



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112121173 B

(45) 授权公告日 2022.05.06

(21) 申请号 202010852776.1 A61K 31/5377 (2006.01)  
(22) 申请日 2020.08.22 A61K 9/107 (2006.01)  
(65) 同一申请的已公布的文献号 A61K 9/127 (2006.01)  
申请公布号 CN 112121173 A A61K 9/14 (2006.01)  
(43) 申请公布日 2020.12.25 A61K 47/34 (2017.01)  
(73) 专利权人 浙江大学 A61K 47/24 (2006.01)  
地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 A61P 37/06 (2006.01)  
38号 审查员 王碧燕  
(72) 发明人 谢海洋 王杭祥  
(74) 专利代理机构 杭州知闲专利代理事务所  
(特殊普通合伙) 33315  
专利代理师 黄燕  
(51) Int. Cl.  
A61K 47/54 (2017.01)  
A61K 31/436 (2006.01)

权利要求书1页 说明书15页 附图19页

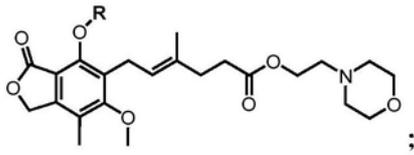
(54) 发明名称

脂肪酸修饰的免疫抑制剂MMF及FK506纳米制剂及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种脂肪酸偶联前药及其制备方法,包括:在缩合剂和催化剂为作用下,他克莫司或霉酚酸酯与R对应的饱和或不饱和脂肪酸进行酯化反应,得到所述脂肪酸偶联前药。本发明上述形式的纳米制剂显著提高了MMF及FK506的水溶性,避免使用增溶剂等辅料,进一步提高载药量;同时用于修饰的饱和或不饱和脂肪酸为人体所需物质,生物相容性好,便于临床转化,具有较好的应用前景。更为重要的是,聚乙二醇化MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及FK506共组装机纳米制剂,显著改善了药物的药代动力学特性,延长其体内循环时间,可将MMF及FK506同时递送至靶部位,发挥药效,对比临床MMF/FK506具有更优的抗移植排斥效应。

1. 一种脂肪酸偶联前药,其特征在于,结构如下式所示结构的一种或多种:



其中,R选自正庚酸、硬脂酸、二十四烷酸、油酸、蓖麻油酸、棕榈油酸、亚油酸、亚麻酸、次亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸去羟基后得到的酰基。

2. 一种权利要求1所述脂肪酸偶联前药的制备方法,其特征在于,在缩合剂和催化剂的作用下,霉酚酸酯与R对应的饱和或不饱和脂肪酸进行酯化反应,得到所述脂肪酸偶联前药。

3. 脂肪酸偶联前药的自组装纳米制剂,其特征在于:包括权利要求1所述的脂肪酸偶联前药中的一种或多种。

4. 脂肪酸偶联前药的共组装纳米制剂,其特征在于:

包括:(1)权利要求1所述的脂肪酸偶联前药中的一种或多种;(2)他克莫司;

或者包括:(1)权利要求1所述的脂肪酸偶联前药中的一种或多种;(2)他克莫司;(3)1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)]。

5. 根据权利要求4所述的脂肪酸偶联前药的共组装纳米制剂,其特征在于,当包括:(1)权利要求1所述的脂肪酸偶联前药中的一种或多种;(2)他克莫司时,以质量计算,所述纳米制剂中,两者的含量比为20:0.5~5;或者,当包括:(1)权利要求1所述的脂肪酸偶联前药中的一种或多种;(2)他克莫司;(3)1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)]时,以质量计算,三者的含量比为20:0.5~5:1~10。

6. 根据权利要求5所述的脂肪酸偶联前药的共组装纳米制剂,其特征在于,所述两者的含量比为20:1;所述三者的含量比为20:1:2。

7. 一种权利要求3所述的脂肪酸偶联前药的自组装纳米制剂的制备方法,其特征在于,将对应的脂肪酸偶联前药的有机溶剂于超声条件下注入水相中,透析得到均匀分散的纳米颗粒。

8. 一种权利要求4~5任一项所述的脂肪酸偶联前药的共组装纳米制剂的制备方法,其特征在于,将对应的脂肪酸偶联前药和他克莫司的有机溶剂,或者将对应的脂肪酸偶联前药、他克莫司和1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)]的有机溶剂,于超声条件下注入水相中,透析得到均匀分散的纳米颗粒。

9. 一种权利要求1所述脂肪酸偶联前药及其水溶性制剂用于制备移植物抗排异药物中的应用。

## 脂肪酸修饰的免疫抑制剂MMF及FK506纳米制剂及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫抑制药物领域,具体涉及免疫抑制剂MMF、FK506前药合成、MMF前药及FK506纳米制剂的制备方法和应用。

### 背景技术

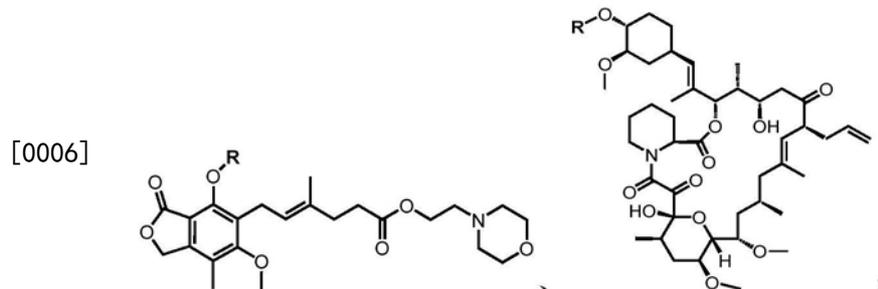
[0002] 他克莫司(FK506)为器官移植术后的首选免疫抑制剂,长期使用会引起多种剂量依赖性不良反应。临床上通常将其与霉酚酸酯(Mycophenolate mofetil,MMF)联用,防治器官移植术后急性排斥,以改善因用药剂量高引起的不良反应。因FK506和MMF联用可显著降低术后排斥反应和移植器官失功,有效改善体内副作用,故此联合治疗方式已纳入欧洲肝病学会制定的《Clinical Practice Guidelines:Liver transplantation(2016版)》,成为了肝移植术后最常规的联合免疫抑制治疗方案。但是FK506和MMF两药水溶性极差,在临床上均以口服用药为主,因肝脏首过效应大幅降低药物体内生物利用度,治疗窗窄。尤其FK506经胃肠道吸收时,易被胃肠道上皮细胞膜上的P-糖蛋白从浆膜侧泵至黏膜侧后由肠腔排出,药物吸收率显著降低,故生物利用度仅17-22%。因此,提高FK506和MMF体内生物利用度,改善其治疗效果是目前迫切需要解决的问题。

[0003] 纳米制剂技术为改善难溶性药物体内生物利用度提供了新思路。目前主要通过将MMF和FK506制备成纳米制剂以增加其水溶性,但是上述单药纳米制剂无法较好地发挥MMF及FK506的协同作用,故治疗效果有限。

### 发明内容

[0004] 本发明提供了一种基于MMF/FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药、制剂及其制备方法和应用,该方法步骤简单,可工业化大批量生产;动物移植模型实验显示,使用本发明的MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及FK506共组装纳米载药体系,对比临床MMF/FK506具有更优的抗移植排斥效应。

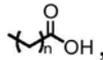
[0005] 一种脂肪酸偶联前药,结构如下式所示结构的一种或多种:



[0007] 其中,R表示饱和或不饱和脂肪酰基;或者所述R来自于饱和或不饱和脂肪酸。

[0008] 作为优选,R表示饱和的C1~C24烷酰基;或者带有1~6个双键的C1~C24不饱和脂肪酰基。或者,所述R来自饱和的C1~C24烷基羧酸;或者带有1~6个双键的C1~C24不饱和

脂肪酸。

[0009] 所述饱和脂肪酸结构如下式所示：  $n=0\sim 24$ 。

[0010] 所述不饱和脂肪酸为 $\omega$ -9、 $\omega$ -6、 $\omega$ -3系列不饱和脂肪酸。进一步讲R选自乙酰基、正庚酰基、硬脂酰基、二十四烷酰基、油酰基、蓖麻油酰基、棕榈油酰基、亚油酰基、亚麻酰基、次亚麻酰基、花生四烯酰基、二十碳五烯酰基、二十二碳六烯酰基。或者R选自乙酸、正庚酸、硬脂酸、二十四烷酸、油酸、蓖麻油酸、棕榈油酸、亚油酸、亚麻酸、次亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸去羟基后得到的酰基。

[0011] 一种上述任一项技术方案所述脂肪酸偶联前药的制备方法，在缩合剂和催化剂为作用下，他克莫司或霉酚酸酯与R对应的饱和或不饱和脂肪酸进行酯化反应，得到所述脂肪酸偶联前药，如上式所示。

[0012] 所述缩合剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)，催化剂为4-二甲氨基吡啶(DMAP)。作为优选，反应溶剂为二氯甲烷或氯仿。作为优选，反应温度为40~50℃。反应时间为2~8小时。作为优选，所述催化剂、缩合剂、不饱和或饱和脂肪酸与他克莫司或霉酚酸酯的摩尔比分别独立的为(1~2):(1~2):(1~1.5):1。

[0013] 一种脂肪酸偶联前药自组装纳米制剂，可以是脂质体制剂、自组装制剂或者高分子聚合物胶束制剂：

[0014] 包括：上述任一项技术方案所述的脂肪酸偶联前药中的一种或多种；

[0015] 或者包括：(1)上述任一项所述的脂肪酸偶联前药中的一种或多种；(2)他克莫司；

[0016] 或者包括：(1)上述任一项所述的脂肪酸偶联前药中的一种或多种；(2)他克莫司或他克莫司对应的脂肪酸偶联前药；(3)1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)]。

[0017] 作为优选，当包括：(1)上述任一项所述的脂肪酸偶联前药中的一种或多种；(2)他克莫司时，以霉酚酸酯和他克莫司的质量计算，所述纳米制剂中，两者的含量比为20:0.5~5；或者，当含有包括：(1)上述任一项所述的脂肪酸偶联前药中的一种或多种；(2)他克莫司或他克莫司对应的脂肪酸偶联前药；(3)1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)]时，以霉酚酸酯和他克莫司的质量计算，三者的含量比为20:0.5~5:1~10。作为优选，所述两者的含量比为20:1；所述三者的含量比为20:1:2。

[0018] 一种上述任一项所述的脂肪酸偶联前药自组装纳米制剂的制备方法，将对应的脂肪酸偶联前药的有机溶剂于超声条件下注入水相中，透析得到均匀分散的纳米颗粒。

[0019] 具体讲：

[0020] 一种MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药自组装纳米制剂，仅包括所述的MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药。

[0021] 本发明提供了一种MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药自组装纳米制剂制备方法，包括将溶有MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药的有机溶剂于超声条件下注入水相中，透析得到均匀分散的纳米颗粒；作为优选，有机溶剂为二甲基亚砜溶剂，二甲基亚砜与水相体积比为1:9。

[0022] 一种FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药自组装纳米制剂，仅包括所述的FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药。

[0023] 本发明提供了一种FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药自组装纳米制剂制备方法,包括将溶有FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药的有机溶剂于超声条件下注入水相中,透析得到均匀分散的纳米颗粒;作为优选,有机溶剂为二甲基亚砷溶剂,二甲基亚砷与水相体积比为1:9。

[0024] 一种MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及FK506共组装纳米制剂,包括所述的MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及FK506。

[0025] 本发明提供了一种MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及FK506共组装纳米制剂制备方法,包括将溶有MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药、FK506的有机溶剂于超声条件下注入水相中,透析得到均匀分散的纳米颗粒;作为优选,以MMF的质量计算,所述MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药与FK506的质量比为20:1。作为优选,有机溶剂为二甲基亚砷溶剂,二甲基亚砷与水相体积比为1:9。

[0026] 一种聚乙二醇化MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及FK506共组装纳米制剂,包括所述的MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药、FK506及1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)]。

[0027] 作为优选,以MMF的质量计算,所述MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药与FK506及1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)]的质量比为20:1:2。作为优选,所述1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)]为DSPE-PEG<sub>2k</sub>。

[0028] 本发明提供了一种聚乙二醇化MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及FK506共组装纳米制剂制备方法,包括:将溶有MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药、FK506与DSPE-PEG<sub>2k</sub>的有机溶剂于超声条件下注入水相中,透析得到均匀分散的纳米颗粒;

[0029] 制备过程中,可将MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药、FK506及DSPE-PEG<sub>2k</sub>分别溶于有机溶剂中,再将有机溶剂充分混匀,最后将混匀的有机溶剂于超声条件下注入水相,透析得到均匀分散的纳米颗粒。作为优选,有机溶剂为二甲基亚砷溶剂,二甲基亚砷与水相体积比为1:9。

[0030] 一种MMF/FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药共组装纳米制剂,包括所述的MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药。

[0031] 本发明提供了一种MMF/FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药共组装纳米制剂制备方法,包括将溶有MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药、FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药的有机溶剂于超声条件下注入水相中,透析得到均匀分散的纳米颗粒;

[0032] 作为优选,以MMF、FK506的质量计算,所述MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药与FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药的质量比为20:1。作为优选,有机溶剂为二甲基亚砷溶剂,二甲基亚砷与水相体积比为1:9。

[0033] 一种聚乙二醇化MMF/FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药共组装纳米制剂,包括所述的MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药、FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)]。

[0034] 作为优选,以MMF、FK506的质量计算,所述MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药与FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)]的质量比为20:1:2。作为优选,所述1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)]为DSPE-PEG<sub>2k</sub>。

[0035] 本发明提供了一种聚乙二醇化MMF/FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药共组装纳米制剂制备方法,包括:将溶有MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药、FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药与DSPE-PEG<sub>2k</sub>的有机溶剂于超声条件下注入水相中,透析得到均匀分散的纳米颗粒;

[0036] 制备过程中,可将MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药、FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及DSPE-PEG<sub>2k</sub>分别溶于有机溶剂中,再将有机溶剂充分混匀,最后将混匀的有机溶剂于超声条件下注入水相,透析得到均匀分散的纳米颗粒。作为优选,有机溶剂为二甲基亚砜溶剂,二甲基亚砜与水相体积比为1:9。

