

• 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。

替莫唑胺是款饶有兴趣的抗癌药物。发端于研制者对达卡巴嗪的应用和对杂环药物化学的兴趣,开始了以化学引领的新型三嗪类药物研究。咪唑并四嗪化合物在生理条件下开环的化学性质,是在细胞内释放重氮甲烷的载体,生成的强烷化剂不仅对癌细胞DNA的鸟嘌呤和腺嘌呤分别发生N⁷和N³的甲基化,产生细胞毒作用,而且还“意外地”对鸟嘌呤的O⁶发生甲基化,由于错配于胸腺嘧啶,又启动并活化了癌细胞的错配修复蛋白系统(MMR),以致(O⁶甲基化—错配—剪切)的N次反复循环,癌细胞发生自杀性的凋亡,所以对耐受三嗪类的肿瘤仍是敏感有效的。这是一项出乎于药物化学的设计,得乎于分子药理学的独特性质,虽然有幸运成分,但20年的坚持研发,得到了回报,成就了治疗脑胶质瘤的一线用药。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1905

始于烷化剂终于靶向作用的替莫唑胺

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 引言

替莫唑胺是一款传统的抗肿瘤药物,1978年开始研究,1999年批准上市,治疗脑恶性胶质瘤和皮肤黑色素瘤。这个简单的杂环分子($M_w = 194$)是含有6个氮元素的咪唑并四嗪化合物,至今仍是胶质瘤的一线用药。替莫唑胺的研发是以药物化学合成作引领、以表型作活性评价,有别于当今以靶标为核心的研究模式。本品之成功,是科学兴趣、洞察力、偶然幸运和持之以恒的交集所致。

2 杂环化学的引领

2.1 达卡巴嗪的启示 英国Aston大学Stevens在20世纪70年代建立了以化学引领的多学科药物研究团队,他们对含多氮元素的杂环化合物感兴趣,其中将连三嗪杂环化学作为选题之一。当时抗癌药达卡巴嗪(**1**, darcabazine, DTIC)已经上市,是含有线型三嗪分子,抗癌作用机制是对DNA的烷基化产生的细胞毒作

用所致。**1**的分子作用机制是在体内经肝脏氧化代谢脱去一个甲基生成MTIC (**1a**),经电荷转移裂解出烷化剂重氮甲烷,所以达卡巴嗪是个前药。图1是达卡巴嗪的活化和烷化示意图。Stevens等探索具有新结构类型的双环并合连三嗪类杂环的化学和生物学性质。

2.2 咪唑并连三嗪酮骨架 苯并连三嗪酮(**2**)和咪唑并吡嗪酮(**3**)也具有断键重排的化学性质,但二者的断裂方式和产物类型不同,化合物**2**在不同条件下可发生1-8a, 2-3或3-4键断裂,生成不同的离子型或自由基型化学片段;而**3**在肼的存在下只断裂4-5键。化合物**2**和**3**的不同裂解方式提示,具有桥头氮的咪唑并连三嗪酮**4**在不同的环境中裂解,可能生成达卡巴嗪样的化合物,成为潜在的新型抗肿瘤药物。

2.3 化合物的合成 目标物的合成通法是2-重氮基咪唑酰胺与各种异氰酸酯反应得到(Ege G, Gilbert K.

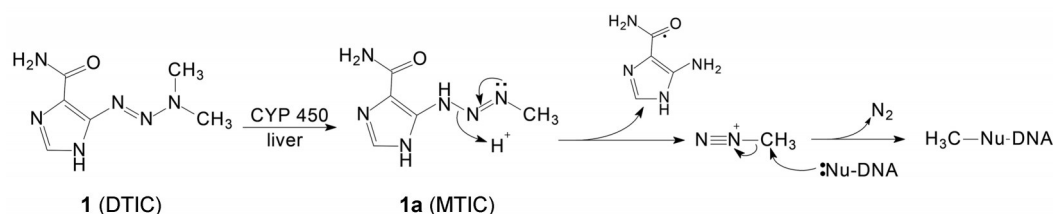
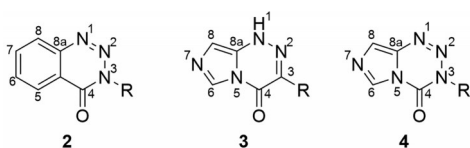


