

抗癌药物紫杉醇

邱德有 朱 澂 编



北京大学出版社

抗癌药物紫杉醇

邱德有 朱 澂 编

北京//天学出 

图书在版编目(CIP)数据

抗癌药物紫杉醇/邱德有,朱激编. —北京:北京大学出版社,
1996.3

ISBN 7-301-02847-4

I. 抗… I. ①邱… ②朱… III. 抗癌药, 紫杉醇
IV. R 979.1

书 名: 抗癌药物紫杉醇

著作责任者: 邱德有 朱 激

责任编辑: 李宝屏

标准书号: ISBN 7-301-02847-4/Q·66

出版者: 北京大学出版社

地 址: 北京市海淀区中关村北京大学校内 100871

电 话: 出版部 2752015 发行部 2559712 编辑部 2752032

排 印 者: 国防科工委印刷厂

发 行 者: 北京大学出版社

经 销 者: 新华书店

787×1092毫米 32开本 4.5印张 100千字

1996年3月第一版 1996年3月第一次印刷

定 价: 7.90元

内 容 简 介

本书系统介绍了抗癌新药紫杉醇的发展历史、作用机理和临床试验；紫杉醇的植物性药源——红豆杉属植物的自然资源；红豆杉属植物的化学成分；紫杉醇的化学合成与结构改造；紫杉醇的生物合成；红豆杉属植物的器官、组织及细胞培养和基因工程；红豆杉属植物产紫杉醇的内生真菌的分离与培养等，并详细介绍了与紫杉醇研究有关的文献、研究室及研究人员。

本书可供大学生物系、化学系、医学院校各专业及科学院有关研究人员参考。

序 言

紫杉醇是一种有效治疗多种癌症的天然植物产物，已受到生物学界和医学界的重视，正在加紧进行临床试验。1989年以来，我国在国外的学者曾多次希望我们实验室开展该项研究，并有与我们合作的设想。为此，我们于1991年开始进行紫杉醇的探索性研究。历时三年，我们对产生紫杉醇的红豆杉植物资源，紫杉醇的测定方法和在红豆杉中的含量，红豆杉的细胞及组织培养，以及红豆杉内生真菌的产紫杉醇等问题进行了一些研究。同时对紫杉醇的化学结构和生物合成，紫杉醇治疗癌病的临床试验效果，国际上从事紫杉醇研究的实验室以及有关紫杉醇生产的专利等方面进行了调查。由于上述这些工作，使我们对国内外紫杉醇研究的现状有了一定的了解。现把这些调查资料整理出版，希望有助于对抗癌药物、植物化学、植物性药源有兴趣的同仁了解紫杉醇作为一种有效的抗癌药物的研究进展。

心脏病、脑血管病和癌病是危及人类生命的三大疾病。我国患癌病人推测多达几百万人。抗癌药物的需求，仅以我国来说，数量也是惊人的。美国肿瘤信息服务部门于1991年宣布紫杉醇对多种癌症有良好的治疗效果，并通过了美国FDA（药品食品检定所）的审核，于1992年批准为治疗晚期卵巢癌的新药。但由于紫杉醇在红豆杉中的含量极低，难以普遍使用，解决紫杉醇药源的关键是要开辟新的途径。现在看来利用化学合成紫杉醇的中间产物或前体，再利用红豆杉培养细胞进行生物转化而获得紫杉醇，可能有希望获得产量大、成本低、药效稳定和副作用小的紫杉醇抗癌药物。当然，其中还包括应用分子生物学技术，改造若干关键

