

高喜树碱——极具开发价值的拓扑异构酶 I 抑制剂

杨 松, 张万年*

(第二军医大学 药学院, 上海 200433)

关键词: 高喜树碱; 喜树碱; 拓扑异构酶 I; 抗肿瘤

中图分类号: R916.2; R916.697

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2004)05-0396-05

Homocamptothecins — novel promising anticancer drugs as inhibitors of topoisomerase I

YANG Song, ZHANG Wan-nian*

(School of Pharmacy, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

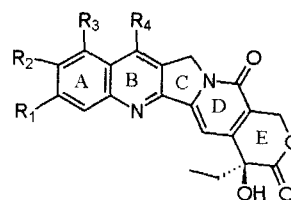
Key words: homocamptothecin; camptothecin; topoisomerase I; anticancer

拓扑异构酶 I (Topo I) 是细胞生存的必需酶, 多种肿瘤细胞中 Topo I 的含量远高于正常细胞, 拓扑异构酶 I 抑制剂已成为高选择性抗肿瘤药物研究的一个主攻方向。喜树碱类化合物是最重要的 Topo I 抑制剂, 也是世界抗肿瘤药物研究的热点之一。国内外对喜树碱类化合物进行了大量合成和构效关系研究, 并从中筛选出了一些具有开发价值的衍生物。其中伊立替康 (irinotecan, CPT-11) 和拓扑替康 (topotecan, TPT) 先后由 FDA 批准上市, 其他如 9-硝基 CPT^[1], DX8951f (exatecan)^[2] 和 GI-147211 (lurtotecan)^[3] 等目前都处在临床研究的不同阶段, 有望于近年内上市。

虽然喜树碱类化合物具有高效、广谱、选择性强的优点, 但也存在体内代谢不稳定^[4]、水溶性差、毒副作用较大、种属差异大^[5,6] 等一些较突出的问题。为了得到高效低毒的抗肿瘤药物, 人们对其进行了大量的衍生化和构效关系研究。在研究过程中, 以前一直认为其六元 α -羟基内酯环不容改变, 否则活性会降低或消失。事实上以前 E 环改造所得的绝大部分喜树碱衍生物也确实为这种观点提供了佐

证。直到 homocamptothecin 的出现, 人们发现, E 环改造同样也可提高该类化合物的活性, 这为喜树碱类抗肿瘤药物的研究提供了一个崭新的方向。

表 1 喜树碱及其衍生物



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|------------|--------------------------------------|-----------------|--|-------------------------------|
| CPT | H | H | H | H |
| Topotecan | H | OH | CH ₂ N(CH ₃) ₂ | H |
| Irinotecan | H | | H | C ₂ H ₅ |
| SN38 | H | OH | H | C ₂ H ₅ |
| Rubitecan | H | H | NO ₂ | H |
| Lurtotecan | -OCH ₂ CH ₂ O- | | H | |
| Exatecan | F | CH ₃ | -CH ₂ CH ₂ CH(NH ₂)- | |

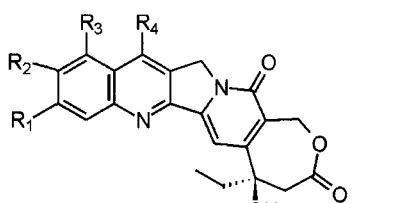
Homocamptothecin, 简称 hCPT, 人们称之为高喜树碱, 一方面“homo”本身有“高”的含义, 另一方面也可显示该类喜树碱类似物较以往 CPT 类化合物所具有的突出优点。其化学结构如下:

收稿日期: 2003-07-09.

基金项目: 国家 973 项目 (G1998051104).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86-21-25074460.

