

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610112295.7

[51] Int. Cl.

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

C07J 9/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 2 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 100462103C

[22] 申请日 2006.9.1

[21] 申请号 200610112295.7

[73] 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

[72] 发明人 金义光 杜丽娜 邢磊 辛瑞

[56] 参考文献

WO9413324A1 1994.6.23

CN1634969A 2005.7.6

审查员 刘瑞华

权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 1 页

[54] 发明名称

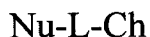
胆固醇基磷酸核苷类似物

[57] 摘要

本发明公开了一种胆固醇基磷酸核苷类似物，其结构为：Nu-L-Ch。其中 Nu 是核苷类似物基团，L 是磷酸基，Ch 是胆固醇基团。由上述胆固醇基磷酸核苷类似物可以形成高度分散的传递系统，包括脂质体、非离子表面活性剂泡囊、纳米粒和微乳，也可以形成自组装传递系统。



1. 一种胆固醇基磷酸核苷类似物，其特征是其结构为：



其中 Nu 是核苷类似物基团，L 是磷酸基，Ch 是胆固醇基团，其中核苷类似物选自阿昔洛韦、更昔洛韦、泛昔洛韦、喷昔洛韦、万乃洛韦、阿巴卡韦、利巴韦林、索利夫定、阿糖腺苷、齐多夫定、拉米夫定、去羟肌苷、扎西他滨、司他夫定、西多福韦、甲氨蝶呤、吉西他滨、卡培他滨、氟达拉滨、去氧氟尿苷、阿糖胞苷、阿扎胞苷。

2. 如权利要求 1 的胆固醇基磷酸核苷类似物，Nu、L 和 Ch 之间以酯键或酰胺键连接。

3. 如权利要求 1 的胆固醇基磷酸核苷类似物，其中 L 除与权利要求 1 中的 Nu 和 Ch 成酯或酰胺外，剩余一个羟基保留或继续酰化成酯或酰胺。

4. 如权利要求 1 的胆固醇基磷酸核苷类似物，其中 Nu 的原型分子是具有抗病毒或抗癌作用的药物。

5. 一种高度分散的传递系统，其特征是它包括权利要求 1 的胆固醇基磷酸核苷类似物，并且选自脂质体、非离子表面活性剂泡囊、纳米粒、微乳或自组装传递系统。

6. 如权利要求 5 的高度分散的传递系统，其中粒子直径小于 1 微米。

7. 如权利要求 5 的高度分散的传递系统，其中自组装传递系统的粒子组成中权利要求 1 的胆固醇基磷酸核苷类似物的量占全部组成成分分子摩尔比例在 50~100% 之间，其余为添加剂。

8. 如权利要求 7 的高度分散的传递系统，其中的添加剂选自脂质分子、表面活性剂。

9. 如权利要求 5 的高度分散的传递系统，其中自组装传递系统的粒子全部由权利要求 1 的胆固醇基磷酸核苷类似物组成。

胆固醇基磷酸核苷类似物

技术领域

本发明涉及化学和生物医药领域，特别涉及一种胆固醇基磷酸核苷类似物，由该化合物可以制备高度分散的传递系统，包括脂质体、非离子表面活性剂泡囊、纳米粒、微乳和自组装传递系统。

背景技术

核苷（Nucleosides）是生物体内的重要化学成分，由它衍生得到的核苷酸以及核酸是遗传信息的携带者。最重要的遗传物质 DNA 和 RNA 就是由核苷酸组装而成。核苷和核苷酸也参与生物体内许多重要的反应。自然界中的核苷由一个嘌呤或嘧啶碱基与一个五碳糖结合而成。碱基包括腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶，五碳糖为核糖和脱氧核糖，并由它们分别组成腺苷、鸟苷、胞苷和尿苷，以及脱氧腺苷、脱氧鸟苷、脱氧胞苷和脱氧胸苷。

核苷类似物（Nucleoside analogues, Nu）是一类重要的化学物质。它的结构特征与核苷类似。人们已经合成了多种核苷类似物，发现其中有许多具有药理活性，例如抗病毒作用、细胞毒作用、免疫抑制作用等。目前对核苷类似物活性的考查主要集中在抗病毒和抗癌方面。抗病毒的核苷类似物在体内经过病毒和人体细胞的激酶磷酸化作用后形成磷酸化核苷类似物，后者可通过各种途径抑制病毒。根据不同作用功能部位，它们可以分为 DNA 聚合酶抑制剂、DNA 还原酶抑制剂、胸苷激酶抑制剂、RNA 酶抑制剂、逆转录酶抑制剂等，临床上用于治疗疱疹病毒、巨细胞病毒、水痘病毒、流感病毒、肝

炎病毒、SARS 病毒、艾滋病毒（HIV）、脑炎病毒等感染。因为病毒的复制在细胞内完成，所以大多数抑制病毒复制增值过程的抗病毒药物需要进入细胞内才能发挥抗病毒作用。核苷类似物的水溶性一般较强，使得细胞内的核苷类物质不易渗出，这是由细胞维持生命本能决定的。同时外界的核苷类似物也较难进入细胞内部，即许多核苷类似物的细胞膜渗透性不好。因此许多核苷类似物药物口服生物利用度差，细胞内浓度小，影响了抗病毒作用的发挥，并且药物长期在细胞内保持低浓度还有可能使病毒产生耐药性（杨道锋，等. 抗病毒核苷类似物简介. 医药导报，2001,20(2):122；李子成，等. 核苷类抗病毒药物的研究进展. 化学研究与应用，2002,14(1):15）。艾滋病毒（HIV）在感染人体的初期，就往往已经进入淋巴系统和脑中，并进一步感染其它部位。而核苷类似物通常为水溶性，进入淋巴和脑都较困难，这也是艾滋病难治的原因之一（Yazdanlan M, et al. Blood-brain barrier properties of human immunodeficiency virus antiretrovirals. J Pharm Sci, 1999,88:950）。抗癌的核苷类似物一般是一种抗代谢物，通过抑制核酸的合成发挥细胞毒作用（Galmarini, et al. Nucleoside analogues and nucleobase in cancer treatment. Lancet, 2002,3:415）。同样它们也需要进入细胞内才能发挥作用。因此抗癌核苷类似物也存在生物利用度较低、穿越细胞膜和血脑屏障较难等问题。

