



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104640841 B

(45)授权公告日 2018.04.13

(21)申请号 201380041854.8

(22)申请日 2013.06.07

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104640841 A

(43)申请公布日 2015.05.20

(30)优先权数据

61/657,480 2012.06.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.02.06

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/044849 2013.06.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/185116 EN 2013.12.12

(73)专利权人 日东电工株式会社

地址 日本大阪

(72)发明人 J·E·佩恩 J·A·高德特 侯征

M·艾哈麦丁 俞磊 V·克诺波夫

V·阿科皮扬 P·卡尔玛里

R·P·维特 N·萨法尔扎德

应文斌 张隼

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 刘鸿林 张晓威

(51)Int.Cl.

C07C 271/16(2006.01)

C07D 333/40(2006.01)

C07C 317/44(2006.01)

C07C 321/14(2006.01)

C07C 333/04(2006.01)

C07C 235/08(2006.01)

C07C 237/08(2006.01)

C07D 207/16(2006.01)

A61K 47/16(2006.01)

A61K 47/18(2006.01)

A61K 47/22(2006.01)

(56)对比文件

CA 2800818 A1,2011.11.03,表格12-13、

15-16

权利要求1;权利要求14、第0116段。

CA 2800818 A1,2011.11.03,表格12-13、

15-16

权利要求1;权利要求14、第0116段。

US 5459127 A,1995.10.17,第1栏,第14-19

行;第6栏第44-46行;第14栏第62-64行。

US 5994317 A,1999.11.30,全文。

CN 1277024 A,2000.12.20,全文。

CN 101163796 A,2008.04.16,全文。

审查员 岳国亮

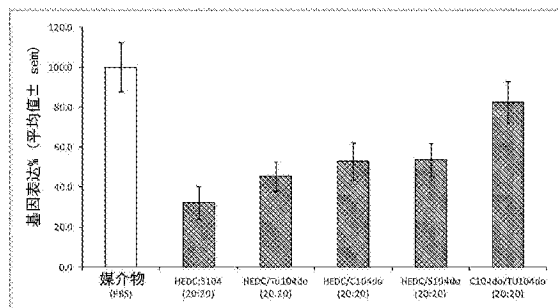
权利要求书3页 说明书38页 附图2页

(54)发明名称

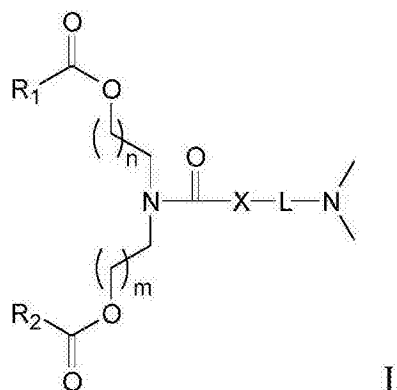
用于治疗剂递送制剂的脂质

(57)摘要

本发明涉及可用于增强脂质体中的治疗剂的递送的可电离的脂质。



1. 式I的可电离的脂质化合物或其药学上可接受的盐形式:



其中

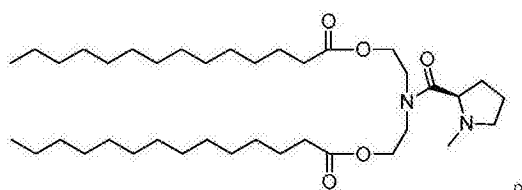
n和m独立地为1、2、3或4;

R₁和R₂独立地为C₁₀₋₁₈烷基或C₁₂₋₁₈烯基;且

X是-CH₂-, -S-, -O-, 或不存在, 并且L是-S-C₁₋₄亚烷基、-O-C(=O)-C₁₋₄亚烷基、-S(=O)₂-C₁₋₄亚烷基、



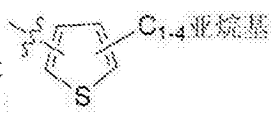
其中所述化合物具有以下结构



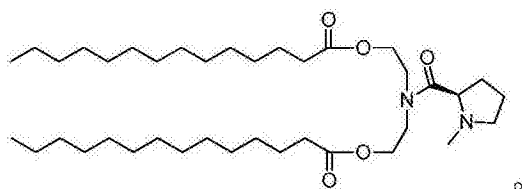
2. 根据权利要求1所述的化合物, 其中n和m是1。

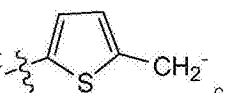
3. 根据权利要求1所述的化合物, 其中n和m是2。

4. 根据权利要求1所述的化合物, 其中X不存在。

5. 根据权利要求4所述的化合物, 其中L是 或者

其中所述化合物具有以下结构



6. 根据权利要求5所述的化合物, 其中L是.

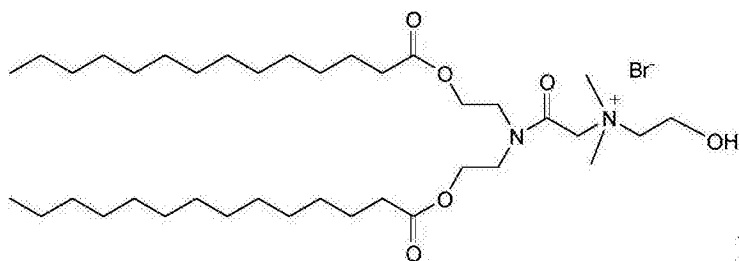
7. 根据权利要求1所述的化合物, 其中X是-CH₂-。

8. 根据权利要求7所述的化合物, 其中L是-S(=O)₂-C₁₋₄亚烷基。

9. 根据权利要求8所述的化合物, 其中L是-S(=O)₂-CH₂-CH₂-。

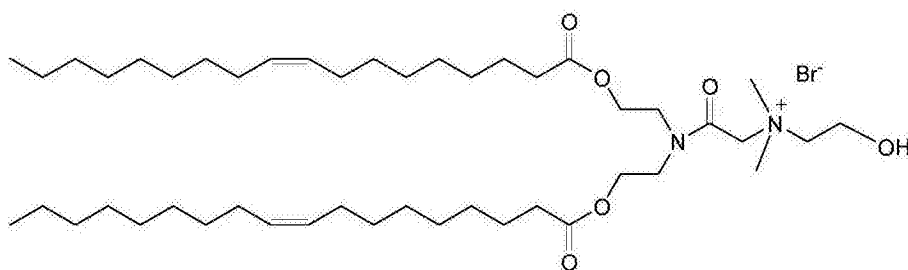
10. 根据权利要求7所述的化合物, 其中L是-O-C(=O)-C₁₋₄亚烷基。

11. 根据权利要求10所述的化合物,其中L是 $-O-C(=O)-CH_2-CH_2-CH_2-$ 。
12. 根据权利要求1所述的化合物,其中X是S。
13. 根据权利要求1所述的化合物,其中X是O。
14. 根据权利要求1所述的化合物,其中R₁和R₂各自为C₁₀₋₁₈烷基。
15. 根据权利要求14所述的化合物,其中R₁和R₂各自为C₁₃烷基。
16. 根据权利要求1所述的化合物,其中R₁和R₂各自为C₁₂₋₁₈烯基。
17. 根据权利要求16所述的化合物,其中R₁和R₂各自为C₁₃₋₁₇烯基。
18. 根据权利要求17所述的化合物,其中R₁和R₂各自为油基或亚油基。
19. 组合物,其包含在脂质体中的根据权利要求1-18中任一项所述的化合物,所述脂质体包含脂质分子的双层。
20. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述化合物占所述脂质分子的5-50摩尔%。
21. 根据权利要求20所述的组合物,其包含两种根据权利要求1-18中任一项所述的化合物,并且其中所述两种化合物的摩尔比为10:30-30:10。
22. 根据权利要求19-21中任一项所述的组合物,其还包含阳离子脂质。
23. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述阳离子脂质是



HEDC

或



HEDODC。

24. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述阳离子脂质占所述脂质分子的5-40摩尔%。
25. 根据权利要求24所述的组合物,其中所述可电离的脂质与所述阳离子脂质的摩尔比为5:35-35:5。
26. 根据权利要求19-21中任一项所述的组合物,其还包含液体介质。
27. 根据权利要求26所述的组合物,其中所述液体介质适于注射到活的生物体中。
28. 根据权利要求26所述的组合物,其中所述液体介质包含有机溶剂。
29. 根据权利要求26所述的组合物,其中所述液体介质包含水和有机溶剂。
30. 根据权利要求19-21中任一项所述的组合物,其还包含非水性介质。
31. 根据权利要求19-21中任一项所述的组合物,其还包含至少一种磷脂。
32. 根据权利要求19-21中任一项所述的组合物,其还包含至少一种PEG缀合的脂质。

33. 星状细胞特异性药物载体,其包含根据权利要求19-31中任一项所述的组合物以及星状细胞特异性的量的靶向分子,所述靶向分子由结构(类视色素)_n-连接基-(类视色素)_n组成,其中n=0、1、2或3;并且其中所述连接基包含聚乙二醇(PEG)分子。

34. 根据权利要求33所述的药物载体,其还包含siRNA分子。

35. 药物制剂,其包含根据权利要求34所述的药物载体以及药学上可接受的载体或稀释剂。

36. 根据权利要求35所述的药物制剂,其中所述siRNA由所述脂质体包封。

37. 权利要求1-18中任一项所述的化合物在制备用于将治疗剂递送到细胞的药物制剂中的用途。

用于治疗剂递送制剂的脂质

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2012年6月8日提交的美国临时专利申请第61/657480号的权益,所述美国临时专利申请的全部内容通过援引加入本文中。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于增强治疗剂的递送的可电离的脂质。

背景技术

[0004] 许多技术可用于将例如siRNA、核酸等的治疗剂递送到细胞中。这些技术包括病毒和非病毒转染系统。非病毒转染系统可包括例如聚合物、脂质、脂质体、胶束、树枝状聚合物和纳米材料。已被研究用于细胞转染的聚合物包括阳离子聚合物,例如聚(L-赖氨酸) (“PLL”)、聚乙烯亚胺 (“PEI”)、壳聚糖和聚(2-二甲基氨基)乙基甲基丙烯酸酯 (“pDMAEMA”)。

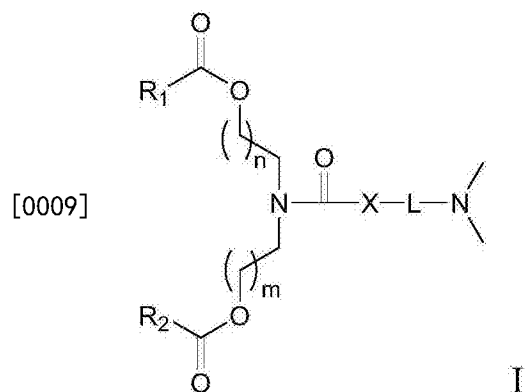
[0005] 然而,病毒和非病毒转染技术具有缺点。例如,病毒系统可以产生高转染效率,但可能不是完全安全的。此外,病毒系统的制备可能会很复杂和/或昂贵。

[0006] 已报道非病毒转染系统(例如采用阳离子聚合物的那些)将质粒DNA转移到细胞中。然而,阳离子聚合物可能不稳定,并且可能对细胞具有毒性。

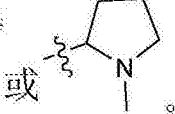
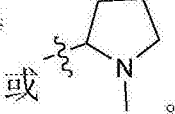
[0007] 因此,需要新型化合物、组合物,以及使用阳离子组合物改善治疗剂向细胞、组织和生物体中的递送的方法。

发明内容

[0008] 本发明涉及式I的可电离的脂质化合物或其药学上可接受的盐形式



[0010] 其中n和m独立地为1、2、3或4;R₁和R₂独立地为C₁₀₋₁₈烷基或C₁₂₋₁₈烯基;X是-CH₂-,S-,O-,N-,或不存在;L是C₁₋₄亚烷基、-S-C₁₋₄亚烷基、-O-C₁₋₄亚烷基、-O-C(=O)-C₁₋₄亚烷基、-S-

(O)₂-C₁₋₄亚烷基、-C₁₋₄亚烷基、或还描述了使用式I的化合物的组合物、药物

制剂、药物载体和方法。

附图说明

[0011] 图1示出了本发明的可电离的脂质:可电离的脂质实施方案的体外协同 功效

[0012] 图2示出了本发明的可电离的脂质:可电离的脂质实施方案的体外协同 功效

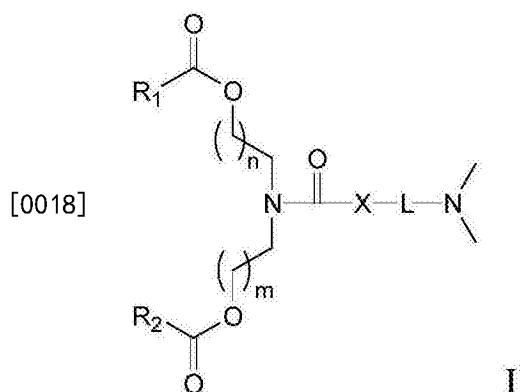
[0013] 图3示出了本发明的可电离的脂质:阳离子脂质实施方案的体外协同功 效

[0014] 图4示出了本发明的可电离的脂质:阳离子脂质实施方案的体内功效

[0015] 示例性实施方案详述

[0016] 本发明涉及可电离的脂质化合物以及其在将治疗剂递送到细胞、组织 和生物体中的用途。

[0017] 在本发明的范围包括式I的可电离的脂质化合物或其药学上可接受的 盐形式:



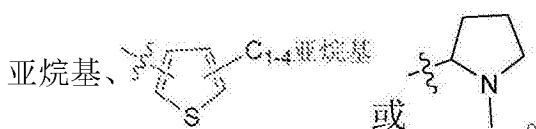
[0019] 其中

[0020] n和m独立地为1、2、3或4;

[0021] R₁和R₂独立地为C₁₀₋₁₈烷基或C₁₂₋₁₈烯基;

[0022] X是-CH₂-, S-, O-, N-, 或不存在;

[0023] L是C₁₋₄亚烷基、-S-C₁₋₄亚烷基、-O-C₁₋₄亚烷基、-O-C(O)-C₁₋₄亚烷基、-S(O)₂-C₁₋₄



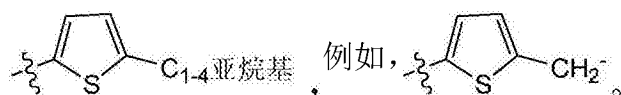
[0024] 在本发明的范围内,n和m可以相同或不同。在优选的实施方案中,n 和m是相同的。特别优选的是其中n和m均为1或n和m均为2的那些实 施方案。

[0025] 在本发明的一些实施方案中,X是键。在其它实施方案中,X是-CH₂-。在又一些其它实施方案中,X是S。还优选的是其中X是O的实施方案。其中X是N的实施方案也在本发明的范围内。

[0026] 在本发明的一些实施方案中,L是C₁₋₄亚烷基。在其它实施方案中,L 是-S-C₁₋₄亚烷基。在再一些其它实施方案中,L是-O-C₁₋₄亚烷基。在又一些 其它实施方案中,L是-O-C(O)-C₁₋₄亚烷基。或者,L是-S(O)₂-C₁₋₄亚烷基。其中L是 的实施方案也在本发

明的范围内。

[0027] 在其中X是键的那些实施方案中,L优选为C₁₋₄亚烷基。L的此类实例 包括-CH₂-、-CH₂-CH₂-、-CH₂CH₂CH₂-和-CH₂CH₂CH₂CH₂-。在其中X是键 的其它实施方案中,L是



[0028] 在其中X是-CH₂-的那些实施方案中,L优选为-S-C₁₋₄亚烷基。L的此类实例包括-S-CH₂-、-S-CH₂-CH₂-、-S-CH₂CH₂CH₂-和-S-CH₂CH₂CH₂CH₂-。

[0029] 在其中X是-CH₂-的其它实施方案中,L优选为-S(O)₂-C₁₋₄亚烷基。L的此类实例包括-S(O)₂-CH₂-、-S(O)₂-CH₂-CH₂-、-S(O)₂-CH₂-CH₂-CH₂-和-S(O)₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-。

[0030] 在其中X是-CH₂-的再一些其它实施方案中,L是-O-C₁₋₄亚烷基。L的此类实例包括-O-CH₂-、-O-CH₂-CH₂-、-O-CH₂CH₂CH₂-和-O-CH₂CH₂CH₂CH₂-。

[0031] 在本发明的其中X是S的那些实施方案中,L优选为C₁₋₄亚烷基。L的此类实例包括-CH₂-、-CH₂-CH₂-、-CH₂CH₂CH₂-和-CH₂CH₂CH₂CH₂-。

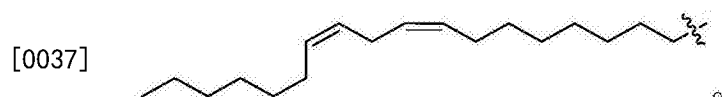
[0032] 在其中X是O的那些实施方案中,L优选为C₁₋₄亚烷基。L的此类实例包括-CH₂-、-CH₂-CH₂-、-CH₂CH₂CH₂-和-CH₂CH₂CH₂CH₂-。

[0033] 在本发明的范围内,R₁和R₂可以相同或不同。优选地,R₁和R₂是相同的。优选地,R₁和R₂是C₁₀₋₁₈烷基。还优选的是其中所述C₁₀₋₁₈烷基是直链C₁₀₋₁₈烷基的实施方案。更优选的是其中R₁和R₂是C₁₂₋₁₈烷基的实施方案。还优选的是其中R₁和R₂是C₁₂₋₁₅烷基的实施方案。在最优选的实施方案中,R₁和R₂均为C₁₃烷基。

[0034] 在本发明的其它实施方案中,R₁和R₂是C₁₂₋₁₈烯基。优选地,R₁和R₂是C₁₃₋₁₇烯基。更优选地,R₁和R₂各自是油基:



[0036] 在本发明的其它实施方案中,R₁和R₂是C₁₂₋₁₈烯基。优选地,R₁和R₂是C₁₃₋₁₇烯基。更优选地,R₁和R₂各自是亚油基(linoleoyl):



[0038] 同样在本发明的范围内的是包含在脂质体中的式I的化合物的组合物,其中所述脂质体包含脂质分子的双层。尽管所述式I的化合物可以占此类组合物中的脂质分子的任何摩尔百分比,但优选的是,所述式I的化合物占本发明的组合物中的脂质分子的约5-约50摩尔%。

[0039] 本发明的包含在脂质体中的式I的化合物的组合物可以包含多于一种式I的化合物。在优选的实施方案中,本发明的此类组合物包含两种式I的化合物。在那些实施方案中,优选的是,所述两种式I的化合物的摩尔比为约10:30-约30:10。

[0040] 本发明的包含在脂质体中的式I的化合物的组合物还可以包含阳离子脂质。在此类实施方案中,所述阳离子脂质占所述组合物的脂质分子的约5-约40摩尔%。此外,在这些包含在脂质体中的式I的化合物与阳离子脂质的实施方案中,所述式I的化合物与所述阳离子脂质的摩尔比为约5:35-约35:5。更优选地,所述比为约10:30-约30:10。

[0041] 在本发明的范围内,本发明的任何组合物还可以包含液体介质。优选地,所述液体介质适于注射到活的生物体中。在一些实施方案中,所述液体介质包含有机溶剂。或者,在本发明的某些实施方案中使用的液体介质包含水和有机溶剂。在本发明的其它实施方案中,所述液体介质还可以包含非水性介质。

[0042] 此外,在本发明的范围内,本发明的任何组合物还可以包含至少一种磷脂。

[0043] 在本发明的其它实施方案中,本发明的任何组合物还可以包含至少一种PEG缀合的脂质。

[0044] 同样在本发明的范围内的是星状细胞特异性药物载体。本发明的这些实施方案包含任何上述组合物以及星状细胞特异性的量的靶向分子,所述靶向分子由(类视色素)_n-连接基-(类视色素)_n组成,其中n=0、1、2或3;并且其中所述连接基包含聚乙二醇(PEG)或PEG样分子。

[0045] 在优选的实施方案中,本发明的药物载体还可以包含siRNA分子。

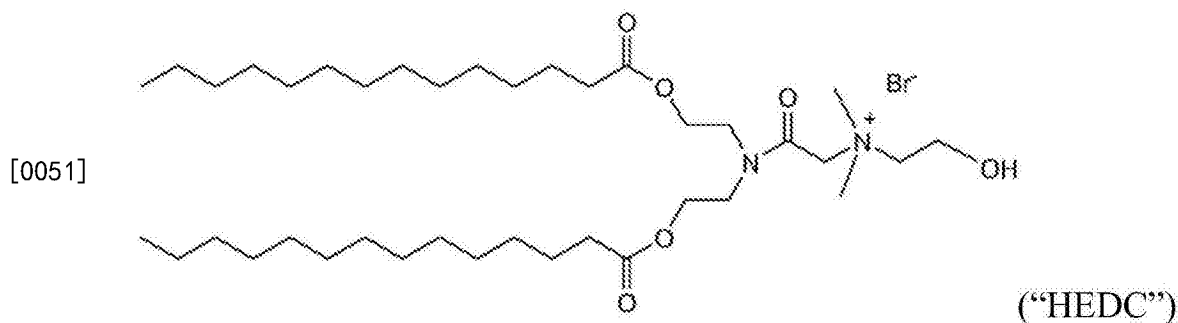
[0046] 同样在本发明的范围内的是药物制剂。在本发明的范围内的药物制剂包含本发明的任何上述药物载体以及药学上可接受的载体或稀释剂。优选的是,在此类制剂中,所述siRNA由本发明的组合物中的脂质体包封。

