

• 新药发现与研究实例简析 •

新药创制是复杂的智力活动, 涉及科学研究、技术创造、产品开发和医疗效果等多维科技活动。每个药物都有自身的研发轨迹, 而构建化学结构是最重要的环节, 因为它涵盖了药效、药代、安全性和生物药剂学等性质。本栏目以药物化学视角, 对有代表性的药物的成功构建, 加以剖析和解读。

天然活性物质实现全合成, 不仅是化学结构的终极确证, 也是研制新药的重要环节, 一方面有利于资源的保护, 更重要的是有助于进行广泛的结构优化, 突破半合成或衍生物化的修饰局限性。有机合成的进步得以实现全合成复杂结构的天然产物, 也为结构变换、构效关系研究和结构简化提供了技术支持。埃博霉素的全合成促进了这类结构的新药研发, 伊沙匹隆由半合成转化为全合成, 以及其他新的候选物的研制都充分体现了这一点。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1304

全合成促进埃博霉素类药物的研制

郭宗儒

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

1 背景

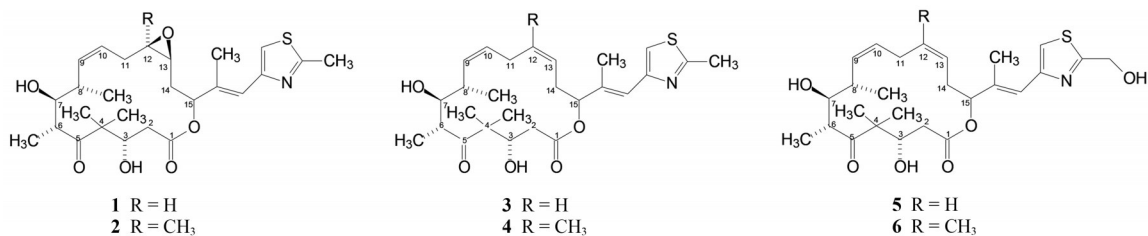
1.1 埃博霉素的发现 埃博霉素 (epothilones) 是一组由 16 元大环内酯所组成的统称, 迄今已发现 6 个天然存在的化合物 (1~6)。1993 年 Gerth 等从南非土壤中黏细菌纤维堆囊菌 *Sorangium cellulosum* 分离得到 (Gerth K, Bedorf N, Höfle G, et al. Antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria) —production, physico-chemical and biological properties. J Antibiot, 1996, 49: 560–563)。起初发现埃博霉素具有抗真菌作用, 后来美国 NCI 证实对癌细胞有强效细胞毒活性。默克药厂的 Bollag 等首先发现埃博霉素 A 和 B (1 和 2) 的作用机制是结合于微管蛋白, 并与 ³H-紫杉醇发生竞争性结合, 提示埃博霉素与紫杉醇结合同一位点 (Bollag DM, McQueney PA, Zhu J, et al. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. Cancer Res, 1995, 55: 2325–2333)。后来发现埃博霉素 C 和 D (3 和 4), 是 1 和 2 的生物合成前体, 也与微管蛋白有强力结合作用。5 和 6 为埃博霉素 E 和 F, 是噻唑环上的

甲基氧化成羟甲基的天然物。

1.2 微管和微管蛋白 真核细胞中的微管作为结构性蛋白有许多功能, 主要是参与有丝分裂过程, 也与细胞内转运、分泌和移动有关。微管是由 α 和 β 微管蛋白异二聚体构成, 再聚合成原丝体, 进而平行缩合成管状物。微管在有丝分裂中以聚合(延长)–解聚(缩短)之间不断的转化履行功能, 形成动态平衡。如果该平衡态受到外来物的干扰, 则阻断有丝分裂。影响微管(蛋白)的物质可分为两类: 微管稳定剂和去稳定剂, 前者有紫杉醇、埃博霉素和圆皮海绵内酯 (discodermolide) 等; 去稳定剂有秋水仙碱、鬼臼毒素和长春碱等。天然的埃博霉素 A~F 对微管蛋白的活性强于紫杉醇 10~1 000 倍不等, 有很高的药用前景。不过在成药性方面因大环内酯的代谢不稳定性, 有必要进行结构变换和优化。

