

用于核酸递送的脂质化合物以及包含所述脂质化合物的相关应用及药物

5 技术领域

本申请涉及人工合成的脂质能够促进核酸递送，特定的人工合成的脂质和核酸的组合能够促进核酸靶细胞和靶器官。

背景技术

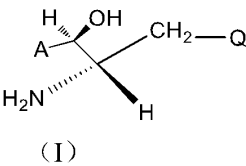
10 在过去几十年中，用核酸分子包括 RNA 分子作为治疗药物的理念从概念走向了临床现实。事实上，核酸分子拥有许多的属性使得它可以作为治疗药物。它们能够折叠形成复杂的构象让它们可以与蛋白质、小分子或者其他核酸相互结合，有些甚至可以形成催化中心。通常，人们一般把 siRNA, miRNA 及其他非编码小 RNA 不加区分的称之为小核酸或小 RNA (sRNA)。然而，由于核酸分子容易降解，
15 在体内半衰期较短，因此，作为治疗药物来说，其通常被认为是一个糟糕的选择。

因此，如何将核酸分子包括小 RNA 有效递送至细胞及体内靶器官，实现其生物活性和治疗或预防作用，是本领域技术人员需要考虑的问题。

发明内容

20 本发明部分基于发明人对一系列鞘氨醇类脂质的递送功能的发现。发明人出乎意料地发现，一定碳数范围内的鞘氨醇类脂质与核酸的组合或一定碳数范围内的鞘氨醇和辅助脂质与核酸的组合可以有效递送核酸进入细胞以及递送核酸进入靶器官。

在第一方面，本发明提供了脂质组合物在制备用于递送核酸的产品/试剂中的用途，所述脂质组合物包含一种或多种具有下式 (I) 的化合物：

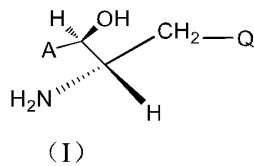


其中，

A 选自直链 C₁₀₋₃₄ 烷基和直链 C₁₀₋₃₄ 烯基；

30 Q 为-OH。

在具体的实施方案中，本发明提供了脂质组合物在制备用于递送核酸的产品/试剂中的用途，所述脂质组合物包含一种或多种具有下式 (I) 的化合物：

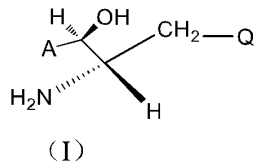


其中，

A 选自直链 C₁₀₋₃₂ 烷基和直链 C₁₀₋₃₂ 烯基；

5 Q 为-OH。

在具体的实施方案中，本发明提供了脂质组合物在制备用于递送核酸的产品/试剂中的用途，所述脂质组合物包含一种或多种具有下式 (I) 的化合物：

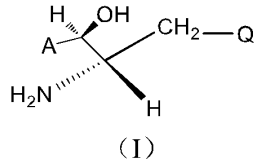


10 其中，

A 选自直链 C₁₁₋₃₁ 烷基和直链 C₁₁₋₃₁ 烯基；

Q 为-OH。

在具体的实施方式中，本发明提供了脂质组合物在制备用于核酸递送的产品/试剂中的用途，所述脂质组合物包含一种或多种具有式 (I) 的化合物：



15 其中，

A 选自直链 C₂₁₋₃₄ 烷基或直链 C₂₁₋₃₄ 烯基；

Q 为-OH。

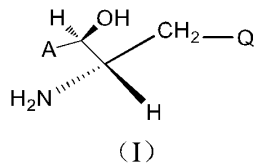
20 优选地，本发明所述 A 选自直链 C₂₁₋₃₂ 烷基和直链 C₂₅₋₃₂ 烯基；更优选地，所述 A 选自直链 C₂₅₋₃₀ 烷基和直链 C₂₅₋₃₀ 烯基。

在具体的实施方案中，本发明提供的用于核酸递送的产品/试剂向受试者体内递送核酸，优选地，所述试剂用于通过口服、肌肉内、静脉内、皮下、经皮、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、心室内、和/或吸入途径向受试者体内递送核酸。

25 在具体的实施方案中，本发明提供的用于核酸递送的产品/试剂向体外的细胞中递送核酸，优选地，通过直接接触的方式向体外的细胞中递送核酸。

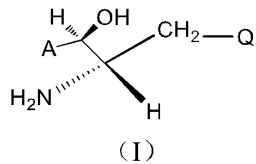
在具体的实施方案中，本发明提供的脂质组合物可用于递送小 RNA 分子，优选地，所述小 RNA 分子是长度为 14-32 核苷酸的小 RNA 分子，优选地，所述核酸分子是长度为 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31 或 32 个核苷酸的小 RNA 分子。

在另一方面，本发明提供了一种药物组合物，其包含脂质组合物和核酸分子，其中，所述脂质组合物包含一种或多种具有式 (I) 的化合物：



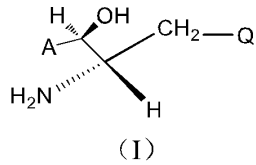
5 其中，
A 选自直链 C₁₀₋₃₄ 烷基或直链 C₁₀₋₃₄ 烯基；
Q 为-OH。

在具体的实施方案中，本发明提供了一种药物组合物，其包含脂质组合物和核酸分子，其中，所述脂质组合物包含一种或多种具有式 (I) 的化合物：



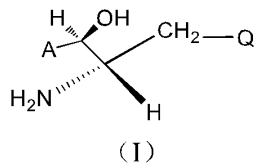
10 其中，
A 选自直链 C₁₀₋₃₂ 烷基或直链 C₁₀₋₃₂ 烯基；
Q 为-OH。

15 在具体的实施方案中，本发明提供了一种药物组合物，其包含脂质组合物和核酸分子，其中，所述脂质组合物包含一种或多种具有式 (I) 的化合物：



20 其中，
A 选自直链 C₁₁₋₃₁ 烷基或直链 C₁₁₋₃₁ 烯基；
Q 为-OH。

在具体的实施方案中，本发明提供了一种药物组合物，其包含脂质组合物以及核酸分子，其中，所述脂质组合物包含一种或多种具有式 (I) 的化合物：



25 其中，
A 选自直链 C₂₁₋₃₄ 烷基或直链 C₂₁₋₃₄ 烯基；
Q 为-OH。

优选地，本发明所述 A 选自直链 C₂₁₋₃₂ 烷基和直链 C₂₅₋₃₂ 烯基；更优选地，所

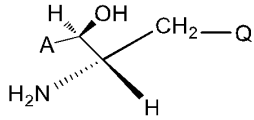
述 A 选自直链 C₂₅₋₃₀ 烷基和直链 C₂₅₋₃₀ 烯基。

在具体的实施方案中，所述核酸分子是 RNA 分子或 DNA 分子，优选地，所述 RNA 分子是小 RNA 分子，优选地，其是长度为 14-32 核苷酸的小 RNA 分子，优选地，其是长度为 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31 或 32 个核苷酸的小 RNA 分子。

在另一方面，本发明提供了一种制备如上所述的本发明的药物组合物的方法，所述方法包括使所述脂质组合物与核酸分子混合的步骤。

在另一方面，本发明提供了本文所述的药物组合物在制备用于治疗受试者中疾病的药物中的用途，优选地，所述药物通过口服、肌肉内、静脉内、皮下、经皮、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、心室内、和/或吸入途径施用于受试者。

另一方面，本发明提供了如式 (I) 所示的化合物：



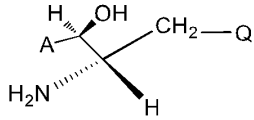
(I)

其中，

所述 A 选自直链 C₁₀₋₃₄ 烷基和直链 C₁₀₋₃₄ 烯基；

Q 为-OH。

在具体的实施方案中，本发明提供了如式 (I) 所示的化合物：



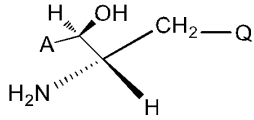
(I)

其中，

所述 A 选自直链 C₁₀₋₃₂ 烷基和直链 C₁₀₋₃₂ 烯基；

Q 为-OH。

在具体的实施方案中，本发明提供了如式 (I) 所示的化合物：



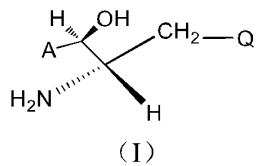
(I)

其中，

所述 A 选自直链 C₁₁₋₃₁ 烷基和直链 C₁₁₋₃₁ 烯基；

Q 为-OH。

另一方面，本发明提供了一种用于体外转染细胞的组合物，其包含脂质组合物和核酸分子，其中，所述脂质组合物包含一种或多种具有式 (I) 的化合物：



其中，

A 选自直链 C₁₀₋₃₄ 烷基或直链 C₁₀₋₃₄ 烯基，优选为直链 C₁₀₋₃₂ 烷基或直链 C₁₀₋₃₂ 烯基；

Q 为-OH。

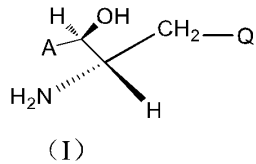
优选地，本发明所述 A 选自直链 C₂₁₋₃₂ 烷基和直链 C₂₅₋₃₂ 烯基；更优选地，所述 A 选自直链 C₂₅₋₃₀ 烷基和直链 C₂₅₋₃₀ 烯基。

具体地，所述脂质组合物包含一种或多种表 1 中所示的化合物。

在具体的实施方案中，所述核酸分子是 RNA 分子或 DNA 分子，优选地，所述 RNA 分子是小 RNA 分子，优选地，其是长度为 14-32 核苷酸的小 RNA 分子，优选地，其是长度为 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31 或 32 个核苷酸的小 RNA 分子；

示例性地，本发明所述小 RNA 分子选自小 RNA 分子 PGY-ssRNA-26。

在具体的实施方案中，本发明提供了如式 (I) 所示的化合物：



其中，

A 选自直链 C₂₁₋₃₄ 烷基和直链 C₂₁₋₃₄ 烯基；优选地，所述 A 选自直链 C₂₁₋₃₂ 烷基和直链 C₂₅₋₃₂ 烯基；更优选地，所述 A 选自直链 C₂₅₋₃₀ 烷基和直链 C₂₅₋₃₀ 烯基；

Q 为-OH，

优选地，所述化合物为表 1 中所示的化合物。

在本发明的一个实施方案中，本发明提供了一种套装组合，其包含本文所述的式 (I) 所示的化合物、或者脂质组合物、或者用于核酸递送的产品/试剂、或者药物组合物，以及核酸，其中所述式 (I) 所示的化合物、或者脂质组合物、或者用于核酸递送的试剂、或者药物组合物和核酸各自独立地提供于第一容器和第二容器中，所述第一容器和第二容器相同或不同。优选地，所述套装组合含有任何一种或多种上述化合物，优选选自表 1 的任何一种或多种化合物。

在本发明的一个实施方案中，本发明提供了用于核酸递送的方法，所述方法包括向受试者给予本文所述的式 (I) 所示的化合物、或者脂质组合物、或者用于核酸递送的产品/试剂、或者药物组合物。

在本发明的一个实施方案中，本发明提供了用于治疗受试者中疾病的方法，所述方法包括向受试者给予本文所述的式 (I) 所示的化合物、或者脂质组合物、

或者用于核酸递送的产品/试剂、或者药物组合物。

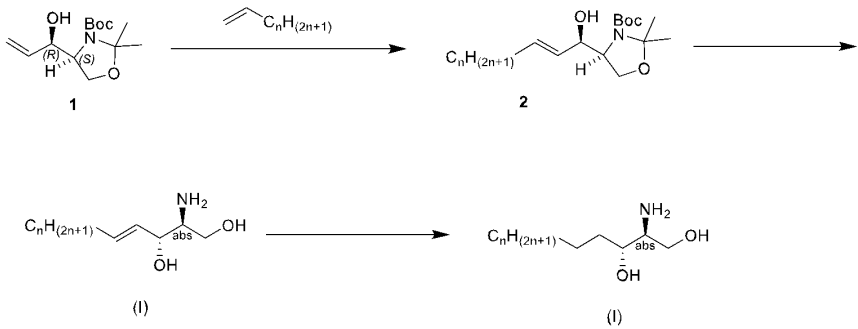
在具体的实施方案中，所述疾病包括癌症、炎症、纤维化疾病、自身免疫疾病、感染、先天性和遗传性疫病、结缔组织疾病、消化系统疾病、内分泌疾病、眼部疾病、生殖性疾病、心血管疾病、肾脏和泌尿性疾病、呼吸系统疾病、代谢性病症、肌肉骨骼疾病、神经系统疾病和血液系统疾病。

在具体的实施方案中，所述癌症选自肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌或血液系统癌症。

在具体的实施方案中，所述药物通过口服、肌肉内、静脉内、皮下、经皮、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、心室内、和/或吸入途径施用于受试者。

另一方面，本发明提供了制备如式（I）所示的化合物的方法，所述方法选自以下中的任意一种：

方法 a.



步骤 a1. 式 1 所示的化合物与链烯烃反应生成式 2 所示的化合物；

步骤 a2. 式 2 所示的化合物转变为 A 为直链烯基的式（I）所示的化合物；

可选的步骤 a3. A 为直链烯基的式（I）所示的化合物还原得到 A 为直链烷基的式（II）所示的化合物；

其中，n=9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32。

优选的，n=9, 10, 14, 16, 18, 19, 24。

在一个实施方案中，步骤 a1 在亚苄基-[1,3-双（2,4,6-三甲基苯基）咪唑烷-2-亚甲基]-二氯-钨、三环己基膦催化下进行。

优选的，步骤 a1 的反应条件为 Grubbs 2nd, DCM, 40℃。

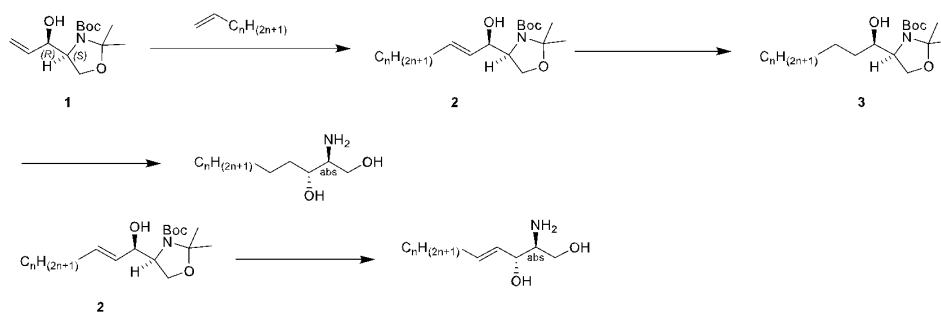
在一个实施方案中，步骤 a2 在 TFA 存在下进行。

优选的，步骤 a2 的反应条件为 TFA, ACN, H₂O, 80℃。

在一个实施方案中，步骤 a3 为加氢还原，优选钨碳催化的加氢还原。

优选的，步骤 a3 的反应条件为 Pd/C, H₂, MeOH/THF, 50℃。

方法 b.



步骤 b1. 式 1 所示的化合物与链烯烃反应生成式 2 所示的化合物;

步骤 b2-1, 式 2 所示的化合物还原得到式 3 所示的化合物;

5 步骤 b3. 式 3 所示的化合物转变为 A 为直链烷基的式 (I) 所示的化合物；
或者

步骤 b2-2. 式 2 所示的化合物转变为 A 为直链烯基的式 (I) 所示的化合物;

其中, $n=9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,$

24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32.

10 优选的, n=20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31。

在一个实施方案中，步骤 b1 同步骤 a1。

在一个实施方案中，步骤 b2-1 为加氢还原，优选钨碳催化的加氢还原。

优选的, 步骤 b2-1 的反应条件为 Pd/C, H₂, MeOH/THF, 50℃。

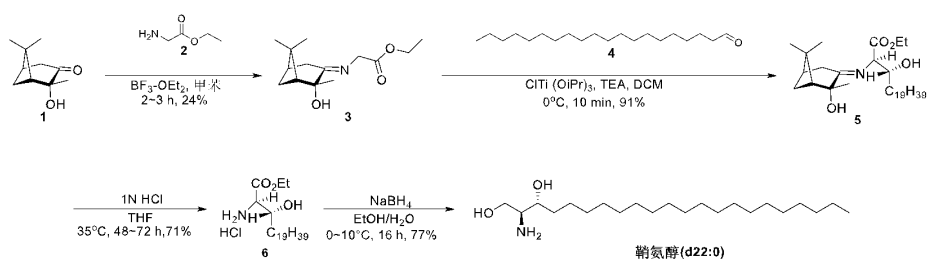
在一个实施方案中，步骤 b3 在 TFA 存在下进行。

15 优选的, 步骤 b3 的反应条件为 TFA, ACN, H₂O, 80℃。

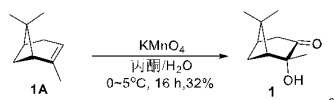
在一个实施方案中，步骤 2-2 在 TFA 存在下进行。

优选的, 步骤 b3 的反应条件为 TFA, ACN, H₂O, 80℃。

方法 c.



优选的，步骤c还包括：



优选的，步骤c还包括：



附图说明

图 1 为体外小核酸在 HPAC 细胞中的递送结果。

图 2 为体外小核酸在 H460 细胞中的递送结果。

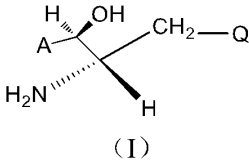
5 图 3 为体外小核酸在 293T 细胞中的递送结果。

具体实施方式

为了更详细的说明本发明，本说明书提供了下列具体实施方案，并结合附图说明这些具体实施方案，但本公开的方案并非仅限于此。本领域技术人员可以结合本领域的公知常识，对本发明的方法、用途和小 RNA 进行适当的改变，只要其能够实现本发明所述的功能，即应落入本发明的范围内。

如本文所用，除非另有说明，本文所用的技术或科学术语具有本领域技术人员通常理解的相同的含义。

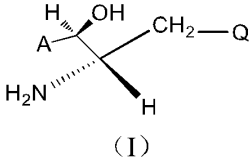
在本发明的一个具体实施方案中，本发明提供了脂质组合物在制备用于核酸递送的试剂中的用途，所述脂质组合物包含一种或多种具有式 (I) 的化合物：



其中，A 选自直链 C₁₀₋₃₂ 烷基和直链 C₁₀₋₃₂ 烯基；任选地，A 为包含 10 个碳原子、11 个碳原子、12 个碳原子、13 个碳原子、14 个碳原子、15 个碳原子、16 个碳原子、17 个碳原子、18 个碳原子、19 个碳原子、20 个碳原子、21 个碳原子、22 个碳原子、23 个碳原子、24 个碳原子、25 个碳原子、26 个碳原子、27 个碳原子、28 个碳原子、29 个碳原子、30 个碳原子、31 个碳原子、32 个碳原子、33 个碳原子或 34 个碳原子的直链烷基，或为包含 21 个碳原子、22 个碳原子、23 个碳原子、24 个碳原子、25 个碳原子、26 个碳原子、27 个碳原子、28 个碳原子、29 个碳原子、30 个碳原子、31 个碳原子或 32 个碳原子的直链烯基；

Q 为-OH。

在具体的实施方案中，本发明提供了脂质组合物在制备用于核酸递送的试剂中的用途，所述脂质组合物包含一种或多种具有式 (I) 的化合物：



其中，

A 选自直链 C₂₁₋₃₄ 烷基或直链 C₂₁₋₃₄ 烯基；任选地，A 为包含 21 个碳原子、22 个碳原子、23 个碳原子、24 个碳原子、25 个碳原子、26 个碳原子、27 个碳原子、

28 个碳原子、29 个碳原子、30 个碳原子、31 个碳原子、32 个碳原子、33 个碳原子或 34 个碳原子的直链烷基，或为包含 21 个碳原子、22 个碳原子、23 个碳原子、24 个碳原子、25 个碳原子、26 个碳原子、27 个碳原子、28 个碳原子、29 个碳原子、30 个碳原子、31 个碳原子、32 个碳原子、33 个碳原子或 34 个碳原子的直链烯基；

Q 为-OH。

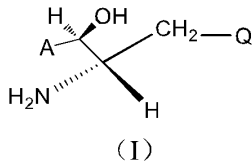
在具体的实施方案中，本发明提供的脂质组合物可以包含一种或多种本申请提供的式 (I) 的化合物或其盐、水合物或溶剂化物；其还可以包含一种或多种本申请提供的化合物以外的其他脂质化合物。所述其他脂质化合物可以是，例如中性脂质、带电脂质、甾族化合物和聚合物缀合的脂质。“中性脂质”是指在所选 pH 值(例如生理 pH 值)下以不带电形式或中性两性离子形式存在的脂质化合物。“带电脂质”是指不受有用的生理范围内的 pH 值(例如 pH 约 3 至约 9)的限制，以带正电或带负电的形式存在的脂质化合物。

在某些实施方式中，所述脂质组合物还可以进一步包含一种或多种溶剂，其能够与本申请提供的化合物或其盐、水合物或溶剂化物混合并形成均一的混合物。

所述脂质组合物中还可以包含有机溶剂或溶剂混合物，例如氯仿，二氯甲烷，二乙醚，环己烷，环戊烷，苯，甲苯，甲醇或其他脂族醇，例如乙醇，丙醇，异丙醇，丁醇，叔丁醇，异丁醇，戊醇和己醇。这些溶剂可以单独地，混合地和/或任选地与合适的缓冲剂一起作为脂质组合物中的溶剂。溶剂的选择通常可以考虑溶剂的极性，在脂质核酸混合物形成的后期除去溶剂的难易程度，和/或药学上可接受的性质。在某些实施方式中，所述溶剂是无毒的，或药学上可接受的。示例性的药学上可接受的溶剂包括低级醇(1-6 个碳原子)，例如甲醇，乙醇，正丙醇，异丙醇和正丁醇。在某些实施方式中，可以使用适量的溶剂，以使核酸和脂质能够形成澄清的单相混合物。

在具体的实施方案中，本发明提供的脂质组合物包含两种或更多种具有式 (I) 的化合物。

在本发明的一个实施方案中，本发明提供了一种药物组合物，其包含脂质组合物以及核酸分子，其中，所述脂质组合物包含一种或多种具有式 (I) 的化合物：



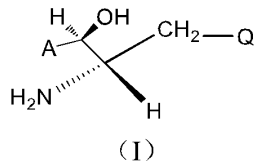
其中，A 选自直链 C₁₀₋₃₂ 烷基和直链 C₁₀₋₃₂ 烯基；任选地，A 为包含 10 个碳原子、11 个碳原子、12 个碳原子、13 个碳原子、14 个碳原子、15 个碳原子、16 个碳原子、17 个碳原子、18 个碳原子、19 个碳原子、20 个碳原子、21 个碳原子、22 个碳原子、23 个碳原子、24 个碳原子、25 个碳原子、26 个碳原子、27 个碳原

子、28 个碳原子、29 个碳原子、30 个碳原子、31 个碳原子、32 个碳原子、33 个碳原子或 34 个碳原子的直链烷基，或为包含 21 个碳原子、22 个碳原子、23 个碳原子、24 个碳原子、25 个碳原子、26 个碳原子、27 个碳原子、28 个碳原子、29 个碳原子、30 个碳原子、31 个碳原子或 32 个碳原子的直链烯基；

5 Q 为-OH；

优选地，所述核酸分子是 RNA 分子或 DNA 分子，优选地，其是小 RNA 分子，优选地，其是长度为 14-32 核苷酸的小 RNA 分子，优选地，其是长度为 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31 或 32 个核苷酸的小 RNA 分子。

10 在具体的实施方案中，本发明提供了一种药物组合物，其包含脂质组合物以及核酸分子，其中，所述脂质组合物包含一种或多种具有式 (I) 的化合物：



其中，

15 A 选自直链 C₂₁₋₃₄ 烷基或直链 C₂₁₋₃₄ 烯基；

Q 为-OH；

优选地，所述核酸分子是 RNA 分子或 DNA 分子，优选地，其是小 RNA 分子，优选地，其是长度为 14-32 核苷酸的小 RNA 分子，优选地，其是长度为 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31 或 32 个核苷酸的小 RNA 分子。

20 在本发明提供的药物组合物的实施方案中，所述脂质组合物与所述核酸分子的质量比为 0.1:1、0.2:1、0.3:1、0.4:1、0.5:1、0.6:1、0.7:1、0.8:1、0.9:1、1:1、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1 或 10:1，或任意上述比值之间的范围。

25 在本发明提供的药物组合物的实施方案中，所述脂质组合物与所述核酸分子的质量比为 1:100、1:30、1:10、1:3、1:1、3:1、10:1、30:1、100:1，或任意上述比值之间的范围。

30 在具体的实施方案中，所述核酸分子是用于治疗的 RNA 分子或 DNA 分子；
 优选地，所述核酸分子通过靶向特异性靶标而用于治疗疾病；任选地，所述核酸分子可用于治疗癌症、炎症、纤维化疾病、自身免疫疾病、感染、先天性和遗传性疫病、结缔组织疾病、消化系统疾病、内分泌疾病、眼部疾病、生殖性疾病、心血管疾病、肾脏和泌尿性疾病、呼吸系统疾病、代谢性病症、肌肉骨骼疾病、神经系统疾病和血液系统疾病。

在具体的实施方案中，所述癌症选自肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌或血液系统癌症。

在具体实施方案中，本发明提供了制备本发明的药物组合物的方法，所述方法包括使所述脂质组合物与核酸分子混合的步骤。

在具体的实施方案中，制备本发明的药物组合物的方法包括：

1) 使所述脂质组合物与核酸分子混合的步骤；和

2) 在 25℃ 至 150℃ 下，

优选地，在 25℃、30℃、35℃、36℃、37℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、85℃、90℃、95℃、100℃、110℃、120℃、130℃、140℃ 或 150℃ 下，

或这些点值之间的任意范围内的温度下，加热步骤 1) 中获得的混合物至少 5 分钟，例如，加热 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 分钟。

术语

如本文所用的术语“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”，并且通常意指 DNA 或 RNA 聚合物，其可以是单链的或双链的、合成的或从天然来源获得的(例如分离的和/或纯化的)；其可以包含天然的、非天然的或被改变的核苷酸。在一些实施方案中，核酸不包含任何插入、缺失、倒位和/或替换。然而，如本文所讨论的，在一些情况下对核酸而言，包含一个或更多个插入、缺失、倒位和/或替换可以是合适的。

如本文所用的术语“载体”，是指并入本文所述的核酸的重组表达载体。所述重组表达载体可以是任何合适的重组表达载体，并且可以用于转化或转染任何合适的宿主细胞，包括但不限于植物表达载体、动物表达载体、病毒载体，例如逆转录病毒载体或慢病毒载体。这些载体是本领域技术人员熟知的，并且可以商购获得。

本文所用的术语“宿主细胞”是指可以转染有本发明的重组表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可以是真核细胞，例如植物、动物、真菌或藻类，或者可以是原核细胞，例如细菌或原生动物。

多种转染技术是本领域公知的，包括但不限于磷酸钙共沉淀、直接微注射到培养的细胞内、电穿孔、脂质体介导的基因转移、脂质介导的转导和使用高速微型射弹的核酸递送。

如本文所用的术语“C_{i-j}”表示碳原子数的范围，其中 i 和 j 为整数且 j 大于 i，并且碳原子数的范围包括端点(即 i 和 j)以及端点之间的每个整数点。例如，C₂₁₋₃₄ 表示 21 至 34 个碳原子的范围，包含 21 个碳原子、22 个碳原子、23 个碳原子、24 个碳原子、25 个碳原子、26 个碳原子、27 个碳原子、28 个碳原子、29 个碳原

子、30个碳原子、31个碳原子、32个碳原子、33个碳原子或34个碳原子。

本文所用的术语“烷基”，是指饱和的直链或支链烃基。术语“直链 C_{i-j} 烷基”指具有 i 至 j 个碳原子的直链烷基。在一些实施方案中，烷基包含21至34个碳原子。在一些实施方案中，烷基包含21个碳原子、22个碳原子、23个碳原子、24个碳
5 原子、25个碳原子、26个碳原子、27个碳原子、28个碳原子、29个碳原子、30个碳原子、31个碳原子、32个碳原子、33个碳原子或34个碳原子。

在一些实施方案中，烷基包含10至34个碳原子，优选包含10至32个碳原子。在一些实施方案中，烷基包含10个碳原子、11个碳原子、12个碳原子、13个碳原子、14个碳原子、15个碳原子、16个碳原子、17个碳原子、18个碳原子、
10 19个碳原子、20个碳原子、21个碳原子、22个碳原子、23个碳原子、24个碳原子、25个碳原子、26个碳原子、27个碳原子、28个碳原子、29个碳原子、30个碳原子、31个碳原子、32个碳原子、33个碳原子、34个碳原子。

