

新型紫杉烷类衍生物的制备及生物活性评价

景云荣^{1,2,3*} 陈阳¹ 马秋菊¹ 刘文丽² 周微²

(¹牡丹江师范学院 牡丹江 157011; ²江苏天士力帝益药业有限公司 淮安 223003;

³沈阳药科大学制药工程学院 沈阳 110016)

摘要 多药耐药性问题是导致第一代紫杉烷类药物在临床化疗失败的主要原因。本文对紫杉醇 C7、C10、C14、C3' 多个位点的取代基进行改造, 针对合成的 6 个新型的紫杉烷化合物, 在体外考察其对多药耐药肿瘤细胞株以及人结肠癌 HCT-116 干细胞的增殖抑制活性, 实验结果表明 6 个化合物的抗多药耐药活性均优于紫杉醇。采用 P-gp 高表达的犬肾细胞 MDCK-MDR1 进一步研究高活性候选化合物 JT-3 与 P-gp 的相互作用。以此研发抗多药耐药型的新一代紫杉烷类药物, 对开发扩大抗癌新适应症的新一代紫杉烷类抗癌药意义重大。

关键词 紫杉烷衍生物 氟取代 多药耐药 肿瘤干细胞 生物活性

Syntheses and Biological Activities Evaluation of Novel Taxane Derivatives

Jing Yunrong^{1,2,3*}, Chen Yang¹, Ma Qiuju¹, Liu Wenli², Zhou Wei²

(¹ Mudanjiang Normal University, Mudanjiang, 157011; ² Jiangsu Tasly Diyi Pharmaceutical Co., Ltd, Huai'an, 223003; ³ School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, 110016)

Abstract Multidrug resistance (MDR) is the main reason for the failure of first-generation taxane drugs in clinical chemotherapy. In this paper, the substituents at C7, C10, C14, and C3' of paclitaxel were modified, and six new taxane compounds were designed and synthesized to investigate their biological activities in multidrug-resistant tumor cell lines and human colon cancer stem cells HCT-116 *in vitro*. All of these novel toxoids exhibited remarkable cytotoxicity against extremely drug-resistant cancer cell lines, as compared to paclitaxel, indicating that these new toxoids can overcome MDR caused by the overexpression of P-gp. The interaction of the candidate compound JT-3 with P-gp was evaluated using Madin-Darby canine kidney (MDCK)-multidrug resistance-1 (MDR1). Therefore, the development of a new generation taxoid anticancer agents with superior efficacy against drug-resistant cancers, is highly promising and significant to develop the new generation of taxane anticancer drugs that expand new anticancer indications.

Keywords Taxane derivatives, Fluorine substitution, Multidrug resistance, Cancer stem cells, Biological activities

恶性肿瘤是严重威胁人类生命和生活质量的主要疾病, 近几十年来, 人们相继发现了许多高细胞毒类化疗药物、分子靶向抗肿瘤药物以及肿瘤免疫治疗药物。目前, 第一代紫杉烷类药物紫杉醇和其半合成衍生物多西紫杉醇在临床上仍作为一线用药和其他抗肿瘤药物联合应用于多种癌症治疗^[1,2]。伴随着其广泛的临床

应用同时也出现了一些问题, 其中长期用药导致的多药耐药性问题最为突出, 这也是第一代紫杉烷类药物化疗失败的主要原因, 同时药物本身对结肠癌、脑瘤等过表达 P-糖蛋白 (P-gp) 的细胞株活性很低, 大大限制了其临床应用范围^[3-5]。第一代紫杉烷类药物多药耐药性产生的机制主要有以下三点: (1) 肿瘤细胞中多药耐药

* 联系人, 景云荣 女, 副教授, 主要从事天然抗肿瘤药物研究。E-mail: swxjyr@126.com

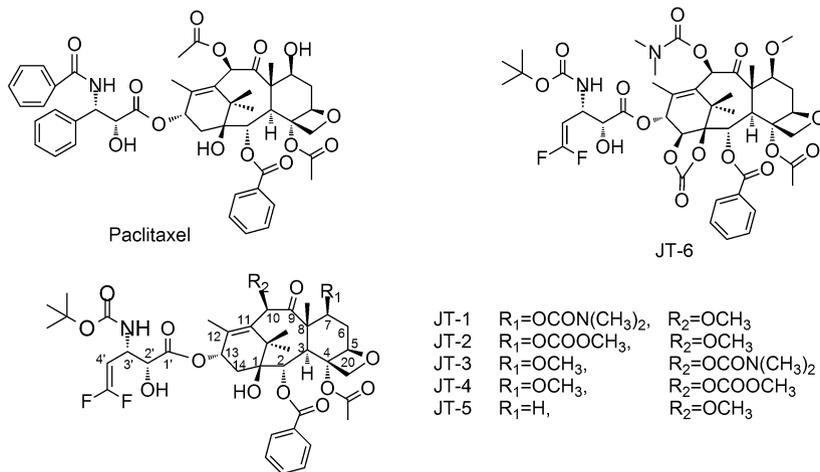
黑龙江省自然科学基金项目 (LH2020H078)、黑龙江省教育厅基础科研业务项目 (1451MSYYB002) 和牡丹江师范学院校级项目 (QN2021001) 资助

2022-09-14 收稿, 2022-10-22 接受

基因的过表达,主要是 P-gp 的过表达;(2) 细胞色素 P450 (CYP3A4) 的代谢;(3) β -微管蛋白的突变^[3]。第一代紫杉烷药物尽管具有显著广谱的抗肿瘤作用,然而对 P-gp 过表达的多药耐药肿瘤几乎没有抑制活性,主要归因于其均为 P-gp 良好的底物。P-gp 在肿瘤细胞中过表达,P-gp 外排泵的作用能够显著降低细胞内化疗药物的浓度,因而导致第一代紫杉烷药物的多药耐药性的产生。

