



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I712422 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 12 月 11 日

(21)申請案號：105140746

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 06 月 08 日

(51)Int. Cl. : A61K47/50 (2017.01)

A61K47/44 (2017.01)

(30)優先權：2011/06/08 美國

61/494,710

2011/06/08 美國

61/494,840

(71)申請人：日商日東電工股份有限公司 (日本) NITTO DENKO CORPORATION (JP)
日本(72)發明人：新津洋司郎 NIITSU, YOSHIRO (JP)；潘恩 約瑟夫 E PAYNE, JOSEPH E. (CA)；
侯政 HOU, ZHENG (US)；葛堤 約翰 A GAUDETTE, JOHN A. (US)；納嘉拉堅
史利達 C NAGARAJAN, SRIDHAR C. (US)；諾波夫 維克多 KNOPOV, VICTOR
(CA)；威特 理查 P WITTE, RICHARD P. (US)；阿瑪狄恩 默漢麥德
AHMADIAN, MOHAMMAD (US)；派羅曼 羅倫 A PERELMAN, LOREN A.
(US)；田中康進 TANAKA, YASUNOBU (JP)；寇派恩 凡歐里特 AKOPIAN,
VIOLETTA (CA)；卡馬利 佩利亞 KARMALI, PRIYA (IN)

(74)代理人：陳長文

審查人員：簡正芳

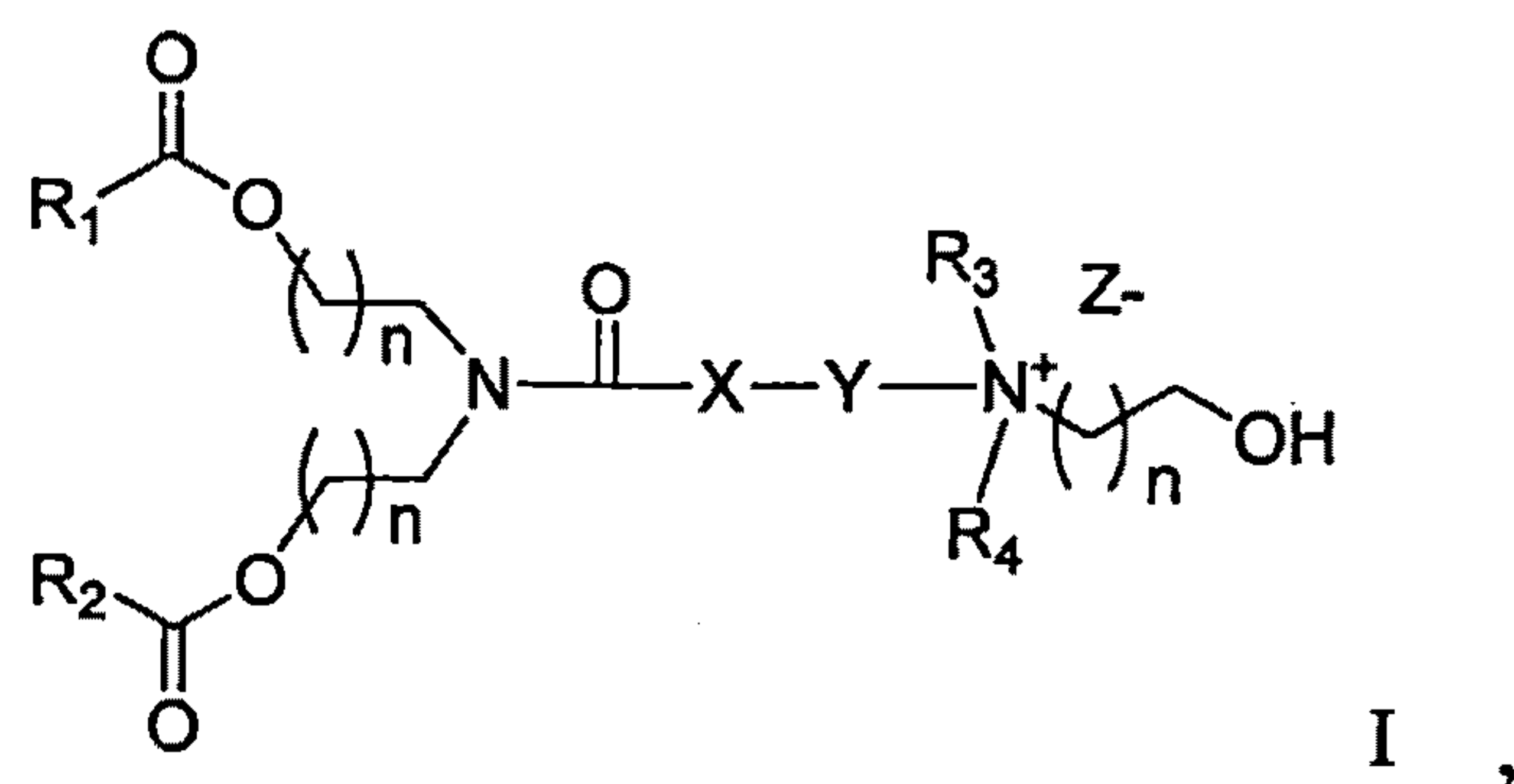
申請專利範圍項數：13 項 圖式數：16 共 140 頁

(54)名稱

標靶藥物遞送及提升 siRNA 活性用脂溶性維生素化合物

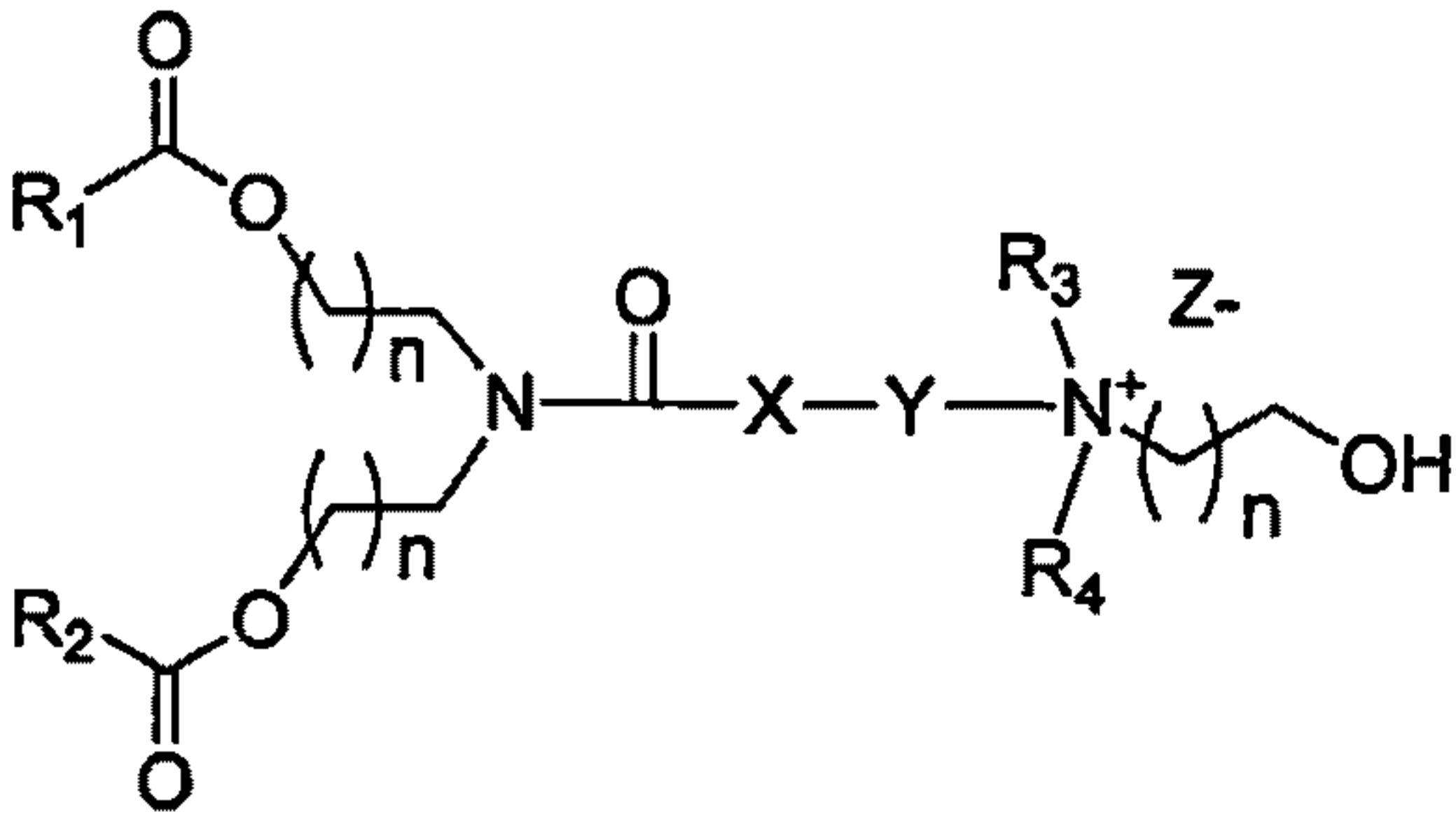
(57)摘要

本文中描述式 I 化合物：



其中 R_1 及 R_2 係獨立地選自由 C_{10} 至 C_{18} 烷基、 C_{12} 至 C_{18} 烯基及油基組成之群；其中 R_3 及 R_4 係獨立地選自由 C_1 至 C_6 烷基及 C_2 至 C_6 烷醇組成之群；其中 X 係選自由 $-CH_2-$ 、 $-S-$ 及 $-O-$ 組成之群，或不存在；其中 Y 係選自 $-(CH_2)_n$ 、 $-S(CH_2)_n$ 、 $-O(CH_2)_n$ 、噻吩、 $-SO_2(CH_2)_n$ 及酯，其中 $n=1$ 至 4；其中 $a=1$ 至 4；其中 $b=1$ 至 4；其中 $c=1$ 至 4；且其中 Z 為相對離子；及由以下結構構成之化合物：(標靶分子) $_n$ -連接基團-(標靶分子) $_n$ ，其中該標靶分子為在標靶細胞上具有特異性受體之類視色素或脂溶性維生素，其中 $n=0$ 、1、2 或 3，且其中該連接基團包含聚乙二醇(PEG)或類似 PEG 之分子；以及適用於遞送治療劑之包括此等化合物中之一或兩者的組合物及醫藥調配物；及使用此等組合物及醫藥調配物之方法。

Here described are compounds of formula I:



wherein R₁ and R₂ is independently selected from a group consisting of C₁₀ to C₁₈ alkyl, C₁₂ to C₁₈ alkenyl, and oleoyl group; wherein R₃ and R₄ are independently selected from a group consisting of H, C₁ to C₆ alkyl, and C₁ to C₆ alkanol; wherein X is selected from a group consisting of -CH₂-, -S-, and -O-; wherein Y is selected from -(CH₂)_n, -S(CH₂)_n, -O(CH₂)_n-, thiophene, -SO₂(CH₂)_n-, and ester, wherein n=1-4; and wherein Z is a counterion; and compounds consisting of the structure (targeting molecule)_n-linker-(targeting molecule)_n, wherein the targeting molecule is a retinoid or a fat soluble vitamin having a specific receptor on the target cell; wherein n=0, 1, 2 or 3; and wherein the linker comprises a polyethylene glycol (PEG) or PEG-like molecule, as well as compositions and pharmaceutical formulations including one or both of these compounds which are useful for the delivery of therapeutic agents; and methods of using these compositions and pharmaceutical formulations.

指定代表圖：

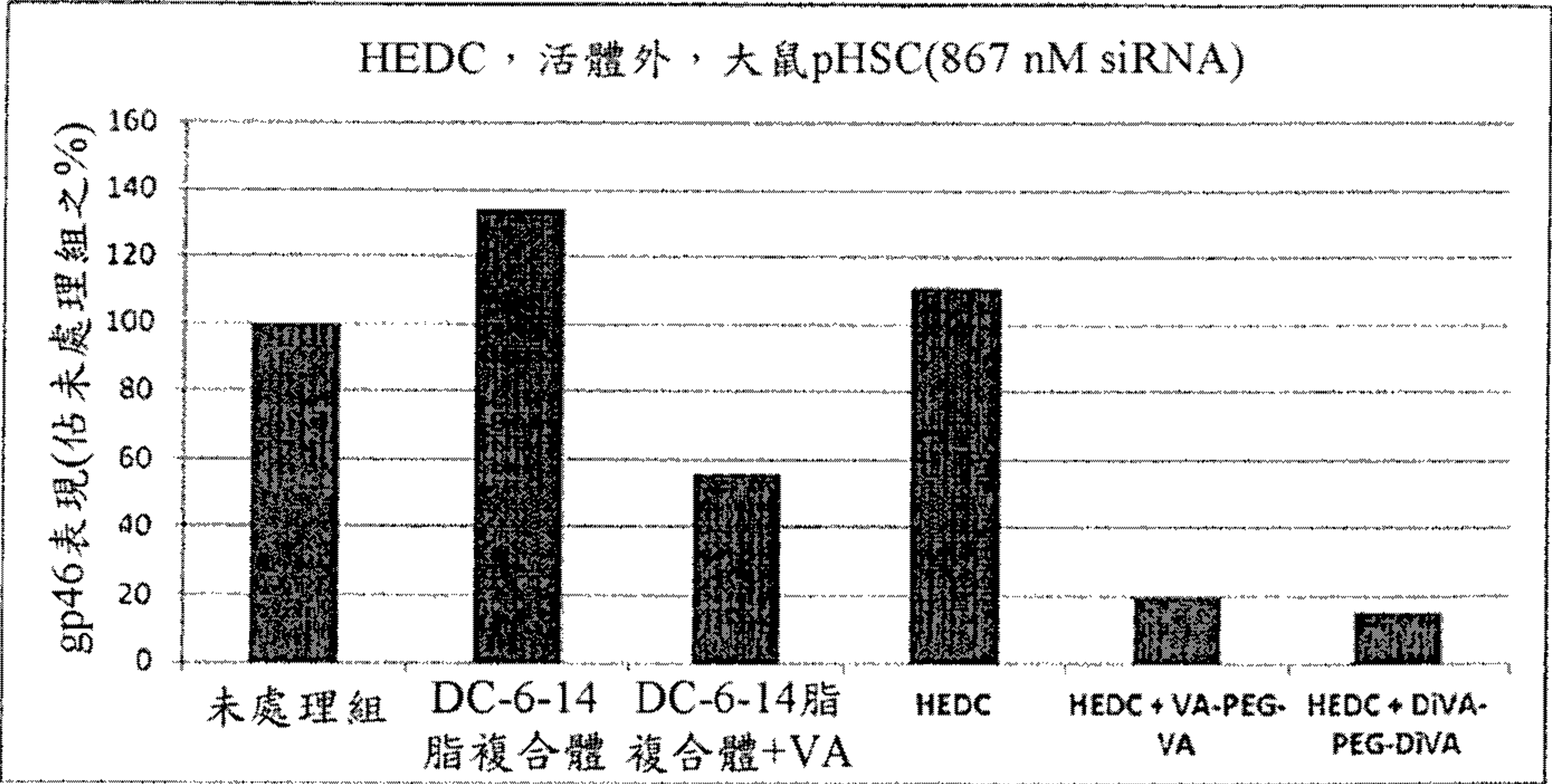
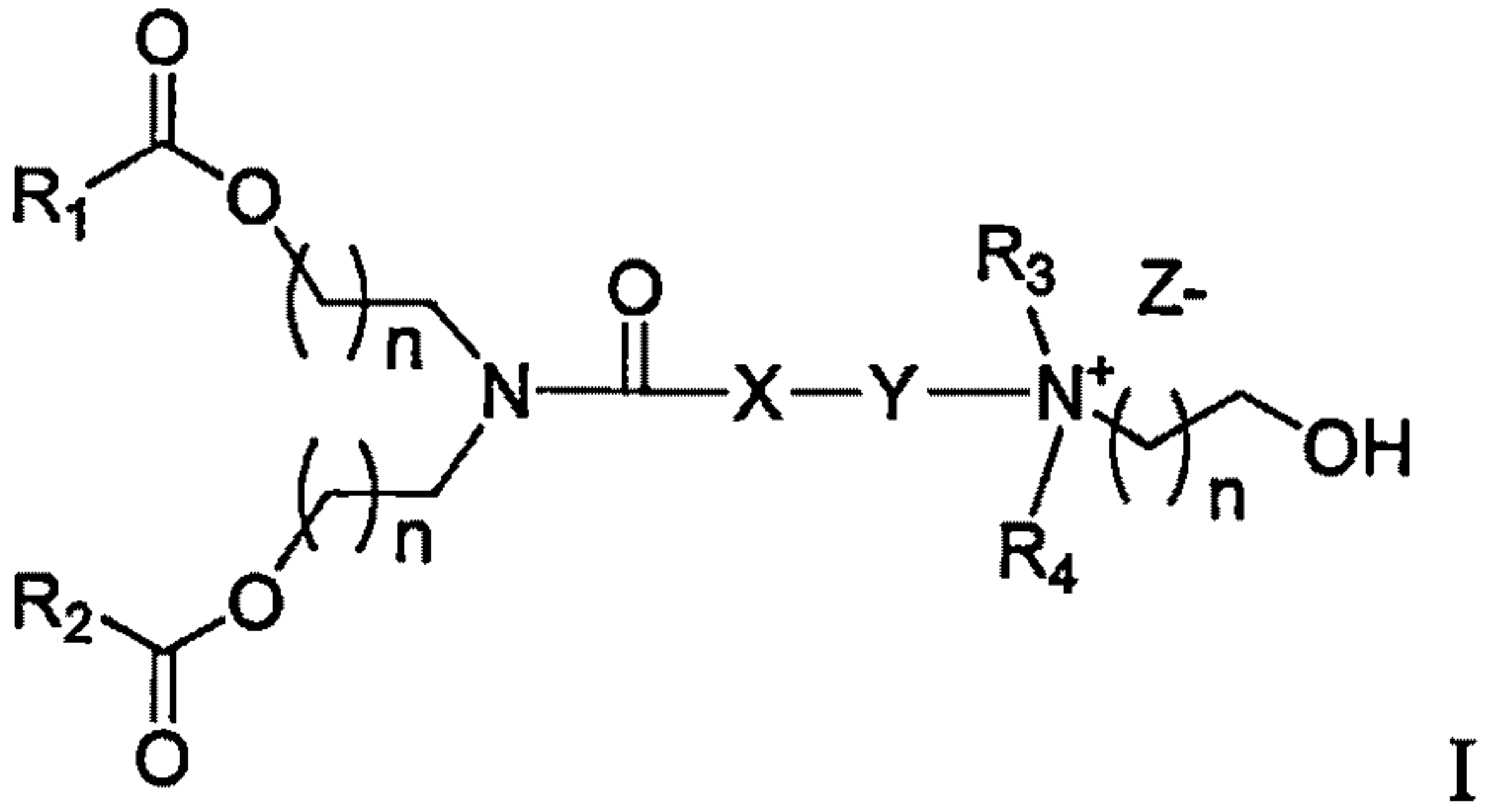


圖1

特徵化學式：



I712422

發明摘要

※ 申請案號：105140746（由101120844分割）

※ 申請日：101/06/08

※IPC 分類：**A61K 47/48** (2006.01)
A61K 47/44 (2006.01)

【發明名稱】

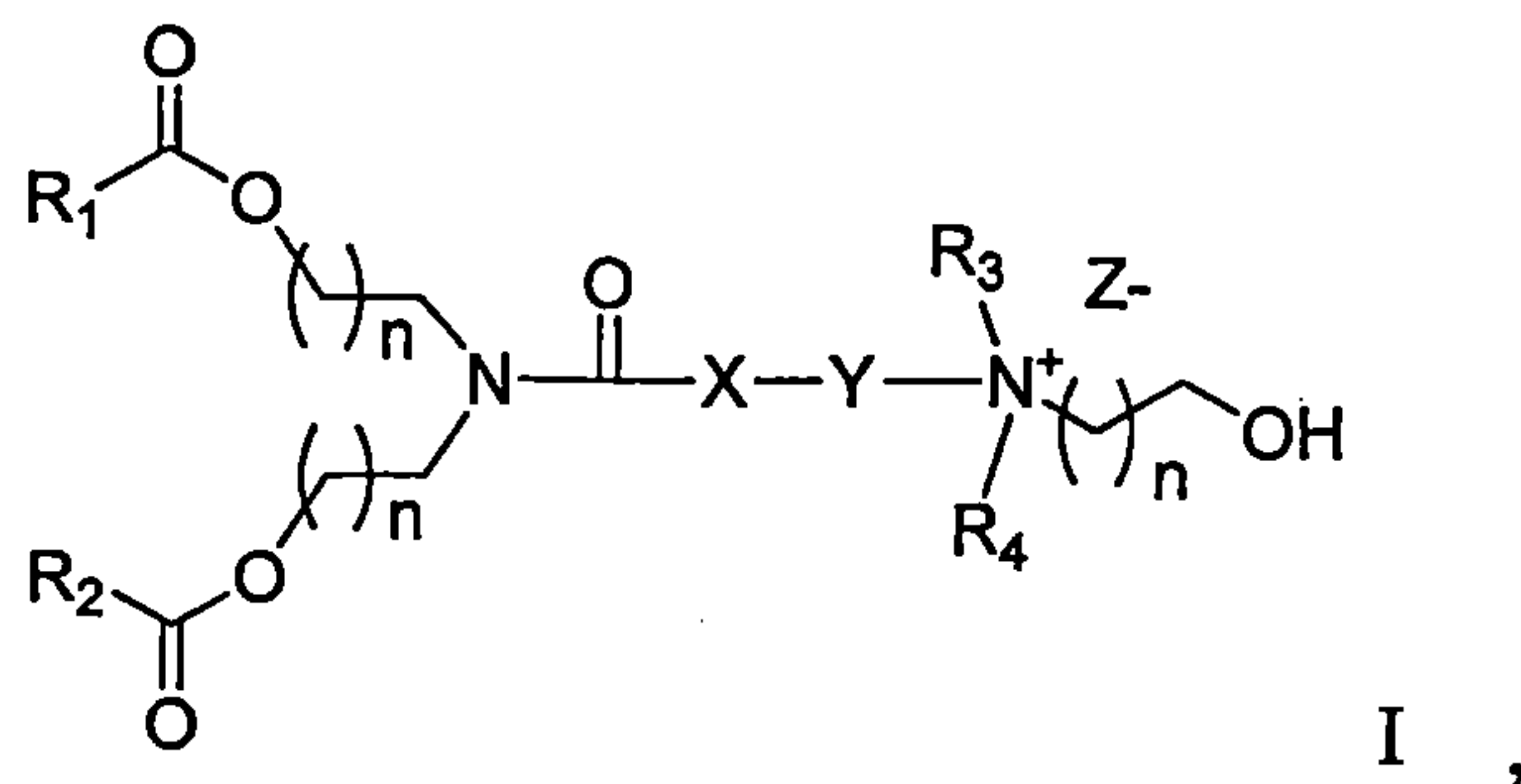
標靶藥物遞送及提升siRNA活性用脂溶性維生素化合物

FAT-SOLUBLE VITAMIN COMPOUNDS FOR TARGETING

DRUG DELIVERY AND ENHANCING siRNA ACTIVITY

【中文】

本文中描述式I化合物：



其中 R_1 及 R_2 係獨立地選自由 C_{10} 至 C_{18} 烷基、 C_{12} 至 C_{18} 烯基及油基組成之群；其中 R_3 及 R_4 係獨立地選自由 C_1 至 C_6 烷基及 C_2 至 C_6 烷醇組成之群；其中X係選自由 $-CH_2-$ 、 $-S-$ 及 $-O-$ 組成之群，或不存在；其中Y係選自由 $-(CH_2)_n$ 、 $-S(CH_2)_n$ 、 $-O(CH_2)_n$ 、噻吩、 $-SO_2(CH_2)_n-$ 及酯，其中 $n=1$ 至4；其中 $a=1$ 至4；其中 $b=1$ 至4；其中 $c=1$ 至4；且其中Z為相對離子；及由以下結構構成之化合物：

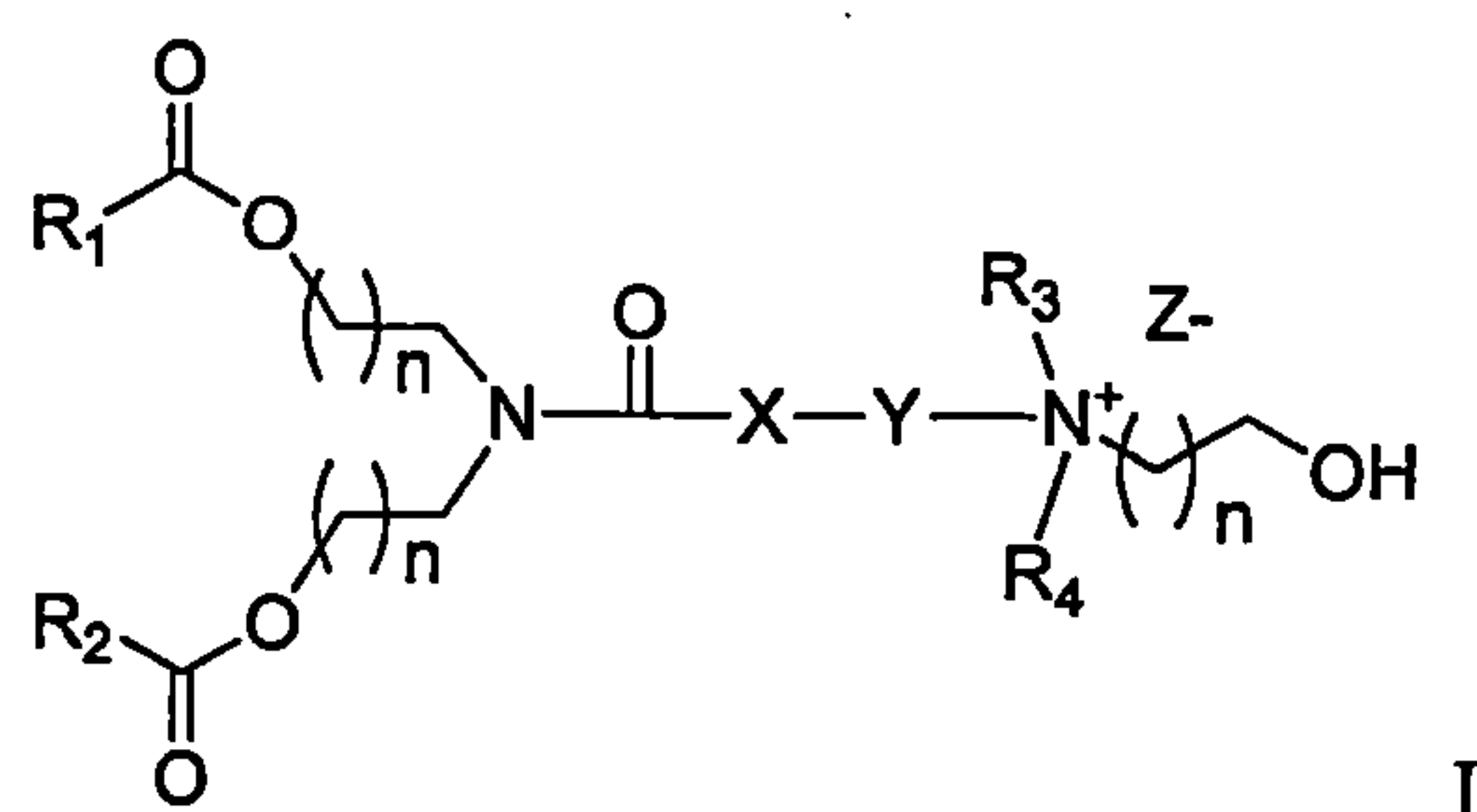
(標靶分子) $_n$ -連接基團-(標靶分子) $_n$ ，

其中該標靶分子為在標靶細胞上具有特異性受體之類視色素或脂溶性維生素，其中 $n=0$ 、1、2或3，且其中該連接基團包含聚乙二醇(PEG)或類似PEG之分子；以及適用於遞送治療劑之包括此等化合物中之一

或兩者的組合物及醫藥調配物；及使用此等組合物及醫藥調配物之方法。

【英文】

Here described are compounds of formula I:



wherein R_1 and R_2 is independently selected from a group consisting of C_{10} to C_{18} alkyl, C_{12} to C_{18} alkenyl, and oleoyl group; wherein R_3 and R_4 are independently selected from a group consisting of H, C_1 to C_6 alkyl, and C_1 to C_6 alkanol; wherein X is selected from a group consisting of $-CH_2-$, $-S-$, and $-O-$; wherein Y is selected from $-(CH_2)_n$, $-S(CH_2)_n$, $-O(CH_2)_n$, thiophene, $-SO_2(CH_2)_n$, and ester, wherein $n = 1-4$; and wherein Z is a counterion; and compounds consisting of the structure



wherein the targeting molecule is a retinoid or a fat soluble vitamin having a specific receptor on the target cell; wherein $n=0, 1, 2$ or 3 ; and wherein the linker comprises a polyethylene glycol (PEG) or PEG-like molecule, as well as compositions and pharmaceutical formulations including one or both of these compounds which are useful for the delivery of therapeutic agents; and methods of using these compositions and pharmaceutical formulations.

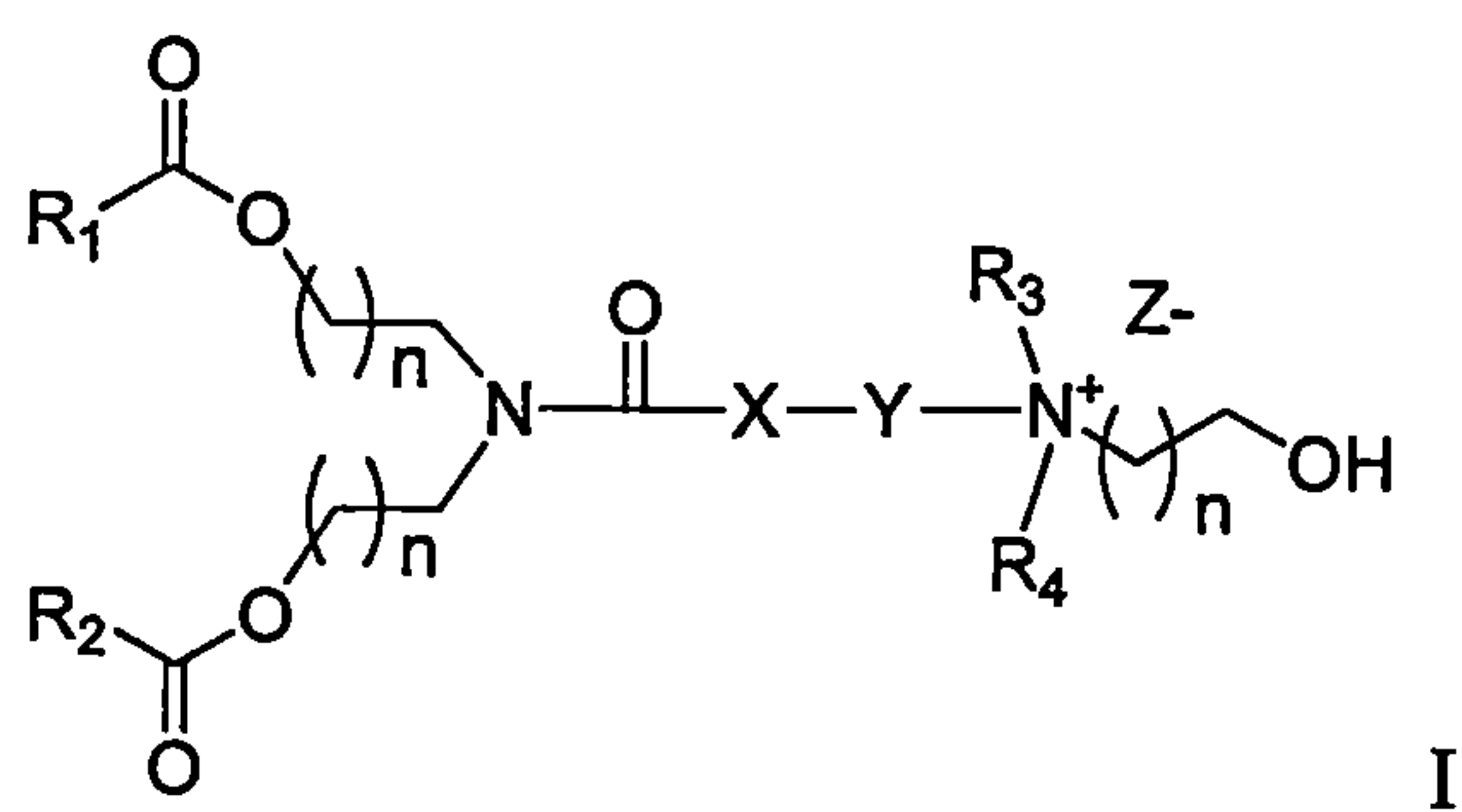
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

標靶藥物遞送及提升siRNA活性用脂溶性維生素化合物

FAT-SOLUBLE VITAMIN COMPOUNDS FOR TARGETING

DRUG DELIVERY AND ENHANCING siRNA ACTIVITY

【技術領域】

本發明係關於陽離子脂質及脂溶性維生素化合物靶向及提升治療性分子(包括siRNA)之活性之用途。

相關申請案之交叉引用

本申請案主張2011年6月8日申請之美國臨時申請案第61/494,840號及第61/494,710號之權益，該等臨時申請案係以全文引用的方式併入本文中。

【先前技術】

肝臟纖維化可能由活化肝星狀細胞(hepatic stellate cell, HSC)引起，導致複數種膠原蛋白分子及纖維結合蛋白沈積於間質組織上。此會導致肝硬化、肝衰竭及/或肝細胞癌。此外，慢性胰臟炎由於胰纖維化以與肝纖維化相同之機制而發生(Madro等人，2004; Med Sci Monit. 10:RA166-70; Jaster, 2004, Mol Cancer. 6:26)。此外，星狀細胞存在於聲帶及喉之聲帶病症(諸如聲帶疤痕、聲帶黏膜纖維化及喉纖維化)中。為了預防或治療此等器官及身體其他位置之纖維化，希望開發藥物載劑及藥物載劑套組。

星狀細胞為治療纖維化之重要標靶候選物之一(Fallowfield等人，2004, Expert Opin Ther Targets. 8:423-35; Pinzani等人，2004, Dig Liver Dis.36:231-42)。在纖維化期間，星狀細胞由附近細胞之細

胞因子活化。已知星狀細胞為維生素A之儲存細胞，且屬於肌纖維母細胞家族，且產生多種因子，其導致肝纖維化。

預防或治療纖維化之治療方法嘗試控制膠原蛋白代謝、膠原蛋白降解系統之促進及星狀細胞活化之抑制。然而，在所有情況下，因為作用特異性及/或器官特異性低，所以存在功效有限及有不良副作用之問題。

抑制膠原蛋白合成尚未確定為治療方法。靶向膠原蛋白產生之分子之效能因可能導致副作用而受限。直接抑制膠原蛋白產生將會為預防或治療纖維化之明顯的治療方法。為了達成此效應，需要控制膠原蛋白I型至IV型之各種類型中之一或多者。實現此之方法可為經由HSP47(一種膠原蛋白特異性分子伴隨蛋白)達成，該蛋白對於為各種類型之膠原蛋白所需之胞內運輸及分子成熟為至關重要的。因此，若可特異性控制HSP47在器官之星狀細胞中之功能，則可能抑制器官中之肝纖維化。

許多技術可用於遞送治療劑(諸如siRNA)至細胞中，包括使用病毒轉染系統及非病毒轉染系統。非病毒轉染系統可包括例如聚合物、脂質、脂質體、微胞、樹枝狀聚合物及奈米材料。先前已關於細胞轉染作過研究之聚合物的實例包括陽離子聚合物，諸如聚(L-離胺酸)(PLL)、聚(伸乙基亞胺)(PEI)、聚葡萄糖胺糖及聚甲基丙烯酸(2-二甲基胺基)乙酯(pDMAEMA)。

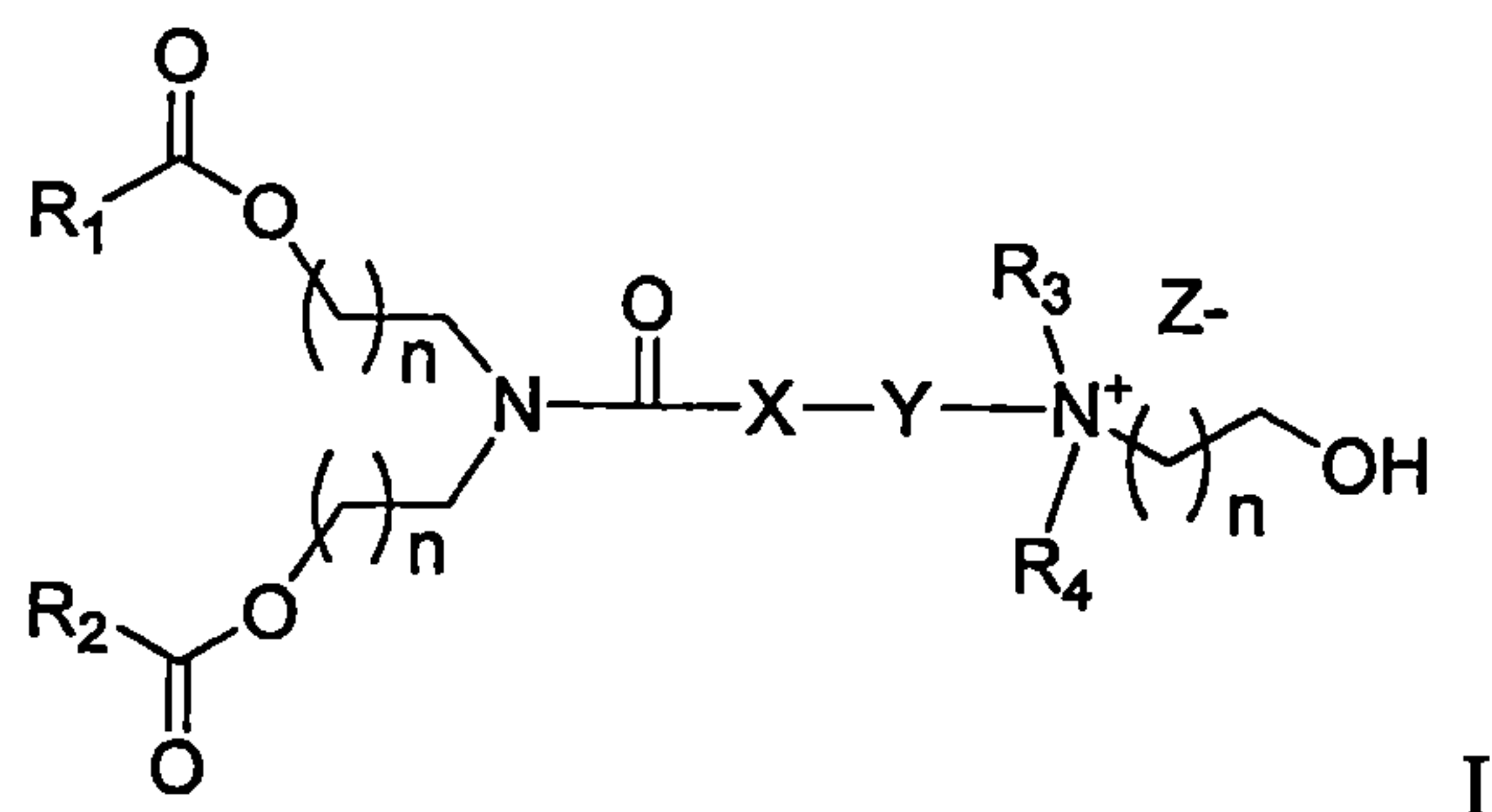
各類系統具有其各別優勢及缺陷。舉例而言，病毒系統可獲得高轉染效率，但可能不如一些非病毒系統安全。此外，病毒系統之製備可能為複雜及/或昂貴的。已報導非病毒轉染系統(諸如陽離子聚合物)可將質體DNA轉移至細胞中。然而，使用陽離子聚合物的一些缺陷包括其對細胞有毒性及/或其缺乏穩定性。

因此，急切需要新穎化合物、組合物及使用陽離子組分的方法

來改良治療藥物(包括核酸)向細胞、組織及生物之遞送。

【發明內容】

本說明書之一個態樣為式I化合物：



其中 R_1 及 R_2 係獨立地選自由 C_{10} 至 C_{18} 烷基、 C_{12} 至 C_{18} 烯基及油基組成之群；其中 R_3 及 R_4 係獨立地選自由 C_1 至 C_6 烷基及 C_2 至 C_6 烷醇組成之群；其中X係選自由 $-CH_2-$ 、 $-S-$ 及 $-O-$ 組成之群，或不存在；其中Y係選自由 $-(CH_2)_n$ 、 $-S(CH_2)_n$ 、 $-O(CH_2)_n$ 、噻吩、 $-SO_2(CH_2)_n-$ 及酯，其中 $n=1$ 至4；其中 $a=1$ 至4；其中 $b=1$ 至4；其中 $c=1$ 至4；且其中Z為相對離子。

在一個態樣中，本發明提供一種有助於藥物遞送至標靶細胞之化合物，該化合物由結構(標靶分子) $_n$ -連接基團-(標靶分子) $_n$ 構成，其中該標靶分子為在標靶細胞上具有特異性受體或活化/結合位點之類視色素；其中 $n=0$ 、1、2或3；且其中該連接基團包含聚乙二醇(PEG)或類似PEG之分子。

在一個實施例中，類視色素係選自由以下組成之群：維生素A、視黃酸、維甲酸、阿達帕林(adapalene)、4-羥基(苯基)視黃醯胺(4-HPR)、棕櫚酸視黃酯、視黃醛、飽和視黃酸及飽和脫甲基視黃酸。

在另一實施例中，連接基團係選自由以下組成之群：雙醯胺基-PEG、參醯胺基-PEG、四醯胺基-PEG、Lys-雙醯胺基-PEG Lys、Lys-參醯胺基-PEG-Lys、Lys-四醯胺基-PEG-Lys、Lys-PGE-Lys、

PEG2000、PEG1250、PEG1000、PEG750、PEG550、PEG-Glu、Glu、C6、Gly3及GluNH。

在另一實施例中，該化合物係選自由以下組成之群：類視色素-PEG-類視色素、(類視色素)₂-PEG-(類視色素)₂、VA-PEG2000-VA、(類視色素)₂-雙醯胺基-PEG-(類視色素)₂、(類視色素)₂-Lys-雙醯胺基-PEG-Lys-(類視色素)₂。

在另一實施例中，類視色素係選自由以下組成之群：維生素A、視黃酸、維甲酸、阿達帕林、4-羥基(苯基)視黃醯胺(4-HPR)、棕櫚酸視黃酯、視黃醛、飽和視黃酸及飽和脫甲基視黃酸。

在另一實施例中，該化合物為下式化合物：



其中q、r及s各自獨立地為1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

在另一實施例中，化合物之化學式包含：



在另一態樣中，本發明提供一種星狀細胞特異性藥物載劑，該藥物載劑包含星狀細胞特異性量之類視色素分子，該類視色素分子由

結構(類視色素)_n-連接基團-(類視色素)_n構成；其中n=0、1、2或3；且其中連接基團包含聚乙二醇(PEG)或類似PEG之分子。

在另一實施例中，本發明提供一種包含脂質體組合物之組合物。在其他實施例中，脂質體組合物包含脂囊泡，該脂囊泡包含雙層脂質分子。

在某些實施例中，類視色素分子在藥物載劑到達星狀細胞之前在藥物載劑之外部至少部分暴露。

在另一實施例中，類視色素為脂質分子之0.2莫耳%至20莫耳%。

在本發明中，亦提供其中脂質分子包含一或多種選自由以下組成之群之脂質的實施例：HEDC、DODC、HEDODC、DSPE、DOPE及DC。在另一實施例中，脂質分子進一步包含S104。

在某些實施例中，藥物載劑包含核酸。

在其他實施例中，核酸為能夠阻斷星狀細胞中之hsp47 mRNA表現的siRNA。

在另一態樣中，本發明提供一種有助於藥物遞送至標靶細胞之化合物，該化合物由結構(脂質)_n-連接基團-(標靶分子)_n構成，其中標靶分子為在標靶細胞上具有特異性受體或活化/結合位點之類視色素或脂溶性維生素；其中n=0、1、2或3；且其中連接基團包含聚乙二醇(PEG)分子。

在一個實施例中，脂質係選自由以下組成之群中之一或多者：DODC、HEDODC、DSPE、DOPE及DC。

在另一實施例中，類視色素係選自由以下組成之群：維生素A、視黃酸、維甲酸、阿達帕林、4-羥基(苯基)視黃醯胺(4-HPR)、棕櫚酸視黃酯、視黃醛、飽和視黃酸及飽和脫甲基視黃酸。

在本發明之另一實施例中，脂溶性維生素為維生素D、維生素E或維生素K。

在另一實施例中，連接基團係選自由以下組成之群：雙醯胺基-PEG、參醯胺基-PEG、四醯胺基-PEG、Lys-雙醯胺基-PEG Lys、Lys-參醯胺基-PEG-Lys、Lys-四醯胺基-PEG-Lys、Lys-PGE-Lys、PEG2000、PEG1250、PEG1000、PEG750、PEG550、PEG-Glu、Glu、C6、Gly3及GluNH。

在另一實施例中，本發明係選自由以下組成之群：DSPE-PEG-VA、DSPE-PEG2000-Glu-VA、DSPE-PEG550-VA、DOPE-VA、DOPE-Glu-VA、DOPE-Glu-NH-VA、DOPE-Gly3-VA、DC-VA、DC-6-VA及AR-6-VA。

【圖式簡單說明】

圖1展示本說明書之某些實施例之阻斷功效。此包括HEDC脂質體與DC-6-14脂複合體對照物之比較。

圖2展示使用陽離子脂質阻斷基因表現之活體外比較。

圖3展示關於本發明之例示性HEDDC脂質體調配物的活體內基因表現評估結果(*指示 $p < 0.05$)。

圖4展示關於實例15之例示性HEDC脂質體調配物的活體外基因表現評估結果。誤差杠指示標準差($n=3$)。基於最佳擬合展示S形劑量-反應曲線。根據曲線計算 EC_{50} 值。此經指示為11.8 nM。

圖5展示使用大鼠DMNQ模型在活體內量測之結果。在減去由未處理組確定之背景gp46 mRNA含量之後，針對媒劑組之平均gp46 mRNA校正所有測試組值(以媒劑組之百分比表示)。處理後之平均gp46 mRNA含量展示劑量依賴性反應及曲線擬合為S形劑量反應曲線。所計算之 EC_{50} 值為0.79 mg/kg。

圖6展示使用大鼠DMNC模型在活體內量測之結果。在減去由未處理組確定之背景gp46 mRNA含量之後，針對媒劑組之平均gp46 mRNA校正所有測試組值(以媒劑組之百分比表示)。藉由定量RT-

PCR(TaqMan)分析測定MRPL19 mRNA含量。針對MRPL19含量校正gp46之mRNA含量。(***)指示 $p < 0.02$ 。)

圖7展示使用大鼠肺博萊黴素模型在活體內量測之結果。在減去由未處理組確定之背景gp46 mRNA含量之後，針對媒劑組之平均gp46 mRNA校正所有測試組值(以媒劑組之百分比表示)。藉由定量RT-PCR(TaqMan)分析測定MRPL19 mRNA含量。針對MRPL19含量校正gp46之mRNA含量。

圖8經由裝飾添加VA-結合物至脂質體提升siRNA活性。

圖9經由共溶解化添加VA-結合物至脂質體提升siRNA活性。

圖10經由共溶解化添加VA-結合物至脂質體提升siRNA活性。

圖11經由共溶解化添加VA-結合物至脂複合體提升siRNA活性。

圖12經由共溶解化添加VA-結合物至脂複合體與經由裝飾添加VA-結合物至脂複合體的比較。

圖13小鼠中之活體內功效測試。

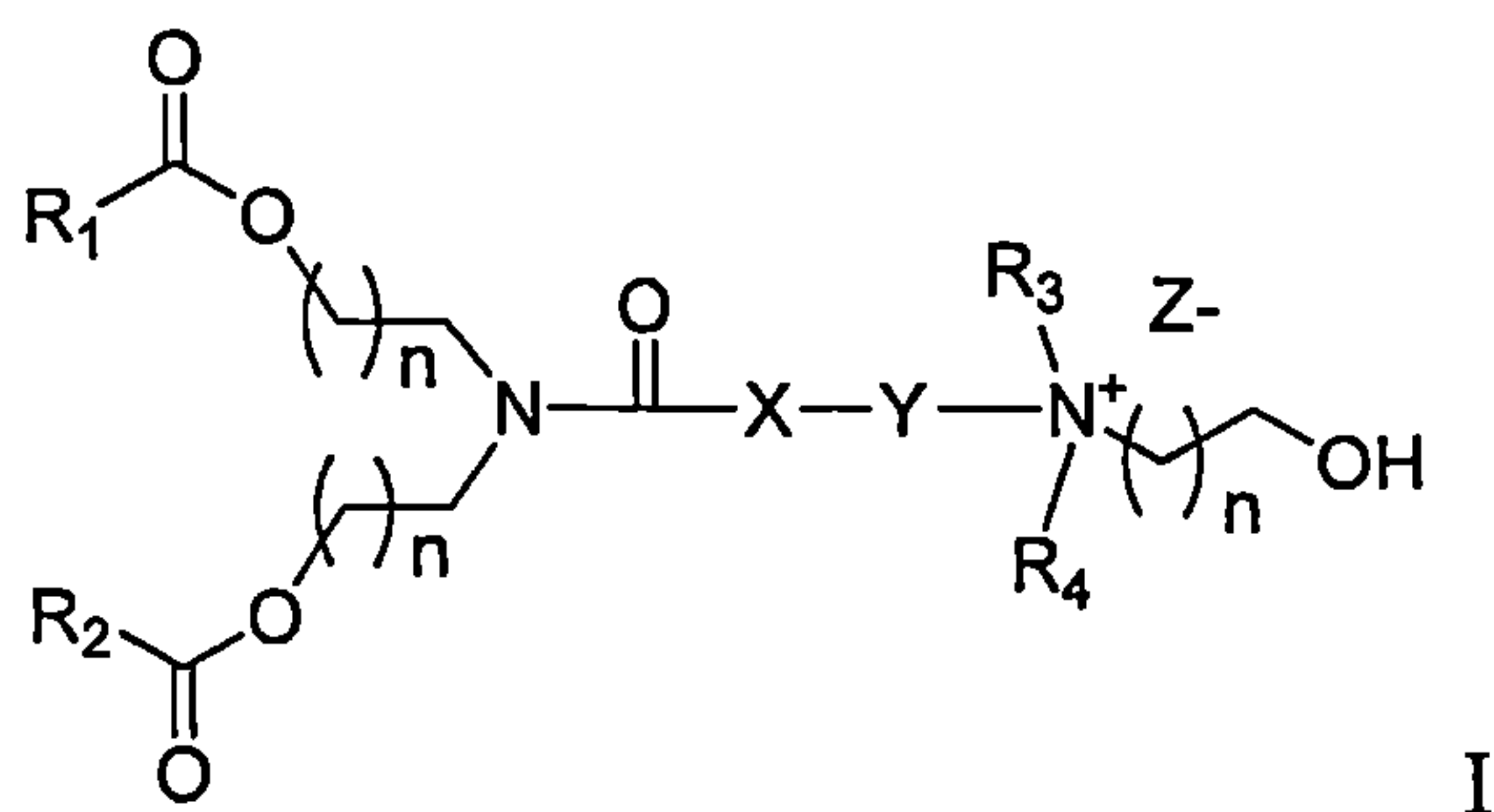
圖14小鼠中之活體內功效測試。

圖15脂質中之類視色素結合物之活體外功效(pHSC)、效應。

圖16類視色素結合物含量(莫耳%)與活體內(大鼠DMNQ)功效之關係。

【實施方式】

式I化合物屬於本說明書之範疇內：



其中 R_1 及 R_2 係獨立地選自由 C_{10} 至 C_{18} 烷基、 C_{12} 至 C_{18} 烯基及油基組成之群；其中 R_3 及 R_4 係獨立地選自由 C_1 至 C_6 烷基及 C_2 至 C_6 烷醇組成之群；其中 X 係選自由 $-CH_2-$ 、 $-S-$ 及 $-O-$ 組成之群，或不存在；其中 Y 係選自由 $-(CH_2)_n$ 、 $-S(CH_2)_n$ 、 $-O(CH_2)_n$ 、噻吩、 $-SO_2(CH_2)_n-$ 及酯，其中 $n=1$ 至 4 ；其中 $a=1$ 至 4 ；其中 $b=1$ 至 4 ；其中 $c=1$ 至 4 ；且其中 Z 為相對離子。

本發明化合物在本文中亦稱為屬於稱為「陽離子脂質」之化合物之類別內。陽離子脂質為包括至少一個脂質部分及與相對離子締合之帶正電荷之氮的化合物。「脂質」在此項技術中應理解為包含疏水性烷基或烯基部分及羧酸或酯部分。

迄今已發現式I化合物之胺基-烷基-羥基($-N$ -烷基- $-OH$)部分賦予本發明調配物以先前在先前報導之其他陽離子脂質情況下未發現的性質。與不包括式I化合物之調配物相比，包括式I化合物之本發明調配物使得蛋白表現大幅減少。尤其令人驚訝的是包括式I化合物之本發明調配物減少HSP47表現之能力。

本發明之較佳化合物包括其中 R_1 及 R_2 各自獨立地為 C_{10} - C_{30} 烷基之化合物。在更佳實施例中， R_1 及 R_2 各自獨立地為 C_{10} - C_{20} 烷基。在甚至更佳的實施例中， R_1 及 R_2 各自獨立地為 C_{12} - C_{18} 烷基。尤其較佳的實施例包括其中 R_1 及 R_2 各自獨立地為 C_{13} - C_{17} 烷基之化合物。最佳為其中 R_1 及 R_2 各自為 C_{13} 烷基之彼等化合物。

在其他實施例中， R_1 及 R_2 各自獨立地為 C_{10} - C_{30} 烯基。在更佳實施例中， R_1 及 R_2 各自獨立地為 C_{10} - C_{20} 烯基。在其他實施例中， R_1 及 R_2 各自獨立地為 C_{12} - C_{18} 烯基。在其他實施例中， R_1 及 R_2 各自獨立地為 C_{13} - C_{17} 烯基。本發明之最佳化合物包括其中 R_1 及 R_2 各自為 C_{17} 烯基之化合物。

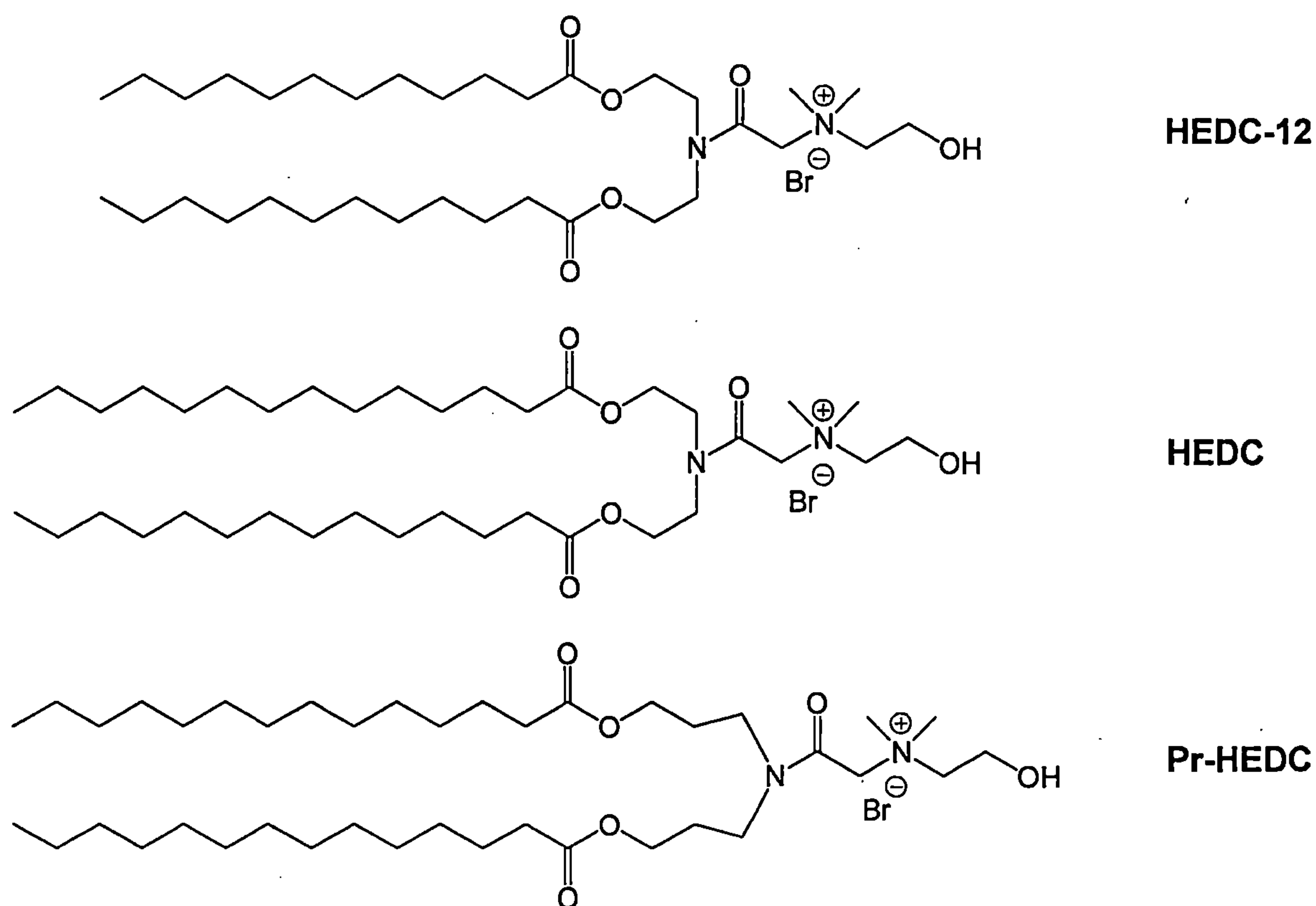
又，在式I化合物中， R_3 及 R_4 係獨立地選自由 C_1 至 C_6 烷基組成之

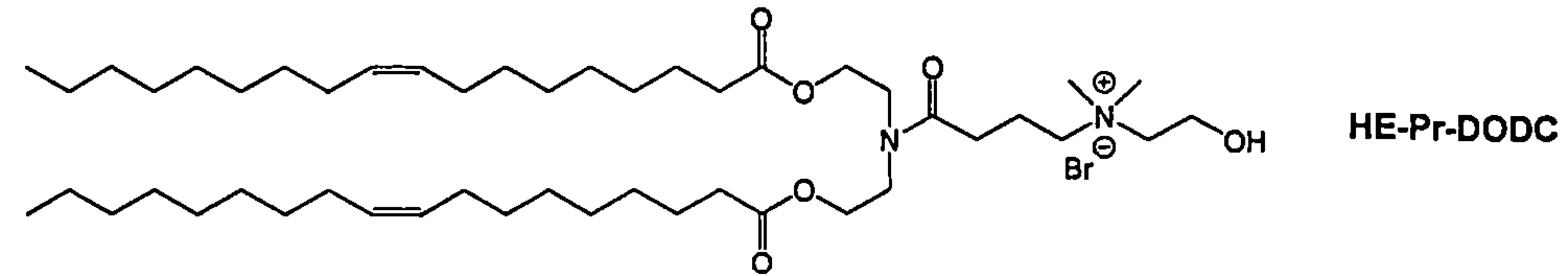
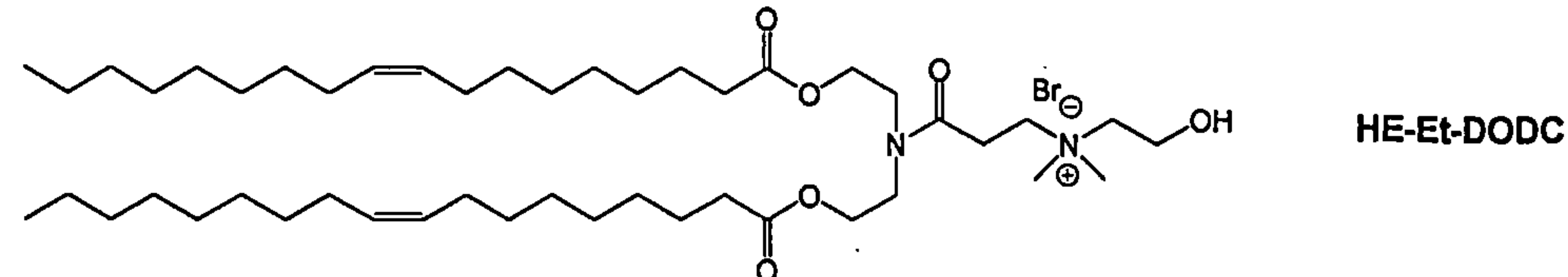
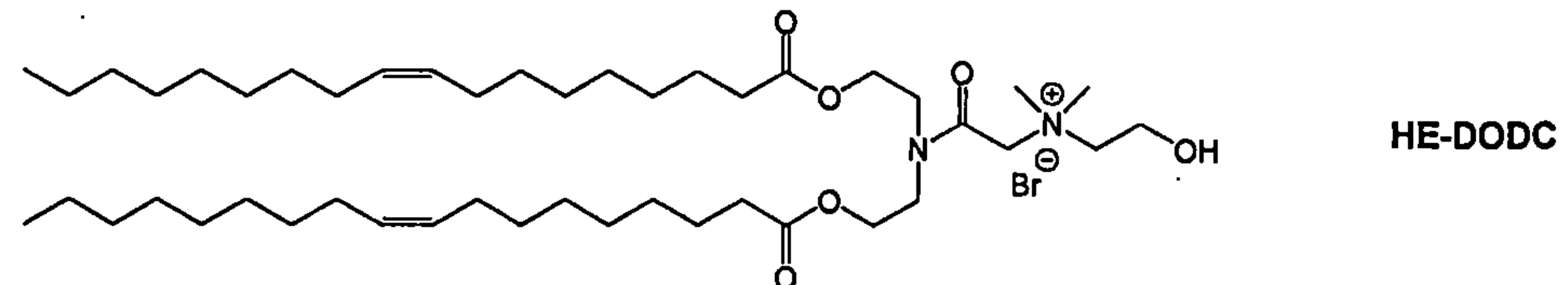
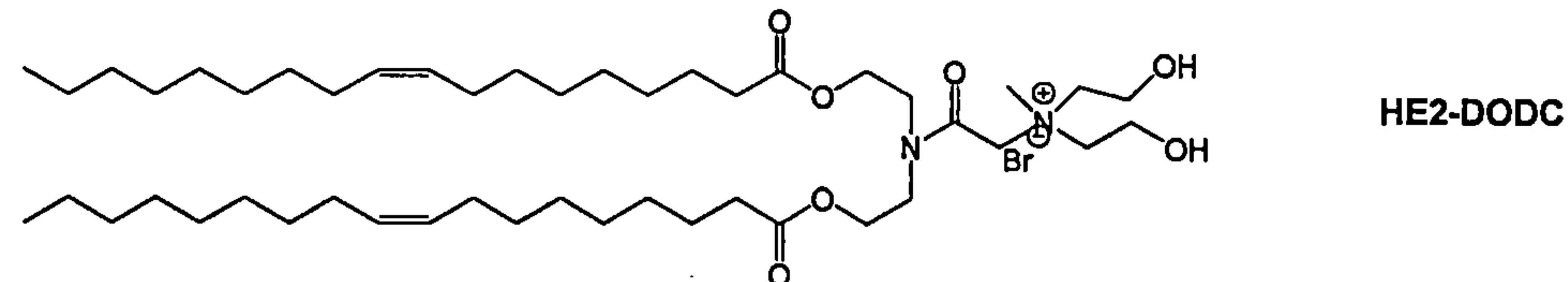
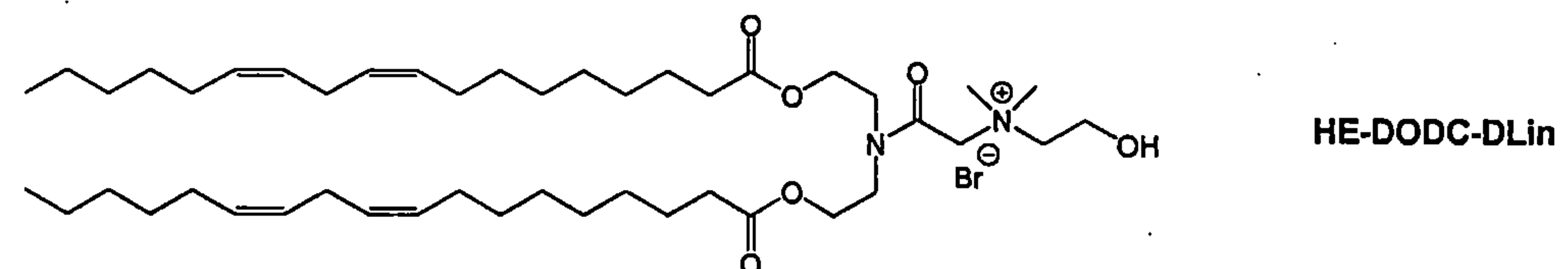
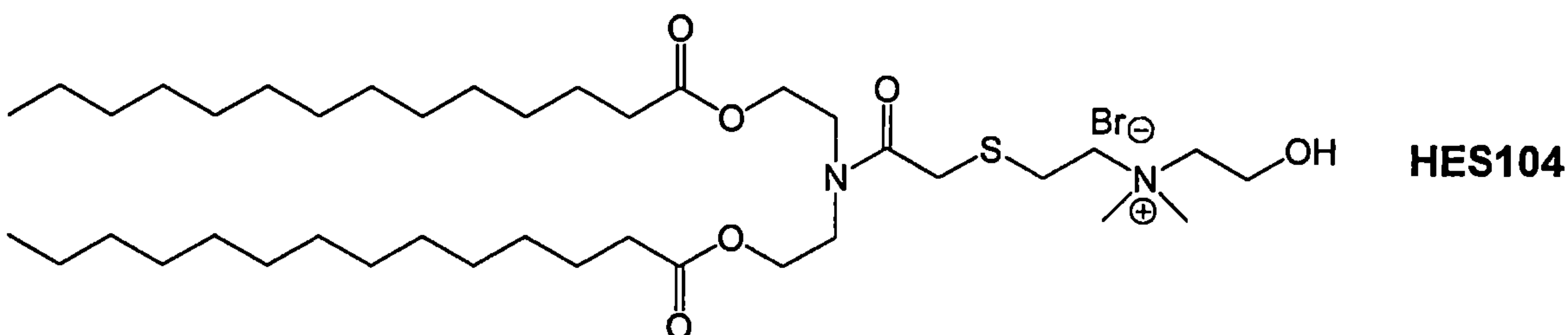
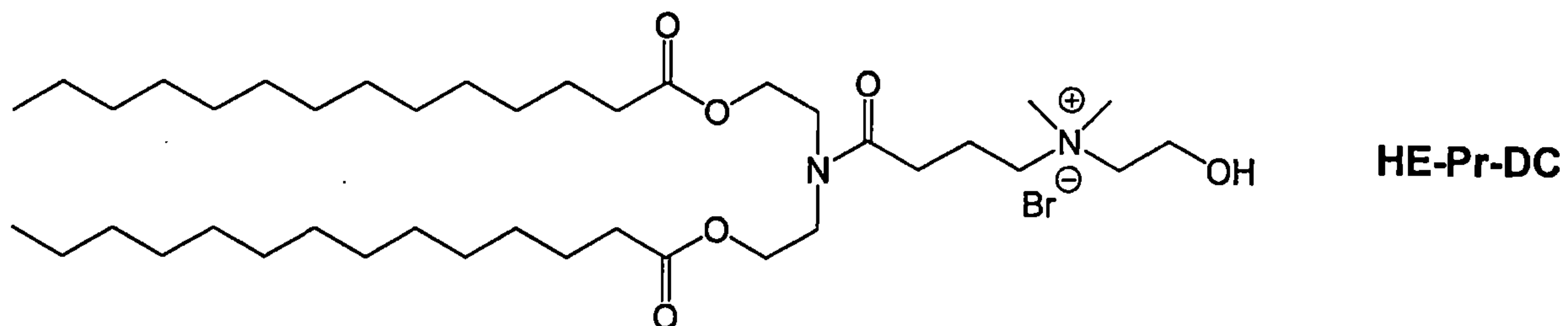
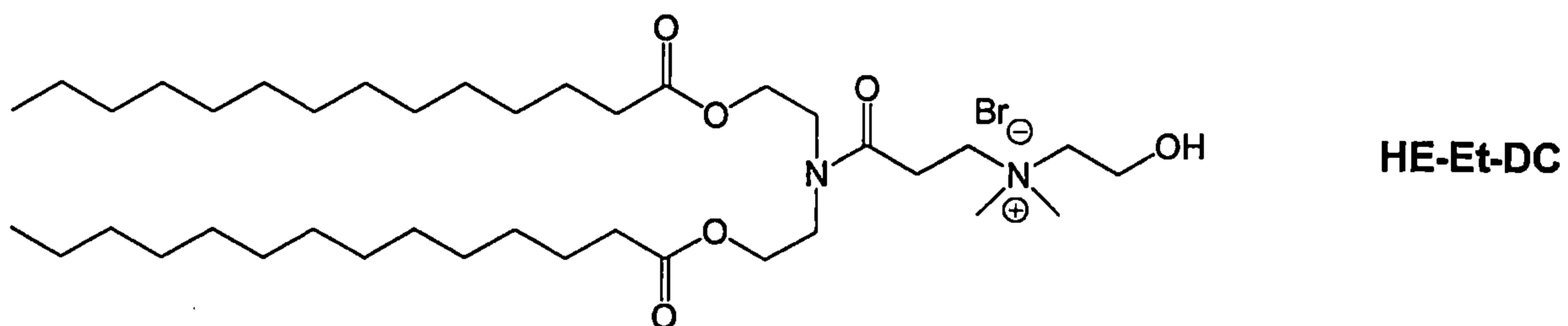
群。在較佳實施例中， R_3 及 R_4 各自獨立地為 C_1 - C_3 烷基。 R_3 及 R_4 最佳各自為甲基。在其他實施例中， R_3 及 R_4 各自為H。在其他實施例中， R_3 及 R_4 中之至少一者為 $-CH_2CH_2OH$ 。在其他實施例中， R_3 為 $-CH_2CH_2OH$ ，且 R_4 為H或 C_1 - C_6 烷基。在彼等實施例中，其中 R_3 為 $-CH_2CH_2OH$ ，且 R_4 較佳為甲基。

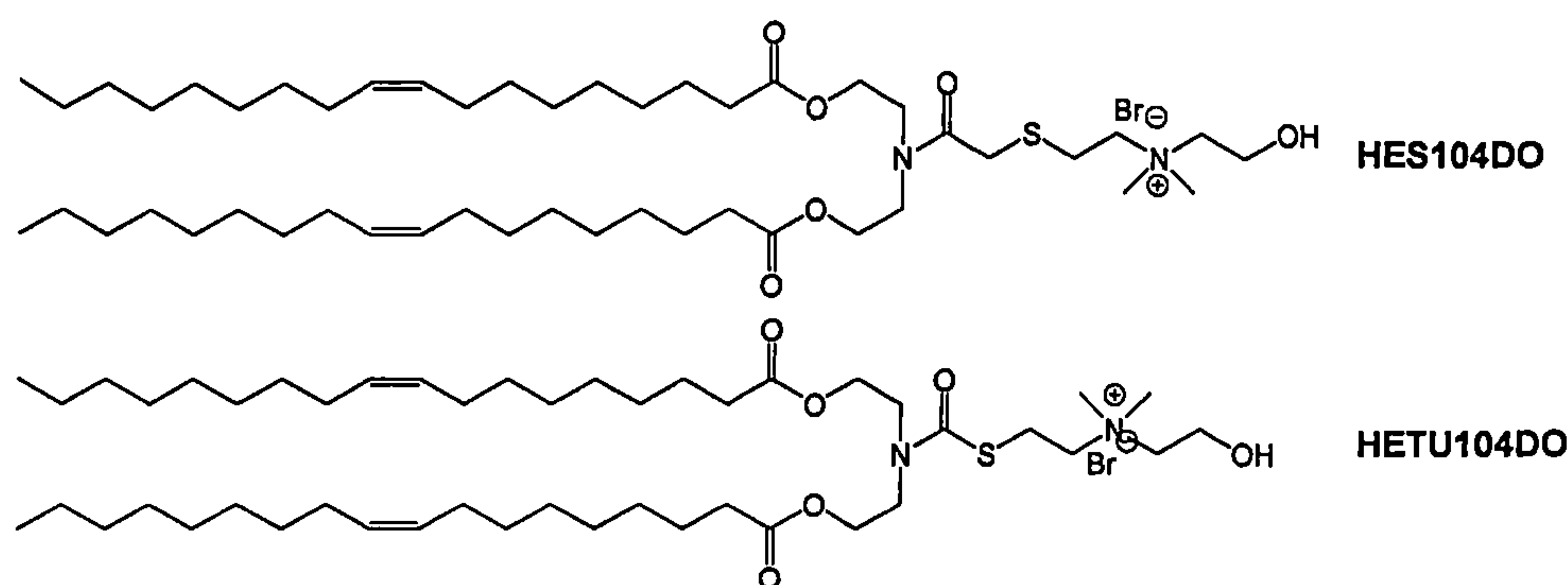
較佳之式I化合物包括其中n為1至4之化合物。最佳為其中n為2之彼等式I化合物。

Z可為任何氮相對離子，彼術語就如同此項技術中容易地理解般。較佳之氮相對離子包括鹵離子，其中氯離子及溴離子尤其較佳；及甲磺酸根($SO_3CH_3^-$)。與先前所述之其他陽離子脂質(其中陽離子脂質之效應視相對離子而定)形成對比，式I化合物之功效意外地似乎與所選相對離子無關。

