

• 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多维性质。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。

紫杉醇是含氮的二萜化合物,1975年发现具有抗癌活性,并揭示其药理作用机制是促进微管蛋白聚合并使微管稳定化,这与已知秋水仙碱和长春碱抑制微管蛋白聚合的机制完全不同。紫杉醇直到1992年由施贵宝公司研发成功上市,历时近20年。曲折的研发历程是由于紫杉醇的化学结构复杂,性质怪异,被紫杉醇发现者谑称为“只有树无所事事才会合成这样的化合物”,水/脂溶性和含量极低,作为天然的先导物对合成、结构改造和开发成药都是非常困难的事情。紫杉醇的构效关系也很窄促,四个稠合环不宜变动自不待言,大部分手性碳也不宜改变构型,酰基也不得简化,因而可变动的位置和基团就很少了,这可以从赛诺菲在1996年和2010年上市的多西他赛和卡巴他赛与紫杉醇的结构相差无多得到反映。紫杉醇注射液含有的助溶剂引起较严重的不良反应,治疗时需慎用免疫抑制剂糖皮质激素也是不得已的。但尽管如此,近30年来的应用,在多种癌症的治疗上仍然不失为明星药物。也因此对紫杉烷类药物以及制剂学的研究一直在进行中。(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1605

紫杉烷类药物的研制

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 概说

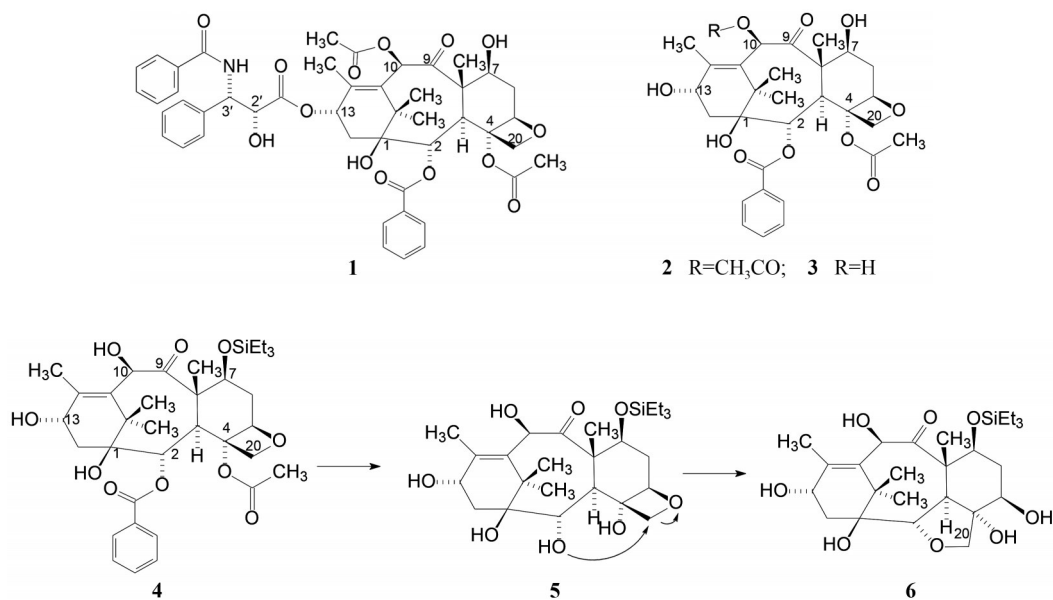
美国国立癌症研究所 (NCI) 癌症治疗部 (DCT) 自1975年起采用一种新的预见性筛选程序,在用表型评价植物提取物活性的大型项目中,成功地发现了紫杉醇。紫杉醇是从红豆杉属 (*Taxus*) 植物中分离出的一种结构复杂的天然产物,也是最早以促进微管蛋白聚合和稳定已聚合微管的抗肿瘤药物。同位素示踪表明,紫杉醇促进微管蛋白聚合且与微管结合使其稳定化,导致细胞内微管的聚集,微管的积累干扰了细胞的各种功能,尤其使细胞分裂停止在有丝分裂期,阻断了细胞的正常分裂,这是紫杉醇抗癌活性之所在。

