

吉西他滨的耐药性及其结构修饰研究进展

万悦, 阮奔放

浙江工业大学药学院, 浙江 杭州

收稿日期: 2023年2月3日; 录用日期: 2023年3月3日; 发布日期: 2023年3月10日

摘要

吉西他滨是FDA批准为一种治疗多种癌症的化疗药物, 被广泛应用于治疗各种实体瘤。虽然吉西他滨在临床上成功应用, 但其较短的血浆半衰期, 向细胞扩散较差, 以及不良毒性降低其化疗潜力。吉西他滨的临床表现受到其不满意的药代动力学参数和易失活的严重限制, 主要是由于吉西他滨快速脱氨作用, 以及活化吉西他滨的脱氧胞苷激酶(DCK)缺乏和核苷转运蛋白的改变等。因此, 设计合成吉西他滨的前体药物以提高吉西他滨的治疗效果至关重要。

关键词

吉西他滨, 耐药性, 结构修饰

Research Progress in Drug Resistance and Structural Modification of Gemcitabine

Yue Wan, Benfang Ruan

College of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou Zhejiang

Received: Feb. 3rd, 2023; accepted: Mar. 3rd, 2023; published: Mar. 10th, 2023

Abstract

Gemcitabine is a chemotherapy drug approved by FDA for the treatment of multiple cancers, and is widely used for the treatment of various solid tumors. Although gemcitabine has been successfully used in clinical practice, its short plasma half-life, poor cell diffusion and adverse toxicity reduce its chemotherapy potential. The clinical performance of gemcitabine is severely limited by its unsatisfied pharmacokinetic parameters and easy inactivation, mainly due to the rapid deamination of gemcitabine, the lack of deoxycytidine kinase (DCK) activated by gemcitabine and the change of nucleoside transporter. Therefore, it is very important to design and synthesize the precursor drugs of gemcitabine to improve the therapeutic effect of gemcitabine.

Keywords

Gemcitabine, Drug Resistance, Structural Modification

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 介绍

目前, 癌症是发展中国家主要的死亡原因之一, 而化疗被广泛应用于治疗各种癌症。临床上使用的化疗药物主要是含有核酸和糖结构的核苷。由于核苷可以作为核酸成分的生物学作用, 是抗代谢物治疗类似物开发的主要目标。修饰过的核苷可以破坏生物过程, 从而导致癌症或病毒感染细胞死亡。

吉西他滨(Gemcitabine, dFdC)结构如图 1 所示, 是这类核苷类似物的例子之一。吉西他滨是脱氧胞苷类似物, 其中脱氧胞苷 2'碳上的氢原子被两个氟原子取代。该化合物已经被 FDA 批准为一种治疗多种癌症的化疗药物, 通常以吉西他滨盐酸盐(称为 Gemzar)的形式注射给药。吉西他滨与脱氧胞苷相似的结构可以使其可以伪装在宿主体内, 通过核苷的挽救途径到达目标受体[1]。吉西他滨最早由 Hertel 等人[2]合成, 最初被开发作为一种潜在的抗 RNA 和 DNA 病毒的抗病毒药物[3]。然而, 由于其对宿主细胞毒性, 以及治疗效果不足, 其被进一步开发为一种抗癌药物。为了发挥抗癌活性, 吉西他滨必须经过一系列磷酸化过程[4], 首先, 吉西他滨通过脱氧胞苷激酶(DCK)磷酸化为吉西他滨一磷酸(dFdCMP), 该过程为限速步骤, 随后通过其他嘧啶激酶的催化, 转化为吉西他滨二磷酸(dFdCDP)及吉西他滨三磷酸(dFdCTP), 整个过程如图 1 所示。其中, 吉西他滨二磷酸可以抑制核糖核苷酸还原酶, 该酶是负责催化脱氧核苷三磷酸的合成, 是 DNA 合成所必需的。而吉西他滨三磷酸通过与内源性脱氧核苷三磷酸盐竞争, 整合到 DNA 中[5], 抑制 DNA 复制并诱导 DNA 损伤。