[0037] 本发明提供了以上基于MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药自组装纳米制剂、MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及FK506共组装纳米制剂、聚乙二醇化MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及FK506共组装纳米制剂的粒径分布图以及扫描电镜图,其平均粒径均在100-200nm范围内。本发明提供了MMF/FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药的脂质体制剂的制备方法,包括:将溶有MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药、FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药与卵磷脂、胆固醇和DSPE-PEG<sub>2k</sub>的脂质混合物溶于有机溶剂中,将上述混合液于超声条件下注入水相中,或薄膜法制备得到均匀分散的载药脂质体。

[0038] 本发明制备药物的载药量为1-20%,将卵磷脂、胆固醇和DSPE-PEG<sub>2k</sub>不同质量比的脂质混合物溶于乙醇中,再将MMF/FK506-饱和或不饱和脂肪酸前药与以上脂质混合物混合后与水混合得到脂质颗粒。

[0039] 本发明提供了MMF/FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药包裹与聚合物胶束的制备方法,包括:将溶有MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药、FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药与聚乙二醇-聚乳酸,聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物或者聚乙二醇-聚己内酯混合物溶于有机溶剂中,将上述混合液于超声条件下注入水相中制备得到均匀分散的载药聚合物胶束。一种上述任一项所述脂肪酸偶联前药在制备用于移植器官抗排斥药物中的应用。作为优选,所述移植器官包括肝脏移植。

[0040] 为更好地利用纳米制剂的优势以增强MMF及FK506的协同作用,本发明通过利用饱和或不饱和脂肪酸修饰前体药物的策略,构建出MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药自组装纳米制剂、MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及FK506或FK506对应的脂肪酸偶联前药共组装纳米制剂、聚乙二醇化MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及FK506或FK506对应的脂肪酸偶联前药共组装纳米制剂。上述前药可以包裹于脂质体及聚合物胶束中,从而显著提高MMF及FK506水溶性。MMF及FK506纳米制剂较好地改善了MMF及FK506的药代动力学特性,延长两者的体内循环时间,提高了两药体内生物利用度,并可将两药同时递送至靶部位,发挥协同作用,对比临床MMF/FK506具有更优的抗移植排斥效应。

[0041] 与现有技术相比,本发明的有益效果体现在:

[0042] 1) 本发明用于修饰MMF/FK506的饱和或不饱和脂肪酸为人体所需物质,生物相容性好,便于临床转化;

[0043] 2) 本发明通过对免疫抑制剂修饰上述饱和及不饱和脂肪酸,有效提高药物水溶性,并通过降低药物在血液中的释放,从而降低毒性;

[0044] 3) 本发明构建的MMF/FK506-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药自组装纳米制剂、MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及FK506或FK506对应的脂肪酸偶联前药共组装纳米制剂显

著提高了MMF与FK506的水溶性,避免使用增溶剂、表面活性剂等辅料,进一步提高了载药量;

[0045] 4) 本发明构建的聚乙二醇化MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及FK506共组装纳米制剂,可同时递送MMF及FK506至靶部位发挥药效,对比临床MMF/FK506具有更优的抗移植排斥效应;

[0046] 5) 本发明合成的饱和或不饱和脂肪酸偶联前药增加了与药剂学常用载体(如脂质体及聚合物胶束)的亲力和相容性,从而通过上述药剂辅料构建水溶性药物制剂递送体系。

## 附图说明

- [0047] 图1为实施例1中Ac-MMF偶联前药的合成路线;
- [0048] 图2为实施例2中Hep-MMF偶联前药的合成路线;
- [0049] 图3为实施例3中Ste-MMF偶联前药的合成路线;
- [0050] 图4为实施例4中t-cos-MMF偶联前药的合成路线;
- [0051] 图5为实施例5中PA-MMF偶联前药的合成路线;
- [0052] 图6为实施例6中OA-MMF偶联前药的合成路线;
- [0053] 图7为实施例7中RA-MMF偶联前药的合成路线;
- [0054] 图8为实施例8中LA-MMF偶联前药的合成路线;
- [0055] 图9为实施例9中LNA-MMF偶联前药的合成路线;
- [0056] 图10为实施例10中GLA-MMF偶联前药的合成路线;
- [0057] 图11为实施例11中AA-MMF偶联前药的合成路线;
- [0058] 图12为实施例12中EPA-MMF偶联前药的合成路线;
- [0059] 图13为实施例13中DHA-MMF偶联前药的合成路线;
- [0060] 图14为实施例14中Ac-FK506偶联前药的合成路线;
- [0061] 图15为实施例15中Hep-FK506偶联前药的合成路线;
- [0062] 图16为实施例16中Ste-FK506偶联前药的合成路线;
- [0063] 图17为实施例17中t-cos-FK506偶联前药的合成路线;
- [0064] 图18为实施例18中PA-FK506偶联前药的合成路线;
- [0065] 图19为实施例19中OA-FK506偶联前药的合成路线;
- [0066] 图20为实施例20中RA-FK506偶联前药的合成路线;
- [0067] 图21为实施例21中LA-FK506偶联前药的合成路线;
- [0068] 图22为实施例22中LNA-FK506偶联前药的合成路线;
- [0069] 图23为实施例23中GLA-FK506偶联前药的合成路线;
- [0070] 图24为实施例24中AA-FK506偶联前药的合成路线;
- [0071] 图25为实施例25中EPA-FK506偶联前药的合成路线;
- [0072] 图26为实施例26中DHA-FK506偶联前药的合成路线;
- [0073] 图27为实施例2中Hep-MMF偶联前药的核磁谱图;
- [0074] 图28为实施例3中Ste-MMF偶联前药的核磁谱图;
- [0075] 图29为实施例6中OA-MMF偶联前药的核磁谱图;

- [0076] 图30为实施例8中LA-MMF偶联前药的核磁谱图；  
[0077] 图31为实施例13中DHA-MMF偶联前药的核磁谱图；  
[0078] 图32-36为实施例2、3、6、8、13中纳米制剂的粒径分布；  
[0079] 图37-41为实施例2、3、6、8、13中纳米制剂的粒径分布；  
[0080] 图42-46为实施例2、3、6、8、13中纳米制剂的粒径分布；  
[0081] 图47-51为实施例2、3、6、8、13中纳米制剂的透射电镜；  
[0082] 图52-56为实施例2、3、6、8、13中纳米制剂的透射电镜；  
[0083] 图57-61为实施例2、3、6、8、13中纳米制剂的透射电镜；  
[0084] 图62为实施例50得到的成活率检测结果；  
[0085] 图63为实施例50得到的体重变化检测结果。

### 具体实施方式

[0086] 以下具体实施方式用来进一步说明本发明,但本发明并不受其限制。

[0087] 实施例1 Ac-MMF偶联前药的合成,如图1所示:

[0088] 在100mL圆底烧瓶中依次加入MMF (43.2g, 0.10mmol)、冰乙酸 (6.0mg, 0.10mmol) 和DMAP (12.6mg, 0.10mmol), 溶解于4mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (16.6mg, 0.11mmol)。43℃搅拌6小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集滤液后减压除去溶剂; 通过柱层析色谱分离纯化 (DCM:MeOH=40:1) 后得到产物1 (20.5mg, 产率43.0%,  $[C_{25}H_{33}NO_8]^+[M+H]^+=476.2279$ )。

[0089] 实施例2 Hep-MMF偶联前药的合成, 如图2所示:

[0090] 在100mL圆底烧瓶中依次加入MMF (73.6mg, 0.17mmol)、正庚酸 (23.4mg, 0.18mmol) 和DMAP (20.6mg, 0.17mmol), 溶解于5mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (26.9mg, 0.17mmol)。43℃搅拌4小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集滤液后减压除去溶剂; 通过柱层析色谱分离纯化 (DCM:MeOH=20:1) 后得到产物2 (37.5mg, 产率40.5%)。

[0091] 产物2的<sup>1</sup>H NMR核磁数据如下, 核磁谱图如图27所示:

[0092] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ5.14 (s, 2H), 5.10 (t, 1H, J=13.4Hz), 4.17 (t, 2H, J=11.7Hz), 3.78 (s, 3H), 3.69 (t, 4H, J=9.3Hz), 3.34 (d, 2H, J=7.6Hz), 2.68 (t, 2H, J=15.3Hz), 2.58 (t, 2H, J=11.9Hz), 2.47 (t, 4H, J=9.3Hz), 2.36-2.41 (m, 2H), 2.27-2.31 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 1.75-1.81 (m, 5H), 1.44 (t, 2H, J=15.3Hz), 1.31-1.36 (m, 4H), 0.90 (t, 3H, J=13.0Hz)。

[0093] 实施例3 Ste-MMF偶联前药的合成, 如图3所示:

[0094] 在100mL圆底烧瓶中依次加入MMF (45.1mg, 0.10mmol)、硬脂酸 (31.4mg, 0.11mmol) 和DMAP (14.6mg, 0.12mmol), 溶解于5mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (17.5mg, 0.11mmol)。43℃搅拌4小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集滤液后减压除去溶剂; 通过柱层析色谱分离纯化 (DCM:MeOH=40:1) 后得到产物3 (36.4mg, 产率

52%)。

[0095] 产物3的<sup>1</sup>H NMR核磁数据如下,核磁谱图如图28所示:

[0096] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.14 (s, 2H), 5.10 (t, 1H, J=13.7Hz), 4.18 (t, 2H, J=11.8Hz), 3.78 (s, 3H), 3.70 (t, 4H, J=9.3Hz), 3.34 (d, 2H, J=6.7Hz), 2.67 (t, 2H, J=15.2Hz), 2.60 (t, 2H, J=11.8Hz), 2.49 (t, 4H, J=9.1Hz), 2.37-2.41 (m, 2H), 2.27-2.30 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 1.77-1.80 (m, 5H), 1.22-1.36 (m, 28H), 0.88 (t, 3H, J=13.6Hz)。

[0097] 实施例4 t-cos-MMF偶联前药的合成,如图4所示:

[0098] 在100mL圆底烧瓶中依次加入MMF (45.1mg, 0.10mmol)、二十四烷酸 (40.6mg, 0.11mmol) 和DMAP (14.6mg, 0.12mmol), 溶解于5mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (17.5mg, 0.11mmol)。43℃搅拌4小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集滤液后减压除去溶剂; 通过柱层析色谱分离纯化 (DCM:MeOH=40:1) 后得到产物4 (32.3mg, 产率41.2%, [C<sub>47</sub>H<sub>77</sub>NO<sub>8</sub>]<sup>+</sup>[M+H]<sup>+</sup>=784.5722)。

[0099] 实施例5 PA-MMF偶联前药的合成,如图5所示:

[0100] 在100mL圆底烧瓶中依次加入MMF (43.2mg, 0.10mmol)、棕榈油酸 (24.5mg, 0.10mmol) 和DMAP (12.6mg, 0.10mmol), 溶解于4mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (16.6mg, 0.11mmol)。43℃搅拌6小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集滤液后减压除去溶剂; 通过柱层析色谱分离纯化 (DCM:MeOH=40:1) 后得到产物5 (27.0mg, 产率40.2%, [C<sub>39</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>8</sub>]<sup>+</sup>[M+H]<sup>+</sup>=670.4313)。

[0101] 实施例6 OA-MMF偶联前药的合成,如图6所示:

[0102] 在100mL圆底烧瓶中依次加入MMF (46.8mg, 0.11mmol)、油酸 (31.6mg, 0.11mmol) 和DMAP (15.8mg, 0.13mmol), 溶解于5mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (17.5mg, 0.11mmol)。43℃搅拌5小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集滤液后减压除去溶剂; 通过柱层析色谱分离纯化 (DCM:MeOH=50:1) 后得到产物6 (35.5mg, 产率46.3%)。

[0103] 产物6的<sup>1</sup>H NMR核磁数据如下,核磁谱图如图29所示:

[0104] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.35 (t, 2H, J=9.9Hz), 5.14 (s, 2H), 5.10 (t, 1H, J=17.2Hz), 4.17 (t, 2H, J=11.9Hz), 3.78 (s, 3H), 3.69 (t, 4H, J=9.2Hz), 3.34 (d, 2H, J=6.7Hz), 2.67 (t, 2H, J=15.0Hz), 2.59 (t, 2H, J=12.0Hz), 2.49 (t, 4H, J=9.5Hz), 2.39 (t, 2H, J=14.7Hz), 2.28 (t, 2H, J=15.0Hz), 2.22 (s, 3H), 1.99-2.04 (m, 4H), 1.77-1.81 (m, 5H), 1.27-1.34 (m, 20H), 0.88 (t, 3H, J=13.2Hz)。

[0105] 实施例7 RA-MMF偶联前药的合成,如图7所示:

[0106] 在100mL圆底烧瓶中依次加入MMF (46.8mg, 0.11mmol)、蓖麻油酸 (32.8mg, 0.11mmol) 和DMAP (15.8mg, 0.13mmol), 溶解于5mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (17.5mg, 0.11mmol)。43℃搅拌5小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集滤液后减压除去溶剂; 通过柱层析色谱分离纯化 (DCM:MeOH=50:1) 后得到产物7

(32.4mg, 产率41.2%,  $[C_{41}H_{63}NO_9]^+[M+H]^+=714.4576$ )。

[0107] 实施例8 LA-MMF偶联前药的合成,如图8所示:

[0108] 在100mL圆底烧瓶中依次加入MMF (65mg, 0.15mmol)、亚油酸 (42.1mg, 0.15mmol) 和 DMAP (18.3mg, 0.15mmol), 溶解于4mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (23.3mg, 0.15mmol)。43℃搅拌3小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集滤液后减压除去溶剂; 通过柱层析色谱分离纯化 (DCM:MeOH=20:1) 后得到产物8 (47mg, 产率45.1%)。

[0109] 产物8的<sup>1</sup>H NMR核磁数据如下, 核磁谱图如图30所示:

[0110] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ5.30-5.42 (m, 4H), 5.14 (s, 2H), 5.10 (t, 1H, J=13.3Hz), 4.16 (t, 2H, J=11.8Hz), 3.78 (s, 3H), 3.68 (t, 4H, J=9.4Hz), 3.34 (d, 2H, J=6.9Hz), 2.78 (t, 2H, J=13.3Hz), 2.68 (t, 2H, J=15.4Hz), 2.57 (t, 2H, J=12.0Hz), 2.47 (t, 4H, J=9.2Hz), 2.36-2.41 (m, 2H), 2.26-2.31 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.03-2.08 (m, 4H), 1.75-1.81 (m, 5H), 1.25-1.36 (m, 14H), 0.89 (t, 3H, J=13.4Hz)。