[0047] 同样在本发明的范围内的是将药物递送到需要治疗的患者中的方法。这些方法包括提供在本发明的范围内的药物制剂和向所述患者给药所述药物制剂。

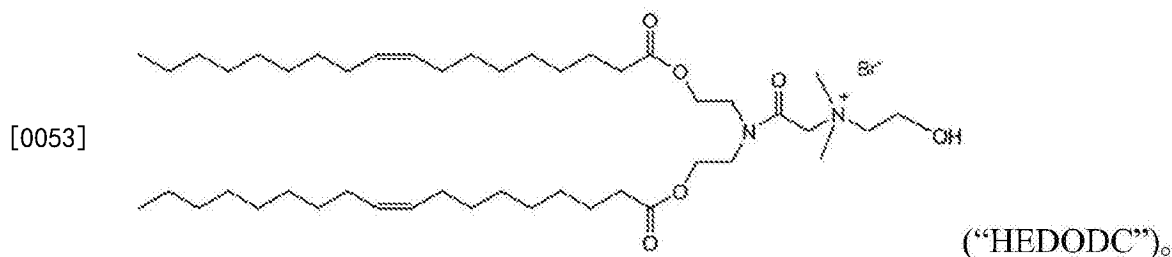
[0048] 定义

[0049] 在整篇本说明书中使用下列术语。

[0050] 如本文所用,“阳离子脂质”是指包含至少一个脂质部分和与抗衡离子缔合的带正电的季氮的化合物。“脂质”在本领域中应理解为包含疏水性烷基或烯基部分以及羧酸或羧酸酯部分。优选用于本发明的阳离子脂质包括:



[0052] 以及



[0054] 如本文所用,“可电离的脂质”是指在本发明的范围内的式I的化合物。这些化合物能够在与适当的抗衡离子物质(例如包含可电离的氢原子的物质)接触时形成带电物质。

[0055] 如本文所用,“烷基”是指直链或支链的完全饱和(没有双键或三键)烃基,例如,具有通式-C_nH_{2n+1}的基团。所述烷基可具有1-50个碳原子(无论何时在本文中出现,例如“1-50”的数值范围是指在给定范围内的每个整数;例如,“1-50个碳原子”是指所述烷基可由1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子,等等,至多50个碳原子并且包括50个碳原子组成,但本定义也涵盖其中未指定数值范围的术语“烷基”的存在)。所述烷基也可以是具有1-30个碳原子的

中等大小的烷基。所述烷基也可以是具有1-5个碳原子的低级烷基。所述化合物的烷基可以指定为“C₁₋₄烷基”或类似的名称。仅作为实例，“C₁₋₄烷基”表示在烷基链中存在1-4个碳原子，即，所述烷基链选自甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。典型的烷基包括但决不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基等。

[0056] 如本文所用，“亚烷基”是指烷二基官能团，例如，-CH₂-、-CH₂CH₂-、-CH₂CH₂CH₂-、-CH₂CH₂CH₂CH₂-等。

[0057] 如本文所用，“烯基”是指在直链或支链的烃链中包含一个或多个双键的烷基。烯基可以是未取代或取代的。当被取代时，除非另有说明，否则取代基可以选自与上文关于烷基取代所公开的基团相同的基团。油基是此类烯基的实例。

[0058] 如本文所用，术语“药物载体”是指促进化合物并入细胞或组织中的化学化合物。例如，二甲基亚砜(DMSO)是常用的载体，因为它促进许多有机化合物吸收到生物体的细胞或组织中。

[0059] 如本文所用，术语“稀释剂”是指会溶解目标制剂(例如，可包含化合物、类视色素、第二脂质、稳定剂和/或治疗剂的制剂)以及稳定所述制剂的生物活性形式的稀释在水中的化学化合物。在本领域中使用溶解于缓冲溶液中的盐作为稀释剂。一种常用的缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水，因为它模拟人血液的盐条件。由于缓冲盐可以在低浓度下控制溶液的pH，因此，缓冲稀释剂很少改变所述制剂的生物活性。如本文所用，“赋形剂”是指加入制剂中以向组合物提供但不限于体积、稠度、稳定性、粘合能力、润滑性、崩解能力等的惰性物质。“稀释剂”是一类赋形剂。

[0060] 在本发明的范围内使用的“有机溶剂”本身是本领域已知的，并且包括例如C₁₋₄烷基醇、二甲基亚砜(“DMSO”)等。

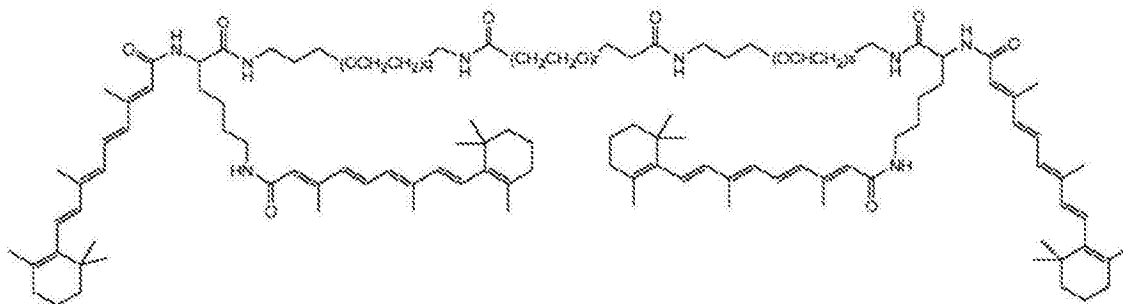
[0061] 如本文所用，“治疗剂”是指在以治疗有效量向哺乳动物给药后向所述哺乳动物提供治疗益处的化合物。治疗剂在本文中可以为药物。本领域技术人员应理解，术语“治疗剂”并不限于已经得到监管机构批准的药物。可以通过操作将“治疗剂”与如本文所述的化合物、类视色素和/或第二脂质缔合。例如，如本文所述的第二脂质可以形成脂质体，并且通过操作可以将所述治疗剂与例如如本文所述的脂质体缔合。

[0062] 如本文所用，“类视色素”是由4个以头尾方式连接的类异戊二烯单元组成的一类化合物的一员，参见G.P.Moss, “Biochemical Nomenclature and Related Documents”，第2版，Portland Press，第247-251页(1992)。“维生素A”是定性地表现视黄醇的生物活性的类视色素的通用描述词。如本文所用，类视色素是指天然和合成的类视色素，包括第一代、第二代和第三代类视色素。天然存在的类视色素的实例包括但不限于(1) 11-顺式视黄醛，(2) 全反式视黄醇，(3) 棕榈酸视黄酯，(4) 全反式视黄酸，以及(5) 13-顺式视黄酸。此外，术语“类视色素”包括视黄醇、视黄醛、视黄酸、类视色素及其衍生物。

[0063] 如本文所用，“类视色素缀合物”是指包含至少一个类视色素部分的分子。在本发明的优选实施方案中，以所述组合物或制剂的总重量计，所述类视色素缀合物以约0.3重量%-约30重量%的浓度存在，这相当于约0.1-约10摩尔%，相当于约0.1-约10的摩尔比。优选地，所述类视色素缀合物是类视色素-连接基-脂质分子或类视色素-连接基-类视色素分子。

[0064] 类视色素缀合物的实例包括那些式II的化合物及其对映体和非对映体：

[0065]

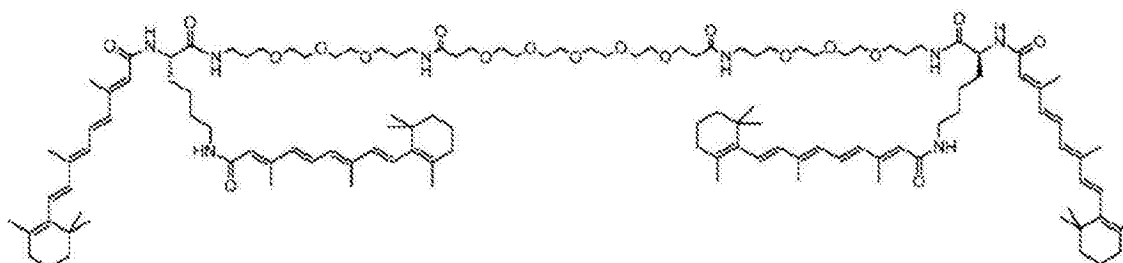


II

[0066] 其中q、r和s各自独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0067] 优选的式II的化合物包括其中q、r和s各自独立地为1、2、3、4、5、6或7的那些。更优选的是其中q、r和s各自独立地为3、4或5的那些式II的化合物。最优选的是其中q是3，r是5并且s是3的那些式II的化合物。式II的化合物的一个实例是

[0068]



DiVA-PEG-DiVA

[0069] DiVA-PEG-DiVA包含立构中心，并且所有对映体和非对映体都被认为在本发明的范围内。

[0070] 如本文所用，“类视色素-连接基-脂质分子”是指包含通过至少一个连接基（例如PEG部分）连接的至少一个类视色素部分和至少一个脂质部分的分子。

[0071] 如本文所用，“类视色素-连接基-类视色素分子”是指包含通过至少一个连接基（例如PEG部分）连接的至少一个类视色素部分和至少一个其它类视色素部分（其可以相同或不同）的分子。

[0072] 如本文所用，术语“脂质”和“亲脂性的”在本文中以其本领域技术人员所理解的普通含义使用。脂质和亲脂性基团的非限制性实例包括脂肪酸、固醇、C₂-C₅₀烷基、C₂-C₅₀杂烷基、C₂-C₅₀烯基、C₂-C₅₀杂烯基、C₂-C₅₀芳基、C₂-C₅₀杂芳基、C₂-C₅₀炔基、C₂-C₅₀杂炔基、C₂-C₅₀羧基烯基和C₂-C₅₀羧基杂烯基。脂肪酸是包含例如12-24个碳原子的饱和或不饱和的长链单羧酸。脂质的特征在于基本上不溶于水，其在水中的溶解度小于约0.01%（按重量计）。如本文所用，术语“脂质部分”和“亲脂性部分”是指已与另一基团连接的脂质或其部分。例如，脂质基团可以通过脂质的官能团（例如羧酸基团）与单体的适当官能团之间的化学反应与另一化合物（例如，单体）连接。

[0073] 如本文所用，“星状细胞”是指具有若干个从细胞体辐射的树突的神经元。星状细胞的实例是抑制性中间神经元。

[0074] 如本文所用，“siRNA”是指小干扰RNA，在本领域中也称为短干扰RNA或沉默RNA。

siRNA是一类双链RNA分子,其具有多种本领域中已知的效果,其中最著名的是干扰特定基因的表达和蛋白质的表达。

[0075] 术语“脂质体”在本文中以其本领域技术人员所理解的普通含义使用,并且是指包含与在水性介质中形成基本上封闭的结构的高亲水性基团连接的脂质的脂质双层结构。在一些实施方案中,可以通过操作将所述脂质体与一种或多种化合物(例如治疗剂和类视色素)缔合。脂质体可以包含单一脂质双层(即,单层的),或者它可以包含两个或更多个脂质双层(即,多层的)。尽管脂质体的内部可以由多种化合物组成,但包含脂质体的水性制剂易接近脂质体的外部。脂质体的形状可以是近似球形或椭圆形的。

[0076] 在一些实施方案中,siRNA由脂质体包封,以使水性介质不能接近siRNA。当包封siRNA时,脂质体会具有实体核心;此类包封siRNA并且具有实体核心的脂质体在本文中称为“脂质纳米颗粒”。在其它实施方案中,siRNA未由脂质体包封。在此类实施方案中,siRNA可以通过将预形成的脂质体与RNA在水溶液中混合而复合在脂质体的外表面上。在这些实施方案中,水性介质可以接近siRNA。仅在其外表面上结合有siRNA的脂质体在本文中称为“脂质复合物(lipoplex)”。

[0077] 本发明的制剂还可以包含PEG缀合的脂质。在本发明的范围内的PEG缀合的脂质本身是本领域已知的。合适的PEG-脂质包括PEG-磷脂和PEG-神经酰胺,例如PEG2000-DSPE、PEG2000-DPPE、PEG2000-DMPE、PEG2000-DOPE、PEG1000-DSPE、PEG1000-DPPE、PEG1000-DMPE、PEG1000-DOPE、PEG550-DSPE、PEG550-DPPE、PEG-550DMPE、PEG-1000DOPE、PEG-BML、PEG-胆固醇、PEG2000-神经酰胺、PEG1000-神经酰胺、PEG750-神经酰胺、PEG550-神经酰胺。

[0078] 本发明的上述组合物可以包含一种或多种磷脂,例如1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(“DSPC”)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(“DPPC”)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(“DPPE”)和1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(“DOPE”)。优选地,辅助脂质是DOPE。

[0079] 同样在本发明的范围内的是除药学上可接受的载体或稀释剂以外还包含任何上述组合物的药物制剂。本发明的药物制剂包含至少一种治疗剂。优选地,所述治疗剂是siRNA。可以设想,任何siRNA分子都可以在本发明的范围内使用。例如,siRNA可包含:

[0080] 有义链(5'→3') GGACAGGCCUCUACAACUATT (SEQ. ID. NO. 1)

[0081] 反义链(3'→5') TTCCUGUCCGGAGAUGUUGAU (SEQ. ID. NO. 2)

[0082] 以及

[0083] 有义链(5'→3') GGACAGGCCUGUACAACUATT (SEQ. ID. NO. 3)

[0084] 反义链(3'→5') TTCCUGUCCGGACAUGUUGAU (SEQ. ID. NO. 4)

[0085] 在本发明的包含siRNA的优选制剂中,所述siRNA由所述脂质体包封。在其它实施方案中,所述siRNA可以位于所述脂质体的外部。在那些实施方案中,所述siRNA可以复合到所述脂质体的外部。

[0086] 同样在本发明的范围内的是将治疗剂递送到患者中的方法。这些方法包括提供包含任何上述组合物以及药学上可接受的载体或稀释剂的药物制剂;以及向所述患者给药所述药物制剂。

[0087] 在另一个方面中,本发明涉及药物制剂,所述药物制剂包含一种或多种生理学上可接受的表面活性剂、药物载体、稀释剂、赋形剂和悬浮剂或其组合;以及本文所公开的制

剂(例如,可包含化合物、类视色素、第二脂质、稳定剂和/或治疗剂的制剂)。可接受的用于治疗用途的其它药物载体或稀释剂在制药领域中众所周知,并且描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack出版公司,Easton,PA(1990)中,其全部内容通过援引加入本文。防腐剂、稳定剂、染料等可以提供于所述药物制剂中。例如,可以加入苯甲酸钠、抗坏血酸和对羟基苯甲酸酯作为防腐剂。此外,也可以使用抗氧化剂和悬浮剂。在各种实施方案中,醇、酯、硫酸化的脂肪醇等可以用作表面活性剂;蔗糖、葡萄糖、乳糖、淀粉、结晶纤维素、甘露醇、轻质无水硅酸盐、铝酸镁、硅酸铝镁(magnesium metasilicate aluminate)、合成硅酸铝、碳酸钙、碳酸氢钠、磷酸氢钙、羧甲基纤维素钙等可以用作赋形剂;椰子油、橄榄油、芝麻油、花生油、大豆油可以用作悬浮剂或润滑剂;作为例如纤维素或糖的碳水化合物的衍生物的醋酸邻苯二甲酸纤维素或作为聚乙烯基的衍生物的乙酸甲酯-甲基丙烯酸酯共聚物可以用作悬浮剂;并且例如邻苯二甲酸酯等的增塑剂可以用作悬浮剂。

[0088] 本文所述的药物制剂自身可以或可以它们与其它活性成分(如在组合疗法中)或者合适的药物载体或赋形剂混合的药物制剂形式给药于人类患者。本申请的化合物的制剂和给药技术可以参见“Remington's Pharmaceutical Sciences”,Mack出版公司,Easton,PA,第18版,1990。

[0089] 合适的给药途径可包括例如肠胃外递送,包括肌内、皮下、静脉内、髓内注射,以及鞘内、直接心室内、腹膜内、鼻内或眼内注射。所述制剂(例如,可包含化合物、类视色素、第二脂质、稳定剂和/或治疗剂的制剂)也可以缓释或控释剂型(包括储库型注射剂(depot injections)、渗透泵等)给药,以便以预定的速率长期和/或定时、脉冲给药。此外,给药途径可以是局部或全身性的。

[0090] 所述药物制剂可以本身已知的方式,例如,通过常规的混合、溶解、制粒、制锭、磨细、乳化、包封、包埋或压片过程制备。

[0091] 药物制剂可以任何常规的方式,使用一种或多种生理学上可接受的药物载体进行配制,所述药物载体包括有助于将活性化合物加工成药学上可使用的制剂的赋形剂和辅剂。适当的制剂取决于所选择的给药途径。可适当地并且如本领域中所理解地使用任何熟知的技术、药物载体和赋形剂;例如,在上文的Remington's Pharmaceutical Sciences中。

[0092] 注射剂可以制备成常规形式:液体溶液或混悬剂,适于在注射前在液体中制备成溶液或混悬剂的固体形式,或乳剂。合适的赋形剂是例如水、盐水、右旋糖、甘露醇、乳糖、卵磷脂、白蛋白、谷氨酸钠、盐酸半胱氨酸等。此外,如果需要,可注射的药物制剂还可以包含少量的无毒性辅助物质,例如润湿剂、pH缓冲剂等。生理上相容的缓冲液包括但不限于Hanks液、林格氏溶液或生理盐水缓冲液。如果需要,可以使用吸收增强剂。

[0093] 用于例如通过推注或连续输注肠胃外给药的药物制剂包括呈水溶性形式的活性制剂(例如,可包含化合物、类视色素、第二脂质、稳定剂和/或治疗剂的制剂)的水溶液。另外,活性化合物的悬浮液可制备成适当的油性注射混悬剂。水性注射混悬剂可以包含增加混悬剂的粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地,所述混悬剂还可以包含合适的稳定剂或增加所述化合物的溶解度以允许制备高浓度溶液的物质。用于注射的制剂可以单位剂型例如安瓿或多剂量容器的形式提供,并加入防腐剂。所述制剂可以采取在油性或水性媒介物中的混悬剂、溶液或乳剂的形式,并且可以包含配制剂,例如悬浮剂、

稳定剂和/或分散剂。或者,活性成分可以呈粉末形式,以在使用前用合适的媒介物(例如无菌无热原水)重构。

[0094] 除上述制剂以外,所述制剂还可以配制为储库制剂。此类长效制剂可以通过肌肉注射给药。因此,例如,所述制剂(例如,可包含化合物、类视色素、第二脂质、稳定剂和/或治疗剂的制剂)可以与以下材料一起配制:合适的聚合物材料或疏水性材料(例如作为在可接受的油中的乳剂)或离子交换树脂,或者所述制剂可以配制为微溶性衍生物,例如配制为微溶性盐。

[0095] 也可以配制本发明的组合物和制剂用于局部递送,并且可以使用任何适于施用局部递送媒介物的方法将其施用到个体的皮肤。例如,所述制剂可以用手、使用涂药器或者通过涉及两者的方法来施用。施用后,可以例如通过按摩使所述制剂进入个体的皮肤中。施用可以每天进行多次或每天进行一次。例如,所述制剂可以每天一次、每天两次或每天多次施用到个体的皮肤,或者可以每两天一次、每三天一次或约每周一次、每两周一次或每几周一次施用。

[0096] 本文的一些实施方案涉及将治疗剂递送到细胞中的方法。例如,一些实施方案涉及将例如siRNA的治疗剂递送到细胞中的方法。适合根据本文所述的方法使用的细胞包括原核细胞、酵母细胞或高等真核细胞,包括植物和动物细胞(例如,哺乳动物细胞)。在一些实施方案中,所述细胞可以是人纤维肉瘤细胞(例如,HT1080细胞系)。在其它实施方案中,所述细胞可以是肝星状细胞(LX2细胞系)。在其它实施方案中,所述细胞可以是癌细胞。在再一些其它实施方案中,所述细胞可以是干细胞(pHSC细胞系)。可以使用作为癌症模型系统的细胞系,包括但不限于乳腺癌细胞系(MCF-7、MDA-MB-438细胞系)、U87胶质母细胞瘤细胞系、B16F0细胞(黑素瘤)、HeLa细胞(子宫颈癌)、A549细胞(肺癌)以及大鼠肿瘤细胞系GH3和9L。在这些实施方案中,本文所述的制剂可用于转染细胞。这些实施方案可以包括使所述细胞与本文所述的包含治疗剂的制剂接触,由此将治疗剂递送到所述细胞中。