例示性式I化合物包括：







一種有助於藥物遞送至標靶細胞之化合物屬於本發明之範疇內，該化合物由結構(標靶分子)_n-連接基團-(標靶分子)_n構成，其中標靶分子為在標靶細胞上具有特異性受體或[活化/結合位點]之類視色素或脂溶性維生素；且其中n=0、1、2或3；且其中連接基團包含聚乙二醇(PEG)或類似PEG之分子，且被指定為「式A」。

本發明亦包括一種有助於藥物遞送至標靶細胞之化合物，該化合物由結構(脂質)_n-連接基團-(標靶分子)_n構成，其中標靶分子為在標靶細胞上具有特異性受體之類視色素或脂溶性維生素；其中n=0、1、2或3；且其中連接基團包含聚乙二醇(PEG)或類似PEG之分子，且被指定為「式B」。

迄今已發現式A化合物或式B化合物賦予本發明調配物以先前未發現之性質。與不包括此等化合物之調配物相比，包括式A化合物或式B化合物之本發明調配物使得基因表現大幅減少。尤其令人驚訝的是包括式A化合物之本發明調配物減少HSP47表現之能力。

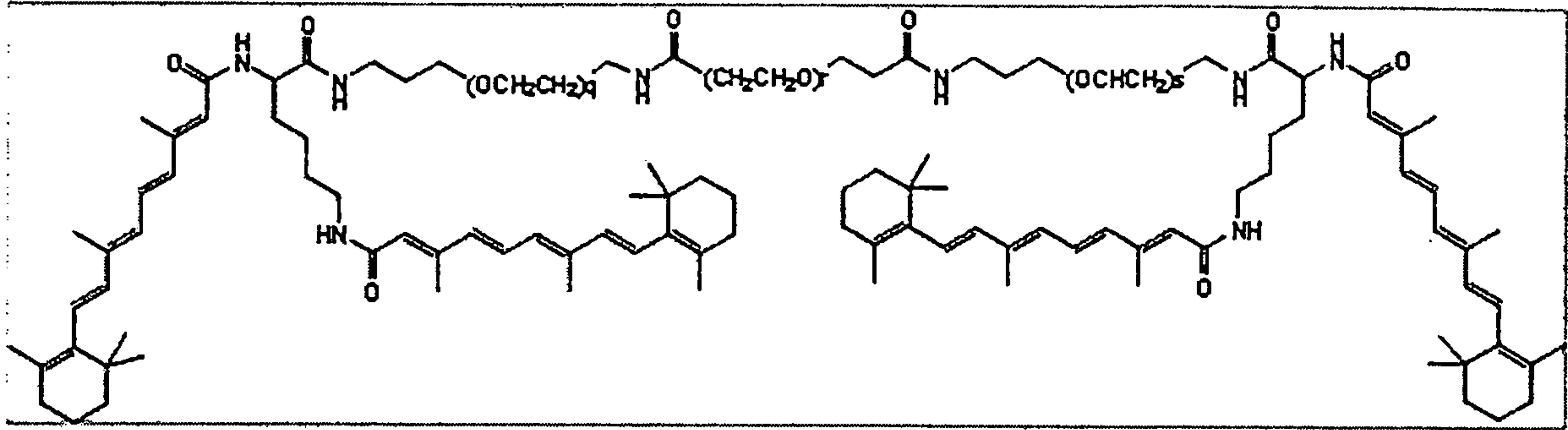
在某些較佳實施例中，類視色素係選自由以下組成之群：維生素A、視黃酸、維甲酸、阿達帕林、4-羥基(苯基)視黃醯胺(4-HPR)、棕櫚酸視黃酯、視黃醛、飽和視黃酸及飽和脫甲基視黃酸。

較佳實施例包括其中連接基團係選自由以下組成之群之化合物：雙醯胺基-PEG、參醯胺基-PEG、四醯胺基-PEG、Lys-雙醯胺基-PEG Lys、Lys-參醯胺基-PEG-Lys、Lys-四醯胺基-PEG-Lys、Lys-PGE-Lys、PEG2000、PEG1250、PEG1000、PEG750、PEG550、PEG-

Glu、Glu、C6、Gly3及GluNH。在其他實施例中，PEG為單分散的。

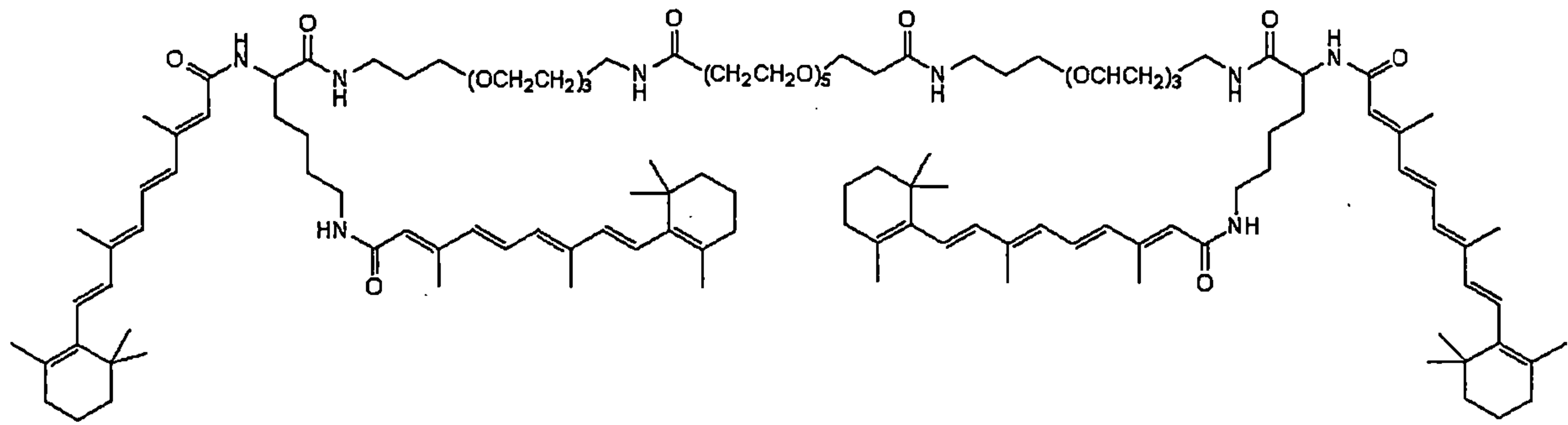
另一實施例提供一種其中式A係選自由以下組成之群之化合物：
類視色素-PEG-類視色素、(類視色素)₂-PEG-(類視色素)₂、VA-PEG2000-VA、(類視色素)₂-雙醯胺基-PEG-(類視色素)₂、(類視色素)₂-Lys-雙醯胺基-PEG-Lys-(類視色素)₂。

在另一較佳實施例中，該化合物為下式：



其中q、r及s各自獨立地為1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

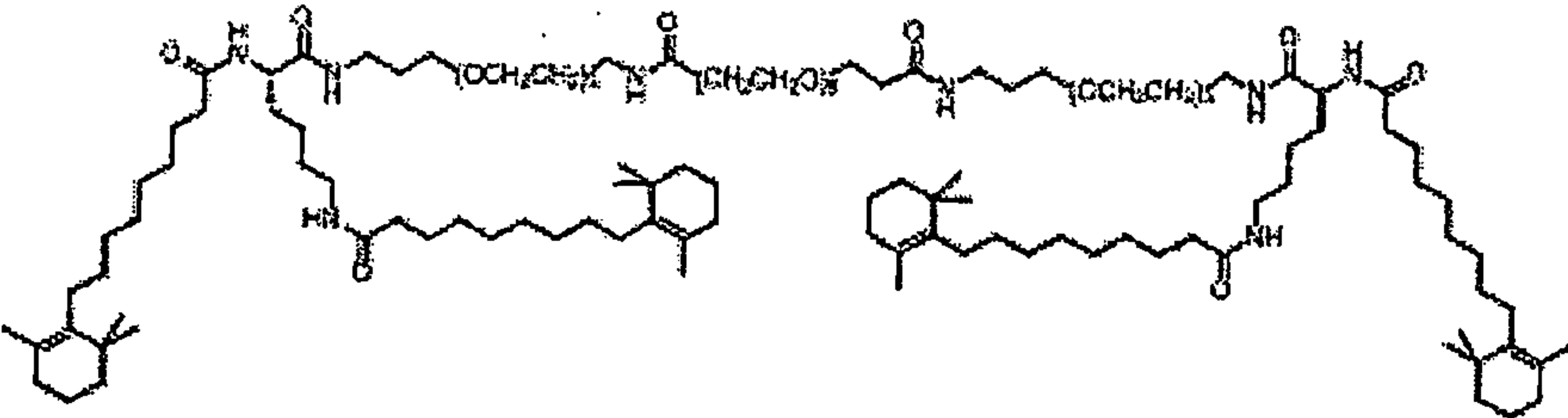
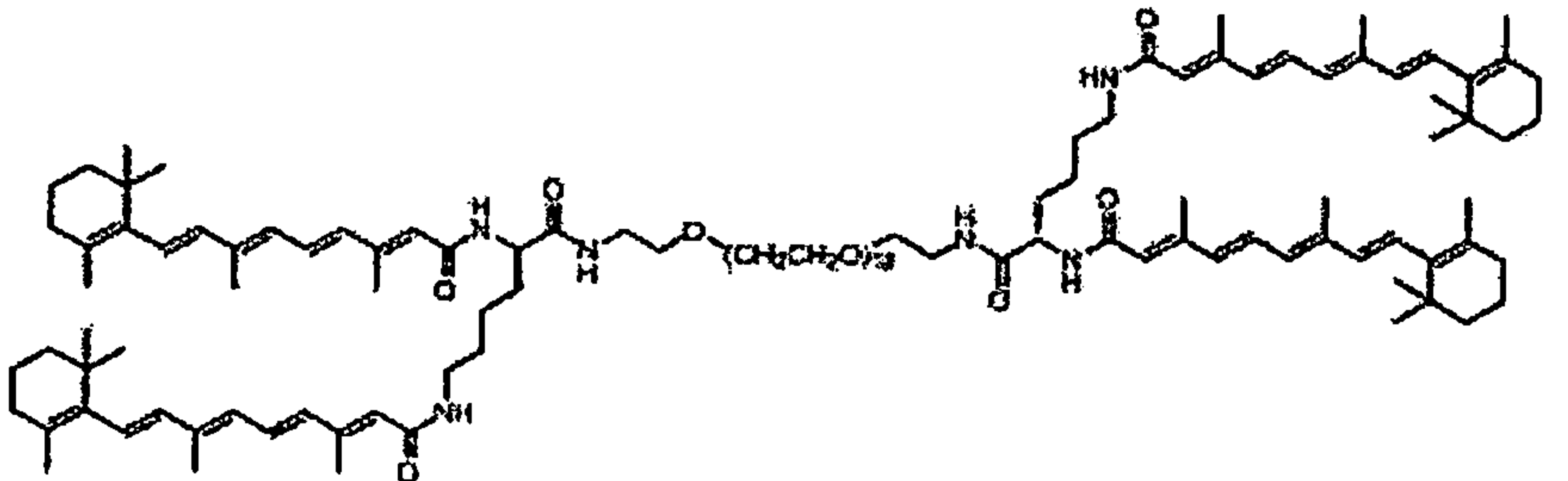
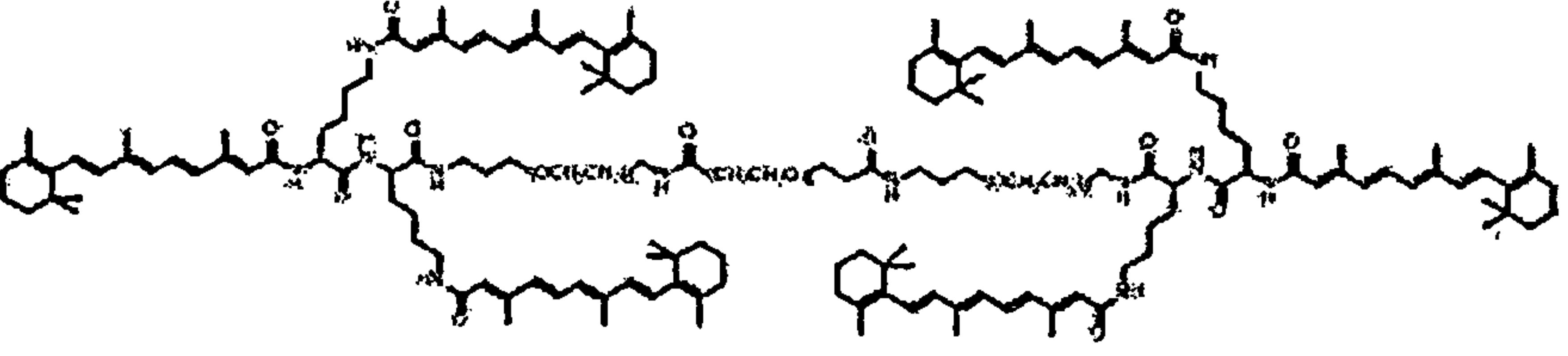
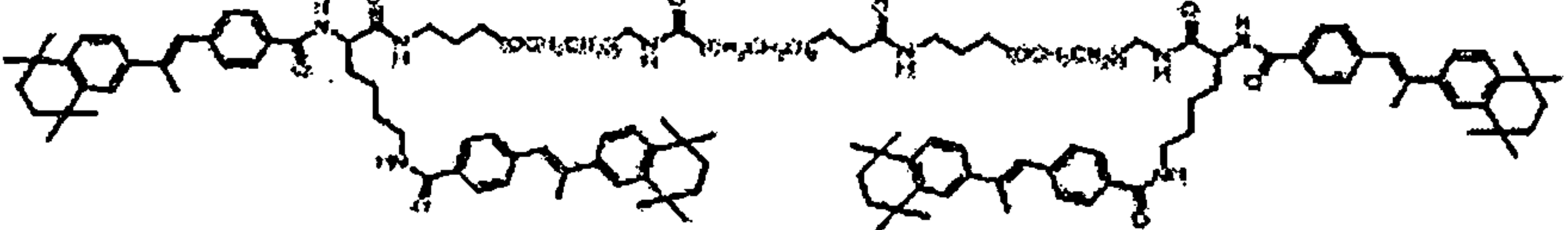
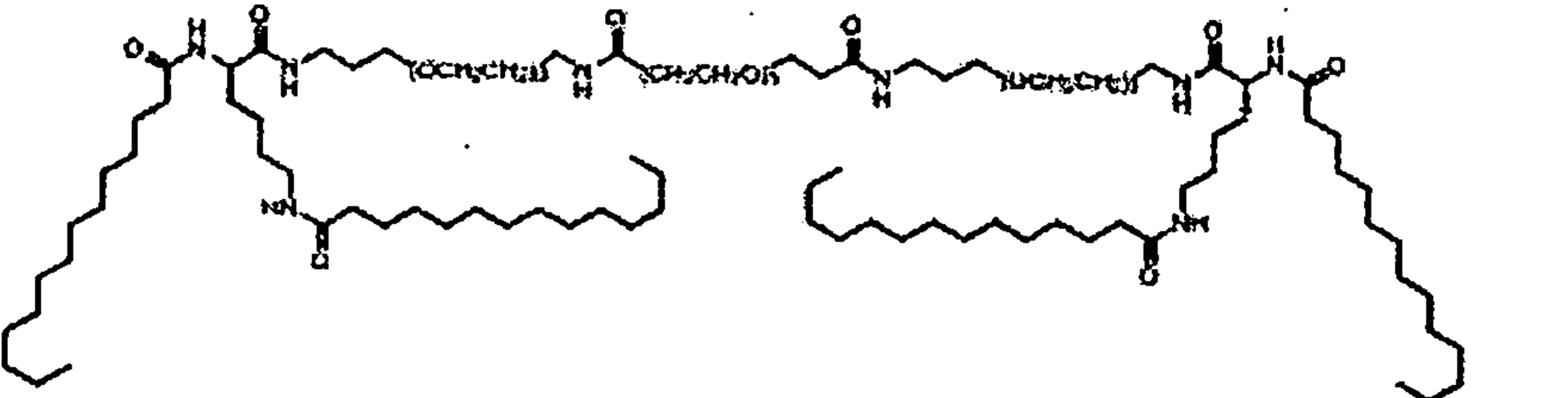
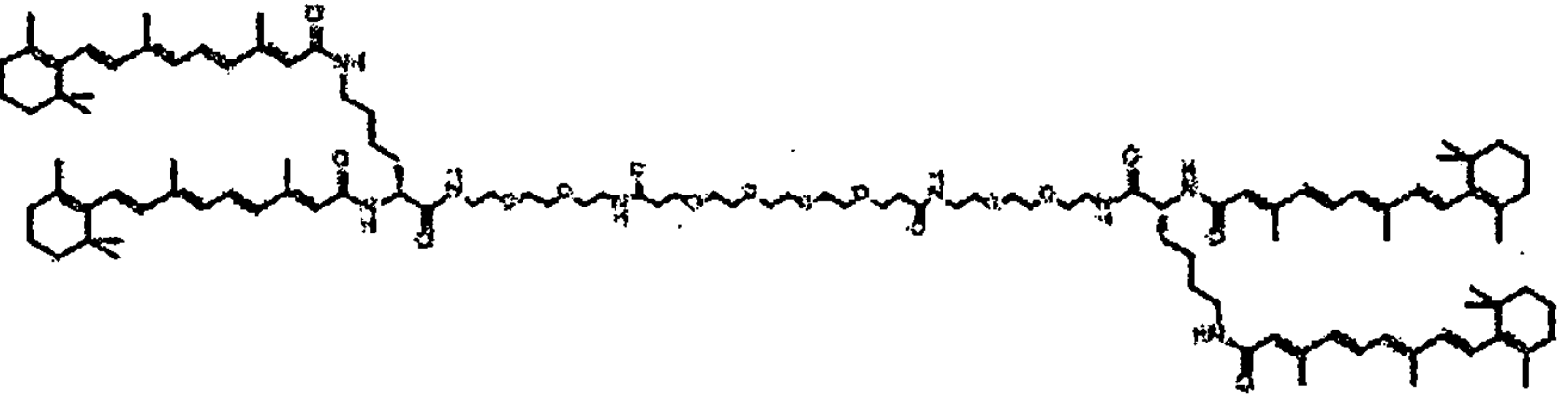
在其他較佳實施例中，化合物之化學式包含：



本發明之其他實施例包括表1中所示之結構。

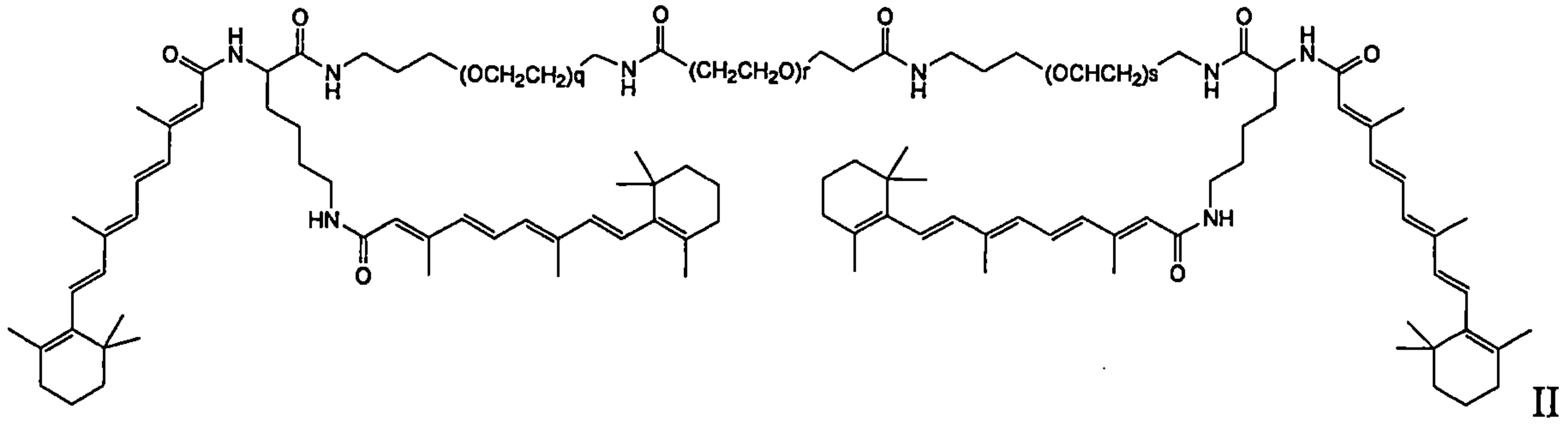
表1

脂質名稱	化合物結構
SatDiVA	The chemical structure of SatDiVA is a bis-retinoid molecule. It consists of two retinoid chains, each featuring a substituted cyclohexene ring at one end and a polyene chain at the other. The polyene chains are connected to a central linker via amide bonds. The linker is a PEG-based structure: $\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_q\text{-NH-CO-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_r\text{-NH-CO-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_s\text{-NH-CO-}$. The retinoid chains are attached to the amide groups of the linker.

SimDiVA	
DiVA-PEG18	
TriVA	
4TTNPB	
4Myr	
DiVA-242	

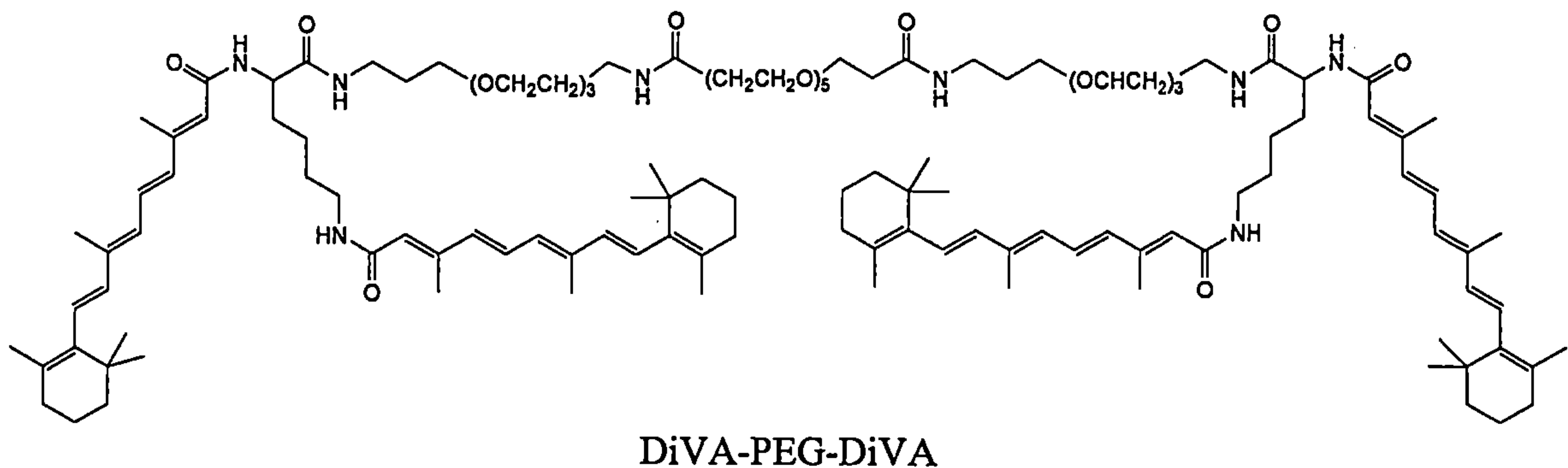
包括至少一種式I化合物及脂質體之本發明組合物可進一步包含一或多種類視色素結合物。在本發明之較佳實施例中，類視色素結合物以組合物或調配物之總重量計將以約0.3重量%至約30重量%之濃度存在，該濃度相當於約0.1莫耳%至約10莫耳%，其相當於約0.1至約10之莫耳比。類視色素結合物較佳為類視色素-連接基團-脂質分子或類視色素-連接基團-類視色素分子。

類視色素結合物之實例包括彼等式II化合物：



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

較佳之式II化合物包括其中q、r及s各自獨立地為1、2、3、4、5、6或7之化合物。其中q、r及s各自獨立地為3、4或5之彼等式II化合物更佳。其中q為3、r為5且s為3之彼等式II化合物最佳。式II化合物之一個實例為：



DiVA-PEG-DiVA包括立體中心且所有對映異構體及非對映異構體均視為屬於本發明之範疇之內。

本發明組合物中之陽離子脂質(包括彼等式I之陽離子脂質)之濃度以組合物之脂質組合物之總重量計可為1重量%至約80重量%。該濃度更佳為1重量%至約75重量%。該濃度甚至更佳為約30重量%至約75重量%。約30重量%至約75重量%之濃度對應於約30莫耳%至60莫耳%及約30至60之莫耳比。具有約50重量%之陽離子脂質濃度之彼等組合物最佳。在含有可離子化之陽離子脂質及四級胺陽離子脂質之混合物之調配物中，較佳之莫耳%為5莫耳%至45莫耳%，甚至更佳為約20莫

耳%。

該等組合物亦可包括水性介質。在該等實施例中，陽離子脂質(包括式I之陽離子脂質)可包封於脂質體內且水性介質難以接近。此外，陽離子脂質(包括式I之陽離子脂質)可定位於脂質體之外表面上且水性介質可接近。

包括至少一種式I化合物及脂質體及視情況選用之類視色素結合物(諸如式II化合物)之本發明組合物亦可包括siRNA。包含至少一種式A化合物或式B化合物及siRNA之調配物亦屬於本發明之範疇內。

預想任何siRNA分子均可用於本發明之範疇內。siRNA可包括由SEQ ID NO:1例示之人類hsp47之mRNA編碼序列的反義序列，其展示如下。

ucuuuggcuu	uuuuuggcgg	agcuggggcg	cccuccggaa	gcguuuccaa	cuuuccagaa	60
guuucucggg	acgggcagga	gggggugggg	acugccauau	auagaucceg	ggagcagggg	120
agcgggcuaa	gaguagaau	gugucgcggc	ucgagagcga	gagucacguc	ccggcgcuag	180
cccagcccga	cccaggccca	ccguggugca	cgcaaaccac	uuccuggcca	ugcgcucccu	240
ccugcuucuc	agcgccuucu	gccuccugga	ggcgggccug	gccgccgagg	ugaagaaacc	300
ugcagccgca	gcagcuccug	gcacugcgga	gaaguugagc	cccaaggcgg	ccacgcuugc	360
cgagcgcagc	gccggccugg	ccuucagcuu	guaccaggcc	auggccaagg	accaggcagu	420
ggagaacauc	cuggugucac	ccgugguggu	ggccucgucc	cuagggcucg	ugucgcuggg	480
cggcaaggcg	accacggcgu	cgcaggccaa	ggcagugcug	agcgccgagc	agcugcgcg	540
cgaggaggug	cacgccggcc	uggggcgagcu	gcugcgcuca	cucagcaacu	ccacggcgcg	600
caacgugacc	uggaagcugg	gcagccgacu	guacggaccc	agcucaguga	gcuucgcuga	660
ugacuucgug	cgcagcagca	agcagcacua	caacugcgag	cacuccaaga	ucaacuuccg	720
cgacaagcgc	agcgcgcu	aguccaucaa	cgaguggggc	gcgcagacca	ccgacggcaa	780
gcugcccag	gucaccaagg	acguggagcg	cacggacggc	gcccugcuag	ucaacgccau	840
guucuucaag	ccacacuggg	augagaaauu	ccaccacaag	augguggaca	accguggcuu	900
cauggugacu	cgguccuaua	ccgugggugu	caugaugaug	caccggacag	gccucuacaa	960
cuacuacgac	gacgagaagg	aaaagcugca	aaucguggag	augccccugg	cccacaagcu	1020
cuccagccuc	aucauccuca	ugccccauca	cguggagccu	cucgagcgcc	uugaaaagcu	1080
gcuaaccaaa	gagcagcuga	agaucuggau	ggggaagaug	cagaagaagg	cuguugccau	1140
cuccuugccc	aaggguugug	uggaggugac	ccaugaccug	cagaaacacc	uggcuggggcu	1200
gggccugacu	gaggccauug	acaagaacaa	ggccgacuug	ucacgcaugu	caggcaagaa	1260
ggaccugua	cuggccagcg	uguuccacgc	caccgccuuu	gaguuggaca	cagauggcaa	1320
ccccuugac	caggacaucu	acgggcgcga	ggagcugcgc	agccccaa	uguucuacgc	1380
cgaccacccc	uucacuucc	uagugcggga	cacccaaagg	ggcucccugc	uauucauugg	1440
gcgccugguc	cggccuaagg	gugacaagau	gcgagacgag	uuauagggcc	ucaggggugca	1500
cacaggau	caggaggcau	ccaaaggcuc	cugagacaca	ugggugcuau	uggggguuggg	1560
ggggagguga	gguaccagcc	uuggauacuc	cauggggugg	ggguggaaaa	acagaccggg	1620
guucccgugu	gccugagcgg	accuucccag	cuagaauuca	cuccacuugg	acauggggccc	1680
cagauacc	gaugcugagc	ccggaaacuc	cacauccugu	gggaccuggg	ccauaguc	1740
ucugccugcc	cugaaagucc	cagaucaagc	cugccucaa	caguauucau	auuuauagcc	1800
agguaccuuc	ucaccuguga	gaccaaauug	agcuaggggg	gucagccagc	ccucuucuga	1860
cacuaaaaca	ccucagcugc	cuccccagcu	cuaucccaac	cucucccaac	uauaaaacua	1920
ggugcugcag	ccccugggac	caggcacccc	cagaugacc	uggccgcagu	gaggcgga	1980
gagaaggagc	ucccaggagg	ggcuucuggg	cagacucugg	ucaagaagca	ucgugucugg	2040
cguugugggg	augaacuuiu	uguuuuguuu	cuuccuuuuu	uaguucuuca	aagauaggga	2100
gggaaggggg	aacaugagcc	uuuguugcua	ucaauccaag	aacuuauuug	uacauuuuuu	2160
uuuuc	aacuuuucca	augacauuuu	guuggagcgu	ggaaaaaa		2208

舉例而言：

有義(5'→3')GGACAGGCCUCUACAACUATT(SEQ. ID. NO. 2)

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

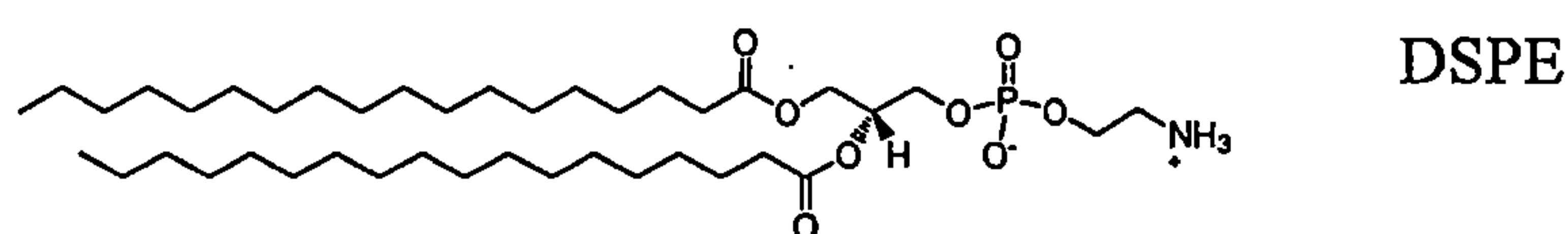
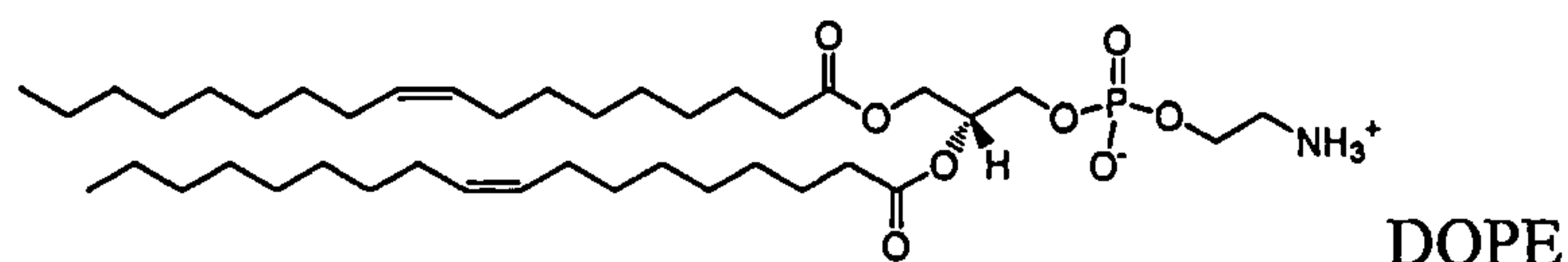
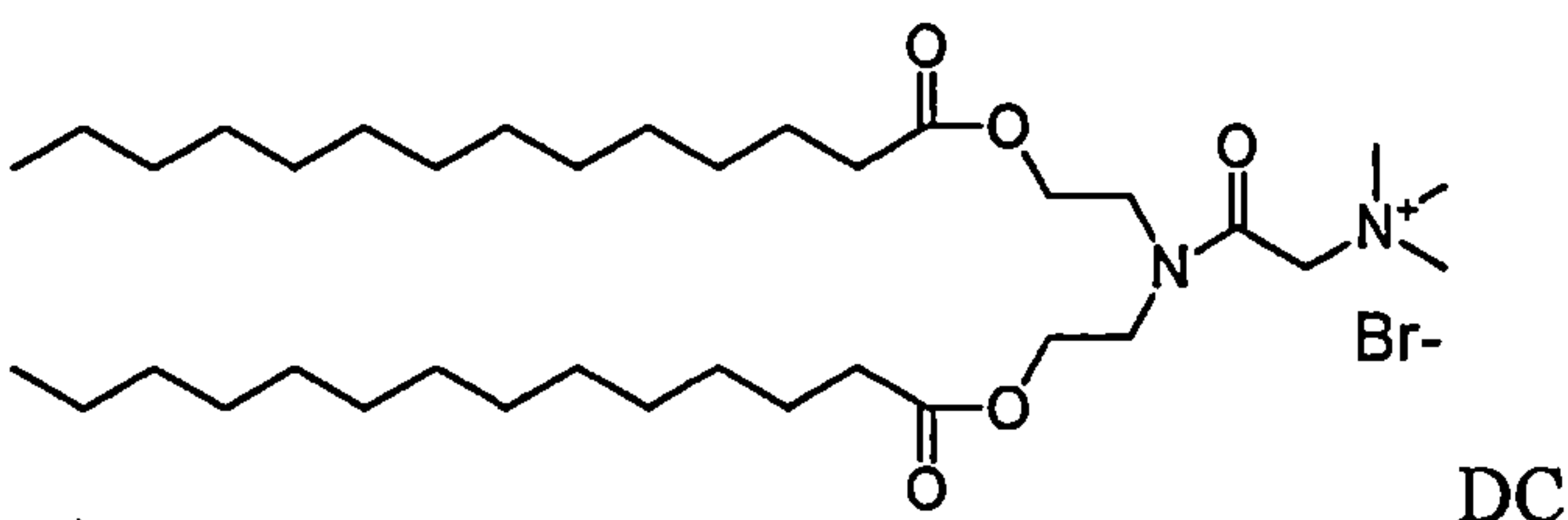
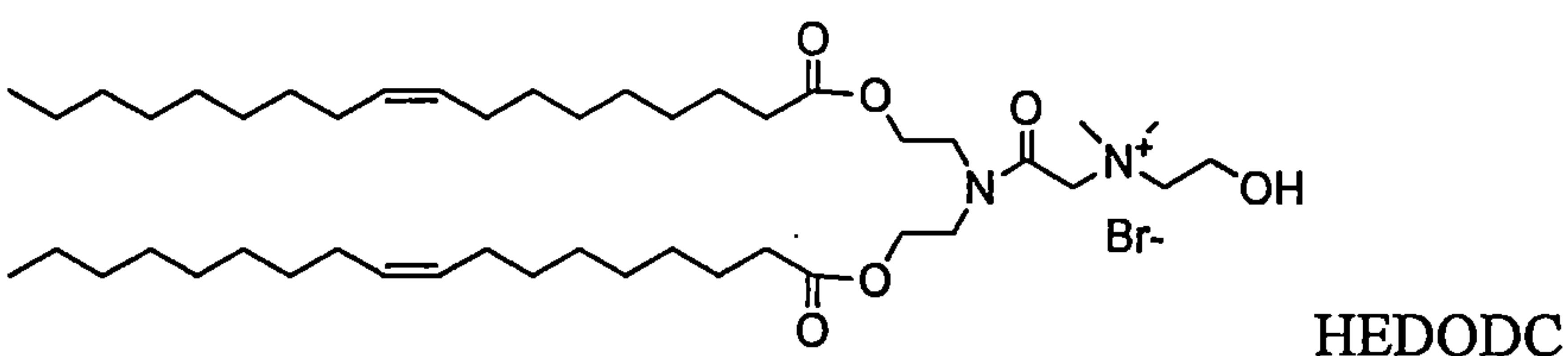
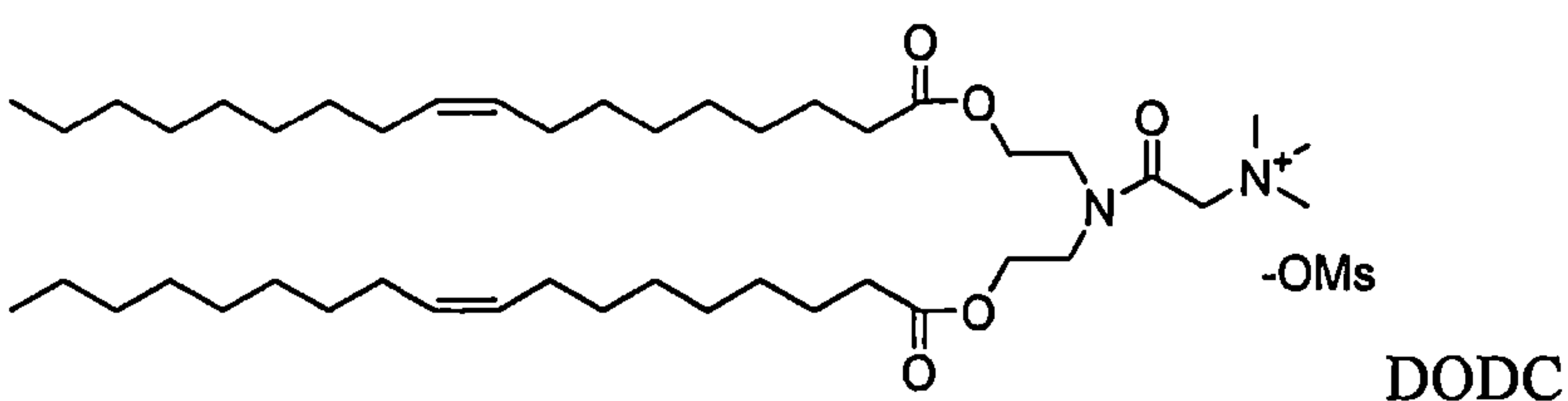
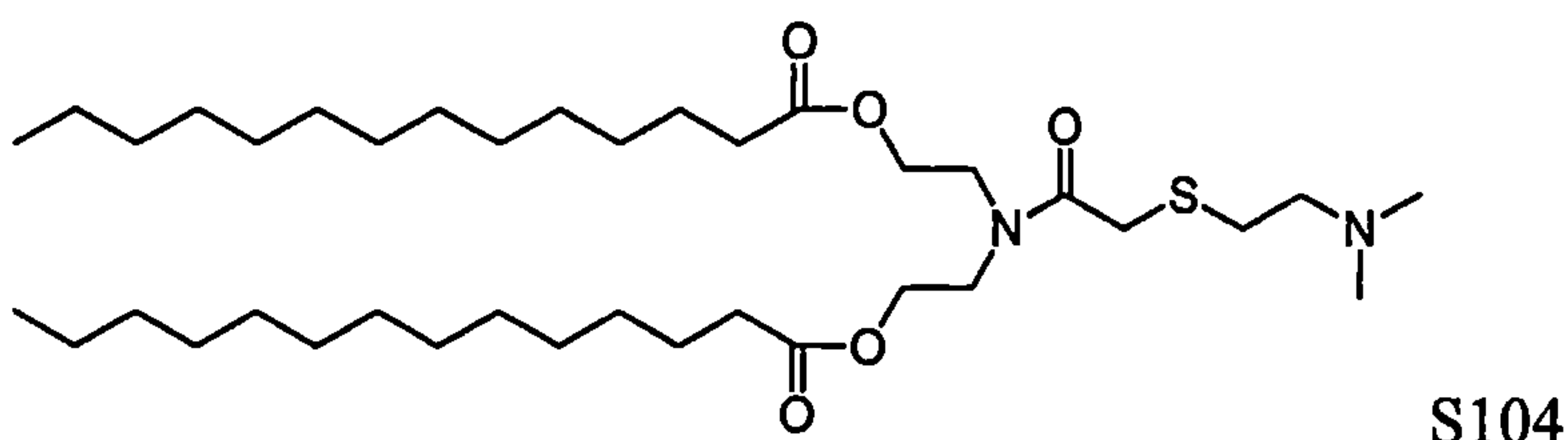
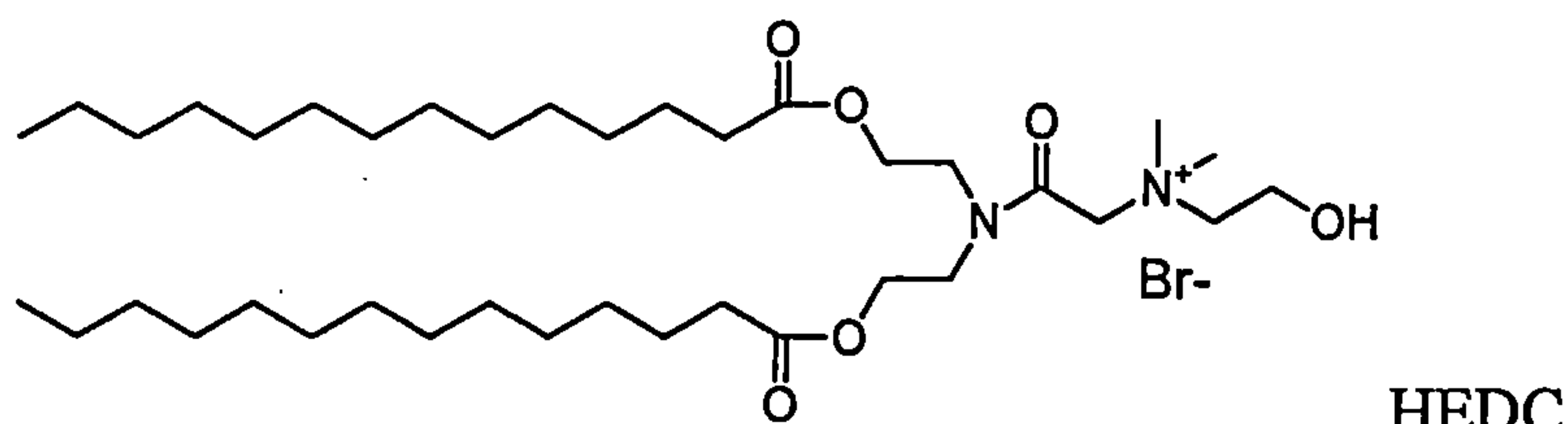
該等組合物亦可包括水性介質。該等組合物較佳基本上由呈與 siRNA 之電荷複合物形式之至少一種式 I 化合物組成。包括式 I 化合物及 siRNA 之該等組合物可進一步包含液體介質。在一個實施例中，液體介質適用於注射至活有機體中。屬於本發明之所述實施例任一者之範疇內的液體介質可為水性，亦即完全包含水性溶劑且包括鹽、緩衝劑及/或其他醫藥賦形劑。在另一實施例中，液體介質可由與另一液體溶劑(諸如有機溶劑)組合之水性溶劑組成。屬於本發明之所述實施例任一者之範疇內的液體介質亦可包括至少一種有機溶劑。有機溶劑本身為此項技術中已知的且包括 C₁ 至 C₄ 醇、二甲亞砜(「DMSO」)及其類似物。包括水及至少一種有機溶劑之混合物的彼等液體介質亦屬於本發明之所述實施例任一者之範疇內。

包含至少一種式 I 化合物及脂質體之組合物亦屬於本發明之範疇內。一些實施例可包括式 I 化合物與脂質體之混合物。其他實施例可包括脂質體及一或多種式 I 化合物外加不屬於式 I 之範疇內之陽離子脂質。

在一些實施例中，siRNA 由脂質體包封，以至於水性介質難以接近 siRNA。在其他實施例中，siRNA 不由脂質體包封。在該等實施例中，siRNA 可複合於脂質體之外表面上。在此等實施例中，水性介質可接近 siRNA。

其他實施例包括包含脂質體組合物之星狀細胞特異性藥物載劑。脂質體組合物可包含脂囊泡，該脂囊泡包含雙層脂質分子。在某些實施例中，類視色素分子在藥物載劑到達星狀細胞之前在藥物載劑之外部至少部分暴露為較佳。

本發明之某些實施例提供包含一或多種選自由以下組成之群之脂質的脂質分子：HEDC、DODC、HEDODC、DSPE、DOPE及DC。在其他實施例中，脂質分子可進一步包含S104。



在一些實施例中，siRNA由脂質體包封，以至於水性介質難以接

近siRNA。在其他實施例中，siRNA不由脂質體包封。在該等實施例中，siRNA可複合於脂質體之外表面上。在此等實施例中，水性介質可接近siRNA。

其他實施例包括包含脂質體組合物之星狀細胞特異性藥物載劑。脂質體組合物可包含脂囊泡，該脂囊泡包含雙層脂質分子。在其他實施例中，類視色素分子在藥物載劑到達星狀細胞之前在藥物載劑之外部至少部分暴露。

在某些較佳實施例中，類視色素為脂質分子之0.2莫耳%至20莫耳%。

前述組合物亦可包括PEG結合脂質，其本身為此項技術中已知的，包括PEG-磷脂及PEG-神經醯胺，包括一或多種選自以下之分子：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-膽固醇、PEG2000-神經醯胺、PEG1000-神經醯胺、PEG750-神經醯胺及PEG550-神經醯胺。

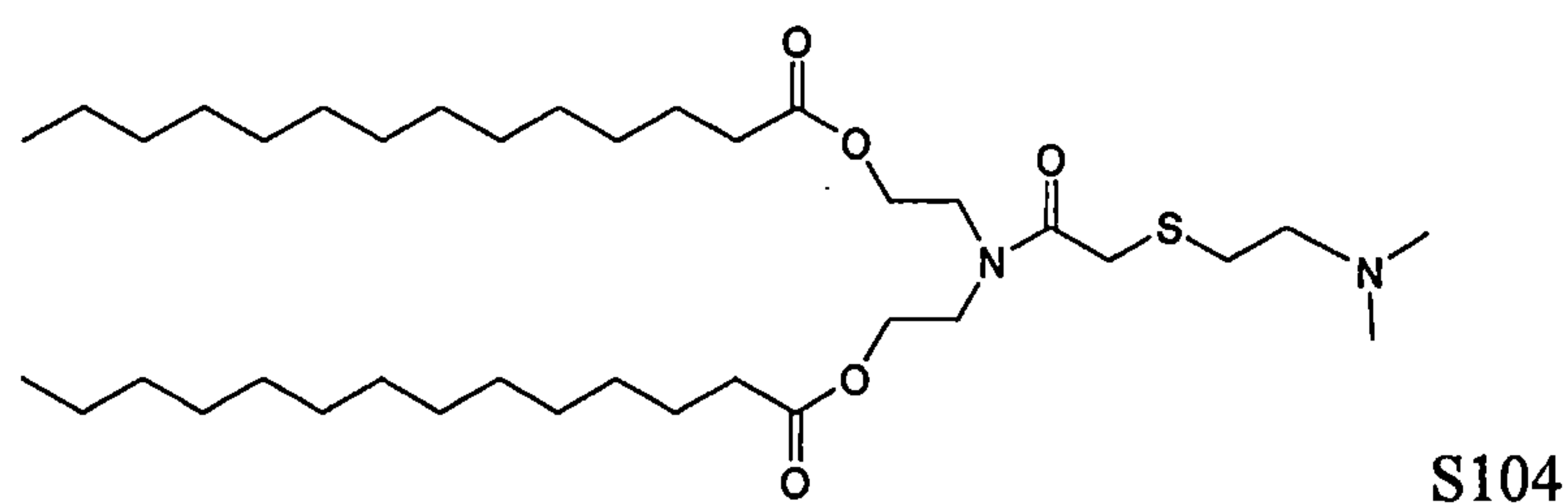
本發明之前述組合物可包括一或多種磷脂，諸如1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(「DSPC」)、二棕櫚醯磷脂醯膽鹼(「DPPC」)、1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(「DPPE」)及1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(「DOPE」)。輔助脂質較佳為DOPE。

舉例而言，使用各種PEG-脂質(使用本文中所描述之共溶解化方法併入)製備屬於本發明範疇內之HEDC脂質體。此等調配物包含HEDC:DOPE：膽固醇：DiVA-PEG-DiVA:PEG-脂質(50:10:38:5:2莫耳比)，且各調配物係使用200 nM濃度之人類/大鼠HSP-47-C siRNA在本文中所描述之pHSC活體外分析中進行測試。結果展示於下表中：

PEG-脂質	gp46基因阻斷(%)	標準差
未處理	0	5.6
RNAimax對照物	50.0	7.9
PEG-BML	95.5	1.7
PEG1000-DMPE	93.2	0.8
PEG1000-DPPE	92.8	1.3
PEG1000-DSPE	93.5	0.8
PEG1000-DOPE	90.7	2.5
PEG2000-神經醯胺	91.8	1.0
PEG2000-DMPE	93.7	3.4
PEG2000-DPPE	91.1	1.4
PEG2000-DSPE	89.4	1.7

本發明之前述組合物可包括一或多種磷脂，諸如1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(「DSPC」)、二棕櫚醯磷脂醯膽鹼(「DPPC」)、1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(「DPPE」)及1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(「DOPE」)。輔助脂質較佳為DOPE。

除了式I之陽離子脂質之外，其他脂質可能適用。其包括可離子化之陽離子脂質，包括：



遞送調配物可由式I之陽離子脂質與可離子化之陽離子脂質的組合組成。可離子化之陽離子脂質可包括例如S104。可離子化之陽離子脂質可以0莫耳%至35莫耳%之濃度存在，包括選自5莫耳%、10莫耳%、15莫耳%、20莫耳%、25莫耳%、30莫耳%及35莫耳%之濃度。

包括上述組合物中之任一者外加醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑的醫藥調配物亦屬於本發明之範疇內。本發明醫藥調配物將包括至少一種治療劑。治療劑較佳為siRNA。預想任何siRNA分子均可用於本發明之範疇內。

包括上述化合物中之任一者外加醫藥學上可接受之載劑或稀釋

劑的醫藥調配物亦屬於本發明之範疇內。本發明醫藥調配物將包括至少一種治療劑。治療劑較佳為siRNA。預想任何siRNA分子均可用於本發明之範疇內。如先前所述，siRNA包括展示為SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3及SEQ ID NO: 4之序列。

在包括siRNA之本發明之較佳調配物中，siRNA由脂質體包封。在其他實施例中，siRNA可在脂質體之外部。在彼等實施例中，siRNA可複合於脂質體之外部。

陽離子脂質：siRNA莫耳比(「N:P」)之有效範圍為0.2至5.0。在本發明之組合物及調配物中，尤其較佳之N:P為2.5。

本發明之較佳調配物包括包含HEDC:S104:DOPE：膽固醇：PEG-DMPE:DiVA-PEG-DiVA(20:20:30:25:5:2 莫耳比)及DiVA-PEG-DiVA已被共溶解之HEDC:S104:DOPE：膽固醇：PEG-DMPE:DiVA-PEG-DiVA(20:20:30:25:5:2 莫耳比)的調配物。DODC:DOPE：膽固醇：PEG-BML:DiVA-PEG-DiVA(50:10:38:2:5 莫耳比)及DiVA-PEG-DiVA已被共溶解之DODC:DOPE：膽固醇：PEG-BML:DiVA-PEG-DiVA調配物。

本發明之其他調配物包括包含HEDODC:DOPE：膽固醇-PEG-BML:DiVA-PEG-DiVA(50:10:38:2:5 莫耳比)及DiVA-PEG-DiVA已被共溶解之HEDODC:DOPE：膽固醇-PEG-BML:DiVA-PEG-DiVA調配物之調配物。

本發明之其他較佳調配物包括包含DC-6-14:DOPE：膽固醇：DiVA-PEG-DiVA(40:30:30:5，莫耳比)及DiVA-PEG-DiVA已被共溶解之DC-6-14:DOPE：膽固醇：DiVA-PEG-DiVA之調配物。

向患者遞送治療劑之方法亦屬於本發明之範疇內。此等方法包含提供包括前述組合物中之任一者及醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑的醫藥調配物；及向患者投與該醫藥調配物。

定義

如本文中所用，「烷基」係指直鏈或分支鏈完全飽和(無雙鍵或參鍵)烴基，例如具有通式 $-C_nH_{2n+1}$ 之基團。烷基可具有1至50個碳原子(每當其在本文中出現時，諸如「1至50」之數值範圍係指既定範圍中之各整數；例如「1至50個碳原子」意謂烷基可由1個碳原子、2個碳原子、3個碳原子等直至且包括50個碳原子組成，但本發明之定義亦涵蓋其中未指定數值範圍之術語「烷基」的存在)。烷基亦可為具有1至30個碳原子之中等尺寸烷基。烷基亦可為具有1至5個碳原子之低碳烷基。化合物之烷基可命名為「 C_1 - C_4 烷基」或類似名稱。僅舉例而言，「 C_1 - C_4 烷基」指示在烷基鏈中存在一至四個碳原子，亦即烷基鏈係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(但決不限於)甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基、第三丁基、戊基、己基及其類似烷基。

如本文中所用，「烯基」係指在直鏈或分支鏈烴鏈中含有一或多個雙鍵之烷基。烯基可為未經取代或經取代。除非另外說明，否則當經取代時，取代基可選自以上關於烷基取代所揭示之相同基團。

如本文中所用，「炔基」係指在直鏈或分支鏈烴鏈中含有一或多個參鍵之烷基。炔基可為未經取代或經取代。除非另外說明，否則當經取代時，取代基可選自以上關於烷基取代所揭示之相同基團。

如本文中所用，「鹵素」係指F、Cl、Br及I。

如本文中所用，「甲磺酸酯基」係指 $-SO_3CH_3$ 。

如本文中所用，術語「醫藥調配物」係指本文中所揭示之組合物與一或多種其他化學組分(諸如稀釋劑)或其他醫藥載劑之混合物。醫藥調配物有助於向有機體投與組合物。存在於此項技術中的投與醫藥調配物之多種技術包括(但不限於)注射及非經腸投與。

如本文中所用，術語「醫藥載劑」係指有助於使化合物併入至細胞或組織中之化合物。舉例而言，二甲亞砜(DMSO)由於其有助於多種有機化合物吸收至有機體之細胞或組織中而為常用載劑。

如本文中所用，術語「稀釋劑」係指可溶解相關調配物(例如可包括化合物、類視色素、第二脂質、穩定劑及/或治療劑之調配物)以及穩定化調配物之生物學活性形式的稀釋於水中之化合物。在此項技術中，利用溶解於緩衝溶液中之鹽作為稀釋劑。一種常用緩衝溶液為磷酸鹽緩衝鹽水，此係因為其可模擬人類血液之鹽狀況。因為緩衝鹽可以低濃度控制溶液之pH值，所以緩衝稀釋劑很少改變調配物之生物活性。如本文中所用，「賦形劑」係指添加至調配物中以向組合物提供(但不限於)鬆散性、一致性、穩定性、結合能力、潤滑作用、崩解能力等的惰性物質。「稀釋劑」為一種賦形劑。

如本文中所用，「治療劑」係指一旦以治療有效量向哺乳動物投與，就向哺乳動物提供治療效益的化合物。治療劑可在本文中稱為藥物。熟習此項技術者應理解，術語「治療劑」不限於已得到管理機構批准之藥物。「治療劑」可與如本文中所描述之化合物、類視色素及/或第二脂質可操作地締合。舉例而言，如本文中所描述之第二脂質可形成脂質體，且治療劑可與例如如本文中所描述之脂質體可操作地締合。

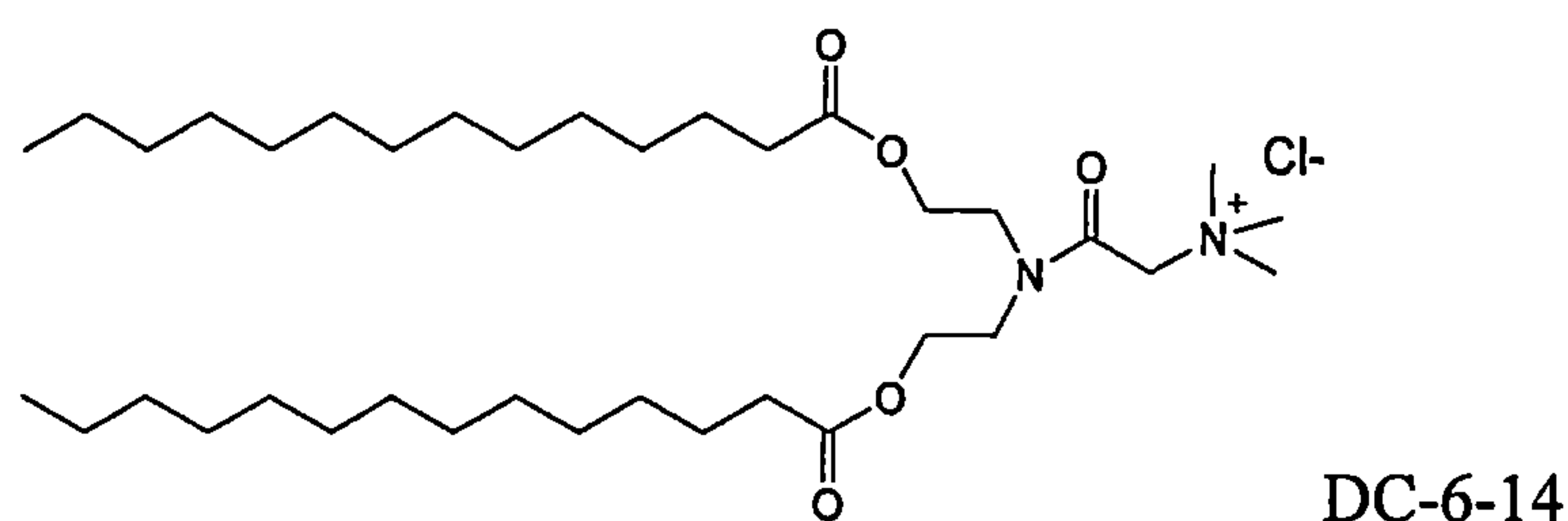
如本文中所用，「脂複合體(Lipoplex)調配物」係指其中siRNA在脂質體之外部的彼等調配物。在較佳脂複合體調配物中，siRNA經複合於脂質體之外部。其他較佳之脂複合體調配物包括其中脂質體之外部所存在之任何介質均可接近siRNA的脂複合體調配物。

如本文中所用，「脂質體調配物」係指其中siRNA包封於脂質體內之彼等調配物。在較佳脂質體調配物中，脂質體之外部所存在之任何介質均難以接近siRNA。

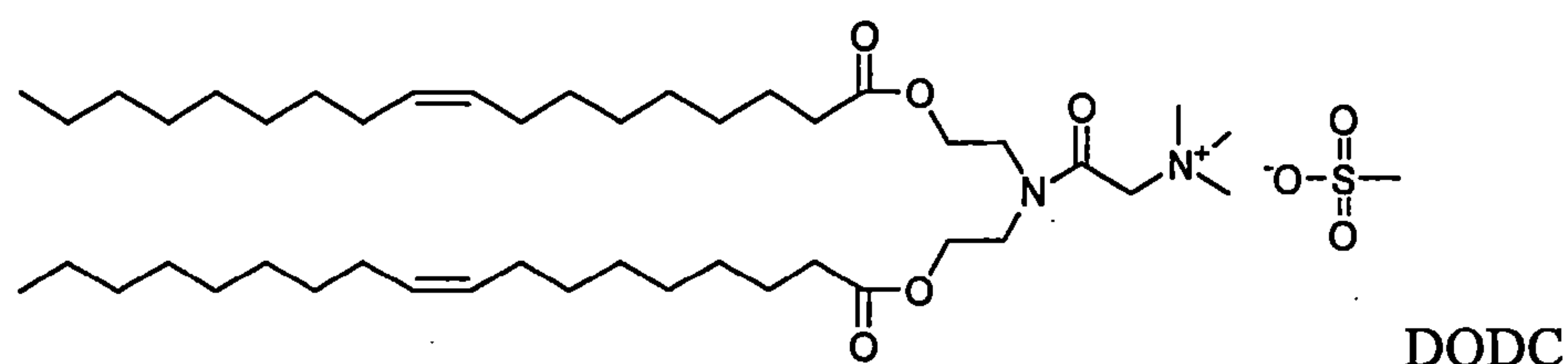
如本文中所用，術語「共溶解」係指在空囊泡形成之前向陽離子脂質混合物中添加組分。

如本文中所用，術語「裝飾」係指在囊泡形成之後添加組分。

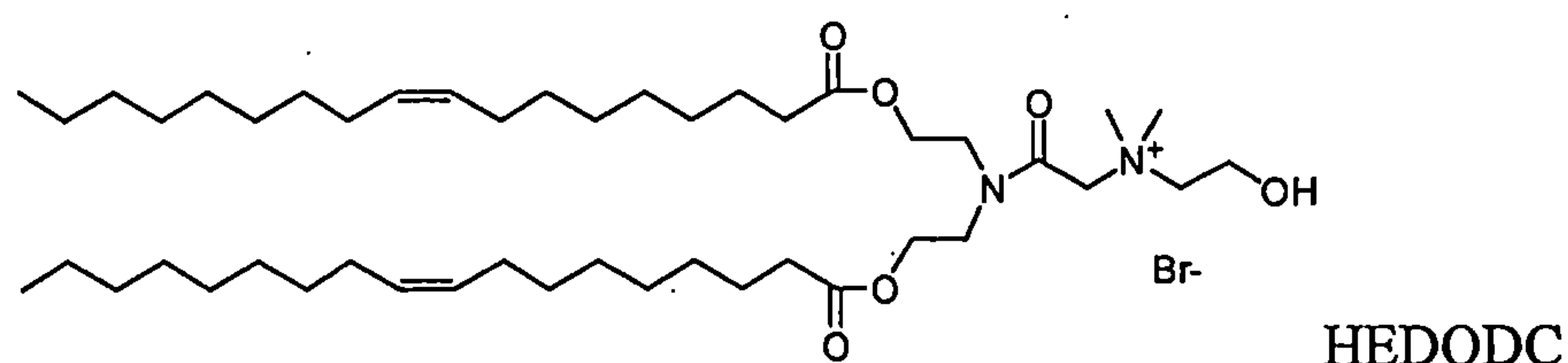
如本文中所用，「DC-6-14」係指以下陽離子脂質化合物：



如本文中所用，「DODC」係指以下陽離子脂質化合物：



如本文中所用，「HEDODC」係指以下陽離子脂質化合物：



如本文中所用，「類視色素」為由四個類異戊二烯單元以頭對尾方式接合組成之一類化合物的成員，參見G. P. Moss，「Biochemical Nomenclature and Related Documents」，第2版，Portland Press，第247頁至第251頁(1992)。「維生素A」為定性展示視黃醇之生物活性之類視色素的通用描述詞。如本文中所用，類視色素係指天然及合成類視色素，包括第一代、第二代及第三代類視色素。天然存在之類視色素之實例包括(但不限於)(1) 11-順式視黃醛、(2)全反式視黃醇、(3)棕櫚酸視黃酯、(4)全反式視黃酸、及(5) 13-順式視黃酸。此外，術語「類視色素」涵蓋視黃醇、視黃醛、視黃酸、類視色素及其衍生物。

如本文中所用，「類視色素結合物」係指包括至少一個類視色素部分之分子。

如本文中所用，「類視色素-連接基團-脂質分子」係指包括經由至少一個連接基團(諸如PEG部分)連接於至少一個脂質部分之至少一個類視色素部分的分子。

如本文中所用，「類視色素-連接基團-類視色素分子」係指包括至少一個類視色素部分且該至少一個類視色素部分經由至少一個連接基團(諸如PEG部分)連接於至少一個其他類視色素部分(其可為相同或不同)的分子。

如本文中所用，「維生素D」為具有抗佝僂病活性之一群維生素的通用描述詞。維生素D群包括：維生素D₂(鈣化醇)、維生素D₃(經輻照之22-二氫麥角固醇)、維生素D₄(經輻照之脫氫穀甾醇)及維生素D₅(經輻照之脫氫穀甾醇)。

如本文中所用，「維生素E」為具有抗氧化活性之一群分子的通用描述詞。維生素E家族包括 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚及 δ -生育酚， α -生育酚最普遍。(Brigelius-Flohe及Traber, *The FASEB Journal*. 1999;13:1145-1155)。

如本文中所用，「維生素K」為抗出血因子之通用描述詞，且包括維生素K₁(植物甲萘醌)、維生素K₂(甲萘醌)、維生素K₃、維生素K₄及維生素K₅。維生素K₁及K₂為天然的，而K₃至K₅為合成的。

如本文中所用，「類視色素-連接基團-脂質分子」係指包括經由至少一個連接基團(諸如PEG部分)連接於至少一個脂質部分之至少一個類視色素部分的分子。

如本文中所用，「類視色素-連接基團-類視色素分子」係指包括至少一個類視色素部分且該至少一個類視色素部分經由至少一個連接基團(諸如PEG部分)連接於至少一個其他類視色素部分(其可為相同或

不同)的分子。

如本文中所用，術語「脂質」及「親脂性」在本文中以其如熟習此項技術者所瞭解之一般含義使用。脂質及親脂性基團之非限制性實例包括脂肪酸、固醇、 C_2 - C_{50} 烷基、 C_2 - C_{50} 雜烷基、 C_2 - C_{50} 烯基、 C_2 - C_{50} 雜烯基、 C_5 - C_{50} 芳基、 C_5 - C_{50} 雜芳基、 C_2 - C_{50} 炔基、 C_2 - C_{50} 雜炔基、 C_2 - C_{50} 羧基烯基及 C_2 - C_{50} 羧基雜烯基。脂肪酸為含有例如12至24個碳原子之飽和或不飽和長鏈單羧酸。脂質的特徵為基本上不溶於水，具有小於約0.01%(重量基準)的水中之溶解度。如本文中所用，術語「脂質部分」及「親脂性部分」係指已連接於另一基團之脂質或其部分。舉例而言，脂質基團可藉由脂質之官能基(諸如羧酸基)與單體之適當官能基之間的化學反應連接於另一化合物(例如單體)。

如本文中所用，「siRNA」係指小干擾RNA，在此項技術中亦稱為短干擾RNA或沉默RNA。siRNA為具有此項技術中已知之多種效應(最顯著的為干擾特異性基因表現及蛋白表現)的一類雙股RNA分子。

如本文中所用，「由脂質體包封」係指組分實質上或完全在脂質體結構內。

如本文中所用，「水性介質可接近的」係指組分能夠與水性介質接觸。

如本文中所用，「水性介質難以接近的」係指組分不能夠與水性介質接觸。

如本文中所用，「複合於脂質體之外表面上」係指組分與脂質體之外表面可操作地締合。

如本文中所用，「定位於脂質體之外表面上」係指組分在脂質體之外表面上或在脂質體之外表面附近。

如本文中所用，「經電荷複合」係指靜電締合。

如本文中所用，術語「可操作地締合」係指如本文中所描述之

化合物、治療劑、類視色素及/或第二脂質之間的電子相互作用。該等相互作用可呈現化學鍵形式，包括(但不限於)共價鍵、極性共價鍵、離子鍵、靜電締合、配位共價鍵、芳族鍵、氫鍵、偶極或凡得瓦爾(van der Waals)相互作用。一般熟習此項技術者瞭解，該等相互作用之相對強度可變化很大。

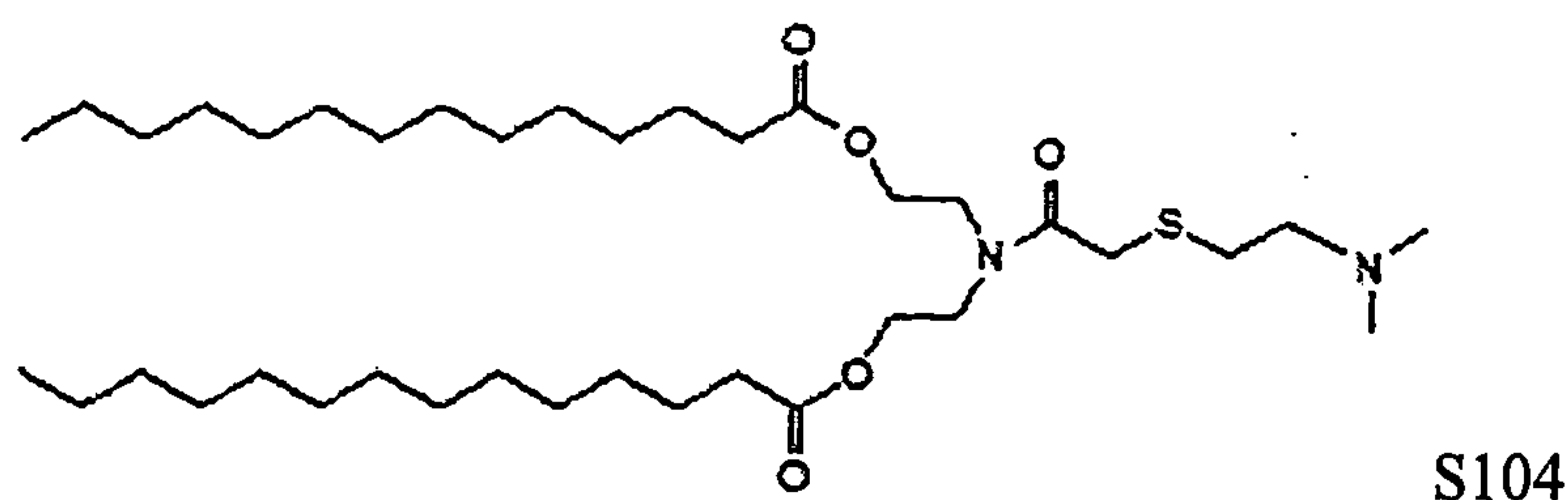
術語「脂質體」在本文中以其如熟習此項技術者所瞭解之一般含義使用，且係指含有連接於極性親水性基團之脂質(其在水性介質中形成實質上封閉的結構)的脂質雙層結構。在一些實施例中，脂質體可與一或多種化合物(諸如治療劑及類視色素)可操作地締合。脂質體可包含單個脂質雙層(亦即單層)或其可包含兩個或兩個以上同心脂質雙層(亦即多層)。另外，脂質體可為近似球形或橢圓形。

術語「有助於藥物遞送至標靶細胞」係指提升本發明之類視色素或脂溶性維生素化合物增強治療性分子(諸如siRNA)向細胞之遞送的能力。雖然不意欲受理論限制，但類視色素或脂溶性維生素化合物與具有可量測之特異性之標靶細胞上的特異性受體或[活化/結合位點]相互作用。舉例而言，當結合親和力(K_a)為 10^6 M^{-1} 或更大、較佳為 10^7 M^{-1} 或更大、更佳為 10^8 M^{-1} 或更大且最佳為 10^9 M^{-1} 或更大時，結合通常視為特異性的。抗體之結合親和力可由一般熟習此項技術者例如藉由史卡查分析(Scatchard analysis)容易地測定(Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51:660, 1949)。

核酸遞送系統可包括例如水性及非水性凝膠、乳膏、多重乳液(multiple emulsion)、微乳液、脂質體、軟膏、水性及非水性溶液、洗劑、氣霧劑、烴類基質及粉末；且可含有賦形劑，諸如增溶劑、增滲劑(例如脂肪酸、脂肪酸酯、脂肪醇及胺基酸)及親水聚合物(例如聚卡波非(polycarbophil)及聚乙烯吡咯啉酮(polyvinylpyrrolidone))。