2 结构优化

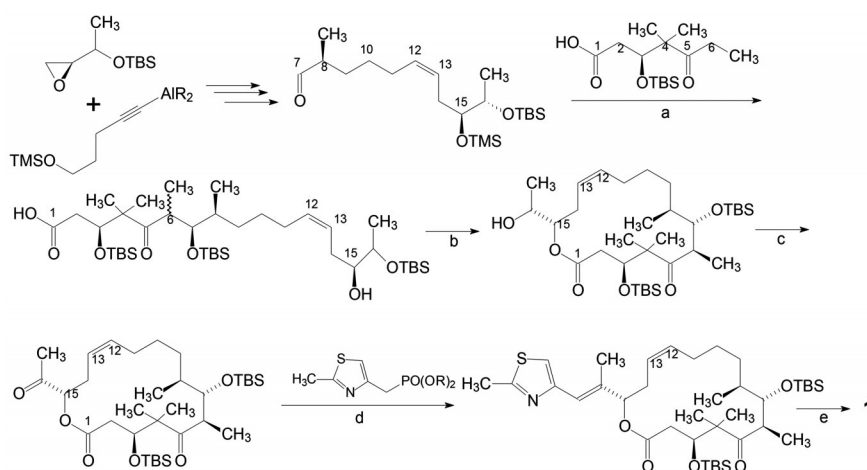
2.1 优化得益于全合成的成功 复杂结构的天然产物改造和构效关系研究, 取决于全合成的实现, 以突破只作衍生化或半合成等局部修饰的限制。埃博霉素 A



和 B 的率先全合成是由 Meng 等在 1996 年完成的 (Meng DF, Bertinato P, Balog A, et al. Total syntheses of epothilones A and B. *J Am Chem Soc*, 1997, 119: 10073–10092), 采用会聚式立体控制方法合成。如今埃博霉素类的合成大体有 4 种不同的合环策略, 例如 C2 和 C3 的羟醛缩合合环; C9 和 C10 烯基还原成键反应; C12 和 C13 烯基还原成键反应; C1 和 C15 的内酯化反应等。此外, 环氧乙烷既可以预构于合成模块中, 也可 C12 和 C13 缩合成双键为化合物 **3** 和 **4** 后进行环氧化反应制得。这样由于不同的合成策略制备了不同的模块, 从而得以合成取代基的不同配置, 不同取代 (或构型) 的大环, 得以研究构效关系。图 1 是由十一碳醛、酮酸和噻唑甲磷酯三个模块合成埃博霉素 A (**1**) 的主要反应流程, 用不同的取代模块, 可以合成不同结构的大环内酯 (Hindupur RM, Panicker B, Valluri M, et al. Total synthesis of epothilone A. *Tetrahedron Lett*, 2001,

42: 7341–7344)。

2.2 构效关系 报道合成埃博霉素 A 和 B 的类似物的结构与活性的文献很多, 到 2015 年合成的埃博霉素类似物至少 400 个, Nicolaou 等对这些化合物综合讨论了构效关系 (Nicolaou KC, Namoto K, Ritzén A, et al. Chemical synthesis and biological evaluation of *cis*- and *trans*-12, 13-cyclopropyl and 12, 13-cyclobutyl epothilones and related pyridine side chain analogues. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 9313–9323)。为了方便讨论构效关系, 将埃博霉素的化学结构划分成 4 个区块 A、B、C 和 D, 如图 2 所示。构效关系概括如下: ① A 区域中的 7 位羟基是必要的功能基, 而且 7*S*-OH 以及 8*R*-CH₃ 的立体构型对活性也是重要的。C9-C10 须保持单键连接以维持一定的柔性, 变成双键或桥连成环都使活性降低。② B 区域的 C12-C13 将环氧基变成双键, 活性和药代动力学性质以及生物利用度保持或增加, 这是研制埃



(a) i. LDA, -78 to -40 °C then ZnCl_2 , -78 to -50 °C, THF, 1 h; ii. TBDMSOTf, 2,6-lutidine, CH_2Cl_2 , 0 °C to rt; iii. aq. AcOH, rt, 72%; (b) i. 2,4,6-Trichlorobenzoyl chloride, TEA, THF, DMAP, toluene, rt, 1 h; ii. H_2SiF_6 , *ter*-BuOH, MeCN, CH_2Cl_2 , rt, 24 h, 70%; (c) Oxalyl chloride, DMSO, TEA, CH_2Cl_2 , -78 °C, 93%; (d) *n*-BuLi, THF, -78 °C to rt, 60%; (e) i. 20% TFA in CH_2Cl_2 , 0 °C, 1 h, 92%; ii. Methyl (trifluoromethyl) dioxirane, MeCN, 0 °C, 56%.