人们设计了很多方法来解决核苷类似物的生物利用度和细胞摄取问题，例如合成前药和设计特殊的药物传递系统，其中脂溶性前药和脂质体给药系统比较引人注目。

药物的生物膜渗透性除了和生物膜本身性质及药物分子量有关外，药物的物理化学性质是主要影响因素。一般认为，适当增加药物的脂溶性可以增强生物膜渗透性。人们已经尝试合成核苷类似物脂溶性前药的方法来增加其生物利用度和细胞摄取。因为核苷类似物通常在非芳香环的脂肪链或环上连有羟基或氨基，人们往往利用这些羟基或氨基与脂肪链基团相连而获得脂溶

性前药。许多研究证明脂溶性增强的核苷类似物的生物利用度和细胞摄取增加，在淋巴系统和脑中的浓度一般也会提高。这些前药可以在细胞内经过酶的作用释放出原药而发挥抗病毒或抗癌作用（Yatvin MB, et al. Improved uptake and retention of lipophilic prodrug to improve treatment of HIV. *Adv Drug Del Rev*, 1999, 39: 165）。

这些脂溶性前药虽然增加了核苷类似物的脂溶性，但脂溶性较强的药物给药有一定困难。因为脂溶性药物不溶或难溶于水，使其一般制剂，如片剂和注射剂无法解决其在水溶液中的分散和溶解问题。药物一般需要以分子或高度分散状态的分子聚集体形式才能吸收和进入细胞。人体内的环境是水溶液形式，生物膜呈脂溶性，药物或药物传递系统需要在体内可以传输，并且多次穿越生物膜，才能达到细胞等作用靶部位。如果不溶性的脂溶性药物无法溶解或高度分散，那就无法有效地传递药物。

脂质体（Liposomes）是一种由磷脂双分子层构成的泡囊（Vesicles），是一种可以在水溶液中高度分散的传递系统，可以作为很多种药物的载体。它的高度分散性使其在体内具有靶向、缓释等效果，口服具有淋巴趋向性，较易携带药物穿越血脑屏障，容易通过融合、内吞等途径进入细胞内（Lasic DD and Papahadjopoulos D. Liposomes revisited. *Science*, 1995, 267:1275）。修饰后的磷脂组成的脂质体还可以有体内长循环、温度靶向、pH 靶向、磁靶向、主动靶向等功能。脂质体的局部（眼、鼻、皮肤）给药有生物相容性好、促进药物渗透的作用。脂质体还是生物化学和分子生物学研究领域中经常使用的一种转染试剂，现在还是基因治疗的一种重要载体（Kikuchi H, et al. Gene delivery using liposome technology. *J Control Release*, 1999, 62:269）。

脂质体泡囊的磷脂双分子层膜将内部包裹的水相和外部水相隔开，双分子层内呈疏水性。药物根据其物理化学性质的不同分别包裹在内水相或膜中。一般地，水溶性药物在内水相中；脂溶性药物在膜层中。脂质体的制备是磷

脂分子在水中自组装的过程，内外水相的体积比例不能很大。这些因素决定了大部分水溶性药物的包裹率较低（<50%），有时还会很低（5%），并且包裹的药物有渗漏到外水相的可能。如果有合适的脂溶性基团（如脂肪链），脂溶性药物分子就可插入到磷脂双分子层中，结合比较牢固，药物分子不容易脱掉，所以药物的包裹率较高。因此为了增加某些水溶性药物在脂质体中的包裹率，人们往往采用了制备成带有长脂肪链的脂溶性前体药物的方式（Gulati M, et al. Lipophilic drug derivatives in liposomes. *Int J Pharm*, 1998, 165: 129）。

目前合成的核苷类似物水溶性普遍较强，脂溶性较差，有的药物甚至水溶性和脂溶性都不好。因此它们的脂质体包裹率较低，往往无法达到给药浓度。如果在制备得到核苷类似物脂溶性前药的基础上，再制备成脂质体，可以增加包裹率，也同时具有了脂质体水溶液中高度分散性和脂溶性前药易渗透进入细胞的特点（Tong P, et al. Preparation and in viro antiviral activity of liposomes of lipophilic esters of acyclovir. *药学学报*, 1991, 27:15）。

非离子表面活性剂泡囊（Niosomes）是指某些非离子表面活性剂（如司盘 60）在一定条件下在水中自组装成泡囊结构，类似脂质体。它同样可以作为药物载体，具有类似脂质体的一些体内外特征。纳米粒（Nanoparticles）一般指是纳米级分散的固体粒子，由于其高度分散性，它作为药物载体有提高药物生物利用度、增强靶向性等特点。固体脂质纳米粒（SLN）采用人体相容的脂质材料作为主要辅料形成纳米粒，具有普通纳米粒的特点和生物相容性好的特点，近年来研究较多。微乳（Microemulsions）是指粒径在 100 纳米以下的乳滴组成的体系，可以将脂溶性药物包裹在乳滴中。由于其高度分散性，它作为药物载体同样有提高药物生物利用度、增强靶向性等特点。

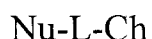
综上所述，将核苷类似物制备成脂溶性前药，并进一步制备成脂质体、非离子表面活性剂泡囊、纳米粒、微乳等水溶液中高度分散的制剂，有利于

发挥药效。

发明内容

本发明人发明了一种胆固醇基磷酰核苷类似物，其特征在于核苷类似物和胆固醇分子通过磷酰基连接，并且本发明人出乎意料地发现由上述胆固醇基磷酰核苷类似物可以方便地制备得到高度分散的传递系统。根据前面所述，具有高度分散状态并且脂溶性较强的药物容易在体内进行传递，并且生物膜渗透性好，具有靶向性。本发明因此首次设计并制备了具备上述功能的胆固醇基磷酰核苷类似物，并制备了其高度分散的传递系统。

本发明提供了一种胆固醇基磷酰核苷类似物，其特征是其结构为：



其中 Nu 是核苷类似物基团，L 是磷酰基，Ch 是胆固醇基团。

本发明涉及的胆固醇（Cholesterol）分子可以来源于提取和合成途径。

胆固醇分子中含有一个游离的羟基，一般采用适当的某种反应将胆固醇、磷酰基、核苷类似物三者结合，得到胆固醇基磷酰核苷类似物。反应可以先将磷酰基与胆固醇结合，再与核苷类似物结合，当然也可以将顺序颠倒。

