

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520091153037

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

一种半乳糖酯修饰的齐多夫定硬脂酸酯
脂质体的研究

The study on GCOE modified AZTS-loaded liposomes

王凌嵩

指导教师姓名: 王秀敏 副教授

专业名称: 药理学

论文提交日期: 2012年4月

论文答辩时间: 2012年5月

学位授予日期: 2012年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 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(王秀敏)课题(组)的研究成果,获得(王秀敏)课题(组)经费或实验室的资助,在(王秀敏)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

摘要

艾滋病(Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS)是由人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)感染导致人体免疫机能缺陷而易于发生机会性感染和肿瘤的临床综合征。高效抗逆转录病毒疗法(Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART)能抑制HIV复制,降低AIDS的发病率和死亡率,但仍存在药物无法彻底清除HIV、难以在HIV病毒贮库中达到有效浓度、长期用药易产生多药耐药等问题。因此,针对HIV贮库开发新的给药系统是当前国际上抗AIDS研究中的一个热点和难点。由于巨噬细胞是HIV病毒贮库中至关重要的一个细胞群,近年来主动靶向巨噬细胞的给药系统研究成为一个新的热点。

在抗 HIV 药物靶向载体中,脂质体是研究最多、最有临床应用前景的一类载体。脂质体能促进某些抗 HIV 药物的细胞内传递,增强药物的治疗效果。但未经修饰的脂质体只具有被动靶向性,为了更特异性地靶向 HIV 感染细胞,本文设计了一种能够与巨噬细胞膜上的半乳糖颗粒受体特异性结合,主动靶向巨噬细胞的新型脂质体:半乳糖酯修饰的齐多夫定硬脂酸酯脂质体,并进行体外主动靶向性的评价研究。预期这种新型脂质体对 HIV 病毒贮库(巨噬细胞)具有高度选择性,能减少 AIDS 治疗过程中耐药株出现的机率。其可以作为抗艾滋病药物的理想剂型,也可以作为其他抗病毒药物的靶向给药剂型,具有良好的应用前景。

本文的研究内容主要包括以下方面:

1. 自主合成了齐多夫定(Azidothymidine, AZT)的脂溶性前药齐多夫定硬脂酸酯(Azidothymidine Stearate, AZTS)和具有主动靶向巨噬细胞膜上半乳糖颗粒受体功能的半乳糖酯,即 D-半乳糖基-4-[4-[(胆甾烷-3-氧基)羰基]氨基]丁基]氨基-4-羰基丁酯(D-galactosyl-4-[4-[(cholestan-3-yloxy)carbonyl] amino]butyl) amino]-4-oxobutanoate, 缩写为 GCOE)。与 AZT 相比, AZTS 的脂溶性明显提高($\log P_{oct}=5.22$),更适宜脂质体制剂的制备;AZTS 脂质体包封率高,且不易泄露。本文中合成 GCOE 的反应条件温和,用正相硅胶柱即能有效分离纯化,操作简单。

2. 建立了 AZTS 的体外 HPLC 分析方法和 AZTS 脂质体包封率的测定方法

(微孔滤膜过滤分离-HPLC 检测药物含量), 采用薄膜分散法或乙醇注入法结合挤出仪整粒技术制备 AZTS 脂质体。最优处方为磷脂含量为 5%(W/V), 药脂比为 1:20(W/W), 总胆固醇与磷脂的质量比为 1:4, GCOE 与胆固醇的质量比为 2:1。制备的脂质体包封率高(85%以上), 粒径较小且均一(平均粒径 180nm, 多分散指数 0.371)。

3. 对 GCOE 修饰的脂质体进行了初步的体外靶向性评价。GCOE 对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 没有毒性, 生物相容性良好。通过与蓖麻凝集素的特异性凝集反应证实了 GCOE 的亲脂性胆甾烷基插入脂质体的磷脂双分子层, 亲水性的半乳糖基暴露于脂质体外面, 能与蓖麻凝集素特异性结合。由于 AZTS 本身不能激发荧光, 本实验选择了具有大共轭系统, 激发的荧光性质较稳定的阿霉素 (Doxorubicine, DOX) 作为荧光探针制备荧光脂质体, 对 GCOE 修饰的荧光脂质体与巨噬细胞的体外亲和力作了定性评价; 同时, 用 MTT 法对 GCOE 修饰的 AZTS 脂质体、DOX 脂质体与巨噬细胞的体外亲和力作了定量评价。结果表明, 经 GCOE 修饰后, 脂质体与巨噬细胞的亲和力显著增强, 能携带更多的药物进入巨噬细胞内。GCOE 能够实现主动靶向巨噬细胞的能力, 预期经 GCOE 修饰的脂质体在抗 HIV 治疗中有良好的应用前景。