的酶系统,以提高生产效率。这一研究无疑需要高水平的人才、雄厚的财力和相当的时间,以及多学科的配合,而非一个实验室所能完成。

本书的出版,希望能引起领导和国内外有识之士的重视,以投入力量,形成一个长期的、稳定的紫杉醇科研与生产的联合体,使紫杉醇能成为一种普遍应用的治癌良药。

本书的主要作者邱德有是我的在学博士研究生。在他以紫杉醇研究为题做毕业论文期间,收集了大量文献,进行了综合分析,完成了论文的综述部分。在此基础上加工整理,反复修改,补充了一些内容,增加了我们对一些问题的看法,最后完成本书。邱德有论文工作中还得到朱至清教授、黄美娟副教授的指导和帮助,顾孝诚教授对紫杉醇研究和本书的出版始终给予热情的鼓励和关怀,谨致以衷心的感谢。

北京大学生命科学学院
植物细胞生物学实验室
朱 澂

1994年10月29日

目 录

第一章 紫杉醇的发现历史、作用机理和临床试验	(1)
一、紫杉醇的发现历史	(1)
二、紫杉醇的作用机理	(2)
三、紫杉醇的 I、II、III 期临床试验	(3)
第二章 红豆杉属植物的自然资源	(9)
一、国内、外红豆杉属植物资源的概况	(9)
二、紫杉醇在红豆杉属植物中的含量及其影响因素	(12)
三、红豆杉属植物的人工栽培	(13)
第三章 红豆杉属植物的化学成分	(15)
一、红豆杉属植物的化学成分	(15)
二、紫杉醇及其主要类似物的结构和光谱特征	(29)
三、紫杉醇及其他紫杉烷类成分的分析方法	(41)
四、紫杉醇大规模分离、纯化的步骤与方法	(55)
第四章 紫杉醇的化学合成与结构改造	(62)
一、紫杉醇的半合成	(62)
二、紫杉醇的全合成	(67)
三、紫杉醇类活性分子的构效关系	(75)
四、紫杉醇的结构改造	(76)
第五章 紫杉醇的生物合成	(83)
一、紫杉醇骨架的生物合成	(83)
二、紫杉醇侧链的生物合成	(86)
三、紫杉醇与植物其他次生代谢产物合成之间的关系	(88)
四、影响紫杉醇生物合成的因素	(90)
五、紫杉醇生物合成的调控	(91)
第六章 红豆杉属植物的器官、组织及细胞培养 和基因工程	(93)
一、红豆杉属植物的器官培养	(93)

二、红豆杉属植物组织及细胞悬浮培养	(95)
三、红豆杉属植物细胞的固定化培养	(100)
四、红豆杉属植物及紫杉醇的基因工程	(101)
第七章 红豆杉属植物产紫杉醇的内生真菌的	
分离与培养	(103)
一、红豆杉属植物产紫杉醇的内生真菌 <i>Taxomyces andreanae</i> 的 分离与培养	(103)
二、红豆杉属植物内生真菌 <i>Taxomyces andreanae</i> 的启示	(104)
结束语	(106)
参考文献	(108)
附录一 用于红豆杉组织、细胞培养的培养基	(123)
附录二 利用红豆杉属植物生产紫杉醇的部分专利目录	(126)
附录三 国际上研究紫杉醇的主要实验室	(128)
附录四 红豆杉 cDNA 文库的建立方法	(130)

第一章 紫杉醇的发现历史、作用机理和临床试验

一、紫杉醇的发现历史

早在 1856 年 Lucas 就从浆果红豆杉 (*Taxus baccata* L.) 的叶片中提取到粉末状碱性部分, 即紫杉碱 (taxine)^[1]。之后的 100 多年间日本和美国分别从东北红豆杉和浆果红豆杉中分离出 20 多个新的紫杉烷类二萜化合物^[2-7]。1962 年美国农业部 (USDA) 开始注意这一问题, 并收集短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia* Nutt.) 的树皮。当时这一工作是美国癌症研究所 (NCI) 癌症化学治疗国家

服务中心筛选植物抗癌药工作的一部分。

1964 年证实该植物树皮的提取物对 KB 细胞具有细胞毒性, 1969 年确定了起作用的有效成分是紫杉醇 (taxol)^[8]。Wall 及其合作者于 1971 年首次从短叶红豆杉的树皮中分离到紫杉醇