[0111] 实施例9 LNA-MMF偶联前药的合成,如图9所示:

[0112] 在100mL圆底烧瓶中依次加入MMF (65mg, 0.15mmol)、亚麻酸 (42.1mg, 0.15mmol) 和 DMAP (18.3mg, 0.15mmol), 溶解于4mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (23.3mg, 0.15mmol)。43℃搅拌3小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集滤液后减压除去溶剂; 通过柱层析色谱分离纯化 (DCM:MeOH=20:1) 后得到产物9 (47.1mg, 产率45.2%,  $[C_{41}H_{59}NO_8]^+[M+H]^+=694.4313$ )。

[0113] 实施例10 GLA-MMF偶联前药的合成,如图10所示:

[0114] 在100mL圆底烧瓶中依次加入MMF (65mg, 0.15mmol)、次亚麻酸 (42.1mg, 0.15mmol) 和 DMAP (18.3mg, 0.15mmol), 溶解于4mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (23.3mg, 0.15mmol)。43℃搅拌3小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集滤液后减压除去溶剂; 通过柱层析色谱分离纯化 (DCM:MeOH=20:1) 后得到产物10 (44.2mg, 产率42.4%,  $[C_{41}H_{59}NO_8]^+[M+H]^+=694.4313$ )。

[0115] 实施例11 AA-MMF偶联前药的合成,如图11所示:

[0116] 在100mL圆底烧瓶中依次加入MMF (65mg, 0.15mmol)、花生四烯酸 (45.7mg, 0.15mmol) 和 DMAP (18.3mg, 0.15mmol), 溶解于4mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (23.3mg, 0.15mmol)。43℃搅拌3小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集滤液后减压除去溶剂; 通过柱层析色谱分离纯化 (DCM:MeOH=20:1) 后得到产物11 (46.9mg, 产率43.4%,  $[C_{43}H_{61}NO_8]^+[M+H]^+=720.4470$ )。

[0117] 实施例12 EPA-MMF偶联前药的合成,如图12所示:

[0118] 在100mL圆底烧瓶中依次加入MMF (65mg, 0.15mmol)、二十碳五烯酸 (45.4mg, 0.15mmol) 和 DMAP (18.3mg, 0.15mmol), 溶解于4mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (23.3mg, 0.15mmol)。43℃搅拌3小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收

集滤液后减压除去溶剂;通过柱层析色谱分离纯化(DCM:MeOH=40:1)后得到产物12(46.1mg,产率42.8%, $[C_{43}H_{59}NO_8]^+[M+H]^+=718.4313$ )。

[0119] 实施例13 DHA-MMF偶联前药的合成,如图13所示:

[0120] 在100mL圆底烧瓶中依次加入MMF(43.2mg,0.10mmol)、顺式-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸(34.5mg,0.10mmol)和DMAP(12.6mg,0.10mmol),溶解于4mL无水二氯甲烷,再快速滴加EDC(16.6mg,0.11mmol)。43℃搅拌6小时,利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时,冷却反应液,分别用0.1M盐酸溶液,饱和碳酸氢钠,饱和食盐水清洗;有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,收集滤液后减压除去溶剂;通过柱层析色谱分离纯化(DCM:MeOH=40:1)后得到产物13(32.7mg,产率43.9%)。

[0121] 产物13的 $^1H$  NMR核磁数据如下,核磁谱图如图31所示:

[0122]  $^1H$  NMR(400MHz,  $CDCl_3$ ): $\delta$ 5.29-5.50(m,12H),5.15(s,2H),5.10(t,1H, $J=13.6$ Hz),4.17(t,2H, $J=12.0$ Hz),3.79(s,3H),3.70(t,4H, $J=9.3$ Hz),3.34(d,2H, $J=6.7$ Hz),2.79-2.89(m,10H),2.76(t,2H, $J=15.2$ Hz),2.55-2.66(m,4H),2.49(t,4H, $J=9.3$ Hz),2.36-2.41(m,2H),2.26-2.31(m,2H),2.22(s,3H),2.04-2.11(m,2H),1.77(s,3H),0.97(t,3H, $J=15.1$ Hz)。

[0123] 实施例14 Ac-FK506偶联前药的合成,如图14所示:

[0124] 在100mL圆底烧瓶中依次加入FK506(80.4mg,0.10mmol)、冰乙酸(6.0mg,0.10mmol)和DMAP(12.6mg,0.10mmol),溶解于4mL无水二氯甲烷,再快速滴加EDC(16.6mg,0.11mmol)。43℃搅拌6小时,利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时,冷却反应液,分别用0.1M盐酸溶液,饱和碳酸氢钠,饱和食盐水清洗;有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,收集滤液后减压除去溶剂;通过柱层析色谱分离纯化(DCM:MeOH=40:1)后得到产物14(39.0mg,产率46.1%, $[C_{46}H_{71}NO_{13}]^+[M+H]^+=846.4998$ )。

[0125] 实施例15 Hep-FK506偶联前药的合成,如图15所示:

[0126] 在100mL圆底烧瓶中依次加入FK506(136.7mg,0.17mmol)、正庚酸(23.4mg,0.18mmol)和DMAP(20.6mg,0.17mmol),溶解于5mL无水二氯甲烷,再快速滴加EDC(23.7mg,0.15mmol)。43℃搅拌4小时,利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时,冷却反应液,分别用0.1M盐酸溶液,饱和碳酸氢钠,饱和食盐水清洗;有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,收集滤液后减压除去溶剂;通过柱层析色谱分离纯化(DCM:MeOH=40:1)后得到产物15(65.0mg,产率41.7%, $[C_{51}H_{81}NO_{13}]^+[M+H]^+=916.5781$ )。

[0127] 实施例16 Ste-FK506偶联前药的合成,如图16所示:

[0128] 在100mL圆底烧瓶中依次加入FK506(80.4mg,0.10mmol)、硬脂酸(31.4mg,0.11mmol)和DMAP(14.6mg,0.12mmol),溶解于5mL无水二氯甲烷,再快速滴加EDC(17.5mg,0.11mmol)。43℃搅拌4小时,利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时,冷却反应液,分别用0.1M盐酸溶液,饱和碳酸氢钠,饱和食盐水清洗;有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,收集滤液后减压除去溶剂;通过柱层析色谱分离纯化(DCM:MeOH=40:1)后得到产物16(50.6mg,产率47.3%, $[C_{62}H_{103}NO_{13}]^+[M+H]^+=1070.7502$ )。

[0129] 实施例17 t-cos-FK506偶联前药的合成,如图17所示:

[0130] 在100mL圆底烧瓶中依次加入FK506(80.4mg,0.10mmol)、二十四烷酸(40.6mg,0.11mmol)和DMAP(14.6mg,0.12mmol),溶解于5mL无水二氯甲烷,再快速滴加EDC(17.5mg,

0.11mmol)。43℃搅拌4小时,利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时,冷却反应液,分别用0.1M盐酸溶液,饱和碳酸氢钠,饱和食盐水清洗;有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,收集滤液后减压除去溶剂;通过柱层析色谱分离纯化(DCM:MeOH=40:1)后得到产物17(54.2mg,产率46.9%, $[C_{68}H_{115}NO_{13}]^+[M+H]^+=1154.8441$ )。

[0131] 实施例18 PA-FK506偶联前药的合成,如图18所示:

[0132] 在100mL圆底烧瓶中依次加入FK506(80.4mg,0.10mmol)、棕榈油酸(25.5mg,0.10mmol)和DMAP(12.6mg,0.10mmol),溶解于4mL无水二氯甲烷,再快速滴加EDC(16.6mg,0.11mmol)。43℃搅拌6小时,利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时,冷却反应液,分别用0.1M盐酸溶液,饱和碳酸氢钠,饱和食盐水清洗;有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,收集滤液后减压除去溶剂;通过柱层析色谱分离纯化(DCM:MeOH=40:1)后得到产物18(43.8mg,产率42.1%, $[C_{60}H_{97}NO_{13}]^+[M+H]^+=1040.7033$ )。

[0133] 实施例19 OA-FK506偶联前药的合成,如图19所示:

[0134] 在100mL圆底烧瓶中依次加入FK506(88.4mg,0.11mmol)、油酸(31.6mg,0.11mmol)和DMAP(15.8mg,0.13mmol),溶解于5mL无水二氯甲烷,再快速滴加EDC(17.5mg,0.11mmol)。43℃搅拌5小时,利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时,冷却反应液,分别用0.1M盐酸溶液,饱和碳酸氢钠,饱和食盐水清洗;有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,收集滤液后减压除去溶剂;通过柱层析色谱分离纯化(DCM:MeOH=50:1)后得到产物19(47.4mg,产率40.3%, $[C_{62}H_{101}NO_{13}]^+[M+H]^+=1068.7346$ )。

[0135] 实施例20 RA-FK506偶联前药的合成,如图20所示:

[0136] 在100mL圆底烧瓶中依次加入FK506(88.4mg,0.11mmol)、蓖麻油酸(32.8mg,0.11mmol)和DMAP(15.8mg,0.13mmol),溶解于5mL无水二氯甲烷,再快速滴加EDC(17.5mg,0.11mmol)。43℃搅拌5小时,利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时,冷却反应液,分别用0.1M盐酸溶液,饱和碳酸氢钠,饱和食盐水清洗;有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,收集滤液后减压除去溶剂;通过柱层析色谱分离纯化(DCM:MeOH=50:1)后得到产物20(46.1mg,产率38.6%, $[C_{62}H_{101}NO_{14}]^+[M+H]^+=1084.7295$ )。

[0137] 实施例21 LA-FK506偶联前药的合成,如图21所示:

[0138] 在100mL圆底烧瓶中依次加入FK506(120.6mg,0.15mmol)、亚油酸(42.1mg,0.15mmol)和DMAP(18.3mg,0.15mmol),溶解于4mL无水二氯甲烷,再快速滴加EDC(23.3mg,0.15mmol)。43℃搅拌3小时,利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时,冷却反应液,分别用0.1M盐酸溶液,饱和碳酸氢钠,饱和食盐水清洗;有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,收集滤液后减压除去溶剂;通过柱层析色谱分离纯化(DCM:MeOH=40:1)后得到产物21(63.2mg,产率39.5%, $[C_{62}H_{99}NO_{13}]^+[M+H]^+=1066.7189$ )。

[0139] 实施例22 LNA-FK506偶联前药的合成,如图22所示:

[0140] 在100mL圆底烧瓶中依次加入FK506(120.6mg,0.15mmol)、亚麻酸(42.1mg,0.15mmol)和DMAP(18.3mg,0.15mmol),溶解于4mL无水二氯甲烷,再快速滴加EDC(23.3mg,0.15mmol)。43℃搅拌3小时,利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时,冷却反应液,分别用0.1M盐酸溶液,饱和碳酸氢钠,饱和食盐水清洗;有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,收集滤液后减压除去溶剂;通过柱层析色谱分离纯化(DCM:MeOH=40:1)后得到产物22(65.3mg,产率40.9%, $[C_{62}H_{97}NO_{13}]^+[M+H]^+=1064.7033$ )。

[0141] 实施例23 GLA-FK506偶联前药的合成,如图23所示:

[0142] 在100mL圆底烧瓶中依次加入FK506 (120.6mg, 0.15mmol)、次亚麻酸 (42.1mg, 0.15mmol) 和DMAP (18.3mg, 0.15mmol), 溶解于4mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (23.3mg, 0.15mmol)。43℃搅拌3小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集滤液后减压除去溶剂; 通过柱层析色谱分离纯化 (DCM:MeOH=40:1) 后得到产物23 (66.1mg, 产率41.4%,  $[C_{62}H_{97}NO_{13}]^+[M+H]^+=1064.7033$ )。

[0143] 实施例24 AA-FK506偶联前药的合成,如图24所示:

[0144] 在100mL圆底烧瓶中依次加入FK506 (120.6mg, 0.15mmol)、花生四烯酸 (45.7mg, 0.15mmol) 和DMAP (18.3mg, 0.15mmol), 溶解于4mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (23.3mg, 0.15mmol)。43℃搅拌3小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集滤液后减压除去溶剂; 通过柱层析色谱分离纯化 (DCM:MeOH=40:1) 后得到产物24 (60.2mg, 产率36.8%,  $[C_{64}H_{99}NO_{13}]^+[M+H]^+=1090.7189$ )。

[0145] 实施例25 EPA-FK506偶联前药的合成,如图25所示:

[0146] 在100mL圆底烧瓶中依次加入FK506 (120.6mg, 0.15mmol)、二十碳五烯酸 (45.4mg, 0.15mmol) 和DMAP (18.3mg, 0.15mmol), 溶解于4mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (23.3mg, 0.15mmol)。43℃搅拌3小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集滤液后减压除去溶剂; 通过柱层析色谱分离纯化 (DCM:MeOH=40:1) 后得到产物25 (74.5mg, 产率45.6%,  $[C_{64}H_{97}NO_{13}]^+[M+H]^+=1088.7033$ )。

[0147] 实施例26 DHA-FK506偶联前药的合成,如图26所示:

[0148] 在100mL圆底烧瓶中依次加入FK506 (80.4mg, 0.10mmol)、顺式-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸 (32.8mg, 0.10mmol) 和DMAP (12.6mg, 0.10mmol), 溶解于4mL无水二氯甲烷, 再快速滴加EDC (16.6mg, 0.11mmol)。43℃搅拌6小时, 利用薄层色谱观察反应情况。当反应基本结束时, 冷却反应液, 分别用0.1M盐酸溶液, 饱和碳酸氢钠, 饱和食盐水清洗; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集滤液后减压除去溶剂; 通过柱层析色谱分离纯化 (DCM:MeOH=40:1) 后得到产物26 (48.2mg, 产率42.6%,  $[C_{67}H_{103}NO_{13}]^+[M+H]^+=1130.7502$ )。

[0149] 实施例27 Hep-MMF自组装纳米制剂的制备

[0150] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的Hep-MMF自组装纳米制剂。以MMF的质量计算, 将相对应量的Hep-MMF (实施例2制备得到) 溶于100 $\mu$ L二甲基亚砜溶液, 再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析 ( $M_w$ 3500) 除去有机溶剂, 得到均匀分散的纳米颗粒。其粒径分布及透射电镜如图32、47所示。