针对第一代紫杉烷类药物中存在的多药耐药性问题,基于 P-gp 介导的抗多药耐药型的紫杉烷类衍生物的构效关系研究表明紫杉醇的 C7、C10、C14 位以及 C3' 位是与 P-gp 亲和力较强的位点,针对其进行结构修饰能够改善紫杉醇的多药耐药性问题^[6];再考虑到紫杉醇的 C2 位取代苯环的

间位,C6 位以及 C3' 位易被代谢氧化^[7]。因此本文针对紫杉醇结构中 with P-gp 结合的关键位点 (C1、C14、C7、C10、C3'), 以及容易受到 CYP3A4 酶代谢的关键位点 (C3') 进行合理的多区域结构修饰 (图式 1), 通过考察其对敏感肿瘤细胞和耐药肿瘤细胞株增殖抑制活性, 从而寻找抗多药耐药的新一代紫杉烷类药物。研究者发现化疗药物出现多药耐药性的另一元凶“肿瘤干细胞”(Cancer stem cells, CSCs), 这种细胞具有极强的多药耐药性, 与肿瘤的复发与转移息息相关^[8]。因此针对合成的新型含氟紫杉烷化合物对人结肠癌 HCT-116 干细胞同时进行了细胞增殖抑制活性测试。最后针对筛选出的高活性的候选化合物, 选用 P-gp 高表达的犬肾细胞 MDCK-MDR1, 进一步研究其与 P-gp 的相互作用。



图式 1 紫杉醇和新型紫杉烷衍生物的化学结构

Scheme 1 Chemical structure of paclitaxel and novel taxane derivatives

针对紫杉醇母核的结构修饰是在本课题组前期工作研究基础上进行的^[9,10], 选取透膜能力较强的候选化合物的母核作为新型含氟紫杉烷化合物的母核部分; 针对紫杉醇侧链中与 P-gp 作用的关键位点 C3' 位的结构改造是基于前人对抗多药耐药型紫杉烷构效关系的研究, 紫杉烷侧链 C3' 位为芳香环 (取代苯环、吡啶、咪唑、噻唑等) 和烷烃 (异丙基、异丁基、异丁烯基等) 取代时, 对多药耐药性的肿瘤细胞株具有良好的细胞毒性, 其中以异丁烯基取代时, 活性最为显著^[11,12]。考虑到 C3' 位取代基同时也是体内代谢的关键位点, 在体内容易被细胞色素 P450 中的 CYP3A4 酶氧化, 从而降低了化合物的活性。有研究表明药物结构中引入氟原子能够提高其药代动力学性质, 例如增加代谢稳定性, 增加药物分子与靶点的亲和性,

以及增加药物分子的透膜能力^[13,14]。因此, 针对 C3' 位的结构改造采用异丁烯基的类似物二氟乙烯基进行取代, 利用 C—F 键代替 C—H 键, 在确保空间构型基本一致的情况下, 提高化合物在体内代谢的稳定性, 同时具有良好的抗多药耐药活性。

1 实验部分

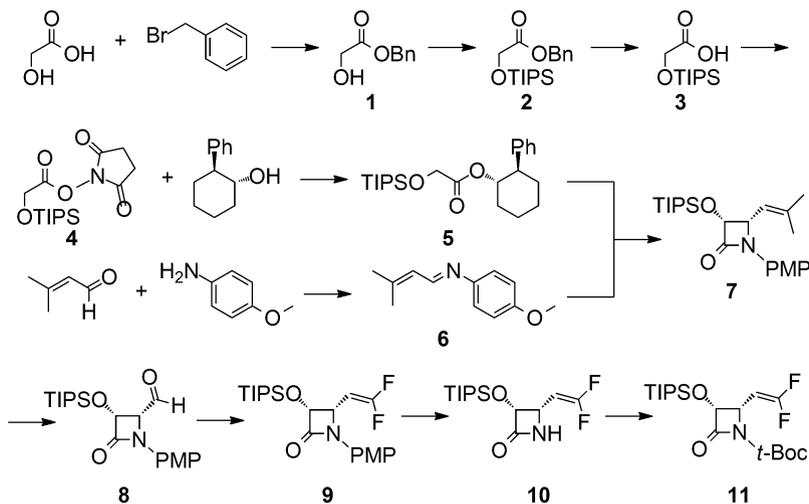
1.1 主要仪器与试剂

Thermo LCQ Fleet 质谱仪 (赛默飞世尔科技); Bruker Avance 300MHz、400MHz、500MHz 型核磁共振谱仪 (德国布鲁克公司)。

10-去乙酰基巴卡亭 III (10-DAB)、咪唑、三乙基氯硅烷 (TESCl)、二甲氨基甲酰氯、N,N'-羰基咪唑、双 (三甲基硅基) 氨基锂 (LHMDS)、乙醇

酸、溴化苄、1,8-二氮杂二环十一碳-7-烯(DBU)、三异丙基氯硅烷、10%钯碳、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、反式-2-苯基环己醇、对甲氧基苯胺等均为分析纯级,购自上海阿拉丁试剂有限公司;3-甲基-2-丁醛、二异丙基氨基锂、二甲基硫醚、2-氯-2,2-二氟乙酸钠、三苯基膦、硝酸铯铵(CAN)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、二碳酸二叔丁酯、70%氟化

氢/吡啶溶液购自上海麦克林生化科技有限公司;紫杉醇、地高辛、维拉帕米为色谱纯级,购自中国药品生物制品检定所;MCF-7细胞株、MCF-7/Adr细胞株、HCT-116细胞株、MDCK-MDR1细胞株(American Type Culture Collection(Rockville, MD));噻唑蓝溴化四唑(MTT)、DMEM培养基、Hank's缓冲液(HBSS)为细胞生物级试剂, Sigma公司。



