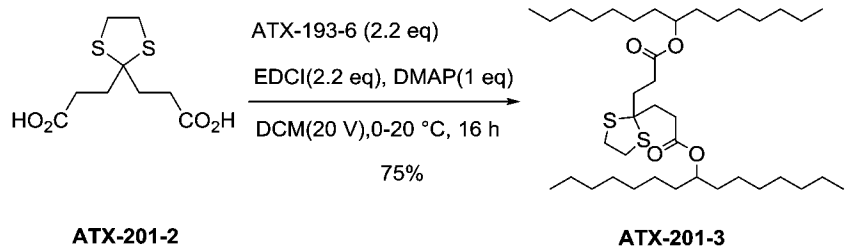
【0216】在室溫及攪拌下，向三頸圓底燒瓶中添加 EtOH (25 mL, 5 V) 及 **ATX-201-SM** (5 g, 1 eq)。在 0°C 下，將 6N NaOH (25 mL, 5 V) 緩慢添加至混合物中。將所得溶液在 60°C 下攪拌 2 h，TLC 指示 **ATX-201-SM** 完全耗盡。將鹽水 (10 wt.%、50 mL, 10 V) 及 DCM (50 mL, 10 V) 添加至混合物中且攪拌 10 分鐘並切相，收集水相且用 3N HCl 將 pH 調整至 3~4。用 DCM (100 mL, 20 V) 萃取混合物。用無水 MgSO₄ 乾燥有機相且然後過濾。在真空下濃縮且乾燥以提供淺黃色固體狀 **ATX-201-1** (3.2 g, 84.6% 產率)。

合成 ATX-201-2



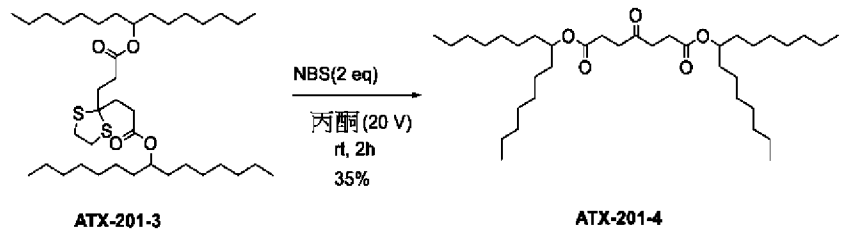
【0217】在室溫下，向三頸圓底燒瓶中添加 DCM (100 mL, 10 V)、**ATX-201-1** (3.2 g, 1 eq) 及乙烷-1,2-二硫醇 (2.1 g, 1.2 eq)。在 0°C 下，將 BF₃·Et₂O (2.5 eq) 緩慢添加至混合物中。將所得溶液在 20°C 下攪拌 16 h，TLC 指示 **ATX-201-1** 完全耗盡。藉由過濾收集固體。在真空下乾燥固體以提供淺黃色固體狀 **ATX-201-2** (4 g, 88% 產率)。此原樣用於下一反應中。

合成 ATX-201-3



【0218】向三頸圓底燒瓶中連續添加DCM (80 mL, 20 V)、**ATX-201-2** (4 g, 1.0 eq)、**ATX-193-6** (8 g, 2.2 eq)及DMAP (2 g, 1 eq)。在0℃下，將EDCI (6.7 g, 2.2 eq)逐份添加至反應混合物中。將所得溶液在20℃下攪拌16 h，TLC指示**ATX-201-2**完全耗盡。用10%檸檬酸溶液(40 mL, 10 V)淬滅反應系統。收集有機相，用10%檸檬酸溶液(40 mL, 10 V)洗滌有機相，且用鹽水(40 mL, 10 V)洗滌。用無水MgSO₄乾燥有機相且然後過濾。將粗產物吸附於20 g矽膠上且在100 g矽膠管柱(類型：ZCX-2, 100-200目，8.00 w./w.)上純化，用100:0至99:1 PE/EA梯度溶析。合併合格之流份，在真空下濃縮且乾燥以提供無色油狀**ATX-201-3** (8 g, 75%產率)。¹H NMR (300 MHz, 氯仿-*d*) δ 4.86 (p, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.26 (s, 4H), 2.67 - 2.56 (m, 4H), 2.30 - 2.15 (m, 4H), 1.50 (t, *J* = 6.3 Hz, 8H), 1.28 (d, *J* = 11.2 Hz, 41H), 0.88 (d, *J* = 6.3 Hz, 12H)。

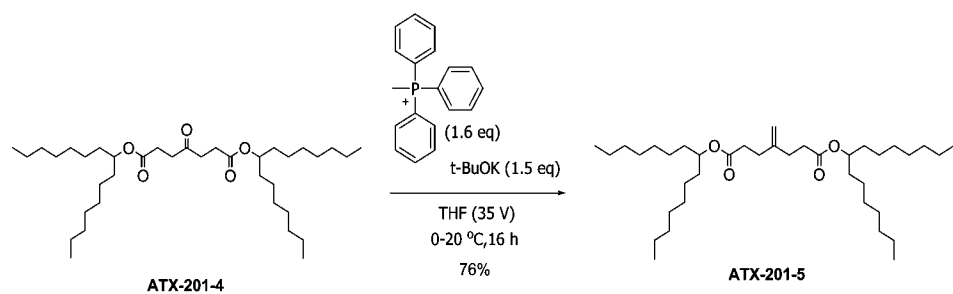
合成 ATX-201-4



【0219】向三頸圓底燒瓶中連續添加丙酮(160 mL, 20

V)、**ATX-201-3** (8 g, 1.0 eq)。在0℃下，將NBS (4.25 g, 2 eq)逐份添加至反應混合物中。將所得溶液在室溫下攪拌2 h，TLC指示**ATX-201-3**完全耗盡。在減壓下移除溶劑。將粗產物吸附於20 g矽膠上且使用combi-flash系統在100 g矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目，8.00 w./w.)管柱上純化。用100:0至97:3 PE/EA梯度溶析產物。匯集合格產物並在真空下濃縮以提供無色油狀**ATX-201-4** (2.5 g, 35%產率)。¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ 4.84 (p, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 6.7 Hz, 4H), 2.59 (t, *J* = 6.7 Hz, 4H), 1.50 (q, *J* = 6.4, 6.0 Hz, 8H), 1.31 - 1.21 (m, 40H), 0.91 - 0.84 (m, 12H)。

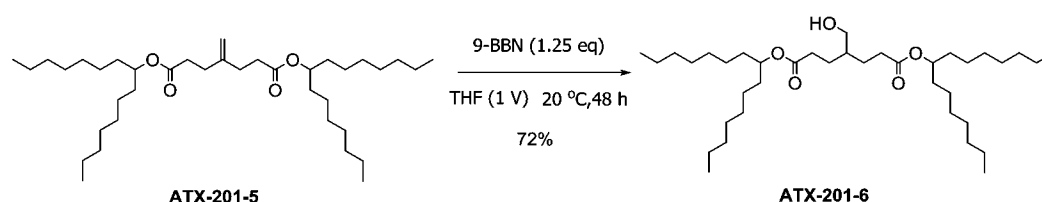
合成**ATX-201-5**



【0220】將甲基三苯基溴化磷鎢(1.9 g, 1.6 eq)、THF (75 mL, 30 V)置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之500 mL 4頸圓底燒瓶中。然後在0℃下在10 min內分幾批添加*t*-BuOK (0.7 g, 1.5 eq)。在0℃下在20 min內，向此中添加THF (25 ml)中之**ATX-201-4** (2.5 g, 1 eq)。將所得溶液在25℃下攪拌18 hr。濃縮所得混合物。將產物吸附於5 g矽膠上且在Combi-Flash系統上之25 g矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目，8.00 w./w.)管柱上藉由用100:0至99:1 PE/EA梯度來純化。合併合格之產物，在真空下濃縮且乾燥以提供無色油狀

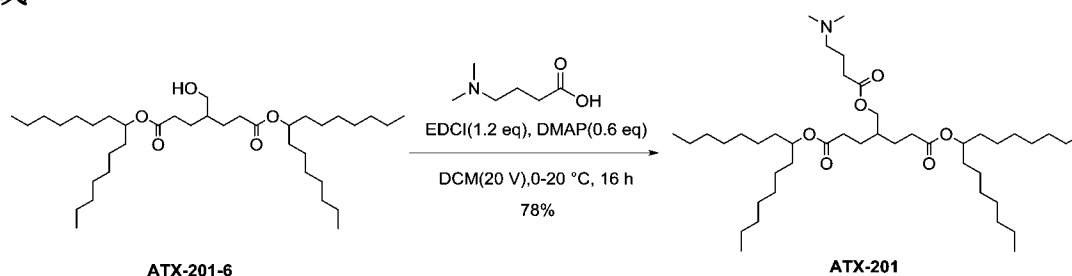
ATX-201-5 (1.9 g, 76%產率)。¹H NMR (300 MHz, 氯仿-*d*) δ 4.88 (p, J = 6.2 Hz, 2H), 4.78 (s, 2H), 2.47 (ddd, J = 8.5, 6.2, 1.8 Hz, 4H), 2.37 (dd, J = 8.6, 5.9 Hz, 4H), 1.53 (s, 8H), 1.27 (, 40H), 0.88 (m, 12H)。

合成 **ATX-201-6**



【0221】向三頸圓底燒瓶中連續添加 **ATX-201-5** (1.9 g, 1 eq)、THF (3.70 mL)。然後在 18°C 下在 20 min 內邊攪拌邊逐滴添加 THF (8 mL, 1.25 eq) 中之 0.5 mol 9-BBN。將混合物在 18°C 下攪拌 18 h 後，連續添加水 (0.47 mL, 0.25 V) 及 3 N NaOH (2.8 mL, 1.5 V)。然後，逐滴添加 30% H₂O₂ (4.75 ml, 2.5 V)，同時維持溫度低於 50°C。在室溫下攪拌 18 h 後，用 2×20 mL 乙酸乙酯萃取所得溶液。用 3×20 mL 鹽水洗滌合併之有機相。經無水硫酸鈉乾燥混合物且過濾。將產物吸附於 5 g 矽膠上且在 Combi-Flash 系統上之 25 g 矽膠 (類型：ZCX-2, 100-200 目，8.00 w./w.) 管柱上藉由用 PE 溶析來純化。合併合格之產物，在真空下濃縮且乾燥以提供無色油狀 **ATX-201-6** (1.4 g, 76%產率)。¹H NMR (300 MHz, 氯仿-*d*) δ 4.87 (p, J = 6.3 Hz, 2H), 4.12 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 3.52 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 2.40 - 2.27 (m, 4H), 1.75 - 1.61 (m, 3H), 1.51 (d, J = 6.4 Hz, 9H), 1.27 (t, J = 3.7 Hz, 40H), 1.23 (m, 40H), 0.87 (m, 12H)。

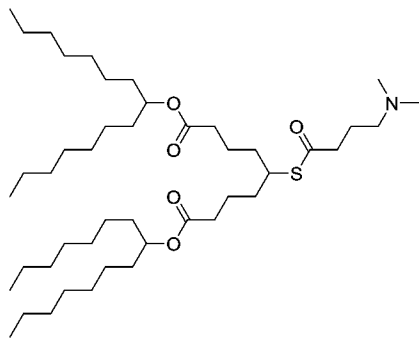
合成 ATX-201



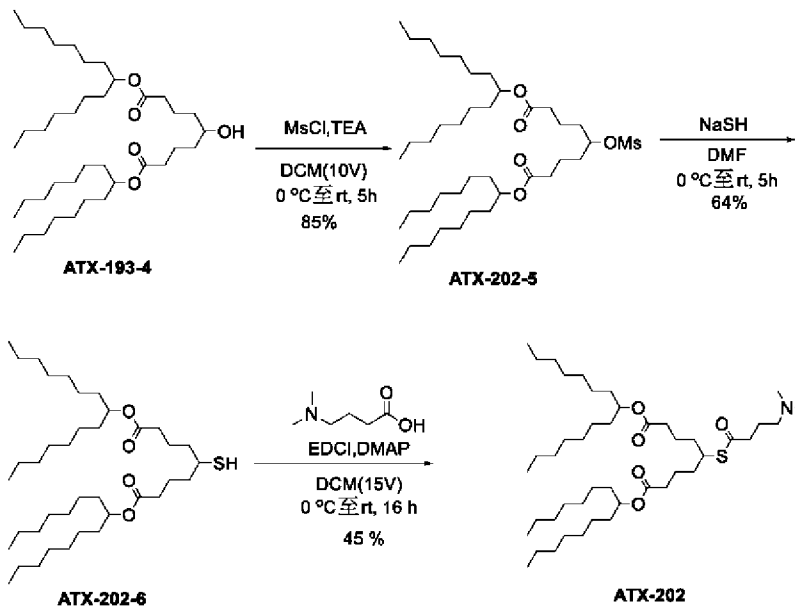
【0222】向三頸圓底燒瓶中連續添加DCM (28 mL, 20 V)、ATX-201-6 (1.4 g, 1.0 eq)、4-(二甲基胺基)丁酸(380 mg, 1 eq)及DMAP (168 mg, 0.6 eq)。在0℃下將EDCI (526 mg, 1.2 eq)逐份添加至反應混合物中。將所得溶液在20℃下攪拌16 h，TLC指示4-(二甲基胺基)丁酸完全耗盡。用10%檸檬酸溶液(14 mL, 10 V)淬滅反應混合物。收集有機相且用10%檸檬酸溶液(14 mL, 10 V)洗滌，並用鹽水(14 mL, 10 V)洗滌。用無水MgSO₄乾燥有機相且然後過濾。將產物吸附於5 g矽膠上且在Combi-Flash系統上之25 g矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目，8.00 w./w.)管柱上藉由用100:0至95:5 DCM/MeOH梯度溶析來純化。合併合格之產物，在真空下濃縮且乾燥以提供淺黃色油狀ATX-201 (1.3 g, 78% 產率)。ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 95:5至5:95 A/B，2.00 min.，保持0.7 min)：RT 3.19 min，m/z (計算值) 723.6，(實驗值) 724.7。¹H NMR (300 MHz, 氯仿-*d*) δ 4.831 (p, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.013 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.000 - 2.881 (m, 2H), 2.70 (s, 6H), 2.464 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.310 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H), 2.112 (dq, *J* = 13.7, 6.8 Hz, 2H), 1.653 (t, *J* = 7.2 Hz, 5H), 1.492 (d, *J* = 6.3 Hz, 8H),

1.242 (m, 40H), 0.910 - 0.762 (m, 12H)。

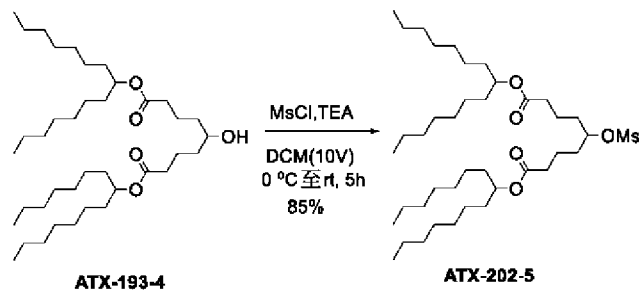
實例 4. 合成 ATX-202



一般方案：



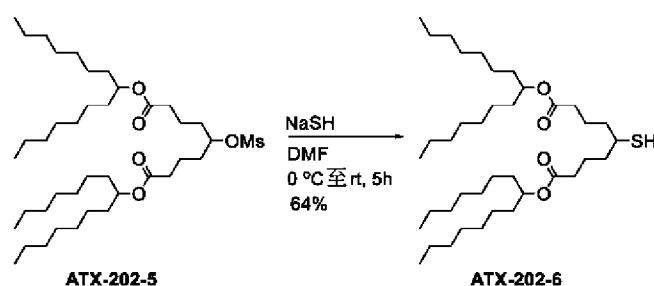
合成 ATX-202-5



【 0223 】 在 0°C 下在 N_2 下，向具有機械攪動之 250 mL 四頸圓底燒瓶中裝填 DCM (50 mL) 中之 5 g 5-羥基壬二酸

1,9-雙(十五烷-8-基)酯。然後在0℃下邊攪拌邊逐滴添加 TEA (1.6 g, 2 equiv)及 MsCl (1.35 g, 1.5 equiv)。將所得溶液在室溫下攪拌5 h。然後藉由添加100 mL H₂O淬滅反應。分離各相，且用1×100 mL DCM萃取水層。然後合併有機層；經無水硫酸鈉乾燥溶劑，過濾且在真空下濃縮。此產生4.8 g (85%) 5-((甲基磺醯基)氧基)壬二酸二(十五烷-8-基)酯。LCMS (Schimadzu 2020；ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 95:5至5:95 A/B，2.00 min.，保持0.7 min)：RT 4.76 min，m/z (計算值) 703.12，(實驗值) 725.3 (M+Na)。

