



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103930135 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 16

(21) 申请号 201280053606. 0

(22) 申请日 2012. 08. 30

(30) 优先权数据

61/529, 694 2011. 08. 31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 04. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/053197 2012. 08. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/033438 EN 2013. 03. 07

(71) 申请人 马林克罗特有限公司

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 T. E. 罗杰斯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 曹立莉

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006. 01)

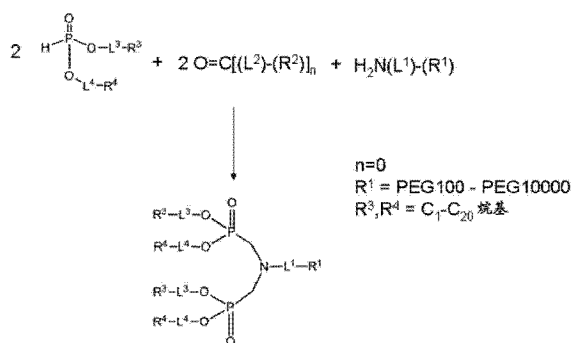
权利要求书4页 说明书39页 附图5页

(54) 发明名称

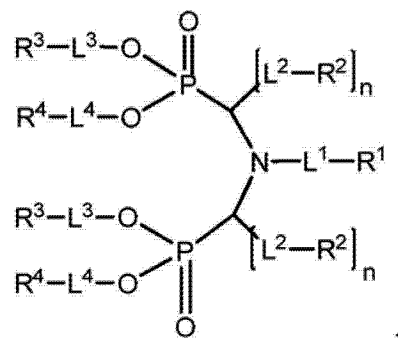
使用 H- 磷酸酯的纳米颗粒 PEG 修饰

(57) 摘要

本发明提供了磷酸酯缀合物和制备所述磷酸酯缀合物的方法, 从而例如改进用于修饰纳米颗粒表面的方法和化合物, 以增加体内循环时间和靶向递送性能。



1. 下式的化合物：



其中

各个 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 独立地选自键和连接基团；

R^1 选自纳米颗粒、联接组分、靶向剂、诊断剂、隐形剂和四足呈现组分；

各个 R^2 独立地选自隐形剂、 C_1 - C_{10} 烷基、羧酸或酯、膦酸或酯、磺酸或酯，和羟基；

各个 R^3 和 R^4 独立地选自 H、纳米颗粒、联接组分、靶向剂、诊断剂和隐形剂，其中 R^3 或 R^4 至少有一个不为 H；且

n 为 0 至 2 的整数。

2. 权利要求 1 的化合物，其中 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 至少有一个为亲水性、非免疫原性、水溶性连接基团。

3. 权利要求 2 的化合物，其中所述亲水性、非免疫原性、水溶性连接基团选自聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇、聚羧酸酯、多糖和葡聚糖。

4. 权利要求 1 的化合物，其中所述靶向剂为适体。

5. 权利要求 1 的化合物，其中所述诊断剂为放射性试剂、荧光剂或对比剂。

6. 权利要求 1 的化合物，其中所述隐形剂选自树枝状聚合物、聚环氧烷、聚乙烯醇、聚羧酸酯、多糖和羟基烷基淀粉。

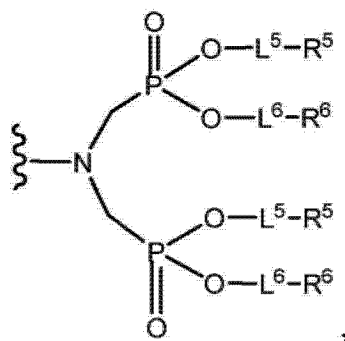
7. 权利要求 6 的化合物，其中所述隐形剂为聚环氧烷。

8. 权利要求 7 的化合物，其中所述聚环氧烷为聚乙二醇 (PEG)，其范围为 PEG₁₀₀ 至 PEG₁₀₀₀₀。

9. 权利要求 6 的化合物，其中所述聚环氧烷为聚乙二醇 (PEG)，其选自 PEG₁₀₀、PEG₅₀₀、PEG₁₀₀₀、PEG₂₀₀₀、PEG₅₀₀₀ 和 PEG₁₀₀₀₀。

10. 权利要求 1 的化合物，其中所述隐形剂包括由连接基团连接在一起的至少两个 PEG 分子。

11. 权利要求 1 的化合物，其中 R^1 为具有下式的四足呈现组分：



其中

各个 L^5 和 L^6 独立地选自键和连接基团 ; 且

各个 R^5 和 R^6 独立地选自靶向剂、诊断剂和隐形剂。

12. 权利要求 1 的化合物, 其中 R^3 和 R^4 各自独立地选自脂质和胆固醇。

13. 权利要求 1 的化合物, 其中 R^1 为隐形剂 ; 且 R^3 和 R^4 各自为联接组分并且独立地选自脂质和胆固醇, 其中所述联接组分连接至纳米颗粒。

14. 权利要求 13 的化合物, 其中所述脂质为饱和或不饱和 C_{10} - C_{22} 烷基。

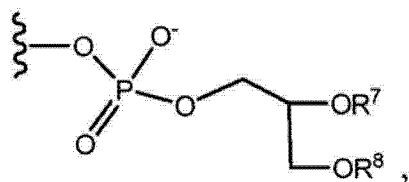
15. 权利要求 14 的化合物, 其中 n 为 0。

16. 权利要求 1 的化合物, 其中 R^1 为联接组分 ; 且 R^3 和 R^4 独立地选自靶向剂、诊断剂和隐形剂。

17. 权利要求 1 的化合物, 其中 R^1 为隐形剂, 其选自 PEG_{100} 、 PEG_{500} 、 PEG_{1000} 、 PEG_{2000} 、 PEG_{5000} 和 PEG_{10000} 。

18. 权利要求 1 的化合物, 其中 R^1 为联接组分, 且所述联接组分为磷脂。

19. 权利要求 18 的化合物, 其中所述磷脂具有下式 :



其中 R^7 和 R^8 各自独立地选自饱和或不饱和 C_{10-24} 烷基或烷酰基和取代的饱和或不饱和 C_{10-24} 烷基或烷酰基。

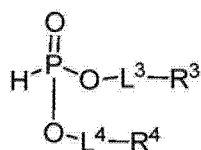
20. 权利要求 1 的化合物, 其中各个 R^1 和 R^2 为隐形剂 ; 各个 R^3 和 R^4 为联接组分, 其独立地选自脂质和胆固醇 ; 且 n 为 1。

21. 制备磷酸酯缀合物的方法, 所述方法包括 :

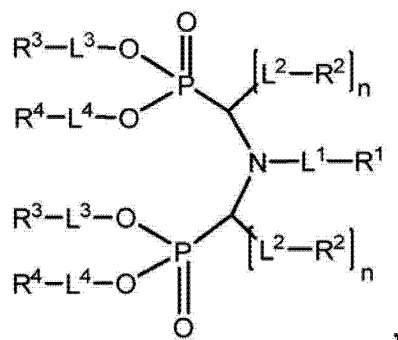
将具有下式的伯胺化合物 : $H_2N(L^1)-(R^1)$ 、

具有下式的羰基化合物 : $O=C[(L^2)-(R^2)]_n$, 和

具有下式的 H- 磷酸酯化合物 :



在足以形成具有下式的磷酸酯缀合物的条件下混合 :



其中

各个 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 独立地选自键和连接基团；

R^1 选自纳米颗粒、联接组分、靶向剂、诊断剂、隐形剂和四足呈现组分；

各个 R^2 独立地选自隐形剂、 C_1 - C_{10} 烷基、羧酸或酯、磷酸或酯、磺酸或酯，和羟基；

各个 R^3 和 R^4 独立地选自 H、联接组分、靶向剂、诊断剂和隐形剂，其中 R^3 或 R^4 至少有一个不为 H；且

n 为 0 至 2 的整数，其中当 n 为 0 或 1 时，所述羰基化合物为醛。

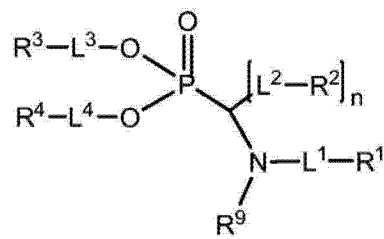
22. 权利要求 21 的方法，其中所述伯胺化合物、羰基化合物和 H- 磷酸酯化合物分别以 1:2:2 的摩尔比混合。

23. 权利要求 21 的方法，其中将所述伯胺化合物和所述羰基化合物混合，然后与所述 H- 磷酸酯化合物混合。

24. 权利要求 21 的方法，其中将 H- 磷酸酯化合物和所述羰基化合物混合，然后与所述伯胺化合物混合。

25. 权利要求 21 的方法，其中两个 H- 磷酸酯化合物毗邻地与脂质体的双层结合，然后与所述伯胺化合物和所述羰基化合物混合，其中 R^3 和 R^4 各自独立地选自脂质和胆固醇。

26. 下式的化合物：



其中

各个 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 独立地选自键和连接基团；

R^1 选自纳米颗粒、联接组分、靶向剂、诊断剂和隐形剂；

R^2 独立地选自隐形剂、 C_1 - C_{10} 烷基、羧酸或酯、磷酸或酯、磺酸或酯，和羟基；

各个 R^3 和 R^4 独立地选自 H、纳米颗粒、联接组分、靶向剂、诊断剂和隐形剂，其中 R^3 或 R^4 至少有一个不为 H；

R^9 为 C_1 - C_{10} 烷基；且

n 为 0 至 2 的整数。

27. 权利要求 26 的化合物，其中 R^3 和 R^4 各自独立地选自脂质和胆固醇；且 L^3 和 L^4 各自为键。

28. 权利要求 27 的化合物，其中所述脂质为饱和或不饱和 C_{10} - C_{22} 烷基。

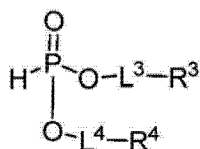
29. 权利要求 26 的化合物，其中 R^1 为隐形剂。

30. 权利要求 29 的化合物，其中所述隐形剂选自 PEG₁₀₀、PEG₅₀₀、PEG₁₀₀₀、PEG₂₀₀₀、PEG₅₀₀₀ 和 PEG₁₀₀₀₀。

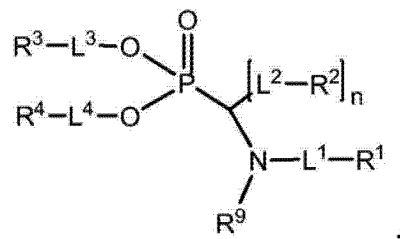
31. 权利要求 26 的化合物，其中 R^9 为 C_1 - C_6 烷基且 L^1 为键。

32. 制备磷酸酯缀合物的方法，所述方法包括：

将具有下式的仲胺化合物： $\text{HN}[(L^1)-(R^1)](R^5)$ ，具有下式的羰基化合物： $\text{O}=\text{C}[(L^2)-(R^2)]_n$ ，和具有下式的 H- 磷酸酯化合物：



在足以形成具有下式的磷酸酯缀合物的条件下混合：



其中

各个 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 独立地选自键和连接基团；

R^1 选自纳米颗粒、联接组分、靶向剂、诊断剂和隐形剂；

R^2 独立地选自隐形剂、 C_1 - C_{10} 烷基、羧酸或酯、磷酸或酯、磺酸或酯，和羟基；

各个 R^3 和 R^4 独立地选自 H、联接组分、靶向剂、诊断剂和隐形剂，其中 R^3 或 R^4 至少有一个不为 H；

R^9 选自 C_1 - C_{10} 烷基；且

n 为 0 至 2 的整数，其中当 n 为 0 时，所述羰基化合物为甲醛。

33. 靶向递送组合物，其包含权利要求 1 或 26 的化合物，其中 R^3 和 R^4 各自为连接至纳米颗粒的联接组分，且 R^1 选自靶向剂、诊断剂和隐形剂。

34. 权利要求 33 的靶向递送组合物，其中所述纳米颗粒为脂质体，且 R^3 和 R^4 各自与所述脂质体的双层结合并且独立地选自脂质和胆固醇。

35. 靶向递送组合物，其包含权利要求 1 或 26 的化合物，其中 R^1 为纳米颗粒或连接至纳米颗粒的联接组分，且 R^3 和 R^4 各自独立地选自靶向剂、诊断剂和隐形剂。

36. 权利要求 35 的靶向递送组合物，其中所述纳米颗粒为脂质体，且 R^1 与所述脂质体的双层结合并且独立地选自脂质和胆固醇。

37. 治疗或诊断受试者癌性病状的方法，其包括向所述受试者给予权利要求 33 或 35 的靶向递送组合物，其中所述组合物包含足以治疗或诊断所述病状的治疗剂或诊断剂，且其中 R^1 、 R^3 和 R^4 至少一个为靶向剂。

38. 权利要求 37 的方法，其中所述纳米颗粒为脂质体且所述治疗剂包封于、嵌入或束缚至所述脂质体。

39. 权利要求 38 的方法，其中所述治疗剂为选自以下的抗癌剂：多柔比星、顺铂、奥沙利铂、卡铂、5-氟尿嘧啶、吉西他滨和紫杉烷。

40. 测定受试者对靶向治疗性治疗适用性的方法，其包括向所述受试者给予权利要求 33 或 35 的靶向递送组合物，其中 R^1 、 R^3 和 R^4 至少一个为靶向剂且所述纳米颗粒包含诊断剂，并使所述受试者成像以检测所述诊断剂。

使用 H- 磷酸酯的纳米颗粒 PEG 修饰

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求美国临时申请 61/529,694 的优先权,其全部内容在此引入作为参考。

[0003] 关于在联邦资助的研究与开发下所作出的发明的专利权的声明

[0004] 不适用

[0005] 关于在光盘上提交的“序列表”、表格或计算机程序列表附录

[0006] 不适用

背景技术

[0007] 目前,大多数的治疗性和诊断性试剂被全身性地给予至患者。不幸的是,目前的递送方法具有若干缺点,包括降低的治疗功效以及由于例如患者非靶点处药物激活导致的副作用。为了解决其中的一些缺点,与诊断性和治疗性试剂联合的纳米颗粒的靶向递送呈现了一种有希望的药物递送的新方式。

[0008] 然而,在一些情况下,纳米颗粒可被患者的免疫系统排斥并在该纳米颗粒到达递送药物的靶点前被处置。为解决这些问题,可对纳米颗粒的表面进行修饰。例如,通常修饰纳米颗粒如脂质体以在其表面上引入聚乙二醇 (PEG) 基团从而增强其体内性能。通常,采用两种常用的方法实现脂质体 PEG 修饰。一种方法包括:在机械方法(例如挤出)下,将脂质-PEG 分子组合以形成脂质体制剂。在另一种方法中,可预组装脂质体,随后经适当处置的 PEG-脂质在该脂质可插入所述脂质体双层的条件下处理,从而形成具有 PEG 连接至脂质体表面的脂质体。

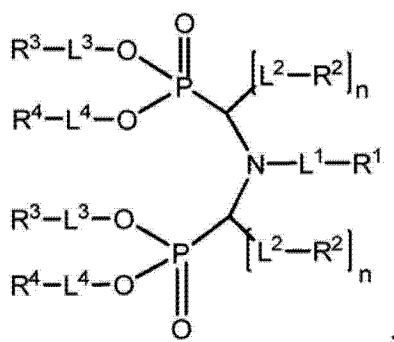
[0009] 尽管在开发靶向药物递送方法中已有一些新近进展,仍需要进一步的改善。例如,目前修饰纳米颗粒的方法仅提供了有限数量的可用于纳米颗粒的修饰。本发明解决了这些和其它需要。

发明内容

[0010] 本发明提供了磷酸酯缀合物和制备所述磷酸酯缀合物的方法,从而例如改进用于修饰纳米颗粒表面的方法和化合物,以增加体内循环时间和靶向递送性能。

[0011] 在本发明的一个方面中,本发明的磷酸酯缀合物可包括下式的化合物:

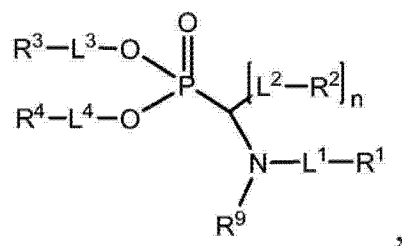
[0012]



[0013] 其中 R¹、R²、R³、R⁴、L¹、L²、L³ 和 L⁴ 各自如下文所详述。

[0014] 在另一方面中,本发明包括下式的化合物:

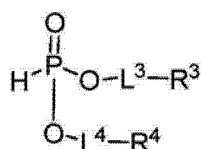
[0015]



[0016] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^9 、 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 如下文所详述。

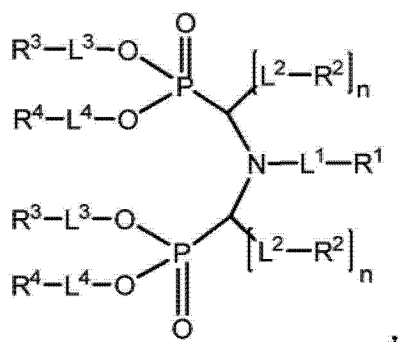
[0017] 在另一方面中,本发明包括制备磷酸酯缀合物的方法,所述方法包括:将具有下式的伯胺化合物: $\text{H}_2\text{N}(\text{L}^1)-(\text{R}^1)$,具有下式的羰基化合物: $\text{O}=\text{C}[(\text{L}^2)-(\text{R}^2)]_n$,和具有下式的 H-磷酸酯化合物:

[0018]



[0019] 在足以形成具有下式的磷酸酯缀合物的条件下混合:

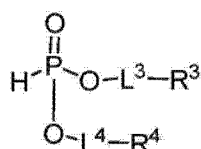
[0020]



[0021] 其中,所述磷酸酯缀合物、伯胺化合物、羰基化合物和 H-磷酸酯化合物如下文所详述。

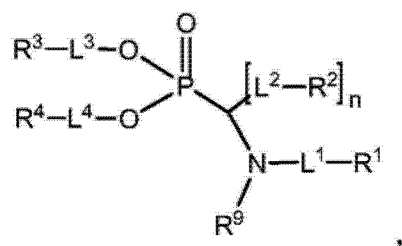
[0022] 在另一方面中,本发明包括制备磷酸酯缀合物的方法,所述方法包括:将具有下式的仲胺化合物: $\text{HN}[(\text{L}^1)-(\text{R}^1)](\text{R}^9)$,具有下式的羰基化合物: $\text{O}=\text{C}[(\text{L}^2)-(\text{R}^2)]_n$,和具有下式的 H-磷酸酯:

[0023]



[0024] 在足以形成具有下式的磷酸酯缀合物的条件下混合:

[0025]



[0026] 其中,所述磷酸酯缀合物、仲胺化合物、羰基化合物和 H- 磷酸酯化合物如下文所详述。

[0027] 本发明的磷酸酯缀合物和其制备方法为药物递送和诊断成像领域提供了许多独特的方面。例如,本发明提供了制备可促进纳米颗粒转化成隐形纳米颗粒(其可用于靶向药物递送)的化合物的稳健而简单的方法。在一些情况中,所述磷酸酯缀合物提供了独特地能力以增加纳米颗粒表面上隐形剂的密度,因此可在使用较低密度可能不那么有效的不同的隐形剂中提供额外的灵活性。此外,可以以一种方式制备所述磷酸酯缀合物以提供额外的稳定性以在纳米颗粒表面上呈现隐形剂或其它组分(例如,靶向剂)。在其它优点中,所述磷酸酯缀合物可引入正电荷和/或负电荷基团以促进纳米颗粒表面特征的修饰。在制备修饰的纳米颗粒中的灵活性也可促成用于特定的治疗应用和/或诊断应用的定制纳米颗粒,其可在给予患者后有长时间的体内半衰期。

[0028] 本发明的性质和优点的进一步理解可通过参考说明书和附图的剩余部分实现。

附图说明

[0029] 图 1 描述了生成本发明磷酸酯缀合物的合成方法的一个实例。

[0030] 图 2 描述了生成本发明磷酸酯缀合物的合成方法的一个实例。

[0031] 图 3 描述了制备本发明磷酸酯缀合物的合成方法的一个实例。

[0032] 图 4 描述了在脂质体表面上制备本发明磷酸酯缀合物的合成方法的一个实例。

[0033] 图 5 描述了在脂质体表面上制备本发明磷酸酯缀合物的合成方法的一个实例。

[0034] 图 6 显示了根据本发明的例示性实施方案,将亚磷酸二苯酯与 1- 烷醇组合形成二烷基氢磷酸酯的一般反应流程。

[0035] 图 7 显示了根据本发明的例示性实施方案制备缀合物的一般反应流程。

[0036] 图 8 显示了根据本发明的例示性实施方案制备缀合物的另一种一般反应流程。

[0037] 发明详述

[0038] I. 定义

[0039] 如本文所用,符号“-”意指单键,“=”意指双键,“≡”意指三键,而“≡”意指单键或双键。

[0040] 如本文所用,术语“烷基”,独自或作为另一取代基的部分,除非另有所指,否则意指具有指定碳原子数(即,C₁₀₋₂₄意指 10 至 24 个碳)的直链或支链烃基。在一些实施方案中,烷基的范围可为 1 至 36 个碳。在一些实施方案中,烷基的范围可为 1 至 10 个碳或 1 至 20 个碳。在一些实施方案中,所述烷基可为饱和的或不饱和的,以及取代的或未取代的。

[0041] 如本文所用,术语“取代的”指的是结合至母体分子或基团的基团。例如,具有氰基取代基的烷基为氰基取代的烷基。适宜的取代基包括但不限于,卤代、氰基、烷基、氨基、

羟基、烷氧基和酰胺基。

[0042] 如本文所用,术语“H-磷酸酯化合物”指的是具有通式为 $\text{H}-\text{P}(\text{O})(\text{OL}^3-\text{R}^3)(\text{OL}^4-\text{R}^4)$ 的化合物,并在本文有所详述。

[0043] 如本文所用,术语“伯胺化合物”通常指的是具有通式 $\text{H}_2\text{N}(\text{L}^1)-(\text{R}^1)$ 的化合物并在本文有进一步描述。

[0044] 如本文所用,术语“仲胺化合物”通常指的是具有通式 $\text{HN}[(\text{L}^1)-(\text{R}^1)](\text{R}^9)$ 的化合物并在本文有进一步描述。

[0045] 如本文所用,术语“羰基化合物”通常指的是具有通式 $\text{O}=\text{C}[(\text{L}^2)-(\text{R}^2)]_n$ 的化合物并在本文有进一步描述。

[0046] 如本文所用,术语“靶向递送组合物”指的是与本发明的磷酸酯缀合物连接的纳米颗粒的组合物,其种类在本文有进一步描述。本发明的组合物可用作治疗组合物、诊断组合物,或治疗和诊断组合物两者。在某些实施方案中,该组合物可靶向至受试者或测试样品中的具体靶点,如本文进一步描述的。

[0047] 如本文所用,术语“纳米颗粒”指的是各种大小、形状、类型和用途的颗粒,其在本文有进一步描述。本领域的普通技术人员应当理解,所述纳米颗粒的特征,例如大小,可取决于所述纳米颗粒的类型和/或用途以及本领域公知的其它因素。通常,纳米颗粒的大小范围可为约 1nm 至约 1000nm。在其它实施方案中,纳米颗粒的大小范围可为约 10nm 至约 200nm。在另一些实施方案中,纳米颗粒的大小范围为可约 50nm 至约 150nm。在一些实施方案中,所述纳米颗粒的大小大于肾脏排泄的限制,例如直径大于约 6nm。在其它实施方案中,所述纳米颗粒足够小以避免通过肝脏从血流中清除,例如直径小于 1000nm。纳米颗粒可包括球形、锥形、椭球形,以及本领域公知的其它形状。纳米颗粒可为中空的(例如,实体内核,中空内核)或实体的或为具有中空和实体层或多个实体层的多层。例如,纳米颗粒可包括实体核区和实体外层包封区,两者可以是交联的。纳米颗粒可由一种物质或多种物质的任意组合组成,其包括脂质、聚合物、磁性材料,或金属材料如二氧化硅、金、氧化铁等。脂质可包括脂肪、蜡类、甾醇类、胆固醇、脂溶性维生素、甘油一酯、甘油二酯、磷脂类、鞘脂类、糖脂类、阳离子或阴离子脂质、衍生脂质、心磷脂等。聚合物通常可包括嵌段共聚物、聚(乳酸)、乳酸-乙醇酸共聚物、聚乙二醇、丙烯酸聚合物、阳离子聚合物,以及本领域已知的用于制备纳米颗粒的其它聚合物。在一些实施方案中,所述聚合物可以是生物可降解的和/或生物相容的。纳米颗粒可包括脂质体、胶束、脂蛋白、脂包衣囊泡(lipid-coated bubble)、嵌段共聚物胶束、聚合物泡囊(polymersome)、类脂囊泡(niosome)、量子点、氧化铁颗粒、金颗粒、树枝状聚合物(dendrimer)或二氧化硅颗粒。在一些实施方案中,脂单层或双层能够全部或部分地包被由能够被脂质包被的材料组成的纳米颗粒,例如聚合物纳米颗粒。在一些实施方案中,脂质体可包括多室脂质体(MLV)、大单室脂质体(LUV)和小单室脂质体(SUV)。

[0048] 如本文所用,术语“治疗剂”指的是当以有效量存在时,可对有需要的受试者产生所需的治疗性作用的化合物或分子。本发明涵盖范围广泛的治疗剂及其在与纳米颗粒和磷酸酯缀合物结合中的用途,如本文进一步所描述。

