

细胞生长抑制剂 Dolastatin 15 类似物的合成及其活性研究

郝建坤, 梁远军, 吴 萍, 何军林, 赵修南, 周文霞, 张永祥, 刘克良
(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

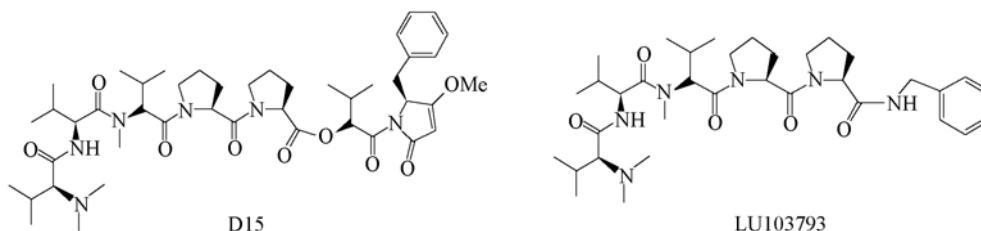
摘要 通过在细胞生长抑制剂 Dolastatin 15 (D15) 的 N 端引入含环胺基的非天然氨基酸 **1~3**, 赋予其构象限制和疏水性, 设计合成了 21 个结构类似物, 并进行了体外抑制肿瘤细胞生长的活性评价. 结果表明, 部分化合物显示出较好的抑制肿瘤细胞生长活性, 同时探讨了初步的构效关系.

关键词 细胞生长抑制剂; Dolastatin 15 类似物; 线性肽; 海洋生物活性肽

中图分类号 O629 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2009)02-0308-06

近几十年来, 涌现出大量源自海洋生物的活性肽类化合物, 它们含有独特的氨基酸或氨基酸衍生物. Dolastatin 15 (D15) 是 Pettit 等^[1,2] 于 1989 年从西印度洋软体动物海兔 (*Dolabella auricularia*) 中分离得到的线性天然多肽, 经美国国家癌症研究所 (NCI) 筛选, 发现其具有很强的抑制细胞生长活性, 对淋巴白血病细胞 P388 的 ED₅₀ 值为 2.4 ng/mL. Aruda 等^[3] 对其结构进行修饰和简化, 发现了化合物 LU103793 (Cemadotin), 它具有水溶性好、稳定性高、细胞毒性强 (IC₅₀ = 0.1 nmol/L) 和化学合成相对简单等优点, 现已进入 II 期临床研究阶段^[4-7]. 作用机制的研究表明, LU103793 作用于细胞内微管并抑制细胞的有丝分裂, 使细胞周期终止在 G₂/M 期^[8]. 从 D15 的分子结构 (见 Scheme 1) 可以看出, 它具有高度的亲脂性. N-端两个缬氨酸的 α -氨基分别被单、双甲基化; 同时还有两个限制主链结构自由度的脯氨酸和一个非氨基酸的 C-末端.

Pettit 等^[9] 提出, D15 的 C-端结构对抑制肿瘤细胞生长只产生有限的作用, 很可能不是重要的活性位点. LU103793 的 C-端苄胺结构较 D15 的 C-端 (2-Hydroxyisovaleryl-dolapyrrolidone) 简化, 不仅提高了活性, 而且降低了毒性. 基于 LU103793 的结构 (见 Scheme 1), Hu 等^[10] 通过对 N-端疏水性的研究发现, 以 *N,N*-双苄基取代 *N,N*-双甲基后, D15 活性下降; 在 C-端苄胺苯环的 4 位引入 F, Cl, 或在 3, 4 位引入二甲氧基或二氧亚甲基后, 并不提高 D15 活性. Bai 等^[11] 研究发现, 在微管蛋白的 β -亚单位上存在 D15 的“肽结合位点”, 可结合片段为 N-端的 *N,N*-二甲基缬氨酰-缬氨酰-*N*-甲基缬氨酸. Schmidt 等^[12] 合成了 D15 的模拟类肽, 以 *N,N*-二异丙胺基模拟 *N,N*-二甲基缬氨酸, *S*-脯氨酸用其相应的对映异构体模拟, 所得类肽没有明显的抑制细胞生长活性.



