



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201713365 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：105123126

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 07 月 21 日

(51)Int. Cl.：

A61K47/48 (2006.01)

A61K33/24 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

(30)優先權：2015/07/22

美國

62/195,654

(71)申請人：華上生技醫藥股份有限公司 (中華民國) GNT BIOTECH & MEDICALS CORPORATION (TW)

臺北市內湖區瑞光路 258 巷 52 號

(72)發明人：廖玉容 LIAO, YU JUNG (TW)；黃偉展 HUANG, WEI JAN (TW)；陳嘉南 CHEN, CHIA NAN (TW)；林煥妤 LIN, HUAN YU (TW)；林靜怡 LIN, CHING YI (TW)；蔡孟儒 TSAI, MENG JU (TW)；徐婉貽 HSU, WAN YI (TW)；紀俐伶 CHI, LILING (TW)；趙月秀 CHAO, YE SU (TW)；吳奕宏 WU, YI HONG (TW)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：34 項 圖式數：6 共 87 頁

(54)名稱

遞送治療藥物之 PH-敏感性的連接物

PH-SENSITIVE LINKERS FOR DELIVERING A THERAPEUTIC AGENT

(57)摘要

本發明提供一種 pH-敏感性連接物，其可同時結合金屬奈米粒子及一或多種具有各種分子尺寸之藥物。本發明連接物可將該等藥物遞送至涉及疾病過程之細胞中或接近該等細胞，使得該等藥物可選擇性地靶向且作用於該等細胞。本發明連接物所提供之靶向遞送可用於例如疾病感測、成像、藥物遞送及療法。

The invention provides a pH-sensitive linker that can simultaneously bind metallic nanoparticles and one or more agents with various molecular size. The linker of the invention can deliver the agents into cells involved in disease processes or close to cells so that the agents can selectively target and effect on the cells. The target delivery provided by the linker of the invention can be used for example for disease sensing, imaging, drug delivery, and therapy.

指定代表圖：

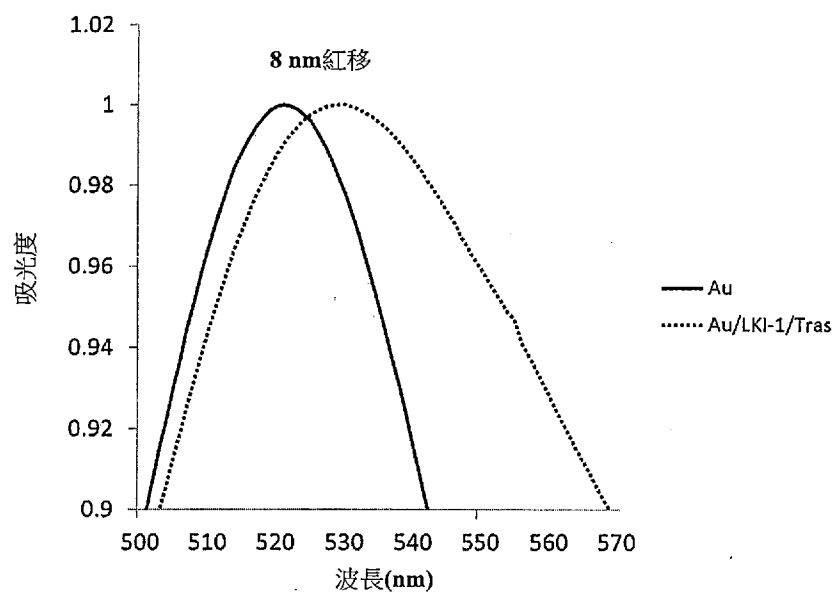
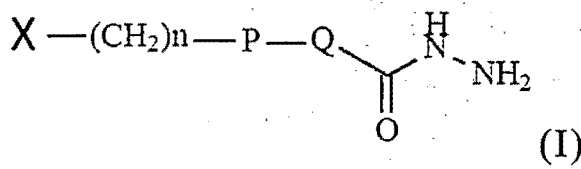


圖3

特徵化學式：



發明摘要

※ 申請案號：105123126

※ 申請日：105.7.21

※IPC 分類：A61K 47/48 (2006.01)

A61K 33/44 (2006.01)

A61K 39/95 (2006.01)

【發明名稱】

遞送治療藥物之PH-敏感性的連接物

PH-SENSITIVE LINKERS FOR DELIVERING A THERAPEUTIC
AGENT

【中文】

本發明提供一種pH-敏感性連接物，其可同時結合金屬奈米粒子及一或多種具有各種分子尺寸之藥物。本發明連接物可將該等藥物遞送至涉及疾病過程之細胞中或接近該等細胞，使得該等藥物可選擇性地靶向且作用於該等細胞。本發明連接物所提供之靶向遞送可用於例如疾病感測、成像、藥物遞送及療法。

【英文】

The invention provides a pH-sensitive linker that can simultaneously bind metallic nanoparticles and one or more agents with various molecular size. The linker of the invention can deliver the agents into cells involved in disease processes or close to cells so that the agents can selectively target and effect on the cells. The target delivery provided by the linker of the invention can be used for example for disease sensing, imaging, drug delivery, and therapy.

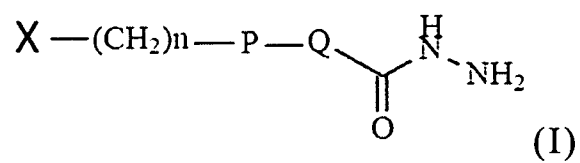
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(3)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】

遞送治療藥物之PH-敏感性的連接物

PH-SENSITIVE LINKERS FOR DELIVERING A THERAPEUTIC
AGENT

【技術領域】

本發明係關於一種可連接藥物及奈米粒子之連接物。特別地，本發明連接物為pH-敏感性的，且可同時結合至奈米粒子及相同或不同類型之藥物。

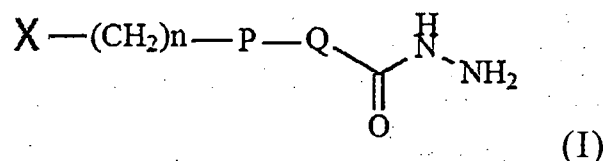
【先前技術】

向細胞(尤其向細胞溶質)特定、有效地遞送治療及診斷化合物為許多醫藥公司之主要目標。已使用多種不同方法以提昇特定性及吸收量。舉例而言，奈米技術已廣泛地用於藥物遞送及癌症療法之新策略的研發中。已研發出pH-敏感性奈米系統，其中具體藉由酸性腫瘤環境來觸發藥物釋放，且此等系統可改良癌症治療之功效。Feng Wnang等人經由酸不穩定鍵將多柔比星(doxorubicin)繫鏈至具有聚(乙二醇)位置之AuNP的表面上研發出藥物遞送系統(*American Chemical Society*, 2011, 第5卷, 第5期, 第3679頁-第3692頁)。Tian-Meng Sun等人揭示一種癌症幹細胞療法，其使用經由脰鍵結合至金奈米粒子之多柔比星(*Biomaterials* 35, 2014, 第836頁-第845頁)。US 2013/0331764係關於一種將抗癌藥物遞送至癌細胞中之方法，其藉由使該抗癌藥物結合至pH-敏感性金屬奈米粒子，以使該等pH-敏感性金屬奈米粒子與癌細胞分開。WO 2013/139942提供一種包含金屬奈米粒子及至少一種連接物之奈米粒子。

然而，仍需要研發具有更佳功效之pH-敏感性遞送系統。

【發明內容】

本發明提供一種具有下式(I)之pH-敏感性連接物，



其中

X為 、-SH、-NH₂ (Boc-NH-；Fmoc-NH-)、-COOH；

n為1至6；

P為-C(O)NH-或-C(O)O-；

Q為-R(CH₂CH₂O)_m-、R(-C(O)NH-)_z或-R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]Y；

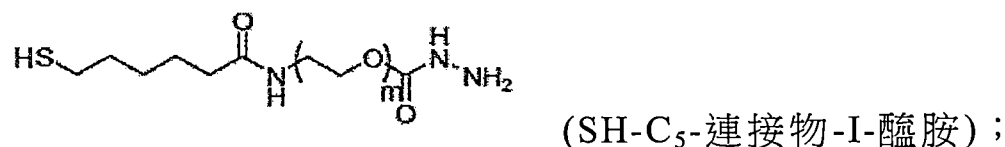
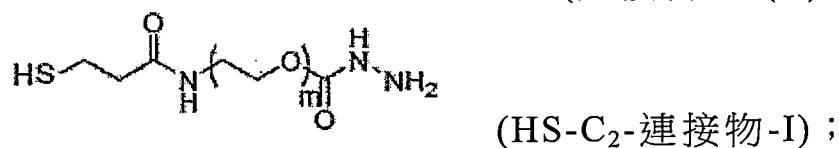
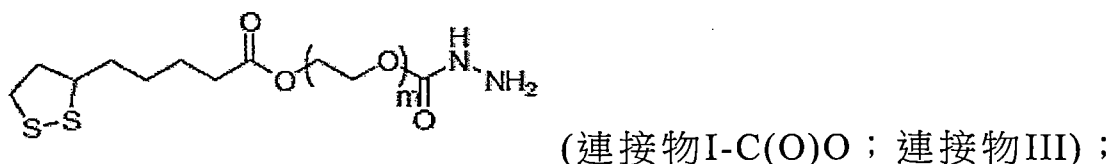
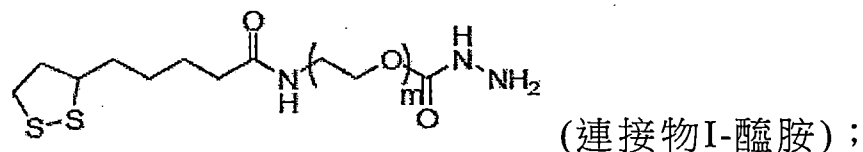
R為鍵、-C₁₋₁₂烷基或C₁₋₁₀烷氧基；

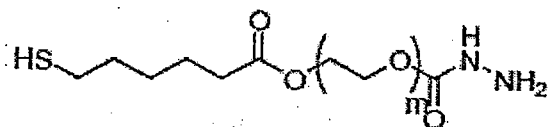
m為1至12；

z為1至4；且

Y為1至12。

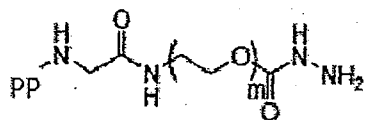
在一些實施例中，該連接物具有下式：



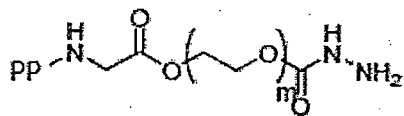


(SH-C₅-連接物-I-C(O)O- ; HS-C₅-

連接物-III ;

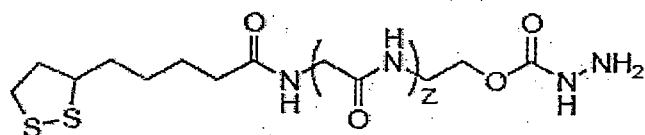


(ppNH-C₁-連接物-I-醯胺)

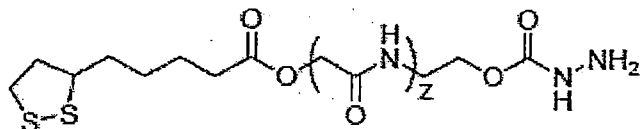


(ppNH-C₁-連接物-I-C(O)O- ; NH₂-C₁-連接

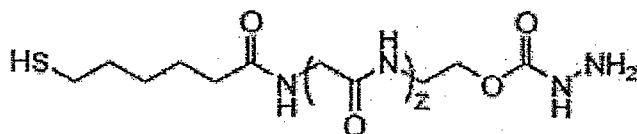
物-III-C(O)O-) ;



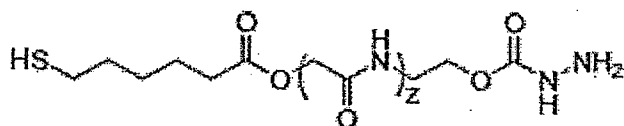
(連接物II-醯胺) ;



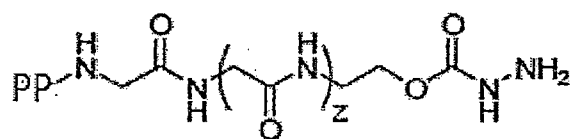
(連接物II-C(O)O-) ;



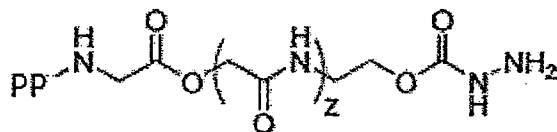
(SH-C₅-連接物-II-醯胺) ;



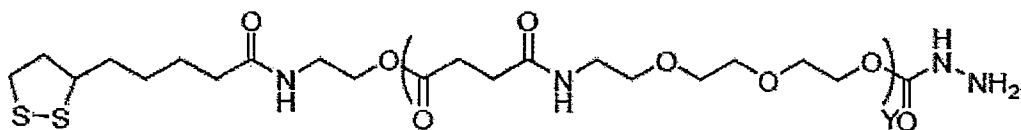
(SH-C₅-連接物-II-C(O)O-) ;



(ppNH-C₁-連接物-II-醯胺) ;

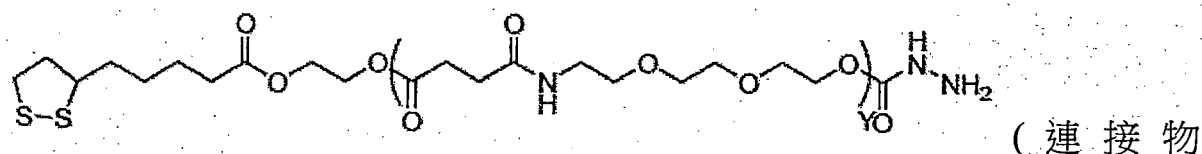


(ppNH-C₁-連接物-II-C(O)O-) ;

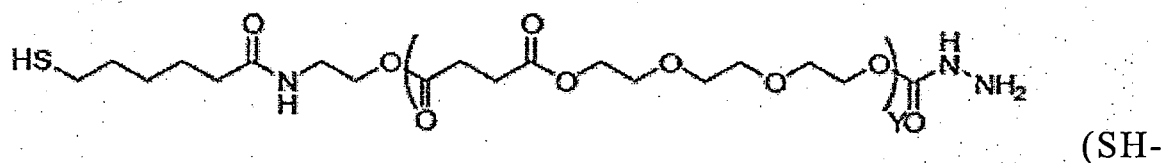


(連接物

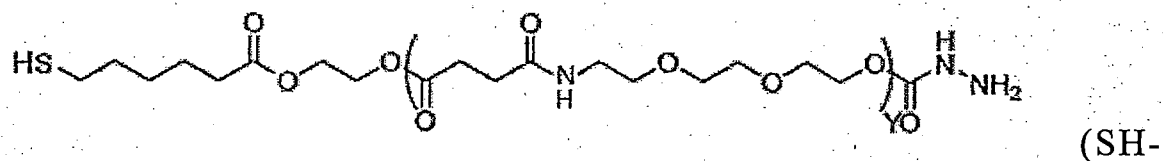
IV-醯胺) ;



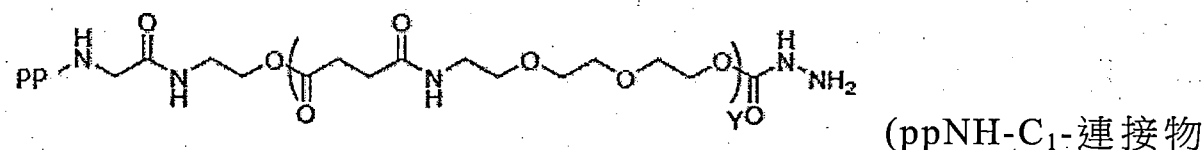
IV-C(O)O-);



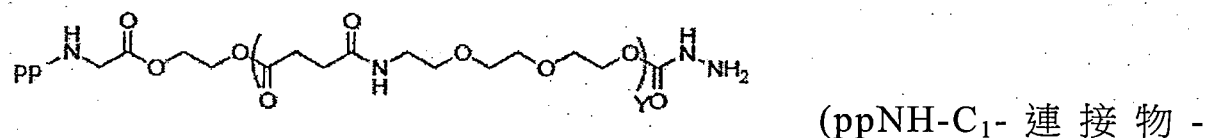
C₅-連接物-IV-醯胺);



C₅-連接物-IV-C(O)O-);



-IV-醯胺); 或



IV-C(O)O-)。

本發明亦提供一種金屬奈米粒子錯合物，其包含與一或多種本發明之連接子錯合、視情況與一或多種PEG錯合的金屬奈米粒子。在一個實施例中，該等金屬奈米粒子為Au、Pd、Pt或Ag奈米粒子。在一個實施例中，該連接物為相同或不同的。更佳地，該金屬奈米粒子錯合物包含複數個具有不同分子長度之連接物。

本發明亦提供一種組合物，其包含連接一或多種相同或不同治療或診斷藥物的一或多種金屬奈米粒子錯合物及醫藥學上可接受之載劑。

本發明亦提供一種藥物遞送系統，其包含連接一或多種相同或不同治療或診斷藥物的一或多種金屬奈米粒子錯合物。

【圖式簡單說明】

圖 1(A)至(C)展示結合至金奈米粒子(Au/LKI-1/mAb-p24)上之抗 HIV-1 p24 抗體(mAb3)仍展示出結合親和力。(A) Au/LKI-1/mAb-p24 錯合物及 Au 之吸收光譜。Au/LKI-1/mAb-p24 錯合物展示電漿子峰之 2 nm 紅移。(B) Au/LKI-1/mAb-p24 錯合物展示用 Alexa Fluor 568 二級抗體偵測到之螢光。(C) ELISA 分析用於展現 Au/LKI-1/mAb-p24 錯合物之形成及 p24 抗原之結合活性，以與 mAb-p24 進行比較。

圖 2(A)至(B)展示結合至金奈米粒子(Au/LKI-1/Ab-EGFR 及 Au/LKI-5/Ab-EGFR)及 Au 上之 EGFR (表皮生長因子受體)抗體的吸收光譜。(A) Au/LKI-1/Ab-EGFR 錯合物展示電漿子峰之 1 nm 紅移。(B) Au/LKI-5/Ab-EGFR 錯合物展示電漿子峰之 1 nm 紅移。

圖 3 展示結合至金奈米粒子(Au/LKI-1/Tras)及 Au 上之曲妥珠單抗 (Trastuzumab ; Tras)抗體的吸收光譜。Au/LKI-1/Tras 錯合物展示電漿子峰之 8 nm 紅移。

圖 4(A)至(C)展示結合至金奈米粒子(Au/LKI-1/ETA)上之依那西普(Etanercept ; ETA)仍展示結合親和力。(A) Au/LKI-1/ETA 錯合物及 Au 之吸收光譜。Au/LKI-1/ETA 錯合物展示電漿子峰之 2 nm 紅移。(B) Au/LKI-1/ETA 錯合物展示用 Alexa Fluor 568 二級抗體偵測到之螢光。(C) 觀測到 Au/LKI-1/ETA 錯合物、1-5 nm 金標記之二級抗人類 IgG 抗體結合至定位於 Au 表面上之 ETA 的 TEM 影像。

圖 5 展示 Au/LKI-1/Dox 錯合物及 Au 之吸收光譜。UV/vis 資料、波長展示 Au/LKI-1/Dox 錯合物之 3 nm 紅移。

圖 6(A)至(D)展示 MDA-MB-231 乳房腫瘤之治療。(A)在治療期間之動物淨重量改變(g)。自資料看出，多柔比星及 Au/LKI-1/Dox 分別導致裸鼠(N=3)重量減輕超過 20% 及 3%。彼意謂與多柔比星相比，Au/LKI-1/Dox 錯合物對裸鼠的毒性少得多。(B) MDA-MD-231 乳房腫

瘤生長(N=3)之抑制：Dox > Au/LKI-1/Dox > Au/PEG=PBS。(C)用Au/LKI-1/Dox錯合物處理之MDA-MB-231乳房腫瘤細胞的TEM影像易於測定異種移植模型中腫瘤中的Au/LKI-1/Dox錯合物。(D)腫瘤樣本之免疫組織化學。乳房腫瘤樣本獲自小鼠，嵌入於石蠟中，且用蘇木精曙紅染色。與用Au/LKI-1/Dox錯合物處理之來自小鼠之腫瘤相比，在用多柔比星處理之來自小鼠之腫瘤中觀測到更多的壞死。

【實施方式】

本發明係基於至少一種以下發現：pH敏感性連接物可同時結合金屬奈米粒子及一或多種具有各種分子大小之藥物。本發明連接物可將該等藥物遞送至涉及疾病過程之細胞中或接近該等細胞，使得該等藥物可選擇性地靶向且作用於該等細胞。由本發明連接物提供之靶向遞送可用於例如疾病感測、成像、藥物遞送及療法。

除非另外定義，否則本文中所用之所有技術及科學術語之含義係與一般熟習此項技術者所通常理解之含義相同。除非另有說明，否則本文中所提及之所有專利、申請案、公開之申請案及其他公開案均以全文引用的方式併入。除非另外說明，否則在本文術語存在複數個定義之情況下，以此部分中之定義為準。

術語「抗體」係以最廣泛意義使用，且包括單株抗體(例如全長或完整單株抗體)、多株抗體、單價抗體、多價抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體，只要其展現所需生物活性)，且亦可包括某些抗體片段(如本文中所較較細描述)。抗體可為嵌合、人類、人類化及/或親和力成熟的。

如本文所用，術語「腫瘤」係指所有贅生性細胞生長及增殖(無論惡性或良性)，及所有癌前及癌細胞以及組織。術語「癌症」、「癌性」、「細胞增殖性病征」、「增殖性病征」及「腫瘤」在本文中提及時不相互排斥。

如本文所使用，術語「癌症」係指哺乳動物中之生理狀況，其特徵通常為不受調控之細胞生長/增殖。癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤(例如霍奇金氏(Hodgkin's)及非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma))、母細胞瘤、肉瘤及白血病、鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀癌、腹膜癌、肝細胞癌、腸胃癌、胰臟癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝腫瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎臟癌、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌瘤、白血病及其他淋巴增殖性病症及各種類型之頭頸癌。

如本文所使用，術語「治療(treating)」、「治療(treatment)」、「治療(therapeutic)」或「療法(therapy)」未必意謂疾病或病況完全治癒或消除。疾病或病況之任何不合需要之病徵或症狀在任何程度上的任何減輕均可視為治療(treatment及/或therapy)。此外，治療可包括會使患者總體健康或外觀感覺惡化之行動。

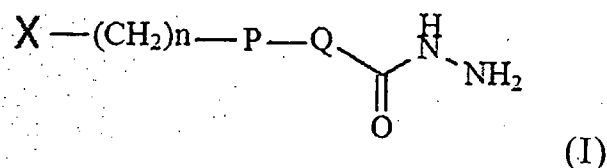
「有效量」係指在所需劑量及時段下，可有效達成所需治療或預防結果之量。

本發明之物質/分子的「治療有效量」可根據諸如以下因素變化：疾病病況、年齡、性別、及個體重量、及在個體中引起所需反應之物質/分子的能力。治療有效量亦為治療有益效應超過物質/分子之任何毒性或有害效應之量。「預防有效量」係指在所需劑量及時間段下，可有效實現所需預防結果之量。通常但未必，因為在疾病之前或在疾病早期在個體中使用預防劑量，所以預防有效量將低於治療有效量。

術語「醫藥學上可接受之鹽」係指對其所投與之生物體不產生顯著刺激且不消除化合物之生物活性及特性的化合物之鹽。

在一個態樣中，本發明提供一種具有下式(I)之pH-敏感性連接

物，



其中

X為 、-SH、-NH₂ (Boc-NH-；Fmoc-NH-)、-COOH；

n為1至6；

P為-C(O)NH-或-C(O)O-；

Q為-R(CH₂CH₂O)_m-、R(-C(O)NH-)_z或-R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]Y；