本文所用的术语“烯基”，是指具有至少一个碳-碳双键的直链或支链烃基，其可任选地被一个或多个本文所述的取代基独立地取代，并且包括具有“顺式”和“反式”取向，或者“E”和“Z”取向的基团。在一些实施方案中，烯基含有21至34个碳
15 原子。在一些实施方案中，烯基包含21个碳原子，22个碳原子，23个碳原子，24个碳原子，25个碳原子、26个碳原子、27个碳原子、28个碳原子、29个碳原子、30个碳原子、31个碳原子、32个碳原子、33个碳原子或34个碳原子。

在一些实施方案中，烯基包含10至34个碳原子，优选包含10至32个碳原子。
20 子。在一些实施方案中，烷基包含10个碳原子、11个碳原子、12个碳原子、13个碳原子、14个碳原子、15个碳原子、16个碳原子、17个碳原子、18个碳原子、19个碳原子、20个碳原子、21个碳原子、22个碳原子、23个碳原子、24个碳原子、25个碳原子、26个碳原子、27个碳原子、28个碳原子、29个碳原子、30个碳原子、31个碳原子、32个碳原子、33个碳原子或34个碳原子。

25 在一些实施方案中，烯基包含超过1个碳-碳双键。应理解，在所述烯基包含超过1个碳-碳双键的情况下，所述双键可以互相分离或共轭。在一些实施方案中，烯基为 α -烯基。

本文所用的术语“递送”涵盖局部和全身递送两者。“局部递送”是指将待递送的治疗剂(例如核酸)直接递送至生物体内的靶部位。例如，试剂可以通过直接注射到
30 靶部位(例如疾病部位，如肿瘤或炎症部位)或靶器官(例如心脏、脾、肺、肾等)而被局部递送。“全身递送”是指导致治疗剂(例如核酸)在生物体内广泛生物分布的递送，从而使有效量的治疗剂暴露于身体的大多数部位。为了获得广泛的生物分布，通常需要这样的血液寿命，使得这些治疗剂在到达远离给药部位的靶部位之前不迅速降解或清除。脂质组合物的全身递送可以是任何合适的方式，包括，例如，
35 口服、吸入、消化道内、静脉内、皮下、和腹膜内来进行。

如本文所用的术语“脂质”是指一类有机化合物，其包括但不限于脂肪酸的

酯,并且特征是不溶于水(例如水中的溶解度小于约 0.01 重量%)但可溶于许多有机溶剂中。脂质可以是,例如简单脂质(例如脂肪、油、蜡),化合物脂质(例如磷脂、糖脂),和衍生的脂质(例如类固醇)。

如本文所用,“治疗”包括治疗在哺乳动物中(特别是在人类中)的疾病状态,并且包括:(a)抑制疾病状态,即阻止其发展;和/或(b)缓解疾病状态,即引起疾病状态消退。

如本文所用,术语“受试者”是指可能潜在地从用本发明的药物组合物中包含的核酸分子的治疗中受益的任何人类或非人类生物体。示例性受试者包括患有疾病的患者,尤其是,患有癌症、炎症、纤维化疾病、自身免疫疾病、感染、先天性和遗传性疫病、结缔组织疾病、消化系统疾病、内分泌疾病、眼部疾病、生殖性疾病、心血管疾病、肾脏和泌尿性疾病、呼吸系统疾病、代谢性病症、肌肉骨骼疾病、神经系统疾病和血液系统疾病的患者。

实施例

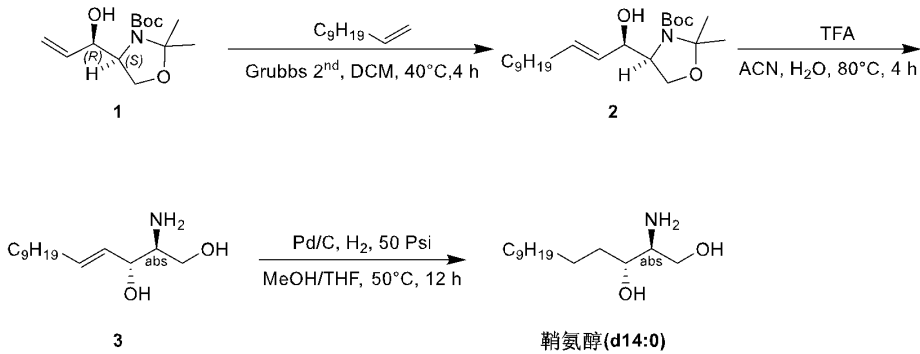
以下实施例仅为举例说明本文公开的发明,在任何情况下都不应解释为对所附权利要求保护范围的限制。

下列方案描述了所提出的合成路线。使用这些方案、下述指导原则和实施例,本领域技术人员可开发出类似或相近的用于制备本发明范围内的化合物的方法。

实施例 1. 鞘氨醇的合成以及质谱确认

鞘氨醇(d14:0)

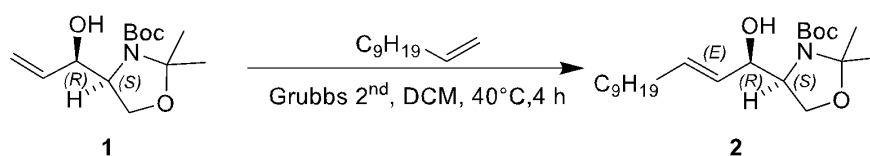
合成路线图:



合成路线:

第一步

叔丁基 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基十二烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯

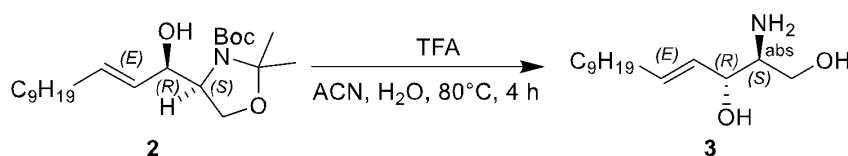


将叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (400 mg, 1.55 mmol)、十一碳-1-烯 (311.79 mg, 2.02 mmol)、亚苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚基]-二氯-钨的混合物; 三环己基膦 (131.97 mg, 155.45 μ mol) 的二氯甲烷 (6 mL) 混合物脱气, 用氮气置换三次。氮气保护下混合物于 40 °C 搅拌 4 h。过滤并将滤液旋干。粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 20%) 纯化, 得到叔丁基 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基十二烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (250 mg, 651.78 μ mol, 收率 41.93%), 性状为棕色油状。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.81 - 5.71 (m, 1H), 5.15 - 4.90 (m, 1H), 2.15 - 2.01 (m, 2H), 1.28 (m, 36H), 0.91 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

第二步

(E, 2S, 3R)-2-氨基十四烷基-4-烯-1,3-二醇

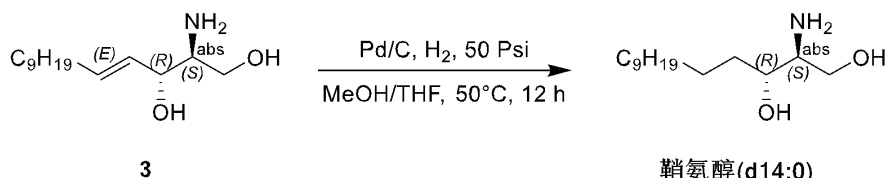


向叔丁基 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基十二烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (250 mg, 651.78 μ mol) 的乙腈溶液 (2 mL) 中加入三氟乙酸 (46.05 mg, 403.87 μ mol, 30 μ L) 的水溶液 (2 mL)。混合物在 80°C 下搅拌 4 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH = 8。用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取三次。合并的有机相用饱和食盐水 (5 mL) 洗涤, 并用无水 Na_2SO_4 干燥并过滤。滤液减压浓缩后得到 (E, 2S, 3R)-2-氨基十四烷基-4-烯-1,3-二醇 (150 mg, 616.31 μ mol, 收率 94.56%), 性状为无色固体。

LCMS Rt = 3.756 min in 7 min 色谱, 10-80AB ESI 计算值 $\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 244.3, 测试值 244.1

第三步

(2S,3R)-2-氨基十四烷基-1,3-二醇



25

鞘氨醇(d14:0)

氮气保护下, 向 (E,2R,3R)-2-氨基十四烷基-4-烯-1,3-二醇 (150 mg, 616.31 μ mol) 的甲醇 (2 mL) 和四氢呋喃 (2 mL) 溶液中加入湿钨碳 (327.94 mg, 308.15 μ mol, 10% 纯度)。混合物脱气并用氢气置换三次。混合物在氢气(50 psi)

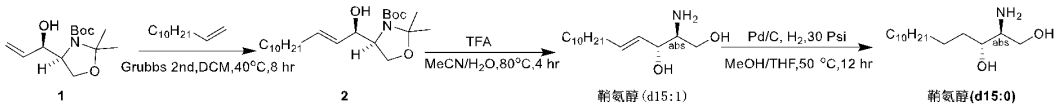
氛围下 于 50℃ 下搅拌 12 h。向混合物中加入四氢呋喃 (10 mL)并过滤。用四氢呋喃 (10 mL) 洗涤滤饼三次。滤液浓缩后的粗品经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱: Phenomenex Luna C8 50*40 mm*5 μm; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 20 min 内 45%-95%B) 得到 (2S,3R)-2-氨基十四烷基-1,3-二醇 (35.8 mg, 145.88 μmol, 收率 23.67%), 性状为白色固体。

LCMS Rt = 5.995 min in 7 min 色谱, 10-80AB ESI 计算值 C₁₄H₃₂NO₂ [M+H]⁺ 246.4, 测试值 246.2

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.50 - 5.40 (m, 1H), 4.05 - 3.95 (m, 1H), 3.87 - 3.70 (m, 2H), 3.60 - 3.45 (m, 1 H), 2.66 - 2.39 (m, 2H), 1.75 - 1.40 (m, 16H), 1.39 - 1.30 (m, 4H), 0.90 (t, J = 6.4 Hz, 3H)。

鞘氨醇(d15:0)

合成路线图:

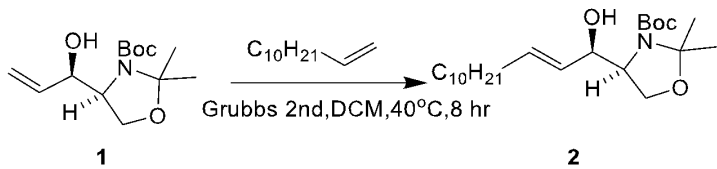


15

合成路线:

第一步

叔丁基 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基十三烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯



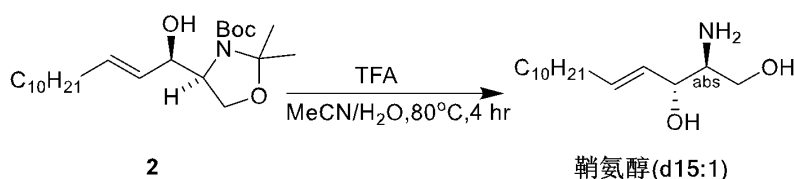
将叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (400 mg, 1.55 mmol)、十二碳-1-烯 (340.14 mg, 2.02 mmol) 和亚苄基-[1,3-双 (2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯-钨; 三环己基膦 (131.97 mg, 155.45 μmol) 的二氯甲烷 (6 mL) 混合液脱气, 并用氮气置换三次。混合物在氮气保护下于 40℃ 搅拌 8 h。减压浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0-14%) 纯化, 得到叔丁基 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基十三烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (380 mg, 955.76 μmol, 收率 61.49%), 性状为黄色油状物。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.83 - 5.57 (m, 1H), 5.52 - 5.32 (m, 1H), 4.24 - 3.74 (m, 4H), 2.10 - 1.90 (m, 2H), 1.53- 1.43 (m, 15H), 1.40 - 1.14 (m, 16H), 0.90 - 0.84 (m, 3H)。

30

第二步

(E,2S,3R)-2- 氨基 十 五 烷 基 -4- 烯 -1,3- 二 醇

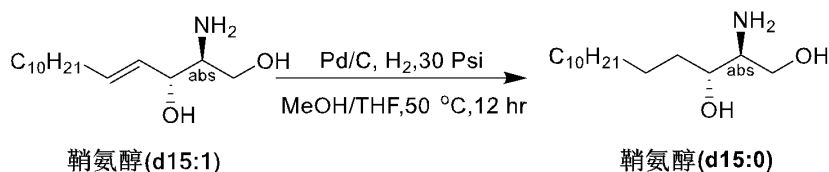


向(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基十三烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (380 mg, 955.76 μmol) 的乙腈溶液 (2 mL) 中加入三氟乙酸 (544.89 mg, 4.78 mmol, 354.98 μL) 的水溶液 (2 mL)。混合物在 80°C 下搅拌 4 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH 值到 8。混合物过滤, 滤饼用水 (10 mL) 洗涤三次并减压干燥, 得到 (E,2S,3R)-2-氨基十五烷基-4-烯-1,3-二醇 (100 mg, 388.48 μmol , 收率 40.65%), 性状为棕色固体。该固体直接用于下一步, 无需进一步纯化。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.82 - 5.69 (m, 1H), 5.51 - 5.41 (m, 1H), 4.85 - 4.41 (m, 2H), 4.13 - 3.95 (m, 1H), 3.77 - 3.55 (m, 2H), 2.97 - 2.77 (m, 1H), 2.12 - 2.00 (m, 2H), 1.40 - 1.35 (m, 2H), 1.28 - 1.24 (m, 14H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

第三步

(2S,3R)-2-氨基十五烷基-1,3-二醇



氮气保护下, 向 (E,2S,3R)-2-氨基十五烷基-4-烯-1,3-二醇 (100 mg, 388.48 μmol) 的甲醇 (2 mL) 和四氢呋喃 (2 mL) 溶液中加入湿钯碳 (206.71 mg, 194.24 μmol , 10% 纯度)。混悬液脱气并用氢气置换三次。混合物氢气氛围 (30 psi) 下于 50°C 搅拌 12 h。向混合物中加入四氢呋喃 (10 mL) 并过滤。用四氢呋喃 (10 mL) 洗涤滤饼三次。滤液浓缩后的粗品经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱: Phenomenex Luna C8 50*40 mm*5 μm ; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 20 min 内 10%-40%B) 得到 (2S,3R)-2-氨基十五烷基-1,3-二醇 (10.6 mg, 34.70 μmol , 收率 8.93%, 甲酸盐), 性状为白色固体。

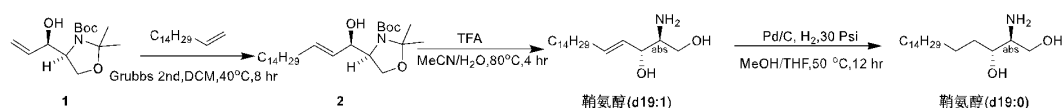
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.54 (br s, 1H), 3.85 - 3.65 (m, 3H), 3.20 - 3.11 (m, 1H), 1.56 - 1.46 (m, 2H), 1.41 - 1.26 (m, 20H), 0.90 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

LCMS Rt = 0.830 min in 1.5 min 色谱, 5-95AB_E ESI 计算值 $\text{C}_{15}\text{H}_{34}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 260.3, 测试值 260.1

HPLC Rt = 0.790 min, 在 8 min 色谱中, ELSD, 纯度 98.862%。

鞘氨醇(d19:1) & (d19:0)

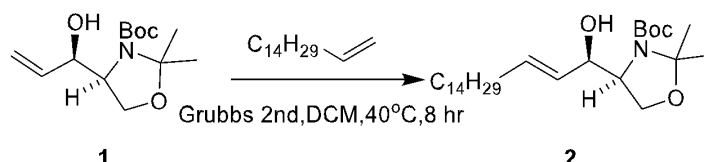
合成路线图:



合成路线:

第一步

叔丁基 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基十七烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

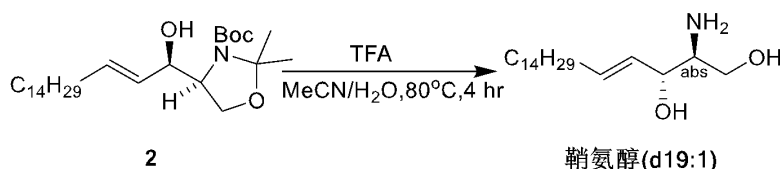


将叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (400 mg, 1.55 mmol)、十六碳-1-烯 (453.51 mg, 2.02 mmol, 580.68 μ L) 和亚苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯-钨; 三环己基膦 (131.97 mg, 155.45 μ mol) 的二氯甲烷 (6 mL) 混合液脱气, 并用氮气置换三次。氮气保护下混合物于 40 °C 搅拌 8 h。减压浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0-14%) 纯化, 得到叔丁基 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基十七烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (300 mg, 661.24 μ mol, 收率 42.54%), 性状为黄色油状物。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.76 - 5.67 (m, 1H), 5.58 - 5.36 (m, 1H), 4.13 - 3.79 (m, 4H), 2.04 - 1.96 (m, 2H), 1.70 - 1.30 (m, 23H), 1.27 - 1.24 (m, 16H), 0.93 - 0.83 (m, 3H)。

第二步

(E,2S,3R)-2-氨基十九烷基-4-烯-1,3-二醇



向叔丁基 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基十七烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (300 mg, 661.24 μ mol) 的乙腈 (2 mL) 和水 (2 mL) 混合溶液中加入三氟乙酸 (753.94 mg, 6.61 mmol, 491.17 μ L)。混合物在 80 °C 下搅拌 4 h。减压浓缩后得到粗品 (200 mg, 637.92 μ mol, 收率 96.47%), 性状为黄色油状物。其中 (100 mg, 318.96 μ mol) 经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱: Phenomenex Luna C8 50*40 mm*5 μ m; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 20 min 内 50%-80%B) 得到 (E,2S,3R)-2-氨基十九烷基-4-烯-1,3-二醇 (10.9 mg, 25.49 μ mol, 收率 7.99%, 三氟乙酸盐), 性状为白色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.53 (s, 0.5H), 5.96 - 5.76 (m, 1H), 5.53 - 5.40 (m, 1H), 4.26 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 3.82 - 3.75 (m, 1H), 3.70 - 3.62 (m, 1H), 3.20 - 3.14

(m, 2H), 2.15 - 2.05 (m, 2H), 1.47 - 1.40 (m, 2H), 1.29 (s, 22H), 0.90 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H)。

^{19}F NMR (376.5 MHz, CD_3OD) $\delta = -76.926$ 。

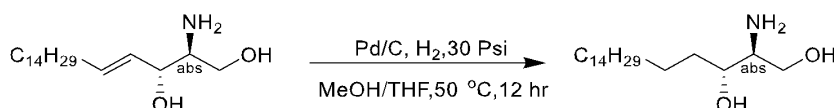
LCMS Rt = 1.764 min in 7 min 色谱, 50-100AB ESI 计算值 $\text{C}_{19}\text{H}_{39}\text{NO}_2$

5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 314.3, 测试值 314.3

HPLC Rt = 2.253 min, 在 8 min 色谱中, ELSD, 纯度 97.530%。

第三步

(2S,3R)-2-氨基十九烷基-1,3-二醇



鞘氨醇(d19:1)

鞘氨醇(d19:0)

10 氮气保护下, 向 (E,2S,3R)-2-氨基十九烷基-4-烯-1,3-二醇 (100 mg, 318.96 μmol) 的 甲醇 (2 mL) 和四氢呋喃 (2 mL) 溶液中加入湿钯碳 (169.72 mg, 159.48 μmol , 10% 纯度)。混悬液脱气并用氢气置换三次。混合物在氢气氛围 (30 psi) 下于 50 °C 搅拌 12 h。向混合物中加入四氢呋喃 (10 mL) 并过滤。用四氢呋喃 (10 mL) 洗涤滤饼三次。滤液浓缩后的粗品经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱:

15 Phenomenex Luna C8 50*40 mm*5 μm ; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 20 min 内 20%-50%B) 得到 (2S,3R)-2-氨基十九烷基-1,3-二醇 (25.7 mg, 71.08 μmol , 收率 22.43%, 甲酸盐), 性状为白色固体。

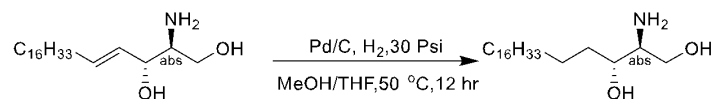
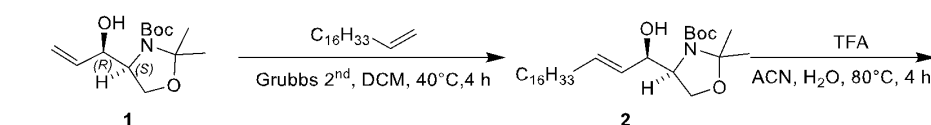
^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) $\delta = 8.54$ (br s, 1H), 3.84 - 3.65 (m, 3H), 3.23 - 3.09 (m, 1H), 1.55 - 1.45 (m, 2H), 1.35 - 1.26 (m, 28H), 0.90 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H)。

20 LCMS Rt = 0.962 min in 1.5 min 色谱, 5-95AB ESI 计算值 $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 316.3, 测试值 316.2

HPLC Rt = 2.105 min, 在 8 min 色谱中, ELSD, 纯度 99.824%。

鞘氨醇(d21:1) & (d21:0)

合成路线图



鞘氨醇(d21:1)

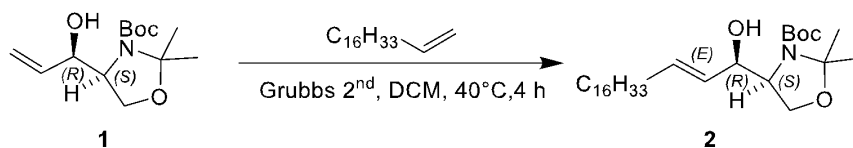
鞘氨醇(d21:0)

25

合成路线:

第一步

(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基十九烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

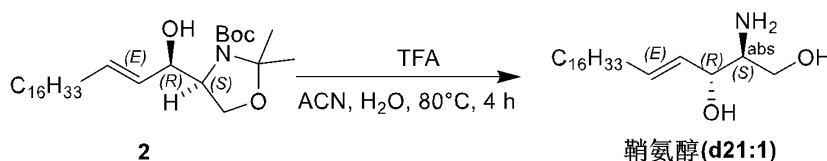


将叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (800 mg, 3.11 mmol)、十八碳-1-烯 (1.02 g, 4.04 mmol) 和亚苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯-钨; 三环己基膦 (263.94 mg, 310.89 μmol) 的二氯甲烷 (12 mL) 混合液脱气, 并用氮气置换三次。混合物在氮气保护下于 40 °C 搅拌 4 h。反应液过滤, 滤液减压浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 20%) 纯化, 得到(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基十九烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (600 mg, 1.25 mmol, 收率 40.06%), 性状为棕色油状物。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.75 - 5.61 (m, 1H), 5.45 - 5.30 (m, 1H), 4.20 - 3.50 (m, 4H), 1.97 - 1.81 (m, 2H), 1.42 (s, 15H), 1.18 (s, 28H), 0.81 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H)。

第二步

(E,2S,3R)-2-氨基二十一烷基-4-烯-1,3-二醇



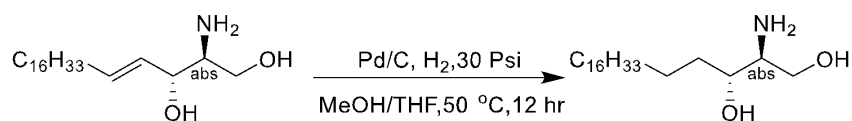
向(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基十九烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (600 mg, 1.25 mmol) 的乙腈溶液 (4 mL) 中加入三氟乙酸 (1.42 g, 12.45 mmol, 925.13 μL) 的水溶液 (4 mL)。混合物在 80°C 下搅拌 4 h。反应液经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱: Phenomenex Luna C8 50*40 mm*5 μm; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 20 min 内 27%-57%B) 冻干得到(E,2S,3R)-2-氨基二十一烷基-4-烯-1,3-二醇 (15.6 mg, 34.24 μmol, 收率 2.75%, 三氟乙酸盐), 性状为白色固体。

LCMS Rt = 3.223 min in 4 min 色谱, 10-80AB ESI 计算值 C₂₁H₄₄NO₂ [M+H]⁺ 342.3, 测试值 342.3

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 5.95 - 5.80 (m, 1H), 5.61 - 5.40 (m, 1H), 4.32 - 4.20 (m, 1H), 3.86 - 3.75 (m, 1H), 3.70 - 3.61 (m, 1H), 3.20 - 3.10 (m, 1H), 2.21 - 2.05 (m, 2H), 1.31 (s, 28H), 0.96 - 0.75 (m, 3H)。

第三步

(2S,3R)-2-氨基二十一烷基-1,3-二醇



鞘氨醇(d21:1)

鞘氨醇(d21:0)

在氮气保护下，向(E,2S,3R)-2-氨基二十一烷基-4-烯-1,3-二醇 (100 mg, 292.77 μmol)的 甲醇 (2 mL) 和四氢呋喃 (2 mL) 溶液中加入湿钯碳 (155.78 mg, 146.38 μmol , 10% 纯度)。混悬液脱气，并用氢气置换三次。混合物在氢气氛围 (30 psi) 下于 50 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 12 h。向混合物中加入四氢呋喃 (10 mL)并过滤。用四氢呋喃 (10 mL) 清洗滤饼三次。滤液浓缩后的粗品经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱: Phenomenex Luna C8 50*40 mm*5 μm ; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 20 min 内 50%-80%B) 得到(2S,3R)-2-氨基二十一烷基-1,3-二醇 (13.0 mg, 33.37 μmol , 收率 11.39%, 甲酸盐)，性状为白色固体。

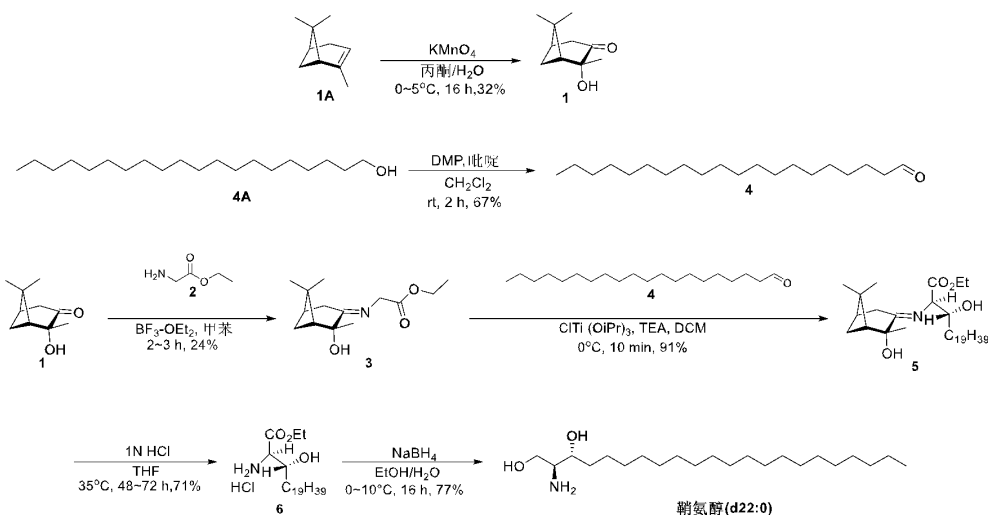
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.54 (br s, 1H), 3.85 - 3.79 (m, 1H), 3.77 - 3.64 (m, 2H), 3.18 - 3.05 (m, 1H), 1.51 - 1.48 (m, 2H), 1.38 - 1.25 (m, 32H), 0.90 (t, J = 6.4 Hz, 3H)。

LCMS Rt = 3.082 min in 7 min 色谱, 50-100AB ESI 计算值 $\text{C}_{21}\text{H}_{46}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 344.4, 测试值 344.3

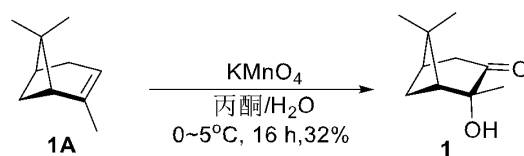
HPLC Rt = 3.162 min, 在 8 min 色谱中, ELSD, 纯度 96.003%。

鞘氨醇(d22:0)

