

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 20520070153584

UDC _____

厦门大学

博士学位论文

含磷前药的设计、合成及其转化机制的研究

Design, Synthesis and Transformation Evaluation of
Phosphorous-containing Prodrugs

程宏明

指导教师姓名: 赵玉芬 院士

吴振 教授

专业名称: 化学生物学

论文提交日期: 2010年11月

论文答辩日期: 2010年12月

学位授予日期: 2010年 月

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2010年11月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

| | |
|---|----|
| 目 录 | |
| 摘 要 | 1 |
| 英文摘要 | 3 |
| 第一章：绪论 | 9 |
| 1.1 核苷类逆转录酶抑制剂抗 HIV 药物研究概况 | 9 |
| 1.1.1 AIDS 的传播形势 | 9 |
| 1.1.2 HIV 的结构及致病机理 | 9 |
| 1.1.3 逆转录酶抑制剂（Transcriptase Inhibitors） | 10 |
| 1.1.4 核苷类抗 HIV 新药的研发策略 | 19 |
| 1.2 布雷菲德菌素 A 的研究概述 | 20 |
| 1.2.1 (+)-Brefeldin A 的抗肿瘤机制研究 | 20 |
| 1.2.2 (+)-Brefeldin A 的自身缺陷及其衍生物的合成 | 24 |
| 1.3 前体药物的原理和应用 | 31 |
| 1.3.1 抗病毒药物 | 32 |
| 1.3.2 抗肿瘤药物 | 35 |
| 1.4 博士论文的工作目的 | 36 |
| 1.4.1 核苷类抗 HIV 前药 d4T-P-R 的化学稳定性及药物动力学 | 37 |
| 1.4.2 BFA 含磷系列化合物的设计，合成及其评价 | 37 |
| 参考文献： | 38 |
| 第二章 d4T-P-R 的合成，物理化学性质和代谢机制的体外研究 | 46 |
| 2.1 d4T-P-R 的合成 | 47 |
| 2.1.1 实验部分 | 47 |
| 2.1.1.1 仪器与试剂 | 47 |
| 2.1.1.2 实验方法 | 48 |
| 2.1.1.3 实验结果 | 48 |
| 2.2 d4T-P-R 的化学稳定性及体外代谢的研究 | 50 |
| 2.2.1 实验部分 | 50 |
| 2.2.2 结果与讨论 | 52 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3 讨论 | 64 |
| 参考文献: | 64 |
| 第三章 d4T-P-R 在大鼠体内代谢动力学的初步研究 | 66 |
| 3.1 实验部分 | 66 |
| 3.1.1 试剂与仪器 | 66 |
| 3.1.2 高效液相色谱—三重四级杆质谱 (Q TRAP HPLC/MS/MS) 分析条 件 | 66 |
| 3.1.3 实验动物 | 67 |
| 3.2 结果与讨论 | 67 |
| 3.2.1 大鼠血浆中 Rc 及 d4T 定量分析方法的建立 | 67 |
| 3.2.2 液质联用方法的确证 | 73 |
| 3.2.3 动物实验设计 | 73 |
| 3.2.4 Rc 及 d4T 的动力学参数计算 | 80 |
| 3.3 结论 | 81 |
| 参考文献 | 82 |
| 第四章 BFA 前药的设计、合成及其化学稳定性和生物转化的研究 | 83 |
| 4.1 BFA 前体药物的合成 | 83 |
| 4.1.1 实验部分 | 83 |
| 4.1.1.1 仪器与试剂 | 84 |
| 4.1.1.2 实验方法 | 84 |
| 4.1.1.3 实验结果 | 85 |
| 4.2 BFA 前药的化学稳定性及酯酶水解的研究 | 90 |
| 4.2.1 实验部分 | 90 |
| 4.2.2 结果与讨论 | 91 |
| 4.3 结论 | 95 |
| 参考文献: | 95 |
| 第五章 BFA 前药大鼠体内代谢动力学研究 | 97 |
| 5.1 实验部分 | 98 |
| 5.1.1 试剂与仪器 | 98 |

| | |
|---|------------|
| 5.1.2 高效液相色谱—三重四级杆质谱 (RP-HPLC-ESI-MS/MS) 分析条件 | 98 |
| 5.1.3 实验动物 | 99 |
| 5.1.4 液质联用定量分析方法的建立 | 99 |
| 5.1.5 动物实验设计 | 108 |
| 5.1.6 动力学实验结果讨论 | 109 |
| 5.2 结论 | 114 |
| 参考文献 | 115 |
| 第六章 总结论 | 118 |
| 附录 1 论文图表索引 | 119 |
| 附录 2 论文中所合成的化合物谱图 | 123 |
| 博士期间发表和已投稿的学术论文 | 134 |
| 致 谢 | 136 |