本发明并不限制胆固醇基磷酰核苷类似物中 Nu、L 和 Ch 之间的连接方式，但优选的是以酯键或酰胺键连接。

本发明中的 Nu 的原型分子为核苷类似物，在分子结构特征方面一般含有活泼基团，如游离的羟基或氨基，优选的是在其非芳香环的脂肪链或环上连有羟基或氨基，更优选的是核苷类似物分子中的非芳香环的脂肪链或环上有一个以上的羟基，进一步优选的是非芳香环的脂肪链或环上有一个羟基。本发明所述的核苷类似物没有要求其具有特殊作用，但优选的是在作用方面具有药理活性的药物，更优选的是具有抗病毒或抗癌作用的药物。抗病毒的药物可以选自阿昔洛韦、更昔洛韦、泛昔洛韦、喷昔洛韦、万乃洛韦、阿巴卡

韦、利巴韦林、索利夫定、利巴韦林、阿糖腺苷、齐多夫定、拉米夫定、去羟肌苷、扎西他滨、司他夫定、西多福韦，优选的是阿昔洛韦、更昔洛韦、泛昔洛韦、喷昔洛韦、阿巴卡韦、利巴韦林、齐多夫定、拉米夫定、去羟肌苷、扎西他滨、司他夫定，更优选的是阿昔洛韦、阿巴卡韦、齐多夫定、拉米夫定、去羟肌苷、扎西他滨、司他夫定。抗癌的药物可以选自甲氨蝶呤、吉西他滨、卡培他滨、氟达拉滨、去氧氟尿苷、阿糖胞苷、阿扎胞苷。

本发明中的胆固醇基磷酰核苷类似物可通过在体内转化为核苷类似物或磷酰核苷类似物发挥药效。

本发明中的磷酰基 L 除与权利要求 1 中的 Nu 和 Ch 成酯或酰胺外，其剩余一个羟基可以保留或继续酰化成酯或酰胺；其中与磷酰基继续酰化的分子对象没有限制，但优选自分子量小于 500 的分子基团，更优选的是分子量小于 200 的分子基团；另外这些分子基团结构上没有限制，优选自短链脂肪醇或脂肪胺，更优选的是氨基酸；其中氨基酸又可选自异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、缬氨酸、精氨酸、组氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、谷氨酸、鸟氨酸、丝氨酸、酪氨酸、 β -氨基丙酸、 γ -氨基丁酸；可继续与磷酰基酰化的分子还有羟基脲。

本发明中的胆固醇基磷酰核苷类似物，具体分子结构可选自胆固醇基磷酰阿昔洛韦、胆固醇基磷酰阿巴卡韦、胆固醇基磷酰索利夫定、胆固醇基磷酰阿糖腺苷、胆固醇基磷酰齐多夫定、胆固醇基磷酰拉米夫定、胆固醇基磷酰去羟肌苷、胆固醇基磷酰扎西他滨、胆固醇基磷酰司他夫定、胆固醇基磷酰西多福韦、胆固醇基磷酰吉西他滨、胆固醇基磷酰卡培他滨、胆固醇基磷酰氟达拉滨、胆固醇基磷酰去氧氟尿苷、胆固醇基磷酰阿糖胞苷，以及相应的在磷酰基继续酰化成酯或酰胺的情况；更优选的是胆固醇基磷酰阿巴卡韦、胆固醇基磷酰齐多夫定、胆固醇基磷酰拉米夫定、胆固醇基磷酰去羟肌苷、

胆固醇基磷酰扎西他滨、胆固醇基磷酰司他夫定、胆固醇基磷酰吉西他滨、胆固醇基磷酰卡培他滨、胆固醇基磷酰氟达拉滨、胆固醇基磷酰去氧氟尿苷，以及相应的在磷酰基继续酰化成酯或酰胺的情况。

本发明中的胆固醇基磷酰核苷类似物的合成步骤一般分为两个阶段。首先通过酰化反应将胆固醇或核苷类似物与磷酰基连接，然后再与另一个反应物反应，最后得到终产物。在上述酰化反应中，可以采用酰氯与羟基或氨基酰化；或由酸直接与羟基或氨基酰化。通过参考相关文献方法和利用一般专业技术就可以得到高纯度的胆固醇基磷酰核苷类似物。

得到本发明中的胆固醇基磷酰核苷类似物后，还可以根据使用要求将其制备成盐。成盐位置一般在磷酰基剩余的游离羟基位置，可以选自钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、氨盐、有机胺盐。核苷基团位置也可以成盐，包括碱盐和酸盐。碱盐可以选自钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、氨盐、有机胺盐。酸盐中的酸可以选自马来酸、富马酸、琥珀酸、苯甲酸、苯磺酸、甲酸、乙酸、丙酸、草酸、氨基酸、柠檬酸、酒石酸、硝酸、磷酸、盐酸、硫酸，优选的是乙酸、柠檬酸、酒石酸、苯甲酸、盐酸、硫酸。制备胆固醇基磷酰核苷类似物的盐的方法一般可以先将胆固醇基磷酰核苷类似物和相应的酸或碱分别溶于相同或不同的有机溶剂，再将它们的有机溶剂溶液按照它们分子摩尔数相当比例混合，经过适当处理，最后将混合溶液挥干，进行适当的纯化和分离，得到胆固醇基磷酰核苷类似物的盐；也可在制备时直接加入过量的酸或碱成盐。

本发明中的胆固醇基磷酰核苷类似物或其盐带有脂溶性较强的胆固醇基团，可以将它们制备成脂质体、非离子表面活性剂泡囊、纳米粒、微乳或自组装传递系统等高度分散的制剂。这些高度分散的制剂可以以水性混悬液的形式存在并给药。这些含有胆固醇基磷酰核苷类似物的高度分散传递系统的粒子直径一般小于1微米，优选的是小于0.5微米，更优选的是小于0.2微米。制备方法可以参考相关文献方法和专业技术（New RRC ed. Liposome: a

practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1990; Uchegbu IF and Vyas SP. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. Int J Pharm, 1998,172:33, Cavalli R, et al. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. Int J Pharm, 1997,148:47; 陆彬, 张正全. 用三角相图法研究药用微乳的形成条件. 药学学报, 2001,36:58)。