合成路线图

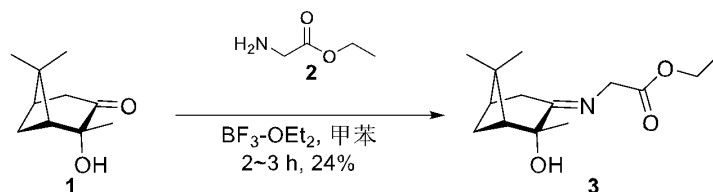


合成路线:
第一步



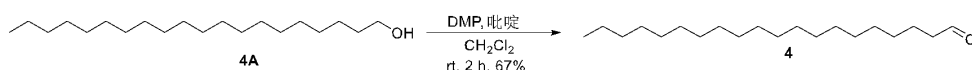
将 α -蒎烯 (1A, 3.0 kg, 22.4 mol, 1.0 eq) 溶于丙酮 (30 L) 和水 (3 L) 中, 控温 0~5 °C 在 2 小时内分多批加入高锰酸钾 (6.0 kg, 38.5 mol, 1.7 eq)。加毕, 于 0~5 °C 搅拌过夜, 反应液变为深黑色。GC 显示原料消耗完, 将反应液过滤除去二氧化锰, 滤液浓缩得到粗品。粗品用乙酸乙酯 (5 L) 溶解, 再次过滤除去不溶物, 滤液用水 (5 L) 和饱和碳酸氢钠 (5 L) 洗, 经无水硫酸钠干燥后过滤浓缩, 得到粗品油状物 (1.7 kg), 再经过蒸馏 (收集 3~4 mmHg, 100~104 °C 馏分) 后得到化合物 1 (1.2 kg, 收率 32%), GC 纯度>97%。

第二步



将化合物 1 (1.0 kg, 5.9 mol, 1.0 eq) 溶于甲苯 (10 L), 加入甘氨酸乙酯盐酸盐 (2, 1.7 kg, 11.9 mol, 2.0 eq), 三乙胺 (1.3 kg, 13.1 mol, 2.2 eq) 以及三氟化硼乙醚 (8.9 g, 59.5 mmol, 0.01 eq)。在氩气保护下, 升温至回流, 反应 2~3 小时。LC-MS 显示化合物 1 剩余约 5%, 将反应液降至室温, 过滤, 滤饼用乙酸乙酯 (5 L) 漂洗, 滤液浓缩得到粗品油状物。粗品经碱性硅胶柱层析 (石油醚/乙酸乙酯=15/1~乙酸乙酯) 纯化后得到黄色油状物化合物 3 (900 g), 经正己烷 (2.7 L) 低温结晶后得到类白色固体化合物 3 (360 g, 收率 24%)。

第三步



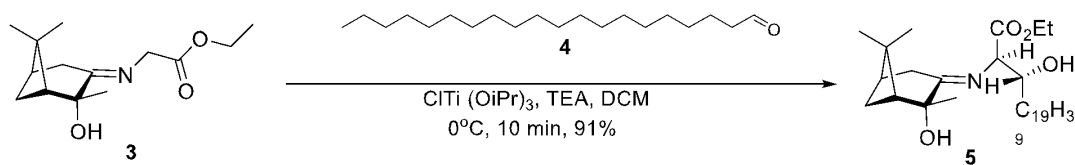
将 1-二十醇 (4A, 1.0 kg, 3.4 mol, 1.0 eq) 和吡啶 (0.8 kg, 10.1 mol, 3.0 eq) 溶于二氯甲烷 (15 L) 中, 降至 10 °C, 加入戴斯-马丁试剂 (1.7 kg, 4.0 mol, 1.2 eq)。于室温反应 2 小时, TLC 显示化合物 4A 消耗完, 将反应液用饱和亚硫酸钠 (10 L) 淬灭后, 水相用二氯甲烷 (5 L) 萃取。有机相合并, 经无水硫酸钠干燥后过滤浓缩, 得到粗品油状物。粗品经硅胶柱层析 (石油醚/乙酸乙酯=200/1~80/1) 纯化后得到类白色固体化合物 4 (670 g, 收率 67%)。

TLC: PE/EA = 20/1 (2, 4-二硝基苯肼)

R_f (化合物 4A) = 0.3

R_f (化合物 4) = 0.8

第四步



将化合物 **3** (0.98 kg, 3.9 mol, 1.0 eq) 溶于二氯甲烷 (4 L) 中, 氩气保护下于 0 °C 依次加入三异丙氧基氯化钛 (1.4 kg, 5.3 mol, 2.5 eq) 的二氯甲烷 (4 L) 溶液, 三乙胺 (1.2 L, 3.0 eq) 和化合物 **4** (0.69 kg, 2.3 mol, 1.1 eq) 的二氯甲烷 (4 L) 溶液。反应 10 分钟后, TLC 显示化合物 **3** 消耗完, 加入饱和食盐水 (3 L) 淬灭反应。将反应液过滤除去钛盐, 滤饼用二氯甲烷 (2 L) 漂洗, 水相用二氯甲烷 (2 L) 萃取。有机相合并, 经无水硫酸钠干燥后过滤浓缩, 得到粗品。粗品用乙酸乙酯 (2 L) 溶解, 过滤除去不溶物, 浓缩得到橙色油状物化合物 **5** (2.1 kg, 收率 91%),

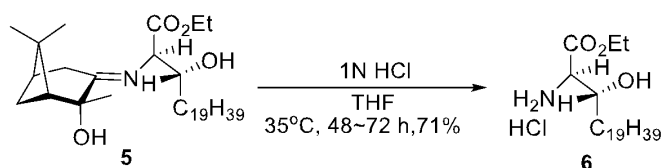
为乙酯和异丙酯的混合物。

TLC: PE/EA = 3/1 (I_2)

R_f (化合物 **3**) = 0.4

R_f (化合物 **5**) = 0.6

第五步



15

将化合物 **5** (3 kg, 5.5 mol) 溶于四氢呋喃 (12 L) 中, 加入配制好的 1.0 M 稀盐酸 (32 L), 于 35 °C 搅拌 48~72 小时。TLC 显示化合物 **5** 消耗完, 反应液直接浓缩得到粗品固体, 粗品经乙醇/乙酸乙酯=2/5 (14 L) 打浆后干燥得到淡黄色固体化合物 **6** (1.7 kg, 收率 71%)。

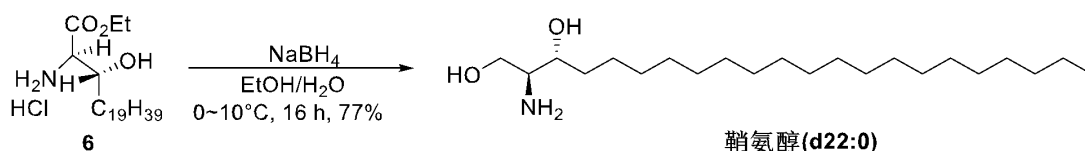
20 固体化合物 **6** (1.7 kg, 收率 71%)。

TLC: PE/EA = 3/1

R_f (化合物 **5**) = 0.6

R_f (化合物 **6**) = 0.1

第六步



25

将化合物 **6** (0.9 kg, 2.5 mol, 1.0 eq) 分散于去离子水 (5.4 L) 和乙醇 (16.2 L), 降温至 0~10 °C, 加入硼氢化钠 (0.6 kg, 20.1 mol, 8.0 eq)。室温反应过夜, LCMS

显示无原料，加入饱和氯化铵（5 L）淬灭反应，搅拌 30 分钟。

两批反应液合并按照以下处理：

反应液合并后过滤，水相用氯仿（10 L）萃取，有机相合并浓缩得到类白色固体。固体与前述滤饼合并后，于 100 °C 溶于去离子水（20 L）和甲醇（5 L），
5 搅拌 1 小时。自然冷却至室温，搅拌过夜，过滤，滤饼干燥得到淡黄色固体（1.8 kg）。固体在回流状态下溶于甲醇（30 L），降至室温后过滤，干燥得到淡黄色固体（1.5 kg）。用氯仿/甲醇=8/1（100 L）溶解固体，经滤膜除去不溶物后，滤液浓缩得到类白色固体鞘氨醇(d22:0)（1.2 kg，收率 77%）

TLC: PE/EA = 1/1 (I₂)

10 R_f (化合物 6) = 0.4

R_f (鞘氨醇(d22:0)) = 0.1

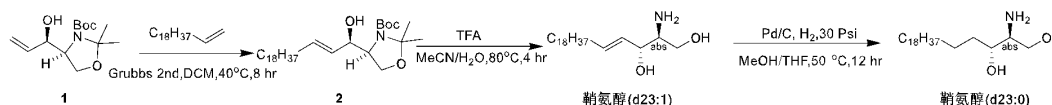
LC-MS: 358.23 [M+1]⁺

¹H NMR (400 MHz, 甲醇-d₄) δ 3.73 (dd, J = 8.0, 4.0 Hz, 1H), 3.52-3.45 (m, 2H),
2.77-2.74 (m, 1H), 1.51 (s, 2H), 1.27 (s, 34H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

15

鞘氨醇(d23:1) & (d23:0)

合成路线图

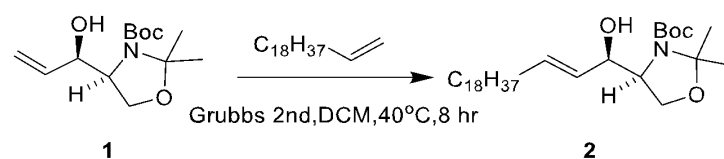


20

合成路线：

第一步

叔丁基 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十一烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸
酯



25

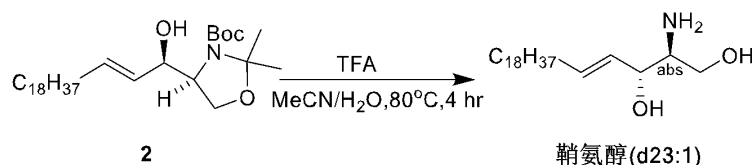
将叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (400 mg, 1.55 mmol)、二十碳-1-烯 (566.89 mg, 2.02 mmol) 和亚苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯-钨；三环己基膦 (131.97 mg, 155.45 μmol) 的二氯甲烷 (6 mL) 混合液脱气，并用氮气置换三次。混合物在氮气保护下于 40 °C 搅拌 8
30 h。反应液减压浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析（洗脱剂：乙酸乙酯在石油醚中占比 0~14%）纯化，得到叔丁基 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十一烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (280 mg, 549.23 μmol, 收率 35.33%)，性状为黄色油状物。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.78 - 5.69 (m, 1H), 5.48 - 5.36 (m, 1H), 4.16 -

3.80 (m, 4H), 2.08 - 2.00 (m, 2H), 1.76 - 1.25 (m, 31H), 1.25 - 1.22 (m, 15H), 0.92 - 0.84 (m, 3H)。

第二步

(E,2S,3R)-2-氨基二十三烷基-4-烯-1,3-二醇



向(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十一烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (280 mg, 549.23 μmol) 的乙腈溶液 (2 mL) 中加入三氟乙酸 (626.24 mg, 5.49 mmol, 407.97 μL) 的水溶液 (2 mL)。混合物在 80°C 下搅拌 4 h。反应液减压浓缩得到的粗品经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱: Phenomenex Luna C8 50*40 mm*5 μm ; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 20 min 内 50%-85%B) 冻干得到(E,2S,3R)-2-氨基二十三烷基-4-烯-1,3-二醇 (4 mg, 8.27 μmol , 收率 0.15%, 三氟乙酸盐), 性状为白色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.54 (br s, 1H), 5.90 - 5.79 (m, 1H), 5.53 - 5.43 (m, 1H), 4.27 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 3.82 - 3.75 (m, 1H), 3.69 - 3.61 (m, 1H), 3.23 - 3.14 (m, 1H), 2.10 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.46 - 1.40 (m, 2H), 1.29 (s, 30H), 0.90 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

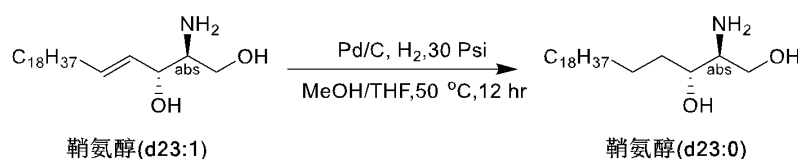
$^{19}\text{F NMR}$ (376.5 MHz, CD_3OD) δ = -76.926.

LCMS Rt = 1.107 min in 1.5 min 色谱, 5-95AB ESI 计算值 $\text{C}_{23}\text{H}_{48}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 370.4, 测试值 370.3

HPLC Rt = 3.661 min, 在 8 min 色谱中, ELSD, 纯度 100.000%。

第三步

(2S,3R)-2-氨基二十三烷基-1,3-二醇



氮气保护下, 向(E,2S,3R)-2-氨基二十三烷基-4-烯-1,3-二醇 (100 mg, 270.55 μmol) 的甲醇 (2 mL) 和四氢呋喃 (2 mL) 溶液中加入湿钯碳 (143.96 mg, 135.27 μmol , 10% 纯度)。悬浊液脱气, 并用氢气置换三次。混合物在氢气氛围 (30 psi) 下于 50°C 搅拌 12 h。向混合物中加入四氢呋喃 (10 mL) 并过滤。用四氢呋喃 (10 mL) 洗涤滤饼三次。浓缩滤液得到的粗品经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱: Phenomenex Luna C8 50*40 mm*5 μm ; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 20 min 内 50%-85%B) 得到(2S,3R)-2-氨基二十三烷基-1,3-二醇 (5.4 mg, 12.93 μmol , 收率 4.80%, 甲酸盐), 性状为白色固体。

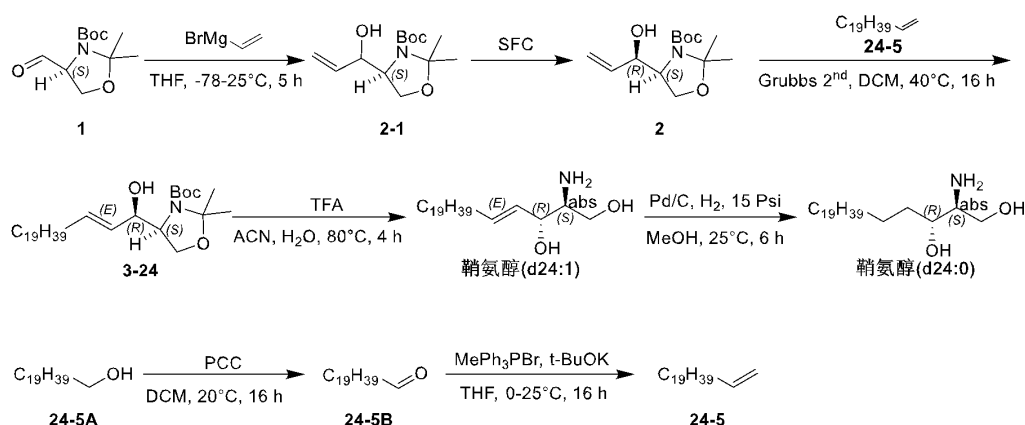
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.55 (s, 1H), 3.82 - 3.75 (m, 1H), 3.65 - 3.55 (m, 2H), 3.01 - 2.89 (m, 1H), 1.56 - 1.50 (m, 2H), 1.33 - 1.28 (m, 36H), 0.90 (t, J = 6.4 Hz, 3H)。

LCMS R_t = 1.118 min in 1.5 min 色谱, 5-95AB ESI 计算值 $\text{C}_{23}\text{H}_{50}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 372.4, 测试值 372.2

HPLC R_t = 3.820 min, 在 8 min 色谱中, ELSD, 纯度 94.809%。

鞘氨醇(d24:1) & (d24:0)

合成路线图

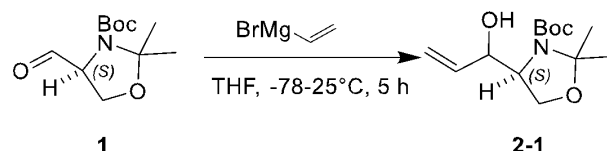


10

合成路线:

第一步

叔丁基 (4S)-4- (1-羟基烯丙基) -2,2-二甲基恶唑烷-3-羧酸酯

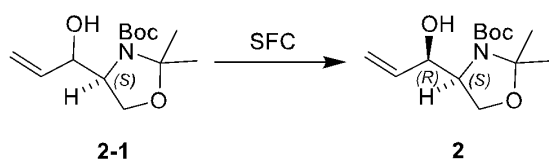


15 向叔丁基 (S)-4-甲酰基-2,2-二甲基恶唑烷-3-羧酸酯 (7.5 g, 32.71 mmol, 1 eq) 的 THF (75 mL) 溶液中, 在 -78°C 下半小时内逐滴加入乙烯基溴化镁 (1 M, 49.07 mL, 1.5 eq)。混合液在 -78°C 下搅拌 2 h 后, 升温至 25°C 并继续搅拌 5 h。反应混合液用饱和氯化铵水溶液 (50 mL) 淬灭, 并用乙酸乙酯 (50 mL $\times$ 3) 萃取水相。合并的有机相用饱和食盐水 (15 mL) 洗涤, 用硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~25%) 纯化, 得到叔丁基 (4S)-4- (1-羟基烯丙基) -2,2-二甲基恶唑烷-3-羧酸酯 (7 g, 27.20 mmol, 收率 83.1%), 性状为无色油状。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.92 - 5.80 (m, 1H), 5.43 - 5.34 (m, 1H), 5.26 - 5.19 (m, 1H), 4.31 - 4.20 (m, 1H), 4.08 - 3.82 (m, 3H), 1.56 - 1.47 (m, 15H)。

25 第二步

叔丁基 (S)-4- (R)-1-羟基烯丙基) -2,2-二甲基恶唑烷-3-羧酸酯



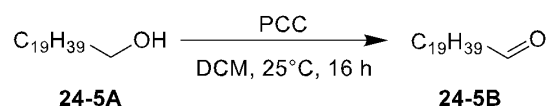
叔丁基 (4S)-4-(1-羟基烯丙基)-2,2-二甲基恶唑烷-3-羧酸酯 (5 g) 经 SFC 纯化 (色谱柱: DAICEL CHIRALCEL OX (250 mm x 30 mm, 10 μ m); 流动相: [CO₂ - EtOH (0.1%NH₃H₂O)]; B%: 10%, 等梯度洗脱模式) 得到叔丁基 (S)-4-(R)-1-羟基烯丙基)-2,2-二甲基恶唑烷-3-羧酸酯 (2.1 g, 8.16 mmol, 收率 42.0%, ee 100%), 性状为无色油状。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.92 - 5.78 (m, 1H), 5.43 - 5.33 (d, J = 17.2 Hz, 1H), 5.26 - 5.17 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 4.33 - 3.86 (m, 4H), 1.58 - 1.45 (m, 15H)。

SFC Rt = 0.540 min in 3 min. 柱子: 手性色谱柱 OX-3 50 x 4.6 mm I.D., 3 μ m 流动相: A 相(CO₂), B 相: (EtOH (0.05% DEA)); 洗脱梯度: B in A from 5% to 40% 流速: 3 mL/min; 检测器: PDA; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 背压: 100 Bar"。

第三步

二十碳-1-醛

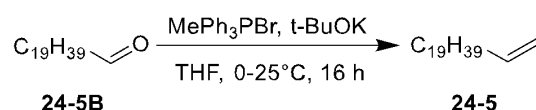


向二十烷-1-醇 (8.5 g, 28.47 mmol, 1 eq) 的 DCM 溶液 (400 mL) 中加入氯铬酸吡啶鎓盐(PCC) (6.75 g, 31.32 mmol, 1.1 eq)。混合物在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌 16h。向棕色混悬液中加入硅胶 (10 g)。所得混合物搅拌 30 min, 浓缩的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~5%) 纯化, 得到二十碳-1-醛 (6.5 g, 21.04 mmol, 收率 73.9%), 性状为白色固体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 9.77 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 2.46 - 2.39 (m, 2H), 1.66 - 1.60 (m, 2H), 1.31 - 1.25 (m, 32H), 0.91 - 0.86 (t, J = 2.8 Hz, 3H)。

第四步

二十一碳-1-烯

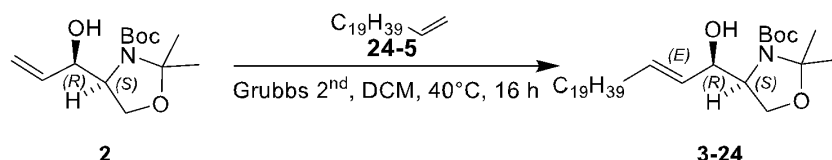


0 $^{\circ}$ C 下向甲基(三苯基)溴化膦 (7.23 g, 20.23 mmol, 3 eq) 的 THF (40 mL) 溶液中加入叔丁醇钾 (2.27 g, 20.23 mmol, 3 eq)。所得黄色混悬液在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌 1h, 并再次冷却至 0 $^{\circ}$ C。0 $^{\circ}$ C 下逐滴加入二十碳-1-醛 (2 g, 6.74 mmol, 1 eq) 的 THF (20 mL) 溶液。混合物在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌 16h。向混合物中加入水 (10 mL), 并用乙酸乙酯 (15 mL x 3) 萃取。合并的有机相用饱和食盐水 (5 mL) 洗涤, 用硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 石油醚) 纯化, 得到二十一碳-1-烯 (1.7 g, 5.77 mmol, 收率 85.5%), 性状为无色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.89 - 5.76 (m, 1H), 5.04 - 4.90 (m, 2H), 2.08 - 2.01 (m, 2H), 1.40 - 1.36 (m, 2H), 1.30 - 1.24 (m, 32H), 0.91 - 0.87 (t, J = 5.2 Hz, 3H)。

第五步

叔丁基 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十二烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯

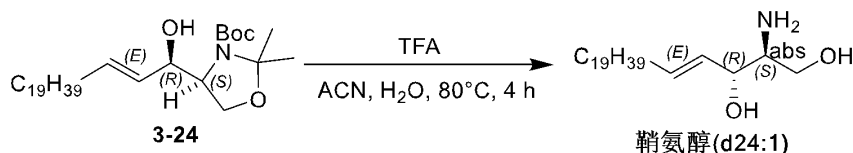


氮气保护下, 将亚苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯化钨; 三环己基膦 (98.98 mg, 116.58 μmol , 0.1 eq) 加入到叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (300.00 mg, 1.17 mmol, 1 eq)、二十一碳-1-烯 (446.43 mg, 1.52 mmol, 1.3 eq) 的二氯甲烷 (10 mL) 混合液中。混合物于 40°C 下搅拌 16 h。反应液减压浓缩后得到的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~25%) 纯化, 得到叔丁基 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十二烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (0.28 g, 534.53 μmol , 收率 45.8%), 性状为黄色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.81 - 5.69 (m, 1H), 5.50 - 5.40 (m, 1H), 4.22 - 3.83 (m, 4H), 2.09 - 2.01 (m, 2H), 1.56 - 1.48 (m, 15H), 1.31 - 1.22 (m, 34H), 0.91 - 0.86 (t, J = 6.4 Hz, 3H)。

第六步

(E,2S,3R)-2-氨基二十四烷基-4-烯-1,3-二醇



向 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十二烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (230.00 mg, 439.07 μmol , 1 eq) 的乙腈 (2 mL) 溶液中加入三氟乙酸 (30.70 mg, 269.24 μmol , 0.02 mL, 0.6 eq) 的水溶液 (2 mL)。将混合物在 80°C 下搅拌 4h。真空浓缩后得到的粗品加入碳酸氢钠饱和水溶液调节 pH 到 8, 过滤, 滤饼经真空干燥后得到 (E,2S,3R)-2-氨基二十四烷基-4-烯-1,3-二醇 (120 mg, 307.78 μmol , 收率 70.1%, 纯度 98.4%), 性状为白色固体。

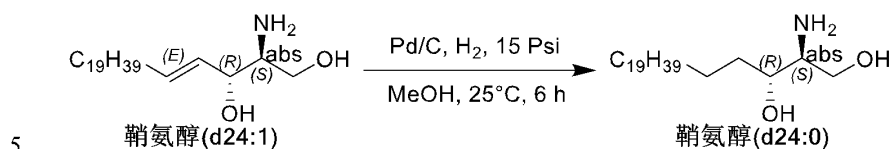
LCMS Rt = 1.786 min in 3 min 色谱, 30-100AB ESI 计算值 $\text{C}_{24}\text{H}_{49}\text{NO}_2$ $[\text{M}+1]^+$ 384.6, 测试值 384.4

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.85 - 5.63 (m, 1H), 5.57 - 5.43 (m, 1H), 4.24 -

3.93 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.74 - 3.57 (m, 2H), 2.95 - 2.78 (m, 1H), 2.10 - 2.04 (m, 2H), 1.90 - 1.67 (m, 4H), 1.41 - 1.36 (m, 2H), 1.26 (s, 32H), 0.91 - 0.87 (t, $J = 2.4$ Hz, 3H)。

第七步

(2S,3R)-2-氨基二十四烷基-1,3-二醇



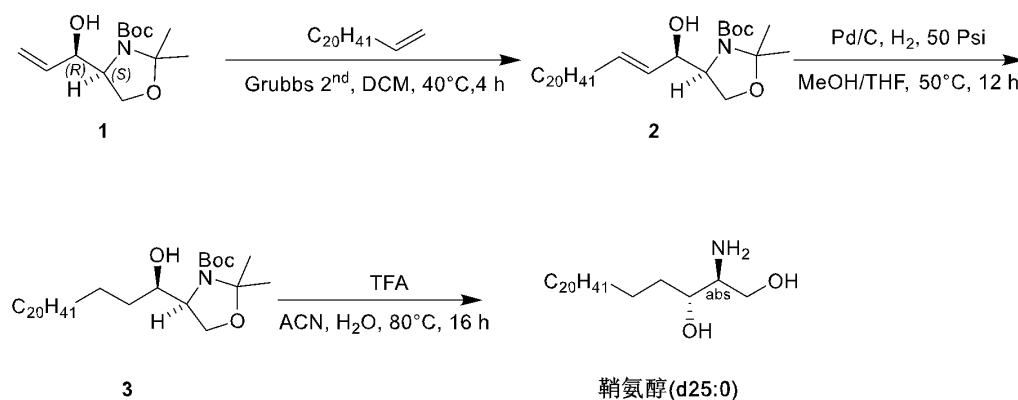
在氮气保护下，向(E,2S,3R)-2-氨基二十四烷基-4-烯-1,3-二醇 (200 mg, 521.31 μmol , 1 eq)的 甲醇 (6 mL) 溶液中加入湿钯碳 (40 mg, 37.59 μmol , 10% 纯度)。混合物在氢气氛围下于 25 $^\circ\text{C}$ 下搅拌 6 h。混合物过滤。浓缩滤液得到的粗品经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱: Phenomenex Luna C18 150 x 25mm, 10 μm ; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 8 min 内 60%-90%B) 得到(2S,3R)-2-氨基二十四烷基-1,3-二醇 (7 mg, 18.13 μmol , 收率 3.4%, 纯度 99.9%)，性状为白色固体。

LCMS Rt = 1.86 min in 3 min 色谱, 30-100AB ESI 计算值 $\text{C}_{24}\text{H}_{51}\text{NO}_2$ $[\text{M}+1]^+$ 386.6, 测试值 386.4

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 3.75 - 3.67$ (s, 2H), 3.65 - 3.58 (s, 1H), 2.91 - 2.81 (s, 1H), 2.00 (br s, 4H), 1.51 - 1.48 (s, 2H), 1.28 - 1.25 (s, 38H), 0.90 - 0.87 (t, $J = 5.6$ Hz, 3H)。

鞘氨醇(d25:0) & (d25:1)

合成路线图

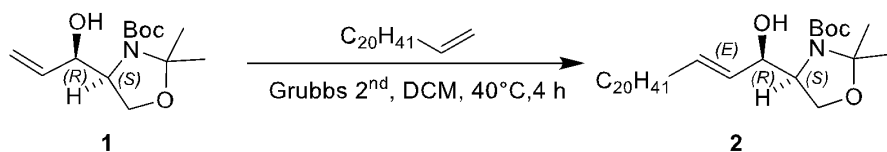


20

合成路线:

第一步

(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十三烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

