

叶酸受体介导的抗肿瘤药物研究进展

赵 杰, 曹胜利*, 郑晓霖, 赵 波

(首都师范大学化学系, 北京 100048)

摘要: 叶酸受体在大多数人体肿瘤细胞表面过度表达, 而在正常细胞中的存在很少, 甚至检测不到, 这就使叶酸受体介导的抗肿瘤药物可以靶向性地作用于叶酸受体呈阳性的肿瘤细胞, 减少传统抗癌药物对正常细胞的毒副作用, 提高药物的选择性。本文对叶酸受体介导的抗肿瘤药物的作用机制进行综述, 介绍近几年研究者设计并合成的叶酸-药物缀合物及其活性测试的结果。

关键词: 叶酸受体; 叶酸-药物缀合物; 抗肿瘤活性; 靶向给药

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 02-0109-06

Folate receptor-mediated antitumor drugs

ZHAO Jie, CAO Sheng-li*, ZHENG Xiao-lin, ZHAO Bo

(Department of Chemistry, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: Folate receptor (FR) is over-expressed in a variety of human cancers and it is seldom expressed or found in normal tissues. Therefore, folate receptor-mediated antitumor drugs can be targeted specially to the FR-positive tumor cells. This strategy improves the selectivity of drugs which may destroy the normal tissues in traditional chemotherapeutics. This review provides the delivery mechanism of FR-mediated antitumor drugs and highlights the novel folate-drug conjugates and their activities.

Key words: folate receptor; folate-drug conjugate; antitumor activity; targeted-drug delivery

尽管癌症的治疗方法和抗癌药物的研究已经取得了很大进展, 但癌症仍是严重威胁人类健康的主要疾病之一。抗癌药物的主要缺点在于抑制肿瘤细胞生长的同时, 也严重抑制了正常细胞的增殖。研究者希望通过靶向给药 (targeted-drug delivery) 来达到药物选择性地作用于肿瘤细胞、减少对正常细胞毒性的目的^[1]。近年来, 叶酸受体 (folate receptor, FR) 作为抗肿瘤药物的靶点受到了极大的关注, 成为新型抗肿瘤药物研究的热点之一。

叶酸受体是一种跨膜单链糖蛋白, 它含有 3 种亚型: α -FR、 β -FR 和 γ -FR^[2]。叶酸受体之所以适合于作为抗肿瘤药物的靶点, 是因为其在大部分人体肿

瘤细胞上都过度表达, 而在正常的器官中很少表达, 甚至不表达^[3]。例如, α -FR 主要在卵巢癌、肺癌、子宫癌和睾丸癌等上皮组织的恶性肿瘤细胞中过度表达^[4]; β -FR 在胎盘、粒单核细胞系中成熟的粒细胞^[5]、被激活的单核或巨噬细胞及超过半数以上的髓系白血病细胞中过度表达^[6]; 而 γ -FR 主要在恶性白血病细胞过度表达^[2]。

在叶酸受体介导的抗肿瘤药物分子的设计上, 研究者主要注重两点: 一是与叶酸受体结合的亲和力 (binding affinity), 亲和力越大, 药物的选择性就越高。叶酸与叶酸受体有很高的亲和力 (K_d : $0.1 \sim 1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 而且当叶酸的 γ -羧基与其他小分子偶联后, 它仍能保持与叶酸受体的高亲和性, 所以叶酸可以作为药物的有效载体^[2]。研究者将抗肿瘤活性显著的小分子药物与叶酸进行偶联, 设计并合成了一些叶酸-药物的缀合物。二是小分子药物与载体在细胞

收稿日期: 2008-10-10.

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(7042006); 北京市教委科技发展计划资助项目(KM200710028008).