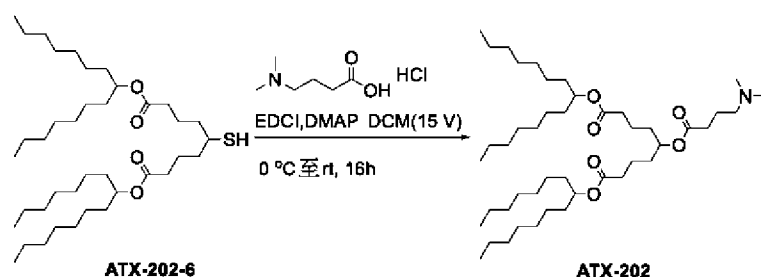
合成 ATX-202-6



【0224】將DMF (48 mL)中之5-側氧基壬二酸1,9-雙(十五烷-8-基)酯(4.8 g, 1.00 equiv)置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之100 mL 3頸圓底燒瓶中。然後在0℃下添加NaHS (2 g, 5.00 equiv)。將所得溶液在室溫下攪拌5 h。然後藉由添加200 mL水/冰淬滅反應。用3×100 mL乙酸乙酯萃取所得溶液且合併有機層。經無水硫酸鈉乾燥混合物且在真空下濃縮。此產生2.8 g (64%)淺黃色油狀5-巰基壬二酸二(十五烷-8-基)酯。LCMS (Schimadzu 2020；ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 95:5至5:95 A/B，2.00

min.，保持 0.7 min)：RT 4.84 min，m/z (計算值) 640.5，
(實驗值) 663.4 (M+Na+H)。

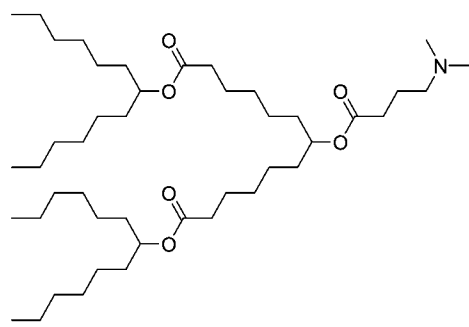
合成 ATX-202



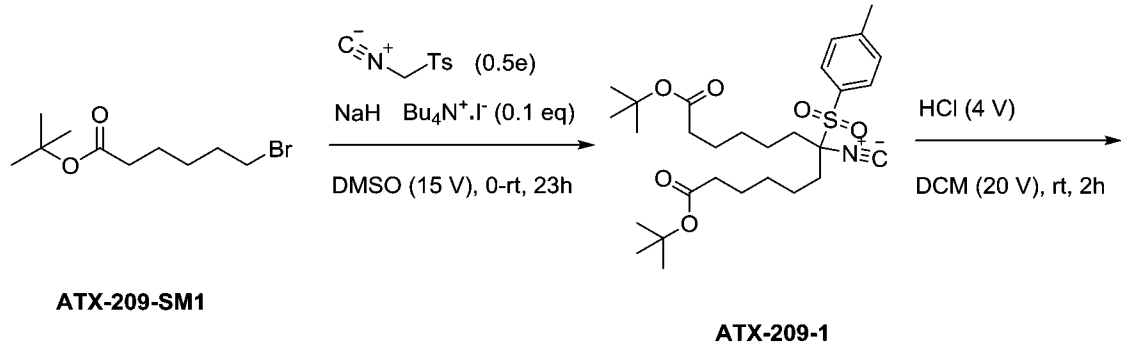
【0225】將 5-巰基壬二酸二(十五烷-8-基)酯 (2.8 g, 1.00 equiv) 於 DCM (28 mL) 中之溶液置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之 100 mL 3 頸圓底燒瓶中。添加 4-(二甲基胺基)丁酸 (0.87 g, 1.20 equiv)、DMAP (0.1g, 0.20 equiv)，然後在 0℃ 下逐份添加 EDCI (0.95 g, 1.20 equiv)。將所得溶液在室溫下攪拌 16 h。然後藉由添加 100 mL HCl (1 mol/L) 淬滅反應。用 2×100 mL DCM 萃取所得溶液且合併有機層。用 2×100 mL 鹽水洗滌所得混合物。在真空下濃縮所得混合物且獲得 6 g 粗產物。將產物溶解於 30 mL DCM 中且添加 10 g 矽膠 (類型：ZCX-2, 100-200 目)。在真空下濃縮混合物。將殘餘物施加至具有 1/0 至 30/1 DCM/ME 梯度之常壓矽膠管柱 (800 g, 類型：ZCX-2, 100-200 目) 上，且收集產物溶析液 (50/1-30/1)。在真空下濃縮所收集產物相。然後將產物溶解於庚烷 (30 mL, 20 V) 中，然後用 MeOH/H₂O (3:1) 30 mL (20 V) 洗滌有機層。在真空下濃縮庚烷相。此產生 1.3 g (45%) 無色油狀 5-[[4-(二甲基胺基)丁醯基]氧基]壬二酸 1,9-雙(十五烷-8-基)酯。LCMS (Schimadzu 2020；ELSD

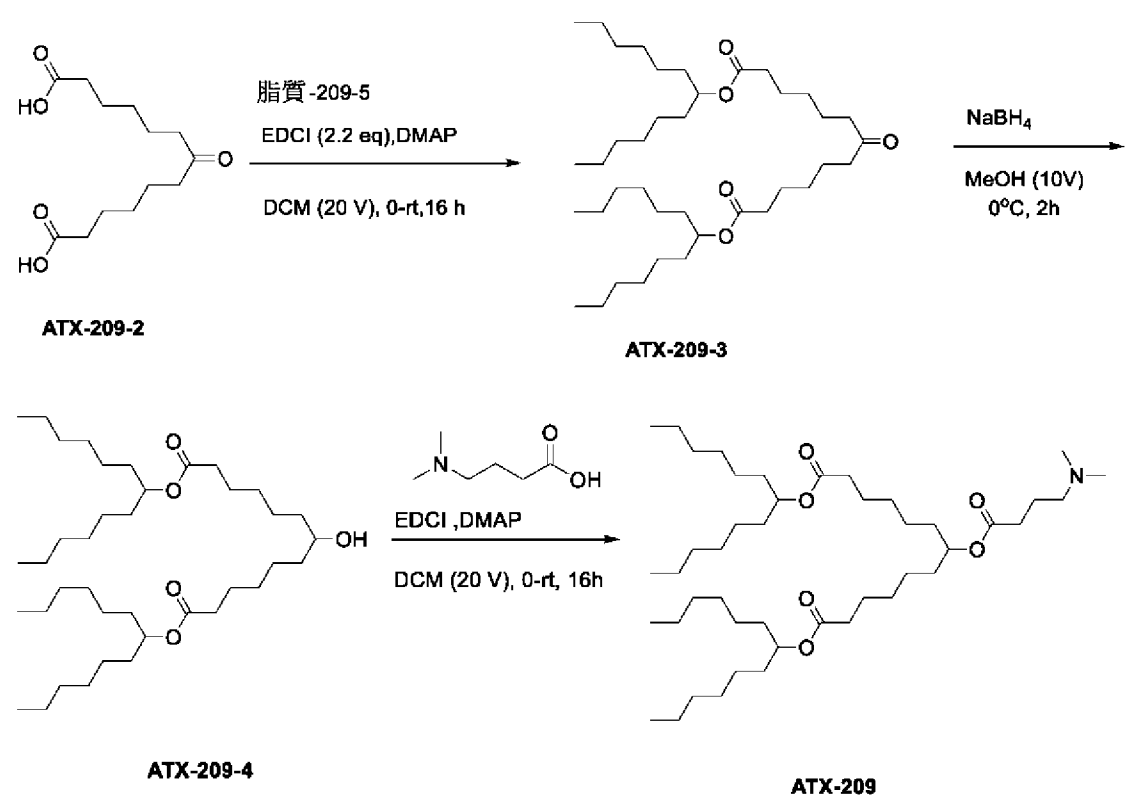
A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 95:5至5:95 A/B，
2.00 min.，保持 0.7 min)：RT 2.83 min，m/z (計算值)
754.25，(實驗值) 754.45 (M)；¹H-NMR (300 MHz，氯仿-*d*, ppm): δ 4.83-4.87 (m, 2H), 3.51-3.54 (s, 1H), 2.55-2.60 (m, 2H), 2.21-2.30 (m, 12H), 1.40-1.91 (m, 19H), 1.11-1.30 (m, 41H), 1.28 (s, 40H), 0.82 - 0.91 (m, 12H)。

實例 5. ATX-209之合成

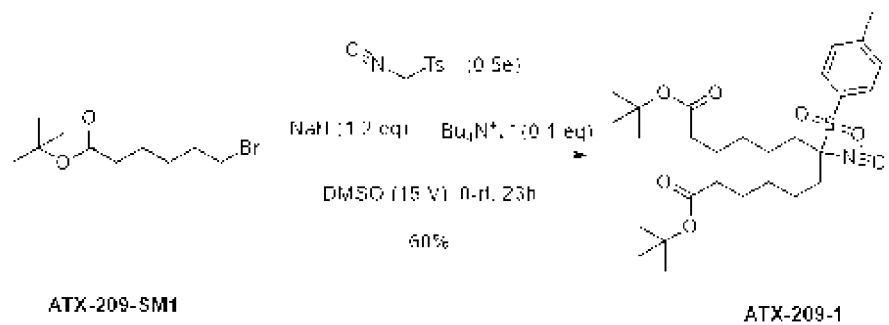


一般方案：





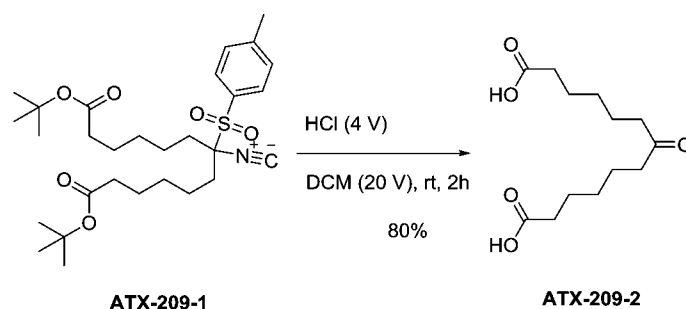
合成 ATX-209-1



【 0226 】 在室溫下，向三頸圓底燒瓶中添加 DMSO (38 mL, 15 V)、ATX-209-SM1 (2.5 g, 1 eq)及 1 ((異氰基甲基)磺醯基)-4-甲基苯(1 g, 0.5 eq)。在 0°C 下，向混合物中連續緩慢添加 NaH (0.30 g, 1.2 eq)及四丁基碘化銨(0.37 g, 0.1 eq)。將所得溶液在 60°C 下攪拌 2 h，TLC 指示 ATX-209-SM1 完全耗盡。然後藉由添加 25 mL 水淬滅反應。用 DCM (3×25 mL) 萃取溶液。用 2×25 mL 飽和鹽水洗滌有機相。經無水硫酸鎂乾燥有機相。用無水 MgSO₄ 乾燥有機相且然後

過濾，在真空下濃縮並乾燥以提供無色油狀 **ATX-209-1** (3.2 g, 60%產率)。LCMS (Schimadzu 2020；ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 95:5 至 5:95 A/B，2.00 min.，保持0.7 min)：RT 0.84 min，m/z (計算值) 535.30，(實驗值) 558.20 (M+Na)。

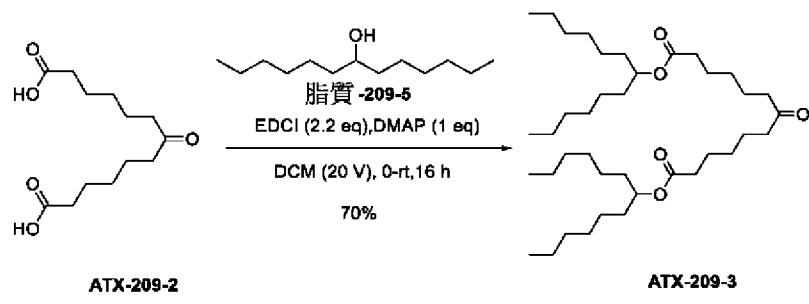
合成 **ATX-209-2**



【0227】在室溫下，向三頸圓底燒瓶中一次性添加 DCM (30 mL, 10 V)、**ATX-209-1** (3 g, 1 eq)。在 0℃ 下將 HCl (6 mL, 2 V) 緩慢添加至混合物中，將所得溶液在 0℃ 下攪拌 2 h，TLC 指示 **ATX-209-1** 完全耗盡。然後藉由添加 30 mL 碳酸氫鈉淬滅反應。用 2×30 mL 飽和鹽水洗滌有機相。用無水 MgSO₄ 乾燥有機相且然後過濾。向濾液中添加 5 g 矽膠 (類型：ZCX-2, 100-200 目，2.00 w./w.)，在真空下濃縮至無流份，同時維持溫度低於 35℃。將 25 g 矽膠 (類型：ZCX-2, 100-200 目，8.00 w./w.) 裝填至管柱中，然後裝填最後一步製備之吸收反應混合物之無水矽膠。使用 combi-flash 純化產物。用 DCM/MeOH (體積比) 溶析。(梯度為 100:0 至 20:1 且每 100±50 mL 收集一次)。取出樣品進行 TLC 分析。合併合格之產物。在真空下濃縮至乾燥以提供白色固體狀 **ATX-209-2** (1.15 g, 80%產率)。¹H NMR (300 MHz,

DMSO-*d*₆) δ 2.36 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 2.16 (t, J = 7.3 Hz, 4H), 1.43 (s, 8H), 1.21 - 1.12 (m, 4H)。

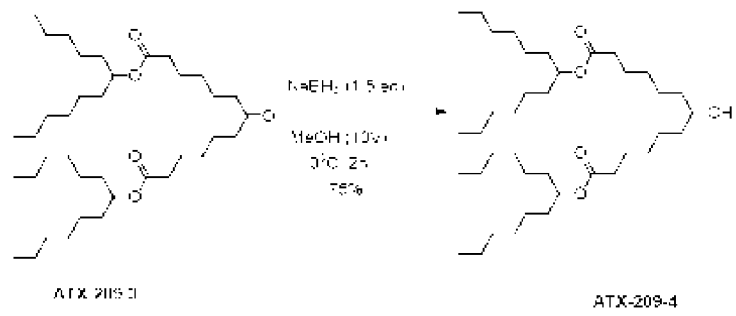
合成 **ATX-209-3**



【0228】向三頸圓底燒瓶中連續添加DCM (20 mL, 20 V)、**ATX-209-2** (1 g, 1.0 eq)、**ATX-209-5** (1.71 g, 2.2 eq) 及 DMAP (0.47 g, 1 eq)。在0℃下將EDCI (1.63 g, 2.2 eq)逐份添加至反應混合物中。將所得溶液在20℃下攪拌16 h，TLC指示**ATX-209-2**完全耗盡。用10%檸檬酸溶液(10 mL, 10 V)淬滅反應系統。收集有機相，用10%檸檬酸溶液(10 mL, 10 V)洗滌有機相，且用鹽水(10 mL, 10 V)洗滌。用無水MgSO₄乾燥有機相且然後過濾。向濾液中添加5 g矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目，2.00 w./w.)，在真空下濃縮至無流份，同時維持溫度低於35℃。將25 g矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目，8.00 w./w.)裝填至管柱中，然後裝填最後一步製備之吸收反應混合物之無水矽膠。使用combi-flash純化產物。用PE/EA (體積比)溶析。(梯度為100:0至50:1，每20±10 ml收集一次)。取出樣品進行TLC分析。合併合格之產物。在真空下濃縮至乾燥以提供無色油狀**ATX-209-3** (1.68 g, 70%產率)。LCMS (Schimadzu 2020；ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 95:5至5:95

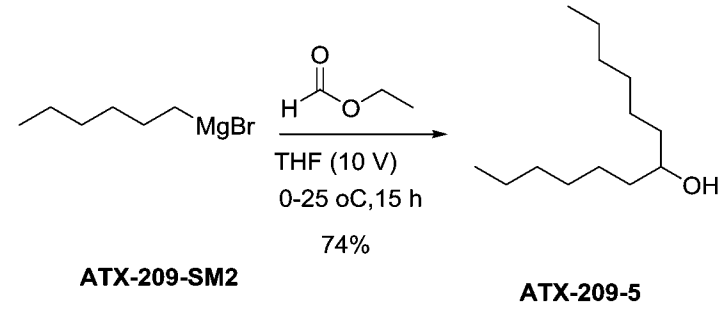
A/B，5.00 min.，保持0.7 min)：RT 4.83 min，m/z (計算值) 622.55，(實驗值) 645.3 (M+Na)。

合成 ATX-209-4



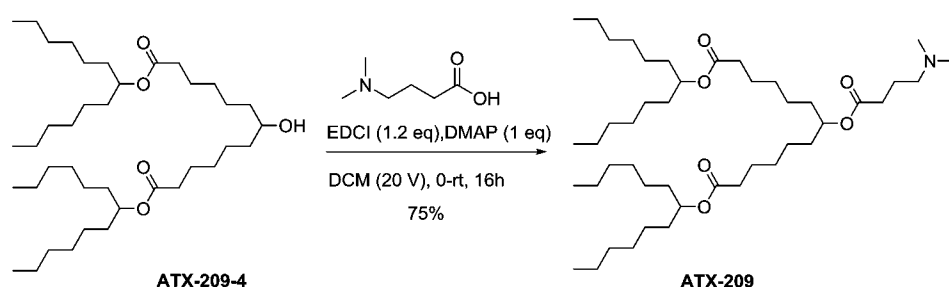
【0229】在室溫下，向100 ml三頸燒瓶中添加MeOH (20 ml, 10V)、ATX-209-3 (2 g, 1 eq)。在0℃下將NaBH₄ (0.18 g, 1.5 eq)逐份添加至反應混合物中。將所得溶液在0℃下攪拌2 h，TLC指示ATX-209-3完全耗盡。然後藉由添加20 mL水淬滅反應。用METB (2×10 ml, 10 V)再萃取系統。用無水MgSO₄乾燥有機相且然後過濾。在真空下濃縮至乾燥以提供無色油狀ATX-209-3 (1.5 g, 75%產率)。LCMS (Schimadzu 2020；ELSD A：水 /0.05% TFA:B: CH₃CN/0.05% TFA 95:5至5:95 A/B，5.50 min.，保持0.7 min)：RT 4.83 min，m/z (計算值) 624.57，(實驗值) 647.35 (M+Na)。