1.1 发现历史 1963年美国化学家瓦尼 (M. Wani) 和沃尔 (M. Wall) 首次从美国西部森林中称谓太平洋杉 (*Taxus brevifolia*) 树皮和木材中得到了紫杉醇的粗提物。在筛选实验中他们发现该粗提物对离体培养的鼠肿瘤细胞有很高抑制活性,从而着手分离单体活性成分,由于活性成分在植物中含量极低,直到1971年,他们同杜克大学的化学教授 McPhail 合作,通过X-射线分析确定了活性最强成分紫杉醇 (**1**, paclitaxel) 的化学结构,是一种含氮的四环二萜化合物 (Wani MC, Taylor HL, Wall ME, et al. Plant antitumor agents. VI. The isola-

tion and structure of taxol, a novel antileukemic and anti-tumor agent from *Taxus brevifolia*. J Am Chem Soc, 1971, 93: 2325-2327)。与此同时,还鉴定了其他四环二萜化合物,多是相同结构骨架在不同位置有不同取代基的化合物,例如C13去酰化物巴卡亭 III (**2**, baccatin III) 和10-去乙酰基巴卡亭 III (**3**, 10-deacetylbaccatin III), 它们是紫杉醇生物合成的前体,也可能是萃取过程中的水解产物,或二者皆有。紫杉醇含量极低,**2**和**3**的含量较高,成为半合成的主要原料。**2**和**3**也是研究紫杉醇类的化学和结构改造的重要化合物。

1.2 紫杉醇的化学 紫杉烷是四环二萜为骨架的天然活性产物,稠合为6/8/6/4元环(自左到右A/B/C/D)。骨架上含有4个酯基。在温和碱性条件下C13的酯键水解成**2**,或同时水解C10的乙酰基成**3**,提示C13和C10的酯键容易水解 (Magri NF, Kingston DGI, Jitrang-sri C, et al. A highly efficient, practical approach to natural taxol. J Org Chem, 1986, 51: 3239-3242)。

化合物**3**的7-O-三乙硅醚化合物 (**4**) 作碱性水解,相继发生4-去乙酰基和2-去苯甲酰基化合物,进而生成2,4-二醇 (**5**),在此条件下**5**发生重排反应,生成含有四氢呋喃片段的化合物**6**。分子模拟显示,C2的羟基



距离环氧丁烷的亚甲基很近, C2的羟基作分子内亲核进攻重排成**6**。

7位的 β 羟基在9位羰基的互动下, 容易通过发生逆羟醛缩合, 异构化为 α 羟基。7位异构化的紫杉醇活性略有降低。C13的羟基难以发生酰化反应, 分子模拟和NMR表明, C4的乙酰氧基对C13羟基构成空间位阻, 导致难以发生亲核进攻。

2 紫杉醇的作用机制

人体的细胞中存在多聚微管, 构成细胞的骨架结构。微管是由 α 微管蛋白和 β 微管蛋白形成的异二聚体, 经自组装成多聚微管。微管和二聚微管蛋白体之间存在动态平衡, 正常状态下的互动调节细胞多种功能, 其中包括细胞的增殖和凋亡。紫杉醇诱导微管蛋白聚合, 促进微管的装配和稳定化, 从而破坏了上述的动态平衡。微管与紫杉醇结合后形态发生改变, 所形成微管束不与染色体连接, 导致细胞不能形成纺锤体和纺锤丝, 阻止染色体向细胞两极移动, 使细胞的有丝分裂停滞在G2期, 从而抑制细胞分裂和增殖, 这与秋水仙碱和长春碱药物的作用机制正好相反。