*通讯作者 Tel: 86-10-68902974, Fax: 86-10-68902493,
E-mail: sl_cao@sohu.com

内分离的难易程度。已有的研究发现, 缀合物分子中如含有二硫键、酰肼键等, 在细胞内比较容易释放出有效成分, 有利于提高药物的效力。

1 叶酸-药物缀合物的结构

如图 1 所示, 典型的叶酸-药物缀合物通常由载体、Spacer、可断裂键 (cleavable bond) 和药物 4 部分组成^[7]。

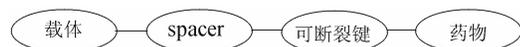


图 1 叶酸-药物缀合物的典型结构

常用的载体是叶酸, 其结构如图 2 所示, 包括蝶酸部分和谷氨酸部分。研究发现, 叶酸受体主要是识别叶酸中的蝶酸部分, 谷氨酸残基对亲和力的影响不大^[8, 9], 所以载体部分既可以是叶酸, 也可以是蝶酸。

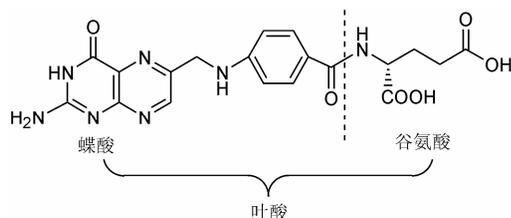


图 2 叶酸的结构

缀合物中的 Spacer 部分也称作 Linker 部分, 其作用是控制叶酸与药物的距离。Spacer 部分也可以连接一些官能团以改进缀合物的性质, 如水溶性、透膜性等。常用的 Spacer 是肽链、聚合物等。

缀合物中常用的可断裂键有两种: 二硫键 (disulfide bonds) 和酰肼键 (hydrazone bonds)。前者可以被细胞中的谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 还原断裂^[10], 而后者主要在细胞内吞腔 pH 较低的条件下水解断裂^[11]。

2 叶酸-药物缀合物的作用机制

如图 3 所示, 叶酸-药物缀合物在肿瘤细胞表面与叶酸受体结合, 通过细胞膜的内吞作用进入细胞, 形成独立的内吞腔。由于离子泵的作用使内吞腔的 pH 下降, 使可断裂键断裂, 从而使小分子药物与结合的叶酸分开, 跨出内吞腔膜, 进入细胞核发挥活性。叶酸受体将重新回到细胞膜表面, 而叶酸分子则通过还原叶酸载体 (reduced folate carrier, RFC) 排出细胞外。缀合物不能直接通过 RFC 作用逸出细胞膜, 这样就保证了药物能有效地作用于肿瘤细胞的细胞核, 并减少对正常细胞的毒性^[12]。

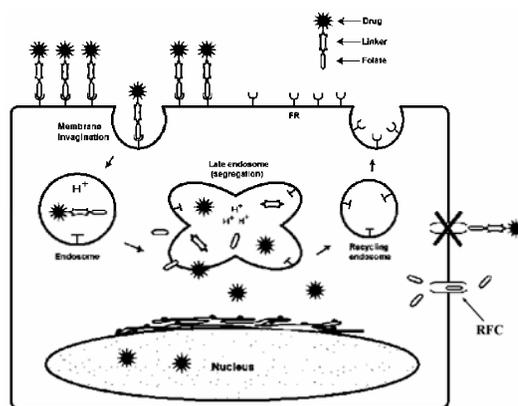


图 3 叶酸-药物缀合物在叶酸受体介导下, 通过内吞进入细胞而发挥作用的示意图

3 已有的叶酸-药物缀合物及其抗肿瘤活性

3.1 叶酸-丝裂霉素缀合物

Leamon 等^[12, 13]将叶酸 γ -半胱氨酸和 *N*-7 位连有取代基的丝裂霉素通过二硫键连接, 合成了叶酸-丝裂霉素缀合物 EC72 (**1**) (图 4)。体外活性测试结果表明, 化合物 **1** 对许多叶酸受体呈阳性的细胞株都有剂量依赖活性 (dose responsive activity)。加入过量的叶酸会明显影响它的活性, 且对叶酸受体呈阴性的细胞株无活性, 表明它是由叶酸受体介导进入细胞的, 而且具有选择性。体内活性测试表明化合物 **1** 对同种移植和异种移植的肿瘤细胞都有活性, 对 KB 细胞和 M109 细胞的抑制活性都很好, 其中对 KB 细胞的 IC_{50} 达到 $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将化合物 **1** 与紫杉醇联合作用于 KB 细胞, 抑制效果比单独使用这两种药物更好。在对小鼠的 M109 细胞毒性测试中, 化合物 **1** 连续给药 30 天, 在主要器官 (包括对叶酸受体呈阳性的肾脏) 中未发现有明显毒性。化合物 **1** 将被考虑用于临床研究。

