

核苷二苯基磷酸酯的合成及大鼠体内药物动力学

朱梅湘¹, 吴 振^{2*}, 赵玉芬^{1,2}

(1. 厦门大学 化学化工学院, 化学生物学福建省重点实验室,

2. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361005)

摘要: AZT 的 5-二苯基系列磷酸酯衍生物在体外抗病毒实验中显示了良好的抗 HIV 病毒活性, 具有开发为新型核苷类抗病毒药物的潜力. 本文采用 PCl_3 一锅法合成了系列核苷二苯基磷酸酯, 并对其纯化后的化合物进行大鼠体内药物动力学规律评价. 结果显示该系列衍生物的动力学表现和苯基上取代基的性质有直接联系, 且均能改善对 AZT 的释放, 有作为临床抗艾滋病治疗剂的可能.

关键词: AZT; 二苯基磷酸酯衍生物; 抗 HIV; 合成; 药物动力学

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2009)02-0228-04

HIV 病毒所引起的人类免疫缺陷综合症(AIDS)严重威胁人类的健康. 核苷类化合物是抗 HIV 药物的重要组成部分. 它们能够作为 HIV 逆转录酶(RT)的竞争性抑制剂, 干扰和阻止病毒的繁殖. AZT 是一种经 FDA 批准上市的抗 HIV 药物, 具有较好的抗 HIV 活性^[1-4]. Mc Guigan C 等报道了 AZT 的 5-二苯基系列磷酸酯衍生物, 在体外细胞活性实验中显示了良好的抗 HIV 病毒活性^[5-6], 具有开发为新型核苷类抗病毒前药的潜力.

虽然很多核苷前药成功提高了体外活性, 仍只有有限的磷酸化核苷前药被系统研究过核苷释放的过程. 并且, 和 TK⁻ (激酶缺乏) 细胞的体外实验不同, 前药在体内细胞的传输机理还不明确, 前药在体内的潜能, 长期毒性, 生物口服利用度, 血浆药物动力学, 以及组织分布等方面的研究也深入不多, 还需依赖于对磷酸酯前药跟踪的结果. 这些重要的数据不仅能增加对核苷生物功能的理解, 也可以为新药设计提供基础. 本文旨在研究系列磷酸化核苷前药, 考察 5-磷酸酯上不同取代基和其体内药动学规律间的关系. 本文采用 PCl_3 一锅法合成了 5 个核苷二苯基磷酸酯, 各选取 3 个芳基上带有吸电子和推电子基团的目标化合物, 并对其纯化后的化合物进行大鼠体内药物动力学规律评价.

1 材料与方 法

收稿日期: 2008-07-21

基金项目: 国家自然科学基金(20732004), 中国科技部国际合作项目(2006DFA43030)资助

*通讯作者: wuzhen@xmu.edu.cn

1.1 材 料

二氯甲烷加入五氧化二磷回流 1 h 后使用; 三氯化磷经重蒸后使用; 三乙胺经氯化钙重蒸使用; 核苷 AZT 购自厦门迈克制药有限公司. 石油醚(PE)、乙酸乙酯、甲醇、氨水、氘代氯仿(CDCl_3)、各种酚类及 *m*-CPBA 等均为分析纯; 柱层析硅胶(300~400 目)、TLC 硅胶板(GF254)为青岛海洋化工厂出品; 乙酸铵(分析纯)购于国药集团化学试剂有限公司; 甲醇(HPLC 纯)购于 TEDIA 公司. SD 大鼠购自上海斯莱克动物实验室.

1.2 仪 器

¹H-NMR 测定: Bruker 400 MHz 核磁共振仪测定; TMS 或氘代试剂为内标. ¹³C-NMR 测定: Bruker 400 MHz 核磁共振仪测定; TMS 或氘代试剂为内标. ³¹P-NMR 测定: Bruker 400 MHz 核磁共振仪测定; 以 85% H_3PO_4 为外标. 质谱测定: Bruker Dalton Esquire 3000 plus 质谱仪; Applied Biosystems 3200Q TRAP LC/MS/MS System 四极杆质谱仪.

1.3 实验方法

1.3.1 二芳基核苷 5-磷酸三酯的合成

在 25 mL 的单口瓶中加入 10 mL 的干燥二氯甲烷和 0.8 mL (10 mmol) 三氯化磷, 氩气保护, 冰盐浴条件下搅拌冷却至 -10℃, 分批加入 1 mmol 的 AZT, 在此温度下反应 30 min, 升至室温继续搅拌 3 h.