Figure 1 Three-component synthesis of epothilone A

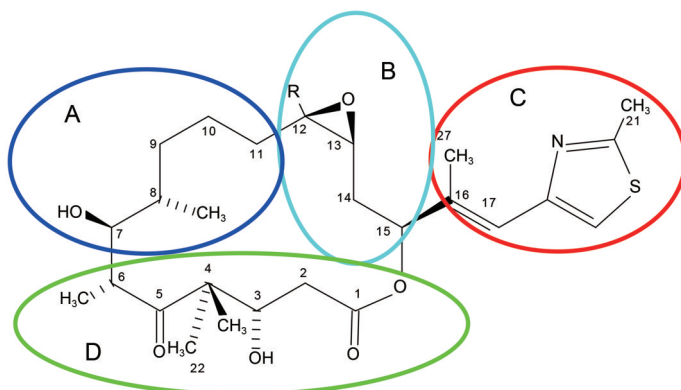


Figure 2 Four domains of epothilones for analysis of SAR

博霉素 D 及其衍生物的依据。去氧化物的 C12-甲基, 乙基或较大的基团仍然保持活性。将氧化乙烯换成环丙烷保持活性 (Johnson J, Kim SH, Bifano M, et al. Synthesis, structure proof, and biological activity of epothilone cyclopropanes. *Org Lett*, 2000, 2: 1537-1540)。氧化乙烯变成氮杂环丙烷也保持活性 (Regueiro-Ren A, Borzilleri RM, Zheng XP, et al. Synthesis and biological activity of novel epothilone aziridines. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 3: 2693-2696)。增加 C10-C12 的刚性 (例如成桥联物) 不利于活性。③ C 区的 C15 连接出的芳香环是非常必要的, 若移至其他位置或改变 C15 构型都会使活性丧失。噻唑环转换成噁唑或吡啶, 或与 C27 稠合的杂环如苯并咪唑、苯并噁唑和喹啉等都保持活性 (Nicolaou K, Scarpelli R, Bollbuck B, et al. Chemical synthesis and biological properties of pyridine epothilones. *Chem Biol*, 2000; 7: 593-599)。但是 C27 的甲基换成大体积的烷基则降低活性, C21 的甲基的变换对活性没有影响。④ D 区的功能基最多。C1 的羰基是活性必要的基团, 内酯的氧原子可用氮原子替换, 保持活性, 这是非常重要的信息, 由于内酰胺比内酯的代谢/化学稳定性高, 研制伊沙匹隆并得以成功就是利用了这个信息。C3 的羟基不是必需基团, 而 C4 的偕二甲基是必要的。C6 的甲基可以增大而不影响活性 (Altmann KH, Florsheimer A, O'Reilly T, et al. The natural products epothilones A and B as lead structures for anticancer drug discovery: chemistry, biology, and SAR studies. *Prog Med Chem*, 2004, 42: 171-205)。

3 已批准上市和处于临床研究的候选物

3.1 伊沙匹隆 迄今唯一批准上市的埃博霉素类药物为伊沙匹隆 (7, ixabepilone), 是由 BMS 公司研制的埃博霉素 B 的类似物, 于 2007 年 FDA 批准, 临床治疗转移和进展性乳腺癌、头颈部肿瘤和黑色素瘤等。7

的结构特征是将 C1-C15 的内酯变换成内酰胺, 从而降低了对酯酶水解的敏感性, 提高了代谢稳定性。7 的作用机制与埃博霉素 B 相同, 即结合于 β 微管蛋白, 阻止了微管的聚合-解聚的动态平衡, 终止癌细胞的有丝分裂。

伊沙匹隆最初是由埃博霉素 B 经半合成方法制备的。方法是在钯催化剂作用下, 内酯环打开, 成稳定的烯丙基阳离子, 经叠氮化钠或四丁基铵叠氮化物作亲核进攻, 生成叠氮羧酸的开环物, 还原得到氨基酸, 进而经 DPPA 或 EDC/HOBT 脱水缩合, 形成内酰胺伊沙匹隆, 如图 3 所示。半合成的规模制备总收率大约为 20%, 由于发酵制备埃博霉素 B 的条件复杂繁琐、产率低, 所以需要全合成的方法。