为了考察二硫键对活性的影响, Reddy 等^[13]同时合成了 EC72 的类似物 EC110 (**2**) (图 4), 其结构中无二硫键, 而代之以等长度的碳链。EC110 对叶酸受体呈阳性的肿瘤细胞没有明显的抑制活性, 说明可断裂的二硫键对生物活性的影响很大。

为了进一步考察可断裂键和不同的 Spacer 对抗肿瘤活性的影响, Reddy 等^[13]又设计合成了新的叶酸-丝裂霉素缀合物 EC118 (**3**) (图 4), 该分子中既包含二硫键, 又包含对 pH 敏感的酰肼键, 并且将 Spacer 部分由碳链变为亲水的四肽链。EC118 在细胞酸性条件下 ($\text{pH} = 5$), 几分钟内酰肼键就断开, 同时二硫键被还原, 释放出药物。活性测试结果表明, EC118 对 M109 细胞的抑制活性比 EC72 更加显著, 对各种

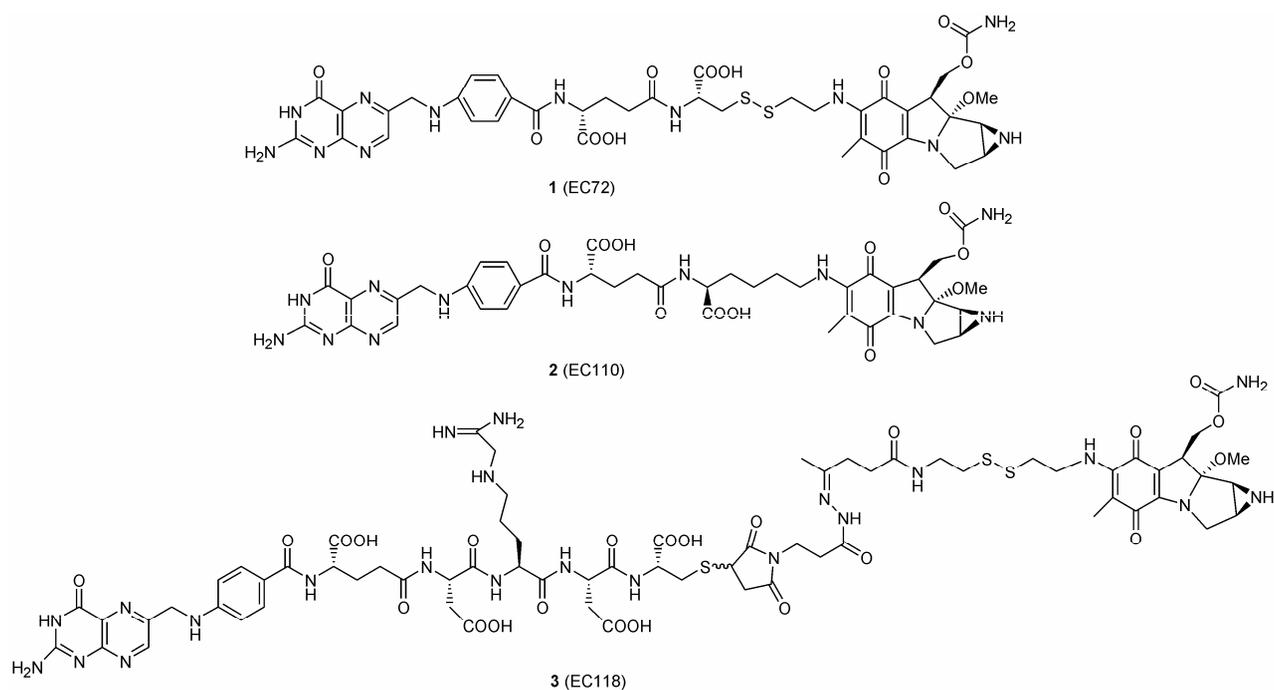


图 4 叶酸-丝裂霉素缀合物的结构

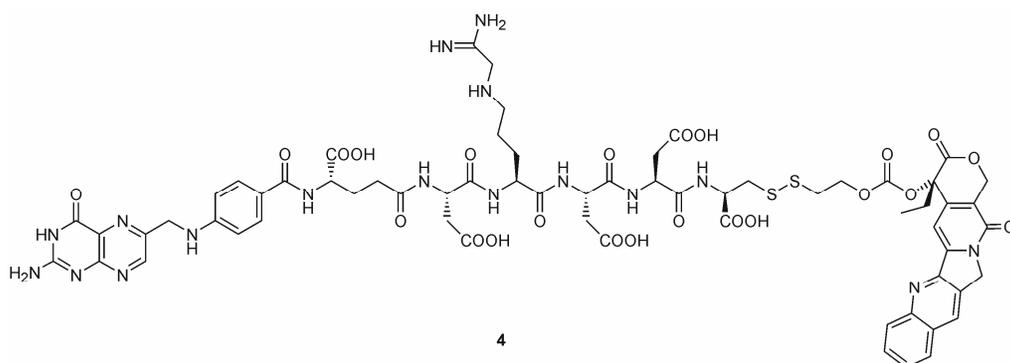


图 5 叶酸-喜树碱缀合物的结构

叶酸受体呈阳性的肿瘤细胞 IC_{50} 为 $5 \sim 10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果表明分子中可断裂的键越多、Spacer 亲水性越好, 抗肿瘤活性就越好。

3.2 叶酸-喜树碱缀合物