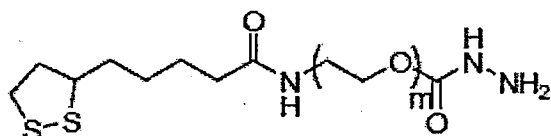
R為鍵、-C₁₋₁₂烷基或C₁₋₁₀烷氧基；

m為1至12；

z為1至4；且

Y為1至12。

在一些實施例中，本發明連接物具有下式：

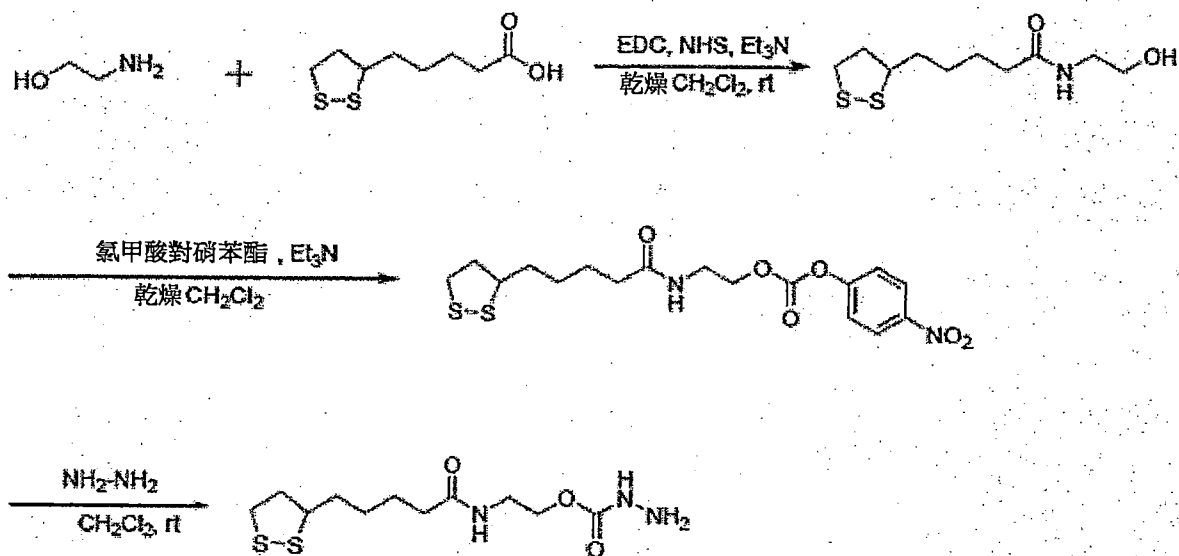


(連接物I-醯胺)，

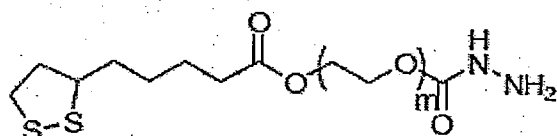
其中m為1至12。

連接物I-醯胺具有式(I)，其中X為 ，n為4，P為C(O)NH，R為鍵且Q為-R(CH₂CH₂O)_m-。較佳地，m為整數1至6。更佳地，m為整數2。

鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之連接物I-醯胺連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。



在一些實施例中，本發明連接物具有下式：

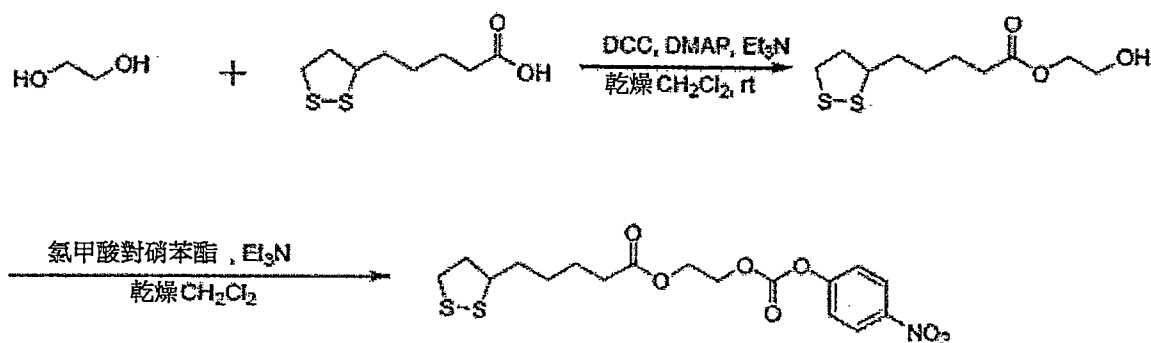


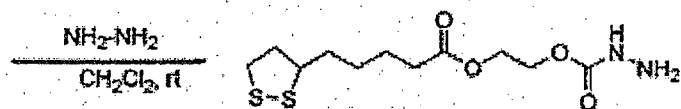
(連接物I-C(O)O；連接物III)，

其中m為1至12。

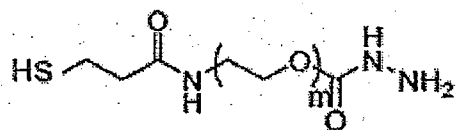
連接物I-C(O)O (連接物III)具有式(I)，其中X為 ，n為4，P為-C(O)O-，R為鍵，Q為-R(CH₂CH₂O)_m-，且m為1至12。更佳地，m為整數2。

鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之連接物I-C(O)O (連接物III)連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。





在一些實施例中，本發明連接物具有下式：

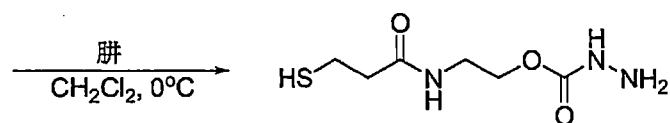
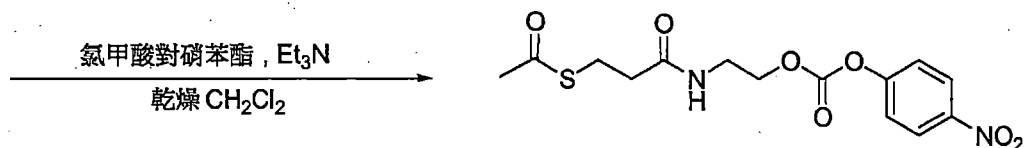
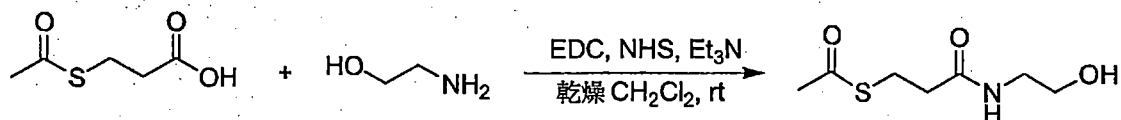


(SH-C₂-連接物-I)，

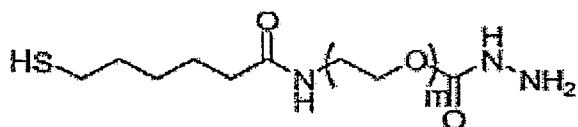
其中m為1至12。

連接物SH-C₂-連接物-I具有式(I)，其中X為-SH，n為2，P為-C(O)NH-，R為鍵，Q為-R(CH₂CH₂O)_m-，且m為1至12。更佳地，m為整數2。

鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之SH-C₂-連接物-I連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。



在一些實施例中，本發明連接物具有下式：

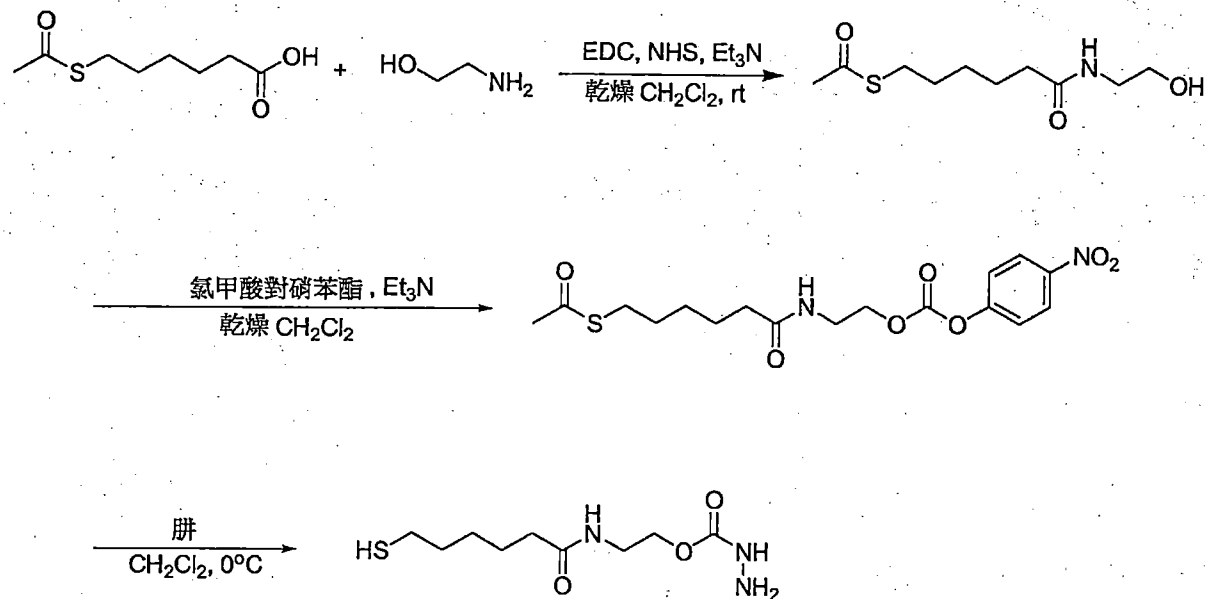


(SH-C₅-連接物-I-醯胺)，

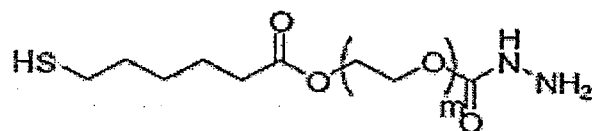
其中m為1至12。

連接物SH-C₅-連接物-I-醯胺具有式(I)，其中X為-SH，n為5，P為-C(O)NH-，R為鍵，Q為-R(CH₂CH₂O)_m-，且m為1至12。更佳地，m為整數2。

鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之SH-C₅-連接物-I-醯胺連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。



在一些實施例中，本發明連接物具有下式：



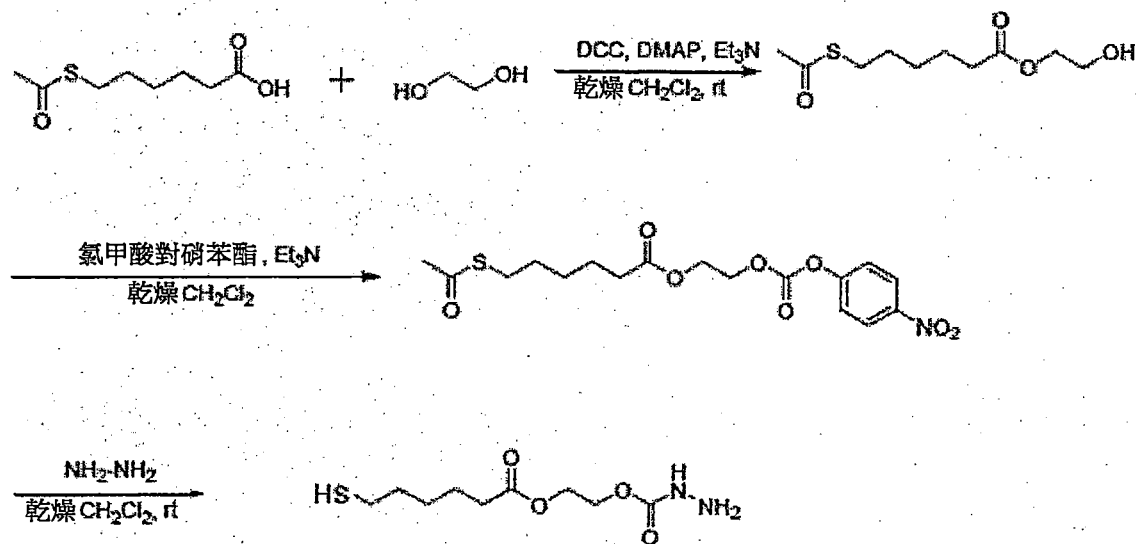
(SH-C₅-連接物-I-C(O)O-；

SH-C₅-連接物-III)，

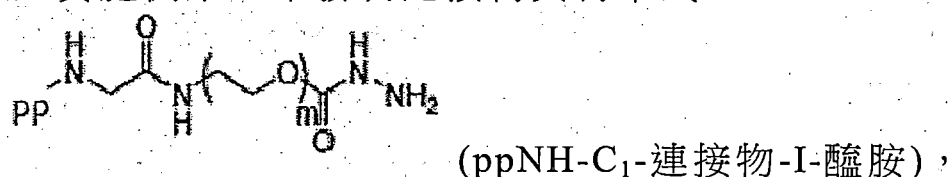
其中m為1至12。

SH-C₅-連接物-I-C(O)O- (SH-C₅-連接物-III)具有式(I)，其中X為-SH，n為5，P為-C(O)O-，R為鍵，Q為-R(CH₂CH₂O)_m-，且m為1至12。較佳地，m為整數1至6。更佳地，m為整數2。

鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之SH-C₅-連接物-I-C(O)O- (SH-C₅-連接物-III)連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。



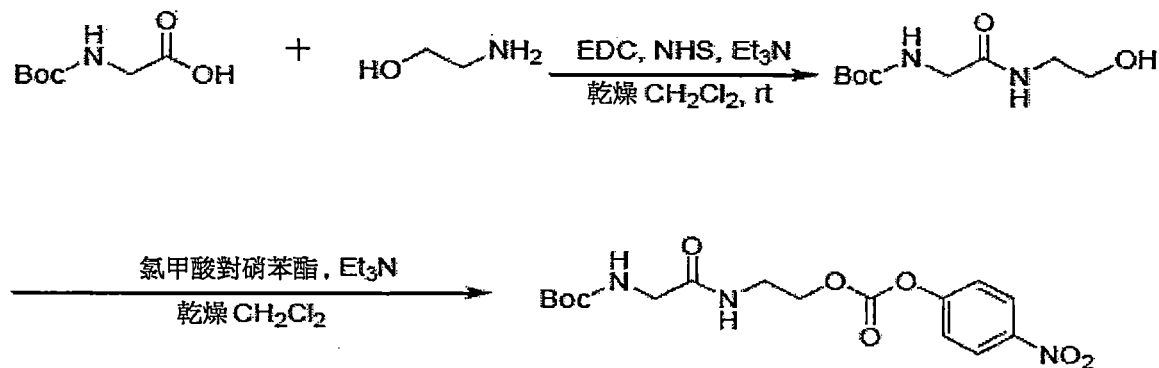
在一些實施例中，本發明連接物具有下式：

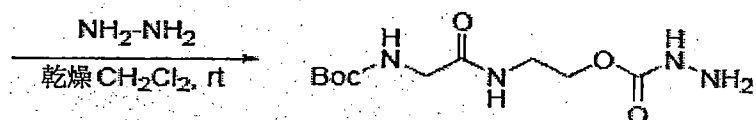


其中pp為保護基(諸如Boc或Fmoc)；且m為1至12。

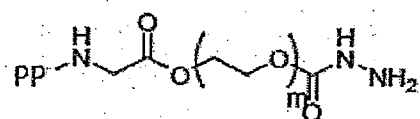
NH₂-C₁-連接物-I-醯胺具有式(I)，其中X為pp-NH-；pp為保護基(諸如Boc或Fmoc)，n為1，P為-C(O)NH-，R為鍵，Q為-R(CH₂CH₂O)_m-，且m為1至12。較佳地，m為整數1至6。更佳地，m為整數2。

鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之NH₂-C₁-連接物-I-醯胺連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。





在一些實施例中，本發明連接物具有下式：



(ppNH-C₁-連接物-I-C(O)O-；NH₂-C₁-連

接物-III-C(O)O-)，

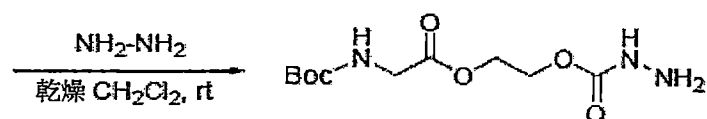
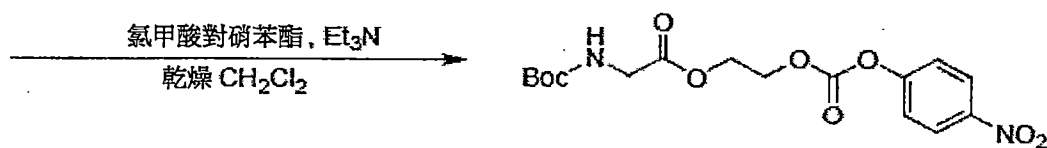
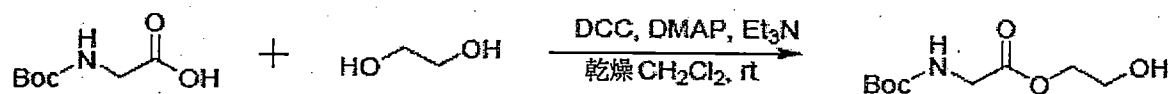
其中

PP為保護基(諸如Boc或Fmoc)；且

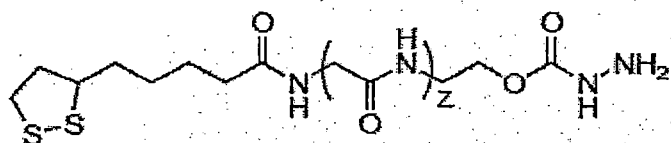
m為1至12。

ppNH-C₁-連接物-I-C(O)O- (ppNH-C₁-連接物-III-C(O)O-)具有式(I)，其中X為pp-NH- (pp為保護基，諸如Boc或Fmoc)，n為1，P為-C(O)O-，R為鍵，Q為-R(CH₂CH₂O)_m-，且m為1至12。較佳地，m為整數1至6。更佳地，m為整數2。

鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之ppNH-C₁-連接物-I-C(O)O- (ppNH-C₁-連接物-III-C(O)O-)連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。



在一些實施例中，本發明連接物具有下式：

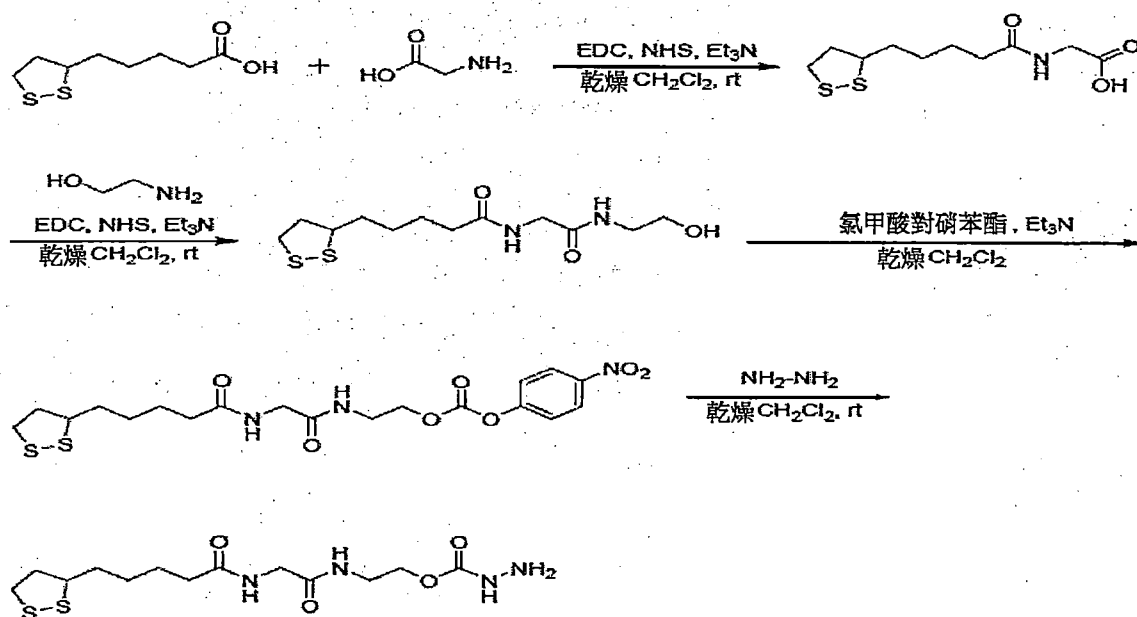


(連接物II-醯胺),

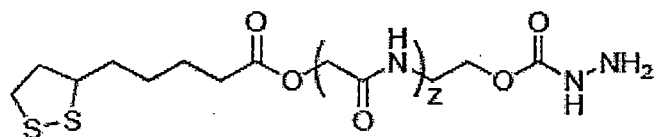
其中 z 為1至4。

連接物II-醯胺具有式(I), 其中X為 , n 為4, P為 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, R為鍵, Q為 $\text{R}(-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-)_z$, 且 z 為1至4。更佳地, z 為整數3。

鑒於本發明, 可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之連接物II-醯胺連接物。舉例而言, 可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。



在一些實施例中, 本發明連接物具有下式:



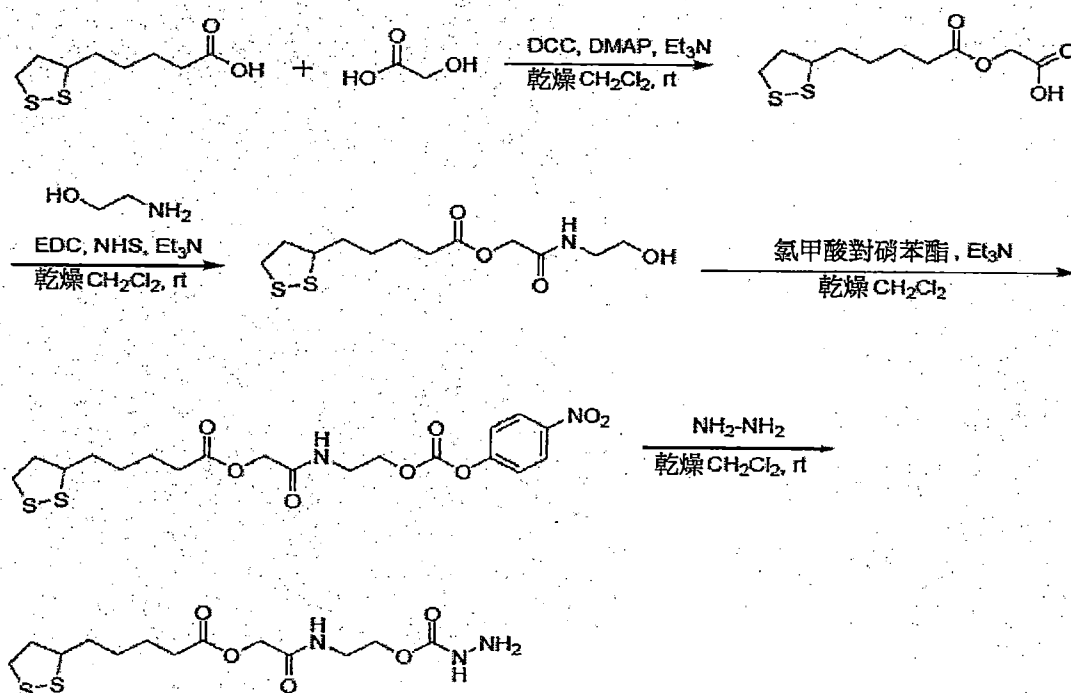
(連接物II-C(O)O-),

其中 z 為1至4。

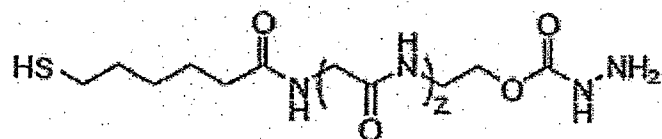
連接物II-C(O)O-具有式(I), 其中X為 , n 為4, P為 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, R為鍵, Q為 $\text{R}(-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-)_z$, 且 z 為1至4。更佳地, z 為整數3。

鑒於本發明, 可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之

連接物II-C(O)O-連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。



在一些實施例中，本發明連接物具有下式：



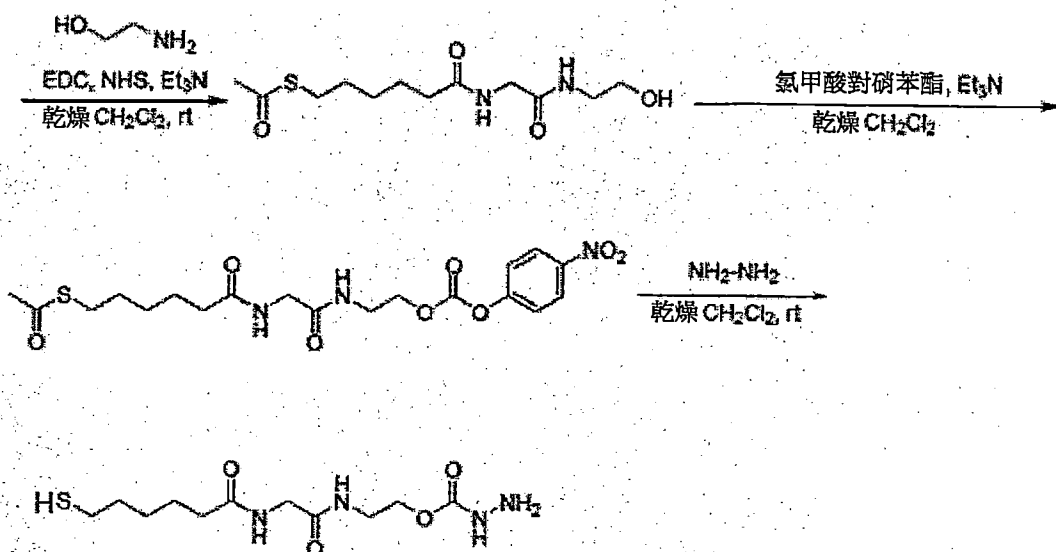
(SH-C₅-連接物-II-醯胺)，

其中z為1至4。

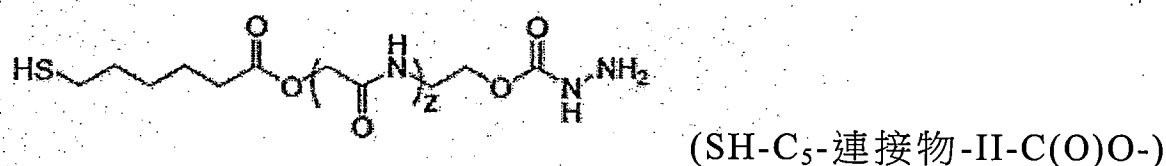
SH-C₅-連接物-II-醯胺具有式(I)，其中X為-SH，n為5，P為-C(O)NH-，R為鍵，Q為R(-CH₂C(O)NH-)z，且z為1至4。更佳地，z為整數3。