伊沙匹隆后来用全合成方法制备, 主要的反应路径如图 4 所示。两个关键性模块, 一个是噻唑烯丙基与 Boc 保护的氨基预构于 C15 的烷基 (C12-C15) 碘化物, 另一个是 C1-C11 的叔丁酯, 两个化合物在钯的催化下, 经 Suzuki 偶联反应, 在 C11 和 C12 形成单键连接, 用钌催化剂对 C3-酮基作不对称氢化还原, 得到高选择性的 (R)-C3-OH, 脱除保护剂 Boc 和叔丁醇, 得到的游离的 C1-羧基和 C15-氨基, 脱水内酰胺化, 生成 16 元环的氮杂-12,13-脱氧埃博霉素 B (即后面叙述的埃博霉素 D), C12-C13 经环氧化生成目标物伊沙匹隆。

我国学者阎家麒等对伊沙匹隆和埃博霉素 B 的全合成方法进行了深入的研究和改进 (阎家麒. 埃博霉素 B 内酰胺衍生物的制备方法. CN 101323869A [P]. 2008-12-17)。

3.2 沙戈匹隆 沙戈匹隆 (8, sagopilone) 是德国先铃药厂研制的埃博霉素 B 类似物, 目前处于临床研究状态。基于 C15 的杂环侧链和 C6 的甲基是与微管蛋白结合的必需药效团, 研制者对这两个位点作了广泛的结构变换, 用汇聚式方法合成了 350 余个类似物, 优选出化合物 8。

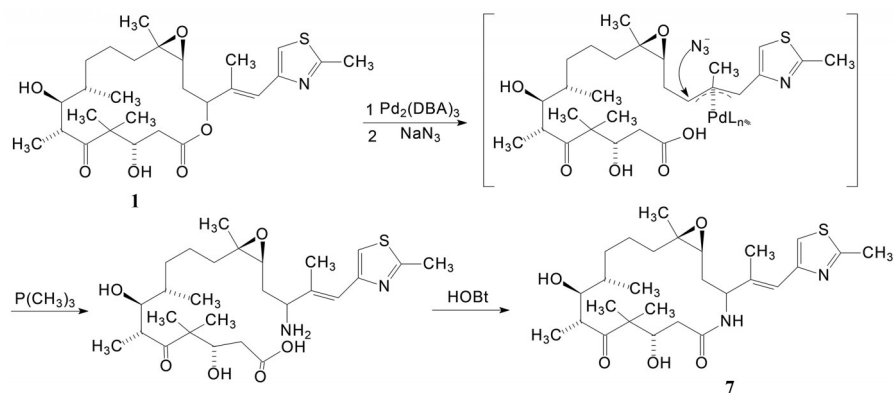


Figure 3 Concise scheme for semi-synthesis of ixabepilone (7) from epothilone B

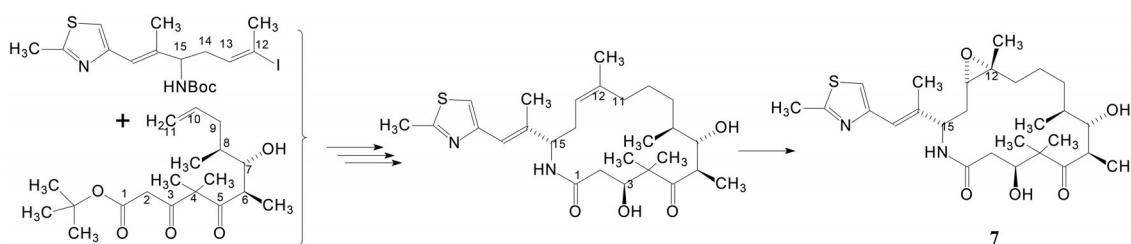
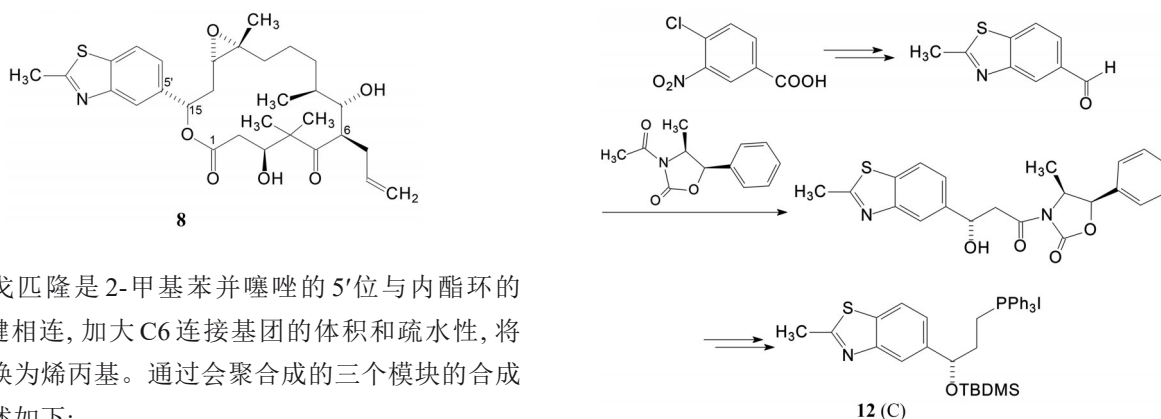
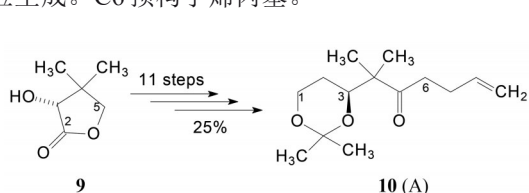