Henne 等^[14]设计合成了叶酸-喜树碱的缀合物(4), 分子中含有亲水性的肽链 Spacer 和可断裂的二硫键(图 5)。生物活性测试表明, 化合物 4 对有叶酸受体表达的细胞有很高的亲和力, 而且对 KB 细胞抑制效果显著, IC_{50} 为 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。若同时加入过量的叶酸, 其抑制活性明显降低, 说明此前药是由叶酸受体介导进入肿瘤细胞的。

3.3 叶酸-去乙酰基长春碱单酰肼 (desacetyl-vinblastine monohydrazone, DAVLBH) 缀合物

Leamon 等^[7]设计并合成了叶酸-去乙酰基长春碱单酰肼 (desacetyl-vinblastine monohydrazone, DAVLBH)

的缀合物 EC140 (5) (图 6), 含有由亲水肽链构成的 Spacer 和对 pH 敏感的酰肼键。体外活性测试结果表明, EC140 对叶酸受体呈阳性的细胞株有选择性和剂量依赖效应。体内活性测试结果表明它对同种移植和异种移植的肿瘤细胞都有活性。EC140 将被考虑用于临床研究。

为了比较二硫键和酰肼键对活性的影响, Vlahov 等^[15, 16]又设计合成了叶酸-去乙酰基长春碱单酰肼 (desacetyl-vinblastine monohydrazone, DAVLBH) 缀合物 EC145 (6) (图 6), 其分子中含有二硫键。体外活性测试结果表明, EC145 对于叶酸受体呈阳性的细胞株有选择性和剂量依赖效应。体内活性测试结果表明它对同种移植和异种移植的肿瘤细胞都有活性。与 EC140 比较, EC145 有更好的抑制活性和耐受力, 说明二硫键比酰肼键对活性更有利, EC145 已进入 I 期临床试验。