Contents

| | |
|--|----|
| Abstract in Chinese | 1 |
| Abstract in English | 3 |
| Chapter 1 Introduction | 9 |
| 1.1 Research Progress in Ant-HIV of Transcriptase Inhibitors | 9 |
| 1.1.1 Epidemic Situation of HIV/AIDS | 9 |
| 1.1.2 Nosogenesis of HIV | 9 |
| 1.1.3 Anti-HIV Drugs..... | 10 |
| 1.1.4 Research Strategies of Nucleoside Anti-HIV Drugs | 19 |
| 1.2 Research Summarization of (+)-Brefeldin A | 20 |
| 1.2.1 Study on (+)-Brefeldin A Inducing Tumor Cells Apoptosis | 20 |
| 1.2.2 The Disadvantages of (+)-Brefeldin A and Synthesized Derivatives of (+)-Brefeldin A | 24 |
| 1.3 The Mechanism and Application of Pro-drug | 31 |
| 1.3.1 Anti-Virus Drugs | 32 |
| 1.3.2 Anticancer Drugs | 35 |
| 1.4 Main Contents of This Thesis | 36 |
| 1.4.1 Hydrolytical Stability of d4T-P-R and Its Pharmacokinetics..... | 37 |
| 1.4.2 Synthesis and evaluation of phosphorous-containing Pro-drugs of BFA | 37 |
| References: | 38 |
| Chapter 2 Synthesis, chemical and enzymatic hydrolysis evaluation of d4T-P-R | 46 |
| 2.1 Synthesis of d4T-P-R | 47 |
| 2.1.1 Experiment Section | 47 |
| 2.1.1.1 Reagents and Instruments..... | 47 |
| 2.1.1.2. Methods | 48 |
| 2.1.1.3. Results | 48 |

| | |
|---|----|
| 2.2 Chemical and enzymatic hydrolysis evaluation of d4T-P-R | 50 |
| 2.2.1 Experiment Section..... | 50 |
| 2.2.2 Results and Discussions..... | 52 |
| 2.3 Conclusions | 64 |
| References:..... | 64 |
| Chapter 3 Study on Pharmacokinetics of d4T-P-R | 66 |
| 3.1 Experiment Section | 66 |
| 3.1.1 Reagents and Instruments..... | 67 |
| 3.1.2 HPLC/ESI-MS/MS Analytical Conditions..... | 67 |
| 3.1.3 Animals..... | 67 |
| 3.2 Results and Discussions | 67 |
| 3.2.1 Establishment of a HPLC/ESI-MS/MS Quantitative Method..... | 67 |
| 3.2.2 Validation of HPLC/ESI-MS/MS MRM Method..... | 72 |
| 3.2.3 Animal Experiments..... | 80 |
| 3.2.4 Determination of $t_{1/2}$ and d4T Pharmacokinetic Parameters..... | 80 |
| 3.3 Conclusions | 81 |
| References..... | 82 |
| Chapter 4 Synthesis, chemical and enzymatic hydrolysis of Brefeldin A prodrugs | 83 |
| 4.1 Synthesis of Brefeldin A prodrugs | 83 |
| 4.1.1 Experiment Section..... | 83 |
| 4.1.1.1 Reagents and Instruments..... | 84 |
| 4.1.1.2 Methods..... | 84 |
| 4.1.1.3 Results..... | 85 |
| 4.2 Chemical and enzymatic hydrolysis of Brefeldin A prodrugs | 90 |
| 4.2.1 Experiment Section..... | 90 |
| 4.2.2 Results and Discussions..... | 91 |
| 4.3 Conclusions | 95 |
| References..... | 95 |

| | |
|--|-----|
| Chapter 4 Study on Pharmacokinetics of Brefeldin A prodrugs | 97 |
| 5.1 Experiment Section | 98 |
| 5.1.1 Reagents and Instruments | 98 |
| 5.1.2 HPLC/ESI-MS/MS Analytical Contiditions | 98 |
| 5.1.3 Animals | 99 |
| 5.1.4 Establishment of a HPLC/ESI-MS/MS Quantitative Method..... | 99 |
| 5.1.5 Animal Experiments..... | 108 |
| 5.1.6 Results and Discussions on Pharmacokinetics | 109 |
| 5.2 Conclusions | 114 |
| References | 115 |
| Chapter 6 General Conclusions | 118 |
| Appendix 1 Index of Figures and Tables in This Thesis | 119 |
| Appendix 2 Spectrum of the Compounds in This Thesis | 123 |
| Publications | 134 |
| Acknowledgements | 136 |