关键词: 齐多夫定硬脂酸酯 半乳糖酯 主动靶向脂质体 巨噬细胞 HIV

Abstract

Human immunodeficiency virus (HIV) is a lentivirus that causes acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), which progressive failure of the immune system allows life-threatening opportunistic infections and malignancies. Although highly active antiretroviral therapy (HAART) is able to inhibit the replication of the HIV, reduce the morbidity and mortality of AIDS, drugs disable eradicating HIV, insufficient concentrations in virus reservoirs, multi-drug resistance against anti-HIV drugs in long-term therapy are nonnegligible problems. Therefore, the challenges associated with optimizing drug delivery system for the effective treatment of AIDS is in the limelight. Since macrophage plays a key role in HIV virus reservoirs, strategy aimed at drug delivery systems for targeting macrophage is highly attractive.

Liposomes are the most promising vector in anti-HIV therapy both in laboratory and clinic. It can improve drug's delivery in vivo, that enhance the therapeutic effect of anti-HIV drugs. While plain liposomes is passive targeting for mononuclear phagocyte system(MPS), in order to specifically target HIV-infected cells, this work designs a new type of liposome, D-galactosyl-4-[(4-[[[(cholestan-3-yloxy)carbonyl]amino}butyl)amino]-4-oxobutanoate(GCOE) modified azidothymidine stearate (AZTS) loaded liposomes, which can specific binding with galactose particle receptor on macrophage membranes, exhibiting active targeting ability to macrophages. We evaluate the drug delievery system's active targeting ability in vitro, the results are same with expectations. This new type of liposome is expected to highly selective against HIV reservoirs (macrophage), reduce the probability of drug-resistant strains in AIDS treatment process. The new type of liposome can be used as the ideal formulation of anti-AIDS drugs as well as targeted drug delivery formulations of other antiviral drugs, has a good application prospects.

The following parts are included in this paper.

1. Successfully synthesize azidothymidine stearate(AZTS) as a fat-soluble

prodrug of Azidothymidine(AZT) and D-galactosyl-4-[(4-[[[(cholestan-3-yloxy) carbonyl]amino}butyl)amino]-4-oxobutanoate(GCOE) as a ligand that active targeting macrophage via galactose particle receptor. Compared with AZT, lipid solubility of AZTS is significantly improved ($\log P_{\text{oct}} = 5.22$), which more suitable for the preparation of the liposome, enhance the efficiency of AZTS-loaded liposomes with little drug leakage. The reaction conditions during the procedure of GCOE synthesis are mild and easy to operate, GCOE can be effectively isolated and purified using normal phase silica gel column.

2. Establish a HPLC method in vitro for AZTS determination, and AZTS liposome entrapment efficiency of the method (filter membrane separation-HPLC detection of drug content), using the thin film dispersion or ethanol inpouring method, combined with extrusion of crude liposomes. The best prescription is: phospholipids account for 5% of the prescription(W/V), with the ratio of drug and total lipid is 1:20(W/W),the ratio of total cholesterol and phospholipid is 1:4(W/W), the ratio of GCOE and cholesterol is 2:1(W/W). The entrapment efficiency of GCOE modified AZTS-loaded liposomes is above 85%, while with small and uniform particle size(mean particle size is 180 nm, polydispersity index is 0.371).

3. GCOE modified liposomes were prepared for preliminarily evaluate the targeting ability of GCOE in vitro. GCOE exhibited good biocompatibility and no cytotoxicity to murine macrophage cell line RAW 264.7. GCOE acts as a anchor on liposome's surface, which is reflected by its galactosyl like group's specific agglutination with Ricinus communis agglutinin. Meanwhile, thanks to doxorubicine (DOX) has a large conjugated system which exciting stable fluorescence, it was used as a fluorescent probe to prepared fluorescent liposomes in this study due to AZTS shows no fluorescence. In contrast with plain liposome and free drug, GCOE modified liposomes exhibit higher affinity with macrophage both in qualitative and quantitative uptake of GCOE modified liposomes studies on RAW264.7 cells in vitro. The GCOE modified liposomes were able to carry more drugs into HIV reservoirs(macrophage) and showed higher affinity with macrophage. The results revealed that GCOE modified liposomes could be a potential candidate for active

macrophage targeting drug carrier in anti-HIV therapy.