3 构效关系

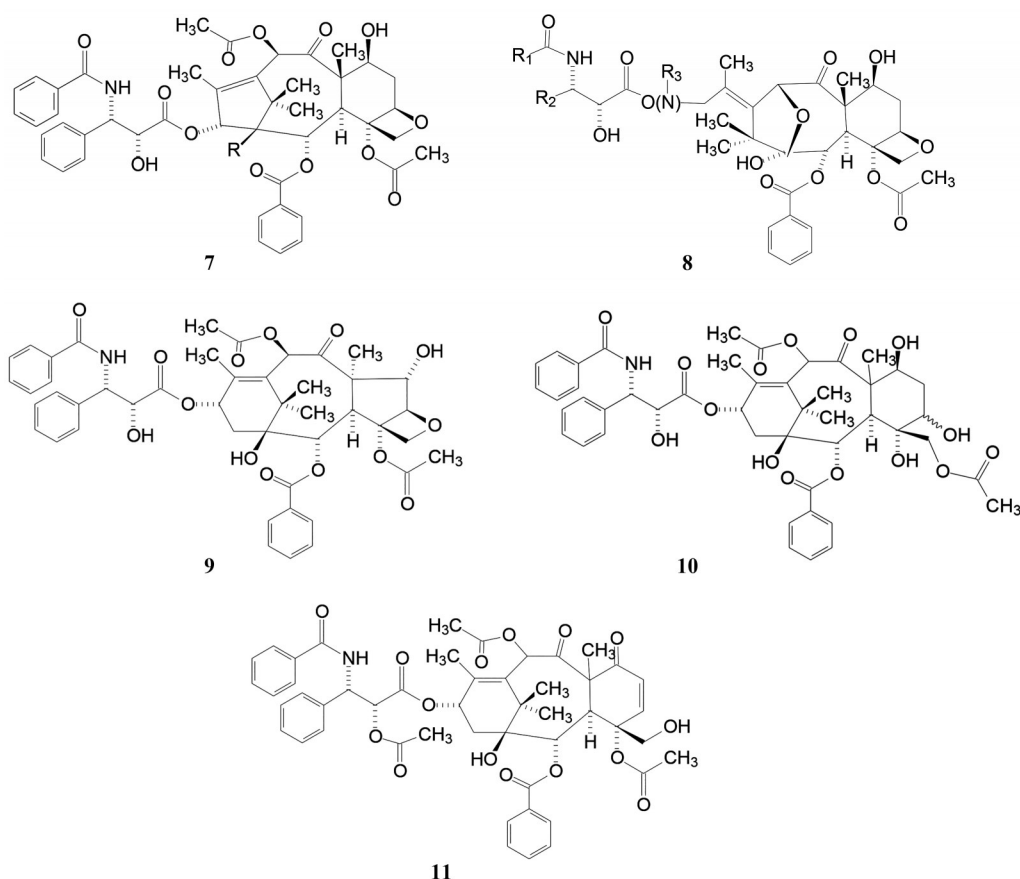
3.1 骨架的必要性

紫杉烷的结构骨架从左到右稠合的A/B/C/D环是抗癌活性所必需的结构, 该骨架支撑的侧链和基团在空间的取向和展示, 是呈现活性所必需, 稠合环打开任何一个都会降低或失去活性。

将A环缩小为五元环(通式**7**), 虽然保持与紫杉醇相当的微管结合能力, 但细胞毒性显著减弱(Yuan HQ, Kingston DGI, Long BH, et al. Synthesis and biological evaluation of C-1 and ring modified A-norpaclitaxels. Tetrahedron, 1999, 55: 9089-9100; Kingston DG. Studies

on the chemistry of taxol. Pure Appl Chem, 1998, 70: 331-334)。将A环剖裂为通式**8**的化合物, 抗癌活性取决于原13位侧链的性质, 用酯基相连的仍有一定的活性, 而用酰胺连接则失去活性(Ojima I, Kuduk SD, Chakravarty S, et al. A novel approach to the study of solution structures and dynamic behavior of paclitaxel and docetaxel using fluorine-containing analogs as probes. J Am Chem Soc, 1997, 119: 5519-5527; Ojima I, Lin S, Chakravarty S, et al. Syntheses and structure activity relationship of novel nor-seco toxoids. J Org Chem, 1998, 63: 1637-1645)。B环是紫杉醇骨架的主要支撑片段, 而且环上连接有多个取代基, 因而未见有缩/扩/裂B环的报道。C环缩小为五元环例如式**9**的化合物活性显著下降, 推测是原来7位的羟基改变成现在的空间位置, 降低了与微管结合的能力(Liang X, Kingston DGI, Long BH, et al. Paclitaxel analogs modified in ring C: synthesis and biological evaluation. Tetrahedron, 1997, 53: 3441-3456)。剖裂D环成化合物**10**, 活性减弱, 此时在原13位的侧链作不同的修饰有可能提高活性(Givanni A, Bruno D, Jasmin J, et al. Synthesis and evaluation of C-seco paclitaxel analogues. Tetrahedron Lett, 1997, 38: 4273-4276)。

D环为氧杂环丁烷, 是呈现活性的必需药效团, 紫杉醇经Lewis酸处理重排成**10**或氧化重排为**11**都失去活性, 所以D环不可缺少(Samaranayake G, Magri NF, Jitrangsri C, et al. Modified taxol. 5. Reaction of taxol with electrophilic reagents and preparation of a rearranged taxol derivative with tubulin assembly activity. J Org Chem, 1991, 56: 5114; Magri NF, Kingston DG.