[0049] 如本文所用,术语“诊断剂”指的是可在受试者或测试样品中检测的组分且在本文有进一步描述。

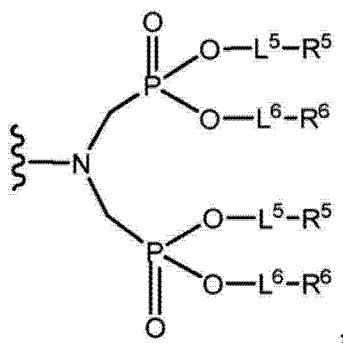
[0050] 如本文所用,术语“连接基团”指的是连接缀合物各个部分的磷酸酯缀合物的部分。例如,连接基团 L^3 ,可将 R^3 (例如,联结组分) 连接至与所述磷酸酯缀合物的磷结合的氧。取决于所制备的磷酸酯缀合物和该化合物所需的性质,所述连接基团可从方便获得的单体组分组装以实现靶向剂和磷酸酯缀合物(其可例如连接至纳米颗粒)的其它部分的适当分离。

[0051] 如本文所用,术语“靶向剂”指的是对靶点具有特异性的分子。在一些实施方案中,靶向剂可包括靶配体(例如,肽模拟配体)的小分子模拟物、靶配体(例如,含肽或叶酸酰胺(folate amide)的RGD肽),或对特定靶点具有特异性的抗体或抗体片段。靶向剂可结合很多种靶点,包括器官、组织、细胞、细胞外基质组分,和/或细胞内区室中可能与疾病的特定发展阶段有关的靶点。在一些实施方案中,靶点可包括癌症细胞,特别是癌症干细胞。靶点还可包括细胞表面的抗原,或与正常组织相比在癌症细胞上为抗原呈递或更普遍的肿瘤标记物。在一些实施方案中,靶向剂还可包括叶酸衍生物、B-12 衍生物、整合素 RGD 肽、RGD 模拟物(Temming, K. et al., Drug Resistance Updates 8:381-402(2005); Liu, S., Mol. Pharm. 3(5):472-87(2006))、NGR 衍生物、生长抑素衍生物或结合生长抑素受体的肽,例如奥曲肽和 octreotate 等。在一些实施方案中,靶向剂可以是适体(其由核酸(例如, DNA 或 RNA)组成),或肽(其结合具体靶点)。可将靶向剂设计成特异性或非特异性结合受体靶点,特别是其表达与肿瘤有关的受体靶点。受体靶点的实例包括但不限于, MUC-1、EGFR、Claudin4、MUC-4、CXCR4、CCR7、FOL1R、生长抑素受体 4、Erb-B2(成红细胞白血病致癌基因同源物 2)受体、CD44 受体和 VEGF 受体-2 激酶。

[0052] 如本文所用,术语“隐形剂”指的是可修饰纳米颗粒的表面性质的分子且在本文有进一步描述。

[0053] 如本文所用,术语“四足呈现组分”指的是具有以下通式的分子:

[0054]



[0055] 其中 L^5 、 L^6 、 R^5 和 R^6 在本文有进一步描述。在一些实施方案中, L^5 和 L^6 各自独立地选自键和连接基团;且 R^5 和 R^6 各自独立地选自 C_1 - C_{36} 烷基、靶向剂、诊断剂和隐形剂。在一些实施方案中, R^5 和/或 R^6 可为氢。

[0056] 如本文所用,术语“嵌入”指的是试剂的位置在纳米颗粒表面上或邻近纳米颗粒表面。例如,嵌入纳米颗粒的试剂可位于脂质体的双层膜内或位于纳米颗粒的外层聚合物壳内以包含在该壳内。

[0057] 如本文所用,术语“包封在”指的是试剂的位置被包在纳米颗粒内部或完全包含于纳米颗粒内部。对于脂质体,例如,可将治疗性和/或诊断性试剂包封以使其存在于该脂质体的水性内部。然后,可通过一些意图使该脂质体不稳定或其它影响该包封试剂释放的条件

触发这些包封试剂的释放。

[0058] 如本文所述,术语“束缚至 (tethered to)”是指一种组分连接至另一组分以使一种或多种组分可在空间中自由地到处移动。在某些示例性实施方案中,联接组分可束缚至纳米颗粒以使得在纳米颗粒周围的溶液中自由地到处移动。在一些实施方案中,联接组分可束缚至纳米颗粒的表面,延伸至该表面之外。

[0059] 如本文所述,术语“脂质”是指脂质分子,其可包括脂肪、蜡、固醇、胆固醇、胆固醇衍生物、脂溶性维生素、甘油一酯、甘油二酯、 C_8 - C_{36} 烷基、磷脂、鞘脂、糖脂、阳离子或阴离子脂质、衍生的脂质等。脂质可形成胶束、单层和双层膜。在某些实施方案中,脂质可自组装为脂质体。在其它实施方案中,脂质可作为单层或双层涂覆纳米颗粒的表面。

[0060] 如本文所述,术语“适体”是指特异结合至具体靶点的非天然存在的寡核苷酸(通常 20-200 个核苷酸)。“非天然存在的”包括天然核苷酸(A, T, C, G, U)的非天然存在的序列,以及具有非天然存在的或修饰的核苷酸的寡核苷酸。例如,“**Spiegelmers®**”为具有镜像核酸的适体,即,具有 L 手性构型而非天然存在的 D 构型。适体可通过分子内相互作用形成独特的三维结构,和 / 或在结合至靶点时改变结构,例如,通过诱导契合机理从主要或次级结构改变。结合至靶点的适体不通过常规互补核酸杂交,例如,双重或三重螺旋形成而介导,尽管部分适体可参与该杂交。例如,适体通常形成分子内发夹(hairpin)结构和其它三维结构。适体可根据任何方法或方法的组合而选择。通过指数式富集配体系统进化(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)(**SELEX™**)或其变体,在本领域是通常使用的。基本的**SELEX™**方法描述于例如,美国专利 5,567,588。也可使用多种基本方法的变体,例如,体内**SELEX™**,如美国申请 2010015041 所述。**MONOLEX™**为另一选择方法,其例如描述于 Nitsche 等人(2007)BMC Biotechnology 7:48 和 W002 29093。使用注入肿瘤细胞的核酸库的体内选择也是可能的(参见,例如, Mi 等人, (2010)Nat. Chem. Biol. 1:22)。用于本发明的适体可设计为结合至多种靶点,包括但不限于 MUC-1、EGFR、Claudin4、MUC-4、CXCR4、CCR7、FOL1R、生长抑素受体 4、Erb-B2(成红细胞白血病致癌基因同源物 2)受体、CD44 受体、VEGF 受体-2 激酶和核仁素。

[0061] 如本文所述,术语“受试者”是指在生命任何阶段的任何哺乳动物,特别是人。

[0062] 如本文所述,术语“给药”、“给予”或“施用”是指给药本发明的靶向递送组合物的方法。本发明的靶向递送组合物可以多种方式给药,包括局部、肠胃外、静脉内、皮内、肌肉内、结肠、直肠或向腹膜内。肠胃外给药和静脉内给药为优选给药方法。该靶向递送组合物也可作为组合物或制剂的部分给予。

[0063] 如本文所述,术语“治疗”病症、疾病、障碍或综合征包括(i)抑制该疾病、障碍或综合征,即,阻止其发展;和(ii)缓解该疾病、障碍或综合征,即,引起疾病、障碍或综合征的消退。如本领域已知的,对于全身和局部递送的调整,年龄、体重、一般健康、性别、饮食、给药时间、药物相互作用和病症严重性可能是需要考虑的,且其可通过本领域技术人员使用常规实验而确定。

[0064] 如本文所述,术语“制剂”是指给药至受试者的组分的混合物。适合肠胃外给药的制剂,例如,关节内(关节中)、静脉内、肌肉内、瘤内、皮内、腹腔内和皮下途径的制剂,包括水

性和非水性、等渗无菌注射溶液,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使得制剂与预期接受者的血液等渗的溶质,和水性和非水性无菌悬浮液,其可包括助悬剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。注射溶液和悬浮液也可由无菌粉末、颗粒和片剂制备。靶向递送组合物的制剂可存在于单位剂量或多剂量密封容器中,如安瓿和小瓶。靶向递送组合物,在单独或与其它合适的组分组合时,可制备成气溶胶制剂(即,它们可被“雾化”)以经由吸入通过口或鼻给药。气溶胶制剂可置于加压可接受的推进剂中,如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等。用于直肠给药的合适的制剂包括,例如,栓剂,其包含有效量的靶向递送组合物和栓剂基质。合适的栓剂基质包括天然或合成的甘油三酯或烷属烃。此外,也可使用明胶直肠胶囊,其包含靶向递送组合物和基质的组合,所述基质包括,例如,液体甘油三酯、聚乙二醇和烷属烃。在某些实施方案中,制剂可局部给药或以滴眼剂形式给药。

[0065] 本发明的实施方案

[0066] II. 概要

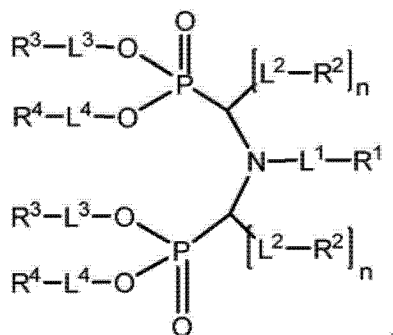
[0067] 本发明的磷酸酯缀合物和其制备方法为药物递送和诊断成像领域提供了许多独特的方面。例如,本发明提供了制备可促进纳米颗粒转化成隐形纳米颗粒(其可用于靶向药物递送)的化合物的稳健而简单的方法。在一些情况中,所述磷酸酯缀合物提供了独特地能力以增加纳米颗粒表面上隐形剂的密度,因此可在较密度可能不那么有效的不同的隐形剂的使用中提供额外的灵活性。此外,可以以一种方式制备所述磷酸酯缀合物以提供额外的稳定性以在纳米颗粒表面上呈现隐形剂或其它组分(例如,靶向剂)。

[0068] 而且,可通过多种方法将所述磷酸酯化合物整合入纳米颗粒中。例如,可使用本文所述的方法生成 H- 磷酸酯化合物,然后将其与纳米颗粒整合从而使得 H- 磷酸酯化合物在所述纳米颗粒的表面上。例如,可通过在制备纳米颗粒前掺入 H- 磷酸酯化合物将所述 H- 磷酸酯化合物与所述纳米颗粒整合。在其它情况中,可生成纳米颗粒并将 H- 磷酸酯化合物连接至所述纳米颗粒的表面,从而修饰所述纳米颗粒的表面。例如,在制备修饰的纳米颗粒中的灵活性提供用于特定的治疗应用和 / 或诊断应用的定制的纳米颗粒,其也可在给予患者后有长时间的体内半衰期。

[0069] III. 磷酸酯缀合物

[0070] 在一方面中,本发明的化合物可包括下式的化合物:

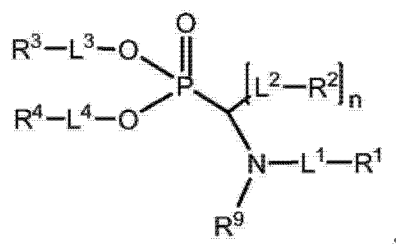
[0071]



[0072] 其中 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 各自独立地选自键和连接基团; R^1 选自纳米颗粒、联接组分、靶向剂、诊断剂、隐形剂和四足呈现组分; 各 R^2 独立地选自隐形剂、 C_1 - C_{10} 烷基、羧酸或酯、磷酸或酯、磺酸或酯, 和羟基; 各 R^3 和 R^4 独立地选自 H、纳米颗粒、联接组分、靶向剂、诊断剂和隐形剂, 其中 R^3 或 R^4 至少有一个不为 H; 且 n 为 0 至 2 的整数。

[0073] 在另一方面中,本发明的化合物可包括下式的化合物:

[0074]



[0075] 其中各 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 独立地选自键和连接基团; R^1 选自纳米颗粒、联接组分、靶向剂、诊断剂和隐形剂; R^2 独立地选自隐形剂、 C_1 - C_{10} 烷基、羧酸或酯、磷酸或酯、磺酸或酯, 和羟基; R^3 和 R^4 各自独立地选自 H、纳米颗粒、联接组分、靶向剂、诊断剂和隐形剂, 其中 R^3 或 R^4 至少一个不为 H; R^9 为 C_1 - C_{10} 烷基; 且 n 为 0 至 2 的整数。

[0076] 纳米颗粒

[0077] 多种纳米颗粒可用于本发明。本领域的普通技术人员应当理解, 所述纳米颗粒的特征, 例如大小, 可取决于所述纳米颗粒的类型和 / 或用途以及本领域公知的其它因素。合适的颗粒可为球体、椭圆体、扁平的、板形的、管状、立方体、长方体、卵形 (oval)、椭圆形 (ellipse)、圆柱体、锥体或角锥。合适的纳米载体的最大尺寸范围 (例如, 直径) 可为约 1nm 至约 1000nm, 约 10nm 至约 200nm, 和约 50nm 至约 150nm。

[0078] 合适的纳米颗粒可由多种本领域通常已知的材料制备。在一些实施方案中, 纳米颗粒可包括一种物质或多种物质的任意组合, 这些物质包括脂质、聚合物, 或金属材料, 如二氧化硅、金、氧化铁等。纳米颗粒的实例可包括但不限于脂质体、胶束、脂蛋白、脂质涂覆的泡囊、嵌段共聚物胶束、聚合物泡囊、类脂囊泡、氧化铁颗粒、金颗粒、二氧化硅颗粒、树枝状聚合物或量子点。

[0079] 在一些实施方案中, 该纳米颗粒为部分或完全由饱和或不饱和的脂质构成的脂质体。合适的脂质可包括但不限于脂肪、蜡、固醇、胆固醇、胆固醇衍生物、脂溶性维生素、单甘油酯、二甘油酯、磷脂、鞘脂、糖脂、衍生的脂质等。在一些实施方案中, 合适的脂质可包括两亲的、中性的、非阳离子的、阴离子的、阳离子的或疏水的脂质。在某些实施方案中, 脂质可包括细胞膜中通常存在的那些, 如磷脂和 / 或鞘脂。合适的磷脂包括但不限于磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酸 (PA)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰甘油 (PG)、磷脂酰丝氨酸 (PS) 和磷脂酰肌醇 (PI)。合适的鞘脂包括但不限于鞘氨醇、神经酰胺、鞘磷脂、脑苷脂、硫脂、神经节苷脂和植物鞘氨醇。其它合适的脂质可包括脂质提取物, 如蛋 PC、心脏提取物、脑提取物、肝提取物和大豆 PC。在一些实施方案中, 大豆 PC 可包括氢化大豆卵磷脂 (Hydro Soy PC, HSPC)。阳离子脂质包括但不限于 N, N-二油酰基 -N, N-二甲基氯化铵 (DODAC)、N, N-二硬脂基 -N, N-二甲基氯化铵 (DDAB)、N-(1-(2, 3-二油酰基氧基) 丙基) -N, N, N-三甲基氯化铵 (DOTAP)、N-(1-(2, 3-二油基氧基) 丙基) -N, N, N-三甲基氯化铵 (DOTMA) 和 N, N-二甲基 -2, 3-二油基氧基) 丙基胺 (DODMA)。非阳离子脂质包括但不限于二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱 (DMPC)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱 (DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱 (DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱 (DPPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油 (DMPG)、二硬脂酰基磷脂酰甘油 (DSPG)、二油酰基磷脂酰甘油 (DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油 (DPPG)、二肉豆蔻酰基磷脂酰丝氨酸 (DMPS)、二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸 (DSPS)、二油酰基磷脂酰丝氨酸 (DOPS)、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸

(DPPS)、二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱 (POPC)、棕榈酰基油酰基 - 磷脂酰乙醇胺 (POPE) 和二油酰基 - 磷脂酰乙醇胺 4-(N- 马来酰亚胺基甲基) - 环己烷 -1- 羧酸酯 (DOPE-mal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺 (DPPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺 (DMPE)、二硬脂酰基 - 磷脂酰 - 乙醇胺 (DSPE)、16-0- 单甲基 PE、16-0- 二甲基 PE、18-1- 反 PE、1- 硬脂酰基 -2- 油酰基 - 磷脂酰基乙醇胺 (SOPE)、1, 2- 二反油酰 (dielaidoyl)-sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺 (反 DOPE) 和心磷脂。在某些实施方案中, 脂质可包括衍生的脂质, 如聚乙二醇化脂质。衍生的脂质可包括, 例如, DSPE-PEG₂₀₀₀、胆固醇 -PEG2000、DSPE- 聚甘油, 或其它本领域通常已知的衍生物。

[0080] 任何脂质的组合可用于构造纳米颗粒, 如脂质体。在某些实施方案中, 脂质体的脂质组合物, 可定制以影响脂质体的特征, 如泄漏率、稳定性、颗粒尺寸、 ζ 电势、蛋白质结合、体内循环和 / 或组织 (如肿瘤、肝、脾) 等中的聚集。例如, DSPC 和 / 或胆固醇可用于减少从脂质体的泄漏。可包括带负电或带正电的脂质, 如 DSPG 和 / 或 DOTAP, 以影响脂质体的表面电荷。在一些实施方案中, 脂质体可包括约 10 种或更少种类的脂质, 或约 5 种或更少种类的脂质, 或约 3 种或更少种类的脂质。在一些实施方案中, 存在的具体类型的脂质的摩尔百分比 (mol%) 通常占纳米颗粒 (如脂质体) 中存在的总脂质的约 0% 至约 10%、约 10% 至约 30%、约 30% 至约 50%、约 50% 至约 70%、约 70% 至约 90%、约 90% 至 100%。本文所述的脂质可包含在脂质体中, 或该脂质可用于涂覆本发明的纳米颗粒, 如聚合物纳米颗粒。涂层可部分或完全围绕纳米颗粒且可包括单层和 / 或双层。

[0081] 在其它实施方案中, 部分或全部纳米颗粒可包括聚合物, 如嵌段共聚物或本领域已知的用于制备纳米颗粒的其它聚合物。在一些实施方案中, 该聚合物可为生物可降解的和 / 或生物相容的。合适的聚合物可包括但不限于聚乙烯、聚碳酸酯、聚酐、聚羧酸、聚丙基富马酸酯、聚己内酯、聚酰胺、聚缩醛、聚醚、聚酯、聚 (原酸酯)、聚氰基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚氰基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯、聚胺及其组合。在一些实施方案中, 示例性颗粒可包括壳交联的 Knedels, 其在以下文献进一步描述: Becker 等人, U. S. Appl. No11/250830; Thurmond, K. B. 等人, J. Am. Chem. Soc., 119(28)6656 - (1997); Wooley, K. L., Chem. Eur. J., 3(9):1397-1399(1997); Wooley, K. L., J. Poly. Sci.:Part A:Polymer Chem., 38:1397-1407(2000)。在其它实施方案中, 合适的颗粒可包括乳酸 - 羟基乙酸共聚物 (PLGA) (Fu, K. 等人, Pharm Res., 27:100-106(2000))。

[0082] 在其它实施方案中, 该纳米颗粒可部分或完全由金属性质的材料构成, 如二氧化硅、金、氧化铁等。在一些实施方案中, 二氧化硅颗粒可为中空的、多孔的和 / 或介孔的 (Slowing, I. I., 等人, Adv. Drug Deliv. Rev., 60(11):1278-1288(2008))。金颗粒是本领域通常已知的, 如通过以下示例性文献提供: Bhattacharya, R. & Mukherjee, P., Adv. Drug Deliv. Rev., 60(11):1289-1306(2008))。氧化铁颗粒或量子点也可使用且是本领域熟知的 (van Vlerken, L. E. & Amiji, M. M., Expert Opin. Drug Deliv., 3(2):205-216(2006))。纳米颗粒还包括但不限于病毒颗粒和陶瓷颗粒。

[0083] 对纳米颗粒的连接

[0084] 在某些实施方案中, 该联接组分可包括官能团, 其可用于将联接组分共价连接至纳米颗粒上存在的反应性基团。该官能团可位于联接组分上的任何位置, 如亚烷基或杂亚

烷基部分的末端位置。多种官能团是本领域通常已知的且可在多种类型的反应下反应,如但不限于亲核取代(例如,胺和醇与酰卤或活性酯的反应)、亲电取代(例如,烯胺反应)和向碳-碳和碳-杂原子重键的加成(例如,Michael 反应或 Diels-Alder 加成)。这些和其它有用的反应公开于,例如, March, *Advanced Organic Chemistry*, 3rd Ed., John Wiley&Sons, New York, 1985; 和 Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996。合适的官能团可包括,例如:(a) 羧基及其多种衍生物,包括,但不限于, N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基苯并三唑酯、酰基卤、酰基咪唑、硫酯、对硝基苯基酯、烷基、烯基、炔基和芳族酯;(b) 可转化为酯、醚、醛等的羟基;(c) 卤代烷基,其中该卤化物随后可被亲核基团代替,例如,胺、羧酸根阴离子、硫醇阴离子、负碳离子或烷氧离子,从而导致新的基团在卤素原子的位点的共价连接;(d) 亲二烯体基团(dienophile group),其可参与 Diels-Alder 反应,例如,马来酰亚氨基;(e) 醛或酮基团,使得随后的衍生化是可能的,其通过形成羰基衍生物,例如,亚胺、腙、缩氨基脲或肟,或通过如 Grignard 加成或烷基锂加成的反应;(f) 磺酰卤基团,用于随后的与胺的反应,例如,形成磺酰胺;(g) 硫醇(thiol),其可转化为二硫化物或与酰卤反应;(h) 氨基或巯基(sulfhydryl),其可,例如,酰基化、烷基化或氧化;(i) 烯烃,其可经历,例如,环加成、酰化、Michael 加成等;和(j) 环氧化物,其可例如,与胺和羟基化合物反应。在一些实施方案中,基于点击化学(click chemistry)的平台可用于将联接组分连接至纳米颗粒(Kolb, H. C., M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int'l. Ed.* 40(11):2004 - (2001))。在一些实施方案中,该联接组分可包括一个官能团或多个官能团(其导致与纳米颗粒的多个共价键)。

[0085] 在一些实施方案中,联接组分可包括官能团,其可用于将所述联接组分共价连接至纳米颗粒上存在的反应基团。所述官能团可位于所述联接组分的任意处,例如烯基或杂烯基部分的端位。多种官能团是本领域通常已知的且可在多种类型的反应下反应,如但不限于亲核取代(例如,胺和醇与酰卤或活性酯的反应)、亲电取代(例如,烯胺反应)和向碳-碳和碳-杂原子重键的加成(例如,Michael 反应或 Diels-Alder 加成)。这些和其它有用的反应公开于,例如, March, *Advanced Organic Chemistry*, 3rd Ed., John Wiley&Sons, New York, 1985; 和 Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996。合适的官能团可包括,例如:(a) 羧基及其多种衍生物,包括,但不限于, N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基苯并三唑酯、酰基卤、酰基咪唑、硫酯、对硝基苯基酯、烷基、烯基、炔基和芳族酯;(b) 可转化为酯、醚、醛等的羟基;(c) 卤代烷基,其中该卤化物随后可被亲核基团代替,例如,胺、羧酸根阴离子、硫醇阴离子、负碳离子或烷氧离子,从而导致新的基团在卤素原子的位点的共价连接;(d) 亲二烯体基团(dienophile group),其可参与 Diels-Alder 反应,例如,马来酰亚氨基;(e) 醛或酮基团,使得随后的衍生化是可能的,其通过形成羰基衍生物,例如,亚胺、腙、缩氨基脲或肟,或通过如 Grignard 加成或烷基锂加成的反应;(f) 磺酰卤基团,用于随后的与胺的反应,例如,形成磺酰胺;(g) 硫醇(thiol),其可转化为二硫化物或与酰卤反应;(h) 氨基或巯基(sulfhydryl),其可,例如,酰基化、烷基化或氧化;(i) 烯烃,其可经历,例如,环加成、酰化、Michael 加成等;和(j) 环氧化物,其可例如,与胺和羟基化合物反应。在一些实施方案中,可使用基于点击化学的平台将所述联接组分连接至纳米颗粒(Kolb, H. C., M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int'l. Ed.* 40(11):2004(2001))。在一些实施方案中,所述联接组分可包括一个官能团或多个官能

团,其可致成与所述纳米颗粒的多个共价键。

[0086] 表 1 提供了可用于本发明的官能团的另外的非限制性、代表性实例。

[0087] 表 1. 用于缀合化学的例示性官能团对

[0088]

官能团:	与以下反应:
酮和醛基团	氨基、酰肼基和氨基氧基
酰亚胺	氨基、酰肼基和氨基氧基
氰基	羟基
烷化剂 (如卤代烷基和马来酰亚氨基(maleimido)衍生物)	硫醇、氨基、酰肼基、氨基氧基
羧基 (包括活化羧基)	氨基、羟基、酰肼基、氨基氧基
活化磺酰基 (如磺酰氯)	氨基、羟基、酰肼基、氨基氧基
巯基	巯基、马来酰亚氨基
His-tag (如6-His标记的肽或蛋白质)	氮川乙酸镍(Nickel nitriloacetic acid)

[0089]