一般地, 如果采用薄膜分散法制备脂质体, 可以将胆固醇基磷酰核苷类似物与磷脂等膜材共同溶于有机溶剂, 盛入烧瓶中, 减压旋转蒸发, 得到一层薄膜, 然后加入水或适当缓冲液, 进行振荡和超声, 直至形成均匀的混悬液。如果超声时间延长, 还可能得到纳米级分散系统。如果采用反相蒸发法制备脂质体, 可以将胆固醇基磷酰核苷类似物与磷脂等膜材共同溶于有机溶剂, 加入水或缓冲液, 高速搅拌或超声制备成乳剂, 然后减压旋转蒸发, 得到凝胶态物质, 然后加入水或适当缓冲液或不加, 继续减压旋转蒸发, 直至形成均匀的脂质体混悬液。脂质体混悬液还可以选择适当处方并在适当条件下进行冷冻干燥或喷雾干燥, 形成固体粉末状, 这样可以保证制剂的稳定性, 临用前加入水溶液振摇即可得到脂质体混悬液。运用同样的技术可以获得胆固醇基磷酰核苷类似物的非离子表面活性剂泡囊。

纳米粒制剂中的固体脂质纳米粒较适合于本发明中的胆固醇基磷酰核苷类似物。一般地, 将胆固醇基磷酰核苷类似物与常温下为固态的脂质, 如磷脂、脂肪酸、甘油酯, 共同加热熔融, 然后加入水或适当缓冲液, 在加热情况下在高压乳匀机上循环乳化多次, 形成纳米分散的乳滴, 迅速冷却, 使之固化, 即得到胆固醇基磷酰核苷类似物固体脂质纳米粒。用微乳法也可制得胆固醇基磷酰核苷类似物固体脂质纳米粒。胆固醇基磷酰核苷类似物纳米粒混悬液还可以选择适当处方并在适当条件下进行冷冻干燥或喷雾干燥, 形成固体粉末状, 这样可以保证制剂的稳定性, 临用前加入水溶液振摇即可得到纳米粒混悬液。

胆固醇基磷酰核苷类似物微乳的制备可以参考常见的处方，一般包括乳化剂、助乳化剂、助溶剂、油相、水相。一般在选择合适的处方后，即可容易地形成微乳。如果选择合适的处方，一般包括乳化剂、助乳化剂、助溶剂、油相，还可以组成自微乳化系统，在加入适量水溶液后，系统可以自行分散成微乳。

除了上述可以方便地得到的胆固醇基磷酰核苷类似物的高度分散的传递系统外，本发明人还出乎意料地发现由于本发明中的胆固醇基磷酰核苷类似物具有特殊的物理化学性质，特别是两亲性，由它自身或加入适量添加剂后在水溶液中可以自组装，形成高度分散的传递系统。胆固醇基磷酰核苷类似物分子中含有脂溶性强的胆固醇基团和极性较大的核苷基团，因此具有两亲性，这种物理化学性质类似于磷脂和某些表面活性剂。如果两亲性分子的分子结构满足一定条件，由它本身可以在水中自组装成高度分散的有序聚集体，例如双分子层、双分子层弯曲得到的泡囊和双分子层叠加得到的纳米粒。本发明中的胆固醇基磷酰核苷类似物具有较长的并且脂溶性较强的胆固醇基团和亲水性核苷基团，较容易形成双分子层，并进一步得到泡囊或纳米粒，不过某些条件下需加入一定量的添加剂。因此本发明首次设计并制备了由本发明中的胆固醇基磷酰核苷类似物组成或加入适量添加剂的高度分散的自组装传递系统。

本发明中的由胆固醇基磷酰核苷类似物组成的高度分散的自组装传递系统的制备方法和脂质体等高度分散系统的制备方法类似。通常是将胆固醇基磷酰核苷类似物溶于某种有机溶剂，根据需要可以将适当添加剂加入胆固醇基磷酰核苷类似物的有机溶剂溶液中或待分散介质（一般是水或水溶液）中，然后进行分散。方法包括薄膜分散法、反相蒸发法、注入法、复乳法等。在某些情况下，添加剂不是必需的，此时传递系统全部由胆固醇基磷酰核苷类似物组成。在某些情况下，单独用胆固醇基磷酰核苷类似物不能形成很好的

高度分散粒子，此时需要加入适当添加剂，帮助其形成有序结构。是否需要加入添加剂根据胆固醇基磷酰核苷类似物的物理化学性质决定，一般可以通过预实验来推断。

本发明中的高度分散的自组装传递系统中胆固醇基磷酰核苷类似物的量占全部组成成分的分子摩尔比例在 50~100% 之间，优选的是 70~100%，更优选的是 85~100%，其余为添加剂。添加剂可选自脂质分子、表面活性剂。脂肪分子可选自脂肪酸、脂肪醇、脂肪胺、胆固醇，脂肪胺如硬脂胺。表面活性剂可选自胆酸盐、去氧胆酸盐、磷脂、多元醇酯类表面活性剂、聚氧乙烯类表面活性剂、聚乙二醇脂质衍生物、多糖脂质衍生物、聚氨基酸脂质衍生物、双十六烷基磷脂酸。磷脂包括合成磷脂、半合成磷脂、天然磷脂。其中合成磷脂又包括修饰的磷脂如聚乙二醇化磷脂、连接单克隆抗体的磷脂。多元醇酯类表面活性剂优选的是失水山梨醇脂肪酸酯，具体如司盘 60、司盘 40、司盘 20。聚氧乙烯类表面活性剂优选的是聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物（也称泊洛沙姆），聚山梨酯、聚氧乙烯脂肪醇醚和聚氧乙烯脂肪醇酯，具体如泊洛沙姆 P188、吐温 80、吐温 60、吐温 40、吐温 20、苜蓿 35。添加剂还可选自胆固醇的某些衍生物如胆固醇脂肪酸酯、聚乙二醇化胆固醇，前者如胆固醇琥珀酸单酯，后者如聚乙二醇 1500 胆固醇琥珀酸酯。