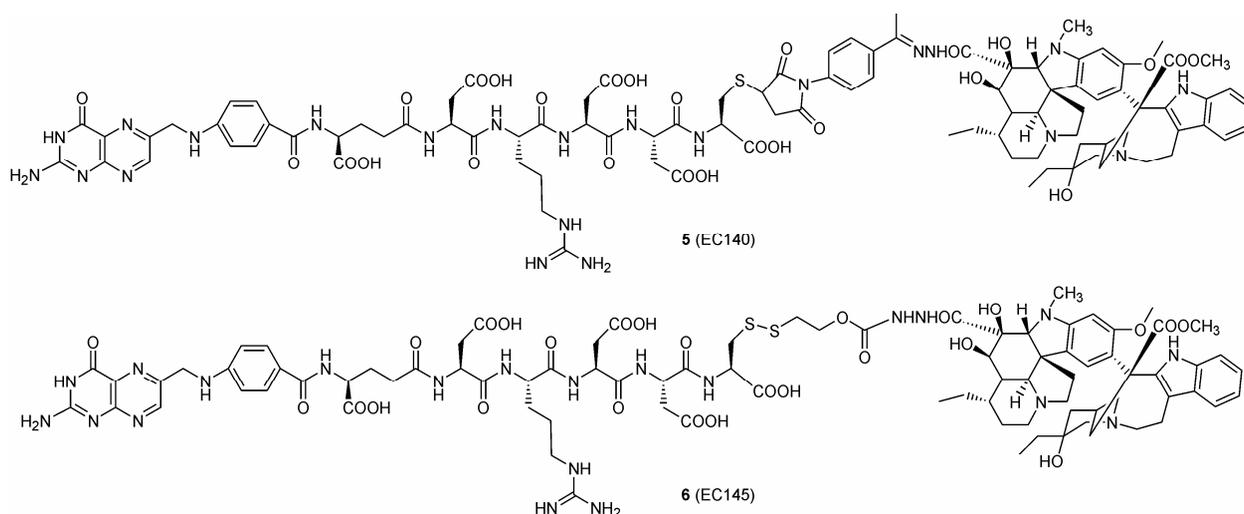


图6 叶酸-去乙酰基长春碱单酰肼缀合物的结构

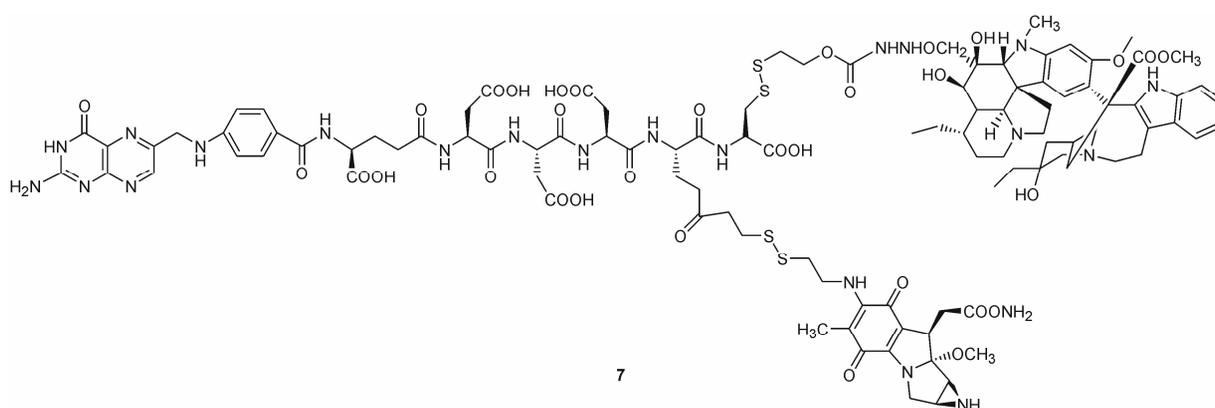


图7 叶酸-长春碱、丝裂霉素缀合物的结构

3.4 叶酸-长春碱、丝裂霉素缀合物

为了进一步优化药物分子的结构,寻找抑制活性更强的缀合物, Leamon 等^[17, 18]又设计合成了叶酸连接两种药物的缀合物 EC0225 (7) (图 7), 其中丝裂霉素和长春碱都是先通过二硫键与亲水的肽链 Spacer 相连, 再与叶酸偶联。体外活性测试表明, 它对叶酸受体呈阳性的肿瘤细胞有很强的抑制活性, 并且有剂量依赖效应。其中对 KB 细胞的 IC_{50} 为 $5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而对叶酸受体呈阴性的肿瘤细胞 4T1 (murine breast carcinoma) 没有活性, 这说明它是叶酸受体介导进入肿瘤细胞的。EC0225 已于 2007 年 3 月进入针对难治愈的实体瘤 (refractory solid tumors) 的 I 期临床试验。

3.5 叶酸-埃坡霉素缀合物

Vite 等^[19]设计并合成了一系列叶酸-埃坡霉素缀合物及其类似物, 其中化合物 8、9 和 10 (图 8) 对肿瘤细胞的抑制活性显著, 对 KB 细胞的 EC_{50} 值分别为 50 、 68 和 $75 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.6 叶酸-NCH-31 缀合物

Suzuki 等^[20]设计合成了两种含有二硫键的组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDACs) 抑制剂 (11, 12) (图 9)。这两种叶酸-NCH-31 缀合物中都包括二硫键, 只是 Spacer 不同。活性测试结果表明, 化合物 11 对叶酸受体呈阳性的乳腺癌 MCF-7 细胞有强的生长抑制活性。