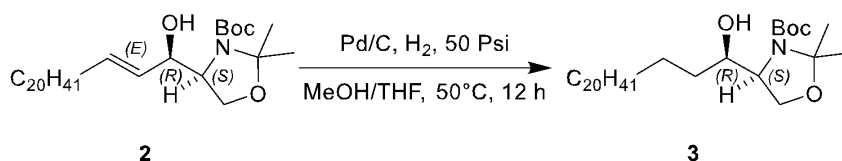


将叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (1 g, 3.89 mmol)、二十二碳-1-烯 (1.56 g, 5.05 mmol) 和亚苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯-钨；三环己基膦 (329.92 mg, 388.61 μ mol) 的二氯甲烷 (15 mL) 混合液脱气，用氮气置换三次。混合物在氮气保护下于 40 °C 搅拌 4 h。反应液过滤，滤液浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析（洗脱剂：乙酸乙酯在石油醚中占比 20%）纯化，得到 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十三烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (910 mg, 1.69 mmol, 收率 43.54%)，性状为棕色油状物。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.80 - 5.70 (m, 1H), 5.50 - 5.40 (m, 1H), 4.24 - 3.85 (m, 4H), 2.10 - 2.00 (m, 2H), 1.51 (s, 15H), 1.28 (s, 36H), 0.90 (t, J = 6.4 Hz, 3H)。

第二步

(4S)-4-[(1R)-1-羟基二十三烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

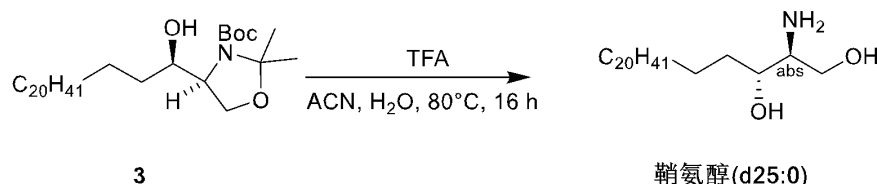


氮气保护下向 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十三烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (730 mg, 1.36 mmol) 的甲醇 (4 mL) 和四氢呋喃 (4 mL) 的混合溶液中加入 Pd/C (722.19 mg, 678.62 μ mol, 纯度 10%)。混悬液脱气，并用氢气置换三次。混合物在氢气氛围 (50 psi) 下于 50 °C 搅拌 16 h。向混合物中加入四氢呋喃 (10 mL) 并过滤。用四氢呋喃 (10 mL) 洗涤滤饼三次。滤液浓缩得到的粗品经快速硅胶柱层析（洗脱剂：乙酸乙酯在石油醚中占比 20%）纯化，得到化合物 (4S)-4-[(1R)-1-羟基二十三烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (560 mg, 1.04 mmol, 收率 76.43%)，性状为白色固状。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 4.20 - 3.75 (m, 4H), 1.65 - 1.55 (m, 15H), 1.27 (s, 42H), 0.95 - 0.85 (m, 3H)。

第三步

(2S,3R)-2-氨基二十五烷基-1,3-二醇



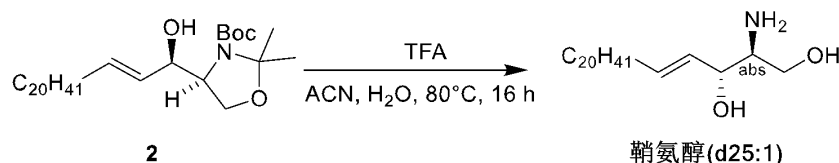
向(4S)-4-[(1R)-1-羟基二十三烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (560 mg, 1.04 mmol) 的乙腈溶液 (3 mL) 中加入三氟乙酸 (591.36 mg, 5.19 mmol, 385.25 μ L) 的水溶液 (3 mL)。混合物在 80°C 下搅拌 4 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液并调节 pH 到 8 后过滤。滤饼在 HCl/二氧六环(2M, 10 mL)中室温下搅拌并过滤。用甲醇 (10mL) 打浆后冻干得到(2S,3R)-2-氨基二十五烷基-1,3-二醇 (241 mg, 552.56 μ mol, 收率 53.27%, 盐酸盐), 性状为白色固体。

MS Rt = 1.92 - 2.14 min in 4 min 色谱, 50-100AB ESI 计算值 $C_{25}H_{54}NO_2$ $[M+H]^+$ 400.4, 测试值 400.4

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.90 - 7.70 (m, 3H), 5.10 - 4.85 (m, 2H), 3.75 - 3.65 (m, 2H), 3.60 - 3.50 (m, 1H), 3.10 - 3.00 (m, 1H), 1.50 - 1.35 (m, 2H), 1.27 (s, 40H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

第四步

(E,2S,3R)-2-氨基二十五烷基-4-烯-1,3-二醇



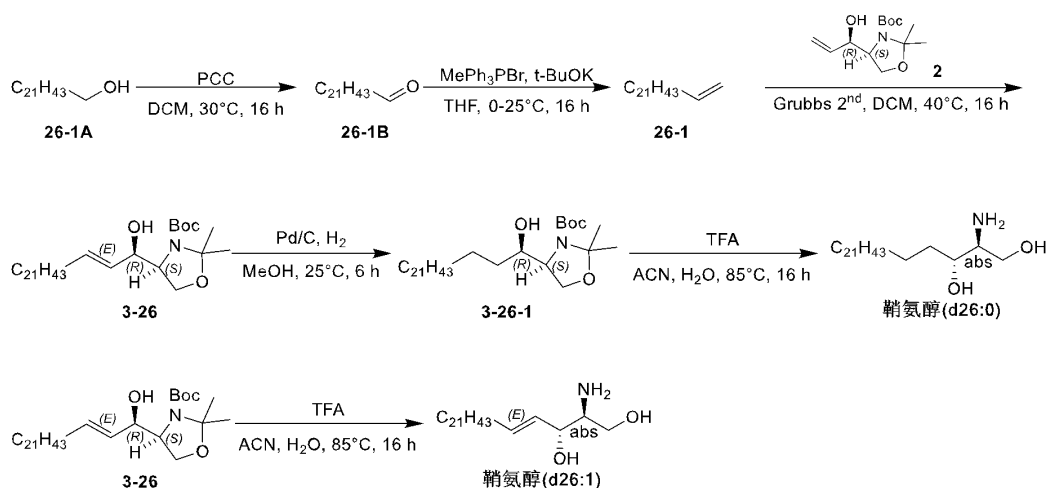
向(4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基二十三烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (80 mg, 148.74 μ mol) 的乙腈溶液 (1 mL) 中加入三氟乙酸 (169.59 mg, 1.49 mmol, 110.48 μ L) 的水溶液 (1mL)。混合物在 80°C 下搅拌 16 h。反应液浓缩后的粗品经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱: Phenomenex Luna C8 50*40 mm*5 μ m; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 20 min 内 30%-60%B) 冻干得到(E,2S,3R)-2-氨基二十五烷基-4-烯-1,3-二醇 (9.7 mg, 21.86 μ mol, 收率 14.70%, 甲酸盐), 性状为白色固体。

LCMS Rt = 1.140 min in 1.5 min 色谱, 5-95AB ESI 计算值 $C_{25}H_{52}NO_2$ $[M+H]^+$ 398.4, 测试值 398.3.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.57 (s, 1H), 5.94 - 5.80 (m, 1H), 5.55 - 5.45 (m, 1H), 4.25 - 4.21 (m, 1H), 3.81 - 3.75 (m, 1H), 3.72 - 3.61 (m, 1H), 3.16 - 3.05 (m, 1H), 2.23 - 2.15 (m, 2H), 1.51 - 1.41 (m, 2H), 1.31 (s, 34H), 0.92 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

鞘氨醇(d26:0) & (d26:1)

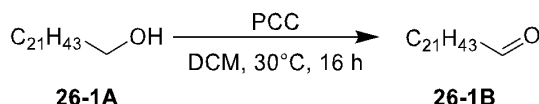
合成路线图



合成路线:

第一步

二十二碳-1-醛

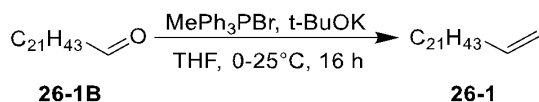


向二十二烷-1-醇 (10 g, 30.62 mmol, 1 eq) 的 DCM 溶液 (400 mL) 中加入氯铬酸吡啶鎓盐(PCC) (7.92 g, 36.74 mmol, 1.2 eq)。混合物在 30 °C 下搅拌 16h。向棕色混悬液中加入硅胶 (20 g)。所得混合物搅拌 30 min, 浓缩后的粗品经快速硅胶层析柱 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~10%) 纯化, 得到二十二碳-1-醛 (7.3 g, 22.49 mmol, 收率 73.4%), 性状为白色固体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 9.78 - 9.76 (t, J=2.0 Hz, 1H), 2.48 - 2.38 (m, 2H), 1.67 - 1.59 (m, 2H), 1.26 (s, 36H), 0.93 - 0.83 (t, J = 6.4 Hz, 3H)。

第二步

二十三碳-1-烯



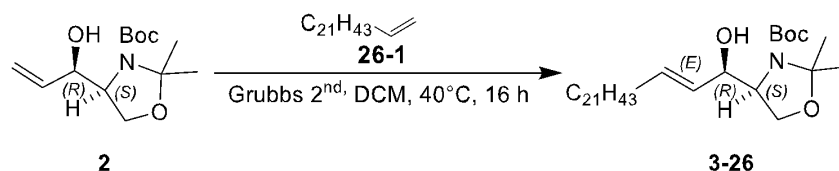
0℃ 下向甲基（三苯基）溴化膦（13.21 g, 36.97 mmol, 3 eq）的 THF（40 mL）溶液中加入叔丁醇钾（4.15 g, 36.97 mmol, 3 eq）。所得黄色混悬液在 25℃ 下搅拌 1h，并再次冷却至 0℃。0℃ 下逐滴加入二十二烷-1-醛（4 g, 12.32 mmol, 1 eq）的 THF（40 mL）溶液。混合物在 25℃ 下搅拌 16h。向混合物中加入水（30 mL），并用乙酸乙酯（40 mL x 3）萃取。合并的有机相用饱和食盐水（15 mL）洗涤，用硫酸钠干燥，过滤并浓缩。粗品经快速硅胶层析柱（洗脱剂：石油醚）纯化，得到二十三碳-1-烯（3.4 g, 10.54 mmol, 收率 85.5%），性状为白色固体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.88 - 5.77 (m, 1H), 5.03 - 4.97 (m, 1H), 4.96 -

4.91 (m, 1H), 2.08 - 2.02 (m, 2H), 1.41 - 1.36 (m, 2H), 1.29 - 1.25 (m, 36H), 0.91 - 0.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H)。

第三步

(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十四烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐



5

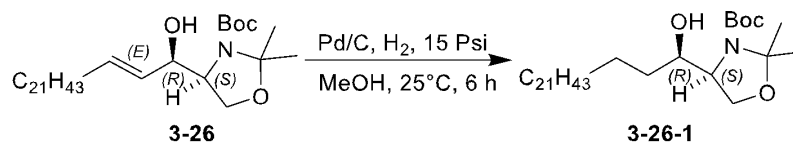
氮气保护下，将亚苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯化钨；三环己基膦 (188.64 mg, 222.20 μ mol, 0.1 eq) 加入到叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (571.78 mg, 2.22 mmol, 1 eq)、二十三碳-1-烯 (2 g, 6.20 mmol, 2.79 eq) 的二氯甲烷 (20 mL) 中。混合液于 40 °C 搅拌 16 h。反应液浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~25%) 纯化，得到 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十四烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (0.6 g, 1.09 mmol, 收率 48.9%)，性状为棕色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 5.79 - 5.71$ (m, 1H), 5.48 (m, 1H), 4.19 - 3.87 (m, 4H), 2.08 - 2.02 (m, 2H), 1.54 - 1.49 (m, 15H), 1.26 (s, 38H), 0.91 - 0.86 (t, $J = 6.0$ Hz, 3H)。

15

第四步

(4S)-4-[(1R)-1-羟基二十四烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐



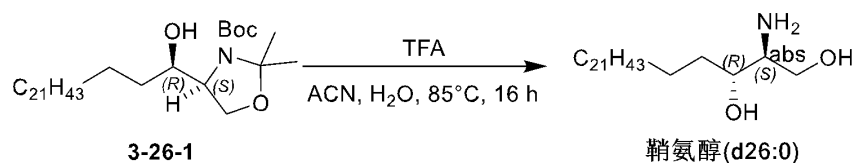
氮气保护下向 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十四烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (300 mg, 543.59 μ mol, 1 eq) 的甲醇 (6 mL) 溶液中加入 Pd/C (40 mg, 37.59 μ mol, 纯度 10%)。混合物在氢气氛围下于 25 °C 搅拌 6 h。过滤并浓缩滤液，得到化合物 (4S)-4-[(1R)-1-羟基二十四烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (0.28 g, 505.51 μ mol, 收率 93.0%)，性状为白色固状。

$^1\text{H NMR}$ $\delta = 4.07 - 3.77$ (m, 4H), 3.60 - 3.46 (s, 1H), 1.60 - 1.58 (s, 2H), 1.54 - 1.49 (m, 15H), 1.26 (s, 42H), 0.91 - 0.87 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H)。

25

第五步

(2S,3R)-2-氨基二十六烷基-1,3-二醇



3-26-1

鞘氨醇(d26:0)

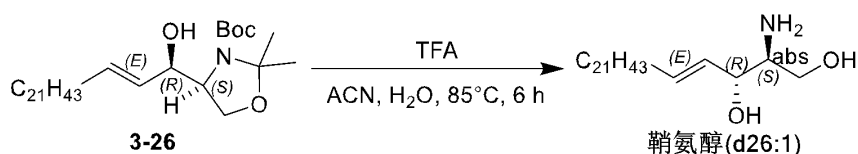
向三氟乙酸 (92.10 mg, 807.73 μmol , 1.72 eq) 的水溶液 (3 mL) 中加入 (4S)-4-[(1R)-1-羟基二十四烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (260 mg, 469.40 μmol , 1 eq) 的乙腈溶液 (3 mL)。混合物在 85°C 下搅拌 16 h。反应液浓缩后得到的粗品加入饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH=8。过滤后的滤液经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱: Welch Xtimate C1 100 x 30 mm, 5 μm ; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 8 min 内 65%-95%B) 得到(2S,3R)-2-氨基二十六烷基-1,3-二醇 (10 mg, 23.42 μmol , 收率 5.0%, 纯度 96.88%), 性状为白色固体。

LCMS Rt = 1.989 min in 3 min 色谱, 30-100AB ESI 计算值 $\text{C}_{26}\text{H}_{55}\text{NO}_2$ $[\text{M}+1]^+$ 414.7, 测试值 414.4

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.56 - 8.50 (s, 1H), 3.86 - 3.80 (dd, J = 4.0, 11.2 Hz, 1H), 3.79 - 3.74 (m, 1H), 3.73 - 3.66 (dd, J = 8.8, 11.6 Hz, 1H), 3.21 - 3.14 (m, 1H), 1.51 - 1.45 (m, 2H), 1.35 - 1.28 (m, 42H), 0.92 - 0.88 (t, J = 6.4 Hz, 3H)。

第六步

(E,2S,3R)-2-氨基二十六烷基-4-烯-1,3-二醇



15

向三氟乙酸 (92.10 mg, 807.73 μmol , 1.49 eq) 的水溶液 (3 mL) 中加入 (4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基二十四烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (300 mg, 543.59 μmol , 1 eq) 的乙腈溶液 (3 mL)。混合物在 85°C 下搅拌 6 h。反应液浓缩后得到的粗品加入饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH=8。过滤后的滤液经 prep-HPLC (色谱柱: Welch Xtimate C1 100 x 30 mm, 5 μm ; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 20 min 内 65%-95%B) 纯化并冻干得到(E,2S,3R)-2-氨基二十六烷基-4-烯-1,3-二醇 (12.7 mg, 30.82 μmol , 收率 5.6%, 纯度 99.9%), 性状为白色固体。

20

LCMS Rt = 1.839 min in 3 min 色谱, 30-100AB ESI 计算值 $\text{C}_{26}\text{H}_{53}\text{NO}_2$ $[\text{M}+1]^+$ 412.7, 测试值 412.4

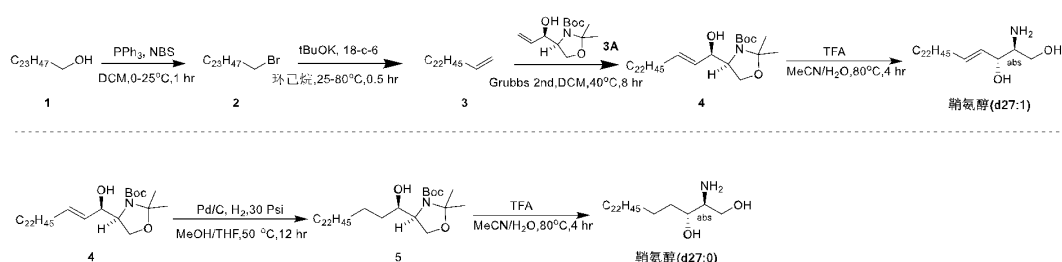
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.59 - 8.50 (s, 1H), 5.83 - 5.72 (m, 1H), 5.53 - 5.44 (m, 1H), 4.12 - 4.06 (m, 1H), 3.76 - 3.68 (m, 1H), 3.60 - 3.51 (m, 1H), 2.97 - 2.88 (m, 1H), 2.12 - 2.06 (m, 2H), 1.44 - 1.40 (m, 2H), 1.33 - 1.27 (m, 36H), 0.93 - 0.87 (t, J = 5.2 Hz, 3H)。

25

鞘氨醇(d27:1) & (d27:0)

合成路线图

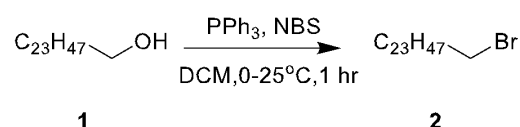
30



合成路线:

第一步

5 二十四烷-1-溴

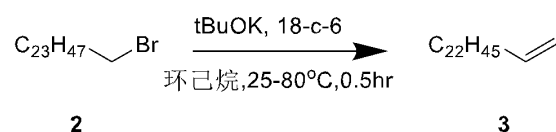


向二十四烷-1-醇 (5 g, 14.10 mmol) 的 DCM 溶液 (50 mL) 中加入 三苯基
 10 膦 (4.44 g, 16.92 mmol)。然后在 0 °C 下向混合物中加入 N-溴代丁二酰亚胺
 (3.01 g, 16.92 mmol)。混合物在 25 °C 下搅拌 1 h。加入饱和 Na₂SO₃ 溶液 (50
 mL)，并用 DCM (50 mL x 3) 萃取水相。合并的有机相用饱和食盐水 (100 mL)
 洗涤，无水 Na₂SO₄ 干燥，过滤并浓缩。粗品经硅胶快速柱层析（洗脱剂：石油
 醚）纯化，得到二十四烷-1-溴 (3.8 g, 9.10 mmol, 收率 64.55%)，性状为白色
 固体。

15 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 3.41 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.92 - 1.82 (m, 2H), 1.48
 - 1.39 (m, 2H), 1.36 - 1.13 (m, 40H), 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

第二步

二十四烷-1-烯

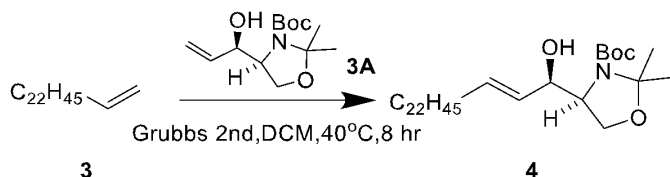


20 25 °C 下，向 二十四烷-1-溴 (3.8 g, 9.10 mmol) 和 18-冠-6 (577.32 mg,
 2.18 mmol) 的环己烷溶液 (40 mL) 中加入叔丁醇钾 (2.45 g, 21.84 mmol)。混合
 物在 80 °C 下搅拌 0.5 h。将混合物加入水 (50 mL) 中，用 EtOAc (50 mL x 3) 萃
 取水层。合并的有机相用饱和食盐水 (100 mL) 洗涤，无水 Na₂SO₄ 干燥，过滤
 并减压浓缩。粗品经硅胶快速柱层析（洗脱剂：石油醚）纯化，得到二十四烷-1-
 25 烯 (2.1 g, 6.24 mmol, 收率 68.55%)，性状为白色固体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.98 - 5.73 (m, 1H), 5.05 - 4.92 (m, 2H), 2.10 -
 2.00 (m, 2H), 1.41 - 1.37 (m, 2H), 1.30 - 1.28 (m, 38H), 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

第三步

(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十五烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

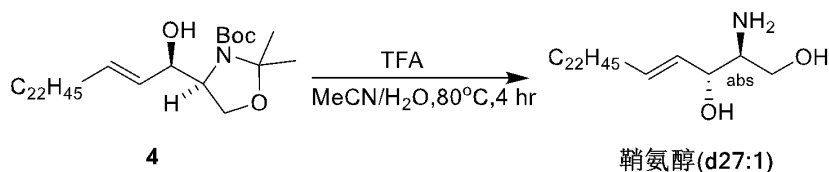


氮气保护下，将叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (504.51 mg, 1.96 mmol)、二十四碳-1-烯 (600 mg, 1.78 mmol) 和亚苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯-钨；三环己基膦 (151.32 mg, 178.23 μmol) 的二氯甲烷 (6 mL) 混合液脱气，并用氮气置换三次。氮气保护下混合液于 40°C 搅拌 8 h。将此反应液与由二十四碳-1-烯 (600 mg) 制备而来的另一批次反应液合并。浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯在石油醚中占比 0~14%) 纯化，得到 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十五烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (880 mg, 1.56 mmol, 收率 43.62%)，性状为黄色油状物。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.82 - 5.68 (m, 1H), 5.47 - 5.38 (m, 1H), 4.15 - 3.74 (m, 4H), 1.49 - 1.25 (m, 57H), 0.89 - 0.85 (m, 3H)。

第四步

(E,2S,3R)-2-氨基二十七烷基-4-烯-1,3-二醇



15

向 (4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基二十五烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (880 mg, 1.56 mmol) 的乙腈溶液 (3 mL) 中加入三氟乙酸 (1.77 g, 15.55 mmol, 1.16 mL) 的水溶液 (3 mL)。混合物在 80°C 下搅拌 4 h。反应液浓缩后得到 (E,2S,3R)-2-氨基二十七烷基-4-烯-1,3-二醇 (660 mg, 1.55 mmol, 收率 99.70%)。其中 (330 mg, 775.14 μmol) 经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱：Welch Xtimate C4 100 x 30 x 10 μm ；流动相：[水 (甲酸)-甲醇]；梯度：20 min 内 70%-55%B) 得到 (E,2S,3R)-2-氨基二十七烷基-4-烯-1,3-二醇 (10.8 mg, 20.01 μmol , 收率 2.57%，三氟乙酸盐)，性状为白色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.52 (br s, 1H), 5.96 - 5.74 (m, 1H), 5.58 - 5.43 (m, 1H), 4.34 - 4.26 (m, 1H), 3.80 - 3.60 (m, 2H), 3.21 - 3.14 (m, 1H), 2.15 - 2.05 (m, 2H), 1.43 - 1.39 (m, 2H), 1.34 - 1.26 (m, 38H), 0.93 - 0.85 (m, 3H)。

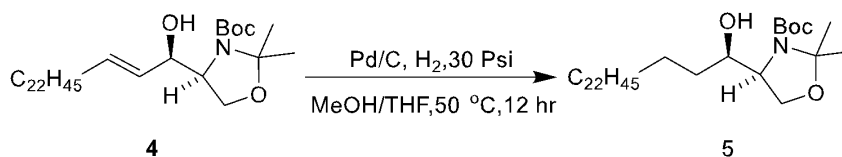
$^{19}\text{F NMR}$ (376.5 MHz, CD_3OD) δ = -76.907。

LCMS R_t = 1.191 min in 1.5 min 色谱, 5-95AB ESI 计算值 $\text{C}_{27}\text{H}_{56}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 426.4, 测试值 426.3

HPLC R_t = 4.980 min, 在 8 min 色谱中, ELSD, 纯度 98.085%。

第五步

(4S)-4-[(1R)-1-羟基二十五烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

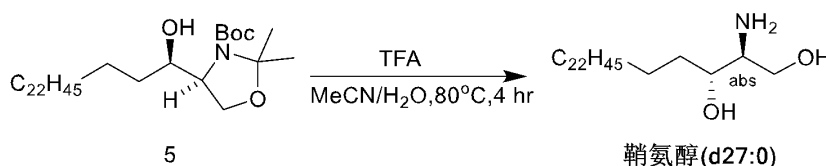


氮气保护下向(4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基二十五烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (1 g, 1.77 mmol) 的甲醇 (5 mL) 和四氢呋喃 (5 mL) 混合溶液中加入 Pd/C (188.05 mg, 176.71 μ mol, 纯度 10%)。混悬液脱气, 用氢气置换三次。混合物在氢气氛围 (30 psi) 下于 50 $^{\circ}$ C 搅拌 12 h。向混合物中加入四氢呋喃 (50 mL) 并过滤。用四氢呋喃 (30 mL) 洗涤滤饼三次。滤液浓缩得到的粗品经快速硅胶柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~14%) 得到化合物 (4S)-4-[(1R)-1-羟基二十五烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (600 mg, 1.06 mmol, 收率 59.79%), 性状为黄色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 4.26 - 3.75 (m, 4H), 3.72 - 3.36 (m, 1H), 1.58 (s, 9H), 1.49 (s, 6H), 1.45 - 1.19 (m, 46H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

第六步

(2S,3R)-2-氨基二十七烷基-1,3-二醇



向(4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基二十五烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (600 mg, 1.06 mmol) 的乙腈溶液 (3 mL) 中加入三氟乙酸 (602.30 mg, 5.28 mmol, 392.38 μ L) 的水溶液 (3 mL)。混合物在 80 $^{\circ}$ C 下搅拌 4 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH=8。过滤, 滤饼减压干燥。室温下, 将滤饼置于盐酸/二氧六环 (2M, 10 mL) 中搅拌并浓缩。粗品用甲醇 (10 mL) 打浆并过滤。滤饼冻干后得到化合物 (2S,3R)-2-氨基二十七烷基-1,3-二醇 (105 mg, 215.07 μ mol, 收率 20.36%, 纯度 95.082%, 盐酸盐), 性状为白色固体。

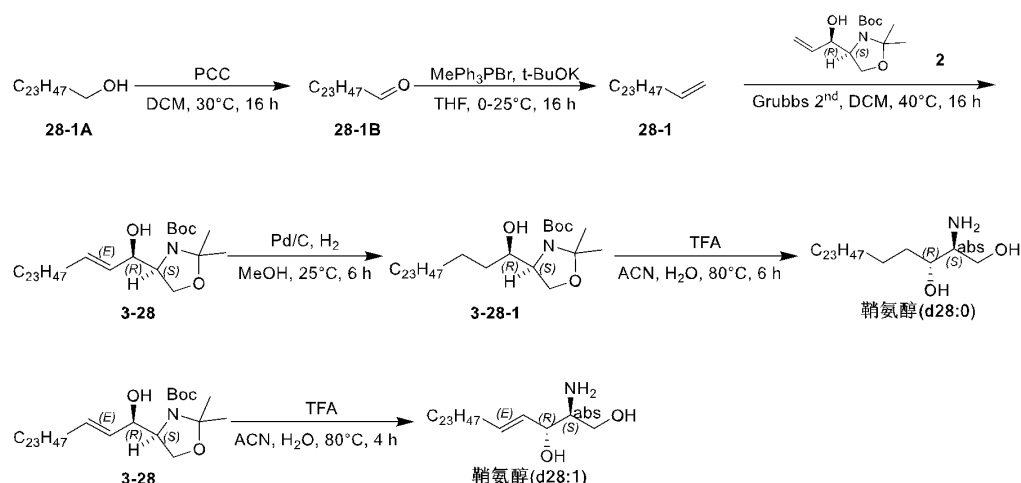
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.04 (br s, 3H), 5.03 (br s, 2H), 3.78 - 3.55 (m, 3H), 3.06 - 2.94 (m, 1H), 1.46 - 1.39 (m, 2H), 1.37 - 1.15 (m, 44H), 0.86 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

LCMS R_t = 5.664 min in 7 min 色谱, 50-100AB ESI 计算值 $\text{C}_{27}\text{H}_{58}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 428.4, 测试值 428.4

HPLC R_t = 5.630 min, 在 8 min 色谱中, ELSD, 纯度 95.082%。

鞘氨醇(d28:1) & (d28:0)

合成路线图

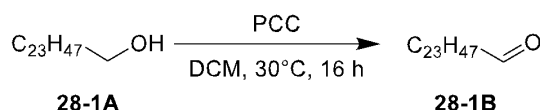


合成路线:

第一步

5

二十四碳-1-醛



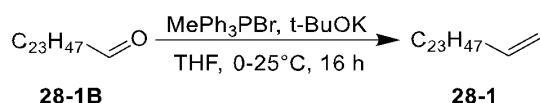
向二十四烷-1-醇 (8 g, 22.56 mmol, 1 eq) 的 DCM 溶液 (400 mL) 中加入氯铬酸吡啶鎓盐(PCC) (7.29 g, 33.84 mmol, 1.5 eq)。混合物在 30℃ 下搅拌 16h。向棕色混悬液中加入硅胶 (20 g)。所得混合物搅拌 30 min, 浓缩后的粗品经快速硅胶层析柱 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~10%) 纯化, 得到二十四碳-1-醛 (5.65 g, 16.03 mmol, 收率 71.0%), 性状为白色固体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 9.78 - 9.76 (t, *J*=2.0 Hz, 1H), 2.48 - 2.38 (m, 2H), 1.67 - 1.59 (m, 2H), 1.26 (s, 40H), 0.90 - 0.86 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

第二步

15

二十五碳-1-烯



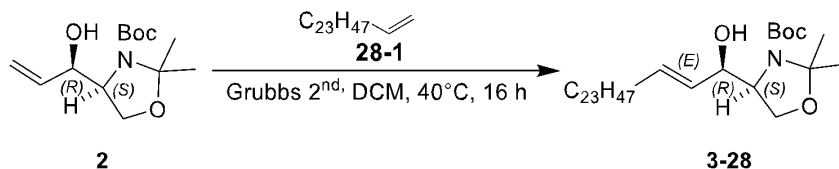
0℃ 下向甲基 (三苯基) 溴化磷 (20.26 g, 56.72, 5eq) 的 THF (15 mL) 溶液中加入叔丁醇钾 (6.36 g, 56.72 mmol, 5 eq)。所得黄色混悬液在 25℃ 下搅拌 1h, 并再次冷却至 0℃。0℃ 下逐滴加入二十四碳-1-醛 (4 g, 11.34 mmol, 1 eq) 的 THF (40 mL) 溶液。混合物在 25℃ 下搅拌 16h。向混合物中加入水 (30 mL), 并用乙酸乙酯 (40 mL x 3) 萃取。合并的有机相用饱和食盐水 (15 mL) 洗涤, 硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。粗品经快速硅胶层析柱 (洗脱剂: 石油醚) 纯化, 得到二十五碳-1-烯 (3.20 g, 9.13 mmol, 收率 80.4%), 性状为浅黄色固体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.88 - 5.77 (m, 1H), 5.03 - 4.91 (m, 2H), 2.06 -

2.03 (m, 2H), 1.29 - 1.25 (m, 42H), 0.91 - 0.86 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H)。

第三步

(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十六烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

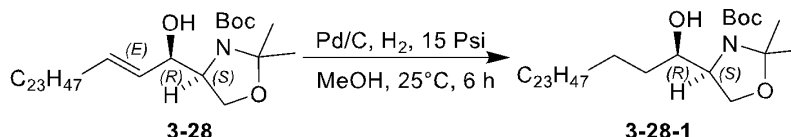


5 氮气保护下，将亚苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯-钨；三环己基膦 (183.44 mg, 216.07 μ mol, 0.1 eq) 加入到叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (556 mg, 2.16 mmol, 1 eq) 和二十五碳-1-烯 (2.11 g, 6.03 mmol, 2.79 eq) 的二氯甲烷 (20 mL) 中。混合液于 40°C 搅拌 16 h。反应液浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯在石油醚中占比 0~25%) 纯化，得到 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十六烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (438 mg, 755.26 μ mol, 收率 34.9%)，性状为黄色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 5.76 - 5.71$ (m, 1H), 5.48 (m, 1H), 4.19 - 3.87 (m, 4H), 2.08 - 2.02 (m, 2H), 1.54 - 1.49 (m, 15H), 1.26 (s, 44H), 0.91 - 0.86 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H)。

第四步

(4S)-4-[(1R)-1-羟基二十六烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

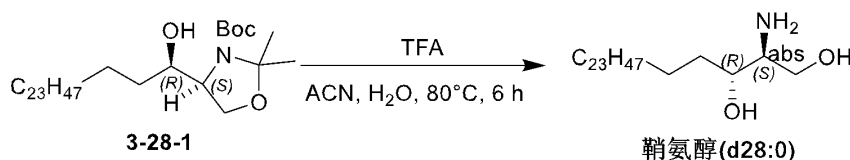


20 氮气保护下向 (4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基二十六烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (300 mg, 517.30 μ mol, 1 eq) 的甲醇 (3 mL) 溶液中加入 Pd/C (30 mg, 28.19 μ mol, 纯度 10%)。混合物在氢气氛围下于 25°C 搅拌 6 h。混合物过滤。滤液经浓缩得到化合物 (4S)-4-[(1R)-1-羟基二十六烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (231 mg, 396.94 μ mol, 收率 76.7%)，性状为白色固体。

$^1\text{H NMR}$ $\delta = 4.07 - 3.77$ (m, 4H), 3.60 - 3.46 (s, 1H), 1.60 - 1.58 (s, 2H), 1.54 - 1.49 (m, 15H), 1.26 (s, 48H), 0.91 - 0.87 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H)。

第五步

(2S,3R)-2-氨基二十八烷基-1,3-二醇



向 (4S)-4-[(1R)-1-羟基二十六烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (231 mg,

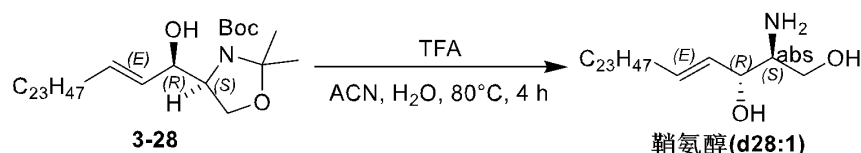
396.94 μmol , 1 eq) 的乙腈溶液 (3 mL) 中加入三氟乙酸 (92.10 mg, 807.75 μmol , 60 μL , 2.03 eq) 的水溶液 (3 mL)。混合物在 80°C 下搅拌 6 h。反应液浓缩后, 加入饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH=8 并过滤。滤液经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱: Welch Xtimate C1 100 x 30 mm, 5 μm ; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 8 min 内 65%-95%B) 得到 (2S,3R)-2-氨基二十八烷基-1,3-二醇 (9 mg, 20.37 μmol , 收率 5.1%, 纯度 100%), 性状为白色固体。

LCMS Rt = 2.854 min in 3 min 色谱, 30-100AB ESI 计算值 $\text{C}_{28}\text{H}_{59}\text{NO}_2$ $[\text{M}+1]^+$ 442.7, 测试值 442.4

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.54 (s, 1H), 3.86 - 3.80 (dd, J = 7.2, 11.2 Hz, 1H), 3.77 - 3.74 (m, 1H), 3.73 - 3.66 (dd, J = 8.8, 11.6 Hz, 1H), 3.16 - 3.13 (m, 1H), 1.52 - 1.45 (m, 2H), 1.35 - 1.28 (m, 46H), 0.92 - 0.88 (t, J = 6.0 Hz, 3H)。

第六步

(E,2S,3R)-2-氨基二十八烷-4-烯-1,3-二醇



向三氟乙酸 (110.52 mg, 969.30 μmol , 72.00 μL , 1.56 eq) 的水溶液 (7 mL) 中加入 (4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基二十六烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (360 mg, 620.76 μmol , 1 eq) 的乙腈溶液 (4 mL)。混合物在 80°C 下搅拌 4 h。反应液浓缩后加入饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH=8 并过滤。滤液经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱: Welch Xtimate C1 100 x 30 mm, 5 μm ; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 8 min 内 60%-90%B) 得到 (E,2S,3R)-2-氨基二十八烷-4-烯-1,3-二醇 (6.99 mg, 15.90 μmol , 收率 2.3%, 纯度 100%), 性状为白色固体。

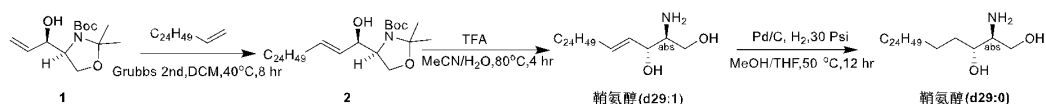
LCMS Rt = 0.478 min in 0.8 min 色谱, 30-100AB ESI 计算值 $\text{C}_{28}\text{H}_{57}\text{NO}_2$ $[\text{M}+1]^+$ 440.7, 测试值 440.4

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.85 - 5.63 (m, 1H), 5.57 - 5.43 (m, 1H), 4.24 - 3.93 (m, 1H), 3.74 - 3.57 (m, 2H), 2.95 - 2.78 (m, 1H), 2.45 - 2.10 (m, 4H), 2.10 - 1.90 (m, 2H), 1.6 - 1.41 (m, 2H), 1.4 - 1.0 (s, 40H), 0.91 - 0.70 (m, 3H)。

鞘氨醇(d29:1) & (d29:0)

合成路线图

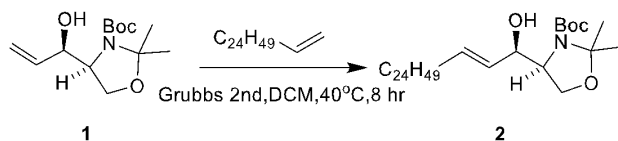
30



合成路线:

第一步

(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十七烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

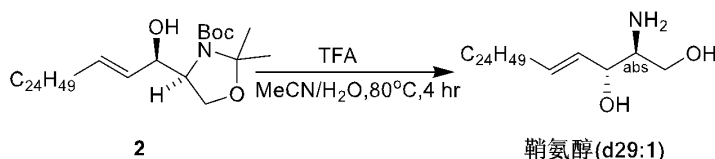


将叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (500 mg, 1.94 mmol) 和二十六碳-1-烯 (921.20 mg, 2.53 mmol) 和亚苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯-钨; 三环己基膦 (164.96 mg, 194.31 μ mol) 的二氯甲烷 (6 mL) 的混合液脱气, 并用氮气置换三次。氮气保护下混合液于 40 °C 搅拌 8 h。反应液浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~14%) 纯化, 得到 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十七烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (280 mg, 471.41 μ mol, 收率 24.26%), 性状为黄色油状物。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.81 - 5.67 (m, 1H), 5.50 - 5.38 (m, 1H), 4.20 - 3.84 (m, 4H), 2.06 - 2.00 (m, 2H), 1.60 - 1.26 (m, 44H), 1.25 - 1.24 (m, 15H), 0.88 (t, J = 6.4 Hz, 3H)。

第二步

(E,2S,3R)-2-氨基二十九烷基-4-烯-1,3-二醇



向 (4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基二十七烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (280 mg, 471.41 μ mol) 的乙腈溶液 (3 mL) 中加入三氟乙酸 (537.50 mg, 4.71 mmol, 350.16 μ L) 的水溶液 (3 mL)。混合物在 80°C 下搅拌 4 h。反应液加入饱和碳酸氢钠水溶液调节到 pH=8。过滤并将滤饼用水(10 mL)洗涤三次。滤饼干燥后得到 (E,2S,3R)-2-氨基二十九烷基-4-烯-1,3-二醇 (200 mg, 440.74 μ mol, 收率 93.49%), 性状为棕色固体。其中 (70 mg, 154.26 μ mol) 经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱: Welch Xtimate C4 100 x 30 x 10 μ m; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 20 min 内 70%-85%B) 纯化两次, 得到 (E,2S,3R)-2-氨基二十九烷基-4-烯-1,3-二醇 (4.3 mg, 8.25 μ mol, 收率 0.05%, 纯度 95.870%, 甲酸盐), 性状为白色固体。

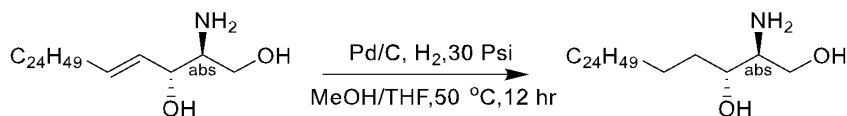
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.43 (br s, 3H), 5.77 - 5.18 (m, 2H), 3.89 - 3.77 (m, 1H), 3.63 - 3.35 (m, 1H), 3.22 - 3.20 (m, 1H), 2.74 - 2.58 (m, 1H), 2.04 - 1.98 (m, 2H), 1.40 - 1.16 (m, 44H), 0.90 - 0.83 (m, 3H)。

LCMS Rt = 5.960 min in 7 min 色谱, 50-100AB ESI 计算值 $\text{C}_{29}\text{H}_{60}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 454.5, 测试值 454.5

HPLC Rt = 5.996 min in 15 min 色谱, ELSD, 纯度 95.870%。

第三步

(2S,3R)-2-氨基二十九烷基-1,3-二醇



鞘氨醇(d29:1)

鞘氨醇(d29:0)

氮气保护下向(E,2S,3R)-2-氨基二十九烷基-4-烯-1,3-二醇(130 mg, 286.48 μmol)
 5 的甲醇(2 mL)和四氢呋喃(2 mL)的混合溶液中加入 Pd/C(152.44 mg, 143.24 μmol ,
 纯度 10%)。反应液脱气并用氢气置换三次。混合物在氢气氛围下(30 psi)于 50 $^{\circ}\text{C}$
 搅拌 12 h。四氢呋喃(10 mL)加入反应液中。滤饼用四氢呋喃(10 mL)洗涤三
 10 次。滤液浓缩后,经 prep-HPLC 纯化(色谱柱: Welch Xtimate C4 100 x 30 x 10
 μm ; 流动相: [水(甲酸)-甲醇]; 梯度: 20 min 内 70%-85%B) 纯化, 得到化合
 物 (2S,3R)-2-氨基二十九烷基-1,3-二醇(6.4 mg, 12.54 μmol , 收率 4.38%, 纯度
 98.296%, 甲酸盐), 性状为白色固体。

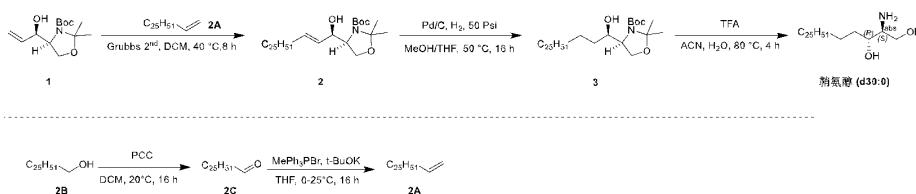
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.37 (s, 3H), 3.64 - 3.45 (m, 1H), 3.28 - 3.27
 (m, 2H), 2.71 - 2.60 (m, 1H), 1.45 - 1.23 (m, 50H), 0.88 - 0.82 (m, 3H)。

LCMS Rt = 6.199 min in 7 min 色谱, 50-100AB ESI 计算值 $\text{C}_{29}\text{H}_{62}\text{NO}_2$
 15 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 456.5, 测试值 456.5。

HPLC Rt = 6.735 min in 15min 色谱, ELSD, 纯度 98.296%。

鞘氨醇(d30:0)

合成路线图:

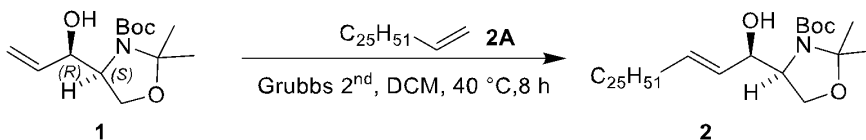


20

合成路线:

第一步

(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十八烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯



25

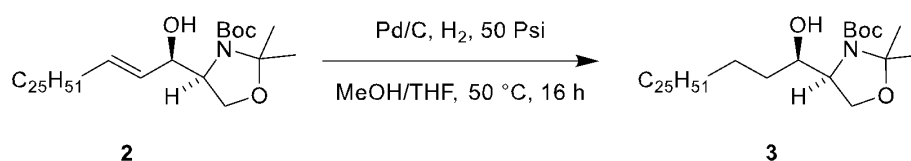
向叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (500 mg,
 1.94 mmol)、二十六碳-1-烯 (1.30 g, 3.43 mmol) 的二氯甲烷 (10 mL) 溶液中加入亚

苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯-钨; 三环己基膦 (224.17 mg, 264.05 μmol)。混合液脱气, 用氮气置换三次。混合物在氮气保护下于 40 °C 搅拌 8 h。反应液浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析(洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~10%) 纯化, 得到 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十八烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯 (280 mg, 460.54 μmol , 收率 17.44%), 性状为棕色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.81 - 5.67 (m, 1H), 5.50 - 5.35 (m, 1H), 4.25 - 3.77 (m, 4H), 2.10 - 1.91 (m, 2H), 1.58 - 1.45 (m, 15H), 1.40 - 1.08 (m, 46H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

第二步

(4S)-4-[(1R)-1-羟基二十八烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯

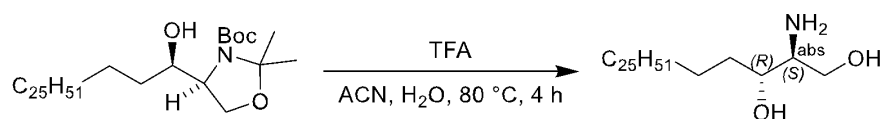


氮气保护下向 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十八烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯 (280 mg, 460 μmol) 的四氢呋喃 (10 mL) 和甲醇 (5 mL) 的混合溶液中加入 Pd/C (50 mg, 纯度 10%)。混悬液脱气, 并用氢气置换三次。混合物在氢气氛围 (50 psi) 下于 50 °C 搅拌 16 h。过滤并用四氢呋喃 (30 mL) 洗涤滤饼三次。滤液浓缩得到的粗品经硅胶板层析 (展开剂: 石油醚: 乙酸乙酯 4: 1) 纯化, 得到化合物 (4S)-4-[(1R)-1-羟基二十八烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯 (160 mg, 262.29 μmol , 收率 56.95%), 性状为白色固状。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 4.15-3.43 (m, 4H), 1.58 (s, 6H), 1.49 (s, 9H), 1.45 - 1.10 (m, 52H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H)。

第三步

(2S,3R)-2-氨基三十烷基-1,3-二醇



鞘氨醇(d30:0)

向 (4S)-4-[(1R)-1-羟基二十八烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯 (160 mg, 262 μmol) 的乙腈溶液 (1.5 mL) 和水 (1.5 mL) 的混合溶剂中加入三氟乙酸 (307 mg, 2.69 mmol, 0.2 mL)。氮气氛围下, 混合物在 80 °C 下搅拌 4 h。向反应液中加入饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH=8。分批过滤, 滤饼用甲醇 (5 mL) 淋洗。将滤饼分散于盐酸/二氧六环 (2M, 5 mL) 中搅拌 20 min 后。粗品用甲醇 (3 mL) 打浆并过滤。滤饼冻干后得到化合物 (2S,3R)-2-氨基三十烷基-1,3-二醇 (53.8 mg, 92.15 μmol , 收率 35.13%, 三氟乙酸盐), 性状为白色固体。

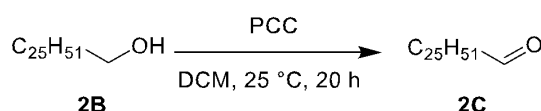
MS Rt = 0.464 min in 0.8 min 色谱, 30-100 AB, ESI 计算值 C₃₀H₆₄NO₂ [M+H]⁺ 470.5, 测试值 470.4.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.71 (br s, 3H), 4.95 - 4.82 (m, 2H), 3.74 - 3.64 (m, 2H), 3.62 - 3.53 (m, 1H), 3.10 - 3.01 (m, 1H), 1.32 - 1.25 (m, 52H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-d₆) δ = -73.413.

第四步

二十六碳-1-醛

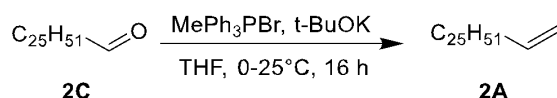


向二十六烷-1-醇 (5 g, 13.06 mmol) 的 DCM 溶液 (350 mL) 中加入硅胶 (5 g) 和氯铬酸吡啶鎓盐(PCC) (5.63 g, 26.12 mmol)。混合物在 25℃ 下搅拌 20h。反应液用硅藻土过滤, 滤液浓缩后得到二十六碳-1-醛 (4.97 g, 13.06 mmol), 性状为白色固体, 无需进一步纯化。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 9.76 (s, 1H), 2.45 - 2.34 (m, 2H), 1.70 - 1.57 (m, 2H), 1.34 - 1.20 (m, 44H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

第五步

二十七碳-1-烯

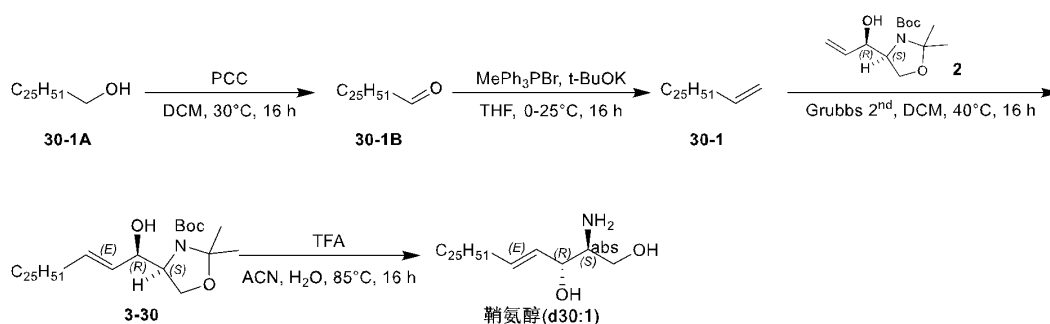


0℃ 下向甲基(三苯基)溴化膦 (13.99 g, 39.17 mmol) 的 THF (120 mL) 溶液中加入叔丁醇钾 (4.39 g, 39.17 mmol)。所得混悬液在 25℃ 下搅拌 1h, 并再次冷却至 0℃。0℃ 下逐滴加入二十六碳-1-醛 (4.97 g, 13.06 mmol) 的 THF (60 mL) 溶液。混合物在 25℃ 下搅拌 16h。向混合物中加入水 (100 mL), 并用乙酸乙酯 (100 mL x 3) 萃取。合并的有机相用饱和食盐水 (200 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 石油醚) 纯化, 得到二十七碳-1-烯 (3.85 g, 10.17 mmol, 两步收率: 77.87%), 性状为白色固体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.88 - 5.75 (m, 1H), 5.04 - 4.88 (m, 2H), 2.04 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.45 - 1.32 (m, 2H), 1.40 - 1.15 (m, 44H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

鞘氨醇(d30:1)

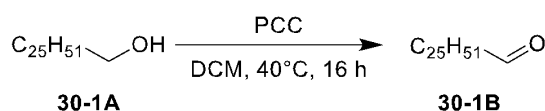
合成路线图



合成路线:

第一步

5 二十六碳-1-醛



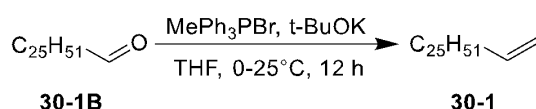
向二十六烷-1-醇 (1.9 g, 4.96 mmol, 1 eq) 的 DCM 溶液 (85 mL) 中加入氯铬酸吡啶鎓盐(PCC) (1.61 g, 7.38 mmol, 1.5 eq)。混合物在 40℃ 下搅拌 16h。向棕色混悬液中加入硅胶 (3.5 g)。所得混合物搅拌 30 min, 浓缩后的粗品经快速

10 硅胶层析柱 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~10%) 纯化, 得到二十六碳-1-醛 (690 mg, 1.81mmol, 收率 36.5%), 性状为白色固体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 9.80 - 9.75 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 2.48 - 2.38 (m, 2H), 1.60 (br s, 2H), 1.29 - 1.25 (m, 44H), 0.91 - 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

第二步

15 二十七碳-1-烯



0℃ 下向甲基 (三苯基) 溴化磷 (1.69 g, 4.73 mmol, 3 eq) 的 THF (5 mL) 溶液中加入叔丁醇钾 (530.57 mg, 4.73 mmol, 3 eq)。所得黄色混悬液在 25℃ 下搅拌 1h, 并再次冷却至 0℃。0℃ 下逐滴加入二十六碳-1-醛 (0.6 g, 1.58 mmol, 1 eq) 的 THF (5 mL) 溶液。混合物在 25℃ 下搅拌 12h。向混合物中加入水 (10 mL), 并用乙酸乙酯 (15 mL x 3) 萃取。合并的有机相用饱和食盐水 (5 mL) 洗涤, 硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩。粗品经快速硅胶层析柱 (洗脱剂: 石油醚) 纯化, 得到二十七碳-1-烯 (0.31 g, 0.87 mmol, 收率 45.0%), 性状为无色固体。

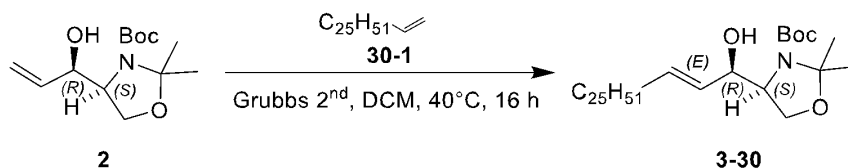
20

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.89 - 5.75 (m, 1H), 5.04 - 4.97 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H), 4.97 - 4.90 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 2.08 - 2.02 (m, 2H), 1.40 - 1.36 (m, 2H), 1.27 (s, 44H), 0.91 - 0.87 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H)。

25

第三步

(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十八烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

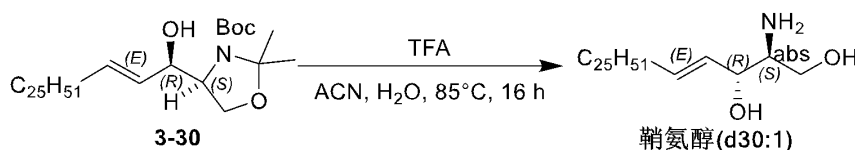


氮气保护下，将亚苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯-钨；三环己基膦 (24.10 mg, 28.39 μmol , 0.1 eq) 加入到叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (146.12 mg, 567.85 μmol , 2 eq) 和二十七碳-1-烯 (300 mg, 792.15 μmol , 2.79 eq) 的二氯甲烷 (15 mL) 的混合液中。混合液于 40°C 搅拌 16 h。反应液浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~25%) 纯化, 得到 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十八烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (55 mg, 90.46 μmol , 收率 31.9%), 性状为灰色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.79 - 5.71 (m, 1H), 5.48 (br s, 1H), 4.19 - 3.87 (m, 4H), 2.08 - 2.02 (m, 2H), 1.54 - 1.49 (m, 15H), 1.26 (m, 46H), 0.91 - 0.86 (t, J = 6.4 Hz, 3H)。

第四步

(E,2S,3R)-2-氨基三十烷基-4-烯-1,3-二醇



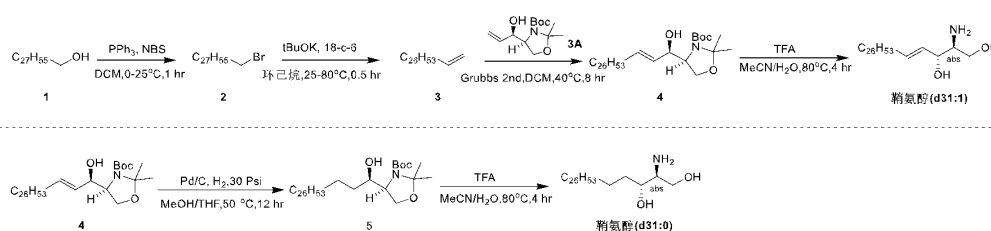
向三氟乙酸 (30.70 mg, 269.24 μmol , 0.02 mL, 3.64 eq) 的水溶液 (1 mL) 中加入 (4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基二十八烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (45 mg, 74.01 μmol , 1 eq) 的乙腈溶液 (1 mL)。混合物在 85°C 下搅拌 16 h。反应液浓缩后, 加入饱和碳酸氢钠水溶液调节到 pH=8。过滤, 滤饼干燥后得到 (E,2S,3R)-2-氨基三十烷基-4-烯-1,3-二醇 (9 mg, 18.57 μmol , 收率 25.1%, 纯度 96.5%), 性状为白色固体。

LCMS Rt = 2.066 min in 3 min 色谱, 30-100 ESI 计算值 $\text{C}_{30}\text{H}_{61}\text{NO}_2$ $[\text{M}+1]^+$ 468.8, 测试值 468.5。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.83 - 5.70 (m, 1H), 5.55 - 5.42 (m, 1H), 4.15 - 4.00 (m, 1H), 3.77 - 3.59 (m, 2H), 2.98 - 2.83 (m, 1H), 2.10 - 2.04 (m, 2H), 1.82 - 1.73 (m, 4H), 1.43 - 1.39 (m, 2H), 1.26 (br s, 44H), 0.91 - 0.87 (t, J = 6.4 Hz, 3H)。