E-mail: zhangwn@online.sh.cn



| | |
|------------|---|
| hCPT | $R_1=R_2=R_3=R_4=H$ |
| BN80915 | $R_1=R_2=F$ $R_3=R_4=H$ |
| BN80927 | $R_1=Cl$ $R_2=Me$ $R_3=H$ $R_4=C(CH_3)_2$ |
| 12-Cl-hCPT | $R_1=R_2=R_3=H$ $R_4=Cl$ |

hCPT 是由法国的 Olivier Lavergne 等于 1997 年首次公开报道^[7], 其与 CPT 结构上的主要区别是 E 环的羟基与酯羰基之间插入了一个亚甲基(CH₂), 由 CPT 的六元 α -羟基内酯环转变成了七元 β -羟基内酯环, 正是这一结构的改变, 使得 hCPT 在许多方面都显示了 CPT 类无法比拟的优越性。

1 高喜树碱(homocampotothecin, hCPT)的优点

1.1 hCPT 细胞毒活性明显高于 CPT 类化合物

将 E 环改造成七元 β -羟基内酯环后, 出现了意想不到的活性提升。即使是外消旋的 hCPT, 对多种肿瘤细胞株的细胞毒活性也明显高于光学纯的 CPT 类化合物。有些 hCPT 类化合物对某些肿瘤细胞株的细胞毒活性甚至超过 CPT 万倍以上^[4]。在对肺癌、前列腺癌、白血病、阿霉素耐药的淋巴瘤细胞株的毒性试验中, hCPT 的活性分别高出 CPT 2 ~ 10 倍^[7,8]; hCPT 类化合物 BN80927 对多种肿瘤细胞株的活性分别超出伊立替康的活性代谢物 SN38 3 ~ 50 倍^[9]; 而 hCPT 类目前已经进入二期临床的 BN80915 与 topotecan 以及 SN38 相比, 活性提高更显著; 3 个结肠癌细胞株分别比 topotecan 高 40 ~ 130 倍, 比 SN38 高 8 ~ 60 倍以上^[10]。所有这些, 都充分表现了 hCPT 类化合物在活性上的优势。

1.2 hCPT 体内代谢稳定性大大提高, 种属差异小, 毒性下降

除了使活性提高之外, 七元 β -羟基内酯还使得 hCPT 在人血浆中的稳定性显示出了令人惊喜的提高^[4,7,11]。稳定性试验表明, 在 37 °C, 人血浆中, 1 h 之内, CPT 几乎全部开环, 活性内酯形式几乎接近于零, 而此时 hCPT 的内酯形式还有初始浓度的 80%, 即使 3 h 之后, 其内酯形式仍然还有初始浓度的 40%。美国的 Curran 小组所研制的 hCPT 衍生物 homosilatecan 也显示了类似的高稳定性^[6]。

hCPT 较高的稳定性可以延长其在体内的作用时间。由于喜树碱类化合物产生的细胞毒活性是 S 期特异性的, 因此代谢稳定性的增加, 活性形式存在

时间的延长, 就可明显增加化合物与细胞的作用时间, 使体内活性上升。

hCPT 不仅代谢稳定性增加, 而且几乎不与入血浆蛋白结合, 相反 CPT 在人血浆中却有 60% 与蛋白结合, 这种性质使得 hCPT 不会象 CPT 类化合物那样由于种属间血浆蛋白结合程度不同而造成种属差异^[8]。研究发现, hCPT 类化合物在人和小鼠血浆中水解速率基本一致, 而 CPT 类化合物则表现出了很大的种属差异, 因此, 小鼠体内药效学试验 hCPT 要比 CPT 可靠得多^[6]。

hCPT 稳定性的提高, 关键在于羟基与酯羰基之间多了一个亚甲基, 它的存在消除了 E 环的分子内氢键, 减少了羟基氧原子对羰基的诱导作用, 降低了羧基部分对亲核试剂(如水、醇、胺等)的反应活性, 从而减慢了内酯环的水解。另一方面, 该亚甲基也使得开环以后的 hCPT 要比 CPT 难以环合, 导致不可逆的开环反应^[8]。

虽然 hCPT 活性高于 CPT, 但毒性却并未增加, 相反, 在小鼠体内试验中, hCPT 的最大耐受剂量(MTD)高于 CPT^[8]。而且开环的不可逆性使得 hCPT 可能避免 CPT 类因在体内酸性环境易环合所引起的一些副反应, 如出血性膀胱炎等^[10,11]。