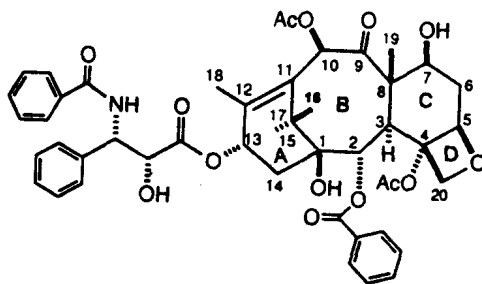


图 1 紫杉醇的分子结构

其分子式是 $C_{47}H_{51}NO_{14}$, 分子量 853.89

并确定了它的结构 (图 1)。试验结果表明紫杉醇对培养的 KB 细胞具有显著的细胞毒性, 对鼠 L1210、P388、P1534 白血病以及

Walker 256 肉瘤、Sarcoma180 和 Lewis 肺癌也有相当的活性^[9]。该试验中有关细胞毒性的正式数据迄今未公开发表。由于紫杉醇的水溶性差及植物中含量低的原因，导致当时紫杉醇没有得到广泛的重视和应用。直到 1979 年发现紫杉醇的独特的抗肿瘤机制以及 NCI 开始下决心解决其供应问题之后，人们才重新对紫杉醇感兴趣。1983 年美国国立癌症研究所报告紫杉醇对人乳腺癌、结肠癌及肺癌裸鼠异种移植株 (MX-1、CX-1 及 LX-1) 有中等抗肿瘤作用，但对结肠癌 38 及 CD8F 乳腺癌无效。给药规程研究证明，每 3 小时给药一次 (相当于连续静脉滴注) 可使荷 P-388 小鼠生命延长最多^[17]。经过临床前药理和毒理试验、I 期临床试验 (1983—1987)、II 期临床试验 (1987—1989) 和 III 期临床和附加临床试验 (1990 年以后) 后，美国食品及药物管理局 (FDA) 和加拿大卫生福利部 (CDHW) 联合对紫杉醇进行了审核。在联合审核的基础上，美国 FDA 于 1992 年 12 月 29 日正式批准紫杉醇可用于治疗晚期卵巢癌患者 (药品名为 paclitaxel)。目前已有 13 个国家批准紫杉醇可用于癌症的治疗。Bristol - Myers Squibb (BMS) 公司拥有 5 年的专卖权。紫杉醇被认为是近 15 年来天然抗癌药物研究领域最重大的发现，它的出现为广大癌症患者 (从目前看主要是卵巢癌和乳腺癌患者) 带来了福音。

二、紫杉醇的作用机理

Horwitz 和其合作者于 1979 年阐明了紫杉醇独特的作用机理^[10-12]。与其他引起微管解聚的药物如长春花碱和秋水仙素不同，紫杉醇可以稳定微管并促进其聚合和组装。仅 $0.05\mu\text{mol/l}$ 的紫杉醇就可以促进微管的体外组装，而且即使在缺乏微管组装所必需的因子如 GTP 或微管结合蛋白 (MAPs) 的情况下，紫杉醇仍然能够促进微管的组装^[12,13]。而且用通常促进微管解聚的因子

如钙和低温处理那些经紫杉醇处理过的微管，微管仍然能够保持其稳定状态^[10,11,14]。因此，对于迅速分裂的肿瘤细胞，紫杉醇可“冻结”有丝分裂纺锤体，从而使肿瘤细胞停止在G₂期和M期，直至死亡；紫杉醇还可抑制 Walker 256 肉瘤细胞的迁移^[15]。进一步的研究还发现紫杉醇可调节体内免疫功能，它可作用于巨噬细胞，导致肿瘤坏死因子 TNF- α 受体的减少以及 TNF- α 的释放^[16]，还可促进白细胞介素 IL-1、IL-2、IL-6 以及干扰素 IFN- α 、IFN- β 的释放，对肿瘤细胞起杀伤或抑制作用。