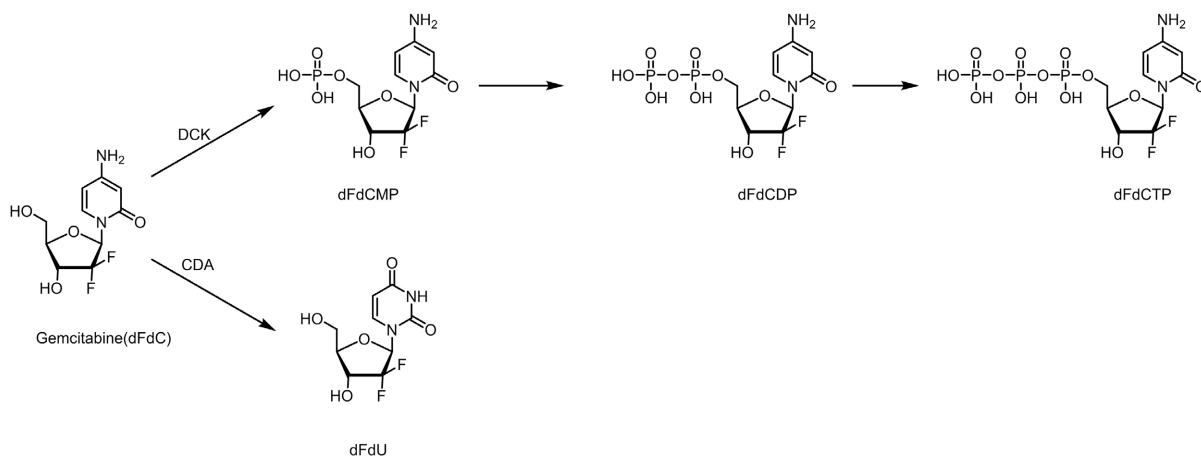


Figure 1. Diagram of the practical teaching system of automation major

图 1. 吉西他滨活化与失活过程

2. 吉西他滨的耐药性

在吉西他滨被激活的同时, 还有其他机制抵消这些过程, 使药物失去活性。具体而言, 吉西他滨通

过静脉注射进入体内后, 可能被血液和肝脏中存在的脱氧胞苷脱氨酶(CDA)迅速脱氨成 2',2'-二氟脱氧尿苷(dFdU), 然后进行快速肾脏清除[6], 该过程如图 1 所示。吉西他滨的这种快速代谢解释了其生物利用度差和血浆半衰期短(10 分钟)的问题。吉西他滨的另一种抗性机制是, 在细胞膜上负责转运吉西他滨的转运蛋白活性降低[7]。吉西他滨的结构含有多个亲水性官能团, 它不能通过被动扩散穿过细胞膜, 需要通过核苷转运蛋白主动转运到细胞内。其中, 以 hENT1 为主要转运蛋白[8]。为了发挥其抗癌活性, 吉西他滨必须经过一系列磷酸化过程。如前面所述, 吉西他滨在细胞内需要通过脱氧胞苷激酶(DCK)磷酸化为吉西他滨一磷酸, 该过程是整个磷酸化过程中激活吉西他滨活性的限速步骤[9]。因此, 脱氧胞苷激酶(DCK)活性缺陷也是耐药的原因之一。总而言之, 吉西他滨失活的主要原因包括高表达脱氧胞苷脱氨酶(CDA)使药物降解增加、核苷转运体的改变和脱氧胞苷激酶(DCK)激活吉西他滨减少。

3. 吉西他滨结构修饰

吉西他滨的血浆半衰期短, 因为一旦它被激活, 它会在血液、肝脏、肾脏和其他组织中迅速脱氨代谢成不活跃的形式, 并通过尿液排出。因此, 癌症患者需要频繁给药, 这也导致吉西他滨有严重的骨髓抑制, 肝毒性和肾毒性, 并且治疗效果仍然较差[10]。因此, 有必要制定有效的药物释放策略, 以规避吉西他滨的耐药现象, 最终提高治疗效果, 减少不良反应。