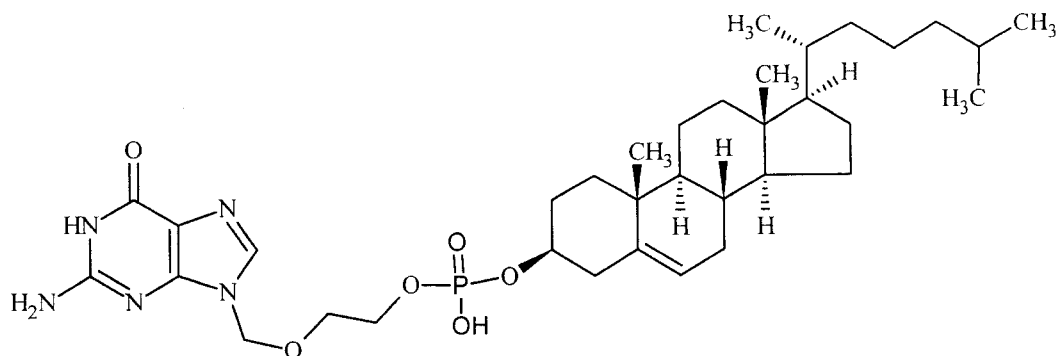
高度分散的传递系统包括自组装传递系统，如果其组成或表面吸附有高度亲水的分子或分子片断，由于在体外环境或体内环境可以形成亲水性保护层，可以阻滞粒子间的聚合或在体内阻滞调理化作用而获得长循环效果。常用的亲水性分子或分子片断是聚乙二醇（PEG）。在本发明中，可以采用添加带有聚乙二醇链的脂肪类衍生物如聚乙二醇化磷脂、聚乙二醇化胆固醇、聚山梨酯的方法制备得到表面亲水的胆固醇基磷酰核苷类似物的高度分散的传递系统包括其自组装传递系统。

上述制备胆固醇基磷酰核苷类似物的高度分散的传递系统的方法不经改

变或经过稍微调整后，都可适用于胆固醇基磷酰核苷类似物的盐。

具体实施方式

实施例 1. 胆固醇基磷酰阿昔洛韦的制备

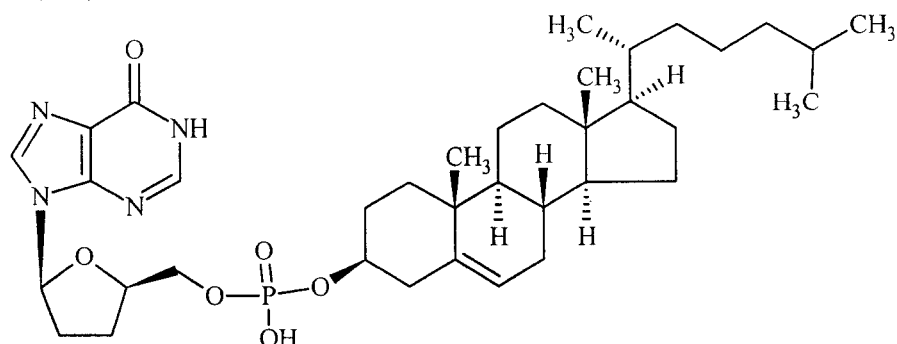


本品是磷酰基分别与阿昔洛韦脂肪链羟基和胆固醇羟基酰化的产物，英文化学名 2-[(2-amino-6-oxo-1,6-dihydro-9H-purin-9-yl)methoxy]ethyl (3b)-cholest-5-en-3-yl hydrogen phosphate，简称为 CPA，分子式 $C_{35}H_{56}N_5O_6P$ ，分子量 673.82。首先合成胆固醇基磷酰氯 (CPC, $C_{27}ClH_{45}O_2P$)，具体步骤如下。取三氯氧磷 6ml 于烧瓶中，加入乙醚 80ml，冰浴，在搅拌下逐渐滴加胆固醇 (7.73g, 0.02mol) 和三乙胺 (TEA, 3ml) 的乙醚溶液 (80ml)，滴加完毕后，继续在冰浴条件下反应 2h，然后减压蒸去溶剂和剩余反应物，得 CPC。取 CPC (1.5g, 3mmol) 溶于 10ml 二氯甲烷。另取阿昔洛韦 (ACV, 0.675g, 3mmol) 和 TEA (0.45ml, 3mmol) 溶于 25ml 二甲基亚砜 (DMSO)，逐渐滴加到上述 CPC 溶液中，室温反应 2h，反应液倾入水中，加入 10ml 二氯甲烷萃取，收集有机相，重复萃取二次，有机相用无水硫酸钠干燥，抽滤，挥干溶剂后得胆固醇基磷酰氯阿昔洛韦 (CPCA)。CPCA 加入 30ml 四氢呋喃 (THF) 溶解后加 1ml 水，70℃ 回流 2h，减压挥去大部分溶剂，加水 20ml，用二氯甲烷 60ml 分三次萃取，收集有机相用无水硫酸钠干燥，抽滤，挥干溶剂后，固体用得异丙醇重结晶后得到胆固醇基磷酰阿昔洛韦 (CPA) 类白色粉末。产物薄层层析显示一个斑点。 1H NMR 显示，化学位移 0.65-2.48 (Cholesterol-H),

3.70, 3.59(OCH₂CH₂O), 5.50(2H, NCH₂O), 6.79(3H, NH₂, POH), 7.81(NCHN), 10.5(NH)。元素分析值 C(62.55%) H(8.78%) N(10.49%), 与理论值 C(62.39%) H(8.38%) N(10.39%)相近。