Modified taxols. 2. Oxidation products of taxol. *J Org Chem*, 1986, 51: 797-802).

3.2 环上各位置的变化 C1上的羟基还原成H, 活性显著下降, 提示该处的羟基不能变动 (Kingston DGI, Chordia MD, Jagtap PG. *Synthesis and biological evaluation of 1-deoxypaclitaxel analogues*. *J Org Chem*, 1999, 64: 1814-1822)。C2连接的苯甲酰氧基是必需片段, 水解成羟基或异构为表-苯甲酰氧基或迁移到1位都失去活性 (Chaudhary AG, Chordia MD, Kingston DG. *A novel benzoyl group migration: synthesis and biological evaluation of 1-benzoyl-2-des(benzoyloxy)paclitaxel*. *J Org Chem*, 1995, 60: 3260-3262)。苯环上引入取代基对活性的影响与所处位置相关, 间位取代基有利于促微管聚合和提高细胞毒活性, 而对位取代降低活性, 提示苯环对位的空间狭小, 不容基团存在 (Kingston DG, Chaudhary AG, Chordia MD, et al. *Synthesis and biological evaluation of 2-acyl analogues of paclitaxel (taxol)*. *J Med Chem*, 1998, 41: 3715-3726)。将苯环变换为环己基也使活性降低, 提示苯甲酰氧基的芳香平面性和空间取向的疏水性对活性有重要影响 (Bogge TC, Himes RH, Vandervelde DG, et al. *The effect of the aromatic rings of taxol on biological activity and solu-*

tion conformation: synthesis and evaluation of saturated taxol and taxotere analogues. *J Med Chem*, 1994, 37: 3337-3343)。C4位的乙酰氧基也是非常重要的药效片段, 用氢原子、乙酰基或苯甲酰基置换, 降低或失去活性 (Chen SH, Huang S, Kant J, et al. *Synthesis of 7-deoxy- and 7,10-dideoxytaxol via radical intermediates*. *J Org Chem*, 1993, 58: 5028-5031)。C7位的羟基的修饰或有无对活性的影响不大, 例如羟基差向异构化、烷基化、酰化或还原成氢仍能保留有与紫杉醇相似的细胞毒性。为提高水溶性, 可在C7的羟基上引入助溶性基团。C10的乙酰氧基并非必要的药效团, 去乙酰基或去乙酰氧基, 仍然保持活性 (Chen SH, Huang S, Kant J, et al. *Synthesis of 7-deoxy and 7,10-dideoxytaxol*. *J Org Chem*, 1993: 5028-5029)。C13连接的侧链上功能基很多, 包括氢键给体和接受体, 两个手性中心, 推测是呈现活性的重要组成部分。幸而C13的侧链是酯基相连, 合成比较容易, 有利于考察构效关系。结果概括如下: ① 将C13相连的氧原子换成氮, 即以酰胺连接的侧链, 活性基本消失 (Chen SH, Farina V, Vayas DM, et al. *Synthesis and biological evaluation of C-13 amide-linked paclitaxel (taxol) analogs*. *J Org Chem*, 1996, 61: 2065-2070), 因而旨在用酰胺替换酯