吉西他滨化学修饰可以最大限度地提高治疗效果, 同时最大限度地减少全身毒性。为了改善吉西他滨的代谢稳定性和细胞毒性活性, 已经报道了各种基于吉西他滨药物相关的化学修饰。吉西他滨的修饰位点完全基于两个功能基团(4'-NH₂和 5'-OH, 图 1)。这些新型吉西他滨前体药物将有望增强治疗益处, 因为它们可以 1) 保护胺功能, 从而阻断脱氧胞苷脱氨酶脱氨作用, 2) 增强胞质部分的储存稳定性,

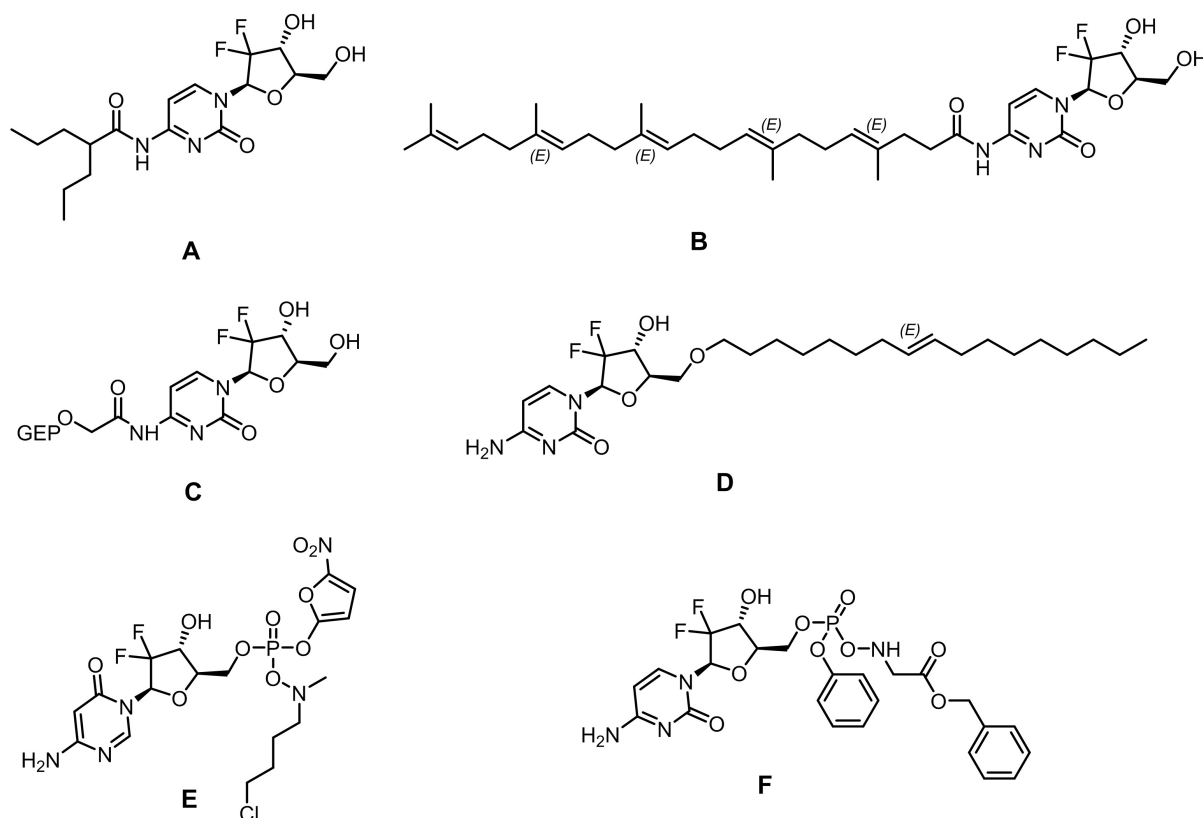


Figure 2. Structure of gemcitabine derivatives

图 2. 吉西他滨衍生物结构

3) 延长细胞内释放, 4) 促进细胞摄取, 和 5) 启动吉西他滨的活化途径等[11]。

图 2 总结了一些典型的吉西他滨前体药物。基于吉西他滨结构修饰的药物可分为三类: 酯型吉西他滨药物、酰胺型吉西他滨药物和磷酰胺型吉西他滨药物。总的来说, 酯型(5'-OH 修饰)和酰胺型(4-NH₂ 修饰)吉西他滨药物可以抑制脱氨作用, 提高体内稳定性。磷酰胺类(5'-OH 修饰)吉西他滨前药可以在不存在脱氧胞苷激酶(DCK)的情况下直接代谢为单磷酸吉西他滨(dFdCMP)。

3.1. 吉西他滨 4'-NH₂ 修饰

吉西他滨的 4'-氨基通过与羧酸偶联是一种广泛使用的策略, 以提供免受酶降解的保护[5]。

2006 年, 礼来公司设计合成了丙戊酸 - 吉西他滨 LY2334737 (图 2A) [11], 为了在类似于消化系统的酸性条件下耐水解脱氨, 但能够在羧酸酯酶作用下释放吉西他滨。LY2334737 通过将丙戊酸与吉西他滨的 4-NH₂ 共价偶联获得 LY2334737, 使其能够阻断脱氨基位点, 从而阻止游离吉西他滨中发生的首过代谢。口服剂量 LY2334737 的 I 期试验显示, 血浆中循环前药水平高于吉西他滨, 符合缓慢的全身水解和吉西他滨暴露时间延长。LY2334737 缓慢水解为吉西他滨是由在肝脏和胃肠道中高水平表达的人羧酸酯酶 2(CES2)介导的。癌细胞中的 CES2 表达通过对吉西他滨的缓慢细胞内切割赋予 LY2334737 敏感性, 吉西他滨在细胞内被释放从而阻止癌症细胞分裂。丙戊酸 - 吉西他滨可能是口服给药的潜在候选药物。然而, LY2334737 的进一步研究被暂停, 因为在 I 期临床试验中观察到它的肝毒性[11]。