Keywords: azidothymidine stearate; galactose modified lipid; active targeting liposomes; macrophage; HIV

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘 要	I
Abstract	III
第一章 前言	1
1.1 艾滋病简介	1
1.1.1 艾滋病流行现状	1
1.1.2 AIDS 发病机制	2
1.2 AIDS 治疗过程中的障碍	3
1.3 抗 HIV 药物靶向载体——脂质体	5
1.3.1 被动靶向脂质体	5
1.3.2 表面修饰的主动靶向脂质体	5
1.4 课题立项依据与实验设计思路	8
1.4.1 模型药物的选择	9
1.4.2 主动靶向配体的设计	9
1.4.3 主动靶向制剂的制备及靶向性评价	10
第二章 脂溶性前药齐多夫定硬脂酸酯及主动靶向配体半乳糖酯的合成	11
2.1 仪器与试药	11
2.2 实验方法与结果	11
2.2.1 脂溶性前药齐多夫定硬脂酸酯 (AZTS) 的合成	11
2.2.2 主动靶向官能团半乳糖酯 (GCOE) 的合成	13
2.3 讨论	17
2.3.1 AZTS 的合成	17
2.3.2 GCOE 的合成	18
2.4 小结	21
第三章 半乳糖酯修饰的齐多夫定硬脂酸酯脂质体的制备	22
3.1 仪器与试药	22
3.2 实验方法与结果	22
3.2.1 AZTS 体外分析方法的建立	22

3.2.2 GCOE 修饰的 AZTS 脂质体包封率测定方法的建立.....	24
3.2.3 GCOE 修饰的 AZTS 脂质体的制备.....	25
3.2.4 GCOE 修饰的 AZTS 脂质体理化性质的考察.....	28
3.3 讨论	29
3.4 小结	30
第四章 GCOE 修饰的 AZTS 脂质体的体外靶向性评价	32
4.1 仪器与试药	32
4.2 实验方法与结果	33
4.2.1 体外凝集活性测定	33
4.2.2 RAW 264.7 细胞的复苏、培养、传代及冻存.....	34
4.2.3 GCOE 修饰的 AZTS 脂质体与巨噬细胞的亲和力测定.....	35
4.3 讨论	39
4.4 小结	40
全文结论	42
附 录	44
参考文献	57
致 谢	62
硕士在学期间科研成果	63

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Summary of AIDS	1
1.1.1 Epidemic Situation of AIDS	1
1.1.2 Pathogenesis of AIDS	2
1.2 Obstacles in AIDS Treatment	3
1.3 Anti-HIV drug Carrier—Liposomes	5
1.3.1 Passive Targeting Liposomes	5
1.3.2 Active Targeting Liposomes with Surface Modification	5
1.4 Basis of Research and Design of Experiments	8
1.4.1 Selection of Model Drug.....	9
1.4.2 Design of Active Targeting Ligand.....	9
1.4.3 Preparation and Evaluation of Active Targeting Liposomes.....	10
Chapter 2 Synthesis of Fat-soluble Prodrug AZTS and Active Targeting Ligand GCOE	11
2.1 Instruments and Reagents	11
2.2 Experimental Methods and Results	11
2.2.1 Synthesis of Fat-soluble Prodrug AZTS	11
2.2.2 Synthesis of Active Targeting Ligand GCOE	13
2.3 Discussion	17
2.3.1 Synthesis of AZTS	17
2.3.2 Synthesis of GCOE.....	18
2.4 Conclusion	21
Chapter 3 Preparation of GCOE Modified AZTS-loaded Liposomes	22
3.1 Instruments and Reagents	22
3.2 Experimental Methods and Results	22
3.2.1 Establishment of Analytical Method of AZTS	22
3.2.2 Establishment of Entrapment Efficiency measuring method of GCOE modified AZTS-loaded Liposomes.....	24
3.2.3 Preparation of GCOE modified AZTS-loaded Liposomes	25