图式2 β -内酰胺侧链前体的合成

Scheme 2 Synthesis of β -lactam side-chain precursor

1.2 化合物的合成

1.2.1 β -内酰胺侧链前体的合成

乙醇酸苄酯 **1** 的制备:将 7.60g (0.10mol) 乙醇酸溶于 10mL 的乙腈中,向溶液中添加 13.60g (0.08mol) 溴化苄,待搅拌均匀后,在 0℃ 下,向反应液中缓慢地滴加入 12.16g (0.08mol) DBU,滴加完毕后,在室温下搅拌过夜。将反应完的溶液倒入冰水中,用乙酸乙酯萃取 (50mL \times 3),合并有机相,先后用 1mol/L 盐酸溶液 (10mL \times 3),饱和食盐水 (5mL \times 3) 洗涤,经无水硫酸镁干燥后过滤,滤液旋蒸浓缩得 12.5g 淡黄色油状液体。

三异丙基硅氧基乙酸苄酯 (**2**) 的制备:将 12.5g (75.3mmol) 化合物 **1** 溶于 100mL 二氯甲烷中,向溶液中加入 1.04g (8.42mmol) DMAP 和 14.1mL (101mmol) 三乙胺,搅拌均匀后,在 0℃ 下向反应液中滴加 22.3mL (101mmol) 1mol/L 的三异丙基氯硅烷。室温过夜搅拌反应,TLC 监测反应进行,待反应完毕后,向反应液中加入 25mL 饱和氯化铵溶液,过滤除去生成的白色固体,滤液经过乙酸乙酯反复萃取 (50mL \times 4),合并有机相,经饱和食盐水 (5mL \times 3) 洗涤后,无水

硫酸镁干燥后过滤,滤液旋蒸浓缩得到 23.7g 淡黄色油状液体。

三异丙基硅氧基乙酸 (**3**) 的制备:将 5g (15.53mmol) 化合物 **2** 溶于 50mL 乙酸乙酯中,向反应液中加入 82.5mg (0.775mmol) 10% 钯碳。排空反应瓶中的空气,向反应瓶中不断的补充氢气,反应 4h, TLC 监测反应进行,待反应结束后,将反应液过滤浓缩得到 3.6g 淡黄色油状液体。

三异丙基硅氧基乙酸琥珀酰亚胺 (**4**) 的制备:将 3.6g (15.5mmol) 化合物 **3** 溶解在 50mL 的二氯甲烷中,向反应液中加入 3.03g (15.5mmol) EDC 和 2.18g (18.6mmol) NHS,室温下反应过夜, TLC 监测反应进行,待反应结束后,二氯甲烷萃取 (30mL \times 3),合并有机相,经饱和食盐水 (5mL \times 3) 洗涤后,无水硫酸镁干燥,过滤浓缩得到 4.38g 淡黄色油状液体。

三异丙基硅氧基乙酸-2-苯基-1-环己酯 (**5**) 的制备:将 1.95g (11.08mmol) 反式-2-苯基环己醇和 1.37g (11.08mmol) DMAP 溶解于 25mL 甲苯中,向反应液中缓慢地加入 4.38g (13.3mmol) 化合物 **4**。在室温下进行反应, TLC 监测反应进行,待反

应结束后,向反应液中加入 20mL 饱和食盐水,乙酸乙酯多次萃取(30mL×3),合并有机相,经无水硫酸镁干燥,过滤浓缩,柱层析分离(石油醚:乙酸乙酯=20:1)纯化得到 3.27g 无色油状液体,产率 75.6%。ESI-MS, m/z : 391.35 $[M+H]^+$ 。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ : 7.17 (dd, $J = 8.7$ 、5.0Hz, 2H), 7.12 ~ 7.05 (m, 3H), 5.00 (td, $J = 10.6$ 、4.4Hz, 1H), 4.00 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 3.83 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 2.65 ~ 2.54 (m, 1H), 2.12 ~ 2.00 (m, 1H), 1.91 ~ 1.82 (m, 1H), 1.82 ~ 1.74 (m, 1H), 1.74 ~ 1.66 (m, 1H), 1.51 ~ 1.23 (m, 4H), 0.96 ~ 0.81 (m, 21H)。

(4-甲氧基-苯基)-(3-甲基-丁-2-亚乙烯基)-胺 **6** 的制备:将 0.31g (2.51mmol) 对甲氧基苯胺溶解于 10mL 二氯甲烷中,向反应液中加入少量无水硫酸镁,然后向反应液中滴加 0.3mL (3.01mmol) 3-甲基-2-丁醛。避光反应 4h, TLC 监测反应进行,待反应结束后,过滤浓缩得到无色油状液体,为粗品化合物 **6**。

1-(4-甲氧基苯基)-4-(2-甲基丙烯基)-3-三异丙基硅烷氧基氮杂环丁烷-2-酮 (**7**) 的制备:将 0.65g (1.67mmol) 化合物 **5** 溶解于 4mL 的四氢呋喃中,在 -78℃ 下向反应液中滴加 2.5mL (2.50mmol) 1mol/L 的二异丙基氨基锂,反应 0.5h 后,将化合物 **6** (2.50mmol) 溶解于 3mL 四氢呋喃,然后向反应液中滴加。反应 2.5h 后,向反应液中加入 5mL 饱和氯化铵溶液猝灭反应,用乙酸乙酯萃取(25mL×3),合并有机相,经饱和食盐水洗涤(5mL×3)后,无水硫酸镁干燥,过滤浓缩,柱层析分离(石油醚:乙酸乙酯=10:1)纯化得到 0.34g 无色油状物,产率 45.6%。ESI-MS, m/z : 404.73 $[M+H]^+$ 。¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ : 7.32 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.83 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 5.36 ~ 5.29 (m, 1H), 5.05 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 4.80 (dd, $J = 10.0$ 、4.9Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 1.85 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H), 1.79 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H), 1.08 (dd, $J = 13.0$ 、6.8Hz, 21H)。