键以提高化合物的稳定性的目标难以实现。②为了简化侧链的结构,合成的乙酸、3-苯丙酸、巴豆酸、乳酸、苯基乳酸、*N*-苯甲酰-异丝氨酸等作为侧链的类似物,结果表明结合微管和细胞毒活性都显著减弱。③苯基丙酸为侧链的化合物促微管聚合的活性 (ID_{50}) 低于紫杉醇 16 倍,苯基乳酸低 3.5 倍,提示 2'-羟基的存在是非常必要的。紫杉醇的 2'-羟基酰化产物使结合微管作用降低,但体内细胞毒和抗癌活性变化不大,是因为体内的酯酶催化水解生成紫杉醇的缘故。这为制备紫杉醇可溶性前药提供了修饰位点 (Mellado W, Magri NF, Kingston DGI, et al. Preparation and biological activity of taxol acetates. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 124: 329-336)。④ 3'-苯基也是必要的药效片段,苯基被氢或甲基置换,活性显著降低 (Gueritte-Voegelein F, Guenard D, Lavele F, et al. Relationships between the structure of taxol analogues and their anti-mitotic activity. *J Med Chem*, 1991, 34: 992-998)。3'-氨基的酰基也是必要的,但可以修饰变换,苯环可以用烷基替代,以 3~6 个碳原子为宜 (Gueritte-Voegelein F, Senilh V, David B, et al. Chemical studies of 10-deacetyl baecatin III. Hemisynthesis of taxol derivatives. *Tetrahedron*, 1986, 42: 4451 - 4460; Oh WK, Schurko B. Docetaxel chemotherapy remains the standard of care in castration-resistant prostate cancer. *Nature Clin Pract Oncol*, 2008, 5: 506-507)。⑤ C2'-*R* 和 C3'-*S* 的构型对于结合和细胞毒活性是重要的,改变构型使活性减弱 (Nicoiaou KC, Dal WM, Guy RK. Chemistry and biology of taxol. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1994, 83: 15-44)。

4 紫杉醇的结合模式

4.1 紫杉醇 C13 链的构象 最早测定紫杉醇与 α,β -微管蛋白的晶体结构是用 Zn^{2+} 诱导的复合物,通过电子晶体学 (EC, 3.7 Å) 方法测试获得的,虽然显示了紫杉醇在蛋白中的定位与取向,但未能提示清晰的微观结合特征 (Nogales E, Wolf SG, Downing KH. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 1998, 391: 199-202)。后来用多西他赛与微管蛋白的复合物结构经电子晶体学测定,揭示了结合特征 (Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, et al. High-resolution model of the microtubule. *Cell*, 1999, 96: 79-88)。由于多西他赛与紫杉醇的结构相似,故以此作为模板,将紫杉醇分子对接到微管蛋白的结合部位,研究紫杉醇的结合构象和模式。

这里需要对紫杉醇单体的三维结构加以讨论。紫杉醇分子是由多种低能量构象群组成,究竟是以怎样的构象与微管蛋白结合,人们曾做过多方面的探讨。最

早提出的优势构象是所谓的疏水折拢式 (hydrophobic collapse) 构象,即 C2 的苯甲酰氧基与 C13 链上的苯甲酰胺基发生 π - π 疏水折拢作用,两个苯环中心距离为 4.7 Å (图 1a) (Dubois, J, Guénard D, Guéritte-Voegelein F, et al. Conformation of taxotere® and analogues determined by NMR spectroscopy and molecular modeling studies. *Tetrahedron*, 1993, 49: 6533-6544)。后来有人基于固态下的紫杉醇结构提出了 C2 的苯甲酰氧基与 C3' 的苯甲酰胺基呈并列配置、以所谓“极性构象”而存在 (图 1b),苯环间距离为 11.6 Å,各自独立存在 (Mastroaolo D, Camerman A, Luo Y, et al. Crystal and molecular structure of paclitaxel (taxol). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92: 6920-6924)。疏水折拢和极性构象是两个完全不同的极端。另一种结合构象是 C2 的苯甲酰氧基与 C3' 连接的两个苯基处于相同的距离,分别为 9.4 Å 和 10.0 Å (图 1c),事后表明,这种低能构象接近于紫杉醇与微管蛋白结合的构象。分子对接提示,微管蛋白的 His-229 处于 C2-苯甲酰氧基与 C3'-苯基之间,避免了苯环之间的疏水折拢,苯环各自独立地参与同蛋白的疏水片段结合。

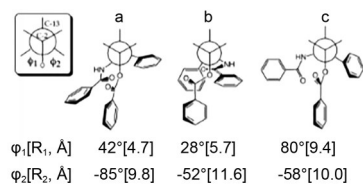


Figure 1 Newman projections for PTX conformations in terms of the improper torsion angles (ϕ_1 , ϕ_2). The front atom is C-2, the unseen back atom, C-3'. Distances (in angstroms) are from the center of the C-2 benzoyl phenyl ring and the center of the C-3' phenyl ring corresponding to the appropriate ϕ_1 and ϕ_2 . a: The "nonpolar" conformation as derived by 1H NMR in $CDCl_3$. b: The "polar" conformation as observed in the solid state. c: Proposed taxol conformation bound to β -TB