3.2.4 Physicochemical Properties of GCOE modified AZTS-loaded Liposomes	28
3.3 Discussion	29
3.4 Conclusion	30
Chapter 4 Cell targeting Uptake Studies of GCOE Modified AZTS-loaded Liposomes <i>in Vitro</i>	32
4.1 Instruments and Reagents	32
4.2 Experimental Methods and Results	33
4.2.1 <i>In Vitro</i> Ligand Agglutination Assay	33
4.2.2 Details about RAW 264.7 cells	34
4.2.3 Determination of Affinity with Macrophages of GCOE Modified AZTS-loaded Liposomes <i>in Vitro</i>	35
4.3 Discussion	39
4.4 Conclusion	40
Conclusions	42
Supporting Informations	44
References	57
Acknowledgements	62
Publications	63

第一章 前言

1.1 艾滋病简介

1.1.1 艾滋病流行现状

艾滋病，即获得性免疫缺陷综合征(Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS)，是由人免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)感染导致人体免疫功能缺陷而易于发生机会性感染和肿瘤的临床综合征。

自 1981 年美国发现首例 AIDS 患者以来，AIDS 已逐渐成为人类前所未有的最具毁灭性疾病，被称为“当代瘟疫”和“超级癌症”，该病已引起世界卫生组织(World Health Organization, WHO)及各国政府的高度重视，无论是人员和经费的投入均放在首位。我国已将艾滋病列入乙类法定传染病，并为国境卫生监测传染病之一。艾滋病预防和治疗的药物研究受到越来越多的重视。

根据联合国艾滋病规划署与世界卫生组织联合发布的 2011 年底最新艾滋病疫情的报告(图 1.1)，截止 2010 年底，大约有 3400 万人携带艾滋病毒。同年，大约 270 万人新感染了艾滋病毒，180 万人死于艾滋病，低、中等收入国家接受抗病毒药物治疗的人数为 665 万^[1]。尽管世界卫生组织正与各会员国着力于改进艾滋病毒治疗、预防和诊断服务，并提高对艾滋病治疗规划的一体化和有效性，以及不断提升对需要抗病毒药物治疗的艾滋病毒携带者的覆盖率，但是，由于目前无治疗 AIDS 的特效药和预防 AIDS 的有效疫苗，死于艾滋病并发症的人数仍居高不下。

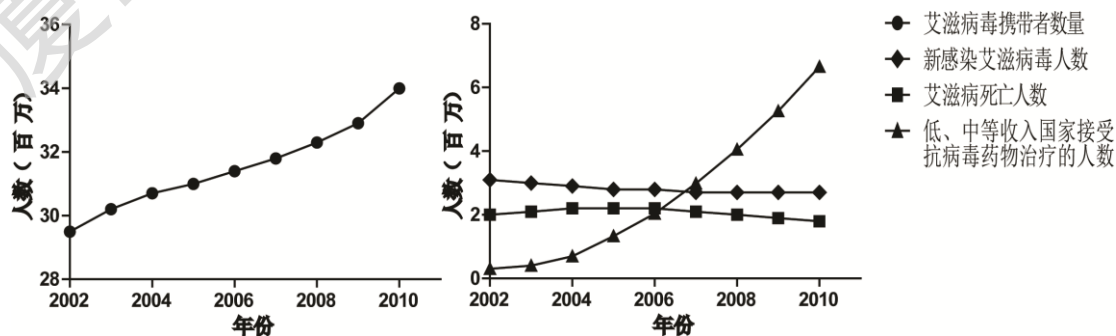


图 1.1 HIV 病毒流行的关键指标(2002-2010 年)

Fig. 1.1 Key indicators for the HIV epidemic, 2002–2010

因此，寻求有效治疗 AIDS 的方法和药物仍是医药工作者面临的紧迫任务。

1.1.2 AIDS 发病机制

HIV 属逆转录病毒科中慢病毒属中的灵长类免疫缺损病毒亚属^[2]，在体外不能繁殖，需借助人体细胞复制再生。HIV 主要侵犯宿主的 CD4⁺T 细胞以及表达 CD4 分子的单核-巨噬细胞、树突状细胞和神经胶质细胞等^[3]。HIV 通过病毒糖蛋白 gp120/gp41 与在被感染细胞的细胞膜表面同时表达的 CD4 分子和辅助受体 (CXCR4 和 CCR5) 进行识别，形成 CD4-gp120-CXCR4/CCR5 三分子复合物，导致 gp120 构象改变，暴露出被其掩盖的 gp41，与宿主细胞膜融合，形成 HIV-融合肽，使病毒核心进入靶细胞，进行逆转录、整合、转录、翻译、组装蛋白、溢出(或储存和隐藏)等步骤(图 1.2)，侵入细胞并损伤宿主的免疫系统，而宿主的免疫应答又不能清除 HIV，导致机体免疫功能的损伤，最终发展成 AIDS^[4]。