[0151] 实施例28 Ste-MMF自组装纳米制剂的制备

[0152] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的Ste-MMF自组装纳米制剂。以MMF的质量计算, 将相对应量的Ste-MMF (实施例3制备得到) 溶于100 $\mu$ L二甲基亚砜溶液, 再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析 ( $M_w$ 3500) 除去有机溶剂, 得到均匀分散的纳米颗粒。其粒径分布及透射电镜如图33、48所示。

[0153] 实施例29 OA-MMF自组装纳米制剂的制备

[0154] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的OA-MMF自组装纳米制剂。以MMF的质量计算,将相对应量的OA-MMF(实施例8制备得到)溶于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析( $M_w$ 3500)除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。其粒径分布及透射电镜如图34、49所示。

[0155] 实施例30 LA-MMF自组装纳米制剂的制备

[0156] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的LA-MMF自组装纳米制剂。以MMF的质量计算,将相对应量的LA-MMF(实施例6制备得到)溶于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析( $M_w$ 3500)除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。其粒径分布及透射电镜如图35、50所示。

[0157] 实施例31 DHA-MMF自组装纳米制剂的制备

[0158] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的DHA-MMF自组装纳米制剂。以MMF的质量计算,将相对应量的DHA-MMF(实施例13制备得到)溶于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析( $M_w$ 3500)除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。其粒径分布及透射电镜如图36、51所示。

[0159] 实施例32 Hep-FK506自组装纳米制剂的制备

[0160] 制备FK506最终浓度为1mg/ml的Hep-FK506自组装纳米制剂。以FK506的质量计算,将相对应量的Hep-FK506(实施例15制备得到)溶于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析( $M_w$ 3500)除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。

[0161] 实施例33 Ste-FK506自组装纳米制剂的制备

[0162] 制备FK506最终浓度为1mg/ml的Ste-FK506自组装纳米制剂。以FK506的质量计算,将相对应量的Ste-FK506(实施例16制备得到)溶于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析( $M_w$ 3500)除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。

[0163] 实施例34 LA-FK506自组装纳米制剂的制备

[0164] 制备FK506最终浓度为1mg/ml的LA-FK506自组装纳米制剂。以FK506的质量计算,将相对应量的LA-FK506(实施例21制备得到)溶于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析( $M_w$ 3500)除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。

[0165] 实施例35 DHA-FK506自组装纳米制剂的制备

[0166] 制备FK506最终浓度为1mg/ml的DHA-FK506自组装纳米制剂。以FK506的质量计算,将相对应量的DHA-FK506(实施例26制备得到)溶于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析( $M_w$ 3500)除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。

[0167] 实施例36 Hep-MMF/FK506共组装纳米制剂的制备

[0168] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的Hep-MMF/FK506共组装纳米制剂。以MMF的质量计算,将Hep-MMF、FK506按质量比20:1混合于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析( $M_w$ 3500)除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。其粒径分布及透射电镜如图37、52所示。

[0169] 实施例37 Ste-MMF/FK506共组装纳米制剂的制备

[0170] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的Ste-MMF/FK506共组装纳米制剂。以MMF的质量计算,将Ste-MMF、FK506按质量比20:1混合于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析( $M_w$ 3500)除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。其粒径分布及透

射电镜如图38、53所示。

[0171] 实施例38 OA-MMF/FK506共组装纳米制剂的制备

[0172] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的OA-MMF/FK506共组装纳米制剂。以MMF的质量计算,将OA-MMF、FK506按质量比20:1混合于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析 ( $M_w$ 3500) 除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。其粒径分布及透射电镜如图39、54所示。

[0173] 实施例39 LA-MMF/FK506共组装纳米制剂的制备

[0174] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的LA-MMF/FK506共组装纳米制剂。以MMF的质量计算,将LA-MMF、FK506按质量比20:1混合于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析 ( $M_w$ 3500) 除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。其粒径分布及透射电镜如图40、55所示。

[0175] 实施例40 DHA-MMF/FK506共组装纳米制剂的制备

[0176] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的DHA-MMF/FK506共组装纳米制剂。以MMF的质量计算,将DHA-MMF、FK506按质量比20:1混合于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析 ( $M_w$ 3500) 除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。其粒径分布及透射电镜如图41、56所示。

[0177] 实施例41 LA-MMF/LA-FK506共组装纳米制剂的制备

[0178] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的LA-MMF/LA-FK506共组装纳米制剂。以MMF、FK506的质量计算,将LA-MMF、LA-FK506按质量比20:1混合于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析 ( $M_w$ 3500) 除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。

[0179] 实施例42 DHA-MMF/DHA-FK506共组装纳米制剂的制备

[0180] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的DHA-MMF/DHA-FK506共组装纳米制剂。以MMF、FK506的质量计算,将LA-MMF、LA-FK506按质量比20:1混合于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析 ( $M_w$ 3500) 除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。

[0181] 实施例43 聚乙二醇化Hep-MMF/FK506共组装纳米制剂的制备

[0182] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的聚乙二醇化Hep-MMF/FK506共组装纳米制剂。以MMF的质量计算,将Hep-MMF、FK506以及DSPE-PEG<sub>2k</sub>按质量比20:1:2混合于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析 ( $M_w$ 3500) 除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。其粒径分布及透射电镜如图42、57所示。

[0183] 实施例44 聚乙二醇化Ste-MMF/FK506共组装纳米制剂的制备

[0184] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的聚乙二醇化Ste-MMF/FK506共组装纳米制剂。以MMF的质量计算,将Ste-MMF、FK506以及DSPE-PEG<sub>2k</sub>按质量比20:1:2混合于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析 ( $M_w$ 3500) 除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。其粒径分布及透射电镜如图43、58所示。

[0185] 实施例45 聚乙二醇化LA-MMF/FK506共组装纳米制剂的制备

[0186] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的聚乙二醇化LA-MMF/FK506共组装纳米制剂。以MMF的质量计算,将LA-MMF、FK506以及DSPE-PEG<sub>2k</sub>按质量比20:1:2混合于100 $\mu$ L二甲基亚砷溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析 ( $M_w$ 3500) 除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。其粒径分布及透射电镜如图44、59所示。

[0187] 实施例46 聚乙二醇化OA-MMF/FK506共组装纳米制剂的制备

[0188] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的聚乙二醇化OA-MMF/FK506共组装纳米制剂。以MMF的质量计算,将OA-MMF、FK506以及DSPE-PEG<sub>2k</sub>按质量比20:1:2混合于100 $\mu$ L二甲基亚砜溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析( $M_w$ 3500)除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。其粒径分布及透射电镜如图45、60所示。

[0189] 实施例47 聚乙二醇化DHA-MMF/FK506共组装纳米制剂的制备

[0190] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的聚乙二醇化DHA-MMF/FK506共组装纳米制剂。以MMF的质量计算,将DHA-MMF、FK506以及DSPE-PEG<sub>2k</sub>按质量比20:1:2混合于100 $\mu$ L二甲基亚砜溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析( $M_w$ 3500)除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。其粒径分布及透射电镜如图46、61所示。

[0191] 实施例48 聚乙二醇化LA-MMF/LA-FK506共组装纳米制剂的制备

[0192] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的聚乙二醇化LA-MMF/LA-FK506共组装纳米制剂。以MMF、FK506的质量计算,将LA-MMF、LA-FK506以及DSPE-PEG<sub>2k</sub>按质量比20:1:2混合于100 $\mu$ L二甲基亚砜溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析( $M_w$ 3500)除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。

[0193] 实施例49 聚乙二醇化DHA-MMF/DHA-FK506共组装纳米制剂的制备

[0194] 制备MMF最终浓度为1mg/ml的聚乙二醇化DHA-MMF/DHA-FK506共组装纳米制剂。以MMF、FK506的质量计算,将DHA-MMF、DHA-FK506以及DSPE-PEG<sub>2k</sub>按质量比20:1:2混合于100 $\mu$ L二甲基亚砜溶液,再于超声条件下快速注入900 $\mu$ L水中。最后透析( $M_w$ 3500)除去有机溶剂,得到均匀分散的纳米颗粒。

[0195] 实施例50 LA-MMF前药脂质体的制备

[0196] 为了制备载药量为4%,最终药物浓度为1mg/mL的LA-MMF前药脂质体,首先将卵磷脂、胆固醇和DSPE-PEG<sub>2k</sub>质量比为35:5:8的脂质混合物溶于0.9mL乙醇中,再将0.1mL,10mg/mL溶于乙醇的LA-MMF前药与以上0.9mL脂质混合物混合后直接注入到10mL水中,得到脂质体颗粒。利用超高速离心机离心100000g $\times$ 10min去除有机溶剂,取沉淀得到高纯度的脂质颗粒稀释后利用高效液相测浓度。根据高效液相测出的脂质体浓度再将脂质体稀释到1mg/mL。该脂质体溶液可冻干得到冻干粉。

[0197] 实施例51 DHA-MMF前药脂质体的制备

[0198] 为了制备载药量为4%,最终药物浓度为1mg/mL的DHA-MMF前药脂质体,首先将卵磷脂、胆固醇和DSPE-PEG<sub>2k</sub>质量比为35:5:8的脂质混合物溶于0.9mL乙醇中,再将0.1mL,10mg/mL溶于乙醇的DHA-MMF前药与以上0.9mL脂质混合物混合后直接注入到10mL水中,得到脂质体颗粒。利用超高速离心机离心100000g $\times$ 10min去除有机溶剂,取沉淀得到高纯度的脂质颗粒稀释后利用高效液相测浓度。

[0199] 实施例52 LA-MMF聚合物纳米制剂的制备

[0200] 为了制备载药量为5%,最终药物浓度为1mg/mL的LA-MMF前药聚合物胶束载药颗粒,首先将聚乙二醇-聚乳酸(分子量为5k-10k)/LA-MMF(1mg)质量比为20:1的混合物溶于1mL丙酮中,再将丙酮溶于缓慢注入到10mL水中,得到胶束颗粒。除去有机溶剂后浓缩得到LA-MMF(1mg/mL)的载药纳米颗粒。该聚合物胶束溶液可冻干得到冻干粉。

[0201] 实施例53 肝脏移植模型的构建及联合免疫抑制治疗实验

[0202] 构建急性排斥大鼠肝移植模型,分别将DA大鼠和Lewis大鼠作为供体及受体,依据Kamada和Calne建立的“双袖套技术”进行肝移植手术。DA大鼠麻醉后进行全身肝素化,分离出供肝并短期置于4℃Ringer平衡液中,随后原位移植于Lewis大鼠。肝上下腔静脉的重建用缝合法,肝下腔静脉及门静脉的重建用“袖套法”。肝移植手术后第二天开始用药,每两天给药1次,共7次(给药量见图62、63所示)。纳米药物组以尾静脉的方式给药,MMF及FK506临床用药形式经口服给药,给药后15天内记录大鼠体重变化情况并以Lewis大鼠存活时间作为药物治疗效果的评价依据。如图62、63所示(图中n为实验老鼠数量),相较于生理盐水组(Saline),MMF及FK506(即TAC)临床用药形式(Combo)、纳米药物组(SAIC,为实施例45制备得到)均有效延长了肝移植受体(Lewis大鼠)的中位生存期。纳米药物组相较于MMF及FK506临床用药形式,具有更为显著的治疗效果。

[0203] 综上所述,本发明上述形式的纳米制剂显著提高了MMF及FK506的水溶性,避免使用增溶剂等辅料,进一步提高载药量;同时用于修饰的饱和或不饱和脂肪酸为人体所需物质,生物相容性好,便于临床转化,具有较好的应用前景。更为重要的是,聚乙二醇化MMF-饱和或不饱和脂肪酸偶联前药及FK506共组装纳米制剂,显著改善了药物的药代动力学特性,延长其体内循环时间,可将MMF及FK506同时递送至靶部位,发挥药效,对比临床MMF/FK506具有更优的抗移植排斥效应。