除了式I之陽離子脂質之外，其他脂質亦可適用。其包括可離子

化之陽離子脂質，包括



遞送調配物可由式I之陽離子脂質與可離子化之陽離子脂質的組合組成。可離子化之陽離子脂質可包括例如S104。可離子化之陽離子脂質可以0莫耳%至45莫耳%之濃度存在，包括選自5莫耳%、10莫耳%、15莫耳%、20莫耳%、25莫耳%、30莫耳%、35莫耳%、40莫耳%及45莫耳%之濃度。

與聚乙二醇分子(PEG)結合之脂質可存在於脂質體粒子中。PEG-脂質包括

- 1,2-二肉豆蔻烯醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-PEG (PEG-DMPE)、
- 1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-PEG (PEG-DPPE)、
- 1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-PEG (PEG-DSPE)、或
- 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-PEG (PEG-DOPE)、及/或
- PEG-神經醯胺。

遞送調配物可由式I之陽離子脂質與PEG-脂質的組合組成。PEG-脂質可以0莫耳%至15莫耳%、較佳為1莫耳%至10莫耳%之濃度存在，包括選自1莫耳%、2莫耳%、3莫耳%、4莫耳%、5莫耳%、6莫耳%、7莫耳%、8莫耳%、9莫耳%及10莫耳%之濃度。

非陽離子脂質之非限制性實例包括磷脂，諸如卵磷脂、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、

二鯨蠟基磷酸酯、二硬脂醯磷脂醯膽鹼(DSPC)、二油醯磷脂醯膽鹼(DOPC)、二棕櫚醯磷脂醯膽鹼(DPPC)、二油醯磷脂醯甘油(DOPG)、二棕櫚醯磷脂醯甘油(DPPG)、二油醯磷脂醯乙醇胺(DOPE)、棕櫚醯油醯基-磷脂醯膽鹼(POPC)、棕櫚醯油醯基-磷脂醯乙醇胺(POPE)、棕櫚醯油醯基-磷脂醯甘油(POPG)、二油醯磷脂醯乙醇胺4-(N-順丁烯二醯亞胺甲基)-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。此等脂質中之醯基較佳為自具有C₁₀-C₂₄碳鏈之脂肪酸衍生之醯基，例如為月桂醯基、肉豆蔻醯基、棕櫚醯基、硬脂醯基或油醯基。

在某些實施例中，存在於粒子中之磷脂之量包含約0莫耳%至約55莫耳%，更特定言之為選自5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%及55%之濃度。作為非限制性實例，磷脂為DOPE。

非陽離子脂質之其他實例包括固醇，諸如膽固醇；及其衍生物，諸如膽甾烷醇、膽甾烷酮、膽甾烯酮、糞甾醇、膽固醇基-2'-羥乙基醚、膽固醇基-4'-羥丁基醚及其混合物。

在某些實施例中，存在於粒子中之膽固醇或膽固醇衍生物包含約0莫耳%至約55莫耳%，更特定言之為選自5莫耳%、10莫耳%、15莫耳%、20莫耳%、25莫耳%、30莫耳%、35莫耳%、40莫耳%、45莫耳%、50莫耳%及55莫耳%之濃度。作為非限制性實例，膽固醇存在於脂質粒子中。

在某些其他實施例中，存在於含有磷脂及膽固醇之混合物之脂

質粒子中的膽固醇包含存在於粒子中之總脂質的約30莫耳%至約40莫耳%、約30莫耳%至約35莫耳%、或約35莫耳%至約40莫耳%。作為非限制性實例，包含磷脂及膽固醇之混合物之脂質粒子可包含存在於粒子中之總脂質的約34莫耳%之膽固醇。

在其他實施例中，存在於含有磷脂及膽固醇之混合物之脂質粒子中的膽固醇包含存在於粒子中之總脂質的約10莫耳%至約30莫耳%、約15莫耳%至約25莫耳%、或約17莫耳%至約23莫耳%。作為非限制性實例，包含磷脂及膽固醇之混合物之脂質粒子可包含存在於粒子中之總脂質的約20莫耳%之膽固醇。

適用於遞送核酸之類視色素或類視色素結合物呈其溶解於可溶解或保留其之介質中或與可溶解或保留其之介質混合的狀態。

任何類視色素或類視色素結合物可用於本說明書中，只要其可由星狀細胞積極地聚集即可；類視色素之實例包括(但不限於)維甲酸、阿達帕林、視黃醇棕櫚酸酯，且尤其為維生素A、飽和維生素A、視黃酸及視黃醛。類視色素結合物之實例包括PEG-類視色素結合物。本說明書利用星狀細胞積極地合併類視色素及/或類視色素結合物之性質，且藉由使用類視色素及/或類視色素結合物作為藥物載劑或藉由與另一藥物載劑組分結合或包括於另一藥物載劑組分中，將所要物質或物體(body)特異性輸送至星狀細胞。類視色素為具有其中四個類異戊二烯單元以頭對尾方式接合之骨架(skeleton)之一類化合物的成員。參見G. P. Moss, 「Biochemical Nomenclature and Related Documents」, 第2版, Portland Press, 第247頁至第251頁(1992)。維生素A為定性展示視黃醇之生物活性之類視色素的通用描述詞。本說明書中之類視色素促進特異性物質遞送至癌細胞及CAF(亦即, 使該物質靶向此等細胞)。該種類視色素不受特別限制, 且其實例包括視黃醇、維生素A、飽和維生素A、視黃醛、視黃酸、視黃醇與脂肪酸

之酯、脂族醇與視黃酸之酯、依曲替酯(etretinate)、維甲酸、異維甲酸、阿達帕林、阿曲汀(acitretine)、他紮羅汀(tazarotene)、及視黃醇棕櫚酸酯、及維生素A類似物(諸如芬維A胺(fenretinide)及貝瑟羅汀(bexarotene))。類視色素結合物包括PEG結合物，例如diVA-PEG-diVA及VA-PEG-VA。

因此，本說明書之藥物載劑可含有除類視色素及/或類視色素結合物以外之藥物載劑組分。該種組分不受特別限制，且醫學及製藥領域已知之任何組分均可使用，但其較佳能夠包括類視色素及/或類視色素結合物。此外，本說明書之藥物載劑可含有能改良於星狀細胞之併入之物質，例如視黃醇結合蛋白(RBP)。類視色素及/或類視色素結合物與本說明書之藥物載劑之結合或包括亦可藉由以化學及/或物理方法使類視色素及/或類視色素結合物與另一藥物載劑組分結合或包括來進行。或者，類視色素及/或類視色素結合物與本說明書之藥物載劑之結合或包括亦可藉由在製備藥物載劑期間將具有形成親和力之類視色素及/或類視色素結合物及藥物載劑之基本組分混合至藥物載劑組分中來進行。

與本說明書之藥物載劑結合或包括於本說明書之藥物載劑中的類視色素及/或類視色素結合物之量以相對於藥物載劑組分之重量比計可為0.01莫耳%至20莫耳%，較佳為0.2莫耳%至10莫耳%，且更佳為0.5莫耳%至5莫耳%，包括選自值0.5莫耳%、1.0莫耳%、1.5莫耳%、2.0莫耳%、2.5莫耳%、3.0莫耳%、3.5莫耳%、4.0莫耳%、4.5莫耳%及5.0莫耳%之濃度。

在某些實施例中，本發明提供經由在腔室中混合而製造之脂質體。此包括一種方法，其在第一儲器中提供包含核酸(諸如干擾RNA)之水溶液、在第二儲器中提供有機脂質溶液、及混合該水溶液與該有機脂質溶液以至於該有機脂質溶液與該水溶液混合，以便製造以有機

溶劑濃度之梯度包封核酸(例如siRNA)之脂質體。

使用混合法形成之脂質體通常具有約40 nm至約250 nm、約50 nm至約150 nm、約60 nm至約150 nm之尺寸。由此形成之粒子不聚集且視情況經設定大小以達成均勻粒度。

本說明書之藥物載劑可呈任何形式，只要所要物質或物體可輸送至標靶星狀細胞即可，且該形式之實例包括(但不限於)聚合物微粒、脂質體、乳液、微球體及奈球體。此外，本說明書之藥物載劑可包括欲輸送之物質在其內部、附著於欲輸送之物質之外部或與欲輸送之物質混合，只要包括於其中之類視色素及/或類視色素結合物在其最終到達星狀細胞之前在製劑之外部至少部分暴露即可。

本說明書之藥物載劑特異性靶向星狀細胞且使所要效應實現，諸如藉由向星狀細胞有效地輸送所要物質或物體(諸如用於控制星狀細胞之活性或生長之藥物)來以最大效應及最小副效應展現對纖維化之抑制或預防。本發明之藥物載劑所遞送之物質或物體不受特別限制，但其尺寸較佳可使得在生物體中自投與部位物理移動至存在星狀細胞之肝臟、胰臟等。因此，本說明書之藥物載劑不僅可輸送物質，諸如原子、分子、化合物、蛋白或核酸；而且可輸送物體，諸如載體、病毒粒子、細胞、由一或多個要素構成之藥物釋放系統或微機器。物質或物體較佳具有對星狀細胞施加一些效應的性質，且其實例包括標記星狀細胞者及控制星狀細胞活性或生長者。

因此，在本說明書之一個實施例中，其為藥物載劑遞送的用於控制星狀細胞活性或生長之藥物。此可為直接或間接抑制與促進纖維化有關之星狀細胞之物理化學作用的任何藥物，且其實例包括(但不限於)TGFβ活性抑制劑，諸如截短型TGFβ II型受體及可溶TGFβ II型受體；生長因子製劑，諸如HGF及其表現載體；MMP產生啟動子，諸如含MMP基因之腺病毒載體；TIMP產生抑制劑，諸如反義TIMP核

酸；PPAR γ 配體、細胞活化抑制劑及/或細胞生長抑制劑，諸如血管緊張素活性抑制劑、PDGF活性抑制劑及鈉通道抑制劑；以及細胞凋亡誘導物，諸如化合物 861 及膠黴毒素 (gliotoxin)；脂聯素 (adiponectin)；及具有Rho激酶抑制活性之化合物，諸如(+)-反-4-(1-胺基乙基)-1-(4-吡啶基胺甲醯基)環己烷。此外，在本說明書中，『用於控制星狀細胞之活性或生長之藥物』可為直接或間接促進與抑制纖維化直接或間接有關之星狀細胞之物理化學作用的任何藥物，且其實例包括(但不限於)用於促進膠原蛋白降解系統之藥物，例如MMP產生啟動子，諸如MMP表現載體；HGF及具有HGF樣活性之藥物(諸如HGF類似物)及其表現載體。

在本說明書中用於控制星狀細胞之活性或生長之藥物的其他實例包括用於控制細胞外基質(諸如膠原蛋白)之代謝之藥物，例如為具有抑制標靶分子(諸如siRNA、核糖核酸酶及反義核酸(包括RNA、DNA、PNA及其複合物))之表現方面之效應的物質；具有顯性負效應之物質；及表現上述者之載體，其靶向例如由星狀細胞產生之細胞外基質成分分子或靶向一或多種具有產生或分泌細胞外基質成分分子之功能之分子。

本說明書亦係關於用於治療星狀細胞相關病症之醫藥，該醫藥含有藥物載劑及用於控制星狀細胞活性或生長之藥物；且係關於藥物載劑之用途，其係用於製造用以治療星狀細胞相關病症之醫藥組合物。此處提及之星狀細胞相關病症意謂其中星狀細胞與病症之病程(亦即病症之發作、惡化、改良、減輕、治癒等)直接或間接有關的病症，且其實例包括肝病，諸如肝炎(尤其慢性肝炎)、肝纖維化、肝硬化及肝癌；及胰臟病症，諸如胰臟炎(尤其慢性胰臟炎)、胰纖維化及胰臟癌。

在本說明書之醫藥中，藥物載劑可包括藥物在其內部、附著於

含藥物之物質之外部或與藥物混合，只要包括於藥物載劑中之類視色素及/或類視色素結合物在其最終到達星狀細胞之前在製劑之外部至少部分暴露即可。因此，視投與途徑或釋放藥物之方式而定，醫藥可以適當物質(諸如腸溶衣或可隨時間崩解之物質)包覆或可併入適當藥物釋放系統中。

因此，本說明書包括藥物載劑或醫藥製劑套組，其含有一或多個含有藥物載劑成分、類視色素及/或類視色素結合物及/或藥物中之一或多者的容器，且亦包括以該種套組之形式提供的藥物載劑或醫藥之必需組分。除上述者之外，本說明書之套組可含有描述關於本說明書之藥物載劑及醫藥之製備方法或投與方法的說明書等。此外，本說明書之套組可含有所有用於使本說明書之藥物載劑或醫藥完整之組分，但不必含有所有該等組分。因此，本說明書之套組不必含有通常可於醫療處、實驗設施等處獲得之試劑或溶劑，諸如無菌水、鹽水或葡萄糖溶液。

本說明書此外係關於治療星狀細胞相關病症之方法，該方法包括向有需要之個體投與有效量之醫藥。此處提及之有效量為抑制目標病症發作、減少其症狀或預防其進展之量，且較佳為預防目標病症發作或治癒目標病症之量。其較佳亦為不會導致超過投與之益處之反效應的量。該種量可按需要藉由使用培養細胞等活體外測試或藉由在模型動物(諸如小鼠、大鼠、狗或豬)中測試來測定，且該等測試方法為熟習此項技術者所熟知。

在本說明書之方法中，術語『個體』意謂任何活個體，較佳為動物，更佳為哺乳動物，且更佳為人類個體。在本說明書中，個體可為健康的或感染有一些病症，且在治療預期病症之情況下，個體通常意謂感染有該病症或具有受感染風險之個體。

此外，術語『治療』包括所有類型之用於治癒、暫時性減輕、

預防病症等目的的醫學上可接受之預防性及/或治療性干預。舉例而言，當病症為肝纖維化時，術語『治療』包括用於各種目的(包括延遲或中斷纖維化進展、使病變消退或消失、預防纖維化發作或預防復發)的醫學上可接受之干預。

本說明書亦係關於使用藥物載劑向星狀細胞遞送藥物之方法。此方法包括(但不限於)使欲遞送之物質支承於藥物載劑上之步驟，及向含星狀細胞之生物體或介質(諸如培養介質)投與或添加攜有欲遞送之物質之藥物載劑之步驟。此等步驟可按需要根據任何已知方法、本說明書中所述之方法等來達成。此遞送方法可與另一遞送方法(例如其中存在星狀細胞之器官為標靶的另一遞送方法等)組合。

核酸分子可適合於單獨或與其他治療組合用於預防或治療纖維化(例如肝臟、腎臟、腹膜及肺部)疾病、性狀、病況及/或病症；及/或與細胞或組織中之hsp47之含量相關或對細胞或組織中之hsp47之含量起反應的任何其他性狀、疾病、病症或病況。核酸分子可包括適於向個體投與之遞送媒劑(包括脂質體)、載劑及稀釋劑及其鹽，且/或可存在於醫藥學上可接受之調配物中。

本說明書之核酸分子可包括表3中所示之序列。該等核酸分子之實例基本上由提供於表3中之序列組成。

核酸分子可經由肺部遞送(諸如藉由吸入藉由吸入裝置或噴霧器投與之氣霧劑或噴霧乾燥調配物)來投與，從而可使核酸分子快速局部地吸收至相關肺部組織中。含有微米尺寸化核酸組合物之可呼吸吸入的乾燥粒子之固體微粒組合物可藉由研磨乾燥或凍乾核酸組合物，且隨後使微米尺寸化組合物通過例如400網篩以離析或分離出較大聚結物來製備。包含本說明書之核酸組合物之固體微粒組合物可視情況含有用來有助於氣霧劑形成之分散劑以及其他治療性化合物。適合分散劑為乳糖，其可以任何適合比率(諸如1比1重量比)與核酸化合物摻

合。

液體粒子之氣霧劑可包括本文中所揭示之核酸分子，且可藉由任何適合設備(諸如用噴霧器)來產生(參見例如美國專利第4,501,729號)。噴霧器為藉助於經由窄文托利(venturi)孔口加速壓縮氣體(通常為空氣或氧氣)或藉助於超音波攪拌將活性成分之溶液或懸浮液轉化為治療性氣霧劑霧狀物的市售裝置。適用於噴霧器之適合調配物包括於液體載劑中之活性成分，其量為調配物之至多40% w/w，較佳為少於20% w/w。載劑通常為水或稀酒精水溶液，較佳藉由添加例如氯化鈉或其他適合鹽使其與體液等張。若調配物並非製備為無菌，則視情況選用之添加劑包括防腐劑(例如羥基苯甲酸甲酯)、抗氧化劑、調味劑、揮發性油、緩衝劑及乳化劑及其他調配界面活性劑。包括活性組合物及界面活性劑之固體粒子之氣霧劑可用任何固體微粒氣霧劑產生器同樣地製備。用於向個體投與固體微粒治療劑之氣霧劑產生器如以上所說明產生可呼吸吸入之粒子，且以適用於人類投與之速率產生大量含有預定劑量之治療性組合物的氣霧劑。一種說明性類型之固體微粒氣霧劑產生器為吹入器。用於藉由吹入投與之適合調配物包括可藉助於吹入器遞送之細碎粉末。在吹入器中，粉末(例如其可有效實現本文中所描述之治療之定劑量)含於通常由明膠或塑膠製成、可當場刺穿或打開之膠囊或藥筒中，且粉末可藉由在吸入時流經裝置之空氣或藉助於人工操作泵來遞送。用於吹入器中之粉末可僅由活性成分組成，或由包含活性成分、適合粉末稀釋劑(諸如乳糖)及視情況選用之界面活性劑之粉末摻合物組成。活性成分通常佔調配物之0.1 w/w至100 w/w。第二類型之說明性氣霧劑產生器包括定劑量吸入器。定劑量吸入器為通常含有活性成分於液化推進劑中之懸浮液或溶液調配物的加壓氣霧劑分配器。在使用期間，此等裝置經由適合於遞送定體積之閥門排出調配物，產生含有活性成分之細粒噴霧劑。適合推進劑包

括某些氯氟碳化合物，例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷及其混合物。調配物可另外含有一或多種共溶劑(例如乙醇)、乳化劑及其他調配界面活性劑(諸如油酸或脫水山梨糖醇三油酸酯)、抗氧化劑及適合調味劑。其他用於肺部遞送之方法描述於例如US 20040037780、US 6592904、US 6582728及US 6565885中。WO 08132723係關於以氣霧劑形式向呼吸系統一般遞送寡核苷酸及尤其為遞送siRNA。

核酸分子可向中樞神經系統(CNS)或周邊神經系統(PNS)投與。實驗已表明，神經元可在活體內有效吸收核酸。參見例如Sommer等人，1998, *Antisense Nuc. Acid Drug Dev.*, 8:75；Epa等人，2000, *Antisense Nuc. Acid Drug Dev.*, 10:469；Broaddus等人，1998, *J. Neurosurg.*, 88:734；Karle等人，1997, *Eur. J. Pharmacol.*, 340:153；Bannai等人，1998, *Brain Research*, 784:304；Rajakumar等人，1997, *Synapse*, 26:199；Wu-pong等人，1999, *BioPharm*, 12:32；Bannai等人，1998, *Brain Res. Protoc.*, 3:83；及Simantov等人，1996, *Neuroscience*, 74:39。因此，核酸分子可經遞送至CNS及/或PNS且由CNS及/或PNS中之細胞吸收。

遞送核酸分子至CNS係藉由多種不同策略提供。可使用之CNS遞送之傳統方法包括(但不限於)鞘內及腦室內投與；植入導管及泵；於損傷或病變部位處直接注射或灌注；注射至腦動脈系統中；或藉由化學或滲透開放血腦障壁來進行。其他方法可包括使用各種輸送及載劑系統，例如使用結合物及生物可降解聚合物。此外，基因治療方法(例如如Kaplitt等人，美國專利第6,180,613號及Davidson, WO 04/013280中所述)可用於於CNS中表現核酸分子。

核酸分子可與聚伸乙基亞胺(例如直鏈或分支鏈PEI)及/或聚伸乙基亞胺衍生物(包括例如接枝PEI，諸如半乳糖PEI、膽固醇PEI、抗體

衍生化PEI及其聚乙二醇PEI(PEG-PEI)衍生物)調配或複合(參見例如 Ogris等人，2001, AAPA PharmSci, 3, 1-11；Furgeson等人，2003, Bioconjugate Chem., 14, 840-847；Kunath等人，2002, Pharm Res 19:810-17；Choi等人，2001, Bull. Korean Chem. Soc., 22:46-52；Bettinger等人，1999, Bioconjugate Chem., 10:558-561；Peterson等人，2002, Bioconjugate Chem. 13:845-54；Erbacher等人，1999, J Gene Med 1:1-18；Godbey等人，1999., PNAS, 96:5177-81；Godbey等人，1999, J Controlled Release, 60:149-60；Diebold等人，1999, J Biol Chem, 274:19087-94；Thomas等人，2002, PNAS, 99, 14640-45；及 Sagara, 美國專利第6,586,524號)。

核酸分子可包括生物結合物，例如如 Vargeese等人，美國序號 10/427,160；美國專利第6,528,631號；美國專利第6,335,434號；美國專利第6,235,886號；美國專利第6,153,737號；美國專利第5,214,136號；美國專利第5,138,045號中所述之核酸結合物。

本文中所揭示之組合物、方法及套組可包括表現載體，其包括以允許表現核酸分子之方式編碼本說明書之至少一個核酸分子的核酸序列。引入核酸分子或一或多個能夠表現dsRNA之股之載體至細胞之環境中的方法將視細胞之類型及其環境之構成而定。核酸分子或載體構築體可直接引入細胞中(亦即胞內)；或胞外引入腔、間質間隙中、引入生物之循環中；經口引入；或可藉由將生物或細胞浸於含有dsRNA之溶液中來引入。細胞較佳為哺乳動物細胞；更佳為人類細胞。表現載體之核酸分子可包括有義區及反義區。反義區可包括與編碼hsp47之RNA或DNA序列互補之序列，且有義區可包括與反義區互補之序列。核酸分子可包括具有互補有義區及反義區之兩個不同股。核酸分子可包括具有互補有義區及反義區之單股。

與標靶RNA分子相互作用且下調編碼標靶RNA分子(例如本文中

以Genbank寄存編號提及之標靶RNA分子)之基因的核酸分子可自插入DNA或RNA載體中之轉錄單元表現。重組載體可為DNA質體或病毒載體。核酸分子表現病毒載體可基於(但不限於)腺相關病毒、反轉錄病毒、腺病毒或 α 病毒構築。能夠表現核酸分子之重組載體可如本文中所描述進行遞送且繼續存在於標靶細胞中。或者，可使用提供核酸分子之短暫表現的病毒載體。該等載體可視需要重複投與。一旦經表現，則核酸分子經由RNA干擾(RNAi)限制且下調基因功能或表現。核酸分子表現載體之遞送可為全身性的，諸如藉由靜脈內或肌肉內投與；藉由向自個體外植之標靶細胞投與，隨後再引入個體中；或藉由可允許引入所要標靶細胞中之任何其他方法來實現。

在另一態樣中，本發明係關於一種醫藥調配物，其包含一或多種生理學上可接受之表面活性劑、醫藥載劑、稀釋劑、賦形劑及懸浮劑或其組合；及本文中所揭示之調配物(例如可包括化合物、類視色素、第二脂質、穩定劑及/或治療劑之調配物)。用於治療性用途之可接受之其他醫藥載劑或稀釋劑為醫藥技術中所熟知，且描述於例如 Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版，Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)中，該文獻以全文引用的方式併入本文中。防腐劑、穩定劑、染料及其類似物可提供於醫藥調配物中。舉例而言，可添加苯甲酸鈉、抗壞血酸及對羥基苯甲酸之酯作為防腐劑。此外，可使用抗氧化劑及懸浮劑。在各實施例中，醇類、酯類、硫酸化脂族醇及其類似物可用作表面活性劑；蔗糖、葡萄糖、乳糖、澱粉、結晶纖維素、甘露糖醇、輕無水矽酸鹽、鋁酸鎂、鋁酸偏矽酸鎂、合成矽酸鋁、碳酸鈣、碳酸氫鈉、磷酸氫鈣、羧甲基纖維素鈣及其類似物可用作賦形劑；椰子油、橄欖油、芝麻油、花生油、大豆油可用作懸浮劑或潤滑劑；作為碳水化合物(諸如纖維素或糖)之衍生物之鄰苯二甲酸乙酸纖維素或作為聚乙烯之衍生物之乙酸甲酯-甲基丙烯酸酯共聚物

可用作懸浮劑；且塑化劑(諸如鄰苯二甲酸酯及其類似物)可用作懸浮劑。

本文中所描述之醫藥調配物本身可向人類患者投與；或以其中其與其他活性成分(如在組合療法中)或適合醫藥載劑或賦形劑混合的醫藥調配物形式向人類患者投與。用於調配及投與本申請案之化合物的技術可見於「Remington's Pharmaceutical Sciences」，Mack Publishing Co., Easton, PA，第18版，1990中。

適合投與途徑可包括例如非經腸遞送，包括肌肉內、皮下、靜脈內、髓內注射以及鞘內、直接室內、腹膜內、鼻內或眼球內注射。調配物(例如可包括化合物、類視色素、第二脂質、穩定劑及/或治療劑之調配物)亦可以持續或控制釋放劑型(包括儲槽式注射劑、滲透泵及其類似物)投與以便按預定速率進行延長及/或時控、脈衝投與。另外，投與途徑可為局部或全身性的。

醫藥調配物可以本身已知的方式(例如藉助於習知混合、溶解、造粒、製糖衣藥丸、水磨、乳化、包封、包埋或製錠製程)製造。

醫藥調配物可以任何習知方式使用一或多種包含賦形劑及助劑(其有助於加工活性化合物為可在醫藥學上使用之製劑)之生理學上可接受之醫藥載劑來調配。適當調配物視所選投與途徑而定。在適合時且如此項技術(例如Remington's Pharmaceutical Sciences，上述)中所理解，任何熟知技術、醫藥載劑及賦形劑均可使用。

可注射劑可以習知形式製備，如液體溶液或懸浮液、適合於在注射前溶解或懸浮於液體中之固體形式或如乳液。適合賦形劑為例如水、鹽水、蔗糖、葡萄糖、右旋糖、甘露糖醇、乳糖、卵磷脂、白蛋白、麩胺酸鈉、鹽酸半胱胺酸及其類似物。此外，若需要，可注射醫藥調配物中可含有少量無毒輔助物質，諸如濕潤劑、pH值緩衝劑及其類似物。生理學上相容之緩衝液包括(但不限於)漢克氏溶液

(Hanks's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理鹽水緩衝液。若需要，則可利用促吸收製劑。

用於非經腸投與(例如藉由快速注射或連續輸注投與)之醫藥調配物包括呈水溶性形式之活性調配物(例如可包括化合物、類視色素、第二脂質、穩定劑及/或治療劑之調配物)的水溶液。另外，活性化合物之懸浮液可經製備為適當油性注射懸浮液。水性注射懸浮液可含有增加懸浮液黏度之物質，諸如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇或聚葡萄糖。視情況而定，懸浮液亦可含有增加化合物溶解性以允許製備高濃度溶液之適合穩定劑或製劑。用於注射之調配物可呈添加有防腐劑之單位劑型(例如在安瓿或多劑量容器中)。調配物可呈諸如於油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液之形式，且可含有諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑之調配劑。或者，活性成分可呈粉末形式，其在使用之前用適合媒劑(例如無菌無熱原質水)組配。

除先前所述之製劑之外，調配物亦可調配為儲積式製劑。該等長效調配物可藉由肌內注射投與。因此，例如，調配物(例如可包括化合物、類視色素、第二脂質、穩定劑及/或治療劑之調配物)可與適合聚合或疏水性物質(例如呈含於可接受之油中之乳液)或離子交換樹脂一起調配，或經調配為難溶衍生物(例如難溶鹽)。

本文中一些實施例係關於一種遞送治療劑至細胞之方法。舉例而言，一些實施例係關於一種遞送治療劑(諸如siRNA)至細胞中之方法。根據本文中所描述之方法使用之適合細胞包括原核生物；酵母；或高等真核細胞，包括植物及動物細胞(例如哺乳動物細胞)。在一些實施例中，細胞可為人類纖維肉瘤細胞(例如HT1080細胞株)。在其他實施例中，細胞可為癌細胞。可使用作為癌症之模型系統之細胞株，包括(但不限於)乳癌(MCF-7、MDA-MB-438細胞株)、U87神經膠母細胞瘤細胞株、B16F0細胞(黑色素瘤)、海拉細胞(HeLa cell)(子宮頸

癌)、A549細胞(肺癌)及大鼠腫瘤細胞株GH3及9L。在此等實施例中，本文中所描述之調配物可用於轉染細胞。此等實施例可包括使細胞與本文中所描述之包括治療劑之調配物接觸，從而遞送治療劑至細胞。

本文中揭示用於治療以異常纖維化為特徵之病況之方法，其可包括投與治療有效量之本文中所描述之調配物。以異常纖維化為特徵之病況可包括癌症及/或纖維變性疾病。可用本文中所描述之調配物治療或改善之癌症之類型包括(但不限於)肺癌、胰臟癌、乳癌、肝癌、胃癌及結腸癌。在一實施例中，可治療或改善之癌症為胰臟癌。在另一實施例中，可治療或改善之癌症為肺癌。可用本文中所描述之調配物治療或改善之纖維變性疾病之類型包括(但不限於)肝纖維化、肝硬化、胰臟炎、胰纖維化、囊腫性纖維化、聲帶疤痕、聲帶黏膜纖維化、喉纖維化、肺纖維化、特發性肺纖維化、囊腫性纖維化、骨髓纖維化、腹膜後纖維化及腎源性全身性纖維化。在一實施例中，可治療或改善之病況為肝纖維化。

本文中所描述之調配物或醫藥組合物可藉由任何適合方法向個體投與。投與方法之非限制性實例尤其包括：(a)經由皮下、腹膜內、經靜脈內、肌內、皮內、眶內、囊內、脊椎內、胸骨內或其類似方法注射投與，包括輸注泵遞送；(b)諸如藉由直接注射於腎臟或心臟區域中(例如藉由儲槽式植入)局部投與；以及如熟習此項技術者視為適當，使活性化合物與活組織接觸。

適用於投與之醫藥組合物包括其中活性成分以可有效達成其預期目的之量包含在內的調配物(例如可包括化合物、類視色素、第二脂質、穩定劑及/或治療劑之調配物)。一劑所需之本文中所揭示之化合物的治療有效量將視投與途徑、所治療之動物類型(包括人類)及所研究之特定動物之物理特徵而定。該劑量可適合於達成所要效應，但

將視諸如體重、膳食、同時使用之藥物治療的因素及熟習醫學技術者可認識到之其他因素而定。更特定言之，治療有效量意謂可有效預防、減輕或改善疾病之症狀或延長所治療個體之存活期的組合物之量。治療有效量之確定完全在熟習此項技術者能力範圍之內，根據本文中所提供之詳述揭示內容尤其如此。

正如熟習此項技術者將顯而易知，欲投與之適用活體內劑量及特定投與模式將視年齡、體重及所治療之哺乳動物種類、所用特定化合物及採用此等化合物之特定用途而變化。有效劑量含量(亦即達成所要結果所需之劑量含量)之測定可由熟習此項技術者使用常規藥理學方法獲得。一般而言，產品之人類臨床應用自較低劑量含量開始，增加劑量含量直至達成所要效應。或者，可接受之活體外研究可用於使用既定藥理學方法確定藉由本發明方法鑑別之組合物的適用劑量及投與途徑。

在非人類動物研究中，潛在產品之應用自較高劑量含量開始，減少劑量直至不再達成所要效應或不良副作用消失。劑量可視所要效應及治療適應症而廣泛變化。一般而言，劑量可為每kg體重約10微克至約100 mg，較佳為每kg體重約100微克至約10 mg。或者，如熟習此項技術者所瞭解，劑量可基於患者之體表面積且依據患者之體表面積來計算。

醫藥組合物之確切配方、投與途徑及劑量可由個別醫師考慮到患者之病況來選擇。(參見例如 Fingl 等人，1975，於「The Pharmacological Basis of Therapeutics」中，該文獻據此以全文引用的方式併入本文中，尤其參考第1章，第1頁)。一般而言，向患者投與之組合物之劑量範圍可為每kg患者體重約0.5 mg至約1000 mg。劑量可如患者所需要在一或多天過程中所給出的單個或兩個或兩個以上之系列。在已就至少一些病況確定化合物之人類劑量之情況下，劑量將

幾乎相同，或劑量為所確定人類劑量的約0.1%至約500%、更佳為約25%至約250%。在未確定人類劑量時，正如新發現之醫藥組合物之情形，可自ED₅₀值或ID₅₀值或由活體外或活體內研究(如由動物中之毒性研究及功效研究鑑定)獲得之其他適當值推斷適合人類劑量。

應注意，主治醫師將知道如何及何時因毒性或器官功能障礙而終止、中斷或調節投與。相反地，主治醫師亦將知道在臨床反應不充足(排除毒性)時調節治療至較高含量。處理相關病症時之投與劑量之量值將隨欲治療之病況之嚴重程度及投與途徑而變化。病況之嚴重程度可例如在某種程度上藉由標準預後評估方法來評估。此外，劑量及或許劑量頻率，亦將視個別患者之年齡、體重及反應而變化。與以上所述者相當之程式可用於獸醫學中。

雖然確切劑量將基於逐個藥物而確定，但在大多數情況下，可關於劑量作出一些概括。用於成年人類患者之每日給藥方案可為例如約0.1 mg至2000 mg、較佳為約1 mg至約500 mg、例如5 mg至200 mg各活性成分之劑量。在其他實施例中，使用約0.01 mg至約100 mg、較佳為約0.1 mg至約60 mg、例如約1 mg至約40 mg之各活性成分的靜脈內、皮下或肌肉內劑量。在投與醫藥學上可接受之鹽的情況下，劑量可根據游離鹼進行計算。在一些實施例中，每天投與調配物1至4次。或者，調配物可藉由連續靜脈內輸注，較佳以每天至多約1000 mg之各活性成分之劑量投與。如熟習此項技術者應瞭解，在某些情況下，可能需要以超過或甚至大大超過上述較佳劑量範圍之量投與本文中所揭示之調配物，以便有效且主動治療尤具侵襲性的疾病或感染。在一些實施例中，調配物之投與應持續連續療法之時間，例如持續一週或一週以上，或持續數月或數年。

可個別地調節劑量及間隔時間以提供足以維持調節效應之活性部分之血漿含量，或最小有效濃度(MEC)。MEC可視各化合物而變

化，但可根據活體外資料估算。達成MEC必需之劑量將視個別特徵及投與途徑而定。然而，HPLC分析或生物分析可用於測定血漿濃度。

給藥間隔時間亦可使用MEC值來確定。組合物應使用維持血漿含量比當時MEC高10%至90%、較佳為30%至90%之間且最佳為50%至90%之間之方案投與。

在局部投與或選擇吸收之情況下，藥物之有效局部濃度可能與血漿濃度無關。

所投與之調配物之量可視所治療之個體、個體之體重、病痛之嚴重程度、投與方式及處方醫師之診斷而定。

可使用已知方法評估本文中所揭示之調配物(例如可包括化合物、類視色素、第二脂質、穩定劑及/或治療劑之調配物)的功效及毒性。舉例而言，特定化合物或共有某些化學部分之化合物子集的毒物學可藉由測定針對細胞株(諸如哺乳動物且較佳為人類細胞株)之活體外毒性來確定。該等研究之結果通常可預測動物(諸如哺乳動物或更特定言之為人類)中之毒性。或者，特定化合物在動物模型(諸如小鼠、大鼠、兔或猴)中之毒性可使用已知方法加以測定。特定化合物之功效可使用數種公認方法(諸如活體外方法)、動物模型或人類臨床試驗確定。就幾乎每一類病況(包括(但不限於)癌症、心血管疾病及各種免疫功能障礙)而言均存在公認活體外模型。同樣，可接受之動物模型可用於確定化學品治療該等病況之功效。當選擇模型以測定功效時，熟習此項技術者可由目前先進技術指導來選擇適當模型、劑量及投與途徑及方案。當然，人類臨床試驗亦可用來測定化合物在人類中之功效。

若需要，則調配物可呈現於可含有一或多個單位劑型(含有活性成分)之包裝或分配器裝置中。包裝可例如包含金屬或塑膠箔，諸如泡殼包裝。包裝或分配器裝置可附有投藥說明書。包裝或分配器亦可

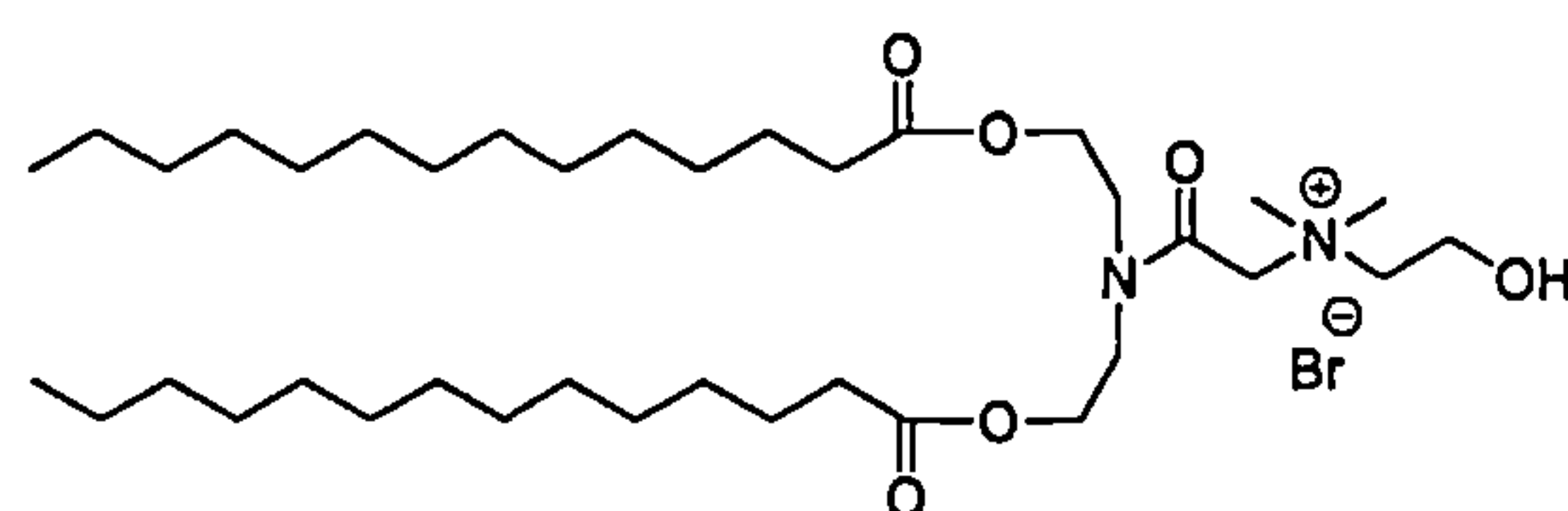
附有與容器相聯之注意事項，其呈管理醫藥品之製造、使用或銷售之政府機構指定的形式，該注意事項反映該機構批准該藥物形式用於人類或獸醫學投與。該等注意事項例如可為經美國食品藥物管理局(U.S. Food and Drug Administration)對於處方藥物批准的標籤或經批准之產品插入物。亦可製備包含調配於相容醫藥載劑中之化合物的組合物，置於適當容器中，且加以標記用於治療指定病況。

應瞭解，在本文中所描述具有一或多個立體中心之任何化合物中，若未明確指定絕對立體化學，則各中心可獨立地具有R組態或S組態或其混合物。因此，本文中所提供之化合物可為對映異構性純的或為立體異構混合物。此外，應瞭解，在具有一或多個產生幾何異構體(可定義為E或Z)之雙鍵的任何化合物中，各雙鍵可獨立地為E或Z或其混合物。同樣，所有互變異構形式均亦意欲包括在內。

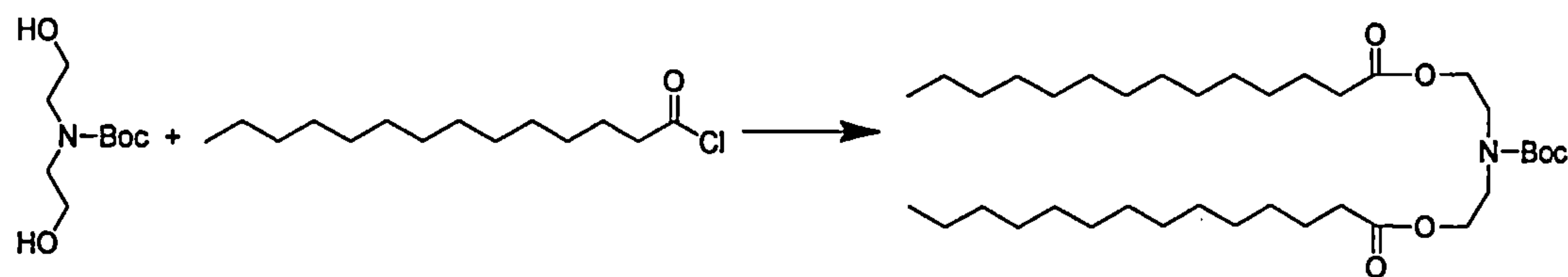
可參考以下實例進一步例示本發明。此等實例僅為說明性的，且不意欲限制本發明。

實例

實例1：製備溴化2-(雙(2-(十四氈氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-2-側氧基乙-銨(HEDC)

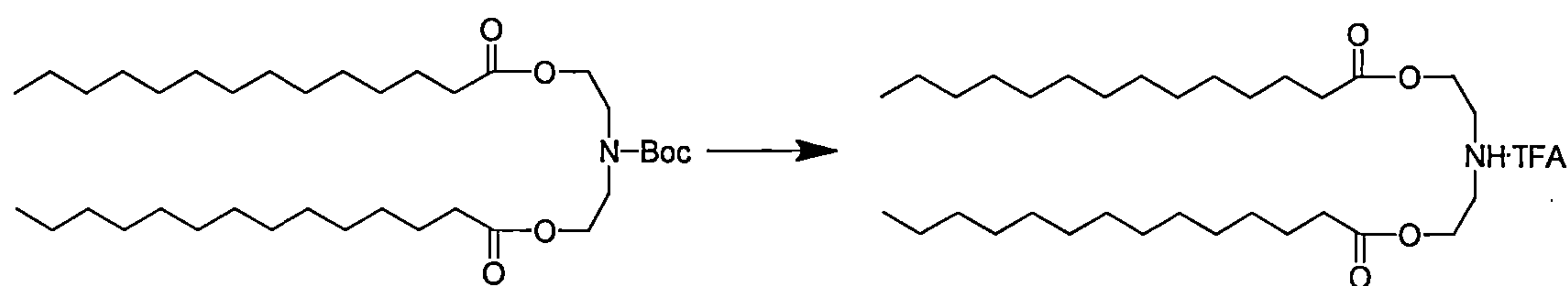


製備中間物1：二-十四烷酸2,2'-(第三丁氧基羰基氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(HEDC-BOC-IN)



冷卻 *N*-BOC-二乙醇胺(194 g, 0.946 mol)、三乙胺(201 g, 2.03 mol)及二胺基吡啶(23.1 g, 0.19 mol)於DCM(1750 mL)中之溶液至0℃。在0℃至10℃下經50分鐘之時間添加肉豆蔻酰氯(491 g, 1.99 mol)於DCM(440 mL)中之溶液，且使混合物升溫至周圍溫度。在20℃至24℃下1.5小時之後藉由TLC指示完全轉化。添加水(1750 mL)且藉由pH計量測pH值為8.3。分離有機相，以(1) 6% NaHCO₃(500 mL)、(2) 0.3 M HCl(1700 mL)、(3) 12.5%氯化鈉(1700 mL)洗滌，且以無水硫酸鎂(120 g)乾燥。在50℃及50毫巴(mBar)下蒸發濾液，得到622 g二-十四烷酸2,2'-(第三丁氧基羰基氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(HEDC-BOC-IN)。靜置時凝固之此蒸餾殘餘物用於下一步驟中。

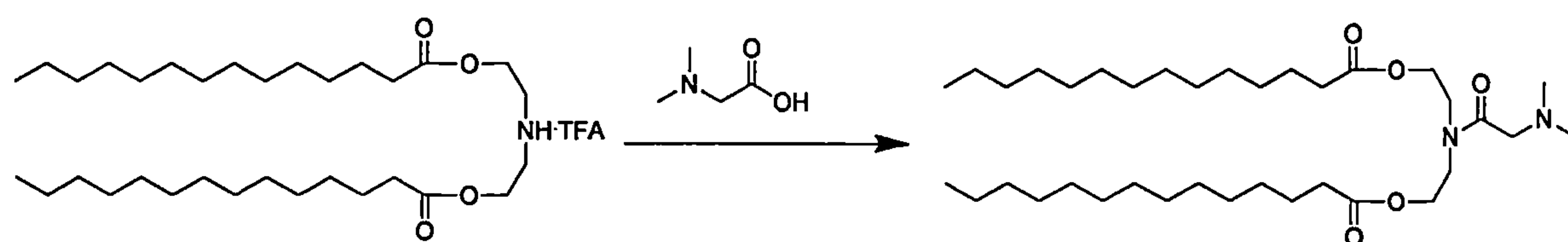
製備中間物2：二-十四烷酸2,2'-(第三丁氧基羰基氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(HEDC-胺-IN)TFA鹽



藉由於50℃浴中短暫加熱將HEDC-BOC-IN(620 g, 0.990 mol)轉化為液體，且隨後冷卻至低於25℃。經30分鐘之時間添加TFA(940 mL, 1.39 kg, 1.18 mol)至液體中，使用緩和冷卻以便維持溫度不高於25℃。添加TFA量之三分之二之後，觀測到顯著氣體逸出。在周圍溫度下攪拌反應混合物隔夜。TLC指示有痕量HEDC-BOC-IN。在減壓(125毫巴至60毫巴)下由50℃至55℃之水浴加熱反應混合物以便蒸餾TFA，且繼續蒸餾直至其變得極慢。以10%氫氧化鈉將TFA煙吸收

於洗滌器中。添加庚烷(2000 mL)，攪拌，且在減壓下蒸餾出。添加庚烷(2000 mL)至部分凝固殘餘物中，且加熱混合物至45℃，在該溫度下形成微混濁溶液。冷卻溶液，在40℃下接種，且藉由在40℃至36℃下攪拌25分鐘之時間來形成沈澱物。在周圍溫度下冷卻且攪拌40分鐘之時間後，藉由過濾分離重晶體之沈澱物，且以庚烷(1000 mL)洗滌濾餅。在減壓(<1毫巴)下在周圍溫度下乾燥濕濾餅(914 g)隔夜，得到635 g(100%)呈白色晶體狀之二-十四烷酸2,2'-(第三丁氧基羰基氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(HEDC-胺-IN)TFA鹽。

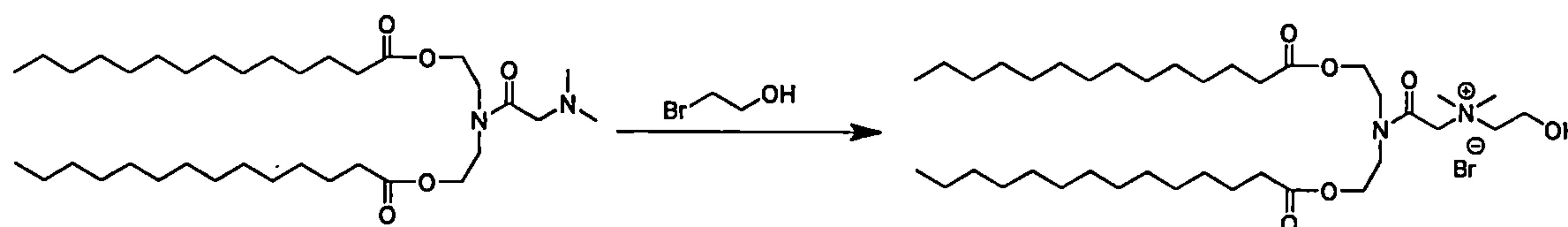
製備中間物3：二-十四烷酸2,2'-(2-(二甲基胺基)乙醯基氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(HEDC-DiMeGly-IN)



添加N,N-二甲基甘胺酸(56.6 g, 548 mmol)、HOBt水合物(83.9 g, 548 mmol)及EDC鹽酸鹽(105 g, 548 mmol)至DMF(3.5 L)中，且在周圍溫度下攪拌混合物一個小時之時間。形成澄清溶液。將HEDC-胺-IN TFA鹽(270 g, 442 mmol)與DCM(1.15 L)及6%碳酸氫鈉(1.15 L)混合。添加具有游離胺之經分離有機相至於DMF中之偶合混合物中，且觀測到沈澱以及約9℃之溫度升高。添加三乙胺(47.0 g, 464 mmol)，且在25℃至30℃下攪拌反應混合物五個小時之時間。TLC指示不完全轉化，且添加額外EDC鹽酸鹽(29.5 g, 154 mmol)。在周圍溫度下攪拌隔夜後，觀測到澄清溶液，且TLC現指示完全轉化。將反應混合物與DCM(2.3 L)及2%碳酸氫鈉(7 L)混合。以1.25%氯化鈉(每次5 L)洗滌有機相兩次且以無水硫酸鎂(186 g)乾燥。在50℃及30毫巴下蒸發濾液，得到253 g粗油狀物。將粗物質裝載至填充有2.6 kg矽膠60(Silica Gel 60)(40 μ至63 μ)之管柱中。相繼以甲苯:乙酸乙酯(8:2)(4 L)及乙酸

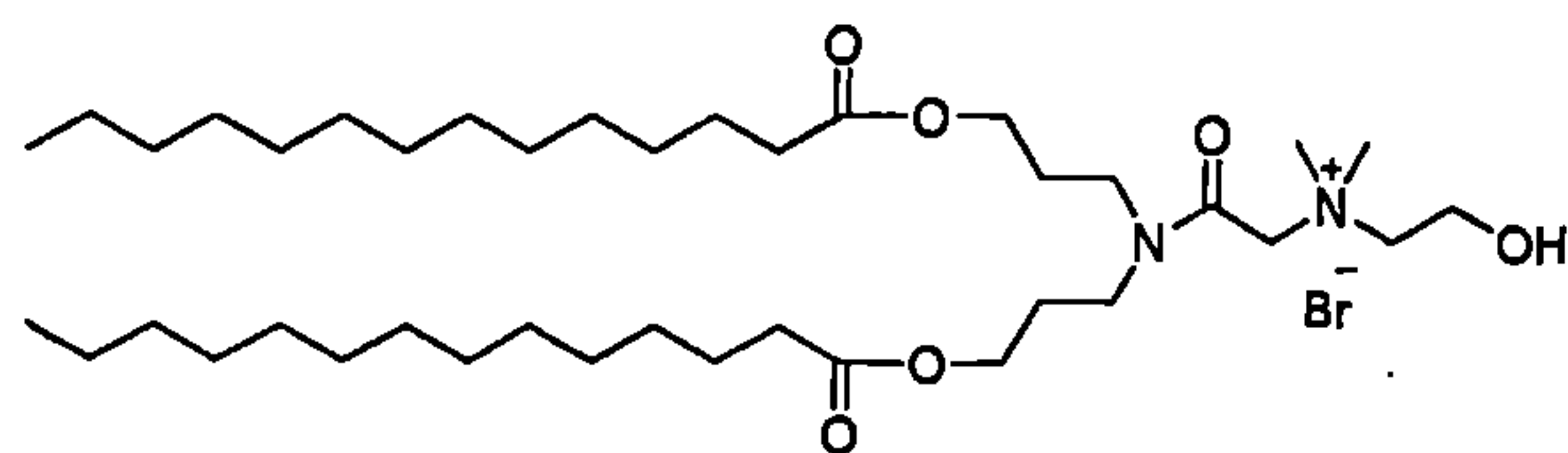
乙酯:甲醇(1:1)(5 L)溶離產物。蒸發(50°C /250毫巴至20毫巴)含有產物之溶離份(3.5 L至8 L)，得到208 g(66%)呈油狀之二-十四烷酸2,2'-(2-(二甲基胺基)乙醯基氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(HEDC-DiMeGly-IN)。

製備HEDC：溴化2-(雙(2-(十四醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-2-側氧基乙銨

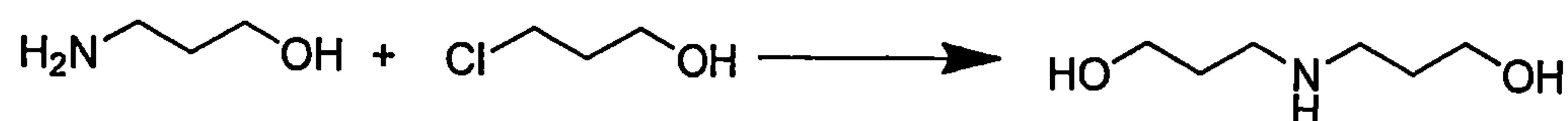


在80°C下攪拌HEDC-DiMeGly-IN(206 g, 337 mmol)及2-溴乙醇(274 g, 2.19 mol)之混合物兩個小時之時間。HPLC指示8.1%未反應之二甲基甘胺酸中間物。再在80°C下持續40分鐘時間之後，HPLC指示7.8%未反應之二甲基甘胺酸中間物。添加溫(65°C)乙酸乙酯(2 L)。以熱乙酸乙酯(0.5 L)洗滌熱溶液之空白過濾。冷卻經合併濾液至0°C，且藉由接種開始結晶。緩慢冷卻產物懸浮液且在-16°C至-18°C下攪拌40分鐘之時間。藉由過濾分離沈澱物，且以冷乙酸乙酯(200 mL)洗滌濾餅。乾燥隔夜(20°C /<1毫巴)，得到211 g粗物質。隨後藉由加熱至35°C且在25°C下接種而自乙酸乙酯(2.1 L)及乙醇(105 mL)之混合物再結晶物質。在10°C下分離沈澱物，以冷乙酸乙酯(300 mL)洗滌且乾燥(20°C /<1毫巴)隔夜，得到161 g(66%)溴化2-(雙(2-(十四醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-2-側氧基乙銨(HEDC)。HPLC指示99.5%純度。QTOF MS ESI+: m/z 655.6 (M+H)。

實例2：製備溴化2-(雙(3-(十四醯氧基)丙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-2-側氧基-乙醇銨(Pr-HEDC)

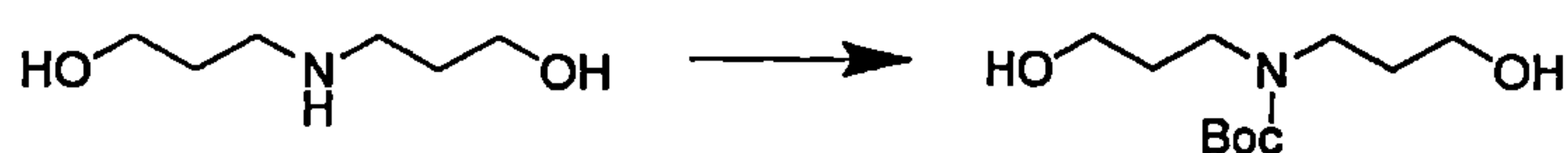


製備中間物1：3,3'-氮二基雙(丙-1-醇)



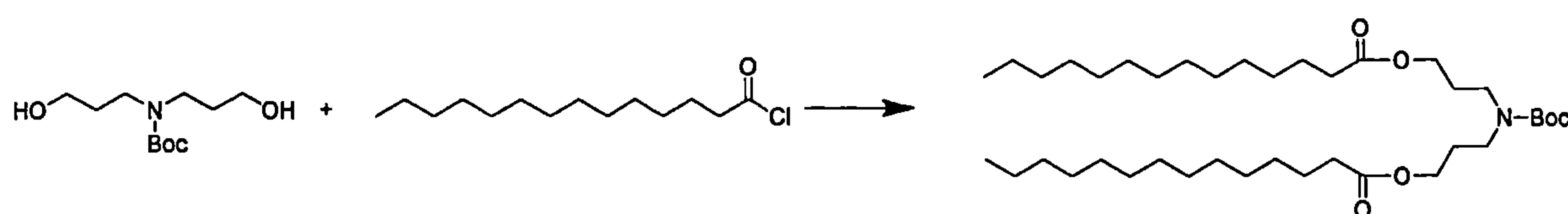
使3-胺基-1-丙醇(14.5 mL, 19.0 mmol)、1-氯-3-羥基丙烷(8 mL, 95.6 mmol)及H₂O(約50 mL)之混合物回流24小時。隨後添加氫氧化鉀(5.40 g)。在溶解之後，蒸發全部H₂O，留下黏性油狀物及大量氯化鉀。將其過濾且以乾燥丙酮及二氯甲烷洗滌。經Na₂SO₄乾燥有機相，過濾，且濃縮。隨後經由在DCM/MeOH梯度下矽膠層析來純化產物，獲得12.5 g 3,3'-氮二基雙(丙-1-醇)。

製備中間物2：雙(3-羥丙基)胺基甲酸第三丁酯



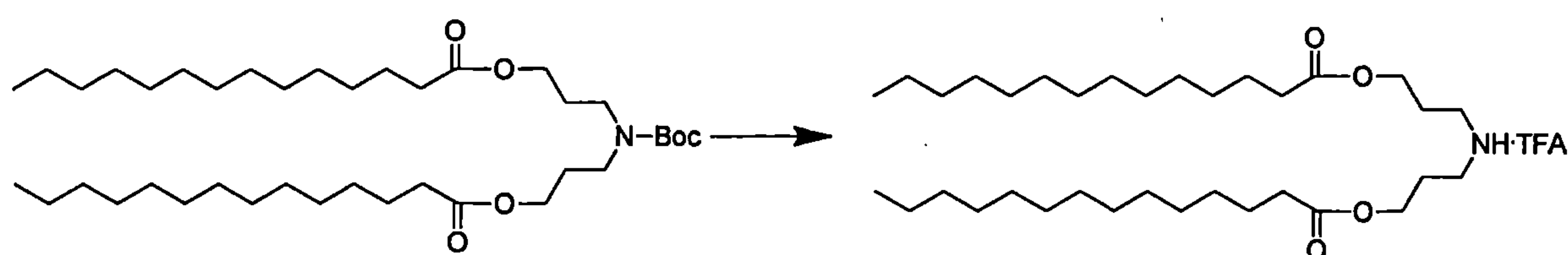
將3,3'-氮二基雙(丙-1-醇)(12.5 g, 95.4 mmol)稀釋於DCM(25 mL)中。在Ar氣層下在攪拌下緩慢添加二碳酸二-第三丁酯(26 g, 119.25 mmol)於DCM(25 mL)中之溶液。攪拌反應物隔夜。濃縮反應混合物。藉由在DCM/MeOH梯度下矽膠層析來純化，獲得雙(3-羥丙基)胺基甲酸第三丁酯。

製備中間物3：二-十四烷酸((第三丁氧基羰基)氮二基)雙(丙-3,1-二酯)



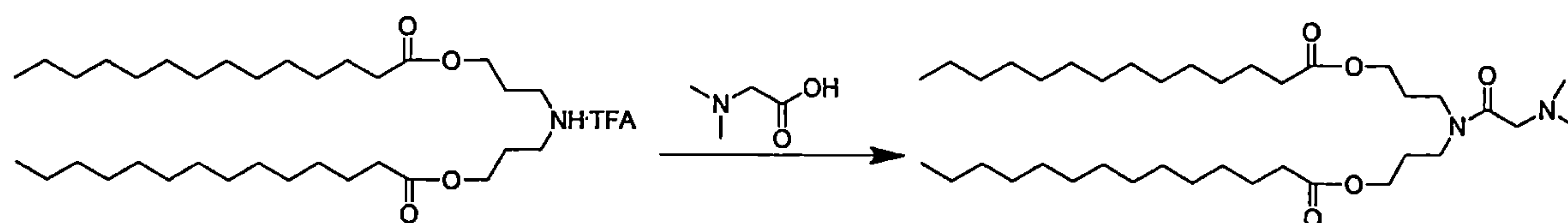
將雙(3-羥丙基)胺基甲酸第三丁酯(4.00 g, 17.3 mmol)、三乙胺(4.80 ml, 34.6 mmol)及4-二甲基胺基吡啶(529 mg, 4.33 mmol)溶解於氯仿(50 mL)中。當於冰浴中攪拌時，在約15分鐘內添加肉豆蔻醯氯之溶液。添加係以使得反應物之溫度不超過30℃之方式進行。在室溫下攪拌反應物隔夜。次日，添加MeOH(50 mL)及0.9%鹽水溶液(50 mL)以淬滅反應。分離有機層且以1 M NaHCO₃洗滌。以Na₂SO₄乾燥溶劑，過濾，且在真空中濃縮，獲得呈油狀之二-十四烷酸((第三丁氧基羰基)氮二基)雙(丙-3,1-二酯)。

製備中間物4：二-十四烷酸氮二基雙(丙-3,1-二酯)TFA鹽



將二-十四烷酸((第三丁氧基羰基)氮二基)雙(丙-3,1-二酯)(11.3 g, 17.3 mmol)溶解於TFA/CHCl₃(1:1, 20 mL)中且在室溫下攪拌混合物15分鐘。隨後在真空中濃縮混合物。再次重複此舉。隨後將殘餘物溶解於DCM中且以H₂O洗滌，以Na₂SO₄乾燥，且在真空中濃縮。藉由在DCM/ MeOH梯度下矽膠層析來純化，獲得呈TFA鹽形式之二-十四烷酸氮二基雙(丙-3,1-二酯)(750 mg)。

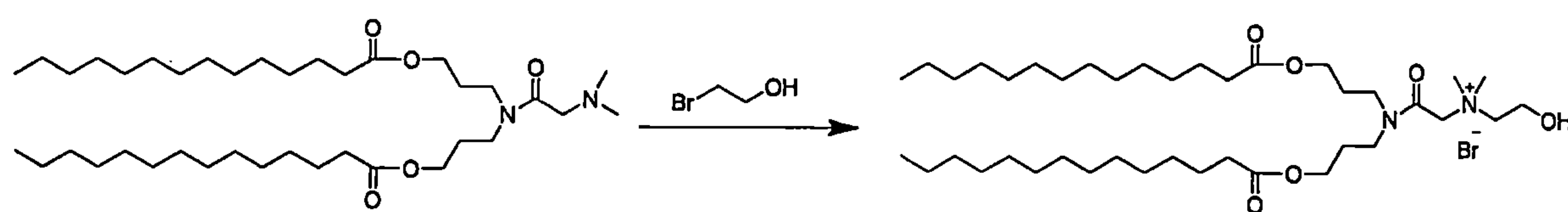
製備中間物5：二-十四烷酸((2-(二甲基胺基)乙醯基)氮二基)雙(丙-3,1-二酯)



以DCM(5 mL)稀釋二-十四烷酸氮二基雙(丙-3,1-二酯)TFA鹽(750

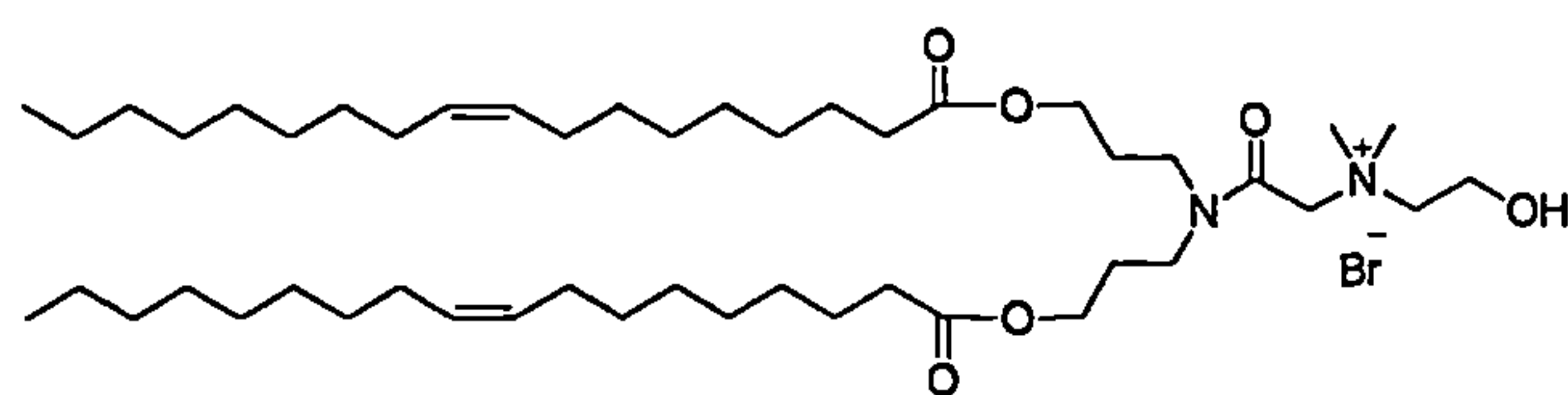
mg, 1.35 mmol) 且將其添加至 N,N-二甲基甘胺酸 (154 mg, 1.49 mmol)、HATU (616 mg, 1.62 mmol) 及 DIEA (495 μ L, 2.84 mmol) 於 DCM (5 mL) 中之預活化混合物中。以氫氣沖洗產物且在室溫下攪拌隔夜，且隨後濃縮。藉由在 DCM/MeOH 梯度下矽膠層析來純化，獲得 465 mg 二-十四烷酸((2-(二甲基胺基)乙醯基)氮二基)雙(丙-3,1-二酯)。

製備 Pr-HEDC：溴化 2-(雙(3-(十四醯氧基)丙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-2-側氧基乙銨

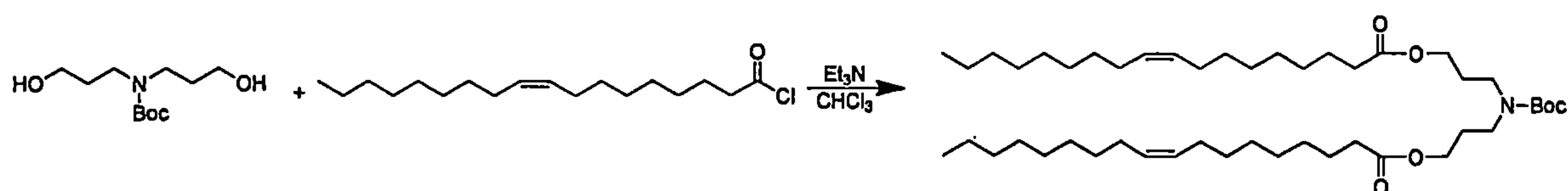


在密封系統中，將二-十四烷酸((2-(二甲基胺基)乙醯基)氮二基)雙(丙-3,1-二酯) (246 mg, 0.385 mmol) 溶解於 ACN (10 mL) 中，且添加 2-溴乙醇 (500 μ L)。以惰性氣體沖洗反應容器且隨後密封。加熱混合物至 80 $^{\circ}$ C，攪拌隔夜，且隨後冷卻且在真空中濃縮。藉由在 DCM/MeOH 梯度下矽膠層析來純化，獲得 99 mg 溴化 2-(雙(3-(十四醯氧基)丙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-2-側氧基乙銨。QTOF MS ESI+: m/z 683.6 (M+H)。

實例 3：製備溴化 2-(雙(3-(油醯氧基)丙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-2-側氧基乙銨 (Pr-HE-DODC)

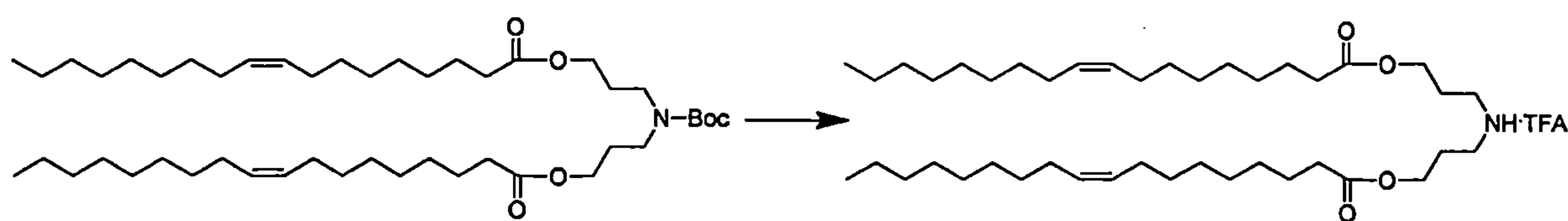


製備中間物 1：二油酸(Z)-((第三丁氧基羰基)氮二基)雙(丙-3,1-二酯)



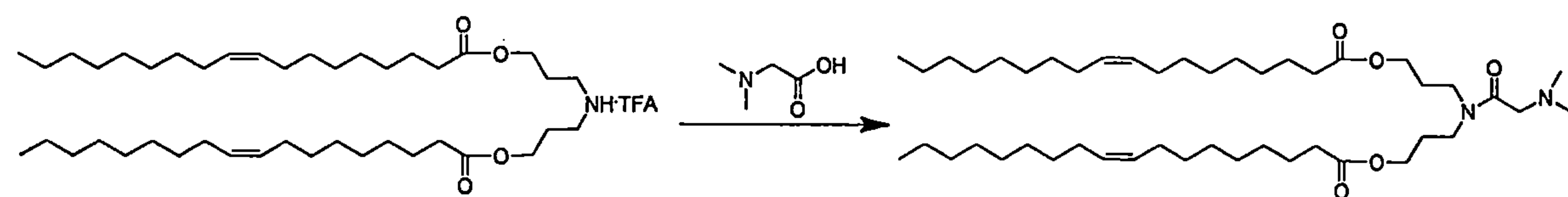
將雙(3-羥丙基)胺基甲酸第三丁酯(先前所述合成)、三乙胺及DMAP溶解於氯仿中。當於冰浴中攪拌時，在15分鐘內添加油醯氯之溶液。添加係以使得反應物之溫度不超過30℃之方式進行。在室溫下攪拌反應物隔夜。次日，添加MeOH(50 mL)及0.9%鹽水溶液(50 mL)以淬滅反應。分離有機層且以1 M NaHCO₃洗滌。以Na₂SO₄乾燥溶劑，過濾且濃縮，獲得油狀物。二油酸(Z)-((第三丁氧基羰基)氮二基)雙(丙-3,1-二酯)無需任何進一步純化即可轉入下一步驟。

製備中間物2：二油酸(Z)-氮二基雙(丙-3,1-二酯)TFA鹽



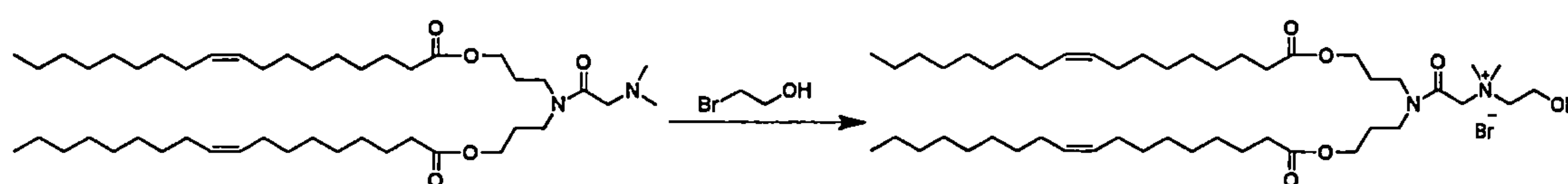
將二油酸(Z)-((第三丁氧基羰基)氮二基)雙(丙-3,1-二酯)(13.2 g, 17.3 mmol)溶解於TFA/CHCl₃(1:1, 20 mL)中且在室溫下攪拌混合物15分鐘。隨後在真空中濃縮混合物。再次重複此舉。隨後將殘餘物溶解於DCM中且以H₂O洗滌，以Na₂SO₄乾燥且濃縮。藉由在DCM/MeOH梯度下矽膠層析來純化，獲得二油酸(Z)-氮二基雙(丙-3,1-二酯)TFA鹽(750 mg)。

製備中間物3：二油酸(Z)-((2-(二甲基胺基)乙醯基)氮二基)雙(丙-3,1-二酯)