在其他實施例中，n為2。鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之SH-C₂₋₅-連接物-II-醯胺連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。





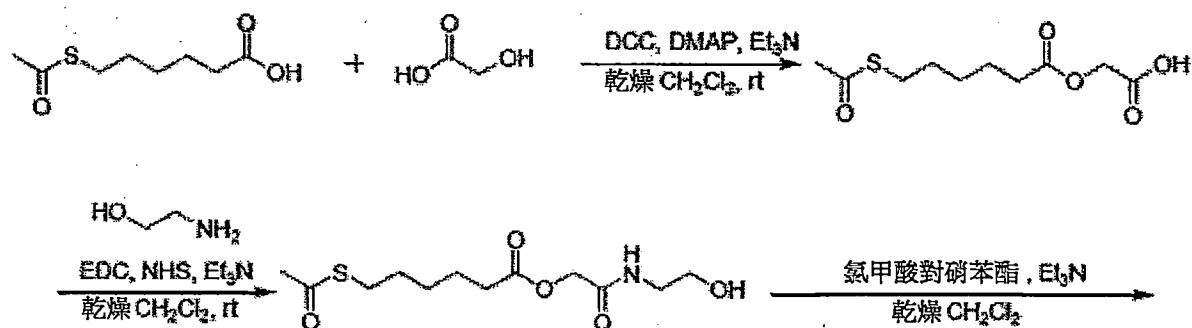
在一些實施例中，本發明連接物具有下式：

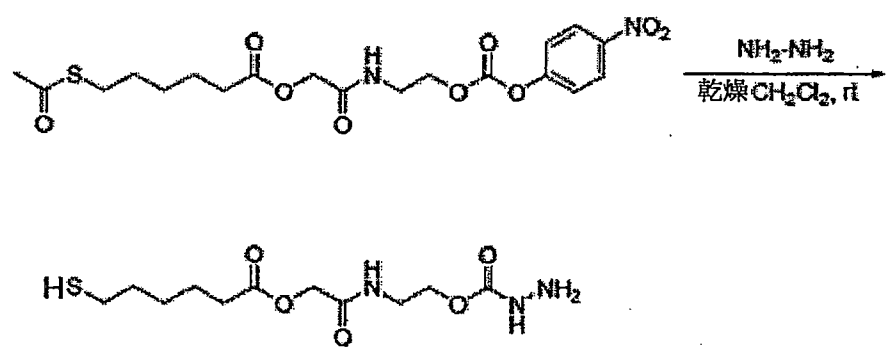


其中z為1至4。

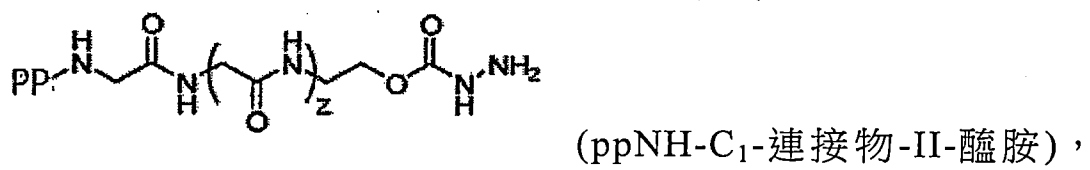
SH-C₅-連接物-II-C(O)O-具有式(I)，其中X為CH₃C(O)S-，n為5，P為-C(O)O-，R為鍵，Q為R(-CH₂C(O)NH-)z，且z為1至4。更佳地，z為整數3。

在其他實施例中，n為2。鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之SH-C₂₋₅-連接物-II-C(O)O-連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。





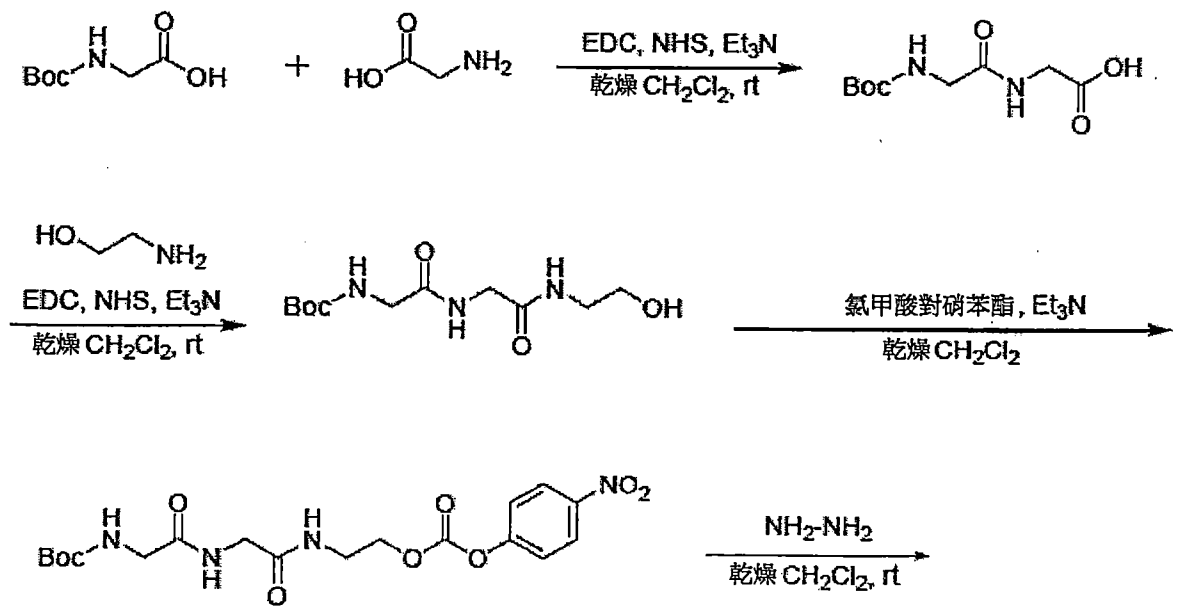
在一些實施例中，本發明連接物具有下式：



其中pp為保護基(諸如Boc或Fmoc)；且
z為1至4。

ppNH-C₁-連接物-II-醯胺具有式(I)，其中X為pp-NH-；pp為保護基(諸如Boc或Fmoc)，n為1，P為-C(O)NH-，R為鍵，Q為R(-C(O)NH-)z，且z為1至4。更佳地，z為整數3。

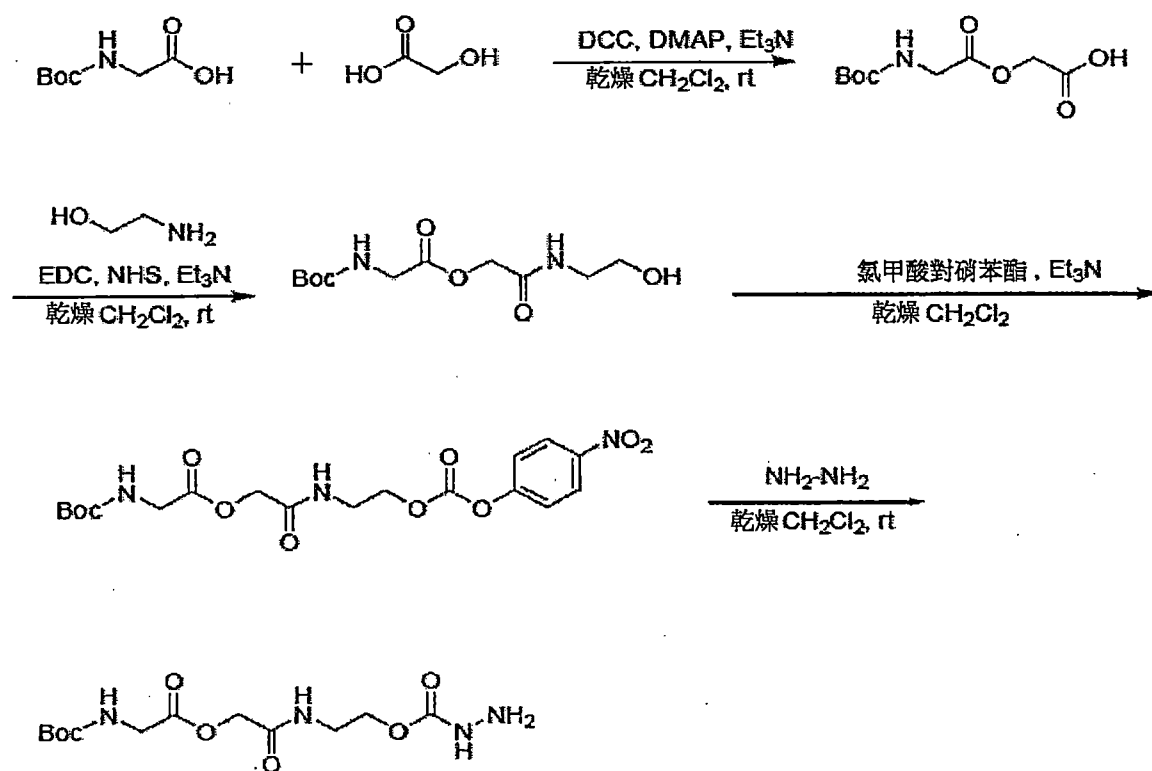
鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之ppNH-C₁-連接物-II-醯胺連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。



$$\text{PP:}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH})_z-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$$

z為1至4。

鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之 ppNH-C₁-連接物-II-C(O)O-連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。

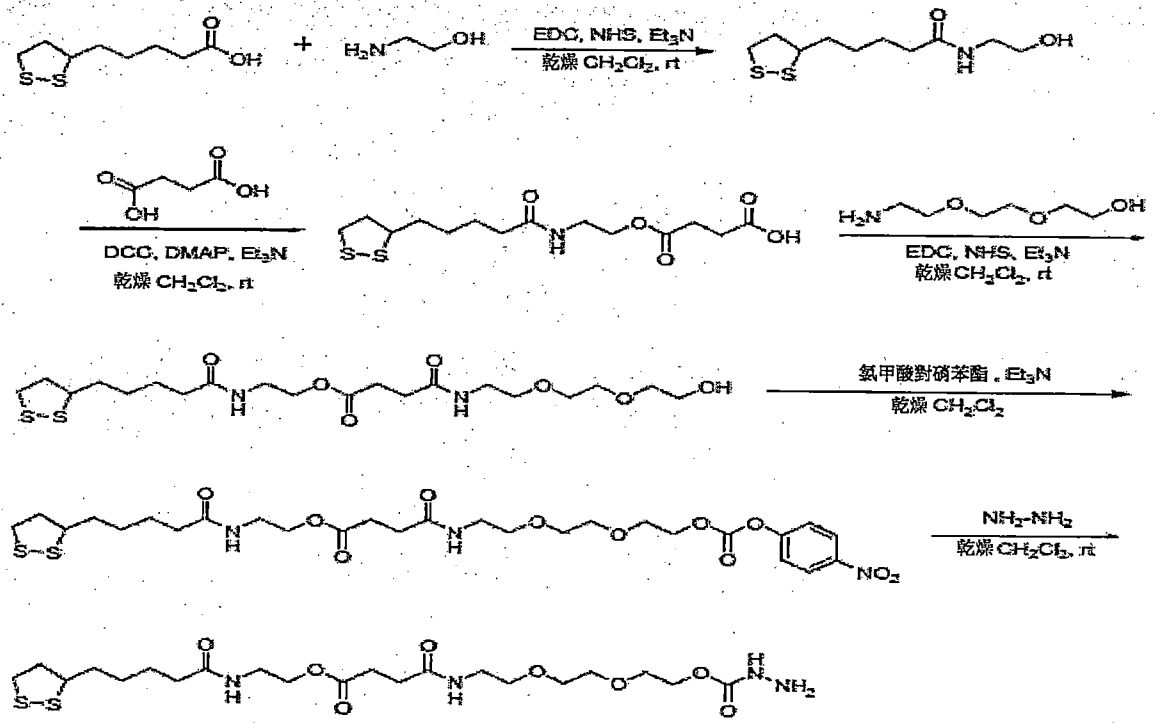
[illegible]

物IV-醯胺)，

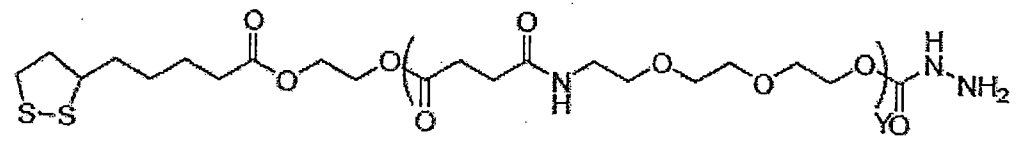
其中Y為1至12。

連接物IV-醯胺具有式(I)，其中X為，n為4，P為-C(O)NH-，R為-CH₂CH₂O-，Q為-R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]_Y，m為3且Y為1至12。較佳地，m為2且Y為2。

在其他實施例中，m為1-12。鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之連接物IV-醯胺連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。



在一些實施例中，本發明連接物具有下式：



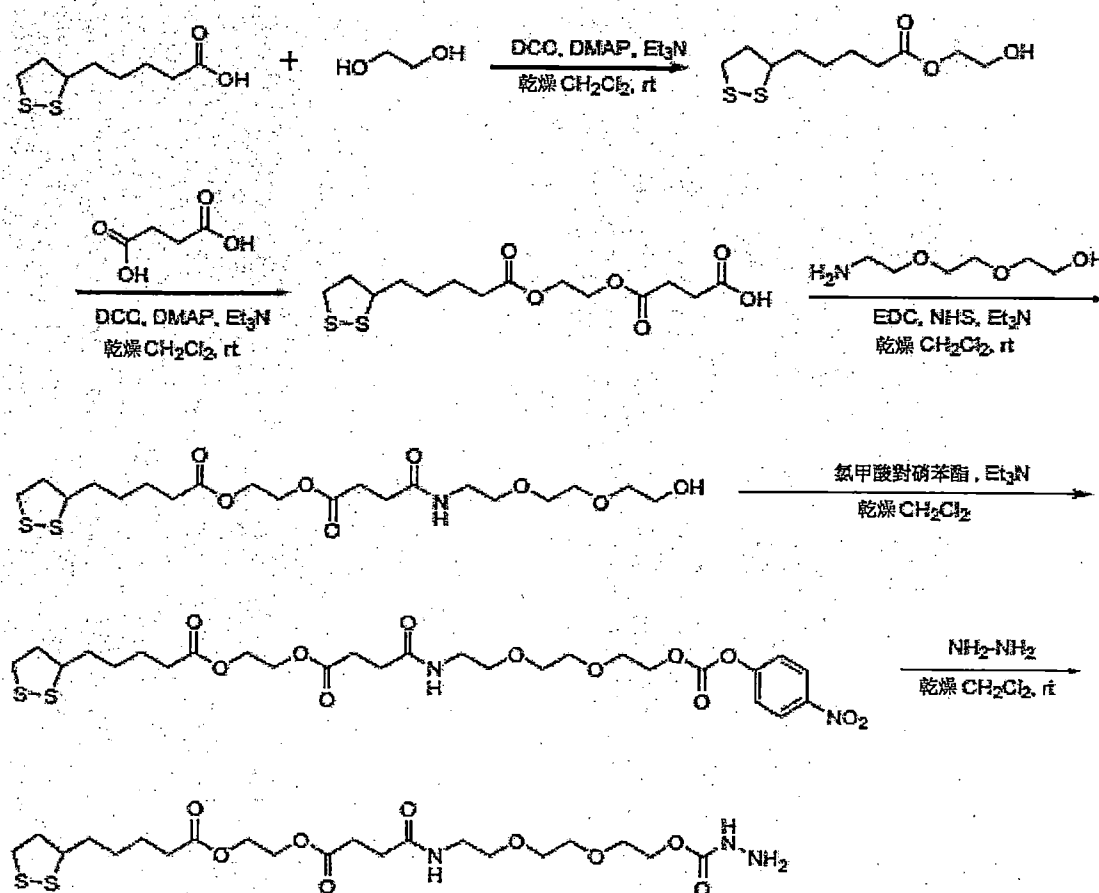
(連接物IV-C(O)O-)，

其中Y為1至12。

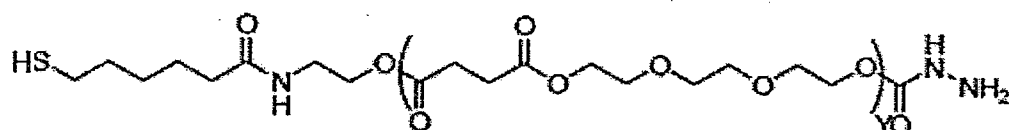
連接物IV-C(O)O-具有式(I)，其中X為，n為4，P為-C(O)O-，

R為 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ，Q為 $-\text{R}[-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m]_Y$ ，m為3且Y為1至12。更佳地，Y為整數2。

在其他實施例中，m為1-12。鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之連接物IV-C(O)O-連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。



在一些實施例中，本發明連接物具有下式：

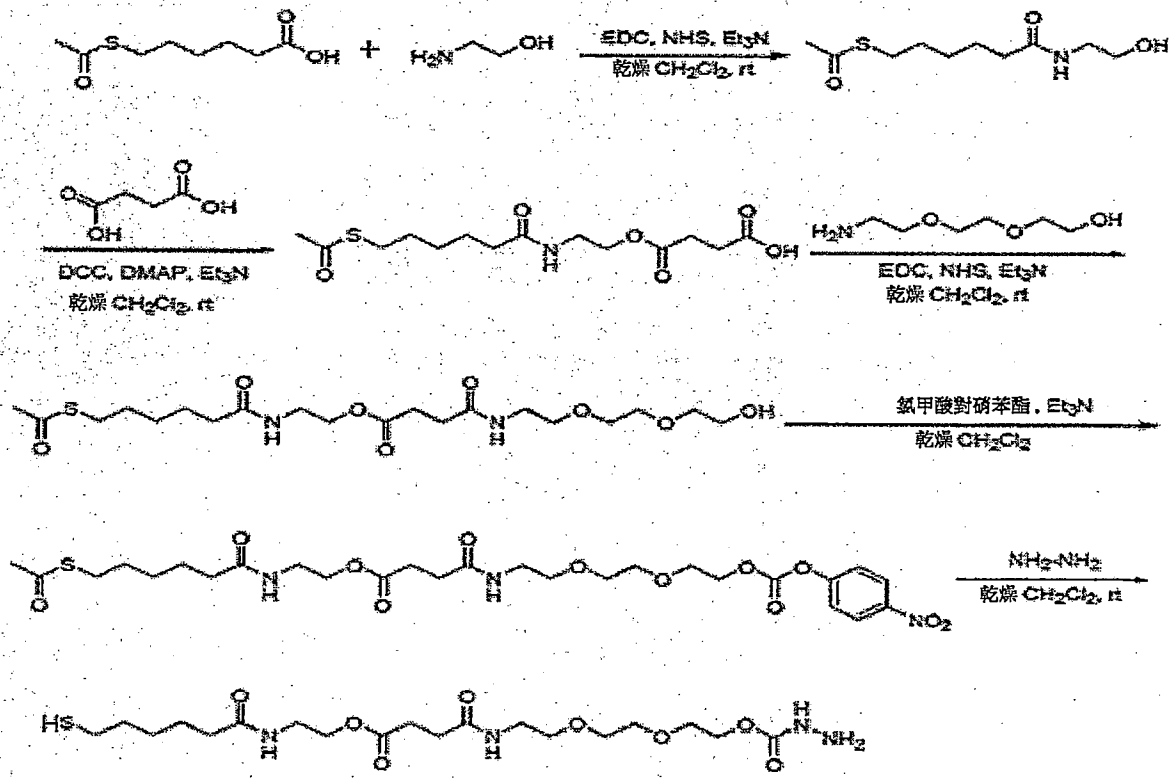


(SH-C₅-連接物-IV-醯胺)，

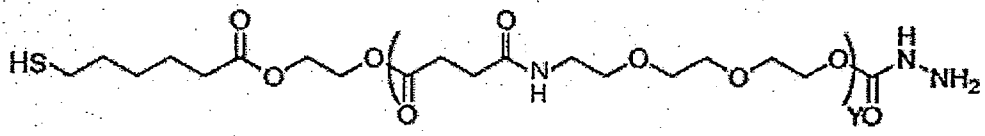
其中Y為1至12。

SH-C₅-連接物-IV-醯胺具有式(I)，其中X為 $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{S}-$ ，n為5，P為 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ，R為 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ，Q為 $-\text{R}[-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m]_Y$ ，m為3且Y為1至12。更佳地，Y為整數2。

在其他實施例中， n 為2或5且 m 為1-12。鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之連接物SH-C₂₋₅-連接物-IV-醯胺連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。



在一些實施例中，本發明連接物具有下式：



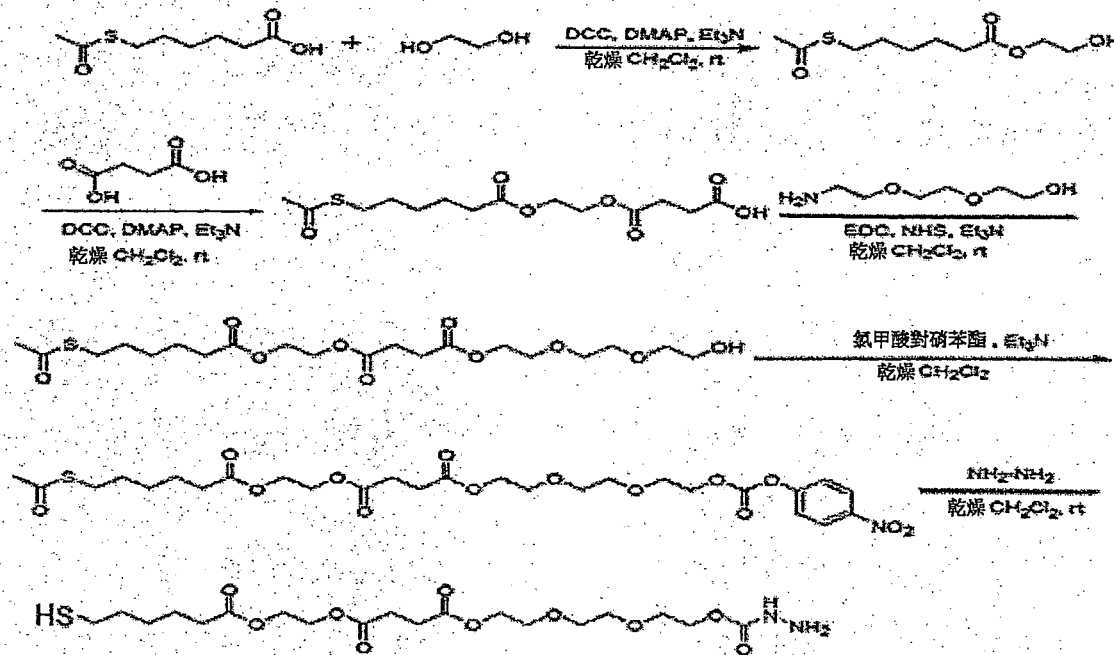
(SH-C₅-連接物-IV-C(O)O-)，

其中Y為1至12。

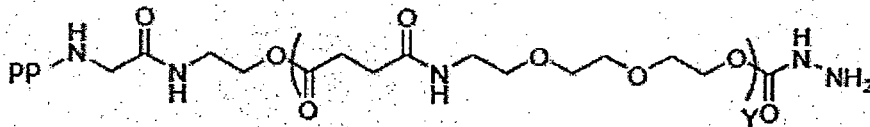
SH-C₅-連接物-IV-C(O)O-具有式(I)，其中X為CH₃C(O)S-， n 為5，P為-C(O)O-，R為-CH₂CH₂O-，Q為-R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O) _{m}] _{Y} ， m 為3且Y為1至12。較佳地，Y為整數1至6。更佳地，Y為整數2。

在其他實施例中， n 為2或5且 m 為1-12。鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之HS-C₂₋₅-連接物-IV-C(O)O-連