合成 ATX-209-5



【0230】在25℃下在N₂下，向具有機械攪動之100 ml四頸圓底燒瓶中添加THF (10 mL)中之**ATX-209-SM2** (1 mol/L, 31 ml)。在0℃下邊攪拌邊逐滴添加甲酸乙酯(1 g, 1.00 eq)。將所得溶液在室溫下攪拌15 h。然後藉由添加NH₄Cl溶液(20 mL, 20 V)淬滅反應。分離各相，且用乙酸乙酯(2×20 mL)萃取水層。然後合併有機層。經無水硫酸鈉乾燥溶劑。過濾且在真空下濃縮。用6 mL ACN將殘餘物製成漿液。藉由過濾收集固體。此產生白色粉末狀**ATX-209-5**(2 g, 74%產率)。

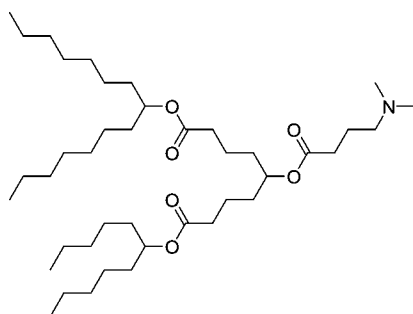
合成 ATX-209



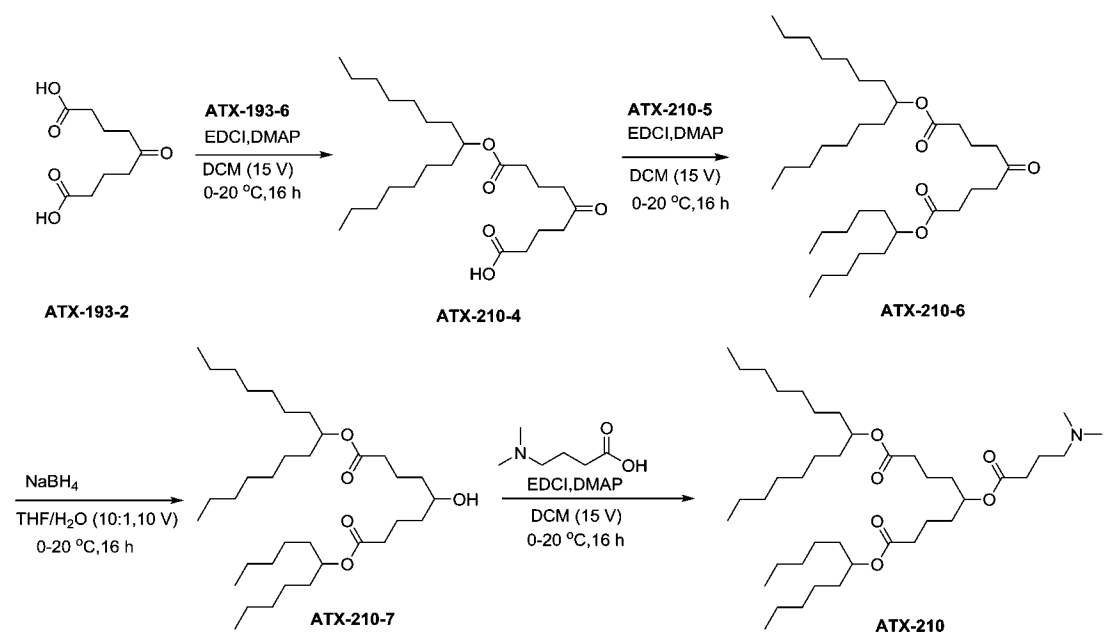
【0231】向三頸圓底燒瓶中連續添加DCM (30 mL, 20 V)、4-(二甲基胺基)丁酸(0.45 g, 1.1 eq)、**ATX-209-4** (1.5 g, 1 eq)及DMAP (0.29 g, 1 eq)。在0℃下將EDCI (0.60 g, 1.3 eq)逐份添加至反應混合物中。將所得溶液在20℃下攪拌16 h，TLC指示**ATX-209-4**完全耗盡。用10%檸檬酸溶液(15 mL, 10 V)淬滅反應系統。收集有機相，用10%檸檬酸溶液(15 mL, 10 V)洗滌有機相，且用鹽水(15 mL, 10 V)洗滌。用無水MgSO₄乾燥有機相且然後過濾。向濾液中添加5 g矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目，2.00 w./w.)，在真空下濃縮至無流份，同時維持溫度低於35℃。將25 g矽膠(類

型：ZCX-2, 100-200目，8.00 w./w.)裝填至管柱中，然後裝填最後一步製備之吸收反應混合物之無水矽膠。使用combi-flash純化產物。用PE/EA (體積比)溶析。(梯度為100:0至50:1，每 20 ± 10 ml收集一次)。取出樣品進行TLC分析。合併合格之產物。在真空下濃縮至乾燥以提供無色油狀**ATX-209** (1.2 g, 75%產率)。ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 95:5至5:95 A/B，5.50 min.，保持0.7 min)：RT 4.83 min，m/z (計算值) 737.5，(實驗值) 738.3 (M+H)；¹H NMR (300 MHz, 氯仿-*d*) δ 4.860 (t, *J* = 6.2 Hz, 3H), 2.370 - 2.201 (m, 14H), 1.801 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.611 - 1.470 (m, 16H), 1.272 (m, 40H), 0.920 - 0.821 (m, 12H)。

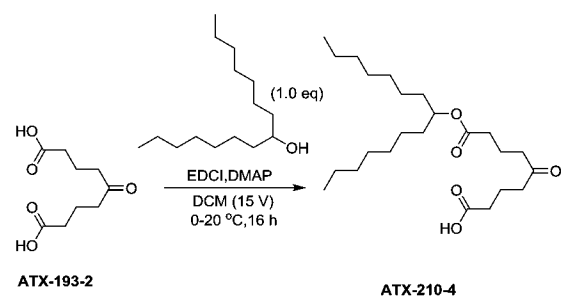
實例 6. 合成 **ATX-210**



一般方案：



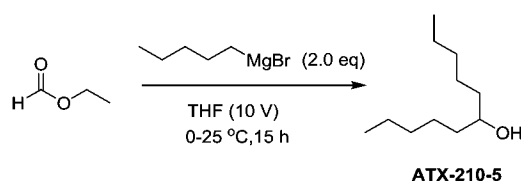
合成 ATX-210-4



【0232】將5-側氧基壬二酸 (6 g, 1.00 eq)、DCM (90 mL)置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之1 L 3頸圓底燒瓶中。然後添加十五烷-8-醇 (6.77 g, .0 eq)、DMAP (0.72 g, 0.2 eq)，在0℃下向此中添加EDCI (6.84 g, 1.2 eq)。將所得溶液在室溫下攪拌16 h。然後藉由添加75 mL HCl (1 mol/L) 淬滅反應。用2×100 ml DCM萃取所得溶液且合併有機層。用2 ×100 ml NaCl洗滌所得混合物。在真空下濃縮有機層。將產物溶解於60 mL DCM中且添加40 g矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目)。在真空下濃縮混合物。將殘餘物施加至含有0/1至1/10 MeOH/DCM梯度之常壓矽膠管柱(400 g, 類型：ZCX-2, 100-200目)上且收集產物溶析液(1/20-

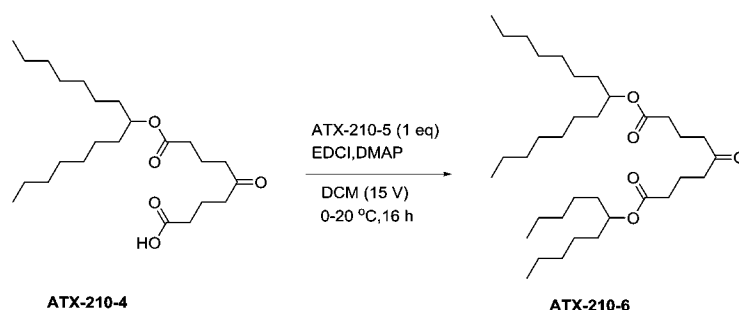
1/10)。在真空下濃縮所收集產物相。此產生 7.2 g (58.8%) 黃色油狀 **ATX-210-4**。ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 95:5至 5:95 A/B，2 min.，保持 0.7 min)：RT 1.60 min，m/z (計算值) 412.32，(實驗值) 435.15 (M+Na)。

合成 **ATX-210-5**



【0233】在 25℃ 下在 N₂ 下，向具有機械攪動之 1 L 四頸圓底燒瓶中裝填 THF (200 mL) 中之 540 mL 戊基溴化鎂 (1 mol/L)。在 0℃ 下，邊攪拌邊逐滴裝填甲酸乙酯 (20.0 g, 1.0 eq)。將所得溶液在室溫下攪拌 15 h。然後藉由添加 500 mL NH₄Cl 淬滅反應。分離各相，且用 2×500 mL 乙酸乙酯萃取水層。然後合併有機層；經無水硫酸鈉乾燥溶劑。過濾且在真空下濃縮。此產生 38.9 g (83.6%) 黃色油狀十一-6-醇。

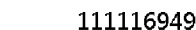
合成 **ATX-210-6**



【0234】將 **ATX-210-4** (7.2 g, 1.00 eq)、DCM (108 mL) 置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之 1 L 3 頸圓底燒瓶中。

111116949

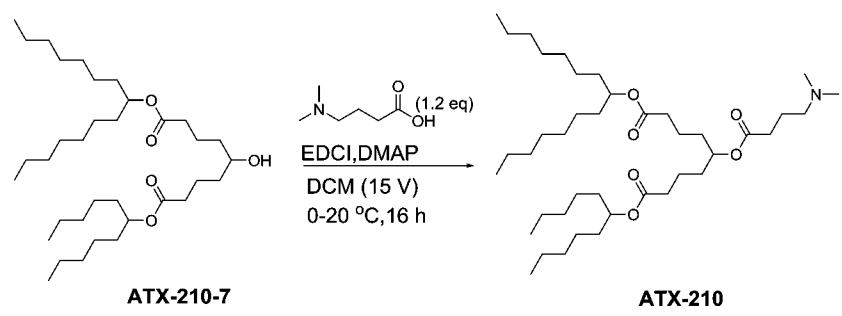
111116949



111116949

物。將殘餘物施加至具有1/0至10/1 PE/EA梯度之常壓矽膠管柱(400 g, 類型：ZCX-2, 100-200目)上，且收集產物溶析液(20/1-10/1)。在真空下濃縮所收集產物相。此產生7.1 g (70.7%)黃色油狀**ATX-210-7**且其未經進一步純化即直接用於下一步驟中。ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 95:5至5:95 A/B，5 min.，保持0.7 min)：RT 3.64 min，m/z (計算值) 568.50，(實驗值) 591.35 (M+Na)。

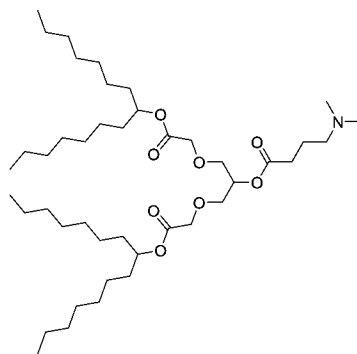
合成**ATX-210**



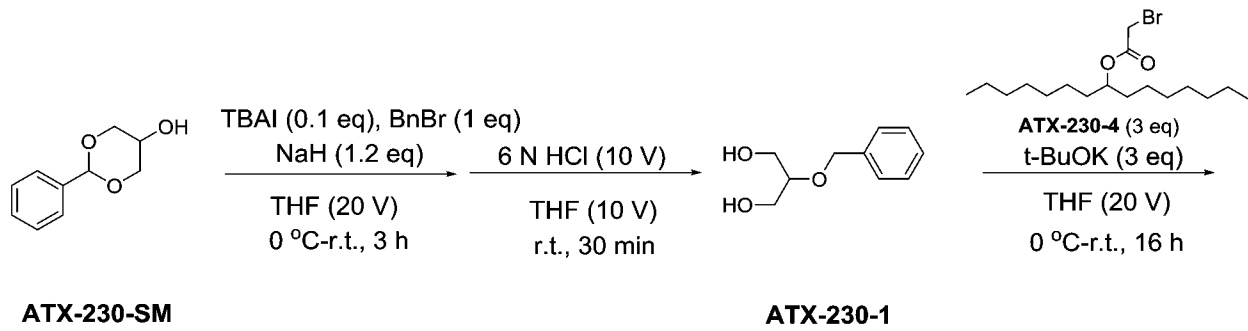
【0236】將**ATX-210-7** (3.3 g, 1.00 eq)於DCM (50 mL)中之溶液置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之100 mL 3頸圓底燒瓶中。添加4-(二甲基胺基)丁酸(1.16 g, 1.20 eq)、DMAP (0.14 g, 0.20 eq)，然後在0℃下逐份添加EDCI (1.34 g, 1.20 eq)。將所得溶液在室溫下攪拌16 h。然後藉由添加50 mL NaHCO₃ (1 mol/L)淬滅反應。用3×50 mL DCM萃取所得溶液且合併有機層。用2×50 mL鹽水洗滌所得混合物。在真空下濃縮有機層。將產物溶解於5 mL DCM中且添加15 g矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目)。在真空下濃縮混合物。將殘餘物施加至含有1/0至10/1 PE/EA梯度之常壓矽膠管柱(150 g, 類型：ZCX-2, 100-200目)上且收集產物溶析液

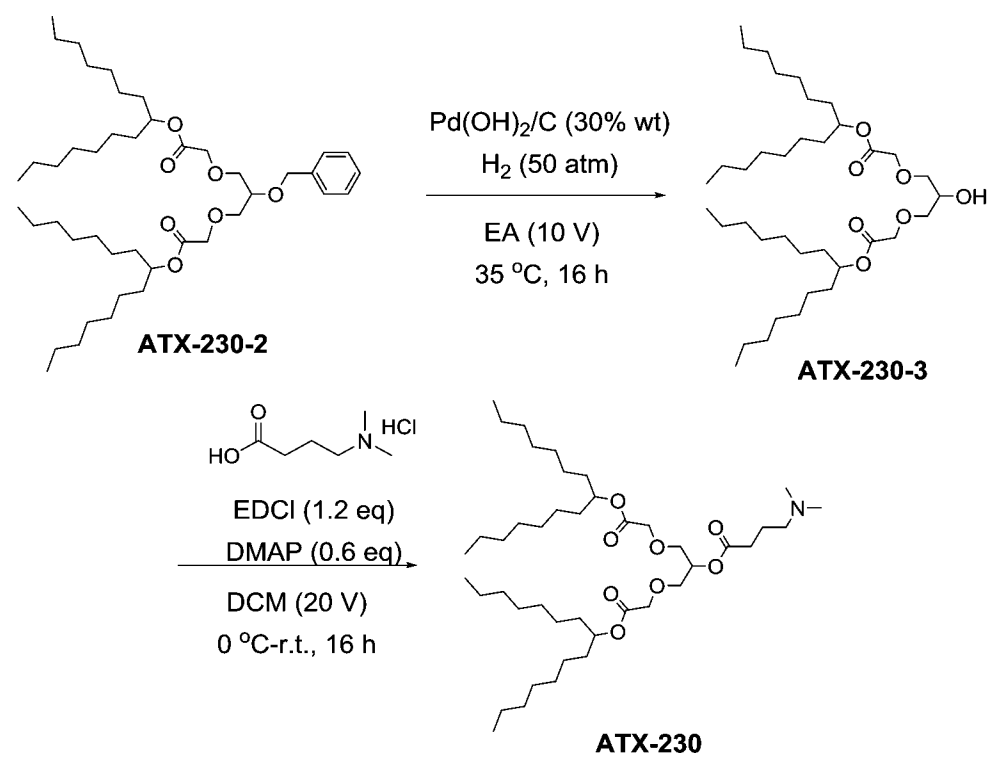
(20/1-10/1)。在真空下濃縮所收集產物相。將產物溶解於庚烷(60 mL, 20 V)中且在真空下濃縮庚烷相。此產生2.3 g (60.0%)黃色油狀 **ATX-210**。ELSD A：水/0.05% TFA:B: CH₃CN/0.05% TFA 95:5 至 5:95 A/B，2 min.，保持0.7 min)：RT 1.84 min，m/z (計算值) 681.59，(實驗值) 682.40 (M+H)；H-NMR- PH-ARC-脂質-210-0: (300 MHz, 氯仿-d): δ 4.821-4.904 (3H, m), 2.235-2.357 (8H, m), 2.187-2.204 (6H, s), 1.571-1.831 (16H, m), 1.261 (32H, s), 0.855-0.899 (12H, m)。