4.2 紫杉醇与微管蛋白的结合特征 紫杉醇结合在 β 微管蛋白的深部疏水裂隙,后者由多个二级结构单元所构成 (图 2): 其中螺旋 H1、H6 和 H7 以及连接 H6 与 H7 间的环套与 C13 侧链的 2'-苯甲酰氧基、3'-苯基和 3'-苯甲酰胺基发生疏水性结合,3'-苯基还同 B8 与 B10 的折叠链作疏水结合。2'-OH 与连接 B9-B10 的环套上 NH 发生氢键结合。C4 的乙酰氧基处于由 10 个氨基酸残基构成的疏水槽中; C8 的甲基与 C 端的 M-环套上的 Thr-276 和 Gln-281 残基发生范德华力结合, Thr-276 还与 O-21 有静电相互作用; C12 甲基与 Leu-371 相结合。所以由疏水性的稠合环所支撑的基团或片段具有

相当高的位置和立体专属性与微管蛋白结合 (Snyder JP, Nettles JH, Cornett B et al. The binding conformation of taxol in β -tubulin: a model based on electron crystallographic density. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98: 5312-5316)。

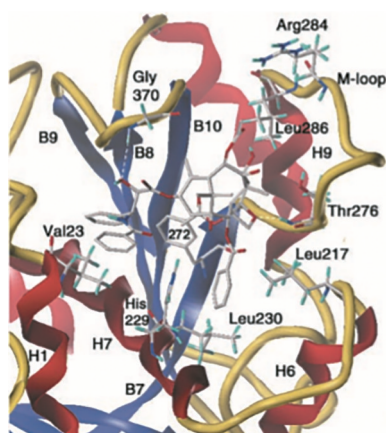


Figure 2 Detail of important binding interactions between PTX in β -tubulin

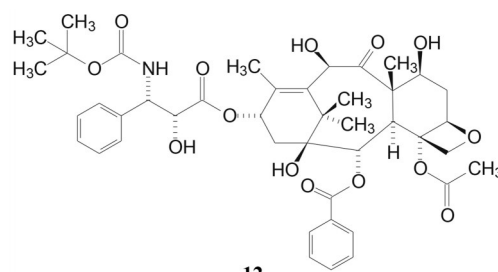
4.3 紫杉醇注射液 紫杉醇的溶解度 ($< 0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和口服生物利用度都很低,用静脉输注给药,其助溶剂是聚氧乙烯蓖麻油 (Cremephor EL) 与乙醇 (1:1) 作为溶剂。由于助溶剂引起较严重的不良反应,输注前患者需用大剂量糖皮质激素如地塞美松,以及苯海拉明和 H2 受体阻断剂如西米替丁,即使依此三联预处理,仍然有患者发生严重不良反应。

紫杉醇是由施贵宝公司研发,于1992年上市,临床治疗多种恶性肿瘤,包括卵巢癌、乳腺癌、肺癌和头颈部肿瘤等。

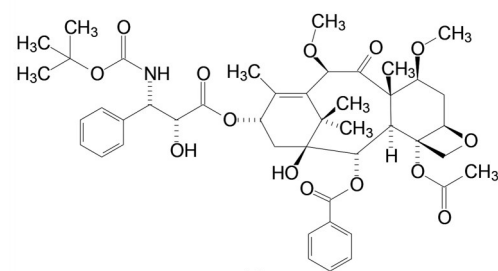
5 紫杉醇类似物

5.1 多西他赛 前述的构效关系提示,7位羟基、10位乙酰氧基和3位与氨基相连的酰基可以变换修饰,对靶标结合作用和细胞毒活性影响可以有向好的趋势。赛诺菲公司设计的10位去乙酰基和3'位用叔丁氧碳基代替苯甲酰基得到化合物 **12**,抗肿瘤谱和活性略优于紫杉醇,溶解性也显著提高,遂进一步研发,成为第一个紫杉醇的半合成类似物,于1996年批准上市,定名为多西他赛 (**12**, docetaxel),多西他赛的水溶性是 $0.0127 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,比紫杉醇高40倍,其抗癌活性也强于紫杉醇,尤其对治疗转移性去势抵抗性前列腺癌有显著作用。

5.2 卡巴他赛 赛诺菲公司研发多西他赛后于2010年又上市了第二个半合成药物卡巴他赛 (**13**, cabazitaxel),卡巴他赛与多西他赛的结构区别是7位和10位都是甲氧基,从而提高了药物的化学稳定性,更重要的