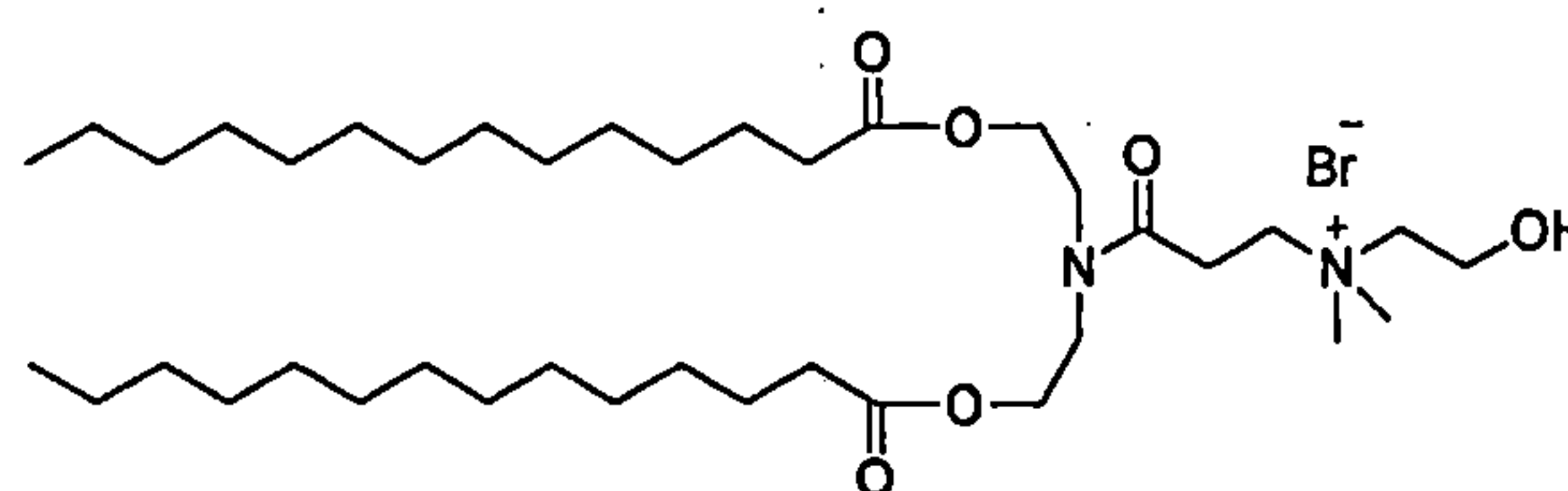
以DCM(5 mL)稀釋二油酸(Z)-氮二基雙(丙-3,1-二酯) TFA鹽(750 mg, 1.13 mmol)且將其添加至N,N-二甲基甘胺酸(128 mg, 1.24 mmol)、HATU(517 mg, 1.36 mmol)及DIEA(413 μ L, 2.37 mmol)於DCM(5 mL)中之預活化混合物中。以氫氣沖洗燒瓶且使其在室溫下攪拌隔夜。濃縮反應混合物，且使其經DCM/MeOH梯度之矽膠層析，獲得二油酸(Z)-((2-(二甲基胺基)乙醯基)氮二基)雙(丙-3,1-二酯)。

製備Pr-HE-DODC：溴化2-(雙(3-(油醯氧基)丙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-2-側氧基乙銨

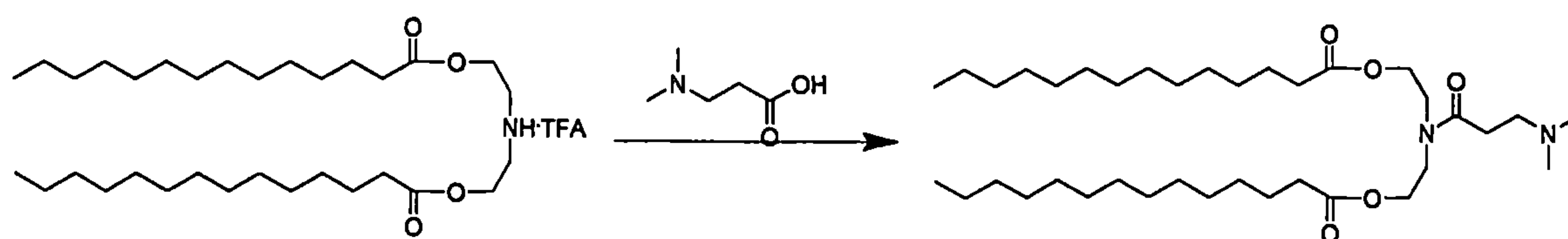


在密封系統中，將二油酸(Z)-((2-(二甲基胺基)乙醯基)氮二基)雙(丙-3,1-二酯)(269 mg, 0.360 mmol)溶解於ACN(10 mL)中，且添加2-溴乙醇(200 μ L)。以惰性氣體沖洗反應容器且隨後密封。加熱反應物至80℃且攪拌隔夜。冷卻反應混合物且濃縮。藉由在DCM/MeOH梯度下矽膠層析來純化，獲得溴化2-(雙(3-(油醯氧基)丙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-2-側氧基乙銨(129 mg)。QTOF MS ESI+: m/z 791.7 (M+H)。

實例4：製備溴化3-(雙(2-(十四醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-3-側氧基丙-1-銨(HE-Et-DC)

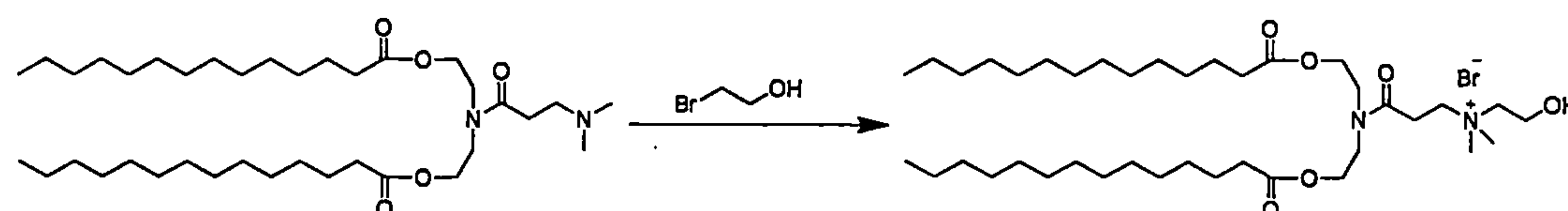


製備中間物1：二-十四烷酸((3-(二甲基胺基)丙醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)



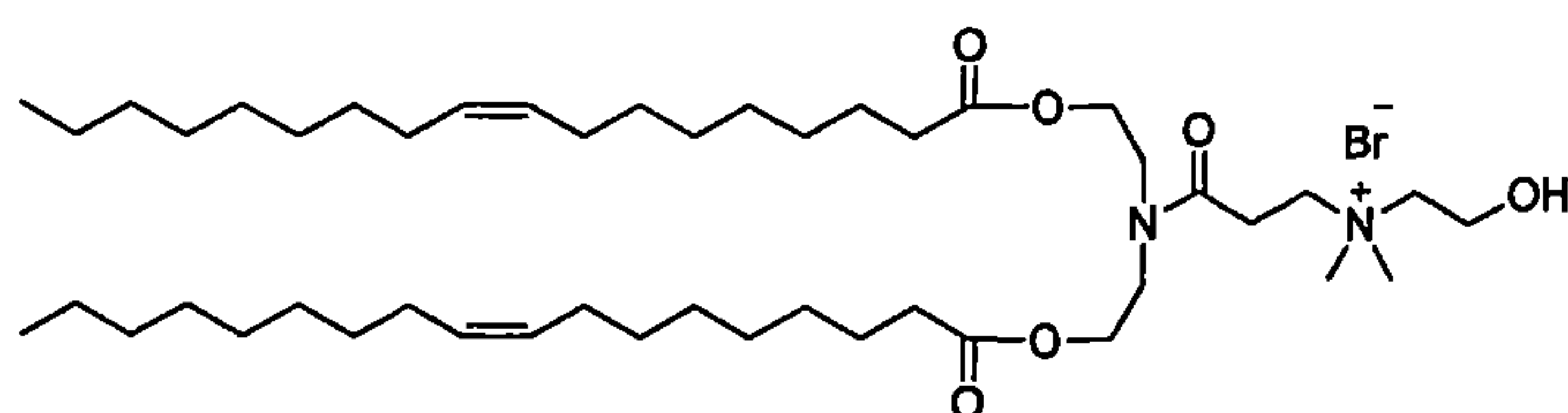
如先前所述合成二-十四烷酸氮二基雙(乙-2,1-二酯)TFA鹽。以DCM(10 mL)稀釋二-十四烷酸氮二基雙(乙-2,1-二酯)TFA鹽(1.5 g, 2.85 mmol)且將其添加至3-(二甲基胺基)丙酸鹽酸鹽(482 mg, 3.14 mmol)、HATU(1.30 g, 3.42 mmol)及DIEA(1.04 mL, 5.98 mmol)於DCM(10 mL)中之預活化混合物中。以氬氣沖洗圓底燒瓶且在室溫下攪拌反應混合物隔夜。濃縮反應混合物。藉由在DCM/MeOH梯度下矽膠層析來純化，獲得二-十四烷酸((3-(二甲基胺基)丙醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)。

製備HE-Et-DC：溴化3-(雙(2-(十四醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-3-側氧基丙-1-銨

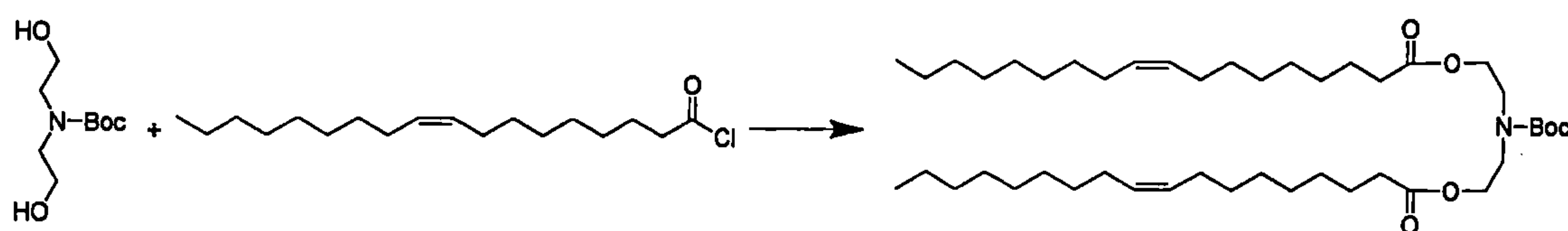


在密封系統中，將二-十四烷酸((3-(二甲基胺基)丙醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(606 mg, 0.970 mmol)溶解於ACN(10 mL)中，且添加2-溴乙醇(500 μ L)。以惰性氣體沖洗反應容器且隨後密封。加熱反應物至80 $^{\circ}$ C且攪拌隔夜，隨後冷卻且濃縮。藉由在DCM/MeOH梯度下矽膠層析來純化，獲得溴化3-(雙(2-(十四醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-3-側氧基丙-1-銨(80 mg)。QTOF MS ESI+: m/z 669.6 (M+H)。

實例5：製備溴化3-(雙(2-(油醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-3-側氧基丙-1-銨(HE-Et-DODC)



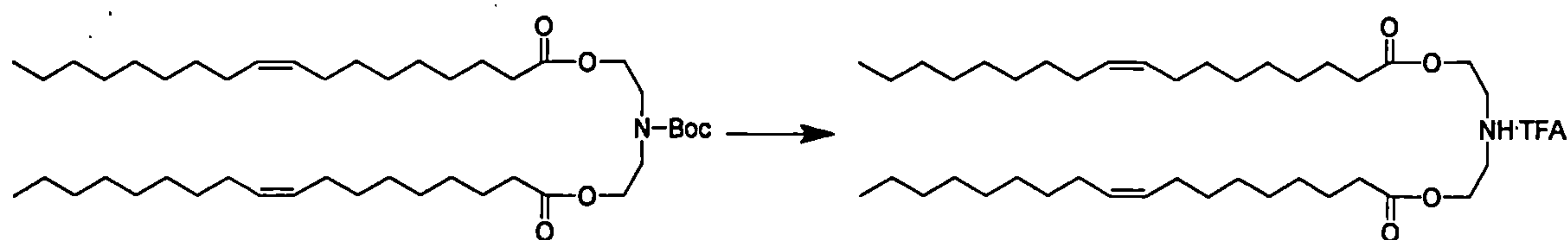
製備中間物1：二油酸(Z)-((第三丁氧基羰基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)



將 *N*-Boc 二乙醇胺 (Aldrich 15268, 貨號 0001406013, MW 205.25; 17.81 g, 0.087 莫耳)、三乙胺 (Aldrich, MW 101.19; 24.4 ml, 0.176 莫耳) 及 4-(二甲基胺基)吡啶 (Aldrich, MW 122.17; 2.76 g, 1.3 g, 0.023 莫耳) 溶解於 350 ml 氯仿中。當攪拌時，在 10 分鐘內添加油醯氯 (MW 300.91; 61.6 g, 0.174 莫耳) 於 100 ml 氯仿中之溶液 (或者，當添加油醯氯時將 *N*-Boc 二乙醇胺之氯仿溶液浸於冰/水浴中)。添加係以使得反應混合物之溫度不超過 50°C 之方式進行。在室溫下攪拌反應混合物 2 小時。添加 200 ml 甲醇 (EMD MX0485-5, 貨號 50350) 及 200 ml 0.9% 鹽水 (氯化鈉, BDH, BDH8014, 貨號 92717) 之混合物以淬滅反應。分離有機層且以 2×100 ml 稀碳酸氫鈉水溶液 (Aldrich S6014, 批號 095K0143) 洗滌。藉由旋轉蒸發移除溶劑，獲得 59.5 g 呈淺黃色油狀之粗產物 (MW 734.14; 59.5 g, 0.081 莫耳, 100% 產率)。此物質無需進一步純化即可用於下一步驟。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 0.87 (t, 6H, CH₃), 1.20-1.40 (m, 40H, CH₂), 1.45 (s, 9H, *t*Bu 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),

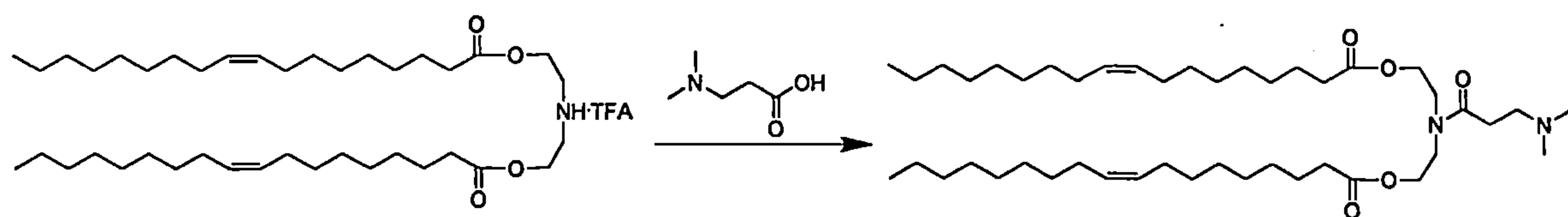
5.33 (m, 4H, CH=CH)。

製備中間物2：二油酸(Z)-氮二基雙(乙-2,1-二酯)TFA鹽



以100 ml三氟乙酸(Alfa Aesar庫號A12198，貨號D07W005，MW 114.02；100 ml，1.35莫耳)及100 ml氯仿(Aldrich 154733，貨號KBF5943V)處理二油酸(Z)-((第三丁氧基羰基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(59.5 g，0.081莫耳)兩次。各包括在室溫下攪拌十分鐘，且在每次處理結束時藉由旋轉蒸發移除溶劑。在第二處理之後，藉由旋轉蒸發濃縮反應混合物。將殘餘物溶解於200 ml二氯甲烷中且已以100 ml水洗滌混合物兩次。藉由矽膠層析、使用甲醇(EMD MX0485-5，貨號50350)及二氯甲烷(EMD DX0835-5，貨號51090)之混合物作為溶離劑純化殘餘物，獲得44 g二油酸(Z)-氮二基雙(乙-2,1-二酯)TFA鹽(44.0 g)。¹H NMR (400 MHz, 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)。

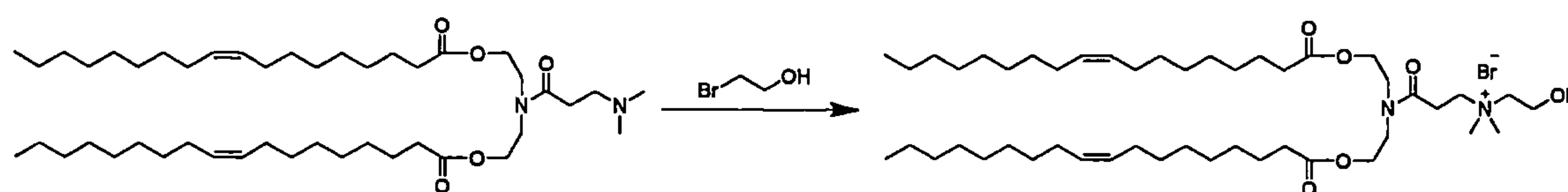
製備中間物3：二油酸(Z)-((3-(二甲基胺基)丙醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)



以DCM(10 mL)稀釋二油酸(Z)-氮二基雙(乙-2,1-二酯)TFA鹽(1.50

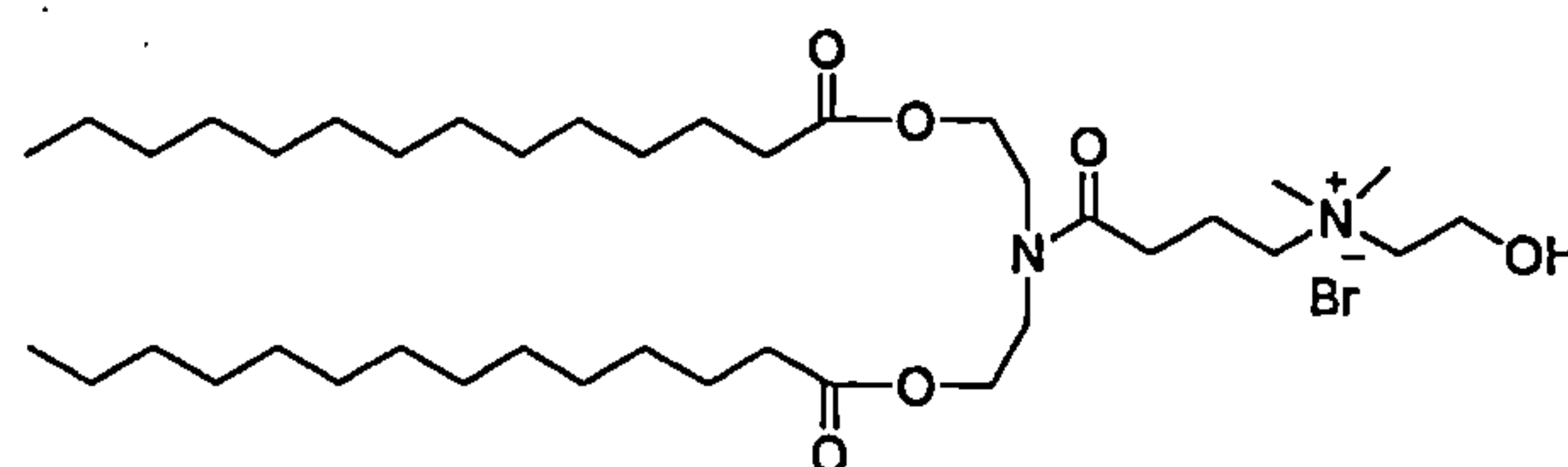
g, 2.37 mmol)且將其添加至3-(二甲基氨基)丙酸鹽酸鹽(383 mg, 2.49 mmol)、HATU(1034 mg, 2.72 mmol)及DIEA(831 μ L, 4.77 mmol)於DCM(10 mL)中之預活化混合物中。以氬氣沖洗圓底燒瓶且在室溫下攪拌反應混合物隔夜。濃縮反應混合物。藉由在DCM/MeOH梯度下矽膠層析來純化，獲得二油酸(Z)-((3-(二甲基氨基)丙醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)。

製備HE-Et-DODC：溴化3-(雙(2-(油醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-3-側氧基-丙-1-銨

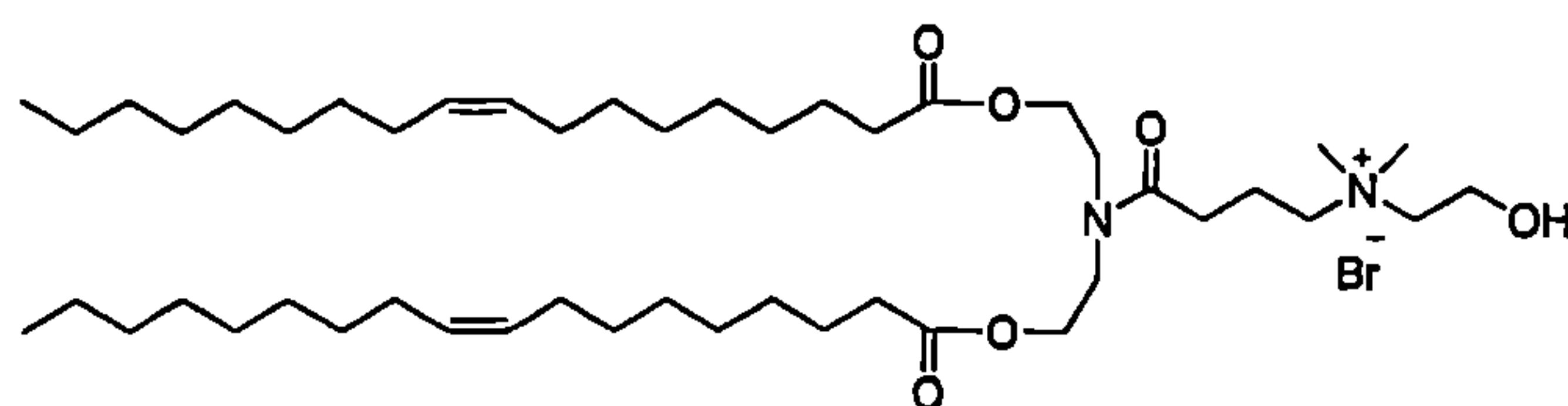


在密封系統中，將二油酸(Z)-((3-(二甲基胺基)乙醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(588 mg, 0.802 mmol)溶解於ACN(10 mL)中，且添加2-溴乙醇(200 μ L)。以惰性氣體沖洗反應容器且隨後密封。加熱反應物至80°C且攪拌隔夜，隨後冷卻且在真空中濃縮。藉由在DCM/MeOH梯度下矽膠層析來純化，獲得溴化3-(雙(2-(油醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-3-側氧基丙-1-銨(160 mg)。QTOF MS ESI+: m/z 764.3 (M+H)。

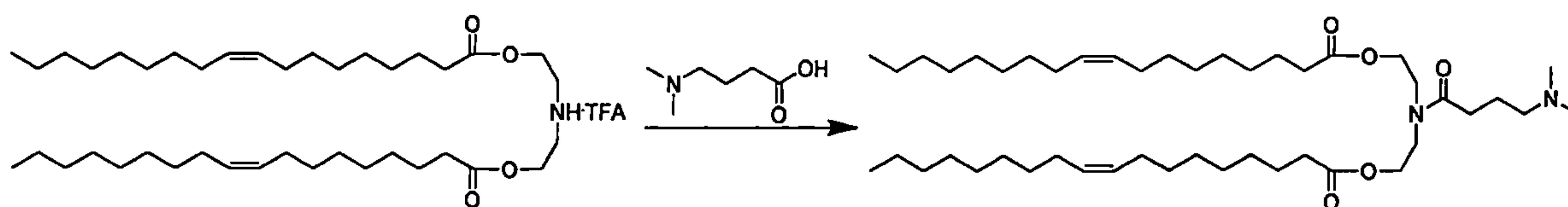
實例6：製備溴化4-(雙(2-(十四醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-4-側氧基丁-1-銨(HE-Pr-DC)



製備中間物1：二-十四烷酸((4-(二甲基胺基)丁醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)

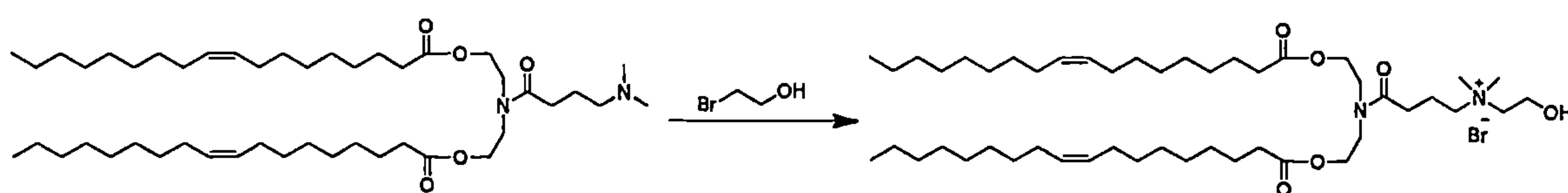


製備中間物1：二油酸(Z)-((4-(二甲基胺基)丁醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)



如先前所述合成二油酸(Z)-氮二基雙(乙-2,1-二酯)TFA鹽。以DCM(5 mL)稀釋二油酸(Z)-氮二基雙(乙-2,1-二酯)TFA鹽(1.00 g, 1.58 mmol)且將其添加至4-(二甲基胺基)丁酸鹽酸鹽(317 mg, 1.89 mmol)、HATU(719 mg, 1.89 mmol)及DIEA(606 μ L, 3.48 mmol)於DCM(5 mL)中之預活化混合物中。以氬氣沖洗燒瓶且在室溫下攪拌反應混合物隔夜，隨後濃縮。藉由在DCM/MeOH梯度下矽膠層析來純化，獲得二油酸(Z)-((4-(二甲基胺基)丁醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)。

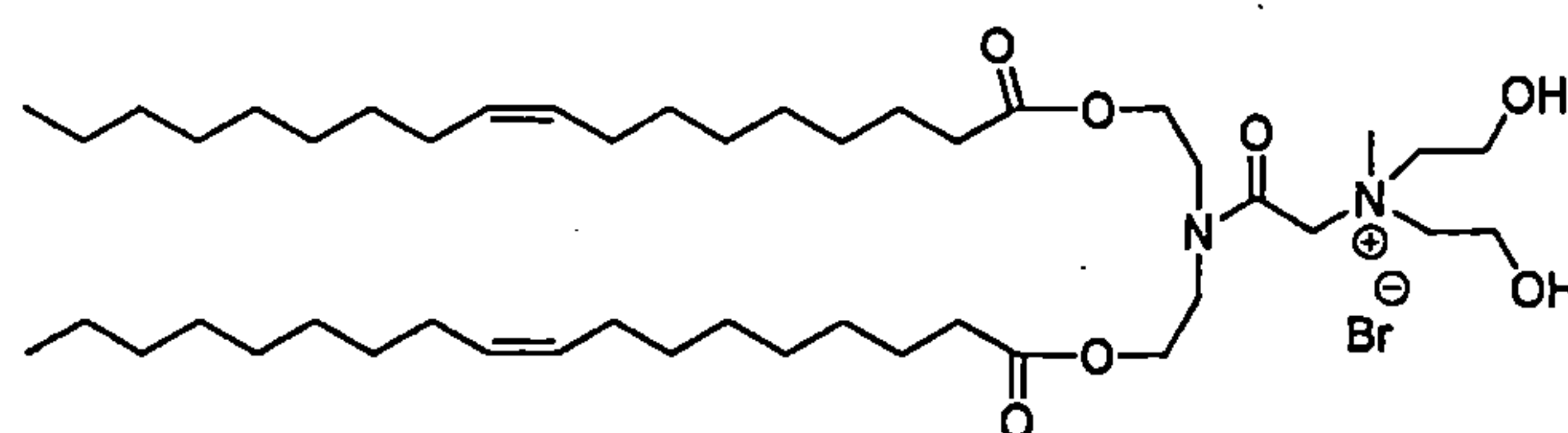
製備HE-Pr-DODC：溴化4-(雙(2-(油醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-4-側氧基丁-1-銨



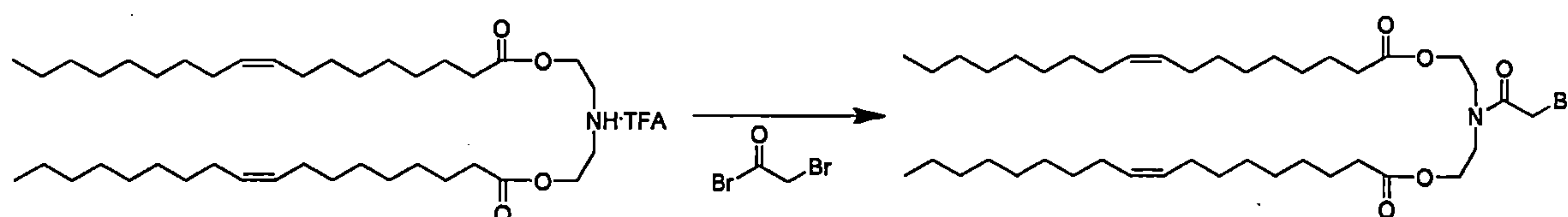
在密封系統中，將二-十四烷酸((4-(二甲基胺基)丁醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(400 mg, 0.535 mmol)溶解於ACN(5 mL)中，且添加2-溴乙醇(500 μ L)。以惰性氣體沖洗反應容器且隨後密封。加熱反應物至80℃且攪拌隔夜，隨後濃縮。藉由在DCM/MeOH梯度下矽膠層析

來純化，獲得溴化4-(雙(2-(油醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-4-側氧基丁-1-銨(255 mg)。LCMS ESI+: m/z 792.5 ($M+H$)。

實例8：製備溴化2-(雙(2-(油醯氧基)乙基)胺基)-N,N-雙(2-羥乙基)-N-甲基-2-側氧基乙銨(HE2DODC)

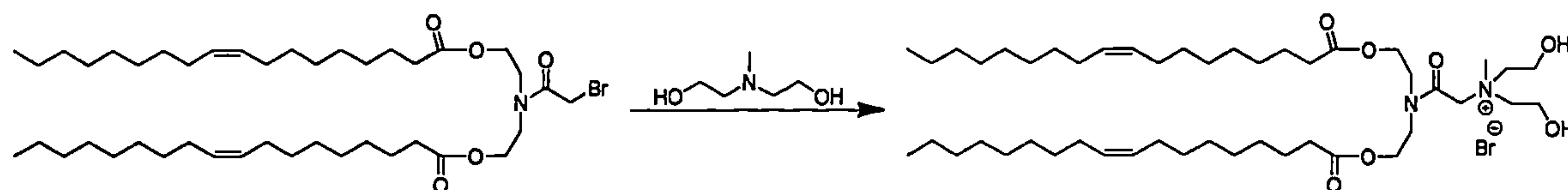


製備中間物1：二油酸(Z)-((2-溴乙醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)



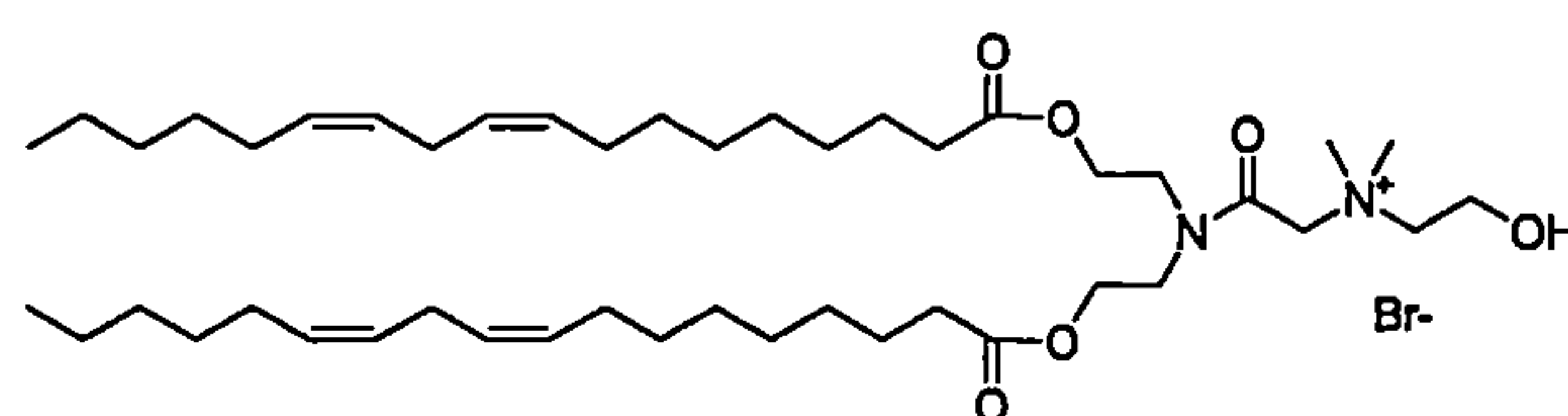
如先前所述合成二油酸(Z)-氮二基雙(乙-2,1-二酯)TFA鹽。將二油酸(Z)-氮二基雙(乙-2,1-二酯)TFA鹽(1.50 g, 2.34 mmol)溶解於DCM(20 mL)中且置於冰浴中。相繼添加溴乙醯溴(214 μ L, 2.46 mmol)及三乙胺(685 μ L, 4.91 mmol)。移除冰浴且在惰性氣體下在室溫下攪拌反應物隔夜，隨後以DCM稀釋至100 mL，且以1 M HCl(75 mL)、H₂O(75 mL)、飽和NaHCO₃溶液(75 mL)及飽和鹽水溶液(75 mL)洗滌。以DCM(25 mL)反萃取所有水性洗滌液。以MgSO₄乾燥有機物，過濾且在真空中濃縮。藉由乙酸乙酯之矽膠層析純化，獲得二油酸(Z)-((2-溴乙醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(1.22 g)。

製備HE2DODC：溴化2-(雙(2-(油醯氧基)乙基)胺基)-N,N-雙(2-羥乙基)-N-甲基-2-側氧基乙銨



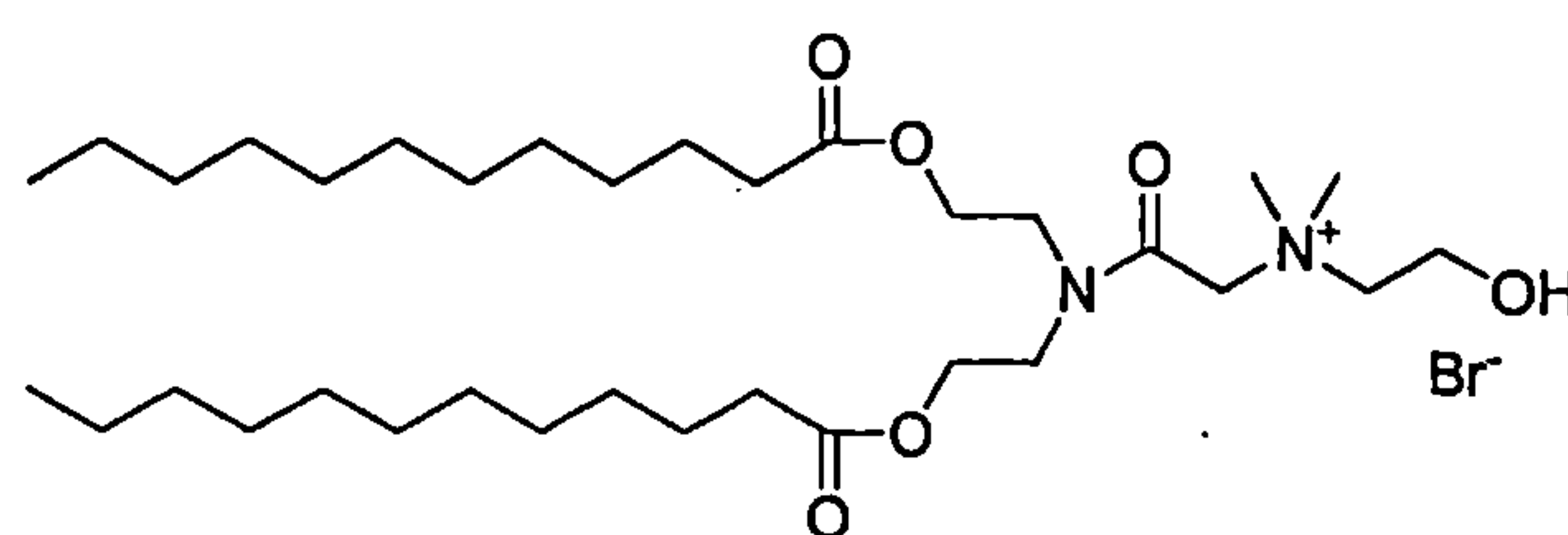
在密封系統中，將二油酸(Z)-((2-溴乙醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(2.08 g, 2.75 mmol)與N-甲基二乙基胺(1.58 mL, 13.8 mmol)合併。以惰性氣體沖洗反應容器且隨後密封。加熱反應物至50℃且攪拌隔夜，且隨後濃縮。藉由在DCM/MeOH梯度下矽膠層析來純化，獲得溴化2-(雙(2-(油醯氧基)乙基)胺基)-N,N-雙(2-羥乙基)-N-甲基-2-側氧基乙銨(479 mg)。LCMS ESI+: m/z 793.7 (M+H)。

實例9：製備溴化2-(雙(2-((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-2-側氧基乙銨(HEDC-DLin)



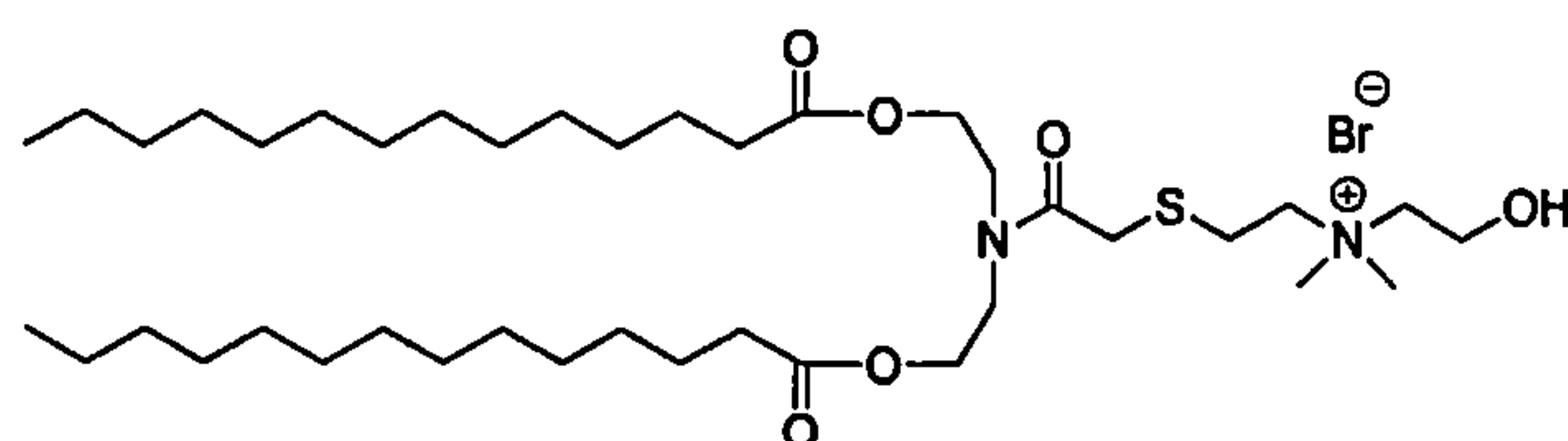
溴化2-(雙(2-((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-2-側氧基乙銨係以與HEDC類似之方式製備，其中用(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯醯氯取代肉豆蔻醯氯。

實例10：製備溴化2-(雙(2-(十二醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-2-側氧基乙銨(HEDC-12)

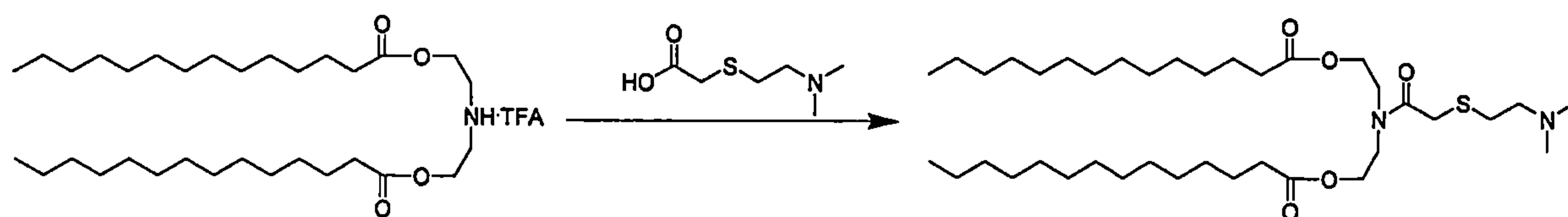


溴化2-(雙(2-(十二醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-2-側氧基乙銨係以與HEDC類似之方式製備，其中用十二醯氯取代肉豆蔻醯氯。

實例11：製備溴化2-((2-(雙(2-(十四鹽氧基)乙基)胺基)-2-側氧基乙基)硫基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基乙銨(HES104)



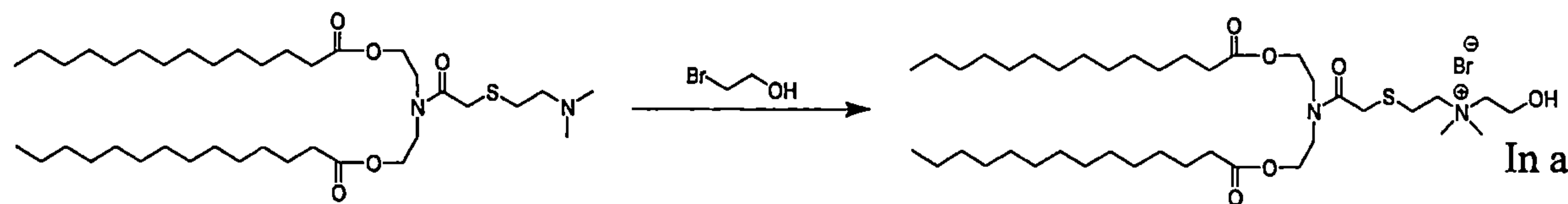
製備中間物1：二-十四烷酸((2-((2-(二甲基胺基)乙基)硫基)乙酯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(S104)。



如先前所述合成二-十四烷酸氮二基雙(乙-2,1-二酯)TFA鹽。在0℃至5℃下攪拌於DCM(2.3 L)及10%碳酸氫鉀(1.15 L)中之二-十四烷酸氮二基雙(乙-2,1-二酯)TFA鹽(152 g, 238 mmol)。分離有機相且以DCM(1.15 L)進一步萃取水相。在0℃至5℃下攪拌經合併有機相與硫酸鎂水合物(236 g)30分鐘之時間，過濾且以DCM(1.15 L)洗滌。向經合併濾液中添加2-((2-(二甲基胺基)乙基)硫基)乙酸鹽酸鹽(57.0 g, 285 mmol)、EDC鹽酸鹽(68.4 g, 357 mmol)及DMAP (2.91 g, 23.8 mmol)，且在周圍溫度下攪拌懸浮液隔夜，在該段時間之後形成澄清溶液。添加MQ-水(2.3 L)及甲醇(460 mL)，且在攪拌10分鐘時間之後分離澄清有機相。以DCM(575 mL)萃取混濁水相(pH 3.0)。濃縮經合併有機萃取物，獲得143 g呈鹽酸鹽形式之粗物質。將粗物質(142.6 g)與DCM(500 mL)一起轉移至蒸餾燒瓶中，且添加乙酸乙酯(1 L)。在大氣壓下加熱溶液以蒸餾，且繼續蒸餾70分鐘之時間，以便獲得76℃之殘餘物溫度。藉由添加乙酸乙酯(800 mL)獲得1.4 L之總體積，且添加

乙醇(70 mL)。冷卻50℃下之澄清溶液至37℃且添加晶種。在37℃至35℃下經10分鐘之時間觀測到開始顯著結晶之後，冷卻懸浮液且在0℃下攪拌隔夜，且藉由過濾分離沈澱物，且以冷乙酸乙酯(210 mL)洗滌。在油泵真空中在周圍溫度下經4.5小時之時間乾燥至恆重，得到134 g呈鹽酸鹽形式、白色結晶固體狀之再結晶物質。添加磷酸三鉀(85 g, 0.40 mol)及磷酸氫二鉀(226 g, 1.30 mol)至純化水(1.7 L)，且冷卻所形成具有pH 10.9之溶液至18℃至20℃。添加DCM(1.3 L)及再結晶S104鹽酸鹽(133 g, 0.188 mol)，且攪拌混合物10分鐘之時間。以緩和速率分離澄清有機相(經35分鐘之時間)，且以DCM(650 mL)進一步萃取混濁水相。攪拌經合併有機相與無水硫酸鎂(65 g)40分鐘之時間，且過濾混合物，以DCM(200 mL)洗滌。在減壓下(降至20毫巴，在該壓力下繼續蒸發一個小時)自50℃水浴蒸發經合併濾液。在油泵真空下自15℃至20℃水浴額外蒸發，產生126 g部分凝固油狀物。在-20℃冷卻浴中冷卻，得到完全凝固，且在油泵真空下-20℃下乾燥後，獲得126 g二-十四烷酸((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(S104)。HPLC指示98.1%純度。

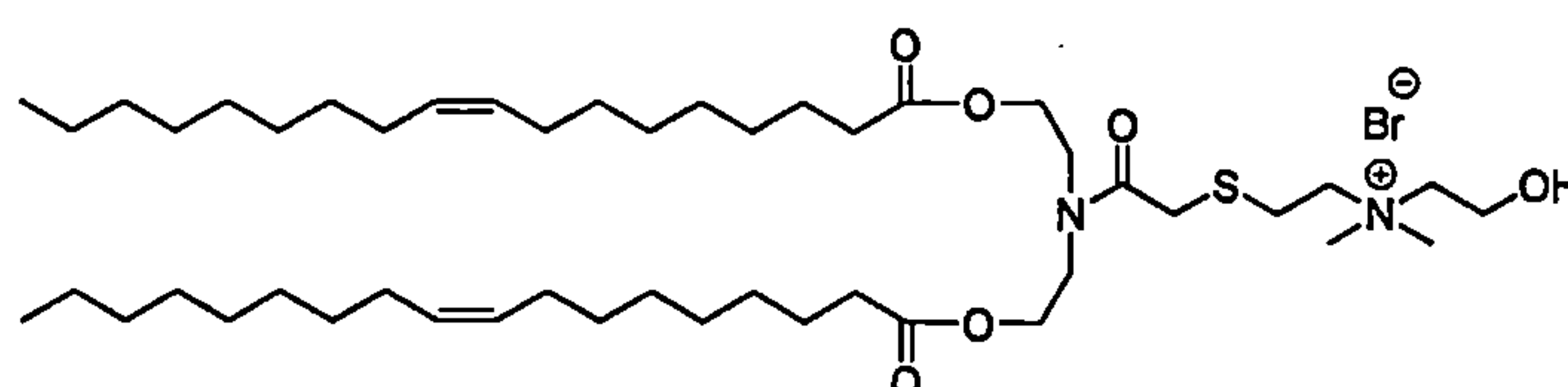
製備HES104：溴化2-((2-(雙(2-(十四醯氧基)乙基)胺基)-2-側氧基乙基)硫基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基乙銨



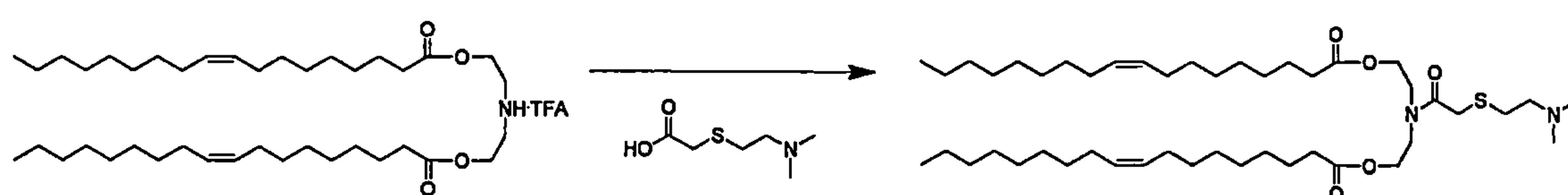
在密封系統中，將二-十四烷酸((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(1.00 g, 1.49 mmol)與2-溴乙醇(687 μ L, 9.69 mmol)合併。以惰性氣體沖洗反應容器且隨後密封。加熱反應物至75℃且攪拌隔夜，隨後冷卻，且在真空中濃縮。藉由在

DCM/MeOH梯度下矽膠層析來純化，獲得溴化2-((2-(雙(2-(十四醯氧基)乙基)胺基)-2-側氧基乙基)硫基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基乙銨(HES104)(790 mg)。LCMS ESI+: m/z 715.7 (M+H)。

實例12：製備溴化2-((2-(雙(2-(油醯氧基)乙基)胺基)-2-側氧基乙基)硫基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基乙銨(HES104-DO)



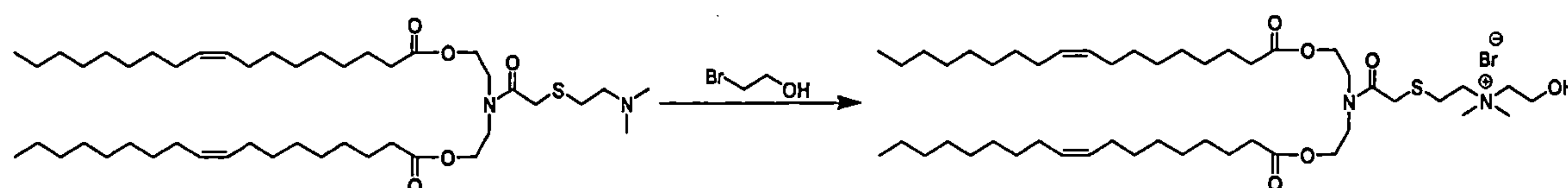
製備中間物1：二油酸(Z)-((2-((2-(二甲基胺基)乙基)硫基)乙醯基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)



如先前所述合成二油酸(Z)-氮二基雙(乙-2,1-二酯)TFA鹽。在0℃至5℃下攪拌於DCM(60 mL)與10% K_2CO_3 (30 mL)中之二油酸(Z)-氮二基雙(乙-2,1-二酯)TFA鹽(4.06 g, 6.41 mmol)。在30分鐘之後，分離有機相且以DCM(30 mL)進一步萃取水相。在0℃至5℃下攪拌經合併有機相與無水 $MgSO_4$ 30分鐘之時間，過濾，且以DCM(30 mL)洗滌。向經合併濾液中添加2-((2-(二甲基胺基)乙基)硫基)乙酸(1.26 g, 7.70 mmol)、EDC鹽酸鹽(1.84 g, 9.62 mmol)、DMAP (78.3 mg, 0.64 mmol)。在室溫下攪拌薄懸浮液隔夜；在該段時間之後，溶液變澄清。次日，添加去離子水(60 mL)及甲醇(30 mL)。在攪拌10分鐘之後，分離澄清有機層。以DCM萃取混濁水相。濃縮經合併有機萃取物。經由二氧化矽塞過濾粗物質且將其溶解於DCM(40 mL)中，且添加PBS(pH=11, 50 mL)。在室溫下攪拌混合物10分鐘。隨後，分離有

機相且再次以DCM(15 mL)萃取水相。攪拌經合併有機相與無水MgSO₄ 30分鐘之時間。隨後過濾混合物，且以DCM洗滌。在真空中濃縮經合併濾液，獲得二油酸(Z)-((2-((2-(二甲基胺基)乙基)硫基)乙基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(3.44 g)。

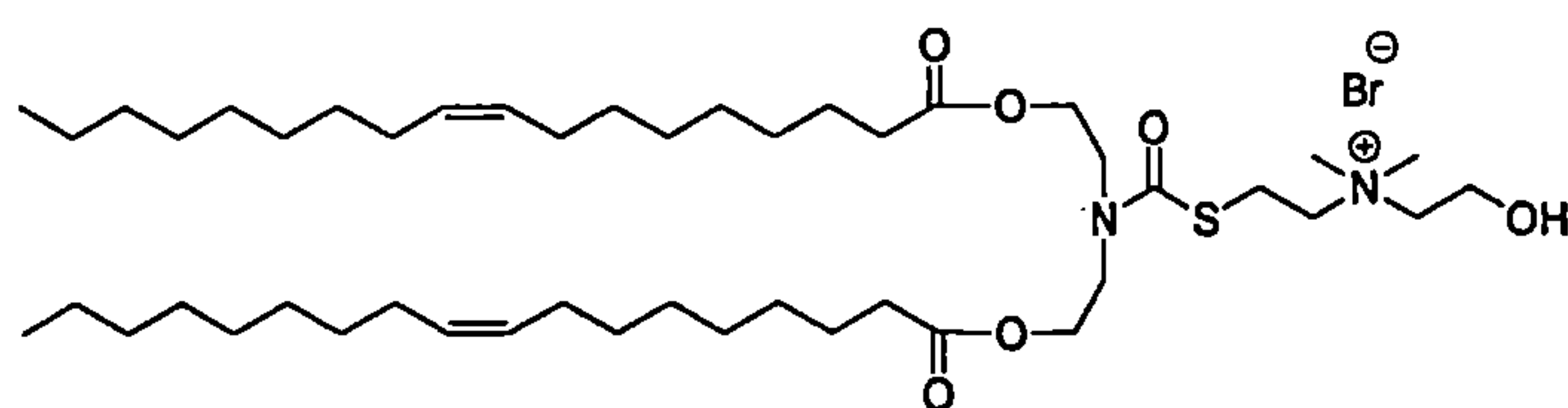
製備HES104-DO



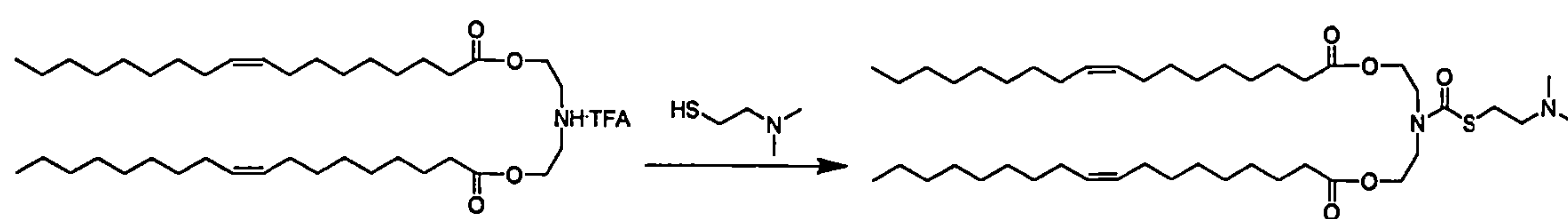
在密封系統中，將二油酸(Z)-((2-((2-(二甲基胺基)乙基)硫基)乙基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(540 mg, 0.693 mmol)與2-溴乙醇(319 μ L, 4.50 mmol)合併。以惰性氣體沖洗反應容器且隨後密封。加熱反應物至75℃且攪拌隔夜。次日，冷卻且在真空中濃縮。藉由在DCM/MeOH梯度下矽膠層析來純化，獲得溴化2-((2-(雙(2-(油醯氧基)乙基)胺基)-2-側氧基乙基)硫基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基乙銨(324 mg)。

LCMS ESI+: m/z 823.8 (M+H)。

實例13：製備溴化2-((雙(2-(油醯氧基)乙基)胺甲醯基)硫基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基乙-銨(HETU104-DO)

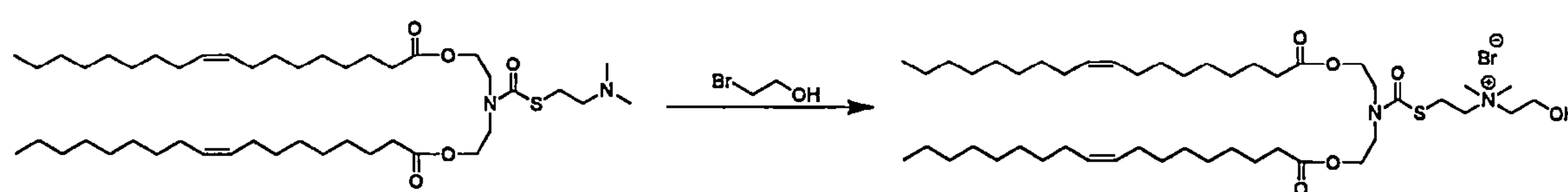


製備中間物1：二油酸(Z)-(((2-(二甲基胺基)乙基)硫基)羰基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)



如先前所述合成二油酸(Z)-((第三丁氧基羰基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)。將二油酸(Z)-((第三丁氧基羰基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(4.2 g, 5.72 mmol)溶解於DCM(20 mL)中且在冰浴中冷卻至0℃。添加TFA(20 mL)，且在惰性氣體層下攪拌混合物20分鐘。隨後，在真空中濃縮混合物。將殘餘物分配於10% K₂CO₃(20 mL)與DCM(20 mL)之間。在冰浴中攪拌混合物20分鐘。收集有機部分，且以DCM(2×10 mL)萃取混濁水層。添加經合併有機萃取物與無水MgSO₄且在0℃下攪拌20分鐘。過濾懸浮液且以DCM(10 mL)洗滌。添加雙光氣(1.38 mL, 11.4 mmol)至於DCM中之二油酸(Z)-氮二基雙(乙-2,1-二酯)物質，且在室溫下在惰性氣體層下攪拌。次日，在真空中移除DCM及過量雙光氣。將2-(二甲基胺基)乙烷硫醇鹽酸鹽(4.05 g, 28.6 mmol)溶解於DCM(50 mL)及三乙胺(5.2 mL, 37.2 mmol)中，且添加至二油酸(Z)-((氯羰基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)殘餘物中。在室溫下攪拌反應混合物隔夜。次日，以DCM稀釋混合物且以0.3 M HCl(75 mL)、水(75 mL)及10% K₂CO₃(75 mL)洗滌。以DCM(25 mL)反萃取所有水性洗滌液。經無水MgSO₄乾燥有機相，過濾，且在真空中濃縮。藉由在DCM/MeOH梯度下矽膠層析來純化，獲得二油酸(Z)-((((2-(二甲基胺基)乙基)硫基)羰基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(1.90 g)。

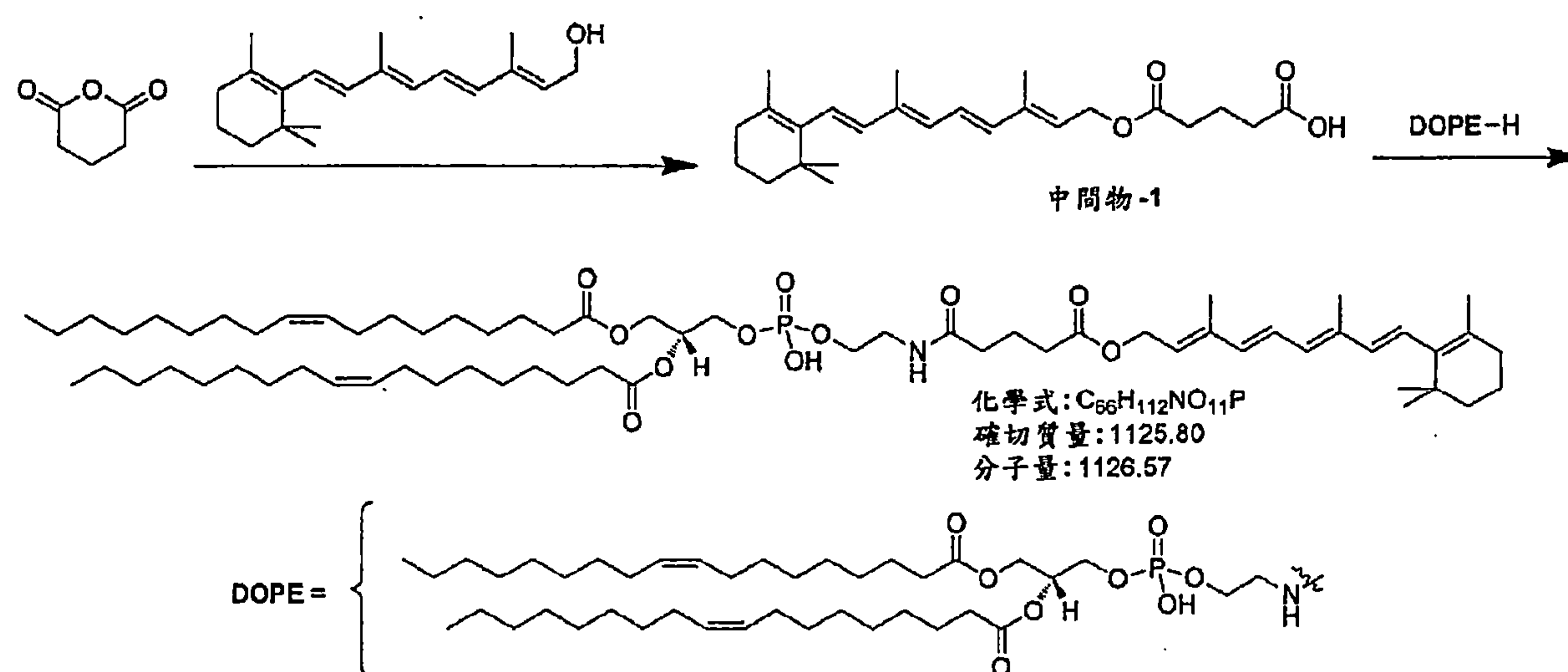
製備HETU104DO



在密封系統中，將二油酸(Z)-((((2-(二甲基胺基)乙基)硫基)羰基)氮二基)雙(乙-2,1-二酯)

氮二基)雙(乙-2,1-二酯)(615 mg, 0.804 mmol)與2-溴乙醇(370 μ L, 5.22 mmol)合併。以惰性氣體沖洗反應容器且隨後密封。加熱反應物至 75 $^{\circ}$ C 且攪拌隔夜，隨後冷卻，且在真空中濃縮。藉由在 DCM/MeOH 梯度下矽膠層析來純化，獲得溴化2-((雙(2-(油醯氧基)乙基)胺甲醯基)硫基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基乙銨(473 mg)。LCMS ESI+: m/z 809.8 (M+H)。

實例14：合成Dope-Glu-VA

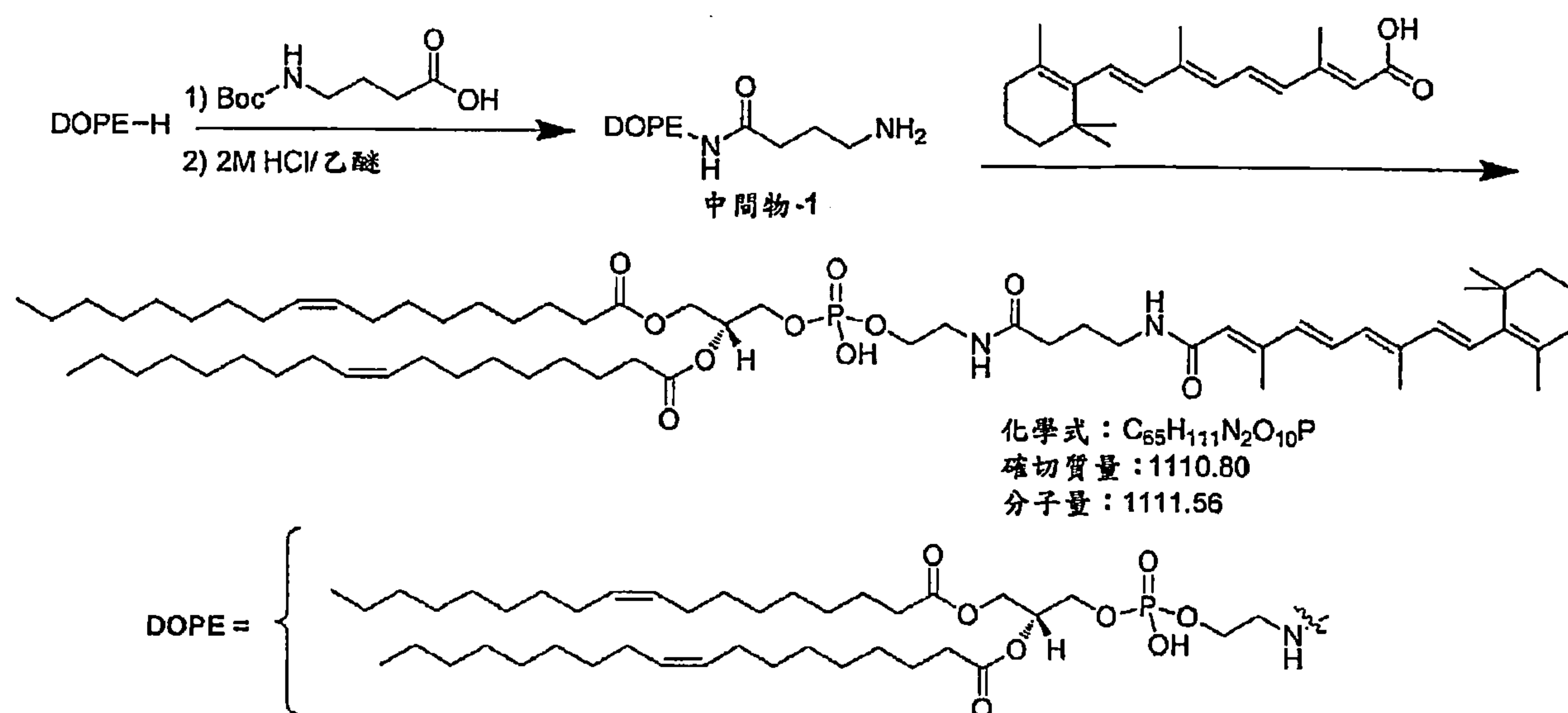


此示意圖展示用以合成Dope-Glu-VA之方法。在琥珀色小瓶中，將戊二酸酐(220.2 mg, 1.93 mmol)及視黃醇(500 mg, 1.75 mmol)溶解於二氯甲烷(5 mL)中。添加三乙胺(513 μ l, 3.68 mmol)，且以氬氣沖洗小瓶。在室溫下攪拌反應物。4小時之後，TLC表明反應完全。在真空中濃縮物質，移除溶劑及鹼。使用Grace層析系統純化物質。使用40 g Si濾筒及二氯甲烷/甲醇(0%至10%至25%)梯度，將物質直接裝載於濾筒上。產物在約8%甲醇周圍溶離。集中溶離份且在真空中濃縮，獲得淺黃色油狀物(700 mg, 定量產率)。藉由NMR檢驗產物。

在以氬氣沖洗之琥珀色小瓶中，將1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(500 mg, 0.672 mmol)、六氟磷酸N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)鎂(306.5 mg, 0.806 mmol)及中間物1(269 mg, 0.672

mmol)溶解於氯仿/ N,N-二甲基甲醯胺(10 mL, 1:1混合物)中, 且添加 N,N-二異丙基乙基胺(300 μ L, 1.68 mmol)。在室溫下攪拌反應物隔夜。次日, TLC表明反應完全。在真空中濃縮物質以移除溶劑及鹼, 且隨後經由Grace層析系統純化物質。使用80 g Si濾筒及二氯甲烷/甲醇(0%至10%至25%)梯度, 將物質直接裝載於濾筒上。產物在接近操作結束時(約25%甲醇)溶離。集中溶離份且在真空中濃縮, 獲得淺黃色油狀物(460 mg, 60.8%)。藉由NMR檢驗產物。 ^1H NMR (400 MHz), δ_{H} : 8.6 (d, 1H), 8.27 (d, 1H), 6.57-6.61 (dd, 1H), 6.08-6.25 (m, 4H), 5.57 (t, 1H), 5.30-5.34 (m, 4H), 5.18 (m, 1H), 4.68-4.70 (d, 2H), 4.28-4.35 (m, 1H), 4.05-4.15 (m, 1H), 3.81-3.97 (m, 4H), 3.52-3.62 (m, 1H), 3.35-3.45 (m, 2H), 2.95-3.05 (m, 1H), 2.33-2.35 (t, 3H), 2.2-2.3 (m, 7H), 1.9-2.05 (m, 17H), 1.85 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.5-1.65 (m, 6H), 1.4-1.5 (m, 2H), 1.18-1.38 (m, $\sim$ 40H), 1.01 (s, 3H), 0.84-0.88 (m, 12H)。

實例15 : DOPE-Glu-NH-VA



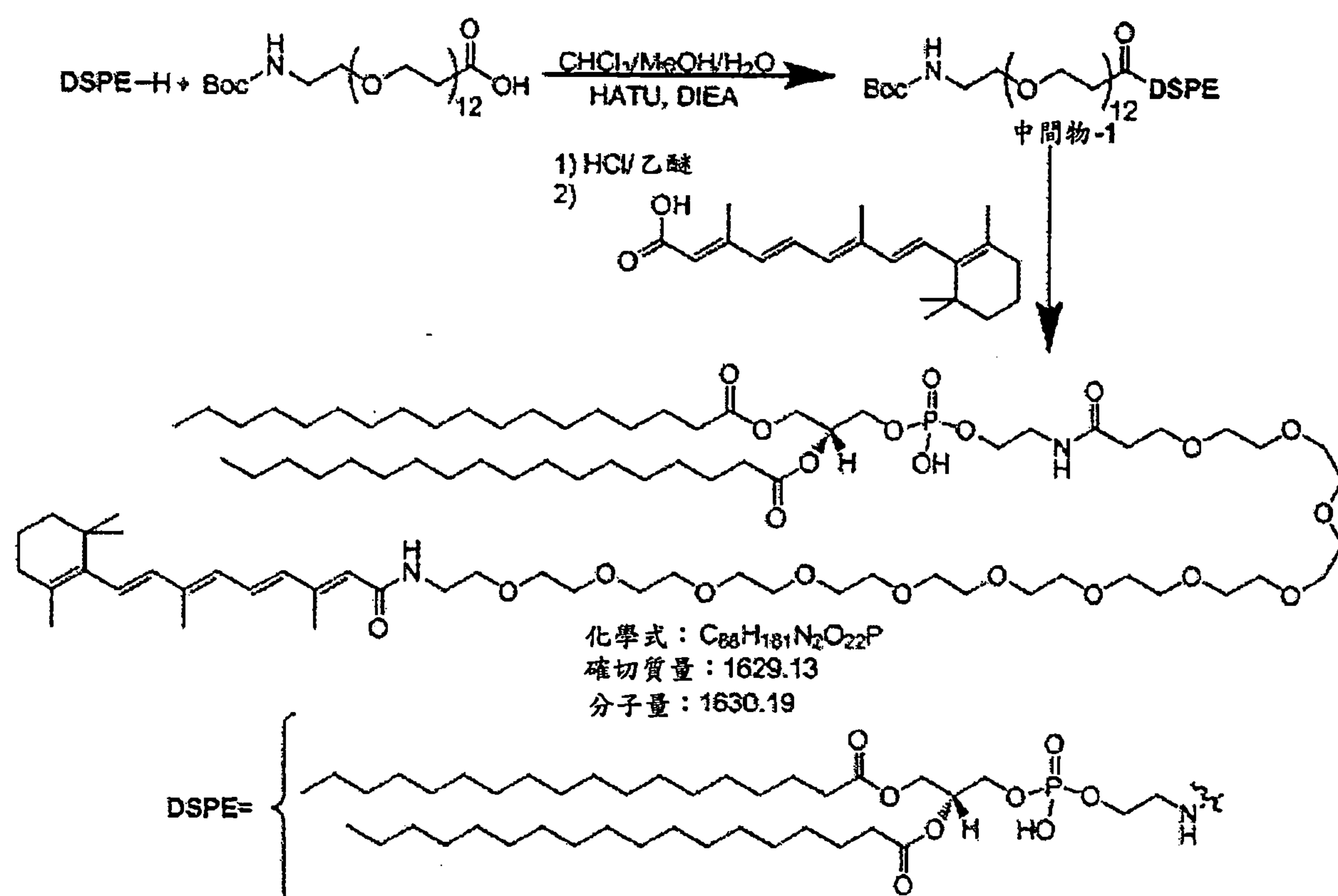
此示意圖展示用以合成Dope-Glu-NH-VA之方法。將1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(2500 mg, 3.36 mmol)、Boc-GABA-OH(751

mg, 3.695 mmol)及六氟磷酸N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)鎂(1531 mg, 4.03 mmol)溶解於N,N-二甲基甲醯胺/氯仿(25 mL, 1:1混合物)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(880 μ L, 5.05 mmol), 且在氬氣層下在室溫下攪拌混合物隔夜。次日, 以約200 mL H₂O稀釋反應混合物, 且以二氯甲烷(3 $\times$ 100 mL)萃取產物。以約75 mL 4.0 M PBS溶液洗滌產物, 以硫酸鈉乾燥有機物, 過濾且在真空中濃縮。隨後經由Grace純化系統純化物質。使用120 g Si濾筒及(1%至25%)二氯甲烷/甲醇梯度, 將物質直接裝載於濾筒上。產物在接近操作結束時(約25%甲醇)溶離。集中溶離份且在真空中濃縮, 獲得無色油狀物(2.01 g, 64.4%)。藉由NMR檢驗產物。隨後將物質溶解於30 mL 2 M HCl/乙醚中。在H₂O浴中在室溫下攪拌反應物。兩個小時後, LCMS展示反應完全。在真空中濃縮產物且在真空下完全乾燥隔夜。物質無需進一步純化即可轉入下一步驟。假定其為定量產率。

將中間物1(1200 mg, 1.45 mmol)、視黃酸(500 mg, 1.66 mmol)及六氟磷酸N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)鎂(689 mg, 1.81 mmol)懸浮於N,N-二甲基甲醯胺/氯仿(10 mL, 1:1混合物)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(758 μ L, 4.35 mmol)。以氬氣沖洗圓底燒瓶且以Al箔覆蓋。在室溫下攪拌反應物。四個小時後, LCMS表明反應完全。將物質分配於二氯甲烷(75 mL)與H₂O(75 mL)。以二氯甲烷萃取產物, 以硫酸鈉乾燥有機物, 過濾且在真空中濃縮。隨後經由Grace純化系統純化物質。使用120 g Si濾筒及(5%至30%)二氯甲烷/甲醇梯度, 將物質直接裝載於濾筒上。設定偵測器用於ELSD、350 nm UV及389 nm UV。產物接近操作中間時(約17%甲醇)溶離。集中溶離份且在真空中濃縮, 獲得淺黃色油狀物(292 mg, 18.2%)。藉由LCMS及NMR檢驗產物。¹H NMR (400 MHz), δ_{H} : 8.55 (s, 1H), 8.2 (d, 1H), 7.3 (s, 1H), 6.6 (dd, 1H), 6.10-6.27 (m, 5H), 5.5 (t, 1H), 5.31 (s, 4H), 5.1-