三、紫杉醇的 I、II、III 期临床试验

在临床试验之前进行过紫杉醇药理及毒理研究。毒理研究有两个目的：一方面为 I 期临床提供试用的剂量；另一方面是为了确定显示毒性的靶器官、毒性与剂量的关系及毒性的可恢复性。当紫杉醇给药规程为每日腹腔或静脉注射一次，连续给药 5 天时其对 CDF1 小鼠的 LD₁₀ 为 69.6mg/(m²·d) (腹腔注射)，而 Sprague Dawley 大鼠的 LD₁₀ 为 137.9 mg/(m²·d) (静脉注射)。主要显示毒性的组织为那些细胞更新快的组织，如骨髓等，而且所有毒性均可以恢复。推荐的临床初试剂量为 5mg/(m²·d)，连续给药 5 天为一个疗程^[17]。韩锐等^[17]人对紫杉醇的胚胎毒性进行了较为系统的研究，发现在 12.5mg/(m²·d) 的剂量下紫杉醇胎鼠数减少，吸收胎数增加，胎鼠出现枕骨骨化延迟，胸骨缺失及侧脑室扩大。说明紫杉醇有一定致畸作用。小剂量紫杉醇 (6.25mg/kg) 除引起枕骨骨化延迟及胸骨缺失外，未显示其他毒性。用³H 标记的紫杉醇进行大鼠体内代谢实验证明，紫杉醇静脉注射后，广泛分布在肝、脾、大肠、肾、脂肪及骨髓中，并经粪、尿、胆汁排出。紫杉醇在人体或动物体内的药物代谢动力学也已经清楚。Longnecker 等 (1987)^[17,18]用 HPLC 法测定人血浆及尿中紫杉醇

含量,进行药代动力学研究。紫杉醇在经过 60—360min 静脉滴注后,血浆中紫杉醇呈双相消除, $t_{1/2\alpha}$ 为 16.2min, $t_{1/2\beta}$ 为 6.4h,VDc 为 8.6 l/m²,VD_{ss} 为 67.1 l/m²,平均血浆消除率为 253ml·min⁻¹·m⁻²,肾消除率 (CL_r) 为 29.3ml·min⁻¹·m⁻²,48h 内尿中测得紫杉醇量占给药量的 5.9±8.8%。同年 Wiernik 等人报道 275mg/m² 紫杉醇静脉点滴 6h,测得 $t_{1/2\alpha}$ 为 21min, $t_{1/2\beta}$ 为 8.4h。剂量在 175—275mg/m² 范围内,血浆 C_{max} 为 2—10μmol/l,AUC 为 16—64mg·h⁻¹·l⁻¹,血浆中紫杉醇浓度与用药量呈正相关。VD_{ss} 为 60 l/m²,进入血内的紫杉醇 90% 与血浆蛋白或组织蛋白相结合。48 小时内从尿中排出紫杉醇原形为 4.3—6.6%,CL_r 为 2.4—14.0ml·min⁻¹·m⁻²,表明肾不是紫杉醇的主要消除途径^[17,19]。

美国从 1983 年开始紫杉醇临床试验,1983 年至 1987 年为 I 期临床试验。试验由 NCI 负责,一些著名大学医院肿瘤中心参加,共有 140 名肿瘤患者在 7 个不同单位接受了 I 期临床试验。I 期临床试验遇到两个问题:紫杉醇的供应不足以及过敏反应发生率太高。I 期临床试验中出现的过敏反应主要是由于紫杉醇乳状针剂中的助溶剂聚氧乙基化蓖麻油 (cremophor EL) 引起组织胺释放造成的,它可以通过滴注紫杉醇乳状针剂前服用抗过敏反应药物,并且在滴注时降低滴注速度来加以克服^[8]。I 期临床试验的目的是确定最大耐受量和剂量限制毒性。最大耐受量随给药方式的不同而不同。根据最大耐受量,多数试验单位推荐紫杉醇 I 期临床试验用药剂量为 200—250mg/m²。I 期临床试验的剂量限制毒性多为白细胞减少及粒细胞减少。有时少数病人出现末梢神经痛,个别病人出现过敏。紫杉醇 I 期临床试验的结果见表 1^[45]。