[0097] 本文公开了用于治疗特征在于异常纤维化的病症的方法,其可以包括给药治疗有效量的本文所述的制剂。特征在于异常纤维化的病症可以包括癌症和/或纤维化疾病。可以用本文所述的制剂治疗或改善的癌症类型包括但不限于肺癌、胰腺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌和结肠癌。在一个实施方案中,可以治疗或改善的癌症是胰腺癌。在另一个实施方案中,可以治疗或改善的癌症是肺癌。可以用本文所述的制剂治疗或改善的纤维化疾病的类型包括但不限于肝纤维化、肝硬化、胰腺炎、胰纤维化、囊性纤维化、声带瘢痕、声带粘膜纤维化、喉纤维化、肺纤维化、特发性肺纤维化、囊性纤维化、骨髓纤维化、腹膜后纤维化和肾源性系统性纤维化。在一个实施方案中,可以治疗或改善的病症是肝纤维化。

[0098] 本文所述的制剂或药物组合物可以通过任何合适的方式向个体给药。给药方法的非限制性实例尤其包括(a)通过注射给药,皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内、皮内、眶内、囊内、椎管内、胸骨内注射等,包括输注泵递送;(b)局部给药,例如通过直接在肾或心脏部位注射,例如通过储库植入;以及本领域技术人员认为适于使活性化合物与活组织接触的给药方法。

[0099] 适于给药的药物组合物包含制剂(例如,可包含化合物、类视色素、第二脂质、稳定剂和/或治疗剂的制剂),其中包含有效实现其预期目的的量的活性成分。作为剂量所要求的本文公开的化合物的治疗有效量取决于给药途径、所治疗的动物的类型(包括人)以及所

考虑的特定动物的体格特征。可以调整剂量以实现期望的效果,但剂量取决于诸如以下的因素:体重、饮食、并行药物治疗和医学领域的技术人员会认识到的其它因素。更具体地,治疗有效量是指有效预防、缓解或改善疾病的症状或延长所治疗个体的存活的化合物的量。治疗有效量的确定在本领域技术人员的能力范围内,尤其是鉴于本文提供的详细公开内容。

[0100] 如本领域技术人员会显而易见的,有用的体内给药剂量和特定的给药方式根据年龄、体重和所治疗的哺乳动物种类、所使用的特定化合物以及使用这些化合物的具体用途而变化。有效剂量水平,即实现期望的结果所需要的剂量水平的确定可由本领域技术人员使用常规药理学方法完成。通常,产品的人类临床应用以较低剂量水平开始,增加剂量水平直到实现期望的效果。或者,可使用可接受的体外研究,使用建立的药理学方法来建立通过本方法鉴定的组合物的有用剂量和给药途径。

[0101] 在非人类动物研究中,潜在产品的应用以较高剂量水平开始,降低剂量直到不再实现期望的效果或不良副作用消失。剂量可以根据期望的效果和治疗适应症在宽范围内变化。通常,剂量可以是约10 μ g/kg-约100mg/kg体重,优选约100 μ g/kg-约10mg/kg体重。或者,如本领域技术人员所理解,剂量可以基于患者的表面积来计算。

[0102] 各医师可以鉴于患者的病症来选择药物组合物的确切制剂、给药途径和剂量。(参见例如Fingl等人,1975年,“The Pharmacological Basis of Therapeutics”,其全部内容通过援引加入本文,特别参考第1章第1页)。通常,向患者给药的组合物的剂量范围可以是约0.5-约1000mg/kg患者体重。视患者需要而定,剂量可以是单一剂量或者在一天或更多天过程中给药的一系列的两个或更多个剂量。在已经针对至少某病症确定了化合物的人类剂量的情况下,剂量大致相同,或者剂量为已确定的人类剂量的约0.1%-约500%,更优选约25%-约250%。在未确定人类剂量的情况下,如新发现的药物组合物的情况,合适的人类剂量可由ED50或ID50值或从体外或体内研究获得的其它适当数值(如由在动物中的毒性研究和功效研究定量的)推断。

[0103] 应注意,主治医师会知道如何和何时由于毒性或器官功能障碍而终止、中断或调整给药。反之,如果临床反应不足(排除毒性),主治医师也会知道将治疗调整到更高水平。在目标病症的管控中所给药剂量的量级会随欲治疗病症的严重程度和给药途径而变化。病症的严重程度可以例如部分地通过标准预后评价方法进行评价。此外,剂量和可能的剂量频率也会根据个体患者的年龄、体重和反应而变化。在兽医学中可以使用与上文所讨论程序相当的程序。

[0104] 尽管确切剂量应逐个药物(drug-by-drug)加以确定,但在大部分情况下,可对剂量进行一些概括。对于成人患者而言,日剂量方案可为例如约0.1mg-2000mg,优选约1mg-约500mg,例如5-200mg各活性成分的剂量。在其它实施方案中,使用约0.01mg-约100mg,优选约0.1mg-约60mg,例如约1mg-约40mg的各活性成分的静脉内、皮下或肌肉内剂量。在给药药理学上可接受的盐的情况下,剂量可以计算为游离碱。在一些实施方案中,所述制剂每天给药1-4次。或者,所述制剂可以优选以每天最多约1000mg各活性成分的剂量通过连续静脉内输注给药。如本领域技术人员所理解,在某些情况下,为有效且积极地治疗特别迅速蔓延的疾病或感染,可能需要给药超过或甚至远远超过上述优选剂量范围的量的本文所公开的制剂。在一些实施方案中,所述制剂将给药一段连续治疗时期,例如一周或更长,或者数月或数

年。

[0105] 可以个别地调整剂量的量和间隔,以提供活性部分的足以维持调节效力的血浆水平,或者提供最低有效浓度(MEC)。MEC对于各种化合物会有所不同,但可根据体外数据加以估测。达到MEC所需的剂量取决于个体特征和给药途径。然而,HPLC测定或生物测定可用来确定血浆浓度。

[0106] 剂量间隔也可以使用MEC值来确定。应使用将血浆水平维持高于MEC持续10-90%、优选30-90%、最优选50-90%的时间的方案给药组合物。

[0107] 在局部给药或选择性吸收的情况下,药物的有效局部浓度可能与血浆浓度无关。

[0108] 制剂的给药量可取决于所治疗的个体、所述个体的体重、痛苦的严重程度、给药方式和处方医师的判断。

[0109] 可使用已知的方法针对功效和毒性对本文所公开的制剂(例如,可包含化合物、类视色素、第二脂质、稳定剂和/或治疗剂的制剂)进行评价。例如,可以通过测定对细胞系(例如哺乳动物细胞系,优选人类细胞系)的体外毒性来建立特定化合物或共有某些化学部分的化合物子集的毒理学。此类研究的结果通常预测在动物,例如在哺乳动物,或更具体地在人类中的毒性。或者,可以使用已知的方法来测定特定化合物在动物模型,例如小鼠、大鼠、兔或猴中的毒性。特定化合物的功效可以使用几种公认的方法,例如体外方法、动物模型或人类临床试验来建立。几乎各类病症都存在公认的体外模型,包括但不限于癌症、心血管疾病和各种免疫功能障碍。类似地,可以使用可接受的动物模型来建立化学品治疗此类病症的功效。当选择模型来测定功效时,可以现有技术指导本领域技术人员选择适当的模型、剂量和给药途径以及方案。当然,也可以使用人类临床试验来测定化合物在人中的功效。

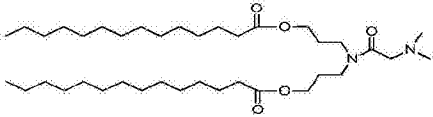
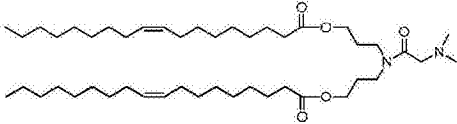
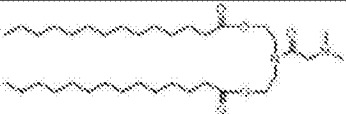
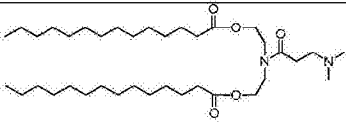
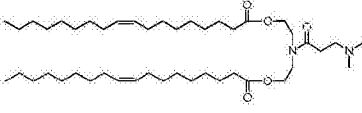
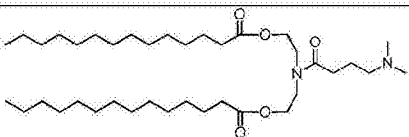
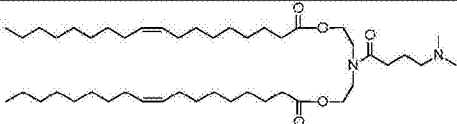
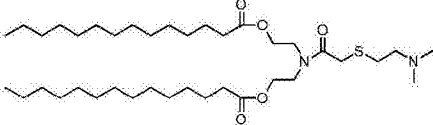
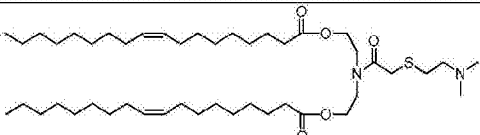
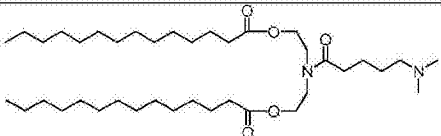
[0110] 如果需要,所述制剂可以包装或分配器装置的形式提供,所述包装或分配器装置可以包含一个或多个包含活性成分的单位剂型。所述包装可以例如包含金属或塑料箔,例如泡罩包装。所述包装或分配器装置可附有给药说明书。所述包装或分配器也可附有与容器相连的以管控医药的制造、使用或销售的政府机构所规定的形式的公告,所述公告反映所述机构对于人类或兽医给药的药物形式的批准。例如,此类公告可以是美国食品与药物管理局(U.S. Food and Drug Administration)对于处方药物所批准的标签或批准的产品说明书。也可以制备包含配制于相容的药物载体中的化合物的组合物,置于适当的容器中,并贴上治疗所指示的病症的标签。

[0111] 应理解,在本文所述的具有一个或多个立构中心的任何化合物中,如果没有明确指示绝对立体化学,则每个中心可以独立地为R-构型、S-构型或其混合物。因此,本文所提供的化合物可以是对映体纯的或者是立体异构体混合物。另外,应理解,在具有一个或多个产生可定义为E或Z的几何异构体的双键的任何化合物中,每个双键可以独立地为E、Z或其混合物。同样,所有互变异构形式也意欲包括在内。

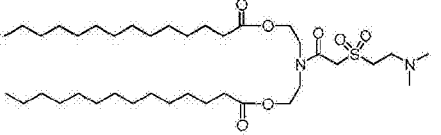
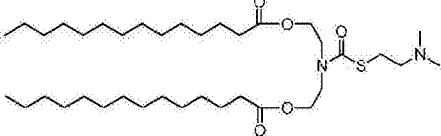
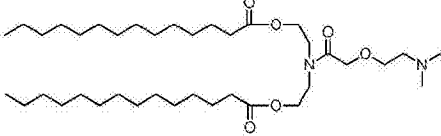
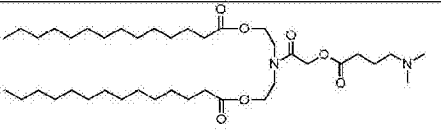
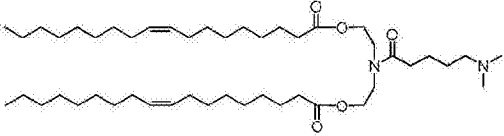
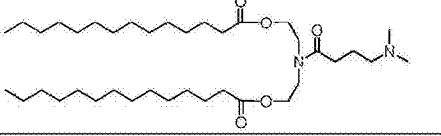
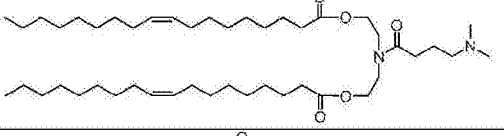
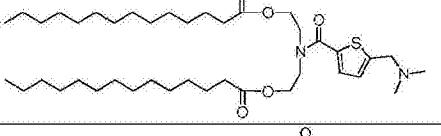
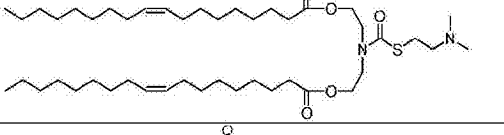
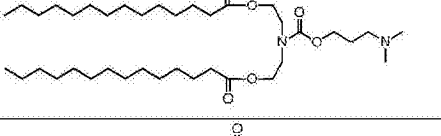
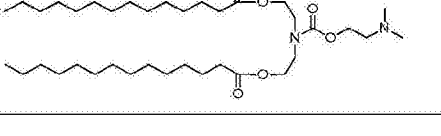
[0112] 在本发明的范围内的优选的式I的化合物列于表1中。体外和体内数据(参见下文)也列于表1中。

[0113] 表1

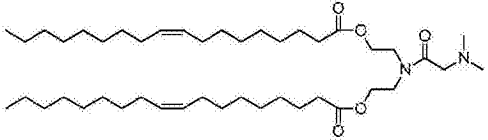
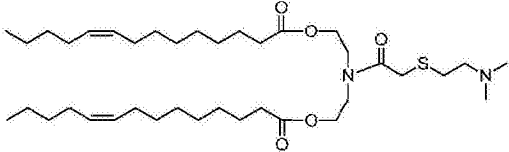
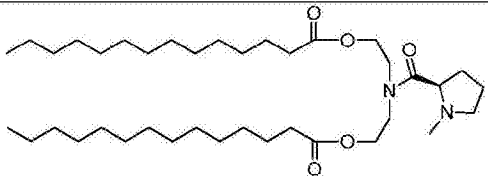
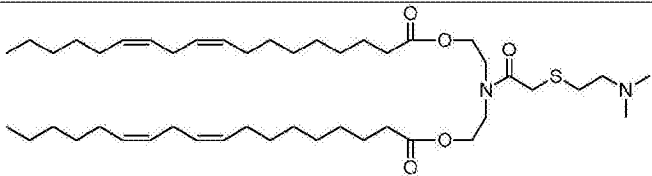
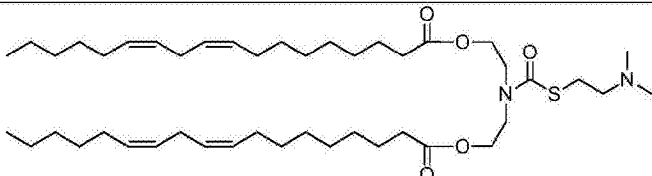
[0114]

脂质	结构	体外 (pHSC) % KD	体内 (大鼠 DMNQ) % KD
i-Pr-DC		53% 在 50 nM 下	
i-Pr-DODC		60% 在 50 nM 下	
i-DC		89% 在 200 nM 下	
i-Et-DC (Et104)		65% 在 50 nM 下	
i-Et-DODC		43% 在 50 nM 下	
i-Prop-DC		55% 在 50 nM 下	
i-Prop-DODC		55% 在 50 nM 下	
S104		68% 在 50 nM 下	52% 在 0.5 mpk 下
S104-DO		78% 在 20 nM 下	65% 在 0.5 mpk 下
C104		53% 在 20 nM 下	75% 在 0.5 mpk 下

[0115]

脂质	结构	体外 (pHSC) % KD	体内 (大鼠 DMNQ) % KD
SO2-S104		75% 在 20 nM 下	18% 在 0.5 mpk 下
TU104		76% 在 20 nM 下	
O104		55% 在 20 nM 下	
HEDC-M1		53% 在 20 nM 下	
C104-DO		32% 在 20 nM 下	
Pr104		54% 在 20 nM 下	
Pr104-DO		27% 在 20 nM 下	
T104		58% 在 20 nM 下	
TU104-DO		81% 在 20 nM 下	40% 在 0.25 mpk 下
CB104		42% 在 20 nM 下	
CA104			

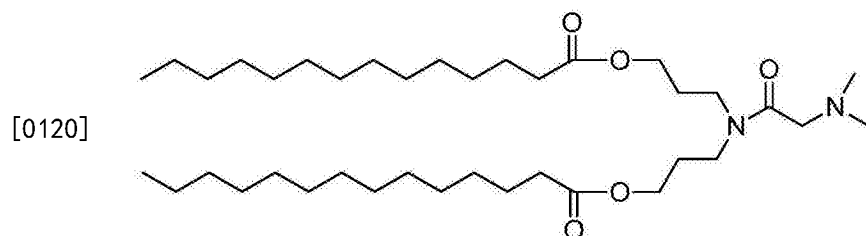
[0116]

脂质	结构	体外 (pHSC) % KD	体内 (大鼠 DMNQ) % KD
INT-4		70% 在 50 nM 下	
S104-DMO		40% 在 10 nM 下	
Pro-DC			
S104-DLin			
TU104-DLin			

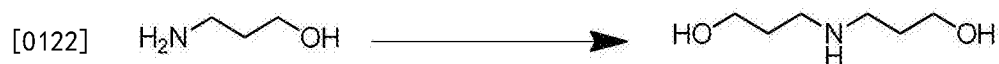
[0117] 可通过参考以下实施例进一步举例说明本发明。这些实施例仅是说明性的，并不意欲限制本发明。

[0118] 实验部分

[0119] ((2-(二甲基氨基)乙酰基)氮烷二基)双(丙-3,1-二基)双十四烷酸酯(i-Pr-DC)的制备



[0121] 步骤1: 中间体1: 3,3'-氮烷二基双(丙-1-醇)的制备



[0123] 将3-氨基-1-丙醇(14.5mL, 19.0mmol)、1-氯-3-羟基丙烷(8.00mL, 95.6mmol)和H₂O(约50mL)的混合物回流24小时。然后,加入氢氧化钾(5.40g)。溶解后,蒸发所有的水,留下粘性油和大量氯化钾。将这些过滤,并用无水丙酮和二氯甲烷洗涤。将有机相在Na₂SO₄上干燥,过滤并蒸发,留下油状物。通过硅胶色谱用DCM/MeOH梯度洗脱进行纯化,获得3,3'-氮烷二基双(丙-1-醇)(12.5g)。

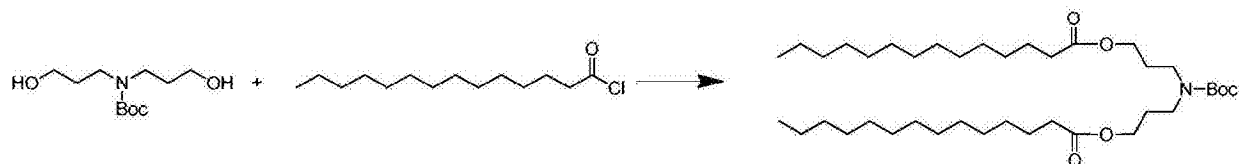
[0124] 步骤2: 中间体2: 双(3-羟基丙基)氨基甲酸叔丁酯的制备



[0126] 将3,3'-氮烷二基双(丙-1-醇)(12.5g, 95.4mmol)稀释在DCM(25mL)中。在氩气氛围中在搅拌下,缓慢加入二碳酸二叔丁酯(26.0g, 119mmol)在DCM(25mL)中的溶液。将反应搅拌过夜。浓缩反应混合物。通过硅胶色谱用DCM/MeOH梯度洗脱进行纯化,获得双(3-羟基丙基)氨基甲酸叔丁酯。

[0127] 步骤3: 中间体3: ((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(丙-3,1-二基)双十四烷酸酯的制备

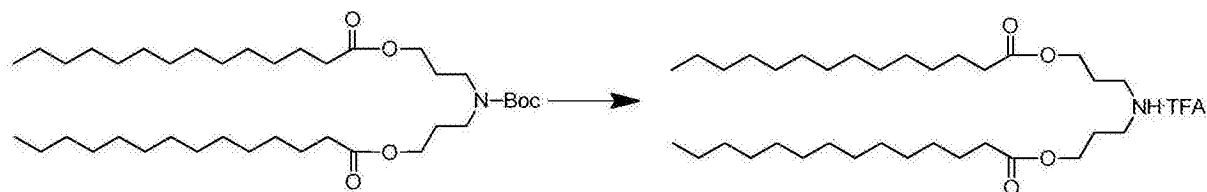
[0128]



[0129] 将双(3-羟基丙基)氨基甲酸叔丁酯(4.00g, 17.3mmol)、Et₃N(4.8mL, 34.6mmol)和DMAP(529mg, 4.33mmol)溶解在氯仿(50mL)中。在冰浴中搅拌下,经15min加入肉豆蔻酰氯的溶液。所述加入以使反应温度不超过30℃的方式进行。将反应在室温下搅拌过夜。第二天,加入MeOH(50mL)和0.9%盐水溶液(50mL),以终止反应。分离有机层并用1M NaHCO₃洗涤。用Na₂SO₄干燥溶剂,过滤并在真空中浓缩,获得油状物形式的((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(丙-3,1-二基)双十四烷酸酯,其未经进一步纯化即转到下一阶段。

[0130] 步骤4: 中间体4: 氮烷二基双(丙-3,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐的制备