角鲨烯是一种天然三萜, 具有显著的饮食益处、生物相容性、惰性等, 已被广泛用于构建角鲨烯 - 药物偶联物[12] [13]。由于角鲨烯具有良好的口服吸收性, 可用于提高吉西他滨的口服给药效率。虽然角鲨烯对肿瘤的抑制作用很低, 但据报道角鲨烯对肿瘤治疗有直接或间接的作用。同丙戊酸 - 吉西他滨一样, 在吉西他滨的 4-NH₂ 处共价偶联角鲨烯酸(图 2B) [14]是通过吉西他滨角鲨烯基化克服吉西他滨在胰腺癌模型上的耐药性和快速失活。细胞活力和凋亡测定证明角鲨烯基化显著增强吉西他滨对敏感的人类胰腺癌细胞(BxPc-3), 人类胰腺癌细胞(Capan-1), 特别是对化疗耐药的 PANC-1 细胞的细胞毒性和抗增殖作用, 这些更有效地抑制 DNA 合成, 更高的 S 期积累和更显著的凋亡诱导的结果。采用皮下肿瘤模型(PANC-1 和 Capan-1)和原位肿瘤模型(PANC-1)进行体内抗肿瘤实验。与吉西他滨相比, 角鲨烯 - 吉西他滨在两种胰腺癌模型中均显示出更高的抗肿瘤效力, 减弱了细胞侵袭, 延长了存活期。此外, 吉西他滨前药的分布很大程度上受到修饰分子的影响。由于角鲨烯具有良好的口服吸收性, 可用于提高吉西他滨的口服给药效率。发现母体吉西他滨在口服给药后能迅速吸收和清除血浆中的毒素。但角鲨烯 - 吉西他滨在组织中的吸收和累积较慢。因此, 角鲨烯 - 吉西他滨在胃和肠组织中的累积显著增强[15]。然而, 它在肝脏, 脾脏, 肺, 胰腺和胸腺等器官的累积治疗 1 小时后类似于吉西他滨[6]潜在的机制是避免脱氧胞苷脱氨酶(CDA)迅速脱氨。游离吉西他滨由于脱氨基而降解, 对小鼠白血病细胞(RNK-16 LGL)的细胞毒性较弱, 而角鲨烯 - 吉西他滨能够抵抗脱氨作用, 显示增强的细胞毒性为吉西他滨 83 倍。此外, 与游离吉西他滨相比, 角鲨烯 - 吉西他滨显示出更高的细胞内积累和滞留, 因为其细胞通路不受影响。