接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。



在一些實施例中，本發明連接物具有下式：



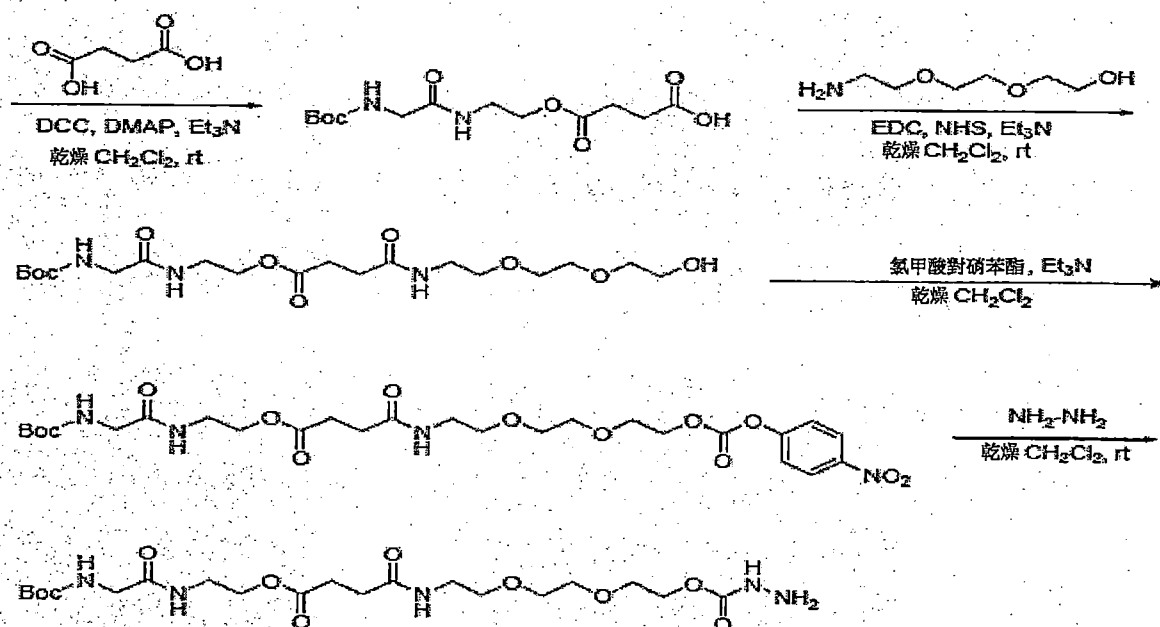
(ppNH-C₁-連接物-IV-醯胺),

其中pp為保護基(諸如Boc或Fmoc)；且Y為1至12。

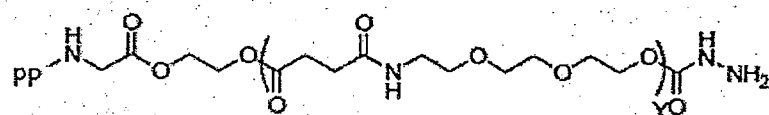
ppNH-C₁-連接物-IV-醯胺具有式(I)，其中X為pp-NH-；pp為保護基(諸如Boc或Fmoc)，n為1，P為-C(O)NH-，R為-CH₂CH₂O-，Q為-R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]_Y，m為3且Y為1至12。更佳地，Y為整數2。

在其他實施例中，m為1-12。鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之ppNH-C₁-連接物-IV-醯胺連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。





在一些實施例中，本發明連接物具有下式：



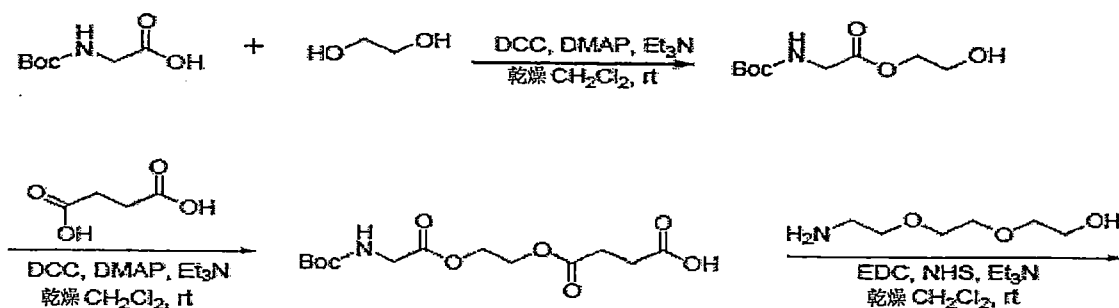
(ppNH-C₁-連接物 -

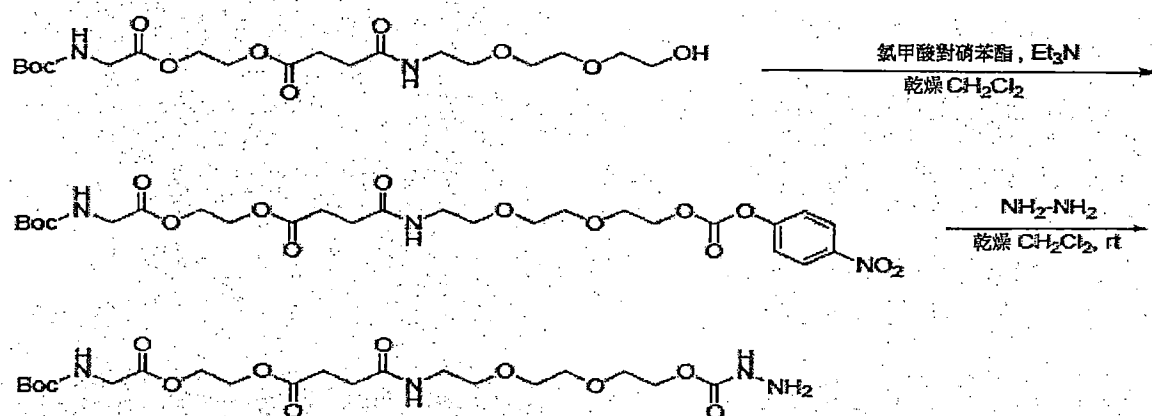
IV-C(O)O-),

其中pp為保護基(諸如Boc或Fmoc)；且Y為1至12。

ppNH-C₁-連接物-IV-C(O)O-具有式(I)，其中X為pp-NH-；pp為保護基(諸如Boc或Fmoc)，n為1，P為-C(O)O-，R為-CH₂CH₂O-，Q為-R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]_Y，m為3且Y為1至12。更佳地，Y為整數2。

在其他實施例中，m為1-12。鑒於本發明，可使用熟習此項技術者已知之方法製備本發明之ppNH-C₁-連接物-IV-C(O)O-連接物。舉例而言，可如以下流程中所展示製備本發明之較佳連接物。





在另一態樣中，本發明提供一種金屬奈米粒子錯合物，其包含與一或多種本發明之連接物錯合、視情況與一或多種PEG錯合的金屬奈米粒子。

在一個實施例中，該等金屬奈米粒子為Au、Pd、Pt或Ag奈米粒子。

在一個實施例中，該連接物為相同或不同的。更佳地，該金屬奈米粒子錯合物包含複數個具有不同分子長度之連接物。具有不同分子長度之連接物可結合不同治療或診斷藥物，其取決於待治療或診斷之靶細胞或疾病的需要。連接物經由該連接物中之1,2-二硫雜環戊烷基團或-SH基團之硫原子連接至金屬奈米粒子。

在一個實施例中，用於本發明之PEG之分子量範圍介於約2000至20,000 Da；較佳地，2000至5000。在一些情況下，亦可使用聚乙二醇化以減小連接物或奈米粒子與生物部分之間的電荷相互作用，例如藉由在連接物或奈米粒子之表面上產生可避免聚合物與生物部分相互作用之親水層。在一些情況下，添加聚(乙二醇)重複單元可延長聚合結合物之血漿半衰期，例如藉由減少由吞噬細胞系統導致之對聚合結合物的捕捉，同時減少由細胞導致之轉染/捕捉效率。一般熟習此項技術者將知曉用於聚乙二醇化聚合物之方法及技術，例如，如下文實例中所論述，藉由開環聚合技術(ROMP)或其類似技術，藉由使用

EDC (1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽)及NHS(N-羥基丁二醯亞胺)以使聚合物與以胺封端之PEG基團反應。

在另一實施例中，金屬奈米粒子之尺寸小於約100 nm，較佳小於80 nm。

在一些實施例中，金屬奈米粒子錯合物進一步連接一或多種相同或不同治療或診斷藥物。較佳地，治療藥物為抗腫瘤藥物或抗體。較佳地，抗體為在諸如腫瘤細胞之細胞表面中靶向抗原特異性表現的抗體；更佳地，抗體擁有靶向、識別及抗腫瘤細胞抗體。

在一些實施例中，抗腫瘤藥物為適用於治療癌症之抗癌藥物或抗癌抗體。抗癌藥物之實例包括烷基化劑，諸如噻替派及環磷醯胺；磺酸烷酯，諸如硫酸布他卡因(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡波醯(carboquone)、米特多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa)；伸乙亞胺及甲基三聚氰胺，包括六甲蜜胺、三伸乙基三聚氰胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三甲密胺；多聚乙醯(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))； δ -9-四氫大麻酚(屈大麻酚(dronabinol))； β -拉帕酮(beta-lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙鹼(colchicine)；樺木酸(betulinic acid)；喜樹鹼(包括合成類似物拓朴替康(topotecan)、CPT-11(伊立替康(irinotecan))、乙醯基喜樹鹼、東莨菪素(scopolectin)及9-胺基喜樹鹼)；苔蘚抑素(bryostatin)；卡利斯他汀(callystatin)；CC-1065(包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；鬼臼毒素(podophyllotoxin)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；替尼泊甙(teniposide)；念珠藻環肽(cryptophycin)(特別是念珠藻環肽1及念珠藻環肽8)；海兔毒素(dolastatin)；倍癌黴素(duocarmycin)(包括合成類似物KW-2189及CB1-TM1)；艾榴素(eleutherobin)；水鬼蕉鹼(pancratistatin)；沙考地

汀(sarcodictyin)；海綿抑素(spongistatin)；氮芥(nitrogen mustard)，諸如氮芥苯丁酸、萘氮芥、氯磷醯胺、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺、氮芥(mechlorethamine)、氮芥氧化物鹽酸鹽、美法侖(melphalan)、新恩比興(novembichin)、芬司特瑞(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥；亞硝基脲，諸如卡莫司汀(nitrosureas)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如卡奇黴素(calicheamicin)，尤其卡奇黴素 γ II及卡奇黴素 ω II (參看，例如 Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))；達內黴素(dynemicin)，包括達內黴素A；埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及新抑癌素發色團(neocarzinostatin chromophore)及相關色素蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克拉黴素(aclacinomycin)、放線菌素(actinomycin)、安麩黴素(authramycin)、偶氮絲胺酸(azaserine)、博來黴素(bleomycin)、放線菌素C(cactinomycin)、卡柔比星(carabycin)、洋紅黴素(caminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycinis)、放線菌素d(dactinomycin)、道諾比星(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、多柔比星(包括(N-嗎啉基)-多柔比星、氰基-(N-嗎啉基)-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星及去氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycin)(諸如絲裂黴素C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(streptonigrin)、鏈脲黴素(streptozocin)、殺結核菌素

(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤(methotrexate)、蝶羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱(fludarabine)、6-巯基嘌呤、噻咪嘌呤、硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-氮雜尿苷(azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)；雄激素，諸如卡普甾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸酯(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitioanol)、美雄烷(mepitioane)、甾內酯(testolactone)；抗腎上腺，諸如胺格魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如亞葉酸；醋葡醛內酯(aceglatone)；醛磷醯胺醣苷；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；貝斯布西(bestrabucil)；比山群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；地磷醯胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醯(diaziquone)；艾福米辛(elformithine)；依利醋鉍；埃博黴素(epothilone)；乙環氧啶(etoglucid)；硝酸鎂；羥基尿素(hydroxyurea)；蘑菇多醣(lentinan)；羅尼達寧(lonidainine)；類美登素(maytansinoid)，諸如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocin)；丙脒脒(mitoguazone)；米托蒽醯(mitoxantrone)；莫比達摩(mopidanmol)；二胺硝吡啶(nitraerine)；噴司他汀(pentostatin)；凡那明(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醯(losoxantrone)；2-乙基醯肼；丙卡巴肼；多醣錯合物(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.)；雷佐生(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐喃(sizofuran)；鍺螺胺；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醯(triaziquone)；

2,2',2''-三氯三乙胺；新月毒素(trichothecene)(尤其是T-2毒素、弗納庫林A(verracurin A)、桿孢菌素A(roridin A)及蛇形菌毒素(anguidine))；尿烷(urethan)；長春地辛(vindesine)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；加西托星(gacytosine)；阿拉伯糖苷(arabinoside)(「Ara-C」)；噻替派；類紫杉醇，例如太平洋紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、不含十六醇聚氧乙烯醚之經白蛋白工程改造的太平洋紫杉醇之奈米粒子調配物(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.)及多西他賽(doxetaxel)(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；苯丁酸氮芥(chloranbucil)；吉西他濱(gemcitabine)；6-硫代鳥嘌呤；巯基嘌呤；甲胺嘌呤；鉑類似物，諸如順鉑(cisplatin)及卡鉑(carboplatin)；長春鹼(vinblastine)；鉑；依託泊苷(etoposide)(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼(vincristine)；奧沙利鉑(oxaliplatin)；亮克沃林(leucovorin)；長春瑞濱(vinorelbine)；米托蒽醌(novantrone)；依達曲沙(edatrexate)；柔紅黴素(daunomycin)；胺基嘌呤(aminopterin)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視黃素(retinoid)，諸如視黃酸；卡培他濱(capecitabine)；以上中之任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物；以及以上中之兩者或更多者之組合，諸如環磷醯胺、多柔比星、長春新鹼及潑尼松龍(prednisolone)之組合療法的縮寫CHOP以及奧沙利鉑與5-FU及亮克沃林組合之治療方案的縮寫FOLFOX。

奈米粒子中所存在抗癌藥物之量可在寬範圍上改變。在一些實施例中，奈米粒子可包括以抗癌藥物與奈米粒子之質量比計在約1%至約50% (重量/重量)範圍內的抗癌藥物量。在其他實施例中，奈米粒子可包括以抗癌藥物與奈米粒子之質量比計在約5%至約40% (重量/重

量)範圍內的抗癌藥物量。在另其他實施例中，奈米粒子可包括在約10%至約30%(重量/重量)範圍內的抗癌藥物量。在又其他實施例中，奈米粒子可包括以抗癌藥物與奈米粒子之質量比計在約1%至約10%(重量/重量)、約1%至約5%(重量/重量)、約5%至約10%(重量/重量)、約10%至約20%(重量/重量)、約15%至約35%(重量/重量)、約30%至約40%(重量/重量)及其類似者範圍內的抗癌藥物量。在一些實施例中，奈米粒子可包括以抗癌藥物與奈米粒子之質量比計約20%(重量/重量)的抗癌藥物量。在其他實施例中，奈米粒子可包括以抗癌藥物與奈米粒子之質量比計5%(重量/重量)、約10%(重量/重量)、15%(重量/重量)、約25%(重量/重量)、約30%(重量/重量)及其類似者的抗癌藥物量。

本文中所描述之一些實施例係關於一種組合物，其可包含連接一或多種相同或不同治療或診斷藥物的金屬奈米粒子錯合物及醫藥學上可接受之載劑。醫藥組合物便於向生物體投與連接一或多種相同或不同治療或診斷藥物的金屬奈米粒子錯合物。在此項技術中存在投與化合物的多種技術，其包括(但不限於)經口、注射、噴霧、非經腸及局部投與。

本文中所描述之一些實施例係關於一種藥物遞送系統，其包含連接一或多種相同或不同治療或診斷藥物的一或多種金屬奈米粒子錯合物。

在此項技術中存在多種技術投與連接一或多種相同或不同治療或診斷藥物的金屬奈米粒子錯合物，包括(但不限於)經口、直腸、局部、噴霧注射及非經腸遞送，其包括肌內、皮下、靜脈內、髓內注射；鞘內、直接室內、腹膜內、鼻內及眼內注射。

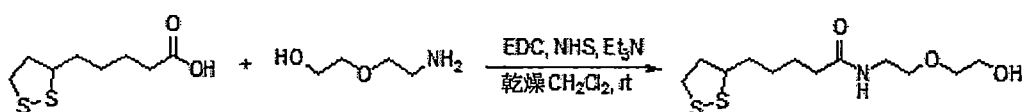
實例

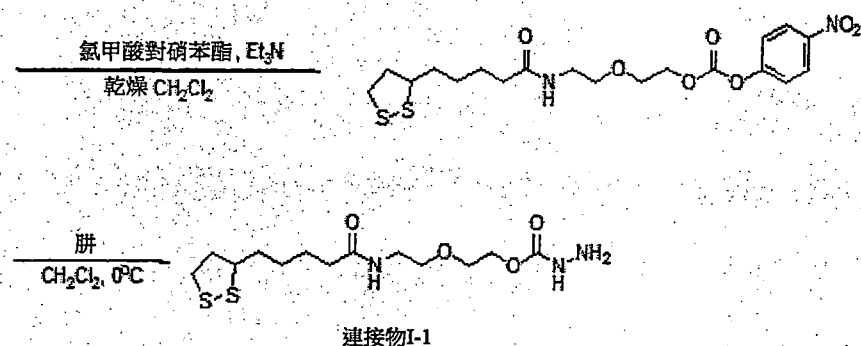
實例1 製備連接物I-鹽胺

步驟1. 將乙醇胺(1.28 g, 1.05當量)及類脂酸(4.13 g, 1.0當量)溶解於80 mL DCM中, 且緩慢添加EDC·HCl (4.98 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (2.30 g, 1.0當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後, 藉由添加ddH₂O來淬滅混合物, 且用DCM萃取2-3次。收集有機層, 用無水硫酸鎂乾燥, 用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產量: 4.04 g; 81.0%。

步驟2. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時, 將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟1產物1, 用注射器將其注入至反應燒瓶中, 且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後, 藉由添加ddH₂O來淬滅混合物, 且用DCM萃取3次。收集有機層, 用無水硫酸鎂乾燥, 用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EtOAc:Hex:MeOH = 1:1:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率: 51.6%。

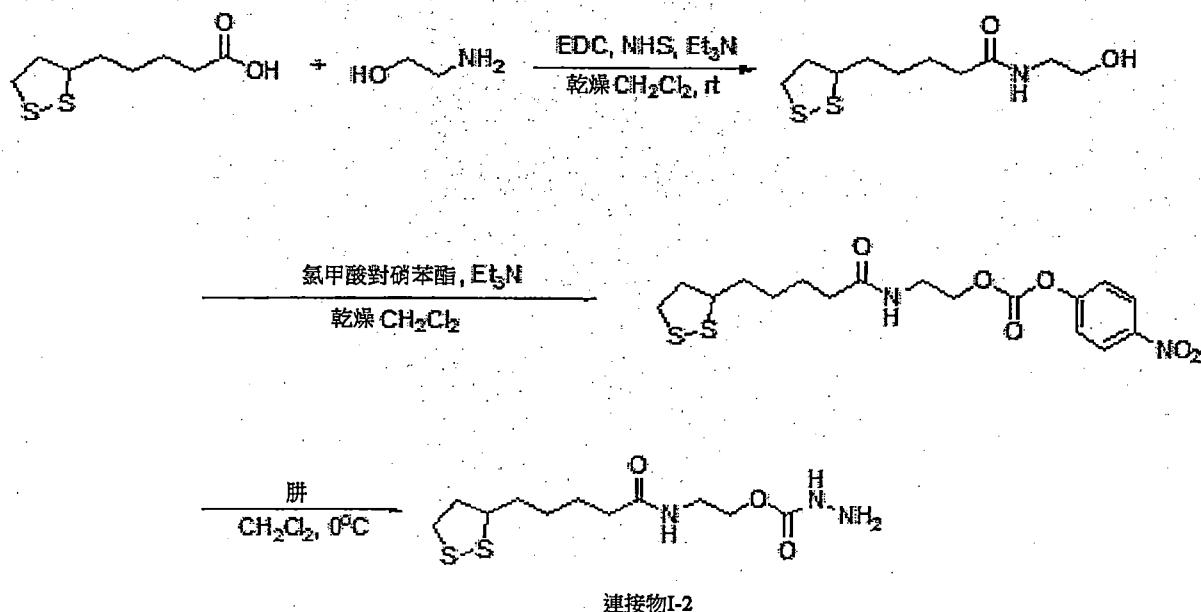
步驟3. 將經稱重之步驟2產物2 (3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中, 且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後, 藉由添加ddH₂O來淬滅混合物, 且用DCM萃取2-3次。收集有機層, 用無水硫酸鎂乾燥, 用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中, 產物黏在管柱中, 且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率: 19.5%。



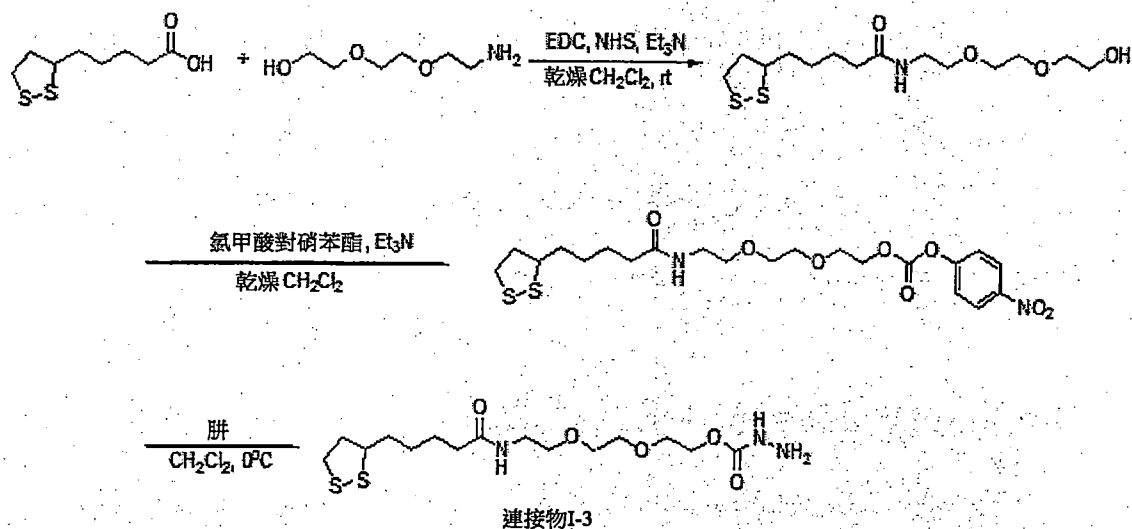


连接物I-1 (连接物I-醯胺, $m=2$)。 $^1\text{H}(400\text{MHz})$ δ 1.23-1.31(2H, m), 1.40-1.51(3H, m), 1.57-1.64(1H, m), 1.78-1.86(1H, m), 2.05(2H, t), 2.32-2.39(1H, m), 3.01-3.18 (4H, m), 3.39(2H, t), 3.52-3.57(3H, m), 4.03-4.19(4H, m), 7.94(1H, s), 8.14(1H, s). $^{13}\text{C}(100\text{MHz})$ δ 25.9, 29.0, 34.8, 36.1, 38.9, 39.5, 40.9, 57.2, 64.7, 69.3, 69.6, 159.5, 174.9 ppm。

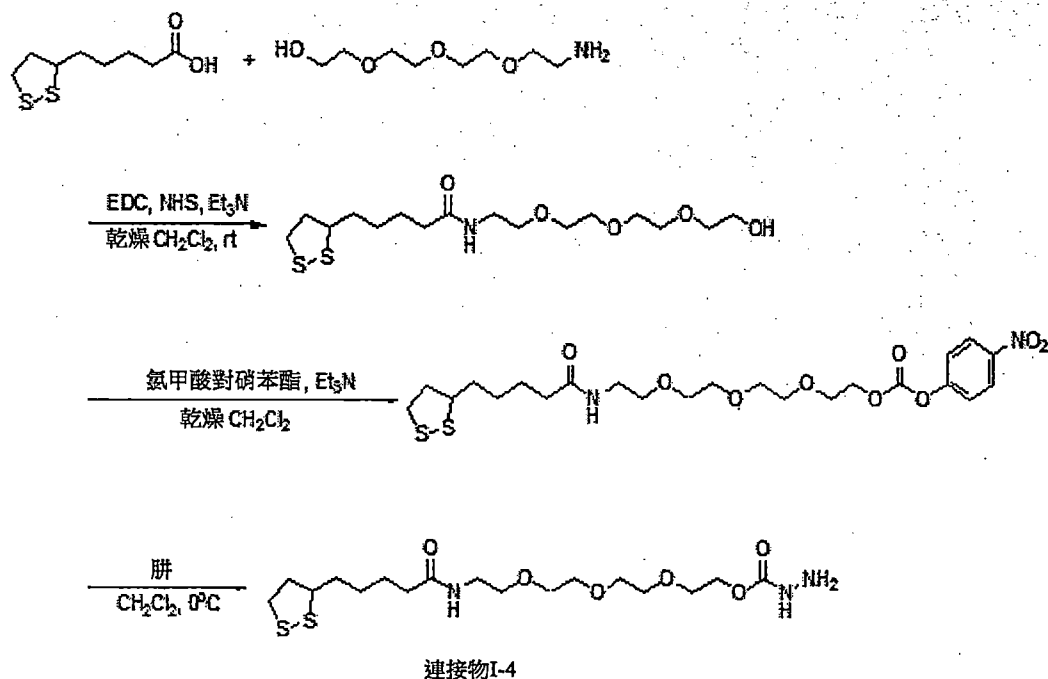
H-Mass (m/z): (M+Na) = 374.1171



连接物I-2 (连接物I-醯胺, $m=1$)。 $^1\text{H}(300\text{MHz})$ δ 1.30-1.38(2H, m), 1.45-1.57(3H, m), 1.60-1.72(1H, m), 1.80-1.92(1H, m), 2.06(2H, s), 2.36-2.46(1H, m), 3.07-3.24(4H, m), 3.56-3.65(1H, m), 3.95(2H, t), 4.02(2H, s), 7.88(1H, t), 8.11(1H, s). $^{13}\text{C}(100\text{MHz})$ δ 25.6, 28.8, 34.6, 35.9, 38.8, 39.4, 40.7, 56.9, 63.7, 163.8, 174.3ppm。 **H-Mass (m/z): (M+Na) = 330.0894。**