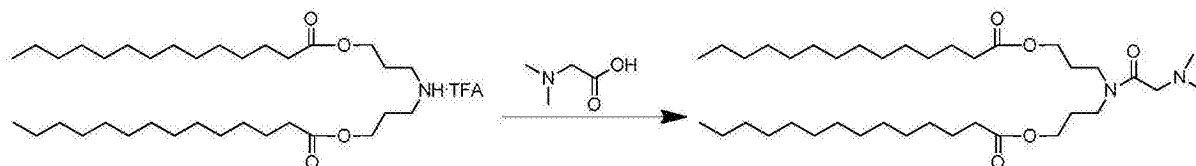
[0131]



[0132] 将((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(丙-3,1-二基)双十四烷酸酯(11.3g, 17.3mmol)溶解在TFA/CHCl₃(1:1, 20mL)中,并将混合物在室温下搅拌15分钟。然后,在真空中浓缩物质。再一次重复该过程。然后,将物质溶解在DCM中,用H₂O洗涤,用Na₂SO₄干燥,在真空中浓缩,并充分干燥过夜。浓缩反应混合物。通过硅胶色谱用DCM/MeOH梯度洗脱进行纯化,获得氮烷二基双(丙-3,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐(7.5g)。

[0133] 步骤5: i-Pr-DC: ((2-(二甲基氨基)乙酰基)氮烷二基)双(丙-3,1-二基)双十四烷酸酯的制备

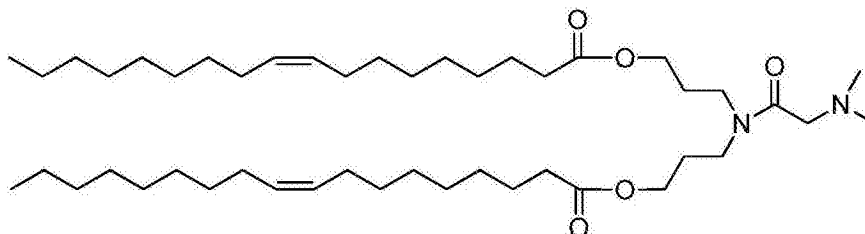
[0134]



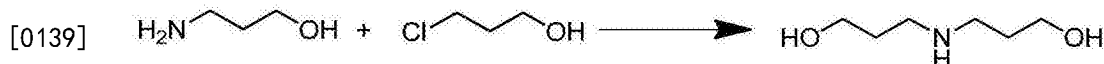
[0135] 将氮烷二基双(丙-3,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐(750mg, 1.35mmol)用DCM(5mL)稀释,并添加到N,N-二甲基甘氨酸(154mg, 1.49mmol)、HATU(616mg, 1.62mmol)和DIEA(495μL, 2.84mmol)在DCM(5mL)中的预活化混合物中。用氩气冲洗烧瓶并在室温下搅拌过夜。浓缩反应混合物。通过硅胶色谱用DCM/MeOH梯度洗脱进行纯化,获得((2-(二甲基氨基)乙酰基)氮烷二基)双(丙-3,1-二基)双十四烷酸酯(465mg)。QTOF MS ESI+:m/z 639.6 (M+H)。

[0136] (Z)-((2-(二甲基氨基)乙酰基)氮烷二基)双(丙-3,1-二基)二油酸酯(i-Pr-DODC)的制备

[0137]



[0138] 步骤1: 中间体1: 3,3'-氮烷二基双(丙-1-醇)的制备



[0140] 将3-氨基-1-丙醇(14.5mL, 19.0mmol)、1-氯-3-羟基丙烷(8.00mL, 95.6mmol)和水(50mL)的混合物回流24小时。然后,加入氢氧化钾(5.40g)。溶解后,蒸发所有的水,留下粘性油和大量氯化钾。将这些过滤,并用无水丙酮和二氯甲烷洗涤。将有机相在Na₂SO₄上干燥,过滤并蒸发,留下油状物。通过硅胶色谱用DCM/MeOH梯度洗脱进行纯化,获得3,3'-氮烷二基双(丙-1-醇)(12.5g)。

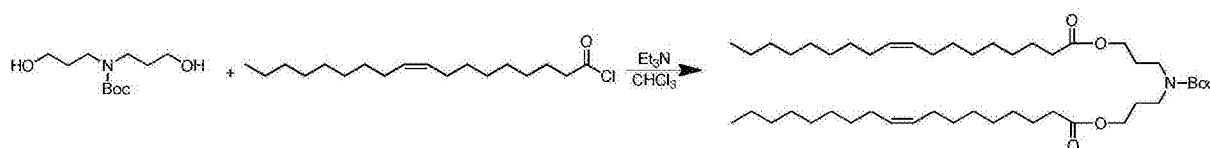
[0141] 步骤2: 中间体2: 双(3-羟基丙基)氨基甲酸叔丁酯的制备



[0143] 将3,3'-氮烷二基双(丙-1-醇)(12.5g, 95.4mmol)稀释在DCM(25mL)中。在氩气氛围中在搅拌下,缓慢加入二碳酸二叔丁酯(26.0g, 119mmol)在DCM(25mL)中的溶液。将反应搅拌过夜。浓缩反应混合物。通过硅胶色谱用DCM/MeOH梯度洗脱进行纯化,获得双(3-羟基丙基)氨基甲酸叔丁酯。

[0144] 步骤3: 中间体3: (Z)-((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(丙-3,1-二基)二油酸酯的制备

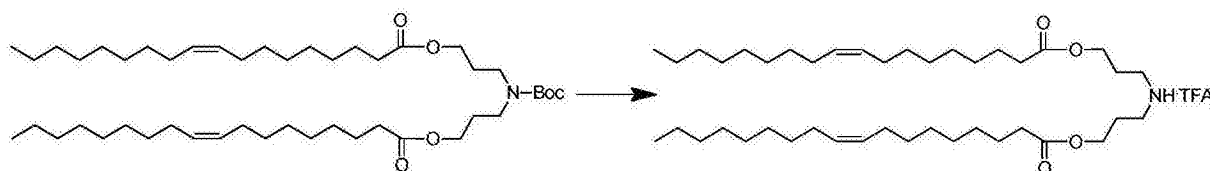
[0145]



[0146] 将双(3-羟基丙基)氨基甲酸叔丁酯、三乙胺和DMAP溶解在氯仿中。在冰浴中搅拌下,经15分钟加入油酐氯的溶液。所述加入以使反应温度不超过30℃的方式进行。将反应在室温下搅拌过夜。第二天,加入MeOH (50mL) 和0.9%盐水溶液(50mL),以终止反应。分离有机层并用1M NaHCO₃洗涤。用Na₂SO₄干燥溶剂,过滤并在真空中浓缩,获得油状物形式的(Z)-((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(丙-3,1-二基)二油酸酯,其未经进一步纯化即转到下一阶段。

[0147] 步骤4: 中间体4: (Z)-氮烷二基双(丙-3,1-二基)二油酸酯TFA盐的制备

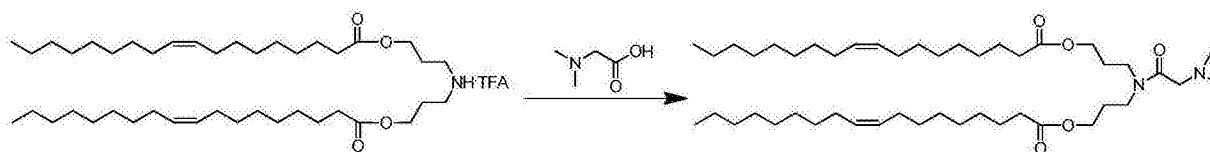
[0148]



[0149] 将(Z)-((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(丙-3,1-二基)二油酸酯(13.2g, 17.3mmol)溶解在TFA/CHCl₃ (1:1, 20mL)中,并将混合物在室温下搅拌15分钟。然后,在真空中浓缩物质。再一次重复该过程。然后,将物质溶解在DCM中,用H₂O洗涤,用Na₂SO₄干燥,并在真空中浓缩。通过硅胶色谱用DCM/MeOH梯度洗脱进行纯化,获得(Z)-氮烷二基双(丙-3,1-二基)二油酸酯TFA盐。

[0150] 步骤5: i-Pr-DODC: (Z)-((2-(二甲基氨基)乙酰基)氮烷二基)双(丙-3,1-二基)二油酸酯的制备

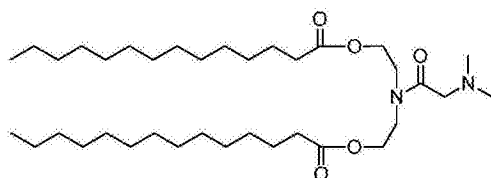
[0151]



[0152] 将(Z)-氮烷二基双(丙-3,1-二基)二油酸酯TFA盐(750mg, 1.13mmol)用DCM(5mL)稀释,并添加到N,N-二甲基甘氨酸(128mg, 1.24mmol)、HATU(517mg, 1.36mmol)和DIEA(413μL, 2.37mmol)在DCM(5mL)中的预活化混合物中。用氩气冲洗烧瓶并在室温下搅拌过夜。浓缩反应混合物。通过硅胶色谱用DCM/MeOH梯度洗脱进行纯化,获得(Z)-((2-(二甲基氨基)乙酰基)氮烷二基)双(丙-3,1-二基)二油酸酯(450mg)。QTOF MS ESI+: m/z 747.7 (M+H)。

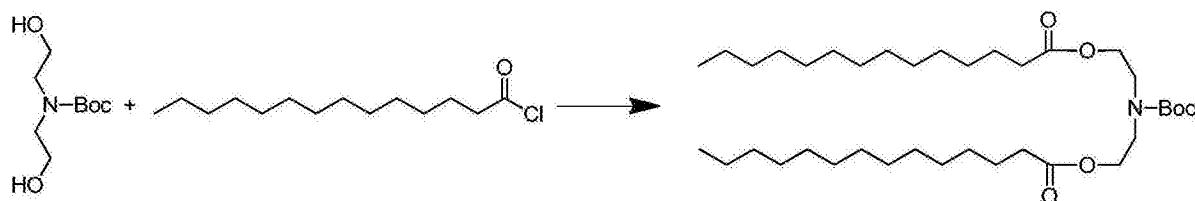
[0153] ((2-(二甲基氨基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(i-DC)的制备

[0154]



[0155] 步骤1: 中间体1: ((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯的制备

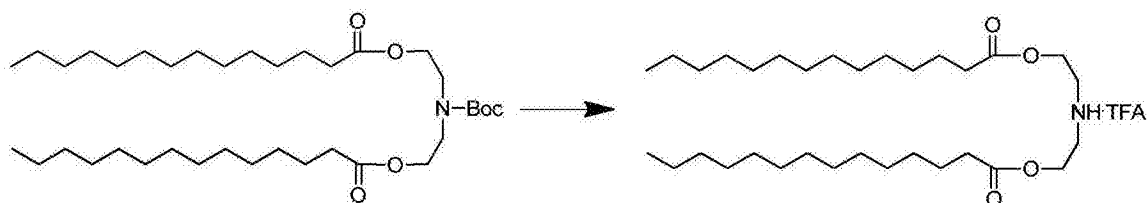
[0156]



[0157] 将N-Boc二乙醇胺(MW 205.25;8.4g,0.041摩尔)、三乙胺(MW 101.19;11.5mL,0.083mol)和4-(二甲基氨基)吡啶(MW 122.17;1.3g,0.011摩尔)溶解在氯仿(170mL)中。在冰/水浴中搅拌下,逐滴加入肉豆蔻酰氯(MW 246.82;22mL,80.9mmol)在100mL氯仿中的溶液。然后,将反应混合物从冷浴中取出,并在室温下持续搅拌2h。加入200mL甲醇和200mL 0.9%盐水的混合物以终止反应。停止搅拌,并分离有机层。通过旋转蒸发除去溶剂,获得无色油状物形式的((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(25.7g),其未经进一步纯化即转到下一阶段。

[0158] 步骤2:中间体2:氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐的制备

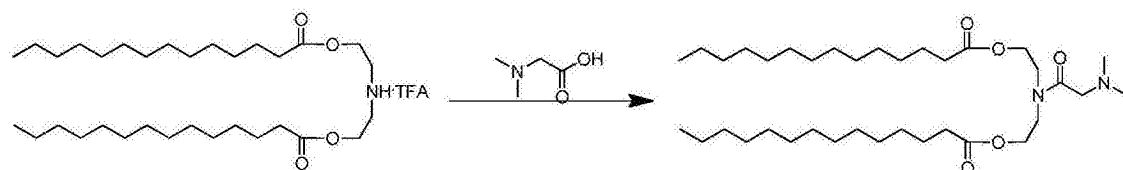
[0159]



[0160] 向((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(33.0g,0.053摩尔)在100mL氯仿中的溶液中加入三氟乙酸(150mL,2.02mol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。通过旋转蒸发除去溶剂后,将所得柔软固体从80mL甲醇重结晶,获得白色固体形式的氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐(16.6g)。

[0161] 步骤3:i-DC:((2-(二甲基氨基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯的制备

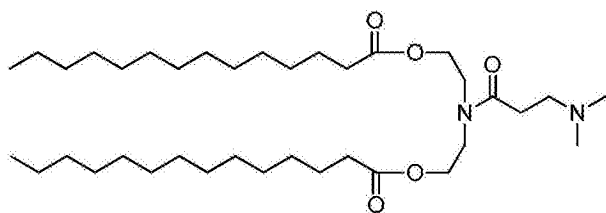
[0162]



[0163] 将氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐(10g,16mmol)与二甲基甘氨酸(42.5g,25mmol)、DCC(4.7g,23mmol)和DIEA(6.33mL,40mmol)一起稀释在吡啶(20mL)中。用氩气冲洗圆底烧瓶,并将反应混合物在55℃下加热过夜。第二天,浓缩反应混合物。通过硅胶色谱用DCM/MeOH洗脱进行纯化后,将集中的流分浓缩,获得((2-(二甲基氨基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯。

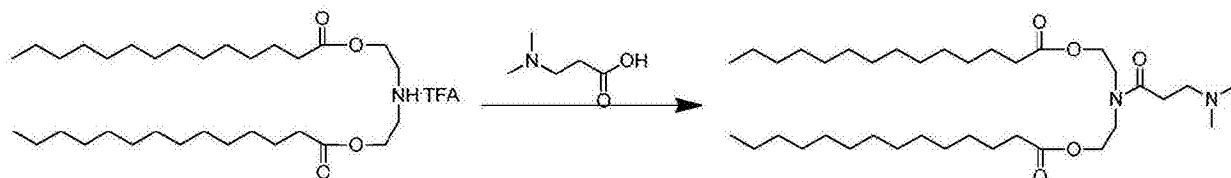
[0164] ((3-(二甲基氨基)丙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(i-Et-DC,在本文中也称为Et104)的制备

[0165]



[0166] i-Et-DC: ((3-(二甲基氨基)丙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯的制备

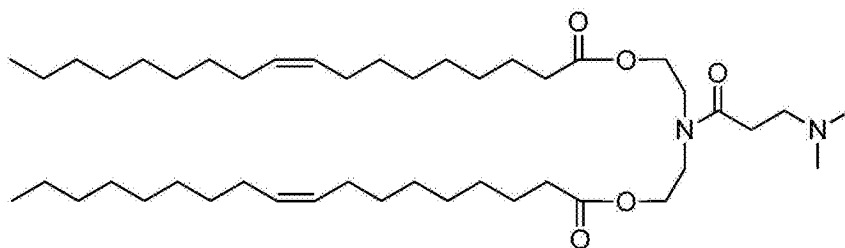
[0167]



[0168] 上文已经描述了氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐的合成。将氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐(1.50g, 2.85mmol)用DCM(10mL)稀释,并添加到3-(二甲基氨基)丙酸HCl盐(482mg, 3.14mmol)、HATU(1.30g, 3.42mmol)和DIEA(1.04mL, 5.98mmol)在DCM(10mL)中的预活化混合物中。用氩气冲洗圆底烧瓶,并将反应混合物在室温下搅拌过夜。浓缩反应混合物。通过硅胶色谱用DCM/MeOH洗脱进行纯化后,将集中的流分浓缩,并在DCM(20mL)和10%K₂CO₃(20mL)中在0-5℃下搅拌30min。分离有机层,并将水层用DCM(2×10mL)进一步萃取。将合并的有机物与MgSO₄一起在0-5℃下搅拌30min,过滤,用DCM洗涤并浓缩,获得((3-(二甲基氨基)丙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(1.01g)。QTOF MS ESI+:m/z 625.6(M+H)。

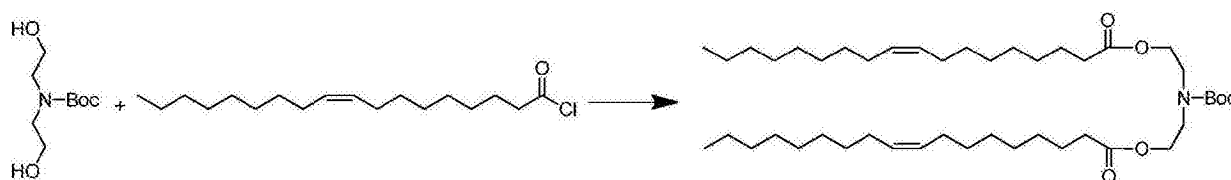
[0169] (Z)-((3-(二甲基氨基)丙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯i-Et-DODC的制备

[0170]



[0171] 步骤1: 中间体1: (Z)-((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯的制备

[0172]

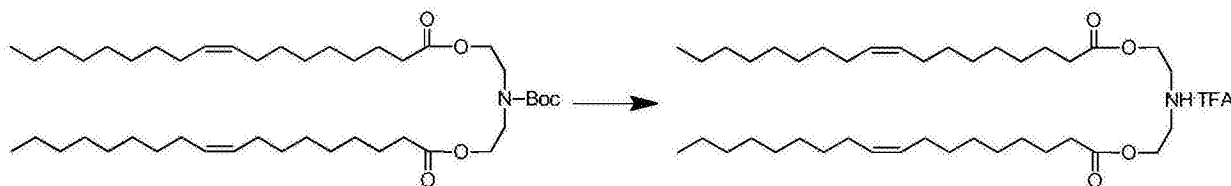


[0173] 将N-Boc二乙醇胺(17.8g, 0.087摩尔)、三乙胺(24.4mL, 0.176摩尔)和4-(二甲基氨基)吡啶(2.76g, 0.023摩尔)溶解在350mL氯仿中。在搅拌下,经10min加入油酰氯(61.6g, 0.174摩尔)在100mL氯仿中的溶液(或者,将N-Boc二乙醇胺的氯仿溶液浸没在冰/水浴中,

同时加入油酰氯)。所述加入以使反应混合物的温度不超过50℃的方式进行。将反应混合物在室温下搅拌2hr。加入200mL甲醇和200mL 0.9%盐水的混合物以终止反应。将有机层分离,并用2×100mL稀碳酸氢钠水溶液洗涤。通过旋转蒸发除去溶剂,获得浅黄色油状物形式的(Z)-((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯(59.5g)。该物质未经进一步纯化即用于下一步骤。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) 0.87 (t,6H,CH₃), 1.20-1.40 (m,40H,CH₂), 1.45 (s,9H,tBu CH₃), 1.59 (m,4H,CH₂CH₂C(=O)), 2.00 (m,8H,CH₂CH=CH), 2.33 (t,4H,CH₂C(=O)), 3.48 (m,4H,NCH₂CH₂O), 4.18 (m,4H,NCH₂CH₂O), 5.33 (m,4H,CH=CH)。

[0174] 步骤2:中间体2:(Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)二油酸酯TFA盐的制备

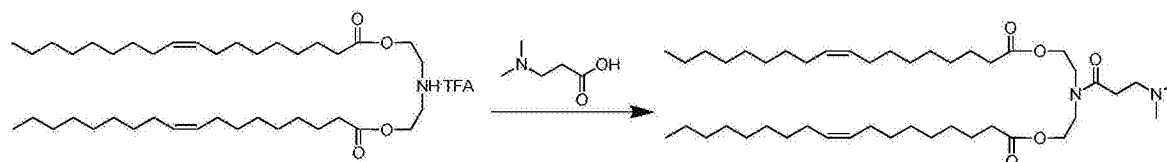
[0175]



[0176] 将(Z)-((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯(59.5g,0.081摩尔)用100mL三氟乙酸(100mL,1.35mol)和100mL氯仿处理两次。各次处理由在室温下搅拌10min组成,并在各次处理结束时通过旋转蒸发除去溶剂。将残余物溶解在200mL二氯甲烷中,并将混合物用100mL水洗涤两次。使用甲醇和二氯甲烷的混合物作为洗脱剂,通过硅胶色谱对残余物进行纯化,获得(Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)二油酸酯TFA盐(44.0g)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) 0.87 (t,6H,CH₃), 1.20-1.40 (m,40H,CH₂), 1.59 (m,4H,CH₂CH₂C(=O)), 2.00 (m,8H,CH₂CH=CH), 2.33 (t,4H,CH₂C(=O)), 3.31 (m,4H,NCH₂CH₂O), 4.38 (m,4H,NCH₂CH₂O), 5.33 (m,4H,CH=CH)。