II 期临床试验开始于 1987 年,其主要任务是评价紫杉醇对肿瘤的疗效。II 期临床试验采用 24 小时静脉滴注,每隔 21 天进行一次点滴,剂量多为 250mg/m²。II 期临床试验结果表明紫杉醇对

表 1 紫杉醇 I 期临床试验结果

试验单位	给药方式	最大耐受剂量 (I 期临床试验 剂推荐用剂量) (mg/m ²)	剂量限制 毒性	其他主要 毒副作用	参考 文献
Johns Hopkins 肿瘤中心	1—6h 静脉滴注 21 天为 1 间隔	265 (210)	中性白细胞减少	神经系统病症 粘膜炎 关节炎/肌炎 过敏反应	20
Einstein 医学院	1—6h 静脉滴注 21 天为 1 间隔	275 (250)	中性白细胞减少 神经系统病症	过敏反应 脱发、粘膜炎	19
Einstein 医学院	24h 静脉滴注 21 天为 1 间隔	275 (250)	中性白细胞减少 神经系统病症	过敏反应	21
Memorial Sloan-Kettering 癌症中心	3h 静脉滴注 21 天为 1 间隔	190 (—)	过敏反应	白细胞减少 恶心 脱发	22
Mount Sinai 医学院	24h 静脉滴注 21 天为 1 间隔	200 (—)	中性白细胞减少	脱发 恶心 呕吐	23
Texas 大学 San Antonio 分校	6h 静脉滴注 21 天为 1 间隔	275 (225)	中性白细胞减少	关节炎/肌炎 粘膜炎 脱发 神经系统病症 过敏反应	24
Texas 大学 M. D. Anderson 癌症中心	每天 1h 静脉滴注持续 5 天 21 天为 1 间隔	40 (20)	中性白细胞减少	脱发 腹泻	25

续表

试验单位	给药方式	最大耐受剂量 (I期临床试验 剂推荐用剂量) (mg/m ²)	剂量限制 毒性	其他主要 毒副作用	参考 文献
Wisconsin 大学	每天 1—6h 静脉滴注 21 天为 1 间隔	40 (30)	中性白细胞减少	过敏反应 恶心 脱发 粘膜炎 血小板减少	26
Johns Hopkins 肿瘤中心	24h 静脉滴注 14—21 天为 1 间隔	390 (310)	粘膜炎	中性白细胞减少 过敏反应 神经系统病症	27
Johns Hopkins 肿瘤中心	24h 静脉滴注	135—170 附加 75mg/m ² 的 cisplatin	中性白细胞减少	关节炎/肌炎 脱发 心血管系统异常 过敏反应 神经系统病症	28

晚期卵巢癌、转移性乳腺癌、黑色素瘤和非小细胞肺癌有显著疗效；McGuire 等^[29]、Thigpen 等^[30]以及 Einzig 等^[31]相继报告紫杉醇对晚期卵巢癌有效，特别是那些对顺铂具有抗药性的病人对紫杉醇仍然有很好的反应，有效率在 30—40% 之间。而且由于紫杉醇的毒性易为病人接受，因而这些结果当时一发表就引起了广泛的注意；安德森医院的 Holmes 等 (1991)^[32]收治了 25 例乳腺癌患者，结果表明对晚期乳腺癌也有很好的疗效。25 例中完全反应 (CR) 的有 3 例，部分反应 (PR) 有 11 例，对晚期乳腺癌单药有效率高达 56%。这种效果可与阿霉素的效果相媲美；对黑色素瘤