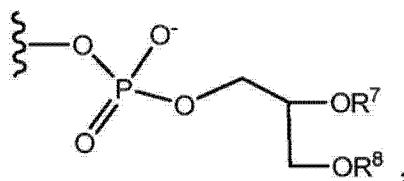
[0090] 在其它实施方案中,联接组分可通过非共价相互作用连接至纳米颗粒,该非共价相互作用可包括但不限于亲和力相互作用、金属配位、物理吸附、疏水相互作用、范德华相互作用、氢键合相互作用、磁性相互作用、静电相互作用、偶极-偶极相互作用、抗体-结合相互作用、互补DNA之间的杂交相互作用等。在一些实施方案中,联接组分可为例如掺入至纳米颗粒中的脂质或磷脂。在一些实施方案中,联接组分可存在于纳米颗粒的脂质双层部分,其中在某些实施方案中该纳米颗粒为脂质体。例如,联接组分可为部分或完全与脂质双层的疏水和/或亲水性区域互相作用的脂质或磷脂(例如,饱和或不饱和的C₈-C₃₆烷基)。在一些实施方案中,该联接组分可包括允许与纳米颗粒非共价相互作用的一个基团,但也考虑到多个基团。例如,多个离子电荷可用于产生联接组分和纳米颗粒之间的足够的非共价相互作用。在替代性实施方案中,该联接组分可包括多种脂质,使得该多种脂质与脂质体双层膜或涂覆在纳米颗粒上的双层或单层互相作用。在某些实施方案中,可改变周围的溶液条件以破坏非共价相互作用,从而将联接组分从纳米颗粒分离。

[0091] 如本文进一步所述,本发明的一些化合物可包含R¹、R²、R³、R⁴、R⁵和/或R⁶作为联接组分。在一些实施方案中,所述联接组分可包括苯基、胆固醇或脂质,如饱和或不饱和C₁₀-C₂₄烷基或取代的饱和或不饱和C₁₀-C₂₄烷基。在一些例示性实施方案中,可选择所述联接组分以促进所述联接组分与脂质双层的结合。例如,可选择烷基的长度、双键的位置和几何构型和/或烷基的取代以提供与脂质双层所需水平的掺合从而通过其它组分例如靶向剂和/或隐形剂的展示来修饰脂质体的表面性质。

[0092] 在一些实施方案中,所述磷酸酯缀合物可通过连接基团,L¹、L²、L³、L⁴、L⁵和/或L⁶直接连接至纳米颗粒。在这些实施方案中,R¹、R³、R⁴和/或R⁶可为纳米颗粒。在其它实施方案中,R¹为联接组分,且所述联接组分为磷脂。在这些实施方案的一些实施方案中,其中

R¹ 为磷脂,所述磷脂具有下式:

[0093]



[0094] 其中 R⁷ 和 R⁸ 各自独立地选自饱和或不饱和 C₁₀₋₂₄ 烷基或烷酰基和取代的饱和或不饱和 C₁₀₋₂₄ 烷基或烷酰基。在一些实施方案中, R⁷ 和 R⁸ 各自独立地选自饱和或不饱和 C₁₀₋₁₈ 烷基或烷酰基和取代的饱和或不饱和 C₁₀₋₁₈ 烷基或烷酰基。适宜的烷酰基包括但不限于, 癸酰基、十一烷酰基、月桂酰基、十三烷酰基、肉豆蔻酰基、十五烷酰基、棕榈酰基、十七烷酰基、硬脂酰基、十九烷酰基、二十烷酰基 (arachidoyl) 等等。也可使用本领域公知的和本文所述的其它磷脂。

[0095] 在一些实施方案中,可制备磷酸酯缀合物以修饰纳米颗粒的表面特性(例如,亲水性或疏水性特性)。例如,正电荷和负电荷基团可包含于所述缀合物中并进一步与纳米颗粒掺合。在一些实施方案中,酸性基团可包含于所述缀合物中以将负电荷掺入脂质体表面。如本文所提供,本发明的缀合物可包括 [L²-R²]_n 基团,其可用于修饰表面特性。n 可以为 0、1 或 2 的整数。在一些实施方案中,L² 可为键或连接基团。R² 可包括但不限于隐形剂、C₁-C₁₀ 烷基、羧酸或酯、膦酸或酯、磺酸或酯,或羟基。

[0096] 连接基团

[0097] 连接基团是本发明磷酸酯化合物的另一特征。本领域的普通技术人员能够理解多种连接基团是本领域已知的,且可在例如以下参考文献中找到:Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, 2nd Ed., Academic Press, Inc. (2008)。本发明的连接基团可用于向所述化合物提供额外的性质,如提供化合物的不同部分之间的间距。该间距可用于例如克服由纳米颗粒引起的位阻问题,例如当与纳米颗粒有一定距离的靶向剂可结合靶点时。在一些实施方案中,连接基团可用于改变所述化合物的物理性质。

[0098] 在一些实施方案中,本发明的磷酸酯缀合物包含 L¹、L²、L³、L⁴、L⁵ 和 L⁶,其可各自独立地为连接基团或键。在一些实施方案中,L¹、L²、L³、L⁴、L⁵ 和 L⁶ 可各自独立地选择为亲水性、非免疫原性水溶性连接基团。本发明的亲水性、非免疫原性水溶性连接基团可包括但不限于,聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇、聚羧酸酯、多糖和葡聚糖。本领域的普通技术人员应当理解可为一些应用(如上文所讨论的间距因素)选择连接基团的长度和/或化学性质。

[0099] 在其它实施方案中,所述连接基团可为,例如 C₁₋₃₀ 亚烷基连接基团或相似的杂亚烷基连接基团(碳链被 1 至 10 个选自 O、N 和 S 的杂原子间断的亚烷基连接基团)。或者,在一些实施方案中,所述连接基团可包括芳基部分如亚苯基环或杂芳基相应部分。在其它实施方案中,连接基团可包括经酰胺基、氨基、酮和羟基取代的亚烷基或杂亚烷基连接基团。

[0100] 隐形剂

[0101] 在一些实施方案中,所述磷酸酯缀合物可包括至少一种隐形剂。例如,在一些实施方案中,R¹、R²、R³、R⁴、R⁵ 和 R⁶ 可独立地选自隐形剂。隐形剂可防止纳米颗粒彼此粘附和防止纳米颗粒粘附至血液细胞或血管壁。在一些实施方案中,当纳米颗粒被给予至受试者时,隐形纳米颗粒,例如隐形脂质体,可降低免疫原性和/或反应原性。隐形剂还可增加纳米颗

粒在受试者内的血液循环时间。在一些实施方案中,纳米颗粒可包括隐形剂,从而,例如使得所述纳米颗粒部分地或全部地由隐形剂组成或所述纳米颗粒被隐形剂包被。用于本发明的隐形剂可包括本领域所公知的那些。适宜的隐形剂可包括但不限于树枝状聚合物、聚环氧烷、聚乙二醇、聚乙烯醇、聚羧酸酯、多糖和 / 或羟基烷基淀粉。隐形剂可通过共价和 / 或非共价连接(如上文关于联接组分所述)连接至本文所述的磷酸酯缀合物。

[0102] 在一些实施方案中,隐形剂可包括聚环氧烷,如“聚乙二醇”(其是本领域所公知的),并且通常指的是环氧乙烷的低聚物或聚合物。聚乙二醇(PEG)可以是直链或支链的,其中支链 PEG 分子可具有从中央核发散的额外的 PEG 分子和 / 或可将多个 PEG 分子接枝至聚合物主链。如本领域所理解的,聚乙二醇可以分子量分布(其可用于鉴定 PEG 的类型)的形式产生。例如,PEG₅₀₀ 通过具有平均分子量为约 500g/mol 的 PEG 分子的分布鉴定,其根据本领域公知的方法测量。或者,PEG 可以下式表示: $\text{H}-(\text{O}-(\text{CH}_2)_2)_m-\text{OH}$, 其中 m 为聚合物中存在的单体的数目(例如, m 的范围可为 1 至 200)。例如,对于 PEG₁₀₀ 的分布可包括 m 等于 2 的 PEG 聚合物。在另一种情况中,PEG₁₀₀₀ 可包括 m 等于 23 的 PEG 分子。或者,PEG₅₀₀₀ 可包括 m 等于 114 的 PEG 分子。

[0103] 在一些实施方案中,PEG 可包括低或高分子量 PEG,例如 PEG₁₀₀、PEG₅₀₀、PEG₂₀₀₀、PEG₃₄₀₀、PEG₅₀₀₀、PEG₁₀₀₀₀ 或 PEG₂₀₀₀₀。在一些实施方案中,PEG 范围可为 PEG₁₀₀ 至 PEG₁₀₀₀₀,或 PEG₁₀₀₀ 至 PEG₁₀₀₀₀,或 PEG₁₀₀₀ 至 PEG₅₀₀₀。在一些实施方案中,所述隐形剂可为 PEG₅₀₀、PEG₁₀₀₀、PEG₂₀₀₀ 或 PEG₅₀₀₀。在一些实施方案中,PEG 可以甲基醚、醇或羧酸为末端。在一些实施方案中,所述隐形剂可包括至少两个 PEG 分子,其各自经连接基团连接在一起。连接基团可包括上文所述的那些,例如酰胺键。在一些实施方案中,纳米颗粒如脂质体的双层中存在足以使所述纳米颗粒“隐形”的量的 PEG 化的脂质,其中隐形纳米颗粒显示降低的免疫原性。

[0104] 治疗剂

[0105] 在一些实施方案中,本发明的化合物可包括治疗性试剂、诊断性试剂或其组合。在一些实施方案中,所述治疗性和 / 或诊断性试剂可直接与本发明的磷酸酯缀合物结合。例如,所述治疗性和 / 或诊断性试剂可共价连接至所述磷酸酯缀合物。在其它实施方案中,所述治疗性试剂和 / 或诊断性试剂可存在于与本发明的磷酸酯缀合物结合的纳米颗粒中、表面或周围。在一些实施方案中,所述治疗性试剂和 / 或诊断性试剂可嵌入、包封于或系连于所述纳米颗粒。在一些实施方案中,所述纳米颗粒为脂质体且所述诊断性和 / 或治疗性试剂包封于所述脂质体中。

[0106] 用于本发明的治疗性试剂可包括任何治疗受试者中病状的试剂。通常,可使用本领域已知的任何治疗性试剂,包括但不限于美国药典 (U. S. P); Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Ed., McGraw Hill, 2001; Katzung, Ed., Basic and Clinical Pharmacology, McGraw-Hill/Appleton & Lange, 8th ed., September 21, 2000; Physician's Desk Reference (Thomson Publishing; and/or The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18th ed., 2006, Beers and Berkow, Eds., Merck Publishing Group; 或在动物的情况下, The Merck Veterinary Manual, 9th ed., Kahn Ed., Merck Publishing Group, 2005 中所列的试剂,其全部引入本文作为参考。

[0107] 治疗剂可根据预期治疗的疾病的类型而选择。例如,某些类型的癌症或肿瘤,如癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤,和中枢神经系统癌症以及实体瘤和混合肿瘤,可包括给

药相同或可能不同的治疗剂。在某些实施方案中,可递送治疗剂以治疗或影响受试者的癌性病症,且其可包括化学治疗剂,如烷化剂、抗代谢物、蒽环类抗生素、生物碱、拓扑异构酶抑制剂,和其它抗癌剂。在一些实施方案中,该试剂可包括反义试剂、microRNA、siRNA 和/或 shRNA 剂。

[0108] 在一些实施方案中,治疗剂可包括抗癌剂或细胞毒素剂,包括但不限于阿瓦斯丁、多柔比星、顺铂、奥沙利铂、卡铂、5-氟尿嘧啶、吉西他滨或紫杉烷,如紫杉醇和多西紫杉醇。另外的抗癌剂可包括但不限于 20-epi-1, 25-二羟基维生素 D3, 4-甘薯苦醇、5-乙炔基尿嘧啶、9-二氢紫杉醇、阿比特龙、阿西维辛、阿柔比星、盐酸阿考达唑、阿克罗宁、酰基富烯 (acylfulvene)、腺环戊醇、阿多来新、阿地白介素、all-tk 拮抗剂、六甲蜜胺、氨莫司汀、安波霉素、醋酸阿美苄醌、艾美多 (amidox)、氨磷汀、氨鲁米特、氨基乙酰丙酸、氨柔比星、安吡啶、阿那格雷、阿那曲唑、穿心莲内酯、血管发生抑制剂、拮抗剂 D、拮抗剂 G、安雷利克斯、安曲霉素、抗背侧化形态形成蛋白-1 (anti-dorsalizing morphogenetic protein-1)、抗雌激素药、抗癌酮、反义寡核苷酸、阿非迪霉素甘氨酸盐、凋亡基因调节剂、凋亡调节剂、脱嘌呤核酸、ARA-CDP-DL-PTBA、精氨酸脱氨基酶、门冬酰胺酶、曲林菌素、奥沙那宁 (asulacrine)、阿他美坦、阿莫司汀、海洋环肽 1、海洋环肽 2、海洋环肽 3、阿扎胞苷、阿扎司琼、阿扎毒素、重氮酪氨酸、阿扎替派、阿佐霉素、浆果赤霉素 III 衍生物、班兰诺 (balanol)、巴马司他、苯并二氢卟吩、苯佐替派、苯甲酰基十字孢碱、 β 内酰胺衍生物、 β -阿立辛 (beta-alethine)、贝拉霉素 B (betaclamycin B)、桦木酸、BFGF 抑制剂、比卡鲁胺、比生群、盐酸比生群、双吡丙啶基精胺、双奈法德、甲磺酸双奈法德、双曲群 A (bistratene A)、比折来新、博来霉素、硫酸博来霉素、BRC/ABL 拮抗剂、breflate、布喹那钠、溴匹立明、布度钛、白消安、丁硫氨酸亚砷胺、放线菌素 C、卡泊三醇、卡弗他丁 C、卡普唑酮、喜树碱衍生物、金丝雀痘 IL-2 (canarypox IL-2)、卡培他滨、卡醋胺、卡贝替姆、卡铂、甲酰胺-氨基-三唑、羧基酰胺基三唑、carestm3、卡莫司汀、cam 700、软骨衍生的抑制剂 (cartilage derived inhibitor)、盐酸卡柔比星、卡折来新、酪蛋白激酶抑制剂、溴粟精胺、杀菌肽 B、西地芬戈、西曲瑞克、苯丁酸氮芥、绿素类、氯喹啉磺酰胺、西卡前列素、西罗霉素、顺铂、顺-卟啉、克拉屈滨、氯米芬类似物、克霉唑、克里霉素 (collismycin) A、克里霉素 B、考布他汀 A4、考布他汀类似物、conagenin、crambescidin 816、克立那托、甲磺酸克立那托、念珠藻素 8、念珠藻素 A 衍生物、curacin A、环戊苄醌、环磷酰胺、cycloplatain、cypemycin、阿糖胞苷、阿糖胞苷烷磷酸酯 (cytarabine ocfosphate)、溶细胞因子、磷酸己烷雌酚、达卡巴嗪、达昔单抗、放线菌素 D、盐酸柔红霉素、地西他滨、脱氢膜海鞘素 B (dehydrodidemnin B)、地洛瑞林、右异环磷酰胺、右奥马铂 (dexormaplatin)、右雷佐生、右维拉帕米、地扎呱宁、甲磺酸地扎呱宁、地吡酮、代代宁 B、didox、二乙基去甲精胺、二氢-5-氮胞苷、dioxamycin、二苯基螺莫司汀、多西紫杉醇、二十二烷醇、多拉司琼、去氧氟尿苷、多柔比星、盐酸多柔比星、屈洛昔芬、柠檬酸屈洛昔芬、丙酸屈他雄酮、屈大麻酚、达佐霉素、duocarmycinSA、依布硒、依考莫司汀、依达曲沙、依地福新、依决洛单抗、依氟鸟氨酸、盐酸依氟鸟氨酸、榄香烯、依沙芦星、乙嘧替氟、恩洛铂、恩普氨酯、依匹哌啶、表柔比星、盐酸表柔比星、爱普列特、厄布洛唑、红细胞基因治疗载体体系、盐酸依索比星、雌莫司汀、雌莫司汀类似物、雌莫司汀磷酸酯钠、雌激素激动剂、雌激素拮抗剂、依他硝唑、依托泊苷、磷酸依托泊苷、氯苯乙嘧胺、依西美坦、法倔唑、盐酸法倔唑、法扎拉滨、芬

维 A 胺、非格司亭、非那雄胺、夫拉平度、氟卓斯汀、氟尿苷、fluasterone、氟达拉滨、磷酸氟达拉滨、fluorodaunorubicin 盐酸盐、氟尿嘧啶、fluorocitabine、福酚美克、福美坦、磷喹酮、福司曲星、福司曲星钠、福莫司汀、钆替沙林、硝酸镓、加洛他滨、加尼瑞克、明胶酶抑制剂、吉西他滨、盐酸吉西他滨、谷胱甘肽抑制剂、hepsulfam、heregulin、六亚甲基双乙酰胺、羟基脲、金丝桃素、伊班膦酸、伊达比星、盐酸伊达比星、吡啶昔酚、伊决孟酮、异环磷酰胺、ilmofosine、伊洛马司他、咪唑并吡啶酮、咪唑莫特、免疫刺激剂肽、胰岛素样生长因子-1 受体抑制剂、干扰素激动剂、干扰素 α -2A、干扰素 α -2B、干扰素 α -N1、干扰素 α -N3、干扰素 β -1A、干扰素 γ -1B、干扰素、白介素、碘苄胍、碘阿霉素、异丙铂、伊立替康、盐酸伊立替康、伊罗普拉、伊索拉定、isobengazole、isohomohalicondrin B、伊他司琼、jasplakinolide、kahalalide F、lamellarin-Ntriacetate、兰瑞肽、醋酸兰瑞肽、leinamycin、来格司亭、硫酸蘑菇多糖、leptolstatin、来曲唑、白血病抑制因子、白细胞 α 干扰素、醋酸亮丙瑞林、亮丙瑞林 / 雌激素 / 孕酮、亮丙瑞林、左旋咪唑、利阿唑、盐酸利阿唑、线性多胺类似物、亲脂二糖肽、亲脂铂化合物、lissoclinamide7、洛铂、胍乙基磷酸丝氨酸、洛美曲索、洛美曲索钠、洛莫司汀、氯尼达明、洛索萘醌、盐酸洛索萘醌、洛伐他汀、洛索立宾、勒托替康、lutetium texaphyrin、lysofylline、裂解肽、美坦新、mannostatin A、马立马司他、马索罗酚、maspin、基质溶解因子抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂、美登素、氮芥盐酸盐、乙酸甲地孕酮、醋酸美仑孕酮、美法仑、美诺立尔、merbarone、巯基嘌呤、美替瑞林、蛋氨酸酶、甲氨蝶呤、甲氨蝶呤钠、甲氧氯普胺、氯苯氨啶、美妥替哌、微藻蛋白激酶 C 抑制剂、MIF 抑制剂、米非司酮、米替福新、米立司亭、错配双链 RNA、米丁度胺、米托卡星、丝裂红素、米托洁林、米托胍脲、二溴卫矛醇、米托马星、丝裂霉素、丝裂霉素类似物、米托蒽胺、米托司培、米托坦、迈托毒素成纤维细胞生长因子-1 皂草素、米托蒽醌、盐酸米托蒽醌、莫法罗汀、莫拉司亭、单克隆抗体、人绒毛膜促性腺激素、单磷酸脂质 A / 分支杆菌细胞壁 SK、莫哌达醇、多重抗药性基因抑制剂、基于多重肿瘤抑制因子 1 的治疗、芥子抗癌剂、印度洋海绵 (mycaperoxide) B、分枝杆菌细胞壁提取物、麦考酚酸、myriaporone、正乙酰基地那林、那法瑞林、nagrestip、纳洛酮 / 喷他佐辛、napavin、萘蒽二醇、那托司亭、奈达铂、奈莫柔比星、奈立膦酸、中性肽链内切酶、尼鲁米特、nisamycin、一氧化氮调节剂、硝基氧抗氧化剂 (nitroxideantioxidant)、nitrullyn、诺考达唑、诺拉霉素、n- 取代的苯甲酰胺、06- 苄基鸟嘌呤、奥曲肽、okicenone、寡核苷酸、奥那司酮、昂丹司琼、oracin、口腔细胞因子诱导剂、奥马铂、奥沙特隆、奥沙利铂、oxaunomycin、奥昔舒仑、紫杉醇、紫杉醇类似物、紫杉醇衍生物、palauamine、棕榈酰基根霉素、帕米磷酸、人参炔三醇、帕诺米芬、parabactin、帕折普汀、培门冬酶、培得星、培利霉素、戊氮芥、戊聚硫钠、喷司他丁、pentrozole、硫酸培洛霉素、全氟溴烷、培磷酰胺、紫苏醇、phenazinomycin、乙酸苯酯、磷酸酶抑制剂、溶链菌素、盐酸毛果云香碱、哌泊溴烷、哌泊舒凡、吡柔比星、吡曲克辛、盐酸吡罗萘醌、placetin A、placetin B、纤溶酶原激活物抑制剂、铂络合物、铂化合物、铂-三胺络合物、普卡霉素、普洛美坦、吡吩姆钠、泊非霉素、泼尼莫司汀、盐酸丙卡巴肼、丙基双吡啶酮、前列腺素 J2、前列腺癌抗雄激素、蛋白酶体抑制剂、基于蛋白质 A 的免疫调节剂、蛋白质激酶 C 抑制剂、蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂、嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂、嘌呤霉素、嘌呤霉素盐酸盐、红紫素、吡唑呋喃菌素、吡唑并吡啶、吡哆醛化血红蛋白聚氧乙烯缀合物、RAF 拮抗剂、雷替曲塞、雷莫司琼、RAS 法呢基蛋白质转移酶抑制剂、RAS 抑制剂、RAS-GAP 抑制剂、脱甲基瑞替普汀、铈 RE 186 依

替膦酸盐、根霉素、利波腺苷、核酶、RII 维甲酰胺 (retinamide)、RNAi、罗谷亚胺、罗希吐碱、罗莫肽、罗喹美克、rubiginone B1、ruboxyl、沙芬戈、盐酸沙芬戈、saintopin、sarcnu、sarcophytol A、沙格司亭、SDI 1 模拟物、司莫司汀、老化衍生的抑制剂 1、正义寡核苷酸、信号转导抑制剂、信号转导调节剂、辛曲秦、单链抗原结合蛋白质、sizofuran、索布佐生、硼卡钠、苯基乙酸钠、solverol、生长调节素结合蛋白质、索纳明、磷乙酰天冬氨酸钠、膦门冬酸、司帕霉素、spicamycin D、盐酸螺旋锳、螺莫司汀、螺铂、脾脏五肽、海绵抑制素 1、角鲨胺、干细胞抑制剂、干细胞分裂抑制剂、stipiamide、链黑菌素、链佐星、基质分解素抑制剂、sulfinosine、磺氯苯脲、强效血管活性肠肽拮抗剂、suradista、苏拉明、苦马豆碱、合成糖胺聚糖、他利霉素、他莫司汀、他莫昔芬甲碘化物、牛磺莫司汀、他扎罗汀、替可加兰钠、替加氟、tellurapyrylium、端粒酶抑制剂、替洛萸醌盐酸盐、替莫泊芬、替莫唑胺、替尼泊苷、替罗昔隆、鞣内酯、四氯十氧化物、tetrazomine、thaliblastine、沙利度胺、硫咪嘌呤、噻可拉林、硫鸟嘌呤、塞替派、血小板生成素、血小板生成素模拟物、胸腺法新、胸腺喷丁受体激动剂、胸腺曲南、甲状腺刺激激素、噻唑羧胺核苷、本紫红素乙酯锡、替拉扎明、二氯环戊二烯钛、盐酸拓扑替康、topsentin、托瑞米芬、柠檬酸托瑞米芬、全能干细胞因子、翻译抑制剂、醋酸曲托龙、维甲酸、三乙酰基尿苷、曲西立滨、磷酸曲西立滨、三甲曲沙、葡萄糖醛酸三甲曲沙、曲普瑞林、托烷司琼、盐酸妥布氯唑、妥罗雄脲、酪氨酸激酶抑制剂、酪氨酸磷酸化抑制剂、UBC 抑制剂、乌苯美司、尿嘧啶芥子、乌瑞替派、泌尿生殖窦衍生的生长抑制因子、尿激酶受体拮抗剂、伐普肽、variolin B、维拉雷琐、藜芦明、verdins、维替泊芬、硫酸长春碱、硫酸长春新碱、长春地辛、硫酸长春地辛、硫酸长春匹定、硫酸长春甘酯、硫酸长春罗新、长春瑞滨、酒石酸长春瑞滨、硫酸长春罗定、vinxaltine、硫酸长春利定、vitaxin、伏氯唑、扎诺特隆、折尼铂、亚苄维 C、净司他丁、净司他丁斯酯、或盐酸佐柔比星。

[0109] 在一些实施方案中，该治疗剂可为药物混合物的部分，其包括给药两种或更多种治疗剂。例如，可给药具有顺铂和奥沙利铂两者的脂质体。此外，该治疗剂可在免疫刺激性佐剂之前、之后或同时递送，所述佐剂如铝凝胶或盐佐剂（例如，磷酸铝或氢氧化铝）、磷酸钙、内毒素、Toll 样受体佐剂等。

[0110] 本发明的治疗剂也可包括用于治疗应用的放射性核素。例如，Auger 电子的发射体，如 ^{111}In ，可与螯合剂，如二乙烯三胺五乙酸 (DTPA) 或 1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷 -1, 4, 7, 10- 四乙酸 (DOTA) 结合，且包含在用于治疗的目标递送组合物（如脂质体）中。其它合适的放射性核素和 / 或放射性核素 - 螯合剂组合可包括但不限于 β 放射性核素 (^{177}Lu 、 ^{153}Sm 、 $^{88/90}\text{Y}$) 与 DOTA、 ^{64}Cu -TETA、 $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-IDA}$ ； $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})$ 三胺（环状或线状）、 $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-Enpy2}$ 和 $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-DTPA}$ 。