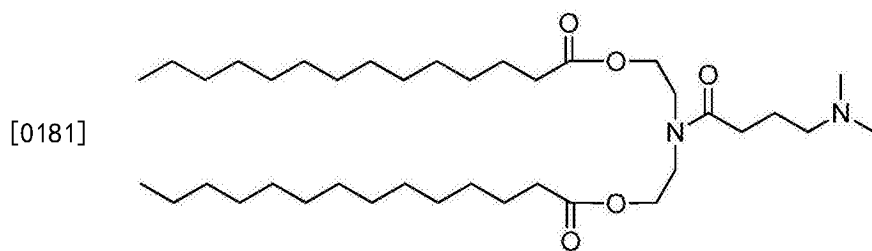
[0177] 步骤3:i-Et-DODC:(Z)-((3-(二甲基氨基)丙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯的制备

[0178]

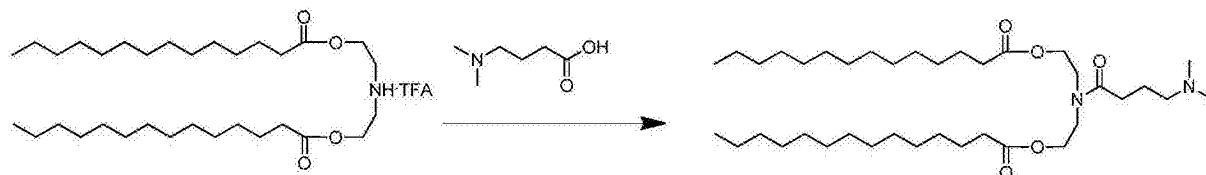


[0179] 将(Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)二油酸酯TFA盐(1.50g,2.37mmol)用DCM(10mL)稀释,并加入3-(二甲基氨基)丙酸HCl盐(383mg,2.49mmol)、HATU(1.03g,2.72mmol)和DIEA(831μL,4.77mmol)在DCM(10mL)中的预活化混合物中。用氩气冲洗圆底烧瓶,并将反应混合物在室温下搅拌过夜。浓缩反应混合物。通过硅胶色谱用DCM/MeOH洗脱进行纯化后,将集中的流分浓缩,并在DCM(20mL)和10%K₂CO₃(20mL)中在0-5℃下搅拌30min。分离有机层,并将水层用DCM(2×10mL)进一步萃取。将合并的有机物与MgSO₄一起在0-5℃下搅拌30min,过滤,用DCM洗涤并浓缩,获得(Z)-((3-(二甲基氨基)丙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯。QTOF MS ESI+:m/z 733.6 (M+H)。

[0180] ((4-(二甲基氨基)丁酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯[i-Prop-DC(在本文中也称为Pr104)]的制备



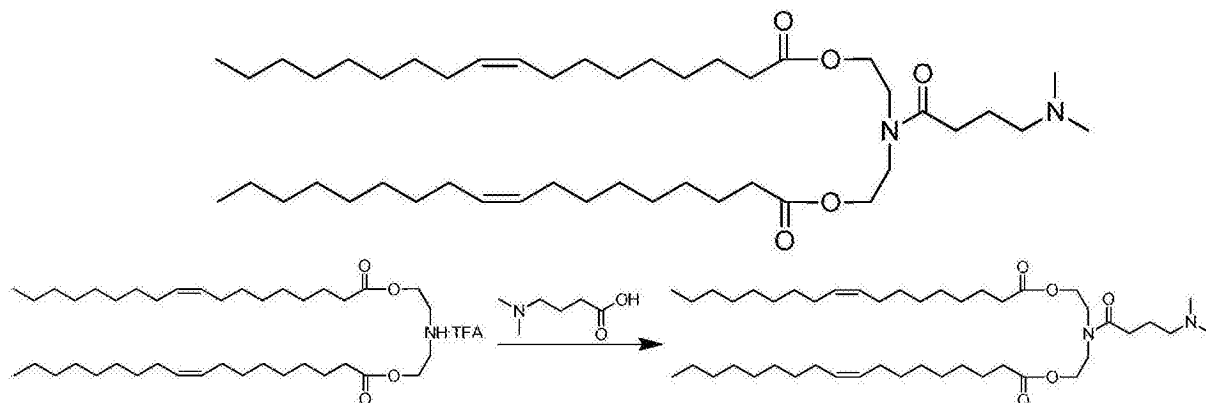
[0182]



[0183] 上文已经描述了氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐的合成。将氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐(1.00g, 1.90mmol)用DCM(5mL)稀释,并加入4-(二甲基氨基)丁酸HCl盐(382mg, 2.28mmol)、HATU(867mg, 2.28mmol)和DIEA(728uL, 4.18mmol)在DCM(5mL)中的预活化混合物中。用氩气冲洗圆底烧瓶,并将反应混合物在室温下搅拌过夜。浓缩反应混合物。通过硅胶色谱用DCM/MeOH洗脱进行纯化后,将集中的流分浓缩,并在DCM(20mL)和10%K₂CO₃(20mL)中在0-5℃下搅拌30min。分离有机层,并将水层用DCM(2×10mL)进一步萃取。将合并的有机物与MgSO₄一起在0-5℃下搅拌30min,过滤,用DCM洗涤并浓缩,获得((4-(二甲基氨基)丁酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯。LCMS ESI +:m/z 639.6 (M+H)。

[0184] (Z)-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯[i-Prop-DODC(在本文中也称为Pr104-DO)]的制备

[0185]

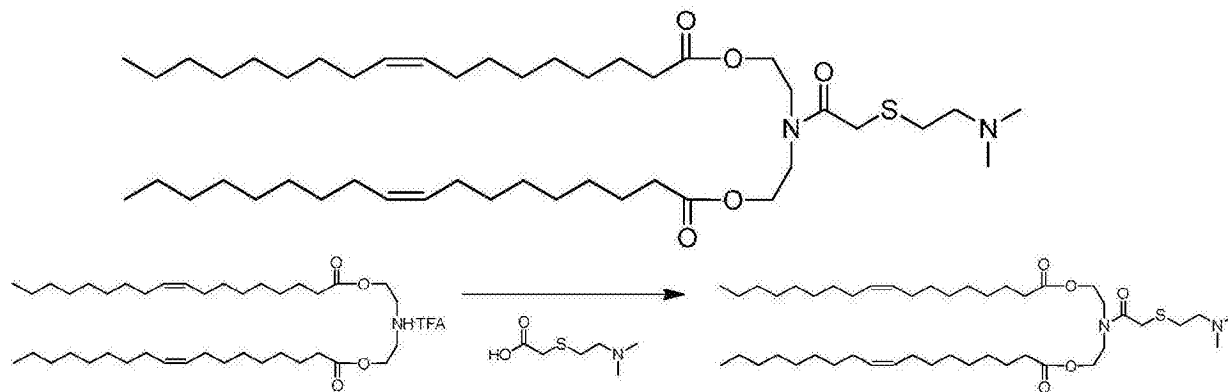


[0186] 上文已经描述了(Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)二油酸酯TFA盐的合成。将(Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)二油酸酯TFA盐(1.00g, 1.58mmol)用DCM(5mL)稀释,并加入4-(二甲基氨基)丁酸HCl盐(317mg, 1.89mmol)、HATU(719mg, 1.89mmol)和DIEA(606uL, 3.48mmol)在DCM(5mL)中的预活化混合物中。用氩气冲洗圆底烧瓶,并将反应混合物在室温下搅拌过夜。浓缩反应混合物。通过硅胶色谱用DCM/MeOH洗脱进行纯化后,将集中的流分浓缩,并在DCM(20mL)和10%K₂CO₃(20mL)中在0-5℃下搅拌30min。分离有机层,并将水层用DCM(2×10mL)进一步萃取。将合并的有机物与MgSO₄一起在0-5℃下搅拌30min,过滤,用DCM洗涤并

浓缩,获得(Z)-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯。LCMS ESI+:m/z 747.7 (M+H)。

[0187] (Z)-((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯(S104-D0)的制备

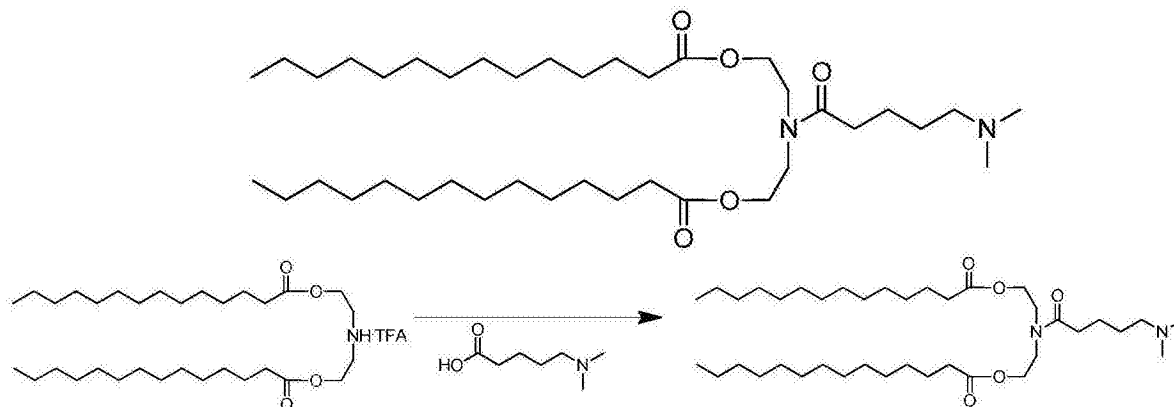
[0188]



[0189] 上文已经描述了(Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)二油酸酯TFA盐的合成。将(Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)二油酸酯TFA盐(4.06g, 6.41mmol)与10%K₂CO₃(30mL)一起在DCM(60mL)中在0-5℃下搅拌。30min后,分离有机相,并将水相用DCM(30mL)进一步萃取。将合并的有机相与MgSO₄一起在0-5℃下搅拌30min,过滤,并用DCM(约30mL)洗涤。向合并的滤液中加入2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酸(1.26g, 7.70mmol)、EDC HCl盐(1.84g, 9.62mmol)、DMAP(78.3mg, 0.64mmol),并将稀悬浮液在室温下搅拌过夜。第二天,加入H₂O(60mL)和MeOH(30mL),搅拌10min后,分离澄清的有机相。将混浊的水相用DCM萃取。浓缩合并的有机萃取物。将粗制物质通过硅胶短柱过滤并溶解于DCM(40mL)中,加入PBS(pH=11, 50mL)。将混合物在室温下搅拌约10min。然后,分离有机相,并将水相再次用DCM(15mL)萃取。将合并的有机物干燥(MgSO₄) 30min,过滤,用DCM洗涤并浓缩,获得(Z)-((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯(3.44g)。LCMS ESI+:m/z 780.2 (M+H)。

[0190] ((5-(二甲基氨基)戊酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(C104)的制备

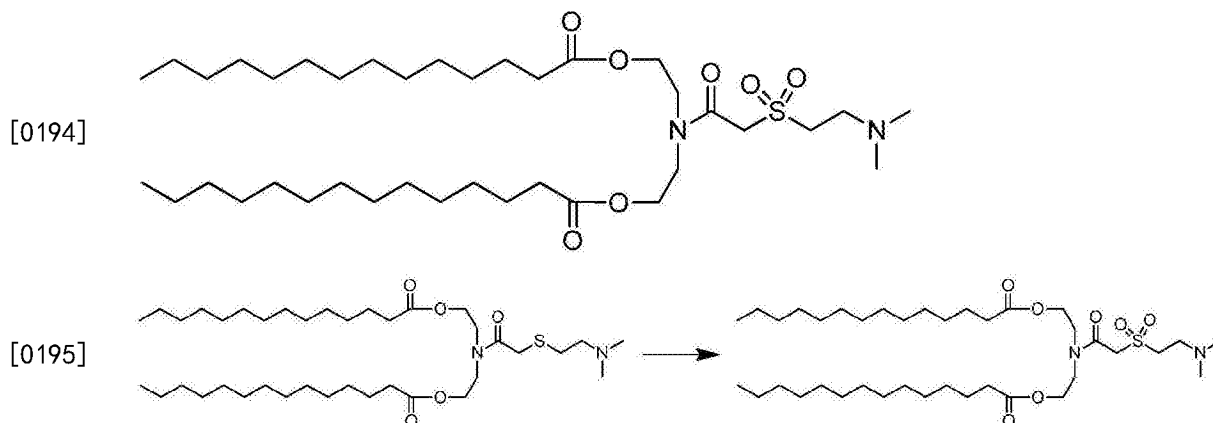
[0191]



[0192] 上文已经描述了氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐的合成。将氮烷二

基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐(730mg, 1.14mmol)与10%K₂CO₃(10mL)一起在DCM(20mL)中在0-5℃下搅拌。30min后,分离有机相,并将水相用DCM(10mL)进一步萃取。将合并的有机相与MgSO₄一起在0-5℃下搅拌30分钟,过滤,并用DCM(10mL)洗涤。向合并的滤液中加入5-(二甲基氨基)戊酸(248mg, 1.37mmol)、EDC HCl盐(328mg, 1.71mmol)、DMAP(14mg, 0.114mmol),并将稀悬浮液在室温下搅拌过夜,此后溶液变得澄清。第二天,加入H₂O(20mL)和MeOH(10mL),搅拌10min后,分离澄清的有机相。将混浊的水相用DCM萃取。浓缩合并的有机萃取物。通过硅胶色谱通过用100%乙酸乙酯随后10%MeOH/DCM洗脱进行纯化后,将纯化的残余物溶解于DCM(25mL)和PBS(pH=11, 25mL)中。将混合物在室温下搅拌15min。然后,分离出有机相,并将水相再次用DCM(15mL)萃取。将合并的有机物干燥(MgSO₄) 30min,过滤,用DCM洗涤并浓缩,获得((5-(二甲基氨基)戊酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(405mg)。LCMS ESI+:m/z 654.1 (M+H)。

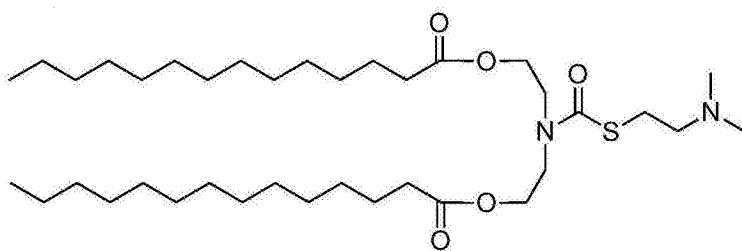
[0193] ((2-((2-(二甲基氨基)乙基)磺酰基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(S02-S104)的制备



[0196] 已经描述了((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(也称为S104)的合成。向在用氩气冲洗的圆底烧瓶中的((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯中加入DCM(10mL)。用冰浴冷却溶液。经5min向其中缓慢加入mCPBA(在DCM中的溶液)。加入后,除去冰浴,并将反应在室温下搅拌过夜。3.5小时后,缓慢加入2M DMA/THF(4.55mL),并将反应混合物搅拌过夜。然后,将反应混合物用DCM稀释到75mL。用H₂O(2×50mL)和10%K₂CO₃(50mL)洗涤。用DCM(40mL)反萃取所有水洗液。将合并的有机物干燥(MgSO₄),过滤,并浓缩,获得无色油状物。浓缩反应混合物。通过硅胶色谱用乙酸乙酯/MeOH梯度洗脱进行纯化,获得((2-((2-(二甲基氨基)乙基)磺酰基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(540mg)。LCMS ESI+:m/z 704.0 (M+H)。

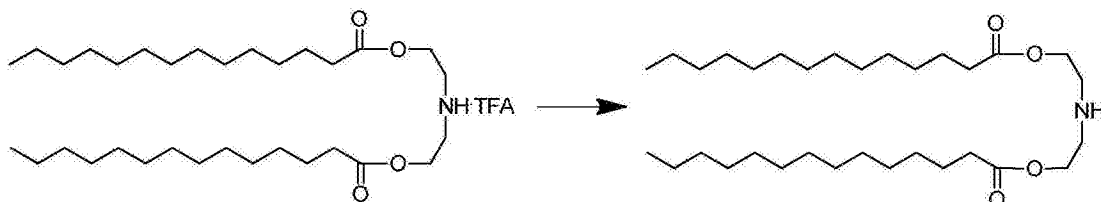
[0197] ((((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(TU104)的制备

[0198]



[0199] 步骤1: 中间体1: 氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯的制备

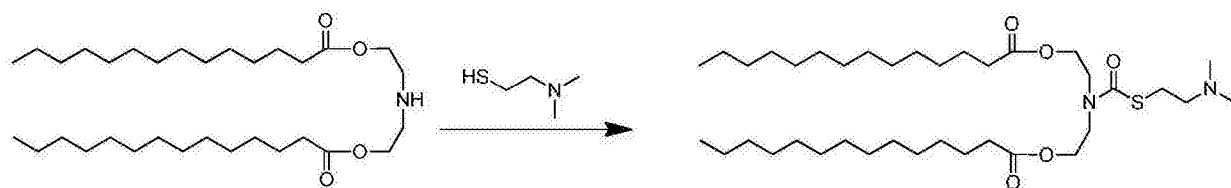
[0200]



[0201] 上文已经描述了氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐的合成。将氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐溶解在DCM(50mL)中,并加入PBS(pH=11,50mL)。将混合物在室温下搅拌15min。然后,分离有机相,并将水相再次用DCM(25mL)萃取。将合并的有机物干燥(MgSO₄) 30min,过滤,用DCM洗涤并浓缩,获得作为游离碱的氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯。

[0202] 步骤2: TU104: (((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯的制备

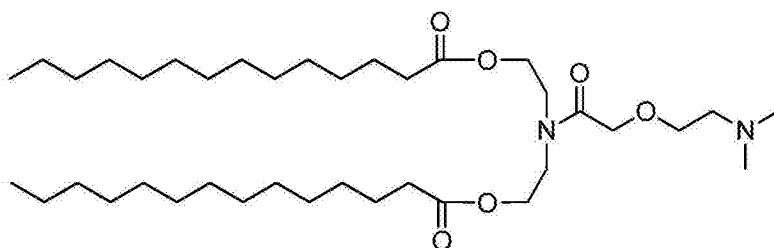
[0203]



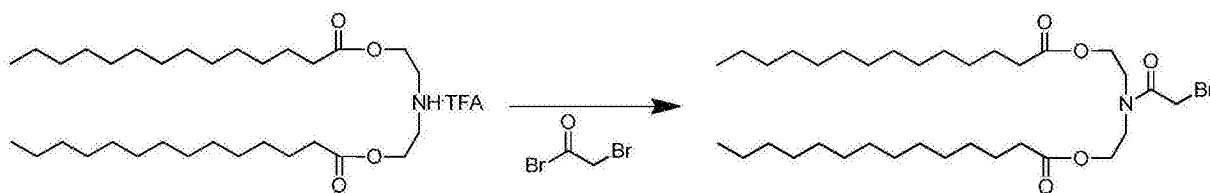
[0204] 将氯甲酸三氯甲酯(也称为双光气)(257uL,2.13mmol)添加到2-(二甲基氨基)乙硫醇HCl盐(302mg,2.13mmol)在无水DCM(20mL)中的溶液中,并在室温下在氩气氛围中搅拌4h。然后,在真空中除去DCM和过量的双光气。然后,加入氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯游离碱(1068mg,2.03mmol)、DCM(20mL)和三乙胺(580uL,4.16mmol)。在室温下16h后,将反应混合物用DCM稀释,并用1M HCl(75mL)、H₂O(75mL)和PBS(pH=11,75mL)洗涤,干燥(MgSO₄),过滤,并浓缩。通过硅胶色谱用乙酸乙酯随后DCM/MeOH梯度洗脱进行纯化,获得(((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(120mg)。LCMS ESI+:m/z 657.5(M+H)。

[0205] ((2-(2-(二甲基氨基)乙氧基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(0104)的制备

[0206]

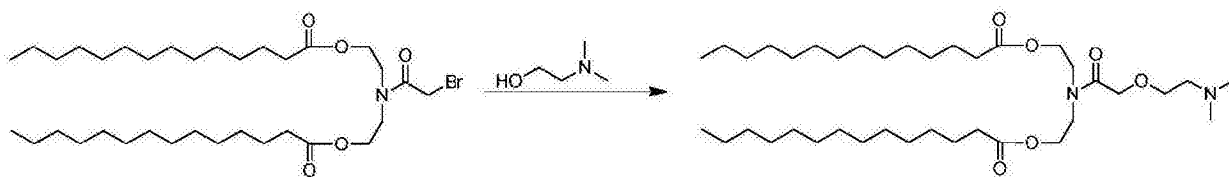


[0207] 步骤1: 中间体1: ((2-溴乙酰基) 氮烷二基) 双(乙-2,1-二基) 双十四烷酸酯的制备
[0208]