多年来, 各种抗肿瘤药物或低分子量的药物已被用于与 PEG 结合。这种方法是克服大多数生物限制的主要方法, 这种类型的聚乙二醇化药物在市场上和临床试验中不断增加, 被广泛用于修饰治疗分子, 改善药物的药代动力学和药效学效应[16] [17]。PEG-吉西他滨(图 2C)也是通过吉西他滨与 PEG 偶联而成, 这个过程可以使吉西他滨半衰期延长, 免疫原性降低和聚集性下降[18]。静脉注射后, 过表达的溶酶体组织蛋白酶 B 会催化吉西他滨前体药物中的酰胺连接降解, 促进药物吉西他滨的释放。与吉西他滨相比, 聚乙二醇 - 吉西他滨在人类胰腺癌细胞(PANC-1)和人类胰腺癌细胞(MIA paCa-2)中显示出更高的抗增殖和诱导细胞凋亡活性。

3.2. 吉西他滨 5'-OH 结构修饰

吉西他滨的 5'-OH 是合成吉西他滨前药的另一个重要反应位点。将吉西他滨的 5'-OH 与脂肪酸形成酯键, 使其亲水性降低, 克服吉西他滨由于核苷转运蛋白的改变而产生的耐药性。

吉西他滨衍生物 CP-4126 (图 2D) 最初是作为静脉注射制剂开发的。合成它是为了提高吉西他滨的临床活性[19]。CP-4126 由吉西他滨 5'-OH 与反-9-十八碳单烯酸偶联而成, 这使 CP-4126 与吉西他滨相比具有两个优点。第一个优点是吉西他滨不同, CP-4126 可以通过被动扩散穿过细胞膜, 然后通过酯酶在细胞内转化为吉西他滨。这意味着 CP-4126 在细胞中的摄取与核苷转运蛋白无关, 因此相对独立于转运蛋白 hENT 和 hCNT 表达下调介导的多药耐药机制[20]。其次, CP-4126 与 LY2334737 一样, 似乎不是脱氨酶的底物, 尽管脂肪酸是与吉西他滨的 5'-OH 位置结合, 而不是与代谢不稳定的胺基结合。

如前所述, 吉西他滨在细胞内代谢为活性三磷酸形式的整个磷酸化过程的速率是由初级磷酸化决定的。因此, 为了绕过吉西他滨的一级磷酸化, 前人已经广泛研究了通过连接磷酸功能保护基团选择性释放磷酸化吉西他滨来化学修饰吉西他滨的策略[21]。他们开发了一种具有磷脂部分的吉西他滨衍生物(图 2E), 该衍生物能够避开转运蛋白依赖的进入细胞, 并且不是 MDR1 转运蛋白的底物。在缺乏 DCK 的细胞系中, 这种化合物的敏感性没有改变, 这表明这种前药物被切割成吉西他滨单磷酸, 从而绕过了 dCK 在吉西他滨激活过程中的速率限制步骤。最近, 另一种根据 ProTide 概念合成的吉西他滨前药 nuc1-1031 (图 2F) 被开发出来。与其他前药相比, 该前药不仅在体外具有活性, 而且在体内对具有固有吉西他滨耐药的肿瘤也具有抗肿瘤疗效。NUC-1031 在吉西他滨耐药的情况下提供细胞毒性作用, 可能是由于 NUC-1031 规避了癌症对吉西他滨发展的基本耐药机制。NUC-1031 也可能具有优于吉西他滨的细胞毒性能力, 因为目前试验报道的半衰期显著更长[22] [23], 范围为 8~24 小时, 而其他研究中吉西他滨的半衰期最长为 80 分钟。较少的 CDA 介导的 NUC-1031 酶促分解和药物在细胞中的更大递送也将使细胞内和持久水平的 dFdCTP 具有细胞毒性活性。NUC-1031 已经对各种晚期和快速进展疾病的患者证实了明确的临床活性迹象, 并且正在进行相关的 III 期临床试验。