5.2 (m, 2H), 4.68 (d, 2H), 4.3 (d, 2H), 4.1 (m, 2H), 3.9 (m, 8H), 3.58 (q, 4H), 3.4 (s, 4H), 3.0 (q, 4H), 2.33-2.35 (t, 3H), 2.2-2.3 (m, 7H), 1.9-2.05 (m, 17H), 1.85 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.5-1.65 (m, 6H), 1.4-1.5 (m, 2H), 1.18-1.38 (m, ~40H), 1.01 (s, 3H), 0.84-0.88 (m, 12H) ◦ MS: m/z 1112.44 ($M+H^+$) ◦

實例 16：DSPE-PEG550-VA

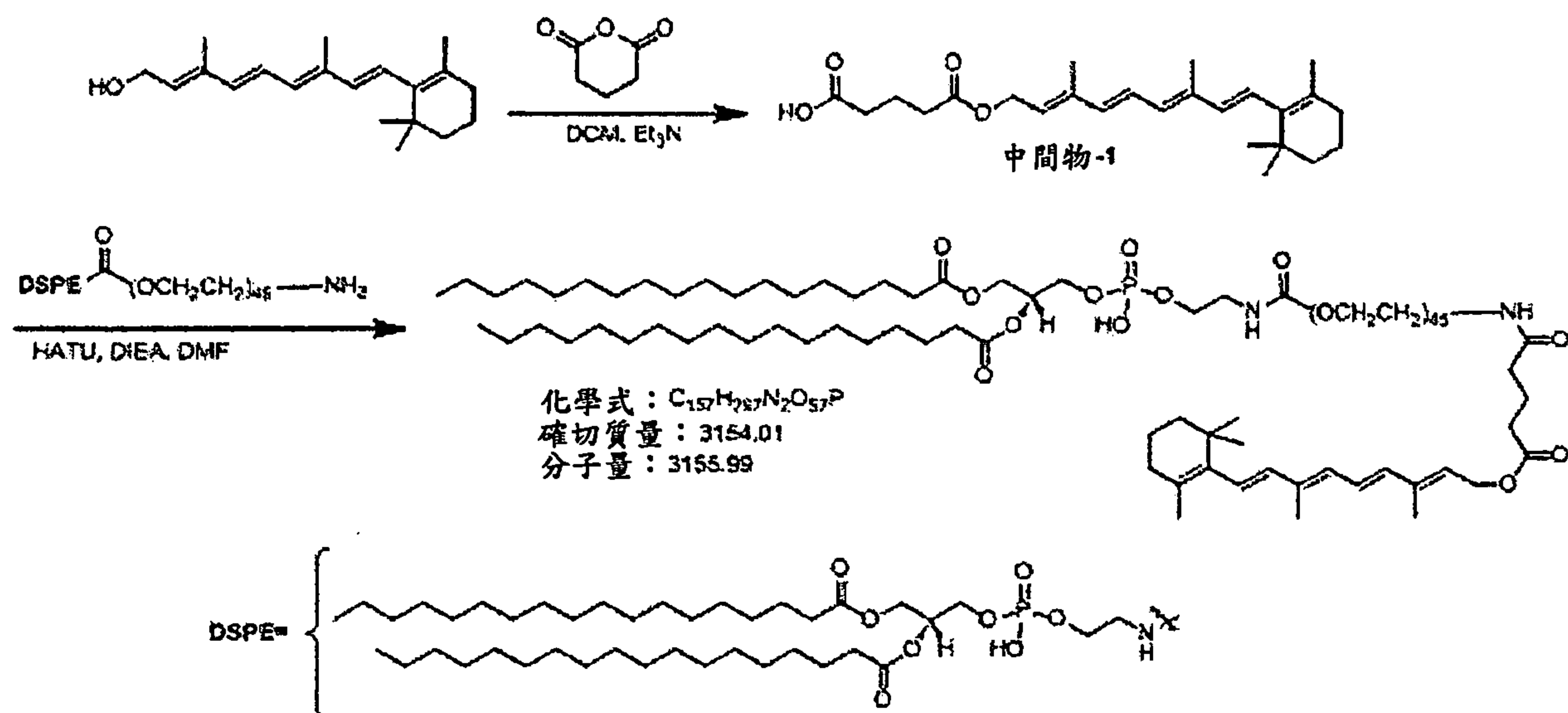


此示意圖展示用以合成DSPE-PEG550-VA之方法。在20 mL以氬氣沖洗之閃爍瓶中，將1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(200 mg, 0.267 mmol)、第三Boc-N-胺基-dPEG₁₂-酸(211 mg, 0.294 mmol)及六氟磷酸N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)鎂(122 mg, 0.320 mmol)溶解於氯仿/甲醇/H₂O(6 mL, 65:35:8 v:v:v混合物)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(116 μL, 0.668 mmol)。在25℃下攪拌反應物。4小時之後，TLC表明反應完全。在真空中濃縮反應混合物。隨後經由Grace純化系統純化物質。使用12 g Si濾筒及(0%至10%至20%)

二氯甲烷/甲醇梯度，將物質直接裝載於濾筒上。產物接近操作結束時(約20%甲醇)以長寬峰形式溶離。集中溶離份且在真空中濃縮，獲得油狀物(252 mg, 65.2%)。藉由LCMS檢驗產物。

將中間物1(252 mg, 0.174 mmol)溶解於乙醚(5 mL)中。在室溫下將反應物置於H₂O浴中。添加2 M HCl/乙醚(2 mL, 4 mmol)，且攪拌混合物約1小時。隨後，在真空中移除溶劑及過量HCl。物質無需任何進一步純化即可轉入下一步驟。假定為定量產率。在以氬氣沖洗之圓底燒瓶中，將物質懸浮於2 mL N,N-二甲基甲醯胺中。添加視黃酸(57.5 mg, 0.191 mmol)、六氟磷酸N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)鎂(79 mg, 0.209 mmol)及N,N-二異丙基乙基胺(106 μ L, 0.609 mmol)。物質不完全溶解，因此添加氯仿/甲醇/H₂O(1 mL, 65:35:8 v:v:v混合物)以使反應物均質。3.5個小時之後，TLC表明反應完全。在真空中濃縮反應混合物。隨後經由Grace純化系統純化物質。使用40 g Si濾筒及(0%至10%至25%)二氯甲烷/甲醇梯度，將物質直接裝載於濾筒上。產物接近操作結束時(約23%甲醇)以長寬峰形式溶離。集中溶離份且在真空中濃縮，獲得茶色固體(210 mg, 73.9%)。藉由NMR及LCMS檢驗產物。¹H NMR (400 MHz), δ_{H} : 8.6 (s, 1H), 8.25 (d, 1H), 6.8-6.9 (dd, 1H), 6.3-6.4 (m, 1H), 6.12-6.25 (dd, 5H), 5.71 (s, 1H), 5.18 (m, 2H), 4.33 (dd, 2H), 4.13 (m, 2H), 3.95 (m, 2H), 3.74 (m, 8H), 3.63 (s, ~48H), 3.0 (q, 2H), 2.5 (t, 3H), 2.35 (s, 3H), 2.25 (t, 8H), 1.97 (m, 7H), 1.7 (3, 3H), 1.5 (m, 2H), 1.36 (m, 12H), 1.23 (m, ~56H), 1.01 (s, 6H), 0.86 (t, 12H)。MS: m/z 1630.28 (M+H⁺)。

實例17：DSPE-PEG2000-Glu-VA

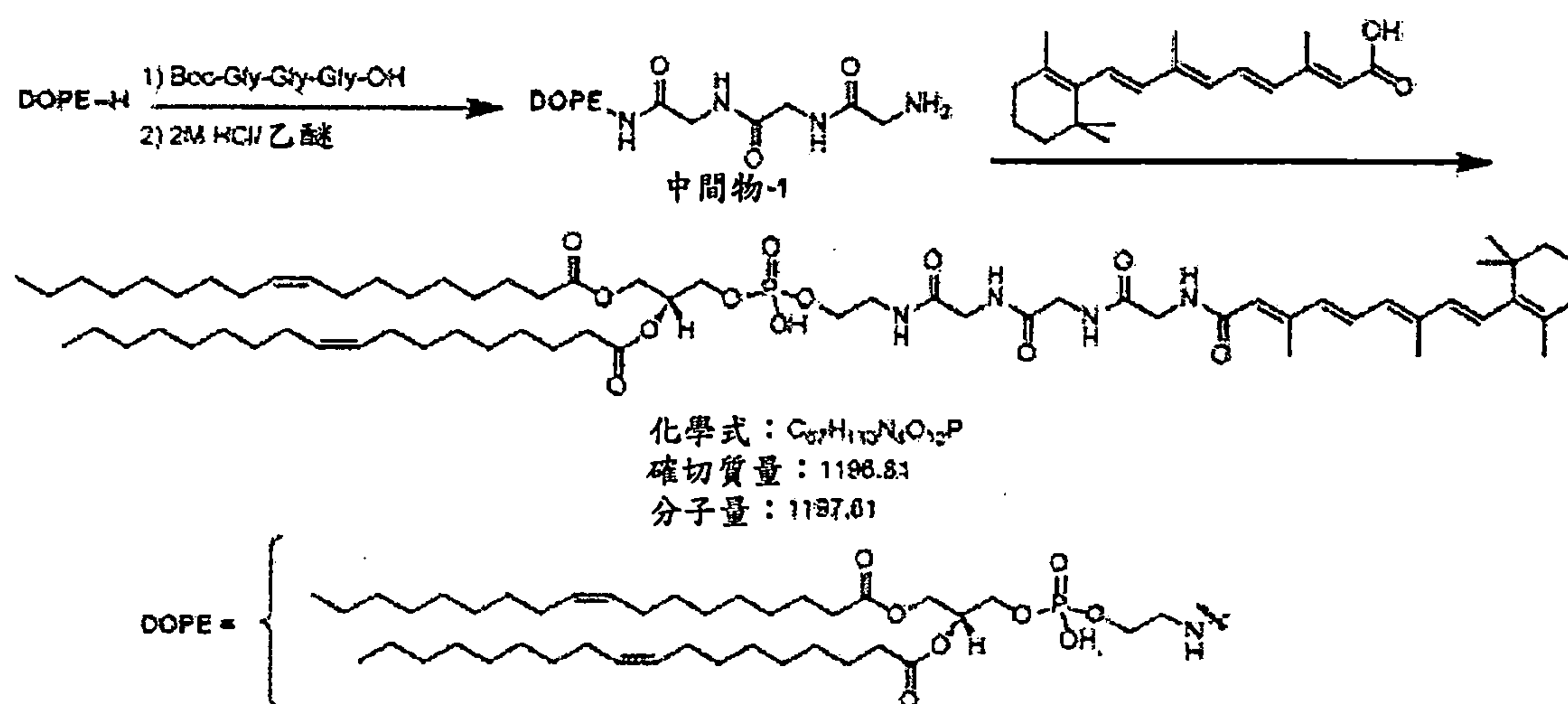


此示意圖展示用以合成DSPE-PEG2000-Glu-VA之方法。在琥珀色小瓶中，將戊二酸酐(115 mg, 1.01 mmol)及視黃醇(240 mg, 0.838 mmol)溶解於二氯甲烷(3 mL)中。添加三乙胺(257 μ l, 1.84 mmol)，且以氬氣沖洗小瓶。在室溫下攪拌反應物隔夜。次日，TLC表明反應完全。在真空中濃縮物質，移除溶劑及鹼。經由Grace層析系統純化物質。使用12 g Si濾筒及二氯甲烷/甲醇(0%至10%至25%)梯度，將物質直接裝載於濾筒上。集中溶離份且在真空中濃縮，獲得淺黃色油狀物(700 mg, 78.3%)。藉由NMR檢驗產物。

在以氬氣沖洗之琥珀色閃爍瓶中，將中間物1(43 mg, 0.108 mmol)、DSPE-PEG2000-NH₂(250 mg, 0.090 mmol)及六氟磷酸N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)鎂(45 mg, 0.117 mmol)溶解於N,N-二甲基甲醯胺(2 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(47 μ L, 0.270 mmol)，且在室溫下攪拌反應物隔夜。次日，經由Grace層析系統純化物質。使用12 g Si濾筒及二氯甲烷/甲醇(0%至10%至25%)梯度，將物質直接裝載於濾筒上。產物接近操作結束時(約23%甲醇)溶離。集中溶離份且在真空中濃縮，獲得淺黃色油狀物(59 mg, 20.7%)。藉由NMR檢驗產物。¹H NMR (400 MHz), δ _H: 7.06 (m, 1H), 6.59-6.66 (dd, 1H), 6.06-6.30 (m 5H), 5.56-5.60 (t, 1H), 5.17-5.23 (m,

2H), 4.35-4.42 (dd, 2H), 4.12-4.25 (m, 5H), 3.96-3.97 (m, 6H), 3.79-3.81 (t, 1H), 3.66 (m, ~180H), 3.51-3.58 (m, 2H), 3.4-3.48 (m, 4H), 3.3-3.38 (m, 2H), 2.25-2.45 (m, 14H), 1.5-2.0 (m, 15H), 1.23-1.32 (m, ~56H), 1.01 (s, 3H), 0.85-0.88 (t, 12H)。

實例18：DOPE-Gly₃-VA

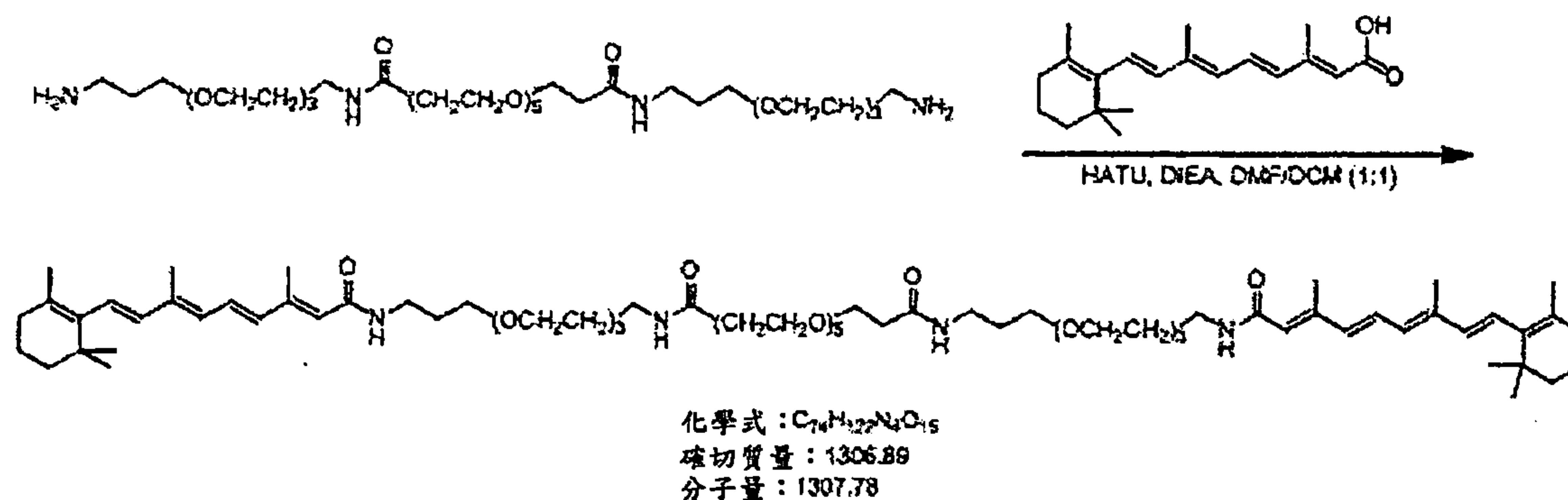


此示意圖展示用以合成Dope-Gly₃-VA之方法。將Boc-Gly-Gly-Gly-OH(382 mg, 1.34 mmol)及六氟磷酸N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)鎂(532 mg, 1.4 mmol)溶解於N,N-二甲基甲醯胺(5 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(488 μL, 2.8 mmol)，且在室溫下攪拌混合物10至15分鐘。隨後，添加1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(833 mg, 1.12 mmol)於氯仿(5 mL)中之溶液，且以氬氣沖洗反應容器。在室溫下攪拌物質隔夜。次日，LCMS展示反應完全。將殘餘物分配於二氯甲烷(50 mL)與H₂O(50 mL)之間。以二氯甲烷(3×50 mL)萃取。以硫酸鈉乾燥有機物，過濾且在真空中濃縮。隨後經由Grace純化系統純化物質。使用80 g Si濾筒及(10%至30%)二氯甲烷/甲醇梯度，將物質直接裝載於濾筒上。偵測器僅設定用於ELSD。產物在接近操作結束時(約25%甲醇)才溶離出。集中溶離份且在真空中濃縮，獲得無色油狀物(940 mg, 82.7%)。藉由LCMS及NMR檢驗產物。

添加2 M HCl/乙醚(5 mL)至含先前產物之圓底燒瓶中。在H₂O浴中攪拌物質約2小時。反應物之LCMS顯示已脫除Boc保護基。在真空中濃縮反應物且將殘餘物溶解於二氯甲烷(75 mL)中。以飽和碳酸氫鈉溶液(75 mL)洗滌。以二氯甲烷(3×75 mL)萃取產物。以硫酸鈉乾燥有機物，過濾且在真空中濃縮，獲得半固體(765 mg, 90.3%)。藉由NMR檢驗。物質無需任何進一步純化即可轉入下一步驟。

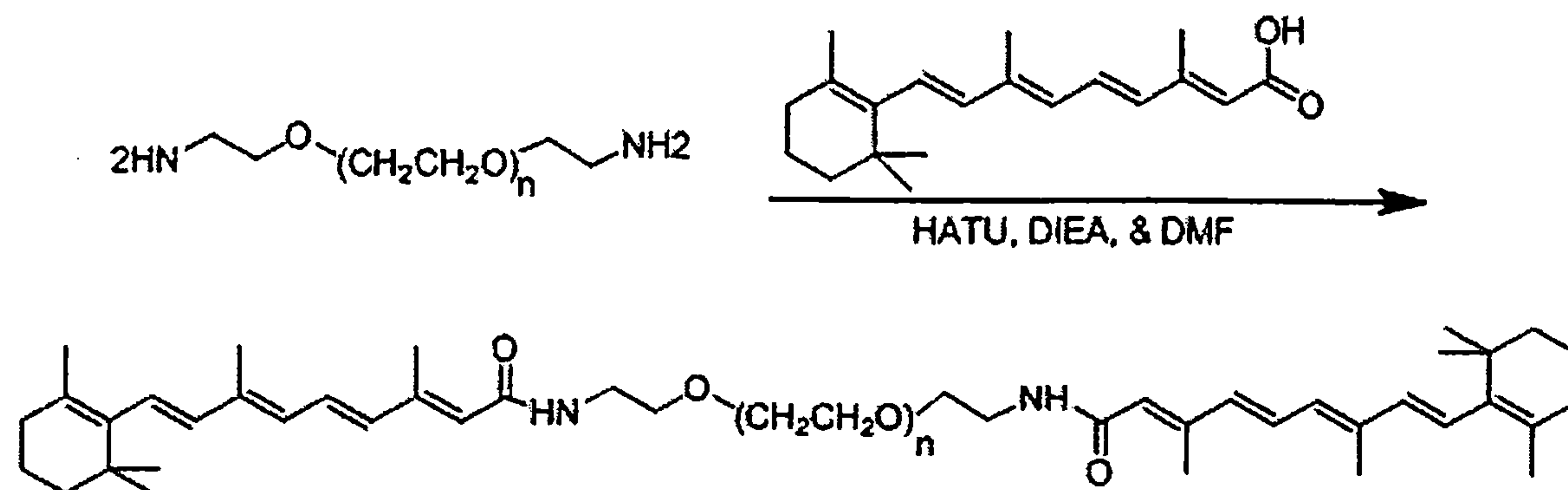
將中間物1(765 mg, 0.836 mmol)、視黃酸(301 mg, 1.00 mmol)及六氟磷酸N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)鎂(413 mg, 1.09 mmol)懸浮於N,N-二甲基甲醯胺(5 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(437 µL, 2.51 mmol)，且以氬氣沖洗反應容器。添加氯仿(5 mL)以幫助物質溶合。在以Al箔覆蓋之圓底燒瓶中，在室溫下攪拌反應物約4小時。隨後，LCMS顯示反應已完全。將物質分配於H₂O(100 mL)與二氯甲烷(100 mL)之間。以二氯甲烷(3×100 mL)萃取，以硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中濃縮。隨後經由Grace純化系統純化物質。使用80 g Si濾筒及(5%至30%)二氯甲烷/甲醇梯度，將物質直接裝載於濾筒上。偵測器設定用於ELSD及354 nm UV。產物在接近操作結束時(約25%甲醇)溶離出。集中溶離份且在真空中濃縮，獲得橙色油狀物(704 mg, 70.3%)。藉由LCMS及NMR檢驗產物。¹H NMR (400 MHz), δ_H: 6.90 (t, 1H), 6.21 (q, 2H), 6.08-6.12 (d, 2H), 5.83 (s, 1H), 5.31 (s, 4H), 5.30 (s, 2H), 4.37 (d, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.91 (m, 8H), 3.59 (m, 2H), 3.29 (m, 2H), 3.01 (m, 2H), 2.28 (m, 6H), 1.95-1.98 (m, 12H), 1.44 (s, 3H), 1.5-1.6 (m, 2H), 1.44 (m, 6H), 1.24 (m, ~48H), 1.00 (s, 6H), 0.86 (t, 3H)。MS: *m/z* 1198.42 (M+H⁺)。

實例19：VA-PEG-VA



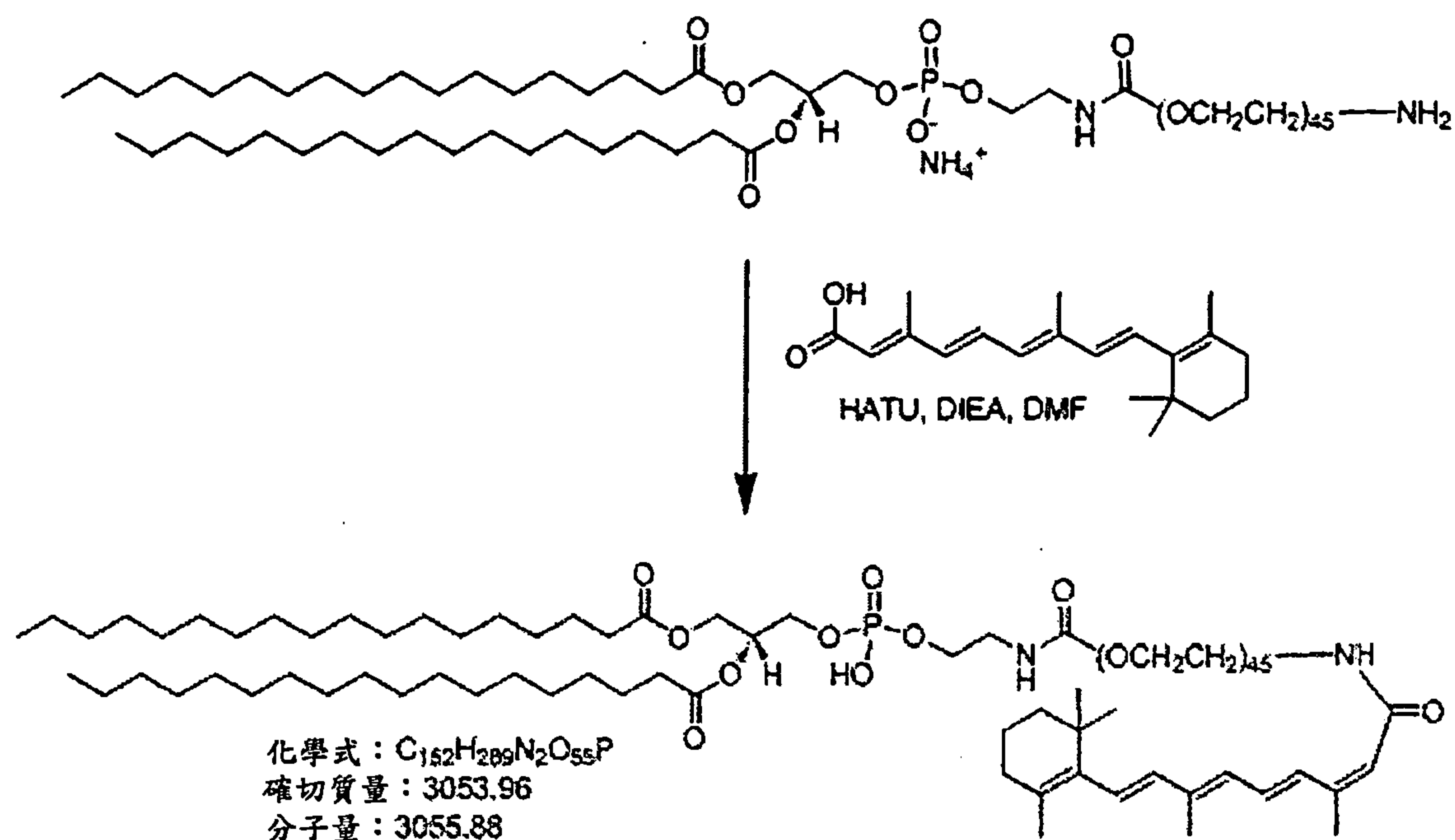
此示意圖展示用以合成VA-PEG-VA之方法。將視黃酸(2913 mg, 9.70 mmol)、六氟磷酸N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)鎂(3992 mg, 10.50 mmol)及二醯胺基-dPEG₁₁-二胺(3000 mg, 4.04 mmol)懸浮於N,N-二甲基甲醯胺(10 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(4222 μ L, 24.24 mmol), 且以氬氣沖洗容器。在以Al箔覆蓋以將曝光減至最小之圓底燒瓶中在室溫下攪拌反應物隔夜。次日, 將物質分配於乙酸乙酯(125 mL)與水(125 mL)之間。以乙酸乙酯(3 $\times$ 125 mL)萃取, 以硫酸鈉乾燥, 過濾且在真空中濃縮。隨後經由Grace純化系統純化物質。使用330 g Si濾筒及(0%至10%至25%)二氯甲烷/甲醇梯度, 將物質直接裝載於濾筒上。設定偵測器用於ELSD、326 nm UV及350 nm UV。產品接近操作結束時溶離。集中溶離份且在真空中濃縮, 獲得黃色油狀物(2900 mg, 54.9%)。藉由LCMS及NMR檢驗產物。¹H NMR (400 MHz), δ_H : 7.1 (s, 2H), 6.87 (t, 2H), 6.51 (t, 2H), 6.12-6.20 (dd, 8H), 5.66 (s, 2H), 3.6-3.8 (m, ~44H), 3.4 (q, 4H), 3.3 (q, 4H), 2.46 (t, 4H), 2.32 (s, 6H), 1.9-2.05 (m, 10H), 1.7-1.85 (m, 15H), 1.6 (m, 4H), 1.3-1.5 (m, 6H), 1.01 (s, 12H)。QTOF MS: m/z 1306 ($M+H^+$)。

實例20: VA-PEG2000-VA



此示意圖展示用以合成VA-PEG2000-VA之方法。將視黃酸(109 mg, 0.362 mmol)、六氟磷酸N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)鎂(149 mg, 0.392 mmol)及胺-PEG_{2K}-胺(333 mg, 0.151 mmol)懸浮於N,N-二甲基甲醯胺(3 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(158 μL, 0.906 mmol)，且以氬氣沖洗容器。在以Al箔覆蓋以將曝光減至最小之圓底燒瓶中在室溫下攪拌反應物隔夜。次日，將物質分配於乙酸乙酯(30 mL)與水(30 mL)之間。以乙酸乙酯(3×30 mL)萃取，以硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中濃縮。隨後經由Grace純化系統純化物質。使用24 g Si濾筒及(0%至10%至25%)二氯甲烷/甲醇梯度，將物質直接裝載於濾筒上。設定偵測器用於ELSD、326 nm UV及350 nm UV。產品接近操作結束時溶離。集中溶離份且在真空中濃縮，獲得黃色油狀物(97 mg, 23.4%)。藉由LCMS及NMR檢驗產物。¹H NMR (400 MHz), δ_H : 6.85-6.92 (t, 2H), 6.20-6.32 (M, 6H), 6.08-6.12 (d, 4H), 5.72 (s, 2H), 3.55-3.70 (m, ~180H), 3.4-3.5 (m, 4H), 2.79 (m, 4H), 2.78 (s, 6H), 2.33 (s, 6H), 2.05 (m, 4H), 1.97 (s, 6H), 1.80 (m, 2H), 1.79 (s, 6H), 1.69 (s, 6H), 1.60 (m, 4H), 1.45 (m, 4H), 1.01 (s, 12H)。QTOF MS: m/z 2774 (M+H⁺)。

實例21：DSPE-PEG2000-VA

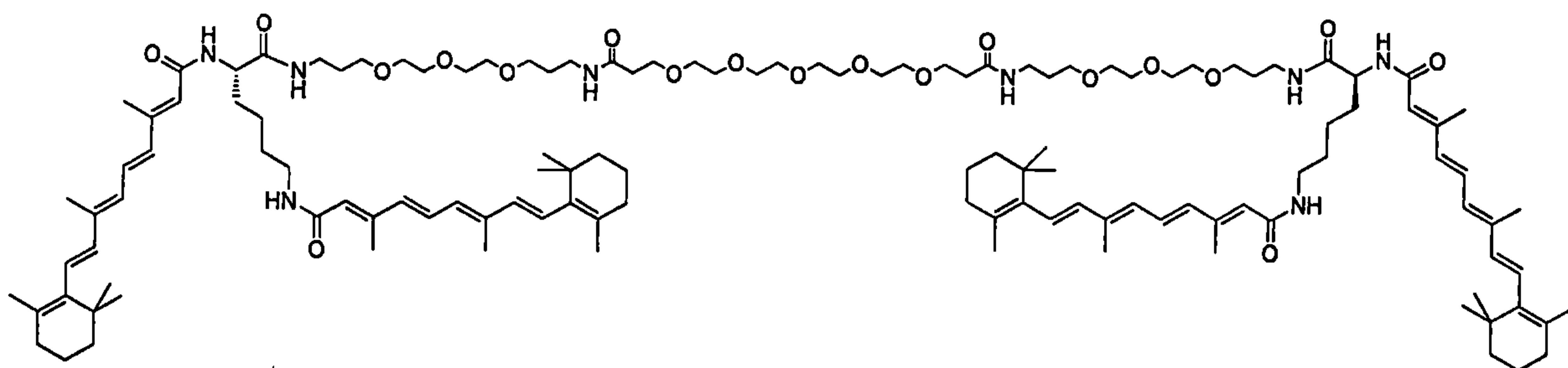


此示意圖展示用以合成DSPE-PEG2000-VA之方法。將DSPE-PEG2000-NH₂(250 mg, 0.090 mmol)、視黃酸(33 mg, 0.108 mmol)及六氟磷酸N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)鎂(45 mg, 0.117 mmol)溶解於N,N-二甲基甲醯胺中。添加N,N-二異丙基乙基胺(47 μL, 0.270 mmol)至混合物中。以氬氣沖洗琥珀色閃爍瓶，且在室溫下攪拌三天。TLC表明反應完全。隨後經由Grace純化系統純化物質。使用40 g Si濾筒及(0%至10%至25%)二氯甲烷/甲醇梯度，將物質直接裝載於濾筒上。設定偵測器用於ELSD、326 nm UV及350 nm UV。集中溶離份且在真空中濃縮，獲得黃色油狀物(245 mg, 88.8%)。藉由NMR檢驗產物。¹H NMR (400 MHz), δ_H: 6.86 (dd, 1H), 6.25 (m, 1H), 6.09-6.21 (dd, 4H), 5.71 (s, 1H), 5.1-5.2 (m, 1H), 4.3-4.4 (d, 1H), 4.1-4.2 (m, 3H), 3.85-4.0 (m, 4H), 3.8 (t, 1H), 3.5-3.75 (m, ~180H), 3.4-3.5 (m, 8H), 3.3 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.26 (m, 4H), 1.70 (s, 3H), 1.55-1.65 (m, 6H), 1.47 (m, 2H), 1.23 (s, ~60H), 1.01 (s, 6H), 0.85 (t, 6H)。

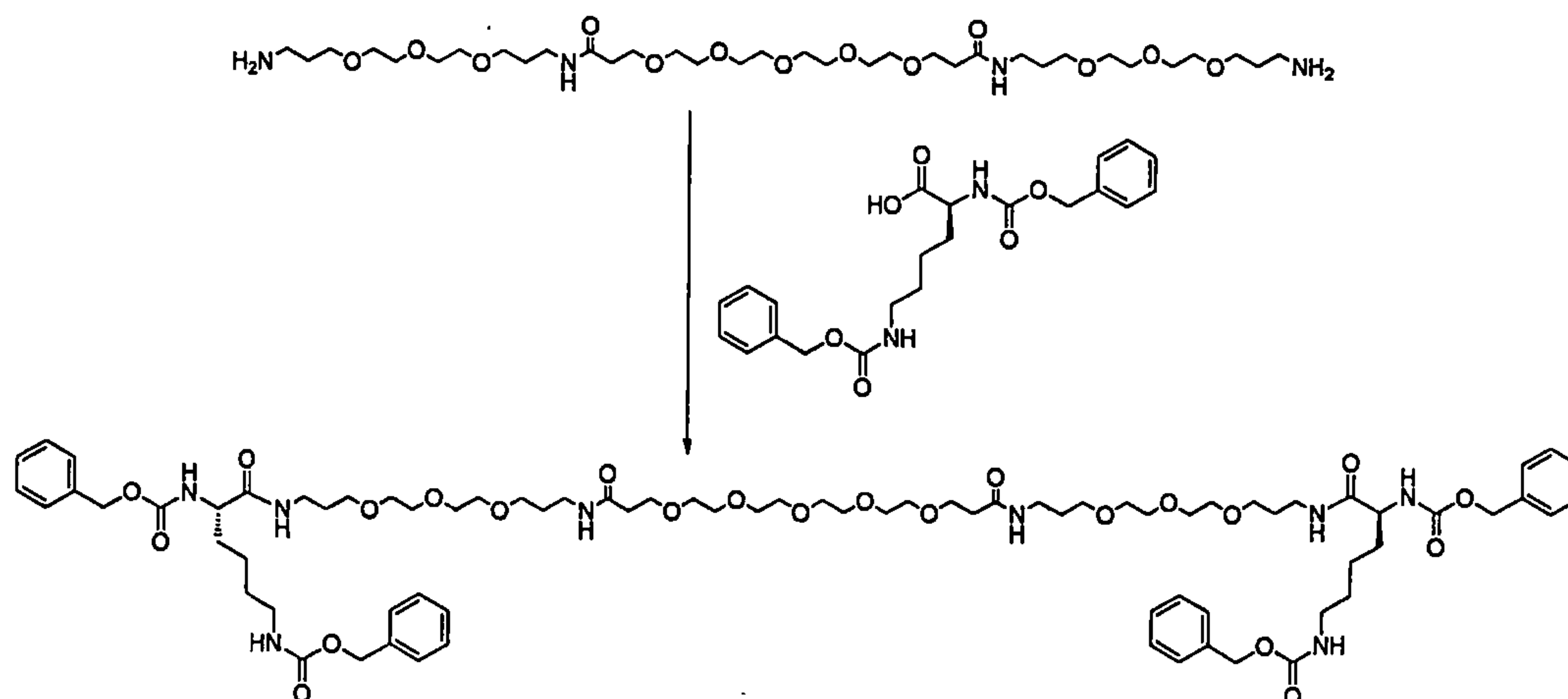
實例22：9 diVA-PEG-diVA

製備N1,N19-雙((S,23E,25E,27E,29E)-16-((2E,4E,6E,8E)-3,7-二甲

基-9-(2,6,6-三甲基環-己-1-烯-1-基)壬-2,4,6,8-四烯醯胺基)-24,28-二甲基-15,22-二側氧基-30-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)-4,7,10-三氧雜-14,21-二氮雜三十-23,25,27,29-四烯-1-基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺(diVA)



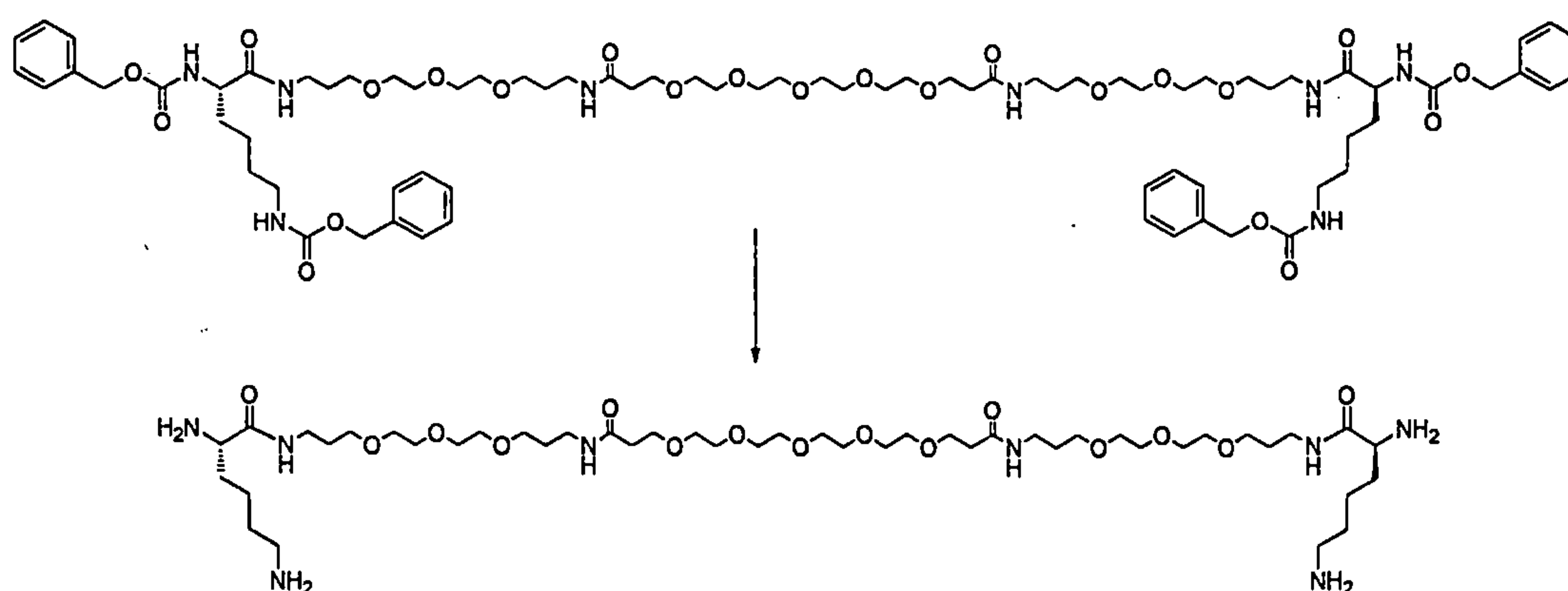
製備中間物 1：((5S,57S)-6,22,40,56-四側氧基-11,14,17,25,28,31,34,37,45,48,51-十一氧雜-7,21,41,55-四氮雜六十一-1,5,57,61-四基)四胺基甲酸四苄酯，亦稱為Z-DiVA-PEG-DiVA-IN



以氮氣沖洗1 L冷卻至5℃至10℃之反應燒瓶，且以二氯甲烷(300 mL)、d-PEG-11-二胺(Quanta貨號EK1-A-1100-010，50.0 g，0.067 mol)、Z-(L)-Lys(Z)-OH(61.5 g，0.15 mol)及HOBt水合物(22.5 g，0.15 mol)饋入。添加4-甲基嗎啉(4-MMP)(15.0 g，0.15mol)至懸浮液中，且觀測到輕微放熱反應。經30分鐘之時間添加EDC鹽酸鹽(43.5 g，0.23莫耳)及4-MMP(20.0 g，0.20 mol)於二氯甲烷(150 mL)中之懸浮

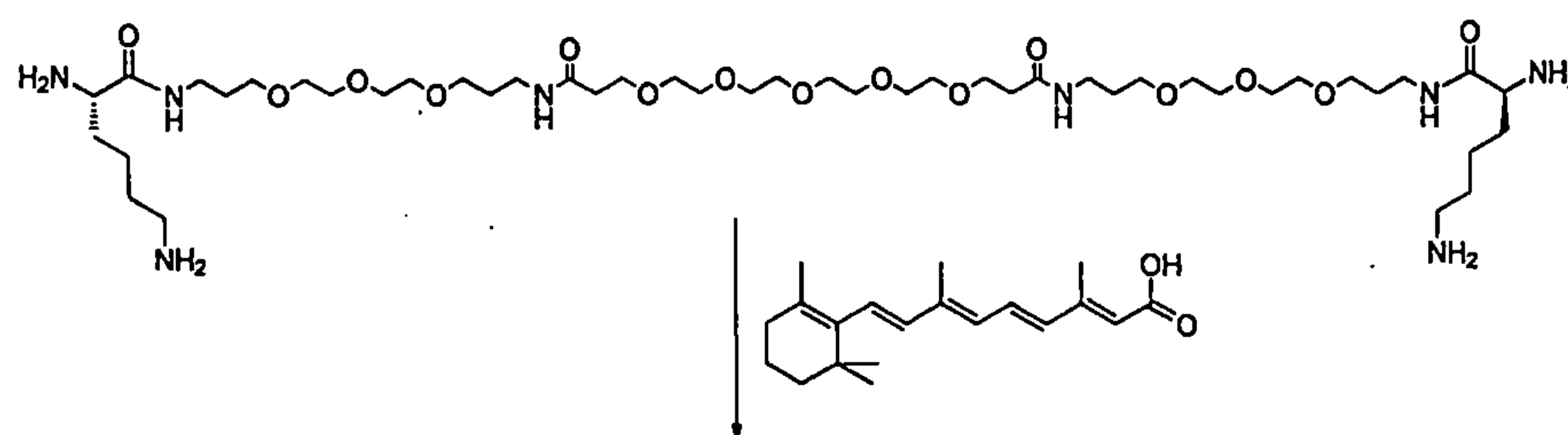
液，且需要緩和冷卻以便維持溫度為20℃至23℃。在周圍溫度下攪拌微混濁溶液隔夜，且HPLC指示反應完成。添加脫礦水(Demi water)(300 mL)，且在攪拌10分鐘之後，觀測到快速相分離。以二氯甲烷(150 mL)萃取水相-稍微較慢相分離。以6%碳酸氫鈉(300 mL)洗滌經合併有機萃取物，且以硫酸鎂(24 g)乾燥。在減壓下自40℃至45℃水浴蒸發，得到132 g粗產物。將粗產物(131 g)於含8%甲醇之乙酸乙酯中之溶液裝載於以含8%甲醇之乙酸乙酯填充的矽膠60(40 μ至63 μ)之管柱上。以含8%甲醇之乙酸乙酯(7.5 L)溶離管柱。在減壓下自45℃水浴蒸發含有足夠純的產物之溶離份(5.00 L至7.25 L)，且得到83.6 g純化產物。將純化產物(83.6 g)於二氯甲烷(200 mL)中之溶液裝載於陶瓦士(Dowex)650 C(H⁺)(200 g)之管柱上，該管柱已以二氯甲烷(250 mL)洗滌。以二氯甲烷(200 mL)溶離管柱。以硫酸鎂(14 g)乾燥經合併含產物之溶離份(300 mL至400 mL)且在減壓下自45℃水浴蒸發，獲得((5S,57S)-6,22,40,56-四側氧基-11,14,17,25,28,31,34,37,45,48,51-十一氧雜-7,21,41,55-四氮雜六十一-1,5,57,61-四基)四胺基甲酸四苄酯，亦稱為Z-DiVA-PEG-DiVA-IN(77.9 g，HPLC純度94.1%)。

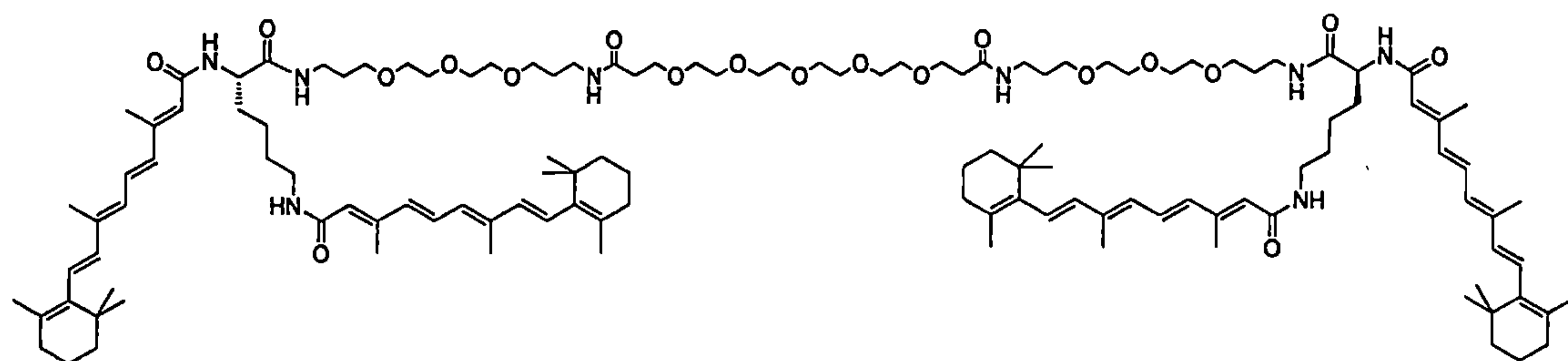
製備中間物2：N1,N19-雙((S)-16,20-二胺基-15-側氧基-4,7,10-三氧雜-14-氮雜二十基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺，亦稱為DiVA-PEG-DiVA-IN



以氫氣沖洗1 L反應燒瓶，且以甲醇(600 mL)及Z-DiVA-PEG-DiVA-IN(92.9 g, 60.5 mmol)饋入。在氫氣下攪拌混合物直至獲得溶液。添加催化劑10% Pd/C/50%水(Aldrich, 10 g)。抽空混合物，且隨後藉由氫氣使壓力均衡。抽空混合物，且隨後藉由氫氣使壓力均衡。在確保穩定低流量氫氣流經反應混合物之情況下，開動攪拌器。在氫氣流中繼續氫化一個小時。隨後封閉系統，且在約0.1巴(bar)下繼續氫化一個小時。抽空混合物，且隨後以氫氣再加壓至約0.1巴。在另一個小時氫化之後，抽空混合物，且隨後以氫氣再加壓至約0.1巴。繼續在氫氣下攪拌15小時，此後藉由HPLC偵測不到起始物質。抽空混合物，且隨後藉由氫氣使壓力均衡。抽空混合物，且隨後藉由氫氣使壓力均衡。隨後在矽藻土545墊上過濾反應混合物。以甲醇(100 mL)洗滌濾餅。最終在45℃下及在小於50毫巴之壓力下濃縮經合併濾液。添加甲苯(100 mL)，且最終在45℃下及在小於40毫巴之壓力下再次濃縮所得混合物，獲得呈靜置後凝固之油狀之N1,N19-雙((S)-16,20-二胺基-15-側氧基-4,7,10-三氧雜-14-氮雜二十基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺，亦稱為DiVA-PEG-DiVA-IN(63.4 g)。

製 備 DiVA-PEG-DiVA： N1,N19- 雙 ((S,23E,25E,27E,29E)-16-((2E,4E,6E,8E)-3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬-2,4,6,8-四烯醯胺基)-24,28-二甲基-15,22-二側氧基-30-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)-4,7,10-三氧雜-14,21-二氮雜三十-23,25,27,29-四烯-1-基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺



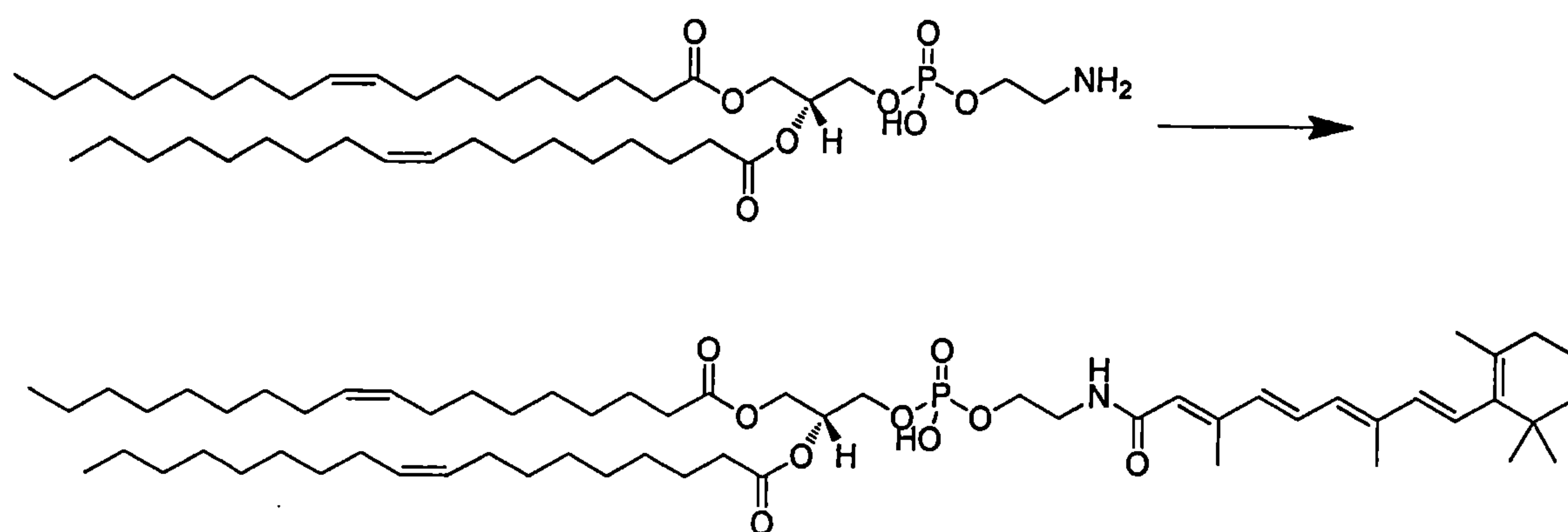


以氬填充2 L反應器，且以二氯甲烷(500 mL)、DiVA-PEG-DiVA-IN(52.3 g, 52.3 mmol)、視黃酸(70.6 g, 235 mmol)及4-N,N-二甲基胺基吡啶(2.6 g, 21.3 mmol)饋入。在氬下攪拌混合物直至溶解(約20分鐘)。保持反應物之溫度為10℃至20℃，經10至15分鐘之時間逐份添加EDCI(70.6 g, 369 mmol)(在前30至60分鐘內反應為輕微放熱的)。以鋁箔覆蓋反應器，且在18℃至21℃下攪拌混合物15至20小時。添加BHT(25 mg)，且隨後將反應混合物傾於6%碳酸氫鈉水溶液(500 mL)上同時保持氬氣氛流經混合物。分離有機相。以二氯甲烷(50 mL)洗滌水相。在惰性氛圍下以硫酸鎂(150 g)乾燥經合併有機相且使其免於光照。濾出(較佳用壓力過濾器)乾燥劑，且以二氯甲烷(500 mL)洗滌濾餅。藉由使用35℃至40℃之水浴在減壓下蒸發來濃縮濾液。添加甲苯(150 mL)至油性殘餘物且再次蒸發，獲得210 g半固體殘餘物。將此殘餘物溶解於二氯甲烷(250 mL)中，且應用於由矽膠60(1.6 kg)及含0.5%甲醇之二氯甲烷(4 L)製備之管柱上。以二氯甲烷(7.2 L)、含3%甲醇之二氯甲烷(13 L)、含5%甲醇之二氯甲烷(13 L)、含10%甲醇之二氯甲烷(18 L)溶離管柱。獲得一個10 L溶離份，且隨後獲得2.5 L溶離份。取樣避光保存之溶離份，以氬氣沖洗且密封。藉由TLC(含10%甲醇之二氯甲烷，UV)分析所取溶離份。藉由HPLC進一步分析含DiVA-PEG-DiVA之溶離份。以同樣方式、使用僅初始量的25%之矽膠及溶劑再純化5個<85%純之溶離份(得到32 g蒸發殘餘物)。合併藉由HPLC獲悉>85%純之溶離份，且使用35℃至40℃之水浴在減壓下蒸發。將蒸發殘餘物(120 g)再溶解於二氯甲烷(1.5 L)中，且使其緩慢通

過(約1小時)自離子交換劑陶瓦士650C H⁺型(107 g)製備之管柱。隨後以二氯甲烷(1 L)洗滌管柱。充分混合經合併溶離液(3277.4 g)，且最終在室溫及<0.1毫巴之壓力下蒸發樣品(25 mL, 33.33 g)，獲得0.83 g 泡沫。自此數字因此計算出固體物質之總量為80.8 g(72.5%)之產率。將剩餘3.24 kg溶液濃縮至423 g。進一步濃縮266 g此溶液，獲得糖漿，且隨後將其再溶解於絕對乙醇(200 mL)中。繼續使用35℃至40℃之水浴在減壓下蒸發，獲得94.8 g含50.8 g(53.6% w/w)亦稱為DiVA-PEG-DiVA之N1,N19-雙((S,23E,25E,27E,29E)-16-((2E,4E,6E,8E)-3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬-2,4,6,8-四烯醯胺基)-24,28-二甲基-15,22-二側氧基-30-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)-4,7,10-三氧雜-14,21-二氮雜三十-23,25,27,29-四烯-1-基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺的最終乙醇溶液。

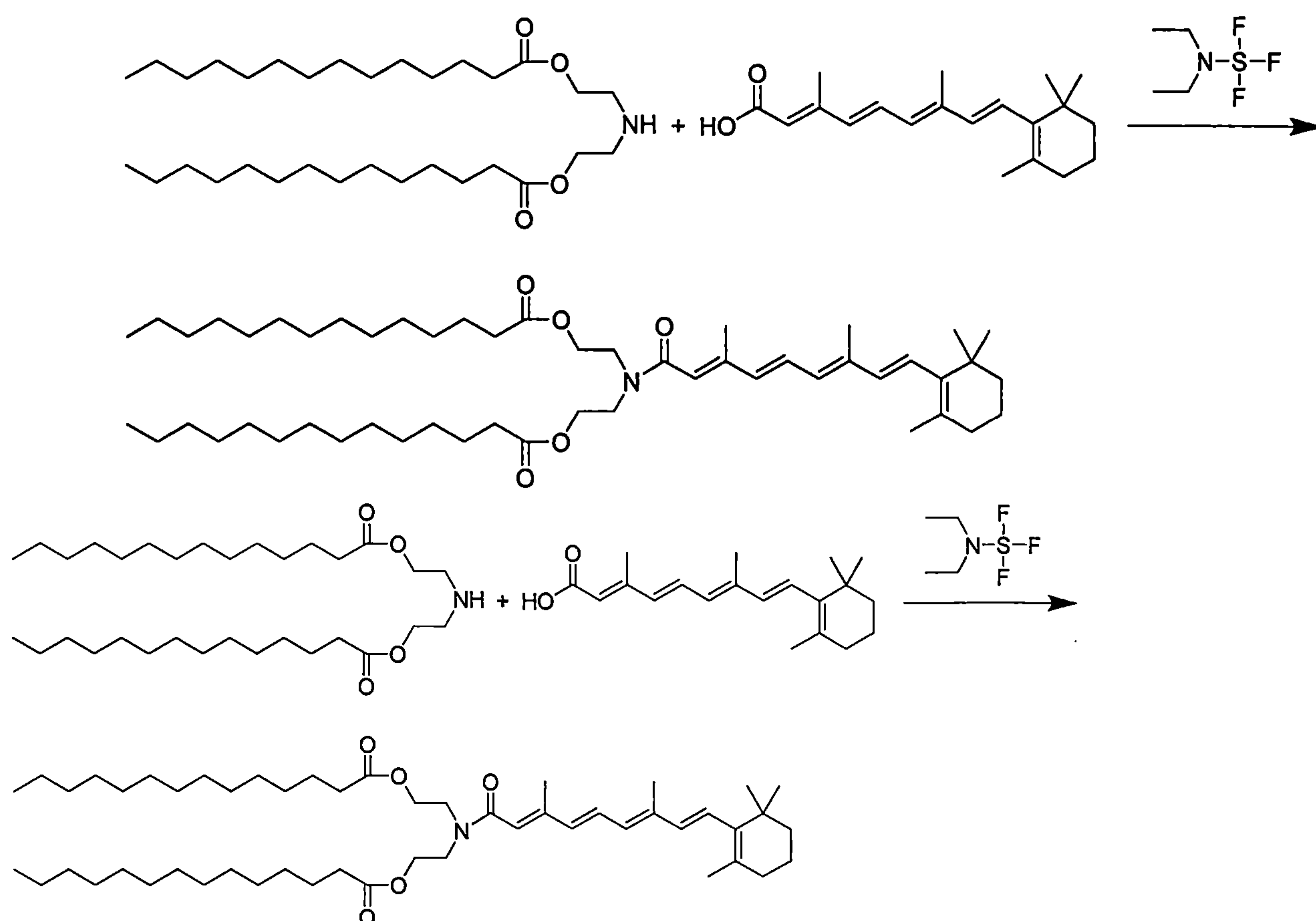
藉由NMR及QTOF檢驗。¹H NMR (400 MHz), δ_H : 7.07 (t, 2H), 7.01 (t, 2H), 6.87-6.91 (m, 4.0H), 6.20-6.24 (m, 10H), 6.10-6.13 (m, 8H), 5.79 (s, 2H), 5.71 (s, 2H), 4.4 (q, 2H), 3.70 (t, 6H), 3.55-3.65 (m, ~34H), 3.59 (t, 6H), 3.4 (m, 2H), 3.25-3.33 (m, 10H), 3.16 (m, 2H), 2.44 (t, 4H), 2.33 (s, 12H), 1.97-2.01 (m, 12H), 1.96 (s, 6H), 1.7-1.9 (m, 12H), 1.69 (s, 12H), 1.5-1.65 (m, 12H), 1.35-1.5(m, 24H), 1.01 (s, 24H)。QTOF MS ESI+: m/z 2128 (M+H⁺)。

實例23：DOPE-VA



此示意圖展示用以合成DOPE-VA之方法。在 -78°C 下在攪拌下向視黃酸(250 mg, 0.83 mmol)於乙醚(20 mL)中之溶液，經由注射器添加三氟化(二乙基胺基)硫(130 μl , 0.90 mmol)於冷乙醚(20 mL)中之溶液。從冷浴中取出反應混合物，且在室溫下再繼續攪拌2小時。最後，藉由旋轉蒸發移除溶劑。在固體 Na_2CO_3 (50 mg)存在下將殘餘物再溶解於氯仿(50 mL)中。向此溶液添加1,2-二油鹽基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(600 mg, 0.81 mmol)，且在室溫下再攪拌反應混合物24小時。藉由旋轉蒸發移除溶劑。藉由管柱層析、依次以二氯甲烷、2%甲醇/二氯甲烷及5%甲醇/二氯甲烷洗滌，純化殘餘物。獲得240 mg產物(0.23毫莫耳，28%產率)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.87 (t, 6H, CH_3), 1.01 (s, 6H, CH_3) 1.20-1.40 (m, 40H, CH_2), 1.40-1.60 (m, 8H, CH_2), 1.70 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}=\text{C}$), 1.80-2.10 (m, 8H), 2.32 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})$), 3.50 (m, 2H), 3.92-4.18 (m, 5H), 4.35 (m, 2H), 5.20 (m, 1H, $\text{NHC}(=\text{O})$), 5.31 (m, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$), 5.80-6.90 (m, 6H, $\text{CH}=\text{CH}$)。

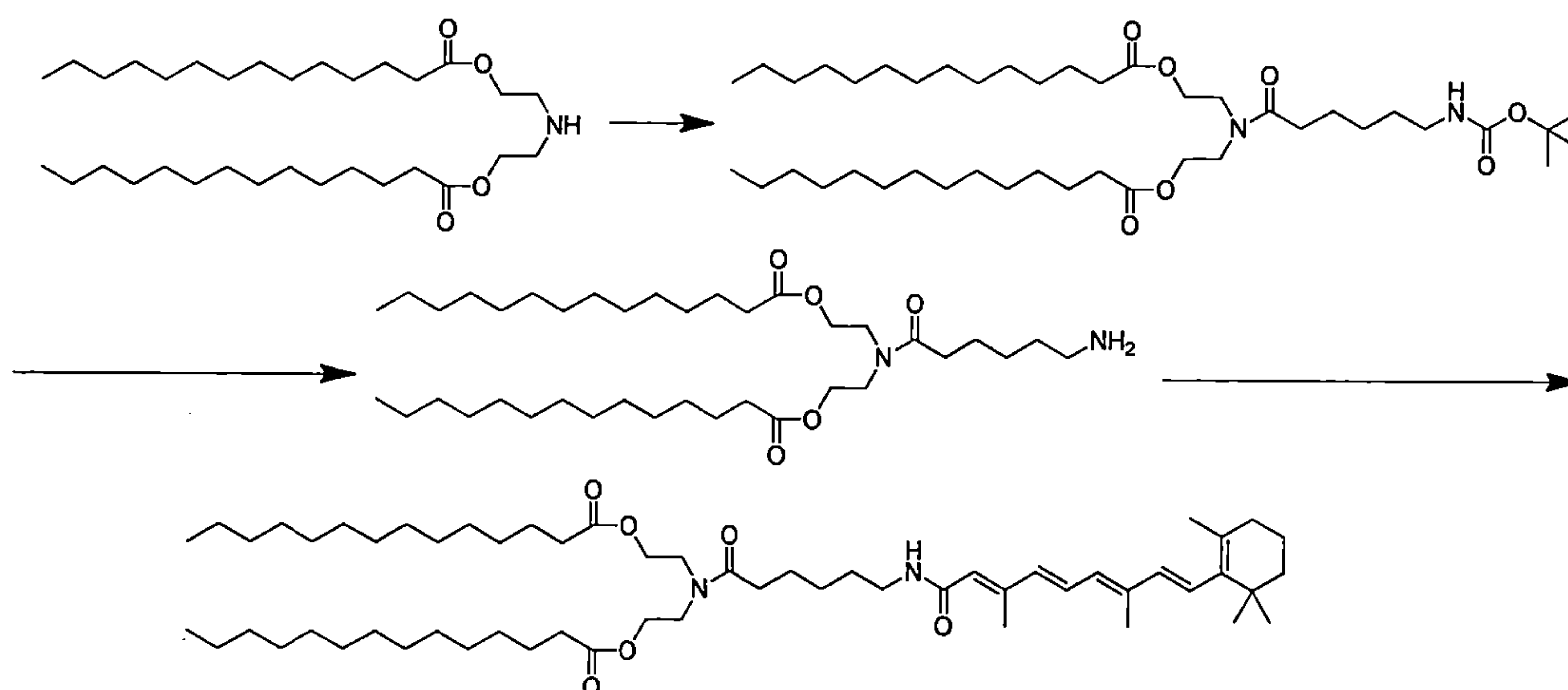
實例24：DC-VA



此示意圖展示用以合成DC-VA之方法。在 -78°C 下在攪拌下向視黃酸(600 mg, 2.0 mmol)於乙醚(25 mL)中之溶液，經由注射器添加三氟化(二乙基胺基)硫(0.3 mL, 2.1 mmol)於5 mL冷乙醚中之溶液。從冷浴中取出反應混合物，且在室溫下再繼續攪拌1小時。在藉由旋轉蒸發移除溶劑之後，在固體 Na_2CO_3 (25 mg)存在下將殘餘物再溶解於二氯甲烷(20 mL)中。向此溶液添加二級胺起始物質(1.05 g, 2.0 mmol)，且在室溫下再攪拌反應混合物24小時。以二氯甲烷(50 mL)稀釋反應混合物且經 MgSO_4 乾燥。在藉由旋轉蒸發移除溶劑之後，藉由管柱層析、使用5%甲醇/二氯甲烷作為溶離劑純化殘餘物，獲得橙色固體產物(800 mg, 50%)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.87 (t, 6H, CH_3), 1.02 (s, 6H, CH_3) 1.20-1.40 (m, 40H, CH_2), 1.40-1.60 (m, 8H, CH_2), 1.70 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}=\text{C}$), 1.97(s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}=\text{C}$), 2.05 (m, 2H, CH_2), 2.15(s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}=\text{C}$), 2.32 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})$), 3.67 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.15-4.30 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 5.80-6.90 (m, 6H,

CH=CH)。

實例 25：DC-6-VA



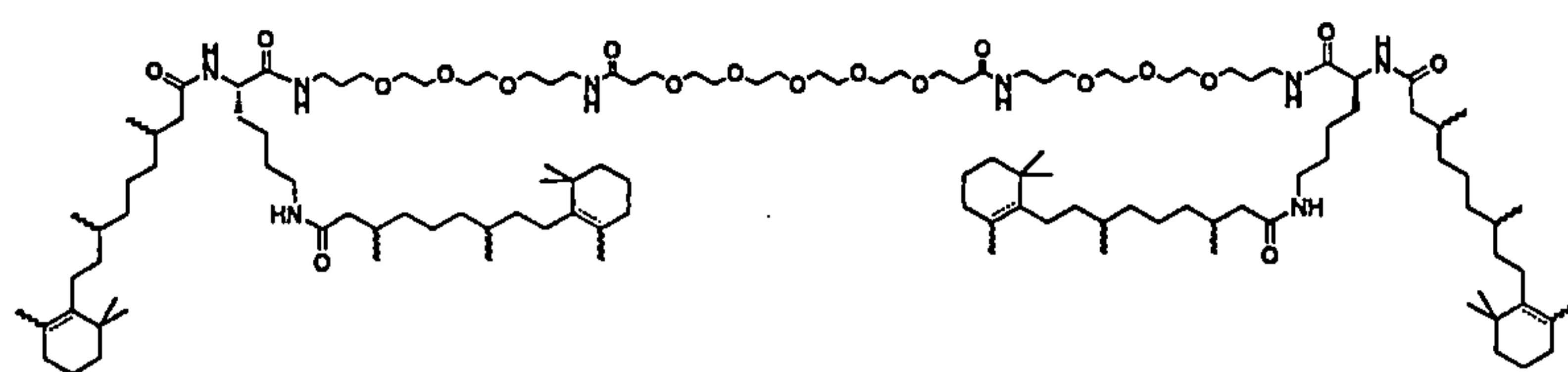
此示意圖展示用以合成DC-6-VA之方法。將二級胺起始物質(2.5 g, 4.8 mmol)、Boc-胺基己酸(1.3 g, 5.6 mmol)、N,N'-二環己基碳化二亞胺(1.3 g, 6.3 mmol)及N,N-二異丙基乙基胺(2.6 mL, 0.015 mmol)之混合物溶解於吡啶(40 mL)中。在60℃下攪拌溶液隔夜。以二氯甲烷(50 mL)稀釋混合物且以鹽水(3×50 mL)洗滌。在藉由旋轉蒸發濃縮之後，以三氟乙酸/二氯甲烷(100 mL, 1:1)處理殘餘物。濃縮混合物，且將其再溶解於二氯甲烷(50 mL)中，且以鹽水(3×50 mL)洗滌。旋轉蒸發，獲得產物(1.5 g, 33%)。

在-78℃下在攪拌下向視黃酸(800 mg, 2.67 mmol)於乙醚(40 mL)中之溶液，經由注射器添加三氟化(二乙基胺基)硫(0.4 mL, 22.80 mmol)於冷乙醚(7 mL)中之溶液。從冷浴中取出反應混合物，且在室溫下再繼續攪拌1小時。在藉由旋轉蒸發移除溶劑之後，在固體Na₂CO₃(40 mg)存在下將殘餘物再溶解於二氯甲烷(25 mL)中。向此溶液添加二級胺起始物質(1.5 g, 1.6 mmol)，且在室溫下再攪拌反應混合物24小時。以二氯甲烷(50 mL)稀釋反應混合物且經MgSO₄乾燥。在藉由旋轉蒸發移除溶劑之後，藉由管柱層析、使用5%甲醇/二氯甲

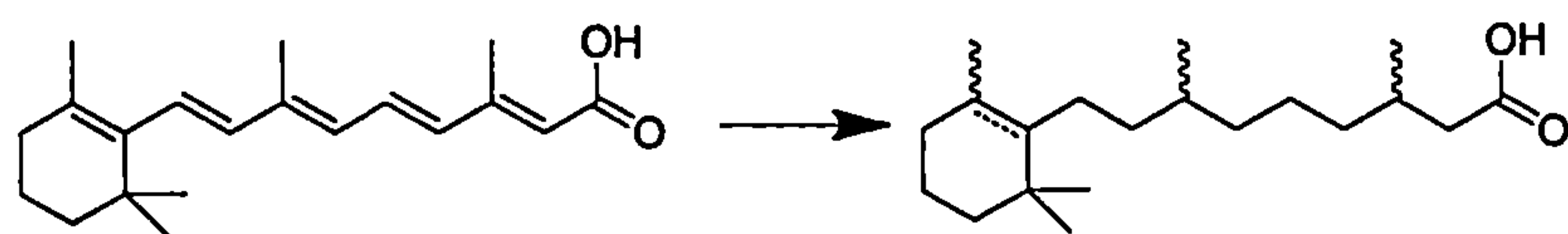
烷作為溶離劑純化殘餘物，獲得橙色固體產物(360 mg, 24%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.87 (t, 6H, CH₃), 1.02 (s, 6H, CH₃) 1.20-1.40 (m, 42H, CH₂), 1.40-1.60 (m, 12H, CH₂), 1.70 (s, 3H, CH₃-C=C), 1.97(s, 3H, CH₃-C=C), 2.05 (m, 2H, CH₂), 2.15(s, 3H, CH₃-C=C), 2.32 (m, 6H, CH₂C(=O)), 3.20 (m, 2H, CH₂NHC(=O)), 3.56 (m, 4H, NCH₂CH₂O), 4.15-4.30 (m, 4H, NCH₂CH₂O), 5.10 (m, 1H), 5.80-6.90 (m, 6H, CH=CH)。

實例26：合成satDiVA

製備N1,N19-雙((16S)-16-(3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬醯胺基)-24,28-二甲基-15,22-二側氧基-30-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)-4,7,10-三氧雜-14,21-二氮雜三十基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺(satDiVA)。



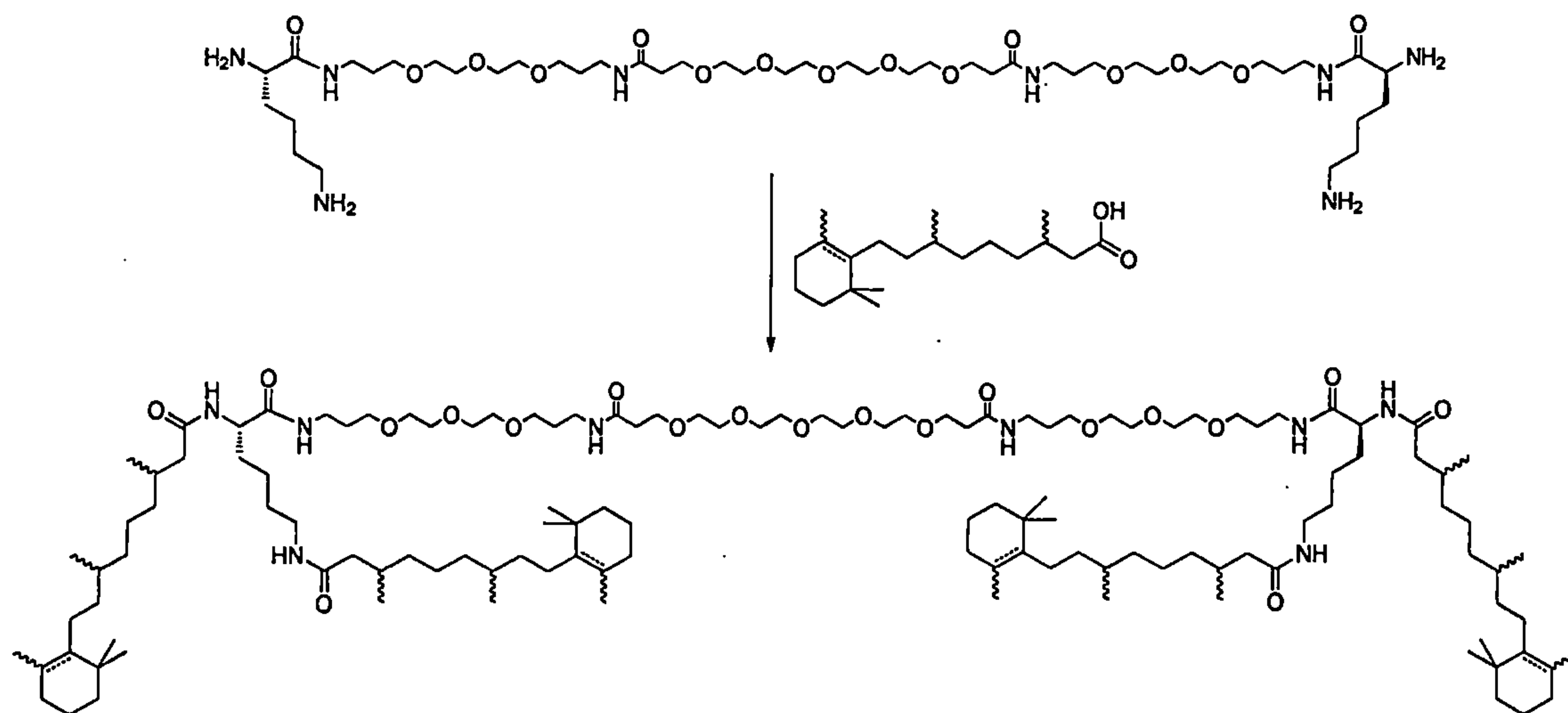
製備中間物1：3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸