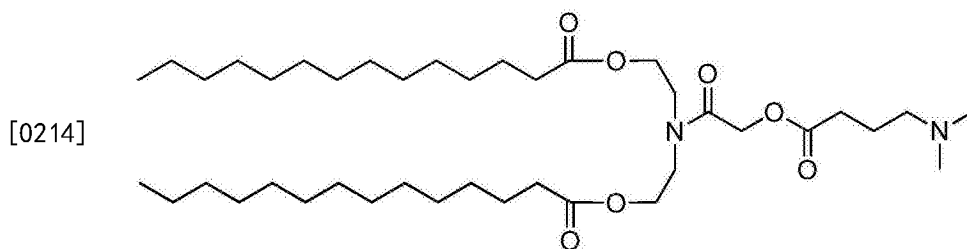
[0209] 上文已经描述了氮烷二基双(乙-2,1-二基) 双十四烷酸酯TFA盐的合成。将氮烷二基双(乙-2,1-二基) 双十四烷酸酯TFA盐(1500mg, 2.34mmol) 溶解在DCM(20mL) 中, 并置于冰浴中。加入溴乙酰溴(214uL, 2.46mmol), 随后加入三乙胺(685uL, 4.91mmol)。除去冰浴, 并将反应在室温下在惰性气体氛围中搅拌过夜。第二天, 用DCM稀释到100mL。用1M HCl(75mL)、H₂O(75mL)、饱和NaHCO₃溶液(75mL) 和饱和盐水溶液(75mL) 洗涤。用DCM(25mL) 反萃取所有水洗液。用MgSO₄干燥有机物, 过滤并在真空中浓缩。通过硅胶色谱用100%乙酸乙酯洗脱进行纯化。集中并浓缩流分, 获得((2-溴乙酰基) 氮烷二基) 双(乙-2,1-二基) 双十四烷酸酯(1220mg)。

[0210] 步骤2: 0104: ((2-(2-(二甲基氨基) 乙氧基) 乙酰基) 氮烷二基) 双(乙-2,1-二基) 双十四烷酸酯的制备
[0211]



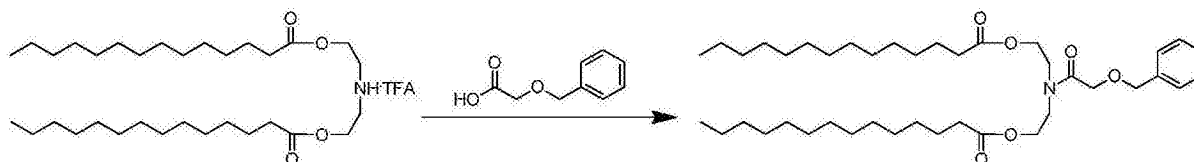
[0212] 向配备有搅拌棒的圆底烧瓶中加入((2-溴乙酰基) 氮烷二基) 双(乙-2,1-二基) 双十四烷酸酯(1.22g, 1.87mmol)、N,N-二甲基乙醇胺(197uL, 1.96mmol)、碘化钾(6.2mg, 0.0374mmol) 和无水THF(25mL)。将所得溶液冷却到-40℃。经5min逐滴加入DBU(588uL, 3.93mmol), 并将反应升温到0℃, 保持2小时。浓缩反应混合物。将残余物用DCM溶解, 加入1M HCl(12mL), 并将两相混合物搅拌15min。然后, 使用PBS(pH=11) 碱化。将有机层分离, 干燥(MgSO₄), 过滤并浓缩。通过硅胶色谱用100%乙酸乙酯随后DCM/MeOH梯度洗脱进行纯化, 获得((2-(2-(二甲基氨基) 乙氧基) 乙酰基) 氮烷二基) 双(乙-2,1-二基) 双十四烷酸酯(53mg)。LCMS ESI+: m/z 655.6 (M+H)。

[0213] ((2-((4-(二甲基氨基) 丁酰基) 氧基) 乙酰基) 氮烷二基) 双(乙-2,1-二基) 双十四烷酸酯(HEDC-M1) 的制备



[0215] 步骤1: 中间体1: ((2-(苄氧基) 乙酰基) 氮烷二基) 双(乙-2,1-二基) 双十四烷酸酯的制备

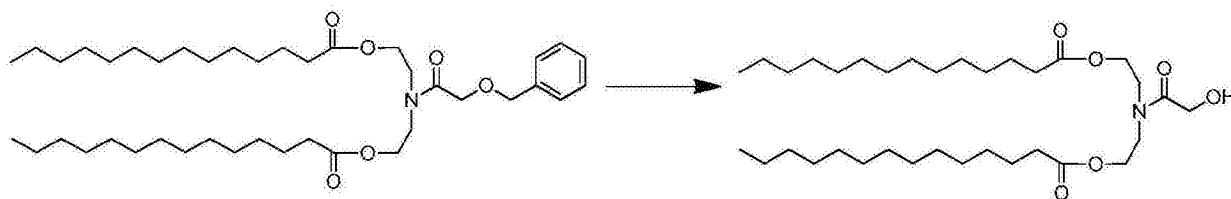
[0216]



[0217] 上文已经描述了氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐的合成。将氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐与10% K_2CO_3 (12.5mL) 一起在DCM (25mL) 中在0-5℃下搅拌。30min后,分离有机层,并将水层用DCM (12mL) 进一步萃取。将合并的有机相与 $MgSO_4$ 一起在0-5℃下搅拌30min,过滤,用DCM (12mL) 洗涤。向合并的滤液中加入苄氧基乙酸(402uL, 2.81mmol)、EDC HCl盐(673mg, 3.51mmol)和DMAP (29mg, 0.234mmol)。将悬浮液在室温下搅拌过夜。第二天,加入 H_2O (25mL) 和MeOH (12mL),搅拌10min后,分离澄清的有机相。将混浊的水相用DCM (25mL) 萃取。将合并的有机萃取物用 $MgSO_4$ 干燥,过滤并浓缩。通过硅胶色谱用己烷/乙酸乙酯梯度洗脱进行纯化,获得((2-(苄氧基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(1.28g)。

[0218] 步骤2: 中间体2: ((2-羟基乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯的制备

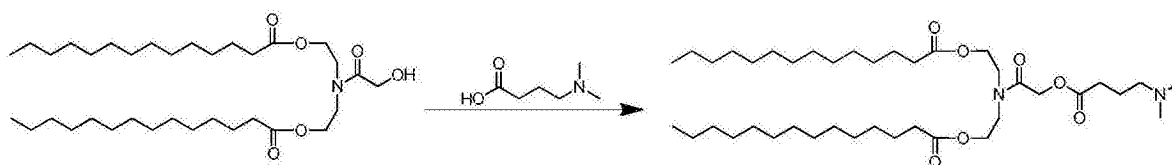
[0219]



[0220] 将((2-(苄氧基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(1.28g, 1.80mmol)溶解在具有MeOH (20mL) 的圆底烧瓶中。给烧瓶盖上盖子并用氩气冲洗。加入10% Pd/C (135mg), 并将烧瓶再次用氩气冲洗一次。经由真空泵除去所有的空气,然后加入填充有 H_2 气体的8"气球。将反应在室温下剧烈搅拌。30min后,将反应混合物过滤(硅藻土),用甲醇洗涤,浓缩为残余物,溶解于DCM (25mL) 和10% K_2CO_3 (25mL) 中。将混合物搅拌15min,然后分离有机层。将水洗液用DCM (15mL) 反萃取。将合并的有机物用 $MgSO_4$ 干燥,过滤并浓缩,获得((2-羟基乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(990mg)。

[0221] 步骤3: HEDC-M1: ((2-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯的制备

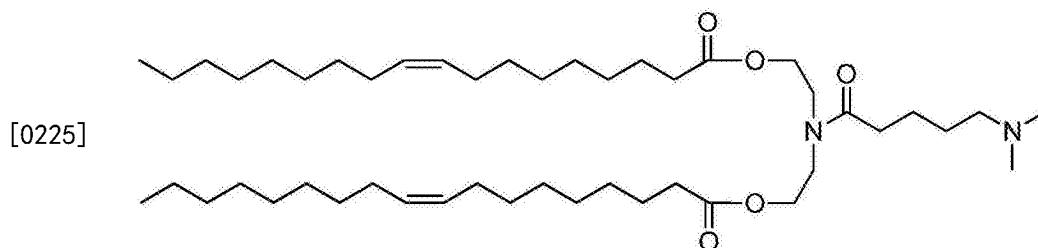
[0222]



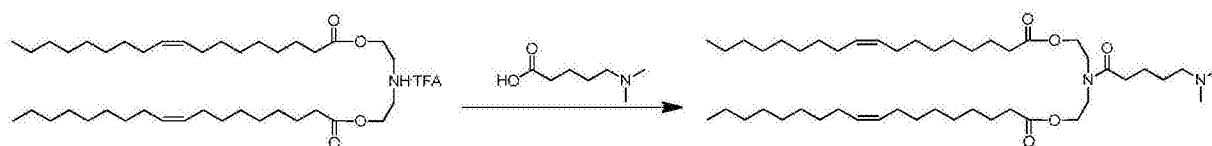
[0223] 将((2-羟基乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(990mg, 1.70mmol)在DCM (20mL) 搅拌,并加入4-二甲基氨基丁酸(268mg)、EDC HCl盐(487mg)和DMAP (21mg)。将悬浮液在室温下搅拌过夜。第二天,加入 H_2O (20mL) 和MeOH (10mL),搅拌10分钟后,分离澄清的有机相。将混浊的水相用DCM (20mL) 萃取。将合并的有机萃取物用 $MgSO_4$ 干燥,过滤并浓

缩。通过硅胶色谱用DCM/MeOH梯度洗脱对粗制物质进行纯化。浓缩集中并浓缩的流分,并用DCM (25mL) 和PBS (pH=11, 25mL) 溶解。将混合物在室温下搅拌15min。然后,分离有机相,并将水相再次用DCM (25mL) 萃取。将合并的有机物干燥 (MgSO₄), 过滤, 并浓缩, 获得 ((2-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯 (672mg)。LCMS ESI+:m/z 697.6 (M+H)。

[0224] (Z)-((5-(二甲基氨基)戊酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯 (C104-D0) 的制备



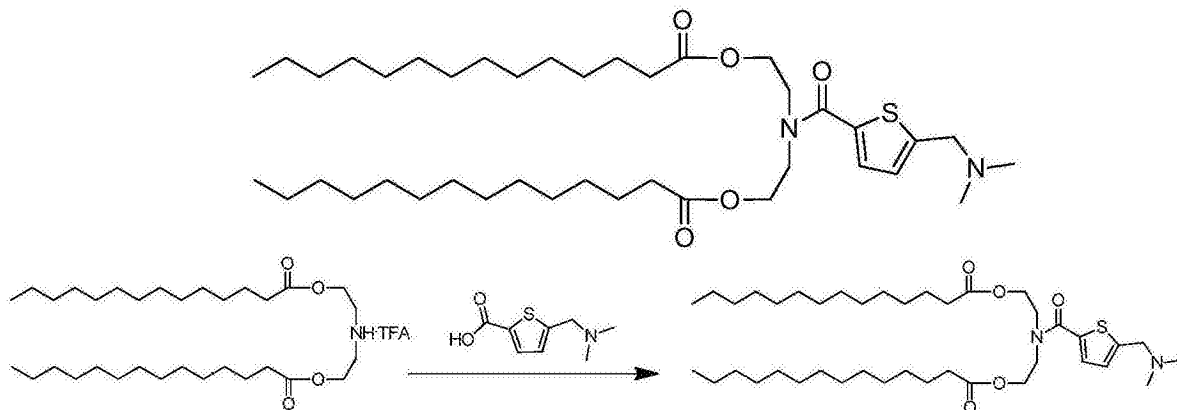
[0226]



[0227] 上文已经描述了 (Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)二油酸酯TFA盐的合成。将 (Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)二油酸酯TFA盐 (1.50g, 2.37mmol) 与 10% K₂CO₃ (10mL) 一起在DCM (20mL) 中在 0-5℃ 下搅拌。30min后,分离有机相,并将水相用DCM (10mL) 进一步萃取。将合并的有机相与MgSO₄一起在 0-5℃ 下搅拌30min,过滤,并用DCM (15mL) 洗涤。向合并的滤液中加入 5-(二甲基氨基)戊酸 (516mg, 2.84mmol)、EDC HCl 盐 (681mg, 3.55mmol)、DMAP (29mg, 0.237mmol), 并将悬浮液在室温下搅拌过夜,这段时间后形成澄清的溶液。第二天,加入H₂O (20mL) 和MeOH (10mL),搅拌10min后,分离澄清的有机相。将混浊的水相用DCM萃取。将合并的有机物干燥 (MgSO₄), 过滤并浓缩。通过硅胶色谱用DCM/MeOH梯度洗脱进行纯化后,将集中并浓缩的流分用DCM (25mL) 和PBS (pH=11, 25mL) 溶解。将混合物在室温下搅拌约10min。然后,分离出有机相,并将水相再次用DCM (15mL) 萃取。将合并的有机物干燥 (MgSO₄), 过滤, 并浓缩, 获得 (Z)-((5-(二甲基氨基)戊酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯 (1.10g)。LCMS ESI+:m/z 761.7 (M+H)。

[0228] ((5-((二甲基氨基)甲基)噻吩-2-羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯 (T104) 的制备

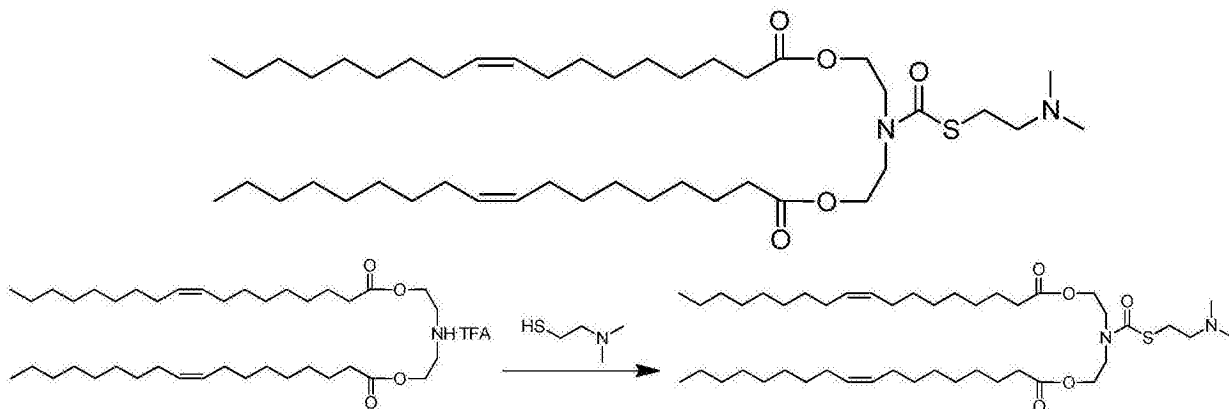
[0229]



[0230] 上文已经描述了氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐的合成。将氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐(1004mg, 1.57mmol)与10%K₂CO₃(20mL)一起在DCM(20mL)中在0-5℃下搅拌。30min后,分离有机相,并将水相用DCM(10mL)进一步萃取。将合并的有机物在0-5℃下用MgSO₄干燥30min,过滤,并用DCM(10mL)洗涤。向合并的滤液中加入((二甲基氨基)甲基)噻吩-2-甲酸(350mg, 1.89mmol)、EDC HCl盐(452mg, 2.36mmol)和DMAP(19.2mg, 0.157mmol)。将悬浮液在室温下搅拌过夜。第二天,加入H₂O(20mL)和MeOH(10mL),搅拌10min后,分离澄清的有机相。将混浊的水相用DCM(25mL)萃取。将合并的有机物干燥(MgSO₄),过滤并浓缩。通过硅胶色谱用己烷/乙酸乙酯梯度洗脱进行纯化后,将集中并浓缩的流分用DCM(20mL)和PBS(pH=11, 20mL)溶解。将混合物在室温下搅拌约10min。然后,分离有机相,并将水相再次用DCM(15mL)萃取。将合并的有机物干燥(MgSO₄) 30min,过滤,用DCM洗涤并浓缩,获得((5-((二甲基氨基)甲基)噻吩-2-羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(482mg)。LCMS ESI+:m/z 693.6(M+H)。

[0231] (Z)-(((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯(TU104-DO)的制备

[0232]

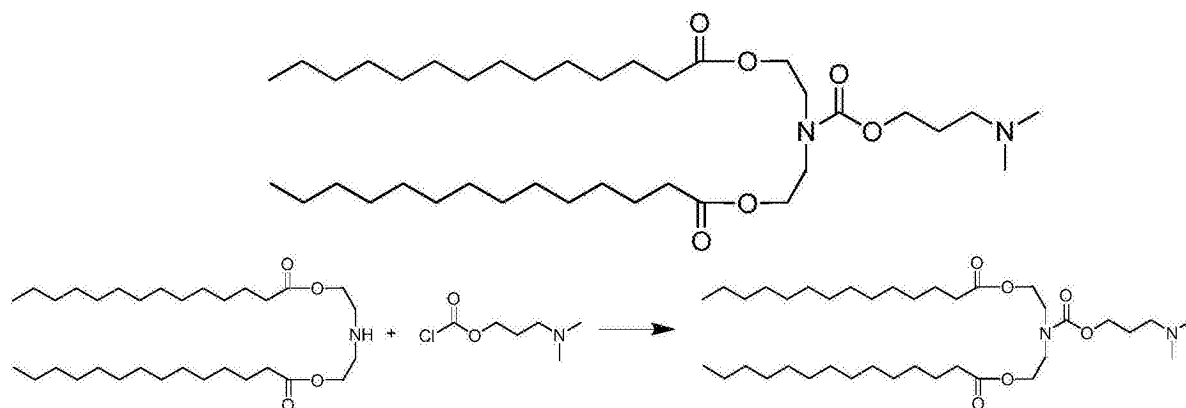


[0233] 上文已经描述了(Z)-((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯的合成。将(Z)-((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯(4.20g, 5.72mmol)溶解在DCM(20mL)中,并在冰浴中冷却到0℃。加入TFA(20mL),并将混合物在惰性气体氛围中搅拌20min。然后,在真空中浓缩反应混合物。将残余物分配于10%K₂CO₃(20mL)与DCM(20mL)之间,并在冰浴中搅拌20min。将有机层分离,干燥(MgSO₄),并过滤。将双光气(1.38mL,

11.4mmol) 添加到在DCM中的(Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)二油酸酯物质中,并在惰性气体氛围中在室温下搅拌。第二天,在真空中除去DCM和过量的双光气。将2-(二甲基氨基)乙硫醇HCl盐(4.05g,28.6mmol)溶解于DCM(50mL)和三乙胺(5.2mL,37.2mmol)中,并加入(Z)-((氯羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯残余物中。将物质在室温下搅拌过夜。第二天,用DCM稀释并用0.3M HCl(75mL)、H₂O(75mL)和10%K₂CO₃(75mL)洗涤。用DCM(25mL)反萃取所有水洗液。将合并的有机物在MgSO₄上干燥,过滤并浓缩。通过硅胶色谱用DCM/MeOH梯度洗脱进行纯化,获得(Z)-(((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯(1.90g)。LCMS ESI+:m/z 765.7(M+H)。

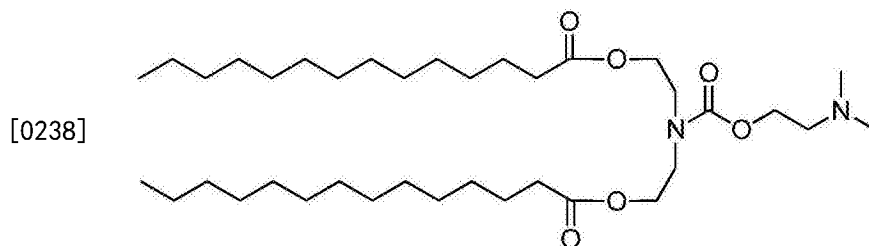
[0234] (((3-(二甲基氨基)丙氧基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(CB104)的制备

[0235]

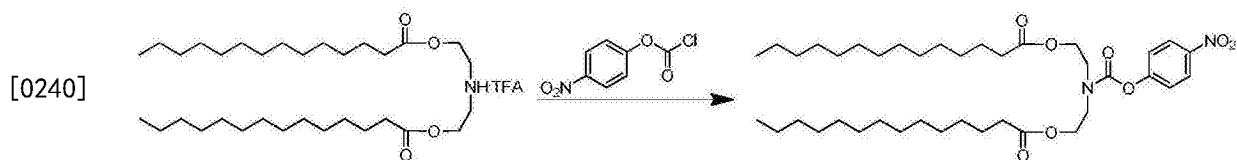


[0236] 上文已经描述了氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯的合成。将双光气(266uL,2.2mmol)加入在DCM(10mL)中的二甲基氨基丙醇(413mg,4.00mmol)中,并在惰性气体氛围中在室温下搅拌4h。在真空中除去DCM和过量的双光气,并加入氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯。将圆底烧瓶用氩气冲洗,并加入DCM(10mL)和三乙胺(859uL,6.16mmol)。将物质在室温下搅拌过夜。然后,将反应混合物用DCM稀释并用0.3M HCl(75mL)、H₂O(75mL)和10%K₂CO₃(75mL)洗涤。用DCM(25mL)反萃取所有水洗液。将合并的有机物在MgSO₄上干燥,过滤并浓缩。通过硅胶色谱用DCM/MeOH梯度洗脱进行纯化,获得(((3-(二甲基氨基)丙氧基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(87mg)。LCMS ESI+:m/z 655.59(M+H)。

[0237] (((2-(二甲基氨基)乙氧基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(CA104)的制备