1-(4-甲氧基苯基)-4-甲酰基-3-三异丙基硅烷氧基氮杂环丁烷-2-酮 (**8**) 的制备:将 485mg (1.20mmol) 化合物 **7** 溶解于 10mL 的二氯甲烷中,向反应液中持续通入 O₃,在 -78℃ 下反应 0.5h,待溶液显现为淡蓝色,向反应液中加入 2mL 的二甲基硫醚,反应 3h 后,浓缩反应液,柱层析分离(石油醚:乙酸乙酯=10:1)纯化得到 386mg 无

色油状液体,产率 85.2%。ESI-MS, m/z : 378.84 $[M+H]^+$ 。¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ : 9.77 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz), 7.27 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz), 6.87 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz), 5.30 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz), 4.46 (dd, 1H, $J = 5.1$ 、4.3Hz), 3.79 (s, 3H), 1.22 ~ 1.13 (m, 3H), 1.12 ~ 1.06 (m, 18H)。

1-(4-甲氧基苯基)-4-二氟乙烯基-3-三异丙基硅烷氧基氮杂环丁烷-2-酮 (**9**) 的制备:将 230mg (0.61mmol) 化合物 **8**、285mg (1.83mmol) 2-氯-2-二氟乙酸钠和 485mg (1.83mmol) 三苯基磷溶解于 10mL *N,N'*-二甲基甲酰胺中。在 90 ~ 100℃ 下,反应 2h 后,待反应液稍冷却后向其中加入 20mL 水,用乙酸乙酯萃取(20mL×3),合并有机相,经饱和食盐水洗涤(5mL×3)后,无水硫酸镁干燥,过滤浓缩,柱层析分离(石油醚:乙酸乙酯=15:1)纯化得到 124mg 无色油状液体,产率 49.6%。ESI-MS, m/z : 412.58 $[M+H]^+$ 。¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ : 7.33 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz), 6.87 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz), 5.14 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 4.83 (ddd, $J = 10.0$ 、4.9、1.5Hz, 1H), 4.54 (ddd, $J = 24.7$ 、10.1、1.6Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 1.34 ~ 1.06 (m, 21H)。

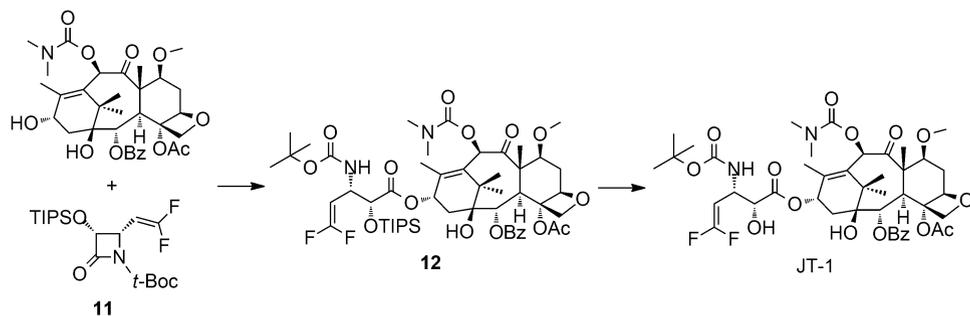
4-二氟乙烯基-3-三异丙基硅烷氧基氮杂环丁烷-2-酮 (**10**) 的制备:将 124mg (0.30mmol) 化合物 **9** 溶解于 10mL 乙腈/水(4:1),在 -10℃ 下,向反应液中加入 575mg (1.05mmol) CAN,反应 2h,待反应结束后,向反应液中加入 30mL 饱和亚硫酸钠,水相用乙酸乙酯进行萃取(20mL×3),合并有机相,经饱和食盐水洗涤(5mL×3)后,无水硫酸镁干燥,过滤浓缩得无色油状物。

1-叔丁氧羰基-4-二氟乙烯基-3-三异丙基硅烷氧基氮杂环丁烷-2-酮 (**11**) 的制备:将 270mg (0.89mmol) 化合物 **10**、0.75mL (5.38mmol) TEA 和 43mg (0.35mmol) DMAP 溶解于 10mL 的二氯甲烷中,室温下向反应液中加入 398mg (1.77mmol) 二叔丁基二碳酸酯,反应过夜,待反应结束后,反应液用乙酸乙酯进行萃取(25mL×3),合并有机相,经饱和食盐水洗涤(5mL×3)后,无水硫酸镁干燥,过滤浓缩,柱层析分离(石油醚:乙酸乙酯=15:1)纯化得 63mg 无色油状液体,产率 71.6%。ESI-MS, m/z : 406.62 $[M+H]^+$ 。¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ : 5.04 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.75 (ddd, $J = 9.8$ 、5.6、1.8Hz, 1H), 4.51 (ddd, $J = 23.8$ 、10.0、1.4Hz, 1H), 1.50 (s, 9H),