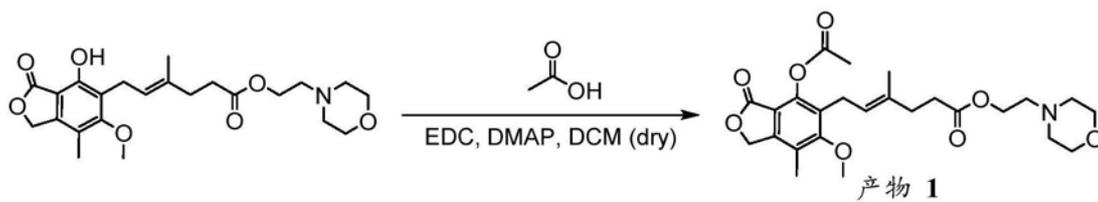


图1

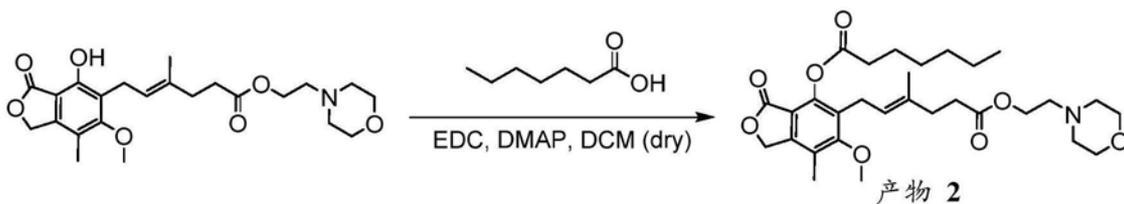


图2

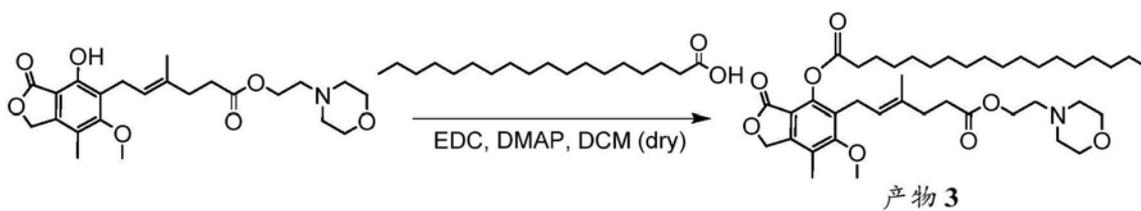


图3

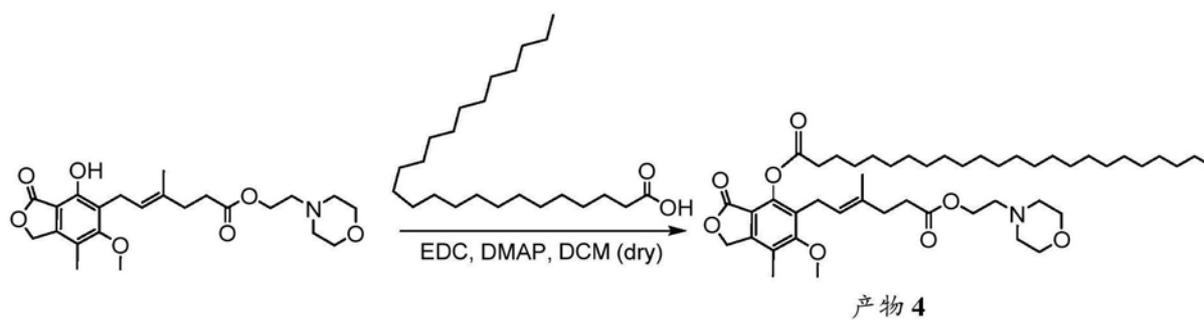


图4

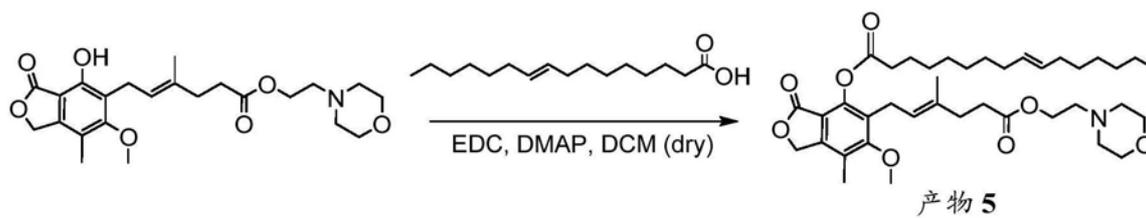


图5

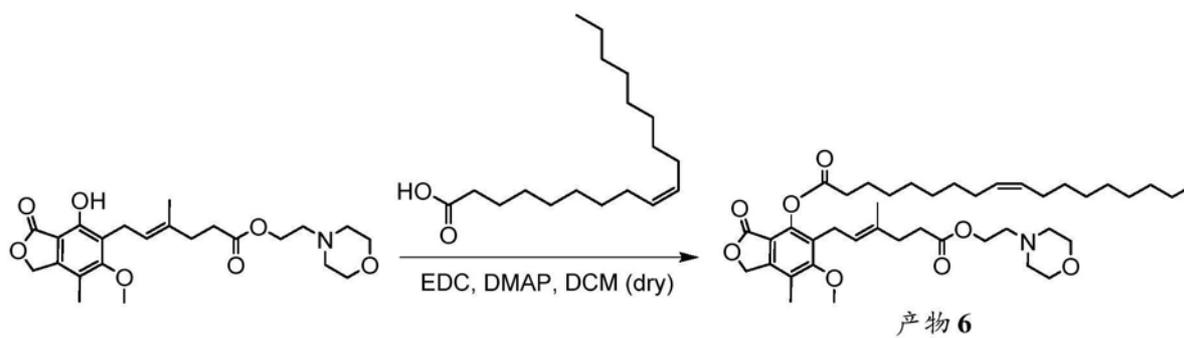


图6

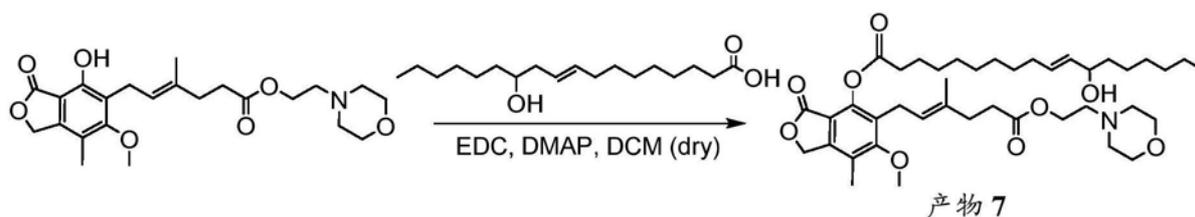


图7

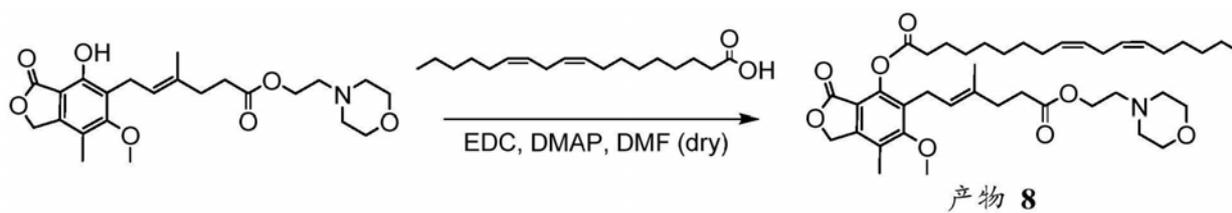


图8

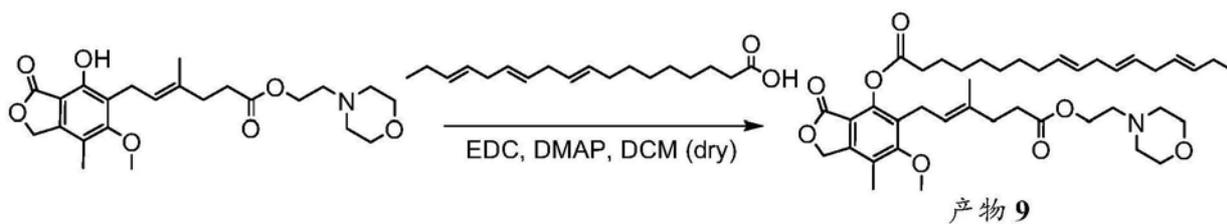


图9

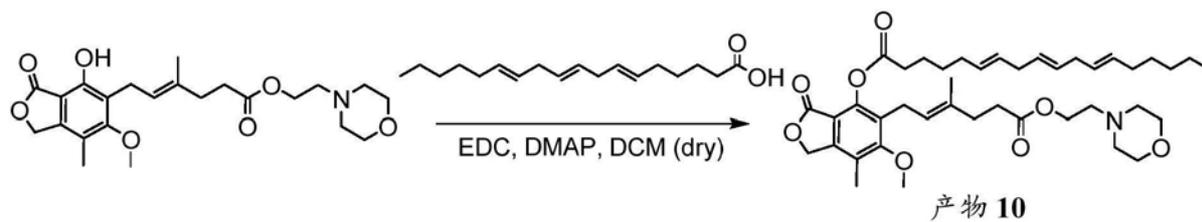


图10

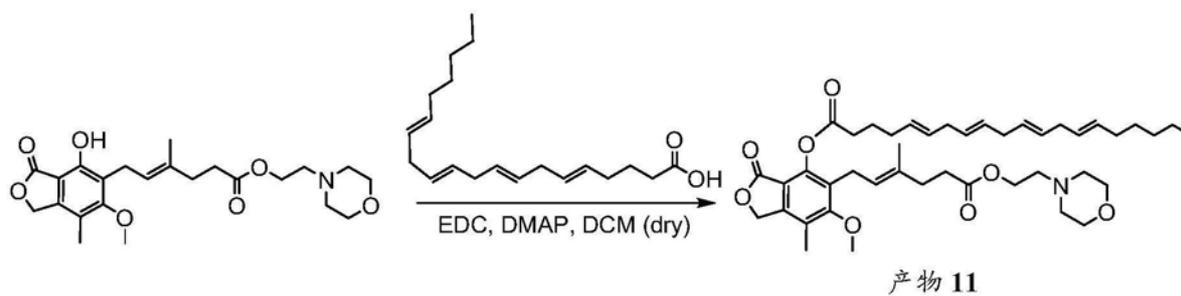


图11

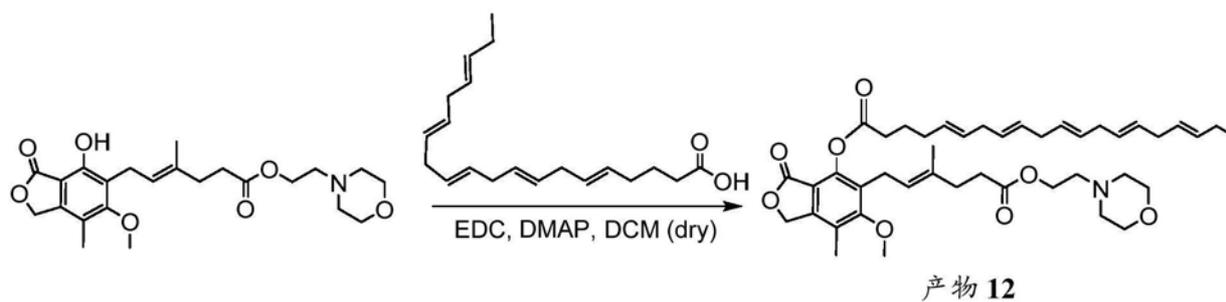


图12

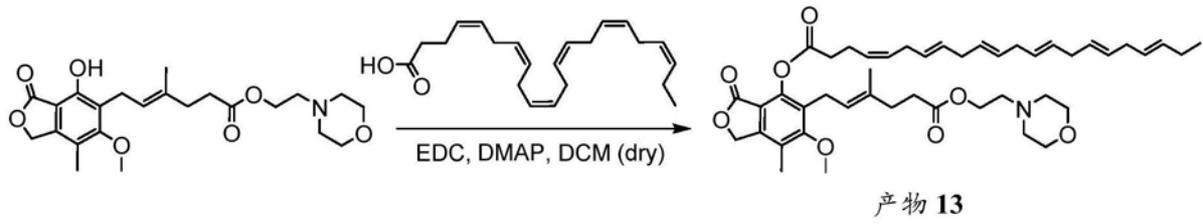


图13

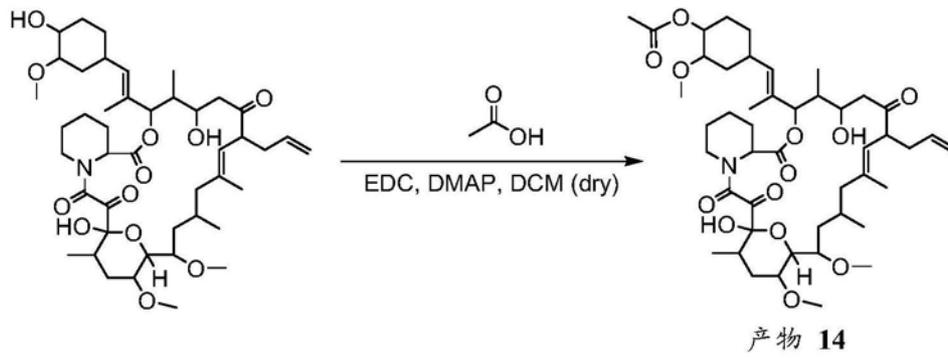


图14