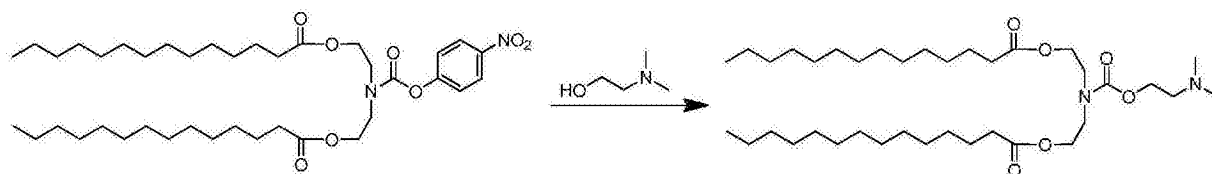
[0239] 步骤1:中间体1:(((4-硝基苯氧基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯的制备



[0241] 上文已经描述了氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐的合成。将氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐溶解在无水DCM(10mL)中,并加入三乙胺(654μL, 4.69mmol)。将反应容器用惰性气体冲洗,并加入氯甲酸4-硝基苯酯。将物质在RT下搅拌过夜。将反应混合物用水(50mL)和DCM(50mL)终止。分离有机层,并将水层用DCM(2×50mL)进一步萃取。将合并的有机物在MgSO₄上干燥,过滤并浓缩。通过硅胶色谱用己烷/乙酸乙酯梯度洗脱进行纯化,获得(((4-硝基苯氧基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯。

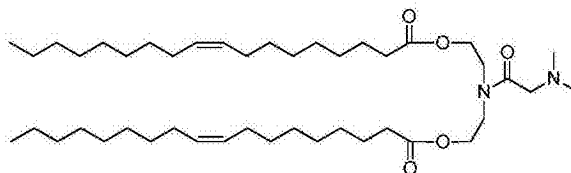
[0242] 步骤2:CA104:(((2-(二甲基氨基)乙氧基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯的制备

[0243]

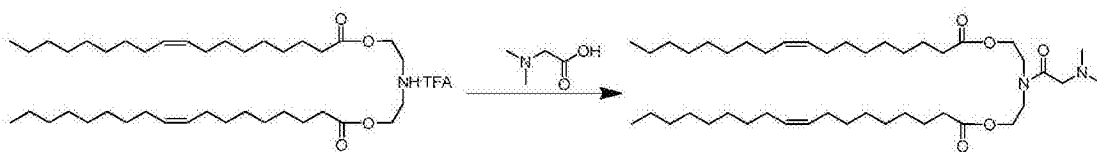


[0244] 向(((4-硝基苯氧基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯中加入2-二甲基氨基乙醇(2mL),并用冷凝柱加热到140℃,保持20min。然后,通过硅胶色谱用DCM/MeOH梯度洗脱对粗制物质进行纯化,获得(((2-(二甲基氨基)乙氧基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(38mg)。LCMS ESI+:m/z 641.7 (M+H)。

[0245] ((2-(二甲基氨基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(INT-4)的制备

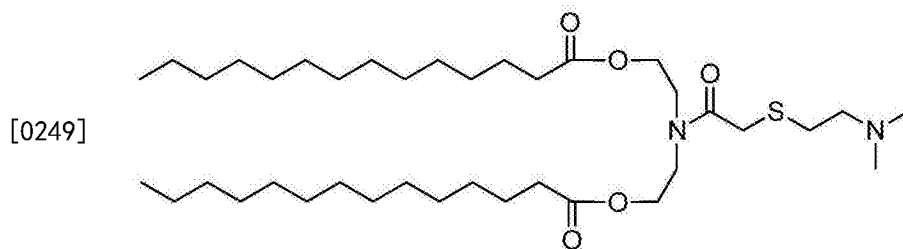


[0246]

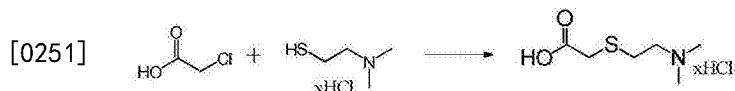


[0247] (Z)-((2-(二甲基氨基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)二油酸酯的合成与i-Prop-DODC类似的方式,用二甲基甘氨酸代替3-(二甲基氨基)丙酸来制备。QTOF MS ESI+:m/z 720.1 (M+H)。

[0248] ((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯(S104)的制备



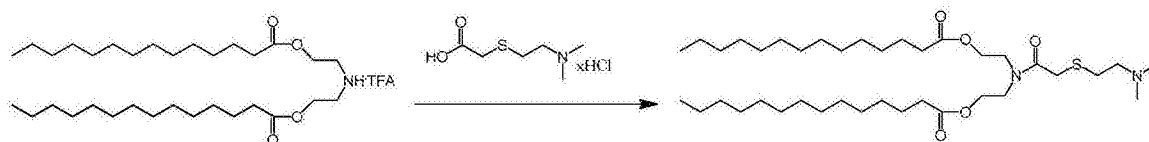
[0250] 步骤1: 中间体1: 2-((2-((2-((二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯的制备



[0252] 将乙醇(500mL)通过抽空三次脱气到60毫巴,保持1-2分钟,并用氮气重新加压。加入氯乙酸(36.9g,0.391mol),并在17-20℃下搅拌5分钟后形成澄清的溶液。加入2-((2-((二甲基氨基)乙基)硫基)乙醇)盐酸盐(52.7g,0.372mol),并在25℃下搅拌20分钟后形成澄清的溶液。经20分钟逐份加入固体氢氧化钠(47.7g,1.19mol),所述过程在冷却下进行,以保持温度低于35℃——观察到短时间为44℃。观察到几乎立即沉淀。最后,将反应混合物加热并在40℃下搅拌2小时,此时,TLC指示反应完成。加入硅藻土545(74g),并将混合物经6分钟过滤通过G3烧结玻璃板,用乙醇(2×105mL)洗涤。将合并的混浊滤液从50℃浴蒸发,得到110g白色固体。将固体溶解在水(250 mL)中,然后使用浓HCl(5.5mL)将pH从13.1(温度为30℃)调节到10.5(温度为31℃),得到非常浅的黄色溶液。将水相用DCM(3×100mL)洗涤,以除去二硫化物杂质(总共需要洗涤三次)。向水相(pH 10.7,温度为22℃)中加入浓HCl,直到pH为1.4(加入57.5mL,温度为35℃)。将水相用DCM(100mL)洗涤,然后浓缩到干燥(浴温为55℃)。加入甲苯(250mL),将混合物浓缩到干燥(浴温为55℃),并将该过程重复一次,得到湿的白色固体(98g)。向固体中加入乙腈(750mL),将混合物在55℃下搅拌45分钟,然后过滤通过G3烧结玻璃板。向滤饼中加入乙腈(250mL),将混合物在55℃下搅拌25分钟,然后过滤通过G3烧结玻璃板,用乙腈(50mL)洗涤。将合并的滤液浓缩到300mL,从而得到大量白色沉淀。将混合物在氮气中冷却,并在0℃下搅拌30分钟。通过过滤通过G3烧结玻璃板分离沉淀,并将滤饼用冷乙腈(100mL)洗涤。在减压下干燥3天得到47.0g(63%) 2-((2-((二甲基氨基)乙基)硫基)乙酸盐酸盐。

[0253] 步骤2: S104: ((2-((2-((二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯的制备

[0254]

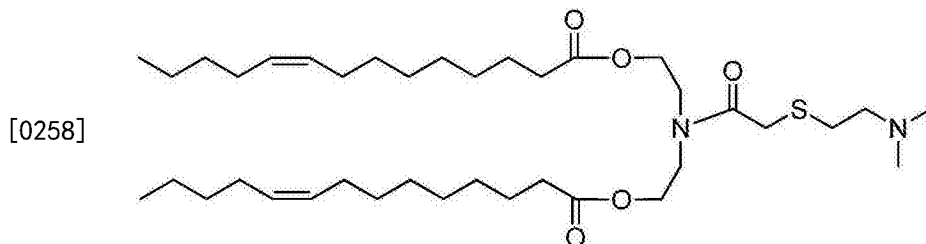


[0255] 上文已经描述了氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐的合成。将氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐(152g,238mmol)与DCM(2.3L)和10%碳酸氢钾(1.15L)一起在0-5℃下搅拌。分离有机相,并将水相用DCM(1.15L)进一步萃取。将合并的有机相与硫酸镁水合物(236g)一起在0-5℃下搅拌30分钟,过滤,并用DCM(1.15L)洗涤。向合并的滤液中加入2-((2-((二甲基氨基)乙基)硫基)乙酸盐酸盐(57.0g,285mmol)、EDC盐酸盐(68.4g,357mmol)和DMAP(2.91g,23.8mmol),并将稀悬浮液在环境温度下搅拌过夜,这段时

间后,形成澄清的溶液。加入水(2.3L)和甲醇(460mL),并在搅拌10分钟后,分离澄清的有机相。将混浊的水相(pH 3.0)用DCM(575mL)萃取。将合并的有机萃取物浓缩,获得143g作为盐酸盐的粗制物质。将粗制物质(142.6g)转移到具有DCM(500mL)的蒸馏烧瓶中,并加入乙酸乙酯(1L)。将溶液在大气压力下加热到蒸馏,并且蒸馏持续70分钟,以获得76℃的温度的残余物。通过加入乙酸乙酯(800mL)获得总共1.4L体积,并加入乙醇(70mL)。将50℃的澄清溶液冷却到37℃,并加入晶种。在37-35℃下在10分钟内观察到开始大量结晶,将悬浮液冷却并在0℃下搅拌过夜,通过过滤分离沉淀,并用冷乙酸乙酯(210mL)洗涤。在环境温度下在油泵真空中经4.5小时干燥到恒重,得到134g重结晶物质,其为盐酸盐形式的白色结晶固体。

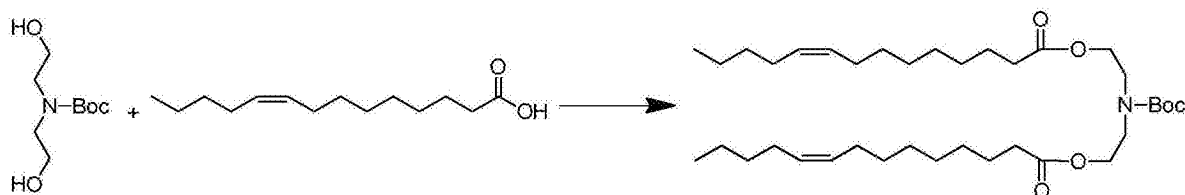
[0256] 向纯净水(1.7L)中加入磷酸三钾(85g,0.40mol)和磷酸氢二钾(226g,1.30mol),并将所形成的pH 10.9的溶液冷却到18-20℃。加入DCM(1.3L)和重结晶的S104盐酸盐(133.0g,0.188mol),并将混合物搅拌10分钟。以中等速率(经35分钟)分离澄清的有机相,并将混浊的水相用DCM(650mL)进一步萃取。将合并的有机相与硫酸镁水合物(65g)一起搅拌40分钟,并将混合物过滤,用DCM(200mL)洗涤。将合并的滤液在减压(低至20毫巴,在所述压力下,持续蒸发1小时)下从50℃水浴蒸发。另外在油泵真空下从15-20℃水浴蒸发,得到126g部分凝固的油。在-20℃的冷却浴中冷却使得完全凝固,并且在真空中在-20℃下干燥2天后获得126g((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯,也称为S104。HPLC指示纯度为98.1%。QTOF MS ESI+:m/z 671.6(M+H)。

[0257] (9Z,9'Z)-((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双(十四-9-烯酸酯)(S104-DMO)的制备



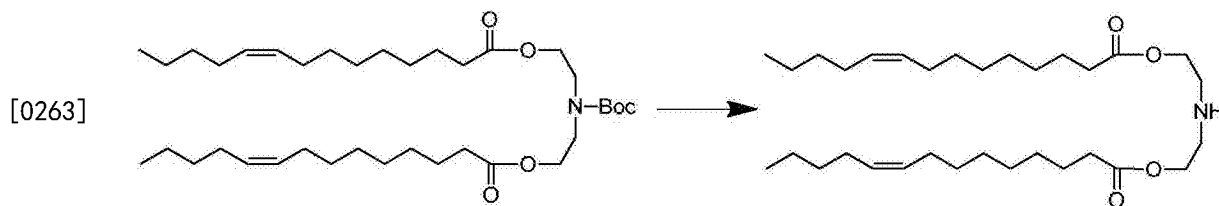
[0259] 步骤1:中间体1:(9Z,9'Z)-((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双(十四-9-烯酸酯)的制备

[0260]



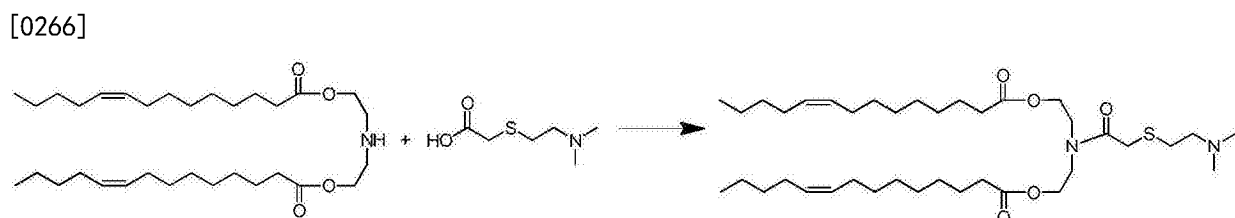
[0261] 将N-Boc-二乙醇胺(454mg,2.21mmol)、肉豆蔻烯酸(1000mg,4.42mmol)和DMAP(54mg,0.442mmol)溶解在DCM(25mL)中,并置于在用惰 性气体冲洗的圆底烧瓶中的在环境温度下的水浴中。经5min分3份加入EDC HCl盐(932mg,4.86mmol)。将反应在室温下在惰性气体氛围中搅拌过夜。第二天,加入H₂O(25mL)并搅拌10min。分离有机层,并将水层用DCM(50mL)进一步萃取。将合并的有机物干燥(MgSO₄)10min,过滤并浓缩。通过硅胶色谱用己烷/乙酸乙酯梯度洗脱进行纯化,获得(9Z,9'Z)-((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双(十四-9-烯酸酯)(1.10g)。

[0262] 步骤2: 中间体2: (9Z,9'Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)双(十四-9-烯酸酯)的制备



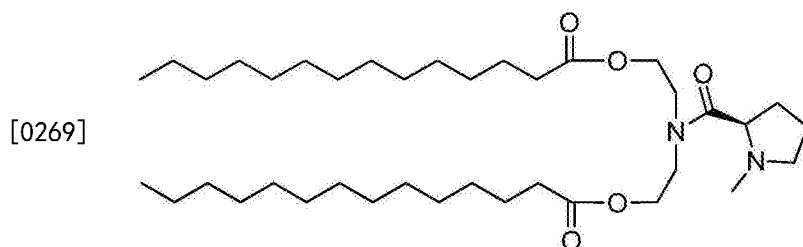
[0264] 向在圆底烧瓶中的 (9Z,9'Z)-((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双(十四-9-烯酸酯) (1100mg, 1.77mmol) 中加入DCM (10mL), 并置于冰浴中。加入TFA (10mL), 并将混合物搅拌20min。然后, 浓缩反应混合物。向残余物中加入甲苯以帮助共沸出过量的TFA。将残余物放回冰浴中, 并加入PBS (pH=11, 25mL) 和DCM (25mL)。将混合物搅拌15min, 然后分离有机层。将混浊的水层用DCM (10mL) 萃取。将合并的有机物在0℃下干燥 (MgSO₄) 15min, 过滤并浓缩, 获得 (9Z,9'Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)双(十四-9-烯酸酯) (923mg)。

[0265] 步骤3: S104-DMO: (9Z,9'Z)-((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双(十四-9-烯酸酯)的制备



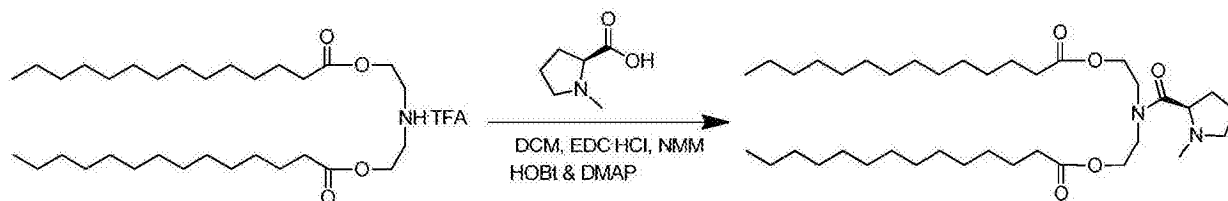
[0267] 将 (9Z,9'Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)双(十四-9-烯酸酯) (923mg, 1.77mmol)、2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酸 (346mg, 2.12mmol) 和EDC HCl盐 (509mg, 2.66mmol) 的混合物悬浮在DCM (10mL) 中。加入DMAP (21.6mg, 0.177mmol), 并将混合物在室温下搅拌过夜。第二天, 加入H₂O (10mL) 和MeOH (10mL), 搅拌10min后, 分离澄清的有机相。将混浊的水相用DCM (2×20mL) 萃取。将合并的有机萃取物用MgSO₄干燥, 过滤并浓缩。通过硅胶色谱用DCM/MeOH洗脱进行纯化后, 将集中并浓缩的流分溶解于DCM (25mL) 和PBS (pH=11, 25mL) 中。将混合物在室温下搅拌约10min。然后, 分离有机相, 并将水相再次用DCM (2×15mL) 萃取。将合并的有机物相干燥 (MgSO₄), 过滤, 并浓缩, 获得 (9Z,9'Z)-((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双(十四-9-烯酸酯) (589mg)。LCMS ESI+: m/z 667.6 (M+H)。

[0268] (R)-((1-甲基吡咯烷-2-羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯 (Pro-DC) 的制备



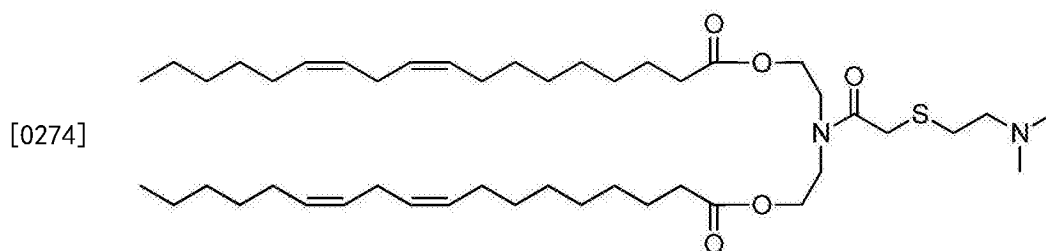
[0270] 步骤1: Pro-DC: (R)-((1-甲基吡咯烷-2-羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯的制备

[0271]



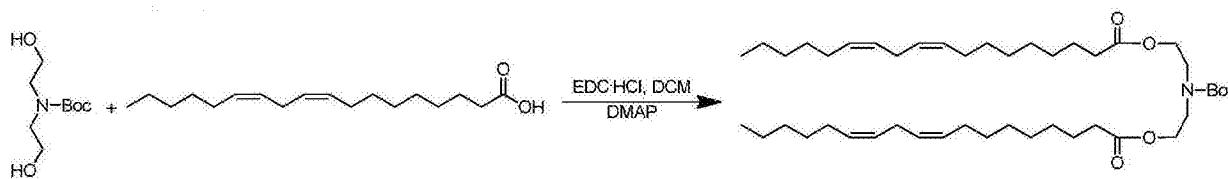
[0272] 上文已经描述了氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐的合成。将氮烷二基双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯TFA盐(1000mg, 1.56mmol)与DCM(10mL)一起搅拌,并加入N-甲基-L-脯氨酸(228mg, 1.77mmol)、HOBT·H₂O(239mg, 1.77mmol)。加入NMM(365μL, 3.32mmol),并且溶液变得近乎澄清。加入EDC盐酸盐(518mg, 2.70mmol)、NMM(257μL, 2.34mmol)和DMAP(19mg, 0.156mmol)在DCM(10mL)中的悬浮液,并将混合物在环境温度下搅拌约12小时,这段时间后,形成澄清的溶液。然后,将混合物用DCM(50mL)稀释,并用10% K₂CO₃水溶液(60mL)洗涤。将有机物用MgSO₄干燥,过滤并浓缩。通过硅胶色谱用在DCM中的(0-10)%甲醇梯度洗脱对所得粗制化合物进行纯化,获得(R)-((1-甲基吡咯烷-2-羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双十四烷酸酯。LCMS ESI+:m/z 637.6 (M+H)。

[0273] (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双(十八-9,12-二烯酸酯)(S104-DLin)的制备



[0275] 步骤1:中间体1:(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双(十八-9,12-二烯酸酯)的制备

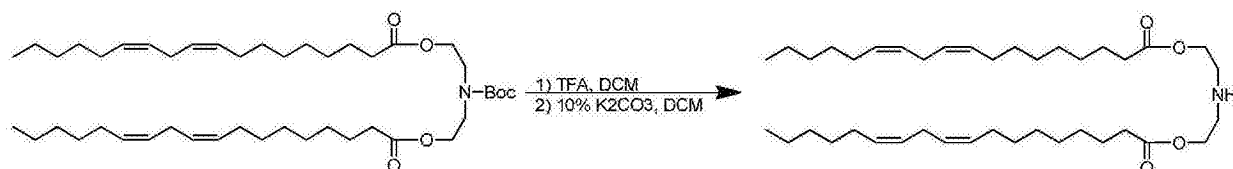
[0276]