1. 19~1. 03(m, 21H)。

1. 2. 2 紫杉烷母核与 β -内酰胺侧链前体对接

紫杉烷类母核部分按照参考文献[9]的制备方法进行制备, 其与 β -内酰胺侧链前体发生



图式 3 紫杉烷衍生物 JT-1 的合成

Scheme 3 Synthesis of taxane derivative JT-1

化合物 **12** 的制备: 将 113mg (0. 18mmol) 紫杉烷母核和 95mg (0. 23mmol) 侧链前体 **11** 溶解于 10mL 干燥的四氢呋喃中, 在 -40°C 下, 向反应液中滴加 0. 36mL (0. 36mmol) 1mol/L 的 LHMDS 四氢呋喃溶液, TLC 监测反应进行, 待反应结束后, 加入 20mL 的饱和氯化铵溶液猝灭反应, 乙酸乙酯萃取 (20mL \times 3), 合并有机相, 干燥浓缩, 柱层析分离 (石油醚: 乙酸乙酯 = 5:1) 纯化得 178mg 白色固体, 产率 95. 7%。 ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ : 8. 14 (d, $J = 7. 4\text{Hz}$, 2H), 7. 62 (t, $J = 7. 3\text{Hz}$, 1H), 7. 51 (t, $J = 7. 4\text{Hz}$, 2H), 6. 41 (s, 1H), 6. 19 (t, $J = 8. 8\text{Hz}$, 1H), 5. 70 (d, $J = 7. 0\text{Hz}$, 1H), 4. 93 (dd, $J = 18. 3, 8. 9\text{Hz}$, 3H), 4. 59~4. 42 (m, 2H), 4. 33 (d, $J = 8. 3\text{Hz}$, 1H), 4. 19 (d, $J = 8. 3\text{Hz}$, 1H), 3. 95~3. 86 (m, 2H), 3. 36 (s, 3H), 3. 08 (s, 3H), 2. 95 (s, 3H), 2. 61~2. 45 (m, 1H), 2. 38 (d, $J = 6. 0\text{Hz}$, 4H), 2. 07 (s, 3H), 1. 90 (t, $J = 10. 9\text{Hz}$, 1H), 1. 70 (s, 3H), 1. 38~1. 18 (m, 12H), 1. 13 (s, 3H), 0. 93 (ddd, $J = 13. 5, 9. 6, 6. 9\text{Hz}$, 21H)。

化合物 JT-1 的制备: 将 178mg (0. 17mmol) 化合物 **12** 溶解于 10mL 的乙腈-吡啶 (1:1) 的混合溶液中, 在 0°C 下, 向反应液中加入 2mL 的 70% HF/Py 溶液, 反应过夜, 待反应结束后, 向反应液中加入 10mL 饱和的碳酸氢钠溶液猝灭反应, 中和过量的 HF, 然后用乙酸乙酯萃取 (20mL \times 3), 合并有机相, 经饱和硫酸铜溶液 (5mL \times 2) 洗涤, 除去过量的吡啶, 最后用饱和食盐水 (5mL \times 2) 洗涤, 经无水硫酸镁干燥, 过滤浓缩, 柱层析分离 (石油醚: 乙酸乙酯 = 1:1) 纯化得到 136mg 白色

Hilton 对接反应, 生成的产物脱去 C2' 位的硅基保护基, 得到最终的含氟紫杉烷类化合物, 以化合物 JT-1 的合成 (图式 3) 为例, 其他目标产物的合成方法相同。

固体, 产率 91. 3%。熔点 $241\sim 242^{\circ}\text{C}$ 。ESI-MS, m/z : 879. 48 [M+H] $^+$ 。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 8. 12 (d, $J = 7. 5\text{Hz}$, 2H), 7. 61 (t, $J = 7. 4\text{Hz}$, 1H), 7. 50 (t, $J = 7. 7\text{Hz}$, 2H), 6. 36~6. 19 (m, 2H, H-10, H-13), 5. 66 (d, $J = 7. 0\text{Hz}$, 1H, H-2), 5. 06~4. 92 (m, 2H, H-5, NH-3'), 4. 64~4. 51 (m, 1H, H-4'), 4. 51~4. 40 (m, 1H, H-2'), 4. 36~4. 25 (m, 2H, H-20, H-3'), 4. 18 (d, $J = 8. 4\text{Hz}$, 1H, H-20), 3. 93~3. 85 (m, 2H, H-7, H-3), 3. 53 (d, $J = 5. 4\text{Hz}$, 1H, OH-2'), 3. 35 (s, 3H, -OCH₃), 3. 04 (s, 3H, -NCH₃), 2. 96 (s, 3H, -NCH₃), 2. 53 (ddd, $J = 14. 9, 9. 6, 6. 7\text{Hz}$, 1H, H-6), 2. 45~2. 33 (m, 4H, H-14, -COCH₃), 2. 33~2. 23 (m, 1H, H-14), 1. 97~1. 83 (m, 4H, H-6, -CH₃), 1. 67 (s, 3H, -CH₃), 1. 30 (s, 9H, -Boc), 1. 25 (d, $J = 1. 7\text{Hz}$, 3H, -CH₃), 1. 16 (s, 3H, -CH₃); ^{13}C NMR (101MHz, CDCl_3) δ : 203. 78, 173. 78, 170. 09, 166. 91, 155. 56, 155. 16, 140. 08, 136. 28, 133. 99, 133. 62, 130. 19, 129. 27, 128. 63, 125. 74, 84. 17, 81. 60, 80. 52, 79. 70, 78. 74, 76. 42, 75. 75, 74. 66, 73. 05, 72. 62, 57. 77, 57. 14, 51. 34, 47. 29, 43. 28, 41. 11, 36. 73, 36. 18, 35. 39, 32. 34, 29. 70, 28. 20, 26. 45, 24. 72, 22. 60, 21. 91, 21. 46, 21. 06。

化合物 JT-2 的制备: 方法同 JT-1 的制备。熔点 $238\sim 240^{\circ}\text{C}$ 。ESI-MS, m/z : 866. 87 [M+H] $^+$ 。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 8. 12 (d, $J = 7. 5\text{Hz}$, 2H), 7. 62 (t, $J = 7. 4\text{Hz}$, 1H), 7. 49 (t, $J = 7. 7\text{Hz}$, 2H), 6. 23 (s, H-10, 1H), 6. 17 (t, $J = 8. 8\text{Hz}$, 1H, H-13), 5. 67 (d, $J = 7. 0\text{Hz}$, 1H, H-2), 5. 07~4. 93 (m, 2H, H-5, NH-3'), 4. 51~4. 40 (m,