用磷酰基先与阿昔洛韦结合, 然后再与胆固醇结合的方法, 也可以得到胆固醇基磷酰阿昔洛韦。

实施例 2. 胆固醇基磷酰去羟肌苷的制备

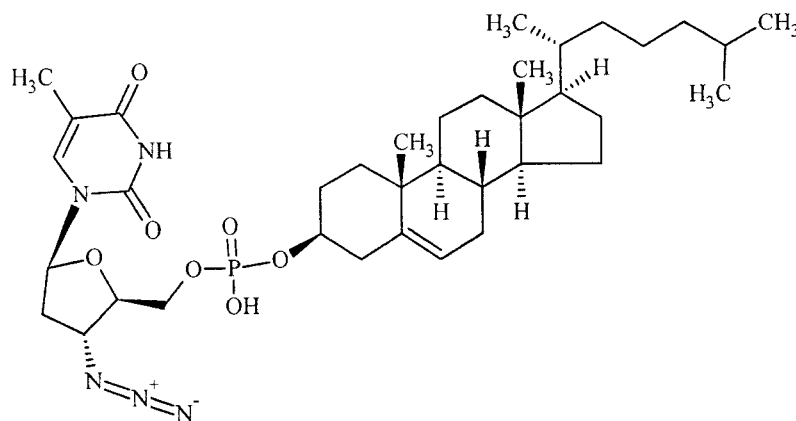


本品是磷酰基分别与去羟肌苷脂肪链羟基和胆固醇羟基酰化的产物, 英文化学名 (3b)-cholest-5-en-3-yl [(2R,5S)-5-(6-oxo-1,6-dihydro-9H-purin-9-yl) tetrahydrofuran-2-yl]methyl hydrogen phosphate, 简称为 CPD, 分子式 C₃₇H₅₇N₄O₆P, 分子量648.85。与实施例1相同, 先合成胆固醇基磷酰氯 (CPC) 然后与去羟肌苷酰化, 最后将剩余磷酰氯水解得到终产物。具体操作如下: 取CPC (1.5g, 3mmol) 溶于20ml二氯甲烷。另取去羟肌苷 (DDI, 0.7g, 3mmol) 和TEA (0.45ml, 3mmol) 溶于10ml二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 逐渐滴加到上述CPC溶液中, 室温反应1h, 反应液倾入5%氯化钠水溶液中, 收集有机相, 并用20ml二氯甲烷重复萃取二次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 抽滤, 挥干溶剂后得胆固醇基磷酰氯去羟肌苷 (CPCD)。CPCD加入30ml四氢呋喃 (THF) 后加1ml水, 70℃回流1h, 减压挥去大部分溶剂, 加水20ml, 用二氯甲烷60ml分三次萃取, 收集有机相用无水硫酸钠干燥, 抽滤, 挥干溶剂后, 固体用得异丙醇重结晶后得到胆固醇基磷酰去羟肌苷类白色粉末。产物薄层层析显示

一个斑点。¹H NMR显示, 化学位移0.65-2.42(Cholesterol-H), 3.93, 3.78(H₂COP), 4.35(OCH), 6.26(NCHO), 7.56(POH), 8.07, 8.16(NCHN, NCHNH), 12.40(NH)。元素分析值C(64.55%) H(8.40%) N(8.23%), 与理论值C(64.89%) H(8.39%) N(8.18%)相近。

用磷酸基先与去羟肌苷结合, 然后再与胆固醇结合的方法, 也可以得到胆固醇基磷酸去羟肌苷。

实施例 3. 胆固醇基磷酸齐多夫定的制备

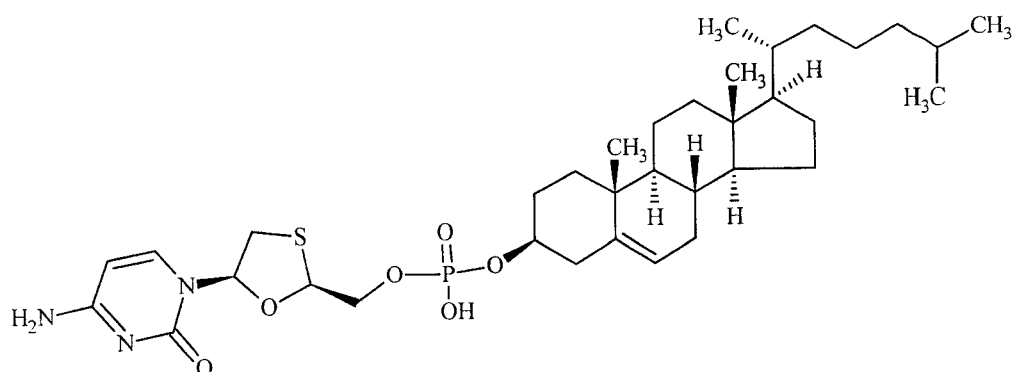


本品是磷酸基分别与齐多夫定脂肪链羟基和胆固醇羟基酰化的产物, 英文化学名 1-{3-azido-5-O-[(3b)-cholest-5-en-3-yloxy](hydroxy)phosphoryl}-2,3-dideoxy-b-L-erythro-pentofuranosyl}-5-methylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione, 简称为 CPCZ, 分子式 C₃₇H₅₈N₅O₇P, 分子量 715.86。与实施例 1 相同, 先合成胆固醇基磷酸氯 (CPC) 然后与齐多夫定酰化, 最后将剩余磷酸氯水解得到终产物。具体操作如下: 取 CPC (1.5g, 3mmol) 溶于 10ml 二氯甲烷。另取齐多夫定 (AZT, 0.8g, 3mmol) 和 TEA (0.45ml, 3mmol) 溶于 20ml 二氯甲烷, 逐渐滴加到上述 CPC 溶液中, 室温反应 1h, 反应液倾入水中, 收集有机相, 并用 20ml 二氯甲烷重复萃取二次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 抽滤, 挥干溶剂后得胆固醇基磷酸氯齐多夫定 (CPCZ)。CPCZ 加入 30ml 四氢呋喃 (THF) 溶解后加 1ml 水, 70℃回流 1h, 减压挥去大部分溶剂, 加水 20ml,

用二氯甲烷 60ml 分三次萃取，收集有机相用无水硫酸钠干燥，抽滤，挥干溶剂后，固体用得异丙醇重结晶后得到胆固醇基磷酰齐多夫定（CPZ）类白色粉末。产物薄层层析显示一个斑点。¹H NMR 显示，化学位移 0.82-2.45 (Cholesterol-H), 4.00, 4.22 (HCH₂COPO), 7.44 (NCHCCH₃), 7.56 (POH), 11.32 (OCNHCO)。元素分析值 C(61.78%) H(8.55%) N(9.39%)，与理论值 C(62.08%) H(8.17%) N(9.78%) 相近。