Figure 1 Scheme of activation and alkylation of darcabazine



[7+2]- and [11+2]-cycloaddition reactions of diazoazoles with isocyanates to azolo[5,1-*d*] [1,2,3,5] tetrazine-4-ones. Tetrahedron Lett, 1979, 20: 4253 – 4256). 反应历程是 [3+2] 环加成 (a 途径) 生成不稳定的螺二环, 然后自动发生 [1,5] 单键转移生成目标物咪唑并四嗪酮 (5)。或者经两步离子反应机制, 即咪唑环上氮原子对异氰酸酯的羰基作亲核进攻 (b 途径), 生成偶极中间体, 再关环生成目标物 5, 异途同归, 如图 2 所示。

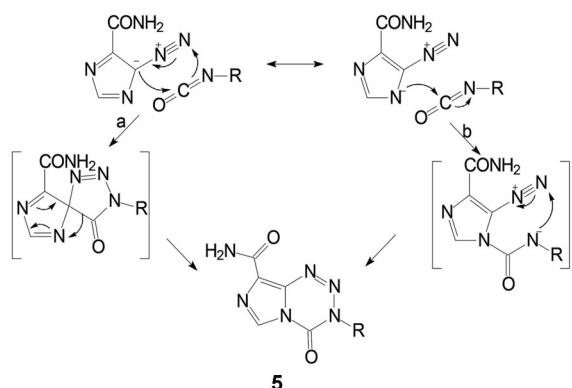


Figure 2 The process of 8-carbamoyl-3-*R*-imidazo[5,1-*d*]-1,2,3,5-tetrazin-4(3*H*)-one from the reaction of 5-diazoimidazole-4-carboxamide and isocyanate

合成的目标化合物结构列于表 1。目标物分别用小鼠移植 L1210 和 P388 肿瘤模型进行 1~5 天的腹腔给药试验, 化合物 6 抑制肿瘤生长和延长生存期显著强于其余化合物, 而且未见明显不良反应。其余化合

Table 1 The structures of 3-substituted imidazo[5,1-*d*]-1,2,3,5-tetrazin-4(3*H*)-ones

Compd.	R	Compd.	R	Compd.	R
6	CH ₂ CH ₂ Cl	9b	<i>p</i> -CH ₃	9f	<i>p</i> -NO ₂
7	CH ₃	9c	<i>p</i> -OCH ₃	9g	<i>m</i> -CN
8	CH ₂ CH ₃	9d	<i>p</i> -OEt	10	-
9a	H	9e	<i>p</i> -Cl		

物除 7 呈现一定的活性外均不显著 (数据从略)。

其中活性最强的化合物是含有氯乙基的化合物 6 (数据省略), 而且小鼠未出现明显的毒性作用。化合物 6 在水中的裂解产物经分析是咪唑酰胺、2-氯乙醇和分子氮, 推测为图 3 所示的反应历程。4 位酮基有较强的亲电性, 水分子足以对羰基作 SN2 进攻, 电荷转移可按 a 断裂 4-5 键, 羧基留在侧链的氮上, 或按 b 断裂 3-4 键, 羧基留在咪唑的氮上, 无论哪条路径, 都容易脱羧生成单环上 5 位有氯乙基三唑的化合物。4 位的酰胺基与三唑的一种互变异构体构成分子内氢键, 固定的一种异构体, 使氯乙基的 β 碳原子具有较强亲电性, 因而水分子做亲核取代, 裂解成氨基咪唑酰胺 (AIC)、氯乙醇和分子氮。在体内生理条件下, DNA 的亲核基团显然比水分子更具有亲核性, 因而被烷基化, 产生细胞毒作用。

与此同时, 还合成了保持骨架和 3-氯乙基片段, 变换咪唑环上的取代基的化合物, 例如 6 位用不同的烷基、芳基或芳烷基取代, 8 位的酰胺氮用不同烷基、芳基或芳烷基取代, 结果表明, 6 位小体积烷基取代与无取代的化合物 6 活性相近, 而大基团降低活性; 8 位的