1.3 Topo I 和 Topo II 双重抑制作用

BN80927 是 hCPT 类化合物中最具特色的一个化合物: 它不仅能抑制 Topo I, 对于 Topo II 也有较强的抑制活性, 是拓扑异构酶的双重抑制剂^[9,12,13]。在抑酶试验中, BN80927 显示出高于 SN38 的抑制 Topo I 活性和高于 VP-16 的抑制 Topo II 的活性, 这种双重抑制活性在 CPT 类化合物中未观察到。前已述及, BN80927 对多种人类肿瘤细胞株的细胞毒活性要明显高于 SN38, 而比 Topo II 抑制剂 VP-16 更是高出 30 ~ 2 000 倍, 不仅如此, BN80927 的细胞毒活性还远高于两个正在进行临床研究的 Topo I 和 Topo II 双重抑制剂 DACA 和 Intoplicine。

由于 BN80927 的作用独特, Huchet 等^[12]以 SN38, CPT 和 VP16 为对照, 测试了 BN80927 对于处于休眠期(G₀/G₁ 期)的结肠癌 HT29 细胞株的细胞毒活性。无论是 SN38 还是 CPT, 对于休眠期的 HT29 细胞都没有产生细胞毒作用, 但在相同浓度范围内, BN80927 却显示了较强的活性, 与此同时, 即使是高浓度下, Topo II 抑制剂 VP16 也未产生细胞毒活性。由于人的肿瘤并不总是处在增生活跃的 S 期, BN80927 的这种高活性就使其更具临床价值。

1.4 hCPT 可口服给药, 体内活性高且个体差异

小^[14]

目前已进入 II 期临床研究的 BN80915 在临床前试验中采取的给药方式是口服给药。在动物试验中,口服(总剂量 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),所显示的鼠体内抑瘤活性远高于大剂量静脉给药的 CPT-11(总剂量 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和 TPT(总剂量 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

实验结果表明, topotecan 和 irinotecan 给药后虽然能暂时抑制肿瘤体积的增大,但也没有减小的趋势,在给药 15 d 后,肿瘤体积开始出现了明显的增长,而 BN80915 治疗的小鼠肿瘤体积却在给药 5 d 后逐渐缩小。研究结果还表明,两个 CPT 类药物治疗组中个体差异很大,同一治疗组(每组 10 只)的小鼠对药物出现了明显不同的反应程度。相反, BN80915 治疗组中却显示了很好的同一性,这可能使临床治疗中因个体差异引起的风险大大降低。

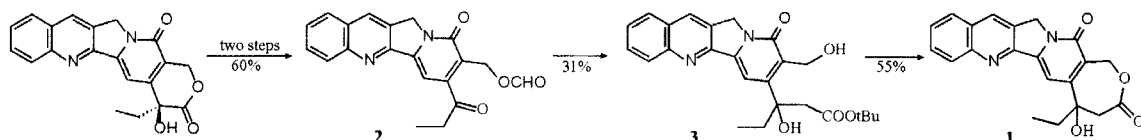
不仅 BN80915 口服给药显示了较强的抗肿瘤活性, BN80927 在临床前异种移植 PC3 和 DU145 前列腺细胞株的小鼠体内试验中,口服给药,也显示了比采取经典给药方式的拓扑替康和伊立替康更强的效果^[12]。

1.5 hCPT 对 DNA 断裂程度增强,断裂位点增加,复合物稳定性提高

研究发现, CPT 和 hCPT 都可以通过稳定 Topo I-DNA 复合物,引起 DNA 在 TG 位点和 TA 位点发生断裂,但是 hCPT 引起的断裂要明显强于 CPT,特别是在低浓度时,这种差距更加明显^[15]。