實例 7. 合成 **ATX-230**

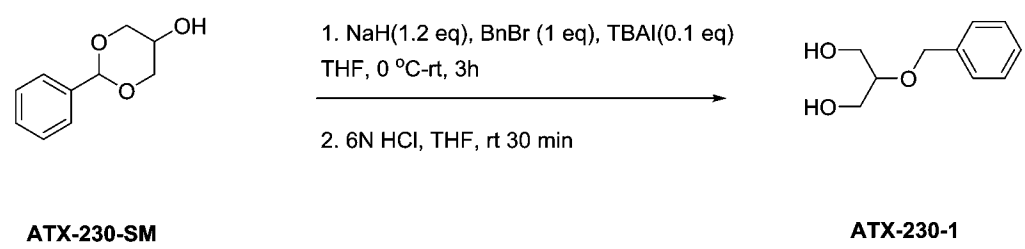


一般方案：





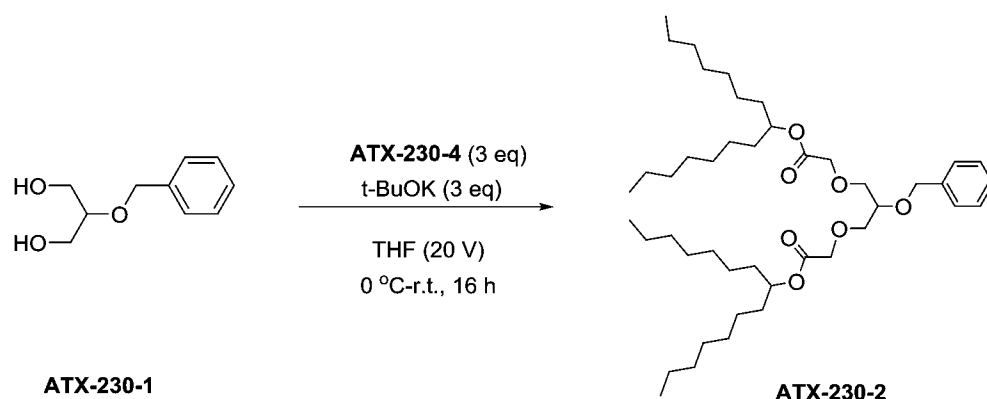
合成 ATX-230-1



【0237】向100 mL 3頸圓底燒瓶中添加於THF (50 mL, 20 V)中之ATX-230-SM (2.5 g, 1.0 equiv)。在0℃下，將NaH (560 mg, 60%於礦物油中，1.2 equiv)分幾份添加至反應混合物中且攪拌30 min。在0℃下，將苄基溴(2.4 g, 1.0 equiv)及四-正丁基碘化銨(TBAI) (1.5 g, 0.1 equiv)添加至反應混合物中。將所得溶液在室溫下攪拌2 h，HPLC指示ATX-230-SM完全耗盡。藉由將冰-水小心地添加至系統中來淬滅反應並攪拌10 min。在真空中蒸發有機溶劑且用DCM (2×25 mL, 20 V)萃取水相。在真空中濃縮有機溶劑。將殘餘物溶解於THF (25 mL, 10 V)中，且在室溫下添加6

mol/L HCl水溶液(25 mL, 10 V)。將所得溶液在室溫下攪拌 30 min。用NaHCO₃水溶液將溶液之pH值調整至7~8。用乙醚(2×25 mL, 20 V)萃取所得溶液。合併有機層，用無水MgSO₄乾燥且然後過濾。向濾液中裝填8 g矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目, 3.20 w./w.)，在真空下濃縮至無流份，同時維持溫度低於20℃。將40 g矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目, 16.00 w./w.)裝填至管柱中，然後裝填最後一步製備之吸收反應混合物之無水矽膠。使用combi-flash純化產物。用PE/EA溶析(體積比，梯度為100/0至95:5)。在真空下濃縮產物流份以提供白色固體狀**ATX-230-1** (1.5 g, 60%產率)。ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 95:5至5:95 A/B, 2 min., 保持0.7 min)：RT 0.79 min, m/z (計算值) 182.09, (實驗值) 205.10 (M+Na)；H-NMR- PH-ARC-脂質-230-1: (300 MHz, 氯仿-*d*): δ 7.40-7.29 (5H, m), 4.66 (2H, s), 3.83-3.71 (4H, m), 3.64-3.58 (1H, m)。

合成**ATX-230-2**



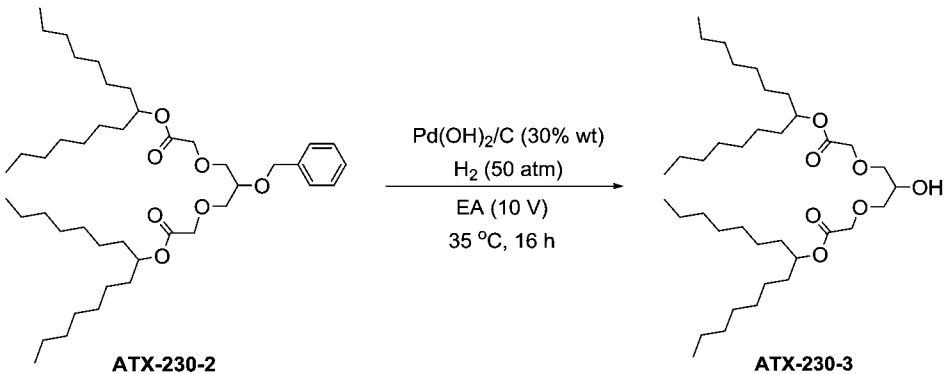
【0238】步驟1：向十五烷-8-醇(150.0 g, 1.0 equiv)於含有N₂之乾燥3頸燒瓶中之DCM (3 L, 20 V)中之溶液中，且然後一次性添加TEA (266.0 g, 4.0 equiv)，然後在0℃下

添加溴乙醯溴 (526.0 g, 4.0 equiv)。將反應物在室溫下攪拌 3 天且在 0°C 下藉由添加飽和 NH₄Cl 水溶液 (10 L, 66.7 V) 淬滅。用 DCM (10 L*3, 200 V) 萃取粗化合物。用鹽水 (10 L, 66.7 V) 洗滌合併之有機流份且經無水 MgSO₄ 乾燥並過濾。向濾液中添加 500 g 矽膠 (類型：ZCX-2, 100-200 目, 3.33 w./w.)，在真空下濃縮至無流份，同時維持溫度低於 35°C。將 2.5 kg 矽膠 (類型：ZCX-2, 100-200 目, 16.67 w./w.) 裝填至管柱中，然後裝填最後一步製備之吸收反應混合物之無水矽膠。使用 combi-flash 純化產物。用 PE/EA (體積比) 溶析。(梯度為 100:0，每 3±0.5 L 收集一次)。取出樣品用於 TLC (PE:EA=8:1, R_f=0.2) 分析。合併合格之流份且濃縮至乾燥。ELSD A：水 / 0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 80:20 至 20:80 A/B，3 min.，保持 0.98 min：RT 0.98 min，m/z (計算值) 348.17，(實驗值) 390.30 (M+Na+H₂O)；H-NMR- PH-ARC-脂質-230-4: (300 MHz, 氯仿-d): δ 5.01-4.87 (1H, m), 3.81 (2H, s), 1.57 (4H, m), 1.34 (22H, m), 0.88 (6H, t)。

【0239】步驟 2：向 100 mL 3 頸圓底燒瓶中添加 THF (30 mL, 20 V) 中之 ATX-230-1 (1.5 g, 1.0 equiv)。在 0°C 下將 t-BuOK (1.38 g, 1.5 equiv) 逐份添加至反應混合物中且攪拌 30 min。在 0°C 下將 ATX-230-4 (4.3 g, 1.5 equiv) 逐份添加至反應混合物中。將所得溶液在室溫下攪拌 16 h。在室溫下，將 t-BuOK (1.38 g, 1.5 equiv) 及 ATX-230-4 (4.3 g, 1.5 equiv) 再添加至反應混合物中。將所得溶液在室溫下攪

拌 16 h。LCMS 指示 **ATX-230-1** 完全耗盡。然後藉由添加氯化銨溶液 (15 mL, 10 V) 淬滅反應。用 Et₂O (2*30 mL, 40 V) 萃取所得溶液。合併有機層，用無水 MgSO₄ 乾燥且然後過濾。向濾液中裝填 3 g 矽膠 (類型：ZCX-2, 100-200 目，2.00 w./w.)，在真空下濃縮，同時維持溫度低於 20℃ 以吸附化合物。在 20 g Combi-flash 矽膠管柱上使用 PE/EA (體積比，梯度為 100/0 至 95:5) 純化材料以溶析產物。匯集各流份並在真空下濃縮以提供黃色固體狀 **ATX-230-2** (2.1 g, 35.5% 產率)。ELSD A：水 / 0.05% TFA : B : CH₃CN / 0.05% TFA 80:20 至 20:80 A/B，3 min.，保持 2.6 min : RT 2.62 min，m/z (計算值) 718.57，(實驗值) 741.50 (M+Na)；¹H-NMR- PH-ARC-脂質-230-2: (300 MHz, 氯仿-*d*): δ 7.39-7.27 (5H, m), 4.99-4.93 (2H, m), 4.52 (2H, s), 4.10 (4H, s), 3.99-3.68 (m, 5H), 1.53 (9H, m), 1.49 (42H, m), 1.26-1.24 (12H, t)。

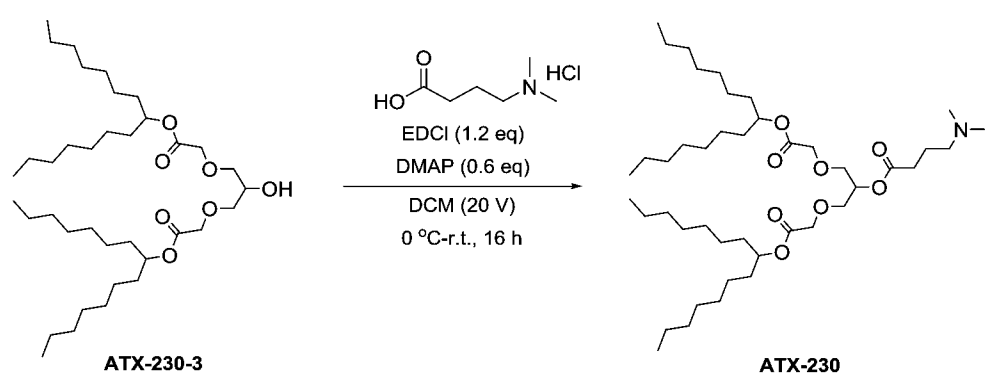
合成 ATX-230-3



【0240】在室溫下，將EA (21 mL, 10 V)中之**ATX-230-2** (2.1 g, 1.0 equiv)及20% Pd(OH)₂/C (0.63 g, 30% wt)裝填至高壓釜中。在35℃下在氫氣氛(50 atm)下攪拌16

h。TLC顯示**ATX-230-2**完全轉化。過濾反應混合物並在40℃下在真空下濃縮以獲得白色固體狀**ATX-230-3** (1.7 g, 95%產率)。ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 80:20至20:80 A/B，3 min.，保持2.6 min：RT 1.90 min，m/z (計算值) 628.53，(實驗值) 651.50 (M+Na)；H-NMR-PH-ARC-脂質-230-3: (300 MHz, 氯仿-*d*): δ 4.99-4.91 (2H, dd), 4.03 (4H, s), 3.67-3.37 (4H, m), 1.56-1.49 (9H, m), 1.29-1.25 (40H, m), 0.97-0.85 (12H, t)。

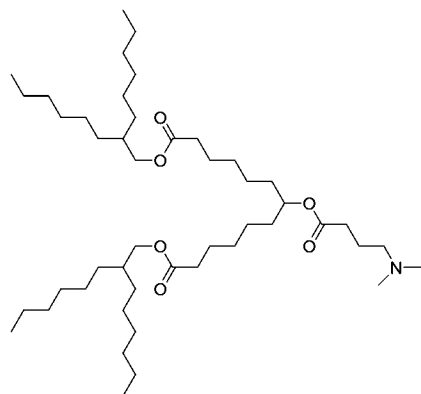
合成**ATX-230**



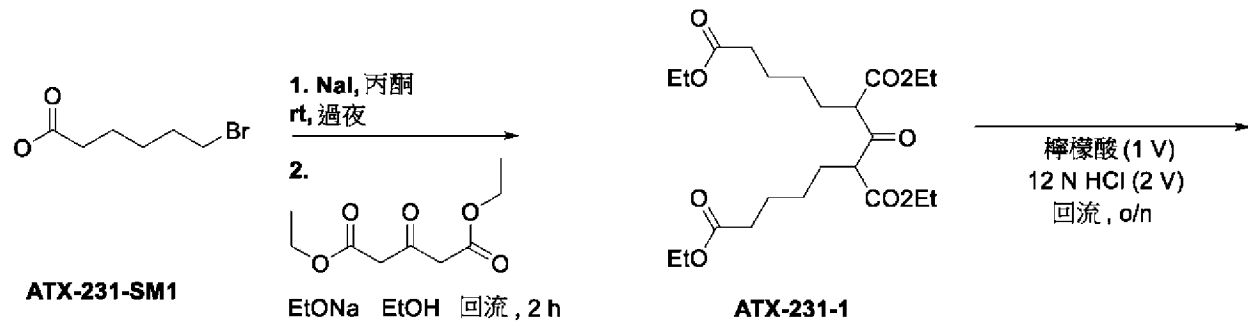
【0241】向100 mL 3頸圓底燒瓶中添加於DCM (34 mL, 20 V)中之**ATX-230-3** (1.7 g, 1.0 equiv)、4 (二甲基胺基)丁酸鹽酸鹽(450 mg, 1.0 equiv)及DMAP (198 mg, 0.6 equiv)。在0℃下，將EDCI (620 mg, 1.2 equiv)分幾份添加至反應混合物中。將所得溶液在20℃下攪拌16 h，用10%檸檬酸水溶液(17 mL, 10 V)淬滅反應系統且收集有機相。用10%檸檬酸水溶液(17 mL, 10 V)、然後用鹽水(17 mL, 10 V)洗滌有機溶液。用無水MgSO₄乾燥有機相且過濾。將混合物吸附於5 g矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目，2.94 w/w)上且在combi-flash矽膠管柱(40 g)上藉由用100:0至98:2

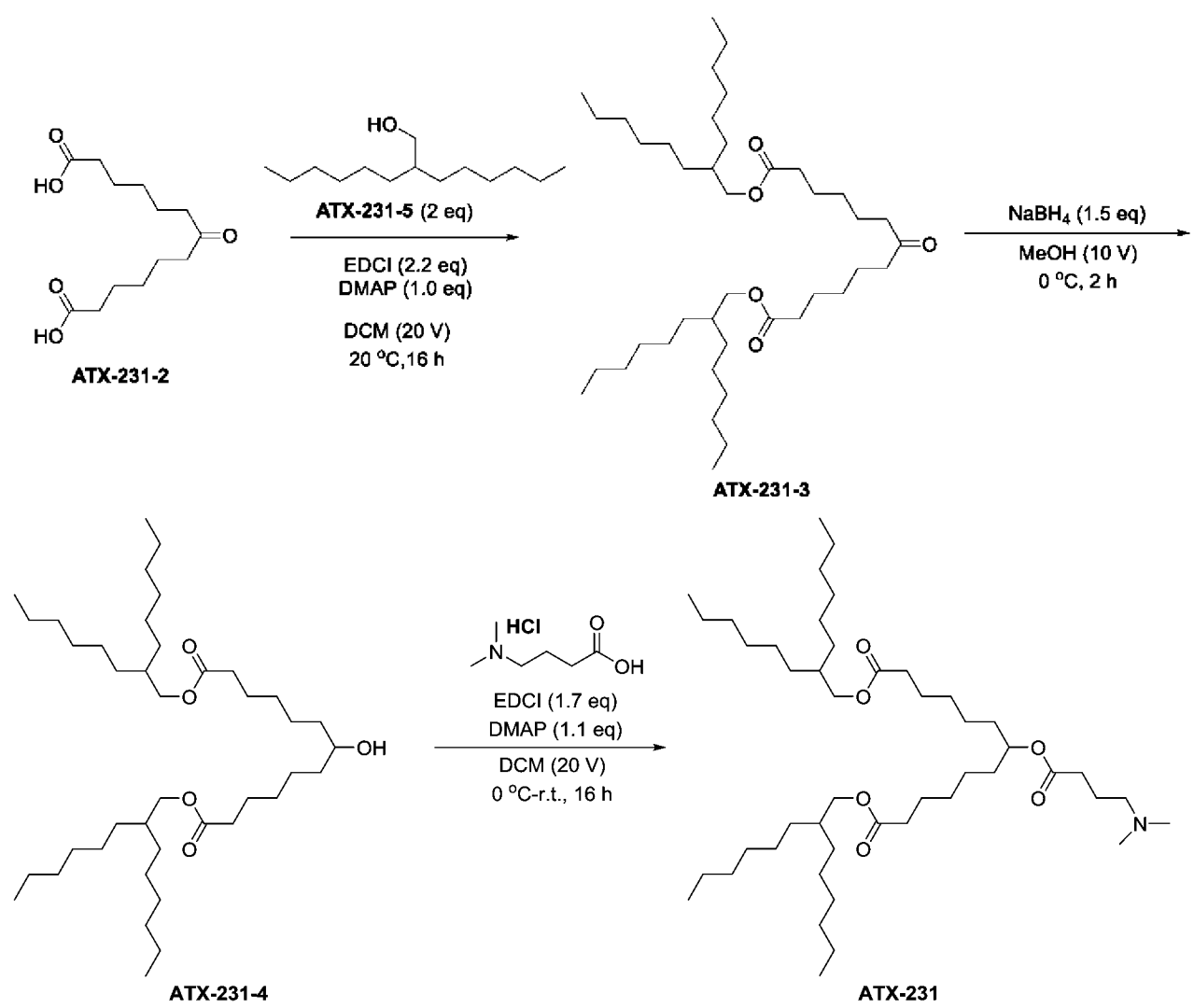
DCM/MeOH梯度溶析來純化。匯集含有產物之流份並在真空下濃縮以提供 1.2 g (65%產率)淺黃色油狀 **ATX-230**。ELSD A：水 /0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 80:20 至 20:80 A/B，3 min.，保持 2.6 min：RT 0.96 min，m/z (計算值) 741.62，(實驗值) 742.6 [M+1]⁺；H-NMR-PH-ARC-ATX-230-0: (400 MHz, CDCl₃, ppm) δ 5.181 (五重峰, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.931 (五重峰, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.081 (s, 4H), 3.830-3.700 (m, 4H), 2.341 (dt, *J* = 41.4, 7.4 Hz, 4H), 2.212 (s, 6H), 1.800 (五重峰, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.530 (d, *J* = 3.9 Hz, 8H), 1.25 (m, 40H), 0.900-0.830 (m, 12H)。