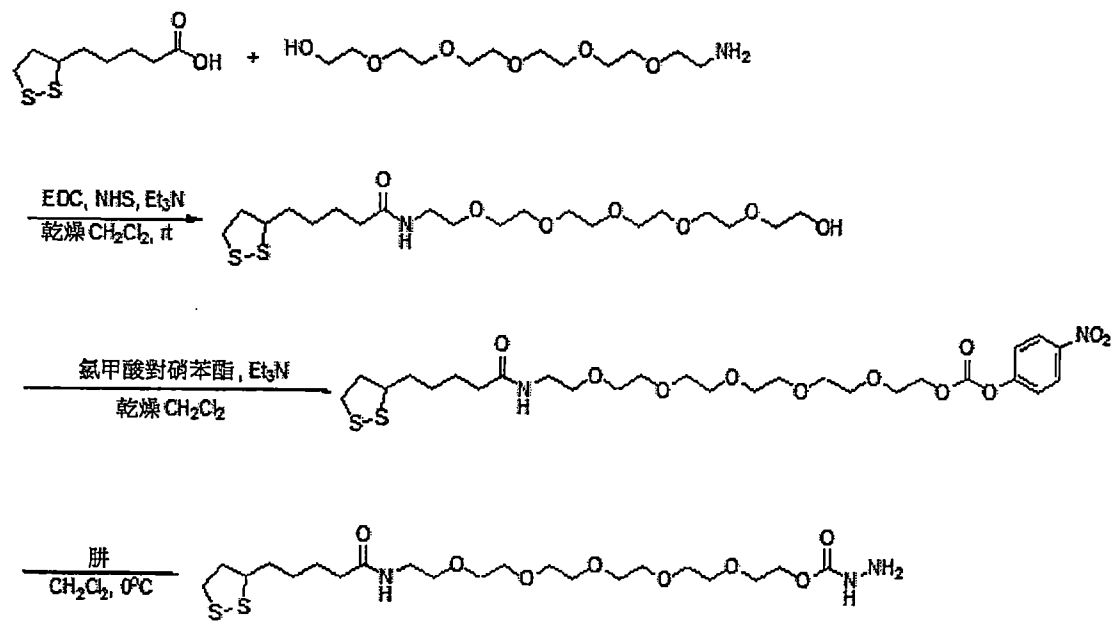


連接物I-3(連接物I-醯胺， $m=3$)。 $^1\text{H}(300\text{MHz})$ δ 1.30-1.37(2H, m), 1.45-1.57(3H, m), 1.60-1.72(1H, m), 1.80-1.91(1H, m), 2.06(2H, t), 2.35-2.46(1H, m), 3.07-3.23(4H, m), 3.39(2H, t), 3.47-3.65(7H, m), 4.02(2H, s), 4.05-4.08(2H, m), 7.84(1H, t), 8.18(1H, s). $^{13}\text{C}(100\text{MHz})$ δ 25.7, 28.9, 34.7, 35.9, 38.8, 39.4, 40.7, 60.0, 64.4, 69.4, 69.6, 70.1, 70.3, 159.2, 174.2ppm。 **H-Mass (m/z): (M+Na) = 418.1466。**



連接物I-4 (連接物I-醯胺， $m=4$)。 $^1\text{H}(300\text{MHz})$ δ 1.30-1.38(2H, m), 1.45-1.57(3H, m), 1.60-1.72(1H, m), 1.80-1.91(1H, m), 2.06(2H, t), 2.36-2.46(1H, m), 3.07-3.23(4H, m), 3.39(2H, t), 3.49-3.65(11H, m),

4.02(2H, s), 4.05-4.08(2H, m), 7.83(1H, t), 8.18(1H, s). $^{13}\text{C}(100\text{MHz})$ δ 25.7, 28.9, 34.7, 35.9, 38.8, 39.4, 40.7, 56.9, 64.4, 69.4, 69.6, 70.2, 70.3, 70.4, 159.2, 174.1ppm。H-Mass (m/z): (M+Na) =440.1875。



連接物I-5

連接物I-5 (連接物I-醯胺，m=5)。 $^1\text{H}(300\text{MHz})$ δ 1.30-1.38(2H, m), 1.45-1.57(3H, m), 1.60-1.69(1H, m), 1.80-1.91(1H, m), 2.06(2H, t), 2.36-2.46(1H, m), 3.07-3.23(4H, m), 3.39(2H, t), 3.51-3.62(19H, m), 4.02(2H, s), 4.05-4.08(2H, m), 4.83(1H, t), 8.18(1H, s). $^{13}\text{C}(100\text{MHz})$ δ 25.9, 29.0, 34.8, 36.1, 39.0, 39.4, 40.9, 57.2, 64.8, 69.5, 69.7, 70.3, 70.4, 70.5, 159.5, 174.8ppm。H-Mass (m/z): (M+Na) =550.2234

實例2 製備連接物I-C(O)O

步驟1. 將乙二醇(1.30 g，1.05當量)及類脂酸(4.13 g，1.0當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加N,N'-二環己基碳化二亞胺(DCC)(5.36 g，1.3當量)、4-(二甲胺基)吡啶(DMAP) (0.24 g，0.1當量)及三乙胺(6.4 mL，2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由

使用DCM:MOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。
產量：4.00 g；80.5%。

步驟2. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g，1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟1產物1，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL，2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EtOAc:Hex:MeOH = 1:1:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：50.6%。

步驟3. 將經稱重之步驟2產物2 (3.5 g，1.0當量)溶解於120 mL DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL，10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率：18.5%。

實例3 製備HS-C₂-連接物-I-醯胺

步驟1. 將乙醇胺(1.28 g，1.05當量)及3-(乙醯基硫)丙酸(2.96 g，1.0當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (4.98 g，1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (2.30 g，1.0當量)及三乙胺(6.4 mL，2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用

DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產量：4.10 g；70.0%。

步驟2. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟1產物1，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EtOAc:Hex:MeOH = 1:1:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：48.6%。

步驟3. 將經稱重之步驟2產物2 (3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率：19.0%。

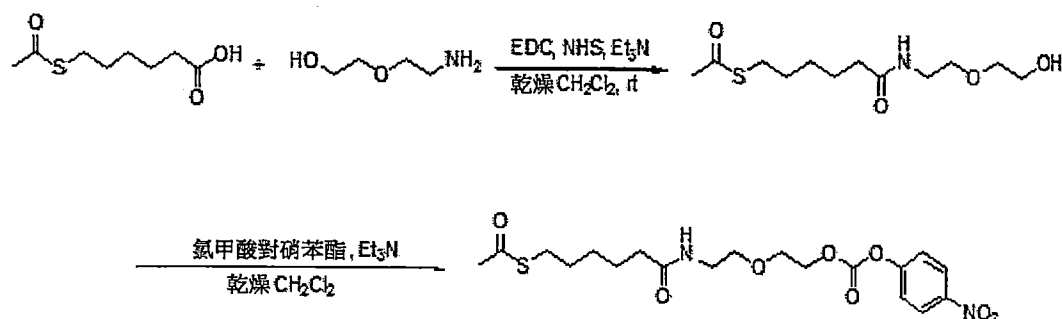
實例4 製備HS-C₅-連接物-I-醯胺

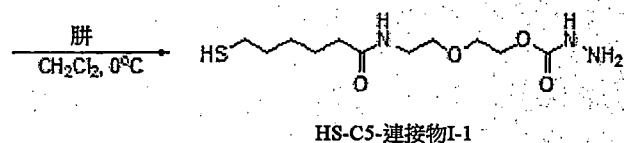
步驟1. 將乙醇胺(1.28 g, 1.05當量)及6-乙醯基硫己酸(3.81 g, 1.0當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (4.98 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (2.30 g, 1.0當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MOH

= 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產量：3.85 g；78.0%。

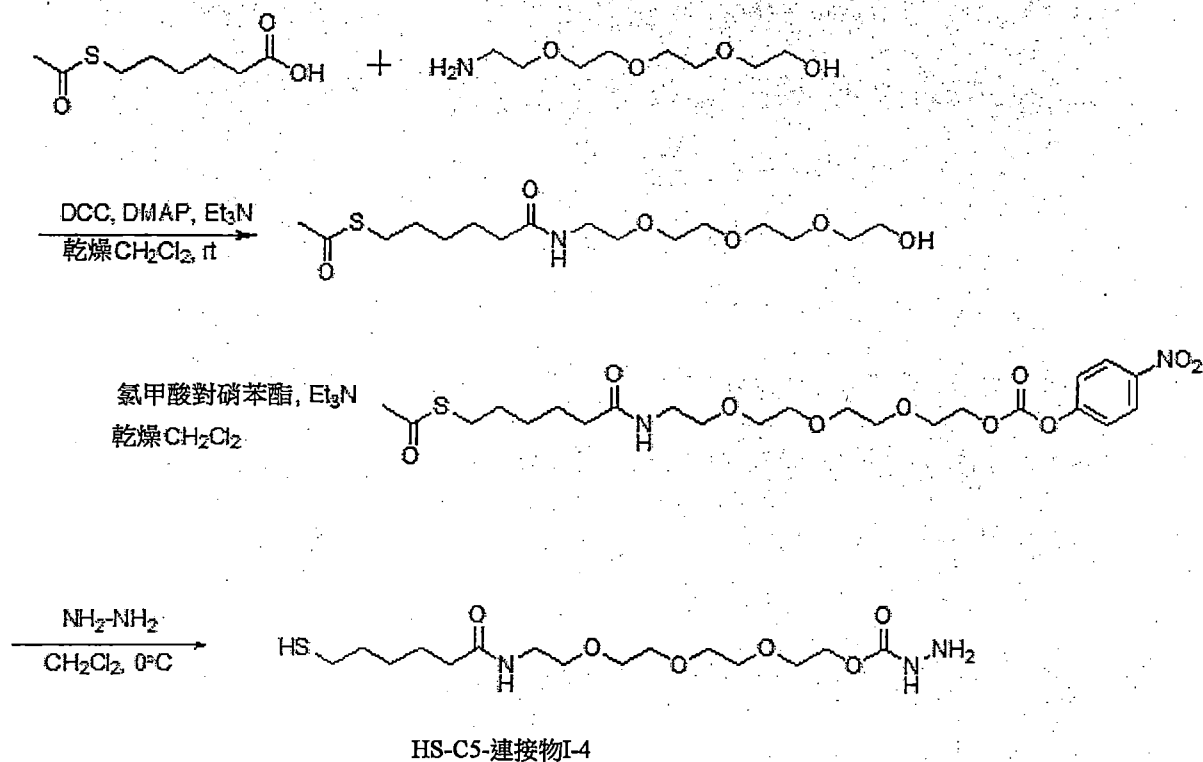
步驟2. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟1產物1，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EtOAc:Hex:MeOH = 1:1:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：48.6%。

步驟3. 將經稱重之步驟2產物2 (3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率：17.0%。





SH-C₅-連接物I-1 (SH-C₅-連接物-1-鹽胺，m為2)：¹H(400MHz) δ 1.26-1.33(2H, m), 1.43-1.55(4H, m), 2.05(2H, t), 2.22(1H, s), 2.45(2H, t), 3.15-3.19(2H, m), 3.37(2H, t), 3.54(2H, t), 4.03-4.08(4H, m), 7.85(1H, t), 8.19(1H, s); ¹³C(100MHz) δ 23.7, 24.7, 27.4, 33.1, 35.2, 38.4, 63.3, 68.6, 69.1, 158.3, 172.2。H-Mass (m/z): (M+Na)=316.1336



SH-C₅-連接物I-4 (SH-C₅-連接物-1-鹽胺，m為4)：¹H(400MHz) δ 1.26-1.34(2H, m), 1.43-1.56(4H, m), 2.05(2H, t), 2.22(1H, t), 2.43-2.48(2H, m), 3.16-3.20(3H, m), 3.39(2H, t), 3.48-3.50(7H, m), 3.56(2H, m), 4.03-4.08(4H, m), 7.84(1H, m), 8.20(1H, s); ¹³C(100MHz) δ 23.7, 24.8, 27.4, 33.1, 35.2, 38.5, 63.4, 68.9, 69.2, 69.6, 69.8, 158.3, 172.2.
H-Mass (m/z): (M+Na) =404.1843

實例5 製備SH-C₅-連接物-I-C(O)O-

步驟1. 將乙二醇(1.30 g, 1.05當量)及6-乙醯基硫己酸(3.81 g,

1.0當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加*N,N'*-二環己基碳化二亞胺(DCC) (5.36 g, 1.3當量)、4-(二甲胺基)吡啶(DMAP) (0.24 g, 0.1當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產量：3.88 g；79.8%。

步驟2. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟1產物1，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EA:Hex:MeOH = 1:1:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：51.6%。

步驟3. 將經稱重之步驟2產物2 (3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率：19.4%。

實例6 製備NH₂-C₁-連接物-I-醯胺

步驟1. 將乙醇胺(1.28 g, 1.05當量)及Boc-甘胺酸(3.50 g, 1.0當

量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (4.98 g，1.3當量)、
 羥基丁二醯亞胺(NHS) (2.30 g，1.0當量)及三乙胺(6.4 mL，2.3當
 量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添
 加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水
 硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH =
 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產量：4.10 g；
 81.5%。

步驟2. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g，1.15當量)置於雙頸瓶中。
 在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL
 DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟1產物1，用注射器將其注
 入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL，2.3當量)。在冰浴
 中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加
 ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫
 酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用
 EtOAc:Hex:MeOH = 1:1:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液
 體。純化後產率：51.6%。

步驟3. 將經稱重之步驟2產物2 (3.5 g，1.0當量)溶解於120 mL
 DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL，10.0當量)。在室溫下進行
 反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加
 ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫
 酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH =
 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增
 加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產
 率：17.9%。

實例7 製備NH₂-C₁-連接物-I-C(O)O-

步驟1. 將乙二醇(1.30 g，1.05當量)及Boc-甘胺酸(3.50 g，1.0當

量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加*N,N'*-二環己基碳化二亞胺(DCC) (5.36 g, 1.3當量)、4-(二甲胺基)吡啶(DMAP) (0.24 g, 0.1當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產量：3.60 g；78.0%。

步驟2. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟1產物1，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EA:Hex:MeOH = 1:1:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：49.7%。

步驟3. 將經稱重之步驟2產物2 (3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率：20.0%。

實例8 製備連接物II-醯胺

步驟1. 將甘胺酸(2.36 g, 1.05當量)及類脂酸(6.19 g, 1.0當量)溶

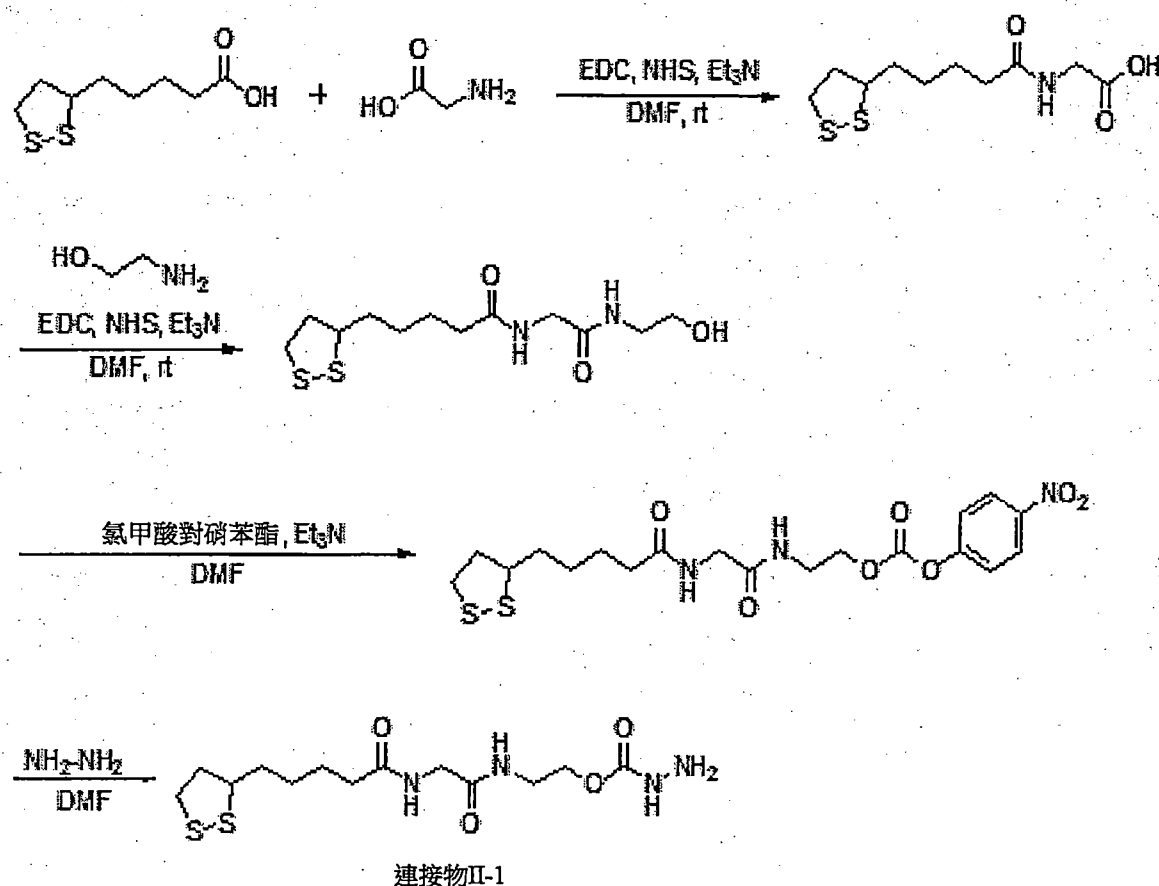
解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (7.47 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (3.45 g, 1.0當量)及三乙胺(9.6 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：70.0%。

步驟2. 將步驟1產物(5.26 g, 1.0當量)及乙醇胺(1.28 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (4.98 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (2.30 g, 1.0當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：81.0%。

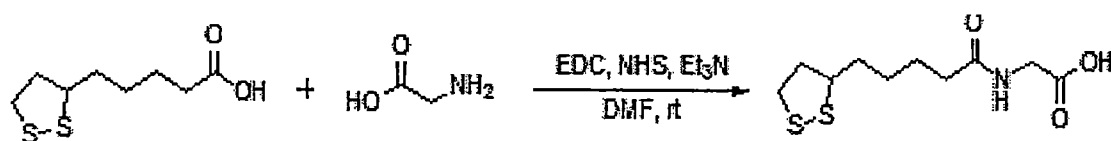
步驟3. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟1產物1，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：51.6%。

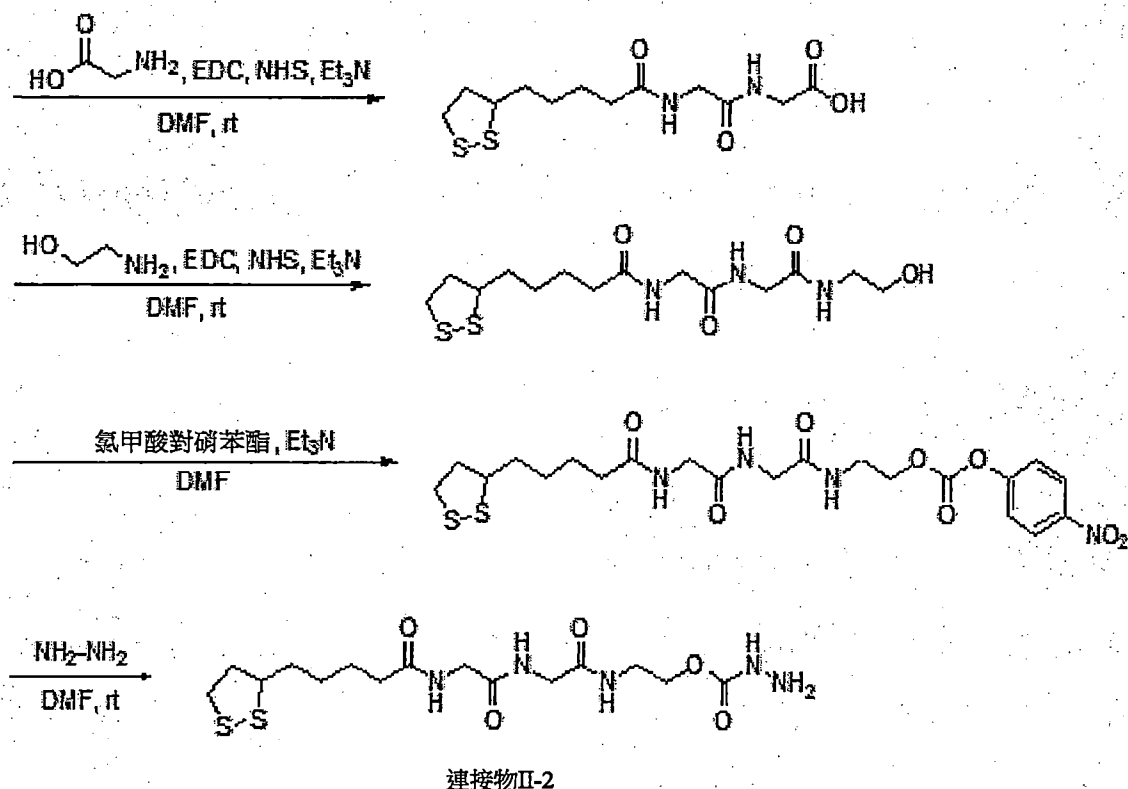
步驟4. 將經稱重之步驟2產物2 (3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫

酸鎂乾燥，用 MgSO_4 過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率：30.0%。

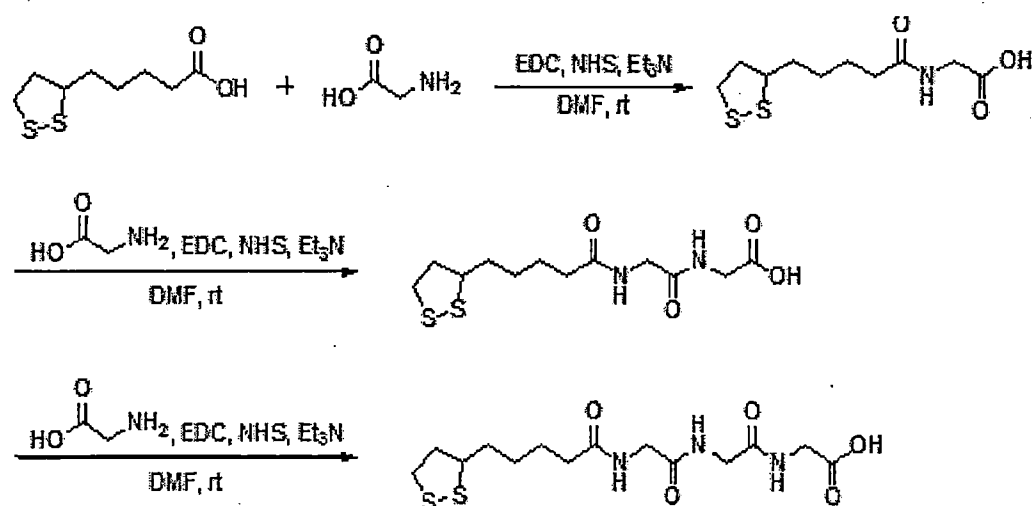


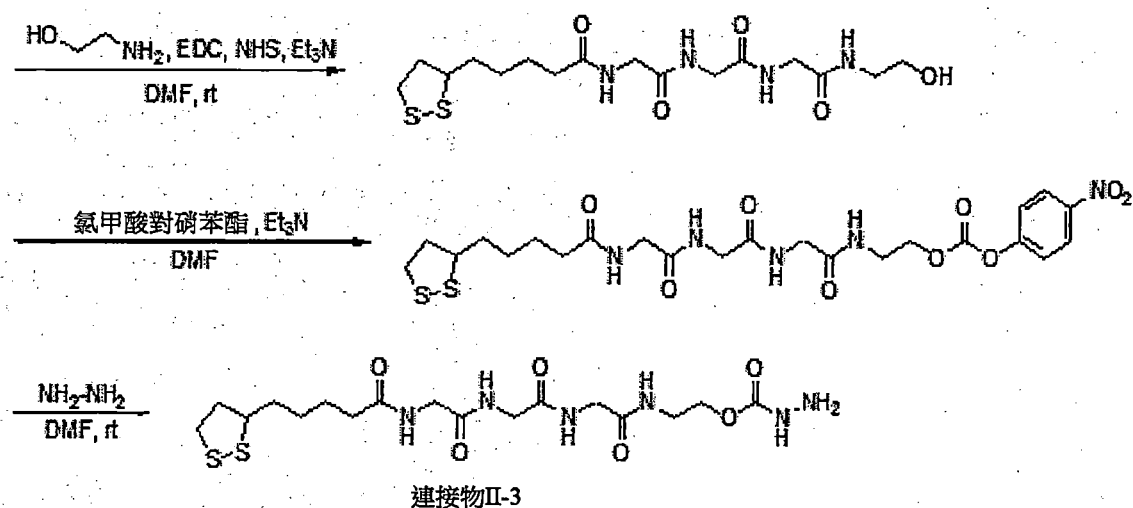
連接物II-1 (連接物II-醯胺， $z=1$)。 $^1\text{H}(400\text{MHz})$ δ 1.32-1.39(2H, m), 1.46-1.57(2H, m), 1.63-1.69(1H, m), 1.83-1.91(1H, m), 2.08(1H, s), 2.13(2H, t), 2.36-2.46(1H, m), 3.07-3.19(2H, m), 3.22-3.28(2H, m), 3.62-3.65 (3H, m), 3.95 (3H, t), 7.01(1H, s), 7.91(1H, t), 8.01(1H, t), 8.14(1H, s). $^{13}\text{C}(100\text{MHz})$ δ 25.2, 28.8, 34.6, 35.4, 38.6, 38.7, 39.5, 42.4, 56.60, 62.85, 135.63, 169.72, 172.83 ppm。 **H-Mass (m/z): (M+Na) = 387.1102**