1H, H-2'), 4.36~4.25(m, 2H, H-20, H-3'), 4.20(d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-20), 3.95~3.81(m, 5H, H-7, H-3, -OCH₃), 3.51(d, $J = 5.4$ Hz, 1H, OH-2'), 3.41(s, 3H, -OCH₃), 2.76(ddd, $J = 15.9, 9.6, 6.5$ Hz, 1H, H-6), 2.49~2.31(m, 5H, H-14, -COCH₃), 2.01(s, 3H, -CH₃), 1.88~1.77(m, 1H, H-6), 1.78(s, 3H, -CH₃), 1.35(s, 9H, -Boc), 1.23(d, $J = 7.0$ Hz, 6H, -CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 202.10, 173.81, 170.17, 166.88, 155.57, 154.80, 141.15, 133.64, 133.12, 132.75, 130.19, 129.23, 128.64, 127.35, 84.08, 81.54, 80.43, 79.77, 78.70, 78.04, 76.41, 74.54, 73.05, 72.57, 57.60, 57.13, 55.17, 51.36, 47.22, 43.21, 41.10, 35.24, 32.25, 29.70, 28.19, 26.36, 24.71, 22.58, 21.91。

化合物 JT-3 的制备:方法同 JT-1 的制备。熔点 245 ~ 246 °C。ESI-MS, m/z : 879.48 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.12(d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.61(t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.48(t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 6.19(t, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-13), 5.68(d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-2), 5.47(dd, $J = 10.5, 7.3$ Hz, 1H, H-7), 5.22(s, 1H, H-10), 5.06~4.92(m, 2H, H-5, NH-3'), 4.64~4.51(m, 1H, H-4'), 4.51~4.40(m, 1H, H-2'), 4.37~4.24(m, 2H, H-20, H-3'), 4.17(d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-20), 3.97(d, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-3), 3.38(s, 3H, -OCH₃), 3.53(d, $J = 5.4$ Hz, 1H, OH-2'), 2.86(d, $J = 2.7$ Hz, 6H, -NCH₃), 2.57(ddd, $J = 14.5, 9.4, 7.4$ Hz, 1H, H-6), 2.40(d, $J = 5.3$ Hz, 5H, H-14, -COCH₃), 2.02(d, $J = 0.6$ Hz, 3H, -CH₃), 1.92(ddd, $J = 14.5, 10.9, 1.9$ Hz, 1H, H-6), 1.81(s, 3H, -CH₃), 1.33(s, 9H, -Boc), 1.19(d, $J = 9.1$ Hz, 6H, -CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 206.25, 173.76, 169.75, 166.93, 155.46, 155.05, 139.59, 137.58, 134.86, 133.52, 130.18, 129.39, 128.60, 127.36, 84.07, 82.81, 80.94, 79.57, 78.85, 76.53, 74.95, 73.02, 72.74, 72.65, 56.80, 56.68, 51.29, 46.49, 43.18, 41.26, 36.49, 35.86, 35.45, 33.97, 28.19, 26.23, 24.72, 23.27, 22.45, 21.91。

化合物 JT-4 的制备:方法同 JT-1 的制备。熔点 239 ~ 240 °C。ESI-MS, m/z : 866.87 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.11(d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.61(t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.48(t, $J =$

7.7 Hz, 2H), 6.19(t, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-13), 5.68(d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-2), 5.38(dd, $J = 10.6, 7.4$ Hz, 1H, H-7), 5.15(s, 1H, H-10), 5.05~4.91(m, 2H, H-5, NH-3'), 4.65~4.52(m, 1H, H-4'), 4.50~4.40(m, 1H, H-2'), 4.37~4.24(m, 2H, H-20, H-3'), 4.17(d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-20), 3.95(d, 1H, $J = 6.9$ Hz, H-3), 3.75(s, 3H, -OCH₃), 3.53(d, $J = 5.4$ Hz, 1H, OH-2'), 3.39(s, 3H, -OCH₃), 2.68~2.52(m, 1H, H-6), 2.39(s, 5H, H-14, -COCH₃), 1.99(s, 4H, H-6, -CH₃), 1.80(s, 3H, -CH₃), 1.33(s, 9H, -Boc), 1.20(s, 3H, -CH₃), 1.17(s, 3H, -CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 205.35, 173.90, 170.06, 166.91, 155.00, 137.58, 130.21, 128.66, 127.36, 83.70, 82.65, 80.80, 78.86, 76.02, 74.75, 73.02, 72.72, 56.85, 56.59, 55.20, 51.31, 46.43, 43.13, 41.23, 33.44, 29.71, 28.19, 26.18, 24.72, 23.29, 22.49, 21.92。

化合物 JT-5 的制备:方法同 JT-1 的制备。熔点 218 ~ 219 °C。ESI-MS, m/z : 792.84 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.14(d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.60(t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.47(t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 6.21(dd, $J = 9.1, 7.9$ Hz, 1H, H-13), 5.66(d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-2), 5.07~4.90(m, 3H, H-5, H-10, NH-3'), 4.62~4.50(m, 1H, H-4'), 4.48~4.40(m, 1H, H-2'), 4.35~4.26(m, 2H, H-20, H-3'), 4.25(d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-20), 3.79(d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-3), 3.51(d, $J = 6.1$ Hz, 1H, OH-2'), 3.43(s, 3H, -OCH₃), 2.49~2.31(m, 5H, H-14, -COCH₃), 2.29~2.18(m, 1H, H-6), 2.04~1.93(m, H-7, 1H), 1.91(d, $J = 0.9$ Hz, 3H, -CH₃), 1.76(s, 3H, -CH₃), 1.62~1.50(m, 1H, H-7), 1.31(s, 9H, -Boc), 1.20(s, 3H, -CH₃), 1.16(s, 3H, -CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 209.29, 173.95, 169.98, 167.13, 155.44, 139.36, 137.25, 134.55, 133.50, 130.24, 129.50, 128.79, 128.62, 84.45, 82.23, 81.41, 79.65, 79.07, 75.96, 73.05, 72.67, 56.44, 53.03, 51.26, 45.21, 42.98, 41.28, 35.68, 29.70, 28.17, 27.20, 25.92, 24.71, 23.27, 22.63, 21.92, 20.89。