[0277] 将N-Boc-二乙醇胺(5g, 24.4mmol)、亚油酸(14.4g, 51.2mmol)和溶解在DCM(100mL)中。加入EDC·HCl盐(10.3g, 53.7mmol),随后加入DMAP(596mg, 4.88mmol)。将反应在室温下在惰性气体氛围中搅拌约12小时。然后,加入50mL水和50mL甲醇,并将混合物搅拌10min。分离有机层,并将水层用DCM(150mL)进一步萃取。将合并的有机物干燥(MgSO₄)10min,过滤并浓缩。通过硅胶色谱用己烷/乙酸乙酯梯度洗脱进行纯化,获得(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((叔丁氧基羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双(十八-9,12-二烯酸酯)(15.9g)。

[0278] 步骤2:中间体2:(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)双(十八-9,12-二烯酸酯)的制备

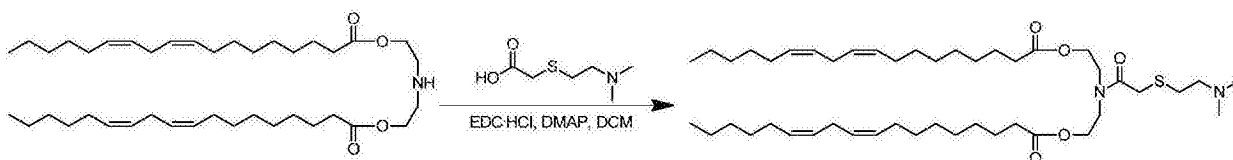
[0279]



[0280] 向在圆底烧瓶中的 (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-(叔丁氧基羰基)氮烷二基双(乙-2,1-二基)双(十八-9,12-二烯酸酯) (5.33g,7.30mmol) 中加入DCM (50mL), 并置于冰浴中。加入TFA (50mL), 并将混合物搅拌30min。然后, 浓缩反应混合物。向残余物中加入甲苯以帮助共沸出过量的TFA。将残余物放回冰浴中, 并加入10%K₂CO₃ (50mL) 和DCM (50mL)。将混合物搅拌15min, 并分离有机层。将混浊的水层用DCM (20mL) 萃取。将合并的有机物干燥 (MgSO₄), 过滤并浓缩, 获得 (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)双(十八-9,12-二烯酸酯) (定量)。

[0281] 步骤3: S104-DLin: (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双(十八-9,12-二烯酸酯)的制备

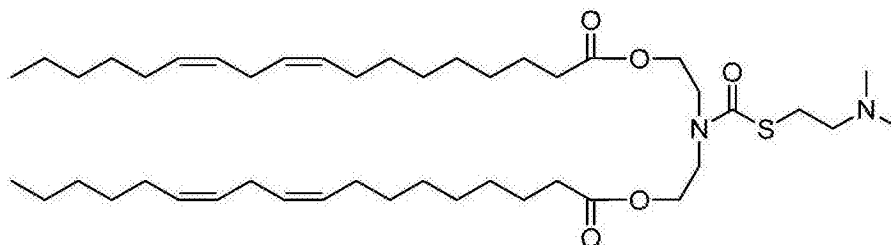
[0282]



[0283] 将 (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)双(十八-9,12-二烯酸酯) (4.68g,7.30mmol)、2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酸 (1.43g,8.76mmol) 和EDC HCl盐 (2.10g,10.95mmol) 的混合物悬浮在DCM (100mL) 中。加入DMAP (89mg,0.73mmol), 在室温下搅拌12小时。加入水和甲醇各50mL, 在搅拌10分钟后, 分离澄清的有机相。将混浊的水相用DCM (2×20mL) 萃取, 并将合并的有机萃取物用PBS (pH=11,100mL) 洗涤。将产物用MgSO₄干燥, 过滤并浓缩。通过硅胶色谱用在DCM中的MeOH梯度洗脱进行纯化。集中并浓缩流分, 获得 (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双(十八-9,12-二烯酸酯) (4.3g)。LCMSESI+:m/z 775.9 (M+H)。

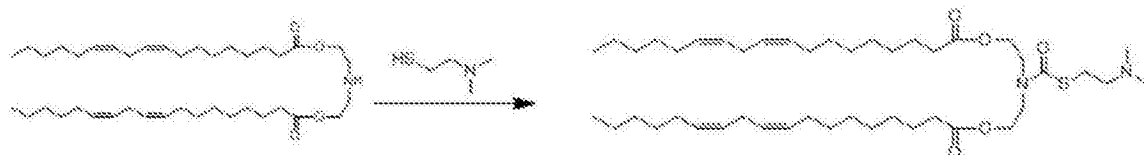
[0284] (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-(((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双(十八-9,12-二烯酸酯) (TU104-DLin) 的制备

[0285]



[0286] 步骤1: TU104-DLin: (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-(((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双(十八-9,12-二烯酸酯)的制备

[0287]



[0288] 上文已经描述了 (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)双(十八-9,12-二烯酸酯)的合成。将氯甲酸三氯甲酯(也称为双光气)(740uL,)添加到(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-氮烷二基双(乙-2,1-二基)双(十八-9,12-二烯酸酯)(2.6g)在无水DCM(40mL)中的溶液中,并在氩气氛围中在室温下搅拌12小时。在真空中除去DCM和过量的双光气。然后,加入2-(二甲基氨基)乙硫醇HCl盐(2.9g)、DCM(40mL)和三乙胺(3.7mL)。在室温下16h后,将反应混合物用DCM稀释,并用10%K₂CO₃(75mL)洗涤,干燥(MgSO₄),过滤,并浓缩。通过硅胶色谱用乙酸乙酯随后用DCM/MeOH梯度洗脱进行纯化,获得(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-(((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)羰基)氮烷二基)双(乙-2,1-二基)双(十八-9,12-二烯酸酯)(850mg)。LCMS ESI+:m/z 761.9 (M+H)。

[0289] 不含diVA的含siRNA的脂质体的形成。将可电离的脂质、DOPE、胆固醇和PEG缀合的脂质以约4.4mg/mL的最终重量浓度溶解在无水EtOH(200标准强度)中。将siRNA以约0.26mg/mL的浓度溶解在柠檬酸盐缓冲液中,并将温度调节到35-40℃。然后,将乙醇/脂质混合物加入含siRNA的缓冲液中,同时搅拌以自发形成负载siRNA的脂质体。将脂质与siRNA组合,以达到7:1-14:1(wt:wt)的最终总脂质与siRNA的比。将所述负载siRNA的脂质体对10倍体积的PBS进行渗滤,以除去乙醇并交换缓冲液。将最终产物通过用于降低生物负荷量的0.22μm除菌级过滤器过滤。该方法获得的脂质体的平均粒径为40-100nm,PDI小于0.2,并且RNA包封(包埋)效率高于85%。

[0290] 用diVA增溶的含siRNA的脂质体的形成。siRNA-diVA-脂质体制剂使用上文所述的方法制备。将diVA-PEG-diVA与其它脂质(可电离的脂质、DOPE、胆固醇和PEG缀合的脂质)共溶在无水乙醇中,然后添加到含siRNA的缓冲液中。diVA-PEG-diVA的摩尔含量在0.1-5摩尔%的范围内。该方法获得的脂质体的平均粒径为40-100nm,PDI小于0.2,并且包埋效率高于85%。

[0291] 具有可电离的脂质和阳离子脂质的含siRNA的脂质体的形成。siRNA-diVA-脂质体制剂和siRNA-脂质体制剂使用上文所述的方法制备。将阳离子脂质与其它脂质(可电离的脂质、DOPE、胆固醇、PEG缀合的脂质和diVA-PEG-diVA)共溶在无水乙醇中,然后加入含siRNA的缓冲液中。阳离子脂质的摩尔含量在5-40摩尔%的范围内。该方法获得的脂质体的平均粒径为40-100nm,PDI小于0.2,并且包埋效率高于85%。

[0292] 体外(pHSC, gp46KD, 在20nM下)功效

[0293] 将在96孔板中的pHSC与制剂一起孵育,所述制剂包含可电离的脂质制剂C104、可电离的脂质制剂Tu104或具有不同比率的可电离的脂质(C104:Tu104)的组合制剂。30分钟后,将培养基更换为新鲜的生长培养基。48小时后,裂解细胞,并通过定量RT-PCR(TaqMan®)测定来测量gp46和GAPDH mRNA水平,并将gp46水平标准化为GAPDH水平。标准化的gp46水平表示为占模拟对照细胞的百分比。误差条指示标准偏差(n=3)。结果示于图1中。如结果所表明,本发明的两种可电离的脂质的组合产生基因表达的观察到的协同降低。

[0294] 用其它可电离的脂质:可电离的脂质和可电离的脂质:阳离子脂质的组合进行了类似的实验。S104-D0:Tu104-D0组合的结果示于图2中。HED0DC:Tu104组合的结果示于图3中。两种可电离的脂质的组合和可电离的脂质:阳离子脂质的组合再次产生基因表达的协同降低。

[0295] 体内 (DMNQ) 功效:

[0296] 在短期肝损伤模型 (称为Quick模型或DMNQ) 中评价了靶向制剂的体内活性。在这个模型中,通过用例如二甲基亚硝胺 (DMN) 的肝毒性剂处理诱导的短期肝损伤伴有gp46mRNA水平的升高。为了诱导这些变化,连续六天给雄性Sprague-Dawley大鼠腹膜内注射DMN。在DMN处理期结束时,将动物基于个别动物的体重随机分组。制剂作为单次IV剂量在最后一次注射DMN后1小时给药。24小时后,切除肝叶,并通过定量RT-PCR (TaqMan) 测定来测定gp46和MRPL19mRNA水平。将gp46的mRNA水平标准化为MRPL19水平。结果示于图4中。对于包封的siRNA的单次0.5mg/kg动物体重的剂量,可电离的脂质:阳离子脂质的几种组合使基因表达降低50%。

[0297] 体外毒理学数据,体外细胞毒性 (HepG2,在200nM下)

[0298] 向本发明的制剂中加入20摩尔%的S104使HepG2细胞毒性测定中的细胞活力从27%改善到52%。

[0299]	制剂	活力%
	40:30:25:5:2 (HEDC:DOPE:胆固醇:Peg-脂质:DiVA)	27 ± 5.3%
	20:20:30:25:5:2 (HEDC:S104:DOPE:胆固醇:Peg-脂质:DiVA)	52 ± 10%

[0300] HepG2细胞毒性测定说明:

[0301] HepG2细胞是从人肝细胞癌获得的贴壁细胞系,将其在补充有10%FBS (Hyclone, Logan,Utah,目录号为SH30910) 的MEM/EBSS (Hyclone,Logan,Utah,目录号为SH30024.01) 中进行培养。将HepG2细胞以5000个细胞/孔接种在96孔Optilux黑板板 (BD Falcon,目录号为BD353220) 中,保持过夜。向每个孔中加入制剂,以达到最终指示的siRNA浓度 (n=3)。在加入制剂后48小时,使用CellTiter-Glo发光细胞活力测定试剂盒 (Promega,目录号为G7572),遵照制造商说明书测定细胞活力。在Clarity发光酶标仪 (502-Biotek,Winooski,Vermont) 上测量化学发光信号。基于对比模拟处理孔标准化的制剂处理孔中化学发光信号的%计算活力。

[0302] 体内毒理学数据

[0303] 如毒性研究中所示,本发明的HEDC:S104 (20:20) 制剂的耐受性非常好。当将制剂分别以高达25mg/kg和12mg/kg的剂量静脉内注射到大鼠和猴中时,没有观察到毒性,这被本领域技术人员认为是优异的。

[0304] 用本发明的制剂的转染:

[0305] 对于LX-2和pHSC,转染方法相同。将本发明的脂质体制剂或脂质复合物制剂以所需浓度与生长培养基混合。将100μl混合物加入96孔板中的细胞中,并将细胞在37℃下在具有5%CO₂的孵育箱中孵育30分钟。30分钟后,培养基更换为新鲜的生长培养基。转染48小时后,将细胞使用Cell-to-Ct裂解试剂 (Applied Biosystems) 根据制造商说明书进行处理。

[0306] 用于测量HSP47mRNA表达的定量(q) RT-PCR

[0307] HSP47和GAPDH TaqMan®测定和One-Step RT-PCR master混合物购自Applied Biosystems。每个PCR反应包含以下组成：5μl One-step RT-PCR混合物、0.25μl TaqMan® RT酶混合物、0.25μl TaqMan®基因表达测定探针 (HSP47)、0.5μl TaqMan®基因表达测定探针 (GAPDH)、3.25μl无RNA酶的水、0.75μl细胞裂解液，总体积为10μl。使用GAPDH作为用于HSP47 mRNA水平的相对定量的内源性对照。定量RT-PCR在ViiA 7实时PCR系统 (Applied Biosciences) 中进行。所有值均标准化为模拟转染细胞的平均HSP47表达，并且表示为与模拟相比HSP47表达的百分比。

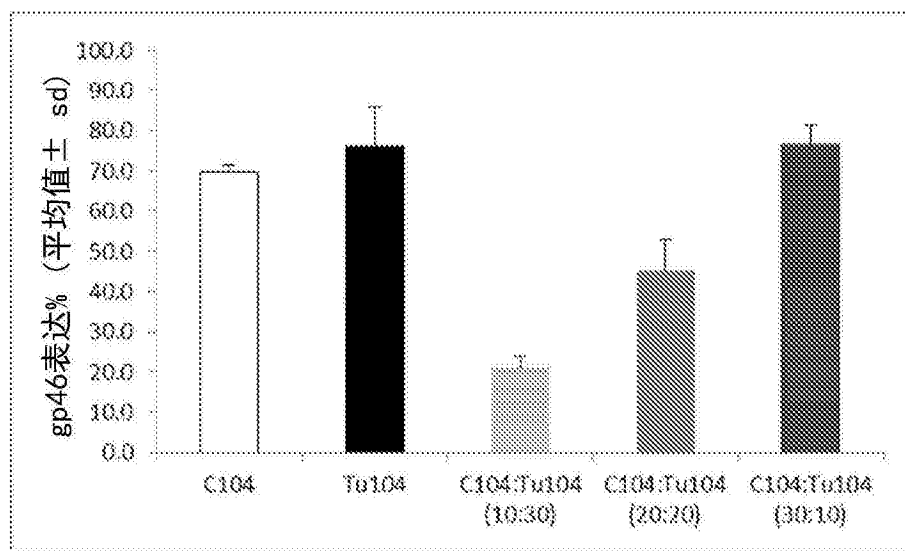


图1

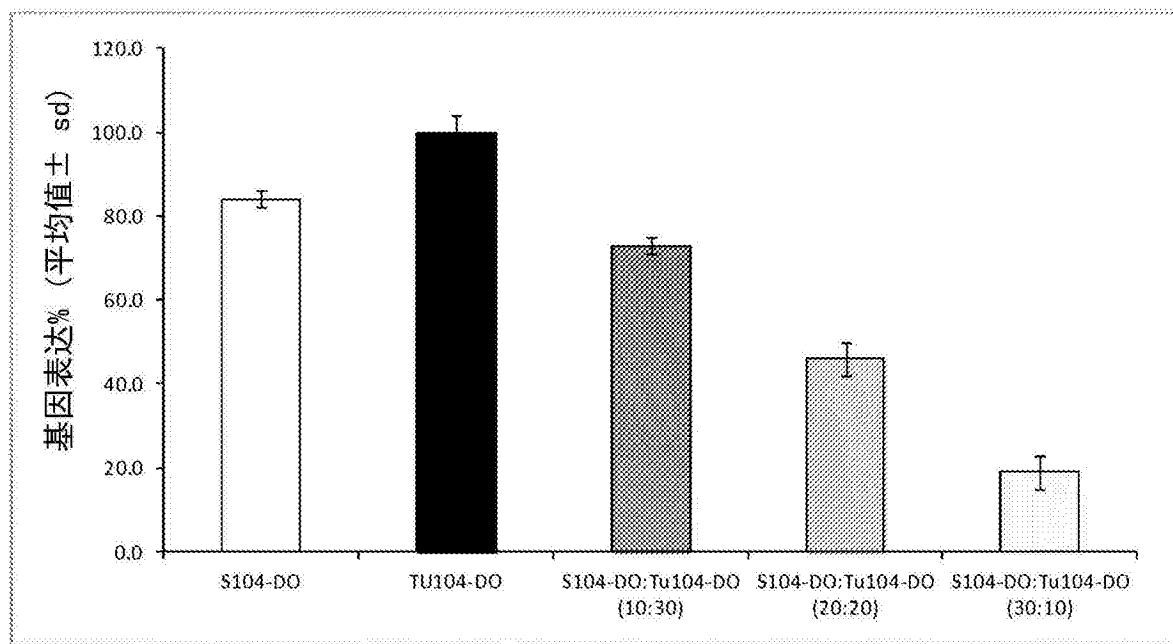


图2

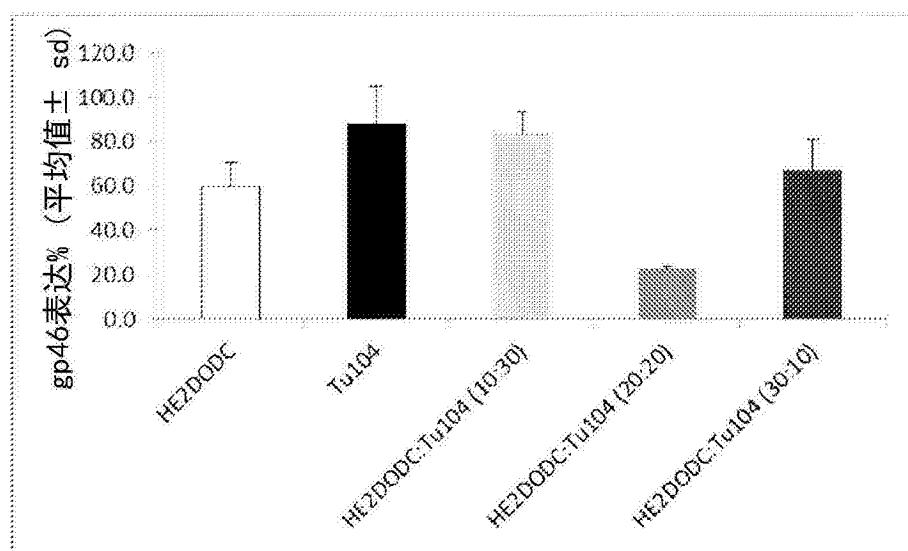


图3

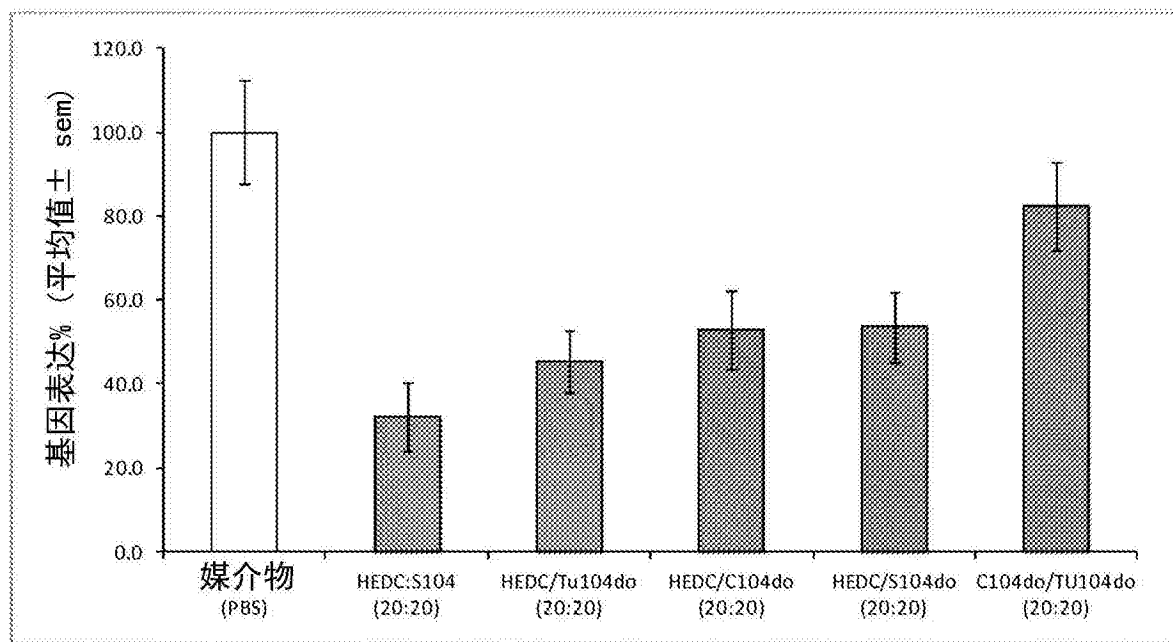


图4