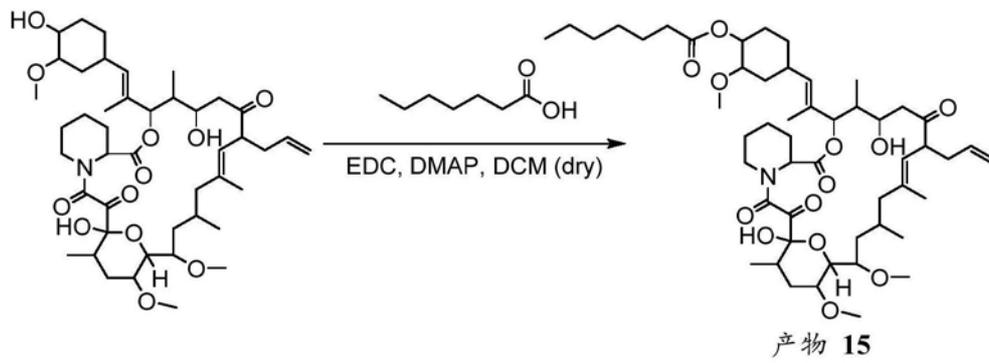


图15

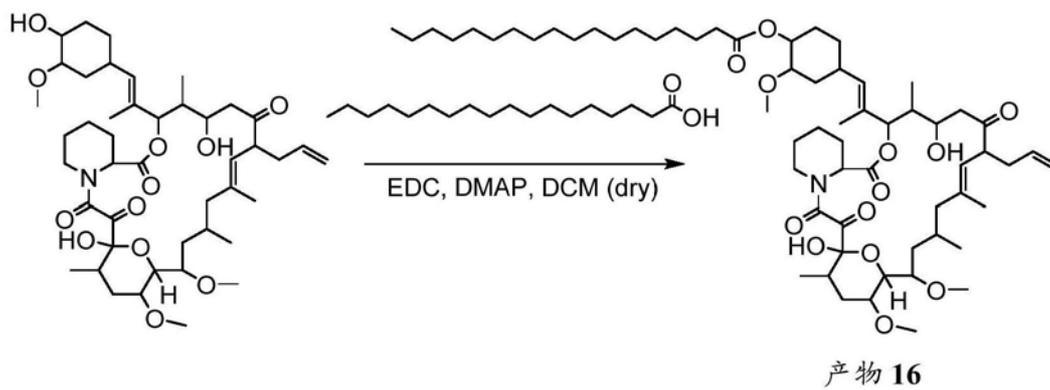


图16

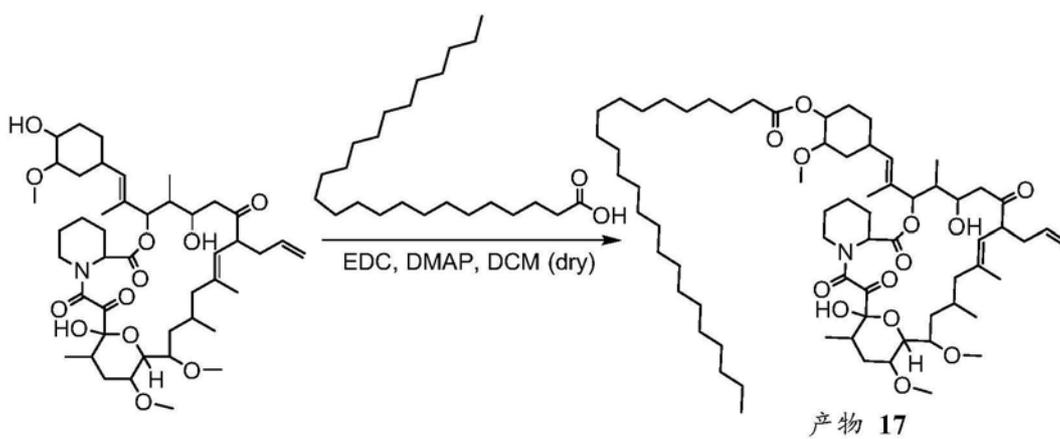


图17

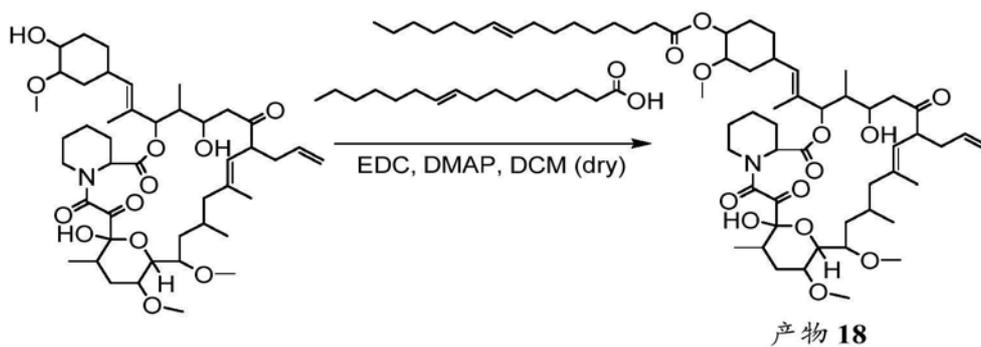


图18

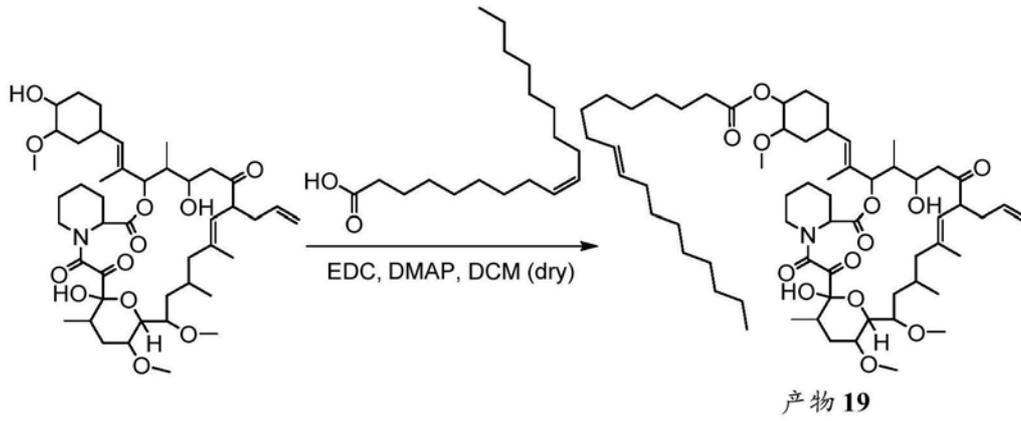


图19

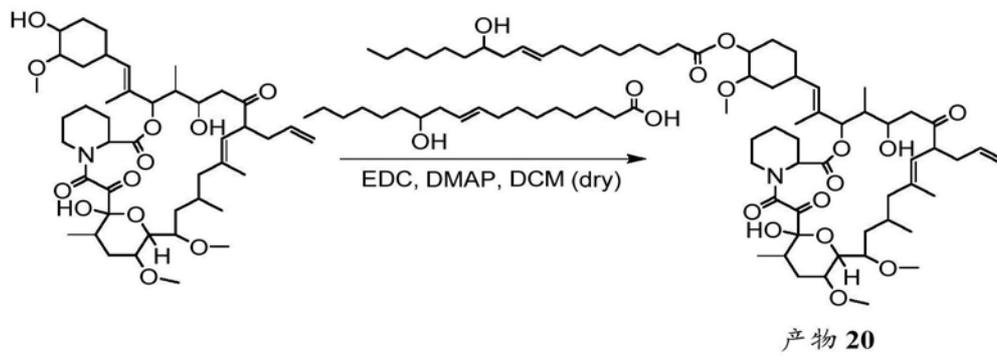


图20

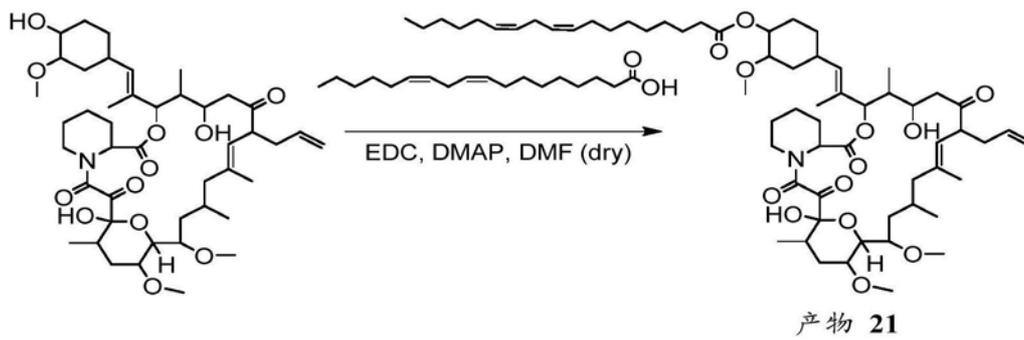


图21

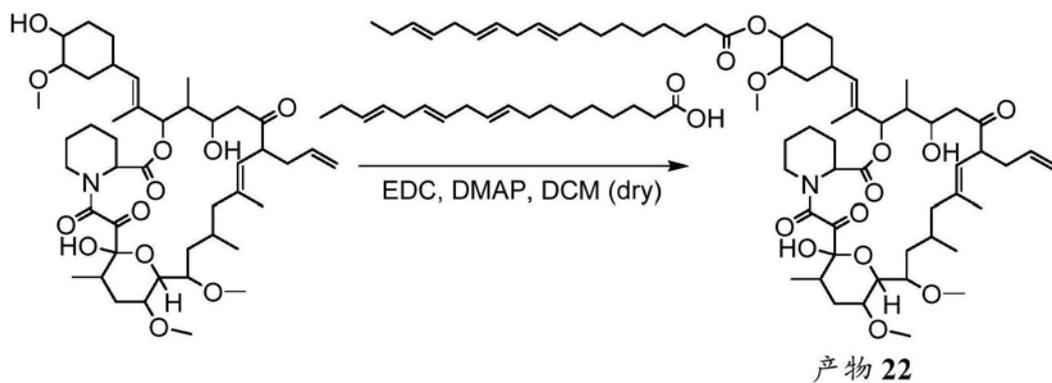


图22

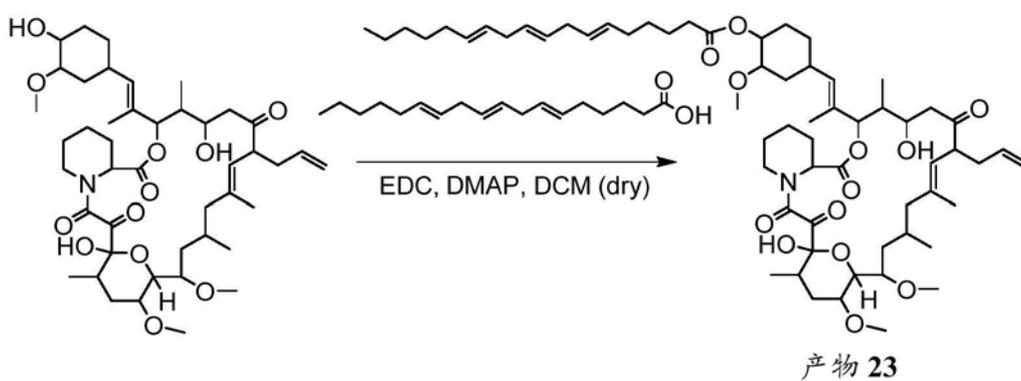


图23

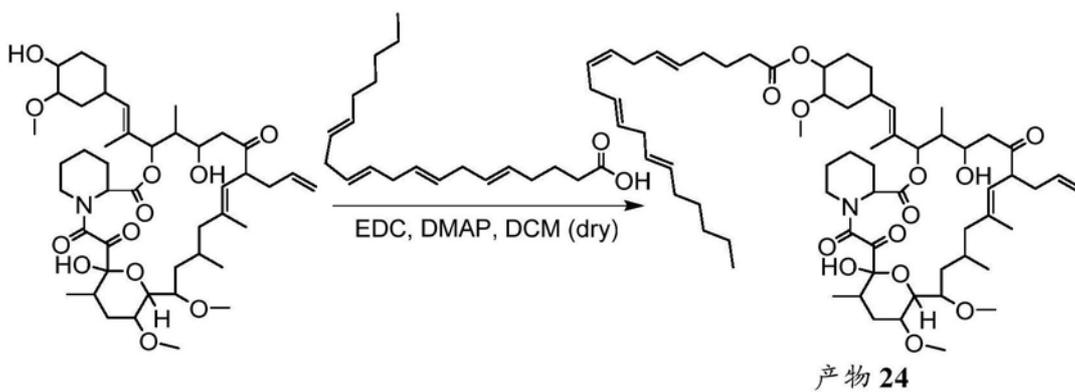


图24

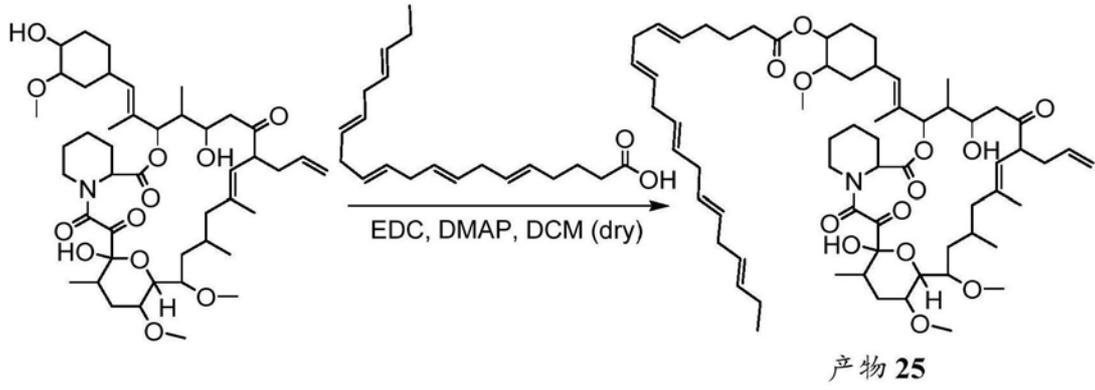


图25

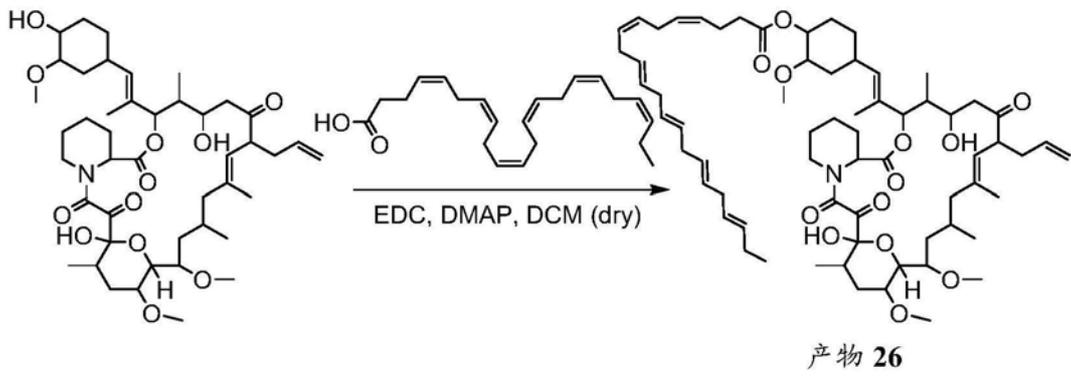


图26

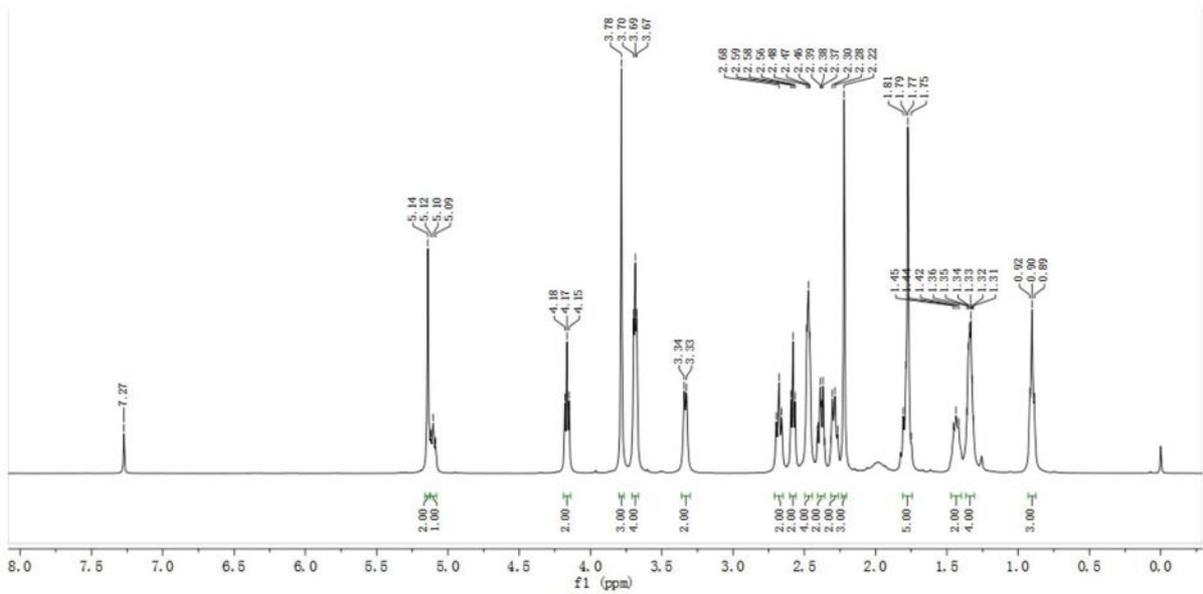


图27

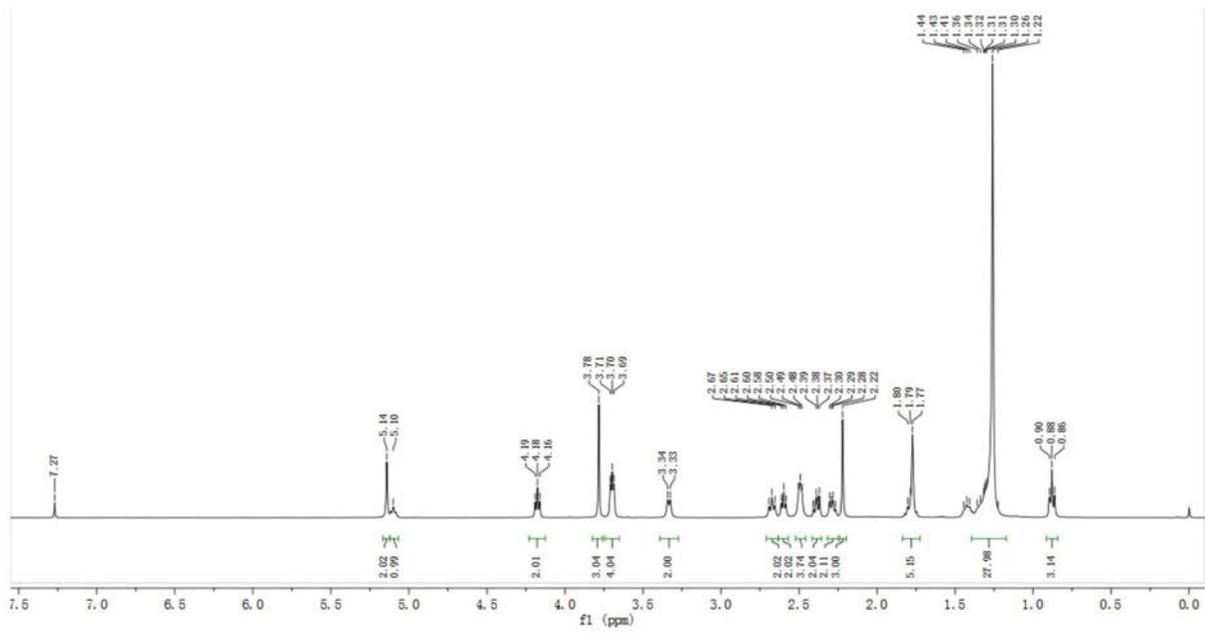


图28