藉助於音波處理將全反式視黃酸(2000 mg, 6.66 mmol)溶解於Hex/IPA(3:1, 40 mL)中。將物質置於Parr震盪器瓶中，且以惰性氣體沖洗。添加10% Pd/C(200 mg)且再次以惰性氣體沖洗容器。在>70 psi 氫氣下將物質置於Parr震盪器上隔夜。次日，經由矽藻土墊濾出Pd/C，且在真空中濃縮物質，獲得3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-

烯-1-基)壬酸(定量)。

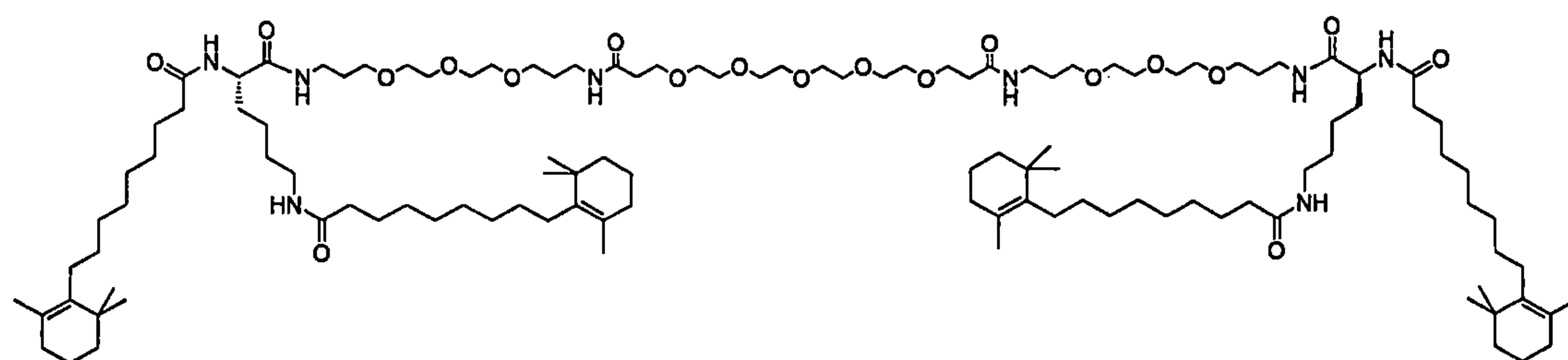
製備 **satDIVA** : N1,N19-雙((16S)-16-(3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬醯胺基)-24,28-二甲基-15,22-二側氧基-30-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)-4,7,10-三氧雜-14,21-二氮雜三十基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺



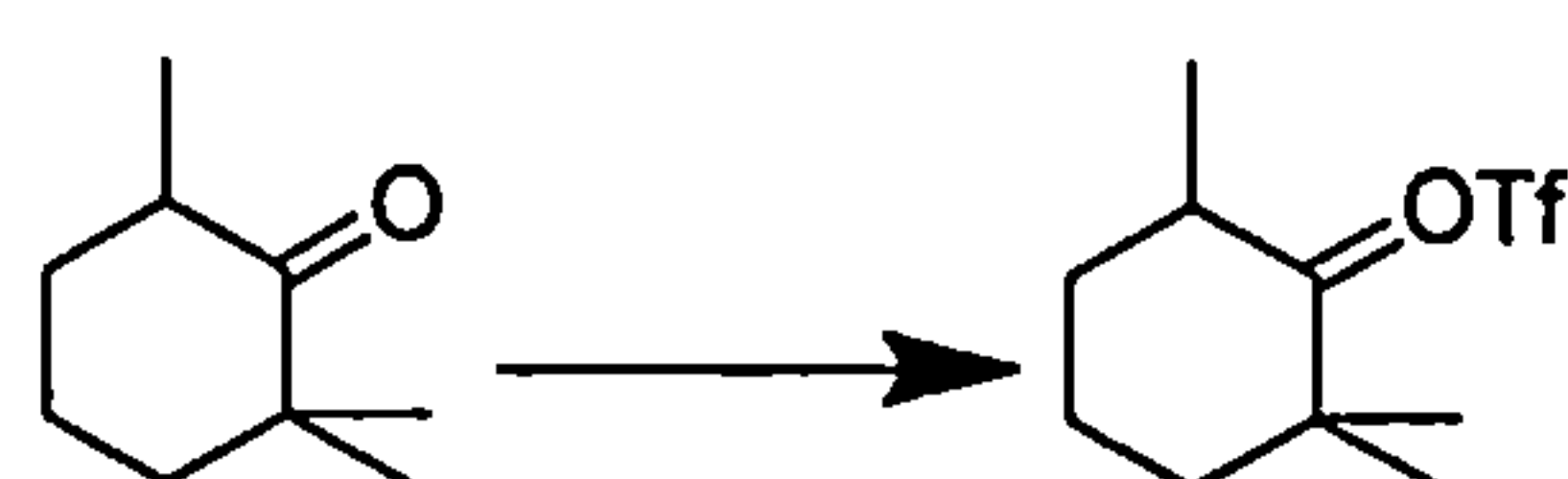
亦稱為 **satDIVA** 之 N1,N19-雙((16S)-16-(3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬醯胺基)-24,28-二甲基-15,22-二側氧基-30-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)-4,7,10-三氧雜-14,21-二氮雜三十基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺係以與 **diva-PEG-diVA** 類似之方式自先前所述之 N1,N19-雙((S)-16,20-二胺基-15-側氧基-4,7,10-三氧雜-14-氮雜二十基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺製備，其中用 3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸取代全反式視黃酸。
QTOF MS ESI+: m/z 2161, 2163, 2165 & 2167 ($M+H^+$)。

實例27：合成 **simDiVA**

製備 N1,N19-雙((S)-15,22-二側氧基-30-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)-16-(9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬醯胺基)-4,7,10-三氧雜-14,21-二氮雜三十基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺 (**simDIVA**)。

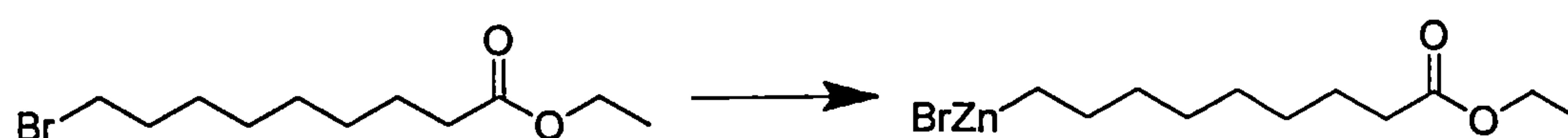


製備中間物1：三氟甲磺酸2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-酯



在氮氣下在 -78°C 下向2,2,6-三甲基環己酮於乾燥THF中之溶液逐滴添加2 M二異丙胺基鋰溶液。在 -78°C 下攪拌混合物3小時。隨後逐滴添加(在 -78°C 下)*N*-苯基-雙(三氟甲磺醯亞胺)於THF中之溶液。將反應燒瓶填充於乾冰中，且攪拌隔夜。在室溫下繼續攪拌3小時，此時所有物質均已溶解。在真空中濃縮反應混合物，且在劇烈攪拌下將殘餘物緩慢添加至己烷(350 mL)中。藉由過濾移除固體物質且以己烷(2×50 mL)洗滌。濃縮濾液且添加更多己烷(150 mL)。藉由過濾移除固體物質且濃縮濾液。再一次重複沈澱，之後藉由急驟層析(二氧化矽，己烷)純化殘餘物，得到呈無色油狀之三氟甲磺酸2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-酯(23.2 g，60%產率)。

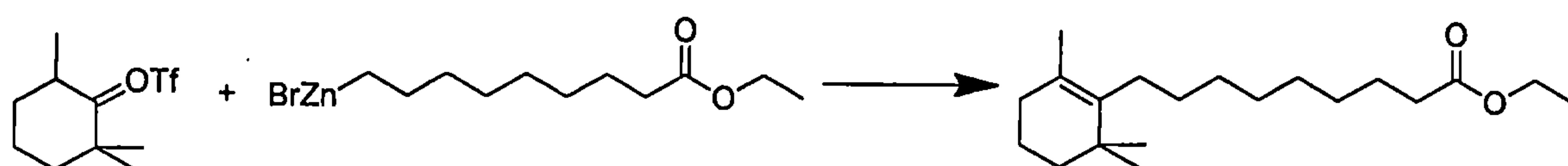
製備中間物2：9-(溴鋅)壬酸乙酯



在氮氣下在乾燥反應管中饋入鋅粉(3.70 g，56.6 mmol)、碘(479 mg，1.89 mmol)及乾燥DMA(20 mL)。在室溫下攪拌混合物直至碘之顏色消失。添加9-溴壬酸乙酯，且在 80°C 下攪拌混合物4小時且隨後

在室溫下攪拌隔夜。(藉由水解反應混合物之GCMS分析檢查鋅嵌入反應之完成。)反應混合物無需進一步處理即可用於後續步驟中。GCMS m/z 186 $[M]^+$ (壬酸乙酯)。

製備中間物3：9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸乙酯



在反應管中在氮氣下，向於二甲基乙醯胺中之新鮮製備9-(溴鋅)壬酸乙酯(37.7 mmol)相繼添加三氟甲烷磺酸2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-酯(10.8 g, 39.6 mmol)及肆(三苯基膦)鈹(0)(872 mg, 0.754 mmol)。密封管，且在95℃下攪拌混合物2小時。使反應混合物冷卻且隨後將其傾入乙醚(100 mL)中。傾析上層，且以乙醚(2×25 mL)洗滌下層兩次。以飽和NH₄Cl及鹽水洗滌經合併乙醚層，乾燥(MgSO₄)且濃縮，得到粗物質(約12 g)。藉由急驟層析(二氧化矽，於己烷中之0至15% EtOAc)純化物質。在真空下攪拌所得油狀物8小時以便移除大部分副產物壬酸乙酯，且隨後藉由第二急驟層析(二氧化矽，於己烷中之0至15%甲苯)純化。藉由LCMS及GCMS分析溶離份。收集最純溶離份且在低於25℃之溫度下在真空中濃縮，得到呈無色油狀之9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸乙酯(經兩個步驟後6.16 g, 53%產率)。LCMS ESI+ m/z 309 $[M+H]^+$ ；GCMS m/z 308 $[M]^+$ 。

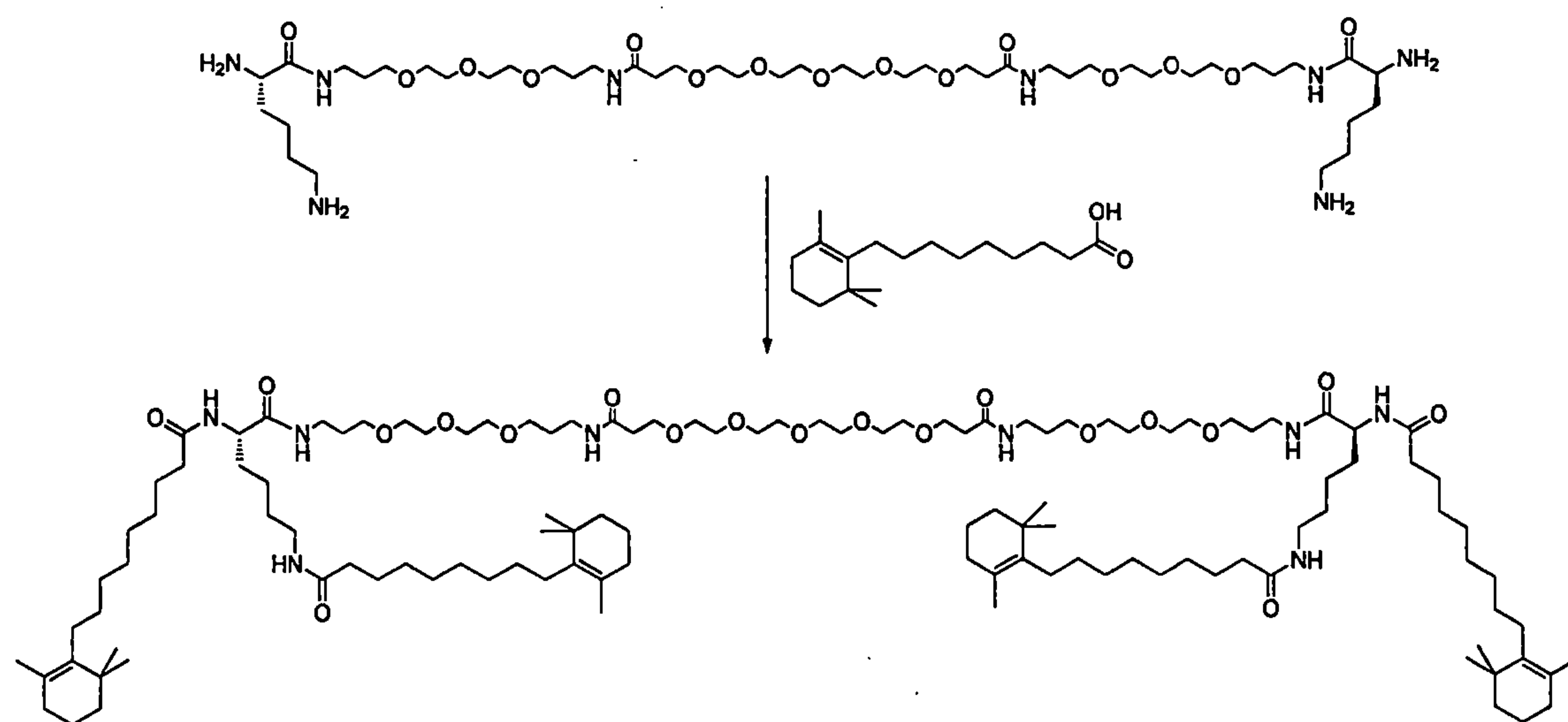
製備中間物4：9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸



向於EtOH(80 mL)中之9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸乙酯

(13.2 g, 42.9 mmol)添加4 M KOH(43 mL)。在室溫下攪拌混合物1.5 小時。添加水(350 mL)且以第三丁基甲基醚(2×100 mL)洗滌溶液。冷卻*SimVA*水相，以4 M HCl(約45 mL)酸化且以戊烷(3×100 mL)萃取。以水(200 mL)洗滌經合併戊烷萃取物，乾燥(MgSO₄)，過濾，在高真空下濃縮且乾燥。將物質再溶解於戊烷(100 mL)中，再一次在高真空下濃縮且乾燥，得到呈無色油狀之9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸(11.1 g, 92%產率)。MS ESI- m/z 279 [M-H]⁻。

製備 **simdiVA**：N1,N19-雙((S)-15,22-二側氧基-30-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)-16-(9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬醯胺基)-4,7,10-三氧雜-14,21-二氮雜三十基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺。

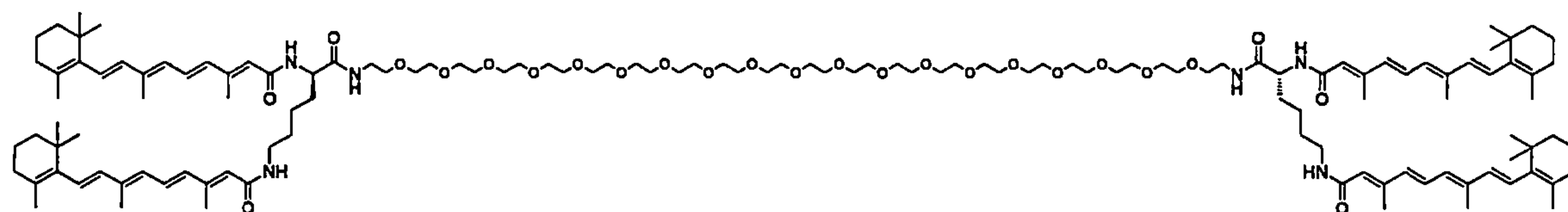


*simDIVA*係以與*diVA*類似之方式自先前所述之N1,N19-雙((S)-16,20-二胺基-15-側氧基-4,7,10-三氧雜-14-氮雜二十基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺製備，其中用9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸取代全反式視黃酸。QTOF MS ESI⁺: m/z 2050 (M+H⁺)。

實例28：合成DiVA-PEG18

製 備 (2E,2'E,2''E,4E,4'E,4''E,6E,6'E,6''E,8E,8'E,8''E)-N,N',N''-((5R,69R,76E,78E,80E,82E)-77,81-二甲基-6,68,75-三側氧基-83-(2,6,6-

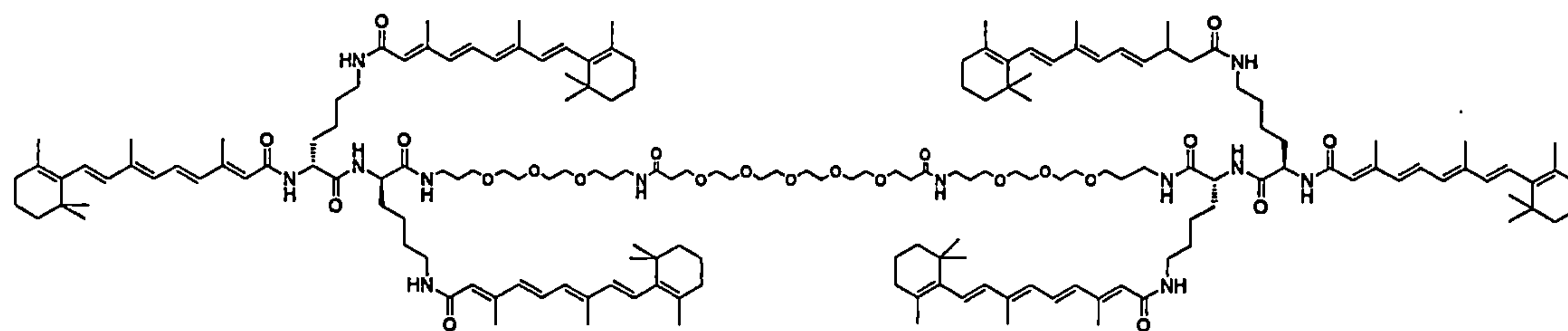
三 甲 基 環 己 -1- 烯 -1- 基)-
10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64- 十九 氧 雜 -
7,67,74-三氮雜八十三-76,78,80,82-四烯-1,5,69-三基)參(3,7-二甲基-9-
(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬-2,4,6,8-四烯醯胺)(DIVA-PEG18)。



亦 稱 為 DIVA-PEG18 之 (2E,2'E,2''E,4E,4'E,4''E,6E,6'E,
6''E,8E,8'E,8''E)-N,N',N''-((5R,69R,76E,78E,80E,82E)-77,81- 二 甲 基 -
6,68,75- 三 側 氧 基 -83-(2,6,6- 三 甲 基 環 己 -1- 烯 -1- 基)-
10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61, 64- 十 九 氧 雜 -
7,67,74-三氮雜八十三-76,78,80,82-四烯-1,5,69-三基)參(3,7-二甲基-9-
(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬-2,4,6,8-四烯醯胺)係以與diVA類似之
方式製備，其中用PEG₁₈二胺取代二醯胺基-dPEG₁₁-二胺。LCMS
ESI+: *m/z* 2305 (M+Na)。

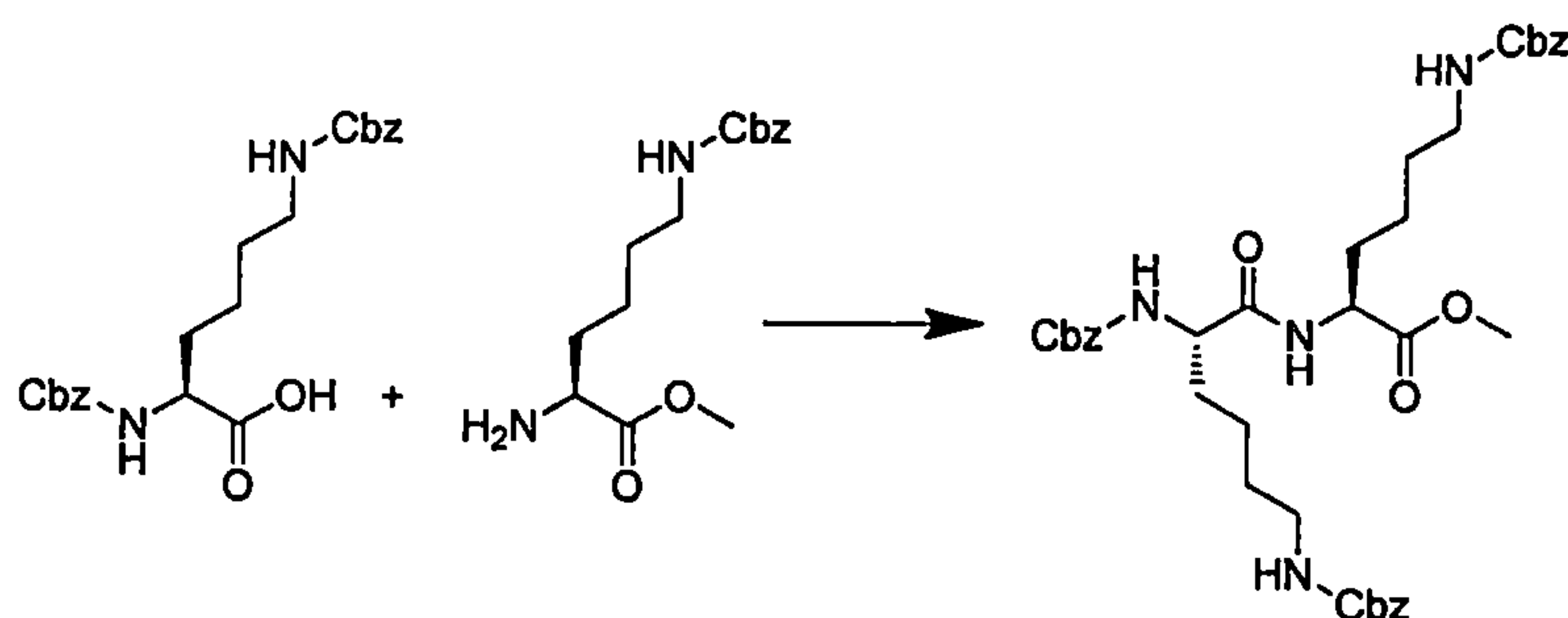
實例29：合成TriVA

製備TriVA



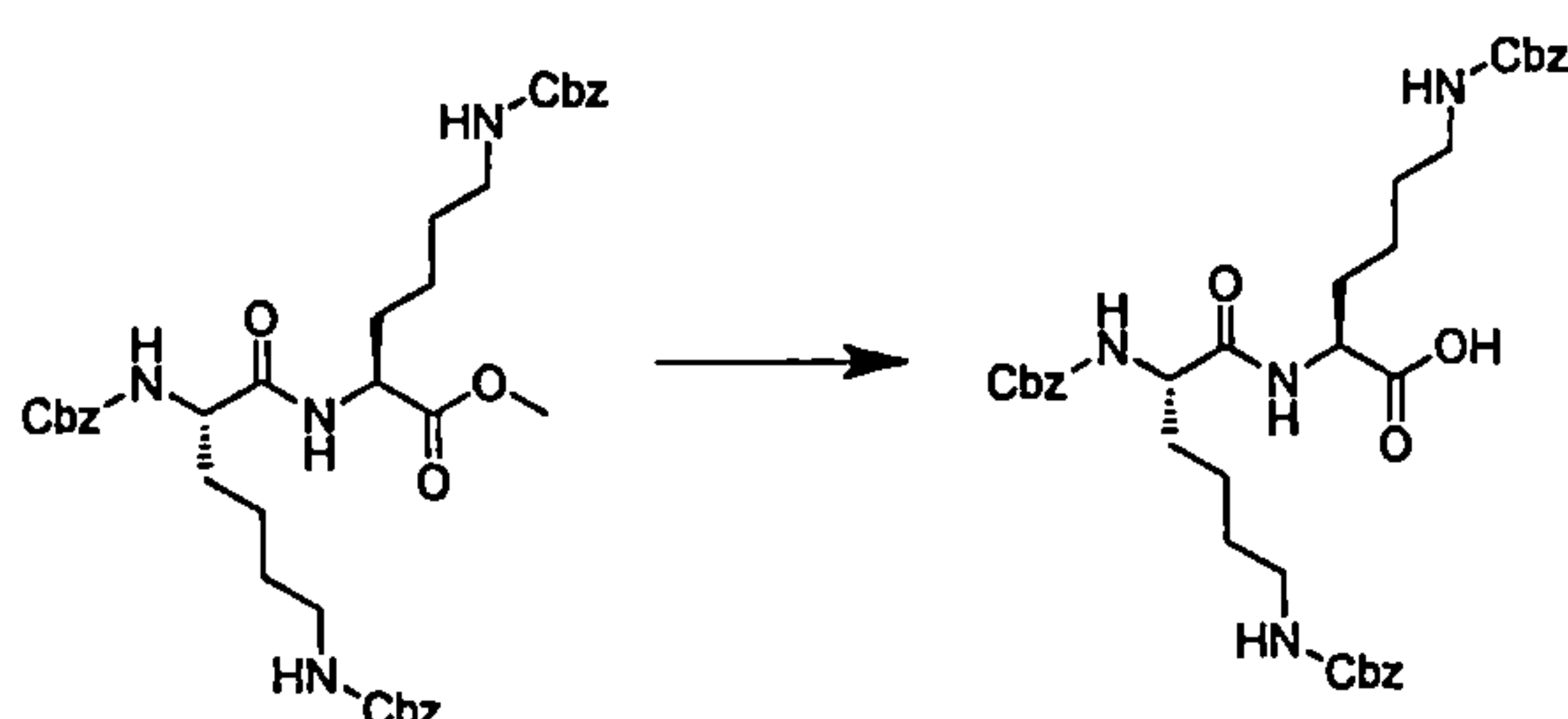
就此結構而言不能生成名稱。

製備中間物1：6-(((苄氧基)羰基)胺基)-2-((S)-2,6-雙(((苄氧基)羰基)胺基)己醯胺基)己酸(S)-甲酯



以惰性氣體沖洗燒瓶，且將H-Lys(Z)-OMe鹽酸鹽(4 g，12.1 mmol)、HOBt水合物(1.84 g，13.6 mmol)、Z-Lys(Z)-OH(5.64 g，13.6 mmol)懸浮於DCM(50 mL)中。添加NMM(1.5 mL，13.6 mmol)至懸浮液中且溶液變澄清。經10分鐘之時間添加EDC鹽酸鹽(4.01 g，20.9 mmol)及NMM(2.0 mL，18.2 mmol)於DCM(50 mL)中之懸浮液。在室溫下攪拌反應物隔夜。次日，以1 M HCl(100 mL)、H₂O(100 mL)、飽和碳酸氫鹽溶液(100 mL)及飽和鹽水溶液(100 mL)洗滌。以DCM(50 mL)反萃取所有水性洗滌液。以Na₂SO₄乾燥有機物，過濾且在真空中濃縮。藉由Grace急驟層析、將粗物質直接裝載於120 g Si濾筒上且以DCM/MeOH梯度溶離，純化物質。集中且濃縮溶離份，獲得6-(((苄氧基)羰基)胺基)-2-((S)-2,6-雙(((苄氧基)羰基)胺基)己醯胺基)己酸(S)-甲酯(6.91 g)。

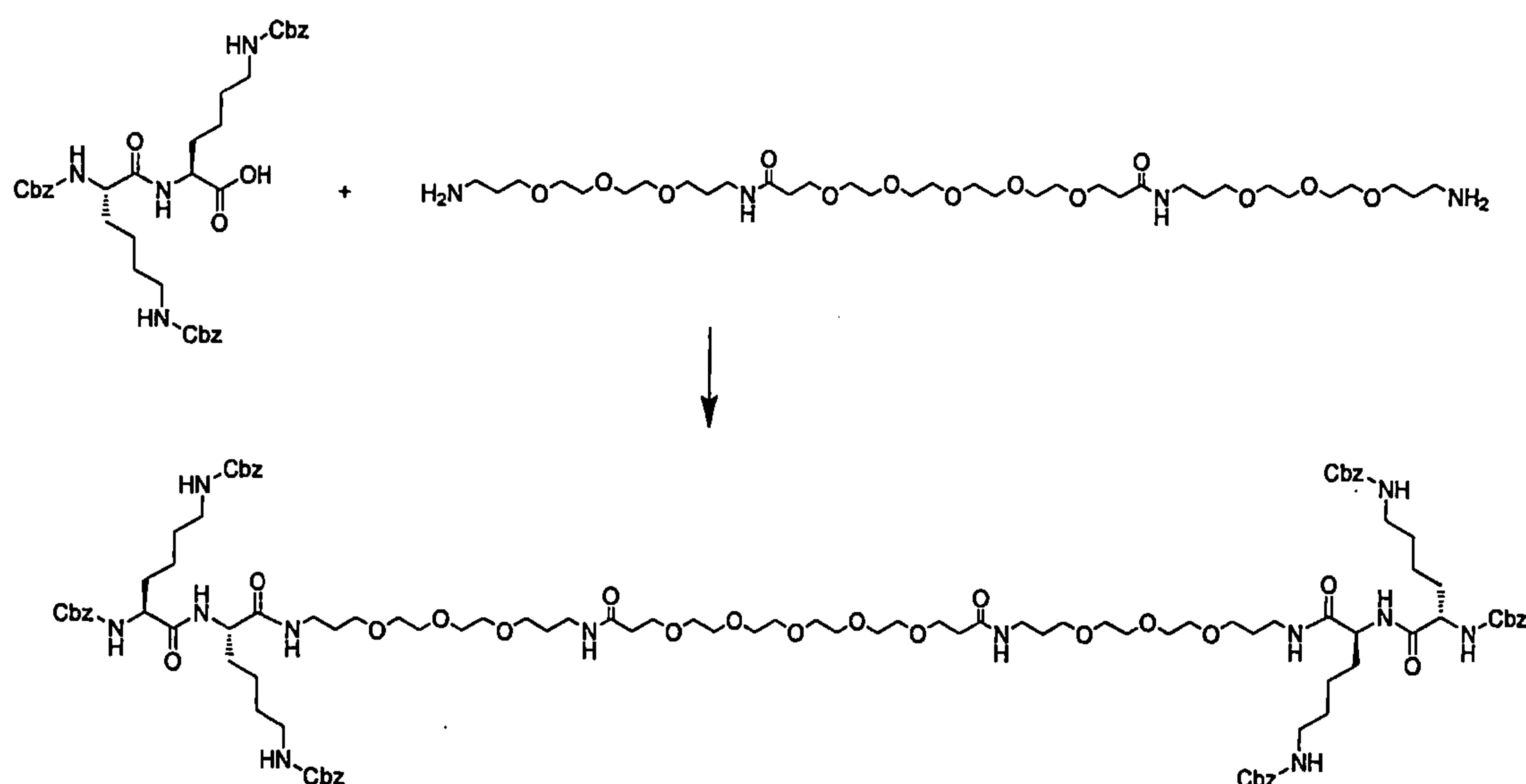
製備中間物2：(S)-6-(((苄氧基)羰基)胺基)-2-((S)-2,6-雙(((苄氧基)羰基)胺基)己醯胺基)己酸



將6-(((苄氧基)羰基)胺基)-2-((S)-2,6-雙(((苄氧基)羰基)胺基)己醯胺基)己酸酯(6.91 g，10 mmol)以MeOH(50 mL)溶解。添加KOH(2.24

g, 40 mmol)且在35℃下攪拌混合物。在2小時之後，藉由添加H₂O(200 mL)淬滅反應，且以乙醚(50 mL)洗滌混合物。隨後，以1 M HCl酸調節pH值為約2。以DCM(3×100mL)萃取產物，以Na₂SO₄乾燥，過濾且在真空中濃縮，獲得(S)-6-(((苄氧基)羰基)胺基)-2-((S)-2,6-雙(((苄氧基)羰基)胺基)己醯胺基)己酸(4 g)。

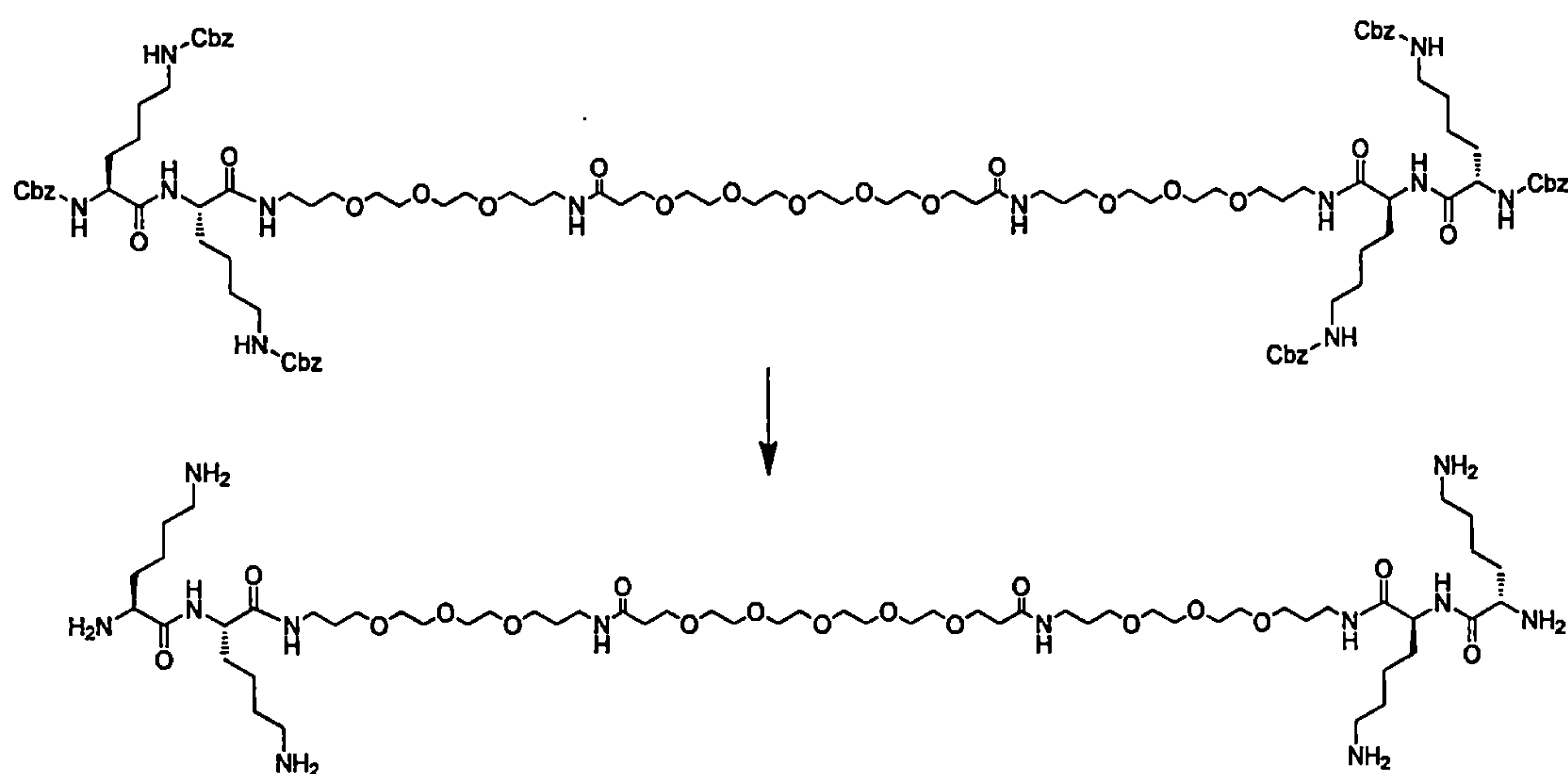
製備中間物3：經(Cbz)₆保護之N1,N19-雙((16S,19S)-19,23-二胺基-16-(4-胺基丁基)-15,18-二側氧基-4,7,10-三氧雜-14,17-二氮雜二十三基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺



以惰性氣體沖洗燒瓶，且將二醯胺基-dPEG₁₁-二胺(1 g, 1.35 mmol)、(S)-6-(((苄氧基)羰基)胺基)-2-((S)-2,6-雙(((苄氧基)羰基)胺基)己醯胺基)己酸(2.05 g, 3.03 mmol)、HOBt水合物(409 mg, 3.03 mmol)懸浮於DCM(25 mL)中。添加NMM(333 μL, 3.03 mmol)至懸浮液中且溶液變澄清。經10分鐘之時間添加EDC鹽酸鹽(893 mg, 4.66 mmol)及NMM(445 μL, 4.05 mmol)於DCM(25 mL)中之懸浮液。在室溫下攪拌反應物隔夜。次日，以1 M HCl(100 mL)、H₂O(100 mL)、飽和碳酸氫鹽溶液(100 mL)及飽和鹽水溶液(100 mL)洗滌。以DCM(50

mL)反萃取所有水性洗滌液。以 Na_2SO_4 乾燥有機物，過濾且在真空中濃縮。藉由Grace急驟層析、將粗物質直接裝載於80 g Si濾筒上且以DCM/MeOH梯度溶離，純化物質。集中且濃縮溶離份，獲得經(Cbz)₆保護之N1,N19-雙((16S,19S)-19,23-二胺基-16-(4-胺基丁基)-15,18-二側氧基-4,7,10-三氧雜-14,17-二氮雜二十三基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺(480 mg)。

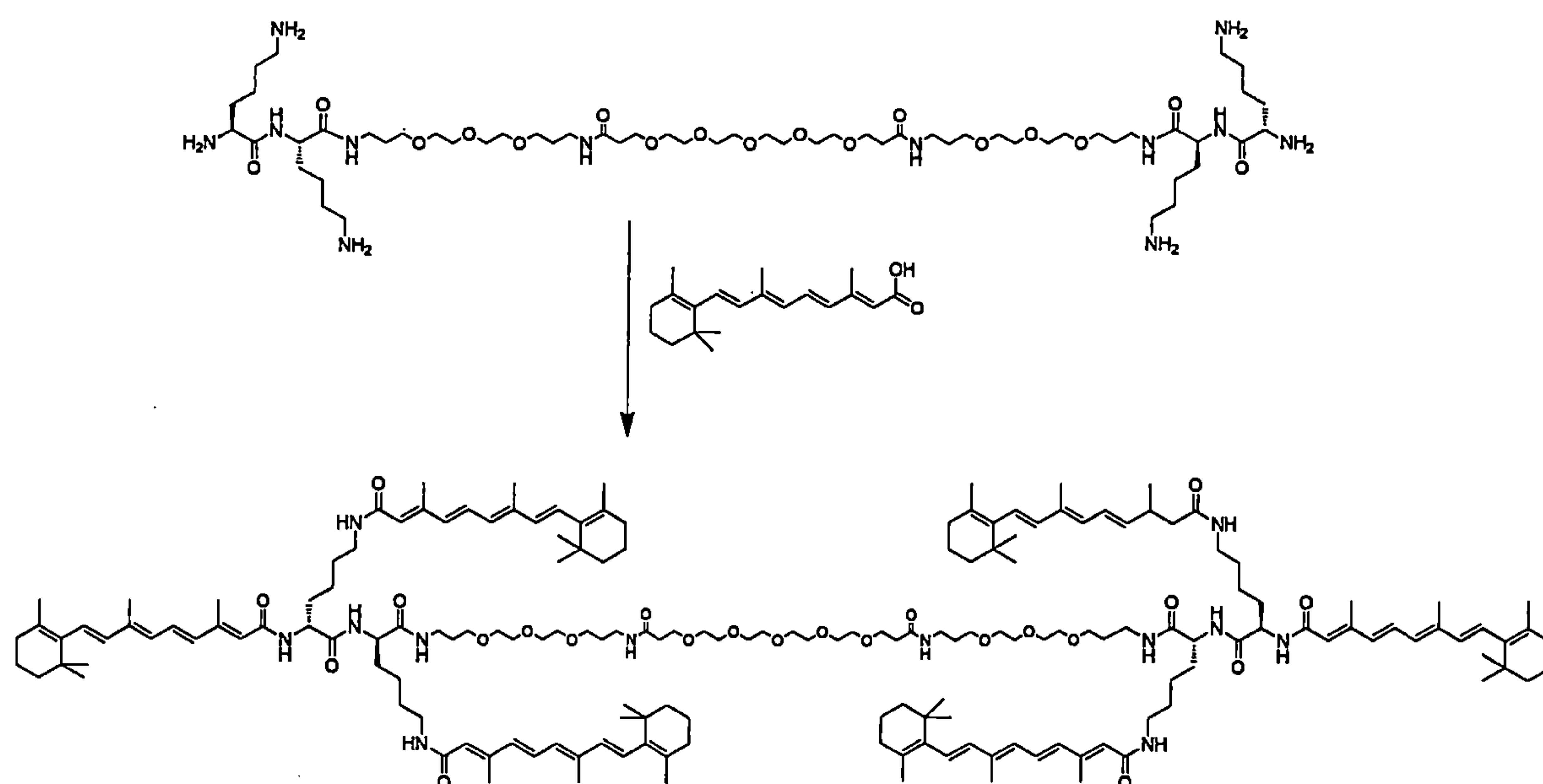
製備中間物4：N1,N19-雙((16S,19S)-19,23-二胺基-16-(4-胺基丁基)-15,18-二側氧基-4,7,10-三氧雜-14,17-二氮雜二十三基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺



在RB燒瓶中，將經(Cbz)₆保護之N1,N19-雙((16S,19S)-19,23-二胺基-16-(4-胺基丁基)-15,18-二側氧基-4,7,10-三氧雜-14,17-二氮雜二十三基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺溶解於MeOH(30 mL)中，且以惰性氣體沖洗。添加10% Pd/C(135 mg)且以惰性氣體再次沖洗燒瓶，且隨後經由真空泵移除所有空氣。添加8" H₂氣球且在室溫下攪拌反應物。在2個小時之後，移除氣球，且藉由經矽藻土墊過濾、以豐量MeOH洗滌移除Pd/C。在真空中濃縮，獲得N1,N19-雙((16S,19S)-19,23-二胺基-16-(4-胺基丁基)-15,18-二側氧基-4,7,10-三氧雜-14,17-

二氮雜二十三基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺(823 mg)。

製備 TriVA

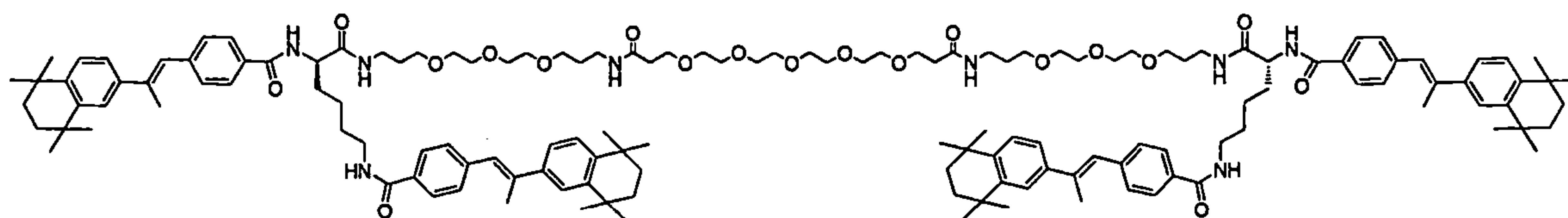


攪拌於DCM(20 mL)中之N1,N19-雙((16S,19S)-19,23-二胺基-16-(4-胺基丁基)-15,18-二側氧基-4,7,10-三氧雜-14,17-二氮雜二十三基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺，且添加DMAP及視黃酸。添加NMM，且在室溫下在以惰性氣體沖洗、覆蓋Al箔之RB燒瓶中攪拌溶液。經10分鐘之時間添加EDC鹽酸鹽及NMM於DCM(20 mL)中之懸浮液至反應物中。在室溫下攪拌反應物隔夜。次日，以DCM稀釋至100 mL。以H₂O(100 mL)、飽和碳酸氫鹽溶液(100 mL)及飽和鹽水溶液(100 mL)洗滌。以DCM(50 mL)反萃取所有水性洗滌液。以Na₂SO₄乾燥有機物，過濾且在真空中濃縮。藉由矽膠層析、直接裝載於80 g鹼性 alumina 濾筒上且以 DCM/EtOH 梯度溶離來純化物質，獲得 TriVA(780 mg)。LCMS ESI+: *m/z* 2972 (M+Na)。

實例30：合成4TTNPB

製備 N1,N19-雙((R)-1,8-二側氧基-7-(4-((E)-2-(5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氫-萘-2-基)丙-1-烯-1-基)苄醯胺基)-1-(4-((E)-2-(5,5,8,8-四甲

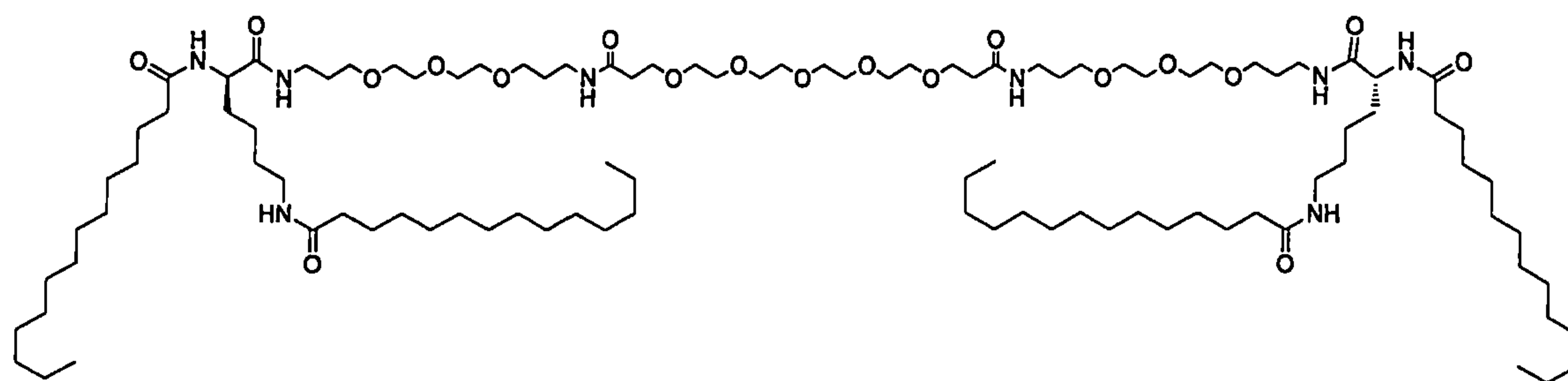
基-5,6,7,8-四氫萘-2-基)丙-1-烯-1-基)苯基)-13,16,19-三氧雜-2,9-二氮雜二十二-22-基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺(4TTNPB)。



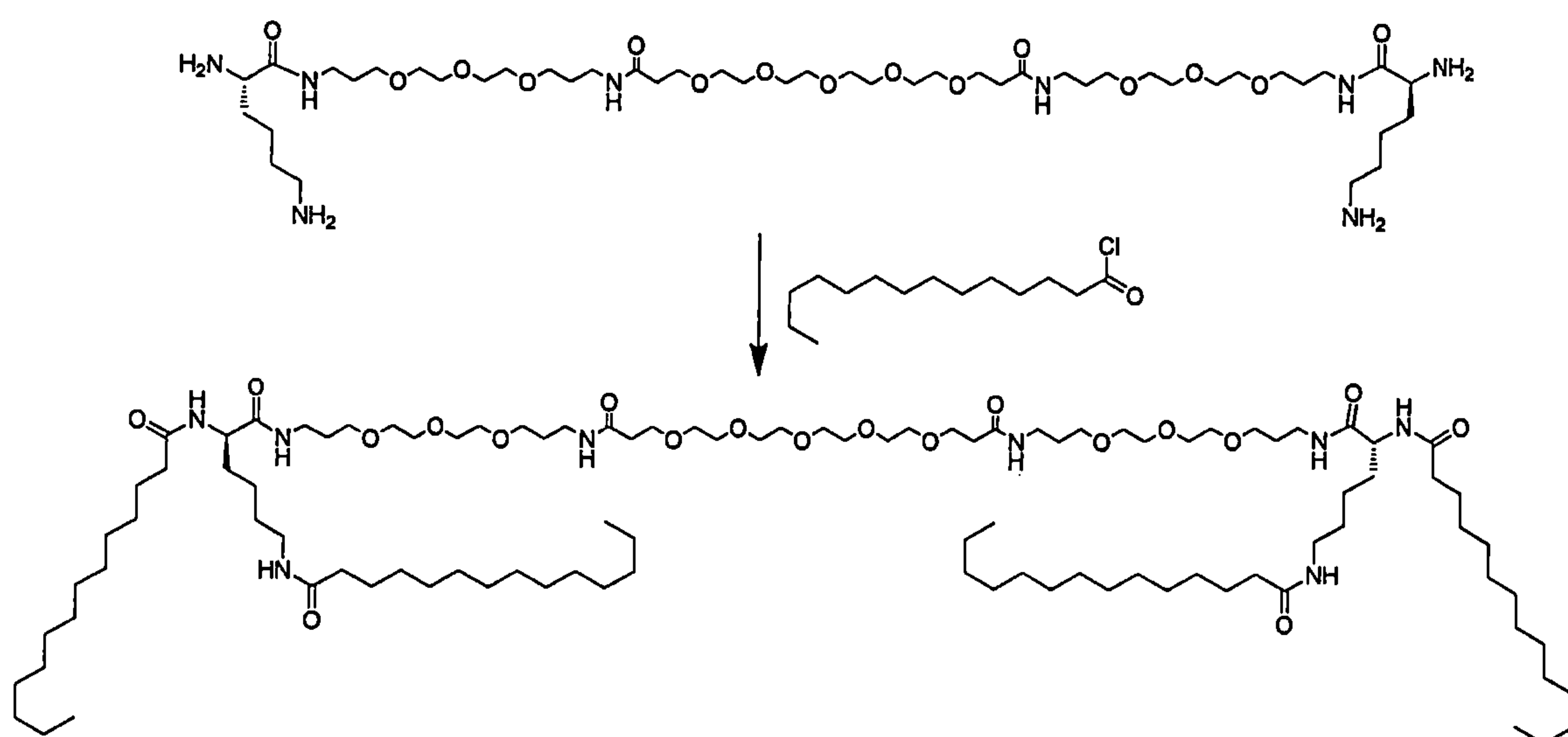
亦稱為 4TTNPB 之 N1,N19- 雙 ((R)-1,8- 二側氧基 -7-(4-((E)-2-(5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氫-萘-2-基)丙-1-烯-1-基)苄醯胺基)-1-(4-((E)-2-(5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氫萘-2-基)丙-1-烯-1-基)苯基)-13,16,19-三氧雜-2,9-二氮雜二十二-22-基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺係以與亦稱為 diVA 之 N1,N19-雙 ((S,23E,25E,27E,29E)-16-((2E,4E,6E,8E)-3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬-2,4,6,8-四烯醯胺基)-24,28-二甲基-15,22-二側氧基-30-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)-4,7,10-三氧雜-14,21-二氮雜三十-23,25,27,29-四烯-1-基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺類似之方式、自 N1,N19-雙 ((S)-16,20-二胺基-15-側氧基-4,7,10-三氧雜-14-氮雜二十基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺製備，其中用 TTNPB 取代全反式視黃酸。
LCMS ESI+: m/z 2343 (M+Na)。

實例31：合成4Myr

製備 N1,N19-雙 ((R)-15,22-二側氧基-16-十四醯胺基-4,7,10-三氧雜-14,21-二氮雜三十五基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺 (4Myr)



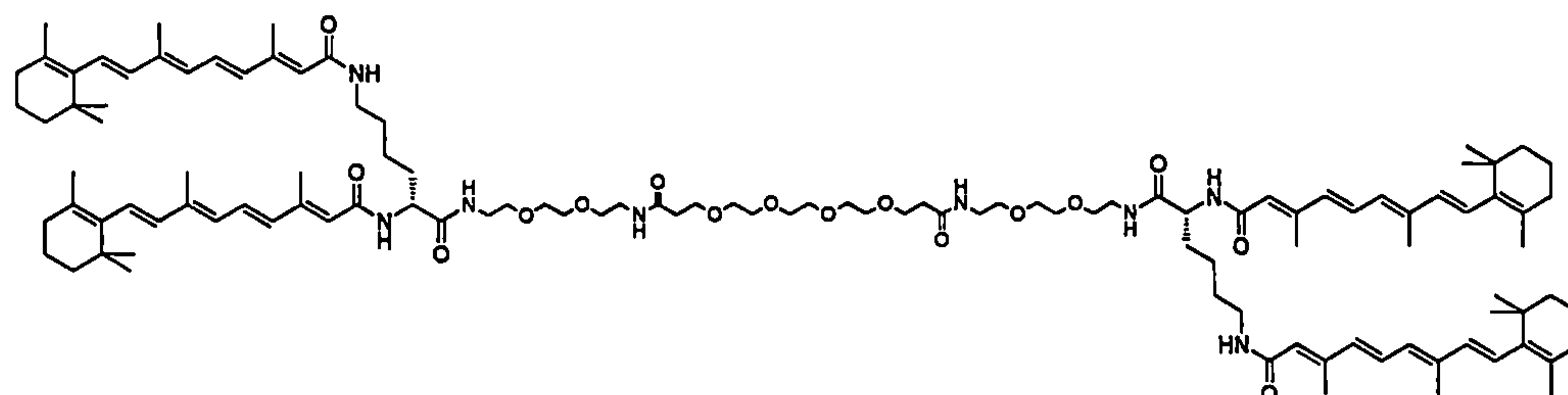
製備 4Myr： N1,N19-雙((R)-15,22-二側氧基-16-十四醯胺基-4,7,10-三氧雜-14,21-二氮雜-三十五基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺



將N1,N19-雙((S)-16,20-二胺基-15-側氧基-4,7,10-三氧雜-14-氮雜二十基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九-1,19-二醯胺(先前所述合成)溶解於DCM中且置於冰浴中。相繼添加肉豆蔻醯氯及三乙胺。移除冰浴且在惰性氣體層下在室溫下攪拌反應物隔夜。次日，以DCM稀釋至100 mL且以1 M HCl(75 mL)、H₂O(75 mL)、飽和碳酸氫鹽溶液(75 mL)及飽和鹽水溶液(75 mL)洗滌。以DCM(25 mL)反萃取所有水性洗滌液。以MgSO₄乾燥有機物，過濾且在真空中濃縮。藉由Grace急驟層析、直接裝載於80 g Si濾筒上且以DCM/MeOH梯度溶離，純化粗物質(410 mg)。LCMS ESI+: *m/z* 1841 (M+H)。

實例32：合成DiVA-242

製備亦稱為 DIVA-242 之 N1,N16- 雙 ((R,18E,20E,22E, 24E)-11-((2E,4E,6E,8E)-3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基-環己-1-烯-1-基)壬-2,4,6,8-四烯醯胺基)-19,23-二甲基-10,17-二側氧基-25-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)-3,6-二氧雜-9,16-二氮雜二十五-18,20,22,24-四烯-1-基)-4,7,10,13-四氧雜十六-1,16-二醯胺

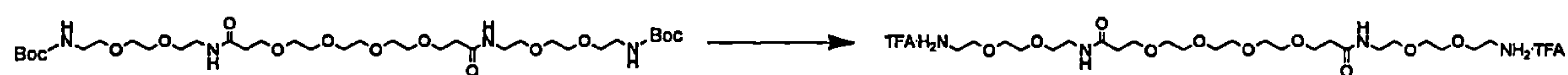


製備中間物 1：(10,25-二側氧基-3,6,13,16,19,22,29,32-八氧雜-9,26-二氮雜三十四-1,34-二基)二胺基甲酸二-第三丁酯



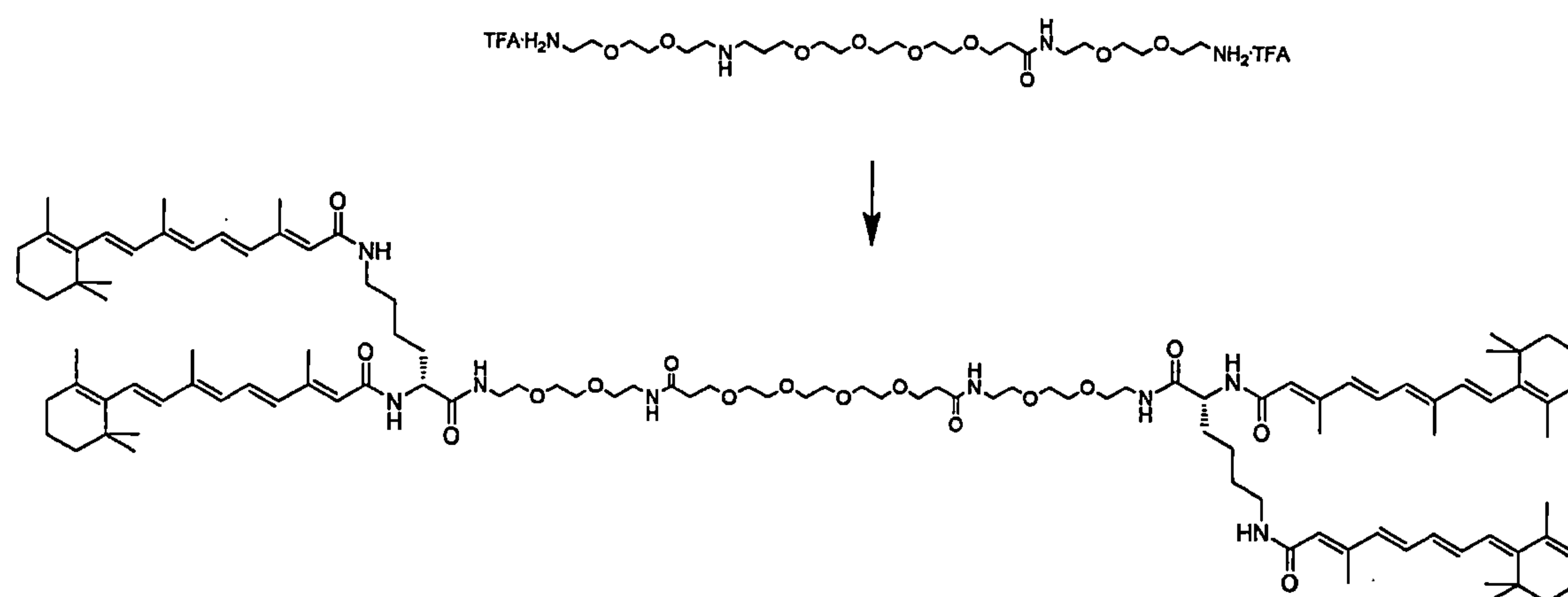
以惰性氣體沖洗 DCM(25 mL)之 RB 燒瓶，且添加雙 dPeg₄ 酸(1000 mg，3.40 mmol)、N-Boc-3,6-二氧雜-1,8-辛烷二胺(1816 μL，7.65 mmol)及 HOBt 水合物(1034 mg，7.65 mmol)。添加 NMM(841 μL，7.65 mmol)至懸浮液中且溶液變澄清。相繼 EDC 鹽酸鹽(2249 mg，11.73 mmol)及 NMM(1121 μL，10.20 mmol)於 DCM(25 mL)中之懸浮液及 DMAP(62 mg，0.51 mmol)。在室溫下攪拌反應物隔夜。次日，以 DCM 稀釋至 100 mL，且以 H₂O(100 mL)、10% K₂CO₃(100 mL)及飽和鹽水溶液(100 mL)洗滌。以 DCM(30 mL)反萃取所有水性洗滌液。以 MgSO₄ 乾燥有機物，過濾且在真空中濃縮。藉由 Grace 急驟層析、直接裝載於 40 g Si 濾筒上且以 DCM/MeOH 梯度溶離，純化物質。集中且濃縮溶離份，獲得(10,25-二側氧基-3,6,13,16,19,22,29,32-八氧雜-9,26-二氮雜三十四-1,34-二基)二胺基甲酸二-第三丁酯(2565 mg)。

製備中間物2：N1,N16-雙(2-(2-(2-胺基乙氧基)乙氧基)乙基)-4,7,10,13-四氧雜十六-1,16-二醯胺TFA鹽



將(10,25-二側氧基-3,6,13,16,19,22,29,32-八氧雜-9,26-二氮雜三十四-1,34-二基)二胺基甲酸二-第三丁酯溶解於DCM(15 mL)中且置於冰浴中。以惰性氣體沖洗RB燒瓶且添加TFA(15 mL)。攪拌混合物20分鐘。隨後，在真空中濃縮物質。藉助於甲苯使過量TFA共沸離開。在高真空下完全乾燥，獲得N1,N16-雙(2-(2-(2-胺基乙氧基)乙氧基)乙基)-4,7,10,13-四氧雜十六-1,16-二醯胺TFA鹽(1885 mg)。

製 備 **DIVA-242** : N1,N16- 雙 ((R,18E,20E,22E,24E)-11-((2E,4E,6E,8E)-3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬-2,4,6,8-四烯醯胺基)-19,23-二甲基-10,17-二側氧基-25-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)-3,6-二氧雜-9,16-二氮雜二十五-18,20,22,24-四烯-1-基)-4,7,10,13-四氧雜十六-1,16-二醯胺



按照與diVA相同之方案、自N1,N16-雙(2-(2-(2-胺基乙氧基)乙氧基)乙基)-4,7,10,13-四氧雜十六-1,16-二醯胺TFA鹽合成N1,N16-雙((R,18E,20E,22E,24E)-11-((2E,4E,6E,8E)-3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基

環己-1-烯-1-基)壬-2,4,6,8-四烯醯胺基)-19,23-二甲基-10,17-二側氧基-25-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)-3,6-二氧雜-9,16-二氮雜二十五-18,20,22,24-四烯-1-基)-4,7,10,13-四氧雜十六-1,16-二醯胺(DIVA-242)。LCMS ESI+: m/z 1940 (M+H)。

實例33：形成核酸-脂質粒子

調配物方案中所提及之siRNA為靶向HSP47/gp46、具有21聚體之雙股siRNA序列，其中HSP47(小鼠)及gp46(大鼠)為同系物-不同物種中之相同基因：

用於活體外分析(大鼠pHSC)之大鼠HSP47-C雙股siRNA

有義(5'→3') GGACAGGCCUCUACAACUATT (SEQ. ID NO. 2)

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

用於供活體內分析(小鼠CC14模型)之調配物中之小鼠HSP47-C雙股siRNA

有義(5'→3') GGACAGGCCUGUACAACUATT (SEQ. ID NO. 4)

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

陽離子脂質儲備液製備。藉由將陽離子脂質與DOPE、膽固醇及diVA-PEG-diVA分別以6.0 mg/mL、5.1 mg/mL及2.7 mg/mL及2.4 mg/mL之濃度組合於乙醇中，製備陽離子脂質之儲備溶液。若需要，則使溶液升溫至約50°C以促進陽離子脂質溶解至溶液中。

空脂質體製備。在35°C至40°C下經由注射針以每注射口1.5毫升/分鐘將陽離子脂質儲備溶液注入迅速攪拌混合物水溶液中。陽離子脂質儲備溶液與水溶液比率(v/v)定為35:65。混合後，自發地形成空囊泡。隨後在35°C至40°C下使所得囊泡均衡10分鐘，隨後乙醇含量減少至約12%。隨後用10X體積緩衝劑水溶液透濾空脂質體以移除乙醇。

脂複合體製備。藉由9%蔗糖將根據以上方法製備之空囊泡稀釋至1 mM濃度陽離子脂質之最終體積。向攪拌溶液，就每一mL經稀釋

空囊泡(「EV」)而言添加100 μ L含5%葡萄糖之RNase游離水中且充分地混合。隨後立即添加150 μ L於RNase游離水中之10 mg/mL siRNA溶液且充分地混合。隨後以5%葡萄糖溶液以就每一mL所用EV而言1.750 mL稀釋混合物。在室溫下在約200 rpm下攪拌混合物10分鐘。使用具有約100000 MWCO之半透膜在交叉流超濾系統中使用適當選擇之蠕動泵(例如Midgee Hoop, UFP-100-H24LA)，將混合物濃縮至原始體積的約1/3(或所要體積)，且隨後使用含有3%蔗糖及2.9%葡萄糖之水溶液、用5倍樣品體積透濾。隨後在使用前在無菌條件下經由0.8微米/0.2微米微孔尺寸之組合過濾裝置過濾產物。

形成含非diVA siRNA之脂質體。將陽離子脂質、DOPE、膽固醇及PEG結合脂質以50:10:38:2之莫耳比及約2.3 mg/mL之最終重量濃度溶解於絕對EtOH(200普魯夫(proof))中。將siRNA以約0.10 mg/mL之濃度溶解於50 mM檸檬酸鹽緩衝液中且調節溫度至35°C至40°C。隨後添加乙醇/脂質混合物至含siRNA之緩衝液同時攪拌以自發地形成siRNA填充之脂質體。脂質係與siRNA組合以達成7:1至15:1(wt:wt)之最終總脂質與siRNA比。用10x體積PBS(pH 7.2)透濾siRNA填充脂質體以移除乙醇且交換緩衝液。經由0.22 μ m滅菌等級PES過濾器過濾最終產物以使生物負荷減少。此製程獲得具有50 nm至100 nm平均粒徑、PDI<0.2、>85%截留效率的脂質體。

形成與diVA共溶解、含siRNA之脂質體。使用上述方法製備siRNA-diVA-脂質體調配物。在添加至含siRNA之緩衝液之前，將diVA-PEG-diVA與其他脂質(50:10:38:2之比率之陽離子脂質、DOPE、膽固醇及PEG結合脂質)共溶解於絕對乙醇中。diVA-PEG-diVA之莫耳含量介於0.1至5莫耳比範圍內(50:10:38:2:5至50:10:38:2:0.1)。此製程獲得具有50 nm至100 nm平均粒徑、PDI<0.2、>85%截留效率的脂質體。

形成具有陽離子脂質、含*siRNA*之脂質體。使用上述方法製備*siRNA*-diVA-脂質體調配物及*siRNA*-脂質體調配物。陽離子脂質可為例如HEDC、HEDDC、DC-6-14或此等陽離子脂質之任何組合。

形成以diVA裝飾之含*siRNA*之脂質體。使用上述方法製備*siRNA*-脂質體調配物且將其稀釋於PBS中至0.5 mg/mL之*siRNA*濃度。陽離子脂質可為HEDC、HEDDC、DC-6-14或此等陽離子脂質之任何組合。將diVA-PEG-diVA溶解於絕對乙醇(200普魯夫)中至10 mg/mL至50 mg/mL範圍內之最終濃度。添加適當量之乙醇溶液至*siRNA*-脂質體溶液以獲得2莫耳%至10莫耳%之間的最終莫耳百分比。以吸液管使溶液反覆地上下插入從而混合。調節diVA-PEG-diVA濃度及乙醇添加體積以保持添加體積>1.0 μL且最終乙醇濃度<3%(vol/vol)。隨後在活體外或活體內評估之前在迴轉式震盪器上在周圍溫度下培育裝飾脂質體1小時。

下表陳列本發明之較佳實施例(以莫耳比以及等效莫耳%及重量百分比表示)。

調配物	莫耳比				
	陽離子脂質	DOPE	膽固醇	PEG-脂質	diVA
HEDDC脂質體	50	10	38	2	-
HEDDC脂質體+diVA	50	10	38	2	5
DC-6-14脂複合體	40	30	30	-	-
DC-6-14脂複合體+diVA	40	30	30	-	5

調配物	莫耳%				
	陽離子脂質	DOPE	膽固醇	PEG-脂質	diVA
HE-DODC脂質體	50	10	38	2	-
HE-DODC脂質體+diVA	47.6	9.5	36.2	1.9	4.8
DC-6-14脂複合體	40	30	30	-	-
DC-6-14脂複合體+diVA	38.1	28.6	28.6	-	4.8

調配物	重量百分比				
	陽離子脂質	DOPE	膽固醇	PEG-脂質	diVA
HE-DODC脂質體	61.1	10.8	21.3	6.9	-
HE-DODC脂質體+diVA	52.9	9.3	18.4	5.9	13.4
DC-6-14脂複合體	43.8	37	19.2	-	-
DC-6-14脂複合體+diVA	37.2	31.4	16.3	-	15.0

實例34：以脂質體調配物轉染

LX-2及pHSC之轉染方法相同。將本發明之脂質體調配物或脂複合體調配物以所要濃度與生長培養基混合。添加100 μ l混合物至96孔板中之細胞中，且在具有5% CO₂之培育箱中在37°C下培育細胞30分鐘。在30分鐘之後，用新鮮生長培養基替換培養基。在48小時轉染之後，使用Cell-to-Ct溶胞試劑(Applied Biosystems)根據製造商說明處理細胞。

定量RT-PCR(qRT-PCR)以量測HSP47 mRNA表現

HSP47及GAPDH TaqMan分析及一步RT-PCR(One-Step RT-PCR)母體混合物係購自Applied Biosystems。各PCR反應含有以下組成：一步RT-PCR混合物5 μ l，TaqMan RT酶混合物0.25 μ l，TaqMan基因表現分析探針(HSP47)0.25 μ l，TaqMan基因表現分析探針(GAPDH)0.5 μ l，RNase游離水3.25 μ l，細胞溶胞物0.75 μ l，總體積10 μ l。使用GAPDH作為相對定量之HSP47 mRNA含量的內因性對照物。在ViiA 7即時PCR系統(Applied Biosciences)中使用內裝相對定量方法進行定量RT-PCR。針對空白對照轉染細胞之平均HSP47表現校正所有值且以相較於空白對照組之HSP47表現百分比表示。

活體內實驗：使用體重範圍為24公克至30公克之雌性C57B1/6退休種小鼠(Charles River)來作此研究。將動物按體重隨機分為每組10個動物之10組。所有動物程序均視需要經Bio-Quant's IACUC及/或主治獸醫(Attending Veterinarian)批准，且所有動物福祉問題均已闡明且

記錄。以異氟烷使小鼠麻醉且經由下腔靜脈放血。

經由每隔一天腹膜內注射CCl₄(CCl₄於橄欖油中，1:7(vol/vol)，每公克體重1 µL)7天(第0、2、4、6天)誘導熱休克蛋白47(HSP47)上調。在第3天，藉由IV注射至尾靜脈中以本發明之脂質體或脂複合體調配物或PBS處理3隻小鼠連續4天(第3、4、5、6天)。一組十隻小鼠(未處理)既不受CCl₄處理又不受IV注射且充當正常HSP47基因表現之對照組。

實驗時刻表

天	0	1	2	3	4	5	6	7
CCl ₄ IP注射	X	X	X	X	X	X	X	
測試物IV注射				X	X	X	X	
樣品收集(n=10)								X

在第7天及最終IV注射後約24小時，將所有剩餘小鼠殺死且在收集肝臟樣品用於PCR分析之前以PBS灌注肝臟。自各小鼠肝臟收集約150 mg樣品且置於1.5 mL RNeasy lysis reagent (Qiagen)中且儲存於2℃至8℃下直至分析。不自明顯及顯著肝損傷及/或壞死之區域收集肝臟樣品。

使用RNeasy管柱(Qiagen)根據製造商方案萃取小鼠肝臟中之總RNA。用20 ng總RNA來作定量RT-PCR以量測HSP47表現。HSP47及GAPDH TaqMan分析及一步RT-PCR母體混合物係購自Applied Biosystems。各PCR反應含有以下組成：一步RT-PCR混合物5 µl，TaqMan RT酶混合物0.25 µl，TaqMan基因表現分析探針(HSP47)0.25 µl，TaqMan基因表現分析探針(GAPDH)0.5 µl，RNase游離水3.25 µl，RNA 0.75 µl，總體積10 µl。使用GAPDH作為相對定量之HSP47 mRNA含量的內因性對照物。在ViiA 7即時PCR系統(Applied Biosciences)中使用內裝相對定量方法進行定量RT-PCR。針對未處理動物組之平均HSP47表現校正所有值且以相較於未處理組之HSP47表

現百分比表示。

圖1中所述之調配物如下：

調配物	莫耳比				
	陽離子脂質	DOPE	膽固醇	PEG-脂質	VA或VA結合物
DC-6-14脂複合體	40	30	30	-	-
DC-6-14 脂 複 合 體 +VA*	40	30	30	-	40
HEDC脂質體	50	10	38	2	-
HEDC 脂 質 體 +VA-PEG-VA*	50	10	38	2	5
HEDC 脂 質 體 +diVA-PEG-diVA*	50	10	38	2	5