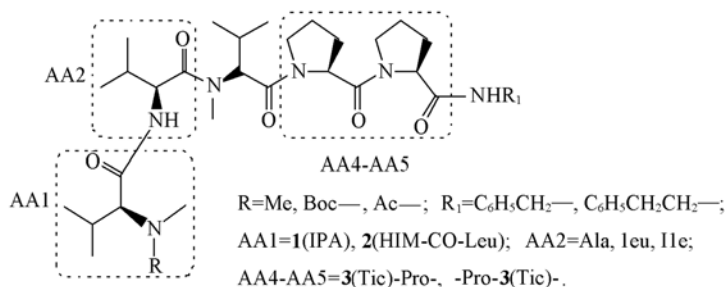
Scheme 1 Structures of D15 and LU103793

根据上述研究结果可以判定, N-端作为“肽结合片段”, 其结构限制性和亲脂/亲水性对活性有显著影响. 因此, 对 D15 的 N-端进行了结构改造或修饰, 主要包括: (1) 引入 α -氨基具有构象限定性因

收稿日期: 2008-07-07.

联系人简介: 刘克良, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事生物活性多肽与核酸研究. E-mail: keliangliu@yahoo.com

素的氨基酸, 如 α -异丙基-1-*R*-哌啶乙酸 (IPA, **1**), *N*-甲基脯氨酸等; (2) 引入空间位阻较大的基团, 如叔丁氧羰基 (Boc—) 或六亚甲基胺甲酰基 (HIM—CO—); (3) 应用其它亲脂性天然氨基酸 (丙氨酸、亮氨酸或异亮氨酸) 替换 2 位的缬氨酸. 此外, D15 中包含-Pro-Pro-结构片段, 其结构限制性也很强, 分别以四氢异喹啉-3-羧酸 (Tic, **3**) 进行替换. C-端采用苄胺或苯乙胺结构. 通过将上述的构建单元引入 D15 中, 得到其相应的结构类似物 (见 Scheme 2), 并评价其体外抑制肿瘤细胞生长的活性.



Scheme 2 Design diagram of D15 analogs

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

RY-1 型熔点仪 (天津分析仪器厂); Bruker ARX 400 型或 US Varian Unity Inova 600 型核磁共振仪, 以 TMS 为内标; Zabspect 高分辨质谱仪; 薄层色谱硅胶 GF254 和柱色谱硅胶 H(200 ~ 300 目) 为青岛海洋化工厂产品. 所用试剂、溶剂均为商品化产品. 所用肿瘤细胞株为人红白血病细胞株 K562、人胃癌细胞株 Kato-III 和人卵巢癌细胞株 OVCA2780. Napco-5410 型 CO₂ 孵温箱 (美国 BIO-RAD); 洁净工作台 (北京); OLYMPUS 光学显微镜和 OLYMPUS 倒置显微镜 (日本奥林巴斯有限公司); Costar96 孔细胞培养板 (美国); 手提式蒸汽高压消毒锅 (上海); 多孔扫描分光光度计 Multiskan MCC/340 MK II (芬兰).

1.2 非天然氨基酸构建单元的合成

1.2.1 α -异丙基-1-*R*-哌啶乙酸盐酸盐 (HCl · IPA, **1**) 的制备 参照文献[13]的方法合成. 白色固体 1.4 g (产率 31.6%). m. p. 222 ~ 225 °C. MS: [M + H]⁺ = 186. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 4.0 (m, 1H), 2.8 (m, 1H), 2.3 (m, 4H), 1.5 (m, 2H), 1.0 (dd, 6H).