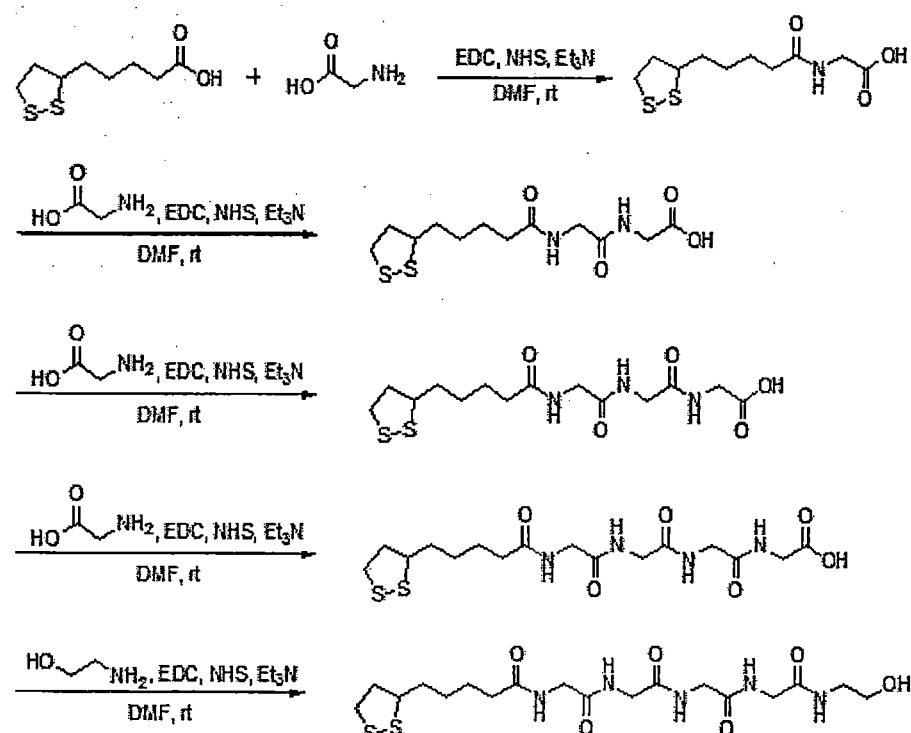


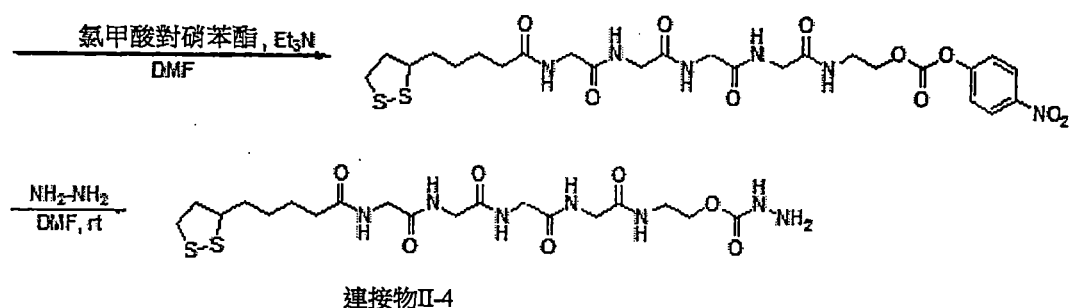
連接物II-2 (連接物II-醯胺, $z=2$)。 $^1\text{H}(300\text{MHz})$ δ 1.32-1.39(2H, m), 1.47-1.57(3H, m), 1.61-1.73(1H, m), 1.81-1.92(1H, m), 2.14(2H, t), 2.35-2.46(2H, m), 3.09-3.21(3H, m), 3.23-3.31(3H, m), 3.65-3.71(4H, m), 3.97 (2H, t), 7.78 (1H, t), 7.89(1H, t), 8.12(2H, t). $^{13}\text{C}(100\text{MHz})$ δ 25.3, 28.8, 34.6, 35.4, 38.6, 38.7, 39.5, 42.4, 42.6, 56.6, 60.2, 62.8, 169.4, 169.9, 173.1 ppm。 $\text{H-Mass (m/z): (M+Na)} = 444.1345$





連接物II-3 (連接物II-醯胺, $z=3$)。 $^1\text{H}(300\text{MHz})$ δ 1.23(1H, s), 1.32-1.40(2H, m), 1.46-1.57(4H, m), 1.63-1.70(1H, m), 1.80-1.92(2H, t), 1.96(1H, s), 2.04(1H, s), 2.14(3H, t), 3.07-3.19(3H, m), 3.58-3.66 (3H, m), 3.72 (3H, t), 3.96(1H, t), 4.05(1H, s), 7.86(1H, s), 8.10(3H, s). $^{13}\text{C}(100\text{MHz})$ δ 25.3, 28.8, 34.6, 35.4, 38.6, 39.5, 39.7, 40.5, 42.4, 42.6, 56.6, 60.2, 62.8, 169.4, 169.6, 170.1, 173.1 ppm。 **H-Mass (m/z):** **(M+Na) =501.1606**





連接物II-4 (連接物II-醯胺, $z=4$)。 $^1\text{H}(300\text{MHz})$ δ 1.26(3H, s), 1.35-1.42(2H, m), 1.47-1.70(4H, m), 1.82-1.94(2H, m), 2.03-2.20(8H, m), 2.26-2.33(2H, m), 3.66-3.81(7H, m), 3.95-4.01(1H, m), 7.86-7.94(1H, m), 8.80-8.22(3H, m). $^{13}\text{C}(100\text{MHz})$ δ 25.3, 28.8, 29.4, 31.2, 34.6, 35.4, 38.5, 38.6, 42.4, 42.6, 56.6, 66.0, 125.8, 128.7, 129.4, 169.4, 169.8, 170.0, 173.1 ppm。 **H-Mass (m/z): (M+Na) = 558.1768**

實例9 製備連接物II- C(O)O-

步驟1. 將乙醇酸(2.40 g, 1.05當量)及類脂酸(6.19 g, 1.0當量)溶解於80 mL DCM中, 且緩慢添加*N,N'*-二環己基碳化二亞胺(DCC)(8.05 g, 1.3當量)、4-(二甲胺基)吡啶(DMAP) (0.37 g, 0.1當量)及三乙胺(9.6 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後, 藉由添加ddH₂O來淬滅混合物, 且用DCM萃取2-3次。收集有機層, 用無水硫酸鎂乾燥, 用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率: 85%。

步驟2: 將步驟1產物(5.26 g, 1.0當量)及乙醇胺(1.28 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中, 且緩慢添加EDC·HCl (4.98 g, 1.3當量)、
 羥基丁二醯亞胺(NHS) (2.30 g, 1.0當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後, 藉由添加ddH₂O來淬滅混合物, 且用DCM萃取2-3次。收集有機層, 用無水硫酸鎂乾燥, 用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH =

9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：80.5%。

步驟3. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟1產物1，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：47.8%。

步驟4. 將經稱重之步驟2產物2 (3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率：19.3%。

實例10 製備連接物SH-C₅-連接物-II-醯胺

步驟1. 將6-乙醯基硫己酸(5.71 g, 1.0當量)及甘胺酸(2.36 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (7.47 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (3.45 g, 1.0當量)及三乙胺(9.6 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產

率：68.8%。

步驟2. 將步驟1產物(5.26 g, 1.0當量)及乙醇胺(1.28 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (4.98 g, 1.3當量)、 α -羥基丁二醯亞胺(NHS) (2.30 g, 1.0當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：80.5%。

步驟3. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟1產物1，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：50.6%。

步驟4. 將經稱重之步驟2產物2 (3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率：18.3%。

實例11 製備連接物SH-C₅-連接物-II-C(O)O-

步驟1. 將6-乙醯基硫己酸(5.71 g, 1.0當量)及乙醇酸(2.40 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中, 且緩慢添加*N,N'*-二環己基碳化二亞胺(DCC) (8.05 g, 1.3當量)、4-(二甲胺基)吡啶(DMAP) (0.37 g, 0.1當量)及三乙胺(9.6 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後, 藉由添加ddH₂O來淬滅混合物, 且用DCM萃取2-3次。收集有機層, 用無水硫酸鎂乾燥, 用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率: 78%。

步驟2. 將步驟1產物(5.26 g, 1.0當量)及乙醇胺(1.28 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中, 且緩慢添加EDC·HCl (4.98 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (2.30 g, 1.0當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後, 藉由添加ddH₂O來淬滅混合物, 且用DCM萃取2-3次。收集有機層, 用無水硫酸鎂乾燥, 用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率: 80.5%。

步驟3. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時, 將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟1產物1, 用注射器將其注入至反應燒瓶中, 且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後, 藉由添加ddH₂O來淬滅混合物, 且用DCM萃取2-3次。收集有機層, 用無水硫酸鎂乾燥, 用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率: 51.6%。

步驟4. 將經稱重之步驟2產物2 (3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中, 且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行

反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率：19.0%。

實例12 製備連接物NH₂-C₁-連接物-II-醯胺

步驟1. 將Boc-甘胺酸(5.26 g, 1.0當量)及甘胺酸(2.36 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (7.47 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (3.45 g, 1.0當量)及三乙胺(9.6 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：70%。

步驟2. 將步驟1產物(5.26 g, 1.0當量)及乙醇胺(1.28 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (4.98 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (2.30 g, 1.0當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：77.8%。

步驟3. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟1產物1，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加

ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：51.6%。

步驟4. 將經稱重之步驟2產物2 (3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率：18.8%。

實例13 製備NH₂-C₁-連接物-II-C(O)O-

步驟1. 將Boc-甘胺酸(5.26 g, 1.0當量)及乙醇酸(2.40 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加*N,N'*-二環己基碳化二亞胺(DCC) (8.05 g, 1.3當量)、4-(二甲胺基)吡啶(DMAP) (0.37 g, 0.1當量)及三乙胺(9.6 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：82.0%。

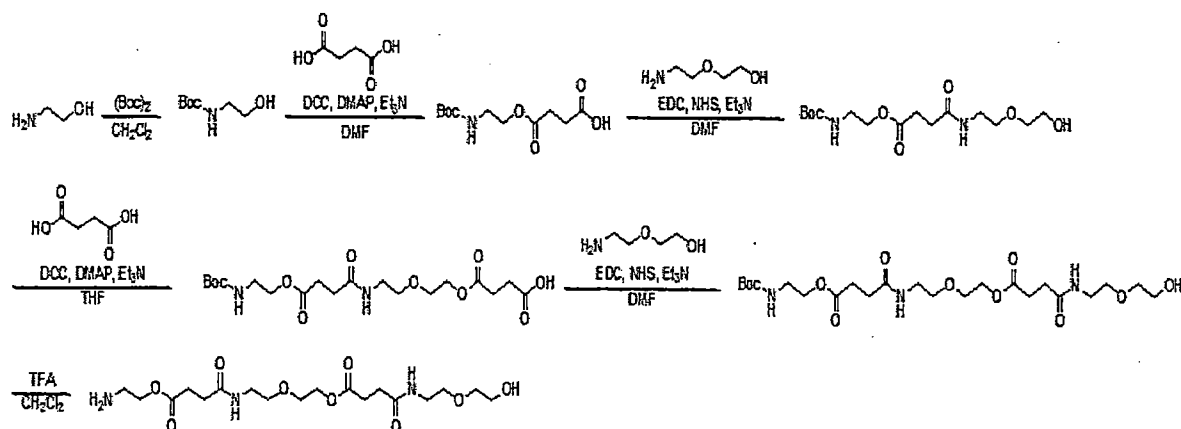
步驟2. 將步驟1產物(5.26 g, 1.0當量)及乙醇胺(1.28 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (4.98 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (2.30 g, 1.0當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水

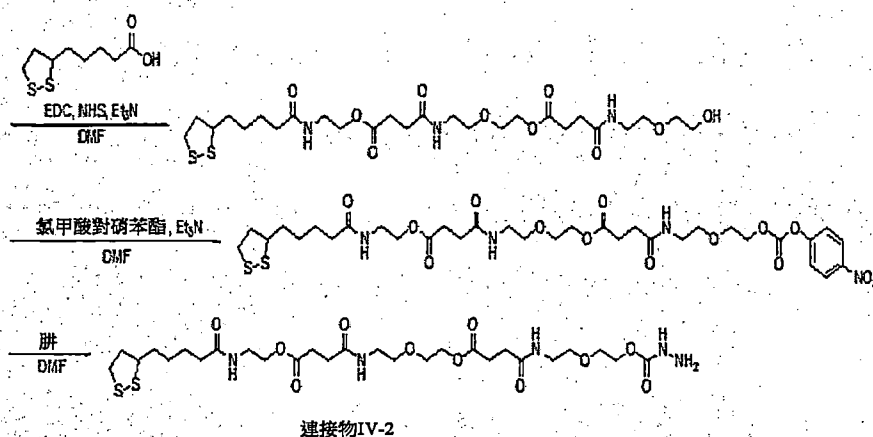
硫酸鎂乾燥，用 MgSO_4 過濾且隨後移除DCM。藉由使用 $\text{DCM}:\text{MeOH} = 9.8:0.2$ 用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：78.5%。

步驟3. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟1產物1，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加 ddH_2O 來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用 MgSO_4 過濾且隨後移除DCM。藉由使用 $\text{EtOAc}:\text{Hex}:\text{MeOH} = 1:2:0.2$ 用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：51.0%。

步驟4. 將經稱重之步驟2產物(3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加 ddH_2O 來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用 MgSO_4 過濾且隨後移除DCM。藉由使用 $\text{DCM}:\text{MeOH} = 9.5:0.5$ 用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加 MeOH 至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率：19.5%。

實例14 製備連接物IV-醯胺





步驟1. 將乙醇胺(1.92 g, 1.05當量)及類脂酸(6.19 g, 1.0當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (7.47 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (3.45 g, 1.0當量)及三乙胺(9.6 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：66.0%。

步驟2. 將步驟1產物(4.98 g, 1.0當量)及丁二酸(2.48 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加*N,N'*-二環己基碳二亞胺(DCC) (5.36 g, 1.3當量)、4-(二甲胺基)吡啶(DMAP) (0.24 g, 0.1當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：80.7 %。

步驟3. 將步驟2產物(3.49 g, 1.0當量)及2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醇(1.57 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (2.49 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (1.15 g, 1.0當量)及三乙胺(3.2 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3

次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用 MgSO_4 過濾且隨後移除 DCM。藉由使用 $\text{DCM}:\text{MeOH} = 9.8:0.2$ 用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：81.2 %。

步驟4. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟3產物，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加 ddH_2O 來淬滅混合物，且用 DCM 萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用 MgSO_4 過濾且隨後移除 DCM。藉由使用 $\text{EtOAc}:\text{Hex}:\text{MeOH} = 1:2:0.2$ 用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：48.6%。

步驟5. 將經稱重之步驟4產物(3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加 ddH_2O 來淬滅混合物，且用 DCM 萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用 MgSO_4 過濾且隨後移除 DCM。藉由使用 $\text{DCM}:\text{MeOH} = 9.5:0.5$ 用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加 MeOH 至5%以溶離最終產物。產物(連接物 IV-2)為淡黃色黏性固體。純化後產率：30.0%。

$^1\text{H}(300\text{MHz})$ δ 1.30-1.34(2H, m), 1.47-1.56(3H, m), 1.60-1.67(1H, m), 1.82-1.87(1H, m), 2.23(2H, t), 2.54-2.56(4H, m), 2.63-2.2.66(4H, m), 3.07-3.25(2H, m), 3.33-3.39(3H, m), 3.40-3.43(2H, m), 3.46-3.50(5H, m), 3.54-3.58(5H, m), 4.03-4.05(2H, m), 4.07-4.10(2H, m), 4.13-4.15(2H, m)

$^{13}\text{C}(100\text{MHz})$ δ 24.5, 24.6, 27.5, 33.7, 34.7, 38.1, 41.0, 55.7, 55.8,

59.6, 59.7, 59.8, 65.7, 65.8, 65.9, 71.5, 71.7, 171.7, 171.9, 172.0, 177.1, 177.2, 177.3

實例15 製備連接物IV-C(O)O-

步驟1. 將乙二醇(1.96 g, 1.05當量)及類脂酸(6.19 g, 1.0當量)溶解於80 mL DCM中, 且緩慢添加*N,N'*-二環己基碳化二亞胺(DCC)(8.04 g, 1.3當量)、4-(二甲胺基)吡啶(DMAP) (0.37 g, 0.1當量)及三乙胺(9.6 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後, 藉由添加ddH₂O來淬滅混合物, 且用DCM萃取2-3次。收集有機層, 用無水硫酸鎂乾燥, 用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率: 66.0 %。

步驟2. 將步驟1產物(4.98 g, 1.0當量)及丁二酸(2.48 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中, 且緩慢添加*N,N'*-二環己基碳化二亞胺(DCC) (5.36 g, 1.3當量)、4-(二甲胺基)吡啶(DMAP) (0.24 g, 0.1當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後, 藉由添加ddH₂O來淬滅混合物, 且用DCM萃取2-3次。收集有機層, 用無水硫酸鎂乾燥, 用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率: 81.2 %。

步驟3. 將步驟2產物(3.49 g, 1.0當量)及2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醇(1.57 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中, 且緩慢添加EDC·HCl (2.49 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (1.15 g, 1.0當量)及三乙胺(3.2 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後, 藉由添加ddH₂O來淬滅混合物, 且用DCM萃取2-3次。收集有機層, 用無水硫酸鎂乾燥, 用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為

淺黃色液體。產率：80.5 %。

步驟4. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟3產物，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：50.3%。

步驟5. 將經稱重之步驟4產物(3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率：31.0%。

實例16 製備SH-C₅-連接物-IV-醯胺

步驟1. 將乙醇胺(1.92 g, 1.05當量)及6-乙醯基硫己酸(5.71 g, 1.0當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (7.47 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (3.45 g, 1.0當量)及三乙胺(9.6 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產

率：74.0 %。

步驟2. 將步驟1產物(4.98 g, 1.0當量)及丁二酸(2.48 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加*N,N'*-二環己基碳化二亞胺(DCC) (5.36 g, 1.3當量)、4-(二甲胺基)吡啶(DMAP) (0.24 g, 0.1當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：80.2 %。

步驟3. 將步驟2產物(3.49 g, 1.0當量)及2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醇(1.57 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (2.49 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (1.15 g, 1.0當量)及三乙胺(3.2 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：80.0 %。

步驟4. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟3產物，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：51.1%。

步驟5. 將經稱重之步驟4產物(3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中, 且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後, 藉由添加ddH₂O來淬滅混合物, 且用DCM萃取2-3次。收集有機層, 用無水硫酸鎂乾燥, 用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中, 產物黏在管柱中, 且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率: 28.0%。

實例17 製備SH-C₅-連接物-IV-C(O)O-

步驟1. 將乙二醇(1.96 g, 1.05當量)及6-乙醯基硫己酸(5.71 g, 1.0當量)溶解於80 mL DCM中, 且緩慢添加*N,N'*-二環己基碳化二亞胺(DCC) (8.04 g, 1.3當量)、4-(二甲胺基)吡啶(DMAP) (0.37 g, 0.1當量)及三乙胺(9.6 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後, 藉由添加ddH₂O來淬滅混合物, 且用DCM萃取2-3次。收集有機層, 用無水硫酸鎂乾燥, 用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率: 71.5 %。

步驟2. 將步驟1產物(4.98 g, 1.0當量)及丁二酸(2.48 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中, 且緩慢添加*N,N'*-二環己基碳化二亞胺(DCC) (5.36 g, 1.3當量)、4-(二甲胺基)吡啶(DMAP) (0.24 g, 0.1當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後, 藉由添加ddH₂O來淬滅混合物, 且用DCM萃取2-3次。收集有機層, 用無水硫酸鎂乾燥, 用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率: 81.4 %。

步驟3. 將步驟2產物(3.49 g, 1.0當量)及2-[2-(2-胺基乙氧基)乙

氧基]乙醇(1.57 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (2.49 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (1.15 g, 1.0當量)及三乙胺(3.2 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：78.8 %。

步驟4. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟3產物，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：51.1%。

步驟5. 將經稱重之步驟4產物(3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率：27.8%。

實例18 製備NH₂-C₁-連接物-IV-醯胺

步驟1. 將乙醇胺(1.92 g, 1.05當量)及Boc-甘胺酸(5.26 g, 1.0當

量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (7.47 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (3.45 g, 1.0當量)及三乙胺(9.6 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：62.0 %。

步驟2. 將步驟1產物(4.98 g, 1.0當量)及丁二酸(2.48 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加*N,N'*-二環己基碳化二亞胺(DCC) (5.36 g, 1.3當量)、4-(二甲胺基)吡啶(DMAP) (0.24 g, 0.1當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：80.4 %。

步驟3. 將步驟2產物(3.49 g, 1.0當量)及2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醇(1.57 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (2.49 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (1.15 g, 1.0當量)及三乙胺(3.2 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：71.0 %。

步驟4. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟3產物，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中

進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：51.9%。

步驟5. 將經稱重之步驟4產物(3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率：29.0%。

實例19 製備NH₂-C₁-連接物-IV-C(O)O-

步驟1. 將乙二醇(1.96 g, 1.05當量)及Boc-甘胺酸(5.26 g, 1.0當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加*N,N'*-二環己基碳化二亞胺(DCC) (8.04 g, 1.3當量)、4-(二甲胺基)吡啶(DMAP) (0.37 g, 0.1當量)及三乙胺(9.6 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：75.0 %。

步驟2. 將步驟1產物(4.98 g, 1.0當量)及丁二酸(2.48 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加*N,N'*-二環己基碳化二亞胺(DCC) (5.36 g, 1.3當量)、4-(二甲胺基)吡啶(DMAP) (0.24 g, 0.1當量)及三乙胺(6.4 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應

後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.5:0.5用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：80.5 %。

步驟3. 將步驟2產物(3.49 g, 1.0當量)及2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醇(1.57 g, 1.05當量)溶解於80 mL DCM中，且緩慢添加EDC·HCl (2.49 g, 1.3當量)、羥基丁二醯亞胺(NHS) (1.15 g, 1.0當量)及三乙胺(3.2 mL, 2.3當量)。在室溫下進行反應至少5小時且反應後接著TLC。隨後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH = 9.8:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。產率：81.0%。

步驟4. 將氯甲酸4-硝基苯酯(3.35 g, 1.15當量)置於雙頸瓶中。在真空下持續1小時，將三通閥轉向至氮氣裝置且用注射器添加60 mL DCM。用10-15 mL DCM溶解經稱重之步驟3產物，用注射器將其注入至反應燒瓶中，且隨後緩慢添加三乙胺(4.5 mL, 2.3當量)。在冰浴中進行反應約1小時且隨後回到室溫下隔夜。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0.2用管柱來純化萃取物。產物為淺黃色液體。純化後產率：50.6%。

步驟5. 將經稱重之步驟4產物(3.5 g, 1.0當量)溶解於120 mL DCM中，且隨後緩慢添加水合肼(6.5 mL, 10.0當量)。在室溫下進行反應約24小時。溶液顏色自淺黃色變為橙色。反應完成後，藉由添加ddH₂O來淬滅混合物，且用DCM萃取2-3次。收集有機層，用無水硫酸鎂乾燥，用MgSO₄過濾且隨後移除DCM。藉由使用DCM:MeOH =

9.5:0.5用管柱來純化萃取物。在此步驟中，產物黏在管柱中，且可增加MeOH至5%以溶離最終產物。產物為淺黃色黏性固體。純化後產率：31.2%。

實例20 本發明連接物之細胞毒性分析

吾等檢測9個連接物之細胞毒性，且計算各連接物之 IC_{50} 值。選擇人類乳腺癌MCF7、MDA-MB-453及MDA-MB-231以及人類乳腺上皮細胞H184B5F5/M10用於細胞毒性測試。在6孔培養盤及經處理之連接物I-1（連接物I-醯胺， $m=2$ ）、連接物I-2（連接物I-醯胺， $m=1$ ）、連接物I-3（連接物I-醯胺， $m=3$ ）、連接物I-4（連接物I-醯胺， $m=4$ ）、連接物I-5（連接物I-醯胺， $m=5$ ）、連接物II-1（連接物II-醯胺， $z=1$ ）、連接物II-2（連接物II-醯胺， $z=2$ ）、連接物II-3（連接物II-醯胺， $z=3$ ）及連接物II-4（連接物II-醯胺， $z=4$ ）中接種細胞，且進一步在 $37^{\circ}C$ 下培育72小時。在照完相片之後，藉由使用血球計計數細胞。生長抑制與未經處理之對照物進行比較以找到抑制50%生長之連接物濃度（ IC_{50} ）。 IC_{50} 之概述展示於表1中。 IC_{50} 值在連接物I-1至連接物I-5及連接物II-1中為300至700 μM 。連接物II-2至II-4之 IC_{50} 值大於800 μM 。此等資料表明細胞毒性低至結合藥物之連接物及藥物遞送之金奈米粒子。