*VA-PEG-VA及diVA-PEG-diVA係經由共溶解化添加。VA係經由加工後裝飾添加。

圖2中所述之調配物如下：

調配物	莫耳比				
	陽離子脂質	DOPE	膽固醇	PEG-脂質	VA或VA結合物
DC-6-14脂複合體	40	30	30	-	-
DC-6-14 脂 複 合 體 +VA*	40	30	30	-	40
DC-6-14脂質體	50	10	38	2	
DC-6-14脂質體+diVA-PEG-diVA*	50	10	38	2	5
HEDODC脂質體	50	10	38	2	-
HEDODC 脂 質 體 +diva-PEG-diVA*	50	10	38	2	5

*diVA-PEG-diVA係經由共溶解化添加。VA係經由加工後裝飾添加。

圖3中所述之調配物如下。

調配物	莫耳比				
	陽離子脂質	DOPE	膽固醇	PEG-脂質	VA或VA結合物
DC-6-14脂複合體	40	30	30	-	-
DC-6-14 脂 複 合 體	40	30	30	-	40

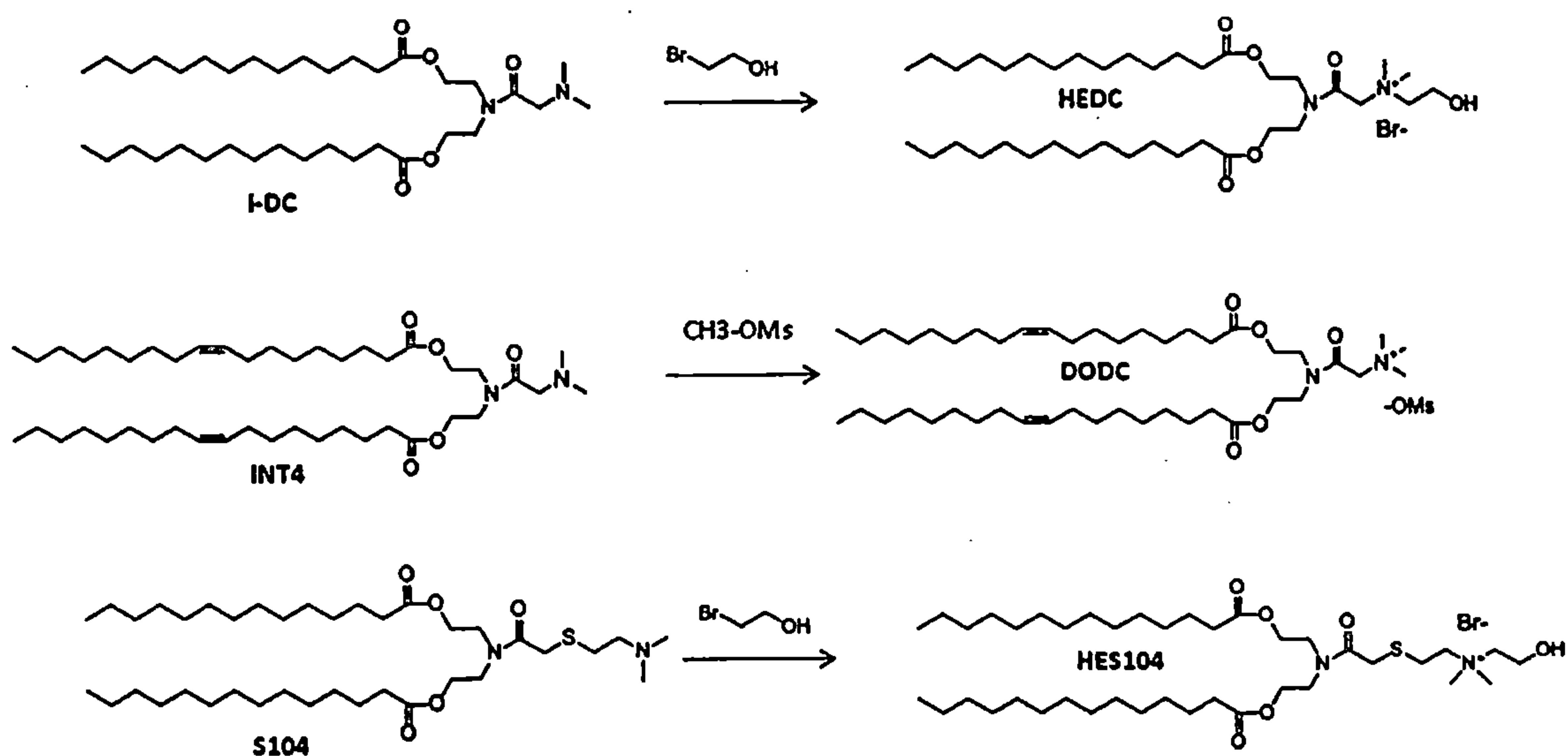
+VA*					
HEDODC脂質體	50	10	38	2	-
HEDODC 脂 質 體 +diVA-PEG-diVA*	50	10	38	2	5

*diVA-PEG-diVA係經由共溶解化添加。VA係經由加工後裝飾添加。

實例35：活體外功效(pHSC)，劑量反應

在96孔板中與增加濃度之siRNA於HEDC:S104:DOPE: Chol:Peg-DMPE:DiVA(20:20:30:25:5:2)調配物中之濃度的調配物一起培育PHSC。在30分鐘之後，用新鮮生長培養基替換培養基。四十八個小時後，溶解細胞，且藉由定量RT-PCR(TaqMan)分析量測gp46及gapdh mRNA含量。針對gapdh含量校正gp46之mRNA含量。經校正gp46含量表示為未處理對照細胞之百分比。圖4展示結果。誤差杆指示標準差(n=3)。使用Graphpad將資料擬合為S形劑量-反應曲線，獲得11.8 nM之EC₅₀。

下表提供不同調配物之例示性結果。在探究具有最有效四級胺陽離子脂質之調配物之後，吾等評估四級胺陽離子脂質之組合及其各別可離子化之合成前驅體(參見以下結構)。



藉由引入可離子化之脂質組合調配物，令人驚訝且出乎意料地

脂質之毒性比不存在彼脂質的脂質體小，然而效能相當(參見下表中之實例HEDC相較於HEDC:iDC及DODC相較於DODC:INT4)。

此結果通常在式I之陽離子脂質與其他可離子化之脂質之所有組合間均適用。HEDC:S104鑑別為另一較佳調配物。

變化描述	調配物變體	活體外KD*(%)	活體外毒性(%細胞活力，HepG2在200 nM下)
陽離子脂質含量	40莫耳% HEDC，無可離子化之脂質	90%在200 nM下	27%
(2莫耳%PEG-脂質)	50莫耳% DODC，無可離子化之脂質	90%在200 nM下	55%
	25莫耳% DODC: 25莫耳% INT4	90%在200 nM下	90%
	20莫耳% HEDC: 20莫耳% i-DC	89%在200 nM下	57%
	20莫耳% HEDC: 20莫耳% S104	90%在200 nM下	52%
	10莫耳% HEDC: 30莫耳% S104	90%在200 nM下	71%
	5莫耳% HEDC: 35莫耳% S104	90%在200 nM下	80%
PEG脂質含量	2莫耳%	70%	
(DMPE-PEG)	5莫耳%	60%	
	7莫耳%	55%	
	10莫耳%	45%	
DiVA含量	0.25莫耳%	35%	
(w/5莫耳% DMPE-PEG)	0.5莫耳%	40%	
	1.0莫耳%	60%	
	2.0莫耳%	70%	
DOPE：膽固醇比率	DOPE-0%：膽固醇55%	89%	
(w/5莫耳% DMPE-PEG)	DOPE-5%：膽固醇50%	82%	
	DOPE-10%：膽固醇45%	77%	
	DOPE-15%：膽固醇40%	74%	
	DOPE-20%：膽固醇35%	80%	
	DOPE-25%：膽固醇30%	79%	
	DOPE-30%：膽固醇25%	82%	
	DOPE-35%：膽固醇20%	80%	
	DOPE-40%：膽固醇15%	84%	
	DOPE-45%：膽固醇10%	80%	
	DOPE-50%：膽固醇5%	78%	
	DOPE-55%：膽固醇0%	72%	
siRNA:總脂質比率	0.07	80%	
(w/5莫耳% DMPE-PEG)	0.09	75%	
	0.11	82%	
*除非另有說明，否則所有資料均具有20莫耳% HEDC、20莫耳% S104及2莫耳% DiVA、50 nM siRNA劑量。			

活體內毒性資料

HEDC:S104(20:20)調配物在初步活體內毒性研究中格外佳地耐受。當調配物係以至多**25 mg/kg**(大鼠)及12 mg/kg (猴)之劑量經靜脈內注射時，觀測不到毒性。此視為在此領域為優良的。舉例而言，2012年3月1日之Alnylam Pharmaceuticals在AsiaTIDES會議上揭示，其最小毒性第三代脂質奈米粒子具有10 mg/kg(單次劑量，大鼠)之

NOAEL。

HepG2細胞毒性分析描述：

在補充有10% FBS(Hyclone, Logan, Utah，目錄號SH30910)之MEM/EBSS(Hyclone, Logan, Utah，目錄號SH30024.01)中培養HepG2細胞(一種由人類肝細胞癌衍生之貼壁細胞株)。將HepG2細胞以5000個細胞/孔接種於96孔Optilux黑板(black plate)(BD Falcon，目錄號BD353220)中隔夜。添加調配物至各孔中至最終指定siRNA濃度(n=3)。添加調配物48小時後，使用CellTiter-Glo發光細胞活力分析套組(Luminescent Cell Viability Assay Kit) (Promega，目錄號G7572)按照製造商說明測定細胞活力。在發光微量盤讀取器(Luminescence Microplate Reader) (502-Biotek, Winooski, Vermont)上量測化學發光信號。基於針對空白對照處理孔校正的調配物處理孔中之化學發光信號之%計算活力。

實例36：活體內功效(大鼠DMNQ)

在短期肝損傷模型(稱為快速模型(Quick Model))中評估標靶調配物之活體內活性。在此模型中，由以肝毒劑(諸如二甲基亞硝胺(DMN))處理誘導之短期肝損傷伴隨有gp46 mRNA含量升高。為誘導此等變化，給雄性史-道二氏大鼠腹膜內注射DMN連續六天。在DMN處理時期結束時，基於個別動物體重將動物隨機分組。在最後注射DMN後一小時以單IV劑量形式投與調配物。二十四小時後，切下肝葉且藉由定量RT-PCR(TaqMan)分析測定gp46及MRPL19 mRNA含量兩者。針對MRPL19含量校正gp46 mRNA之含量。

以DMN在第1、2、3天以10 mg/kg且在第4、5、6天以5 mg/kg經由腹膜內給藥來處理雄性史-道二氏大鼠(Sprague-Dawley rat)，從而誘導肝損傷。在最後注射DMN後一小時，向動物(每組n=8)經靜脈內注射0.5 mg/kg、0.75 mg/kg、1.0 mg/kg、2 mg/kg siRNA於由

HEDC:S104:DOPE: Chol:Peg-DMPE:DiVA (20:20:30:25:5:2)組成之調配物中之劑量的調配物或PBS(媒劑)。二十四個小時後，自各動物之右肝葉之切片純化總siRNA且將其儲存於4℃下直至RNA分離。對照組包括PBS媒劑組(經DMN處理)及未處理(未經處理；無DMN)組。圖5展示量測之結果。在減去由未處理組確定之背景gp46 mRNA含量之後，針對媒劑組之平均gp46 mRNA校正所有測試組值(以媒劑組之百分比表示)。處理後之平均gp46 mRNA含量展示劑量依賴性反應，且曲線擬合為S形劑量反應曲線，獲得0.79 mg/kg之EC₅₀。

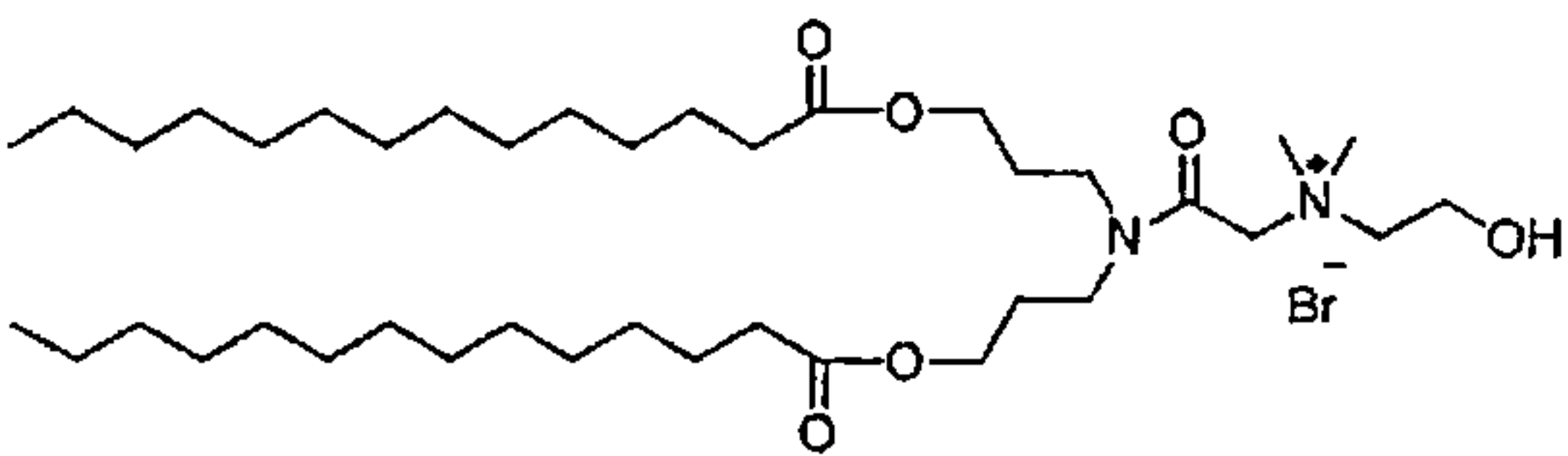
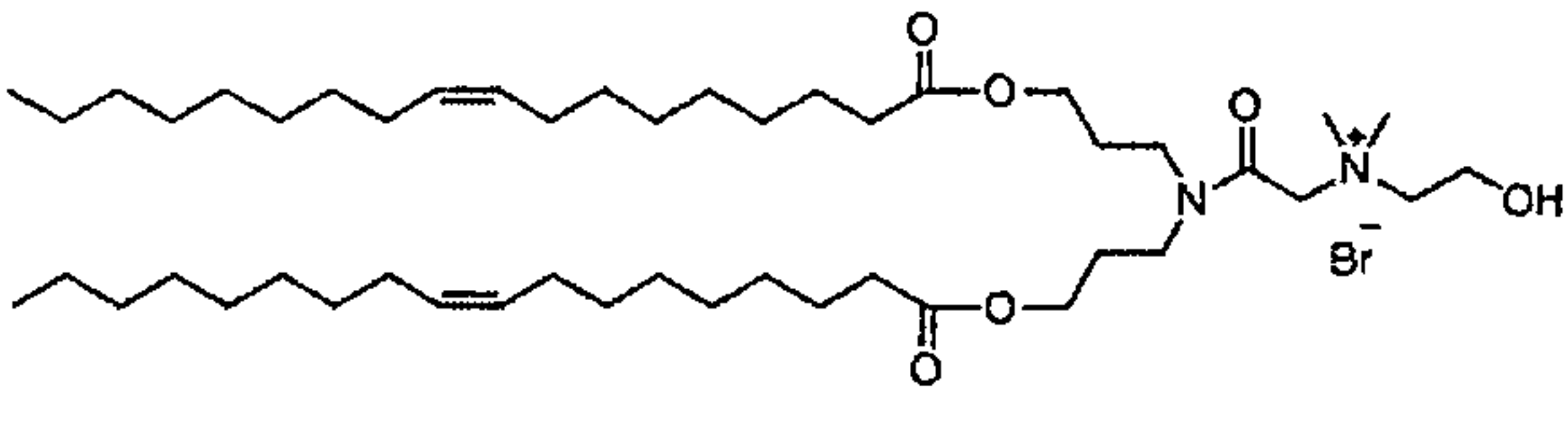
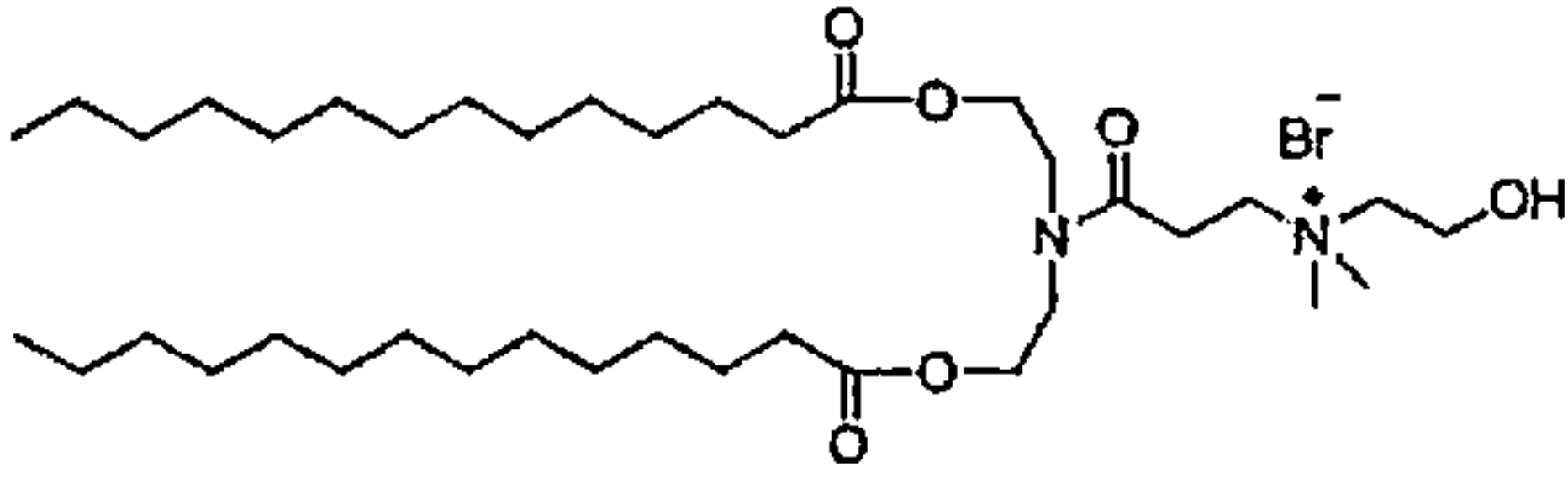
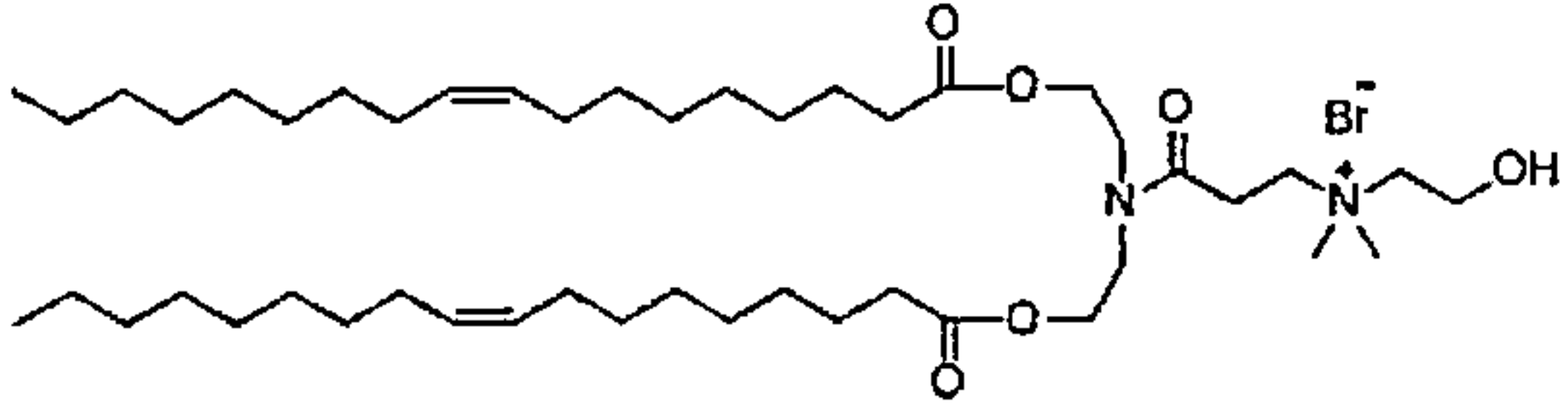
實例37：活體內功效(大鼠DMNC)

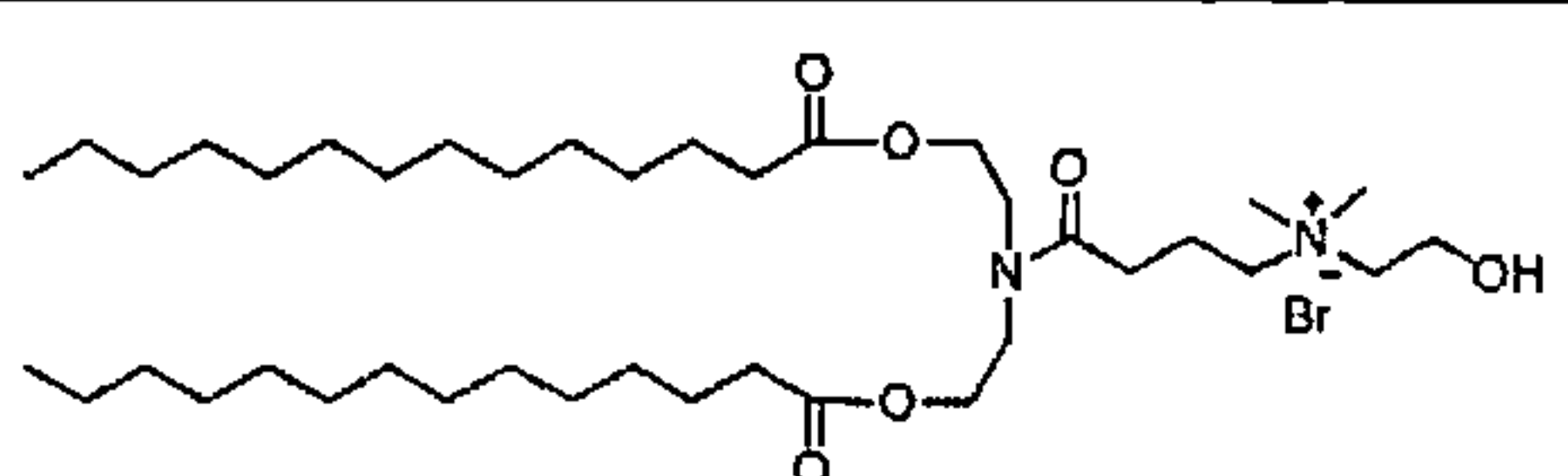
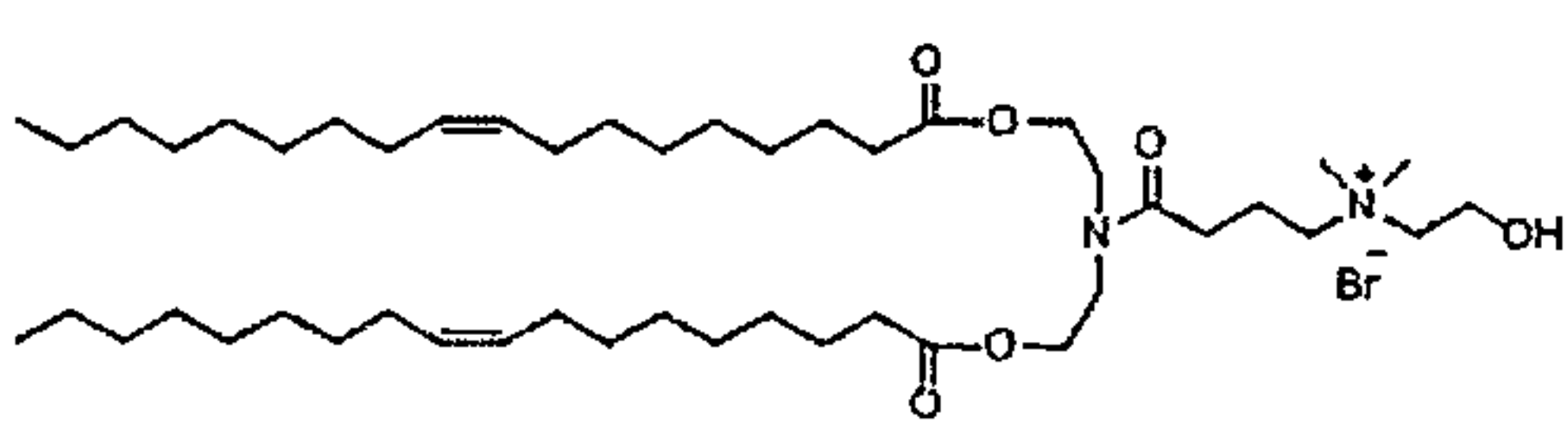
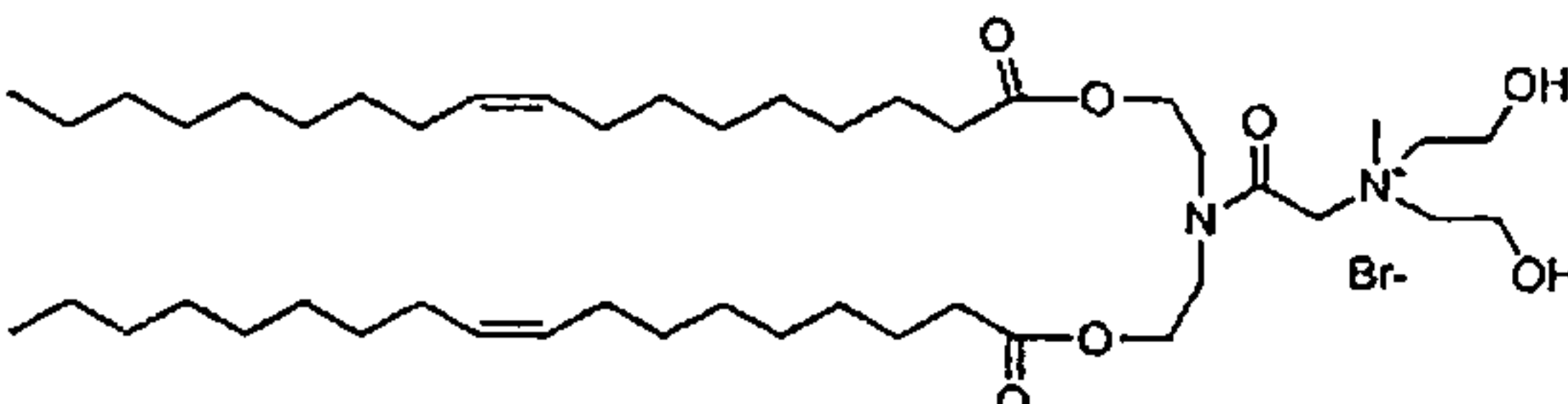
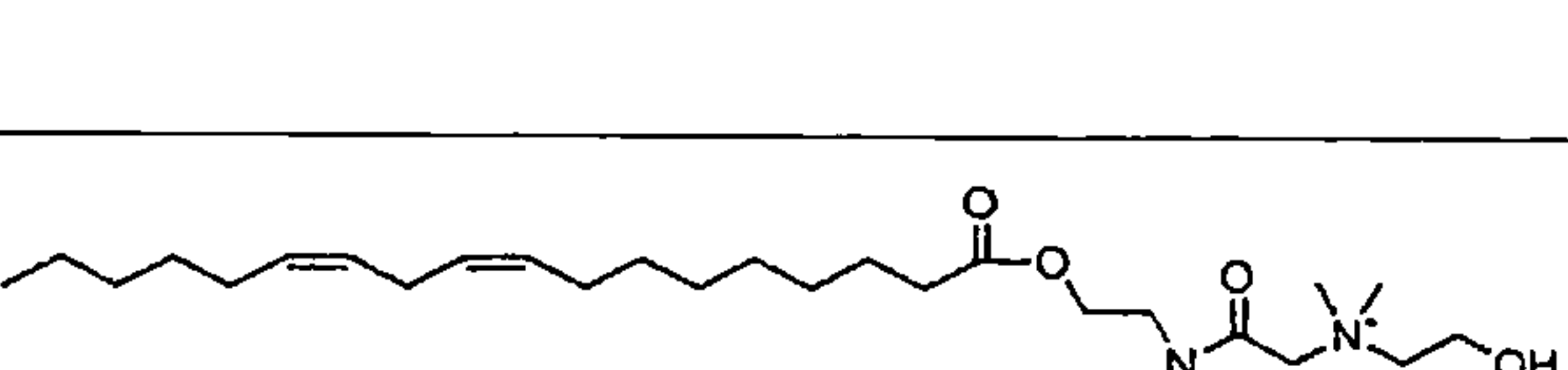
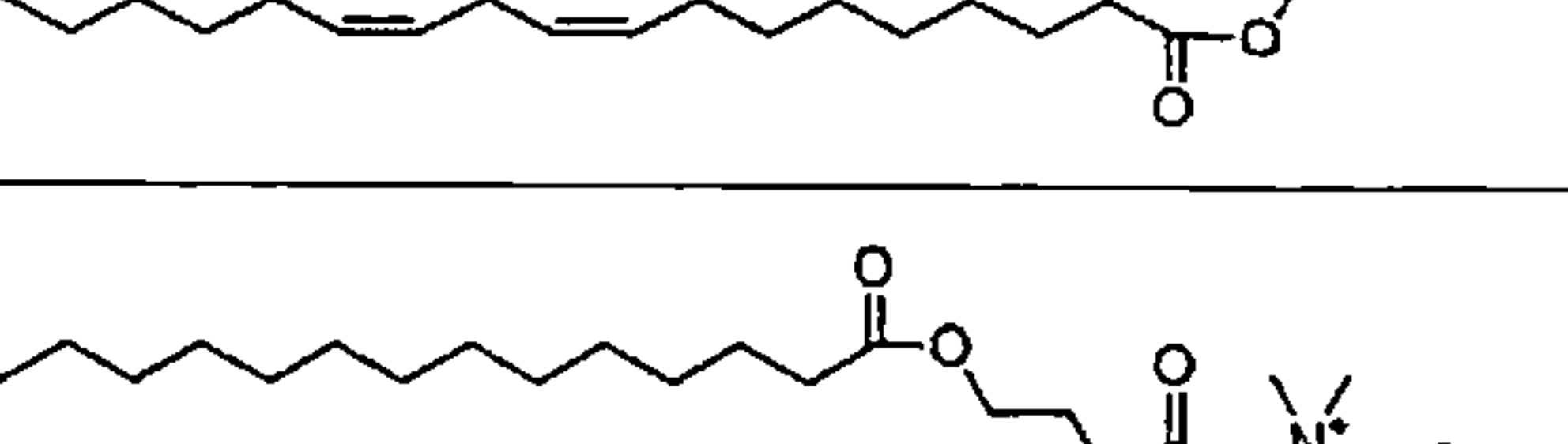
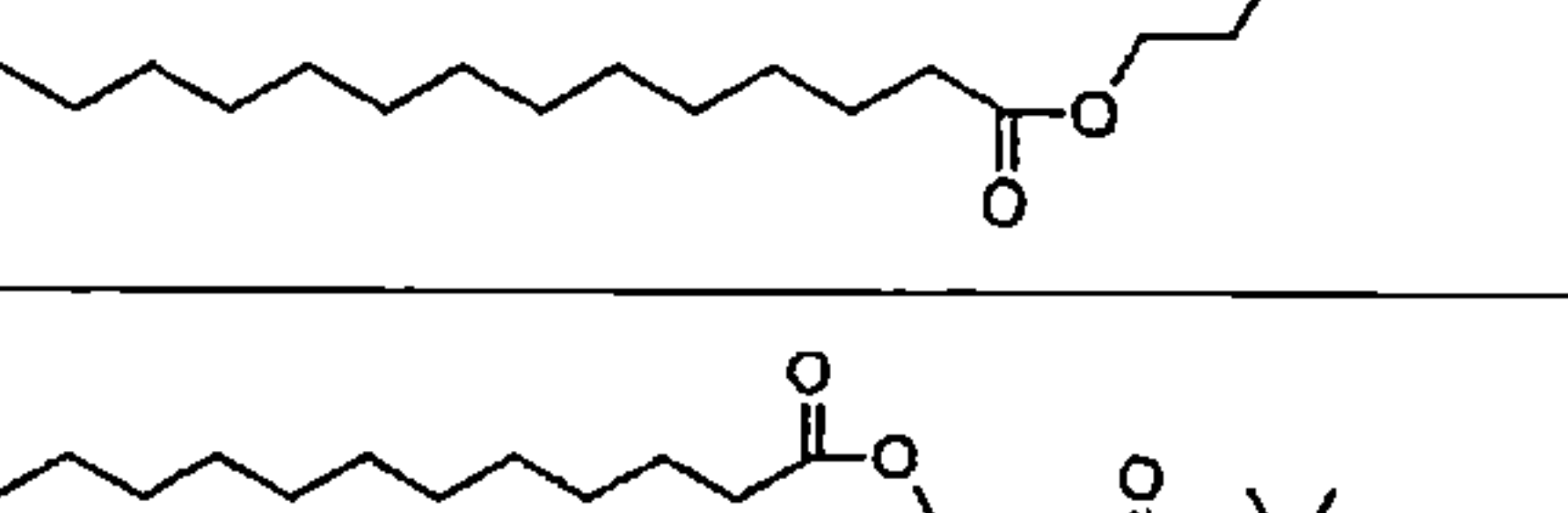
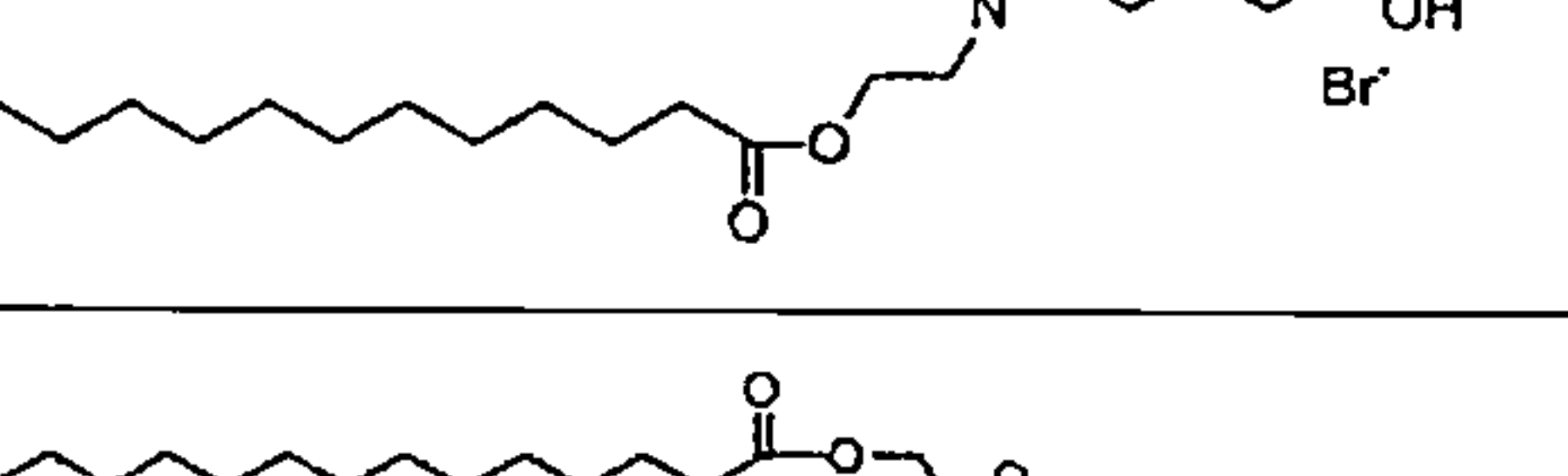
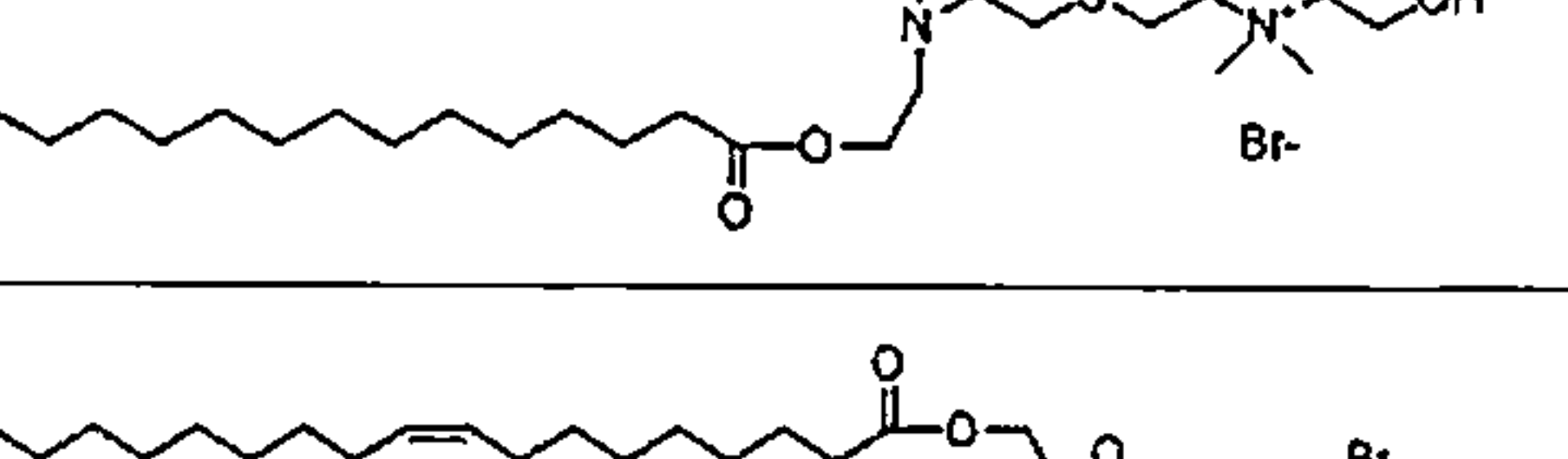
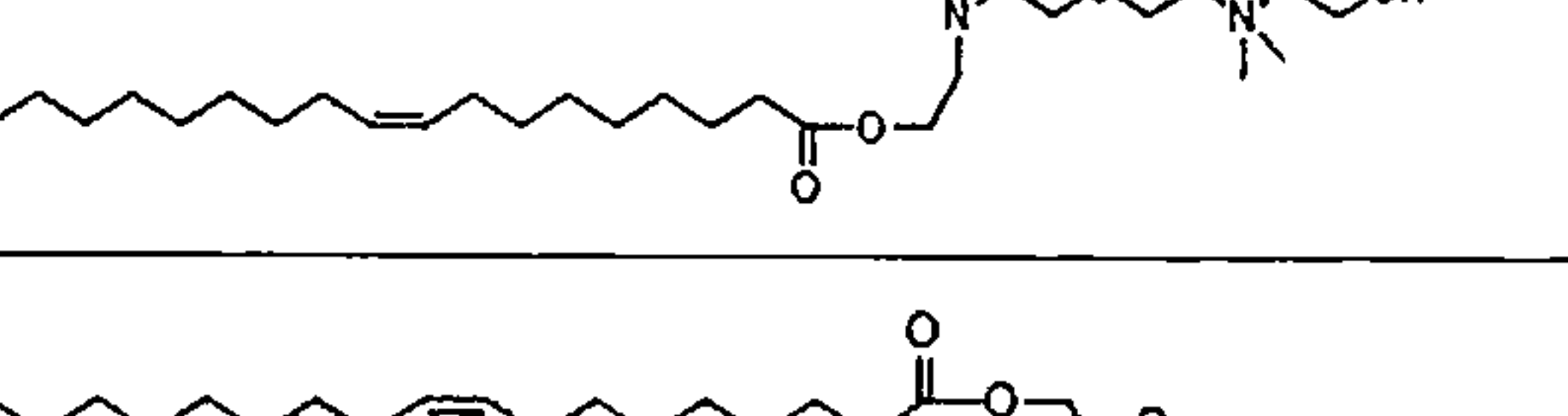
以DMN經由腹膜內給藥來處理雄性史道二氏大鼠，從而誘導肝纖維化。DMN處理方案為每週3次(星期一、星期三及星期五)，在前3週中為10 mg/kg(亦即，5.0 mg/mL以2.0 mL/kg體重之劑量之DMN)，第22天至第57天為5 mg/kg之半劑量(亦即5.0 mg/mL以1.0 mL/kg體重之劑量之DMN)。使用相同時程給假處理組動物注射PBS(DMN之溶劑)。在第22天，最後DMN處理後24小時，收集血液樣品且分析肝疾病生物標記物以證實DMN處理之有效性。基於體重將DMN處理動物分成不同處理組，且確保各組中之動物之平均體重及體重範圍不具有顯著差異。在第25天將預處理組之動物殺死以評估處理開始之前的疾病進展階段。在第25天開始以每週2次以指定siRNA劑量處理的以含有gp46 siRNA之調配物進行之處理總共10次。在第59天，最後調配物處理後48小時及最後DMN處理後72小時，藉由CO₂吸入將動物殺死。切下肝葉且藉由定量RT-PCR(TaqMan)分析測定gp46及MRPL19 mRNA含量兩者。針對MRPL19含量校正gp46之mRNA含量。

以DMN以10 mg/kg歷時三週(三次/週)且隨後在第22天至第57天(三次/週)以5 mg/kg經由腹膜內給藥來處理雄性史-道二氏大鼠，從而誘導肝纖維化。在最後注射DMN後一小時，向動物(每組n=10)經靜脈

內注射1.5 mg/kg、1.0 mg/kg、0.75 mg/kg及0.5 mg/kg由具有2% DiVA之HEDC:S104:DOPE:Chol:Peg-DMPE:DiVA(20:20:30:25:5:2)組成之調配物或PBS(媒劑)10次(2次/週)。在第59天，自各動物之右肝葉之切片純化總siRNA且將其儲存於4℃下直至RNA分離。對照組包括PBS媒劑組(DMN誘導，PBS處理，n=7)及假處理組(PBS處理替代DMN及調配物，n=10)組。圖6展示量測之結果。在減去由未處理組確定之背景gp46 mRNA含量之後，針對媒劑組之平均gp46 mRNA校正所有測試組值(以媒劑組之百分比表示)。在第25天將預處理組(n=7)之動物殺死以評估處理開始之前的疾病進展程度。單因子Anova分析、隨後Dunnett's測試顯示，與媒劑組相比，所有處理組中之gp46基因阻斷顯著(***, P<0.001)。

下表概述本文中所述之化合物及藉由活體內及活體外測試此等化合物所得之結果。

陽離子脂質 名稱	結構	活體外 (pHSC)% KD	活體內(大鼠 DMNQ)% KD
Pr-HEDC		75%在50 nM下	
Pr-HE-DODC		73%在50 nM下	
HE-Et-DC		70%在50 nM下	
HE-Et-DODC		71%在50 nM下	

HE-Pr-DC		47%在50 nM下	
HE-Pr-DODC		75%在50 nM下	
HE2DODC		78%在50 nM下	
HEDC-DLin		50%在50 nM下	
HEDC		68%在50 nM下	52%在0.5 mpk 下
HEDC-12		0%在50 nM下	
HES104			
HES104DO			
HETU104DO			

實例38：含siRNA之VA結合脂質體的活體內抗肺纖維化活性

在麻醉下藉由氣管內套管插入術(MicroSprayer, Penn-Century, Inc.)向雄性S-D大鼠(8個大鼠/組，8週大，Charles River Laboratories Japan, Inc.)肺中投與溶解於0.1 mL鹽水中之0.45 mg博萊黴素(bleomycin, BLM)一次，產生博萊黴素肺纖維化模型。以此方法，顯

著纖維化通常在約2週後出現於肺中。自博萊黴素投與後2週開始，經由尾靜脈向大鼠投與脂質體調配物(以siRNA之量形式1.5 mg/kg，以體積計1 ml/kg，亦即就200 g大鼠而言200 μ l)或PBS(以體積計1 ml/kg)，持續總計十次(每隔一天)。在最後處理後兩天時殺死大鼠，進行肺組織之組織學研究(參見圖7)。使用單因子ANOVA及Bonferroni多比較測試來評估統計學顯著差異。

根據常規方法福馬林固定一部分移除之肺，且使其經偶氮卡紅染色(偶氮胭脂紅，苯胺藍橙G液)。在PBS投與組(疾病)中，觀測到以因大量藍漬膠原纖維所致之間隙擴大為特徵的顯著纖維變性圖像；而在調配物投與組(治療)中，纖維化顯然得以抑制。

如組織學計分(T. Ashcroft計分)之結果所示，在調配物投與組(治療)中，纖維化計分顯著減少。

實例39：活體外評估VA-siRNA-脂質體調配物在LX-2細胞株及大鼠初級肝星狀細胞(pHSC)中之阻斷效率

在具有5% CO₂之培育箱中在37℃下使LX2細胞(Dr. S.L. Friedman, Mount Sinai School of Medicine, NY)生長於補充有10%胎牛血清(Invitrogen)之DMEM(Invitrogen)中。在培育箱中在37℃下使用TryPLExpress溶液(Invitrogen)以胰蛋白酶處理細胞3分鐘。藉由在血球計中細胞計數測定細胞濃度且以3000個細胞/孔接種至96孔板中。在轉染之前使細胞生長24小時。

根據先前公開之方法(Nat. Biotechnol. 2008, 26(4):431-42)自史-道二氏大鼠中分離大鼠初級肝星狀細胞(pHSC)。使pHSC生長於補充有10%胎牛血清之DMEM中。在使用其供活體外篩檢之前，在分離之後使細胞生長至多兩代。以1000個細胞/孔之細胞密度接種細胞於96孔板中，且在使用其供轉染之前使其生長48小時。

以VA-siRNA-脂質體調配物轉染。LX-2及pHSC細胞之轉染方法

相同。將VA-siRNA-脂質體或VA-siRNA-脂複合體調配物以所要濃度與生長培養基混合。添加100 μ l混合物至96孔板中之細胞中，且在具有5% CO₂之培育箱中在37°C下培育細胞30分鐘。在30分鐘之後，用新鮮生長培養基替換培養基。在48小時轉染之後，使用Cell-to-Ct溶胞試劑(Applied Biosystems)根據製造商說明處理細胞。

定量(q)RT-PCR以量測HSP47 mRNA表現。 HSP47及GAPDH TaqMan®分析及一步RT-PCR(One-Step RT-PCR)母體混合物係購自Applied Biosystems。各PCR反應含有以下組成：一步RT-PCR混合物5 μ l，TaqMan® RT酶混合物0.25 μ l，TaqMan®基因表現分析探針(HSP47) 0.25 μ l，TaqMan®基因表現分析探針(GAPDH) 0.5 μ l，RNase游離水3.25 μ l，細胞溶胞物0.75 μ l，總體積10 μ l。使用GAPDH作為相對定量之HSP47 mRNA含量的內因性對照物。在ViiA™ 7即時PCR系統(Applied Biosciences)中使用內裝相對定量方法進行定量RT-PCR。針對空白對照轉染細胞之平均HSP47表現校正所有值且以相較於空白對照組之HSP47表現百分比表示。

調配物方案中所提及之siRNA為靶向HSP47/gp46、具有21聚體之雙股siRNA序列，其中HSP47(小鼠)及gp46(大鼠)為同系物-不同物種中之相同基因：

用於活體外分析(大鼠pHSC)之大鼠HSP47-C雙股siRNA

有義(5'→3') GGACAGGCCUCUACAACUATT (SEQ. ID NO. 2)

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

陽離子脂質儲備液製備。藉由將陽離子脂質與DOPE、膽固醇及diVA-PEG-diVA分別以6.0 mg/mL、5.1 mg/mL及2.7 mg/mL及2.4 mg/mL之濃度組合於乙醇中，製備陽離子脂質之儲備溶液。若需要，則使溶液升溫至約50°C以促進陽離子脂質溶解至溶液中。

空脂質體製備。在40°C±1°C下經由注射針以每注射口1.5毫升/分

鐘將陽離子脂質儲備溶液注入9%蔗糖之迅速攪拌混合物水溶液中。陽離子脂質儲備溶液與水溶液比率(v/v)定為35:65。混合後，自發地形成空囊泡。隨後在40℃下使所得囊泡均衡10分鐘，隨後乙醇含量減少至約12%。

脂複合體製備。藉由9%蔗糖將根據以上方法製備之空囊泡稀釋至1 mM濃度陽離子脂質之最終體積。向攪拌溶液，就每一mL經稀釋空囊泡(「EV」)而言添加100 μ L含5%葡萄糖之RNase游離水且充分地混合。隨後立即添加150 μ L於RNase游離水中之10 mg/mL siRNA溶液且充分地混合。隨後以5%葡萄糖溶液以就每一mL所用EV而言1.750 mL稀釋混合物。在室溫下在約200 rpm下攪拌混合物10分鐘。使用具有約100000 MWCO之半透膜在交叉流超濾系統中使用適當選擇之蠕動泵(例如Midgee Hoop, UFP-100-H24LA)，將混合物濃縮至原始體積的約1/3(或所要體積)，且隨後使用含有3%蔗糖及2.9%葡萄糖之水溶液、用5倍樣品體積透濾。隨後在使用前在無菌條件下經由0.8微米/0.2微米微孔尺寸之組合過濾過濾產物。

形成含非diVA siRNA之脂質體。將陽離子脂質、DOPE、膽固醇及PEG結合脂質(例如PEG-BML)以50:10:38:2之莫耳比及約2.3 mg/mL之最終重量濃度溶解於絕對EtOH(200普魯夫)中。將siRNA以約0.10 mg/mL之濃度溶解於50 mM檸檬酸鹽緩衝液中且調節溫度至35℃至40℃。隨後添加乙醇/脂質混合物至含siRNA之緩衝液同時攪拌以自發地形成siRNA填充之脂質體。脂質係與siRNA組合以達成12:1(wt:wt)之最終總脂質與siRNA比。範圍可為10:1至12:1，較佳為7:1至12:1。用10x體積PBS(pH 7.2)透濾siRNA填充脂質體以移除乙醇且交換緩衝液。經由0.22 μ m滅菌等級PES過濾器過濾最終產物以使生物負荷減少。此製程獲得具有80 nm至90 nm平均粒徑、PDI<0.2、>95%截留效率及 ζ 電位>30 mV的脂質體。

形成與 diVA 共溶解、含 siRNA 之脂質體。使用上述方法製備 siRNA-diVA-脂質體調配物。在添加至含 siRNA 之緩衝液之前，將 diVA-PEG-diVA 與其他脂質(50:10:38:2 之比率之陽離子脂質、DOPE、膽固醇及 PEG 結合脂質)共溶解於絕對乙醇中。diVA-PEG-diVA 之莫耳含量介於 0.1 至 5 莫耳比範圍內(50:10:38:2:5 至 50:10:38:2:0.1)。此製程獲得具有 110 nm 至 130 nm 平均粒徑、PDI<0.2、>95% 截留效率及 ζ 電位 >30mV 的脂質體。

形成具有陽離子脂質、含 siRNA 之脂質體。使用上述方法製備 siRNA-diVA-脂質體調配物及 siRNA-脂質體調配物。陽離子脂質可為例如 DODCM、HEDC、HEDODC、DC-6-14 或此等陽離子脂質之任何組合。

形成以 diVA 裝飾之含 siRNA 之脂質體。使用上述方法製備 siRNA-脂質體調配物且將其稀釋於 PBS 中至 0.5 mg/mL 之 siRNA 濃度。陽離子脂質可為 DODCM、HEDC、HEDODC、DC-6-14 或此等陽離子脂質之任何組合。將 diVA-PEG-diVA 溶解於絕對乙醇(200 普魯夫)中至 10 mg/mL 至 50 mg/mL 範圍內之最終濃度。添加適當量之乙醇溶液至 siRNA-脂質體溶液以獲得 2 莫耳% 至 10 莫耳% 之間的最終莫耳百分比。以吸液管使溶液反覆地上下插入從而混合。調節 diVA-PEG-diVA 濃度及乙醇添加體積以保持添加體積 >1.0 μ L 且最終乙醇濃度 <3%(vol/vol)。隨後在活體外或活體內評估之前在迴轉式震盪器上在周圍溫度下培育裝飾脂質體 1 小時。

結果

圖 8 顯示，經由裝飾添加 VA-結合物至脂質體改良 siRNA 之阻斷功效、提升 siRNA 活性。脂質體由 DLin-KC2-DMA 組成。VA-結合物係在脂質體形成之後加工後添加。調配物配方為 40:10:40:10(BML2:DSPC：膽固醇：PEG-BML)。就所有樣品而言用

量均為867 nM siRNA HSP47-C。結果顯示，在其中添加VA-結合物至脂質體之每一情況下，與不具有類視色素之脂質體相比及與以游離(非結合)視黃醇裝飾之脂質體相比，siRNA活性經提升。RNAiMAX為市售轉染試劑。

圖9顯示，經由共溶解化添加VA-結合物至脂質體改良siRNA之阻斷功效。此等脂質體不同於圖8之脂質體之處在於其為其中經由共溶解化添加VA-結合物之DODC脂質體。調配物為50:10:38:2:X DODC:DOPE：膽固醇：PEG-BML:VA-結合物。每一情況下之用量均為100 nM siRNA HSP47-C。結果顯示，經由共溶解化添加VA-結合物至脂質體提升siRNA活性。

圖10顯示，經由共溶解化添加VA-結合物至脂質體改良siRNA之阻斷功效。結果包括三種不同脂質體：DC-6-14、DODC、HEDODC，其中經由共溶解化添加VA結合物。調配物就全體而言均一樣，為50:10:38:2陽離子脂質：DOPE：膽固醇：PEG-BML，其中僅陽離子脂質各異。siRNA之濃度為200 nM siRNA HSP47-C，就全體而言均相同。結果顯示，當藉由共溶解化製備時，VA結合物添加至具有不同陽離子脂質之脂質體提升siRNA活性。

圖11顯示，經由共溶解化添加VA結合物至具有DC-6-14陽離子脂質之脂複合體及RNA包覆脂質體之外部提升siRNA活性。調配物為40%脂複合體調配物40:30:30 DC-6-14:DOPE：膽固醇。就所有樣品而言濃度均為867 nM siRNA HSP47-C。結果顯示，與不具有VA結合物之脂質體相比，經由共溶解化添加VA結合物至脂複合體提升siRNA活性。

圖12顯示，經由共溶解化形成之添加VA結合物至脂複合體與其中經由裝飾添加VA結合物之脂複合體相比。此等結果來自DC-6-14及DODC脂複合體。調配物由40:30:30 DC-6-14:DOPE：膽固醇組成。各

樣品中之濃度均為867 nM siRNA HSP47-C。相對於藉由裝飾添加之VA結合物，經由共溶解化添加VA結合物顯著改良活體外阻斷功效。

實例40：活體內實驗

使用體重範圍為24公克至30公克之雌性C57B1/6退休種小鼠(Charles River)。將動物按體重隨機分為每組10個動物之10組。所有動物程序均視需要經Bio-Quant's IACUC及/或主治獸醫批准，且所有動物福祉問題均已闡明且記錄。以異氟烷使小鼠麻醉且經由下腔靜脈放血。

用於供活體內分析(小鼠CCl4模型)之調配物中之小鼠HSP47-C雙股siRNA

有義(5'->3') GGACAGGCCUGUACAACUATT (SEQ. ID NO. 3)

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

經由每隔一天腹膜內注射CCl₄(CCl₄於橄欖油中，1:7(vol/vol)，每公克體重1 μL)7天(第0、2、4、6天)誘導熱休克蛋白47(HSP47)上調。在第3天，藉由IV注射至尾靜脈中以本發明之脂質體或脂複合體調配物或PBS處理3隻小鼠連續4天(第3、4、5、6天)。一組十隻小鼠(未處理)既不受CCL4處理又不受IV注射且充當正常HSP47基因表現之對照組。

實驗時刻表

天	0	1	2	3	4	5	6	7
CCl ₄ IP注射	X	X	X	X	X	X	X	
測試物IV注射				X	X	X	X	
樣品收集(n=10)								X

在第7天及最終IV注射約24小時後，將所有剩餘小鼠殺死且在收集肝臟樣品用於PCR分析之前以PBS灌注肝臟。自各小鼠肝臟收集約150 mg樣品且置於1.5 mL RNAlater穩定化試劑(Qiagen)中且儲存於2℃至8℃下直至分析。不自明顯及顯著肝損傷及/或壞死之區域收集肝

臟樣品。

使用RNeasy®管柱(Qiagen)根據製造商方案萃取小鼠肝臟中之總RNA。用20 ng總RNA來作定量RT-PCR以便量測HSP47表現。HSP47及GAPDH TaqMan®分析及一步RT-PCR母體混合物係購自Applied Biosystems。各PCR反應含有以下組成：一步RT-PCR混合物5 µl，TaqMan® RT酶混合物0.25 µl，TaqMan®基因表現分析探針(HSP47) 0.25 µl，TaqMan®基因表現分析探針(GAPDH) 0.5 µl，RNase游離水3.25 µl，RNA 0.75 µl，總體積10 µl。使用GAPDH作為相對定量之HSP47 mRNA含量的內因性對照物。在ViiA™ 7即時PCR系統(Applied Biosciences)中使用內裝相對定量方法進行定量RT-PCR。針對未處理動物組之平均HSP47表現校正所有值且以相較於未處理組之HSP47表現百分比表示。圖13及圖14展示此等結果。

實例 41：脂溶性維生素標靶結合物 HEDC:S104:DOPE:Chol:PEG-DMPE:DiVA之活體外功效

測試具有50 nM siRNA之脂質體調配物。脂質體為HEDC:S104:DOPE:Chol:PEG-DMPE:DiVA(+DiVA)或不含維生素A部分之對照物(-DiVA)，且將其在含有大鼠肝星狀細胞之96孔培養板中培育30分鐘。在30分鐘之後，用新鮮生長培養基替換培養基。四十八個小時後，溶解細胞，且藉由定量RT-PCR(TaqMan®)分析量測gp46及gapdh mRNA含量，且針對GAPDH含量校正gp46含量。

2% DiVA siRNA之活體外功效(pHSC)、效應在2% diVA的情況下為有效的，且具有14 nM之EC₅₀。在96孔板中以不具有標靶維生素A部分之調配物(-DiVA)或以50 nM siRNA包括維生素A部分之調配物(+DiVA)培育PHSC。在30分鐘之後，用新鮮生長培養基替換培養基。四十八個小時後，溶解細胞，且藉由定量RT-PCR(TaqMan)分析量測gp46及gapdh mRNA含量，且針對gapdh含量校正gp46含量。經校正

gp46 含量以佔空白對照細胞之百分比表示。誤差杠指示標準差 (n=3)。基於單尾t測試，含DiVA處理後之平均gp46含量顯著不同於空白對照處理(P<0.001)。

比較DiVA及satDiVA

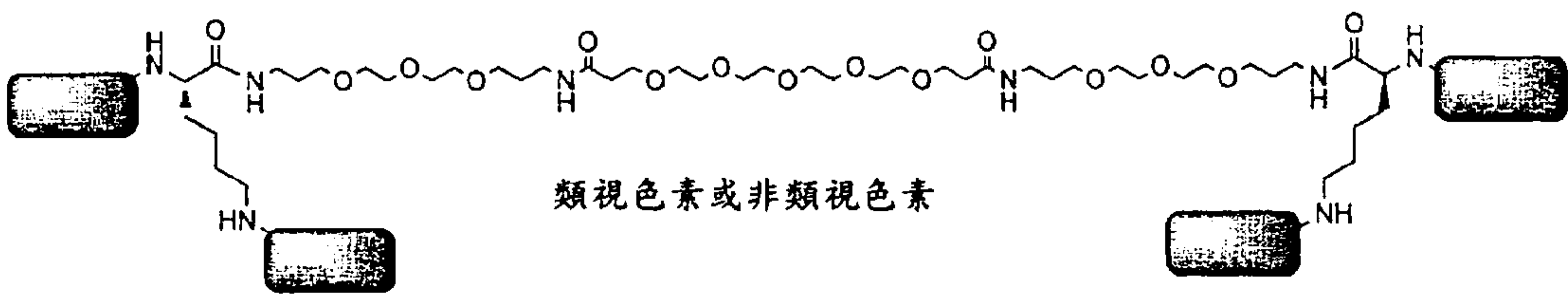
在96孔板中將脂質體調配物轉染至大鼠pHSC中30分鐘。在48小時之後，使用Cells-to-Ct溶胞試劑(Applied Biosystems)處理細胞且藉由qRT-PCR定量HSP47 mRNA含量。針對空白對照物校正HSP47表現。藉由量測六個 siRNA 半對數劑量下之HSP47阻斷(KD)且在 Graphpad Prism® 5.04中將資料擬合成「典型S形劑量反應函數」來測定EC₅₀。

結果顯示，DiVA及Sat DiVA兩者均增加KD功效(圖15)。DiVA及Sat DiVA之EC₅₀均為12 nM。

類視色素結合物	調配物	活體外(pHSC)EC ₅₀ 或% KD	活體內(大鼠 DMNQ)% KD
DiVA	具有2% DiVA之20:20 HEDC:S104	EC ₅₀ =12 nM	60%在0.75 mpk下
satDiVA	具有2% satDiVA之20:20 HEDC:S104	EC ₅₀ =14 nM	74%在0.75 mpk下

類視色素結合物相較於非類視色素結合物

發現相對於非類視色素等效物，類視色素結合物一貫在活體外更有效(參見4TTNBB及4Myr相較於類視色素結合物等效物satDiVA及DiVA)



類視色素結合物	調配物	活體外(pHSC)EC ₅₀ 或% KD
DiVA	具有2% DiVA之20:20 HEDC:S104	EC ₅₀ =12 nM
satDiVA	具有2% satDiVA之20:20 HEDC:S104	EC ₅₀ =14 nM
4TTNPB(非類視色素)	具有2% 4TTNPB之20:20 HEDC:S104	34%在50 nM下
4Myr(非類視色素)	具有2% 4Myr之20:20 HEDC:S104	27%在50 nM下

實例 42：脂溶性維生素標靶結合物 HEDC:S104:DOPE:Chol:PEG-DMPE:DiVA之活體內功效

在短期肝損傷模型(稱為快速模型)中評估標靶調配物之活體內活性。在此模型中，藉由以肝毒劑(諸如二甲基亞硝胺(DMN))處理誘導短期肝損傷，且伴隨有gp46 mRNA含量升高。為誘導此等變化，給雄性史-道二氏大鼠腹膜內注射DMN連續六天。在DMN處理時期結束時，基於個別動物體重將動物隨機分組。以單個IV劑量形式投與調配物，且在最後注射DMN後一小時給出。二十四小時後，切下肝葉且藉由定量RT-PCR(TaqMan®)分析測定gp46及MRPL19 mRNA含量兩者。針對MRPL19含量校正gp46之mRNA含量。

結果(圖16)顯示，類視色素結合物之量與功效之間的關係明顯。在大鼠DMNQ模型中僅需要0.25莫耳%就可見到顯著效應。在2莫耳% DiVA下，觀測到gp46表現之穩固阻斷。圖16展示以DMN在第1、2、3天以10 mg/kg且在第4、5、6天以5 mg/kg經由腹膜內給藥處理、從而誘導肝損傷之雄性史-道二氏大鼠。在最後注射DMN後一小時，向動物(每組n=8)經靜脈內注射0.75 mg/kg siRNA之劑量的含有0%、0.25%、0.5%、1%及2% DiVA之調配物或PBS(媒劑)。二十四個小時後，自各動物之右肝葉之切片純化總siRNA且將其儲存於4°C下直至RNA分離。對照組包括PBS媒劑組(經DMN處理)及未處理(未經處理；無DMN)組。在減去由未處理組確定之背景gp46 mRNA含量之後，針對媒劑組之平均gp46 mRNA校正所有測試組值(以媒劑組之百分比表示)。

以DMN經由腹膜內給藥來處理雄性史道二氏大鼠(130 g至160 g)，從而誘導肝纖維化。DMN處理方案為每週3次(星期一、星期三及星期五)，在前3週中為10 mg/kg(亦即，5.0 mg/mL之DMN，以2.0 mL/kg體重之劑量)，且第22天至第57天為5 mg/kg之半劑量(亦即5.0

mg/mL之DMN，以1.0 mL/kg體重之劑量)。使用相同時程給假處理組動物注射PBS(DMN之溶劑)。在第22天，最後DMN處理後24小時，收集血液樣品且分析肝疾病生物標記物以證實DMN處理之有效性。基於體重將DMN處理動物分成不同處理組，且確保各組中之動物之平均體重及體重範圍不具有顯著差異。在第25天將預處理組之動物殺死以評估處理開始之前的疾病進展階段。在第25天開始以每週2次以指定siRNA劑量處理的以含有gp46 siRNA之調配物進行之處理總共10次。在第59天，最後調配物處理後48小時及最後DMN處理後72小時，藉由CO₂吸入將動物殺死。切下肝葉且藉由定量RT-PCR(TaqMan)分析測定gp46及MRPL19 mRNA含量兩者。針對MRPL19含量校正gp46之mRNA含量。

本文中所提及或引用之論文、專利及專利申請案及所有其他文件及可電子獲得之資訊之內容均據此以全文引用的方式併入本文中，其引用程度就如同特定且各別地指示各個別公開案以引用的方式併入一般。

申請人保留向本申請案實體地併入來自任何該等論文、專利、專利申請案或其他實際及電子文件之任何及所有材料及資訊的權利。

熟習此項技術者顯而易知，可在不悖離本說明書之範疇及精神的情況下，對本文中所揭示之本說明書作出不同替代及修改。因此，該等其他實施例在本說明書及下列申請專利範圍之範疇之內。本說明書教示熟習此項技術者測試本文中所描述之化學修飾之各種組合及/或取代，從而產生具有介導RNAi活性之改良活性的核酸構築體。該改良活性可包括介導RNAi之細胞反應的改良穩定性、改良生物可用性及/或改良型活化。因此，本文中所描述之特定實施例不具限制性，且熟習此項技術者易於瞭解，可不經過度實驗來測試本文中所描述之修飾之特定組合，從而識別具有改良RNAi活性之核酸分子。

適宜在不存在未在本文中特定揭示之任何要素、限制的情況下實踐本文中說明性描述之本說明書。因此，例如，在描述本說明書之情形下(尤其在以下申請專利範圍之情形下)，除非本文中另外說明或明顯與上下文矛盾，否則術語「一個/種(a)」及「一個/種(an)」及「該(the)」及類似指示用詞應視為涵蓋單數及複數兩者。術語「包含」、「具有」、「包括」、「含有」等應以開放性含義來理解且不具限制性(例如意謂「包括(但不限於)」)。除非本文中另外說明，否則本文列舉之數值範圍僅意欲用作個別地指示屬於該範圍內之各各別值的速記方法，且各各別值如同其在本文中被個別列舉一般併入本說明書中。除非本文中另外說明或明顯與上下文矛盾，否則本文中所描述之所有方法均可以任何適合次序進行。除非另外主張，否則本文中所提供之任何及所有實例或例示性語言(例如，「諸如」)之使用僅意欲更好地說明本說明書而非限制本說明書之範疇。說明書中之任何語言皆不應視為指示實踐本說明書所必需的任何未主張之要素。另外，本文中所用之術語及表述用作說明書之術語且不具限制性，且在使用該等術語及表述時不欲排除所示及所述特徵之任何等效形式或其部分，但應認識到可在所主張之本說明書之範疇內進行各種修改。因此，應瞭解，雖然本說明書已藉由較佳實施例及可選特徵加以特定揭示，但本文中所揭示之本說明書中所實施之修改及變化可由熟習此項技術者實施，且該等修改及變化視為屬於本說明書之範疇內。

本文中已廣泛及大體地描述了本說明書。屬於屬類揭示內容之較窄物種及亞屬分群每一者亦形成本說明書之一部分。此包括本說明書之屬類描述，限制條件或否定限制為自屬類除去任何標的，無論切下之材料是否在本文中被明確列舉皆然。其他實施例屬於隨附申請專利範圍內。此外，在就馬庫西(Markush)群組而言描述本說明書之特徵及態樣時，熟習此項技術者將認識到亦藉此就馬庫西群組成員之任

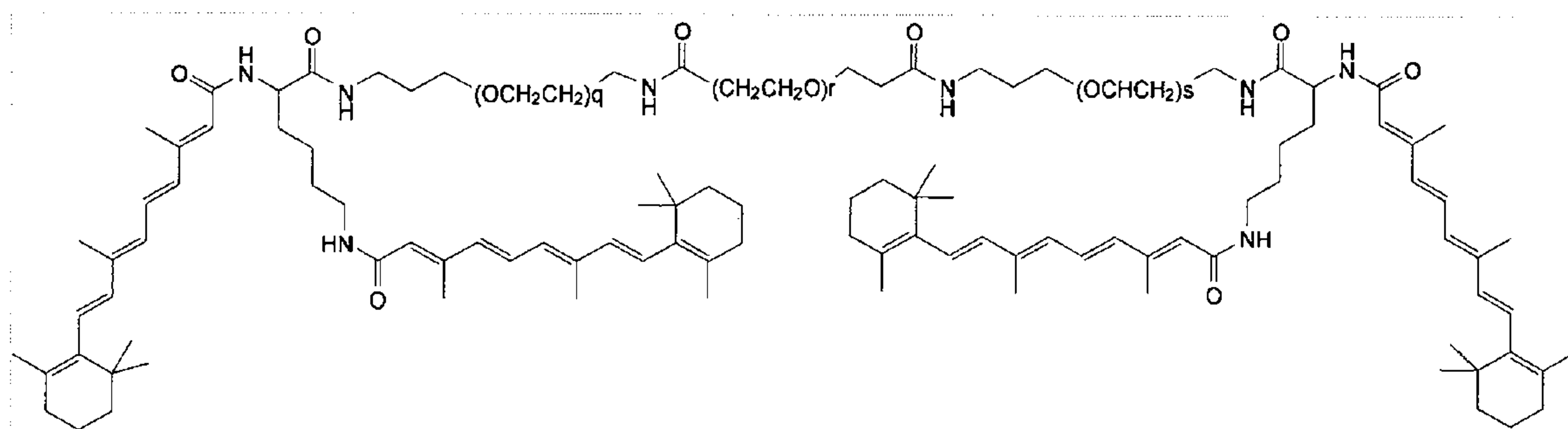
何個別成員或子群而言描述本說明書。

【符號說明】

無

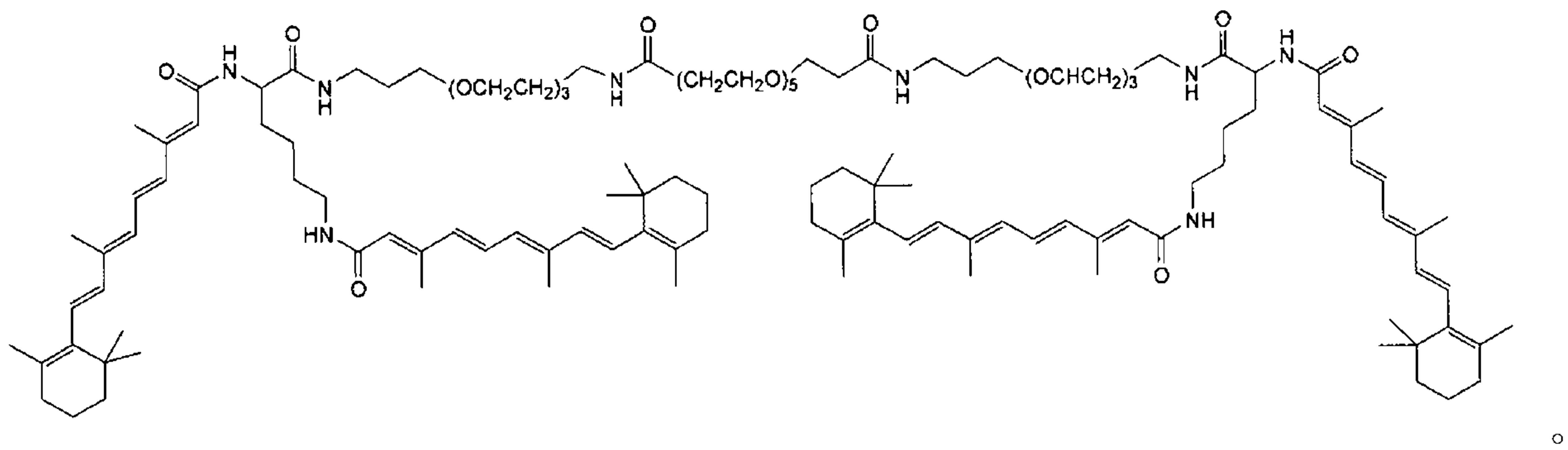
申請專利範圍

1. 一種化合物，其由結構：(類視色素)_m-連接基團-(類視色素)_n所構成；其中m及n係各自獨立地為2或3；且其中該連接基團包含聚乙二醇(PEG)、CO-(CH₂)₃-CO、己醯基、三甘胺醯基及/或CO-(CH₂)₃-NH。
2. 如請求項1之化合物，其中該類視色素係選自由以下組成之群：維生素A、視黃酸、維甲酸、阿達帕林(adapalene)、4-羥基(苯基)視黃醯胺(4-HPR)、棕櫚酸視黃酯、視黃醛、飽和視黃酸及飽和脫甲基視黃酸。
3. 如請求項1或2之化合物，其中該連接基團係選自由以下組成之群：雙醯胺基-PEG、參醯胺基-PEG、四醯胺基-PEG、Lys-雙醯胺基-PEG、Lys-參醯胺基-PEG-Lys、Lys-四醯胺基-PEG-Lys、Lys-PEG-Lys、PEG2000、PEG1250、PEG1000、PEG750、PEG550、PEG-CO-(CH₂)₃-CO、CO-(CH₂)₃-CO、己醯基、三甘胺醯基及CO-(CH₂)₃-NH。
4. 如請求項1或2之化合物，其中該化合物係選自由以下組成之群：(類視色素)₂-PEG-(類視色素)₂、(類視色素)₂-雙醯胺基-PEG-(類視色素)₂、及(類視色素)₂-Lys-雙醯胺基-PEG-Lys-(類視色素)₂。
5. 如請求項4之化合物，其中該化合物為具有下式之化合物：