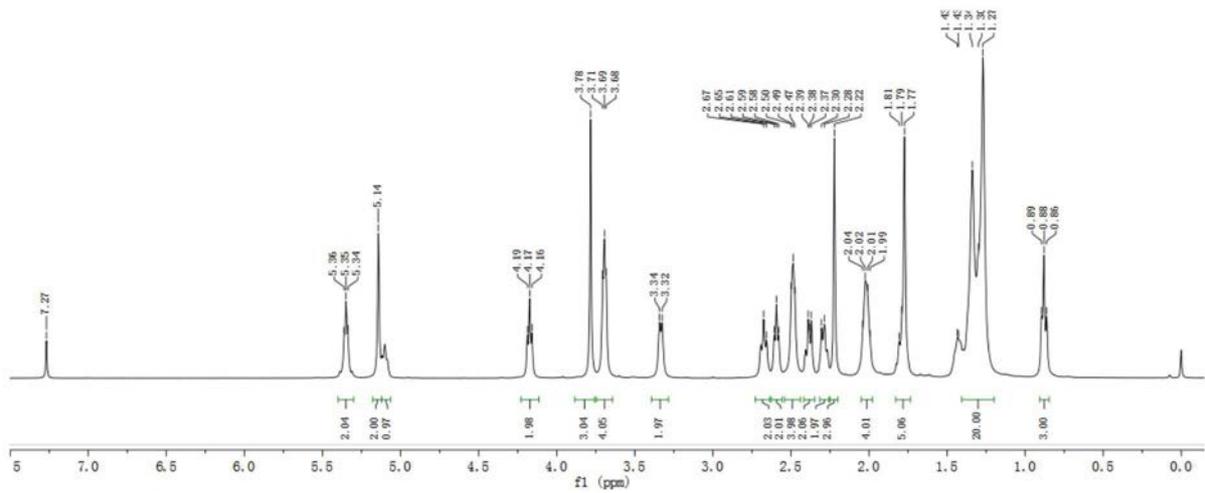


图29

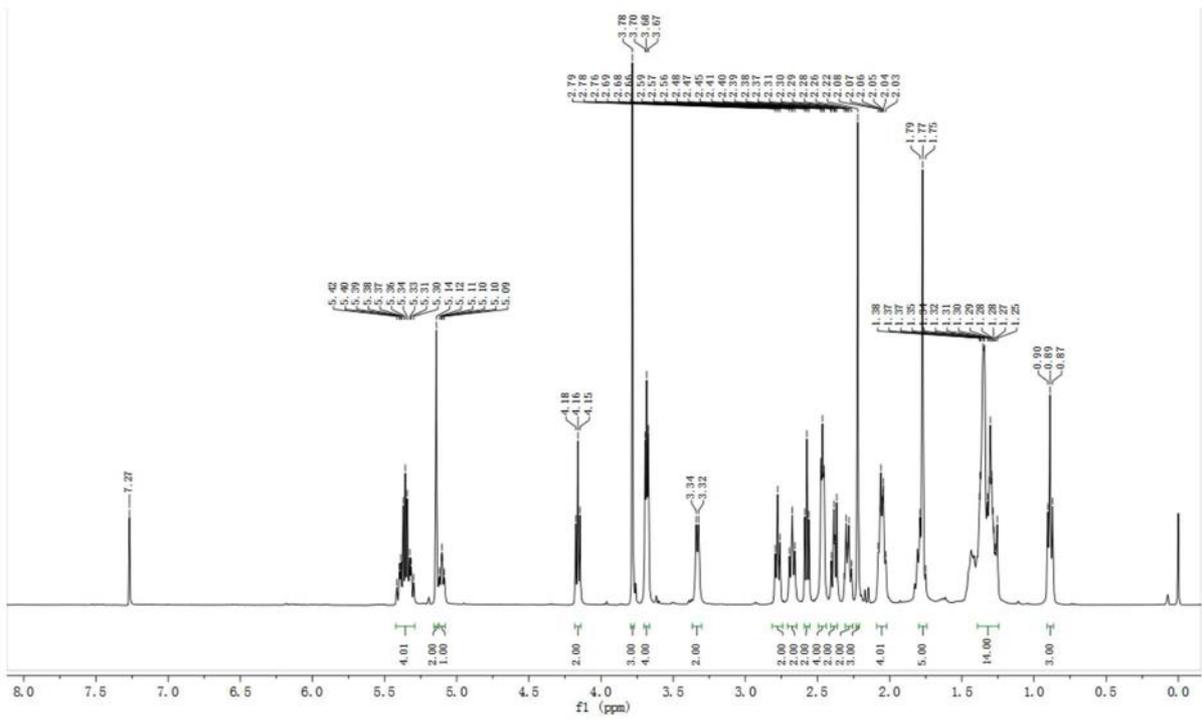


图30

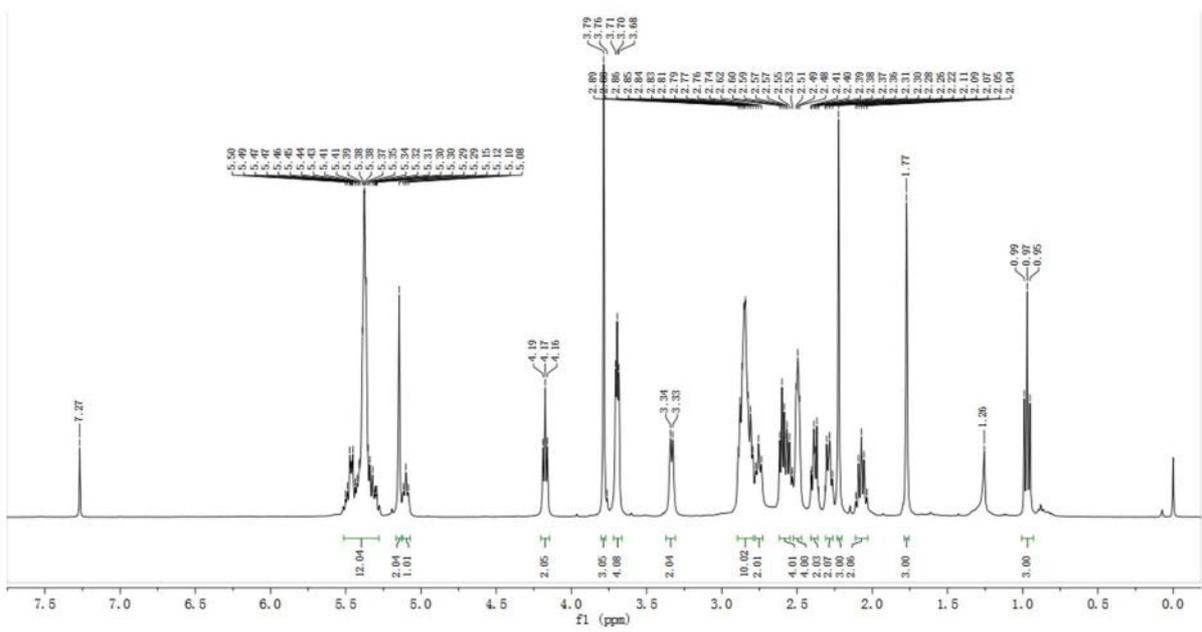


图31

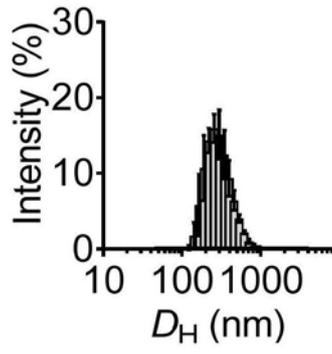


图32

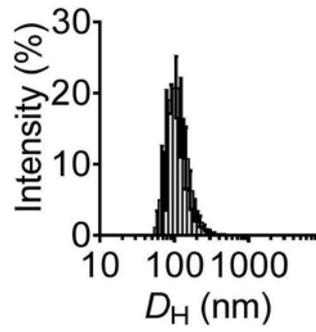


图33

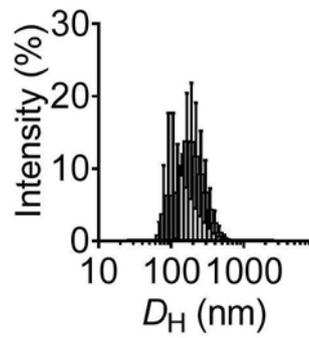


图34

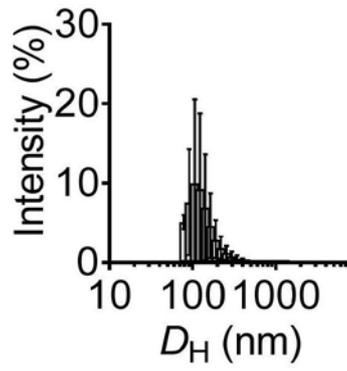


图35

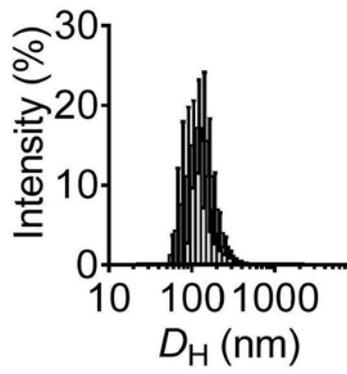


图36

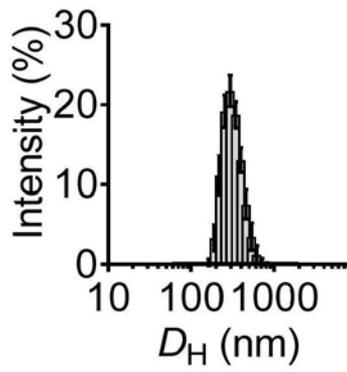


图37

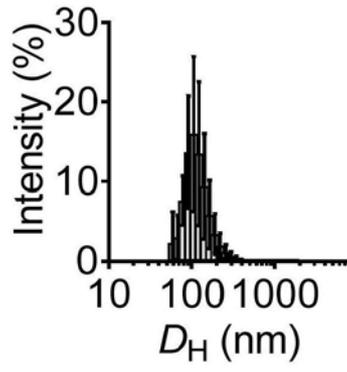


图38

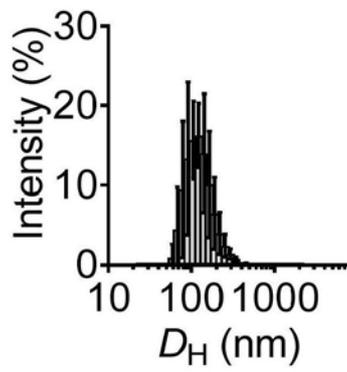


图39

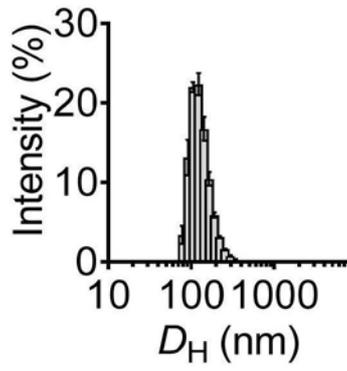


图40

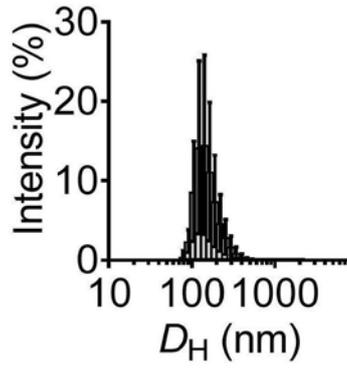


图41

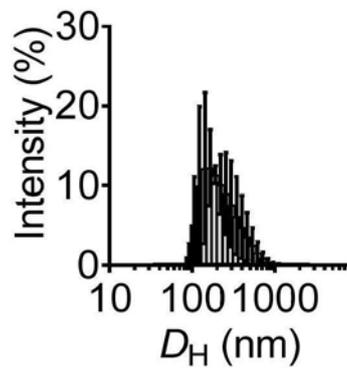


图42