實例 8. 合成 **ATX-231**

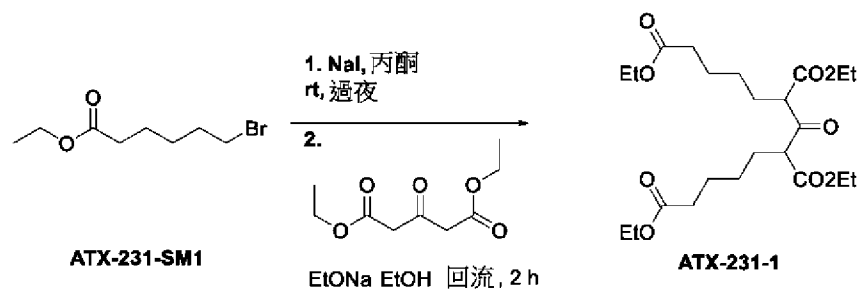


一般方案：





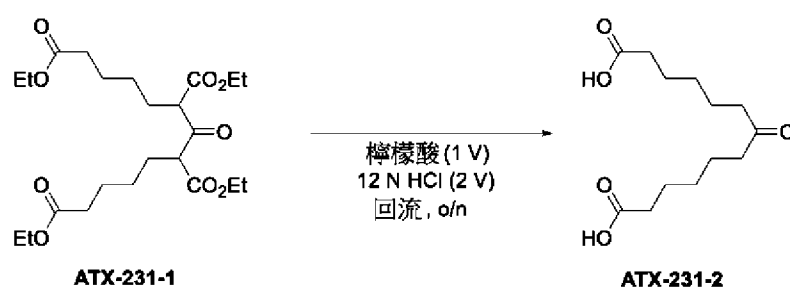
合成 ATX-231-1



【0242】向1 L 3頸圓底燒瓶中添加丙酮(500 mL, 10 V)中之乙基ATX-231-SM1 (50.0 g, 1.0 equiv)及碘化鈉(180 g, 4.4 equiv)。將反應物在室溫下攪拌過夜。用水(400 mL, 8 V)稀釋反應混合物且用二乙醚(400 mL, 8 V)萃取。用水洗滌有機流份，經無水硫酸鎂乾燥，過濾且移除溶劑。將

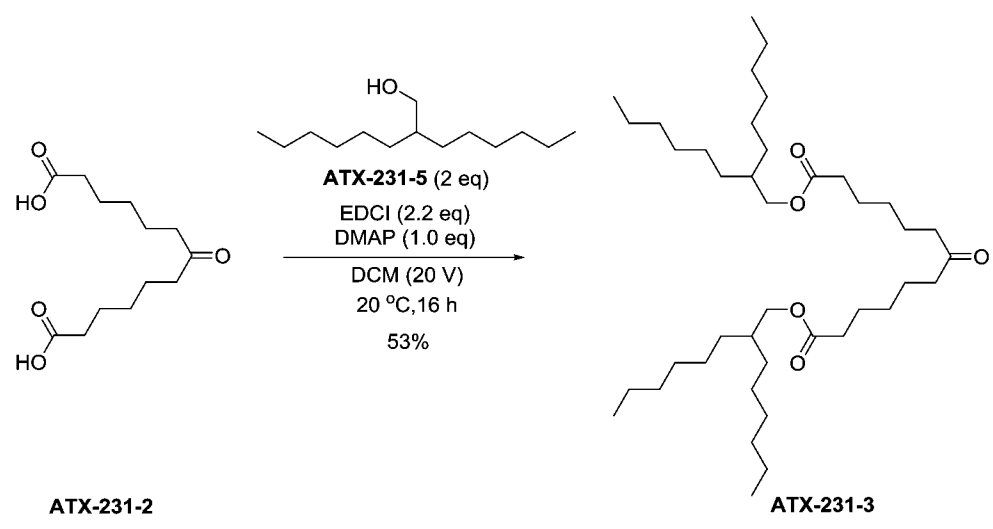
乙醇鈉(10.8 g, 2.1 equiv)溶解於無水乙醇(90 mL, 2 V)中。添加二乙基丙酮二甲酸酯(36.0 g, 1.12 equiv)且將溶液加熱至回流。然後緩慢添加6-碘己酸乙酯(24.0 g, 1.0 equiv)且將溶液回流1小時。添加乙醇鈉(10.8 g, 2.1 equiv)於乙醇(90 mL, 2 V)中之溶液，然後添加6-碘戊酸乙酯(24.0 g, 1.0 equiv)。將溶液回流過夜。冷卻反應混合物，用水(400 mL, 8 V)稀釋且用二乙醚(400 mL, 8 V)萃取。在真空下濃縮以提供47.5 g (粗製)黃色油狀**ATX-231-1**。

合成 ATX-231-2

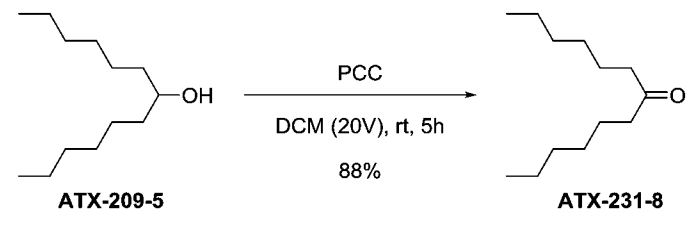


【0243】向100 mL 3頸圓底燒瓶中添加檸檬酸(40 mL, 1 V)及HCl (80 mL, 2V, 12 mol/L)中之**ATX-231-1** (40.0 g, 1.0 equiv)。將反應溶液回流過夜。冷卻溶液，用水稀釋，且用二氯甲烷萃取。移除溶劑且使殘餘物自丙酮重結晶並在真空下乾燥以獲得4 g (14%)白色固體狀**ATX-231-2**。ELSD A：水/5 mM NH₄HCO₃：B：CH₃CN 80:20至90:10 A/B，2 min.：RT 0.16 min，m/z (計算值) 258.15，(實驗值) 257.30 [M+1]⁺；H-NMR-PH-ARC-ATX-231-1: (400 MHz, CDCl₃, ppm) δ 2.5-2.49 (m, 2H), 2.42-2.32 (m, 2H), 2.19-2.15 (m, 4H), 2.00-1.98 (m, 8H), 1.51-1.47 (m, 4H)。

合成 ATX-231-3

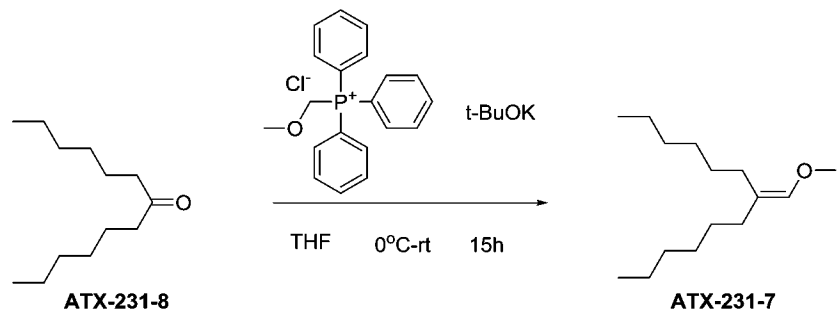


步驟 1 :



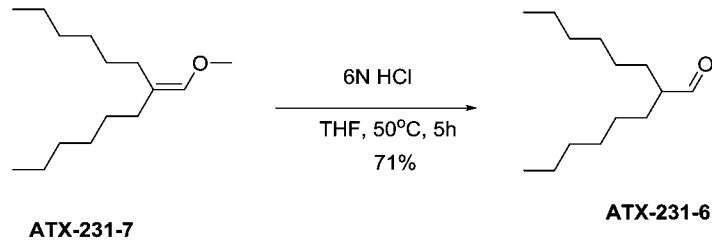
【 0244 】 將 DCM (300 ml, 20 V)、ATX-209-5 (15 g, 1eq)及氯鉻酸吡啶鎊鹽(PCC, 40 g, 2.5 eq)添加至500 ml三頸燒瓶中。將所得溶液在室溫下攪拌 5 h。TLC觀察指示 ATX-209-5完全轉化。藉由在真空下蒸餾來移除溶劑。將粗產物施加至矽膠管柱上且用乙酸乙酯/石油醚(1: 10)梯度溶析產物以獲得無色澄清油狀 ATX-231-8 (13 g, 88%產率)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6) δ 2.38 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 1.53 - 1.36 (m, 4H), 1.34 - 1.15 (m, 12H), 0.89 - 0.80 (m, 6H)。

步驟 2 :



【0245】將THF (260 ml, 20 V)及(甲氧基甲基)三苯基氯化磷(32 g, 1.6 eq)添加至500 ml三頸燒瓶中，然後在0℃下將t-BuOK (11.8, 1.6 eq)分批添加至混合物中。在0℃下攪拌1 h。將ATX-231-8 (13 g, 1 eq)添加至反應混合物中。在室溫下攪拌15 h。將氯化銨水溶液(10 wt%, 260 ml, 20 V)添加至系統中以淬滅。添加MTBE (260 ml, 20 V)且萃取至反應混合物並收集有機相。濃縮有機相後，將混合物施加至含有乙酸乙酯/石油醚(2: 98)之矽膠管柱上。獲得油狀ATX-231-7 (10 g, 70%產率)。¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 5.74 (s, 1H), 3.51 (s, 3H), 2.03 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.88 - 1.81 (m, 2H), 1.42 - 1.20 (m, 16H), 0.93 - 0.83 (m, 6H)。

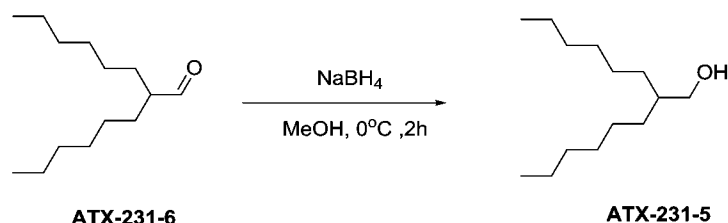
步驟3：



【0246】在室溫下，將THF (50 ml, 5 V)、ATX-231-7 (10 g, 1 eq)及6N HCl (20 ml, 2 V)添加至250 ml三頸燒瓶中。在50℃下攪拌5 h。將3N NaOH (40 ml, 4 V)及MTBE (100 ml, 10 V)添加至反應混合物中且將產物萃取至醚相中。收集醚相並在真空下濃縮以獲得油狀ATX-231-6 (6.57

g, 71%產率)。¹H NMR (300 MHz, 氯仿-*d*) δ 9.49 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 3.62 (m, 1H), 1.22 (m, 20H), 0.88 - 0.78 (m, 6H)。

步驟4：

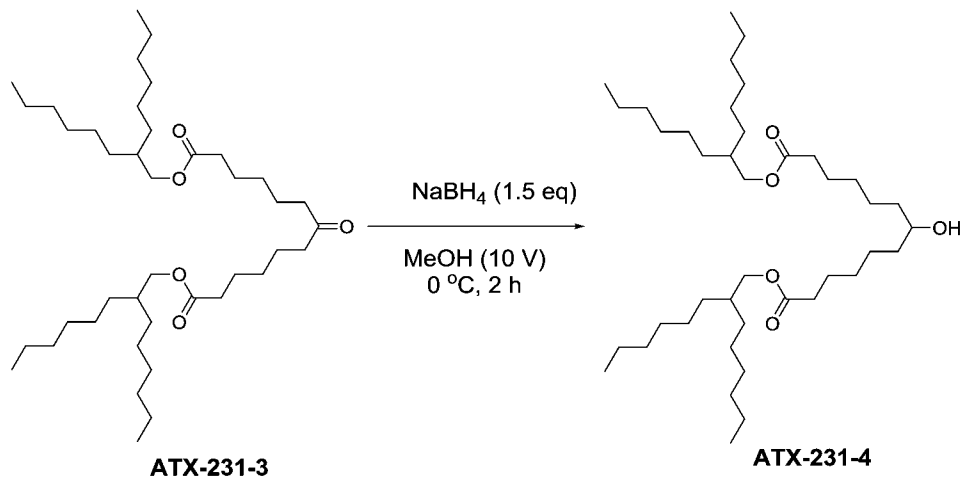


【0247】在室溫下，將MeOH (65 ml, 10V)及ATX-231-6 (6.57 g, 1 eq)添加至100 ml三頸燒瓶中。在0℃下將NaBH₄ (1.76, 1.5 eq)分批添加至反應混合物中且在0℃下攪拌2 h。在0℃下，將檸檬酸溶液(10 wt%, 65.7 ml, 10 V)添加至反應混合物中。將產物萃取至甲基第三丁基醚(MTBE, 65 ml, 10 V)中，收集有機相並在真空下濃縮以獲得油狀ATX-231-5 (5.2 g, 79%產率)。¹H NMR (300 MHz, 氯仿-*d*) δ 3.53 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.48 (s, 1H), 1.28 (m, 20H), 0.93 - 0.83 (m, 6H)。

【0248】步驟5：向250 mL 3頸圓底燒瓶中添加於DCM (60 mL, 20 V)中之ATX-231-2 (3.0 g, 1.0 equiv)、ATX-231-5 (4.97 g, 2.0 equiv)及DMAP (1.42 g, 1.0 equiv)。然後在0℃下，將EDCI (4.9 g, 2.2 equiv)分幾份添加至反應混合物中。將所得溶液在20℃下攪拌16 h，TLC指示ATX-231-2完全耗盡。用10%檸檬酸水溶液(30 mL, 10 V)淬滅反應。用10%檸檬酸水溶液(30 mL, 10 V)將分離之有機相洗滌一次，然後用鹽水(30 mL, 10 V)洗滌。用無水MgSO₄乾

燥有機相且然後過濾。將粗產物吸附於 6 g 矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目，2.00 w./w)上，且在 30 g 矽膠管柱上、使用 100:0 至 98:2 石油醚/乙酸乙酯梯度純化。在 TLC 分析(10:1 PE:EA)後將合格流份匯集且在真空下濃縮至乾燥以提供 4 g (53% 產率)無色油狀 **ATX-231-3**。ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 80:20 至 20:80 A/B，3.5 min：RT 2.89 min，m/z (計算值) 650.58，(實驗值) 673.50 (M+Na)；H-NMR- PH-ARC-脂質-230-2: (300 MHz, 氯仿-*d*): δ 3.97-3.96 (d, *J* = 2.4 Hz, 4H), 2.45-2.43 (m, 4H), 2.38-2.28 (m, 4H), 1.66-1.60 (9H, m), 1.49 (48H, m), 0.86-0.88(12H, t)。