鞘氨醇(d31:1) & (d31:0)

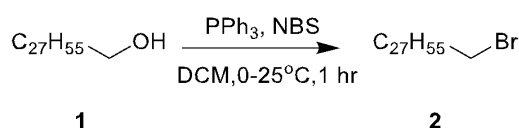
合成路线图



合成路线:

第一步

5 二十八碳-1-溴

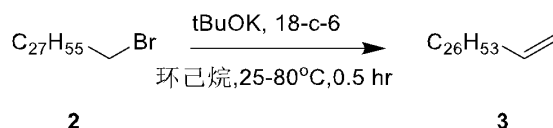


向二十八烷-1-醇 (5 g, 12.17 mmol) 的 DCM 溶液 (50 mL) 中加入 PPh₃ (3.83 g, 14.61 mmol)。然后在 0°C 下向混合物中加入 N-溴代丁二酰亚胺 (2.60 g, 14.61 mmol)。混合物在 25°C 下搅拌 1 h。加入饱和 Na₂SO₃ 溶液 (50 mL), 并用 DCM (50 mL x 3) 萃取水相。合并的有机相用饱和食盐水 (100 mL) 洗涤, 用无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并减压浓缩。粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 石油醚) 纯化, 得到二十八碳-1-溴 (5.77 g, 12.18 mmol, 收率 100.00%), 性状为白色固体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 3.42 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.95 - 1.80 (m, 2H), 1.44 (s, 2H), 1.30 - 1.24 (m, 48H), 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

第二步

二十八碳-1-烯

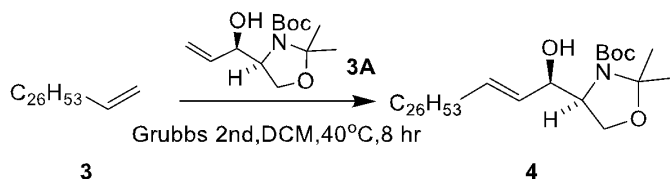


25°C 下, 向 二十八碳-1-溴 (4.77 g, 10.07 mmol) 和 18-冠-6 (638.85 mg, 2.42 mmol) 的环己烷溶液 (5 mL) 中加入叔丁醇钾 (2.71 g, 24.17 mmol)。混合物在 80°C 下搅拌 0.5 h。将混合物加入水 (50 mL) 中, 用 EtOAc (50 mL x 3) 萃取水相。合并的有机相用饱和食盐水 (100 mL) 洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并减压浓缩。粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 石油醚) 纯化, 得到二十八碳-1-烯 (3.15 g, 8.02 mmol, 收率 79.64%), 性状为白色固体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.87 - 5.70 (m, 1H), 5.07 - 4.85 (m, 2H), 1.25 - 1.24 (m, 50H), 0.86 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

第三步

(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十九烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

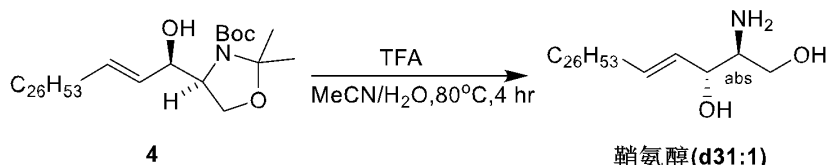


将叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (800 mg, 3.11 mmol)和二十八碳-1-烯 (1.59 g, 4.04 mmol)和亚苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯-钨; 三环己基膦 (263.94 mg, 310.89 μ mol)的二氯甲烷 (12 mL)的混合液脱气, 并用氮气置换三次。氮气保护下混合液于 40°C 搅拌 8 h。反应液浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析(洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~14%)纯化, 得到(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基二十九烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (450 mg, 723.46 μ mol, 收率 23.27%), 性状为黄色油状物。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.78 - 5.70 (m, 1H), 5.50 - 5.38 (m, 1H), 4.08 - 3.69 (m, 4H), 2.09 - 2.00 (m, 2H), 1.79 - 1.29 (m, 48H), 1.25 - 1.24 (m, 15H), 0.89 - 0.86 (m, 3H)。

第四步

(E,2S,3R)-2-氨基三十一烷基-4-烯-1,3-二醇



15

鞘氨醇(d31:1)

向(4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基二十九烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (450 mg, 723.46 μ mol) 的乙腈溶液 (3 mL)中加入三氟乙酸 (824.88 mg, 7.23 mmol, 537.38 μ L) 的水溶液 (3 mL)。混合物在 80°C 下搅拌 4 h。反应液加入饱和碳酸氢钠水溶液调节到 pH=8。过滤, 滤饼用水 (10 mL) 洗涤三次, 减压干燥后得到 (E,2S,3R)-2-氨基三十一烷基-4-烯-1,3-二醇 (340 mg, 705.64 μ mol, 收率 97.54%), 性状为棕色固体。其中(170 mg, 352.82 μ mol)经 prep-HPLC (色谱柱: Welch Xtimate C4 100 x 30 x 10 μ m; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 20 min 内 70%-90%B) 纯化两次, 得到化合物(E,2S,3R)-2-氨基三十一烷基-4-烯-1,3-二醇 (2 mg, 3.64 μ mol, 收率 1.03%, 纯度 96.127%, 甲酸盐), 性状为白色固体。

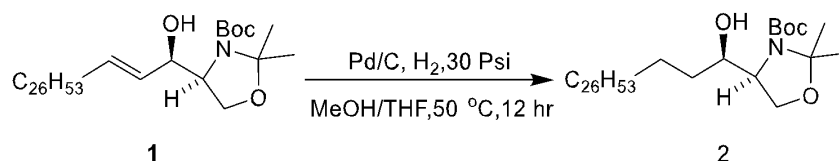
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.21 (br s, 2H), 5.60 - 5.25 (m, 2H), 3.65 - 3.46 (m, 2H), 3.40 - 3.37 (m, 1H), 2.69 - 2.66 (m, 1H), 2.03 - 1.97 (m, 2H), 1.52 - 1.46 (m, 2H), 1.30 - 1.23 (m, 46H), 0.88 - 0.85 (m, 3H)。

LCMS Rt = 6.247 min in 7 min 色谱, 50-100AB ESI 计算值 $\text{C}_{31}\text{H}_{64}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 482.5, 测试值 482.5。

HPLC Rt = 7.018 min in 15 min 色谱, ELSD, 纯度 96.127%。

第五步

(4S)-4-[(1R)-1-羟基二十九烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

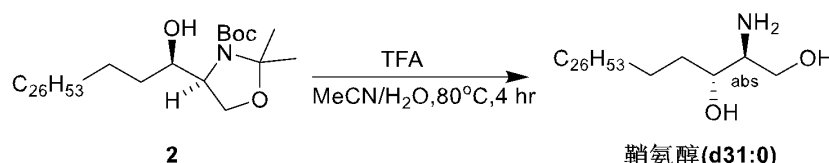


氮气保护下向(4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基二十九烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (1 g, 1.61 mmol) 的甲醇 (5 mL) 和四氢呋喃 (5 mL) 混合溶液中加入 Pd/C (171.09 mg, 160.77 μmol , 纯度 10%)。混合物脱气并用氢气置换三次。混合物在氢气氛围下(30 psi)于 50°C 搅拌 12 h。四氢呋喃(50 mL)加入到反应液中。混合物过滤, 滤饼用四氢呋喃(30 mL)洗涤三次。滤液经浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析(洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~14%)得到化合物 (4S)-4-[(1R)-1-羟基二十九烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (280 mg, 448.70 μmol , 收率 27.91%), 性状为黄色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 4.18 - 3.72 (m, 4H), 3.67 - 3.31 (m, 1H), 1.57 (s, 9H), 1.49 (s, 6H), 1.48 - 1.13 (m, 54H), 0.88 (t, J =6.8 Hz, 3H)。

第六步

(2S,3R)-2-氨基三十一烷基-1,3-二醇



向(4S)-4-[(1R)-1-羟基二十九烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (280 mg, 448.70 μmol) 的乙腈溶液 (3 mL) 中加入三氟乙酸 (255.80 mg, 2.24 mmol, 166.65 μL) 的水溶液 (3 mL)。混合物在 80°C 下搅拌 4 h。反应液加入饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH=8 并过滤。滤饼减压干燥。室温下, 将滤饼置于盐酸/二氧六环 (2M, 10 mL) 中搅拌并浓缩。粗品用甲醇 (10 mL) 打浆并过滤。滤饼冻干后得到化合物 (2S,3R)-2-氨基三十一烷基-1,3-二醇 (51 mg, 88.33 μmol , 收率 19.69%, 纯度 90.112%, 盐酸盐), 性状为白色固体。

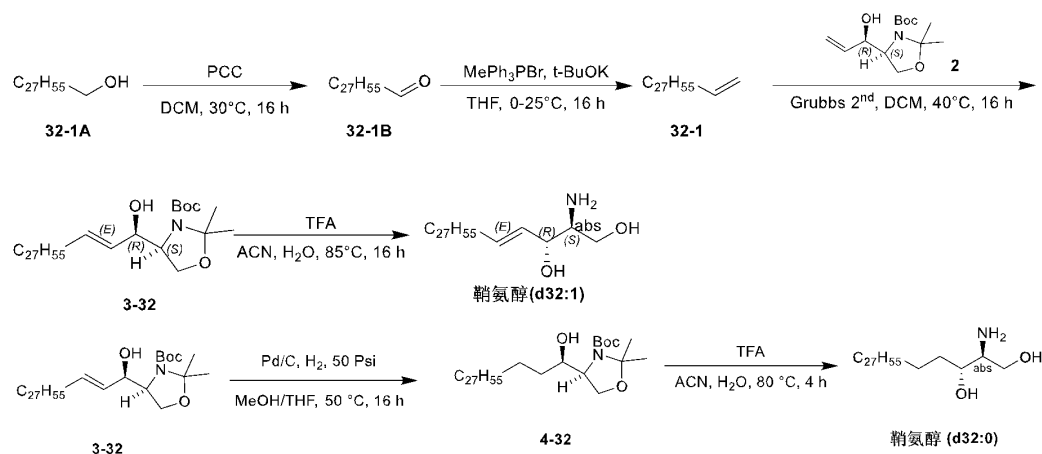
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 7.83 (br s, 1.5H), 5.04 - 4.89 (m, 1H), 3.78 - 3.38 (m, 3H), 3.04 - 2.99 (m, 1H), 1.46 - 1.42 (m, 2H), 1.32 - 1.24 (m, 52H), 0.86 (t, J =7.6 Hz, 3H)。

LCMS Rt = 6.614 min in 7 min 色谱, 50-100AB ESI 计算值 $\text{C}_{31}\text{H}_{66}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 484.5, 测试值 484.5。

HPLC Rt = 6.672 min, 在 8 min 色谱中, ELSD, 纯度 90.112%。

鞘氨醇(d32:1) & (d32:0)

合成路线图

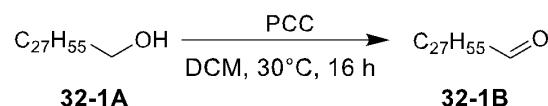


5

合成路线:

第一步

二十八碳-1-醛

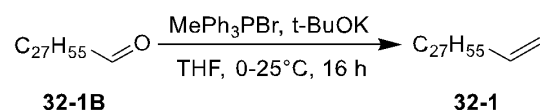


- 10 向二十八烷-1-醇 (10 g, 24.35 mmol, 1 eq) 的 DCM 溶液 (400 mL) 中加入氯铬酸吡啶鎓盐(PCC) (6.30 g, 29.21 mmol, 1.2 eq)。混合物在 30 °C 下搅拌 16h。向棕色混悬液中加入硅胶 (15 g)。所得混合物搅拌 30 min, 浓缩后的粗品经快速硅胶层析柱 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~10%) 纯化, 得到二十八碳-1-醛 (4.5 g, 11.01 mmol, 收率 45.2%), 性状为白色固体。

- 15 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 9.79 - 9.76 (s, 1H), 2.46 - 2.39 (m, 2H), 1.67 - 1.61 (m, 2H), 1.31 - 1.25 (m, 48H), 0.91 - 0.87 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H)。

第二步

二十九碳-1-烯



- 20 0 °C 下向甲基 (三苯基) 溴化膦 (11.80 g, 33.03 mmol, 3 eq) 的 THF (40 mL) 溶液中加入叔丁醇钾 (3.71 g, 33.03 mmol, 3 eq)。所得黄色混悬液在 25 °C 下搅拌 1h, 并再次冷却至 0 °C。0 °C 下逐滴加入二十八碳-1-醛 (4.5 g, 11.01 mmol, 1 eq) 的 THF (50 mL) 溶液。混合物在 25 °C 下搅拌 16h。向混合物中加入水 (30 mL), 并用乙酸乙酯 (40 mL x 3) 萃取。合并的有机相用饱和食盐水 (15 mL) 洗涤, 硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。粗品经快速硅胶层析柱 (洗脱剂: 石油醚) 纯化,
- 25

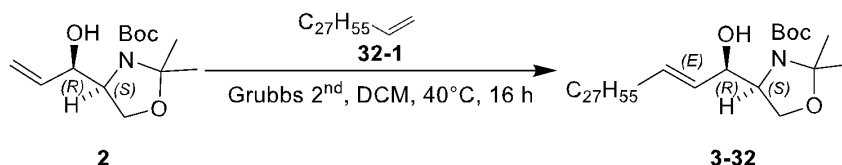
得到二十九碳-1-烯 (3.4 g, 8.36 mmol, 收率 75.9%), 性状为白色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.91 - 5.75 (m, 1H), 5.07 - 4.88 (m, 2H), 2.08 - 2.01 (m, 2H), 1.40 - 1.36 (m, 2H), 1.28 - 1.25 (m, 48H), 0.91 - 0.87 (t, J = 6.4 Hz, 3H)。

5

第三步

(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基三十烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐



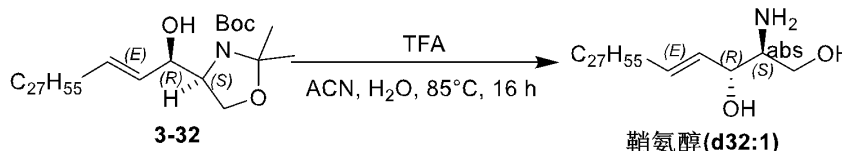
氮气保护下, 将亚苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯化钨; 三环己基膦 (149.61 mg, 176.23 μmol , 0.1 eq) 加入到叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (453.48 mg, 1.76 mmol, 1 eq) 和二十九碳-1-烯 (2 g, 4.92 mmol, 2.79 eq) 的二氯甲烷 (20 mL) 的混合液中。混合液于 40°C 搅拌 16 h。反应液减压浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~25%) 纯化, 得到 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基三十烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (0.3 g, 471.67 μmol , 收率 26.8%), 性状为棕色固体。

15

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.79 - 5.68 (m, 1H), 5.48 - 5.41 (m, 1H), 4.10 - 3.76 (m, 4H), 2.05 - 2.01 (m, 2H), 1.54 - 1.49 (m, 15H), 1.28 - 1.24 (m, 50H), 0.91 - 0.86 (t, J = 6.4 Hz, 3H)。

第四步

(E,2S,3R)-2-氨基三十二烷基-4-烯-1,3-二醇



20

向三氟乙酸 (92.10 mg, 807.73 μmol , 60.00 μL , 1.71 eq) 的水溶液 (3 mL) 中加入 (4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基三十烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (0.3 g, 471.67 μmol , 1 eq) 的乙腈溶液 (3 mL)。混合物在 85°C 下搅拌 16 h。反应液浓缩后, 加入饱和碳酸氢钠水溶液调节到 pH=8。过滤, 滤饼减压干燥后得到化合物 (E,2S,3R)-2-氨基三十二烷基-4-烯-1,3-二醇 (110 mg, 216.29 μmol , 收率 45.9%, 纯度 97.5%), 性状为白色固体。

25

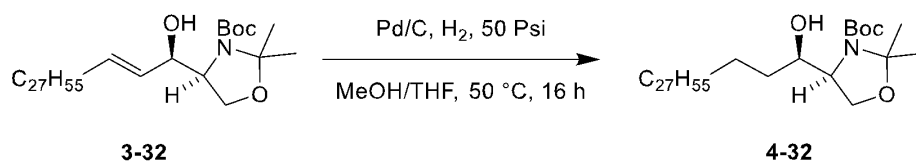
LCMS R_t = 2.137 min in 3 min 色谱, 30-100AB ESI 计算值 $\text{C}_{32}\text{H}_{65}\text{NO}_2$ $[\text{M}+1]^+$ 496.8, 测试值 496.5。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.82 - 5.70 (m, 1H), 5.53 - 5.42 (m, 1H), 4.14 - 3.97 (s, 1H), 3.74 - 3.58 (m, 2H), 2.96 - 2.82 (s, 1H), 2.10 - 2.03 (m, 2H), 1.91 - 1.70 (m, 4H), 1.41 - 1.36 (m, 2H), 1.29 - 1.24 (m, 48H), 0.91 - 0.86 (m, 3H)。

30

第五步

(4S)-4-[(1R)-1-羟基三十烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯

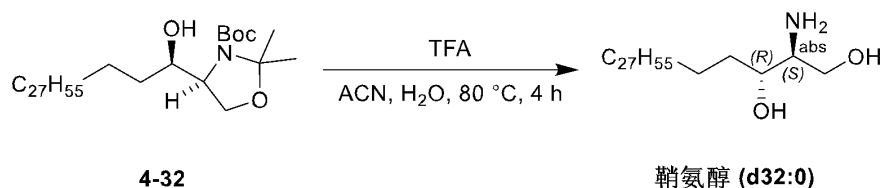


氮气保护下, 向(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基三十烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯 (300 mg, 471.67 μ mol) 的四氢呋喃 (5 mL) 和甲醇 (5 mL) 混合溶液中加入Pd/C (50 mg, 纯度10%), 将混悬液脱气, 并用氢气置换3次, 然后在氢气氛围下 (50psi) 于50℃搅拌16hr。过滤并将滤饼用四氢呋喃 (50 mL) 洗涤3次。滤液浓缩得到(4S)-4-[(1R)-1-羟基三十烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯 (250 mg, 391.81 μ mol), 性状为棕色固体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 4.15-3.67 (m, 4H), 1.56 (s, 6H), 1.43 (s, 9H), 1.38 - 1.15 (m, 56H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

第六步

(2S,3R)-2-氨基三十二烷-1,3-二醇



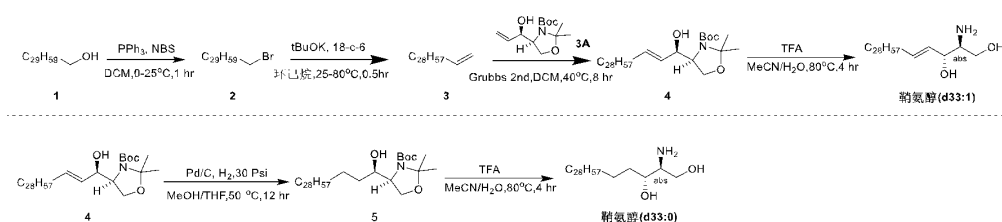
向(4S)-4-[(1R)-1-羟基三十烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯 (250 mg, 391.81 μ mol) 的乙腈 (2ml) 和水 (2ml) 混合溶液中加入三氟乙酸 (307.00 mg, 2.69 mmol, 0.2 mL)。混合物在80℃下搅拌4h。向反应液中加入饱和碳酸氢钠水溶液调节pH=8。分批过滤, 滤饼用甲醇 (5 mL) 淋洗。将滤饼分散于盐酸/二氧六环 (2M, 5 mL) 中搅拌后浓缩。粗品用甲醇 (10 mL) 打浆并过滤。滤饼冻干后得到化合物 (2S,3R)-2-氨基三十二烷-1,3-二醇 (44.7 mg, 83.65 μ mol, 收率21.35%, 盐酸盐), 性状为白色固体。

MS Rt = 0.497 min in 0.8 min 色谱, 30-100 AB, ESI 计算值 C₃₂H₆₈NO₂ [M+H]⁺ 498.5, 测试值498.6。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.76 (s, 3H), 4.90 (s, 2H), 3.74 - 3.64 (m, 2H), 3.63 - 3.53 (m, 1H), 3.10 - 3.00 (m, 1H), 1.48 - 1.35 (m, 2H), 1.41 - 1.15 (m, 54H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

鞘氨醇(d33:1) & (d33:0)

合成路线图

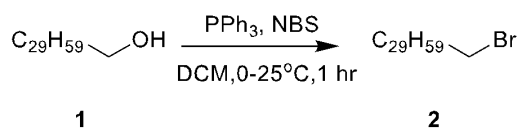


合成路线:

第一步

5

三十碳-1-溴



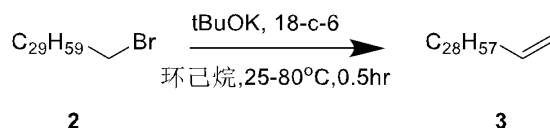
向三十烷-1-醇 (3 g, 6.84 mmol) 的 DCM 溶液 (50 mL) 中加入 三苯基膦 (2.15 g, 8.20 mmol)。然后在 0 °C 下向混合物中加入 N-溴代丁二酰亚胺 (1.46 g, 8.20 mmol)。混合物在 25 °C 下搅拌 1 h。加入饱和 Na₂SO₃ 溶液 (50 mL), 并用 DCM (50 mL x 3) 萃取水相。合并的有机相用饱和食盐水 (100 mL) 洗涤, 用无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并减压浓缩。粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 石油醚) 纯化, 得到三十碳-1-溴 (3.43 g, 6.84 mmol, 收率 100.00%), 性状为白色固体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 3.42 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.86 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.47 – 1.15 (m, 54H), 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

15

第二步

三十碳-1-烯



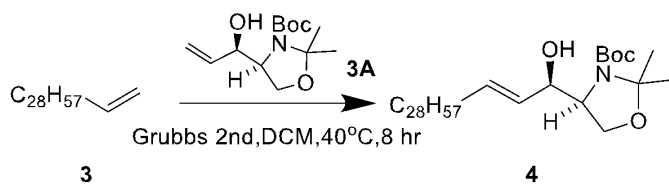
25 °C 下, 向 三十碳-1-溴 (2.43 g, 4.84 mmol) 和 18-冠-6 (307.25 mg, 1.16 mmol) 的环己烷溶液 (5 mL) 中加入叔丁醇钾 (1.30 g, 11.62 mmol)。混合物在 80 °C 下搅拌 0.5 h。将混合物加入水 (50 mL) 中, 用 EtOAc (50 mL x 3) 萃取水相。合并的有机相用饱和食盐水 (100 mL) 洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并减压浓缩。粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 石油醚) 纯化, 得到三十碳-1-烯 (1.35 g, 3.21 mmol, 收率 66.24%), 性状为白色固体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.95 - 5.68 (m, 1H), 5.02 - 4.83 (m, 2H), 1.26 - 1.24 (m, 54H), 0.86 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

25

第三步

(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基三十一烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

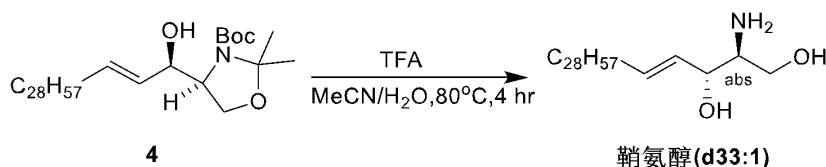


将叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (800 mg, 3.11 mmol)和三十碳-1-烯 (1.70 g, 4.04 mmol)和亚苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯-钨; 三环己基膦 (263.94 mg, 310.89 μ mol)的二氯甲烷 (12 mL)的混合液脱气, 并用氮气置换三次。氮气保护下混合液于 40 °C 搅拌 8h。反应液浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~14%) 纯化, 得到(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基三十一烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (260 mg, 399.96 μ mol, 收率 12.86%), 性状为黄色液体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.78 - 5.55 (m, 1H), 5.47 - 5.23 (m, 1H), 4.09 - 3.75 (m, 4H), 2.02 - 1.87 (m, 2H), 1.75 - 1.20 (m, 52H), 1.18 - 1.17 (m, 15H), 0.83 - 0.79 (m, 3H)。

第四步

(E,2S,3R)-2-氨基三十三烷基-4-烯-1,3-二醇



向(4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基三十一烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (240 mg, 369.19 μ mol) 的乙腈溶液 (3 mL)中加入三氟乙酸 (420.95 mg, 3.69 mmol, 274.24 μ L) 的水溶液 (3 mL)。混合物在 80 °C 下搅拌 4 h。反应液加入饱和碳酸氢钠水溶液调节到 pH=8。过滤, 滤饼用水 (10 mL) 洗涤三次, 减压干燥后得到 (E,2S,3R)-2-氨基三十三烷基-4-烯-1,3-二醇 (180 mg, 353.02 μ mol, 收率 95.62%)。其中(90 mg, 176.51 μ mol)经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱: Welch Xtimate C4 100 x 30 x 10 μ m; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 20 min 内 70%-90%B) 纯化, 得到化合物(E,2S,3R)-2-氨基三十三烷基-4-烯-1,3-二醇 (7.8 mg, 14.03 μ mol, 收率 7.95%, 甲酸盐), 性状为白色固体。

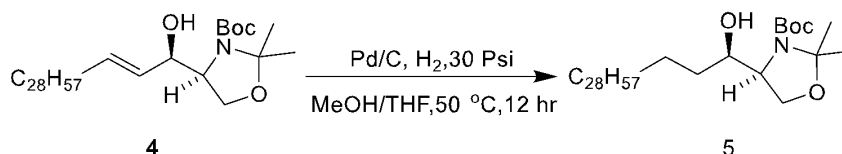
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.27 (br s, 1H), 5.66 - 5.55 (m, 1H), 5.50 - 5.40 (m, 1H), 3.93 - 3.85 (m, 1H), 3.48 - 3.47 (m, 2H), 2.71 - 2.65 (m, 1H), 2.04 - 1.95 (m, 2H), 1.36 - 1.31 (m, 2H), 1.30 - 1.21 (m, 50H), 0.89 - 0.83 (m, 3H)。

LCMS R_t = 1.336 min in 1.5 min 色谱, 5-95AB ESI 计算值 $\text{C}_{33}\text{H}_{68}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 510.5, 测试值 510.4。

HPLC R_t = 7.948 min in 15 min 色谱, ELSD, 纯度 98.751%。

第五步

(4S)-4-[(1R)-1-羟基三十一烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

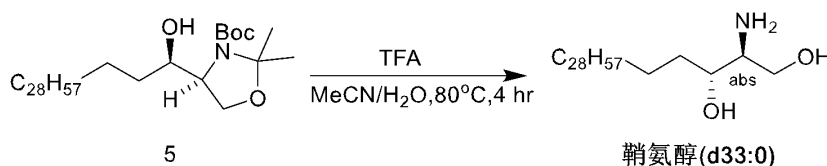


氮气保护下，向(4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基三十一烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (280 mg, 430.72 μmol) 的甲醇 (5 mL) 和四氢呋喃 (5 mL) 混合溶液中加入 Pd/C (45.84 mg, 43.07 μmol , 纯度 10%)。混合物脱气，并用氢气置换三次。混合物在氢气氛围下(30 psi)于 50 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 12 h。四氢呋喃 (50 mL) 加入到反应液中。混合物过滤，滤饼用四氢呋喃 (30 mL) 洗涤三次。滤液浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯在石油醚中占比 0~14%) 得到化合物 (4S)-4-[(1R)-1-羟基三十一烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (240 mg, 368.05 μmol , 收率 85.45%)，性状为黄色油状物。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 4.06 - 3.85 (m, 4H), 3.74 - 3.49 (m, 1H), 1.59 (s, 6H), 1.49 (s, 9H), 1.48 - 1.13 (m, 58H), 0.88 (t, J =6.8 Hz, 3H)。