化合物 JT-6 的制备:方法同 JT-1 的制备。熔点 225 ~ 227 °C。ESI-MS, m/z : 921.52 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.04(d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.63(t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.50(t, $J =$

7. 7Hz, 2H), 6. 45 (d, $J = 6. 0\text{Hz}$, 1H, H-13), 6. 39 (s, 1H, H-10), 6. 11 (d, $J = 7. 4\text{Hz}$, 1H, H-2), 5. 06 ~ 4. 92 (m, 2H, H-5, NH-3'), 4. 82 (d, $J = 6. 6\text{Hz}$, 1H, H-14), 4. 64 ~ 4. 51 (m, 1H, H-4'), 4. 51 ~ 4. 40 (m, 1H, H-2'), 4. 36 ~ 4. 25 (m, 2H, H-20, H-3'), 4. 22 (d, $J = 8. 4\text{Hz}$, 1H, H-20), 3. 86 (dd, $J = 10. 6/6. 5\text{Hz}$, 1H, H-7), 3. 78 (d, $J = 7. 8\text{Hz}$, 1H, H-3), 3. 54 (d, $J = 5. 5\text{Hz}$, 1H, OH-2'), 3. 35 (s, 3H, -OCH₃), 3. 07 (s, 3H, -NCH₃), 2. 98 (s, 3H, -NCH₃), 2. 72 (ddd, $J = 14. 6/9. 7/6. 5\text{Hz}$, 1H, H-6), 2. 46 (s, 3H, -COCH₃), 1. 98 (d, $J = 0. 9\text{Hz}$, 3H, -CH₃), 1. 85 ~ 1. 74 (m, 4H, H-6, -CH₃), 1. 40 (s, 9H, -Boc), 1. 36 (s, 3H, -CH₃), 1. 32 (s, 3H, -CH₃); ¹³C NMR (101MHz, CDCl₃) δ : 202. 12, 171. 91, 171. 24, 170. 81, 164. 68, 155. 71, 154. 81, 134. 64, 134. 15, 129. 93, 128. 95, 128. 12, 126. 63, 88. 01, 84. 02, 81. 04, 80. 60, 80. 16, 79. 68, 75. 91, 75. 00, 74. 74, 74. 34, 69. 12, 57. 81, 57. 36, 46. 68, 41. 83, 36. 81, 36. 21, 32. 12, 28. 26, 25. 87, 22. 75, 22. 62。

1. 3 细胞抑制活性评价

将多种肿瘤细胞悬液加入透明的 96 孔平底板中, 100 μL /孔, 将培养板放置于 CO₂ 培养箱中培养。过夜后分组, 分为阳性对照组和受试化合物组, 分别加入不同浓度梯度的阳性对照药紫杉醇和待测化合物, 给药均为 20 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 48h。每孔加入 10 μL 5mg/mL 由无菌 PBS 配制的 MTT 溶液。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 4h。加入 100 μL 三联溶解液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱过夜溶解。使用 Spectramax 酶标仪在波长 570/670 nm 检测吸光度值, 记录分析所得的实验结果, 计算在不同待测物存在下的 IC₅₀ 值。

1. 4 MDCK-MDR1 细胞模型转运实验

细胞培养和种板 MDCK-MDR1 细胞按 2. 5 $\times 10^4$ cell/mL 接种于 Transwell 细胞培养皿 (0. 4mL/孔), 培养皿下腔加入培养基 0. 6mL。接种 6 d 后, 测定 MDCK-MDR1 细胞膜的跨膜电阻 (TEER) 和表观渗透系数 (P_{app}) 值以评价模型的完整性, 对于 TEER 和 P_{app} 值达到标准的孔进行扫描电镜和透射电镜的完整性验证, 测试其 TEER 值 > 1000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, 方可用于渗透实验。

样品测试: 首先在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下预热给药池和接收池 5min 后, 分别向给药池中加入 0. 8mL, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的测试样品溶液, 接收池中加入 0. 4mL

HBSS 缓冲液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 的条件下培育 90min 后, 分离给药池和接收池, 分别从给药池和接收池中取出 100 μL 的溶液, 按照如下比例进行稀释: 给药池: 6 μL donor sample + 54 μL 0. 4% DMSO HBSS + 60 μL ACN with IS (内标, 为 Osalmid 或 Imipramine); 接收池: 60 μL receiver sample + 60 μL ACN with IS; 样品准备好之后经 LC-MS/MS 检测。

$$P_{\text{app}} =$$

$$\left(\frac{V_A}{\text{Area} \times \text{Time}} \right) \left(\frac{[\text{drug}]_{\text{acceptor}, 90\text{-min}}}{([\text{drug}]_{\text{donor}, 0\text{min}}) \text{Dilution Factor}} \right)$$

注: V_A 为接收池的体积 (mL), Area 为细胞单层膜的面积 (cm^2), Time 为总的转运时间 (s), $[\text{drug}]_{\text{acceptor}, 90\text{min}}$ 表示 90min 后接收池中测试样品的药物浓度, $[\text{drug}]_{\text{donor}, 0\text{min}}$ 表示初始加入到给药池中的测试样品的浓度。Dilution Factor 指在进行检测 LC-MS/MS 前样品稀释的倍数。

2 结果与讨论

2. 1 细胞增殖抑制活性评价

以紫杉醇为阳性对照药, 采用 MTT 法分别考察 6 个新型紫杉烷化合物对 3 种肿瘤细胞株 (敏感型人乳腺癌细胞株 MCF-7、多药耐药型人乳腺癌细胞株 MCF-7/Adr、人结肠癌 HCT-116 干细胞) 的细胞增殖抑制活性, 实验结果见表 1。