此外,七元内酯环还给 hCPT 带来了新的作用位点:hCPT 不仅能引起 DNA 在上述位点的断裂,还能使其在 CG 位点发生断裂^[15]。在 12-Cl-hCPT 与 SN38 的对比试验中,也证实了新位点的存在^[16]。

研究还表明, BN80915 产生的 DNA-Topo I 复合



Scheme 1 hCPT 的半合成路线

2.2 Lavergne 等的全合成路线^[4]

为了得到更多的 hCPT 类化合物, Lavergne 等设计了一条全合成路线。

该路线以 2-Cl-4-丙酰基吡啶 **4** 为原料,经 10 步反应以 13.4% 的收率得到关键中间体 **6**, **6** 与 **7** 通过 Mitsunobu 反应得到 **8**,最后以 Heck 反应得到高喜树碱。该法总收率不高,约为 1.76% ~ 4.36%。另外,

物要比 SN38 和 CPT 产生的复合物多两倍以上,如果要产生相当水平的复合物需要的 SN38 浓度要比 BN80915 高 20 倍。动力学试验还显示在 BN80915 所产生的复合物要比 SN38 产生的复合物稳定得多^[10]。在另外一项研究中也表明 hCPT 形成的共价复合物要明显多于 CPT,且更加稳定,而不像 CPT 在低浓度的盐存在下很容易逆转^[17]。由于复合物存在的时间越长,所引起的 DNA 断裂就越多,更易造成细胞凋亡,因此 hCPT 类化合物的活性也更强。

1.6 hCPT 有望克服耐药性

临床化疗失败的一个重要原因是肿瘤耐药性的出现,因此,寻找抗耐药化疗药是目前抗肿瘤药物研究的一个重要方面。体外活性试验表明, hCPT 类化合物对于多种耐药性的细胞株都显示了非常强的活性。临床前研究显示 BN80915 对于多种耐药肿瘤细胞株的 IC_{50} 达到纳摩尔级,远高于 SN38^[14]。同样, 12-Cl-hCPT 对于一些耐药性细胞株也显示了远超过 SN38 的活性^[16]。由于对许多耐药性细胞株的高活性,因此该类药物就可能在临床二线化疗发挥良好的作用^[14]。

2 hCPT 的合成方法

由于该类化合物问世较晚,其合成方法远没有 CPT 类化合物丰富。目前主要方法有以下几种:

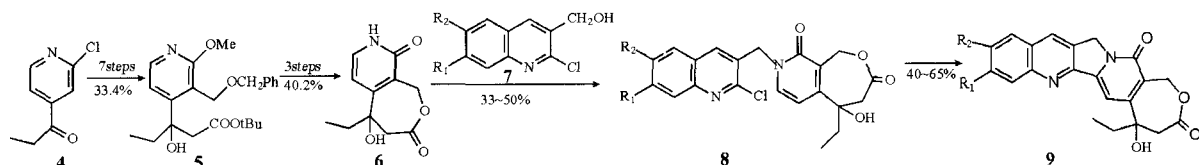
2.1 半合成法^[4,7]

半合成方法是以现有的 CPT 类化合物为原料,以硼氢化钠还原后再以高碘酸钠氧化开环,然后通过 Reformatsky 反应形成 β -羟基酸酯,最后在酸性条件下发生分子内环合,得到消旋的 hCPT。该法虽然步骤较短,但产率并不高,仅有 10% 左右,更重要的是该法需要现成的 CPT 类化合物,原料种类稀少不易得,价格昂贵,难以进行衍生化。

引入取代基的 AB 环前体 **7** 也需要通过一定的方法合成,收率不高,且不易在 B 环引入取代基。该法还需要 -78°C 的超低温条件和使用一些较危险(如 NaH)和昂贵(如钯碳和醋酸钯)的试剂。

为了得到光学纯的 hCPT 类化合物, Lavergne 将 **5** 水解后得游离羧酸,然后以奎尼丁进行拆分,得到 R 构型的中间体 **6**(由于亚甲基的插入, hCPT 活性构