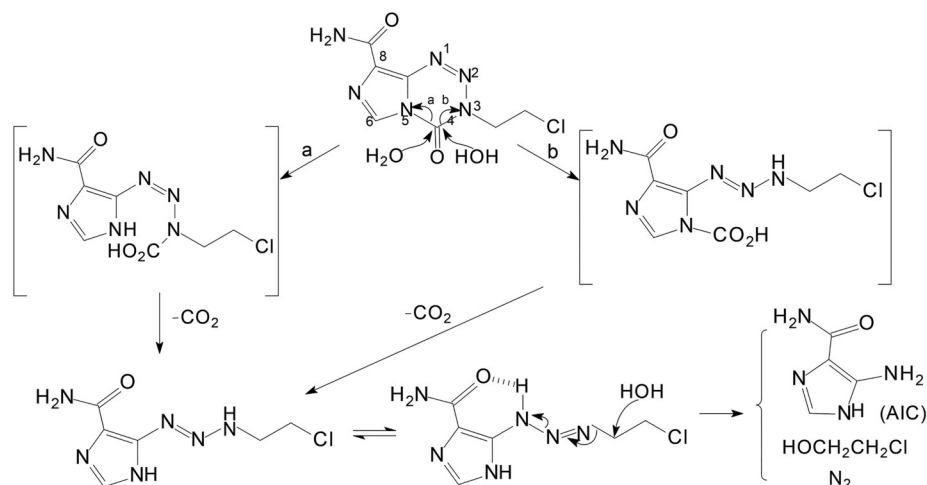


Figure 3 The mechanism of decomposition of 6 in aqueous solution

N-取代不利于活性(数据省略), 构效关系表明咪唑环上不宜做取代基变换(Lunt E, Newton CG, Smith C, et al. Antitumor imidazotetrazines. 14. Synthesis and antitumor activity of 6- and 8-substituted imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazinones and 8-substituted pyrazolo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazinones. J Med Chem, 1987, 30: 357-366)。

用小鼠 TLX5 淋巴瘤细胞体外评价化合物 **6** 和 **7** 的细胞毒活性, 抑制浓度 (MIC_{50}) 分别为 2.5 和 $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, **6** 的活性强于 **7** 一倍。

化合物 **6** 对小鼠多种移植性肿瘤的抗癌活性强于其他化合物, 而且也未显示明显的不良反应, Stevens 团队与 May & Baker 公司合作, 开始了 **6** 的临床研究, I 期临床试验却发现患者发生显著的不良反应, 骨髓抑制引起血小板减少, 因而中止了试验与合作。

3 新的候选化合物

3.1 评价对不同瘤株的选择性抑制 对活性较高的化合物在两种癌细胞株做了深入的研究, 以揭示深层次的作用特征。一是用类成淋巴细胞系 GM892A, 这种淋巴瘤细胞中缺乏具有修复功能的 O⁶-烷基鸟嘌呤烷基转移酶 (Mer-); 另一是用患者的 Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞, 这种细胞具有修复受损 DNA 的功能 (Mer+)。用这两种细胞评价了代表性化合物, 揭示对修复的选择性作用, 结果列于表 2。化合物 **6** 和 **7** 对 Mer- (缺乏修复酶的细胞) 的抑制活性强于对 Mer+ (具有修复酶的细胞), 分别是 8 倍和 23 倍, 而乙基取代的化合物 **8** 只有 2 倍, 虽然 3 个化合物都可裂解出重氮甲烷, 对 DNA 鸟嘌呤 O6 和 N7 的发生甲基化。

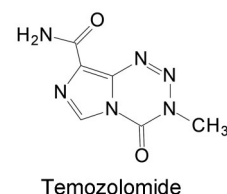
3.2 新的候选物及其上市 中止了化合物 **6** 的研究, 转而启动了化合物 **7**, **7** 的相对分子质量 194, 其脂溶性

Table 2 *In vitro* activity of typical compounds against GM892A (Mer-) and Raji (Mer+) cells

Compd.	$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Ratio of IC_{50} , Raji/GM892A
	GM892A (Mer-)	Raji (Mer+)	
6	4.8	39	8.1
7	7.6	175	23.0
8	180	435	2.4

可穿越血脑屏障进入中枢, 这为治疗脑瘤提供了药动力学的优势。**7** 在酸性环境是稳定的, 但在中性或碱性溶液中 ($\text{pH} > 7$), 例如在生理条件下发生非酶促性水解, 生成 MTIC 中间体, 后者就地生成重氮甲烷, 对 DNA 进行甲基化, 如流程图 4 所示。

化合物 **7** 作为新的候选物进行了系统的临床前研究, 显示具有广谱抗癌活性, 口服后可完全吸收, 并有广泛的组织分布, 体内消除半衰期 1.8 h, 与血浆蛋白结合率 12%。此时 Acton 大学与先灵葆雅公司合作进行开发研究, 定名为替莫唑胺 (temozolomide), 临床研究表明, 替莫唑胺口服治疗多形性胶质细胞瘤和间变性星状细胞瘤, 于 1999 年美国 FDA 批准上市, 作为与放射治疗联合治疗脑瘤的一线用药 (Clark AS, Deans B, Stevens MF, et al. Antitumor imidazotetrazines. 32.1 Synthesis of novel imidazotetrazinones and related bicyclic heterocycles to probe the mode of action of the anti-tumor drug temozolomide. J Med Chem, 1995, 38: 1493-1504)。