[0111] 如上所述，用于本发明的治疗剂可以多种方式与纳米颗粒结合，如嵌入、包封入或束缚至纳米颗粒。治疗剂的负载可通过本领域已知的多种方式实现，例如以下文献中公开的：de Villiers, M. M. 等人, Eds., Nanotechnology in Drug Delivery, Springer (2009)；Gregoriadis, G., Ed., Liposome Technology: Entrapment of drugs and other materials into liposomes, CRC Press (2006)。在一组实施方案中，一种或多种治疗剂可负载至脂质体中。脂质体的负载可通过例如主动或被动方式进行。例如，治疗剂可在溶液中脂质体的自组装过程中包含在其中，使得治疗剂包囊在脂质体中。在某些实施方案中，该治疗剂也可嵌入脂质体双层或多层脂质体的多层中。在替代性实施方案中，该治疗剂可主动负载至脂

质体中。例如,该脂质体可暴露于条件,如电穿孔,其中使双层膜对包含治疗剂的溶液可渗透,从而使得治疗剂进入脂质体的内部体积。

[0112] 诊断剂

[0113] 用于本发明的诊断剂可包括本领域已知的任何诊断剂,例如以下文献所提供的:Armstrong et al.,*Diagnostic Imaging*, 5th Ed., Blackwell Publishing(2004); Torchilin, V. P., Ed., *Targeted Delivery of Imaging Agents*, CRC Press (1995); Vallabhajosula, S., *Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*, Springer(2009)。在一些实施方案中, R¹、R²、R³、R⁴、R⁵ 和 R⁶ 可独立地选择为诊断剂。诊断剂可通过多种方式检测,包括提供和 / 或增强可检测信号的试剂,该信号包括,但不限于, γ -发射、放射性、回声、光学、荧光、吸收、磁性或断层摄影信号。用于成像诊断剂的技术可包括,但不限于,单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)、磁共振成像(MRI)、光学成像、正电子发射断层摄影术(PET)、计算机断层摄影术(CT)、X-射线成像、 γ 射线成像等。

[0114] 在一些实施方案中,诊断剂可包括螯合剂,该螯合剂例如结合至金属离子以用于多种诊断成像技术。示例性螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸(EDTA)、[4-(1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1-基)甲基]苯甲酸(CPTA)、环己烷二胺四乙酸(CDTA)、乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA)、二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、柠檬酸、羟基乙基乙二胺三乙酸(HEDTA)、亚氨基二乙酸(IDA)、三亚乙基四胺六乙酸(TTHA)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(亚甲基膦酸)(DOTP)、1,4,8,11-四氮杂环十二烷-1,4,8,11-四乙酸(TETA)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA),及其衍生物。

[0115] 放射性同位素可掺入本文所述的一些诊断剂中,且可包括发射 γ 射线、正电子、 β 和 α 颗粒和 X-射线的放射性核素。合适的放射性核素包括但不限于 ²²⁵Ac、⁷²As、²¹¹At、¹¹B、¹²⁸Ba、²¹²Bi、⁷⁵Br、⁷⁷Br、¹⁴C、¹⁰⁹Cd、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、¹⁸F、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、³H、¹²³I、¹²⁵I、¹³⁰I、¹³¹I、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹³N、¹⁵O、³²P、³³P、²¹²Pb、¹⁰³Pd、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁴⁷Sc、¹⁵³Sm、⁸⁹Sr、^{99m}Tc、⁸⁸Y 和 ⁹⁰Y。在某些实施方案中,放射性试剂可包括 ¹¹¹In-DTPA、^{99m}Tc(CO)₃-DTPA、^{99m}Tc(CO)₃-ENPy2、^{62/64/67}Cu-TETA、^{99m}Tc(CO)₃-IDA、和 ^{99m}Tc(CO)₃ 三胺(环状或线状)。在其它实施方案中,该试剂可包括 DOTA 及其具有 ¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹⁵³Sm、^{88/90}Y、^{62/64/67}Cu、或 ^{67/68}Ga 的多种类似物。在一些实施方案中,该脂质体可被放射标记,例如,通过掺入连接至螯合剂的脂质,如 DTPA-脂质,如下文献提供:Phillips 等人, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(1):69-83(2008); Torchilin, V. P. & Weissig, V., Eds. *Liposomes* 2nd Ed.: Oxford Univ. Press(2003); Elbayoumi, T. A. & Torchilin, V. P., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 33:1196 - (2006); Mouglin-Degraef, M. 等人, *Int' l J. Pharmaceutics* 344:110-117(2007)。

[0116] 在其它实施方案中,该诊断剂可包括光学试剂如荧光剂、磷光试剂、化学发光试剂等。多种试剂(例如染料、探针、标记或指示剂)是本领域已知的且可在本发明使用。(参见,例如,Invitrogen, *The Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Tenth Edition(2005))。荧光剂可包括多种有机和 / 或无机小分子或多种荧光蛋白质及其衍生物。例如,荧光剂可包括但不限于花青、酞菁、卟啉、靛青、罗丹明、吩噻嗪、苯基咕吨、吩噻嗪、吩噻嗪、荧光素、苯并卟啉、方酸菁、二吡咯并嘧啶酮、并四苯(tetracenes)、喹啉、吡嗪、咕啉、克酮酸(croconiums)、吡啶酮、菲啉、罗丹明、吡啶、葱醌、

chalcogenopyrylium 类似物、二氢卟吩、萘酞菁、甲川染料 (methine dyes)、吲哚染料 (indolenium dyes)、偶氮化合物、甘菊蓝、氮杂甘菊蓝、三苯基甲烷染料、吲哚、苯并吲哚、吲哚碳菁、苯并吲哚碳菁, 和具有 4, 4'-二氟-4'-硼-3a, 4a'-二氮杂-s'-二环戊二烯并苯的通用结构的 BODIPYTM 衍生物, 和 / 或任意这些的缀合物和 / 或衍生物。可使用的其它试剂包括, 但不限于, 例如, 荧光素、荧光素-多天冬氨酸缀合物、荧光素-多谷氨酸缀合物、荧光素-多精氨酸缀合物、靛青绿、靛青-十二天冬氨酸缀合物、靛青-多天冬氨酸缀合物、异舒泛蓝、吲哚二磺酸盐 (indole disulfonates)、苯并吲哚二磺酸盐、二(乙基羧基甲基)靛青、二(戊基羧基甲基)靛青、多羟基吲哚磺酸盐、多羟基苯并吲哚磺酸盐、刚性杂原子吲哚磺酸盐、靛青双丙酸、靛青双己酸、3, 6'-二氰基-2, 5'-[(N, N, N', N'-四(羧基甲基)氨基]吡嗪、3, 6'-[(N, N, N', N'-四(2-羟基乙基)氨基]吡嗪-2, 5'-二羧酸、3, 6'-二(N-氮杂环丁烷子基 (azatedino)) 吡嗪-2, 5'-二羧酸、3, 6'-二(N-吗啉代)吡嗪-2, 5'-二羧酸、3, 6'-二(N-哌嗪子基)吡嗪-2, 5'-二羧酸、3, 6'-二(N-硫吗啉代)吡嗪-2, 5'-二羧酸、3, 6'-二(N-硫吗啉代)吡嗪-2, 5'-二羧酸 S-氧化物、2, 5'-二氰基-3, 6'-二(N-硫吗啉代)吡嗪 S, S'-二氧化物、吲哚碳菁四磺酸盐 (indocarbocyaninetetrasulfonate)、氯吲哚碳菁, 和 3, 6'-二氨基吡嗪-2, 5'-二羧酸。

[0117] 本领域技术人员将理解使用的具体光学试剂可取决于用于激发的波长、皮肤组织下面的深度, 和本领域通常众所周知的其它因素。例如, 光学试剂的最佳的吸收或激发最大量可根据使用的试剂的而改变, 但通常, 本发明的光学试剂将吸收以下光或被以下光激发: 电磁波谱的紫外 (UV)、可见或红外 (IR) 范围的光。对于成像, 在近红外吸收和发射的染料 (约 700-900nm, 例如, 靛青) 是优选的。对于使用内窥镜方法的局部可视化, 在可见范围吸收的任何染料是合适的。

[0118] 在一些实施方案中, 本发明的方法中使用的非电离辐射的波长范围可为约 350nm 至约 1200nm。在一个示例性实施方案中, 该荧光剂可被波长在电磁波谱的可见部分的蓝色范围的光激发 (约 430nm 至约 500nm) 且以在电磁波谱的可见部分的绿色范围的波长 (约 520nm 至约 565nm) 发射。例如, 荧光素染料可被波长约 488nm 的光激发且具有约 520nm 的发射波长。作为另一实例, 3, 6'-二氨基吡嗪-2, 5'-二羧酸可被波长约 470nm 的光激发且在波长约 532nm 发荧光。在另一实施方案中, 光学试剂的激发和发射波长可落在电磁波谱的近红外范围。例如, 靛青染料, 如靛青绿, 可被波长约 780nm 的光激发且具有约 830nm 发射波长。

[0119] 在其它实施方案中, 该诊断剂可包括但不限于本领域通常已知的磁共振 (MR) 和 X-射线造影剂, 包括, 例如, 基于碘的 X-射线造影剂、超顺磁氧化铁 (SPIO)、钆或锰的复合物, 等。(参见, 例如, Armstrong 等人, Diagnostic Imaging, 5th Ed., Blackwell Publishing(2004))。在一些实施方案中, 诊断剂可包括磁共振 (MR) 显像剂。示例性磁共振试剂包括但不限于顺磁剂、超顺磁剂, 等。示例性顺磁剂可包括但不限于钆喷酸、钆特酸、钆双胺、钆、钆特醇、锰福地吡、钆弗塞胺、柠檬酸铁铵、钆贝酸、钆布醇或钆塞酸。超顺磁剂可包括但不限于超顺磁氧化铁以及氧化铁和氧化亚铁复合物 (Ferristene)。在某些实施方案中, 该诊断剂可包括 X-射线造影剂, 例如, 在以下文献提供: H. S. Thomsen, R. N. Muller and R. F. Mattrey, Eds., Trends in Contrast Media, (Berlin:Springer-Verlag, 1999); P. Dawson, D. Cosgrove and R. Grainger, Eds., Textbook of Contrast Media (ISIS

Medical Media1999); Torchilin, V. P., Curr. Pharm. Biotech. 1:183-215 (2000); Bogdanov, A. A. 等人, Adv. Drug Del. Rev. 37:279-293 (1999); Sachse, A. 等人, Investigative Radiology 32(1):44-50 (1997)。X-射线造影剂的实例包括包括,但不限于,碘帕醇、碘美普尔、碘海醇、碘喷托、碘普胺、碘西胺、碘佛醇、碘曲仑、碘酞硫、碘克沙醇、碘西醇、碘葡萄糖酰胺、碘葡苯胺、iogulamide、碘沙考、碘昔兰、碘帕醇、甲泛葡胺、碘比醇和碘美醇。在某些实施方案中,该 X-射线造影剂可包括碘帕醇、碘美普尔、碘普胺、碘海醇、碘喷托、碘佛醇、碘比醇、碘克沙醇、碘曲仑和碘美醇。

[0120] 类似于上述治疗剂,该诊断剂可以多种方式与纳米颗粒结合,包括例如嵌入、包封入或束缚至纳米颗粒。类似的,诊断剂的负载可通过本领域已知的多种方式进行,例如以下文献公开的: de Villiers, M. M. 等人, Eds., Nanotechnology in Drug Delivery, Springer (2009); Gregoriadis, G., Ed., Liposome Technology: Entrapment of drugs and other materials into Liposomes, CRC Press (2006)。

[0121] 靶向剂

[0122] 在一些实施方案中,本发明的磷酸酯缀合物还可包括至少一种靶向剂。例如,在一些实施方案中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 可独立地选择为靶向剂。通常,本发明的靶向剂可与任何感兴趣的靶点(如与器官、组织、细胞、细胞外基质和细胞内区域有关的靶点)结合。在某些实施方案中,靶点可与具体疾病状态,如癌性病症相关。或者,靶向剂可靶向一种或多种具体类型的细胞,例如,该细胞可具有指示细胞、组织和/或受试者的具体疾病和/或具体状态的靶点。在一些实施方案中,靶向剂可特异于仅一个靶点,如受体。合适的靶点可包括但不限于核酸,如 DNA、RNA,或其修饰的衍生物。合适的靶点也可包括但不限于蛋白质,如细胞外蛋白质、受体、细胞表面受体、肿瘤-标记、跨膜蛋白质、酶,或抗体。合适的靶点可包括碳水化合物,如可例如存在于细胞的表面的单糖、二糖或多糖。在某些实施方案中,合适的靶点可包括粘蛋白如 MUC-1 和 MUC-4、生长因子受体如 EGFR、Claudin4、核仁磷蛋白如核仁素、趋化因子受体如 CCR7、受体如生长抑素受体 4、Erb-B2(成红细胞白血病致癌基因同源物 2)受体、CD44 受体,和 VEGF 受体-2 激酶。

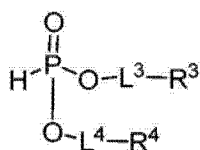
[0123] 在某些实施方案中,靶向剂可包括靶标配体的小分子模拟物(例如,肽的模拟的配体)、靶标配体(例如,包含 RGD 肽的肽或叶酸酰胺),或针对具体靶点特异的抗体或抗体片段。在一些实施方案中,靶向剂可进一步包括叶酸衍生物、B-12 衍生物、整联蛋白 RGD 肽、NGR 衍生物、生长抑素衍生物或结合至生长抑素受体的肽,例如,奥曲肽和 octreotate 等。

[0124] 本发明的靶向剂还可包括适体。适体可被设计为与感兴趣的靶点关联或结合。适体可由以下构成,例如, DNA、RNA 和/或肽,且适体的某些方面是本领域众所周知的。(参见例如, Klussman, S., Ed., The Aptamer Handbook, Wiley-VCH (2006); Nissenbaum, E. T., Trends in Biotech. 26(8):442-449 (2008))。在本发明中,合适的适体可为线性或环状且可包括具有少于约 150 个碱基的寡核苷酸(即,少于约 150 的聚体)。适体的长度范围可为约 100 至约 150 个碱基或约 80 至约 120 个碱基。在某些实施方案中,适体的范围可为约 12 至约 40 个碱基,约 12 至约 25 个碱基,约 18 至约 30 个碱基,或约 15 至约 50 个碱基。可开发所述适体与适宜的靶点一起使用,所述靶点在疾病状态下存在或表达,且包括但不限于本文所记录的靶点。

[0125] IV. 制备磷酸酯缀合物和关联组分的方法

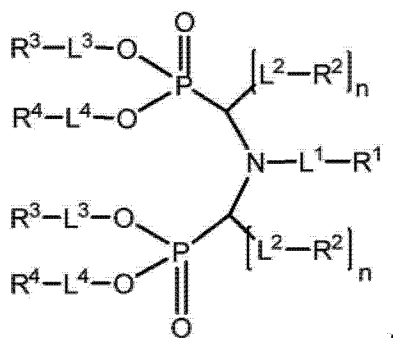
[0126] 可以多种方式生成所述磷酸酯缀合物。在一方面中,本发明包括制备磷酸酯缀合物的方法,所述方法包括:将具有下式的伯胺化合物: $\text{H}_2\text{N}(\text{L}^1)-(\text{R}^1)$,具有下式的羰基化合物: $\text{O}=\text{C}[(\text{L}^2)-(\text{R}^2)]_n$,和具有下式的 H- 磷酸酯化合物:

[0127]



[0128] 在足以形成具有下式的磷酸酯缀合物的条件下混合:

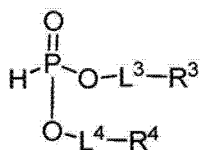
[0129]



[0130] 其中 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 各自独立地选自键和连接基团; R^1 选自纳米颗粒、联接组分、靶向剂、诊断剂、隐形剂和四足呈现组分; R^2 各自独立地选自隐形剂、 C_1 - C_{10} 烷基、羧酸或酯、磷酸或酯、磺酸或酯,和羟基; R^3 和 R^4 各自独立地选自 H、联接组分、靶向剂、诊断剂和隐形剂,其中 R^3 或 R^4 至少有一个不为 H;且 n 为 0 至 2 的整数,其中当 n 为 0 或 1 时,所述羰基化合物为醛。

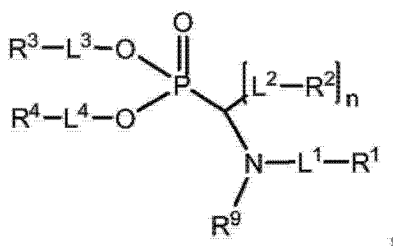
[0131] 在另一方面中,本发明包括制备磷酸酯缀合物的方法。所述方法包括将具有下式的仲胺化合物: $\text{HN}[(\text{L}^1)-(\text{R}^1)](\text{R}^9)$,具有下式的羰基化合物: $\text{O}=\text{C}[(\text{L}^2)-(\text{R}^2)]_n$,和具有下式的 H- 磷酸酯化合物:

[0132]



[0133] 在足以形成具有下式的磷酸酯缀合物的条件下混合:

[0134]



[0135] 其中 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 各自独立地选自键和连接基团; R^1 选自纳米颗粒、联接组分、靶向剂、诊断剂和隐形剂; R^2 独立地选自隐形剂、 C_1 - C_{10} 烷基、羧酸或酯、磷酸或酯、磺酸或酯,

和羟基； R^3 和 R^4 各自独立地选自 H、联接组分、靶向剂、诊断剂和隐形剂，其中 R^3 或 R^4 至少一个不为 H； R^9 选自 C_1 - C_{10} 烷基；且 n 为 0 至 2 的整数，其中当 n 为 0 时，所述羰基化合物为甲醛。

[0136] 一般而言，用于制备磷酸酯缀合物的反应包括 H- 磷酸酯化合物、羰基化合物，和伯胺化合物或仲胺化合物。在合成过程中，可以任意顺序混合这些化合物以得到最终的磷酸酯缀合物。例如，在一些实施方案中，可将所述伯胺化合物或仲胺化合物和所述羰基化合物混合以形成中间体化合物，然后与 H- 磷酸酯化合物混合形成最终的磷酸酯缀合物。在其它实施方案中，可将 H- 磷酸酯化合物与羰基化合物混合以形成中间体化合物，然后与伯胺化合物或仲胺化合物混合形成最终的磷酸酯缀合物。在一些实施方案中，可将所需化合物混合在一个反应中以生成最终的磷酸酯缀合物。对于一些缀合物，H- 磷酸酯化合物、羰基化合物和伯胺化合物的比例可为 2:2:1。对于其它缀合物，H- 磷酸酯化合物、羰基化合物和仲胺化合物的比例可为 1:1:1。不同化合物的比例取决于特定反应条件和所需的磷酸酯缀合物。

[0137] 如本文所提供，涉及 H- 磷酸酯化合物、伯胺或仲胺化合物和羰基化合物的反应可用于生成很多种化合物，这些化合物可包括联接组分、靶向剂、诊断剂、治疗剂、隐形剂或其组合。例如，如图 1 和图 2 所示，可将比例为 2:2:1 的 H- 磷酸酯化合物、羰基化合物和伯胺化合物混合以形成本发明的磷酸酯缀合物。如图 1 所示，所述磷酸酯缀合物可包含 R^1 作为 PEG 基团，其范围为 PEG_{100} - PEG_{10000} 。 R^3 和 R^4 也可选自 C_1 - C_{20} 烷基以便于例如与脂质体的双层膜连接。在该特定实例中， n 为 0，其中所述羰基化合物为甲醛。类似地，如图 2 所示，所述羰基化合物可具有的 n 为 1 且 R^2 为甲基，其改变了图 1 中所述磷酸酯缀合物的结构。本领域的普通技术人员应当理解多种可能的组合可用于生成本文所公开的磷酸酯缀合物。

[0138] 在一些实施方案中，可生成磷酸酯缀合物从而提供例如可自纳米颗粒表面延伸的呈现组件。如图 3 所示，脂质分子可包括伯胺和 R^7 以及 R^8 ，其可为例如 C_1 - C_{20} 烷基。在该实例中， n 为 0，且 L^3 和 L^4 可为键或短亚烷基（例如， C_1 - C_6 ）或其它连接基团以允许所需的间距或特定应用所需的其它特性。如示，可分别以 1:2:2 的比例将所述脂质分子与 H- 磷酸酯化合物和甲醛混合以形成呈现 R^3 和 R^4 的四足组件的磷酸酯缀合物。

[0139] 在一些实施方案中，可将制备这些化合物的方法与纳米颗粒组合以合成磷酸酯缀合物，同时一种起始物料，例如 H- 磷酸酯化合物，连接至所述纳米颗粒。如实例图 4 所述，可将脂质双层膜中两个相邻的 H- 磷酸酯化合物与两当量的羰基化合物 $O = C[(L^2)-(R^2)]_n$ 和一当量的伯胺化合物 $H_2N(L^1)-(R^1)$ 结合，以在纳米颗粒的表面上生成本发明的磷酸酯缀合物。例如，如图 4 所示， R^3 和 R^4 可为联接组分，例如 C_1 - C_{20} 烷基，其嵌入至脂质体的脂质双层中。然后可将所制备的具有 H- 磷酸酯化合物的脂质体与伯胺化合物（其例如包括隐形剂，如范围为 PEG_{100} - PEG_{10000} 的 PEG）混合。在包含羰基化合物的氢磷酸酯化反应后，所述隐形剂可显示在脂质体的表面上，从而将所述脂质体转化成隐形脂质体。

[0140] 如图 5 中所述，类似策略可用于生成自所述纳米颗粒表面延伸的呈现组件。脂质分子可包括自表面延伸的伯胺，且 R^7 和 R^8 可为嵌入至脂质双层的 C_1 - C_{20} 烷基。当与两当量的 H- 磷酸酯化合物和甲醛混合时，氢磷酸酯化反应可在两个 H- 磷酸酯化合物间形成桥，且还在脂质体的表面上呈现 R^5 和 R^6 ，其中 R^5 和 R^6 可为隐形剂，如范围为 PEG_{100} - PEG_{10000} 的 PEG。如上文所详述，所述连接基团 L^1 、 L^2 和 L^3 可独立地选自连接基团或键以允许所需的间距或

特定应用所需的其它特性。本领域的普通技术人员应当理解多种合成方法可用于在纳米颗粒的表面上生成本发明的磷酸酯缀合物。

[0141] 如本领域的普通技术人员所理解的,如果需要,可使用常规技术,包括但不限于,过滤、蒸馏、结晶、色谱等等分离或纯化本文所述的合成反应方案的起始物料和中间体。可使用常规方法,包括物理常数和光谱数据表征这些物料。除非另有相反指定,本文所述反应可在惰性气氛在大气压下在反应温度范围为约 -78°C 至约 150°C 、或约 0°C 至约 125°C 进行,且在一些实施方案中,在约室温(或环境温度)例如约 20°C 进行。本文所述的反应可在多种溶剂(其可取决于用于生成本文所述的中间体或终产物的特定反应)中进行。在一些实施方案中,所述反应溶剂可包括有机溶剂,如非质子溶剂(例如,THF 或醚)。在一些实施方案中,所述反应溶剂可为水性溶剂且可包括额外的缓冲剂、盐、添加剂等等。本文所述的一些反应可包括回流条件以例如纯化本文所述的某些化合物。

[0142] 尽管氢磷酸酯化反应为在纳米颗粒上生成本发明的磷酸酯缀合物提供了若干优点,但可使用其它方法制备所述化合物。例如,可将 H-磷酸酯化合物、伯胺和仲胺化合物,以及羰基化合物一起反应以形成本发明的磷酸酯缀合物。随后,可将所述磷酸酯缀合物连接至纳米颗粒。在一些实施方案中,可通过以下方法将磷酸酯缀合物掺合至脂质体中:首先使用标准方法(例如,挤出法)生成脂质体,随后将所述磷酸酯缀合物连接至所述脂质体。在其它实施方案中,可在脂质体形成过程中将磷酸酯缀合物掺合至所述脂质体双层中,例如通过将磷酸酯缀合物和脂质组分一起干燥,然后将混合物重悬于水性溶液中以形成磷酸酯缀合物与双层结合的脂质体。

[0143] 使用其它合成顺序生成所述磷酸酯缀合物也在考虑之中。例如,如图 1 所示,可将包括 R^1 和 L^1 的伯胺化合物与不含 R^3 和 R^4 的 H-磷酸酯反应。在此类实施方案中, L^3 和 L^4 可为连接基团(其包括与 R^3 和 / 或 R^4 键接的官能团), R^3 和 / 或 R^4 可包括例如靶向剂、隐形剂或诊断剂。因此,可将 R^3 和 / 或 R^4 与 L^3 和 L^4 的官能团反应以生成最终的磷酸酯缀合物。本领域的普通技术人员应当理解存在若干种其它可能的合成顺序以生成本发明的磷酸酯缀合物。例如, R^3 和 R^4 可以是相同的,且因此,例如,若 R^3 和 R^4 各自为靶向剂,则 L^3 和 L^4 可各自含有可与所述靶向剂反应生成本发明的磷酸酯缀合物的官能团。

[0144] 纳米颗粒

[0145] 如本文所提供的,本发明包括可通过本领域公知的多种方式生成的纳米颗粒的用途,并且制备此类纳米颗粒的方法可取决于所需的特定纳米颗粒。本领域可用的任何测量技术可用于测定靶向递送组合物和纳米颗粒的性质。例如,技术如动态光散射、X-射线光电子显微术、粉末 X-射线衍射、扫描电子显微术(SEM)、透射电子显微术(TEM)和原子力显微镜法(AFM)可用于确定纳米颗粒和 / 或靶向递送组合物的平均尺寸和分散度。