3.7 叶酸-四苯基卟啉缀合物

在癌症的光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT) 中, 四苯基卟啉作为局部光敏剂, 在适当波长的光波照射下与细胞内氧分子作用, 生成短暂存在的单态氧 (singlet oxygen), 从而诱导细胞凋亡。为了提高四苯基卟啉在细胞中的选择性, Schneider 等^[21]设计合成了两种叶酸-四苯基卟啉缀合物 13 和 14 (图 10)。在化合物 13 中, 叶酸与药物通过碳链连接, 而在化合物 14 中是由等长度的聚乙二醇链相连。活性测试表明这两种缀合物是通过叶酸受体介导进入细胞的, 而且在对比实验中, 两种缀合物的活性明显高

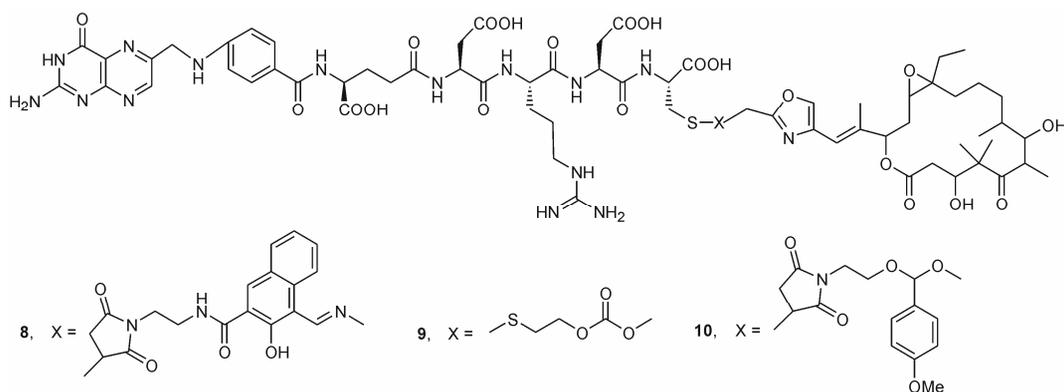


图8 叶酸-埃坡霉素缀合物的结构

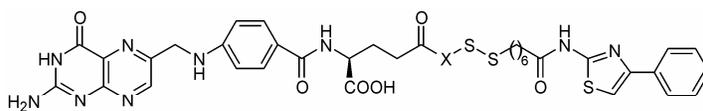


图9 叶酸-NCH-31缀合物的结构

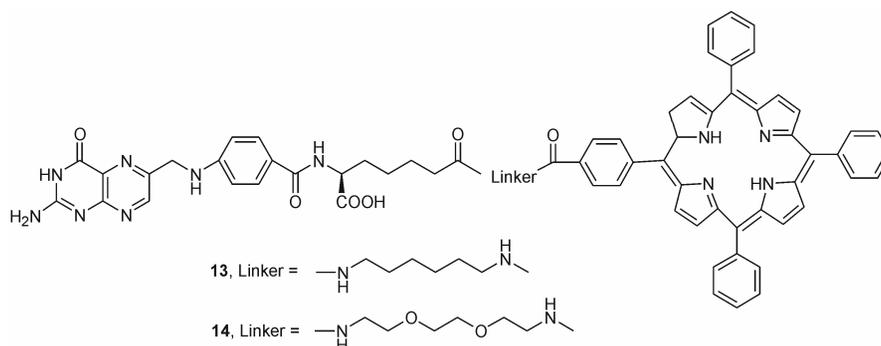


图10 叶酸-四苯基吡啶缀合物的结构

于四苯基吡啶。

综上所述,在已合成的叶酸受体介导的抗肿瘤药物中,大部分具有很好的抗肿瘤活性,并且与叶酸受体的亲和性很高,可以选择性地作用于肿瘤细胞,毒性比原有药物降低,其中一些活性显著的药物已经进入临床研究阶段。以叶酸受体为靶点的靶向给药策略,在新型抗肿瘤药物的研究和开发中已显示出广阔的应用前景。深入研究的重点应集中在设计合成与叶酸受体有更高亲和力的载体,探索针对某种肿瘤细胞的最适合的 Spacer, 找出更活泼的可断裂键,挖掘和使用更加有效的现有药物或新型结构的药物,从而研究和开发出具有更高实用价值的叶酸受体介导的抗肿瘤缀合物。

References

[1] Zhang Q, Xiang GY, Long N, et al. Anticancer activity of

N-(phenylacetyl) doxorubicin combined with folate-targeted PGA [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2005, 40: 1046-1050.