4. 结论

吉西他滨是对抗癌细胞最有效的药物之一, 被批准用于多种肿瘤的治疗。静脉注射后, 它经过一系列的磷酸化作用而活化, 从而发挥抗癌作用。然而, 由于吉西他滨半衰期短, 在血浆中快速代谢脱氨。因此, 为了维持其在体内的治疗浓度, 在临床治疗中需反复给药, 从而导致严重的副作用。短暂的半衰期并不是唯一的缺点, 许多肿瘤发展出耐药机制, 缺乏转运蛋白和缺乏磷酸化所需的激酶。基于吉西他滨结构的化学修饰是一个有效的解决方案, 通过延长天然或单磷酸吉西他滨的释放, 最终通过增强细胞毒性作用而具有有益的抗肿瘤作用。希望这篇综述能够为以吉西他滨为基础的增强癌症治疗策略的合理设计提供新的见解。

参考文献

- [1] Hui, Y.F. and Reitz, J. (2012) Gemcitabine: A Critical Nucleoside for Cancer Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, **19**, 1076-1087. <https://doi.org/10.2174/092986712799320682>
- [2] Gesto, D.S., Cerqueira, N., Fernandes, P.A. and Ramos, M.J. (2012) Gemcitabine: A Critical Nucleoside for Cancer Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, **19**, 1076-1087. <https://doi.org/10.2174/092986712799320682>
- [3] Hertel, L.W., Kroin, J.S., Misner, J.W. and Tustin, J.M. (1988) Synthesis of 2-deoxy-2,2-difluoro-D-ribose and 2-deoxy-2,2'-difluoro-D-ribofuranosyl Nucleosides. *The Journal of Organic Chemistry*, **53**, 2406-2409. <https://doi.org/10.1021/jo00246a002>
- [4] Hertel, L.W., Boder, G.B., Kroin, J.S., et al. (1990) Evaluation of the Antitumor Activity of Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Research*, **50**, 4417-4422.