1.2.2 *N,N*-六亚甲基胺甲酰-*L*-亮氨酸 (HIM-CO-*L*-Leu, **2**) 的制备 参照文献[14]方法合成. 白色晶体 7.4 g (产率 72.0%). m. p. 92 ~ 94.5 °C. MS: [M + H]⁺ = 242. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 0.93 (m, 3H), 3.38 (m, 4H), 4.38 (d, 1H), 5.10 (s, 1H), 10.90 (s, 1H).

1.2.3 *N*-叔丁氧羰基-*N*-甲基-*L*-缬氨酸 (Boc-*N*-Me-*L*-Val) 的制备 参照文献[15]方法制备. 黄色油状物 4.2 g (产率 90.0%). MS: [M + H]⁺ = 232. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 10.6 (bs, 1H), 4.1, 4.2 (dd, 1H), 2.8 (2s, 3H), 2.2 (bs, 1H), 1.4 (s, 9H), 0.8 ~ 1.0 (dd, 6H).

1.2.4 *N*-乙酰基-*N*-甲基-*L*-缬氨酸 (*N*-Ac-*N*-Me-*L*-Val) 的制备 将 11.7 g (0.1 mol) *L*-缬氨酸的 2 mol/L 氢氧化钠溶液 110 mL (0.22 mol) 用冰水浴冷却, 滴加 11.4 mL (0.12 mol) 醋酐, 反应 40 min. 以浓盐酸调 pH ≈ 2, 滤集固体, 3.2 g (20 mmol). 以 55 mL 无水四氢呋喃/二甲基甲酰胺 (体积比 10:1) 混合溶液溶解, 加入碘甲烷 10 mL (160 mmol) 和氢化钠 2.88 g (50%, 60 mmol), 80 °C 反应 24 h, 得无色针状结晶 2.77 g (产率 80.0%), m. p. 112 ~ 114 °C. MS: [M + H]⁺ = 160. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 9.7 (bs, 1H), 4.5 (m, 1H), 3.0 (s, 3H), 2.8 (m, 1H), 2.2 (s, 3H), 1.0 (dd, 6H).

1.2.5 *N*-甲基-*L*-脯氨酸 (*N*-Me-*L*-Pro) 的制备 参照文献[16]方法制备. 无色针状结晶 1.11 g (产率 99.1%), m. p. 109 ~ 112 °C. MS: [M + H]⁺ = 130. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 10.7 (bs, 1H), 2.4 ~ 2.2 (m, 2H), 2.3 (s, 3H), 1.7 ~ 1.9 (m, 2H), 1.4 ~ 1.6 (m, 2H).

1.2.6 *N,N*-二甲基-*L*-缬氨酸 (*N,N*-Me₂Val) 的制备 参照文献[16]方法制备. 白色针状结晶, m. p. 152 ~ 154 °C. MS: [M + H]⁺ = 146. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 3.8 (m, 1H), 2.5 (m, 1H), 2.3 (s, 6H), 0.9 (dd, 6H).

1.2.7 *N*-叔丁氧羰基-四氢异喹啉-3-*R*-羧酸 (*R*-Boc-Tic) 的制备 参照文献[17]方法, 在 *L*-苯丙氨酸

5.0 g(33 mmol)的37%~40%(体积分数)甲醛水溶液(11.5 mL)中,加入浓盐酸38 mL,于90 °C反应3 h. 补加浓盐酸10 mL和37%~40%甲醛水溶液5 mL,于95 °C反应3 h. 室温放置过夜,析出淡黄色固体. 滤集固体,在冰浴下用氨水/水(体积比2:3)溶解,浓盐酸调pH \approx 9.0,无色固体析出,滤集固体5.72 g(产率98.0%). 取该固体3.90 g(22 mmol)溶于90 mL二氧六环/45 mL水中,冰浴冷却,加入1 mol/L氢氧化钠45 mL和叔丁氧羰基5.28 g(24.2 mmol),室温反应2.5 h. 将反应液浓缩,用稀硫酸氢钾溶液调pH \approx 3,以乙酸乙酯萃取(3次),饱和氯化钠溶液洗涤. 干燥,浓缩,得无色固体5.3 g(产率87.0%), m. p. 76~80 °C. MS: $[M + H]^+ = 278$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO), δ : 7.48(m, 1H), 7.40(m, 1H), 7.21(m, 1H), 7.17(m, 1H), 3.60~3.90(m, 3H), 2.8~3.0(m, 2H).