表1 人類乳腺癌MCF7、MDA-MB-453及MDA-MB-231以及人類乳腺上皮細胞H184B5F5/M10中持續72小時時連接物細胞毒性之 IC_{50} 值概述。

連接物細胞毒性之 IC_{50} 值(μM)	MCF7	MDA-MB-231	M10	MDA-MB-453
連接物I-1	692.0 ± 51.9	528.9 ± 52.1	584.4 ± 62.7	298.6 ± 23
連接物I-2	730 ± 36.7	535.6 ± 21.6	685.7 ± 105.5	432.5 ± 96.6
連接物I-3	538.2 ± 39.6	453.7 ± 141.7	555 ± 33.5	332.9 ± 9.8
連接物I-4	569.2 ± 14.1	575.6 ± 81.9	560 ± 45.1	342.3 ± 11
連接物I-5	418.9 ± 23.8	484.3 ± 64.6	569.3 ± 54.7	460 ± 87.9
連接物II-1	500.8	474.3	500.4	> 800

連接物II-2	> 800	> 800	> 800	> 800
連接物II-3	> 800	428.3 ± 116.2	585.3 ± 132.2	> 800
連接物II-4	> 800	> 800	> 800	> 800
連接物IV-2	> 800	655.5	> 800	708.4 ± 35.3
連接物SHI-1	>800	558.9 ± 23.3	>800	128.3 ± 15.1
連接物SHI-4	>800	532.7 ± 63.9	>800	129.7 ± 13.4

實例21 製備金奈米粒子、連接物及抗癌藥物及/或抗體之錯合物

1. Au/LKI-1/mAb-p24錯合物

製備 Au/LKI-1/mAb-p24錯合物

為將抗體結合至金奈米粒子上，使用10 kDa MWCO離心過濾器 (Millipore，UFC501024)濃縮抗HIV-1 p24 (HIV-1 p24) (GeneTex，GTX41595)抗體，且以1 mg/mL溶解於100 mM Na₂HPO₄、pH 7.4緩衝劑中。隨後，將5 µL含有100 mM NaIO₄之水溶液添加至50 µL抗體溶液中，且在暗處培育混合物30分鐘。藉由添加250 µL 1× PBS來淬滅反應。此時，氧化抗體之Fc部分上的碳水化合物部分以使其具有醛基。隨後，添加連接物I-1 (連接物I-醯胺，**m=2**)至抗體溶液中。連接物在分子相對位置上具有醯肼及二硫醇基。醯肼部分與經改質抗體分子之Fc部分的醛基相互作用。在室溫下培育反應混合物2小時，且隨後使用離心過濾器收集硫醇化抗體，且在0.1 M磷酸鈉緩衝劑(pH 7.4)中對其進行再懸浮。將一百微升0.1 mg/ml濃度之硫醇化抗體與0.5 mL金奈米粒子混合，且在室溫下培育懸浮液1小時。將抗體-金奈米粒子錯合物保持在4℃來儲存以供進一步使用。

Au/LKI-1/mAb-p24錯合物之表徵

用UV-Vis分光光度計(Beckman，DU 800)分析Au/LKI-1/mAb-p24錯合物之調配物。所記錄表面電漿子共振譜展示抗體結合之金奈米粒子之電漿子峰($\lambda_{\max}$)中的2 nm紅移(圖1A)。使用倒置顯微鏡(Nikon，TE2000-U)量測Alex Fluor 568二級抗體標記之Au/LKI-1/mAb-p24錯合物的紅色螢光影像。各金奈米粒子展示紅色螢光，其表明各金奈米粒

子在表面上與抗HIV-1 P24抗體結合(圖1B)。另外，吾等研究抗HIV-1 P24抗體在金奈米粒子上之結合親和力。自ELISA，吾等可確認Au/LKI-1/mAb-p24錯合物對抗HIV-1 P24蛋白質之結合親和力(圖1C)。

2. Au/LKI-1或LK I-5/Ab-EGFR錯合物

製備Au/LKI-1或LK I-5/Ab-EGFR錯合物

為將抗體結合至金奈米粒子上，使用10 kDa MWCO離心過濾器(Millipore，UFC501024)濃縮抗人類EGFR純系H11 (Thermo，MA1-12693)，且以1 mg/mL溶解於100 mM Na_2HPO_4 、pH 7.4緩衝劑中。隨後，將5 μL 含有100 mM NaIO_4 之水溶液添加至50 μL 抗體溶液中，且在暗處培育混合物30分鐘。藉由添加250 μL 1× PBS來淬滅反應。此時，氧化抗體之Fc部分上的碳水化合物部分以使其具有醛基。隨後，添加連接物I-1 (連接物I-醯胺， $m=2$)或連接物I-5 (連接物I-醯胺， $m=5$)至抗體溶液中。連接物在分子相對位置上具有醯肼及二硫醇基。醯肼部分與經改質抗體分子之Fc部分的醛基相互作用。在室溫下培育反應混合物2小時，且隨後使用離心過濾器收集硫醇化抗體，且在0.1 M磷酸鈉緩衝劑(pH 7.4)中對其進行再懸浮。將一百微升0.1 mg/ml濃度之硫醇化抗體與0.5 mL金奈米粒子混合，且在室溫下培育懸浮液1小時。將抗體-金奈米粒子錯合物保持在4°C來儲存以供進一步使用。

Au/LKI-1或LK I-5/ Ab-EGFR錯合物之表徵

用UV-Vis分光光度計(Beckman，DU 800)分析Au/LKI-1/ Ab-EGFR錯合物或Au/ LK I-5/ Ab-EGFR錯合物之調配物。所記錄表面電漿子共振譜展示抗體結合之金奈米粒子之電漿子峰(λ_{max})中的2 nm紅移(圖2)。吾等檢測兩個連接物連接物I-1 (連接物I-醯胺($m=2$))及連接物I-5 (連接物I-醯胺($m=5$))以檢測EGFR抗體及金奈米粒子結合。

Au/LKI-1/ Ab-EGFR錯合物及Au/LKI-5/ Ab-EGFR錯合物之流式細胞測量術分析顯示人類乳腺癌MCF-7細胞上之靶向親和力。與EGFR抗體相比，Au/LKI-1/ Ab-EGFR錯合物及Au/LKI-5/ Ab-EGFR錯合物均展示類似靶向能力(表2)。此等資料表明連接物適用於抗體及金奈米粒子結合，且保持對抗體之結合親和力。

表2 Ab-EGFR、Au/LKI-1/Ab-EGFR錯合物及Au/LKI-5/Ab-EGFR錯合物在MCF-7乳房腫瘤細胞表面之EGFR上之靶向作用的流動式細胞量測分析。

	Ab-EGFR	Au/LKI-1/Ab-EGFR錯合物	Au/LKI-5/Ab-EGFR錯合物
靶向細胞表面之% EGFR (細胞株：MCF-7)	71.5	68	67

3. Au/LKI-1/曲妥珠單抗(Tras)錯合物

製備Au/LKI-1/Tras錯合物

為將抗體結合至金奈米粒子上，使用10 kDa MWCO離心過濾器(Millipore，UFC501024)濃縮Tras (JHL biotech，JHL1188)抗體，且以1 mg/mL溶解於100 mM Na_2HPO_4 、pH 7.4緩衝劑中。隨後，將5 μL 含有100 mM NaIO_4 之水溶液添加至50 μL 抗體溶液中，且在暗處培育混合物30分鐘。藉由添加250 μL 1× PBS來淬滅反應。此時，氧化抗體之Fc部分上的碳水化合物部分以使其具有醛基。隨後，添加連接物I-1(連接物I-醯胺(m=2))至抗體溶液中。連接物在分子相對位置上具有醯肼及二硫醇基。醯肼部分與經改質抗體分子之Fc部分的醛基相互作用。在室溫下培育反應混合物2小時，且隨後使用離心過濾器收集硫醇化抗體，且在0.1 M磷酸鈉緩衝劑(pH 7.4)中對其進行再懸浮。將一百微升0.1 mg/ml濃度之硫醇化抗體與0.5 mL金奈米粒子混合，且在室溫下培育懸浮液1小時。將Au/LKI-1/Tras錯合物保持在4°C來儲存以供進一步使用。

Au/LKI-1/Tras錯合物之表徵

用UV-Vis分光光度計(Beckman，DU 800)分析Au/LKI-1/Tras錯合物之調配物。所記錄表面電漿子共振譜展示抗體結合之金奈米粒子之電漿子峰($\lambda_{\max}$)中的8 nm紅移(圖3)。吾等檢測Au/LKI-1/Tras錯合物。Au/LKI-1/Tras錯合物之流式細胞測量術分析顯示在人類乳腺癌細胞上之靶向親和力。與曲妥珠單抗相比，Au/LKI-1/Tras錯合物展示類似的靶向能力(表3)。

表3. Tras及Au/LKI-1/Tras錯合物在MDA-MB-453乳房腫瘤細胞表面之Her2/neu上之靶向作用的流動式細胞量測分析。

	Ab-EGFR	Au/LKI-1/Ab-EGFR錯合物
對細胞表面上之Her2/neu的%曲妥珠單抗 (細胞株：MDA-MB-453)	99.89	99.98

4. Au/LKI-1/依那西普(ETA)錯合物

製備Au/LKI-1/ETA錯合物

為將抗體結合至金奈米粒子上，使用10 kDa MWCO離心過濾器(Millipore，UFC501024)濃縮依那西普(ETA) (Mycenax biotech，TuNEX)，且以1 mg/mL溶解於100 mM Na_2HPO_4 、pH 7.4緩衝劑中。隨後，將5 μL 含有100 mM NaIO_4 之水溶液添加至50 μL 抗體溶液中，且在暗處培育混合物30分鐘。藉由添加250 μL 1 $\times$ PBS來淬滅反應。此時，氧化抗體之Fc部分上的碳水化合物部分以使其具有醛基。隨後，添加連接物I-1至抗體溶液中。連接物在分子相對位置上具有醯肼及二硫醇基。醯肼部分與經改質抗體分子之Fc部分的醛基相互作用。在室溫下培育反應混合物2小時，且隨後使用離心過濾器收集硫醇化抗體，且在0.1 M磷酸鈉緩衝劑(pH 7.4)中對其進行再懸浮。將一百微升0.1 mg/ml濃度之硫醇化抗體與0.5 mL金奈米粒子混合，且在室溫下培育懸浮液1小時。將Au/LKI-1/ETA錯合物保持在4 $^{\circ}\text{C}$ 來儲存以

供進一步使用。

Au/LKI-1/ETA錯合物之表徵

用UV-Vis分光光度計(Beckman，DU 800)分析Au/LKI-1/ETA錯合物之調配物。所記錄表面電漿子共振譜展示Au/LKI-1/ETA之電漿子峰(λ_{max})中的2 nm紅移(圖4A)。使用倒置顯微鏡(Nikon，TE2000-U)量測Alex Fluor 568二級抗體標記之Au/LKI-1/ETA錯合物的紅色螢光影像。各金奈米粒子展示紅色螢光，其表明各金奈米粒子在表面上與ETA抗體結合(圖4B)。吾等藉由與結合有1-5 nm AuNP之二級抗體結合來進一步檢測Au/LKI-1/ETA錯合物。觀測到Au/LKI-1/ETA錯合物之TEM影像、1-5 nm金標記之二級抗人類IgG抗體結合至定位於AuNP表面上的ETA (圖4C)。吾等進一步研究ETA及Au/LKI-1/ETA之TNF α 阻斷能力。分別用12.5 ng/mL TNF α 及62.5、125、250、500 ng/mL ETA或Au/LKI-1/ETA錯合物之混合物處理MCF-7細胞(5×10^5) 2小時。經處理細胞在37°C下培育72小時，且隨後藉由MTS [(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羥基甲氧基苯基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑鎗)]分析來計數細胞數目。TNF α 阻斷能力在僅ETA及Au/LKI-1/ETA錯合物中均觀測到。ETA及Au/LKI-1/ETA錯合物用於測試其阻斷TNF α 誘導之MCF-7細胞凋亡的能力，表4。與ETA相比，Au/LKI-1/ETA錯合物展示類似的阻斷TNF α 能力

表4. Au/LKI-1/ETA錯合物阻斷TNF α 誘導之MCF-7細胞凋亡的能力

TNF α 12.5 ng/mL	相對細胞存活期%	
劑量(ng/mL)	ETA	Au/LKI-1/ETA錯合物
62.5	36.7 $\pm$ 1.4	35.6 $\pm$ 4.9
125	68.5 $\pm$ 2.3	54.9 $\pm$ 3.1
250	82.1 $\pm$ 6.5	67.2 $\pm$ 2.2
500	103.3 $\pm$ 0.9	100.9 $\pm$ 5.4

5. Au/LKI-1/多柔比星(Dox)錯合物

製備Au/LKI-1/Dox錯合物

添加1當量多柔比星及2當量連接物I-1 (連接物I-醯胺(m=2))至乾燥MeOH中，且在室溫下混合。添加TFA (1.3當量)至所得混合物中以進行反應隔夜。過濾所得混合物，獲得澄清溶液。藉由滴管添加澄清溶液至具有50 mL EtOAc之燒瓶中，攪拌20分鐘，且過濾，獲得Dox-連接物-1固體。所得固體用EtOAc洗滌，且隨後乾燥。添加400 μ L Dox/LKI-1 (2000 ppm)及2 μ L NaOH至1 mL AuNPs (50 ppm)中，且隨後混合21小時。混合物以1400 rpm離心20分鐘。所得沈澱物藉由DI水洗滌，且所得沈澱物再懸浮於DI水中。添加PEG (2K, 2000 Da)至懸浮液中，且混合隔夜，獲得Au/LKI-1/Dox錯合物。

Au/LKI-1/Dox錯合物之表徵

用UV-Vis分光光度計(Beckman, DU 800)分析Au/LKI-1/DOX錯合物。所記錄表面電漿子共振譜展示Au/LKI-1/Dox錯合物之電漿子峰($\lambda_{\max}$)中的3 nm紅移(圖5)。

其他連接物I-2、I-3、I-4、I-5、II-1、II-2、II-3、II-4、IV-2、SHI-1及SHI-4用於結合DOX及金奈米粒子以獲得根據上文所提及之方法的各種錯合物。

實例22 Au/連接物(LK)/Dox錯合物之細胞毒性分析

吾等檢測Au/LK/Dox錯合物之細胞毒性，且計算IC₅₀值。選擇人類乳腺癌MCF7、MDA-MB-453及MDA-MB-231以及人類乳腺上皮細胞H184B5F5/M10用於細胞毒性測試。在96孔培養盤及經處理之2 μ M多柔比星(Dox)、20-50 nm與多柔比星結合之金奈米粒子中使用如下表中展示之各種連接物接種細胞，且用SH-PEG (Au/LK/Dox，含有2 μ M多柔比星)覆蓋，且進一步在37°C下培育72小時。CellTiter 96®單溶液細胞增殖分析(AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) (MTS)試劑購自Promega (Madison, WI, USA)，且分析根據製造商之說明書進行。使用微定量盤式讀取器(Bio-tek, Powerwave X340，

Winooski, VT, USA)在490 nm下量測吸光度。生長抑制與未經處理之對照物相比以找到抑制50%生長之Au/LK/Dox錯合物濃度(IC₅₀)。

表5 人類乳腺癌MCF7、MDA-MB-453及MDA-MB-231以及人類乳腺上皮細胞H184B5F5/M10中持續72小時Au/LK/Dox錯合物細胞毒性之IC₅₀值概述。

錯合物細胞毒性之IC ₅₀ 值(μM)	MCF7	MDA-MB-231	MDA-MB-453	M10
Au/連接物I-1/Dox	0.54 ± 0.03	0.5 ± 0.082	1.93 ± 0.2	0.49 ± 0.0138
Au/連接物I-2/Dox	0.7 ± 0.0096	0.86 ± 0.056	0.7 ± 0.05	0.46 ± 0.058
Au/連接物I-3/Dox	> 2.0	> 2.0	> 2.0	> 2.0
Au/連接物I-4/Dox	> 2.0	> 2.0	> 2.0	> 2.0
Au/連接物I-5/Dox	> 2.0	> 2.0	> 2.0	> 2.0
Au/連接物II-1/Dox	0.65 ± 0.037	0.83 ± 0.027	0.69 ± 0.026	0.56 ± 0.015
Au/連接物II-2/Dox	> 2.0	0.98 ± 0.26	> 2.0	0.67 ± 0.1
Au/連接物II-3/Dox	0.76 ± 0.03	0.46 ± 0.035	0.85 ± 0.319	0.19 ± 0.03
Au/連接物II-4/Dox	> 2.0	> 2.0	1.9 ± 0.12	0.7 ± 0.137
Au/連接物IV-2/Dox	0.77 ± 0.02	0.57 ± 0.048	0.73 ± 0.073	0.49 ± 0.031
Au/連接物SHI-1/Dox	0.82 ± 0.09	>2.0	>2.0	>2.0
Au/連接物SHI-4/Dox	0.75 ± 0.15	>2.0	>2.0	>2.0
Dox	0.41 ± 0.055	0.67 ± 0.088	0.65 ± 0.072	0.14 ± 0.034

IC₅₀值在Au/LK/Dox錯合物(LKI-1、LKI-2、LKII-1、LKII-3及LKIV-2)中針對癌細胞(MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-453)為0.46~1.93 μM，其類似於Dox。對於正常細胞M10，錯合物之細胞毒性低於Dox。資料表明Au/LK/Dox錯合物比Dox更加安全。

實例23 Au/LKI-1/Dox錯合物之pH-敏感性LKI-1釋放測試

以14000 rpm離心1 mL Au/LKI-1/Dox錯合物溶液20分鐘。丟掉上澄液，且添加pH 5.5緩衝劑或pH 7.4緩衝劑至其中。在不同時間點之後，以14000 rpm離心錯合物溶液20分鐘，且隨後將上澄液在557.6 nm (F-4500 FL分光光度計)下進行螢光掃描，獲得OD值。藉由自Dox標準曲線內插可獲得自錯合物釋放之Dox量(X小時Dox釋放量)。

以14000 rpm離心1 mL Au/LKI-1/Dox錯合物溶液20分鐘。丟掉上

澄液，且添加pH 1.0緩衝劑至其中。在一小時之後，以14000 rpm離心錯合物溶液20分鐘，且隨後將上澄液在557.6 nm (F-4500 FL分光光度計)下進行螢光掃描，獲得OD值。藉由自Dox標準曲線(pH=1培育1小時Dox釋放量)內插可獲得Dox 100%釋放。根據下式計算Dox累積釋放百分比。

● $\text{Dox累積釋放}\% = (\text{X小時Dox釋放量} / \text{pH=1培育1小時Dox釋放量}) \times 100\%$

表6 Au/LKI-1/Dox錯合物之pH-敏感性LKI-1釋放測試

培育時間(h)	Au/LKI-1/Dox之Dox釋放，(%)	
	pH=5.5	pH=7.4
1	23.40	6.12
3	27.87	7.30
5	27.80	7.39
7	32.11	7.54
12	37.16	7.51
24	46.01	7.91
48	55.39	8.96
72	70.45	8.88

資料展示LKI-1在pH 5.5下比在pH 7.4下釋放更多Dox。在Au/LKI-1/Dox中，Dox隨時間變化釋放越來越多。

實例24 功效研究設計

BALB/c-nu/nu小鼠購自BioLASCO Taiwan。八週齡雄性小鼠藉由皮下注射單側注射含有 1.0×10^7 個MDA-MB-231乳房腫瘤細胞之200 μL 50:50 Matrigel/Leibovitz's (L-15)至背部。(1)媒劑-PBS (陰性對照)，(2)多柔比星(陽性對照)，5 mg/kg，(3) Au/PEG，(4) Au/LKI-1/Dox錯合物，5 mg/kg Dox。處理持續進行直至臨床症狀需要處死為止。小鼠每週最少稱量兩次，且監測腫瘤尺寸直至臨床症狀需要處死為止(參看圖6A、圖6B)。在異種移植模型中用Au/LKI-1/Dox錯合物處理之MDA-MB-231乳房腫瘤細胞的TEM影像。圖中之箭頭展示Au/LKI-1/Dox錯合物存在於MDA-MB-231乳房腫瘤細胞內部。(參看圖6C)在

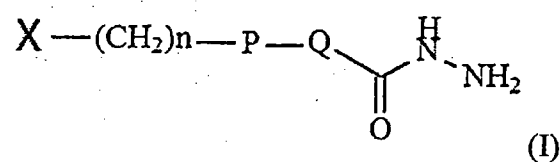
異種移植模型中用Au/LKI-1/Dox錯合物處理之MDA-MB-231腫瘤細胞的H&E染色。(參看圖6D)

【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種pH-敏感性連接物，其具有下式(I)，



其中

X為 、-SH、-NH₂ (Boc-NH-；Fmoc-NH-)、-COOH；

n為1至6；

P為-C(O)NH-或-C(O)O-；

Q 為 -R(CH₂CH₂O)_m-、R(-C(O)NH-)_z 或 -R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]Y；

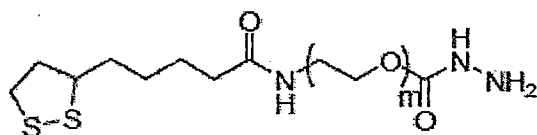
R為鍵、-C₁₋₁₂烷基或C₁₋₁₀烷氧基；

m為1至12；

z為1至4；且

Y為1至12。

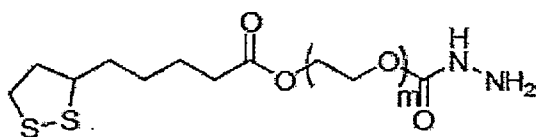
2. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(連接物I-酯胺)，

其中m為1至12。

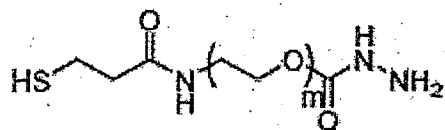
3. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(連接物I-C(O)O；連接物III)，

其中m為1至12。

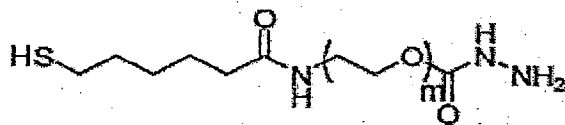
4. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(SH-C₂-連接物-I),

其中m為1至12。

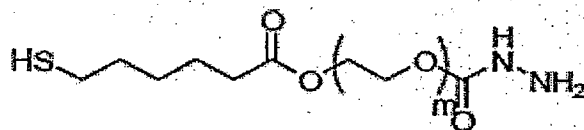
5. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(SH-C₅-連接物-I-醯胺),

其中m為1至12。

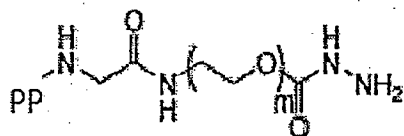
6. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(SH-C₅-連接物-I-C(O)O-；HS-C₅-連接物-III),

其中m為1至12。

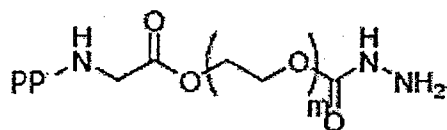
7. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(ppNH-C₁-連接物-I-醯胺),

其中pp為保護基(諸如Boc或Fmoc)；且m為1至12。

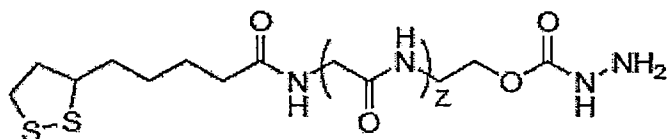
8. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(ppNH-C₁-連接物-I-C(O)O-；NH₂-C₁-連接物-III-C(O)O-),

其中pp為保護基(諸如Boc或Fmoc)；且m為1至12。

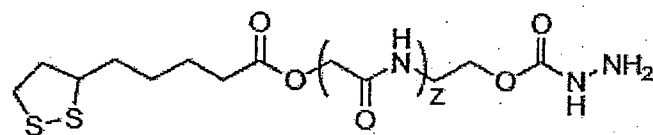
9. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(連接物II-醯胺),

其中z為1至4。

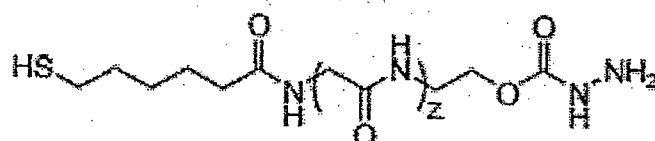
10. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(連接物II- C(O)O-)，

其中z為1至4。

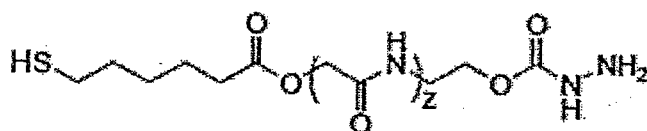
11. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(SH-C₅-連接物-II-醯胺)，

其中z為1至4。

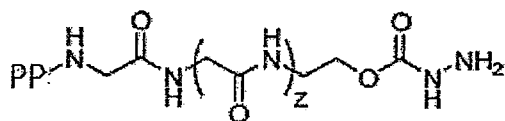
12. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(SH-C₅-連接物-II-C(O)O-)，