12



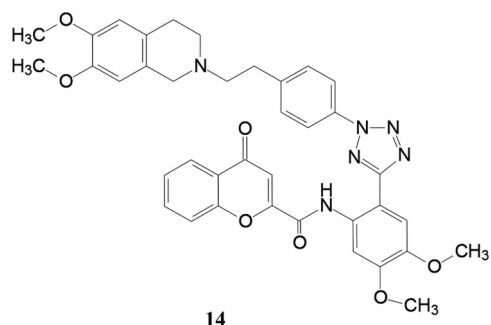
13

是卡巴他赛对外排泵 P-gp 糖蛋白的结合力 (底物性质) 弱于紫杉醇和多西他赛,因而它的生物利用度和作用持续时间优于紫杉醇和多西他赛 (Galsky MD, Dritselis A, Kirkpatrick P, et al. Cabazitaxel. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9: 277-278)。卡巴他赛治疗转移性去势抵抗性前列腺癌优于多西他赛。

6 紫杉醇类药物的制剂

6.1 口服紫杉醇 为了避免注射紫杉醇因助溶剂而引起的不良反应, Athenex 公司研制了紫杉醇的口服制剂,避免了使用聚氧乙烯蓖麻油,该制剂称作 Oraxol,于2020年FDA批准上市。Oraxol是由紫杉醇与 P 糖蛋白抑制剂 encequidar (**14**) 组成复方制剂。Encequidar 是韩美医药研发的称作 Orascovery 平台技术的一个药物,该技术是专门研制对药物发生外排或阻止吸收的 P 糖蛋白抑制剂 (Kohler SC, Wiese M. HM30181 derivatives as novel potent and selective inhibitors of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). J Med Chem, 2015, 58: 3910-3921), encequidar 对外排紫杉醇的糖蛋白有特异性抑制活性,对其他转运蛋白没有抑制,而且也不抑制细胞色素 P450 活性。口服 Oraxol 可达到剂量为 $80 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ 静脉注射紫杉醇的体内暴露量,患者的应答率和耐受性都优于传统的紫杉醇注射液,这其中也由于不使用激素保护了患者的免疫系统 (Loong HHF, Mennel R, Wagner M, et al. 1733TiP - a pilot study of oral paclitaxel (ORAXOL) in subjects with cutaneous angiosarcomas (KX-ORAX-010). Ann Oncol, 2019, 33: 708)。

6.2 白蛋白紫杉醇 另一个上市的紫杉醇制剂称作 Abraxane,是利用白蛋白作为紫杉醇的载体,形成紫杉



醇-白蛋白复合纳米粒。细胞上存在白蛋白转运体 (例如 SPARC 和 gp60), 负责运输白蛋白, 在许多肿瘤中高表达, 为快速生长的癌细胞转运白蛋白提供充足的氨基酸和能量。所以白蛋白的结合蛋白可介导紫杉醇靶向输送到肿瘤组织中。由于避免使用助溶剂, 用药前不需要预防过敏反应的预处理治疗, 能够安全地提高紫杉醇的剂量, 缩短滴注时间 (Green MR, Manikhas GM, Orlov S, et al. Abraxane, a novel cremophor-free, albumin-

bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 2006, 17: 1263-1268)。Abraxane 于 2005 年批准用于乳腺癌治疗。2012 年, 它被批准用于不能进行化疗的转移性非小细胞肺癌的一线治疗。2013 年批准 Abraxane 联合吉西他滨用于转移性胰腺癌的一线治疗。

7 后记

紫杉醇以天然结构作为抗实体瘤药物, 历时已近 30 年, 迄今仍是某些肿瘤的一线用药, 是因为独特的作用机制, 较少与其他药物发生交叉耐受的缘故。然而紫杉醇的结构复杂, 与靶标多位点的结合, 导致难以作结构大改, 这已从报道的许多构效关系的研究得到证实。多西他赛和卡巴他赛的结构与紫杉醇结构大同小异, 说明了构效关系的狭窄, 也因此难以厘清“多卡二赛”结构优化的脉络。此外紫杉醇类药物的物理化学性质也是不利的成药性, 因而在制剂学和复方的研究也成为活跃领域。紫杉烷类药物的研究仍在路上。