减压浓缩除去溶剂及过量的三氯化磷, 真空干燥 20 min, 有白色泡状固体产生. 接着加入 10 mL 干燥的二氯甲烷溶解, 冰浴中加入 0.35 mL (2.5 mmol) 干燥的三乙胺, 搅拌 10 min, 加入 2 mmol 的 ROH 酚(分别为: 苯酚, 对碘苯酚, 对溴苯酚, 对甲硫基苯酚, 对氧

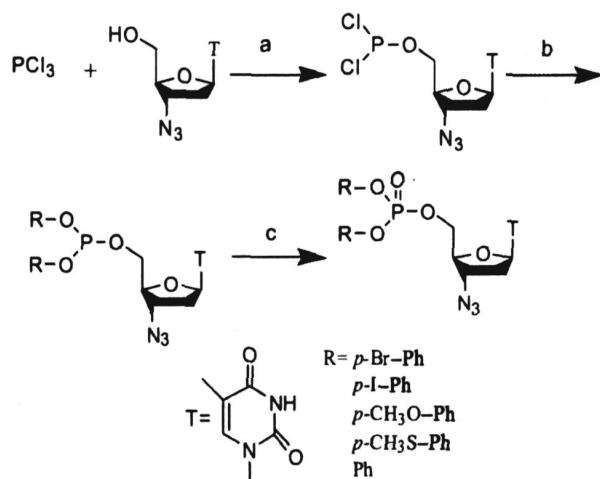


图 1 二芳基核苷 5-磷酸三酯的一锅法合成步骤图

- a. (1) CH_2Cl_2 , -5, 30 min, (2) rt, 3 h;
 b. ROH, CH_2Cl_2 , Et_3N , 0, 30 min;
 c. *m*-CPBA (2 equiv) 15 min

Fig. 1 One-pot synthesis of diaryl phosphates triester derivatives of AZT

甲基苯酚), 继续反应 30 min.

缓慢加两倍量用 CH_2Cl_2 溶解的 *m*-CPBA, 氧化 15 min 后减压除去溶剂, 用 $V(\text{CH}_2\text{Cl}_2) : V(\text{MeOH}) = 40 : 1$ 或 $V(\text{EtOAc}) : V(\text{PE}) = 1 : 1$ 作为洗脱液, 进行硅胶柱层析分离, 得产率 72% ~ 90%.

1.3.2 动物实验

每个化合物取 SD 雄性大鼠 6 只, 体质量 200 ~ 300 g, 实验前置于代谢笼饲养 24 h. 次日称质量, 经乙醚轻度麻醉后, 作动脉插管手术, 待动物清醒后, 按 5 mg/kg 的剂量静脉注射给药. 在注射后 1、5、30、60、120、180、300、480、720、960 以及 1 440 min 从动脉导管取血 0.2 mL, 立即离心取血浆 0.1 mL, 放置于 -20 冷冻保存至分析测定^[7-9].

使用 WinNonlin Professional Edition Version 2.1 药代动力学计算软件计算相关药代动力学参数^[10], 根据所得数据, 绘制血药浓度-时间曲线.

2 实验结果

2.1 二芳基系列核苷 5-磷酸三酯的表征

2.1.1 AZT-二苯基-5-磷酸三酯(M1)

White foam. $^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 162 MHz): = -12.87; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): = 9.99 (s, 1H, NH-3), 7.36 ~ 7.17 (m, 11H, H-6 and phenyl), 6.24 ~ 6.20 (m, 1H, H-1), 4.57 ~ 4.44 (m, 2H, H-5), 4.44 ~ 4.29 (m, 1H, H-3), 4.06 ~ 4.04 (m, 1H, H-4), 2.43 ~ 2.36 (m, 1H, H-2), 2.26 ~ 2.21 (m,

1H, H-2), 1.26 (s, 3H, 5-Me); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): = 163.9 (C-4), 150.3, 150.0 (Ph-*isop*), 149.9 (C-2), 135.0 (C-6), 129.8, 129.8 (Ph-*meta*), 125.7 (Ph-*para*), 119.8, 119.7 (Ph-*ortho*), 111.4 (C-5), 84.6 (C-1), 81.8, 81.8 (C-4), 67.4, 67.3 (C-5), 59.8 (C-3), 37.1 (C-2), 12.2 (5-Me); ES/MS (+): m/z 522 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