[0146] 本发明使用的脂质体可使用本领域通常众所周知的多种技术制备。(参见,例如,Williams, A. P., *Liposomes: A Practical Approach*, 2nd Edition, Oxford Univ. Press(2003); Lasic, D. D., *Liposomes in Gene Delivery*, CRC Press LLC(1997))。例如,脂质体可通过但不限于以下技术制备,如挤压、搅拌、超声处理、反相蒸发(reverse phase evaporation)、水溶液中自组装(self-assembly in aqueous solution)、基于电极的形成技术(electrode-based formation techniques)、微流体导向的形成技术(microfluidic directed formation techniques),等。在某些实施方案中,该方法可用于制备多层和 / 或

单层的脂质体,其可包括大单层脂质体(LUV)和/或小单层脂质体(SUV)。类似于溶液中脂质体的自组装,胶束可使用本领域通常众所周知的技术制备,使得当溶于足以形成胶束的溶液条件时两亲型分子将形成胶束。脂质涂覆的泡囊和脂蛋白也可使用本领域已知的方法构造(参见,例如, Farook, U., J. R. Soc. Interface, 6(32):271-277(2009); Lacko 等人, Lipoprotein Nanoparticles as Delivery Vehicles for Anti-Cancer Agents in Nanotechnology for Cancer Therapy, CRC Press(2007))。

[0147] 制备可用于本发明的聚合物纳米颗粒的方法是本领域公知的(参见,例如 Sigmund, W. et al., Eds., Particulate Systems in Nano-and Biotechnologies, CRC Press LLC(2009); Karnik et al., Nano Lett., 8(9):2906-2912(2008))。例如,可使用本领域已知的合成方法制备嵌段共聚物从而使得所述嵌段共聚物可在溶液中自组装以形成聚合物泡囊和/或嵌段共聚物胶束。类脂囊泡是本领域已知的,且可使用多种技术和组合物制备(Baillie A. J. et al., J. Pharm. Pharmacol., 38:502-505(1988))。可使用本领域已知的任何方法(如共沉淀、热分解和微乳化)构建磁性和/或金属颗粒。(也参见 Nagarajan, R. & Hatton, T. A., Eds., Nanoparticles Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization, Oxford Univ. Press(2008))。可使用本领域公知的多种技术(如Turkevich方法、Brust方法、Perraut方法或超声波分解法)制备金颗粒和其衍生物(也参见 Grzelczak et al., Chem. Soc. Rev., 37:1783-1791(2008))。在一些实施方案中,所述联接组分可通过硫金束缚化学(sulfur-gold tethering chemistry)连接。可使用本领域已知的任何方法(如胶体合成技术)合成量子点或半导体纳米晶体。通常,量子点可由多种材料如半导体材料(包括硒化镉、硫化镉、砷化铟、磷化铟等)组成。

[0148] 其它关联组分

[0149] 如本文所述,本发明的磷酸酯缀合物可包括组分如靶向剂、隐形剂、诊断剂、治疗剂和联接组分。本领域的普通技术人员应当理解可用于生成包含于所述磷酸酯缀合物中的组分的各种组合的标准的、公知的技术。例如,靶向剂、隐形剂、诊断剂、治疗剂可通过共价和/或非共价连接(如上文关于联接组分所述)连接至本发明的磷酸酯缀合物。

[0150] 关于靶向剂,对于一些实施方案而言,所述靶向剂可包括适体。可使用本领域已知的技术鉴别特定靶点的适体,如但不限于体外选择方法,如SELEX™(指数富集的配体系统进化技术)或MonoLex™技术(用于AptaResAG的单轮适体分离程序)、体内选择方法,或其组合。(参见,例如 Ellington, A. D. & Szostak, J. W., Nature 346(6287):818-22; Bock et al., Nature 355(6360):564-6(1992))。在一些实施方案中,上述提及的方法可用于鉴别特定的DNA或RNA序列,所述序列可用于结合感兴趣的特定靶点,如本文所公开的。一旦已经识别了特定适体的序列,则可以本领域已知的多种方法(如亚磷酸酰胺合成法)构建所述适体。对于肽适体,可使用多种鉴别和制备技术(参见,例如 Colas, P., J. Biol. 7:2(2008); Woodman, R. et al., J. Mol. Biol. 352(5):1118-33(2005))。

[0151] 可通过多种方式将适体连接至所述H-磷酸酯化合物、伯胺和仲胺化合物,以及羧基化合物。例如,H-磷酸酯化合物和/或伯胺或仲胺化合物上的连接基团可与所述适体的3'或5'端反应。在替代实施方案中,可通过将核酸一次一个添加至所述H-磷酸酯化合物和伯胺或仲胺化合物上的连接基团来连续合成所述适体。本领域的普通技术人员应当理解可用于将适体包含于本发明磷酸酯缀合物中的公知技术。

[0152] V. 给药靶向递送组合物的方法

[0153] 本发明还包括包含磷酸酯缀合物的靶向递送组合物。在一方面中,本发明包括包含本文所述的磷酸酯缀合物的靶向递送组合物,其中 R^3 和 R^4 各自为连接至纳米颗粒的联接组分,且 R^1 选自靶向剂、诊断剂和隐形剂。如上文所详述,所述联接组分可以若干种方式连接纳米颗粒,例如,所述联接组分可以为与脂质体双层结合的脂质。在一些实施方案中,所述靶向递送组合物可包括脂质体,且 R^3 和 R^4 可各自与所述脂质体的双层结合并可独立地为脂质或胆固醇。在其它实施方案中,所述磷酸酯缀合物的 R^1 可为纳米颗粒或连接至纳米颗粒的联接组分,且 R^3 和 R^4 可各自为靶向剂、诊断剂或隐形剂。

[0154] 本发明的靶向递送组合物和方法可用于治疗和 / 或诊断任何与受试者有关的疾病、病症和 / 或病状。在一项实施方案中,本发明的方法包括用于治疗或诊断受试者癌性病状的方法,其包括向所述受试者给予包含连接至纳米颗粒的本发明的磷酸酯缀合物的靶向递送组合物,其中所述组合物还包含足以治疗或诊断所述病状的治疗性或诊断性试剂,且 R^1 、 R^3 和 R^4 至少一个为靶向剂。在某些实施方案中,癌性病症可包括充分表达(例如,在细胞表面或在脉管系统中)被本发明的靶向递送组合物的靶向剂靶向的受体的癌症。

[0155] 在另一项实施方案中,本发明的方法包括测定受试者对靶向治疗性治疗适用性的方法,其包括向所述受试者给予包含本文所述的纳米颗粒和磷酸酯缀合物的靶向递送组合物,其中所述磷酸酯缀合物或纳米颗粒包含诊断剂,并使所述受试者成像以检测所述诊断剂,且 R^1 、 R^3 和 R^4 至少一个为靶向剂。

[0156] 给药

[0157] 在一些实施方案中,本发明可包括靶向递送组合物和生理学上(即,药学上)可接受的载体。如本文所述,术语“载体”是指通常的用作药物如治疗剂的稀释剂或媒介物的惰性物质。该术语也包括赋予组合物粘聚性的通常的惰性物质。通常,生理学上可接受的载体以液体形式存在。液体载体的实例包括生理盐水、磷酸盐缓冲液、生理缓冲盐水(135-150mM NaCl)、水、缓冲水溶液、0.4% 盐水、0.3% 甘氨酸、糖蛋白以提供增强的稳定性(例如,白蛋白、脂蛋白、球蛋白等),等。因为生理学上可接受的载体部分通过给予的具体组合物以及通过用于给予组合物的具体方法而决定,因此有很多本发明的药物组合物的合适制剂(参见,例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st edition, 2005)。

[0158] 本发明的组合物可通过常规、众所周知的灭菌技术灭菌或可在无菌条件下制备。水溶液可被包装使用或在无菌条件过滤且冻干,该冻干制剂在给药前与无菌水溶液合并。该组合物可按需要包含药物可接受的辅助物质以接近生理条件,如 pH 调节和缓冲剂、张度调节剂、湿润剂,等,例如,乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨醇单月桂酸酯和三乙醇胺油酸盐。可包含糖以稳定该组合物,如用于冻干的靶向递送组合物的稳定剂。

[0159] 所选择的靶向递送组合物,当单独或与其它合适的组分组合时,可制备成气溶胶制剂(即,它们可被“雾化”)以通过吸入给药。气溶胶制剂可置于加压可接受的推进剂中,如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气,等。

[0160] 用于直肠给药的合适的制剂包括,例如,栓剂,其包含有效量的包装的靶向递送组合物以及栓剂基质。合适的栓剂基质包括天然或合成的甘油三酯或烷属烃。此外,也可使用明胶直肠胶囊,其包含选择的靶向递送组合物与基质的组合,基质包括,例如,液体甘油三酯、聚乙二醇,和烷属烃。

[0161] 适合肠胃外给药的制剂,例如,通过关节内(关节中)、静脉内、肌内、瘤内、皮内、腹腔内、和皮下途径,包括水性和非水性、等渗无菌注射溶液,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使得制剂与预期接受者的血液等渗的溶质,和水性和非水性无菌悬浮液,其可包括助悬剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。注射溶液和悬浮液也可由无菌粉末、颗粒和片剂制备。在本发明的实践中,组合物可通过,例如,静脉内输注、局部、向腹膜内、膀胱内或鞘内给药。肠胃外给药和静脉内给药是优选给药方法。靶向递送组合物的制剂可存在于单元剂量或多剂量密封容器,如安瓿和小瓶中。

[0162] 该药物制剂优选以单位剂型形式。以该形式,制剂细分为包含合适的量的活性成分的单位剂量,例如,靶向递送组合物。该单位剂型可为包装的制剂,包含离散量的制剂的包装。如果需要的话,该组合也可包含其它相容的治疗剂。

[0163] 在治疗癌症的治疗用途中,本发明的药物组合物中使用的包含治疗和/或诊断剂的靶向递送组合物可以初始剂量为每日约0.001mg/kg至约1000mg/kg给药。可使用日剂量范围约0.01mg/kg至约500mg/kg,或约0.1mg/kg至约200mg/kg,或约1mg/kg至约100mg/kg,或约10mg/kg至约50mg/kg。然而,该剂量可根据患者的需求、治疗病症的严重性和使用的靶向递送组合物而改变。例如,剂量可考虑具体患者中诊断的癌症的类型和阶段而凭经验地确定。给药于患者的剂量,在本发明的上下文,应足以随时间在患者中实现有益治疗响应。剂量大小也将通过在具体患者中伴随给药具体靶向递送组合物的任何不利副作用的存在、性质和程度而确定。对具体情形的适当剂量的确定是医生技能范围内的。通常,治疗起始于较小剂量,其小于靶向递送组合物的最佳剂量。之后,剂量通过小增量增加直到达到情况下的最佳效果。为方便起见,总日剂量可分开且在一天过程中分部分给药,如果需要的话。

[0164] 在一些实施方案中,本发明的靶向递送组合物可用于诊断疾病、障碍和/或病症。在一些实施方案中,该靶向递送组合物可用于诊断受试者的癌性病症,如肺癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、子宫颈癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、食管癌,等。在一些实施方案中,诊断疾病状态的方法可包括使用靶向递送组合物以物理检测和/或定位受试者体内的肿瘤。例如,肿瘤可与充分表达(例如,在细胞表面或在脉管系统中)被本发明的靶向递送组合物的靶向剂靶向的受体的癌症相关。在一些实施方案中,该靶向递送组合物也可用于诊断癌症之外的疾病,如增殖性疾病、心血管疾病、胃肠疾病、泌尿生殖疾病、神经病、肌骨病、血液疾病、炎性疾病、自身免疫性疾病、类风湿性关节炎等。

[0165] 如本文所述,本发明的靶向递送组合物可包括具有本质上可检测性质的诊断剂。在检测受试者中的诊断剂中,该靶向递送组合物,或部分为靶向递送组合物的一群颗粒,可给药于受试者。该受试者然后可使用用于成像诊断剂的技术成像,如单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)、磁共振成像(MRI)、光学成像、正电子发射断层摄影术(PET)、计算机断层摄影术(CT)、X-射线成像、 γ 射线成像,等。任何本文所述的成像技术可与其它成像技术结合使用。在一些实施方案中,将用于成像的放射性同位素掺入颗粒使得在受试者体内示踪该靶向递送组合物。例如,靶向递送组合物的生物分布和/或消除可被测量且任选用于改变患者的治疗。例如,可能需要或多或少的靶向递送组合物以优化患者的治疗和/或诊断。

[0166] 靶向递送

[0167] 在某些实施方案中,本发明的靶向递送组合物可递送至受试者以通过靶向的方式释放治疗剂或诊断剂。例如,靶向递送组合物可递送至受试者中的靶点,然后嵌入、包封入或束缚至靶向递送组合物(如至纳米颗粒)的治疗剂,可基于靶点附近的溶液条件而递送。溶液条件,如pH、盐浓度等,可引起治疗剂经较短或较长时间释放至靶点附近的区域。或者,酶可裂解该源自靶向递送组合物的治疗剂或诊断剂以引发释放。在一些实施方案中,该靶向递送组合物可通过内吞作用递送至细胞内部区域且可能随后在细胞的内部的功能区隔(如溶酶体)降解。本领域技术人员将理解治疗剂或诊断剂的靶向递送可使用本领域通常已知的多种方法进行。

[0168] 试剂盒

[0169] 本发明还提供用于将靶向递送组合物给药至受试者以治疗 and / 或诊断疾病状态的试剂盒。该试剂盒通常包括两种或更多种治疗和 / 或诊断疾病状态所需的组分,如癌症病症所需的组分。该组分可包括本发明的靶向递送组合物、试剂、容器和 / 或装置。在一些实施方案中,试剂盒中的容器可包含靶向递送组合物,该组合物包含在使用前被放射标记的放射性药物。该试剂盒可进一步包括给药靶向递送组合物所需的任何反应组分或缓冲液。而且,该靶向递送组合物可为冻干形式且然后在给药前重构。

[0170] 在某些实施方案中,本发明试剂盒可包括包装组件,其可包括一种或多种用于治疗 and / 或诊断患者疾病状态的组分。例如,包装组件可包括容纳至少一种如本文所述的靶向递送组合物的容器。单独的容器可包含可在给药至患者前与靶向递送组合物混合的其它赋形剂或试剂。在一些实施方案中,医师可根据具体患者所需的治疗或诊断选择和匹配某些组分和 / 或包装组件。

[0171] 应理解本文所述的实施方案仅是解释性目的,基于其的各种变化或修饰都对本领域技术人员进行了暗示,且包含在本申请的精神和范围以及所附权利要求的范围内。本文引用的所有公开、专利和专利申请以其整体在此引入作为参考用于所有目的。

[0172] 以下给出制备和实施例使本领域的技术人员能够更清楚的理解和实践本发明。其不应被视为限制本发明的范围,而应当仅被视为其解释和代表。

[0173] VI. 实施例

[0174] 制备这些化合物中所使用的起始物料和试剂通常可从商品供应商如 Aldrich Chemical Co. 得到或通过本领域的技术人员公知的方法根据科学或专利文献和参考文件(如 Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis; Wiley & Sons: New York, 1991, Volumes 1-15; Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, Elsevier Science Publishers, 1989, Volumes 1-5 and Supplementals; and Organic Reactions, Wiley & Sons: New York, 1991, Volumes 1-40) 中所述的方法制备得到。以下合成反应方案仅用于解释可合成本发明化合物的一些方法,可对这些合成反应方案作出各种修改,并且参阅本申请公开内容的本领域的技术人员能够想到这些修改。

[0175] 如果需要,可使用常规技术,包括但不限于,过滤、蒸馏、结晶、色谱等等分离或纯化所述合成反应方案的起始物料和中间体。可使用常规方法,包括物理常数和光谱数据表征这些物料。

[0176] 实施例 1

[0177] 氢膦酸二烷基酯的制备

[0178] 使用一般化合成操作生成氢膦酸二烷基酯,其可进一步反应以形成一些本发明的化合物。如图6所述,一般反应方案为将二苯基亚磷酸酯与1-烷醇混合以形成氢膦酸二烷基酯。如下制备以下氢膦酸二烷基酯化合物:

[0179]

n	1-烷醇	1-烷醇 MW	膦酸二烷基酯	产物 MW
11	C ₁₂ H ₂₆ O	1- 十二 烷 醇 186.33	C ₂₄ H ₅₁ O ₃ P	418.63
13	C ₁₄ H ₃₀ O	1- 十四 烷 醇 214.39	C ₂₈ H ₅₉ O ₃ P	474.74
15	C ₁₆ H ₃₄ O	1- 十六 烷 醇 242.44	C ₃₂ H ₆₇ O ₃ P	530.85
17	C ₁₈ H ₃₈ O	1- 十八 烷 醇 270.49	C ₃₆ H ₇₅ O ₃ P	586.95
21	C ₂₂ H ₄₆ O	1- 二十二 烷 醇 326.60	C ₄₄ H ₉₁ O ₃ P	699.17

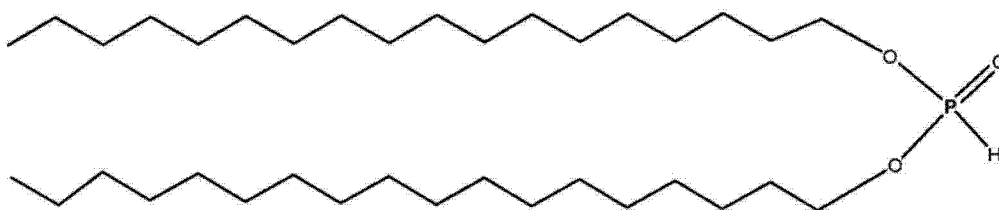
[0180] 向 2-5 mL 微波瓶中加入 3-6 mol 二苯基亚磷酸酯和 2.1 当量 1- 烷醇。使用注射器向瓶中加入 2 当量 (以体积计) 无水吡啶,并通过卷曲顶部密封该瓶。在 100°C 使用 Biotage™ Initiator Reactor 将反应混合物暴露于微波辐射 30 分钟。通过 ³¹P NMR 检查 CDCl₃ 中反应混合物的完成。

[0181] 将反应混合物转移至 100mL 圆底烧瓶中,并在 70°C 旋转蒸发以除去溶剂。通过正相硅胶快速色谱使用己烷 / 乙酸乙酯梯度 (C₁₂ 产物) 纯化粗产物残余物或在丙酮 (C₁₄-C₂₂ 产物) 中沉淀纯化粗产物残余物。在各情况中,MS 和 NMR 数据与预期产物一致。

[0182] 实施例 2

[0183] 氢膦酸双十八烷基酯的制备

[0184]



[0185] 向配备有机械搅拌器和热电偶的 125mL 圆底烧瓶 (RBF) 中加入 1- 十八烷醇 (25.41g, 0.0939mol, 2.2 当量)、二苯基亚磷酸酯 (10.0g, 0.0427mol, 1.0 当量) 和吡啶 (4.053g, 0.5124mol, 1.2 当量),并将混合物加热至 75°C。2.5h 后,通过 ³¹P NMR(CDCl₃) 检查反应的完成:产物在 7.8ppm 处,中间体单十八烷基苯基膦酸酯在 4.2ppm 处,二苯基膦酸酯在 0.35ppm 处。反应显示约 94% (通过积分) 产物、1.5% 中间体和 4.6% 于 5.5ppm 处的峰。将混合物冷却至 40-50°C 并缓慢加入约 50mL 二氯甲烷以防止物料固结并缠住搅拌器。进一步用 150mL 二氯甲烷稀释混合物并将其转移至分液漏斗。混合物经 50mL 水洗涤,经 3×75mL 3N 盐酸萃取,并经水和盐水各 75mL 进一步洗涤。有机层经无水 Na₂SO₄ 干燥并在旋转蒸发仪 (rotovap) 上浓缩以得到澄清液体,其静置后缓慢固结。

[0186] 向配备有机械搅拌器的干净的 250mL 圆底烧瓶中加入 100mL 丙酮。在环境温度通过塑料吸量管将浓缩的产物加入搅拌的丙酮中；所述液体沉淀成蓬松的白色固体。搅拌该混合物 1h, 然后经盖有一层 Sharkskin™ 纸的 Whatman™#4 滤纸过滤, 得到蓬松的白色湿饼。将该湿饼在真空下在环境温度过夜干燥。产量: 19.11g (76.3%)。HRMS: $[M+H]^+$ 计算值 587.5525, 实测值 587.5525; $[M+Na]^+$ 计算值 609.5346, 实测值 609.5339。HPLC-MS: 587.25 $[M+H]^+$, 604.17 $[M+NH_4]^+$, 609.58 $[M+Na]^+$, ^{31}P NMR (500MHz, $CDCl_3$) = 7.734ppm。 1H 和 ^{13}C NMR 与预期结构一致。

[0187] 或者, 在认为初始反应结束后, 将 250mL 蒸馏烧瓶中的粗反应混合物放置于 Kugelrohr 蒸馏装置中, 并通过将该烧瓶放置于高真空, 并历时约 1.5 小时将 Kugelrohr 烘箱以 10℃ 增幅逐渐从 60℃ 温热至 120℃, 且维持 120℃ 3 小时将挥发物除去。馏出物接收器在干冰 / 丙酮浴中冷却。在完成蒸馏后, 将 250mL 蒸馏烧瓶中的热的、液化产物倾入涂有焦油的 125mL 玻璃储藏罐中, 其中所述产物经冷却后固结。由此得到白色蜡状固体的产物。通过 ^{31}P NMR 光谱法检查一等分该固体于 $CDCl_3$ 中的溶液, 其显示在约 δ 7.72 处的单峰。通过 1H 和 ^{13}C NMR, 产物中唯一可观测到的杂质为起始的 1-十八烷醇, 其占分离产物的约 15mol%。

[0188] 实施例 3

[0189] 氢膦酸二油基酯的制备

[0190]

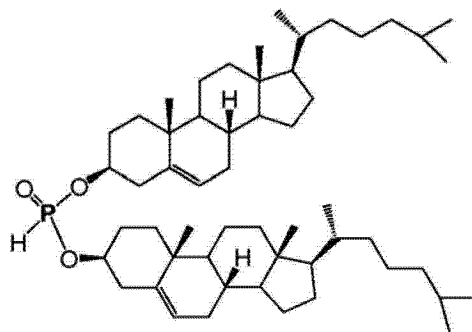


[0191] 向配备有机械搅拌器和热电偶的 125mL 圆底烧瓶中加入油醇 (30.85g, 0.115mol, 2.2 当量)、二苯基亚磷酸酯 (12.23g, 0.0522mol, 1 当量) 和吡啶 (4.96g, 0.0627mol, 1.2 当量)。将混合物加热至 65℃, 持续 3h。通过 ^{31}P NMR ($CDCl_3$, 7.76ppm) 检查反应的完成。将混合物冷却至 <50℃, 并加入 50mL 二氯甲烷。进一步用 150mL 二氯甲烷稀释混合物并将其转移至分液漏斗。混合物经 50mL 水洗涤, 经 3×75mL 3N 盐酸萃取, 并经水和盐水各 75mL 进一步洗涤。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥并浓缩, 得到无色油状物。将纯净的油状物转移至 250mL 分液漏斗并用 6×50mL 乙腈 (ACN) 洗涤。收率: 19.86g (65.2%)。高分辨质谱 (HRMS): $[M+Na]^+$ 计算值 605.5033, 实测值 605.5015; ^{31}P NMR (500MHz, $CDCl_3$) = 7.734ppm。 1H 和 ^{13}C NMR 与预期结构一致。

[0192] 实施例 4

[0193] 氢膦酸双胆固醇基酯的制备

[0194]



[0195] 向配备有机械搅拌器和热电偶的 250mL 圆底烧瓶中加入胆固醇 (44.42g, 0.1149mol)、二苯基亚磷酸酯 (12.23g, 0.0522mol) 和吡啶 (4.957g, 0.0627mol)。将混合物加热至 85–90°C, 在该温度混合物从固体变成可搅拌的流体物质。加热过夜后, 通过 ³¹P NMR(CDCl₃) 检查反应结束, 其在 4.31ppm 处具有主峰, 经 HRMS 验证为预期产物。将混合物冷却至 <50°C, 并加入 100mL 氯仿以溶解固体。进一步用 150mL 氯仿稀释混合物并将其转移至分液漏斗。混合物经 50mL 水洗涤, 经 3×50mL 3N 盐酸萃取, 并经水和盐水各 50mL 进一步洗涤。有机层经无水 Na₂SO₄ 干燥并在旋蒸仪上浓缩以得到粘稠的橙色油状物 (其静置后缓慢固结)。

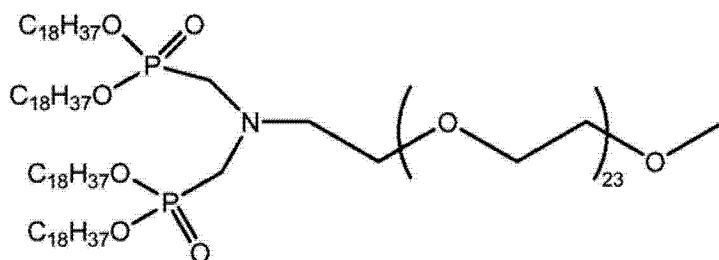
[0196] 向配备有机械搅拌器的干净的 500mL 圆底烧瓶中加入 200mL 丙酮。在环境温度通过塑料吸量管将浓缩的产物加入搅拌的丙酮中; 所述液体沉淀成蓬松的白色固体。将混合物搅拌过夜, 然后经 Whatman™ #4 和 Sharkskin™ 纸过滤以得到蓬松的米白色粉末。将该湿饼在真空下在环境温度过夜干燥。收率为 29.69g (69.4%)。HRMS: [M+Na]⁺ 计算值 841.6598, 实测值 841.6599; ³¹P NMR(CDCl₃) 4.31ppm; ¹H 和 ¹³C NMR 与预期结构一致。