[2] Leamon CP, Reddy JA. Folate-targeted chemotherapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56: 1127-1141.

[3] Reddy JA, Allagadda VM, Leamon CP. Targeting therapeutic and imaging agents to folate receptor positive tumors [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2005, 6: 131-150.

[4] Bagnoli M, Canevari S, Figini M, et al. A step further in understanding the biology of the folate receptor in ovarian carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2003, 88: S140-S144.

[5] Pan XQ, Zheng X, Shi G, et al. Strategy for the treatment of acute myelogenous leukemia based on folate receptor beta-targeted liposomal doxorubicin combined with receptor induction using all-trans retinoic acid [J]. *Blood*, 2002, 100: 594-602.

[6] Garin-Chesa P, Campbell I, Saigo PE, et al. Trophoblast and ovarian cancer antigen LK26. Sensitivity and specificity in

- immunopathology and molecular identification as a folate-binding protein [J]. *Am J Pathol*, 1993, 142: 557–567.
- [7] Leamon CP, Reddy JA, Vlahov IR, et al. Synthesis and biological evaluation of EC140: a novel folate-targeted vinca alkaloid conjugate [J]. *Bioconjug Chem*, 2006, 17: 1226–1232.
- [8] Leamon CP, Deprince RB, Hendren RW. Folate-mediated drug delivery: effect of alternative conjugation chemistry [J]. *Drug Target*, 1999, 7: 157–169.
- [9] Leamon CP, Cooper SR, Hardee GE. Folate-liposome-mediated antisense oligodeoxynucleotide targeting to cancer cells: evaluation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Bioconjug Chem*, 2003, 14: 738–747.
- [10] Lomaestro BM, Malone M. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues [J]. *Ann Pharmacother*, 1995, 29: 1263–1273.
- [11] Cordes EH, Jencks WP. The mechanism of hydrolysis of Schiff bases derived from aliphatic amines [J]. *J Am Chem Soc*, 1963, 85: 2843–2848.
- [12] Leamon CP, Reddy JA, Vlahov IR, et al. Synthesis and biological evaluation of EC72: a new folate-targeted chemotherapeutic [J]. *Bioconjug Chem*, 2005, 16: 803–811.
- [13] Reddy JA, Westrick E, Leamon CP, et al. Folate receptor specific anti-tumor activity of folate-mitomycin conjugates [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 58: 229–236.
- [14] Henne WA, Kularatne SA, Low PS, et al. Synthesis and activity of a folate peptide camptothecin prodrug [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16:5350–5355.
- [15] Vlahov IR, Santhapuram HKR, Kleindl PJ, et al. Design and region-selective synthesis of a new generation of targeted chemotherapeutics. Part 1: EC145, a folic acid conjugate of desacetylvinblastine monohydrate [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 5093–5096.
- [16] Leamon CP, Reddy JA, Vlahov IR, et al. Comparative preclinical activity of the folate-targeted vinca alkaloid conjugates EC140 and EC145 [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121: 1585–1592.
- [17] Leamon CP, Reddy JA, Vlahov IR, et al. Preclinical antitumor activity of a novel folate-targeted dual drug conjugate [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4: 659–697.
- [18] Vlahov IR, Santhapuram HKR, Wang Y, et al. An assembly concept for the consecutive introduction of unsymmetrical disulfide bonds: synthesis of a releasable multidrug conjugate of folic acid [J]. *J Org Chem*, 2007, 72: 5968–5972.
- [19] Vite GD, Lee FY, Leamon CP. Conjugates of aziridinyl-epothilone analogs and pharmaceutical compositions comprising same: US, 20070275904 [P]. 2007-11-29.
- [20] Suzuki T, Hisakawa S, Itoh Y, et al. Design, synthesis, and biological activity of folate receptor-targeted prodrugs of thiolate histone deacetylase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 4208–4212.
- [21] Schneider R, Schmitt F, Frochot C, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13: 2799–2808.