2.1.2 AZT-二对碘苯基-5-磷酸三酯(M2)

Pale yellow powder. $^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 162 MHz): = -12.30; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): = 9.32 (s, 1H, NH-3), 7.69 ~ 7.64 (m, 4H, meta-Ar), 7.28 (s, 1H, H-6), 6.98 ~ 6.96 (m, 4H, ortho-Ar), 6.19 ~ 6.16 (m, 1H, H-1), 4.58 ~ 4.45 (m, 2H, H-5), 4.34 ~ 4.30 (m, 1H, H-3), 4.06 ~ 4.04 (m, 1H, H-4), 2.50 ~ 2.33 (m, 2H, H-2), 1.84 (s, 3H, 5-Me); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): = 163.5 (C-4), 150.1, 149.9 (Ph-*isop*), 149.8 (C-2), 139.0, 138.9 (Ph-*meta*), 135.3 (C-6), 122.1, 122.0 (Ph-*ortho*), 111.6 (C-5), 89.7 (Ph-*para*), 85.3 (C-1), 81.9, 81.8 (C-4), 67.7 (C-5), 59.8 (C-3), 37.2 (C-2), 12.4 (5-Me); HRMS (ESI (+)): m/z calcd for $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (773.8718); found: 773.8735 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

2.1.3 AZT-二对溴苯基-5-磷酸三酯(M3)

White foam. $^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 162 MHz): = -13.53; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): = 10.5 (s, 1H, NH-3), 7.42 ~ 7.49 (m, 4H, meta-Ar), 7.27 (s, 1H, H-6), 7.09 ~ 7.13 (m, 4H, ortho-Ar), 6.17 ~ 6.20 (m, 1H, H-1), 4.48 ~ 4.60 (m, 2H, H-5), 4.34 ~ 4.38 (m, 1H, H-3), 4.07 ~ 4.13 (m, 1H, H-4), 2.35 ~ 2.48 (m, 2H, H-2), 1.74 ~ 1.84 (s, 3H, 5-Me); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): = 163.7 (C-2), 150.1 (C-4), 148.7, 148.6 (Ar-*isop*), 135.2 (C-6), 132.6, 132.5 (Ar-*meta*), 121.4 (Ar-*ortho*), 118.4 (Ar-*para*), 110.9 (C-5), 84.9 (C-1), 81.4 (C-4), 67.6 (C-5), 59.9, 59.6 (C-3), 36.5 (C-2), 11.9 (5-Me); ES/MS (+): m/z 658.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 680.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

2.1.4 AZT-二对甲硫基苯基-5-磷酸三酯(M4)

White foam. $^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 162 MHz): = -12.7; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): = 9.80 (s, 1H, NH-3), 7.35 (s, 1H, H-6), 7.10 ~ 7.30 (m, 8H, ArH), 6.25 (m, 1H, H-1), 4.55 (m, 2H, H-5), 4.35 (m, 1H, H-3), 4.10 (m, 1H, H-4), 2.23 ~ 2.57 (m, 8H, H-2, SCH_3), 1.91 (s, 3H, 5-Me); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): = 163.9 (C-2), 150.5 (C-4), 147.8 (Ar-*isop*), 136.2 (C-6), 135.3 (Ar-*para*), 128.2

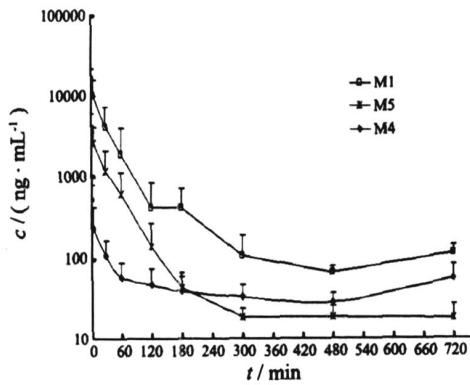


图2 M1、M4、M5 静脉注射给大鼠后,血浆中平均药物浓度-时间曲线图

Fig. 2 Mean drug plasma concentration-time curve (mean \pm S. D., $n=6$) of pro-drugs in rats after i. v. administration of M1, M4, M5

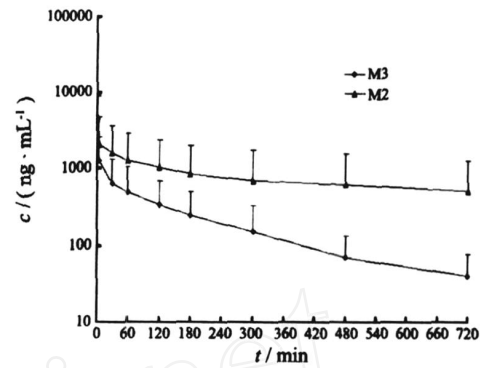


图3 M2、M3 静脉注射给大鼠后,血浆中平均药物浓度-时间曲线图

Fig. 3 Mean drug plasma concentration-time curve (mean \pm S. D., $n=6$) of pro-drugs in rats after i. v. administration of M2 and M3

(Ar-meta), 120.5 (Ar-ortho), 111.7 (C-5), 85.1 (C-1), 82.0 (C-4), 66.0 (C-5), 60.0 (C-3), 37.4 (C-2), 16.4 (SCH₃), 12.5 (5-Me); ESFMS(+): m/z 592.1[M+H]⁺, 614.1[M+Na]⁺.