[0197] 实施例 5

[0198] 四足 C₁₈-PEG₁₀₀₀-OMe 的制备

[0199] (((2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71-二十四氧杂七十三烷-73-基) 氮烷二基) 双(亚甲基)) 双膦酸四(十八烷基) 酯 (本文称为四足 C₁₈-PEG₁₀₀₀-OMe)

[0200]



[0201] 图 7 显示制备四足 C₁₈-PEG₁₀₀₀-OMe 的一般反应方案, 其通过首先制得如上文实施例 2 中所述的氢膦酸双十八烷基酯来制备。其次, 如下生成该四足 C₁₈-PEG₁₀₀₀-OMe: 将配备有三角搅拌叶片的 10mL Kontes microflex 瓶中加入氢膦酸双十八烷基酯 (1.0g, 1.704mmol, 2 当量)、多聚甲醛 (76.7mg, 2.56mmol, 3 当量), 和单分散 PEG₁₀₀₀ (Quanta Bioscience, 0.927g, 0.852mmol, 1 当量)。将瓶盖拧紧, 并将该瓶温热至 75°C 并搅拌 24 至 72 小时。定期取样该反应, 并使用配备有蒸发光散射检测器 (ELSD) 的反相 (C4, 300A) HPLC 进行分析。若认为反应未进行完全, 则可加入额外的多聚甲醛以促进进一步转化成预期产物。

若反应已充分转化成产物,则将反应冷却并将所得的蜡状固体进行纯化。

[0202] 通过超声和略微加热将粗反应物料溶解于异丙醇中。通过反相色谱在 Waters 柱 (C4, 300A, 5 μ m, 19x150mm) 在流速为 30mL/min 的条件下纯化粗溶液 (通常为 10-15mg/mL)。所使用的溶剂为乙腈 (0.05% TFA) 和水 (0.05% TFA)。以下为所使用的梯度方法;

[0203]

时间	ACN (0.05% TFA)	水 (0.05% TFA)
0	80	20
4	100	0
15	100	0
15.1	80	20
20	80	20

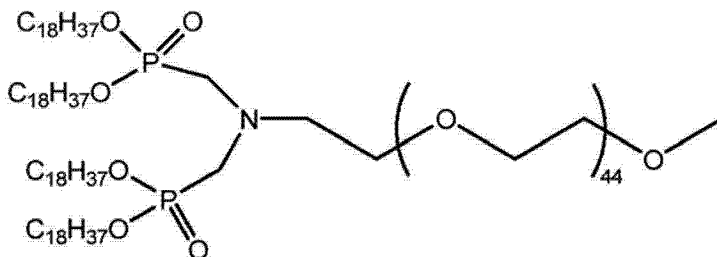
[0204] 将含有预期产物的级分在真空下浓缩并冻干成固体 (分离收率 :0.334g, 理论收率 :1.40g, 百分比收率 :23.8%)。LC/MS: $[M+H]^+ = 2287.7m/z$ 。使用蒸发光散射检测的 HPLC 分析 :99 面积%。 ^{31}P NMR 与预期结构一致。

[0205] 实施例 6

[0206] 四足 C_{18} -PEG₂₀₀₀-OMe 的制备

[0207] (2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 98, 101, 104, 107, 110, 113, 116, 119, 122, 125, 128, 131, 134 - 四十五氧杂一百三十六烷 -136- 基氮烷二基) 双 (亚甲基) 双磷酸四 (十八烷基) 酯 (本文称为四足 C_{18} -PEG₂₀₀₀-OMe)

[0208]



[0209] 生成四足 C_{18} -PEG₂₀₀₀-OMe 的合成步骤与上文实施例 5 中所公开的步骤类似。首先,通过实施例 2 中所公开的相同方法制备氢磷酸双十八烷基酯。其次,如下生成该四足 C_{18} -PEG₂₀₀₀-OMe:将配备有三角搅拌叶片的 10 mL Kontes microflex 瓶中加入氢磷酸双十八烷基酯 (0.587 g, 1.0 mmol, 2 当量)、多聚甲醛 (90.1 mg, 3.0 mmol, 6 当量),和多分散 PEG₂₀₀₀ (NANOCs) (1.0 g, 0.50 mmol, 1 当量)。将瓶盖拧紧,并将该瓶温热至 75°C 并搅拌 24 至 72 小时。定期取出小份样品,溶解于异丙醇 (IPA)/ 水中,并使用配备有 ELSD 检测器的反相 (C4, 300A) 高效液相色谱 (HPLC) 进行分析。若认为反应未进行完全,则可加入额外的多聚甲醛以促进进一步转化成预期产物。若反应已充分转化成产物,则将反应冷却并将所得的蜡状固体进行纯化。

[0210] 通过超声和略微加热将粗反应物料溶解于异丙醇/水(约3-5%水)中。通常,该粗溶液为15-25 mg/mL。通过反相色谱在含C4 二氧化硅填充物的柱上(5 μ m, 300A)获得预期产物。所使用的溶剂为ACN(0.05%三氟乙酸(TFA))和水(0.05% TFA)。以下为与Waters™ 柱(C4, 5 μ m, 19x150 mm)合用的梯度方法,流速为30 mL/min:

[0211]

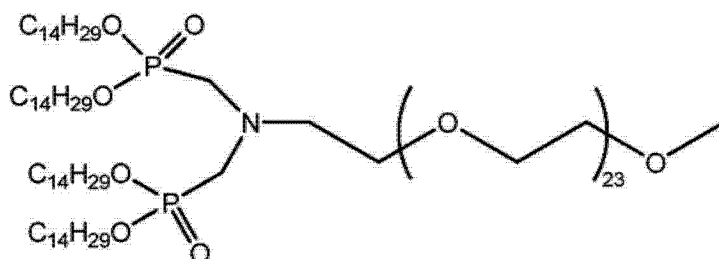
时间	ACN (0.05% TFA)	水 (0.05% TFA)
0	80	20
4	100	0
15	100	0
15.1	80	20
20	80	20

[0212] 将含有预期产物的级分在真空下浓缩并通过冻干分离。分离收率(纯化物料): 0.335 g (20.8 %)。高分辨MS: 模拟质谱 $[M+2Na]^{2+} = 1628.1472$; 检测质谱 $[M+2Na]^{2+} = 1628.1491$ 。HPLC(ELSD): 单峰: 保留时间(约7.88分钟) = >98 面积%。LC/MS: $[M+Na]^{2+} = 1616.9m/z$ 。 ^{31}P NMR 与预期结构一致。

[0213] 实施例 7

[0214] 四足 C₁₄-PEG₁₀₀₀-OMe 的制备

[0215]



[0216] (((2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71-二十四氧杂七十三烷-73-基)氮烷二基)双(亚甲基))双磷酸四(十四烷基)酯(本文称为四足 C₁₄-PEG₁₀₀₀-OMe)

[0217] 除使用氢磷酸双十四烷基酯代替氢磷酸双十八烷基酯外,操作与实施例5中四足 C18-PEG₁₀₀₀-OMe 相同,并使用以下量:氢磷酸双十四烷基酯(0.404g, 0.852mmol, 2当量)、多聚甲醛(0.077g, 2.56mmol, 6当量)、和单分散 PEG₁₀₀₀(Quanta Biodesign™)(0.464g, 0.426mmol, 1当量)。在经 Waters™ 柱(C4, 300A, 5 μ m, 19x150mm)反相色谱后,将含有预期产物的级分合并,在真空下浓缩,并冻干成半固体;分离收率0.496g(56.5%)。使用 ELSD 检测的 HPLC 分析:>99 面积%。 ^{31}P NMR 与预期结构一致。

[0218] 实施例 8

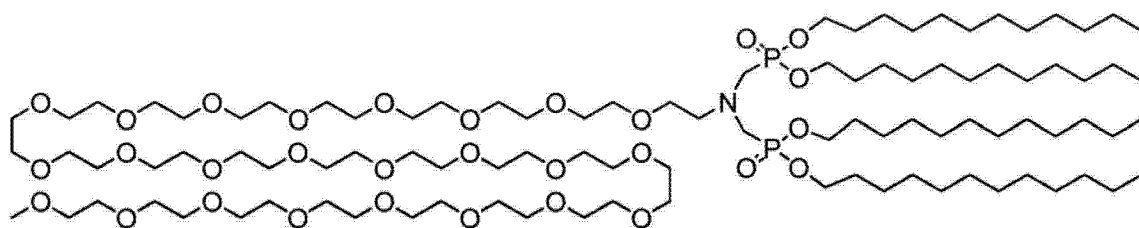
[0219] 其它四足烷基-PEG 磷酸酯缀合物的制备

[0220] 也可制备其它四足烷基-PEG 磷酸酯缀合物。如实施例1中一般方案所述,可制备

双烷基（例如 C_{12} 、 C_{16} 和 C_{22} ）氢膦酸酯。然后可使用基本上如实施例 6 中所述的操作制备 C_{12} -、 C_{16} - 和 C_{22} -PEG₁₀₀₀-OMe 膦酸酯缀合物。然而，对于 C_{12} -、 C_{16} - 和 C_{22} -PEG₁₀₀₀-OMe 缀合物，该反应可分别包括 1- 十二烷醇、1- 十六烷醇和 1- 二十二烷醇而不使用 1- 十八烷醇，其各自如下所示。HRMS 和 / 或 LRMS 以及 ^{31}P NMR 与这些衍生物各自预期的结构一致。

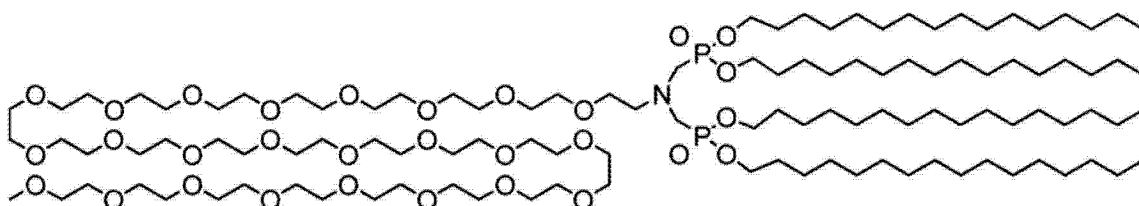
[0221] (((2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71-二十四氧杂七十三烷-73-基) 氮烷二基) 双(亚甲基)) 双膦酸四(十二烷基) 酯 (C_{12} /单分散 PEG₁₀₀₀)。化学式： $C_{99}H_{203}NO_{30}P_2$ ，分子量：1949.61g/mol。

[0222]



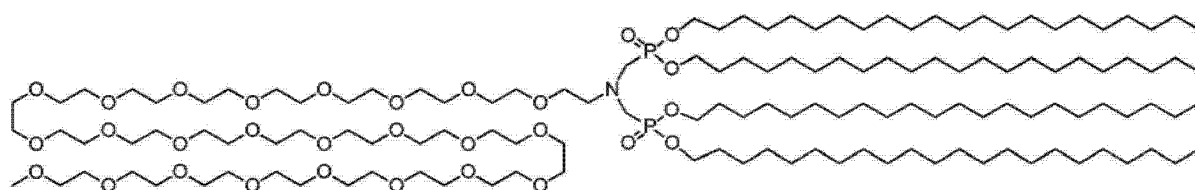
[0223] (((2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71-二十四氧杂七十三烷-73-基) 氮烷二基) 双(亚甲基)) 双膦酸四(十六烷基) 酯 (C_{16} /单分散 PEG₁₀₀₀)。化学式： $C_{115}H_{235}NO_{30}P_2$ ，分子量：2174.03g/mol。

[0224]



[0225] (((2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71-二十四氧杂七十三烷-73-基) 氮烷二基) 双(亚甲基)) 双膦酸四(二十二烷基) 酯 (C_{22} /单分散 PEG₁₀₀₀)。化学式： $C_{139}H_{283}NO_{30}P_2$ ，分子量：2510.67g/mol。

[0226]

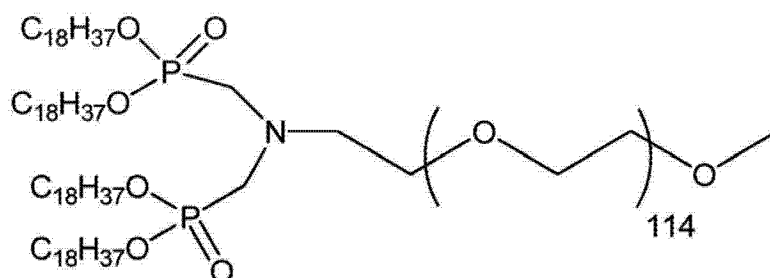


[0227] 类似地，可根据上文所述的一些步骤制备具有可变长度的 PEG 分子（例如，PEG₁₀₀ 至 PEG₁₀₀₀₀ 或更高 MW PEG）的缀合物。例如，可根据实施例 6 中的步骤制备四足 C_{18} 膦酰基-甲基氨基-PEG₅₀₀₀-OMe 缀合物，除使用多分散 PEG₅₀₀₀ 代替 PEG₁₀₀₀。四足 C_{18} 膦酰基-甲基氨基-PEG₅₀₀₀-OMe 缀合物的化学结构如下：

[0228] (2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 98, 101, 104, 107, 110, 113, 116, 119, 122, 125, 128, 131, 134, 137, 140, 143, 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 176, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 200, 203, 206, 209, 212, 215, 218, 221, 224, 227, 230, 233, 236, 239, 242, 245, 248, 251, 254, 257, 260, 263, 266, 269, 272, 275, 278, 281, 284, 287, 290, 293, 296, 299, 302, 305, 308, 311, 314, 317, 320, 323, 326, 329, 332, 335, 338, 341, 344, 347, 350, 353, 356, 359, 362, 365, 368, 371, 374, 377, 380, 383, 386, 389, 392, 395, 398, 401, 404, 407, 410, 413, 416, 419, 422, 425, 428, 431, 434, 437, 440, 443, 446, 449, 452, 455, 458, 461, 464, 467, 470, 473, 476, 479, 482, 485, 488, 491, 494, 497, 500, 503, 506, 509, 512, 515, 518, 521, 524, 527, 530, 533, 536, 539, 542, 545, 548, 551, 554, 557, 560, 563, 566, 569, 572, 575, 578, 581, 584, 587, 590, 593, 596, 599, 602, 605, 608, 611, 614, 617, 620, 623, 626, 629, 632, 635, 638, 641, 644, 647, 650, 653, 656, 659, 662, 665, 668, 671, 674, 677, 680, 683, 686, 689, 692, 695, 698, 701, 704, 707, 710, 713, 716, 719, 722, 725, 728, 731, 734, 737, 740, 743, 746, 749, 752, 755, 758, 761, 764, 767, 770, 773, 776, 779, 782, 785, 788, 791, 794, 797, 800, 803, 806, 809, 812, 815, 818, 821, 824, 827, 830, 833, 836, 839, 842, 845, 848, 851, 854, 857, 860, 863, 866, 869, 872, 875, 878, 881, 884, 887, 890, 893, 896, 899, 902, 905, 908, 911, 914, 917, 920, 923, 926, 929, 932, 935, 938, 941, 944, 947, 950, 953, 956, 959, 962, 965, 968, 971, 974, 977, 980, 983, 986, 989, 992, 995, 998, 1001, 1004, 1007, 1010, 1013, 1016, 1019, 1022, 1025, 1028, 1031, 1034, 1037, 1040, 1043, 1046, 1049, 1052, 1055, 1058, 1061, 1064, 1067, 1070, 1073, 1076, 1079, 1082, 1085, 1088, 1091, 1094, 1097, 1100, 1103, 1106, 1109, 1112, 1115, 1118, 1121, 1124, 1127, 1130, 1133, 1136, 1139, 1142, 1145, 1148, 1151, 1154, 1157, 1160, 1163, 1166, 1169, 1172, 1175, 1178, 1181, 1184, 1187, 1190, 1193, 1196, 1199, 1202, 1205, 1208, 1211, 1214, 1217, 1220, 1223, 1226, 1229, 1232, 1235, 1238, 1241, 1244, 1247, 1250, 1253, 1256, 1259, 1262, 1265, 1268, 1271, 1274, 1277, 1280, 1283, 1286, 1289, 1292, 1295, 1298, 1301, 1304, 1307, 1310, 1313, 1316, 1319, 1322, 1325, 1328, 1331, 1334, 1337, 1340, 1343, 1346, 1349, 1352, 1355, 1358, 1361, 1364, 1367, 1370, 1373, 1376, 1379, 1382, 1385, 1388, 1391, 1394, 1397, 1400, 1403, 1406, 1409, 1412, 1415, 1418, 1421, 1424, 1427, 1430, 1433, 1436, 1439, 1442, 1445, 1448, 1451, 1454, 1457, 1460, 1463, 1466, 1469, 1472, 1475, 1478, 1481, 1484, 1487, 1490, 1493, 1496, 1499, 1502, 1505, 1508, 1511, 1514, 1517, 1520, 1523, 1526, 1529, 1532, 1535, 1538, 1541, 1544, 1547, 1550, 1553, 1556, 1559, 1562, 1565, 1568, 1571, 1574, 1577, 1580, 1583, 1586, 1589, 1592, 1595, 1598, 1601, 1604, 1607, 1610, 1613, 1616, 1619, 1622, 1625, 1628, 1631, 1634, 1637, 1640, 1643, 1646, 1649, 1652, 1655, 1658, 1661, 1664, 1667, 1670, 1673, 1676, 1679, 1682, 1685, 1688, 1691, 1694, 1697, 1700, 1703, 1706, 1709, 1712, 1715, 1718, 1721, 1724, 1727, 1730, 1733, 1736, 1739, 1742, 1745, 1748, 1751, 1754, 1757, 1760, 1763, 1766, 1769, 1772, 1775, 1778, 1781, 1784, 1787, 1790, 1793, 1796, 1799, 1802, 1805, 1808, 1811, 1814, 1817, 1820, 1823, 1826, 1829, 1832, 1835, 1838, 1841, 1844, 1847, 1850, 1853, 1856, 1859, 1862, 1865, 1868, 1871, 1874, 1877, 1880, 1883, 1886, 1889, 1892, 1895, 1898, 1901, 1904, 1907, 1910, 1913, 1916, 1919, 1922, 1925, 1928, 1931, 1934, 1937, 1940, 1943, 1946, 1949, 1952, 1955, 1958, 1961, 1964, 1967, 1970, 1973, 1976, 1979, 1982, 1985, 1988, 1991, 1994, 1997, 2000, 2003, 2006, 2009, 2012, 2015, 2018, 2021, 2024, 2027, 2030, 2033, 2036, 2039, 2042, 2045, 2048, 2051, 2054, 2057, 2060, 2063, 2066, 2069, 2072, 2075, 2078, 2081, 2084, 2087, 2090, 2093, 2096, 2099, 2102, 2105, 2108, 2111, 2114, 2117, 2120, 2123, 2126, 2129, 2132, 2135, 2138, 2141, 2144, 2147, 2150, 2153, 2156, 2159, 2162, 2165, 2168, 2171, 2174, 2177, 2180, 2183, 2186, 2189, 2192, 2195, 2198, 2201, 2204, 2207, 2210, 2213, 2216, 2219, 2222, 2225, 2228, 2231, 2234, 2237, 2240, 2243, 2246, 2249, 2252, 2255, 2258, 2261, 2264, 2267, 2270, 2273, 2276, 2279, 2282, 2285, 2288, 2291, 2294, 2297, 2300, 2303, 2306, 2309, 2312, 2315, 2318, 2321, 2324, 2327, 2330, 2333, 2336, 2339, 2342, 2345, 2348, 2351, 2354, 2357, 2360, 2363, 2366, 2369, 2372, 2375, 2378, 2381, 2384, 2387, 2390, 2393, 2396, 2399, 2402, 2405, 2408, 2411, 2414, 2417, 2420, 2423, 2426, 2429, 2432, 2435, 2438, 2441, 2444, 2447, 2450, 2453, 2456, 2459, 2462, 2465, 2468, 2471, 2474, 2477, 2480, 2483, 2486, 2489, 2492, 2495, 2498, 2501, 2504, 2507, 2510, 2513, 2516, 2519, 2522, 2525, 2528, 2531, 2534, 2537, 2540, 2543, 2546, 2549, 2552, 2555, 2558, 2561, 2564, 2567, 2570, 2573, 2576, 2579, 2582, 2585, 2588, 2591, 2594, 2597, 2600, 2603, 2606, 2609, 2612, 2615, 2618, 2621, 2624, 2627, 2630, 2633, 2636, 2639, 2642, 2645, 2648, 2651, 2654, 2657, 2660, 2663, 2666, 2669, 2672, 2675, 2678, 2681, 2684, 2687, 2690, 2693, 2696, 2699, 2702, 2705, 2708, 2711, 2714, 2717, 2720, 2723, 2726, 2729, 2732, 2735, 2738, 2741, 2744, 2747, 2750, 2753, 2756, 2759, 2762, 2765, 2768, 2771, 2774, 2777, 2780, 2783, 2786, 2789, 2792, 2795, 2798, 2801, 2804, 2807, 2810, 2813, 2816, 2819, 2822, 2825, 2828, 2831, 2834, 2837, 2840, 2843, 2846, 2849, 2852, 2855, 2858, 2861, 2864, 2867, 2870, 2873, 2876, 2879, 2882, 2885, 2888, 2891, 2894, 2897, 2900, 2903, 2906, 2909, 2912, 2915, 2918, 2921, 2924, 2927, 2930, 2933, 2936, 2939, 2942, 2945, 2948, 2951, 2954, 2957, 2960, 2963, 2966, 2969, 2972, 2975, 2978, 2981, 2984, 2987, 2990, 2993, 2996, 2999, 3002, 3005, 3008, 3011, 3014, 3017, 3020, 3023, 3026, 3029, 3032, 3035, 3038, 3041, 3044, 3047, 3050, 3053, 3056, 3059, 3062, 3065, 3068, 3071, 3074, 3077, 3080, 3083, 3086, 3089, 3092, 3095, 3098, 3101, 3104, 3107, 3110, 3113, 3116, 3119, 3122, 3125, 3128, 3131, 3134, 3137, 3140, 3143, 3146, 3149, 3152, 3155, 3158, 3161, 3164, 3167, 3170, 3173, 3176, 3179, 3182, 3185, 3188, 3191, 3194, 3197, 3200, 3203, 3206, 3209, 3212, 3215, 3218, 3221, 3224, 3227, 3230, 3233, 3236, 3239, 3242, 3245, 3248, 3251, 3254, 3257, 3260, 3263, 3266, 3269, 3272, 3275, 3278, 3281, 3284, 3287, 3290, 3293, 3296, 3299, 3302, 3305, 3308, 3311, 3314, 3317, 3320, 3323, 3326, 3329, 3332, 3335, 3338, 3341, 3344, 3347, 3350, 3353, 3356, 3359, 3362, 3365, 3368, 3371, 3374, 3377, 3380, 3383, 3386, 3389, 3392, 3395, 3398, 3401, 3404, 3407, 3410, 3413, 3416, 3419, 3422, 3425, 3428, 3431, 3434, 3437, 3440, 3443, 3446, 3449, 3452, 3455, 3458, 3461, 3464, 3467, 3470, 3473, 3476, 3479, 3482, 3485, 3488, 3491, 3494, 3497, 3500, 3503, 3506, 3509, 3512, 3515, 3518, 3521, 3524, 3527, 3530, 3533, 3536, 3539, 3542, 3545, 3548, 3551, 3554, 3557, 3560, 3563, 3566, 3569, 3572, 3575, 3578, 3581, 3584, 3587, 3590, 3593, 3596, 3599, 3602, 3605, 3608, 3611, 3614, 3617, 3620, 3623, 3626, 3629, 3632, 3635, 3638, 3641, 3644, 3647, 3650, 3653, 3656, 3659, 3662, 3665, 3668, 3671, 3674, 3677, 3680, 3683, 3686, 3689, 3692, 3695, 3698, 3701, 3704, 3707, 3710, 3713, 3716, 3719, 3722, 3725, 3728, 3731, 3734, 3737, 3740, 3743, 3746, 3749, 3752, 3755, 3758, 3761, 3764, 3767, 3770, 3773, 3776, 3779, 3782, 3785, 3788, 3791, 3794, 3797, 3800, 3803, 3806, 3809, 3812, 3815, 3818, 3821, 3824, 3827, 3830, 3833, 3836, 3839, 3842, 3845, 3848, 3851, 3854, 3857, 3860, 3863, 3866, 3869, 3872, 3875, 3878, 3881, 3884, 3887, 3890, 3893, 3896, 3899, 3902, 3905, 3908, 3911, 3914, 3917, 3920, 3923, 3926, 3929, 3932, 3935, 3938, 3941, 3944, 3947, 3950, 3953, 3956, 3959, 3962, 3965, 3968, 3971, 3974, 3977, 3980, 3983, 3986, 3989, 3992, 3995, 3998, 4001, 4004, 4007, 4010, 4013, 4016, 4019, 4022, 4025, 4028, 4031, 4034, 4037, 4040, 4043, 4046, 4049, 4052, 4055, 4058, 4061, 4064, 4067, 4070, 4073, 4076, 4079, 4082, 4085, 4088, 4091, 4094, 4097, 4100, 4103, 4106, 4109, 4112, 4115, 4118, 4121, 4124, 4127, 4130, 4133, 4136, 4139, 4142, 4145, 4148, 4151, 4154, 4157, 4160, 4163, 4166, 4169, 4172, 4175, 4178, 4181, 4184, 4187, 4190, 4193, 4196, 4199, 4202, 4205, 4208, 4211, 4214, 4217, 4220, 4223, 4226, 4229, 4232, 4235, 4238, 4241, 4244, 4247, 4250, 4253, 4256, 4259, 4262, 4265, 4268, 4271, 4274, 4277, 4280, 4283, 4286, 4289, 4292, 4295, 4298, 4301, 4304, 4307, 4310, 4313, 4316, 4319, 4322, 4325, 4328, 4331, 4334, 4337, 4340, 4343, 4346, 4349, 4352, 4355, 4358, 4361, 4364, 4367, 4370, 4373, 4376, 4379, 4382, 4385, 4388, 4391, 4394, 4397, 4400, 4403, 4406, 4409, 4412, 4415, 4418, 4421, 4424, 4427, 4430, 4433, 4436, 4439, 4442, 4445, 4448, 4451, 4454, 4457, 4460, 4463, 4466, 4469, 4472, 4475, 4478, 4481, 4484, 4487, 4490, 4493, 4496, 4499, 4502, 4505, 4508, 4511, 4514, 4517, 4520, 4523, 4526, 4529, 4532, 4535, 4538, 4541, 4544, 4547, 4550, 4553, 4556, 4559, 4562, 4565, 4568, 4571, 4574, 4577, 4580, 4583, 4586, 4589, 4592, 4595, 4598, 4601, 4604, 4607, 4610, 4613, 4616, 4619, 4622, 4625, 4628, 4631, 4634, 4637, 4640, 4643, 4646, 4649, 4652, 4655, 4658, 4661, 4664, 4667, 4670, 4673, 4676, 4679, 4682, 4685, 4688, 4691, 4694, 4697, 4700, 4703, 4706, 4709, 4712, 4715, 4718, 4721, 4724, 4727, 4730, 4733, 4736, 4739, 4742, 4745, 4748, 4751, 4754, 4757, 4760, 4763, 4766, 4769, 4772, 4775, 4778, 4781, 4784, 4787, 4790, 4793, 4796, 4799, 4802, 4805, 4808, 4811, 4814, 4817, 4820, 4823, 4826, 4829, 4832, 4835, 4838, 4841, 4844, 4847, 4850, 4853, 4856, 4859, 4862, 4865, 4868, 4871, 4874, 4877, 4880, 4883, 4886, 4889, 4892, 4895, 4898, 4901, 4904, 4907, 4910, 4913, 4916, 4919, 4922, 4925, 4928, 4931, 4934, 4937, 4940, 4943, 4946, 4949, 4952, 4955, 4958, 4961, 4964, 4967, 4970, 4973, 4976, 4979, 4982, 4985, 4988, 4991, 4994, 4997, 5000, 5003, 5006, 5009, 5012, 5015, 5018, 5021, 5024, 5027, 5030, 5033, 5036, 5039, 5042, 5045, 5048, 5051, 5054, 5057, 5060, 5063, 5066, 5069, 5072, 5075, 5078, 5081, 5084, 5087, 5090, 5093, 5096, 5099, 5102, 5105, 5108, 5111, 5114, 5117, 5120, 5123, 5126, 5129, 5132, 5135, 5138, 5141, 5144, 5147, 5150, 5153, 5156, 5159, 5162, 5165, 5168, 5171, 5174, 5177, 5180, 5183, 5186, 5189, 5192, 5195, 5198, 5201, 5204, 5207, 5210, 5213, 5216, 5219, 5222, 5225, 5228, 5231, 5234, 5237, 5240, 5243, 5246, 5249, 5252, 5255, 5258, 5261, 5264, 5267, 5270, 5273, 5276, 5279, 5282, 5285, 5288, 5291, 5294, 5297, 5300, 5303, 5306, 5309, 5312, 5315, 5318, 5321, 5324, 5327, 5330, 5333, 5336, 5339, 5342, 5345, 5348, 5351, 5354, 5357, 5360, 5363, 5366, 5369, 5372, 5375, 5378, 5381, 5384, 5387, 5390, 5393, 5396, 5399, 5402, 5405, 5408, 5411, 5414, 5417, 5420, 5423, 5426, 5429, 5432, 5435, 5438, 5441, 5444, 5447, 5450, 5453, 5456, 5459, 5462, 5465, 5468, 5471, 5474, 5477, 5480, 5483, 5486, 5489, 549