1.3 D15类似物的合成

Me₂Val-Val-MeVal-Tic-Pro-NHCH₂C₆H₅(**19**)的制备: 将L-脯氨酸甲酯盐酸盐3.32 g(20 mmol)用20 mL二氯甲烷溶解,在冰浴下加入三乙胺2.78 mL(20 mmol)、Boc-R-四氢异喹啉-3-羧酸5.54 g(20 mmol)、1-羟基苯并三氮唑(HOBt)2.84 g(21 mmol)和二异丙基碳二亚胺(DIC)3.3 mL(21 mmol),室温反应12 h. 将反应液浓缩,加入乙酸乙酯萃取,有机相分别用10%柠檬酸溶液、饱和碳酸氢钠溶液和饱和氯化钠溶液洗涤,干燥,浓缩,得黄色油状物7.3 g. 经硅胶柱层析[V(乙酸乙酯):V(石油醚)]=1:1, $R_f = 0.62$],得到无色结晶(Boc-Tic-ProOMe), 5.34 g(68.8%, 13.8 mmol). 取该结晶3.25 g(10 mmol),加入4 mol/L盐酸/二氧六环20 mL,室温反应1 h,反应液浓缩得黄色油状液体. 用相同方法制得Boc-Val-MeVal-Tic-ProOMe,得到黄色油状物1.5 g(86.2%, 2.75 mmol). 将该油状物用甲醇溶解,在冰浴下滴加2 mol/L氢氧化钠溶液2.8 mL(5.6 mmol),室温反应3 h. 反应液浓缩,用柠檬酸调pH \approx 4后,用乙酸乙酯萃取(25 mL \times 3),饱和氯化钠溶液洗涤,干燥,浓缩,得黄色油状物1.08 g(2.05 mmol). 取该油状物0.216 g(0.41 mmol),用10 mL二氯甲烷溶解,冰浴,加入HOBt 60 mg(0.451 mmol)、DIC 71 μL (0.451 mmol)和苯乙胺51.7 μL (0.41 mmol),室温搅拌11 h. 反应液浓缩后,用乙酸乙酯萃取,有机相经洗涤,干燥,浓缩,得黄色油状物(Boc-Val-MeVal-Tic-Pro-NH₂CH₂Ph)0.24 g(0.35 mmol, 产率85.4%). 在上述油状物中,加入4 mol/L盐酸/二氧六环溶液5 mL,室温搅拌1 h. 反应液浓缩后,得黄色油状液体. 取该油状物0.11 g(0.175 mmol),用5 mL二氯甲烷溶解,冰浴下加入三乙胺60.9 μL (0.44 mmol)、N,N-二甲基缬氨酸25.4 mg(0.175 mmol)和磷酸二乙酯(DEPC)40.0 μL (0.26 mmol),室温反应24 h. 反应液浓缩后,用二氯甲烷萃取,经洗涤,干燥,浓缩,得淡黄色油状液体(Me₂Val-Val-MeVal-Tic-Pro-NHCH₂C₆H₅). MS: $[M + H]^+ = 703$.

其余各肽类似物均参照此法合成. 以HPLC分析纯度(C₁₈, 4.6 mm \times 250 mm, 210 nm, 流动相A: 0.1% TFA/水, B: 0.1% TFA/70%乙腈, 1.0 mL/min, 梯度洗脱, 0 min, 15% B; 15 min, 85% B).