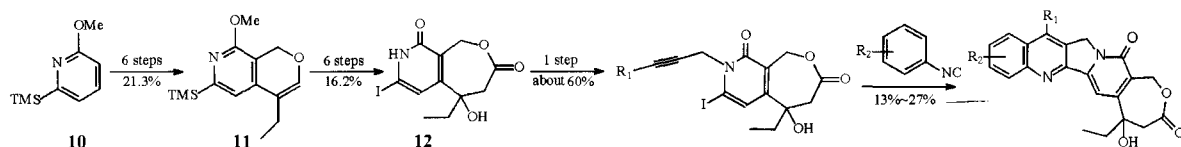
型命名规则为 *R* 构型)。由 **5** 至 (*R*)-**6** 共需 5 步反应, 收率 10.8%^[13]。光学纯的 (*R*)-hCPT 总收率



Scheme 2 Lavergne 的全合成路线

2.3 Curran 小组的全合成路线^[6,18]

美国的 Curran 小组对高喜树碱也进行了全合成研究。Curran 小组主要研究 R_1 (Scheme 3) 为取代硅烷基的 hCPT, 该法总收率不足 1%, 且需使用危险、昂贵和不易得的试剂, 如 NaH, 醋酸钼,



Scheme 3 Curran 小组的全合成路线

由上可见, 为了更好地研究高喜树碱类化合物, 目前尚需要一条高收率、易衍生化、安全、易于实施的全合成路线。

3 hCPT 研究现状与展望

hCPT 类化合物自 1997 年首次公开报道, 目前真正进行深度研究的机构并不多。最主要的是法国 Beaufour Ipsen 公司的 O. Lavergne 小组, 他们最先合成并研究了 hCPT。目前, 他们所开发的 BN80915 已顺利完成 I 期临床研究, 进入了 II 期临床, 并显示了较好的前景。其他如 BN80927, 12-Cl-hCPT 等都处于临床前研究阶段。这些化合物虽然还处于开发之中, 但由于其突出的优点, 已经引起了国际大制药公司的瞩目。前不久, Roche 公司以 1.5 亿美元高价买下对 BN80915 (Diflomotecan) 和 BN80927 的共同开发权。在 Beaufour Ipsen 公司之后, 美国匹兹堡大学的 Curran 小组也进行了较多的研究, 该小组主要研究重点是 7 位硅烷基取代的 hCPT。此外, 美国的 Burke 等也做了一些工作, 通过半合成方法得到了不多的几个 hCPT 衍生物^[19]。目前尚未见到后两个小组有化合物进入临床研究阶段。

综上所述, hCPT 是一类高活性、高稳定性、广谱、可口服的喜树碱类似物, 有的还是 Topo I 和 Topo II 的双重抑制剂。hCPT 在各方面都表现出了远高于 CPT 类化合物的优点, 有很高的研究开发价

值。

$\text{Me}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NMeCHO}$ 和 $\text{Me}_3\text{SnSnMe}_3$ 等, 此外, 该方法可引入的取代基数量有限, 而且当 R_2 不在异氰基对位时, 就会出现 A 环上不同位置取代的异构体, 难以分离。

值。该类化合物面世只有六年, 就已显示了光明的前景, 相信不久的将来一定会有更多的 hCPT 类药物出现在临床抗肿瘤的治疗中。

References:

- [1] Raymond E, Campone M, Stupp R, *et al.* Multicentre phase II and pharmacokinetic study of RFS2000 (9-nitro-camptothecin) administered orally 5 days a week in patients with glioblastoma multiforme [J]. *Eur J Cancer*, 2002, **38** (10):1348 - 1350.
- [2] Giles FJ, Cortes JE, Thomas DA, *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of DX-8951f (exatecan mesylate), a hexacyclic camptothecin, on a daily-times-five schedule in patients with advanced leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, **8**(7):2134 - 2141.
- [3] Kehrer DF, Bos AM, Verweij J, *et al.* Phase I and pharmacologic study of liposomal lurtotecan, NX 211: urinary excretion predicts hematologic toxicity [J]. *J Clin Oncol*, 2002, **20**(5):1222 - 1231.
- [4] Lavergne O, Lesueur-Ginot L, Rodas FP, *et al.* Homocamptothecin: synthesis and antitumor activity of novel E-ring-modified camptothecin analogues [J]. *J Med Chem*, 1998, **41**(27):5410 - 5419.
- [5] Cao Z, Harriss N, Kozielski A, *et al.* Alkyl esters of camptothecin and 9-nitrocamptothecin: synthesis, *in vitro* pharmacokinetics, toxicity, and antitumor activity [J]. *J Med Chem*, 1998, **41**(1):31 - 37.
- [6] Bom D, Curran DP, Chavan AJ, *et al.* Novel A, B, E-