由于机体的免疫系统遭到破坏，病原体、微生物及癌细胞等便趁机侵入机体，并引发一系列的病变。AIDS 的病理改变，可以归纳为以下三个方面：①HIV 直接造成的淋巴造血系统和神经系统的原发性病变；②HIV 感染后引起的免疫功能损伤或缺陷，继而出现的机会性感染和恶性肿瘤；③其他病变，包括发病机制尚不明确的病变，如 HIV 相关的肺、心脏、肠、肾病等^[5]。

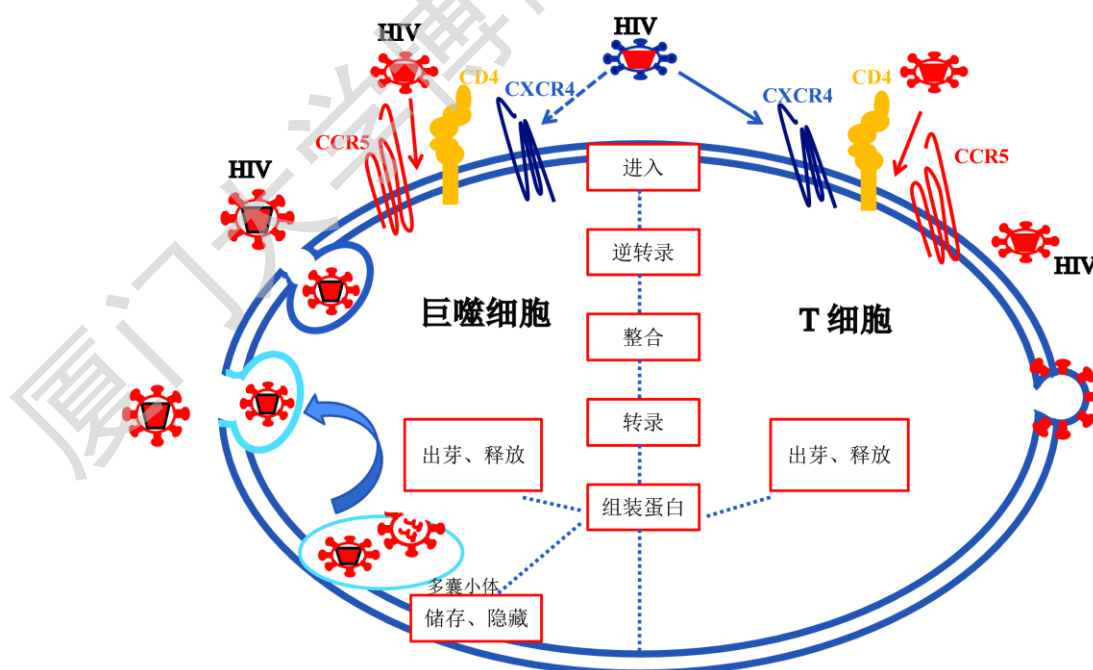


图 1.2 HIV-1 在巨噬细胞和 T 细胞中的复制周期

Fig. 1.2 Differences between the HIV-1 life cycle in macrophages and CD4⁺T cells

1.2 AIDS 治疗过程中的障碍

尽管人类投入了大量的时间和精力于抗艾滋病事业上,迄今艾滋病仍然无法治愈,也没有有效的疫苗。目前,临床上多采用综合治疗:抗 HIV 病毒治疗、预防和防治机会性感染、中医药治疗、增加机体免疫功能、支持疗法以及心理咨询,其中以抗病毒治疗最为关键^[6],较为有效的 AIDS 治疗方案是高效抗逆转录病毒法(Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART),俗称“鸡尾酒”疗法。HAART 疗法通常是根据药物的毒性、耐药性、实用性、可行性以及病人的具体情况来制定各自的给药方案,在已有的抗逆转录病毒药物(Antiretrovirus Drugs, ARV)基础上,组成以 2 种核苷类逆转录酶抑制剂(Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NRTIs)为骨架,联合非核苷类逆转录酶抑制剂(Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NNRTIs)或蛋白酶抑制剂(Protease Inhibitors, PIs)的方案,或 3 种 NRTIs 的方案等。HAART 疗法在一定程度上能抑制 HIV 复制,降低感染人群的发病率和死亡率^[7, 8]。但是,由于药物无法彻底清除 HIV,病人一直生活在病毒低水平复制的状态中。一旦停药,生产性的病毒复制将恢复到原来水平,甚至会更高^[3, 7]。