第六步

(2S,3R)-2-氨基三十三烷基-1,3-二醇



15

向(4S)-4-[(1R)-1-羟基三十一烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (240 mg, 368.05 μmol) 的乙腈溶液 (3 mL) 中加入三氟乙酸 (209.83 mg, 1.84 mmol, 136.69 μL) 的水溶液 (3 mL)。混合物在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 4 h。反应液加入饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH=8 并过滤。滤饼减压干燥。室温下，将滤饼置于盐酸/甲醇 (4M, 10 mL) 中搅拌并浓缩。粗品用甲醇 (10 mL) 打浆并过滤。滤饼冻干后得到化合物 (2S,3R)-2-氨基三十三烷基-1,3-二醇 (226.3 mg, 349.87 μmol , 收率 95.06%, 纯度 84.780%, 盐酸盐)，性状为白色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 7.89 (br s, 2H), 4.98 (br s, 1H), 3.73 - 3.56 (m, 2H), 3.54 - 3.40 (m, 1H), 3.04 - 2.99 (m, 1H), 1.45 - 1.41 (m, 2H), 1.34 - 1.21 (m, 56H), 0.87 (t, J =6.4 Hz, 3H)。

25

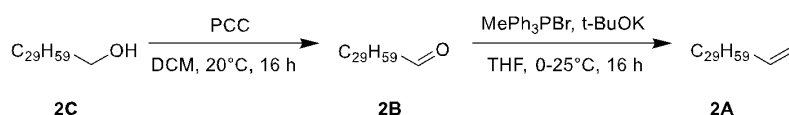
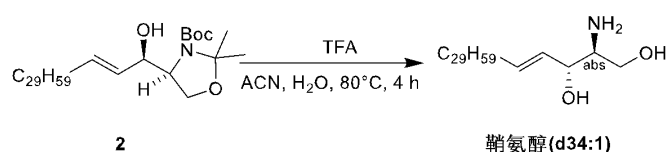
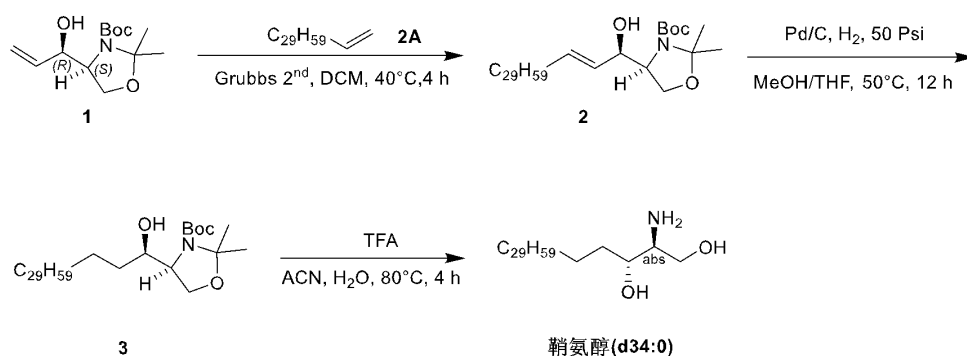
HPLC R_t = 7.079 min, 在 8 min 色谱中, ELSD, 纯度 84.780%。

MS R_t = 2.97 - 3.14 min in 4 min 色谱, 50-100AB ESI 计算值 $\text{C}_{33}\text{H}_{70}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 512.5328, 测试值 512.5456。

鞘氨醇(d34:0) & (d34:1)

30

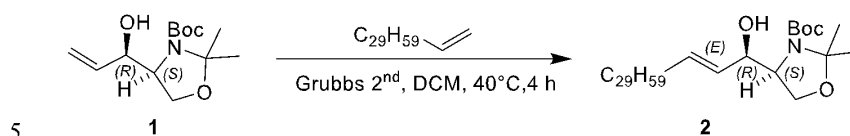
合成路线图



合成路线:

第一步

(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基三十二烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

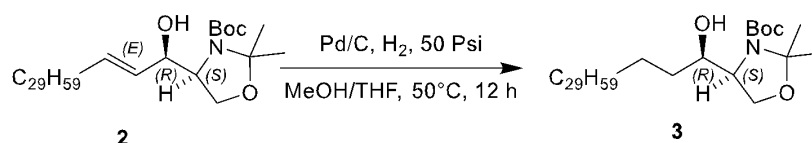


将叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (800 mg, 3.11 mmol)和三十一碳-1-烯 (1.2 g, 2.76 mmol)和亚苄基-[1,3-双(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-亚甲基]-二氯-钨; 三环己基膦 (234.30 mg, 275.98 μ mol)的二氯甲烷 (12 mL)的混合液脱气,并用氮气置换三次。混合液于 40°C 搅拌 4h。反应液过滤,滤液浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析(洗脱剂:乙酸乙酯在石油醚中占比 20%)纯化,得到(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基三十二烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (1 g, 1.51 mmol, 收率 54.56%), 性状为黑色油状物。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.80 - 5.70 (m, 1H), 5.55 - 5.40 (m, 1H), 4.10-3.75 (m, 4H), 2.07 (s, 2H), 1.51 (s, 15H), 1.27 (s, 54H), 0.95 - 0.85 (m, 3H)。

第二步

(4S)-4-[(1R)-1-羟基三十二烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐

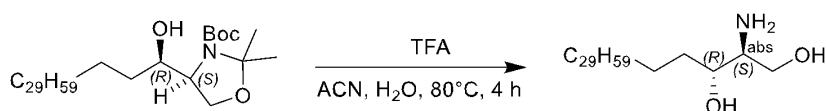


- 氮气保护下，向(4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基三十二烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (1 g, 1.51 mmol) 的甲醇 (10 mL) 和四氢呋喃 (10 mL) 混合溶液中加入 Pd/C (800 mg, 751.40 μ mol, 纯度 10%)。混合物脱气并用氢气置换三次。
- 5 混合物在氢气氛围下(50 psi)于 50℃ 搅拌 16 h。四氢呋喃 (10 mL) 加入到反应液中。混合物过滤，滤饼用四氢呋喃 (10 mL) 洗涤三次。滤液经浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂：乙酸乙酯在石油醚中占比 20%) 得到化合物 (4S)-4-[(1R)-1-羟基三十二烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (460 mg, 690.58 μ mol, 收率 45.86%)，性状为白色固体。

- 10 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 4.05-3.82 (m, 4H), 1.67 (s, 15H), 1.28 (s, 60H), 0.95-0.84 (m, 3H)。

第三步

(2S,3R)-2-氨基三十四烷基-1,3-二醇



2

鞘氨醇(d34:0)

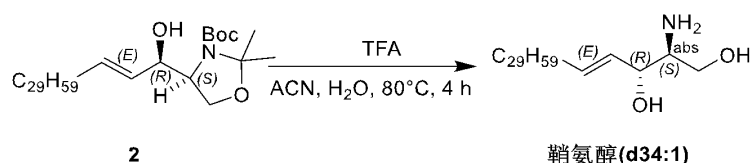
- 15 向(4S)-4-[(1R)-1-羟基三十二烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (460 mg, 690.58 μ mol) 的乙腈溶液 (3 mL) 中加入三氟乙酸 (393.70 mg, 3.45 mmol, 256.48 μ L) 的水溶液 (3 mL)。混合物在 80°C 下搅拌 4 h。反应液加入饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH=8 并过滤。滤饼减压干燥。室温下，将滤饼置于盐酸/二氧六环 (2M, 10 mL) 中搅拌 10 min 并浓缩。粗品用甲醇 (10 mL) 打浆并过滤。滤饼冻干后得到
- 20 化合物(2S,3R)-2-氨基三十四烷基-1,3-二醇(377.4 mg, 671.06 μ mol, 收率 97.17%, 盐酸盐)，性状为白色固体。

MS Rt = 1.06-1.43 min in 4 min 色谱, 80-100 AB, ESI 计算值 $\text{C}_{34}\text{H}_{72}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 526.5, 测试值 526.6

- 25 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.10 - 7.90 (m, 3H), 5.10 - 4.85 (m, 1H), 3.75 - 3.65 (m, 2H), 3.65 - 3.55 (m, 1H), 3.04 - 3.00 (m, 1H), 1.45 - 1.35 (m, 2H), 1.27 (s, 60H), 0.90 - 0.80 (m, 3H)。

第四步

(E,2S,3R)-2-氨基三十四烷基-4-烯-1,3-二醇



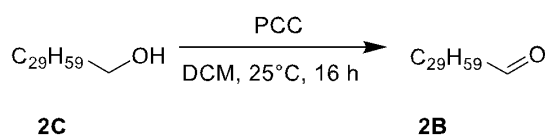
向(4S)-4-[(E, 1R)-1-羟基三十二烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸盐 (480 mg, 722.79) 的乙腈溶液 (4 mL) 中加入三氟乙酸 (824.12 mg, 7.23 mmol, 536.89 μ L) 的水溶液 (4 mL)。混合物在 80°C 下搅拌 4 h。反应液加入饱和碳酸氢钠水溶液调节到 pH=8 并过滤。滤饼减压干燥后得到(E,2S,3R)-2-氨基三十四烷基-4-烯-1,3-二醇 (300 mg, 572.61 μ mol, 收率 79.22%)。母液经 prep-HPLC 纯化 (色谱柱: Welch Xltime C4 100 x 30 x 10 μ m; 流动相: [水 (甲酸)-甲醇]; 梯度: 20 min 内 70%-90%B) 纯化, 得到化合物(E,2S,3R)-2-氨基三十四烷基-4-烯-1,3-二醇 (8.2 mg, 14.39 μ mol, 收率 1.99%, 甲酸盐), 性状为白色固体。

LCMS Rt = 1.342 min in 1.5 min 色谱, 5-95AB ESI 计算值 C₃₄H₇₀NO₂ [M+H]⁺ 524.5, 测试值 525.4。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*⁶) δ = 8.35 (s, 2H), 5.65 - 5.40 (m, 3H), 5.40 - 5.30 (m, 1H), 3.90 - 3.87 (m, 1H), 3.50 - 3.46 (m, 1H), 3.35 - 3.25 (m, 1H), 2.70 - 2.66 (m, 1H), 2.05 - 1.95 (m, 2H), 1.27 (s, 54H), 0.90-0.80 (m, 3H)。

第五步

三十碳-1-醇

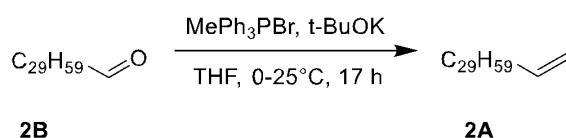


向三十碳-1-醇 (2 g, 4.56 mmol) 的 DCM 溶液 (100 mL) 中加入氯铬酸吡啶鎓盐(PCC) (1.08 g, 5.01 mmol)和硅胶 (3.00 g, 49.93 mmol)。混合物在 25°C 下搅拌 16h。混合物过滤, 滤液浓缩后的粗品经快速硅胶层析柱 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 0~30%) 纯化, 得到三十碳-1-醛 (1 g, 2.29 mmol, 收率 50.23%), 性状为棕色固体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 9.85 - 9.75 (m, 1H), 2.50 - 2.35 (m, 2H), 1.70 - 1.60 (m, 2H), 1.30 - 1.20 (m, 52H), 0.95 - 0.85 (m, 3H)。

第六步

三十一碳-1-烯



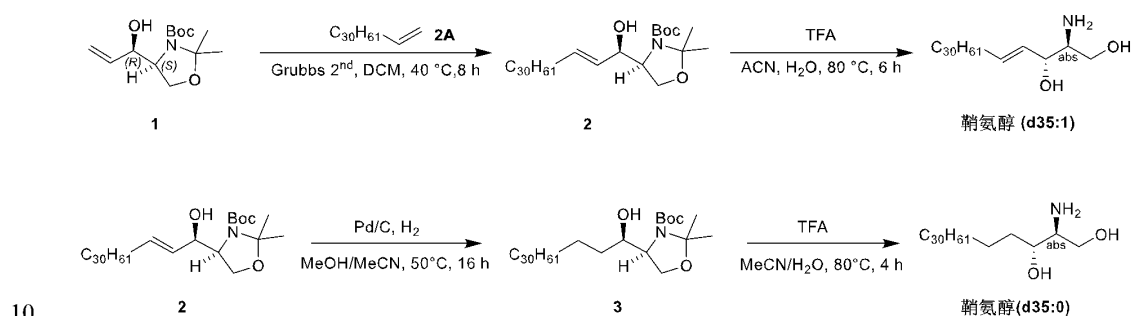
0°C 下向甲基 (三苯基) 溴化膦 (5.89 g, 16.48 mmol) 的 THF (50 mL) 溶液中加入叔丁醇钾 (1.85 g, 16.48 mmol)。所得黄色混悬液在 25°C 下搅拌 1h, 并再次冷却至 0°C。0°C 下逐滴加入三十碳-1-醛 (2.4 g, 5.49 mmol) 的 THF (25 mL)

溶液。混合物在 25℃ 下搅拌 16h。反应液与从三十碳-1-醛 (1 g) 制备而来的另一批次合并。向混合物中加入水 (50 mL)，并用乙酸乙酯 (50 mL x 3) 萃取。合并的有机相用饱和食盐水 (10 mL) 洗涤，硫酸钠干燥，过滤并浓缩。粗品经快速硅胶层析柱（洗脱剂：石油醚）纯化，得到三十一碳-1-烯 (1.1 g, 2.53 mmol, 收率 32.42%)，性状为无色油状物。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.90 - 5.80 (m, 1H), 5.05 - 4.93 (m, 2H), 2.09 - 2.02 (m, 2H), 1.28 (s, 54H), 0.91 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

鞘氨醇(d35:1) & (d35:0)

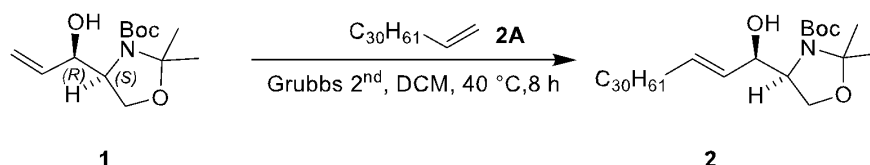
合成路线图：



合成路线：

第一步

15 (4S)-4-[(E,1R)-1-羟基三十三烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯

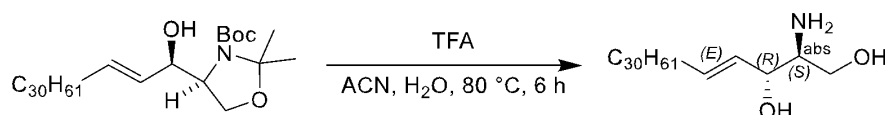


向叔丁基(4S)-4-[(1R)-1-羟基烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯(500 mg, 1.94 mmol)和三十二碳-1-烯(1.13 g, 2.53 mmol)的二氯甲烷 (7.5 mL)混合液中加入 Grubbs二代催化剂苄基-[1,3-二(2,4,6-三甲基苯基)咪唑烷-2-酰基]-二氯钨-三环己基磷 (164.96 mg, 194.31 μmol)，混合液脱气并用氮气置换3次，然后在氮气氛围下于 40℃ 搅拌8h。反应液浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析（洗脱剂：乙酸乙酯在石油醚中占比0~15%）纯化，得到(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基三十三烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯(90.0 mg, 132.72 μmol ，产率6.83%)，性状为白色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.78 - 5.68 (m, 1H), 5.48 - 5.35 (m, 1H), 4.24 - 3.76 (m, 4H), 2.07 - 1.98 (m, 2H), 1.55 - 1.47 (m, 15H), 1.40 - 1.11 (m, 56H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

第二步

(E, 2S, 3R)-2-氨基三十五烷基-4-烯-1,3-二醇



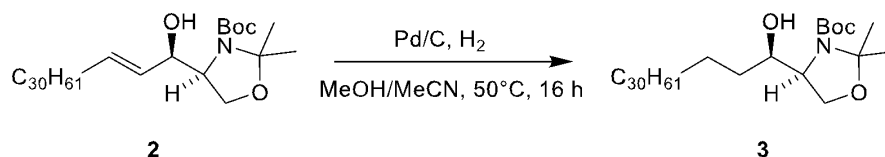
向(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基三十三烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯 (90.0 mg, 132.7 μmol) 的乙腈(1.5 mL)和水(1.5 mL)的混合液中加入三氟乙酸(307 mg, 2.69 mmol, 0.2 mL), 混合液于80℃搅拌6h。向反应液中加入饱和碳酸氢钠水溶液调节pH=8。分批过滤, 滤饼用甲醇(5 mL)淋洗。将滤饼分散于盐酸/二氧六环 (2M, 5 mL)中并搅拌20 min。浓缩后的粗品用甲醇(3 mL)打浆并过滤。滤饼冻干后得到化合物 (E, 2S, 3R)-2-氨基三十五烷基-4-烯-1,3-二醇 (15.0 mg, 26.11 μmol, 收率19.68%, 盐酸盐), 性状为白色固体。

MS Rt = 0.519 min in 0.8 min 色谱, 30-100 AB, ESI 计算值 C₃₅H₇₂NO₂ [M+H]⁺ 538.5, 测试值 538.5.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.81 - 7.39 (m, 3H), 5.79 - 5.66 (m, 1H), 5.51 - 5.41 (m, 1H), 5.24 - 5.14 (m, 1H), 4.93 - 4.81 (m, 1H), 4.26 - 4.16 (m, 1H), 3.69 - 3.59 (m, 1H), 3.58 - 3.47 (m, 1H), 3.58 - 3.47 (m, 1H), 3.18 - 3.07 (m, 1H), 2.07 - 1.99 (m, 2H), 1.42 - 1.32 (m, 2H), 1.40 - 1.15 (m, 56H), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

第三步

(4S)-4-[(1R)-1-羟基三十三烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯

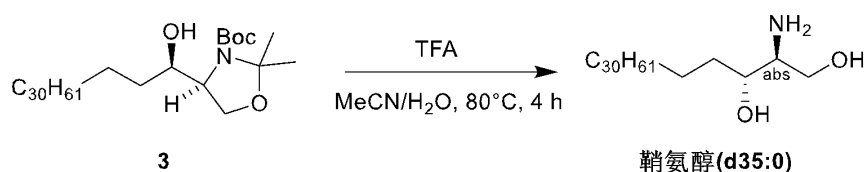


氮气保护下, 向(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基三十三烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯 (150 mg, 221.20 μmol) 的四氢呋喃 (2 mL) 和甲醇 (2 mL) 混合溶液中加入Pd/C (117.70 mg, 110.60 μmol, 纯度10%), 将混悬液脱气, 并用氢气置换3次, 然后在氢气氛围下 (50psi) 于50℃搅拌16hr。加入四氢呋喃 (10 mL)。过滤并将滤饼用四氢呋喃 (10 mL)洗涤3次。滤液浓缩后的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比20%) 纯化, 得到(4S)-4-[(1R)-1-羟基三十三烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯 (110 mg, 161.73 μmol, 收率73.12%), 性状为白色固体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 4.14 - 3.67 (m, 4H), 1.64 - 1.58 (m, 15H), 1.36 - 1.12 (m, 62H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

第四步

(2S,3R)-2-氨基三十五烷-1,3-二醇



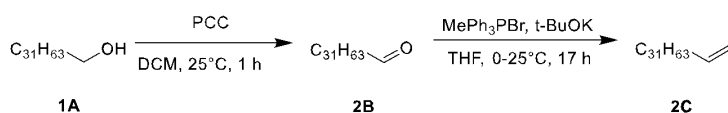
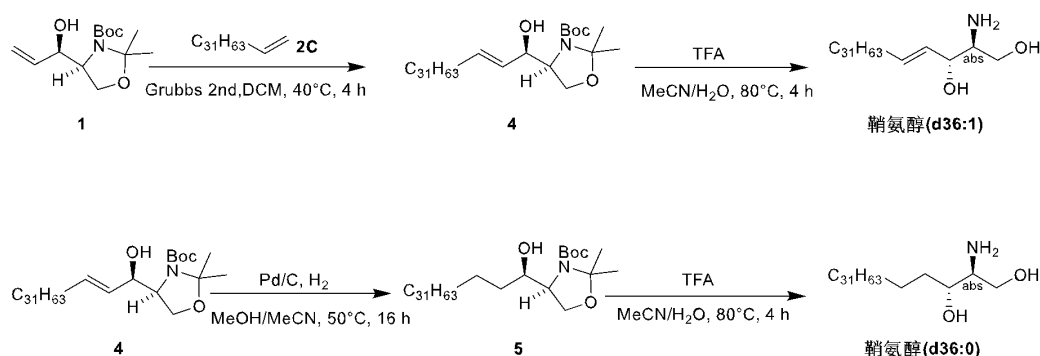
向(4S)-4-[(1R)-1-羟基三十三烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯 (110 mg, 161.73 μmol)的乙腈 (2mL) 溶液中加入三氟乙酸 (92.20 mg, 808.66 μmol , 60.07 μL) 的水溶液 (2 mL)。混合物在80℃下搅拌4h。向反应液中加入饱和碳酸氢钠水溶液调节pH=8。分批过滤，滤饼减压浓缩。将滤饼在室温下分散于盐酸/二氧六环 (2M, 10 mL) 中后浓缩。粗品用甲醇 (10 mL) 打浆并过滤。滤饼冻干后得到化合物 (2S,3R)-2-氨基三十五烷-1,3-二醇 (35.4 mg, 61.41 μmol , 收率37.97%, 盐酸盐)，性状为白色固体。

MS Rt = 2.158 min in 3 min 色谱, ESI 计算值 $\text{C}_{35}\text{H}_{74}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 540.6, 测试值 540.6。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 7.23 - 6.74 (m, 3H), 4.39 - 4.19 (m, 2H), 3.16 - 3.06 (m, 2H), 2.95 - 2.88 (m, 1H), 2.70 - 2.64 (m, 1H), 0.86 - 0.77 (m, 4H), 0.69 - 0.66 (m, 58H), 0.30 - 0.24 (m, 3H)。

15 鞘氨醇(d36:1) & (d36:0)

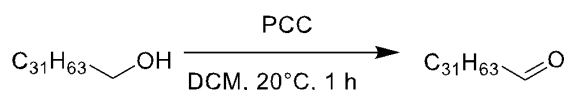
合成路线图:



20 合成路线:

第一步

三十二碳-1-醛



1A

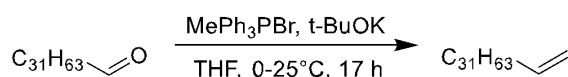
2B

向三十二烷-1-醇 (20 g, 42.84 mmol) 的 DCM 溶液 (1 L) 中加入氯铬酸吡啶鎓盐(PCC) (10.16 g, 47.12 mmol) 和硅胶 (20.00 g, 332.87 mmol)。混合物在 25℃ 下搅拌 1h。反应液和另一批次的反应液 (由20 克1A制备而来) 合并。过滤, 滤液浓缩后得到三十二碳-1-醛 (14 g, 30.12 mmol, 收率35.15%), 性状为白色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 9.79 (s, 1H), 2.45 - 2.38 (m, 2H), 2.03 - 1.96 (m, 2H), 1.27 - 1.30 (m, 56H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

第二步

三十二碳-1-烯



2B

2C

10

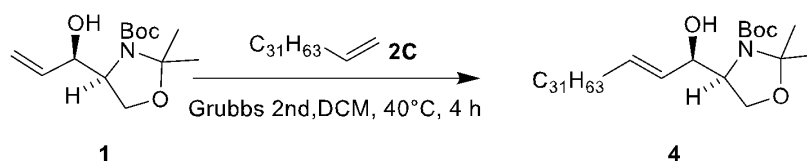
0℃ 下向甲基 (三苯基) 溴化膦 (6.92 g, 19.36 mmol) 的 THF (50 mL) 溶液中加入叔丁醇钾 (2.17 g, 19.36 mmol)。所得黄色混悬液在 25℃ 下搅拌 1h, 并再次冷却至 0℃。0℃ 下逐滴加入三十二碳-1-醛 (3 g, 6.45 mmol) 的 THF (25 mL) 溶液。混合物在25℃ 下搅拌16h。向混合物中加入水 (50 mL), 并用乙酸乙酯 (50 mL x 3) 萃取。合并的有机相用饱和食盐水 (50 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 石油醚) 纯化, 得到三十二碳-1-烯 (880 mg, 1.90 mmol, 收率: 29.46%), 性状为白色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.85 - 5.77 (m, 1H), 5.04 - 4.92 (m, 1H), 4.90 - 4.86 (m, 1H), 2.09 - 1.95 (m, 2H), 1.31 - 1.25 (m, 58H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

20

第三步

(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基三十四烷-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯



氮气氛围下, 向叔丁基 (4S)-4-[(1R)-1-羟基烯丙基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸酯 (532.02 mg, 2.07 mmol)、三十三碳-1-烯 (870 mg, 1.88 mmol) 的二氯甲烷 (12 mL) 溶液中加入亚苄基-[1,3-双 (2,4,6-三甲基苯基) 咪唑烷-2-亚甲基]-二氯-钨; 三环己基膦 (159.57 mg, 187.96 μmol)。混合物在氮气保护下于40℃搅拌4 h。反应液过滤, 并将滤液浓缩。粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比0~25%) 纯化, 得到(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基三十四烷-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-

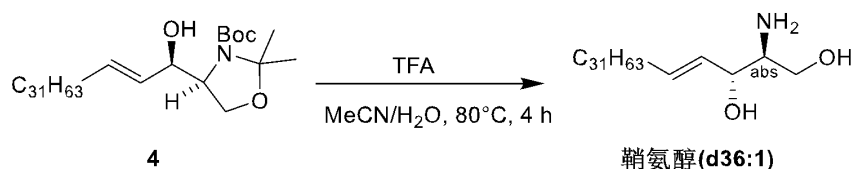
羧酸叔丁酯 (70 mg, 101.13 μmol , 收率 5.38%), 性状为白色固体。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.80 - 5.70 (m, 1H), 5.48 - 5.40 (m, 1H), 4.17 - 3.95 (m, 4H), 2.09 - 1.98 (m, 2H), 1.61 - 1.55 (m, 15H), 1.31 - 1.24 (m, 58H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

5

第四步

(E, 2S, 3R)-2-氨基三十六烷基-4-烯-1,3-二醇



向(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基三十四烷基-2-烯基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯 (70 mg, 101.13 μmol)的乙腈(1 mL)溶液中加入三氟乙酸(57.66 mg, 505.67 μmol , 37.56 μL)的水溶液(1 mL)。混合液于80℃搅拌4h。向反应液中加入饱和碳酸氢钠水溶液调节pH=8。分批过滤,滤饼减压下干燥。将滤饼分散于盐酸/二氧六环 (2M, 10 mL)中并浓缩。用甲醇 (10 mL) 打浆并冻干,得到化合物 (E, 2S, 3R)-2-氨基三十六烷基-4-烯-1,3-二醇 (32 mg, 54.38 μmol , 收率53.77%, 盐酸盐), 性状为白色固体。

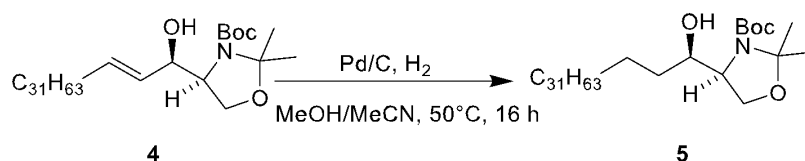
15 **MS** R_t = 1.348 min in 1.5 min 色谱, 5-95 AB, ESI 计算值 $\text{C}_{36}\text{H}_{74}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 552.6, 测试值 552.5。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 7.82-7.58 (m, 2H), 5.84 - 5.68 (m, 1H), 5.50 - 5.43 (m, 1H), 5.28 - 5.19 (m, 1H), 5.00 - 4.89 (m, 1H), 4.30 - 4.19 (m, 1H), 3.71 - 3.62 (m, 1H), 3.58 - 3.52 (m, 1H), 3.35-3.32(m, 1H), 2.08-2.00 (m, 2H), 1.31 - 1.25 (m, 58H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

20

第五步

(4S)-4-[(1R)-1-羟基三十四烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯



25 氮气保护下向(4S)-4-[(E,1R)-1-羟基三十四烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯 (170 mg, 245.61 μmol) 的四氢呋喃 (2 mL) 和甲醇 (2 mL) 的混合溶液中加入 Pd/C (130.69 mg, 122.81 μmol , 纯度 10%)。混悬液脱气,并用氢气置换三次。混合物在氢气氛围 (50 psi) 下于 50℃ 搅拌 16 h。加入四氢呋喃 (10 mL)并过滤。用四氢呋喃 (10 mL) 洗涤滤饼三次。滤液浓缩得到的粗品经硅胶快速柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯在石油醚中占比 20%) 纯化,得到化合物 (4S)-4-[(1R)-1-羟基三十四烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯 (70 mg, 100.84 μmol , 收率