2.1.5 AZT 二对甲氧基苯基-5-磷酸三酯(M5)

White foam.³¹P-NMR (CDCl₃, 162 MHz): = -11.0; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): = 9.94 (s, 1H, NH-3), 7.28 (s, 1H, H-6), 7.04 ~ 7.15 (m, 4H, meta-Ar), 6.75 ~ 6.88 (m, 4H, ortho-Ar), 6.20 (m, 1H, H-1), 4.47 (m, 2H, H-5), 4.30 (m, 1H, H-3), 4.05 (m, 1H, H-4), 3.73 (s, 3H, OMe), 2.39 (m, 1H, H-2), 2.24 (m, 1H, H-2), 1.75 (s, 3H, 5-Me); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): = 164.0 (C-2), 157.2 (Ar-is-po), 150.6 (C-4), 143.7 (Ar-para), 135.2 (C-6), 120.9 (Ar-ortho), 114.8 (Ar-meta), 111.6 (C-5), 84.8 (C-1), 82.0 (C-4), 67.4 (C-5), 60.0 (C-3), 55.6 (OCH₃), 37.3 (C-2), 12.4 (5-Me); ESFMS(+): m/z 560.2[M+H]⁺, 582.2[M+Na]⁺.

2.2 二芳基系列核苷 5-磷酸三酯的药物动力学结果

通过大鼠体内的动力学实验,得到 AZT-二苯基磷酸酯系列化合物的药物动力学参数,列于表 1. 血药浓度-时间曲线如图 2、3 所示.

结果表明,5 个化合物均表现出消除快,吸收好的特点. 将这些结果与 AZT 本身的动力学数据进行对比,可以看出,修饰后的核苷二苯基磷酸酯半衰期有不同程度延长(1~6 倍),稳态表观分布容积明显增大(8~24 倍),平均驻留时间(MRT)增大 3~7 倍. 磷酸化修饰后的核苷二苯基磷酸酯有缓释 AZT 的可能,能延长体内滞留时间,改进 AZT 在体内的药物水平,减少药物副作用.

3 讨论

实验结果表明:(1) 该系列核苷-5-二苯基磷酸酯的体内药物动力学性质类似,相比母药 AZT 有很大

表 1 每个化合物以 5 mg/kg 剂量静脉注射给 6 只大鼠后得到的药物动力学主要参数(平均值)

Tab. 1 The main pharmacokinetic parameters of 5 AZT pro-drugs after i. v. administration to six rats at a dose of 5 mg/kg (mean)

R =	$t_{1/2}$ / min	K_e / (L · min ⁻¹)	CL/ (L · min ⁻¹ · kg ⁻¹)	V _{ss} / (L · kg ⁻¹)	MRT _(0-∞) / min	AUC _(0-∞) / (ng · min · mL ⁻¹)
Ph	79.4	0.009	0.007	0.760	133.5	877365.3
<i>p</i> -I-Ph ¹	378.1	0.002	0.014	7.439	271.0	565543.5
<i>p</i> -Br-Ph ²	196.1	0.004	0.074	21.028	181.8	146579.4
<i>p</i> -SCH ₃ -Ph	201.3	0.006	0.019	4.854	201.3	515666.2
<i>p</i> -OCH ₃ -Ph	87.2	0.009	0.021	3.016	111.1	418756.7
AZT ³	56		0.029	1.017	35.9	

1,2:因检测不到原药,动力学数据根据血液中释放的 AZT 来计算;3:AZT(20 mg/kg,静脉注射)的动力学数据来自参考文献[7].

程度的提高;(2)不同取代基对核苷-5-二苯基磷酸酯的体内药物动力学有不同影响,吸电子和推电子基团的强弱是主导因素;(3)吸电子基团衍生物在体内血浆中几乎检测不到原药,基本代谢转化成 AZT;(4)推电子基团衍生物在体内血浆中能同时检测到原药和代谢物 AZT.