的疗效在 15% 左右, 而且对非小细胞肺癌也有一定疗效, 非小细胞肺癌总反应率为 24%^[33]。紫杉醇 I 期临床试验结果如表 2 所示^[17]。

表 2 紫杉醇 I 期临床试验结果

试验单位	肿瘤类型	剂量 (mg/m ²)	总病例	可评价 病例	CR	PR	有效率
Jones Hopkins	卵巢癌	135—170	47	44	1	11	27
GOG	卵巢癌	150	49	44	8	8	36
Einstein	卵巢癌	200—250	34	30	2	4	20
Einstein	黑色素瘤	250	34	28	3	1	14
Anderson	黑色素瘤	200—250	25	25	0	3	12
Einstein	肾癌	250	18	18	0	0	0

紫杉醇的 III 期临床试验开始于 1990 年。1991 年, 美国肿瘤信息服务部门对国外医疗机构宣布, 紫杉醇治疗卵巢癌、乳腺癌有良好效果, 对治疗前列腺癌、上胃肠道癌、小细胞性和非小细胞性肺癌前景良好。基于五次计 189 名癌症患者的临床以及 300 多名其他附加临床 (包括 III 期临床) 的试验结果, 紫杉醇很快通过了美国 FDA 的审核, 于 1992 年 12 月底被正式批准用于治疗晚期卵巢癌的新药。紫杉醇于 1993 年底又被 FDA 批准用于治疗乳腺癌, 这样全世界对紫杉醇这种药的需求量将大大增加。可以预见, 紫杉醇将有可能成为今后很长一段时期内很重要的抗癌药之一。

紫杉醇的发现至今已有 20 多年的历史, 其独特的作用机理也初步被阐明清楚, 临床试验的结果也表明了它是一种高效的天然抗癌药物。由于它具有这种独特的作用机理和良好的抗癌效果, 必

然引起全世界的广泛注目，而首先吸引人们注意力的当然是其植物的自然资源。人们发现这种植物资源在全世界的分布极其有限，而且分布零零散散，于是就把重点转移至红豆杉属植物的人工栽培上面。

第二章 红豆杉属植物的自然资源

一、国内、外红豆杉属植物资源的概况

紫杉醇及其类似物迄今为止仅存在于裸子植物红豆杉科 (Taxaceae) 的红豆杉属 (*Taxus*) 和澳洲红豆杉属 (*Austrotaxus*) 中。红豆杉属植物全世界有 11 种^[35] (但 Strobel 认为只有 8 种^[34])，广泛分布于欧亚大陆和北美的寒带、温带及亚热带地区，但分布零散，生长缓慢；澳洲红豆杉属仅分布于南半球，数量稀少。国外常见的有 4 种。由于这 4 种植物广泛分布于欧洲和北美，且由于长期隔离和适应的结果，出现许多地理品种 (geographic races)。据报道仅欧洲红豆杉就不少于 40 个地理种，它们的花果期、花和种子的形态或化学成分都有一定差别。为了应用或描述的方便，常用不严格的产区来命名，如 Irish yew, Dovasto yew, English yew, Himalaian yew, Japanese yew 等。此外，还有许多杂种，常见的有 *Taxus media* Rehd (*T. cuspidata* × *T. baccata*) 和 *T. hunnewelliana* Rehd (*T. cuspidata* × *T. canadensis*)^[35]。国外红豆杉属植物的分布和栽培历史详见表 3^[35]。我国红豆杉属植物有 4 种 1 个变种，即为红豆杉 (*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.)、东北红豆杉 (*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.)、西藏红豆杉 (*Taxus willichiana* Zucc.)、云南红豆杉 (*Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu.) 和美丽红豆杉 (变种) (*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. var. *mairi* (Lemee et Levl.) Cheng et L. K. Fu., comb. nov.)。其分布情况如表 4 所示。