- [5] Moysan, E., Bastiat, G. and Benoit, J.-P. (2013) Gemcitabine versus Modified Gemcitabine: A Review of Several Promising Chemical Modifications. *Molecular Pharmaceutics*, **10**, 430-444. <https://doi.org/10.1021/mp300370t>
- [6] Abbruzzese, J.L., Grunewald, R., Weeks, E.A., Gravel, D., Adams, T., Nowak, B., Mineishi, S., Tarasoff, P., Satterlee, W. and Raber, M.N. (1991) A Phase I Clinical, Plasma, and Cellular Pharmacology Study of Gemcitabine. *Journal of Clinical Oncology*, **9**, 491-498. <https://doi.org/10.1200/JCO.1991.9.3.491>
- [7] Hu, G., Li, F., Ouyang, K., et al. (2011) Intrinsic Gemcitabine Resistance in a Novel Pancreatic Cancer Cell Line. *International Journal of Oncology*, **40**, 798-806.
- [8] MMoysaoyan, E., Bastiat, G. and Benoit, J.-P. (2013) Gemcitabine versus Modified Gemcitabine: A Review of Several Promising Chemical Modifications. *Molecular Pharmaceutics*, **10**, 430-444. <https://doi.org/10.1021/mp300370t>
- [9] Dubey, R.D., Saneja, A., Gupta, P.K. and Gupta, P.N. (2016) Recent Advances in Drug Delivery Strategies for Improved Therapeutic Efficacy of Gemcitabine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **93**, 147-162. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.08.021>
- [10] Dasanu, C.A. (2008) Gemcitabine: Vascular Toxicity and Prothrombotic Potential. *Expert Opinion on Drug Safety*, **7**, 703-716. <https://doi.org/10.1517/14740330802374262>
- [11] Cavaliere, A., Probst, K.C., Westwell, A.D. and Slusarczyk, M. (2017) Fluorinated Nucleosides as an Important Class of Anticancer and Antiviral Agents. *Future Medicinal Chemistry*, **9**, 1809-1833. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0095>
- [12] Reddy, L.H. and Couvreur, P. (2009) Squalene: A Natural Triterpene for Use in Disease Management and Therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **61**, 1412-1426. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.005>
- [13] Sobot, D., Mura, S., Yesylevskyy, S.O., et al. (2017) Conjugation of Squalene to Gemcitabine as Unique Approach Exploiting Endogenous Lipoproteins for Drug Delivery. *Nature Communications*, **8**, Article No. 15678. <https://doi.org/10.1038/ncomms15678>
- [14] Réjiba, S., Reddy, L.H., Bigand, C., et al. (2011) Squalenoyl Gemcitabine Nanomedicine Overcomes the Low Efficacy of Gemcitabine Therapy in Pancreatic Cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **7**, 841-849. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.02.012>
- [15] Harivardhan Reddy, L., Ferreira, H., Dubernet, C., et al. (2008) Oral Absorption and Tissue Distribution of a New Squalenoyl Anticancer Nanomedicine. *Journal of Nanoparticle Research*, **10**, 887-891. <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9322-7>
- [16] Suk, J.S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J. and Ensign, L.M. (2016) PEGylation as a Strategy for Improving Nanoparticle-Based Drug and Gene Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **99**, 28-51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>
- [17] Zhao, X., Si, J., Huang, D., Li, K., Xin, Y. and Sui, M. (2020) Application of Star Poly(ethylene glycol) Derivatives in Drug Delivery and Controlled Release. *Journal of Controlled Release*, **323**, 565-577. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.039>
- [18] Mero, A., Clementi, C., Veronese, F.M. and Pasut, G. (2011) Covalent Conjugation of Poly(Ethylene Glycol) to Proteins and Peptides: Strategies and Methods. *Bioconjugation Protocols*, **751**, 95-129. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-151-2_8
- [19] Adema, A.D., Bijnsdorp, I.V., Sandvold, M.L., Verheul, H.M. and Peters, G.J. (2009) Innovations and Opportunities to Improve Conventional (Deoxy)nucleoside and Fluoropyrimidine Analogs in Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, **16**, 4632-4643. <https://doi.org/10.2174/092986709789878229>
- [20] Bergman, A.M., Adema, A.D., Balzarini, J., et al. (2011) Antiproliferative Activity, Mechanism of Action and Oral Antitumor Activity of CP-4126, a Fatty Acid Derivative of Gemcitabine, in *in Vitro* and *in Vivo* Tumor Models. *Investigational New Drugs*, **29**, 456-466. <https://doi.org/10.1007/s10637-009-9377-7>
- [21] Pradere, U., Garnier-Amblard, E.C., Coats, S.J., Amblard, F. and Schinazi, R.F. (2014) Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs. *Chemical Reviews*, **114**, 9154-9218. <https://doi.org/10.1021/cr5002035>
- [22] Blagden, S.P., Rizzuto, I., Suppiah, P., et al. (2018) Anti-Tumour Activity of a First-in-Class Agent NUC-1031 in Patients with Advanced Cancer: Results of a Phase I Study. *British Journal of Cancer*, **119**, 815-822. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0244-1>
- [23] Kazmi, F., Nicum, S., Roux, R.L., et al. (2021) A Phase Ib Open-Label, Dose-Escalation Study of NUC-1031 in Combination with Carboplatin for Recurrent Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research*, **27**, 3028-3038. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-4403>