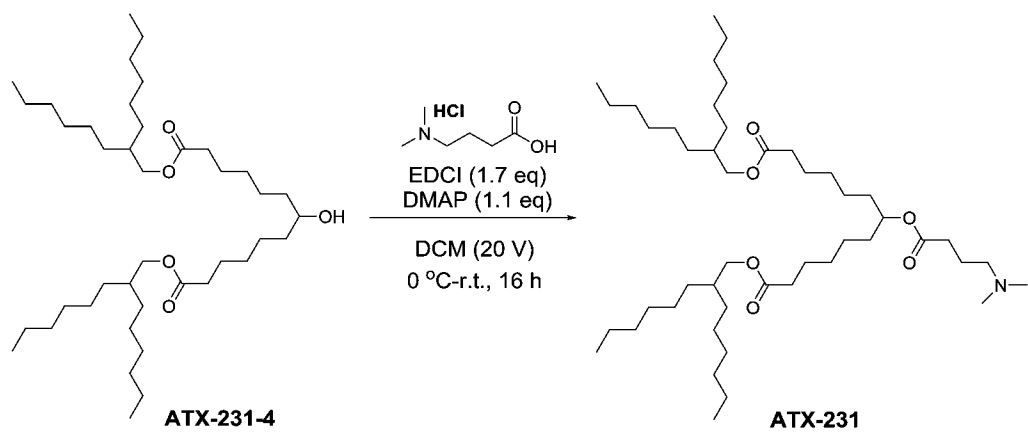
合成 **ATX-231-4**



【0249】在室溫下，向 100 mL 3 頸燒瓶中添加 MeOH (40 mL, 10 V) 中之 **ATX-231-3** (4.0 g, 1 equiv)。然後在 0°C 下，將 NaBH_4 (0.34 g, 1.5 equiv) 分幾份添加至反應混合物中。將所得溶液在 0°C 下攪拌 2 h。TLC 分析指示 **ATX-231-3** 完全耗盡。藉由添加水 (40 mL, 10 V) 淬滅反應。用 MTBE

(2×20 ml, 10 V)將產物萃取兩次。用無水MgSO₄乾燥有機相，過濾且在真空下濃縮至乾燥以提供3.4 g (85%產率)無色油狀**ATX-231-4**。ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 80:20至20:80 A/B，3.5 min：RT 3.03 min，m/z (計算值) 652.60，(實驗值) 675.50 (M+Na)；H-NMR- PH-ARC-脂質-230-2: (300 MHz, 氯仿-*d*): δ 4.00-3.98 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H), 3.59-3.51 (m, 1H), 2.35-2.30 (m, 4H), 1.68-1.63 (m, 6H), 1.55-1.29 (m, 55H), 0.92-0.88(12H, t)。

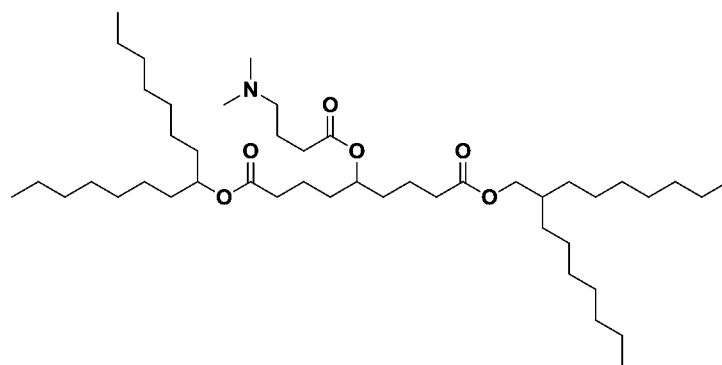
合成**ATX-231**



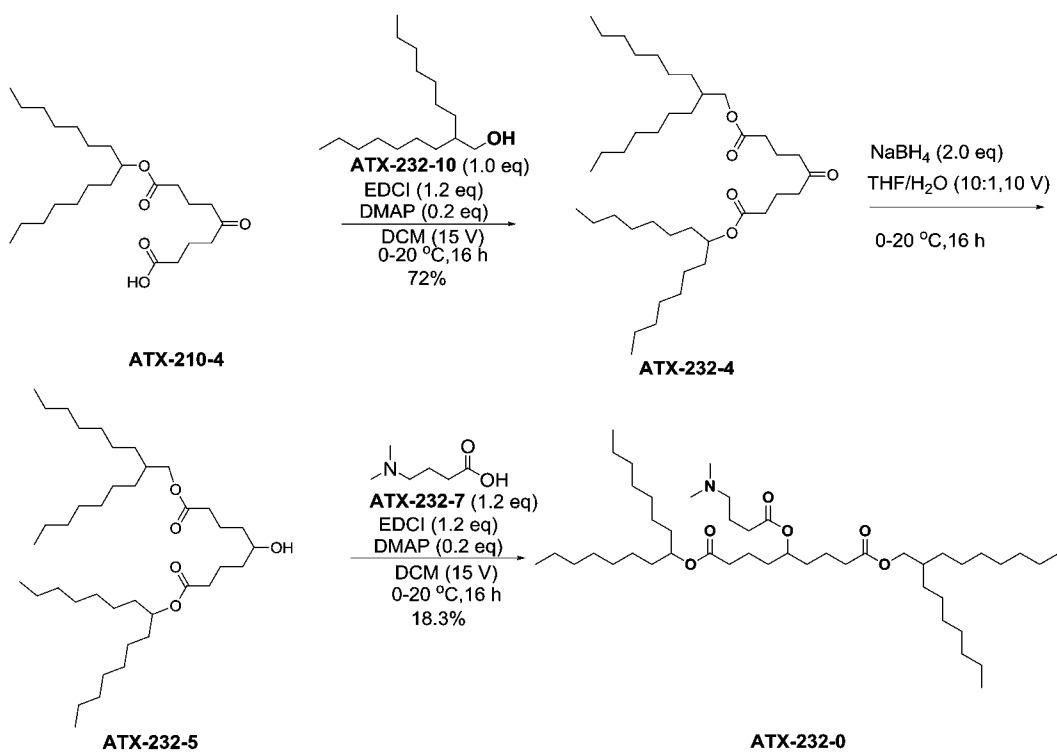
【0250】向100 mL 3頸圓底燒瓶中添加於DCM (60 mL, 30 V)中之**ATX-231-4** (2.0 g, 1.0 equiv)、4-(二甲基-胺基)丁酸鹽酸鹽 (0.81 g, 1.6 equiv)及DMAP (0.4 g, 1.1 equiv)。然後在0℃下，將EDCI (1.0 g, 1.7 equiv)分幾份添加至反應混合物中。將所得溶液在室溫下攪拌16 h，TLC指示**ATX-231-4**完全耗盡。用10%檸檬酸水溶液(20 mL, 10 V)淬滅反應且分離有機相。用10%檸檬酸水溶液(20 mL, 10 V)再洗滌有機相，然後用鹽水(20 mL, 10 V)洗滌，用無水MgSO₄乾燥且過濾。將粗產物吸附於6 g矽膠(類型：

ZCX-2, 100-200目, 3.00 w./w.)上且在Combi-flash系統上使用30 g矽膠管柱純化。用100:0至98:2石油醚乙酸乙酯梯度溶析產物。分析流份(TLC, EA:PE=1:10), 匯集, 在真空下濃縮至乾燥以提供1.5 g (75%產率)淺黃色油狀**ATX-231**。ELSD A: 水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 80:20至20:80 A/B, 3.5 min: RT 1.90 min, m/z (計算值) 766.25, (實驗值) 767.23 (M+H)。¹H-NMR-PH-ARC-ATX-231-0: (300 MHz, CDCl₃, ppm) δ 4.892-4.851 (m, 1H), 3.988-3.969 (d, *J* = 5.8 Hz, 4H), 2.957-2.905 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 2.713 (s, 6H), 2.445 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.308 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H), 2.117 (五重峰, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.650-1.521 (m, 10H), 1.288 (bs, 48H), 0.921-0.900 (m, 12H)。

實例9. 合成ATX-232

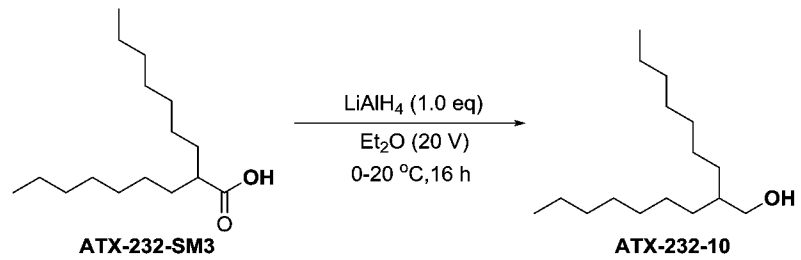


一般方案：



合成 ATX-232-4 :

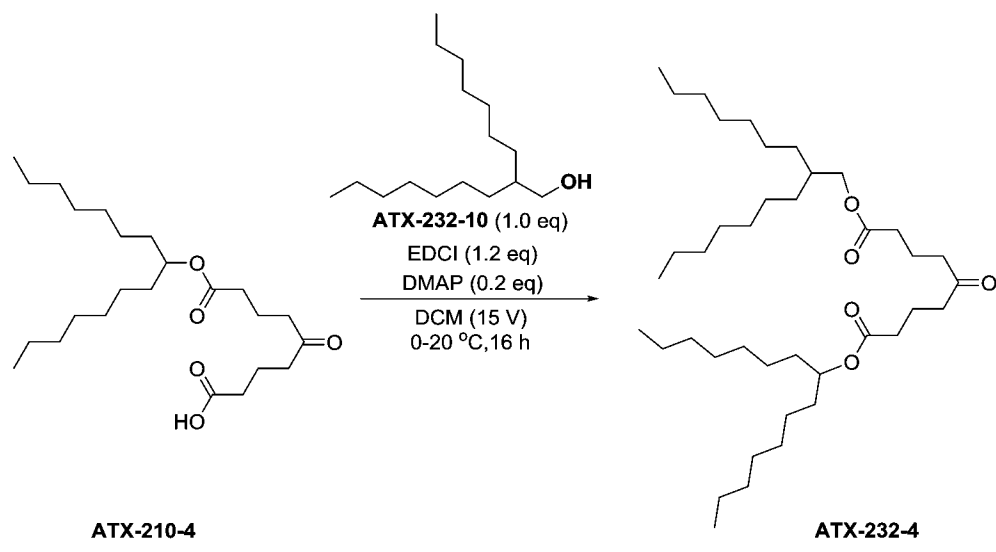
步驟 1 :



【0251】在室溫下，將Et₂O (100 mL, 10 V)中之ATX-232-SM3 (10.0 g, 1.0 equiv)置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之250 mL 3頸圓底燒瓶中。然後在0℃下添加LiAlH₄ (1.48 g, 1.0 equiv)。將所得溶液在室溫下攪拌16 h。然後藉由添加冰水(50 mL, 5 V)淬滅反應。用EA (3*200 mL, 60 V)萃取所得溶液且合併有機層。用鹽水(2*100 mL, 20 V)洗滌有機層且用無水Na₂SO₄乾燥，過濾並在真空下濃縮。此產生7.0 g (75%產率)黃色油狀ATX-232-10。 ¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 4.18-4.11(m, 1H), 3.57-3.55 (d, J = 8 Hz, 2H),

1.44-1.28 (m, 25H), 0.93 - 0.85 (m, 6H)。

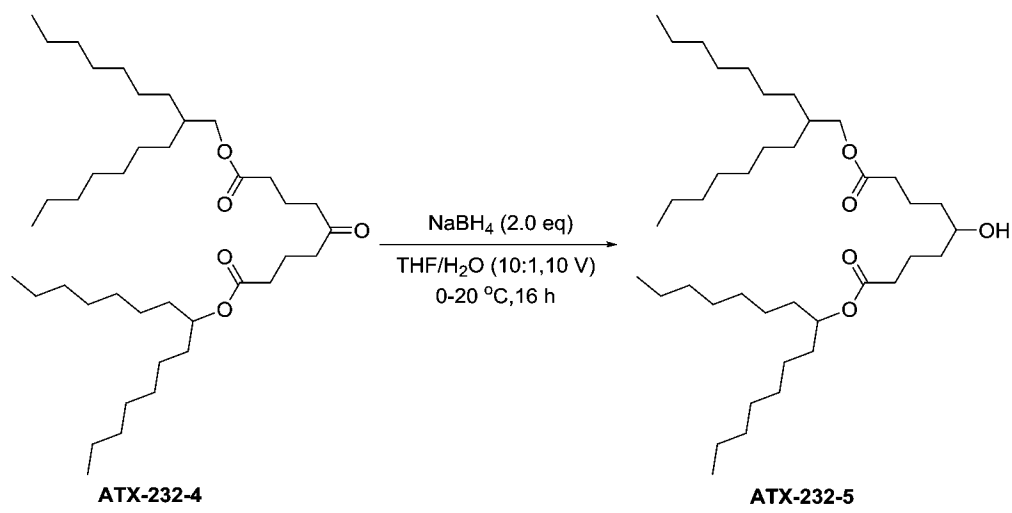
步驟 2：



【0252】在室溫下，將**ATX-210-4** (5.0 g, 1.0 equiv)及DCM (75 mL, 15 V)置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之250 mL 3頸圓底燒瓶中。然後在室溫下添加**ATX-232-10** (2.91 g, 1.0 equiv)及DMAP (0.3 g, 0.2 equiv)，然後在0℃下添加EDCI (2.74 g, 1.2 equiv)。將所得溶液在室溫下攪拌16 h。然後藉由添加1 mol/L HCl水溶液(25 mL, 5 V)淬滅反應。用DCM (3*165 mL, 100 V)萃取所得溶液且合併有機層。用鹽水(2*150 mL, 60 V)洗滌有機層且用無水Na₂SO₄乾燥，過濾並在真空下濃縮。將粗混合物吸附於10 g矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目，2.00 w./w.)上，且在100 g矽膠管柱上、藉由用100:0至90:10 DCM/MeOH梯度溶析來純化。在TLC分析(DCM:MeOH=10:1)後匯集各流份且在減壓下濃縮以獲得5.5 g (72%產率)黃色油狀**ATX-232-4**。ELSD A：水/0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 80:20至20:80 A/B，3.5 min：RT 2.81 min，m/z (計算值) 636.57，(實驗值) 659.55

(M+Na) ; H-NMR- PH-ARC-脂質 -230-2: (300 MHz, 氯仿 -*d*): δ 4.89-4.85 (m, 1H), 3.99-3.97 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 2.50-2.46 (m, 4H), 2.36-2.29 (m, 4H), 1.95-1.85 (m, 4H), 1.52-1.51 (6H, m), 1.28 (48H, m), 0.91-0.84(m, 12H)。

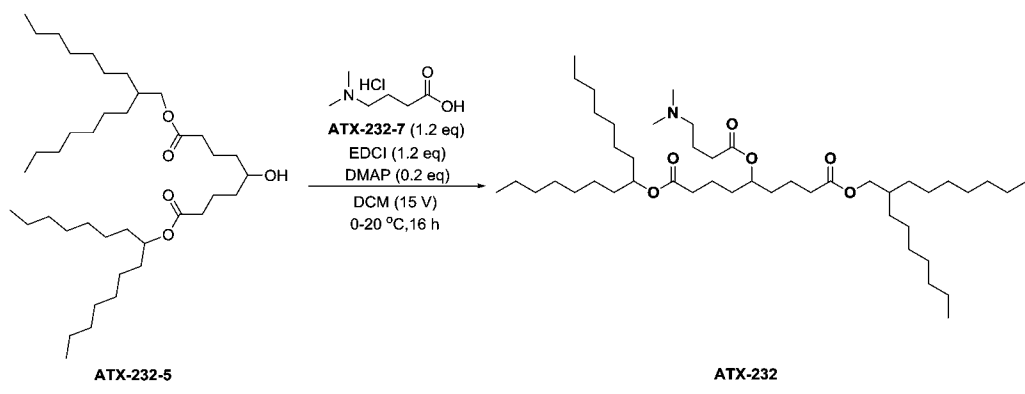
合成 **ATX-232-5**



【0253】在室溫下，將THF/H₂O (10/1, 55 mL, 10 V) 中之**ATX-232-4** (5.5 g, 1.0 equiv)置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之100 mL 3頸圓底燒瓶中。然後在0℃下分幾批添加NaBH₄ (0.88 g, 2.0 equiv)。將所得溶液在室溫下攪拌16 h。然後藉由添加冰水(27.5 mL, 5 V)淬滅反應。用乙酸乙酯(3*90 mL, 50 V)萃取所得溶液且合併有機層。用鹽水(2*110 mL, 40 V)洗滌有機層，用無水Na₂SO₄乾燥，過濾且在真空下濃縮。將粗混合物吸附於11 g矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目，2.00 w./w.)上，且在60 g矽膠管柱上、藉由用100:0至90:10 DCM/MeOH梯度溶析來純化。在TLC分析(DCM:MeOH=10:1)後匯集各流份且在減壓下濃縮以獲得5.1 g (93%產率)黃色油狀**ATX-232-5**。ELSD A：水 /

0.05% TFA:B:CH₃CN/0.05% TFA 80:20至20:80 A/B，3.5 min：RT 2.81 min，m/z (計算值) 638.58，(實驗值) 661.55 (M+Na)；H-NMR- PH-ARC-脂質-230-2: (300 MHz，氯仿-*d*): δ 4.93-4.83 (m, 1H), 4.00-3.98 (d, *J*=8 Hz, 2H), 3.66-3.62 (m, 12H), 2.50-2.46 (m, 4H), 2.64-2.69 (m, 4H), 1.88-1.85 (m, 6H), 1.95-1.85 (m, 4H), 1.58-1.52 (m, 7H), 1.47-1.44 (m, 44H), 0.96-0.88(m, 12H)。