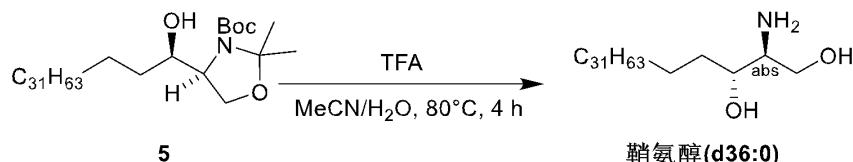
30

41.06%), 性状为白色固状。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 4.13 - 3.77 (m, 4H), 1.81 - 1.52 (m, 15H), 1.44 - 1.42 (m, 2H), 1.35 - 1.10 (m, 62H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

第六步

5 (2S,3R)-2-氨基三十六烷基-1,3-二醇



向(4S)-4-[(1R)-1-羟基三十四烷基]-2,2-二甲基-恶唑烷-3-羧酸叔丁酯 (70 mg, 100.84 μmol) 的乙腈溶液(2 mL)加入三氟乙酸 (57.49 mg, 504.20 μmol , 37.45 μL)的水溶液(2 mL)。混合物在 80°C 下搅拌 4 h。向反应液中加入饱和碳酸氢钠水溶液调节pH=8。分批过滤, 滤饼减压干燥。将滤分散于盐酸/二氧六环 (2M, 10 mL)中室温下搅拌。粗品用甲醇 (10 mL) 打浆并冻干, 得到化合物(2S,3R)-2-氨基三十六烷基-1,3-二醇(15.2 mg, 25.74 μmol , 收率 25.53%, 盐酸盐), 性状为白色固体。

MS Rt = 1.586 min in 3 min 色谱, ESI 计算值 $\text{C}_{36}\text{H}_{76}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 554.6, 测试值 554.5。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 7.70 - 7.55 (m, 3H), 5.10 - 4.63 (m, 2H), 3.70 - 3.62 (m, 2H), 3.58 - 3.51 (m, 1H), 3.18 - 3.10 (m, 1H), 1.40 - 1.38 (m, 2H), 1.28 - 1.25 (m, 62H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H)。

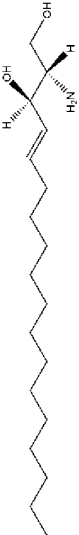
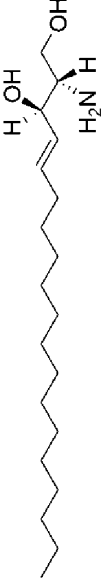
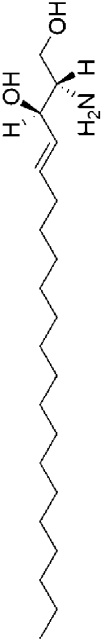
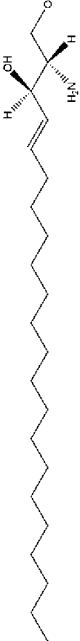
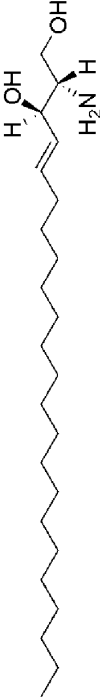
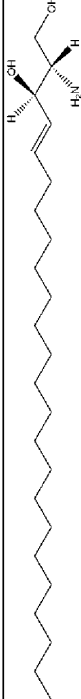
本发明实施例中使用的脂质为如下表 1 所示的鞘氨醇。

表 1：本发明中使用的鞘氨醇

序号	缩写	IUPAC 名称	结构
	鞘氨醇(d14:0)	(2S,3R)-2-氨基十四烷-1,3-二醇 (2S,3R)-2-aminotetradecane-1,3-diol	
	鞘氨醇(d15:0)	(2S,3R)-2-氨基十五烷-1,3-二醇 (2S,3R)-2-aminopentadecane-1,3-diol	
	鞘氨醇(d16:0)	(2S,3R)-2-氨基十六烷-1,3-二醇 (2S,3R)-2-aminohexadecane-1,3-diol	
	鞘氨醇(d17:0)	(2S,3R)-2-氨基十七烷-1,3-二醇 (2S,3R)-2-aminoheptadecane-1,3-diol	
	鞘氨醇(d18:0)	(2S,3R)-2-氨基十八烷-1,3-二醇 (2S,3R)-2-aminooctadecane-1,3-diol	
	鞘氨醇(d19:0)	(2S,3R)-2-氨基十九烷-1,3-二醇 (2S,3R)-2-aminononadecane-1,3-diol	
	鞘氨醇(d20:0)	(2S,3R)-2-氨基二十烷-1,3-二醇 (2S,3R)-2-aminoicosane-1,3-diol	
	鞘氨醇(d21:0)	(2S,3R)-2-氨基二十一烷-1,3-二醇 (2S,3R)-2-aminohenicosane-1,3-diol	

	鞘氨醇(d22:0)	(2S,3R)-2-氨基二十二烷-1,3-二醇 ((2S,3R)-2-aminodocosane-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d23:0)	(2S,3R)-2-氨基二十三烷-1,3-二醇 ((2S,3R)-2-aminotricosane-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d24:0)	(2S,3R)-2-氨基二十四烷-1,3-二醇 ((2S,3R)-2-aminotetracosane-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d25:0)	(2S,3R)-2-氨基二十五烷-1,3-二醇 ((2S,3R)-2-aminopentacosane-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d26:0)	(2S,3R)-2-氨基二十六烷-1,3-二醇 ((2S,3R)-2-aminohexacosane-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d27:0)	(2S,3R)-2-氨基二十七烷-1,3-二醇 ((2S,3R)-2-aminoheptacosane-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d28:0)	(2S,3R)-2-氨基二十八烷-1,3-二醇 ((2S,3R)-2-aminooctacosane-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d29:0)	(2S,3R)-2-氨基二十九烷-1,3-二醇 ((2S,3R)-2-aminononacosane-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d30:0)	(2S,3R)-2-氨基三十烷-1,3-二醇 ((2S,3R)-2-aminotriacontane-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d31:0)	(2S,3R)-2-氨基三十一烷-1,3-二醇 ((2S,3R)-2-aminohentriacontane-1,3-diol)	

		3-diol)	
	鞘氨醇(d32:0)	(2S,3R)-2-氨基三十二烷-1,3-二醇 ((2S,3R)-2-aminotriacontane-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d33:0)	(2S,3R)-2-氨基三十三烷-1,3-二醇 ((2S,3R)-2-aminotriacontane-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d34:0)	(2S,3R)-2-氨基三十四烷-1,3-二醇 ((2S,3R)-2-aminotetracontane-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d35:0)	(2S,3R)-2-氨基三十五烷-1,3-二醇 ((2S,3R)-2-aminopentatriacontane-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d36:0)	(2S,3R)-2-氨基三十六烷-1,3-二醇 ((2S,3R)-2-aminohexatriacontane-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d14:1)	(2S,3R,E)-2-氨基十四碳-4-烯-1,3-二醇 ((2S,3R,E)-2-aminotetradec-4-ene-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d15:1)	(2S,3R,E)-2-氨基十五碳-4-烯-1,3-二醇 ((2S,3R,E)-2-aminopentadec-4-ene-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d16:1)	(2S,3R,E)-2-氨基十六碳-4-烯-1,3-二醇 ((2S,3R,E)-2-aminohexadec-4-ene-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d17:1)	(2S,3R,E)-2-氨基十七碳-4-烯-1,3-二醇 ((2S,3R,E)-2-aminoheptadec-4-ene-1,3-diol)	

		1,3-diol) (2S,3R,E)-2-氨基十八碳-4-烯-1,3-二 醇 (2S,3R,E)-2-aminooctadec-4-ene-1 ,3-diol)	
	鞘氨醇(d19:1)	(2S,3R,E)-2-氨基十九碳-4-烯-1,3-二 醇 (2S,3R,E)-2-aminononadec-4-ene- 1,3-diol)	
	鞘氨醇(d20:1)	(2S,3R,E)-2-氨基二十碳-4-烯-1,3-二 醇 (2S,3R,E)-2-aminoicos-4-ene-1,3- diol)	
	鞘氨醇(d21:1)	(2S,3R,E)-2-氨基二十一碳-4-烯-1,3-二 醇 (2S,3R,E)-2-aminohenicos-4-ene-1 ,3-diol)	
	鞘氨醇(d22:1)	(2S,3R,E)-2-氨基二十二碳-4-烯-1,3-二 醇 (2S,3R,E)-2-aminodocos-4-ene-1, 3-diol)	
	鞘氨醇(d23:1)	(2S,3R,E)-2-氨基二十三碳-4-烯-1,3-二 醇 (2S,3R,E)-2-aminotricos-4-ene-1,3 -diol)	
	鞘氨醇(d24:1)	(2S,3R,E)-2-氨基二十四碳-4-烯-1,3-二 醇 (2S,3R,E)-2-aminotetracos-4-ene- 1,3-diol)	

	鞘氨醇(d25:1)	(2S,3R,E)-2-氨基二十五碳-4-烯-1,3-二醇 (2S,3R,E)-2-aminopentacos-4-ene-1,3-diol	
	鞘氨醇(d26:1)	(2S,3R,E)-2-氨基二十六碳-4-烯-1,3-二醇 (2S,3R,E)-2-aminohexacos-4-ene-1,3-diol	
	鞘氨醇(d27:1)	(2S,3R,E)-2-氨基二十七碳-4-烯-1,3-二醇 (2S,3R,E)-2-aminoheptacos-4-ene-1,3-diol	
	鞘氨醇(d28:1)	(2S,3R,E)-2-氨基二十八碳-4-烯-1,3-二醇 (2S,3R,E)-2-aminooctacos-4-ene-1,3-diol	
	鞘氨醇(d29:1)	(2S,3R,E)-2-氨基二十九碳-4-烯-1,3-二醇 (2S,3R,E)-2-aminononacos-4-ene-1,3-diol	
	鞘氨醇(d30:1)	(2S,3R,E)-2-氨基三十碳-4-烯-1,3-二醇 (2S,3R,E)-2-aminotriacont-4-ene-1,3-diol	
	鞘氨醇(d31:1)	(2S,3R,E)-2-氨基三十一碳-4-烯-1,3-二醇 (2S,3R,E)-2-aminotriacont-4-ene-1,3-diol	
	鞘氨醇(d32:1)	(2S,3R,E)-2-氨基三十二碳-4-烯-1,3-二醇 (2S,3R,E)-2-aminotriacont-4-ene-1,3-diol	

		e-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d33:1)	(2S,3R,E)-2-氨基三十三碳-4-烯-1,3-二- (2S,3R,E)-2-aminotritriacont-4-ene-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d34:1)	(2S,3R,E)-2-氨基三十四碳-4-烯-1,3-二- (2S,3R,E)-2-aminotetatracont-4-ene-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d35:1)	(2S,3R,E)-2-氨基三十五碳-4-烯-1,3-二- (2S,3R,E)-2-aminopentatriacont-4-ene-1,3-diol)	
	鞘氨醇(d36:1)	(2S,3R,E)-2-氨基三十六碳-4-烯-1,3-二- (2S,3R,E)-2-aminohexatriacont-4-ene-1,3-diol)	

实施例 2. 脂质核酸复合物的体外小核酸递送研究

1. 细胞培养

实验所用人胰腺腺泡上皮癌细胞系 HPAC、人大细胞肺癌细胞系 H460 和人胚肾细胞系 HEK293T(购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心)置于 37°C、5% CO₂ 培养箱内培养。HPAC 细胞培养于 DMEM/F12 培养基, H460 细胞培养于 RPMI-1640 培养基, 293T 细胞培养于 DMEM 培养基, 培养基中含 10%胎牛血清和 1%抗生素(青霉素 100 U/mL & 链霉素 100 mg/mL)。细胞培养至对数生长期, 细胞密度为 6×10^5 /1mL 培养基/孔; 分板至 12 孔板(1 mL 培养基/孔), 37°C 孵育过夜(12 h)后进行后续实验。

2. 脂质-RNA 混合物的制备

向 2 mL 玻璃管中加入 5 μ L 核酸及 95 μ L DEPC 处理过的水, 混匀后加入一定量脂质单体, 充分混匀, 90°C 水浴加热 15 min 后自然冷却, 得到核酸脂质混合物。

示例性地, 本实施例中使用的 RNA PGY-ssRNA-26, 其具有序列 UCCGGAAUGAUUGGGCGUAAAGCGU (SEQ ID NO: 1)。

3. 流式细胞技术(CFlow)检测细胞内脂质递送核酸的细胞摄取量

1) 主要实验仪器及器材:

10 cm 细胞培养皿、12 孔细胞培养板、移液器、移液管、光学显微镜、流式细胞仪 CytoFLEX 仪器(购自美国 Beckman 公司)

2) 主要实验试剂:

模型建立及转染: 表中所示的人工合成脂质单体和核酸

3) 实验所用人胰腺腺泡上皮癌细胞系 HPAC 细胞、人大细胞肺癌细胞系 H460 细胞和人胚肾细胞系 HEK293T 细胞培养至对数生长期, 然后铺板到 12 孔板, 细胞密度为 6×10^5 /mL 培养基/孔; 12 孔板, 37°C 孵育过夜(12 h)后进行后续实验。

4) 实验分组如下:

a) 空白组: 是指未经处理的细胞, 该组作为空白对照组。

b) 自由摄取组: 直接加入 5 μ L 荧光标记的核酸溶液(贮存浓度 20 μ M), 该组作为阴性对照组。

c) 脂质核酸混合物处理组: 将步骤 2 中制备的脂质与荧光标记的核酸的混合物加入细胞中, 混匀, 核酸终浓度为 100 nM。

5) 与细胞共同孵育 9h 后, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 用 PBS(自配)重悬细胞, 使用流式细胞仪 CytoFLEX 仪器(购自美国 Beckman 公司)检测样品孔细胞的荧光强度。

本实施例中体外小核酸递送的结果见下表 2-表 4 和图 1-图 3。
在表 2-表 4 中使用的小核酸均为 PGY-ssRNA-26。

表 2

脂质名称	空白组	自由摄取组	脂质递送组 (1.25ug/mL)	递送序列	细胞系
鞘氨醇(d22:0)	0.00%	0.10%	39.08%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d23:0)	0.00%	0.10%	78.91%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d23:1)	0.00%	0.10%	7.93%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d24:0)	0.00%	0.10%	96.61%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d24:1)	0.00%	0.10%	16.65%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d25:0)	0.00%	0.10%	96.17%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d25:1)	0.00%	0.10%	89.70%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d26:0)	0.00%	0.10%	97.75%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d26:1)	0.00%	0.10%	96.03%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d27:0)	0.00%	0.10%	97.35%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d27:1)	0.00%	0.10%	99.42%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d28:0)	0.00%	0.10%	94.40%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d28:1)	0.00%	0.10%	96.66%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d29:0)	0.00%	0.10%	83.57%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d29:1)	0.00%	0.10%	23.36%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d30:0)	0.00%	0.10%	93.63%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d30:1)	0.00%	0.10%	69.34%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d31:0)	0.00%	0.10%	70.5%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d31:1)	0.00%	0.10%	60.61%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d32:0)	0.00%	0.10%	70.16%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d32:1)	0.00%	0.10%	87.38%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d33:0)	0.00%	0.10%	2.48%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d33:1)	0.00%	0.10%	45.88%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d34:0)	0.00%	0.10%	0.55%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d34:1)	0.00%	0.10%	2.95%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d35:0)	0.00%	0.10%	51.46%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d35:1)	0.00%	0.10%	53.75%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d36:0)	0.00%	0.10%	58.22%	PGY-ssRNA-26	HPAC
鞘氨醇(d36:1)	0.00%	0.10%	48.77%	PGY-ssRNA-26	HPAC

表 3

脂质名称	空白组	自由摄取组	脂质递送组 (1.25ug/mL)	递送序列	细胞系
鞘氨醇(d22:0)	0.00%	0.20%	24.32%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d23:0)	0.00%	0.20%	98.65%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d23:1)	0.00%	0.20%	44.11%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d24:0)	0.00%	0.20%	98.13%	PGY-ssRNA-26	H460

鞘氨醇(d24:1)	0.00%	0.20%	79.66%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d25:0)	0.00%	0.20%	99.26%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d25:1)	0.00%	0.20%	78.43%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d26:0)	0.00%	0.20%	95.2%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d26:1)	0.00%	0.20%	85.87%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d27:0)	0.00%	0.20%	97.57%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d27:1)	0.00%	0.20%	95.74%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d28:0)	0.00%	0.20%	98.52%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d28:1)	0.00%	0.20%	84.15%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d29:0)	0.00%	0.20%	65.81%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d29:1)	0.00%	0.20%	62.37%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d30:0)	0.00%	0.20%	78.84%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d30:1)	0.00%	0.20%	54.83%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d31:0)	0.00%	0.20%	68.16%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d31:1)	0.00%	0.20%	82.66%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d32:0)	0.00%	0.20%	46.19%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d32:1)	0.00%	0.20%	62.18%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d33:0)	0.00%	0.20%	72.21%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d33:1)	0.00%	0.20%	67.01%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d34:0)	0.00%	0.20%	24.56%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d34:1)	0.00%	0.20%	66.64%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d35:0)	0.00%	0.20%	69.95%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d35:1)	0.00%	0.20%	64.66%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d36:0)	0.00%	0.20%	62.71%	PGY-ssRNA-26	H460
鞘氨醇(d36:1)	0.00%	0.20%	48.37%	PGY-ssRNA-26	H460

表 4

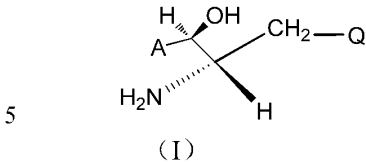
脂质名称	空白组	自由摄取组	脂质递送组 (1.25ug/mL)	递送序列	细胞系
鞘氨醇(d22:0)	0.00%	0.60%	22.99%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d23:0)	0.00%	0.60%	98.16%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d23:1)	0.00%	0.60%	34.51%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d24:0)	0.00%	0.60%	96.77%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d24:1)	0.00%	0.60%	63.97%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d25:0)	0.00%	0.60%	97.76%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d25:1)	0.00%	0.60%	78.12%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d26:0)	0.00%	0.60%	95.55%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d26:1)	0.00%	0.60%	87.97%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d27:0)	0.00%	0.60%	91.06%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d27:1)	0.00%	0.60%	92.77%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d28:0)	0.00%	0.60%	96.93%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d28:1)	0.00%	0.60%	86.5%	PGY-ssRNA-26	293T

鞘氨醇(d29:0)	0.00%	0.60%	72.18%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d29:1)	0.00%	0.60%	32.74%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d30:0)	0.00%	0.60%	83.38%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d30:1)	0.00%	0.60%	95.79%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d31:0)	0.00%	0.60%	97.4%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d31:1)	0.00%	0.60%	75.77%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d32:0)	0.00%	0.60%	34.02%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d32:1)	0.00%	0.60%	86.77%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d33:0)	0.00%	0.60%	61.39%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d33:1)	0.00%	0.60%	40.07%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d34:0)	0.00%	0.60%	5%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d34:1)	0.00%	0.60%	38.31%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d35:0)	0.00%	0.60%	43.03%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d35:1)	0.00%	0.60%	50.79%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d36:0)	0.00%	0.60%	40.66%	PGY-ssRNA-26	293T
鞘氨醇(d36:1)	0.00%	0.60%	25.23%	PGY-ssRNA-26	293T

该结果表明：实验组与阴性对照组相比，荧光偏移量增加，表示细胞摄入荧光标记的 RNA 量更多，即脂质递送入细胞的 RNA 量更多，即反映递送效率更高。从上表 2-表 4 的结果可见，与自由摄取组相比，实验组中鞘氨醇脂质在 1.25ug/mL 浓度条件下递送 0.1nmol 核酸后荧光值有明显偏移，表明不同鞘氨醇单体均可有效递送 sRNA 进入细胞。鞘氨醇脂质单体对核酸递送具有有效性，尤其是碳链长度在 21 以上的本发明鞘氨醇。

权 利 要 求 书

1. 脂质组合物在制备用于递送核酸的产品中的用途，所述脂质组合物包含一种或多种具有下式 (I) 的化合物：



其中，

A 选自直链 C₁₀₋₃₄ 烷基和直链 C₁₀₋₃₄ 烯基，优选为直链 C₁₀₋₃₂ 烷基和直链 C₁₀₋₃₂ 烯基；

10 Q 为-OH，优选地，所述脂质组合物包含一种或多种表 1 中所示的化合物。

2. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述脂质组合物包含两种或更多种具有式 (I) 的化合物，任选地，所述脂质组合物还包含除具有式 (I) 的化合物以外的其他脂质。

15

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的用途，其中所述产品用于向受试者体内递送核酸，优选地，所述试剂用于通过口服、肌肉内、静脉内、皮下、经皮、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、心室内、和/或吸入途径向受试者体内递送核酸。

20

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的用途，其中所述产品用于向体外的细胞中递送核酸，优选地，通过直接接触的方式向体外的细胞中递送核酸，优选地，所述细胞是肿瘤细胞。

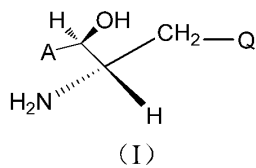
25

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的用途，其中所述核酸是 RNA 分子或 DNA 分子，优选地，

所述 RNA 分子是小 RNA 分子，优选地，所述 RNA 分子是长度为 14-32 核苷酸的小 RNA 分子，优选地，所述核酸分子是长度为 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31 或 32 个核苷酸的小 RNA 分子。

30

6. 一种药物组合物，其包含脂质组合物和核酸分子，其中，所述脂质组合物包含一种或多种具有式 (I) 的化合物：



其中，

A 选自直链 C₁₀₋₃₄ 烷基或直链 C₁₀₋₃₄ 烯基，优选为直链 C₁₀₋₃₂ 烷基和直链 C₁₀₋₃₂ 烯基；

Q 为-OH，

优选地，所述脂质组合物包含一种或多种表 1 中所示的化合物。

7. 根据权利要求 6 所述的药物组合物，其中所述核酸分子是 RNA 分子或 DNA 分子，优选地，

所述核酸分子是小 RNA 分子，优选地，所述核酸分子是长度为 14-32 核苷酸的小 RNA 分子，优选地，所述核酸分子是长度为 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31 或 32 个核苷酸的小 RNA 分子。

15

8. 根据权利要求 6-7 中任一项所述的药物组合物，其中所述脂质组合物与所述核酸分子的质量比为 1:100 至 100:1。

9. 根据权利要求 8 所述的药物组合物，其中所述脂质组合物与所述核酸分子的质量比为 1:100、1:30、1:10、1:3、1:1、3:1、10:1、30:1、100:1，或任意上述比值之间的范围。

20

10. 根据权利要求 6-9 中任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物进一步包含药学上可接受的载体或赋形剂。

25

11. 根据权利要求 6-10 中任一项所述的药物组合物，其中所述核酸分子是用于治疗 RNA 分子或 DNA 分子；优选地，所述核酸分子通过靶向特异性靶标而用于治疗疾病。

12. 一种制备如权利要求 6-11 中任一项所述的药物组合物的方法，所述方法包括以下步骤：

30

1) 将脂质组合物与核酸分子混合；

其中所述脂质组合物如权利要求 6 和 8 中任一项所定义；所述核酸分子如权利要求 7、8 和 9 中任一项所定义。

35

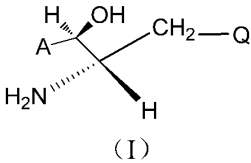
13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中所述方法进一步包括以下步骤：
2) 在 25°C 至 150°C 下，
优选地，在 25°C、30°C、35°C、36°C 、37°C 、40°C、45°C、50°C、55°C、
60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、90°C、95°C、100°C、110°C、120°C、
5 130°C、140°C 或 150°C 下，或这些点值之间的任意范围内的温度下，
加热权利要求 12 的步骤 1) 中所获得的混合物至少 5 分钟，
优选地，加热 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、
21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 分钟。

10 14. 根据权利要求 6-11 中任一项所述的药物组合物、或根据权利要求 12-13
中任一项所述的方法制备的药物组合物，在制备用于治疗受试者中疾病的药物中的
用途，优选地，所述药物通过口服、肌肉内、静脉内、皮下、经皮、动脉内、
腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、心室内、和/或吸入途径施用于
受试者。

15 15. 根据权利要求 14 所述的用途，其中所述疾病选自癌症、炎症、纤维化疾
病、自身免疫疾病、感染、先天性和遗传性疾病、结缔组织疾病、消化系统疾病、
内分泌疾病、眼部疾病、生殖性疾病、心血管疾病、肾脏和泌尿性疾病、呼吸系
统疾病、代谢性病症、肌肉骨骼疾病、神经系统疾病和血液系统疾病。

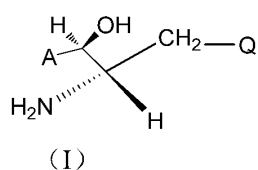
20 16. 根据权利要求 15 所述的用途，其中所述癌症选自肺癌、前列腺癌、乳腺
癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵
巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌或血液系统癌症。

25 17. 一种用于体外转染细胞的组合物，其包含脂质组合物和核酸分子，其中，
所述脂质组合物包含一种或多种具有式 (I) 的化合物：



其中，
30 A 选自直链 C₁₀₋₃₄ 烷基或直链 C₁₀₋₃₄ 烯基，优选为直链 C₁₀₋₃₂ 烷基和直链 C₁₀₋₃₂
烯基；
Q 为-OH；
所述核酸分子为小 RNA 分子。

35 18. 如下式 (I) 所示的化合物：



其中,

所述 A 选自直链 C₁₀₋₃₄ 烷基和直链 C₁₀₋₃₄ 烯基, 优选为直链 C₁₀₋₃₂ 烷基和直链

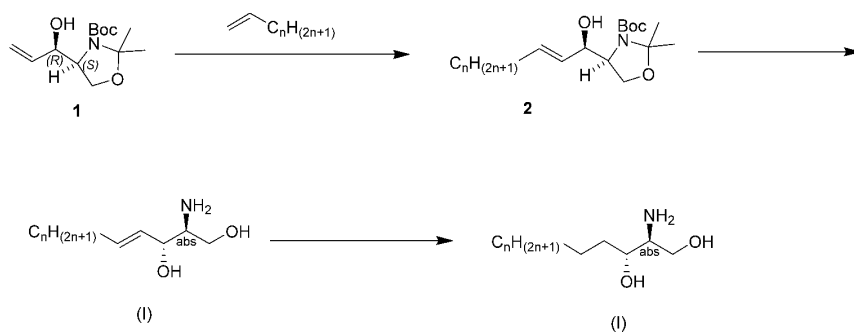
5 C₁₀₋₃₂ 烯基;

Q 为-OH,

优选地，所述化合物为表 1 中所示的化合物。

19. 一种制备如权利要求 18 所述式 (I) 所示的化合物的方法, 所述方法选自
10 以下方法 a 至方法 c 中的任意一种:

方法 a.



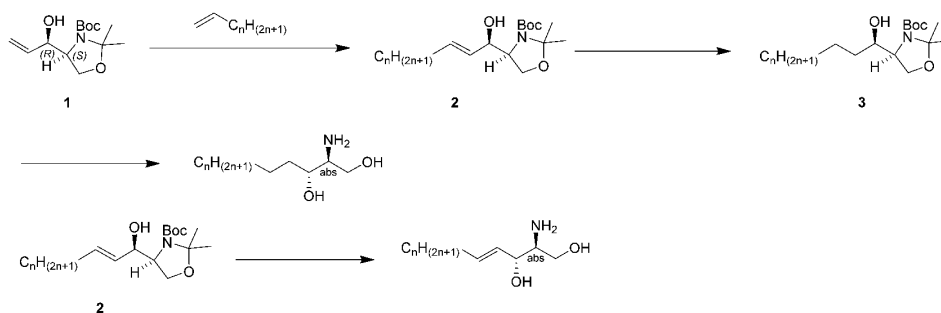
其包括：

步骤 a1. 式 1 所示的化合物与链烯烃反应生成式 2 所示的化合物:

15 步骤 a2. 式 2 所示的化合物转变为 A 为直链烯基的式 (I) 所示的化合物; 和
可选的步骤 a3. 将 A 为直链烯基的式 (I) 所示的化合物还原得到 A 为直链烷基的式 (I) 所示的化合物;

其中, n=9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 或 32;

20 方法 b.



其包括：

步骤 b1. 式 1 所示的化合物与链烯烃反应生成式 2 所示的化合物；和

步骤 b2-1. 式 2 所示的化合物还原得到式 3 所示的化合物；

步骤 b3. 式 3 所示的化合物转变为 A 为直链烷基的式 (I) 所示的化合物；

或者

5 步骤 b2-2. 式 2 所示的化合物转变为 A 为直链烯基的式 (I) 所示的化合物；

其中, $n=9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,$

24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 或 32;

方法 c.