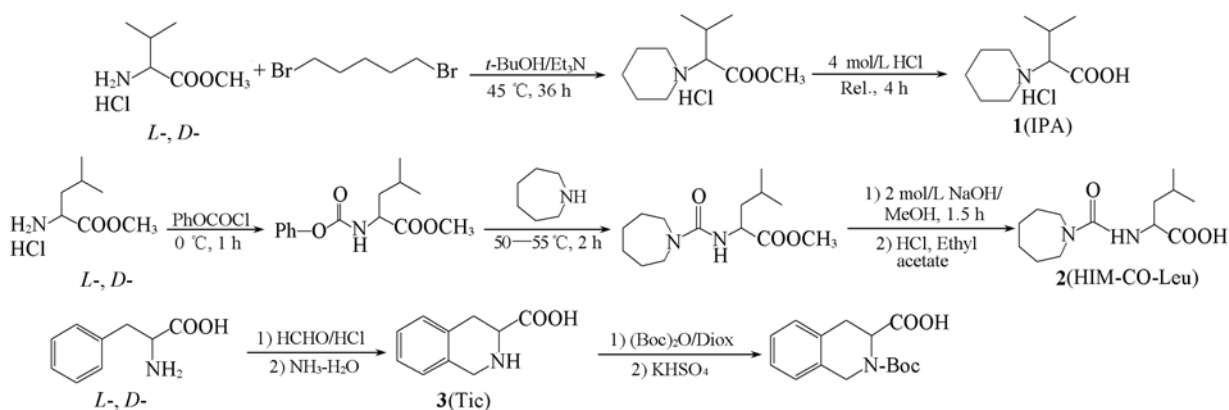
1.4 体外抗肿瘤活性评价

采用MTT法,评价化合物抑制肿瘤细胞K562, Kato-III和OVCA2780的生长情况. 取传代培养48 h的癌细胞株,用0.4%台盼兰与细胞悬液以体积比1:1(50 μL + 50 μL)混匀,立即用白细胞计数法计数活细胞数,用10%小牛血清1640液将细胞浓度调整到 3.125×10^5 个/mL,备用. 在无菌条件下向96孔板的每孔中加入癌细胞悬液80 μL 和药液20 μL ,每个药物浓度设4个复孔,然后放入CO₂孵温箱中培养48 h. 加0.5% MTT液20 μL /孔,继续培养4 h. 然后加入10% SDS 100 μL /孔,置孵温箱培养过夜. 用多孔扫描分光光度计测定570 nm的OD值,计算抑制率(%).

2 结果与讨论

2.1 非天然氨基酸的合成

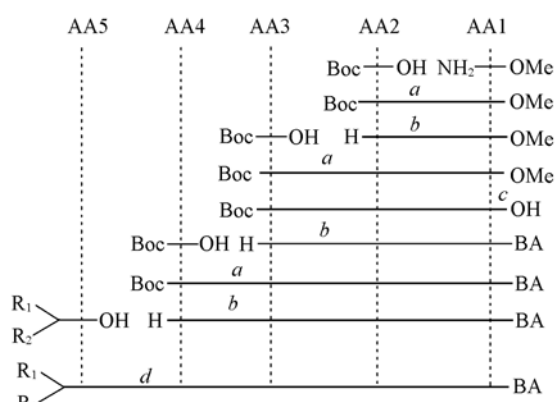
3个非天然氨基酸都含有环状氨基结构,但以不同的方法获得(Scheme 3). 通过1,5-二溴戊烷与缬氨酸甲酯的氨基的二次取代反应,将环戊基引入到 α -氨基,继而水解其羧基,得到化合物**1**. 在化合物**2**中,环己胺基通过甲酰基与其 α -氨基连接,先在亮氨酸甲酯的 α -氨基引入苯氧羰酰基,进一步与环己胺反应,在 α -氨基上引入了环己胺基甲酰基. 将L-苯丙氨酸的 α -氨基通过缩合反应,以亚甲基与其苯环连接成环,就得到化合物**3**.