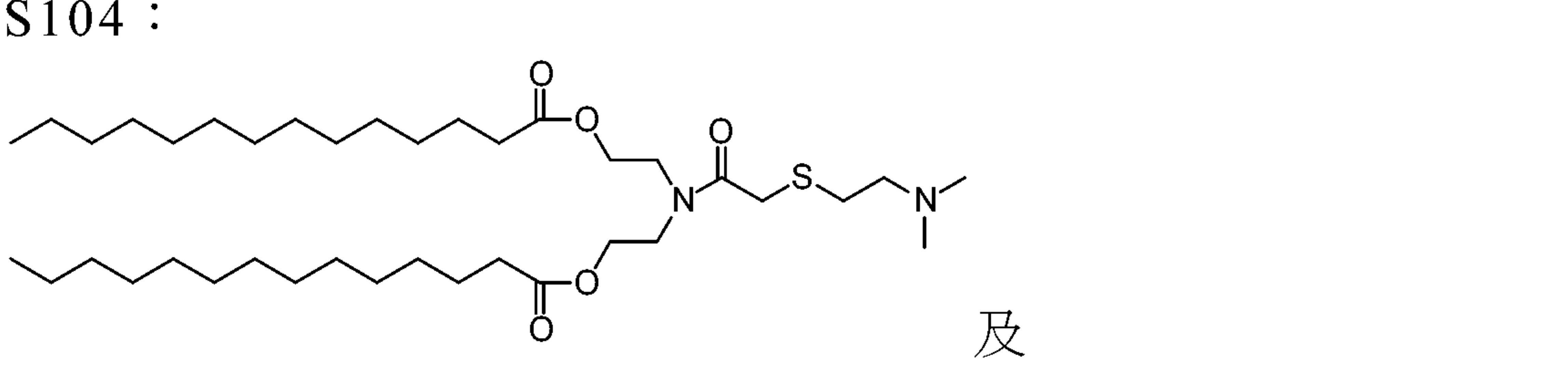
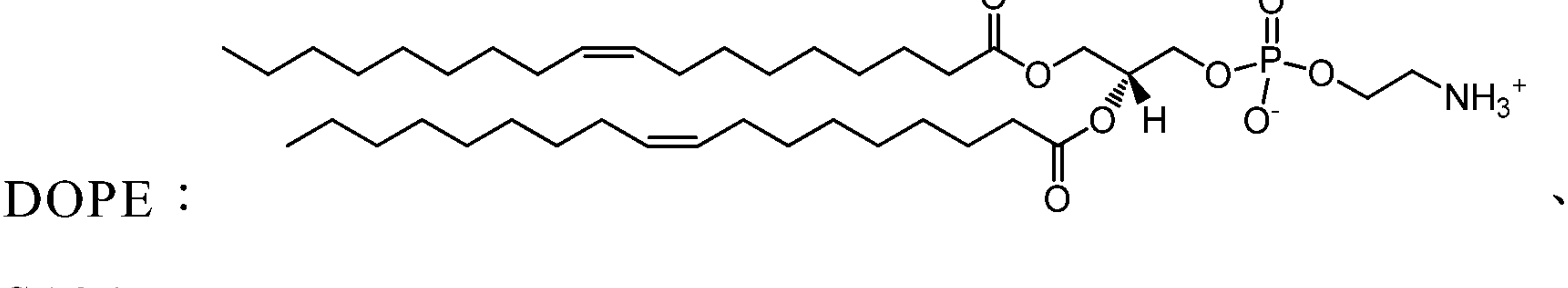
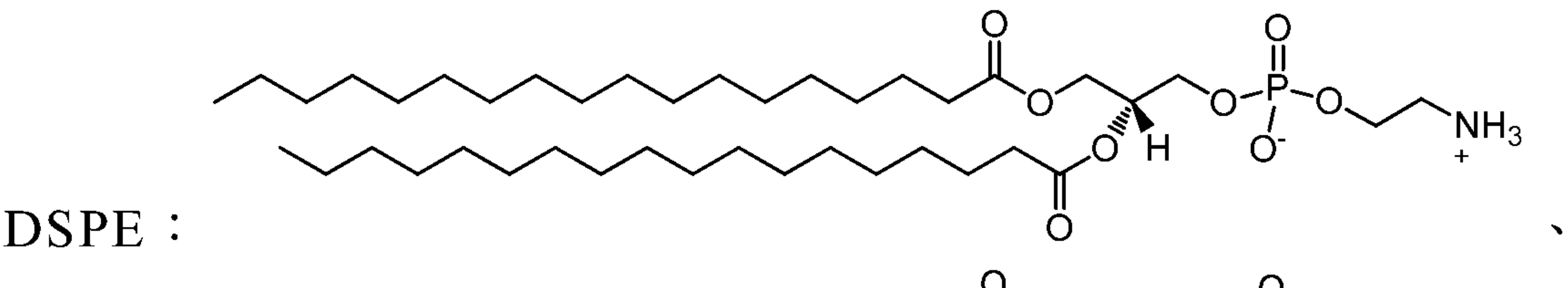
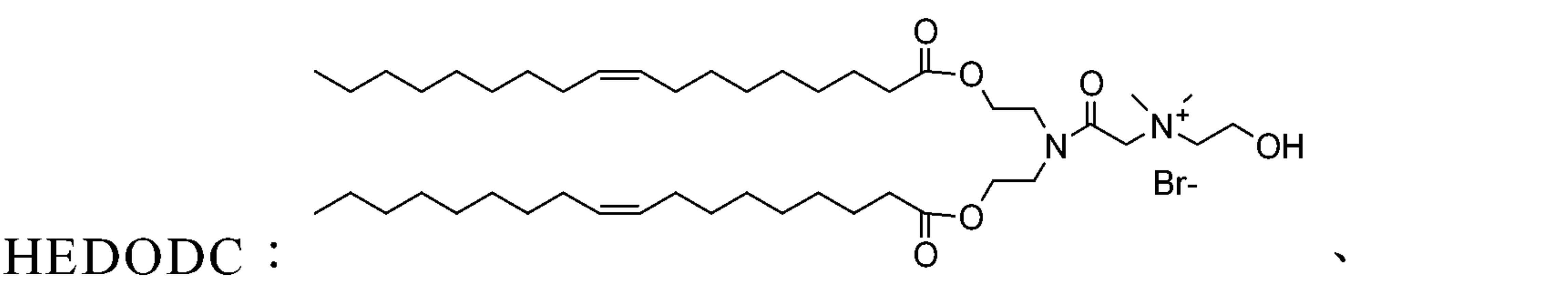
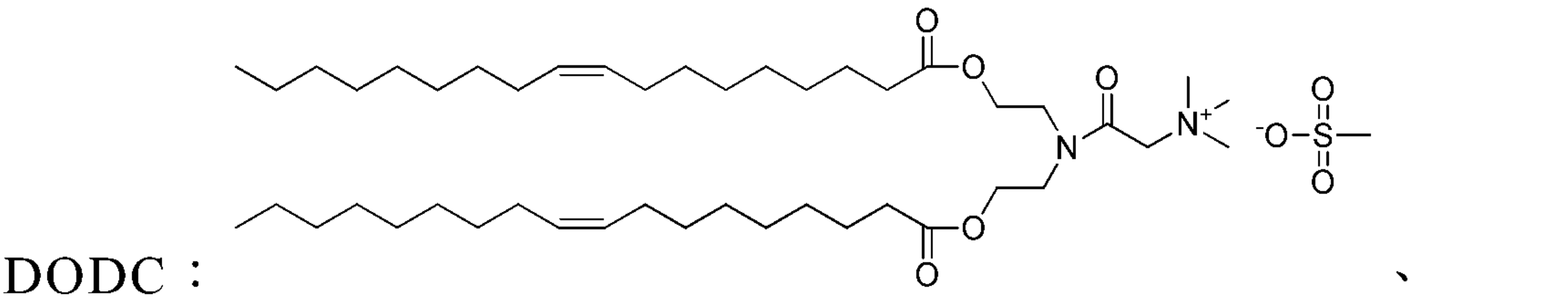


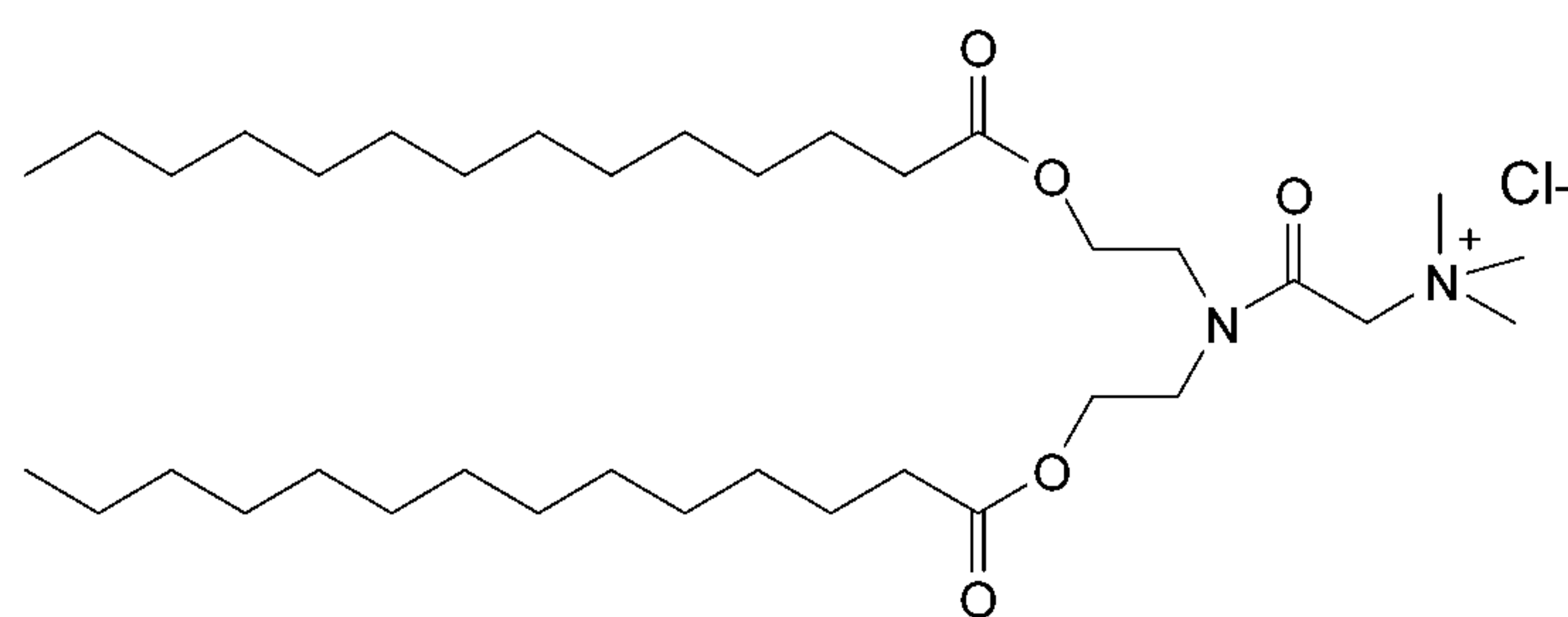
其中q、r及s各自獨立地為1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

6. 如請求項5之化合物，其中該式化合物為：



- 7. 一種組合物，其包含如請求項1至6中任一項之化合物。
- 8. 如請求項7之組合物，其具有脂質粒子的形式。
- 9. 如請求項8之組合物，其中包含選自由以下組成之群之脂質：





DC-6-14：

10. 如請求項7至9中任一項之組合物，其進一步包含標記或藥物。
11. 如請求項10之組合物，其中該藥物為核酸。
12. 一種如請求項1至6中任一項之化合物之用途，其係用以製造用於治療纖維變性疾病或癌症之組合物。
13. 一種如請求項1至6中任一項之化合物之用途，其係用以製造用於提升藥物遞送至標靶細胞之能力之組合物。

圖式

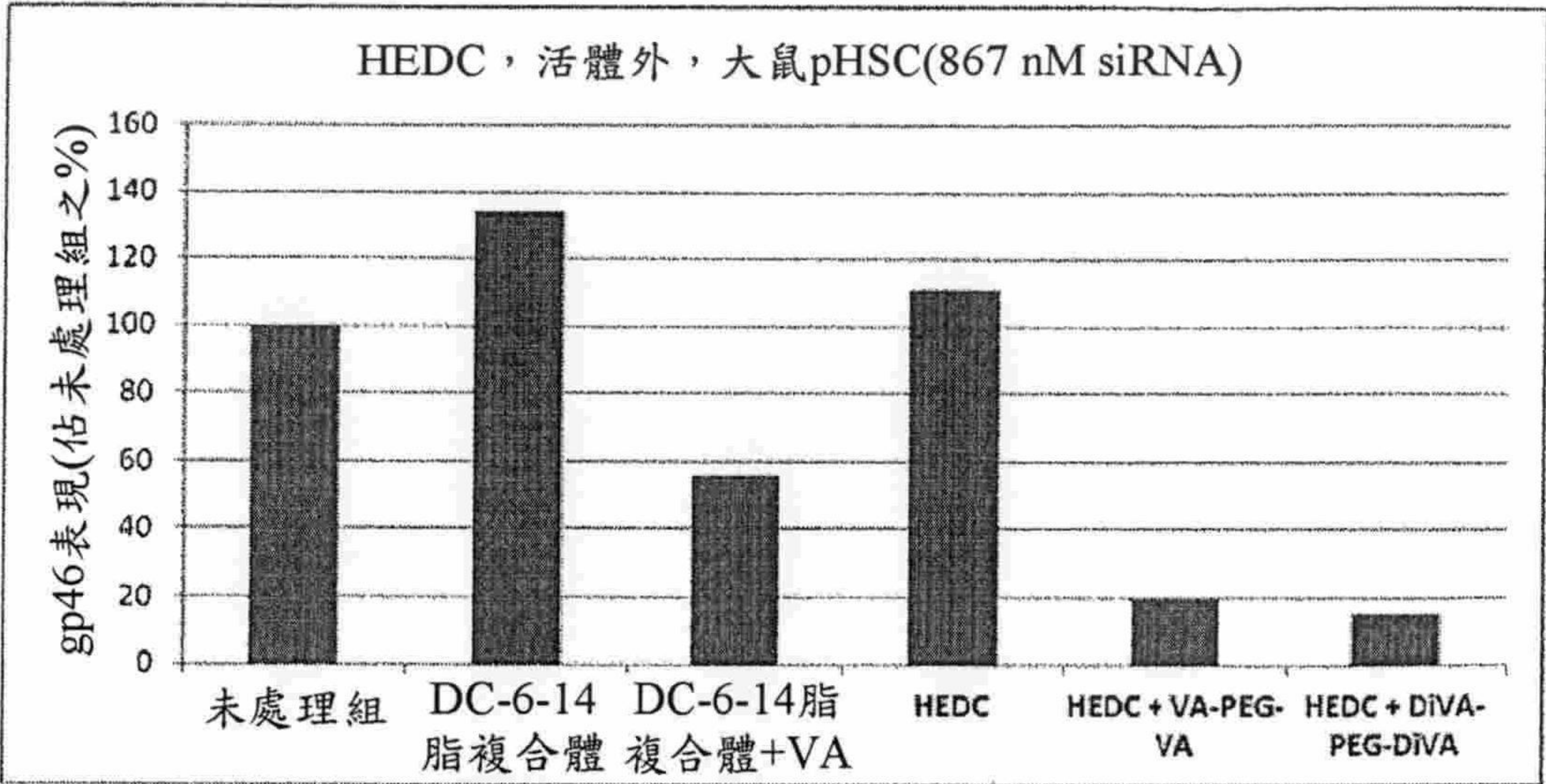


圖1

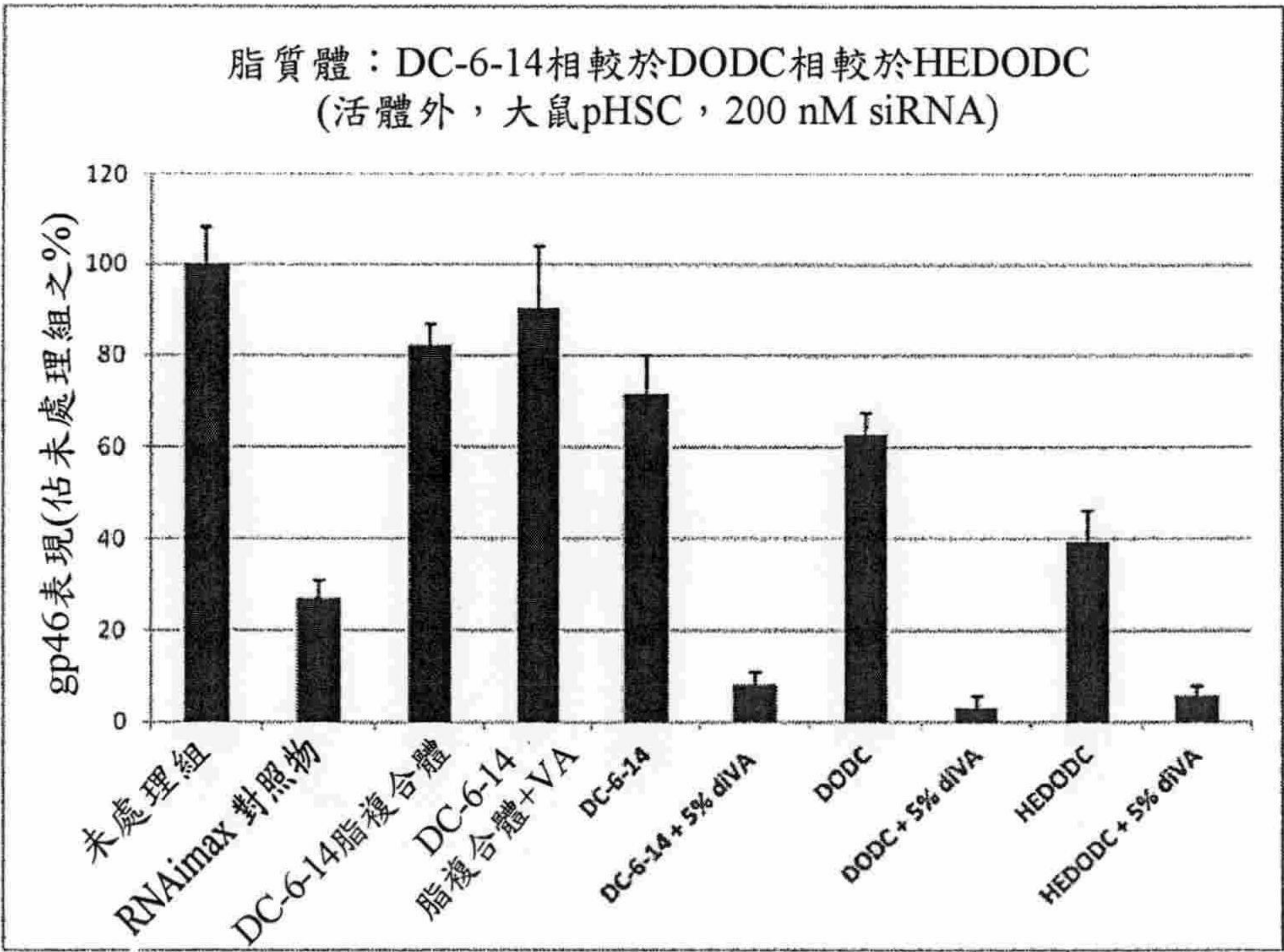


圖2

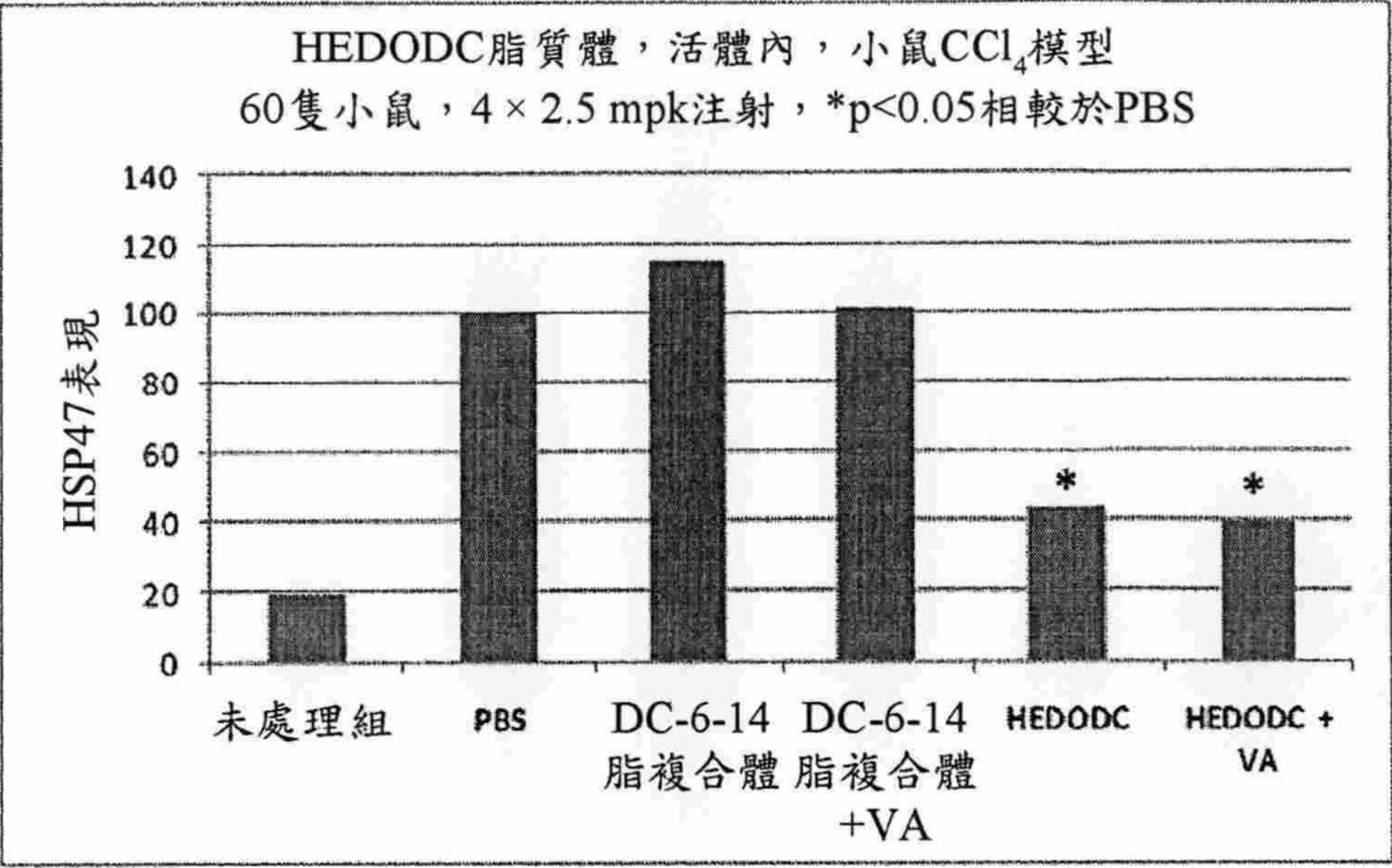


圖3

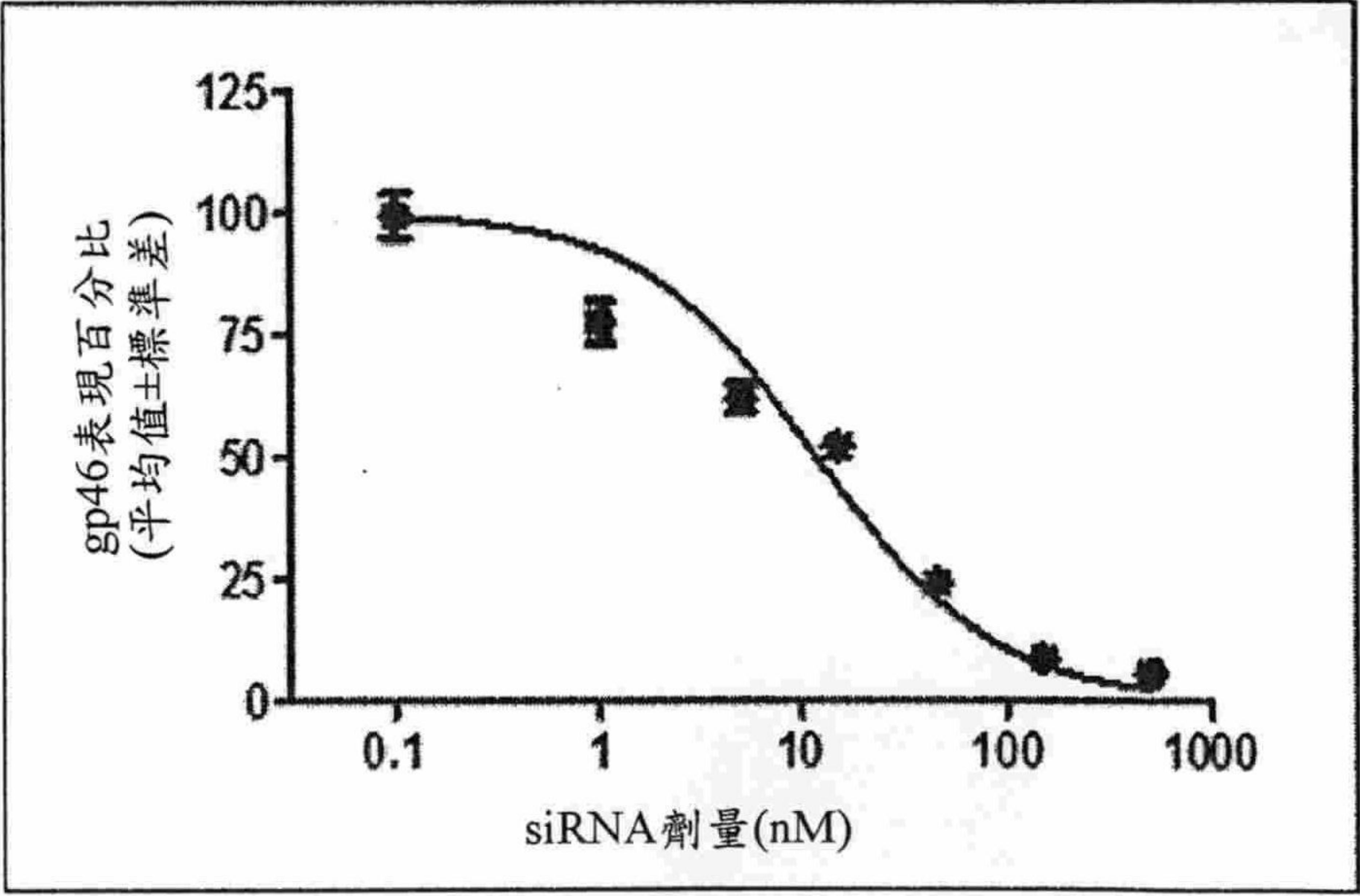


圖4

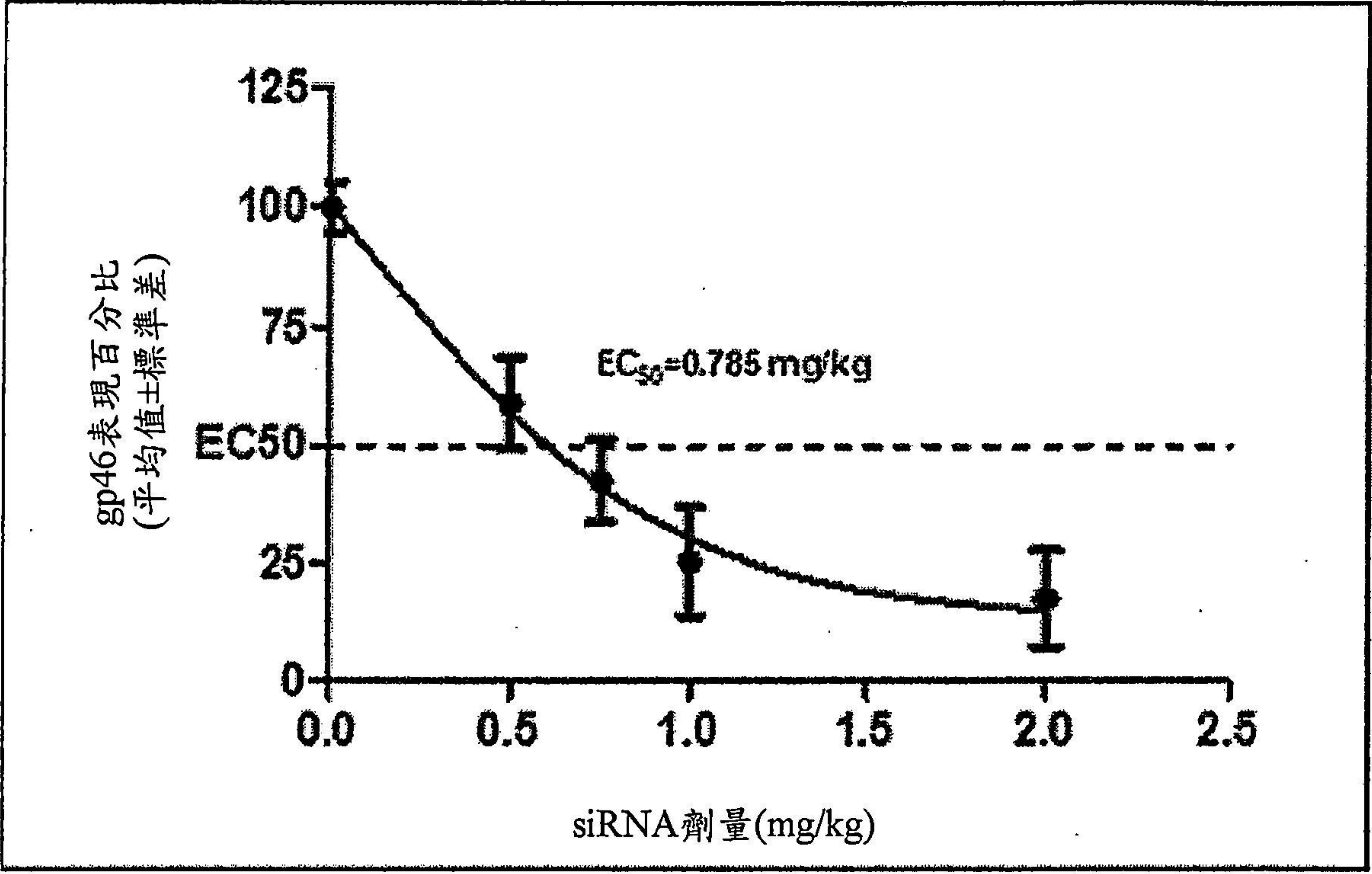


圖5

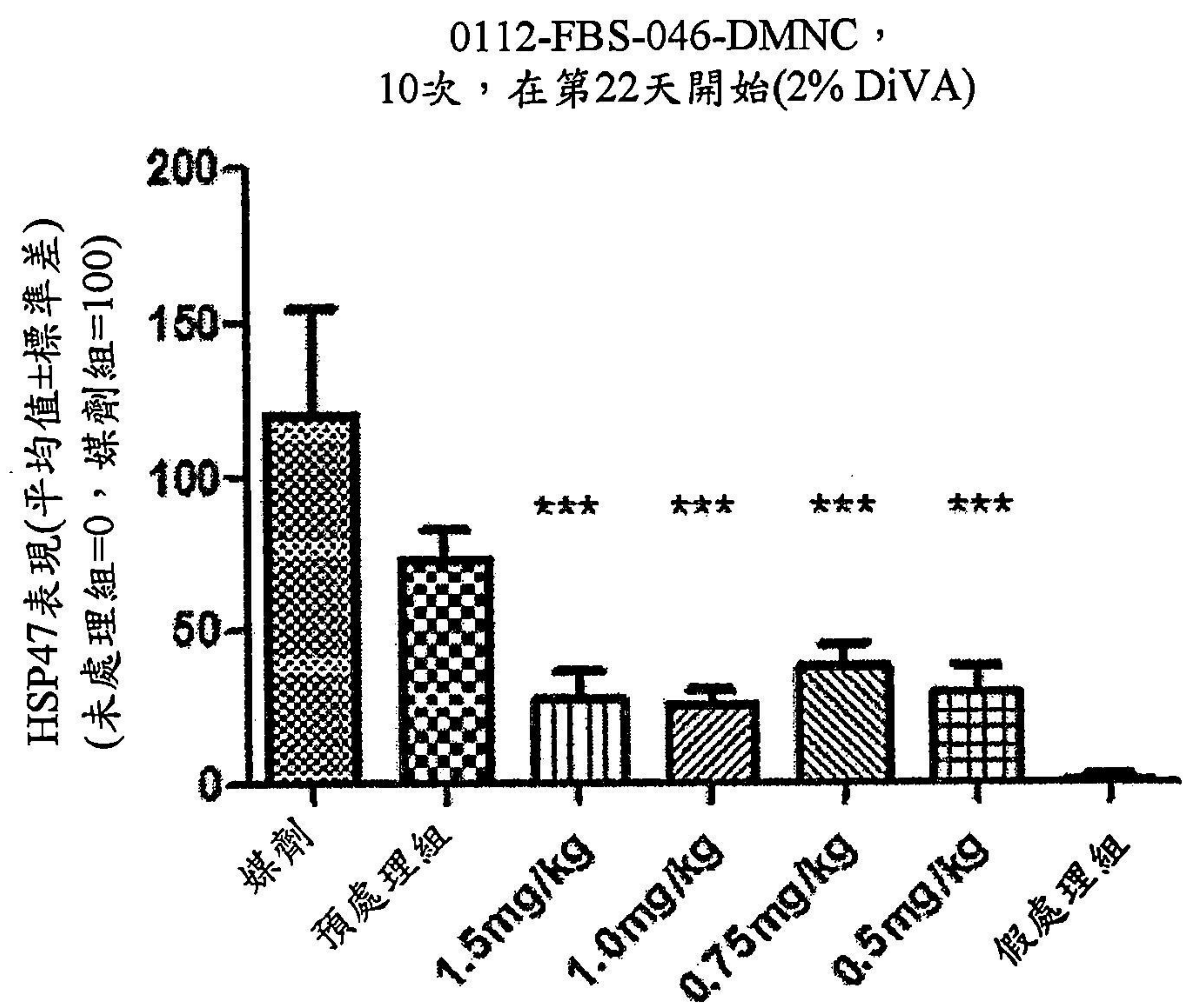


圖6

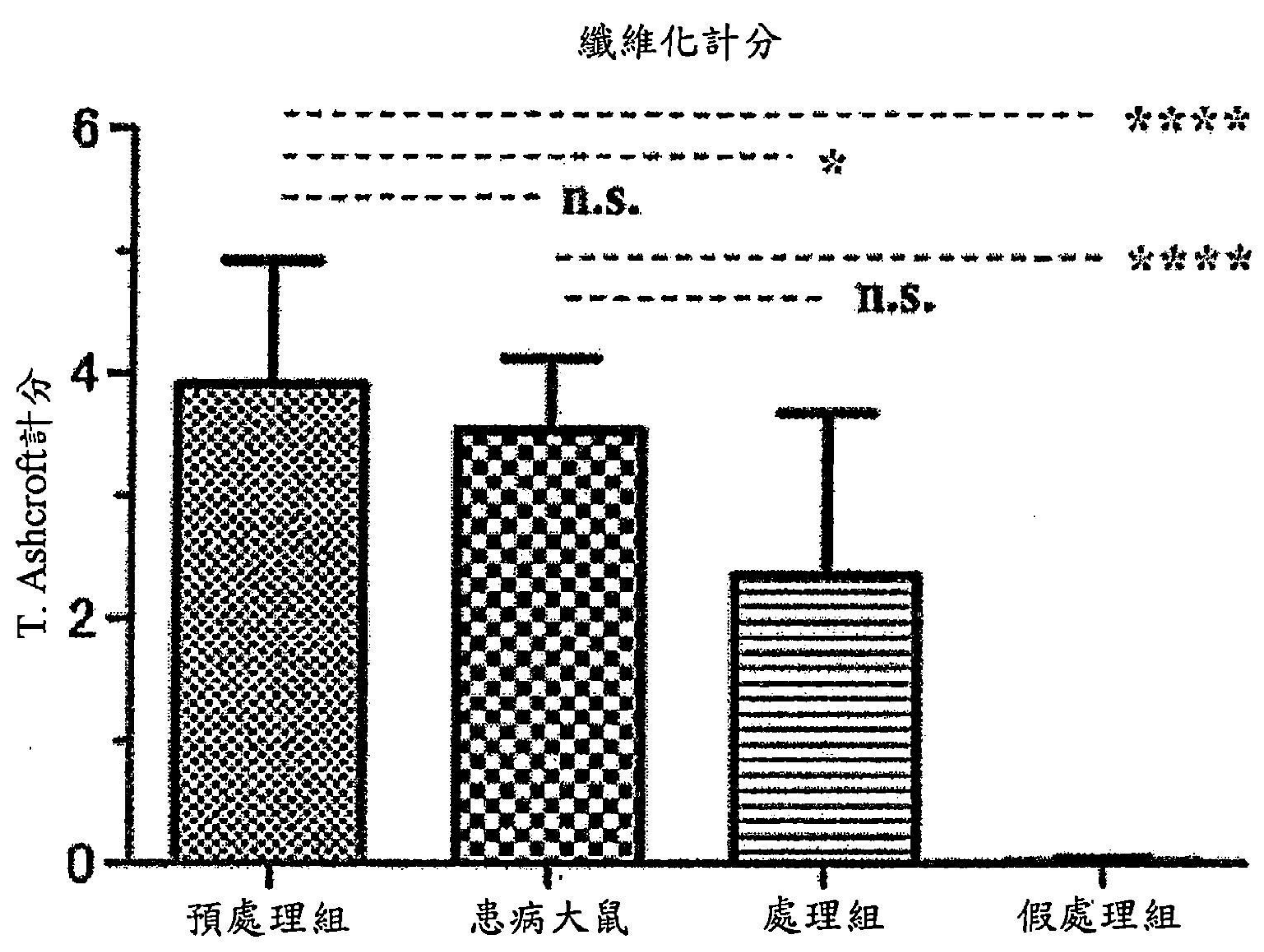


圖7

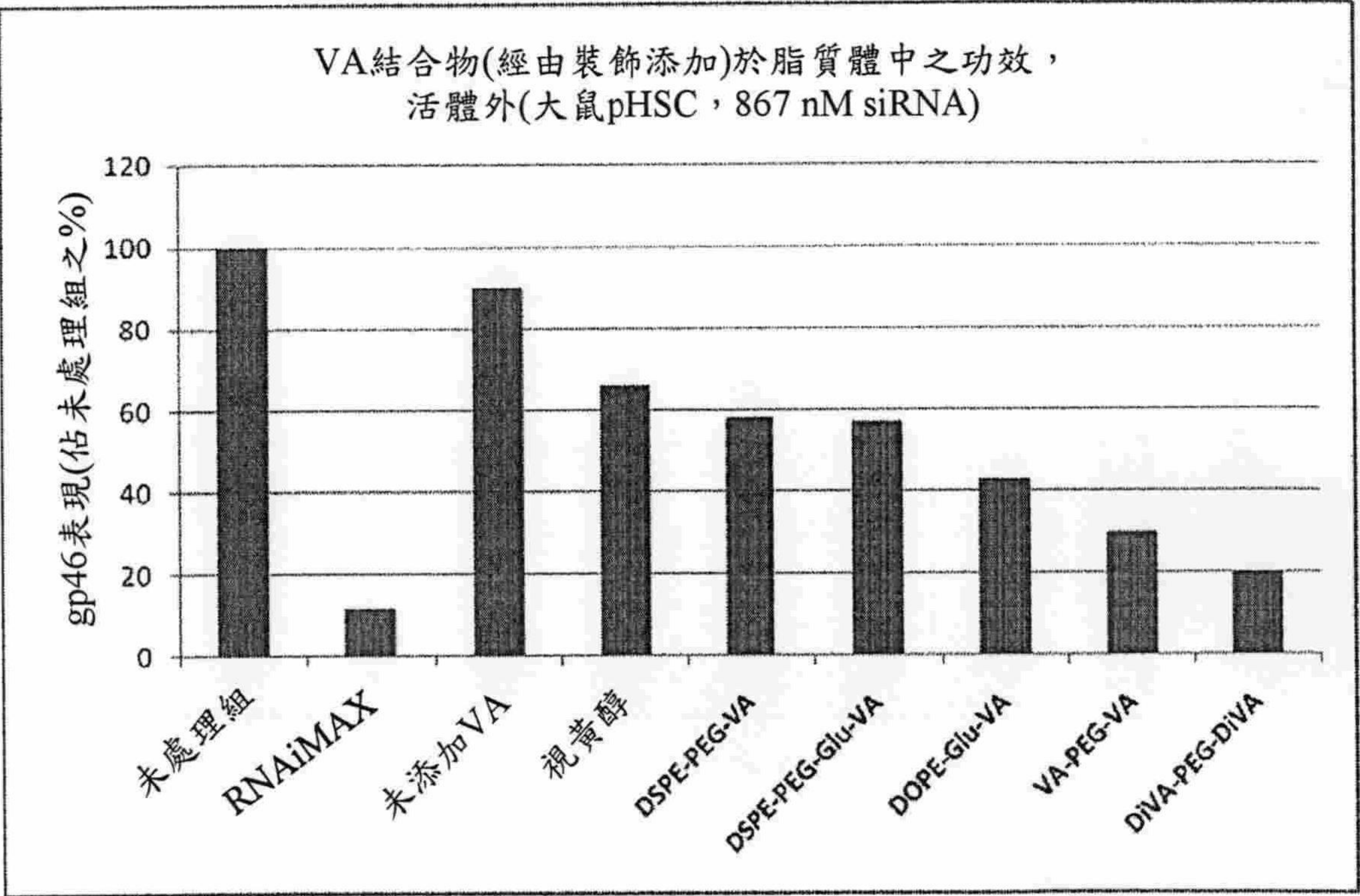


圖8

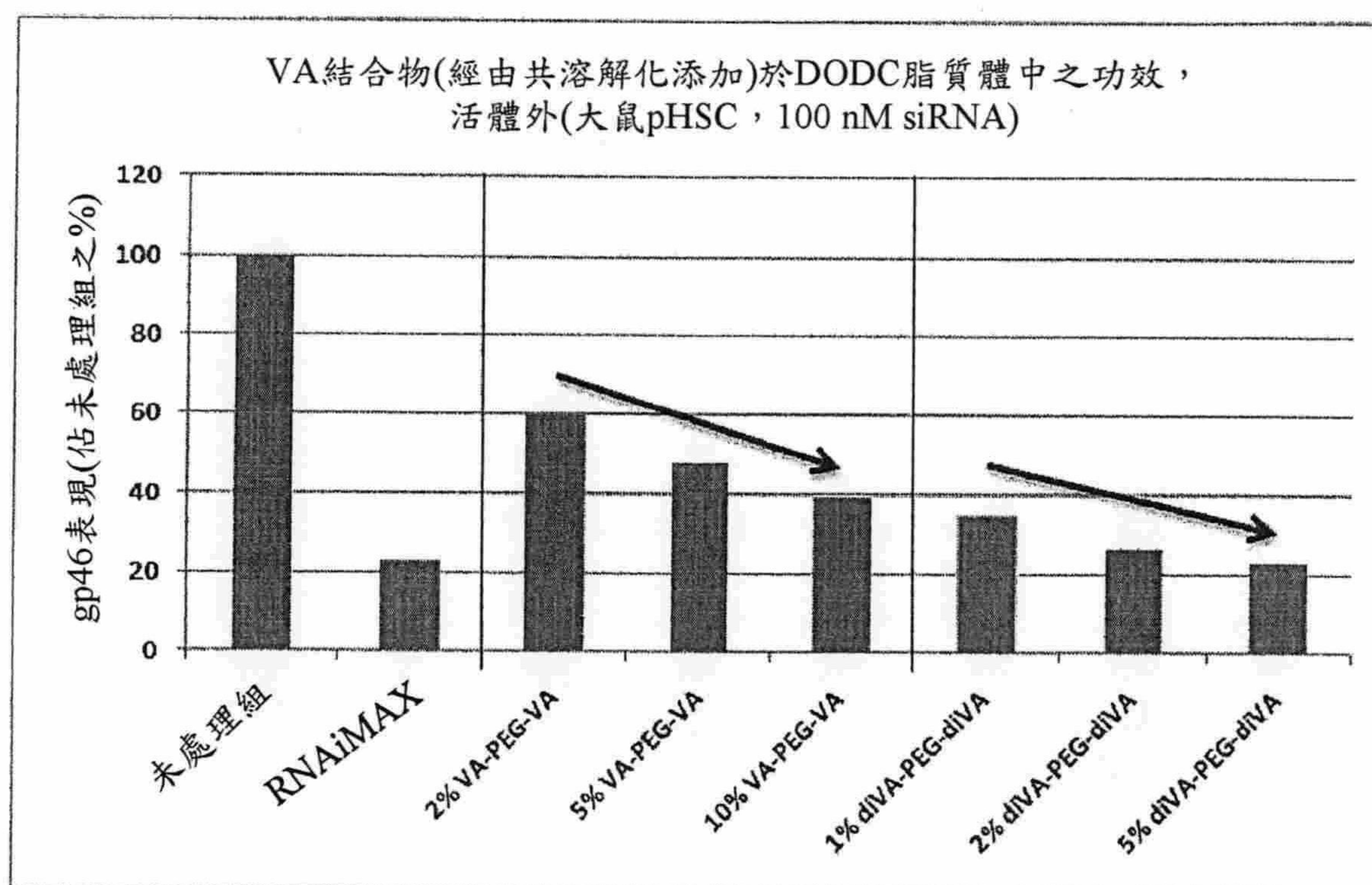


圖9

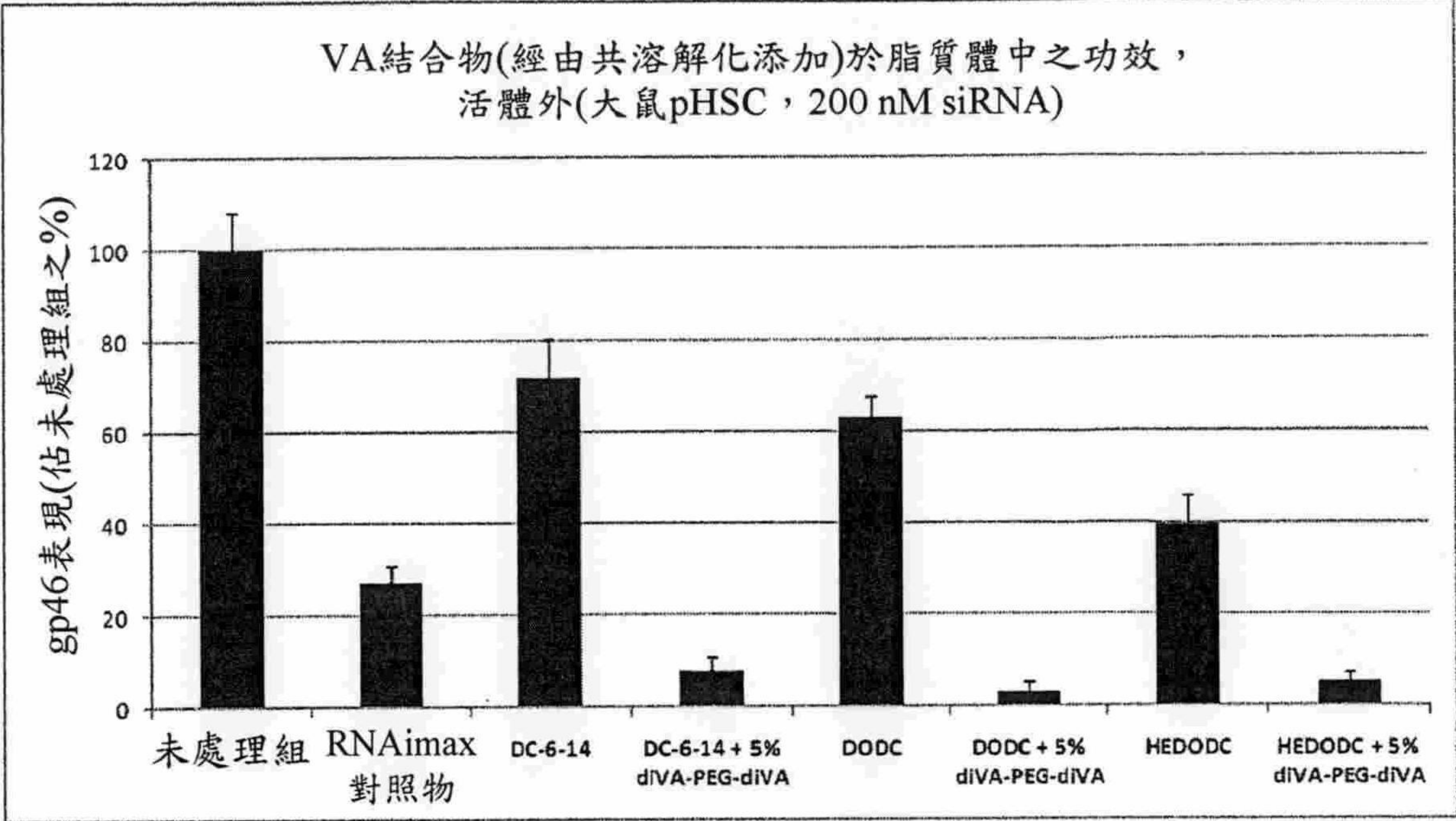


圖10

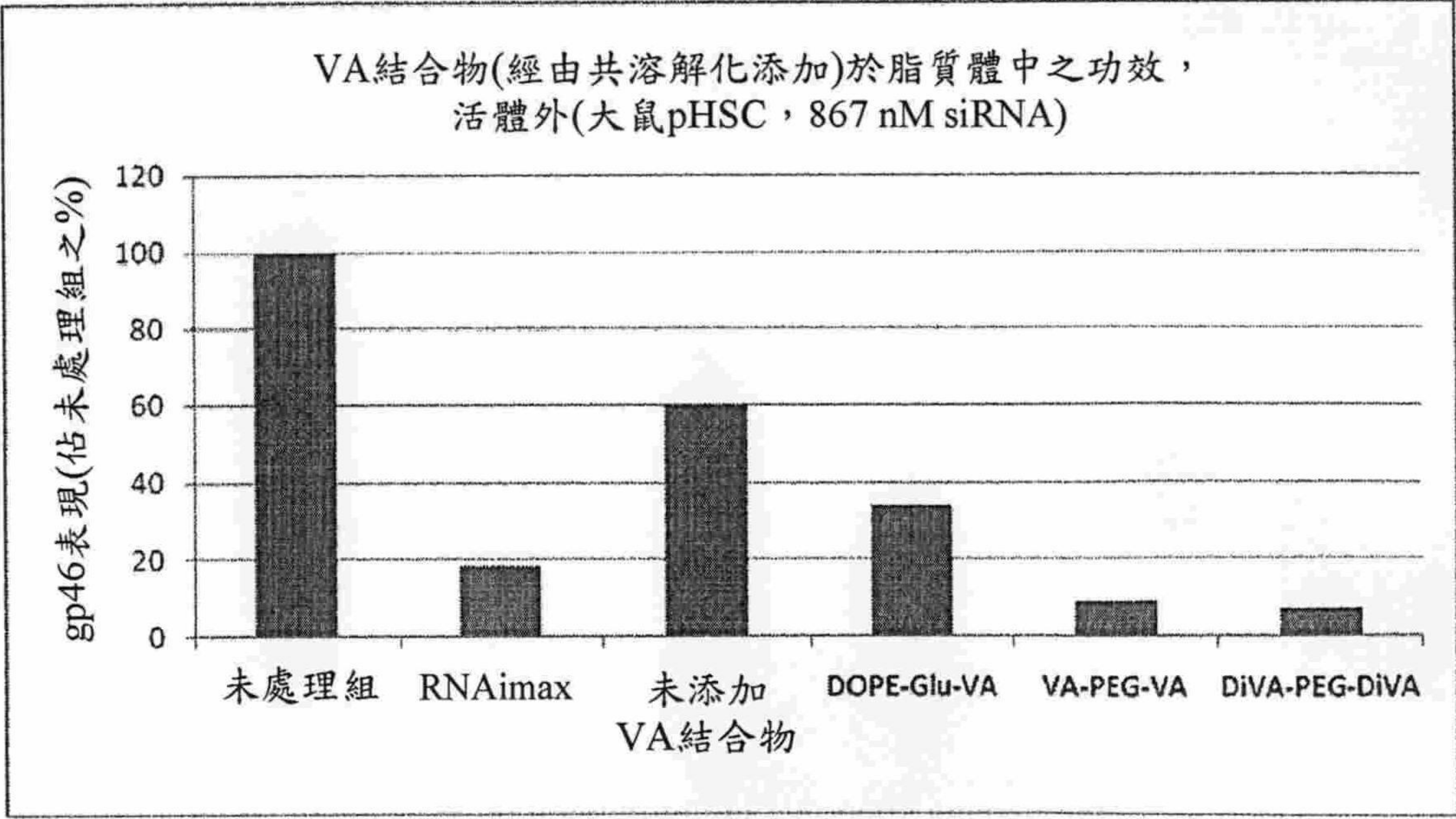


圖11

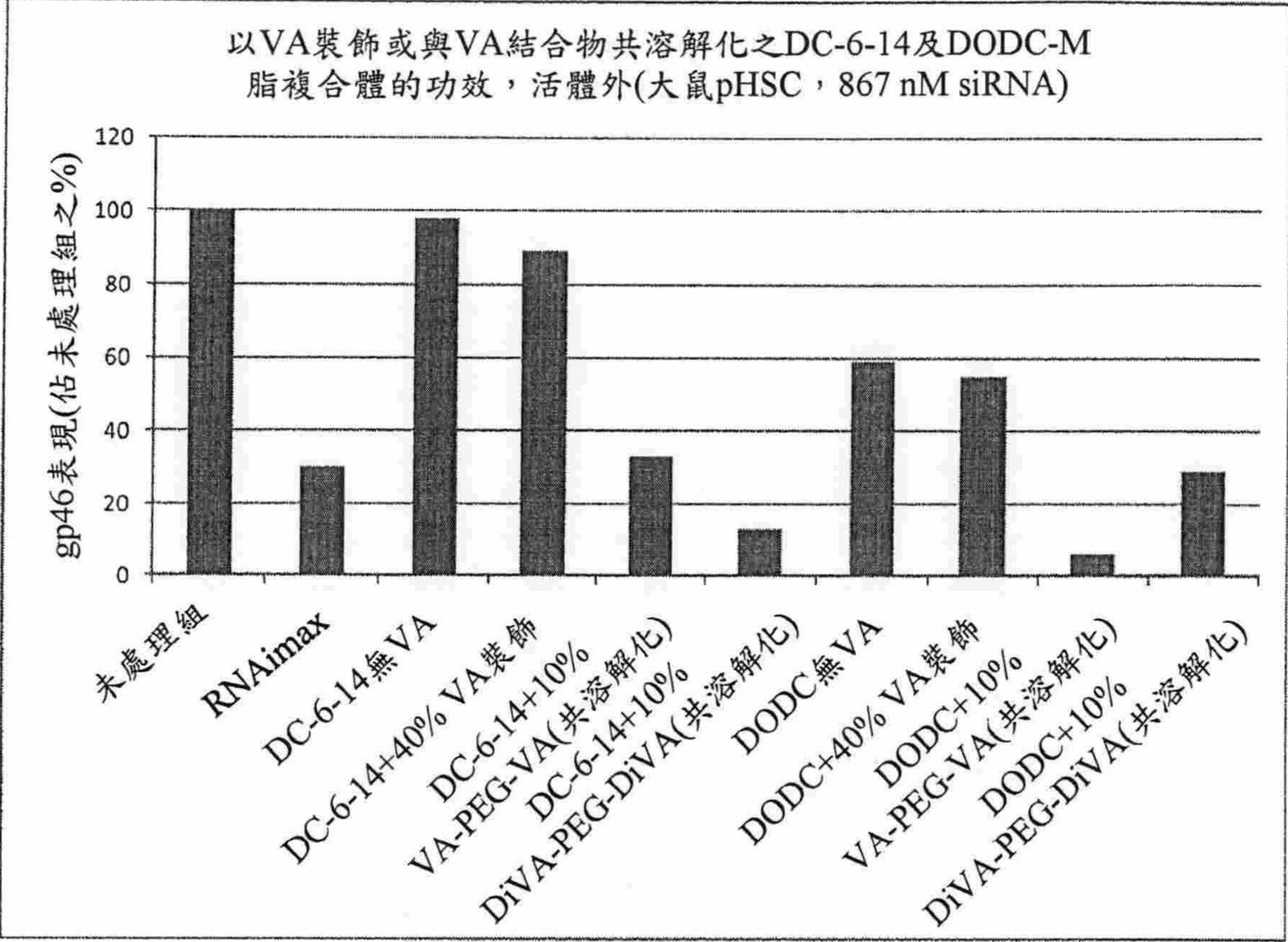


圖12

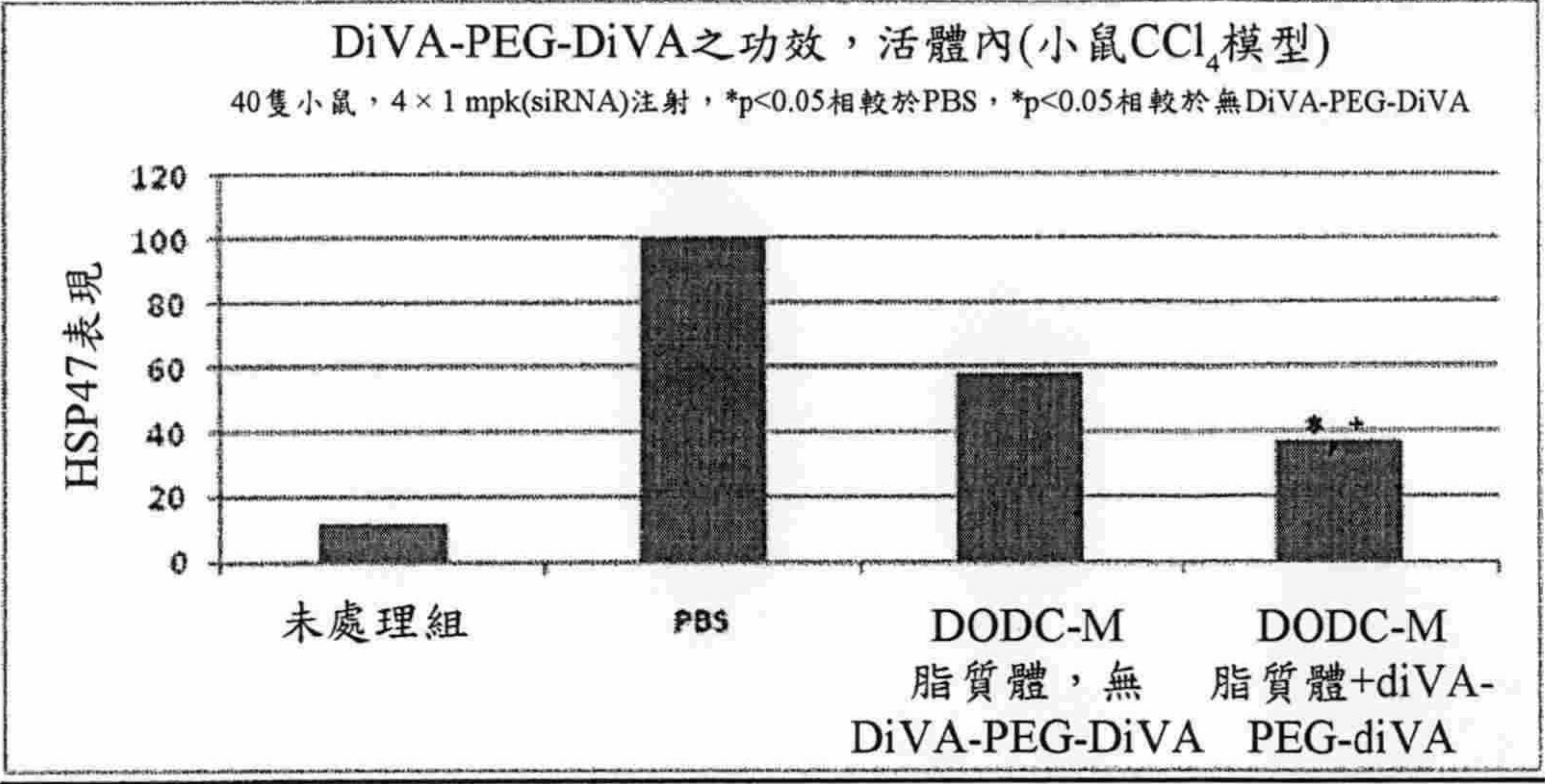


圖13

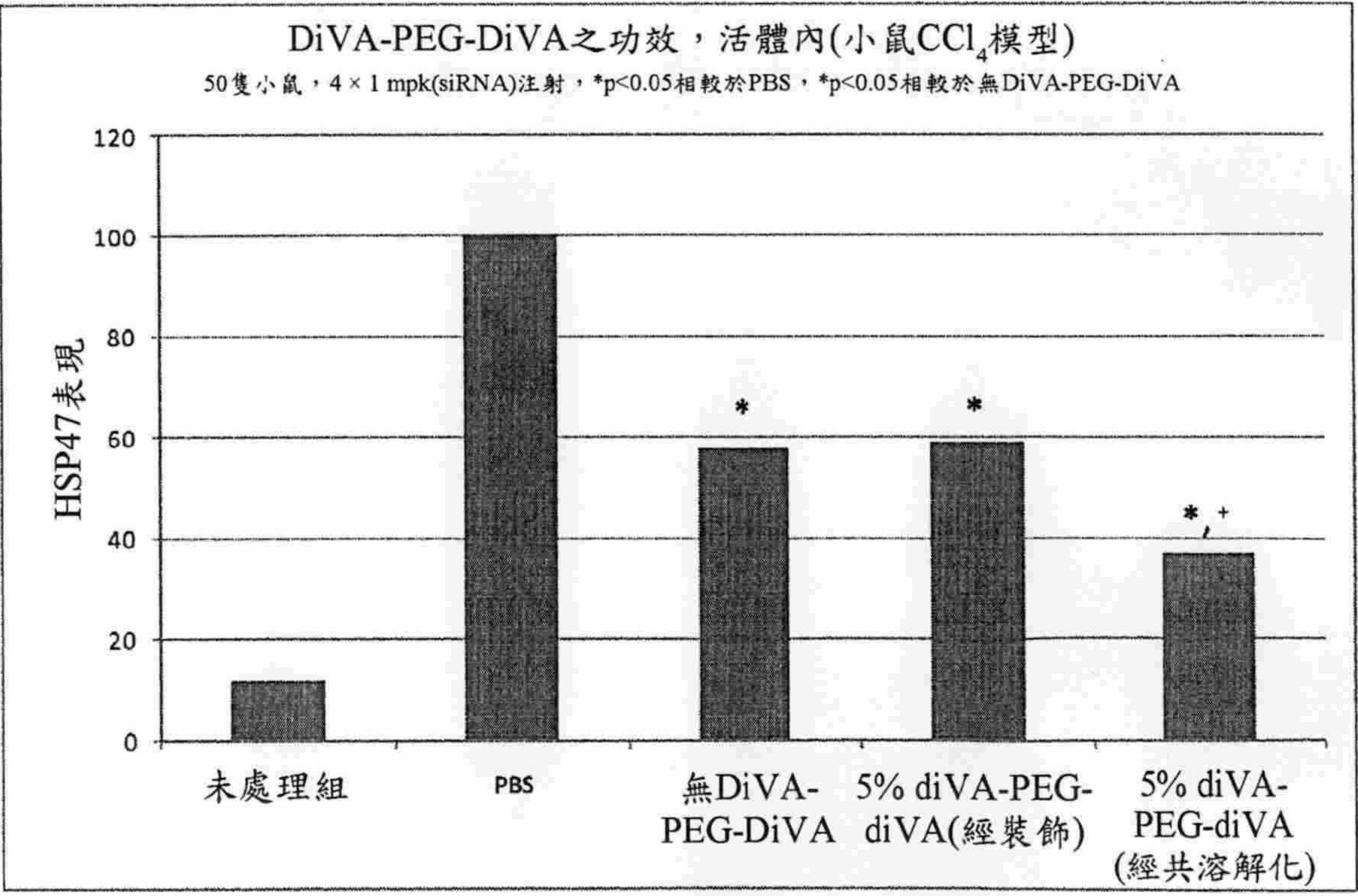


圖14

脂質中之類視色素結合物效應，活體外功效(pHSC)

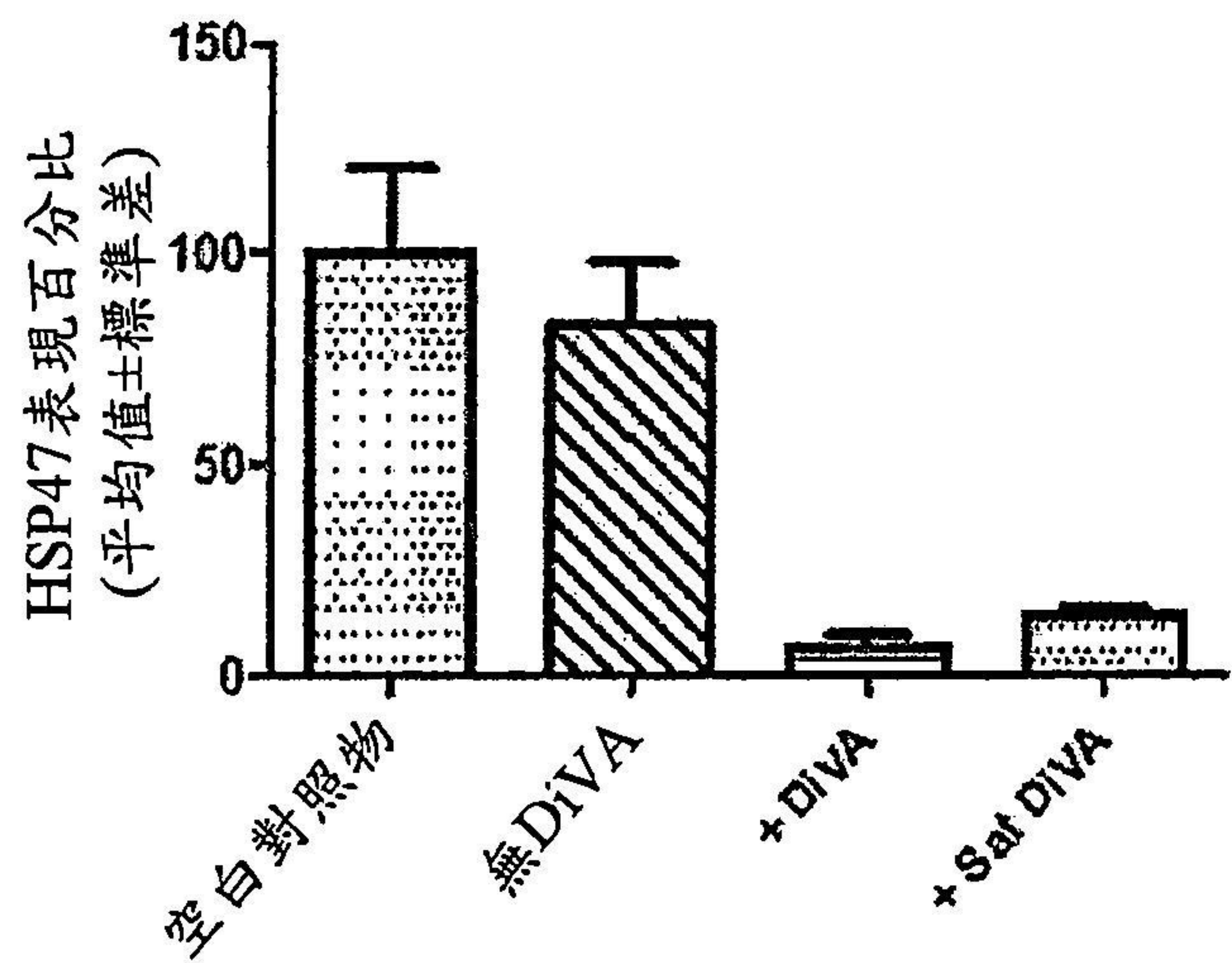


圖15

DiVA含量與活體內(大鼠DMNQ)功效之關係

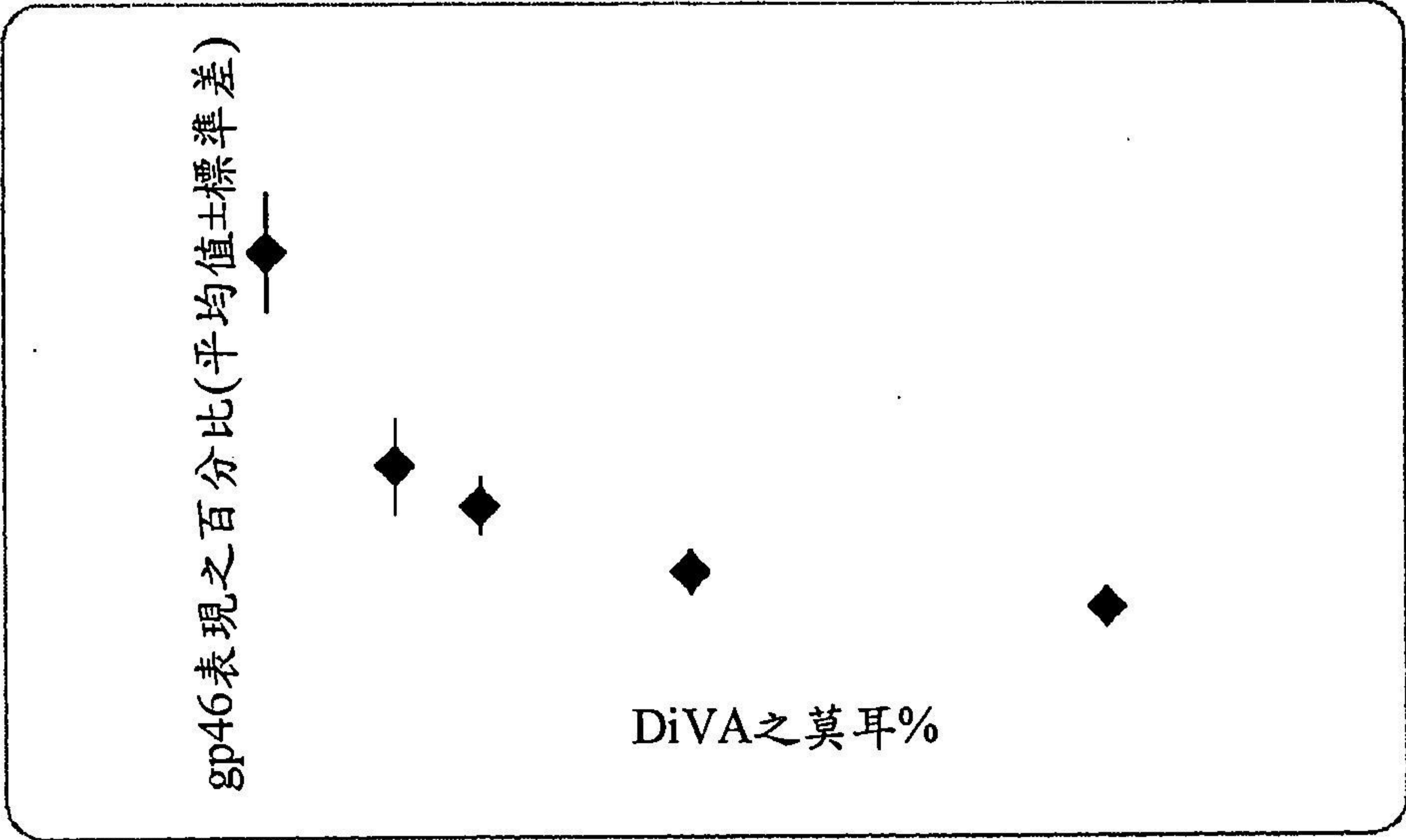


圖16