3.3 替莫唑胺的作用机制 作为生物烷化剂的替莫唑胺是个前药, 从化学结构上看, 不像是载体型前药, 其实它既是载体 (carrier) 型也是生物前体 (bioprecursor) 型前药, 咪唑酰胺以并合环方式携带着甲基三嗪结构, 而后者又是重氮甲烷的前体。对替莫唑胺的抗癌机制特别是与达卡巴嗪 (**1**) 相比, 虽然都经过 MTIC (**1a**) 的中间体, 但体内分子药理学结果是不同的。

用同位素示踪和 DNA 足迹法 (footprinting) 研究表明, 替莫唑胺对核酸的甲基化发生在 3 个位点: 鸟嘌呤 N7 甲基化 (**9**, m⁷G) 大约占 70%, 在腺嘌呤的 N3 的

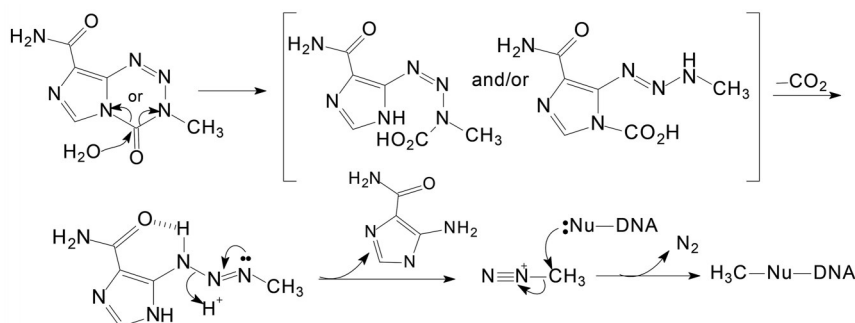
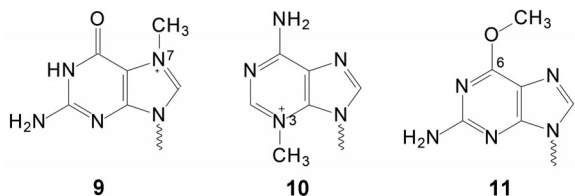


Figure 4 The mechanism of action between compound **7** and DNA

甲基化 (**10**, m³A) 占 9%, 鸟嘌呤的 O⁶ 甲基化 (**11**, O⁶mG) 占 5%, O⁶mG 虽然生成率较小, 但却是十分重要的 (Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, et al. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry*, 1994, 33: 9045 – 9051)。



达卡巴嗪和替莫唑胺的抗癌作用和耐药机制, 取决于 DNA 的至少 3 种修复系统: ① O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶 (MGMT), 是个有酶样作用的小蛋白, 通过化学计量性和自失活反应, 将 DNA 上 O⁶-甲基鸟嘌呤的甲基转移到自身的半胱氨酸残基上, “牺牲自己”以修复 DNA; ② 碱基剪切修复 (BER), 用以清除

由于细胞代谢、物理或化学因素引起的 DNA 结构损伤; ③ 错配修复 (MMR), 是通过形成蛋白复合物来修复 DNA 复制中产生的错误或损伤。MMR 识别错配的碱基和插入-删除的环套后, 通过酶蛋白系统剪切掉受损伤或错误的核苷酸序列, 恢复正确的碱基序列。

替莫唑胺对 DNA 发生 m⁷G 和 m³A 甲基化, 可阻断癌细胞 BER 修复机制, 应该说是致命性损伤。问题是癌细胞为了逃逸这种损伤, 还启动了高表达 O⁶-甲基鸟苷甲基转移酶的 MGMT 机制, 以及为修复缺陷而启动的 MMR 机制。替莫唑胺的独特性在于, 它对鸟苷酸发生 O⁶-甲基化反应, 虽然只有 5%, 却发挥了主导作用, 因为此时生成的 m⁶G 不再同胞苷配对而是与胸苷作氢键结合, 这种错误配对也被癌细胞的 MMR 酶系统识别而纠错, 对胸苷实施剪切。由于替莫唑胺不断地对胞苷甲基化, 并错配胸苷, 又被 MMR 识别而剪切。这种持续的生成-错配-剪切, 最终导致癌细胞凋亡, 在这个意义上, 替莫唑胺激活了癌细胞的 MMR 机制, 导致自杀性凋亡 (Tentori L, Graziani G. Recent approaches to improve the antitumor efficacy of temozolomide. *Curr Med Chem*, 2009, 16: 245–257)。