Scheme 3 Synthesis routes of amino acid derivatives 1, 2 and 3

2.2 D15 类似物的合成

肽的合成应用液相合成法 (Scheme 4). 基于 D15 的 N-端“肽结合片段”以及 -Pro-Pro-片段的结构限制性特点, 合成了 21 个 D15 结构类似物. 由于有单烷基和双烷基取代的氨基酸, 以及非天然氨基酸的插入, 在使用常规缩合剂 (如 HOBt/DCC) 时, 缩合产率极低, 甚至不发生缩合, 这与其较大的空间位阻有关. 根据 Hu 等^[10] 的方法, 利用缩合剂磷酸脒二乙酯 (DEPC), 得到了令人满意的结果. 所有肽片段以 ESI-MS 测定分子量 (见表 1), HPLC 纯度为 70%~90%.



Scheme 4 Synthetic procedure of D15 analogs

a. HOBt/DCC, Et₃N; b. 4 mol/L HCl/Diox; c. 2 mol/L NaOH/MeOH; d. DEPC, Et₃N. R₁, R₂ = C₁—C₅ alkyl chain.

Table 1 Amino acid sequences and MS data of compounds 1—20 and 25

Compd.	Sequence	M_w , Calcd.	M_w , Mea. sl.	HPLC purity (%)
LU103793	Me ₂ Val-Val-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	640.9	641.6	90
1	IPA-Val-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	680.5	680.5	87
2	IPA-Ala-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	652.4	652.7	89
3	IPA-Leu-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	694.5	694.5	89
4	IPA-Ile-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	694.5	694.6	85
5	HIM-CO-Leu-Val-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ CH ₂ Ph	765.5	766.5	85
6	HIM-CO-Leu-Ala-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ CH ₂ Ph	737.5	738.5	86
7	HIM-CO-Leu-Leu-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ CH ₂ Ph	779.5	780.4	83
8	HIM-CO-Leu-Ile-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ CH ₂ Ph	779.5	780.7	87
9	HIM-CO-Leu-Val-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	751.5	752.5	86
10	HIM-CO-Leu-Ala-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	723.5	724.5	83
11	HIM-CO-Leu-Leu-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	765.5	766.7	85
12	HIM-CO-Leu-Ile-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	765.4	766.7	81
13	Ac-N-MeVal-Val-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	668.4	669.5	84
14	Boc-MeVal-Val-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	726.5	727.8	80
15	HCl · MeVal-Val-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	626.4	627.6	79
16	Me ₂ Val-Ala-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	612.4	613.5	85
17	Me ₂ Val-Leu-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	654.5	655.4	88
18	Me ₂ Val-Ile-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	654.5	655.6	87
19	Me ₂ Val-Val-MeVal-Tic-Pro-NHCH ₂ Ph	702.5	703.5	73
20	Me ₂ Val-Val-MeVal-Pro-Tic-NHCH ₂ Ph	702.5	703.5	70
25	MePro-Ala-MeVal-Pro-Pro-NHCH ₂ Ph	596.4	597.4	89

2.3 D15 类似物抑制肿瘤细胞生长的活性评价与初步构效关系探讨

采用人源肿瘤细胞株红白血病细胞株 K562、卵巢癌细胞株 OVCA2780 和胃印戒癌细胞株 Kato-III, 筛选了 D15 类似物体外抑制肿瘤细胞生长的活性. 其中 12 个化合物(1, 3, 9~12, 13~15, 17, 18, 25)对 3 种肿瘤细胞的生长有抑制作用(表 2).

对于细胞株 K562, 7 个化合物(1, 13~15, 17, 18 和 25)的抑制率在 40% 以上, 大大高于对照药 LU103793(11.1%). 化合物 3, 11 和 16 的抑制率为对照药的 2 倍左右; 化合物 7, 12 和 20 也具有相当的抑制活性. 对于细胞株 OVCA2780, 12 个化合物(1, 3, 9~12, 14~15, 17)显示较好的抑制活性, 其中化合物 3 的抑制率(53.8%)是 LU103793(24.1%)的 2 倍以上, 其余化合物与其相当. 对于细胞株 Kato-III, 4 个化合物(15, 17, 18, 25)的抑制率较高, 其中 3 个化合物的抑制率达到 35% 以上, 好于对照药(28.5%).