- ring-modified camptothecins displaying high lipophilicity and markedly improved human blood stabilities [J]. *J Med Chem*, 1999, **42**(16):3018 - 3022.
- [7] Lavergne O, Lesueur-Ginot L, Rodas FP, *et al.* BN80245: an E-ring modified camptothecin with potent antiproliferative and topoisomerase I inhibitory activities [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1997, **7**(17):2235 - 2238.
- [8] Lesueur-Ginot L, Demarquay D, Kiss R, *et al.* Homocamptothecin, an E-ring modified camptothecin with enhanced lactone stability, retains topoisomerase I-targeted activity and antitumor properties [J]. *Cancer Res*, 1999, **59**(12):2939 - 2943.
- [9] Lavergne O, Harnett J, Rolland A, *et al.* BN 80927: a novel homocamptothecin with inhibitory activities on both topoisomerase I and topoisomerase II [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, **9**(17):2599 - 2602.
- [10] Larsen AK, Gilbert C, Chyzak G, *et al.* Unusual potency of BN 80915, a novel fluorinated E-ring modified camptothecin, toward human colon carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2001, **61**(7):2961 - 2967.
- [11] Lavergne O, Demarquay D, Kasprzyk PG, *et al.* Homocamptothecins: E-ring modified CPT analogues [C]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, **922**:100 - 111.
- [12] Huchet M, Demarquay D, Coulomb H, *et al.* The dual topoisomerase inhibitor, BN 80927, is highly potent against cell proliferation and tumor growth [C]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, **922**:303 - 305.
- [13] Demarquay D, Coulomb H, Huchet M, *et al.* The homocamptothecin, BN 80927, is a potent topoisomerase I poison and topoisomerase II catalytic inhibitor [C]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, **922**:301 - 302.
- [14] Demarquay D, Huchet M, Coulomb H, *et al.* The homocamptothecin BN 80915 is a highly potent orally active topoisomerase I poison. [J]. *Anticancer Drugs*, 2001, **12**(1):9 - 19.
- [15] Bailly C, Lansiaux A, Dassonneville L, *et al.* Homocamptothecin, an E-ring-modified camptothecin analogue, generates new topoisomerase I-mediated DNA breaks [J]. *Biochemistry*, 1999, **38**(47):15556 - 15563.
- [16] Bailly C, Laine W, Baldeyrou B, *et al.* A novel B-ring modified homocamptothecin, 12-Cl-hCPT, showing antiproliferative and topoisomerase I inhibitory activities superior to SN-38 [J]. *Anticancer Drug Des*, 2001, **16**(1):27 - 36.
- [17] Urasaki Y, Takebayashi Y, Pommier Y. Activity of a novel camptothecin analogue, homocamptothecin, in camptothecin-resistant cell lines with topoisomerase I alterations [J]. *Cancer Res*, 2000, **60**(23):6577 - 6580.
- [18] Curran DP, Ko SB, Josien H. Cascade radical reactions of isonitriles: a second-generation synthesis of (20S)-camptothecin, topotecan, irinotecan, and GI-147211C [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1995, **34**(23):2683 - 2684.
- [19] Burke TG, Demir AS, Chavan AJ, *et al.* Water-soluble derivatives of camptothecin/homocamptothecin [P]. *US Pat*: 6291676, 2001-09-18.