用磷酰基先与齐多夫定结合，然后再与胆固醇结合的方法，也可以得到胆固醇基磷酰齐多夫定。

实施例 4. 胆固醇基磷酰拉米夫定的制备

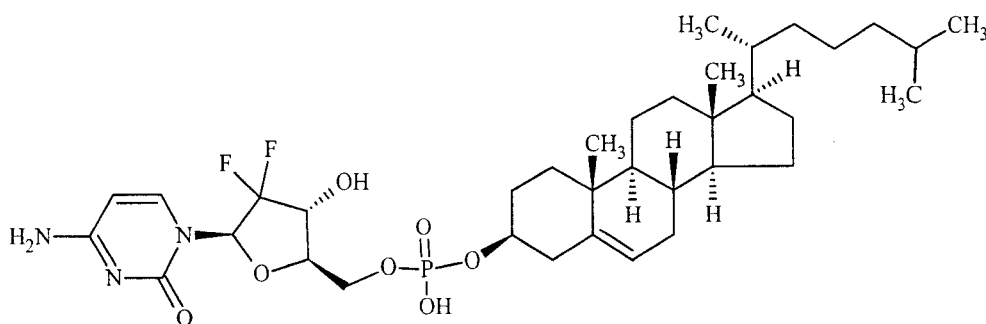


本品是磷酰基分别与拉米夫定脂肪链羟基和胆固醇羟基酰化的产物，英文化学名 [(2S,5R)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-1,3-oxathiolan-2-yl] methyl (3b)-cholest-5-en-3-yl hydrogen phosphate，简称为 CPL，分子式 C₃₅H₅₆N₃O₆PS，分子量 677.87。与实施例 1 相同，先合成胆固醇基磷酰氯(CPC)然后与拉米夫定酰化，最后将剩余磷酰氯水解得到终产物。具体操作如下：取 CPC (1.5g, 3mmol) 溶于 20ml 二氯甲烷。另取拉米夫定 (3TC, 0.69g, 3mmol) 和 TEA (0.45ml, 3mmol) 溶于 10ml 二甲基甲酰胺，逐渐滴加到上述 CPC 溶液中，室温反应 2h，反应液倾入水中，收集有机相，并用 20ml 二氯甲烷重复萃取二次，有机相用无水硫酸钠干燥，抽滤，挥干溶剂后得胆固

醇基磷酰氯拉米夫定 (CPCL)。CPCL 加入 30ml 四氢呋喃 (THF) 后加 1ml 水, 70℃回流 1h, 减压挥去大部分溶剂, 加水 20ml, 用二氯甲烷 60ml 分三次萃取, 收集有机相用无水硫酸钠干燥, 抽滤, 挥干溶剂后, 固体用得异丙醇重结晶后得到胆固醇基磷酰拉米夫定类白色粉末。产物薄层层析显示一个斑点。¹H NMR 显示, 化学位移 0.65-2.47(Cholesterol-H), 3.91, 4.08(H₂COP), 5.34(OCHS), 6.00(H₂NCCH), 6.16(NCHO), 7.61(POH, NH₂), 8.02(CHN)。元素分析值 C(62.34%) H(8.70%) N(6.55%), 与理论值 C(62.01%) H(8.33%) N(6.20%) 相近。

用磷酰基先与拉米夫定结合, 然后再与胆固醇结合的方法, 也可以得到胆固醇基磷酰拉米夫定。

实施例 5. 胆固醇基磷酰吉西他滨的制备



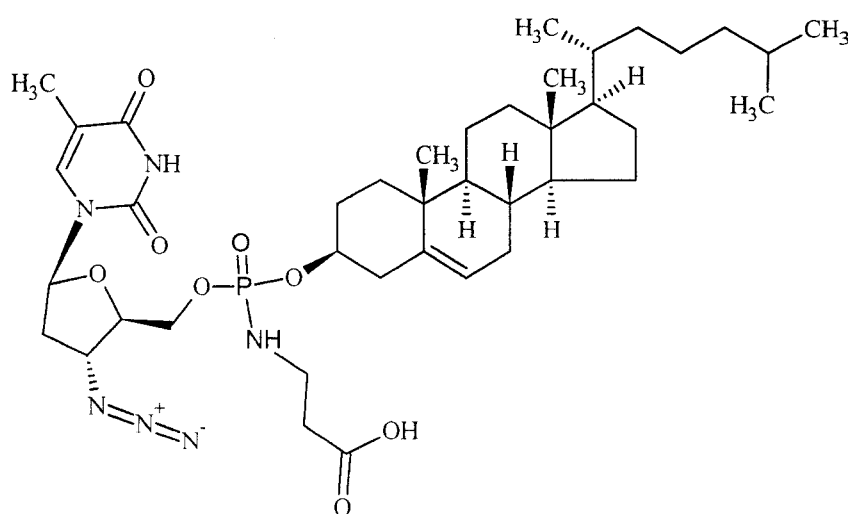
本品是磷酰基分别与吉西他滨脂肪链羟基和胆固醇羟基酰化的产物, 英文化学名 5'-O-[[[(3b)-cholest-5-en-3-yl]oxy](hydroxy)phosphoryl]-2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine, 简称为 CPG, 分子式 C₃₆H₅₆F₂N₃O₇P, 分子量 711.82。与实施例 1 相同, 先合成胆固醇基磷酰氯 (CPC) 然后与吉西他滨酰化, 最后将剩余磷酰氯水解得到终产物。具体操作如下: 取 CPC (1.5g, 3mmol) 溶于 20ml 二氯甲烷。另取盐酸吉西他滨 (GTB, 0.8g, 3mmol) 和 TEA (0.45ml, 3mmol) 溶于 20ml 二甲基甲酰胺/二甲基乙酰胺 (DMF/DMA, 1:1), 逐渐滴加到上述 CPC 溶液中, 室温反应 1h, 反应液倾入 5%氯化钠水溶液中, 收集

有机相,并用 20ml 二氯甲烷重复萃取二次,有机相用无水硫酸钠干燥,抽滤,挥干溶剂后得胆固醇基磷酰氯吉西他滨(CPCG)。CPCG 加入 30ml 四氢呋喃(THF)后加 1ml 水,70℃回流 1h,减压挥去大部分溶剂,加 1%柠檬酸溶液 20ml,用二氯甲烷 60ml 分三次萃取,收集有机相用无水硫酸钠干燥,抽滤,挥干溶剂后,固体用得异丙醇重结晶后得到胆固醇基磷酰吉西他滨类白色粉末。产物薄层层析显示一个斑点。¹H NMR 显示,化学位移 0.65-2.47(Cholesterol-H), 3.94(HCOP), 4.46(OCHCHOH), 6.06(HCCNH₂, NCH), 6.10(OH), 6.62(POH), 6.73(NH₂), 7.93(NCH), 11.32(OCNHCO)。元素分析值 C(60.39%) H(8.08%) N(6.12%), 与理论值 C(60.74%) H(7.93%) N(5.90%)相近。

若水解完毕,将其倒入 2%盐酸溶液中,可得到胆固醇基磷酰吉西他滨盐酸盐。元素分析值 C(57.55%) H(7.29%) N(5.33%), 与理论值 C(57.78%) H(7.68%) N(5.62%)相近。