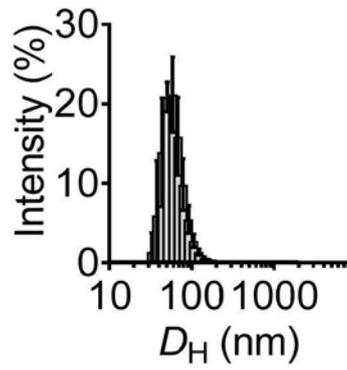


图43

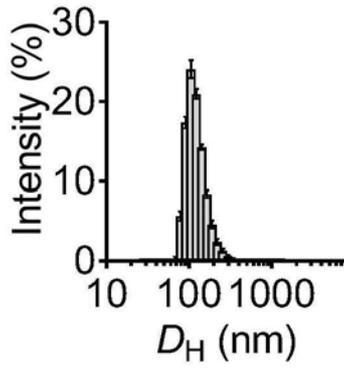


图44

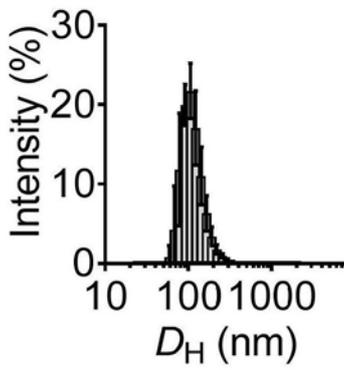


图45

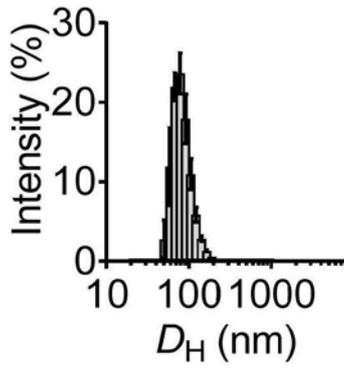


图46

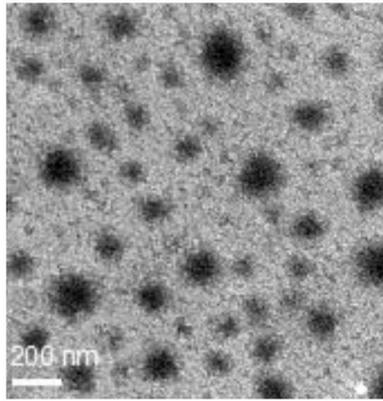


图47

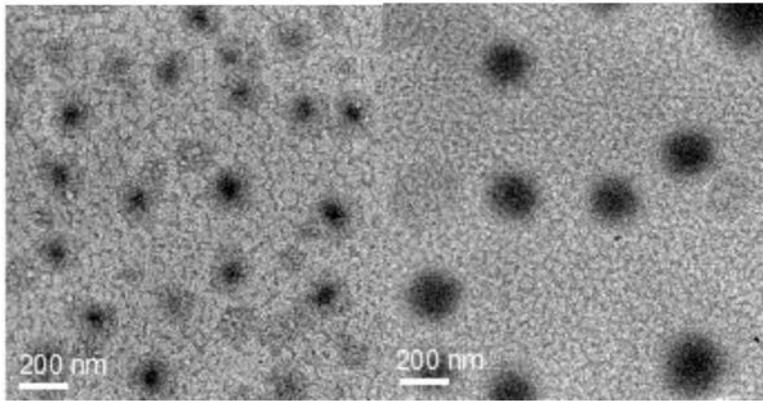


图 48

图 49

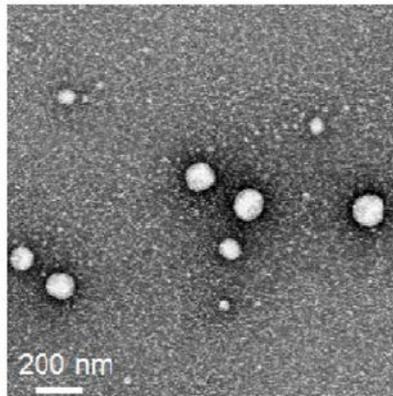


图50

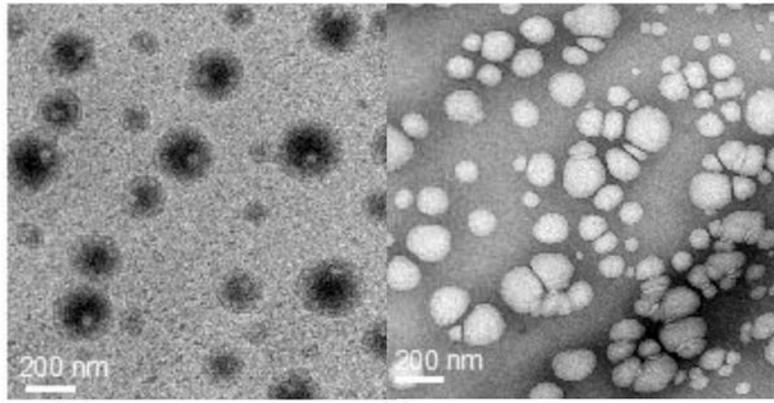


图 51

图 52

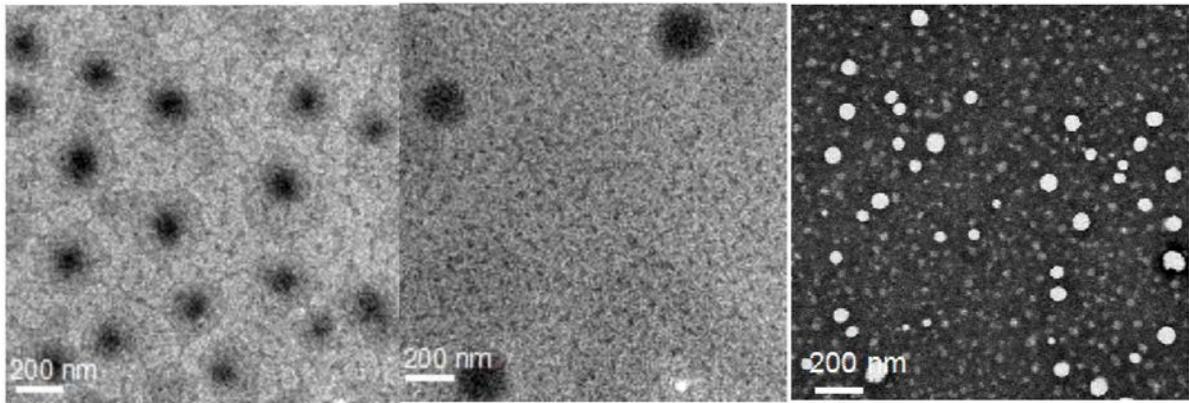


图 53

图 54

图 55

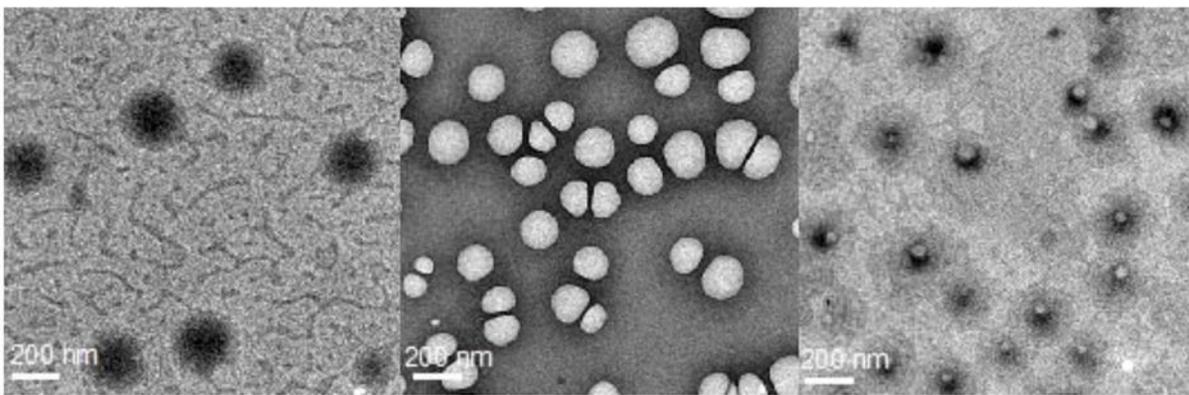


图 56

图 57

图 58

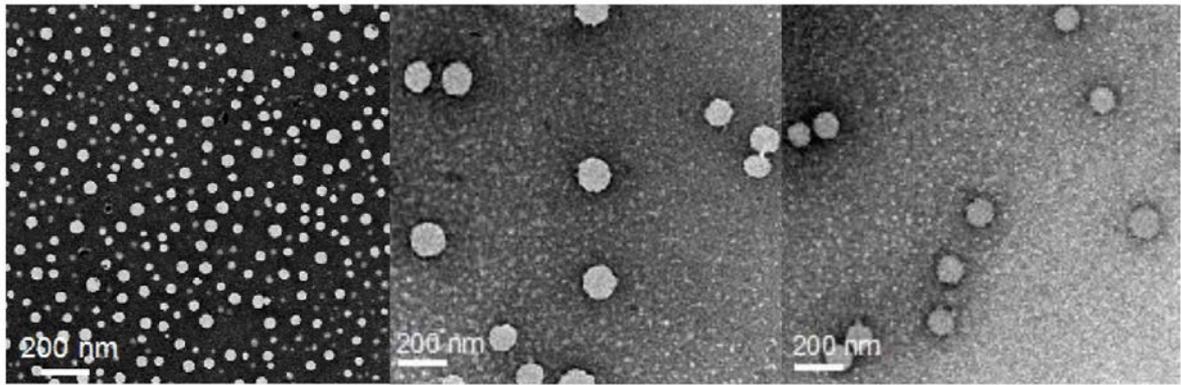


图 59

图 60

图 61

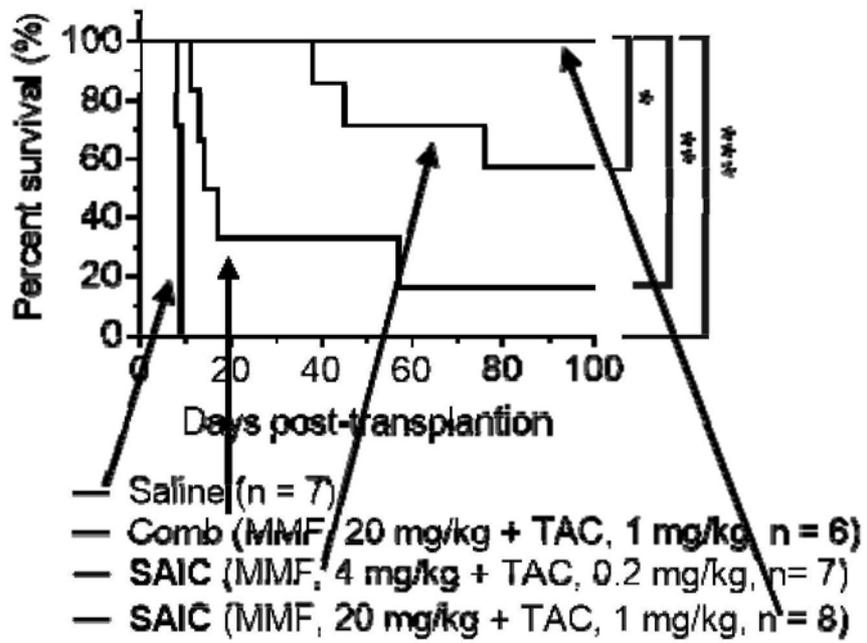


图62

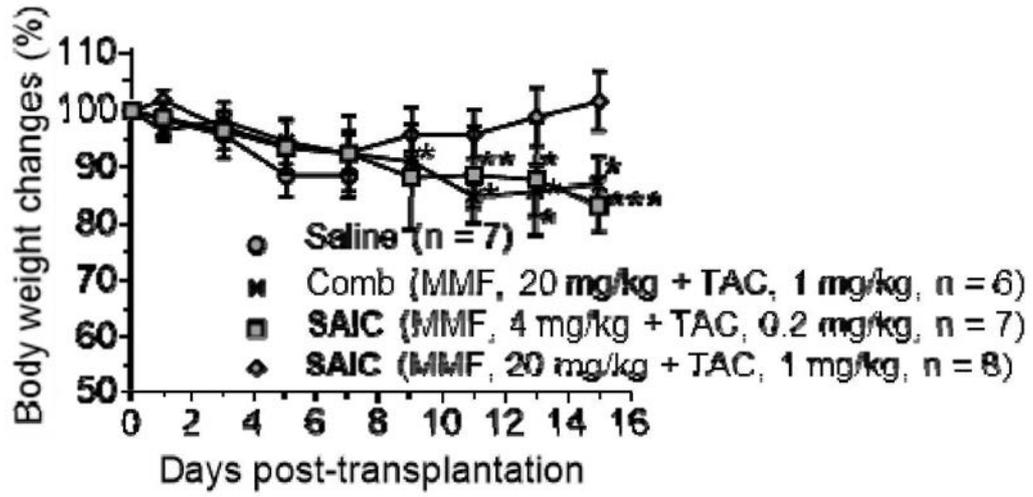


图63