合成ATX-232



【0254】在室溫下，將DCM (80 mL, 15 V)中之ATX-232-5 (5.1 g, 1.0 equiv)置於經吹掃且維持惰性氮氣氛之100 mL 3頸圓底燒瓶中。然後在室溫下添加ATX-232-7 (1.6 g, 1.2 equiv)及DMAP (0.21 g, 0.2 equiv)，然後在0℃下添加EDCI (1.92 g, 1.2 equiv)。將所得溶液在室溫下攪拌16 h。然後藉由添加冰水(25 mL, 5 V)淬滅反應。用DCM (3*80 mL, 50 V)萃取所得溶液且合併有機層。用鹽水(2*100 mL, 40 V)洗滌有機層且用無水Na₂SO₄乾燥，過濾並在真空下濃縮。將粗混合物吸附於11 g矽膠(類型：ZCX-2, 100-200目，2.00 w./w.)上，且在60 g矽膠管柱上、

藉由用 100:0 至 90:10 DCM/MeOH 梯度溶析來純化。在 TLC 分析 (DCM:MeOH=10:1) 後匯集各流份且在減壓下濃縮以獲得 1.1 g (18.3 % 產率) 黃色油狀 **ATX-232**。LC-MS-PH-ARC-ATX-232-0: (ES, m/z): 752 $[M+1]^+$; H-NMR-PH-ARC-ATX-232-0: (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 4.997-4.858 (m, 2H), 3.983 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.386-2.261 (m, 6H), 2.261 (s, 6H), 1.823 (五重峰, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.799-1.512 (m, 13H), 1.289 (s, 46H), 0.922-0.882 (m, 12H)。

實例 10. 本發明化合物之生物數據

【0255】實施多種分析以評價本揭示案脂質之效率。該等分析之描述如下。

因子 VII 減弱評估之方案

【0256】使用此實例之方案評估下文進一步闡述之包含 FVII siRNA 之脂質調配物之減弱活性。在 FVII 評估中，7 至 8 週齡之雌性 Balb/C 小鼠係自 Charles River Laboratories (Hollister, CA) 購得。將小鼠保持在無病原體環境中且根據制度性動物護理及使用委員會 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 建立之指南實施涉及小鼠之所有程序。以 10 mL/kg 之給藥體積及兩個劑量水準 (0.03 mg/kg 及 0.01 mg/kg) 靜脈內投與含有因子 VII siRNA 之脂質奈米粒子。48 h 後，用異氟醚麻醉小鼠且將血液睜後收集至塗覆有 0.109 M 檸檬酸鈉緩衝液 (BD Biosciences, San

Diego, CA)之Microtainer®管中，並處理成血漿。立即測試血漿樣本之因子VII水準或將其儲存在-80℃下用於後續分析。使用比色Biophen VII分析套組(Aniara Diagnostica, USA)測定血漿中FVII蛋白之量測。在405 nm下量測吸光度且使用經連續稀釋之對照血漿生成校準曲線以測定經治療動物相對於鹽水治療之對照動物之血漿中因子VII之水準。

用於hEPO mRNA表現評估之方案

【0257】根據此實例之方案，評估包含以下hEPO mRNA之脂質調配物之活體內表現hEPO的能力。使用制度批准之方案(IACUC)實施所有動物實驗。在此方案中，至少6-8週齡之雌性Balb/c小鼠係自Charles River Laboratory購得。經由尾靜脈使用hEPO之兩個劑量水準(0.1 mg/kg及0.03 mg/kg)中之一者向小鼠靜脈內注射hEPO-LNP。6 hr後，用血清分離管收集血液，且藉由離心分離血清。然後使用ELISA分析(人類紅血球生成素Quantikine IVD ELISA套組，R&D Systems, Minneapolis, MD)量測血清hEPO水準。

小鼠血漿穩定性

【0258】藉由將脂質以5 mg/mL之濃度溶解於異丙醇中來製備脂質儲備溶液。然後以1.0 mL之總體積用50:50 (v/v)乙醇/水將所需體積之脂質-異丙醇溶液稀釋至100 μM

濃度。將 10 微升此 100 μM 溶液摻入 1.0 mL 小鼠血漿 (BioIVT, 目錄號: MSE00PLNHUNN, CD-1 小鼠, 抗凝劑: 肝素鈉, 未過濾) 中, 將其預熱至 37°C 且使用磁力攪拌棒以 50 rpm 攪拌。因此, 血漿中脂質之起始濃度係 1 μM 。在時間點 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min 及 120 min 時, 自反應混合物抽出 0.1 mL 血漿, 且藉由添加 0.9 mL 冰冷 4:1 (v/v) 乙腈/甲醇並添加 1 $\mu\text{g/mL}$ 之所選內部標準脂質使蛋白質沈澱。經由 0.45 微米 96 孔過濾板過濾後, 藉由 LC-MS (Thermo Fisher 之 Vanquish UHPLC - LTQ XL 線性離子捕集質譜儀); Waters XBridge BEH Shield RP18 2.5 μm (2.1 $\times$ 100 mm) 管柱及其匹配之保護管柱分析濾液。移動相 A 係水中之 0.1% 甲酸, 且移動相 B 係 1:1 (v/v) 乙腈/甲醇中之 0.1% 甲酸。流量係 0.5 min/min。溶析梯度係: 時間 0 - 1 min: 10% B; 1 - 6 min: 10% - 95% B; 6 - 8.5 min: 95% B; 8.5 - 9 min: 95% - 10% B; 9 - 10 min: 10% B。質譜呈 600 - 1100 m/z 之正性掃描模式。使用 Xcalibur 軟體 (Thermo Fisher) 在萃取離子層析 (XIC) 中對脂質之分子離子峰進行積分。根據內部標準之峰面積正規化後, 使用與 T=0 相比之相對峰面積作為每一時間點剩餘之脂質之百分比。使用一階衰變模型計算 $T_{1/2}$ 值。

活體內生物降解度分析

【0259】實施活體內生物降解度分析以評價 LNP 中脂質之生物降解度。簡言之, 向小鼠中注射 0.1 mg/Kg 或 0.03

mg/Kg劑量且在24或48小時後收集小鼠肝臟。為量測小鼠肝臟中脂質之濃度，將肝臟樣品在適當緩衝液中以1 - 10稀釋度均質化且與等量穩定血漿混合。然後將樣品與摻有內部標準之有機溶劑混合以使蛋白質沈澱。離心後，用有機溶劑進一步稀釋上清液，然後藉由LC-MS分析樣品。在LC-MS分析中，使用正電噴霧離子化，且設定多個反應監測(MRM)參數以特異性靶向脂質分析物及內部標準。在穩定血漿中製備校準標準且在蛋白質沈澱之前將其與等量均質化緩衝液混合。在空白肝臟均質物中製備含有已知量之脂質之品質控制樣品以監測分析之精度及準確性。

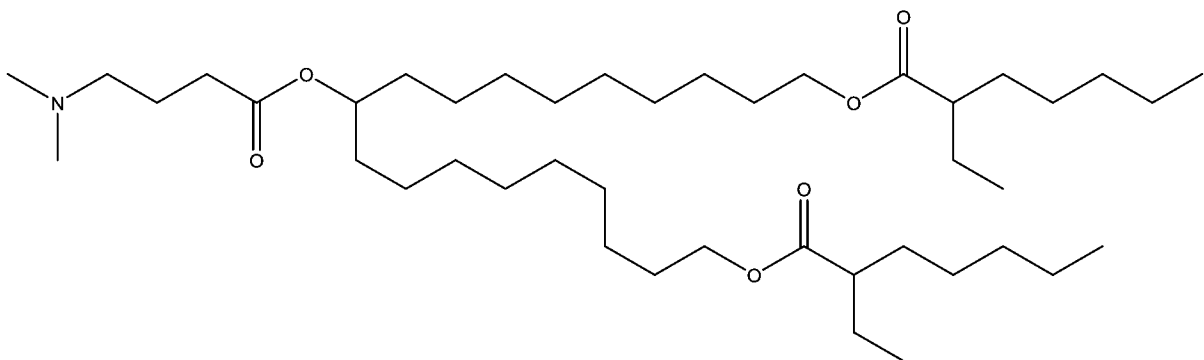
表 1. 生物分析數據

ATX#/屬性	化合物-10111	ATX-193	ATX-200	ATX-201	ATX-202	ATX-209	ATX-210	ATX-231	ATX-232
FVII KD% _ 0.03 mpk	95	100	97.5	97.5	83.22	90.6	97.65	86	90
FVII KD% _ 0.01 mpk	89	95.6	87.1	87.4	61.42	65.7	87	72	74
EPO 表現 (ng/mL) 0.03 mpk	105	264	494	523	447	65	329	1706	2115
EPO 表現 (ng/mL) 0.1 mpk	213	498	828	680	531	290	662	5446	510

表 2. 半衰期及降解度數據

ATX#/屬性	化合物-10111	ATX-209	ATX-231
2 h 後剩餘之血漿半衰期%	91	80	89
48 h 時之活體內降解度 ng/g 組織 0.03 mpk	566	0	0
48 h 時之活體內降解度 ng/組織 0.1 mpk	2613	647	0

【 0260 】 化 合 物 -10111 顯 示 於 下 文 中 ， 且 列 於 WO 2021/030701 之 第 243 頁 ：



【 0261 】 下表 3 顯示 ATX 化合物之所計算 LogD (cLogD)及所計算 pKa (cpKa)以及括弧中之所量測 pKa值。藉由 ACD Labs結構設計器 v12.0生成 cLogD及 cpKa值。

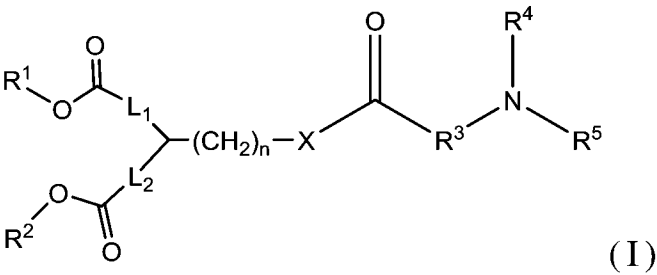
表 3. cLogD 及 cpKa 值

ATX-#	cLogD	c-pKa (pKa)
193	13.74	9.36 (6.35)
200	14.01	9.37 (6.78)
201	13.23	9.37 (6.74)
202	14.42	9.31 (6.17)
209	13.51	9.37
210	11.70	9.35 (6.53)
230	12.56	9.34
231	14.02	9.35
232	14.25	9.36

【 0262 】 儘管出於清楚理解之目的，已藉助說明及實例一定詳細地闡述前述發明，但熟習此項技術者應瞭解，可在所附申請專利範圍之範圍內實踐某些變化及修改。另外，本文所提供之每一參考文獻之全文皆以引用方式併入，其併入程度如同每一參考文獻係個別地以引用方式併入一般。當本申請案與本文所提供參考文獻之間存在衝突時，應以本申請案為準。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽，



其中：

R^1 及 R^2 各自獨立地係 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CH}-$ 、 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-1})\text{CH}$ 、 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-2})\text{CH}$ 、 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CHCH}_2-$ 或 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-1})\text{CHCH}_2-$ ，其中 m 係4-11；

L^1 及 L^2 各自獨立地係不存在、直鏈 C_{1-5} 伸烷基或 $(\text{CH}_2)_p-\text{O}-(\text{CH}_2)_q$ ，其中 p 及 q 各自獨立地係1-3；

R^3 係視情況地經一或兩個甲基取代之直鏈 C_{2-5} 伸烷基；

R^4 及 R^5 各自獨立地係H或 C_{1-6} 烷基；

X 係O或S；且

n 係0-2。

【請求項2】如請求項1之化合物，其中 R^1 及 R^2 各自獨立地選自 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CH}-$ 及 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CHCH}_2-$ 。

【請求項3】如請求項1或2之化合物，其中 R^1 及 R^2 各自獨立地係 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CH}-$ 。

【請求項4】如請求項1或2之化合物，其中 R^1 及 R^2 各

自獨立地係 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CHCH}_2-$ 。

【請求項5】如請求項1之化合物，其中 R^1 及 R^2 各自獨立地選自 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-1})\text{CH}$ 、 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-2})\text{CH}$ 及 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-1})\text{CHCH}_2-$ 。

【請求項6】如請求項1之化合物，其中 R^1 係 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CH}-$ 或 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)_2\text{CHCH}_2-$ ，且 R^2 選自 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-1})\text{CH}$ 、 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-2})\text{CH}$ 及 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m)(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{m-1})\text{CHCH}_2-$ 。

【請求項7】如前述請求項中任一項之化合物，其中 m 係4至8。

【請求項8】如前述請求項中任一項之化合物，其中 m 係5至7。

【請求項9】如前述請求項中任一項之化合物，其中 m 係5。

【請求項10】如前述請求項中任一項之化合物，其中 m 係6。

【請求項11】如前述請求項中任一項之化合物，其中 m 係7。

【請求項12】如前述請求項中任一項之化合物，其中 L^1 及 L^2 各自獨立地係 C_{2-5} 伸烷基或 $(\text{CH}_2)_p-\text{O}-(\text{CH}_2)_q$ 。

【請求項13】如前述請求項中任一項之化合物，其中 L^1 及 L^2 各自獨立地係 C_{2-5} 伸烷基。

【請求項14】如前述請求項中任一項之化合物，其中 L^1 及 L^2 各自係伸丙基。

【請求項15】如請求項1至11中任一項之化合物，其中 L^1 及 L^2 各自係不存在。

【請求項16】如前述請求項中任一項之化合物，其中 R^3 係 C_{3-5} 伸烷基。

【請求項17】如前述請求項中任一項之化合物，其中 R^3 係伸丙基。

【請求項18】如前述請求項中任一項之化合物，其中 R^4 及 R^5 各自獨立地係 C_{1-6} 烷基。

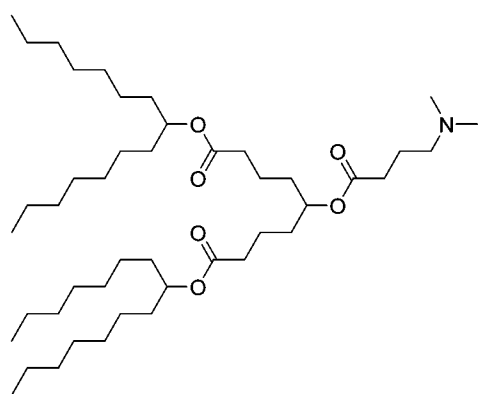
【請求項19】如前述請求項中任一項之化合物，其中 R^4 及 R^5 各自係甲基。