Table 2 *In vitro* cytotoxic activities of compounds 1—20 and 25

Compd.	Inhibitory rate(%)			Compd.	Inhibitory rate(%)		
	K562	OVCA2780	Kato-III		K562	OVCA2780	Kato-III
LU103793	11.1	24.1	28.5	11	20.0	22.9	8.8
1	42.6	24.9	17.5	12	15.4	22.6	3.5
2	7.4	14.9	5.0	13	43.4	13.6	16.2
3	24.9	53.8	14.3	14	45.8	31.3	18.7
4	3.4	8.9	3.2	15	50.7	33.1	35.4
5	5.4	12.8	13.7	16	24.2	15.7	13.3
6	2.4	17.0	12.0	17	48.1	34.9	27.6
7	12.5	9.8	17.6	18	53.9	15.6	36.5
8	9.5	8.0	16.2	19	5.0	8.3	-2.6
9	4.0	22.6	13.1	20	10.8	13.8	-5.1
10	4.3	29.7	11.9	25	42.6	12.0	39.6

相对于对照品 LU103793, 化合物 16~18 中的第二个氨基酸 Val 分别被 Ala, Leu 或 Ile 取代后, 对 K562 的抑制活性都大大提高; 对 Kato-III, 化合物 17 和 18 都显示出抑制活性; 而只有化合物 17 可使 OVCA2780 的活性有所提高. 上述结果表明, 第二个氨基酸的脂溶性越强, 活性越高, 其亲脂性修饰有利于提高活性. 然而, 当将第一个氨基酸 Me₂Val 用 IPA 取代后, 活性评价的结果却并未出现“第二个氨基酸的脂溶性越强, 活性越高”的结果. 在经 IPA 修饰的化合物中, 化合物 1 的活性要高于化合物 2~4, 其抑制 K562 的活性甚至比对照化合物更强, 化合物 3 抗 OVCA2780 活性有所提高, 化合物 2, 4 的活性却明显下降.

这一结果说明, 虽然 N-端环己基的脂溶性和立体结构与二甲基相当, 但当第二个氨基酸发生改变时, 这两种结构修饰对活性的影响没有加和性, 因而推测环己基产生的立体要求在某种情况下是不利于活性的. 在化合物 2 的基础上, 以 MePro 代替 IPA, 此种改变对细胞 K562 和 Kato-III 较为敏感, 对其抑制活性大大提高, 同时高于对照药物的活性.

如果 N-端以体积较大的 HIM-CO-Leu 取代时(化合物 9~12), 对细胞 K562 和 Kato-III 的抑制活性大大降低, 其中化合物 11 和 12 对 K562 细胞表现出较好的抑制活性. 化合物 9~12 对细胞 OVCA2780 的抑制活性与对照化合物相当. 如果进一步将 C-端以苯乙基取代苄基, 有利于对细胞 Kato-III 的抑制活性, 而对细胞 K562 和 OVCA2780 的抑制受到影响. 这一结果表明 C-端的取代是一个不利因素.

将 N-端 Me₂Val 的一个甲基以盐酸盐或乙酰基和叔丁氧羰基取代, 分别得到化合物 15、13 和 14. 细胞 K562 对这一改变十分敏感, 对它的抑制活性提高了 4 倍. 盐酸盐化合物 15 对 3 种细胞株的抑制活性都有提高. 将序列中的两个 Pro 分别以 Tic 代替, 得到的化合物 19 和 20 对 3 种细胞株的抑制活性都下降. 说明 Tic 的亲脂性侧链和结构限制性不利于活性.

综上所述, 化合物 D15 具有很大的结构可变性, 不同位置的变换会改变其对不同细胞的敏感性. C-末端苄基相对比较保守, 其改变不利于活性; N-端第二、三位氨基酸的亲脂性是保持活性的重要因素. 由于结构单元的类型及活性数据的限制, -Pro-Pro-片段的影响还有待进一步探讨.