用磷酰基先与吉西他滨结合,然后再与胆固醇结合的方法,也可以得到胆固醇基磷酰吉西他滨。

实施例 6. 胆固醇基(丙酸)胺基磷酰齐多夫定的制备



本品是胆固醇磷酰齐多夫定分子中磷酰基继续与 β-氨基丙酸的氨基缩

合酰化后得到，简写为 CPAZ，分子式 $C_{40}H_{63}N_6O_8P$ ，分子量 786.94。按实施例 3 操作，先合成胆固醇基磷酰氯齐多夫定 (CPCZ)，然后 CPCZ 继续将 β -氨基丙酸酰化得到 CPAZ。 1H NMR 与 CPZ 近似。元素分析值 C(61.28%) H(8.33%) N(10.49%)，与理论值 C(61.05%) H(8.07%) N(10.68%)相近。

实施例 7. 胆固醇基磷酰齐多夫定钠盐的制备

分子式 $C_{37}H_{57}N_5O_7PNa$ 。取胆固醇基磷酰齐多夫定 (7.16g, 0.01mol) 溶于 20ml 氯仿，加入含 0.01mol NaOH 的甲醇溶液，振摇超声，减压挥干溶剂，甲醇重结晶，得到胆固醇基磷酰齐多夫定钠盐白色晶体。薄层层析显示一个斑点。元素分析值 C(60.55%) H(7.40%) N(9.81%)，与理论值 C(60.23%) H(7.79%) N(9.49%)相近。其它碱盐如钾盐、钙盐、镁盐、氨盐、有机胺盐等制备方法相近。

实施例 8. 胆固醇基磷酰拉米夫定醋酸盐的制备

分子式 $C_{37}H_{60}N_3O_8PS$ 。取胆固醇磷酰拉米夫定 (6.78g, 0.01mol) 溶于 20ml 氯仿，加入含 0.01mol 醋酸的丙酮溶液，振摇超声，减压挥干溶剂，异丙醇重结晶，得到胆固醇磷酰拉米夫定醋酸盐。薄层层析显示一个斑点。元素分析值 C(60.51%) H(7.95%) N(5.37%)，与理论值 C(60.22%) H(8.20%) N(5.69%)相近。其它有机酸盐如甲酸盐、草酸盐、柠檬酸盐等制备方法相近。

实施例 9. 胆固醇基磷酰阿昔洛韦脂质体的制备

取胆固醇基磷酰阿昔洛韦 (25mg)、大豆磷脂 (0.1g) 于 250ml 烧瓶中，用 20ml 二氯甲烷溶解，减压旋转蒸发，得到一层有机脂溶性膜，加入 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 10ml，振荡，大部分膜脱落，在 50℃超声，直至得到均匀混悬液，显微镜下观察，大部分粒子直径小于 1 微米，即为胆固醇基磷酰阿昔

洛韦脂质体。

实施例 10. 胆固醇基磷酰阿昔洛韦非离子表面活性剂泡囊的制备

取胆固醇基磷酰阿昔洛韦（30mg）、司盘 60（0.08g）于 250ml 烧瓶中，用 20ml 二氯甲烷溶解，减压旋转蒸发，得到一层有机脂溶性膜，加入 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 10ml，振荡，大部分膜脱落，在 50℃超声，直至得到胆固醇基磷酰阿昔洛韦非离子表面活性剂泡囊的均匀混悬液，激光散射粒度分析仪检测，平均粒径为 285 纳米。

实施例 11. 胆固醇基磷酰去羟肌苷长循环脂质体的制备

取胆固醇基磷酰去羟肌苷（50mg）、大豆磷脂（0.1g）、PEG 化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺（PEG-DSPE）（0.02g）于烧瓶中，用 20ml 氯仿:异丙醚(1:1, v/v)溶解，加入适量蒸馏水，超声使其成为乳剂，减压旋转蒸发，得到凝胶态物质，加入少量水，继续减压旋转蒸发，凝胶态物质脱落并分散成均匀混悬液，显微镜下观察，大部分粒子直径小于 1 微米，即为去羟肌苷胆固醇琥珀酸酯长循环脂质体。

实施例 12. 胆固醇基磷酰齐多夫定固体脂质纳米粒的制备

取胆固醇基磷酰齐多夫定（50mg）、单硬脂酸甘油酯（0.7g）、吐温 80（0.03g）于烧杯中加热至 80℃，逐渐加入含十二烷基硫酸钠（10mg）的 80℃水（10ml），保持温度不变，呈透明液体。再将其用注射器注入到高速搅拌的 0℃水中，呈透明液体。在原子力显微镜下观察，多为 100 纳米以下的粒子。该胆固醇基磷酰齐多夫定固体脂质纳米粒混悬液可常温放置 10 天未见沉淀析出。该固体脂质纳米粒混悬液添加适当保护剂后冻干成固体粉末，临用前加入水，即成胆固醇基磷酰齐多夫定固体脂质纳米粒混悬液。

实施例 13. 胆固醇基磷酰齐多夫定自组装传递系统的制备

取胆固醇基磷酰齐多夫定溶于四氢呋喃（5%，w/w），用微量注射器缓慢注入到搅拌的水中，至得到均匀微混悬液，减压可挥去有机溶剂，并可在加热条件下进一步浓缩产品，产品经磷钨酸负染后，粒子透射电镜下观察，为纳米级泡囊状结构（见说明书附图 1），即为胆固醇基磷酰齐多夫定自组装传递系统。

实施例 14. 胆固醇基磷酰拉米夫定自组装传递系统的制备

将含有胆固醇基磷酰拉米夫定（5%，w/w）和 Tween20（0.5%，w/w）的四氢呋喃溶液，用微量注射器缓慢注入到搅拌的水中，至得到均匀微混悬液，减压可挥去有机溶剂，并可在加热条件下进一步浓缩产品。产品经磷钨酸负染后，用透射电镜观察，为纳米级泡囊状结构，即为胆固醇基磷酰拉米夫定自组装传递系统。

实施例 15. 胆固醇基磷酰吉西他滨自组装传递系统的制备

将含有胆固醇基磷酰吉西他滨（5%，w/w）和泊洛沙姆 P188（1%，w/w）的四氢呋喃溶液，用微量注射器缓慢注入到搅拌的水中，至得到均匀微混悬液，减压可挥去有机溶剂，并可在加热条件下进一步浓缩产品。产品经磷钨酸负染后，用透射电镜观察，为纳米级泡囊状结构，即为胆固醇基磷酰吉西他滨自组装传递系统。

附图说明：

图 1 胆固醇基磷酰齐多夫定自组装传递系统透射电镜照片



图 1