8, 311, 314, 317, 320, 323, 326, 329, 332, 335, 338, 341, 344, 347- 一百一十六氧杂三百五十烷-349-基) 氮烷二基) 双(亚甲基) 双磷酸四(十八烷基) 酯化学式: $C_{305}H_{615}NO_{121}P_2$, 准确质量: 6291.15, 分子量: 6295.03g/mol。

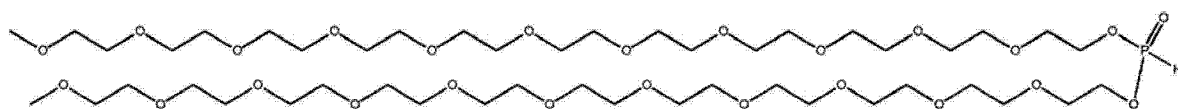
[0229]



[0230] 实施例 9

[0231] 磷酸二(2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32- 十一氧杂三十四烷-34-基) 酯

[0232]

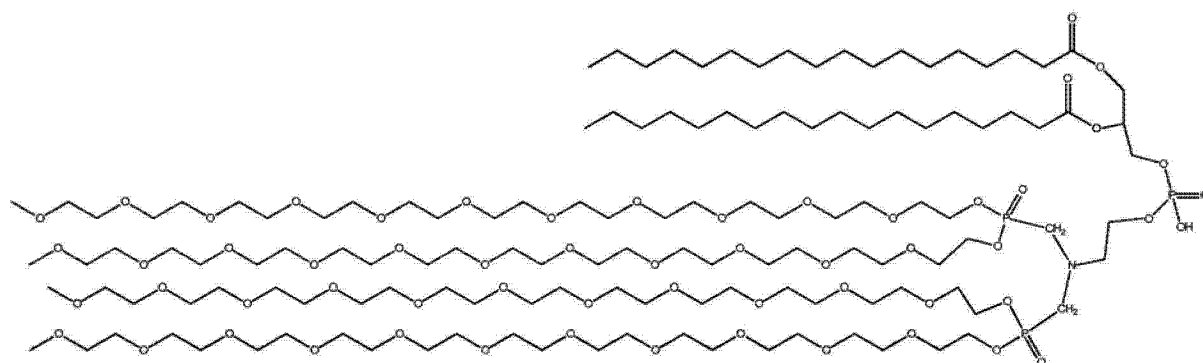


[0233] 将 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32- 十一氧杂三十四烷-34-醇 (2.00g, 3.87mmol) 溶于圆底烧瓶的甲苯中。通过共沸蒸馏干燥该溶液。然后除去残余甲苯。然后加入吡啶 (0.092g, 1.16mmol) 和二苯基亚磷酸酯 (0.45g, 1.94mmol)。在 65℃ 加热混合物 16 小时。将反应混合物冷却至室温, 溶于 15mL 二氯甲烷中, 并与 3.0g Dowex WBA 树脂搅拌 30 分钟。从该树脂珠过滤二氯甲烷溶液, 并蒸发挥发物得到黄色油状物。将油状物溶于 1, 2, 4- 三甲基苯, 并在减压下除去挥发物, 共沸除去苯酚副产物。得到预期产物 (1.34g) 的油状物。HRMS: 计算值: $(M+2Na)/2 = 562.2842$, $(M+Na) = 1101.5792$, 实测值: $(M+2Na)/2 = 562.2818$, $(M+Na) = 1101.5751$ 。 ^{31}P NMR: 9.22ppm。 1H NMR、 ^{13}C NMR 和 ^{13}C APT NMR 与结构一致。化学式: $C_{46}H_{95}NO_{25}P$, 分子量: 1078.59g/mol。

[0234] 实施例 10

[0235] 3-(((2-(双((二(2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32- 十一氧杂三十四烷-34-基) 磷酰基) 甲基) 氨基) 乙氧基) (羟基) 磷酰基) 氧基) 丙烷-1, 2-二基二硬脂酸酯

[0236]



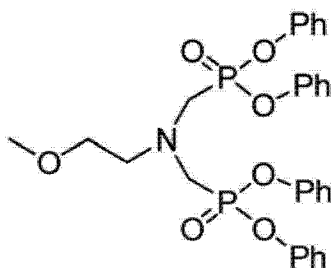
[0237] 向闪烁瓶中加入 DSPE(1, 2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺, 0.45g, 0.60mmol)、实施例 9 中制备的磷酸二(2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32- 十一

氧杂三十四-34-基)酯(1.34g, 1.24mmol)、多聚甲醛(0.054g, 1.81mmol 甲醛)和二甲基甲酰胺(2.0mL)。盖上该瓶,并在75℃加热24小时。取出反应混合物并溶解于甲醇中,经Dowex WBA树脂(1.0g)处理。从该树脂珠过滤甲醇溶液,并除去溶剂得到黄色油状物。将该油状物溶于15mL80/20水/异丙醇中,并通过装载Grace Vydac Protein C-4反相填料的柱进行色谱处理,使用水/异丙醇作为洗脱剂。将所得级分冰冻并冻干,得到0.337g目标化合物的白色粉末。LRMS实测值:(M+2H)/2 = 1465, (M+2Na)/2 = 1487, (M+3H)/3 = 977。HRMS:计算值:(M-H) 2927.7505,实测值:(M-H) 2927.7570。³¹P NMR实测值25.96ppm和-0.21ppm。¹H NMR、¹³C NMR和¹³C APT NMR与结构一致。HPLC分析(ELSD)关于预期产物峰,实测值为99.8面积%。化学式:C₁₃₅H₂₇₂NO₅₈P₃,分子量:2928.76g/mol。

[0238] 实施例 11

[0239] (2-甲氧基乙基氮烷二基)双(亚甲基)双膦酸四苯基酯。化学式:C₂₉H₃₁NO₇P₂,准确质量:567.16,分子量567.51g/mol。

[0240]

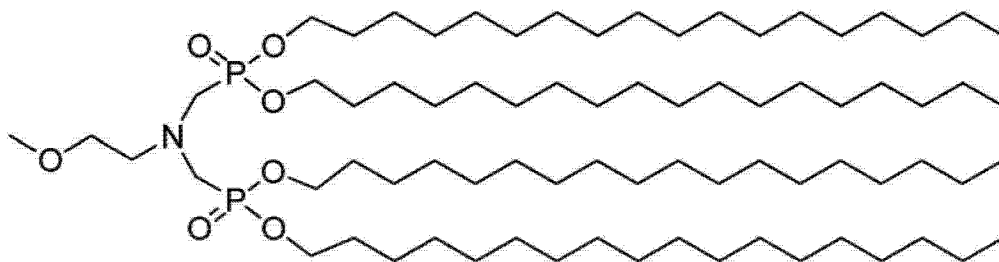


[0241] 通过以下操作制备该化合物。将2-甲氧基乙基胺(3g,40mmol;3.44mL)与甲醛(2.4g;320mmol,6.5mL,37%的水溶液)和二甲基甲酰胺(DMF)(30mL)混合。向该混合物中缓慢加入二苯基亚磷酸酯(DPP)(20.6g,88mmol;2.2当量)。在短暂的初始放热反应之后,在室温搅拌该混合物12小时。HPLC指示完全反应,然后蒸发除去DMF。将残余物溶于乙酸乙酯(EA)(200mL)并用饱和KHSO₄和盐水洗涤。分离各层并且有机层经Na₂SO₄干燥,过滤,在真空下在旋转蒸发器上除去挥发物。将残余的油状物溶于EA/己烷混合物(1:4)中并通过二氧化硅填料(silica plug)过滤。然后用EA/己烷混合物(1:1)将产物从二氧化硅上洗脱。蒸发除去溶剂,得到15.6g(27mmol;69%)澄清油状物。LC/MS:MH⁺ = 568.2¹H和³¹P NMR与结构一致。

[0242] 实施例 12

[0243] (2-甲氧基乙基氮烷二基)双(亚甲基)双膦酸四(十八烷基)酯。化学式:C₇₇H₁₅₉NO₇P₂,准确质量:1272.16,分子量:1273.04g/mol。

[0244]



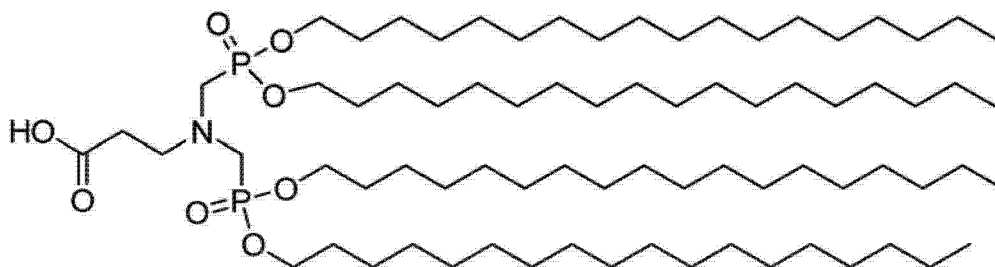
[0245] 除了使用氢膦酸双十四烷基酯代替二苯基亚磷酸酯(DPP)外,使用基本上与实施

例 11 相同的操作制备该分子,并且该反应如实施例 5 中在无 DMF 溶剂(即,无溶剂)条件下使用反应瓶(10mL)和聚四氟乙烯涂布的旋转叶片根据实施例 5 中所述的处理和分离操作进行。

[0246] 实施例 13

[0247] 3-(双((双(十八烷基氧基)磷酰基)甲基)氨基)丙酸。化学式: $C_{77}H_{157}NO_8P_2$, 准确质量:1286.14, 分子量 1287.02g/mol。

[0248]

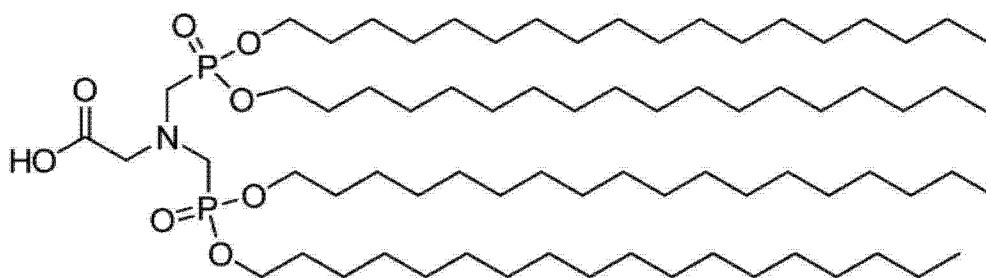


[0249] 如下制备该化合物:在 80℃在耐压瓶中,磷酸双十八烷基酯(5.87g, 10mmol)与 β -丙氨酸(0.45g, 5mmol)和甲醛(6mL, 37%的水溶液)在 DMF(20mL)中在搅拌下反应 2 天。除去反应混合物并小心蒸发挥发物,将残余物溶于 $CHCl_3$ (200mL)中。有机层经 10% $KHSO_4$ 和盐水(各 50mL)洗涤。有机层经 $MgSO_4$ 干燥、过滤并蒸发获得油状物。在搅拌数小时后,将剩余的油状物与约 100mL 丙酮混合,滤除白色的细沉淀。产量:5.4g(4.2mmol;84%)粗产物。 ^{31}P NMR 24.503ppm。HRMS: 计算值 MH^+ 1287.1384;实测值 MH^+ = 1287.1477。

[0250] 实施例 14

[0251] 2-(双((双(十八烷基氧基)磷酰基)甲基)氨基)乙酸。化学式: $C_{76}H_{155}NO_8P_2$, 准确质量:1272.12, 分子量:1272.99g/mol。

[0252]

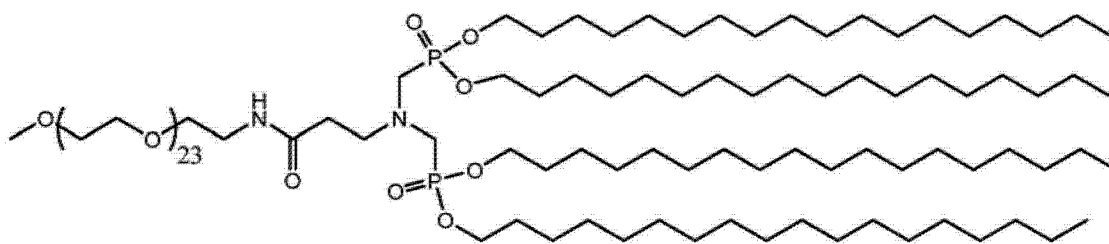


[0253] 类似于实施例 13,通过使磷酸双十八烷基酯与甘氨酸和甲醛在 DMF 中反应制备该化合物。以实施例 13 中所示类似的方式分离该产物。通过 ^{31}P NMR 和 HRMS 确认结构。

[0254] 实施例 15

[0255] (78-甲基-75-氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-二十四氧杂-74,78-二氮杂七十九烷-79-基)双(亚甲基)双磷酸四(十八烷基)酯。化学式: $C_{126}H_{256}N_2O_{31}P_2$, 分子量:2357.32g/mol。

[0256]

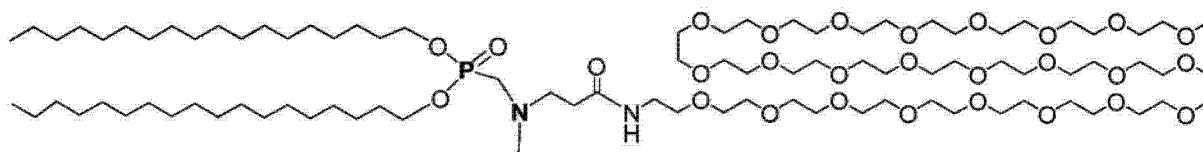


[0257] 3-(双((双(十八烷基氧基)磷酰基)甲基)氨基)丙酸(128mg, 0.1mmol)与 m-dPEG₂₄-胺(108mg, 0.1mmol)在TBTU(O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸盐)(48mg, 0.15mmol)和DIPEA(N,N-二异丙基乙基胺)(0.175mL)存在下在DCM(20mL)中发生偶联。(见图8)。在室温搅拌12小时后,该混合物经二氯甲烷(DCM)(100mL)稀释并经10% KHSO₄和盐水洗涤。DCM溶液经Na₂SO₄干燥、过滤,蒸发溶剂得到220mg澄清油状物(粗物质),其可通过C4, 300A RP-HPLC纯化并冻干得到预期产物。MS:M+Na⁺ = 2, 379.73且³¹P NMR与结构一致。

[0258] 实施例16

[0259] (78-甲基-75-氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-二十四氧杂-74,78-二氮杂七十九烷-79-基)磷酸双十八烷基酯(C₁₈/N-甲基β-丙氨酸/PEG₁₀₀₀)。化学式:C₉₀H₁₈₃N₂O₂₈P,准确质量:1771.27,分子量:1772.39g/mol。

[0260]

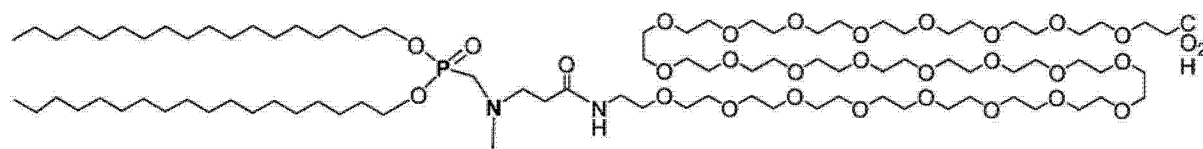


[0261] 可使用基本上与实施例15中所列的相同的反应条件和纯化操作,通过实施例13中形成的3-(双((双(十八烷基氧基)磷酰基)甲基)氨基)丙酸与m-dPEG₂₄-胺在TBTU存在下反应合成该化合物。

[0262] 实施例17

[0263] (78-羧基-75-氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-二十四氧杂-74,78-二氮杂七十九烷-79-基)磷酸双十八烷基酯(C₁₈/N-甲基β-丙氨酸/PEG₁₀₀₀羧酸酯)。化学式:C₉₂H₁₈₅N₂O₃₀P,准确质量:1829.27,分子量:1830.42g/mol。

[0264]

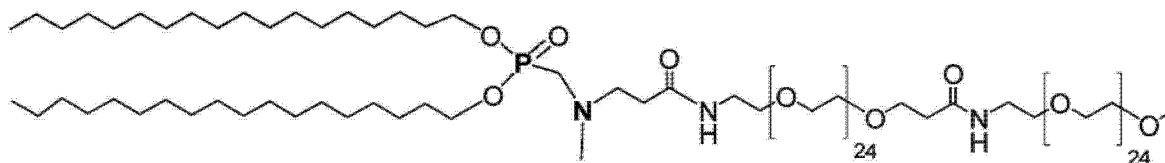


[0265] 可使用基本上与实施例15中所列的相同的反应条件和纯化操作,通过实施例13中形成的3-(双((双(十八烷基氧基)磷酰基)甲基)氨基)丙酸与氨基-PEG₂₄-羧酸酯在TBTU存在下反应获得酯而合成该化合物。可在碱性或酸性条件下实现将该酯水解成酸,并通过C4反相HPLC分离该产物羧酸酯,合并各级分并冻干,获得基本上纯的产物。

[0266] 实施例 18

[0267] 158- 甲基 -77, 155- 二氧化 -2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 73, 80, 82, 85, 88, 91, 94, 97, 100, 103, 106, 109, 112, 115, 118, 121, 124, 127, 130, 133, 136, 139, 142, 145, 148, 151- 五十氧杂 -76, 154, 158- 三氮杂一百五十九烷 -159- 基磷酸双十八烷基酯 (C_{18}/N - 甲基 β - 丙氨酸 /PEG₁₀₀₀ 酰胺连接的 PEG₁₀₀₀)

[0268]

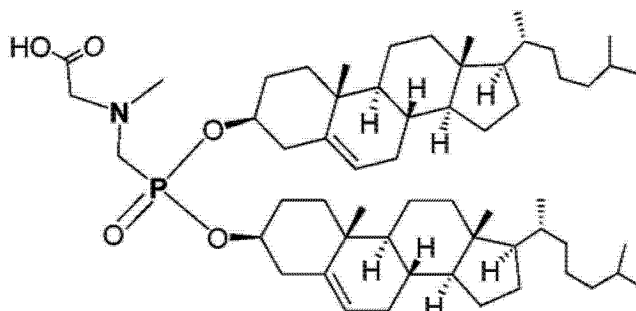


[0269] 可使用基本上与实施例 15 中相同的偶联操作和纯化方案,通过取得实施例 15 的产物并将其与氨基 -PEG OMe (1000MW) 反应制备该化合物。

[0270] 实施例 19

[0271] 2-(((双((3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-10, 13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基氧基)磷酸基)甲基)(甲基)氨基)乙酸(二胆固醇/肌氨酸)。化学式: $C_{58}H_{98}NO_5P$, 准确质量: 919.72, 分子量: 920.38g/mol。

[0272]

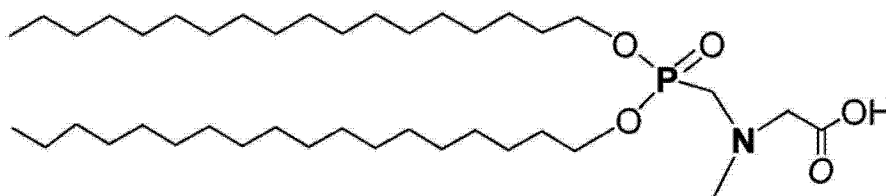


[0273] 如下制备该化合物: 在 75℃, 氢磷酸二胆固醇基酯 (5.0g, 0.006mol) 与肌氨酸 (0.54g, 0.006mol) 和甲醛 (2.2g, 0.03mol) 在 DMF 中以非均质混合物形式反应。在 75℃ 4 小时后, 9% 转化成预期的二胆固醇磷酸基甲基肌氨酸。加入另一份甲醛 (2.2g, 0.03mol) 并将反应温度升高至 85℃。在 85℃ 16 小时后, 55% 转化成预期的 2-(((双((3S, 8S, 10R, 13R, 17R)-10, 13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基氧基)磷酸基)甲基)(甲基)氨基)乙酸, 经冷却后从该反应混合物沉淀出黄色固体。通过过滤分离产物(黄色固体)并通过 ^{31}P NMR (22.5ppm) 确认该产物。使用 95% 氯仿 /5% MeOH 在硅胶 (15g) 上纯化粗品二胆固醇肌氨酸 (700mg)。

[0274] 实施例 20

[0275] 2-(((双(十八烷基氧基)磷酸基)甲基)(甲基)氨基)乙酸 ($C_{18}/$ 肌氨酸)。化学式: $C_{40}H_{82}NO_5P$, 准确质量: 687.59, 分子量: 688.06g/mol。

[0276]