其中z為1至4。

13. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：

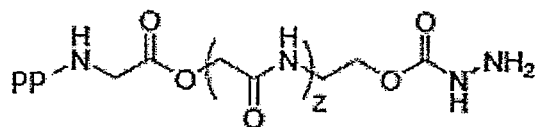


(ppNH-C₁-連接物-II-醯胺)，

其中pp為保護基(諸如Boc或Fmoc)；且

z為1至4。

14. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：

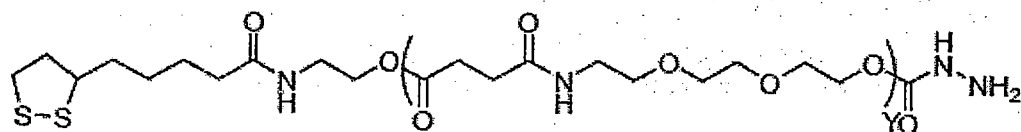


(ppNH-C₁-連接物-II-C(O)O-)，

其中pp為保護基(諸如Boc或Fmoc)；且

z為1至4。

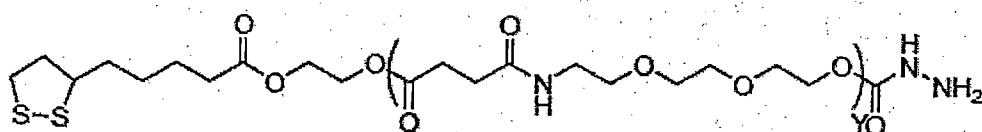
15. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(連接物IV-醯胺)，

其中Y為1至12。

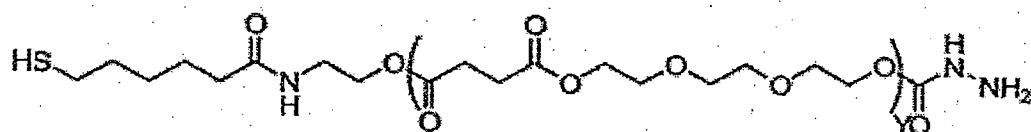
16. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(連接物IV-C(O)O-)，

其中Y為1至12。

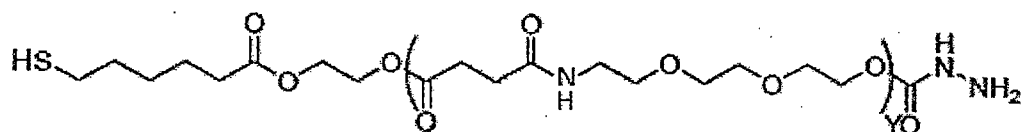
17. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(SH-C₅-連接物-IV-醯胺)，

其中Y為1至12。

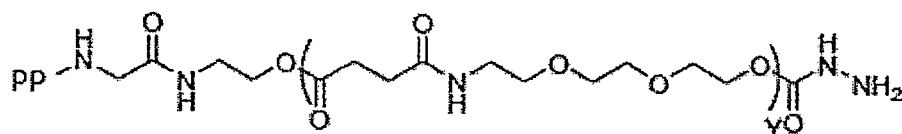
18. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(SH-C₅-連接物-IV-C(O)O-)，

其中Y為1至12。

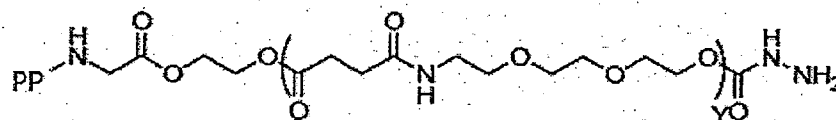
19. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(ppNH-C₁-連接物-IV-醯胺)，

其中pp為保護基(諸如Boc或Fmoc)；且Y為1至12。

20. 如請求項1之pH-敏感性連接物，其具有下式：



(ppNH-C₁-連接物-IV-C(O)O-),

其中pp為保護基(諸如Boc或Fmoc)；且Y為1至12。

21. 一種金屬奈米粒子錯合物，其包含與一或多種如請求項1至20中任一項之連接物錯合、視情況與一或多種PEG錯合之金屬奈米粒子。
22. 如請求項21之金屬奈米粒子錯合物，其中該金屬奈米粒子為Au奈米粒子、Pd奈米粒子、Pt奈米粒子或Ag奈米粒子。
23. 如請求項21之金屬奈米粒子錯合物，其中該多種連接物為相同或不同的。
24. 如請求項21之金屬奈米粒子錯合物，其中該金屬奈米粒子錯合物包含複數個具有不同分子長度之連接物。
25. 如請求項21之金屬奈米粒子錯合物，其中用於本發明之PEG的分子量範圍介於約2000至20,000 Da。
26. 如請求項21之金屬奈米粒子錯合物，其中該金屬奈米粒子之尺寸小於約80 nm。
27. 如請求項21之金屬奈米粒子錯合物，其中該金屬奈米粒子錯合物進一步連接一或多種相同或不同治療或診斷藥物。
28. 如請求項27之金屬奈米粒子錯合物，其中該治療藥物為抗腫瘤藥物或抗體；較佳地，該抗體為靶向諸如腫瘤細胞之特異性細胞的抗體或抗腫瘤抗體。
29. 如請求項28之金屬奈米粒子錯合物，其中該抗腫瘤藥物為抗癌藥物。

30. 如請求項29之金屬奈米粒子錯合物，其中該抗癌藥物為烷化劑、磺酸烷酯、氮丙啶、嘌呤類似物、嘧啶類似物、喜樹鹼(camptothecin)或多柔比星(doxorubicin)、順鉑(cisplatin)。
31. 如請求項29之金屬奈米粒子錯合物，其中該抗癌藥物之量占該金屬奈米粒子錯合物之約1%至約50% (重量/重量)。
32. 一種醫藥組合物，其包含連接一或多種相同或不同治療或診斷藥物的一或多種金屬奈米粒子錯合物及醫藥學上可接受之載劑。
33. 一種向個體遞送治療或診斷藥物之方法，其包含向該個體投與如請求項27之金屬奈米粒子錯合物。
34. 一種藥物遞送系統，其包含連接一或多種相同或不同治療或診斷藥物的一或多種如請求項1至20中任一項之金屬奈米粒子錯合物。

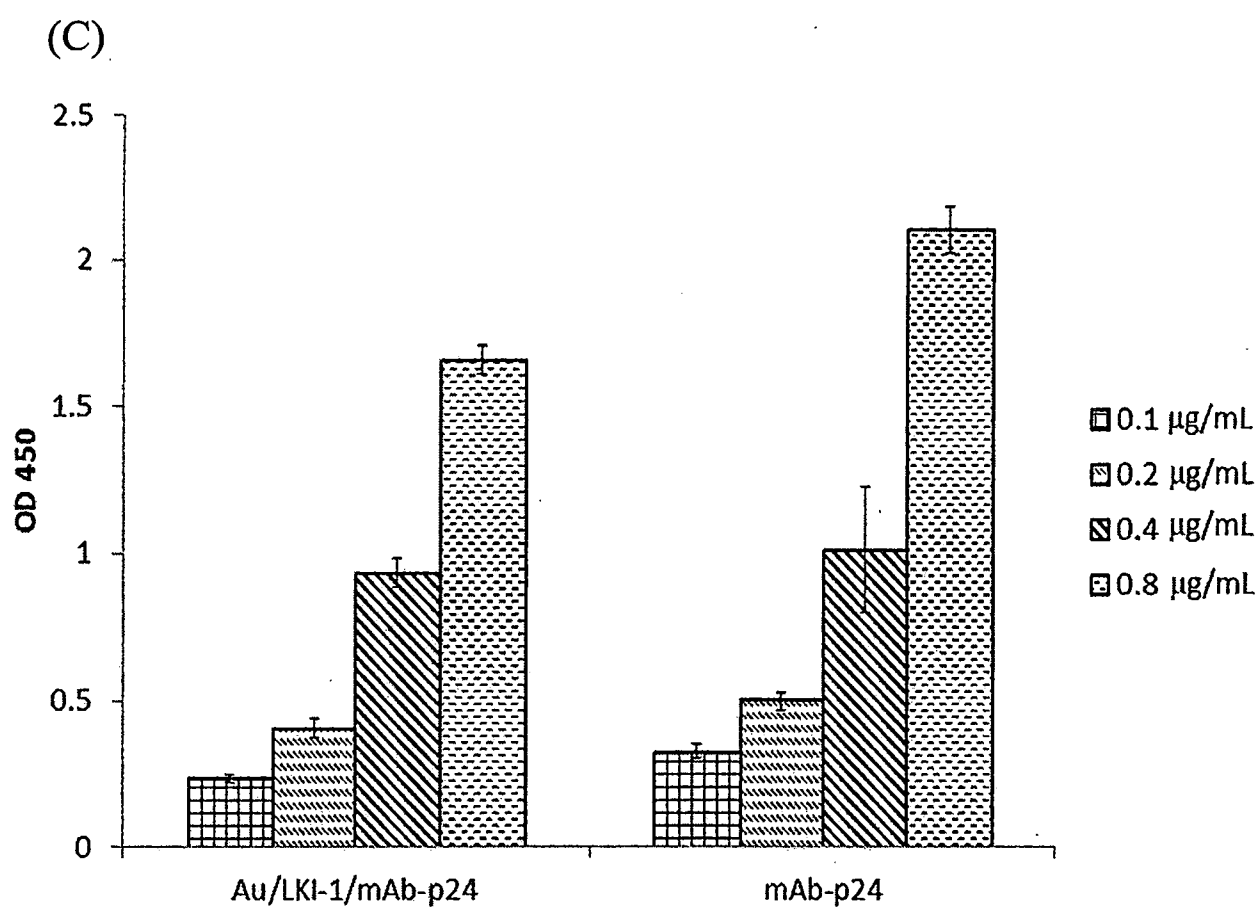
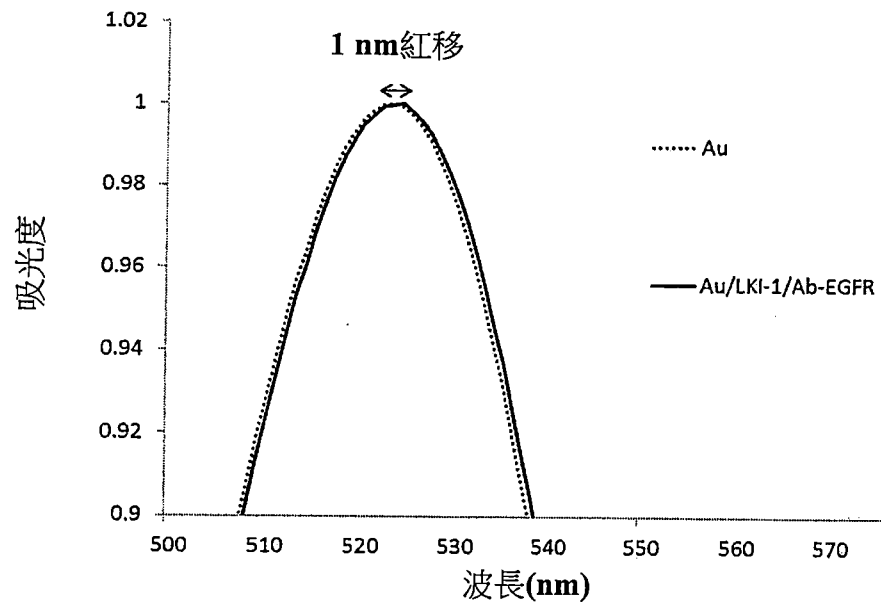


圖1(續)

(A)



(B)

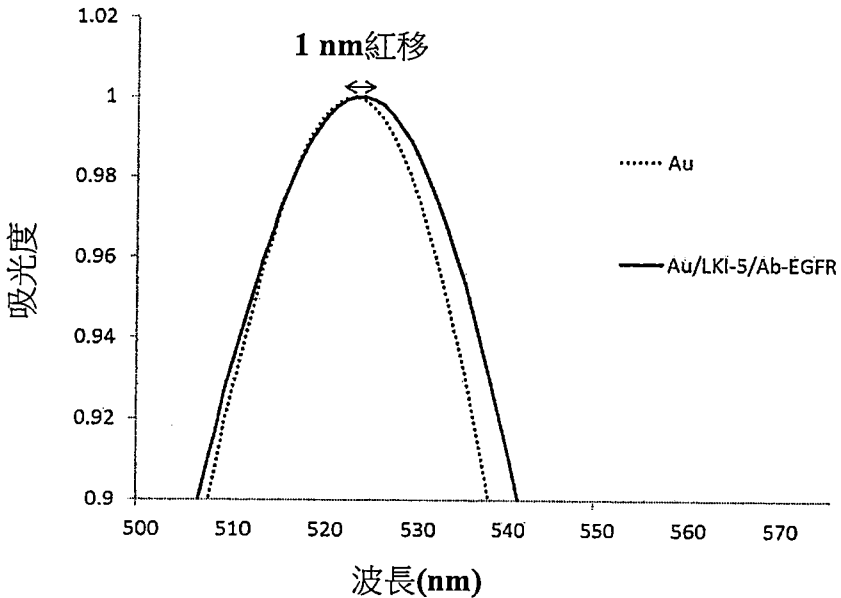


圖2

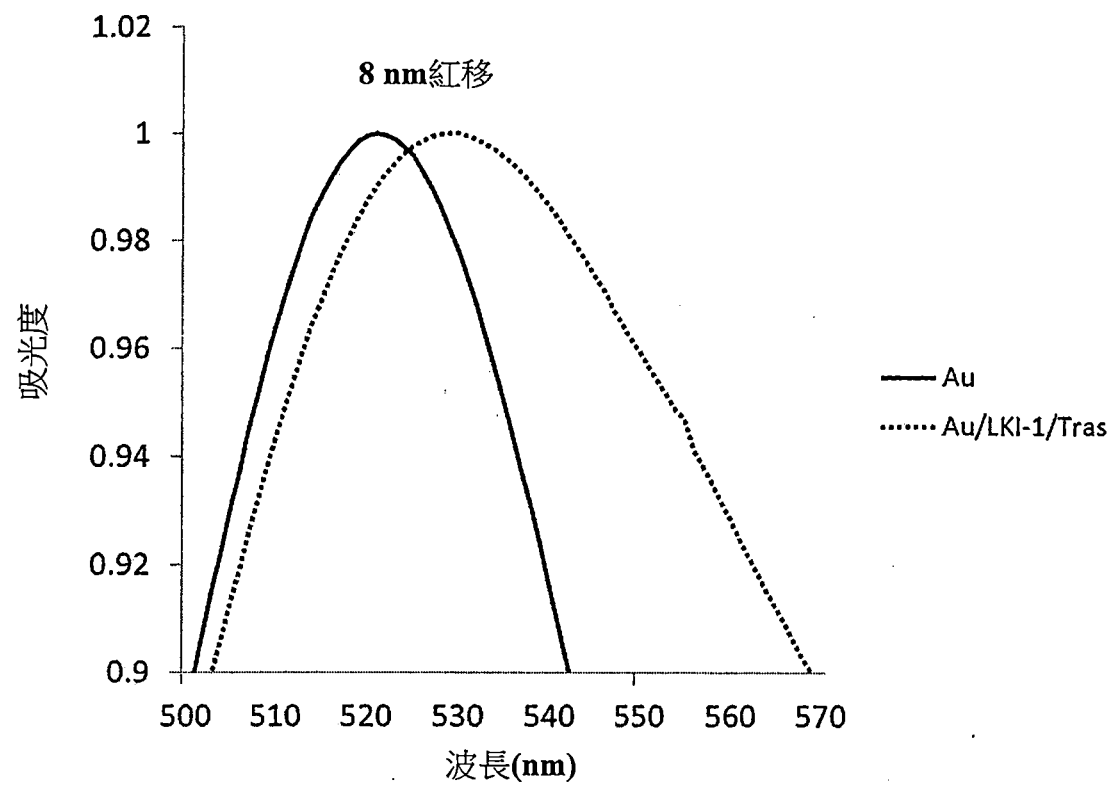


圖3

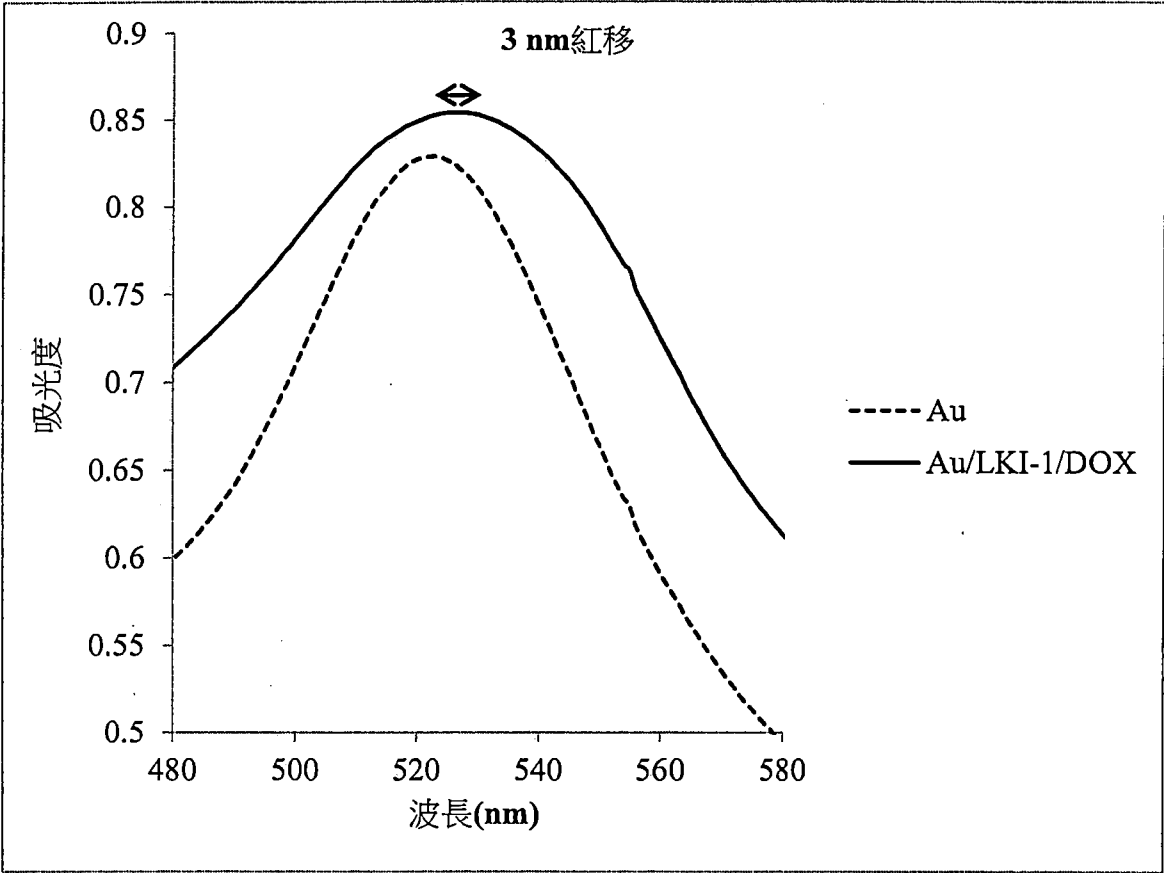


圖5

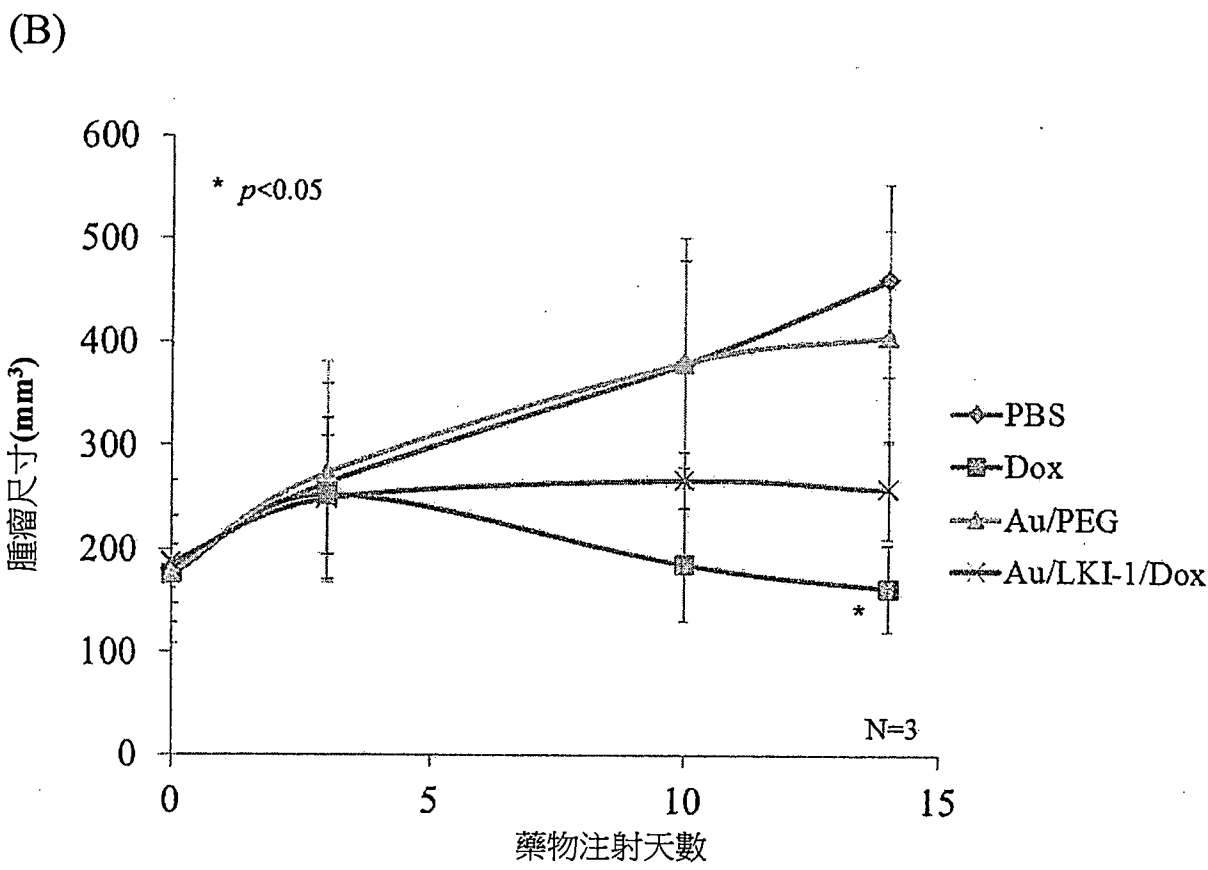
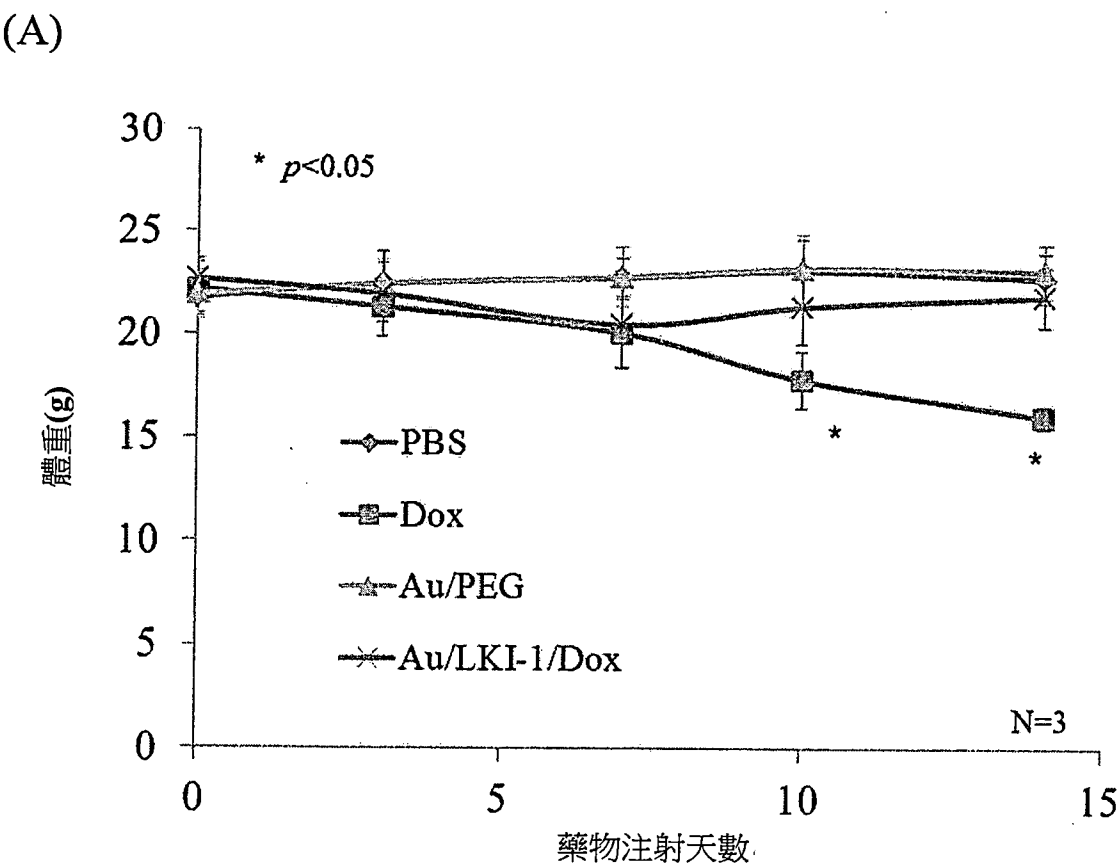


圖6