初步活性评价表明, 这类含氟紫杉烷衍生物不但针对敏感型的肿瘤细胞株活性优于紫杉醇, 针对多药耐药型的肿瘤细胞株也表现出优于阳性对照紫杉醇的活性, 抗药因子 (R/S 值) 远优于紫杉醇; 对人结肠癌 HCT-116 干细胞的细胞毒性优于阳性对照药紫杉醇 44 ~ 136 倍。实验结果表明这类新型含氟紫杉烷衍生物具有良好的抑制敏感型和多药耐药型肿瘤细胞株的活性, 同时具有良好的抑制肿瘤干细胞增殖的活性。

2. 2 MDCK-MDR1 细胞模型转运实验

进一步选用 P-gp 高表达的 MDCK-MDR1 细胞, 以紫杉醇为阳性对照, 探讨高活性候选化合物 JT-3 与 P-gp 的相互作用。在有 P-gp 的抑制剂 (维拉帕米) 存在的情况下, 以 P-gp 已知底物地高辛作为参照物, 根据待测样品的外排率情况来考察其是否为 P-gp 的底物, 实验结果如表 2 所示。

表 1 新型紫杉烷化合物体外肿瘤细胞株增殖抑制评价 ($IC_{50}/(nmol/L)$)Tab. 1 Proliferation inhibition rate of novel taxanes in tumor cell lines *in vitro* ($IC_{50}/(nmol/L)$)

Taxoid	MCF-7	MCF-7/Adr	R/S ^a	HCT-116
Paclitaxel	1.35±0.11	261±7.85	193.33	35.4±2.83
JT-1	0.11±0.02	5.46±0.05	49.63	0.43±0.12
JT-2	0.15±0.02	4.78±0.03	31.87	0.79±0.15
JT-3	0.098±0.003	0.49±0.02	5.00	0.31±0.05
JT-4	0.093±0.005	1.15±0.02	12.36	0.26±0.08
JT-5	0.098±0.002	1.82±0.01	18.57	0.58±0.12
JT-6	0.079±0.003	0.51±0.02	6.46	0.47±0.09

^a Resistance factor = (IC_{50} for drug resistant cell line, R) / (IC_{50} for drug-sensitive cell line, S).

表 2 维拉帕米 (100 μ mol/L) 存在与否待测物在 MDCK 细胞转运实验的外排率情况Tab. 2 A-B and B-A Papp of paclitaxel, JT-3 and digoxin across MDCK-MDR1 monolayers in the presence and absence of verapamil (100 μ mol/L)

Compd. ^a	Treatment ^b	MDCK-MDR1		Efflux ratio
		$P_{app}/(10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s})$		
		A-B	B-A	
Paclitaxel	Control	0.13±0.02	45.21±0.24	347.77
	Verapamil	2.65±0.03	26.35±0.12	9.94
JT-3	Control	0.77±0.01	5.87±0.04	7.62
	Verapamil	1.67±0.03	3.92±0.02	2.35
Digoxin	Control	0.39±0.01	26.97±0.18	69.15
	Verapamil	1.89±0.02	2.41±0.01	1.27

^a Paclitaxel, JT-3 and digoxin were added to donor compartments at 5 μ mol/L; ^b Verapamil was added to both AP and BL compartments at 100 μ mol/L.

分析表 2 中的实验数据可知,相较于 P-gp 的已知底物地高辛的外排率,紫杉醇是 P-gp 的底物,亲和作用强;从其结构衍生物 JT-3 在维拉帕米存在与否表现出来的外排率变化比例来看,其依然是 P-gp 的底物,但是其所表现的外排率变化比例显著地低于紫杉醇和地高辛的外排率变化,因此可知化合物 JT-3 与 P-gp 的亲和作用较弱,是 P-gp 的弱底物。

3 结论

为了改善第一代紫杉烷类药物在有效性和耐受性方面的问题,本文通过对紫杉醇进行多位点结构修饰,削弱其与 P-gp 的相互作用,以达到克服多药耐药性,增强药物的疗效。同时针对 P-gp 过表达的结肠癌细胞株抑制活性进行评价,结果表明能够显著抑制其增殖活性。因此,这类新型紫杉烷衍生物在克服了多药耐药的同时,对消化道肿瘤也具有较好疗效,其为扩大紫杉烷类抗肿瘤药物的临床应用范围和提高对恶性肿瘤的治疗指数提供了理论基础。

参 考 文 献

[1] Cucinotto I, Fiorillo L, Gualtieri S. *J. Drug Deliv.*, 2013,

2013; 905091.

[2] Weaver B A. *Mol. Biol. Cell*, 2014, 25(18): 2677~2681.

[3] Tang Y, Rodríguez-Salarichs J, Zhao Y, et al. *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, 137: 488~503.

[4] Quinton A E, Gwynne S H, Yim K L. *Med. Oncol.*, 2018, 35(8):115.

[5] Qiu W Q, Cui Y M, Tang P, et al. *Nat. Prod. Res.*, 2019, 32(1/3): 121~127.

[6] Ojima I, Wang X, Jing Y R, et al. *J. Nat. Prod.*, 2018, 81(3): 703~721.

[7] Kuznetsova L, Liang S, Jin C, et al. *J. Fluorine Chem.*, 2012, 143:177~188.

[8] Ojima I, Lichtenthal B, Lee S, et al. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2016, 26(1): 1~20.

[9] Jing Y R, Zhou W, Li W L, et al. *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, 22(1):194~203.

[10] Jing Y R, Zhou W, Wang X Y. *Sci. Rep.*, 2020, 10(1): 3211.

[11] Kuznetsova L, Sun L, Chen J, et al. *J. Fluorine Chem.*, 2012, 143: 177~188.

[12] Rong D, Wang C, Zhang X, et al. *Cancer Lett.*, 2020, 491: 36~49.

[13] Kirk K L. *J. Fluorine Chem.*, 2006, 127: 1013~1029.

[14] Ojima I. *J. Fluorine Chem.*, 2017, 198: 10~23.