【請求項20】如前述請求項中任一項之化合物，其中 n 係0-1。

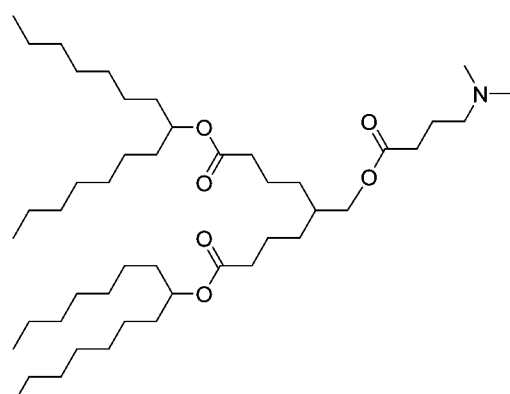
【請求項21】如前述請求項中任一項之化合物，其中 n 係0。

【請求項22】如請求項1至20中任一項之化合物，其中 n 係1。

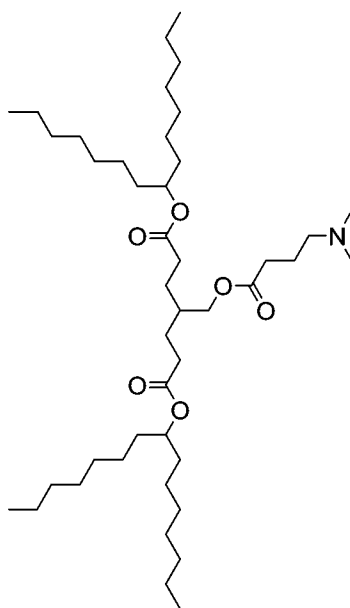
【請求項23】如請求項1至22中任一項之化合物，其選自由以下組成之群：



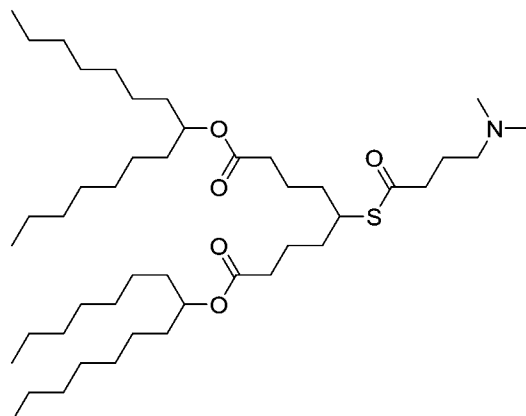
ATX-193



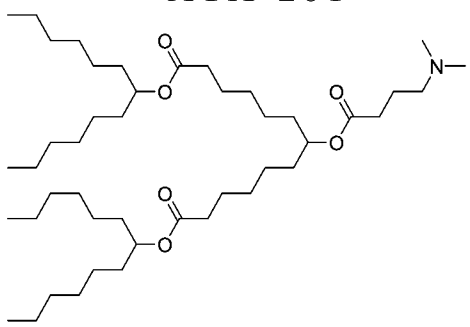
ATX-200



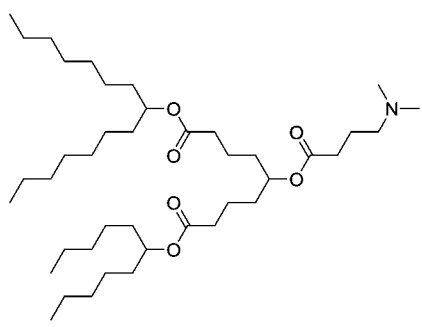
ATX-201



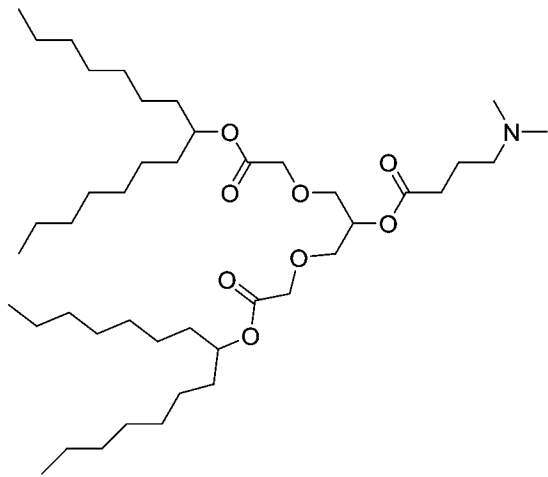
ATX-202



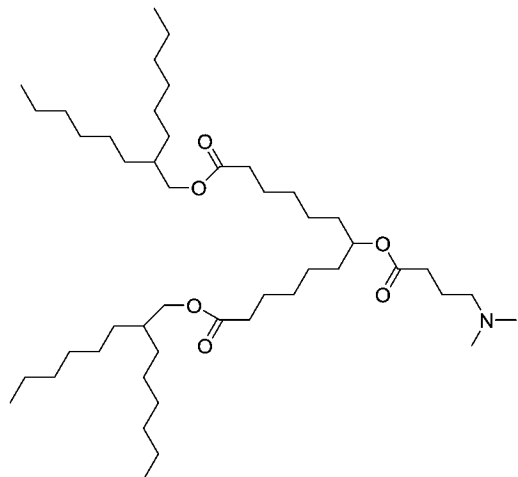
ATX-209



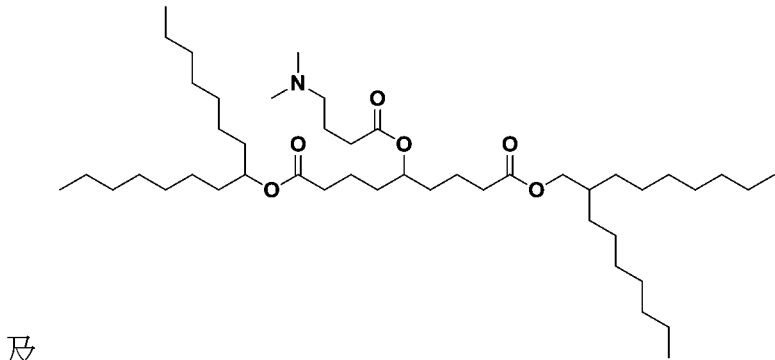
ATX-210



ATX-230



ATX-231



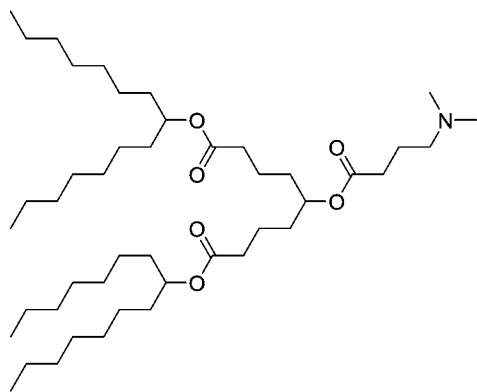
及

；

ATX-232

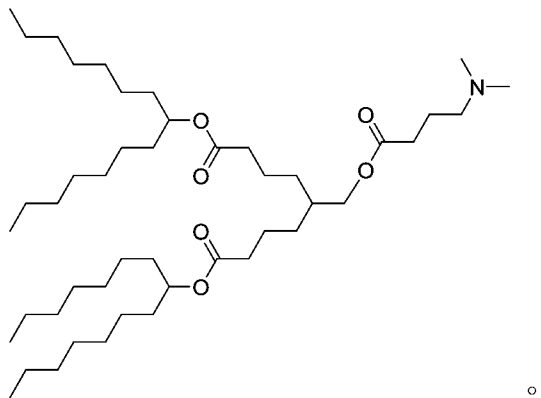
或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項24】如請求項23之化合物，其中該化合物係ATX-193：

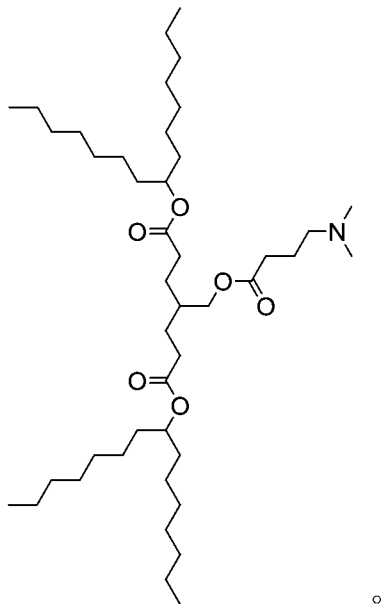


。

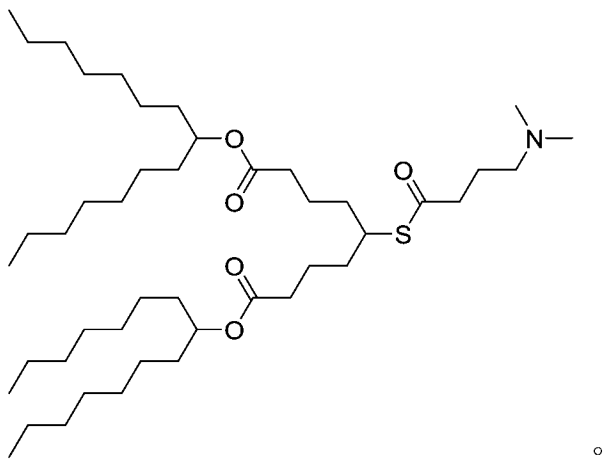
【請求項25】如請求項23之化合物，其中該化合物係ATX-200：



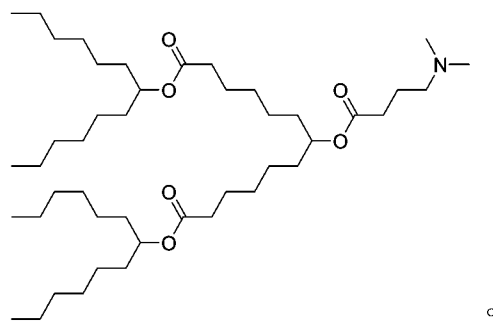
【請求項 26】如請求項 23 之化合物，其中該化合物係 ATX-201：



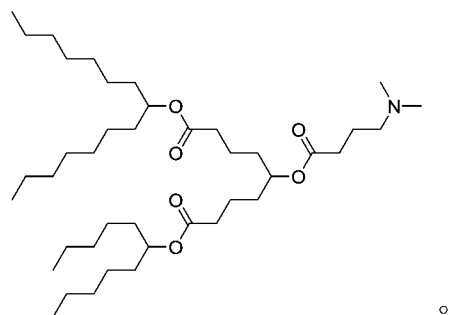
【請求項 27】如請求項 23 之化合物，其中該化合物係 ATX-202：



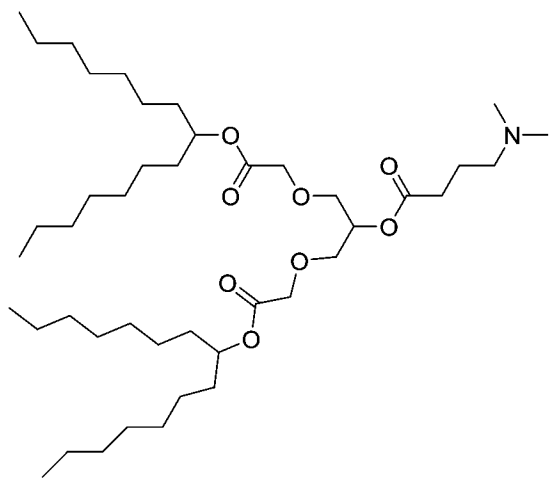
【請求項 28】如請求項 23 之化合物，其中該化合物係
ATX-209：



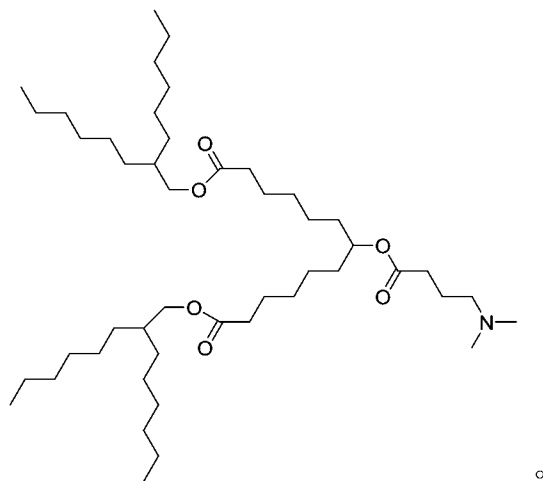
【請求項 29】如請求項 23 之化合物，其中該化合物係
ATX-210：



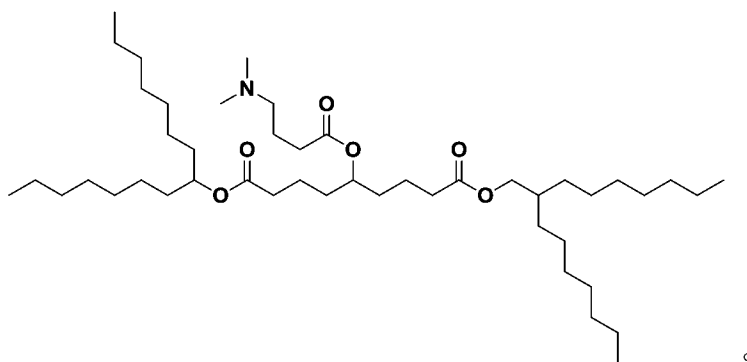
【請求項 30】如請求項 23 之化合物，其中該化合物係
ATX-230：



【請求項 31】如請求項 23 之化合物，其中該化合物係
ATX-231：



【請求項32】如請求項23之化合物，其中該化合物係ATX-232：



【請求項33】一種脂質組合物，其包含核酸及如前述請求項中任一項之化合物。

【請求項34】如請求項33之脂質組合物，其中該核酸選自 siRNA、mRNA、自複製 RNA、DNA 質體及反義寡核苷酸。

【請求項35】如請求項33或34之脂質組合物，其中該核酸係包含編碼所關注治療蛋白之編碼區之 mRNA 或自複製 RNA。

【請求項36】如請求項35之脂質組合物，其中該所關注治療蛋白係酶及抗體、抗原、受體或轉運子。

【請求項37】如請求項35或36之脂質組合物，其中該

所關注治療蛋白係基因編輯酶。

【請求項38】如請求項37之脂質組合物，其中該基因編輯酶選自TALEN、CRISPR、大範圍核酸酶或鋅指核酸酶。

【請求項39】如請求項33至38中任一項之脂質組合物，其中該脂質組合物包含脂質體、脂複合物(lipoplex)或脂質奈米粒子。

【請求項40】一種脂質奈米粒子，其包含複數種配位體，其中每一配位體獨立地係如請求項1至32中任一項之化合物，其中該複數種配位體自組裝形成包含內部及外部之該脂質奈米粒子。

【請求項41】如請求項40之脂質奈米粒子，其中該脂質奈米粒子之平均粒徑小於約100 nm。

【請求項42】如請求項40或41之脂質奈米粒子，其中該脂質奈米粒子之平均粒徑係約55 nm至約85 nm。

【請求項43】如請求項40至42中任一項之脂質奈米粒子，其中該脂質奈米粒子進一步包含囊封於該內部中之核酸。

【請求項44】如請求項43之脂質奈米粒子，其中該核酸選自siRNA、mRNA、自複製RNA、DNA質體及反義寡核苷酸。

【請求項45】如請求項43或44之脂質奈米粒子，其中該核酸係包含編碼所關注治療蛋白之編碼區之mRNA或自複製RNA。

【請求項46】如請求項45之脂質奈米粒子，其中該所關注治療蛋白係酶及抗體、抗原、受體或轉運子。

【請求項47】如請求項50或51之脂質奈米粒子，其中該所關注治療蛋白係基因編輯酶。

【請求項48】如請求項47之脂質奈米粒子，其中該基因編輯酶選自TALEN、CRISPR、大範圍核酸酶或鋅指核酸酶。

【請求項49】如請求項40至48中任一項之脂質奈米粒子，其中該脂質奈米粒子進一步包含選自以下之輔助脂質：二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油(DMPG)、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)及磷脂醯膽鹼(PC)。

【請求項50】如請求項49之脂質奈米粒子，其中該輔助脂質係二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)。

【請求項51】如請求項40至50中任一項之脂質奈米粒子，其進一步包含膽固醇。

【請求項52】如請求項40至51中任一項之脂質奈米粒子，其進一步包含聚乙二醇(PEG)-脂質結合物。

【請求項53】如請求項52之脂質奈米粒子，其中PEG-脂質結合物係PEG-DMG。

【請求項54】如請求項53之脂質奈米粒子，其中該PEG-DMG係PEG2000-DMG。

【請求項55】如請求項40至54中任一項之脂質奈米粒

子，其中該脂質奈米粒子包含約45 mol%至65 mol%之如請求項1至32中任一項之化合物、約2 mol%至約15 mol%之輔助脂質、約20 mol%至約42 mol%之膽固醇及約0.5 mol%至約3 mol%之PEG-脂質結合物。

【請求項56】如請求項55之脂質奈米粒子，其中該脂質奈米粒子包含約50 mol%至約61 mol%之如請求項1至32中任一項之化合物、約5 mol%至約9 mol%之該輔助脂質、約29 mol%至約38 mol%之膽固醇及約1 mol%至約2 mol%之該PEG-脂質結合物。

【請求項57】如請求項55之脂質奈米粒子，其中該脂質奈米粒子包含約56 mol%至約58 mol%之如請求項1至32中任一項之化合物、約6 mol%至約8 mol%之DSPC、約31 mol%至約34 mol%之膽固醇及約1.25 mol%至約1.75 mol%之該PEG-脂質結合物。

【請求項58】如請求項43至48中任一項之脂質奈米粒子，其中該脂質奈米粒子之總脂質:核酸重量比係約50:1至約10:1。

【請求項59】如請求項58之脂質奈米粒子，其中該脂質奈米粒子之總脂質:核酸重量比係約40:1至約20:1。

【請求項60】如請求項58之脂質奈米粒子，其中該脂質奈米粒子之總脂質:核酸重量比係約35:1至約25:1。

【請求項61】如請求項58之脂質奈米粒子，其中該脂質奈米粒子之總脂質:核酸重量比係約32:1至約28:1。

【請求項62】如請求項58之脂質奈米粒子，其中該脂

質奈米粒子之總脂質:核酸重量比係約31:1至約29:1。

【請求項63】一種醫藥組合物，其包含如請求項1至32中任一項之化合物或如請求項40至62中任一項之脂質奈米粒子及醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項64】如請求項63之醫藥組合物，其中該醫藥劑係凍乾組合物。

【請求項65】如請求項63或64之醫藥組合物，其中該脂質奈米粒子包含pH為約7.4之HEPES緩衝液。

【請求項66】如請求項65之醫藥組合物，其中該HEPES緩衝液之濃度係約7 mg/mL至約15 mg/mL。

【請求項67】如請求項63至66中任一項之醫藥組合物，其中該脂質奈米粒子進一步包含約2.0 mg/mL至約4.0 mg/mL之NaCl。

【請求項68】如請求項63至67中任一項之脂質奈米粒子，其中該脂質奈米粒子進一步包含一或多種冷凍保護劑。

【請求項69】如請求項68之脂質奈米粒子，其中該一或多種冷凍保護劑選自蔗糖、甘油或蔗糖及甘油之組合。

【請求項70】如請求項69之脂質奈米粒子，其中該脂質奈米粒子包含濃度為約70 mg/mL至約110 mg/mL之蔗糖及濃度為約50 mg/mL至約70 mg/mL之甘油的組合。

【請求項71】一種治療有需要之個體之疾病的方法，其包括向該個體投與治療有效量之如請求項40至62中任一項之脂質奈米粒子或如請求項63之醫藥組合物。

【請求項72】如請求項71之方法，其中該化合物或脂質奈米粒子係靜脈內或肌內投與。

【請求項73】一種在靶細胞中表現蛋白質或多肽之方法，其包括使該靶細胞與如請求項40至62中任一項之脂質奈米粒子或如請求項63之醫藥組合物接觸。

【請求項74】如請求項73之方法，其中該蛋白質或多肽係抗原，且該抗原之表現提供活體內免疫原性反應。

【請求項75】一種將核酸遞送至有需要之個體之方法，其包括將治療有效量之該核酸囊封於如40至62中任一項之脂質奈米粒子中，及將該脂質奈米粒子投與該個體。