Figure 4 Concise scheme of total synthesis of ixabopilone(7)

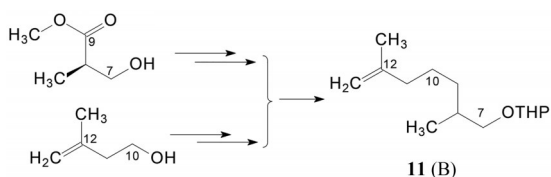


沙戈匹隆是2-甲基苯并噻唑的5'位与内酯环的C15单键相连, 加大C6连接基团的体积和疏水性, 将甲基转换为烯丙基。通过会聚合成的三个模块的合成路径简述如下:

模块A (10) 是包含目标化合物的C1~C6的片段, 由3-羟基-4,4-二甲基丁内酯 (9, pantolactone) 经11步反应生成。C6预构了烯丙基。

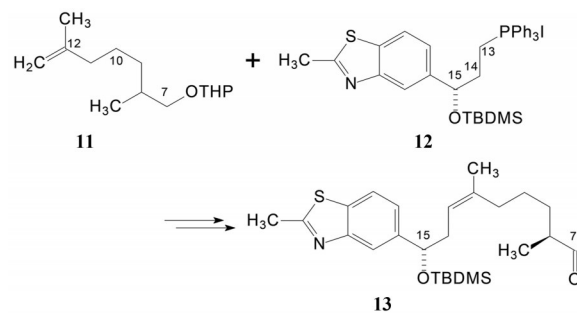


模块B (11) 是包含目标化合物的C7~C12的片段, 由羟基甲基丙酸酯与2-甲基-4-丁烯醇等简单原料缩合而成。



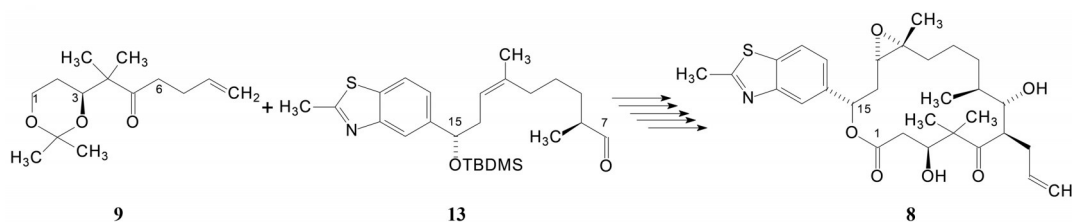
模块C (12) 是C15连出的杂环侧链, 是由3-硝基-4-氯苯甲酸经5步反应生成。

模块B (11) 和模块C (12) 经 Wittig 反应, 缩合成 BC (13), 为含有杂环侧链的C7~C15的片段。



化合物 13 (C7~C15 片段) 与 9 (模块A, 含有C1~C6的片段) 经5步反应, 得到目标化合物沙戈匹隆 8。(Klar U, Buchmann B, Schwede W, et al. Total synthesis and antitumor activity of ZK-EPO: the first fully synthetic epothilone in clinical development. Angew Chem Int Ed, 2006, 45: 7942–7948)。