摘 要

艾滋病是严重危害人类健康的全球性传染病。目前，医学界至今仍未成功研究出可以彻底治疗 AIDS 的方法。核苷逆转录酶抑制剂（NRTIs / NtRTIs）一直是主导的抗 AIDS 药物，研究发展迅速。但这类药物的临床应用都受到了一定的限制，例如 d4T 的骨髓毒性，低治疗指数，难通过血脑屏障以及在血浆中半衰期短等。磷酸酯类前药是近年核苷类药物结构修饰的一个重要方向。尽管氢亚磷酸酯作为前药载体有了一定的发展，但其转化释放前药的机制目前还未有过系统的研究。因此，本论文合成了 d4T 的一系列氢亚磷酸酯前药，通过体外和体内的化学以及生物转化实验来考察其释放原药的机制。

本论文结合有机合成，分析化学和临床前药物动力等方法进行研究，取得了以下的结果：

1. 经过体外不同 pH 缓冲液中稳定性的考察，发现弱酸环境有利于 d4T 氢亚磷酸酯前药的稳定；在强酸和中性条件下容易水解；碱性条件下立即分解。通过 HPLC/MS/MS 检测水解产物表明，化学水解可以使前药部分转化成原药，释放出 d4T。
2. 目前还未见到关于氢亚磷酸酯水解酶的报道。实验结果表明，氢亚磷酸酯是酯酶（esterase）的底物，不是三种常见磷酸酯酶（碱性磷酸酯酶、酸性磷酸酯酶和磷酸二酯酶）的底物。酶解实验表明，d4T 氢亚磷酸酯对酯酶（esterase）非常敏感，降低酯酶含量到 0.027 U/mL 即可水解该类前药，与磷连接的侧链 R 基团对其影响不大。
3. 我们选择了 d4T 氢亚磷酸异丙酯（Rc）进行了体内代谢动力学的研究，并且得到了和体外酯酶水解相关性很强的结果：大鼠静脉注射给药后无法检测到前药，只能检测到原药，说明 d4T 氢亚磷酸异丙酯在体内迅速被酶水解，快速释放出 d4T。实验结果为氢亚磷酸酯类前药的设计提供了依据。

布雷菲德菌素 A ((+)-Brefeldin A, 简称 BFA)，是一种大环内酯类抗生素，它具有多种生物活性，如抗真菌、抗病毒、抗线虫和抗肿瘤等。国际肿瘤协会发

现(+)-Brefeldin A 能够诱导肿瘤细胞分化和凋亡，作为化学治疗剂用于抗肿瘤有很大的应用前景。虽然 BFA 的生物活性极其诱人，但是该化合物本身有一些“先天”不足。例如：（1）在生物体内的半衰期短；（2）生物利用度很低；（3）水溶性差等。这些缺点限制了 BFA 在临床上的应用。本文设计并合成了一系列 BFA 磷酸氨基酸酯类和氨基酸酯类前药，并系统的进行了原药释放的构效关系研究。

1. 不同 pH 缓冲液的稳定性实验表明，BFA 磷酸氨基酸酯类前药的稳定性与载体连接的位点有关。
2. 酯酶转化实验结果与水环境中类似。只有 7' 位的载体容易被水解，充分释放出原药 BFA。
3. 为了考察载体结构中磷酸酯基团对酶水解的影响，合成了相应的 BFA 氨基酸酯类前药。酶解实验表明，BFA 氨基酸酯类前药对酯酶非常敏感，很快就被酶转化成 BFA。
4. 为了验证体外实验的结论是否可以用于体内，建立了一种快速、灵敏的测定大鼠血浆中 BFA 的浓度的液质连用定量方法（HPLC/MS/MS MRM）。经过灵敏度，检测限，精密度和准确度，特异性，基质效应，稳定性的确证，可以应用于 BFA 在大鼠体内动力学的研究。
5. 静脉给药后，BFA 的前药转化释放规律和体外酶转化相似。并发现 7' 位单取代 BFA 磷酸氨基酸酯前药能改善 BFA 在大鼠体内的半衰期；BFA 氨基酸酯类化合物作为 BFA 的水溶性前药，在体内能够充分释放原药，有作为 BFA 注射给药制剂开发的可能。

本论文充分利用 HPLC 和 ESI-MS/MS 等现代分析技术，化学水解、酶转化和大鼠体内代谢动力学等实验方案，对氢亚磷酸酯和磷酸氨基酸酯作为前药载体时的释放机制作了初步的研究；通过设计合成具有结构规律性的前药，对影响前药转化成原药的结构因素进行了系统的构效关系研究。

关键词：获得性免疫缺陷综合征；前药；布雷菲德菌素 A；化学稳定性；HPLC/MS/MS MRM 定量方法；药物代谢动力学

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