核苷-5-二苯基磷酸酯的体内药物动力学的差异取决于芳基取代基的性质. 药物在体内释放 AZT 的能力和芳基取代基上吸电子和推电子基团的强弱,或相应酚的 pK_a 大小有着直接的联系. 可以认为,酚的酸性可能和基团的离去能力有关,即造成 P-O-芳基的不稳定性. ROH 酚(分别为:苯酚,对碘苯酚,对溴苯酚,对硫甲基苯酚,对氧甲基苯酚)的 pK_a 分别对应为 10.0、9.20、9.26、9.81、10.21^[8]. 其中,由于对碘苯酚,对溴苯酚的 pK_a 较小,使得修饰后的 AZT-二对碘苯基-5-磷酸三酯, AZT-二对溴苯基-5-磷酸三酯的 P-O-芳基在复杂的生理环境下,包括 pH 条件、各种酶作用,较容易崩解,立即释放出 AZT,而在血液中检测不到原药. 相对芳基上取代基 pK_a 值较高的 AZT-二对硫甲基苯基-5-磷酸三酯, AZT-二对氧甲基苯基-5-磷酸三酯, AZT-二苯基-5-磷酸三酯在体内环境有一定的耐受性,能缓慢随着 P-O-芳基键的裂解而逐渐释放 AZT.

本文通过对 5 个分别带有吸电子和推电子基团的核苷-5-二苯基磷酸酯进行系统的大鼠体内动力学研究,发现该系列衍生物都能改善对 AZT 的释放,有作为临床抗艾滋病治疗剂的可能,其动力学表现和苯基上取代基的性质有很大关系.

参考文献:

- [1] Kolata G. FDA approves AZT [J]. Science, 1987, 235: 1570.
- [2] Kim J, Park S, Tretyakova N Y, et al. A method for quantitating the intracellular metabolism of AZT amino acid phosphoramidate pronucleotides by capillary high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. Mol Pharm, 2005, 2 (3): 233 - 241.
- [3] Herdewijn P. Structural requirements for antiviral activity in nucleosides [J]. Drug Discov Today, 1997, 2 (6): 235 - 242.
- [4] Ledneva R K, Preobrazhenskaya N N, Shinskii N G, et al. Analogs of uridine-5-phosphoamides and their hydrolysis by ribonucleoside-5-phosphoamidase [J]. Dokl Akad Nauk SSSR, 1970, 193: 1308 - 1310.
- [5] Mc Guigan C, Davies M, Pathirana R, et al. Synthesis and anti-HIV activity of some novel diaryl phosphate derivatives of AZT [J]. Antiviral Research, 1994, 24: 69 - 77.
- [6] Unadkat D J, Wang J P, Pulham D, et al. Dose-ranging pharmacokinetics of zidovudine (azidothymidine) in the rat [J]. Pharmaceutical Research, 1989, 6(8): 734 - 736.
- [7] Shah V P, Midha K K, Dighe S. Analytical methods validation: bioavailability bioequivalence and pharmacokinetics studies [J]. J Pharm Sci, 1992, 81: 309 - 312.
- [8] Karnes H T, March C. Precision, accuracy, and data acceptance criteria in biopharmaceutical analysis [J]. Pharm Res, 1993, 10: 1420 - 1422.
- [9] 萧参, 陈坚行. 生物药剂分析方法的认证 [J]. 中国药学杂志, 1993, 24: 425 - 426.
- [10] 王广基, 刘晓东, 刘晓泉. 药物代谢动力学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

Synthesis and Pharmacokinetics of Five Diaryl Phosphate Triester Derivatives of Zidovudine

ZHU Mei-xiang¹, WU Zhen^{2*}, ZHAO Yu-fen^{1,2}

(1. Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University,

2. College of Medical, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Diaryl phosphates triester derivatives of AZT were demonstrated great *in vitro* anti-HIV activity. Five pro-drugs were synthesized through tricoordinated phosphate chemistry. The overall pharmacokinetics in rat plasma was associated with the structure of the diaryl phosphate triester compounds, the magnitude of which varied considerably with the nature of the aryl substituent. The diaryl phosphate triester pro-drugs of AZT proved the tendency of sustained release of AZT, longer residence time *in vivo* and increased plasma concentration of AZT. The 5 diaryl phosphate triester pro-drugs exhibited the success in the potency of clinical anti-HIV therapeutics.

Key words: AZT; diaryl phosphate triester derivatives; anti-HIV activity; synthesis; pharmacokinetics