沙戈匹隆的体外抗肿瘤活性以及I期临床研究都呈现优良的效果, 其抗癌作用的广谱性和能够穿越血脑屏障进入中枢神经等优于伊沙匹隆。沙戈匹隆是全



合成候选药物,体现了天然产物的全合成促进复杂结构药物的研制。

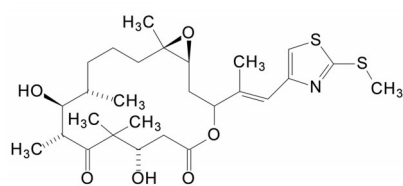
3.3 其他进入临床研究的候选物 其他已进入临床研究的有天然化合物埃博霉素 B (**2**, patupilone, EPO906) 是由诺华研发的 (Mozzetti S, Iantomasi R, De Maria I, et al. Molecular mechanisms of patupilone resistance. *Cancer Res*, 2008, 68: 101197-101204)。

诺华研制的另一个处于临床研究的化合物甲硫埃博霉素 B (**14**, ABJ879), 是噻唑环上 2 位甲基变换位甲硫基, 增大了体积和疏水性, 提高了结合力 (Dilea C, Wartmann M, Maira SM. A PK-PD dose optimization strategy for the microtubule stabilizing agent ABJ879 [abstract]. *Proc Am Asso Cancer Res*, 2004, 45: 5132; Wartmann M, Loretan J, Reuter R. Preclinical pharmacological profile of ABJ879, a novel epothilone B analog with potent and protracted anti-tumor activity [abstract]. *Proc Amer Asso Cancer Res*, 2004, 45: 5440)。

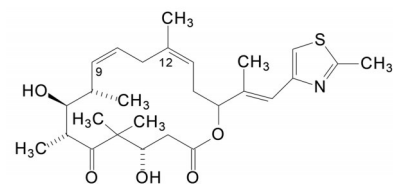
C12 的甲基变换为三氟甲基 (**16**, iso-fludelone, KOS-1803) 是另一个处于临床研究的候选物 (Christner SM, Parise RA, Levine ED, et al. Quantitative method for the determination of iso-fludelone (KOS-1803) in human plasma by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 100: 199-204)。

罗氏公司开发的天然存在的埃博霉素 D (**4**, KOS-862) 是埃博霉素 B (**2**) 的 12,13 脱氧成 Δ^{12} 的化合物, 保持了同样的活性, 而且便于合成 (Spriggs DR, Dupont J, Pezzulli S, et al. KOS-862 (epothilone D): phase 1 dose escalating and pharmacokinetic (PK) study in patients (pts) with advanced malignancies [abstract]. *ECCO*, 2003, 12: 547)。

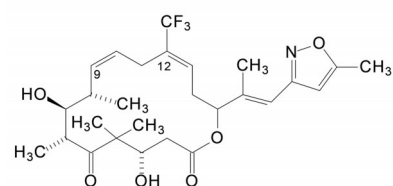
KOS-1584 (**15**, Δ^9 -epothilone D) 是罗氏研发的另一个埃博霉素 D 衍生物, 为埃博霉素 D 的 9,10-脱氢物, 其安全有效性优于 **4**, 而且增加了水溶性, 提高了向癌组织的渗透, 降低了穿越血脑屏障作用, 也降低了



14 (ABJ879)



15 (KOS-1584)



16 (iso-fludelone)

被糖蛋白 P-gp 的外排作用 (Zhou Y, Zhong Z, Liu F. KOS-1584: a rationally designed epothilone D analog with improved potency and pharmacokinetic (PK) properties [abstract]. *Proc Amer Asso Cancer Res*, 2005, 46: 2535)。

BMS 研发的 iso-fludelone (**16**) 是最新的埃博霉素 D 的类似物, 在 3 个位置改变了结构: 9,10 位脱氢成不饱和键; 12 位的甲基变为三氟甲基; 15 位连接出的杂环为 3-甲基异噻唑。**16** 的优势是提高了水溶性和化学稳定性, 也增加了作用强度和持续性, 提高了向肿瘤组织的穿透性, 降低了不良反应。此外, 对糖蛋白 G-gp 的外排作用也具有耐受性 (Chou TC, Zhang X, Zhong ZY, et al. Therapeutic effect against human xenograft tumors in nude mice by the third generation microtubule stabilizing epothilones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 13157-13162)。