参 考 文 献

- [1] Pettit G. R. , Kamano Y. , Dufresne C. , *et al.* . J. Org. Chem. [J] , 1989 , **54**(26) : 6005—6006
- [2] Pettit G. R. , Kamano Y. , Herald C. L. , *et al.* . Tetrahedron[J] , 1993 , **49**(41) : 9151—9170
- [3] De Arruda M. , Cocchiario C. A. , Nelson C. M. , *et al.* . Cancer Res. [J] , 1995 , **55**(14) : 3085—3092
- [4] Villalona-Calero M. A. , Baker S. D. , Hammond L. , *et al.* . J. Clin. Oncol. [J] , 1998 , **16**(8) : 2770—2779
- [5] Supko J. G. , Lynch T. J. , Clark J. W. , *et al.* . Cancer Chemother. Pharmacol. [J] , 2000 , **46**(4) : 319—328
- [6] Smyth J. , Boneterre M. E. , Schellens J. , *et al.* . Ann. Oncol. [J] , 2001 , **12** : 509—511
- [7] Kerbrat P. , Dieras V. , Pavlidis N. , *et al.* . Eur. J. Cancer[J] , 2003 , **39** : 317—320
- [8] Jordan M. A. , Walker D. , De Arruda M. , *et al.* . Biochem. [J] , 1998 , **37** : 17571—17578
- [9] Pettit G. R. , Flahive E. J. , Boyd M. R. , *et al.* . Anticancer Drug Design[J] , 1998 , **13** : 47—66
- [10] Hu M. K. , Huang W. S. . J. Pept. Res. [J] , 1999 , **54**(6) : 460—467
- [11] Bai R. , Friedman S. J. , Pettit G. R. , *et al.* . Biochem. Pharmacol. [J] , 1992 , **43**(12) : 2637—2645
- [12] Schmidt J. , Bernd M. , Kutscher B. , *et al.* . Bioorg. Med. Chem. Lett. [J] , 1998 , **8** : 385—388
- [13] Juárez J. , Gnecco D. , Galindo A. , *et al.* . Tetrahedron: Asymmetry[J] , 1997 , **8**(2) : 203—206
- [14] Nagase T. , Mase T. , Fukami T. , *et al.* . Bioorg. Med. Chem. Lett. [J] , 1995 , **5**(13) : 1395—1400
- [15] Jassen B. , Barlozzari T. , Haupt A. , *et al.* . Dolastatin 15 Derivatives. US 6143721[P] , 2000
- [16] Bowman R. E. , Stroud H. H. . Chem. Soc. [J] , 1950 : 1342—1345
- [17] Julian P. L. , Karpel W. J. , Magnani A. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J] , 1948 , **70**(1) : 180—183

Synthesis of Cell Growth Inhibitor Dolastatin 15 Analogues and Their Activities

QIE Jian-Kun, LIANG Yuan-Jun, WU Ping, HE Jun-Lin, ZHAO Xiu-Nan,
ZHOU Wen-Xia, ZHANG Yong-Xiang, LIU Ke-Liang*

(*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*)

Abstract Dolastatin 15 (D15) was a linear depsipeptide with two N-methylated valines and a complex C-terminal, showing potent cell growth inhibitory activity. D15 was highly alkylation and with spacial constraints. Modifications at D15's N-terminal were performed by introducing three unnatural amino acid analogs **1—3** with more conformation-restriction and hydrophobicity. Twenty-one compounds were synthesized, and their activities were evaluated *in vitro* on human tumor cell lines K562, OVCA2780 and Kato-III. Some compounds exhibited modest potency compared to compound LU103793, an analog of D15, evaluated in clinical phase II now. A primary structure-activity relationship was summarized about the N-terminal.

Keywords Cell growth inhibitor; Dolastatin 15 analogs; Linear peptide; Marine bioactive peptide

(Ed. : H, J, Z)