当前治疗措施无法根治 AIDS 的主要原因是治疗中存在两个主要障碍:一是耐药株的出现,使病毒逃脱原有药物的进一步治疗;二是现有治疗方案药物无法有效到达病毒贮库^[8, 9]。由于 HIV 在感染数小时至 2 周内即形成了一个终生的病毒贮库,甚至对于某些接受抗 HIV 预防药物进行治疗的病人也无法幸免^[10]。HIV 病毒贮库在体内主要包括^[3, 11-13]: 1) CD4⁺T 淋巴细胞; 2) 整合前的单核细胞/巨噬细胞,因在体内不同组织又称为单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、郎格汉斯细胞等; 3) 脑、肝脏、胃肠道、生殖道。其中,由于巨噬细胞在体内被 HIV 病毒感染后,不但能在抗原-抗体呈递过程中随血流分布到全身,将病毒传染给其他免疫细胞,本身作为病毒的贮库也能长期地隐藏在体内,随血液循环进入中枢神经系统和生殖道、睾丸等“庇护所”,备受科研工作者的重视。

针对第一个障碍,需加大抗 HIV 新药的研发力度。近年来,除了针对传统靶点的逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、融合酶抑制剂等,一些研发中的药物以靶向病毒复制周期中不同阶段的基因产物为目的,包括辅助受体拮抗剂、进入/融合抑制剂、整合酶抑制剂、成熟抑制剂、蛋白组装抑制剂、核糖核酸酶抑制剂

等药物^[14]。但是,单一凭借化学药物的治疗不能完全清除病毒,而且不管治疗时间长短,一旦停药,生产性的病毒复制将会恢复到原来水平,开始新一轮的感染。表 1.3 为已上市的抗逆转录病毒药物(ARV)简介。此外,我国在抗 HIV 新药的研发上也取得了一定的成效,其中,西夫韦肽(融合酶抑制剂)、二咖啡酰奎尼酸(整合酶抑制剂)、艾博卫泰(整合酶抑制剂)、尼非韦罗(CCR5 拮抗剂)等具有自主知识产权的抗艾滋病 I 类新药也都相继处于临床试验阶段,有望在近几年内上市。

表 1.1 已上市的抗逆转录病毒药物(ARV)

Table 1.1 The antiretroviral drugs approved into market

ARV 种类	通用名	剂型
核苷类逆转录酶抑制剂(NRTIs)	齐多夫定、拉米夫定、司他夫定、去羟肌苷、阿巴卡韦、替诺福韦、恩曲他滨	胶囊、片剂、糖浆、咀嚼片、颗粒剂、散剂、口服液
非核苷类逆转录酶抑制剂(NNRTIs)	依非韦仑、奈韦拉平	胶囊、片剂、糖浆
蛋白酶抑制(PIs)	阿扎那韦、茚地那韦、洛匹那韦、利托那韦、沙奎那韦、达芦那韦	片剂、胶囊、软胶囊、口服液
融合抑制剂(FIs)	恩夫韦肽	注射剂
整合酶抑制剂(Is)	雷特格韦、拉替拉韦	片剂
辅助受体(CCR)拮抗剂	马拉韦罗	片剂

第二个障碍才是 AIDS 治疗方案无法奏效的根本原因。针对第二个障碍,如果在病毒贮库中能持续维持足够的药物浓度,就可以将病毒完全清除。目前抗 HIV 药物的毒副作用较大且对感染细胞的靶向性低,若能采取措施使药物在感染细胞(病毒贮库)中的浓度达到治疗水平使药物富集于贮库,在降低抗 HIV 药物的毒副作用的同时,也减少了耐药株产生几率,治疗过程中的第一个障碍也就迎刃而解了。

因此,寻找高效低毒的抗 HIV 新药,以及针对 HIV 贮库开发新的给药系统是当前国际上抗 AIDS 研究中的一个热点和难点^[14-18]。

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.