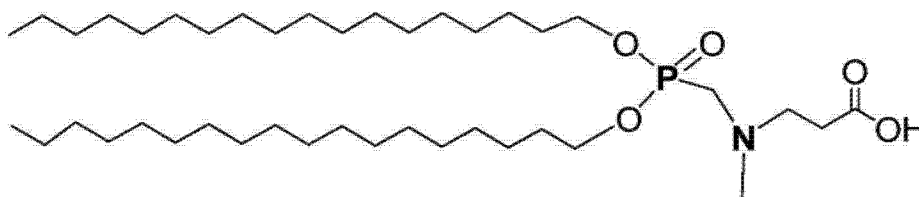


[0277] 如下制备该化合物：在 75℃，向配备有机械搅拌器和热电偶的圆底烧瓶（250mL）中加入含氢膦酸双十八烷基酯（1.98g, 0.003mol）、肌氨酸（0.30g, 0.003mol）和甲醛（1.1g, 0.013mol）的 N,N-二甲基甲酰胺（50mL）。2 小时后，通过 ^{31}P NMR (24.4ppm) 观察到 76% 转化成 2-(((双(十八烷基氧基)磷酰基)(甲基)氨基)乙酸。允许反应在 75℃ 继续进行另外的 4 小时，得到 88.5% 的转化。此时，将该反应混合物冷却至环境温度并得到浅橙色浆液。加入水（50mL）并在环境温度搅拌该混合物额外的 30 分钟。通过过滤分离产物为浅橙色固体。在 30-40℃ 在烘箱中过夜干燥该固体（2.0g）。通过 ^{31}P NMR (24.3ppm) 确认所分离的固体中二足 C18 肌氨酸的最终纯度为 81.3%。HPLC-MS (689.6mH⁺)。 ^{13}C 和 ^1H NMR 与所指定的结构一致。

[0278] 实施例 21

[0279] 3-(((双(十八烷基氧基)磷酰基)甲基)(甲基)氨基)丙酸 (C₁₈/N-甲基 β-丙氨酸)。化学式：C₄₁H₈₄N₂O₅P，准确质量：701.61，分子量：702.08g/mol。

[0280]

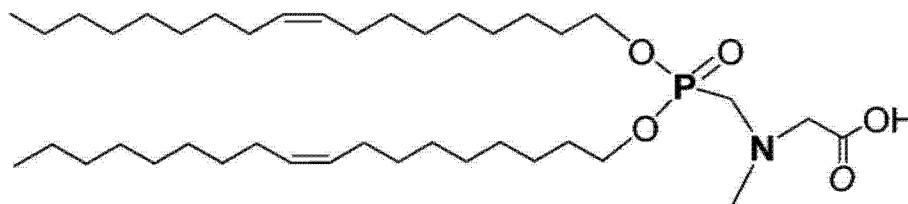


[0281] 除使用甲基 β-丙氨酸代替肌氨酸外，使用基本上与实施例 20 中相同的操作，制备本化合物。在 C4 反相 HPLC 纯化和分离后，得到预期的 MS 和 ^{31}P NMR。

[0282] 实施例 22

[0283] 2-(((双((Z)-十八碳-9-烯基氧基)磷酰基)甲基)(甲基)氨基)乙酸 (C₁₈ 油基 / 肌氨酸)。化学式：C₄₀H₇₈N₂O₅P，准确质量：683.56，分子量：684.02g/mol。

[0284]

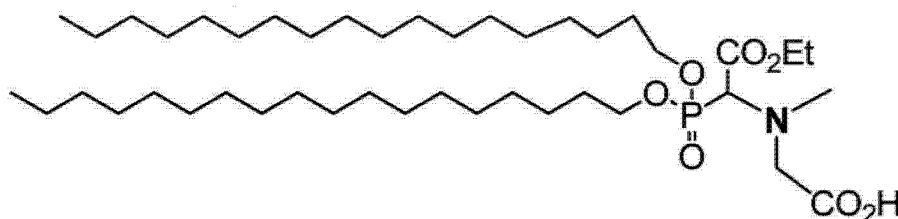


[0285] 如下制备该化合物：在 75℃，向配备有机械搅拌器和热电偶的圆底烧瓶（250mL）中加入含氢膦酸二油基酯（1.96g, 0.003mol）、肌氨酸（0.30g, 0.003mol）和甲醛（1.1g, 0.013mol）的 N,N-二甲基甲酰胺（50mL）。允许该反应在 75℃ 发生 4 小时。通过 ^{31}P NMR 约 24ppm 观测到约 89% 转化成预期的 2-(((双((Z)-十八碳-9-烯基氧基)磷酰基)(甲基)氨基)乙酸。将反应混合物过夜冷却至环境温度，然后蒸发得到油状物。通过 ^{13}C 和 ^1H NMR 以及 LCMS 确认产物。

[0286] 实施例 23

[0287] 2-((1-(双(十八烷基氧基)磷酸基)-3-乙氧基-3-氧代乙基)(甲基)氨基)乙酸。化学式: $C_{43}H_{86}NO_7P$, 准确质量:759.61419, 分子量:760.12g/mol。

[0288]

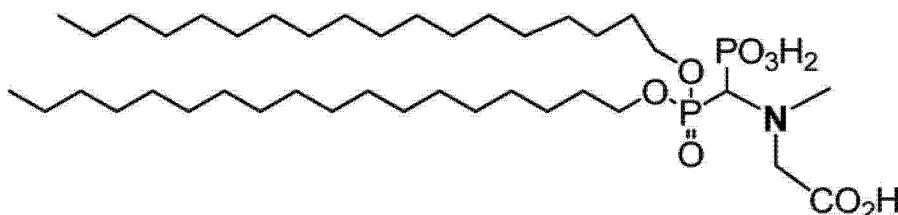


[0289] 在 25mL 圆底烧瓶中,在氩气氛下在 100 °C 搅拌含肌氨酸 (0.21g, 2.3mmol)、氢磷酸双十八烷基酯 (0.69g, 1.2mmol)、1-十八醇 (0.63g, 2.3mmol) 和乙醛酸乙酯 (0.36g, 1.8mmol) 的 4mL 甲苯和 4mL 二甲亚砜 16 小时。通过 ^{31}P NMR 检查 $CDCl_3$ 中的反应混合物,指示是否显著存在预期的产物 (24.8ppm)。通过正相快速色谱使用氯仿/含 5% 氢氧化铵的异丙醇梯度纯化该反应混合物,并获得预期的 2-((1-(双(十八烷基氧基)磷酸基)-3-乙氧基-3-氧代乙基)(甲基)氨基)乙酸。

[0290] 实施例 24

[0291] 2-(((双(十八烷基氧基)磷酸基)(磷酸基)甲基)(甲基)氨基)乙酸。化学式: $C_{40}H_{83}NO_8P_2$, 分子量:768.04g/mol。

[0292]



[0293] 除以类似的比例使用甲酰基磷酸 (Wagenknecht, J. H., Journal of the Electrochemical Society (1976), 123 (5), 620-4, US4568432, and W09850391) 替换乙醛酸乙酯外,可依照基本上与实施例 23 相同的操作制备标题化合物。

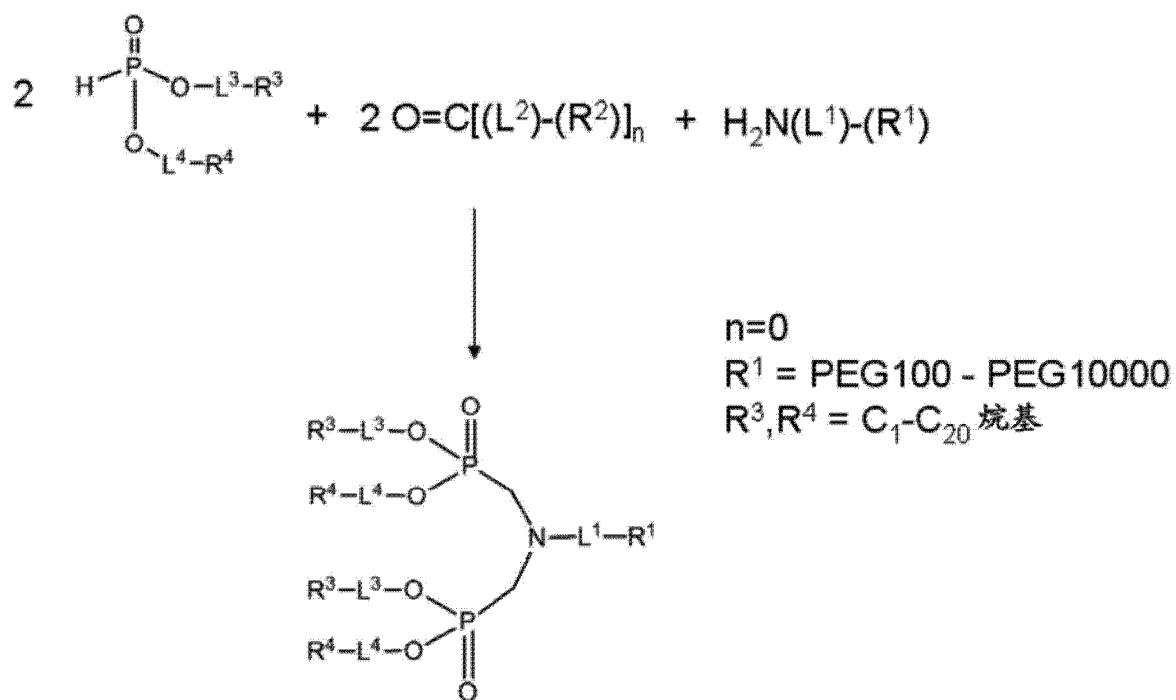


图 1

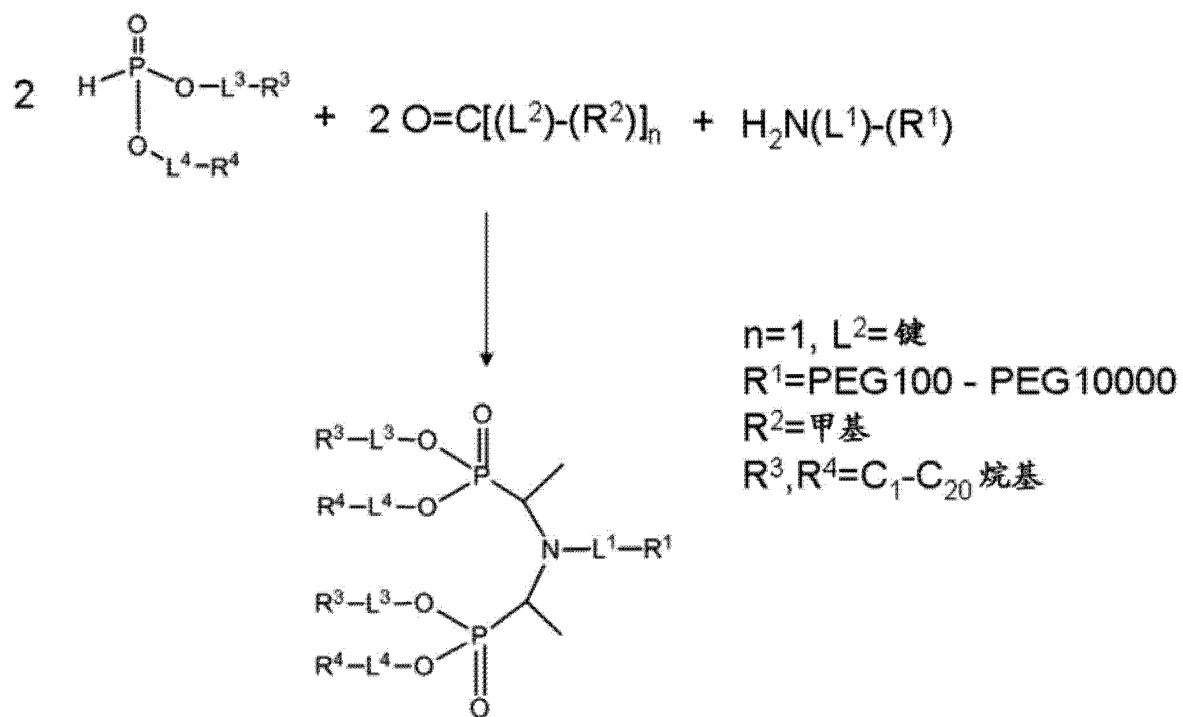


图 2

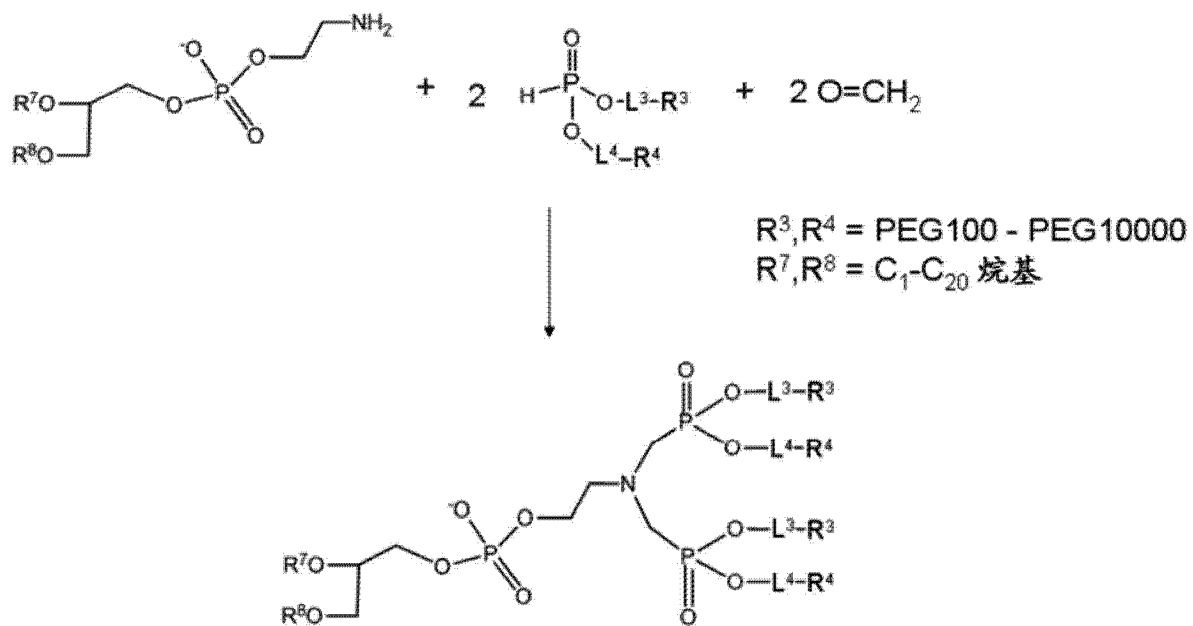


图 3

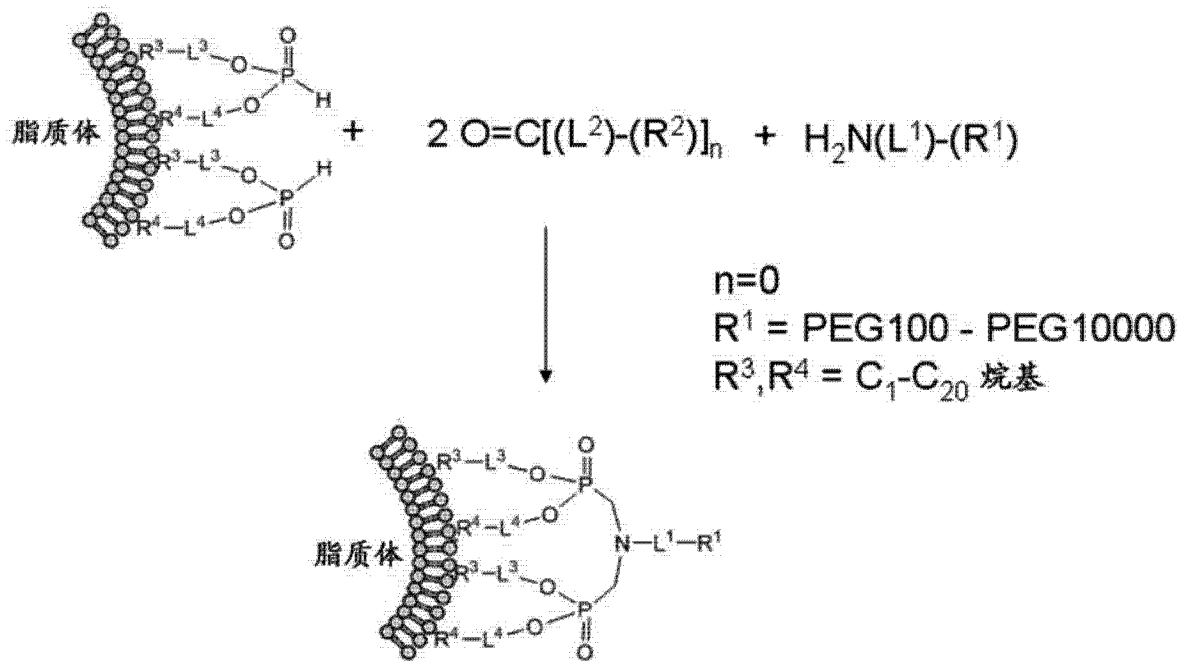


图 4

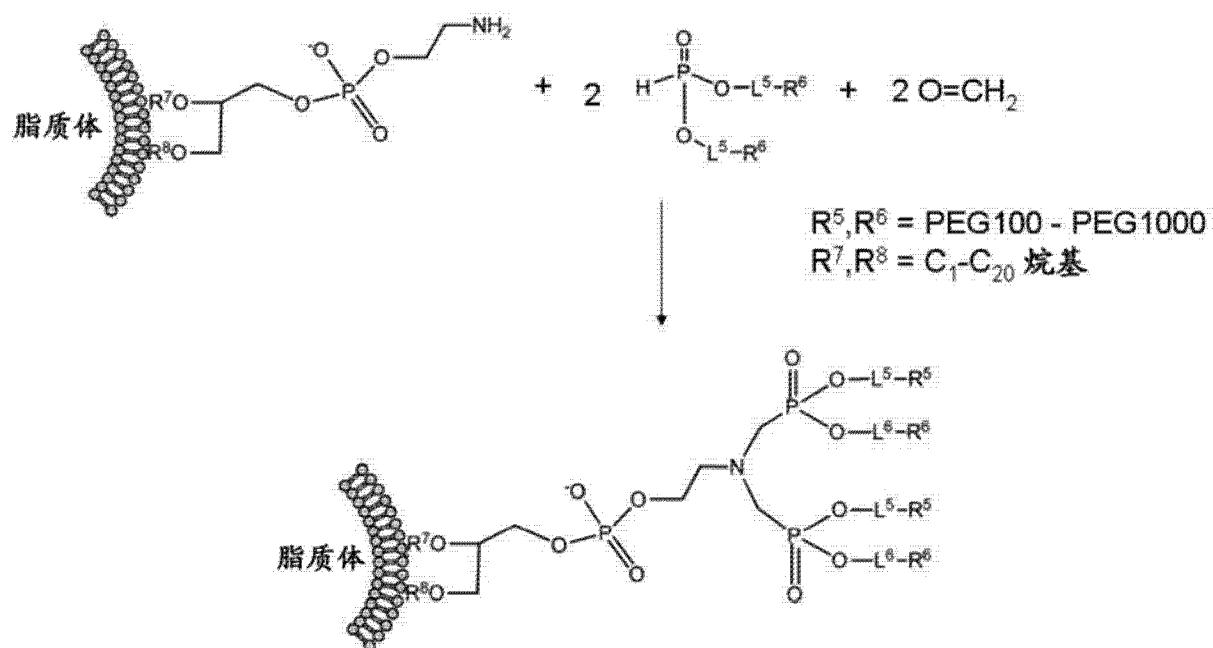


图 5

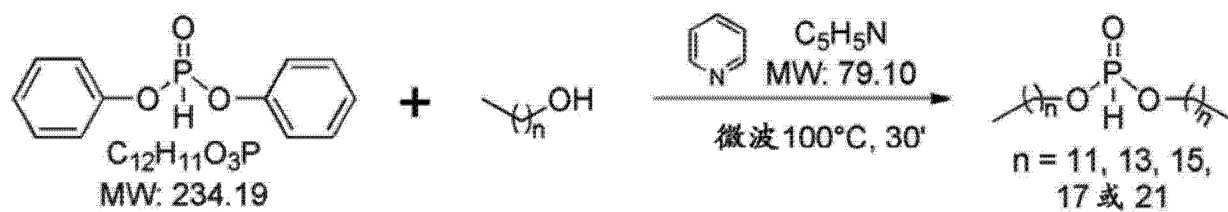


图 6

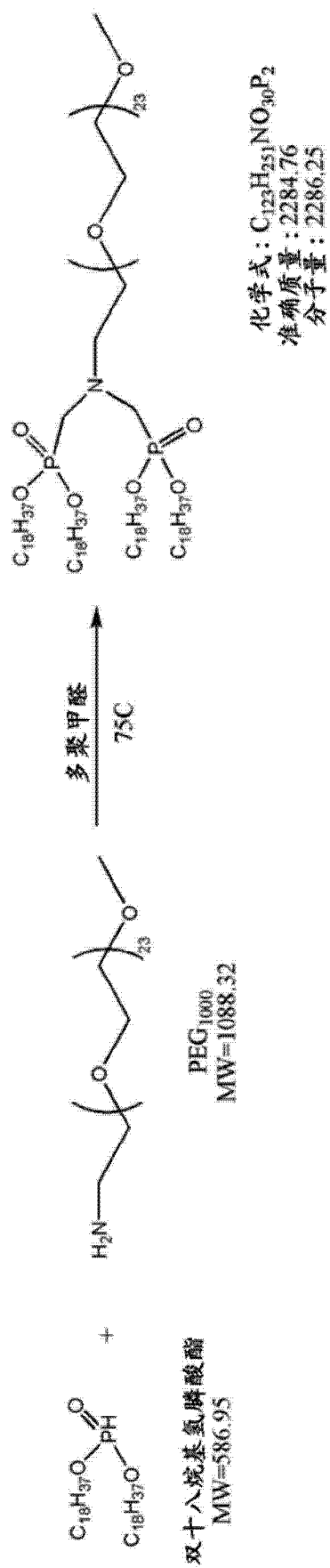


图 7

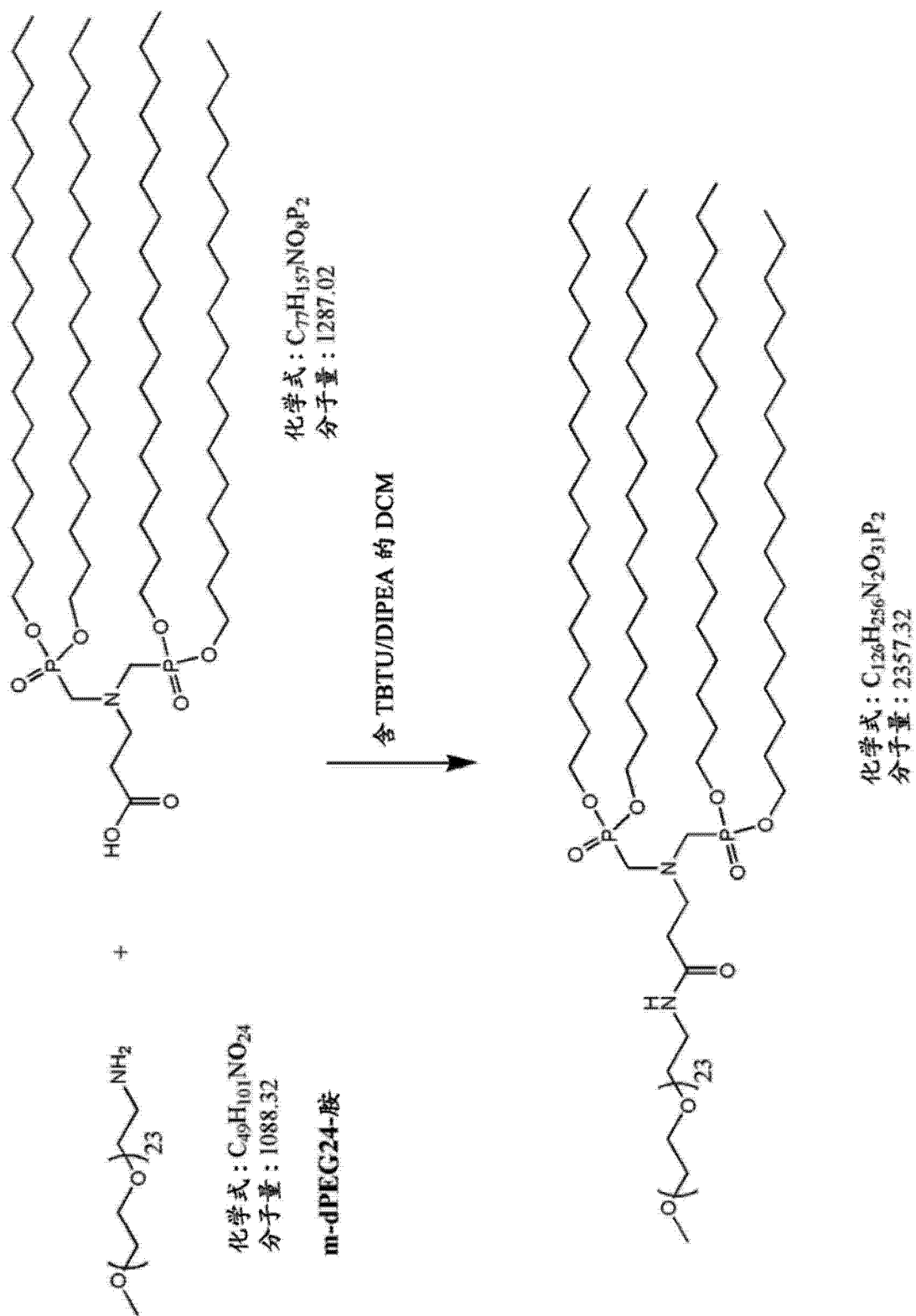


图 8